

【热门靶点】殊途同归的CTLA4与PD1

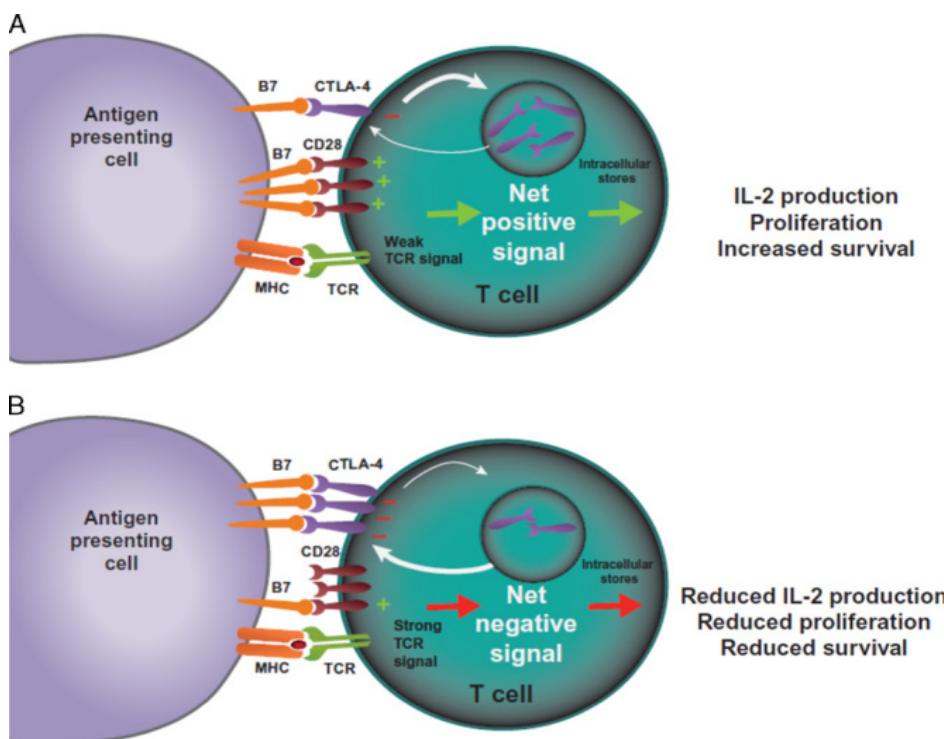
CTLA-4

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, 也叫CD152) 是免疫球蛋白超家族的成员，CTLA-4蛋白由CTLA-4基因编码，位于人2号染色体（2q33.2），小鼠1号染色体。

1995年，Tak Wah Mak 和 Arlene H. Sharpe 两家实验室分别利用CTLA-4基因敲除小鼠模型发现了CTLA-4基因负调控T细胞活化的功能。

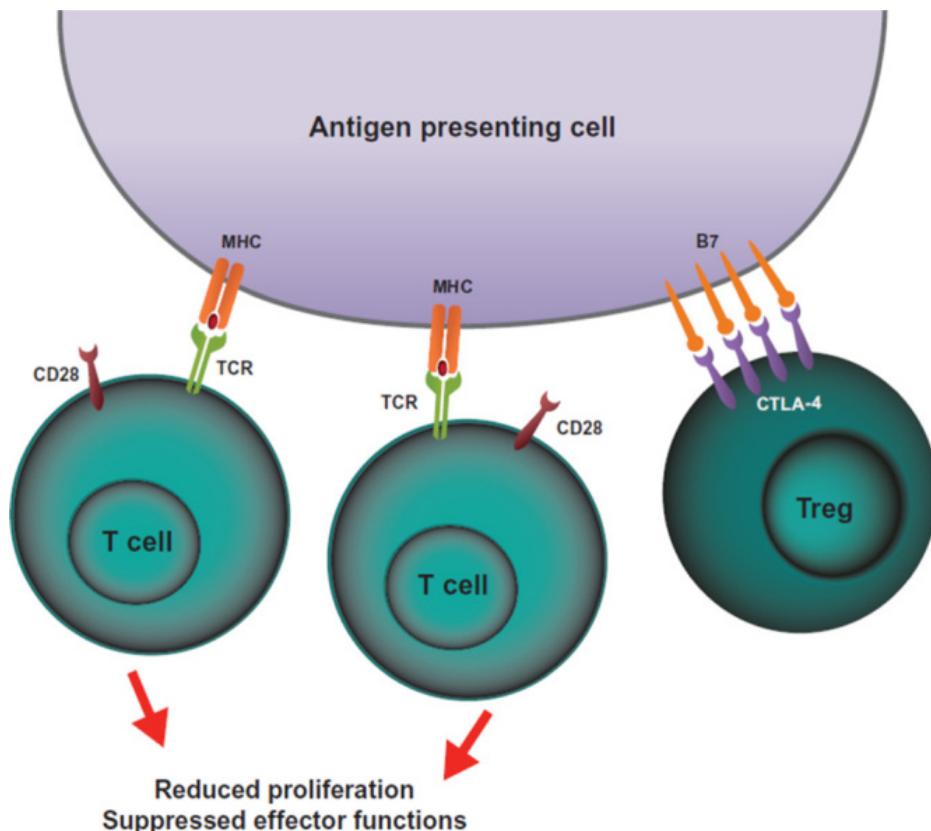
在活化的T细胞表面表达，与CD28（T细胞共激活因子）同源，两者均可与抗原提呈细胞表面的CD80和CD86（也叫b7-1和b7-2）结合。CD28负责传递激活信号，活化T细胞；而CTLA-4负责传递抑制信号给T细胞，让T细胞不会杀伤其它细胞，包括肿瘤细胞。并且CTLA-4与CD80和CD86的亲和力要高得多，因此会竞争和阻断CD28的激活作用。

