



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111154765 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201911400634.5

A61K 31/7088(2006.01)

(22)申请日 2019.12.30

A61P 35/00(2006.01)

(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  
钟莉婷

(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)

权利要求书1页 说明书8页

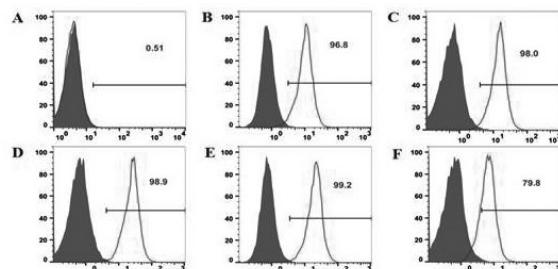
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

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

(57)摘要

本发明涉及一种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,包括以下步骤:1)干粉ss DNA文库的预处理;2)正筛选;3)反筛选;4)PCR扩增;5)单链DNA制备;6)多轮筛选;7)克隆与测序;8)流式细胞术检测;9)免疫荧光检测;10)检测及分离;11)切片;12)检测中Bi-Apt的封闭性,本发明通过细胞筛选针对PD-1蛋白的适配体,采用将靶蛋白表达在细胞膜表面,通过自行构建293T细胞系实现对靶标分子PD-1的稳定表达,选取T细胞并将其表面免疫抑制性靶点PD-1进行封闭,在靶分子方面选择的是特异表达的PD-1分子,完成整个筛选过程,本发明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-1的适配体筛选、鉴定方法,其特征在于:包括以下步骤:
  - 1) 干粉ss DNA文库的预处理:溶解后进行第一轮的筛选;
  - 2) 正筛选:共进行三轮的筛选之中展开的仅仅是正筛选;
  - 3) 反筛选:自第四轮的筛选起,在每一轮的正筛选前把反筛选引进其中,对非特异性的结合完全去除,筛选后的细胞置于冰箱中保存;
  - 4) PCR扩增:以上所述的筛选中,在每一轮都将能与靶细胞结合,且不能与反筛选细胞结合产物筛选,第四轮开始的ss DNA文库加以扩增,把上一筛选产物当作是下一轮所需的PCR模板,每一轮的筛选进行3次PCR的扩增;
  - 5) 单链DNA制备:对dsDNA进行单链化,产物可置于-20 °C的环境下保存;
  - 6) 多轮筛选:重复上述步骤进行正筛选及反筛选,至文库富集达饱和的平台期;
  - 7) 克隆与测序:对产物实行PCR扩增反应,采用TA克隆测序,对测序结果进行整理分析,去除无效结果,比对分析有效的序列,选出同一家族中拥有共性的代表序列;
  - 8) 流式细胞术检测:采用流式细胞仪检测,并对检测结果进行分析处理;
  - 9) 免疫荧光检测;
  - 10) 检测血液中Bi-Apt的敏感性:运用梯度离心的方法,对血液进行分离;
  - 11) 检测Bi-Apt与肝癌组织中浸润的T细胞的结合:采用石蜡切片方法,将组织切为极薄的组织片并连续切片;
  - 12) 检测Bi-Apt的封闭性。
2. 根据权利要求1所述T细胞免疫检查点PD-1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-1的适配体,是序列2条中的核苷酸序列中的任意一条或两条序列。
3. 一种T细胞免疫检查点PD-1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-1的适配体在抗肿瘤临床中应用。

## 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

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,尤其是涉及一种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。

### 背景技术

[0002] 适配体在一定条件下拥有相对稳定的3D结构,其3D结构可受以下因素影响,包括核苷酸的分子序列以及序列长度(通常小于100nt)、具体的环境条件(例如温度等)构成了其结构的多样性。针对靶分子,适配体经折叠改变自身构象,与靶分子在三维结构下形成形状互补特异性的与靶分子结合位点相结合。在免疫治疗中,适配体的应用比以往的抗体治疗更是有其天然优势。抗体治疗,常会因其免疫原性导致一定的免疫毒性作用,即免疫相关的副作用(irAEs)。而适配体并没有免疫原性,在体内不会引起相关的副作用。另一方面,适配体在运输与储存方面的优势也弥补了抗体的不足。众所周知,抗体稳定性差,在运输和储存常需要特殊处理;而研究发现短链核苷酸在干燥阴冷的环境下可储存二十年。因而,现如今经筛选发现和肿瘤密切关联的适配体已逾几百种,而且,一些适配体已被投进了肿瘤临床的前期实验中而部分药品已经通过美国FDA批准,为临床肿瘤治疗提出了新思路,因此,对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,是本领域技术人员亟待解决的难题。

### 发明内容

[0003] 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。

[0004] 本发明的技术方案概述如下:

本发明的一种T细胞免疫检查点PD-1的适配体筛选、鉴定方法,其特点是:包括以下步骤:

1) 干粉ss DNA文库的预处理:溶解后进行第一轮的筛选。

[0005] 2) 正筛选:共进行三轮的筛选之中展开的仅仅是正筛选。

[0006] 3) 反筛选:自第四轮的筛选起,在每一轮的正筛选前把反筛选引进其中,对非特异性的结合完全去除,筛选后的细胞置于冰箱中保存。

[0007] 4) PCR扩增:以上所述的筛选中,在每一轮都将能与靶细胞结合,且不能与反筛选细胞结合产物筛选,第四轮开始的ss DNA文库加以扩增,把上一筛选产物当作是下一轮所需的PCR模板,每一轮的筛选进行3次PCR的扩增。

