

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.05.02

犬 PD-1 单克隆抗体的筛选与鉴定

王卓^{1,2}, 徐司雨², 夏兴霞², 李志敏², 毕振威², 钱晶², 莫菲²,
诸玉梅², 王永山², 孙树民^{1*}, 谭业平^{2*}

(1. 内蒙古民族大学, 内蒙古通辽 028000; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所,

农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

[收稿日期] 2024-03-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2024)05-0010-07 [中图分类号] Q78

[摘要] 为筛选犬程序性死亡受体 1 (cPD-1) 单克隆抗体, 以原核表达并纯化复性的 cPD-1 胞外区蛋白为靶抗原免疫 BALB/c 小鼠, 应用单克隆抗体杂交瘤细胞技术和间接 ELISA 方法, 经 3 轮筛选和克隆化, 获得 1 株能稳定分泌抗 cPD-1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1F9。间接 ELISA 检测显示 1F9 杂交瘤细胞株连续传代培养能稳定分泌单克隆抗体, 效价达到 1:2048, 亚型鉴定重链为 IgG1, 轻链为 κ ; 以 HEK293 细胞表达 cPD-1 胞外区蛋白为检测抗原, Western-blot 和间接免疫荧光试验进行鉴定, 结果显示 1F9 单克隆抗体能特异性结合 cPD-1 胞外区蛋白。本研究通过小鼠杂交瘤技术成功筛选到 1 株鼠源 cPD-1 单克隆抗体。

[关键词] 犬; PD-1; 单克隆抗体; 肿瘤

Development and Characterization of Mouse Anti-canine PD-1 Monoclonal Antibodies

WANG Zhuo^{1,2}, XU Si-yu², XIA Xing-xia², LI Zhi-min², BI Zhen-wei², QIAN Jing²,
MO Fei², ZHU Yu-mei², WANG Yong-shan², SUN Shu-min^{1*}, TAN Ye-ping^{2*}

(1. College of animal science and technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-Products, Nanjing 210014, China)

Corresponding authors: SUN Shu-min, E-mail: shums1975@163.com; TAN Ye-ping, E-mail: yepingtan@163.com

Abstract: In order to screen the monoclonal antibody against canine programmed death receptor 1 (cPD-1), BALB/c mice were immunized with prokaryotically expressed and purified recombinant cPD-1 extracellular region protein as the target antigen, and a hybridoma cell line 1F9, which could stably secrete anti-cPD-1 monoclonal antibody, was obtained after 3 rounds of screening and clonation by applying monoclonal antibody hybridoma cell technology and indirect ELISA method. Indirect ELISA showed that the 1F9 hybridoma cell line

作者简介: 王卓, 硕士研究生, 研究方向为宠物疾病防治。

通讯作者: 孙树民, E-mail: shums1975@163.com; 谭业平, E-mail: yepingtan@163.com

was able to stably secrete monoclonal antibodies with a potency of 1:2048 in continuous passaging culture, and the heavy chain was identified as IgG1 and the light chain as κ by subtype identification; the cPD - 1 extracellular region protein expressed by HEK293 cells was used as the detection antigen, and Western - blot and indirect immunofluorescence assays were used for identification; the results showed that 1F9 monoclonal antibody could specifically bind to cPD - 1 extracellular region protein. In this study, a mouse - derived cPD - 1 monoclonal antibody was successfully screened by mouse hybridoma technique.

