

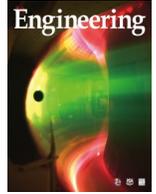


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Immunology—Article

基于表位定向细胞库筛选高亲和力PD-1突变体诱骗分子

刘昊^{a,b,#}, 乔春霞^{a,#}, 胡乃静^{a,c,#}, 王志宏^{a,d}, 王晶^a, 冯健男^a, 沈倍奋^a, 马远方^{b,*}, 罗龙龙^{a,*}

^a State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China

^b Joint National Laboratory for Antibody Drug Engineering, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Henan University, Kaifeng 475004, China

^c School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

^d School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2019

Revised 17 August 2020

Accepted 16 November 2020

Available online 13 July 2021

关键词

诱骗程序性细胞死亡蛋白-1

程序性细胞死亡配体-1

哺乳动物细胞文库

表位定向

摘要

抗程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed cell death protein-1, PD-1)/程序性细胞死亡配体-1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 单克隆抗体的免疫疗法已成为治疗肺癌、肠癌和黑色素瘤等多种癌症的常规方法。PD-1/PD-L1 信号通路在肿瘤微环境中可抑制T细胞活化,使其成为一个热门的抗癌靶点。野生型 (wild type, WT) PD-1 胞外结构域由于亲和力低而难以阻断PD-1/PD-L1 复合物的形成。本文利用三维 (3D) 晶体复合结构分析了PD-1 与PD-L1 或PD-L2 的相互作用。文中还报道了PD-1 与其临床抗体Opdivo 结合模式的理论研究。通过对PD-1 及其配体 (即PD-L1 和PD-L2) 或抗体Opdivo 的理论结合分析,建立了PD-1 的一个小库容量、表位定向的哺乳动物细胞文库。经过三轮细胞分选,筛选出对PD-L1 有较高亲和力的PD-1 突变体463 (亲和力较野生型PD-1 提高近3个数量级)。它对PD-1 具有抑制作用,可阻止PD-1 与PD-L1 形成复合物,这与商品化的抗PD-L1 抗体atezolizumab (ATE) 的作用相似。突变体463 的半数有效浓度 (median effective concentration, EC₅₀) 为0.031 μg·mL⁻¹,而ATE的EC₅₀ 为0.063 μg·mL⁻¹,两者均明显低于野生型PD-1 的EC₅₀ (2.571 μg·mL⁻¹)。在MC38转基因小鼠模型中,463 可有效逆转PD-1 对T细胞活化的抑制作用,而且10 mg·kg⁻¹ 的463 突变体蛋白对肿瘤生长的抑制率约为75%,与同等剂量下ATE 的抑制活性相似。更有趣的是,低剂量的463 (2 mg·kg⁻¹) 显示出比10 mg·kg⁻¹ 的野生型PD-1 更好的抑瘤效果。这项工作提供了一种高亲和力诱骗分子463,其体内活性较天然PD-1 分子有明显提高,因此,它有可能成为靶向PD-1/PD-L1 治疗相关肿瘤的良好选择。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

淋巴细胞活性通常由抑制性、刺激性和共刺激性信号通路调节。在T淋巴细胞中,负调节信号和正调节信号之间的平衡决定了T细胞对反应肽或主要组织相容性复合物 (MHC) 的反应[1]。癌症“抗原”被细胞毒性T淋巴细胞上的T细胞受体 (T cell receptor, TCR) 识别,在许多情况下,激发免疫系统对癌症的内源性反应[2]。然而,癌

细胞通常利用免疫抑制信号逃避免疫监视[3]。例如,免疫检查点信号通路PD-1 以及其配体之一PD-L1 可阻断T细胞活化进而造成免疫功能障碍[4]。PD-1/PD-L2 以及PD-L1/CD80 同样可以对T细胞产生抑制信号。正常情况下,PD-1/PD-L1 信号通路阻碍大量T细胞活化并维持对自身抗原产生免疫耐受[5]。然而,在如淋巴瘤、黑色素瘤、肺癌以及乳腺癌等多种癌症中,PD-L1 通常是过量表达,并与T淋巴细胞表面PD-1 分子作用阻止肿瘤微环境

* Corresponding authors.

E-mail addresses: luolong_long@126.com (L. Luo), mayf@henu.edu.cn (Y. Ma).

These authors contributed equally to this work.

中T淋巴细胞抗肿瘤活性[6–10]。PD-1通过其胞内结构域启动抑制，信号级联放大，该结构域包含一个开关基序以激活蛋白酪氨酸磷酸酶（SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SHP）并干扰TCR激活信号和一个免疫受体酪氨酸抑制基序[11]。PD-1/PD-L1抑制T细胞增殖、细胞因子释放以及细胞毒性，进而导致肿瘤中T淋巴细胞耗竭和（或）凋亡[12]。因此，PD-1/PD-L1信号通路已被确定为肿瘤免疫治疗的关键分子，多种抗PD-1/PD-L1抗体药物已被批准进入市场，如Keytruda/pembrolizumab、Opdivo/nivolumab和Tecentriq/atezolizumab (ATE)。这些药物已经被证明无论在癌症晚期还是转移期均具有广泛的抗癌效应[13–17]。已经证实，在临床上大量的癌症患者对抗PD-1/PD-L1免疫治疗有长期反应[14]。得益于临床上突出的疗效，2014年美国食品药品监督管理局（FDA）加速批准了pembrolizumab和nivolumab[†] [18–19]。最近，有证据表明，在转移性黑色素瘤的治疗中，抗PD-1抗体比传统化疗更有效[20–22]。Nivolumab在转移性鳞状非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）患者中也显示出令人满意的临床结果。它已被证明是近15年以来总生存率[‡]（OS）明显优于传统治疗的单一免疫治疗药物。抗体阻断PD-1/PD-L1信号转导，逆转肿瘤中的免疫抑制状态，进而激活T淋巴细胞以达到次优疗效；此外，传统抗体通过自然杀伤细胞（natural killer cell, NK）或巨噬细胞的细胞毒性免疫反应[例如，抗体依赖的细胞介导的细胞毒性（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）]或抗体依赖的细胞介导的吞噬作用（acoustic doppler current profiler, ADCP）发挥免疫功能[23]。此外，抗PD-1抗体阻断PD-1与其配体（PD-L1或PD-L2）结合，而抗PD-L1抗体阻断PD-1/PD-L1或PD-L1/CD80信号通路[24–25]。与大多数研究中在阻断PD-1/PD-L1通路时使用的单克隆抗体类似，PD-1的胞外域可以作为竞争性拮抗药物。PD-1胞外域比单克隆抗体（其分子质量约为150 kDa）小，分子质量约为30 kDa，因此更容易进入肿瘤区域。然而，野生型PD-1以低亲和力（约 10^{-6} mol·L⁻¹）与PD-L1结合[26]；因此，野生型PD-1很难阻断PD-1/PD-L1的抑制信号。此前，我们尝试建立一个表位定向的哺乳动物细胞展示文库，并获得了一种新型的抗人PD-1抗体[27]。因此，我们考虑了通过体外亲和力成熟的高亲和力PD-1突变体是否可以像抗体一样表现出令人满意的抗肿瘤效应。因此，基于PD-1与PD-L1结合的关键残基，我们建立了一个包含数百万个PD-1突变体的表位特异性细胞表面展示

