



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111004805 A

(43)申请公布日 2020.04.14

(21)申请号 201911400633.0

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2019.12.30

(71)申请人 广西医科大学

地址 530001 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路22号

(72)发明人 赵永祥 李大力 程亮 彭睿

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 张锋

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

C12N 15/10(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

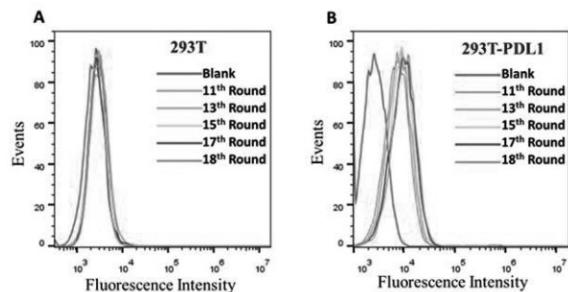
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用

(57)摘要

本发明属于生物医学领域,尤其是涉及T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用,包括以下步骤:1)筛选文库及引物;2)对文库进行处理;3)进行流式细胞术检测文库富集;4)进行TA克隆测序;5)平衡解离常数检测;6)六条候选适配体的结合能力检测;7)温度对适配体结合能力的影响;8)截短优化适配体序列,本发明具有便携化、操作简单、成本低等特点,可以在人体抗肿瘤临床中试验应用,为人类对抗肿瘤的临床使用提供了一种很好的方法。



1. 一种T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 筛选所用的DNA寡核苷酸文库、引物、相关细胞及试剂;

2) 对以上所述步骤1)的DNA寡核苷酸文库进行处理,采用筛选法,前两轮运用正向筛选法,自第三轮的筛选起,反向筛选,再进行正向筛选,得到单链DNA干粉,置于-20℃温度中保存;

3) 将以上所述步骤2)得到的单链DNA干粉进行流式细胞术检测文库富集;

4) 进行TA克隆测序;

5) 平衡解离Kd值常数检测;

6) 六条候选适配体的结合能力检测,根据平衡解离常数检测及结合能力检测,筛选,得到hPDL1-6作为PDL1蛋白的核酸适配体;

7) 温度对适配体结合能力的影响. 将正筛选细胞与hPDL1-6适配体分别在4℃和37℃下共孵育30min,孵育完毕后进行流式检测;

8) 截短优化适配体序列。

2. 根据权利要求1所述T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,其特征在于:所述TA克隆测序中的PD-L1的适配体,是1~9条序列中的核苷酸序列中的任意一条或几条序列。

3. 根据权利要求1所述T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,其特征在于:所述截短优化的适配体为PD-L1蛋白的核酸适配体,是7~9条序列中的核苷酸序列中的任意一条或几条序列。

4. 一种T细胞免疫检查点PD-L1的适配体的应用,其特征在于:如权利要求1所述的T细胞免疫检查点PD-L1的适配体在抗肿瘤临床中应用。

# T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用

## 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,尤其是涉及T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用。

## 背景技术

[0002] 核酸适配体能与多种目标物质高特异性、高选择性地结合,它是一种能够特异性结合靶分子的单链寡核苷酸,常被称为“化学抗体”,由体外构建的寡核苷酸文库筛选获得。与抗体相比,核酸适配体在科学的研究中体现出了一系列优势,例如:无免疫原性、结构灵活、稳定性好、易于获得、易修饰、靶标范围广泛等。由于适配体良好的结构识别作用,它们已迅速成为成像工具和靶向剂,应用于肿瘤的诊断与治疗中。

[0003] PD-1 / PD-L1途径可诱导免疫耐受和免疫逃逸,尤其是在肿瘤微环境中,癌细胞能够通过上调PD-1或PD-L1的表达水平来逃避免疫监视。因此,PD-L1适配体可被开发成人类癌症免疫的治疗药物,因此,采用一种合理的细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,是本领域技术人员亟待解决的难题。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对上述存在的科学问题,提供T细胞免疫检查点PD-1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用。

[0005] 本发明的技术方案如下所示:

本发明的一种T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,其特征在于:包括以下步骤:

