靶向多肽分子筛选及其在肿瘤免疫诊疗中的应用进展

李凌云, 马兵*, 王蔚芝*

北京理工大学化学与化工学院, 北京 100081

*通讯作者, E-mail: mabing@bit.edu.cn; wangwz@bit.edu.cn

收稿日期: 2020-05-13; 接受日期: 2020-06-05; 网络版发表日期: 2020-07-28

国家自然科学基金(编号: 21775031)和北京市自然科学基金(编号: L172035, 2172056)资助项目

摘要 恶性肿瘤严重威胁着人类健康. 随着人们对肿瘤免疫循环机制的认识逐渐深刻, 免疫诊疗策略成为当前的研究热点. 多肽类分子诊疗试剂具有靶向性强、特异性好、生物相容性良好、安全性高、易化学修饰、来源广泛等优点, 在肿瘤免疫诊疗中拥有广阔的应用前景. 本文从靶向多肽探针的筛选和构筑方面介绍了近年来发展起来的一些有特色的新方法和新策略, 并着重从肿瘤免疫诊断、免疫分子影像以及免疫检查点阻断等方面综述多肽在肿瘤免疫诊疗中的应用进展.

关键词 多肽分子探针, 多肽筛选, 免疫诊断, 免疫检查点阻断剂

1 引言

分子识别是分子间通过非共价键形成的特异而专一的相互作用. 在生物体系内, 分子识别网络精确控制着高度复杂的生命过程. 发现新的分子识别体系, 针对特定靶点建立高亲和力及高特异性分子检测新方法, 是精准医疗下对于新型靶向诊疗技术的迫切需求. 与抗原-抗体识别相比, 低分子量的识别元件具有如靶向多肽、核酸适配体等独特优势. 其中, 靶向多肽是指针对特定的生物靶标具有特异性亲和作用的肽分子. 多肽由几个到几十个结构、性质、功能各异的氨基酸按照一定的顺序通过酰胺键连接. 多肽虽然体积小、结构简单, 但是通常具有与天然蛋白/抗体类似的生物学功能. 相比抗体识别, 靶向多肽穿透性强、免疫原性

低、易于化学合成与修饰、批次重复性高; 相比其他类型的低分子量单元, 如核酸识别等, 由于氨基酸种类更多且亲疏水性、电荷各不相同, 多肽具有更高度的多样性和更巨大的信息量^[1,2]. 因此, 通过有效的筛选、合理的设计和多模式的合成策略可以产生多种功能性的靶向多肽. 此外, 多肽还具有一种与生俱来的能力, 即可在特定的条件下实现可控自组装. 多肽可在氢键、 π - π 堆积、疏水作用、静电力等驱动下, 自发组装形成有序的超分子拓扑结构, 如纳米管、纤维、囊泡、片层等, 展现出单分子或分子低聚体所没有的特性^[3]. 自发的聚集和组装使得局部配体“密度”增高, 可与靶标实现多价结合. 由于多肽紧密组装, 能避免被酶降解, 具有生物稳定性. 尤其是多肽具有生物活性和生物相容性, 能够赋予超分子探针独特的生物学功能^[4].

引用格式: Li L, Ma B, Wang W. Progress of new strategies on screening of targeting peptides and applications in tumor immunotherapy. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1132–1141, doi: [10.1360/SSC-2020-0072](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0072)

综上所述, 不论是针对小分子多肽探针识别还是纳米化的自组装多肽靶向诊疗, 都已经成为分子识别领域的研究前沿, 取得了众多的研究成果. 目前已有很多综述对此领域进行了报道^[5-7]. 本文简述了关于多肽分子探针筛选构筑的新方法和新策略, 并选取此前鲜有报道的多肽分子探针在肿瘤免疫诊疗领域的应用角度进行了详细综述. 希望通过本文传递近来研究靶向多肽探针筛选构筑领域一些思路新颖并具有借鉴意义和应用前景的研究成果.

2 小分子靶向多肽探针筛选的新方法

从数千万计的多肽配体文库中高效地筛选出针对靶标具有亲和力和特异性的多肽既是关键, 也是难点. 传统的组合化学筛选方法周期长、效率低、分析鉴定耗时, 传统的噬菌体展示方法难以进行非天然氨基酸插入或修饰, 具有局限性. 因此, 发展新的筛选方法是高效获得靶向亲和配体的关键途径. 显然, 实现高效筛选的手段其一是采用合理的设计使肽库简并, 其二是发展新型高通量的方法可以快速完成筛选.

Zhao课题组^[8]利用反义肽简并性和正义肽-反义肽靶向识别原理构建了靶向小分子多肽文库. 反义肽现象是根据遗传密码的简并性由核酸向蛋白衍生出来的一种自然现象, 相当于把大量随机的氨基酸排列组合用核酸碱基编码. 例如, 可将一个库容量为 20^{10} 的十肽全库通过理性设计降低8个数量级. 利用反义肽作用的专一性, 筛选到新型的靶向多肽与关键膜蛋白的相互作用, 有效地干扰病毒对细胞的穿透. 作为亲和配基用于蛋白质的分析检测中, 可实现疾病相关诊疗探针的研发. 尤其是该课题组发展的新型溶酶体四次穿膜蛋白的靶向多肽在细胞定位、靶向杀伤、肿瘤诊疗方面具有广泛应用^[9,10].

