



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111381020 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 201811614476.9

(22)申请日 2018.12.27

(71)申请人 上海细胞治疗集团有限公司

地址 201805 上海市嘉定区安亭镇园国路  
1585号6幢

申请人 上海细胞治疗研究院

(72)发明人 金华君 张志伟 李杨 黄晨  
钱其军

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283  
代理人 薛琦 黄益澍

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

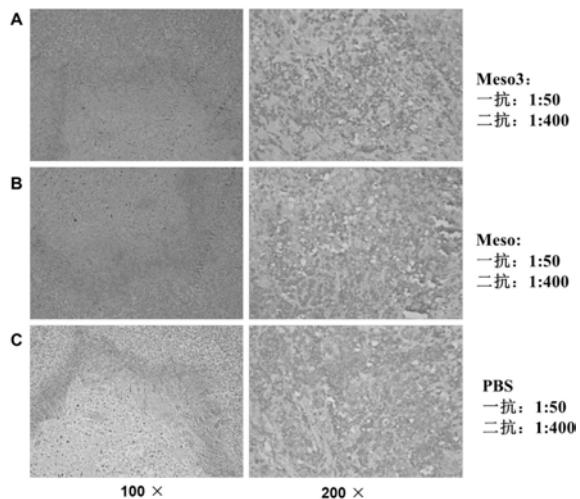
序列表6页 附图4页

(54)发明名称

一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒  
及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色的试剂盒,其中,所述试剂盒包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体为浓度0.8-1.0mg/ml的含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白,所述第二抗体为浓度0.8-1.2mg/ml的抗第一抗体的抗体;其中,所述第一抗体的工作浓度为所述第一抗体的1:50稀释液,所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:200~1:600稀释液。本发明还公开了所述试剂盒在间皮素CAR-T细胞非诊断目的的检测中,以及在制备防治疾病的药物中的应用。所述试剂盒具有优良的检测特异性和灵敏度,便于应用和推广。



1. 一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体为浓度0.8-1.0mg/ml的含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白,所述第二抗体为浓度0.8-1.2mg/ml的抗第一抗体的抗体;其中,所述第一抗体的工作浓度为所述第一抗体的1:50稀释液,所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:200~1:600稀释液。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白包括如SEQ ID NO:7所示的人间皮素结构域III蛋白;和/或,所述第一抗体的浓度为0.9mg/ml,所述第二抗体的浓度为1.0mg/ml,所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:400稀释液。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白还包括轻链信号肽和Fc;优选地,所述轻链信号肽的序列如SEQ ID NO:6所示,所述Fc为IgG4 Fc;更优选地,所述轻链信号肽位于所述人间皮素结构域III蛋白的N端,所述Fc位于所述人间皮素结构域III蛋白的C端;最优选地,所述间皮素结构域III融合蛋白的序列如SEQ ID NO:2所示。

4. 如权利要求1-3任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述可检测标记包括以下标记的一种或多种:酶标记包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶-抗过氧化物酶和碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶,荧光素标记包括异硫氰酸荧光素、异硫氰酸罗丹明,生物素标记和同位素标记。

5. 如权利要求1-4任一项所述的试剂盒,其特征在于,还包括与可检测的标记相配合的试剂;优选地,所述与可检测的标记相配合的试剂包括HRP酶、DAB显色液、苏木素和中性树胶中的一种或多种。

6. 如权利要求1-5任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第二抗体为HRP酶标记的抗生物素的抗体。

7. 一种间皮素CAR-T细胞的非诊断目的的检测方法,其特征在于,用如权利要求1-6任一项所述的试剂盒来检测细胞,以确定所述细胞是否为肿瘤组织浸润间皮素CAR-T细胞。

8. 如权利要求7所述的检测方法,其包括以下步骤:

- (1) 加入所述工作浓度的所述第一抗体于经处理的离体组织切片上,孵育后冲洗;
- (2) 随后加入所述工作浓度的所述第二抗体,孵育后冲洗;
- (3) 显色、复染、脱水及封片后分析染色结果。

9. 如权利要求7或8所述的检测方法,其中所述稀释液为PBS缓冲液,所述步骤(1)的孵育条件为4℃过夜,所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次,每次3分钟;所述步骤(2)的孵育条件为37℃30分钟,所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次,每次3分钟;和/或,所述步骤(3)的显色使用DAB,复染使用苏木素,脱水使用乙醇,封片使用中性树胶。

10. 如权利要求1-6任一项所述的试剂盒在筛选或制备防治疾病的药物中的应用;优选地,所述疾病为CAR-T疗法治疗后的癌症;更优选地,所述癌症为间皮素异常表达的癌症,如淋巴癌。

## 一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫组织化学技术领域,具体涉及一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 间皮素 (Mesothelin, 简称meso或MSLN) 是一种分子量为40kDa的细胞表面糖蛋白,其高表达于多种肿瘤组织中,也可表达于正常胸膜、心包和腹膜的间皮细胞中。虽然间皮素不是肿瘤特异性蛋白,但测定癌症患者血液或组织中的间皮素可能有助于这些患者的诊断。2017年10月19日,美国政府批准第二种基于改造患者自身免疫细胞的疗法(yescarta疗法)治疗特定淋巴瘤患者,yescarta疗法属于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, 简称CAR-T)。近年来,关于CAR-T的研究方兴未艾。

[0003] 间皮素CAR-T细胞治疗是靶向间皮素抗原阳性表达的肿瘤细胞的一种新型CAR-T细胞疗法,逐渐成为治疗实体瘤的一种有效治疗方法,但是间皮素CAR-T细胞治疗后,肿瘤组织中间皮素CAR-T细胞的存在和浸润量仍缺乏可行的检测方法。肿瘤组织间皮素CAR-T细胞的阳性表达是间皮素CAR-T细胞通过血液循环迁移到肿瘤局部杀伤肿瘤细胞的直接证据,间皮素CAR-T细胞比例还与患者治疗疗效及预后密切相关。采用抗原与抗体特异性结合的原理,免疫组化技术为CAR-T细胞在肿瘤组织的阳性表达率检测提供了可行的检测方法。

