

细胞程序性死亡配体 1 表位肽疫苗的设计及抗肿瘤活性

邵世帅, 段树康, 田 泓, 姚文兵, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

摘要 目前已有多款细胞程序性死亡受体 1(PD-1)和其配体(PD-L1)免疫检查点阻断抗体用于临床治疗,但只有部分患者表现出临床反应,因此需要一种替代的肿瘤免疫治疗策略。以 PD-L1 为靶点的治疗性肿瘤疫苗是一种有意义的尝试。本研究设计了以 PD-L1 为靶点的表位肽疫苗,然后基于人源化免疫系统(HIS)小鼠模型筛选,具有免疫原性的 PD-L1 表位肽,进一步研究其抗肿瘤活性。结果显示,设计并筛选得到的 PD-L1-B1 表位肽疫苗不仅成功诱导了 PD-L1 特异性的体液免疫和细胞免疫,还表现出抗肿瘤活性。此外,免疫治疗还增加了肿瘤的 T 淋巴细胞浸润,重塑了肿瘤免疫抑制微环境。综上所述,PD-L1-B1 表位肽疫苗表现出强效的抗肿瘤活性,对 PD-1/PD-L1 阻断不敏感的患者可能是一种有效的替代免疫治疗策略。

关键词 肿瘤免疫;免疫检查点;PD-L1;表位肽疫苗

中图分类号 R73-3 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)02-0245-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.2023022803

引用本文 邵世帅,段树康,田泓,等.细胞程序性死亡配体 1 表位肽疫苗的设计及抗肿瘤活性[J].中国药科大学学报,2023,54(2):245-254.

Cite this article as: SHAO Shishuai, DUAN Shukang, TIAN Hong, *et al.* Design and antitumor activity of programmed cell death ligand 1 epitope peptide vaccine[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(2): 245 - 254.

Design and antitumor activity of programmed cell death ligand 1 epitope peptide vaccine

SHAO Shishuai, DUAN Shukang, TIAN Hong, YAO Wenbing, GAO Xiangdong*

Jiangsu Provincial Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Several programmed cell death protein 1 (PD-1) or its ligand (PD-L1) immune checkpoint blocking antibodies are available for clinical treatment, but only some patients show clinical response, so an alternative strategy for tumor immunotherapy is needed. A therapeutic tumor vaccine targeting PD-L1 is a meaningful attempt. In this study, we designed an epitope peptide vaccine targeting PD-L1, and then screened the immunogenic PD-L1 epitope peptide based on the humanized immune system (HIS) mouse model and further investigated its anti-tumor activity. The results show that the designed and screened PD-L1-B1 epitope peptide vaccine not only successfully induced PD-L1-specific humoral and cellular immunity, but also exhibit anti-tumor activity. In addition, immunotherapy increased T-lymphocyte infiltration of tumors and reshaped the tumor immunosuppressive microenvironment. In conclusion, PD-L1-B1 epitope peptide vaccine exhibits potent anti-tumor activity and may be an effective alternative immunotherapeutic strategy for patients insensitive to PD-1/PD-L1 blockade.

Key words tumor immunity; immune checkpoint; PD-L1; epitope peptide vaccine

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82073754, No. 81973222); and the Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2020B03003)

收稿日期 2023-02-28 *通信作者 Tel: 13405852857 E-mail: 1019830864@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82073754, No. 81973222);新疆维吾尔自治区重点研发计划(No. 2020B03003)

免疫检查点阻断(ICB)疗法在癌症治疗方面取得了前所未有的进展,极大地改变了肿瘤治疗策略^[1-2]。以PD-1/PD-L1为靶点的单克隆抗体被证明在晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中表现出较为显著的临床疗效和抗肿瘤活性^[3-6],但免疫检查点阻断疗法仅对部分患者产生持久反应,对大多数癌症患者仍然无效^[7-8]。

ICB介导的抗肿瘤反应依赖于能够识别并杀伤肿瘤细胞的T细胞的浸润情况^[9],免疫细胞如CD8⁺T细胞影响着免疫治疗的疗效与癌症患者的生存期^[10]。肿瘤疫苗可诱导CD8⁺T细胞的增殖,在某些情况下,这些T细胞可被招募至肿瘤组织中^[11]。因此,将ICB与肿瘤疫苗联用是提高临床疗效较为合理的方案。肿瘤新生抗原疫苗是治疗性肿瘤疫苗的最新进展^[12],已有多项新生抗原疫苗与ICB联合应用的临床研究正在进行中^[13]。然而并非每一种突变都能产生新生抗原。据报道,自发发生的新生表位特异性T细胞只反映个体肿瘤突变的1%~2%^[14]。因此选择可在多种肿瘤类型中高表达的肿瘤相关抗原,设计出惠及更多肿瘤患者的肿瘤疫苗仍是更为现实有效的疫苗策略。

免疫检查点PD-L1是一种在正常组织中低表达,可在肿瘤部位诱导高表达的“适应性”的肿瘤相关抗原^[15-16]。在癌症的发展过程中,肿瘤通过高表达PD-L1与其受体PD-1相互作用抑制T细胞反应,逃避肿瘤免疫监视,从而抑制抗肿瘤免疫反应^[17]。有研究发现PD-L1几乎可以在所有的小鼠肿瘤细胞系上诱导表达^[18]。因此,PD-L1被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点。此外,细胞毒性T细胞(CTL)释放的IFN- γ 是反应性PD-L1表达的最强刺激物^[19],因此将PD-L1作为肿瘤疫苗的靶点,靶向PD-L1的CTL理论上可以在肿瘤部位通过正反馈调节不断地发起对PD-L1阳性肿瘤细胞的杀伤。

本研究以免疫检查点PD-L1为肿瘤疫苗靶点,预测PD-L1的CTL表位肽和线性B表位肽,并与硝基化辅助T细胞表位连接,设计靶向PD-L1的表位肽疫苗。硝基化辅助T细胞表位是本课题组前期设计的能够打破自体蛋白免疫耐受的CD4⁺T表位,研究表明CD4⁺T细胞对于诱导强大的CTL反应和CD8⁺记忆性T细胞是十分必要的^[20]。因此,本研究筛选并验证了PD-L1表位肽的免疫原性,并在小鼠肿瘤模型中研究了PD-L1-B1表位肽疫苗的

