

· 综 述 ·

噬菌体抗体库技术在肿瘤治疗中的研究进展及应用

陈晓阳^{1#}, 安瑞珩^{1#}, 黄菊¹, 梁有泮¹, 张文静¹, 郝明炫¹, 郭蕊¹, 李小宁¹,
李永超², 应璐², 杨昭^{1,2*}

1 北京化工大学生命科学与技术学院 分子诊断技术创新研究中心, 北京 100029

2 塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室,
新疆 阿拉尔 843300

陈晓阳, 安瑞珩, 黄菊, 梁有泮, 张文静, 郝明炫, 郭蕊, 李小宁, 李永超, 应璐, 杨昭. 噬菌体抗体库技术在肿瘤治疗中的研究进展及应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3644-3669.

CHEN Xiaoyang, AN Ruiheng, HUANG Ju, LIANG Youfeng, ZHANG Wenjing, HAO Mingxuan, GUO Rui, LI Xiaoning, LI Yongchao, YING Lu, YANG Zhao. Phage antibody library technology in tumor therapy: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3644-3669.

摘 要: 肿瘤是严重威胁人类健康的疾病。目前肿瘤治疗策略以手术切除、放化疗、靶向治疗和免疫治疗为主。单克隆抗体药物因具备高效性和低毒性等特点, 逐渐成为肿瘤临床治疗中不可或缺的药物类型。噬菌体抗体库技术(phage antibody library technology, PALT)是一种新型的单克隆抗体制备技术, 其将免疫球蛋白可变区 VH (variable region of heavy chain)/VL (variable region of light chain)基因重组后整合在噬菌体载体上, 并以融合蛋白的形式将抗体表达在噬菌体表面, 从而获得多样性抗体库。抗体库经过“吸附-洗脱-扩增”过程即可筛选获得特异结合抗原的抗体分子及其基因序列。PALT 具有抗体生产周期短、抗体结构可塑性强、抗体产量大、多样性高和可直接生产人源化抗体等优点, 已应用于乳腺癌、胃癌、肺癌和肝癌等肿瘤标志物的筛选和抗体药物的制备等领域。文中综述了 PALT 在肿瘤治疗中的研究进展及应用。

关键词: 肿瘤; 噬菌体抗体库技术; 单克隆抗体; 靶向治疗; 标志物

资助项目: 新疆科协青年人才托举工程项目(2021); 北京化工大学-中日友好医院生物医学转化工程研究中心联合基金项目(XK2023-21); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2022AB022)

This work was supported by the Young Elite Scientists Sponsorship Program by Xinjiang Association for Science and Technology (2021), the Joint Project of Biomedical Translational Engineering Research Center of Beijing University of Chemical Technology-China-Japan Friendship Hospital (XK2023-21), and the Scientific and Technological Research Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2022AB022).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-10-64421335, E-mail: yangzhao@mail.buct.edu.cn

Received: 2023-01-21; Accepted: 2023-05-26

Phage antibody library technology in tumor therapy: a review

CHEN Xiaoyang^{1#}, AN Ruiheng^{1#}, HUANG Ju¹, LIANG Youfeng¹, ZHANG Wenjing¹,
HAO Mingxuan¹, GUO Rui¹, LI Xiaoning¹, LI Yongchao², YING Lu², YANG Zhao^{1,2*}

1 Innovation Center of Molecular Diagnostics, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: Tumor is a serious threat to human health. At present, surgical resection, chemoradiotherapy, targeted therapy and immunotherapy are the main therapeutic strategies. Monoclonal antibody has gradually become an indispensable drug type in the clinical treatment of cancer due to its high efficiency and low toxicity. Phage antibody library technology (PALT) is a novel monoclonal antibody preparation technique. The recombinant immunoglobulin variable region of heavy chain (VH)/variable region of light chain (VL) gene is integrated into the phage vector, and the antibody is expressed on the phage surface in the form of fusion protein to obtain a diverse antibody library. Through the process of adsorption-elution-amplification, the antibody library can be screened to obtain the antibody molecule with specific binding antigen as well as its gene sequence. PALT has the advantages of short antibody production cycle, strong plasticity of antibody structure, large antibody yield, high diversity and direct production of humanized antibodies. It has been used in screening tumor markers and preparation of antibody drugs for breast cancer, gastric cancer, lung cancer and liver cancer. This article reviews the recent progress and the application of PALT in tumor therapy.

Keywords: tumor; phage antibody library technology; monoclonal antibody; targeted therapy; markers

肿瘤是指人体细胞在各种致癌因子作用下发生过度增生和异常分化所形成的一种新生物肿块。据 2020 年全球癌症统计数据显示:当年全球新增恶性肿瘤病例 1 930 万,死亡病例 1 000 万,是当今社会对人类生命威胁最大的疾病^[1]。顶级医学期刊 *The Lancet* 于 2019 年刊登的 2 项大规模调查研究显示,肿瘤已经取代心血管疾病,成为发达国家民众的第一大死因,并将在未来几十年内成为全球范围内的“第一大健康杀手”。2021 年中国新增恶性肿瘤病例 457 万,

死亡病例 300 万,二者均位列全球第一^[2],严重影响了我国人民的生命健康。肿瘤根据发生的组织部位不同可以分为不同类型,其按发病率从高到低的排序为^[3]:乳腺癌(11.7%)、肺癌(11.4%)、结直肠癌(10.0%)、前列腺癌(7.3%)和胃癌(5.6%);按死亡率从高到低排序为:肺癌(18.0%)、结直肠癌(9.4%)、肝癌(8.3%)、胃癌(7.7%)和乳腺癌(6.9%)。

目前肿瘤治疗策略是以手术为主,并结合放化疗、靶向治疗及免疫治疗等方法的联合治

疗,多种方法借助抗肿瘤药物发挥作用。抗肿瘤药物主要分为细胞毒类药物、激素类药物、生物反应调节剂和单克隆抗体(单抗)药物等几大类。其中单抗药物具有特异性高、毒副作用小等优点,不仅对多种恶性肿瘤具有显著疗效,还能与其他抗肿瘤药物联合使用,给肿瘤患者带来显著的生存受益,成为当代主流抗肿瘤药物之一,也是部分肿瘤一线治疗的首选药物。

单抗的制备方法和技术主要包括免疫血清提取法、杂交瘤技术、单个 B 淋巴细胞抗体制备技术和噬菌体抗体库技术(phage antibody library technology, PALT)等。1890 年,德国科学家埃米尔·阿道夫·冯·贝林以及日本科学家北里柴三郎^[4]首次发现了血清中存在某种特殊物质分别对白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)产生的白喉毒素和破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)产生的破伤风痉挛毒素具有抵抗作用,并提出了这种介质可以与外来抗原发生反应的假设,这是第一个用免疫血清中抗体治疗的实例。1975 年,英国科学家 Köhler 和 Milstein^[5]将鼠源的 B 淋巴细胞与肿瘤细胞融合形成杂交瘤细胞,发明了杂交瘤技术。杂交瘤技术是整个生命科学发展的一个重要里程碑,其制备的单抗特异性较高,且易于大量生产。虽然杂交瘤技术在基础生物学研究和临床医学方面均发挥着重要作用,但仍存在着操作相对复杂且产生的抗体并非人源抗体等不足。单个 B 淋巴细胞的抗体制备技术利用单细胞测序技术生产全人源化抗体,主要包括单个 B 细胞分选、抗体基因扩增和克隆及抗原特异性抗体表达、筛选和鉴定等过程^[6]。其产生的抗体具有全人源性、高抗原特异性、高亲和性和基因多样性等优势^[7],但制备过程受限于 B 细胞,不易获得靶向自身抗原的抗体。

PALT 是一种基于噬菌体展示技术(phage

display technology, PDT)的抗体制备技术。PDT 是由美国生物学家 Smith^[8]于 1985 年发明,他通过将外源基因序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因中,使外源蛋白与噬菌体的外壳蛋白融合表达,并展示在子代噬菌体的表面^[9]。PDT 突破性地体外建立了蛋白表型与其遗传信息的直接联系,并保持了抗体的空间结构和生物学活性。1990 年,McCafferty 等^[10]利用 PDT 成功构建出第一个噬菌体抗体库。PALT 是一种强大的用于制备全人源抗体的技术手段^[11],其制备抗体不依赖于体内的免疫反应,可用于发现针对几乎所有类型抗原的抗体,并且结合了 PDT 表达蛋白基因型和表型的统一的特点,通过表型筛选就能得到相应的基因,可用于疾病标志物的识别和抗体药物的筛选制备,是制备单克隆抗体领域中继 B 细胞杂交瘤技术后的又一次飞跃^[12]。2002 年首次上市的阿达木单抗(Humira)是第一个通过 PDT 获得的单抗药物,也是全球首个获批的全人源抗体,它先后获批治疗 10 多种不同的适应症(如类风湿关节炎、强直性脊柱炎等),累计销售额突破 1 700 亿美元,连续多年成为全球药王^[13],为全球广大患者带来了福音,在医药研发史上有着特殊的意义。

PALT 与其他单抗制备技术相比有很大的优势(表 1),例如其具有强大的筛选能力,筛选范围为 10^7 – 10^9 ,而杂交瘤技术的筛选范围为 10^3 左右。PALT 能够在体外模拟体内的抗体生成过程,在体外进行试验并灵活筛选,可以不经杂交瘤途径,甚至不经过免疫就可以制备和生产单克隆抗体。PALT 能够制备人源抗体并优化抗体结构,促使抗体在应用中发挥更好的作用,且 PALT 抗体制备周期短。这些优点使 PALT 已广泛应用于人源抗体制备、药物筛选、疫苗研制和肿瘤生物标志物筛选鉴定等方面^[10]。近年来,各领域针对 PALT 不断进行研究和试验

过程的优化,已经筛选出多种肿瘤对应的抗体,正在进行临床试验并用于肿瘤的治疗,包括乳腺癌^[14]、胃癌^[15]、肺癌^[16]和肝癌^[17]等,PALT在肿瘤诊断和肿瘤药物制备等领域已经受到广泛关注。

1 噬菌体抗体库技术的发展历程

PALT的发展(图1)最早可追溯到1985年,Smith^[8]将 *EcoR* I 内切酶部分基因片段与 PIII 基因融合,获得的重组噬菌体可在体外稳定增长,同时表达产物能被抗 *EcoR* I 内切酶抗体所

识别。试验成功地将外源 DNA 整合到 M13 噬菌体中,并利用 M13 噬菌体外壳蛋白表达了外源多肽,首次证实了丝状噬菌体(M13 噬菌体)的基因组能通过基因工程的手段加以改造。1988年,Parmlley 等^[18]首次应用 PDT 阐明抗体分子是噬菌体表面表达的一个具有天然蛋白质功能的蛋白质分子。1989年英国剑桥大学的 Ward 等^[19]采用 PCR 技术从溶菌酶免疫后的小鼠脾细胞 DNA 中扩增出重链可变区(variable region of heavy chain, VH)基因,测序证实了其多样性,并随后在大肠杆菌中表达了该 VH 片

表 1 不同抗体制备技术的差异

Table 1 Differences between different antibody preparation techniques

	Immunoserological extraction	Hybridoma technique	PALT
Antibody form	Polyclonal antibody	Monoclonal antibody	Monoclonal recombinant antibody
Host cell	N/A (not applicable)	Hybridoma	<i>E. coli</i> /293/CHO
Screening range	N/A (not applicable)	10 ³	10 ⁷ -10 ⁹
Time period	A couple of months	A couple of months	Several weeks
Immunization	Requires immunization	Requires immunization	Independent of immunization
Humanized antibody	No	No	Yes
Production	+++	++	++++
Gene sequence	N/A (not applicable)	Yes	Yes

+ represents the degree, the more + the higher the degree.

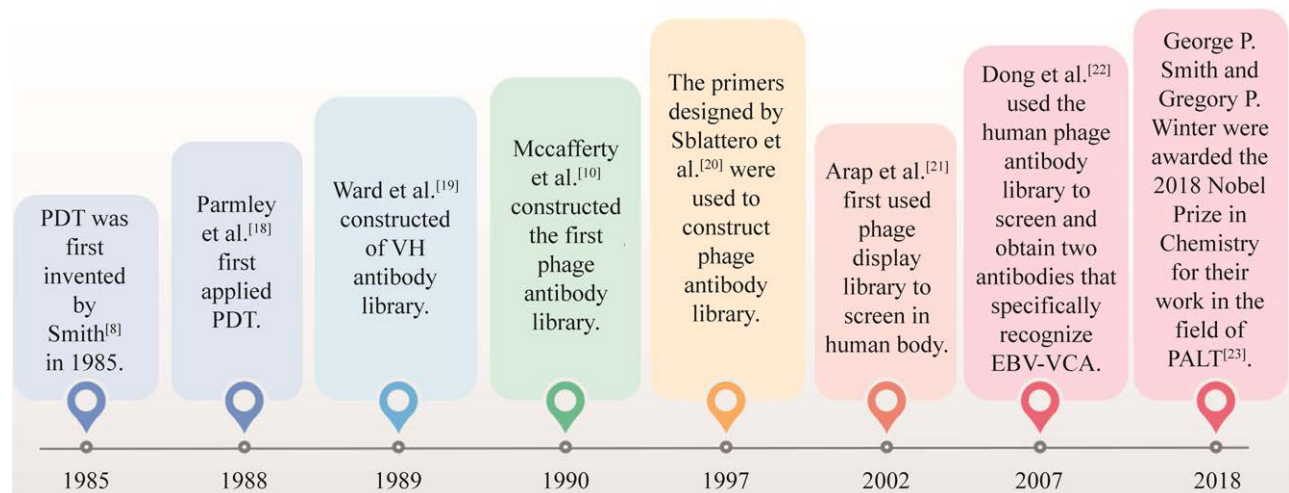


图 1 PALT 的发展历程^[8,10,18-23]

Figure 1 The development of PALT^[8,10,18-23].

段, 该小组发表的关于 VH 抗体库构建的文章是最早关于 PALT 的报道。同年, 美国 Scripps 研究所 Huse 等^[24]利用噬菌体载体, 通过噬菌斑印迹技术筛选抗体, 发表了关于含有完整轻重链抗体库的文章。

1990 年, Mccafferty 等^[10]利用丝状噬菌体及其衍生的噬菌粒, 在噬菌体表面表达了一种溶菌酶的抗体, 这是公认的第一例噬菌体抗体库。1994 年, Winter 等^[11]首次使用了辅助噬菌体 M13K07, 进一步完善了利用噬菌粒构建完整轻重链抗体库的方式。该方法产生的抗体具有良好的亲和力(10^{-8} – 10^{-9} mol/L), 并能够有效与外来或自身抗原高特异性结合。

1997 年 Sblattero 等^[20]设计的构建噬菌体抗体库所用的“通用引物”广泛应用于国内外很多研究中。2002 年, Arap 等^[21]首次利用噬菌体展示文库在人体内进行筛选。试验发现噬菌体展示肽在各个组织内并非随机分布, 它可以特异性地进入前列腺血管系统, 最终筛选出了一种前列腺特异性的七肽, 这是人体内噬菌体展示筛选的首次报道。

同年, 第一个由 PDT 得到的药物 Humira 获美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市^[13]。Humira 又被称为 D2E7, 为评估其治疗效果, 1999 年 Kempeni^[25]招募了 120 名类风湿性关节炎患者进行临床试验, 试验中发现在 3 个最高治疗剂量组中, 40%–70% 的患者达到了疾病活动评分(disease activity score, DAS)和美国风湿病学会疗效评估标准(American College of Rheumatology Efficacy Evaluation Criteria, ACR20)缓解状态; 采用安慰剂的对照组中, 达到此状态的患者比例只有 19%。2002 年, Feldmann 等^[26]招募了超过 2 000 名类风湿关节炎患者进行了 4 项大型 III 期临床试验, 相较于安慰剂治疗的对照组患者,

D2E7 治疗组患者症状显著改善, 其中 30% 的患者甚至达到了 3 年以上的缓解。以上临床试验数据证明 D2E7 对类风湿性关节炎具有良好的治疗效果。自上市以来, Humira 已连续 8 年蝉联全球销售额冠军, 是利用 PDT 制备的最具有代表性的单抗药物。

2007 年, 日本金泽医学大学的 Dong 等^[22]利用人噬菌体抗体库筛选得到了 2 个特异识别 EBV-VCA 的抗体, 它们能降低其他抗 EBV-VCA 单抗对其抗原的结合, 这一研究为今后疫苗的设计和致病机理的研究提供了依据。2017 年, 美国 FDA 和欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准了 6 种通过 PALT 发现或设计的全人源化抗体^[27]。Smith 和 Winter 凭借他们在 PALT 领域的杰出贡献, 2018 年获得了诺贝尔奖化学奖^[23]。

2019 年, 新冠疫情暴发, 杨晓明研究员团队利用 PALT 以 8 名 SARS-CoV-2 感染康复患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)为基因原材料, 建立抗体文库, 成功筛选出多株对 SARS-CoV-2 具有高中和活性的单抗^[28]。晶体结构解析数据显示, 活性最强的抗体 2B11 所识别的受体结合区(receptor binding domain, RBD)表位与血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE-2)的结合位点高度重叠, 通过竞争性结合有效阻断新冠病毒与细胞表面的 ACE-2 结合, 进而阻止其感染细胞。随着科学技术的不断发展和革新, PALT 未来在抗体药物研发过程中将发挥重要作用。

2 噬菌体抗体库的构建及分类

2.1 噬菌体抗体库的构建

PALT 的基本技术路线如图 2 所示。(1) 从体外细胞中提取总 RNA, 包括免疫的细胞、杂

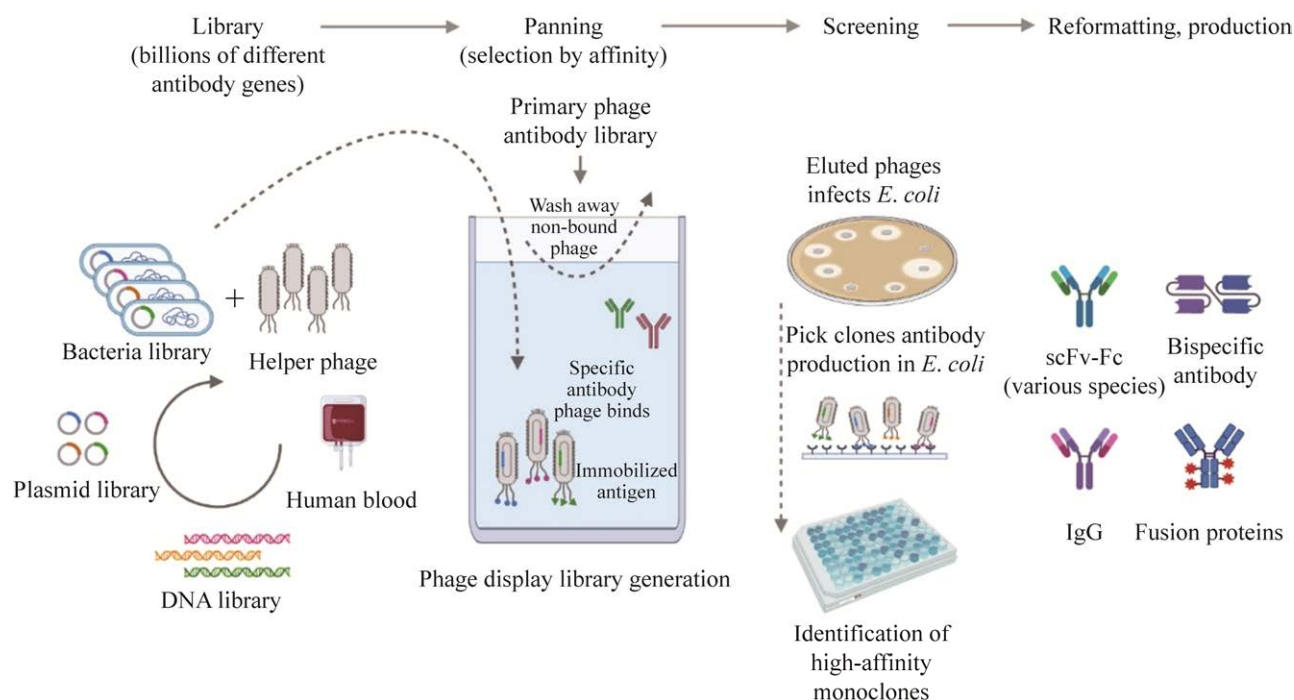


图 2 噬菌体抗体库的构建

Figure 2 Construction of phage antibody library.

交瘤细胞、B 淋巴细胞、末梢血淋巴细胞、骨髓淋巴细胞和脾细胞等。(2) 反转录总 RNA 得到细胞的 cDNA 文库，从中扩增获得全套的可变区基因，包括重链可变区 VH 和轻链可变区 (variable region of light chain, VL) 基因，随机拼接 VH 和 VL 基因构建多样性的抗体基因库。(3) 将抗体基因克隆至噬菌体表达载体，并加入辅助噬菌体侵染大肠杆菌，通过离心取上清即得到针对某种抗原的初级噬菌体抗体库。(4) 选择某种特定抗原作为靶标，对建立的初级抗体库通常进行 3–6 轮重复的筛选流程，其中有 2 个主要的步骤分别是淘筛 (panning) 和单克隆鉴定。淘筛分为吸附、洗脱和扩增 3 个过程^[29]。吸附指噬菌体抗体库与抗原共同孵育，使噬菌体抗体与抗原特异性结合；接下来弃去未结合的噬菌体，并在不影响噬菌体的感染能力的前提下洗脱与抗原特异性结合的噬菌体，收集结合的噬

菌体。然后将获得的噬菌体感染细菌并扩增，进行下一轮淘筛。几轮淘筛后，对富集到的与抗原特异性结合的多克隆噬菌体进行单克隆化，即从多克隆噬菌体中挑选出单克隆噬菌体。至此可得到高特异性单克隆菌株，并获得抗体基因^[30]。

笔者团队从 10 例膀胱癌患者的外周血中分离了 PBMC、提取了总 RNA 后经反转录得到 cDNA，并通过 PCR 对抗体的 VH 片段和 VL λ (variable region of lambda light chain)、VL κ (variable region of kappa light chain) 这 2 个区域进行扩增，最终利用短接头肽 (linker peptide) 将上述片段拼接形成单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 片段。将 scFv 片段电转至大肠杆菌 XL1-Blue 中，并利用辅助噬菌体 VCSM13 侵染重组的大肠杆菌，成功制备了膀胱癌人源 scFv 重组抗体库^[31]。

2.2 主要分类

2.2.1 按基因来源分类

已建立的噬菌体抗体库根据基因的来源不同,可分为免疫抗体库和非免疫抗体库^[32]。

免疫抗体库里的抗体基因主要来自于经抗原免疫的个体,采用经过免疫后的淋巴细胞直接建立抗体库,由于存在免疫偏好性,因此从该类抗体库中容易筛选出针对与某一特定抗原反应的高亲和力抗体克隆^[32]。因为在体内淋巴细胞已经与抗原的亲和力选择,所以建立小容量的抗体库即可筛选出特异性强的高亲和力抗体。但是这种抗体库有着明显的缺点,即免疫个体本身就有限制性和偏好性,且只能产生针对特定抗原的特定抗体,其通量小,存在需要进行主动免疫的缺陷。1998年Chang等^[33]针对经过人Rh(D)抗原免疫后的人外周血淋巴细胞构建了抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)免疫抗体库,并得到大量抗Rh(D)抗体。研究人员对得到的83个克隆进行序列分析,抗体序列中包含了28个不同的VH和41个不同的VL基因片段,多样性不高。同时免疫抗体库对弱抗原、毒性抗原和自身抗原均无效果^[34],某一特定的免疫库只能产生针对特定抗原的抗体,不能作为一个广泛筛选的平台。

非免疫抗体库可识别的抗原具有多样性,包括那些不引起机体免疫反应的弱抗原、自身抗原和具有毒性的抗原,理论上能够制备大量的多样性抗体。非免疫抗体库又分为天然抗体库、半合成抗体库和全合成抗体库。天然抗体库是采用未经免疫的淋巴细胞建立的抗体库,可获得全部的抗体可变区序列,而且不易遗漏抗体基因^[35]。半合成抗体库为人工合成一部分可变区,其余部分来自于天然抗体的合成抗体库。而全合成抗体库是指可变区都由人工合成的抗体库。非免疫抗体库的特点是不针对特定的抗

原,建立多样性强的抗体库,最大可能分离出高亲和力的抗体^[36]。Kim等^[37]成功构建了一个庞大的Fab非免疫抗体库,通过测序获得了包含7373个VH和41804个kappa轻链可变区域VL κ 序列的数据库,证实了VH和VL κ 序列的多样性,得到的抗体片段序列未来可以用于设计多样性的抗体库。随着基因工程技术的不断发展,构建无免疫偏好性的大容量、多样性的非免疫抗体库已成为抗体库技术的发展方向。

2.2.2 按噬菌体展示系统分类

噬菌体抗体库技术可以选择不同的噬菌体来进行抗体的展示,具体可分为丝状噬菌体展示系统、T4、T7和 λ 噬菌体展示系统等(表2)^[38]。

丝状噬菌体是一种单链DNA噬菌体,由管状蛋白质外壳和单链环状DNA构成。它属于溶源性噬菌体,在周质中组装,在不裂解宿主的情况下从细菌膜中分泌出来,是噬菌体抗体库技术应用最多的噬菌体类型,最常见的为M13噬菌体。丝状噬菌体DNA共编码5种衣壳蛋白,包括PⅢ、PⅣ、PⅦ、PⅧ和PⅨ,其中PⅢ与PⅧ基因常用来展示外源蛋白,又称为PⅢ展示系统和PⅧ展示系统^[38]。PⅢ是丝状噬菌体的次要外壳蛋白,位于病毒颗粒的尾端,具有3-5个拷贝数。PⅢ蛋白的结构特点是具有高度的灵活性和易变性,使得其可以展示较大的蛋白质片段且不影响噬菌体结构。PⅧ基因是丝状噬菌体主要的衣壳蛋白,位于噬菌体两侧,约有2700个拷贝数,可以展示多种外源蛋白,但是其只能展示约5个氨基酸组成的多肽,较大的多肽会影响噬菌体本身的装配和感染力。

T4噬菌体为二十面体结构,具有线性双链DNA。其衣壳蛋白中含有2种非必需外壳蛋白:小外衣壳蛋白(small outer capsid protein, SOC)和高抗原外衣壳蛋白(highly antigenic outer capsid protein, HOC),它们不影响噬菌体的正常

表 2 不同展示系统的差异

Table 2 The differences between different display systems

Phage display system	Phage type	Display site	Characteristic
Filamentary phage display system	Single stranded circular DNA, mild phage, siphonate	PIII protein	The PVIII system displays long peptides with low copy number
T4 phage display system	Linear double stranded DNA, virulent phage, icosahedron	PVIII protein SOC protein HOC protein	The PVIII system displays short peptides with high copy number Both SOC and HOC proteins could display different peptides or proteins at the same time
T7 phage display system	Linear double stranded DNA, virulent phage, icosahedron	10B protein	The T7 display system displays short peptides with high copy number and long peptides with medium or low copy number
λ phage display system	Linear double stranded DNA, mild phage, icosahedron	D protein PV protein	The D protein makes up the phage head protein and the PV protein makes up the phage tail protein, showing a wide range of proteins

活性因而可以作为外源基因的结合位点来展示外源蛋白^[39]。T4 噬菌体是在宿主细胞内装配, 不需通过分泌途径, 因而可展示多种大小的多肽或蛋白质而很少受到限制, 并且 SOC 和 HOC 蛋白拷贝数较多, 可以进行多价展示。

T7 噬菌体是一种双链丝状 DNA 烈性噬菌体, 成熟的噬菌体通过细胞裂解而释放, 展示在 T7 表面的多肽或蛋白质不需要通过细胞膜分泌出来, 因而其表面展示多肽和蛋白的范围较广。它的衣壳蛋白有 10A 蛋白和 10B 蛋白 2 种形式, 其中 10B 蛋白位于噬菌体表面, 用于噬菌体展示系统^[40]。T7 展示系统能够以高拷贝数展示 50 个氨基酸长度的多肽; 也可通过中或低拷贝数展示 900–1 200 个氨基酸的多肽(蛋白质), 因此广泛应用于筛选不同分子量、不同亲和力的蛋白质。

λ 噬菌体具有线性双链 DNA 分子, 与 T4 噬菌体相同为二十面体, 主要进行裂解性生长和溶源性生长。 λ 噬菌体有 D 蛋白和 PV 蛋白 2 种展示系统^[41], D 蛋白是参与噬菌体头部组

装的装饰蛋白, PV 蛋白构成了尾部管状部分。 λ 噬菌体在宿主细胞内完成装配, 同样无需将外源肽或蛋白分泌到细菌胞膜外, 可展示的蛋白质范围极广。

2.2.3 按载体类型分类

噬菌体抗体库技术中常用的载体包括噬菌体载体和噬菌粒载体 2 种^[42]。噬菌体是基因工程中常用的载体, 将外源基因替代或插入到噬菌体基因组当中, 组成噬菌体载体。大多数噬菌体载体表面有多个蛋白展示位点, 通常为多价展示。但是多价展示会使弱结合性克隆显示出假阳性, 不易筛选特异性高的克隆, 相反单价展示可以提高筛选到高亲和力克隆的可能性, 因此人们选择利用噬菌粒作为载体, 通过单价展示进行高亲和力的筛选。

噬菌粒是一种对丝状噬菌体进行人工改造得到的特殊类型载体, 兼具丝状噬菌体与质粒的优点^[43]。作为一种特殊的质粒, 可以像一般的质粒那样被复制, 也可以在病毒体内作为单链 DNA 被包装。噬菌粒具有基因组较小可插入

较大片段、复制型为双链 DNA、易于操作、转化效率高和产生的重组子更加稳定等优点。但由于其没有任何噬菌体功能基因, 导致噬菌粒不能独立合成单链 DNA, 因此需要在辅助噬菌体的帮助下才可以完成对宿主细胞的侵染。

2.2.4 按抗体类型分类

传统的全抗体由于分子量较大, 不易于展示在噬菌体表面, 因此噬菌体抗体库技术主要用于制备 scFv、Fab、二硫键稳定性抗体(disulfide-stabilized Fv fragment, DsFv)、双链抗体(diabody)或小抗体(minibody)等(图 3)。

scFv 是利用基因工程的方法将抗体的 VH 与 VL 通过一段 15–25 个氨基酸的 linker 连接构成的重组蛋白, 是具有抗体活性的最小功能结构单位, 其分子量约为完整抗体分子的 1/6。scFv 的优势是分子量小、穿透力强, 但容易形成聚体, 构建成完整分子后亲和力可能会缺失^[44]。

Fab 是一种完整抗体的片段, 由 VH 与重链恒定区(heavy chain constant region 1, CH1)以及一条完整的轻链即 VL 与轻链恒定区(light chain constant region, CL)组成, 二者之间由一个链间二硫键连接, 形成异二聚体, 仅有一个完整的抗原结合位点, 其分子量约为完整 IgG (immunoglobulin G) 分子的 1/3。相较于 scFv 库,

Fab 的形式更接近于完整抗体, 其稳定性更好, 但其表达水平较低^[45]。

DsFv 是通过在 VH 和 VL 之间形成二硫键来稳定 Fv 片段。与 scFv 相比, DsFv 的稳定性和亲和力更高, 同时也具有 scFv 小分子的优势, 在临床上具有很高的应用价值。2009 年 Huang 等^[46]成功开发出一个 sc-DsFv 噬菌体展示平台, sc-DsFv 蛋白被成功地表达在 M13 噬菌体表面, 其表达量与野生型的信号肽序列文库相比增加了 2 个数量级。

双链抗体由 2 个交叉的单链抗体 scFv 组成, 由于连接用的 linker 将每个轻链重链的可变区分隔开, 所以只能形成二聚体。2015 年 Li 等^[47]构建了 2 个大型的人 scFv 噬菌体抗体库, 并使 scFv 带有 2 种不同的连接(linker) (17 aa-SSA 和 18 aa-SX), 通过限制性内切酶消化和重新连接使 linker 长度迅速缩短, 可将 scFvs 快速转化为双链抗体。

小抗体通过基因工程手段采用不同的 linker 把 scFv 的 VH 与 IgG 的重链恒定区 CH3 (constant region of heavy chain, CH) 融合, 形成 VL-VH-CH3 的结构, 称之为小抗体。早在 1994 年 Martin 等^[48]就已经成功构建出小抗体库, 并成功分离得到一种能够抑制人白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 活性的特异性结合的多肽。

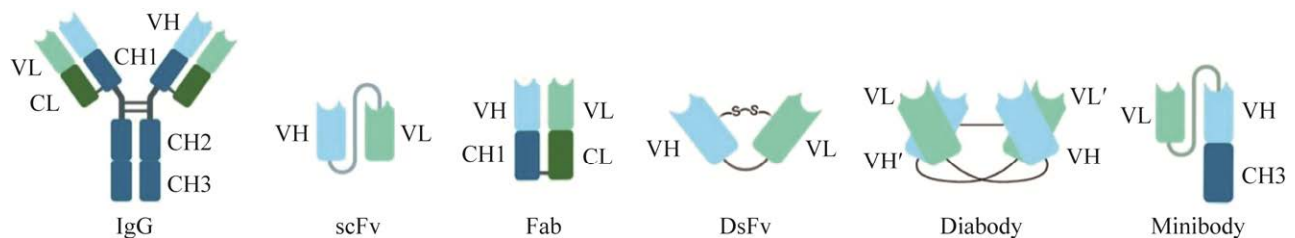


图 3 不同抗体类型模式图

Figure 3 Diagram of different antibody types.

3 噬菌体抗体库技术在肿瘤治疗中的研究进展及应用

3.1 乳腺癌

乳腺癌(breast cancer)是一种由乳房腺上皮组织发生恶性增生而引发的肿瘤疾病^[49], 2020年, 全球乳腺癌新发病例230万, 已经成为全球发病率最高的癌症, 死亡病例68.5万^[1], 是全球第五大癌症死亡原因, 也是女性人群中发病率最高的恶性肿瘤, 在110个国家中死亡率中排名第一^[50]。乳腺癌目前治疗方案为以手术为主, 辅以放化疗、内分泌治疗的个体化综合治疗, 但是乳腺癌常发生转移, 患者面临着生存降低和预后差等问题。

人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)在30%的浸润性乳腺癌中高表达, 靶向HER2可以有效治疗HER2阳性乳腺癌^[51]。1998年获批的赫赛汀(曲妥珠单克隆抗体)是第一个乳腺癌靶向治疗药物, 它主要通过特异性阻断HER2信号通路, 抑制癌细胞的增生, 这使得药物治疗乳腺癌的方法取得突破性进展^[52]。2021年Lamtha等^[53]用HER2-酪氨酸激酶(HER2-tyrosine kinase, HER2-TK)重组蛋白作为靶抗原, 从人源化噬菌体展示文库中筛选出了抗HER2-TK结构域的重组单域抗体(single-domain antibody, sdAb) V_HH17, 该抗体可以抑制HER2-TK的磷酸化, 最终降低乳腺癌细胞的活力; V_HH17能显著结合HER2-TK, 其K_d值为7.49×10⁻⁷ mol/L, 并对HER2-TK的TK活性有抑制作用, IC₅₀值为3 nmol/L; 试验将V_HH17与富含精氨酸的细胞穿透性多肽 Nona-Arg (R9)相连, 得到抗体R9V_HH17, 其与HER2-TK间的K_d值为3.74×10⁻⁷ mol/L, 对HER2-TK也具有明显亲和力, 并且V_HH17添加了穿透性多肽后增强了对

靶细胞的穿透, 显著降低HER2阳性癌细胞的存活率, 试验测定MDA-MB-231(三阴性乳腺癌细胞)、A431(表皮生长因子受体[epidermal growth factor receptor, EGFR]阳性的表皮样癌细胞)和BT-474(HER2阳性的人乳腺癌细胞)的IC₅₀值分别为1282、314 nmol/L和41 nmol/L, 说明R9V_HH17的作用是细胞特异性的, 对表达HER2的癌细胞具有细胞穿透性和生长抑制活性。因此, V_HH17可以降低癌细胞的增殖速度, 减缓疾病的进展, 有望成为治疗HER2阳性乳腺癌的有效药物。

2021年Sales-Dias等^[54]以重组人DLL1(rhDLL1)蛋白为靶抗原, 从人scFv噬菌体展示文库中进行3轮筛选得到DLL1特异性单抗IgG-69; 试验测定IgG-69与细胞表面rhDLL1的半数有效结合浓度(EC₅₀)近似值为0.17 nmol/L, 具有良好的抗肿瘤活性。IgG-69是DLL1特异性结合抗体, 其K_d值为22 nmol/L, 亲和力在两位数nmol/L范围内; 试验通过Notch荧光素酶报告基因检测来研究IgG-69对DLL1-Notch信号转导的抑制作用, 数据发现IgG-69显著降低了由rhDLL1-EGF3-Fc诱导的Notch报告基因的活性, 平均降低25% (P=0.012 2); 将MCF-7细胞暴露于不同IgG-69浓度中, 观察抗体对Notch靶基因HY-L表达水平的影响, 与暴露于同等浓度的IgG Ctr的细胞(P=0.015 0)相比, 10 μg/mL的IgG-69使HY-L的表达水平降低了30%, 由此可见, IgG-69显著削弱了DLL1-Notch通路的激活; 同时试验检测了抗体对癌细胞生长的抑制作用, IgG-69使rhDLL1-ECD-Fc诱导的MCF-7细胞生长减少50% (P=0.011 5), 结果与抑制DLL1-Notch信号一致; 利用体外的乳腺癌细胞成球试验评估其潜在的抗乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)效果, 与未经处理的对照细胞(P=0.043 3)或用IgG Ctr处理的

细胞($P=0.0174$)相比, IgG-69 使 MCF-7 成球的数量分别减少了约 30%和 40%, 这表明 IgG-69 显著抑制了 BCSCs 的自我更新能力。单抗 IgG-69 能够部分抑制 DLL1 介导的 Notch 通路的激活, 并能损伤乳腺癌干细胞亚群, 抑制癌细胞生长。在未来的乳腺癌治疗中具有很大潜力, 考虑到目前 IgG-69 的亲合力较差, 需要进一步提高亲合力, 从而改善在未来的体内试验以及可能的临床试验中的治疗效果。

虽然近几年乳腺癌的治疗和预后情况得到了改善, 但乳腺癌仍是女性中的第一大癌, 寻找针对乳腺癌特异性抗原的无创、敏感性高、特异性强且简单可行的抗体, 作为乳腺癌的早期诊断和治疗工具依然具有重要的临床应用价值。PALT 得到的抗体是目前报道最多且有应用前景的一类小分子抗体, 其结构简单, 能够减少抗体引起的免疫反应, 因此已经应用 PALT 筛选出针对乳腺癌相关抗原及受体所对应的单抗如 V_H H17 和 IgG-69 等, 为肿瘤的诊断和靶向治疗提供理论依据。

3.2 肺癌

肺癌(lung cancer)是仅次于乳腺癌的第二大常见癌症类型。2020 年, 全球肺癌新发病例 220 万, 新增肺癌死亡病例 180 万^[1], 是死亡率最高的癌症。根据肺癌细胞的形态特点可将肺癌分为小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 2 种, 绝大多数肺癌为 NSCLC, 约占所有肺癌的 85%^[55]; SCLC 相比 NSCLC 恶性程度更高, 其 5 年的生存率 $<6\%$ 。NSCLC 的治疗多以靶向 EGFR 为主^[56], SCLC 的一线化疗方案仍以顺铂或卡铂加依托泊苷为主^[57]。传统治疗方式尽管使 NSCLC 和 SCLC 对放化疗敏感, 但容易出现复发和转移, 亟需开发肺癌治疗的新方法。

2020 年 Kang 等^[58]利用 PALT 针对肿瘤生物标志物 hYKL-40^[59]进行人 Fab 噬菌体展示文库的抗体筛选, 鉴定出独特的单抗片段 H1 (Fab); 将 H1 (Fab)重组成免疫球蛋白 IgG 形式并使用生物层干涉仪(bi-layer interferometer, BLI)和蛋白质热位移(protein thermal shift, PTS)进一步分析, 其表观 K_d 和热稳定性 T_m 分别为 5.0×10^{-11} nmol/L 和 73.7°C , EC_{50} 值为 0.5 nmol/L, 亲合力效果显著; 单抗 IgG-H1 在体外试验中明显抑制肺癌细胞系 A549 和 H460 的迁移, PBS 处理的 A549 细胞和 H460 细胞对照组中, 分别有 (405 ± 21) 个/ mm^2 和 (529 ± 14) 个/ mm^2 细胞迁移到跨孔下侧, 而 IgG-H1 处理组细胞迁移数为 (124 ± 5) 个/ mm^2 和 (112 ± 12) 个/ mm^2 。之后进行小鼠体内试验研究 IgG-H1 的体内抗癌作用, 在 PBS 处理的对照组中, 肿瘤占据了肺组织表面的 $41.3\% \pm 5.0\%$, 而经 IgG-H1 治疗后肿瘤占肺组织表面积降低至 $7\% \pm 1.2\%$; 此外, 用 PBS 处理的小鼠肺表面的平均肿瘤结节数为 (38.7 ± 4.9) 个, 而用 IgG-H1 处理的小鼠中平均肿瘤结节数显著降低至 (3.8 ± 0.4) 个^[58]。以上体外和体内试验发现了抗 hYKL-40 的单克隆抗体 IgG-H1 可能具有治疗肺癌的能力, 其在亲合力、热稳定性和非聚集性等生物物理特性中有显著优势, 并且在体内可以明显抑制肺癌细胞生长和迁移, 有望可以开发成为良好的抗肺癌药物。

2018 年 Dho 等^[60]从 scFv 噬菌体展示文库中经过 4 轮筛选, 得到与 CD55 特异性结合的 scFv 抗体, 转化为 IgG 并用镥-177 (Lu-177)标记得到抗 CD55 的 ^{177}Lu 抗体; ^{177}Lu -anti-CD55 抗体与 H460 细胞具有高亲合力, 其 K_d 值为 (7.149 ± 5.144) nmol/L; 试验研究了这种抗体在小鼠胸膜转移性肺癌模型中的分布, ^{177}Lu -anti-CD55 主要滞留在肿瘤组织, 抗体经过 24 h 后在肿瘤组织蓄积达 $18.35\% \pm 3.58\%$ ID (initial dose)/g,

而在正常组织中并不聚集,说明 ^{177}Lu -anti-CD55可以特异性地靶向表达CD55的转移性肺癌细胞;在体外试验中,用 ^{177}Lu -anti-CD55处理H460细胞后,肺癌细胞侵袭减少66.23%,迁移减少61.51%,表明该抗体在体外能够抑制肺癌细胞的侵袭和迁移; ^{177}Lu -anti-CD55还可以与顺铂联合治疗肺癌,试验单独用 ^{177}Lu -anti-CD55和单独用顺铂处理H460细胞,细胞存活率分别下降11.5%和13.6%,而当 ^{177}Lu -anti-CD55和顺铂联合处理后,H460细胞存活率降低了44.2%,这表明二者存在协同效应,可以更好地发挥治疗效果。 ^{177}Lu -anti-CD55抗体是治疗胸膜转移性肺癌的一种有前途的药物,通过单抗与Lu-177相结合,可以更好地发挥治疗肺癌的效果,在转移性肺癌的治疗领域有广泛的应用前景。

2015年经FDA批准上市的耐昔妥珠单抗(necitumumab)是一种重组人源性IgG1单克隆抗体,作为EGFR的拮抗剂,其可与吉西他滨和顺铂共同用于NSCLC的联合化疗。同年*The Lancet Oncology*的一项研究指出,与单纯化疗组相比,耐昔妥珠单抗联合化疗可将NSCLC患者总生存期从9.9个月提高至11.5个月,死亡风险下降16%^[61]。尽管该药物尚未在我国国内上市,但相信随着未来PALT和其他诊疗技术的逐步发展与成熟,这类单抗药物有望成为肺癌的“明星药物”,给众多肿瘤患者提供新的治疗方案。

噬菌体抗体库技术筛选得到的特异性抗体在肺癌的临床治疗中发挥着重要作用,现阶段PALT可以结合放射性核素疗法和放化疗等方法帮助临床上的诊断和治疗,不再局限于单一的抗体使用。因此,PALT与不同治疗癌症的方式相结合的治疗手段仍在不断的探索和改进,相信未来会有很大的突破。

3.3 胃癌

胃癌(gastric cancer)是全世界重视的恶性消化道癌症,2020年全球胃癌新发病例100多万,死亡病例76.9万^[1],相当于全球每13例因癌症死亡中就有1例死于胃癌。胃癌的主要治疗手段是以手术、放疗和化疗为主的综合治疗^[62],但临床中存在诸多的限制而影响其疗效,以X射线和内镜超声等为主的胃癌诊断方法对早期胃癌的诊断缺乏足够的特异性和准确性^[63]。由于PALT可以筛选到与肿瘤表面标志物特异性结合的多肽,使得其应用于胃癌领域的研究不断增多,尤其在早期检测和靶向治疗方面均取得了诸多进展。

在胃癌病人体内的血管内皮细胞、外膜细胞、平滑肌细胞及细胞外基质中,通常会表达某些十分稀少且难以检测的分子标志物。2012年Zhang^[64]为了诊断早期胃癌,利用PALT对人胃癌细胞系BGC823与人胃正常粘膜上皮细胞GES-1进行对照筛选获得了可以与胃癌细胞特异性结合的多肽AAD;酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试验数据显示多肽AAD与BGC823细胞结合的A值(在490 nm处用酶标仪测定的吸光度, OD_{490})为 1.15 ± 0.09 ,与GES-1细胞结合的A值为 0.123 ± 0.035 ,证明了多肽AAD选择性地与BGC823细胞结合而不与正常胃粘膜细胞GES-1结合;之后用多肽免疫荧光试验测定AAD与新鲜胃癌组织的选择性结合情况,荧光图像显示AAD与肿瘤细胞膜、细胞质结合,但不与正常胃粘膜结合,免疫组织化学对AAD的结合分析出多肽与弥漫性胃癌存在特异性结合。研究还对37例胃癌、15例邻近胃粘膜、12例乳腺癌和15例结肠直肠癌组织进行半定量图像分析,测定AAD含量,结果发现AAD在胃癌组织中含最高,具有统计学意义^[64]。

以上结果说明新多肽 AAD 与胃癌具有特异结合活性,可用于区分肿瘤和正常胃粘膜组织,为胃镜检查发现早期肿瘤提供了可能。同样,2017年 Sahin 等^[65]采用弥漫性胃腺癌细胞 MKN-45 作为靶细胞,从噬菌体展示文库中进行 5 轮筛选得到与 MKN-45 细胞特异性结合的抗体 DE532,并根据 DE532 中氨基酸的偏好性重新设计得到抗体 DE-Obs,结果发现 DE-Obs 具有与 MKN-45 细胞更强的亲和力,但不与正常人胃细胞 HFE-145 中结合,说明通过 PALT 得到的这 2 个抗体均可以与 MKN-45 人胃癌细胞的特异性结合,可以作为胃癌研究诊断和治疗潜在药物。

2019年 Mehdipour 等^[66]为了寻找与胃癌腹膜转移相关的潜在肿瘤生物标志物,利用半合成的人 scFv 噬菌体展示文库对 MKN-45 靶细胞进行阳性筛选,通过 ELISA 和流式细胞仪对纯化的 scFv 进行特异性分析,证实其中 3 个克隆(B12、F10 和 G1)与 MKN-45 细胞可以特异性结合,而与肠胃腺癌 AGS 和正常细胞 NIH-3T3 无结合;试验用流式细胞术检测了所选择的 scFv 片段在药物靶向传递中的潜在应用,F10 和 G1 单链抗体的肿瘤细胞摄取率分别为 57% 和 35%,而阴性对照的细胞仅有 8.4%。采用免疫沉淀法对 G1 沉淀和 F10 沉淀靶蛋白进行质谱分析,数据表明 HSP90a (HSP90AA1)、HSP90b (HSP90AB1)和 c-Met 可作为 MKN-45 胃癌细胞系转移型的其他候选生物标志物。试验得到的 MKN-45 特异性单链抗体片段及其同源抗原将有利于弥漫性胃腺癌的筛选和靶向治疗,此外,c-Met、HSP90a 和 HSP90b 在肿瘤生长、胃癌转移和不良预后中起着关键作用,是弥漫型胃腺癌细胞系 MKN-45 的潜在分子生物标志物^[66]。

血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial

growth factor receptor 2, VEGFR2)又称为激酶插入区受体(kinase insert domain receptor, KDR),它可与 VEGF 相结合从而促进内皮细胞增殖和肿瘤内的新生血管生成。2002年 Lu 等^[67]针对 KDR 在人天然 Fab 噬菌体展示文库进行筛选,得到了 3 种对 KDR 具有高亲和力的克隆 D2C6、D2H2 和 D1H4, K_d 为 2-4 nmol/L;研究人员通过分析以上抗体序列发现它们具有相同的 VH 片段,进而重新构建了具有相同 VH 片段的噬菌体展示文库,并筛选得到了克隆 1121,它作为 KDR/VEGF 相互作用的阻断剂 IC_{50} 值为 1 nmol/L,比原本 3 个抗体更有效;同时 1121 Fab 对 KDR 的结合能力比 3 个亲本 Fab 都更强, K_d 为 0.1 nmol/L,甚至比原本配体 VEGF 还要高约 8-9 倍。将 1121Fab 转换成 IgG1 型的抗体 IMC-1121 后依然具有与 KDR 很高的亲和力, K 为 50 pmol/L,而且 IC_{50} 值为 0.8 nmol/L,是最强的 KDR 结合剂和最有效的 KDR/VEGF 相互作用阻断剂^[68]。2014年 Fuchs 等^[69]对雷莫卢单抗(ramucirumab)的有效性和安全性进行了评估,355 名晚期胃癌患者被随机分配到治疗组($n=238$)或安慰剂组($n=117$)。在 278 例患者死亡中,有 179 例(75%)接受雷莫卢单抗治疗,99 例(85%)患者服用安慰剂;试验测定接受雷莫卢单抗治疗的患者的中位总生存期为 5.2 个月,接受安慰剂的患者为 3.8 个月;6 个月后治疗组总生存率预计为 41.8%,安慰剂组为 31.6%;12 个月生存率预计为 17.6%和 11.8%,证明雷莫卢单抗治疗可以显著改善患者的总生存期。治疗组中高血压的发生率为 16%,高于安慰剂组的 8%,但是仅有少数服用雷莫卢单抗的患者出现三级高血压,且其他不良反应方面二者发生率基本相似(94%和 88%)^[69]。2014 年雷莫卢单抗被 FDA 批准用于治疗晚期转移性胃癌和晚期非小细胞肺癌,商标为 Cyramza。

通过 PALT 构建的抗体库可以利用特异性结合的能力,提高治疗效率并减少传统方法带来的副作用,在癌症诊断和靶向治疗方面都具有极高的应用潜力,利用 PALT 对胃癌进行治疗的研究不断增多,尤其在早期检测和靶向治疗方面均取得了诸多进展,目前已经可以使用已筛选出的抗体氨基酸特征设计新型抗体,设计的抗体中每个氨基酸的顺序和重复次数可影响亲和力等功能。

3.4 肝癌

肝癌(hepatocellular carcinoma)是人类最常见、最致命、恶性程度极高的肿瘤之一。2020 年全球肝癌新发病例 90.6 多万,死亡 83 万,在大多数地区,男性的发病率和死亡率都比女性高 2-3 倍,在男性死亡率中排名第二^[1]。肝癌根据肿瘤来源不同可以分为原发性肝癌和继发性肝癌 2 种。目前肝癌的治疗手段主要是以手术为主的综合治疗,但是由于诊断过晚,其术后的复发和转移率很高,预后极差,被诊断为肝癌的患者的一年生存率不到 50%^[70]。目前,抗血管生成是肝癌的主要治疗手段^[71],但存在细胞毒性等缺陷促使人们寻求更有效的治疗手段。

早在 2007 年 Zhang 等^[72]利用噬菌体展示文库对人肝癌细胞株(HepG2)和正常肝细胞株(L02)进行筛选,经过 4 轮淘筛筛选出抗体 HCBP1,使用肝癌细胞 HepG2 进行体外试验,通过 ELISA 法、免疫细胞化学染色、免疫组织化学染色等方法,证明了抗体 HCBP1 可以较好地与 HepG2 结合,而不与 L02 或其他类型的癌细胞 HeLa 结合;体内试验通过对携带 HepG2 的小鼠注射抗体库,在肿瘤组织中噬菌体浓度是非肿瘤器官如脑、肺、心脏和非肿瘤肝脏组织的 2.2-10.5 倍,发现抗体 HCBP1 仅定位于肝肿瘤块中,而不与脑、肺、心脏或非肿瘤肝组织结

合,说明抗体 HCBP1 特异性结合肝癌细胞。2011 年, Zhang 等^[73]同样使用原发性肝癌患者的血清,利用噬菌体展示文库来筛选早期原发性肝癌潜在的血清生物标志物,最后得到了血清标记结合多肽 HC1; ELISA 结果显示,早期肝细胞癌的 HC1 噬菌体克隆的阳性反应率为 91.4%,而健康对照组为 10.0%;与健康对照组比较,HC1 检测早期肝癌的敏感性为 91.4%,特异性为 90.0%,阳性预测值(positive predictive value, PPV)为 90.1%,准确性为 90.7%,说明多肽 HC1 可以有效地诊断早期原发性肝癌,因此可以作为早期原发性肝癌的候选血清生物标志物。

2020 年 Liu 等^[74]利用 PALT 对肝癌靶点 GPC3 进行筛选获得一个新的人源单抗 32A9;试验首先测定了 32A9 与 GPC3-Fc 蛋白的结合活性,亲和力约为 1.24 nmol/L,接下来又测定了 32A9 与 GPC3 阳性细胞的结合活性,亲和力约为 6.25 nmol/L,说明 32A9 与人 GPC3 具有良好的结合活性和特异性;随后在体内试验中测定 32A9 的抗肿瘤活性,对接种 Huh-7 细胞的小鼠进行静脉注射 10 mg/kg 的 32A9 抗体和等体积的 PBS 进行对照,治疗 2 周后,注射 32A9 的治疗组肿瘤体积明显小于对照组($P<0.001$),减少了约 65%,表明 32A9 具有良好的抗肿瘤活性。研究人员进一步将 32A9 单链抗体和去免疫的假单胞菌外毒素(mPE24)融合,构建了一种新的抗 GPC3 的免疫毒素 32A9-mPE24,在体外试验测定其细胞毒性,用 32A9-mPE24 处理细胞发现其可以选择性地抑制 GPC3 阳性癌细胞的生长, IC_{50} 值为 0.68 nmol/L;在体内外试验中 32A9-mPE24 显示出作为裸抗和免疫毒素的双重抗肿瘤效力,可显著抑制肝癌移植瘤的生长^[74]。

原发性肝癌是危害我国人民的主要恶性肿瘤,自 1994 年以来,肝癌已经成为我国部分农村最常见的癌症,在部分城市仅次于肺癌。专

家认为,我国肝癌流行情况仍然十分严重,肝癌发病的总体水平还将继续提高^[75],研究如何早期诊断和治疗肝癌有着重要意义,急需寻找一种具有高灵敏度和高特异性的能够用于早期诊断肝癌的新标志物,因此合理运用 PALT 可以帮助寻找新的可用于肝癌早期诊断的抗体及抗原。

3.5 结直肠癌

结直肠癌(colorectal cancer)是常见的消化道恶性肿瘤。2020 年全球结直肠癌新发病例 190 多万,发病率排名全球第三。我国近 10 年结直肠癌发病率和死亡率均呈逐年上升趋势^[1]。结直肠癌在早期筛查和诊断上存在诸多困难,导致多数患者到中晚期才被确诊^[76],因此寻求敏感度高、特异性强的生物标志物用于结直肠癌早期诊断已成为研究热点^[77]。

2018 年 Hou 等^[78]利用 PALT 筛选出一种可以与结直肠癌肿瘤细胞特异性结合的抗体 CBP-DWS,用于早期结肠癌成像检测;体外试验使用的细胞是人结肠癌细胞系 COLO320HSR、HCT116、SW480、HT29、LoVo 和正常人肠上皮细胞系 NCM460,在体外进行的 COLO320HSR 细胞结合试验中,抗体 CBP-DWS 的结合能力较强,其积分光密度值(integrated optical density, IOD)是对照抗体的 8 倍左右,并且在其他 4 种细胞系 HCT116、HT29、SW480 和 LoVo 中也都观察到了类似的结合趋势以及强烈的荧光信号,证明抗体 CBP-DWS 能够大量结合到结肠癌细胞系和组织上,且与正常的人肠上皮细胞株和正常的结肠周围组织几乎没有结合;生物信息学分析进一步表明,这种抗体还可以靶向作用于受体磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3)。据此有望开发结直肠癌的检测探针和治疗药物载体。

近年来,人表皮生长因子样结构域蛋白 6

(epidermal growth factor-like domain 6, EGFL6)已被报道与癌症的发展有关。2021 年 Sung 等^[79]发现 EGFL6 在 I-IV 期患者肿瘤组织中高表达,在非肿瘤组织中不表达。作者利用 PALT 针对靶点 EGFL6 制备了抗体 EGFL6-E5-IgG,研究其治疗结直肠癌的潜在效果;体外试验使用的是人结肠直肠癌细胞系 HCT-116 和 HT-29,以及小鼠结肠癌细胞系 CT-26;结果显示,EGFL6-E5-IgG 与抗原的亲合力为 1.91×10^{-8} nmol/L,EGFL6-E5-IgG 在荷瘤小鼠中可显著抑制肿瘤生长,肿瘤抑制率(tumor growth inhibition value, TGI)为 36.2% ($P < 0.01$),体重没有显著变化;同时,EGFL6-E5-IgG 还具有抗癌、抗转移和抗血管生成能力,且对伤口愈合无影响,证明了 EGFL6-E5-IgG 具有成为结直肠癌治疗剂的潜力。

作为世界上第三常见的恶性肿瘤,结直肠癌的发病率和死亡率都极高。约一半的结肠癌患者将发展为转移性结肠癌,约 25%的患者在确诊后已经发生转移^[80]。目前使用贝伐单抗治疗结直肠癌具有诸多不良反应,如可能会增加穿孔、出血和创面愈合并发症等^[81]。此外,结肠癌患者接受支架置入治疗恶性肠阻塞也有较高的结肠穿孔风险^[82]。因此,通过 PALT 筛选出特异性抗体来治疗结直肠癌将有助于减轻严重的不良反应并发挥有效的治疗效果。

3.6 前列腺癌

前列腺癌(prostate cancer)是男性泌尿系统和生殖系统常见的癌症。2020 年全球新发前列腺癌 140 万,死亡 37.5 万,是男性癌症死亡的第五大原因^[1]。目前治疗前列腺癌的手段主要包括手术治疗、放射治疗和内分泌治疗,但由于其早期诊断技术有限,大多数前列腺癌病人诊断时已是进展期,不适宜进行根治性手术。由于传统治疗方法都存在明显的局限性,人们

越来越多地把希望寄托于肿瘤的靶向治疗^[83]。

Mintz 等^[84]利用 PALT 对前列腺癌病人血清中的循环抗体进行 3 轮筛选,发现几乎所有的抗体所识别的多肽都包含有 N (X) S (T) DKS (T)的氨基酸序列;研究人员将 CNVSDKSC 的氨基酸序列与谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)结合形成融合蛋白,并通过 ELISA 试验研究了 108 名前腺癌患者和 71 名健康对照者血清与上述融合蛋白的结合情况。结果显示,79%的前腺癌晚期患者的血清能够与该融合蛋白发生阳性反应,远高于健康对照者的 7%。在此基础上,作者运用生化模拟和同源搜索等方法,鉴定了葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated protein-78 kDa, GRP78)为 CNVSDKSC 氨基酸序列对应的靶蛋白,并利用抗原抗体结合试验证明了抗 CNVSDKSC 的抗体同样可以识别 GRP78 蛋白^[84]。综上所述,基于 PALT 鉴定的 GRP78 是前列腺癌的潜在生物标志物。

2013 年 Shen 等^[85]利用 PALT 从噬菌体展示文库中筛选出了 2 种对前列腺癌特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)具有高度亲和力的 562 肽(SHSFSVSGDHPFT)和 563 肽(GRFLTGGTGRLLRIS),它们可以结合 PSMA 并诱导内化。数据显示,562 肽和 563 肽的 IC_{50} 值分别为 661 mmol/L 和 708 mmol/L,而当 562 肽形成四聚体后其具有更小的 IC_{50} 值(311 mmol/L),能以更高的亲和力结合 PSMA,从而可以进一步用于开发前列腺癌的成像检测和免疫治疗靶点。Han 等^[86]针对域外 B 纤连蛋白(EDB-FN),开发了一种具有 CTVRTSADC (ZD2)序列的环状非肽,可以用于局部特异性靶向治疗和前列腺癌成像;这种 ZD2 肽,在体内表现出对前列腺癌的特异性和靶向性,有望应用于前列腺癌的成像。

随着人口老龄化、饮食和生活习惯的改变,我国前列腺癌发病人数逐年增加,多以中晚期为主^[87],且发病年龄也日趋年轻化^[88]。国际上对前列腺癌诊断方法的差异很可能是造成世界各地前列腺癌发病率差距悬殊的主要因素。在美国、加拿大和澳大利亚等国家,由于广泛采用前列腺特异抗原检测,可以检测出早期癌症,因而发病率逐年下降^[89]。如果我国在诊疗前期也能够及时利用相关抗体进行早期诊断,前列腺癌患者的存活率有望大大提高。

3.7 膀胱癌

膀胱癌(bladder cancer)是指发生在膀胱粘膜表面的恶性肿瘤^[90]。2020 年全球新发膀胱癌 57.3 万,男女比约为 4:1,是男性第六常见的癌症^[1]。传统的白光膀胱镜在检查微小肿瘤、原位癌时敏感性较低,有一定漏诊率,因此医学上迫切需要发现新的生物标志物用于膀胱癌的无创性诊断,同时开展更深入的研究以寻找新的靶点,为膀胱癌的精准确治疗提供理论依据。

2005 年 Martínez-Torrecedrada 等^[91]对成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)进行了研究,指出成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor, FGFR3)可能是泌尿系肿瘤治疗的潜在靶点,并针对该靶点筛选得到了人源 scFv 抗体 3C 和 7D;体外试验中使用膀胱癌细胞系 RT112 测定 2 种的亲和力,抗体 3C 和 7D 的亲和力分别为 25.0 nmol/L 和 40.9 nmol/L;随后对 RT112 细胞染色后进行流式细胞术分析,当使用 3B、3C、2D 和 7D 纯化的抗体片段时,3C 和 7D 出现了强烈的免疫荧光染色,其中大部分是活的 RT112 细胞,而其他抗体染色的细胞百分较低,表明抗体对表位的可及性不同;使用抗体 3C 和 7D 对 RT112 细胞进行的免疫沉淀试验中,产生了一条显著的条带,该条带能被 FGFR3 特异性识别,证实

了这 2 种抗体识别 FGFR3 的能力;最后从形态学的角度发现使用 3C 和 7D 处理 48 h 后的细胞形态发生明显变化并且生长减慢,其中 7D 对细胞有着更为突出的空泡化作用。综上所述这 2 种抗体对癌细胞均有很好的识别效果,有望作为新型抗肿瘤药物应用于膀胱癌治疗领域。

2017 年 Sweeney 等^[92]利用 PALT 筛选出了抗体 Cyc6,该抗体与介孔二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticle, MSN)结合后对膀胱癌细胞表现出特异性,并且在小鼠和人类等多个物种中具有同源性;体外试验使用全细胞的荧光显微镜和提取细胞膜蛋白的荧光研究来评估 Cyc6 的特异性。结合 4 h 后,膀胱癌细胞 MB49 的结合程度明显高于正常细胞 NIH3T3;试验数据显示,在 MRI 中测量的分段肿瘤体积分别为 7.4、9.5、15.9 mm³,其中具有 7.4 mm³肿瘤的小鼠接受了 FITC-Gd2O3-MSN 滴注,另外 2 只小鼠接受了 Cyc6-FITC-Gd2O3-MSN 滴注,24 h 后的 MRI 扫描结果显示,用 Cyc6 功能化的 MSN 小鼠中具有明显的低信号;在体外试验中,Cyc6 与 MSN 结合后,提高了与膀胱癌细胞的结合效率和特异性;而在体内模型中,将 MSN 注入小鼠的膀胱,增强了 MRI 信号,提高了肿瘤边界的检测。上述研究先通过 PALT 筛选抗体、再结合其他技术进一步增加靶向性的这一思路可实际用于膀胱癌肿瘤治疗监测和药物输送。

阿特殊单抗(Atezolizumab)是一种靶向 PD-L1 的人源化 IgG1 单克隆抗体。阿特殊单抗可与 PD-L1 结合并阻止 PD-L1 与其受体 PD-1 和 B7-1 之间的相互作用,避免肿瘤细胞 PD-L1 表达后使效应 T 细胞失活,从而防止 T 细胞耗竭,体现出抗肿瘤活性。阿特殊单抗在 I 期的临床治疗的数据显示^[93],尽管有 57% 的膀胱癌患者出现了与阿特殊单抗相关的不良反应,但是

仅有 4% 的患者出现了三级不良反应,其他不良反应多为疲劳和食欲下降。接下来研究人员对阿特殊单抗进行了 II 期研究(IMVigor210)^[93],第一组针对不适合用顺铂治疗的晚期膀胱癌患者,其总体缓解率(overall response rate, ORR)为 23%,完全缓解率(complete response, CR)为 9%,中位应答时间为 2.1 个月,中位总生存期(median overall survival, OS)为 15.9 个月,而中位无进展生存期(progress free survival, PFS)仅为 2.7 个月;第二组针对适合铂类化疗患者进行研究,不良反应率为 69%,但只有 16% 的患者出现 3-4 级严重不良反应,并且没有出现与治疗相关的死亡病例;在高表达 PD-L1 的患者体内 ORR 为 26%,CR 为 11%。2016 年, FDA 批准阿特殊单抗用于辅助铂类化疗膀胱癌,2017 年 FDA 加速批准阿特殊单抗用于无法采用顺铂治疗的晚期膀胱癌患者的初始治疗,以商品名 Tecentriq 销售。

目前,膀胱癌的临床诊疗在医疗实践过程中仍存在许多问题,如侵入性检查导致的创伤、尿细胞学检查引起的尿路感染以及手术无法确保肿瘤全部切除等,甚至有越来越多的数据表明在多种技术改进后膀胱癌的复发率并没有明显降低^[94]。而膀胱癌的早期诊断有望提升患者的生存率,因此医学上迫切需要开发新的非侵入性的检查方法以及更敏感的生物标志物和治疗靶点,近年来 PALT 的应用为无创性诊断和治疗膀胱癌提供了可能。

3.8 白血病

白血病(leukemia),亦称血癌,是一类起源于造血干细胞的恶性疾病。2020 年全球白血病新发 47.4 万,死亡 31.1 万^[1]。临床上治疗白血病的主要方法有骨髓移植和化疗等,但都存在易复发和易耐药等问题。数据显示,20 岁以上急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)和急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,

ALL)患者的5年生存率仅为25%和37%^[95],且有一半以上的患者最终复发^[96]。PALT作为一种开发新抗体的有效技术,有望在白血病的临床诊断和药物研发上得到应用。

2015年Fitting等^[97]利用噬菌体展示文库筛选出了一种scFv(EMI405),结果发现分离纯化的EMI405可以特异性地结合在AML细胞和AML骨髓活检标本表面,并于15min内被Kasumi-1细胞内化。为了进一步获得抗体-药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC),作者将EMI405序列插入到含有假单胞菌(*Pseudomonas*)外毒素A(exotoxin A, ETA')基因的原核表达载体,从而大规模生产具有免疫毒性的scFv-ETA'融合蛋白;采用XTT比色法检测细胞增殖活性,测得EMI405(scFv)-ETA'的 IC_{50} 值为(265.2±0.2)nmol/L,且对细胞生长的抑制呈剂量依赖性;而Kasumi-1细胞的活力既不受非特异性蛋白425(scFv)-ETA'的影响,也不受非内化EMI408的影响;此外,EMI405对阴性对照KG-1细胞的活力无影响,证实了其靶向细胞毒性。在研究免疫毒素融合蛋白EMI405(scFv)-ETA'诱导细胞凋亡时,检测了Kasumi-1样品中半胱天冬酶底物的信号水平;结果显示,96h后Kasumi-1细胞的凋亡率为33.0%±1.4%,而KG-1细胞的凋亡率为0.6%±0.1%,Kasumi-1细胞在48h和72h时的凋亡百分比分别为4.2%±2.1%和15.9%±0.6%,表明细胞的凋亡呈时间依赖性增加。该研究将有助于人们开发新的肿瘤特异性内化抗体片段,为AML患者提供一种前所未有的免疫治疗策略。

2021年Weber等^[98]针对AML的Kasumi-1细胞系构建了噬菌体展示文库,并筛选出AB11、AB22、AB24和AB35共4种抗体;流式细胞术分析结果显示,通过增加内化时间,抗体AB11、AB22、AB24和AB35都表现为荧

光信号减少;共聚焦成像的结果表明,细胞膜在初始时显示出明亮的荧光信号,而240min后荧光信号微弱,进一步证实了这4种抗体的内化活性;此外,当筛选的轮数为3轮时,发现原始细胞的计数对于噬菌体抗体选择的结果起重要的作用,并且能够分离出4种对AML原始细胞高亲和力的抗体。未来还需要使用此类抗体来验证其对恶性细胞的杀伤效果,从而进一步在临床治疗中发挥作用。

现阶段抗体免疫疗法作为治疗白血病一种的新方法,具有毒副作用低、特异性强等优点,已经引起了人们的广泛重视。近年来随着抗体人源化技术的进步,抗体药物在肿瘤临床治疗领域已取得突破性进展,在这一大背景下,基于原发肿瘤细胞的PALT有望成为白血病治疗领域的焦点。

4 总结与展望

PALT是一种日渐发展成熟的抗体制备技术^[32],自1985年Smith^[8]证明了噬菌体具有展示肽的能力以来,PALT便逐渐朝着简便、有效和易于控制的方向前进,在肿瘤早期诊断和治疗方面展现出很好的应用前景。本文详细介绍了PALT的发展历程和技术原理等内容,并阐述了该技术在肿瘤治疗中发挥的重要作用(表3)。PALT在肿瘤治疗领域的主要应用方向包括:(1)靶向治疗,利用PALT筛选得到的抗体或多肽可以发挥治疗肿瘤的作用,例如单抗IgG-69^[54]、单抗IgG-H1^[58]和EGFL6-E5-IgG^[79]等。(2)偶联毒素,抗体可以通过与杀伤肿瘤的活性物质相偶联,更好地发挥特异性治疗肿瘤的效果,例如抗体R9V_HH17^[53]、免疫毒素32A9-mPE24^[74]。(3)联合治疗,单抗与不同的肿瘤治疗方法相结合,可以实现更好的治疗效果,例如¹⁷⁷Lu-anti-CD55抗体^[60]与顺铂联合治疗。此外,PALT不仅可筛

表 3 PALT 制备的用于肿瘤治疗的抗体

Table 3 Antibody for tumor treatment prepared by PALT

Cancer	Antibodies discovered by PALT	Target	Reference
Breast cancer	V _H H17	HER2-TK	[53]
	IgG-69	rhDLL1	[54]
Lung cancer	IgG-H1	hYKL-40	[58]
	¹⁷⁷ Lu-anti-CD55	CD55	[60]
	Necitumumab	EGFR	[61]
Gastric cancer	AAD	BGC823/-	[64]
	DE532, DEObs	MKN-45/-	[65]
	F10, G1	MKN-45/HSP90a, HSP90b, c-Met	[66]
	Ramucirumab	VEGFR2	[67]
Hepatocellular carcinoma	HCBP1	HepG2/-	[72]
	HC1	Serum	[73]
	32A9	GPC3	[74]
Colorectal cancer	CBP-DWS	COLO320HSR/-	[78]
	EGFL6-E5-IgG	HCT-116/EGFL6	[79]
Prostate cancer	CNVSDKSC	GRP78	[84]
	GRFLTGGTGRLL-RIS, SHSFSVSGGDHSPFT	PSMA	[85]
	ZD2	EDB-FN	[86]
	3C, 7D	RT112/FGFR3	[91]
Bladder cancer	Cyc6	MB49/-	[92]
	Atezolizumab	PD-L1	[93]
Leukemia	EMI405	Kasumi-1/-	[97]
	AB11, AB22, AB24, AB35	Kasumi-1/-	[98]

选出治疗性抗体外,也可以用于肿瘤生物标志物的筛选与鉴定,例如胃癌的标志物 HSP90a、HSP90b 和 c-Met^[66]、多肽 AAD^[64]和多肽 HC1^[73]等。

综上所述,利用 PALT 制备的抗体在肿瘤治疗方面具有良好的应用前景。相较于目前其他单抗制备技术,PALT 具有筛选范围广、抗体制备周期短、全人源化、无需经过机体免疫等复杂步骤、可在体外环境下操作以及噬菌体表型与基因型统一易于筛选等优点。其生产的抗体不仅能够特异性识别抗原决定簇,还可以根据临床需要进行抗体结构调整而不影响抗体治疗效果,具有进行工程化大量生产的优势^[99]。所以 PALT 出现后立即引起了各领域的广泛关注并得到迅速发展。

但 PALT 也具有一定的局限性。首先,PALT 筛选的成功主要依靠噬菌体抗体库的库容(10^8-10^{10})大小,因为抗体库的库容决定着能否筛选出与抗原特异性结合的高质量抗体。然而,为分离出高亲和力且特异性结合的抗体需要进行大规模的淘筛。2016 年 Rahbarnia 等^[100]针对这一问题开发了一种称为倒置生物淘选的新型筛选策略,可以高效快速地分离高亲和力 scFvs。试验对比了 2 种不同的淘筛策略获得抗体的亲和力和特异性,策略一直接对抗原进行筛选,策略二首先对消除非特异性结合的干扰,再对抗原进行筛选。用于筛选的抗原浓度同为 25 mg/mL,策略一中特异性噬菌体滴度为 5×10^6 PFU/mL,策略二中滴度为 3.4×10^4 PFU/mL,滴度明显小于策略一,表明该方法能够有效排

除非特异性结合的干扰,提高了筛选出特异性抗体效率。

其次, PALT 一般用于制备如 scFv 这一类分子量较小的重组抗体,这类抗体虽然具有较强的肿瘤穿透能力,但与完整抗体相比,其半衰期更短,热稳定性较差,可能在未到达特定靶点时就被分解从而无法发挥作用。针对小分子抗体结构不稳定的问题,一种有效的策略是通过各种诱变方式对抗体进行功能改造或性能优化。例如, Schier 等^[101]对靶向肿瘤抗原 c-erbB-2 的 scFv 进行研究,发现野生型抗体在肿瘤细胞表面的半衰期仅为 13 min,而来自 4 个 VH CDR3 库的突变株抗体的半衰期则长达 24 h。Miller 等^[102]通过结合突变将 scFv 的中点转变温度(mid-point transition temperature, T_{50})提升至 82 °C,相较于野生型 BHA10 抗体提高了 33 °C,有着更高的耐热性能。另一种策略是对抗体进行共价融合,构建诸如含 Fc 区的双特异性抗体(IgG-like 双特异性抗体)的稳定结构形式。例如, Fennell 等^[103]利用 4 个 VL CDR3 库的突变株生产出一种能靶向结合可溶性趋化因子 CXCL13 和细胞表面炎症抗原的 scFv-Fc-scFv 分子,并已验证该双特异性抗体在 100 mg/mL 标准药物缓冲液中具有稳定的稳定性,适合用于皮下给药。

目前实际生产中通常使用免疫球蛋白形式的抗体,而利用 PALT 筛选出的 scFv 或 Fab 通常被转化为 IgG 形式进而应用于产品开发。但是转化的过程中,不同形式的抗体之间活性和功能缺乏一致性,有时转化后的 IgG 与 scFv 的分子性质和生物物理性质明显不同,对抗体的实际应用造成很大影响。2017 年 Xiao 等^[104]开发了一个免疫球蛋白功能筛选平台(SiPF),它不同于以前的克隆策略,通过 PCR 扩增噬菌体载体上 scFv 的基因,得到线性化噬菌体 scFv,不

会干扰可变区的多样性和配对情况,进而将 scFv 从噬菌体文库中重新格式化为 IgG,以 IgG 的形式进行抗体的筛选,解决了改变抗体结构所导致的功能失效等问题。

随着现代生活节奏的不断加快和自然环境的变化,恶性肿瘤在人群中的发病率不断上升,亟须开发新型有效的治疗方法。PALT 的出现及噬菌体抗体的研制成功已成为生命科学研究的突破性进展之一^[105],其与现有抗体制备技术相比,具有生产周期短、抗体结构可塑性强、抗体产量大、多样性高和可直接生产人源化抗体等优点,会在未来肿瘤的诊断和治疗领域大放异彩。

REFERENCES

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 刘宗超,李哲轩,张阳,周彤,张婧莹,游伟程,潘凯枫,李文庆. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
LIU ZC, LI ZX, ZHANG Y, ZHOU T, ZHANG JY, YOU WC, PAN KE, LI WQ. Interpretation of 2020 Global Cancer Statistics Report[J]. Electronic Journal of Integrated Oncology Therapy, 2021, 7(2): 1-14 (in Chinese).
- [3] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志, 2021, 13(3): 63-69.
CAO MM, CHEN WQ. Interpretation on the global cancer statistics of GLOBOCAN 2020[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science, 2021, 13(3): 63-69 (in Chinese).
- [4] BEHRING E, KITASATO S. Ueber das zustandekommen der diphtherie-Immunität und der tetanus-Immunität bei thieren[J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1890, 16(49): 1113-1114.
- [5] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.

- [6] SHAPIRO E, BIEZUNER T, LINNARSSON S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(9): 618-630.
- [7] WINTERS A, MCFADDEN K, BERGEN J, LANDAS J, BERRY KA, GONZALEZ A, SALIMI-MOOSAVI H, MURAWSKY CM, TAGARI P, KING CT. Rapid single B cell antibody discovery using nanopens and structured light[J]. *mAbs*, 2019, 11(6): 1025-1035.
- [8] SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [9] WANG YC, GAO SH, LV JY, LIN Y, ZHOU L, HAN LY. Phage display technology and its applications in cancer immunotherapy[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(2): 229-235.
- [10] MCCAFFERTY J, GRIFFITHS AD, WINTER G, CHISWELL DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. *Nature*, 1990, 348(6301): 552-554.
- [11] WINTER G, GRIFFITHS AD, HAWKINS RE, HOOGENBOOM HR. Making antibodies by phage display technology[J]. *Annual Review of Immunology*, 1994, 12: 433-455.
- [12] NAGANO K, TSUTSUMI Y. Phage display technology as a powerful platform for antibody drug discovery[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 178.
- [13] COGHLAN J, HE HL, SCHWENDEMAN AS. Overview of humira® biosimilars: current European landscape and future implications[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 110(4): 1572-1582.
- [14] SHADIDI M, SØRENSEN D, DYBWAD A, FURSET G, SIOUD M. Mucosal vaccination with phage-displayed tumour antigens identified through proteomics-based strategy inhibits the growth and metastasis of 4T1 breast adenocarcinoma[J]. *International Journal of Oncology*, 2008, 32(1): 241-247.
- [15] LIANG SH, LIN T, DING J, PAN YL, DANG DM, GUO CC, ZHI M, ZHAO PT, SUN L, HONG L, SHI YQ, YAO LP, LIU J, WU KC, FAN DM. Screening and identification of vascular-endothelial-cell-specific binding peptide in gastric cancer[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2006, 84(9): 764-773.
- [16] BAI FH, LIANG J, WANG J, SHI YQ, ZHANG KD, LIANG SH, HONG L, ZHAI HH, LU YY, HAN Y, YIN F, WU KC, FAN DM. Inhibitory effects of a specific phage-displayed peptide on high peritoneal metastasis of gastric cancer[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2007, 85(2): 169-180.
- [17] LO A, LIN CT, WU HC. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2008, 7(3): 579-589.
- [18] PARMLEY SF, SMITH GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes[J]. *Gene*, 1988, 73(2): 305-318.
- [19] WARD ES, GÜSSOW D, GRIFFITHS AD, JONES PT, WINTER G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 1989, 341(6242): 544-546.
- [20] SBLATTERO D, BRADBURY A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions[J]. *Immunotechnology*, 1998, 3(4): 271-278.
- [21] ARAP W, KOLONIN MG, TREPEL M, LAHDENRANTA J, CARDÓ-VILA M, GIORDANO RJ, MINTZ PJ, ARDELT PU, YAO VJ, VIDAL CI, CHEN L, FLAMM A, VALTANEN H, WEAVIND LM, HICKS ME, POLLOCK RE, BOTZ GH, BUCANA CD, KOIVUNEN E, CAHILL D, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(2): 121-127.
- [22] DONG L, MASAKI Y, TAKEGAMI T, KAWANAMI T, ITOH K, JIN ZX, HUANG CR, TONG XP, FUKUSHIMA T, TANAKA M, SAWAKI T, SAKAI T, SUGAI S, OKAZAKI T, HIROSE Y, UMEHARA H. Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen[J]. *International Immunology*, 2007, 19(3): 331-336.
- [23] ILLANES A. Dr. Frances Arnold is awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2018: good news for biocatalysis[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 36: A1.
- [24] HUSE WD, SASTRY L, IVERSON SA, KANG AS, ALTING-MEES M, BURTON DR, BENKOVIC SJ, LERNER RA. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda[J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1275-1281.
- [25] KEMPENI J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1999, 58(supplement 1): i70-i72.
- [26] FELDMANN M, MAINI RN. Discovery of TNF- α as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical

- and clinical studies[J]. *Joint Bone Spine*, 2002, 69(1): 12-18.
- [27] FRENZEL A, SCHIRRMANN T, HUST M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy[J]. *mAbs*, 2016, 8(7): 1177-1194.
- [28] PAN YB, DU JH, LIU J, WU H, GUI F, ZHANG N, DENG XJ, SONG G, LI YF, LU J, WU XL, ZHAN SS, JING ZF, WANG J, YANG YM, LIU JB, CHEN Y, CHEN Q, ZHANG HY, HU HR, et al. Screening of potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 using convalescent patients-derived phage-display libraries[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 57.
- [29] HOOGENBOOM HR. Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications[M]. New York: *Methods in Molecular Biology*, 2002, 178: 1-37.
- [30] KRETZSCHMAR T, von RÜDEN T. Antibody discovery: phage display[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(6): 598-602.
- [31] 黄菊. 膀胱癌噬菌体抗体库的构建和微生物组成研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2022. HUANG J. Construction of phage antibody library of bladder cancer and study on microbial composition[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2022 (in Chinese).
- [32] KUPSCH JM, TIDMAN NH, KANG NV, TRUMAN H, HAMILTON S, PATEL N, NEWTON BISHOP JA, LEIGH IM, CROWE JS. Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5(4): 925-931.
- [33] CHANG TY, SIEGEL DL. Genetic and immunological properties of phage-displayed human anti-Rh(D) antibodies: implications for Rh(D) epitope topology[J]. *Blood*, 1998, 91(8): 3066-3078.
- [34] BENHAR I. Design of synthetic antibody libraries[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2007, 7(5): 763-779.
- [35] CESARO-TADIC S, LAGOS D, HONEGGER A, RICKARD JH, PARTRIDGE LJ, BLACKBURN GM, PLÜCKTHUN A. Turnover-based *in vitro* selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(6): 679-685.
- [36] ROJAS G, LAMDAN H, PADRON S, MUNOZ Y, AYALA M, GAVILONDO JV. Efficient construction of a highly useful phage-displayed human antibody repertoire[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336(4): 1207-1213.
- [37] KIM S, PARK I, PARK SG, CHO S, KIM JH, IPPERNS, CHOI SS, LEE ES, HONG HJ. Generation, diversity determination, and application to antibody selection of a human Naïve fab library[J]. *Molecules and Cells*, 2017, 40(9): 655.
- [38] MENG FM, ZHANG CH, AI YC. Advances of development of phage display systems[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(10): 1113-1120.
- [39] 贾球锋, 李丽芳, 张映. 噬菌体展示技术[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(2): 101-103. JIA QF, LI LF, ZHANG Y. Phage display technology[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(2): 101-103 (in Chinese).
- [40] 郭莉, 汤永民. 噬菌体展示系统的研究进展[J]. *医学分子生物学杂志*, 2005, 2(3): 205-209. GUO L, TANG YM. Advances in studies on phage display systems[J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2005, 2(3): 205-209 (in Chinese).
- [41] 祝仁发, 黄莉清, 何后军, 谢宝东. 噬菌体展示系统及筛选技术研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2005(S1): 23-26. ZHU RF, HUANG LQ, HE HJ, XIE BD. Research progress of phage display system and screening technology[J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2005(S1): 23-26 (in Chinese).
- [42] 侯伟. 噬菌体展示系统的构建及其在疾病防控领域应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(5): 1688-1696. HOU W. Research progress on construction of phage display system and its application in the field of disease prevention and control[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(5): 1688-1696 (in Chinese).
- [43] 张文倩, 李华琴. 噬菌粒载体在噬菌体展示中的应用和研究进展[J]. *生物技术*, 2014, 24(1): 96-100. ZHANG WQ, LI HQ. Application and progress of phagemid vector in phage display[J]. *Biotechnology*, 2014, 24(1): 96-100 (in Chinese).
- [44] FARAJNIA S, AHMADZADEH V, TANOMAND A, VEISI K, KHOSROSHAHI SA, RAHBARNIA L. Development trends for generation of single-chain antibody fragments[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2014, 36(5): 297-308.
- [45] OMAR N, LIM TS. Construction of naive and immune human fab phage-display library[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York,

- 2017: 25-44.
- [46] HUANG YJ, CHEN IC, YU CM, LEE YC, HSU HJ, CHING ATC, CHANG HJ, YANG AS. Engineering anti-vascular endothelial growth factor single chain disulfide-stabilized antibody variable fragments (sc-dsFv) with phage-displayed sc-dsFv libraries[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(11): 7880-7891.
- [47] LI KY, ZETTLITZ KA, LIPIANSKAYA J, ZHOU Y, MARKS JD, MALLICK P, REITER RE, WU AM. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2015, 28(10): 307-316.
- [48] MARTIN F, TONIATTI C, SALVATI AL, VENTURINI S, CILIBERTO G, CORTESE R, SOLLAZZO M. The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6[J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(22): 5303-5309.
- [49] 史茜. 联合人附睾蛋白 4 的特征性抗原提取及对女性常见恶性肿瘤异质性的分子水平评估及临床意义[D]. 大连医科大学硕士学位论文, 2019.
- SHI Q. Characteristic antigen extraction of human epididymal protein 4 and molecular level assessment of heterogeneity of common female malignant tumors and its clinical significance[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Medical University, 2019 (in Chinese).
- [50] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424.
- [51] TAO ZQ, SHI AM, LU CT, SONG T, ZHANG ZG, ZHAO J. Breast cancer: epidemiology and etiology[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015, 72(2): 333-338.
- [52] VALABREGA G, MONTEMURRO F, AGLIETTA M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer[J]. *Annals of Oncology*, 2007, 18(6): 977-984.
- [53] LAMTHA T, TABTIMMAI L, BANGPHOOMI K, KIRIWAN D, MALIK AA, CHAICUMPA W, van BERGEN EN HENEGOUWEN PMP, CHOOWONGKOMON K. Generation of a nanobody against HER2 tyrosine kinase using phage display library screening for HER2-positive breast cancer therapy development[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2021, 34: gzab030.
- [54] SALES-DIAS J, FERREIRA A, LAMY M, DOMENICI G, MONTEIRO SMS, PIRES A, LEMOS AR, KUCHERYAVA K, NOBRE LS, SOUSA PMF, BANDEIRAS TM, SILVA G, BARBAS A. Development of antibodies against the Notch ligand delta-like-1 by phage display with activity against breast cancer cells[J]. *New Biotechnology*, 2021, 64: 17-26.
- [55] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(2): 69-90.
- [56] PIRKER R. EGFR-directed monoclonal antibodies in non-small cell lung cancer[J]. *Targeted Oncology*, 2013, 8(1): 47-53.
- [57] BUNN PA JR, MINNA JD, AUGUSTYN A, GAZDAR AF, OUADAH Y, KRASNOW MA, BERNS A, BRAMBILLA E, REKHTMAN N, MASSION PP, NIEDERST M, PEIFER M, YOKOTA J, GOVINDAN R, POIRIER JT, BYERS LA, WYNES MW, MCFADDEN DG, MACPHERSON D, HANN CL, et al. Small cell lung cancer: can recent advances in biology and molecular biology be translated into improved outcomes?[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2016, 11(4): 453-474.
- [58] KANG K, KIM K, LEESR, KIM Y, LEE JE, LEE YS, LIM JH, LIM CS, KIM YJ, BAEK SI, SONG DH, HONG JT, KIM DY. Selection and characterization of YKL-40-targeting monoclonal antibodies from human synthetic fab phage display libraries[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6354.
- [59] YEO IJ, LEE C-K, HAN S-B, YUN J, HONG JT. Roles of chitinase 3-like 1 in the development of cancer, neurodegenerative diseases, and inflammatory diseases[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019, 203: 107394.
- [60] DHO SH, KIM SY, CHUNG C, CHO EH, LEE SY, KIM JY, KIM LK, MIN SW, LEE J, JUNG SH, LIM JC. Development of a radionuclide-labeled monoclonal anti-CD55 antibody with theranostic potential in pleural metastatic lung cancer[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8960.
- [61] THATCHER N, HIRSCH FR, LUFT AV, SZCZESNA A, CIULEANU TE, DEDIU M, RAMLAU R, GALIULIN RK, BÁLINT B, LOSONCZY G, KAZARNOWICZ A, PARK K, SCHUMANN C, RECK M, DEPENBROCK H, NANDA S, KRULJAC-LETUNIC A, KUREK R, PAZ-ARES L, SOCINSKI MA. Necitumumab plus gemcitabine and

- cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial[J]. *The Lancet Oncology*, 2015, 16(7): 763-774.
- [62] ZHOU D, QUAN ZW, WANG JD, ZHAO MN, YANG Y. Laparoscopic-assisted versus open distal gastrectomy with D2 lymph node resection for advanced gastric cancer: effect of learning curve on short-term outcomes. A meta-analysis[J]. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques*, 2014, 24(3): 139-150.
- [63] THOMAS DS, FOURKALA EO, APOSTOLIDOU S, GUNU R, RYAN A, JACOBS I, MENON U, ALDERTON W, GENTRY-MAHARAJ A, TIMMS JF. Evaluation of serum CEA, CYFRA21-1 and CA125 for the early detection of colorectal cancer using longitudinal preclinical samples[J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 113(2): 268-274.
- [64] ZHANG WJ. Affinity peptide developed by phage display selection for targeting gastric cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(17): 2053.
- [65] SAHIN D, TAFLAN SO, YARTAS G, ASHKTORAB H, SMOOT D. Screening and identification of peptides specifically targeted to gastric cancer cells from a phage display peptide library[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 2018, 19: 927-932.
- [66] MEHDIPOUR T, TOHIDKIA MR, ATA SAEI A, KAZEMI A, KHAJEH S, RAHIM RAHIMI AA, NIKFARJAM S, FARHADI M, HALIMI M, SOLEIMANI R, ZUBAREV RA, NOURI M. Tailoring subtractive cell biopanning to identify diffuse gastric adenocarcinoma-associated antigens via human scFv antibodies[J]. *Immunology*, 2020, 159(1): 96-108.
- [67] LU D, JIMENEZ X, ZHANG HF, BOHLEN P, WITTE L, ZHU ZP. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy[J]. *International Journal of Cancer*, 2002, 97(3): 393-399.
- [68] LU D, SHEN JQ, VIL MD, ZHANG HF, JIMENEZ X, BOHLEN P, WITTE L, ZHU ZP. Tailoring *in vitro* selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(44): 43496-43507.
- [69] FUCHS CS, TOMASEK J, YONG CJ, DUMITRU F, PASSALACQUA R, GOSWAMI C, SAFRAN H, dos SANTOS LV, APRILE G, FERRY DR, MELICHAR B, TEHFE M, TOPUZOV E, ZALCBERG JR, CHAU I, CAMPBELL W, SIVANANDAN C, PIKIEL J, KOSHIJI M, HSU Y, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *The Lancet*, 2014, 383(9911): 31-39.
- [70] GIANNINI EG, FARINATI F, CICCARESE F, PECORELLI A, RAPACCINI GL, DI MARCO M, BENVENIGNU L, CATURELLI E, ZOLI M, BORZIO F, CHIARAMONTE M, TREVISANI F, ITALIAN LIVER CANCER G. Prognosis of untreated hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 184-190.
- [71] ZHU XD, TANG ZY, SUN HC. Targeting angiogenesis for liver cancer: past, present, and future[J]. *Genes & Diseases*, 2020, 7(3): 328-335.
- [72] ZHANG BH, ZHANG YQ, WANG JW, ZHANG YD, CHEN JJ, PAN YF, REN LF, HU ZY, ZHAO JF, LIAO MM, WANG SW. Screening and identification of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library[J]. *Molecular Medicine*, 2007, 13(5/6): 246-254.
- [73] ZHANG ZJ, XU LY, WANG ZM. Screening serum biomarkers for early primary hepatocellular carcinoma using a phage display technique[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2011, 25(6): 402-408.
- [74] LIU XY, GAO F, JIANG LW, JIA M, AO L, LU M, GOU LM, HO M, JIA SC, CHEN F, GAO W. 32A9, a novel human antibody for designing an immunotoxin and CAR-T cells against glypican-3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2020, 18(1): 1-12.
- [75] 陈建国, 宋新明. 中国肝癌发病水平的估算及分析[J]. *中国肿瘤*, 2005, 14(1): 28-31.
CHEN JG, SONG XM. An evaluation on incident cases of liver cancer in China[J]. *Bulletin of Chinese Cancer*, 2005, 14(1): 28-31 (in Chinese).
- [76] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 曾红梅, 邹小农, 陈茹, 顾秀瑛, 魏文强, 赫捷. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.
ZHENG RS, SUN KX, ZHANG SW, ZENG HM, ZOU XN, CHEN R, GU XY, WEI WQ, HE J. Report of cancer epidemiology in China, 2015[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2019, 41(1): 19-28 (in Chinese).

- [77] IJSSELSTEIJN ME, SANZ-PAMPLONA R, HERMITTE F, de MIRANDA NFCC. Colorectal cancer: a paradigmatic model for cancer immunology and immunotherapy[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, 69: 123-129.
- [78] HOU LD, ZHU DX, LIANG Y, TIAN XH, LI L, WANG P, ZHU LM, WENG XL, WANG YY, LI Y, WU TQ, WANG JH, MENG XJ. Identification of a specific peptide binding to colon cancer cells from a phage-displayed peptide library[J]. *British Journal of Cancer*, 2018, 118(1): 79-87.
- [79] SUNG TY, HUANG HL, CHENG CC, CHANG FL, WEI PL, CHENG YW, HUANG CC, LEE YC, HUANGFU WC, PAN SL. EGFL6 promotes colorectal cancer cell growth and mobility and the anti-cancer property of anti-EGFL6 antibody[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 1-14.
- [80] MA HB, WU XL, TAO MM, TANG N, LI YY, ZHANG XQ, ZHOU Q. Efficacy and safety of bevacizumab-based maintenance therapy in metastatic colorectal cancer[J]. *Medicine*, 2019, 98(50): e18227.
- [81] GORDON CR, ROJAVIN Y, PATEL M, ZINS JE, GRANA G, KANN B, SIMONS R, ATABEK U. A review on bevacizumab and surgical wound healing[J]. *Annals of Plastic Surgery*, 2009, 62(6): 707-709.
- [82] PACHECO-BARCIA V, MONDÉJAR R, MARTÍNEZ-SÁEZ O, LONGO F, MORENO JA, ROGADO J, DONNAY O, SANTANDER C, CARRATO A, COLOMER R. Safety and oncological outcomes of bevacizumab therapy in patients with advanced colorectal cancer and self-expandable metal stents[J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2019, 18(3): e287-e293.
- [83] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [84] MINTZ PJ, KIM J, DO KA, WANG XM, ZINNER RG, CRISTOFANILLI M, ARAP MA, HONG WK, TRONCOSO P, LOGOTHETIS CJ, PASQUALINI R, ARAP W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(1): 57-63.
- [85] SHEN DW, XIE F, EDWARDS WB. Evaluation of phage display discovered peptides as ligands for prostate-specific membrane antigen (PSMA)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68339.
- [86] HAN Z, ZHOU ZX, SHI XY, WANG JP, WU XH, SUN D, CHEN YH, ZHU H, MAGI-GALLUZZI C, LU ZR. EDB fibronectin specific peptide for prostate cancer targeting[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, 26(5): 830-838.
- [87] 唐华科, 曾星, 胡志全. 去势抵抗前列腺癌新型内分泌治疗耐药的研究进展[J]. *肿瘤*, 2017, 37(9): 1006-1010.
- TANG HK, ZENG X, HU ZQ. Progress on resistance to new endocrine therapy in castration-resistant prostate cancer[J]. *Tumor*, 2017, 37(9): 1006-1010 (in Chinese).
- [88] AIGNER A, RENNEBERG H, BOJUNGA J, APEL J, NELSON PS, CZUBAYKO F. Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5733-5742.
- [89] ZHOU CK, CHECK DP, LORTET-TIEULENT J, LAVERSANNE M, JEMAL A, FERLAY J, BRAY F, COOK MB, DEVESA SS. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: an analysis of time trends overall and by age group[J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(6): 1388-1400.
- [90] RAZZAK M. Narrow-band imaging—improving urothelial carcinoma detection[J]. *Nature Reviews Urology*, 2012, 9(1): 3.
- [91] MARTÍNEZ-TORRECUADRADA J, CIFUENTES G, LÓPEZ-SERRA P, SAENZ P, MARTÍNEZ A, CASAL JI. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation[J]. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11(17): 6280-6290.
- [92] SWEENEY S, LUO Y, O'DONNELL M, ASSOULINE J. Peptide-mediated targeting mesoporous silica nanoparticles: a novel tool for fighting bladder cancer[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2017, 13(2): 232-242.
- [93] SHAH NJ, KELLY WJ, LIU SV, CHOQUETTE K, SPIRA A. Product review on the anti-PD-L1 antibody atezolizumab[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2018, 14(2): 269-276.
- [94] WU CH, LIU IJ, LU RM, WU HC. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 1-14.
- [95] HAFERLACH T, SCHMIDTS I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia[J]. *British Journal of Haematology*, 2020,

- 188(1): 36-48.
- [96] RONSON A, TVITO A, ROWE JM. Treatment of relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in adults[J]. *Current Oncology Reports*, 2016, 18(6): 1-10.
- [97] FITTING J, BLUME T, TEN HAAF A, BLAU W, GATTENLÖHNER S, TUR MK, BARTH S. Phage display-based generation of novel internalizing antibody fragments for immunotoxin-based treatment of acute myeloid leukemia[J]. *mAbs*, 2015, 7(2): 390-402.
- [98] WEBER T, PSCHERER S, GAMERDINGER U, TEIGLER-SCHLEGEL A, RUTZ N, BLAU W, RUMMEL M, GATTENLÖHNER S, TUR M. Parallel evaluation of cell-based phage display panning strategies: optimized selection and depletion steps result in AML blast-binding consensus antibodies[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 24(5): 767.
- [99] TOLMACHEV V, ORLOVA A, NILSSON FY, FELDWISCH J, WENNBORG A, ABRAHMSÉN L. Affibody molecules: potential for *in vivo* imaging of molecular targets for cancer therapy[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2007, 7(4): 555-568.
- [100] RAHBARNIA L, FARAJNIA S, BABAEI H, MAJIDI J, VEISI K, TANOMAND A, AKBARI B. Invert biopanning: a novel method for efficient and rapid isolation of scFvs by phage display technology[J]. *Biologicals*, 2016, 44(6): 567-573.
- [101] SCHIER R, MCCALL A, ADAMS GP, MARSHALL KW, MERRITT H, YIM M, CRAWFORD RS, WEINER LM, MARKS C, MARKS JD. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 263(4): 551-567.
- [102] MILLER BR, DEMAREST SJ, LUGOVSKOY A, HUANG F, WU XF, SNYDER WB, CRONER LJ, WANG N, AMATUCCI A, MICHAELSON JS, GLASER SM. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2010, 23(7): 549-557.
- [103] FENNELL BJ, MCDONNELL B, TAM ASP, CHANG LJ, STEVEN J, BROADBENT ID, GAO HL, KIERAS E, ALLEY J, LUXENBERG D, EDMONDS J, FITZ LJ, MIAO WY, WHITTERS MJ, MEDLEY QG, GUO YJ, DARMANIN-SHEEHAN A, AUTIN B, SHÚILLEABHÁIN DN, CUMMINS E, et al. CDR-restricted engineering of native human scFvs creates highly stable and soluble bifunctional antibodies for subcutaneous delivery[J]. *mAbs*, 2013, 5(6): 882-895.
- [104] XIAO XD, DOUTHWAITE JA, CHEN Y, KEMP B, KIDD S, PERCIVAL-ALWYN J, SMITH A, GOODE K, SWERDLOW B, LOWE D, WU H, DALL'ACQUA WF, CHOWDHURY PS. A high-throughput platform for population reformatting and mammalian expression of phage display libraries to enable functional screening as full-length IgG[J]. *mAbs*, 2017, 9(6): 996-1006.
- [105] SIDHU SS, LI B, CHEN Y, FELLOUSE FA, EIGENBROT C, FUH G. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 338(2): 299-310.

(本文责编 郝丽芳)