

APPLICATION NOTE

在 SpectraMax 微孔读板机上用报告生物分析法鉴定生物制剂对免疫检查点的阻断作用

Cathy Olsen, PhD | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

Zhijie Jey Cheng, PhD | R&D Manager and Sr. Research Scientist III | Promega Corporation

简介

免疫检查点受体是治疗包括肿瘤和自身免疫病等多种疾病的非常具有前景的免疫治疗靶点。几种共抑制受体，如程序性细胞死亡蛋白 (PD-1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4)、具有免疫球蛋白的 T 细胞免疫受体及酪氨酸基抑制基序免疫受体 (TIGIT)、T 细胞免疫球蛋白和包含粘蛋白结构域-3 (TIM-3) 以及淋巴细胞活化基因-3 (LAG-3) 已被识别为单克隆抗体阻断共抑制信号的靶点，从而启动了对癌症的积极免疫治疗。

此外，联合应用免疫治疗靶点的临床前研究表明，这些药物协同作用于 T 细胞活化、抗肿瘤反应和患者生存。同时抑制一种或两种免疫检查点受体的治疗药物的开发对体外检测提出了更高的挑战。目前用于检测针对免疫检查点的药物活性的方法依赖于人的原代 T 细胞和功能终点的测定，如细胞增殖、细胞表面标记物的表达、干扰素 γ 和白细胞介素 2 的产生。由于这些试验依赖于供体原代细胞、复杂的检测方案和无法确定质量的分析试剂，所以费时费力且很不稳定。

Promega 公司已经开发了一套功能性的报告生物试验，以使各种免疫检查点靶点的研究和药物开发成为可能，包括此应用文献中提及的两个靶点，TIGIT 和 CTLA-4。每个试剂盒都提供解冻即可使用的细胞，避免了原代细胞培养的需要，使获得结果的时间更短。

TIGIT/CD155 阻断剂生物测定法由两种基因工程细胞系组成：TIGIT 效应细胞，带有荧光素酶报告基因表达人 TIGIT 的 Jurkat T 细胞，此报告基因可被启动子驱动表达，可对 TCR 活化和 CD226 共刺激作出应答；以及 CD155 aAPC/CHO-K1 细胞，CHO-K1 细胞被设计表达 CD155，并带有不依赖抗原方式激活 TCR 复合物的工程细胞表面蛋白。当这两种类型细胞共培养时，TIGIT 抑制 CD226 的活化以及启动子介导的发光反应。添加抗 TIGIT 抗体阻断 TIGIT 与 CD155 的相互作用或抑制 TIGIT 的功能以避免 CD226 的同二聚化，最终都会产生启动子介导的发光信号 (图 1)。

优势

- 轻松测定用于阻断免疫检查点信号的生物制剂的有效性和稳定性
- 减少手工操作时间，提高解冻即可使用的检测方式的分析重现性
- 通过荧光素酶报告基因获得稳定的实验表现
- 使用多用途的多功能读板机实现高灵敏度
- 采用自动化数据分析以更快获得结果

