

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.003

· 基础研究 ·

基于噬菌体展示技术筛选鉴定 HLA-G 肿瘤靶向锚定蛋白

颜家耀, 仲丽晴, 刘宝瑞(南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心, 江苏 南京 210000)

[摘要] **目的:** 基于噬菌体展示靶向锚定蛋白文库, 以人白细胞抗原 G (HLA-G) 为靶点筛选锚定序列作为 HLA-G 结合蛋白 (HGBP) 并评价其功能。 **方法:** 利用 TCGA、GTEX 等数据库分析肿瘤组织中 HLA-G 表达与临床预后和免疫浸润的相关性。利用噬菌体展示靶向锚定蛋白文库对 HLA-G 胞外片段进行生物淘选并随机挑取单克隆进行测序。通过 ELISA、免疫荧光染色鉴定优势噬菌体克隆的功能。利用原核体系生产纯化 HGBP, 通过 ELISA、表面等离子共振 (SPR)、免疫荧光染色法评价其亲和力及肿瘤特异性结合能力。 **结果:** 生物信息学分析发现, HLA-G 在肿瘤组织中普遍呈高表达, 其与临床总生存期、免疫细胞浸润水平具有相关性 ($P < 0.05$)。5 轮噬菌体文库筛选后获得优势克隆, ELISA 及免疫荧光染色结果均显示, 优势噬菌体对 HLA-G 阳性细胞结合显著强于阴性细胞 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。经纯化生产的 HGBP 与 HLA-G 之间的亲和力可达 17 nmol/L, ELISA 结果显示, HGBP 与 HLA-G 分子的结合显著 ($P < 0.05$); 免疫荧光染色结果表明, HGBP 能与 HLA-G 阳性细胞特异性结合 ($P < 0.01$)。 **结论:** 经噬菌体展示文库筛选出的 HGBP 对 HLA-G 具有高亲和力, 可特异性结合肿瘤细胞表达的 HLA-G。

[关键词] 人白细胞抗原 G; 噬菌体展示文库; 靶向锚定蛋白; 肿瘤靶向治疗

[中图分类号] Q939.48; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 07-0689-09

Screening and identification of HLA-G tumor-targeting ankyrins based on phage-display technology

YAN Jiayao, ZHONG Liqing, LIU Baorui (The Comprehensive Cancer Centre, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To identify HLA-G-binding proteins (HGBPs) by screening targeting ankyrin sequences from a phage display-based ankyrin protein library using human leukocyte antigen G (HLA-G) as the target, and to evaluate their functions. **Methods:** The expression of HLA-G in tumor tissues and its correlation with clinical prognosis and immune infiltration were analyzed using bioinformatics tools such as TCGA and GTEX databases. The extracellular domain of HLA-G was subjected to biopanning with a phage-displayed ankyrin protein library, followed by random selection and sequencing of monoclonal phage clones. The functional properties of dominant phage clones were validated using ELISA and immunofluorescence staining. HGBPs were produced and purified using a prokaryotic expression system, and their affinity and tumor-specific binding ability were evaluated using ELISA, surface plasmon resonance (SPR), and immunofluorescence staining. **Results:** Bioinformatics analysis revealed that HLA-G is widely overexpressed in tumor tissues and is correlated with overall survival (OS) and immune cell infiltration ($P < 0.05$). After five rounds of biopanning, dominant clones were obtained. Both ELISA and immunofluorescence staining results showed that these dominant phages had a significantly higher affinity to HLA-G positive cells compared to HLA-G negative cells ($P < 0.05$, $P < 0.001$). The purified HGBPs exhibited an affinity of up to 17 nmol/L for HLA-G. ELISA results showed significant binding of HGBP to HLA-G ($P < 0.05$), and immunofluorescence staining confirmed that HGBP could specifically bind to HLA-G-positive cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** The HGBPs identified via phage display exhibit high affinity and specificity to HLA-G on tumor cells.

[Key words] human leukocyte antigen-G (HLA-G); phage-display library; targeting protein; cancer targeted therapy

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(7): 689-697. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.003]

人白细胞抗原 G (human leukocyte antigen-G, HLA-G) 是非经典 HLA I 类分子之一, 在胚胎期参与母胎免疫耐受建立, 维持免疫稳态^[1-3]; 成年期后表达静默, 正常组织中除胎盘外几乎无表达, 而在肿瘤组织中由于基因调控紊乱而异常高表达^[4]。既往研究通过免疫组化检测发现, HLA-G 在多种肿瘤类型中

广泛高表达。例如, 甲状腺癌中阳性率为 44.3%~100%, 乳腺癌中阳性率为 24%~94.1%, 胃癌中阳性率

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82272811)

[作者简介] 颜家耀(1994—), 男, 博士生, 主要从事肿瘤个体化靶向与免疫治疗研究

[通信作者] 刘宝瑞(扫码获取作者联系方式)



为25.5%~71%,肝癌中阳性率为50.2%~66.7%等^[5-6]。HLA-G表达于肿瘤细胞膜表面,可与多种免疫细胞(如T细胞、DC、NK细胞等)表达的免疫球蛋白样转录子(immunoglobulin-like transcript, ILT)结合,下调免疫功能,形成抑制性免疫微环境,因此HLA-G具有免疫检查点特性^[7-8]。以上特点使得HLA-G成为极具潜力的肿瘤特异性靶点,该靶点的肿瘤靶向免疫治疗逐渐受到关注。目前,HLA-G特异性结合蛋白以传统抗体为主,开发工艺复杂、周期长、依赖真核体系表达,并且可能存在对HLA家族同源蛋白的交叉反应。为获取针对HLA-G的特异性靶向结合蛋白,本研究拟采用噬菌体展示技术(将外源蛋白展示于噬菌体表面形成文库的一种生物工程技术^[9]),通过靶向锚定蛋白文库对特异抗原靶点进行生物淘选,实现亲和力优化,最终获取高亲和力靶向结合序列^[10-11],该靶向锚定结合蛋白具有开发周期短、原核体系量产便捷、亲和力高、稳定性强等特点,将其命名为HLA-G结合蛋白(HLA-G binding protein, HGBP)。本研究旨在探讨利用噬菌体展示靶向锚定蛋白文库,筛选HLA-G特异性结合蛋白序列,并鉴定、评价HGBP的功能。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人乳腺癌MDA-MB-231细胞和人胃腺癌AGS细胞购自中国科学院细胞库(上海细胞库)。M13噬菌体展示靶向锚定蛋白文库及对照空载噬菌体来自南京鼓楼医院肿瘤中心实验室,链霉亲和素磁珠(130-133-282)购自美天旎公司,生物素标记HLA-G肽段、表达His-靶向锚定蛋白序列的大肠杆菌BL21购自金斯瑞公司,ELISA显色底物TMB(HE101-01)购自全式金公司,RPMI 1640、DMEM培养基和胎牛血清购自Gibco公司,抗M13抗体(11973-MM05T)、辣根过氧化物酶(HRP)标记抗M13抗体(11973-MM05T-H)购自义翘神州公司,抗HLA-G抗体(ab52454)、HRP标记抗6×His标签抗体(ab1187)、DyLight488标记抗6×His标签抗体(ab117512)、山羊抗小鼠IgG H&L-Alexa Fluor488标记抗体(ab150113)均购自Abcam公司。