[0004] 现有技术检测间皮素CAR-T细胞在肿瘤局部的表达,主要是通过全长间皮素抗原作为一抗,特异性相对较差,存在假阴性或者假阳性结果;而且灵敏度不高。

### 发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是克服临床中间皮素CAR-T细胞检测技术特异性较差的缺陷,提供了一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒及其应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案之一为:一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒,其中,所述试剂盒包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体为浓度0.8-1.0mg/ml的含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白,所述第二抗体为浓度0.8-1.2mg/ml的抗第一抗体的抗体;所述第一抗体的工作浓度为所述第一抗体的1:50稀释液;所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:200~1:600稀释液。该试剂盒染色过程简便快捷,提高了检测的特异性和灵敏度,可以在间皮素CAR-T细胞治疗后的肿瘤组织标本中检测间皮素CAR-T细胞的阳性率,从而指导药物的进一步制备和用药策略。使用本发明中的稀释液、稀释比例稀释得到的所述第一抗体和所述第二抗体,也可以直接用于本发明的试剂盒中。即试剂盒中可以包括直接应用、无需稀释的160~200μg/ml的第一抗体(即0.8-1.0mg/ml的第一抗体稀释50倍而得),和1~6μg/ml例如1、1.33、1.5、2、2.5、3、4、4.5、5、6μg/ml等浓度的第二抗体(即0.8-1.2mg/ml的第二抗体稀释200~600倍而得)。

[0007] 在一个较佳的具体实施例中,所述试剂盒中,所述含可检测标记的间皮素结构域

III融合蛋白包括如SEQ ID NO:7所示的人间皮素结构域III蛋白(即Meso3)；其中，所述第一抗体的浓度为0.9mg/ml，所述第二抗体的浓度为1.0mg/ml，所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:400稀释液。同上所述，试剂盒中可以包括直接应用、无需稀释的180 $\mu$ g/ml的第一抗体(即0.9mg/ml的第一抗体稀释50倍而得)和2.5 $\mu$ g/ml的第二抗体(即1.0mg/ml的第二抗体稀释400倍而得)。

[0008] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，所述含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白还包括轻链信号肽和Fc。优选地，所述轻链信号肽的序列如SEQ ID NO:6所示，所述Fc为IgG4Fc。更优选地，所述轻链信号肽位于所述人间皮素结构域III蛋白的N端，所述Fc位于所述人间皮素结构域III蛋白的C端。最优选地，所述间皮素结构域III融合蛋白的序列如SEQ ID NO:2所示。如SEQ ID NO:2所示的间皮素结构域III融合蛋白(即轻链信号肽-Meso3-Fc蛋白)可以提供较佳的检测特异性。

[0009] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，所述可检测的标记包括以下标记的一种或多种：酶标记包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)和碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶(APAAP)，荧光素标记包括异硫氰酸荧光素、异硫氰酸罗丹明，生物素标记和同位素标记。生物素标记的间皮素结构域III融合蛋白(即meso3-biotin)可提供最佳的检测特异性。

[0010] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，还包括与可检测的标记相配合的试剂。优选地，所述与可检测的标记相配合的试剂包括HRP酶、DAB显色液、苏木素和中性树胶中的一种或多种。

[0011] 在一个较佳的具体实施例中，所述第二抗体为HRP酶标记的抗生物素的抗体。所述第二抗体与所述第一抗体配合使用可提供最佳的检测灵敏度。

[0012] 为解决上述技术问题，本发明的技术方案之二为：一种间皮素CAR-T细胞的非诊断目的的检测方法，其使用如上所述的试剂盒来检测细胞，以确定所述细胞是否为肿瘤组织浸润间皮素CAR-T细胞。

[0013] 在一个较佳的具体实施例中，所述的检测方法包括以下步骤：

[0014] (1)加入所述工作浓度的所述第一抗体于经处理的离体组织切片上，孵育后冲洗；

[0015] (2)随后加入所述工作浓度的所述第二抗体，孵育后冲洗；

[0016] (3)显色、复染、脱水及封片后分析染色结果。

[0017] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，步骤(1)的孵育条件为4℃过夜；所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次，每次3分钟。

[0018] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，步骤(2)的孵育条件为37℃30分钟；所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次，每次3分钟。

[0019] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，步骤(3)的显色使用DAB，复染使用苏木素，脱水使用乙醇，封片使用中性树胶。

[0020] 在一个较佳的具体实施例中，所述试剂盒中，所述稀释液为PBS缓冲液，步骤(1)的孵育条件为4℃过夜，所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次，每次3分钟；步骤(2)的孵育条件为37℃30分钟，所述冲洗为PBS缓冲液冲洗3次，每次3分钟；步骤(3)的显色使用DAB，复染使用苏木素，脱水使用乙醇，封片使用中性树胶。以上的显色、复染、脱水和封片均为本领域常规技术，所述步骤的具体细节参见实施例部分。

[0021] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案之三为:提供一种如上所述的试剂盒在筛选或制备防治疾病的药物中的应用。优选地,所述疾病为CAR-T疗法治疗后的癌症。更优选地,所述癌症为间皮素表达异常的癌症,如间皮瘤或淋巴癌。

[0022] 术语解释:

[0023] 本发明中,meso、Meso (mesothelin, MSLN) 的术语均表示全长间皮素胞外区抗原。meso3、Meso3、间皮素3区和间皮素结构域III的术语均表示相同的含义;间皮素抗原胞外部分有三个区,分别是I区、II区和III区,其中III区是接近细胞膜的信号端,不受其他蛋白的竞争性结合,具有更好的临床治疗应用价值。含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白由可检测标记和间皮素结构域III连接而成,在本发明中,优选地还含有轻链信号肽和Fc,其序列如上所述。

[0024] 本发明中,meso3CAR-T即靶向间皮素胞外区第III区(近细胞膜端)的嵌合抗原T细胞;mesoCAR-T即靶向间皮素胞外区全长抗原的嵌合抗原T细胞。间皮素CAR-T细胞则泛指靶向间皮素结构域III的CAR-T即meso3CAR-T和靶向间皮素全长胞外结构域的CAR-T即mesoCAR-T。

[0025] 第一抗体即一抗,可以特异结合底物或抗原的结合蛋白,本发明中的一抗包括抗体和除抗体以外的一般蛋白,如间皮素胞外结构域III区;第二抗体即二抗,其可以和一抗结合,并带有结合可检测标记(如上述的化学发光或显色基团)的生物大分子例如抗体,作用是结合一抗,放大抗原信号。本发明中,生物素标记有时也称为生物素化。

