《生物技术制药》

# 第一章 概述

## 一、挑战与机遇：

许多重大疑难疾病(传染病、癌症和心血管疾病等)对人类构成的巨大威胁和挑战。

**艾滋病**

ް目前全球有3300多万人感染艾滋病病毒，在这些艾滋病病毒感染者中，15岁以下的约为250万。

ް2007年，亚洲艾滋病毒感染者数量为490万，其中新增感染者数量为44万；因与艾滋病相关的疾病而死亡的人数为30万。

ް越南的感染者数量在2000年至2005年间翻了一倍多。

ް中国现存艾滋病病毒感染者和病人约70万。

ذ据美国癌症协会报告称，2007年全世界因各种癌症死亡的人数约为760万。

ذWHO专家在日内瓦警告说，到2020年全球每年的癌症死亡人数可能将增加一倍左右，未来10年中可能会有约8400万人死于癌症。

ذ机遇：传统医药在重大传染病和癌症等的预防和治疗方面面临巨大挑战，为生物技术药物的发展提供了广阔的前景。

## 二、几个基本概念

药物；药品；生物制品

生物药物；生物技术药物

(药物(medicine，remedy)：

是指用于预防、治疗和诊断或用于调节机体生理功能，促进机体康复、保健的物质。

化学药物(无机药物、合成药物和天然药物)

药物生物药物(生化药物、微生物药物、生物制品和生物技术药物)

中草药

药品(drug)：

是指用于预防、治疗、诊断人的疾病，有目的地调节人的生理功能并规

定有适应症、用法和用量的物质。包括：中药材、中药饮片、中成药、化学原料药及其制剂、抗生素、生物制品、放射性药品、疫苗、血液制品和诊断药品等。

￨生物制品(biologics)：

是应用普通的或以基因工程、细胞工程、蛋白质工程和发酵工程等生物技术获得的微生物细胞及各种动物和人源的组织和液体生物材料制备的、应用人类疾病预防、治疗和诊断的药品。实际上，生物制品一般指来自血液、疫苗、毒素和免疫制剂的医药产品，而传统的生物药物如激素、酶制剂和植物代谢物则不应属于生物制品范畴。

ﭨ生物药物(biopharmaceutics)：

是利用生物体、生物组织及其成分，综合应用生物学、生物化学、微生物学、免疫学、物理化学和现代药学的原理和方法进行加工，制造而成的一大类用于预防、治疗和诊断疾病的制剂。广义的生物药物包括从动物、植物、微生物和海洋生物等生物体中制取的各种天然生物活性物质及其人工合成或半合成的天然物质类似物。主要包括：生化药物、微生物药物、生物制品及其相关的生物医药产品。

A.基因工程药物(应用基因工程和蛋白质工程技术制造的重组活性蛋白、多肽及其修饰物如抗体、疫苗和治疗性蛋白等)

B.基因药物(治疗基因、反义核酸和核酶等)

C.天然生化药物(生物材料中的天然生化活性物质)

D.合成或半合成的生物药物生物药物

生物技术药物(biotech drugs)

又称基因工程药物，是指以DNA重组技术生产的蛋白质、多肽、酶、激素、疫苗、单克隆抗体和细胞因子类药物，也包括用蛋白质工程技术制造的上述产品及其修饰物。此外，还包括应用生物技术研究开发的反义药物和用于基因治疗的基因药物和核酶等。

生物制药技术：

DNA重组技术(基因工程)

蛋白质工程技术(蛋白质工程)

发酵培养技术(微生物工程)

蛋白质分离纯化与分析技术(生化工程等)

反义技术与基因治疗技术

## 三、生物技术药物研究开发简史

ࢨ发酵工程制药：以发酵工程制药为基础的传统生物技术阶段；

ࢨ细胞工程、酶工程制药：以酶工程制药为基础的近代生物技术阶段；

ࢨ基因工程制药：以基因工程药物为核心的现代生物技术药物。

## 四、生物技术药物的现状

ࡨ1982年美国Lilly公司首先将重组胰岛素投放市场，标志着世界第一个基因工程药物的诞生。迄今为止，已有50多种基因工程药物上市，近千种处于研发状态，形成一个巨大的高新技术产业，产生了不可估量的社会效益和经济效益。

ࡨ据最新统计，美国的生物技术公司已有约2000家（包括1300多家生物药物相关公司），其中已有约300多家已经上市。

## 五、生物技术药物前景展望

೨“中华民族基因组中若干位点基因结构的研究”和“人类重大疾病基因的研究”

೨我国重要疾病如高血压、糖尿病、肿瘤（肺癌、食道癌、鼻咽癌、白血病等）相关基因的研究也取得了重要进展

೨基因组和后基因组的研究将把医疗保健带入一个新时代

೨与人类疾病和工业有关的微生物模式生物基因组研究工作也在进行

基因组

♣“人类基因组计划”的工作草图

♣模式生物基因组——药物筛选平台

后基因组

♣基因多态性（SNPs）——个性化医疗

♣功能基因组研究

蛋白质工程

♣蛋白质组学（研究基因的执行体）—药物靶点、疾病机理

表达蛋白组学(定量表达图谱)—细胞通路、疾病及药物作用

细胞图谱蛋白质组学（功能蛋白质组）——蛋白质相互作用

♣蛋白结构、性质和功能研究

细胞工程

♣永生细胞系——基因组的保存

♣细胞离体培养、代谢、调控研究

♣稳定的原核、真核表达、调控——目标产品生产载体

生化工程

♣基因工程表达的原核、真核、动植物个体的工厂化培养

♣分离纯化、产品剂型

♣工程放大、工厂化生产成套生产工艺、技术与设备

产业

♣利用原核、真核细胞或动植物个体工厂化生产基因工程药物、试剂

# 第二章 生物技术新药设计

新药研发程序：

（实验室）

药物筛选 结构改造 制备过程 药效检测 安全评价 市场预测

论证与决策

（中试）

技术复核 中试放大 工艺优化 批量制备 成本降低 临床样品

动物临床实验方案

（动物临床）

药代动力学 药效学 药理学 毒理学药剂学 三致试验（部分）研发

上会资料准备——上会

样品送检——人体临床批文

（人体临床）

剂量与代谢 有效性 安全性 用药途径 不良反应 病例数量

人体临床总结——上会

二、三期人体临床——新药证书

（生产准备）

论证与决策 选址建厂 GMP论证 设备配置 人员培训 市场网络

合理药物设计( RationalDrug Design )

近年来，随着受体信号转导、细胞肿瘤学、细胞免疫学、细胞血液学和神经生物学等学

科的发展，人类基因组计划的实施，使从分子水平阐明疾病病因和病理机制已成为可能。

新技术的广泛应用为研究生物大分子的3D结构、活性构象及其与配体分子相互作用方式、

推测作用机理、揭示构效关系提供了技术手段。

在此基础上通过抑制、阻断或调节病理过程中相关酶系、受体或离子通道和核酸等药物

作用靶，从而达到治疗疾病的目的，这是合理药物设计的基础。

依据药物发现过程中基础研究所揭示的药物作用靶点(target，受体)，从其内源性配基(ligand)或天然药物的化学结构特征，寻找和设计合理的药物分子，以发现选择性作用于靶点的、具有药理活性的先导物;根据靶点3D结构直接设计活性配基;

合理药物设计本质上是针对药物作用靶点，如酶、受体、离子通道、膜、抗原、病毒、核酸和多糖等，寻找和设计合理的药物分子。包括：

①基于结构的药物设计(药物和受体结构的理解)；

②基于机理的药物设计(对靶点结构、功能、与药物作用方式及产生生理活性机理的认识)。

## 一、生物技术新药设计的理论依据与指导思想

疾病与分子信号传导通路异常

创新

Wnt信号通路与胚胎发育及许多人类肿瘤的发生发展密切相关

组成：细胞外因子(Wnt)、跨膜受体(frizzled)、胞质蛋白(β–catenin)及核内转录因子(TCF)等

一系列蛋白.

APC(adenomatouspolyposiscoli，结肠腺瘤性息肉病基因)，是一个典型的抑癌基因,约85%散发性结肠癌中可检测到APC基因缺失突变或失活。最近发现结肠癌细胞中APC的失活可直接导致β-catenin在核内的累积，导入正常的APC基因后，可消除该现象.

β-catenin和TCF的复合物可以激活c-myc的表达. c-myc的激活与Burkitt’s淋巴瘤、肺癌、结肠癌等多种人类肿瘤相关.

APC 突变后，使其不能有效地与β-catenin、GSK-3 和Axin结合而形成复合物，β-

catenin降解受阻从而在胞内累积，随即进入核内，激活靶基因的表达.同时，β-catenin

氨基端的Ser/Thr磷酸化位点突变也可影响其降解过程，造成β-atenin胞内水平升高，从

而激活Wnt信号通路。

## 二、合理药物设计基本策略

仿真、类似、结构简化、激活、拮抗、拼合、前药转换、软药代谢、老药新用、化害为利等。

### 基本策略一:仿真

心钠素(AtrialNatriureticPeptide,ANP)被发现于1956年，是人的心房肌细胞产生和分泌的一

种心脏激素。1981年心钠素的生物学功能和作用机理得以详细阐述，并于1984年测定其氨基酸序列及基因编码。1995年日本SUNTORY公司生产的基因工程人心钠素正式上市销售。

### 基本策略二:类似

脑啡肽(enkephalin)

内源性阿片样物质－－镇痛

甲硫啡肽(ME):Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

亮啡肽(LE)：Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

环化(Tyr游离氨基,阿片活性必需) 2-5 环活性高于母体；

修饰:引入D-氨基酸(D-Ala代替2-Gly,活性及代谢稳定性增高)

假肽(pseudopeptide)/类肽(peptoid)

耐酶解

提高口服生物利用度

稳定性好作用时间长

无免疫原性

成本低

### 基本策略三:结构简化

뿐截短型（胞外功能域95aa-281aa，114－281aa）

뿐TNFSF10的结构生物学研究；活性三聚体；Cys230等位点；

뿐重构专利分子TNFSF10的设计（AX1区＋柔性linker+AX2区）

쐐灭活疫苗

쐐亚单位疫苗

쐐表位疫苗

### 基本策略四:激活

肝脏刺激物(hepatic stimulator substance, HSS);

肝细胞生长因子(hepatocytegrowth factor, HGF);

人肝再生增强因子(human augmenter of liver regeneration, hALR) 最早由Hagiya et al从新生大鼠的肝组织中克隆;

促进肝细胞增殖，促进肝损伤修复有关，提高中毒性肝衰竭动物存活率;

### 基本策略五：反义药物(拮抗)

反义DNA

核酶

肽核酸(peptide nucleic acid, PNA):聚酰胺骨架代替糖－磷酸骨架，不易被核酸酶、蛋白酶降解

### 基本策略六:拼合

阿斯匹林：羧基，对胃粘膜有刺激性

对乙酰氨基酚（扑热息痛）：酚羟基，肾脏毒性

脱水酯化--Benorilate扑炎痛

酯酶分解，重新成原两药,共同发挥解热镇痛

作用减少剂量。

GM-CSF和IL-3(多重集落刺激因子)融合表达：GM-CSF和IL-3的融合蛋白可明显增强造血功能；融合蛋白PIXY321促进细胞增殖作用是GM-CSF加IL-3作用的10倍，刺激造血细胞集落作用比单独使用IL-3、GM-CSF或联合应用要高10～20倍。

### 基本策略七:前药转换

Prodrug

体外无或较小活性

体内经酶或非酶的作用

转化为具有药理作用的化合物

HSV-TK/GCV肿瘤基因治疗

### 基本策略八: 软药代谢

Soft drug: 设计药物完成治疗作用后，可按照预先规定的代谢途径和可以控制的代谢速率，转化失去活性，碎片无毒或几乎没有毒性活性、毒性分离

### 基本策略九:老药新用

IL-2

肿瘤辅助治疗

结核辅助治疗

### 基本策略十:化害为利

毒副作用转为新的药理作用

## 三、计算机辅助药物设计

（Computer aided drug design, CADD）

以计算机为工具，采用各种理论计算方法和分子图形模拟技术，根据累积的大量有关结构和功能的资料，设计具有一定药效的新分子

分子图形学和三维图形工作站

剑桥小分子结构数据库和蛋白质数据库PDB

### 理论基础

以受体学说为核心的分子药理学

Structure-activity relation SAR

Quantitative structure-activity

relationship (QSAR)

### 技术基础

X ray crystallography

Bio-NMR

Compute aided molecular modeling

Discovery software and Expert system

### 方法

直接药物设计：从已知受体的三维结构设计配基分子.