Key words: cannie; PD - 1; monoclonal antibody; cancer

随着宠物营养保健和医疗护理理念与技术的进步,宠物呈现老龄化发展趋势,据《2023 - 2024 年中国宠物行业白皮书》报道,2023 年城镇犬数量为 5175 万只,其中 7 岁以上的犬只占比为 20.6%,达到 1066.5 万只。老年疾病将成为宠物主要健康问题,催生更多医疗护理需求。肿瘤是引起老龄犬的主要死亡原因之一,在临床病例中占比和关注度逐渐升高,肿瘤诊疗技术和药物需求日益增长。

肿瘤免疫逃逸是人和动物癌症发生发展的关键机制。肿瘤细胞通过多种机制逃避宿主免疫,包括改变自身表面分子,降低宿主免疫识别;分泌 TGF - β 、IL - 10 等免疫抑制因子下调宿主免疫细胞效应;下调 MHC I 类分子表达和肿瘤抗原递呈,降低免疫应答;利用免疫检查点分子 (CTLA4、PD - 1 及其配体 PD - Ls) 抑制 T 细胞的功能活化等^[1]。人医基于肿瘤免疫逃逸机制的免疫治疗取得了长足进步,尤其是 PD - 1/PD - Ls 免疫检查点阻断疗法已在多类型肿瘤治疗获得显著疗效和广泛应用^[2]。然而宠物肿瘤治疗目前仍以手术、放化疗为主,靶向治疗和免疫治疗等研究和应用相对滞后,国内几乎空白。本研究通过小鼠杂交瘤技术筛选抗 cPD - 1 单克隆抗体,为犬源化嵌合抗体的设计提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 载体、细胞和主要试剂 pCold II 载体, BamH I 和 Sal I 限制性内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。SP2/0 细胞、HEK293 细胞、pcDNA3.4 - cPD - 1 真核表达质粒为本实验室保存。Rosetta (DE3) 表达感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。HRP Goat Anti - Mouse IgG (H + L)、FITC

Goat Anti - Mouse IgG (H + L)、HRP - conjugated Rabbit anti His - Tag mAb、ColorMixed Protein Marker 180 (10 ~ 180 kD)、DL15000 DNA Marker 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。DMEM 细胞培养基、RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清均购自北京索莱宝科技有限公司。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、HAT 和 HT 均购自 Sigma 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。小鼠单抗 Ig 分型鉴定 ELISA 试剂盒购自苏州博奥龙免疫技术有限公司。Sinofection 转染试剂购自北京义翘神州科技股份有限公司。

1.2 实验动物 6 ~ 8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌鼠购自上海必凯科翼实生物科技有限公司。

1.3 cPD - 1 胞外区原核表达质粒的构建 设计 cPD - 1 (ACCESSION: AB898677) 胞外区编码基因序列,经大肠杆菌嗜嗜性密码子优化后进行基因合成,将其克隆至 pCold II 原核表达载体 BamH I 和 Sal I 酶切位点,通过双酶切和测序方法鉴定阳性质粒,命名为 pCold II - cPD - 1。

1.4 cPD - 1 胞外区原核表达 提取质粒 pCold II - cPD - 1 并转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞构建重组表达菌株,按照 1% 接种于 LB 培养液,37 °C,200 r/min 振荡培养至 A600 达到 0.5 时,冷却培养液到 15 °C,静置 30 min,添加 0.5 mmol/L IPTG,25 °C,170 r/min 诱导表达 16 h,超声破碎菌液,离心收集上清和沉淀,进行 SDS - PAGE 电泳检测。然后用湿转法转印至硝酸纤维素膜 (NC) 上,以 HRP - conjugated Rabbit anti His - Tag mAb (1:10000) 进行 Western - blot 鉴定。

1.5 cPD - 1 胞外区纯化和复性 包涵体洗涤液

(0.02 mol/L PB, 0.5 mol/L NaCl, 2 mol/L Urea, 1% Triton X-100, pH7.4) 洗涤 cPD-1 包涵体沉淀 3 次, 按照 1:10 (W:V) 比例加入包涵体溶解液 (0.02 mol/L PB, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L Urea) 4 °C 过夜, 离心获取上清, 使用 Ni Focurose 6FF (IMAC) 预装柱进行亲和层析纯化, 步骤参考操作说明书。将纯化的 cPD-1 胞外区蛋白稀释至浓度至低于 1 mg/mL 后装入透析袋中, 在复性缓冲液 (0.02 mol/L PB, 0.5 mol/L NaCl, 6 mol/L/4 mol/L/2 mol/L/0 mol/L Urea, 5% 丙三醇, 1% 甘氨酸, 0.2% PEG6000, 1 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L GSSG) 中进行梯度透析, 获得复性的 cPD-1 胞外区蛋白。