1.2 预后相关性分析及免疫浸润评分

从UCSC(<https://xenabrowser.net/>)数据库中获取来自NCI TCGA、NCI TARGET及NIH GTEx的泛癌数据集:TCGA TARGET GTEx[PANCAN, $N = 19\ 131$, 总样本数(G) = 60 499],进一步从中提取HLA-G基因在各个样本中的表达数据,选取10种肿瘤组织:胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)、甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)、胸腺癌(thymoma,

THYM)、胃癌(stomach adenocarcinoma, STAD)、肝细胞肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)、乳腺浸润癌(breast invasive carcinoma, BRCA)和膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BLCA)及其配对癌旁组织,提取HLA-G在各类组织中的表达水平数据,进行统计分析,并将其与对应患者的总生存期(OS)关联,进行Kaplan-Meier生存分析。

为进行免疫浸润评分,从上述数据集中进一步筛选来源为Primary Blood Derived Cancer-Peripheral Blood、Primary Tumor、各癌种的Metastatic、Primary Blood Derived Cancer-Bone Marrow、Primary Solid Tumor、Recurrent Blood Derived Cancer-Bone Marrow的样本数据,从中提取肿瘤组织中HLA-G表达谱,映射到GeneSymbol,通过R语言(R Core Team, <https://www.r-project.org/>)软件包IOBR的Timer方法^[12],基于HLA-G表达水平评估泛癌及上述10种肿瘤类型中每位患者的B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、DC浸润评分并进行统计分析。

1.3 噬菌体展示文库筛选优势克隆

为获取靶向结合HLA-G的优势噬菌体克隆,共进行5轮文库筛选(包括1轮阴性筛选和4轮肽段筛选)。先将链霉亲和素磁珠与M13噬菌体展示靶向锚定蛋白文库共孵育1 h,于磁场中分离,流穿液即为阴性筛选后的噬菌体文库,用于后续实验。以生物素标记的HLA-G肽段为靶点,将 2×10^{12} pfu噬菌体展示靶向锚定蛋白文库与其共孵育1 h后,加入链霉亲和素磁珠再次共孵育1 h,在磁场中利用0.2% TBST洗脱,分离出具有结合能力的噬菌体克隆群并测定滴度。随后,将其扩增为子文库,此为一轮生物淘选。继续取 2×10^{12} pfu子文库投入下一轮次淘选,重复上述步骤,并逐步增加TBST洗脱次数,共进行4轮针对HLA-G肽段的生物淘选。计算每轮筛选富集度(第一轮阴性筛选不计算),计算公式:富集度 = 洗脱产物噬菌体数量/投入筛选噬菌体数量。

取第4轮、第5轮磁珠淘选后噬菌体,进行噬菌体DNA Sanger测序。利用SnapGene software (www.snapgene.com)分析展示蛋白序列,确定优势克隆HLA-G噬菌体后将其扩增纯化,供后续实验使用。

1.4 ELISA检测噬菌体展示靶向锚定蛋白结合HLA-G的能力

ELISA检测噬菌体结合能力:准备分子板、AGS细胞板及MDA-MB-231细胞板。分子板为HLA-G肽段以100 μg/mL加入96孔板(100 μL/孔),过夜包

被;细胞板为向96孔板加入 2×10^4 个细胞/孔,37 °C、5% CO₂过夜培养,次日利用4%多聚甲醛固定细胞20 min后用PBS清洗。将分子板与细胞板在室温下用0.5% BSA封闭2 h后用PBS清洗。随后,将预先梯度稀释的噬菌体,包括优势克隆HLA-G噬菌体以及无外源插入展示蛋白的空载M13噬菌体(空载噬菌体),加入对应各孔,室温下作用3 h,以0.5% PBST清洗3次,去除未结合噬菌体。每孔继续加入200 μL HRP标记的抗M13抗体,室温下作用1 h,以0.5% PBS-T清洗3次。显色时,加入100 μL/孔TMB底物液,室温下避光反应2~5 min,加入100 μL/孔反应终止液(1 mol/L HCl),并于波长450 nm处测定各孔光密度(D)值。

ELISA 检测蛋白结合能力:准备HLA-G分子包被96孔板、封闭同前。将预先梯度稀释的带有His标签的靶向锚定蛋白加入对应各孔,室温作用3 h,以0.5% PBST清洗3次,加入HRP标记抗6×His标签抗体室温下作用1 h,以0.5% PBST清洗3次。同上进行显色反应、终止步骤操作同上,测定 D_{450} 值。

1.5 靶向锚定蛋白原核表达与质控

为获取HGBP及对照无关序列的靶向锚定蛋白(control binding protein, Ctrl BP),将表达His-靶向锚定蛋白的大肠杆菌BL21加入4 mL LB-Kan培养基中,37 °C、200 rpm过夜培养。次日,取2 mL过夜培养物,加入200 mL LB-Kan培养基,37 °C、200 rpm培养2.5 h至 D_{600} 达0.6~0.8,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导剂,继续以条件一诱导表达(15 °C、200 rpm培养16 h),或以条件二诱导表达(37 °C、200 rpm培养4 h)。随后,离心、取菌体沉淀,重悬后进行超声裂解,再次离心,上清液即为蛋白粗产物。利用镍柱及蛋白纯化仪对粗产物进行纯化,获得高纯度靶向锚定蛋白。

为进行蛋白表达纯化质控,收集生产过程中各组分,通过SDS-PAGE、BCA法检测目的蛋白产量及纯度,对纯化后的蛋白产物通过尺寸排阻色谱-高效液相色谱(Size Exclusion Chromatography-High Performance Liquid Chromatography, SEC-HPLC)、圆二色谱检测蛋白的结构组分。用AlphaFold3 (<https://alphafold3.org/>)进行蛋白质结构解析。

