

噬菌体抗体展示技术及其在抗新冠病毒抗体发现中的应用

王加利 和似琦 康子茜 王建勋

(北京中医药大学生命科学学院, 北京 102400)

摘要: 噬菌体抗体展示技术是第一个也是目前应用最广泛的体外抗体筛选技术, 可用于发现治疗各种疾病的全人源抗体。虽然存在不同的抗体发现方法, 但噬菌体抗体展示技术已成为发现和优化靶标特异性单克隆抗体不可或缺的工具。研究人员可通过在丝状噬菌体上创建组合抗体库, 从而在几周内获得抗原特异性抗体。在当前冠状病毒病 (COVID-19) 大流行的情况下, 对中和抗体的研究激励着研究人员寻找出抗 SARS-CoV-2 的候选治疗药物。通过对噬菌体抗体库的筛选, 目前已有许多不同的 SARS-CoV-2 中和抗体被发现。因此, 本文综述了噬菌体抗体展示技术的原理, 抗体库的构建、分类及淘选流程, 并对其优点及局限性进行了讨论。此外, 还总结了利用该技术发现抗 SARS-CoV-2 中和抗体的最新进展。旨在为今后该技术在抗体发现中的应用提供理论支持。

关键词: 单克隆抗体; 噬菌体抗体展示; 抗体库; 淘选; 新冠病毒

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0862

Antibody Phage Display Technology and Its Application in the Discovery of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies

WANG Jia-li HE Si-qi KANG Zi-xi WANG Jian-xun

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400)

Abstract: Phage antibody display technology is the first and most widely used of the in vitro antibody screening technologies, which enable the discovery of human antibodies for therapeutic applications associated with all kinds of diseases. Different antibody discovery approaches exist, but phage antibody display technology has become an indispensable tool for the discovery and optimization of target-specific monoclonal antibodies. The researchers can create combinatorial antibody libraries on filamentous phage to be utilized for generating antigen specific antibodies in a matter of weeks. In the current situation of pandemic of Coronavirus disease (COVID-19), the research for neutralizing antibodies is motivating the researchers to find therapeutic candidates against SARS-CoV-2. By panning phage antibody libraries, many different SARS-CoV-2 neutralizing antibodies have been found at present. Therefore, we summarize the principles of phage antibody display technology, and the construction, classification and panning process of phage antibody library, also discuss the advantages and limitations. Furthermore, we summarize the recent advances in the use of this technology for discovering neutralizing antibody against SARS-CoV-2. It is aimed to provide the theoretical support for the application of this technology in antibody discovery in the coming years.

Key words: monoclonal antibody; phage antibody display; antibody library; panning; SARS-CoV-2

20 世纪 90 年代初, John McCafferty 和 Sir. Gregory Winter 开发了一种被称为噬菌体抗体展示的体

外抗体筛选技术, 该技术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及单个靶点

收稿日期: 2021-07-04

基金项目: 教育部双一流引导专项师资队伍建设项目 (1000061020014)

作者简介: 王加利, 女, 博士, 研究方向: 噬菌体展示; E-mail: wangjl120@163.com

通讯作者: 王建勋, 男, 博士, 特聘教授, 研究方向: 噬菌体展示; E-mail: jianxun.wang@bucm.edu.cn

多表位的抗体,已被证明是一种强大的用于发现全人源抗体的技术平台。2018年10月,Sir Gregory P. Winter因开发了此项技术获得诺贝尔化学奖。该技术主要通过将丝状噬菌体上构建抗体组合表达库来筛选抗原特异性单克隆抗体^[1]。由于单克隆抗体分子量(150 kD)较大,在噬菌体表面展示具有一定的挑战性。因此,在噬菌体上展示的抗体多为保留亲和性的较小的抗体片段,如单链可变片段(single-chain fragment variable, scFv)、抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)和单域抗体(single domain antibody, sdAb)。这些抗体片段具有较小的尺寸(15–50 kD),往往具有更好的药代动力学和药效学特性。与多克隆抗体和单克隆抗体相比,基于噬菌体展示技术的重组抗体片段生产速度更快,程序更自动化,且减少了对实验动物的利用。首个获美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的全人源抗肿瘤坏死因子- α (anti-tumor necrosis factor- α , TNF- α)单克隆抗体阿达木单抗即通过该技术发现。截至2020年,共有70多个通过噬菌体抗体展示技术发现的单克隆抗体进入临床研究,其中14个已经获得批准^[2]。