文库，并从中筛选出亲和力更高的PD-1突变体。以获得比野生型PD-1功能更好的突变体分子。

2. 材料和方法

2.1. 试剂

人PD-1、PD-L1、CD80和人/鼠PD-L2购自SinoBiological公司（货号：10377-H02H、10084-H02H和10698-H02H）。别藻蓝蛋白（APC）偶联物（如PD-1）和生物素偶联物（如PD-1、PD-L1和PD-L2）由中国嘉轩生物科技有限公司制备。干扰素（IFN）- γ 检测试剂盒购自美国BioLegend公司，抗PD1抗体Opdivo和抗PD-L1抗体ATE均在本实验室根据专利DNA序列制备。MIL50是我们实验室制备的抗蓖麻毒单克隆抗体。链霉亲和素-辣根过氧化物酶（HRP）、链霉亲和素-APC、同种型对照免疫球蛋白G（IgG）（货号：02-7102）和山羊抗人IgG（H+L）二抗（HRP偶联；货号：#A18805）购自美国Invitrogen公司。DMEM培养基（货号：11965-092）、DMEM-F12培养基（货号：C11330500BT）和胎牛血清（FBS；货号：10438-034）购自美国Thermo Fisher公司。ExpiCHO表达系统购自美国Thermo Fisher公司（货号：A29133）。具有表面膜展示功能的哺乳动物细胞文库质粒pFRT-FT-MK和携带完整Ig结构的质粒pFRT-IgG1K，由本实验室构建[27]。以上两种载体均购自Invitrogen公司的pcDNA5/FRT载体（货号：V601020），并连接Flp-In™系统。该载体包含Flp重组目标（FRT）特征序列。FLP重组酶（flipase, FLP）可以将质粒切割并插入在基因组中具有相同特征序列的特定位置。所有其他试剂均以分析级从商业来源获得。

2.2. 细胞培养

将PD-L1基因转染到CHO-K1细胞（美国ATCC公司）中，成功构建CHO-K1-PD-L1细胞。人胚肾上皮细胞293T购自美国ATCC公司，MC38（鼠PD-L1敲除，人PD-L1敲入小鼠）购自上海南方模式生物科技股份有限公司；CHO-Flp-In™细胞在DMEM/F12培养基中培养，培养基中添加100 units·mL⁻¹青霉素、100 units·mL⁻¹链霉素、100 μ g·mL⁻¹博来霉素（zeocin）和10%热灭活FBS。293T细胞在添加10%热灭活FBS、100 units·mL⁻¹青霉素和100 units·mL⁻¹链霉素的DMEM培养基中培养。细胞培养在37°C、5%二氧化碳（CO₂）的孵箱（美国Thermo公司）。

[†] <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm436534.htm>.

[‡] <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm436566.htm>.

2.3. 计算机辅助设计PD-1文库

人PD-1与PD-L1结合的理论三维(3D)结构使用InsightII(2005版, Molecular Simulations, 美国)构建, 并使用模块Discover和Discover_3进行优化。非键合截止值为10 Å(1 Å = 0.1 nm), 原子电荷和非键合参数为默认值。与距离相关的介电常数用于真空计算。分别使用最速下降(2000步)和共轭梯度(5000步)方法最小化模型。根据PD-1和PD-L1复合物的理论结构, 预测PD-1/PD-L1相互识别的潜在氨基酸位点。为了证明理论预测的正确性, 将参与识别PD-1的PD-L1的关键氨基酸替换为丙氨酸, 以验证PD-L1和PD-1作用的关键位点。在验证模型正确的情况下, 我们设计了一系列PD-1突变。我们用残基取代了PD-1的PD-L1作用位点, 这些残基具有与PD-1相似的碳链主链, 但侧链更长, 与PD-L1结合更紧密。为保证理论文库质量, PD-1和PD-L2的3D复合结构、PD-1及其临床抗体Opdivo也采用相同的理论方法进行了研究。

2.4. 流式细胞术

本实验全程需在冰上进行。将细胞(5×10^5 个)洗涤, 重悬在测定缓冲液[含2% FBS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)]中, 然后与蛋白质(如PD-L1-生物素)或抗体在冰上孵育30 min。如有必要, 洗涤后将细胞与APC偶联的链霉亲和素孵育, 使用BD荧光激活细胞分选(FACS)Calibur™(美国)测定。使用BD CellQuest Pro软件(美国)分析细胞荧光密度。

2.5. PD-1库的设计与构建

根据计算机辅助设计, PD-1上的5个突变位点(M1~M5)可能是与PD-L1结合的关键位点, 首先通过丙氨酸替换并进行全基因合成, 质粒转染入细胞并展示在293T细胞表面。PD-1上的特定氨基酸取代以及突变前后与PD-L1结合的自由能结果见表1。PD-1突变体与PD-L1结合的FACS数据检测用于确定突变区域的重要性, 选择PD-1的13个关键位点并替换1~3种具有增强PD-1与PD-

L1结合潜力的氨基酸(表2)。最终产生了一个小数量级的PD-1靶向文库。我们使用重叠聚合酶链反应(overlap-PCR)合成文库基因, 将它们亚克隆到pFRT-FTMK载体中, 然后将文库质粒转染到CHO-Flp-In™细胞中。

2.6. 流式细胞仪分选

从加压筛选细胞库中收集 5×10^7 个细胞, 并重悬于1 mL含有2%胎牛血清的PBS中。然后加入 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PD-L1-biotin, 4 °C孵育30 min, 洗液清洗一遍后加入APC偶联的链霉亲和素, 在相同条件下进行孵育和洗涤。野生型PD-1细胞设置为对照组。分析荧光数据, 使用FACS Aria III流式细胞仪对结合能力较强的细胞进行分选。对PD-1突变基因进行测序、亚克隆并利用Flp-FRT哺乳动物细胞系统对突变蛋白进行表达[27]。

2.7. 酶联免疫吸附测定

酶联免疫吸附测定(ELISA)板包被 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白(如PD-1)4 °C包被过夜, 然后在含有1%牛血清白蛋白(BSA)、0.05%吐温-20的PBS中, 37 °C封闭1 h。然后加入蛋白质(如PD-L1-biotin)。洗涤后, 加入辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素, 在室温孵育1 h。使用四甲基联苯胺(TMB)底物(货号: 00-4201-56; 美国Invitrogen公司)观察结合信号, 并使用ELISA读数器在450 nm处测量吸光度。