[0008] 5) 单链DNA制备:对dsDNA进行单链化,产物可置于-20 °C的环境下保存。

[0009] 6) 多轮筛选:重复上述步骤进行正筛选及反筛选,至文库富集达饱和的平台期。

[0010] 7) 克隆与测序:对产物实行PCR扩增反应,采用TA克隆测序,对测序结果进行整理分析,去除无效结果,比对分析有效的序列,选出同一家族中拥有共性的代表序列。

[0011] 8) 流式细胞术检测:采用用流式细胞仪检测,并对检测结果进行分析处理。

[0012] 9) 免疫荧光检测。

[0013] 10) 检测血液中Bi-Apt的敏感性:运用梯度离心的方法,对血液进行分离。

[0014] 11) 检测Bi-Apt与肝癌组织中浸润的T细胞的结合:采用石蜡切片方法,将组织切成极薄的组织片并连续切片。

[0015] 12) 检测Bi-Apt的封闭性。

[0016] 以上所述TA克隆测序中的PD-1的适配体,是序列2条中的核苷酸序列中的任意一条或两条序列。

[0017] 本发明的一种T细胞免疫检查点PD-1的适配体的应用,其特点是:所述的T细胞免疫检查点PD-1的适配体在抗肿瘤临床中应用。

[0018] 本发明突出的实质性特点和显著的进步是:

1. 本发明通过细胞筛选针对于PD-1蛋白的适配体,采用将靶蛋白表达在细胞膜表面,而放弃了以往以蛋白为细胞筛选的方法,并且通过自行构建293T细胞系,来实现对靶标分子PD-1的稳定表达,以此作为正筛选细胞。

2. 将来自不同实验室中的有效茎环结构进行拼接,并发现其封闭抗原的效果比单一的适配体封闭效果更好。

3. 选取T细胞并将其表面免疫抑制性靶点PD-1进行封闭,在靶分子方面选择的是特异表达的PD-1分子,来完成整个筛选过程。

4. 挑选出具有良好靶向能力的适配体序列;并将取得的最优序列与文献报道的序列连接提高了其对PD-1的封闭作用。

5. 本发明所述的T细胞免疫检查点PD-1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

[0023] 图1是筛选细胞PD-1蛋白表达情况筛选流程。

[0024] 1. 筛选前正筛选细胞与反筛选细胞PD-1表达的流式细胞仪检测结果A. 293T细胞PD-1的表达量只有0.5%左右;B-E. 不同293T-PD-1细胞株,其中表达量最高的B3株PD-1表达量为99.2%。

[0025] 图2是293T-PD-1细胞适配体筛选流程示意图。

[0026] 图3是富集文库对于293T细胞及293T-PD-1细胞结合力验证293T细胞表面的荧光强度随着筛选轮数的增加几乎没有变化;293T-PD-1细胞膜表面的荧光强度随着筛选轮数的增加而增强。

[0027] 图4是第12轮筛选产物测序比对结果图按照DNA序列中高保守区域的相似性,将测序结果分为四个家族。

[0028] 图5是候选适配体Apt-1 (A)、Apt-2 (B)、Apt-3 (C)、Apt-4 (D) 在4 °C条件下与靶细胞的结合情况。

[0029] 图6是 PD-1-Apt适配体 (A), Apt-4 (B), 以及重组适配体Bi-Apt (C) 分别与与靶细胞的结合情况。

[0030] 图7是PD-1-Apt适配体, Apt-4, 以及重组适配体Bi-Apt分别与293T-PD-1细胞孵育

封闭后,细胞与PD-1抗体(PE)孵育结果。

[0031] 图8是PBS,PD-1-Apt适配体,Apt-4,以及重组适配体Bi-Apt分别与293T-PD-1细胞孵育封闭后,293T-PD-1细胞与293T-PDL1细胞共孵育结果(1000×)

### 具体实施方式

[0032] 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。

[0033] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

### 实施例

[0034] 本发明的T细胞免疫检查点PD-1的适配体筛选、鉴定方法,参看如图1~4所示:包括以下步骤:

#### 1. 文库预处理

筛选之前,需要对文库进行预处理,即95 °C解链处理。文库的预先处理的步骤具体如下:

(1) 将干粉ss DNA 文库用14000rpm离心1min温度4°C。

[0035] (2) 将其溶解于500μL的BB中,然后,将其放入预热至干式的恒温器(温度升至 95 °C)之中,加热变性达到5min,此后即刻地置放到冰上加以冷却10min,以使其得以生成稳定程度比较高的二级结构,添入500μLBB定容至1 mL。

[0036] 在第一轮的筛选之中,所采纳的是5mmol的ss DNA 文库,后面的每一轮筛选之中,其文库均采纳上一轮筛选得出的产物,将产物干燥,重复上述步骤进行溶解、变性和冷却等。

#### 2. 正筛选

在前三轮的筛选之中展开的仅仅是正筛选,而自第四轮起,正筛选需在反筛选后展开,其步骤如下:

(1) 将以上预处理过得到的文库(第三轮开始既是使用该轮次的反筛选产物)滴入正筛选细胞表层,溶液得以均匀覆盖在细胞表面,冰上放置孵育。

[0038] (3) 将细胞从冰盒取出,吸弃上清。

[0039] (4) 加入1 mL灭菌去离子水,采用细胞刮刀刮下细胞,收集到Eppendorf管中。

[0040] (6) 把以上收集起来的细胞与DNA混合液置于预热至95 °C的干式恒温器中裂解,加热10min后,对细胞表面上的蛋白予以破坏继而释放出了能够结合于靶标的相应的ssDNA。

