

# 新型 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白通过活化肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞促进抗肿瘤疗效

尹智文, 侯继艳, 韩萍<sup>#</sup>, 杨选明<sup>#</sup>

(上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要:** 共抑制和共刺激通路对 T 淋巴细胞活化都是至关重要的, 调节这些通路的抗体都是十分有前景的肿瘤治疗候选物。虽然阻断 PD-L1/PD-1 和 CTLA-4 的抗体在一些肿瘤患者中取得了良好的效果, 但仍有约 70% 的患者对这些治疗反应不佳。许多内在机制, 特别是低肿瘤突变负荷和有限数量的肿瘤浸润淋巴细胞是造成该耐药性的主要原因。为克服这些因素, 课题组设计了新型 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白, 其可以同时增加肿瘤浸润淋巴细胞数量并阻断 PD-1/PD-L1 免疫抑制通路。IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白在体内外均显示出活化 T 淋巴细胞能力, 这有助于后者提高有效的体内抗肿瘤活性。综上, 课题组视 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白应用于临床为肿瘤免疫治疗新策略。

**关键词:** 肿瘤免疫治疗; IFN- $\alpha$ ; anti-PD-L1; 融合蛋白; CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞

**中图分类号:** R392.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)01-0001-07

近年来肿瘤免疫治疗如细胞因子治疗、过继性 T 淋巴细胞治疗及免疫检查点阻断治疗均显示了持久的临床疗效<sup>[1]</sup>, 尤其是免疫检查点阻断治疗取得了重大突破。

PD-L1 作为 PD-1 的配体, 也被称为 CD274、B7-H1, 于 1999 年由当时在梅约诊所的陈列平教授发现<sup>[2]</sup>。PD-L1 广泛表达于多种造血及非造血类细胞, 此外, PD-L1 也在某些肿瘤细胞上表达。当肿瘤微环境中的 PD-L1 与 T 淋巴细胞表面的 PD-1 结合后, 肿瘤特异性靶向 T 淋巴细胞的活化受到抑制, 诱导免疫耐受, 并介导肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[3]</sup>。研究表明, anti-PD-L1 可阻断 PD-1/PD-L1 通路, 解除 PD-L1 对免疫细胞的抑制, 从而恢复后者杀伤肿瘤细胞的能力<sup>[4-5]</sup>。大量临床数据显示, anti-PD-L1 治疗需要患者肿瘤组织内有较多的淋巴细胞浸润以及较高水平的 PD-L1, 否则该疗法的效果较局限<sup>[3]</sup>。

IFN- $\alpha$  属于 I 型 IFN, 是最早被应用于临床实验的 IFN<sup>[6]</sup>。大多数细胞在受到 TLR 刺激后都能够表达 IFN- $\alpha$ <sup>[7-8]</sup>。多年研究证明其在抗病毒和抗肿瘤反应中起着十分重要的作用<sup>[9-11]</sup>, 因此 IFN- $\alpha$

被用于治疗多种肿瘤<sup>[12]</sup>。近年来, 随着对 IFN- $\alpha$  研究的逐渐深入, 研究者发现其抗肿瘤作用的主要原因为 IFN- $\alpha$  可作用于机体免疫细胞, 激活系统性抗肿瘤免疫反应<sup>[10]</sup>。此外, IFN- $\alpha$  还能够诱导淋巴细胞活化和浸润, 有助于改善肿瘤微环境对免疫细胞的抑制作用<sup>[13-14]</sup>。然而, 大剂量及长时间的 IFN- $\alpha$  治疗不仅容易引起不良反应, 还能使 PD-L1 表达水平显著升高, 产生耐药反应<sup>[15]</sup>。

因此本研究设计了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白, 其具有 IFN- $\alpha$  和 anti-PD-L1 两种蛋白的功能。该融合蛋白将细胞因子治疗及免疫检查点阻断治疗两种免疫治疗方法结合到一起, 发挥二者的长处, 有望为肿瘤免疫治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** OT-I 转基因小鼠, 购自美国 Jackson 实验室; *Ifnar1*<sup>-/-</sup> C57BL/6 小鼠, 由芝加哥大学 Anita Chong 博士馈赠; C57BL/6 小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有动物饲养于 12 h/12 h 昼夜交替、(24.0±0.5) °C 室温环境中, 自由摄食和饮水。本研究对动物的处理符合国际实验动物使用准则及上海交通大学实验动物伦理与使用章程。