2.8. Biacore

表面等离子体共振实验在25 °C下使用Biacore T200机器进行, HBS-EP作为运行缓冲液(货号: BR-1003-99; 美国GE Healthcare公司)。本实验使用胺基偶联试剂盒(货号: BR-1001-88; 美国GE Healthcare公司)在pH 5.0的条件下将PD-L1或PD-L2偶联到CM5芯片上。将一系列稀释的PD-1突变体(从 $3.125 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)以 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度通过两个流动池, 以记录结合期(120 s)。解离阶段监测1200 s, 并通过用HBS-EP替

表1 PD-1与PD-L1相互作用的特定氨基酸替代丙氨酸, 以及基于计算机辅助设计的交互能量计算

PD-1 mutant	Key residues in PD-1 interact with PD-L1	Interaction energy between PD-1 and PD-L1 before PD-1 mutant (kJ)	Interaction energy between PD-1 and PD-L1 after Ala replacement in PD-1 (kJ)
PD-1 M1	Asn ⁶⁶ Tyr ⁶⁸	-218.96	-108.29
PD-1 M2	Asn ⁷⁴ Gln ⁷⁵ Thr ⁷⁶ Asp ⁷⁷ Lys ⁷⁸	-218.96	-98.31
PD-1 M3	Tyr ⁴⁵ Glu ⁴⁶ Asp ⁴⁸ Asn ⁴⁹	-218.96	-215.38
PD-1 M4	Ile ¹²⁶ Leu ¹²⁸ Lys ¹³¹ Ile ¹³⁴ Glu ¹³⁶	-218.96	-94.29
PD-1 M5	Glu ⁸⁴ Asp ⁸⁵ Arg ⁸⁶ Ser ⁸⁷ Gln ⁸⁸	-218.96	-106.83

Asn: asparagine; Tyr: tyrosine; Gln: glutamine; Thr: threonine; Asp: aspartic acid; Lys: lysine; Glu: glutamic acid; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Arg: arginine; Ser: serine.

表2 设计高亲和力PD-1突变,构建小库容量细胞文库

Key amino acid	Alternative amino acid replacement (free energy ≤ -119 kJ)	Merger codon
Val ⁶⁴	His, Ile, Leu	AWS
Arg ⁶⁹	Glu	RRS
Asn ⁷⁴	Gly, Ser	RRC
Ala ⁸¹	Val, Leu, Ile	VYC
Glu ⁸⁴	Gln, Asp	SAS
Arg ⁸⁶	His, Tyr	YRC
Ser ⁸⁷	Asn	ARC
Gly ⁹⁰	Ala, Val, Leu	SBC
Gln ⁹¹	Tyr, Phe	YWS
Leu ¹²²	Ile, Gln	MWS
Ser ¹²⁷	Tyr, Phe	THC
Ala ¹²⁹	Gly	GSC
Ala ¹³²	Val, Leu, Ile	BYC

M = A/C, R = A/G, W = A/T, S = G/C, Y = C/T, V = A/G/C, H = A/C/T, and B = G/C/T represents the merger of several bases. In theory, the frequency of each base in the synthesis process is equal.

Val: valine; Ala: alanine; Gly: glycine; Phe: phenylalanine; His: histidine.

换样品溶液来触发。减去在参考流动池（第一个流动池）上获得的响应来校正整体折射率差异。每个循环后，传感器表面用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸-HCl (pH 2.1) 短暂处理再生。利用 Biacore T200 评估软件（美国 GE Healthcare 公司）使用 1:1 结合模型记录和分析结合动力学。以野生型 PD-1 为对照，溶剂（样品缓冲液）为阴性对照。根据 V-基线扣除背景以获得动力学曲线并计算解离常数 (K_D 值)。

2.9. 小鼠肿瘤异种模型

12~14 周龄雌性转基因小鼠 C57BL/6J（鼠 PD-1 敲除小鼠，人 PD-1 敲入小鼠）购自上海南方模式生物科技股份有限公司，置于顶部具有过滤器的笼子（每笼子 5 只小鼠）中，于特定无病原体（SPF）级别实验室饲养，喂食经过消毒的食物和水。在研究期间使用小鼠时，我们遵循《动物研究：体内实验报告（ARRIVE）指南》[†]。我们在研究过程中按照替换、减少和优化的“3R”原则观察动物伦理；小鼠的使用或治疗严格符合研究动物的护理和使用指南，并经北京药理毒理研究所动物伦理委员会批准。在我们注射癌细胞之前，一周内每天检查小鼠状态是否正常。然后，在 MC38 细胞系的基础上进行基因工程改造，用人 PD-L1 分子原位替换小鼠 PD-L1 基因，简称为 MC38 (hPD-L1)。将上述细胞培养至对数生长期，然后每只小鼠

静脉注射 1×10^6 个 MC38 (hPD-L1) 细胞。大约一周后，当肿瘤体积达到 80 mm^3 时，给小鼠腹腔注射抗 PD-L1 抗体 ATE、野生型 PD-1、PD-1 突变体 463 或同种型对照（抗蓖麻毒蛋白抗体 MIL50）。每周观察小鼠两次，以测量小鼠体重和肿瘤大小，持续 4 周。实验结束后，采用氯胺酮麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠；并使用深度冷冻确认死亡。

2.10. 统计分析

通过 *t* 检验或重复测量单因素方差分析（ANOVA）和图基事后检验法进行统计分析。体内差异通过双向方差分析和 Bonferroni 事后检验进行分析。用正常线性混合效应模型测试剂量递增实验的显著性。当 $p < 0.05$ 时，具有显著性差异。

3. 结果

3.1. PD-1 与 PD-L1 结合的表位叠加

我们使用同源建模、分子对接和动态模拟的方法，分别对 PD-1 及其配体 PD-L1、PD-L2 与抗 PD-1 抗体 Opdivo 的理论结构进行了建模。利用 PD-1 和 PD-L1 的 3D 复合物结构，初步构建了亲和力成熟的文库。为保证文库质量，从理论上分析了 PD-1 与 PD-L2、PD-1 与 Opdivo 的结合模式。利用 PD-L2 和 Opdivo 鉴定 PD-1 的结合方式和关键残基，优化亲和成熟文库，预测重要残基。如图 1 (a) 所示，PD-1 和 PD-L1 相互作用的关键氨基酸位点用不同颜色的棒状结构表示。

将表达 PD-1 突变体的细胞 (M1~M5) 与生物素偶联的 PD-L1 一起孵育，然后与 APC 偶联的链霉亲和素通用二抗一起孵育。M1、M2、M4 和 M5 突变位点氨基酸被证实对于 PD-1 与 PD-L1 的结合很重要，因为它们的替换会导致 PD-1 与 PD-L1 的结合显著减少或完全丧失 [图 1 (b)]。基于图 1 (b) 所示的 FACS 数据，优化了 PD-1/PD-L1 复合物的结构。发现 PD-1 上的重要残基 N74、A81、E84、R86、S87、G90、Q91、L122、S127、A129、V64、R69 和 A132，如果发生突变，有可能提高 PD-1 与 PD-L1 结合的亲和力。

3.2. 具有表位特异性细胞文库的高亲和力 PD-1 突变体的定向进化

野生型 PD-1 与 PD-L1 之间的亲和力较低，因此在癌症微环境中很难起到阻断 PD-1/PD-L1 结合的目的。而高亲和力的 PD-1 突变体可以作为一种潜在的诱饵药物阻止

[†] <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>.

