



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105121715 B

(45)授权公告日 2018.10.26

(21)申请号 201380071758.8

(22)申请日 2013.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105121715 A

(43)申请公布日 2015.12.02

(30)优先权数据

61/735,791 2012.12.11 US

61/833,588 2013.06.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.07.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/073275 2013.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/093118 EN 2014.06.19

(73)专利权人 艾伯特叶史瓦大学爱因斯坦医学院

地址 美国纽约

(72)发明人 S·C·阿尔莫 R·D·塞德尔三世
B·S·希勒里希

S·C·加勒特汤姆森 J·D·洛夫

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 肖鹏 王君

(51)Int.Cl.

C40B 30/06(2006.01)

审查员 穆飞航

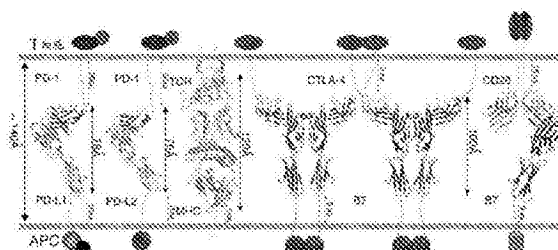
权利要求书2页 说明书31页 附图23页

(54)发明名称

高通量受体:配体鉴定方法

(57)摘要

本发明提供了用于高通量鉴定受体:配体相互作用的方法和系统。本申请全篇,在括号内提到各种出版物。在说明书的结尾处可找到对这些参考文献的完整引用。这些出版物及本文提到的所有专利、专利申请公布和书籍的公开内容均特此以引用的方式整体并入本申请中以更全面地描述本发明所属的领域。



1. 一种系统,其包括:

(i) 第一多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞,其中所述细胞经载体转化以便:

(a) 在其细胞表面表达第一异源蛋白;并且

(b) 表达第一胞质表达型荧光蛋白,使得所述第一多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞表达至少两种不同类型的第一异源蛋白;和

(ii) 第二多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源蛋白并且表达第二胞质表达型荧光蛋白,其中所述第二多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞表达单一类型的第二异源蛋白;

其中:

i) 由所述第一多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞表达的每一种载体包含所表达异源蛋白单一的15-35个核苷酸的预定序列;并且

ii) 通过荧光活化细胞分选 (FACS) 分析确定所述第一和第二胞质表达型荧光蛋白的共定位。

2. 根据权利要求1所述的系统,其中所述第一多个细胞中的任何单个细胞在其细胞表面仅表达一种第一异源蛋白。

3. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述多个的不同类型第一异源蛋白为预定野生型蛋白的每种突变体。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的系统,其中所述第二异源蛋白为野生型蛋白。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的系统,其中所述第一多个细胞中每种类型的异源蛋白与所述多个中每种其它类型的异源蛋白不同之处在于1个、2个、3个、4个或5个氨基酸残基点突变。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的系统,其中所述第一或第二异源蛋白为免疫球蛋白超家族蛋白、TNF受体蛋白、细胞因子、趋化因子、1型跨膜受体蛋白、2型跨膜受体蛋白、离子通道蛋白、膜转运蛋白、tol1样受体、G蛋白偶联受体、生长因子受体、粘连蛋白、白细胞介素或白细胞介素受体。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的系统,其中所述第一或第二异源蛋白为PD-1多肽、PD-L1多肽、PD-L2多肽、B7-1多肽、B7-2多肽、CD28多肽、CTLA-4多肽、ICOS多肽或ICOS-L多肽。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的系统,其中所述单一序列能够被一种或多种通用引物引发。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的系统,其中所述第一和第二胞质表达型荧光蛋白为不同颜色。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的系统,其中每一种多个细胞为多个哺乳动物细胞。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的系统,其中所述第二异源蛋白是至少两种不同类型的第二异源蛋白的配体。

12. 一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括:

a) 表达所述候选配体蛋白或肽作为根据权利要求1-11中任一项所述的系统中所述第一多个细胞的第一异源蛋白;

b) 在允许所述第一异源蛋白与所述第二异源蛋白结合的条件下,表达所述第二蛋白或肽作为根据权利要求1-11中任一项所述的系统中的第二异源蛋白;并且

c) 回收所述第一和第二异源蛋白共定位的细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法,其包括步骤b) 和步骤c) 之间的洗涤步骤以去除任何未结合的第一异源蛋白。

14. 根据权利要求13所述的方法,其包括从所述回收细胞中获得核酸并对所述核酸测序以鉴定其中所含的15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定与所述单一的15-35个核苷酸相对应的已经结合了所述第二蛋白或肽的所述候选配体蛋白或肽。

15. 一种确定第一蛋白的预定氨基酸残基对所述第一蛋白与第二蛋白结合的影响的方法,所述方法包括:

a) 表达相对于所述第一蛋白经一个或多个点突变而突变的蛋白作为根据权利要求1-11中任一项所述的系统的所述第一多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞中的所述至少两种不同类型的第一异源蛋白;

b) 使所述第一多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞与呈根据权利要求1-11中任一项所述的系统中经转化以便表达所述第二蛋白和所述第二胞质表达型荧光蛋白的所述第二多个悬浮适应性哺乳动物细胞或昆虫细胞的第二异源蛋白形式的所述第二蛋白接触;

c) 回收显示所述第一和第二胞质表达型荧光蛋白共定位的细胞;

d) 从所述回收细胞获得核酸并对所述核酸测序以鉴定其中所含的所述15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定已经结合了所述第二蛋白或肽的所述第一蛋白,并且将已经结合了所述第二蛋白或肽的蛋白的水平与预定参考水平作比较,

其中已经结合了所述第二蛋白或肽的蛋白的水平超过所述预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基增强第一蛋白与所述第二蛋白的结合,并且其中已经结合了所述第二蛋白或肽的蛋白的水平低于所述预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基抑制第一蛋白与所述第二蛋白的结合。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述预定水平为对照,任选地,其中通过测定未突变的第一蛋白与所述第二蛋白结合的水平获得所述预定水平。

17. 根据权利要求15-16中任一项所述的方法,其中通过荧光活化细胞分选分析回收显示所述第一和第二胞质表达型荧光蛋白共定位的细胞。

高通量受体:配体鉴定方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年12月11日提交的美国临时申请第61/735,791号和2013年6月11日提交的美国临时申请第61/833,588号的权益,其各自的内容特此以引用的方式并入。

[0003] 政府支持的声明

[0004] 本发明根据美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权编号3U54GM094662-02、5U01GM094665-02和AI057158在政府支持下进行。政府具有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 本申请全篇,在括号内提到各种出版物。在说明书的结尾处可找到对这些参考文献的完整引用。这些出版物及本文提到的所有专利、专利申请公布和书籍的公开内容均特此以引用的方式整体并入本申请中以更全面地描述本发明所属的领域。

[0007] 细胞表面受体和粘附分子是细胞功能的保卫者,对正常生理和病理重要的发育、形态发生和环境过程。这些分子是主要的治疗靶标。这些复合物的高分辨率结构表征限定了为受体:配体特异性、亲和力、寡聚状态、效价和对于将这些相互作用及其相关信号传导通路整合到整体细胞生理学中很重要的整体结构特征的基础的化学和物理决定因素。所有这些特征对于了解驱动复杂细胞过程并为治疗干预提供难得机会的基本机制至关重要。不幸的是,目前对这些关键复合物的系统性结构表征(即,分泌蛋白质组的结构基因组学)是不现实的目标,因为即使不是大多数,也有许多受体:配体对仍不明确,因此不能在结构上表征。

[0008] 本发明通过提供有效且系统性鉴定与人体生理学、疾病和药品有关的受体:配体相互作用的所有组成部分的技术解决了这种需要。

[0009] 发明概述

[0010] 提供了一种细胞微阵列,其包括:

[0011] (i) 经转化以便表达第一预定异源分泌蛋白、异源膜蛋白或异源细胞表面蛋白和第一荧光蛋白的第一多个细胞和(ii) 经转化以便表达第二预定异源分泌蛋白或第二异源蛋白和第二荧光蛋白的至少第二多个细胞,

[0012] 其中所述第一和第二多个细胞附着于所述微阵列的固体表面,并且其中所述第一和第二多个细胞在所述固体表面上处于空间上不同的位置。

[0013] 提供了一种细胞微阵列,其包括:

[0014] (i) 经转化以便表达(a) 第一预定异源蛋白和(b) 第一荧光蛋白的第一多个细胞和(ii) 经转化以便表达(a) 第二预定异源蛋白和(b) 第二荧光蛋白的至少第二多个细胞,

[0015] 其中所述第一和第二多个细胞附着于所述微阵列的固体表面,并且其中所述第一和第二多个细胞在所述固体表面上处于空间上不同的位置。

[0016] 提供了一种制备如本文所述的细胞微阵列的方法,包括:将编码所述第一异源蛋白和第一荧光蛋白的第一多个表达构建体固定在微阵列的固体表面上并且在空间上不同于所述固定的第一多个表达构建体的位置,将编码所述第二异源蛋白和第二荧光蛋白的至

少第二多个表达构建体固定在所述微阵列的固体表面上,并且在包括转染剂存在的条件下使所述表达构建体与多个细胞接触,以便允许所述细胞附着于所述固体表面并且发生在每个空间上不同的位置的至少一部分细胞被所述相应表达构建体的转染。

[0017] 还提供了一种确定候选蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括表达所述第二蛋白作为本文所述的细胞微阵列的异源蛋白,并且使所述细胞微阵列与所述候选蛋白或肽接触,其中所述候选蛋白或肽已经将第三荧光蛋白或肽固定于其上,洗涤与所述候选蛋白或肽接触的所述细胞微阵列以便去除未结合的候选蛋白或肽,并且确定在洗涤之后是否存在与所述细胞微阵列结合的任何候选蛋白或肽,其中在洗涤之后在对应于经第一异源蛋白转化的细胞的第一空间位置存在与所述细胞微阵列结合的候选蛋白或肽表明所述候选蛋白或肽与所述第一异源蛋白结合,并且其中在洗涤之后在所述第一空间位置不存在与所述细胞微阵列结合的候选蛋白或肽表明所述候选蛋白或肽不与所述异源蛋白结合。

[0018] 还提供了一种系统,其包括(i)微阵列固体表面和经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽和第一C端胞质表达型荧光蛋白的悬浮适应性细胞系和(ii)至少a)经转化以便在其细胞表面表达预定异源蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞,或b)已经将所述异源蛋白固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个微珠,其中a)或b)固定到所述微阵列固体表面。同上,加以必要的变更,还提供了一种系统,其中在第二多个经转化的细胞或多个微珠上表达所述候选配体蛋白或肽,并且在经转化的悬浮适应性细胞系的细胞表面表达所述异源蛋白。

[0019] 一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在当前系统的所述悬浮适应性细胞系的多个细胞中表达所述候选配体蛋白或肽和第一荧光蛋白,并且使所述多个细胞与a)经转化以便表达所述异源蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞,或b)已经将所述异源蛋白和第二荧光蛋白固定到其表面的多个微珠接触,并且洗涤以去除未结合的候选配体蛋白或肽,并且通过FACS分析鉴定显示所述第一和第二荧光蛋白共定位的细胞,其中显示所述第一和第二荧光蛋白在空间上不同的位置共定位的细胞表明所述第一蛋白或肽与对应于所述空间上不同的位置的所述异源蛋白结合。

[0020] 提供了一种系统,其包括第一多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源蛋白并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述载体包含所述第一异源蛋白的15-35个核苷酸的单一预定序列,所述单一序列能够被一个或多个通用引物引发;和第二多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源蛋白并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述第二载体包含所述第二异源蛋白的15-35个核苷酸的不同单一预定序列;和(i)一种或多种另外的多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽并且表达第二荧光蛋白,所述第二悬浮适应性细胞系包含稳定表达的肽细胞表面表位,或(ii)已经将候选配体蛋白或肽固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个磁性微珠。

[0021] 还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二预定蛋白结合的方法,所述方法包括表达第二预定蛋白作为当前系统的异源蛋白并且与所述(i)经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽并且表达第二荧光蛋白的一种或多种另外的多个悬浮适应性细胞系细胞的候选配体蛋白或肽接触,所述第二悬浮适应性细胞系包含稳定表达的肽细胞表面

表位,或与(ii)已经将候选配体蛋白或肽固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个磁性微珠的候选配体蛋白或肽接触;

[0022] 通过磁吸引分离与所述第二多个细胞中的一个或多个或与所述多个磁性微珠结合的所述第一多个悬浮适应性细胞系细胞中的任一个;

[0023] 从此类分离的细胞-细胞或细胞-微珠缀合物获得DNA并且若DNA中存在单一序列,则使用所述通用引物扩增所述单一序列;

[0024] 对所述单一序列的拷贝测序以确认其存在;

[0025] 将这样鉴定的所述单一序列与将所述15-35个核苷酸的单一预定序列与特定异源蛋白或肽相关联的数据库作比较,并由此鉴定这样相关联的任何异源蛋白或肽结合,从而将特定异源蛋白或肽鉴定为与所述候选蛋白或肽结合。

[0026] 一种系统,其包括(i)第一多个悬浮适应性细胞系细胞,其中所述多个细胞经载体转化以便(a)在其细胞表面表达异源蛋白并且(b)表达第一胞质表达型荧光蛋白,并且其中所述载体包含表达的所述异源蛋白单一的15-35个核苷酸的预定序列,使得第一多个悬浮适应性细胞系细胞表达至少两种不同类型的第一异源蛋白;和(ii)第二多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源蛋白并且表达第二胞质表达型荧光蛋白,其中所述第二多个悬浮适应性细胞表达单一类型的第二异源蛋白。在一个实施方案中,第一多个细胞中的任何单个细胞在其细胞表面仅表达一种异源蛋白。在一个实施方案中,没有第一多个细胞的不同类型第一异源蛋白具有与所述第二多个细胞的第二异源蛋白相同的序列。

[0027] 还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在允许所述第一异源蛋白与所述第二异源蛋白结合的条件下表达候选配体蛋白或肽作为如本文所述的系统中第一多个细胞的第一异源蛋白并且表达第二蛋白或肽作为如本文所述的系统中的第二异源蛋白,并且任选地,洗涤以去除任何未结合的第一异源蛋白,然后回收第一和第二异源蛋白共定位的细胞,从回收细胞中获得核酸并对核酸测序以鉴定其中所含的15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定与单一的15-35个核苷酸相对应的已经结合了第二蛋白或肽的候选配体蛋白或肽。

[0028] 还提供了一种确定第一蛋白的预定氨基酸残基对所述第一蛋白与第二蛋白结合的影响的方法,所述方法包括表达相对于第一蛋白经一个或多个点突变而突变的所述蛋白作为如本文所述的系统的第一悬浮适应性细胞系多个细胞中的多种不同类型的异源蛋白,并且使所述多种蛋白与呈本文所述的系统中经转化以便表达第二蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞的第二异源蛋白形式的第二蛋白接触,并且回收显示所述第一和第二荧光蛋白共定位的细胞,从回收细胞获得核酸并对核酸测序以鉴定其中所含的15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定已经结合了第二蛋白或肽的所述第一蛋白,并且将已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平与预定参考水平作比较,

[0029] 其中已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平超过预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基增强第一蛋白与第二蛋白的结合,并且其中已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平低于预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基抑制第一蛋白与第二蛋白的结合。

[0030] 还提供了一种系统,其包括(i)经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源候选

配体蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白的第一多个悬浮适应性细胞系细胞和经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源候选配体蛋白或肽并且表达第二胞质表达型荧光蛋白的第二多个悬浮适应性细胞系细胞,和(ii)已经将靶蛋白、肽或抗体固定到其表面的多个磁性微珠。

[0031] 还提供了一种确定两种候选配体蛋白或肽中的一种或多种是否与靶蛋白、肽或抗体结合的方法,所述方法包括在允许所述第一异源蛋白和所述第二异源蛋白与所述靶蛋白、肽或抗体结合的条件下表达第一候选配体蛋白或肽作为当前系统中第一多个细胞的第一异源蛋白并且表达第二候选配体蛋白或肽作为当前系统中的第二异源蛋白,并且回收与第一荧光蛋白表达细胞复合和/或与第二荧光蛋白表达细胞复合的任何微珠,并鉴定所述复合物中的所述候选配体蛋白,其中回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明第一候选配体蛋白或肽结合靶蛋白或肽,并且其中回收到连接于第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明第二候选配体蛋白或肽结合靶蛋白或肽,并且其中未回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞或第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠分别表明第一候选配体蛋白不结合靶蛋白或肽,并且第二候选配体蛋白不结合靶蛋白或肽。

[0032] 还提供了一种系统,其包括(i)经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源靶蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白的第一多个悬浮适应性细胞系细胞和经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源候选配体蛋白或肽并且表达第二胞质表达型荧光蛋白的一种或多种第二多个悬浮适应性细胞系细胞,和(ii)已经将针对候选配体蛋白或肽或针对靶蛋白或肽的抗体固定到其表面的多个磁性微珠。还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与靶蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在允许所述候选配体蛋白或肽与所述靶蛋白或肽结合的条件下表达候选配体蛋白或肽作为当前系统中所述第二多个细胞的第二异源蛋白并且表达靶蛋白或肽作为当前系统中的第一异源蛋白,并且回收与第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞复合的任何微珠,其中回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明候选配体蛋白或肽结合所述靶蛋白或肽,并且其中未回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明候选配体蛋白不结合所述靶蛋白或肽。

[0033] 附图简述

[0034] 图1.T细胞和抗原呈递细胞之间形成的免疫突触的结晶视图。免疫突触中心区内TCR:MHC和共刺激受体:配体复合物的复合模型。TCR:MHC(PDB代码1G6R)、PD-1:PD-L1(3BIK)、PD-1:PD-L2(3BP5)和CTLA-4:B7-1(1I8L)复合物是现有晶体结构的代表;单价CD28:B7-1复合物的模型基于CD28单体(1YJD)和CTLA-4:B7-1结构。示出了复合物的近似尺寸(即长度),以及连接结构化Ig结构域与膜的残基数量。还指出了免疫突触中质膜之间约140Å的距离。示意性地(即几何符号)示出了采用通过受体:配体胞外域之间的相互作用强加的定位和组织的胞质信号传导和支架蛋白。该图突出了受体:配体结构在限定基本特征(例如,寡聚状态、效价、配体特异性)和对于细胞表面受体和配体而言是功能的关键决定因素的整体组织原理方面的重要性[45]。

[0035] 图2:受体:配体结构的研究。左:鼠PD-1:PD-L2复合物的结构。右:产生亲和力增强且特异性改变的PD-1受体的点突变的位置。

[0036] 图3:细胞微阵列平台。左:生成细胞微阵列的示意图。右:为了说明,将GFP表达构

建体(即,质粒)“钉”在玻璃表面上以产生表达阵列。将HEK293细胞接种到点印cDNA上,随后变成经转染,产生活细胞阵列。使用定制的微阵列打印机构建这种2000-斑点网格。每个斑点为50-80个细胞的集群。

[0037] 图4A-4C:使用细胞微阵列平台检测T细胞配体和受体结合。(A) 含有交替成行的表达胞质GFP或质膜嵌入型PD-L1-GFP的HEK细胞的高密度细胞微阵列(示意性地示出)。(B) 用与Alexa 594二抗(RED)预混的经纯化PD-1 IgG处理所述阵列并且在Axon 4000B微阵列扫描仪上成像。仅呈递PD-L1胞外域的细胞呈现出染色;表达胞质GFP的细胞未显示出染色并且用作阴性对照。(C) 显示经标记的PD-1-Ig融合蛋白和PD-L1GFP但非胞质GFP构建体共定位的合并图像。这些结果证明了所述微阵列的特异性。PD-L1和对照(单独的GFP)之间GFP荧光强度的差异由表达方法表现。

[0038] 图5:在Ig超家族的不同成员之间显示出特异性结合的3个细胞微阵列。用交替成行的编码PD-1、B7-1和CD200R的GFP融合构建体或单独的GFP的质粒DNA点印载玻片。将3张经点印载玻片置于10cm方形培养皿中,用转染剂处理,然后接种HEK细胞。转染3天后,洗涤载玻片并且随后用PD-L2(载玻片1)、CTLA-4(载玻片2)或CD200(载玻片3)的Ig-融合物处理;将Ig-融合物与Cy7二抗预孵育以便检测。所有点印行均成功转染并且为GFP阳性(数据未示出)。图像仅显示了来自于Cy7通道的荧光信号。对于每个阵列而言,仅对存在其同源受体或配体的那些行检测到Ig-融合物明显结合。例如:PD-L2,受体PD-1的配体,仅在点印了PD-1GFP的那些行中结合。为清楚起见,将单独载玻片伪上色并且重叠图揭示了特定结合模式。

[0039] 图6: Ig超家族哺乳动物表达文库的生成。示意图(上)显示了特别工程化以迅速有效地克隆I型分泌蛋白的不依赖连接的载体。已经克隆了Ig超家族的283个成员并通过瞬时转染HEK293细胞测试了表达。使用荧光显微镜术,240个(约85%成功)克隆表达高于本底并且展示正确的膜定位。示出了240个表达文库成员中一组24个代表的GFP荧光图像。对每个表达构建体的预验证突出了需要附加“救援工作”并且对完全表征的稳固平台很关键的那些蛋白。

[0040] 图7: 呈细胞微阵列形式的共转染。左) 经胞质GFP转染的HEK293细胞。中) 经胞质mCherry转染的HEK293细胞。右) 经胞质GFP和mCherry共转染的HEK293细胞。用绿色和红色荧光团的共转染产生黄色荧光。正如呈细胞微阵列形式实现功能性多组分受体所需要的那样,这提供了表达多种多肽的原理证明。

[0041] 图8A-8C: 用高亲和力微珠发现受体:配体的策略。A) 悬浮适应性HEK293细胞经选择的与胞质mCHERRY连接的细胞表面(例如,PD-L1;红色细胞)瞬时转染。B) 用PD-1 Ig或B7-1 Ig-融合蛋白(绿色珠粒)修饰50nm蛋白A涂覆的GFP标记微珠。C) 孵育红色细胞和绿色微珠产生红色:绿色缀合物。D) 流式细胞术允许检测和量化受体:配体相互作用。沿着Y轴是未结合的红色转染细胞;沿着X轴是未结合的绿色微珠;沿着对角线是报告了受体:配体相互作用的红色:绿色细胞:微珠缀合物。

[0042] 图9: 基于微珠证明PD-L1:PD-1和PD-L1:B7-1相互作用。蛋白A微珠饱和按1:4比例的经沉淀且随后重新悬浮于PBS中的FITC-IgG与Ig-融合物(即PD-1或B7-1)预混的IgG。将缀合的微珠与表达单独mCherry或PD-L1mCherry融合物的HEK细胞一起孵育,并且通过流式细胞术测定结合程度。这些数据清楚地证明经PD-1缀合的微珠和经B7-1缀合的微珠均与仅

