



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106645677 B

(45)授权公告日 2019.08.09

(21)申请号 201611022501.5  
 (22)申请日 2016.11.15  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 106645677 A  
 (43)申请公布日 2017.05.10  
 (73)专利权人 恒瑞源正(上海)生物科技有限公司  
 地址 200135 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区加太路29号2号楼西部一层D-01室  
 专利权人 恒瑞源正(广州)生物科技有限公司  
 (72)发明人 韩研妍 梁小玲 陈锡和 马民骏 唐龙清 周向军  
 (74)专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217  
 代理人 邹秋菊

(51)Int.Cl.  
 G01N 33/53(2006.01)  
 G01N 33/50(2006.01)  
 A61K 39/00(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 102250208 A,2011.11.23,  
 CN 102662054 A,2012.09.12,  
 CN 104387450 A,2015.03.04,  
 CN 104356198 A,2015.02.18,  
 WO 2005116051 A2,2005.12.08,  
 EP 2824182 A1,2015.01.14,  
 US 2009221509 A1,2009.09.03,  
 审查员 马立楠

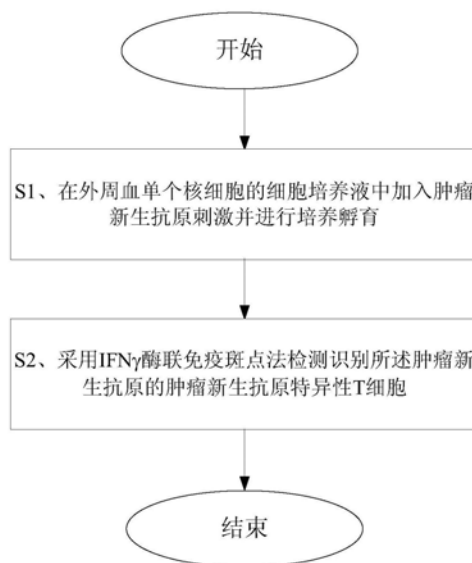
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

## (54)发明名称

体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒以及肿瘤疫苗

## (57)摘要

本发明涉及一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒以及肿瘤疫苗。所述体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,包括:S1、在外周血单个核细胞的细胞培养液中加入肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育;S2、采用IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞。实施本发明的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法和试剂盒,通过IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法可以高精度地检测出肿瘤新生抗原特异性T细胞,且检测方法简单、结果明确、成本低廉。实施本发明的肿瘤疫苗,可以有效扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞,进而有效用于肿瘤免疫治疗药物的制作。



1. 一种非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,包括:  
S1、在外周血单个核细胞的细胞培养液中加入肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育;  
S2、采用IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞;

其中所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVVGAAGVGKSAL的抗原肽。

2. 根据权利要求1所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S1包括:

S11、采用抗原预测软件netMHC4设计所述肿瘤新生抗原;

S12、在悬浮所述外周血单个核细胞的细胞培养液中加入所述肿瘤新生抗原进行预刺激并进行培养。

3. 根据权利要求2所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S11包括:

S111、取离体肿瘤组织做基因分析,以找出非同义的基因突变位点;

S112、采用抗原预测软件netMHC4基于包含所述非同义基因突变位点的抗原与相应的主要组织相容性分子的结合能力选择结合能力最好的抗原肽序列;

S113、采用抗原预测软件netMHC4从所述抗原肽序列中选择出其与相应的主要组织相容性分子的结合能力明显高于其对应的非基因突变位点与相应的主要组织相容性分子的结合能力的抗原肽序列作为所述肿瘤新生抗原。

4. 根据权利要求2所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S12包括:

S121、将所述外周血单个核细胞在无血清细胞培养液中悬浮,并加入所述肿瘤新生抗原进行预刺激;

S122、在常温含CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

5. 根据权利要求4所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S2包括

S21、将预刺激后的所述外周血单个核细胞转移到包被有IFN  $\gamma$  抗体的容器内,加入所述肿瘤新生抗原进行孵育,从而使得受到所述肿瘤新生抗原刺激后的肿瘤新生抗原特异性T细胞分泌IFN  $\gamma$  ;

S22、所述IFN  $\gamma$  抗体捕获所述IFN  $\gamma$  ,且通过酶联反应产生新生肉眼可见的免疫斑点;

S23、统计所述免疫斑点的数量,以基于所述免疫斑点的数量检测所述肿瘤新生抗原特异性T细胞的数量。

6. 根据权利要求5所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S21进一步包括:

S211、采用乙醇水溶液在常温下润湿Elispot板,随后采用PBS清洗所述Elispot板;

S212、加IFN  $\gamma$  抗体以包被所述Elispot板,然后加板盖低温孵育过夜,随后用PBS清洗后加封闭液封闭所述IFN  $\gamma$  抗体未结合的位置,加板盖常温孵育;

S213、调整所述无血清细胞培养液中的预刺激后的所述外周血单个核细胞的浓度后,随后加入相应的所述肿瘤新生抗原形成混合无血清细胞培养液;

