

蛋白质相互作用芯片与自动化筛选程序的完美整合

从噬菌体展示库中鉴定潜在的Fab抗体分子片段

- 迅速的从数以百计的特异性抗体中进行筛选
- 大大降低特征鉴定中的瓶颈
 - 高容量的二次筛选，减少对繁重的上游选择步骤的依赖
- 在早期阶段降低丢失潜在候选目标的风险
 - 多信息二次筛选
- 使用相同的平台来排列，选择和分析结合的特异性，并确定活性位点结合噬菌体
- 提高二次筛选的严苛性
 - 减少分析时间
 - 提高实验结果的一致性
 - 尽量减少目标噬菌体的消耗

我们需要一个二次筛选的过程，以此来比较每一个候选目标的亲和力的大小，同时不能妨碍整个过程的运行，这就是Flexchip能够做到的。

Daniel J. Sexton, Dyax Corp., Cambridge, MA, USA

感谢

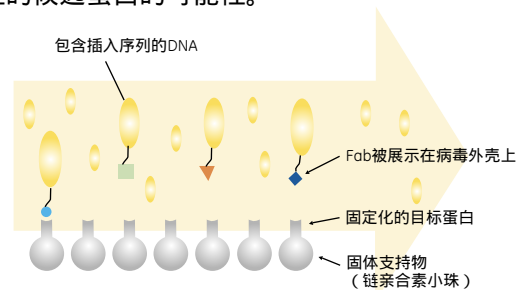
我们感谢Daniel J. Sexton博士 (Dyax Corporation, Cambridge, MA 02139, USA) 的通力合作。



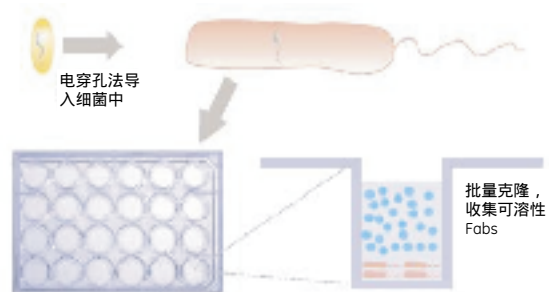
引言

噬菌体展示技术可以产生数量巨大的具有潜在治疗性的蛋白质，如治疗性抗体等。自动化选择技术的发展（使用固定目标分子对噬菌体展示库进行洗脱）和初步筛选（如ELISA）过程可以有效发现众多的特异性抗体。不过，从大量的候选目标中鉴定出最有效的蛋白却是一个巨大的挑战。

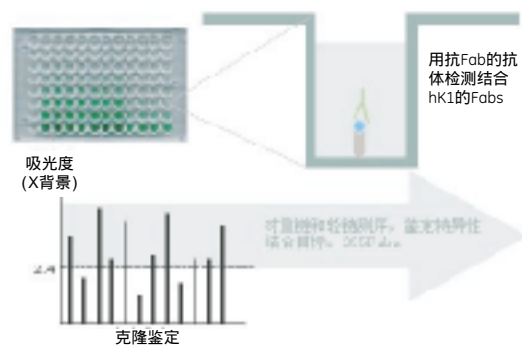
通常情况下，噬菌体展示库中的候选噬菌体需先经过初步的数轮筛选和扩增，再通过更细致的二次筛选，然后进行功能检验。采用这种策略的目的是为了减少对二次筛选的需求，不过同时它也降低了匹配目标的多样性并且增大了丢失潜在候选物的风险。另一种策略是限制初次筛选的次数，以便能收集更多的结合噬菌体进入二次筛选。根据其动力学特征，多样化的结合噬菌体收集方法可以增加发现具有功能活性的候选蛋白的可能性。



a) Fab被展示在病毒外壳上固定的目标蛋白从包含了 3×10^{10} 个Fab的噬菌体展示库中选择固定的抗原Fab片段，得到4608个候选目标

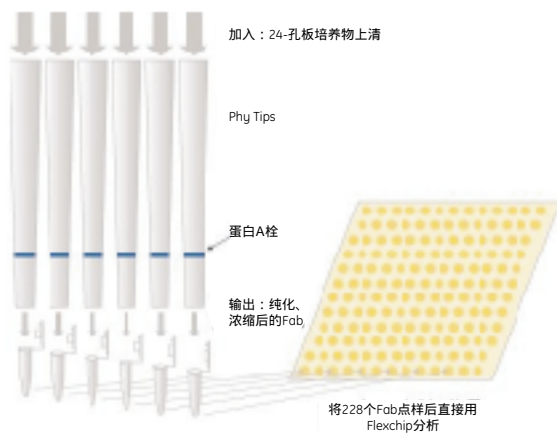


b) 在24孔板中扩大培养



背景吸光度因子高于2.4结合hK1的噬菌体被挑选出来进行后续的特征分析

c) 结合了hK1的噬菌体，如果其背景吸光度因子高于2.4，将被挑选出来进行后续的特征分析



d) 自动化的纯化和浓缩



e) 经Flexchip快速分析，获取全部的相互作用特征数据

Flexchip用于分析蛋白相互作用可以提供以下信息：

- 动力学信息
- 亲和能力排序
- 特异性分析
- 鉴定活性位点结合物

图1. 自动化流程示意图。从噬菌体展示库中筛选潜在抗体，从早期选择到最终数百个候选目标相互作用的具体分析。通过高解析度的动力学分析，例如Biacore T100系统等，可以完成整个特征分析和筛选流程，明确鉴定蛋白间相互作用的特征，并确保筛选到最佳的Fabs作为治疗性候选物。

在一项筛选潜在的人类炎症丝氨酸蛋白酶抗体抑制剂的计划中，将组织激肽释放酶1（hk1）（Dyax Corp., 剑桥，马萨诸塞州）应用到Flexchip系统中用作二次筛选，使之成为一套高度自动化的筛选程序。（整个过程详见图1）。这个过程是基于次数有限的筛选和放大过程，然后进行数百个候选目标的相互作用分析。

对本案例的研究显示了，在使用Flexchip来快速鉴定目标之前，Dyax公司是如何开发一个自动化程

序来筛选，纯化和浓缩Fabs的。关于完整的实验的细节可参考文献(1)。

在二次筛选过程中，Flexchip具有同时监测数百个相互作用反应的能力，这使得鉴定潜在治疗性候选物的速度显著提高。由于候选目标出现在整个流程中，所以需要对其相互作用进行持续的分析，例如，在优化过程中进行进一步的筛选，或者监测免疫原性反应，甚至进行批量释放测试。候选目标在开发流程中还需要符合各类相关法规的要求，例如GXP规则等。其他一些系统也可以满足这些需求，例如Biacore T100和Biacore A100。根据这里描述的筛选方案，Flexchip将从噬菌体展示库内大量的候选目标中进行选择，并确保只有最优的候选目标能从药物开发流程中被筛选出来。

自动挑选Fab片段和初级筛选

通过固定化的hk1筛选人类Fab噬菌体文库(2)，鉴定针对hk1活性位点的特异性Fab片段，该片段可能具有有效抑制酶的活性。Fab段被批量克隆到噬菌体中来产生可溶性Fab。我们共挑选了4608个Fab克隆，使用固定化的hk1进行ELISA筛选，最后得到1152个强结合候选目标。针对这1152个Fab目标的重链和轻链进行测序，得到355个特异性结合候选目标。

自动化Fab的分离纯化及浓缩

特异性的Fab通过大肠杆菌进行少量表达(6ml)，在一块96孔板上，所有的样品同时通过自动化液体提取装置，经蛋白A phytip柱(Phynexus公司)进行纯化处理。小型纯化的优势在于Fab经过洗脱浓缩后的浓度通常为50-500mg/ml，100mg/ml通常足以用于分析蛋白质间的相互作用。洗脱后Fab的纯度通过SDS-PAGE进行分析。

相互作用分析：排序，特异性和活性位点结合物的鉴定

排序

纯化的Fab样品重复三次点样，无需使用金亲和芯片调整样品的洗脱蛋白浓度(每片96个样本)。用hk1(100nM)溶液加样到芯片，测定了228个Fab中的191个的结合速率常数(K_a)和解离速率常数(K_d)，这228个Fab在纯化后的浓度足够用于蛋白质相互作用的分析(>~100mg/ml)。使用flexchip软件分析数据，结果显示均符合1:1相互作用模式。

这191个Fab的速率常数被绘制在一个表格中，该表格显示了它们的动力学特征(图2)。以相似的

亲和力与配体相互作用结合的样本位于同一条对角线上 ($KD = K_d/K_a$)，而它们在坐标上的位置表示其动力学分组。虽然不同的样本对同一个配体的亲和作用力可能相似，但是它们的动力学行为可以有显著的不同。这些通过Flexchip得到的蛋白间相互作用的信息能预测蛋白的功能，而且具有唯一性。

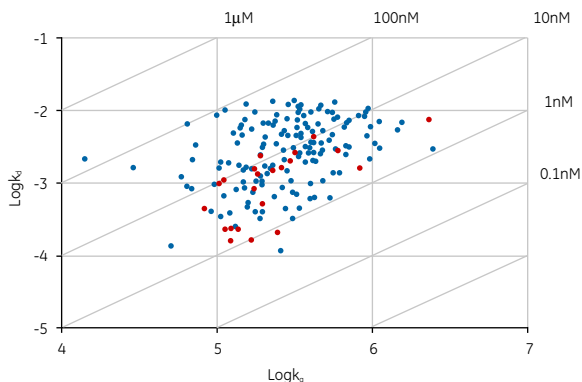


图2. 191个Fab与hk1相互作用的动力学分布图。红点表示的这些Fab在后续的生物试验中显示出具有抑制hk1蛋白酶活性。注意大部分的红点占据图中具有高亲和力及慢解离率的区域。

图3列举了不同类别的样品作为例子，该图显示了这些Fab（从图2中选出）与hk1相互作用的特征。

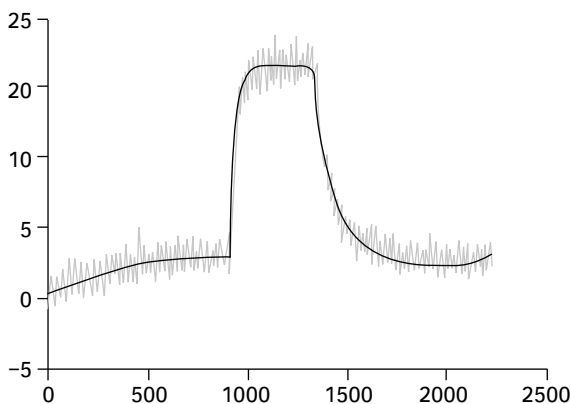
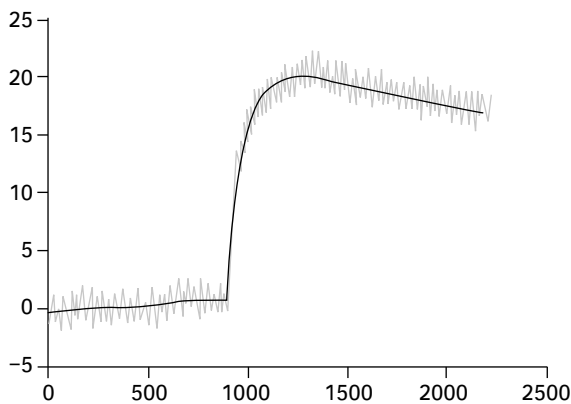


图3. hk1和代表性的Fab蛋白相互作用的特征。此图显示了他们的动力学和亲和力特征曲线。这两者间最大的区别在于上图样品在高亲和力作用下，其解离速度显著低于下图。

特异性分析

为了评测有效结合物的特异性，并排除结合能力较弱的结合分子，使用类似的异形酶hk2和hk3在相互作用测试终端进行交叉反应测试。hk1溶液加样到含有固定Fab的亲和芯片，在一段时间之后记录亲和力水平。清洗芯片表面后，用其他的hk异性酶加样到芯片表面，记录亲和力水平，并于hk1的结果作比较。图4表明，多个Fab与hk1和hk2明显存在交叉反应，可能需要将其在后续研发中排除。

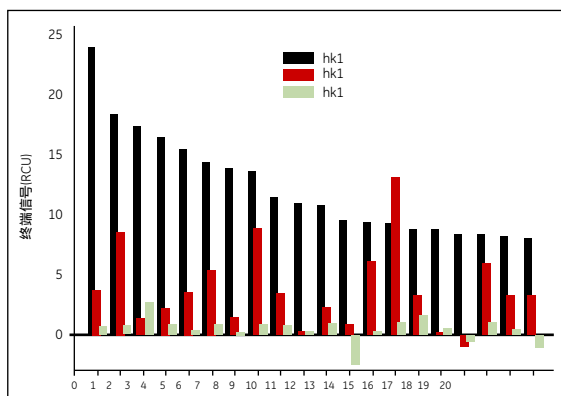
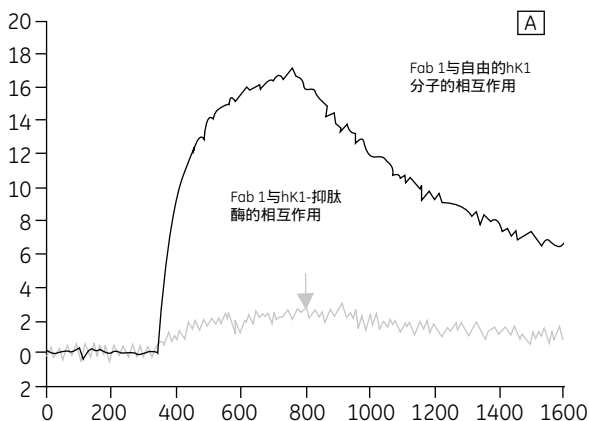


图4. 若干个Fab对hk1和hk2的结合能力显著的重叠。hk1特异性的Fab不表现出对hk3的结合能力。

鉴定活性位点结合物

将自由的hk1分子加样到芯片表面，以一定的时间间隔测定其与点在亲和芯片上的Fab片段结合的亲和力水平。同理测定Fab片段与结合了抑肽酶的hk1复合物的结合水平。通过比较两者的区别，来鉴定活性位点结合物。43个测试的Fab中的15个与hk1复合物的结合水平较之与自由hk1分子的结合水平低20%以上。这些Fab被认定为能结合hk1的活性位点(图5)。



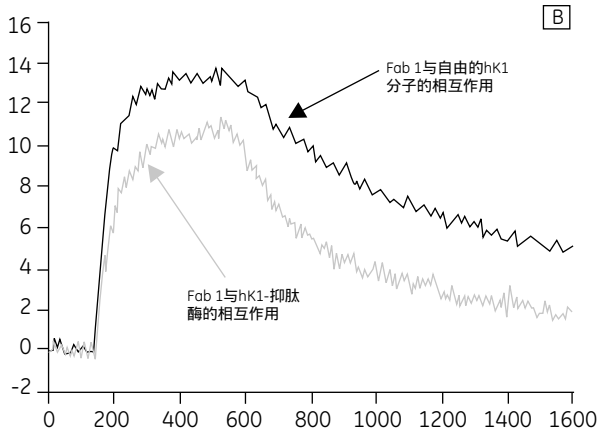


图5. (A)这两条曲线相互重叠,表明固定在芯片表面上的Fab1结合到hk1的活性位点上,而抑肽酶抑制这一相互作用。(B)抑肽酶对hk1和Fab2的相互作用影响不大,表明Fab2结合hk1的位点在活性位点之外。

大部分鉴定出的活性位点结合物都显示出对hk1的抑制力。但是,多个能同时结合hk1复合物和自由分子的Fab也被发现具有抑制蛋白酶活性的能力,这可能表明这些Fab结合到活性位点附近或者与活性位点重合(图6)。

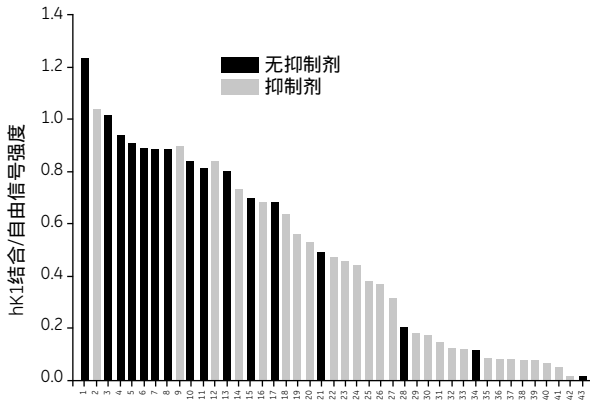


图6. flexchip可以用来对Fab与hk1活性位点相互作用的特异性强弱进行排序。有明确的发展趋势表明,特异性活性位点结合蛋白能显著的抑制hk1的生物活性(右边的柱状图较低),但在整个候选目标群体中一直有例外出现,这可能表明这些Fab结合到活性位点周围或附近的位点上了。

结论

高度自动化的筛选程序,通过细致的二次筛选,从噬菌体展示库产生的众多候选目标中选择合适的Fab。Flexchip的高度并行分析能力使其成为一体化的筛选工具,在进行详细的特征分析前,为筛选过程提供强大的帮助。

传统的二次筛选需要耗费大量的时间却只能分析少量的单个样品,而Flexchip使得该步骤不再是分析过程中的瓶颈。

针对候选目标在整个群体中具有不同的特征,根据结合率、解离率和亲和力对Fab分组,这些信息可以为后续的设计候选目标的优化方案提供宝贵的资料。

flexchip是一种具有完整分析能力的工具:

- 确定特异性
- 特别是能排除具有交叉反应的候选目标
- 能特异性的选择结合目标分子活性位点的候选目标

参考文献

1. Wassaf, D., Kuang, G., Kopacz, K., Wu, Q.L., Nguyen, Q., Toews, M., Cosic, J., Jacques, J., Wiltshire, S., Lambert, J., Pazmany, C.C., Hogan, S., Ladner, R.C., Nixon, A.E. and Sexton, D.J. High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays *Anal Biochem* 351:241-53(2006)
2. Hoet, R.M., Cohen, E.H., Kent, R.B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M., Pieters, H., van Hegelsom, R., Neer, N.C., Natri, H.G., Rondon, I.J., Leeds, J.A., Hufton, S.E., Huang, L., Kashin, I., Devlin, M., Kuang, G., Steukers, M., Viswanathan, M., Nixon, A.E., Sexton, D.J., Hoogenboom, H.R. and Lader, R.C. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity *Nat Biotechnol* 23:344-8(2005)