

单链抗体展示系统研究进展

陈遥^{1,2}, 舒星富^{1,2}, 赵钰^{1,2}, 张博文^{1,2}, 马忠仁¹, 张海霞^{1*}

1 西北民族大学生物医学研究中心 生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

陈遥, 舒星富, 赵钰, 张博文, 马忠仁, 张海霞. 单链抗体展示系统研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3681-3694.
CHEN Yao, SHU Xingfu, ZHAO Yu, ZHANG Bowen, MA Zhongren, ZHANG Haixia. Single chain antibody fragment display systems: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3681-3694.

摘要: 单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)是由抗体重链可变区(variable region of heavy chain, VH)和轻链可变区(variable region of light chain, VL)通过柔性短肽连接组成的小分子, 是具有完整抗原结合活性的最小功能片段, 包含抗体识别及抗原结合部位。相比于其他抗体, scFv 具有分子量小、穿透性强、免疫原性弱、易构建表达等优点。目前, scFv 最常用的展示系统主要有噬菌体展示系统、核糖体展示系统、mRNA 展示系统、酵母细胞表面展示系统和哺乳动物细胞展示系统等。近年来, 随着 scFv 在医学、生物学、食品安全学等领域的发展, 使得其在生物合成和应用研究方面备受关注。本文对近年来 scFv 展示系统的研究进展作一综述, 以期为 scFv 的筛选及应用提供理论基础。

关键词: 单链抗体; 基因工程抗体; 噬菌体展示系统; 核糖体展示系统

Single chain antibody fragment display systems: a review

CHEN Yao^{1,2}, SHU Xingfu^{1,2}, ZHAO Yu^{1,2}, ZHANG Bowen^{1,2}, MA Zhongren¹,
ZHANG Haixia^{1*}

1 National Ethnic Affairs Commission Key Laboratory of Bioengineering and Technology, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

Abstract: Single chain antibody fragment (scFv) is a small molecule composed of a variable

资助项目: 国家自然科学基金(22104045); 2023 年度甘肃省教育厅高等学校创新基金项目(2023B-059); 西北民族大学人才引进项目(xbmuyjrc202226); 西北民族大学“双一流”引导专项生物工程特色学科(10018703, 1001070204)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22104045), the College Innovation Fund of Gansu Province in 2023 (2023B-059), the Talent Introduction Project of Northwest Minzu University (xbmuyjrc202226), and the Northwest Minzu University “Double First-class” Guiding Special Biological Engineering Characteristic Discipline (10018703, 1001070204).

*Corresponding author. E-mail: zhx@xbmu.edu.cn

Received: 2022-11-15; Accepted: 2023-02-22

region of heavy chain (VH) and a variable region of light chain (VL) of an antibody, and these two chains are connected by a flexible short peptide. scFv is the smallest functional fragment with complete antigen-binding activity, which contains both the antibody-recognizing site and the antigen-binding site. Compared with other antibodies, scFv has the advantages of small molecular weight, strong penetration, low immunogenicity, and easy expression. Currently, the most commonly used display systems for scFv mainly include the phage display system, ribosome display system, mRNA display system, yeast cell surface display system and mammalian cell display system. In recent years, with the development of scFv in the field of medicine, biology, and food safety, they have also attracted much attention in the sectors of biosynthesis and applied research. This review summarizes the advances of scFv display systems in recent years in order to facilitate scFv screening and application.

Keywords: single chain antibody fragment; genetically engineered antibody; phage display system; ribosome display system

近年来, 各种新型基因工程抗体(genetically engineered antibodies, GEAs)相继问世。基因工程抗体又称重组抗体(recombinant antibodies, RAs), 是运用基因工程和重组抗体技术对抗体相应的基因序列进行改造和组装获得的新型抗体分子, 如: 单域抗体(single domain antibody, sdAb)、纳米抗体(nanobody, Nb)、双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)、抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)、单链抗体(single chain variable fragment, scFv)等^[1]。其中, 单域抗体是由重链抗体重链可变区(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)组成的抗体, 因其分子量小, 故也被称为纳米抗体; 双特异性抗体是由两个不同的轻链和重链组成的工程化抗体, 具有两种特异性抗原结合位点; 抗原结合片段则是指抗体上与抗原结合的区域, 由轻链可变区、重链可变区、轻链恒定区和一个重链恒定区组成, 分子量为 47–48 kDa。

单链抗体(single chain variable fragment, scFv)是人工合成小分子抗体的一种, 通过一条富含甘氨酸的柔性短肽(linker)将抗体重链可变区(variable region of heavy chain, VH)和轻链可变区(variable region of light chain, VL)连接而

成, linker 因具有灵活性和亲水性, 可以影响 scFv 的物理、化学性质和活性^[2]。scFv 包含 4 个骨架区/framework region, FR)和 3 个互补决定区(complementarity-determining region, CDR) (图 1), 其中由 CDR 组成的抗体识别和抗原结合部位, 能决定抗体的特异性, 因此缺乏恒定区的 scFv 仍能稳定地与抗原特异性结合并发挥作用^[3]。此外, scFv 具有分子量小(25 kDa)、易清除、穿透性强、易构建表达、免疫原性弱、生产成本低、无人抗鼠抗体反应等特点, 从而成为新型抗体研发热点^[1,4]。

展示系统是制备 scFv 至关重要的一环, scFv 展示系统是将 scFv 基因导入相关展示系统中, 利用构建成功的抗体文库进行筛选和展示, 达到筛选和鉴定的目的。George Smith 和 Gregory Paul Winter 因利用分子进化的原理创立了“多肽与抗体的噬菌体展示技术”而获得 2018 年诺贝尔化学奖^[5]。常用的 scFv 展示系统主要有噬菌体展示系统(phage display system, PDS)、核糖体展示系统(ribosome display system, RDS)、酵母表面展示系统(yeast surface display system, YSDS)等。本文主要对 scFv 常用展示系统及其优缺点作一综述, 并对其应用前景进行展望。

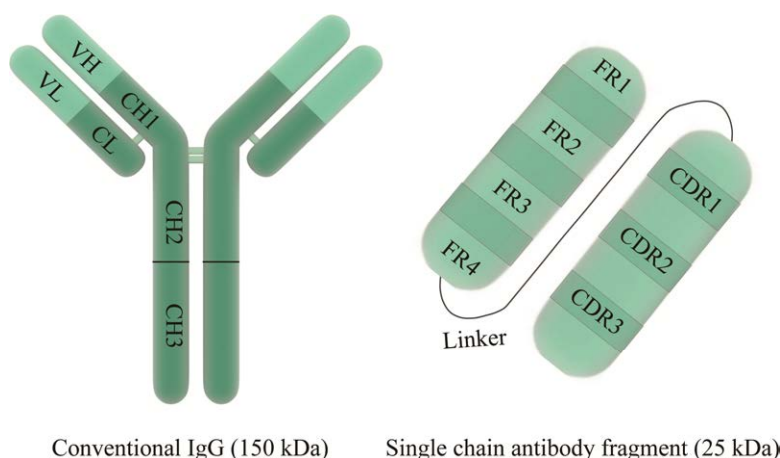


图 1 传统抗体与单链抗体的结构对比示意图

Figure 1 Structures of conventional antibody and single chain antibody fragment.

