



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106350533 B

(45)授权公告日 2020.07.17

(21)申请号 201610881376.7
 (22)申请日 2016.10.09
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106350533 A
 (43)申请公布日 2017.01.25
 (66)本国优先权数据
 201510649025.9 2015.10.09 CN
 (73)专利权人 上海宇研生物技术有限公司
 地址 200333 上海市普陀区中江路879弄4
 号楼401室
 (72)发明人 施炜星 杨春霞 杜盈 房永生
 (74)专利代理机构 上海三方专利事务所(普通
 合伙) 31127
 代理人 吴玮 杨懿
 (51)Int.Cl.
 C12N 15/62(2006.01)
 C12N 15/867(2006.01)
 A61K 35/17(2015.01)
 A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
 WO 2014165707 A3,2015.03.12,
 CN 105874061 A,2016.08.17,
 CN 109422815 A,2019.03.05,
 WO 2019003164 A1,2019.01.03,
 CN 108864310 A,2018.11.23,
 US 2018186878 A1,2018.07.05,
 WO 2018107058 A1,2018.06.14,
 WO 2018009972 A1,2018.01.18,
 刘青春等.重组共表达载体pSNAV2.0-HSV1-
 tk-IRES-hIL-1Ra的构建及其在滑膜细胞中的表
 达.《山东大学学报(医学版)》.2009,第47卷(第9
 期),81-85.

白静等.抗PD-L1-CAR基因的构建
 及CAR-T的功能活性研究.《浙江理工大学
 学报(自然科学版)》.2017,第37卷(第6期),901-
 908.

张文君等.PD-1/PD-L1信号通路在恶性肿瘤
 免疫治疗中的作用.《中国医药导报》.2016,第13
 卷(第12期),57-60.

审查员 彭郁葱

权利要求书1页 说明书12页
 序列表3页 附图2页

(54)发明名称

Anti-PD-L1-CAR-T及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及Anti-PD-L1-CAR-T及其制备方
 法和应用,将PD-L1抗体基因与CAR-T的铰链区、
 跨膜区及胞内信号区基因片段合成,其构建载体
 为PCDH慢性病毒载体:pcDH-CNV-MCS-EF1-
 copGFP,本发明首次将抗PD-L1基因构建至CAR基
 因中,为治疗肿瘤提供了一种新的思路。



1. 一种anti-PD-L1-CAR-T基因,其碱基序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种权利要求1的anti-PD-L1-CAR-T基因的制备方法,其特征在于包括以下步骤:
将获得的PD-L1抗体基因与相关的铰链区、跨膜区及胞内信号区基因片段合成Anti-PD-L1-CART-CD28-41BB-CD3-IRES-HSV-TK基因序列,如SEQ ID NO:1所示,并选定构建载体为PCDH慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP。
3. 如权利要求2的anti-PD-L1-CAR-T基因的制备方法,其特征在于还包括制备PD-L1的抗体基因的步骤。
4. 如权利要求2的anti-PD-L1-CAR-T基因的制备方法,其特征在于还包括PD-L1的抗体基因的活性检测步骤。
5. 如权利要求2的anti-PD-L1-CAR-T基因的制备方法,其特征在于所述的PD-L1抗体的VH区碱基序列如SEQ ID NO:2,VK区碱基序列如SEQ ID NO:3。
6. 权利要求1所述anti-PD-L1-CAR-T基因在制备肿瘤药物中的应用。

Anti-PD-L1-CAR-T及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及Anti-PD-L1-CAR-T及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 利用人体自身的免疫系统治疗肿瘤,即肿瘤免疫治疗,近年来发展迅速,它的临床试验进展令人瞩目,被《科学》杂志评为2013年十大科学突破第一位。肿瘤免疫治疗主要包括非特异性的免疫刺激,免疫检验点抗体,过继细胞治疗,单克隆T细胞受体治疗和肿瘤治疗性疫苗等。过继T细胞治疗是肿瘤免疫疗法的一种,已成为继手术,放疗,化疗外的第四种治疗肿瘤的方法。肿瘤的过继免疫细胞治疗,经历了从早期的淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)治疗,细胞因子诱导的杀伤性细胞(CIK,DC-CIK)治疗,NK细胞治疗,到肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)治疗,抗原特异性的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)治疗,嵌合抗原受体T细胞(CART)治疗。前面三者LAK和CIK细胞治疗是非特异性的过继免疫细胞治疗,后三者为特异性的过继免疫细胞治疗。特异性的过继免疫细胞治疗杀伤肿瘤机制明确,肿瘤杀伤的专一性强,优势显而易见。

[0003] 嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptors,CARs)T细胞技术(CAR-T)主要是通过构建嵌合抗原受体基因转染患者的T细胞,使T细胞表面能表达嵌合抗原受体而成为CAR-T细胞。CARs基因包括能识别某种肿瘤抗原的单链抗体的胞外区、跨膜区(一般是引入多个共刺激信号分子,如CD28、CD134和CD137等),以及T细胞信号分子CD3- ζ 链的胞内区。因此CAR-T细胞既能识别肿瘤细胞上的抗原,又因带有T细胞的信号分子CD3- ζ 和共刺激分子区域,使得T细胞在体外能大量增殖,回输到患者体内后也能存活相当一段时间,能靶向性地有效杀伤肿瘤细胞。

[0004] 与其它的免疫细胞治疗相比,CAR-T细胞技术有更多的优势。首先,CAR-T细胞拉近了与肿瘤细胞的距离,犹如生物导弹,直接精确地攻击肿瘤细胞。其次,由于CAR-T细胞杀伤肿瘤不依赖于MHC,不需要抗原提呈机制来识别肿瘤抗原,这样就克服了肿瘤细胞通过MHC的下调和抗原提呈的降低而介导的免疫逃脱,更有效地杀伤肿瘤细胞。再次,CAR基因的构建是基于肿瘤细胞表达的肿瘤抗原,但这个肿瘤抗原不一定具有肿瘤的特异性。鉴于多种肿瘤细胞可能表达同一个肿瘤抗原,以此抗原建立的CAR-T细胞可以在多种肿瘤的治疗中被应用。最后,CAR-T细胞治疗肿瘤的效果更好,尤其是新一代的CAR结构中引入了促进T细胞增殖和活化的共刺激分子序列,T细胞进入体内不但能继续增殖,而且能长期存活。

[0005] 另外一种肿瘤的免疫治疗方法是免疫检验点抗体的治疗,免疫检验点抗体可以抑制病人T细胞上的免疫检验点,从而来激活自身的T细胞。目前正在研究的免疫检验点主要有3个,细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxicT-lymphocyte-associated antigen 4,CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death protein 1,PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-1 ligand,PD-L1)。PD-1在2000年被发现,去年上市的抗PD-1明星药物Nivolumab,其作用原理是通过结合细胞PD-1分子,干扰PD-1和受体的结合,阻断其信号通路,唤醒免疫系统继续攻击黑色素瘤细胞。PD1是一种免疫球蛋白超家族I型跨膜糖蛋白,与

