

# 基于噬菌体展示技术的替雷利珠单抗特异性结合肽筛选鉴定及其应用研究<sup>△</sup>

陈雨<sup>1,2\*</sup>, 樊芳<sup>2</sup>, 袁智龙<sup>1</sup>, 张雨欣<sup>2</sup>, 王卓<sup>1#</sup> (1. 海军军医大学第一附属医院药学部, 上海 200433; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)05-0513-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.05.001



**摘要** 目的: 开发一种高效、低成本的即时检测方法, 用于免疫检查点抑制剂替雷利珠单抗的血液浓度监测, 解决现有检测方法(酶联免疫吸附试验、液相色谱-串联质谱法)在临床应用中的局限性, 并推动个体化精准治疗发展。方法: 采用噬菌体展示技术经3轮生物淘选获得替雷利珠单抗特异性结合环肽(CP1), 通过硫醇-金配位作用将优化的多肽CP1.1固载于金纳米颗粒表面, 构建基于金纳米颗粒聚集/分散产生颜色变化的紫外传感器(CP1.1@AuNPs)。结果: 筛选获得高亲和力( $K_D = 1.01 \mu\text{mol/L}$ )且无免疫球蛋白G交叉反应的特异性多肽, 所建传感器可通过多肽-抗体结合诱导AuNPs聚集的紫外信号变化实现对替雷利珠单抗的快速检测, 灵敏度显著优于传统方法。结论: 该研究为单克隆抗体药物浓度监测提供了新型解决方案, 其多肽识别元件可拓展至侧流层析等检测平台, 为免疫治疗药物动态监测和个性化给药奠定了基础, 未来需通过临床样本验证其实际应用价值。

**关键词** 替雷利珠单抗; 噬菌体展示; 多肽; 金纳米颗粒; 浓度检测

## Screening, Identification and Application of Tislelizumab-Specific Binding Peptides Based on Bacteriophage Display Technology<sup>△</sup>

CHEN Yu<sup>1,2</sup>, FAN Fang<sup>2</sup>, YUAN Zhilong<sup>1</sup>, ZHANG Yuxin<sup>2</sup>, WANG Zhuo<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To develop an efficient and low-cost point-of-care assay for blood concentration monitoring of the immune checkpoint inhibitor tislelizumab, to address the limitations of existing assays (enzyme linked immunosorbent assay, liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in clinical applications, and to promote the development of individualized precision therapy. **METHODS:** Tislelizumab-specific binding cyclic peptide (CP1) was obtained by bacteriophage display technology and three rounds of biological panning, and the optimized peptide CP1.1 was immobilized on the surface of gold nanoparticles through thiol-gold coordination, and an ultraviolet sensor (CP1.1@AuNPs) based on the aggregation/dispersion of gold nanoparticles produced by color change was constructed. **RESULTS:** The specific peptides with high affinity ( $K_D = 1.01 \mu\text{mol/L}$ ) and no immunoglobulin G cross-reactivity were screened, and the sensor could quickly detect tislelizumab through the ultraviolet signal change of peptide-antibody binding induced by AuNPs aggregation, the sensitivity was significantly better than that of traditional methods. **CONCLUSIONS:** This study provides a new solution for the monitoring of monoclonal antibody drug concentration, and its peptide recognition element can be extended to detection platforms such as lateral flow chromatography, which lays a foundation for dynamic monitoring and individualized administration of immunotherapy drugs, and its practical application value needs to be verified through clinical samples in the future.

**KEYWORDS** Tislelizumab; Bacteriophage display; Peptides; Gold nanoparticles; Concentration detection

替雷利珠单抗为靶向程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)的免疫检查点抑制剂, 其作用机制基于阻断

PD-1与程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)的免疫抑制通路。PD-1是T细胞表面的关键检查点蛋白, 与肿瘤细胞高表达的PD-L1结合后可抑制T细胞活性, 帮助肿瘤逃避免疫清除<sup>[1]</sup>。替雷利珠单抗通过竞争性结合PD-1受体, 恢复T细胞的抗肿瘤功能, 现已成为非小细胞肺癌、尿路上皮癌等病症的核心治疗药物。然而, 该药的临床应用面临双重挑战: 一方面, 其引发的免疫相关不良事件, 如皮