重症急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的2019冠状病毒病(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)仍在全球肆虐,成为目前最受关注的突发传染性疾病。截至2021年6月21日,已有178 503 429例确诊病例,其中死亡3 872 457例。(数据来源:<https://covid19.who.int/>)。自新冠病毒爆发以来,国内外多家研究机构和企业对其开展了流行病学和药理学研究,其中包括治疗和预防SARS-CoV-2疫苗和抗体药物的研究。虽然目前已有多种疫苗成功上市,但这些疫苗的保护率均无法达到100%,因此中和抗体的研究十分必要。并且相比新冠疫苗,中和抗体疗法具有预防和治疗的三重作用。噬菌体抗体展示技术已被广泛用于发现抗病毒感染的中和抗体,如流感^[3]、麻疹^[4]和狂犬病^[5]等。在此次疫情中,研究人员也同样通过该技术筛选新冠病毒中和抗体。目前已有多个研究团队获得该中和抗体,并进入临床前研究阶段。

本文阐述了噬菌体抗体展示技术的基本原理,抗体库的构建、分类及淘筛流程,同时对该技术的

优势及局限性进行了分析。另外,总结了自新冠肺炎爆发以来,噬菌体抗体展示技术在研发新冠病毒中和抗体研究中的应用情况。

1 噬菌体抗体展示技术原理

噬菌体抗体展示技术通过将抗体基因序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因中,使抗体与噬菌体的外壳蛋白形成融合蛋白,并随着子代噬菌体的重新组装展示在噬菌体表面,同时又可以保持相对的空间结构和生物活性。该技术的突破性贡献在于建立体外抗体功能和其对应的遗传信息的直接联系,其核心是基于噬菌体的生物学特征。T4、T7、 λ ,以及丝状M13噬菌体均可用于噬菌体展示,其中M13噬菌体在噬菌体抗体展示技术中应用最广泛^[6]。

1.1 M13丝状噬菌体

M13丝状噬菌体是一种圆柱形病毒粒子,包含一个环状单链DNA分子(6 407个碱基对),由9个基因组成,编码5种衣壳蛋白(pIII、pVIII、pVI、pVII和pIX)以及6个组装和复制蛋白^[7-8]。主要衣壳蛋白pVIII以2 700个拷贝在DNA周围形成一个管状结构,呈重叠的螺旋排列。而其他4种次要衣壳蛋白均有5个拷贝,pVII和pIX位于衣壳的一端,pIII和pVI位于衣壳的另一端。大多数噬菌体抗体展示系统都是将抗体序列融合到pIII衣壳蛋白的N端,这是由于pIII蛋白结构的灵活性和它在不丧失其功能的情况下展示大蛋白的能力^[9]。

1.2 M13噬菌体展示系统

在早期的研究中,抗体基因被直接克隆到丝状噬菌体基因组中。由于每个噬菌体通常包含5个G3P拷贝,所以使用噬菌体载体会出现抗体-G3P融合蛋白的多价展示。尽管这样的多价展示系统会干扰pIII-F菌毛的相互作用,从而对噬菌体侵染性和抗体库多样性产生负面影响^[10]。但使用噬菌体系统的主要问题是克隆大量外源性DNA到噬菌体基因组可能产生的有害影响,如遗传不稳定等^[11]。为了避免这些问题,具有单价展示特性的噬菌粒载体系统现已被广泛应用于噬菌体抗体展示技术中。

噬菌粒(phagemid)包含3个关键元素:(1)用于质粒筛选和扩增的抗生素标记;(2)抗体-G3P融合蛋白的编码基因;(3)启动滚环复制产生ss-

DNA 的 M13 复制起点。在没有其他噬菌体蛋白的情况下,噬菌粒会像质粒一样进行扩增。为了制备展示抗体 - G3P 融合蛋白的功能性噬菌体,携带噬菌粒载体的大肠杆菌必须被辅助噬菌体感染。辅助噬菌体包含完整的 M13 基因组,具有编码衣壳生成、噬菌体装配、染色体复制和出芽所需的所有噬菌体蛋白。最常用的辅助噬菌体是 M13KO7,它是 M13 的衍生物^[12]。由于辅助噬菌体的野生型 pIII 基因的表达水平优于噬菌粒编码的 pIII- 抗体融合基因,所以 90% 的子代噬菌体没有展示抗体 - G3P 融合蛋白,而且绝大多数携带抗体 - G3P 融合蛋白的噬菌体均为单价展示^[13]。目前利用超级辅助噬菌体可以将噬菌粒载体系统的抗体展示水平恢复到与噬菌体载体系统相同的水平^[14]。然而,在构建噬菌体抗体库中单价展示依然是最受欢迎的展示系统,因为它允许选择更高亲和力的抗体^[15]。

2 噬菌体抗体库

基于噬菌体抗体展示技术原理,研究人员通常在丝状噬菌体上构建抗体库来筛选抗原特异性单克隆抗体。

2.1 噬菌体抗体库的构建

噬菌体抗体库的构建包括:(1)提取 B 细胞 mRNA (可来源于免疫或未免疫的人或动物),(2)用随机引物将 RNA 逆转录为 cDNA,(3)设计合适的引物从 cDNA 文库中 PCR 扩增得到抗体 V 片段基因,(4)将基因克隆至噬菌粒载体中,(5)噬菌粒电转 TG1 感受态细胞,(6)用辅助噬菌体感染对数期 TG1 细胞,扩增纯化得到噬菌体抗体库。

