

· 专论与综述 ·

噬菌体展示技术在血液肿瘤诊断治疗中的应用 *

王 沂 张春明 郝建秀 宋娜玲 刘金剑 贺 欣 刘鉴峰 王德芝[△]

(中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所天津市分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 血液肿瘤即造血系统的恶性肿瘤,是一种严重危害公共健康的疾病。目前,血液肿瘤诊断治疗的最理想方法就是分子特异性诊断和靶向治疗,但该方法面临的最大困难就是分子靶点的选择。噬菌体展示技术是近十年发展起来的一种新的生物学技术,具有高通量筛选、模拟天然表位、易于纯化、将蛋白功能与编码基因相统一等优点,广泛应用于功能性蛋白质和多肽的筛选、蛋白质间的识别与相互作用、抗原表位的鉴定、基因工程抗体的筛选等多个分子生物学领域,非常适于理想靶点的选择。目前,噬菌体文库技术在血液肿瘤诊治中的应用主要集中在噬菌体抗体文库和噬菌体随机肽库上。本文就噬菌体展示技术在血液肿瘤诊断治疗中的研究成果做一总结分析,并对该技术在这一领域的应用前景进行展望。

关键词 噬菌体展示 血液肿瘤 诊断 治疗

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)10-1962-03

The Application of Phage Display Technology in the Diagnosis and Therapy of Hematological Malignancies*

WANG Yi, ZHANG Chun-ming, HAO Jian-xiu, SONG Na-ling, LIU Jin-jian, HE Xin, LIU Jian-feng, WANG De-zhi[△]

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT: Hematopoietic malignancies are serious hazard to public health. Presently, the most ideal method in diagnosing and treating hematopoietic malignancies is specific molecular diagnosis and targeted therapy. However, the most stubborn difficulty of this method lies in the screening of molecular target. Phage display technology, a powerful approach developed in recent decade, has many advantages, including high throughput screening, mimicking natural epitopes, easy purification, integrating protein function with its coding gene, etc. Phage display technology is widely used in the area of molecular biology, such as screening of functional peptides and proteins, the study of protein interactions, identification of antigens, screening of genetically engineered antibodies, etc, which is very fit for the screening of ideal targets. At present, the application of this technology in hematopoietic malignancies diagnosis and therapy is focus on phage antibody library and phage random peptide library. This article will introduce the research findings of phage display technology in hematopoietic malignancies diagnosis and therapy, and look forward to the prospect of this technology in this area.

Key words: Phage display; Hematological malignancies; Diagnosis; Therapy

Chinese Library Classification(CLC): Q81 **Document code:** A

Article ID : 1673-6273(2012)10-1962-03

1985年,Smith G P^[1]第一次将外源基因插入丝状噬菌体 f1 的基因中,使目的基因编码的多肽以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面,从而创建了噬菌体展示技术(phage display technology)。噬菌体展示技术是一种研究蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 相互作用的高效方法。该技术的基本原理是将编码外源多肽或蛋白质的基因克隆入噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,在阅读框正确且不影响其他外壳蛋白正常功能的情况下,外源多肽或蛋白与外壳蛋白融合表达并组装展示在子代噬菌体表面,且保持其相对独立的空间结构和生物学活性。肽库

与固相上的靶蛋白分子孵育后经过3至5轮的“吸附-洗脱-扩增”后,与靶分子特异结合的噬菌体得到高度富集。该技术具有高通量筛选、模拟天然表位、易于纯化、将蛋白功能与编码基因相统一等优点,广泛应用于功能性蛋白质和多肽的筛选、蛋白质间的识别与相互作用、抗原表位的鉴定、基因工程抗体的筛选等多个分子生物学领域。

血液肿瘤即造血系统的恶性肿瘤,是一种严重危害人类身体健康的疾病。目前,血液肿瘤诊断治疗最理想的方法就是分子特异性诊断和靶向治疗,因其具有特异性强、疗效显著、正常

* 基金项目 天津市自然科学基金项目(一般项目)(10JCYBJC09900)资助

作者简介 王沂(1979-)女,硕士研究生,研究方向:基因工程抗体 电话:022-85682396 E-mail: wangyi718@yahoo.cn;

张春明(1952-)男,学士,研究员 E-mail: zhangchunming101@yahoo.com.cn;

郝建秀(1985-)女,硕士生 E-mail: foxs0@163.com;

△通讯作者 王德芝(1964-)女,学士,副研究员 E-mail: wangdezhi2008@hotmail.com

(收稿日期 2011-09-02 接受日期 2011-09-30)

组织损伤少的优点,是当前肿瘤诊断治疗研究的热点,同时,该方法也面临着一些问题,其中最大的困难就是分子靶点的选择,好的靶点应该能够特异表达在肿瘤细胞而正常细胞完全没有表达。噬菌体展示技术具有多样性、易于人源化、可以多层次筛选等特点,非常适于理想靶点的选择。目前,噬菌体文库技术在血液肿瘤诊治中的应用主要集中在噬菌体抗体文库和噬菌体随机肽库上。