其配体PD-L1、PD-L2相结合而对淋巴细胞的活化产生抑制作用,从而抑制免疫细胞的免疫应答反应。其中PD-L1主要表达在多种肿瘤细胞表面,因此与肿瘤细胞躲避免疫应答的机制有关。

[0006] 目前,已有超过20项的CAR-T细胞疗法的临床试验正在进行,主要是通过肿瘤细胞表面的CD19抗原识别,用于成人急性B淋巴细胞白血病。本发明将免疫检验点PD-L1的抗体用于CAR-T技术中,使T细胞表面表达抗PD-L1的嵌合抗原受体,一方面抑制了由PD-L1介导的抑制型T细胞激活通路,一方面可使T细胞与肿瘤细胞表面的PD-L1相结合,使T细胞直接作用于肿瘤细胞。由于PD-1是广泛存在于T细胞表面的免疫检验点,因此抗PD-L1-CAR-T突破了传统的CAR-T技术中肿瘤抗原的限制。虽然已经有学者将CAR-T技术(如anti Her-2 CAR-T)与免疫检验点技术(PD-1抗体)联合使用来对比单一使用时对肿瘤的效果,但是到目前为止,还没有将抗PD-L1基因构建至CAR基因中的先例。另外,PD-L1除表达在肿瘤细胞表面外,在一些正常组织中也有表达。为了阻止CAR-T细胞的脱靶效应,我们在构建的CAR基因中插入了自杀基因。本发明就抗PD-L1-CAR-T技术做详细阐述。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于将抗PD-L1基因构建至CAR基因中。

[0008] 为了实现上述目的,提供一种Anti-PD-L1-CAR-T分子,其碱基序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 本发明还包括该anti-PD-L1-CAR-T基因的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 将PD-L1抗体基因与CAR-T的铰链区、跨膜区及胞内信号区基因片段合成,其构建载体为PCDH慢性病毒载体:pcDH-CMV-MCS-EF1-copGFP。

[0011] 还包括制备PD-L1的抗体基因的步骤。

[0012] 还包括PD-L1的抗体基因的活性检测步骤。

[0013] 所述的PD-L1抗体的VH区碱基序列如SEQ ID NO:2,VK区碱基序列如SEQ ID NO:3。

[0014] 该anti-PD-L1-CAR-T基因可以用于制备肿瘤药物。

[0015] 本发明首次将抗PD-L1基因构建至CAR基因中,为治疗肿瘤提供了一种新的思路。

附图说明

[0016] 图1为实施例中的发明流程示意图。

[0017] 图2为ELISA测定上清中PD-L1活性。

[0018] 图3为ELISA测定上清中单链PD-L1抗体活性。

具体实施方式

[0019] 以下,结合实施例和附图对于本发明做进一步说明,实施例仅用于解释说明而不用来限定本发明的保护范围。

[0020] 本实用新型的设计思路如图1所示,其具体步骤如下:

[0021] 第一部分:PD-L1基因构建

[0022] PD-L1分泌蛋白基因合成在此基因在苏州金唯智公司完成。该基因在已报道的PD-L1基因(Gene ID: 29126)的基础上加入CD33序列,以促进PD-L1分泌型蛋白的表达。其基因

序列如SEQ ID NO:4所示。

[0023] 第二部分:PD-L1蛋白的表达及纯化

[0024] 一. COS细胞的PD-L1基因转染(转染共分为3个小组,一为转染组;一为阴性对照组;一为空白对照组)

[0025] 1. 转染前一天,取2ml, 0.7×10^6 cos细胞于6孔细胞培养板中。培养液为:DMEM+10% FCS;

[0026] 2. 第一天,稀释10 μ l lipofectamin 2000于0.1ml opti-EME培养基中,吹打混匀。

[0027] 3. 稀释2.5 μ gDNA (PD-L1 in pcDNA3, 浓度为:0.5 μ g/ μ l, 5 μ l) 于0.1ml opti-EME培养基中,吹打混匀,并与1 在室温下混匀放置20min后添加1ml的opti-EME培养基。

[0028] 4. 用1毫升opti-EME培养基在细胞板中洗涤COS细胞3遍。

[0029] 5. 2 中得到的含有PD-L1 cDNA 的培养液重悬洗涤过后的COS细胞并在37 $^{\circ}$ C下培养2h。

[0030] 6. 加入1 毫升 的含20%FBS(no p/s)的opti-EME,并在37 $^{\circ}$ C下培养24h。

[0031] 7. 第3天,观察细胞生长情况,细胞换液,每板中加入2ml的10%FBS的DMEM血清培养基(no /P/S),

[0032] 8. 第5天,吸取2 毫升上清液(储存在冰箱留用),用0.5 毫升胰蛋白酶消化细胞,洗涤,离心除去过量胰蛋白酶后,取一半细胞悬浮于10毫升含另加入50 μ g/ml的G418的细胞培养液中筛选,置于10cm的细胞培养皿中,另一半细胞用1 毫升细胞冻存液悬浮,转至冻存管,储存在-80C。

[0033] 9. 后期定期换液处理,观察细胞克隆株的形成。用带有1毫升墙头的移液枪在超净台里挑取6个培养皿中的细胞克隆至12孔的细胞培养板中,每孔加入3毫升含50 μ g/ml的G418的细胞培养液中继续培养。

[0034] 二. 双抗体夹心法检测PD-L1的表达

[0035] 1. 包被:在所需ELISA板孔中加入2 μ g/ml的puried antibody PD-L1,添加时小心加入,避免接触孔壁,加入后封板膜包被于4度放置过夜待用。

[0036] 2. 洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液(≥ 0.4 ml),静置5min后弃去,拍干。

[0037] 3. 封闭:加入300 μ l封闭液,室温下放置1小时。

[0038] 4. 洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液(≥ 0.4 ml),静置5min后弃去,拍干。

[0039] 5. 样品加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。加入各稀释浓度(具体情况具体分析)的上清液在酶标包被板上待测样品孔中。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。

[0040] 6. 试剂加样:加入50 μ l 0.16 μ g/ml的Biotin-antibody PD-L1,轻轻晃匀。

[0041] 7. 温育:用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育2h。

[0042] 8. 配液:将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用。

[0043] 9. 洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液(≥ 0.4 ml),静置2min后弃去,如此重复5次,拍干。

