

噬菌体抗体库技术及其研究进展

杨乃娣 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 噬菌体抗体库技术将噬菌体展示技术与 PCR 技术相结合, 在噬菌体表面成功表达抗体可变区基因, 从而得到多样性噬菌体抗体集合。目前, 噬菌体抗体库技术逐渐成为获得人源性抗体的主要手段之一, 已有多株来源于噬菌体抗体库技术的单克隆抗体应用于临床。现就噬菌体抗体库构建、筛选及应用作一综述。

关键词 噬菌体抗体库; 噬菌体展示

自 1975 年 Köhler 和 Milstein 创立淋巴细胞杂交瘤技术至今, 单克隆抗体的研究方兴未艾, 单抗可以应用于疾病诊断与治疗等多个领域。早期应用于人类疾病治疗的主要是鼠源性单抗, 但是鼠单抗通常半衰期短^[1]且作为异源蛋白会引起人体免疫反应, 产生人抗鼠抗体^[2], 不能很好的发挥其生物学功能, 因此在临床应用中受到限制; 后来, 在鼠单抗基础上, 改造形成了嵌合式抗体和人源化抗体, 但两者应用于人体依旧存在免疫原性^[3]; 目前, 人们正致力于人源性单克隆抗体的研究, 主要采用噬菌体展示技术和转基因技术, 由此产生的多株抗体已经应用于临床, 如 2006 年美国最先批准了人源性单克隆抗体 Panitumumab (商品名 Vectibix) 用于转移性结肠直肠癌的临床治疗^[4]。

1989 年英国剑桥 Winter 小组与 Scripps 研究所 Lerner 小组创造性地采用 PCR 方法克隆机体全部抗体基因, 并重组于原核表达载体中^[5]; 第二年, McCafferty 等^[6]将该技术与噬菌体展示技术(phage display)结合起来, 在噬菌体表面成功表达抗体可变区基因, 构建了噬菌体抗体库。噬菌体抗体库可以对各种抗原进行高通量筛选, 且可快速获得抗体片段, 并易于改造, 因而获得广泛应用。据统计, 应用于临床的单克隆抗体中, 约有 30% 来源于噬菌体抗体库技术^[7]。

1 噬菌体展示技术及噬菌体抗体库技术概述

噬菌体展示技术最初由 Smith^[8] 于 1985 年创建, 噬菌体作为一种表达载体将多肽展示于噬菌体外壳。基本原理是通过将外源 DNA 克隆到噬菌体的基

因组中, 使外源 DNA 编码的肽段与噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白, 从而伸展到噬菌体表面。再采用与固定配体相互作用的亲和筛选方法, 可以富集得到能表达某种特异肽序列的噬菌体。噬菌体(phage)和噬菌粒(phagemid)都可作为表达载体来展示抗体或其他蛋白。噬菌粒携带表达 g III 外壳的基因、克隆位点及噬菌体包装信号, 并由辅助噬菌体(如 M13K07 或 VCS-M13)提供完成包装所需的结构蛋白。含有完整噬菌体基因组的丝状噬菌体常用来构建肽库, 而噬菌粒能够展示大量重组蛋白质, 更易于产生可溶性蛋白, 同时自身不易受异源基因影响, 因此在噬菌体抗体库构建中占据主导地位^[9]。

抗体片段首次由 McCafferty 等^[6]在噬菌体表面成功展示, 他们采用 PCR 方法扩增出完整的抗体可变区基因, 将多样性的可变区基因与表达载体(如噬菌体或噬菌粒载体)相连后, 转化宿主细胞, 并最终表达于噬菌体表面, 从而得到多样性噬菌体抗体集合, 即噬菌体抗体库。此后产生的抗体库均是在上述方法的基础上构建而成, 图 1 展示了人源性噬菌体抗体库的构建过程^[6,10]。将构建好的噬菌体抗体库与目的抗原、细胞或组织共同温育, 通过“吸附-洗脱-扩增”的淘筛过程(panning), 可筛选出特异性抗体。噬菌体不但可以将外源基因编码的多肽或蛋白质呈现于噬菌体表面, 而且能够在大肠杆菌系统中进行扩增, 因此噬菌体抗体库将基因型和表型统一于一体, 将选择能力与扩增能力偶联起来, 具有强大的筛

收稿日期: 2009-02-12 接受日期: 2009-07-28

浙江省重大科技专项(No.2009C13G2010074)和国家自然科学基金(No.30670424 和 No.30470369)资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