[0026] 工作浓度是较浓度或原始浓度而言,在使用试剂盒时,用稀释液稀释原始浓度的组分,在本发明中,特定工作浓度的所述第一抗体和第二抗体的配合,可以带来最佳的检测效果。

[0027] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0028] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0029] 本发明的积极进步效果在于:本发明肿瘤组织浸润间皮素CAR-T细胞的免疫组化染色试剂盒,首次采用生物素标记的间皮素蛋白胞外结构域III区分子作为免疫组化检测的一抗,并限定了一抗与二抗的工作浓度配比(分别为1:50稀释和1:200~1:600稀释),提高了检测的特异性和灵敏度,为检测靶向间皮素III区的CAR-T细胞的肿瘤局部浸润量检测提供了一种新方法。优选地,HRP酶标的抗生物素的二抗保证了实验的稳定性,比传统的链霉素-生物素检测体系更加准确地反应了靶向间皮素的CAR-T细胞在肿瘤局部的分布特征;当一抗的工作浓度为180 $\mu$ g/ml,二抗的工作浓度为2.5 $\mu$ g/ml时,结合其他的参数,所述试剂盒可提供最佳的检测效果。

## 附图说明

[0030] 图1为靶向间皮素结构域III的CAR的结构示意图。

[0031] 图2为CAR-T治疗组Meso3CAR-T细胞免疫组化检测结果图:A.采用生物素化的meso3抗原作为一抗的检测结果(二抗1:200);B.采用生物素化的meso抗原作为一抗的检测结果(二抗1:200);C.采用PBS作为一抗的检测结果(二抗1:200)。

[0032] 图3为CAR-T治疗组Meso3CAR-T细胞免疫组化检测结果图:A.采用生物素化的

meso3抗原作为一抗的检测结果(二抗1:400);B.采用生物素化的meso抗原作为一抗的检测结果(二抗1:400);C.采用PBS作为一抗的检测结果(二抗1:400)。

[0033] 图4为CAR-T治疗组Meso3CAR-T细胞免疫组化检测结果图:A.采用生物素化的meso3抗原作为一抗的检测结果(二抗1:600);B.采用生物素化的meso抗原作为一抗的检测结果(二抗1:600);C.采用PBS作为一抗的检测结果(二抗1:600)。

[0034] 图5为PBS治疗组肿瘤组织的免疫组化检测结果图.A.采用生物素化的meso3抗原作为一抗的检测结果(二抗1:200);B.采用生物素化的meso抗原作为一抗的检测结果(二抗1:200);C.采用PBS作为一抗的检测结果(二抗1:200)。

## 具体实施方式

[0035] 在本发明的较佳实施例中,设计了包含生物素标记的人间皮素结构域III一抗、HRP标记的抗生物素二抗和显色试剂的间皮素CAR-T细胞免疫组化检测试剂盒。其中,生物素标记的间皮素抗原可以直接结合表达包含靶向间皮素的抗体的CAR的CAR-T细胞,二抗结合生物素,阳性显色代表间皮素CAR-T细胞阳性表达。本发明生物素标记的间皮素结构域III(meso3)作为免疫组化检测的一抗,间皮素抗原蛋白分子的III区(近膜端)与meso3CAR-T细胞抗体识别区一致。一抗与meso3CAR-T胞外抗原识别区特异性结合,然后采用HRP标记的抗生物素二抗结合一抗,特异性较其他方法提高,不仅可以清晰地显示肿瘤组织中浸润的meso3CAR-T细胞的位置,还可以评价阳性比例。

[0036] 所述检测方法主要用于检测肿瘤局部针对间皮素抗原III区的CAR-T细胞浸润量,采用两次特异性结合反应,第一次是meso3CAR蛋白的抗原识别区与间皮素抗原的特异性结合,第二次是抗生物素二抗与生物素化一抗的特异性结合,提高了间皮素CAR-T细胞的特异性和准确性。

[0037] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0038] 制备实施例1生物素化的间皮素抗原的制备

[0039] 间皮素结构域III(meso3)抗原的制备方法如下:合成序列为SEQ ID NO:1的DNA片段,表达氨基酸序列为SEQ ID NO:2的轻链信号肽-Meso3-Fc蛋白,Fc为IgG4Fc,轻链信号肽旨在使得Meso3-Fc融合蛋白能够被有效分泌到真核细胞外,方便后续纯化。在SEQ ID NO:1所示DNA序列的5'端与3'端分别连接EcoRI与XbaI的酶切位点接头后,连接到pCDNA3.4载体(常规载体,市售可得)上,构建得到过表达Meso3-Fc融合蛋白的表达载体。根据ExpiCHO<sup>TM</sup>表达系统说明书,使用ExpiCHO<sup>TM</sup>表达系统对上述融合蛋白进行过表达后,使用GE Healthcare的MabSelect亲和层析树脂按说明书操作步骤对表达产物进行纯化,既制得纯化的Meso3-Fc融合蛋白。

[0040] 间皮素全长抗原(mesothelin,MSLN)的制备方法如下:合成序列如SEQ ID NO:3所示的DNA片段,表达氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链信号肽-Meso-Fc蛋白,轻链信号肽旨在使得Meso-Fc融合蛋白能够被有效分泌到真核细胞外,方便后续纯化。在SEQ ID NO:3所示DNA序列的5'端与3'端分别连接EcoRI与XbaI的酶切位点接头后,连接到pCDNA3.4载体上,构建得到过表达Meso-Fc融合蛋白的表达载体。根据ExpiCHO<sup>TM</sup>表达系统说明书,使用

ExpiCHO<sup>TM</sup>表达系统对上述融合蛋白进行过表达后,使用GEHealthcare的MabSelect亲和层析树脂按说明书操作步骤对表达产物进行纯化,既制得纯化的Meso-Fc融合蛋白。

[0041] 纯化获得的间皮素结构域III抗原与间皮素全长抗原委托金斯瑞公司进行生物素标记,标记的方法为本领域常规的多肽标记生物素的化学方法。ExpiCHO<sup>TM</sup>表达系统购自ThermoFisher。