[0041] (7) 把细胞裂解液细心地移至于冷冻离心机之中,处于4°C环境中,其转速应达到11000 rmp以进行离心,时间为5min,对上清予以收集,标记后可直接用于PCR扩增其余保存至冰箱备用。

#### 3. 反筛选

自第四轮的筛选起,在每一轮的正筛选前会把反筛选引进其中,以对非特异性的结合完全去除,具体的操作步骤可详见于下:

(1) 把单层的对数期之下的293T细胞取出,吸弃上清,沿培养皿侧壁轻柔加入WB 2 mL,静置铺匀1min,用巴氏吸管吸弃上清,如此重复清洗3次。

[0043] (2) 将预处理过得文库延侧壁,逐滴滑入皿内反筛细胞表面,滴加时注意,使其覆盖均匀,以确保每个细胞皆可结合于DNA文库。

[0044] (3) 把细胞培养皿具体地置放于预备的冰盒之中,于摇床上对其震荡孵育达到一定时间之后,收集上清液并标记,可用于本轮次正筛选当中,也可置于冰箱中保存。

[0045] 4. PCR扩增

适配体的筛选中,在每一轮都要将能与靶细胞结合,且不能与反筛细胞结合(第四轮开始)的ss DNA文库加以扩增,以求确保在后轮的筛选之中所需的文库量。把上一筛选产物当作是下一轮所需的PCR模板,每一轮的筛选皆需要进行3次的PCR的扩增。

[0046] (1)第一次的整体扩增

把通过正筛选出来的细胞裂解液上清用作PCR模板,以下表1所示,为依据扩增,视为第一次整体扩增。

[0047] 表1第一次整体扩增体系图例

反应成分	体积
10x PCR Buffer	150 $\mu$ L
dNTP mixture (2.5 mM each)	120 $\mu$ L
FP (100 $\mu$ M)	37.5 $\mu$ L
RP (100 $\mu$ M)	37.5 $\mu$ L
Template	1000 $\mu$ L
rTaq	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	150 $\mu$ L

(2)循环数优化

首次的整体性的扩大和增加会让目标的产量减少,出现片段纯度较低,非特异性产物等相关状况。解决之一难题有赖于PCR的扩增。首先,对PCR的热循环数进行了优化,通过对相应泳道的目的条带分析,以选择最优循环数。体系如下表2所示:

表2循环数优化反应体系

反应成分	体积
10x PCR Buffer	10 $\mu$ L
dNTP mixture	8 $\mu$ L
FP (100 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
RP (100 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
Template	10 $\mu$ L
rTaq	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	66.5 $\mu$ L

(3)第二次整体扩增

第二次的整体扩增其用途即是要对量大的高纯度产物加以制备,以备此后的实验之需,反应体系如表3所示:

表3第二次整体扩增反应体系

反应成分	体积
10x PCR Buffer	200 $\mu$ L
dNTP mixture	160 $\mu$ L
FITC-FP/Cy-5-FP (100 $\mu$ M)	50 $\mu$ L
Biotin-RP (100 $\mu$ M)	50 $\mu$ L
Template	200 $\mu$ L
rTaq	10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1330 $\mu$ L

### 5. 单链DNA制备

在第二次整体扩增之后,已经获得了一条链带有生物素标记的产物,此时所获取的是可以和细胞结合的单链DNA被复制成双链DNA,也就是double strands DNA,简称dsDNA,由于需要的靶标结合的是单链DNA,即ssDNA,故而需对dsDNA进行单链化,来获取便于后期筛选的ssDNA文库,具体步骤如下:

(1) 取出50 $\mu$ L体积的链霉亲和素微球,经100 $\mu$ L PBS进行3次反复清洗。

[0048] (2) 微球洗毕后,添入第二次整体扩增的产物里,在37 °C恒温的摇床震荡器中进行30min孵育,让微球和dsDNA中含生物素标记的链结合;完成孵育后,从离心中取出混合物,继续拿PBS对其进行3次的反复清洗。

[0049] (3) 添加0.2mol/L的NaOH溶液,让dsDNA两条链中间的氢键断裂然后丢掉与微球结合的带有生物素标记的单链,收集与微球不能结合的携带荧光标记的ssDNA。

[0050] (4) 把收集好的ssDNA-NaOH混合物,用NAP5脱盐柱脱盐纯化处理弃掉NaOH。

[0051] (5) 将产物经过真空干燥机抽干处理,产物可置于-20 °C的环境下保存,或者用作下轮的筛选。

### 6. 多轮筛选

在筛选的过程中,不仅仅是简单的重复上述步骤进行筛选,随着轮数增加,需要逐步增加筛选压力,尽快获得高亲和力高特异性的目的序列。增加筛选压力的方案主要包括:在正筛选过程中缩短孵育的时间,减少细胞数量;在反筛选过程中增长孵育时间,增加细胞数量;逐步增强洗涤时间和洗涤次数,直至文库富集基本到达饱和的平台期。筛选压力调控如表4所示:

表4筛选压力调控明细表

筛选轮数	文库用量 (pmol)	正筛选培养皿 规格 (mm)	正筛选孵育时间 (min)	反筛选培养皿 规格 (mm)	反筛选孵育时间 (min)	洗涤缓冲液体积 (mL)
1	5000	10	60	-	-	2
2	288	10	60	-	-	2
3	290	10	55	-	-	2
4	345	10	55	6	30	2
5	336	10	50	6	30	3
6	356	10	50	6	35	3
7	340	6	45	6	35	3
8	320	6	45	6	40	3