1.6 SPR测定靶向锚定蛋白对HLA-G亲和力

将HLA-G肽段作为偶联物包被于SPR检测芯片,将HGBP(分子量为17 000)作为分析物,从8 μg/mL进行2倍梯度稀释至0.25 μg/mL,按设定时间(结合600 s,解离900 s),各浓度分析物同时与SPR检测芯片包被的HLA-G相互作用,经分子互作仪(XLEMENT, 中国)检测得到结合-解离曲线,并拟合

曲线计算得出结合速率与解离速率,并按照公式“ $K_D = k_{off}/k_{on}$ ”计算得到平衡解离常数。

1.7 免疫荧光染色法检测HLA-G噬菌体及靶向锚定蛋白结合肿瘤细胞的能力

免疫荧光染色法检测噬菌体结合能力:将AGS及MDA-MB-231细胞分别以 1.5×10^5 个细胞/孔铺于12孔细胞培养板,37 °C、5% CO₂过夜培养。每孔加入4%多聚甲醛溶液固定、PBS清洗后,加入1% BSA封闭液,于37 °C下作用1 h。弃去封闭液,分别加入HLA-G噬菌体及空载噬菌体作为一抗,于37 °C下作用2 h。以PBS洗涤各孔后,加入鼠源抗M13抗体作为二抗,室温下作用1 h,洗涤各孔后加入山羊抗小鼠IgG H&L-Alexa Fluor488标记抗体作为三抗,室温下孵育1 h后洗涤各孔。每孔加入200 μL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核,室温下静置20 min, PBS洗涤后在荧光显微镜下拍照,并用Image J软件对荧光强度进行分析。

免疫荧光染色法检测蛋白结合能力:细胞培养及封闭操作同前。完成封闭后分别加入带有His标签的HGBP及Ctrl BP,于37 °C下孵育2 h。以PBS洗涤各孔后,加入DyLight488标记抗6×His标签抗体,室温下作用1 h, PBS洗涤,复染细胞核后在荧光显微镜下拍照,并用Image J软件对荧光强度进行分析。

免疫荧光染色法检测抗体结合能力:细胞培养及封闭操作同前。完成封闭后弃去上清,分别加入鼠源抗HLA-G抗体,于37 °C孵育2 h。以PBS洗涤各孔后,加入山羊抗小鼠IgG H&L-Alexa Fluor488标记抗体,室温下作用1 h, PBS洗涤,同前复染细胞核后荧光显微镜下拍照,并用Image J软件对荧光强度进行分析。

1.8 统计学处理

利用Graphpad Prism软件进行统计分析。临床预后OS比较采用Kaplan-Meier Plotter统计方法进行Log-Rank检验,采用配对样本t检验比较癌与癌旁组织中基因表达,采用非配对样本t检验比较其余两组实验数据的统计学差异。统计图中数据如无特殊标注,均为 $\bar{x} \pm s$ 。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

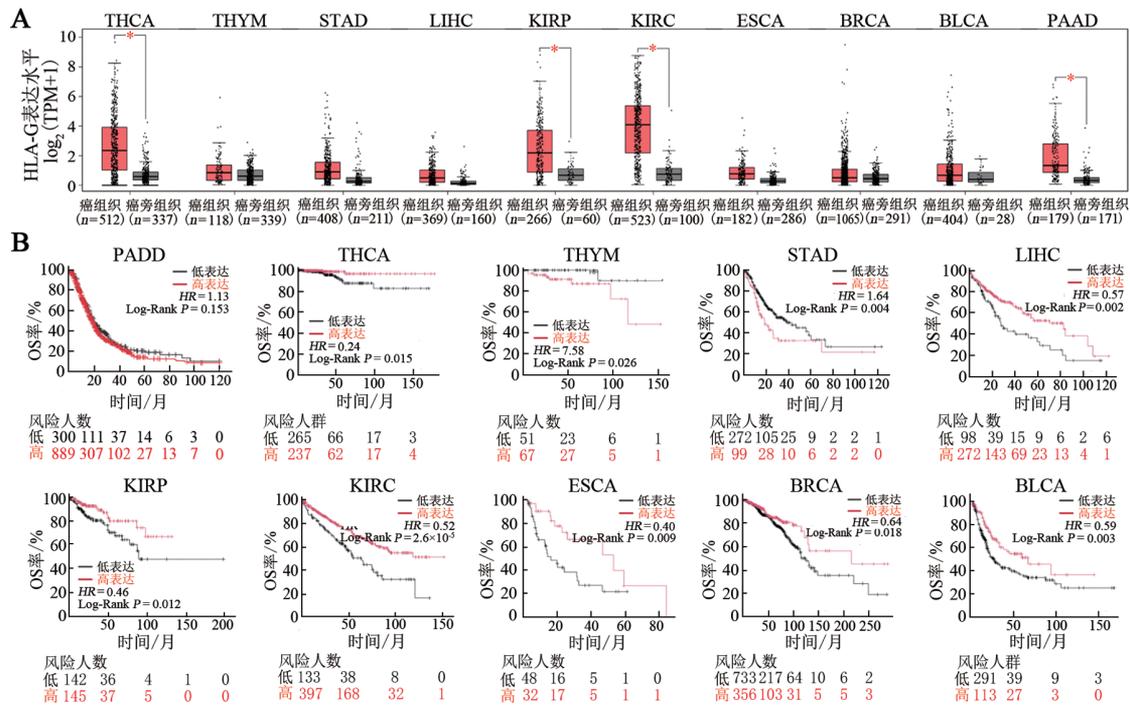
2 结果

2.1 HLA-G表达水平与临床预后相关

利用TCGA及GTEx数据库,在配对分析癌与癌旁组织HLA-G表达水平后发现,在10个常见肿瘤类型中HLA-G表达高于癌旁组织,尤其在THCA、KIRP、KIRC、PAAD中,HLA-G在肿瘤组织表达水平显著高于癌旁组织(图1A,均 $P < 0.05$)。此外,对上述10种常见类型肿瘤,在TCGA数据库中分析其表

达水平与患者OS发现,HLA-G表达水平与患者预后密切相关,在THYM、STAD中,高表达HLA-G的患者的OS显著低于低表达患者(图1B,均 $P < 0.05$),这

