



Bio-Genesis Technologies

創世紀生技



Autophagy & Immune check point

Autophagy

Autophagy 的分子調控以及 訊息傳遞步驟.....	3
Autophagy 在藥物研究的方向及治療的策略發展.....	5
Autophagy 相關藥物.....	6
Autophagy 抗體/ELISA kit.....	8
Lysosome 螢光染劑.....	9
Lysosome 分離 kit.....	10

Immune Check Point

Immune Check point 調控機制.....	11
Immune check point 相關抗體/重組蛋白/ELISA Kit.....	13
CAR-T cells 調控機制.....	17
CAR-T cells 相關產品.....	19

台北 TEL : 02-287929619

服務專線: 0800-211-667

台北 FAX : 02-87929620

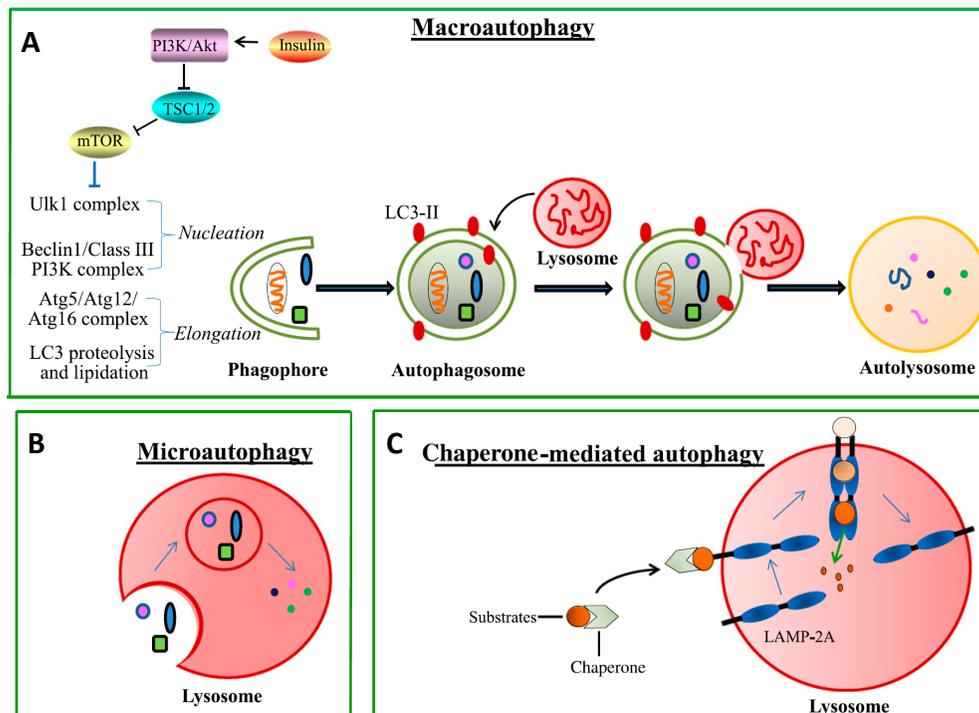
服務信箱: service@biogenesis.com.tw

2016 年諾貝爾獎隆重登場，這一次生理醫學獎頒給 Yoshinori Ohsumi 教授，他發現的「細胞自噬(**autophagy**)」其實在 1950 年中期，科學家就發現在細胞內存在一個新的特化胞器，其內含可分解蛋白質、醣類和脂肪的酵素。在 1960 年代，科學家進一步發現這是細胞內部會用自己的細胞膜，捲縮成小型袋狀囊泡，並將細胞自己的一小部份胞器包裹其內，現今我們稱這種袋狀物為溶酶體 (**lysosome**)，而溶酶體內所含的分解酵素會將胞器分解、摧毀，而這些物質同時被細胞回收再行利用。根據自噬作用發生的過程，主要可以分為 **Macroautophagy**、**Microautophagy** 和 **Chaperone-mediated autophagy (CMA)**，這三種過程都會促使細胞質中的蛋白質在 **lysosome** 中進行降解。

Macroautophagy：即普遍認識的自噬作用 **autophagy**，會使細胞質中的物質經由雙層膜結構的囊泡包裹後，形成 **autophagosome**，接著和 **lysosome** 進行聚合(**fusion**)後，形成 **autolysosome**，再將囊泡中的物質進行裂解。

Microautophagy：溶酶體主動或直接經由細胞膜內陷的方式，將細胞質中的物質吞噬並裂解。

Chaperone-mediated autophagy (CMA)：目標蛋白和 Chaperone 蛋白 (**Hsc-70**)形成複合體後，移動到 **lysosome** 表面，接著經由 **lysosome** 膜上的接受器(**lysosomal-associated membrane protein 2A, LAMP-2A**)辨識後，進入 **lysosome** 內進行 **unfolding** 和分解。



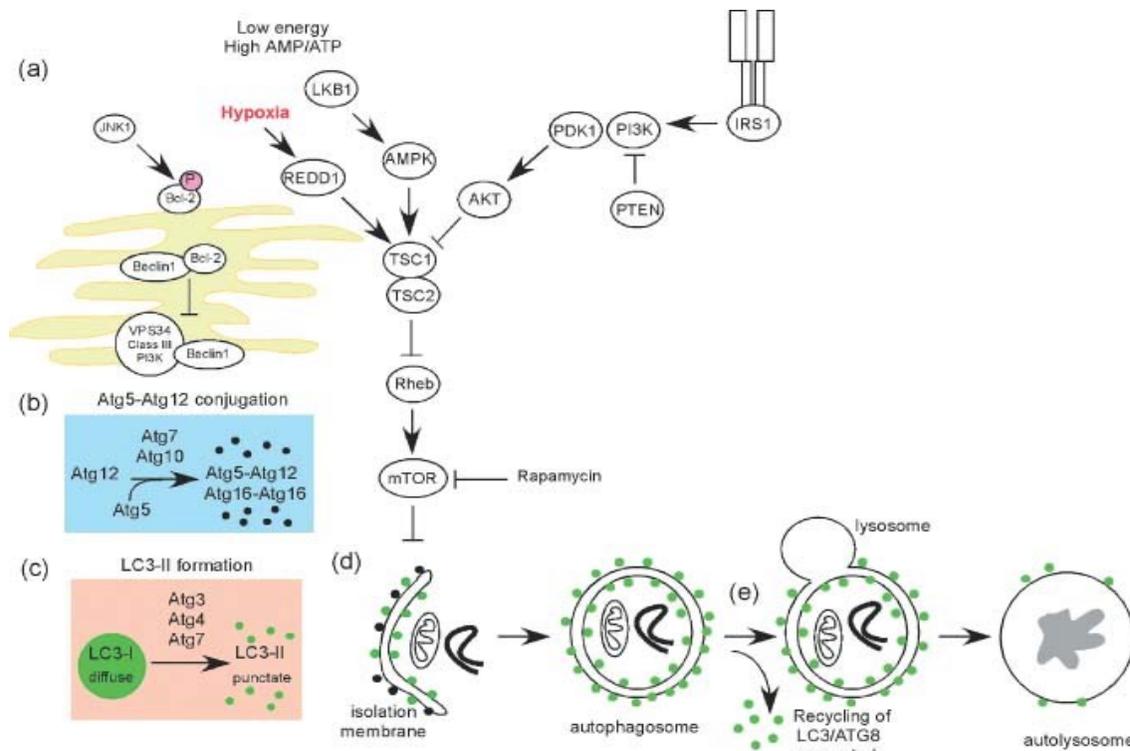
(Pharmacol Rev 65:1162–1197, October 2013)

Fig. Macroautophagy、Microautophagy 和 Chaperone-mediated autophagy (CMA) 的流程示意圖。

Autophagy 是一個複雜的自我降解機制，在整個進程之中會被許多訊息所調控，以維持細胞內的恆定。而調控其進程的關鍵步驟有：

Phagophore 形成

mammalian cell 中，autophagy 的發生，會在 Beclin-1/VPS34 的訊號刺激下，由內質網開始徵召一些細胞膜的結構，例如:trans-Golgi 或 late endosome，進而形成 phagophore membrane 的結構，然而在訊息的調控下，不斷擴張。Phagophore membrane 是一種扁平，由雙層脂質所形成的一種碗狀結構為 autophagy 形成時的指標物。



(*J Pathol.* 2010 May ; 221(1): 3–12. doi:10.1002/path.2697.)