抗肿瘤活性,同时初步探究了PD-L1-B1表位肽疫苗对肿瘤微环境的影响。

1 材料

1.1 试剂

IFN- γ EliSpot 检测试剂盒(德国AID公司); CpG 1018(北京擎科生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠IgG抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);AF488标记的羊驼抗人IgG抗体(美国杰克逊公司);RPMI 1640培养基、DMEM高糖培养基、EasyPure RNA Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司);红细胞裂解液、FITC标记的抗小鼠CD45抗体、BB700标记的抗小鼠CD3抗体、PE标记的抗小鼠CD4抗体、APC标记的抗小鼠CD8抗体(美国BD公司);7AAD活性染色溶液、CFSE细胞增殖试剂盒(美国赛默飞公司);HiScript III RT SuperMix for qPCR、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技公司);mPDL1蛋白、hPDL1蛋白(课题组设计并合成纯化,纯度大于80%)。

1.2 动物和细胞株

重度免疫缺陷(NPI)雌性小鼠,6~8周龄,SPF级,购自北京艾德摩生物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2022-0001;BALB/c雌性小鼠(6~8周龄),SPF级,购自杭州子源实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(浙)2019-0004。所有动物实验均符合中国药科大学动物伦理委员会标准。

小鼠肝癌细胞株H22、小鼠结肠癌细胞株CT26、人黑色素瘤细胞株A375、小鼠黑色素瘤细胞株B16F10(中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存)。

1.3 仪器

Nanodrop 2000分光光度计、QuantStudio 3 PCR仪、高速冷冻离心机(美国赛默飞公司);Countstar细胞计数仪(上海泽权仪器设备有限公司);BD Accuri C6 Plus流式细胞仪(美国BD公司)。

2 方法

2.1 免疫检查点PD-L1表位预测与肽疫苗设计

免疫检查点PD-L1分子胞外区和跨膜区蛋白序列由Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org>)查询得到。随后,通过免疫表位在线预测数据库

IEDB(<http://www.iedb.org>)对 PD-L1 胞外和跨膜序列进行 CTL 表位和线性 B 表位预测。综合分析所有预测结果,选择预测排名好、亲和力高、半衰期长的表位进行合并设计,使所设计的 CTL 表位肽可至少针对两个不同的主要组织相容性复合体 MHC I 类分子。最后通过柔性肽将 PD-L1 表位肽与硝基化辅助 T 细胞表位连接,设计成 PD-L1 表位肽疫苗。所有的表位肽由合肥合生生物工程有限公司进行合成,合成肽的纯度大于 95%。

2.2 免疫原性验证实验

2.2.1 人外周血单个核细胞(hPBMC)的分离与孵育

吸取无菌 PBS 将滤器中残留血液冲出稀释,离心管中加入人淋巴细胞分离液 15 mL,然后缓慢加入血液 25 mL。采用密度梯度离心,1 850 r/min 离心 25 min。用一次性吸管吸取 PBMC 细胞层(乳白色)到离心管中,补加 PBS 至 40 mL,1 420 r/min 离心 10 min。加入红细胞裂解液 3 mL 重悬,裂解 10 min。加入 PBS 至 30 mL,1 600 r/min 离心 3 min,室温洗涤两次。用 RPMI 1640 完全培养基重悬,稀释,计算细胞数量以及存活率。将人白细胞抗原(HLA)分型匹配的 PBMC 铺板,每个培养皿 2×10^7 个细胞。每个肽孵育 50 μg , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 过夜培养。

2.2.2 NPI 小鼠人源免疫系统重建和免疫方案

将 NPI 小鼠按照体重随机分成 3 组,每组 4 只,分别为溶剂对照组、PD-L1-B1 组、PD-L1-B2 组,确保分组后组间小鼠体重没有显著性差异。尾静脉移植约 1×10^7 个 PBMC,重建人免疫系统。第 2 天皮下免疫表位肽疫苗,此后每周免疫 1 次,共 3 次。每只小鼠接种 PD-L1-B 表位肽 50 μg 和佐剂 CpG 1018 20 μg 的混合溶液,每 3 天记录一次小鼠的体重和移植抗宿主病(GVHD)情况。

2.2.3 PD-L1 蛋白的构建和纯化

将小鼠 PD-L1 蛋白胞外区(19-239)与硝基化辅助 T 细胞表位融合构建 mPD-L1 蛋白,将人 PD-L1 蛋白胞外区(19-238)与硝基化辅助 T 细胞表位融合构建 hPD-L1 蛋白。mPD-L1 和 hPD-L1 蛋白的表达和纯化同文献^[21]所述。随后,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western blot 对纯化的 PD-L1 疫苗进行分析验证,蛋白纯度大于 80%。

2.2.4 ELISA 评价 PD-L1-B 表位肽的免疫原性

分别于免疫后第 7、14、21、24 天对小鼠进行眼底静

脉丛取血,6 000 r/min 离心 30 min,取上清液即为所需抗血清,选择免疫系统重建成功的 HIS 小鼠,取抗血清以 1:100 比例进行稀释后检测 PD-L1 特异性抗体滴度。hPD-L1 蛋白作为抗原包被于酶标条中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤 5 次,然后用 5% BSA 封闭过夜。PBST 洗涤 5 次,加入稀释的小鼠抗血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤 6 次,接着用 HRP 标记的山羊抗人二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。PBST 洗涤 7 次。加入显色剂显色,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。用 1 mol/L H_2SO_4 终止反应,使用酶标仪在 450 nm、630 nm 处读取吸收度。

2.2.5 流式检测抗血清中 PD-L1-B1 抗体与天然 PD-L1 受体的结合

以高表达 PD-L1 的肿瘤细胞为靶细胞(如 A375、B16F10)。收集靶细胞并计数,使每个样本细胞数量为 2×10^5 个。加入含 1% FBS 的 PBS 1 mL 洗涤细胞,1 769 r/min 离心 5 min,弃上清。加入按 1:100 稀释的小鼠抗血清 100 μL ,室温孵育 30 min。1 769 r/min 离心 5 min,弃上清液。PBS 洗涤 3 次,将细胞重悬于 PBS 0.1 mL 中。加入 AF488 标记的羊驼抗人 IgG 二抗,室温孵育 1 h。PBS 洗涤 2 次,最后重悬细胞于 PBS 0.2 mL 中。在流式细胞仪上分析抗体结合的细胞荧光强度。