<sup>△</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 82204339); 长海医院“234学科攀登计划”(No. 2019YXK012)

\* 硕士研究生。研究方向: 临床药学。E-mail: 925350766@qq.com  
# 通信作者: 主任药师, 博士生导师。研究方向: 临床药学。  
E-mail: wangzhuo088@163.com

肤红斑狼疮<sup>[2]</sup>、多器官损伤<sup>[3]</sup>等,可能会导致治疗中断;另一方面,受肿瘤异质性及微环境复杂性影响,单药治疗的客观缓解率普遍<30%<sup>[4]</sup>。研究表明,该类药物毒性和疗效的个体差异可能与血药浓度动态波动、患者免疫特征及肿瘤微环境调控密切相关<sup>[5]</sup>。这些局限性凸显了优化治疗策略的迫切需求,尤其是基于个体化药理学监测的精准给药方案。此外,目前临床采用固定剂量方案,未充分考虑患者体重、免疫状态等个体差异。尽管已有研究探索该类药物的药理学特征,如纳武利尤单抗,但该类药物的暴露量与疗效/毒性的关系仍存争议<sup>[6]</sup>。关于替雷利珠单抗的药理学相关学术报道较少,更凸显了治疗监测与个体化给药的重要性。

目前,该类单抗的检测主要依赖于酶联免疫吸附试验(ELISA)<sup>[7-8]</sup>、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[9]</sup>,基于PD-1蛋白的ELISA法稳定性不足且需批量检测,等待时间较长;而LC-MS/MS需要复杂繁琐的前处理流程,限制了其日常应用。因此,亟需开发简单快速、高灵敏、高准确度的检测方法。而开发此类方法的关键在于高特异性识别元件的获得。相对于传统抗原,多肽因分子量小、成本低、可修饰性强等优势,成为理想的候选识别元件<sup>[10]</sup>。噬菌体展示技术是获得多肽的重要手段,其作为一种成熟的高通量筛选方法,可将外源基因编码的多肽展示于噬菌体表面,通过多轮生物淘选富集获得目标分子的高亲和力配体<sup>[11-12]</sup>。该技术已成功应用于曲妥珠单抗等抗体的靶向多肽筛选<sup>[13]</sup>。因此,本研究旨在利用噬菌体展示技术,以替雷利珠单抗为靶蛋白,筛选替雷利珠单抗特异性结合肽。筛选到的多肽可以作为该单抗的特异性识别元件,在复杂体系中实现对替雷利珠单抗的捕获,为该单抗的后续研究提供强有力的工具。在此基础上,本研究中基于筛选获得的多肽序列耦合金纳米颗粒(AuNPs),利用多肽介导抗体偶联导致纳米颗粒聚集/分散产生颜色变化,成功构建了替雷利珠单抗新的紫外分析方法。本研究结果将对单抗类药物浓度的监测有一定指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 替雷利珠单抗淘选 Ph. D. -, C7C 噬菌体展示文库

本研究以替雷利珠单抗(国药准字 S20190045)为靶蛋白,使用 Ph. D. -, C7C 噬菌体文库(New England Biolabs)进行淘选,按照 Ph. D.™ Phage Display Libraries Kits v2 Instruction Manual 中“Surface-Phase Panning (Direct Target Coating)”的实验流程进行 3 轮噬菌体展示淘选。

### 1.2 噬菌体测序

选取含噬菌斑<100 个的第 3 轮平板,从中随机挑选 10 个蓝色噬菌斑进行噬菌体单克隆扩增与噬菌体单链 DNA 提取。将提取到的噬菌体单链 DNA 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。使用 DNASTar 软件对测序结果进行分析,找到酶切位点 Kpn I/Acc65 I 以及 Eag I,环肽序列即插在两者之间,翻译多肽序列。通过基于 web 的应用程序(<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)对获得的所有肽进行统计分析,以生成氨基酸组成分析图。