Atg5-Atg12 conjugation, Atg16L 的結合以及 phagophore 的聚合

phagophore 形成後，接著就有兩個 ubiquitin-like 的訊號會進行反應，而這兩個訊號也是 autophagy 中相當重要的訊號：Atg5-Atg12 的 conjugation 以及 LC3 訊息的傳遞。最初，Atg7 會先對 Atg12 進行活化，接著 Atg12 會與 Atg10/Atg5 復合物進行 conjugation。接著此 Atg5-Atg12 復合物會和 Atg16L dimer 進行配對，而形成 Atg5-Atg12-Atg16L complex，最後和 phagophore 結合。而這步驟被認為是和 phagophore 內陷以及 LC3B-II 訊號的徵召相關。

LC3 訊號分子的傳遞和 phagophore 的交互作用

第二重要的步驟是 LC3 訊號與 autophagosome 的形成，主要步驟 microtubule-associated protein light chain3 (LC3B) 蛋白被 Atg4 進行水解，進而生成 LC3B-I 後被 Atg7 活化，接著和 Atg3 結合形成 LC3B-II。LC3B-II 的形成與 autophagy 的形成、細胞膜表面的 hemifusion、分解物質的選擇及降解有相當大的關聯。

Autophage 對降解物質的標記及篩選

一般來說，autophage 的過程之中，分解物質的選擇看似是隨機的，但是隨著許許多的證據顯示，LC3B-II 會在 phagophore 中扮演「接受器」的角色，和一些蛋白沉澱物、細胞碎片進行結合，而進行「有選擇性」的吞噬及降解。

Autophagosome 和 lysosome 的融合

當 autophagosome 完全形成之後，下一個步驟即是和細胞內的 lysosome 進行融合，形成 autolysosome。在這期間，autophagosome 中待分解的物質也會被 lysosome 進行分解，而分解完的胺基酸也被運送到細胞質，重新被細胞吸收利用。

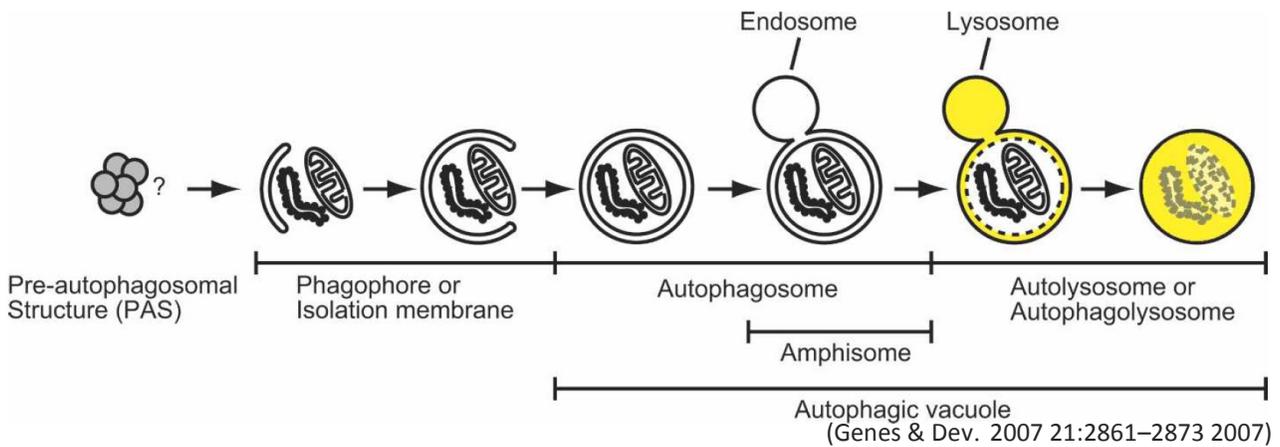


Fig. 在哺乳動物中 autophage 的簡易流程

Autophagy 的分子調控機制與訊息傳遞

過去許多年都在致力於探討 autophagy 的分子機制及訊息傳遞路徑，而根據許多研究的文獻大致上可歸類為幾個重點：

1. Autophagy 的分子調控機制：

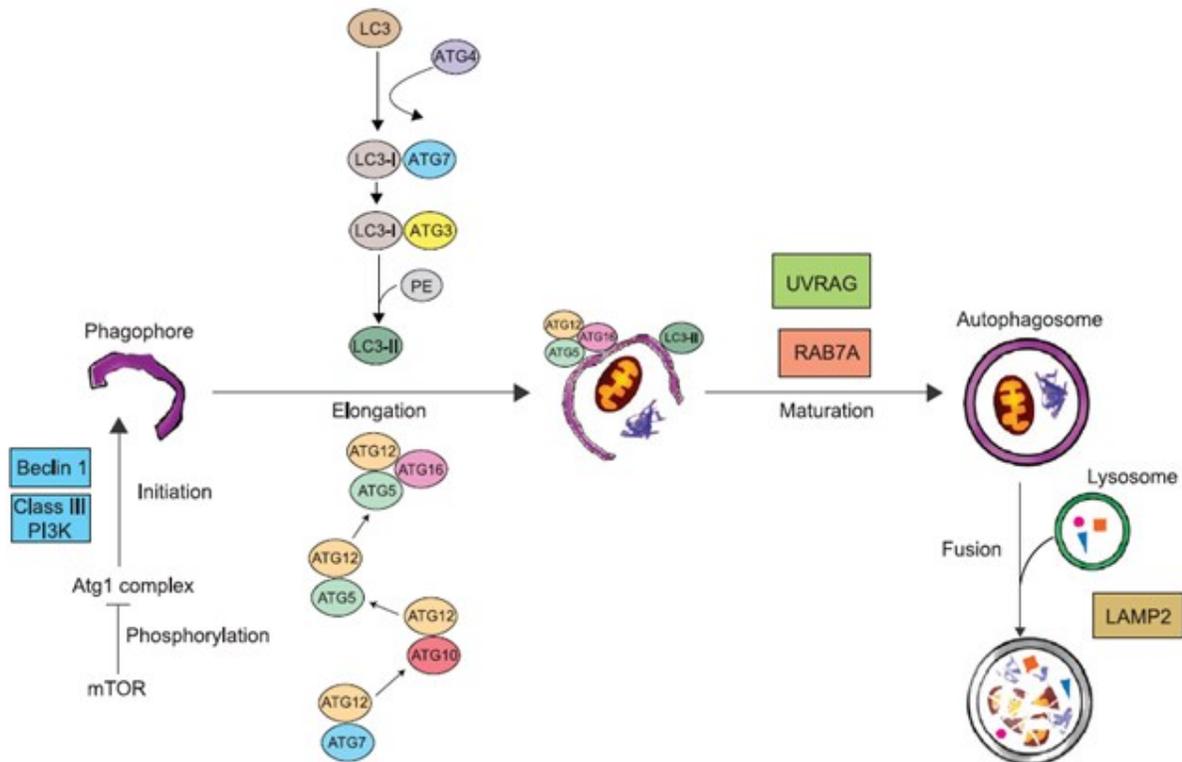
一開始在研究 autophagy 的分子調控機制是依據酵母菌中與 autophagosome 形成相關約 30 多個 autophagy-related genes (Atg)，而這些酵母菌中的 Atg 基因在哺乳動物中都有高度相似性的基因存在。

Beclin 1 和酵母菌中的 Atg6 高度相似，為第一個在哺乳動物中被定義出來的 autophagy gene。在 autophagosome 形成的時候，需要 Beclin 1 和其它分子聚集形成 Beclin 1-class III PI3K complex (Beclin 1-Vps34-p150) 進而誘導細胞進行 autophagosome 的形成。

Rubicon 為逆向調控 autophagy 的分子，它會和 Beclin 1 結合，進而降低 Vps34 的活性和細胞形成 autophagosome 的能力。

Atg1 在 autophage 形成的早期會和 Atg13 和 Atg17 形成復合體，而 Atg13 和 Atg17 會進一步促進 Atg1 kinase 的活性，而促使 autophagosome 的生成。

LC3-II (Light chain 3-II) 是 LC3 被 Atg4 水解後，形成 LC3-I 後再進一步被其它分子切割及轉換而形成 LC3-II。LC3 普遍被用來當作哺乳動物 autophagosome 形成的指標，此外，LC3-II 會存在成熟的 autophagosome 中，直到和 lysosome 進行融合完成。



(Journal of Cell Science 125, 2349–2358)

2. Autophage 的訊息傳遞路徑

Mammalian target of rapamycin (mTOR)

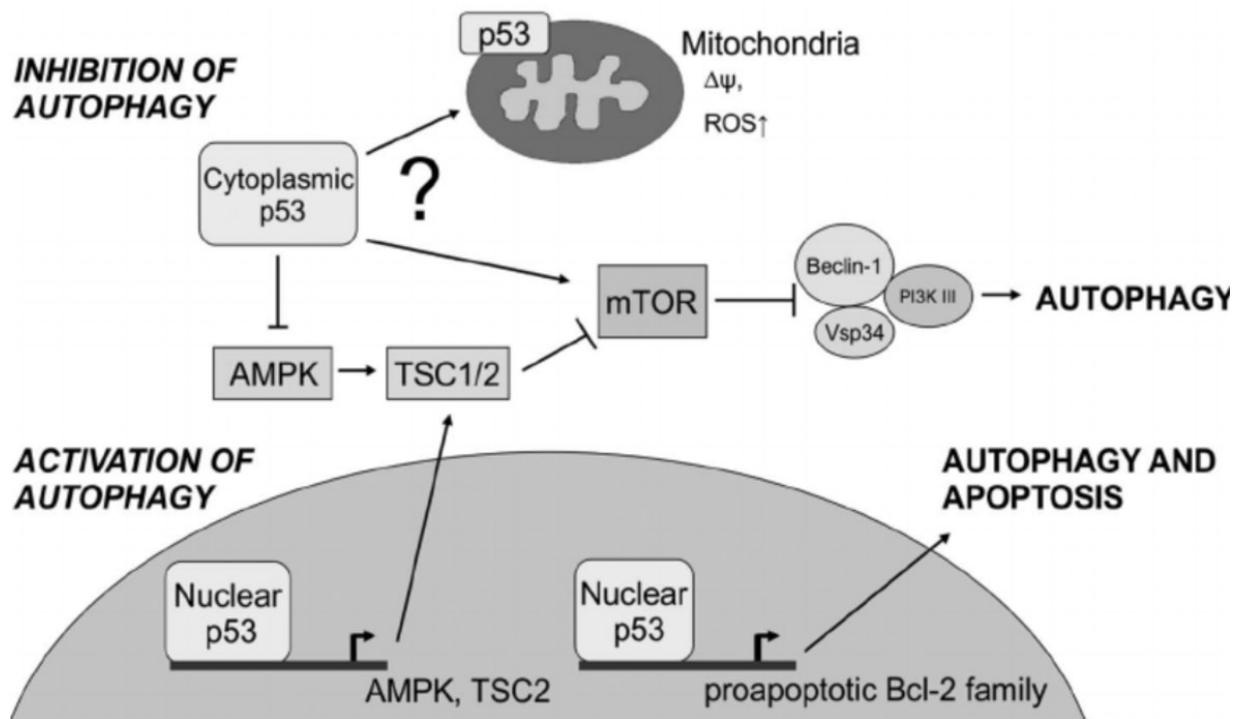
mTOR 是一個 PI3K 相關的 serine/threonine protein kinase，主要負責調控細胞的生長及增生。近幾年的一些研究也發現 mTOR 和 autophage 的形成有所關連。當 mTOR 被外在因素活化時會磷酸化 ULK1、Atg13，進而影響 Atg1 和 Atg13 的結合逆向調控 autophage 的形成。

