

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00055

临床诊断与治疗的新工具——可变淋巴细胞受体

于涛^{1,2}, 韩英伦^{1,2}, 肖蓉^{1,2}, 刘欣², 李庆伟^{1,2}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081;
2. 辽宁师范大学海洋生物功能基因及蛋白质组学研究所, 大连 116081

摘要: 单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb)在癌症以及自身免疫等疾病的诊断与治疗中得到广泛应用, 并且取得了重大进展。当今应用于临床的单克隆抗体是在免疫球蛋白的基础上进行改造研发而得。然而近期发现的无颌类脊椎动物的特异性抗原受体——可变淋巴细胞受体(Variable lymphocyte receptor, VLR), 为抗体类试剂或药物的研发提供了新的视角。与免疫球蛋白(Immunoglobulins, Ig)相比, VLR 与抗原结合的特异性、亲和力及稳定性都优于 Ig 类抗体, 并且抗原特异性单克隆 VLR 的制备技术日趋成熟。因此, VLR 在临床诊断和治疗中具有更高的应用价值, 并可能成为新一代的抗体药物。文章就 VLR 的基本特征、制备方法及其应用前景进行综述, 为实现 VLR 在临床诊断与治疗等领域中的应用提供有益参考。

关键词: 可变淋巴细胞受体; 单克隆抗体药物; 临床诊断; 工程蛋白支架

Variable lymphocyte receptors: the novel tool for clinical diagnosis and therapy

YU Tao^{1,2}, HAN Ying-Lun^{1,2}, XIAO Rong^{1,2}, LIU Xin², LI Qing-Wei^{1,2}

1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China;
2. Institute of Marine Genomics & Proteomics, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China

Abstract: Monoclonal antibodies, which are widely applied to the diagnosis and therapy of cancers as well as autoimmune diseases, have been made significant progresses. Currently, the monoclonal antibodies for clinical applications are mostly based on the modified immunoglobulins. However, the variable lymphocyte receptors (VLRs), which are recently discovered as specific antigen receptors of jawless vertebrates, provide a new perspective for the development of antibody reagents and drugs. Compared with immunoglobulins, the antigen-binding specificity, affinity and stability of VLRs-based antibodies are better. In addition, the production technology of antigen-specific monoclonal VLRs has become more and more mature. Therefore, the VLRs have a higher clinical value and may become the next-generation antibody drug. This review focuses on the basic feature, production method and application prospect of VLRs, which provides valuable clues for the applications of VLRs in the field of clinical diagnosis and therapy.

Keywords: variable lymphocyte receptor; monoclonal antibody drug; clinical diagnosis; engineered protein scaffold

收稿日期: 2012-08-07; 修回日期: 2012-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31071991)和辽宁省教育厅科研项目(编号: LT2010056)资助

作者简介: 于涛, 硕士研究生, 专业方向: 细胞生物学。Tel: 15904968321; E-mail: yutaodengta@163.com

通讯作者: 李庆伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 七鳃鳗功能基因及蛋白质组学。E-mail: liqw@263.net

网络出版时间: 2012-11-21 16:27:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121121.1627.006.html>

单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb)通常是指来自单一B细胞克隆或杂交瘤细胞的抗体, mAb已被广泛地应用于疾病的诊断与治疗^[1,2]。特别是人源化单克隆抗体的出现, 在很大程度上减弱了异源mAb的排斥反应, 使抗体药物的临床应用得以实现。目前mAb在临床上主要应用于癌症、炎症和自身免疫等疾病的诊断与治疗, 并且取得了重大进展^[2-4]。然而随着抗体药物研发及应用的深入, 免疫球蛋白(Immunoglobulins, Ig)昂贵且复杂的生产工艺及其分子本身的物理和化学性质的局限性逐渐暴露出来。为此, 人们尝试去改造一些结合蛋白, 以作为免疫球蛋白的替代物^[5,6], 但目前临床诊断与治疗所应用的抗体仍以Ig为主。

