

# 用于筛选人工结合蛋白的骨架蛋白

袁丽\* 戴和平

(中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072)

**摘要** 抗体作为最著名的天然结合蛋白,因其具有与抗原特异结合的特性,近 100 多年以来无论在生物技术领域,还是在疾病的诊断及治疗方面,都发挥着广泛而重要的作用。但是抗体自身固有的局限性也在很大程度上限制了它的应用,而人工结合蛋白既具有抗体的特点,又兼具更多优势:分子更小;稳定性更高;能在大肠杆菌中高产量、高可溶性表达;易于修饰;能够达到高亲和力和高特异性;并且与抗体没有知识产权的冲突,因此被称为理想的“新一代抗体”。人工结合蛋白是从基因改造构建而成的骨架蛋白库中针对特定的靶分子筛选而得的。从骨架蛋白的概念和设计,骨架蛋白的分类,应用骨架蛋白筛选人工结合蛋白的技术以及人工结合蛋白的应用和前景等方面进行总结概述。

**关键词** 抗体 人工结合蛋白 骨架蛋白 噬菌体展示技术

**中图分类号** Q511

蛋白质间的相互结合作用一直以来都是研究蛋白质结构和功能最强有力的手段之一。抗体与抗原的结合是最为典型的蛋白质相互作用的范例,因此抗体作为一种有效的工具在生物技术以及疾病的诊断和治疗等领域中得到了广泛的应用<sup>[1]</sup>。抗体的制备也从多抗血清发展到杂交瘤方法制备的单克隆抗体,再发展为应用基因工程技术制备的重组抗体片段,如:scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, minibody 等。随着抗体越来越深入而广泛的应用,它的某些固有的局限性也逐渐显露出来。越来越多的抗体三级结构的确定以及抗体抗原结合分子机理的揭示,激发了骨架蛋白(scaffold protein)概念的提出<sup>[2-4]</sup>。骨架蛋白在近二十多年的开发和应用中凸显了其独特的优势和应用前景,它不仅具有抗体的特性,而且还具备很多超越抗体的优势<sup>[5, 6]</sup>。因此也被称为“新一代抗体”<sup>[7]</sup>。骨架蛋白的研究主要集中在美国 and 德国,瑞士,瑞典,挪威等欧洲国家,在俄罗斯和澳大利亚也有少数研究小组从事该方面的研究。我国军事医学科学院在国内率先开始了骨架蛋白的开发和研究工作,其中杜建芳等<sup>[8]</sup>尝试用硫氧还蛋白(Trx)作为骨架,在其上的突环区插入一条随机化的 10 肽库片段构

建了骨架蛋白多肽库,为后续特异性多肽的筛选奠定了基础。赵安等<sup>[9]</sup>将昆虫防御素 A 进行了分子改造,使其成功地展示在噬菌体表面,从而使其具有进一步开发为骨架蛋白的潜力。

## 1 骨架蛋白的概念和设计

骨架蛋白的概念和设计来源于抗体的特性及其局限性。抗体作为一种天然的抗原结合蛋白,在生物科学研究领域及医学领域都做出了突出的贡献<sup>[10]</sup>。抗体的制备最初是用抗原免疫实验动物而产生多克隆抗血清。但是多抗血清存在着内含物复杂和与抗原结合效率低等不足。而后 Kohler<sup>[11]</sup>在 1975 年建立的杂交瘤技术制备单克隆抗体的方法将抗体的应用推上了一个新台阶。1985 年 Smith<sup>[12]</sup>首先建立的噬菌体展示技术为重组抗体的筛选提供了技术支持。1990 年重组抗体库首次被 McCafferty 等<sup>[13]</sup>构建。随后各种利用生物工程技术构建的重组抗体相继被开发出来,其中应用最广泛的有 scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, minibody 以及基于这些重组抗体上的人源化嵌合抗体。

随着抗体越来越广泛和深入的应用,它本身某些固有的局限性也逐渐显露出来,主要表现在以下几个方面:1)抗体分子太大(约 150 kDa),血液和组织渗透

收稿日期:2012-09-12 修回日期:2012-11-17

\* 电子信箱:liyuan@ihb.ac.cn

性较差,因此抗体类药物的疗效被大大削减;2)抗体分子内部具有几对固有的二硫键,因此其稳定性在很大程度上依赖于这些二硫键,在还原性环境下极不稳定,从而限制了抗体在细胞内的应用(因为胞内通常都是还原性环境)。3)抗体与抗原结合的部位位于轻链和重链可变区上的 CDR(互补决定区),抗体的 Fc 片段通常会引起非目的性的结合,从而影响抗体的特异性。4)抗体分子不稳定,在常温及恶劣的条件下很容易失活;5)用杂交瘤技术制备的单克隆抗体来源于小鼠腹水,因此产量有限,成本较高。基因工程抗体虽然可以在大肠杆菌中制备,因其具有二硫键,必须分泌表达才能保证正确折叠,因此产量也受到一定限制。这些局限性激发研究者们去寻找一种新型的可以替代抗体的蛋白质分子。

