

噬菌体展示技术在肿瘤诊断和治疗中的应用

阳艳丽 王自正

【摘要】 噬菌体体内展示技术的出现,使器官靶向性多肽的筛选、器官特异性血管分子作图成为可能。更值得注意的是,通过动物体内的筛选,鉴定出了一系列肿瘤相关分子标志物的特异性多肽配体,为肿瘤的诊断、肿瘤药物的输送以及肿瘤血管性基因治疗等提供了靶向性分子。最近,人们又成功地将此技术应用于肿瘤患者,并鉴定出与肿瘤特异性结合的多肽模序。

【关键词】 肽库; 药物筛选试验, 抗肿瘤; 分子诊断技术; 肿瘤辅助疗法; 噬菌体展示

Application of phage display in diagnosis and therapy of cancer

YANG Yan-li¹, WANG Zi-zheng²

(1. Clinical Laboratory Diagnostics, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, China;
2. Nanjing Clinical Nuclear Medicine Center, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

【Abstract】 Phage display is possible to screening targeted peptides, mapping organ-specific vascular molecule because of in vivo phage display. It is more remarkable that a variety of peptide ligands specific for tumor-associated makers is identified, which supplied targeted molecules for tumor diagnosis, delivery of tumor drugs and tumor vascular gene therapy. Recently, people succeed in applying the technology to tumor patients and identifying peptide motifs binding to tumor specifically.

【Key words】 Peptide library; Drug screening assays, antitumor; Molecular diagnostic techniques; Neoadjuvant therapy; Phage display

噬菌体展示技术是一项将外源的重组肽、蛋白质包括抗体片段融合到噬菌体颗粒衣壳蛋白上的基因技术,其主要优点在于:①能够筛选包含数亿个肽或蛋白的文库,得到具有某种特性的、单一的肽或蛋白;②噬菌体文库将展示的肽或蛋白的表型与编码该分子的基因型联系在一起,当筛选到某一特定的肽或蛋白后,能通过感染大肠杆菌而扩增该目的分子。

1 噬菌体载体

目前,应用最广的噬菌体载体是丝状噬菌体家族(包含 M13、fd 和 f1)中的 M13。M13 病毒颗粒上的 5 种衣壳蛋白都被用来展示外源分子,最常见的方式是将外源肽融合在 pⅢ或 pⅧ的氨基端,也有研究者将外源蛋白插入到 pⅦ和 pⅨ的氨基端或者插入到 pⅥ、人工合成的 pⅧ和 pⅢ的羧基端。

基金项目:江苏省社会发展科技项目(BS2004507)

作者单位:1. 210009 南京,东南大学医学院临床检验诊断学(阳艳丽); 2. 210006,南京医科大学附属南京第一医院临床核医学中心(王自正)

通讯作者:王自正(E-mail: zzwang136@yahoo.com.cn)

2 噬菌体文库

根据噬菌体展示的外源分子的不同,将其分为 3 类:多肽文库、抗体文库和 cDNA 文库。本文重点阐述多肽文库和抗体文库及其应用。

2.1 多肽文库

组合多肽文库是最早产生的噬菌体多肽文库,其展示的多肽是由人工合成的核苷酸随机编码。随后为了提高多肽的亲合力,在此基础上又引入了结构限制性文库,即在展示多肽的两侧各引入一个半胱氨酸残基,使之形成一个含二硫键的环形结构;另一种限制性文库是将随机多肽插入其他折叠结构或结构域的环形结构中,使随机多肽的结构受限制,因此又被称为结构域文库。

2.2 抗体文库

小分子抗体片段最早被用于构建抗体文库,即将抗体的单链可变区片段(single chain variable region fragment, scFv)或抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)表达于噬菌体表面。其中,免疫文库来源于免疫的供体 B 细胞(一般来源于

脾)的抗体基因。非免疫文库包括天然和合成文库两种,前者由没有经过免疫的供体B细胞的抗体基因产生;后者是将抗体V基因和人工合成的D、J基因片段融合而成,又称为“single pot”文库。

3 筛选策略

3.1 体外筛选

最经典的体外筛选策略是将靶分子吸附并固定在某一物质表面,如醋酸纤维膜、聚偏二氟乙烯膜或聚苯乙烯膜等,然后加入重组噬菌体,洗去没有与靶分子结合的噬菌体,再将与靶分子结合的噬菌体感染大肠杆菌进行扩增,得到的扩增产物用于下一轮筛选。