1 噬菌体展示系统

噬菌体展示技术(phage display technique, PDT)是将编码外源蛋白或多肽的 DNA 序列与噬菌体衣壳蛋白编码基因融合后,以噬菌体表面为媒介进行展示和筛选的基因工程技术(图 2)^[6]。噬菌体展示系统(phage display system, PDS)主要是以噬菌粒或 M13、 λ 、T4、T7、Q β 和 MS2 噬菌体等为载体的展示系统。噬菌体展示系统具有操作简便、高效、高通量、低成本等优势,还可免受高温、pH、变性剂、紫外线和蛋白水解酶等因素的影响^[7]。然而,噬菌体展示过程中需要经过细菌转化、噬菌体包装,且抗体在细胞中不同的结合特性,导致噬菌体展示系统受到库容量和多样性的限制,文库容量通常在 10^7 – 10^9 ;噬菌体展示文库建成后,无法在体外进行有效的突变、重组,因此大大限制了文库的多样性;因噬菌体展示系统依赖细胞内基因的表达,故具有细胞毒性的分子很难有效表达和展示;并非所有基因均能在噬菌体展示系统中获得有效表达,因为蛋白质功能的形成条件复杂,如未叠折蛋白易降解、重组蛋白易形成

聚集物等^[8]。基于此,根据目标抗体的不同对噬菌体进行改造,以建成库容量大、灵活性强的展示文库解决噬菌体展示系统的库容量和多样性问题;通过抗体形式、抗原呈递的方式以及构建嗜热噬菌体展示系统等优化策略可能解决噬菌体展示系统的诸多展示问题^[9]。

噬菌体展示技术被广泛应用于生物医药、健康环保、新材料及新能源相关的基础与应用研究中,尤其在抗体药物研发和靶蛋白筛选方面发挥着重要作用。目前已成功构建了多种合成和天然噬菌体展示 scFv 文库,用于开发抗体模拟肽、微抗体、双特异性抗体、抗病毒药物等,并筛选特定的靶蛋白或多肽^[10]。Hamideh 等^[11]通过原核生物表达系统表达出鹰嘴豆褪绿矮缩病毒(Chickpea chlorotic dwarf virus, CpCDV)外壳蛋白,并以其为靶蛋白,利用噬菌体展示系统筛选特异性 scFv,并成功制备了抗 CpCDV-scFv,可用于该病毒的免疫学检测。该团队后续又利用以柑橘衰退病毒(Citrus tristeza virus, CTV)外壳蛋白(coat protein, CP)为靶蛋白在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达,并在噬菌体展示抗体库中经生物淘洗筛选,获得 8 个序列相同的阳

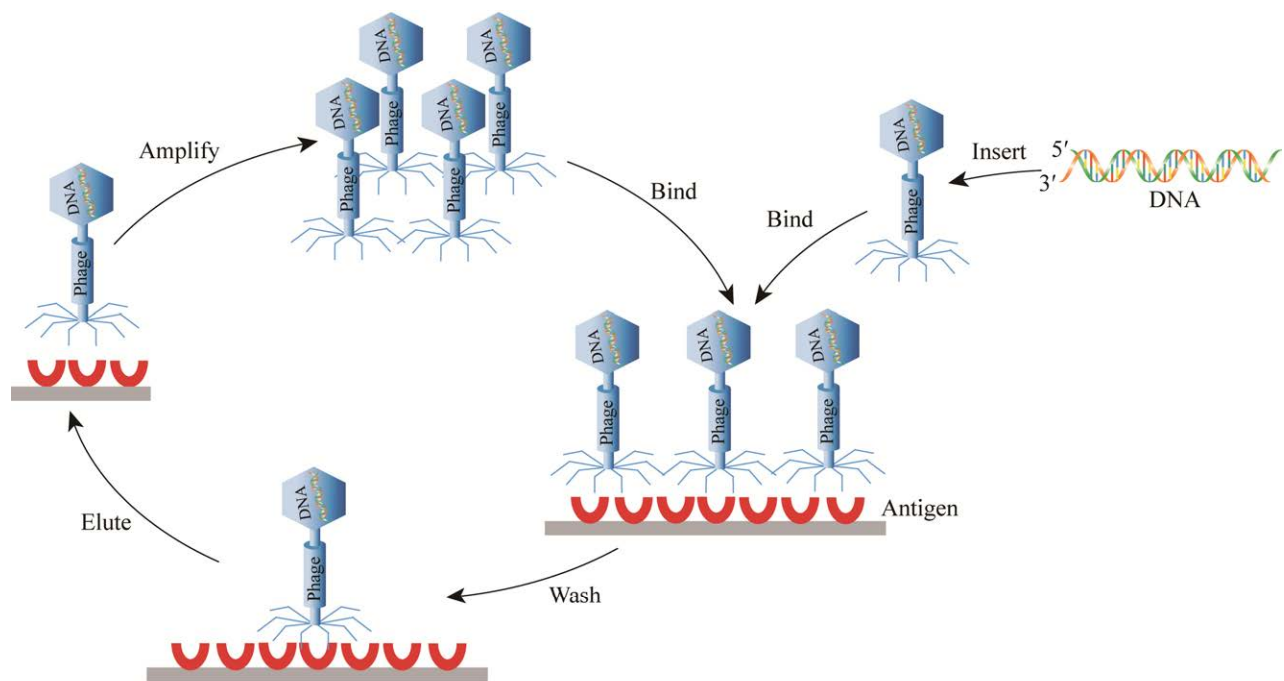


图2 噬菌体展示技术流程

Figure 2 Flowchart of phage display technology.

性克隆 scFv F10, 经酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹、同源性分子建模和对接分析等方法证实 scFv F10 具有作为诊断 CTV 感染植物潜力的工具^[12]。庞倩等^[13]以黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 为模板特异性扩增出 VH 和 VL 片段, 构建噬菌粒-辅助噬菌体展示系统文库, 并经过 5 轮淘选策略成功筛选出亲和力好、抗 AFB1 的 scFv。随着噬菌体展示系统不断地优化与完善, 其有望成为筛选安全、高效 scFv 的有力工具, 为诊断工具的开发、抗病毒药物的研发提供新思路。

2 核糖体展示系统

核糖体展示技术(ribosome display technology, RDT)是一种利用功能性蛋白相互作用进行体外筛选的技术(图 3)^[14]。核糖体展示系统(ribosome display system, RDS)通过在核糖体上形成蛋白质-核糖体-mRNA (protein-ribosome-mRNA, PRM)

三聚体复合物, 实现基因型与表型的偶联, 且能进行高效定向筛选蛋白或多肽, 是一种新型的无细胞展示平台^[15]。核糖体展示系统因不涉及细胞培养、转染、噬菌体展示技术中的转化以及表达等限制, 故可构建出成本低、效率高、容量大、质量高、操作简便和分子多样性强的文库, 库容量可高达 10^{12} – 10^{14} 。此外, 还可利用突变技术、重组技术和逆转录 PCR、多重 PCR、套式 PCR 和非对称 PCR 等特殊 PCR 技术, 以提高蛋白表达的多样性与亲和力^[16]。这些优势为利用核糖体展示系统制备小分子蛋白或多肽开辟了新途径。但是由于 mRNA 稳定性较差, 如何防止 mRNA 快速降解是该展示系统急需解决的首要问题; 其次, 如何形成稳定的三聚体复合物及筛选大分子蛋白质也是该展示系统的关键^[17]。针对核糖体展示系统中 mRNA 稳定性问题, 可通过在模板两端设计发夹环结构或添加 RNA 酶抑制剂(如焦碳酸二乙酯、异硫氰酸