1 噬菌体抗体文库在血液肿瘤诊治中的应用

噬菌体抗体文库是将体外克隆的抗体基因片段表达在噬菌体表面,并用抗原筛选获得特异的单克隆噬菌体抗体。利用这一技术可以从患者甚至正常人外周血淋巴细胞筛选出完全人源化的高亲和力抗体,避免了人类免疫的伦理问题,在多种疾病尤其是肿瘤的诊断与治疗方面有其独特的优越性。其在血液肿瘤诊治中的应用主要体现在治疗性抗体的筛选和血液肿瘤特异抗原的反向鉴定上。

1.1 筛选治疗性抗体

治疗性抗体是可以用来治疗疾病的抗体,因此也称它们为抗体药物,是靶向治疗中最常用的一种工具。目前,噬菌体抗体文库技术在抗血液肿瘤治疗性抗体筛选中的应用主要体现在以下几点。

1.1.1 构建免疫毒素 免疫毒素是一类抗肿瘤单抗和生物毒素蛋白偶联的分子。可利用抗体与肿瘤细胞的特异性结合将毒素蛋白导向和攻击肿瘤细胞,故被形象地称为“生物导弹”。噬菌体抗体文库能够高效提升抗体的亲和力,从而保证免疫毒素的高度特异性。Stein C^[2]等通过噬菌体抗体文库技术获得了高亲和力的鼠源 CD123 单链抗体,将该抗体分别与绿脓杆菌外毒素 A 和 CD16 单链抗体连接,构建成为免疫毒素和双功能抗体,在体外实验中对急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia AML) 来源的细胞系显示出了良好的杀伤活性。

1.1.2 筛选具有直接抑瘤活性的抗体 免疫毒素中的抗体部分仅仅起导向作用,本身并不具有生物学功能,但一些针对肿瘤细胞表面特定抗原的抗体无需同细胞毒药物偶联就能直接发挥杀伤和抑制肿瘤的功能。这类抗体所针对的抗原都是一些肿瘤细胞表面特有的或高表达的对肿瘤细胞生存必须的分子,通常是一些重要细胞因子或营养物质的受体,治疗性抗体与其结合后阻断或者模仿其配体作用,导致肿瘤细胞程序性死亡。通过噬菌体抗体库技术,可以一次性获得多株针对靶分子的抗体,再从这些抗体中筛选出具有生物学活性的抗体株。

Zhu Z 等^[3]利用噬菌体抗体文库技术筛选出多株针对血管生长因子受体 2 (VEGFR2) 的嵌合抗体,能够在体外显著抑制 VEGF 诱导的白血病细胞的增殖。Crépin R^[4]等通过噬菌体抗体文库构建并筛选出抗转铁蛋白受体的高亲和力单链抗体,该抗体能显著抑制多种血液肿瘤细胞系及红白血病小鼠体内肿瘤细胞的增殖,非常适合于高转铁蛋白受体类型肿瘤的治疗,尤其是急性淋巴系和髓系白血病。Secchiero P^[5]等构建了抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL)-R2 的单链抗体,结合 TRAIL-R2 后,能够模仿 TRAIL 的作用,诱导白血病细胞的凋亡,在多种白血病细胞系体外实验中显示出了很好的抗瘤活性。

1.1.3 筛选免疫调节性治疗抗体 一些治疗性抗体并不直接针

对肿瘤细胞,而是作用调控免疫细胞,由免疫细胞发挥抑制杀伤肿瘤的作用。多种血液肿瘤的发生发展过程中都会出现 Th1 细胞向 Th2 细胞的转变。McWhirter JR^[6]等用原代慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者的肿瘤细胞免疫的噬菌体抗体文库筛选出了与免疫抑制分子 CD200 特异结合的抗体,该抗体能够有效防止 B-CLL 患者肿瘤细胞引起的 Th1 细胞水平下降,重新提高 Th1 细胞的水平并恢复其细胞毒效应。

1.1.4 全细胞筛选治疗性抗体 早期噬菌体文库来源抗体,均由固相纯化抗原筛选得到。在对肿瘤抗原和受体等膜蛋白的筛选中,保持其天然构象至关重要,因此常规的固相筛选难以胜任,而以表达这些抗原的完整细胞进行筛选则可以避免构象改变引起的问题。采用噬菌体抗体库技术以血液肿瘤细胞系或病人的肿瘤细胞做正向筛选,以正常人细胞做负向筛选,可以获得针对肿瘤细胞特异诊断或治疗性的抗体。