此外, 利用计算机建模技术进行多肽文库的简并效果也十分显著. Baker课题组^[11]发明了一款名为“Rosetta”的计算机建模平台, 可将天文数字的全肽库容量(理论库容 20^{40})简并为22660并设计了数千种长度约为40个氨基酸的非天然来源的多肽. “Rosetta”建模软件预测这些多肽不仅能与分子靶标紧密结合, 还能抑制靶标蛋白的正常功能, 为药物的快速筛选提供了可能. 在该研究中, 以流感H1血凝素和肉毒杆菌神经毒素B作为筛选靶标, 筛选出了稳定性强、免疫原性低、生

物安全性高且抗流感药效优于市售抗体的新型多肽药物(图1(a)).

上述提及的两种手段各自用巧妙的方法实现了肽库的简并, 使得目标分子最大可能地留在小范围的肽库中. 然而, 很多情况下肽库简并不能遵循一定的规律, 大规模的筛选不可避免, 开发一类高效而通用的高通量筛选技术非常有必要. 这就需要借助一些自动化的高效的筛选工具. 首先, 新型质谱技术的发展为高效的多肽筛选提供了强有力的工具. Yang课题组^[12]基于新型的质谱技术发展了高通量糖基化肽段的筛选方法, 该方法基于阶梯能量的一步质谱采集法, 提高了糖肽鉴定的通量并开发了pGlyco 2.0糖肽检索引擎, 从糖链、肽段、糖肽三个层面对糖肽数据库检索进行精确质控, 从而大幅提升了N糖蛋白质组学分析的通量和精准度. 最后, 这一研究报道了目前最大的糖基化数据集: 在1%的假阳性率下, 研究人员在小鼠的5个脏器中鉴定到了超过一万条N糖肽.

此外, 微流控芯片系统因分析效率高、可灵活设计、自动控制并通量集成等特点在高通量筛选方面显示了独特的优势, 利用微流控芯片技术进行配体文库筛选是研究热点之一. 例如, Xu课题组^[13]报道了一种高通量微芯片, 将不同的蛋白点在芯片上形成微阵列, 配体库与芯片进行相互作用, 与阳性蛋白或阴性蛋白结合均会在响应的点阵发出信号, 整个富集过程通过扫描微阵列就可以进行实时监测. 本课题组在微流控芯片高通量多肽筛选新方法上也进行了多年的研发. 基于光刻微腔阵列芯片, 实现 10^8 库容量的组合化学肽库分选和基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)原位测序. 全流程可在几小时内完成, 相较于常规方法数天的筛选周期, 效率显著提高(图1(b))^[14]. 基于高效率筛选, 进一步发展高内涵筛选, 同时获得更多参数. 将微腔阵列中的多肽以原位“打印”的形式转移至表面等离子体共振成像(SPRi)芯片, 实现实时、在线、免标记检测, 创新地实现了两组阵列同时定性(原位测序)和定量(原位亲和力表征)分析, 检测灵敏度达到纳克级(图1(c))^[15]. 利用上述的高效平台, 筛选得到新型多肽靶向多肽CP, 其针对肿瘤干细胞标志物CD133的 K_D 达到 7.37×10^{-9} M, 与多克隆抗体相当. CP血液循环半衰期近3 h, 与常见多肽的活体半衰期只有数分钟相比, 稳定性显著提高. 将CP与新型近红外二区(NIR-II)信号单元IRT偶联后(CP-IRT)进行

图1 靶向多肽筛选新方法. (a) 利用“Rosetta”计算机建模平台筛选出以流感H1血凝素和肉毒杆菌神经毒素B为靶标的新型多肽^[11]. (b) 基于微阵列芯片实现组合化学肽库的在线分选和MALDI-TOF-MS原位测序^[14]. (c) 微腔阵列中的多肽以原位“打印”的形式转移至表SPRi芯片, 实现两组阵列同时定性和定量分析^[15] (网络版彩图)

Figure 1 New methods for screening targeting peptides. (a) Using the “Rosetta” computer modeling platform to screen out novel peptides targeting influenza H1 hemagglutinin and botulinum neurotoxin B [11]. (b) Microarray-chip-based screening from 10^8 combinatorial chemical library which integrated with on line sorting and *in situ* MALDI-TOF-MS sequencing [14]. (c) The peptides in the microwell array are transferred onto the SPRi through the “imprinting” strategy, which realized qualitative and quantitative analysis simultaneously [15] (color online).

活体造影, 肿瘤/健康组织信号比值接近9, 显著优于此前报道的小分子光学探针. 进而, 其还可快速排泄, 6 h内约90%的CP-IRT可经泌尿系统排出. 相比之下, 虽然同样具有靶向功能, 抗体修饰的IRT在肝脏大量富集, 显示了小分子探针的优势^[16].

