



北京大学
PEKING UNIVERSITY

新型人源化 PD-L1 纳米抗体的开发及优化

A Novel Humanized PD-L1
Nanobody for Cancer Therapy

小组：G03

成员：马毅骢，杨敏琪，舒颖，邱姗

主讲：邱姗

ABC Project | January 16th, 2022



成员

MEMBERS



马毅骢



杨敏琪



舒颖



邱姗

目录

CONTENTS

01

背景介绍

02

PD-L1 纳米抗体的特征与结构

03

提高纳米抗体的亲和力

04

纳米抗体人源化

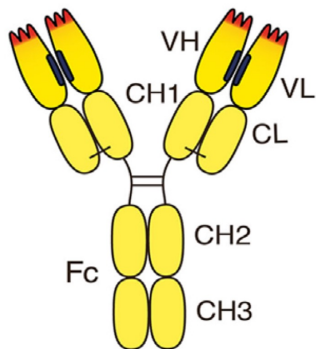
05

总结

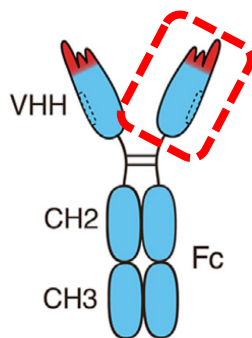
抗体的结构



羊驼



免疫球蛋白



重链抗体

纳米抗体
Nanobody

于 1993 年首次报道，现逐渐成为抗体药物的热门候选

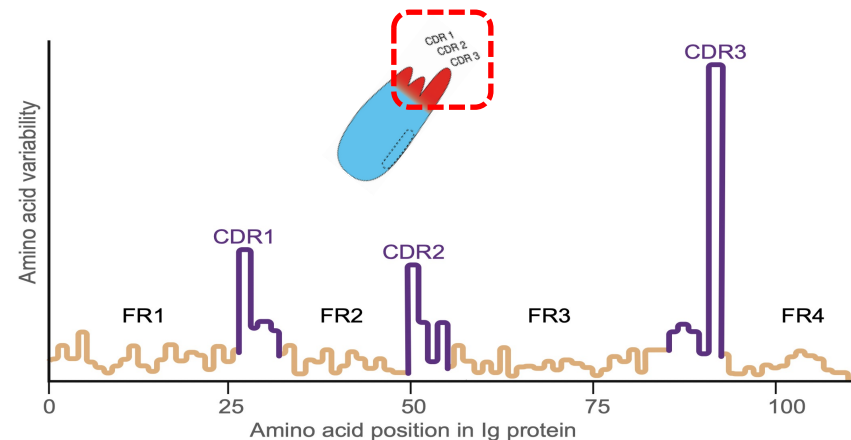
分子量小

稳定性高

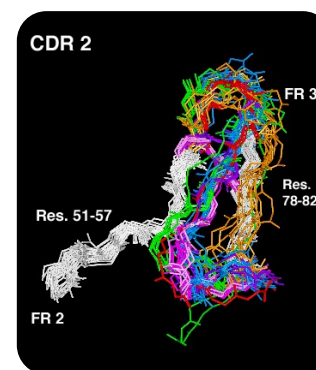
溶解度高

原核生物表达

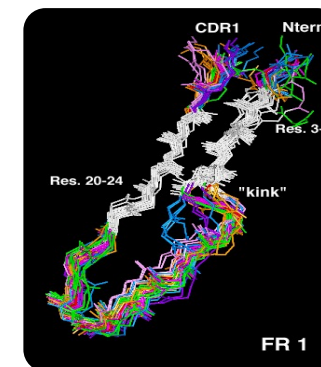
组织渗透性好



三个互补决定区(CDR)由
框架区(FR)相连



CDR 为回环结构



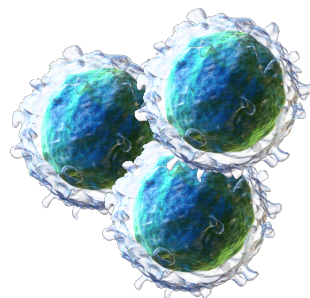
FR 为 β 片层结构

(图片来自 Aho Amazing Atlas of Antibody Anatomy)

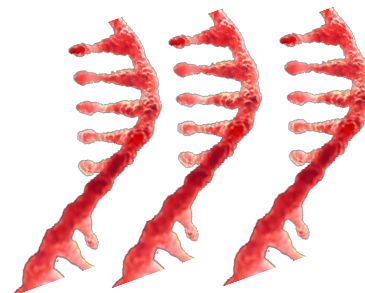
噬菌体展示技术



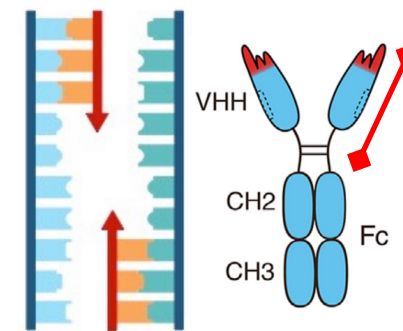
1. 免疫羊驼
周期为 6 个月



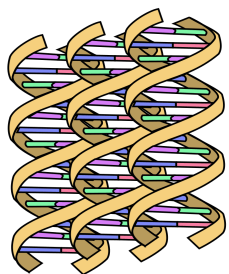
2. 从 100mL 的血液样品中
提取 B 细胞



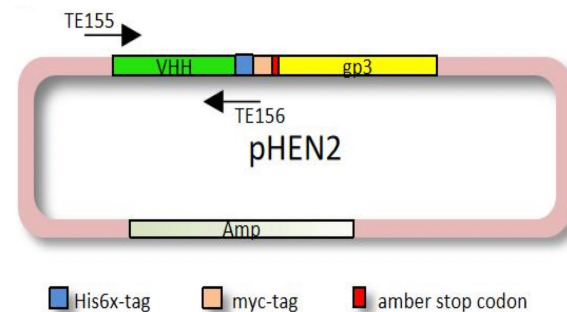
3. 提取 mRNA
逆转录时，使用多聚胸腺
嘧啶为引物



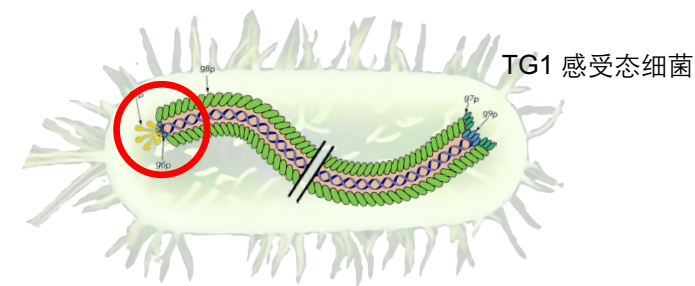
4. PCR 扩增
引物1 - CH2 结构域
引物2 - VH 结构域



5. 制备纳米抗体序列库
序列片段长度：500bp 左右



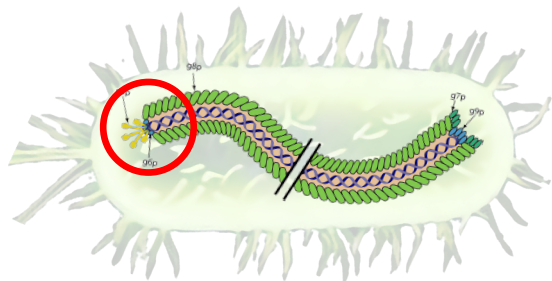
6. 制备 F1 噬菌体质粒
目标序列 - 纳米抗体序列
载体序列 - pHEN2