[0044] 10. 加酶:每孔加入酶标试剂HRP-streptavidin(1/5000稀释) 100 μ l。

- [0045] 11. 温育:用封板膜封板后置37℃温育30min。
- [0046] 12. 洗涤:操作同6。
- [0047] 13. 显色:每孔先加入显色剂s substrate TMB solution 100μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15-30min。
- [0048] 14. 终止:每孔加终止液stop solution 100μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。
- [0049] 15. 测定:以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。测定应在加终止液后15分钟以内进行。检测待测孔是否有阳性颜色反应。
- [0050] 三. PD-L1蛋白浓缩及纯化
- [0051] 1. 选择阳性表达细胞株,大量培养后收集细胞上清。准备透析以及浓缩;
- [0052] 2. 层析柱准备:将2 mL的Protino Ni-IDA Resin加到空的Protino层析柱中;
- [0053] 3. 层析柱清洗:加5个层析柱体积的ddH₂O清洗,速度:2mL/min;
- [0054] 4. 层析柱平衡:加5个层析柱体积的上样缓冲液平衡,1mL/min;
- [0055] 5. 上样:将破碎后上清缓缓上样至平衡后的层析柱,速度0.5mL/min;
- [0056] 6. 洗涤:加5个层析柱体积的上样缓冲液,速度1mL/min;
- [0057] 7. 洗脱:10个层析柱体积的洗脱缓冲液进行,2mL/管收集,速度1mL/min;
- [0058] 8. 层析柱存放:加10个层析柱体积的上样缓冲液和10个层析柱体积的去离子水冲洗层析柱。加2个层析柱体积20%的乙醇冲洗后加入20%的乙醇,将Protino Ni-IDA Resin存放于 4度;
- [0059] 9. 洗脱液透析浓缩:在5kD孔径的透析管中加入PBS进行透析,共加入5倍洗脱液体积的PBS,最终浓缩至0.5-1ml.待用
- [0060] 第三部分: PD-L1抗体的制备及抗体基因获得
- [0061] 一. 动物免疫
- [0062] 1. 试验计划对3只6周龄的雄性小鼠作为免疫对象。共经过3次免疫及一次加强免疫,采用腹腔免疫法和背部多点免疫法。
- [0063] 2. 免疫前准备:取20ug抗原于适量的PBS混合,加入等量的完全弗氏佐剂(增强抗原的免疫原性并通过乳化抗原以缓慢释放)。
- [0064] 3. 免疫:剔除动物毛发,酒精擦拭消毒。
- [0065] 4. 第一次免疫:将乳化好的抗原注射到小部皮下股腔中,采用多点免疫法并尽量防止乳化的抗原在皮下形成肿包。免疫结束后几个小时内要密切观察小鼠状态,以免发生过敏性休克或伤n出血等症状。
- [0066] 5. 第二次免疫:第一次免疫免疫两星期后进行二次免疫,用不完全弗氏佐剂取代完全弗氏佐剂,其他遵照第一次免疫方法。
- [0067] 6. 第三次免疫:第二次免疫两星期后进行第三次免疫,方法同上。
- [0068] 7. 加强免疫:细胞融合的前3天为增强免疫效果进行,无需添加佐剂,将抗原与PBS混合后直接进行腹腔免疫。
- [0069] 二. ELISA检测免疫小鼠血清中的抗体效价
- [0070] 1. 免疫后10天,尾部取血,约100 μl/只。高速离心收集血清,5000r/min,20min。甘油1:1稀释,-20度保存。
- [0071] 2. 抗原包被:用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释抗原,将抗原稀释成浓度

2.0ug/mL,在96孔的酶标反应板中以100 μl/孔包被酶标板,放置于湿盒中室温包被过夜;

[0072] 3.洗涤:用PBST洗涤96孔酶标板2次;

[0073] 4.封闭:每孔加入150 μl封闭液,室温封闭1h,封闭后甩干;

[0074] 5.加待测血清:小鼠阳性及阴性血清(免疫前血清)进行有限梯度稀释,稀释比例如下,1:100、1:700、1:4900、1:34300等各稀释梯度分别取 100 μl/孔,37度温育1h。洗涤四次。

[0075] 6.加入二抗:羊抗鼠二抗IgG-HRP按照1:4,000比例稀释,每孔100 μl,设置空白对照。37度温育1h;洗涤四次。

[0076] 7.显色反应:显色液每孔加入150 μl,室温避光反应15-20min。

[0077] 8.终止显色反应:加入50μl 2M H₂SO₄终止显色反应。

[0078] 9.酶标测定:以底物溶液加在空白对照孔内的结果做为零点校酶标仪,以450nm和590nm双波长测定OD值。

[0079] 三.细胞融合及杂交瘤细胞筛选克隆

[0080] 1.取生长状态良好的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞核小鼠脾细胞按1:1的比例混合

[0081] 2.1400r/min离心3min,弃上清,轻轻弹击离心管底部使两种细胞混匀;

[0082] 3.沿管壁缓慢加入聚乙二醇融剂,边加边缓慢的转动离心管,45 s内加完;

[0083] 4.立即加入50mL 37°C预热的培养基终止融合剂的作用,颠倒50 mL离心管3-4次,静置10 min;

[0084] 5.1400 r/min离心3 min,弃上清,用手轻弹重悬细胞,加入35 mL培养基并混匀摇混匀,将重悬细胞加入到1000mL培养基中,充分混匀后将细胞铺到96孔细胞培养板中,280 μl/孔。37°C、5% CO₂的培养箱中培养。

[0085] 6.融合7-8天后,可以观察细胞的生长状态,确定筛选时间。

[0086] 7.用PD-L1抗原以0.1 ng/mL的浓度进行包被,50μl/孔。取细胞培养上清液进行效价检测,

[0087] 8.用有限稀释法进行杂交瘤细胞亚克隆。

[0088] 四.Protein A亲和层析法纯化抗体及浓度和效价测定

[0089] 1.装柱:用10mLProtein A beads灌柱,确保柱面水平,无气泡产生。

[0090] 2.洗柱:用5-10个柱体积的PBS缓冲液清洗层析柱,然后再用Binding Buffer平衡层析柱,使pH值约为8.6。

[0091] 3.加样:将预处理的杂交瘤细胞培养上清与Binding Buffer按1:1混合,过柱,洗涤样品过柱之后再用10-20个柱体积的Binding Buffer除去杂蛋白。

[0092] 4.启动AKTA,预热30min,在收集管内加入收集体积1/10的K₂HPO₄溶液。

[0093] 5.洗脱:用pH3.7的Elution Buffer洗脱目的蛋白,密切观察检测软件的峰值。

[0094] 6.洗脱完全后,用PBS缓冲液洗柱,使其pH恢复到中性。用大约3-5个柱体积的Guanidine-HCl溶液对柱子进行再生。用PBS缓冲液洗涤层析柱,大约10-20个柱体积,至pH恢复到中性。