选功能,加速了抗体技术的发展。

2 噬菌体抗体库构建的研究进展

2.1 抗体库中展示抗体片段的选择

因为噬菌体可以有效的表达异二聚体的抗原结合区片段(Fab)、单链可变区片段(scFv)、二硫键稳定性抗体(dsFv)及双价抗体(diabody),所以建库之前应依据实际需要选择所需表达的抗体片段,并据此选择相应的建库策略。相对于免疫球蛋白,Fab和scFv等小分子片段结构简单(不存在Fc段),易于穿过血管壁和组织屏障,有利于对肿瘤等疾病的治疗;并且能够快速在原核生物中表达,从而降低生产成本^[7],迄今所报道的抗体库主要应用Fab和scFv。其中scFv

具有在细菌内易于合成且耐受性好等优点,因此在建库初期占主导地位;而Fab更加稳定,易于进行结构改造且细菌内表达产物多为有功能的抗体片段等优点而得到迅速发展^[11,12]。Fab和scFv的主要特点见表1,根据文献^[12]做适当修改。

2.2 高质量抗体库的构建

构建高质量抗体库是获得目标抗体的重要途径。高质量抗体库应具备以下几个特征^[7]:一是库中抗体分子应具有丰富的多样性,并能表达有功能的抗体分子,使随后的筛选及大量生产成为可能;二是抗体库中获得的目标抗体要便于及时进行基因工程改造,使产生的抗体作为治疗药物具有低免疫原性;最后,建库及筛选抗体方法要简便。

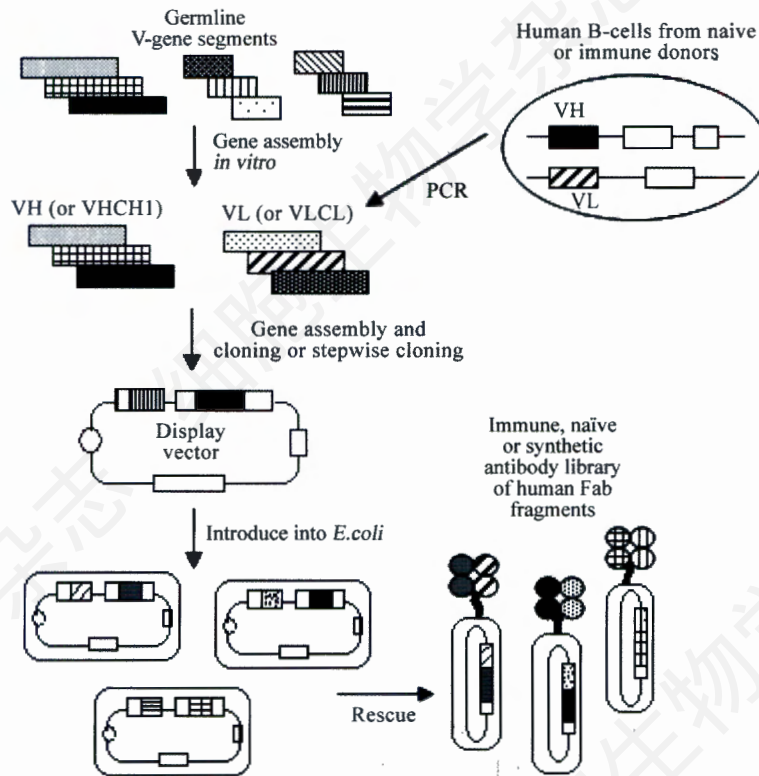


Fig.1 Construction of a human antibody library displayed on phage^[10]

Table 1 The characteristic of scFv and Fab^[12]

scFv	Fab
Easy to synthesis and better tolerated by bacteria	More difficult to synthesis in bacteria
Less likely to be degraded	More likely to be degraded
Can form dimmers (diabodies)	No dimerisation
Single protein molecule	Two protein molecules
Introduce into (Gly ₄ Ser) ₃ linker	No linker need
Less stable and lower repeatability	More stable
A fraction of expressed scFv can be non-functional	Most fraction of expressed Fab tend to be functional
DNA insert about 750 bp	DNA insert>1 500 bp