**1.2 细胞及试剂** Lenti-X 293T 细胞、B16-OVA 细胞、*PD-L1*<sup>-/-</sup> B16-OVA 细胞, 均为本实验室保存的细胞系。OPTI-MEM、DMEM、RPMI 1640 等

收稿日期: 2018-05-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671643)

作者简介: 尹智文(1993-), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学研究

通信作者: 杨选明(E-mail: xuanmingyang@sju.edu.cn); 韩萍(E-mail: esterhanping@sju.edu.cn); # 为共同通信作者

培养液, 购自美国 Hyclone 公司; 双抗、胎牛血清 (fetal calf serum, FCS), 购自美国 Gibco 公司; 实验所用抗体, 购自美国 BioLegend 或 eBioscience 公司; T 淋巴细胞纯化试剂盒, 购自加拿大 STEMCELL 公司; 鼠 IFN- $\gamma$  检测 CBA 试剂盒, 购自美国 BD 公司; SDS-PAGE 预制胶, 购自上海瑞楚生物科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白的表达与纯化

IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白质粒 pCDHEF- $\alpha$ -mPD-L1-6Fc 与 mIFN- $\alpha$ 4-9Fc 由本实验室保存, 将其瞬时转染到 Lenti-X 293T 细胞中, 细胞连续培养 5 d 后收集上清, 进行 ELISA 检测以及蛋白质纯化, 纯化后将蛋白质分装并置 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 细胞培养与刺激 将所需的不同类型细胞 ( $1 \times 10^5$  个 B16-OVA 细胞、 $4 \times 10^5$  个 T 淋巴细胞) 接种于 96 孔培养板, 加入 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白 ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中共培养 72 h。收集细胞, 并进行相关细胞表面分子或胞内分子的流式细胞术检测。

1.3.3 MTT 细胞增殖实验 将  $5 \times 10^3$  个 B16-OVA 细胞分别与等摩尔浓度的 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白一起置于 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中共培养 72 h。在培养结束前 3 h 将 20  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL) 加入各孔中, 每孔再加入 200  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L HCl/异丙醇, 置摇床 (80 r/min) 室温孵育 30 min, 酶标仪读取 D (570 nm)。

1.3.4 T 淋巴细胞刺激实验 取小鼠脾脏, 研磨后加入 2 mL 1 $\times$ ACK 裂解红细胞 2 min, PBS 中和后, 离心弃上清, 获得淋巴细胞。利用 T 淋巴细胞纯化试剂盒获得 T 淋巴细胞后, 用含 9% FCS

的 RPMI 1640 培养液重悬, 并置于 96 孔板中。加入 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白 ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中共培养 72 h。收集上清液, CBA 试剂盒检测 IFN- $\gamma$  水平以评估 T 淋巴细胞活化程度。

1.3.5 体内肿瘤治疗实验 取 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠, 将  $5 \times 10^5$  个 B16-OVA 细胞接种于小鼠右侧背部皮下。1 周后测量小鼠肿瘤大小 (长 $\times$ 宽 $\times$ 高/2) 并给予融合蛋白治疗, 每隔 3 d 进行测量及治疗, 共测量 5 次, 治疗 2 次。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 软件分析各组实验数据, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白的设计与鉴定

将 IFN- $\alpha$ 4 编码 DNA、anti-PD-L1 编码 DNA 分别与 6Fc、9Fc 融合, 6Fc、9Fc 是工程改造后只能形成异源二聚体的 Fc<sup>[16]</sup>。经过该设计, 所得融合蛋白只能是 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 组合, 而没有 IFN- $\alpha$ /IFN- $\alpha$  或 anti-PD-L1/anti-PD-L1 组合 (图 1A)。将 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白的重组质粒 pCDHEF- $\alpha$ -mPD-L1-6Fc 与 mIFN- $\alpha$ 4-9Fc 转入 Lenti-X 293T 细胞中以进行表达, 收集培养 5 d 后的上清液, ELISA 测定蛋白质浓度 (图 1B)。利用 Protein A 磁珠纯化 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白, 并对融合蛋白进行 SDS-PAGE 分析以确定 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白的异源二聚体组成和相对分子质量大小。结果显示 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白与其相应的对照蛋白 IFN- $\alpha$ 、anti-PD-L1 相对分子质量相同 (图 1C)。