### 1.3 多肽合成

将序列委托吉尔生化有限公司通过固相有机合成法进行合成,使用高效液相色谱法进行纯化(纯度>90%)并经质谱

分析确认,保存至-20℃备用。

## 1.4 表面等离子共振技术(SPR)验证多肽与替雷利珠单抗的亲合性

SPR 是基于光学原理发展而来的新型分析技术,是利用光在不同介质中产生消逝波后与等离子波产生共振,进而检测生物分子相互作用的传感分析技术。通过氨基偶联法将替雷利珠单抗以及同型内源性干扰物质免疫球蛋白 G(IgG)固定于 CM5 芯片表面,按照“Biacore 检测蛋白与小分子结合操作指南”进行上样。使用 Graphpad 对曲线图进行数据分析和处理,使用稳态亲和模式(1:1)进行拟合获得亲和常数。

### 1.5 基于肽修饰金纳米传感器的制备

为改善替雷利珠单抗特异性结合环肽 CP1 的亲水性,在 CP1(ACISIWGTF CGGS-CONH<sub>2</sub>, C2-C10)的基础上合成了 CP1.1(ACISIWGTFCKKK, C2-C10)。制备具体步骤:将 CP1.1 溶于 DMSO 配制成 10 mmol/L 储备液后,取 50 μL 经 1 mL 双蒸水稀释混匀;然后向 5 mL 玻璃瓶中加入 500 μL AuNPs 溶液(0.05 mg/mL, d=30 nm)和等体积双蒸水,磁力搅拌下注入肽稀释液,室温(25℃)下避光搅拌 4 h;最后将混合液转移至截留分子量为 3 000 Da 的 RC 透析袋中持续透析 12 h,获得纯化后的 CP1.1@AuNPs。

### 1.6 透射电镜(TEM)表征溶液形态

将 AuNPs、CP1.1@AuNPs 及其与 100 μg/mL 替雷利珠单抗的混合液分别超声分散后,各取 1 μL 样品滴覆于 20 nm 超薄碳膜铜网上,经耐热干燥烤灯烘干,最终通过 TEM 观察 AuNPs 的形貌特征。

### 1.7 CP1.1@AuNPs 对替雷利珠单抗的紫外响应工作曲线

向一系列 250 μL 微量离心管中加入 90 μL 的 CP1.1@AuNPs 储备液以及不同体积的替雷利珠单抗(溶液中单抗的终浓度为 0、30、50、100、150、200 及 300 μg/mL),加水定容至 100 μL。混合均匀后转移至容量为 350 μL 的微量比色皿中,放入样品室进行紫外吸收光谱扫描。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体展示淘选结果

基于噬菌体展示技术的筛选流程,通过清洗去除低亲和力及非特异性结合的噬菌体,然后利用洗脱液解离高亲和力的噬菌体。经扩增的噬菌体进入下一轮筛选,通过多轮循环实现对靶向替雷利珠单抗的高亲和力噬菌体的富集。本研究采用噬菌体展示环七肽库对替雷利珠单抗进行 3 轮筛选,回收率数据显示,首轮回收率为  $1.24 \times 10^{-5}$ ,第 3 轮显著提升至  $3.33 \times 10^{-4}$ ,增幅约 27 倍,表明高亲和力噬菌体成功被富集,见表 1。

表 1 替雷利珠单抗筛选回收率

筛选轮数	投入噬菌体/pfu	回收噬菌体/pfu	回收率 <sup>a</sup>
1	$3.20 \times 10^{10}$	$3.96 \times 10^5$	$1.24 \times 10^{-5}$
2	$2.00 \times 10^{11}$	$6.04 \times 10^7$	$3.02 \times 10^{-4}$
3	$2.00 \times 10^{11}$	$6.67 \times 10^8$	$3.33 \times 10^{-4}$

注:“a”,回收率=回收噬菌体/投入噬菌体。

### 2.2 噬菌体展示淘选结果

从第 3 轮滴度测定的平板上(噬菌斑<100 个)随机挑选 10 个噬菌斑,利用 Sanger 测序法对噬菌体进行测序,然后对测序结果进行分析,得到多肽序列,结果见表 2。最终得到了 8 个有效结果(2 条空载),3 条序列,其中 CP1 重复 6 次,CP2