1.6 动物免疫 选取 6 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 采用纯化复性的 cPD-1 胞外区蛋白与弗氏完全佐剂等体积乳化, 以 100 μg/只剂量颈背部皮下多点注射免疫。首次免疫后, 第 14 天、第 28 天采用 PD-1 胞外区蛋白与弗氏不完全佐剂等体积乳化, 100 μg/只颈背部皮下注射免疫两次。融合前 3 天不加佐剂 200 μg/只加强免疫一次, 融合前 1 天断尾采血, 参考王筱婧^[3] 建立 ELISA 方法, 以纯化复性的重组 cPD-1 胞外区蛋白包板, 间接 ELISA 方法检测免疫小鼠血清抗体效价, 未免疫小鼠血清为阴性对照。

1.7 细胞融合和杂交瘤细胞筛选 取出脾脏置于玻璃皿中, 使用无血清的 RPMI-1640 培养基充分清洗, 使用注射器推杆对脾脏充分研磨并细胞计数, 取生长状态良好的 SP2/0 细胞并细胞计数, 两者以 1:5~1:10 的比例与脾细胞混合, PEG4000 促进融合, 将融合后的细胞均匀加到制备好的饲养细胞 96 孔细胞培养板中, 于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养, 第 3 天补加 HAT 培养基; 第 5 天更换培养基, 细胞生长至孔底 1/10~1/5 时, ELISA 检测杂交瘤培养上清液, 将初步筛选得到的阳性细胞采用有限稀释法进行 3~5 次克隆化培养, 获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

1.8 cPD-1 单克隆抗体的鉴定

1.8.1 亚类和遗传稳定性鉴定 使用小鼠单抗 IgG 类/亚类鉴定 ELISA 试剂盒对单克隆抗体进行亚类

鉴定, 操作步骤严格按说明书进行。将筛选到的杂交瘤细胞株冻存, 1 个月后复苏并连续传代, 每周收集 1 次培养上清, 间接 ELISA 方法检测上清抗体效价, 评价杂交瘤细胞株分泌抗体的稳定性。

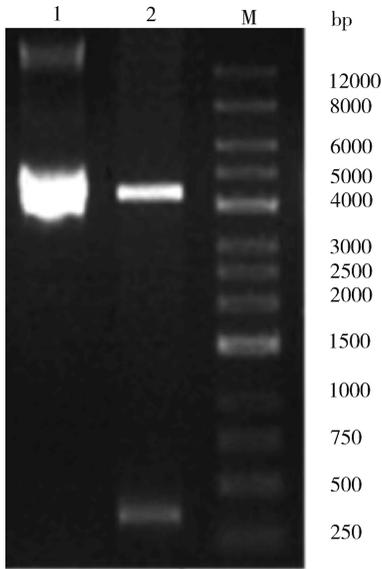
1.8.1 Western-blot 鉴定 将 pcDNA3.4-cPD-1 真核表达质粒用 Sinofection 转染试剂转染 HEK293 细胞, 72 h 后 400 g 离心 5 min 收集转染细胞和未转染的 HEK293 细胞, 经上样缓冲液悬浮后煮沸, 12000 g 离心 5 min, 分别取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿法将蛋白转至 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液 37 °C 封闭 30 min, 以阳性杂交瘤细胞克隆的培养上清作为一抗 (1:1000), HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 为二抗 (1:5000), 进行 Western-blot 鉴定。

1.8.2 间接免疫荧光鉴定 将 pcDNA3.4-cPD-1 真核表达质粒用 Sinofection 转染试剂转染 HEK293 细胞, 转染 72 h 后用 4% 的甲醛溶液固定, 以阳性杂交瘤细胞克隆的培养上清作为一抗 (1:200), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, FITC Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 为二抗 (1:400), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 最后在倒置荧光显微镜下观察结果。