3 超分子多肽纳米探针筛选构筑的新进展

通过设计制备结构有序、构象可控、多价识别、性质稳定的超分子探针实现纳米尺度检测有望解决上述问题. 尤其是多肽具有生物活性和生物相容性, 能够赋予超分子探针独特的生物学功能. 近年来, 基于多肽超分子的生物医学检测已成为纳米分子诊疗研究的热点, 涌现了许多成果. 例如, 多肽在形成组装体过程中, 可改变肿瘤细胞黏度, 扰乱胞内生理平衡, 从而杀灭肿瘤细胞^[17]. 又如, 在活体中, 一些多肽配体在受体处特异自组装形成纳米结构, 可作为药物或信号分子载体,

实现靶向输运^[18]. 这些前瞻性工作彰显了超分子在性质和功能方面的优势.

近年来, 在筛选构筑自组装多肽方面涌现了很多新进展, 尤其是基于活性组织甚至活体原位进行自组装超分子材料的筛选已经成为了该领域的前沿. Wang课题组^[19]利用高通量迈克尔加成反应策略筛选了多肽-高分子嵌段自组装材料. 在该研究中, 选取了靶向识别多肽单元、高分子单体、亲疏水调控单元等, 通过正交排列组合, 在微孔板原位构建了多于1000种的多肽自组装文库, 并与细胞相互作用进行实时筛选, 通过自组装材料与细胞相互作用中多个参数的变化, 优选出与细胞具有亲和力、特异性以及抑制能力的嵌段多肽高分子自组装材料(图2(a)). 基于活性体系原位筛选的多肽超分子探针或者诊疗试剂在生物活性和稳定性方面都极具优势^[20,21].

多肽类超分子材料还有一个显著的优点是组织相容性, 其中, 基于肽的水凝胶由于具有易于合成修饰、

图 2 超分子多肽纳米探针的筛选构筑. (a) 利用高通量细胞原位反应策略对多肽自组装文库进行实时筛选^[19]. (b) 利用深度学习设计水凝胶自组装行为的筛选程序, 构建文库预测未知水凝胶的形成并指导多肽设计^[22] (网络版彩图)

Figure 2 Screening and construction of supramolecular peptide nanoprobe. (a) Real-time screening of high-throughput peptide self-assembly libraries through the orthogonal arrangement of regulatory units by Michael addition reaction strategy^[19]. (b) Self-assembled hydrogel design and construction using a deep learning program, which can construct a library to predict the formation of unknown hydrogels as well as guide the peptide design^[22] (color online).

可生物降解和有一定的力学性能等特点在组织工程、药物缓释等方面表现出广泛的应用潜力. 然而, 多肽水凝胶分子结构具有多样性, 此前对于多肽分子水凝胶材料既没有形成一定的构筑和预测规律, 也没有成熟可行的大规模筛选方法, 极大地限制了多肽水凝胶领域的研究进度. 随着人工智能技术的发展, 机器学习成为信息化时代发展科技的重要工具, 为众多领域的研究工作提供了新方法. Li课题组^[22]建立了一个多肽水凝胶文库, 通过分析其化学特征并进行机器学习设计了一个多肽水凝胶自组装行为的筛选程序, 可以实现高通量筛选数据传输. 这种方法将物理结构、化学特性及其自组装行为联系在一起, 加快了生物医学用途的新型多肽分子的结构设计. 该研究通过高通量组合化学策略建立了容量为2304的多肽文库, 通过氨基酸单元的设计, 使得可形成水凝胶的多肽分子涵盖其中. 利用深度学习的方法, 使得机器学习并总结出自然界中多肽形成水凝胶的内在规律与机制, 实现对肽库中的每个多肽分子的计算、模拟与分析, 可以得到二维结构、三维结构、亲疏水、共轭等在内的3000余

个生物、物理及化学参数并计算这些参数所代表的数据点之间的关系, 预测未知水凝胶的形成, 并指导设计(图2(b)). 随着大数据时代的到来, 利用人工智能方法辅助实现生物材料及超分子药物等的发现将成为趋势.

4 多肽在肿瘤免疫诊断中的应用进展

肿瘤免疫诊疗是一种通过激活免疫系统增强机体自身识别和清除肿瘤的能力从而阻断肿瘤免疫逃逸的新兴诊疗策略^[23]. 肿瘤免疫诊疗改变了传统的癌症诊疗, 于2018年获得诺贝尔奖, 被称为第三次抗癌革命. 其中, 免疫检查点(immune checkpoint)及其配体广泛存在于不同种类肿瘤患者体内, 是成像诊断及靶向治疗的优良靶标. 随着Nivolumab、Pembrolizumab、Atezolizumab等免疫检查点阻断药物在临床上取得巨大成功, 免疫检查点诊疗的研究成为免疫诊疗发展的重要趋势. 目前的免疫检查点诊疗试剂以抗体为主, 然而, 抗体疗法面临的挑战有多种靶标同时存在但抗

体同时识别难度大, 抗体难于化学修饰, 穿透能力差、生物利用度低, 有获得性耐药问题, 有副作用、药物毒性容易积累等^[24,25]。因此, 研发多肽类的免疫诊疗试剂有望解决上述抗体类试剂所面临的问题。以免疫诊疗中的明星分子程序性死亡配体1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1)为例, 在PD-L1抗体研发在临床应用的同时, PD-L1多肽诊疗的开发也成为基础研究领域的前沿。本节首先简述了关于PD-L1靶向多肽探针在肿瘤诊断和分子影像方面的进展。目前报道免疫靶点多肽分子探针多为放射性同位素修饰, 详见表1。