[0042] 以上制得的Meso3-Fc融合蛋白、Meso-Fc融合蛋白、生物素标记的Meso3-Fc和Meso-Fc融合蛋白以下分别简称为meso3抗原、meso抗原、meso3-biotin和meso-biotin。meso3-biotin和meso-biotin溶于PBS缓冲液,分别制成浓度为0.9mg/mL和1.0mg/mL的原液。

[0043] 制备实施例2

[0044] 1、含有编码Meso3CAR的表达载体的构建

[0045] 人工合成meso3CAR的编码序列(SEQ ID NO:5),将其装入基于PB转座子系统的载体pNB328的EcoRI和SalI酶切位点之间(pNB328的结构及序列参见CN201510638974.7,本文将其全部内容以引用的方式纳入本文),构建的重组表达载体命名为pNB328-meso3CAR,结构示意图如图1所示,所述Meso3CAR从5'LTR至3'LTR依次为CD8信号肽、Meso3SCFV、CD8铰链区、CD8跨膜、CD28胞内和CD3 $\zeta$ 。图1未示出启动子序列和polyA加尾信号序列,其分别位于5'LTR和信号肽序列之间以及3'LTR之前。

[0046] 2、Meso3CAR-T细胞的制备

[0047] Meso3抗原和抗CD28抗体包被6孔板:在6孔板的一个孔中加入2mLDPBS(Hyclone),根据meso3抗原和抗CD28抗体的浓度计算出各自的10 $\mu$ g的体积,然后用枪吸取分别并添加到孔中,用“十字混匀法”混匀,使meso3抗原和抗CD28抗体的包被浓度均为5 $\mu$ g/mL。将6孔板至于4℃冰箱包被过夜(或置于37℃细胞培养箱孵育4h)。

[0048] 取商业化PBMC细胞(购自ALLCELLS公司),用生理盐水调整浓度至 $5 \times 10^6$ 个/mL。取1.5mL EP管,加入 $5 \times 10^6$ 个细胞,1200rmp离心3min,弃上清,取电转试剂盒(购自Lonza公司)按比例加入电转试剂共100 $\mu$ L,再加入pNB328空载质粒4 $\mu$ g,将混合液转移至电转杯中,放入LonzaNucleofactor 2b电转仪,选取编号为U014的设备自带程序进行电击;使用试剂盒中的微量吸管将电转好的细胞悬液转移到已加入培养液的、用meso3抗原和抗CD28抗体包被好的六孔板中(培养液为含2%FBS的AIM-V培液),混匀,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养5-7天后,再离心细胞,弃上清,细胞沉淀用新鲜含2%FBS的AIM-V培养基重悬,继续培养3-5天,获得靶向间皮素结构域III的CAR-T细胞Meso3CAR-T。

[0049] 3、Meso3CAR-T细胞治疗卵巢癌的动物实验

[0050] 在SPF级饲养环境开展动物实验,NSG小鼠购买于北京百奥赛图生物科技有限公司。取4-6周龄的雌性NSG小鼠10只,接种 $5 \times 10^6$ 个SKOV-3细胞(购自ATCC,货号:HTB-77),接种肿瘤细胞1周后,挑选肿瘤大小一致的小鼠分为PBS组和Meso3CAR-T组,每组5只,尾静脉分别注射100微升PBS或步骤2中制得的Meso3CAR-T细胞进行治疗,Meso3CAR-T细胞剂量为 $1 \times 10^7$ 个/100 $\mu$ L,在一周后取材做组织切片,观察肿瘤浸润Meso3CAR-T细胞比例。

[0051] 4、组织切片的制备

[0052] 分别切取3中Meso3CAR-T组和PBS组小鼠的肿瘤组织,放置到包埋盒中;浸泡于10%福尔马林溶液中固定24小时,流水冲洗2小时;梯度乙醇脱水:70%乙醇2小时,80%乙

醇2小时,90%乙醇2小时,95%乙醇1小时,100%乙醇I 1小时,100%乙醇II 1小时;透明:二甲苯I 40分钟,二甲苯II 1小时;在60℃恒温烤箱中,浸蜡石蜡I 1小时,石蜡II 2小时,石蜡III 2小时;使用金属框包埋蜡块,冷却后取出蜡块;用组织切片机切片,厚度4μm,捞片贴到载玻片;65℃烤片0.5小时备用。每组的肿瘤组织分别制备三张切片。

[0053] 效果实施例1免疫组化染色

[0054] 免疫组化染色步骤均为本领域常规操作,其步骤如下:

[0055] (1) 将制备实施例2的4中获得的组织切片放入70℃恒温箱中烤片2h;

[0056] (2) 常规二甲苯脱蜡2次,每次10分钟,100%、100%、95%、90%、80%梯度乙醇水化,每次5分钟,最后蒸馏水冲洗3分钟;

[0057] (3) 抗原热修复(即修复scFv的空间构象),自然冷却至室温,自来水冲洗,PBS冲洗3次,每次3分钟;

[0058] (4) 在3%过氧化氢中室温孵育10分钟,阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗3次,每次3分钟;

[0059] (5) 用羊血清封闭30分钟,甩去多余血清,不洗,Meso3CAR-T组和PBS组的各自的三张切片分别滴加用PBS按1:50稀释的制备实施例1制得的meso3-biotin、meso-biotin抗原原液和阴性对照PBS(即一抗),一抗4℃孵育过夜,PBS冲洗3次,每次3分钟;

[0060] (6) 滴加HRP酶标记的抗生物素的抗体(即二抗),二抗用PBS 1:200稀释(购自Abcam,货号:ab6651),37℃孵育30分钟,PBS冲洗3次,每次3分钟;

[0061] (7) DAB(购自上海基因科技,货号:GK500710)显色,显微镜镜下监测显色过程,适时终止反应;

[0062] (8) 苏木素(购自福建迈新,货号:CTS-1090)复染,1%盐酸酒精分化数秒,流水冲洗返蓝;

[0063] (9) 脱水透明:将切片依次放入80%、90%、95%、100%、100%梯度乙醇脱水各5分钟;