间接药物设计：在未知受体的三维结构的情况下，从一系列配基分子中归纳出

受体受点的要求，再以此设计新的配基.

#### 直接药物设计

3 D structure searching

数据库：brookhavenprotein data bank,PDB

cambridgestructural database,CSD

Search criteria 或query

搜寻算法：3D几何（DOCK）

molecular similarity

柔性构象（能量合理）

De novo drug design molecular fragment (官能团)approach：

碎片连接法

碎片生长法

Tripos公司LEAPFROG软件(交互跃进)

http://www.tripos.com

#### CoMFA(Comparativemolecular field analysis):比较分子场分析

药物分子与受体可逆性的非键合作用

用分子的势场来描述；

建立3D-QSAR方程

Which key fits best?

탐What physical-chemical properties for the key?

탐What biological activity profile is needed?

Variations on the Lock and Key Model

Which structure of the lock should be targeted?

Is the binding pocket a good target?

Is it deep enough?

Is it hydrophobic enough?

Is structure-based design relevant for my receptor?

Is the 3D structure reliable?

Is the binding pocket static enough?

测试方式：

1. 与某种固定靶受体的亲和力；

2 .可溶性受体与固定配基的结合力；

3. 可溶性化合物的活性试验。

检测方法：荧光法等

全库千余产物同在一块小玻片上作为一个样品，与带有荧光标记的抗体（酶、受

体）浸泡反应，激光扫描，通过光密度的大小计算亲和力

384孔板；实验室自动工作站

生物技术药物的新剂型

胃肠道消化酶

低扩散性能和分配系数

生物屏障

药物物理、化学稳定性

聚集表面吸附结晶及吸水水解氧化

溶解度

赋形剂

新型注射给药系统

微粒及纳米粒系统

生物可降解载体（葡聚糖、白蛋白）缓释长效

例：生长抑素注射埋植剂动物体内缓释250d

控释

例：胰岛素性激素磁控改变孔洞大小的载体

无针头内喷射器：N2、顶部小孔、皮下注射（氦气）

例：罗氏公司(Roche)的干扰素液

经皮粉末喷射剂

# 第三章 生物技术药物研发的原理与方法

基因工程药物研发的基本程序：

构建目的基因DNA重组体

将DNA重组体转入宿主菌构建工程菌

工程菌的发酵

外源基因表达

产物的分离

纯化产品的检验

## 一、目的基因获得与诱变

药用目的基因的特点

逆转录法分离目的基因

化学合成法获得目的基因

基因定点诱变和定向进化

药用目的基因的特点

真核细胞中单拷贝基因只占染色体DNA的10－5 ～10－7，多拷贝也只有10－3。因此，从染色体上直接分离、纯化目的基因十分困难；

真核基因一般都有内含子，由于原核细胞缺乏mRNA的转录后加工系统，真核基因转录的mRNA不能加工、拼接成为成熟的mRNA。cDNA

克隆真核基因常用的方法

逆转录法

化学合成法

### 1 逆转录法

总RNA的分离；

mRNA的纯化

cDNA第一链的合成；

双链cDNA的合成

cDNA的克隆

将重组体导入宿主细胞

cDNA文库的鉴定

目的cDNA克隆的分离和鉴定

总RNA的提取－异硫氰酸胍法

细胞(淋巴细胞、肿瘤细胞)

用PBS洗涤

加3.5ml异硫氰酸胍，用枪头吹吸

离心

加入乙酸钠帮助RNA沉淀，加无水乙醇沉淀

异硫氰酸胍作用：

①裂解细胞

②失活RNA酶

mRNA的分离－亲和层析法

mRNA 3′末端都有长度为20-250个A 组成的

polyA尾巴

层析柱填料：oligo-dT纤维柱

纯度：90％

cDNA第一链的合成

随机引物(random hexamers):

Oligo(dT) 12－18bp

反应体系: mRNA模板;引物;缓冲液(buffer);

dNTP逆转录酶(reverse transcriptase, RT)

cDNA第二链的合成

自身引导合成法：

单链cDNA3' 末端反转形成具有部分双链结构的发夹环形式

RNA酶H

DNA聚合酶1

S1核酸酶

不足之处:获得的双链cDNA5' 端会有几对碱基缺失

置换合成法：获得的双链cDNA5′端也会有几对碱基缺失

#### cDNA法分离目的基因的基本程序：

完备分离程序

햀提取细胞总mRNA，合成总cDNA，将之全部克隆，然后借助于合适的筛选手段找到目的重组子

햀筛选时，若使用的是多拷贝载体，则采用菌落原位杂交法筛选；若使用的是表达型载体，则采用菌落免疫杂交法筛选

햀完备分离程序适用于mRNA分子数少的目的基因的克隆，如人胰岛素基因、干扰素基因、凝血因子VIII基因等

特异分离程序

핀提取细胞总mRNA，琼脂糖凝胶电泳分离，回收目标mRNA，由此合成双链cDNA，然后进行克隆.

핀特异分离程序较适用于mRNA丰度极高的目的基因克隆如血红蛋白基因等.

差异分离程序

쿀利用两组细胞mRNA种类的差异，分离克隆差异mRNA所对应的cDNA，因而这种程序较适用于分离克隆新基因.

쿀例如：正常的大鼠FR3T3成纤维细胞中，有些新基因是不能自发表达的，需在多瘤病毒感染之后方可转录。通过分离克隆这些新基因，进而研究其生物学功能.

cDNA法克隆目的基因的局限性

①并非所有的mRNA分子都具有polyA结构

②细菌或原核生物的mRNA半衰期很短

③mRNA在细胞中含量少，对酶和碱极为敏感

④分离纯化困难

⑤仅限于克隆蛋白质编码基因

聚合酶链式反应

(Polymerase chain reaction, PCR)

模板变性

引物退火

热稳定DNA聚合酶进行DNA合成

### 2 化学合成法

化学合成法的基本战略

化学合成的单元操作

DNA化学合成的用途

#### 化学合成法的基本策略

全基因合成

前提条件：基因的DNA序列已知,有三种策略

A. 小片段粘接法：根据目的基因全序列，分别合成12-15碱基长的单链DNA小片段

混合退火

T4-DNA连接酶连接

克隆入合适的载体

B.补钉延长法：根据目的基因两条互补链全序列，分别合成12-15碱基长的单链DNA小片段以及20-30碱基长的单链DNA中片段.

混合退火

Klenow酶聚合

T4-DNA连接酶连接

克隆入合适的载体

C.大片段酶促法：根据目的基因的全序列，分别合成40-50碱基长的单链DNA片段

混合退火

Klenow酶聚合

T4-DNA连接酶连接

克隆入合适的载体

#### DNA化学合成的用途

合成天然基因

如生长激素释放抑制素基因、

脑啡肽基因、胰岛素基因、干扰素基因等.

如组织型纤溶酶原激活剂基因、尿激酶原基因等.

修饰改造基因

设计新型基因

制备探针、引物、接头

化学合成法不足之处：

已知目的基因的核苷酸序列

不能合成太长的基因，否则出错的可能性很大

选择合适的密码子

费用较高

### 3 定点诱变

例：将tPA(tissueplasminogenactivator, 组织型纤溶酶原激活剂)Asn117替换为Glu117，从而除去一个原有的糖基化位点。由于该处原有的糖链能促进tPA从血浆清除，因此点突变后能够降低tPA的血浆清除率，延长血浆半衰期。

#### 寡核苷酸引物介导的定点突变方法

将待突变基因克隆到突变载体上；

制备待突变基因的单链模板；

含有突变碱基的寡核苷酸引物与模板退火，形成一小段碱基错配的异源双链的DNA；

合成突变链:在DNA聚合酶的催化下；引物以单链DNA为模板合成全长的互补链，而后由连接酶封闭缺口，产生闭环的异源双链的DNA分子；

转化和初步筛选：异源双链DNA分子转化大肠杆菌后，产生野生型、突变型的同源双链DNA分子。可以用限制性酶切法、斑点杂交法等初步筛选突变体；

对突变体基因进行序列分析。

#### PCR介导的定点突变法

4种扩增引物，3次PCR反应。

头两次PCR反应中, 应用两个互补的并在相同部位具有相同碱基突变的内侧引物,扩增形成两条有一端可彼此重叠的双链DNA片段,去除未掺入的多余引物之后, 这两条双链DNA片段经变性和退火可以形成具有3’凹末端的异源双链分子, 在TaqDNA聚合酶的作用下，产生含重叠序列的双链DNA分子。

这种DNA分子再用两个外侧寡核苷酸引物进行第三次PCR扩增,便产生突变体DNA。

#### 盒式突变（cassette mutagenesis)

又称片段取代法（DNA fragment replacement)，利用目标基因序列中适当限制酶切位点，插入各种合适的突变DNA片段，用以取代目标基因中特定DNA片段。

关键

目标基因序列中有适当限制酶切位点

如何得到各种合适的用以取代目标基因中特定DNA片段的突变DNA片段

#### 三种定点突变方法的优、缺点比较

寡核苷酸引物介导

优点 保真度高;

缺点 操作过程复杂、周期长,而且在克隆待突变基因时会受到限制性酶切位点的限制.

PCR介导的定点突变

优点 操作简单,突变的成功率可达100%.

缺点1). 后续工作较复杂,PCR扩增产物通常需要连接到载体分子上,然后才能对突变的基因进行转录、翻译等方面的研究;

2). 不论是用普通的TaqDNA聚合酶还是高保真的Pfu酶，PCR方法产生的DNA片段都要经过核苷酸序列测定，方可确证有无发生其它突变发生。

盒式突变法

优点 简单易行、突变效率高,可以在一对限制酶切位点内一次突变多个位点;

缺点 合成多条引物的成本较高,在一般情况下,在靶DNA片段的两侧往往难以满足存在一对限制性酶切位点的要求,限制了该方法的广泛应用.然而一旦具备了这样的条件，该方法则为首选。

### 4 定向进化

体外定向进化(directed evolution in-vitro),又称实验分子进化(experimentally molecular evolution),属于蛋白质的非合理设计(irrational design).

定向进化＝随机突变＋选择

1993年,美国科学家Arnold F.H.首先提出酶分子的定向进化的概念，并用于天然酶的改造或构建新的非天然酶。

#### 易错PCR (error prone PCR)

简单、快速、廉价

改变PCR的条件：降低一种dNTP的量（降至5％～10％）；加入dITP来代替被减少的dNTP；在PCR缓冲液中另加0.5 mmol/ＬMn2+。

用易错PCR法进行定向改造关键在于突变率的控制。突变率太高不利于发现有用的突变株，太低则出现的大多是野生型。理想的突变率为每个目的基因的碱基替代在5到15个左右。

#### DNA改组(DNA shuffling)

将DNA拆散后重排, 一种模仿自然进化的体外DNA重组的新技术. 这种方法不仅可以对一种基因人为进化, 而且可以将具有结构同源性的几种基因进行重组, 共同进化出一种新的蛋白质. 在实验室中把DNA改组与有效的筛选方法结合起来可为多领域的应用快速进化基因.

#### DNA shuffling

目的基因片段的准备:一个或几个较高同源性的基因；

DNaseⅠ酶切: 成约10～50bp或300bp左右的小片段;

不加引物的PCR: 在Taq酶作用下将切割后的DNA重叠小片段重新连接起来,可能发生许多突变和重组;

加引物的PCR:加入目的基因片段两端的引物,使连接好的DNA得到扩增,筛选正突变.得到的正突变子又可以重复进行shuffling,使性状进一步提高.

例：源于四种菌的头孢菌素酶(moxalactamase),同源性在58％～82％之间.单基因shuffling产生的突变体对moxalactam(头孢菌素的一种)的抗性增加了8倍,而多基因共同shuffling 得到的突变体抗性增加270～540倍. 对于后者的研究表明,102个氨基酸来自Citrobacter,142个氨基酸来自Enterobacter,181个氨基酸来自Klebsiella,另196个氨基酸来自Yersinia.由此可见,对于具有同源性的一类酶进行多基因的shuffling可以加速酶的人为进化.

