

doi: 10.3969/j.issn.1003-4271.2014.03.07

肿瘤靶向多肽生物淘选技术研究进展

郝葆青, 车晨, 李涵依

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

摘要: 生物淘选肿瘤或癌细胞的各种特异性靶向多肽是探索肿瘤早期诊断和治疗方法的有效途径。特异性靶向多肽既可用于探测肿瘤细胞表型特征, 又将其与抗癌药物结合进行靶向治疗, 同时还可作为体内肿瘤的成像制剂, 用于肿瘤及肿瘤细胞微转移的早期探测。噬菌体展示肽库技术能够有效地进行生物淘选或识别出与癌或肿瘤细胞某一靶点连结的, 具有特异性、高亲和性的多肽。近年来, 利用体内或体外噬菌体展示肽库技术已成功淘选或识别出一些癌细胞的靶向多肽。本文就这些方面的研究进展进行了简要阐述, 重点介绍了癌或肿瘤细胞靶向多肽的体外和体内生物淘选最新技术和临床应用。

关键词: 靶向多肽; 噬菌体展示肽库; 体外(内)淘选; 癌症细胞; 肿瘤

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 1003-4271(2014)03-0358-06

1 引言

调控或肿瘤细胞的异常分化、肿瘤药物的有效转运等方面的发现是探索新型癌症或肿瘤防治方法的主要途径^[1]。利用肽库技术筛选一些与肿瘤特异连接的多肽是目前癌症诊疗中最具有潜力的方法之一。一方面, 这些特异性多肽不仅可作为辨别肿瘤细胞的表型和亲和性的配体, 提高对肿瘤分子诊断的敏感性, 又可用于连接抗癌药物进行靶向治疗, 而不损伤其他健康组织; 另一方面, 这些特异性多肽还可作为体内肿瘤成像剂, 用于早期癌细胞及其肿瘤组织微转移的探测。不过, 如何鉴别这些与癌症或肿瘤细胞表面连结的特异性多肽仍然是临床靶向药物转运、传递、分子成像等应用的主要瓶颈。

细胞表面存在多种大分子, 使得每一类细胞都会具有独特外貌轮廓或表面地貌结构, 这些独特的地貌结构常是一些生物分子的递送地址或靶位。癌细胞由于遗传变异和环境因素的影响或改变了其蛋白组结构、受体类型、数量和排布方式, 因而细胞表面呈现出独特地貌结构^[2]。靶向治疗、体外和体内分子诊断都需要筛选出能分辨细胞及细胞间表面地貌结构细微差别的一些高特异性、亲和性的配体。这种情况下, 除了掌握各类型靶细胞膜蛋白受体的大分子信息外, 还应该熟知某一类蛋白受体在不同类型细胞上的表达水平。一段时间以来, 这些可用作诊断、预后和(或)药物靶点生物标记的蛋白, 其识别方法通常都只采用蛋白组学方法^[3]。比如, 利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)来比较癌症和对照样品之间蛋白的差别, 再采用质谱(MS)法鉴别不同蛋白表达水平。尽管 2D-PAGE/MS 方法很有效, 但是在检测含量低或某些类别蛋白时存在局限性, 尤其是膜蛋白。因而这类方法通常被认为不适用于诊断靶向药物传递的特异细胞表面蛋白表达的识别^[4]。

癌症或肿瘤治疗和诊断领域中, 许多有成就的发现大都集中在单克隆抗体研发方面, 并已相继研制出一些具有治疗性的临床癌症单克隆抗体^[5]。单克隆抗体作为递送载体表现出极高的亲和性及特异性, 不过同样也存在一些局限性。免疫抗体复合物的体积较大, 很难渗透进入肿瘤组织^[5]。抗体同毒素或放射性同位素结合后易被网状内皮系统非特异性吸收, 易导致肝毒性和骨髓毒性的发生。抗体在体内的半衰期与 PET 成像术采用的普通放射性同位素的半衰期不太匹配, 检测肿瘤时对比度很差, 通常不能用作分子成像剂^[5]。此外, 抗体大分子下游工程本身的化学修饰也具有极大的挑战性。针对抗体的这些局限性, 现多倾向于采用多肽作为靶向配体。多

收稿日期: 2014-02-17

作者简介: 郝葆青(1956-), 男, 汉族, 河北保定人, 教授, 研究方向: 药物载体. Email: 1296714389@qq.com.

肽拥有许多优势,例如相比抗体型配体其体积较小,可按某一特性大量合成,或者按某一衍生物特性来进行处理加工^[6]。多肽通常可避开网状内皮系统的吸收,且对蛋白受体有较高的亲和性,因此是理想的靶向配体。Schally 等研究表明^[7],多肽通过选择性修饰可增加其在机体内的稳定性;他们认为一些已知的肿瘤细胞所表达的、且能够与细胞表面受体连结的肽基配体常可用作靶向因子。

噬菌体展示肽库技术使与靶蛋白相连接的、可作为靶向多肽配体的筛选成为可能,尤其是筛选出那些自然存在或还未被发现的、并可用作生物标记的多肽配体^[8]。相关多肽的筛选和识别必将在癌症或肿瘤研究中扮演越来越重要的作用。本文针对近年来肿瘤靶向多肽的体外或体内淘选的噬菌体展示肽库技术的研究进展作了较简要介绍,重点讨论了肿瘤靶向多肽不同淘选方法的特点、临床应用前景及展望。

2 肿瘤靶向多肽生物淘选

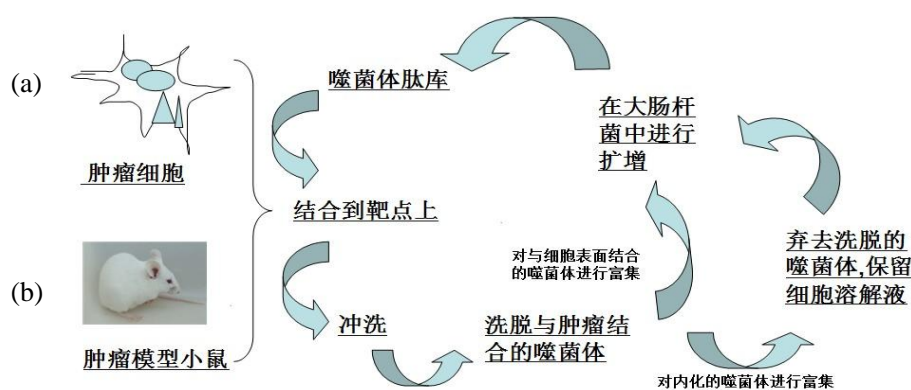


图1 肿瘤靶向多肽的噬菌体展示肽库淘选示意图

Fig.1 the abridged general view of phage display peptide technology for biopanning of tumor targeting peptides.

在图1中,培养的癌细胞(a)或动物体内的肿瘤(b)都可用作生物淘选的靶目标。对噬菌体的扩增进行洗脱可作为连结细胞表面的噬菌体克隆富集。来自细胞裂解物的噬菌体扩增则作为连结在细胞上的介导细胞吸收的多肽富集。

1996年, Pasqalini 等^[9]首先使用噬菌体展示肽库从动物体内淘选分离出了能识别或回访该动物特异器官血管的多肽。同年, Johnston 等^[10]发现对体外培养的细胞进行生物淘选也可获得能与该类靶细胞结合并可引起该靶细胞内吞作用的多肽。他们实验共同特点是所淘选出的短肽对其来源的靶细胞类型识别的特异性远高于对其他类型细胞。并且,重要的是这些淘选方法消除了先前需对其细胞靶蛋白进行鉴别和纯化的忧虑^[11]。此外,所淘选的短肽通常可作为细胞自身的成分并与它们的靶点连接。不过,他们的实验都只是针对异源性靶点的非偏差筛选,而不是用于靶向治疗各类细胞受体纯化蛋白连接多肽的淘选。现在观点认为这些方法在理论上仍可用于针对肿瘤特异性靶向配体的淘选^[11]。肿瘤细胞的生物淘选常可分为全细胞淘选(体外生物淘选)和体内生物淘选两类,其中全细胞筛选又包括有固相全细胞筛选、液相全细胞筛选。这两类淘选方法都具有各自特点、优势和不足。

2.1 肿瘤细胞的全细胞淘选

全细胞淘选(也常称体外生物淘选),噬菌体肽库展示方法之一,用于分离与细胞特定靶点连接的多肽,也就是将培养的完整细胞作为诱饵以达到分离各种细胞连接多肽的淘选方法(图-1-a)。目前,这种方法在利用不同噬菌体展示肽的排列识别某种细胞类型的细胞连接配体方面已经取得了非常大的成功,尽管在淘选过程中存在靶点异源性。目前,该方法已被拓展为各种纯化蛋白的多肽配体的识别技术^[12]。要淘选分离出或获取与细胞表面连接的、或是既可与细胞连接又能引发细胞吸收的多肽配体,主要取决于配体下游应用的需要。经体外生物淘选的多肽都有一个特殊的特征,那就是细胞特异性,即不同于与它们来源的或相近的细胞类型的细胞相连接^[13]。简单而言,体外淘选的方法就是将短肽随机组成的噬菌体肽库与有兴趣研究的细胞进行孵育,孵育后进行一系

列严格清洗以去除未连接或连接不牢的噬菌体。为了获取结合有细胞表面片段(多肽)的噬菌体,一定强度的洗脱程序是必需的。然后用这些连接有多肽片段的噬菌体去感染大肠杆菌后就可完成噬菌体的回收和扩增。以上几步称为一轮淘选,大概需要经历4-6轮。实际上,评判整个淘选结束的标准被设定为与细胞一起孵育的噬菌体总数和与细胞连接的噬菌体总数的比值不再增加或是保持相对稳定为止。噬菌体对哺乳动物细胞没有趋向性,由肽库扩增的噬菌体既可牢固地与细胞表面连接又可促使细胞内在的消化吸收^[14]。由于肽库中任一噬菌体的唯一的、独特的组分就是所展示的多肽,因此这个多肽就成为噬菌体是否与一特定细胞类型连接的决定因素。

全细胞多肽淘选有如下优势:首先,能保持细胞受体的天然属性。细胞外表地貌是由膜结合蛋白的表达水平以及在膜中的排列情况所决定,这不是纯化的膜蛋白所能模仿的。其次,通过洗涤条件的改变可使淘选出偏重于可介导细胞吸收的短肽,因为在淘选纯化后的膜蛋白时,其过程仅由连接特性来驱动。第三,在对所淘选的特定大分子没有选择要求的情况下,此种方法是一种随机的淘选方式,换言之就是不需要了解细胞受体前期情况^[15]。因此,某类型细胞靶向多肽的生物淘选无需了解其细胞外表结构形态;研究人员可通过淘选去发现那些还未被考虑的、或有望成为靶点的或者是还未被识别的细胞表面大分子^[15]。

目前采用全细胞淘选方法已经分离出了许多癌症特异性多肽^[15]。但这些多肽序列之间几乎没有相似性,这很可能是肽库设计、细胞株和淘选方案上的不同所致。现采用的肽库有线性和环状,多肽长度多为6至20个氨基酸,大多可以直接用于各种新鲜细胞株的多肽生物淘选。2008年Kubo等报道,对使用捕获显微激光切割分离法得到的人类结肠癌细胞进行的生物淘选获得了成功^[16]。全细胞淘选方法突显了体系稳固性和细胞诱饵属性的灵活性,淘选出的多肽能特异回访作为诱饵的细胞。另外,该方法也可用于肿瘤基质中的一些蛋白生物学混合物的淘选。2006年Pilch等^[17]报道,针对肿瘤胞外基质中富含凝血纤维的结合素可渗透进肿瘤间隙空间从而产生纤维蛋白这一现象,他们将血浆凝块作为靶点进行生物淘选,分离后得到可与纤维蛋白-纤链结合蛋白网络结合的两个环状多肽。这两个多肽通常聚集在动物异种移植的乳腺癌(MDA-MB-435)细胞间隙中,并且能与乳腺癌临床样本的冷冻切片组织相连接。

需要进行多轮的体外淘选,直至几个“最好”或占优势(由亲和性来确定)的多肽序列被淘选出。另外,如果想要实现药物或基因转送等方面的应用还需考虑所淘选分离的多肽能否被介导细胞所吸收。对于多数细胞株或患者样本的筛选,也可在淘选过程中通过使用大规模测序方法来尽早鉴别出这些符合要求的短肽序列^[18]。即使这些合意短肽由于不具有高度的亲和性而不能用作细胞靶向配体,但它们仍可用于实验细胞株表面相似物的鉴别,而且它们能提供某类疾病异质性的信息,以便了解不同器官所产生的癌细胞之间的相似性。

2.2 肿瘤靶向短肽体内淘选

体内淘选多基于肽库噬菌体能够定向的识别靶器官的分离这一特性。一般来说就是将肽库噬菌体注入小鼠尾部静脉,在体内短暂孵育后,处死小鼠取出靶向器官,然后将靶器官的噬菌体回收后在均质组织中进行扩增,再将其注入到另一只小鼠体内进行下一轮重复淘选过程(图-1-b)。3-5轮淘选后,几个靶器官的短肽序列即可被鉴定出来^[19]。由于体内淘选方法取决于回收感染噬菌体的能力,因此体内循环时间通常选择在5到15分钟的范围内。就因为这个原因,尽管研究人员已经发现个别短肽可渗进肿瘤组织,体内淘选还是通常只涉及到以血管器官为靶点的短肽识别。另外,此种淘选方法不管受到何种生物学限制,比如动物内在的血清稳定性、细胞途径和清除率等,体内淘选应确保所分离的多肽必须能回访动物体内的靶点。体内淘选通常需要体外淘选来协作进行,即在体内淘选前可先进行体外淘选以富集可能的候选肽,之后再将这些多肽注入进行体内淘选。有文献报道,并且国内已有实验证实噬菌体肽库筛选的次数越多,就越能够获得具有高度亲和性的噬菌体展示肽。以此为基础进行多次体内或体外淘选,噬菌体的富集率将会逐渐提。Laakkonen等将体内淘选和体外淘相结合分离出了一种与肿瘤淋巴管相结合、而不是同脉管系统结合的多肽^[20]。肿瘤淋巴管能为肿瘤细胞提供从原发瘤扩散的途径,如果这些靶向多肽破坏了这些淋巴管,也就达到了抑制肿瘤的潜在性转移目的。

不同类型的肿瘤可分离得到不同的多肽,即使采用相同的肽库,不同的肿瘤类型也会影响内皮细胞的受体外形。2003年Hoffman等报道,他们分离出了可区分发育不健全的皮肤新生血管与继发肿瘤中的新生血管的多肽^[21]。说明多肽的辨别力是相当精确的,同时这些多肽也是具有特异性的。2004年,Laakkonen等采用生物淘选法分离出可与乳腺癌、前列腺癌和骨肉瘤中淋巴管接合的高度特异性环状9肽(LyP-1)^[22]。该肽不会回访黑色素瘤

和血癌异种移植物, 由此显示出该肽仅对肿瘤上的淋巴标记物表现出特异性. 同时, 他们证实了该肽不会与小鼠肿瘤的脉管系统或其他组织相接合. 该肽一旦与淋巴标记物特异性接合时, 其就会转移到细胞核的位置. 2006年, Zhang 等报道说所淘选分离的一些短肽能区分在恶化前受到损伤部分的淋巴管和一个前列腺癌 TRAMP 动物模型中恶化的肿瘤^[23]. 2008年 Han 等鉴别出了一种能与肿瘤相结合的短肽, 这种短肽在与非应答肿瘤接合时会对接放射治疗结合的、VEGF 受体络氨酸激酶的抑制剂(SU11248)产生了敏感性^[24].

相同肽库和(或)相同细胞株, 生物淘选(体外和体内)方法不同所分离的短肽也不尽相同. 利用十二肽库和非小细胞肺癌 CL1-5 细胞株进行体外淘选, 分离得到的短肽为 TDSILRSYDWTY(SP5-2); 用同样的肽库和肿瘤异种皮移植物的 CL1-5 细胞株进行体内淘选, 分离得到的短肽为 SVSVGMKPSRP(SP5-52)^[25,26]. 进一步研究证实, SP5-52 是以器官的血管为靶点, 而 SP5-2 则渗透进入肿瘤形成分散贯穿肿瘤团块的连接形式. 因此, 这两种生物淘选方法各自强调靶点的不同分子特征. 淘选小鼠内皮产生的血管瘤, 如果所分离得到的多肽不能跨越物种差异, 那么这些多肽也许不会转化到人类的血管系统中. 为了克服这种局限性, 需鉴别短肽的细胞靶向性并确定人类血管瘤是否有相同类似物的表达; 或者是将分离出的短肽序列作为与人体中配对物连结的最佳突变起始点; 或是直接在人体中进行生物淘选. Arap 等^[27]首次尝试了将肽库噬菌体注入到一位晚期患者体内, 并从其组织中回收噬菌体. 经过大量精确的测序鉴别出了能分离不同血管器官的不同三肽模体. Krag 等^[28]也报道说, 他们对患者进行了一系列的淘选/活体组织检测. 尽管在人体内进行生物淘选的前景无限, 但到目前为止仍未淘选出能够应用于临床的高亲和性肿瘤靶向因子.

2.3 肿瘤靶向多肽的研究现状

靶向治疗在肿瘤治疗过程中通俗来讲就是针对某种癌细胞, 或者是癌细胞的某一个蛋白, 某一个分子进行治疗. 其分为三种类型, 第一种是针对某个器官, 叫器官靶向; 第二种叫细胞靶向, 针对某种类型的肿瘤细胞; 第三种是分子靶向, 其是针对的是, 肿瘤细胞内某一蛋白家族的某部分分子, 或是某一核苷酸片段, 亦或是某个基因的产物. 其中分子靶向治疗的特异性最高, 其分辨出肿瘤细胞与正常细胞表面地貌的差异, 只攻击肿瘤细胞, 对正常的细胞没有太大的影响.

分子靶向治疗常用的载体之一便是靶向性多肽, 另一种载体为单克隆抗体. 针对肿瘤抗原设计相应的单克隆抗体, 由于其开发过程更快捷, 具有较高的特异性以及诱导针对疾病的免疫能力, 是目前肿瘤导向治疗中最常用的载体. 但其种类非常有限, 并因体积较大, 渗透力较差及对肝脏骨髓的毒性作用等原因, 在实际操作过程中仍存在不便. 寻找新的分子靶点, 提高单抗导向的特异性, 实验单抗人源化, 是进一步研究的重点.

靶向性多肽是当前普遍认为的比较理想的肿瘤诊断和靶向性治疗载体. 它们具有高特异性、高亲和性、良好的组织渗透性, 能被肿瘤细胞所摄取, 易于化学合成并有较低的免疫原性, 同单克隆抗体相比拥有更多的优势. 近年来, 国内外的研究人员利用肽库技术针对不同的靶点进行不同的肿瘤靶向肽筛选, 例如 Arap 等对乳腺癌荷瘤小鼠进行肽库筛选后获得了一系列与肿瘤血管特异性结合的短肽, 其中的 RGD 序列被证实可与 α 整合素结合, 可特异性靶向多种恶性肿瘤.

噬菌体展示肽库技术在多种靶向肿瘤多肽配体研究中发挥了重要作用, 目前有研究报道: 在体外已成功筛选出针对不同肿瘤细胞如肺癌细胞、大肠癌细胞、宫颈癌细胞、肾癌细胞以及急性髓性白血病细胞等特异性结合肽, 这在肿瘤的诊断、靶向治疗等方面具有潜在的临床应用价值.

目前, 医治肿瘤的传统治疗模式如手术、放疗、化疗仍然是治疗肿瘤的主要手段. 随着生物学研究对肿瘤靶向肽配体的不断探索, 肿瘤靶向治疗因其较低的不良反应及良好的疗效, 能够明显提高患者的生活质量, 代表着肿瘤治疗的未来趋势, 将来的肿瘤治疗模式将是以分子生物学诊断为基础的综合性靶向治疗^[30]. 噬菌体肽库展示技术以活细胞为靶目标筛选噬菌体肽库, 寻找特异性及高亲和性的生物活性肽, 为蛋白质分子相互识别的研究、新型疫苗的研制以及药物的开发开拓了新的前景.

虽然针对肿瘤分子的靶向治疗的研究仍是前沿研究领域的热点之一, 但是到目前为止, 大部分靶向治疗的临床研究都不尽如人意, 研究人员在进行真正的临床治疗方面仍存在较大障碍. 原因之一是载体不能特异性的针对肿瘤细胞, 另一个原因是治疗基因没有在肿瘤细胞内很好的表达, 其结果是无法完全消灭肿瘤; 靶向药物在经过静脉到达肿瘤组织时药物不断降解、稀释乃至失活或者与正常的细胞或组织非特异性结合等等这些都严

重影响治疗的效果。

3 挑战与展望

噬菌体展示技术在淘选分离肿瘤靶向肽配体方面获得了一些成功,但仍然存在巨大挑战。主要的挑战就是所淘选各种多肽的细胞靶向性识别,因为已有的多肽配体受体只鉴定出15%。虽然淘选分离的短肽在细胞受体未知情况下仍可用于药物靶向传送,但优先考虑靶点受体的鉴别主要基于以下几个理由:第一,受体识别能够提供癌病变、肿瘤维持以及转移期间的细胞表面轮廓变化信息,这可为疾病中新受体作用的基础研究打开通道。第二,受体一旦识别,即可产生受体的新配体。肽配体在某一些应用中也许更具有适用性,而在其他方面,抗体、类肽或小分子活血是更好的选择。第三,深刻理解配体相应受体属性将有助于加快肽配体临床应用的进程。

生物细胞表面具有蛋白与微域内的各种连接片段或簇发生多聚化的地貌结构,这种外貌地形同时也赋予了肽配体的特异性。换言之,肽配体特异性不仅由受体蛋白表达水平所产生,同时也取决于细胞膜表面受体的排布。在膜蛋白的亲性和纯化制备时,很容易丢失受体蛋白表达水平的信息,而且这些信息在mRNA水平中不会出现。另外,假设短肽与蛋白受体相链接,那么这些链接多发生在糖蛋白、糖脂和磷脂的糖部分。Elayadi等^[29]报道他们利用蛋白数据库寻找某个多肽相似序列的方法时获得了几个分离短肽的候选受体。大多数噬菌体展示肽库都是化学合成的,而非由生物源产生,不过完全覆盖更长的多肽序列是受限制的。就化学合成而论,其短肽序列与生物源序列匹配的概率在静态上是较低的。即使存在较多的匹配,许多化学合成的短肽也无法确切了解受体的生物学特征。总之,作为淘选肽配体的受体配对物的识别仍需要开发一些新技术,具体来说就是将细胞生物学、蛋白质组和基因组方法相结合来处理这个难题。

虽然现在已经证实了噬菌体展示肽库技术是获取癌症靶向肽配体的重要来源,但在实际应用癌症靶向肽配体的过程中仍然有许多困难需要克服。近年来,随着分子生物技术的蓬蓬勃勃飞发展,市场上多肽药物数量以及癌症靶向肽配体的研发及制药公司的数目明显增加。这些也都显示出多肽作为药物以及药物载体的障碍正逐渐被消除。相信在不久的将来,更多的能够作为靶向药物或分子成像探针的多肽亦或是癌症靶向肽配体将会投放到临床实验和应用中去。

参考文献

- [1] LEWIS PHILIPS G, LI G, DUGGER D, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate[J]. *Cancer Res*, 2008, 68:9280-9290.
- [2] MEYERSON M, CARBONE DP. Genomic and proteomic profiling of lung cancers: Lung cancer classification in the age of targeted therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23:3219-3226.
- [3] CELIS JE, GROMOV P. Proteomics in translational cancer research: towards an integrated approach[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3:9-15.
- [4] Nielsen UB, Marks JD. Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage libraries[J]. *Pharm Sci Technol Today*, 2000, 3:282-291.
- [5] ADAMS GP, WEINER LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, 23:1147-1157.
- [6] BRAY BL. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2:587-593.
- [7] SCHALLY V, NAGY JA. New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin, and bombesin[J]. *Life Sci*, 2003, 72:2305-2320.
- [8] KEHOE J, KAY B. Filamentous phage display in the new millennium[J]. *Chem Rev*, 2005, 105:4056-4072.
- [9] PASQUALINI R, RUOSLAHTI E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries[J]. *Nature*, 1996, 380:364-366.
- [10] BARRY MA, DOWER WJ, JOHNSTON SA. Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries[J]. *Nat Med*, 1996, 2: 299-305.
- [11] KRUMPE L, MORI T. Potential of phage-displayed peptide library technology to identify functional targeting peptides[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2007, 2:525-537.
- [12] LI Z, ZHAO R, WU X, et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptors for targeted delivery of therapeutics[J]. *FASEB J*, 2005, 19: 1978-1985.
- [13] AINA OH, LIU R, SUTCLIFFE JL, et al. From combinatorial chemistry to cancer targeting peptides[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 4: 631-651.
- [14] DING H, PRODINGER W, KOPECEK J. Identification of CD21-binding peptides with phage display and investigation of binding properties of HPMA copolymer-peptide conjugates[J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17: 514-523.
- [15] HOWELL R, REVSKEYA E, PAZO V, et al. Phage display library derived peptides that bind to human tumor melanin as potential vehicles for targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma[J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 1739-1748.
- [16] KUBO N, AKITA N, SHIMIZU A, et al. Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using

- laser capture microdissection[J]. *J Drug Target*, 2008, 16: 396-404.
- [17] PILCH J, BROWN D, KOMATSU M, et al. Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2800-2804.
- [18] KOLONIN MG, BOVER L, SUN J, et al. Ligand-directed surface profiling of human cancer cells with combinatorial peptide libraries[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 34-40.
- [19] KOLONIN MG, SAHA PK, CHAN L, et al. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue[J]. *Nat Med*, 2004, 10: 625-632.
- [20] LAAKKONEN P, ZHANG L, RUOSLAHTI E. Peptide targeting of tumor lymph vessels[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2008, 1131: 37-43.
- [21] HOFFMAN J, GIRAUDO E, SING M, et al. Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4: 383-391.
- [22] LAAKKONEN P, AKERMAN M, BILIRAN H, et al. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9381-9386.
- [23] ZHANG L, GIRAUDO E, HOFFMAN J, et al. Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5696-5706.
- [24] HAN Z, FU A, WANG H-R, et al. Noninvasive assessment of cancer response to therapy[J]. *Nat Med*, 2008, 14: 343-349.
- [25] CHANG D-K, LIN C-T, WU C-H, et al. A novel peptide enhances therapeutic efficacy of liposomal anti-cancer drugs in mice models of human lung cancer[J]. *PLOS Med*, 2009, 4: 1-11.
- [26] LEE T-Y, LIN C-T, KUO S-Y, et al. Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 10958-10965.
- [27] ARAP W, KOLONIN M G, TREPPEL M, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. *Nature medicine*, 2002, 8(2): 121-127.
- [28] KRAG D N, SHUKLA G S, SHEN G P, et al. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries[J]. *Cancer research*, 2006, 66(15): 7724-7733.
- [29] ELAYADI AN, SAMLI KN, PRUDKIN L, et al. A peptide selected by biopanning identifies the integrin $\alpha_v\beta_6$ as a prognostic biomarker for non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 5889-5895.

Advances in the research and development of phage display peptide library technology for biopanning of tumor targeting peptides

HAO Bao-qing, CHE Chen, LI Han-yi

(School of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, P.R.C.)

Abstract: Biopanning tumor-specific or cancer-specific binding peptide as targeting factor is one of the effective methods for earlier diagnosis and treatment of tumor. Tumor-specific binding peptides can be used to probe the tumor cell surface phenotype and customize treatment accordingly by binding to an anticancer drug. Additionally, these targeting peptides can be used as in vivo imaging agents that allow for earlier detection of tumors and micrometastasis. Phage display is a powerful technique for the isolation of peptides that bind to a particular target with high affinity and specificity. The biopanning of intact cancer cells or tumors in animals can be used to isolate peptides that bind to cancer-specific cell surface biomarkers. Over the past 10 years, unbiased biopanning of phage-displayed peptide libraries has generated a suite of cancer targeting peptidic ligands. This review discusses the identification of surface features on cancer or tumor cells and methods of biopanning with phage display peptide technology in vitro and in vivo, and highlights advances in the research and development of screening of cancer or tumor cells targeting peptides as well as the use of the isolated peptides in clinical applications.

Key words: phage display peptide library technology; targeting peptide; biopanning in vitro(in vivo); cancer cell; tumor