在静息的幼稚T细胞中，CTLA-4主要位于胞内，TCR和CD28：B7结合产生的刺激信号通过含有CTLA-4的囊泡的胞吐作用诱导CTLA-4异位到细胞表面。通过CTLA-4：B7竞争结合产生负调控信号，通过抑制IL-2产生和细胞周期进展来防止T细胞的完全活化。



CTLA-4-mediated inhibition of T cells. (图片来自Am J Clin Oncol. 2016 Feb;39(1):98-106.)

CTLA-4还参与其它的免疫控制途径。调节性T细胞（Tregs）组成型表达CTLA-4，**CTLA-4 KO小鼠模型中Tregs控制效应T细胞的功能被削弱，说明CTLA-4对Tregs功能也很重要**。有研究认为Tregs控制效应T细胞的一种机制是APC上B7配体的下调，导致CD28共刺激减少。



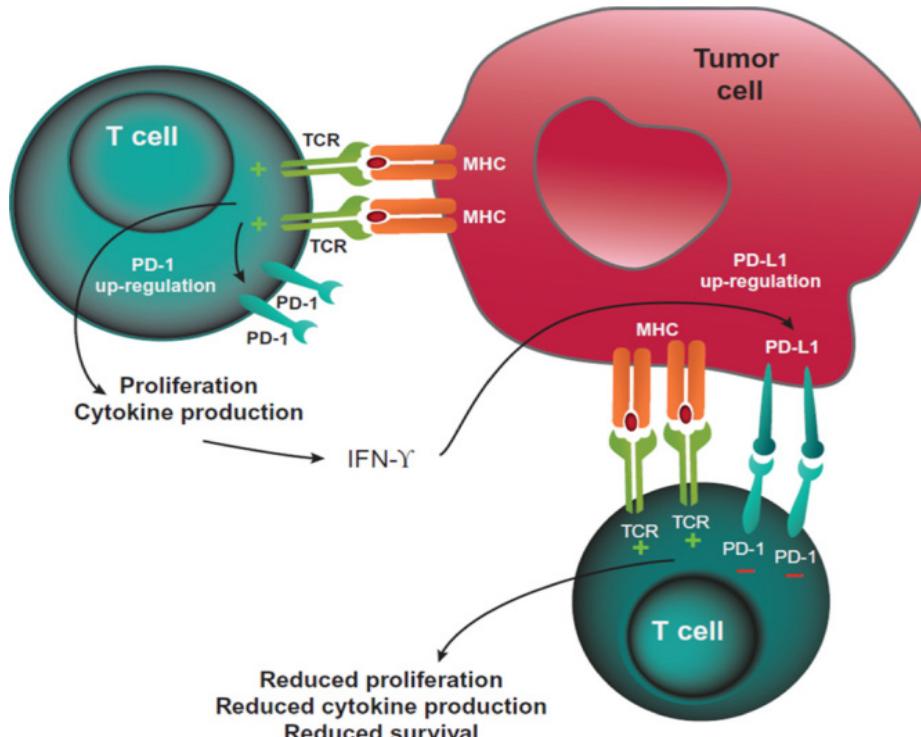
CTLA-4-mediated inhibition of Tregs. (图片来自Am J Clin Oncol. 2016 Feb;39(1):98-106.)

PD-1

PD-1是共刺激受体B7 / CD28家族的成员，由PDCD1基因编码，位于人2号染色体、小鼠1号染色体。

它通过与其配体程序性死亡配体1（PD-L1）和程序性死亡配体2（PD-L2）结合来调节T细胞活化。

与CTLA-4信号传导类似，PD-1结合抑制T细胞增殖，和干扰素-γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子TNF-α和IL-2的产生，并降低T细胞存活率。PD-1及其配体是T细胞耗竭过程中最主要的抑制性受体。



PD-1-mediated inhibition of T cells. (图片来自Am J Clin Oncol. 2016 Feb;39(1):98-106.)