3.2 体内筛选

噬菌体的体内筛选是将噬菌体文库静脉注入实验动物体内,根据需要循环一定的时间后,处死动物并收获目的脏器,将与该脏器组织特异性结合的噬菌体通过感染大肠杆菌进行扩增,产物进行下一轮循环。

体内筛选与体外筛选相比具有显著的优点:①分离的噬菌体多肽在体内选择性定靶于“完整”的目的靶分子,克服了某些细胞表面分子在体外缺失导致的筛选失败;②大量噬菌体可以识别普遍存在的血浆和细胞表面蛋白,而在体内筛选过程中可以利用心脏灌注将这些噬菌体清除;③能够筛选到稳定的多肽,因为只有血液中的多肽才能到达靶点并与靶分子结合;④筛选得到的噬菌体多肽对于新受体的功能分析有重要作用,同时它筛选得到的组织血管特异性多肽有可能作为新靶向药物的候选分子^[1]。

研究者已经成功地利用噬菌体文库进行体内筛选,获得针对不同靶分子的特异性多肽配体。

4 噬菌体展示在肿瘤诊断和治疗中的应用

人们试图利用噬菌体文库鉴定结合于肿瘤细胞膜蛋白、肿瘤新生血管内皮细胞表面分子或肿瘤细胞的特异性配体。以下几种方式可以用于筛选与细胞表面分子特异结合的多肽或抗体片段:①用膜蛋白可溶性细胞外结构域、免疫黏附结构或蛋白磷脂体进行筛选;②用培养的完整细胞进行筛选;③静脉注射噬菌体多肽文库或抗体文库进行体内筛选;

④用分离的完整器官进行筛选^[2]。分离到的特异性多肽或抗体片段与放射性核素、荧光素等分子连接,可以应用于肿瘤的显像、诊断和治疗。

4.1 肿瘤的显像、诊断和监视

4.1.1 肿瘤的显像

人们利用从噬菌体文库中分离得到的肿瘤细胞或血管内皮细胞特异性多肽或抗体片段耦联放射性核素、荧光素等分子,对肿瘤进行显像、诊断和监视,其中与完整蛋白特异结合的多肽能够对肿瘤的新生血管进行显像。

Zitzmann等^[3]利用噬菌体展示技术筛选前列腺特异性膜抗原阴性的细胞株DU-145,分离得到DUP-1(一种特异性结合于前列腺肿瘤细胞的多肽),并将¹²⁵I标记的DUP-1静脉注入皮下移植DU-145和PC-3前列腺肿瘤的裸鼠,结果显示该肽在两种小鼠每克肿瘤组织的积聚分别达到注射剂量的5%和7%,且体内灌注不易将其洗脱下来,并且观察到小鼠前列腺肿瘤模型中肿瘤的放射性强度较正常前列腺组织高达300%。

4.1.2 肿瘤的血管靶向性诊断

肿瘤血管由于表达独特的分子标志物,使其不论在结构上还是功能上都与正常组织的血管不同,另外,大量资料显示,来自不同组织、不同类型的肿瘤,甚至在单一肿瘤中,血管的结构和功能都存在很大的异质性,因此越来越多的显像剂指向了肿瘤新生血管内皮细胞。

Weller等^[4]将肿瘤血管内皮细胞特异性三肽RRL(Arg-Arg-Leu)与超声对比微气囊(ultrasound contrast microbubbles)相连,进行肿瘤血管生成的超声成像;在皮下携带克隆C或PC-3肿瘤的小鼠静脉注射RRL-微气囊后,超声成像显示三肽RRL在两种肿瘤中的造影增强显著,而对照心肌中仅有轻微的造影增强,并且肿瘤的声波强度明显高于心脏。另外,Valadon等^[5]利用构建的噬菌粒抗体文库筛选小鼠肺血管内皮细胞,得到6个与抗体TX3.83高度同源的序列,为了消除静脉注射噬菌体后被肝脏吸收,研究小组将抗体TX3.83的scFv与鼠的Fc γ 1段融合成scFv-Fc融合蛋白并标记上放射性核素,从小鼠尾静脉注射后通过 γ 闪烁平面显像很直观地看到scFv-Fc融合蛋白靶向定位于鼠的肺脏。