[0095] 7.用蛋白定量仪测定个样品浓度。

[0096] 8.用ELISA方法检测纯化抗体效价。

[0097] 五.根据获得的PD-L1抗体蛋白,其VH区如SEQ ID No:2所示,VK区如SEQ ID NO:3

所示。

[0098] 第四部分:抗PD-L1基因活性检测

[0099] 一.Anti-PD-L1的转染

[0100] 1.转染前一天,取10ml, 5×10^6 Cos细胞于10cm的培养板中,共6组。

[0101] 2.转染当天, Anti PD-L1的转染共分为2个小组,一Anti PD-L1组;一为空白对照组,每组3个重复。同时进行。

[0102] 3.稀释50 μ l lipofectamin 2000于1ml opti-EME培养基中。

[0103] 4.稀释25 μ g DNA于1ml opti-EME培养基中。并与2在室温下混匀放置20min后添加4ml的opti-EME培养基。

[0104] 5.用opti-EME培养基在细胞板中洗涤COS细胞3遍。

[0105] 6.3中得到的培养液重悬洗涤过后的COS细胞并在37 $^{\circ}$ C下培养2h。

[0106] 7.加入6ml的含20%FBS(no p/s)的opti-EME,并在37 $^{\circ}$ C下培养24h。

[0107] 8.第3天,观察细胞生长情况,细胞换液,每板中加入14ml的opti-EME培养基(no FBS/P/S)。

[0108] 9.第5天,对AntiPD-L1转染组的细胞生长液取上清保存于-20 $^{\circ}$ C待用。

[0109] 10.对细胞上清液进行蛋白浓缩(超滤),细胞上清液体积浓缩到3ml待用(10000rpm,4 $^{\circ}$ C)。

[0110] 二.ELISA检测

[0111] 1.调整肺癌细胞5853,5853-A2(均表达PD-L1),浓度为 5×10^5 铺于96孔板中,37 $^{\circ}$ C过夜。

[0112] 2.洗涤:对孵有细胞的96孔板离心,去上清,并在各孔中加入200 μ l的PBST洗涤,静置5min,去除上清。重复2遍。

[0113] 3.固定:在96板各试验孔中计入200 μ l 10% folmanin的PBST,室温下静置10min。

[0114] 4.洗涤:在各孔中加入200 μ l的PBST洗涤,静置5min,去除上清。重复3遍。

[0115] 5.封闭:去除上清,各孔中加入200 μ l封闭液(含3%BSA的PBST),室温下静置30min。

[0116] 6.抗体:去除上清,在各孔中加入相应量的抗PD-L1转染Cos细胞的上清液,室温下孵育2h。

[0117] 7.洗涤:对孵有细胞的96孔板,去除上清,并加入200 μ l PBST,静置5分钟,重复3遍

[0118] 8.二抗-HRP: 在各试验孔加入对应的二抗-HRP试剂,试剂均用封闭液稀释1000倍后使用,室温下孵育1h。

[0119] 9.洗涤:在各孔中加入200 μ l的PBST洗涤,静置5min,去除上清。重复3遍。

[0120] 10.TMB: 在各试验孔中加入100 μ lTMB Substrate solution。避光显色15min。

[0121] 11.终止:在显色后加入等量的终止液,观察颜色变化。

[0122] 12.测定:在630nm处酶标检测各孔OD.值。

[0123] 三.结果如图2和图3所示。

[0124] 图2与图3中,96孔板上孵育5853、5853A2细胞(均表达PD-L1),用PD-L1基因转染Cos细胞的上清(浓缩后)检测Cos细胞分泌的PD-L1抗体的活性。其中实验组为PD-L1抗体基因转染Cos细胞上清,对照组为不加质粒转染Cos细胞上清,培养基阴性对照组则只用培养

基作为上清。

[0125] 第五部分:Anti-PD-L1-CAR-T的制备

[0126] 一. Anti-PD-L1-CAR-T的基因合成和载体构建

[0127] 将获得的PD-L1抗体基因与相关的铰链区、跨膜区及胞内信号区基因片段合成Anti-PD-L1-CAR-CD28-41BB-CD3-IRES-HSV-TK基因序列,如SEQ ID NO:1所示。并选定构建载体为PCDH慢病毒载体(pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP)。包装载体和包膜载体来自Invitrogen的三包被系列(通用载体),此慢病毒系统属于第三代病毒。

[0128] 二.慢病毒包装及收集浓缩检测

[0129] 1. 293T 细胞的培养

[0130] 1) 首先复苏293T细胞,提前30分钟打开超净工作台的紫外线灯和 37℃水浴锅,预热PBS及含10%FBS的DMEM培养基。

[0131] 2) 从-100℃冰箱取出一只293T细胞的冻存管,37℃水浴中快速融化。

[0132] 3) 将冻存管移入超净工作台中,酒精消毒,用1ml 移液管吸取细胞悬液(约 1ml)移至盛有5ml DMEM培养基的15ml离心管中,1200r/min离心5min,弃上清。

[0133] 4) 加入6ml PBS清洗一次,1200r/min离心5min弃上清。

[0134] 5) 加5ml 含10%FBS的DMEM培养基,轻轻吹打细胞悬液,使细胞分散均匀,然后移入T25瓶中,将其置于37℃,5%CO₂培养箱中培养。

[0135] 6) 用倒置显微镜观察细胞生长,当汇合度达到 80%左右进行传代。

[0136] 7) 实验准备同上,将培养瓶中的旧培养基吸出,用预热的 PBS 冲洗一次,弃去。

[0137] 8) 加入0.25%胰酶1ml消化,至显微镜下观察,消化程度适宜时,立即加入2ml 含10%FBS的DMEM培养基终止消化。将细胞悬液移入15ml离心管中,1000r/min离心5min,弃上清。

[0138] 2. 慢病毒包装(采用HET高效转染包装试剂盒)

[0139] 1) 转染前24h,用0.25%胰酶消化对数生长期的293T细胞,用10ml 含10%FBS的DMEM培养基重悬 5×10^6 个293T细胞接种于10cm细胞培养皿中,37℃,5%CO₂培养过夜使细胞密度达到70% ~ 80%,此时细胞达到最佳转染状态。

[0140] 2) 转染当天检查 293T 细胞,如果培养基看起来发黄或有許多漂浮的细胞,则更换培养基(培养基需提前37℃预热),动作要轻柔,避免细胞从培养板上分离下来。

[0141] 3) 使用前预热试剂至常温。

[0142] 4) 次日,吸去细胞培养液,加入新鲜培养液(不含青霉素-链霉素)。

[0143] 5) 取两根无菌1.5ml eppendorf管,分别记为A、B。按下表,

[0144] 在100-mm 培养皿包装体系,

[0145] A管:500μl Buffer A

[0146] B管:50μl Buffer B + 40ug的无菌水补足体系至500μl

[0147] (50ug PCDH + 35ug plp1+ 35ug plp2 + 25ug pvsug)