成功构建一个大型多样化的噬菌体抗体库的关键在于:(1)PCR 扩增出多样化的抗体基因组合库;(2)抗体基因片段与噬菌粒载体的高效连接;(3)制备超高效率的电转感受态,提高电转效率^[16]。噬菌体抗体库质量评价的最佳标准是能否从中筛选出具有研究价值的抗体。

2.2 噬菌体抗体库分类

噬菌体展示抗体库可以根据获得的抗体基因来源进行分类,主要包括:天然文库,免疫文库,半合成和全合成文库。

天然文库,也被称为通用文库,是由未免疫的

健康人或动物的外周血淋巴细胞、脾脏和骨髓细胞中 B 细胞的 IgM mRNA 构建。由于天然文库的抗体基因来源于未免疫者,所以该文库中的抗体不偏向于任何特定的靶标,可用于分离针对所有类型抗原的抗体,也包括非免疫原性、疏水靶点和毒性抗原的抗体^[17]。但从天然文库获得的抗体因在体内的亲和力和不够成熟,往往较免疫库抗体的亲和力和弱^[18]。通常为了建立一个高度多样化的天然噬菌体抗体文库,研究人员会使用大量来自不同种族的抗体基因,并在文库构建过程中最大限度地提高抗体基因扩增的效率^[19]。从实用的角度来看,天然库是开发抗体的首选文库,因为它可以针对多种疾病循环利用。

免疫文库是由免疫的人或动物的血细胞样本中 IgG 基因的 mRNA 构建。由于 VH 和 VL 基因片段在体内经历了自然的亲和力成熟过程,这些抗体往往比从类似大小的天然文库中分离的抗体具有更高的亲和力^[20]。免疫文库的规模通常相对较小,但可通过从多个个体或宿主动物中获取免疫球蛋白基因,来进一步提高抗体库的库容和多样性。免疫库的缺点是需要免疫,且有时引起的免疫反应是不可预测的或不正确的。而且,由于伦理问题、高成本和繁琐的程序等原因,我们不可能为每种疾病建立免疫库,因此构建天然文库成为研究者的另一种选择^[21]。在医学研究中,免疫库常用于分离抗感染性疾病的抗体以及针对癌症靶点的抗体^[22-23]。

半合成抗体库由天然抗体序列和合成抗体序列组合构建。被报道的半合成库多通过人工合成随机化 CDR3,再与胚系可变区基因(CDR1 和 CDR2)组合,然后在体外模拟 V(D)J 重组构建^[24]。在全合成抗体库中,抗体基因的全部序列均由人工合成。半合成库和全合成库增加了抗体基因的多样性,且不受人抗体基因种类的限制,具有极大的发展优势^[25]。但因抗体基因序列是人工随机合成的,可能会导致部分克隆没有生物学活性^[26]。半合成文库和全合成文库是筛选针对自身抗原抗体的首选文库^[27]。

2.3 噬菌体抗体库的抗体片段形式

自 1990 年以来,不同的抗体形式已被用于构建噬菌体抗体展示文库。由于大肠杆菌在折叠和分泌

复杂的抗体时存在很强的偏倚，所以在大肠杆菌中很难实现生产全长 IgG。因此，目前在噬菌体表面展示的均为抗体片段，如单链可变片段（scFv）、抗原结合片段（Fab）和单域抗体（sdAb）。

scFv 是由抗体轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）通过 10–25 个氨基酸组成的短而灵活的甘氨酸连接肽（linker）连接而成的单一肽链^[28]。由于单链抗体体积小，其可以与隐蔽的或空间受限的抗原表位结合^[29]。单链抗体在非目标组织滞留时间短且半衰期短，使其可应用于成像、药物靶向输送^[30]、放射性核苷酸^[31]以及毒素^[32]等应用中。Fabs 由抗体的整个轻链和位于链 N 端的两个区域（VH 和 CH1）组成。噬菌体外壳蛋白上显示的 Fab 抗体片段具有较高的结构稳定性，并且很容易转换为完整的 IgG 抗体，并不会影响其结合活性^[33]。重组抗体片段的另一种常见形式为单域抗体（sdAbs），也被称为纳米抗体，其来源于骆驼和鲨鱼体内重链抗体（HCAbs）的可变区。由于其分子量小（~ 12–15 kD），在溶解度、稳定性和靶标可及性方面表现出一些优势^[34]。

从噬菌体抗体库中筛选的抗体片段可以直接用于各种应用，也可以根据需要工程转换成其他不同的形式，如全长单克隆抗体 IgG、多价抗体、多特异性抗体以及免疫偶联物^[35]。