值得振奋的是, 21 世纪初在以七鳃鳗和盲鳗为代表的无颌类脊椎动物中发现了一类不同于Ig的特异性抗原受体, 由于这类具有高度多样性的抗原受体在激活的类淋巴细胞中表达, 因此将其命名为可变淋巴细胞受体(Variable lymphocyte receptor, VLR)^[7-9]。Pancer等^[10]认为VLR与Ig在多样性形成机制、分子结构以及抗原结合特点等方面存在着很大的差别。与有颌类脊椎动物传统的Ig相比, VLR与抗原的识别与结合具有更高的特异性、亲和力以及稳定性。这些优于Ig的特征表明, VLR更适合作为抗体试剂或药物应用于生物技术以及医学领域。本文就VLR抗体试剂或药物研发的可行性进行综述, 为基于VLR的临床诊断与治疗等研究提供有益参考。

1 可变淋巴细胞受体(VLR)的基本特征

无颌类脊椎动物的特异性抗原受体分为VLRA、VLRB和VLRC 3 种类型^[11], 它们在不同亚型的类淋巴细胞中表达, 并且在基因组中具有独立的基因座位。类似于哺乳动物免疫球蛋白的基因重排, VLR通过VLR胚系基因(germ-line VLR genes)的重排至少可以产生 10^{14} 种独特抗原特异性的受体, 其多样性程度与哺乳动物的免疫球蛋白相当^[12,13]。

1.1 可变淋巴细胞受体的分子结构

VLR的分子结构主要由不同数量的亮氨酸富集重复基序(Leucine-rich repeat, LRR)组成(图 1A): 包括N末端的帽区基序(N-terminal LRR, LRRNT), 靠近N端的LRR1(Leucine-rich repeat 1), 不同数量的多

样性LRR(Variable LRR, LRRV), 连接肽(Connecting peptide, CP)和C末端帽区基序(C-terminal LRR, LRRCT)共 5 个部分。虽然靠近C端的LRRV(LRRVe)具有区别于其他LRRV的序列标志^[14], 但是LRRV的一级结构符合 $XL^2XXL^5XXL^8XL^{10}XXN^{13}XL^{15}XXL^{18}P^{19}XXXF^{23}X$ 的保守序列(X表示任意的氨基酸残基)^[15]。由于每个VLR分子所具有的LRRV的种类、数量和排列顺序的不同, 因而使得VLR具有高度的多样性。VLR分子的C端还有一段茎区(STALK)和一段对VLR进行糖基磷脂酰肌醇(Glycosyl-phosphatidyl-inositol, GPI)修饰所必须的疏水尾(Hydrophobic tail)^[9]。VLRA和VLRC可以通过GPI修饰, 切掉疏水尾后锚定到类淋巴细胞膜表面(图 1A), 以膜结合型特异性抗原受体形式存在^[16]。但值得注意的是VLRB能够分泌到胞外^[17]。分泌型VLRB的单体通过疏水尾的半胱氨酸残基形成分子间的二硫键, 最终以二聚体亚单位形式连接成类似IgM的十聚体或八聚体^[9](图 1B)。

迄今为止, 由于尚未得到天然VLR蛋白的晶体, 所以相关于VLR空间结构的研究主要源自于重组的VLR蛋白。一级结构分析显示重组VLR的分子缺失天然VLR蛋白的茎区和疏水尾结构。与“Y”形的Ig不同, 重组VLR的空间构象类似于一根弯曲的“螺旋线管”^[16]。分子的凹面是由LRRV基序的 $XL^8XL^{10}XX$ 序列所形成 β 折叠片层组成, 是VLR参与抗原结合的主要部位^[18]。此外, LRRCT基序形成的一个突起, 它与VLR分子的凹面共同构成了VLR与抗原结合的互补决定区^[19,20](图 2: A, B)。VLR所识别的抗原表位倾向于抗原表面有裂沟的区域, 而免疫球蛋白则识别相对平坦的抗原表位^[19]。从分子结构的角度来说, 与两条重链和两条轻链的Ig相比, 仅由一条多肽链组成的VLR分子其结构显得较为简单(图 2C)。

1.2 可变淋巴受体(VLR)的生物物理学性质

对于不同的VLR分子来说, LRRV基序数量的不同是造成VLR大小差异的主要原因。到目前为止, 据文献报道, 最大的VLR分子具有 9 个LRRV基序^[10], 依此推算VLR的相对分子质量约在 15 ~45 kDa之间。而典型的IgG相对分子质量约为 156 kDa。由于具有较大分子量的Ig分子作为抗体药物在体内穿