分子探针需要在血液中循环最终滞留于病灶部位, 环化是增加多肽稳定性的有效手段。Bristol-Myers-Squibb (BMS)公司筛选出了两类大环肽可靶向PD-L1, 展现出了良好的结合能力与生物稳定性, 这两种大环肽与PD-L1结合形成的复合物晶体结构也为PD-1/PD-L1途径的小分子阻断剂的设计提供了依据^[29,30]。其中WL12肽具有单个伯胺, 适合修饰, 常被放射标记后用于成像诊断。Nimmagadda课题组^[26,27]基于此分别设计了⁶⁴Cu和⁶⁸Ga修饰的WL12分子探针用于正电子扫描成像(PET)造影剂, 均可以在注射后60 min之内快速而无创的成像。除此之外, Li课题组^[31]利用噬菌体展示技术筛选的多肽TPP-1也可通过与PD-L1特异性结合来激活T细胞。Zhang课题组^[28]用¹⁸F或⁶⁴Cu对其进行标记并将其中一部分TPP-1聚乙二醇化形成四聚体, 并对制备的探针进行分析, 发现⁶⁴Cu标记的探针显示出较好的成像潜能, 且聚乙二醇化后的探针在血液中的停留时间更长。虽然这些研究不断提升着分子探针的性能, 但目前还多处于基础研究阶段。

5 多肽在肿瘤免疫检查点阻断中的应用进展

免疫检查点表达于免疫及相关细胞, 与肿瘤细胞上的受体结合后通过抑制免疫细胞的活性和增殖能力来抑制免疫应答, 从而诱导免疫逃逸^[32,33]。目前, 科学家发现了一系列可以作为肿瘤诊疗靶标的免疫检查点, 其中研究最深入的是在上一节中提及的程序性死亡受体1 (programmed death 1, PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)。筛选及制备出的一些分子可以与免疫检查点或其配体特异性结合, 通过阻断其相互作用

表1 用于PET成像示踪剂的靶向PD-L1的多肽探针

Table 1 PD-L1 peptide probes for PET imaging tracers

多肽	多肽探针	比活度	放射化学纯度
WL12 ^[26,27]	⁶⁴ Cu-WL12	1.9±0.11 mCi/mg	>95%
	⁶⁸ Ga-WL12	128 GBq/μmol	>99%
TPP-1 ^[28]	¹⁸ F-AIF-TPP-1	4.05±0.4 GBq/μmol	>98%
	¹⁸ F-AIF-PEG-TPP-1	5.3±0.3 GBq/μmol	>95%
	⁶⁴ Cu-TPP-1	36.5±0.5 GBq/μmol	100%
	⁶⁴ Cu-PEG-TPP-1	25.8±0.8 GBq/μmol	>98%

而使免疫细胞发挥正常功能, 这类化合物被称为免疫检查点阻断剂(immunecheckpoint blockade)。目前美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的免疫检查点阻断剂主要为抗体类药物。上一节论述了抗体诊疗试剂的不足, 同样, 用免疫原性较低、稳定性高、合成简单的多肽替代单克隆抗体作为免疫检查点阻断药物也成为可能。

CTLA-4是第一个被单克隆抗体靶向的免疫检查点受体, 配体为B7-1(B-lymphocyte activation antigen B 7-1)和B7-2。Kolmar课题组^[34]报道了一种由胱氨酸肽(halcyo)定向进化得到的多肽, 这种多肽由于二硫键的交错而表现出高度的热稳定性, 蛋白水解稳定性和化学稳定性。其可与CTLA-4胞外域特异性结合, 且与人免疫球蛋白G1 (IgG1)融合后可得到四价复合物, 亲和常数 K_D 值达到118 nM。与C4b人源重组蛋白结合后得到的复合物 K_D 值达到8 nM。同时, 研究人员也指出, 这些化合物与相关生理功能的结构域结合可能会产生细胞毒性。可见, 亲和能力和多价识别能力的提升前提是不能影响正常的生理过程(图3(a))。此外, Fujiwara课题组^[35]报道了一种螺旋-环-螺旋(HLH)肽可与CTLA-4特异性结合, K_D 值为196 nM, 与B7-1的结合力(K_D ~200 nM)相当, 且具有 α -螺旋结构, 稳定性好。在细胞内, 该多肽展现出了优异的结合力与特异性, 并能从某些信号通路激活肿瘤免疫, 展示出了成为CTLA-4阻断剂的潜力(图3(b))。

PD-1多表达于T细胞, 其与两个内源性配体PD-L1和PD-L2的结合会触发T细胞活化抑制信号, 导致T细胞功能衰竭或凋亡, 从而引起肿瘤细胞免疫逃逸。表2中列举了一些已报道的可阻断PD-1/PD-L1通路的多肽抑制剂。2014年, Aurigene Discovery Technologies和

图 3 多肽类阻断剂靶向CTLA-4. (a) 酵母表面展示胱氨酸结肽文库, 定向进化得到的多肽阻断CTLA-4^[34]. (b) 酵母表面展示螺旋-环-螺旋(HLH)肽文库, 定向进化并体外亲和成熟得到的多肽阻断CTLA-4^[35] (网络版彩图)

Figure 3 Peptide inhibitors target CTLA-4. (a) Cystine-knot peptide from yeast surface display library which can block CTLA-4^[34]. (b) Helix-Loop-Helix peptide which from yeast surface display library after *in vitro* affinity maturation can block CTLA-4^[35] (color online).