也可能预示着HLA-G在这两种肿瘤中显示出较强的免疫微环境抑制性。



A:HLA-G在癌与癌旁组织中表达水平比较;B:HLA-G与患者临床预后OS关联性分析。* $P < 0.05$ 。

图1 HLA-G表达水平及其与患者预后相关性分析

2.2 肿瘤HLA-G表达与微环境免疫细胞浸润相关

通过TCGA TARGET GTEx数据集分析HLA-G表达与免疫细胞浸润相关性,获得了共38个肿瘤类型中9406个肿瘤样本的6类免疫细胞浸润评分,计算各种肿瘤中HLA-G与免疫细胞浸润评分的皮尔逊相关系数,以确定显著相关的免疫浸润评分,最终在31个癌种中发现,HLA-G表达与免疫浸润显著相关($P < 0.05$,图2A)。进一步对前述10种常见类型(图2B)逐一分析发现,在THYM中,HLA-G表达水平增高,B细胞:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞在肿瘤中浸润均显著减少(B细胞, $r = -0.22, P = 0.02$;CD4⁺T细胞: $r = -0.24, P = 0.009$;CD8⁺T细胞: $r = -0.23, P = 0.01$);在其余癌种中,HLA-G表达与各类免疫细胞浸润多呈正相关性。以上结果表明,肿瘤细胞表达的HLA-G对免疫微环境中B细胞、T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及DC的浸润均有影响。

2.3 文库筛选HGBP优势克隆

为获取HGBP,选择HLA-G中家族同源性较低的肽段(VTHHPVFDYEATLRC)作为筛选靶点,采用噬菌体展示靶向锚定蛋白文库筛选策略,经过第1轮磁珠阴性筛选及4轮抗原肽筛选后,富集度在第4轮达到最高峰(图3A)。对第4轮及第5轮筛选产物的候选克隆测序发现,其中1个克隆(命名为HLA-G噬

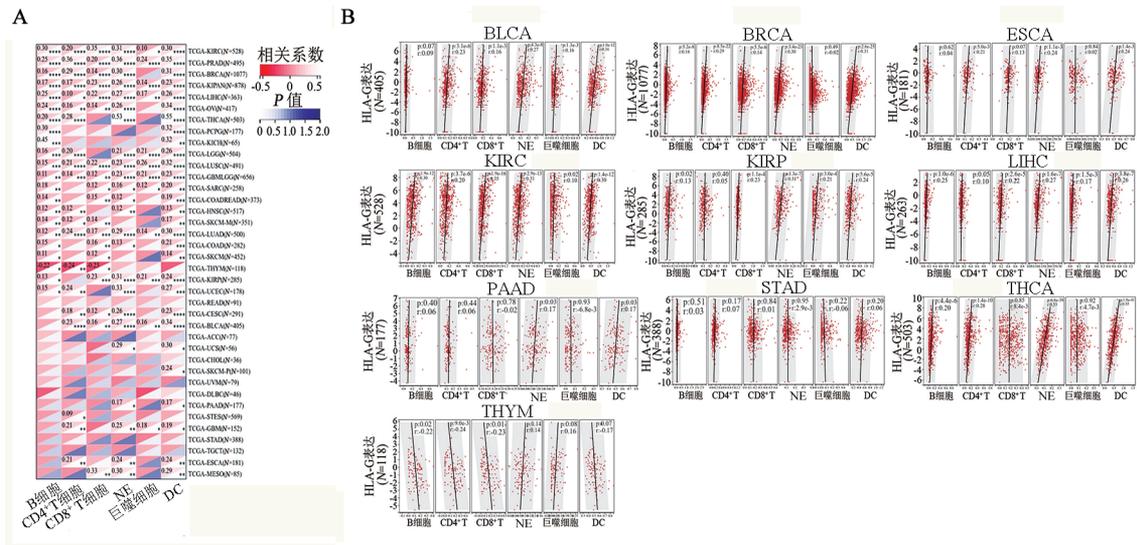
菌体)占比高达85.4%,显著高于其他克隆($P < 0.05$,图3B),经测序分析转换为氨基酸后获取明确靶向蛋白部分可变区序列,测序图谱为单峰形态,各位点碱基准确(图3C)。通过ELISA检测噬菌体结合能力,结果(图3D)显示,HLA-G噬菌体对HLA-G肽段结合随着滴度升高逐渐增加,而空载噬菌体无明显变化,表明HLA-G噬菌体展示的锚定序列对HLA-G具有较强的结合能力($P < 0.05$)。以上结果表明,通过文库筛选成功获取结合HLA-G的优势克隆。

2.4 HLA-G优势克隆能够特异性结合HLA-G阳性肿瘤细胞

为进一步鉴定HLA-G噬菌体克隆对HLA-G的结合能力,利用经市售抗体免疫荧光染色明确为HLA-G阳性的MDA-MB-231细胞和阴性的AGS细胞作为工具细胞(图4A、B)。通过ELISA检测噬菌体对细胞结合能力,结果(图4C)显示,HLA-G噬菌体对MDA-MB-231细胞的结合能力显著强于AGS细胞($P < 0.05$);HLA-G噬菌体对MDA-MB-231细胞的结合能力显著强于空载噬菌体($P < 0.05$,图4D)。利用免疫荧光染色检测噬菌体对细胞结合能力,结果(图4E、F)显示,HLA-G噬菌体在MDA-MB-231细胞中具有较强的荧光信号($P < 0.001$),而在其他组中

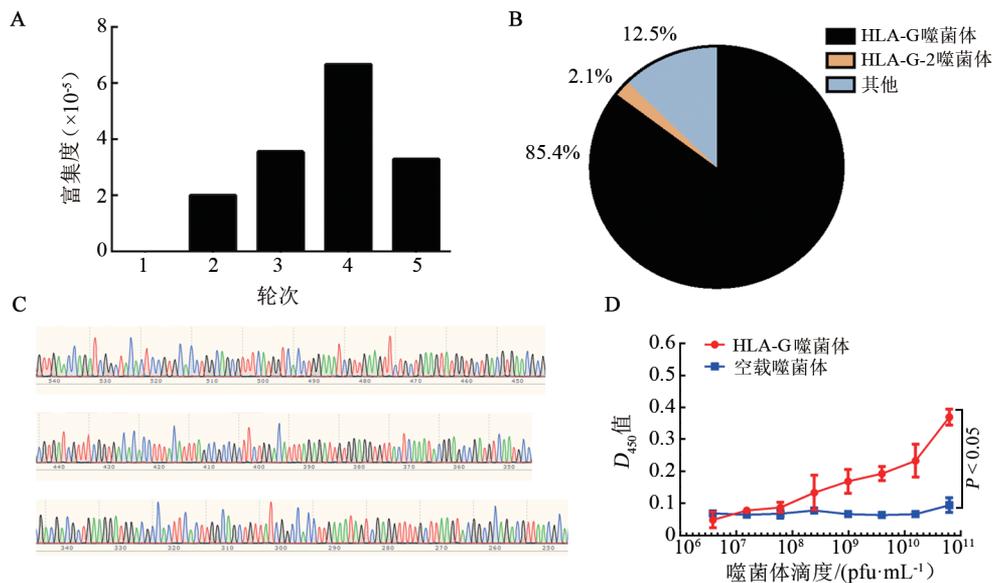
均未检测到明显信号。以上结果表明,HLA-G噬菌体可特异性结合HLA-G阳性肿瘤细胞,而不与