S214、将所述混合无血清细胞培养液加入到包被好的所述Elispot板的板孔中,加盖板在常温含CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

7. 根据权利要求6所述的非诊断目的的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法,其特征在于,所述步骤S22进一步包括:

S221、弃除所述无血清细胞培养液,然后采用PBS进行清洗,随后采用清洗液进行清洗;

S222、随后加入生物素偶联的IFN $\gamma$ 识别抗体,常温孵育;

S223、采用清洗液进行清洗,然后加入偶联链酶亲和素的辣根过氧化物酶,加板盖进行常温孵育;

S224、采用清洗液进行清洗,然后加入辣根过氧化物酶的底物,室温避光,然后采用清洗液充分清洗,晾干。

8. 一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的试剂盒,其特征在于,包括:肿瘤新生抗原、包被有IFN $\gamma$ 抗体的Elispot板、以及酶联反应试剂;所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVGAAGVGKSAL的抗原肽,所述酶联反应试剂包括生物素偶联的IFN $\gamma$ 识别抗体、偶联链酶亲和素的辣根过氧化物酶、辣根过氧化物酶的底物,以及助剂。

9. 一种肿瘤疫苗,其特征在于,包括用于扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞的肿瘤新生抗原,所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVGAAGVGKSAL的抗原肽。

## 体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒以及肿瘤疫苗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子免疫学和细胞免疫学领域,更具体地说,涉及一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒,以及肿瘤疫苗。

### 背景技术

[0002] T细胞通过T细胞表面免疫受体特异性识别肿瘤细胞的主要组织相容性分子(Major histocompatibility complex, MHC)递呈的抗原肽段(即抗原表位)来杀死或者杀伤癌细胞。CD8+细胞毒性T细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)能特异性识别靶细胞分泌重要的细胞因子干扰素 $\gamma$ (Interferon  $\gamma$ , IFN  $\gamma$ ),并直接杀伤癌细胞。CD4+辅助T细胞识别肿瘤抗原表位后能分泌多种细胞因子包括IFN  $\gamma$ 、IL2、IL4和TNF $\alpha$ ,激活CD8+CTL识别并杀伤肿瘤细胞。目前找寻合适的肿瘤细胞特有靶点,即肿瘤抗原,以及扩增特异性识别肿瘤抗原的免疫细胞是肿瘤免疫治疗技术的关键技术。目前大部分细胞免疫治疗选择的靶点是肿瘤细胞过表达抗原,即在肿瘤细胞中的表达远远高于正常细胞。肿瘤新生抗原是区分肿瘤细胞和正常细胞的特异性靶点,是肿瘤免疫细胞治疗的最佳靶点。

[0003] 检测特异性识别肿瘤新生抗原的T细胞可以使用MHC-肽多聚体染色(比如ProImmune的五聚体,Beckman coulter的四聚体以及Immudex公司的dextramer)。外周血中新生抗原特异性的T细胞能结合MHC-肿瘤新生抗原肽的多聚体,偶联在多聚体上的荧光分子在激光激活下会发出荧光,所以结合了MHC-肽多聚体的肿瘤新生抗原肽多聚体的特异性T细胞可以被细胞流式仪检测到,用来分析病人外周血中识别肿瘤新生抗原肽的T细胞数量和比率。

[0004] 然而,使用MHC-肽多聚体流式细胞分析方法检测肿瘤新生抗原特异性T细胞识别主要有以下几个缺点:

[0005] 1) 不确定性高:肿瘤新生抗原的长度以及递呈它对应的MHC分子都具有不确定性,因此可能无法产生稳定的MHC-新生肽的多聚体;

[0006] 2) 敏感度低:MHC-肽多聚体流式细胞分析方法能有效检测的特异性T细胞比率是0.001%,当低于这个数值时,将无法被检测;

[0007] 3) 功能缺失:MHC-肽多聚体流式细胞分析方法只能展现特异性T细胞能特异性地结合MHC-肽复合体,但不能检测到T细胞识别抗原肽后是否能有效被刺激,分泌功能性细胞因子或者杀伤肿瘤细胞;

[0008] 4) 费用高:每一个抗原肽需要由特定的MHC分子递呈而被T细胞识别,因此检测费用高。

### 发明内容

[0009] 本发明要解决的技术问题在于,针对现有技术的上述缺陷,提供一种确定性强、敏感度高、功能全面且费用低廉的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法和试剂盒,以及

可以用于扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞的肿瘤疫苗。

[0010] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：构造一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法，包括：

[0011] S1、在外周血单个核细胞的细胞培养液中加入肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育；

[0012] S2、采用IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞。

[0013] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述步骤S1包括：

[0014] S11、采用抗原预测软件netMHC4设计所述肿瘤新生抗原；

[0015] S12、在悬浮所述外周血单个核细胞的细胞培养液中加入所述肿瘤新生抗原进行预刺激并进行培养。

[0016] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述步骤S11包括：

[0017] S111、取离体肿瘤组织做基因分析，以找出非同义的基因突变位点；

[0018] S112、采用抗原预测软件netMHC4基于包含所述非同义基因突变位点的抗原与相应的主要组织相容性分子的结合能力选择结合能力最好的抗原肽序列；

[0019] S113、采用抗原预测软件netMHC4从所述抗原肽序列中选择出其与相应的主要组织相容性分子的结合能力明显高于其对应的非基因突变位点与相应的主要组织相容性分子的结合能力的抗原肽序列作为所述肿瘤新生抗原。