抗体与抗原结合的关键部位 CDRs 也被称为高变区(图 1b),特指氨基酸序列高频率变化区域,抗体轻链和重链的可变区上其它相对保守的氨基酸则起到一个骨架的作用(图 1a),将 6 个 CDRs 以特定的分布呈现于抗体分子的表面,使之能够接触到抗原分子,当它们相互结合的部位构象互补时,就能实现高亲和力的结合。骨架蛋白的概念正是源于抗体的 CDRs 结构:它描述的是一种能够耐受多个氨基酸的插入,缺失或者替换,而保持其折叠和三级结构不变的蛋白质骨架<sup>[5]</sup>(图 1c,d,e)。一般来讲,获取能与靶分子结合的人工结合蛋白的程序是:首先选取一种高稳定性,高可溶性,约 10~20kDa 的蛋白质作为骨架蛋白,在保证骨架蛋白的主体结构不变的基础上,运用基因工程技术对 8~24 个暴露于分子表面的氨基酸位点进行随机化突变,在分子表面形成一个可变的蛋白结合区域,从而构建骨架蛋白库。然后通过表面展示技术从该蛋白库中筛选得到能与靶分子特异性结合的克隆。这个过程从某种程度上在体外模拟了人体免疫反应<sup>[5]</sup>,不同的是结果得到的人工结合蛋白,而非抗体。在骨架蛋白中,随机化产生的结合位点模拟了抗体分子中的 CDRs 区域,而骨架蛋白中其它蛋白所构成的骨架作用则与抗体中保守氨基酸骨架的作用类似。理论上,从骨架蛋白文库中能筛选到与任何靶分子相互结合的蛋白克隆。

基于骨架蛋白的人工结合蛋白与抗体相比,具有很多优势:1)蛋白稳定性高,能耐受高温和高浓度的变性剂。例如基于  $\gamma$ B-crystallin 的骨架蛋白能够耐受 8mol/L 尿素,在 pH 值 1~9 的范围内保持蛋白结构不

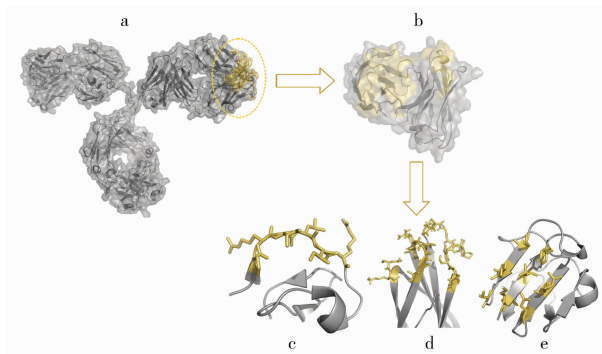


图 1 抗体及其 CDR 与框架蛋白上结合位点的三级结构图

Fig. 1 Tertiary structure of antibody, its CDR and binding patches of protein scaffolds

The amino acids in hyper variable region of antibody and in randomization binding patch in scaffold proteins are in yellow; the amino acids contributed to protein framework are in grey. The concept of scaffold protein was inspired by the tertiary structure of CDR (b, PDB code: 1IGT) in antibody (a, PDB code: 1IGT). In scaffold proteins, different mechanisms of target interaction are possible via a single-loop presented on a rigid protein framework (c, PDB code: 1H9H), via multiple loops imitating the antibodies CDR (d, PDB code: 1FNA) or via surface-exposed side chains of secondary structure elements (e, PDB code: 2JDF). Graphical representations were prepared using the software "Pymol" (<http://www.pymol.org>) and coordinate sets 1IGT, 1H9H, 1FNA and 2JDF as deposited in the Protein Data Bank

变,并且具有高温耐受性,实验表明它在 7mol/L 尿素存在的条件下,温度升高至 75℃ 仍保持蛋白活性<sup>[14]</sup>。2)蛋白分子大小通常在 10~20kDa,比 scFv 还小,这就使之具有更高的组织穿透性,作为靶向药物能更快到达病灶部位,并且在肿瘤成像时像素更高,背景更低。3)蛋白可溶性高,通常能在大肠杆菌中高产量高可溶性表达,使得该类蛋白质生产成本大大降低。4)骨架蛋白结构稳定,更易于做各种修饰。5)已有多个研究小组成功筛选到与靶蛋白高亲和力,高特异性结合的人工结合蛋白。其中 Hackel 等<sup>[15]</sup>从以 fibronectin 为骨架蛋白设计的蛋白文库中获得了一个能与溶菌酶(lysozyme)特异性结合的人工结合蛋白,亲和力高达 1pM。6)大多数人工结合蛋白不含二硫键,能在胞内环境中维持结构稳定,因此可以应用在胞内靶向治疗上并已有成功的范例<sup>[16-17]</sup>,这是抗体所无法实现的。7)抗体以及与抗体相关的各类产品都受到严格的知识产权保护,而骨架蛋白不属于抗体,因此新开发的骨架

蛋白以及筛选得到的人工结合蛋白与抗体没有专利冲突,使之更具商业价值。自 2000 年人工结合蛋白展现出其巨大的潜在商业价值以来,仅在欧洲就相继有近 20 家致力于开发骨架蛋白的生物科技公司成立<sup>[5]</sup>。表 1 对人工结合蛋白与单克隆抗体和基因工程抗体在基本性质上做了较为详细的比较。