HLA-G阴性肿瘤细胞结合,并且该特异性结合能力依赖所展示的HLA-G靶向序列。



A: HLA-G 泛癌免疫浸润评分; B: 10 个常见肿瘤类型中 6 种免疫细胞的浸润评分 [NE: 中性粒细胞 (neutrophil)]. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图2 HLA-G 表达水平与免疫浸润相关性分析



A: 噬菌体筛选富集度分析; B: 测序所得氨基酸序列占比; C: 噬菌体单克隆 Sanger 测序峰图; D: ELISA 检测噬菌体与 HLA-G 的结合能力。

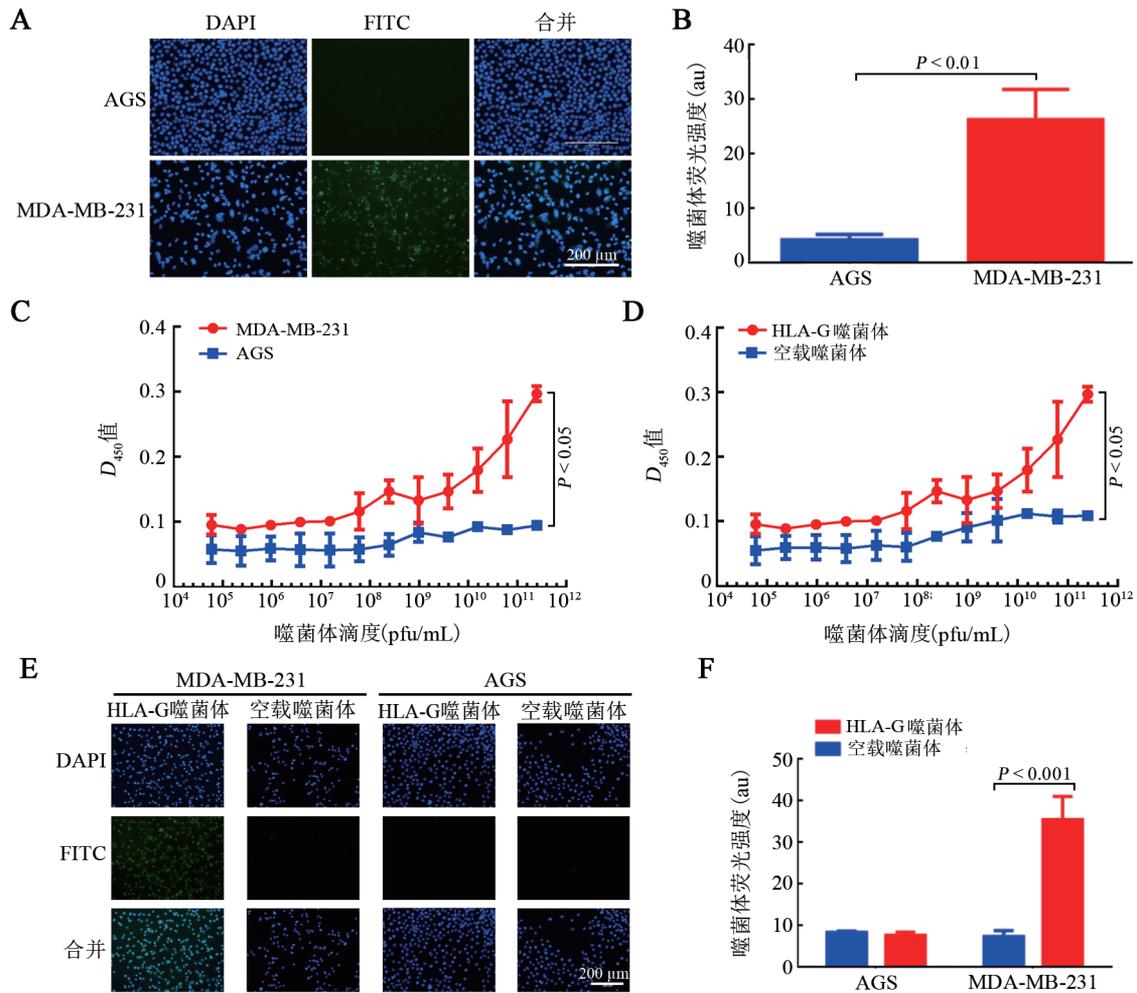
图3 噬菌体展示文库筛选优势克隆

2.5 HGBP 高亲和力结合 HLA-G

经蛋白生产纯化后,进行 SDS-PAGE 及 SEC-HPLC 检测纯度,纯化后蛋白可见符合预期分子量 (17 000) 的产物条带及产物峰,并且诱导后上清液几乎无条带,表明 HGBP 主要以可溶性方式表达(图 5A、B)。获得了纯度高于 90% 的纯化锚定蛋白,蛋白产量可达 80 mg/L 以上。圆二色谱表征结构,表明该蛋白具有正确的螺旋、折叠等蛋白二级结构(图 5C)。

接下来,利用 ELISA 检测锚定蛋白对 HLA-G 抗原的结合能力,结果(图 5D)显示,与 Ctrl BP 相比,HGBP 对 HLA-G 具有更强的结合能力,两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。SPR 法测定结果显示,HGBP 结合 HLA-G 的亲和力达到 17 nmol/L (图 5E)。AlphaFold3 解析蛋白构象(图 5F)显示,HGBP 具有多个 α 螺旋结构,从 N 端向 C 端可分为 5 个结构域,其中第 2、3、4 结构域包含可变区,即与 HLA-G 抗原结合

的位点,两端的1、5结构域为非可变区骨架结构。以上结果表明,HGBP通过可变区对HLA-G实现高亲和力结合。



A、B:免疫荧光染色法检测HLA-G在MDA-MB-231和AGS细胞表面的表达;C:ELISA检测HLA-G噬菌体对MDA-MB-231及AGS细胞的结合能力;D:ELISA检测噬菌体对MDA-MB-231细胞的结合能力;E、F:噬菌体免疫荧光染色法检测噬菌体与MDA-MB-231和AGS细胞的结合能力。