2 结果与分析

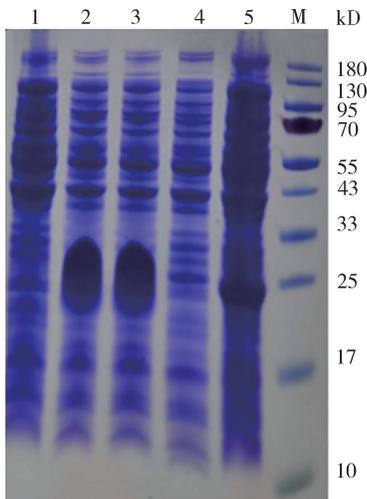
2.1 cPD-1 胞外区重组表达质粒的构建 重组表达质粒 pCold II-cPD-1 经 BamH I 和 Sal I 双酶切, 酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示: 质粒经双酶切获得一条大小约 4400 bp 条带, 与 pCold II 大小相符, 另一条在 378 bp 左右, 与犬 PD-1 胞外区编码基因序列大小相符。将重组表达质粒 pCold II-cPD-1 送公司测序进一步验证表达框序列正确。

2.2 cPD-1 胞外区原核表达 将重组表达质粒 pCold II-cPD-1 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色结果显示: cPD-1 胞外区蛋白以包涵体形式高效表达, 大小约 25 kD (图 2)。Western-blot 进一步鉴定结果显示: 在约 25 kD 处有特异性条带 (图 3), 与预期大小一致。



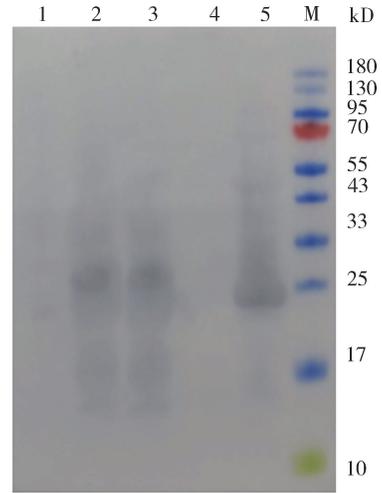
1: pCold II - cPD - 1 质粒重组质粒;
2: pCold II - cPD - 1 质粒双酶切结果;
M: DL12000 DNA Marker
1: pCold II - cPD - 1 recombinant plasmid;
2: Plasmid digestion of pCold II - cPD - 1; M: DL12000 DNA Marker

图 1 pCold II - cPD - 1 质粒重组质粒的酶切鉴定
Fig 1 Identification of pCold II - cPD - 1 recombinant plasmid by enzyme digestion



1: 未诱导蛋白;2,3:破碎沉淀;4:破碎上清;
5:诱导蛋白;M:蛋白质量分子标准
1: Uninduced protein;2,3: Ultrasonic precipitation of protein;
4: Ultrasonic supernatant of protein; 5: Induced protein;
M: Protein Marker

图 2 cPD - 1 胞外区 SDS - PAGE 电泳结果
Fig 2 Results of SDS - PAGE electrophoresis of cPD - 1 extracellular region



1: 未诱导蛋白;2,3:破碎沉淀;4:破碎上清;
5:诱导蛋白;M:蛋白质量分子标准
1: Uninduced protein;2,3: Ultrasonic precipitation of protein;
4: Ultrasonic supernatant of protein; 5: Induced protein;
M: Protein Marker

图 3 cPD - 1 胞外区 Western - blot 结果
Fig 3 Results of Western - blot of cPD - 1 extracellular region

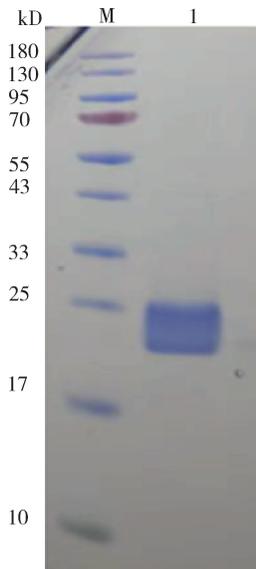
2.3 cPD - 1 胞外区纯化和复性 cPD - 1 胞外区包涵体经洗涤、溶解变性和亲和层析纯化,进行 SDS - PAGE 电泳,结果如图 4 所示,获得了高纯度的 cPD - 1 胞外区蛋白,大小约为 25 kD,纯度 95% 以上。将纯化的 cPD - 1 胞外区蛋白进行梯度透析复性,获得 cPD - 1 胞外区蛋白。

2.4 免疫小鼠血清效价 间接 ELISA 方法检测免疫小鼠血清抗体效价,3 只免疫小鼠抗体效价分别达到 1: 102400、1: 102400 和 1: 204800,选择血清抗体效价最高的小鼠进行加强免疫和细胞融合,建立杂交瘤细胞库,进行 cPD - 1 单克隆抗体杂交瘤细胞筛选。

2.5 克隆化检测结果 将间接 ELISA 方法检测的阳性细胞池采用有限稀释法进行 3 轮亚克隆,共筛选到 6 株阳性杂交瘤细胞株,分别为 1D8、1F9、1B7、1E9、2D12、2E12。选取亲和力最强的单克隆抗体杂交瘤细胞株 1F9 进行下一步鉴定。

2.6 cPD - 1 单克隆抗体鉴定结果

2.6.1 亚类和遗传稳定性鉴定 通过小鼠单抗



M: 蛋白质分子质量标准; 1: cPD - 1 胞外区蛋白

M: Protein Marker; 1: cPD - 1 extracellular region protein

图 4 SDS - PAGE 检测蛋白纯化情况

Fig 4 SDS - PAGE detection of protein purification

Ig 分型鉴定试剂盒鉴定纯化后的 1F9 单克隆抗体亚类,结果显示:1F9 单克隆抗体重链为 IgG1,轻链为 κ 。1F9 杂交瘤细胞株经液氮冻存和复苏连续传代培养,ELISA 检测结果显示:效价达到 1:2048 且抗体效价未降低(表 1),表明筛选的单克隆抗体稳定性良好。

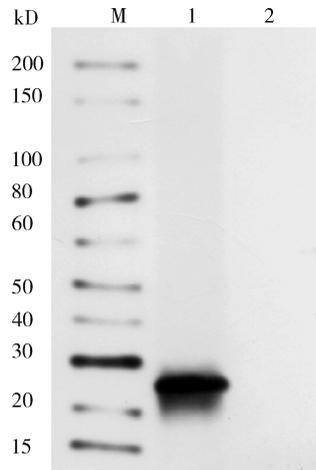
表 1 ELISA 方法鉴定杂交瘤细胞稳定性

Tab 1 Identification of hybridoma cell stability

杂交瘤细胞	抗体效价		
	冻存前	一个月	三个月
1F9	1:2048	1:2048	1:2048

2.6.2 Western - blot 分析单抗与 cPD - 1 结合活性 将转染 pcDNA3.4 - cPD - 1 表达质粒的 HEK293 细胞和转染 pcDNA3.4 空载体的 HEK293 细胞蛋白作为检测抗原,以 1F9 杂交瘤细胞株的培养上清作为一抗(1:1000),进行 Western - blot 鉴定,结果如图 5 所示,1F9 单抗与 cPD - 1 反应,出现特异性条带,而与阴性对照未出现条带,表明 1F9 单克隆抗体与 cPD - 1 能特异性结合反应。

2.6.3 间接免疫荧光分析单抗与 cPD - 1 结合活性



M: 蛋白质分子质量标准;1: cPD - 1 胞外区蛋白; 2: pcDNA3.4 空载体

M: Protein Marker; 1: cPD - 1 extracellular region protein; 2: pcDNA3.4 empty vector

图 5 cPD - 1 - 1F9 单克隆抗体的 Western - blot 鉴定结果

Fig 5 Western - blot result of cPD - 1 - 1F9 monoclonal antibody

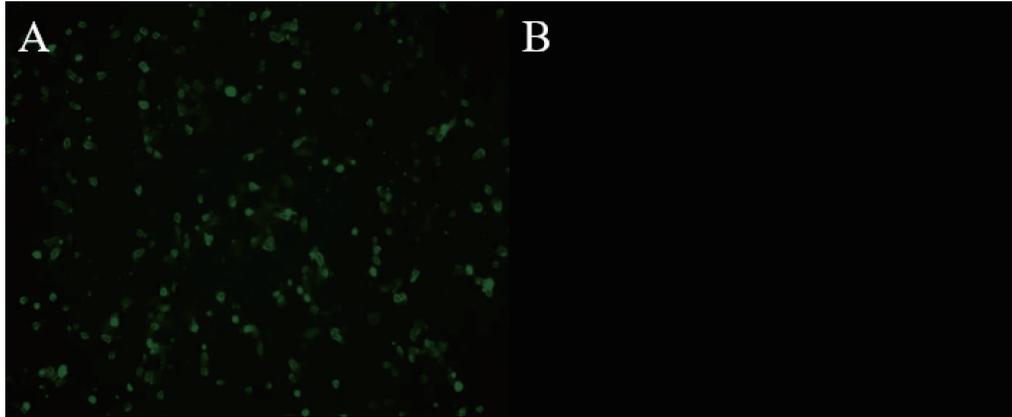
将转染 pcDNA3.4 - cPD - 1 的 HEK293 细胞和转染 pcDNA3.4 空载体的 HEK293 细胞甲醛固定后,以 1F9 杂交瘤细胞株的培养上清作为一抗(1:200),FITC Goat Anti - Mouse IgG (H + L) 为二抗(1:400)进行间接荧光免疫试验,结果如图 6 所示:1F9 单克隆抗体可与转染 cPD - 1 质粒的 HEK293 细胞反应,发出绿色荧光(图 6A),而与未转染的细胞不发生反应(图 6B),表明 1F9 单克隆抗体能特异性结合 cPD - 1。

3 讨论

靶向 PD - 1 和 CTLA - 4 等免疫检查点的抗体药物在肿瘤免疫治疗领域迅速发展,在治疗 32 种人类晚期肿瘤方面取得了显著成效,包括黑色素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌^[4-8],许多患者实现了肿瘤缓解,使某些类型的癌症作为慢性疾病得到控制^[9]。在犬的多种恶性肿瘤的细胞系和临床样本中检测到 PD - 1/PD - L1 的表达,包括犬的 B 细胞淋巴瘤,尿路上皮细胞瘤,肥大细胞瘤(MCT)、黑色素瘤和骨肉瘤等^[10-12]。此外,在犬的鳞状细胞瘤(SCC)、恶性黑色素瘤(MM)、乳腺癌、肝细胞

瘤、肾细胞瘤 (RCC)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 和软组织肉瘤 (STS) 等肿瘤中发现 PD-1 过表达^[13-15]。丝裂原刺激的犬淋巴细胞表

面表达 PD-1 分子^[16], 靶向犬 PD-1/PD-L1 分子的免疫检查点抑制剂亦可用于犬肿瘤免疫治疗^[17]。



A: 1F9 单克隆抗体与转染 cPD-1 质粒的 HEK293 细胞反应结果;
B: 1F9 单克隆抗体与转染 pcDNA3.4 空载体的 HEK293 细胞反应结果

A: Results of the reaction between 1F9 monoclonal antibody and HEK293 cells transfected with cPD-1 plasmid;
B: Results of the reaction between 1F9 monoclonal antibody and HEK293 cells transfected with pcDNA3.4 empty vector

图 6 1F9 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定结果

Fig 6 Indirect immunofluorescence identification of canine PD-1-1F9 monoclonal antibody

目前已经开发了几种对犬 PD-1/PD-L1 的特异性单克隆抗体, 并且在体外和体内证实了这些单克隆抗体的功能活性^[18-19]。Masaya 等于 2020 年应用其制备的犬 PD-1 单克隆抗体治疗了 30 例犬晚期黑色素瘤病例, 其中 24 例病例有明显的治疗效果^[20]。因此针对犬 PD-1/PD-L1 靶点的单克隆抗体有望成为一种免疫治疗的潜力药物。本研究以原核表达并纯化复性的 cPD-1 胞外区蛋白作为免疫原, 通过小鼠杂交瘤技术筛选鉴定了 1F9 株单克隆抗体, 能特异的结合 cPD-1 胞外区蛋白, 为进一步鉴定其对 PD-1/PD-L1 通路的阻断活性以及重轻链可变区测序和犬源化改造工作奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] E D D, Shilpa G. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Control*, 2014, 21: 231-237.
- [2] Hu P P, Liu Q Q, Deng G D, *et al.* The prognostic value of

cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 in cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42913.

- [3] 王筱婧, 刘运龙, 王东兴, 等. 定量检测 PD-1 单克隆抗体 ELISA 法的建立[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(08): 712-715, 724.
Wang X J, Liu Y L, Wang D X, *et al.* Development and application of ELISA method for quantitative detection of PD-1 monoclonal antibody[J]. *Immunological Journal*, 2016, 32(8): 712-715, 724.
- [4] Topalian L S, Drake G C, Pardoll M D. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2012, 24(2): 207-212.
- [5] Zhang W, Zhu X D, Sun H C, *et al.* Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects[J]. *Clinical Cancer Research: An official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, 16(13): 3420-3430.
- [6] A P O, Stephen F H, Caroline R. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients [J]. *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2013, 19(19): 5300–5309.
- [7] A S Q, S K P. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2013, 108(8): 1560–1565.
- [8] Perez-Gracia L J, Labiano S, Rodriguez-Ruiz E M, *et al.* Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2014, 2789–2797.
- [9] Jun G, Alexander C, Srikanth R, *et al.* Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2018, 6(1): 8.
- [10] Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, *et al.* Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade[J]. *PLoS ONE*, 2017, 9(6): e98415.
- [11] Hartley G, Faulhaber E, Caldwell A, *et al.* Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression[J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2017, 15(2): 534–549.
- [12] Pinard Christopher J, Hocker Samuel E, Poon Andrew C, *et al.* Evaluation of PD-1 and PD-L1 expression in canine urothelial carcinoma cell lines [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2022, 243: 110367.
- [13] John D, J G C, J S B V, *et al.* PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer [J]. *J Immunother*, 2012, 35: 169–178.
- [14] Xia L L, Liu Y Y, Wang Y. PD-1/PD-L1 blockade therapy in advanced non-small-cell lung cancer: Current status and future directions[J]. *The Oncologist*, 2019, 24(S1): S31–S41.
- [15] A L E, Marleen K, S L O. Targeting the programmed cell death-1 pathway in breast and ovarian cancer[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28: 142–147.
- [16] Nemoto Y, Shosu K, Okuda M, *et al.* Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2018, 198: 19–25.
- [17] Kocikowski M, Dziubek K, Parys M. Hyperprogression under immune checkpoint-based immunotherapy—current understanding, the role of PD-1/PD-L1 tumour-intrinsic signalling, future directions and a potential large animal model[J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 804.
- [18] He Y F, Zhang G M, Wang X H, *et al.* Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(8): 4919–4928.
- [19] Nitin C, Prieto Victor G. Predictive factors of activity of anti-programmed death-1/programmed death ligand-1 drugs: immunohistochemistry analysis [J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2015, 4(6): 743–751.
- [20] Masaya I, Yuki N, Kazuhito I, *et al.* A pilot clinical study of the therapeutic antibody against canine PD-1 for advanced spontaneous cancers in dogs[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 18311.

(编辑:李文平)