AMP-activated protein kinase (AMPK)

AMPK 是一個 serine/threonine protein kinase，一般被認為負責調控脂質、葡萄糖的代謝及 ATP 在細胞內的濃度。在一些研究中也指出 AMPK 會和磷酸化的 ULK1 進行結合，進而參與 ULK1 所負責的 autophage 訊息傳遞路徑。

Bcl-2 family 蛋白

Bcl-2 家族的蛋白一般被定義為調控細胞存活的指標。anti-apoptosis 的 Bcl-2 家族蛋白，Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-wl 和 Mcl-1 被研究指出會去抑制 autophage 的形成。然而也有一些 Bcl-2 家族的蛋白 BNIP3L, Bad, Noxa, Puma, BimEL22 and Bik 會促進 autophage 的形成。



(J Cardiovasc Pharmacol. 2012. volume 60, Number 2)

Fig 5. p53 藉由兩種路徑調控 autophagy

腫瘤抑制因子 p53

p53 和腫瘤的相關性已被許多研究證明。而近期的一些研究發現 p53 具有誘導 in vitro 和 in vivo autophagy 形成的能力。例如：在核內的 p53 會經由活化 DRAM 和 sestrin 而去促使 autophagy 的形成；p53 也會藉由抑制 mTOR 的活性而抑制因 mTOR 而形成的 autophagy。

p53 可以藉由兩種路徑調控 autophagy：

根據 p53 坐落的位置不同決定其功能，細胞核內的 p53 經由轉錄調控而活化 autophagy，細胞質中的 p53 則會抑制 autophagy。

Autophagy 在藥物研究的方向及治療的策略發展

許多的研究證據也一一指出，autophagy 和人類疾病的發生也是有相關性的，例如：cancer, Diabetes, neurodegeneration disease, Alzheimer disease, Parkinson disease...

Table 1. Autophagy effector genes are frequently mutated in human cancer

Gene name(s)	Stage of autophagy	Type of human cancers	Type of mutation in cancer	References
<i>BECN1</i>	Initiation	Breast, ovarian and prostate cancer	Monoallelic deficiency	(Aita et al., 1999)
<i>UVRAG</i>	Initiation	Colorectal and gastric cancer	Monoallelic deficiency as a result of frameshift mutation	(Ionov et al., 2004; Goi et al., 2003; Kim et al., 2008)
<i>SH3GLB1</i> (Bif-1)	Initiation	Gastric and prostate cancer	Decreased expression	(Takahashi et al., 2007)
<i>ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12</i>	Elongation	Gastric and colorectal cancer	Frameshift mutation	(Kang et al., 2009)
<i>RAB7A</i>	Fusion	Leukaemia	Gene rearrangement and deletion	(Kashuba et al., 1997)

所以研究 autophagy 在生病的人和正常人的組織中的差異性則變的相當重要。由於 autophagy 的訊息傳遞中，一些分子具有促進或抑制 autophagy 的產生，所以針對性的使用相關的藥物來進行治療或研究就要特別的注意。

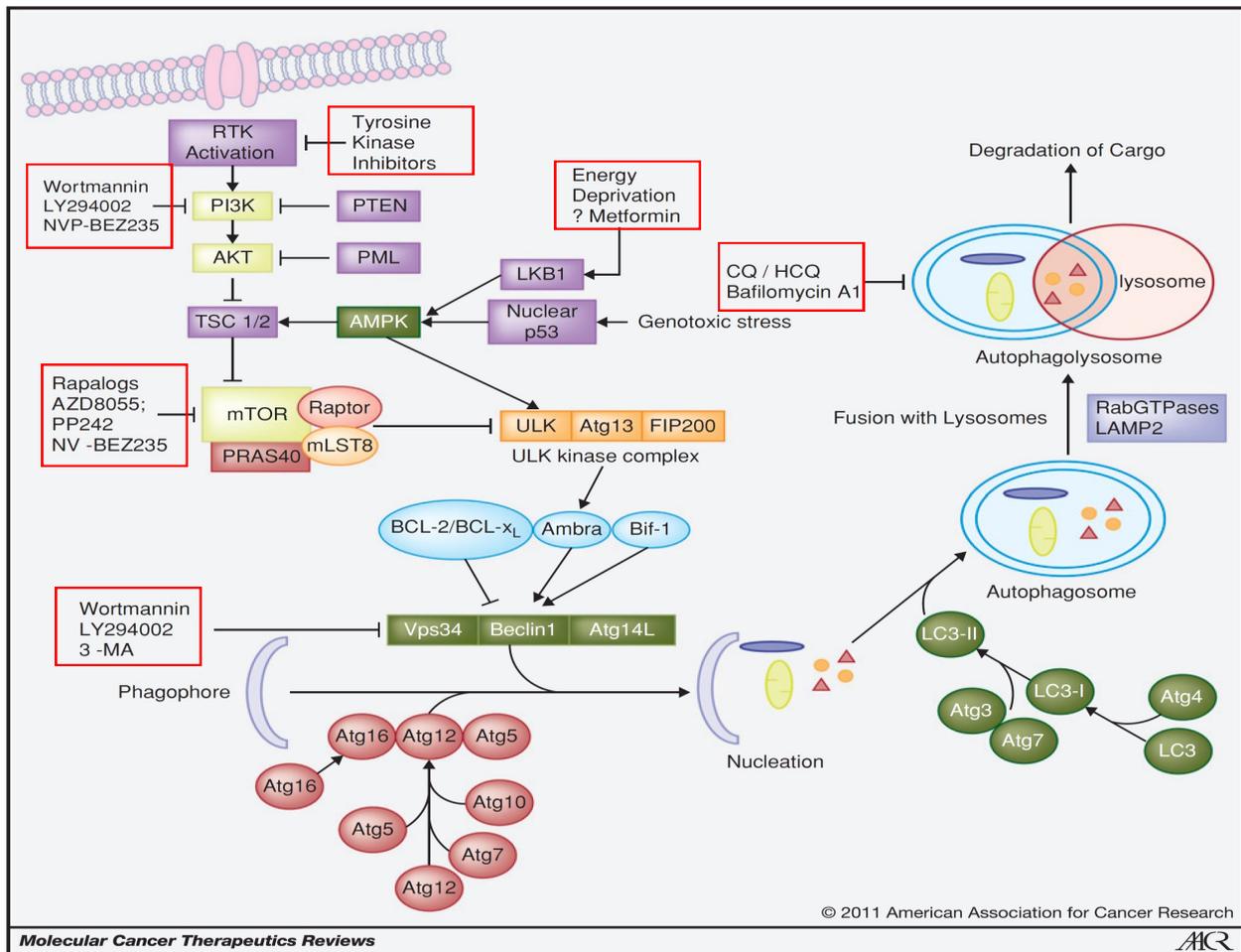
Autophagy inhibitor :

Class III PI3K inhibitor : LY294002, wortmannin, 3-Methyladenine

Lysosome acidification inhibitor: bafilomycin A1, chloroquine, hydroxychloroquine

Lysosomal proteolysis inhibitor: leupeptin, pepstatin A

Microtubule formation inhibitor: Nocodazole, colchicine, vinblastine



(Mol Cancer Ther; 2011. 10(9))

Autophagy activator:

mTORC1 inhibitor: rapamycin, sirolimus, Temsirolimus(CCI-779), Everolimus (RAD-001), Deforolimus(AP23573), Perhexiline, Nilosamide, amiodarone, rottlerin