2.2.6 IFN- γ EliSpot 评价 PD-L1-T 表位肽的免疫原性

准备 IFN- γ EliSpot 试剂板,加入灭菌 PBS 清洗 4 次。然后加入 RPMI 1640 完全培养基,室温静置孵育 30 min。倒弃培养基,随后在各孔中加入对应的刺激物,其中刺激用肽每孔 10 μg ,阳性刺激物每孔 0.3 μL 。接着加入小鼠脾脏淋巴细胞悬液,每孔 5×10^5 个细胞,设置阳性对照和阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。PBS 洗涤 5 次。加入稀释的 IFN- γ 抗体,室温孵育 2 h。PBS 洗涤 5 次,加入过滤后的显色液,避光显色 20 min。用去离子水洗涤正反面及底座 3~5 遍,终止显色。将板条避光密封保存,酶联免疫斑点分析仪读取数据。

2.3 PD-L1-B1 表位肽的抗肿瘤活性评价

2.3.1 H22 肝癌肿瘤模型构建及动物分组

BALB/c 小鼠腹腔移植 2×10^6 个 H22 细胞,腹腔培养 10 d 后,抽取腹水,分离 H22 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 过夜培养。第 2 天,每只 BALB/c 小鼠于右后肢靠背部位皮下注射 5×10^5 个 H22 细胞。当肿瘤直径达到 3~5 mm 时,选择造模成功且肿瘤形态规则

的小鼠,以肿瘤体积大小为标准进行随机区间分组,确保组间小鼠肿瘤体积和体重大小没有显著性差异。将小鼠分为3组,分别为溶剂对照组、PD-L1组、PD-L1-B1组,每组8~10只。其中PD-L1组免疫的是实验室前期验证有抗肿瘤活性的mPD-L1蛋白,用于比较PD-L1-B1表位肽疫苗与PD-L1蛋白疫苗的抑瘤效果。

2.3.2 免疫方案 分组当天(第0天)进行皮下免疫,溶剂对照组注射生理盐水,PD-L1组和PD-L1-B1组免疫用的蛋白和表位肽(50 μg)与佐剂CpG 1018(20 μg)混合后接种。随后在第7、14天进行两次免疫,共免疫3次。从第0天开始,每3天进行一次体质量和肿瘤测量。

2.4 CTL效应检测

将200 μL , 5×10^4 个靶细胞提前铺于48孔板。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养4 h。收集过夜刺激孵育的脾脏淋巴细胞到离心管中,1 200 r/min离心5 min。加入PBS 10 mL, 1 200 r/min离心5 min。加入适量的PBS重悬细胞,添加CFSE,使其终浓度为2 $\mu\text{mol/L}$,立即混合并在室温下避光孵育7 min。通过添加4倍体积的预冷的完全培养基(含 $\geq 10\%$ 血清)停止标记,并在冰上孵育10 min, 1 200 r/min离心5 min。用预冷的完全培养基洗涤细胞2次, 1 200 r/min离心5 min。加入完全培养基重悬计数,按照50:1效靶比进行铺板,每孔200 μL , 2.5×10^6 个细胞。摇匀,孵育24 h。收集培养基,再加入PBS洗涤,收集上清液。向孔中加入胰酶200 μL 消化,加入完全培养基200 μL 终止消化,吹打收集细胞, 1 769 r/min离心5 min。加入PBS 1 mL重悬, 1 769 r/min离心5 min。用70 μm 滤膜过滤,每孔在上样前5 min加入7AAD(靶细胞单染加7AAD 0.5 μL) 5 μL ,混悬。流式细胞仪检测细胞杀伤活性。

2.5 小鼠肝癌肿瘤浸润淋巴细胞检测

取实体肿瘤组织新鲜标本,用手术剪去除坏死及脂肪组织,选取癌细胞集中和细胞活力较好的部位。将组织切成直径1~2 mm的碎块,随后将肿瘤组织转移至装有消化酶的离心管中。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化40 min,每隔2~3 min颠倒混匀。将细胞悬液经70 μm 滤网过滤,PBS冲洗,收集滤液, 1 769 r/min离心7 min。加入PBS重悬细胞。设置实验组、单染组和空染组,每个样本取 2×10^6 个细胞,加入PBS重悬细胞1 mL, 1 769 r/min离心

5 min。加入含1% BSA的PBS 1 mL重悬细胞, 1 769 r/min离心5 min。加入FITC标记的抗小鼠CD45抗体、BB700标记的抗小鼠CD3抗体、PE标记的抗小鼠CD4抗体、APC标记的抗小鼠CD8抗体,CD45、CD3、CD4、CD8单染管加入对应的流式抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min。每管加入PBS 1 mL洗涤, 1 769 r/min离心5 min。加入PBS 600 μL 重悬细胞,过滤后,流式细胞仪检测肿瘤浸润淋巴细胞。

2.6 肿瘤组织RNA分离提取和qRT-PCR

每个小鼠肿瘤样本称取20 mg,放入液氮预冷的研钵中研磨成粉,随后使用EasyPure RNA Kit试剂盒提取肿瘤组织RNA。使用Nanodrop 2000检测RNA的浓度和纯度。使用HiScript III RT Super-Mix for qPCR试剂将每个样本的1 μg 总RNA反转录为cDNA,使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒通过qRT-PCR检测基因表达差异。实验步骤按照试剂盒操作说明书进行。

2.7 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0软件进行数据统计学分析,各项结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Student's *t*-test对两组样本进行显著性比较,采用One-way ANOVA方差分析对3组及以上样本进行显著性比较, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 PD-L1表位肽疫苗的设计

选择中国人群常见的HLA I类分型:HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02进行表位预测,获得了CTL表位肽和线性B表位肽,经过表位合并,设计了4个CTL表位肽和2个线性B表位肽,并与硝基化辅助T细胞表位连接,最终候选表位肽序列见表1。