1)筛选所用的DNA寡核苷酸文库、引物、相关细胞及试剂。

[0006] 2)对以上所述步骤1)的DNA寡核苷酸文库进行处理,采用筛选法,前两轮运用正向筛选法,自第三轮的筛选起,反向筛选,再进行正向筛选,得到单链DNA干粉,置于-20℃温度中保存。

[0007] 3)将以上所述步骤2)得到的单链DNA干粉进行流式细胞术检测文库富集。

[0008] 4)进行TA克隆测序。

[0009] 5)平衡解离Kd值常数检测。

[0010] 6)六条候选适配体的结合能力检测,根据平衡解离常数检测及结合能力检测,筛选,得到hPDL1-6作为PDL1蛋白的核酸适配体。

[0011] 7)温度对适配体结合能力的影响。将正筛选细胞与hPDL1-6适配体分别在4℃和37℃下共孵育30min,孵育完毕后进行流式检测。

[0012] 8)截短优化适配体序列。

[0013] 所述所述TA克隆测序中的PD-L1的适配体,是1~9条序列中的核苷酸序列中的任意一条或几条序列。

[0014] 所述所述截短优化的适配体为PD-L1蛋白的核酸适配体,是7~9条序列中的核苷酸序列中的任意一条或几条序列。

[0015] 所述T细胞免疫检查点PD-L1的适配体的应用,其特点是:以上所述T细胞免疫检查点PD-L1的适配体在抗肿瘤临床中应用。

[0016] 本发明突出的实质性特点和显著的进步是:

1. 本发明的T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法具有便携化、操作简单、成本低等特点。

[0017] 2. 本发明所述的T细胞免疫检查点PD-L1的适配体可以在抗肿瘤临床中进行试验应用,扩大了核酸适配体的应用范围,给众多的肿瘤癌症病痛的患者带来新的希望,特别是让那些忍受不了西医手术、放化疗等治疗手段的患者赋以新的治疗方法。

## 附图说明

[0018] 图1是将干燥后的FAM标记的双链DNA,以250nM的浓度分别与正筛细胞和反筛细胞孵育30min后进行流式检测的结果图。

[0019] 图2是衡解离常数(Kd值)检测的结果图。

[0020] 图3是六条候选适配体的结合能力检测结果图。

[0021] 图4是将正筛细胞与hPDL1-6适配体分别在4℃和37℃下共孵育30min,孵育后进行流式检测的结果图。

[0022] 图5是将正反筛细胞分别与截短后的三条适配体在4℃共孵育30min,孵育后进行流式检测的结果图。

[0023] 图6 正筛细胞分别与hPDL1-6、hPDL1-6a、hPDL1-6b、hPDL1-6c等四条适配体在4℃共孵育30min,孵育后进行流式检测各条适配体的结合率结果图。

## 具体实施方式

[0024] 下面对本发明的实施操作做详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施案例。

[0025] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

## 实施例

[0026] 本发明的T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,包括以下步骤:

### 1. 筛选所用文库及引物

筛选所用的DNA寡核苷酸文库,总长度为81个核苷酸(81bp),引物包括无标记的正向引物(Forward Primer, FP)、无标记的反向引物(Reverse Primer, RP)、羧基荧光素标记的正向引物(FAM-Forward Primer, FAM-FP)、生物素标记的反向引物(Biotin-Reverse Primer, Bio-RP),所涉及序列由上海生工生物工程有限公司合成。具体序列如下表1所示:

表1 DNA文库与引物

序列名称	核酸序列
Random library	5' -ATA CCA GCT TAT TCA ATT- N45-AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

FP	5' -ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3'
RP	5' -AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3'
FAM-FP	5' -FAM-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3'
Bio-RP	5' -Biotin-AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3'

## 2. 筛选相关细胞及试剂

正筛选细胞293T-PDL1、反筛选细胞293T、完全DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、嘌呤霉素溶液、洗涤缓冲液(Washing Buffer, WB)、100×tRNA、100×BSA、结合缓冲液(Binding Buffer, BB)等。