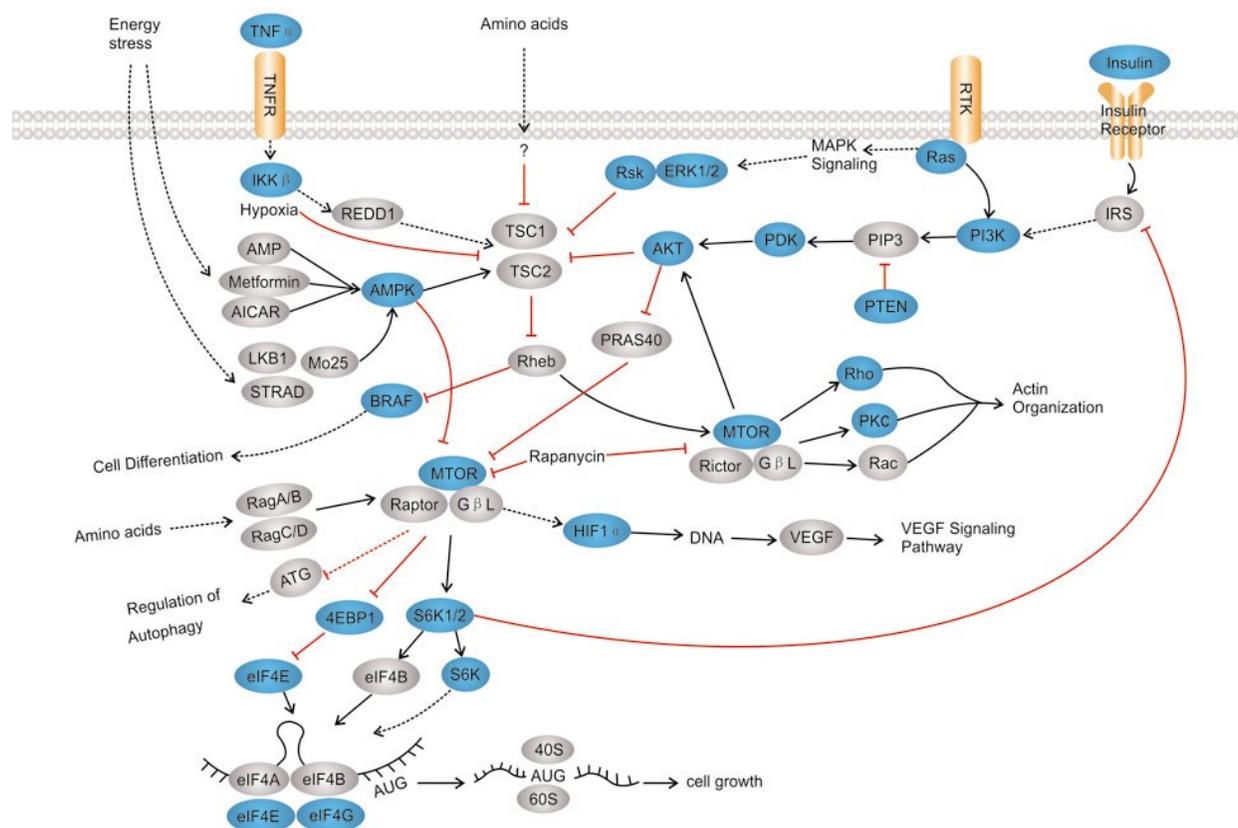
mTORC1/mTORC2 inhibitor: Torin 1, AZD8055

PI3K-mTOR dual inhibitor: PI-103, NVP-BE2235

Tyrosine kinase inhibitor: Imatinib, Dasatinib

Proteasome inhibitor: Bortezomib, NPI-0052

MTOR Signaling Pathway



Cat. No.	product	Information
HY-10218	Everolimus	an mTOR inhibitor of FKBP12 with IC ₅₀ of 1.6-2.4 nM
HY-15247	AZD2014	a novel mTOR inhibitor with IC ₅₀ of 2.8 nM
HY-13003	Torin1	a potent inhibitor of mTOEC1/2 with IC ₅₀ of 2 nM/10 nM
HY-13002	Torin2	a potent and selective mTOR inhibitor with IC ₅₀ of 0.25 nM
HY-10108	LY294002	an inhibitor of PI3K $\alpha/\beta/\delta$ (IC ₅₀ = 0.5/0.97/0.57 μ M)
HY-13261	A66	a potent and specific p110 α inhibitor with IC ₅₀ of 32 nM
HY-13026	CAK-101	a selective p110 δ inhibitor with IC ₅₀ of 32 nM
HY-10358	MK 2206	a highly selective inhibitor of Akt1/2/3 with IC ₅₀ of 8 nM/12 nM/68 nM
HY-15965	GSK2141795	a potent and selective pan-Akt inhibitor Akt1/2/3 (IC ₅₀ = 180/328/38 nM)
HY-13898	GDC-0032	a next-generation β isoform-sparing PI3K inhibitor for PI3K $\alpha/\beta/\gamma$ (ic ₅₀ =0.29/0.12/0.97 nM)



EKISA Kit

Product	Cat. No.	Product	Cat. No.
ATG12detection kit	SEL224Hu	mTOR detection kit	SEB806Hu
ATG5 detection kit	SEL221Hu	Bcl-2 detection kit	SEA778Hu
ATG7 detection kit	SEL222Hu	p53 detection kit	SEA928Hu
MAP1BLC3 detection kit	SEL701Hu	Beclin 1 detection kit	SEJ557Hu
Valosin Containing Protein (VCP) detection kit	SEC601Hu	LC3A II detection kit	SEE348Hu
LMTK3 detection kit	SEE375Hu	SQSTM1 detection kit	SED198Hu

Antibody

Product	Cat. No.	Product	Cat. No.
LMTK3 pAb	PAE375Hu01	SQSTM1 pAb	PAD198Hu01
Valosin Containing Protein (VCP) pAb	PAC601Hu01	mTOR mAb	MAB806Hu21
MAP1LC3a mAb	MAL701Hu21	Bcl2 mAb	MAA778Hu22
Beclin 1 mAb	MAJ557Hu21	LC3AII pAb	PAE348Hu01
ATG7 mAb	MAL222Hu21	p53 mAb	MAA928Hu22

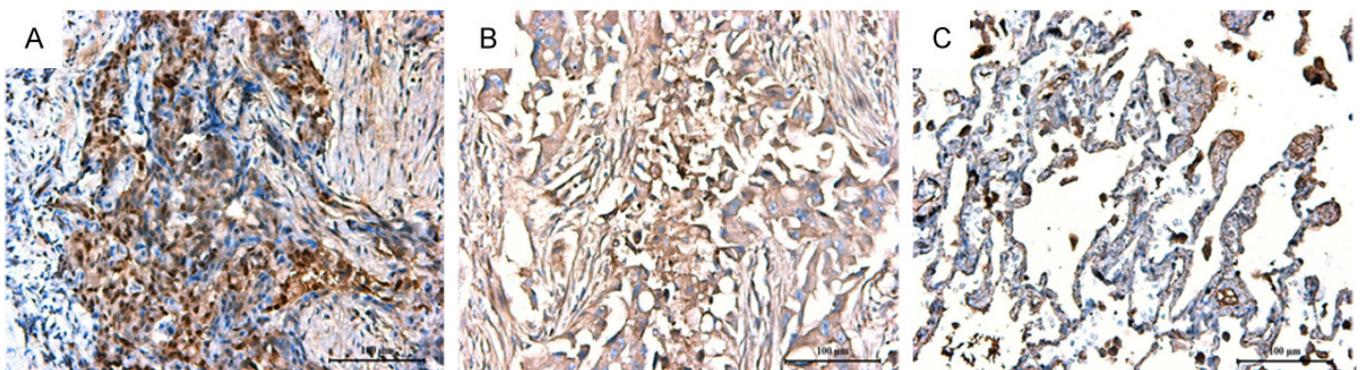


Fig. IHC分析 LMTK3在肺癌細胞及正常細胞之間的表現. A. B圖中可看到肺鱗狀細胞癌、肺腺癌中LMTK3在細胞核、質中蛋白有高度表現; C. LM正常細胞表現較低.Rabbit anti-human LMTK3 (1:50), HRP-goat anti-rabbit IgG (1:100) .

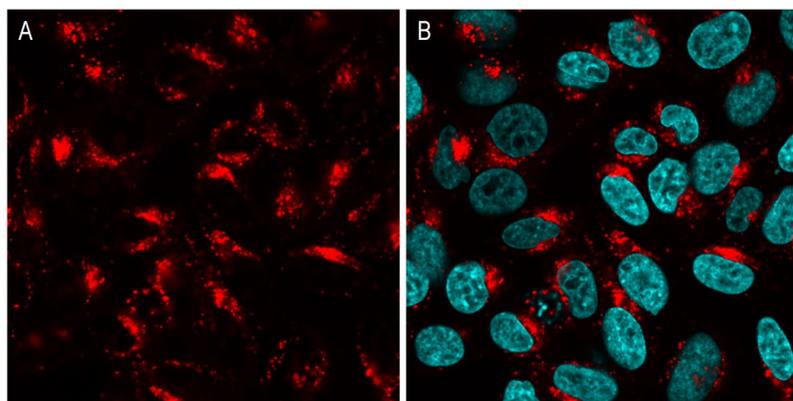
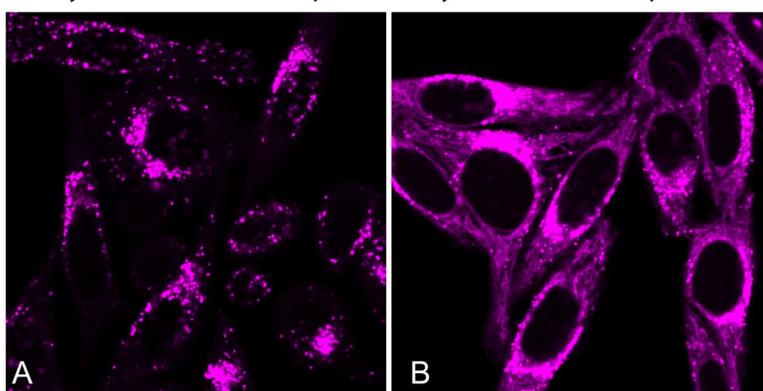


Fig. HeLa cells were stained with 1X LysoView 540 and Hoechst 33342 for 37°C for 30 minutes, then imaged on a Zeiss LSM 700 confocal microscope. **A.** LysoView 540 staining imaged in the Cy[®]3 channel (red). **B.** Same field as A showing LysoView 540 staining (red) and nuclear staining with Hoechst (blue).