表 1 抗体与人工结合蛋白的性质比较

Table 1 Characteristics of antibodies and artificial binding proteins

性质	单克隆抗体 (mAbs)	基因工程抗体 (Fab/scFv)	基于骨架蛋白的 人工结合蛋白
大小(kDa)	150	50/25	10-20 <sup>a</sup>
多肽链	4	2/1	1
E. coli 生产	-	+/-	+
高稳定性	+	-	+
易于修饰	+/-	+	+
高亲合力	+	+	+
高特异性	+/-	+	+
人源化	+/-	+/-	+
独立知识产权	-	-	+

<sup>a</sup> Size of the artificial binding protein depends on the scexfold chosen, normally is about 10 ~ 20kDa

2 骨架蛋白的分类

骨架蛋白上随机化形成的结合区域的大小及形态等特征直接决定了能否在后续筛选过程中得到高亲合力的克隆。根据骨架蛋白上结合区域类型的不同可大致将目前已开发的骨架蛋白分为三类。下面将逐一介绍各类的特征以及本类中成功应用的范例。

2.1 具有 single-loop 结合区域的骨架蛋白

具有 single-loop 结合区域的骨架蛋白是骨架蛋白最早期的应用策略,即将一个具有稳定的刚性结构的蛋白质作为载体,运用碱基替换的方法把一段本身具有已知结合活性的多肽嫁接到蛋白载体上(图 1c),从而使该人工结合蛋白既具有多肽的结合活性,又具有骨架蛋白载体的稳定性<sup>[18-19]</sup>。

例如美国的 Dyax 公司利用 Kunitz 蛋白作为骨架蛋白,在其上嫁接了丝氨酸水解酶的抑制多肽,从而使之变为更加稳定的丝氨酸蛋白酶抑制剂。该公司将两个基于该骨架蛋白的蛋白酶抑制剂 DX-88 和 DX-890 投入到二期临床中,分别作为血管性水肿(angioedema)<sup>[20]</sup>和囊性纤维化(cystic fibrosis)<sup>[21]</sup>这两种疾病的靶向药物取得了良好的疗效。

德国的 Selecore 公司以只含有大约 30 个氨基酸的

Squash-type 蛋白酶抑制剂为基础开发的骨架蛋白 Microbodies 是目前最小的骨架蛋白之一,该骨架蛋白上的结合位点是选用其上具有蛋白酶抑制功能的一段多肽进行随机化突变而形成的<sup>[22-24]</sup>。在 Micrododies 的筛选中,细胞表面展示和 mRNA 展示等新兴的展示技术被成功构建和应用。

2.2 具有 multiple loops 结合区域的骨架蛋白

另一种位于骨架蛋白上的结合区域是由多个在序列上不连续的多肽 loop 区在蛋白表面形成的一个连续的结合区域,这类结合区域与抗体可变区上的高变 loop 区形成的抗体 CDRs 最类似,可以被称为抗体结合位点的模拟体(图 1d)。

例如基于 lipocalins 设计出来的骨架蛋白 Anticalins 是一个由八条  $\beta$  折叠环绕形成的桶状结构,约有 180 个氨基酸。在该桶状结构的顶端开放区域选择 4 条连接不同  $\beta$  折叠的 loop 区进行定点随机突变从而构成一个结合位点<sup>[25-27]</sup>。从 Anticalins 骨架蛋白文库中运用噬菌体展示技术和核糖体展示技术都筛选到了高特异性高亲合力的结合蛋白<sup>[27-30]</sup>。德国的 Pieris Proteolab 公司将其称为“Anticalin technology”,并进一步发展,用以治疗癌症及其它重大疾病的靶向药物的研发工作,取得了良好进展<sup>[31-33]</sup>。

CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4)部分属于免疫球蛋白家族,并与抗体的 VH 结构域具有类似的结构特征。澳大利亚的 Evogenix 公司将该蛋白开发成骨架蛋白并命名为 Evibody。他们成功地运用噬菌体展示技术筛选到了能与 human  $\alpha v \beta 3$  integrin 特异性结合的蛋白<sup>[34]</sup>。运用核糖体展示技术也成功地从该骨架蛋白文库中筛选到了能与 lysozyme 特异性结合的蛋白<sup>[35]</sup>。

Fibronectin type III domain 是由 94 个氨基酸组成的天然的反向平行  $\beta$  折叠蛋白。对于该蛋白分子 N 端的 3 个 loop 进行的随机化突变实验表明该蛋白分子非常适合作为骨架蛋白的模板<sup>[36]</sup>。运用噬菌体展示技术<sup>[36]</sup>和酵母双杂交技术<sup>[16]</sup>分别从该骨架蛋白文库中分离出能与 ubiquitin 和 human estrogen receptor  $\alpha$  特异性结合的人工结合蛋白。美国的 Compound Therapeutics 公司运用该骨架蛋白(以前被称为 Monobody,现叫 AdNectin)成功开发了新型的肿瘤治疗靶向药物<sup>[10]</sup>。