9	300	6	40	6	40	4
10	280	6	40	10	45	4
11	260	6	35	10	45	4
12	240	6	35	10	50	4

## 7. 克隆与测序

当文库与293T-PD-1细胞的结合达到平台期既筛选至饱和状态后,对产物实行PCR扩增反应,并作分装标记送至公司,即上海生工生物工程有限公司采用TA克隆测序。对公司返回的测序结果进行整理分析,去除无效结果,用Clustal X 2软件比对分析有效的序列。经过NUPACK网站,对其二级结构进行,并通过二级结构的特性,划分出序列区家族(如图4所示)。将同一家族中拥有共性的代表序列选出,送公司合成在其5'端修饰荧光标签,留待下一步的流式检测。

## [0053] 8. 流式细胞术检测

(1) 把0、9、10、11、12轮的整体扩增的产物依次进行单链化成呈ssDNA文库(具有荧光标记的),用流式细胞术检测其与靶细胞的结合率。

[0054] (2) 将上述轮次产物各取250nM,与1'10<sup>5</sup>个293T细胞和1'10<sup>5</sup>个293T-PD-1细胞分别在冰上震荡孵育30min。

[0055] (3) 用1mL WB轻柔吹打混匀,1000rpm,离心5min重复洗涤3次,用BB将细胞重悬,用流式细胞仪检测。

[0056] (4) 使用FLOWJO软件对检测结果进行分析处理。

## [0057] 9. 免疫荧光检测

(1) 将293-T细胞、293-T-PD-1细胞分别爬片,24h后待其密度达到百分之八十,对细胞核进行DAPI染色。

[0058] (2) 滴加 400μL含有 250nM Cy-5标记的适配体的 BB,冰上避光孵育30min。

[0059] (3) 用 PBS 洗涤3次后,再加入 400μL BB,用于激光共聚焦成像。

## [0060] 10. 检测血液中Bi-Apt的敏感性

运用梯度离心的方法,对脐血PBMC进行分离。

[0061] (1) 将抗凝剂添加到脐血中,并进行确保其完全混合。

[0062] (2) 将混合好的血液进行稀释,添加37°C预热的PBS,且保证容积相同。

[0063] (3) 在容量为50mL的离心管中添加12mL的淋巴细胞分离液。

[0064] (4) 保证离心管为45°的倾斜度,将12mL的抗凝血液缓慢加入试管,保证淋巴细胞分离液位于抗凝血液的下层。

[0065] (5) 用2000rpm离心20min,注意,将离心机设置为缓慢升速和缓慢降速的模式。

[0066] (6) 轻轻取出离心管,用吸管沿管壁轻轻地吸出灰白色液体,并将其放入预先备好的离心管中。

[0067] (7) 用5倍体积的PBS进行稀释,以300g,离心10min。并将此步重复2次。

[0068] (8) 倘若试管底部有出现红色,必须进行破红处理,即加入预热的红细胞裂解液,然后与细胞进行充分混合,为保证效果,这一过程序需等待几分钟。

[0069] (9) 而后加入等量的PBS,取出10μL液体与台盼蓝1:1混匀后,计数,而后将其余的液体经300 g,离心10min。

[0070] (10) 将细胞进行收集并使用专用的培养器皿进行培养, 使用1640完全培养基重悬。

[0071] (11) 在三个小时之后, 用离心管将悬浮的细胞进行收集, 将血清与红细胞进行分离。

[0072] (12) 将细胞吸入在六孔板中, 用1640完全培养基培养, 并加入5ng/mL的PHA刺激活化。

[0073] (13) 24h后从六孔板边缘轻轻吸取1mL上清, 特别注意不要吸到细胞然后加含有5ng/mL的PHA的1640完全培养基。

[0074] (14) 48h后, 吸取收集细胞2000rmp, 10min, 弃上清。

[0075] (15) 使用250 nM浓度Cy-5标记的DNA序列溶液, PBS, 红色荧光标记的PD-1抗体, 分别与1~10<sup>5</sup>个PBMC细胞在冰上孵育30min。

[0076] (16) 用500μL WB充分洗涤3次, 使用BB对细胞沉淀进行重悬滴片在激光共聚焦显微镜下观察。

[0077] 11. 检测Bi-Apt与肝癌组织中浸润的T细胞的结合

石蜡切片广泛应用于组织病理学, 石蜡切片可切极薄的组织片并能连续切片, 组织结构清晰, 抗原定位准确。

[0078] (1) 将肝癌肿瘤组织取出后切成薄片, 用4%多聚甲醛固定24~36h。

[0079] (2) 经50%乙醇90min; 70%乙醇90min; 85%乙醇90min; 95%乙醇90min; 100%乙醇60min; 100%乙醇60min脱水; 再经二分之一的乙醇十二分之一的二甲苯, 每一步时间60min透化二分之一的二甲苯十二分之一的石蜡(90min) 石蜡I120min, 62℃石蜡II120min 渗透, 所有液体体积必须是组织体积5倍以上。

[0080] (3) 将组织放入模具中, 做好标记后永石蜡完全没过组织调整好位置, 在石蜡包埋机的冷台上冷却。

[0081] (4) 拆除包埋的组织块和切片机并对其进行修复, 厚度设定为0.4μm, 避免组织的折叠, 用聚赖氨酸附着膜载玻片承载上述组织, 并且所述组织完全粘附到载玻片上, 在68℃下0.5 h干燥, 烘烤, 在60℃下补片后2h。

[0082] 12. 检测肿瘤组织中T细胞的PD-1表达

(1) 配0.01M PB缓冲液。

[0083] (2) A液(0.2 M磷酸二氢钠水溶液): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O 27.6 g, 溶解于去1000 mL去离子水中。

[0084] (3) B液(0.2 M磷酸氢二钠水溶液): Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 53.6 g (或Na<sub>2</sub> HP0<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O 71.6g或Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O 35.6g) 溶解于1000 mL去离子水中。