图4 优势噬菌体克隆功能评价

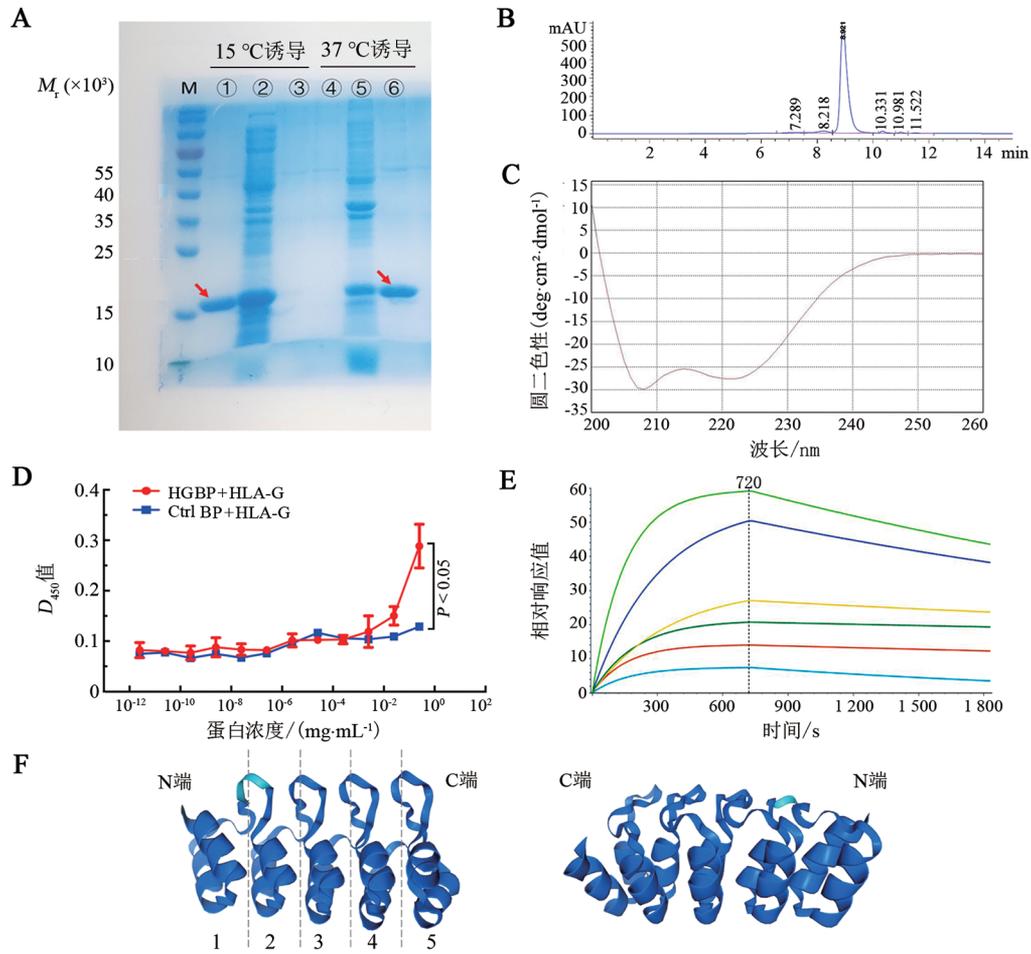
2.6 HGBP 特异性结合 HLA-G 阳性肿瘤细胞

利用HGBP对MDA-MB-231细胞和AGS细胞进行免疫荧光染色,结果(图6A、B)显示,代表HGBP对HLA-G阳性MDA-MB-231细胞结合能力的荧光强度显著高于其他组($P < 0.01$)。实验结果表明,经文库筛选获取的HGBP对表达HLA-G的肿瘤细胞具有特异性结合能力。

3 讨论

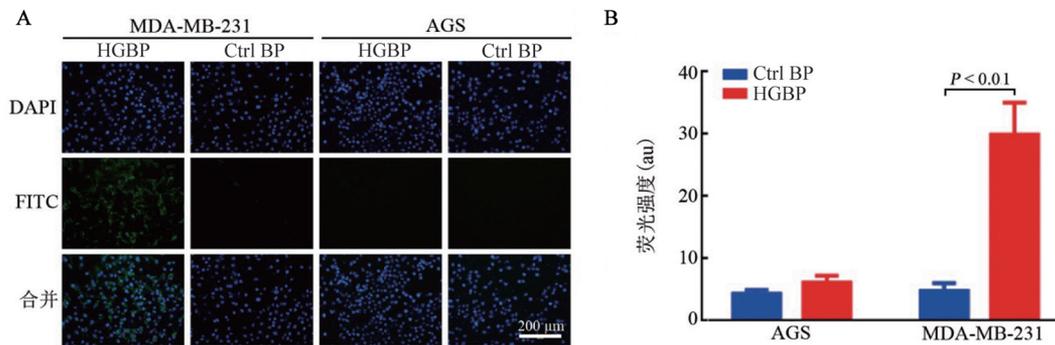
HLA-G在多种肿瘤组织中表达水平显著高于正常组织,作为肿瘤细胞膜表面标志物,能与肿瘤免疫微环境中多种免疫细胞(T细胞、B细胞、DC、NK细胞和巨噬细胞)表达的ILT结合,抑制免疫应答,形成抑

制性免疫微环境^[13]。研究^[14]显示,HLA-G还参与解整合素-金属蛋白酶12(a disintegrin and metalloproteinase domain 12, ADAM12)、神经细胞黏附分子1(neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)和神经纤毛蛋白1(neuropilin 1, NRP1)相关信号通路,调控血管生成、钙流动及线粒体动力学,促进肿瘤发生发展。因此,HLA-G靶向治疗不仅有望作为免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)解除免疫抑制,还能直接阻断HLA-G介导的多种促癌通路,极具应用潜力。本研究结果显示,HLA-G在THCA、KIRP、KIRC、PAAD组织中呈高表达,且与临床预后及免疫浸润密切相关,提示此类优势癌种人群更有可能从HLA-G靶向治疗中获益。



A: SDS-PAGE(M: 蛋白分子量标准, ①纯化后蛋白, ②纯化前蛋白, ③诱导后上清液, ④诱导后上清液, ⑤纯化前蛋白, ⑥纯化后蛋白; 箭头指示目标产物条带); B: SEC-HPLC 检测纯化后蛋白的纯度; C: 圆二色谱检测纯化后蛋白的二级结构; D: ELISA 检测 HGBP 对 HLA-G 的结合能力; E: SPR 法检测 HGBP 对 HLA-G 分子亲和力; F: HGBP 蛋白构象, 左侧为从 N 端向 C 端展示, 右侧为从 C 端向 N 端展示。

