

## 噬菌体抗体库技术的研究进展

黄 甦 寿成超

(北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京 100034)

1989年, Huse 第一次从噬菌体表达的重组抗体库中分离出单克隆抗体<sup>[1]</sup>, 但自 Smith 用丝状噬菌体显示其方法与各种实验相结合的过程后, 该技术才得到了迅速的发展<sup>[2]</sup>。尤其随着筛选策略、洗脱条件、抗体库的构建及亲和力成熟等方法的改进, 该项技术得到了广泛地应用。本文简要介绍噬菌体抗体库构建技术的研究进展。

### 一、噬菌体显示技术的基本原理

如图 1 所示<sup>[3]</sup>, 噬菌体表面显示技术是将蛋白质或肽段的基因克隆到丝状噬菌体的基因 DNA 中, 并使噬菌体表面表达异源性分子, 其主要特点是将特定分子的基因型与表型统一在同一病毒颗粒内, 即在噬菌体表面表达特定蛋白, 而在噬菌体核心 DNA 中则含有该蛋白的结构基因。由于丝状噬菌体易于在大肠杆菌中扩增, 该技术将选择能力和扩增能力联系在一起, 即通过与配体结合从数量众多的多样化群体中选择出表达有相应配体的噬菌体颗粒, 再通过感染大肠杆菌使选择出的噬菌体得到扩增<sup>[4]</sup>。抗体片段显示在噬菌体表面可以分为 Fab 片段<sup>[5]</sup>、单链可变区片段 (single-chain variable region fragment, scFVs) 或二聚 scFVs 又称双体分子 (diabodies)。实际上, 特异性抗体的获得是一个“吸附-洗脱-扩增”的富集过程。

### 二、筛选策略: 细胞筛选及其他

以往, 噬菌体显示抗体库的筛选都是以筛选固定在人造表面的纯化抗原为主, 其缺点是<sup>[6]</sup>: (1) 需要纯化的抗原; (2) 分离的抗体经常不能与天然蛋白抗原相结合; (3) 因为亲和力 (avidity) 效应, 很难选择出高亲和力的抗体; (4) 难于区分亲和力相似的克隆。现在越来越多的抗体筛选是针对细胞表达的抗原进行的<sup>[7,8,9]</sup>, 其优点是: (1) 可以用来筛选无法得到纯化的抗原或未知的抗原, 即寻找新的细胞标志, 如: 红细胞表面的所表达的大部分抗原可用血清学方法定义, 但无法获得纯化形式。用自主或同种免

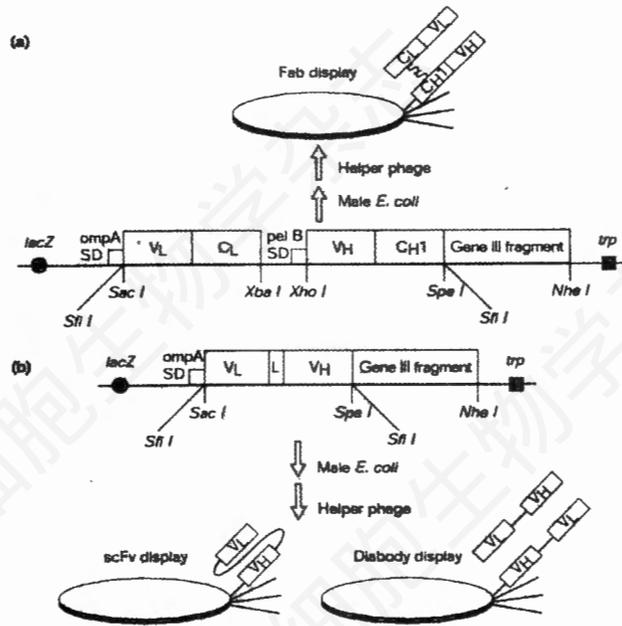


图 1 噬菌体显示技术基本原理<sup>[3]</sup>

Fab display: Fab 表面显示

scFv display: 单链抗体表面显示

Diabody display: 双体分子表面显示

Helper phage: 辅助噬菌体

VL: 轻链可变区 VH: 重链可变区

Gene III fragment: 基因 III 片段

(a) 图为 Fab 表面显示的构建

(b) 图为单链抗体表面显示及双体分子表面显示的构建

疫的个体中获得的重组抗体库已被用来筛选红细胞表面的抗原<sup>[10]</sup>。(2) 相对于纯化的抗原而言, 细胞筛选更有可能获得在体内能与表位相结合的抗体, 并已成为获得具有治疗作用的抗体的重要手段。(3) 由于细胞表面抗原的嗜同种抗体 (homophilic) 或嗜异种抗体 (heterophilic) 的相互作用, 筛选多集中在与生物相关的表位上, 如: 表达在 HIV-1 病毒或 HIV-1 感染的细胞上的多聚 gp120 比单体 gp120 更宜筛选出 HIV-1 的中和抗体<sup>[11]</sup>。