3 特异性抗体的淘选

从噬菌体抗体库中获得抗原特异性抗体需要经过生物淘选（biopanning）。淘选所用抗原可以是不同的形式，如纯化的蛋白、合成的多肽、组织或全细胞^[36]。通常体外淘选需要将目标抗原固定在固体表面，如磁珠、聚苯乙烯管或板。但当纯化蛋白较难获得或其在固体表面附着可能发生构象改变时，也可以在溶液中进行淘选，如使用含蛋白 G/A、链霉亲和素的磁珠。包被好抗原后，需使用封闭液封闭固体表面的剩余位点，如 BSA、牛奶或酪蛋白，以防止非特异性噬菌体结合到表面^[37]。当加入噬菌体抗体库与固定的抗原相互作用后，大量的未结合或弱结合噬菌体必须通过严格的洗涤去除。随后，结合的噬菌体可通过胰蛋白酶酶解或其他洗脱方法（如稀酸或稀碱）洗脱^[13]。然后重新感染大肠杆菌，

加入辅助噬菌体后扩增形成一个次级噬菌体抗体库，用于下一轮淘选。通常经过 3–5 轮淘选，文库中展示抗原特异性抗体的噬菌体达到显著富集。完成生物淘选的阳性噬菌体文库通过感染 TG1 细胞后挑选单克隆，然后利用噬菌体 ELISA 法进行高通量筛选。得到的阳性克隆通过测序可获得抗体基因序列，以便对其进行下一步的基因工程改造。例如，阳性克隆的单链抗体基因可以被重新克隆到细菌表达载体中用于大规模生产，或者通过将可变区插入到含有抗体恒定区的表达载体中来重组成完整的单抗^[38]。

最优淘选策略取决于许多参数，包括目标抗原浓度、抗原固定表面的类型、库的质量以及结合和洗涤条件^[39]。因为操纵洗涤条件可以控制结合特性，所以为了分离出高亲和力的噬菌体抗体，每轮生物淘选的洗涤强度都应逐渐增加^[40]。另外还可使用不同的洗涤条件，如改变 pH 值或与游离抗原竞争等。生物淘选过程的另一个重点是抗原浓度，一般随着淘选次数的增加，抗原浓度应该逐渐降低。总之，通过灵活调节淘选压力，我们可以从噬菌体文库中得到更多或者亲和力更强或者有某种特性的抗体。

4 噬菌体抗体展示技术的优点和局限性

噬菌体抗体展示技术不论是作为抗体发现的有力工具，还是作为抗体工程改造中的筛选工具，都有着传统技术无可替代的优势。其优势主要体现在以下几个方面：（1）该技术对人或动物的 B 细胞抗体基因库进行体外建库筛选，避免了免疫和细胞融合等步骤，大大缩短了实验周期。且从构建的人源抗体库中可直接获得全人源抗体，免去了抗体人源化过程。（2）通过严格控制体外淘选条件可预先设计抗体特性，包括抗原表位特异性^[41]，甚至构象特异性^[42]和种间交叉反应等^[43]。（3）可被用于发现具有细微构象差异的靶标抗体，典型的例子是针对阿尔茨海默病肽聚集体的抗体和针对马尔堡病毒的纳米抗体^[44–45]。（4）可通过随机致突变技术，链置换或 PCR 错配等改变抗体亲和力，模拟抗体体内亲和力和成熟过程，筛选出亲和力更高的抗体^[46]。（5）使用大肠杆菌原核表达系统使该技术在成本效益和可扩展性方面优于其他真核展示方法，如酵母或哺乳动物细胞展示。

噬菌体抗体展示技术的局限性包括以下几点：

(1) 与基于细胞的抗体制备技术相比, 噬菌体抗体库的筛选过程比较繁琐^[47]。(2) 该技术无法控制生物淘选过程中的富集程度, 这导致一些克隆在生物淘选过程中占主导地位, 从而在淘选结束时只有少数阳性克隆。(3) 在构建的抗体库中, 抗体可变重链(VH)和可变轻链(VL)基因通过PCR随机重组, 虽然增加了库的多样性, 但也破坏了抗体分子的自然状态, 使其稳定性难以保证。(4) 噬菌体抗体展示过程必须经过细菌转化、噬菌体包装, 这大大限制了所建抗体库的库容和多样性。

5 在新冠病毒抗体发现中的应用

SARS-CoV-2 属于冠状病毒科 β 冠状病毒属, 是一种单链 RNA 包膜病毒, 可通过表面的刺突蛋白(S蛋白)与宿主细胞受体血管紧张素转换酶-2(angiotensin converting enzyme-2, ACE-2)结合进入细胞^[48]。S蛋白包含S1和S2两个亚基, 其中S1亚基C-端区的受体结合域(receptor binding domain, RBD)主要负责与宿主细胞受体结合, 是目前筛选新冠中和抗体的主要靶点^[49]。目前, 国内外多家研究机构和企业正在加快推进新冠病毒中和抗体药物的开发。噬菌体抗体展示技术在筛选病毒感染抗体方面有其独特的优越性, 在此次疫情中也发挥了其强大的功能。

