



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107794268 B

(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201710150320.9

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2017.03.14

G01N 33/535 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/533 (2006.01)

申请公布号 CN 107794268 A

审查员 熊壮壮

(43) 申请公布日 2018.03.13

(73) 专利权人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区麓山南路2号

(72) 发明人 谭蔚泓 孙洋 叶茂 方晓红

莫柳婷 赵子龙

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责

任公司 43113

代理人 马强 周栋

(51) Int. Cl.

C12N 15/115 (2010.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

检测人PDL1蛋白的核酸适体及其在制备检测制剂中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测人PDL1蛋白的核酸适体,其序列中含有如SEQ ID NO.1所示的序列。同现有的一些技术相比本发明的优点在于核酸适体具有与蛋白相似的亲和力和特异性而分子量小,免疫源性低,易于体外合成并修饰,稳定性好易于保存。采用本发明进行PDL1蛋白水平的检测更为简便、迅速、重现性好且极大地降低了成本。

1. 一种核酸适体在制备检测人PDL1制剂中的应用,其特征在于,所述核酸适体序列如SEQ ID NO. 1所示。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列为SEQ ID NO.3- SEQ ID NO.7所示的序列。
3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列中,SEQ ID NO.1所示的序列进被二聚或三聚化。
4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列被二聚或三聚化。
5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列中,SEQ ID NO. 1所示的序列被甲基化修饰。
6. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列被甲基化修饰。
7. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述核酸适体序列连接上荧光物质、放射性物质、治疗性物质、生物素或被酶标记。

检测人PDL1蛋白的核酸适体及其在制备检测试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种可用于细胞及组织水平人PDL1检测的核酸适体及其制备检测试剂的应用方法。

技术背景

[0002] 传统的肿瘤治疗方法主要是手术治疗结合化疗放疗。但传统疗法存在很多不足,比如副作用大,病人往往饱受折磨;另外易复发。近年来越来越多的目光聚焦于靶向治疗、免疫治疗等新的治疗方法。

[0003] 人体的免疫系统通过免疫激活和免疫抑制受体维持动态的平衡状态。以T细胞为例,免疫抑制主要是通过其表面的免疫抑制受体实现的,其中包括两个已用于临床的药物靶点CTLA-4和PD1(Programmed death protein 1(PD1),程序性死亡受体1,可被诱导表达于多种免疫细胞包括T细胞、B细胞、树突状细胞和单核细胞等。其配体PDL1(programmed death ligand 1)分布比较广泛,如T/B细胞、血管内皮细胞、多种间质细胞、肝细胞、胰岛细胞、神经胶质细胞、胎盘细胞、以及多种肿瘤细胞等,预示着其在机体免疫调控中发挥重要作用。PD1与PDL1结合之后会诱导T细胞的动能耗尽、凋亡等,研究表明其参与免疫排异反应、自身免疫疾病、动脉粥样硬化、肿瘤等多种疾病。

[0004] 近年来PD1/PDL1在肿瘤中的作用备受关注,目前已报道PDL1在多种肿瘤细胞中高表达,如宫颈癌、胰腺癌、泌尿上皮癌、胃癌、食管癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、胶质瘤、头颈部细胞癌、白血病、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、多发性骨髓瘤等。近两年多种靶向PD1/PDL1的药物纷纷开展了临床试验,包括中国的首个PDL1单克隆抗体KN035,另外目前FDA已经批准两个PD1的单克隆抗体用于临床治疗,分别是百时美施贵宝的Opdivo和默沙东的Keytruda,获批的适应症是黑色素瘤、晚期肾细胞癌和非小细胞肺癌。目前PDL1的单克隆抗体尚未上市,但罗氏、阿斯利康、默克/辉瑞等公司的PDL1抗体已经进入临床III期实验,而罗氏的Atezolizumab已经向FDA提交了膀胱癌和非小细胞肺癌的BLA申请。

[0005] 新抗体的研发及上市确实鼓舞人心,然而大部分的抗体药物制作周期长、成本高、售价昂贵,且作为生物大分子往往免疫源性高,治疗往往伴随着较多的副作用。核酸适体作为化学抗体具有合成周期短、合成成本低、重复性好、稳定、易于保存、易于修饰等等优点。近年来FDA已经批准核酸适体Macugen用于治疗老年黄斑性病变,另外核酸适体RB006、AS1411也已经进入临床实验。

[0006] 目前为止尚未有针对人PDL1蛋白的核酸适体报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种高特异性、稳定性、可用于人PDL1蛋白及相关样本检测的核酸适体及其制备检测试剂的应用方法。

[0008] 为了达到上述目的,本发明提供的技术方案为:

[0009] 所述检测人PDL1蛋白的核酸适体序列中含有如SEQ ID NO.1所示的序列。

[0010] 优选地,所述核酸适体序列中,与SEQ ID NO.1所示的序列两端连接的碱基被删或被人工替换。

[0011] 优选地,所述核酸适体序列中,SEQ ID NO.1所示的序列进被二聚或多聚化。

[0012] 优选地,所述核酸适体序列被二聚或多聚化。

[0013] 优选地,所述核酸适体序列中,SEQ ID NO.1所示的序列被硫代修饰或甲基化修饰。

[0014] 优选地,所述核酸适体序列被硫代修饰或甲基化修饰。

[0015] 优选地,所述核酸适体序列连接上荧光物质、放射性物质、治疗性物质、生物素或被酶标记。

[0016] 优选地,所述核酸适体的序列如SEQ ID NO.2所示。

[0017] 上述核酸适体均可用于制备检测人PDL1制剂。

[0018] 下面对本发明作进一步说明:

[0019] 本发明所述核酸适体的基础序列如下:

[0020] 5' TAAAGGGCGGGGGTGGGGTGGTGTAGTTGTTTTTCTGTTTC 3' (SEQ ID NO.2),命名为核酸适体Ap3。其中划线部分为保守序列(SEQ ID NO.1)。

[0021] 本发明所述的检测人PDL1蛋白的核酸适体还可以在保持Ap3下划线部分的保守核苷酸序列不变的情况下将核酸适体进行修饰和改造,具体包括如下几种:

[0022] a) 核酸适体Ap3下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端的核苷酸进行删减;

[0023] b) 核酸适体Ap3下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端核苷酸的碱基进行人工碱基替换;

[0024] c) 核酸适体Ap3下划线部分的保守序列核苷酸或整个序列进行二聚或多聚化;

[0025] d) 核酸适体Ap3下划线部分的保守序列核苷酸或整个序列进行修饰,如硫代修饰,甲基化修饰;

[0026] e) 核酸适体Ap3连接上荧光物质、放射性物质、治疗性物质、生物素、或者酶标记。

[0027] 本发明所述的检测人PDL1蛋白的核酸适体与PDL1具有特异性结合,可用于检测不同细胞系及组织样本中PDL1蛋白的水平,为临床诊断、分型和给药提供相应的依据。与现有技术相比本发明的优点在于:本发明得到的核酸适体具有与抗体相类似的亲和力和特异性;分子量小;无免疫源性;易于体外化学合成;易于进行修饰、标记、取代等;序列稳定,易于长期保存。用本发明的核酸适体进行人PDL1蛋白检测,操作更为简便,快捷,且使用成本低,周期短,重复性好。

[0028] 总之,本发明首次报道了一条可以特异性识别人PDL1蛋白的核酸适体,可以特异性识别不同细胞系中PDL1的表达水平,能够一定程度上阻断PD1与PDL1的结合,改善T细胞的活性。为PDL1相关疾病的早期诊断和靶向治疗提供了新的手段。

附图说明

[0029] 图1为用非小细胞肺癌结合的aptamer库与过表达PDL1的人非小细胞肺鳞癌细胞H1299以及未处理的H1299细胞的结合情况;

[0030] 图2核酸适体Ap3与PDL1纯蛋白以及细胞裂解液中PDL1结合的情况;