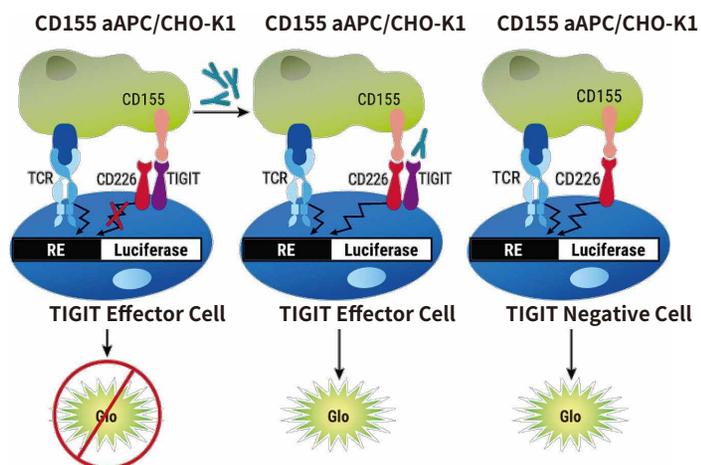


图 1 TIGIT/CD155 阻断剂生物测定法原理。生物测定法由两种基因工程细胞系组成，TIGIT 效应细胞和 CD155 aAPC/CHO-K1 细胞。左：当共培养时，TIGIT 抑制 CD226 通路激活的发光反应。添加抗 TIGIT 抗体可阻断 TIGIT/CD155 相互作用，从而重新建立 CD226 通路激活的发光反应，此发光信号可通过加入 Blo-Glo™ 试剂以剂量依赖方式被发光检测仪探测并定量。中：当与无 TIGIT 表达的效应细胞共培养时，CD155 诱导通过 CD226 通路激活的发光反应。(图示由 Promega 公司提供)

CTLA-4 阻断剂生物测定法同样由两种基因工程细胞系组成：CTLA-4 效应细胞，包含可稳定表达人 CTLA-4 和可被启动子驱动表达的荧光素酶报告基因的 Jurkat T 细胞，其可对 TCR/CD28 活化作出应答；以及 aAPC/Raji 细胞，Raji 细胞表达一种设计用于以不依赖抗原方式激活同源 TCRs 的工程细胞表面蛋白并且内源性表达 CTLA-4 的配体 CD80 和 CD86。当这两种类型细胞共培养时，CTLA-4 与 CD28 竞争结合它们的共同配体，CD80 和 CD86，因此可抑制 CD28 通路的激活以及启动子介导的发光反应。添加抗 CTLA-4 抗体可阻断 CTLA-4 与配体 CD80 和 CD86 的相互作用并最终产生启动子介导的发光信号（图 2）。

得益于它们稳定的发光信号，这两种测定方法都很容易在具有发光检测功能的微孔读板机上检测到。我们比较了上述两种实验在 Molecular Devices 公司多台微孔读板机上的检测表现。它们包括 SpectraMax® iD3 多功能微孔读板机、SpectraMax® L 微孔读板机、SpectraMax® i3x 多功能微孔读板机和 SpectraMax® M5 多功能微孔读板机。所有的读板机均使用 SoftMax® Pro 软件操作运行，此软件也内置有数据分析和能够自动计算 EC₅₀ 效应值的曲线拟合功能，并可进行简单的数据集比较。

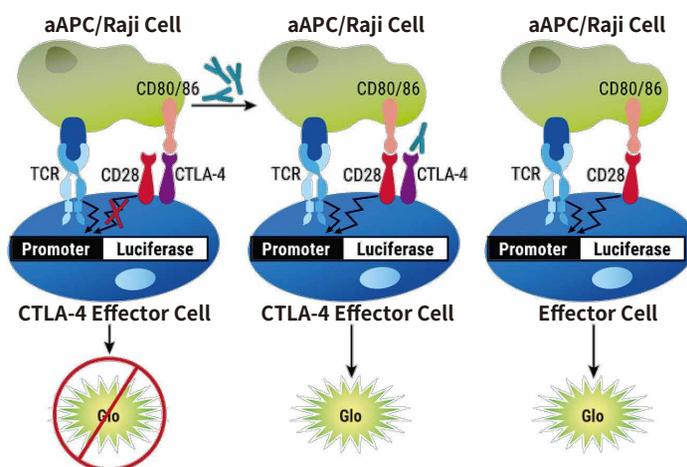


图 2 CTLA-4 阻断剂生物测定法原理。生物测定法由两种基因工程细胞系组成，CTLA-4 效应细胞和 aAPC/Raji 细胞。左：当共培养时，CTLA-4/CD80和CD86 相互作用抑制 CD28 通路激活的发光反应。添加抗 CTLA-4 抗体可阻断 CTLA-4/CD80 和 CD86 相互作用，从而重新建立 CD28 通路激活的发光反应，此发光信号可通过加入 Blo-Glo™ 试剂以剂量依赖方式被发光检测仪探测并定量。中：当与无 CTLA-4 表达的效应细胞共培养时，会通过 CD28 通路激活同样诱导产生发光反应，但是以不依赖于抗 CTLA-4 抗体的方式。（图示由 Promega 公司提供）