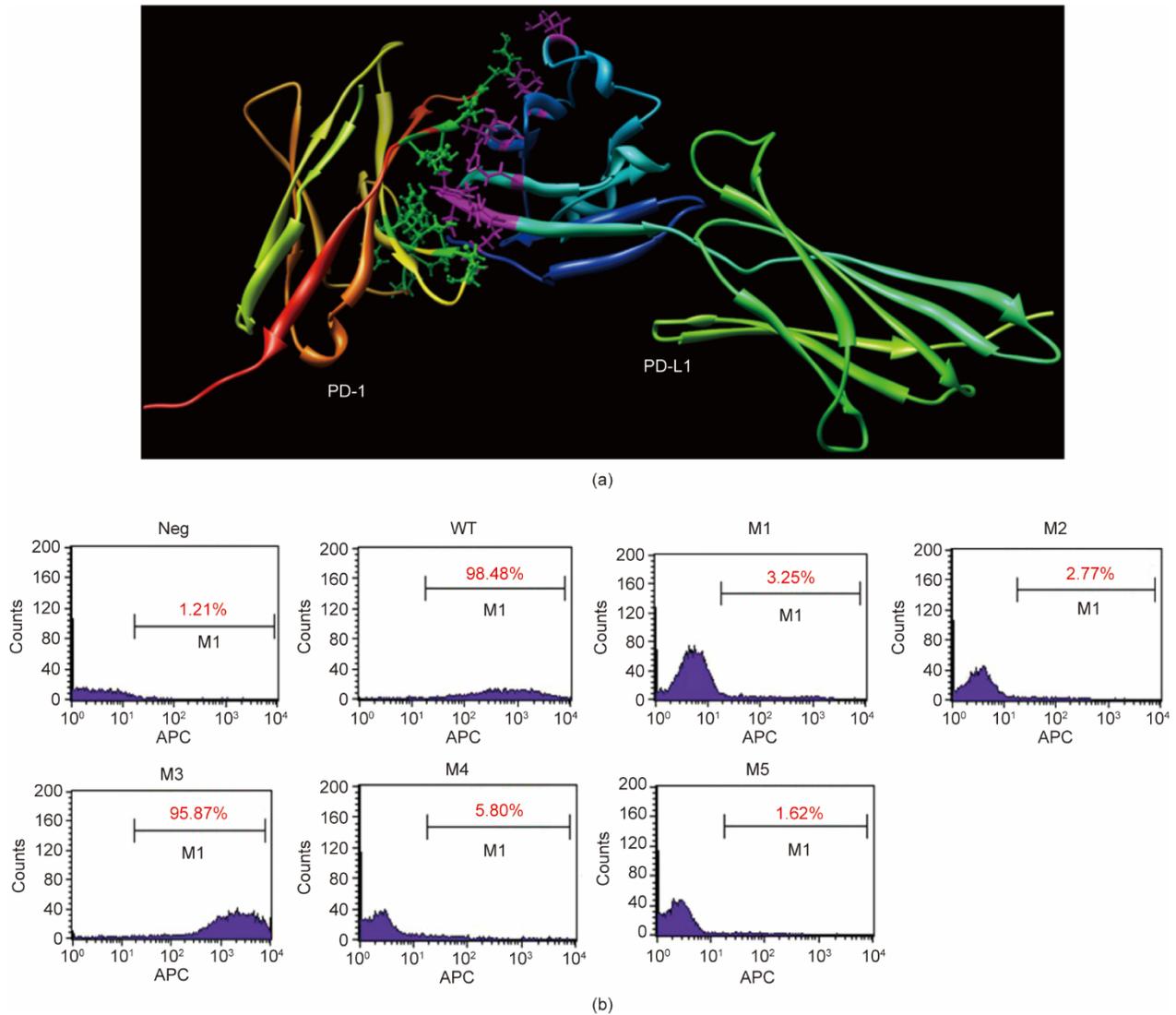


图1. PD-1结合PD-L1表位分析。(a) PD-1与PD-L1复合物理论结构,绿色球棍代表PD-1参与识别的关键氨基酸位点,紫色球棍代表PD-L1上参与识别PD-1的关键氨基酸位点。在PD-1与PD-L1之间被标注的氨基酸位点(绿色和紫色球棍)是二者相互作用的关键位点。(b)流式细胞术检测PD-L1与293T细胞膜展示的野生型PD-1分子或者PD-1突变体结合活性。利用计算机结构对接确定PD-1识别的关键位点,并通过基因合成的方式对特定位点进行丙氨酸替换获得突变体分子。转染突变体分子的细胞与生物素化的PD-L1分子进行孵育,以APC-链霉素作为二抗。突变体M1、M2、M4、M5丢失了与PD-L1结合的活性,表明在突变体上的突变残基是PD-1识别PD-L1的关键位点。

PD-1/PD-L1复合物的形成[图2(a)]。基于PD-1的结构信息和关键位点,我们设计了每个氨基酸亲和力更高的突变。但是在设计过程中,保留每个突变体中PD-L1重要的识别表位。也就是说,突变体需要具有与野生型PD-1相似的结构、物理及化学特征。因此,该文库是一个多样性较小的文库,仅包含具有稳定表位的高亲和力的PD-1突变序列。通过重叠PCR,扩增PD-1突变体的DNA序列。电泳结果显示,DNA文库片段在琼脂糖凝胶中的转移条带与理论条带大小相同,分子质量约为650 bp(见附录A中的图S1)。并将突变序列通过常规分子生物学酶切、酶连的方法插入载体pFRT-FTMK中。