以下简述目前细胞筛选中的一些常用方法:

#### 1. 消减 (subtraction) 或称删除法 (deletion)

将抗体库或肽库与不表达靶抗原的阴性细胞预

吸附,利用磁珠或流式细胞仪将非靶抗原除去。噬菌体显示技术对于非靶抗原的抗体常更易富集。消减或删除法可以有效地解决上述问题<sup>[12]</sup>。但此方法受到以下两种情况的限制:一是许多在细胞上表达的抗原的密度非常低,当抗原密度远低于抗体库中任何一个抗体的亲和力常数时,筛选就非常困难;二是因其他蛋白或糖基造成的空间结构而阻碍抗体的选择,在此情况下,消减(substraction)或删除法(deletion)则不一定适用,例如<sup>[13]</sup>:通过细胞转染方法获得的表达相对较高的两个膜抗原,一个为在中国地鼠卵巢细胞(CHO)细胞上表达的生长激素释放因子(somatostatin)的7-转膜受体(7-TM),一个为糖蛋白 CD-36,分别用天然抗体库进行筛选,前者尽管用受体表达阴性细胞预吸附却未获得特异性抗体,而后者直接筛选表达具有与前者蛋白表达密度相同的糖蛋白 CD-36 CHO 细胞,却获得了大量抗原特异性抗体。该例表明消减或删除法,在没有与直接细胞筛选比较后,很难评述其价值。因此需要更精确的消减法来定位抗原特异性噬菌体抗体。

## 2. 'pathfinder' 筛选方法

其基本步骤(如图2所示)为:(1)在一个已知的亲和素-HRP 偶联化的特异性配体与细胞靶受体结合后,加入初次抗体库,HRP 指导生物素酪胺(biotin-tyramine)沉积在受体周围非常小的区域内的噬菌体抗体上。(2)这些噬菌体抗体被洗脱下来,并且可以与无特异配体结合的新鲜细胞结合,加入可与这些沉积有生物素酪胺的噬菌体抗体结合的亲和素-HRP。(3)加入二次抗体库,在 HRP 作用下,生物素酪胺可以沉积在与靶受体结合的噬菌体抗体上,洗脱后被亲和素磁珠吸附获得。这种方法可将特异性配体选择空间集中起来,因此可以忽略细胞表面受体的低密度,但必须有针对靶受体的配体。当然,此方法还可用来进行靶抗原,甚至寡配体的受体相关的蛋白的特异性抗体的筛选<sup>[14]</sup>。

## 三、抗原浓度及洗脱条件与抗体亲和力的关系

为了获得高亲和力的抗体,抗原浓度及洗脱条件也十分重要。抗原的浓度过高可能使高亲和力的抗体与具有基本亲和力的抗体难以区别。同样,过量的减少抗原浓度又将导致高亲和力噬菌体的丢失。用亲和素包被磁珠吸附生物素化抗原的方法能够解决这一难题<sup>[15]</sup>,尤其是在选择一个亲和力成熟的抗体时——抗原浓度低至既定的亲和力常数当