图5 HGBP 纯化质控及亲和力评价



A: 锚定蛋白免疫荧光染色; B: 锚定蛋白荧光强度分析。

图6 HGBP 功能评价

HLA-G 有多种同源异构体, 它们的胞外结构多数含有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 亚基, 其中 $\alpha 3$ 亚基是与 T 细胞、NK 细胞、DC 表面 ILT-2/4 相互结合并抑制免疫功能的关键结构域^[15-17]。研究^[18]表明, HLA-G 与 $\beta 2m$ 蛋白相关型同源异构体 (HLA-G1/ $\beta 2m$ -associated) 以及非相关型同源异构体 (HLA-G1/ $\beta 2m$ -free) 这两种亚型, 是与 ILT-2/4 相互作

用的主要亚型。有研究者^[10]针对其包含的 $\alpha 3$ 亚基开发了抗 HLA-G 单克隆抗体 (mAb) (15E7), 衍生的 CAR-T 细胞在体内外实验中均显示出较强的肿瘤杀伤能力。在本研究中, 进一步筛选靶向锚定蛋白特异性结合 HLA-G, 采用噬菌体展示靶向锚定蛋白文库筛选的策略, 选取了 HLA-G $\alpha 3$ 亚基中家族同源性最低的一段序

列(VTHHPVFDYEATLRC)作为筛选靶点,经噬菌体展示靶向锚定蛋白文库筛选,成功获取到一株优势克隆,经ELISA、免疫荧光染色验证了该HLA-G噬菌体克隆对HLA-G具有特异性结合能力,对肿瘤细胞的结合依赖于HLA-G的膜表达。进一步地,在纯化HGBP后,通过ELISA确认其可结合HLA-G分子,并通过定量SPR检测发现该靶向锚定蛋白与HLA-G亲和力达17 nmol/L,显示出较强的结合能力。在细胞结合能力评价中,HGBP可实现对HLA-G阳性细胞的特异性结合,与HLA-G阴性细胞几乎无结合,具有较强的靶向特异性,显示出临床应用潜力。随着抗PD-1、抗CTLA4等ICI研究的开展^[19-20],抗HLA-G相关药物有望成为新一代ICI。根据Clinicaltrials网站记录,目前有6项HLA-G相关临床试验注册(NCT05672459、NCT04613297、NCT04485013、NCT04300088、NCT05769959和NCT04991740),涉及CAR-T细胞、mAb、双特异性T细胞接合剂(bispecific T-cell engager, BiTE)等,均处于I期临床试验阶段。文献^[21]报道,靶向HLA-G的T细胞接合剂(JNJ-78306358,抗HLA-G×CD3)不仅可通过CD3端激活T细胞,还可通过HLA-G端阻断免疫抑制,在入组的34例晚期实体瘤患者中,50%患者评价为疾病稳定(SD),其中2例有长达40周的SD,所有入组患者均未出现3级或以上细胞因子释放综合征,具有较好的安全性。

靶向锚定蛋白是一类具有锚蛋白重复序列的新型小分子结合蛋白^[22-23],可变区结构域可形成高亲和力的靶向锚定结合蛋白,突变其关键位点氨基酸,即形成靶向锚定蛋白文库^[24]。靶向锚定蛋白相比于传统抗体药物,具有分子量小(约17 000)、水溶性好、亲和力高、肿瘤穿透性强、生产便捷、高效等特点^[25-26],在肿瘤靶向免疫治疗领域逐渐受到关注,多款新型药物进入临床试验(例如MP0310,靶点为FAP×4-1BB^[27];MP0317,靶点为FAP×CD-40^[28]等)。此外,靶向锚定蛋白易于构建多价融合蛋白或修饰多种功能结构域,生产纯化便捷高效。本研究筛选鉴定的HGBP具有纳摩尔级亲和力,未来可作为肿瘤靶向端,有望拓展应用于CAR-T细胞、免疫细胞接合剂、抗体偶联药物等肿瘤靶向免疫治疗,以目前进展最快的HLA-G×CD3双抗为例,将已报道的CD3靶向蛋白^[29]与本研究中HLA-G靶向蛋白融合表达,可形成新型T细胞接合剂,激活T细胞对HLA-G阳性肿瘤细胞的靶向杀伤,该类新型BiTE药物有望进入临床转化应用。另外,由于HLA-G具有免疫检查点特性,而HGBP结合的抗原区域正是位于HLA-G产生免疫细胞相互作用的 $\alpha 3$ 亚基,因此HGBP不仅可作为靶向模块应用于各类药物开发,还有望作为ICI应用于肿

瘤免疫治疗,相关调控机制值得进一步深入探究。

本研究也存在不足之处,HGBP的亲合力仍需进一步提高。未来将采用多价融合蛋白形式,以二价或三价形式提升整体蛋白对HLA-G的亲合力,并将其作为肿瘤靶向结构域应用于免疫细胞治疗或融合蛋白治疗,进一步评价抗肿瘤疗效及安全性。

综上所述,本研究通过噬菌体展示文库技术筛选出针对HLA-G的靶向锚定蛋白HGBP,其具有较高亲和力以及较强的特异性结合功能,为靶向HLA-G新药物开发提供了新的靶向端蛋白序列,具有成为新型免疫ICI的潜力,显示出一定的临床转化应用价值。

[参考文献]

- [1] MANDEL I, HAVES ZIV D, GOLDSHEIN I, *et al.* BND-22, a first-in-class humanized ILT2-blocking antibody, promotes antitumor immunity and tumor regression[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(9): e004859[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36096532/>. DOI:10.1136/jitc-2022-004859.
- [2] MAO J, FENG Y, ZHU X F, *et al.* The molecular mechanisms of HLA-G regulatory function on immune cells during early pregnancy [J/OL]. *Biomolecules*, 2023, 13(8): 1213[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37627278/>. DOI:10.3390/biom13081213.
- [3] LINTAO R C V, RICHARDSON L S, KAMMALA A K, *et al.* PGRMC2 and HLA-G regulate immune homeostasis in a microphysiological model of human maternal-fetal membrane interface [J/OL]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 1041[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39179795/>. DOI:10.1038/s42003-024-06740-2.
- [4] SUAREZ-TRUJILLO F, JUAREZ I, VAQUERO-YUSTE C, *et al.* The immune modulation HLA-G*01: 01: 01 full allele is associated with gastric adenocarcinoma development[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10645[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39408976/>. DOI:10.3390/ijms251910645.
- [5] WANG S Y, WANG J X, XIA Y, *et al.* Harnessing the potential of HLA-G in cancer therapy: advances, challenges, and prospects[J/OL]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 130[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38310272/>. DOI:10.1186/s12967-024-04938-w.
- [6] LIN A F, YAN W H. HLA-G/ILTs targeted solid cancer immunotherapy: opportunities and challenges[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 698677 [2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34276691/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.698677.
- [7] WANG J, CHAI Q Y, LEI Z H, *et al.* LILRB1-HLA-G axis defines a checkpoint driving natural killer cell exhaustion in tuberculosis[J]. *EMBO Mol Med*, 2024, 16(8): 1755-1790. DOI: 10.1038/s44321-024-00106-1.
- [8] MARIMPIETRI D, CORRIAS M V, TRIPODI G, *et al.* Immunomodulatory properties of extracellular vesicles isolated from bone marrow of patients with neuroblastoma: role of PD-L1 and HLA-G[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1469771[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39512342/>. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1469771.
- [9] 王若瑜, 白崇智, 仲启明, 等. 人乳头瘤病毒16型纳米抗体的筛选