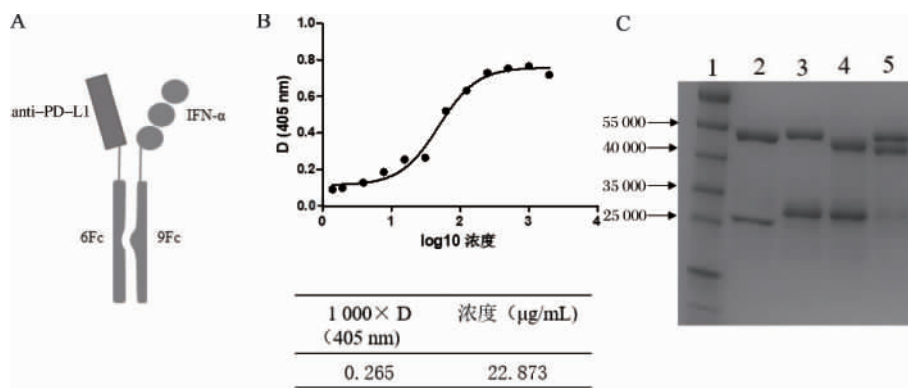


图 1 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白的设计与鉴定

注: A. IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白结构图; B. ELISA 标准品西妥昔单抗的浓度曲线及上清稀释 1 000 倍后测得的 D (405 nm) 以及计算后原液中的蛋白质浓度; C. 1: 蛋白标准品, 2: 西妥昔单抗, 3: IFN- $\alpha$ , 4: anti-PD-L1, 5: IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1

**2.2 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白中 IFN- $\alpha$  功能的鉴定** IFN- $\alpha$  能够上调细胞表面 MHC I 类分子、PD-L1 表达水平，因此本研究利用 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白刺激 B16-OVA 细胞 30 min，检测 MHC I 类分子、PD-L1 表达水平。结果发现刺激后 B16-OVA 细胞表面 MHC I 类分子(图 2A)、PD-L1(图 2B)的表达水平显著升高。此外，JAK-STAT 是 IFN- $\alpha$  发挥肿瘤杀伤作用的下游信号通路，本研究也发现经 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 刺激后 B16-OVA 细胞的 STAT1 磷酸化水平显著提高(图 2C,  $P <$

0.01)。IFN- $\alpha$  具有抑制肿瘤细胞生长的功能，因此本研究用等摩尔浓度(1.8 nmol/L)的 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白和 IFN- $\alpha$  刺激 B16-OVA 细胞。MTT 实验发现 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白或 IFN- $\alpha$  均能显著抑制 B16-OVA 细胞生长( $P <$  0.001)，证明了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白有与 IFN- $\alpha$  相似的肿瘤细胞增殖抑制功能(图 2D)。综上，本研究从三方面验证并得出结论——IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白具有 IFN- $\alpha$  蛋白的功能。