Fig. Live HeLa cells were stained for 10 minutes at 37°C with 1X LysoView™ 633 or 50 nM LysoTracker® Deep Red (Life Technologies) in cell culture medium. Both dyes were imaged using Cy[®]5 excitation/emission settings with the same gain settings. LysoView™ 633 **(A)** shows more specific punctate lysosomal staining with less cytoplasmic staining compared to LysoTracker® Deep Red **(B)**.

LysoView™ 633 compared to LysoTracker® Deep Red



Cat. No.	product
70061-T	LysoView™ 540, 1000X in DMSO
70061	LysoView™ 540, 1000X in DMSO
70058	LysoView™633 (1000X after reconstitution)
70060-T	"Light-On" LysoView™ 555, 1 mM in DMSO
70060	"Light-On" LysoView™ 555, 1 mM in DMSO

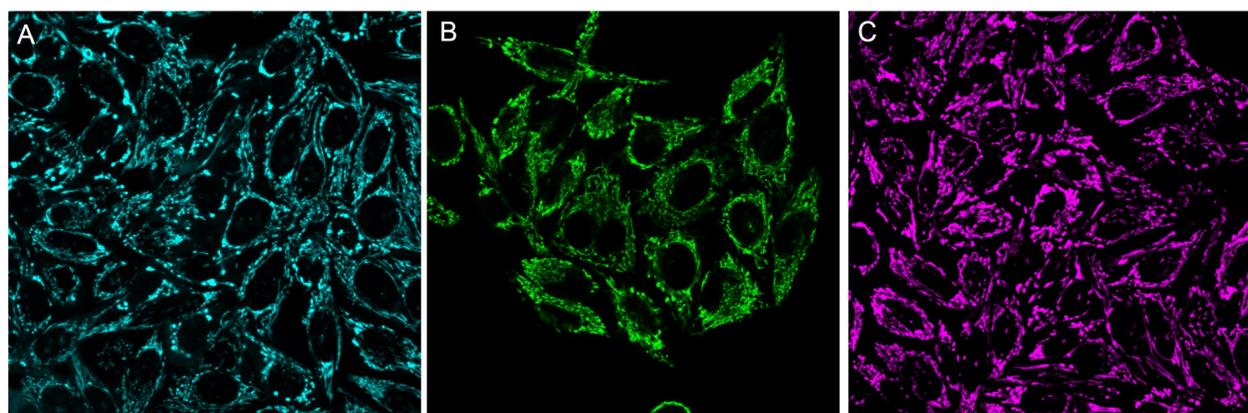
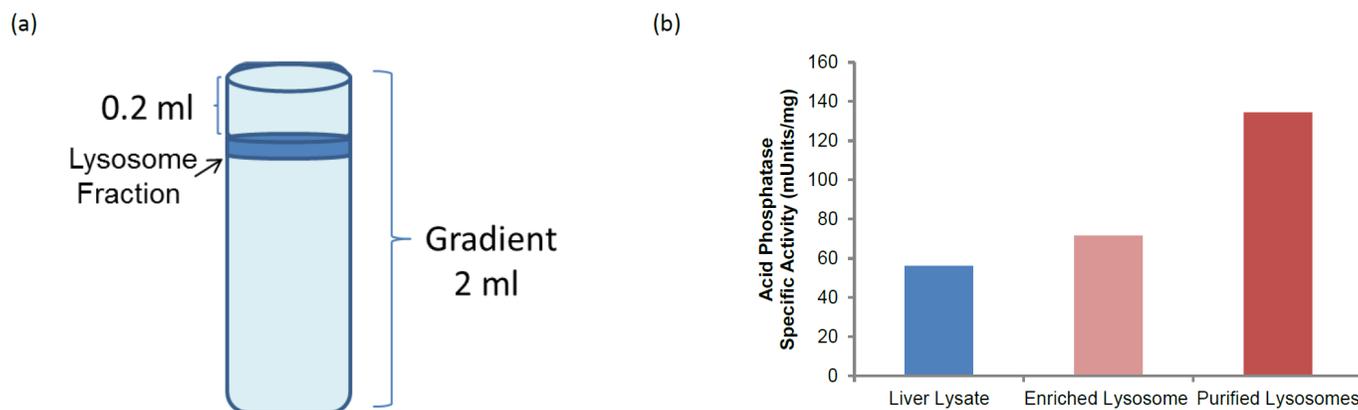


Figure . Live HeLa cells stained with (A) MitoView™ Blue, (B) MitoView™ Green, or (C) MitoView™ 633.

Cat. No.	product
70052	MitoView™ Blue
70054	MitoView™ Green
70055	MitoView™ 633

Lysosome Isolation Kit from Tissue and Cultured Cells

Catalog # K235-50; 50 Extractions; Store at -20°C)



Lysosome Isolation: (a.) Tentative Lysosome band location in gradient density. (b.) Acid Phosphatase (biomarker enzyme of lysosomes) specific activity increased with each purification step. Activity Assay experiments were carried out using Acid Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision Cat. K411). Data is normalized by the amount of protein used per well.

Antibody

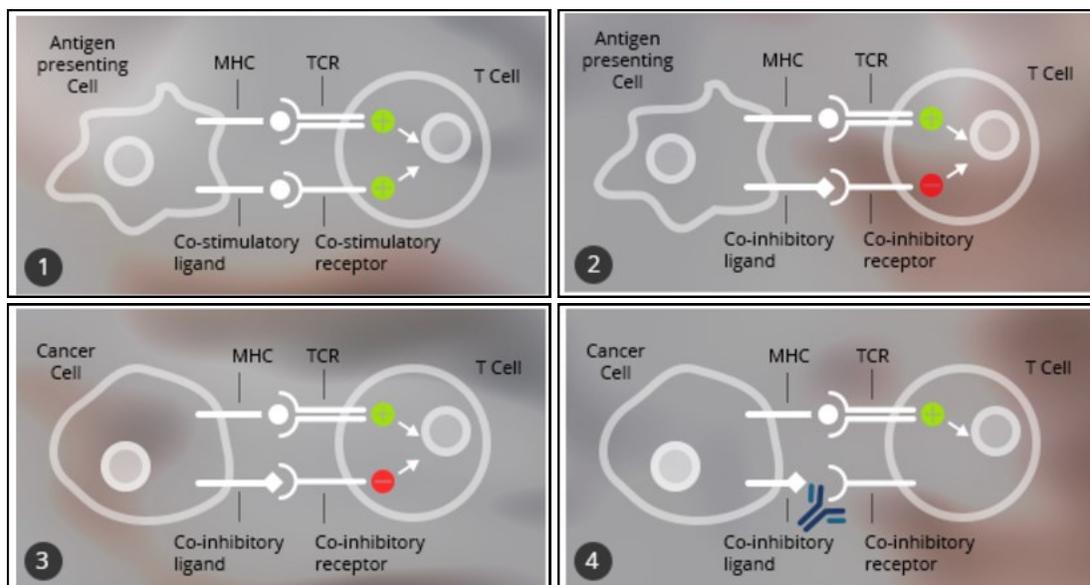
Cat. No.	product	Cat. No.	product
5070	ATG16 Antibody (Center)	6951	Phospho-LC3C(S12) Antibody
5075	DRAM antibody	3233	LC3 (APG8) Antibody (Clone 166AT1234)
6946	LC3 (APG8B) (NT) Antibody	3235	LC3 (APG8A) (Isoform A specific) Anti-
6947	LC3A (Cleaved) Antibody	3886	Apg5/Atg5 Antibody
6948	LC3 (APG8A) (NT) Antibody	3907	APG7/ATG7 Antibody
6950	LC3 (APG8C) Antibody	3910	APG10/ATG10 Antibody

Immune Checkpoint

隨著時代的進步，為了治癒癌症，層出不窮的治療手段也愈來愈多元化；從傳統的手術、放射療法到化療藥物，進展到標靶藥物療法到目前的免疫療法。雖然隨著治療方法的進步，癌症的存活率已明顯增加，但是因為癌症的復發性、循環腫瘤細胞(circulating tumor cell)或腫瘤幹細胞(cancer stem cell)等因素使得癌症治療仍有許多困難點需要克服。

免疫系統的組成極為複雜，細胞的部分包含 B 細胞、plasma 漿細胞、NK(自然殺手細胞)、DC(樹突細胞)、等等，而在非細胞的部分包含 antibody 抗體與免疫球蛋白、complement 補體等。上述物質在免疫反應中彼此協調合作，確保免疫系統正常運轉。利用免疫原理消滅癌細胞的方法很多，其實單株抗體標靶藥物治療也算是免疫治療的一環。T 細胞透過辨認異常細胞的特定抗原而活化，進一步攻擊體內異常細胞或腫瘤細胞。但當人體免疫功能失去控制的時候，則無法有效殺死異常細胞，起因於免疫系統中有稱之為免疫檢查點(Immune Checkpoint)的調控機制，在免疫反應中扮演關鍵的角色，使正常細胞避免因 T 細胞攻擊時造成過度免疫反應而死亡。異常細胞會利用 Immune Checkpoint 來抑制 T 細胞的活化，讓異常細胞可以逃過 T 細胞的辨識與攻擊。