[0020] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVVGAGVGKSAI的抗原肽。

[0021] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述步骤S12包括：

[0022] S121、将所述外周血单个核细胞在无血清细胞培养液中悬浮，并加入所述肿瘤新生抗原进行预刺激；

[0023] S122、在常温含CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

[0024] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述步骤S2包括

[0025] S21、将预刺激后的所述外周血单个核细胞转移到包被有IFN  $\gamma$  抗体的容器内，加入所述肿瘤新生抗原进行孵育，从而使得受到所述肿瘤新生抗原刺激后的肿瘤新生抗原特异性T细胞分泌IFN  $\gamma$ ；

[0026] S22、所述IFN  $\gamma$  抗体捕获所述IFN  $\gamma$ ，且通过酶联反应产生新生肉眼可见的免疫斑点；

[0027] S23、统计所述免疫斑点的数量，以基于所述免疫斑点的数量检测所述肿瘤新生抗原特异性T细胞的数量。

[0028] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中，所述步骤S21进一步包括：

[0029] S211、采用乙醇水溶液在常温下润湿Elispot板，随后采用PBS清洗所述Elispot板；

[0030] S212、加IFN  $\gamma$  抗体以包被所述Elispot板，然后加板盖低温孵育过夜，随后用PBS

清洗后加封闭液封闭所述IFN  $\gamma$  抗体未结合的位置,加板盖常温孵育;

[0031] S213、调整所述无血清细胞培养液中的预刺激后的所述外周血单个核细胞的浓度后,随后加入相应的所述肿瘤新生抗原形成混合无血清细胞培养液;

[0032] S214、将所述混合无血清细胞培养液加入到包被好的所述Elispot板的板孔中,加盖板在常温含CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

[0033] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法中,所述步骤S22进一步包括:

[0034] S221、弃除所述无血清细胞培养液,然后采用PBS进行清洗,随后采用清洗液进行清洗;

[0035] S222、随后加入生物素偶联的IFN  $\gamma$  识别抗体,常温孵育;

[0036] S223、采用清洗液进行清洗,然后加入偶联链酶亲和素的辣根过氧化物酶,加板盖进行常温孵育;

[0037] S224、采用清洗液进行清洗,然后加入辣根过氧化物酶的底物,室温避光,然后采用清洗液充分清洗,晾干。

[0038] 本发明解决其技术问题所采用的另一技术方案是:构造一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的试剂盒,包括:肿瘤新生抗原、包被有IFN  $\gamma$  抗体的Elispot板、以及酶联反应试剂;所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVVGAAGVGKSAL的抗原肽,所述酶联反应试剂包括生物素偶联的IFN  $\gamma$  识别抗体、偶联链酶亲和素的辣根过氧化物酶、辣根过氧化物酶的底物,以及助剂。

[0039] 在本发明所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的试剂盒中,所述助剂包括清洗液、PBS、封闭液、无血清细胞培养液。

[0040] 本发明还涉及一种肿瘤疫苗,包括用于扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞的肿瘤新生抗原,所述肿瘤新生抗原包括序列为LSKENSLIIQFTSFVAV的抗原肽和序列为KLVVVGAAGVGKSAL的抗原肽。

[0041] 实施本发明的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法和试剂盒,通过IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法可以高精度地检测出肿瘤新生抗原特异性T细胞,且检测方法简单、结果明确、成本低廉。实施本发明的肿瘤疫苗,可以有效扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞,进而有效用于肿瘤免疫治疗药物的制作。

## 附图说明

[0042] 下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明,附图中:

[0043] 图1是根据本发明的第一实施例的所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法的流程图;

[0044] 图2是根据本发明的第二实施例的所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法的流程图;

[0045] 图3是肿瘤新生抗原特异性T细胞的免疫反应的Elispot图;

[0046] 图4是肿瘤新生抗原特异性T细胞的免疫斑点示意图。

## 具体实施方式

[0047] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0048] 本领域技术人员知悉,在下述实施例中,除特别说明之外,各个试剂、仪器均为市面上可以购得的常规产品。在下述实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。对于下述实施例中的试剂浓度、处理温度以及处理时间,均可以由本领域技术人员根据实际情况加以调节或变化。

[0049] 图1是根据本发明的第一实施例的所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法的流程图。如图1所示,在步骤S1中,在外周血单个核细胞的细胞培养液中加入肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育。在本发明的一个实施例中,可以采用抗原预测软件netMHC4设计所述肿瘤新生抗原。在本发明的另一个实施例中,可以采用现有技术中已知的任何可被肿瘤新生抗原特异性T细胞识别的肿瘤新生抗原。在本发明的一个优选实施例中,所述肿瘤新生抗原具有非同义基因突变的长肽或整个抗原蛋白。在本发明中,可以采用本领域中已知的任何技术和方法获取所述外周血单个核细胞,并采用肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育。