表达PD-L1的HEK细胞结合并且支持增加配体的亲和力来提高可用实验方法测量的潜在受体-配体相互作用的动态范围的策略。

[0043] 图10:通过流式细胞术检测特定工程化细胞-细胞相互作用。用GFP、mCherry、PD-L1mCherry或PD-1GFP转染HEK 293细胞。使细胞重新悬浮在含2%BSA的冰冷DMEM中并且按1:1化学计量比将细胞系混合在一起。在4℃下孵育个体群和混合二元对2小时。当存在配体和受体时仅观察到红色和绿色荧光事件(即,缀合物)数量的显著(约60倍)增加。

[0044] 图11:通过流式细胞术检测CD200:CD200-受体相互作用。用GFP、mCherry、CD200mCherry或CD200-受体GFP转染HEK293细胞。如图10,处理并分析细胞。当存在单独表达配体和受体的细胞时,仅观察到红色:绿色荧光事件(即,缀合物)数量的显著增加。

[0045] 图12:使用微珠和细胞-细胞FACS测定鉴定具有高度选择性功能的PD-L1突变体。A) 将一组>100个PD-L1mCherry突变构建体瞬时转染到HEK293细胞中。然后用预饱含PD-1的Ig-融合物的微珠(微珠数据呈橙色)或在一组单独实验中用预饱含瞬时表达PD-1GFP的细胞(细胞-细胞数据呈蓝色)激发这些系。在每个实验中,将通过FACS分析测定的结合百分比标准化为野生型结合。数据显示了使用微珠或细胞-细胞方法观察到的平均结合的直接比较。为清楚起见,仅示出了数据的一个子集。还进行了一组类似的实验,用B7-1(PD-L1的另一种已知配体)激发PD-L1突变体(数据未示出)。B) 筛选PD-L1突变体产生显示与PD-1、B7-1或二者的结合受损的几种突变体。为进一步验证这些结果,使7个PD-L1突变体表达为Ig-融合物。将纯化的PD-L1突变体与Alexa 594二抗(红色)预孵育以便检测并且添加到表达PD-1GFP或B7-1GFP(绿色)的HEK293细胞中。FACS数据显示了GFP荧光(X轴)与Alexa 594荧光(Y轴)。虽然数据似乎与用细胞-细胞结合方法获得的结果关联更紧密,但是使用纯化蛋白观察到的结合程度反映了在两种筛选方法中观察到的结合程度。

[0046] 图13A-13E:细胞表面蛋白间相互作用平行鉴定的策略。A) 通过向条形码库载体(生成GFP报告基因和两侧为通用T7正向和反向引物位点的28个核苷酸的独特核心条形码的BC-L载体)LIC克隆生成条形码文库。将所述文库汇合并一同转染至悬浮适应性HEK293细胞中。B) 在单独反应中,将单个查询受体转染至也经mCherry标记的HEK293细胞中并且细胞表面呈递FLAG表位以允许磁捕获/分离。C) 将汇合文库与查询表达细胞(1:1)混合以允许同源受体之间的生产性相互作用。D) 通过磁捕获(“分选”)查询受体细胞从表达集合中回收正相互作用(即,缀合物)。E) 提取质粒DNA并且用通用引物进行条形码的PCR扩增。F) 使用下一代大规模并行测序,获得每种PCR产物的序列。独特的条形码签名独特地标识与查询受体复合的配体。值得注意的是,可通过对大量查询蛋白进行以上步骤,单独地捕获呈多孔板形式(例如,24孔板)的所得缀合物并在步骤E中向引物添加“良好特异性”标识符(独特的8个核苷酸的条形码)多路复用这种方案。然后将这些扩增子汇合进入单次下一代测序运行并且在测序后去卷积以降低每次反应的成本。

[0047] 图14A-14B:可使用磁性微珠捕获和分离特异性细胞-细胞结合事件。A) 将瞬时表达PD-L1mCherry-融合物的HEK293细胞与瞬时表达GFP或PD-1GFP-融合物的细胞按1:1比例(总共 4×10^6 个细胞)混合。添加修饰有PD-L1抗体的磁性蛋白A涂层微珠(Miltenyi)并取出样品(总量);这代表起始混合物的组成。将混合物涂到磁性细胞分离柱上并且洗涤和洗脱结合的细胞。通过FACS分析“总量”和“结合”样品以测定GFP阳性细胞的百分比。经磁珠捕获的PD-L1表达细胞,分离的表达PD-1GFP-融合物的细胞明显比表达单独GFP的细胞多,证明

同源受体:配体缀合物明显特异性富集。B) 为证明分离“稀有”事件的能力,正如在高通量筛选中将遇到的那样,将 10^6 个PD-L1mCherry细胞与 0.1×10^6 个表达PD-1GFP-融合物或GFP的细胞和 5×10^6 个未转染细胞混合(以模拟伪库)。在这个实验中,GFP阳性细胞占总细胞的约1.5%。2小时后,添加抗PD-L1涂敷的微珠,取“总量”样品并且如A中所述分离结合部分。数据显示PD-1GFP-融合物表达细胞受磁捕获的PD-L1表达细胞的明显富集。

[0048] 图15:模拟信噪比:通过与FACS分选偶联的细胞-细胞结合从集合富集“稀有”受体。A) 为模拟表达文库,将 10^7 个瞬时表达GFP的HEK293细胞与 0.02×10^6 个表达PD-1GFP融合物的细胞(0.2%的GFP阳性细胞)混合。然后用 10^6 个瞬时表达mCherry(阴性对照)或PD-L1mCherry-融合物的HEK293细胞激发该“文库”。数据显示了对总共 3×10^6 个事件的流式细胞术分析。基于GFP“文库”、mCherry或单独的PD-L1mCherry-融合物的10,000个事件读数设定门控。B) 显示了用于验证PD-1GFP-融合物富集的引物的位置的示意图。C) 对于PD-L1mCherry激发(A中的右图),分选阳性结合事件(Q2)并收集10,000个事件。为了比较,还在分选之前从细胞混合物(分选前样品)收集了10,000个细胞。PD-1GFP-融合物PCR对照在左泳道。对分选前后PCR产物的比较证实分选的阳性结合事件对于PD-1GFP而言富集。

[0049] 图16:细胞-细胞FACS测定的多路复用:用带独特条形码(表达质粒上3'末端下游约20个碱基对的可变序列)的每种表达构建体生成分泌蛋白哺乳动物表达文库。这些构建体与GFP荧光蛋白标志一起表达。例如,还用mCherry荧光蛋白标志生成无条形码的“激发物”分泌蛋白表达构建体。文库构建体和“激发物”构建体在哺乳动物细胞中单独表达。将“文库”和“激发物”细胞群混合在一起。然后从非相互作用细胞中分选细胞-细胞相互作用。分选可通过荧光进行(即分选所有双阳性事件,mCherry+GFP),或使用磁珠捕获所有“激发物”细胞连同任何结合的文库伴侣一起依磁力进行。在分选前后取细胞样品,溶解并且用上清液进行表达质粒的PCR扩增。送汇合PCR样品进行深度测序而提供对存在多少个拷贝的特定条形码的定量评估。在我们的实验中,特定条形码超过本底的富集将指示蛋白质-蛋白质特异性相互作用。然后我们可以使用特定条形码序列鉴定何种蛋白来自于所述文库。

[0050] 图17:细胞-细胞“稀有事件”测定:多路复用方法允许从文库中提取特异性结合相互作用,其中与整个库相比目标蛋白将相对稀有。例如,如果有100个基因的文库并且使其在哺乳动物细胞中单独表达并将那100个表达群体等量混合在一起,则表达的任一基因都将占总库的1/100。

[0051] 该实验证明即使目标基因(在该案例中为PD-1)为GFP阳性细胞总群体的1/100时,对于PD-1/PD-L1相互作用而言,仍可使用本文所述的技术富集。作为深度测序方法的初始试验,利用一组先前表征的PD-L1突变体。想法是使用突变体序列作为“条形码”,因为每个PD-L1突变体序列本质上不同。这些突变体中的几个显示与PD-1的结合减少,并且可能使用多路复用深度测序方法鉴定那些相同的突变体。

[0052] 图18:PD-L1突变体:测试案例-所示序列是对于小鼠PD-L1基因的一部分而言。突出显示的氨基酸显示了独特点突变的位置。绿色是突变时未显示对与PD-1结合有影响的残基。红色残基是突变时显示与PD-1的结合强烈损失的残基并且黄色残基显示与PD-1的结合更适度损失。用蓝色突出显示的DNA序列显示分选前后用于PCR扩增汇合的PD-L1文库的引物的位置。FACS图显示了使用GFP激发PD-L1突变体文库的阴性对照模拟分选和实验PD-1激发分选。对于实验而言,在分选之前(分选前)和从分选群体Q2(分选后)收集20,000个细胞,

并且使用以上突出显示的引物进行PCR扩增。右下方的琼脂糖凝胶图像显示了从分选前后的样品获得的PCR产物。然后送这些样品进行深度测序分析。

[0053] 图19:分析深度测序结果以确定鉴定出每个独特PD-L1单一序列的次数(总发生次数)。然后计算发生时分选前后的样品之间的富集比。例如,如果在分选前样品中,计数到10个野生型PD-L1序列并且在分选后样品中计数到100个,则观察到野生型PD-L1富集10倍(100除以10)。如果特异性PD-L1突变体不结合PD-1,例如D122A,则我们仍可在分选前样品中计数到10个D122A序列,但是在分选后样品中仅计数到5个序列。这样产生了0.5的富集比(5除以10)。为了将所述数据与使用传统FACS结合方法获得的数据(浅蓝色柱)比较,将所有数据标准化为野生型PD-L1结合。所述数据明确证明使用多路复用深度测序方法类似地鉴定了先前鉴定为弱PD-1结合因子的那些突变体。

[0054] 图20:使用本文所述的细胞微阵列平台对T细胞配体-受体结合的检测用于检查几种IgSF受体/配体对。结合具特异性。

[0055] 图21:使用微珠平台鉴定具选择性功能的PD-L1突变体。

[0056] 图22:用编码野生型PD-L1、单独的mCherry或一系列PD-L1突变体的质粒DNA点印载玻片。图最右侧示出了每个点印构建体的位置。来自于mCherry (Cy3) 激光的荧光信号报告了每个点印构建体的表达水平。Alexa 647 (Cy5) 激光显示了PD-1 (上图) 或B7-1 (下图) Fc融合蛋白与PD-L1表达细胞的结合。因此在Cy5通道中不发荧光的斑点未显示结合。右边的网格带颜色编码以指示使用微珠结合实验观察到的结合。那些绿色构建体显示出与野生型相似的结合。黄色突变体显示结合减少并且红色突变体显示很少至没有显示结合。在微阵列上观察到相同结合模式。

[0057] 图23:将细胞-细胞结合测定延伸到适合高通量蛋白质-蛋白质相互作用筛选的96孔板形式。A) 将两重复组16个对照细胞样品设为3种不同的总细胞浓度并且在4℃下于96孔深孔板中孵育2小时。用绿色突出显示含同源配体:受体对并且因此应展示出明显结合的细胞-细胞混合物(表A的下两行)。培养之后,将一个等分试样的细胞转移到96孔U形底板中并且使用与BD Accuri细胞计数仪连接的Intellicyt HTFC连续流动系统分析。B) 来自于代表性96孔板运行的孔探测器视图。每个峰表示从一个孔收集到的事件。标识符标记96孔板每一行的末端。注意峰的大小反映孔内细胞的浓度,从而使得所述3种不同的细胞浓度明显地可区分。C) 门控来自于整个96孔板的所有单线态细胞的GFP荧光、mCherry荧光或二者(双阳性“命中”)。D) 将双阳性“命中”显示为所有单线态细胞事件的百分比的热图。E) 图表将双阳性(命中)显示为全部16个对照细胞样品在试验的每个细胞浓度下总单线态细胞事件的百分比。注意细胞-细胞结合的百分比随着总细胞浓度降低而降低,但是阴性对和阳性对之间的差异倍数从 1×10^6 个细胞/mL下的约6倍略微提高至 0.2×10^6 个细胞/mL下的约10倍。数据表示两次独立实验的平均值,误差条表示标准偏差。

[0058] 图24:表达IgG超家族成员的细胞微阵列。A) 用IgG超家族中144个人基因的表达构建体点印聚-1-赖氨酸涂敷的载玻片。点印每个构建体,每行重复4次,产生总计 4×144 个斑点的阵列。转染后,可经由mCherry荧光(伪绿色,单通道未示出)直接观察到点印的每个构建体的表达。随后用与Alexa 647标记的抗人IgG预孵育的重组PD-L1-Fc处理该细胞阵列,洗涤并用4%甲醛固定(伪红色,单通道未示出)。数据显示重叠的绿色和红色伪彩色图像,其中观察到结合呈由绿色和红色荧光信号合并产生的黄色/橙色。标记A和B的行含有PD-L1

的两种已知结合靶标PD-1 (A) 和B7-1 (B)。B) A中突出显示的行的10倍放大图,与从周围斑点观察到的信号相比,其显示了对PD-L1与PD-1和B7-1结合所观察到的阳性信号。

[0059] 发明详述

[0060] 提供了一种细胞微阵列,其包括:

[0061] (i) 经转化以便表达第一预定异源分泌蛋白、异源膜蛋白或异源细胞表面蛋白和第一荧光蛋白的第一多个细胞和(ii) 经转化以便表达第二预定异源分泌蛋白或第二异源蛋白和第二荧光蛋白的至少第二多个细胞,

[0062] 其中所述第一和第二多个细胞附着于所述微阵列的固体表面,并且其中所述第一和第二多个细胞在所述固体表面上处于空间上不同的位置。

[0063] 提供了一种细胞微阵列,其包括:

[0064] (i) 经转化以便表达(a) 第一预定异源蛋白和(b) 第一荧光蛋白的第一多个细胞和(ii) 经转化以便表达(a) 第二预定蛋白和(b) 第二荧光蛋白的至少第二多个细胞,

[0065] 其中所述第一和第二多个细胞附着于所述微阵列的固体表面,并且其中所述第一和第二多个细胞在所述固体表面上处于空间上不同的位置。

[0066] 在一个实施方案中,第一或第二预定蛋白为经典分泌蛋白。在一个实施方案中,第一或第二预定蛋白为非经典分泌蛋白。非经典分泌包括诸如具有明确定义的非经典分泌途径的FGF2的蛋白以及由于细胞溶解/死亡而释放的胞质蛋白。

[0067] 在一个实施方案中,所述细胞微阵列还包括包含(i) 异源蛋白之一的候选蛋白或肽配体和(ii) 与异源蛋白之一结合的第三荧光蛋白的融合蛋白,或还包括包含异源蛋白之一的肽或蛋白配体的化合物,所述化合物具有通过非肽键与之结合的第三荧光蛋白,其中所述化合物与细胞微阵列的异源蛋白之一结合。

[0068] 在一个实施方案中,所述细胞微阵列还包括作为对照的第三多个细胞,所述第三多个细胞任选地经转化以便表达第一荧光蛋白,但是未经第一或第二预定异源蛋白转化。

[0069] 在一个实施方案中,每种多个细胞均为多个哺乳动物细胞。

[0070] 在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为分离的人细胞。

[0071] 在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为人胚肾(HEK)细胞系细胞。

[0072] 在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为HEK293细胞系细胞。

[0073] 在一个实施方案中,所述微阵列包括至少10种不同的多个细胞,每一种多个细胞均经转化以便表达预定异源蛋白和第一荧光蛋白,所述异源蛋白与所述微阵列中每种其它多个转化细胞表达的异源蛋白不同。

[0074] 在一个实施方案中,所述微阵列包括至少100种不同的多个细胞,每一种多个细胞均经转化以便表达预定异源蛋白和第一荧光蛋白,所述异源蛋白与所述微阵列中每种其它多个转化细胞表达的异源蛋白不同。

[0075] 在一个实施方案中,第一和/或荧光蛋白为绿色荧光蛋白或黄色荧光蛋白。

[0076] 在一个实施方案中,第三荧光蛋白为红色荧光蛋白。

[0077] 在一个实施方案中,每种多个细胞仅经转化以便表达第一预定异源蛋白和第一荧光蛋白,并且未经转化以表达任何其它异源蛋白。

[0078] 在一个实施方案中,第一预定异源蛋白为多亚基异源蛋白的亚基,并且所述多个细胞还经转化以表达所述多亚基异源蛋白的一个或多个剩余成员。

- [0079] 在一个实施方案中,第一预定异源蛋白在表达时通过其C端与第一荧光蛋白连接。
- [0080] 在一个实施方案中,第一预定异源蛋白在表达时与跨膜锚定肽连接。
- [0081] 在一个实施方案中,通过将编码第一异源蛋白和荧光蛋白的第一多个表达构建体固定在微阵列的固体表面上并且在空间上不同于所述固定的第一多个表达构建体的位置,将编码第二异源蛋白和荧光蛋白的至少第二多个表达构建体固定在固体表面上微阵列的固体表面上,并且在包括转染剂存在的条件下使所述表达构建体与多个细胞接触,以便允许在每个空间上不同的位置的至少一部分细胞被相应表达构建体转染,而制成所述细胞微阵列。
- [0082] 在一个实施方案中,所述表达构建体包括pEGFP-N1表达构建体。在一个实施方案中,所述表达构建体包括CMV启动子。
- [0083] 在一个实施方案中,所述细胞为昆虫细胞。在一个实施方案中,所述细胞为果蝇(*Drosophila*) S2细胞。
- [0084] 在一个实施方案中,第一或第二预定异源蛋白为免疫球蛋白超家族蛋白、TNF受体蛋白、细胞因子、趋化因子、1型跨膜受体蛋白、2型跨膜受体蛋白、离子通道蛋白或膜转运蛋白。
- [0085] 在一个实施方案中,如本文所述的第一或第二预定异源蛋白为1) 人的整个分泌蛋白质组(即,约8000种分泌蛋白和膜内在蛋白,包括GPCRC) 中的蛋白;2) 人/小鼠的非经典分泌蛋白;3) 经由与细胞表面的结合表现出细胞外功能的胞质蛋白或分泌蛋白;或4) 病原体分泌蛋白或膜内在蛋白。
- [0086] 在一个实施方案中,第一或第二预定异源蛋白为toll样受体、TNF受体、GPCR、生长因子受体、粘连蛋白(nectin)、白细胞介素或白细胞介素受体。
- [0087] 在一个实施方案中,第一或第二预定异源蛋白为哺乳动物蛋白。
- [0088] 在一个实施方案中,第一或第二预定异源蛋白在质膜局部位置表达。在一个实施方案中,第一和/或第二异源蛋白为分泌蛋白、跨膜蛋白或细胞表面蛋白。在一个实施方案中,所述细胞微阵列包括100、200、300、400或500种或更多种不同的经转化以表达异源蛋白的多个细胞中的一种,其中每一种多个细胞表达与其它种的多个转化细胞表达的每种其它异源蛋白不同的异源蛋白。在一个实施方案中,所述细胞微阵列包括750种或更多种不同的经转化以表达异源蛋白的多个细胞,其中每一种多个细胞表达与其它种的多个转化细胞表达的每种其它异源蛋白不同的异源蛋白。在一个实施方案中,所述细胞微阵列包括1000种或更多种不同的经转化以表达异源蛋白的多个细胞,其中每一种多个细胞表达与其它种的多个转化细胞表达的每种其它异源蛋白不同的异源蛋白。
- [0089] 在一个实施方案中,所述异源蛋白为分泌蛋白并且表达为与跨膜螺旋融合。
- [0090] 在一个实施方案中,第一荧光蛋白和第二荧光蛋白为相同类型,并且第三荧光蛋白为不同类型。
- [0091] 在一个实施方案中,将每种多个细胞分成多个细胞的斑点,细胞的每个倍数小于所述多个细胞中细胞的总数,并且其中排列每个斑点以便比另一种多个细胞的斑点更靠近同种多个细胞的另一个斑点。
- [0092] 提供了一种制备如本文所述的细胞微阵列的方法,包括:将编码第一异源蛋白和第一荧光蛋白的第一多个表达构建体固定在微阵列的固体表面上并且在空间上不同于所

述固定的第一多个表达构建体的位置,将编码第二异源蛋白和第二荧光蛋白的至少第二多个表达构建体固定在所述微阵列的固体表面上,并且在包括转染剂存在的条件下使所述表达构建体与多个细胞接触,以便允许所述细胞附着于所述固体表面并且发生在每个空间上不同的位置的至少一部分细胞被相应表达构建体的转染。

[0093] 在一个实施方案中,表达构建体可将包含异源蛋白和荧光蛋白的融合蛋白的单一转录产物编码为单一共价融合多肽。在一个实施方案中,表达构建体可将异源蛋白和荧光蛋白编码为两种不同的多肽(例如,IRES构建体)。在一个实施方案中,使用不依赖连接的克隆(LIC)制备所述表达构建体。在一个实施方案中,使用传统限制位点克隆。

[0094] 还提供了一种确定候选蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括表达第二蛋白作为本文所述细胞微阵列的异源蛋白,并且使所述细胞微阵列与候选蛋白或肽接触,其中所述候选蛋白或肽已经将第三荧光蛋白或肽固定于其上,洗涤与候选蛋白或肽接触的细胞微阵列以便去除未结合的候选蛋白或肽,并且确定在洗涤之后是否存在与细胞微阵列结合的任何候选蛋白或肽,其中在洗涤之后在对应于经第一异源蛋白转化的细胞的第一空间位置存在与细胞微阵列结合的候选蛋白或肽表明所述候选蛋白或肽与所述第一异源蛋白结合,并且其中在洗涤之后在第一空间位置不存在与细胞微阵列结合的候选蛋白或肽表明所述候选蛋白或肽不与所述异源蛋白结合。

[0095] 在一个实施方案中,确定在洗涤之后是否存在与细胞微阵列结合的任何候选蛋白或肽通过测量第三荧光蛋白的荧光并确定其在细胞微阵列上的位置来实现,其中第三荧光蛋白与第一或第二荧光蛋白在空间上不同的位置的共定位表明第一蛋白或肽与对应于所述空间上不同的位置的异源蛋白结合。

[0096] 还提供了一种系统,其包括(i)微阵列固体表面和经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽和第一C端胞质表达型荧光蛋白的悬浮适应性细胞系;和(ii)至少a)经转化以便在其细胞表面表达预定异源蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞,或b)已经将所述异源蛋白固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个微珠,其中a)或b)固定到所述微阵列固体表面。同上,加以必要的变更,还提供了一种系统,其中在第二多个经转化的细胞或多个微珠上表达所述候选配体蛋白或肽,并且在经转化的悬浮适应性细胞系的细胞表面表达所述异源蛋白。