2.3 具有位于蛋白二级结构上亲水性氨基酸构成的结合区域的骨架蛋白

还有一种骨架蛋白的结合区域不同于前两种 loop

区介导的结合区域,其部分或全部由骨架蛋白上的 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 折叠的刚性二级结构上进行随机突变而产生的(图1e)。这类结合区域与受体分子结合的机理通常是类似钥匙和锁(key-to-lock)模式的结合,因此其在亲和力(具有较低的结合熵值)和特异性(具有特有的构像限制)方面都独具优势<sup>[37]</sup>。

例如以 Ankyrin repeat protein 为基础开发的骨架蛋白 DARPins<sup>[38]</sup>,是由数个 Ankyrin 单元组成,每个单元是由 33 个氨基酸组成的含有一个 $\beta$ 转角和两个反向平行的 $\alpha$ 螺旋的结构域。该骨架蛋白可根据需要选择不同数量的重复结构域<sup>[39-40]</sup>。瑞士的 Molecules Partners 公司近年来一直致力于设计和开发以 DARPins 为骨架蛋白的各种用于诊断和治疗的蛋白分子类药物<sup>[38, 41-43]</sup>。

被称为 Affibodies 的人工结合蛋白是以一种 IgG 结合蛋白 Protein A(来源于 *Staphylococcus aureus*)上的由 58 个氨基酸组成的 Z domain 为骨架蛋白构建的<sup>[44-45]</sup>。Affibodies 由 3 条 $\alpha$ 螺旋构成,对其中两条 $\alpha$ 螺旋上最多 13 个暴露于分子表面亲水性的氨基酸进行随机化突变而不改变蛋白整体结构而构建成 Affibody 文库<sup>[46]</sup>。Affibodies 是较早开发的骨架蛋白之一,而且由于其本身具有极高的稳定性,因此在作为靶向药物方面极具潜力,已发表相关的研究报道两百余篇。

Affilins 描述的是基于在稳定蛋白上的 $\beta$ 折叠区域选择随机化位点进行突变而形成的人工结合蛋白。已有基于 hgBC (human gamma B crystallin)<sup>[14, 47]</sup>和 Ubiquitin<sup>[48]</sup>的骨架结构文库构建成功并从中筛选到与蛋白质、甾醇类等多种生物分子特异性相互结合的蛋白。德国的 Scil Proteins 公司正在运用核糖体展示技术和 TAT 噬菌体展示技术对 TNF $\alpha$ 、VEGF 等多种肿瘤相关蛋白特异性结合的人工结合蛋白进行筛选和后续研究,以期开发新型的肿瘤治疗靶向药物。

### 3 应用骨架蛋白筛选人工结合蛋白的技术

筛选与目标分子结合的人工结合蛋白的技术主要是各种表面展示技术,噬菌体展示技术和核糖体展示技术是运用得最为广泛的展示技术,mRNA 展示技术,细胞表面展示技术以及酵母表面展示技术等在该领域也都有成功的应用。这些表面展示技术最大的优点就是将蛋白的基因型和表现型通过某种方式有机的结合起来,这样在筛选到某一能与靶分子特异性结合的蛋白的同时,也就得到了编码该蛋白的基因。表面展示

技术的建立和发展为生物工程类蛋白的设计和筛选提供了强有力的技术支持。

传统的丝状噬菌体展示系统最初是为展示多肽库和重组抗体库设计的,用于与外源蛋白融合表达并使之展示在噬菌体表面的噬菌体衣壳蛋白都是先在大肠杆菌细胞内合成,然后通过 SEC 途径(secretory pathway,分泌型途径)从胞内经过细胞内膜被转运到细胞周质腔中进行折叠,最后穿过细胞外膜和细胞壁的同时组装在噬菌体表面。丝状噬菌体的 g3p 衣壳蛋白是应用得最广泛的展示融合蛋白。由于重组抗体本身是分泌型蛋白,SEC 型转膜途径模拟了蛋白分泌的过程,抗体内含的二硫键在周质腔氧化环境中得以形成,因此丝状噬菌体展示系统中的 SEC 转膜途径对于抗体的展示是一个完美的设计。但是对于骨架蛋白来说,通常高稳定性,快速折叠,在胞内能以高可溶性表达等作为骨架蛋白的选取是首要考虑的因素,而 SEC 途径只能转运未折叠的多肽,而不能展示已折叠好的蛋白质分子,因此传统的丝状噬菌体展示系统对骨架蛋白的展示并不适用。尽管利用丝状噬菌体展示系统也筛选出了能与靶分子结合的人工结合蛋白,如 Affilins<sup>[14]</sup>,但筛选到的 Affilins 蛋白在稳定性和可溶性方面都远远低于野生型的骨架蛋白 $\gamma$ B-crystallin,推测由于 SEC 转膜途径只能转运未折叠多肽,因此只有那些由于随机化突变而使折叠变慢的克隆被转运到膜外,继而展示在噬菌体表面以供筛选,而那些维持骨架蛋白本身结构和快速折叠特性的克隆则失去了被展示的机会,而没有被筛选到。到目前为止,被发现的大肠杆菌转膜途径有 3 种:SEC 途径,TAT 途径(twin-arginine translocation pathway,双精氨酸转运途径)和 SRP 途径(signal recognition particle pathway,信号识别颗粒途径)。其中,SEC 途径将未折叠多肽转运到周质腔进行折叠,适用于分泌型蛋白<sup>[49]</sup>;TAT 途径是一种双精氨酸介导的转膜途径,它只转运已折叠好的蛋白质分子,适用于快速折叠蛋白<sup>[50]</sup>;SRP 途径也是一种转运未折叠多肽链的转运途径,但有别于 SEC 途径,它是一种共转运途径,即多肽链在核糖体上边合成边被转运,在多肽链合成完成时也就完成了转膜过程,该途径通常用于膜蛋白的转运,也适用于某些快速折叠蛋白<sup>[51]</sup>。为了使骨架蛋白库能够高效地展示在噬菌体表面,选择合适的转膜途径是至关重要的。目前已有几个小组成功构建了 SRP 噬菌体展示系统<sup>[42, 52-53]</sup>。在该展示系统中,只需将传统丝状噬菌体展示系统中的 SEC 途径信