[0064] (10) 将切片晾干,中性树胶(购自北京索莱宝,货号:G8590)封片,Meso3CAR-T组的结果如图2所示;PBS组的结果如图5所示。

[0065] 图2显示meso3-biotin染色后可见Meso3CAR-T阳性表达.meso-biotin染色后Meso3CAR-T也有着色,但效果弱于meso3-biotin组,PBS为阴性对照组。图5显示未注射CAR-T细胞的小鼠的切片在Meso3、Meso和PBS各组之间无差异。

[0066] 效果实施例2

[0067] 选取制备实施例2制得的组织切片,重复效果实施例1中的步骤(1) - (10),其中区别在于步骤(6)中的二抗稀释倍数为1:400,结果如图3所示。

[0068] 图3显示meso3-biotin染色mesoCAR-T阳性表达,间质无着色,对比效果好.meso-biotin染色后mesoCAR-T着色较弱。

[0069] 效果实施例3

[0070] 选取制备实施例2制得的组织切片,重复效果实施例1中的步骤(1) - (10),其中区别在于步骤(6)中的二抗稀释倍数为1:600,结果如图4所示。

[0071] 图4显示meso3-biotin染色后Meso3CAR-T阳性偏弱但仍可见有明显的信号,meso-biotin染色Meso3CAR-T着色效果与图2和图3相比则明显下降。

[0072] 结果分析：

[0073] 以上结果表明,对于鉴定组织中靶向间皮素结构域III的CAR-T细胞,使用间皮素结构域III抗原具有优异的阳性Meso3CAR-T细胞检测效果,特异性高,稳定性与可重复性好,且明显优于使用全长间皮素抗原的检测效果。

## 序列表

<110> 上海细胞治疗集团有限公司;  
上海细胞治疗研究院

<120> 一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒及其应用

<130> P180116209C

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 轻链信号肽-Meso3-Fc DNA

<400> 1

atggaagccc cagctcagct tctttcctc ctgctactct ggctccaga taccaccgga 60  
aacgggtccg aataacttcgt gaagatccag tccttcctgg gtggggccccc cacggaggat 120  
ttgaaggcgc tcagtcagca gaatgtgagc atggacttgg ccacgttcat gaagctgcgg 180  
acggatgcgg tgctgccgtt gactgtggct gaggtgcaga aacttctggg accccacgtg 240  
gagggcctga aggccggagga gcggcaccgc ccgggtgcggg actggatcct acggcagcgg 300  
caggacgacc tggacacgct gggctgggg ctacagggcg gcatccccaa cggctacctg 360  
gtccttagacc tcagcatgca agaggccctc tcggagtcca aatatggtcc cccatgccca 420  
ccatgccca ggcagccccc agagccacag gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag 480  
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctaccc cagcgacatc 540  
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 600  
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtgg 660  
caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 720  
cagaagagcc tctccctgtc tctggtaaa tga 753

<210> 2

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 轻链信号肽-Meso3-Fc 蛋白

<400> 2

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	
1					5				10				15		
Asp	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Ser	Phe
						20			25				30		

Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn  
 35 40 45  
 Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val  
 50 55 60  
 Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile  
 85 90 95  
 Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln  
 100 105 110  
 Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu  
 115 120 125  
 Ala Leu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly  
 130 135 140  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 165 170 175  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 180 185 190  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 195 200 205  
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn  
 210 215 220  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 225 230 235 240  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 245 250  
 <210> 3  
 <211> 1329  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 轻链信号肽-MSLN-Fc DNA  
 <400> 3  
 atggaagccc cagctcagct tctttccctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
 gaagtggaga agacagcctg tccttcaggc aagaaggccc gcgagataga cgagaggctc 120  
 atcttctaca agaagtggga gctggaagcc tgcgtggatg cggccctgct ggccacccag 180  
 atggaccgcg tgaacgccc tcccttcacc tacgagcagc tggacgtcct aaagcataaa 240

ctggatgagc tctacccaca aggttacccc gagtctgtga tccagcacct gggctacctc 300  
 ttcctcaaga tgagccctga ggacattcgc aagtggaatg tgacgtccct ggagaccctg 360  
 aaggcttgc ttgaagtcaa caaaggcac gaaatgagtc ctcaggtggc caccctgatc 420  
 gaccgctttg tgaagggaag gggccagcta gacaaagaca ccctagacac cctgaccgccc 480  
 ttctaccctg ggtacctgtg ctccctcagc cccgaggagc tgagctccgt gccccccagc 540  
 agcatctggg cggtcaggcc ccaggacac gacacgtgtg acccaaggca gctggacgtc 600  
 ctctatccca aggccgcct tgcttccag aacatgaacg ggtccgaata cttcgtgaag 660  
 atccagtcct tcctgggtgg ggccccacg gaggattta aggcgctcag tcagcagaat 720  
 gtgagcatgg acttggccac gttcatgaag ctgcggacgg atgcggtgct gccgttgact 780  
 gtggctgagg tgcagaaact tctggaccc cacgtggagg gcctgaaggc ggaggagcgg 840  
 caccgcccgg tgcggactg gatccctacgg cagcggcagg acgacctgga cacgctgggg 900  
 ctgggctac agggcggcat ccccaacggc tacctggtcc tagacctcag catgcaagag 960  
 gcccctctcg agtccaaata tggtccccca tgcccaccat gcccaggca gccccgagag 1020  
 ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagccctg 1080  
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140  
 cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgtgg actccgacgg ctccttcttc 1200  
 ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg agggaaatgt cttctcatgc 1260  
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 1320  
 ggtaaatga 1329  
 <210> 4  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 轻链信号肽-MSLN-Fc 蛋白  
 <400> 4

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

100	105	110
Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys		
115	120	125
Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val		
130	135	140
Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala		
145	150	155
Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser		
165	170	175
Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr		
180	185	190
Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala		
195	200	205
Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe		
210	215	220
Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn		
225	230	235
Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val		
245	250	255
Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val		
260	265	270
Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile		
275	280	285
Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln		
290	295	300
Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu		
305	310	315
Ala Leu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu		
340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn		
405	410	415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440

<210> 5  
 <211> 1485  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 编码Meso3CAR的 DNA序列  
 <400> 5