- [0031] 图3核酸适体Ap3与PDL1抗体竞争性结合PDL1;
- [0032] 图4对H-P细胞进行PDL1蛋白敲低、过表达均会影响Ap3的结合;
- [0033] 图5明确Ap3与PDL1表达水平不同的细胞系的结合能力;
- [0034] 图6考察Ap3与非小细胞肺癌组织的结合能力以及与PDL1蛋白的相关性;
- [0035] 图7对Ap3的性质考察及优化;
- [0036] 图8核酸适体Ap3的功能考察。
- [0037] 具体实施方法
- [0038] 以下实施实例中的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下属实例中所用的实验材料如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买所得。
- [0039] 细胞来源
- [0040] 本实验所用到的非小细胞肺癌细胞株均来源于中南大学刘静教授实验室
- [0041] 实施例1:人PDL1蛋白特异性结合的aptamer的筛选
- [0042] 构建PDL1质粒,转染非小细胞肺癌细胞株H1299,通过分选流式筛选PDL1稳定高表达的细胞株记为H1299-PDL1 (H-P)。用目前报道的非小细胞肺癌相关的aptamer库,分别考察其与H1299细胞以及过表达PDL1蛋白的H1299细胞 (H-P) 的结合能力,最终挑选出一条差别较明显的核酸适体,命名为Ap3。
- [0043] 实施例2:明确核酸适体Ap3与PDL1蛋白的结合
- [0044] H-P细胞裂解液与核酸适体Ap3或文库于4度孵育1h,之后将混合液与标记有链霉亲和素的琼脂糖球珠于4度孵育1h,清洗之后用2X的蛋白上样缓冲液将结合到球珠上的蛋白洗脱并用Western Blotting实验进行分析。
- [0045] 人的纯PDL1蛋白(义翘神州生物科技有限公司)与Ap3或文库于4度孵育1h之后将混合液与标记有链霉亲和素的琼脂糖球珠于4度孵育1h,清洗之后用2X的蛋白上样缓冲液将结合到球珠上的蛋白洗脱并用Western Blotting实验进行分析。
- [0046] 实施例3:核酸适体Ap3可与PDL1的抗体竞争性结合H-P细胞
- [0047] 将核PDL1抗体单独与H-P细胞孵育或20倍于PDL1抗体的Ap3与PDL1抗体同时跟H-P细胞孵育,清洗之后对比细胞上结合的PDL1抗体的荧光强度 (PE)。
- [0048] 实施例4:对H-P细胞进行PDL1蛋白的敲低、过表达会影响核酸适体Ap3的结合
- [0049] 用PDL1的siRNA对H-P细胞中的PDL1蛋白进行敲低,用PE-PDL1抗体检测膜表面蛋白的敲低效果,再检测核酸适体Ap3的结合情况。
- [0050] 构建pcmv-PDL1质粒,将其转染到H-P细胞中,分选出PDL1表达情况不同的细胞,考察Ap3的结合能力。
- [0051] 实施例5:明确Ap3与PDL1表达水平不同的细胞系的结合能力
- [0052] 用PE-PDL1抗体明确不同非小细胞肺癌细胞 (A549, H1299,) 中PDL1蛋白的表达情况,明确核酸适体Ap3的结合能力。
- [0053] 实施例6:考察Ap3与非小细胞肺癌组织的结合能力以及与PDL1蛋白的相关性
- [0054] 用PE-PDL1抗体明确不同非小细胞肺癌组织样本中PDL1蛋白的表达情况,明确核酸适体Ap3的结合能力,并分析两者的相关性。
- [0055] 实施例7:对Ap3的性质考察及优化
- [0056] 平行设置多组H-P细胞与梯度浓度的Ap3进行孵育,清洗之后用流式细胞术检测得

出对应浓度的平均荧光强度,扣除文库的非特异性吸附产生的平均荧光强度,利用 $Y = B_{\max}X/(K_d+X)$,以梯度浓度为横坐标,平均荧光强度为纵坐标。

[0057] 通过逐渐删减两端固定序列的方法,得到删减后的6条ssDNA序列。序列的碱基组成如下:

[0058] (下划线部分为Ap3的保守核苷酸序列)

[0059] Ap3-S41: (5' 端删减4个碱基)

[0060] GGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGTAGTTGTTTTTCTGTTTC (SEQ ID NO.3)

[0061] Ap3-S40: (3' 端删减5个碱基)

[0062] TAAAGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGTAGTTGTTTTTCT (SEQ ID NO.4)

[0063] Ap3-S35: (3' 端删减10个碱基)

[0064] TAAAGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGTAGTTGTTT (SEQ ID NO.5)

[0065] Ap3-S26: 3' 端删减15个碱基)

[0066] TAAAGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGTAGT (SEQ ID NO.6)

[0067] Ap3-S36: (5' 端删减4个碱基, 3' 端删减5个碱基)

[0068] GGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGTAGTTGTTTTTCT (SEQ ID NO.7)

[0069] Ap3-S22: (5' 端删减4个碱基, 3' 端删减19个碱基)

[0070] GGGCGGGGGGTGGGTGGTTGG (SEQ ID NO.1)

[0071] 将一系列删减后的Ap3序列及全长的Ap3序列与H-P细胞孵育后进行流式细胞术检测。结果发现Ap3-S22的结合能力比全长序列更强。

[0072] 将Ap3-S22的二聚体、三聚体及全长的Ap3序列与H-P细胞孵育后进行流式细胞术检测。结果发现Ap3-S22三聚体的结合能力比全长序列更强。Ap3-S22二聚体、三聚体碱基组成如下:

[0073] Ap3-S22二聚体:

[0074] GGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGG (SEQ ID NO.8)

[0075] Ap3-S22三聚体:

[0076] GGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGGGGGCGGGGGGTGGGTGGTTGG (SEQ ID NO.9)