[0050] 在步骤S2中,采用IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞。在受到所述肿瘤新生抗原刺激之后,所述肿瘤新生抗原特异性T细胞分泌的IFN  $\gamma$  可以被细胞周围的IFN  $\gamma$  抗体捕获,通过酶联反应产生新生肉眼可见的免疫斑点,通过统计免疫斑点的数量就可以检测所述肿瘤新生抗原特异性T细胞的数量。

[0051] 因此首先,本发明中的所述肿瘤新生抗原的肽段在于外周血单个核细胞的共孵育过程中,被外周血单个核细胞中的抗原递呈细胞比如树突细胞和B细胞自然切割成与自身主要组织相容性分子相符的抗原片段,递呈给所述肿瘤新生抗原特异性T细胞。因此,所检测到的所述肿瘤新生抗原特异性T细胞识别的所述肿瘤新生抗原的肽段是自然呈现的,并且包括了通过生物信息方法无法预测到的抗原表位,这样能确保所述肿瘤新生抗原特异性T细胞识别的抗原表位的天然性以及全面性。

[0052] 其次,采用IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法可以检测到 $3 \times 10^5$  PBMC中的一个特异性T细胞,因此其敏感性极高,有利于检测到低比例的肿瘤新生抗原特异性T细胞。并且IFN  $\gamma$  酶联免疫斑点法检测的是识别肿瘤抗原后并能分泌功能细胞因子IFN  $\gamma$  的肿瘤新生抗原特异性T细胞,即是功能性检测,直接反应肿瘤新生抗原特异性T细胞的免疫反应。

[0053] 此外,免疫原性好的肿瘤新生抗原是病人癌症细胞区别于正常细胞特有的靶点,可以作为肿瘤疫苗或者用于扩增肿瘤特异性T细胞应用于肿瘤免疫治疗中。

[0054] 图2是根据本发明的第二实施例的所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法的流程图。如图2所示,在步骤S1中,采用抗原预测软件netMHC4设计肿瘤新生抗原。在本发明的一个优选实施例中,可以取肿瘤病人的离体肿瘤组织做基因分析,找出非同义的基因突变位点(包括由于核酸的点突变,插入或者缺失而形成的新氨基酸序列),使用抗原预测软件netMHC4预测包含基因突变位点的全部候选肿瘤新生抗原。随后采用抗原预测软件netMHC4基于其与主要组织相容性分子的结合能力设计并合成包含15-30氨基酸长度的长肽作为肿瘤新生抗原。在设计出肿瘤新生抗原之后,本领域技术人员可以采用现有技术

中的任何已知技术和方法合成纯度>95%的相关肿瘤新生抗原。

[0055] 在步骤S2中,在悬浮所述外周血单个核细胞的细胞培养液中加入所述肿瘤新生抗原进行预刺激并进行培养。在本发明的一个实施例中,从外周血分离出外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells,PBMC)用无血清细胞培养液悬浮,加入肿瘤新生抗原肽(包含突变位点的15-30氨基酸长肽)预刺激,在37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱共培养2天。在本实施例中,刺激培养时间可以根据实际情况进行调整。

[0056] 在步骤S3中,将预刺激后的所述外周血单个核细胞转移到包被有IFN $\gamma$ 抗体的容器内,加入所述肿瘤新生抗原进行孵育1天,从而使得受到所述肿瘤新生抗原刺激后的肿瘤新生抗原特异性T细胞分泌IFN $\gamma$ 。孵育时间可以根据实际情况进行调整。

[0057] 在步骤S4中,所述肿瘤特异性T细胞分泌的IFN $\gamma$ 被细胞周围的IFN $\gamma$ 抗体捕获,通过酶联反应产生肉眼可见的免疫斑点。

[0058] 在步骤S5中,统计所述免疫斑点的数量,以基于所述免疫斑点的数量检测所述肿瘤新生抗原特异性T细胞的数量。所述肿瘤新生抗原特异性T细胞的数量反映病人外周血对新生肿瘤的免疫反应强弱。

[0059] 因此首先,本发明中的所述肿瘤新生抗原的肽段在于外周血单个核细胞的共孵育过程中,被外周血单个核细胞中的抗原递呈细胞比如树突细胞和B细胞自然切割成与自身主要组织相容性分子相符的抗原片段,递呈给所述肿瘤新生抗原特异性T细胞。因此,所检测到的所述肿瘤新生抗原特异性T细胞识别的所述肿瘤新生抗原的肽段是自然呈现的,并且包括了通过生物信息方法无法预测到的抗原表位,这样能确保所述肿瘤新生抗原特异性T细胞识别的抗原表位的天然性以及全面性。