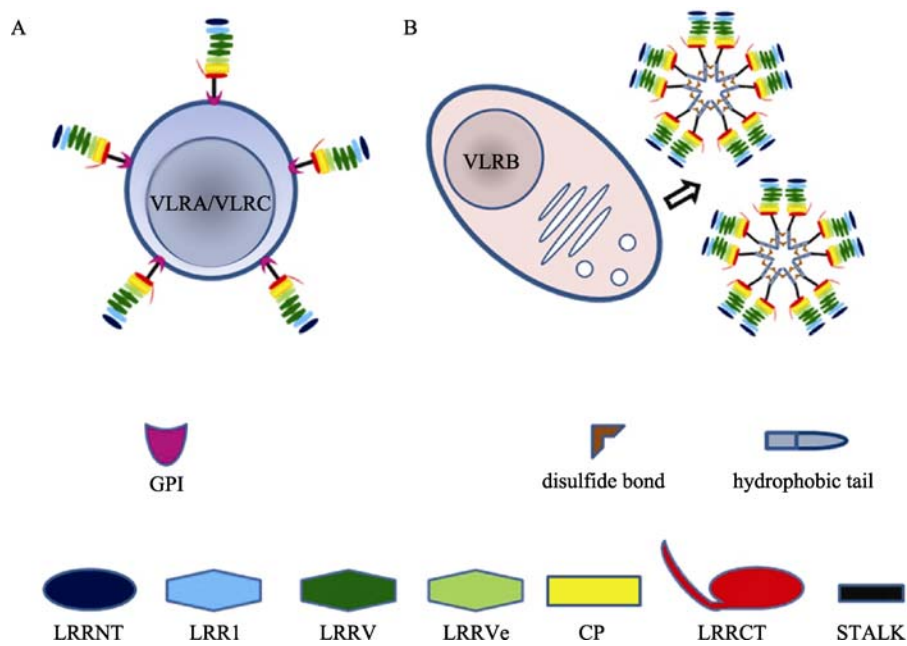


图 1 VLR 分子结构模式图

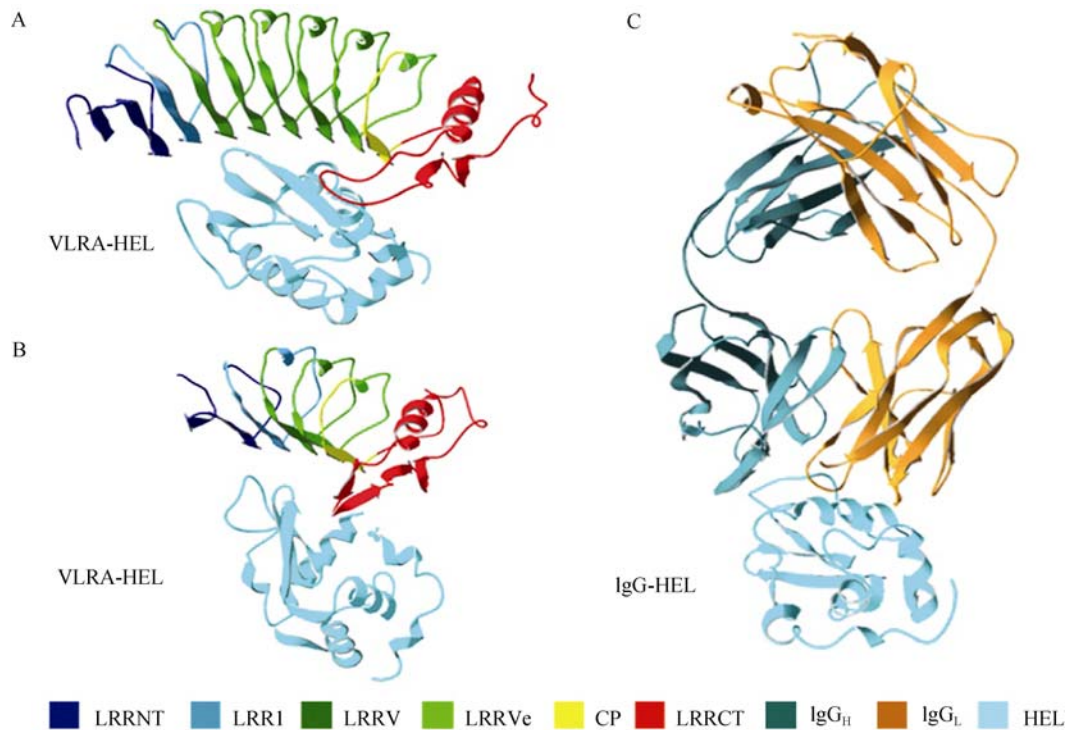


图 2 抗原-抗体复合体的晶体结构
A：抗原-抗体复合体的晶体结构来自PDB数据库，VLRA-HEL^[21](PDB ID 3M18)，VLRB-HEL^[19](PDB ID 3G3A)，IgG-HEL^[22](PDB ID 3HFM)；B：图中抗原为鸡蛋卵清溶菌酶(Hen egg lysozyme, HEL)；C：三维结构图由Swiss-Pdb Viewer v.4.0 软件以卡通形式展现。

透血管的能力较差，因此将免疫球蛋白小型化是抗体药物设计需要考虑的主要因素之一。而来源于无颌类脊椎动物的 VLR 的相对分子质量只有 Ig 的 1/4

左右，因此更适合应用于抗体药物的研发。
Wezner-Ptasińska等^[23]依据海七鳃鳗的 VLR 序列，设计了一个重组的 VLR 蛋白。这个重组的 VLR

是一个以单体形式存在的可溶性蛋白,在 pH 4.0~10.0 范围内可以保持完整的三级结构;在 pH 6.0 以及 0.3 mol/L 的 NaCl 条件下, VLR 保持稳定三级结构的上限温度为 73.9 °C;在 pH 7.5 的条件下,以盐酸胍为变性剂,其变性过程符合协同的二态模型,两态转换时的变性剂浓度为 3.3 mol/L。在没有变性剂作用的条件下,去折叠的自由能变化高达 14.1 kcal/mol。这些生物物理学性质表明, VLR 具有良好的稳定性,可以作为新型的抗体应用于生物技术以及医学领域。

2 抗原特异性单克隆 VLR 的制备