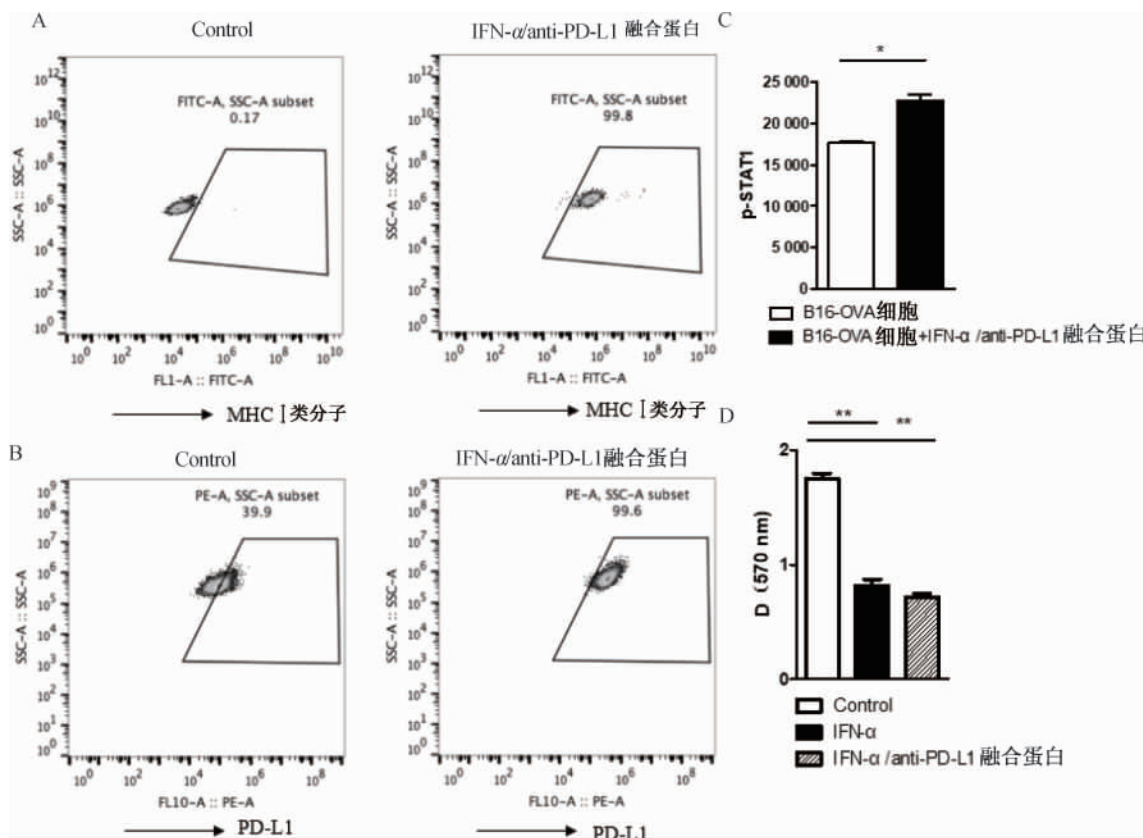


图 2 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白中 IFN- $\alpha$  部分的功能鉴定

注: A~C. B16-OVA 细胞与 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白共培养后流式细胞术检测 MHC I 类分子(A)、PD-L1(B)、p-STAT1(C)表达水平; D. B16-OVA 细胞与 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白共培养后 MTT 检测细胞增殖水平。\*  $P <$  0.01, \*\* $P <$  0.001

**2.3 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白中 anti-PD-L1 功能的鉴定** 将 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白作为一抗(1  $\mu$ g/mL)分别与 PD-L1<sup>+/+</sup> B16-OVA 细胞、PD-L1<sup>-/-</sup> B16-OVA 细胞共孵育，后通过检测融合蛋白上的 hFc 片段以确认融合蛋白是否与 B16-OVA 细胞表面的 PD-L1 结合。结果显示，IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白组与 anti-PD-L1 组(阳性对照)相同，能够与 PD-L1<sup>+/+</sup> B16-OVA 细胞结合，而不能与 PD-L1<sup>-/-</sup> B16-OVA 细胞结合(图 3A)。Anti-

PD-L1 具有阻断 PD-1-PD-L1 通路、活化 T 淋巴细胞的能力，故本研究将 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白与 OT- I 转基因小鼠纯化出的 T 淋巴细胞、B16-OVA 细胞共培养，检测其上清中 IFN- $\gamma$  的分泌量，以证明 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白中 anti-PD-L1 对 T 淋巴细胞的刺激能力。结果显示 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白与 OT- I 转基因小鼠脾脏中纯化出的 T 淋巴细胞、B16-OVA 细胞共培养后能够显著增加 T 淋巴细胞 IFN- $\gamma$  的表达水平，表明

IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白能够刺激 T 淋巴细胞活化(图 3B,  $P < 0.001$ )。此外,为排除融合蛋白中 IFN- $\alpha$  对实验结果的影响,本研究又取了 *Ifnar1*<sup>-/-</sup> C57BL/6 小鼠脾脏,将其纯化出的 T 淋巴细胞与抗 mCD3、IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白共培养,结果发现 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白与 *Ifnar1*<sup>-/-</sup> C57BL/6 小鼠脾脏中纯化出的 T 淋巴细

胞、抗 mCD3 抗体共培养后,也同样能够提高 IFN- $\gamma$  的表达水平(图 3C,  $P < 0.001$ ),这进一步说明了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白具有与 anti-PD-L1 相似的刺激 T 淋巴细胞活化的功能。综上,课题组从两方面验证并得出结论,IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白具有 anti-PD-L1 的功能。