表 2 PD-1/PD-L1多肽类抑制分子

Table 2 PD-1/PD-L1 peptide inhibitors

受体	多肽	氨基酸序列	亲和解离常数 K_D (M)
PD-1	AUNP-12 ^[36]	—	—
	Ar5Y4 ^[37]	GNWDYNSQRAQLYNQ	1.38×10^{-6}
	P5-1 ^[38]	GNWDYNSQRA	0.21×10^{-6}
	DS-II ^[39]	GVYRCMISYGGADYKRITVKVNA	109×10^{-6}
	ADS-III[c110–128] ^[39]	Cyclic[CVYRCMISYGGADYKRITC]	11.6×10^{-6}
PD-L1	WL12 ^[26]	Cyclic[Y(Ac)A(NMe)NPHL[Hyp]WSW(Me)[Nle](NMe)[Nle](NMe)[Om](R)C]G	22×10^{-9}
	TPP1 ^[30]	SGQYASYHCWCWRDPGRSGGSK	95×10^{-9}
	PD-L1Pep-1 ^[40]	CLQKTPKQC	0.37×10^{-6}
	PD-L1Pep-2 ^[40]	CVRARTR	0.28×10^{-6}
	CLP002 ^[41]	WHRSYTWNLNT	0.37×10^{-6}
	^D PPA-1 ^[42]	NYSKPTDRQYHF	0.51×10^{-6}
	G7-βH2_mt ^[43]	HVVVWHRESPSGQTDTKAA	2.75×10^{-9}

Pierre Fabre两家生物医药公司共同宣布一种名为AUNP-12的药物可用于癌症免疫治疗, 这是第一个被纳入临床试验的PD-1/PD-L1通路多肽类阻断剂^[36]. AUNP-12是一个29肽, 与人源化PD-1(hPD-1)胞外结构域结合, 活性主要由支链肽C末端的长度决定, 该多肽在大鼠外周血单个核细胞增殖实验(PBMC, 相当于在

模型动物中完全模拟一套人源免疫系统)中展现出良好的抑制肿瘤细胞活性的能力. 除此之外, Li课题组^[37]基于hPD-L1与hPD-1结合的5个重要残基(Y56、R113、A121、D122和Y123)从头设计并筛选出了一种15肽Ar5Y4, 亲和常数 K_D 为 $1.38 \mu\text{M}$. 此外, Ar5Y4多肽还能恢复受到抑制的免疫细胞的功能. 随后该课题

组对Ar5Y4多肽进行了优化, 截去其C末端形成 α 螺旋且在结合位点外的5个氨基酸残基, 通过减少结合位阻得到了亲和力更高的多肽阻断剂P5-1, 将 K_D 优化了一个数量级^[38]. 如前文所述, 环化是增加多肽稳定性和亲和力的有效手段. Ma课题组^[39]在研究并确定了PD-1/PD-L1结合界面的热点区域后, 将PD-L1的双链节段分离出来, 截短并环化, 得到的环肽 Δ DS-II[c110-128]与PD-1结合的亲和常数 K_D 值达到11.6 μ M, 相较于其环化前的线性肽DS-II($K_D \sim 109 \mu$ M)提高了近10倍.

除了靶向PD-1之外, 靶向PD-L1进行阻断剂开发也是非常有效的手段. Lee课题组^[40]利用噬菌体展示技术筛选出了两种多肽PD-L1Pep-1和PD-L1Pep-2, 亲和力均优于其内源性配体PD-1($K_D \sim 590$ nM), 并可以在一定程度上诱导PD-L1内在化, 下调PD-L1在细胞表面的数量. Cheng课题组^[41]则利用一种新的生物淘选方法筛选出了肽CLP002, 不仅可以阻断PD-1/PD-L1通路, 还可以阻断CD80/PD-L1的相互作用, 进一步增强免疫反应. Liu课题组^[42]基于免疫检查点开发了多条靶向多肽, 于2015年报道了第一个靶向PD-L1的D型多肽^DPPA-1, 与PD-L1胞外IgV结构域结合, 亲和力约为0.51 μ M. ^DPPA-1最大的优势是抗水解, 不仅在人血清中表现出稳定性, 在活体内和体外均可以阻断PD-1/PD-L1作用途径. 最近, 该课题组开发了第一条靶向新型免疫检查点TIGIT的抗水解D型多肽^DTBP-3 (GGYTFHWHLNP), 亲和常数 K_D 值约为5.60 μ M (图4(a))^[44]. TIGIT在许多肿瘤细胞中表达高于PD-1, 尤其是PD-1耐药肿瘤, 具有作为免疫诊疗新靶标的潜力. 该肽的开发也为解决PD-1药物耐药性提供了有效策略.