[0148] 6) 用移液管混匀B管中溶液并将B管中溶液轻轻逐滴加入到A管中。用气泡法混匀转染混合物,竖直震荡10s,这一步尽量在2分钟内完成,室温孵育30分钟。

[0149] 7) 将混合物逐滴加入到细胞中,轻轻摇晃培养皿使混合物均匀分布在细胞表面。

[0150] 8) 放置到潮湿37℃、5%CO₂培养箱中培养。

[0151] 9) 转染6h后用新鲜培养基更换细胞培养液,于37℃ 5%CO₂培养箱中继续培养24-

48h。

[0152] 3. 慢病毒上清液的收集及浓缩

[0153] 1) 病毒的收集: 转染48h后,用荧光显微镜观察对照组LV-GFP绿色荧光细胞的情况。用20ml注射器吸取培养皿中的病毒上清至15ml离心管中,2500r/min离心5min以除去细胞碎片,再将上清通过0.45 μ m滤膜出去杂质。

[0154] 2) 病毒的浓缩: 配制20%蔗糖溶液,将10g蔗糖溶于50ml超纯水中,经0.22 μ m过滤除菌。取4个Ultra-clear SW28离心管,用乙醇和紫外线消毒。

[0155] 3) 向每个离心管中加入约 20ml 的病毒上清。

[0156] 4) 用移液管吸取4 ml蔗糖溶液,插入到管底,慢慢打出。

[0157] 5) 用PBS调整各管的重量,使对应的离心管之间的重量相差不超过0.1g。

[0158] 6) 将4个离心管放入超速离心转头中,4 $^{\circ}$ C,25000 r/min离心2 h。

[0159] 7) 取出离心管,弃液,倒扣在洁净的吸水纸上约10 min,管底可见沉淀。

[0160] 8) 每管中加入200 μ l PBS溶解沉淀。4 $^{\circ}$ C溶解2 h,每隔20 min轻轻震荡。

[0161] 9) 4 $^{\circ}$ C,800r/min离心1 min,使溶液集中于管底。用200 μ l移液枪将所有管中的液体吸出,按500 μ l/管分装至EP管中。

[0162] 10) 所获得的病毒应立即使用,若短时间不用则保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。获得的慢病毒命名为LV-CD19/CAR。

[0163] 4. 病毒感染293T细胞效率测定

[0164] 1) 感染前一天,用胰酶消化细胞并计数,准备 5×10^5 细胞/ml 的293T细胞接种24孔板,每孔0.5ml。

[0165] 2) 细胞接种后第二天,根据病毒的预期滴度,准备3个无菌的EP管,以1:10,1:100,1:1000倍稀释慢病毒浓缩液。

[0166] 3) 各感染孔内分别加入相应稀释度的病毒液及病毒原液100 μ l,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱内。

[0167] 4) 感染24小时后,换液,每孔内加入500 μ l DMEM+10% FBS+1%P/S继续放回培养箱内进行孵育。

[0168] 5) 感染72h后观察荧光情况,用胰酶消化细胞,PBS重悬后流式上机检测GFP阳性细胞数,并依此计算待测慢病毒的滴度。

[0169] 6) 计算公式为:Titer=[F \times C/V] \times D,其中,F=GFP阳性细胞百分比,C=感染时每孔细胞总数,V=接种体积(ml),D=慢病毒稀释度。

[0170] 三. T细胞的准备

[0171] 1. PBMC的分离

[0172] 1) 抽取健康人新鲜外周血(按0.1 ml肝素/ml全血加入肝素抗凝),与等体积PBS混匀。

[0173] 2) 加入1/3的Ficoll淋巴细胞分离液,用移液管将血样沿管壁缓慢加入到淋巴细胞分离液的液面上,注意保持界面清楚,2500r/min,离心30min。

[0174] 3) 小心吸出血浆层和分离液之间的淋巴细胞层,加入10倍体积的PBS,充分混匀,1200 r/min离心10 min。

[0175] 4) 再用10倍体积的PBS洗一次,1200 r/min 离心10min。

[0176] 5) 用培养基重悬并计数,获得分离的人外周血单个核细胞(PBMCs)。

[0177] 2. CD8/CD3细胞磁珠分离

[0178] 1) PBMC洗涤:将PBMC转移至离心管中,并于离心机中1500rpm离心5min。将离心管取出,去除上清,并用移液枪吸取8ml的RPMI1640+10%FBS于离心管中,轻轻吹打5-10次悬浮细胞。

[0179] 2) 计数PBMC,置于离心机中1500rpm离心5min,将离心管取出,去除上清液。

[0180] 3) 在每 10^7 PBMC中用移液器添加分离缓冲液80 μ l并重悬,同时在细胞液中添加20 μ l磁珠液并用移液枪吹打5-10次混匀。

[0181] 4) 将细胞液置于4冰箱摇晃培养15min。

[0182] 5) 在PBMC和磁珠孵育过程中,将过滤柱安放在磁体上,并以15ml离心管接取废液。

[0183] 6) 用移液器吸取500 μ l的分离缓冲液,经过过滤网,轻轻注入过滤柱的中央位置,注入期间注意避免气泡的产生。重复2-3次。

[0184] 7) 在PBMC和磁珠孵育结束后,移去接取废液的离心管,换一新15ml离心管于过滤柱下端接取NON-CD8细胞液。

[0185] 8) 用移液器将孵育结束的PBMC液经过过滤柱,逐滴加入经过洗涤的过滤柱中,注入期间注意避免气泡的产生。

[0186] 9) 待PBMC液过滤完全后,用移液器吸取500 μ l的分离缓冲液经过过滤网,轻轻注入过滤柱中,注入期间注意避免气泡的产生。重复3次。

[0187] 10) 在洗涤结束后,从磁体中移出过滤柱并安置于一新的15ml离心管中,用移液枪吸取500 μ l的RPMI1640培养液添加在过滤柱中,用力挤压过滤柱柱头,将培养液滤置离心管中。用移液器吸取500 μ l的RPMI1640培养液重复上述过程并收集CD8细胞液。

[0188] 四.慢病毒感染T细胞

[0189] T细胞的生长情况可以用倒置显微镜观察,当细胞生长状态良好时可进行感染。按适当比例加入LV- PD-L1-CAR的量,将病毒悬液加入T细胞培养基中,LV-GFP 为阴性对照、未感染细胞为空白对照。过夜培养,约16-18h后换液。