7. 制备 F 菌毛特异性噬菌体
纳米抗体将表达在噬菌体的蛋白外壳上

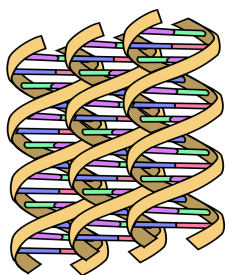
噬菌体展示技术

TG1 感受态细菌



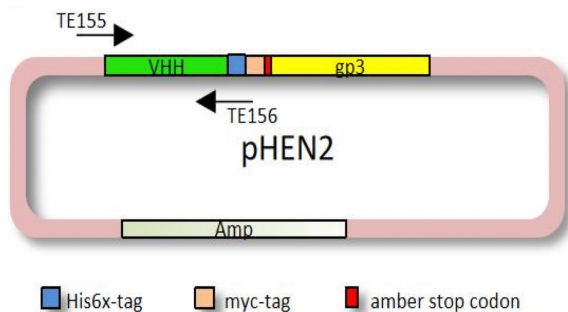
7. 制备 F 菌毛特异性噬菌体

纳米抗体将表达在噬菌体的蛋白外壳上



5. 制备纳米抗体序列库

序列片段长度：500bp 左右



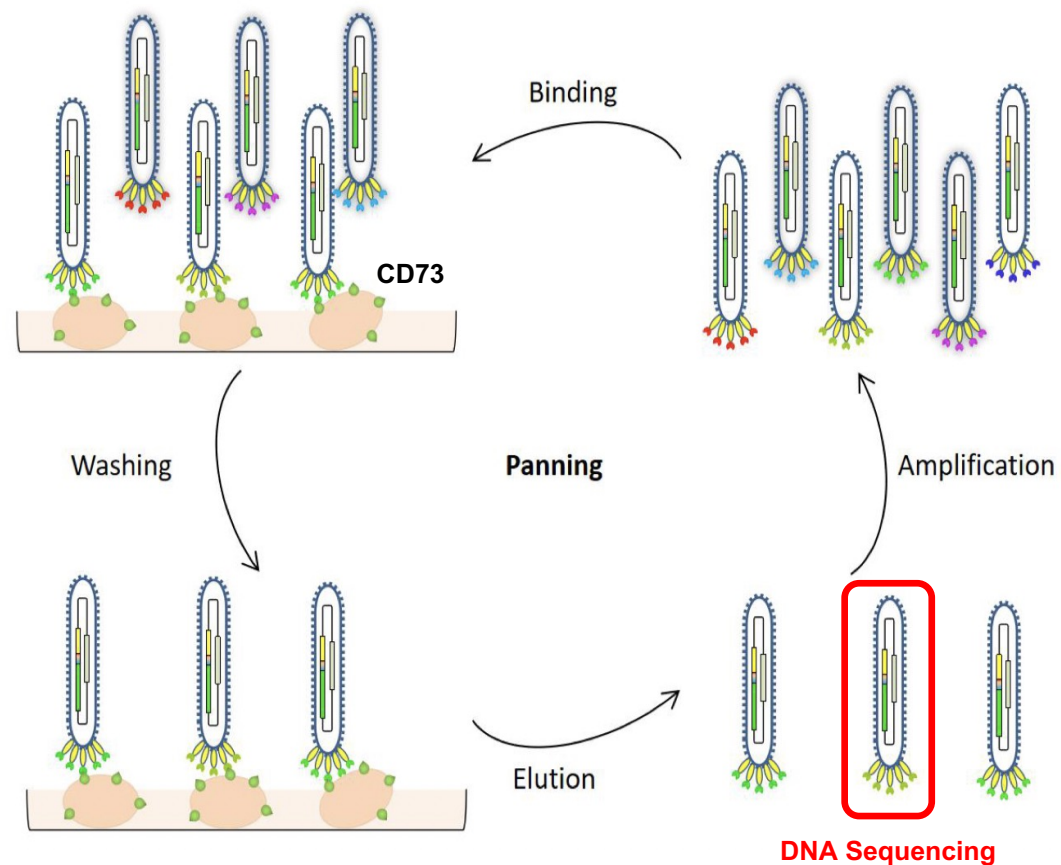
6. 制备 F1 噬菌体质粒

目标序列 – 纳米抗体序列

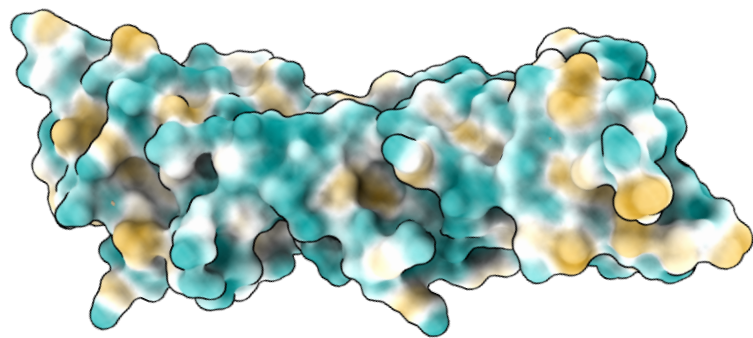
载体序列 – pHEN2

8. 筛选流程

两轮循环即可获得具有抗原结合力的纳米抗体

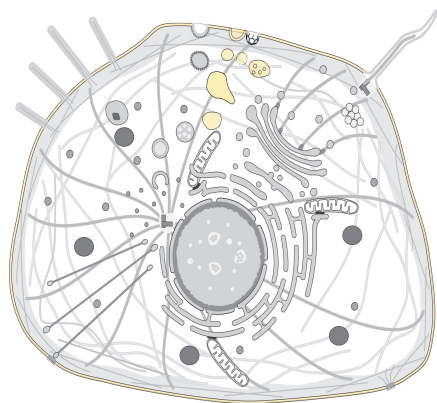


癌症的免疫疗法

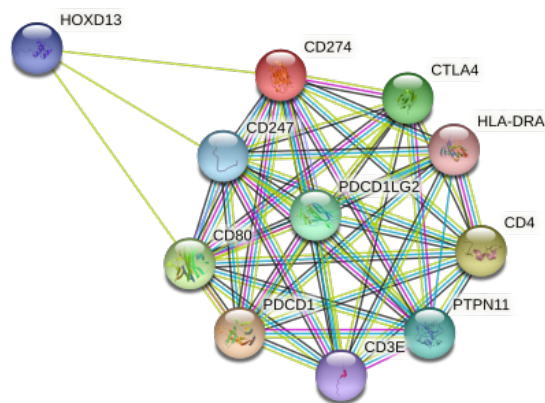


Programmed Cell Death 1 Ligand 1

PD-L1



亚细胞定位



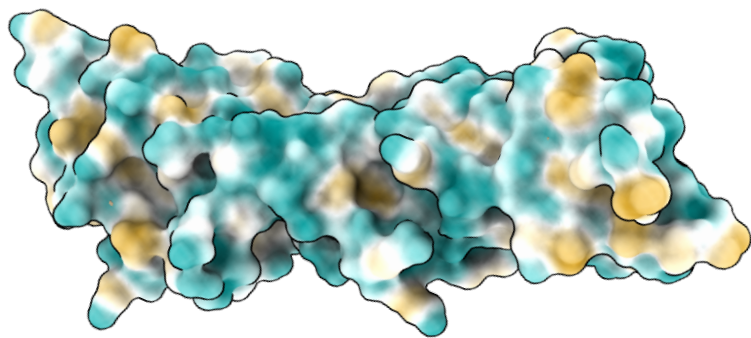
蛋白互作组

现有抗体药物的局限性

1. **组织渗透性差**：抗体难以结合实体瘤内部的 PD-L1 蛋白；
2. **量产能力不佳**：抗体的合成要求重链、轻链的折叠与配对，故表达载体贵、生产周期长。

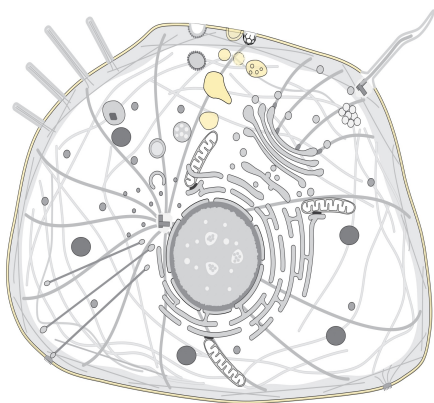
Clinically approved checkpoint inhibitors