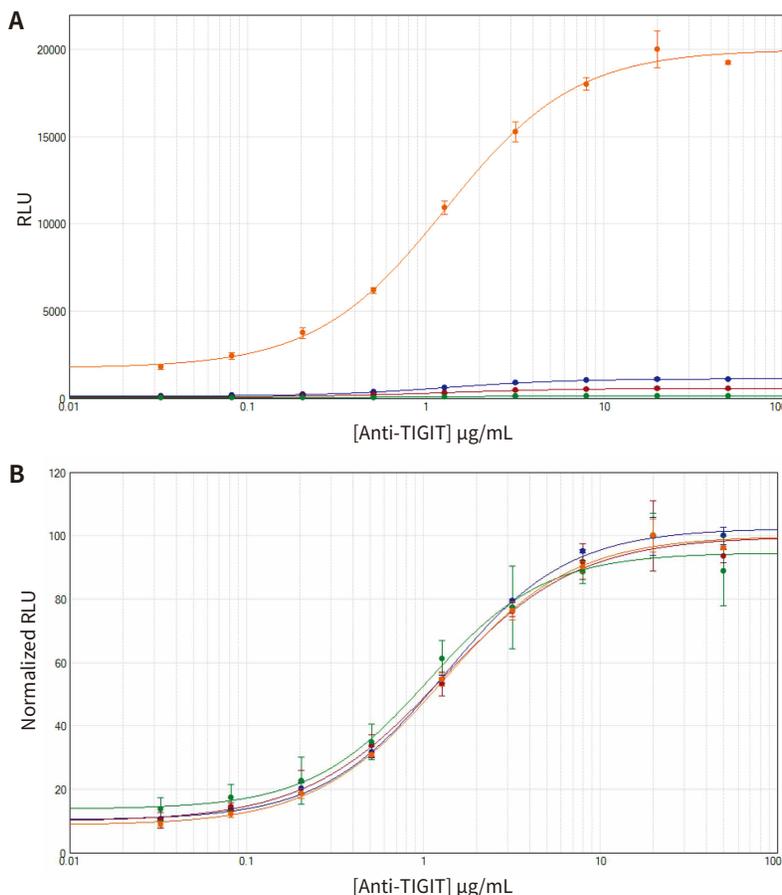


图 3 对照抗体的应答测定，在 TIGIT/CD155 阻断实验中抗 TIGIT。解冻即可使用的 TIGIT 效应细胞铺板并孵育过夜。第二天，加入对照抗体、抗 TIGIT，然后加入 CD155 aAPC/CHO-K1 细胞。37°C 孵育 6 小时后，加入 Bio-Glo Luciferase Assay 试剂并检测。RLU 值 (A) 和标准化的 RLU 值 (B) 由 SpectraMax 读板机获得 (橙色, SpectraMax L; 蓝色, SpectraMax iD3; 红色, SpectraMax i3x; 绿色, SpectraMax M5)。由 SoftMax Pro 软件进行四参数曲线分析。

材料

TIGIT/CD155 实验

- TIGIT/CD155 阻断剂生物测定法 (Promega cat. #J2201, J2205)
- Control Ab, Anti-TIGIT (Promega cat. #J2051)

CTLA-4 assay

- CTLA-4 阻断剂生物测定法 (Promega cat. #JA3001, JA3005)
- Control Ab, Anti-CTLA-4 (Promega cat. #JA1020)

其他材料和设备

- 白色, 组织培养处理的, 平底 96 孔检测板 (Corning cat. #3917)
- CO₂ 孵箱, 37°C, 5% CO₂, 湿度保持
- SpectraMax® iD3 多功能微孔读板机 (cat. #ID3-STD)
- SpectraMax® i3x 多功能微孔读板机 (cat. #i3X)
- SpectraMax® M5 多功能微孔读板机 (cat. #M5)
- SpectraMax® L 微孔读板机 (cat. #SpectraMax L Config)

方法

TIGIT/CD155 阻断剂生物测定法

检测前一天, 按照产品技术手册描述准备实验缓冲液。将一管解冻即用型 TIGIT 效应细胞解冻并重悬于细胞复苏培养基中。细胞悬液添加到 96 孔白色平底检测板的 60 个孔中。板子在 CO₂ 孵箱中 37°C 孵育过夜。