噬菌体抗体库的发展经历了免疫抗体库(immune antibody library)、天然抗体库(naïve antibody library)及合成抗体库(synthetic antibody library)三代^[13], 期间研究人员一直努力优化建库方法^[14-18]。Sblattero 等^[14]设计了一系列引物, 能够扩增出当时已知的人全部抗体可变区基因, 之后他们采用包含两个非同源loxP 位点的单一噬菌粒作为载体, 感染能够表达 Cre 重组蛋白酶的细菌, 获得容量为 3×10^{11} 的多样性抗体库, 并且所有的重组子均能表达功能性抗体^[15]; Rojas 等^[16]通过选用 32 种不同来源的人淋巴细胞以及一系列复合引物并进行分步扩增来提高库的多样性; Rondot 等^[17]通过改造辅助噬菌体使 scFv 片段在噬菌体表面表达量有了大幅度提高; Pavoni 等^[18]报道了一个新型的噬菌粒载体——pKM19, 提高了抗体库中 scFv 片段的筛选效率, 并且降低了抗体表达过程中的生物偏爱性。此外, 多家公司构建了抗体库并将其商业化, 如 BioInvent 公司的 n-CoDeRTM-Fab 抗体库(www.bioinvent.com)、Cambridge antibody technology 公司的 CAT-scFv 抗体库(www.Cambridgeantibody.com)以及 MorphoSys 公司的 HuCAL GOLD 抗体库(www.morphosys.com)。

3 噬菌体抗体库筛选的研究进展

多样性噬菌体抗体库的构建为筛选打下了良好基础, 而选择合适的筛选方法则是获得高亲和力抗体的关键环节。根据筛选靶标和筛选目的的不同, 筛选方法也各异, 但基本原理都是利用抗原抗体的免疫学反应将构建好的噬菌体抗体库与靶标抗原结合, 去掉不结合的噬菌体。去除方法有多种, 如酸洗脱法, 蛋白酶切法, 抗原抗体竞争法等^[19]。理论上新一轮淘洗就可以得到目的抗体, 但通常存在非特异性结合, 从而限制了目的抗体的富集程度, 因此, 实际筛选过程至少要经过 2~5 轮。有关目的抗原的选择, 很重要的两点: 一是体内正常细胞要尽可能少地表达该抗原, 这样抗体就能够区分异常细胞和正常细胞; 二是异常细胞表达的抗原蛋白并不分泌到循环系统中, 否则抗体就会结合可溶性抗原而非异常细胞上的抗原^[4]。Bradbury 等^[12]将筛选方法分为两类: 对已知抗原(如癌胚抗原CEA)的筛选和对未知抗原(如细胞表面的未知抗原)的筛选。

3.1 噬菌体抗体库对已知抗原进行筛选

通过将疾病发生过程中相关重要蛋白质作为抗原, 与噬菌体抗体库结合, 可以筛选出高亲和力的抗

体。筛选过程包括两步: 第一步是初步筛选, 也称做淘筛(panning), 通常是将抗原包被在固相介质如酶标板或亲和层析柱上, 然后加入待筛选的噬菌体抗体库, 经过结合、洗脱等过程, 洗去无亲和力或(和)低亲和力抗体, 回收高亲和力噬菌体抗体。可以通过递减抗原用量, 改变洗脱条件(如应用碱性溶液或酸性溶液、蛋白酶消化法), 增加洗脱次数以及降低温育时间等方法获得高亲和力抗体^[19]。由于第一步会筛选到多株具有不同结合特性的抗体, 因此需要对每株抗体特性分别进行验证, 即进一步筛选。通常将淘筛得到的抗体作为一抗, 选取相应的抗体(如抗噬菌体抗体 HRP-anti-M13 抗体)作为二抗, 检测所得抗体的特异性。Buckler 等^[20]将第二步筛选方法归纳为三大类, 包括基于膜技术、芯片技术及酶联免疫吸附(ELISA)技术, 并对三类筛选方法及如何分析收集到的数据进行了介绍。

上述方法以固相介质为基础, 难以计算包被在介质中的实际抗原含量。而采用液相筛选法, 则能克服上述问题。液相筛选法将噬菌体抗体库与生物素化的可溶性抗原混合反应, 再用链亲和素包被的磁珠富集能与抗原结合的噬菌体抗体^[19]。此外, 选用液相筛选法, 能够降低 scFv 多聚体与抗原结合的影响, 从而获得特异性的 scFv 单体^[21]。

但是液相筛选也存在不足, 分离到的目的抗体同时会混有抗链亲和素抗体^[22], 因此在实验过程中需要根据蛋白质的性质采用固、液相结合的筛选方法, 才能得到高特异性的抗体。