一般来说, 在多肽文库中筛选出的特异性多肽亲和力和达不到转化临床应用的强度, 这也是多肽类诊疗试剂一直以来面临的挑战. 将PD-L1的内源性配体PD-1胞外域部分分离并进行改造后得到的分子, 其与PD-L1的结合能力可得到提高. Ring课题组^[45]利用蛋白质定向进化技术将PD-1胞外域改造为具有高亲和力的PD-L1结合蛋白, K_D 可达到110 pM级别. 另外, 将该蛋白用⁶⁴Cu标记, 可用作PET成像示踪剂, 由于其极强的亲和力极有希望用于临床. 最近, Hong课题组^[43]报道了一种 β -发夹状的多肽树状大分子系统, 其是将PD-1胞外区结构域分离改造得到的多肽片段与树状大分子

多价缀和, 形成的多肽-树状大分子复合物由于拓扑作用而折叠形成了 β -发夹状, 不仅由于多价缀和而增强了靶向亲和力, 还具有较高的稳定性, 可用于活体内的靶向成像与示踪, 并且可发展成为纳米型PD-1阻断剂.

事实上, PD-L1不仅存在于细胞膜表面, 在细胞质中也有大量储存, PD-L1可通过囊泡动态转运到细胞表面, 与癌症的转移和复发密切相关. 研究人员发现, 在细胞质中存在的PD-L1会在酶的催化下被棕榈酰化修饰, 从而抑制溶酶体对PD-L1的降解, 增强PD-L1的表达和功能. Xu课题组^[46]基于此开发出了棕榈酰化竞争性多肽CPP-S1, 由细胞穿透肽和PD-L1胞质结构域中棕榈酰化修饰作用的序列组成, CPP-S1通过竞争作用减少了PD-L1的棕榈酰化修饰, 降低了肿瘤细胞中PD-L1的表达, 从而增强了T细胞的免疫力. 对PD-L1来说, 该多肽既是阻断剂, 又是抑制剂, 这为基于免疫检查点筛选构筑新型靶向药物的策略提供了新思路 (图4(b)).

对于多肽类诊疗试剂来说, 由于人体结构复杂精妙以及肿瘤微环境的错综复杂, 如何开发具有良好的亲和力和稳定性的多肽是需要解决的难点问题, 环化、定向进化或多价缀和为这些问题提供了一些解决策略. 另外随着对免疫检查点探索的不断深入, 研究者们可以开发出不同功能、种类的多肽类诊疗试剂, 更全面、有效地应对肿瘤免疫诊疗中出现的各种问题如普适性、耐药性等. 总而言之, 虽然目前肿瘤的免疫治疗效果极佳, 但目前仅对少部分患者起效, 免疫检查点诊疗技术仍然存在巨大的创新研发空间, 有望从多个思路和角度实现突破和革新.

6 总结与展望

通过理性的设计与高效的筛选发现新的具有亲和力、特异性和稳定性的多肽分子探针技术在生物医学领域具有极大的应用价值. 通过高效筛选和精准控释策略构筑的小分子和超分子多肽探针在肿瘤以及非肿瘤等重大疾病诊断和治疗方面发挥着重要作用. 当然, 在多肽靶向探针筛选研究以及在免疫诊疗的应用中, 我们还面临着一系列的困难. 首先, 生命体系极其复杂, 许多具有良好性能的多肽在溶液中经过严格的纯度、浓度、酸度控制, 可形成精巧的纳米结构, 然而

图 4 多肽类肿瘤免疫检查点阻断剂。(a) 新型镜像噬菌体文库筛选得到的D型多肽阻断TIGIT^[42]。(b) 新型多肽通过竞争结合减少了细胞质内PD-L1的棕榈酰化修饰并实现肿瘤细胞中PD-L1表达的降低^[46] (网络版彩图)

Figure 4 Peptide-based immune checkpoint blockades. (a) A new D-peptide from mirror phage library which can block TIGIT^[42]. (b) Peptide reduced palmitoylation of PD-L1 as well as PD-L1 expression in cytoplasm^[46] (color online).

这种结构在复杂的活体中却很难实现稳定可控。加之目前报道的靶向分子探针大多从分子层面入手设计, 由于各单元的设计和合成都相对独立。在复杂活体环境中各功能难以协同达到最佳。

此外, 组装序列通常模仿少数天然的蛋白序列, 难以在形貌及功能上有所突破。随着有机化学、合成生物学的发展, 以及基于人工智能技术的深度学习等技术的辅助, 高效地锚定、筛选、合成具有更好协同性能、更精准选择性靶点和更高稳定性的多肽探针是该领域创新发展的必由之路。尤其是在本文所论述的免疫相关的靶点识别与抑制方面, 与传统的靶点不同,