## 二、基因表达

1) 原核表达系统

2) 影响目的基因表达的因素

3) 目的基因在大肠杆菌中的表达形式

合成目的基因产物: 它包括转录、翻译、加工等过程. 在多数情况下,新生多肽需经过翻译后加工,如糖基化、磷酸化等才能成为有功能的蛋白.

表达载体需要具备的条件

①能够独立复制.复制能力强,多用松弛型;

②具有灵活、便于操作的多克隆位点;

③具有方便的筛选标记;

④具有强启动子,能为大肠杆菌的RNA聚合酶识别;

⑤具有强终止子;

⑥所产生的mRNA必须具有翻译的起始信号,即起始密码AUG和SD序列;

⑦一般具有阻遏子,使启动子受到控制。

### 1 原核表达系统

#### 大肠杆菌

研究的比较多,技术成熟；

操作方便;成本低；

枯草芽孢杆菌

分泌能力强；

链霉菌

分泌能力强,安全不致病.

#### pET系列

基于T7噬菌体RNA聚合酶/启动子的大肠杆菌表达系统

T7噬菌体RNA聚合酶合成RNA的速度高于大肠杆菌5倍。T7噬菌体RNA聚合酶只识别自己的启动序列,不启动大肠杆菌DNA任何序列的转录,可以使T7噬菌体启动子(pT7)控制下的基因得到特异性表达.在适宜的条件下,T7噬菌体RNA聚合酶/启动子表达系统表达的基因产物可以占细胞总蛋白的25%以上.

载体pET-28a的主要构成元件

有T7噬菌体启动子、乳糖操纵子、核糖体结合位点、6XHis标签序列、凝血酶切割位点、多克隆位点、T7噬菌体终止子以及乳糖阻遏子序列(lacI)、pBR322复制子、f1噬菌体复制子、卡那霉素筛选标记序列等.

T7噬菌体启动子、核糖体结合位点引导高效转录和翻译.

乳糖操纵子和乳糖阻遏子序列(lacI)存在的主要意义: 当目的蛋白对大肠杆菌有毒性时,可以通过添加阻遏物,控制目的蛋白以较低水平表达.

6XHis标签序列、凝血酶切割位点存在的意义主要在于方便利用针对6XHis的螯和层析(His.BindTM树脂)分离纯化蛋白,然后利用凝血酶切割去除标签蛋白.

多克隆位点处的XhoI、BamHI等位点在该载体上只有单一切点，方便用作目的基因的插入位点.

pET表达系统受体菌

能够产生T7 RNA聚合酶的大肠杆菌菌株.常用菌株为BL21(DE3)和BL21(DE3)pLysS.

BL21菌缺损lon和ompT蛋白酶,使目的蛋白更稳定,表达水平大大提高.

BL21(DE3) 菌株的细菌基因组上以溶原形式携带一个克隆的T7 RNA聚合酶基因,异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)可以诱导T7 RNA聚合酶大量合成,目的基因高效表达.

BL21(DE3)pLysS菌株能够产生T7 RNA聚合酶的抑制剂—T7溶菌酶，使目的基因的表达处于严谨的控制之下,同时由于T7溶菌酶的破细胞壁作用,菌株很容易通过冻融或0.1%TrotinX-100处理而破裂细胞,分离纯化目的蛋白.

### 2 影响目的基因表达的因素

当蛋白质的表达量较少时，可从以下几个方面考虑：

mRNA中是否有不为其二级结构封阻的RBS(RibosomeBinding Site)。在保留编码蛋白的序列的同时重新构建基因的5′端，使其A+T含量增加到最大限度。这将减少mRNA的二级结构，或改变反应中一个尚未确定的参数，如改变起始密码子前端的序列，增加翻译效率。

确定转录终止子的存在与否。如果载体插入基因的下游无转录终止子存在，应插入一个。转录终止子的存在增强了mRNA稳定性并减少了核苷酸在细胞中的消耗，从而有助于表达。

检查克隆基因序列的密码子是否为大肠杆菌不常用者。如果多个稀有密码子存在，可导致核糖体停滞，引起翻译与转录的解偶联，导致转录信息的提前终止。即使转录能够正常进行，停滞于核糖体上的mRNA 3’端可暴露出来，被宿主的核酸酶降解，降低了稳定性。一旦发现使用了稀有密码子（尤其是在基因的第二个密码子处），应更换成大肠杆菌偏爱的密码子以提高表达产量，即利用密码子的简并性在不改变蛋白质序列的条件下改变5’末端编码序列。

说明：当需要表达可溶、有活性的蛋白质时，出现产量大却不溶的产物，可采用以下措施

1改变培养温度。大肠杆菌可在10～43℃范围内合成蛋白质。许多蛋白质在低温下比在高温下更易溶解，某些酶在温度大于37℃时具有更高的比活性。尝试不同温度，尤其是在较低温度下培养，可望表达出可溶、有活性的蛋白质。

2测试不同培养基和金属添加剂。许多蛋白质含有金属，并以之作为结构或催化反应的辅基。当蛋白质生物合成的速率快于往细胞转运金属的速率时，引起不含金属辅基的脱辅蛋白的堆积。这些蛋白不能正确折叠，常呈不溶的状态。此时，可测试不同培养基和金属添加剂，合理补充金属辅基。

3使用低拷贝数质粒。采用低拷贝数质粒，常常降低表达水平。但是，降低表达水平有时可能有利于增加可溶性蛋白比例，得到可溶性的表达产物。

影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素

外源基因的拷贝数

外源基因的表达效率

启动子的强弱

核糖体结合位点的有效性

SD序列和起始密码ATG的间距

密码子的偏爱性

表达产物的稳定性

细胞的代谢负荷

工程菌的培养

### 3 目的基因在大肠杆菌中的表达形式

融合蛋白形式

非融合蛋白形式

分泌型表达

包涵体形式

#### 蛋白质的融合表达

将克隆化基因引入某表达载体编码的高表达蛋白(担体蛋白)氨基末端的一段序列(担体序列)的3’末端。

担体序列：表达谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白(thioredoxin,TRX)等。用基于对担体蛋白特异的抗体的亲和层析进行融合蛋白的分离提纯。一些担体蛋白如TRX，可以经渗透压休克或冻融步骤从完整细胞中释放出来，这一特性通常可用于从细胞中分离与担体融合的融合蛋白。

融合蛋白进行位点特异性裂解的方法

(1)化学裂解

可采用诸如溴化氰(Met↓)、BNPS-3-甲基吲哚(Trp↓)、羟胺(Asn↓Gly)等试剂或低pH (Asp↓Pro)来进行融合蛋白的化学裂解。

化学裂解的方法比较便宜而且有效，但有时因目的蛋白中存在裂解位点，或者因为发生了副反应而导致对蛋白质进行了不需要的修饰，从而阻碍了它们的应用。

(2) 酶解

温和；高度专一性。

凝血酶、肠激酶、Xa因子、凝乳酶、胶原酶等。所有这些酶都具有较长的底物识别序列(比如在凝乳酶中为7个氨基酸)，从而降低了蛋白质中其他无关部位发生断裂的可能性。

肠激酶和凝血酶应用最多，因为它们切割各自的识别序列的羧基端，就使带有天然氨基端的被融合部分得以释放。

GST融合表达载体pGEX-6P-3

硫氧还蛋白融

合表达载体

pTRXFUS

#### 蛋白质的分泌型表达

细胞外膜蛋白、周质蛋白、内膜蛋白以带有N-端信号肽的前体形式在细胞质中合成，随后穿膜运送到周质或定位到内、外膜上。在穿膜的过程中，信号肽被信号肽酶切除。

蛋白质分泌表达的优点

信号肽被切除后生成的蛋白质的N-末端氨基酸残基和天然的产物是一致的；

周质空间中的蛋白酶的活性要比胞质中的低，这使所表达的蛋白能稳定存在于周质中；

周质中只有少量的细菌蛋白，它们仅占细菌总蛋白的4%，使得重组蛋白更易纯化；

周质空间中提供了一个氧化的环境，更有利于二硫键的正确形成。

信号肽序列

信号肽：15-30个疏水氨基酸残基组成，N-端的小段肽链是以带正电荷的赖氨酸和精氨酸为特征，随后是一段以疏水氨基酸为主的肽段，在邻近切割位点处常有几个侧链很短的氨基酸，如甘氨酸、丙氨酸等。

N–端带正电荷肽段：有助于新生肽链与带负电荷的细胞质膜结合；

疏水肽段：能形成α-螺旋结构，两段螺旋以反平行的方式形成发夹结构之后，容易进入内膜的脂双层；

邻近切割位点的氨基酸：倾向于形成β-折叠，可能是信号肽酶所识别的结构。

信号肽后面的氨基酸：影响蛋白质的穿膜和随后的切割。

实现分泌表达的条件

合适的信号肽；

培养条件：培养温度影响着分泌的速度，分泌速度又与蛋白质的正确折叠有关；

启动子的强度和诱导剂的浓度也有影响；

目前普遍接受的观点：

低温、低强度的启动子和较低浓度的诱导剂，可能实现分泌表达。

不同的菌种，分泌的效果也不同。

例：瘦素Leptin的分泌表达

当细胞在37℃培养时，在一定的IPTG浓度下，包涵体达Leptin总量的75—90%；当在30℃培养时，大部分的Leptin则能以可溶的形式生成，可溶蛋白占总目的蛋白的85-92%，然而与37℃条件相比总目的蛋白的量却减少了30-40%。利用低浓度的IPTG诱导也可提高可溶蛋白的含量。

由于DsbA(大肠杆菌周质空间内的巯基/二硫键氧化酶)有助于蛋白质正确的折叠，加速分子间二硫键的形成，因此，利用共表达DsbA可以阻止包涵体的形成。

利用DsbA的共表达可以在正常的培养条件下(37℃)保证Leptin可溶性表达。

并非所有的蛋白都可以利用这个方法。

#### 蛋白质的包涵体形式表达与蛋白质复性

包涵体：蛋白质在细胞内聚集成没有生物活性的直径约0.1－3.0μm的固体颗粒。

不可溶、无生物活性的包涵体必须经过变性、复性才能获得天然结构和生物活性。

选择一个合适的复性过程来实现正确的蛋白质折叠(protein folding)，获得生物活性，是基因工程的难点和热点。

包涵体形成的原因

重组蛋白是大肠杆菌的异源蛋白，由于缺少真核生物中翻译后修饰所需的酶类，致使中间体大量积累，容易形成包涵体沉淀。

缺乏蛋白质折叠过程中需要的某些酶和辅助因子，或环境不适，无法形成正确的次级键等，也是原因之一。

表达量越高越容易形成包涵体。可能因为合成速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确配对，过多的蛋白间可能存在非特异性结合，蛋白质无法达到足够的溶解度等。

减少包涵体形成的策略

降低重组菌的生长温度。

促进重组蛋白质可溶性表达的生长添加剂：高浓度的多醇类、蔗糖可以阻止分泌到周质的蛋白质的聚集反应。其它添加剂还有乙醇(诱导热休克蛋白的表达)、低分子量的巯基或二硫化合物（改变细胞周质的还原态，影响二硫键的形成）等。

供给丰富的培养基，创造最佳条件，如供氧、pH。

包涵体蛋白质的复性

自发的从变性的热力学不稳定状态向热力学稳定状态转变，形成具有生物活性的天然结构。

对于蛋白质的折叠机制，目前有多种不同的假设，但很多学者认为有一个“熔球态”的中间状态，在“熔球态”中，蛋白质的二级结构已经基本形成，其空间结构也初具规模，再做一些局部调整就可形成正确的立体结构。