[0190] 1. CD3/CD8 T细胞感染

[0191] 1) 将分离好的CD3/CD8细胞在24孔板中培养,每孔中 1×10^6 细胞/2mlPRMI+10%FBS培养基。

[0192] 2) 在每孔细胞中添加30U/ml的IL-2和20U/ml的IL-7,移入5%CO₂,37度培养箱中培养,每3天更换培养基和细胞因子。

[0193] 3) 当细胞浓度达到 3×10^6 /ml时,转移细胞与6孔板中 1×10^6 /孔。

[0194] 4) 按照病毒感染复苏在T细胞培养液中滴加病毒浓缩液。

[0195] 5) 6h左右感染后,更换培养基,IL-2为60U/ml。

[0196] 6) 观察细胞培养状态,感染T细胞5天左右后,可利用流式细胞仪检测T细胞表面CAR的表达。设置阴性对照和同型对照。

[0197] 2. PBMC感染

[0198] 1) 抗体包被:将24孔板用1 μ g/ml anti CD3和5 μ g/ml antiCD28包被待用。

[0199] 2) 将分离得到的PBMC在培养预包装的细胞板中激活3天,细胞培养过程中添加100U/ml的IL-2;在细胞培养第2天,添加20U/ml的IL-7;

[0200] 3) T细胞激活后,观察细胞生长状态,将浓缩纯化好的病毒悬液按照适当比例滴加在T细胞液中,感染约18h后更换培养基于培养。

[0201] 4) 培养过程中观察细胞状态,每隔3天更换细胞培养液,加入100u/ml的IL-2,使细胞浓度维持在 $1-2 \times 10^6$ /ml,37度,5%CO₂培养。

[0202] 5) 待细胞量达到 50×10^6 后,对细胞毒性检测。

[0203] 第五部分CAR-T的体内外检测

[0204] 一.T细胞中CAR的检测(流式法)

[0205] 1.慢病毒LV感染目的T细胞5天后,收集各组细胞 1×10^6 于离心管中;

[0206] 2.1200rpm离心5min,去上清;

[0207] 3.各管细胞加入1ml的PBS洗涤细胞,1200rpm离心5min后去上清。

[0208] 4.各管加入0.1ml的PBS,对抗体FC端用anti mouse IgG封闭后,加入anti human IgG F(ab)2 PE(具体量需参考说明书)。

[0209] 5.置于4度孵育20min后用PBS洗涤两次,流式检测。

[0210] 二.T细胞中CAR的检测(Western blot法)

[0211] 1.培养细胞蛋白质样品的制备:在感染CAR后的T细胞培养之一定密度(80%左右),取一定量的细胞于离心管中,5000rpm离心5min,用预冷的PBS洗涤3次,离心收集,加入0.2ml左右的裂解液反复吹打,获得细胞蛋白样品。

[0212] 2.SDS-PAGE电泳:按照常规方法配制12%的分离胶和5%的浓缩胶;细胞蛋白样品与SDS的loading buffer混匀后在100度水浴加热5min,待上样检测;一般采用恒压浓缩胶85V,分离胶120V,时间2小时左右后停止电泳。

[0213] 3.免疫印迹:SDS-PAGE胶转移,以3层滤纸—PVDF膜—凝胶—3层滤纸的方式装置转印槽,同时出去各层夹带的气泡;25V电转印30min左右后放入封闭液中室温摇床封闭2小时;

[0214] 4.抗体杂交:一抗孵育:anti human CD3/CD8;洗膜;二抗孵育:HRP的anti mouse-IgG;洗膜;显色检测

[0215] 三.CAR-T细胞的细胞毒性检测(非放射性细胞毒性杀伤cyto96检测)

[0216] 1.靶细胞:稳定表达PD-L1的COS细胞作为阳性靶细胞,未转染的COS作为对照细胞。两种细胞用含10%FBS的DMEM培养基在37℃、5%CO₂培养箱中。

[0217] 2.效应细胞:CAR+T细胞,GFP+T细胞和未感染T细胞

[0218] 3.用细胞培养液对效应细胞洗涤并确保单细胞个体存在,调至浓度为 2×10^6 /ml。

[0219] 4.效应细胞设置:分别取50 μ l效应细胞细胞液于对应10:1效靶细胞孔中(每组3个重复)。添加细胞培养液,对剩余细胞液稀释5倍后分别取50 μ l于2.5:1效靶细胞孔中(每组3个重复)。同样稀释剩余细胞液5倍后分别吸取50 μ l于0.625:1效靶细胞孔中(每组2个重复)。

[0220] 5.靶细胞的设置:用细胞培养液对靶细胞洗涤并确保单细胞个体存在,调至浓度为 2×10^5 /ml。吸取50 μ l细胞液于对应已添加效应细胞孔中。

[0221] 6.靶细胞自发和最大释放孔:取400-500 μ l靶细胞液稀释2倍后分别取50 μ l肿瘤细胞于相应孔中(每组3个重复)。

[0222] 7.吸取100 μ l细胞培养基于培养基背景孔和体积校正对照孔中做空白对照(共3

×2孔)。

[0223] 8. 向体积校正对照孔中添加10 μ l裂解液(10 \times)完成体积校正。

[0224] 9. 将设置好的培养板250g离心4min,确保效应细胞核靶细胞的充分接触。

[0225] 10. 培养板置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂湿润培养箱中孵育至少4小时。

[0226] 11. 孵育完成前45min,分别向靶细胞最大释放孔中加入10 μ l裂解液(10 \times)(共4 \times 3孔)。(注:如镜下观察靶细胞未完全理解,可加入5 μ l裂解液(10 \times),同时在体积校正孔中同量添加。)

[0227] 12. 孵育完成后,250g离心4min。

[0228] 13. 用排枪从每孔中转移50 μ l上清液至一个新的平底96孔板中。

[0229] 14. 37 $^{\circ}$ C融化检测缓冲液Assay buffer,取出12ml(剩余迅速储存于-20 $^{\circ}$ C中)避光平衡至室温后加入到一瓶底物混合液Substrate mix中,轻轻颠倒摇晃使底物溶解(避光直射,立即使用)。

[0230] 15. 向有上清分析板中每孔加入50 μ l配置好的底物,锡箔纸避光室温孵育30min。剩余储存于-20 $^{\circ}$ C中待用。

[0231] 16. 孵育结束后每孔添加50 μ l终止液。并用注射器针头戳破大气泡,1小时内490nm或492nm测量吸光值。

[0232] 17. 数据分析

[0233] 实验值(均值)=实验孔吸光值-培养基背景吸光值

[0234] 靶细胞自发释放值(均值)=靶细胞自发释放孔吸光值-培养基背景吸光值

[0235] 效应细胞自发释放值(均值)=效应细胞自发释放吸光值-培养基背景吸光值

[0236] 细胞毒性%=(实验值-靶细胞自发释放值-效应细胞自发释放值)/(靶细胞最大释放值-细胞自发释放值) \times %

[0237] 三. ELISA法检测IFN- γ 的分泌

[0238] 1. 稳定表达PD-L1的COS细胞作为阳性靶细胞,未转染的COS作为对照细胞。两种细胞用含10%FBS的DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中。