4.1.3 肿瘤的时期特异性 (stage-specific) 监视

用噬菌体体内展示技术可筛选肿瘤血管的时期特异性血管内皮细胞表面标志物。Hoffman 等^[6]利用含 7 个氨基酸序列的环肽文库筛选诱导发生表皮肿瘤的 K14-HPV16 转基因小鼠, 分离得到 3 个多肽, 其中, 含 9 个氨基酸序列的 CSRPRRSEC 仅识别发育异常的皮肤组织的新生血管系统, 含 5 个氨基酸序列的 CGKRK 和 CDTRL 则优先结合肿瘤的新生血管系统, 仅少量结合于癌变前的异常皮肤组织新生血管, 不结合正常皮肤和其他组织, 因此得出在皮肤肿瘤发生过程中, 恶化前和恶性肿瘤的新生血管之间存在差异的结论。在另一个类似的实验中, Joyce 等^[7]证明了在发生胰腺癌的 RIP-Tag2 转基因小鼠模型中, 肿瘤血管存在不同的特异性分子标志物, 并通过筛选暴露于脉管系统的细胞, 尤其是内皮细胞、周皮细胞和肿瘤细胞, 得到分别结合于正常血管、恶化前血管和肿瘤血管的特异性多肽, 说明在肿瘤的发生过程中血管也处于不同的特异阶段。噬菌体体内筛选技术能鉴别时期特异性肿瘤和寻找器官特异性血管编码 (zip codes), 为将来研究肿瘤新生血管进程的发病机制打下了基础, 并为肿瘤的放射性核素显像尤其是早期诊断和定位, 以及化学治疗药物的输送提供靶向性分子。

4.2 肿瘤的免疫治疗

4.2.1 scFv 的抗肿瘤作用

目前, scFv 依赖其分子质量小以及更强的肿瘤穿透性、迅速的血浆清除率而成为新一代抗肿瘤分子。scFv 的典型抗肿瘤方式是先通过 scFv 噬菌体文库筛选到肿瘤细胞表面特异性分子, 然后将获得的肿瘤特异性 scFv 耦联药物或毒素发挥靶向肿瘤的杀伤作用。例如, 将抗细胞分化抗原 CD30 的 scFv 与假单胞菌外毒素融合治疗霍奇金淋巴瘤, 在小鼠模型上观察到很好的抗肿瘤疗效^[8]。

4.2.2 双特异抗体的抗肿瘤作用

另一种用于肿瘤免疫治疗的抗体是具有双重特异性的抗体, 即两个针对不同靶分子的 scFv 通过亮氨酸拉链或可变接头连接形成的二聚体。该抗体具有理想的结构、较小的毒性, 并降低了抗体纯化和亲和力成熟的要求; 能迅速从循环中被清除, 因此其肿瘤/血液比率远远超过单克隆抗体。实验证明, 双特异性抗体能在裸鼠体内表达相关抗原的肿

瘤异种移植物中持续存在^[9]。

双特异抗体的抗肿瘤作用可以通过招募淋巴细胞或其他细胞毒性细胞对肿瘤细胞进行杀伤。Asano 等^[10]将筛选到的抗表皮生长因子受体和抗细胞分化抗原 CD3 的双特异性抗体 Ex3 通过嫁接的方式人源化成 hEx3, 观察到其与 T 淋巴细胞激活的杀伤细胞和白细胞介素 2 连接后能延长结肠癌裸鼠的生存期。Adams 等^[9]通过将双特异抗体耦联放射性核素对肿瘤进行放射免疫导向治疗: 将发射 β 射线的 ⁹⁰Y (半衰期为 64 h) 与特异性靶向人类肿瘤相关抗原 HER2/neu 的双特异抗体 C6.5K-A' 耦联, 观察到该化合物在 MDA-361/DYT2 人类乳腺癌异种移植裸鼠模型中具有持续的抗肿瘤生长作用。

4.3 肿瘤脉管系统靶向性治疗

4.3.1 肿瘤血管的靶向治疗

抗肿瘤血管生成治疗因其具有独特的优势而受到人们的关注: ①即使仅破坏一段微血管壁的少量血管内皮的情况下, 也能使依赖它的大量肿瘤细胞坏死; ②与肿瘤细胞相比, 肿瘤脉管系统的细胞实质上是正常的细胞, 而且具有更稳定的遗传性, 因此对药物产生获得性耐药的可能性也较小^[11]。

NGR (Asn-Gly-Arg) 是通过体内筛选鉴定的、与小鼠和人类肿瘤血管内皮细胞氨基肽酶 N 选择性结合的三肽, Cumis 等^[12]将此三肽与人肿瘤坏死因子融合, 观察到其抗肿瘤活性高于单独使用肿瘤坏死因子。