### [0027] 3. 筛选过程

#### 1) 文库处理

筛选文库中加入1ml结合缓冲液(Binding Buffer, BB),干式恒温器中95℃加热5min,结束后立即置于冰上冷却10min。

### [0028] 2) 筛选(在4℃条件下进行)

根据Cell-SELEX技术进行筛选,前两轮只进行正向筛选,从第三轮开始先进行反向筛选,然后进行正向筛选。筛选过程如下:

将正筛选细胞从培养箱中取出并弃去培养基,加入洗涤缓冲液(WB)重复洗涤细胞3次,然后将已处理好的筛选文库加入细胞培养皿中与细胞共孵育一定时间。孵育完毕后吸弃上清并用WB洗涤3次,然后用1mL超纯水收集细胞,95℃加热10min,得到细胞裂解液。将裂解液11000rpm高速离心5min,收集上清液用于下一步PCR扩增。(首轮筛选需 $1 \times 10^7$ 个正筛选细胞,细胞数量随筛选轮数的增加而逐渐减少,直至细胞数量为 $2 \times 10^6$ 个,首轮筛选孵育时间为1h,随后每轮递减5min,直至孵育时间减少至30min。)

从第三轮开始,需要加入反向筛选。反向筛选即将每轮筛选产生的次级文库先与反筛选细胞孵育,孵育完毕后收集上清再与正筛选细胞孵育。(首次加入反筛选细胞数量约 $5 \times 10^6$ 个,细胞数量随筛选轮数的增加而逐渐增加至 $1 \times 10^7$ 个;而反筛选细胞首次孵育时间为30min,之后每轮递增5min,直至增加到1h。)

在筛选过程中需要进行三次PCR扩增,第一次整体扩增将正向筛选后获得的细胞裂解液上清作为模板,体系如下表2所示:

表2第一次整体扩增体系

反应成分	体积(μL)
dd H <sub>2</sub> O	140
10×PCR Buffer	150
dNDP mixture	120
FP	37.5
RP	37.5
Template	1000
ExTaq	7.5

PCR反应程序:94℃ 3min(预变性);94℃ 30sec(变性);46.0℃ 30sec(退火);72℃ 30sec(延伸);进行10个热循环扩增;72℃ 5min(延伸);产物保存于4℃。

### [0029] 收集第一次PCR产物,11000rpm高速离心5min,收集上清(标记为P1)并以其为模板

进行第二次PCR扩增,体系如下表3所示:

表3 第二次PCR扩增体系

反应成分	体积(μL)
dd H <sub>2</sub> O	67.5
10×PCR Buffer	10
dNDP mixture	8
FP	2.5
RP	2.5
Template	10
ExTaq	1

PCR反应程序:94℃ 3min(预变性);94℃ 30sec(变性);46.0℃ 30sec(退火);72℃ 30sec(延伸);进行13个热循环扩增;72℃ 5min(延伸);在反应进行至第5、7、9、11、13循环末(即72℃延伸结束时),取出相应产物,置于冰上备用。将产物进行琼脂糖凝胶电泳,选择条带单一且明亮的循环数作为最优循环数,以此进行第三次PCR大量扩增。

[0030] 以P1为模板,按照以下反应体系进行第三次PCR大量扩增,结果如下表4所示:

表4第三次PCR大量扩增体系

反应成分	体积(μL)
dd H <sub>2</sub> O	1330
10×PCR Buffer	200
dNDP mixture	160
FP	50
RP	50
Template	200
Ex Taq	10

PCR反应程序:94℃预变性3min;94℃变性30sec;46.0℃退火30sec;72℃延伸30sec;循环数按照第二次PCR后选取的最优循环数;72℃延伸5min;产物保存于4℃。

[0031] 收集第三次PCR产物进行单链化,将适量的链霉亲和素修饰的琼脂糖微珠与第三次PCR产物混合,然后在37℃摇床中200rpm孵育30min,孵育完毕后,将孵育物8000rpm离心3min,吸弃上清,