3.2 噬菌体抗体库对未知抗原进行筛选

绝大多数成功的抗体筛选选用的是性质明确的纯化抗原, 但当遇到目标抗原无法纯化或纯化过程中抗原性质遭到破坏(如某种特定的血浆膜蛋白)以及性质不确定的抗原(如某些细胞表面未知抗原)等情况时, 就不能采用以某种单一物质作为抗原进行筛选的传统方法, 而可以选取直接对细胞、组织或整体进行筛选。

3.2.1 对细胞筛选 由于细胞膜表面成分极其复杂, 含有许多蛋白质、糖类、脂类, 因此非特异性噬菌体抗体结合到细胞的几率更大。膜表面抗原密度很低, 也给抗体筛选带来了一定困难, 主要表现为非特异性吸附、背景值高、洗涤过程中特异性配体损失。因此很难获得针对某一抗原的高特异性抗体。为此, 人们设计了递减筛选法^[23]和竞争筛选法^[24,25]来去掉非特异性抗体, 二者原理都是采用抗原阴

性细胞和抗原阳性细胞共同进行筛选。前者是将不同种细胞分别与抗体库温育后再筛选,后者则是将多种细胞混合后再与抗体库温育进行筛选。对于后者,为更好的回收目的细胞,人们采用流式细胞分选法^[24]和磁珠分选法^[25],即通过将阳性抗原细胞用荧光素或生物素标记回收细胞。Reiersen等^[26]打破了通过针对抗体的特点来设计验证阳性克隆的传统方法,描述了一种基于抗原本身的新验证方法。他们首先将肿瘤细胞与抗体库温育,然后采用磁珠法分离携带抗体的肿瘤细胞,最后通过PCR法扩增细胞的保守基因来验证抗体是否真正结合到细胞的表面。相对于传统的ELISA法,该法具有高敏感性,其关键在于含目标抗原的细胞携带报告基因,如 β -肌动蛋白。Lipes等^[27]用稳定的肿瘤细胞系对小鼠进行免疫,提取免疫鼠脾脏细胞,构建对人Toll样受体2(hTLR2)的噬菌体抗体库;将抗体库与原始的HEK细胞(hTLR2阴性)温育后,上清液与hTLR2阳性HEK细胞进行温育筛选;与此同时直接用抗体库与重组的hTLR2(体外表达)温育;结果发现针对完整细胞筛选获得的抗体对重组hTLR2具有高亲和力,但通过对抗重组hTLR2产生的抗体则不能与细胞结合,即不能识别细胞表面hTLR2的天然构象。该方法同样可应用于筛选对抗其他细胞表面抗原的抗体。

对于完整细胞的筛选,除利用细胞表面抗原筛选法外,还存在细胞内化型抗体的筛选。抗体可以通过受体介导等方式内吞入细胞,洗脱结合在细胞表面的抗体后,将细胞裂解,使内化的噬菌体抗体释放出来,再进行扩增,从而得到内化型抗体。与毒素、脂质体、药物分子或DNA片段相连的内化型抗体,在疾病的靶向治疗中具有很高的应用价值^[28-30]。

3.2.2 对非细胞结构筛选 对非细胞的筛选主要有组织筛选和体内筛选。组织筛选由于抗原进一步复杂等局限性并未得到广泛应用;当用于筛选的细胞难以分离,或分离得到的细胞难以进行体外培养(如血管内皮细胞)以及体外无法模拟体内分子相互作用的微环境(如体内各种酶对抗体的分解作用)时,体内筛选具有特殊意义^[31]。体内筛选最初是由Pasqualini等^[32]将噬菌体肽库注射荷瘤小鼠,从中筛选多肽;后来Johns等^[31]首先采用噬菌体抗体库来进行体内筛选:他们将噬菌体抗体库尾静脉注射到小鼠体内2h后,提取小鼠肝脏、心脏、胸腺等器官,获取各组织样品后,经过四轮淘洗,回收结合的噬菌体,诱导表达后与胸腺组织作用,筛选得到对胸腺内皮的单链

抗体(scFv),并检测验证了其特异性。最后他们还通过免疫沉淀的方法获得了与单链抗体结合的两种抗原,一种仅仅在胸腺表达,另一种在胸腺和血管周皮均能表达;最近Villa等^[33]利用体内筛选法获得对纤粘连蛋白可变剪切额外结构域A(EDA)高亲和力的单克隆抗体。