为了确认文库的正确率和多样性,使用第二代测序方

法对质粒进行测序,并分析氨基酸序列中突变氨基酸的分布(图S2)。然后,将含各种PD-1突变体的文库质粒转染至CHO-Flp-In™细胞并展示在细胞表面。使用三轮细胞分选筛选高亲和力克隆[图2(b)]。每轮细胞分选后,都会获得与PD-L1结合强的克隆。三轮分选结束对突变序列进行测序,共筛选出29个单克隆。然后将突变序列基因插入pFRT-IgG1Fc载体,然后将重组质粒转染293T细胞,制备PD-1突变体Fc融合蛋白。收集、稀释转染细胞的表达上清液,并与包被的PD-L1/PD-L2孵育,以与野生型PD-1竞争。

ELISA检测显示了29个PD-1突变体以及野生型PD-1与PD-L1、PD-L2的结合能力(图S3)。选择了下列9个

具有潜在强结合能力的突变体进行进一步拮抗鉴定：408、431、407、410、446、411、463、506和576。这些突变体可以与人PD-L1（图S4）、PD-L2（图S5）结合，具有剂量依赖性。此外，它们可以抑制野生型PD-1与PD-L1、PD-L2的结合[图S6（a）和（b）]，表明其可能作为一种诱饵蛋白去阻断PD-1与PD-L1之间的信号传递。使用Biacore分析确认与PD-L1、PD-L2具有最高亲和力的五个PD-1突变体（表3）。

与野生型PD-1（ $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）[26]相比，它们的亲和力常数范围从 $1.28 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $2.06 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，表明这些突变体的结合能力更强。其中一个突变体463具有比其他突变体更小的解离常数（ $2.06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ）。此外，五个突变体与PD-L2的亲和力常数在 2.67×10^{-8} ~

$6.95 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，高于野生型PD-1。根据流式细胞术数据，两种PD-1突变体463和506抑制了PD-1与PD-L1表面结合。它们都显示出比野生型PD-1更好的抑制活性，并且与ATE具有相似甚至更好的效果[图S6（c）]。我们建立了两者的稳定细胞系；然而，在ExpiCHO表达系统中506的表达水平远低于463，因此我们选择463进一步研究。

463以剂量依赖性方式与人PD-L1结合， EC_{50} 值为 $0.031 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低于野生型PD-1（ $2.571 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）和ATE（ $0.063 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ），表明463在未来的应用中可能会改变PD-1与PD-L1的结合[图3（a）]。如图3（b）所示，463以剂量依赖性方式与人PD-L2结合， EC_{50} 值为 $0.63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，远低于野生型PD-1（ $> 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）；463还与鼠

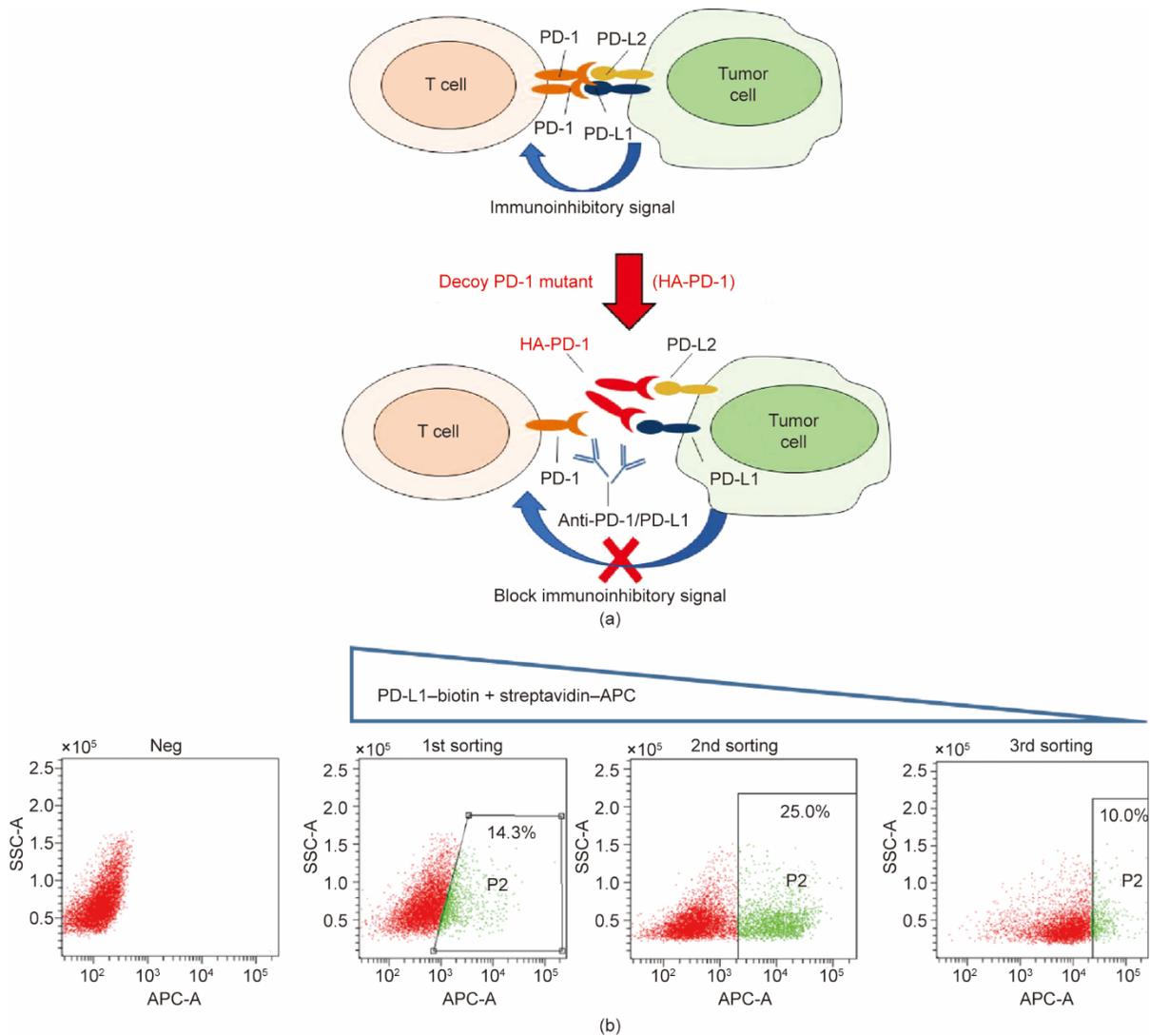


图2. 利用细胞表面展示方法开展高亲和力PD-1突变体外筛选进化。(a) 高亲和力PD-1（HA-PD-1）诱骗分子设计示意图，野生型PD-1分子不能有效阻断PD-1与PD-L1之间的免疫抑制信号，而提高PD-1与PD-L1之间的亲和力可有效阻断PD-1与PD-L1之间的亲和力，进而解除免疫细胞的抑制状态，提升其肿瘤杀伤活性。(b) PD-1分子库三轮筛选。每一轮筛选之后，细胞克隆群均表现与PD-L1更强的结合活性。SSC-A：侧向角散射；APC-A：别藻蓝蛋白；HA：高亲和力。