[0239] 2. 计数靶细胞,将细胞浓度调至1 \times 10⁶/ml。

[0240] 3. CAR-T细胞为效应细胞,GFP+T细胞和未感染T细胞做为对照。

[0241] 4. 计数Anti PD-L1-CAR-T细胞,将细胞浓度调至1 \times 10⁶/ml。

[0242] 5. 将效应细胞和靶细胞以1:1、2:1、4:1、8:1放入圆底96孔板中。(实验设3组重复)

[0243] 6. 将细胞在37C孵育18~20小时,离心96孔板。

[0244] 7. 吸取100 μ l上清液至新的平底96孔板中。

[0245] 8. 用IFN- γ ELISA试剂盒检测IFN- γ 的分泌。

[0246] 五. 动物实验

[0247] 1. 裸小鼠肿瘤模型建立

[0248] 1) PD-L1-COS细胞用DMEM培养基(含10%FBS)、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

[0249] 2) 0.25%胰蛋白酶消化,DMEM培养基洗涤细胞,弃上清液。

[0250] 3) 用无菌PBS重悬制成细胞密度为5 \times 10⁷/ml的单细胞悬液备用。

[0251] 4) 100 μ l细胞悬液接种于裸小鼠背部皮下,每天观察小鼠饮食、排便及精神等状况,称量体重。用游标卡尺测量肿块的长度和宽度。

[0252] 2. CAR-T 细胞输注

[0253] 1) 当肿瘤体积达到一定程度时, 将裸小鼠按每组5只随机分为3组。

[0254] 2) 按如下将细胞溶于1ml PBS通过尾静脉注射小鼠体内。A组: 1×10^7 CAR+T 细胞; B 组: 1×10^7 GFP+T 细胞; C 组: 空白对照只加1ml PBS。

[0255] 输注后, 继续按如上方法观察, 观察小鼠状况, 称量。共观察60d。

<110>上海宇研生物技术有限公司
 <120>Anti-PD-L1-CAR-T 及其制备方法和应用
 <160>3
 <210>1
 <211>3947
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <400>1

[0001]

```

gctagcgcca ccatggacat gagagtgctg gccagctgc tgggcctgct gctgctgtgc      60
ttccccggcg ccagatgcca catcgtgctg acccagagcc ccgccagcct ggccctgagc      120
cccgcgagaga gagccaccct gagctgcaga gccaccgaga gcgtggagta ctacggcacc      180
agcctggtgc agtggtagca gcagaagccc ggccagcccc ccaagctgct gatctacgcc      240
gccagcagcg tggacagcgg cgtgcccagc agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac      300
ttcaccctga ccatcaacag cctggaggag gagcagccg ccatgtactt ctgccagcag      360
agcagaagag tgccctacac cttcggccag gccaccaagc tggagatcaa gagaggcagc      420
accagcggca gcggcaagcc cggcagcggc gagggcagca ccaagggcga ggtgcagctg      480
gtgcagagcg gcgccgaggt gaagaagccc gccgcccagc tgaagatgag ctgcaaggcc      540
agcggctaca ccttcaccag ctacgtgatg cactgggtga agcaggcccc cggccagaga      600
ctggagtgga tcggctacgt gaaccocctc aacgacggca ccaagtacaa cgagatgttc      660
aagggcagag ccaccctgac cagcgacaag agcaccagca ccgcctacat ggagctgagc      720
agcctgagaa gcgaggacac cgccgtgtac tactgcgcca gacaggcctg gggtaccccc      780
tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc agcaggtcca aatatggtcc ccgctgcccc      840
ccatgccccag cacctgaatt cgaaggggga ccatcagctc tcctgttccc cccaaaaccc      900
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccocct gaggtcactg gcgtgggtgt ggacgtgagc      960
caggaaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc     1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc     1080
gtcgtgcacc aggactggct gaacggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaaggc     1140
ctcccgctct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagccacag     1200
gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc     1260
ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg     1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac     1380
agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtctctc atgtccctg     1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgct tctgggtaaa     1500
tctagaaagc ccttttgggt gctggtggtg gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg     1560
ctagtaacag tggcctttat tattttctgg gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac     1620
agtactaca tgaacatgac tccccgcgc cccgggcccc cccgcaagca ttaccagccc     1680
tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat cgctccggag gtggaaagag aggcagaaag     1740
aagctgctgt acatcttcaa gcagccctc atgagaccgg tgcagaccac ccaggaggag     1800
gacggctgca gctgcagatt ccccgaggag gagggggcg gctgcgagct ggggtggagga     1860
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc     1920
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc     1980
cgggaccctg agatgggggg aaagccgcag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac     2040
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaagggcag     2100
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac     2160

```

	acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgcct aatgtacagc cgccctctc	2220
	cctccccccc ccctaacggt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg	2280
	tctatatggt attttccacc atattgcgtt cttttggcaa tgtgagggcc cggaacctg	2340
	gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag	2400
	gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt	2460
	ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc cccacactgg cgacaggtgc ctctgcggcc	2520
	aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga	2580
	gttggatagt tgtggaaaaga gtcaaattgg tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga	2640
	aggatgcccc gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tacacatgct	2700
	ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg	2760
	ttttcctttg aaaaacacga tgataatat gccacaagat ctgccaccat ggcttcgtac	2820
	ccctgccatc aacacgcgtc tgcgttcgac caggttcgac gttctcgtgg ccatagcaac	2880
	cgacgtacgg cgttgccccc tcgccggcaa caagaagcca cggaagtccg cctggagcag	2940
	aaaatgcccc cgctactgcg ggtttatata gacggctctc acgggatggg gaaaaccacc	3000
	accacgcaac tgctggtggc cctgggttcg cgcgacgata tcgtctacgt acccgagccg	3060
	atgacttact ggcgggtgct gggggcttcc gagacaatcg cgaacatcta caccacacaa	3120
	caccgcctcg accaggggtg gatatcggcc ggggacgcgg cgggtgtaat gacaagcgcc	3180
	cagataacaa tgggcatgcc ttatgccgtg accgacgccg ttctggctcc tcatatcggg	3240
	ggggaggtcg ggagctcaca tgccccccc ccggccctca ccctcatctt cgaccgccat	3300
	cccacgcgag ccctcctgtg ctaccggccc gcgtgggtacc ttatgggcag catgaccccc	3360
	caggccgtgc tggcgttcgt ggccctcacc ccgccgacct tgcccggcac aaacatcgtg	3420
[0002]	cttggggccc ttccggagga cagacacatc gaccgcctgg ccaaacgcca gcgccccggc	3480
	gagcggcttg acctggctat gctggccgag attcgcgcgag ttacgggct acttgccaat	3540
	acggtcgagg atctgcagtg cggcgggtcg tggcgggagg actggggaca gctttcgggg	3600
	acggccgtga cgccccaggg tgccgagccc cagagcaacg cgggcccacg accccatata	3660
	ggggacacgt tatttaccct gtttcggggc cccgagttgc tggcccccaa tggcgacctg	3720
	tacaacgtgt ttgcctgggc cttggacgtc ttggccaaac gcctccgtcc catgcaacgtc	3780
	tttatcctgg attacgacca atcgcccgcc ggtgcgaggg acgccctgct gcaacttacc	3840
	tccgggatgg tccagacca cgtcaccacc cccggtccca taccgacgat ctgcgacctg	3900
	gcgcgcacgt ttgcccgga gatgggggag gctaactgag cggccgc	3947