CTLA-4 vs PD-1

相同之处

- 在活化的T细胞表面表达
- 表达水平受tcr信号影响
- 降低T细胞的增殖、葡萄糖代谢、细胞因子产生和存活

不同之处

CTLA-4	PD-1
在早期T细胞反应（免疫致敏阶段）起抑制作用，主要在淋巴组织	在T细胞反应后期（免疫效应阶段）发挥作用，主要在外周组织
在T细胞表达	除了T细胞以外，也在其它细胞中表达，如：B细胞、NK细胞、树突细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、上皮细胞等。

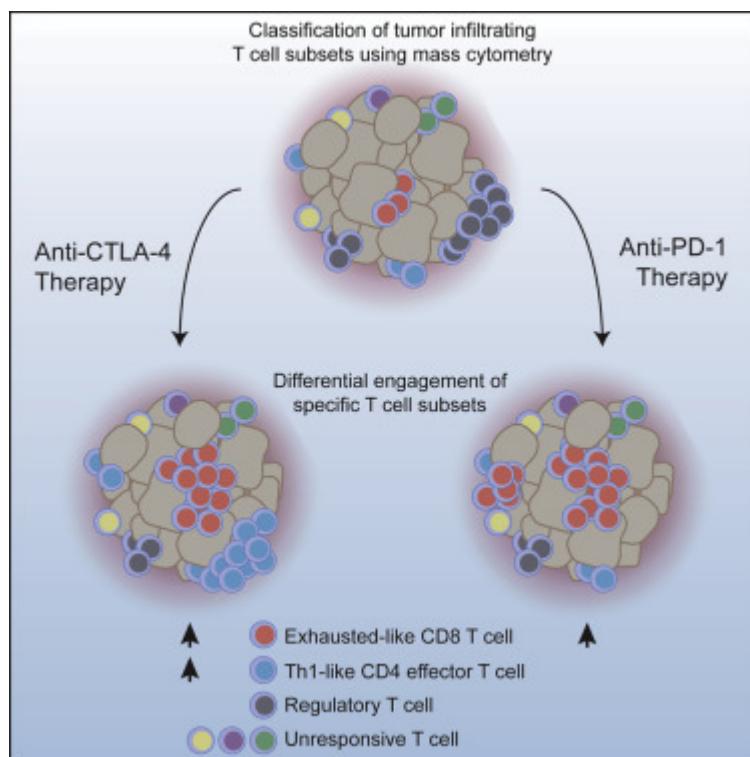
配体仅在抗原提呈细胞（APC）表达	配体除了APC以外，也在其它免疫细胞中表达，如：PD-L1广泛表达于多种细胞，常见于造血细胞，如T细胞、B细胞、DC细胞和巨噬细胞，以及非造血细胞，如血管和间质血管内皮细胞、胎盘合体滋养细胞和角质细胞，也在肿瘤细胞中表达。相较之下，PD-L2的表达受到很大的限制，主要由DC细胞、巨噬细胞和B细胞表达。
通过相较少途径的T细胞信号通路发挥作用	通过更多途径的T细胞信号通路发挥作用
影响Treg的功能	对Treg的作用尚不清楚

anti-CTLA-4 vs anti-PD-1

针对CTLA-4通路与PD-1/PD-L1通路的靶向药物包括：

类型	名称	公司
CTLA-4 inhibitor	Ipilimumab	Bristol-Myers Squibb
	Tremelimumab	Medimmune/AstraZeneca
PD-1 inhibitor	Pembrolizumab	Merck
	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb
	Pidilizumab	TionCureTech/Mediva
PD-L1 inhibitor	Durvalumab	Medimmune/AstraZeneca
	Atezolimab	Roche

利用CTLA-4抗体和PD-1抗体分别阻断CTLA-4和PD-1之后，**抗PD-1主要诱导特定肿瘤浸润的耗竭CD8 T细胞亚群的扩增；抗CTLA-4在此基础上还诱导了ICOS+ Th1-like CD4 T细胞扩增**。虽然它们都会使CD8+ T细胞增加，但其实是各自通过不同的细胞机制来实现的：anti-PD-1主要是通过触发线粒体氧化磷酸化途径，而anti-CTLA-4则能触发胞内大多数信号途径，其中包括细胞周期调控途径。



Anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint-blockade therapies target distinct tumor-infiltrating T cell

populations to induce tumor rejection.