[0097] 用1)荧光标记探针蛋白;2)荧光微珠上呈递的探针蛋白;和/或3)在其表面表达探针分子的细胞可探测微阵列上的细胞。

[0098] 在一个实施方案中,所述系统还包括c)经转化以便在其细胞表面表达不同的预定异源蛋白和第二荧光蛋白的一种或多种另外的多个细胞,或d)已经将所述不同的预定异源蛋白固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的一种或多种另外的多个微珠,其中c)或d)固定到所述微阵列固体表面上与多个a)和/或b)在空间上不同的位置。

[0099] 在一个实施方案中,异源蛋白经由蛋白A分子固定到微珠上。

[0100] 在一个实施方案中,经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽的悬浮适应性细胞系已经用编码候选配体蛋白或肽的核酸构建体瞬时转染。在一个实施方案中,所述异源蛋白通过受连接于微珠的抗体结合而固定到微珠上。在一个实施方案中,第一和第二荧光蛋白为不同颜色。在一个实施方案中,所述一种荧光蛋白为绿色而另一种荧光蛋白为红色。非限制性实例包括绿色荧光蛋白和mCherryTM。

[0101] 在一个实施方案中,所述多个细胞为多个哺乳动物细胞。在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为分离的人细胞。在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为人胚肾 (HEK) 细胞系细胞。在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞为HEK293细胞系细胞。

[0102] 在一个实施方案中,所述预定异源蛋白为多亚基异源蛋白的亚基,并且所述多个细胞也经转化以表达多亚基异源蛋白的一个或多个剩余成员。在一个实施方案中,所述预定异源蛋白为分泌蛋白、膜蛋白或细胞表面蛋白。在一个实施方案中,所述预定异源蛋白在表达时通过其C端与荧光蛋白连接。在一个实施方案中,所述预定异源蛋白为分泌蛋白并且在表达时,与跨膜锚定肽或蛋白连接。在一个实施方案中,所述表达构建体包括pEGFP-N1表达构建体和/或CMV启动子。在一个实施方案中,所述异源蛋白为免疫球蛋白超家族蛋白、TNF受体蛋白、细胞因子、趋化因子、1型跨膜受体蛋白、2型跨膜受体蛋白、离子通道蛋白或膜转运蛋白。在一个实施方案中,所述异源蛋白为to11样受体、TNF受体、GPCR、生长因子受体、粘连蛋白、白细胞介素或白细胞介素受体。在一个实施方案中,所述异源蛋白为哺乳动物蛋白。在一个实施方案中,所述异源蛋白在质膜局部位置表达。

[0103] 一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在当前系统的悬浮适应性细胞系多个细胞中表达所述候选配体蛋白或肽和第一荧光蛋白,并且使所述多个细胞与a) 经转化以便表达所述异源蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞,或b) 已经将所述异源蛋白和第二荧光蛋白固定到其表面的多个微珠接触,并且洗涤以去除未结合的候选配体蛋白或肽,并且通过FACS分析鉴定显示所述第一和第二荧光蛋白共定位的细胞,其中显示所述第一和第二荧光蛋白在空间上不同的位置共定位的细胞表明第一蛋白或肽与对应于所述空间上不同的位置的异源蛋白结合。

[0104] 在一个实施方案中,通过FACS分析确定第一和第二荧光蛋白的共定位。

[0105] 在嗜血性相互作用的特定实施方案中,候选配体蛋白或肽和第二蛋白或肽具有相同序列。

[0106] 提供了一种系统,其包括第一多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源候选配体蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述载体包含所述第一异源候选配体蛋白或肽的15-35个核苷酸的单一预定序列,所述单一序列能够被一个或多个通用引物引发;和第二多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源候选配体蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述第二载体包含所述第二异源候选配体蛋白或肽的15-35个核苷酸的不同单一预定序列;和(i) 一种或多种另外的多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经转化以便在其细胞表面表达受体蛋白或肽并且表达第二荧光蛋白,所述第二悬浮适应性细胞系包含稳定表达的肽细胞表面表位,或(ii) 已经将受体蛋白固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个磁性微珠。

[0107] 在一个实施方案中,所述受体蛋白可为经典识别受体。在一个实施方案中,所述受体蛋白可不为经典识别受体,但仅仅是所述配体的接收蛋白。

[0108] 提供了一种系统,其包括第一多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源蛋白并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述载体包含第一异源蛋白的15-35个核苷酸的单一预定序列,所述单一序列能够被一个或多个通用引物引发;和第二多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细

胞表面表达第二异源蛋白并且表达第一胞质表达型荧光蛋白并且其中所述第二载体包含第二异源蛋白的15-35个核苷酸的不同单一预定序列；和(i)一种或多种另外的多个悬浮适应性细胞系细胞，所述细胞经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽并且表达第二荧光蛋白，所述第二悬浮适应性细胞系包含稳定表达的肽细胞表面表位，或(ii)已经将候选配体蛋白或肽固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的多个磁性微珠。

[0109] 在一个实施方案中，所述通用引物包括T7正向和反向通用引物。

[0110] 在一个实施方案中，所述肽细胞表面表位为FLAG表位(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:1)。在一个实施方案中，所述系统还包括含磁性分子实体的抗FLAG表位抗体，所述抗体与FLAG表位结合。

[0111] 在一个实施方案中，磁性分子实体为超顺磁铁浸渍珠。在一个实施方案中，所述20-35个核苷酸的单一预定序列长度为28个核苷酸。

[0112] 还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二预定蛋白结合的方法，所述方法包括表达第二预定蛋白作为当前系统的异源蛋白并且与所述(i)经转化以便在其细胞表面表达候选配体蛋白或肽并且表达第二荧光蛋白的一种或多种另外的多个悬浮适应性细胞系细胞的候选配体蛋白或肽接触，所述第二悬浮适应性细胞系包含稳定表达的肽细胞表面表位，或与(ii)已经将候选配体蛋白或肽固定到其表面并且已经固定了第二荧光蛋白的所述多个磁性微珠的候选配体蛋白或肽接触；

[0113] 通过磁吸引分离与所述第二多个细胞中的一个或多个或与所述多个磁性微珠结合的所述第一多个悬浮适应性细胞系细胞中的任一个；

[0114] 从此类分离的细胞-细胞或细胞-微珠缀合物获得DNA并且若DNA中存在单一序列，则使用所述通用引物扩增单一序列；

[0115] 对所述单一序列的拷贝测序以确认其存在；

[0116] 将这样鉴定的单一序列与将所述15-35个核苷酸的单一预定序列与特定异源蛋白或肽相关联的数据库作比较，并由此鉴定这样相关联的任何异源蛋白或肽结合，从而将特定异源蛋白或肽鉴定为与候选蛋白或肽结合。

[0117] 在一个实施方案中，所述候选配体蛋白或肽经由蛋白A分子固定到微珠上。在一个实施方案中，所述候选配体蛋白或肽通过受连接于微珠的抗体结合而固定到微珠上。在一个实施方案中，第一和第二荧光蛋白为不同颜色。在一个实施方案中，所述一种荧光蛋白为绿色而另一种荧光蛋白为红色。上文提供了此类荧光蛋白的非限制性实例。在一个实施方案中，所述多个细胞为复数。在一个实施方案中，所述哺乳动物细胞为人胚肾(HEK)细胞系细胞。在一个实施方案中，所述哺乳动物细胞为HEK293细胞系细胞。在一个实施方案中，所述预定异源蛋白为多亚基异源蛋白的亚基，并且所述多个细胞还经转化以表达所述多亚基异源蛋白的一个或多个剩余成员。在一个实施方案中，所述预定异源蛋白在表达时通过其C端与荧光蛋白连接。在一个实施方案中，所述预定异源分泌蛋白在表达时与跨膜锚定肽连接。在一个实施方案中，所述异源蛋白为免疫球蛋白超家族蛋白、TNF受体蛋白、细胞因子、趋化因子、1型跨膜受体蛋白、2型跨膜受体蛋白、离子通道蛋白或膜转运蛋白。在一个实施方案中，所述异源蛋白为tol1样受体、TNF受体、GPCR、生长因子受体、粘连蛋白、白细胞介素或白细胞介素受体。在一个实施方案中，所述异源蛋白为哺乳动物蛋白。在一个实施方案中，所述异源蛋白在质膜局部位置表达。

[0118] 一种系统,其包括(i)第一多个悬浮适应性细胞系细胞,其中所述多个细胞经载体转化以便(a)在其细胞表面表达异源蛋白并且(b)表达第一胞质表达型荧光蛋白,并且其中所述载体包含表达的异源蛋白单一的15-35个核苷酸的预定序列,使得所述第一多个悬浮适应性细胞系细胞表达至少两种不同类型的第一异源蛋白,和(ii)第二多个悬浮适应性细胞系细胞,所述细胞经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源蛋白并且表达第二胞质表达型荧光蛋白,其中所述第二多个悬浮适应性细胞表达单一类型的第二异源蛋白。在一个实施方案中,第一多个细胞中的任何单个细胞在其细胞表面仅表达一种异源蛋白。在一个实施方案中,没有第一多个细胞的不同类型第一异源蛋白具有与第二多个细胞的第二异源蛋白相同的序列。

[0119] 在一个实施方案中,第二异源蛋白为膜受体。在一个实施方案中,在第一多个悬浮适应性细胞系细胞中表达的每种异源蛋白均为分泌肽、多肽或蛋白。在一个实施方案中,所述多种的不同类型第一异源蛋白为预定野生型蛋白的每种突变体。在一个实施方案中,第二异源蛋白为野生型蛋白。在一个实施方案中,第一多种不同蛋白中每种类型的异源蛋白与所述多种中每种其它类型的异源蛋白不同之处在于1个、2个、3个、4个或5个氨基酸残基点突变。在一个实施方案中,多种不同蛋白中每种类型的蛋白与所述多种中每种其它类型的异源蛋白不同之处在于1个氨基酸残基点突变。

[0120] 在一个实施方案中,所述单一序列能够被一个或多个通用引物引发。在一个实施方案中,所述单一序列为15-35个核苷酸。在一个实施方案中,第一或第二荧光蛋白为绿色。在一个实施方案中,另一种荧光蛋白为红色。

[0121] 还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与第二蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在允许第一异源蛋白与第二异源蛋白结合的条件下,表达候选配体蛋白或肽作为如本文所述的系统中第一多个细胞的第一异源蛋白并且表达第二蛋白或肽作为如本文所述的系统中的第二异源蛋白,并且任选地,洗涤以去除任何未结合的第一异源蛋白,然后回收第一和第二异源蛋白共定位的细胞,从回收细胞中获得核酸并对核酸测序以鉴定其中所含的15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定与单一的15-35个核苷酸相对应的已经结合了第二蛋白或肽的候选配体蛋白或肽。

[0122] 还提供了一种确定第一蛋白的预定氨基酸残基对第一蛋白与第二蛋白结合的影响的方法,所述方法包括表达相对于第一蛋白经一个或多个点突变而突变的蛋白作为如本文所述的系统的第一悬浮适应性细胞系多个细胞中的多种不同类型的异源蛋白,并且使所述多种蛋白与呈本文所述的系统中经转化以便表达第二蛋白和第二荧光蛋白的第二多个细胞的第二异源蛋白形式的第二蛋白接触,并且回收显示第一和第二荧光蛋白共定位的细胞,从回收细胞获得核酸并对核酸测序以鉴定其中所含的15-35个核苷酸的单一序列以便鉴定已经结合了第二蛋白或肽的第一蛋白,并且将已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平与预定参考水平作比较,

[0123] 其中已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平超过预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基增强第一蛋白与第二蛋白的结合,并且其中已经结合了第二蛋白或肽的蛋白的水平低于预定参考水平表明所述蛋白中突变的一个或多个残基抑制第一蛋白与第二蛋白的结合。

[0124] 在一个实施方案中,预定水平为对照。在一个实施方案中,通过测定未突变的第一

蛋白与第二蛋白结合的水平获得预定水平。在所述方法的一个实施方案中,通过FACS分析回收显示第一和第二荧光蛋白共定位的细胞。

[0125] 还提供了一种系统,其包括(i)经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源候选配体蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白的第一多个悬浮适应性细胞系细胞和经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源候选配体蛋白或肽并且表达第二胞质表达型荧光蛋白的第二多个悬浮适应性细胞系细胞,和(ii)已经将靶蛋白、肽或抗体固定到其表面的多个磁性微珠。

[0126] 还提供了一种确定两种候选配体蛋白或肽中的一种或多种是否与靶蛋白、肽或抗体结合的方法,所述方法包括在允许第一异源蛋白和第二异源蛋白与靶蛋白、肽或抗体结合的条件下,表达第一候选配体蛋白或肽作为当前系统中第一多个细胞的第一异源蛋白并且表达第二候选配体蛋白或肽作为当前系统中的第二异源蛋白,并且回收与第一荧光蛋白表达细胞复合和/或与第二荧光蛋白表达细胞复合的任何微珠,并鉴定所述复合物中的候选配体蛋白,其中回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明第一候选配体蛋白或肽结合靶蛋白或肽,并且其中回收到连接于第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明第二候选配体蛋白或肽结合靶蛋白或肽,并且其中未回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞或第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠分别表明第一候选配体蛋白不结合靶蛋白或肽,并且第二候选配体蛋白不结合靶蛋白或肽。

[0127] 还提供了一种系统,其包括(i)经载体转化以便在其细胞表面表达第一异源靶蛋白或肽并且表达第一胞质表达型荧光蛋白的第一多个悬浮适应性细胞系细胞和经第二载体转化以便在其细胞表面表达第二异源候选配体蛋白或肽并且表达第二胞质表达型荧光蛋白的一种或多种第二多个悬浮适应性细胞系细胞,和(ii)已经将针对候选配体蛋白或肽或针对靶蛋白或肽的抗体固定到其表面的多个磁性微珠。还提供了一种确定候选配体蛋白或肽是否与靶蛋白或肽结合的方法,所述方法包括在允许候选配体蛋白或肽与靶蛋白或肽结合的条件下,表达候选配体蛋白或肽作为当前系统中第二多个细胞的第二异源蛋白并且表达靶蛋白或肽作为当前系统中的第一异源蛋白,并且回收与第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞复合的任何微珠,其中回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明候选配体蛋白或肽结合靶蛋白或肽,并且其中未回收到连接于第一荧光蛋白表达细胞和第二荧光蛋白表达细胞的复合物的微珠表明候选配体蛋白不结合靶蛋白或肽。

[0128] 在所述方法的一个实施方案中,磁力分选显示第一和第二荧光蛋白共定位的细胞。可连接于第二多个细胞的磁性实体,例如珠粒,是在鉴定显示第一和第二荧光蛋白共定位的细胞时调用的磁性分离。因此,本文所述的方法和系统可包括连接于第二多个细胞的磁性实体,例如磁性微珠并且可包括使连接于第二多个细胞中的细胞的磁性实体,例如磁性微珠附着。

[0129] 在一个实施方案中,异源蛋白或肽与其表达所在的细胞就蛋白质的来源而论是异源的(例如另一细胞类型或另一物种)。在一个实施方案中,异源蛋白或肽与其表达所在的细胞就其位置而言是异源的,例如所述蛋白未在正常生理条件下(例如体内)的位置(例如,细胞表面)表达。

[0130] 在所述方法的一个实施方案中,对15-35个核苷酸的单一序列进行PCR。在一个实

施方案中,对汇合PCR产物进行深度测序以鉴定15-35个核苷酸的单一序列。在所述方法的一个实施方案中,所述方法包括确定15-35个核苷酸的单一序列在分选后(或回收后)与分选前(或回收前)是否富集。

[0131] 在本文所述的方法和系统的一个实施方案中,所述单一序列为20-35个核苷酸。在本文所述的方法和系统的一个实施方案中,所述单一序列为20-30个核苷酸。在本文所述的方法和系统的一个实施方案中,所述单一序列为25-30个核苷酸。本文所述的方法和系统的一个实施方案中,所述单一序列长度为20个核苷酸。本文所述的方法和系统的一个实施方案中,所述单一序列长度为28个核苷酸。

[0132] 在本文所述方法的一个实施方案中,溶解共定位细胞或回收细胞并对其上清液的内含物进行测序。

[0133] 在本文所述方法的另一个实施方案中,在多孔平皿的每个孔中用不同于其余孔的扩增子进行所述方法。在一个实施方案中,多孔平皿的不同孔含不同受体蛋白。

[0134] 除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾,则本文所述各要素的所有组合在本发明的范围之内。

[0135] 从下面的实验细节将更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员将容易认识到讨论的特定方法和结果仅仅是为了说明本发明,在跟随其后的权利要求中更全面地描述了本发明。

[0136] 实验细节

[0137] 对受体:配体复合物连续结构表征的需要:包括免疫球蛋白(Ig)、TNF/TNFR、GPCR、趋化因子和受体激酶超家族的成员在内的众多种生物分子对分泌蛋白质组系统性结构表征的目标极为重要。下面描述了CD28受体家族(即,CD28、CTLA-4、ICOS和PD-1),为最佳T细胞功能提供主要信号的免疫球蛋白超家族(IgSF)的一个亚类[41-43]。这些信号传导受体共有结构特征并且以相似的相互作用模式识别相关细胞表面配体(例如,B7-1、B7-2、ICOS-L、PD-L1和PD-L2)(图1)[44,45]。例如,CD28受B7-1和B7-2接合导致T细胞活化,而相同B7配体受CTLA-4接合则提供抑制信号。诱导型共刺激受体(ICOS)在结合ICOS-L后提供另外的重要正信号(即,共刺激),并且PD-1与其两种B7样配体PD-L1和PD-L2中的任一种接合引发另外的抑制途径(即,共抑制)。这些分子和复合物,包括来自于该实验室[28,35,46-48]的几种的结构已有助于定义如图1中总结的共刺激和共抑制信号传导所需的基本机制特征(例如,寡聚状态、效价、配体特异性等)和整体组织原理[45]。

[0138] 除定义基本的生物物理和组织特征外,这些结构还提供了生成新型生物化学试剂和独特机制信息模型系统的基础。例如,以本文公开的PD-1:PD-L2复合物的结构为指导[35],生成了以野生型亲和力结合鼠PD-L2,但是未表现出与PD-L1的相互作用的突变鼠PD-1受体。根据这些发现,本文公开了Ig-融合蛋白和敲入小鼠模型的生成,其提供了前所未有的剖析两种配体相关信号传导途径在正常生理和疾病中的机制作用的机会(图2)。此外,根据这种复合物的结构,生成了人PD-1受体的单点突变体,其对PD-L1和PD-L2分别具有高50倍和30倍的亲和力(未公布数据)。这种试剂代表可提供独特治疗机会的新型高亲和物种类(见下文)。这些实例突出了此类受体:配体结构以及其可被影响的方式对于生物学洞悉和新治疗机会极具价值。

[0139] 新的关键受体:配体相互作用仍有待定义。在与这种应用的特定相关性中,甚至在

受到极大量研究的CD28受体家族中,也仅仅是最近才发现另外的重要相互作用。已经证明B7-1结合PD-L1,产生双向抑制信号,而已经证明ICOS-L结合CD28和CTLA4,CD28:ICOS-L相互作用是人T细胞活化所必需的[49,50]。这些交叉的竞争性相互作用产生高度复杂的信号传导途径网络。这些实例突出了系统性地定义受体:配体相互作用的整个组成部分的价值,因为即使单个新的受体:配体对的发现也可显著影响对与T细胞功能、人体生理和疾病相关的信号传导途径的机制理解。

[0140] 受体:配体复合物的治疗相关性。重要的是,许多细胞表面分子及其相关的结合伴侣是故意调节信号传导途径以治疗各种人类疾病的出色靶标。靶向细胞表面免疫受体和配体的功能阻断性抗体是用于操纵免疫反应以治疗传染病、自身免疫性疾病和恶性肿瘤的一类重要的蛋白质治疗剂。主要实例包括Yervoy™ (Bristol Myers Squibb),针对CTLA-4抑制性受体的功能阻断性mAb,其产生全面免疫刺激并且于2011年3月受FDA批准用于治疗晚期黑素瘤[51]。这些免疫受体不仅是靶标,而且本身是有效的治疗剂。例如,作为Orencia™ (BMS) 在市场上销售的可溶性形式的CTLA-4与CD28竞争结合B7配体,达成对CD28相关刺激途径的抑制。CD28刺激的阻滞达成全面免疫抑制,这使Orencia成为包括类风湿性关节炎在内的自身免疫性疾病的主要治疗药[52]。需要特别指出的是Belatacept™ (BMS),具有两个点突变的Orencia的可溶性CTLA-4变体。Belatacept于2011年11月受FDA批准用于预防急性肾移植排斥,显示出与现有疗法相当的功效并且,由于突变,大大减少了副作用和毒性。值得注意的是,Belatacept在对B7配体的亲合力上仅增加两倍,但是在其生物学效力上增强10倍[26,53]。这种发现有力地支持了对于主要共刺激分子及其同源复合物的结构和生物化学分析的持续作用以便获得有助于新型治疗剂开发的分子了解。这些原理可推广到整个分泌蛋白质组。

[0141] 实现提出的高通量技术将提供用于(例如)以下方面的有力研究工具:与人分泌蛋白质组相关的相互作用,定义与病毒、细菌、真菌和寄生虫病相关的胞外宿主:病原体相互作用的范围(例如[54]),鉴定宿主:病原体相互作用。另外,最近有证据表明许多“表面上看来”为胞质蛋白也具有细胞外功能[55-59]。非经典分泌机制(即,不依赖信号序列的分泌)不断地被描述并且是相当多研究的主题[60,61]。值得注意的是,这些非经典分泌蛋白中的许多者的细胞表面受体尚未鉴定。

[0142] 定义与哺乳动物分泌蛋白质组相关的相互作用相当大的价值长期以来已经得到公认并且已经引起了小型生物技术公司、大型制药公司和学术团体相当大的关注。已经在非常适度的规模进行了源于学术实验室的努力[62,63];最突出/广泛的实例包括Genentech和Five Prime Therapeutics, Inc.的贡献。Genentech利用其相当大的资源生成了>1000种Ig-融合蛋白的文库,以使用表面等离子体共振技术进行直接结合分析。这些努力使得发现了Ig超家族成员BTLA和TIGIT的新配体[64,65]。考虑到每个单独靶标(例如,TIGIT)需要对所述文库中的每个成员进行单独筛选,这种方法缺乏实现真正高通量所需的特征。Genentech最近描述了其中约700种分泌蛋白单独钉到固体支撑体上的蛋白质阵列;随后用单独呈递约90种人Ig-融合蛋白的多价试剂筛选该阵列[66]。这个平台有助于发现新的令人惊讶的受体:配体相互作用,包括B7-1和NGFR之间出乎意料的相互作用。

[0143] 与这些“排列”方法相比,Five Prime Therapeutics, Inc.采取更“强力”的方法,其中在293T细胞中单独表达分泌蛋白的约3400种构建体和跨膜蛋白的胞外域[67]。在探测