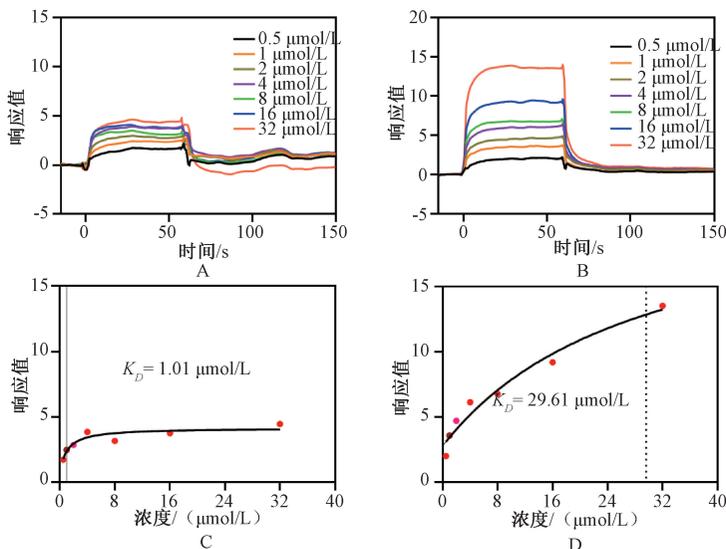
与 CP3 仅出现 1 次。考虑到亲和性高的多肽应出现重复,故选择 CP1 进行合成。为模拟噬菌体内多肽构象,最终合成多肽序列为 ACISIWGTFCGGGS-CONH<sub>2</sub>, C2-C10。

表 2 替雷利珠单抗环七肽库测序结果

序列命名	氨基酸序列	出现频率
CP1	ACISIWGTFC	6/8
CP2	ACHGRYADRC	1/8
CP3	ACFSPLGWTC	1/8

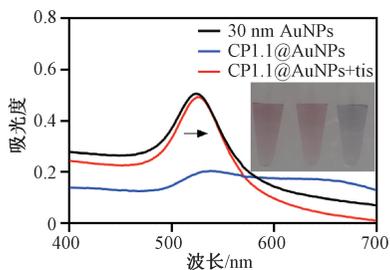
### 2.3 SPR 验证多肽与蛋白亲和性

在筛选过程中,非特异性结合是无法避免的,所以需要



A. CP1 与替雷利珠单抗的 SPR 响应曲线; B. CP1 与 IgG 的 SPR 响应曲线; C. CP1 与替雷利珠单抗的拟合图; D. CP1 与 IgG 的拟合图。

图 1 SPR 响应曲线与拟合图



试管从左至右依次为 AuNPs、CP1.1@AuNPs 及 CP1.1@AuNPs+100 μg/mL 替雷利珠单抗。

图 2 紫外吸收光谱图

成功制备 CP1.1@AuNPs。如图 2 所示,30 nm AuNPs 特征峰位于 524 nm,经 CP1.1 修饰后红移至 526 nm,表明多肽成功偶联。在该溶液中加入 100 μg/mL 替雷利珠单抗后,吸光度从 0.5 骤降至 0.2,表明纳米颗粒分散状态发生显著改变。实验结果验证了 CP1.1@AuNPs 的成功构建及其可对替雷利珠单抗产生较为灵敏的响应。

2.4.2 CP1.1@AuNPs 的 TEM 表征图谱:采用 TEM 对 AuNPs、CP1.1@AuNPs 及其与替雷利珠单抗(100 μg/mL)复合物进行纳米形貌分析,见图 3。原始 AuNPs 的分散性良好,粒径均一且表面光滑;经多肽修饰后虽出现了局部二聚或少量团聚,但仍维持较好的分散状态;再加入替雷利珠单抗后,