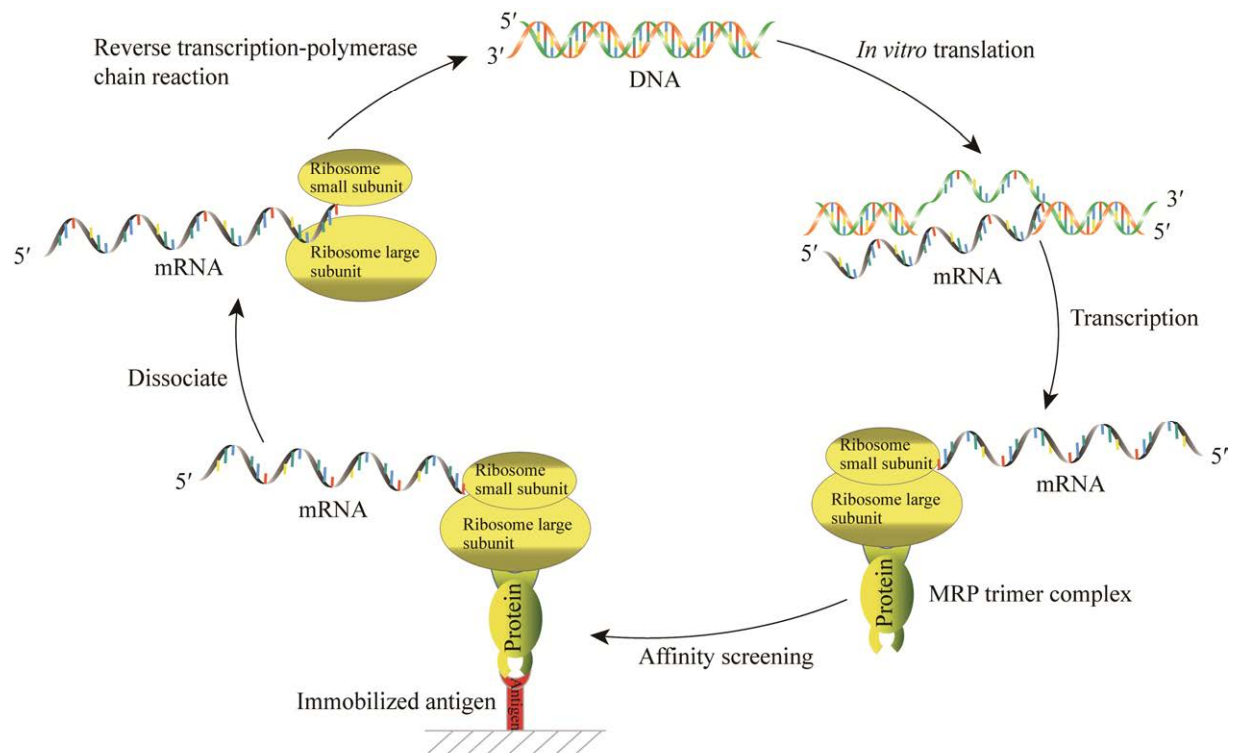


图3 核糖体展示技术流程

Figure 3 Flowchart of ribosome display technology.

胍、氧钒核糖核苷复合物等),使 mRNA 在体外转录和翻译过程中不受核酸外切酶的影响,从而有效防止 mRNA 降解。此外,还可将 mRNA 部分反转录为 cDNA,该方法主要通过促进 mRNA 与连接子的结合和 cDNA 的反向转录合成,从而将 mRNA-蛋白质的融合体转变为 cDNA-蛋白质融合体,进而避免由于 mRNA 稳定性差而产生的问题。另外,当使用修饰过的核苷酸作为转录反应的底物时, mRNA 也可以稳定地存在^[18]。在体外翻译时,通过提高 mRNA 翻译效率,增加 mRNA 产量,有助于形成稳定的蛋白质-核糖体-mRNA 三聚体复合物。根据所需蛋白质分子量的大小,还可与酵母展示系统相结合进行大分子蛋白的筛选^[19]。

目前,核糖体展示系统不仅广泛应用于蛋白质互作与组学、基因工程抗体和合成酶等方面,

还开辟了靶向肿瘤、传染性、炎症性疾病和自身免疫性疾病等的新型治疗性抗体或药物筛选的新途径^[20]。Westlund 等^[20]使用核糖体展示系统筛选出针对神经肽胆囊收缩素 B (cholecystokinin B, CCK-B)受体的 scFv,该 scFv 可有效减少焦虑、抑郁和疼痛相关行为,可减轻或消除持续使用阿片类镇痛药物治疗患者的慢性疼痛感。研究表明,优化后的 CCK-B 受体 scFv 可作为常规疼痛佐剂,具有预测低剂量阿片类药物的有效性,还可有效改善治疗神经性疼痛的生理性镇痛。scFv 还开启了三叉神经综合征治疗学、药理学和病理生理学研究的新时代。由 Kunamneni 等^[21-22]研究团队通过核糖体展示系统先后筛选出针对寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)包膜蛋白和丝状病毒(filovirus)糖蛋白的 scFv,这些 scFv 不仅可中和相应病毒抑制其传染,还可检测同

属于丝状病毒科的埃博拉病毒(Ebola viruses, EBOV)和马尔堡病毒(Marburg virus, MARV), 该方法成本低、速度快, 可用于快速开发出特异性高、亲和力好的 scFv。Shabani 等^[23]利用核糖体展示分离出针对重组人葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein78, GRP78) C 末端结构域的 scFv, 该 scFv 具有识别和黏附肿瘤细胞表面 GRP78 的能力, 形成的 GRP78-scFv 复合物能调节细胞信号传导, 引起下游细胞效应, 在癌症治疗中有抑制肿瘤生长的重要作用。

目前, 基于核糖体展示系统筛选的 scFv 不仅可用于开发出各种癌症新型疗法, 如免疫毒素、抗体-药物缀合物、靶向分泌体、双特异性 T 细胞衔接器、放射性同位素标记等; 还可用于开发出改善人体神经的疼痛疗法, 这些高效且安全的治疗方式使 scFv 成为癌症诊断、免疫治疗和疼痛治疗等方面的研究新热点。

3 mRNA 展示系统

mRNA 展示技术(mRNA display technology, mRNA-DT), 又称 mRNA-蛋白质融合体展示技术, 是一种将蛋白质与其自身编码 RNA 通过共价连接, 形成 mRNA-蛋白质融合体的技术(图 4)^[24]。mRNA 展示系统是在无细胞参与下, 一种蛋白质合成抑制剂-嘌呤霉素(puromycin)通过共价连接, 形成 mRNA-蛋白质融合体外蛋白或多肽筛选的生物展示平台^[24]。mRNA 展示系统与核糖体展示系统均会形成 mRNA 相关复合物。但 mRNA 展示系统形成的 mRNA-蛋白质复合物, 由于无核糖体存在, 更加利于靶蛋白或多肽的筛选^[25]。mRNA 展示系统的优点在于操作简便、筛选效率高、文库多样性强、库容量高达 10^{13} - 10^{15} , 且不受转化步骤限制, 还可反复随机突变和筛选^[26]; 但该系统尚存在一些不足:

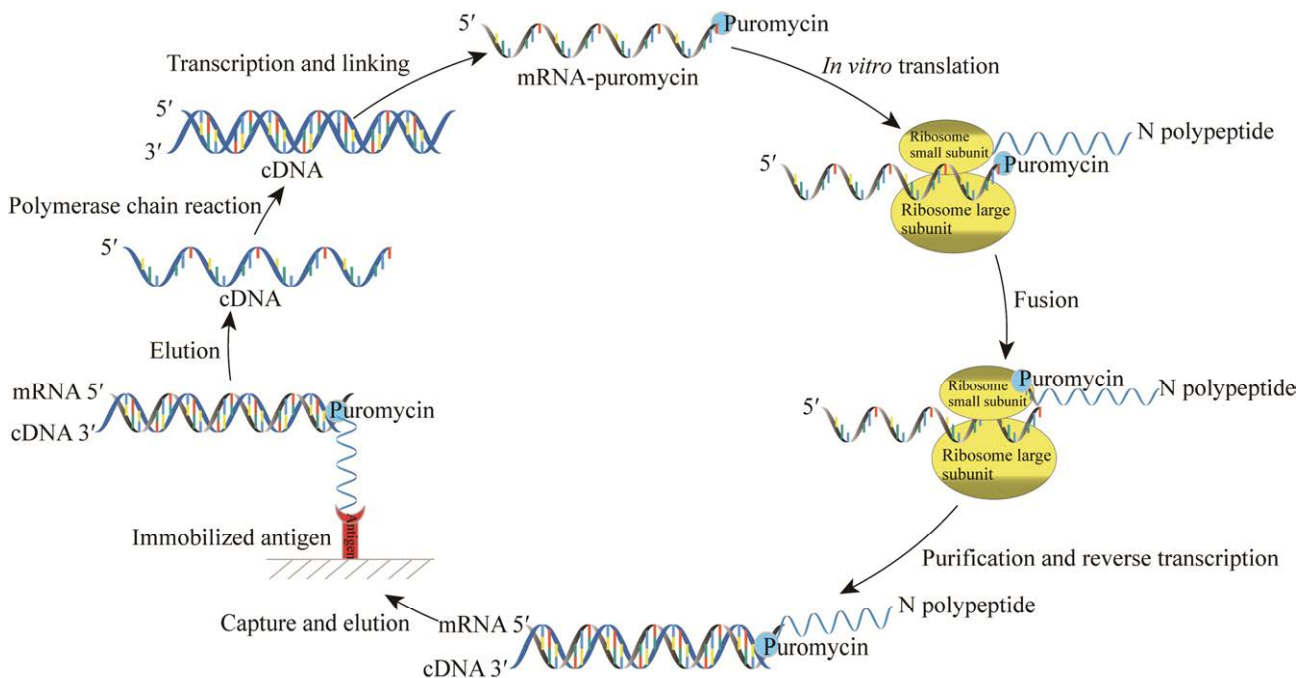


图 4 mRNA 展示技术流程

Figure 4 Flowchart of mRNA display technology.

首先,形成 mRNA-蛋白质复合物的稳定性是展示效率的关键因素,因此如何调控形成稳定的复合物尤为重要;其次,由于全程不依赖于细胞的参与,导致蛋白质翻译后无法进行正常的加工与修饰,直接影响到展示效果,因此如何进行蛋白质翻译后加工与修饰是该系统发展需攻克的另一大难题^[27]。mRNA 展示系统所面临的问题需在实验室条件下才可能解决,一是 mRNA 与蛋白质通过“连接子”形成 mRNA-蛋白质复合物,且“连接子”的产生需进行复杂的化学反应,可通过优化改造增加“连接子”的连接性、稳定性,以助于 mRNA-蛋白质复合物的稳定形成^[24]。二是 mRNA 展示系统在转录时,需加入一定浓度的还原剂,从而抑制了翻译后二硫键的形成。因二硫键对维持蛋白质的分子结构稳定性具有重要作用,则可根据蛋白质设计、引入二硫键或者加入低浓度还原剂等,以促进蛋白质在翻译之后进行正常加工与修饰。

在过去的 20 年里, mRNA 展示系统已被用于开发高亲和力配体,以对抗广泛的靶点,包括细胞内外蛋白、膜蛋白和 RNA^[28]。Tabata 等^[29]将 mRNA 展示系统与微流体系统相结合,实现超高效率的蛋白质筛选,以获得亲和力高、专一性强的 scFv,该方法为促进单克隆抗体的高通量制备,分析蛋白质表达和检测生物标志物、蛋白质的高通量分析-蛋白质组学和治疗领域中的蛋白质、蛋白质-DNA 和蛋白质-药物相互作用提供了基础。He 等^[30]在 mRNA 展示系统基础上,建立了抗体-核糖体-mRNA (antibody-ribosome-mRNA, ARM)展示技术,并在兔网状细胞系统内表达,从构建的抗体库中筛选获得了与抗孕酮 DB3 单抗有相同活性的 scFv。Fukuda 等^[31]则将 mRNA 展示技术同易错 PCR 和 DNA 改组技术相结合,建立了一套研究体外

scFv 分子进化的方法。mRNA 展示系统不仅为高效筛选 scFv 提供了库容量大、多样性强等坚实基础,更是为利用 scFv 作为癌症的免疫疗法提供了新导向。

4 酵母细胞表面展示系统

酵母细胞表面展示技术 (yeast surface display technology, YSDT)是一种用于真核蛋白或多肽载体表达的前沿技术(图 5)^[32]。酵母细胞表面展示系统 (yeast surface display system, YSDS)是将外源蛋白与载体基因序列进行融合表达,通过酵母转运机制将蛋白转运至酵母细胞表面进行体外筛选的一种全细胞展示平台^[33]。酵母细胞表面展示系统根据酵母类型分为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)展示系统和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)展示系统。

4.1 酿酒酵母细胞表面展示系统

根据外源目的蛋白与酵母细胞壁蛋白融合部位的不同,酿酒酵母细胞表面展示系统分为凝集素系统和絮凝素系统。凝集素系统是根据酵母细胞壁上甘露糖蛋白分为 α -凝集素 (α -agglutinin, Aga α)和 a-凝集素 (a-agglutinin, Aga)展示系统,可通过基因融合技术使酵母展示载体 pYD1 和 pCTCON2 利用 scFv N 端两侧的黏附蛋白 Aga2,将 Aga1 黏附在酿酒酵母壁上展示 scFv^[34]。絮凝素系统又分为糖基磷脂酰肌醇 (glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)锚定系统和絮凝素结构域锚定系统,絮凝素基因与外源蛋白通过共价键或非共价键结合在细胞壁表面^[33]。GPI 锚定系统是利用絮凝素 Flo1p C 末端与外源蛋白锚定。絮凝结构域锚定系统是利用 Flo1p 的中间絮凝功能结构域与外源蛋白进行融合,以助功能结构域识别酵母细胞壁中甘露聚糖链,从而诱导细胞黏附、聚集形成具有可逆性的絮状物^[35]。