Mechanism of Immune Checkpoint



(<https://www.cgen.com>)

1. Co-stimulation 活化 T 細胞接受器，進而活化免疫反應。
2. Co-inhibitory 降低 T 細胞活性與減少過度免疫反應而造成的組織傷害。
3. 癌細胞透過抑制免疫檢查點來減少 Anti-tumor 的免疫反應。

Immune Checkpoint

目前許多的免疫檢查點以被廣泛研究，而直到今日，研究最深入的是 CTLA-4 與 PD-1，此兩分子為 2014 年獲唐獎頒獎的研究主題。1987 年學者 Brunet 發現免疫球蛋白家族成員之一 CTLA-4，1995 年動物實驗中證實 CTLA-4 knockout 老鼠在出生後會迅速死於自體免疫疾病，進一步在動物實驗中也證實了阻斷 CTLA-4 可使腫瘤縮小，2011 年 FDA 更核准 CTLA-4 阻斷劑(Ipilimumab)在黑色素瘤上的使用；此外在 1992 年本庶佑博士證實 PD-1 的高度表現會傳遞抑制 T 細胞活性的訊息，因此可以保護發炎反應造成的細胞傷害，使得腫瘤細胞不被 T 細胞殺死。而多數免疫檢查點都以發展阻斷劑並進入臨床研究。

The clinical development of agents that target immune-checkpoint pathways

Target	Biological function	Antibody or Ig fusion protein	State of clinical development*
CTLA4	Inhibitory receptor	Ipilimumab	FDA approved for melanoma, Phase II and Phase III trials ongoing for multiple cancers
		Tremelimumab	Previously tested in a Phase III trial of patients with melanoma; not currently active
PD1	Inhibitory receptor	MDX-1106 (also known as BMS-936558)	Phase I/II trials in patients with melanoma and renal and lung cancers
		MK3475	Phase I trial in multiple cancers
		CT-011 [†]	Phase I trial in multiple cancers
		AMP-224 [§]	Phase I trial in multiple cancers
PDL1	Ligand for PD1	MDX-1105	Phase I trial in multiple cancers
		Multiple mAbs	Phase I trials planned for 2012
LAG3	Inhibitory receptor	IMP321	Phase III trial in breast cancer
		Multiple mAbs	Preclinical development
B7-H3	Inhibitory ligand	MGA271	Phase I trial in multiple cancers
B7-H4	Inhibitory ligand		Preclinical development
TIM3	Inhibitory receptor		Preclinical development

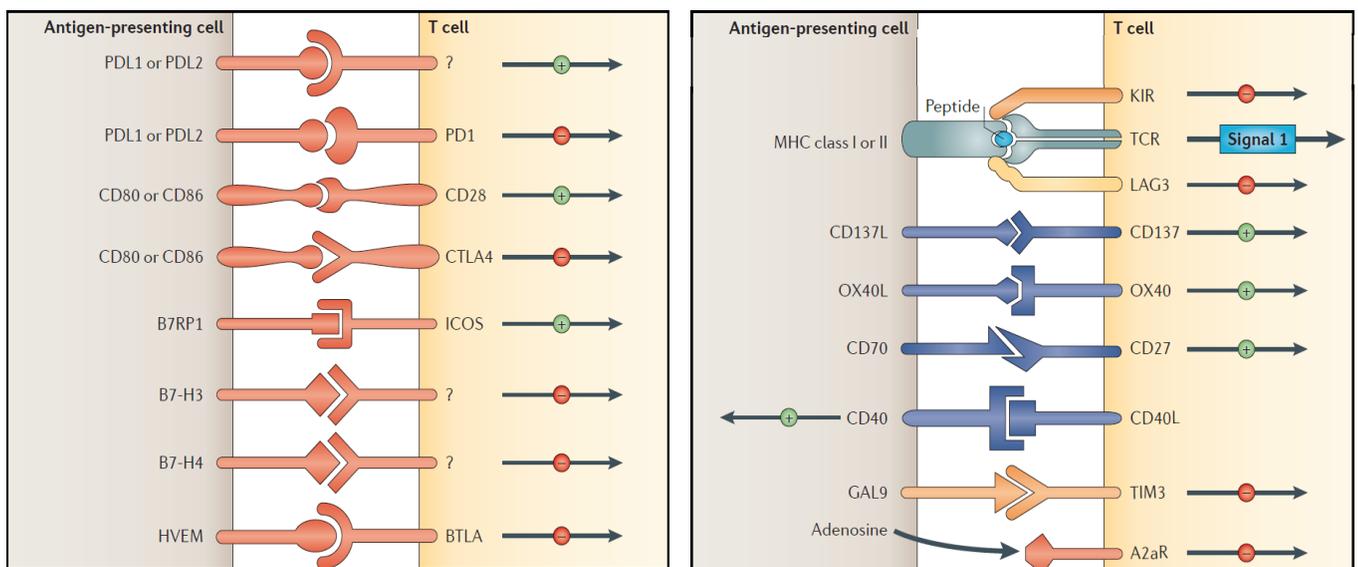
(Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-64)

而上述 T 細胞誘發的細胞死亡可分為四種：

1. 抗體誘發細胞毒性(antibody dependent cell mediated cytotoxicity)：活化自然殺手細胞(Nature Killer cells)或 T 細胞，而 NK 細胞與 T 細胞會釋出使異常細胞死亡的 Cytokine。
2. 補體誘發細胞毒性(complement dependent cytotoxicity)：活化的補體會造成異常細胞破裂進一步造成死亡。
3. 直接促使癌細胞凋亡(apoptosis)：不需上述之物質，直接促使癌細胞走向死亡。

Immune Checkpoint

Multiple co-stimulatory and inhibitory interactions regulate T cell responses



(Nat Rev Cancer. (2012) 22;12(4):252-64.)

技術提供

Checkpoint Blocking Antibodies **BioVision**

Product Name	Cat. No.	Size	Host	Species	Application
4-1BBL Antibody	5369	30 µg, 100 µg	Rb	hu	WB, IHC
BTLA Polyclonal Antibody	A1082	50 µg	Rb	hu	WB, IHC, IF
CD137 Polyclonal Antibody	A1088	100 µl	Rb	hu	WB, ELISA, IF
CD137/4-1BB Antibody	A1087	50 µl	Rb	hu, ms, rt	IHC
CD223 (LAG3) Polyclonal Antibody	A1067	100 µg	Rb	hu, ms	WB, IHC, FC
CD27 Polyclonal Antibody	A1074	100 µg	Rb	hu	WB, FC
CD28 Polyclonal Antibody	A1076	100 µg	Rb	hu	WB, ELISA
CTLA4 Polyclonal Antibody	A1083	100 µl	Rb	hu	WB, IHC
GITR / TNFSF18 Monoclonal Antibody	A1086	50 µg	Ms	hu	WB
GITR / TNFSF18 Polyclonal Antibody	A1085	100 µl	Rb	hu	WB
HVEM / TNFRSF14 Antibody	A1084	50 µg	Rb	hu, ms	WB, IHC, IF
OX40 Antibody	3890	100 µg	Rb	Rt	WB
PD-1/PDCD1 Antibody	6931	50 µg	Rb	hu	WB, ELISA
Tim-3 Antibody	3808	100 µg	Rb	hu	WB, IHC

Immune Checkpoint



技術提供

Immune Checkpoint Proteins

Product Name	Cat. No.	Size	Source
Human CellExp™ 4-1BB Ligand/TNFSF9, Human recombinant	9240	10 µg, 25 µg	HEK293 cells
4-1BB Receptor, human recombinant	4370	100 µg, 1000 µg	E. coli
Human CellExp™ B7-2 /CD86, Human recombinant	7496	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ B7-H3 / CD276, Human recombinant	9239	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ B7-H5 / VISTA, Human recombinant	9242	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ BTLA, Human recombinant	9228	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD155, human recombinant	7462	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD160/BY55, human recombinant	7386	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD172A / SIRP, human recombinant	7506	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
CD226, human recombinant	7310	100 µg	E. coli
Human CellExp™ CD244 / 2B4 / SLAMF4, Human recombinant	7374	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD27 / TNFRSF7, Human recombinant	9243	25 µg, 100 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD273 / B7-DC / PD-L2, Human recombinant	7369	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD28, Human recombinant	9237	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
CD40Ligand/TRAP, human recombinant	4014	10 µg, 1000 µg	E. coli
Human CellExp™ CD47, Human recombinant	7385	10 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CD80, Human recombinant	7383	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ CTLA4/CD152, human recombinant	7476	20 µg, 100 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ GITR / TNFRSF18, Human recombinant	9231	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ Human CD40/ TNFRSF5, Human recombinant	9230	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™LAG3 /CD223, Human recombinant	7278	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ HVEM/TNFRSF14, Human recombinant	7466	20 µg, 100 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ ICOS / CD278, Human recombinant	9238	10 µg, 100 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ ICOSLG /B7-H2 /CD275, Human recombinant	7426	20 µg, 100 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ OX40 Ligand / TNFSF4, Human recombinant	9244	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ PD-1 /PDCD1, C-Fc Tag, Human recombinant	7500	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ PD-1 /PDCD1, C-Fc Tag, Mouse recombinant	7503	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ PD-1 /PDCD1, Human recombinant	7498	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ PD-1 /PDCD1, Mouse recombinant	7499	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
PD-1/PDCD1, Human Recombinant	P1024	10 µg, 50 µg	E. coli
Human CellExp™ PD-L1 /CD274 /B7-H1, Human recombinant	7429	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
Human CellExp™ PD-L1 /CD274 /B7-H1, Mouse recombinant	7428	10 µg, 50 µg	HEK293 cells
PD-L1 /CD274, Human Recombinant	P1023	10 µg, 50 µg	E. coli