癌症的免疫疗法

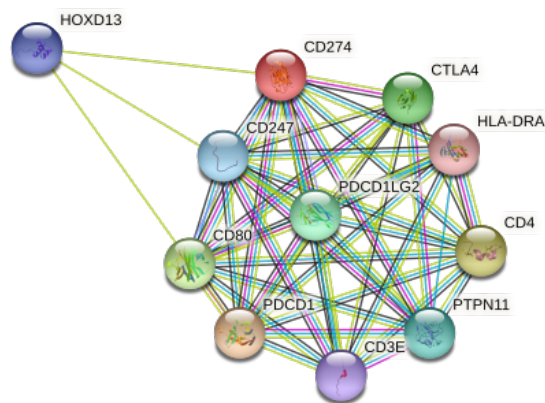


Programmed Cell Death 1 Ligand 1

PD-L1



亚细胞定位



蛋白互作组



- 通过噬菌体展示法，能特异性结合人源 PD-L1 蛋白的纳米抗体被成功制备；

……NMGWFRQAPGKEREFVAAISRFGGVTDYA……

- 但是，原始的 PD-L1 纳米抗体结合抗原时的亲和力较低，且源自羊驼的氨基酸序列可能会引发人类免疫系统的响应。

使用生信技术对纳米抗体进行优化

目录

CONTENTS

01

背景介绍

02

PD-L1 纳米抗体的特征与结构

03

提高纳米抗体的亲和力

04

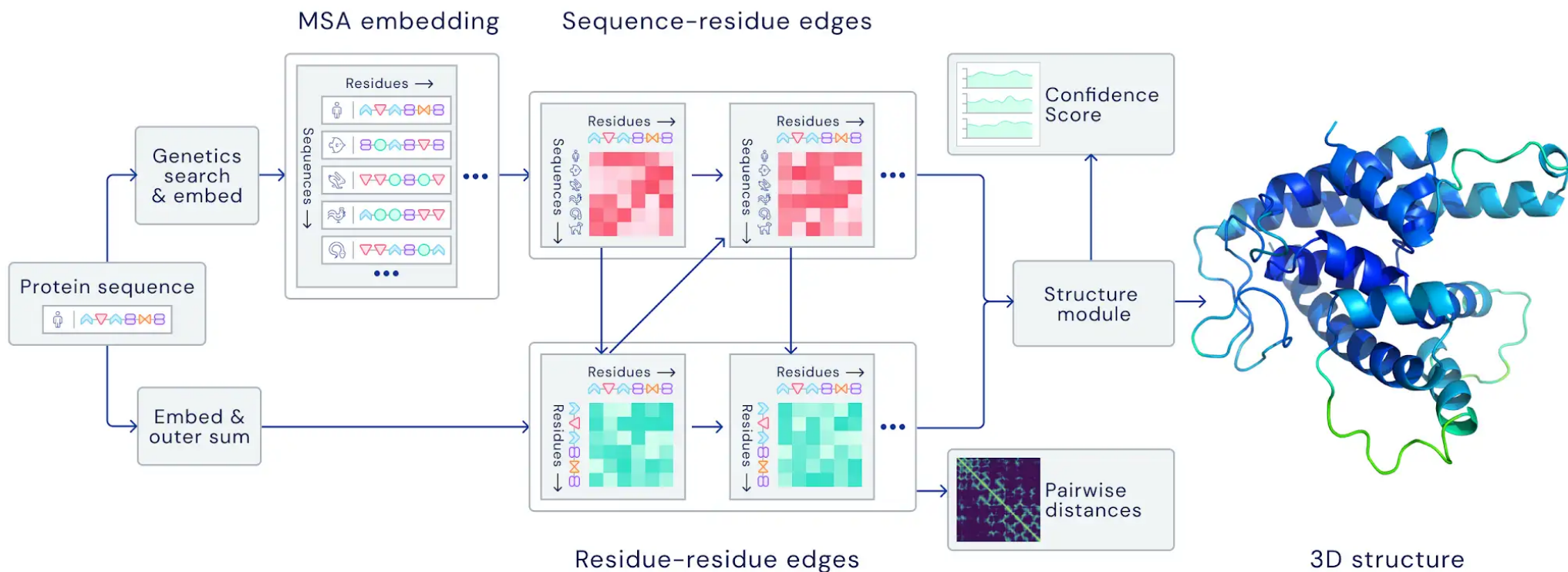
纳米抗体人源化

05

总结

AlphaFold2.0 蛋白质结构预测

将筛选得到的纳米抗体序列作为输入： ·····NMGWFRQAPGKEREFVAAISRFGGVTDYA·····

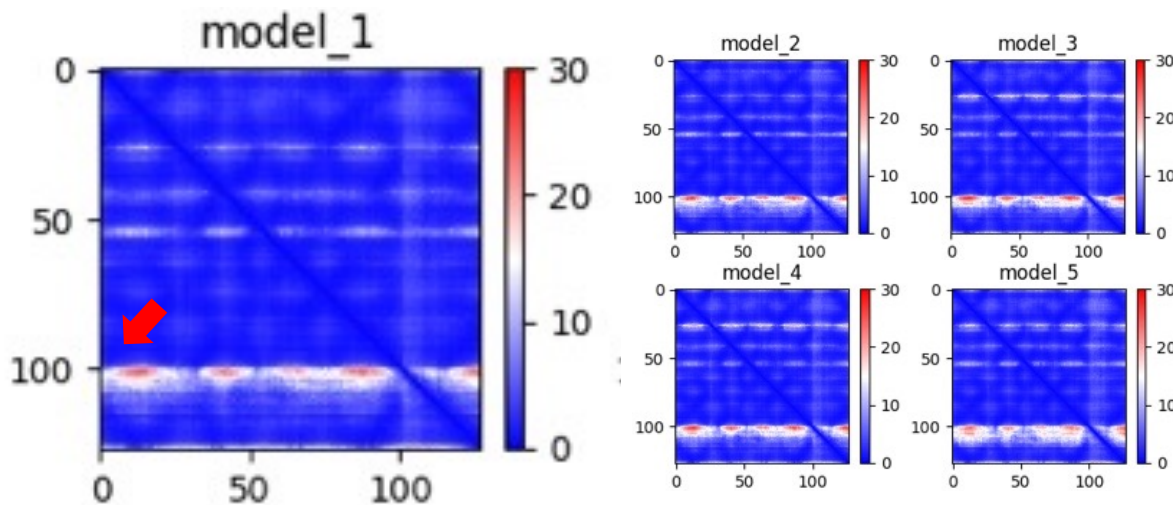
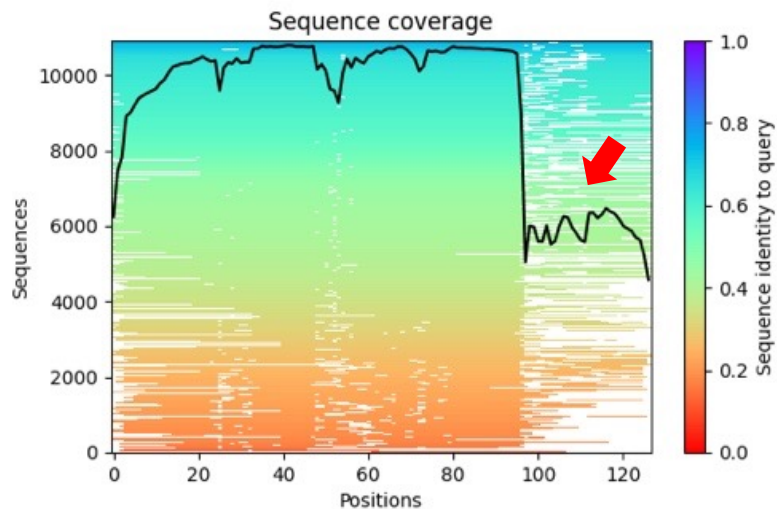