众多种细胞系中与免疫和心血管功能以及癌增殖相关的代谢、转录和生长反应的30次不同HTP测定中检查这些蛋白质。这些努力证明了先前未表征的蛋白质IL-34是(表面上)经充分表征的集落刺激因子1受体的配体。这项研究是需要去孤儿化分子(de-orphanize molecule)(例如,IL-34)的主要实例,并且突出了即使是经充分表征的细胞表面分子也可具有未知相互作用的事实。

[0144] 这些鉴定受体:配体相互作用的高通量方法是生物科学中最激动人心的最新发展,因为它们拥有发现新的基本生物学机制和产生新的治疗策略的潜力。然而,出于一些原因,这些研究也许不能达到可能需要的广泛影响。首先,生成这些测定所需的大量分泌蛋白/Ig-融合物的能力超出了甚至最有雄心的学术实验室,包括受蛋白质结构计划(Protein Structure Initiative)支持的实验室的能力范围。此外,所有这些方法在蛋白质不可纯化,在储存和后续操纵期间表现出不稳定性,或表现出不利溶液行为(例如,通常影响Ig-融合蛋白的聚集)的情况下均失败。在Five Prime Therapeutics筛选的情况下,所选基于细胞的筛选未覆盖的具有生物学功能的蛋白(或同源结合蛋白)不会产生相互作用。需要特别指出的是,所有这些方法不适宜于一些最重要类别的膜内在蛋白,包括GPCR、转运蛋白和通道蛋白,因为这些蛋白质通常与功能活性物质的高通量纯化不相容并且不可耐受测定的物理过程。最后,可能也是最重要的,由这些商业性努力报告的结果仅代表认为可接受向公众发布的那些相互作用;许多“非科学”因素影响这些决定并且几乎可以肯定这些重要数据中很大的比例将永远不会进入公共领域。

[0145] 本文公开了3种可承受、有效且高通量鉴定相互作用的技术,其涉及例如用于高分辨率结构发现、生物化学分析和治疗剂研发的哺乳动物分泌蛋白质组。公开的技术提供了许多优于现有方法的优点:1)呈细胞微阵列形式表达允许系统性表达所有类别的蛋白质(包括多跨膜内在蛋白例如GPCR和转运蛋白,以及多组分受体例如整联蛋白);2)细胞微阵列表达非常易处理,因为仅需要DNA(即,表达载体),而不需要纯化蛋白质本身;3)所述技术全部基于对直接物理相互作用的检测,因此不需要对生物学功能的任何了解;4)基于流式细胞术的方法允许诱饵和捕获物均在独立且可辨别的细胞表面表达,从而去除对纯化的蛋白的所有需求;并且5)执行与深度测序和分泌蛋白表达细胞的条形码文库相缀合的磁性分离提供了相对于整组潜在受体对许多(全部)配体的大规模平行探询。

[0146] 用于细胞表面蛋白质-蛋白质相互作用的高通量鉴定的细胞微阵列的研发:修改细胞微阵列技术以针对单个查询配体系统性筛选细胞表面受体的泛基因组文库(即,分泌蛋白质组)。这种方法在呈先前排列形式的活宿主细胞的情况下提出了许多受体。为有效筛选潜在受体构建体的文库,已经成功地修改了细胞微阵列技术[68,69]。每个表达构建体(例如,基于pEGFP-N1骨架的质粒和经由CMV启动子驱动表达的其它荧光变体)单独“钉”到玻璃表面以产生文库分子的表达阵列。哺乳动物细胞在转染试剂(例如,脂质类试剂)的存在下接种于点印cDNA上时,变得经转染,产生活细胞阵列,每个单独的集群表达所述库的不同成员(图3)。(点印cDNA之间生长的细胞未转染并且仍为“黑色”)。然后用纯化的荧光标记查询蛋白激发这些表达阵列。洗涤去除未结合的配体之后根据荧光为正相互作用评分。因为每个构建体“钉”在微阵列中的已知位置,所以可立即将阳性“命中”与其相互作用的伴侣相关联。

[0147] 使用PD-1:PD-L1相互作用(Kd约5.5 μ M)验证细胞微阵列平台。生成由交替成行的

表达PD-L1的GFP融合蛋白或单独的GFP的细胞组成的活细胞微阵列(图4A)。如图解所示(图4,左图),GFP对照在细胞质中表达(绿色实心圆),而与PD-L1融合的GFP(绿色环形)定位于膜上(对PD-L1-GFP观察到的绝对GFP荧光较低是由于胞质GFP构建体的表达水平较高)。通过用PD-1胞外域的红色Alexa 594结合型二价Ig-融合物(即,Fc-融合物)构建体激发这些阵列,正确鉴定了特异性表达同源PD-L1配体的那些斑点(图4B/C)。这些实验明确地证明了用于鉴定受体:配体复合物的细胞微阵列技术。图5显示了用于各种不同蛋白质相互作用(PD-1:PD-L2,CTLA-4:B7-1和CD200R:CD200)的细胞微阵列技术;这些结果进一步验证了细胞微阵列平台的广泛适用性并且突出了这种方法的信噪比和特异性。

[0148] 类似地研究了属于Ig超家族(IgSF)的粘连蛋白/粘连蛋白样家族的14个成员。这些蛋白质中至少10种表现出同嗜性相互作用并且在粘连蛋白家族成员之间存在至少20种异嗜性相互作用[70-72]。此外使约500个胞外域和包含整个人IgSF的分泌蛋白通过这个系统允许。在这些实验中,点印IgSF每个成员的表达载体以生成用特异性IgSF成员的Ig融合构建体探测的微阵列(即,每个斑点代表IgSF的一个成员)。因为大部分IgSF成员结合IgSF的其它成员,这样提供了令人兴奋的鉴定IgSF中新的受体:配体相互作用的机会。根据其在癌症生物学和自身免疫性疾病中相当大的机制和治疗重要性,鉴定IgSF成员B7-H4[73-80]、VISTA[81]、B7-H3[74,79,82-85]、LAG-3[86-90]和嗜乳脂蛋白家族的10个成员[91-94]的配体也是必要的。IgSF的其它成员,包括延长B7、癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)[95]和白细胞受体复合物[96]家族的其它成员为候选靶标。IgSF很大一部分的表达试剂已经成功生成并得到验证(图6)。

[0149] TNF和TNFR超家族的所有成员均可作为所述平台的一部分;所有这些蛋白质为重要的机制和治疗靶标并且为II型膜蛋白(即,TNF超家族成员)。所述技术可适于整个分泌蛋白质组,包括GPCR、To11样受体、生长因子受体、白细胞介素、白细胞介素受体、离子通道等。

[0150] 克隆:获得大量所需克隆模板的通路可用。例如,NYSGR掌握了来自于OpenBiosystems的整个人类哺乳动物基因组集合(MGC)cDNA组并且这些克隆模板免费可用。在一个优选实施方案中,高度有效不依赖连接的克隆(LIC)[97]用于生成表达文库;目标插入基因后面将是跨膜锚并且将在其C端(I型膜蛋白)与细胞质定位的GFP表达报告基因共价融合(图4和6)。最近,执行LIC克隆已经在过去的18个月支持生成了>15,000个用于大规模结构(nysgrc.org)和功能基因组(enzymefunction.org)程序的经序列验证的构建体。对于迅速生成上述库所需的高通量分子生物学而言,用自动化液体处理机器人(例如Biomek FXP液体处理机和Perkin-Elmer EP3机器人)辅助所述方法。容易生成所需全部表达载体(图6)。

[0151] 查询蛋白的Ig融合构建体的质量生成:已经建立了高通量瞬时转染和慢病毒驱动平台以生成分泌蛋白并且特别是Ig融合蛋白。图12示出了最近已经生成的许多突变PD-L1Ig融合构建体。该平台基于Daedalus系统[98]并且具有每周生成48个慢病毒的能力。此外,已经有效生成了无数分泌蛋白和胞外域,用作机制研究[21-23]和治疗应用[24-27]的可溶性Ig融合蛋白。这一巨大的文献证明与非天然结构域的共价融合没有有害影响并且与各种分泌蛋白和胞外域相容。

[0152] 细胞微阵列中功能性质膜定位GFP融合蛋白的表达:在细胞微阵列筛选的情况下,天然膜内在蛋白将利用天然跨膜元件来避免I型和II型膜内在蛋白之间的区分问题。重要

的是,已经报道了生物相关荧光蛋白融合蛋白(例如,GFP融合蛋白)的许多实例,包括Ig、TNF/TNFR[1-3]、GPCR[4-6]、整联蛋白[7]和转运蛋白[8]超家族的成员。对于细胞微阵列而言,可通过添加将其锚定到细胞表面用于后续探测的跨膜螺旋将分泌蛋白有效地工程化为膜内在蛋白。基于来自许多家族的由于交替剪接和/或脱落(即,蛋白水解)[9-19]而具有生物重要性膜锚定和分泌形式的许多蛋白质的存在,拴系不是问题。此外,已经有意将多种分泌蛋白(例如,IL-2和GM-CSF)工程化为单跨内在膜蛋白以提供新型治疗策略(例如,疫苗设计)[20]。

[0153] 一些受体需要多个组分以便表现出对其同源配体(例如,T细胞受体、整联蛋白)的结合活性。视情况而定,通过在细胞微阵列的单个位置共表达多个组分解决这些更复杂的受体(图7)。

[0154] 选择用于微阵列呈递的细胞系:已经用HEK293细胞牢固确立了细胞微阵列技术。为区分与HEK293细胞内源性表达的细胞表面蛋白结合的那些查询蛋白,将与所有微阵列中存在的未转染对照细胞(即,未接收编码质膜定位蛋白的表达载体的那些细胞)的结合用作方便的对照。然而,在大多数情况下由强CMV启动子驱动的饱和水平的过表达将优于低水平的内源性细胞表面表达。而且,适当的统计方法可在统计上鉴定信号结合事件。为帮助这些统计分析,可在细胞微阵列中点印所有表达载体,一式两份。重要的是,各种替代细胞系也可用作微阵列中的“救援宿主系”。例如果蝇S2细胞已被Sabatini用于呈微阵列形式的基因组范围的功能丧失研究[99,100]。

[0155] 亲合力及动态范围:二价Ig-融合物已有效用于鉴定具适度亲和力(即,PD-1:PD-L1; $K_d=5.5\mu M$)的相互作用。用较高效价的B7-1修饰的微珠激发PD-L1表达细胞允许在基于流式细胞术的实验中稳固募集和特异性鉴定受体:配体结合(图9)。这种比较支持了如下观点,增加配体的亲合力扩大了可用实验方法测量的潜在受体:配体相互作用的动态范围,提高了检测与点印细胞微阵列的结合的能力。对于较低亲和力而言,用例如修饰有Ig-融合蛋白的高亲合力多价微珠探测微阵列是有用的。

[0156] 使用瞬时转染细胞的更高亲合力:上述实验涉及用纯化查询配体探测活细胞阵列,最终将实验的主旨推向查询蛋白生成和标记。为提高所述平台的简易度、实用性和通过量,可使用粘附性降低的悬浮适应性哺乳动物细胞系(即,HEK293自由式(Invitrogen)[101]),其表达由与细胞质C端mCherry报告蛋白(或其它适合的荧光蛋白)融合的单跨膜螺旋固定在其表面的查询蛋白。然后mCherry(红色)悬浮细胞可用于激发阵列上的固定绿色“受体”细胞。含GFP(例如,微阵列定位受体)和mCherry(例如,悬浮查询配体)的共定位细胞斑点将产生正分数。在细胞环境中表达查询配体除去了查询配体纯化和标记的负担;具有将查询蛋白配体维持在更接近天然状态的环境中的附加优点,这对于诸如GPCR等蛋白质而言至关重要。为解决非特异性结合和本底,提出以下内容。细胞微阵列中的每个“斑点”代表在单层未转染细胞中过表达规定基因产物的细胞集群。观察到的本底因与微阵列上的单层未转染细胞的非特异性相互作用外加在荧光检测之前一般无法用力洗涤微阵列而产生。增强单层粘附性以经受严格洗涤,或使细胞在空间上受限制的向有清晰界限的明确规定区域的沉积,可缓解这些问题。为提高斑点状细胞在微阵列环境下的局部化粘附性,通过使用非经典分泌系统令scAvidin指向并锚定在质膜外叶(数据未示出)成功地工程化了稳定表达功能性细胞表面固有的单链抗生物素蛋白(scAvidin)的HEK293细胞系[102]。这种稳定

细胞系特异性结合非细胞渗透性Alexa 594标记生物素并且如果需要更用力的洗涤步骤,这种策略可用于全面地将细胞锚定到所述阵列上,或可用于经由生物素缀合物的定点点印特异性地将细胞拴系到规定区域。两种方案都将减少本底信号。

[0157] 细胞微阵列的统计分析:虽然用眼睛易于辨别十分明显的相互作用(例如,图4和6),但是优选应用适当的统计标准鉴定统计上显著的较弱相互作用。

[0158] 用于高通量鉴定细胞表面蛋白质-蛋白质相互作用的自动化流式细胞技术。还公开了使用流式细胞术确定特异性受体:配体相互作用的有效替代方法。这种平台允许轻而易举地检查具各种有亲合力的亲和探针(即,二价Ig-融合物、高亲合力微珠和极高亲合力的瞬时转染细胞)。使用Ig-融合蛋白在概念上与上述实验类似。下文更全面地描述了微珠和瞬时转染细胞用于发现新的受体:配体相互作用的实用性。

[0159] 用上述相同的PD-1:PD-L1相互作用证明了基于微珠的方法,并且因包括PD-L1:B7-1相互作用而扩展。图8示出了微珠实验的整体策略。图9示出了载有PD-1或B7-1Ig-融合蛋白的微珠与表达质膜定位的PD-L1:mCherry融合蛋白的HEK293细胞之间的高度特异性相互作用。这些实验显示多种蛋白(例如,PD-1和B7-1)受微珠呈递的作用并且展示出可预计的高信噪比(即,用仅表达质膜GFP的细胞检测到极低本底结合)。这些原理论证实验突出了基于微珠呈递加上定义受体:配体相互作用的流式细胞分析的实用性和作用。使用对细胞-微珠方法描述的相同PD-L1相互作用,进一步说明了细胞-细胞流式细胞方法。虽然微珠呈递相对于Ig-融合蛋白提供了更高的亲合力,但是查询蛋白在真核细胞质膜上的表达提供了更高的受体密度,明显更高的亲合力和用于检测较弱受体:配体相互作用的扩大动态范围。

[0160] 下面是在悬浮适应性HEK293细胞中单独表达的:1) 呈mCherry融合蛋白的全长PD-L1,2) 呈GFP融合蛋白的全长PD-1,3) 细胞质mCherry和4) 细胞质GFP。对单独和混合群体的流式细胞术分析明确证明表示仅在表达PD-1的细胞和表达PD-L1的细胞都存在时的特异性细胞-细胞相互作用的信号明显增加(约60倍)(图10)。因为另外的阴性对照PD-1也呈mCherry融合蛋白表达并且不出所料PD-1本身不相互作用(数据未示出)。如同微珠分析一样,细胞-细胞方法也证明了来自于瞬时转染HEK293细胞的PD-L1-mCherry和B7-1-GFP之间的相互作用(数据未示出)。这种方法似乎具有一般实用性,因为它也明确揭示了CD200和CD200受体(CD200R)之间的预计相互作用(图11),这与PD-1、PD-L1、B7-1蛋白质家族无关。

[0161] 这些流式细胞方法可适用于其它已知的T细胞共刺激受体:配体对,包括上述粘连蛋白家族中的同嗜性和异嗜性相互作用(图5)。微珠和瞬时转染HEK293细胞均可用于挑战使用已知免疫受体的方法以探测整个Ig超家族、TNF/TNFR超家族的结合并且最终将这些实验扩展到探针整个分泌蛋白质组。

[0162] 生物化学功能剖析:微珠-细胞和细胞-细胞相互作用可用于通过筛选大量突变体分子剖析复杂的生物化学功能。已经通过生成对PD-1和B7-1表现出不同亲和力的PD-L1点突变体,并且尤其重要的是专与PD-1或B7-1结合的PD-L1点突变体证明了这些能力。这些研究使用经大量(即,>100种)PD-L1突变体-mCherry融合物单独瞬时转染的一代HEK293细胞系。通过流式细胞术探测这些细胞结合修饰有野生型PD-1Ig-融合物或野生型B7-1Ig-融合蛋白的GFP负载微珠或经质膜定位的野生型PD-1-GFP或B7-1-GFP融合物瞬时转染的HEK293细胞的能力。需要特别指出的是,观察到在微珠阵列中没有结合的几个突变体在细胞-细胞

形式的情况下显示出明显结合(例如,K124A和K125A)(图12)。这种差异可直接归因于与细胞表面表达相关的效价/亲合力提高并且强调了具一系列亲合力的多个平台的价值。这些研究产生了特异性结合PD-1(G119A、G120A)或B7-1(D122A、Y123A)的一代突变PD-L1Ig-融合蛋白(图12),并且提供了负责PD-1和B7-1识别的不同但重叠的PD-L1表面的绘图(数据未示出);这些独特试剂允许PD-L1:PD-1和PD-L1:B7-1相互作用对待定义的哺乳动物免疫力的不同贡献。这些结果突出了微珠-细胞和细胞-细胞相互作用平台的选择性、实用性和互补性。此外,关于结合亲和力,正在进行的对这些PD-L1突变体相互作用的K_d定量测定(例如,表面等离子体共振)将有助于确定这些微珠-细胞和细胞-细胞平台以及细胞微阵列平台的敏感性。

[0163] 提高通量。使用支持呈一次性形式约1个样品/分钟的适度通量的BD FACS Aria III进行以上进行的研究,需要使用者持续关注。这些方法可用于其它系统,例如96/384-孔板形式以支持利用例如IntelliCyt™ HTFC系统的高通量筛选。IntelliCyt™支持呈免提模式每张96孔板3分钟/每张384孔板12分钟的通量。这种基于流式细胞术的方法,在使用基于多孔的细胞计数仪和全自动组织培养机器人进行时,提供了大规模受体去孤儿化实验所需的高通量。可与所述方法一起使用的系统的其它实例包括Perkin Elmer细胞::探测器;基于全自动组织培养的液体处理机、Janus工作站、Liconic振荡式培养箱、Envision酶标仪-全部可经由BSL-2生物安全罩内容纳的六轴机械臂进入,例如以确保无菌。完全实现的自动化组织培养能力,包括细胞生长、培养基更换、转染等对效率有帮助。呈多孔形式的平台可任选地以已证明的相互作用对(PD-1:PD-L1、PD-1:PD-L2、PD-L1:B7-1、CTLA-4:B7、CD200R:CD200;图4、6、10、11)以及整组PD-L1突变体(图12)为基准。这可推广到如上所述的Ig超家族的所有成员并最终推广到整个分泌蛋白质组。重要的是要注意虽然许多实验室已经证实可通过FACS分析容易地检查基于细胞-细胞的相互作用(图10和11),但是这些努力全部具有低通量性并且不易转向赋予本文所述优点的完全筛选。

[0164] 修改磁捕获技术和下一代测序以高度多路复用鉴定细胞表面蛋白质-蛋白质相互作用:本文所述的另一种平台采用磁捕获技术迅速富集由于特异性受体:配体相互作用而形成的细胞-微珠(或细胞-细胞)缀合物[103]并采用下一代大规模并行测序(例如,Illumina/454[104-106])以使所得集合去卷积(例如,[107-110])。这种平台对表达文库每个成员的标记表达载体起杠杆作用,所述载体含有可以是可用“通用引物”扩增并且易于通过深度测序鉴定的条形码的独特核苷酸条形码(在所述实例中,为28个核苷酸,但是可使用其它范围)(图13)[107-110]。可汇合带条形码的载体文库并一同转染到悬浮适应性HEK293细胞中。汇合的表达文库与查询蛋白混合(在微珠或细胞表面呈递的情况下)形成缀合物,通过多孔磁性分离(例如,在少于30分钟内进行24次平行分离)回收缀合物。虽然在汇合文库内存在查询蛋白,但是磁性查询蛋白(在微珠或细胞表面呈递的情况)大大过量,从而消除了来自于汇合文库组分的竞争。扩增来自于富集集合成员的条形码并进行下一代深度测序(例如,75个核苷酸各自多达10,000,000个读数)以鉴定通过捕获过程富集的条形码。这些富集条形码直接鉴定了用于通过体外生物化学方法(SPR、ITC、SEC、FACS)后续验证的潜在受体:配体相互作用。所述策略允许迅速鉴定单个查询蛋白的结合伴侣,但是可易于多路复用以大大地增加通过量和降低成本。例如,使用组织培养自动化,500个IgSF成员中的每一个均可单独地用作查询蛋白,来自于每个查询蛋白的捕获缀合物收集在多孔板的单独孔

内。对每种查询蛋白的候选相互作用因子的这种物理分离允许在扩增步骤中使用“复合”引物(即,每个孔接收其中两个“通用T7引发序列”两侧为附加8个独特、特异性良好的核苷酸的独特引物组)。使用复合引物允许特异性鉴定由于和对应特定孔的查询蛋白(附加、特异性良好的核苷酸条形码,例如8个核苷酸)的相互作用而富集的那些文库成员(28个核苷酸的核心条形码)(图13)。用这些复合引物单独扩增每个孔之后,汇合扩增子并且经单次深度测序运行去卷积。这样根据为IgSF的每个成员分配的独特核苷酸条形码鉴定了所述文库中相互作用的成员。通过对每个孔有特异性的独特(例如8个核苷酸)条形码将这些相互作用因子鉴定为特异性查询蛋白的结合伴侣。

[0165] 磁捕获/富集:在细胞-微珠缀合物的情况下使用Miltenyi系统进行细胞富集很简单[103]。优选但不限于使用50nm磁珠进行细胞富集。图14展示了使用磁性微珠分离/富集由于同源受体:配体相互作用而形成的特异性细胞-细胞缀合物。为推广这种方法用于通过磁性分离高通量捕获细胞-细胞缀合物,在表面稳定表达跨膜锚定标签(例如FLAG)的细胞系内表达查询蛋白以允许通过携带抗FLAG的磁珠捕获。这种策略防止微珠结合的捕获试剂(例如,抗FLAG)干扰特异性受体:配体复合物。此外,可能检查到一系列文库集合:查询细胞化学计量并改变利用的磁珠的量,因为这些变量将影响产率和选择的严格性。重要的是,磁性微珠捕获允许大量的洗涤步骤并且导致本底减少。与细胞-细胞缀合物形成相关的极高多价相互作用的强度完全与相对温和的磁性分离技术相容。这种方法不依赖于用于确定“结合”和“未结合”事件的荧光信号的测量,并且除去了门控、激光设置等的复杂化。