4.3.2 淋巴系统为靶点的肿瘤治疗

已经证实实体中存在大量的淋巴系统, 并带有特异性的分子标志, 且肿瘤的淋巴组织可以通过表达淋巴管生成、生长因子而促进肿瘤的转移, 因此肿瘤的淋巴系统也有可能成为抗肿瘤的靶点。Laakkonen 等^[13]利用噬菌体多肽文库筛选 MDA-MB-435 小鼠乳腺癌异种移植物, 分离得到结合于肿瘤淋巴管内皮细胞的、含 9 个氨基酸序列的环形多肽 LyP-1, 观察到荧光素标记的 LyP-1 积聚于肿瘤淋巴管内皮细胞胞核以及肿瘤细胞胞核, 并观察到它的抗肿瘤活性。

4.4 基因治疗

有效的基因治疗基于载体能在体内将诊断基因特异性地输送至靶分子而使非特异性吸收毒性降至最小。与动物病毒相比, 丝状噬菌体缺失了感染动

物细胞的特性,使噬菌体在寻靶的过程中不需要再消除它天然的趋向性,而且即使产生了非特异性内摄,噬菌体蛋白和复制的噬菌体产物也不太可能出现在动物细胞中;其次,细菌培养悬液中能够得到高滴度的噬菌体载体并进行大规模的纯化,因此获得噬菌体载体相对而言比较简便和经济^[14],这些优点使得噬菌体载体在基因治疗中越来越受到人们的关注。

5 噬菌体展示技术的应用前景

考虑到人类肿瘤异种移植模型中多肽的靶向作用在肿瘤患者身上可能并不存在,2002年美国食品与药品管理局对噬菌体展示技术能否应用于人类做了临床前研究,实验证明,连续的体内筛选,小鼠对噬菌体的耐受性很好,因此批准将噬菌体展示技术应用于人体的试验^[15]。

Arap 等^[16]首先利用噬菌体展示技术对1例肿瘤患者进行筛选,并分析了来自该患者不同器官的近50 000个三肽模序,结果显示这些三肽对不同器官的血管靶向性是非随机的。随后,Krag 等^[17]进行了类似的试验,他们分别用噬菌体随机多肽文库和 scFv 文库对8例处于癌症IV期的肿瘤患者进行筛选。这是第一次在肿瘤患者体内进行连续的噬菌体筛选、鉴定肿瘤靶向性配体的研究,虽然没用鉴别出肿瘤特异性多肽物质,却证明了噬菌体展示技术在肿瘤患者体内进行肿瘤特异性配体筛选的可行性,并为将来这种技术进一步应用于肿瘤患者打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Hassan ME, Highsmith EW. Phage display technology: clinical applications and recent innovations[J]. *Clin Biochem*, 2002, 35(6): 425-445.
- [2] Mori T. Cancerspecific ligands identified from screening of peptide-display libraries[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(19): 2335-2343.
- [3] Zitzmann S, Mier W, Schad A, et al. A new prostate carcinoma binding peptide (DUP-1) for tumor imaging and therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 139-146.
- [4] Weller EG, Wong MK, Modzelewski RA, et al. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2): 533-539.
- [5] Valadon P, Garnett JD, Testa JE, et al. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(2): 407-412.
- [6] Hoffman JA, Giraudo E, Singh M, et al. Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 383-391.
- [7] Joyce JA, Laakkonen P, Bernasconi M, et al. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 393-403.
- [8] Barth S, Huhn M, Matthey B, et al. Ki-4 (scFv)-ETA, a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice[J]. *Blood*, 2000, 95(12): 3909-3914.
- [9] Adams GP, Shaller CC, Dadachova E, et al. A single treatment of Yttrium-90-labeled CHX-A⁶⁶-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17): 6200-6206.
- [10] Asano R, Sone Y, Makabe K, et al. Humanization of the bispecific epidermal growth factor receptor x CD3 diabody and its efficacy as a potential clinical reagent[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 4036-4042.
- [11] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10): 727-739.
- [12] Curmis F, Sacchi A, Borgna L, et al. Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13)[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1185-1190.
- [13] Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, et al. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9381-9386.
- [14] Larocca D, Baird A. Receptor-mediated gene transfer by phage-display vectors: applications in functional genomics and gene therapy[J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(15): 793-801.
- [15] Krag DN, Fulle SP, Oligino L, et al. Phage-displayed random peptide libraries in mice: toxicity after serial panning[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 50(4): 325-332.
- [16] Arap W, Kdonin MG, Trepel M, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 121-127.
- [17] Krag DN, Shukla GS, Shen GP, et al. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7724-7733.

(收稿日期: 2007-07-16)