工作流程

AlphaFold2.0 蛋白质结构预测

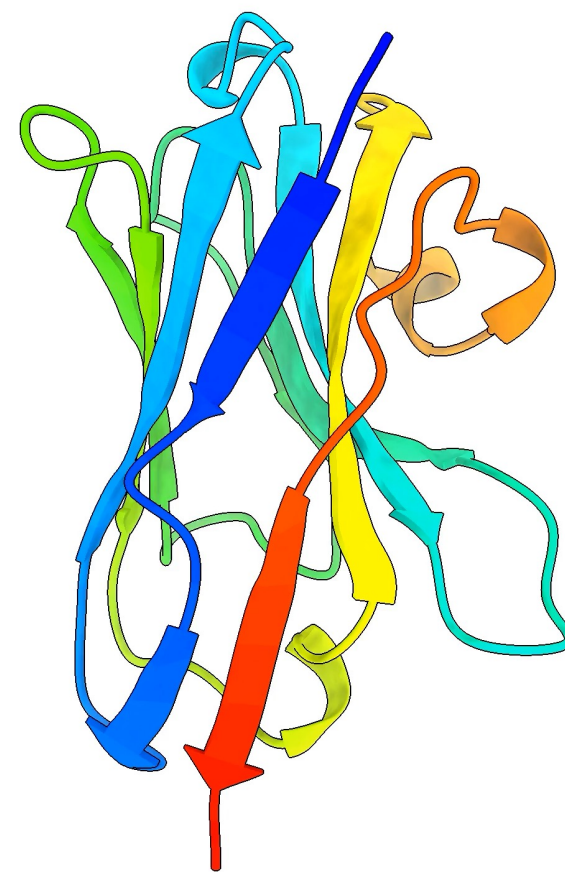
1 序列覆盖率分析：

- 每条彩色直线代表与纳米抗体片段相似的序列；
- 折线代表匹配到的相似序列数量。



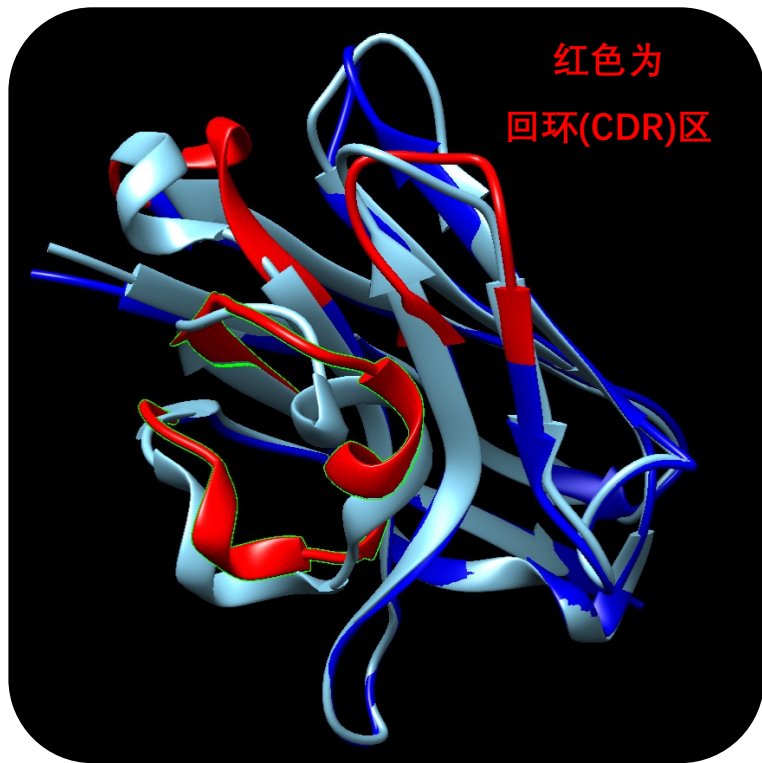
2 模型误差分析：

- 返回五个模型；
- 红色代表高误差，蓝色代表低误差。



3 可信度最高的模型

与已知的 PD-L1 纳米抗体对比



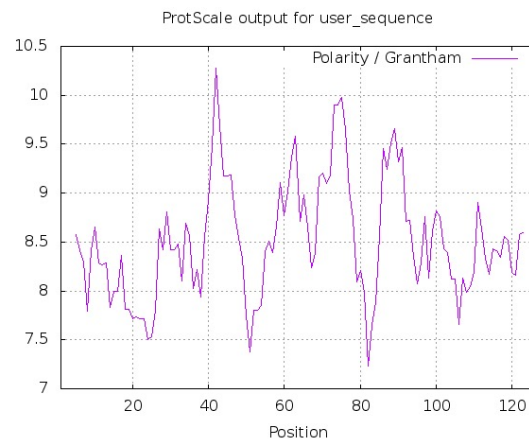
浅蓝 – 已知纳米抗体

深蓝 – 预测的纳米抗体结构

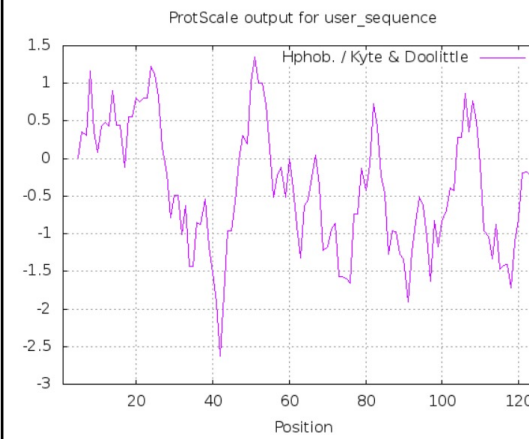
β 折叠结构类似， \longrightarrow 抗原结合能力有差异
回环区域差异较大

已知抗体

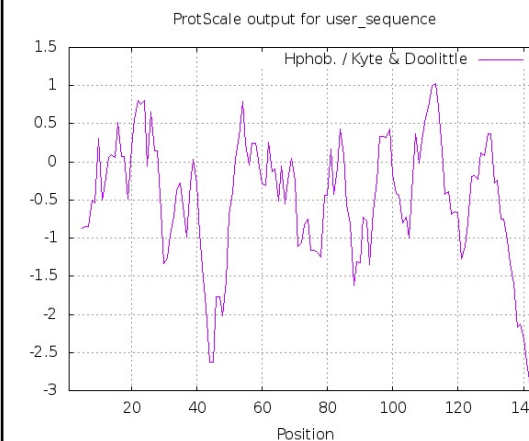
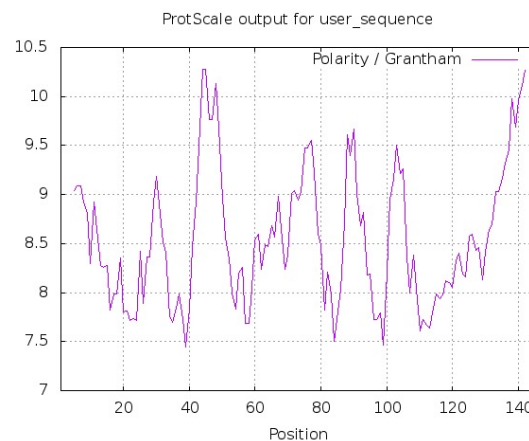
极性预测