在折叠反应中，从伸展态到中间体的速度是非常快的，只需要几毫秒，但从中间体转变为天然态的过程比较缓慢，是一个限速过程。

伸展态→中间体→后期中间体→天然态（复性）

蛋白质折叠

蛋白质折叠涉及两种疏水作用：分子内的疏水相互作用，可促进蛋白质正确折叠；部分折叠的肽链分子间的疏水相互作用，会导致蛋白质聚集。聚集过程与复性过程相互竞争。

蛋白质伸展肽链折叠为天然活性结构的过程还受到周围环境，如温度、pH值、离子强度等因素的影响。

复性方法

透析、超滤和稀释复性法：最传统也应用最普遍的蛋白质折叠复性方法

透析法耗时长，易形成无活性蛋白质聚集体；

超滤法在膜上聚集变性，易造成膜污染；

稀释法处理量太大，不利于工业放大。

添加促进剂的复性方法：

A)共溶剂：如PEG 6000-20000，阻止蛋白质分子间的相互碰撞机会；

B) 去污剂及表面活性剂：如Triton X-100、磷脂等对蛋白质复性有促进作用，但它们能与蛋

白质结合，很难去除；

C 氧化-还原剂：如DTT等，通过促进不正确形成的二硫键快速交换反应，提高了正确配对的二硫键的产率；

D 分子伴侣和折叠酶：分子伴侣: 结合和稳定另一种蛋白质的不稳定构象,促进新生多肽链的折叠、多聚体的装配。

折叠酶: 二硫键异构酶(PDI)、脯氨酸异构酶等。

这类蛋白在折叠复性后要除去，而且十分昂贵。

E 单克隆抗体：待折叠复性的蛋白质的抗体可有效协助复性。

F 其它：甘油可以增加黏度，减少分子碰撞的机会，减少错配以提高复性效率；适量的盐浓度可以降低某些带电基团间的斥力，有利于蛋白质的折叠。

液相色谱（LC）复性法

最有效的纯化蛋白质的方法

液相色谱复性的优点是：

色谱固定相对变性蛋白质的吸附可明显的减少变性蛋白质在脱离变性剂环境后的分子聚集，从而避免了沉淀的产生；

在蛋白质复性的同时，可使目标蛋白与杂蛋白分离；

疏水相互作用色谱（HIC）、离子交换色谱（IEC）、凝胶排阻色谱（SEC）、亲和色谱（AFC）已成功地对变性蛋白进行了复性。

## 三、生物技术药物的临床前研究与临床试验研究

(生物技术药物的专利申请与知识产权保护)

生物技术新药的特点

种属特异性：不同种属动物对同一药物表现不同反应；

结构确证不完整性：生物大分子结构复杂，不能完全确认化学结构；

免疫原性：药物对动物的异源性，安全评价困难。

多功能性：生物体内药物受体分布广泛；

生物技术药物非临床安全性评价

(临床前研究)

根据《药品注册管理办法》，生物技术药物非临床安全性评价的基本内容与化学药物的相同，包括：安全性药理、单次给药毒性、重复给药毒性、遗传毒性、生殖毒性、致癌性、依赖性和特殊毒性(过敏性、局部刺激性、溶血性)试验。

临床前药品安全评价

所谓临床前安全性评价:是指利用实验动物进行的一系列试验研究,主要观察和测定药物对机体的损害和影响,其研究结果为评价新药对人类健康的危害程度提供科学依据. “药物非临床研究质量管理规范(GLP)”作为药品临床前研究行为和实验室条件的规范，是国际上新药安全性评价实验室共同遵循的准则，也是新药研究数据国际互认的基础。

新药临床前安全性评价研究必须在符合GLP要求的实验室进行。否则，其药品注册申请将不予受理.我国有SFDA (State Food and Drug Administration)认可的GLP实验室，但国际上(FDA)不认可，这是新药评价的薄弱环节.

生物技术药物非临床安全性评价的特殊性

①安全性问题：免疫毒性，杂质引起的毒性，药理作用放大引起的毒性.

②受试物的质量：要与临床用药有可比性.

③给药剂量与动物的全选择：剂量与临床一致.动物的选择因药而不同.

④免疫原性：检定产生的抗体,是否有意义,以抗体产生不影响治疗作用为准.

⑤三致试验(致癌、致残、致畸形)：不同新药，要求不同.

1、生物技术药物安全性问题

生物技术药物的安全性问题可能主要来自以下三方面：

(1)药理作用的放大或延伸；

(2)免疫毒性，包括免疫原性、免疫抑制和刺激反应及过敏反应；

(3)杂质或污染物引起的毒性。

2、受试物的质量

表达蛋白宿主细胞(如细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞)的污染可能会导致潜在的危险，但这些由杂质或污染物引起的安全性问题应尽可能地通过纯化等质量控制手段来解决。

一般来说，用于毒理试验的产品应与拟用于临床试验的产品具有可比性。当在药物的开发过程中为提高产品的质量或产量进行工艺改进时，研发者应考虑到生产工艺的改变对动物试验结果(外推至人体)可能产生的影响.

3、相关动物的选择

非临床安全性评价的意义很大程度上取决于动物毒性反应和人体不良反应之间的相关性，因此选择一种与人体相关的动物对于非临床安全性评价至关重要。生物技术药物大多仅作用于特定的受体产生药效或毒性作用，很难与其它受体发生作用。化学药物以代谢过程的差异来判断相关动物，通常使用大鼠和犬进行安全性评价，但对生物技术药物而言，除非其在大鼠

或犬体内具有生物活性，否则使用这两种动物进行非临床安全性评价是不合适的

4、给药剂量的选择

确定试验动物给药剂量的主要依据: 临床给药剂量、容量、浓度、制剂和给药部位等的影响。如果活性成分清除较快或溶解度低，可适当增加实验动物的给药次数或给药容量。

动物给药剂量应包括中毒剂量和未观察到不良反应的剂量(NOAEL)，以反映剂量反应关系。对某些毒性很小或无毒的生物技术药物，研发者需根据药物预期的药理或生理作用、受试物的易得程度以及临床适应症选择合理的给药剂量。

5、免疫原性

生物技术药物由于分子量较高,往往在动物体内具有免疫原性。因此，在重复给药毒性试验期间,应注意检测抗体滴度、出现抗体的动物数及中和抗体等.在很多情况下，如果生物技术药物的免疫原性不干扰对安全评价数据的解释，就可以认为抗体的产生并无特殊意义。此

时，抗体的检出不宜单独作为提前终止临床前安全性评价或改变试验设定的观察时间的标准。

6、遗传毒性和致癌性

由于生物技术药物很难与DNA或其他染色体物质发生直接作用，因此，通常不需要进行常规的遗传毒性试验。自发突变细胞的累积(如通过促进增殖的选择优势)可能致癌，但常规的遗传毒性试验并不能检测这类情况。针对这些问题，可以采用其它体内或体外试验方法进行研究和评价。标准致癌试验一般对生物技术药物并不合适，若从其生物活性角度考虑存在潜在致癌性担忧时，应结合其有效性、适应症性质等进行利弊权衡。

7、药代动力学

由于蛋白质在生物体内会很快降解为小肽和氨基酸，其药代动力学研究具有相当的难度。

放射性标记是生物技术药物药代动力学研究中经常使用的方法，使用时，要保证放射标记的受试物质仍保持了与非标记物质相当的生物学活性。由于放射性标记联接不稳定，或标记的氨基酸进入与药物无关的蛋白质循环，使用放射性标记蛋白得到的组织放射活度和(或)放射

自显影数据有时会很难解释。

由免疫介导的清除机制也可能影响生物技术药物在动物体内的药代动力学行为。

生物技术药物的研制

研制分以下几个阶段：

调研立项阶段，实验研究阶段 (有效部分 稳定性 生物活性 质量控制)，小量试制，中试阶段

中试应具的条件：

工艺稳定，有制检规程。

有质控标准; 三批产品足够量.

申报资料项目与要求

项目：

（一）综述资料

（二）药学研究资料

（三）药理毒理研究资料

（四）临床研究资料

（五）其他

要求：按申报资料的指导原则分期编写，要求材料的完整性，规范性，可靠性，真实性。直接体现了新药申报资料的质量。

资料举例：生产工艺研究资料

工艺路线设计思路依据和验证数据;

工艺各步参数设定依据，包括发酵工程菌生长曲线图，各阶段液的电泳，层析图;

中间产物的质控要求，有效去除核酸，内毒素及其他有毒，有害杂质等;

应尽可能详细，能看到生产工艺的合理性及可行性。

生物技术药物质量控制的要求

生物技术药物种类不同，质控方法各异，具有复杂性及可变性。

质控标准与WHO接轨。

质控要有标准品,与国际通行标准比。

所用动物必须来自正规动物室。

质控人员须经过培训。

生物技术药物质量控制的目的

1 安全性

2 有效性

3 质量可控性

要达到以上要求，必须从原材料，生产工艺，原液，半成品，成品的保存条件等全程质量控制。单靠成品质量控制是不行的。GMP的全面实施，使国内的生物技术药物质量控制标准和方法更加规范。但与国外产品比还有要改进的地方。

申报生物技术药物的质量控制中常见的问题

质量标准不完善：要用国际通用标准（ICH)，最低要用内控参比标准。

生产用原材料也要有标准，生产才能稳定。我国对原材料要求比较简单。

生产工艺的验证不受重视。

产品稳定性研究要进一步改进。

检定记录不规范等。

临床试验的分期

Ⅰ期临床试验：人体安全性试验，在健康志愿者进行(20-30例;1年)

Ⅱ期临床试验：安全与有效性实验，在少量病人身上进行(100-300例；2年)。

Ⅲ期临床试验：大量的有效性与安全性实验，在足量病人身上进行(1000-3000例；3年)。

Ⅳ期临床试验：应用研究阶段，进一步观察疗效和不良反应。

临床试验的暂停或终止

不能有效保证受试者安全的；

未报告严重不良事件的；

已有证据证明药物无效的；

试验药物出现质量问题的；

试验中弄虚作假的；

违反GCP的其它情形的等；

生产文号的申报和审批

不要越级申报，在省，市，自治区形式审查的基础上申报。

临床做完，应再送三批到检定所检定，并拿到检定报告。

各项申报资料和文件必须齐全，复核资料的完整性和规范性。

经常浏览SFDA网站(www.sda.gov.cn)，及时了解药品注册信息。

# 第四章 生物技术药物表达系统和工程菌发酵培养

## 一、原核表达系统

大肠杆菌

研究的比较多，技术成熟；

操作方便；成本低；

枯草芽孢杆菌

分泌能力强；

链霉菌

分泌能力强，安全不致病。

## 二、酵母表达系统

ᠸ酵母是一类单细胞真核生物，具有完整的亚细胞结构和控制严密的基因表达调控机制。它既能通过有丝分裂进行无性繁殖，也可通过减数分裂实现有性繁殖。

ᠸ作为一种微生物，它具有生长繁殖迅速、营养要求简单和便于工业化大规模发酵培养的优点。

ᙸ1996年酿酒酵母作为第一个真核生物被完成了全基因组测序，为人类对酿酒酵母的更深入研究及更广泛利用打下了基础。

ᙸClack-Walker和Miklos(1974)发现大多数酿酒酵母中也存在一种质粒，为全长约6300bp的双链DNA，每个二倍体细胞有60 ~100个拷贝，即后来被称为2μ环的质粒；酵母的LEU2、URA3、HIS3和TRPl基因先后在大肠杆菌中得到克隆; Hinnen在1978年首先将来自一株酿

酒酵母的LEU2基因导入另一株酿酒酵母，并可互补后者的leu2缺陷。这标志着酵母表达系统的建立。

᫸Hitman等(1981)即用酵母基因表达系统表达了人α干扰素，随后众多外源基因在酵母系统中表达，其中包括获得美国FDA批准、用于人体的第一个基因工程疫苗——乙型肝炎疫

苗等。

᫸我国在1983年首次用酵母菌表达了乙型肝炎病毒表面抗原基因。

᫸近年来，已在除酿酒酵母以外的许多酵母菌中发展出了多个性能优良的表达系统，各有特点，并都在表达外源基因的实际应用中取得了很好的效果。

### (一)酵母载体的基本结构

ᴸ酵母表达系统载体通常既能在酵母菌中进行复制也能在大肠杆菌中进行复制，形成所谓酵母菌—大肠杆菌穿梭载体。大肠杆菌转化方法简单、效率高，从大肠杆菌制备质粒DNA也比较方便。因此，利用大肠杆菌系统构建酵母载体可以大大简化手续，缩短时间。