检测当天, 将准备好的一系列稀释的对照抗体、抗 TIGIT 制作成 10 个数据点的剂量应答曲线。将一管解冻即用型 CD155 aAPC/CHO-K1 细胞解冻并重悬于实验缓冲液中。从孵箱中取出包含 TIGIT 效应细胞的检测板。将系列稀释的对照抗体加入到含有 TIGIT 效应细胞的孔中, 再加入 CD155 aAPC/CHO-K1 细胞。板子加盖孵育在 37°C、5% CO₂ 加湿孵箱中 6 小时。

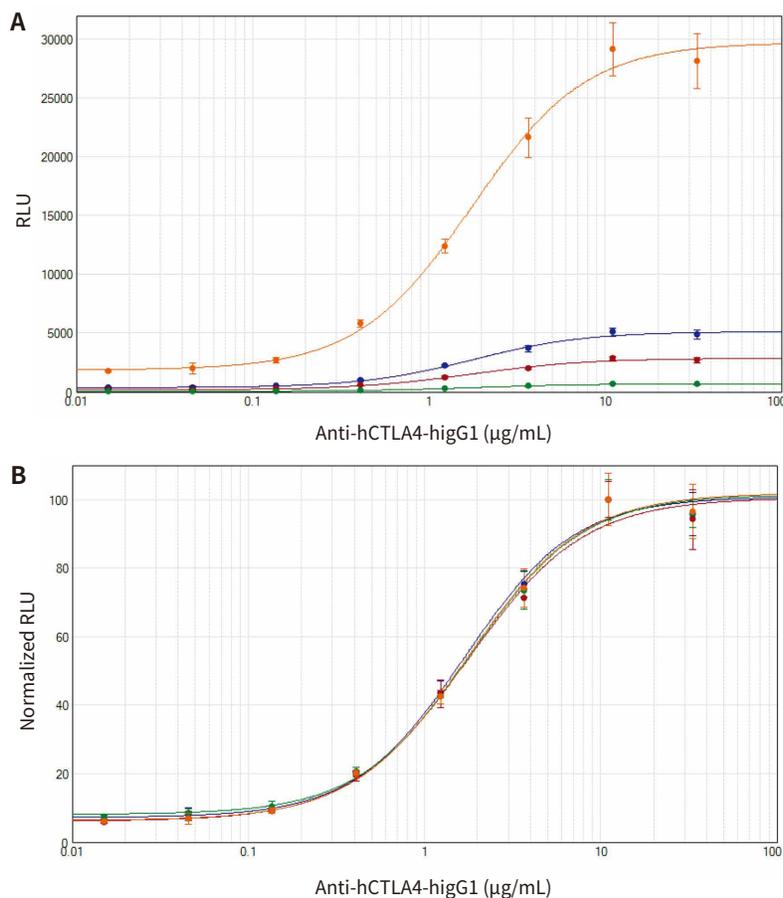


图 4 对照抗体、抗 CTLA-4 在 CTLA-4 阻断检测中的实验应答。解冻即用型 CTLA-4 效应细胞接种于白色 96 孔检测板中。系列稀释的对照抗体、抗 CTLA-4 加入到 CTLA-4 效应细胞中。然后将 aAPC/Raji 细胞添加到检测板的 CTLA-4 效应细胞和抗体中。在 37°C/5% CO₂ 孵育 16 小时后, 加入 Bio-Glo Luciferase Assay Reagent, 并测定发光信号。RLU 值 (A) 和标准化 RLU 值 (B) 由 SpectraMax 读板机获得 (橙色, SpectraMax L; 蓝色, SpectraMax iD3; 红色, SpectraMax i3x; 绿色, SpectraMax M5)。通过 SoftMax Pro 软件进行四参数逻辑曲线分析。

	Reader	Uninduced RLU	EC ₅₀ response (µg/mL)
TIGIT/CD155 Blockade Bioassay	SpectraMax® iD3	104.5	1.31
	SpectraMax® L	1762.4	1.28
	SpectraMax® i3x	49.7	1.26
	SpectraMax® M5	18.1	1.05
CTLA-4 Blockade Bioassay	SpectraMax® iD3	369.0	1.69
	SpectraMax® L	1862.3	1.76
	SpectraMax® i3x	175.7	1.76
	SpectraMax® M5	57.1	1.82