PD-1 CTLA-4 PD-1 CTLA-4

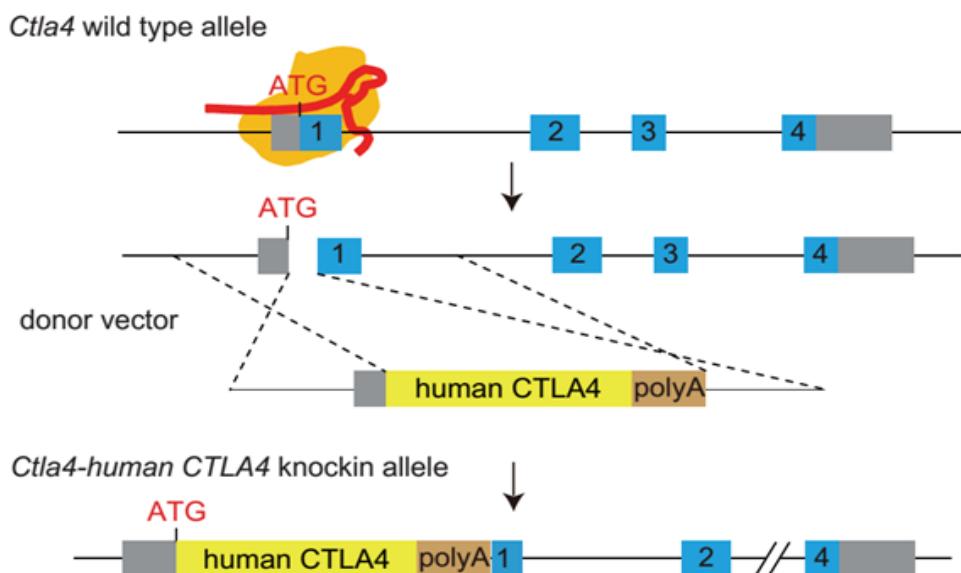
构建免疫检验点人源化小鼠模型，使科研人员能够研究只识别人体免疫检验点的药物。人源化小鼠为研究靶定人体免疫检验点的检验点抑制剂提供了可能性，并且在临床试验前更精准的预测药物功效以及可能的副作用（如自身免疫，促炎症等）。

南模生物已开发出CTLA-4、PD-1、PD-L1三种已验证的人源化小鼠模型，用以测试靶向人体免疫检验点的药物。

人源化小鼠及验证数据

CTLA-4-HU

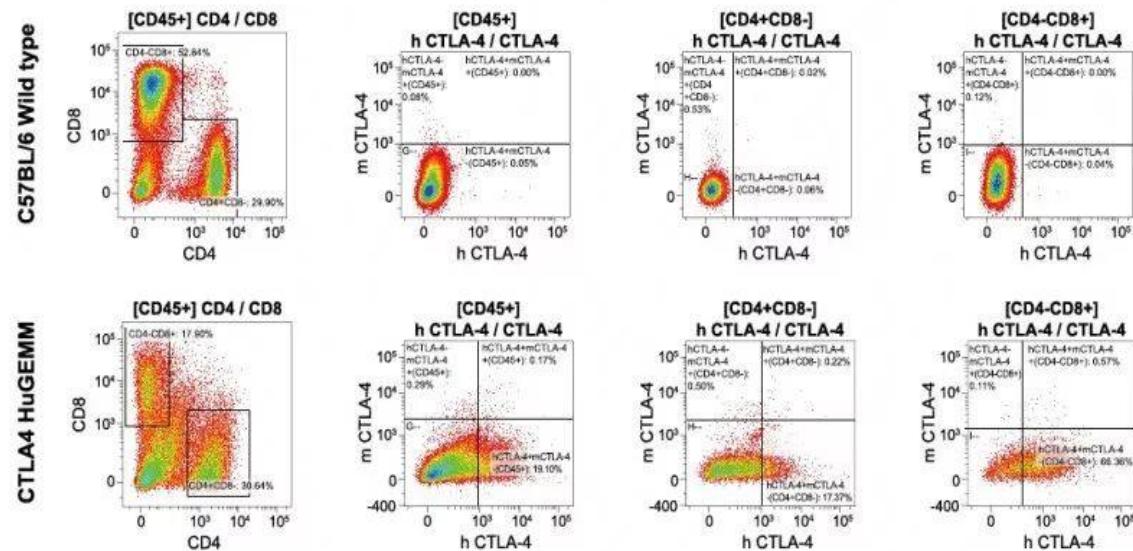
构建策略



CTLA4人源化小鼠构建策略。在C57BL/6J遗传背景下，将人源CTLA4蛋白编码序列插入小鼠*Ctl4*基因的ATG位置，在表达全人源CTLA4蛋白的同时取代小鼠内源*Ctl4*的表达。

验证数据

CTLA4人源化小鼠流式分析(FACS)数据



FACS 检测CTLA4 人源化小鼠活化后脾脏淋巴细胞的CTLA4 表达。CTLA4 人源化纯合子小鼠脾脏淋巴细胞经anti-CD3 和anti-CD28刺激 72h 后收集细胞染色, FACS 检测人源CTLA4 表达。结果显示: **CTLA4 人源化纯合子小鼠活化的CD4+ 和CD8+ T 淋巴细胞中可以检测到人源CTLA4 的活跃表达。(与CrownBio 合作完成)**