3.2 基于HIS小鼠检测PD-L1表位肽的体液免疫活性

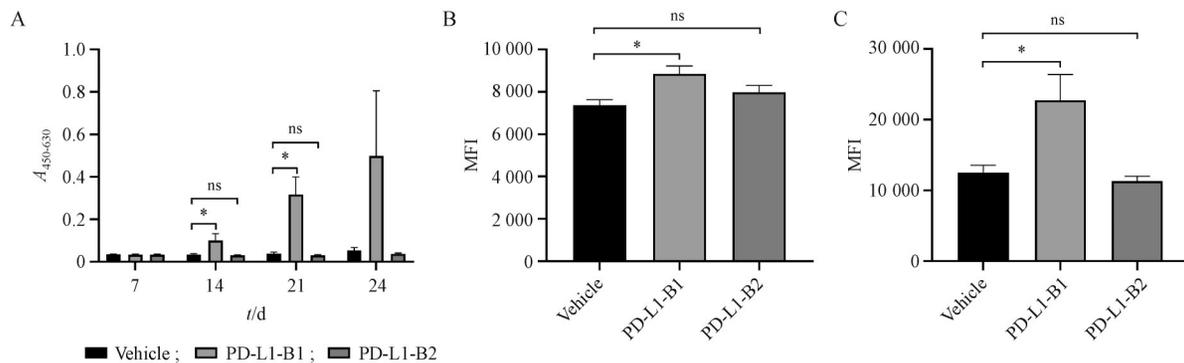
为了检测PD-L1-B表位肽的免疫原性,取首次免疫后第7、14、21、24天的HIS小鼠血清,使用ELISA法检测抗体滴度验证B表位肽的免疫原性。结果如图1-A所示,从第14天开始,PD-L1-B1表位肽诱导产生了相较于溶剂对照组有显著性差异的PD-L1特异性抗体($P < 0.05$),并且第21、24天的抗体滴度进一步升高,但PD-L1-B2表位肽未能成功诱导出PD-L1特异性抗体。

Table 1 Amino acid sequence of hPD-L1 epitope peptides

Name	Epitope peptide
PD-L1-T1	KQLDLAALIVYWEMEDKNIIQF-SLVR-LRMK-AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA
PD-L1-T2	SSYRQRARLLKDQSL-SLVR-LRMK- AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA
PD-L1-T3	KREEKLFNVTSTLRI-SLVR-LRMK-AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA
PD-L1-T4	RITVKVNAPYNKINQRI-SLVR-LRMK-AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA
PD-L1-B1	FVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQSLG-LRMK- AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA
PD-L1-B2	YNKINQRILVDP-LRMK-AKFVAAWTLK{L-4-NO ₂ -Phe}AA

为了验证诱导产生的 PD-L1-B1 抗体能否和细胞表达的天然 PD-L1 受体结合,采用流式细胞术检测。选择 PD-L1 阳性表达细胞为靶细胞(本实验选择人 A375 肿瘤细胞和小鼠 B16F10 肿瘤细胞),加入 HIS 小鼠血清作为一抗,然后加入荧光标记的抗人 IgG 二抗进行检测。结果如图 1-B 所示,与对照

组相比,设计的两款 PD-L1-B 表位肽中,PD-L1-B1 成功诱导出了 PD-L1 特异性抗体,并能与人 PD-L1 阳性表达细胞 A375 结合。研究还发现当以鼠 PD-L1 阳性表达细胞 B16F10 为靶细胞时,HIS 小鼠血清中 PD-L1 特异性抗体同样能够结合小鼠 B16F10 细胞上表达的 PD-L1 蛋白(图 1-C)。

**Figure 1** Immunogenicity of PD-L1-B epitope peptide and cross-reactivity of the PD-L1-B1 antiserum to native PD-L1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Antibody titers produced after immunization of mice with PD-L1-B epitope peptide vaccine; B: Binding of PD-L1-B1 antiserum to human A375; C: Binding of PD-L1-B1 antiserum to mouse B16F10

* $P < 0.05$; ns:Not significant

3.3 基于 HIS 小鼠检测 PD-L1 表位肽的细胞免疫活性

序列分析发现,预测并设计的 PD-L1-T2 表位肽包含于 PD-L1-B1 表位肽中。为了验证 PD-L1-B1 中的 T2 表位肽是否能够诱导出针对 T2 表位肽的肽特异性 T 细胞,对 HIS 小鼠进行 PD-L1-B1 表位肽疫苗免疫。随后在 IFN- γ EliSpot 实验中,采用 T2 短肽刺激脾脏淋巴细胞,结果如图 2 所示。采用配对 T 检验,加入 T2 肽刺激后,斑点数显著增加,这表明 PD-L1-B1 肽中的 T2 肽能有效诱导出肽特异性 T 细胞。

3.4 PD-L1-B1 表位肽疫苗的抗肿瘤活性评价

前面的免疫原性验证实验筛选并验证了 PD-L1 表位肽的免疫原性,发现 PD-L1-B1 表位肽疫苗

诱导的 PD-L1 特异性抗体不仅能结合人 PD-L1,还能与鼠 PD-L1 结合,同时 PD-L1-B1 还包含了一个验证有免疫原性的 CTL 表位肽 PD-L1-T2,因此选择 PD-L1-B1 表位肽,进一步探究其抗肿瘤活性。

为了评价 PD-L1-B1 表位肽的抑瘤活性,在 BALB/c 小鼠中构建 H22 肝癌皮下移植瘤模型。抑瘤结果如图 3-A, 3-B 所示,相较于溶剂对照组,PD-L1-B1 表位肽显著抑制了肿瘤的生长 [(757.3 \pm 376.2) mm³ vs (1 978 \pm 1 026) mm³, $P < 0.01$],并且抑瘤效果不比 PD-L1 蛋白疫苗差。在进一步评价 PD-L1-B1 表位肽活性的实验中,分离了治疗后的小鼠脾脏淋巴细胞,首先通过 IFN- γ Elispot 评估了各组淋巴细胞的 IFN- γ 的分泌水平,然后通过流式细胞术检测了各组脾脏淋巴细胞的细胞杀伤毒