表 1 SpectraMax 读板机上决定 EC₅₀ 应答。TIGIT/CD155 和 CTLA-4 阻断剂生物测定法的结果由 SoftMax Pro 软件计算得出。

CTLA-4 测定

检测当天，实验缓冲液按照产品册描述的来准备。将准备好的一系列稀释的对照抗体、抗 CTLA-4 制作成一条完整的剂量应答曲线。抗体稀释液留作之后加入细胞之用。将一管解冻即用型 CTLA-4 效应细胞解冻并重悬于实验缓冲液中。将细胞悬液添加到 96 孔白色平底检测板的 60 个孔中，接着加入系列稀释的对照抗体。

将一管解冻即用型 aAPC/Raji 细胞解冻并重悬于实验缓冲液中。细胞悬液添加到已含有 CTLA-4 效应细胞和抗体混合物的检测板的 60 个孔中。板子加盖孵育在 37°C、5% CO₂ 加湿孵育箱中 16 小时。

Bio-Glo Luciferase Assay 检测

在检测的孵育期间，Bio-Glo™ Luciferase Assay Buffer 孵育至室温。Bio-Glo™ Luciferase Assay System 的再生通过将一瓶 Bio-Glo 缓冲液转移到含有 Bio-Glo™ Substrate 的瓶中进行。

经过 6 或 16 小时的孵育后，检测板平衡 10-15 分钟至室温。将相同体积再生的 Bio-Glo™ Reagent 加入到每个含有细胞的孔中。板子室温下孵育 5-10 分钟。使用 Molecular Devices 微孔读板机的发光检测功能测定发光信号，一秒整合时间。

数据分析

标准化 RLU 值是通过将每个仪器获得的最大 RLU 值设置为 100% 来计算的，相应地缩放剩余的 RLU 值。数据显示为原始 RLU 或标准化 RLU 与抗体浓度之间的关系。使用 SoftMax Pro 软件的内置数据分析和四参数逻辑曲线拟合获得 EC₅₀ 值。

结果

孵育 6 或 16 小时后，荧光素酶活性在 SpectraMax 读板机上用发光检测功能测定。使用 SoftMax Pro 软件的 4 参数曲线拟合绘制原始 RLU 和标准化 RLU 值 (图 3A 和 3B, 4A 和 4B)。本次所有检测中，SpectraMax L 读板机给出了最高的 RLU 值，而 SpectraMax M5 读板机给出了最低 RLU 值 (表 1)。标准化的 RLU 值显示所有仪器的数据都是相似的。对于所有读板机，观察到的 EC₅₀ 值是极其相近的，抗 TIGIT 抗体的范围从 1.05 to 1.31 µg/mL，抗 CTLA-4 抗体的范围从 1.69 to 1.82 µg/mL (表 1)。

总结

TIGIT/CD155 和 CTLA-4 阻断剂生物测定法为使用者提供了一种生物相关的方法来测量生物的作用机制。这些生物测定法通过使用工程效应细胞和 aAPC 细胞组合成一种简单的添加-混合-读数工作流程。这些生物分析方法简单、可靠，并符合国际人类用药技术要求协调理事会 (ICH) 指南的要求，并符合了常规药效和稳定性研究所需的精度、准确性和线性的要求。检测的时间可以根据仪器不同有所改变，决定使用多久的检测时间将在一定程度上取决于发光读板机的灵敏度，除了偏好的工作流程外。利用解冻即用型细胞，无需细胞培养，且这些实验很容易以 96 或 384 孔格式实现。此实验可靠、重现性好并基于发光信号读取，使其适合与各种 SpectraMax® 读板机联合使用。Softmax Pro 软件新增的快速、方便的工作流程方式，能够方便的自动获取数据分析并进行图形绘制。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

上海 电话: 86-21-3372 1088

传真: 86-21-3372 1066

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

北京 电话: 86-10-6410 8669

传真: 86-10-6410 8601

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

成都 电话: 86-28-6558 8820

传真: 86-28-6558 8831

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

台北 电话: 886-2-2656 7585

传真: 886-2-2894 8267

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

香港

传真: 852-2289 5385

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