加入0.2 M NaOH溶液以回收单链DNA,并用浓HCl中和收集到的液体pH至7.0。将产物置于真空干燥仪中干燥浓缩,得到单链DNA干粉(即下一轮筛选次级文库),-20℃保存备用。

[0032] 4. 流式细胞术检测文库富集程度

上游引物使用FAM荧光进行标记,对第11、13、15、17、18轮的P1产物使用第三次PCR反应体系进行扩增,对扩增产物单链化后得到FAM标记的双链DNA,干燥后将其以250nM的浓度分别与正筛选细胞和反筛选细胞孵育30min后进行流式检测,结果如图1所示(参看附图1):

结果显示筛选至18轮时荧光强度几乎不再增强,即为筛选终点,结果如图2所示(参看附图2)。

[0033] 5. 克隆测序

对第18轮产物进行TA克隆测序,结果显示,经过筛选获得了六条候选适配体,参看核酸

序列表一(5'-3')所示：

6. 平衡解离常数(Kd值)检测

将正筛细胞与梯度浓度(如0nM、10nM、25nM、100nM、200nM等)的带FAM荧光标记的候选适配体共孵育30min,孵育完毕后进行流式检测,检测结果使用SIGMAPLOT软件处理,利用公式 $Y=B_{max}X/(Kd+X)$ 即可求出Kd值。结果如图2所示(参看附图2)。

[0034] 7. 六条候选适配体的结合能力检测

根据平衡解离常数检测及结合能力检测结果,经过筛选,hPDL1-6可作为人PDL1蛋白的核酸适配体。结果如图3所示(参看附图3)：

8. 温度对适配体结合能力的影响

将正筛细胞与hPDL1-6适配体分别在4℃和37℃下共孵育30min,孵育完毕后进行流式检测,结果如图4所示(参看附图4)：

9. 截短优化适配体序列

将hPDL1-6序列进行截短,截短后如核酸序列表二(5'-3')所示。

[0035] 将正反筛细胞分别与截短后的三条适配体在4℃共孵育30min,孵育完毕后进行流式检测,结果如图5所示(参看附图5)。

[0036] 经过优化,可将hPDL1-6b作为人PDL1蛋白的核酸适配体。

[0037] 本发明的T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法,可以应用于抗肿瘤的临床试验。

[0038] 本发明并不局限于前述的具体实施方式,本发明扩展到任何本说明书中披露的新特征或新的组合,以及披露的任一新方法或过程的步骤或新的组合。

## 序列表

<110> 广西医科大学

<120> T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用

<130> 2019-12-30

<160> 9

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 1

ataccagctt attcaattac ccactgattg gagttttaa agtcgtctta aagatatcgt 60

cgggagatagt aagtgcaatc t 81

<210> 2

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 2

ataccagctt attcaattac cccactttt gcatcattcg atgggtcctt ataagattct 60

gtgagatagt aagtgcaatc t 81

<210> 3

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 3

ataccagctt attcaattac cccactttt gcatcattcg atgggtcctt ataagattct 60

gtgagatagt aagtgcaatc t 81

<210> 4

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 4

ataccagctt attcaattcg tacggttta tctgtctcta tttaaaacag ctgcgccgcc 60

ggggagatagt aagtgcaatc t 81

<210> 5

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 5  
ataccagctt attcaattac tatgttatga tcgcttgact aaagcagaac ggtatgagga 60  
ctaagatagt aagtgcatac t 81  
<210> 6  
<211> 76  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial sequence Latin)  
<400> 6  
ataccagctt attcaattac gactaactgc tgccgcgg ggaaaatact gtacggttag 60  
atagtaagtgcatact 76  
<210> 7  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial sequence Latin)  
<400> 7  
ataccagctt attcaattac gactaactgc tgccgcgg ggaaaatact gtacggtt 58  
<210> 8  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial sequence Latin)  
<400> 8  
acgactaact gctgcgcgc cggaaaata ctgtacggtt agatagtaag tgcaatct 58  
<210> 9  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial sequence Latin)  
<400> 9  
acgactaact gctgcgcgc cggaaaata ctgtacggtt 40