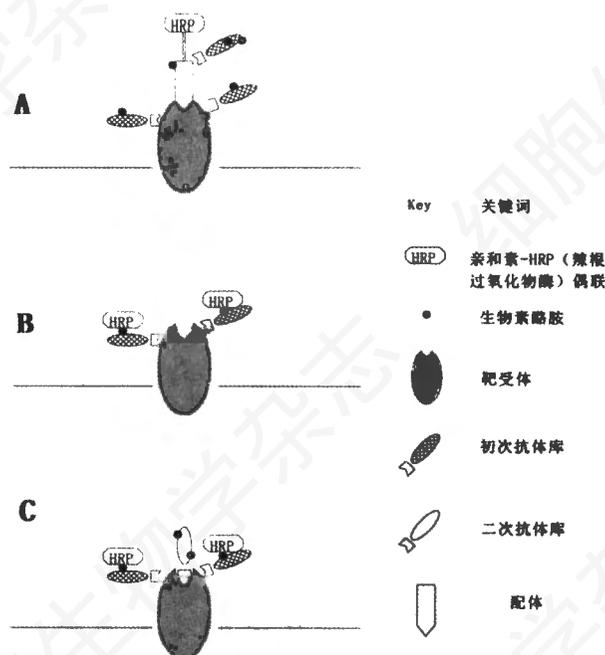


图2 'pathfinder' 筛选法原理图<sup>[14]</sup>

量,而又高于噬菌体抗体的数量时,结合于抗原的噬菌体抗体数取决于其亲和常数,用磁珠就可将高亲和力的克隆分离出来。

成功地洗脱高亲和力的噬菌体需要随着亲和力的增加而增加洗脱的严格性<sup>[16]</sup>,许多实验室面临的问题是富集特异性抗体失败或仅能恢复低亲和力抗体。Rober de Brain 和同事们即使用世界上最大的库——“The Griffin-1 Library”(由人类 scFV 片段组成)也经历了同样问题,认为其中极大的可能性便是筛选中高亲和力抗体的丢失<sup>[17]</sup>。通过延长三乙胺洗脱时间从 10 至 30 分钟,洗脱下的抗体对 NH3 蛋白抗原具有高亲和力,其结果显示筛选过程中仅仅检测富集率是不够的。严格的洗脱方式可能导致噬菌体抗体构成的完全不同,并决定了高亲和力的噬菌体抗体是被选择还是被丢失。

## 四、抗体库的构建及抗体亲和力的成熟

初级噬菌体抗体库抗体基因的来源有两种:<sup>[6,13]</sup>

### 1. 来源于人类或动物供者的免疫或非免疫的抗体 V-基因库

其抗体库构建是利用逆转录和多聚酶链反应扩增来源于供者 B-细胞重组或基因转换的抗体 V-基因。免疫抗体库来源于针对某种抗原免疫反应的供体,因此具有高亲和力及特异性,有多种潜在的运用价值,包括预防、免疫治疗以及了解人类在患病时

的体液免疫。免疫抗体库的主要优点是:(1)具有编码特异性抗体的 V-基因的高度倾向,相对较小的库容( $\times 10^5$ )就可获得高亲和力的抗体;(2)可编码亲和力和成熟的抗体,增加库中高亲和力抗体的数目。其缺点是:(1)因为耐受机制难以获得针对自身抗原的抗体;(2)抗原的毒性导致供者的死亡;(3)由于伦理道德而致免疫供体的难以获得。非免疫抗体库来源于未免疫的人的 B-细胞的 IgM mRNA 或总 mRNA 的 V-基因,理论上,应尽量避免有抗原倾向的 IgG V-基因。与免疫抗体库相比,非免疫抗体库不需反复进行免疫和抗体库的构建;不需免疫过的供者;并且如果库容和多样性足够,仅一个抗体库就可用来筛选所有的抗原;另外,可以分离针对自身抗原、无免疫原性和毒性抗原的抗体。而非免疫抗体库的缺点在于必须有很大的库容,克隆的 V-基因库的特性不可知及难以控制。

## 2. 体外构建合成的 V-基因抗体库

利用人工的手段在体外将 V-基因部分和 D/J 部分组装构建,形成抗体。V-基因的组装通过在胚系 V-基因中加入已知随意性的 CDR 区,CDR 区的多样性决定了库的多样性,重链的 CDR3 的结构和序列最为多样,其他五个 CDR 区变化较小,因此最初的合成抗体库就是由 49 个人类 VH-部分通过 PCR 与一个短 CDR3 区(编码 5-8 个氨基酸)组装。合成抗体库的优点是可以选择有利于库的表达,折叠及在 *E. coli* 的低毒性的 V-基因部分,增加有功能的库容。V-基因在体外及噬菌体库中的多样性意味着可获得一些很好的折叠形成抗原结合成分。