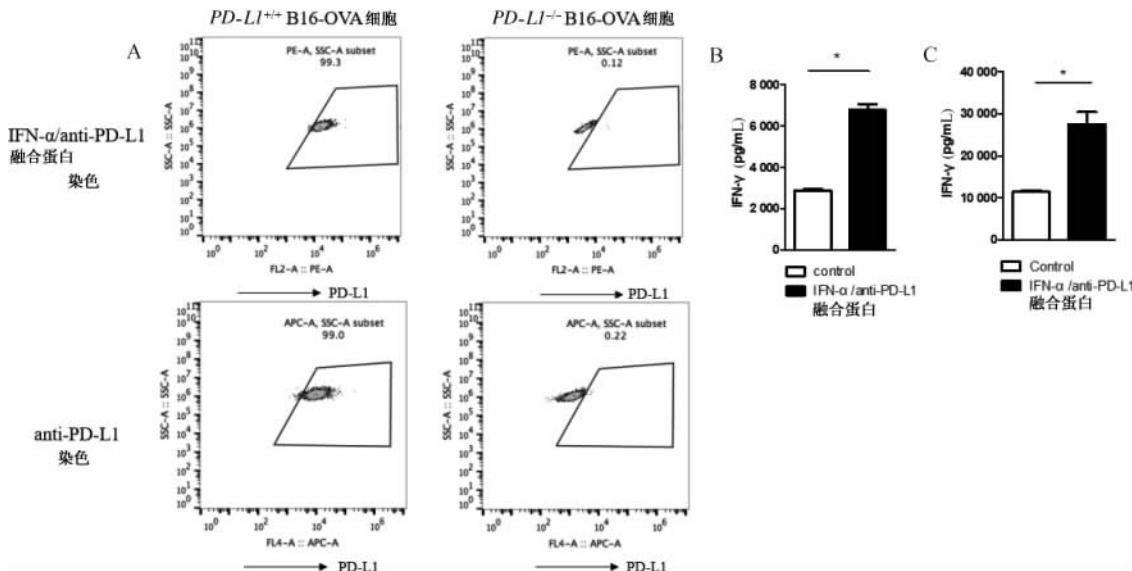


图 3 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白中 anti-PD-L1 部分的功能鉴定

注:A. 将 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白作为一抗分别与 *PD-L1*<sup>+/+</sup> B16-OVA 细胞、*PD-L1*<sup>-/-</sup> B16-OVA 细胞作用后,再用抗 hFc-藻红蛋白抗体作为二抗与之作用,并进行流式细胞术检测分析;B. 经纯化后得到的 OT-I 转基因小鼠 T 淋巴细胞,将之与 B16-OVA 细胞、IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白(1  $\mu$ g/mL)共培养 72 h 后,CBA 试剂盒检测上清中 IFN- $\gamma$  水平;C. 经纯化后得到的 *Ifnar1*<sup>-/-</sup> 转基因小鼠 T 淋巴细胞,将之与抗 mCD3(0.1  $\mu$ g/mL)、IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白(1  $\mu$ g/mL)共培养 72 h 后,CBA 试剂盒检测上清中 IFN- $\gamma$  水平。 $*P < 0.001$

**2.4 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白体内抗肿瘤功能鉴定** 为验证 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白体内的抗肿瘤作用,本研究用 C57BL/6 小鼠建立了 B16-OVA 皮下肿瘤模型。肿瘤接种 1 周后,瘤内注射 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白进行治疗。结果显示,与对照组相比,IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白治疗能够显著抑制肿瘤生长( $P < 0.001$ ),证明 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白在体内有着显著的抗肿瘤功能(图 4A)。肿瘤内部淋巴细胞浸润数量与免疫检查点抑制剂的疗效密切相关,而 IFN- $\alpha$  具有诱导淋巴细胞活化和浸润的功能,故本研究检测了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白治疗后肿瘤部位淋巴细胞的浸润情况。结果显示,IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白治疗与对照组相比能够显著增加肿瘤部位 CD45<sup>+</sup> 淋巴细胞浸润数量(图 4B,  $P < 0.05$ )。体外实验已知 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白能够刺激 T 淋巴细胞活化,且 B16-OVA 肿瘤表达 OVA 蛋