• CTLA4人源化小鼠MC38荷瘤模型体内验证结果

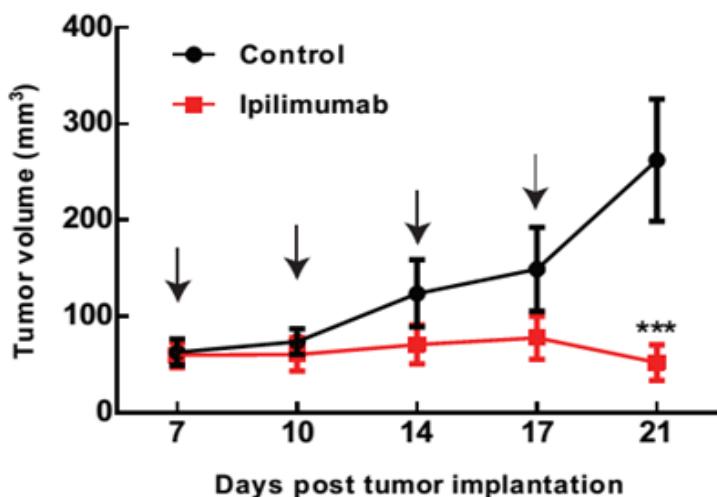
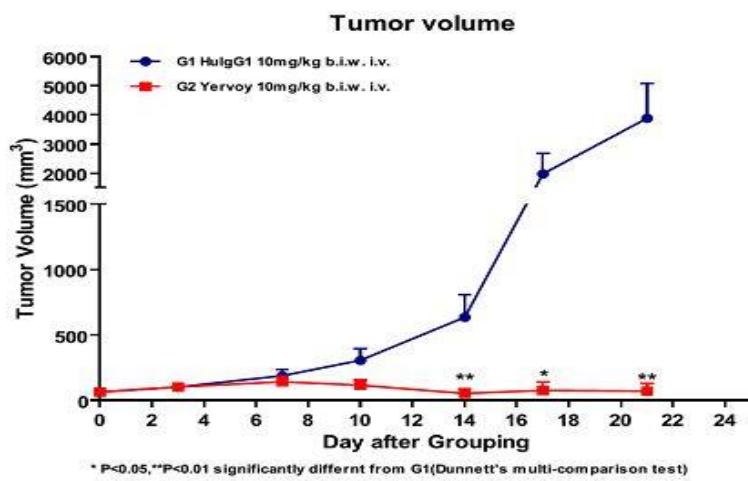


图4. CTLA4人源化小鼠模型的抗CTLA4人源化抗体Ipilimumab 体内抗肿瘤效果。(数据为与信达生物制药有限公司合作完成)

分组和给药以及检测：将MC38结直肠癌细胞接种于CTLA-4转基因小鼠右侧背部皮下，成瘤后随机分为2组，然后分别给予Ipilimumab 10 mg/kg或者等体积生理盐水进行治疗，每周给药2次，连续给药4次，每次给药前测定肿瘤体积。

实验结果：抗human-CTLA4药物Ipilimumab能够显著抑制MC38肿瘤在CTLA-4小鼠体内的生长，给药1周后即可检测到肿瘤抑制效果，给药2周后可见非常显著的抑制效果（如上图），同时Ipilimumab治疗组有2只动物肿瘤完全消失，而对照组则肿瘤持续生长。

A



B

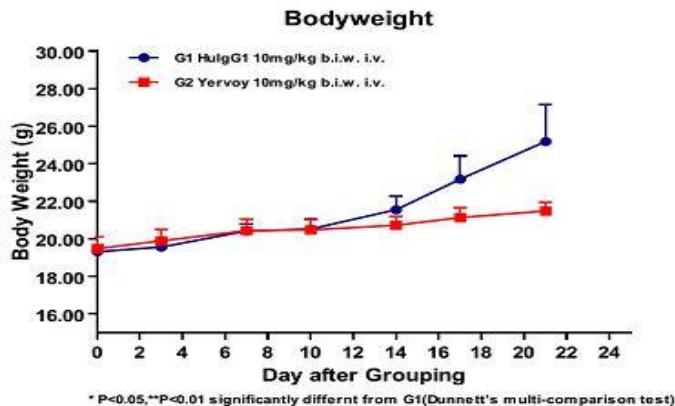
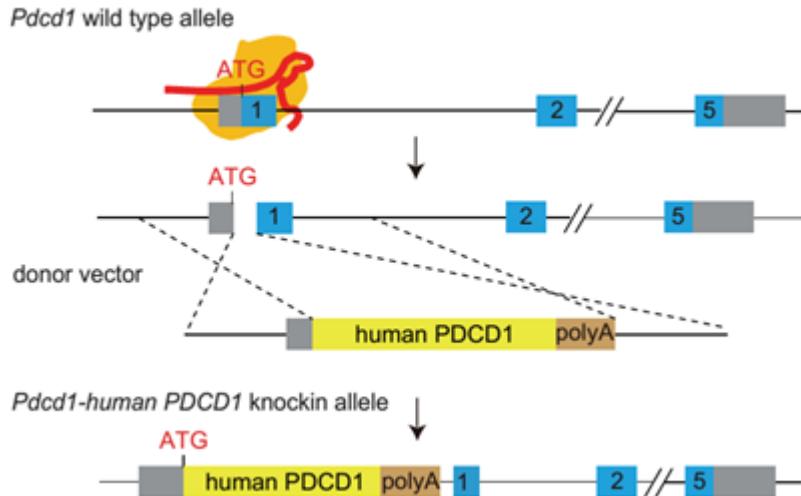