该类靶点涉及的生理病例过程及相关信号通路复杂, 涉及多器官、多系统联动, 因此, 诊疗试剂的稳定性、长效性和可控性显得尤为重要。

最后, 在发展新的功能性多肽探针的同时, 提高多肽探针的生物利用度和降低多肽探针的生物毒性是相辅相成的两方面研究。一方面, 为了提高多肽探针的生物利用度, 往往对其进行改性修饰, 如引入一些非天然的分子, 如D型氨基酸、高分子等。同时这些改性也带来一些生物相容性等方面的隐患。两方面如何权衡与评估也依赖于生物化学、计算化学、纳米毒理学等领域的进一步发展。

参考文献

- 1 Sasikumar PG, Ramachandra M. *Biodrugs*, 2018, 32: 481–497
- 2 Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. *Drug Discovery Today*, 2010, 15: 40–56
- 3 Estroff LA, Hamilton AD. *Chem Rev*, 2004, 104: 1201–1218
- 4 Wang L, Li LL, Ma HL, Wang H. *Chin Chem Lett*, 2013, 24: 351–358

- 5 Bisker G, Dong J, Park HD, Iverson NM, Ahn J, Nelson JT, Landry MP, Kruss S, Strano MS. *Nat Commun*, 2016, 7: 10241
- 6 Ren C, Wang Z, Wang Q, Yang C, Liu J. *Small Methods*, 2020, 4
- 7 Wang W, Hu Z. *Adv Mater*, 2019, 31: 1804827
- 8 He J, Gui S, Huang Y, Hu F, Jin Y, Yu Y, Zhang G, Zhang D, Zhao R. *Chem Commun*, 2017, 53: 11091–11094
- 9 Huang Y, Zhang G, Hu F, Jin Y, Zhao R, Zhang D. *Chem Sci*, 2016, 7: 7013–7019
- 10 Zhu Y, Huang Y, Jin Y, Gui S, Zhao R. *Anal Chem*, 2019, 91: 1880–1886
- 11 Chevalier A, Silva DA, Rocklin GJ, Hicks DR, Vergara R, Murapa P, Bernard SM, Zhang L, Lam KH, Yao G, Bahl CD, Miyashita SI, Goresnik I, Fuller JT, Koday MT, Jenkins CM, Colvin T, Carter L, Bohn A, Bryan CM, Fernández-Velasco DA, Stewart L, Dong M, Huang X, Jin R, Wilson IA, Fuller DH, Baker D. *Nature*, 2017, 550: 74–79
- 12 Liu MQ, Zeng WF, Fang P, Cao WQ, Liu C, Yan GQ, Zhang Y, Peng C, Wu JQ, Zhang XJ, Tu HJ, Chi H, Sun RX, Cao Y, Dong MQ, Jiang BY, Huang JM, Shen HL, Wong CCL, He SM, Yang PY. *Nat Commun*, 2017, 8: 438
- 13 Liu X, Li H, Jia W, Chen Z, Xu D. *Lab Chip*, 2016, 17: 178–185
- 14 Wang W, Wei Z, Zhang D, Ma H, Wang Z, Bu X, Li M, Geng L, Lausted C, Hood L, Fang Q, Wang H, Hu Z. *Anal Chem*, 2014, 86: 11854–11859
- 15 Wang W, Li M, Wei Z, Wang Z, Bu X, Lai W, Yang S, Gong H, Zheng H, Wang Y, Liu Y, Li Q, Fang Q, Hu Z. *Anal Chem*, 2014, 86: 3703–3707
- 16 Wang W, Ma Z, Zhu S, Wan H, Yue J, Ma H, Ma R, Yang Q, Wang Z, Li Q, Qian Y, Yue C, Wang Y, Fan L, Zhong Y, Zhou Y, Gao H, Ruan J, Hu Z, Liang Y, Dai H. *Adv Mater*, 2018, 30: 1800106
- 17 Cong Y, Ji L, Gao Y, Liu F, Cheng D, Hu Z, Qiao Z, Wang H. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 4632–4637
- 18 Liang C, Zhang L, Zhao W, Xu L, Chen Y, Long J, Wang F, Wang L, Yang Z. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: 1800899
- 19 Qiao ZY, Lin YX, Lai WJ, Hou CY, Wang Y, Qiao SL, Zhang D, Fang QJ, Wang H. *Adv Mater*, 2016, 28: 1859–1867
- 20 Zhang L, Jing D, Jiang N, Rojalin T, Lam KS. *Nat Nanotech*, 2020, 1–9
- 21 He PP, Li XD, Wang L, Wang H. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 367–378
- 22 Li F, Han J, Cao T, Lam W, Fan B, Tang W, Chen S, Fok KL, Li L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 11259–11264
- 23 Chen DS, Mellman I. *Immunity*, 2013, 39: 1–10
- 24 Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge R. *mAbs*, 2014, 2: 256–265
- 25 Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 767–774
- 26 Chatterjee S, Lesniak WG, Miller MS, Lisok A, Sikorska E, Wharram B, Kumar D, Gabrielson M, Pomper MG, Gabelli SB, Nimmagadda S. *Biochem BioPhys Res Commun*, 2017, 483: 258–263
- 27 De Silva RA, Kumar D, Lisok A, Chatterjee S, Wharram B, Venkateswara Rao K, Mease R, Dannals RF, Pomper MG, Nimmagadda S. *Mol Pharm*, 2018, 15: 3946–3952
- 28 Kuan H, Masayuki H, Xie L, Zhang Y, Kotaro N, Hisashi S, Zhang MR. *Chem Commun*, 2019, 55: 4162–4165
- 29 Miller MM, Mapelli C, Allen MP, Bowsher MS, Boy KM, Gillis EP, Langley DR, Mull E, Poirier MA, Sanghvi N. Macrocyclic inhibitors of the PD-1/PD-L1 and CD80(B7-1)/PD-L1 protein/protein interactions. US Patent, 9850283B2, 2017-12-26
- 30 Magiera-Mularz K, Skalniak L, Zak KM, Musielak B, Rudzinska-Szostak E, Berlicki Ł, Kocik J, Grudnik P, Sala D, Zarganes-Tzitzikas T, Shaabani S, Dömling A, Dubin G, Holak TA. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 13732–13735
- 31 Li C, Zhang N, Zhou J, Ding C, Jin Y, Cui X, Pu K, Zhu Y. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6: 178–188
- 32 Acúrcio RC, Scomparin A, Connot J, Salvador JAR, Satchi-Fainaro R, Florindo HF, Guedes RC. *J Med Chem*, 2018, 61: 10957–10975
- 33 Buchbinder EI, Desai A. *Am J Clin Oncol*, 2016, 39: 98–106
- 34 Maaß F, Wüsthube-Lausch J, Dickgießer S, Valldorf B, Reinwarth M, Schmoldt HU, Daneschdar M, Avrutina O, Sahin U, Kolmar H. *J Pept Sci*, 2015, 21: 651–660
- 35 Ramanayake Mudiyansele TMR, Michigami M, Ye Z, Uyeda A, Inoue N, Sugiura K, Fujii I, Fujiwara D. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 360–368
- 36 Sasikumar PGN, Ramachandra M. Immunosuppression modulating compounds. US Patent, 8907053B2, 2014-12-09
- 37 Li Q, Quan L, Lyu J, He Z, Wang X, Meng J, Zhao Z, Zhu L, Liu X, Li H. *Oncotarget*, 2014, 7: 64967–64976
- 38 Quan L, Diao Y, Li Q, Li W, Zhu L. *J East China Univ Sci Technol*, 2020, 1: 35–40 (in Chinese) [全丽娜, 刁妍妍, 李巧, 李文杰, 朱丽丽. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2020, 1: 35–40]
- 39 Zhou K, Lu J, Yin X, Xu H, Li L, Ma B. *Biophys Chem*, 2019, 253: 106213
- 40 Gurung S, Khan F, Gunasekaran GR, Yoo JD, Poongkavithai Vadevoo SM, Permpoon U, Kim SH, Kim HJ, Kim IS, Han H, Park JH, Kim S,