[0077] 考察Ap3三聚体与H-P细胞亲和力的方法与之前相同。

[0078] 对Ap3进行硫代修饰, Ap3中TAAAGGGCGG (SEQ ID NO.10) 和TTTTCTGTTTC (SEQ ID NO.11) 被硫代修饰:

[0079] 首先利用流式细胞术检测修饰后的Ap3与H-P细胞的结合情况, 然后利用琼脂糖凝胶电泳技术研究修饰前后的Ap3在完全培养基中的稳定性情况。

[0080] 实施例8: 核酸适体Ap3的功能考察

[0081] H-P细胞结合PD1蛋白, 通过PE-PD1抗体考察其有效结合; 用20X的核酸适体Ap3竞争结合PD1蛋白, 再考察PE的荧光强度改变。

[0082] 永生化的人白血病T细胞Jurkat经PHA, PMA, CD3活化之后用PE-PD1检测其表面PD1的表达情况。T细胞活化之后与H-P细胞按4:1接种, 并用Ap3或lib阻断PDL1与PD1两者结合, 考察T细胞分泌的IL-2的产量及T细胞的增殖, 凋亡水平的改变。

[0083] 皮下注射H460细胞, 建立小鼠皮下移植瘤模型, 待肿瘤长至直径0.5cm时尾静脉注

射4.5nM的核酸适体Ap3或文库,考察并对比靶向肿瘤的能力,解剖小鼠内脏,考察其代谢。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 湖南大学

[0003] <120> 检测人PDL1蛋白的核酸适体及其在制备检测制剂中的应用

[0004] <160> 11

[0005] <170> PatentIn version 3.3

[0006] <210> 1

[0007] <211> 22

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人工合成

[0010] <400> 1

[0011] gggcggggggg tggggtgggt gg 22

[0012] <210> 2

[0013] <211> 45

[0014] <212> DNA

[0015] <213> 人工合成

[0016] <400> 2

[0017] taaagggcgg ggggtggggt ggttggtagt tgttttttct gtttc 45

[0018] <210> 3

[0019] <211> 41

[0020] <212> DNA

[0021] <213> 人工合成

[0022] <400> 3

[0023] gggcggggggg tggggtgggt ggtagttggt ttttctgttt c 41

[0024] <210> 4

[0025] <211> 40

[0026] <212> DNA

[0027] <213> 人工合成

[0028] <400> 4

[0029] taaagggcgg ggggtggggt ggttggtagt tgttttttct 40

[0030] <210> 5

[0031] <211> 35

[0032] <212> DNA

[0033] <213> 人工合成

[0034] <400> 5

[0035] taaagggcgg ggggtggggt ggttggtagt tgttt 35

[0036] <210> 6

[0037] <211> 30

[0038] <212> DNA

[0039]	<213> 人工合成
[0040]	<400> 6
[0041]	taaagggcgg ggggtggggt ggtagtagt 30
[0042]	<210> 7
[0043]	<211> 36
[0044]	<212> DNA
[0045]	<213> 人工合成
[0046]	<400> 7
[0047]	gggcgggggg tggggtgggt ggtagttgtt ttttct 36
[0048]	<210> 8
[0049]	<211> 44
[0050]	<212> DNA
[0051]	<213> 人工合成
[0052]	<400> 8
[0053]	gggcgggggg tggggtgggt gggggcgggg ggtggggtgg ttgg 44
[0054]	<210> 9
[0055]	<211> 66
[0056]	<212> DNA
[0057]	<213> 人工合成
[0058]	<400> 9
[0059]	gggcgggggg tggggtgggt gggggcgggg ggtggggtgg ttgggggcgg ggggtggggt 60
[0060]	ggttgg 66
[0061]	<210> 10
[0062]	<211> 10
[0063]	<212> DNA
[0064]	<213> 人工合成
[0065]	<400> 10
[0066]	taaagggcgg 10
[0067]	<210> 11
[0068]	<211> 11
[0069]	<212> DNA
[0070]	<213> 人工合成
[0071]	<400> 11
[0072]	ttttctgttt c 11