[0060] 其次,采用IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法可以检测到 $3 \times 10^5$ PBMC中的一个特异性T细胞,因此其敏感性极高,有利于检测到低比例的肿瘤新生抗原特异性T细胞。并且IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法检测的是识别肿瘤抗原后并能分泌功能细胞因子IFN $\gamma$ 的肿瘤新生抗原特异性T细胞,即是功能性检测,直接反应肿瘤新生抗原特异性T细胞的免疫反应。肿瘤新生抗原特异性T细胞的免疫反应可以通过肉眼可见的免疫斑点表示,快速简单地定量检测病人外周血中肿瘤新生抗原的免疫原性以及肿瘤病人外周血中针对肿瘤新生抗原的免疫反应。

[0061] 此外,免疫原性好的肿瘤新生抗原是病人癌症细胞区别于正常细胞特有的靶点,可以作为肿瘤疫苗或者用于扩增肿瘤特异性T细胞应用于肿瘤免疫治疗中。

[0062] 并且,肿瘤新生抗原采用生物信息方法预测并合成,方法简单。肿瘤新生抗原的切割以及递呈在抗原递呈细胞内自然完成,不需要花费高额费用合成MHC-抗原肽的多聚体。

[0063] 下面将以实施例的方式详细对根据本发明的第三实施例的所述的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法做进一步的介绍。

[0064] 实施例1、肿瘤新生抗原的预测和合成

[0065] 取离体肿瘤组织做基因组分析,找出非同义的基因突变位点(包括由于核酸的点突变,插入或者缺失而形成的新氨基酸序列),使用抗原预测软件netMHC4基于包含所述非同义基因突变位点的抗原与相应的主要组织相容性分子的结合能力选择结合能力最好的抗原肽序列作为候选的肿瘤新生抗原肽。候选的肿瘤新生抗原肽与相应MHC的结合能力通过达到稳定MHC-抗原肽结合所需要的抗原肽最低浓度表示。浓度越低,表示抗原肽与MHC分子的结合越稳定,它的抗原原性就越强,能更好地刺激特异性T细胞的增殖。

[0066] 然后采用抗原预测软件netMHC4从所述抗原肽序列中选择出其与相应的主要组织相容性分子的结合能力明显高于其对应的非基因突变位点与相应的主要组织相容性分子的结合能力的抗原肽序列作为所述肿瘤新生抗原。即从候选的肿瘤新生抗原肽中筛选与相应MHC分子的结合力明显高于对应的非突变肽(即原生肽)与MHC分子的结合力的抗原肽序列作为所述肿瘤新生抗原。确定候选的肿瘤新生抗原肽是肿瘤细胞特有的靶点,可以刺激产生肿瘤细胞靶向的特异性免疫反应,而不会识别表达原生肽的正常细胞。

[0067] 附表1是采用netMHC4软件筛选出来的两个肿瘤新生抗原肽和它们对应原生肽的肽序列。如附表2所示,这两个肿瘤新生抗原肽与相应MHC分子的结合力都高于对应的原生肽与MHC分子的结合力,表示这两个突变产生了所需的肿瘤新生抗原。

[0068] 表1预测的肿瘤新生抗原及其对应原生肽的氨基酸序列

		肽序
[0069]	肿瘤抗原1	新生肽 LSKENSLI <u>I</u> QFTSFVAV
		原生肽 LSKENSLITQFTSFVAV
	肿瘤抗原2	新生肽 KLVVVGA <u>A</u> GVGKSAL
		原生肽 KLVVVGAGGVGKSAL

[0070] 注:粗体并加下画线的氨基酸为肿瘤新生抗原的突变位点

[0071] 表2预测的肿瘤新生抗原与相应MHC的结合能力(Kd,nM\*)

	新生肽	原生肽
[0072]	肿瘤抗原1	9 nM
	肿瘤抗原2	16 nM
		27 nM
		57 nM

[0073] \*:潜在肿瘤新生抗原肽与相应的MHC的结合能力通过达到稳定的MHC-抗原肽结合所需要的抗原肽最低浓度表示,浓度越低,表示肽与MHC分子的结合越稳定,潜在抗原原性就越强。

[0074] 在预测包含突变位点的肿瘤新生抗原,设计如表1所示的包含肿瘤新生抗原肽的15-30氨基酸长度的长肽,送交肽合成的生物公司合成纯度>95%的肿瘤新生抗原肽备用。

[0075] 实施例2肿瘤新生抗原肽预刺激

[0076] 同一例肿瘤病人在知情告知情况下,用肝素钠抗凝管抽取病人外周静脉血10mL。用淋巴细胞分离液(Fresenius Kabi Norge AS,Lymphoprep™)通过密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞PBMC后,用新鲜的无血清培养液(Life Technology公司的AIM-V)悬浮,细胞密度在 $1-3 \times 10^6$ /mL。在无血清培养液中,加入上述肿瘤新生抗原肽或者对应的原生肽(1-10 $\mu$ g/mL),在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养36-48h。检测病人PBMC对原生肽的免疫反应是为了检验是否对肿瘤新生抗原的免疫反应是靶向突变序列,以确定肿瘤新生抗原特异性T细胞只特异性靶向识别突变细胞即癌细胞而不杀伤正常细胞。另外加入一个无相关肽(比如HIV病毒的包膜蛋白的一个肽段)作为阴性对照,不加肽作为空白对照,用来评估PBMC中免疫反应的背景水平。