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgcccagg 60  
 ccggaggtgc agctggtgga gtccggggga ggcctggtcc agcctggggg atccctgaga 120  
 ctctcctgcg cagcctctgg attcgcacctc ggtttctact tttacgcctg ttgggtccgc 180  
 caggctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcatgcattt atactgctgg tagtggtagc 240  
 acgtactacg cgagctgggc gaaaggccga ttcaccatct ccagagacaa ttcaagaaac 300  
 acgctgtatc tgcaaattgaa cagtctgaga gccgaggaca cggccgtgtt ttactgtgcg 360  
 agatctactg ctaatactag aagtacttat tatcttaact tgtggggcca aggcaccctg 420  
 gtcaccgtct cctcaggcgg aggccgatca ggtggtggcg gatctggagg tggcggaaagc 480  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcattt ctgtgggaga cagagtcacc 540  
 atcaacttgcc aggccagtca gaggattgt agttacttat cctggatca gcagaaacca 600  
 gggaaagtcc ccaagctcct gatctatggt gcatccactc tggcatctgg ggtccctcg 660  
 cggttcagtg gcagtggtatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 720  
 gaagatttg ccacttacta ctgtcagagt tatgcttatt ttgatagtaa taattggcat 780  
 gctttcggcg gaggaccaa ggtggagatc aaaaccacga cgccagcgcc gcgaccacca 840  
 acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagaggc gtgcggccca 900  
 gcgccgggg ggcgcagtgcac cacgaggggg ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg 960  
 gcgccctgg ccggacttg tgggtcctt ctccgtcac tggatcac ccttactgc 1020  
 aaacggggca gaaagaagct cctgtatata ttcaaacaac cattatgag accagtacaa 1080  
 actactcaag aggaagatgg ctgttagctgc cgattccag aagaagaaga aggaggatgt 1140  
 gaactgagag tgaagttcag caggagcgc gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac 1200  
 cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgttt ggacaagaga 1260  
 cgtggccggg accctgagat gggggaaag ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg 1320  
 tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc 1380  
 gagcgcggg gggcaaggg gcacgatggc cttaaccagg gtctcagttac agccaccaag 1440  
 gacacctacg acgcccattca catgcaggcc ctgccccctc gctga 1485