[0085] (4) 200mL 0.01 M PB是由A液28mL, B液72mL, 蒸馏水100mL组成, pH值调至7.2。

[0086] (5) 0.3%过氧化氢甲醇溶液(10mL): 0.3%过氧化氢: 甲醇: 0.01M PBS = 0.1 mL: 8 mL: 2 mL。

[0087] (6) 1%盐酸酒精: 浓盐酸0.5~1mL + 75%酒精99mL。

[0088] (7) 取石蜡切片在60℃预热30min。

[0089] (8) 脱蜡, 浸入二甲苯3次, 每次5min水化, 侵入无水乙醇3次, 每次5min。

[0090] (9) PB洗三次, 每洗一次需要5min的时间。

[0091] (10) 将PB进行脱干处理。将细胞组织的范围用免疫组化笔标出,然后再添加0.3%过氧化氢甲醇溶液,避光孵育10min。

[0092] (11) 甩去过氧化氢甲醇溶液,PB漂洗3次,每次3min。

[0093] (12) 将切片侵入PB中,微波修复高火4min。

[0094] (13) 自然晾干冷却后,在组织区域滴加5%BSA,37℃孵育30min。

[0095] (14) PB洗三次,每次2min,在组织区域滴加用PB按照1:200稀释的荧光PD-1抗体,和浓度为10nM的Cy-5荧光标记的适配体,每个组织50μL。湿盒4℃孵育过夜。

[0096] (15) 孵育过夜后,加入100μL DAPI 孵育8min,用PBS洗三次,每次1min。

[0097] (16) 激光共聚焦显微镜下观察。

[0098] 13. 检测中Bi-Apt的封闭性

核酸适配体与靶标的结合并不能完全包裹抗原,所以双价以及多价适配体则有可能改善其封闭效能。本发明将所筛选的Apt-4与文献报道中的PD-1适配体(5' -GTACAGTTCCCGTCCCTGCACTACA-3')官能茎环相连接形成双价适配,即Bi-Apt 5' -GTACAGTT CCCGTCCCTGCACTACATTTGTCGAGGGCTATTCTATTGCTGTTCCGCCA-3' 由上海生工生物工程技术服务有限公司采用高效液相色谱法(HPLC)对其进行合成纯化的操作。并选择CRISPR/Cas9敲入PD-1的人肾上皮细胞系(293T-PD-1)、CRISPR/Cas9敲入PD-L1的人肾上皮细胞系(293T-PDL1),进行抗原封闭能力验证。具体操作步骤如下:

(1) 将293T-PD-1分为四组,分别用PBS,PD-1-Apt适配体,Apt-4,以及重组适配体Bi-Apt分别与293T-PD-1细胞孵育冰上30min。

[0099] (2) 293T-PD-1细胞及293T细胞(PKh26)染色步骤:293T-PD-1用不全DMEM培养基洗一遍。弃去上清液,用500μL含有0.1% BSA的PBS重悬为A液。另一方面,在500μL含0.1%BSA的PBS中加入2μL Pkh26原液吹打混匀为B液,立即将A液与B液混匀,室温下孵育4 min。然后,迅速加入1mL的小牛血清孵育1min进行反应终止,用10mL DMEM完全培养基洗涤三次,以上所有操作需避光。

[0100] (3) 293T-PDL-1细胞及293T细胞(PKh67)染色染色步骤:293T-PD-1用不全DMEM培养基洗一遍。弃去上清液,用500μL含有0.1% BSA的PBS重悬为A液。另一方面,在500μL含0.1%BSA的PBS中加入2μL Pkh67原液吹打混匀为B液,立即将A液与B液混匀,室温下孵育4min。然后,迅速加入1mL的小牛血清孵育1min进行反应终止,用10mL DMEM完全培养基洗涤三次,以上所有操作需避光。

[0101] (4) 293T-PD-1细胞与293T-PDL-1细胞以及293T细胞(红)与293T细胞(绿)轻轻涡旋混匀37℃孵育10min,洗涤一次。

[0102] (5) 倾倒上清,100μL PBS重悬。

[0103] (6) 吸取10μL混合细胞悬液制备涂片,用荧光显微镜检测细胞情况。

[0104] 所述TA克隆测序中的PD-1的适配体,是序列2条中的核苷酸序列中的任意一条或两条序列。

[0105] 本发明的T细胞免疫检查点PD-1的适配体筛选、鉴定方法可以应用于抗肿瘤的临床试验。

[0106] 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-1的适配体筛选、鉴定方法及抗肿瘤应用

<130> 2019-12-30

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 1

gtacagttcc cgtccctgca ctaca 25

<210> 1

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence Latin)