[0077] 实施例3采用IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞(U-CyTech BV,CT230-PR5)

[0078] 操作流程参考试剂盒使用手册。具体实验流程如下:

[0079] 用70%乙醇水溶液在常温润湿Elispot板1小时,随后采用PBS清洗2遍后,加IFN $\gamma$

包被抗体包被Elispot板,加板盖4℃孵育过夜,用PBS清洗3遍,加封闭液封闭所述IFN $\gamma$ 抗体未结合的位置,加板盖37℃孵育1小时;

[0080] 调整预刺激过的PBMC浓度为 $1-3 \times 10^6$ /ml,分别加入相应的1-10 $\mu$ g/mL肿瘤新生抗原(表1中的新生肽1、新生肽2)、肿瘤原生抗原(表1中的原生肽1和原生肽2)、对照肽段(比如HIV病毒的包膜蛋白的一个肽段)的无血清细胞培养液以及空白的无血清细胞培养液;每孔加100 $\mu$ l无血清细胞培养液到包被好的Elispot板上(即每孔 $1-3 \times 10^5$ 细胞、每一条抗原肽做2-3个平行孔),加板盖37℃,5%CO<sub>2</sub>培养16-24h;

[0081] 弃除所述无血清细胞培养液,先用PBS清洗2遍,再用清洗液洗5遍,加入生物素偶联的IFN $\gamma$ 识别抗体,在37℃孵育1小时;

[0082] 用清洗液洗5遍,加入偶联链酶亲和素的辣根过氧化物酶,加盖37℃孵育1小时;

[0083] 用清洗液洗5遍,加入辣根过氧化物酶的底物,室温避光25-50分钟,用清水充分清洗板的正反面,晾干。

[0084] 用Elispot板分析器统计孔内免疫斑点数(如附图3所示),结合每孔中PBMC的细胞总数,计算出一定数目PBMC中特异性识别肿瘤新生抗原并分泌功能细胞因子IFN $\gamma$ 的肿瘤新生抗原特异性T细胞的数目,即识别肿瘤新生抗原特异性T细胞的比例,比例越高说明外周血中针对肿瘤新生抗原的免疫反应越强,肿瘤新生抗原的免疫原性也越强。

[0085] 如附图3-4所示,本案例中的肿瘤病人外周血中能识别非突变的两个原生肿瘤肽并分泌IFN $\gamma$ 的免疫细胞数目跟阴性对照没有明显差异,所以原生肽没有有效刺激肿瘤特异性T细胞的能力,即没有免疫原性。而能识别两个肿瘤新生抗原肽并分泌功能细胞因子IFN $\gamma$ 的免疫细胞数目明显高于针对它们对应的非突变原生肽或者阴性对照,特别是针对新生肽1的免疫斑点非常明显(附图3),表明这两个潜在肿瘤新生抗原具有免疫原性,能刺激病人外周血中特异性的T细胞,可用于制备肿瘤特异性T细胞或者肿瘤疫苗应用于肿瘤免疫治疗。

[0086] 综上所述,本发明公开了使用IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点技术检测肿瘤病人外周血中肿瘤新生抗原特异性T细胞反应,确定肿瘤新生抗原的免疫原性,为病人的肿瘤免疫治疗找寻有效的靶点,应用于临床免疫治疗药物的制作。

[0087] 本发明进一步公开候选的肿瘤新生抗原采用生物信息方法预测并合成,方法简单。新生抗原的切割以及递呈在抗原递呈细胞内自然完成,不需要花费高额费用合成MHC-抗原肽的多聚体。新生抗原特异性T细胞的免疫反应可以通过肉眼可见的免疫斑点表示,很直观地反映肿瘤新生抗原的免疫原性以及肿瘤病人外周血中针对肿瘤新生抗原的免疫反应。免疫原性好的肿瘤新生抗原是病人癌症细胞区别于正常细胞特有的靶点,可以作为肿瘤疫苗或者用于扩增肿瘤特异性T细胞应用于肿瘤免疫治疗药物的制作中。