疏水性预测



新的抗体



目录

CONTENTS

01

背景介绍

02

PD-L1 纳米抗体的特征与结构

03

提高纳米抗体的亲和力

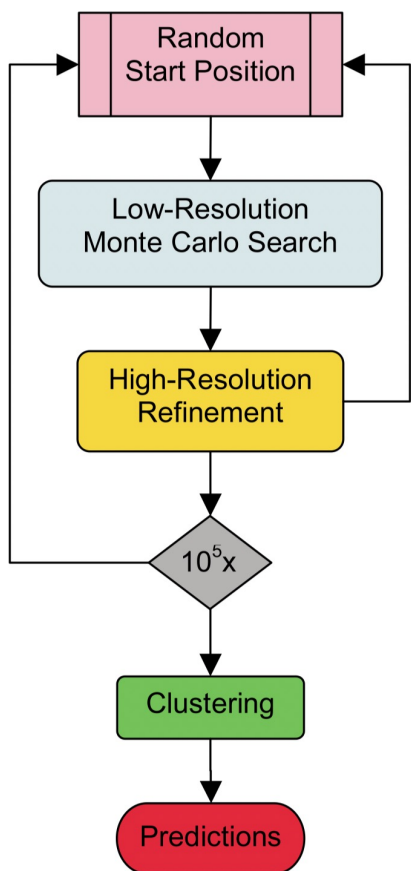
04

纳米抗体人源化

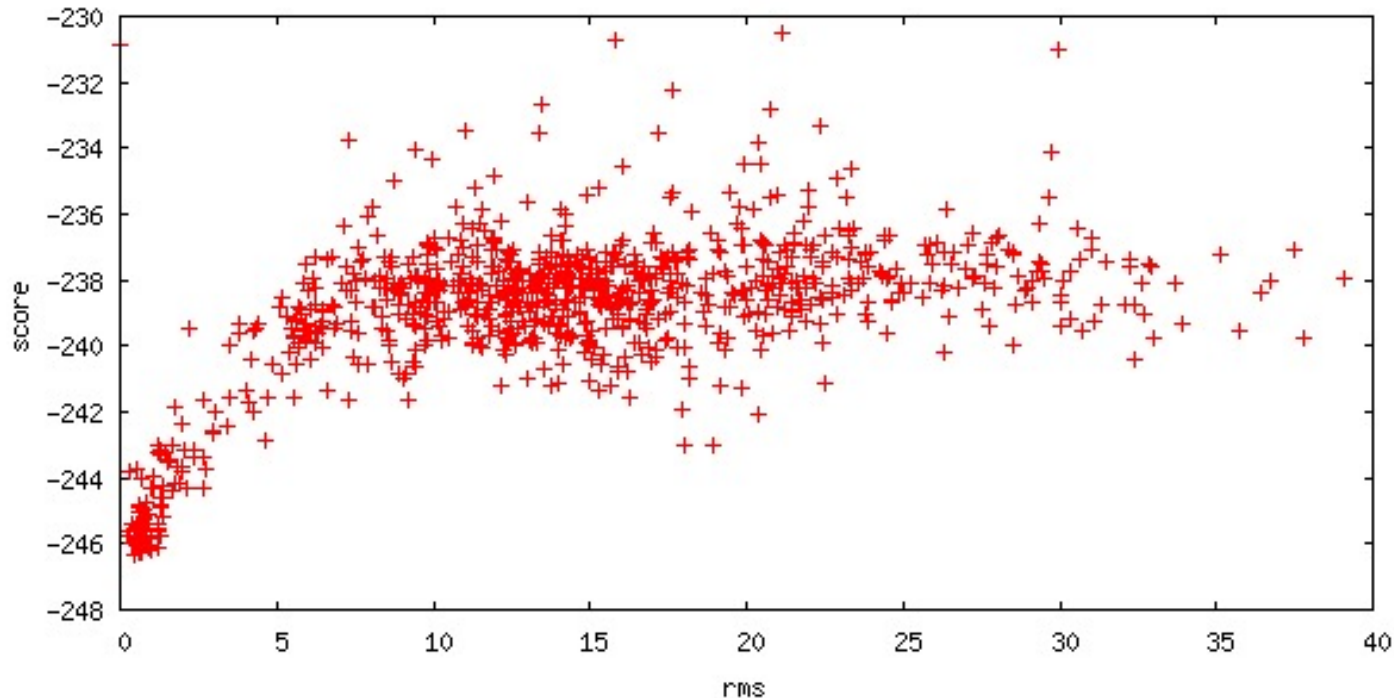
05

总结

ROSETTA 蛋白质对接模拟



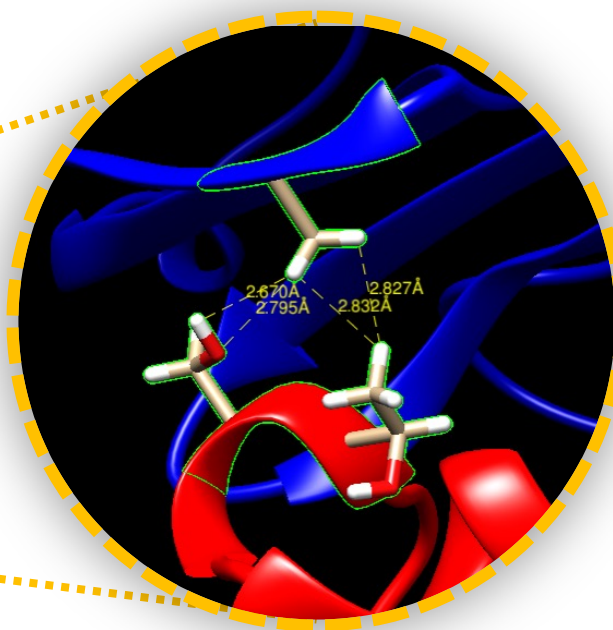
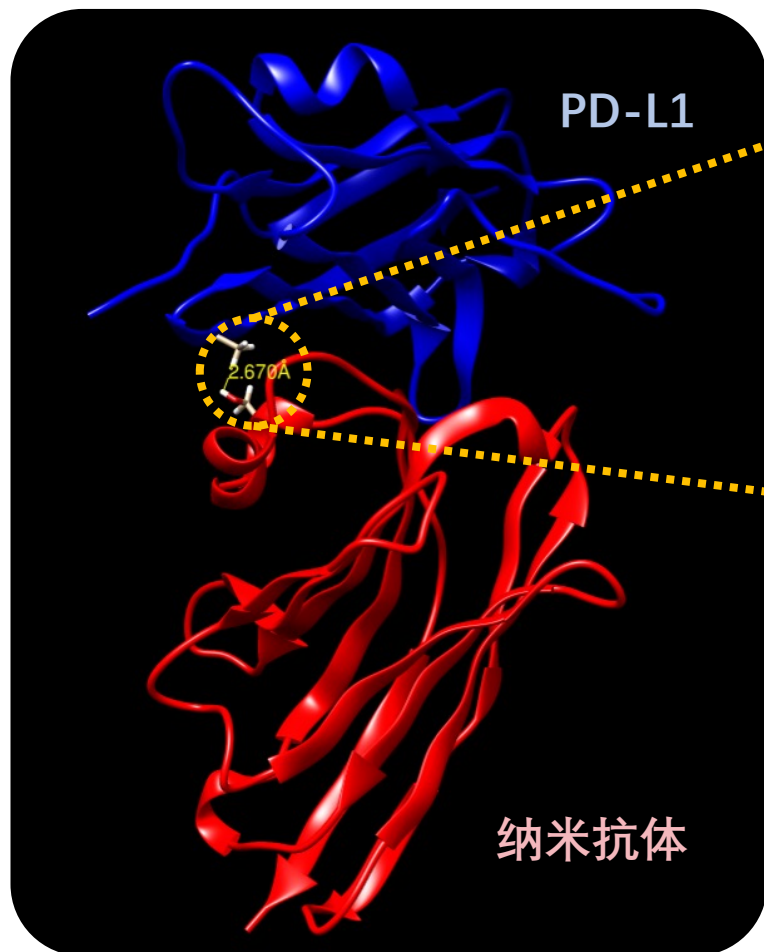
工作流程



前置假设

1. 蛋白质在对接时，其碳链骨架的结构不变；
2. 蛋白复合物能量最低时，对接成功。

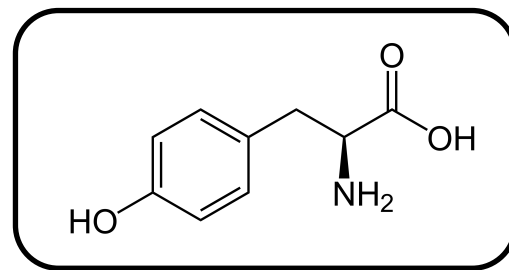
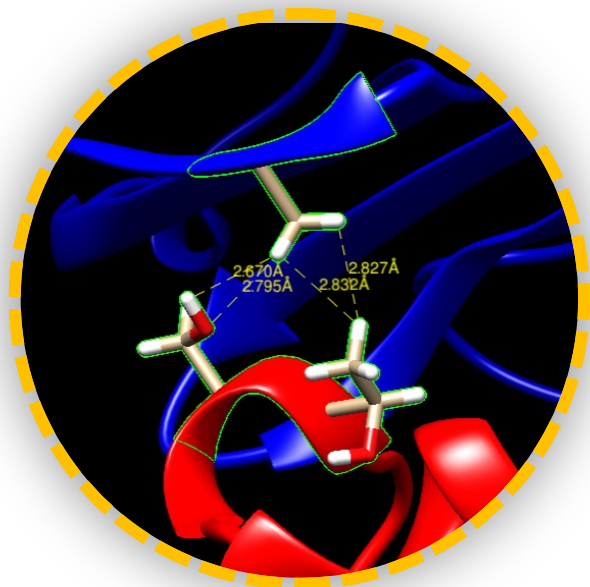
结果分析



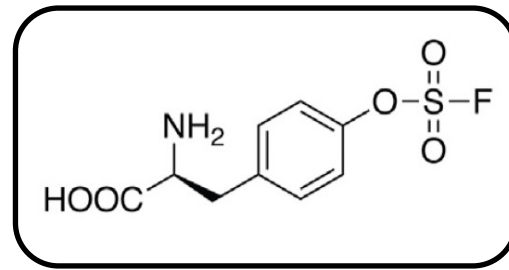
纳米抗体的 S112 T113和 PD-L1 的 G120 A121 之间可能组成重要的互作区

- 两者交界处**最短**原子间距离：2.670Å
- 位置：纳米抗体 **112 位丝氨酸**的羟基 H 原子和 PD-L1 蛋白 **121 位的丙氨酸**侧链 H 原子之间