PD-L1 结合, EC_{50} 值为 $0.970 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 远低于野生型 PD-1 ($132.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [图 3 (c)]。

表 3 使用 Biacore 分析确定五个 PD-1 突变体与 PD-L1、PD-L2 之间的亲和力

Mutant	Simple No.	K_a ((mol·L ⁻¹ ·s) ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_D (mol·L ⁻¹)
408	PD-L1	9.84×10^7	0.572	5.81×10^{-9}
410	PD-L1	1.08×10^5	0.137	1.28×10^{-6}
446	PD-L1	5.05×10^6	0.178	3.53×10^{-8}
463	PD-L1	9.99×10^5	2.060×10^{-3}	2.06×10^{-9}
506	PD-L1	4.25×10^9	23.600	5.54×10^{-9}
408	PD-L2	3.40×10^6	9.070×10^{-2}	2.67×10^{-8}
410	PD-L2	3.47×10^{10}	4.240×10^2	1.22×10^{-8}
446	PD-L2	2.31×10^6	2.070×10^{-2}	8.96×10^{-9}
463	PD-L2	2.80×10^6	1.950×10^{-2}	6.95×10^{-9}
506	PD-L2	7.70×10^6	0.128	1.66×10^{-8}

K_a : association rate constant; K_d : disassociation rate constant; K_D : the equilibrium disassociation constant; $K_D = K_d/K_a$.

3.3. PD-1 突变体 463 阻断 PD-1/PD-L1 复合物以抑制体内肿瘤生长及增殖

PD-1 突变体 463 抑制野生型人 PD-1 与 PD-L1 (图 S7)、PD-L2 (图 S8)、CD80 (图 S9) 的结合, 因此以剂量依赖性方式逆转由 CD3/CD28 途径触发 T 细胞细胞因子释放 (如 IFN- γ)。PD-L1 抑制 T 细胞活化, 然而抗 PD-1 抗体 Opdivo 可逆转这种抑制。463 与 Opdivo 效果接近, 但比野生型 PD-1 好得多, 因为后者几乎没有逆转效果 [图 4 (a)]。

在体内 MC38 异种移植小鼠模型 (每组 $n = 5$) 中,

463 以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长, 这与相同剂量 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ATE 的作用相似。在 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 463 的治疗组中, 肿瘤平均体积约为 600 mm^3 , 而野生型 PD-1 治疗组的肿瘤体积接近 2000 mm^3 , 与同型对照组相似 (MIL50 组)。更有趣的是, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 463 也比 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的野生型 PD-1 具有更好的抗肿瘤能力, 平均肿瘤体积约为 1100 mm^3 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 463 vs $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 野生型 PD-1, $p < 0.05$)。第 20 天, 处死小鼠, 剥离肿瘤并称重。发现 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 463 以及 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 463 都显示出良好的抗肿瘤效果, 肿瘤重量分别约为 $(0.6 \pm 0.31) \text{ g}$ 、 $(1.06 \pm 0.45) \text{ g}$ 。与野生型 PD-1 相比, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 463 在相同剂量下优于 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 野生型 PD-1 [$(1.53 \pm 0.81) \text{ g}$] [图 4 (b) ~ (d), $p < 0.05$]。

4. 讨论

免疫检查点分子 PD-1 是存在于 T 细胞表面并能够调节 T 细胞活化的 I 型跨膜受体。T 细胞活化后会分泌过量的炎症细胞因子; 然而, 作为 T 细胞过度激活的免疫检查点分子, PD-1 与其配体 PD-L1 和 PD-L2 结合后会限制 T 细胞的活化。在肿瘤环境中, 癌细胞表面过表达 PD-L1 分子; 因此, PD-1/PD-L1 信号能够通过抑制 T 细胞抗肿瘤免疫应答, 从而导致癌症进展 [28]。用抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 之间的信号通路, 在黑色素瘤、非小细胞肺癌和其他实体瘤的临床试验中观察到了客观肿瘤反应, 并表现出显著的治疗效果 [29]。该方法在转移性尿路上膀胱癌的 I 期临床试验中治疗效果显著, 其中 43%

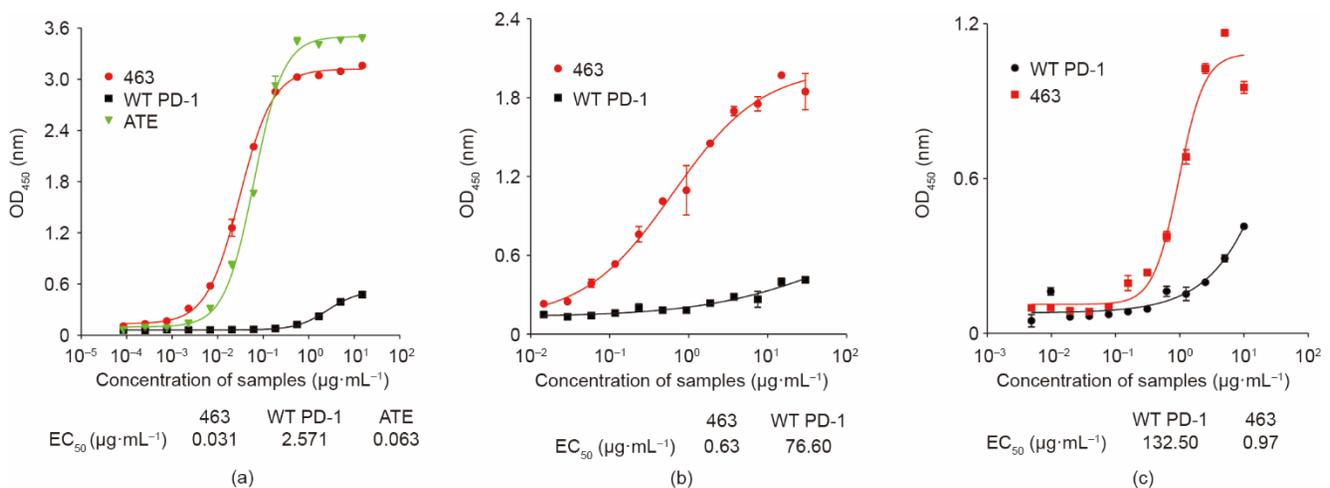


图 3. PD-1 突变体 463 以剂量依赖的关系结合鼠/人 PD-L1 或 PD-L2。(a) 463 以剂量依赖的关系结合人 PD-L1, 其中, Atezolizumab (ATE) 和野生型 PD-1 作为阳性对照。对应的 EC_{50} 值分别为 $0.031 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (463)、 $2.571 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (野生型 PD-1) 以及 $0.063 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ATE), 表明 463 能够有效地逆转 PD-1/PD-L1 产生的免疫抑制效应。(b) 463 以剂量依赖的方式结合人 PD-L2, 以野生型 PD-1 作为阳性对照, 463 组的 EC_{50} 值是 $0.63 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而 PD-1 野生型组的 EC_{50} 值大于 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明 463 可有效逆转 PD-1/PD-L2 产生的免疫抑制效应。(c) 463 以剂量依赖的方式结合鼠 PD-L1, 野生型 PD-1 作为阳性对照。对应的 EC_{50} 值分别是 $0.970 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (463) 和 $132.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (野生型 PD-1)。