酵母载体一般以大肠杆菌质粒为基本骨架并具有以下一些构件:

#### 1. DNA复制起始区：

ᢸ一小段具有DNA复制起始功能的DNA序列，通常来自酵母菌的天然2μ质粒的复制起始区及酵母基因组中的自主复制序列(autonomously replicating sequence，ARS)。

ᢸDNA复制起始区赋予酵母载体在细胞每个分裂周期的S期自主复制一次的能力。

ᢸDNA复制起始区是酵母细胞核内DNA复制起始复合物的结合位点。

#### 2.选择标记:

ꉸ是载体转化酵母筛选转化子时必须的构件，它们和宿主的基因型相互配合。

ꉸ酵母表达系统中所用的选择标记有两类：一类是酵母宿主为营养缺陷型，如leu2、ura、his3、trp1和lys2等，其选择标记就是营养合成代谢途径中相应的LEU2、URA3、HIS3、TRP1和LYS2基因；另一类是显性选择标记，如G418和cycoheximide,CYH。显性选择标记的优点是它可以用于野生型酵母菌的转化。

#### 3.整合介导区:

ꕸ是与受体菌株基因组有某种程度同源性的一段DNA序列，能有效地介导载体与宿主染色体之间发生同源重组，使载体整合到宿主染色体上。根据不同的目的和要求，可通过特定的整合介导序列人为地控制载体在宿主染色体上的整合位置与拷贝数。

ꕸ一般地说，酵母染色体的任何片段都可作为整合介导区，但最方便、最常用的单拷贝整合介导区是营养缺陷型选择标记基因序列。酵母基因组内的高拷贝重复序列(如rDNA、Ty序

列等)则可作为多拷贝整合介导区。

#### 4.有丝分裂稳定区：

ꮸ游离于染色体外的载体在宿主细胞有丝分裂时能否有效地分配到子细胞中去是决定转化子稳定性的重要因素之一。

ꮸ作用：当细胞有丝分裂时能帮助载体在母细胞和子细胞之间平均分配。常用的有丝分裂稳定区是来自于酵母染色体的着丝粒( centromere)片段。此外，来自酵母2μ质粒的STB( stability )片段也有助于提高游离载体的有丝分裂稳定性。

#### 5.表达盒(expression cassette)：

ꭸ是酵母基因表达载体最重要的构件，主要由转录启动子和终止子组成。如果需要外源基因的表达产物分泌，在表达盒的启动子下游还应该包括分泌信号序列。由于酵母对异种生物的转录调控元件的识别和利用效率很低，所以，表达盒中的转录启动子、分泌信号序列及终止子都应该来自酵母本身。

(1)启动子：

ꮸ是表达盒中的核心构件。酵母菌启动子长度一般在1~2 kb之间,启动子下游有转录起始位点和TATA序列，其上游调控序列包括:上游激活序列(upstream activating sequence, UAS)，上游阻遏序列(upstream repression sequence，URS)和组成型启动子序列等。

ꮸ一组被称为普遍性转录因子的蛋白质能识别转录起始位点及TATA序列，形成转录起始复合物。转录起始复合物决定了一个基因的基础表达水平。位于启动子上游的UAS、URS等序列分别与一些调控蛋白相结合，并和转录起始复合物相互作用，以激活、阻遏等方式调节基因的转录效率。

(2)终止子：

是决定mRNA 3‘末端形成效率的重要元件。酵母中mRNA 3’末端的形成与高等真核生物相似，也经过前体mRNA加工和多聚腺苷酸化反应。但是，在酵母中这些反应是紧密偶联的，而且就发生在基因3‘端的近距离内，所以酵母基因的终止子一般不超过500 bp。

(3) 分泌信号序列：

也称信号序列(signal sequence)，是前体蛋白N端一段17~30个氨基酸残基的分泌信号肽的编码区。

作用：引导分泌蛋白在细胞内沿着正确的途径转移到胞外，对于分泌蛋白翻译后加工和生物活性有重要意义。

酵母细胞能在一定程度上识别外源分泌蛋白的信号肽进行蛋白的输送和分泌表达产物，但其效率一般较低。故需要依赖酵母本身的分泌信号肽来指导外源基因表达产物的分泌。

常用的酵母分泌信号序列有α因子的前导肽序列、蔗糖酶和酸性磷酸酸酶的信号肽序列等。

### (二)酵母表达系统中载体的种类

酵母表达载体可根据载体在酵母中复制形式、载体的用途、载体表达外源基因的方式等来分类。其中按载体在酵母细胞中的复制形式标准进行分类，一般可以把它们分为YIp，YRp，YCp，YEp，和YAC等五类。

#### 1 YIp(yeast integration plasmid)型载体：

是一种整合型载体，它不含酵母的DNA复制起始区，不能在酵母中自主复制;但它带有整合介导区，可通过同源重组而整合入酵母基因组并随同酵母染色体一起复制。其同源重组过程有两种形式：单交换整合与双交换整合。

单交换整合(single cross-over integration)的结果通常是在整合转化子染色体的整合位点附近又增加了一份同源序列的拷贝，所以，已整合上去的载体有可能因这两份同源序列之间的重组又从染色体上切割下来。因自然发生的同源重组频率非常低，所以单交换整合转化子一般还是相当稳定的。在整合介导区用限制性内切酶将YIp型载体切成线形分子，可以大大增加整合效率。

双交换整合又称替换或置换(replacement/transplacement)：整合载体的一部分通过在两个不同位点与染色体发生同源重组而整合入酵母基因组，并同时置换下这两个位点间一段染色体DNA。

双交换整合的结果不会在整合位点附近形成同源序列的重复，避免了再次发生同源重组的可能性，转化子是非常稳定。

它的不足之处：一是转化频率很低( <102转化子/μgDNA)，二是它的整合拷贝数一般都很少(1~2个拷贝/每个细胞) ，因而其转化子对外源基因的表达量相对较低。如果用在酵母染色体上以多拷贝形式存在的DNA片段，如rDNA、Ty序列等作为整合介导序列构建整合载体，就可以大大提高整合的拷贝数和外源基因的表达水平。

#### 2. YRp(yeast replication plasmid)型载体

酵母自主复制型载体，它含有酵母基因组的DNA复制起始区，能在酵母染体外自主复制。YRp质粒的特点是转化效率高(103~4转化子/μgDNA)，并且每个细胞的质粒拷贝数可高达上百个。 由于这种类型的载体在细胞分裂时很难在母细胞与子细胞之间平均分配，而且大多滞留在母细胞内，即使在有选择压力的条件下，随着转化细胞不断地分裂繁殖，子代细胞中YRp质粒拷贝数也会迅速减少，最终导致整个群体的平均拷贝数变得很低(只有1~10个拷贝/细胞)。

YRp质粒虽然是一种较好的建库载体，也可作为实验研究的表达载体，但难以用于工业生产中高表达外源基因。

#### 3. YCp(yeast centromericplasmid)型载体：

酵母着丝粒载体，一种在YRp质粒结构基础上增加了一段来自酵母染色体着丝粒DNA片段的载体。由于酵母着丝粒的存在可以使这种载体在细胞分裂时就能像染色体那样在母细胞与子细胞之间平均分配，其转化子细胞每世代丢失质粒的频率不到1%，表现出高度的质粒稳定性。然而，与此同时它的DNA复制也受到严格地控制，每个细胞中的质粒拷贝数只有1~2个。

YCp质粒常用于构建基因文库，它特别适用于克隆和表达那些多拷贝时会抑制细胞生长的基因。

#### 4. YEp(yeastepisomalplasmid)型载体：

酵母附加体型载体，含有酿酒酵母2μ质粒DNA复制有关的部分或全部序列，2μ质粒序列的存在使这类载体有很高的转化效率(约103~4转化子/μgDNA)。野生型的2μ质粒在酵母细胞中非常稳定，每个细胞中的拷贝数可以高达60-100。

在对2μ质粒DNA的结构和功能做了大量研究后，知道2μ质粒的SnaBI位点附近为一非必要区。将构建酵母载体的所有其他构件都插入这个位点，就能保持与质粒的完整功能，从而使其成为一个高稳定、高拷贝的Yp型载体。

#### 5. YAC (yeast artificial chromosome)型载体：

酵母人工染色体型载体，具有酵母染色体的主要构件包括酵母染色体自主复制序列(ARS)、着丝粒序列(CEN)和端粒序列(TEL)。

导入酵母细胞的YAC 载体以线性双链DNA形式存在，具有高度的遗传稳定性。但是，YAC载体的复制受细胞分裂周期的严格控制，一般每个细胞中都只有单拷贝。YAC载体可以插入大至50 kb的DNA片段，因此，它可用于高等真核生物基因组DNA的克隆。

此外，近年来的研究表明YAC载体或经过修饰的YAC载体还可以导入哺乳动物细胞或人的细胞。将人的生长激素基因插入一个210 kb大的YAC载体，然后导入大鼠，获得了能高

表达人生长激素的转基因大鼠。 以一个含人着丝粒DNA的YAC载体为基础，再插入人的端粒DNA和选择性标记，然后导入培养的人HT-1080细胞，结果证明导入的人工染色体可以在人细胞中稳定地自主复制。这些结果可能会在转基因动物及基因治疗方面得到应用。

### (三)酵母菌基因表达系统的宿主

酵母是一类种类繁多的生物资源，已知有80个属约600多种，数千个分离株。但是，作为基因表达系统的宿主应该具备一定的条件，这些条件是：

1) 安全无毒，不致病。

2)有较清楚的遗传背景，容易进行遗传操作。最好已具有较好的分子生物学的研究基础。

3) 容易进行载体DNA的导入。就已试验的酵母菌而言，一般都能实现载体DNA的转化。由于DNA转化技术的不断发展，只要对转化条件进行优化，多数酵母菌可以取得较高的

转化效率。

4) 培养条件简单，容易进行高密度发酵。

5) 有良好的蛋白质分泌能力。

6) 有类似高等真核生物的蛋白质翻译后的修饰功能。

两个重要的酵母表达系统：

酿酒酵母(Saccharomycescerevisiae)表达系统

嗜甲醇酵母(巴氏毕赤酵母，Pichiapastoris)表达系统

#### 酿酒酵母(Saccharomycescerevisiae)

是最符合上述条件的酵母，因此被最早发展成为基因表达系统的宿主。至今已广泛被用来表达各种各样的外源基因。

用酿酒酵母表达的乙型肝炎疫苗(Merck公司)、人胰岛素(Novo-Nordisk公司)和人粒细胞集落剌激因子(Immunex公司)都已成为正式上市的基因工程产品。

酿酒酵母不足之处：

①发酵时会产生乙醇，乙醇的积累会影响酵母本身的生长，因此较难进行高密度发酵。

②蛋白质的分泌能力较差。

③虽然能进行蛋白质的糖基化修饰，但是和高等真核生物的相比所形成的糖基侧链太长。这种过度糖基化可能会引起副反应。

#### 巴斯德毕赤氏酵母(Pichiapastoris)表达系统：

可以使发酵密度达到很高的水平；分泌外源基因表达产物的能力强；糖基化修饰功能更接近高等真核生物。比较好的互补了酿酒酵母的不足。

Pichiapastoris表达系统的缺点:

①分子生物学的研究基础差，要对其进行遗传改造困难较大。

②不是一种食品微生物，发酵时又要添加甲醇，所以，要用它来生产药品或食品还没有被广泛接受。

③发酵虽然能达到很高的密度，但是发酵周期一般较长。

酿酒酵母表达系统

YEP(yeast episomalplasmid,酵母附加体质粒)

YIP(yeast integrative plasmid,酵母整合质粒)