中国科学院生物物理研究所的研究人员利用重组RBD蛋白免疫的小鼠外周淋巴细胞的RNA构建了一个Fab噬菌体抗体库, 然后以RBD作为靶点对抗体库进行筛选, 筛选出与RBD特异性结合的抗体(H014)后对其进行人源化, 通过新冠病毒假病毒和真病毒中和试验测试其中和活性分别为3 nmol/L和38 nmol/L^[50]。匹兹堡大学的研究者同样以SARS-CoV-2 RBD蛋白为筛选靶点, 6 d内从8个天然噬菌体展示抗体文库(Fab、scFv和VH文库)中筛选出多个全人源单克隆抗体。其中, IgG1 ab1对SARS-CoV-2活病毒有很好的中和效果, IC₅₀约为200 ng/mL。在hACE2转基因小鼠的动物试验中, 也展示了抑制病毒感染的能力, 在预先注射中和抗体之后, 5只小鼠中只有一只被新冠病毒所感染^[51]。秦成峰课题组通过构建新冠病毒免疫Fab噬菌体抗体库, 筛

选出一种对活病毒中和效价可达0.22 nmol/L的高效中和抗体HB27。值得注意的是, HB27也可以防止SARS-CoV-2膜融合。在两个已建立的小鼠模型中, 单剂量的HB27对SARS-CoV-2具有有效的保护作用, 且10倍有效剂量的HB27在恒河猴中并未发生明显不良反应。目前该抗体已经在中国和美国进入临床研究, 是一种很有前途的抗COVID-19免疫疗法的候选药物^[52]。Parry等^[53]从天然人源半合成噬菌体抗体库中筛选出对新冠RBD具有高亲和力的单链抗体片段II62, 并将其进一步设计成另外两种抗体形式, scFv-Fc和IgG1。在不同的检测系统中, 3种抗体均对SARS-CoV-2 RBD和S蛋白具有较高的结合活性。

纳米抗体(Nanobodies, Nbs)体积较小(13–15 kD), 具有优良的物理和化学性能, 可雾化吸入, 直接应用于感染部位, 且生物利用度高, 患者依从性高。它在治疗呼吸道病毒方面具有非常吸引人的潜力^[54]。近年来, 它们对呼吸道病原体的应用研究也在加速。例如, 使用纳米抗体对抗MERS-CoV^[55]、H1N1^[56]、H5N1^[57]、流感^[58]等。因此, 通过噬菌体抗体展示技术开发高效的抗新冠病毒纳米抗体成为许多科研工作者的研究方向。Wrapp等^[59]使用SARS-CoV-1和MERS-CoV S蛋白对骆驼进行免疫, 构建了一个驼源噬菌体纳米抗体库, 通过两轮淘选获得多个抗S蛋白的纳米抗体, 其中包括VHH-72。他们还发现VHH72对SARS-CoV-1和SARS-CoV-2 S蛋白存在交叉反应, 且将VHH72转化为二价人IgG Fc融合体后能更有效地中和SARS-CoV-2假病毒S蛋白, IC₅₀约为0.2 μ g/mL。此外, Huo等^[60]利用SARS-CoV-2 RBD作为筛选靶标, 从羊驼天然噬菌体纳米抗体库中分离出两个纳米抗体, H11-D4和H11-H4。它们结合RBD(KD分别为39和12 nmol/L)并在体外阻断S蛋白与ACE2的结合。这两种抗体与Fc融合后均能中和SARS-CoV-2活病毒, H11-H4的中和活性为4–6 nmol/L, 而H11-D4的中和活性为18 nmol/L。Hanke等^[61]用SARS-CoV-2 S1-Fc和RBD蛋白免疫羊驼, 通过对构建的噬菌体纳米抗体库进行连续两轮的淘选后, 结合ELISA实验筛选出纳米抗体Ty1。他们发现Ty1对SARS-CoV-2假病毒的中和作用可达0.77 μ g/mL^[54]

nmol/L)，而 Ty1-Fc 有效中和作用可进一步提高到约 12 ng/mL。低温电镜的结构显示，Ty1 可以与“向上”或“向下”构象的 RBD 结合，并在空间上阻碍 RBD- ACE2 的结合。同样，上海罗奇生物医学科技有限公司使用 SARS-CoV-2 RBD 蛋白免疫骆驼后，从构建的噬菌体纳米抗体库中鉴定出 381 个与 RBD 特异性结合的 Nbs，其中 Nb11-59 对 SARS-CoV-2 真病毒具有较强中和活性，约为 0.55 $\mu\text{g/mL}$ ^[62]。Dong 等^[63]从两个羊驼 VHH 文库（天然和合成）中发现了 80 多种针对 SARS-CoV-2 S1 蛋白的 VHH 抗体，其中 19 种可阻止 S/ACE2 的结合。为了分析不同 VHH 抗体的协同效应，他们构建了双特异性 VHH-Fc 抗体，该抗体对 SARS-CoV-2 RBD 的结合和 S/ACE2 的阻断明显强于单价 VHH-Fc 抗体。其他研究人员也尝试设计多价、多特异性 Nbs 来中和 SARS-CoV-2。如 Koenig 等^[64]利用 SARS-CoV-2 RBD 和福尔马林灭活的 SARS-CoV-2 免疫羊驼，通过对噬菌体纳米抗体库的淘选，发现了 4 种 Nbs（VHHs E、U、V 和 W）能有效中和 SARS-CoV-2 真病毒和假病毒。这 4 个 Nbs 结合 RBD 上两个不同的表位。他们设计了多种二价、三价和多特异性的 Nbs，结果发现，VHH EEE（三价抗体）中和 SARS-CoV-2 假病毒的活性最高，IC₅₀ 约为 0.52 nmol/L。以上报道显