白,能够产生抗原特异性的 OT-I,被携带 MHC I 类分子的 APC 提呈并活化 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞。因此本研究在此基础上,为进一步验证 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白在体内是否能够刺激肿瘤特异性 T 淋巴细胞活化,进行了以下实验:取 2 次治疗后第 3 天的小鼠脾脏,获取淋巴细胞,并加入 OT-I 刺激,72 h 后检测上清 IFN- $\gamma$  的水平。结果显示 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白与对照组相比能够显著提高 IFN- $\gamma$  的表达量( $P < 0.001$ ),证明 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白能够在体内活化 T 淋巴细胞(图 4C)。此外,为进一步确认哪类淋巴细胞参与到 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白体内抗肿瘤效应过程中,本研究进行了 T 淋巴细胞删除实验。结果显示,当 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞被删除后,融合蛋白治疗组与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞删除组相比并没有显著区别,说明 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞对 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白体内抗肿瘤功能的发挥不重要(图 4D);

而当 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞被删除后,融合蛋白治疗组与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞删除组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),说明 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞是 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白发挥抗肿瘤功能的关键细胞

(图 4E)。综上所述,IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白具有显著的抗肿瘤作用,且 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞在其中发挥关键作用。

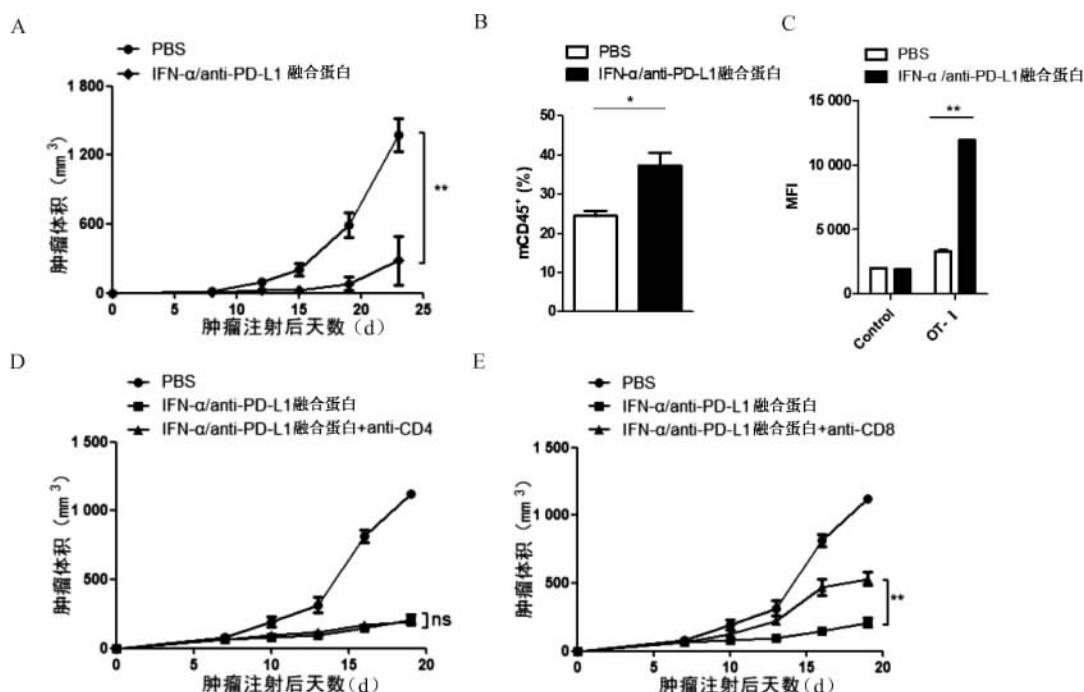


图 4 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白体内抗肿瘤功能鉴定

注:A. 在 WT C57BL/6 小鼠(每组 5 只)皮下注射  $5 \times 10^5$  个 B16-OVA 细胞,并于肿瘤注射后第 7 天、第 10 天瘤内注射  $6 \mu\text{g}$  IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白,每周测量并比较肿瘤体积 2 次;B. 在 WT C57BL/6 小鼠(每组 3 只)皮下注射  $5 \times 10^5$  个 B16-OVA 细胞,并在肿瘤注射后第 7 天瘤内注射  $10 \mu\text{g}$  IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白,3 d 后分离肿瘤浸润淋巴细胞并进行流式分析;C. 前期步骤与 A 相同,最后一次治疗 3 d 后取出淋巴细胞,与 OT-I 共培养重刺激后,CBA 试剂盒检测上清中 IFN- $\gamma$  水平;D~E. 前期步骤与 A 相同,于肿瘤注射后第 7 天、第 10 天腹腔注射  $200 \mu\text{g}$  anti-CD4(D)、anti-CD8(E),每周测量并比较肿瘤体积 2 次。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ , ns: 差异无统计学意义