嗜甲醇酵母(巴氏毕赤酵母，Pichiapastoris)表达系统

能够以甲醇为唯一碳源

含有乙醇氧化酶（alcohol oxidase, AOX）

（乙醇氧化酶与氧的结合能力弱，因此需求量高，从而乙醇氧化酶基因的启动子活性很强）

嗜甲醇酵母(巴氏毕赤酵母, Pichiapastoris)表达系统载体

pPIC3.5k

pPIC9k

pAO815

载体共同点

5′AOX1(aldehyde oxidase1)：含有AOX1启动子，可调控异源蛋白表达，同时也是载体和受体菌染色体发生重组的位点；

MCS：多克隆位点，允许目的基因插入；

TT：转录终止和多聚腺苷酸化序列，允许mRNA有效转录终止和多聚腺苷酸化；

3’AOX1：TT序列下游区域，同源重组位点之一；

His：编码组氨酸，提供转化子的筛选标记，也是重组位点之一；

Amp：氨苄抗性基因，允许在大肠杆菌中筛选。

各载体特点

载体pPIC3.5K和pPIC9K，携带有卡那霉素基因，使得甲醇酵母阳性转化子能抗卡那霉素，有助于筛选。

载体pPIC9K上带有Signal，编码α因子Ｎ末端信号肽序列，可引导蛋白分泌。

载体pAO815在5′AOX1-MCS-TT的两端为BglII和BamHI位点，BglII和BamHI为同尾酶，酶切片段可以相互连接。目的基因插入MCS后，得到携带单拷贝目的基因的表达质粒1。表达质粒1可以用BglII和BamHI双酶切回收目的基因表达盒，该表达盒又可以再次插入表达质粒1的BglII切点或者BamHI切点，得到携带两拷贝目的基因的表达质粒2,构建串联的目的基因多拷贝，在转化受体酵母菌后能实现目的基因的多拷贝表达。

整合

导入酵母体内的重组表达载体只有和酵母染色体上同源区发生重组，整合到染色体上，目的基因才能够稳定存在，目的蛋白才能得到稳定表达。

5′AOX1，3′AOX1 和Ｈis (组氨酸)为整合区。同源重组有时会产生多拷贝整合,一般占转化子的1%～10%。一个拷贝整合到染色体上以后，整合位点依然存在，另外的拷贝又可整合上去。

通过提高Ｇ418浓度，容易得到高拷贝表达。

转化方法

原生质体方法

电转法

PEG法

LiCL法

嗜甲醇酵母表达系统的优点

真核:翻译后的加工和修饰；

营养要求低，生长快，培养基廉价，便于工业化生产；可高密度发酵培养；

表达量较高，在酿酒酵母中，EGF的表达量为7.4μg/ml，在甲醇酵母中，上发酵罐发酵时表达量为450 μg/ml，表达量提高约60倍；

表达的蛋白既可存在于胞内，亦可分泌至胞外。甲醇酵母自身分泌的蛋白(背景蛋白)非

常少，十分有利于纯化。

### (四)外源基因在酵母中的高表达

⳸1. 提高和控制外源基因的转录水平

⳸筛选高效启动子。和糖酵解有关的酶在细胞中的含量特别高，所以筛选和克隆糖酵解有关的酶的基因首先成为大家的目标。已有的磷酸甘油酸激酶基因启动子(PGK1) ，甘油醛磷酸

脱氢酶基因启动子(GAPDH或GAPl)是目前最强的启动子，用这两个启动子已高效表达了许多有用的外源基因，如：人α干扰素、牛凝乳酶、免疫球蛋白和HIV抗原、乙型肝炎病毒表面抗原及核心抗原、人SOD和人表皮生长因子等。

2. 提高表达载体在细胞中的拷贝数和稳定性：

⫸表达载体在细胞中的拷贝数对外源基因在酵母中的表达有明显的影响。用LacZ为报告基因，以LEU2基因为选择标记及整合介导序列得到了整合拷贝数不同的转化子。研究发现当整合拷贝数在1~7时，表达的β-半乳糖苷酶活性和拷贝数呈正相关，但是一个拷贝数为11的转化子表达的β-半乳糖苷酶活性并不比7拷贝的转化子高。

⫸酿酒酵母和一些其他酵母有多拷贝的内源质粒。以这类质粒为基础可以建成高拷贝表达载体。

3. 提高外源基因在酵母系统表达水平的真他因素

其中包括采取提高翻译效率的措施，如：优化翻译起始区前后mRNA的二级结构，在外源基因中尽量选用酵母偏爱的密码子等；避免表达产物在细胞内的降解；选择或改造宿主，如采用二倍体宿主、采用酿酒酵母以外的酵母菌作为宿主；优化工程菌发酵工艺，如提高发酵密度、控制发酵阶段和发酵时间等

酵母表达系统已经使外源基因的表达量得到相当高的水平，这使本来很难得到的生物活性蛋白质有可能开发成为新药。

为了使由酵母表达的产物在结构上尽可能地与天然产物的一致。这就是表达产物的可靠性( authensicity)问题。影响表达产物可靠性的因素很多，其中包括：

①外源基因在表达系统中的遗传稳定性。

②不同生物在蛋白质合成、加工和修饰功能上的差别。

③产物在短时间的过量表达等。

### (五)提高外源基因表达产物的质量

1.表达系统的遗传稳定性

㍸Bussinean等(1994)认为在表达系统中突变事件经常会发生。如果表达载体以多拷贝形式存在，在表达系统中发生的极大多数突变并不会对表达产物产生影响。但是，有时由于这种突变不仅影响产物的结构，同时还会使带突变的酵母细胞具有生长优势。在高密度发酵条件下，随着发酵时间的延长，这种突变表达产物的比例就会逐渐增加。

2. 胞内表达产物的加工和修饰

细胞内表达产物的加工和修饰包括：N端甲硫氨酸残基的去除，氨基端的乙酰化，羧端的甲基化、豆寇酰化(myristylation)、法呢酰化(farnesylation)及多亚基的聚合等。

Ecker等(1989)和Sabin等(1989)采用以Uiquitin融合方式来表达胞内蛋白质，结果不仅提高了表达水平，而且，由于ubiquitin水解酶的作用可以完全避免在表达产物氨基端会有甲硫氨酸残基存在的问题。

Hallewell等(1987)在用酿酒酵母表达人SOD时得到与天然人SOD一样的乙酰化氨基未端。说明酵母具有使胞内表达的外源基因产物在氨基端进行乙酰化的能力。

3.分泌表达产物的加工和修饰

酵母可以对很多外源基因进行分泌表达。分泌表达可以提高表达水平，简化表达产物的纯化步骤，还可以使表达产物通过分泌途径完成一系列的加工和修饰，这对保证表达产物的天然活性是十分重要的。酵母表达的单链抗体、人胃脂肪酶、成纤维细胞胶原酶、白介素-8 都具有与天然产物相同的活性。

组织蛋白酶B 不能在大肠杆菌和昆虫细胞系统中表达，但是可以在酵母细胞中分泌表达出活性很好的产物。说明酵母细胞有一定能力通过分泌途径进行蛋白质的翻译后修饰。

## 三、基因工程菌的稳定性

基因工程菌在传代过程中常出现质粒不稳定的现象。

质粒不稳定可分为：

分裂不稳定

结构不稳定

分裂不稳定：指工程菌分裂时出现一定比例不含质粒子代菌的现象。

结构不稳定：指外源基因从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能的改变。

质粒不稳定产生的原因

常见分裂不稳定的两个因素：

⑴含质粒菌产生不含质粒子代菌的频率；

⑵这两种菌比数率差异的大小。

对同一工程菌控制不同的比生长数率可改变质粒的拷贝数：

低拷贝质粒工程菌产生不含质粒子代菌频率高，如增加工程菌质粒拷贝数可提高稳定性；

高拷贝质粒工程菌产生不含质粒子代菌频率低，但对结构稳定性不利。

质粒稳定性分析方法

样品

不含抗性标记抗生素平板培养基

含抗性标记抗生素平板培养基

统计生长菌落数

重复三次,计算比值

(稳定性stability)

10～12h

10～12h

100个菌落

提高质粒稳定性的方法

为了提高质粒稳定性，工程菌培养采用两阶段培养法：

⑴先使菌体生长至一定密度；

⑵再诱导外源基因的表达.

由于第一阶段外源基因未表达，减小了重组菌与质粒丢失菌的生长速率的差别，增加了质粒稳定性。

在培养基中加入抗菌素抑制质粒丢失菌的生长，提高质粒稳定性。

调控环境参数如温度、pH、培养基组分和溶解氧浓度。

有些含质粒菌对发酵环境的改变比不含质粒菌反应慢，间歇改变培养条件以改变两种菌比生长速率，可改善质粒稳定性。

通过间歇供氧和改变稀释数率，都可以提高质粒稳定性。

## 四、基因工程菌生长控制

菌体的生长通常用比生长速率来表示。

工程菌培养可通过选用不同的碳源控制补料和稀释速率等方法来控制菌体的生长。

控制菌体的生长对提高质粒的稳定性、减少代谢副产物积累、提高外源蛋白产率有重要意义。

䶸大肠杆菌的蛋白/菌体量的比值是基本恒定的，因而菌体的生长速度反映了蛋白质的合成速度。

䶸培养条件的改变，都会改变菌体的能量代谢和小分子前体的供应，影响生物大分子的和成和菌体的生长。

菌体的生长与能量的关系

䶸碳源物质是组成培养基的主要成分。

䶸碳源物质为细胞提供能量，当菌体生长所需能量大于菌体有氧代谢提供的能量时，菌体会产生乙酸，导致培养基的pH值下降，从而影响菌体的生长。适当提高pH，可减少乙酸的抑制作用

分批培养中选择不同的碳源，连续培养中控制稀释速率等都能一定范围内控制菌体的生长，从而控制乙酸的产生，减少它的抑制作用。

加入蛋氨酸和酵母提取物都能减少乙酸的产生。

大肠杆菌中克隆携带氧能力的VHB蛋白的基因可提高菌体生长速率。

VHB蛋白(透明颤菌血红蛋白)：来自专性好氧的革兰氏阴性细菌透明颤菌属的一种同源双亚基血红蛋白，其基因的转录受生境中氧浓度的调节。当这种蛋白在多种原核及真核生物中表达时，具有促进生长和提高各种有用代谢产物的作用。

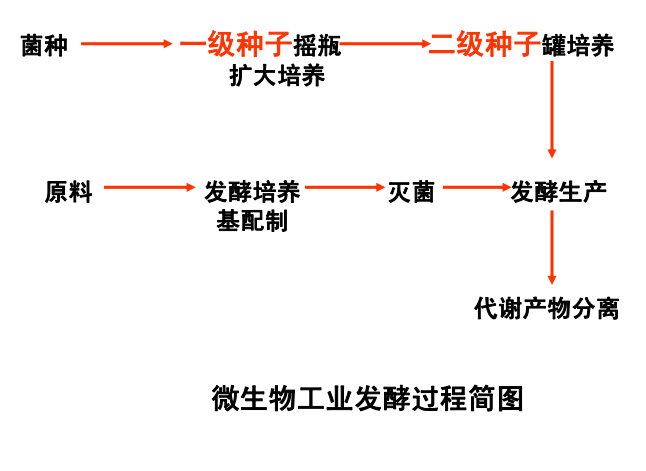
采用磷酸乙酰化酶缺陷株作为宿组主细胞，阻止乙酸产生，可提高产量。

## 五、基因工程菌发酵

基因工程菌的培养过程包括:

⑴通过摇瓶操作基因工程菌生长的基础条件,如温度、pH、培养基各种组分、碳氧比，分析表达产物的合成、积累对受体细胞的影响;

⑵通过培养罐操作确定培养参数和控制方案以及顺序。



基因工程菌的培养方式

①补料分批培养；

②连续培养；

③透析培养；

④固定化培养。

补料分批培养

补料分批培养是将种子接入发酵反应器中进行培养,经过一段时间后间歇或连续地补加新鲜培养基，使菌体进一步生长的方法。

发酵工艺

基因工程菌的发酵与传统的微生物发酵不同,基因工程菌带外源基因,发酵的目的是使外源基因高效表达。它不仅涉及宿主载体和克隆基因之间的相互关系还和环境有关。

工艺要求

外源基因既高效表达，又有利于产品分离纯化。对发酵影响较大的几个因素有：

培养基的影响；

接种量的影响；

温度的影响

溶解氧的影响；

诱导时机的影响；

pH的影响;

①培养基的影响

培养基的组成既要提高工程菌的生长速率，又要保持工程菌的稳定性，使外源基因高效表达。常用的碳源有：葡萄糖、甘油、乳糖、甘露糖、果糖等。常用的氮源有：酵母提取液、蛋白胨、酪蛋白水解物、玉米浆、氨水、硫酸铵、氯化铵等。还有无机盐、维生素等。