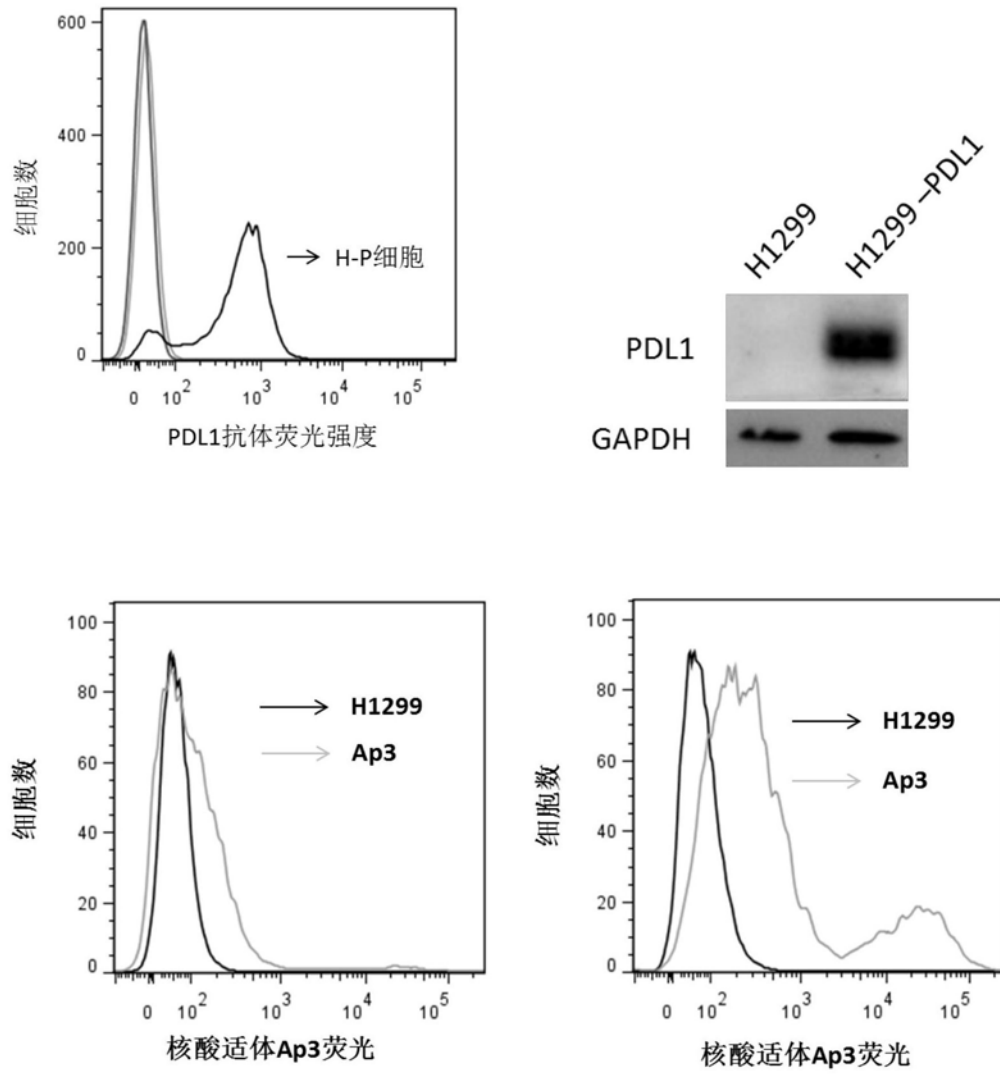


图1

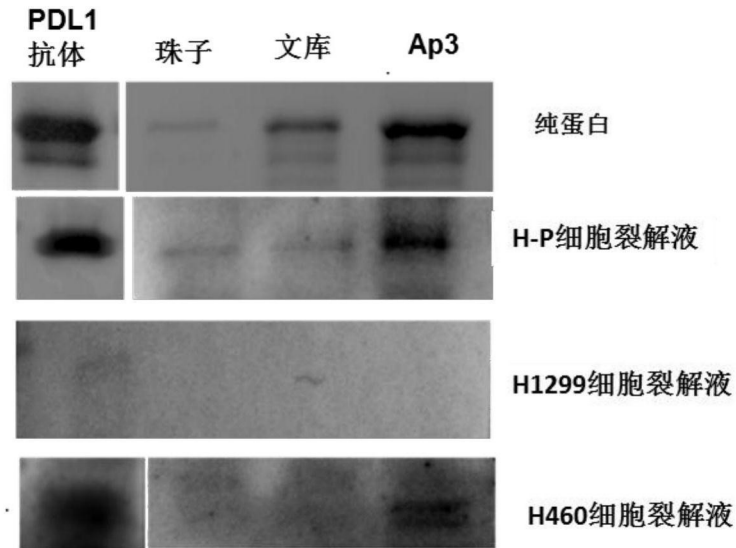


图2