<210>2

<211>345

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>PD-L1 抗体的 VH 区

<400>2

	gaggccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
	tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcaggcc	120
	cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac	180
	aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac	240
	atggagctca tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttctgcagc	300
	ctgaggctct aggacactgc ggtctattac tgtgcaagac aggct	345

<210>3
 <211>333
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223> PD-L1 抗体的 VK 区
 <400>3
 gacattgtgc tcaccaatc tccagcttct ttggctctgt ctcccgggga gagagccacc 60
 ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtag 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180
 ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240
 tctctggagg aggaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300
 acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210>4
 <211>333
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <400>4
 gaattcgccg ccaccatgcc gctgctgcta ctgctgcccc tgctgtgggc aggggcgcta 60
 gctttcaccg tgaccgtgcc caaggacctg tacgtggtgg agtacggcag caacatgacc 120
 atcgagtgca agttccccgt ggagaagcag ctggacctgg ccgccctgat cgtgtactgg 180
 gagatggagg acaagaacat catccagttc gtgcacggcg aggaggacct gaaggtgcag 240
 cacagcagct acagacagag agccagactg ctgaaggacc agctgagcct gggcaacgcc 300
 gccctgcaga tcaccgacgt gaagctgcag gacgccggcg tgtacagatg catgatcagc 360
 tacggcggcg ccgactacaa gagaatcacc gtgaaggatga acgcccccta caacaagatc 420
 aaccagagaa tcctgggtgt ggacccccgt accagcgagc acgagctgac ctgccaggcc 480
 gagggctacc ccaaggccga ggtgatctgg accagcagcg accaccagggt gctgagcggc 540
 aagaccacca ccaccaacag caagagagag gagaagctgt tcaacgtgac cagcaccctg 600
 agaatcaaca ccaccacaa cgagatcttc tactgcacct tcagaagact ggacccccgag 660
 gagaaccaca ccgccgagct ggtgatcccc gagctgcccc tggccccccc cccaacgag 720
 agaaccggat ccaccacca ccaccaccac caccactgag cggccgc 767

[0003]

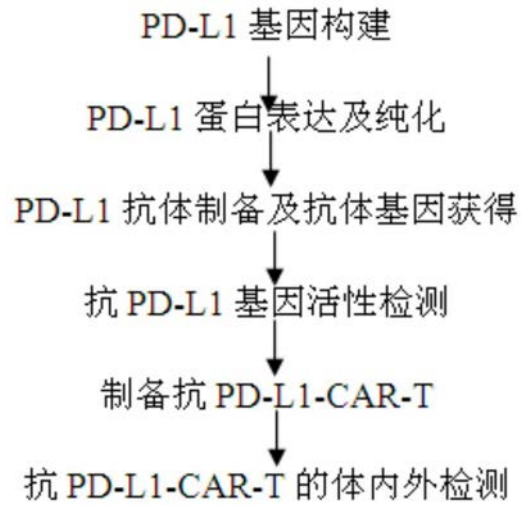


图1

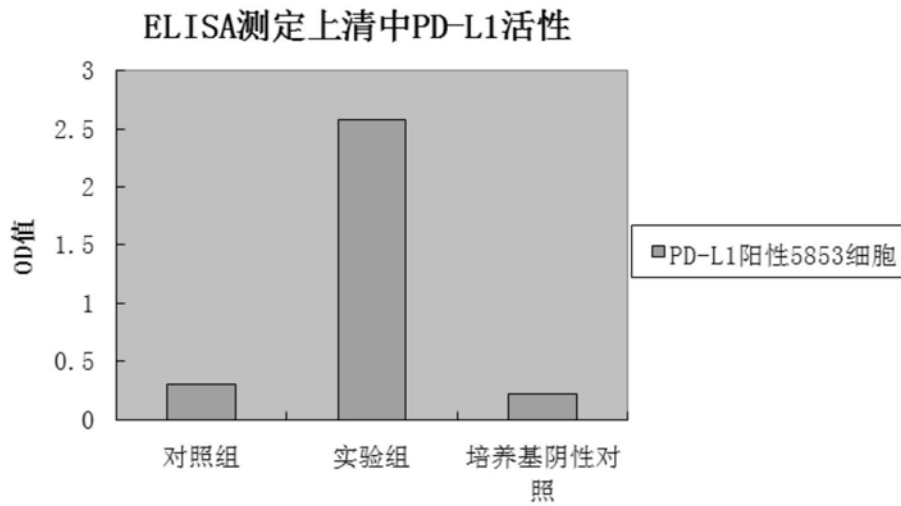


图2

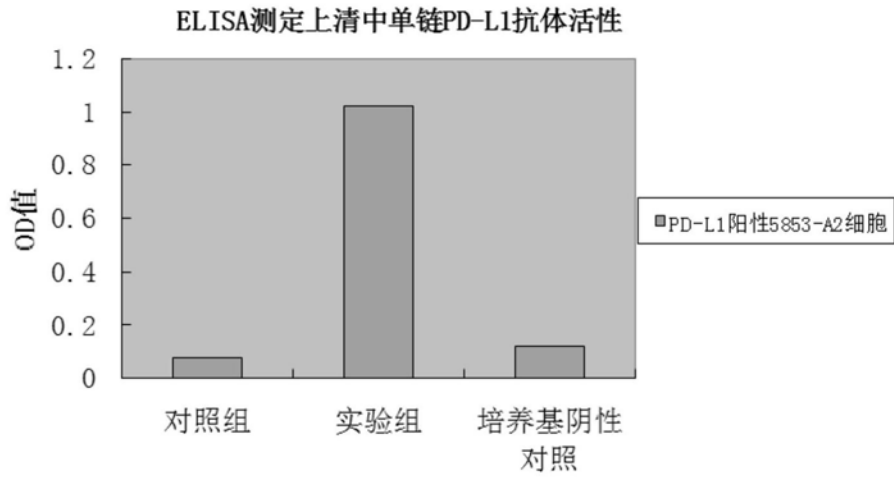


图3