示出了对 SARS-CoV-2 具有中和作用的 Nbs 作为抗 COVID-19 潜在疗法的潜力。基于噬菌体抗体展示技术发现靶向 SARS-CoV-2 刺突蛋白抗体的临床前研究如表 1 所示。

6 结论与展望

噬菌体抗体展示技术是最早也是应用最广泛的体外抗体筛选技术，其无论是作为抗体发现的源头技术，还是作为抗体工程中抗体特性改造中的筛选工具，都有着无可替代的优势和多领域的应用。大量临床开发中的噬菌体展示衍生抗体证明了这种体外筛选技术在发现治疗性抗体方面的价值。一个庞大的多样性噬菌体抗体库，在短时间内可筛选出大量针对各种抗原的重组抗体。而且它不需要通过免疫就能分离出针对多种类型抗原的人类抗体，这使它与转基因小鼠技术、抗体人源化技术和单个 B 细胞技术一起成为发现人类治疗性抗体的主要平台^[65]。过去由于噬菌体展示技术的商业应用仅限于少数拥有其技术专利的公司，导致其发展受限。但近年来，随着欧洲和美国的大部分噬菌体展示技术专利已经过期，促使该技术在抗体药物研发等领域得到了广泛应用。许多研究机构、初创企业和工业实验室都在不断对噬菌体抗体文库的设计、构建和筛选进行优化。由于其独特的优势，相信该技术在

表 1 噬菌体展示来源的靶向 SARS-CoV-2 刺突蛋白抗体的临床前研究

Table 1 Preclinical studies of phage display-derived antibodies targeting the spike protein of SARS-CoV-2					
抗体名称	噬菌体抗体库	靶抗原	抗体类型	中和活性	参考文献
Antibody description	Phage antibody library	Target antigen	Antibody format	Neutralization activity	Reference
H014	免疫 Fab 文库	RBD	人源化 Fab	假病毒 3 nmol/L 活病毒 38 nmol/L	[50]
IgG1 ab1	天然 Fab、scFv、VH 文库	RBD	IgG1	活病毒 200 ng/mL	[51]
HB27	免疫 Fab 文库	RBD	IgG1	活病毒 0.22 nmol/L	[52]
II62	天然半合成 scFv 文库	RBD	scFv、scFv- Fc、IgG1	—	[53]
VHH-72	免疫 VHH 文库	S	VHH-Fc	假病毒 0.2 $\mu\text{g/mL}$	[59]
H11-D4、H11-H4	天然 VHH 文库	RBD	VHH-Fc	活病毒 18 nmol/L (H11-D4)、4-6 nmol/L (H11-H4)	[60]
Ty1	免疫 VHH 文库	RBD	VHH、VHH-Fc	假病毒 0.77 $\mu\text{g/mL}$ (Ty1) 12 ng/mL (Ty1-Fc)	[61]
Nb11-59	免疫 VHH 文库	RBD	VHH	活病毒 0.55 $\mu\text{g/mL}$	[62]
双特异性 VHH	天然和合成 VHH 文库	S1	VHH-Fc	—	[63]
VHH EEE	免疫 VHH 文库	RBD	三价 VHH	假病毒 0.52 nmol/L	[64]

注：“—”为文献未涉及
Note：“—” refers to not mentioned in the literature

今后单抗的研发和生产中会愈发地受到重视。

在抗击新冠疫情的疗法开发方面,中和抗体的开发一直是研发的重心之一。因为其可与疫苗一起形成双重防御性的治疗和保护作用。通过噬菌体抗体展示技术,不少研究者发现了对 SARS-CoV-2 中和活性较好的抗体,其中以纳米抗体居多。鉴于纳米抗体较稳定、具有容易表达和折叠的特性,有些研究者利用它们构建多价或多特异性分子,大大提高了对 SARS-CoV-2 的中和活性。虽然纳米抗体可雾化吸入,直接应用于感染部位,但我们还需要通过进一步的研究来评估开发基于纳米抗体的吸入药物治疗 COVID-19 的可行性。另外,有研究者认为噬菌体抗体展示技术在分离针对多种 SARS 相关冠状病毒或 SARS-CoV-2 多种变异/突变体的交叉反应抗体方面比其他筛选策略具有优势^[66]。总之,噬菌体抗体展示技术作为一个多功能强大的抗体筛选平台,为发现和设计新的具有更好药代动力学特性、安全性和有效性的重组抗体分子提供了巨大的机会。