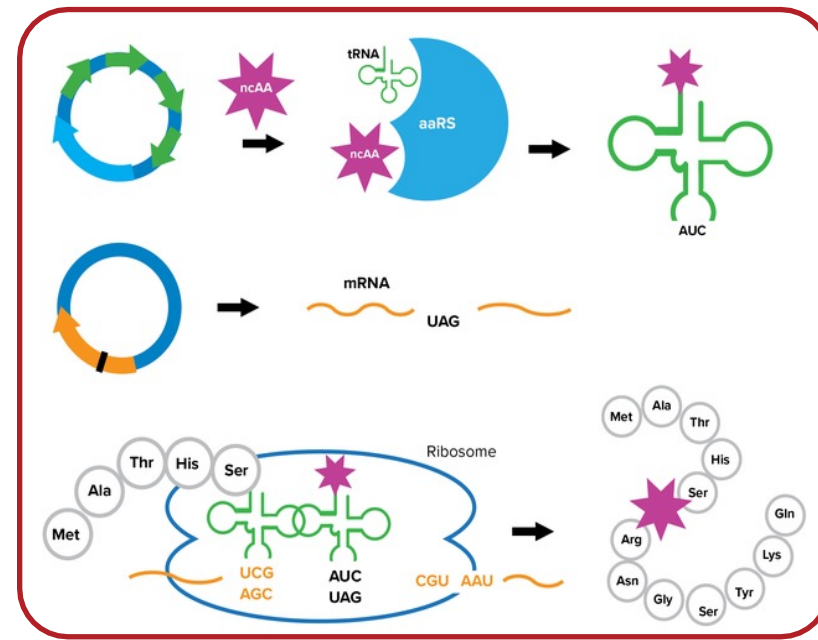
替换亲和力更强的氨基酸



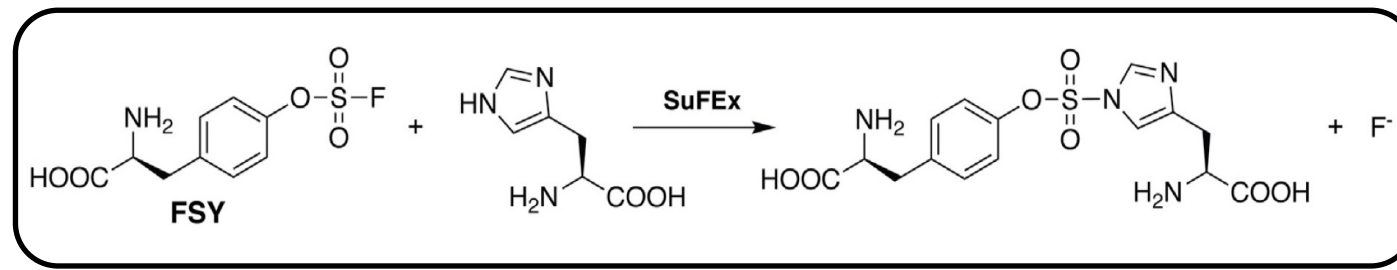
酪氨酸



磺酰氟酪氨酸



密码子扩展技术



硫氟交换反应

纳米抗体的 S112 T113和
PD-L1 的 G120 A121 之
间可能组成重要的互作区

目录

CONTENTS

01

背景介绍

02

PD-L1 纳米抗体的特征与结构

03

提高纳米抗体的亲和力

04

纳米抗体人源化

05

总结

寻找高相似性的人类抗体片段

抗体人源化的基本思路

将纳米抗体中对抗原结合至关重要的 CDR 结构域移植到人类抗体的框架 FR 中



寻找高相似性的人类抗体片段

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

IGBLAST

A tool for immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V domain sequences

			<-----FR1-IMGT-----><CDR1-I><---FR2-IMGT----><CDR2-I><-----FR3-IMGT----->		
	Query_1	1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRL	GKREFVAAISRFGGVTDYADS	ED 90
V	77.3% (75/97)	<u>IGHV3-23*04</u>	E.....P.....	..GL.W.S...GS..S.Y....	.. 90
V	77.3% (75/97)	<u>IGHV3-64*04</u>P.....	..GL.Y.S...SN..S.Y....	.. 90
V	76.3% (74/97)	<u>IGHV3-23*01</u>	E...L.....P.....	..GL.W.S...GS..S.Y....	.. 90

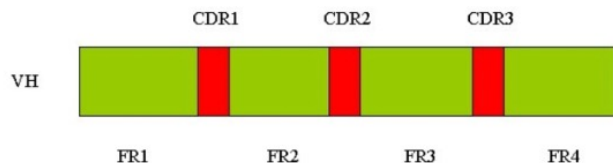
匹配到 3 段人类抗体重链可变区

	Query_1	91	TAQYYCA	97
V	77.3% (75/97)	<u>IGHV3-23*04</u>	..V....	97
V	77.3% (75/97)	<u>IGHV3-64*04</u>	..V....	97
V	76.3% (74/97)	<u>IGHV3-23*01</u>	..V....	97

抗体人源化的基本思路

将纳米抗体中对抗原结合至关重要的 CDR

结构域移植到人类抗体的框架 FR 中



- 检测原理类似 MEME、SMART 等工具；
- CDR 结构域间的 FR 序列在进化中高度保守。

CDR Analysis (reverse translation of Untitled to a 381 base sequence of most likely codons.)

检测到 3 个 CDR 结构域 <---CDR1---> <---CDR2---> <---CDR3--->

reverse_translatio G YN.... ISRFG .. AGRR STYNY

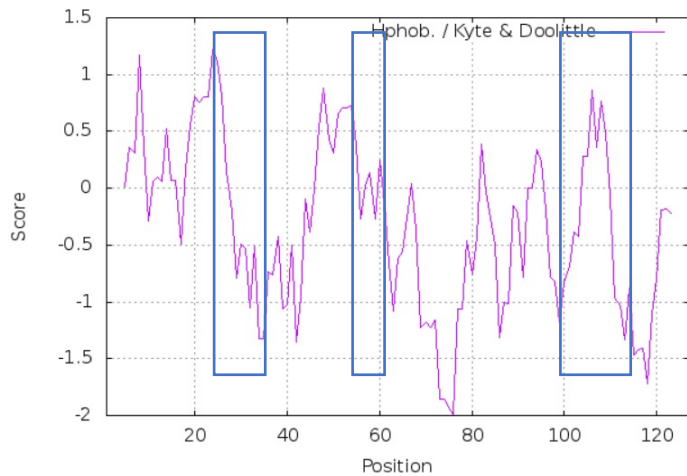
将 CDR 插入人源框架



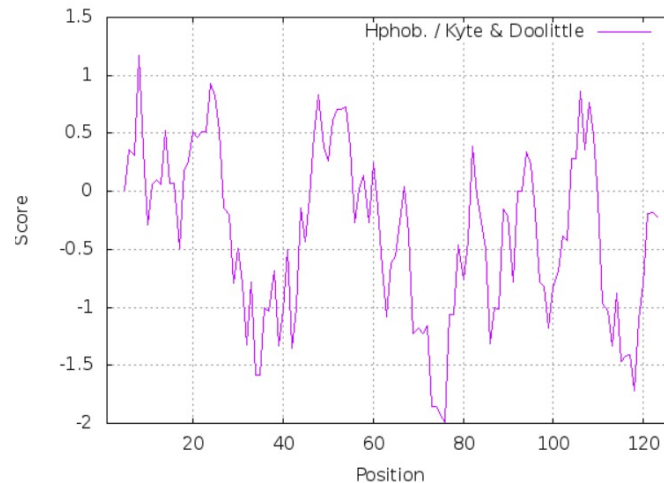
	Molecular Weight	Theoretical pI	Instability Index	Aliphatic Index	Grand Average of Hydropathicity
I	13864.49	9.27	38.71 Stable	74.49	-0.284
II	13906.54	9.43	40.80 Unstable	73.70	-0.327
III	13878.52	9.27	38.71 Stable	75.28	-0.287

疏水性分析

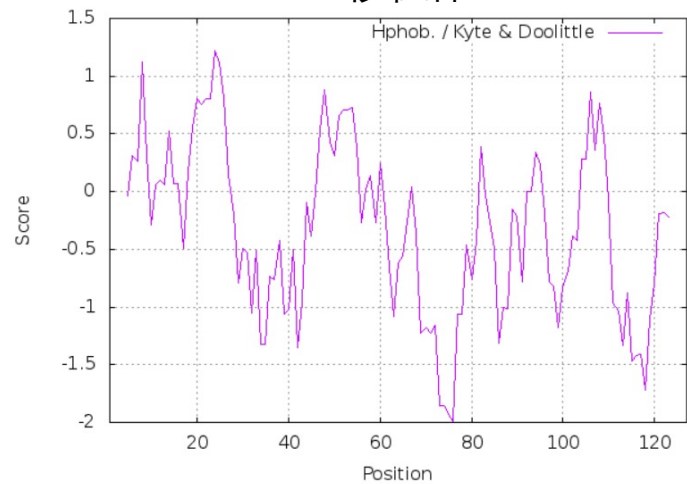
CDR 移植体 1



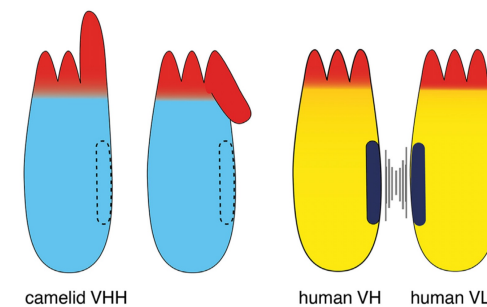
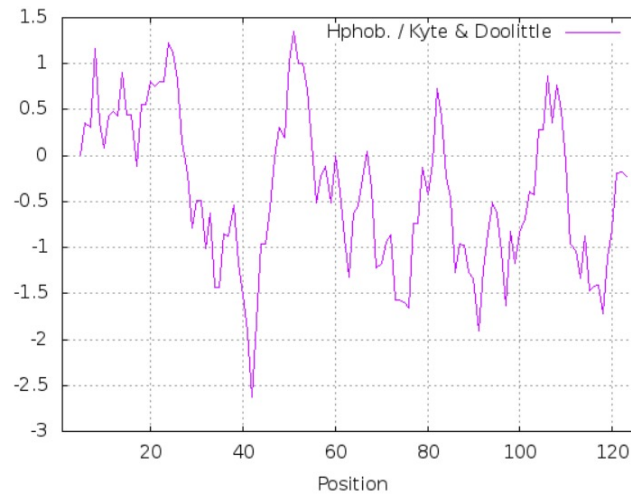
CDR 移植体 2