号肽(signal peptide)改成 SRP 途径的信号肽即可,实验结果表明 DARPIn 等几个骨架蛋白与 g3p 的融合蛋白能够一同被 SRP 途径成功转运。但是 TAT 噬菌体展示系统则并非如此简单,早期的 TAT 噬菌体展示都以失败告终,因为实验结果表明只有能被 TAT 途径转运的骨架蛋白能够成功被转运,但是一旦骨架蛋白与 g3p 融合则不能成功地被共同转运,以至于无法展示在噬菌体表面<sup>[54-55]</sup>,因此 Paschke 等<sup>[56]</sup>建立了一种较为复杂的 TAT 噬菌体展示系统:在骨架蛋白基因前选用 TAT 信号肽,而在 g3p 基因前用 SEC 信号肽,使这两个蛋白分别被 TAT 途径和 SEC 途径转运到周质腔,而后通过设计在骨架蛋白和 g3p 上的亮氨酸拉链元件 Jun 和 Fos 通过二硫键使它们联合起来,从而展示在噬菌体表面。该方法虽然成功地将骨架蛋白展示在了噬菌体表面,但是因为结构复杂,存在较多不确定因素而使展示效率和淘选效率都在一定程度上大打折扣。Speck 等<sup>[57]</sup>在 2011 年新构建的 TAT 噬菌体展示技术选用缺失了两个 N 端结构域和域间 linker 的 g3p C 端结构域与骨架蛋白融合表达,该融合蛋白能够一起成功地被 TAT 途径转运,从而将骨架蛋白成功地展示在噬菌体表面。

T7 噬菌体展示系统的应用没有丝状噬菌体展示系统广泛,但是由于 T7 噬菌体是一种快速生长的裂解型噬菌体,成熟的噬菌体颗粒是通过裂解宿主细胞的方式释放出来的,所以在 T7 噬菌体的繁殖周期中不需要蛋白质的转膜过程。因此理论上 T7 噬菌体展示系统非常适合用于展示胞内快速折叠的骨架蛋白。并且与丝状噬菌体相比,T7 噬菌体生长速度更快,噬菌斑在 3 小时内就可以长成,在感染后 1~2 小时就能完成细胞裂解,使得淘选周期缩短,一天可以进行 2~3 轮的淘选,而传统的丝状噬菌体则需要两天时间完成一轮淘选。T7 噬菌体较丝状噬菌体稳定,因此在淘选过程中能采取更剧烈的洗脱条件而不破坏噬菌体的感染活性。另有一项研究结果表明 T7 噬菌体展示的多肽库比 M13 丝状噬菌体展示的多肽库具有较低的氨基酸序列偏向性<sup>[58]</sup>,使得 T7 噬菌体展示的多肽库具有更高的丰度。Herman 等<sup>[59]</sup>在尝试用丝状噬菌体展示一种以 Trip cage motif 为骨架蛋白的文库失败后,选用 T7 噬菌体展示取得了成功。随后 Dai 等也运用 T7 噬菌体展示系统成功获得了基于绿色荧光蛋白 GFP 为骨架蛋白的人工结合蛋白<sup>[60]</sup>。作者曾在德国 Martin Luther University 生物化学与生物技术学院的“artificial binding

proteins”研究小组从事 4 年半的博士后研究工作,期间也成功地运用 T7 噬菌体展示系统,将 GPCR (guanosine-binding protein coupled receptor, G 蛋白偶联受体)家族中两个蛋白的 N 端结构域:nPTH1R (n terminal of parathyroid hormone type 1 receptor, n 端甲状旁腺激素 1 型受体)和 nPAC1R (n terminal of Pituitary Adenylate Cyclase-activating polypeptide Receptor, n 端垂体腺苷酸环化酶激活肽 1 型受体)作为靶蛋白,分别对基于骨架蛋白 hgBC (human gamma B crystalline,人  $\gamma$  B 晶状体蛋白)和 M7 蛋白构建的文库进行了筛选,结果都分别筛选到了能与靶蛋白特异性结合的阳性克隆(结果尚未发表)。这些研究都从实际应用上证实了 T7 噬菌体展示技术的确是一种适合人工结合蛋白的筛选方法。