### 3 讨论

基于目前已有的大量数据和对免疫系统的了解,研究者普遍认为无论是机体自发还是治疗干预,抗肿瘤 T 淋巴细胞免疫的产生均需经过 3 个阶段<sup>[1]</sup>: (1)APC(主要是 DC)识别肿瘤抗原,DC 受到活化信号刺激并成熟<sup>[17-18]</sup>; (2)成熟并且携带肿瘤抗原的 DC 转移到淋巴结,并在此刺激活化 T 淋巴细胞,产生抗肿瘤 T 淋巴细胞反应<sup>[19]</sup>; (3)活化后的 T 淋巴细胞进入肿瘤病灶处对其进行特异性杀伤。

PD-1-PD-L1 通路在抗肿瘤 T 淋巴细胞免疫应答产生的第一和第三阶段都有抑制作用。研究者已经发现 PD-1 在许多免疫细胞上都有表达,如单核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、DC 等<sup>[20]</sup>。而 PD-L1 则在肿瘤细胞和 APC 上有所表达<sup>[21]</sup>。PD-L1

与 T 淋巴细胞表面 PD-1 结合可以导致 T 淋巴细胞功能紊乱、耗竭和被清除<sup>[22-23]</sup>。当肿瘤免疫反应进入第三阶段后,活化的 T 淋巴细胞进入肿瘤病灶处,会因为肿瘤细胞表面表达的 PD-L1 而使其不能发挥出良好的抗肿瘤功能。本实验中设计的 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白包含 anti-PD-L1,能够通过阻断 PD-1 通路刺激活化 T 淋巴细胞,使其发挥出抗肿瘤作用。通过细胞删除实验课题组发现 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞对于 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白发挥抗肿瘤功能至关重要,而通过体内外实验课题组也证明了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 能够刺激活化 T 淋巴细胞,从而更好地抑制肿瘤生长。

IFN- $\alpha$  在临床试验中之所以能够发挥不错的抗肿瘤作用,很大程度上在于其能够作用于机体免疫细胞<sup>[24]</sup>。其通过与受体 IFNAR 结合,可活化免疫细胞,发挥抗肿瘤作用<sup>[25]</sup>。DC 是这些活化细胞中

十分重要的一员, I 型 IFN 能够促进 DC 活化<sup>[26]</sup>, 增强其抗原提呈能力从而激活抗肿瘤 T 淋巴细胞反应。本研究尝试通过 anti-CD11c 删除 DC, 来检测 DC 是否参与到 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白抗肿瘤功能中。虽然有文献报道了一定的删除效率, 但是该抗体在课题组实验中不能有效删除 DC, 导致肿瘤生长曲线与对照组没有显著差异(数据未显示)。但根据以往诸多的研究本团队仍然认为 DC 有可能参与到 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白介导的抗肿瘤效应中, 运用 DC 条件性敲除小鼠 CD11c-DTR 将能更好地回答该问题。

此外 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白也在一定程度上克服了其所包含的 2 种蛋白的局限性。本实验验证了 IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白能够发挥 IFN- $\alpha$  部分功能, 即上调肿瘤细胞表面 PD-L1 表达水平, 增加肿瘤部位淋巴细胞浸润, 从而克服 anti-PD-L1 需要患者肿瘤部位有较高 PD-L1 表达水平以及较多淋巴细胞浸润这一局限性。IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 融合蛋白相比于其所含的单独 2 种蛋白, 能够更全面地参与到肿瘤免疫产生的 3 个阶段当中, 从而更好地使机体发挥抗肿瘤作用。