不同的碳源对菌体的生长和外源基因表达有较大的影响。使用葡萄糖和甘油对菌体比生长速率及呼吸强度相差不大。但使用甘油菌体得率较大，而使用葡萄糖菌体产生的副产品较多。葡萄糖对lac启动子有阻遏作用。乳糖对lac启动子有利。

在氮源中，酪蛋白水解物有利于产物的合成与分泌。色氨酸对trp启动子控制的基因有影响。

无机磷在许多代谢反应中是一个效应因子，磷浓度不同，影响菌体生长。

②接种量的影响

接种量是指移入的种子液体积和培养液体积的比例。接种量的大小影响发酵的产量和发酵周期。接种量小，菌体延迟期较长，使菌龄老化，不利于外源基因表达。接种量大，可缩短生长延迟期，菌体迅速繁衍，很快进入对数生长期，适于表达外源基因。接种量过高，使菌体生长过快，代谢物积累过多，反而会抑制后期菌体的生长。

③温度的影响

温度对基因表达的调控作用发生在复制转录翻译和小分子调节分子的合成等水平上。

温度对发酵过程的影响是多方面的。它影响各种酶的反应速度，改变菌体代谢产物的反应方向，影响代谢调控机制。

适宜的发酵温度是既适合菌体的生长，又适合代谢产物合成的温度。高温或低温都会使发酵异常，影响终产物的形成并导致减产。

温度还影响蛋白质的活性和包含体的形成。

④溶解氧的影响

对于好氧发酵,溶解氧浓度是重要的参数。好氧微生物利用溶解于培养液中的氧气进行呼吸。若能提高溶氧速度和氧的利用率，则能提高发酵产率。发酵时，随DO2浓度的下降，细胞生长减慢，ST值下降，发酵后期下降幅度更大。

外源基因的高效表达需要大量的能量，促进细胞的呼吸作用，提高对氧的需求。

维持较高的DO2值，才能提高工程菌的生长，利于外源蛋白产物的形成。

采用调节搅拌转速的方法,可改变培养过程中的氧供给，提高活菌产量。

⑤诱导时机的影响

对于λPL启动子型的工程菌，使用cI阻遏蛋白的温度敏感型突变株（clts857），在28～30 0C下培养时，该突变体能合成有活性的阻遏蛋白阻遏PL启动子的转录；

当温度升高42 0C时，该阻遏蛋白失活，使启动子启动转录，提高目的基因的表达效率。一般在对数生长期或对数生长后期升温诱导表达。

在对数生长期，细胞快速繁殖，直到细胞密度达到10 9/个为止，这时菌体数目倍

增，对营养和氧需求量急增，营养和氧成了菌群旺盛代谢的限制因素。

⑥pH的影响

pH对细胞的正常生长和外源蛋白的高效表达都有影响，所以应根据工程菌的生长和代谢情况，对pH进行适当的调节。

如采取两段培养工艺，培养前期重点是优化工程菌的生长条件，其最佳pH在6.8～7.4左右;培养后期重点是优化外源蛋白的表达条件,其最佳pH为6.0～6.5。

总之,最佳化的工艺是获得:

最快周期、最高产量、最好质量、

最低消耗、最大安全性、最周全的废物

处理效果、最佳速度和最低失败率等。

## 六、培养设备

应用发酵罐大规模培养基因工程菌。它不同于微生物发酵，微生物发酵目的是为了获得初级或次级代谢产物，细胞生长并非主要目标，而基因工程发酵是为了获得最大量的基因表达产物。

发酵罐的组成有：

发酵罐体、保证高传质作用的搅拌器、精细的温度控制和灭菌系统、空气无菌过滤装置、残留气体处理装置、参数测量与控制系统、培养液配制和连续操作系统。

对发酵罐要求：

提供菌体生长最适生长条件;

培养过程不得污染;

保证纯菌培养;

培养及消毒过程不得游离异物，不能干扰细菌代谢活动等.

# 第五章 动物细胞生产基因工程药物

## 一、动物细胞培养

常用培养试剂

MEM(Eagle)：含有12种必需氨基酸、谷氨酰胺、8种维生素，广泛适用于各种已建成细胞系的培养。0.22 um微孔滤膜抽滤除菌。

DMEM：在MEM基础上，各营养成分用量加倍。又分高糖(1000mg\L)和低糖(400mg\L)2种。

RPMI1640：可高压灭菌(不含谷氨酰胺),灭后，再补加谷氨酰胺。

用干粉培养基制备培养液时，常需添加NaHCO3(母液7.5％)。可用稀酸、稀碱调节pH，一般在7.2左右。亦可加HEPES缓冲pH。

细胞培养液还需添加小牛血清：维持液2－5％，生长液8－10％。

另加双抗：青霉素G钠盐(终浓度100单位\mL，储存液1万单位\mL)，链霉素(100ug\mL或100单位\mL)

消化液与平衡盐溶液

1．消化液

胰蛋白酶：0.25％或0.125％，过滤除菌。

EDTA：二乙胺四乙酸二钠，0.02％，高压灭菌。

EDTA亦可与胰蛋白酶1：1或2：1混合并用。

2．Hanks平衡盐溶液(克/ 升)

无水CaCl20.14 KCl0.4

KH2PO4 0.06 MgCl2.6H2O 0.10

MgSO4.7H2O 0.10 NaCl8.0

Na HCO30.35 Na2HPO4.7H2O 0.09

葡萄糖1.0 酚红0.01

血清的作用

1.细胞生长增殖所需的生长因子和激素

2.细胞贴壁所需的贴附因子和伸展因子

3.可识别金属、激素等的结合蛋白

4.细胞生长所需的脂肪酸和微量元素

消化与传代

吸出培养瓶中培养基，注入消化液(覆盖细胞)，37℃或室温作用3－5分钟，终止消化(若消化过度，细胞完全脱落，可以离心分离细胞)。吸出或倒出消化液，用适量Hanks液轻轻洗涤。加入适量培养液，用吸管反复轻轻吸营养液、吹瓶壁细胞。镜下观察瓶壁应无细胞。将细胞悬液分装3个培养瓶，每瓶补加适量培养基，37℃恒温培养箱中培养。

冻存与复苏

原则:慢冻快融

冻存:90％培养液＋10％DMSO(或甘油),注意液氮伤眼

复苏:取出冻存细胞，快速放入37℃水浴中融化,800rpm低速离心5分钟,弃上清。用培养液漂洗沉淀,离心。加适量培养液(血清含量丰富)重悬,移入培养瓶中,37℃培养.

细胞培养要素控制

容器内生长表面的选择和处理(静置贴壁培养)：细胞培养容器的生长表面为玻璃、塑料、不锈钢(或钛)。玻璃应选用明矾-硅硼酸钠玻璃(例如Pyrex)，反复使用会减少细胞的贴壁，用1mmol/L醋酸镁处理能获恢复；塑料表面常用聚苯乙烯，此外还可用聚乙烯多聚碳酸盐、聚四氟乙烯(Teflon)玻璃纸及醋酸纤维素等；不锈钢(或钛)对细胞生长是合适的，但处理和清洗时要用酸洗(10%硝酸、3.5%氟氢酸、86.5%水)除去表面污物。

为了利于细胞贴壁，培养表面要求使用糖蛋白和/或二价阳离子(Ca2+、Mg2+)交联，研究最多的糖蛋白为纤粘素。培养表面也可用胶原以及多聚氨基酸覆盖壁表面。

细胞培养注意事项

严防污染(房间，工作台，器物，手等，注意器物放置角度)(培养液无菌检测).

消化适度.

传代适时(细胞至对数生长期：在瓶壁上铺八成满或刚刚长成单层。若近期不拟传代，可用维持液保证缓慢生长).

单层贴壁培养的缺点

传代、扩大培养比较困难，生产规模受限制。

细胞取样、计数较困难。

在测定和控制pH和O2以及细胞完全同质性比较困难。

占用的空间大。

所用培养瓶(管)因瓶(管)口多，传代换液需开口操作，容易发生污染。

贴壁－悬浮培养

微载体(microcarrier)

包埋(entrapment)

微囊(microencapsulation)

微载体细胞培养法

最早使用离子交换凝胶(DEAE-SephadexA50)作载体，轻微搅动即可悬浮,细胞贴附于载体上进行生长。既可大大增加细胞附着面积，又使细胞能与培养基充分接触，达到大量培养细胞的目的。

微载体

是指直径在60-250μm，能适用于贴壁细胞生长的微珠。一般由天然葡聚糖或者各种合成的聚合物组成。常用商品化微载体有三种：Cytodex1、2、3，Cytopore和Cytoline。

微载体的大小：增大单位体积内表面积（S/F）对细胞生长非常有利。使微载体直径尽可能小，最好控制在100-200μm之间。

微载体的密度：一般为1.03-1.05g/cm2，随着细胞的贴附及生长，密度可逐渐增大。

微载体培养优点

面积/体积(S/V)大，因此单位体积培养液的细胞产率高；

把悬浮培养和贴壁培养融合在一起，兼有两者的优点；

可用简单的显微镜观察细胞在微珠表面的生长情况；

简化了细胞生长各种环境因素的检测和控制，重现性好；

培养基利用率较高；

放大容易；

细胞收获过程不复杂；

劳动强度小；

培养系统占地面积和空间小。

包埋法

将细胞包埋在多孔载体内部制成固定化细胞的方法称为包埋法(entrapment)。

优点：步骤简便、条件温和、负荷量大、细胞泄漏少，抗机械剪切。

缺点：扩散限制，并非所有细胞都处于最佳基质浓度，且大分子基质不能渗透到高聚物网络内部。

一般适用于非贴壁依赖型细胞的固定化，常用载体为多孔凝胶，如琼脂糖凝胶、海藻酸钙凝胶和血纤维蛋白。

微囊法

是用一层亲水的半透膜将细胞包围在珠状的微囊里，细胞不能逸出，但小分子物质及营养物质可自由出入半透膜；囊内是种微小培养环境，与液体培养相似，能保护细胞少受损伤，故细胞生长好、密度高。

微囊直径控制在200-400μm为宜。

制备中应注意：

温和、不损伤细胞，尽量在液体和生理条件下操作；

所用试剂和膜材料对细胞无毒害；

膜的孔径可控制，必须使营养物和代谢物自由通过；

膜应有足够机械强度抵抗培养中的搅拌。

悬浮培养基中的添加剂

通常将纤维素(羟甲基纤维钠)加入悬浮培养基中(0.11%浓度)以防止搅拌、通气和灌注时对细胞产生机械损伤(预先应做毒性预试验)。

通常将消泡剂pluronicF=68(polyglgcol)(BASF, wyandot)加入培养液中(0.11%浓度)，可防止血清在搅拌通气中产生泡沫，也可阻止细胞贴壁(预先应做毒性预试验)。

培养条件

温度：通常选择36℃±0.5上下波动进行控制，培养液要事先预温。

pH：理想的pH值为7.2，常加入Hepes以稳定pH。

细胞生长期的选择：对数生长期后期的细胞接种。

接种细胞密度：5×104～2×105细胞/mL或5×103～2×104细胞/mL。

搅拌速度：对于悬浮细胞可用200～350 r/min 之间，而微载体培养细胞通常使用20～100 r/min 范围之内。

培养基和营养物质的选择

悬浮培养常用Eagle(MEM)血清成分为2～5%，但谷氨酰胺需不断补充，同时可补充胱氨酸、精氨酸，培养2～3天后还应补加葡萄糖以利细胞稳定生长.

为了加速生长，可加入适量生长因子、激素等，如：胰岛素（5mg/L）、转铁蛋白（5～35mg/L）、胆胺（20μmol/L）及硒（5μg/L）等.

Ca2+、Mg2+应尽量降低，以防细胞结团、贴壁、下沉，也可采用补加胰蛋白酶(2mg/L)予以克服.