4 噬菌体抗体库的应用

噬菌体抗体库在治疗性抗体的筛选过程中发挥重要作用,通过该技术产生的多株单克隆抗体已经应用于临床,如Adalimumab(商品名Humira)和Bevacizumab(商品名Avastin)分别广泛应用于类风湿性关节炎和转移性结肠直肠癌的治疗^[4,34];此外,通过噬菌体抗体库技术还可以发现新的疾病标记物。Karthé等^[30]筛选到一株与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白具高亲和力的单链抗体,并发现其能进入细胞内,降低核心蛋白的表达水平,从而间接抑制了携带病毒细胞的生长,表明该抗体可以作为抗HCV的候选;Goenaga等^[35]采用噬菌体抗体库技术获得了6株与肿瘤标记物——铁传递蛋白受体结合的单链抗体,并通过免疫沉淀反应与液-质联用技术(LC-MS/MS)识别出一种新的肿瘤细胞抗原。噬菌体抗体库技术不仅在疾病诊断和治疗中占据重要地位,也应用于其他领域,如识别精子细胞表面分子标记物,从而对性别进行预先鉴定,其意义在于不仅可以预防人类X染色体连锁的遗传性疾病,且能加速畜牧业的育种发展^[36]。

5 小结与展望

单克隆抗体可以通过分子展示技术(包括噬菌体展示技术、核糖体展示技术及细胞表面展示技术等)、表达人源抗体的转基因鼠技术以及鼠源单克隆抗体人源化改造得来,但是噬菌体展示技术更加成熟,因此大多数抗体库基于噬菌体展示建立起来。噬菌体抗体库技术与后来发展起来的转基因鼠技术是获得治疗性单克隆抗体的主要途径^[19]。在发展噬菌体抗体库技术的同时,人们不断探索改造抗体的方法:如通过将筛选得到的抗体片段与化合物(如聚乙二醇)偶合作用、与Fc段结合等方式增强抗体稳定性、提高亲和力^[29,37]。近年来,用抗体作为运载载体的靶向治疗研究也取得了很大进展:如将抗体与脂质体相连,构成免疫脂质体,再连接细胞毒性药物,能大幅度提高抗体对肿瘤细胞的亲和力和毒性^[38];将抗体与毒素相连,能显著抑制肿瘤细胞生长^[4,39]。将抗

体与纳米颗粒结合,在较低阈值的激光辐射情况下,就能有效杀伤肿瘤细胞^[40]。目前,由噬菌体抗体库技术产生的多株抗体已经应用于临床,但研究者仍面临如何获得高特异性、高亲和力及低免疫原性抗体的问题。此外,怎样将改造后的抗体安全有效的用于疾病诊断与治疗也需要不断探索。随着科学技术日新月异的发展,特别是噬菌体抗体库技术研究的不断深入,这些问题将逐步得以解决,从而为疾病的临床诊断、药物筛选、新药开发等打下基础。

参考文献(References)