[0166] 信噪比:在查询蛋白表达细胞系和“非靶标”(即,不表达同源配体的细胞)之间可发生非特异性结合。图14B展示了磁捕获技术对于“稀有事件”(即,总的可能相互作用的1.5%)特异性富集的能力。图15提供了条形码方法能够检测甚至更稀有的事件的证据。对于典型的二元细胞-细胞测定法而言,其中群体由表达同源受体:配体对(例如,PD-1:PD-L1和CD200:CD200R)的细胞的1:1混合物组成,10-30%的事件通常被评为阳性结合相互作用(见图10和11)。对于阴性对照(例如,GFP和mCherry)而言,通常约0.2-0.5%的事件被评为结合,其中“结合”定义为呈GFP和mCherry阳性的事件的数量(即,图15A,2象限)。

[0167] 为具体评估在表达文库情况下与鉴定同源相互作用相关的挑战,通过将107个瞬时表达GFP的HEK293细胞与 0.02×10^6 个表达PD-1GFP-融合蛋白的细胞(0.2%的GFP阳性细胞,如果全部以相等效率转染则将代表IgSF的单个成员)混合来模拟本底。用106个mCherry(阴性对照)或瞬时表达PD-L1mCherry-融合物的HEK293细胞激发该文库。图15展示了由于特异性PD-1:PD-L1相互作用,GFP:mCherry缀合物明显富集(2象限)。重要的是,基于PCR验证PD-1表达细胞的富集与为使汇合扩增子去卷积而执行的条形编码策略完全类似(即,PD-1编码序列起内在条形码的作用)。重要的是,图14和15中达到的富集水平完全在采用的下一代深度测序方法的检测极限范围内[113]。

[0168] 可用图13中描述的独特条形码方法检查PD-L1:PD-1和PD-L1:B7-1相互作用,属于人IgSF的并入两个表达载体中的每一个(即,500个受体、500个配体)并经受相互作用筛选的500个基因也可以。该系统使得能够为整组潜在受体同时查询许多配体,允许对大型查询列表同时、有效且有成本效益的探询。这种方法可覆盖整个分泌蛋白质组。

[0169] 图16-24中展示了本发明另外的方面及其验证。

[0170] 参考文献

- [0171] 1.Cheung,T.C.,et al.,T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment.J Immunol,2009.183(11):p.7286-96.
- [0172] 2.Cheung,T.C.,et al.,Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival.Proc Natl Acad Sci U S A,2009.106(15):p.6244-9.
- [0173] 3.Olszewski,M.B.,et al.,TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis.J Immunol,2007.178(9):p.5701-9.
- [0174] 4.Giebing,G.,et al.,Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction.Circ Res,2005.97(7):p.707-15.
- [0175] 5.Tarasova,N.I.,et al.,Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein.Endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A.J Biol Chem,1997.272(23):p.14817-24.
- [0176] 6.Bohme,I.and A.G.Beck-Sickinger,Illuminating the life of GPCRs.Cell Commun Signal,2009.7:p.16.
- [0177] 7.Carman,C.V.and T.A.Springer,Integrin avidity regulation:are changes in affinity and conformation underemphasized?Curr Opin Cell Biol,2003.15(5):p.547-56.
- [0178] 8.Chiu,C.S.,et al.,Number,density,and surfatce/cytoplasmic distribution of GABA transportets at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype I-green fluorescent protein fusions.J Neurosci,2002.22(23):p.10251-66.
- [0179] 9.Geng,H.,et al.,Soluble form of T cell Ig mucin 3is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response.J Immunol,2006.176(3):p.1411-20.
- [0180] 10.Sakimoto,T.,A.Yamada,and M.Sawa,Release of soluble tumor necrosis factor receptor I from corneal epithelium by TNF-alpha-converting enzyme-dependent ectodomain shedding.Invest Ophthalmol Vis Sci,2009.50(10):p.4618-21.
- [0181] 11.Sanderson,M.P.,et al.,Generation of novel,secreted epidermal growth factor receptor(EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion.J Cell Biochem,2008.103(6):p.1783-97.
- [0182] 12.Chalaris,A.,et al.,The soluble Interleukin 6 receptor:generation and role in inflammation and cancer.Eur J Cell Biol,2011.90(6-7):p.484-94.
- [0183] 13.Shibata,M.A.,el al.,The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model.BMC Med,2010.8:p.69.

- [0184] 14.Pavlakovic,H.,et al.,Soluble VEGFR-2:an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors.Ann N Y Acad Sci,2010.1207 Suppl 1:p.E7-15.
- [0185] 15.Khankin,E.V.,et al.,Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease.PLoS One,2010.5(2): p.e9246.
- [0186] 16.Jones,D.C.,et al.,Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes.Eur J Immunol,2009.39(11): p.3195-206.
- [0187] 17.Chen,Z.,et al.,Identification of an expressed truncated form of CD200,CD200tr,which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression.Transplantation,2008.86(8):p.1116-24.
- [0188] 18.Eshel,D.,et al.,Characterization of natural human antagonistic soluble CD40isoforms produced through alternative splicing.Mol Immunol, 2008.46(2):p.250-7.
- [0189] 19.Levine,S.J.,Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation.J Biol Chem,2008.283(21):p.14177-81.
- [0190] 20.Yang,Y.,et al.,A novel method to incorporate bioactive cytokines as adjuvants on the surface of virus particles.J Interferon Cytokine Res, 2009.29(1):p.9-22.
- [0191] 21.Cao,E.,et al.,T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface.Immunity,2007.26(3): p.311-21.
- [0192] 22.Bitonti,A.J.,et al.,Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway.Proc Natl Acad Sci U S A,2004.101(26):p.9763-8.
- [0193] 23.Ozkaynak,E.,et al.,Programmed death-1 targeting can promote allograft survival.J Immunol,2002.169(11):p.6546-53.
- [0194] 24.Yang,T.,et al.,A variant of TNFR2-Fc fusion protein exhibits improved efficacy in treating experimental rheumatoid arthritis.PLoS Comput Biol,2010.6(2):p.e1000669.
- [0195] 25.Moreland,L.,G.Bate,and P.Kirkpatrick,Abatacept.Nat Rev Drug Discov,2006.5(3):p.185-6.
- [0196] 26.Vincenti,F.,A.Dritselis,and P.Kirkpatrick,Belatacept.Nat Rev Drug Discov,2011.10(9):p.655-6.
- [0197] 27.Moreland,L.W.,Soluble tumor necrosis factor receptor(p75) fusion protein(ENBREL)as a therapy for rheumatoid arthritis.Rheum Dis Clin North Am, 1998.24(3):p.579-91.
- [0198] 28.Zhang,X.,et al.,Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1.Immunity,2004.20(3):p.337-47.

- [0199] 29.Bhatia,S.,et al.,Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2:implications for signaling.Proc Natl Acad Sci U S A,2005.102(43): p.15569-74.
- [0200] 30.Cao,E.,et al.,NTB-A receptor crystal structure:insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family.Immunity,2006.25(4):p.559-70.
- [0201] 31.Chattopadhyay,K.,et al.,Structural basis of inducible costimulator ligand costimulatory function:determination of the cell surface oligomeric state and functional mapping of the receptor binding site of the protein.J Immunol,2006.177(6):p.3920-9.
- [0202] 32.Chattopadhyay,K.,et al.,Assembly and structural properties of glucocorticoid-induced TNF receptor ligand:Implications for function.Proc Natl Acad Sci U S A,2007.104(49):p.19452-7.
- [0203] 33.Yan,Q.,et al.,Structure of CD84 provides insight into SLAM family function.Proc Natl Acad Sci U S A,2007.104(25):p.10583-8.
- [0204] 34.Chattopadhyay,K.,et al.,Evolution of GITRL immune function:murine GITRL exhibits unique structural and biochemical properties within the TNF superfamily.Proc Natl Acad Sci U S A,2008.105(2):p.635-40.
- [0205] 35.Lazar-Molnar,E.,et al.,Crystal structure of the complex between programmed death-I (PD-I) and its ligand PD-L2.Proc Natl Acad Sci U S A, 2008.105(30):p.10483-8.
- [0206] 36.Zhan,C.,et al.,Biochemical and structural characterization of the human TL 1A ectodomain.Biochemistry,2009.48(32):p.7636-45.
- [0207] 37.Bhatia,S.,et al.,Dynamic equilibrium of B7-1 dimers and monomers differentially affects immunological synapse formation and T cell activation in response to TCR/CD28 stimulation.J Immunol,2010.184(4):p.1821-8.
- [0208] 38.Zhan,C.,et al.,Decoy strategies:the structure of TL1A:DcR3 complex.Structure,2011.19(2):p.162-71.
- [0209] 39.Samanta,D.,et al.,Structure of Nectin-2 reveals determinants of homophilic and heterophilic interactions that control cell-cell adhesion.Proc Natl Acad Sci U S A,2012.109(37):p.14836-40.
- [0210] 40.Eads,J.C.,et al.,Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin.Biochemistry,1998.37(32):p.11171-81.
- [0211] 41.Bout-Jordan,H.,et al.,Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7family.Immunol Rev,2011.241(1):p.180-205.
- [0212] 42.Nurieva,R.I.,X.Liu,and C.Dong,Yin-Yang of costimulation:crucial controls of immune tolerance and function,Immunol Rev,2009.229(1):p.88-100.
- [0213] 43.Wang,S.and L.Chen,T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-

CD28 family. *Cell Mol Immunol*, 2004.1 (1):p.37-42.

[0214] 44. Zang, X. and J. P. Allison, The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res*, 2007.13 (18 Pt 1):p.5271-9.

[0215] 45. Chattopadhyay, K., et al., Sequence, structure, function, immunity: structural genomics of costimulation. *Immunol Rev*, 2009.229 (1):p.356-86.

[0216] 46. Ostrov, D. A., et al., Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science*, 2000.290 (5492):p.816-9.

[0217] 47. Schwartz, J. C., et al., Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature*, 2001.410 (6828):p.604-8.

[0218] 48. Zhang, X., et al., Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003.100 (5):p.2586-91.

[0219] 49. Butte, M. J., et al., Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 2007.27 (1):p.111-22.

[0220] 50. Yao, S., et al., B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity*, 2011.34 (5):p.729-40.

[0221] 51. Mansh, M., Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale J Biol Med*, 2011.84 (4):p.381-9.

[0222] 52. Bluestone, J. A., E. W. St Clair, and L. A. Turka, CTLA4lg: bridging the basic immunology with clinical application. *Immunity*, 2006.24 (3):p.233-8.

[0223] 53. Larsen, C. P., et al., Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant*, 2005.5 (3):p.443-53.

[0224] 54. Lum, G. and X. J. Min, FunSecKB: the Fungal Secretome KnowledgeBase. Database (Oxford), 2011.2011:p.bar001.

[0225] 55. Mishra, S. K., H. R. Siddique, and M. Saleem, S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev*, 2011.

[0226] 56. Nickel, W., The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic*, 2011.12 (7):p.799-805.

[0227] 57. Kadono, N., et al., The impact of extracellular syntaxin4 on HaCaT keratinocyte behavior. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012.417 (4):p.1200-5.

[0228] 58. Rawat, P., et al., The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. *Biochem Cell Biol*, 2012.90 (3):p.329-38.

[0229] 59. Kumar, S., et al., Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012.44 (1):p.189-99.

- [0230] 60.Nickel, W.,Pathways of unconventional protein secretion.Curr Opin Biotechnol,2010.21 (5):p.621-6.
- [0231] 61.Prudovsky,I.,et al.,Secretion without Golgi.J Cell Biochem, 2008.103 (5):p.1327-43.
- [0232] 62.Bushell,K.M.,et al.,Large-scale screening for novel low-affinity extracellular protein interactions.Genome Res,2008.18 (4):p.622-30.
- [0233] 63.Jiang,L.and A.N.Barclay,Identification of leucocyte surface protein interactions by high-throughput screening with multivalent reagents.Immunology,2010.129 (1):p.55-61.
- [0234] 64.Gonzalez,L.C.,et al.,A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator.Proc Natl Acad Sci U S A,2005.102 (4):p.1116-21.
- [0235] 65.Yu,X.,et al.,The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.Nat Immunol,2009.10 (1):p.48-57.
- [0236] 66.Ramani,S.R.,et al.,A secreted protein microarray platform for extracellular protein interaction discovery.Anal Biochem,2012.420 (2):p.127-38.
- [0237] 67.Lin,H.,et al.,Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome.Science,2008.320 (5877): p.807-11.
- [0238] 68.Palmer,E.,Cell-based microarrays:overview.Methods Mol Biol, 2011.706:p.1-12.
- [0239] 69.Ziauddin,J.and D.M.Sabatini,Microarrays of cells expressing defined cDNAs.Nature,2001.411 (6833):p.107-10.
- [0240] 70.Takai,Y.,et al.,Nectins and nectin-like molecules:roles in contact inhibition of cell movement and proliferation.Nat Rev Mol Cell Biol,2008.9 (8):p.603-15.
- [0241] 71.Takai,Y.,et al.,The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin.Annu Rev Cell Dev Biol,2008.24: p.309-42.
- [0242] 72.Chan,C.J.,D.M.Andrews,and M.J.Smyth,Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer.Curr Opin Immunol,2012.24 (2):p.246-51.
- [0243] 73.Wang,X.,et al.,Blockade of both B7-H4 and CTLA-4 co-signaling pathways enhances mouse islet allograft survival,Islets,2012.4 (4).
- [0244] 74.Yi,K.H.and L.Chen,Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4.Immunol Rev,2009.229 (1):p.145-51.
- [0245] 75.Mirza,N.and D.Gabrilovich,Comment on"Cutting edge:induction of B7-

H4 on APCs through IL-10:novel suppressive mode for regulatory T cells".J Immunol,2007.178(8):p.4705-6;author reply 4706.

[0246] 76.Krambeck,A.E.,et al.,B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature:associations with cancer progression and survival.Proc Natl Acad Sci U S A,2006.103(27):p.10391-6.

[0247] 77.Sica,G.L.,et al.,B7-H4,a molecule of the B7 family,negatively regulates T cell immunity.Immunity,2003.18(6):p.849-61.

[0248] 78.Wei,J.,et al.,Tissue-specific expression of B7x protects from CD4 T cell-mediated autoimmunity.J Exp Med,2011.208(8):p.1683-94.

[0249] 79.Zang,X.,et al.,B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome.Proc Natl Acad Sci U S A,2007.104(49):p.19458-63.

[0250] 80.Zang,X.,et al.,B7x:a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation.Proc Natl Acad Sci U S A,2003.100(18):p.10388-92.

[0251] 81.Wang,L.,et al.,VISTA,a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses.J Exp Med,2011.208(3):p.577-92.

[0252] 82.Sun,Y.,et al.,B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer.Lung Cancer,2006.53(2):p.143-51.

[0253] 83.Fauci,J.M.,et al.,A review of B7-H3 and B7-H4 immune molecules and their role in ovarian cancer.Gynecol Oncol,2012.127(2):p.420-5.

[0254] 84.Guo,G.,et al.,The characteristic expression of B7-H3 and B7-H4 in liver biopsies from patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure.Pathol Int,2012.62(10):p.665-74.

[0255] 85.Guo,G.,et al.,The expression and distribution of immunomodulatory proteins B7-H1,B7-DC,B7-H3,and B7-H4 in rheumatoid synovium.Clin Rheumatol, 2012.31(2):p.271-81.

[0256] 86.Triebel,F.,et al.,LAG-3,a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4.J Exp Med,1990.171(5):p.1393-405.

[0257] 87.Triebel,F.,LAG-3:a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination.Trends Immunol,2003.24(12):p.619-22.

[0258] 88.Chun,T.,et al.,The effect of soluble LAG-3(CD223)treatment in fetal thymic organ culture.Biotechnol Lett,2004.26(17):p.1371-7.

[0259] 89.Okazaki,T.,et al.,PD-1and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice.J Exp Med,2011.208(2):p.395-407.

[0260] 90.Sierro,S.,P.Romero,and D.E.Speiser,The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications.Expert Opin Ther Targets,2011.15(1): p.91-101.

[0261] 91.Abeler-Dorner,L.,et al.,Butyrophilins:an emerging family of immune

regulators. *Trends Immunol*, 2012. 33 (1) : p. 34-41.

[0262] 92. Cubillos-Ruiz, J.R. and J.R. Conejo-Garcia, It never rains but it pours: potential role of butyrophilins in inhibiting anti-tumor immune responses. *Cell Cycle*, 2011. 10 (3) : p. 368-9.

[0263] 93. Arnett, H.A., S.S. Escobar, and J.L. Viney, Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine*, 2009. 46 (3) : p. 370-5.

[0264] 94. Elleder, D., et al., The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily. *J Virol*, 2005. 79 (16) : p. 10408-19.

[0265] 95. Kuespert, K., S. Pils, and C.R. Hauck, CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. 18 (5) : p. 565-71.

[0266] 96. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunol Rev*, 2008. 224 : p. 98-123.

[0267] 97. Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1990. 18 (20) : p. 6069-74.

[0268] 98. Bandaranayake, A.D., et al., Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39 (21) : p. e143.

[0269] 99. Lindquist, R.A., et al., Genome-scale RNAi on living-cell microarrays identifies novel regulators of *Drosophila melanogaster* TORC1-S6K pathway signaling. *Genome Res*, 2011. 21 (3) : p. 433-46.

[0270] 100. Wheeler, D.B., et al., RNAi living-cell microarrays for loss-of-function screens in *Drosophila melanogaster* cells. *Nat Methods*, 2004. 1 (2) : p. 127-32.

[0271] 101. Graham, F.L., Growth of 293 cells in suspension culture. *J Gen Virol*, 1987. 68 (Pt 3) : p. 937-40.

[0272] 102. Stegmayer, C., et al., Direct transport across the plasma membrane of mammalian cells of *Leishmania* HASPB as revealed by a CHO export mutant. *J Cell Sci*, 2005. 118 (Pt 3) : p. 517-27.

[0273] 103. Grutzkau, A. and A. Radbruch, Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A*, 2010. 77 (7) : p. 643-7.

[0274] 104. Thudi, M., et al., Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. *Brief Funct Genomics*, 2012. 11 (1) : p. 3-11.

[0275] 105. Koboldt, D.C., et al., Massively parallel sequencing approaches for characterization of structural variation. *Methods Mol Biol*, 2012. 838 : p. 369-84.

- [0276] 106.Morozova,O.and M.A.Marra,Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics.Genomics,2008.92(5):p.255-64.
- [0277] 107.Whitehead,T.A.,et al.,Optimization of affinity,specificity and function of designed influenza inhibitors using deep sequencing.Nat Biotechnol,2012.30(6):p.543-8.
- [0278] 108.Smith,A.M.,et al.,Competitive genomic screens of barcoded yeast libraries.J Vis Exp,2011(54).
- [0279] 109.Lee,W.,et al.,Genome-wide requirements for resistance to functionally distinct DNA-damaging agents.PLoS Genet,2005.1(2):p.e24.
- [0280] 110.Pierce,S.E.,et al.,Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures.Nat Protoc,2007.2(11):p.2958-74.
- [0281] 111.McLellan,A.S.,et al.,The Wasp System:An open source environment for managing and analyzing genomic data.Genomics,2012.
- [0282] 112.Golden,A.,et al.,The Einstein Genome Gateway using WASP-a high throughput multi-layered life sciences portal for XSEDE.Stud Health Technol Inform,2012.175:p.182-91.
- [0283] 113.Jiang,L.,et al.,Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments.Genome Res,2011.21(9):p.1543-51.

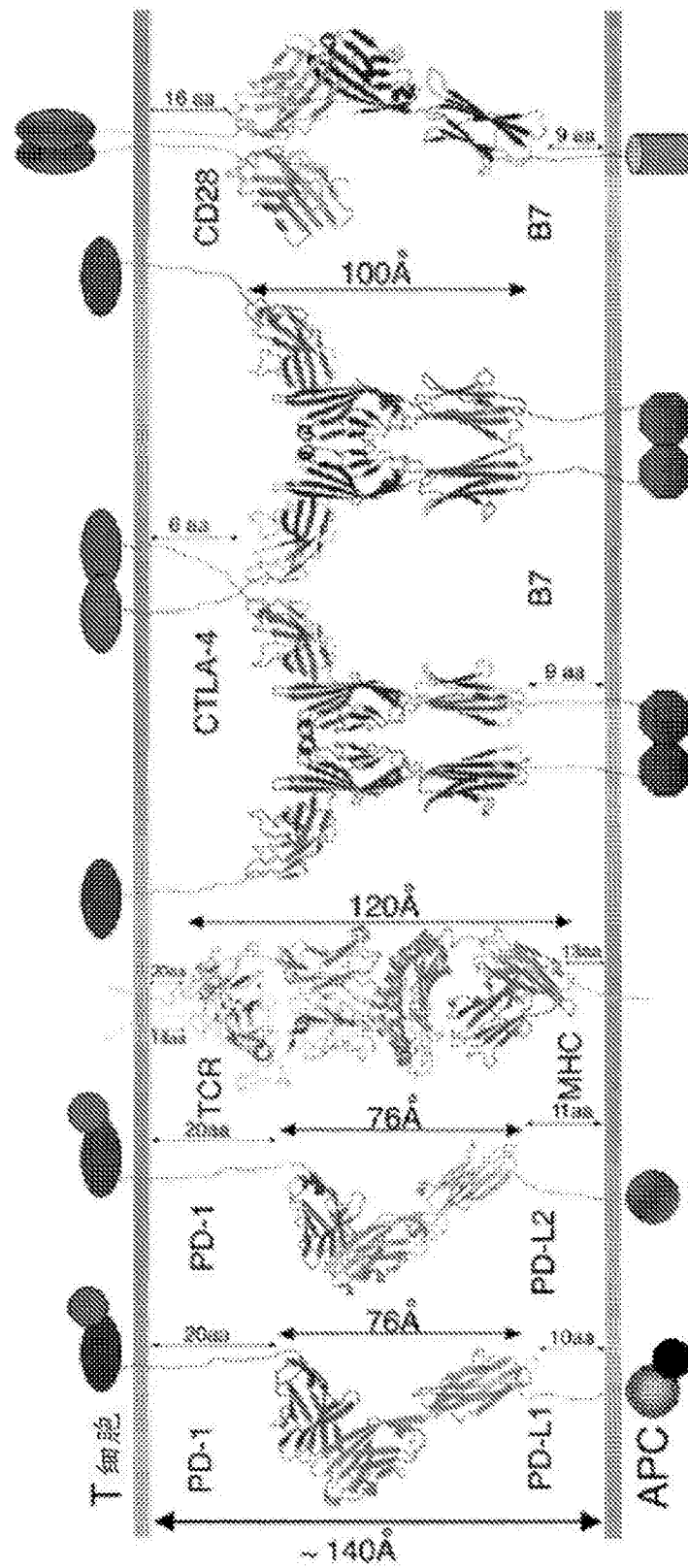


图1

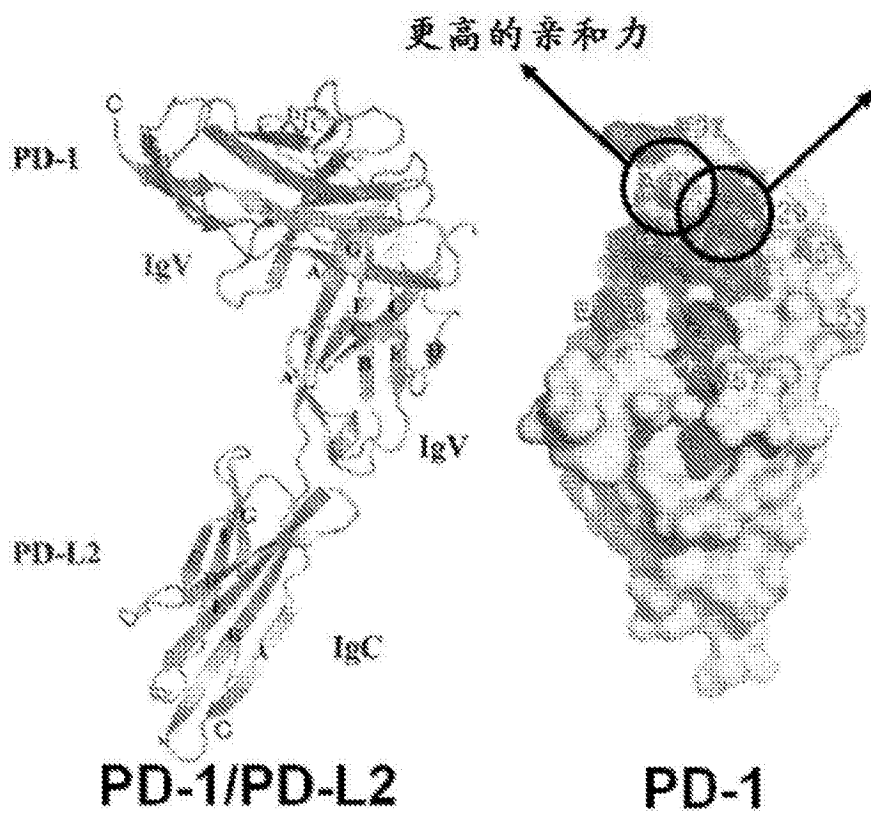


图2

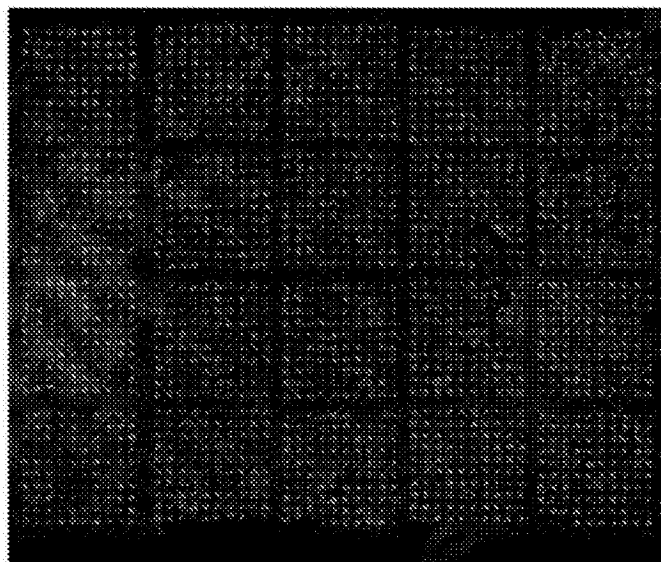
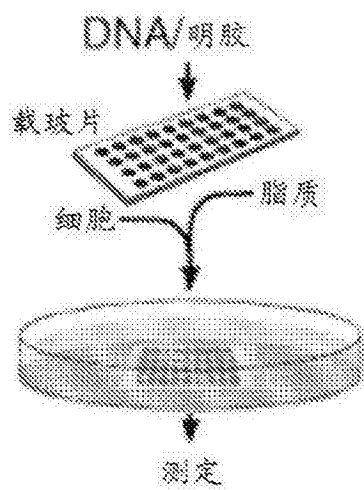