<400> 1

gtacagttcc cgtccctgca ctacatttt gtcgaggcatttcttatt catgctgttc 60

cggca 65

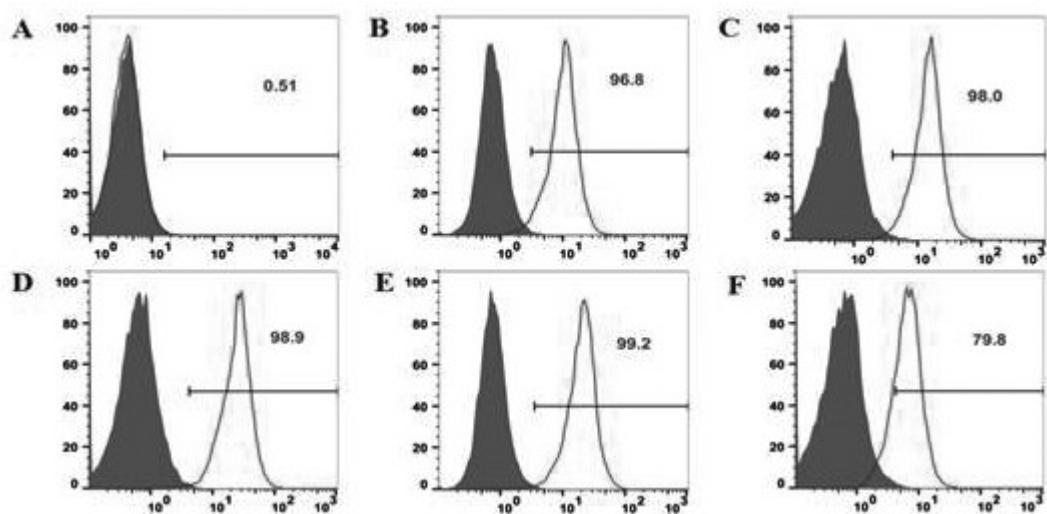
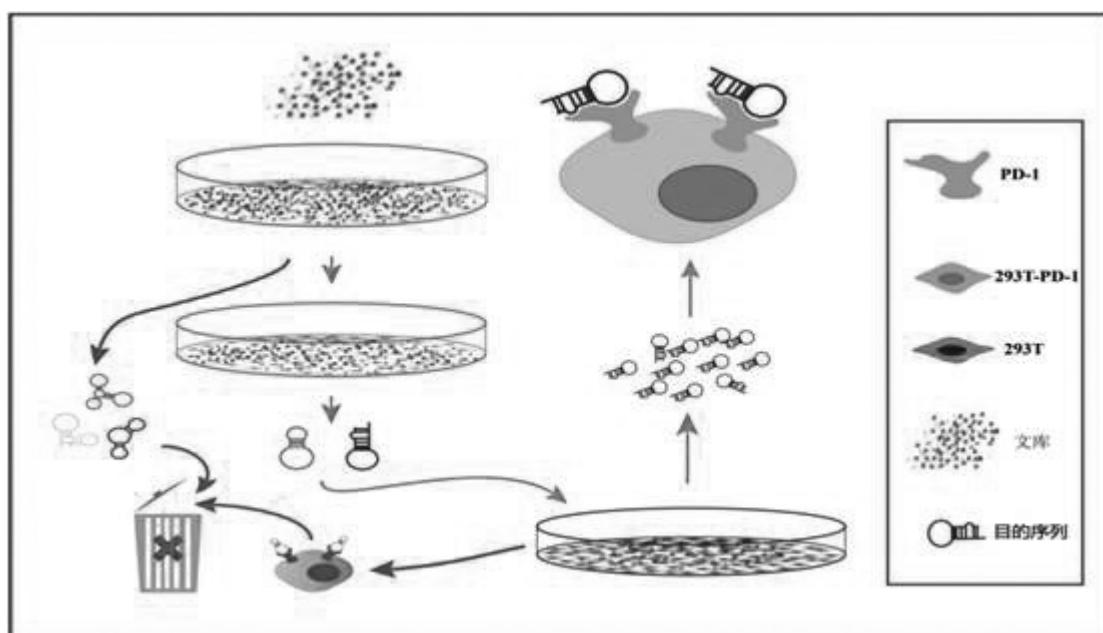