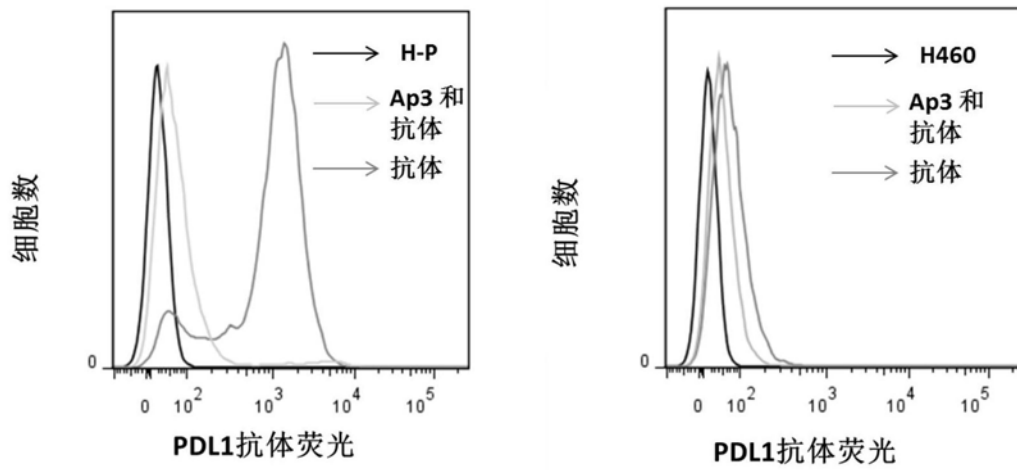


图3

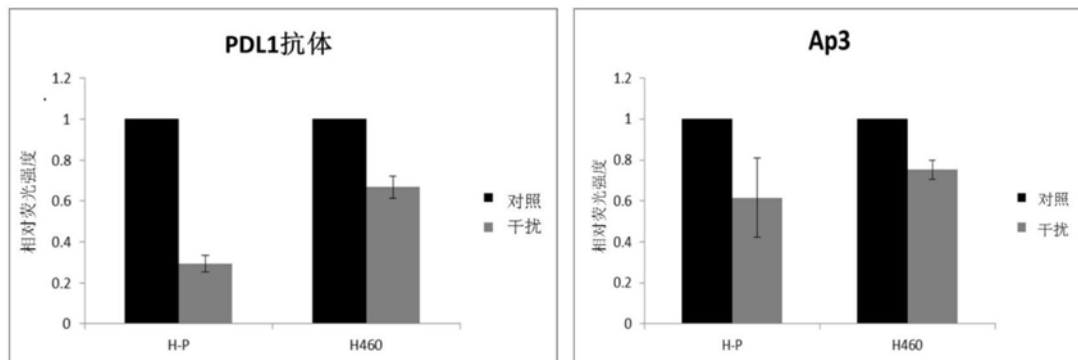


图4