图3

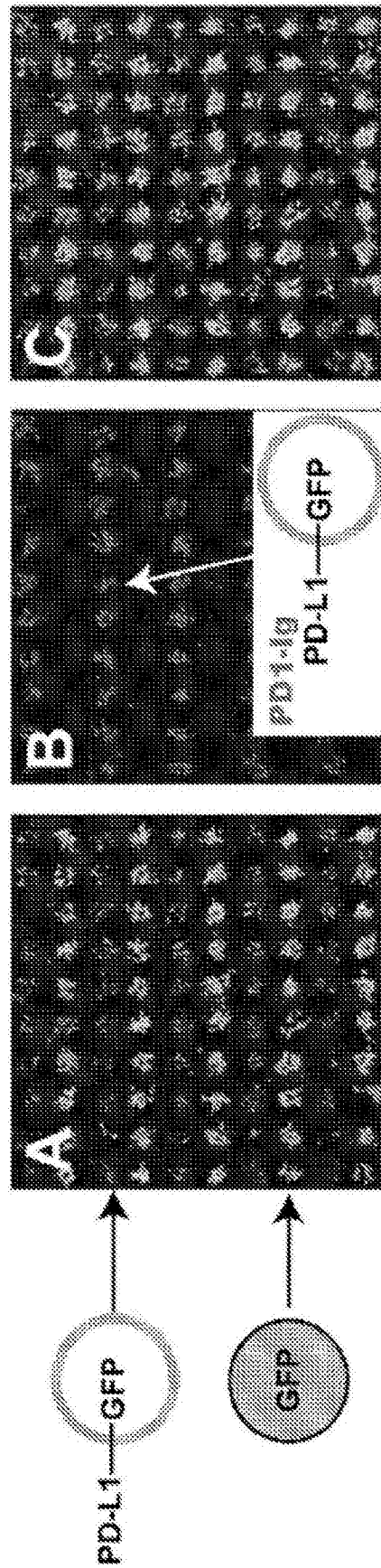


图4

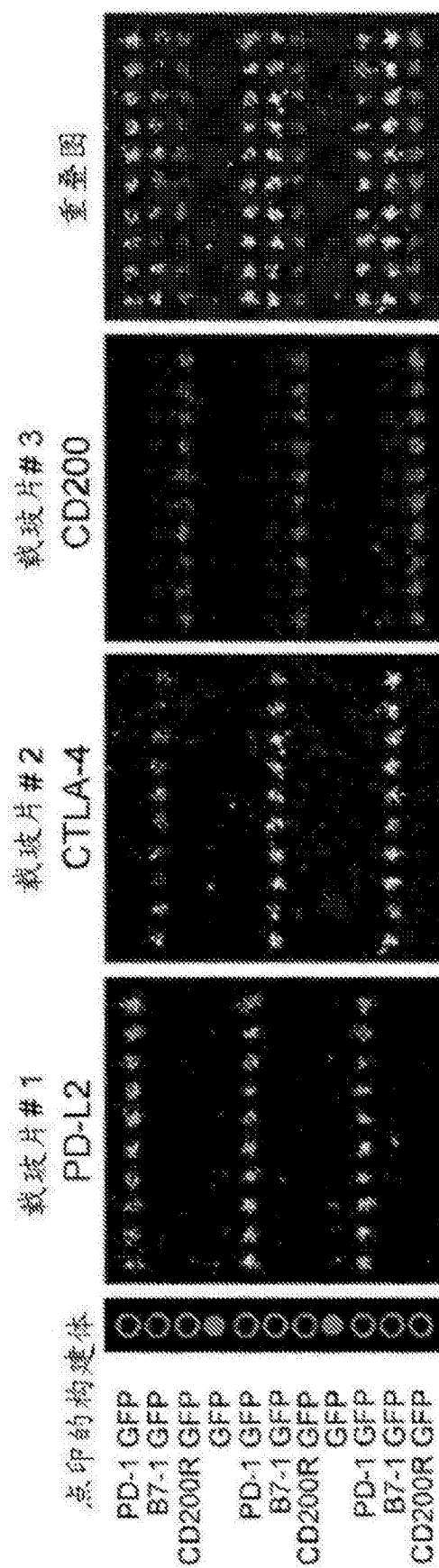


图5

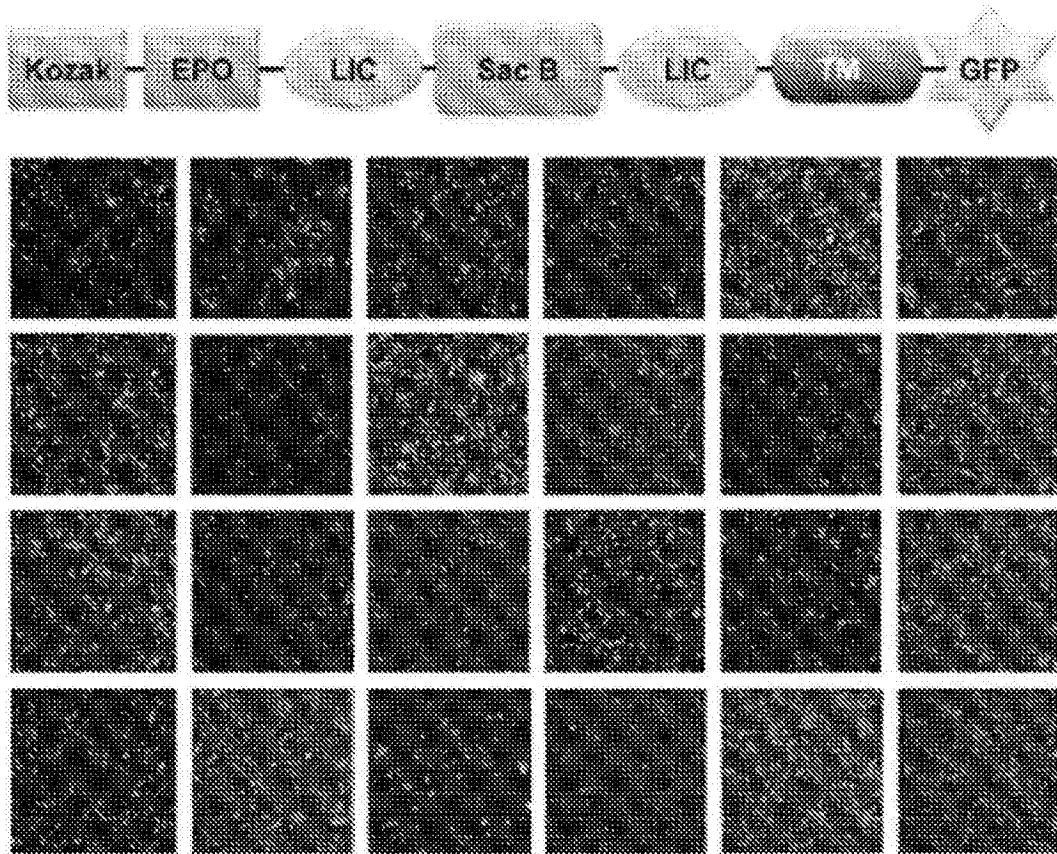


图6

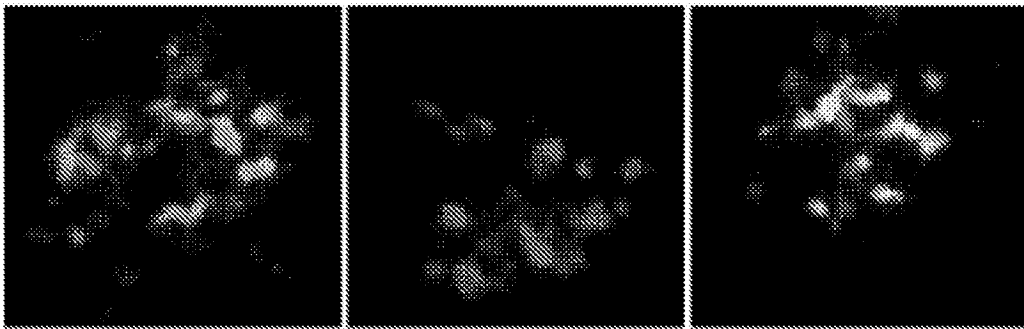


图7

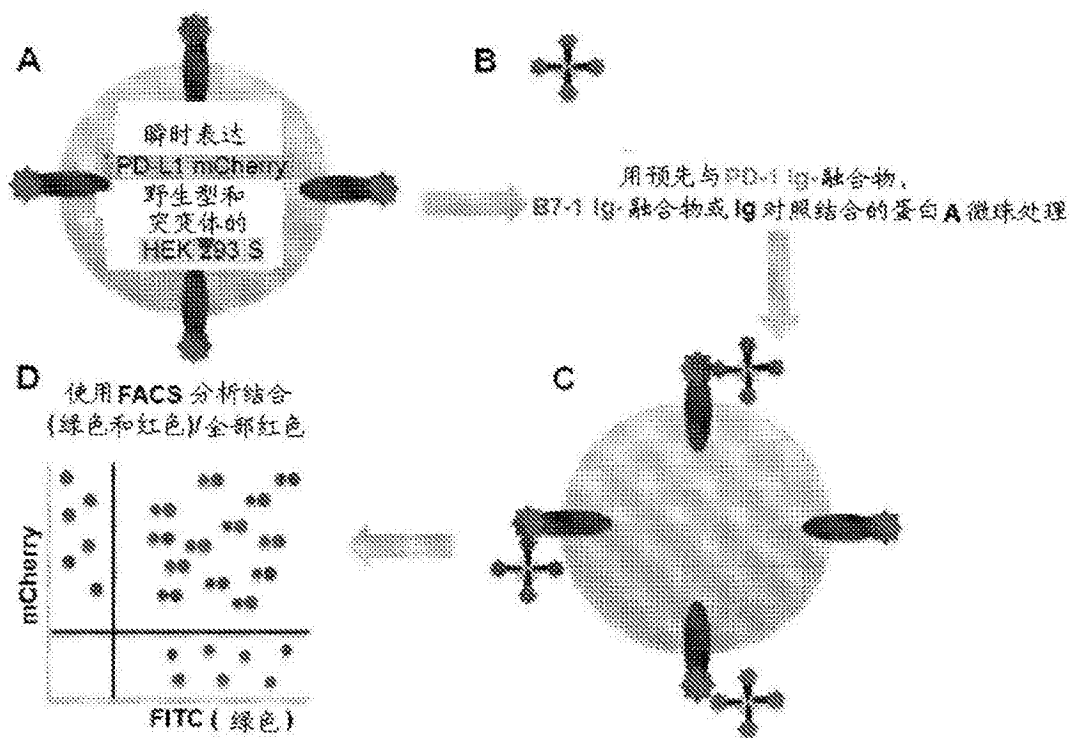


图8A-8D

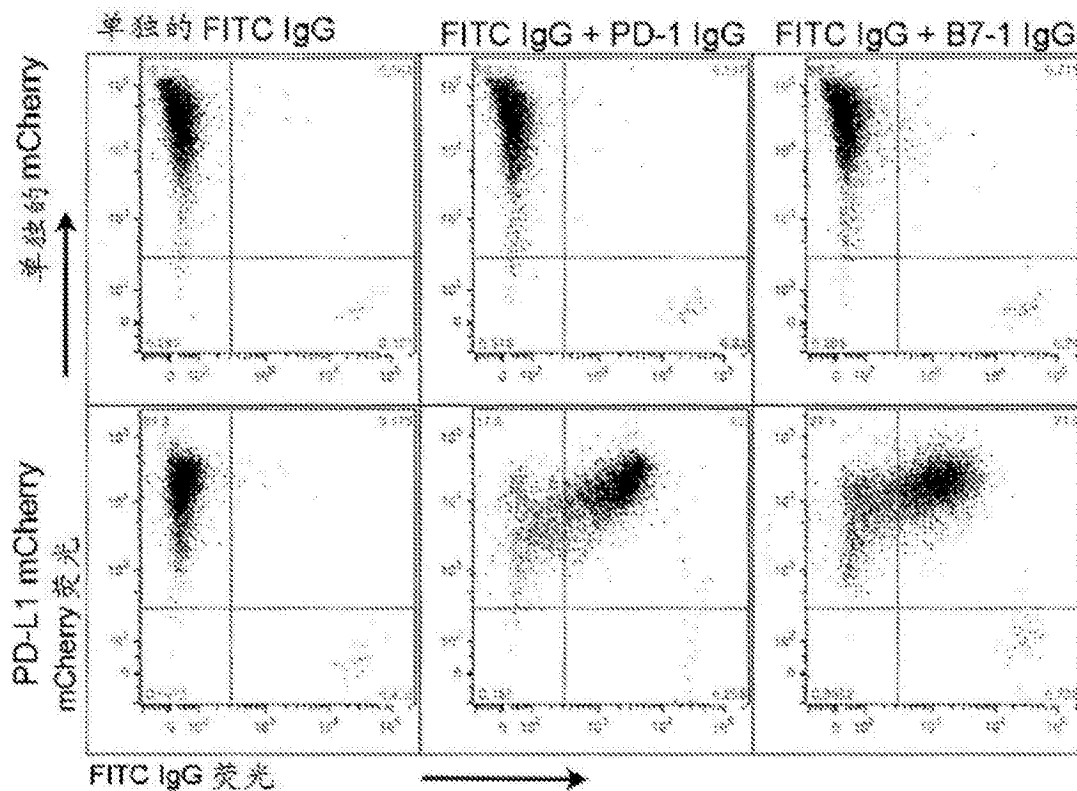


图9

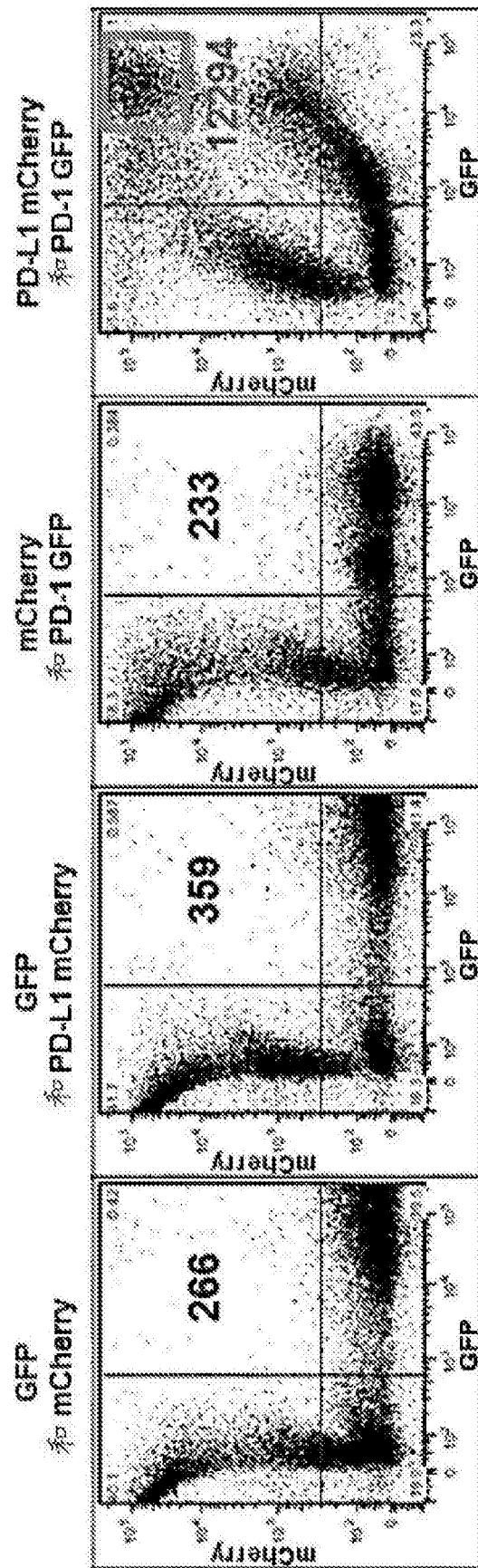


图10

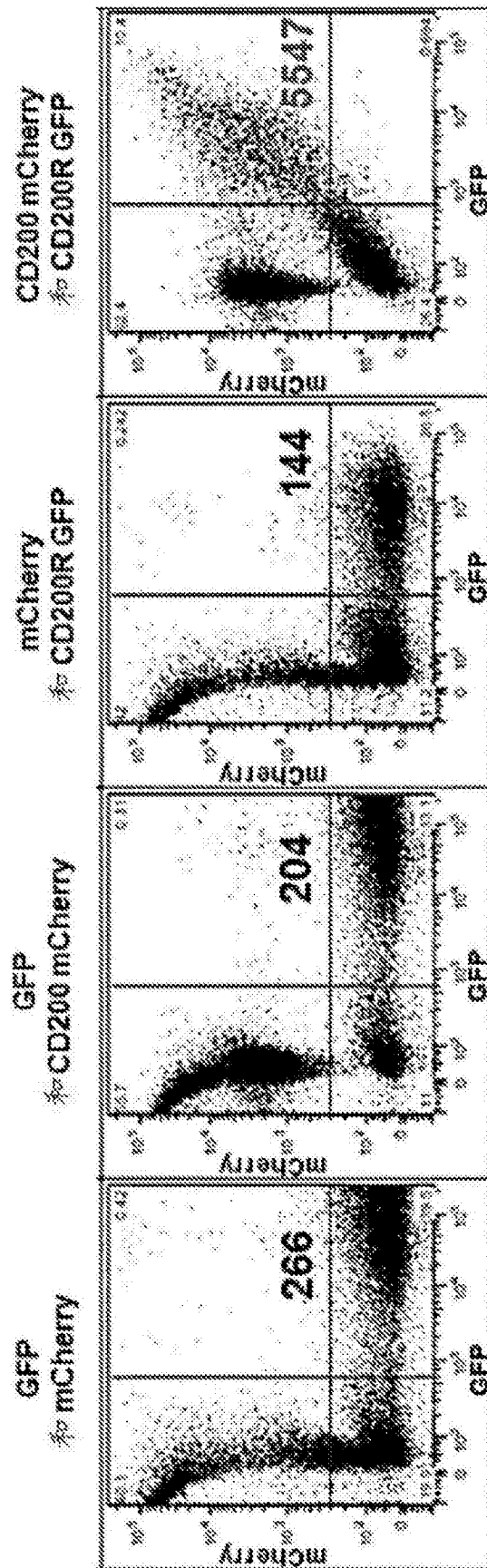


图11

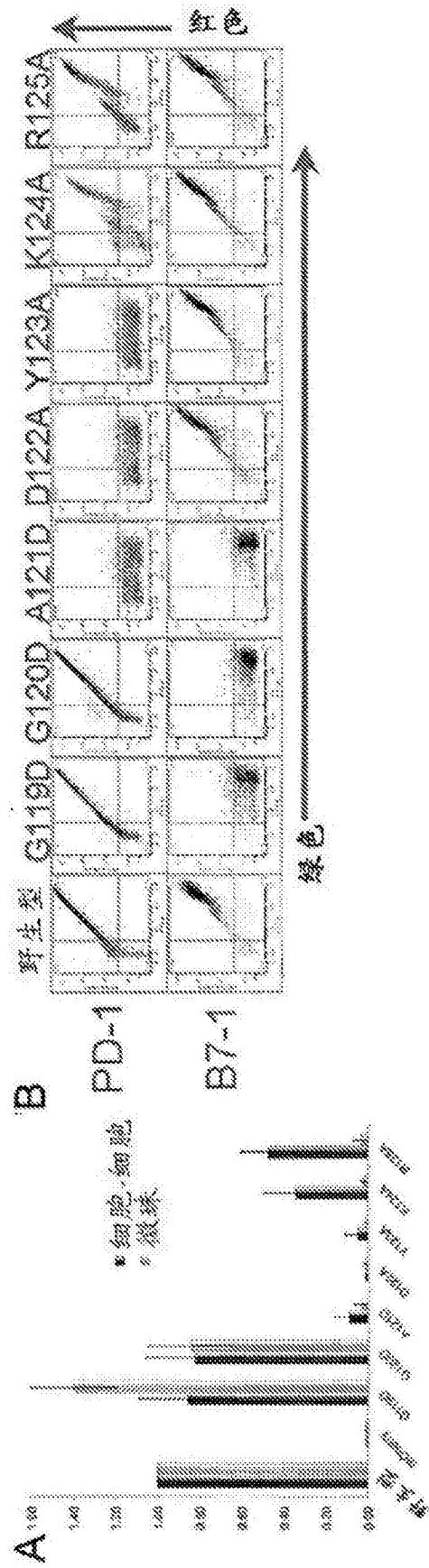


图12

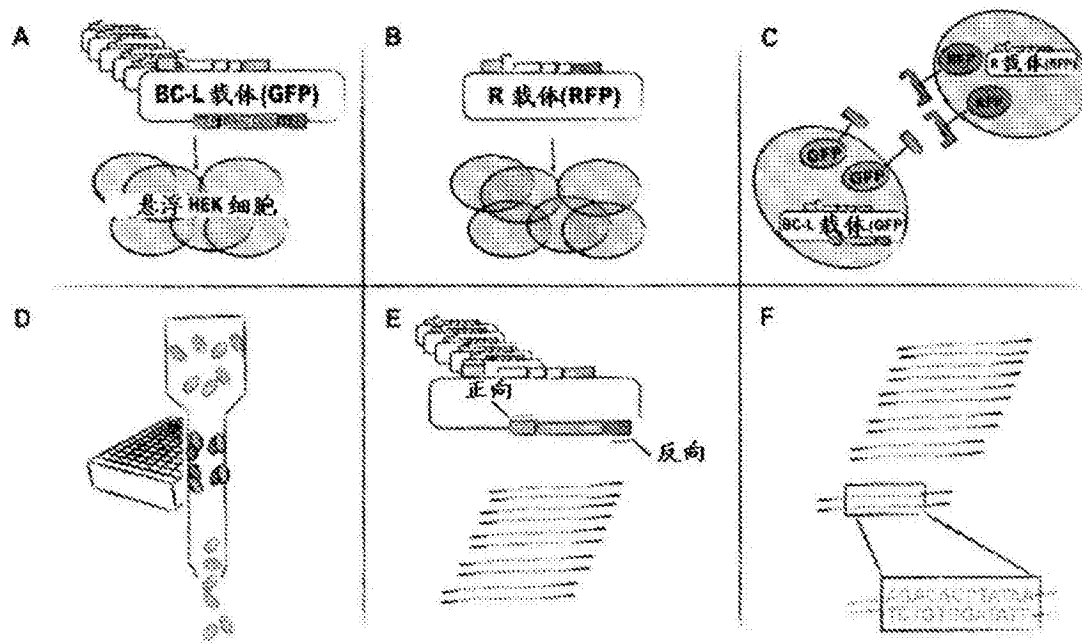


图13

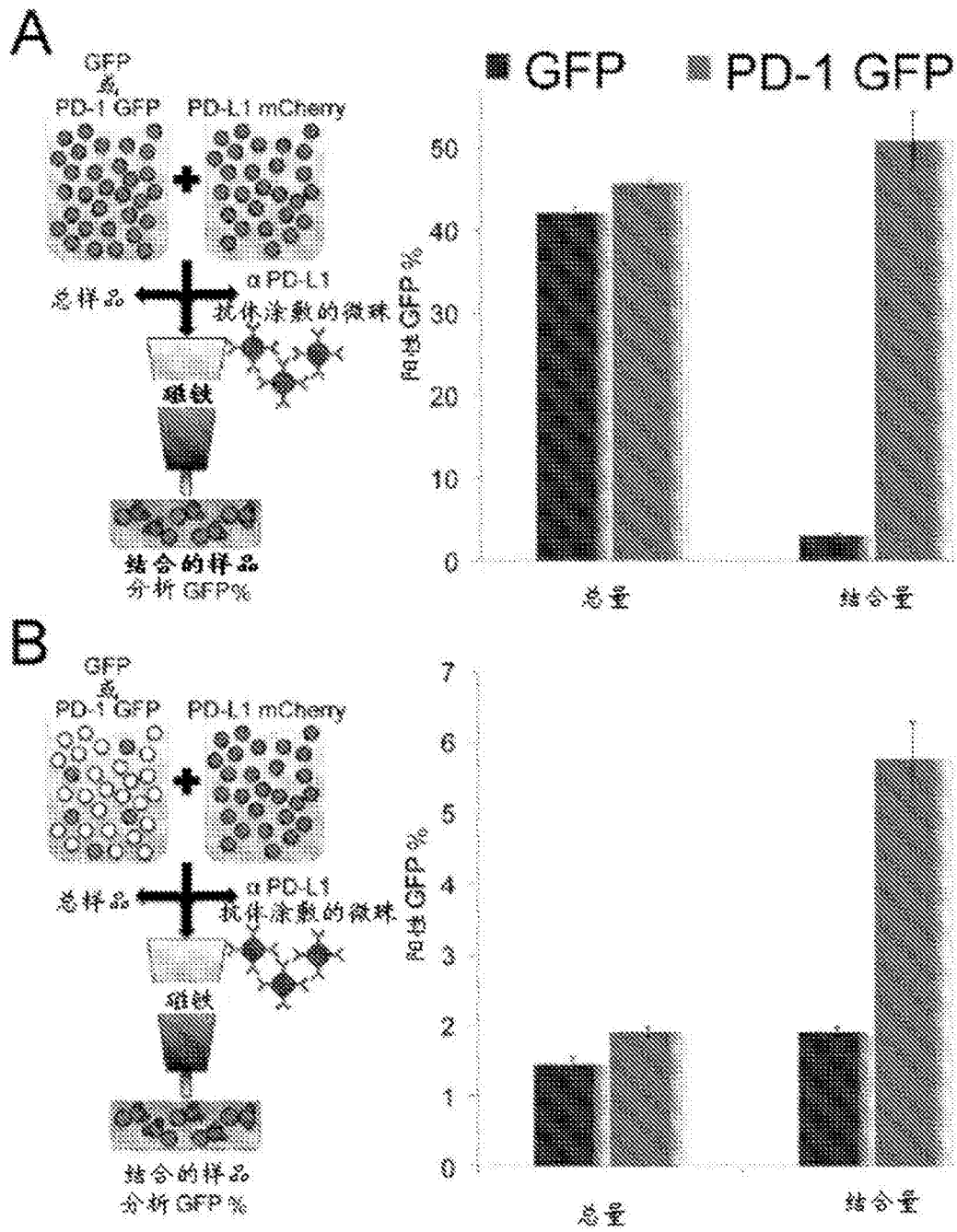


图14A-14B

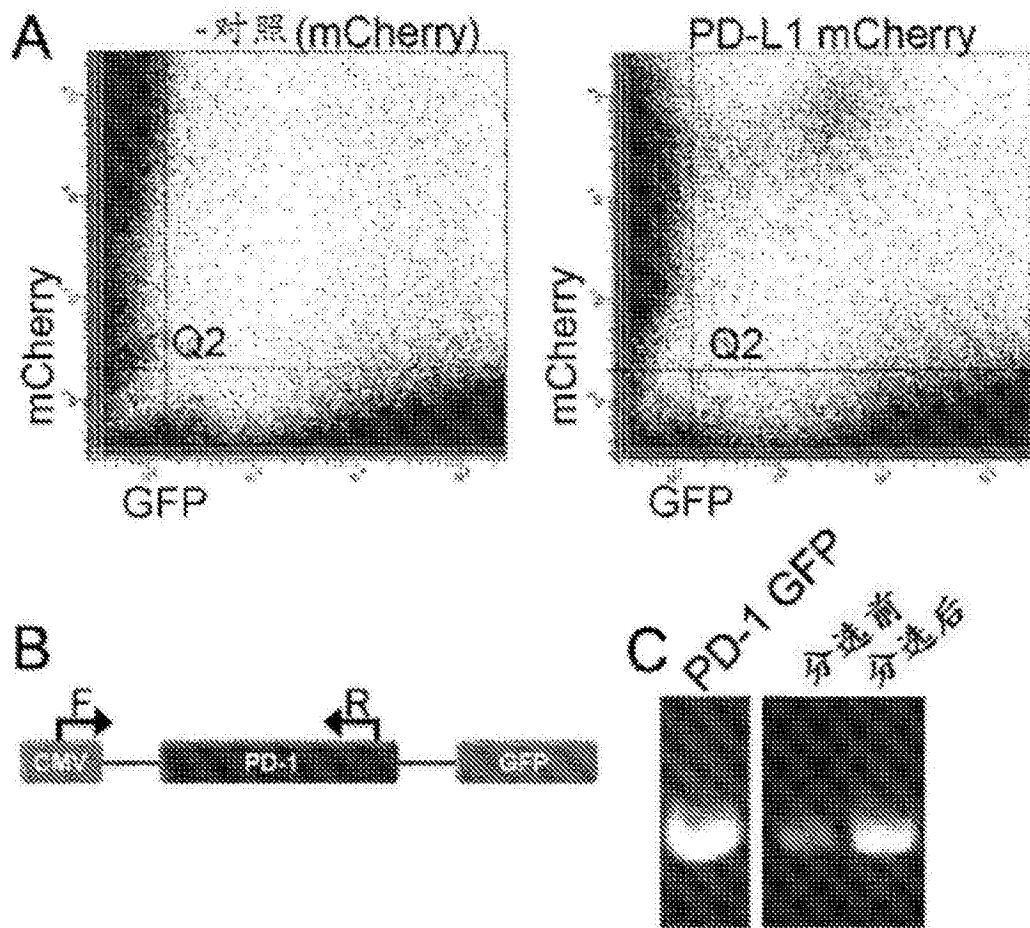


图15A-15C

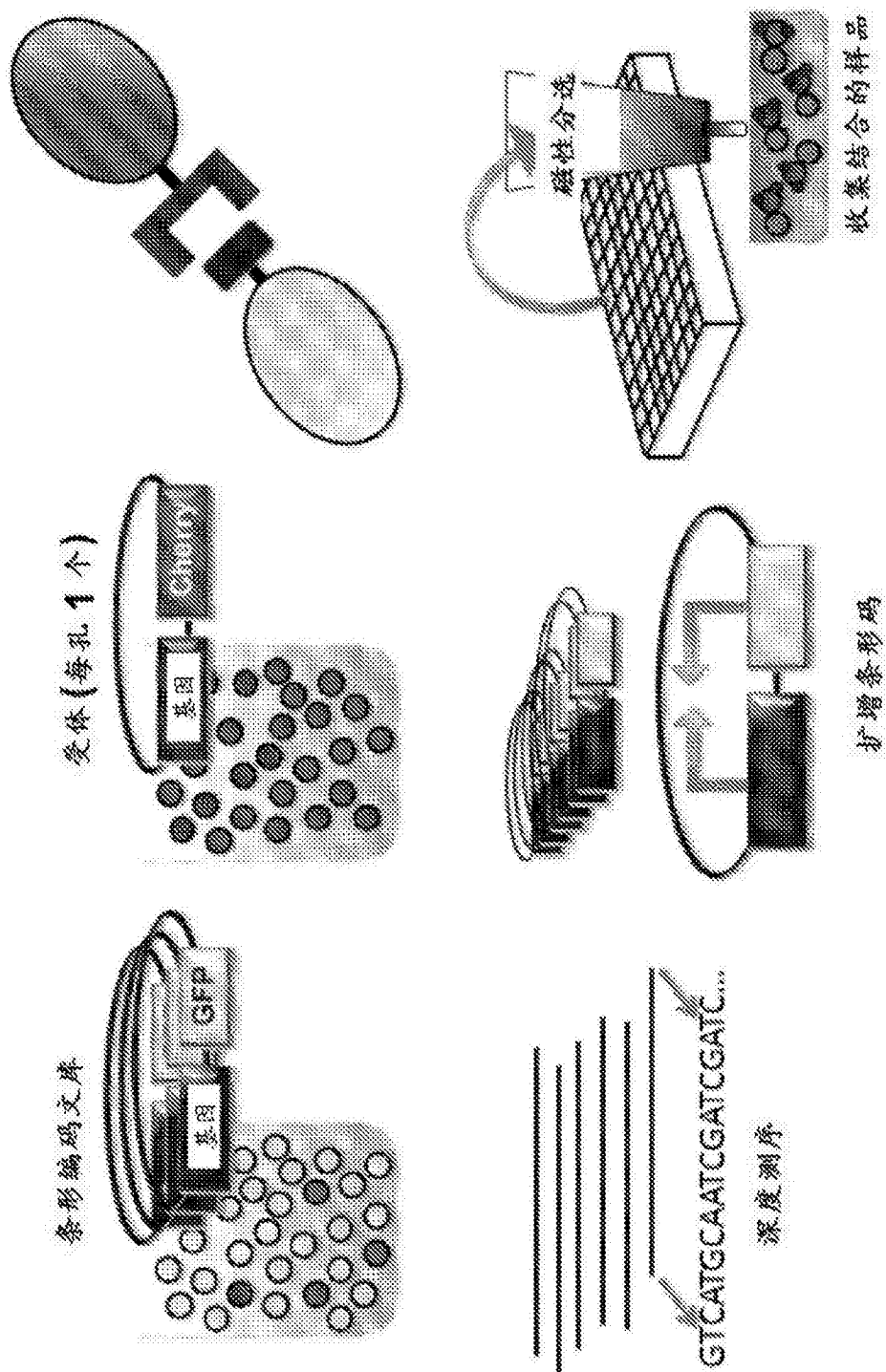


图16

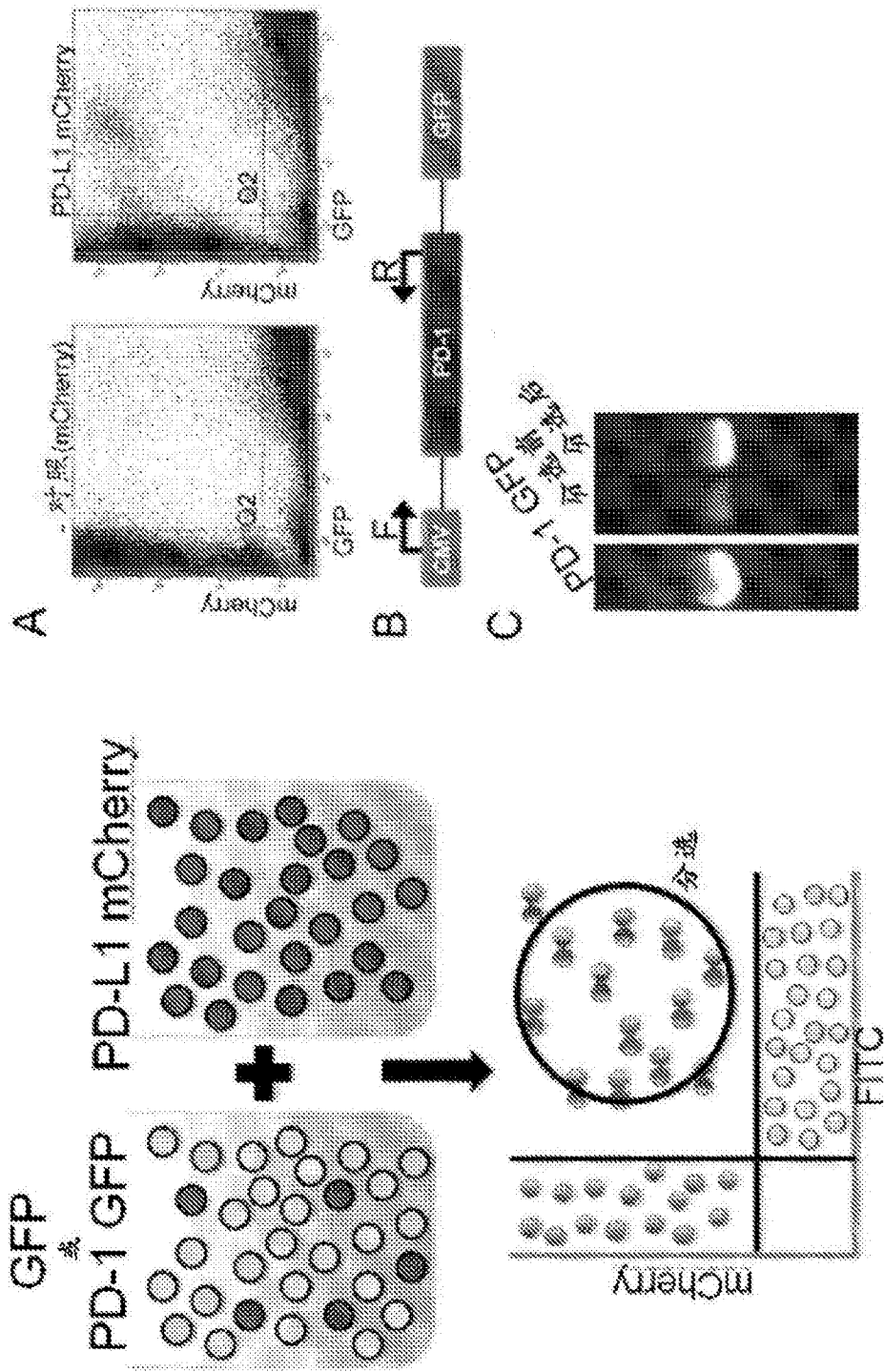


图17

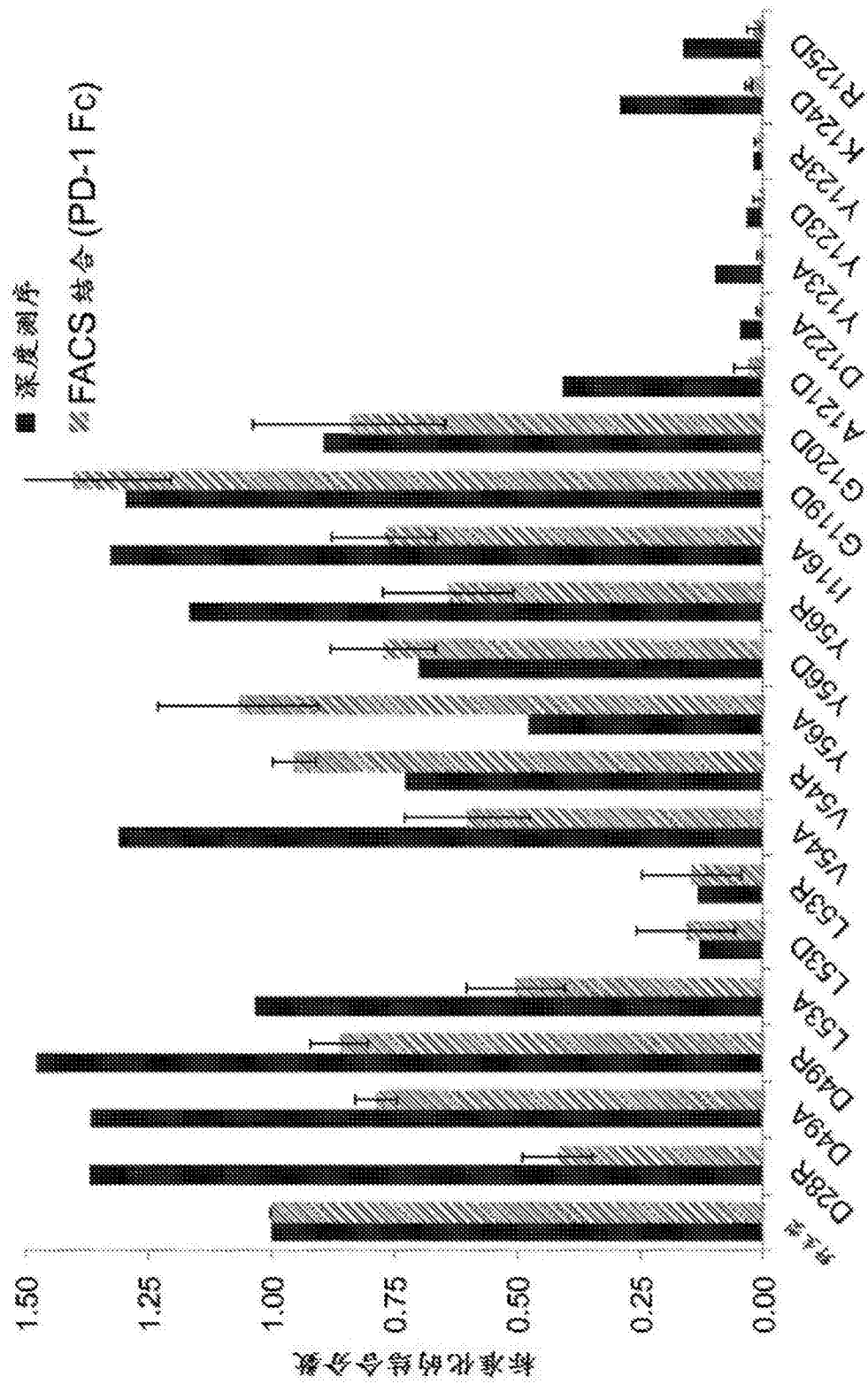


图19

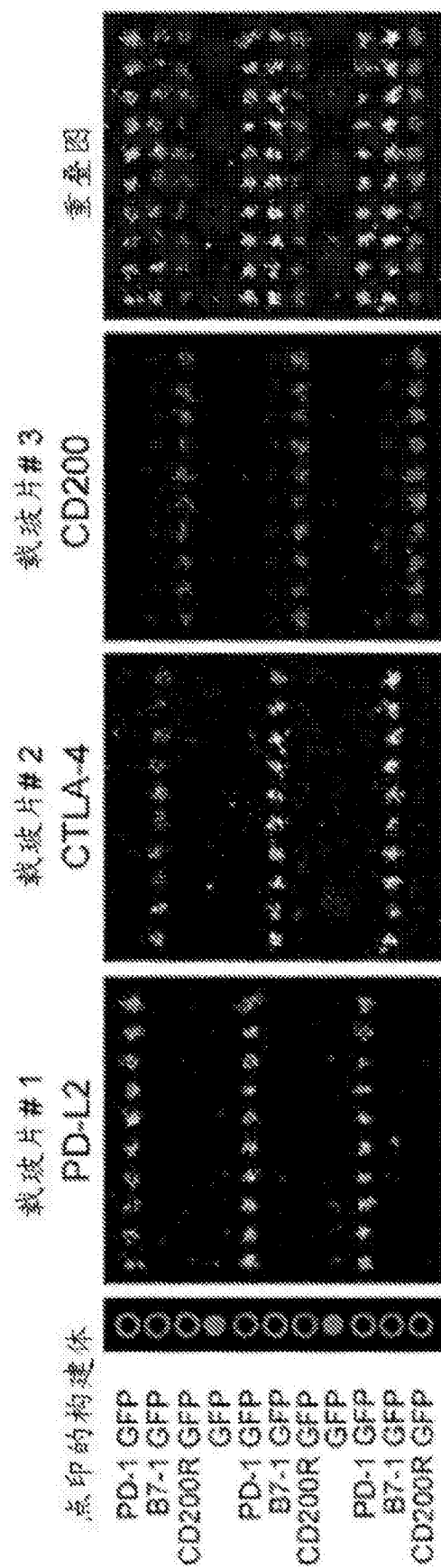


图20

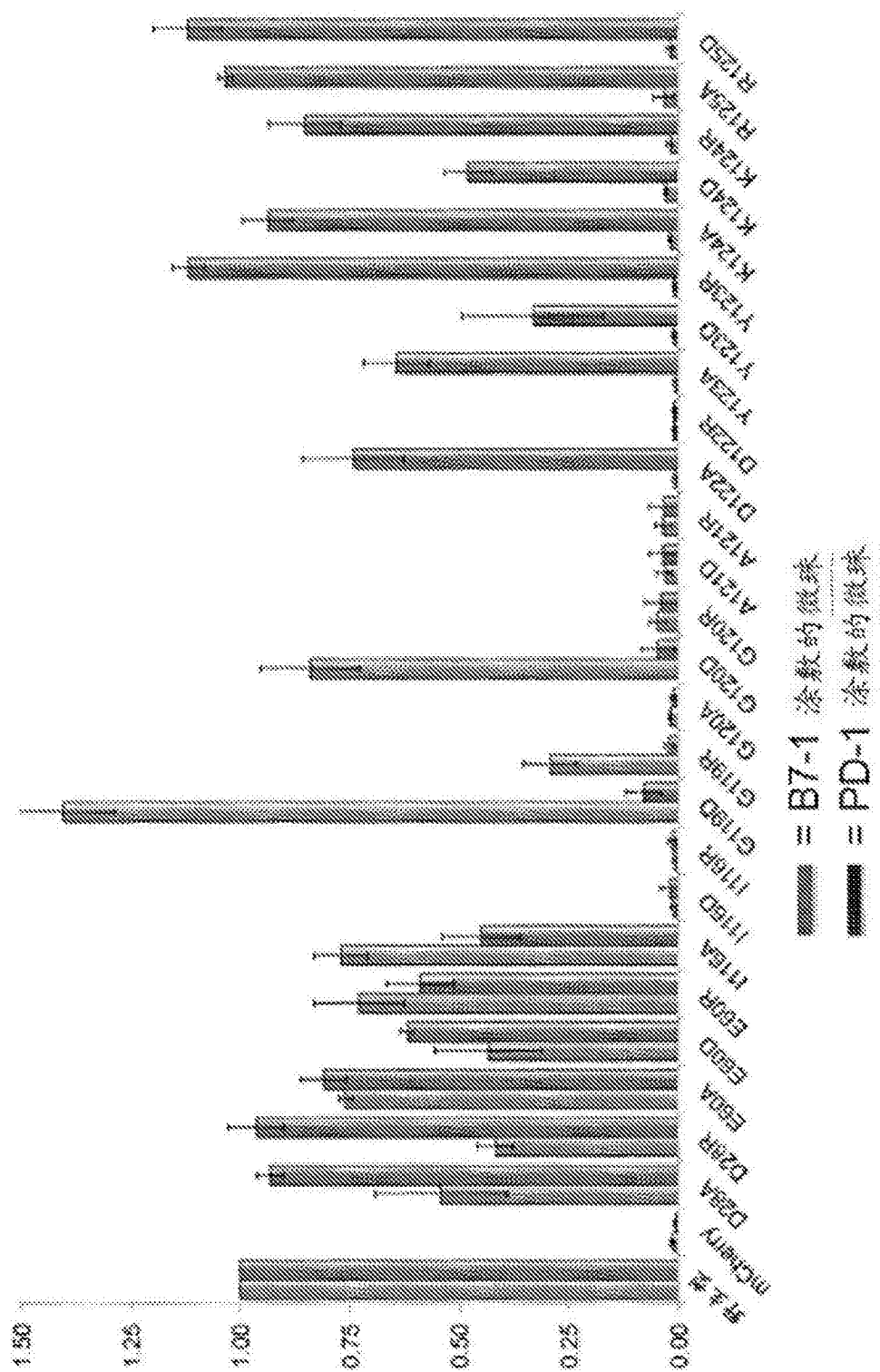


图21

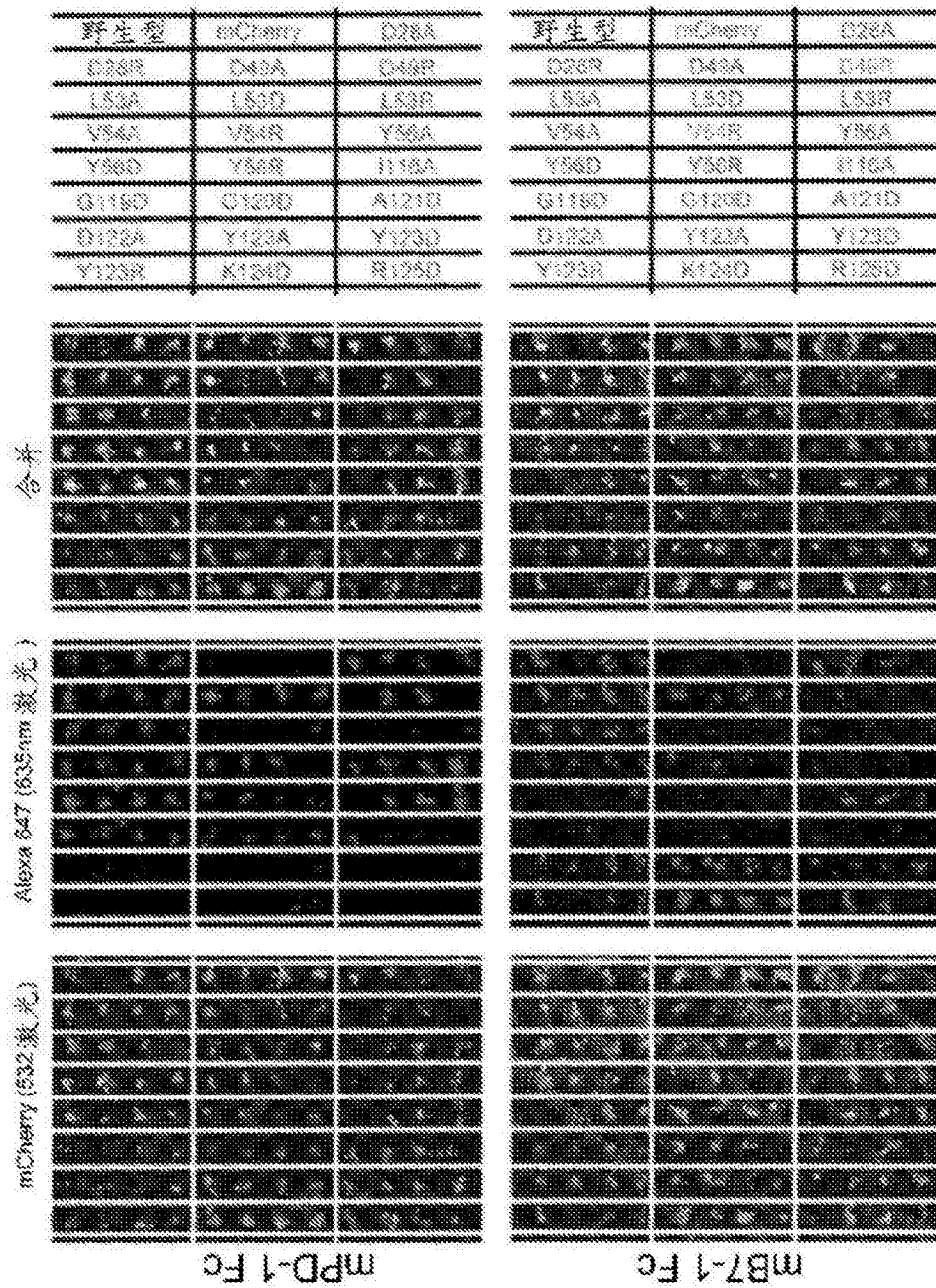
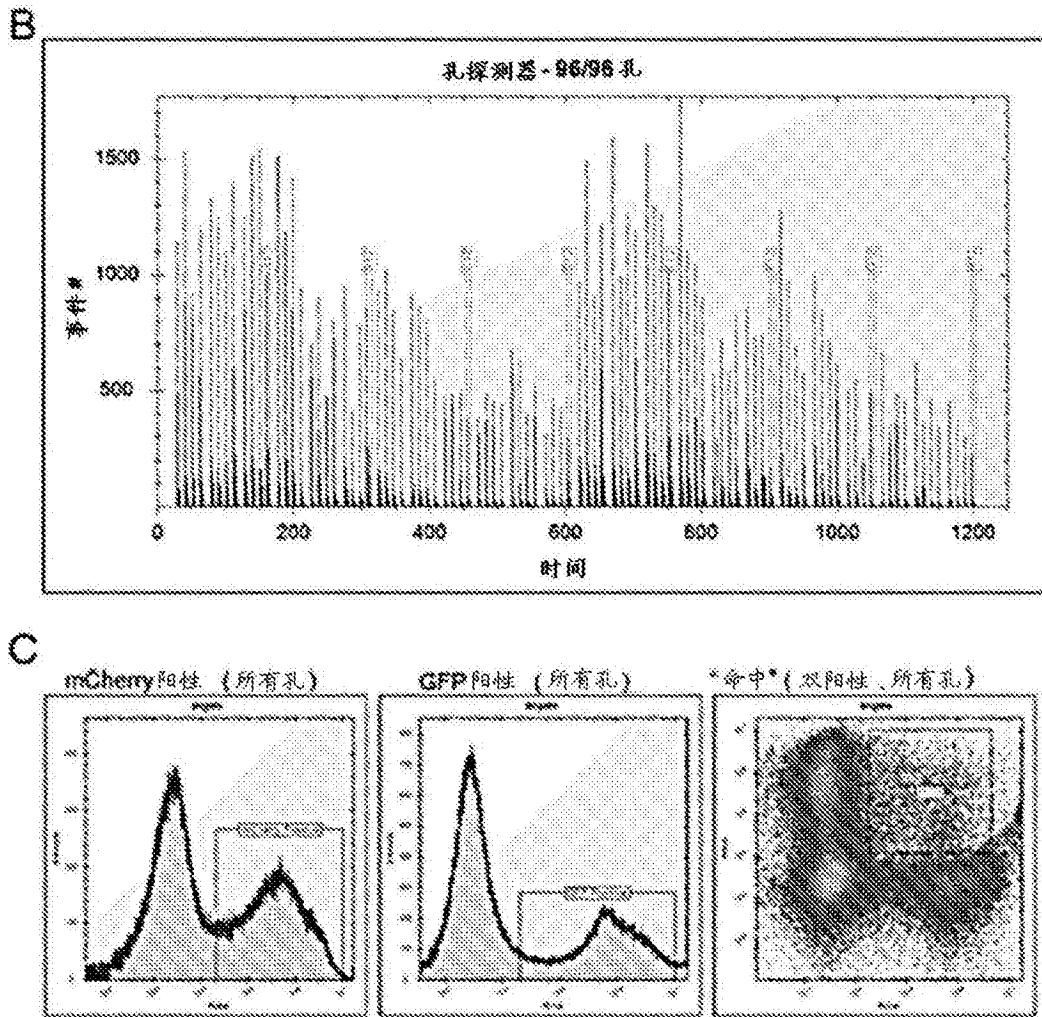


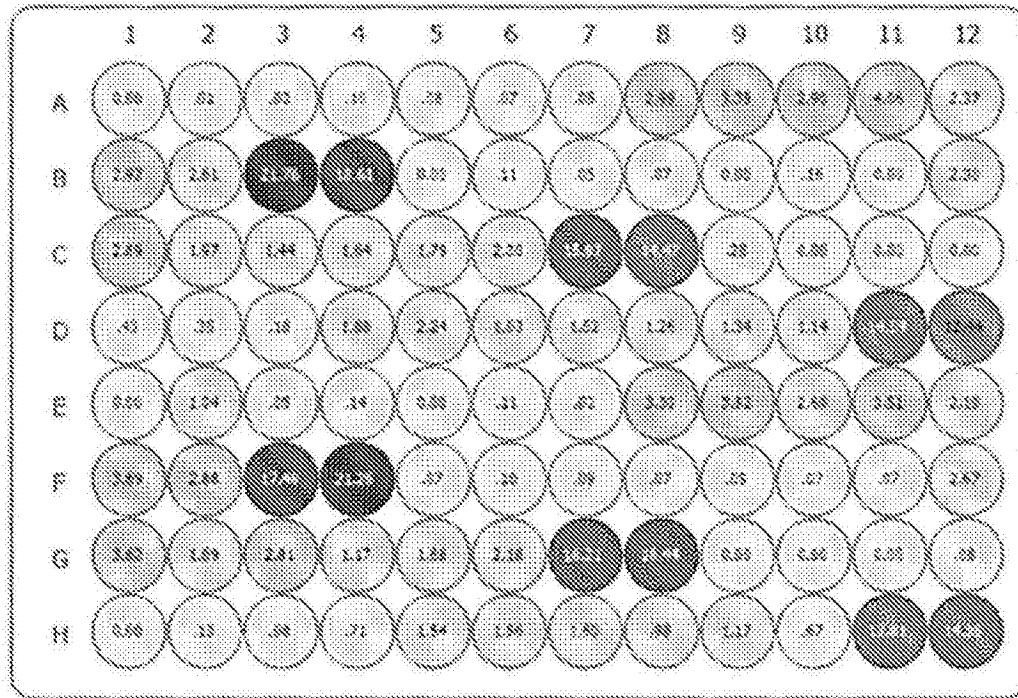
图22

A