- [1] Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, *et al.* Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies, *Int Immunol*, 2001, 13(12): 1551-1559
- [2] Kipps TJ, Parham P, Punt J, *et al.* Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies, *J Exp Med*, 1985, 161(1): 1-17
- [3] Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody, *Cytotechnology*, 2007, 55(2-3): 55-60
- [4] Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(5): 349-356
- [5] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, *et al.* Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*, *Nature*, 1989, 341(6242): 544-546
- [6] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature*, 1990, 348(6301): 552-554
- [7] Kretzschmar T, von Ruden T. Antibody discovery: phage display, *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6): 598-602
- [8] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317
- [9] Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, *et al.* Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains, *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(15): 4133-4137
- [10] Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications, *Methods Mol Biol*, 2002, 178: 1-37
- [11] Sidhu SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces, *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(4): 481-487
- [12] Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries, *J Immunol Methods*, 2004, 290(1-2): 29-49
- [13] Pini A, Bracci L. Phage display of antibody fragments, *Curr Protein Pept Sci*, 2000, 1(2): 155-169
- [14] Sblattero D, Bradbury A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions, *Immunotechnology*, 1998, 3(4): 271-278
- [15] Sblattero D, Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries, *Nat Biotechnol*, 2000, 18(1): 75-80
- [16] Rojas G, Lamdan H, Padron S, *et al.* Efficient construction of a highly useful phage-displayed human antibody repertoire, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(4): 1207-1213
- [17] Rondot S, Koch J, Breitling F, *et al.* A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display, *Nat Biotechnol*, 2001, 19(1): 75-78
- [18] Pavoni E, Monteriu G, Cianfriglia M, *et al.* New display vector reduces biological bias for expression of antibodies in *E. coli*, *Gene*, 2007, 391(1-2): 120-129
- [19] Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1105-1116
- [20] Buckler DR, Park A, Viswanathan M, *et al.* Screening isolates from antibody phage-display libraries, *Drug Discov Today*, 2008, 13(7-8): 318-324
- [21] Schier R, Bye J, Apell G, *et al.* Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection, *J Mol Biol*, 1996, 255(1): 28-43
- [22] Hoogenboom HR, Henderix P, de Haard H. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy, *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 31(1-2): 5-31
- [23] Ridgway JB, Ng E, Kern JA, *et al.* Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines, *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2718-2723
- [24] Lekkerkerker A, Logtenberg T. Phage antibodies against human dendritic cell subpopulations obtained by flow cytometry-based selection on freshly isolated cells, *J Immunol Methods*, 1999, 231(1-2): 53-63
- [25] Siegel DL, Chang TY, Russell SL, *et al.* Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology, *J Immunol Methods*, 1997, 206(1-2): 73-85
- [26] Reiersen H, Berntsen G, Stassar M, *et al.* Screening human antibody libraries against carcinoma cells by affinity purification and polymerase chain reaction, *J Immunol Methods*, 2008, 330(1-2): 44-56
- [27] Lipas BD, Chen YH, Ma H, *et al.* An entirely cell-based system to generate single-chain antibodies against cell surface receptors, *J Mol Biol*, 2008, 379(2): 261-272
- [28] Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, *et al.* Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries, *J Mol Biol*, 2000, 301(5): 1149-1161
- [29] Liu B, Conrad F, Roth A, *et al.* Recombinant full-length human IgG1s targeting hormone-refractory prostate cancer, *J Mol Med*, 2007, 85(10): 1113-1123
- [30] Karthe J, Tessmann K, Li J, *et al.* Specific targeting of hepatitis C virus core protein by an intracellular single-chain antibody of human origin, *Hepatology*, 2008, 48(3): 702-712
- [31] Johns M, George AJ, Ritter MA. *In vivo* selection of sFv from phage display libraries, *J Immunol Methods*, 2000, 239(1-2): 137-151
- [32] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v integrins as

- receptors for tumor targeting by circulating ligands, *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 542-546
- [33] Villa A, Trachsel E, Kaspar M, *et al*. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature *in vivo*, *Int J Cancer*, 2008, 122(11): 2405-2413
- [34] Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design, *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(5): 343-357
- [35] Goenaga AL, Zhou Y, Legay C, *et al*. Identification and characterization of tumor antigens by using antibody phage display and intrabody strategies, *Mol Immunol*, 2007, 44(15): 3777-3788
- [36] Soares SG, Barbosa JE. Application of recombinant antibody library for screening specific antigens in a bovine sperm cell subpopulation, *Livestock Sci*, 2008, 114(2-3): 188-193
- [37] Deonarain MP. Recombinant antibodies for cancer therapy, *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(8): 1123-1141
- [38] Marty C, Langer-Machova Z, Sigrist S, *et al*. Isolation and characterization of a scFv antibody specific for tumor endothelial marker 1 (TEM1), a new reagent for targeted tumor therapy, *Cancer Lett*, 2006, 235(2): 298-308
- [39] Klechevsky E, Gallegos M, Denkberg G, *et al*. Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts, *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6360-6367
- [40] Chen J, Wang D, Xi J, *et al*. Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells, *Nano Lett*, 2007, 7(5): 1318-1322

Progress in Phage-displayed Antibody Libraries

Nai-Di Yang, Jin-Biao Zhan*

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The technology of phage-displayed antibody library is based on the combination of phage display and PCR. By using the phage display, antibodies can be expressed on the surface of bacteriophage, and diverse antibody library can be constructed. It becomes one of main approaches to obtain human antibodies, which have been used in clinical diagnosis and therapy. In this article, we summarize the progress in this filed, including the construction, selecting and screening as well as application of phage antibody libraries.

Key words phage-displayed antibody libraries; phage display

Received: February 12, 2009 Accepted: July 28, 2009

This work was supported by the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2009C13G2010074), and the National Natural Science Foundation of China (No.30670424 and No.30470369)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn