

# 体内筛选技术在靶向治疗中的新进展\*

田媛 胡宝成\*\*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

**摘要** 用噬菌体展示技术进行体内筛选可以更好地模拟靶抗原的天然环境,以筛选到与活体内某些器官或组织有特异结合活性的肽或抗体。近年来利用该技术在动物体内的研究已取得了可喜的进展。综述了体内筛选技术在器官和组织血管靶向载体的筛选、基因治疗及绘制人类血管分子图谱方面的应用,并对其今后的研究发展方向进行了阐述。

**关键词** 噬菌体展示技术 体内筛选 靶向治疗

噬菌体展示技术(phage display techniques)最初报道于1985年,它是将蛋白分子或肽段的基因克隆到丝状噬菌体的基因组DNA中,与噬菌体的外壳蛋白形成融合蛋白,从而使该异源分子呈现于噬菌体表面。其主要特点是将特定分子的基因型和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,在噬菌体核心DNA中含有该蛋白的结构基因,这样通过筛选有特定结合功能的蛋白,就可以获得相应的编码基因。由于丝状噬菌体易于在大肠杆菌系统中分离扩增,此技术又将选择能力与扩增能力偶联在一起,使得噬菌体展示技术成为极为有效的筛选体系,而该技术在筛选上的巨大潜力也越来越被人们所认识。理论上讲,任何抗原都能从天然抗体库中筛选到相应抗体。

近年来,噬菌体作为重组蛋白的研究工具使得抗体库技术得到很大发展,而噬菌体展示技术的发展更是带动了抗体库筛选方法的革命。最初,抗体库筛选的方法是基于已知抗原固定于固相表面,经数次“吸附→洗涤→洗脱→扩增”过程筛选到特异性的抗体。这种方法要求获得纯化或融合表达的抗原,而对存在脂双层中的蛋白质,或者某种组织、细胞表面以及在特殊分化或疾病诱导状态下的细胞表面的新型标志物来说,纯化抗原较难获得,噬菌体抗体库必须在复杂抗原上进行筛选。因此人们希望采用细胞直接筛选,而这也需要得到稳定的

细胞系或所感兴趣的组织,这使得血管内皮细胞特异的抗体很困难:首先,分离新鲜组织的内皮细胞,很难保持其天然表面分子及表型;其次,内皮细胞在培养中易于改变其表型并难以形成稳定的细胞系株;此外,不同的内皮细胞系表达多种常见分子的水平不同,而且很难完全模拟体内的性状。近几年,人们尝试利用噬菌体展示技术进行体内生物淘筛(in vivo biopanning),为筛选生长过程中特定状态、特定时间的血管内皮细胞特异性抗体提供了新的途径。1996年, Pasqualini 等<sup>[1]</sup>首次将噬菌体展示技术应用于体内,揭开了噬菌体文库筛选方法的新篇章。以往体内噬菌体展示技术仅限于肽库,然而大多数多肽与靶标的亲和力相对较低,所以筛选与抗原表位具有高亲和力的抗体又成为一条理想的替代途径。

血管生长在组织修复、炎症和恶性肿瘤等生理病理过程中起重要作用,体积超出 $1\text{mm}^3 \sim 2\text{mm}^3$ 的肿瘤不仅需要新生血管维持营养供给和排泄代谢产物,还需要提供有利于转移的途径,把癌细胞转移到其他器官。抑制肿瘤血管生成,能显著抑制肿瘤的生长和转移<sup>[2]</sup>。利用体内噬菌体展示技术筛选器官、组织血管特异性抗体的方法,因其无可比拟的优点,而应用于许多方面,并在更多领域中显示出良好的前景。

## 1 寻找血管受体方面的研究

### 1.1 器官靶向受体

已有研究表明血管内皮细胞标志分子是一组异质性蛋白,这种异质性表现为不同器官的内皮细

收稿日期:2004-06-14 修回日期:2004-08-18

\* 国家自然科学基金资助项目(30271458)

\*\* 通讯作者,电子信箱:baochengh@nic.bmi.ac.cn

胞呈现出器官特异性抗原。这些蛋白中有许多与某些病理过程密切相关。关于鉴定正常组织及肿瘤组织血管特异受体及其配基的研究已经深入开展,目前已找到鼠的脑、肾、肺、皮肤、胰脏、肠道、子宫、肾上腺、视网膜以及异种移植肿瘤的特异表面标志物<sup>[1,3~6]</sup>。这些发现拓宽了人们对内皮细胞功能表型的认知,这一领域已被称为血管蛋白组学(vascular proteomics)。而组织器官特异性亲和肽的发现,更是为靶向血管床分子水平研究提供了工具,并可用于进一步的诊断和治疗,随着研究的发展,还将发现更多的组织器官特异性亲和肽。在将来,不仅病理的血管标志分子将被发现,而且描述肿瘤类型的血管标志分子也将出现<sup>[7]</sup>。

Kolonin 等<sup>[8]</sup>向受孕 18 天的 C57BL/6 母鼠体内注射 M13 展示的肽库,分离得到了 4 段胎盘特异性多肽基序,其中 TPKTSVT 可与胎盘中运输载体结合,并能阻断 IgG 的胎盘运输。向怀孕 12 天的母鼠体内以非毒性剂量重复注射 TPKTSVT,结果表明它干扰了胎儿的正常发育,使胎儿重量不再增加,而对照噬菌体未见此现象。

## 1.2 病变组织靶向受体

病变组织的血管具有特殊的特征,它表达的特异标志物不存在于正常组织的血管。这些标志物存在于肿瘤血管内皮细胞、外膜细胞或细胞外基质的表面,多数是与肿瘤诱导血管生成相关的蛋白,是新血管的萌芽<sup>[9]</sup>。通过噬菌体展示抗体库的体内生物淘筛,可以找到肿瘤血管和淋巴血管的分子标志,并为人们了解肿瘤的发生发展提供新的线索。

靶向作用于血管特定定位点的抗体分子已成为很有吸引力的治疗及诊断载体。特定药物运输可以把药物集中于靶向位点,增加药力,并减少对其他组织的副作用。靶向运输在肿瘤治疗中显然极具魅力。目前用于治疗癌症的化疗药物具有毒性,这使其使用剂量在很大程度上受到限制,从而导致耐受,而把化疗药物与靶向载体偶联则可以使这一现状大大改观。

很多研究表明血管表皮生长因子(VEGF)在生理学和肿瘤血管的构成中扮演很重要的角色<sup>[10]</sup>。VEGF/VEGF-R2 信号出现于肿瘤发展的早期,并在最初血管形成中起着关键作用,从而成为肿瘤血管生成的限速步骤<sup>[11]</sup>。Vitaliti 等<sup>[12]</sup>从噬菌体展示抗体库中筛选出的抗 VEGF 的 scFv V65,在裸鼠体内

已经显示出部分抑制皮下肿瘤生长的作用。由于大多数 scFv 半衰期较短,为增加其在血液中循环时间,对抗 VEGF 的 V65 做了两种改构:一是与人 IgG1 的 CH3 区组装成“迷你”抗体(minibody);二是与人 IgG1 的 Fc 区融合成为融合蛋白<sup>[13]</sup>。

Joyce 等<sup>[14]</sup>利用体内噬菌体展示技术对胰腺癌小鼠模型进行筛选,得到了 7 条可以分别或共同特异识别新生血管萌芽及实体瘤的短肽,且均对胰岛或其他正常组织不发生作用;得到 5 个短肽选择性归巢于胰腺癌变组织,而不结合于皮下生长的  $\beta$ -细胞瘤、人肿瘤细胞系的异种移植或内源性皮肤鳞状细胞癌;得到 3 条短肽特异性归巢于生成血管细胞集落和肿瘤,或者可以与内皮细胞或外膜细胞特异标志共定位。其中一个肽与血小板源生长因子原 PDGF-B(pro-platelet-derived growth factor B)同源,并表达于内皮细胞,而它的受体表达于外膜细胞。

Liu 等<sup>[15]</sup>利用载脂蛋白 e(ApoE, apoprotein E)基因敲除小鼠模型对粥样硬化病变的内皮细胞进行了噬菌体肽库的体内生物淘筛。通过重复生物筛选,得到 103 条短肽基序,多与已知蛋白基因同源,其中 9.7% 的肽段含有 CAPGPSKSC 序列。在噬菌体上展示的或合成的短肽,可以选择性地在体内结合于 ApoE 基因敲除小鼠的粥样硬化病变表面,并在体外结合于人的粥样硬化病变。借助此短肽可筛选到一个与之结合的大约 82kDa 的细胞表面蛋白,并由质谱法分析鉴定为葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78),显示这种小胞体伴侣蛋白在粥样硬化病变内皮细胞表面也存在。通过 3 条与金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)同源的短肽,阐明了它们的同系物可以模拟其结合功能,它们分别是 CNHRYMQMC, CNQRHQMSC 和 CNNRSDGMC。携带 CNHRYMQMC 基序的噬菌体在 ApoE 基因敲除小鼠体内结合到粥样硬化病变内皮细胞。这 3 条短肽与内皮细胞的结合呈剂量依赖关系,并被金属蛋白酶组织抑制剂 2 抑制。这些肽段为研究动脉粥样化形成和血栓形成并发症的细胞表面所有成分提供了探针。

## 2 靶向基因治疗

打靶细胞中治疗性基因的高效输送和选择性表达是基因治疗的关键问题。由于缺乏有效的靶向载体,而使对血管尤其是肿瘤血管的靶向基因治

疗研究受到阻碍。最近实验表明, 基因治疗载体也可以用噬菌体来源的肽或抗体作导向。Arap 等<sup>[9]</sup>将噬菌体肽库注入乳腺癌荷瘤裸鼠体内, 从肿瘤回收的噬菌体证实有 3 个主要肽基元——RGD, NGR, GSL, 免疫组化染色鉴定显示 RGD、NGR 与肿瘤血管特异性亲和。将 RGD 表达于腺病毒表面蛋白上, 可以改变此病毒的趋向性 (tropism) (例如可感染表达整合蛋白的细胞)<sup>[16, 17]</sup>。

White 等<sup>[18]</sup>通过噬菌体展示技术分离得到了靶向作用于人静脉血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的短肽, 并将其融合表达达到腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 衣壳上。把修饰过的腺相关病毒静脉注射到小鼠体内, 在注射后 1 小时和第 28 天进行检测, 发现与裸露 AAV 相比, 肝中 AAV 的累积量减少, 并延缓血液清除率。此种 AAV 还可以提高腔静脉对病毒颗粒的吸收。再导向作用 (retargeting) 依赖于注射剂量, 用此种 AAV 与肝磷脂或非竞争性多肽共注入, 实验显示摄取量主要取决于原来 AAV 的趋向性以及此短肽的导向性。

Engelstadter 等<sup>[19]</sup>将筛选噬菌体抗体库得来的与 T 细胞特异结合的单链抗体展示在鼠白血病病毒 (murine leukemia virus, MLV) 的外壳蛋白上, 此单链抗体可以介导 MLV 有选择地导入人的初级 T 细胞。将抗 VEGF 的 V65 单链抗体与腺病毒载体连接, 进行基因治疗, 也取得较好效果<sup>[12]</sup>。

使基因治疗具有靶向性的另一方法是利用双特异抗体将腺病毒与血管相关受体 (angiogenesis-associated receptor) 相偶联<sup>[20]</sup>。

### 3 绘制人类血管分子图谱的研究

尽管血管异质性的生物学基础 (biological basis) 还不清楚, 利用小鼠模型得到的几株血管特异性肽段却已被作为载体用于定向输送细胞毒药物 (cytotoxic drugs)、前凋亡小肽 (proapoptotic peptides)、金属蛋白酶抑制剂 (metalloprotease inhibitors)、细胞因子 (cytokines)、荧光团 (fluorophores) 和基因 (genes)。普遍认为, 与靶向多肽偶联的化合物比原始化合物更有效, 且毒副作用小。此外, 与正常器官和肿瘤的血管受体相对应的选择性肽段也已经分离得到了。总而言之, 这些结果表明基于选择性表达的血管受体的治疗策略是可行的。

虽然从鼠模型中分离得到的某些配基和受体

对于鉴定假设的人的同系物很有帮助, 但把鼠源探针用于人的靶向输送还是不太可行。人类基因组计划的研究数据显示, 与其他哺乳动物相比, 人类更高的复杂性是由于不同组织位点的蛋白质的表达模式不同造成的, 其表达水平与时间是由多基因控制的<sup>[21, 22]</sup>。种属间差异蛋白的表达及配体-受体的作用表明: 由动物模型得到的血管靶向数据在用于推断人的研究之前必须进行小心评估。

人噬菌体肽库体内筛选可以优化人血管靶向探针的鉴定, 并可以促进血管靶向治疗和造影试剂的发展。Arap 等<sup>[23]</sup>向一患者体内静脉注射了  $2 \times 10^8$  噬菌体肽库, 15 分钟后取活组织, 进行组织病理学检查并回收不同器官的噬菌体。结果表明随血液循环的多肽最终的分布不是随机的, 归巢的噬菌体对应着不同表达的受体配基。分别得到了骨髓、皮肤、脂肪、肌肉以及前列腺等特异的 3 个肽的基序。其中一段归巢于前列腺的基序 CGRRAGGSC, 它可模拟白介素-11 结合于前列腺上白介素-11 的受体 (IL-11R $\alpha$ )。通过衡量此 IL-11 的模拟肽的吸收及由此肽介导的细胞程序性死亡的体外实验, 对 IL-11R $\alpha$  的内化能力进行了评估<sup>[24]</sup>。实验表明 IL-11R $\alpha$  是治疗和诊断早期或转移性前列腺癌的有前景的靶标。这些研究为定向运输于人类血管及靶向药物的开发前景提供了强有力的证据。

### 4 前 景

噬菌体展示技术作为抗体技术领域中的一项革命性进展, 自建立之日起即得到了广泛应用, 并且在应用中不断发展完善。体外和体内描述血管异质性及靶向血管特异受体已取得了重要进展。一些试剂 (如细胞毒或细胞保护药物, 基因治疗载体或抗原) 可以靶向作用于特定器官或组织的血管内皮细胞。而关于测试靶向化合物的临床试验还需要进一步设计, 使其更具可行性。

由于已有很多诊断和治疗试剂可有效识别血管内皮细胞特异受体, 所以这个研究领域的长期目标是寻找更加丰富的血管功能性标志物。也正因为如此, 在病人体内筛选噬菌体库的研究必须进行下去。最终, 确定出特殊病理条件下 (如癌症、自身免疫疾病或动脉粥样硬化等) 的血管分子分布也将成为可能。

## 参考文献

- [ 1 ] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, 380( 6572 ): 364~ 366
- [ 2 ] Matsuda K M, Madoiwa S, Hasumi Y, et al. A novel strategy for the tumor angiogenesis targeted gene therapy: generation of angiostat in from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7( 4 ): 589~ 596
- [ 3 ] Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J Clin Invest*, 1998, 102( 2 ): 430~ 437
- [ 4 ] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol*, 1997, 15( 6 ): 542~ 546
- [ 5 ] Burg M A, Pasqualini R, Arap W, et al. NG2 proteoglycan binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res*, 1999, 59( 12 ): 2869~ 2874
- [ 6 ] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, 279( 5349 ): 377~ 380
- [ 7 ] Trepel M, Arap W, Pasqualini R. *In vivo* phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6( 3 ): 399~ 404
- [ 8 ] Kolonin M G, Pasqualini R, Arap W. Teratogenicity induced by targeting a placental immunoglobulin transporter. *Prog Natl Acad Sci USA*, 2002, 99( 20 ): 13055~ 13060
- [ 9 ] Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2( 2 ): 83~ 90
- [ 10 ] Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11( 6 ): 617~ 624
- [ 11 ] Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor 2, and angiopoietin 2. *J Clin Invest*, 2002, 109( 6 ): 777~ 785
- [ 12 ] Vitali A, Wittmer M, Steiner R, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by a single chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 2000, 60( 6 ): 4311~ 4314
- [ 13 ] Afanasieva T A, Wittmer M, Vitali A, et al. Single chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther*, 2003, 10( 21 ): 1850~ 1859
- [ 14 ] Joyce J A, Laakkonen P, Bernasconi M, et al. Stage specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2003, 4( 5 ): 393~ 403
- [ 15 ] Liu C, Bhattacharjee G, Boisvert W, et al. *In vivo* interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *Am J Pathol*, 2003, 163( 5 ): 1859~ 1871
- [ 16 ] Wickham T J. Targeting adenovirus. *Gene Ther*, 2000, 7( 2 ): 110~ 114
- [ 17 ] Haviv Y S, Blackwell J L, Kanerva A, et al. Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res*, 2002, 62( 15 ): 4273~ 4281
- [ 18 ] White S J, Nickin S A, Buning H, et al. Targeted gene delivery to vascular tissue *in vivo* by tropism-modified adenovirus associated virus vectors. *Circulation*, 2004, 109( 4 ): 513~ 519
- [ 19 ] Engelstadter M, Bobkova M, Baier M, et al. Targeting human T cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. *Hum Gene Ther*, 2000, 11( 2 ): 293~ 303
- [ 20 ] Nettelbeck D M, Miller D W, Jerome V, et al. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single chain antibody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol Ther*, 2001, 3( 6 ): 882~ 891
- [ 21 ] Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409( 6822 ): 860~ 921
- [ 22 ] Venter J C, Adams M D, Myers E W, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291( 5507 ): 1304~ 1351
- [ 23 ] Arap W, Kolonin M G, Trepel M, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med*, 2002, 8( 2 ): 121~ 127
- [ 24 ] Zurita A J, Troncoso P, Cardo Vila M, et al. Combinatorial screenings in patients: the interleukin 11 receptor alpha as a candidate target in the progression of human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64( 2 ): 435~ 439

Advances in Targeted Therapy by Using *in vivo* Phage Display

TIAN Yuan HU Bao-cheng

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850, China)

**Abstract** *In vivo* biopanning of phage display techniques can imitate the nature condition of targeting antigen more accurately, in order to select organ or tissue specific peptides or antibodies. Recent years, great progress has been made in animal model by using *in vivo* phage display. Some applications of the techniques such as vascular addresses, targeted gene therapy and molecular mapping of the human vasculature were reviewed, the perspective of this technique was also described.

**Key words** Phage display techniques *In vivo* Biopanning Targeted therapy