Immune Checkpoint



Antibodies

Product Name	Cat. No.	Size	Host	Species	Application
CD134/OX40 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab01422	100ug	Rabbit	Human	ELISA, WB
CD27 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab01453	100ug	Rabbit	Human	ELISA, WB, FC
CD276 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab01454	100ug	Rabbit	Human, Mouse, Rat	ELISA, WB, IHC, FC
HVEM/TNFRSF14 Rabbit Polyclonal	FNab04086	100ug	Rabbit	Human	ELISA
LAG-3 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab04676	100ug	Rabbit	Human, Mouse, Rat	ELISA, WB, IP
PD-1/CD279 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab06234	100ug	Rabbit	Human	ELISA, WB, IHC, FC
PD-1/CD279 Mouse Monoclonal Antibody	FNab06235	100ug	Mouse	Human	ELISA, WB, IHC
PD-L1/CD274 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab06280	100ug	Rabbit	Human, Mouse, Rat	ELISA, WB, IHC, IF
PD-L1/CD274 Mouse Monoclonal Antibody	FNab06281	100ug	Mouse	Human, Mouse, Pig	ELISA, WB, IHC
VTCN1 Rabbit Polyclonal Antibody	FNab09461	100ug	Rabbit	Human, Mouse, Rat	ELISA, WB

ELISA Kits

Cat. No.	UniProt ID	Product Name
EH0252	Q15116	Human PD-1/PDCD1 (Programmed Cell Death Protein 1) ELISA Kit
ER1238	----	Rat PDCD1LG1 (Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1) ELISA Kit
EH3528	Q9NZQ7	Human PDCD1LG1 (Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1) ELISA Kit
EM0399	Q9EP73	Mouse CD274 (Programmed cell death 1 ligand 1) ELISA Kit
EM0062	P09793	Mouse CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4) ELISA Kit
EH0667	P16410	Human CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4) ELISA Kit
EH1083	P18627	Human LAG3 (Lymphocyte activation gene 3 protein) ELISA Kit
EH0634	Q5ZPR3	Human CD276 (CD276 antigen) ELISA Kit
ER6232	Q7TPB4	Rat Cd276 (CD276 antigen) ELISA KIT
EM6399	Q8VE98	Mouse Cd276 (CD276 antigen) ELISA KIT
EH1214	Q7Z7D3	Human VTCN1 (V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1) ELISA Kit

Immune Checkpoint

Cloud-Clone Corp.

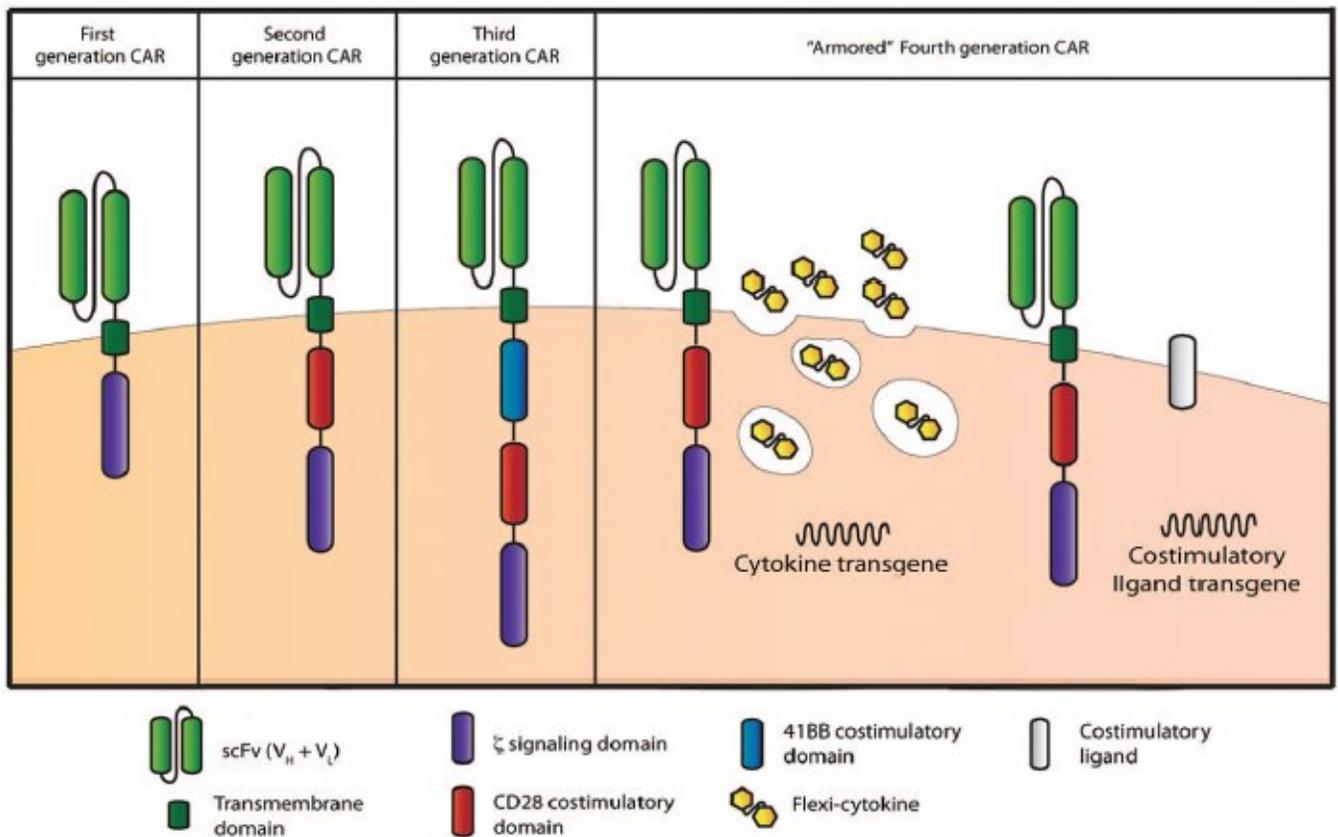
Assay Reagents  Analysis Equipments  Animal Experiments

	產品類型	Cat. No.	產品名稱
PD-1	抗體	PAA751Ra01	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
		PAA751Hu01	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
		RPA751Hu01	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
	重組蛋白	RPA751Ra01	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
	ELISA kit	SEA751Hu	ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
		SEA751Mu	ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)
SEA751Ra		ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1)	
PD-L1	抗體	PAA788Hu01	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		PAA788Ra01	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		PAA788Mu01	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		PAA788Mu02	Polyclonal Antibody to Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
	重組蛋白	RPA788Mu01	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		RPA788Mu02	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		RPA788Ra01	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		RPA788Hu01	Recombinant Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
	ELISA kit	SCA788Hu	CLIA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		SEA788Ra	ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		SEA788Hu	ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
		SEA788Mu	ELISA Kit for Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PDCD1LG1)
CTLA4	抗體	PAB230Ra01	Polyclonal Antibody to Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		PAB230Hu01	Polyclonal Antibody to Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		PAB230Mu01	Polyclonal Antibody to Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
	重組蛋白	RPB230Mu01	Recombinant Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		RPB230Hu01	Recombinant Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		RPB230Ra01	Recombinant Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
	ELISA kit	SEB230Mu	ELISA Kit for Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		SEB230Ra	ELISA Kit for Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)
		SEB230Hu	ELISA Kit for Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4 (CTLA4)

CAR-T cells (chimeric antigen receptor T cell)

CAR generations

傳統的標靶藥物大多是針對細胞生長或細胞分裂相關的重要因子來加以控制，或是抑制腫瘤週邊血管的生長而達到抑制腫瘤的生長。近年來，免疫療法的發展更是為癌症治療開啟了新的一扇門，針對人體的免疫細胞進行修飾而增強對腫瘤細胞的攻擊(Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)，以及強化人體免疫細胞對癌細胞的辨認(Immuno checkpoint: CTLA-4, PD-1/PDL-1 system)，可顯著降低腫瘤增生。



(Hematology Am Soc Hematol Educ Program) 2012;2012:143-51)

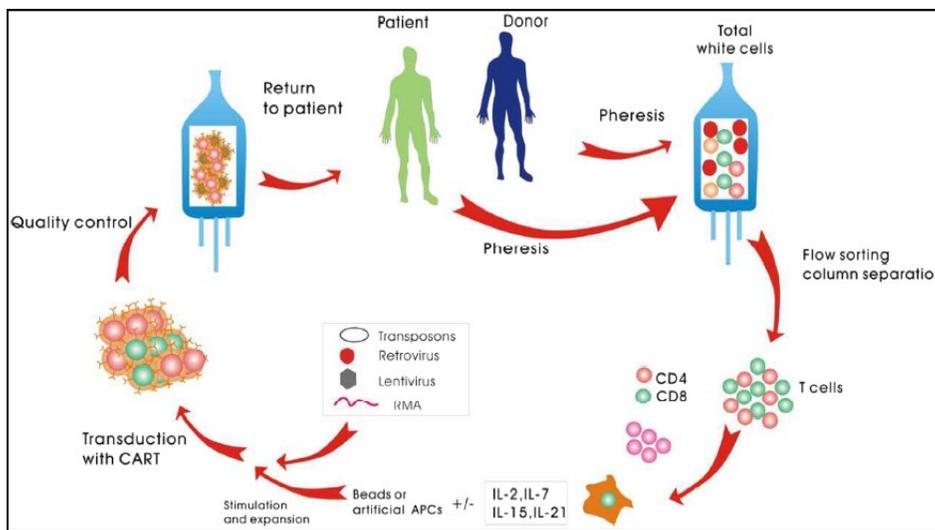
CARs 是由胞外結合標靶(通常是 single-chain variable fragment ScFv)、特定長度的 spacer、橫跨細胞膜區域(transmembrane (TM) region)和膜內 T 細胞訊息相關區域(T-cell signaling)。