参考文献

- [1] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies [J]. *Nature*, 1991, 349 (6307): 293-299.
- [2] Alfaleh MA, Alsaab HO, Mahmoud AB, et al. Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1986.
- [3] Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (12): e3942.
- [4] de Carvalho Nicacio C, Williamson RA, Parren PW, et al. Neutralizing human Fab fragments against measles virus recovered by phage display [J]. *J Virol*, 2002, 76 (1): 251-258.
- [5] Kramer R, Marissen W, Goudsmit J, et al. The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35 (7): 2131-2145.
- [6] Sokullu E, Soleymani Abyaneh H, Gauthier MA. Plant/bacterial virus-based drug discovery, drug delivery, and therapeutics [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11 (5): 211.
- [7] Specthrie L, Bullitt E, Horiuchi K, et al. Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage [J]. *J Mol Biol*, 1992, 228 (3): 720-724.
- [8] van Wezenbeek PM, Hulsebos TJ, Schoenmakers JG. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd [J]. *Gene*, 1980, 11 (1/2): 129-148.
- [9] Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium [J]. *Chem Rev*, 2005, 105 (11): 4056-4072.
- [10] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228 (4705): 1315-1317.
- [11] Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19 (15): 4133-4137.
- [12] Rakonjac J, Jovanovic G, Model P. Filamentous phage infection-mediated gene expression: construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3 [J]. *Gene*, 1997, 198 (1/2): 99-103.
- [13] Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, et al. Basics of antibody phage display technology [J]. *Toxins*, 2018, 10 (6): 236.
- [14] Rondot S, Koch J, Breitling F, et al. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (1): 75-78.
- [15] Lowman HB, Bass SH, Simpson N, et al. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display [J]. *Biochemistry*, 1991, 30 (45): 10832-10838.
- [16] Tohidkia MR, Barar J, Asadi F, et al. Molecular considerations for development of phage antibody libraries [J]. *J Drug Target*, 2012, 20 (3): 195-208.
- [17] Dübel S, Stoevesandt O, Taussig MJ, et al. Generating recombinant antibodies to the complete human proteome [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28 (7): 333-339.
- [18] Schirrmann T, Meyer T, Schütte M, et al. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy [J]. *Molecules*, 2011, 16 (1): 412-426.
- [19] Kim S, Park I, Park SG, et al. Generation, diversity determination, and application to antibody selection of a human naïve fab library [J]. *Mol Cells*, 2017, 40 (9): 655-666.
- [20] Bradbury ARM, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 290 (1/2): 29-49.
- [21] Tsuruta LR, Dos ML, Moro AM. Display technologies for the