除了噬菌体展示技术以外,核糖体展示技术也在人工结合蛋白的筛选上发挥着很大的作用。早期在噬菌体展示技术尚未能有效展示骨架蛋白时,很多筛选是由核糖体展示技术来完成的。但是由于核糖体在体外不如噬菌体稳定,其展示的蛋白容易在筛选过程中丢失,而且核糖体展示不易于操作,淘选过程中极易受到污染,因此随着噬菌体展示骨架蛋白的技术逐渐完善,该技术通常就不直接作为初步淘选的方法,而是在噬菌体展示技术淘选得到阳性克隆后,再构建二级库,用它来进行亲和力成熟的淘选,以得到高亲和力的人工结合蛋白。

#### 4 骨架蛋白的应用及发展前景

骨架蛋白概念的提出为基因工程蛋白的开发和应用带来了广阔的前景。人工结合蛋白的设计理念来源于抗体,而又优于抗体,因此它在今后的医学领域,生物技术领域以及基础研究领域都将会会有广泛的应用前景。

在医学领域,到目前为止已有超过 50 种骨架蛋白被成功地设计和开发出来。由于骨架蛋白在蛋白的选取,设计,随机化位点的选取以及筛选方法的建立等方面所需成本较高,并且人工结合蛋白作为新型诊断试剂及靶向药物,其商业利润较高,因此到目前为止,几乎所有人工结合蛋白的研究都集中在疾病的诊断治疗以及重大疾病相关蛋白的性质和功能的研究上。到 2010 年上半年,已有超过 10 种人工结合蛋白进入临床阶段,其中有 6 个已进入二期临床,令人惊喜的是这些药物均尚未表现出严重临床不良反应和机体抗药性免疫反应<sup>[61]</sup>。无论是单克隆抗体还是重组抗体都无法彻

底摆脱二硫键,因此抗体类药物在细胞内的还原性环境下极不稳定,而无法实现胞内受体的靶向治疗作用,人工结合蛋白在该领域则可突破该局限性,在胞内受体的靶向治疗方面取得了突破性的进展<sup>[16-17]</sup>。在肿瘤成像方面,人工结合蛋白以其分子小,组织渗透性强的特点使得其能快速在靶位点聚集,并能快速被机体清除,从而提高肿瘤成像的分辨率,并降低成像背景,成像效果优于抗体类蛋白<sup>[62-63]</sup>。

在一些核心生物技术领域,人工结合蛋白也做出了突出的前沿性贡献。高分辨率的蛋白质晶体结构不仅有助于理解蛋白质的功能和生物过程,而且对于理想的蛋白质药物设计也起着关键作用。但是对于一些本身柔韧性较强的蛋白如激酶类蛋白或者只具有极少的亲水基团的蛋白如膜蛋白,结晶非常困难。针对这两种情况,人工结合蛋白都能通过与目的蛋白特异性结合来锁定过于柔韧的蛋白或通过结合来增加蛋白疏水性部分从而成功地与目的蛋白进行共结晶。Affibody 和 DARPin 都有成功用于蛋白共结晶的例子<sup>[64-65]</sup>。另外,由于人工结合蛋白折叠紧密,稳定性高,能耐受广泛的 pH 阈值,高温和高浓度变性条件,因此作为亲和纯化<sup>[66-67]</sup>或者生物芯片的受体用在蛋白质纯化和检测上独具优势。Affibodies 作为一种来源于 Protein A 的人工结合蛋白,采用与 Protein A 类似的原理已成功应用到商业化免疫球蛋白的纯化过程中。鉴于人工结合蛋白耐高温,耐高浓度变性剂等方面的特点,作者认为将其应用到诸如水环境污染生物标志物的检测等方法中也必将有广阔的应用前景。

在基础研究领域,如以抗体作为二抗检测手段的实验方法,人工结合蛋白以其独特的稳定性和易修饰的特性,势必在不久的将来一定程度上取代抗体。总而言之,人工结合蛋白作为“新一代抗体”将在众多领域超越和取代抗体的应用,因此具有很大的开发价值和广阔的应用前景。