Creative biolabs 目前已進展到了第四代，在功能及專一性上相較於前幾代，已做出不同程度的更新。例如：可誘導而進行表現 cytokine (IL-12)，增加 CAR-T 細胞的活性化，而促使內在免疫細胞毒殺 antigen-negative 的癌細胞。

CAR-T cells

最初 CAR-T 細胞在建立時是使用非病毒載體的 DNA 轉染技術，其轉染效果不易產生突變但需要長時間培養，且因較低的基因轉染率，需要再經過抗生素篩選，其中抗生素基因也會造成不良的免疫反應。轉位子系統能較有效率的轉殖基因，但上述兩種方式都需要長期培養進而影響細胞活性和持久性。所以便有多數研究者開始利用 γ 反轉錄病毒(γ -retrovirus)來有效率與永久轉殖 T 細胞，此外在初級人類 T 細胞中已被證明具有安全性，唯一的缺點是可能造成基因沈默，影響 CAR 的穩定表現。近年來發現慢病毒載體(lentiviral vector)可有效率並永久轉殖 T 細胞，且進一步被證實慢病毒載體在造血幹細胞中較 γ 反轉錄病毒安全。使用專一啓動子與慢病毒轉殖，可使 T 細胞表面持續表現 CAR，可延長 CAR-T 細胞於體內的存活時間。

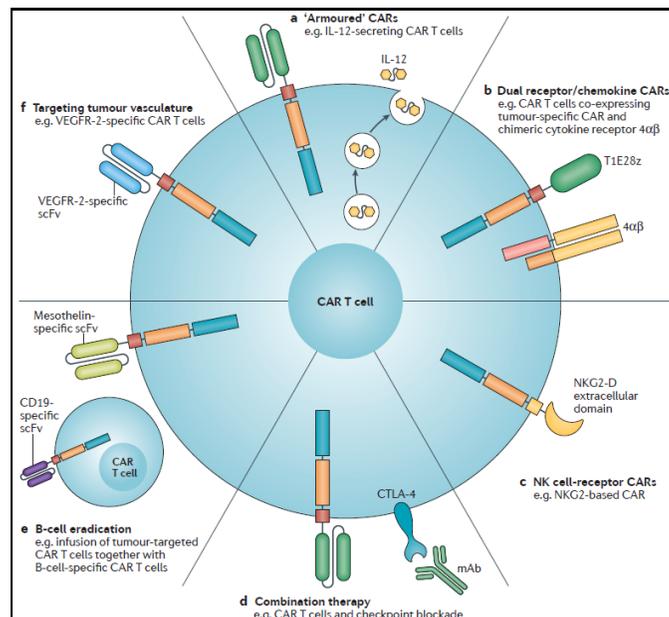
The procedure of chimeric antigen receptor (CAR) therapy



CAR-T 細胞，主要由病人的血液中收集 T 細胞再利用基因轉殖與細胞培養技術進行數量放大後，最後將帶有特定抗原接收器的 T 細胞打回病人體內進行免疫治療。

(Front Immunol. 2017 Apr 3;8:267)

Approaches to improve CAR-T-cell therapy



- CAR-T 細胞會釋放促進發炎反應因子(例:IL-12)。
- Dual receptor/chemokine CAR-T細胞會標記腫瘤細胞並因腫瘤釋放的細胞因子而活化。
- 建立自然殺手細胞互補區域(例如:NKG2-D)。
- 合併使用免疫檢查點單株抗體，減緩免疫反應被抑制的現象。
- 使用兩種CAR-T細胞，可減少 B 細胞表現和增加腫瘤專一-CAR-T細胞的存活時間。
- 建立抑制腫瘤血管生長特性CAR-T。(例如: VEGFR-2-specific CAR-T細胞)。

(Nat Rev Clin Oncol.2016 Jun;13(6):370-83)

CAR-T cells



Chimeric Antigen Receptor (CAR) Products

Associated malignancy	Target antigen	Receptor type	CARs generation
Leukemia	CD19	ScFv-CD28-41BB-CD3ζ	3rd
	CD19	ScFv-CD28	2nd
	CD19	ScFv-41BB-CD3ζ	2nd
	k-light chain	ScFv-CD3ζ (VZV)	1st
	CD33	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
	CD33	ScFv-41BB-CD3ζ	2nd
	CD123	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
	WT1	ScFv-41BB-CD3ζ	2nd
	Pr3	ScFv-41BB-CD3ζ	2nd
Lymphoma	CD20	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
	CD19	ScFv-CD28-41BB-CD3ζ	3rd
	CD22	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
	k-light chain	ScFv-CD3ζ (VZV)	1st
	CD19	ScFv-b2c-CD3ζ	2nd
	CD19	ScFv -CD3ζ	1st
	CD19	ScFv-41BB-CD3ζ	2nd
	CD30	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
Breast and others	erb-B2	ScFv-CD28mut-CD3ζ	2nd
	erb-B2	ScFv-CD28-OX40-CD3ζ	3rd
	erb-B 2,3,4	ScFv-CD3ζ	1st
	MUC1	ScFv-FcεR1γ	1st
	LeY	ScFv-CD3ξ	1st
Prostate cancer	erb-B2	ScFv-CD3ζ	1st
	PSCA	scFv-FcεR1γ	1st
Colorectal cancer	EGP-40	ScFv-CD28-CD3ζ vs. CD3ζ	2nd
	erb-B2	ScFV-CD28-FcεR1γ	2nd
Lung malignancy	Her2/neu	ScFv-CD3ζ	1st
Adenocarcinomas	TAG-72	ScFv-FcεR1γ (alloantigen)	1st
Cervical carcinoma	CD44v7/8	ScFv-CD28-CD3ζ	2nd
Melanoma	GD3	ScFv-CD3ζ	1st
	MAGE-A1	ScFv-CD4-CD3ζ	2nd
Renal cell carcinoma	CAIX	ScFv-CD3ζ(EBV)	1st
Epithelial derived tumors	LeY	ScFv-CD3ξ	1st

CAR-T cells



Associated malignancy	Target antigen	Receptor type	CARs generation
Advanced osteosarcoma	Her2/neu	scFv-CD3 ζ	1st
Rhabdomyosarcoma	Fetal acetylcholine receptor	ScFv-CD3 ζ	1st
Ewing's	GD2	ScFv-CD3 ζ	1st
sarcoma	NKG2D	ScFv-CD28-CD3 ζ	2nd
	MUC1	ScFv-4-1BB-CD3 ζ	2nd
	survivin	ScFv-CD28-4-1BB-CD3 ζ	3rd
	CSPG4	ScFv-CD28-4-1BB-CD3 ζ	3rd
Medulloblastoma	Her2/neu	ScFv-CD3 ζ	1st
	IL-13R-a2	ScFv-CD3 ζ (Influenza MP-1)	1st
Neuroblastoma	GD2	ScFv-CD3 ζ	1st
	GD2	ScFv-iC9-GD2-CD28-OX40	3rd
	L1 cell adhesion molecule	ScFv-CD3 ξ	1st
	CD171	ScFv-CD28-4-1BB-CD3 ζ	3rd
	EGFRvIII	ScFv-CD28-4-1BB-CD3 ζ	3rd
	ROR1	ScFv-CD28-4-1BB-CD3 ζ	3rd
Ovarian cancer	α -Folate receptor	ScFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ	2nd
	FBP	ScFv-CD3 ζ	1st
	MUC1	ScFv-Fc ϵ R1 γ	1st
Glioma	Her2/neu	scFv-CD3 ζ	1st
	IL-13R-a2	ScFv-CD3 ζ (EBV)	1st
Multiple Malignancies	EGP-2	ScFv-CD28-CD3 ζ (Influenza)	2nd
	EGP-2	ScFv-CD28-CD3 ζ	2nd
Various tumors	Mesothelin	ScFV-CD4-Fc ϵ R1 γ	2nd
	Mesothelin	ScFv-CD8-CD3 ζ	2nd
	Mesothelin	ScFv-Fc ϵ R1 γ	1st
	NKG2D ligands	ScFv-Fc ϵ R1 γ	1st
Tumor neovasculature	KDR	ScFV-CD3 ζ (vaccination)	1st
	VEGF-R2	ScFv-Fc ϵ R1 γ CAIX	1st
Prostate/tumor vasculature	PSMA	ScFv-Fc ϵ R1 γ	1st
Virus (CMV or EBV or adenovirus)	CD28	ScFv-Fc ϵ R1 γ	1st

廠商	技術服務
Creative Biomart	CAT-T related plasmid
Oxford genetics	CRISPR, protein expression, siRNA, and gene integration



Bio-Genesis Technologies

創世紀生技

www.bio-genesis.com.tw