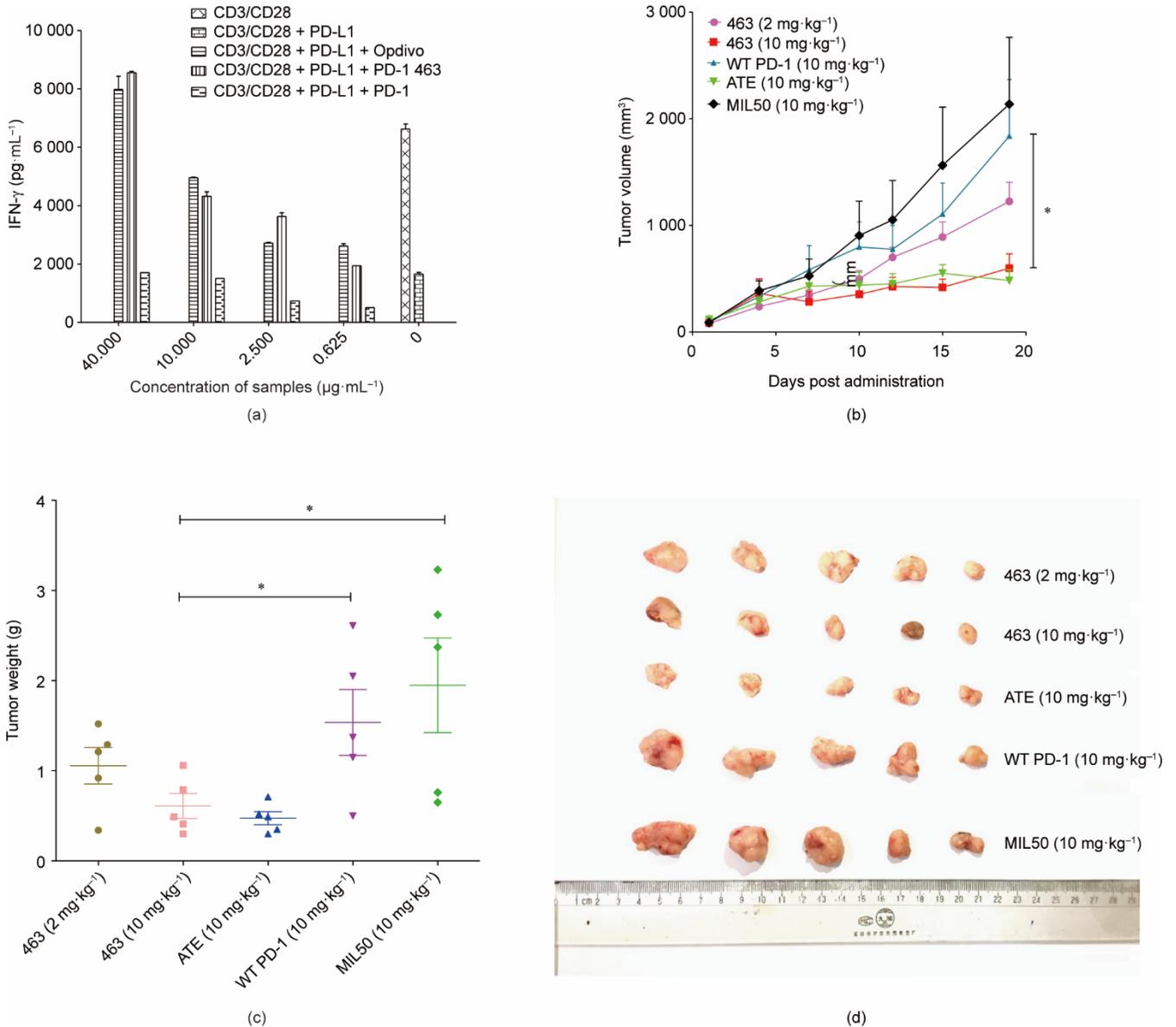


图4. PD-1 诱骗分子463体内外生物学功能。(a) 通过检测IFN- γ 释放可知463可以剂量依赖性关系有效逆转PD-L1对活化的T细胞(由CD3/CD28抗体诱导)的抑制作用。Opdivo和野生型PD-1作为阳性对照。463表现出与Opdivo相似的功能。463能够有效抑制移植瘤增殖。(b) 移植瘤小鼠肿瘤体积-时间曲线。(c) 实验终点剥离小鼠肿瘤体重。(d) 实验终点小鼠肿瘤拍照。设置ATE和PD-1作为阳性对照, 抗蓖麻毒素抗体MIL50作为无关抗体同型对照。463 (10 mg·kg⁻¹)表现出与同等剂量ATE (10 mg·kg⁻¹)相似的抗肿瘤活性, 然而, 10 mg·kg⁻¹野生型PD-1表现出非常弱的抗肿瘤活性, 而更有趣的是, 低剂量的463 (2 mg·kg⁻¹)表现出比高剂量野生型PD-1 (10 mg·kg⁻¹)更强的抗肿瘤活性。* $p < 0.05$ 。

的患者肿瘤明显减小; 因此, 美国FDA授予该抗体突破性疗法认证[30–31]。在全球范围内, 抗PD-1/PD-L1治疗性抗体药物正在扩大对癌症治疗的适应症。然而, 抗PD-1和抗PD-L1抗体治疗仍处于临床开发的早期阶段, 并且更多的检查点抗体和抗体样蛋白在临床前或临床试验中起了更进一步的作用。由于抗体的固有局限性, 包括恶性肿瘤/组织渗透和耗尽免疫细胞的有害Fc-效应器功能, PD-1/PD-L1的定向免疫疗法可以通过更小的蛋白质分子(如诱饵PD-1)来改善治疗。本文中高亲和力诱饵PD-1突变体具有广泛扩散到肿瘤中的潜力, 并且已经发现大多数抗

PD-L1抗体能够靠近血管和(或)肿瘤的周边。此外, 在肿瘤治疗中高亲和力诱饵PD-1突变体比PD-L1抗体更有效, 这可能是由于融合了Fc的高亲和力诱饵PD-1突变体的蛋白质分子量减半, 能够更有效地进入肿瘤内部[32]。