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 轻链信号肽

<400> 6

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Meso3

<400> 7

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala

1 5 10 15

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp

20 25 30

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr

35 40 45

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys

50 55 60

Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg

65 70 75 80

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro

85 90 95

Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser

100 105 110



图1

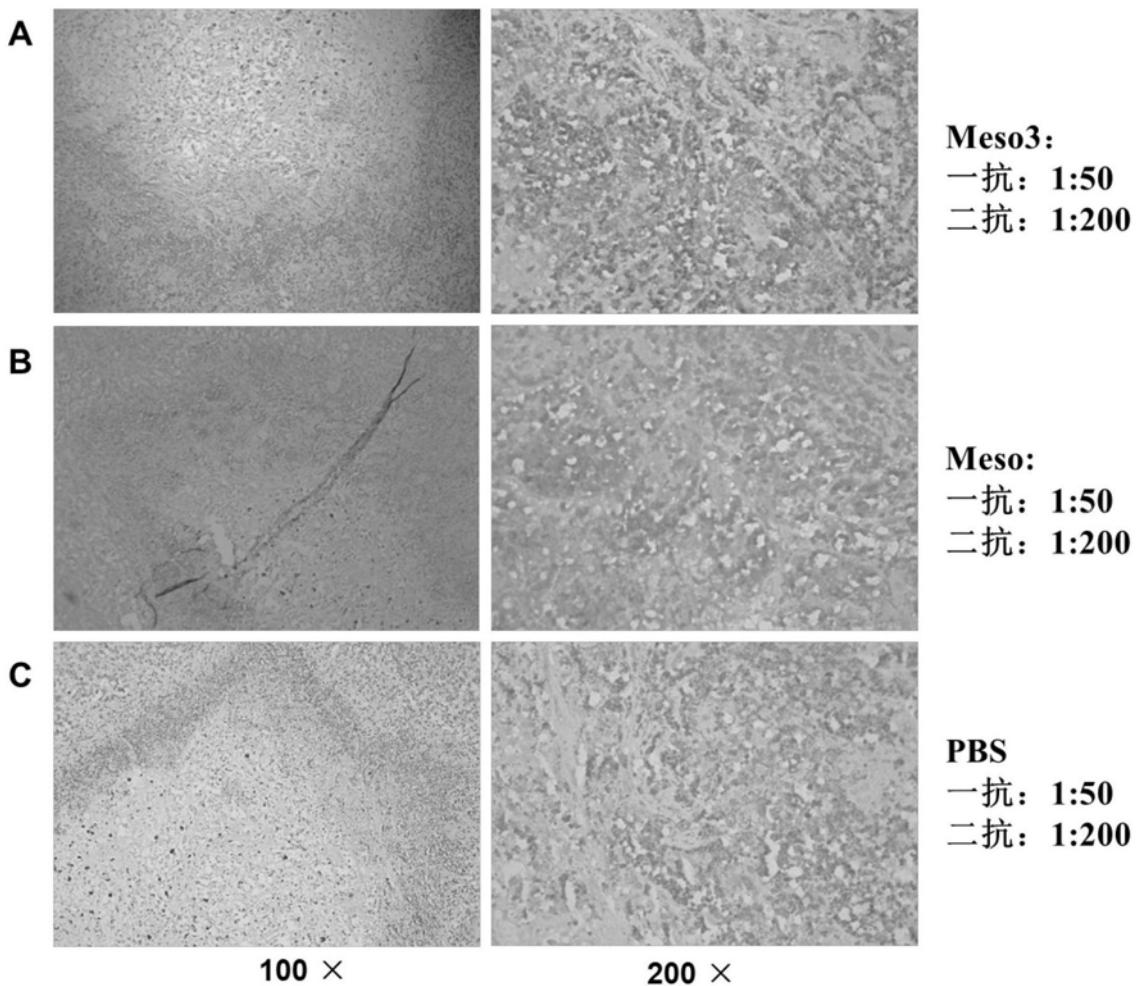


图2

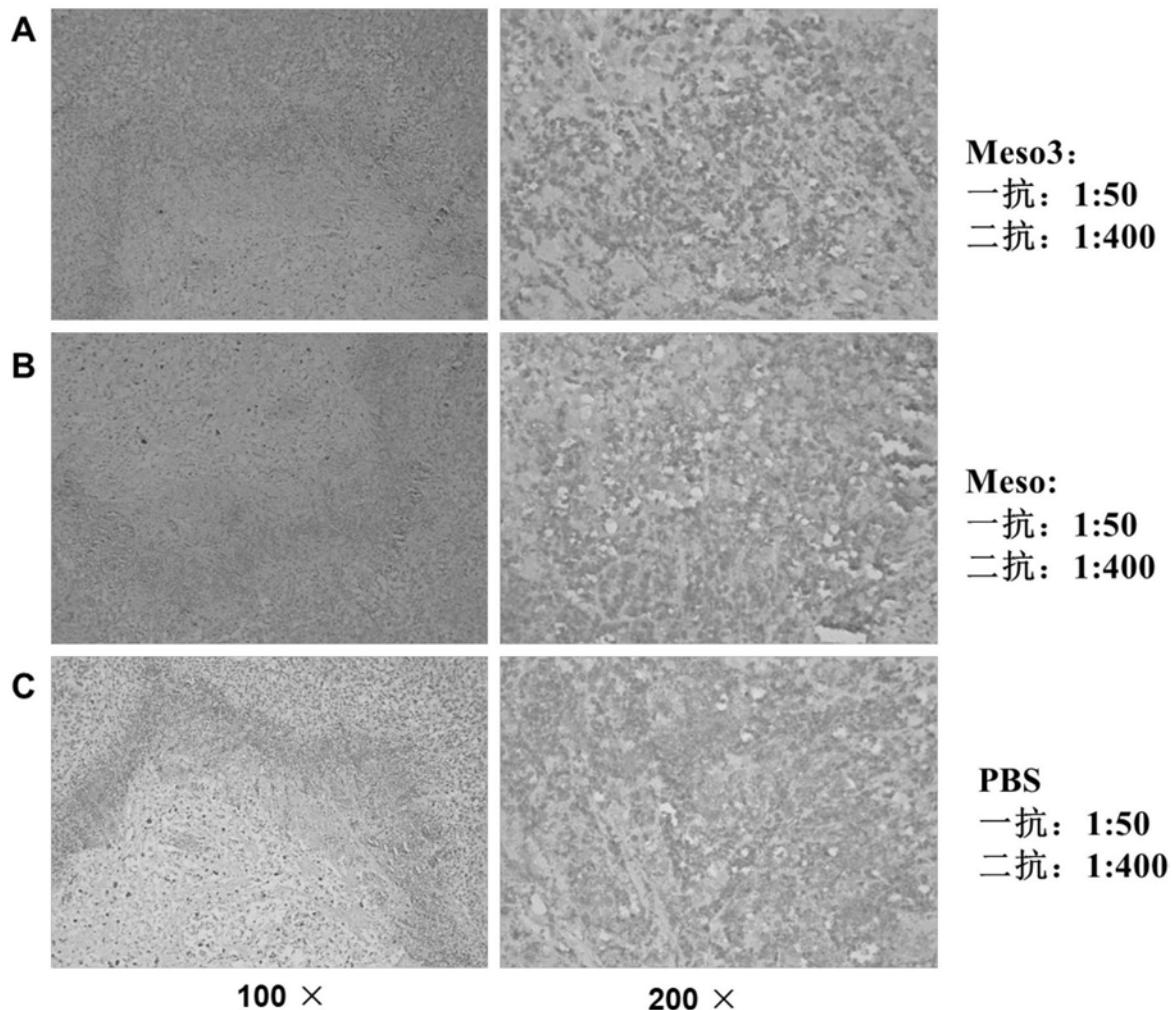


图3

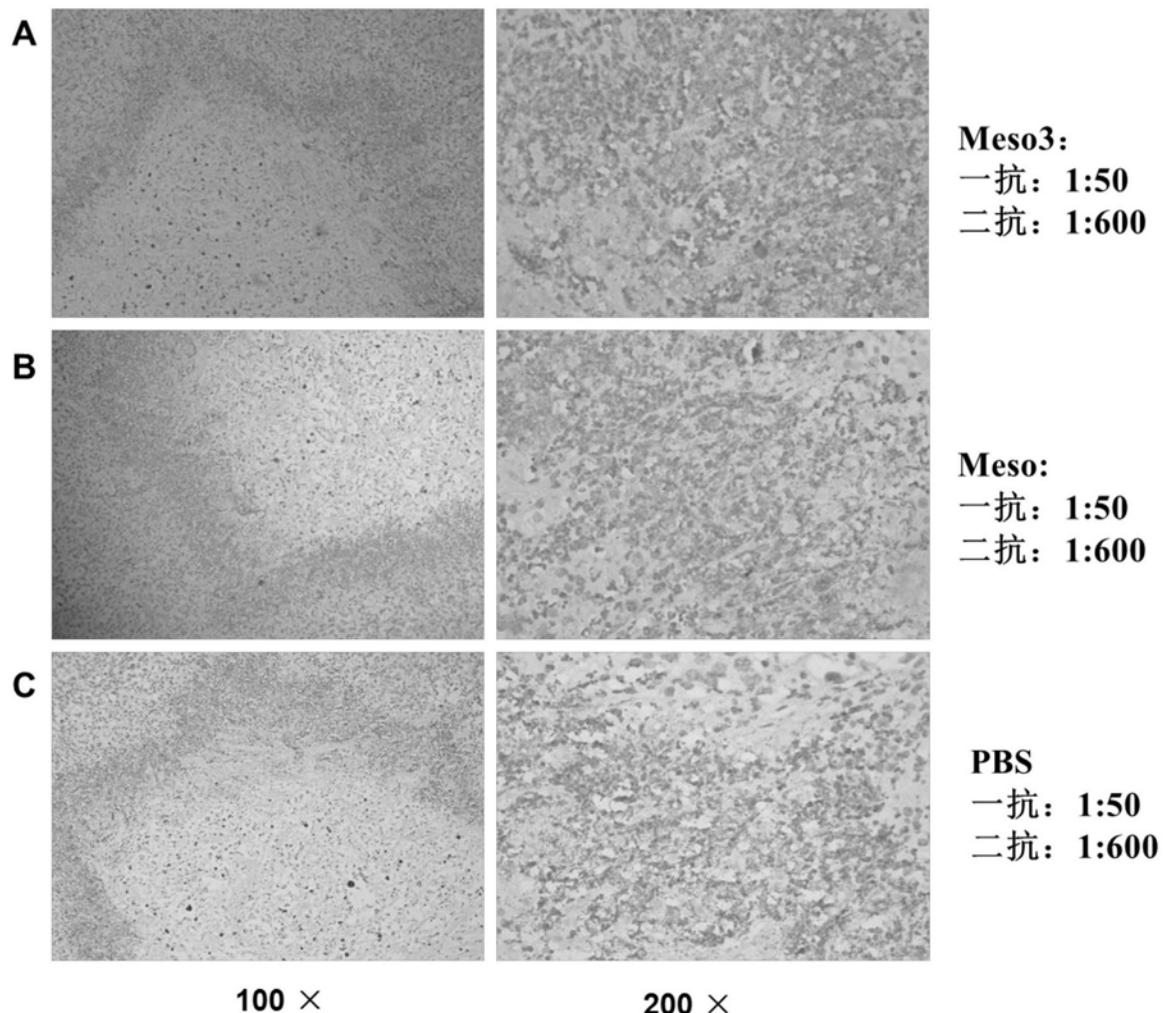