Shadidi M 等^[7]构建了针对早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 的单链抗体噬菌体展示文库,通过与人类胶质瘤细胞孵育去除交叉反应的噬菌体,即所谓负向筛选,以 HL-60 细胞做正向筛选,最终获得多株针对 HL-60 细胞的高特异性单链抗体,其中一株单链抗体对 HL60 细胞增殖的抑制率达 90%。

1.2 通过噬菌体抗体库技术反向鉴定血液肿瘤特异抗原

通过全细胞筛选获得特异性抗体后,再结合亲和层析、色谱分析等技术可以反向鉴定其抗原,从而获得肿瘤细胞特异性表达的分子。Bakker AB 等^[8,9]采用噬菌体展示技术结合流式细胞术筛选出一株能够和 AML 患者肿瘤细胞特异反应的单链抗体。反向鉴定发现其抗原是一种未知的跨膜糖蛋白--C 型凝集素样分子 1 (CLL-1)。研究显示,92% 的 AML 骨髓样本中有 CLL-1 的表达,而在正常 CD34(+)/CD38(-)造血干细胞和其它组织则没有表达,因而可以作为 AML 的一个诊断标志物和潜在治疗靶点。Geuijen CA 等^[10]采用噬菌体抗体展示库的方法,经过多株髓系来源细胞系和急性髓细胞白血病患者骨髓标本的两轮筛选,获得了一组能够和髓系细胞特异结合的单链抗体。对这些抗体的抗原表位进行免疫沉淀和质谱分析,鉴定出了一系列的细胞表面抗原,其中包括多种未知蛋白。

2 通过噬菌体肽库筛选穿透肽并鉴定其配体

噬菌体肽库是由大量带有不同肽段的单个噬菌体组成的重组噬菌体库。通过目标受体来筛选与其相互作用的噬菌体肽,并分析所筛选到的肽的结构和序列,为蛋白质分子之间的相互作用机理提供理论依据。

细胞膜穿透肽 (cell penetrating peptide, CPP) 是一类能以受体依赖或非受体依赖方式介导胞吞作用的短肽^[11]。CPP 的这一特性使其成为一种有效的运输载体,不仅能够携带细胞毒药物,而且能够向细胞内运送各种自身不能穿越细胞膜的大分子生物活性物质,如 DNA、RNA 和多肽等,为生物治疗提供了一个崭新的有力工具。噬菌体多肽文库技术是筛选 CPP 的最理想方法,目前在血液肿瘤研究领域已经有多组报道。

Nishimura S 等^[12]用急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Molt-4 对一个随机噬菌体展示肽库进行筛选,分离出了一株表达 CAYHRLRRC 氨基酸序列的噬菌体。这个肽段包括一段淋巴细胞归巢基序 (Cys-Ala-Tyr) 和一段细胞穿透基序 (Arg-Leu-Arg-Arg)。该噬菌体能够以能量和温度依赖的方式与

多种白血病、淋巴瘤细胞系及病人来源标本发生高亲和力结合并内吞入细胞,而非白血病细胞则结合率很低,因而有可能用于配体导向的抗白血病治疗。Karjalainen K 等^[13]通过一个组合噬菌体展示多肽库对人类白血病细胞进行筛选,分离出了一段多肽基序,这段序列可以和不同的白血病细胞系和白血病病人骨髓细胞表面的受体跨膜糖蛋白 Neuropilin-1 结合后内吞入细胞。将该段氨基酸序列与一段前凋亡氨基酸序列融合后,显示出显著的抗白血病细胞效应。进一步研究显示,Neuropilin-1 在多种白血病细胞系及白血病人骨髓细胞中存在高表达,提示 Neuropilin-1 可以作为一个配体导向治疗的靶标。S Jäger 等^[14]采用噬菌体文库技术筛选出肽段 CPLDIDFYC,该肽段能够与 AML1/ETO 阳性 AML 来源细胞系发生特异性结合并介导内吞作用。进一步研究证实该肽段以 $\alpha 4\beta 1$ 整合素作为受体,这为高表达 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的白血病患者治疗提供了方向。