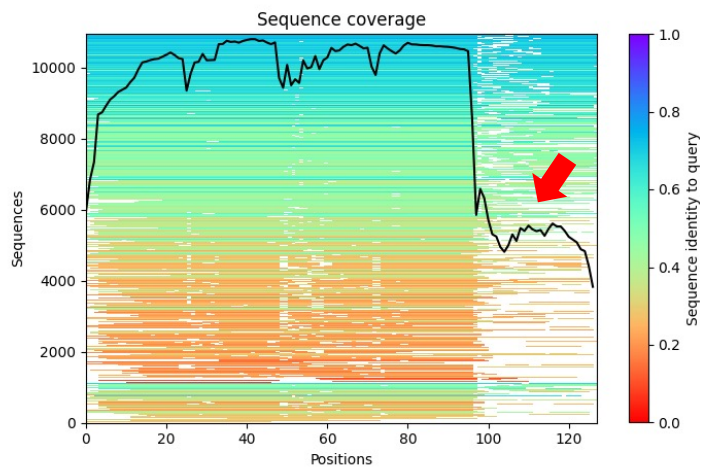
CDR 移植体 3



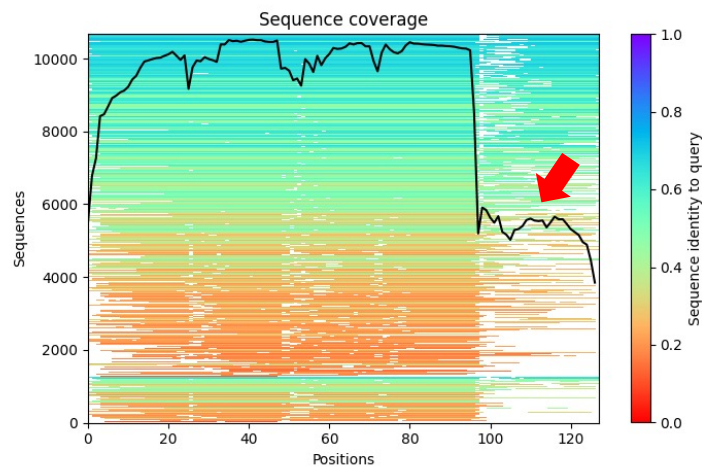
原始纳米抗体



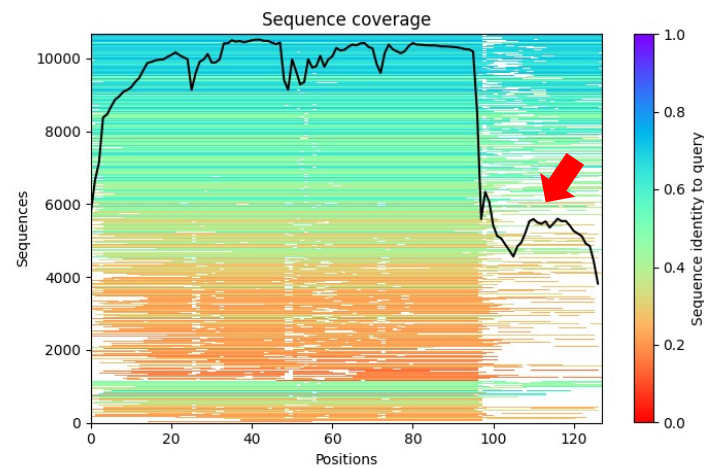
- 三个 CDR 在人源化序列中的定位是 26-33, 51-58, 97-116 位, 可以看到 CDR 常与疏水区域相关联;
- 人源化增强了纳米抗体的疏水性.

 相似序列覆盖度统计

CDR 移植体 1



CDR 移植体 2

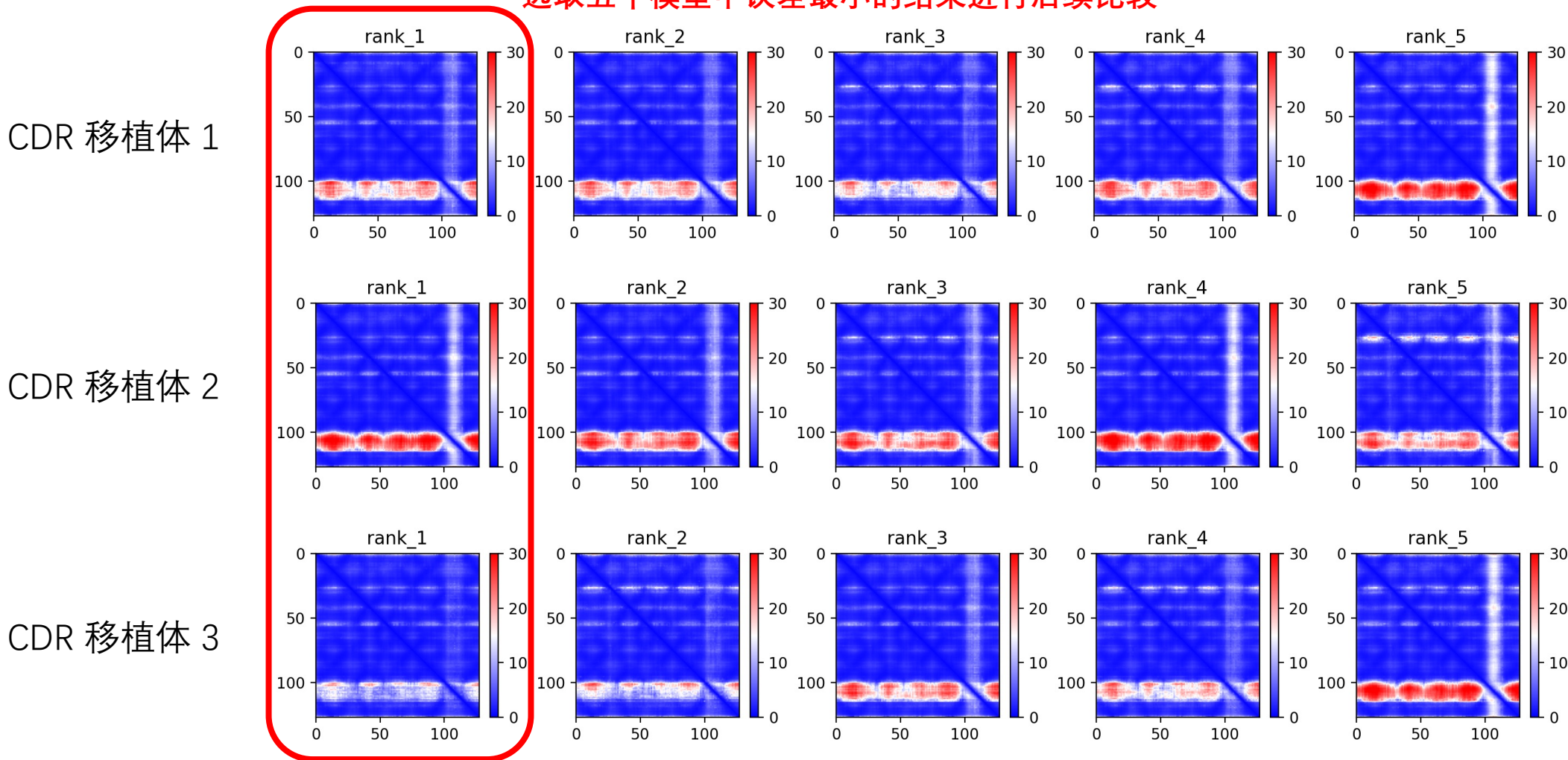


CDR 移植体 3

AlphaFold2.0 的建模统计显示，三种人源化纳米抗体的 CDR3 区域（红色箭头指示）匹配到的序列数量都**较少**，这会降低**该结构域**预测的可靠性。不过，AlphaFold2.0 成功找到**大量的**、与纳米抗体其余部分相似度较高的序列，这说明 CDR 移植体的**整体结构**仍有较高的准确度。