图5. CTLA4人源化小鼠模型的抗CTLA4人源化抗体Ipilimumab 体内抗肿瘤效果。（数据为与PharmaLegacy合作完成）

CTLA4 人源化小鼠 MC38 荷瘤模型体内抗肿瘤药效验证。CTLA4 人源化纯合子小鼠接种 MC38 结肠癌细胞系，肿瘤生长至约 100 mm³随机将动物分组为对照组和治疗组 (n=9)。结果显示：针对人的 CTLA4 阳性药物 Yervoy 有非常显著的抗肿瘤效果 (p<0.001)，证明CTLA4 人源化小鼠是一个很好的验证针对人 CTLA4 抗体药效的体内模型。

PD-1-HU

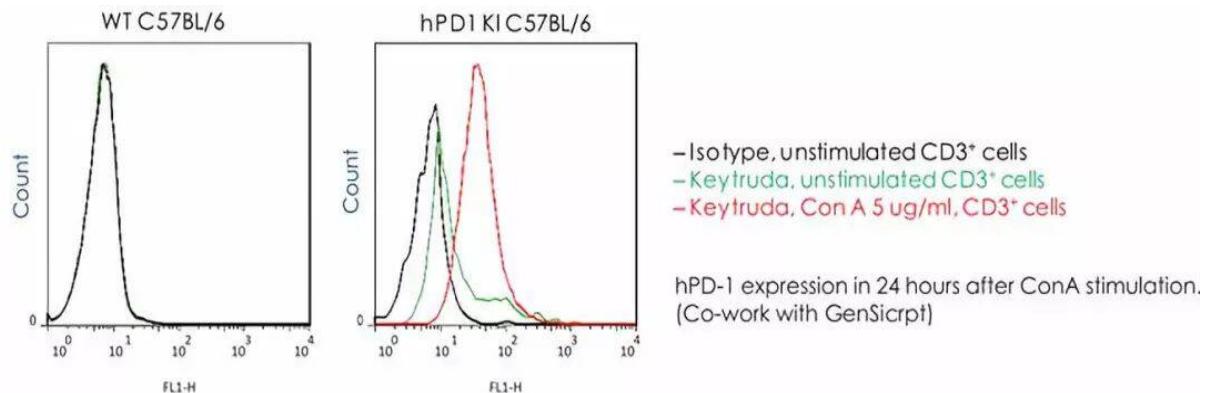
构建策略



PD-1人源化小鼠构建策略。在 C57BL/6J 遗传背景下，将人源 PDCD1 蛋白编码区插入小鼠 *Pdcd1* 基因的 ATG 位置，在表达人源全长 PDCD1 蛋白的同时，取代小鼠内源 *Pdcd1* 的表达。

验证数据

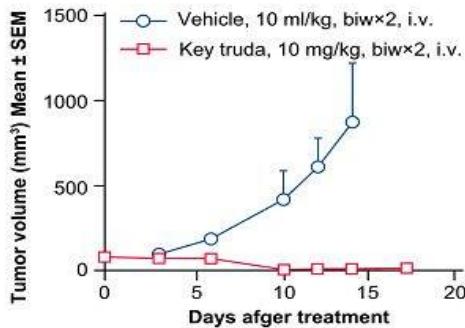
· PD-1人源化小鼠T细胞流式分析（FACS）数据



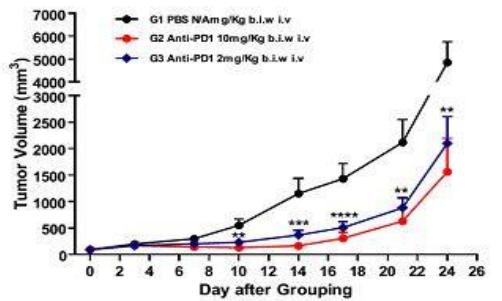
PD-1人源化小鼠T细胞经ConA激活后流式分析（与 Genscript 合作完成）。FACS 检测 PD-1 人源化小鼠脾脏淋巴细胞 PD-1 表达。PD-1 人源化纯合子小鼠和野生型小鼠取脾脏 T 淋巴细胞，体外 ConA 刺激 24 小时后，FACS 检测人源 PD-1 在 T 细胞表面表达。**结果显示：ConA 体外刺激后，在 PD-1 人源化小鼠 T 细胞表面可以检测到人源 PD-1 蛋白表达。**