### 参考文献

- [ 1 ] Leader B, Baca Q J, Golan D E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug discovery*, 2008, 7;21-39.
- [ 2 ] Ku J, Schultz P G. Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92;6552-6556.
- [ 3 ] Lofblom J, Frejd F Y, Stahl S. Non-immunoglobulin based protein scaffolds. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22;843-848.
- [ 4 ] Nygren P A, Skerra A. Binding proteins from alternative scaffolds. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 290;3-28.
- [ 5 ] Hey T, Fiedler E, Rudolph R, et al. Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol*, 2005, 23;514-522.
- [ 6 ] Binz H K, Amstutz P, Pluckthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nature Biotechnology*, 2005, 23;1257-1268.
- [ 7 ] Gebauer M, Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13;2452-2455.
- [ 8 ] 杜建芳, 王金凤, 孙万军, 等. 以 Trx 为骨架构建可诱导表达的酵母构象型随机肽库. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30 (3);201-205.  
Du J F, Wang J F, Sun W J, et al. Construct ion of an inducible yeast random conformat ion-constrained peptide library based on Trx scaffold. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2006, 30 (3);201-205.
- [ 9 ] 赵安, 薛沿宁, 冯健男, 等. 昆虫防御素 A 的分子改造及其在噬菌体表面的展示. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26 (4);270-272.  
Zhao A, Xue Y N, Feng J N, et al. Rational design of the insect defensin A and its displaying on the surface of phage. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2002, 26 (4);270-272.
- [ 10 ] Reichert J M, Valge-Archer V E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 6;349-356.
- [ 11 ] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256;495-497.
- [ 12 ] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228;1315-1317.
- [ 13 ] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, 348;552-524.
- [ 14 ] Ebersbach H, Fiedler E, Scheuermann T, et al. Affilin-novel binding molecules based on human gamma-B-crystallin, an All beta-Sheet Protein. *J Mol Biol*, 2007, 372;172-185.
- [ 15 ] Hackel B J, Kapila A, Wittrup K D. Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling. *J Mol Biol*, 2008, 381;1238-1252.
- [ 16 ] Koide A, Abbatiello S, Rothgery L, et al. Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99;1253-1258.
- [ 17 ] Amstutz P, Binz H K, Parizek P, et al. Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed

- ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 2005, 280:24715-24722.
- [18] Roberts B L, Markland W, Ley A C, et al. Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89:2429-2433.
- [19] Dennis M S, Herzka A, Lazarus R A. Potent and selective Kunitz domain inhibitors of plasma kallikrein designed by phage display. *J Biol Chem*, 1995, 270:25411-25417.
- [20] Williams A, Baird L G. DX-88 and HAE: a developmental perspective. *Transfus Apher Sci*, 2003, 29:255-258.
- [21] Wark P A. DX-890 (Dyax). *IDrugs : the investigational drugs journal*, 2002, 5:586-589.
- [22] Baggio R, Burgstaller P, Hale S P, et al. Identification of epitope-like consensus motifs using mRNA display. *J Mol Recognit*, 2002, 15:126-134.
- [23] Hilpert K, Wessner H, Schneider-Mergener J, et al. Design and characterization of a hybrid miniprotein that specifically inhibits porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem*, 2003, 278:24986-24993.
- [24] Christmann A, Walter K, Wentzel A, et al. The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for Escherichia coli cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Engineering*, 1999, 12:797-806.
- [25] Skerra A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J*, 2008, 275:2677-2683.
- [26] Gebauer M, Skerra A. Anticalins small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol*, 2012, 503:157-188.
- [27] Hohlbaum A M, Skerra A. Anticalins: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2007, 3:491-501.
- [28] Liu J, Ning B, Liu M, et al. Construction of ribosome display library based on lipocalin scaffold and screening anticalins with specificity for estradiol. *The Analyst*, 2012, 137:2470-2479.
- [29] Mercader J V, Skerra A. Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Anal Biochem*, 2002, 308:269-277.
- [30] Schlehuber S, Skerra A. Anticalins as an alternative to antibody technology. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2005, 5:1453-1462.
- [31] Schonfeld D, Matschiner G, Chatwell L, et al. An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106:8198-8203.
- [32] Kim H J, Eichinger A, Skerra A. High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc*, 2009, 131:3565-3576.
- [33] Schlehuber S, Skerra A. Anticalins in drug development. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics. Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 2005, 19:279-288.
- [34] Hufton S E, van Neer N, van den Beuken T, et al. Development and application of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 as a protein scaffold for the generation of novel binding ligands. *FEBS letters*, 2000, 475:225-231.
- [35] Irving R A, Coia G, Roberts A, et al. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 248:31-45.
- [36] Koide A, Bailey C W, Huang X, et al. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol*, 1998, 284:1141-1151.
- [37] Binz H K, Amstutz P, Kohl A, et al. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nature Biotechnology*, 2004, 22:575-582.
- [38] Tamaskovic R, Simon M, Stefan N, et al. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy. *Methods Enzymol*, 2012, 503:101-134.
- [39] Binz H K, Stumpp M T, Forrer P, et al. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol*, 2003, 332:489-503.
- [40] Boersma Y L, Pluckthun A. DARPs and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22:849-857.
- [41] Seeger M A, Mittal A, Velamakanni S, et al. Tuning the drug efflux activity of an ABC transporter in vivo by *in vitro* selected DARPin binders. *PLoS One*, 2012, 7:e37845.
- [42] Steiner D, Forrer P, Pluckthun A. Efficient selection of DARPs with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol*, 2008, 382:1211-1227.
- [43] Stumpp M T, Binz H K, Amstutz P. DARPs: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 2008, 13:695-701.
- [44] Nord K, Nilsson J, Nilsson B, et al. A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Protein Engineering*, 1995, 8:601-608.
- [45] Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, et al. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nature Biotechnology*, 1997, 15:772-777.
- [46] Wahlberg E, Lendel C, Helgstrand M, et al. An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding.



- Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100:3185-190.
- [47] Mirecka E A, Hey T, Fiedler U, et al. Affilin molecules selected against the human papillomavirus E7 protein inhibit the proliferation of target cells. *J Mol Biol*, 2009, 390:710-721.
- [48] Hoffmann A, Kovermann M, Lilie H, et al. New binding mode to TNF- $\alpha$  revealed by ubiquitin-based artificial binding protein. *PLoS One*, 2012, 7:e31298.
- [49] Nilsson B, Berman-Marks C, Kuntz I D, et al. Secretion incompetence of bovine pancreatic trypsin inhibitor expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1991, 266:2970-2977.
- [50] Teter S A, Klionsky D J. How to get a folded protein across a membrane. *Trends in Cell Biology*, 1999, 9:428-431.
- [51] Valent Q A. Signal recognition particle mediated protein targeting in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 79:17-31.
- [52] Nangola S, Minard P, Tayapiwatana C. Appraisal of translocation pathways for displaying ankyrin repeat protein on phage particles. *Protein Expression and Purification*, 2010, 74:156-161.
- [53] Steiner D, Forrer P, Stumpp M T, et al. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nature Biotechnology*, 2006, 24:823-831.
- [54] Droge M J, Boersma Y L, Braun P G, et al. Phage display of an intracellular carboxylesterase of *Bacillus subtilis*: comparison of Sec and Tat pathway export capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:4589-4595.
- [55] Velappan N, Fisher H E, Pesavento E, et al. A comprehensive analysis of filamentous phage display vectors for cytoplasmic proteins: an analysis with different fluorescent proteins. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38:e22.
- [56] Paschke M, Hohne W. A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. *Gene*, 2005, 350:79-88.
- [57] Speck J, Arndt K M, Muller K M. Efficient phage display of intracellularly folded proteins mediated by the TAT pathway. *Protein Eng Des Sel*, 2011, 24:473-484.
- [58] Krumpe L R, Atkinson A J, Smythers G W, et al. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics*, 2006, 6:4210-4222.
- [59] Herman R E, Badders D, Fuller M, et al. The Trp cage motif as a scaffold for the display of a randomized peptide library on bacteriophage T7. *J Biol Chem*, 2007, 282:9813-9824.
- [60] Dai M, Temirov J, Pesavento E, et al. Using T7 phage display to select GFP-based binders. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21:413-424.
- [61] Beck A, Wurch T, Bailly C, et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10:345-352.
- [62] Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14:2999-3019.
- [63] Miao Z, Levi J, Cheng Z. Protein scaffold-based molecular probes for cancer molecular imaging. *Amino Acids*, 2011, 41:1037-1047.
- [64] Sennhauser G, Grutter M G. Chaperone-assisted crystallography with DARPins. *Structure*, 2008, 16:1443-1453.
- [65] Huber T, Steiner D, Rothlisberger D, et al. In vitro selection and characterization of DARPins and Fab fragments for the co-crystallization of membrane proteins: The Na<sup>+</sup>-citrate symporter CitS as an example. *J Struct Biol*, 2007, 159:206-221.
- [66] Nord K, Gunneriusson E, Uhlen M, et al. Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80:45-54.
- [67] Reina J, Lacroix E, Hobson S D, et al. Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences. *Nature Structural Biology*, 2002, 9:621-627.

## Overview of Scaffold Protein Used for Selection of Artificial Binding Proteins

YUAN Li   DAI He-ping

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract** As the most well-known native binding proteins, antibodies with binding ability to antigen are extensively used in biotechnological and medical applications for over one hundred years. However, the intrinsic limitations of antibodies restrict its applications in many fields. Artificial binding proteins not only have the



properties of antibodies, but also are possess of more advantages: smaller size, higher stability, *E. Coli* production with high throughput and high solubility, ease of modification, high affinity and high specificity, no IP conflict with antibody, therefore it was also called as ideal “the next generational antibody”. Artificial binding proteins were selected from protein scaffolds library which was constructed by gene engineering based on stable protein scaffolds. This review will focus on following points: the concept and design of protein scaffold, classify of protein scaffolds, screening technologies of artificial binding proteins based on protein scaffold and application and development of artificial binding proteins.

**Key words** Antibody Artificial binding protein Scaffold protein Phage display

### 姜老师信箱

蛋白质研讨班学员问:

姜老师,您好!我是第15期蛋白质分离纯化技术研讨班的学员,目前用渗透压冲击法提取细菌胞内酶,在优化条件时碰到了一些问题,实验步骤和部分结果请见附件(略)。希望得到您的回复,谢谢!

姜老师答:

你好!很高兴看到你发来的实验报告,但你没有完全按照我课程上讲的做:第一,不知你为何选择中性的pH,而不是我介绍的pH9;第二,加入高渗液后会有蛋白质提取出来是正常现象,但此时细胞内蛋白基本是出不来的;第三,你的低渗液加入量是多少不清楚,我没有建议加三次,一次就足够了;第四,并非40%抽提一定比20%高,因为跟不同蛋白有一定关系,但普遍的讲,40%更加保险些。总的来说,你的实验是可以用的,但有关参数要按照我讲的做,目前其他文献和书籍上的数据不够严密。

祝实验顺利!