由于尚未实现七鳃鳗类淋巴细胞在体外的长期培养,也没有找到适于融合的肿瘤细胞,因此还不能应用杂交瘤技术制备单克隆 VLR^[9]。目前可用的单克隆 VLR 制备技术还处于实验室研发阶段,主要制备技术有异源表达系统和酵母表面展示系统。

2.1 异源表达系统制备单克隆 VLR

Herrin 等^[9]首次获得了抗炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis* Sterne)孢子的单克隆 VLR。基本的制备原理是:以炭疽芽孢杆菌孢子为抗原对七鳃鳗幼体进行免疫,然后建立类淋巴细胞中的 VLRB cDNA 文库。文库中的质粒经扩增纯化后,将每种 VLRB 表达质粒转染至人胚肾细胞(Human embryonic kidney, HEK-293T)进行单克隆 VLRB 的异源表达。由于 VLRB 是分泌型蛋白,因此 HEK-293T 细胞培养的上清液中会含有分泌的重组 VLRB,采用 ELISA 和流式细胞术对细胞培养上清液进行检测,筛选阳性克隆。最后将阳性克隆的质粒再扩增、纯化、转染以及鉴定。

该实验室最终筛选出 14 株抗 *B. anthracis* 孢子的分泌型单克隆 VLRB。进一步研究表明,抗 *Ba* 孢子的单克隆 VLRB 通过二硫键将二聚体亚单位连接并形成四聚体或五聚体;在相同浓度下,抗 *Ba* 孢子单克隆 VLRB 的抗原亲和力比鼠抗 *B. anthracis* 孢子 IgG 高 1 000 倍,其与抗原结合后不能被高盐或强酸缓冲液洗脱,只有在强碱性条件下(pH>11)才能被洗脱。洗脱后的 VLR 在室温放置一个月,或在 56 °C 放置 36 h 后仍保持完整的抗原结合能力。这些特征表明单克隆 VLRB 具有较高的抗原亲和力并且能够长

期保存,足以满足作为抗体药物或试剂所需的条件。

2.2 酵母表面展示系统(Yeast surface display system, YSD)制备单克隆 VLR

利用哺乳动物的细胞实现 VLR 的异源表达,不仅操作复杂,生产费用还十分昂贵,不适合大规模制备单克隆 VLR。然而原核细胞不具备真核生物分泌蛋白合成所需的内膜系统,并且缺乏有效的蛋白质氧化折叠机制(Oxidative protein-folding machinery)^[24,25]。因此 Cooper 研究团队以酵母作为重组 VLR 的表达宿主细胞,采用酵母表面展示系统成功制备了鸡蛋卵清溶菌酶(HEL)、 β 半乳糖苷酶(β -galactosidase)和霍乱毒素亚基 B(Cholera toxin subunit B)等 6 种不同抗原特异性的单克隆 VLR。由于 VLR 与抗原的最佳结合需要自由的 N 末端,因此, Xu 等^[26]构建了 VLR 的 C 末端与絮凝素融合的表达载体,从而使 VLR 合成后通过絮凝素锚定在酵母表面,随后经流式细胞术对阳性克隆进行反复筛选与富集,最终获得抗原特异性的单克隆 VLR。

Tasumi 等^[20]研究发现由未经抗原免疫的七鳃鳗所建立的 VLR YSD 文库含有针对各种抗原的特异性 VLR 克隆。在纳摩尔至皮摩尔浓度范围内,通过酵母表面展示系统所获得的单克隆 VLR 能够特异的识别并结合其特异性抗原。该实验室通过体外诱变的方法使单克隆 VLR 的亲和力得到进一步提高。以 HEL 抗原为例, VLRB.HEL.1 经体外诱变后,通过筛选与富集得到最高亲和力的 VLRB.CTMut.5,其抗原亲和力提高了 1 300 倍。而具有高亲和力的鼠源 IgG 与其特异性抗原发生结合的有效浓度仅为纳摩尔水平^[27],这意味着重组的单克隆 VLR 较 IgG 具有更高的抗原结合能力,将其研发为抗体试剂或药物应用于临床诊断和治疗将会得到令人满意的效果。

3 可变淋巴细胞受体(VLR)的应用前景

VLR 除了具有分子量小、生物物理学性质稳定以及较高的抗原亲和力等优点之外,其分子结构也较为简单。与免疫球蛋白相比, VLR 仅由一条肽链组成。因此只要获得了 VLR 的一级结构信息,便可通过原核表达制备单克隆 VLR^[23,28]。与杂交瘤技术制备单克隆抗体相比,单克隆 VLR 的生产工艺更为简捷、生产成本更加低廉,便于大规模工业化生产,使

得VLR具有更优越的应用开发前景。

3.1 VLR 在临床诊断中的应用前景

抗体是一种非常重要的医学诊断工具,由免疫球蛋白开发的诊断试剂盒不胜枚举。而VLR具有较Ig更强的特异性和更高的亲和力,是一种潜在的、更为卓越的诊断工具。由于VLR以 β 片层作为主要的抗原结合表面,这种结合方式与Ig完全不同,因此VLR可以识别一些Ig无法识别的、特殊的抗原表位^[9]。例如,炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis* Sterne)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* T)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* Kurstaki)是3种相近的物种,但是只有*B.anthraxis*能够引起对人类具有较高致死率的炭疽病。传统的抗芽孢杆菌孢子的单克隆抗体会对3种不同的芽孢杆菌孢子发生一定程度的交叉反应^[29],因此采用Ig对炭疽病的早期检测,假阳性较高。然而,对*B.anthraxis*孢子特异性的VLR不会与*B.cereus*和*B.thuringiensis*的孢子发生交叉反应,并且该抗*B.anthraxis*孢子的VLR与*B.anthraxis*孢子的亲和力比鼠源抗*B.anthraxis*的Ig高1 000倍,这说明VLR是比Ig更为有效的诊断工具^[9,30]。

此外,采用单克隆VLR检测肿瘤标志物对肿瘤相关疾病的早期诊断及预后分析具有非常重要的意义。由于VLR所识别的抗原表位不受哺乳动物免疫耐受的限制,因而应用VLR可能会发现一些新的更有价值的肿瘤标志物^[33]。近期研究发现,VLR能够识别肿瘤相关的糖蛋白抗原。Hong等^[34]验证了这类肿瘤相关抗原特异性的VLR对存活率低的非小细胞肺癌患者具有良好的检测效果。由于VLR对这类肿瘤相关抗原的检测,兼有高亲和力和高特异性的优点。因此,发现和识别肿瘤特异性抗原是单克隆VLR临床应用研究的主要趋势。

3.2 VLR 作为抗体药物的应用前景

传统的Ig类抗体药物在1988年进行了第一次商业性的临床试验,在短短的二十几年时间里,抗体药物的应用对一些疑难疾病的治疗取得了重大进展。然而,随着本世纪初七鳃鳗VLR的发现,科研工作者也逐渐关注VLR是否能够作为抗体药物用于某些疑难疾病的治疗。大量的前期工作表明VLR具有非常独特的分子结构、优越的稳定性以及良好的抗原结合能力,有着许多Ig无法比拟的优势。首先,

癌症或自身免疫等复杂疾病通常是由多重因子同时引发,对不同病理因子和病理途径的多重阻断可以提高治疗效果^[31,32]。而以四聚体或五聚体形式存在的VLRB可以改造成具有多种特异性的大分子复合物,实现对多个靶点同时作用以达到更佳的疗效。其次,VLR分子结构简单,便于分子工程学改造或与其他因子融合(如酶、表位标签分子及药物活性成分等)以发挥多种功能^[26]。例如,VLR与组织特异性的表位标签分子融合,则可以实现对组织的定向治疗,从而增加治疗的靶向性并提高治疗效果。更重要的是,往往有些疾病是由自身蛋白或其他自身分子异常所引起的,而B细胞在发育过程中经历了阴性选择,清除了能够发生自身反应的抗体分子,这就使得没有可用的抗体用于这些疾病的靶向治疗。然而作为无颌类脊椎动物的特异性抗原受体,VLR可以弥补这一空缺^[9]。因此,将VLR开发为抗体类药物,其应用前景非常可观。

3.3 基于VLR的工程蛋白支架

工程蛋白支架(Engineered protein scaffolds)是指利用蛋白质工程的方法,将天然的结合蛋白人工改造为具有结合能力的蛋白支架或结合试剂,作为免疫球蛋白的替代物应用于医学诊断和治疗^[35]。

可变淋巴细胞受体兼有LRR蛋白家族所具有的独特分子结构和免疫球蛋白所具有的抗原特异性结合能力等特点,是工程蛋白支架的良好素材。Lee等^[28]将同属于LRR蛋白家族的、内化素B(Internalin B)的LRRNT、LRR1和LRR2替换掉VLR模板支架(Template scaffold)的LRRNT、LRR1和LRRV1,构建了一个在大肠杆菌中能够以可溶性蛋白形式高水平表达的工程蛋白支架(图3),并将其命名为重复体(Repebody)。该重复体的分子结构特点是保留了VLR分子的抗原结合部位,因此只要对参与抗原结合的氨基酸残基进行合理设计,便可获得抗原特异性的结合蛋白。该实验室成功设计了骨髓分化蛋白2(Myeloid differentiation protein2, MD2)、鸡蛋卵清溶菌酶(Hen Egg Lysozyme, HEL)和白介素6(Interleukin-6, IL-6)的特异性结合蛋白,并且表现出良好的抗原特异性和亲和力。

4 展望

可变淋巴细胞受体(VLR)作为无颌类脊椎动物

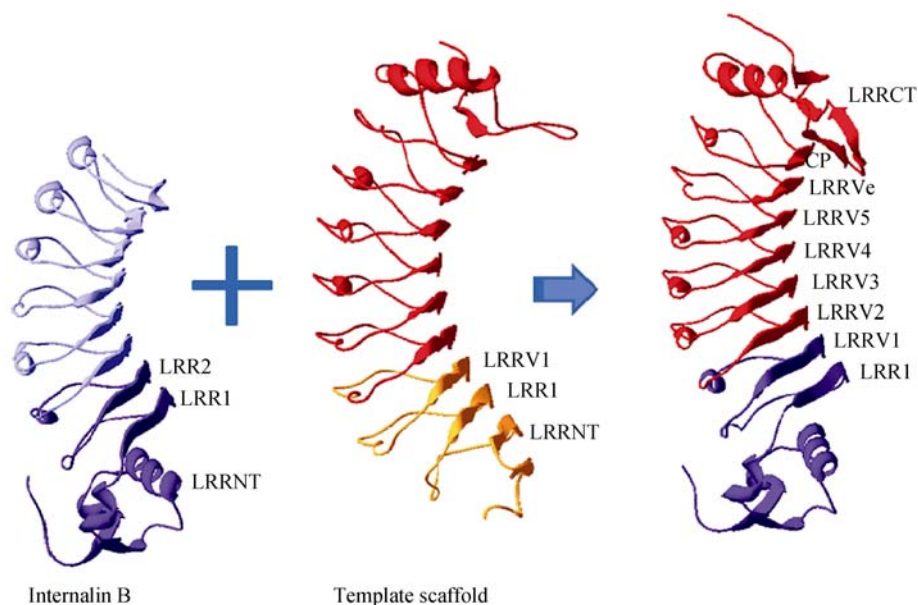


图 3 重复体设计原理图^[28]

的特异性抗原受体, 不仅具有抗体分子所共有的特异性识别并结合抗原的能力, 还具有由它本身独特的分子特征所决定的优点: 分子结构简单、识别抗原种类广泛、抗原结合特异性强且亲和力高、化学性质稳定等等。目前的实验技术已经能够人工制备高亲和力、高特异性的单克隆 VLR, 距离 VLR 在医学诊断与治疗中的实际应用仅差一步之遥。

近期之内, VLR 的实际应用可能会在医学诊断领域崭露头角。例如, 基于 VLR 所开发的肿瘤诊断试剂盒, 将会对肿瘤发生早期的肿瘤标志物进行检测, 实现肿瘤疾病的早期诊断并提高治疗效果。然而, VLR 作为抗体类药物会受到人体免疫系统的排斥。如何根据 VLR 分子的结构特征对其进行分子生物学改造以逃避人体免疫系统的识别与清除, 将成为 VLR 临床应用研究的热点问题; 与此同时, 还没有一套完善的基于 VLR 的单克隆抗体大规模制备工艺, 其商品化生产还需要进一步研究。因此为实现 VLR 在医学诊断与治疗中的实际应用, 还需更多的努力去突破目前存在的障碍, 相信在短期之内, 以 VLR 为基础的、全新的抗体时代即将到来。

参考文献(References):

- [1] Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 278–287. [DOI](#)
- [2] Weiner LM, Murray JC, Shuptrine CW. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell*, 2012, 148(6): 1081–1084. [DOI](#)
- [3] Ordás I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91(4): 635–646. [DOI](#)
- [4] Chugh PK. Lupus: novel therapies in clinical development. *Eur J Intern Med*, 2012, 23(3): 212–218. [DOI](#)
- [5] Wurch T, Lowe P, Caussanel V, Bes C, Beck A, Corvaia N. Development of novel protein scaffolds as alternatives to whole antibodies for imaging and therapy: status on discovery research and clinical validation. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(6): 502–509. [DOI](#)
- [6] Skerra A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotech*, 2007, 18(4): 295–304. [DOI](#)
- [7] Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GRA, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 2004, 430(6996): 174–180. [DOI](#)
- [8] Alder MN, Herrin BR, Sadlonova A, Stockard CR, Grizzle WE, Gartland LA, Gartland GL, Boydston JA, Turnbough CL Jr, Cooper MD. Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 319–327. [DOI](#)
- [9] Herrin BR, Alder MN, Roux KH, Sina C, Ehrhardt GR, Boydston JA, Turnbough CL Jr, Cooper MD. Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2040–2045. [DOI](#)
- [10] Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT,