- selection of monoclonal antibodies for clinical use [M] // Böldicke T. Antibody Engineering. London : intechopen, 2018 : 47-73.
- [22] Lai JY, Lim TS. Infectious disease antibodies for biomedical applications : a mini review of immune antibody phage library repertoire [J] . Int J Biol Macromol, 2020, 163 : 640-648.
- [23] Kessler C, Pardo A, et al. Novel PSCA targeting scFv-fusion proteins for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer [J] . J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143 (10) : 2025-2038.
- [24] Barbas CF, Bain JD, Hoekstra DM, et al. Semisynthetic combinatorial antibody libraries : a chemical solution to the diversity problem [J] . PNAS, 1992, 89 (10) : 4457-4461.
- [25] Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J] . EMBO J, 1994, 13 (14) : 3245-3260.
- [26] Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library : the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens [J] . PNAS, 1998, 95 (11) : 6157-6162.
- [27] Chan CE, Lim AP, et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery [J] . Int Immunol, 2014, 26 (12) : 649-657.
- [28] Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, et al. Generation of human scFv antibody libraries : PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding sequences [J] . Cold Spring Harb Protoc, 2011, 2011 (9) : pdb. prot065573.
- [29] Chen W, Dimitrov DS. Human monoclonal antibodies and engineered antibody domains as HIV-1 entry inhibitors [J] . Curr Opin HIV AIDS, 2009, 4 (2) : 112-117.
- [30] Beck A, Goetsch L, Dumontet C, et al. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates [J] . Nat Rev Drug Discov, 2017, 16 (5) : 315-337.
- [31] Mattes MJ. Radionuclide-antibody conjugates for single-cell cytotoxicity [J] . Cancer, 2002, 94 (4 suppl) : 1215-1223.
- [32] Alewine C, Hassan R, Pastan I. Advances in anticancer immunotoxin therapy [J] . Oncologist, 2015, 20 (2) : 176-185.
- [33] Bradbury AR, Sidhu S, Dübel S, et al. Beyond natural antibodies : the power of *in vitro* display technologies [J] . Nat Biotechnol, 2011, 29 (3) : 245-254.
- [34] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability [J] . Protein Sci, 2002, 11 (3) : 500-515.
- [35] Zhao AZ, Tohidkia MR, et al. Phage antibody display libraries : a powerful antibody discovery platform for immunotherapy [J] . Crit Rev Biotechnol, 2016, 36 (2) : 276-289.
- [36] Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries [J] . Nat Biotechnol, 2005, 23 (9) : 1105-1116.
- [37] Shen W, Li SQ, et al. Blocking agent optimization for nonspecific binding on phage based magnetoelastic biosensors [J] . J Electrochem Soc, 2012, 159 (10) : B818-B823.
- [38] Jones ML, Seldon T, Smede M, et al. A method for rapid, ligation-independent reformatting of recombinant monoclonal antibodies [J] . J Immunol Methods, 2010, 354 (1/2) : 85-90.
- [39] Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy [J] . Hum Vaccines Immunother, 2012, 8 (12) : 1817-1828.
- [40] Smith GP, Petrenko VA. Phage display [J] . Chem Rev, 1997, 97 (2) : 391-410.
- [41] Zhou M, Meyer T, Koch S, et al. Identification of a new epitope for HIV-neutralizing antibodies in the gp41 membrane proximal external region by an Env-tailored phage display library [J] . Eur J Immunol, 2013, 43 (2) : 499-509.
- [42] Nizak C, Monier S, del Nery E, et al. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors [J] . Science, 2003, 300 (5621) : 984-987.
- [43] Liang WC, Wu XM, et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF) -blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF [J] . J Biol Chem, 2006, 281 (2) : 951-961.
- [44] Frenzel A, Kügler J, et al. Designing human antibodies by phage display [J] . Transfus Med Hemother, 2017, 44 (5) : 312-318.
- [45] Froude JW, Pelat T, et al. Generation and characterization of protective antibodies to Marburg virus [J] . MAbs, 2017, 9 (4) : 696-703.
- [46] Schofield DJ, Pope AR, Clementel V, et al. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization [J] . Genome Biol, 2007, 8 (11) : R254.
- [47] Löfblom J, Wernérus H, et al. Fine affinity discrimination by normalized fluorescence activated cell sorting in staphylococcal surface display [J] . FEMS Microbiol Lett, 2005, 248 (2) : 189-198.
- [48] Hoffmann M, Kleine-Weber H, et al. SARS-CoV-2 cell entry de-

- depends on ACE2 and TMPRSS₂ and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181 (2): 271-280. e8.
- [49] Fan X, Cao D, Kong L, et al. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 3618.
- [50] Lv Z, Deng YQ, Ye Q, et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody [J]. *Science*, 2020, 369 (6510): 1505-1509.
- [51] Li W, Drelich A, Martinez DR, et al. Potent neutralization of SARS-CoV-2 in vitro and in an animal model by a human monoclonal antibody [J]. *bioRxiv*, 2020, 093088.
- [52] Zhu L, Deng YQ, Zhang RR, et al. Double lock of a potent human therapeutic monoclonal antibody against SARS-CoV-2 [J]. *Natl Sci Rev*, 2021, 8 (3): nwa297.
- [53] Parry HA, Chiranjivi AK, Asthana S, et al. Identification of an anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain-directed human monoclonal antibody from a naïve semisynthetic library [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (36): 12814-12821.
- [54] Detalle L, Stohr T, Palomo C, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (1): 6-13.
- [55] Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection [J]. *Sci Adv*, 2018, 4 (8): eaas9667.
- [56] Hufton SE, Risley P, Ball CR, et al. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e103294.
- [57] Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, et al. Nanobodies with *in vitro* neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203 (8): 1063-1072.
- [58] Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin [J]. *Science*, 2018, 362 (6414): 598-602.
- [59] Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies [J]. *Cell*, 2020, 181 (5): 1004-1015. e15.
- [60] Huo J, Le Bas A, Ruza RR, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27 (9): 846-854.
- [61] Hanke L, Vidakovic Perez L, Sheward DJ, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 4420.
- [62] Gai J, Ma L, Li G, et al. A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential [J]. *MedComm : Beijing*, 2021, 2 (1): 101-113.
- [63] Dong J, Huang B, Jia Z, et al. Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9 (1): 1034-1036.
- [64] Koenig PA, Das H, Liu H, et al. Structure-Guided Multivalent Nanobodies Block Sars-Cov-2 Infection and Suppress Mutational Escape [J]. *Science*, 2021, 371 (6530): eabe6230.
- [65] Wilson PC, Andrews SF. Tools to therapeutically harness the human antibody response [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12 (10): 709-719.
- [66] Sun Y, Ho M. Emerging antibody-based therapeutics against SARS-CoV-2 during the global pandemic [J]. *Antib Ther*, 2020, 3 (4): 246-256.

(责任编辑 张婷婷)