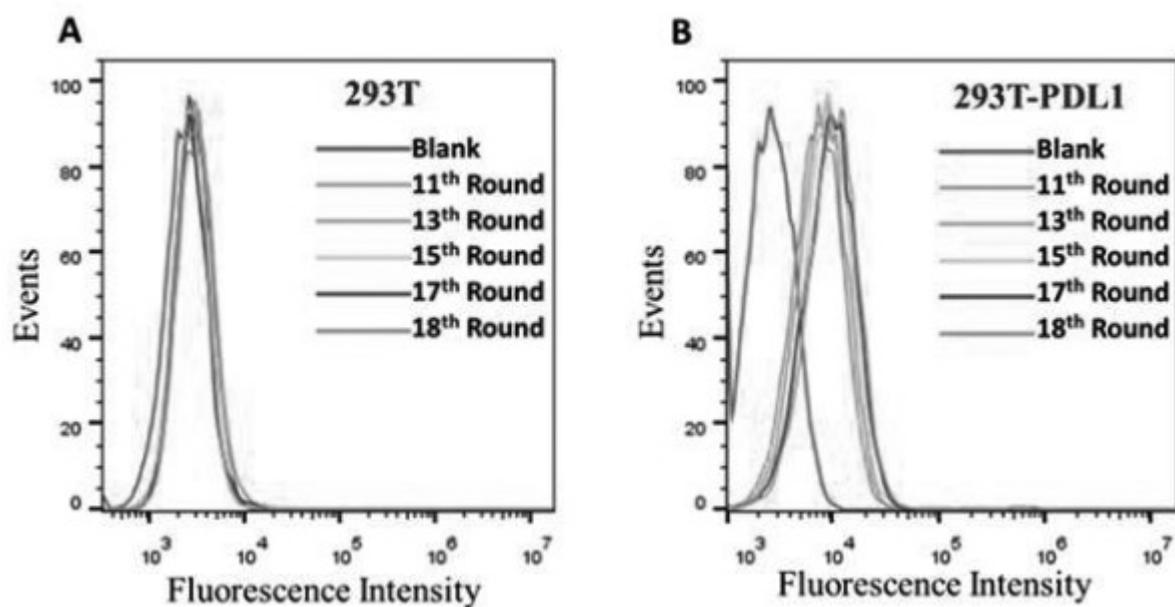


图 1

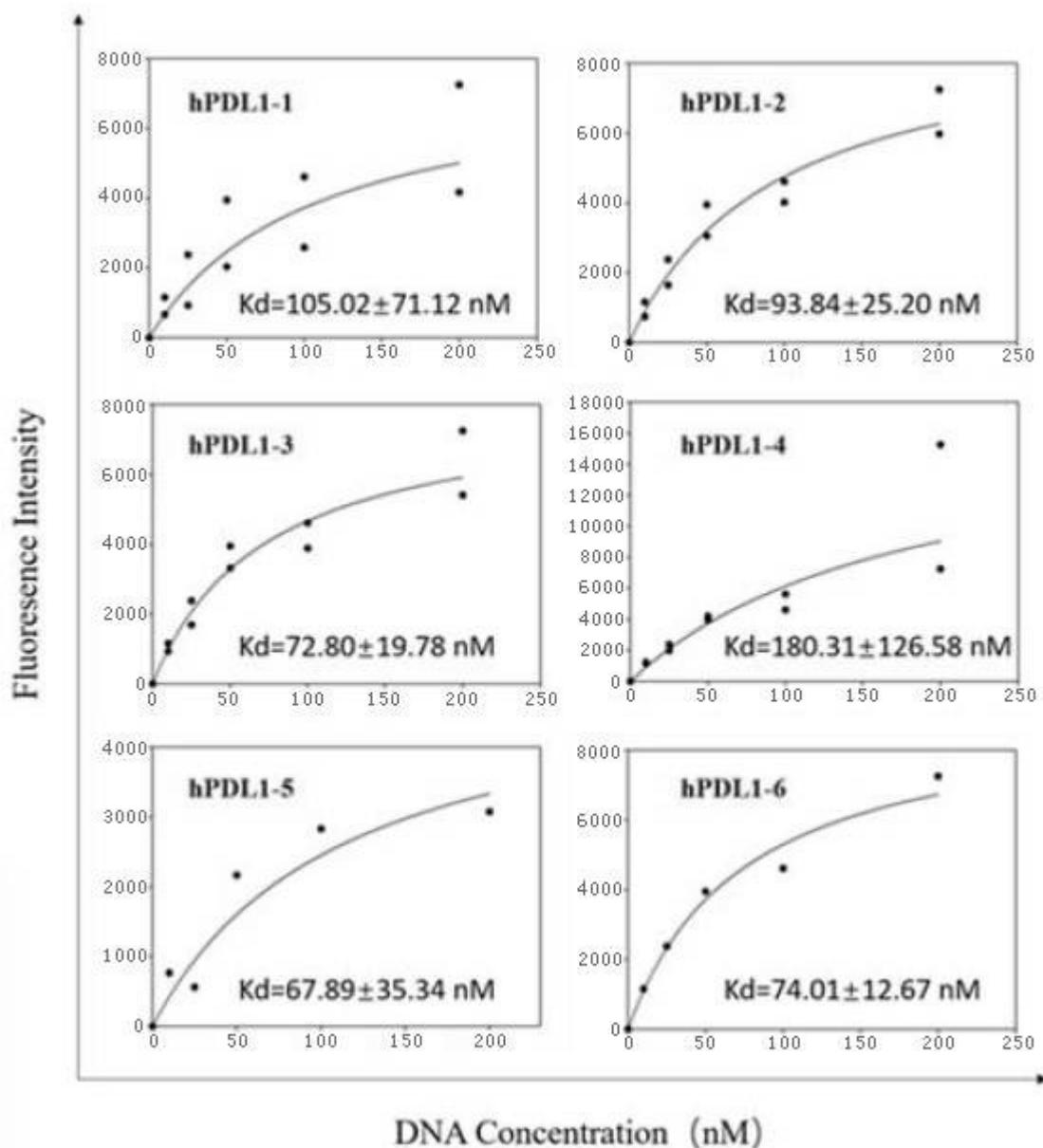


图 2

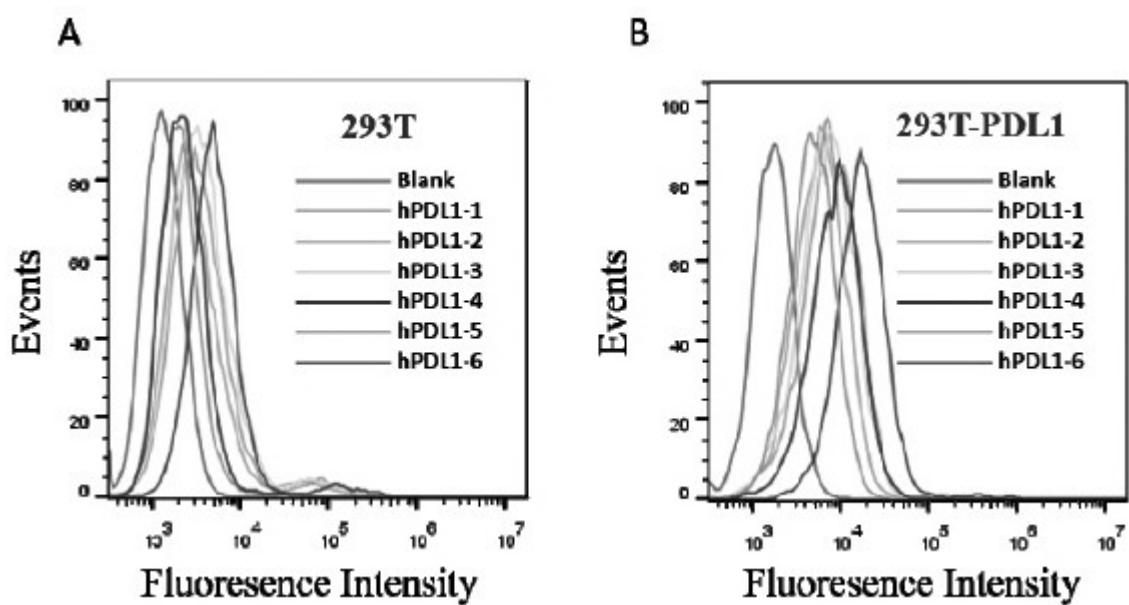


图 3

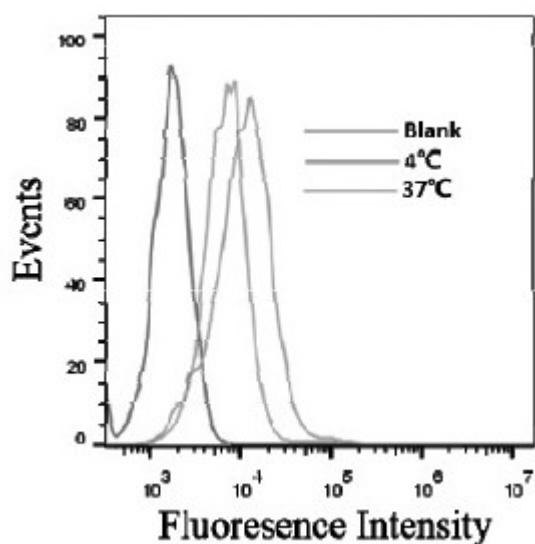


图 4

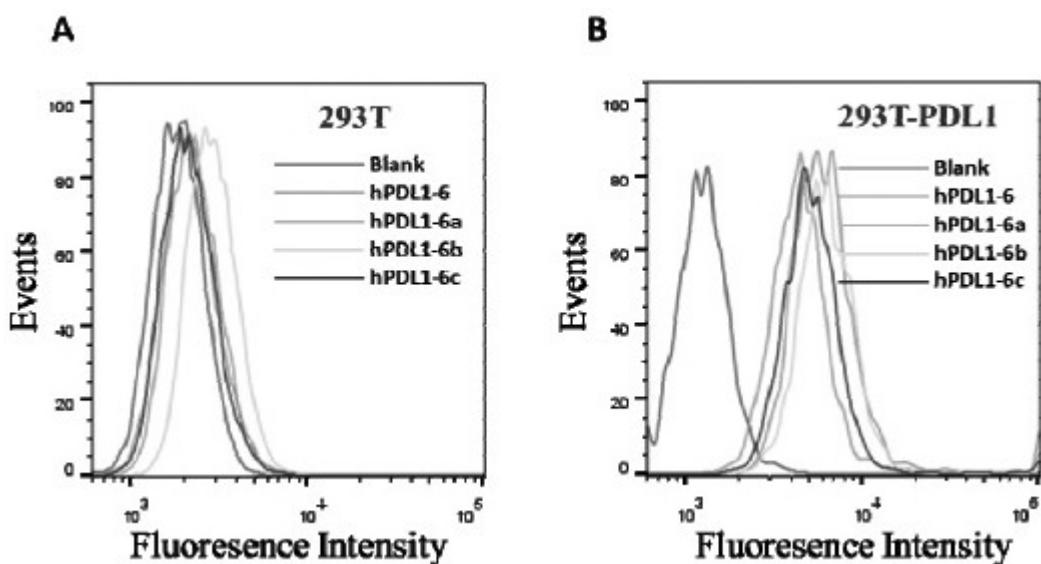


图 5

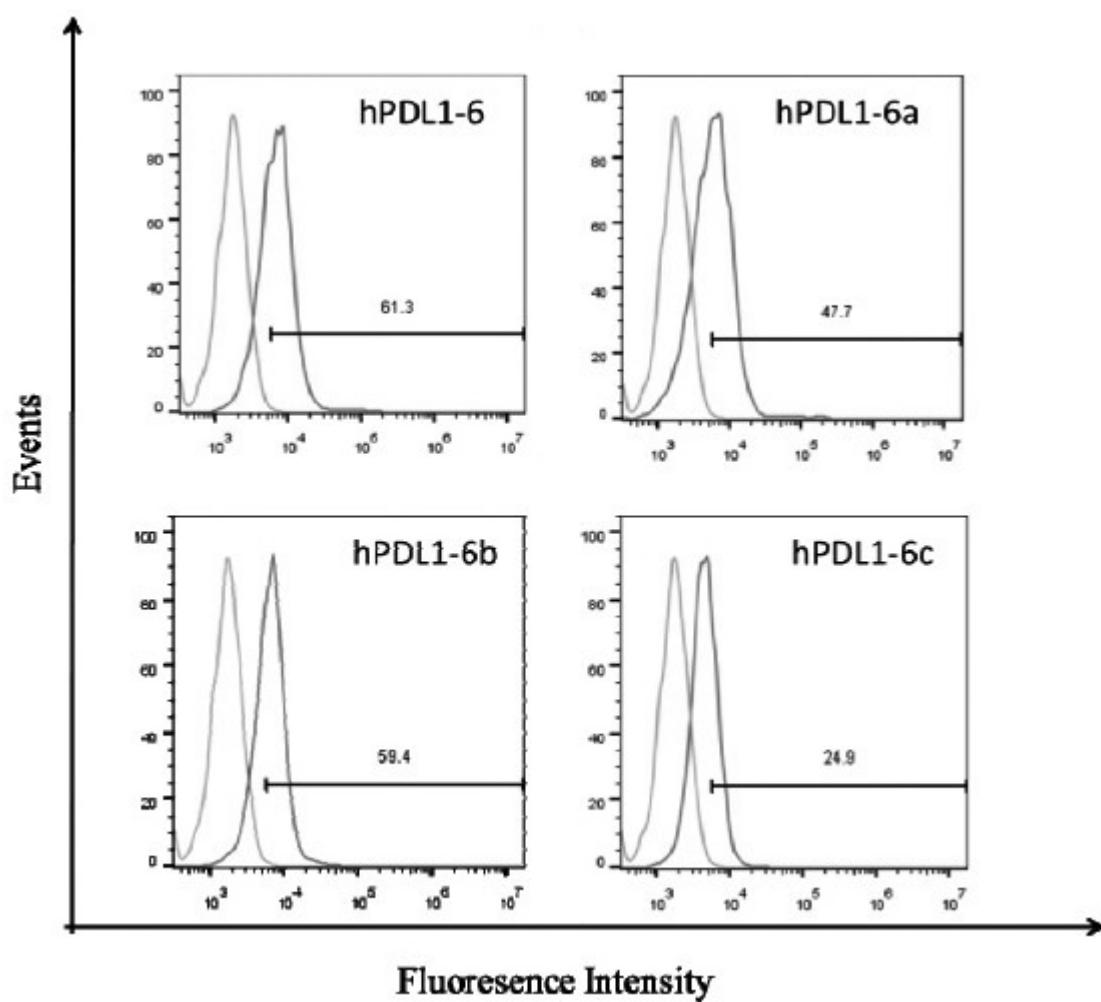


图 6

专利名称(译)	T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN111004805A</a>	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201911400633.0	申请日	2019-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
[标]发明人	赵永祥 李大力 程亮 彭睿		
发明人	赵永祥 李大力 程亮 彭睿		
IPC分类号	C12N15/115 C12N15/10 G01N33/68 G01N33/53 A61K31/7088 A61P35/00		
CPC分类号	A61K31/7088 A61P35/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2330/31 G01N33/5308 G01N33/68 G01N2333/70532		
代理人(译)	张峰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明属于生物医学领域，尤其是涉及T细胞免疫检查点PD-L1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用，包括以下步骤：1) 筛选文库及引物；2) 对文库进行处理；3) 进行流式细胞术检测文库富集；4) 进行TA克隆测序；5) 平衡解离常数检测；6) 六条候选适配体的结合能力检测；7) 温度对适配体结合能力的影响；8) 截短优化适配体序列，本发明具有便携化、操作简单、成本低等特点，可以在人体抗肿瘤临床中试验应用，为人类对抗肿瘤的临床使用提供了一种很好的方法。