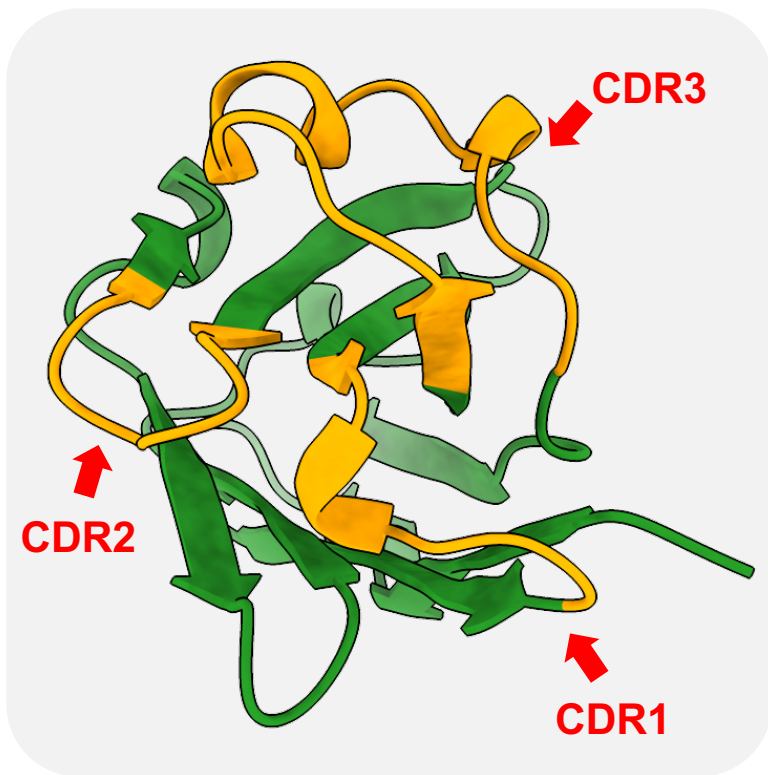
预测对应误差 (PAE) 统计

选取五个模型中误差最小的结果进行后续比较

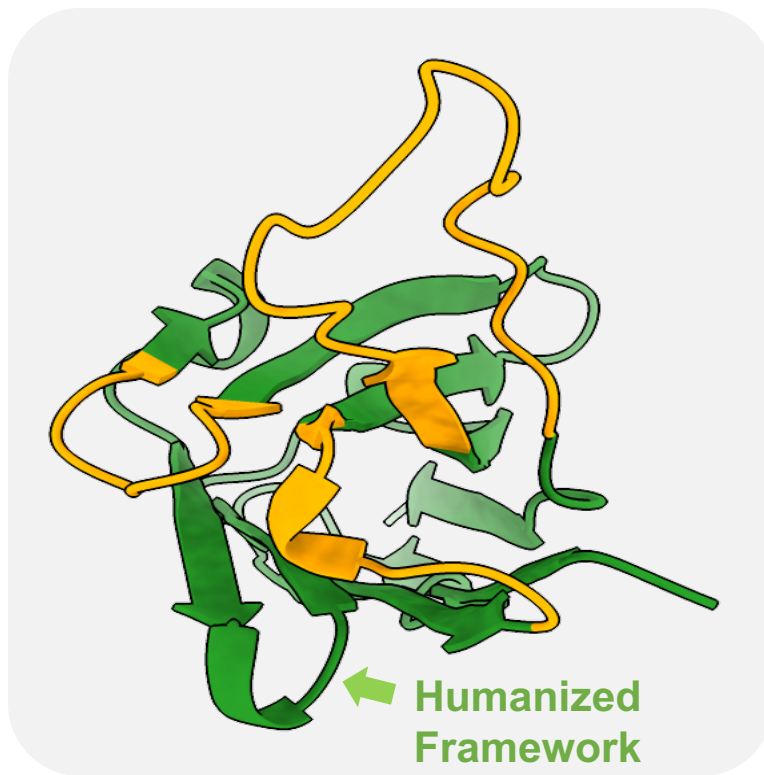


预测模型对比

CDR 移植体 1



CDR 移植体 2



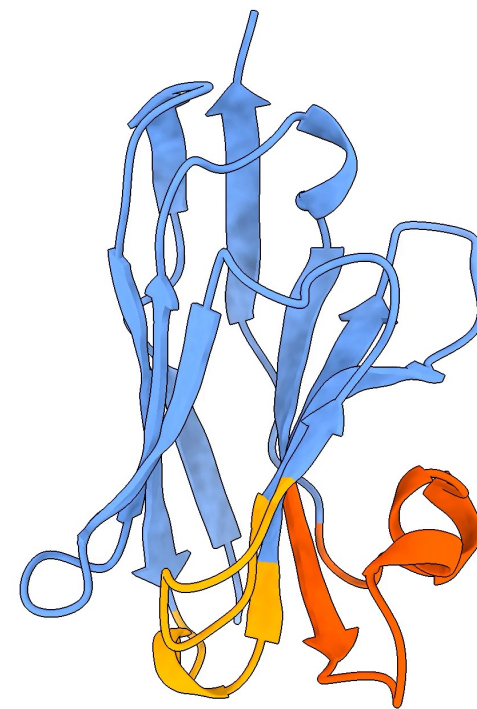
CDR 移植体 3



 预测模型对比

1. 将三种人源化纳米抗体的模型基于全局序列比对进行叠加；
 - 算法：Needleman-Wunsch
 - 矩阵：BLOSUM62
2. 除 CDR3 区域外，三种纳米抗体的结构基本相同；
3. CDR3 区颜色：
 - 橙色 – 移植体 1；
 - 粉色 – 移植体 2；
 - 紫色 – 移植体 3.

人源化 v.s. 羊驼源



橘红 – CDR3 区

目录

CONTENTS

01

背景介绍

02

PD-L1 纳米抗体的特征与结构

03

提高纳米抗体的亲和力

04

纳米抗体人源化

05

总结

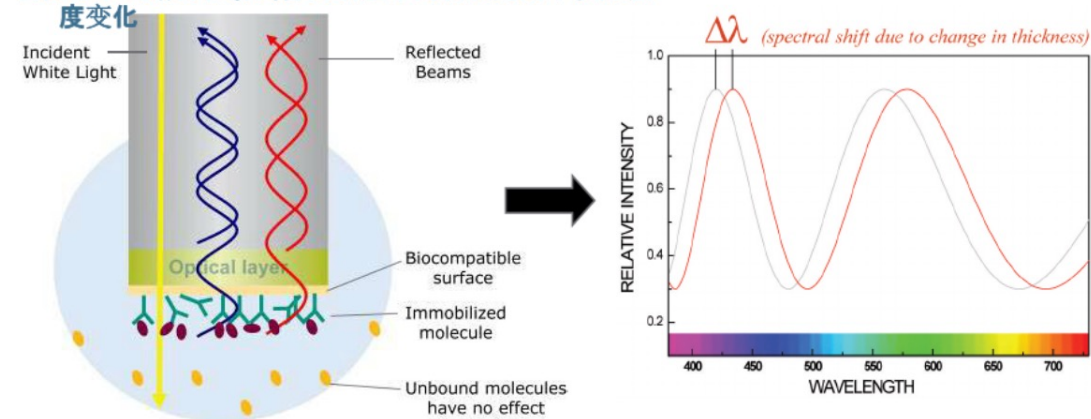
生信分析的启示

- 相比传统的全抗体，纳米抗体**结构简单且稳定**，这与其表面由**高度亲水**的氨基酸残基构成有关；
- 结构预测显示，抗 PD-L1 的纳米抗体间结构类似，主要差异集中在 **CDR 区域**；这导致在分子对接时，不同纳米抗体与 PD-L1 互作的界面有明显区别；
- 根据干实验的结果，我们能够锁定对纳米抗体**亲和力**影响较大的氨基酸残基，以及对 CDR 结构影响较小的人源化**框架**。

后续湿实验

- **生物膜干涉技术 (BIL)** – 测量优化后的纳米抗体与 PD-L1 互作时的解离常数；
- **人源化小鼠模型** – 对比羊驼源、人源化纳米抗体的免疫原性差异。

任何分子的结合和解离都会引起不同波长光的干涉光强度变化



致谢

感谢罗静初教授、杨德昌老师的指导

感谢 G03 小组成员对本汇报的贡献

感谢 ABC 所有同学的倾听

欢迎老师和同学的批评与指导！



北京大学
PEKING UNIVERSITY