抗体库的多样性、库容的增加可以筛选出只针对一个抗原更多的和亲和力更好的抗体。在合成的抗体库中,有人用细菌噬菌体 Pllox-Cre 定位重组制备了一个库容为  $6.5 \times 10^{10}$  的 Fab 的抗体库,并且获得针对不同抗原的抗体<sup>[18,19]</sup>,亲和力有的可高达 nmol/L 水平。最近,有一个更加稳定、库容为  $1.2 \times 10^9$  scFV 的噬粒库通过标准克隆方法以及同样的合成的 V-基因被构建,且具有同样的高效<sup>[6]</sup>。有几个第二代的合成抗体库正在发展,例如, MorphoSys' 人类重组抗体库用 master frameworks 基础上的 V-基因部分代表每一个 Kabat 亚类,这种设计是为了更好地表达并有利于筛选<sup>[13]</sup>。另外 Ig-蛋白结合区上预筛选扩增和显示的合成 V-基因(V<sub>H</sub> 在蛋白 A 上, V<sub>K</sub> 在蛋白 L 上)<sup>[20]</sup>,可将有终止密码子和结构转换子(frameshifts)的克隆消除,并且选择正

确折叠的 V-区。更令人兴奋的想法是组合初级(germline, 种系)和次级(somatic hypermutation, 体细胞高突变)抗体库于一个单一的噬菌体抗体库。这或许是可行的,因为高突变机制中仅有几个残基为热点(hotspots)。这一发展将最终建立一个超级抗体库,并可能因此而获得超级亲和力的抗体<sup>[21]</sup>。

较大的初级噬菌体抗体库所筛选的大部分抗体的亲和力介于亚 nM 和亚 mM 之间。通常这些抗体可适用于研究目的。但是当选择如表位特异性抗体、临床特异性中和抗体、或出于某种商业考虑(价格及剂量比)时,亲和力必须进一步提高。这个过程可以通过构建和筛选次级噬菌体显示抗体库,即类同与“亲和力成熟”的过程来完成。低亲和力抗体改善亲和力相对容易,但已有 nmol/L 结合力的抗体需要更精细的提炼才能改善它已具有的高亲和力<sup>[22]</sup>。目前经常使用的方法有:(1)局限 CDR 区的随机突变<sup>[23]</sup>(CDR walking mutagenesis)。用随机合成的 CDR 区作引物,通过重叠 PCR 法构建次级突变库。(2)链更替<sup>[24]</sup>(chain shuffling),将得到的低亲和力的噬菌体抗体其一条链(如轻链)与另一条链(如重链)的全部组合(repertoire)得到次级库,选择亲和力得到改善的克隆,再次重链固定,与轻链全部组合建库,筛选高亲和力的克隆。(3)运用大肠杆菌的突变株提供一个近似于体外错配 PCR 的体内突变<sup>[25]</sup>,有些大肠杆菌菌株由于遗传缺陷具有较高的突变率,将携有抗体可变区基因的载体转化到致突变株大肠杆菌中培养一定时间后即可得到次级突变库。

以上三种方法中,CDR walking mutagenesis 的方法是亲和力成熟方法学中最可靠的一种。运用这个方法已产生单价亲和力达到 picomolar(pM 级)人类抗-HIV<sup>[4]</sup>及抗-c-erbB-2 抗体<sup>[23]</sup>——其在自然界中尚不存在。该方法又可分为 CDR 顺序适应(optimization)及 CDR 平行适应(optimization)。在顺序适应中,抗体库有单一的随机的 CDR,通过几轮筛选后,阳性克隆用于第二个有不同的单一的随机的 CDR 抗体库构建。构建的抗体库再次筛选几轮,阳性克隆再用来构建三次文库等。显然,顺序的 optimization 是基于适宜的结合可能来源于 CDRs 的相互依存的考虑。在平行法中,构建相互独立的抗体库,每一个库具有一个指定的随意的 CDR。首先,每个抗体库筛选几轮,然后,单独的适宜的 CDRs 重新组合,如果由适宜的 CDRs 组合的单一抗体自由能的改变近似于在各个适宜 CDRs 的自由

能的总和的改变,那么自由能的改变可以认为是相加的。由于抗体亲和力的叠加是不能完全预言的,因此,CDR顺序适应的方法更受人们青睐。目前认为最高亲和力抗体的获得来源于对重链 CDR3 及轻链 CDR3 区域的改造。该方法之所以能优越于 PCR 错配或突变株诱导的突变是因为其对于母本抗体的修饰仅限于超变区,而该区域的改变所引起的免疫抗体更少(相对于包含保守序列结构区域的改变而言)。