B 细胞恶性肿瘤包括多种恶性淋巴瘤、慢性 B 淋巴细胞白血病(B-CLL)和急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)。其中大部分的 B 系淋巴瘤、B-CLL 以及浆细胞恶性肿瘤患者的肿瘤细胞分化程度较高,表达膜免疫球蛋白(mIg)。由于患者肿瘤细胞来源于一个恶性 B 细胞克隆,因而每名患者体内的肿瘤细胞膜免疫球蛋白具有高度的同一性。又因为 B 细胞的 mIg 是基因随机重排的产物,因此肿瘤细胞的 mIg 相对于其他患者的 mIg 或者正常 B 细胞的 mIg 具有很强独特性。这一方面提示 mIg 可能作为靶向治疗的一个很有前途的靶标,另一方面也提出了挑战,就是针对每名患者都需要设计出独特的能够与其肿瘤细胞 mIg 特异结合的导向抗体或多肽,也就是说要“个体化用药”。噬菌体展示库技术具有操作方便、成本低、周期短的特点,因而非常适于 B 系肿瘤细胞抗独特型抗体或导向多肽的制备。Choi JH 等^[15]用 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 对一个九肽噬菌体文库进行筛选,发现了序列 CTLPHLKMC 对 Raji 细胞有着超强的亲和力,而与正常供者的 B 细胞和其他血液肿瘤来源的细胞系则完全没有结合。质谱分析显示该段九肽可能与 Raji 表面的 mIg 的重链可变区结合,因此将该段九肽与生物毒素相偶联,则有望成为专门杀伤 Raji 细胞的靶向药物。此外, Buhl L^[16]等从噬菌体展示随机肽库中分离出 CLL 患者 B 细胞 mIg 所针对的配体肽段。这种方法有望用于 CLL 及其它 B 细胞来源肿瘤的靶向治疗。

肿瘤的发生本质上是个体基因异常表达的结果,因此肿瘤治疗的关键就是如何发现并消灭这些表达异常基因的肿瘤细胞。而血液肿瘤不能像实体肿瘤那样通过外科手术切除,因而更加迫切的需要一种能够鉴定、消灭肿瘤细胞的方法。噬菌体文库技术高通量筛选、易于人源化、蛋白功能与编码基因相统一等优点使之成为鉴定筛选靶点、靶向治疗的理想方法。尤其适用于诊断和治疗肿瘤细胞表面标志在个体间变异极大的血液肿瘤,比如说淋巴系恶性肿瘤,有望达到“个体化诊断和治疗”的最高境界。通过噬菌体肽库筛选穿透肽更是噬菌体展示技术应用上的一大进步,相比噬菌体抗体文库技术,前者完全商业化,库容量更大、更加稳定,筛选出的穿透肽更短且生物活性明显,有望成为噬菌体展示技术在血液肿瘤诊治方面研究的重点。总之,目前噬菌体展示文库技术在血液肿瘤诊治中的应用还处于研究阶段,要达到临床应用目的,尚需要一段时间。不过在体外和体内实验中,噬菌体展示文库技术已经显现了良好的应用前景。相信在不久的将来,噬菌体展示文库技术将应用于

临床,在血液肿瘤的诊断和治疗中发挥越来越重要的作用。

参考文献(References)

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228 (4705): 1315-1317
- [2] Stein C, Kellner C, Kü gler M, et al. Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells[J]. Br J Haematol, 2010, 148(6): 879-889
- [3] Zhu Z, Hattori K, Zhang H, et al. Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity[J]. Leukemia, 2003, 17(3): 604-611
- [4] Cré pin R, Goenaga AL, Jullienne B, et al. Development of human single-chain antibodies to the transferrin receptor that effectively antagonize the growth of leukemias and lymphomas [J]. Cancer Res, 2010, 70(13): 5497-5506
- [5] Secchiero P, Sblattero D, Chiaruttini C, et al. Selection and characterization of a novel agonistic human recombinant anti-TRAIL-R2 minibody with anti-leukemic activity [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2009, 22(1): 73-83
- [6] McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (4): 1041-1046
- [7] Shadidi M, Sioud M, et al. An anti-leukemic single chain Fv antibody selected from a synthetic human phage antibody library [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(2): 548-552
- [8] Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia[J]. Cancer Res, 2004, 64(22): 8443-8450
- [9] Van Rhenen A, van Dongen GA, Kelder A, et al. The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells[J]. Blood, 2007, 110: 2659-2666
- [10] Geuijen CA, Bijl N, Smit RC, et al. A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(1): 178-187
- [11] Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides[J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(3): 99-103
- [12] Nishimura S, Takahashi S, Kamikatahira H, et al. Combinatorial targeting of the macropinocytotic pathway in leukemia and lymphoma cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(17): 11752-11762
- [13] Karjalainen K, Jaalouk DE, Bueso-Ramos CE, et al. Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma [J]. Blood, 2011, 117(3): 920-927
- [14] S Jäger, A Jahnke, T Wilmes, et al. Leukemia targeting ligands isolated from phage display peptide libraries Leukemia targeting peptides[J]. Leukemia, 2007, 21(3): 411-420
- [15] Choi JH, Lee WK, Han SH, et al. Identification and characterization of nonapeptide targeting a human B cell lymphoma, Raji [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(6): 852-858
- [16] Buhl L, Szecsi PB, Gisselø GG, et al. Surface immunoglobulin on B lymphocytes as a potential target for specific peptide ligands in chronic lymphocytic leukaemia. [J]. Br J Haematol, 2002, 116 (3): 549-554