[0088] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

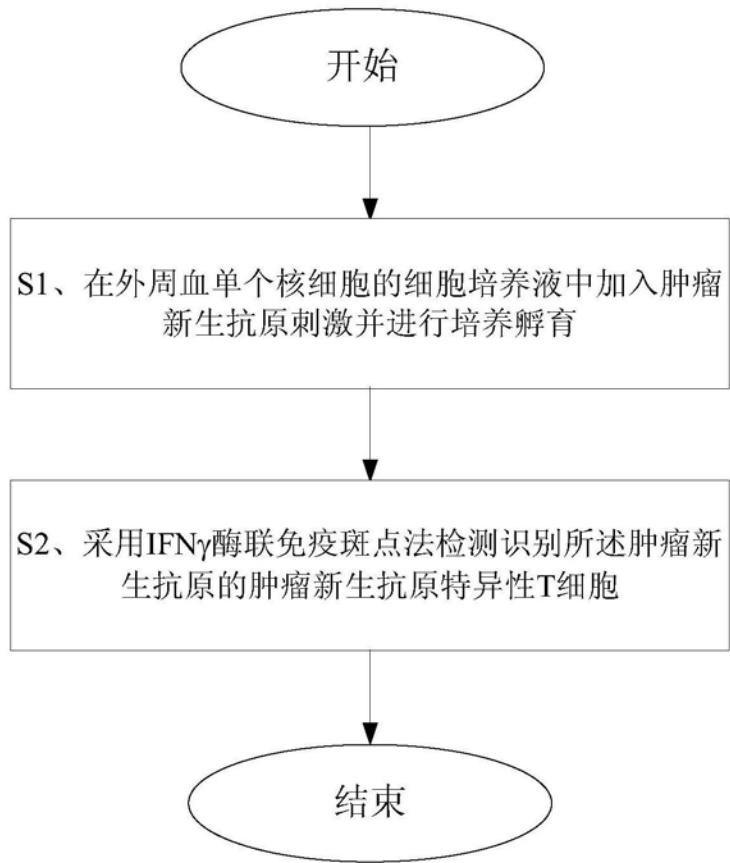


图1

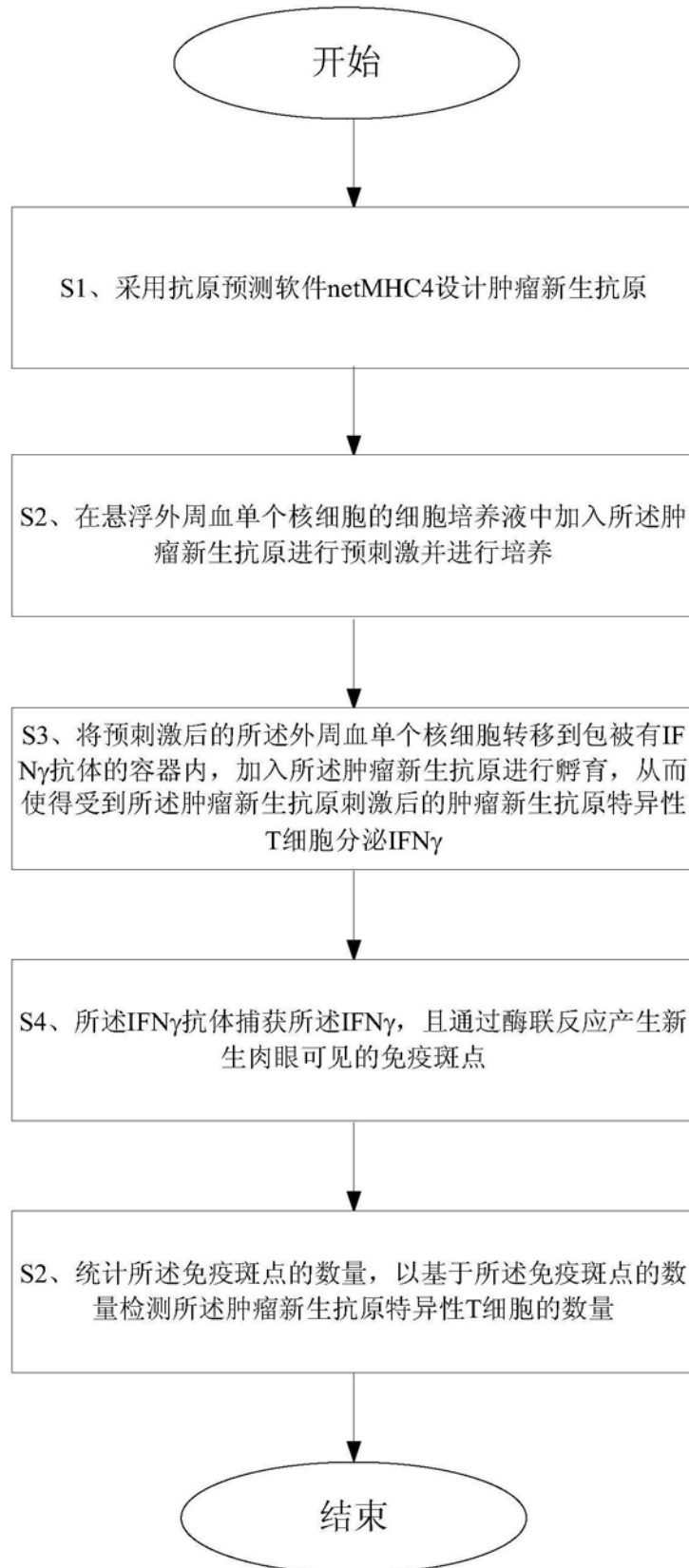


图2

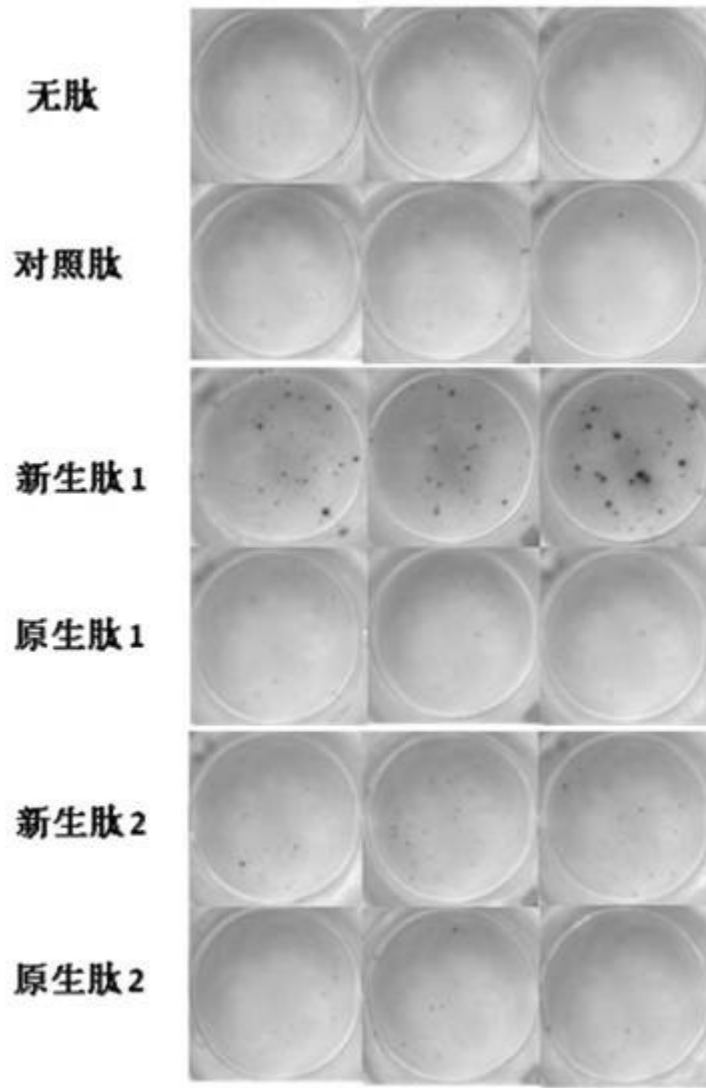


图3

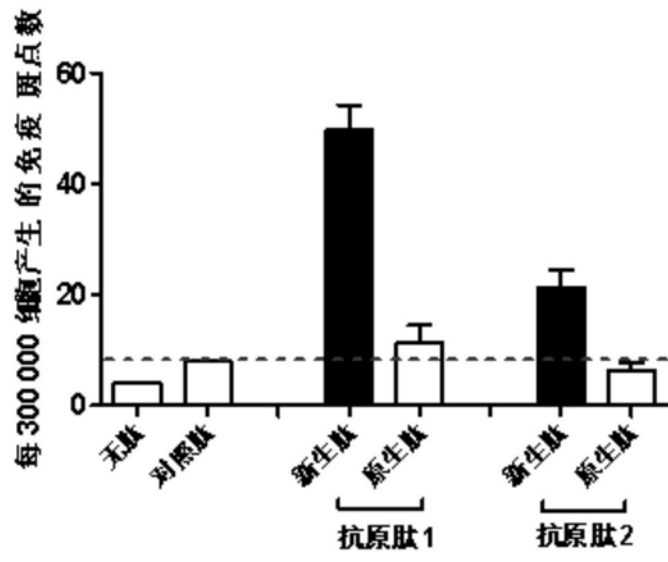


图4

专利名称(译)	体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒以及肿瘤疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645677B</a>	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201611022501.5	申请日	2016-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	恒瑞源正(深圳)生物科技有限公司 深圳源正细胞医疗技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	恒瑞源正(深圳)生物科技有限公司 深圳源正细胞医疗技术有限公司		
[标]发明人	韩研妍 梁小玲 陈锡和 马民骏 唐龙清 周向军		
发明人	韩研妍 梁小玲 陈锡和 马民骏 唐龙清 周向军		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 A61K39/00 A61P35/00		
CPC分类号	A61K39/0011 G01N33/505 G01N33/53 A61K2300/00		
其他公开文献	CN106645677A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法、试剂盒以及肿瘤疫苗。所述体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法，包括：  
S1、在外周血单个核细胞的细胞培养液中加入肿瘤新生抗原刺激并进行培养孵育；S2、采用IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法检测识别所述肿瘤新生抗原的肿瘤新生抗原特异性T细胞。实施本发明的体外检测肿瘤新生抗原特异性T细胞的方法和试剂盒，通过IFN $\gamma$ 酶联免疫斑点法可以高精度地检测出肿瘤新生抗原特异性T细胞，且检测方法简单、结果明确、成本低廉。实施本发明的肿瘤疫苗，可以有效扩增肿瘤新生抗原特异性T细胞，进而有效用于肿瘤免疫治疗药物的制作。