- Lee B. *Biomaterials*, 2020, 247: 119984
- 41 Liu H, Zhao Z, Zhang L, Li Y, Jain A, Barve A, Jin W, Liu Y, Fetse J, Cheng K. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 270
- 42 Chang HN, Liu BY, Qi YK, Zhou Y, Chen YP, Pan KM, Li WW, Zhou XM, Ma WW, Fu CY, Qi YM, Liu L, Gao YF. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 11760–11764
- 43 Jeong W, Bu J, Han Y, Drelich AJ, Nair A, Král P, Hong S. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 1832–1837
- 44 Zhou X, Zuo C, Li W, Shi W, Zhou X, Wang H, Chen S, Du J, Chen G, Zhai W, Zhao W, Wu Y, Qi Y, Liu L, Gao Y. *Angew Chem Int Ed*, 2020, anie.202002783
- 45 Maute RL, Gordon SR, Mayer AT, McCracken MN, Natarajan A, Ring NG, Kimura R, Tsai JM, Manglik A, Kruse AC, Gambhir SS, Weissman IL, Ring AM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E6506–E6514
- 46 Yao H, Lan J, Li C, Shi H, Brosseau JP, Wang H, Lu H, Fang C, Zhang Y, Liang L, Zhou X, Wang C, Xue Y, Cui Y, Xu J. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3: 306–317

Progress of new strategies on screening of targeting peptides and applications in tumor immunotherapy

Lingyun Li, Bing Ma^{*}, Weizhi Wang^{*}

School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

^{*}Corresponding authors (email: mabing@bit.edu.cn; wangwz@bit.edu.cn)

Abstract: Malignant tumor has threatened human's health. Along with the deep understanding of the mechanism of tumor immune cycle, tumor immune diagnosis and therapy have become the research hot spot. Among all the theranostic reagents, peptides have good affinity, high specificity, good biocompatibility, ease of modification and so on. Peptide-based reagents have broad application prospects and great potential in tumor immune diagnosis and therapy. This review summarizes from the aspects of some new methods and new strategies on targeting peptide probes screening and construction. Furthermore, we focus on some research progress on targeting-peptide-based tumor immunol imaging and peptide-based immune checkpoint therapy.

Keywords: peptide probes, peptide screening, immunodiagnosis, immune checkpoint blockades

doi: [10.1360/SSC-2020-0072](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0072)