· PD-1人源化小鼠MC38荷瘤模型体内验证结果

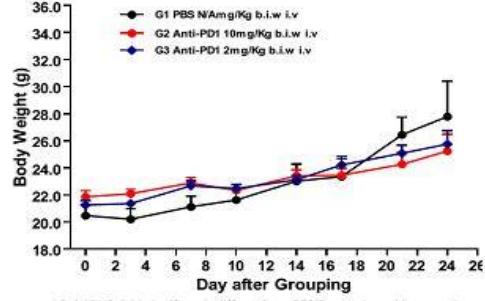
A



B



C



A. 肿瘤组织平均体积 \pm SEM。 (与 Genscript 合作完成)

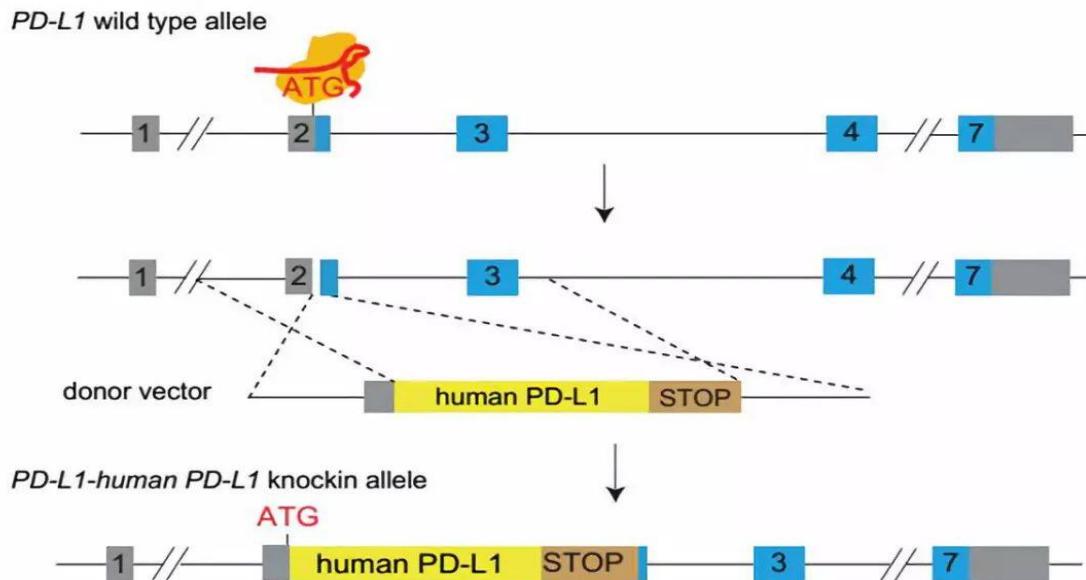
PD-1 人源化小鼠 MC38 荷瘤模型体内抗肿瘤药效验证。PD-1 人源化纯合子小鼠接种 MC38 结肠癌细胞系，肿瘤生长至约 100 mm^3 随机将动物分组为对照组和治疗组 ($n=8$)，每周给药两次，连续给药四次。**结果显示：针对人的 PD-1 阳性药物 Keytruda 有非常显著的抗肿瘤效果 ($p<0.001$)，证明 PD-1 人源化小鼠是一个很好的验证针对人 PD-1 抗体药效的体内模型。**

B. 肿瘤组织平均体积 \pm SEM。C. 小鼠平均体重 \pm SEM。 (与 PharmaLegacy 合作完成)

PD-1 人源化小鼠 MC38 荷瘤模型体内抗肿瘤药效剂量验证。PD-1 人源化纯合子小鼠接种 MC38 结肠癌细胞系，肿瘤生长至约 90 mm^3 随机将动物分组为对照组和治疗组 ($n=9$)。**结果显示：针对人的 PD-1 抗体有非常显著的抗肿瘤效果 ($p<0.001$)，且这种抗肿瘤效果呈现出剂量效应。**