事实上, 鼠PD-1与PD-L1 [33]或PD-L2 [34–35]结合的晶体结构在很早之前就已经被报道, 人PD-1与PD-L1复合物的X射线晶体结构也已发表(PDB: 3RRQ)。考虑天然PD-1与PD-L1的亲和力为 1×10^6 , 其亲和力过低不能有效与PD-1/PD-L1的复合物竞争。为了找到更高亲和力诱饵PD-1突变体, 基于已报道的结构, 我们首先构建并

优化人PD-1/PD-L1复合物的结构（溶剂，柔性结构）模型。已经表明人PD-1/人PD-L1与受体PD-1内的显著塑性相关，并且PD-L1能被小分子靶向，以抑制PD-1/PD-L1通路[36]。根据我们的模型，预测了关键残基，丙氨酸扫描实验进一步修订了理论预测结构。此外，基于与PD-L1结合的PD-1的关键残基，我们设计并建立了包含数百万种PD-1突变体特异性细胞表面展示文库，从中筛选出亲和力较高的PD-1突变体463，其显示出与野生型PD-1相比更好的功能。

肿瘤相关的PD-L1表达水平可以预测PD-1免疫疗法的临床效果；然而，PD-L1阴性的患者对抗PD-1检查点治疗仍可获益，这表明存在其他PD-1相关配体或途径参与治疗。PD-L2是另一种已知的PD-1配体，肿瘤组织中PD-L2的表达水平与PD-1单抗pembrolizumab治疗头颈部鳞状细胞癌（head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC）的临床疗效密切相关。已经发现，PD-L2与PD-L1的表达均与PD-1单抗治疗效果相关，而在缺乏PD-L1的某些肿瘤中检测到了PD-L2表达。PD-L1和PD-L2都可以预测帕博利珠单抗的治疗效应。PD-L1和PD-L2双阳性的患者比PD-L1单阳性的患者具有更好的治疗效果。PD-L2也可用于无进展的存活（PFS）的帕博利珠单抗治疗的独立预测因子。与PD-L2阴性患者相比，PD-L2阳性患者具有更长的无进展生存期和较长的总生存期。

总结来说，对于PD-L1和PD-L2阳性的肿瘤患者，靶向PD-1的药物可能比靶向PD-L1的药物具有更好的临床效果[37]。本研究表明，亲和成熟的PD-1突变体463与PD-L1和PD-L2结合具有高亲和力（图3）。与上述PD-1抗体或PD-L1抗体不同，高亲和力诱饵分子463阻断了三种信号通路：PD-1/PD-L1（图S7）、PD-1/PD-L2（图S8）和PD-L1/CD80（图S9）。这进一步阐明了463作为抗肿瘤候选分子的理论基础。此外，463可有效逆转T细胞经抗CD3/CD28抗体激活状态下，PD-L1对T细胞的免疫抑制作用（如IFN- γ 表达水平）。在体内异种移植小鼠模型中，463抑制肿瘤生长，其效果与同等剂量下ATE的效果相当，并且优于野生型PD-1（图4）。我们的数据展示了PD-1诱饵突变体蛋白463的抗肿瘤活性，并表明它具有PD-1相关癌症治疗的可能性，尤其是PD-L1和PD-L2阳性癌症。

致谢

本研究受到国家自然科学基金项目(21976210)

支持。

Compliance with ethics guidelines

Hao Liu, Chunxia Qiao, Naijing Hu, Zhihong Wang, Jing Wang, Jiannan Feng, Beifen Shen, Yuanfang Ma, and Longlong Luo declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.11.011>.

References

- [1] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
- [2] Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):307–13.
- [3] Klump KE, McGinnis JF. The role of reactive oxygen species in ocular malignancy. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:655–9.
- [4] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12293–7.
- [5] Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant* 2012;12(10):2575–87.
- [6] Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010;236(1):219–42.
- [7] Hawkes EA, Grigg A, Chong G. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma. *Lancet Oncol* 2015;16(5):e234–45.
- [8] Ahmadsadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009;114(8):1537–44.
- [9] Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139(3):667–76.
- [10] Matsuzaki M, Nomizu T, Katagata N, Sakuma T, Momma T, Tachibana K, et al. A case of primary malignant lymphoma of the breast with an unusual ultrasound image. *Fukushima J Med Sci* 2010;56(2):145–50.
- [11] Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004;173(2):945–54.
- [12] Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer ARL, Bajor DL, et al. Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2015;3(4):399–411.
- [13] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455–65.
- [14] Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with pembrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369(2):134–44.
- [15] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443–54.

- [16] Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2015;33(13):1430–7.
- [17] Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015;16 (3): 257–65.
- [18] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015;27(4):450–61.
- [19] Dömling A, Holak TA. Programmed death-1: therapeutic success after more than 100 years of cancer immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53 (9):2286–8.
- [20] Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer* 2015;112(9):1421–7.
- [21] Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin Ther* 2015;37 (4):764–82.
- [22] Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39(1):1–10.
- [23] Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):278–87.
- [24] Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7–H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(5): 1021–34.
- [25] Lipson EJ, Forde PM, Hammers HJ, Emens LA, Taube JM, Topalian SL. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in cancer treatment. *Semin Oncol* 2015;42 (4): 587–600.
- [26] Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A, Waters LC, Muskett FW, Morgan SH, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem* 2013;288(17):11771–85.
- [27] Luo L, Wang S, Lang X, Zhou T, Geng J, Li X, et al. Selection and characterization of the novel anti-human PD-1 FV78 antibody from a targeted epitope mammalian cell-displayed antibody library. *Cell Mol Immunol* 2018;15 (2):146–57.
- [28] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2011;208(6):1331.
- [29] Brahmer JR. PD-1-targeted immunotherapy: recent clinical findings. *Clin Adv Hematol Oncol* 2012;10(10):674–5.
- [30] Choueiri TK, Figueroa DJ, Fay AP, Signoretti S, Liu Y, Gagnon R, et al. Correlation of PD-L1 tumor expression and treatment outcomes in patients with renal cell carcinoma receiving sunitinib or pazopanib: results from COMPARZ, a randomized controlled trial. *Clin Cancer Res* 2015;21(5):1071–7.
- [31] Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loria Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515(7528):558–62.
- [32] PD-High-affinity1 protein has potential. *Cancer Discov* 2015;5(11):1115–6.
- [33] Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HP, Mikami B, et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(8):3011–6.
- [34] Freeman GJ. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10275–6.
- [35] Lázár-Molnár E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, Almo SC. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10483–8.
- [36] Zak KM, Kite R, Przetocka S, Golik P, Guzik K, Musielak B, et al. Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand PD-L1. *Structure* 2015;23(12):2341–8.
- [37] Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, et al. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(12):3158–67.