样品	1.0x10 ⁵ 个细胞/mL 0.5x10 ⁶ 个细胞/mL 0.2x10 ⁶ 个细胞/mL 1.0x10 ⁶ 个细胞/mL 0.5x10 ⁶ 个细胞/mL 0.2x10 ⁶ 个细胞/mL											
未转染	A01	B05	C09	E01	F05	G09						
单独的 GFP	A02	B06	C10	E02	F06	G10						
单独的 mCherry	A03	B07	C11	E03	F07	G11						
单独的 PD-1 GFP	A04	B08	C12	E04	F08	G12						
单独的 PD-L1 mCherry	A05	B09	D01	E05	F09	H01						
单独的 CD200R GFP	A06	B10	D02	E06	F10	H02						
单独的 CD200 mCherry	A07	B11	D03	E07	F11	H03						
"细胞-细胞" GFP 和 mCherry	A08	B12	D04	E08	F12	H04						
"细胞-细胞" GFP 和 PD-L1 mCherry	A09	C01	D05	E09	G01	H05						
"细胞-细胞" GFP 和 CD200 mCherry	A10	C02	D06	E10	G02	H06						
"细胞-细胞" mCherry 和 PD-1 GFP	A11	C03	D07	E11	G03	H07						
"细胞-细胞" mCherry 和 CD200R GFP	A12	C04	D08	E12	G04	H08						
"细胞-细胞" CD200R GFP 和 PD-L1 mCherry	C01	C05	D09	F01	G05	H09						
"细胞-细胞" PD-1 GFP 和 CD200 mCherry	B02	C06	D10	F02	G06	H10						
"细胞-细胞" PD-1 GFP 和 PD-L1 mCherry	B03	C07	D11	F03	G07	H11						
"细胞-细胞" CD200R GFP 和 CD200 mCherry	B04	C08	D12	F04	G08	H12						



D



E

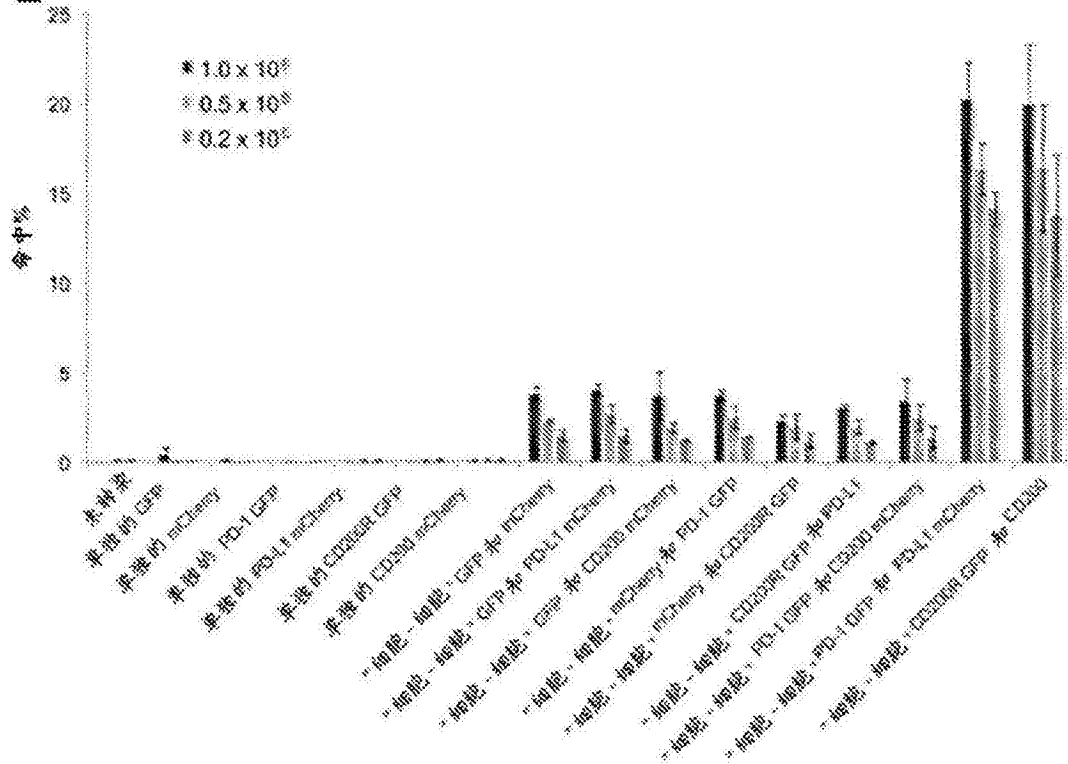


图23

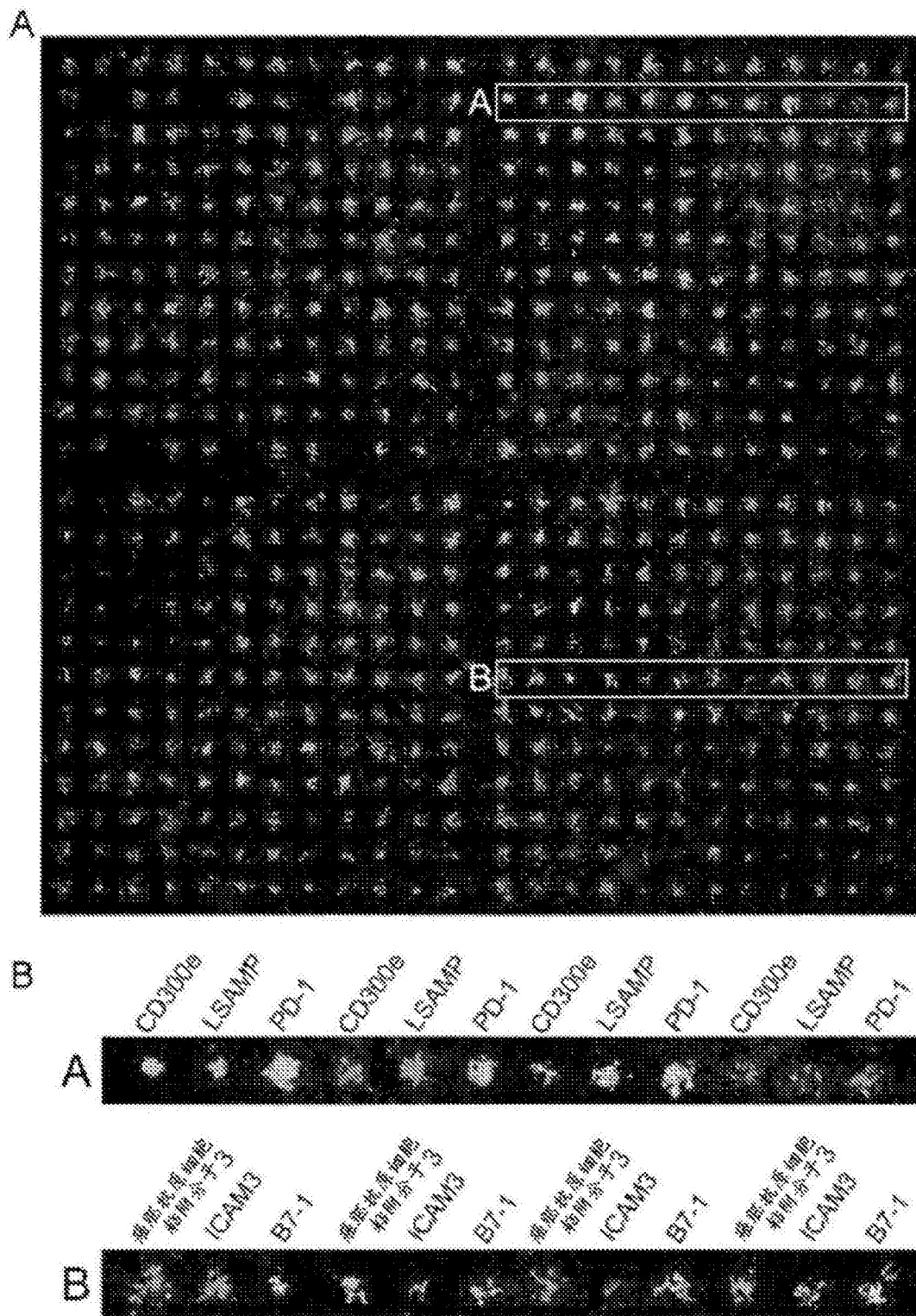


图24