PD-L1-HU

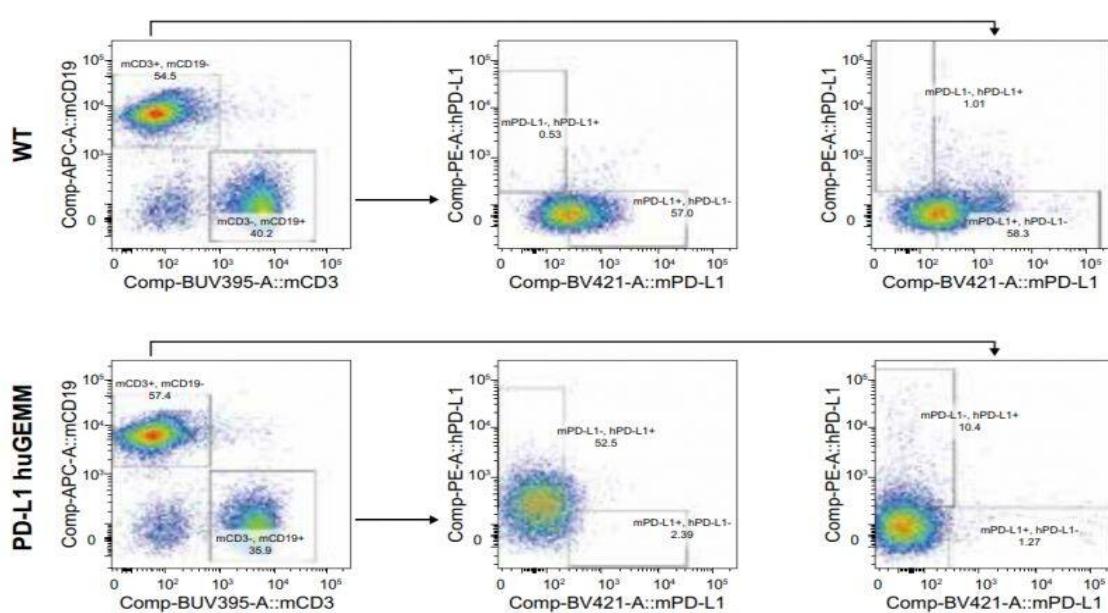
构建策略



PD-L1人源化小鼠构建策略。在 C57BL/6J 遗传背景下，将人源 PD-L1 蛋白编码序列插入小鼠 Pd-l1 基因的 ATG 位置，在表达全人源 PD-L1 蛋白的同时取代小鼠内源 Pd-l1 的表达。

验证数据

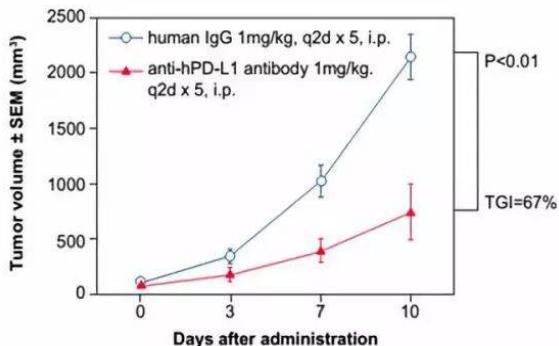
· PD-L1人源化小鼠T细胞流式分析(FACS)数据



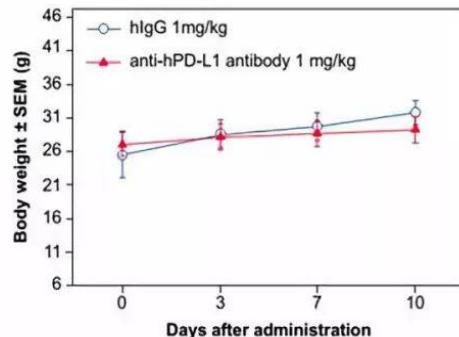
FACS 检测 PD-L1 人源化纯合子小鼠和野生型小鼠脾脏淋巴细胞 PD-L1 表达。结果显示：在人源化 PD-L1 纯合子小鼠脾脏 T 细胞和 B 细胞中均可以检测到人源 PD-L1 的表达。（与 CrownBio 合作完成）

PD-L1人源化小鼠MC38荷瘤模型体内验证结果

PD-L1 antibody anti-tumor efficacy validation



Body weight changes in anti-tumor validation



PD-L1 人源化小鼠 MC38 荷瘤模型体内抗肿瘤药效验证。PD-L1 人源化纯合子小鼠接种 MC38 人源化结肠癌细胞系（表达人源 PDL1，不表达鼠源 PD-L1），肿瘤生长至约 100 mm³随机将动物分组为对照组和治疗组（n=5）。结果显示：针对人的 PD-L1 抗体有非常显著的抗肿瘤效果（TGI：抑瘤率，p<0.01），证明 PD-L1 人源化小鼠是一个很好的验证针对人 PD-L1 抗体药效的体内模型。

人源化小鼠订购信息

名称	目录号	状态
CTLA-4-HU	NM-HU-00014	活体
PD-1-HU	NM-HU-00015	活体
PD-L1-HU	NM-HU-00062	活体
PD-1&CTLA-4-HU	NM-HU-00079	活体
PD-L1&CTLA-4-HU	NM-HU-00102	活体
PD-1&PD-L1-HU	NM-HU-00100	活体

参考文献

- Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol.* 2002;3:611-618.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immuno-surveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21:137-148.
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25:9543-9553.
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322:271-275.
- Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy—Inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6580-6587.
- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):98-106.