- 及鉴定[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(12): 1211-1217. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.006.
- [10] HAMPTON J T, LIU W R. Diversification of phage-displayed peptide libraries with noncanonical amino acid mutagenesis and chemical modification[J]. Chem Rev, 2024, 124(9): 6051-6077. DOI:10.1021/acs.chemrev.4c00004.
- [11] ISTOMINA P V, GORCHAKOV A A, PAOIN C, *et al.* Phage display for discovery of anticancer antibodies[J]. N Biotechnol, 2024, 83: 205-218. DOI:10.1016/j.nbt.2024.08.506.
- [12] ZENG D Q, YE Z L, SHEN R F, *et al.* IOBR: multi-omics immunology biological research to decode tumor microenvironment and signatures[J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 687975[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34276676/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.687975.
- [13] DURMANOVA V, MIKOLASKOVA I, ZSEMLYE E, *et al.* Association of HLA-G expression, its genetic variants and related neuro-immunomodulation with characteristics of bladder carcinoma [J/OL]. Cancers, 2024, 16(22): 3877[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39594832/>. DOI:10.3390/cancers16223877.
- [14] TRONIK-LE ROUX D, DAOUYA M, PORAS I, *et al.* HLA-G neo-expression modifies genetic programs governing tumor cell lines [J/OL]. Cancer Immunol Immunother, 2024, 73(12): 247[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39358558/>. DOI: 10.1007/s00262-024-03768-5.
- [15] CHEN Q Y, ZHOU W J, ZHANG J G, *et al.* Prognostic significance of the immune checkpoint HLA-G/ILT-4 in the survival of patients with gastric cancer[J/OL]. Int Immunopharmacol, 2022, 109: 108798[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35569305/>. DOI:10.1016/j.intimp.2022.108798.
- [16] LOUSTAU M, ANNA F, DRÉAN R, *et al.* HLA-G neo-expression on tumors[J/OL]. Front Immunol, 2020, 11: 1685[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32922387/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.01685.
- [17] ATTIA J V D, DESSENS C E, VAN DE WATER R, *et al.* The molecular and functional characteristics of HLA-G and the interaction with its receptors: where to intervene for cancer immunotherapy?[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8678[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33213057/>. DOI: 10.3390/ijms21228678.
- [18] ANNA F, BOLE-RICHARD E, LEMAULT J, *et al.* First immunotherapeutic CAR-T cells against the immune checkpoint protein HLA-G[J/OL]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e001998 [2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33737343/>. DOI: 10.1136/jitc-2020-001998.
- [19] 刘宝瑞. 实体肿瘤免疫治疗的关键问题与对策[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 575-580. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2017.06.001.
- [20] 胡红梅, 于秋红, 杨毅, 等. 基于靶点人源化小鼠的PD-1/CTLA-4双特异性抗体及其IgG1亚型的抗癌活性评价[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(5): 380-386. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.003.
- [21] GEVA R, VIEITO M, RAMON J, *et al.* Safety and clinical activity of JNJ-78306358, a human leukocyte antigen-G (HLA-G) x CD3 bispecific antibody, for the treatment of advanced stage solid tumors [J/OL]. Cancer Immunol Immunother, 2024, 73(10): 205[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39105878/>. DOI: 10.1007/s00262-024-03790-7.
- [22] KONSHINA A G, BOCHAROV E V, KONOVALOVA E V, *et al.* Structural basis of activity of HER2-targeting construct composed of DARPin G3 and albumin-binding domains[J/OL]. Int J Mol Sci, 2024, 25(21): 11370[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39518923/>. DOI:10.3390/ijms252111370.
- [23] XU X S, WANG X X, LI Y, *et al.* Research progress of ankyrin repeat domain 1 protein: an updated review[J/OL]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 131[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39420247/>. DOI:10.1186/s11658-024-00647-w.
- [24] MORSELLI M, HOLTON T R, PELLEGRINI M, *et al.* Design and construction of a designed ankyrin repeat protein (DARPin) display library[J/OL]. Curr Protoc, 2024, 4(1): e960[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38206591/>. DOI:10.1002/cpz1.960.
- [25] SCHNIDER S T, ALESSANDRA VIGANO M, AFFOLTER M, *et al.* Functionalized protein binders in developmental biology[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2024, 40(1): 119-142. DOI:10.1146/annurev-cellbio-112122-025214.
- [26] GABRIELE F, PALERMA M, IPPOLITI R, *et al.* Recent advances on affibody- and DARPin-conjugated nanomaterials in cancer therapy [J/OL]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8680[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37240041/>. DOI:10.3390/ijms24108680.
- [27] SALTARELLA I, LINK A, LAMANUZZI A, *et al.* Improvement of daratumumab- or elotuzumab-mediated NK cell activity by the bispecific 4-1BB agonist, DARPin α -FAPx4-1BB: a preclinical study in multiple myeloma[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2024, 176: 116877[2024-11-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38850654/>. DOI:10.1016/j.biopha.2024.116877.
- [28] RIGAMONTI N, VEITONMÄKI N, DOMKE C, *et al.* A multispecific anti-CD40 DARPin construct induces tumor-selective CD40 activation and tumor regression[J]. Cancer Immunol Res, 2022, 10(5): 626-640. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-21-0553.
- [29] BIANCHI M, REICHEN C, CROSET A, *et al.* The CD33xCD123 xCD70 multispecific CD3-engaging DARPin MP0533 induces selective T cell-mediated killing of AML leukemic stem cells[J]. Cancer Immunol Res, 2024, 12(7): 921-943. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-23-0692.

[收稿日期] 2024-11-29

[修回日期] 2025-05-16

[本文编辑] 党瑞山