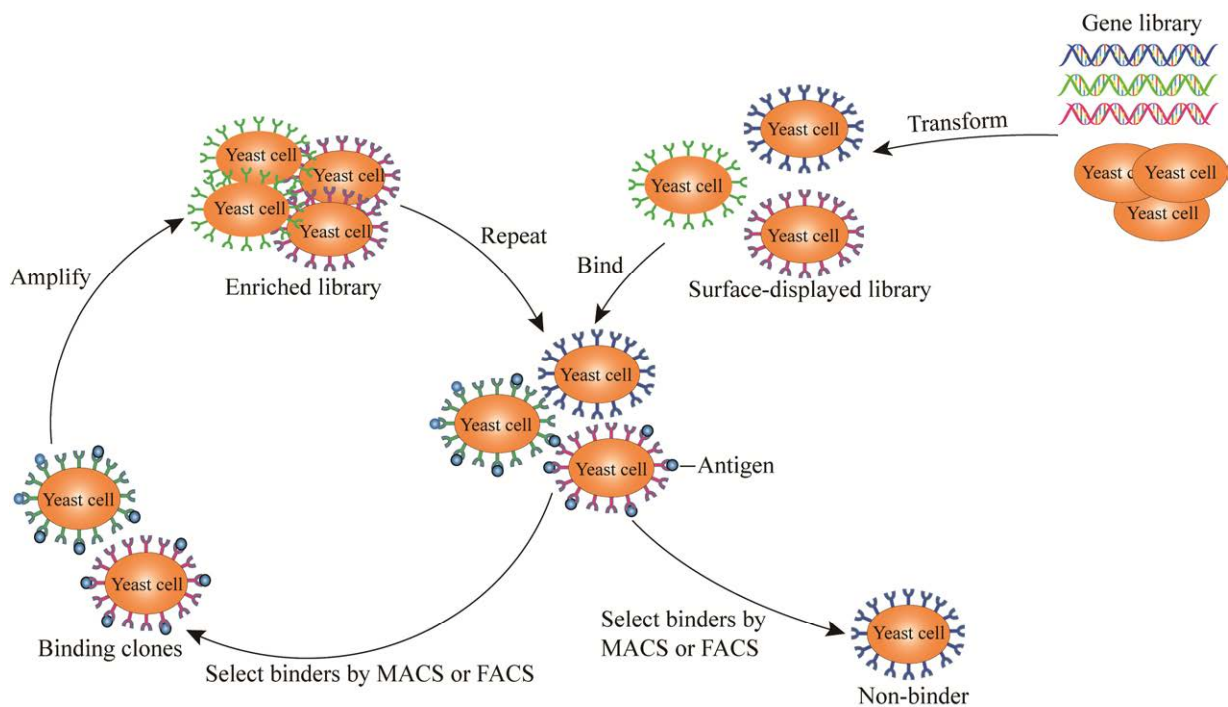


图5 酵母细胞表面展示技术流程

Figure 5 Flowchart of yeast cell surface display technology.

4.2 毕赤酵母细胞表面展示系统

巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)是一种具有醇氧化酶基因启动子的甲醇营养型酵母,可利用甲醇作为唯一碳源和能源诱导调控外源蛋白表达。毕赤酵母细胞表面展示系统利用锚定蛋白与目的蛋白融合表达,从而将目的蛋白通过共价键或非共价键连接到毕赤酵母细胞表面^[36]。毕赤酵母细胞表面展示的锚定蛋白不仅有酿酒酵母的凝集素和絮凝素,还有毕赤酵母的 GPI 细胞壁蛋白和内部重复蛋白(protein with internal repeats, PIR)。PIR 型细胞壁蛋白既可以通过 N 端融合也可以通过 C 端融合的方式将目的蛋白锚定在细胞壁表面^[32]。酵母细胞表面展示系统不仅具备真核生物的翻译后修饰系统,细胞培养和基因改造简单,极端环境中的稳定性,大分子蛋白质可正确折叠和分泌等优点,还可与荧光激活细胞分选术(fluorescence

activated cell sorting, FACS)相兼容,能够对大型组合文库进行高通量筛选和生物物理表征^[37]。尽管如此,酵母细胞表面展示系统仍存在一些缺陷,如库容量比其他系统小,其文库容量仅有 10^7 ,且多样性差;利用该系统展示小分子抗体时,常因酵母细胞转化效率过低导致实验周期长、成本高、产能低;在流式细胞仪中易受低流速的阻碍等^[38]。与细菌和酿酒酵母相比,巴斯德毕赤酵母中不存在甘露糖基转移酶,因此很少出现超甘露糖基化,可防止蛋白被超糖基化,且很少分泌无关的内源性蛋白。基于此,巴斯德毕赤酵母更适合用于高分子量蛋白的细胞表面展示。

酵母细胞表面展示系统广泛应用于文库筛选、疫苗研发、生物修复、生物燃料生产和全蛋白质组研究等方面。Wang 等^[39]建立了一套由展示载体 pYS 和表达载体 pYE 组成的酿酒酵

母展示筛选系统, 并利用此系统筛选和生产了抗艾滋病病毒 1 型(human immunodeficiency virus-1, HIV-1) scFv, 基于假病毒试验鉴定其具有 HIV-1 中和活性。Yu 等^[40]采用酵母细胞表面展示系统开发出对人源硫酸软骨素蛋白聚糖 4 (chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4)具有亲和力好和特异性强的全人源 scFv, 使用随机诱变法对 CSPG4 scFv 进行亲和力成熟, 并从酵母展示文库中筛选出改进的变体, 然后进行 FACS。再经 6 轮淘选和分选, 分离出突变的 scFv, 最后通过流式细胞术和表面等离子共振对 scFv 亲和力进行表征, 与亲本克隆相比, 变体 scFv 亲和力提高了 270–3 000 倍。该方法获得的 scFv 可用于开发针对 CSPG4 的肿瘤免疫疗法。Elter 等^[41]利用酵母细胞表面展示系统与 FACS 相结合建立了鸡源抗体的人源化策略。他们以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的细胞外域(extracellular domain, ECD) scFv (E1、E2)为例, 首先从免疫鸡中筛选出鸡源性 E1 和 E2, 再将其重链和轻链的互补决定区(CDR)置换入人源抗体中, 组成人源化的 scFv-Fc 融合体, 并将鸡源性 E1 和 E2 被亚克隆到嵌合 IgG 中作为全长抗体形式。与全长抗体相比, 该 scFv-Fc 融合体不仅亲和力好, 还表现出优越的稳定性和聚集性, 该策略进一步简化了将鸡源抗体进行人源化的过程。

酵母细胞表面展示系统是研究工程蛋白质稳定性、蛋白质表达和相互作用的领先技术, 也是酵母细胞工程的新兴技术。该系统可以通过调控酵母细胞的信号序列、基因缺失或过表达等, 以提高转化效率; 也可对流式细胞仪中的参数进行优化, 以克服流速阻碍, 增强筛选力度等问题。酵母细胞表面展示系统不仅可以稳定、高效地筛选 scFv, 还可以筛选出正确折叠的高分子量蛋白, 该系统为体外抗体制备和

口服活载体疫苗提供了新思路 and 方向。

5 哺乳动物细胞展示系统

哺乳动物细胞展示技术(mammalian cell display technology, MCDT)是将重组 DNA 序列转至哺乳动物细胞中, 利用细胞分选和细胞扩增富集筛选出与靶标特异性结合抗体的新技术(图 6)^[42]。哺乳动物细胞展示系统(mammalian cell display system, MCDS)是以哺乳动物细胞为媒介进行天然蛋白质筛选的细胞展示平台^[43]。近年来, 哺乳动物细胞展示系统因可实现抗体稳定的高水平表达, 抗体结构的多样展示, 以及翻译修饰的抗体最接近于天然蛋白分子而逐渐被重视^[42]。然而, 由于哺乳动物细胞转化效率低和抗体重链和轻链的表达不一致或抗体易组装错误, 影响哺乳动物细胞展示系统的文库多样性、稳定性, 现有文库容量仅达 10^8 , 该系统还受到周期长、成本高、操作复杂, 以及在质粒转染和病毒侵染时无法确保单个基因进入细胞等阻碍, 这使得从筛选文库中直接分离出高亲和力抗体较为困难^[44]。因此, 在实验设计时, 需充分考虑筛选结果的随机性, 故可通过转染试剂的筛选、感染细胞数的增加等以保证靶标筛选的准确性, 根据展示靶标选择不同的哺乳动物细胞设计开发出相应的展示系统; 还可通过改造质粒和哺乳动物表达载体以确保仅有一种外源基因进入单个细胞, 从而提高哺乳动物细胞转化效率, 以解决周期长、成本高、操作复杂等问题。

目前, 哺乳动物细胞展示系统主要应用于抗体的开发、诊断和治疗。该系统凭借其特有优势可分离出高亲和力和特定生物学功能的 scFv, 在开发治疗性药物方面具有较大潜力^[45]。Zhang 等^[44]利用人表皮生长因子受体-3 (receptor tyrosine-protein kinase erbB-3, ErbB3)构建哺乳动物细胞展示系统, 研究者从志愿者外周血淋

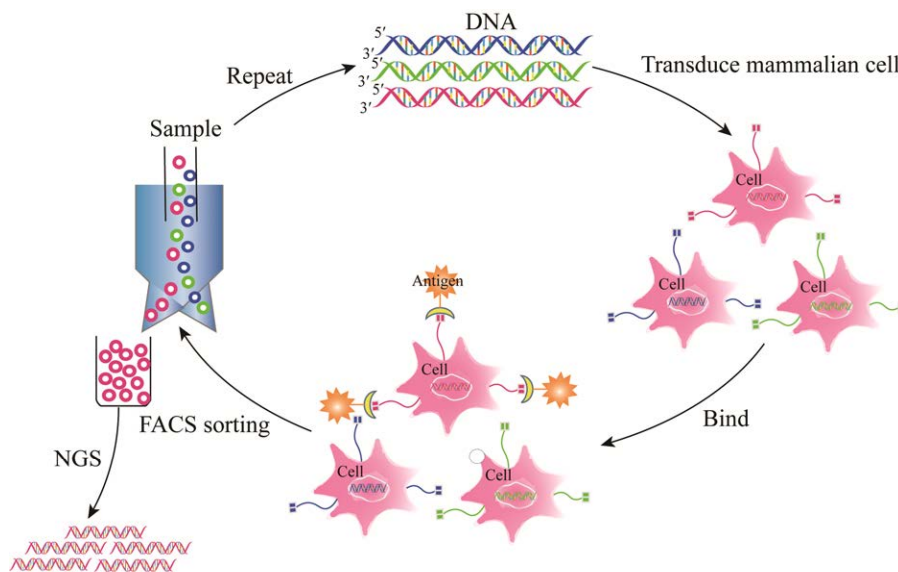


图6 哺乳动物细胞展示技术流程

Figure 6 Flowchart of mammalian cell display technology.

巴细胞中分离出抗体的基因序列，构建了具有一定库容量、多样性和有效性的 scFv 抗体库，该抗体库最大优点在于 2-3 周内便可成功筛选出具有一定亲和力的 ErbB3-scFv，以有效地提供从头分离的抗原特异性抗体。本筛选系统为体外快速获得高亲和力 scFv 提供了一种最佳选择。钱尼良等^[46]在哺乳动物细胞展示型人源 scFv 抗体库中获得了全新抗 B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BlyS) scFv 序列，该 scFv 分子量小、易于表达且与 BlyS 有较高的亲和力，该研究为后续的活性验证和产品研发奠定了基础。哺乳动物细胞展示系统仍是目前单克隆抗体筛选的重要手段之一，这是由于该系统稳定性好、表达量高，且具有真核表达系统的翻译后加工功能。研发治疗性抗体领域将会有哺乳动物细胞展示系统的一席之地，更为开发安全可靠的 scFv 提供了新手段。

6 展望

随着 scFv 研究的不断深入，scFv 在医学、

食品、生物等领域展现出了广阔的应用前景。在靶向治疗方面，可以将药物、毒素与 scFv 结合，形成免疫药物或者免疫毒素，利用抗原与抗体特异性结合的特点，定位靶细胞，并对靶细胞进行特异性免疫杀伤^[47]；在肿瘤治疗时，可将 scFv 与 T 细胞表面受体嵌合于 T 细胞上构建出嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor-modified T cells, CAR-T)。该 CAR-T 细胞不仅可通过 scFv 特异性识别并结合肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs)，还可避免 T 细胞受主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的限制^[48]。在影像诊断方面，由于 scFv 穿透力强、体内半衰期短，其在肿瘤组织中的分布指数较完整；在放射显像时，其放射性核素排出较快，对身体伤害较小，可用于肿瘤的显像定位诊断等^[49]；但 scFv 仍存在许多不足，导致其在实际应用中受到一定的限制，如：由于 scFv 的半衰期短，可能其疗效作用尚未充分发挥就被清除，因此这既是优点也是缺点；其次，由于 scFv 的分子

量小, 结构稳定性较差, 易受到环境、生产等因素的影响, 因此需根据其使用目的进行适当的结构改造。

目前, 噬菌体、核糖体、mRNA、酵母和哺乳动物细胞等展示系统是筛选 scFv 的主要平台, 对其研究和应用都较为广泛, 与传统的抗体工程方法相比, 上述各展示系统均存在其优缺点。噬菌体展示系统能实现蛋白或多肽基因型与表型的统一, 可迅速筛选并获得目标抗体。核糖体展示系统基于从文库中体外选择 scFv, 克服了体内免疫耐受或表位优势的限制, 且在亲和力成熟的情况下, 易从文库中筛选获得高亲和力的 scFv^[50]。mRNA 展示系统不仅弥补了噬菌体展示系统、酵母细胞表面展示系统等所面临的库容量不足的缺陷, 更为构建多样化、库容量大的文库提供了可能, 这为展示不同类型的 scFv 提供了基础。尽管目前 mRNA 展示系统应用广泛性不如其他展示系统, 但它将凭借自身独特优势在各领域中发挥作用^[51]。相比于其他展示系统(如噬菌体、mRNA、哺乳动物细胞等), 酵母细胞表面展示系统具有培养密度大、蛋白表达效率高、翻译后修饰机制与高等生物更为接近等优势, 在药物研发上具有良好的应用前景^[52]。哺乳动物细胞展示系统则由于可利用 FACS 识别、监测高亲和力 scFv 而优于其他系统, 且可用于构建小分子抗体库和全长抗体库, 这将为哺乳动物细胞展示系统在研发治疗性抗体方面提供优势^[53]。目前尚无全能、通用且有效的单一抗体展示系统用于筛选抗体及 scFv, 实验过程中, 可利用两种或多种展示系统相结合, 通过筛选获得特异性强、亲和力好的 scFv, 以实现抗体的高效展示及表达。随着 scFv 的广泛应用前景, 其展示系统也迅速成为了研究热点, 各展示系统将不断优化, 并在未来几十年中开发出更多具有针对性、差异性

的抗体展示系统, 将从 scFv 的筛选扩展到医学、农学、食品学和生物学等领域。

REFERENCES

- [1] ZHANG HX, WANG XL, LI XR, MA ZR, FENG RF. Construction, expression, and characterization of a single-chain variable fragment (scFv) antibody targeting to the encephalomyocarditis virus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2018, 90(7): 1184-1191.
- [2] JAVADIAN FS, BASAFA M, BEHRAMAN A, HASHEMI A. Solubility assessment of single-chain antibody fragment against epithelial cell adhesion molecule extracellular domain in four *Escherichia coli* strains[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2021, 19(1): 26.
- [3] 单超, 李兰, 王宗华. IgM 型单克隆抗体之 scFv 库的建立与筛选[J]. *亚热带农业研究*, 2009, 5(2): 132-136.
SHAN C, LI L, WANG ZH. Construction of an anti-LPG scFv library and screening for specific antibodies against LPG[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2009, 5(2): 132-136 (in Chinese).
- [4] ARSLAN M, KARADAG M, ONAL E, GELINCI E, CAKAN-AKDOGAN G, KALYONCU S. Effect of non-repetitive linker on *in vitro* and *in vivo* properties of an anti-VEGF scFv[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 5449.
- [5] BARDERAS R, BENITO-PEÑA E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(12): 2475-2479.
- [6] 张家禾, 左伟勇, 洪伟鸣, 管远红, 孟婷, 刘莉, 周作红. 噬菌体展示技术及其在抗体制备中应用的研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2014, 54(2): 83-88.
ZHANG JH, ZUO WY, HONG WM, GUAN YH, MENG T, LIU L, ZHOU ZH. Research progress in phage display antibody technology and its applications[J]. *Journal of Nanchang University (Medical Sciences Edition)*, 2014, 54(2): 83-88 (in Chinese).
- [7] LEDSGAARD L, LJUNGARS A, RIMBAULT C, SØRENSEN CV, TULIKA T, WADE J, WOUTERS Y, MCCAFFERTY J, LAUSTSEN AH. Advances in antibody phage display technology[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(8): 2151-2169.
- [8] LU JC, DING JN, LIU ZX, CHEN TT. Retrospective

- analysis of the preparation and application of immunotherapy in cancer treatment (review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2022, 60(2): 12.
- [9] JAROSZEWICZ W, MORCINEK-ORŁOWSKA J, PIERZYŃSKA K, GAFFKE L, WĘGRZYŃ G. Phage display and other peptide display technologies[J]. *FEMS microbiology reviews*, 2021, 46(2): fuab052.
- [10] LUTHRA A, LANGLEY DB, SCHOFIELD P, JACKSON J, ABDELATTI M, ROUET R, NEVOLTRIS D, MAZIGI O, CROSSETT B, CHRISTIE M, CHRIST D. Human antibody bispecifics through phage display selection[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(13): 1701-1704.
- [11] HAMIDEH R, REZA SM, PEDRAM M, HOSSEIN S, YALDA S. Isolation of single-chain variable fragment (scFv) antibodies for detection of Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) by phage display[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(12): 2789-2798.
- [12] HAMIDEH R, REZA SM, FARIDEH S. A new single-chain variable fragment (scFv) antibody provides sensitive and specific detection of citrus tristeza virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 300: 114412.
- [13] 庞倩, 陈晶, 王小红, 王佳. 基于噬菌体展示技术抗黄曲霉毒素B1单链抗体的筛选及其蛋白结构分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(12): 41-48.
PANG Q, CHEN J, WANG XH, WANG J. Screening of anti-aflatoxin B1 ScFv based on phage display technology and analysis of its protein structure[J]. *China Biotechnology*, 2018, 38(12): 41-48 (in Chinese).
- [14] KANAMORI T, FUJINO Y, UEDA T. PURE ribosome display and its application in antibody technology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844(11): 1925-1932.
- [15] NAKAI H, ISSHIKI K, HATTORI M, MAEHIRA H, YAMAGUCHI T, MASUDA K, SHIMIZU Y, WATANABE T, HOHSAKA T, SHIHOYA W, NUREKI O, KATO Y, WATANABE H, MATSUURA T. Cell-free synthesis of human endothelin receptors and its application to ribosome display[J]. *Analytical chemistry*, 2022, 94(9): 3831-3839.
- [16] KUNAMNENI A, OGAUGWU C, BRADFUTE S, DURVASULA R. Ribosome display technology: applications in disease diagnosis and control[J]. *Antibodies*, 2020, 9(3): 28.
- [17] LAGOUTTE P, LUGARI A, ELIE C, POTISOPON S, DONNAT S, MIGNON C, MARIANO N, TROESCH A, WERLE B, STADTHAGEN G. Combination of ribosome display and next generation sequencing as a powerful method for identification of affibody binders against β -lactamase CTX-M15[J]. *New Biotechnology*, 2019, 50: 60-69.
- [18] LU JC, DING JN, LIU ZX, CHEN TT. Retrospective analysis of the preparation and application of immunotherapy in cancer treatment (review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2022, 60(2): 12.
- [19] MINISTRO J, MANUEL AM, GONCALVES J. Therapeutic antibody engineering and selection strategies[J]. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 2020, 171: 55-86.
- [20] WESTLUND KN, MONTERA MA, GOINS AE, ALLES SRA, AFAGHPOUR-BECKLUND M, BARTEL R, DURVASULA R, KUNAMNENI A. Single-chain fragment variable antibody targeting cholecystokinin-B receptor for pain reduction[J]. *Neurobiology of Pain*, 2021, 10: 100067.
- [21] KUNAMNENI A, YE CY, BRADFUTE SB, DURVASULA R. Ribosome display for the rapid generation of high-affinity Zika-neutralizing single-chain antibodies[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0205743.
- [22] KUNAMNENI A, CLARKE EC, YE CY, BRADFUTE SB, DURVASULA R. Generation and selection of a panel of pan-filovirus single-chain antibodies using cell-free ribosome display[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2019, 101(1): 198-206.
- [23] SHABANI S, MOGHADAM MF, LATIF MOUSAVI GARGARI S. Isolation and characterization of a novel GRP78-specific single-chain variable fragment (scFv) using ribosome display method[J]. *Medical Oncology*, 2021, 38(9): 115.
- [24] NAGUMO Y, FUJIWARA K, HORISAWA K, YANAGAWA H, DOI N. PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2016, 159(5): 519-526.
- [25] 李若微. 核糖体展示天然纳米抗体文库筛选 HIF-1 α 单域重链抗体的应用基础研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2018.
LI RW. An applied basic research of the ribosome-displayed non-immunised nanobody library used for selection of single domain heavy chain antibodies targeting HIF-1 α [D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2018 (in Chinese).

- [26] NEWTON MS, CABEZAS-PERUSSE Y, TONG CL, SEELIG B. *In vitro* selection of peptides and proteins-advantages of mRNA display[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(2): 181-190.
- [27] KAMALINIA G, GRINDEL BJ, TAKAHASHI TT, MILLWARD SW, ROBERTS RW. Directing evolution of novel ligands by mRNA display[J]. Chemical Society Reviews, 2021, 50(16): 9055-9103.
- [28] GRINDEL BJ, ENGEL BJ, ONG JN, SRINIVASAMANI A, LIANG XW, ZACHARIAS NM, BAST RC JR, CURRAN MA, TAKAHASHI TT, ROBERTS RW, MILLWARD SW. Directed evolution of PD-L1-targeted affibodies by mRNA display[J]. ACS Chemical Biology, 2022, 17(6): 1543-1555.
- [29] TABATA N, SAKUMA Y, HONDA Y, DOI N, TAKASHIMA H, MIYAMOTO-SATO E, YANAGAWA H. Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: e64.
- [30] HE MY, TAUSSIG MJ. Ribosome display of antibodies: expression, specificity and recovery in a eukaryotic system[J]. Journal of Immunological Methods, 2005, 297(1/2): 73-82.
- [31] FUKUDA I, KOJOH K, TABATA N, DOI N, TAKASHIMA H, MIYAMOTO-SATO E, YANAGAWA H. *In vitro* evolution of single-chain antibodies using mRNA display[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(19): e127.
- [32] TEYMENNET RAMÍREZ KARLA V, FERNANDO MM, TREJO HERNÁNDEZ MARÍA R. Yeast surface display system: strategies for improvement and biotechnological applications[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 9: 794742.
- [33] CHUN J, BAI J, RYU S. Yeast surface display system for facilitated production and application of phage endolysin[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(3): 508-516.
- [34] WANG Z, MATHIAS A, STAVROU S, NEVILLE DM. A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities[J]. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS, 2005, 18(7): 337-343.
- [35] 张益民. *Aspergillus terreus* 来源 α -L-鼠李糖苷酶在毕赤酵母细胞表面的高效展示及应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2021.
ZHANG YM. High-level cell-surface display of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in *Pichia pastoris* and the primary application in selective trimming of rutin[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [36] 苏国栋. 南极假丝酵母脂肪酶 B 在毕赤酵母细胞表面高效展示体系的构建与定向进化研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2010.
SU GD. Sonstruction of novel efficient cell-surface display systems on *Pichia pastoris* cell surface and directed evolution of *Candida antarctica* lipase B[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2010 (in Chinese).
- [37] TRAXLMAYR MW, SHUSTA EV. Directed evolution of protein thermal stability using yeast surface display[M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017: 45-65.
- [38] CHERF GM, COCHRAN JR. Applications of yeast surface display for protein engineering[M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015: 155-175.
- [39] WANG Y, SHAN YM, GAO XY, GONG R, ZHENG J, DOUGLAS ZHANG X, ZHAO Q. Screening and expressing HIV-1 specific antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Immunology, 2018, 103: 279-285.
- [40] YU X, QU L, BIGNER D, CHANDRAMOHAN V. Selection of novel affinity-matured human chondroitin sulfate proteoglycan 4 antibody fragments by yeast display[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2017, 30: 639-647.
- [41] ELTER A, BOGEN JP, HINZ SC, FIEBIG D, MACARRÓN PALACIOS A, GRZESCHIK J, HOCK B, KOLMAR H. Humanization of chicken-derived scFv using yeast surface display and NGS data mining[J]. Biotechnology Journal, 2021, 16(3): e2000231.
- [42] BOWERS PM, HORLICK RA, NEBEN TY, TOOBIAN RM, TOMLINSON GL, DALTON JL, JONES HA, CHEN A, ALTOBELL L, ZHANG X, MACOMBER JL, KRAPF IP, WU BF, MCCONNELL A, CHAU B, HOLLAND T, BERKEBILE AD, NEBEN SS, BOYLE WJ, KING DJ. Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(51): 20455-20460.
- [43] JIN YJ, YU D, TIAN XL, LI HX, ZHOU XC, KONG Y, ZHANG W, ZHANG L, LEI C, YANG ZL, TU C, WU

- YL, YING TL. A novel and effective approach to generate germline-like monoclonal antibodies by integration of phage and mammalian cell display platforms[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(4): 954-962.
- [44] ZHANG J, ZHANG XA, LIU Q, LI MY, GAO LC, GAO X, XIANG SS, WU LL, FU J, SONG HF. Mammalian cell display for rapid screening scFv antibody therapy[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(10): 859-866.
- [45] LIU Y, LEE AG, NGUYEN AW, MAYNARD JA. An antibody Fc engineered for conditional antibody-dependent cellular cytotoxicity at the low tumor microenvironment pH using mammalian cell display[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(4): 101798.
- [46] 钱尼良, 张晶, 高柳村, 万德有, 冯红茹, 刘蕴慧, 杨懿, 高新, 宋海峰. 人源抗 BLYS 单链抗体的筛选及其构建与表达[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(6): 638-643.
- QIAN NL, ZHANG J, GAO LC, WAN DY, FENG HR, LIU YH, YANG Y, GAO X, SONG HF. Screening, construction and expression of human anti-BLYS ScFv antibody[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2015, 24(6): 638-643 (in Chinese).
- [47] 张波. 金葡菌 α 溶血素 scFv 的制备及其保护作用研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2019.
- ZHANG B. The preparation and therapeutic roles of single-chain antibody that against hla of *Staphylococcus aureus* to control mastitis in mice[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [48] CHUNG H, JUNG H, NOH J. Emerging approaches for solid tumor treatment using CAR-T cell therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12126.
- [49] 向新楚, 刘雪, 胡耀凯, 赵成君, 罗文新. 抗 GPC3 单链抗体的制备及其在肝细胞癌靶向检测中的应用[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(12): 2860-2867.
- XING XC, LIU X, HU YK, ZHAO CJ, LUO WX. Preparation of anti-GPC3 single chain antibody for targeted detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(12): 2860-2867 (in Chinese).
- [50] HOET RM, COHEN EH, KENT RB, ROOKEY K, SCHOONBROODT S, HOGAN S, REM L, FRANS N, DAUKANDT M, PIETERS H, van HEGELSOM R, NEER NCV, NASTRI HG, RONDON IJ, LEEDS JA, HUFTON SE, HUANG LL, KASHIN I, DEVLIN M, KUANG GN, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(3): 344-348.
- [51] KUSUMOTO Y, HAYASHI K, SATO S, YAMADA T, KOZONO I, NAKATA Z, ASADA N, MITSUKI S, WATANABE A, WAKASA-MORIMOTO C, UEMURA K, ARITA S, MIKI S, MIZUTARE T, MIKAMIYAMA H. Highly potent and oral macrocyclic peptides as a HIV-1 protease inhibitor: mRNA display-derived hit-to-lead optimization[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2022, 13(10): 1634-1641.
- [52] BAN B, BLAKE RCII, BLAKE DA. Yeast surface display platform for rapid selection of an antibody library *via* sequential counter antigen flow cytometry[J]. *Antibodies*, 2022, 11(4): 61.
- [53] BAHJOB MSZ, FATEMEH O, SHIRIN E, MARYAM H, BEHZAD B, NASSER P, REZA TM, AHAD M, SERGE M. An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies; advantages and disadvantages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 421-442.

(本文责编 陈宏宇)