### 五、结束语

产生及选择重组抗体库的方法仍将不断地改善和发展。其主要动力是完全人源化单抗的潜在医学价值。迄今已有不少抗体被选择用于蛋白识别、免疫及基础应用学科的研究。预计不久将制备一个大库容、稳定的噬菌体抗体库,使其得到更为广泛地应用。抗体库可以用于寻找新药的作用目标、细胞受体及它们的配体。与此同时,筛选及洗脱方法的改善,对于技术的成熟同样具有重要意义。可以预见,噬菌体表面显示技术必将成为抗体产生的主要技术。

### 摘要

从显示在丝状噬菌体表面的重组抗体库中选择抗体的方法已成为获得试剂、诊断及治疗的重要手段。本文介绍该技术的原理、发展及运用,但着重描述如何利用细胞筛选、改进洗脱条件、增加库容及进一步筛选以获得高亲和力抗体的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al., 1989, *Science*, **246**:1275-1281.  
[2] Smith GP. 1985, *Science*, **228**:1315-1317.

- [3] Christoph Rader, 1997, Carlos F Barbas III. *Curr Opin Biotechnol*, **8**:503-508.  
[4] 董志伟、王琰, 1997. 5, 抗体工程, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社.  
[5] Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, et al., 1995, *J Mol Biol.*, **254**:392-403.  
[6] Andrew D Griffiths, Alexander R Duncan. 1998, Feb. *Curr Opin Biotechnol.* **9**(1): 102-8 Samuelsson A, Yari F, Hinkula J, et al., *Eur J Immunol.*  
[7] Andersen PS, Stryhn A, Hause n B E, et al., 1996, *Natl Acad Sci USA.*, **93**:1820-1824.  
[8] Figini Mariangela et al., 1998, *Cancer Research*, **58**:991-996.  
[9] *Immunol Methods* 203(1997)11-24.  
[10] Siegel DL, 1995, *Ann NY Acad Sci.* **764**:547-558.  
[11] Parren PWHI, Fiscaro P, Labrijn AF, et al., 1996, *J Virology*, **70**:9046-9050.  
[12] Van Ewijk W, de Kruij J, Germeraad WT, et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**:3903-3908.  
[13] Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, et al., 1998, *Immunotechnology, Jun*, **4**(1):1-20.  
[14] Osbourn JK, Derbyshire E, Vaughan T, et al., 1998, *Immunotechnology Jan*, **3**(4):293-302.  
[15] Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. *J Mol Biol.*, 1992, **266**:889-896.  
[16] Schier R, Marks JD, 1996, *Hum Antibodies Hybridomas.*, **7**:97-105.  
[17] Robert de Bruin, Kees Spelt, Joseph Mol, et al., 1999, *Nat Biotechnol*, **17**:397-399.  
[18] De Lalla c, Tamborini E, Longhi R, et al., 1996, *Eur J Immunol*, **26**:629-639.  
[19] Doorbar J, Foo C, Columon IV, Medcalf L, et al., 1997, *Virology*, **238**:40-52.  
[20] Akerstrom B, Nilson BH, Hoogenboom HR, et al., 1994, *J Immunol Methods*, **177**:151-163.  
[21] Hoogenboom HR. 1997, *Trends Biotechnol*, **15**:62-70.  
[22] Barbas CF III, Burton DR, 1996, *Trends Biotechnol*, **14**:230-234.  
[23] Schier R, Mc Call A, Adams GP, et al., 1996, *J Mol Biol.*, **263**:551-567.  
[24] Schier R, Bye J, Apell G, et al., 1996, *J Mol Biol.*, **255**:28-43.  
[25] Low NM, Holliger P, Winter G. 1996, *J Mol Biol.*, **260**:359-368.

## Th1/Th2 细胞分化的分子机制

巩 芷 娟\*

(上海市免疫学研究所 上海 200025)

CD4<sup>+</sup> T 细胞的亚群及其功能已早有报道, Th1/Th2 细胞在调节机体免疫功能中起着重要作用。这些 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群的出现实际上是分化、成熟的 T 细胞在外周特异性免疫应答过程中形成不同效应细胞群体,在功能上发生极化的过程<sup>[1]</sup>。

Th 细胞的这种分化受多种因素影响,包括细胞因

上海市免疫学研究所周光炎研究员对本文进行了校阅,谨此致谢。

\* 现工作单位:上海儿童医院遗传所,邮编 200040。