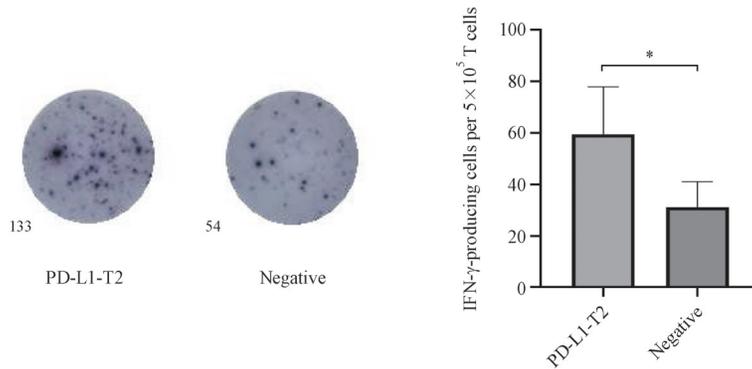


Figure 2 IFN- γ EliSpot responses against T2 epitope peptide in PD-L1-B1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

* $P < 0.05$

性,统计结果分别如图 3-C、3-D 所示。结果表明 PD-L1-B1 表位肽免疫后显著增强了脾脏淋巴细胞的 IFN- γ 分泌水平,同时其诱导的 CTL 具有很高的

体外杀伤活性,为 $(36.87 \pm 3.43)\%$ 。相较于溶剂对照组,PD-L1-B1 组 CTL 对靶细胞的杀伤活性有统计学差异($P < 0.0001$)。

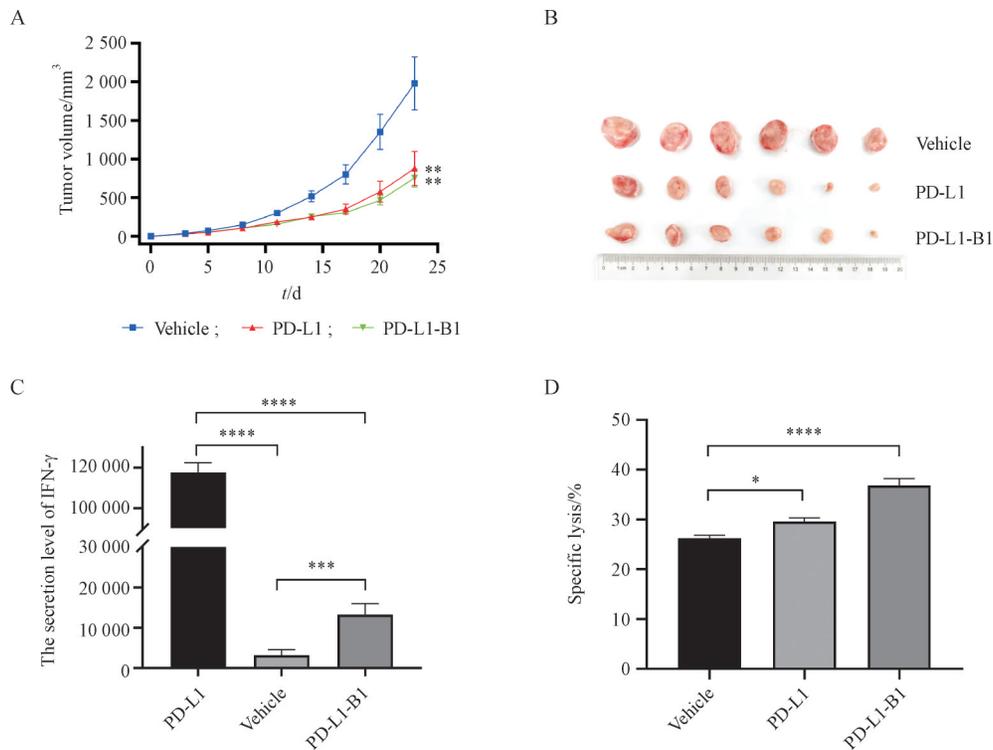


Figure 3 Anti-tumor activity of PD-L1-B1 epitope peptide vaccine

A: Tumor volume growth curve in mice after vaccine immunization ($\bar{x} \pm s, n = 8-10$); B: Tumor size in mice executed after vaccine treatment ($\bar{x} \pm s, n = 6$); C: IFN- γ secretion levels in 5×10^5 spleen lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$); D: *In vitro* killing toxicity of splenic lymphocytes after immunization ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3.5 肿瘤浸润淋巴细胞检测

为了分析 PD-L1-B1 表位肽疫苗治疗后对肿瘤微环境中肿瘤浸润淋巴细胞的影响,分别检测肿

瘤组织中 CD45⁺细胞、CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞的浸润情况,结果如图 4 所示。与溶剂对照组相比,PD-L1-B1 表位肽疫苗接种显著增加

了 CD45⁺免疫细胞的肿瘤浸润数量 ($P < 0.0001$) (图 4-A), 并且相对于溶剂对照组, PD-L1-B1 组诱导的 T 淋巴细胞浸润水平显著提高 ($P < 0.01$) (图 4-B)。进一步分析发现, PD-L1 蛋白和 PD-L1-B1 表位肽都提高 CD4⁺ T 细胞的肿瘤浸润水平, 但 PD-

L1-B1 组肿瘤浸润的 CD4⁺ T 细胞比例更高, 占比达到 (59.48 ± 12.87)%, 与溶剂对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.001$) (图 4-C)。最后相较于溶剂对照组, PD-L1-B1 表位肽诱导的 CD8⁺ T 细胞浸润水平显著提高 ($P < 0.0001$) (图 4-C)。

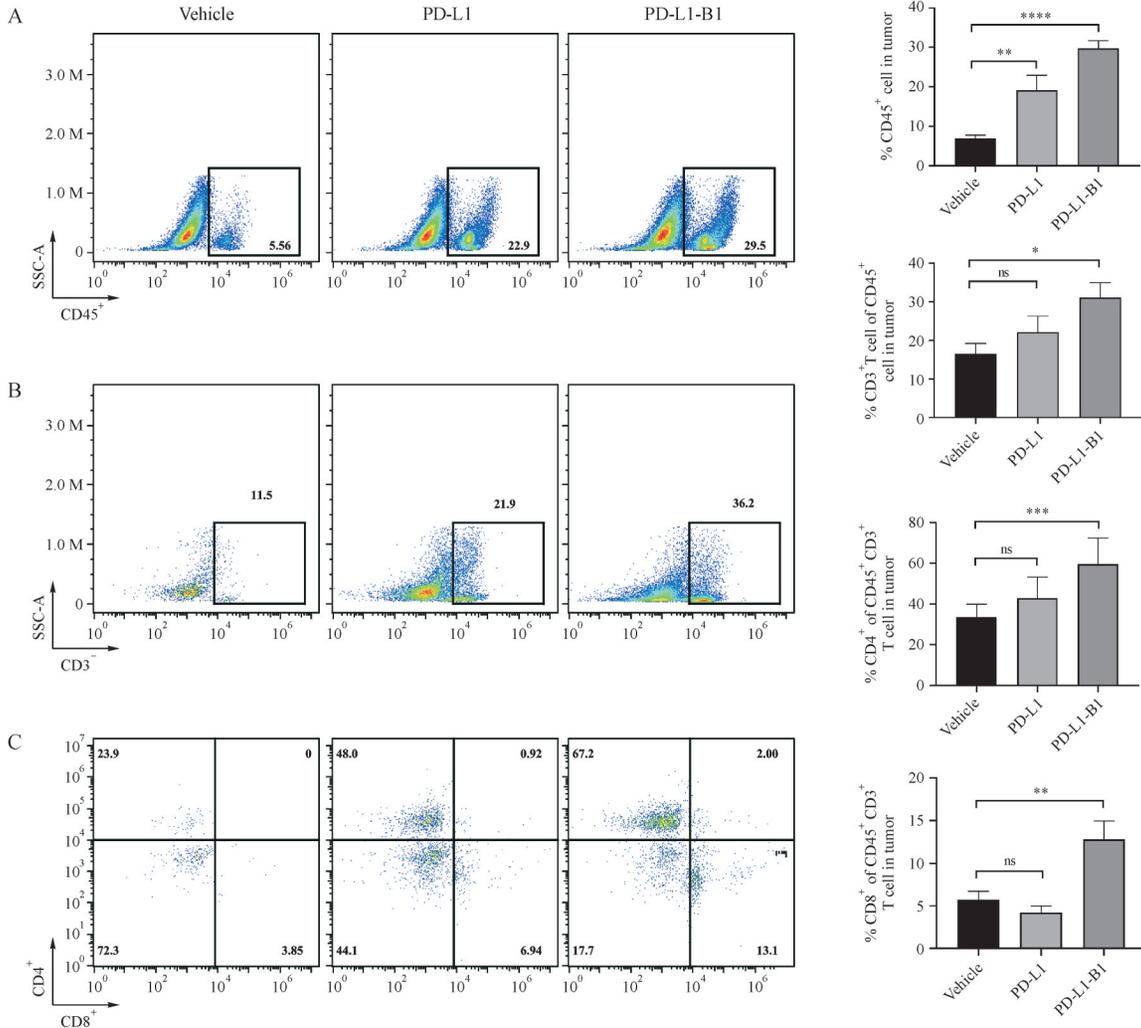


Figure 4 Detection of tumor-infiltrating lymphocytes in mouse tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A: Proportion of infiltrating CD45⁺ cells in tumor tissue after immunization; B: Proportion of CD3⁺ T cells to CD45⁺ cells in tumors after immunization;

C: Proportion of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells to CD3⁺ T cells in tumors after immunization

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3.6 肿瘤组织中相关蛋白的转录水平检测

为了进一步分析 PD-L1-B1 表位肽疫苗对肿瘤微环境的影响, 检测了肿瘤组织中相关蛋白或者细胞因子的转录水平变化情况, 结果如图 5 所示。首先检测了肿瘤微环境中 PD-L1 的转录水平变化, 发现相对于溶剂对照组, PD-L1-B1 组肿瘤组织中 PD-L1 的 mRNA 转录水平显著升高 ($P < 0.01$) (图 5-A)。随后检测了具有抑瘤作用的 IFN- γ 和 TNF-

α 的转录水平变化 (图 5-B, 图 5-C), 发现相较于溶剂对照组和 PD-L1 组, PD-L1-B1 组肿瘤微环境中 IFN- γ 和 TNF- α 的 mRNA 转录水平显著提高。此外, 还检测了炎症因子 IL-2 和 IL-10 的转录水平变化情况, 结果显示 PD-L1-B1 组肿瘤组织免疫激活细胞因子 IL-2 的 mRNA 转录水平显著升高 ($P < 0.001$), 而免疫抑制细胞因子 IL-10 的 mRNA 转录水平下降 ($P < 0.01$) (图 5-D, 图 5-E)。