- Kasahara M, Cooper MD. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9224–9229. [DOI](#)
- [11] Kasamatsu J, Sutoh Y, Fugo K, Otsuka N, Iwabuchi K, Kasahara M. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14304–14308. [DOI](#)
- [12] Rogozin IB, Iyer LM, Liang L, Glazko GV, Liston VG, Pavlov YI, Aravind L, Pancer Z. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 647–656. [DOI](#)
- [13] Nagawa F, Kishishita N, Shimizu K, Hirose S, Miyoshi M, Nezu J, Nishimura T, Nishizumi H, Takahashi Y, Hashimoto SI, Takeuchi M, Miyajima A, Takemori T, Otsuka AJ, Sakano H. Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nat Immunol*, 2007, 8(2): 206–213. [DOI](#)
- [14] Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*, 2005, 310(5756): 1970–1973. [DOI](#)
- [15] Han BW, Herrin BR, Cooper MD, Wilson IA. Antigen recognition by variable lymphocyte receptors. *Science*, 2008, 321(5897): 1834–1837. [DOI](#)
- [16] Boehm T, McCurley N, Sutoh Y, Schorpp M, Kasahara M, Cooper MD. VLR-based adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30(1): 203–220. [DOI](#)
- [17] Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 47–59. [DOI](#)
- [18] Kim HM, Oh SC, Lim KJ, Kasamatsu J, Heo JY, Park BS, Lee H, Yoo OJ, Kasahara M, Lee JO. Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6726–6732. [DOI](#)
- [19] Velikovsky CA, Deng L, Tasumi S, Iyer LM, Kerzic MC, Aravind L, Pancer Z, Mariuzza RA. Structure of a lamprey variable lymphocyte receptor in complex with a protein antigen. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(7): 725–730. [DOI](#)
- [20] Tasumi S, Velikovsky CA, Xu G, Gai SA, Wittrup KD, Flajnik MF, Mariuzza RA, Pancer Z. High-affinity lamprey VLRA and VLRB monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12891–12896. [DOI](#)
- [21] Deng L, Velikovsky CA, Xu G, Iyer LM, Tasumi S, Kerzic MC, Flajnik MF, Aravind L, Pancer Z, Mariuzza RA. A structural basis for antigen recognition by the T cell-like lymphocytes of sea lamprey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(30): 13408–13413. [DOI](#)
- [22] Padlan EA, Silverton EW, Sheriff S, Cohen GH, Smith-Gill SJ, Davies DR. Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(15): 5938–5942. [DOI](#)
- [23] Wezner-Ptasińska M, Krowarsch D, Otlewski J. Design and characteristics of a stable protein scaffold for specific binding based on variable lymphocyte receptor sequences. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(9): 1140–1145. [DOI](#)
- [24] Chao GE, Lau WL, Hackel BJ, Sazinsky SL, Lippow SM, Wittrup KD. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 755–768. [DOI](#)
- [25] Gai SA, Wittrup KD. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(4): 467–473. [DOI](#)
- [26] Xu G, Tasumi S, Pancer Z. Yeast surface display of lamprey variable lymphocyte receptors. *Methods Mol Biol*, 2011, 748: 21–33. [DOI](#)
- [27] Marks JD, Bradbury A. Selection of human antibodies from phage display libraries. *Methods Mol Biol*, 2004, 248: 161–176. [DOI](#)
- [28] Lee SC, Park K, Han J, Lee JJ, Kim HJ, Hong S, Heu W, Kim YJ, Ha JS, Lee SG, Cheong HK, Jeon YH, Kim D, Kim HS. Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(9): 3299–3304. [DOI](#)
- [29] Nuttall SD, Wilkins ML, Streltsov VA, Pontes-Braz L, Dolezal O, Tran H, Liu CQ. Isolation, kinetic analysis, and structural characterization of an antibody targeting the *Bacillus anthracis* major spore surface protein BclA. *Proteins*, 2011, 79(4): 1306–1317. [DOI](#)
- [30] Kirchdoerfer RN, Herrin BR, Han BW, Turnbough CL Jr, Cooper MD, Wilson IA. Variable lymphocyte receptor recognition of the immunodominant glycoprotein of *Bacillus anthracis* spores. *Structure*, 2012, 20(3): 479–486. [DOI](#)
- [31] Sarkar S, Tang XL, Das D, Spencer JS, Lowary TL, Suresh MR. A bispecific antibody based assay shows potential for detecting tuberculosis in resource constrained laboratory settings. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32340. [DOI](#)
- [32] Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs*, 2012, 4(2): [Epub ahead of print]. (未出版刊物) [DOI](#)
- [33] Yu CL, Ali S, St-Germain J, Liu YL, Yu XC, Jaye DL, Moran MF, Cooper MD, Ehrhardt GRA. Purification and identification of cell surface antigens using lamprey monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 2012, 386(1–2): 43–49. [DOI](#)
- [34] Hong X, Ma MZ, Gildersleeve JC, Chowdhury S, Barchi JJ Jr, Mariuzza RA, Murphy MB, Mao L, Pancer Z.

Sugar-binding proteins from fish: selection of high affinity "Lambodies" that recognize biomedically relevant glycans. *ACS Chem Biol*, 2012, [Epub ahead of print]. (未出版刊物)[DOI](#)

[35] Gebauer M, Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(3): 245–255. [DOI](#)