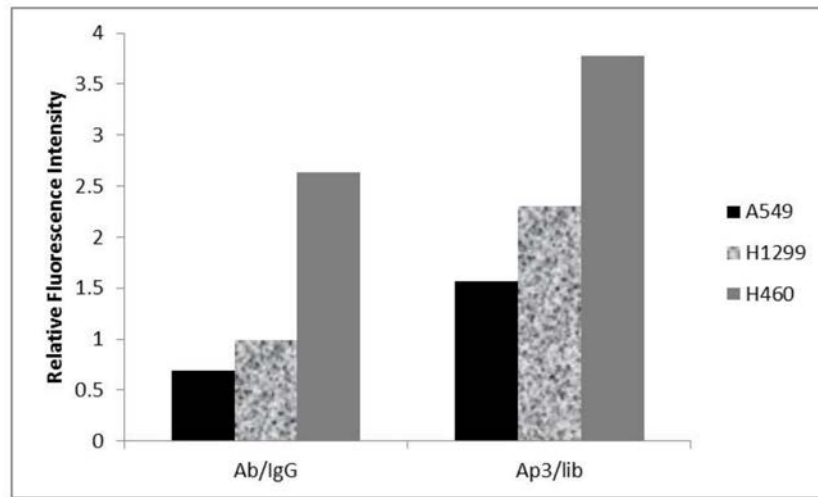


图5

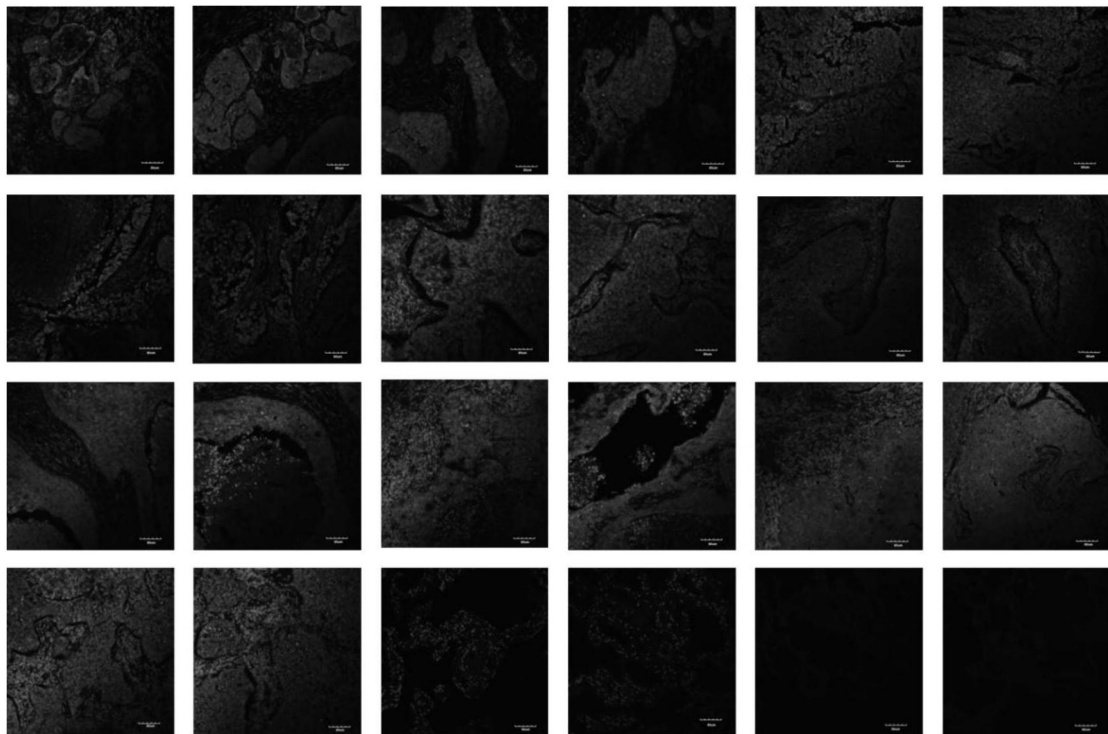


图6