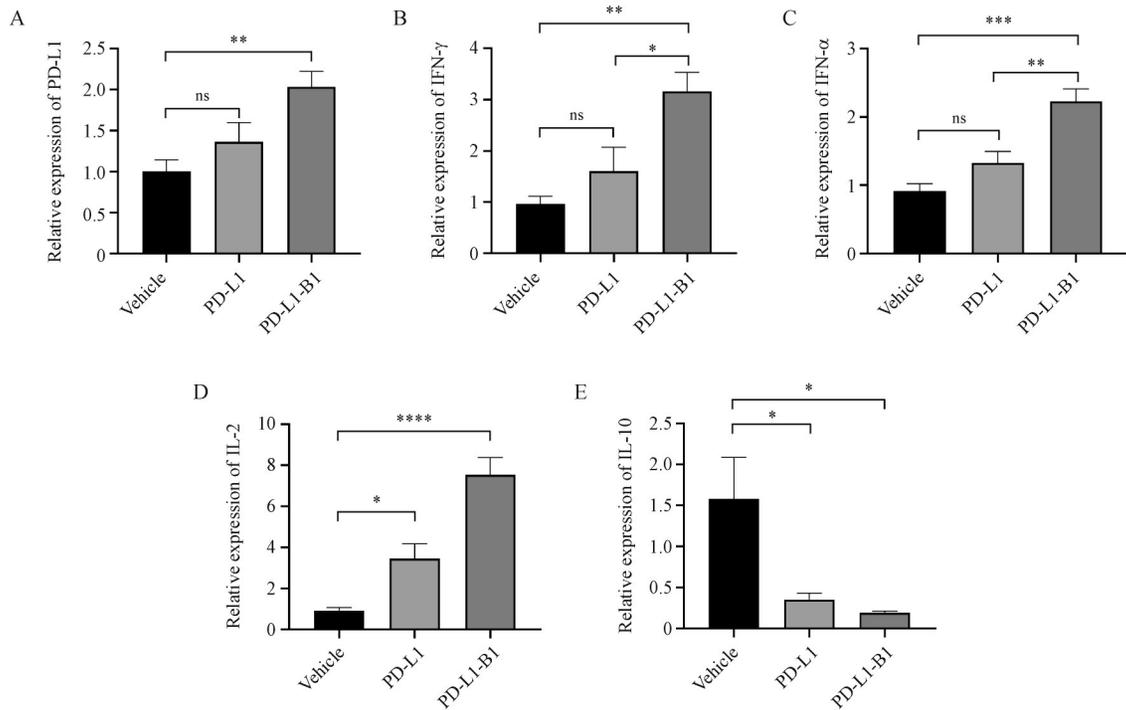


Figure 5 Detection of relevant proteins relative expression levels in tumor tissues by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A: mRNA transcript levels of PD-L1; B: mRNA transcript levels of IFN- γ ; C: mRNA transcript levels of TNF- α ; D: mRNA transcript levels of IL-2; E: mRNA transcript levels of IL-10

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4 讨论

本研究以PD-L1为靶点预测PD-L1表位肽,并与硝基化辅助T细胞表位连接设计成PD-L1表位肽疫苗。抑瘤实验结果表明(图3),设计的PD-L1-B1表位肽疫苗具有良好的抑瘤活性,治疗后的小鼠脾脏淋巴细胞具有显著的细胞杀伤活性,这表明以PD-L1为靶点设计表位肽疫苗是可行的。

PD-1/PD-L1是肿瘤免疫疗法的理想靶点,目前国内上市的PD-1/PD-L1单克隆抗体已经达到15款。然而在大多数癌症类型中,由于缺乏预先存在的抗肿瘤CTL,大多数患者没有反应,也没有获得临床益处^[11]。因此,能够诱导产生针对肿瘤抗原的CTL的治疗性肿瘤疫苗可以提高患者对ICB的反应率。PD-L1可在大多数肿瘤中诱导表达,是致使肿瘤免疫逃逸的主要免疫检查点分子,目前的PD-1/PD-L1 ICB适应症基本囊括主要癌症类型。在评价PD-L1-B1表位肽抑瘤活性的实验中,发现PD-L1-B1表位肽疫苗治疗能够有效增加免疫细胞的肿瘤浸润数量。在连接硝基化辅助T细胞表位的情况下,PD-L1-B1表位肽组的肿瘤浸润

CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的浸润水平相较于溶剂对照组显著升高(图4-C)。在检测肿瘤组织中IFN- γ 和PD-L1的mRNA转录水平变化时,发现经PD-L1-B1表位肽治疗后,IFN- γ 转录水平明显上升。相对应的,PD-L1的转录水平也被检测到上升,与目前研究认为的IFN- γ 可诱导PD-L1表达是一致的^[22]。因此,针对PD-L1的表位肽疫苗能够诱导肽特异性T细胞聚集到肿瘤组织中,分泌IFN- γ 引发一系列抗肿瘤反应,而IFN- γ 还能够诱导肿瘤细胞表达PD-L1,PD-L1特异性CTL又能进一步识别并杀伤PD-L1阳性肿瘤细胞,发挥正反馈调节的作用。

针对肿瘤免疫逃逸机制的免疫检查点开发肿瘤疫苗提供了一种新的、可推广的策略。治疗性肿瘤肽疫苗是一种低副作用的疫苗接种方法,能以主动免疫的方式在体内诱导出针对肿瘤细胞的持久的特异性T细胞反应^[23]或者多克隆抗体反应^[18]。在检测肿瘤组织中相关细胞因子的转录水平时发现,PD-L1-B1表位肽疫苗治疗能够提高激活免疫的炎症因子转录,如IFN- γ 、TNF- α 、IL-2。

IFN- γ 和 TNF- α 被认为在抗肿瘤免疫中发挥了重要作用^[24],有研究发现肿瘤中同时表达 IFN- γ 和 PD-L1 的患者比单独表达 IFN- γ 的患者具有更好的预后^[25]。此外 IL-2 除了具有促进 T 细胞增殖作用外,还调节 CD8⁺ T 细胞效应和记忆反应^[26]。同时,PD-L1-B1 表位肽疫苗还降低免疫抑制分子的表达,如 IL-10。综上所述,PD-L1 表位肽疫苗可以重塑肿瘤免疫抑制微环境,使肿瘤微环境向免疫炎症方向转变。目前研究认为免疫炎症肿瘤(又称“热”肿瘤)特征是高 T 细胞浸润、IFN- γ 信号增强、PD-L1 表达和高肿瘤突变负荷(TMB)^[27]。因此,认为在 PD-L1-B1 表位肽疫苗的作用下,“冷”肿瘤有向“热”肿瘤转化的趋势。

综上所述,本研究筛选得到的 PD-L1-B1 表位肽不仅能诱导产生 PD-L1 特异性抗体和细胞毒性 T 细胞,有效抑制肿瘤生长,还能增加肿瘤浸润 CD8⁺ T 细胞,重塑肿瘤免疫抑制微环境。因此,PD-L1-B1 表位肽疫苗是一个有效的肿瘤免疫治疗候选分子,期待 PD-L1-B1 表位肽疫苗联合 ICB 或者其他免疫疗法在肿瘤临床治疗中的应用前景。