综上所述, 本实验将 IFN- $\alpha$  与 anti-PD-L1 融合成一个蛋白——IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 的设计能够在一定程度上克服当前 PD-L1 阻断治疗的局限性, 也为今后肿瘤免疫治疗领域提供了一种新的治疗方式。该治疗方式无论是单独使用, 还是与其他治疗手段联用, 都将会为更好地治疗肿瘤提供理论依据及指导。

## 参考文献

- [1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489.
- [2] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-3391.
- [3] Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, *et al.* PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 561.
- [4] Wang Q, Wu X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 210-219.
- [5] 闵愨, 吴霞. PD-1/PD-L1 阻断治疗及其疗效预测研究进展[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(3): 261-265.
- [6] Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, *et al.* Immunotherapy of cancer in 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(5): 309-335.
- [7] Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, *et al.* Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity[J]. *Ann Rev Immunol*, 2005, 23: 307-336.
- [8] Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 373-381.
- [9] Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, *et al.* Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(7): 709-718.
- [10] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(11): 836-848.
- [11] Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(12): 1219-1226.
- [12] Kirkwood J. Cancer immunotherapy: The interferon-alpha experience[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(3 Suppl 7): 18-26.
- [13] Cho HJ, Hayashi T, Datta SK, *et al.* IFN-alpha beta promote priming of antigen-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by immunostimulatory DNA-based vaccines[J]. *J Immunol*, 2002, 168(10): 4907-4913.
- [14] Le Bon A, Durand V, Kamphuis E, *et al.* Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8<sup>+</sup> T cell response during cross-priming[J]. *J Immunol*, 2006, 176(8): 4682-4689.
- [15] Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, *et al.* IFN- $\alpha$  directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity[J]. *J Immunol*, 2011, 186(5): 2772-2779.
- [16] Tang H, Wang Y, Chlewicki LK, *et al.* Facilitating T cell infiltration in tumor microenvironment overcomes resistance to PD-L1 blockade[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(3): 285-296.
- [17] Boon T, Coulie PG, van den Eynde BT, *et al.* Human T cell responses against melanoma[J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 175-208.
- [18] Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, *et al.* Epitope landscape in breast and colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 889-892.
- [19] Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets[J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 464-478.
- [20] Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, *et al.* B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders[J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2149-2158.
- [21] Zhang X, Cheng C, Hou J, *et al.* Distinct contribution of PD-L1 suppression by spatial expression of PD-L1 on tumor and non-tumor cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2018.
- [22] Kooi S, Zhang HZ, Patenia R, *et al.* HLA class I expression on human ovarian carcinoma cells correlates with T-cell infiltration *in vivo* and T-cell expansion *in vitro* in low concentrations of recombinant interleukin-2[J]. *Cell Immunol*, 1996, 174(2): 116-128.

- [23] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3360-3365.
- [24] Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36-49.
- [25] Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, *et al.* Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(2): 119-134.
- [26] Yang X, Zhang X, Fu ML, *et al.* Targeting the tumor microenvironment with interferon- $\beta$  bridges innate and adaptive immune responses[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 37-48.

## IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 fusion protein activates tumor specific CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses for anti-tumor efficacy

YIN Zhi-wen, HOU Ji-yan, HAN Ping<sup>#</sup>, YANG Xuan-ming<sup>#</sup> (*School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract:** Both co-inhibitory and co-stimulatory pathways are critical for T cell activation, and antibodies that modulate these pathways are promising cancer therapeutic drug candidates. Indeed, blocking antibodies against PD-L1, PD-1 and CTLA-4 have achieved good results in some cancer patients. However, about 70% of patients do not respond well to these treatments. A lot of intrinsic mechanisms, especially low tumor mutation burden and limited tumor infiltrating lymphocytes contribute to the treatment resistance. To overcome these limitations, we designed an IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 fusion protein, which can simultaneously increase tumor infiltrating lymphocytes and block co-inhibitory PD-1-PD-L1 pathway. The IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 fusion protein showed T cell activating ability both *in vitro* and *in vivo*, which contributes to its potent anti-tumor activity *in vivo*. Taken together, our data indicate that IFN- $\alpha$ /anti-PD-L1 fusion protein may be a new strategy for cancer immunotherapy.

**Key words:** cancer immunotherapy; IFN- $\alpha$ ; anti-PD-L1; fusion protein; CD8<sup>+</sup> T lymphocyte