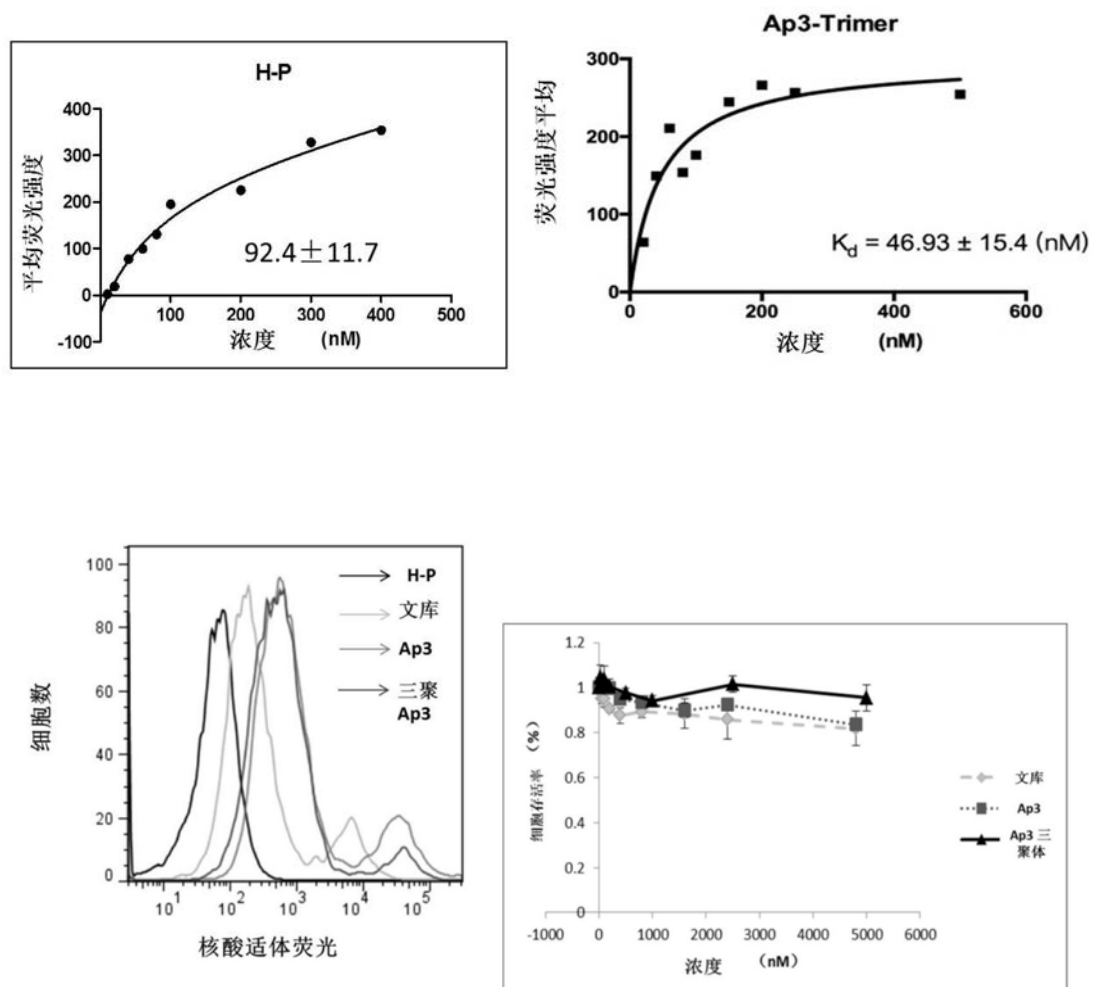


图7

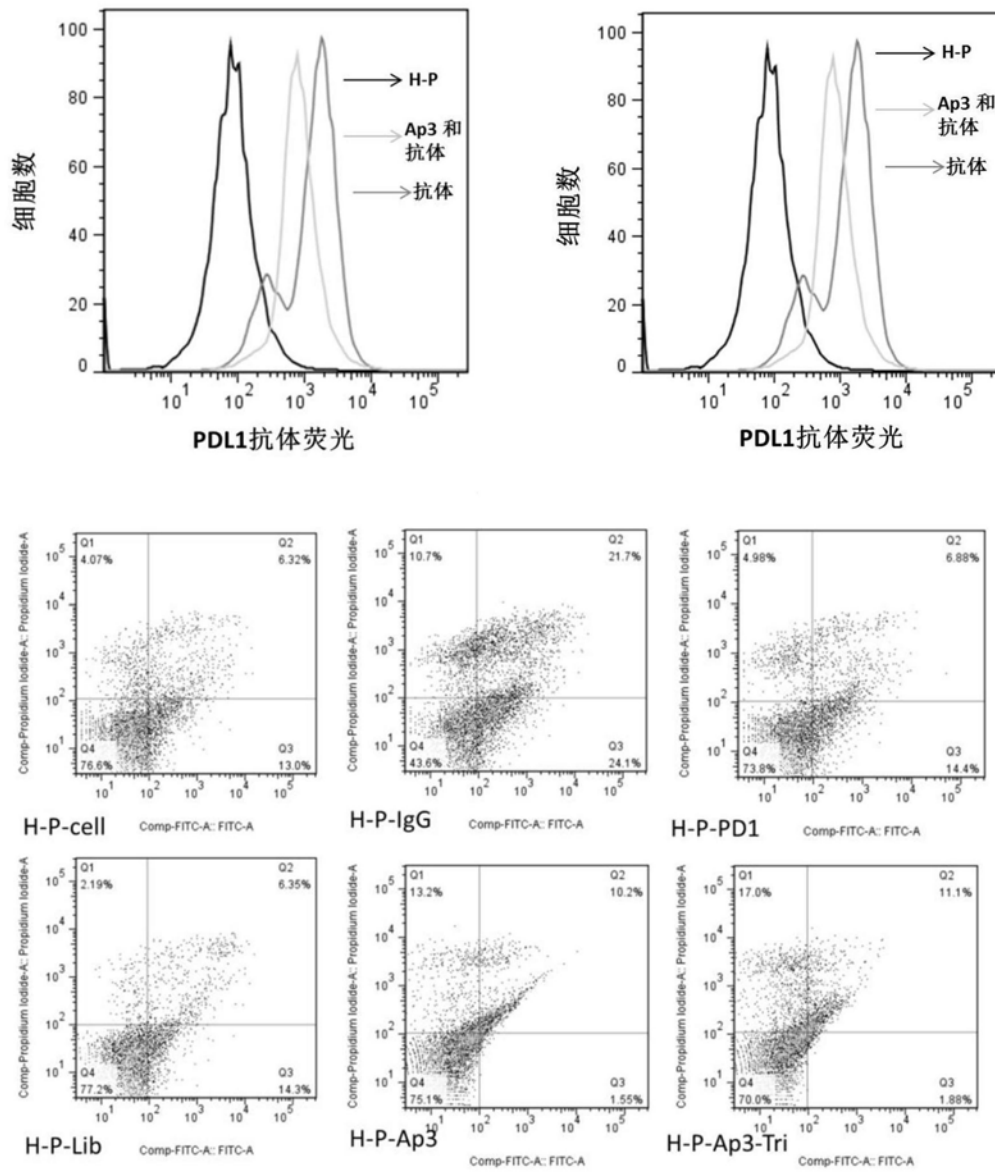


图8