References

- [1] Morad G, Helmink BA, Sharma P, et al. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2022, **185**(3): 576.
- [2] Zhou F, Qiao M, Zhou CC. The cutting-edge progress of immune-checkpoint blockade in lung cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, **18**(2): 279-293.
- [3] André T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(23): 2207-2218.
- [4] Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2021, **398**(10294): 27-40.
- [5] Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, et al. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: facts and hopes[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(15): 4592-4602.
- [6] Huang AC, Zappasodi R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance[J]. *Nat Immunol*, 2022, **23**(5): 660-670.
- [7] Lei QY, Wang D, Sun K, et al. Resistance mechanisms of anti-PD-1/PD-L1 therapy in solid tumors[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 672.
- [8] Tian H, Kang YL, Song XD, et al. PD-L1-targeted vaccine exhibits potent antitumor activity by simultaneously blocking PD-1/PD-L1 pathway and activating PD-L1-specific immune responses[J]. *Cancer Lett*, 2020, **476**: 170-182.
- [9] Liu YT, Sun ZJ. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration[J]. *Theranostics*, 2021, **11**(11): 5365-5386.
- [10] Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, **20**(11): 662-680.
- [11] McAuliffe J, Chan HF, Noblecourt L, et al. Heterologous prime-boost vaccination targeting MAGE-type antigens promotes tumor T-cell infiltration and improves checkpoint blockade therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, **9**(9): e003218.
- [12] Blass E, Ott PA. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, **18**(4): 215-229.
- [13] Ott PA, Hu-Lieskovan S, Chmielowski B, et al. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer[J]. *Cell*, 2020, **183**(2): 347-362.e24.
- [14] Parkhurst MR, Robbins PF, Tran E, et al. Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers[J]. *Cancer Discov*, 2019, **9**(8): 1022-1035.
- [15] Geuijen C, Tacke P, Wang LC, et al. A human CD137 \times PD-L1 bispecific antibody promotes anti-tumor immunity via context-dependent T cell costimulation and checkpoint blockade [J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 4445.
- [16] Munir S, Lundsager MT, Jørgensen MA, et al. Inflammation induced PD-L1-specific T cells[J]. *Cell Stress*, 2019, **3**(10): 319-327.
- [17] Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. The importance of exosomal PD-L1 in tumour immune evasion[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, **20**(4): 209-215.
- [18] Guo LL, Overholser J, Good AJ, et al. Preclinical studies of a novel human PD-1 B-Cell peptide cancer vaccine PD-1-Vaxx from BALB/c mice to beagle dogs and to non-human primates (*Cynomolgus* monkeys)[J]. *Front Oncol*, 2022, **12**: 826566.
- [19] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade[J]. *Science*, 2018, **359**(6382): 1350-1355.
- [20] Yu W, Jiang N, Ebert PJ, et al. Clonal deletion prunes but does not eliminate self-specific $\alpha\beta$ CD8⁺ T lymphocytes[J]. *Immunity*, 2015, **42**(5): 929-941.
- [21] Tian H, He Y, Song XD, et al. Nitrated T helper cell epitopes enhance the immunogenicity of HER2 vaccine and induce anti-tumor immunity[J]. *Cancer Lett*, 2018, **430**: 79 - 87.
- [22] Su S, Zou ZY, Chen FJ, et al. CRISPR-Cas9-mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2017, **6**(1): e1249558.

- [23] Nelde A, Rammensee HG, Walz JS. The peptide vaccine of the future[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, **20**: 100022.
- [24] Liao P, Wang WM, Wang WC, et al. CD8⁺ T cells and fatty acids orchestrate tumor ferroptosis and immunity via ACSL4[J]. *Cancer Cell*, 2022, **40**(4): 365-378.e6.
- [25] Gao Y, Yang JJ, Cai YX, et al. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling[J]. *Int J Cancer*, 2018, **143**(4): 931-943.
- [26] Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(10): 648-659.
- [27] Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, **22**(8): 1865-1874.

· 校园信息 ·

尤启冬/姜正羽团队在 *J Am Chem Soc* 上发表即时终止 PROTAC 蛋白降解的新策略

2023年4月,国际著名期刊 *Journal of the American Chemical Society* (IF: 16.383) 发表了我国药科大学药学院尤启冬/姜正羽团队题为“Ligation to Scavenging Strategy Enables On-Demand Termination of Targeted Protein Degradation”的最新研究成果。本校药学院博士后金雨辉为本文的第一作者,药学院尤启冬教授、姜正羽特聘研究员,福建医科大学李宁教授为本论文的通讯作者,中国药科大学为本论文的第一通讯单位。

近年来,蛋白降解靶向嵌合体技术(Proteolysis Targeting Chimeras, PROTACs)蓬勃发展。PROTACs技术的特点是利用双功能分子调控体内泛素化降解系统,催化性地诱导相关靶蛋白的降解,从而直接下调细胞内靶蛋白的含量,成为创新药物研究热点领域。然而,作为事件驱动型分子,PROTAC在蛋白降解过程中并未被消耗,而是催化性地持续诱导靶蛋白降解。随着PROTACs技术应用于大量功能性靶标的调控,如何干预和调节这类催化性降解过程变得日益重要。实现靶蛋白的可控降解和按需终止是PROTACs技术中亟待解决的关键性问题。

针对PROTAC诱导的事件驱动性(event-driven)降解过程,团队原创性地提出了能够即时终止蛋白降解过程的连接-清除(Ligation to Scavenging)策略。该策略由四嗪标记的PROTAC分子(Tz-PROTACs)和反式环辛烯(TCO)修饰的树枝状大分子PAMAM-G5-TCO组成。基于树枝状分子的巨大表面和四嗪-TCO的逆电子需求的狄尔斯-阿尔德反应(IEDDA)的高反应性,PAMAM-G5-TCO可通过IEDDA反应快速清除游离的Tz-PROTACs,从而实现靶向蛋白降解的终止调控,使已下调的靶蛋白逐步恢复到正常水平。研究通过对BET蛋白、PARP蛋白等多个底物蛋白的降解终止论证了该策略的可靠和适用性,为PROTAC降解技术装上了可靠的“刹车”。

本研究通过多学科交叉,整合药物分子设计、生物正交化学和材料科学技术,实现对细胞内PROTACs分子的高效清除和对事件驱动性降解过程的快速终止,综合性地解决了可控蛋白降解领域中的瓶颈问题。同时,连接-清除(Ligation to Scavenging)系统操作简单,只需加入Tz-PROTACs或PAMAM-G5-TCO即可启动/关闭靶蛋白的降解过程,无需任何附加操作,使得精准和按需调节细胞中的靶蛋白水平成为可能,为蛋白降解技术的应用开拓了新模式。

该工作获得了国家自然科学基金重点项目和面上项目、江苏省杰出青年基金项目和中国药科大学兴药学者计划的资助,以及江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室和多靶标天然药物全国重点实验室的支持。

论文链接: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.2c12809>

(药学院)