多肽的亲和力进行进一步验证,选择 SPR 验证候选肽与替雷利珠单抗的结合亲和性和特异性;同时,选择 IgG 作为阴性对照,考察该条多肽是否可以排除其他同型抗体的干扰。CP1 与替雷利珠单抗和 IgG 的 SPR 相互作用结果见图 1,CP1 出现了良好的亲和力与特异性,与替雷利珠单抗的平衡解离常数( $K_D$ )为 1.01 μmol/L( $K_D$  值越低,亲和力越高),与 IgG 的  $K_D$  值为 29.61 μmol/L,两者有数量级的差异。因此,CP1 可作为替雷利珠单抗的候选肽。

### 2.4 基于肽修饰金纳米的传感器构建及其性质

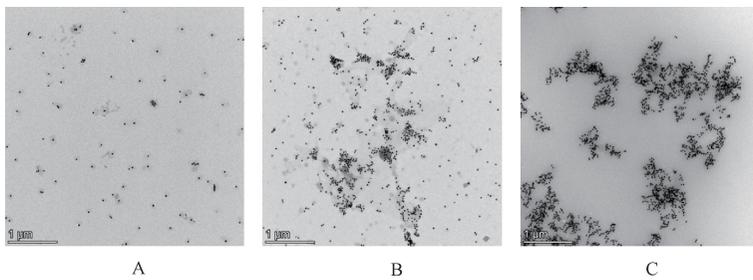
2.4.1 CP1.1@AuNPs 的紫外光谱性质:基于“1.5”项下方法

纳米颗粒发生显著聚集,并形成致密网状结构,1 μm 观察视野内呈现连续聚沉区域。该现象表明替雷利珠单抗可通过特异性结合 CP1.1 触发纳米颗粒交联,其空间位阻消除引发等离子体耦合效应,导致体系分散态急剧改变。这种特异性聚集行为验证了多肽对抗体的识别能力,为构建基于纳米颗粒聚集的抗体检测方法奠定了理论基础。

2.4.3 CP1.1@AuNPs 对替雷利珠单抗的紫外响应工作曲线:将不同浓度的替雷利珠单抗(0、30、50、100、150、200 和 300 μg/mL)加入至 CP1.1@AuNPs 中,使用紫外分光光度计进行扫描,绘制紫外吸收光谱图。加入了替雷利珠单抗的 CP1.1@AuNPs 的最大吸收峰在 529 nm 处,随着单抗浓度的不断增大,吸收峰也不断下降,见图 4(A)。取 529 nm 处的吸收峰值与替雷利珠单抗的浓度进行拟合,得到了标准工作曲线[见图 4(B)],方程为  $Y = -0.0009456X + 0.4650$  ( $R^2 = 0.9695$ ),表明 CP1.1@AuNPs 对替雷利珠单抗能够产生灵敏的紫外吸收响应,可以用于替雷利珠单抗的定性分析和定量测定。

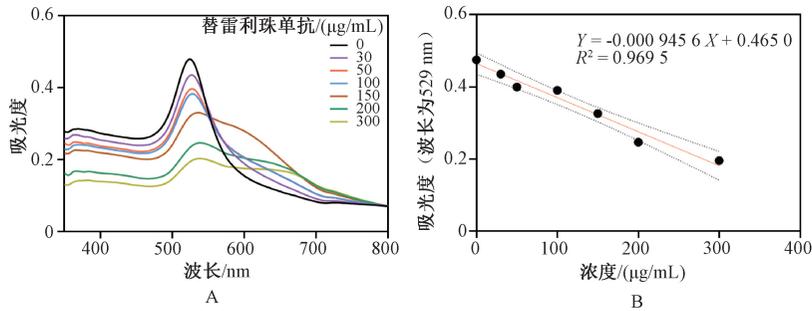
3 讨论

替雷利珠单抗作为靶向 PD-1 的免疫检查点抑制剂,通过阻断 PD-1 与 PD-L1 的相互作用恢复 T 细胞的抗肿瘤活性,在非小细胞肺癌等实体瘤的治疗中展现显著疗效。然而,其临床应用受限于免疫相关不良事件以及实体瘤中较低反应率。这些现象可能与其暴露量动态变化、患者免疫特征差异和肿瘤微