图4

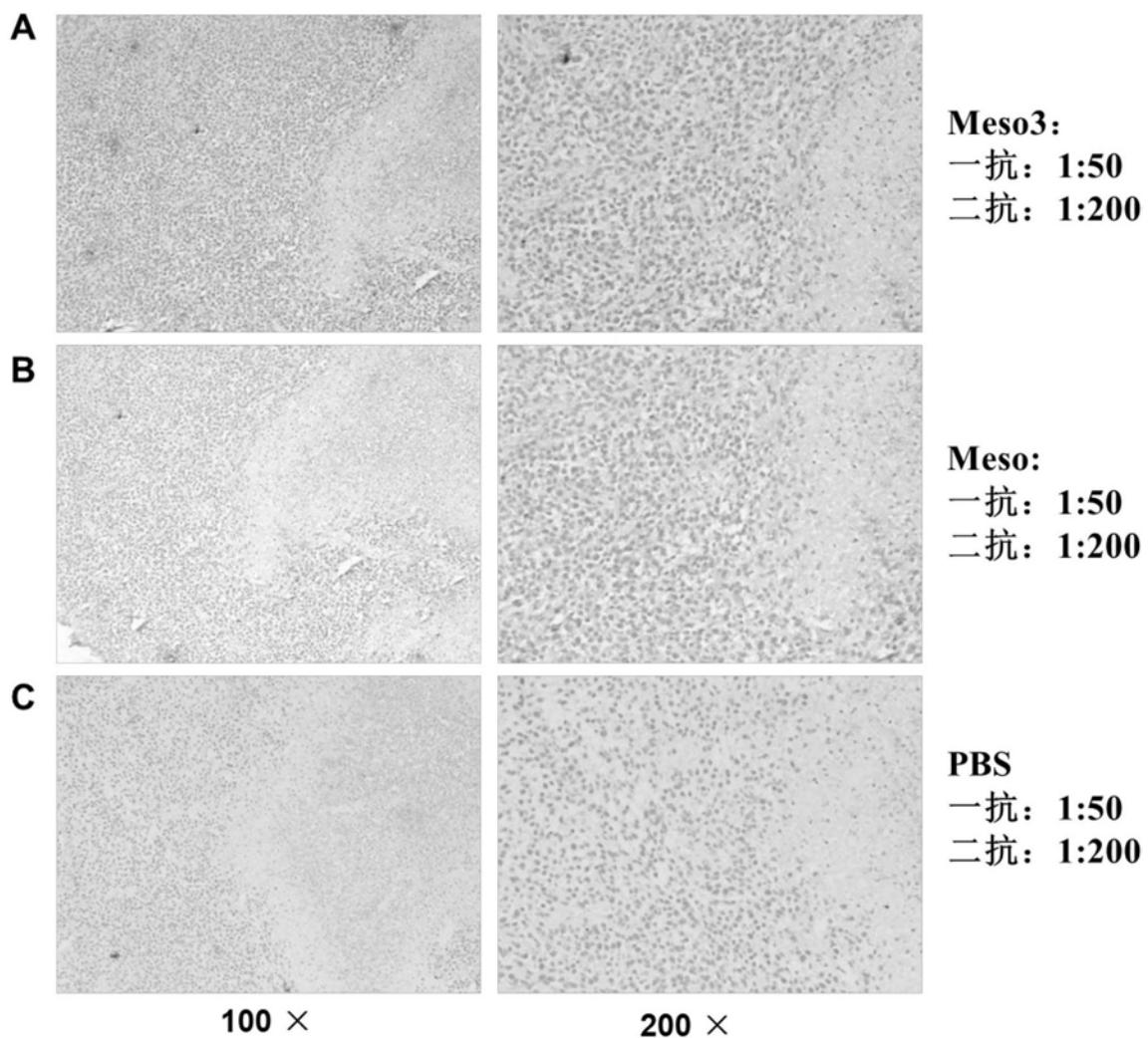


图5

专利名称(译)	一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN111381020A</a>	公开(公告)日	2020-07-07
申请号	CN201811614476.9	申请日	2018-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海细胞治疗研究院		
申请(专利权)人(译)	上海细胞治疗研究院		
当前申请(专利权)人(译)	上海细胞治疗研究院		
[标]发明人	金华君 张志伟 李杨 黄晨 钱其军		
发明人	金华君 张志伟 李杨 黄晨 钱其军		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	薛琦 黄益澍		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种间皮素CAR-T细胞免疫组化染色的试剂盒，其中，所述试剂盒包括第一抗体和第二抗体，所述第一抗体为浓度0.8-1.0mg/ml的含可检测标记的间皮素结构域III融合蛋白，所述第二抗体为浓度0.8-1.2mg/ml的抗第一抗体的抗体；其中，所述第一抗体的工作浓度为所述第一抗体的1:50稀释液，所述第二抗体的工作浓度为所述第二抗体的1:200 ~ 1:600稀释液。本发明还公开了所述试剂盒在间皮素CAR-T细胞非诊断目的的检测中，以及在制备防治疾病的药物中的应用。所述试剂盒具有优良的检测特异性和灵敏度，便于应用和推广。