图 1



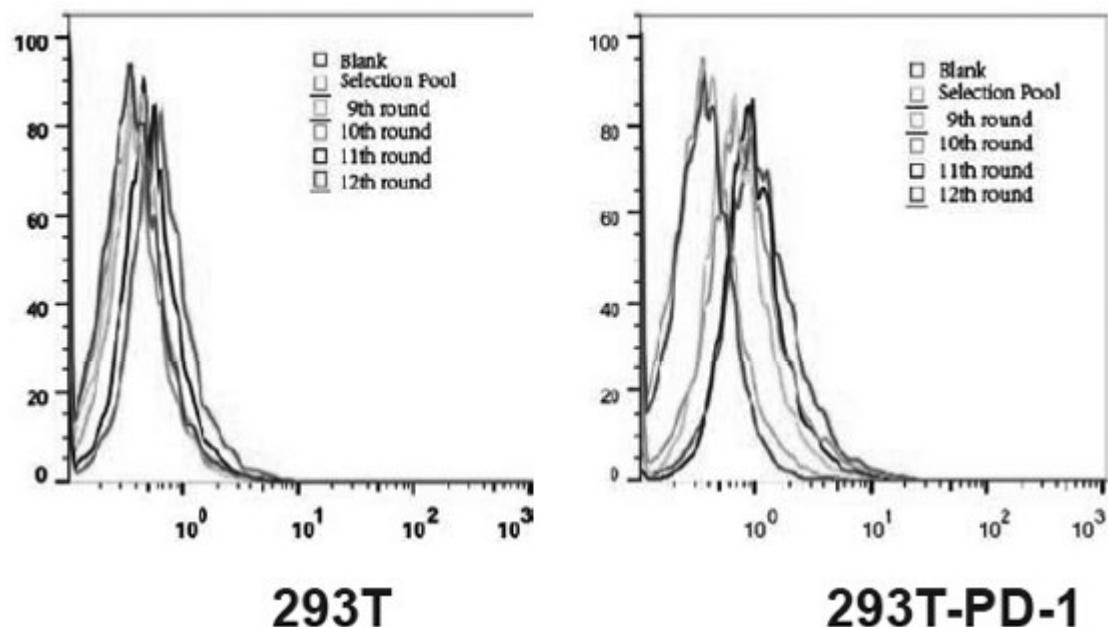


图 3

冬 4

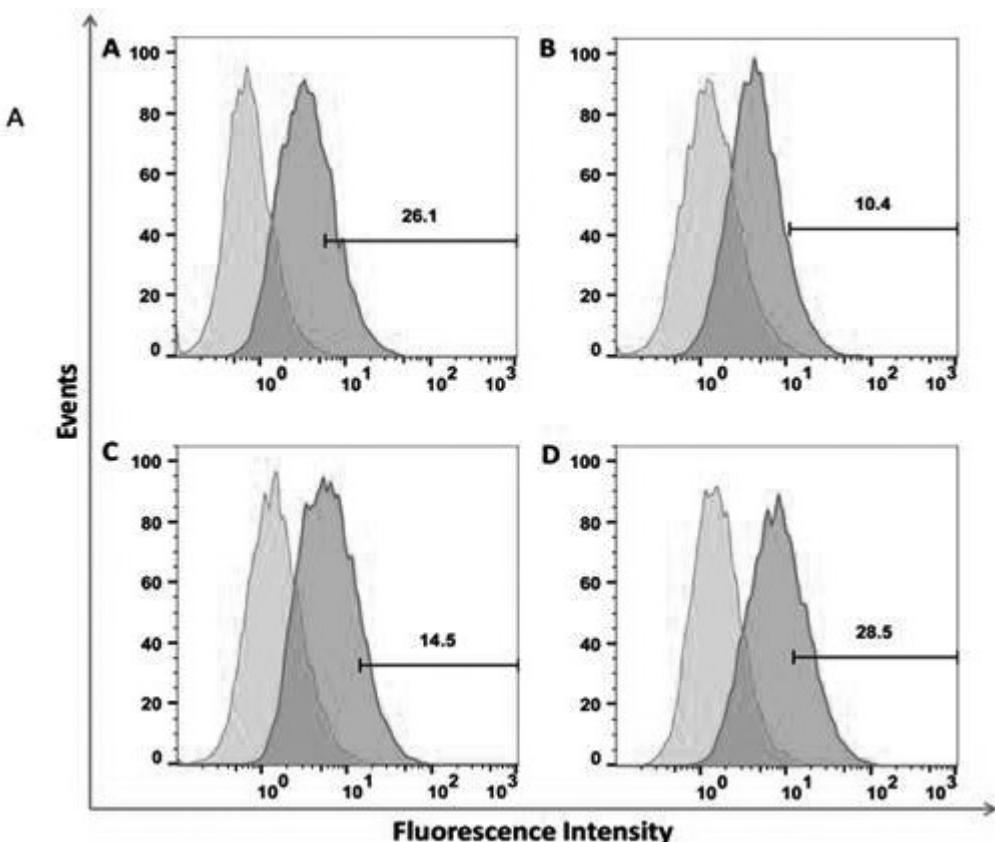


图 5

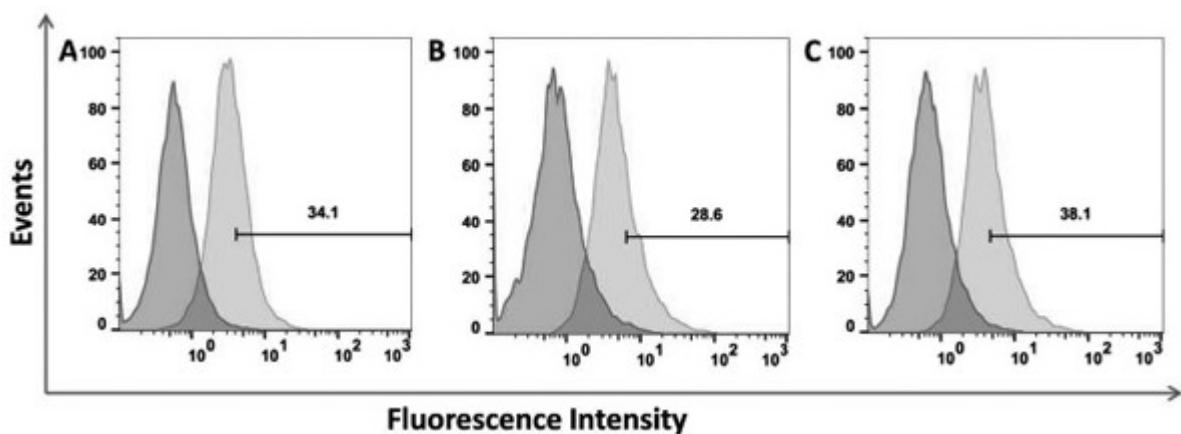


图 6

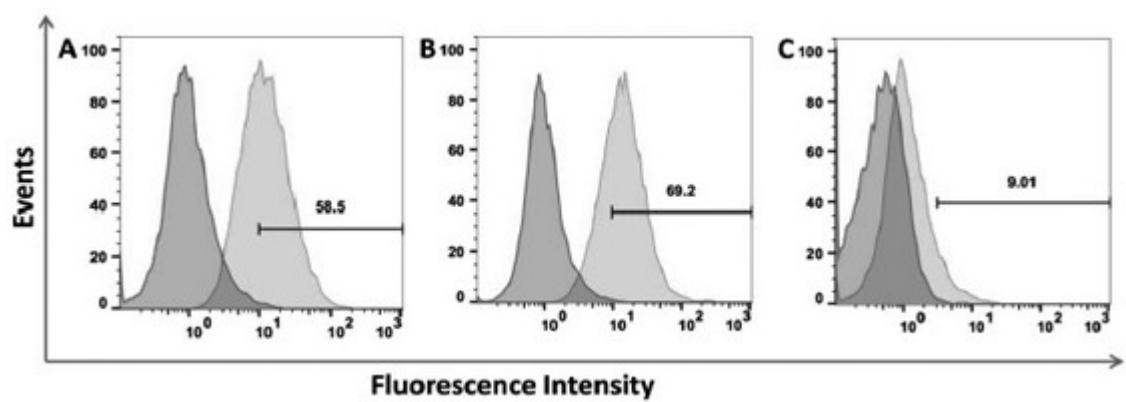


图 7

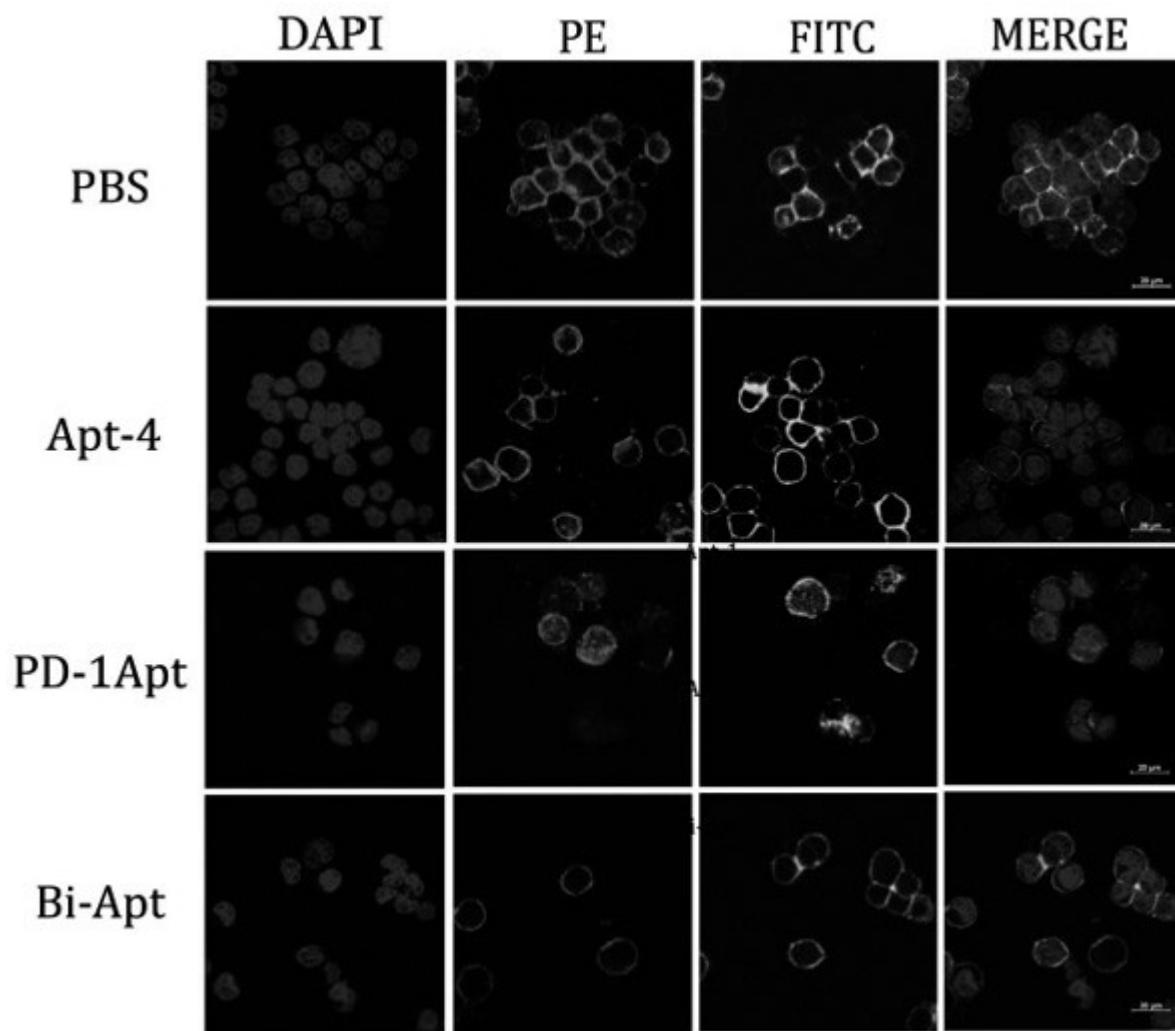


图 8

专利名称(译)	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		
公开(公告)号	<a href="#">CN111154765A</a>	公开(公告)日	2020-05-15
申请号	CN201911400634.5	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 钟莉娟		
发明人	赵永祥 李大力 程亮 彭睿 钟莉娟		
IPC分类号	C12N15/115 C12N15/10 G01N33/68 G01N33/53 A61K31/7088 A61P35/00		
代理人(译)	张锋		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及一种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，包括以下步骤：1) 干粉ss DNA文库的预处理；2) 正筛选；3) 反筛选；4) PCR扩增；5) 单链DNA制备；6) 多轮筛选；7) 克隆与测序；8) 流式细胞术检测；9) 免疫荧光检测；10) 检测及分离；11) 切片；12) 检测中Bi-Apt的封闭性，本发明通过细胞筛选针对于PD-1蛋白的适配体，采用将靶蛋白表达在细胞膜表面，通过自行构建293T细胞系实现对靶标分子PD-1的稳定表达，选取T细胞并将其表面免疫抑制性靶点PD-1进行封闭，在靶分子方面选择的是特异表达的PD-1分子，完成整个筛选过程，本发明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。