A. AuNPs; B. CP1.1@AuNPs; C. CP1.1@AuNPs+100 µg/mL 替雷利珠单抗。

图3 TEM 图谱



A. 加入不同浓度的替雷利珠单抗(0、30、50、100、150、200及300 µg/mL)后CP1.1@AuNPs的紫外吸收光谱变化;  
B. CP1.1@AuNPs在529 nm处的吸收峰值对替雷利珠单抗浓度的拟合图。

图4 CP1.1@AuNPs对替雷利珠单抗的紫外响应工作曲线

环境复杂性等密切相关。现行固定剂量方案未充分考虑患者体重、免疫状态等个体差异,而关于其药动学参数与疗效/毒性关系的争议(如暴露量是否影响临床结局)进一步凸显了个体化治疗监测的迫切需求。现有血药浓度检测方法(如ELISA、LC-MS/MS)因成本高、操作复杂或设备依赖性强,难以满足临床即时检测的需求。因此,开发基于新型识别元件的高效检测方法成为关键。多肽因其分子量小、成本低及可修饰性强等优势,成为理想的识别元件。本研究利用噬菌体展示技术筛选并获得了替雷利珠单抗特异性结合环肽CP1,并将其修饰肽CP1.1耦合于AuNPs表面,构建了基于AuNPs聚集/分散产生颜色变化的紫外定量分析方法。实验证实,该多肽可特异性地介导抗体结合并触发AuNPs聚集,形成定量检测的紫外信号。本研究不仅为替雷利珠单抗的浓度监测提供了高灵敏、低成本的新方法,更为其他单抗类药物的个体化治疗监测开辟了新路径。筛选的多肽识别元件可进一步拓展至其他检测平台(如侧流层析、生物传感器)的构建,推动免疫检查点抑制剂治疗的精准化发展。未来需结合临床样本验证其实际应用价值,并探索多肽在动态药效评估中的潜力。

### 参考文献

[1] SHEN S Y, HONG Y H, HUANG J J, et al. Targeting PD-1/PD-L1 in tumor immunotherapy: mechanisms and interactions with host growth regulatory pathways [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2024, 79: 16-28.

[2] CHEN W Q, SONG X, ZHOU Y. Kutaner Lupus erythematoses ausgelöst durch Tislelizumab[J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2024, 22(7): 1003-1005.

[3] YUAN M, HAN N, SHU L, et al. Case report: multi-organ injuries induced by tislelizumab[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1508293.

[4] ZHU S M, ZHANG T, ZHENG L, et al. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy [J]. *J Hematol*

*Oncol*, 2021, 14(1): 156.

[5] GUO L B, WEI R, LIN Y, et al. Clinical and recent patents applications of PD-1/PD-L1 targeting immunotherapy in cancer treatment-current progress, strategy, and future perspective [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1508.

[6] 杨云云, 骆锦前, 王卓. 免疫检查点抑制剂药动学和药效学的关系[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(10): 1276-1280.

[7] PUSZKIEL A, NO É G, BOUDOU-ROUQUETTE P, et al. Development and validation of an ELISA method for the quantification of nivolumab in plasma from non-small-cell lung cancer patients[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 139: 30-36.

[8] PLUIM D, ROS W, VAN BUSSEL M T J, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for the quantification of nivolumab and pembrolizumab in human serum and cerebrospinal fluid [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 128-134.

[9] MILLET A, KHOUDOUR N, BROS P, et al. Quantification of nivolumab in human plasma by LC-MS/HRMS and LC-MS/MS, comparison with ELISA[J]. *Talanta*, 2021, 224: 121889.

[10] RIFAI N, HORVATH A R, WITTEW C T. Principles and Applications of Molecular Diagnostics[M]. Amsterdam: Elsevier, 2018: 345-380.

[11] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[12] SAW P E, SONG E W. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy[J]. *Protein Cell*, 2019, 10(11): 787-807.

[13] VAN ROSMALEN M, NI Y, VERVOORT D F M, et al. Dual-Color bioluminescent sensor proteins for therapeutic drug monitoring of antitumor antibodies[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(5): 3592-3599.

(收稿日期:2025-03-27 修回日期:2025-04-16)