培养系统的控制

(1) pH：一般培养液含25mmol/L NaHCO3，要选用5%CO2来平衡（通气口安装气体过滤器），培养系统中常安装有经高压灭菌的pH 检测探头，将信号输入控制器，然后换成数字pH 显示。pH 调节是由pH 值调控板上的高或低点的接点，接通后能起动泵或螺线管活塞上的中继器，使酸或碱(5.5%NaHCO3)自动加入培养液中以调整pH ，加入时应提高搅拌速度，以防局部浓碱损害细胞。通常加入Hepes。

（2）通气调控系统：维持较大的上方空间是很重要的。

## 二、细胞的要求和获得

1. 生产用动物细胞的要求

原代细胞

二倍体细胞系

转化细胞系

2. 生产用动物细胞的获得

原代细胞

是直接取自动物组织器官,经过粉碎消化而获得的细胞悬液(10 9/g)，需要大量动物，费钱费劳力。鸡胚细胞、原代兔肾细胞、鼠肾细胞、淋巴细胞。

二倍体细胞系

原代细胞经过传代筛选克隆从多种细胞成分的组织中，挑选并纯化出，某种具有一定特征的细胞株。

二倍体细胞有正常细胞的特点

染色体组型是2n核型；

贴壁依赖接触抑制；

可传代培养50代；

无致瘤性。

转化细胞系

通过某个转化过程形成的，常由于染色体断裂变成异倍体，失去正常细胞特点，而获得无限增殖能力。转化过程可以是自发的、人工的，或从肿瘤组织中形成的。

W1-38

CHO-K1

BHK21

Vero

Sf-9

3、生物技术药物几种常用生产用动物细胞系

几种常用生产用动物细胞系特性

W1-38：

正常胚肺组织人二倍体细胞系，核型为2n=46。成纤维细胞，能产生胶原，培养基用BME (Eagle’Basal medium)。10%小牛血清，pH7.2，同工酶为G6PD B型。倍增时间为24h，有限寿命50代，安全。

CHO-K1

从中国地鼠卵巢中分离的上皮样细胞。核型：2n=20～22。培养基：DEME培养基，0.1mmol/L次黄嘌呤，0.1mmol/L胸苷，10%小牛血清，加入脯氨酸。

BHK-21

从5只无性别的生长1天的地鼠幼鼠肾脏中分离的;成纤维样细胞,核型为2n=44;培养基为DMEM加7%胎牛血清。用于增殖病毒，包括多瘤病毒、口蹄疫病毒、狂犬病毒等并制作疫苗，现已用于工程细胞构建。

Vero

从正常成年非洲绿猴肾脏分离的。为贴壁依赖的成纤维细胞，核型2n=60；培养基为199培养基，加5%胎牛血清；用于增殖病毒，包括多瘤病毒、脊髓灰质炎、狂犬病毒。

Sf-9

1983年从亲代IPLB—SF21AE中克隆形成。亲代细胞从秋粘虫的蛹卵组织中分离获得。它对苜宿尺蠖核型多角体病毒和其它杆状病毒高度敏感。通常用的培养基为Grace培养基，添加3.3g/L 水解乳蛋白和3.3g/L酵母浸液, 10%胎牛血清。用于高效表达外来蛋白制品。

SP2/0-Ag14

通过融合的方法，从有羊抗红细胞活性的BALB/c小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞系P3X63Ag8融合杂交瘤SP2/NL-Ag 亚克隆中分离获得，能耐受8氮鸟嘌呤20μg/ml但在含HAT 选择培养基中不能存活。通常用培养基为DMEM，添加10%胎牛血清。用于生产单抗杂交瘤细胞和抗体。

## 三、基因工程细胞构建和筛选

在生产中采用更多的更有前景的是融合细胞及采用基因工程构建的各种工程细胞。

被用构建工程细胞的动物细胞有：

CHO-dhfr、BHK-21、Namalwa、Vero、SP2/0、Sf-9 等细胞。

⒈真核细胞基因表达载体的构建

使用的载体有两类：

㈠病毒载体

牛痘病毒、腺病毒、逆转录病毒、杆状病毒

㈡质粒载体

牛痘病毒：用构建多价疫苗；

腺病毒、逆转录病毒：用于基因治疗。

杆状病毒：用于外源基因表达。其作为载体的优点：

①双链DNA，易重组；②插入7～8kb DNA不影响正常病毒粒子的形成；③多角体蛋白和病毒粒子的形成无直接关系，因此用外源基因更换多角体蛋白基因，仍能形成有感染力病毒粒子；④多角体蛋白基因有非常强的启动子，产生的蛋白质可占全部蛋白质的20%～30%；⑤用光学显微镜可看到多角体，可以此作为标记物，选阳性克隆；⑥如用家蚕杆状病毒，还可在蚕体表达外源基因。

质粒载体：

在细菌和哺乳动物细胞体内都能扩增。

都含有如下基本成分：①允许载体在细菌体内扩增的质粒序列。②含有使基因表达的调控元件。③能用以筛选出外源基因已整合的选择标记。④有时还带有选择性增加拷贝数的扩增系统。

基因载体导动物细胞常用方法是：

磷酸钙沉淀法

电穿孔法

磷酸钙沉淀法

溶解的DNA 加Na2HPO4和CaCl2 形成磷酸钙沉淀，DNA被包在磷酸钙沉淀中，形成DNA—磷酸钙共沉淀物，当和细胞表面接触时，则通过细胞吞噬作用而将DNA导入。

电穿孔法

借助电穿孔仪的高压脉冲电场，使细胞膜出现瞬时可逆性小孔，外源DNA沿小孔进入细胞。转化率较高，拷贝数低。

细胞库的建立

生产用的工程细胞必须建立两个细胞库：

原始细胞库

生产用细胞库

⒈原始细胞库

贮存时须有该细胞的详细挡案，包括：①该细胞系的历史；②该细胞系的特性；③对各种有害因子的检查结果.

⒉生产用细胞库

从原始细胞库来的，或从单一安瓶来，或从多个安瓶来即刻混合，经培养扩增再分装储存形成细胞库。

需建挡案，进行无菌性无细胞交叉污染的检查。需确定最高使用的传代数。

干细胞(Stemcell)

具有无限分裂能力，同时亦可分化成特定组织细胞，在细胞生物发育阶段属于较原始时期的细胞。

全能性干细胞：每一个细胞均可发育成一个完整的生物个体。一个受精卵分裂成为两个完全相同的细胞，二个细胞分裂成为四个细胞、八个细胞。八个细胞中任何一个细胞单独放入子宫中均可发育成为完整的个体，这种细胞即称为全能性干细胞。所谓同卵双胞胎、三胞胎、四胞胎，即为受精卵分裂成两个或四个全能性干细胞后，每个细胞单独发育。

多能性干细胞：具有非完全能力的，受部份限制。

# 第六章 生物技术蛋白质药物分离纯化与质量控制

## 一、蛋白质药物分离纯化

（要求能够根据给定条件设计分离纯化的工艺流程）

1.粗分级；精细纯化

2. 生化技术手段的组合与衔接原则

生物技术蛋白质药物特点

初始物料组成复杂

目的产物含量较低

稳定性差

质量、纯度要求较高

一般流程

细胞收集：离心；膜过滤

细胞破碎：机械（超声；高压匀浆；高

速珠磨；高压挤压）；酶溶法

固液分离：离心；膜过滤

目的产物分离纯化：生化技术

\*亲和层析Affinity chromatography(AC)

选择性最强；

不放在第一步；否则：

杂质多，寿命短；

体积大，介质贵

\*\*凝胶过滤

凝胶过滤色谱主要用途

脱盐，换缓冲液

分级分离(杂蛋白分子量一般大于30KD)(细胞因子分子量一般约15KD)(300-500bp;100多个氨基酸)

产品成形前去除多聚体或降解产物，避免不均一性

规模小，速度慢，一般放最后

\*\*\* 疏水色谱Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

separates biomoleculesaccording to hydrophobicity

HIC主要特点及用途

介质疏水基团：苯基、辛基

蛋白质疏水区域：苯丙氨酸、丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸侧链

高盐吸附（类似盐析）

低盐洗脱

盐析样品不宜于离子交换，可直接疏水色谱

离子交换(Ion exchange)

蛋白质是两性分子；若在低pH范围稳定，带正电，用阳离子交换剂；若在高pH范围稳定，带负电，用阴离子交换剂；

等电点处于极端位置：pI<5或者pI>8的基因工程产物首选离子交换色谱；

盐析-疏水色谱；离子交换-疏水色谱

The higher the net charge, the higher the salt concentrationrequired for desorption

离子交换色谱Ion exchange chromatography (IEX)

阴离子交换树脂阳离子交换树脂

选择分离纯化方法的依据

产物表达形式：包含体

分离单元衔接：

沉淀、超滤；

离子(疏水)、亲和；

凝胶层析

## 二、基因工程药物质量控制

1.基因工程药物生产质量管理规范

2.蛋白质药物目标产品的质量控制

### 1. 生产质量管理规范

药品生产质量管理规范，即:good manufacturing practices for drugs, 简称GMP。1962年FDA首先提出GMP作为药品质量管理的法定性文件。1969年世界卫生组织也公布了药品生产和质量管理规范(good practices for the manufacture and quality control of drugs)。

我国于1988年3月，卫生部批准颁布了《药品生产质量管理规范，2002年原国家药品监督管理局颁布《药品生产质量管理规范认证管理办法》。

现行GMP可分为三类:

第一类是国际性标准(international standard)，如WHO、欧洲共同体、东南亚国家联盟公布的GMP;

第二类是国家标准(national standard), 各个国家政府所组织制定并颁布的;

第三类是行业性标准(professional standard),如美国制药联合会制定的GMP，日本等国也有他们的行业协会制定的GMP，这类行业GMP标准往往较国家颁布的GMP标准更严格。

只有国家政府制定并颁布的GMP为国家标准，为该国强制实行的标准，其余皆为推荐标准。

生物制品生产质量管理基本要求

机构与人员

对从事高生物活性、强污染、高放射性及有特殊要求的药品、生物制品生产人员和质量检验人员应有相应专业技术培训和安全防护培训。

对从事生物制品生产、设备保养、检定及试验动物管理的所有人员都应进行相应疫苗预防接种，定期进行活动性结核及有关器质疾病检测。

厂房与设施

整洁、不会造成污染，不得相互妨碍。

合理布局。

应有防止交叉污染的措施。

分开保存、分开罐装。

保持相对负压。

重组产品生产工艺流程及环境区域划分示意见图

### 2. 蛋白质药物的质量控制

产品的鉴别

纯度分析

生物活性测定

稳定性考察

产品一致性的保证

#### (一) 产品的鉴别

1).肽图分析

酶切肽图分析方法

(胰蛋白酶裂解)

待检样品处理

将浓度为1mg/ml的待检样品及对照品分别对1%碳酸氢胺溶液充分透析，按酶与蛋白质溶液之比为1：50（w/w）加入胰蛋白酶，37℃保温24小时后，10000r/min离心5分钟，收集上清(或者用0.45um的滤器过滤).

分析方法

用RP-HPLC对离心后上清进行分析.色谱柱为蛋白和多肽分析用的C8或C18柱,上样量为100μl,流速为1ml/min.A液为含0.1%三氟乙酸的水溶液,B液为含0.1%三氟乙酸的乙腈溶液.连续梯度洗脱70分钟(A液从100%至30%,B液从0至70%),检测波长为214nm.

化学裂解肽图分析方法

（溴化氰裂解）

待检样品处理

取相当于50μg蛋白的待检样品及对照品分别用超纯水透析至少16小时，冻干。复溶于20μl 裂解液中，室温裂解24小时，然后裂解物加入180μl超纯水，再冻干。冻干的裂解物用超纯水复溶至适当浓度。

电泳

用SDS-PAGE凝胶电泳（高浓度胶20%）进行电泳分析

染色

用银染法进行染色

2). 氨基酸成分分析

3). 部分氨基酸序列分析

4). 蛋白质分子量测定

标准蛋白质及其分子量

名称 分子量 名称 分子量

细胞色素C11700过氧化氢酶（单体）60000

核糖核酸酶13700牛血清白蛋白（单体）68000

肌红蛋白17200乳酸脱氢酶（单体）36000

胰凝乳蛋白酶原25700乳酸脱氢酶130000

胰蛋白酶23300β-淀粉酶215000

羧肽酶A34600过氧化氢酶240000

胃蛋白酶35000黄嘌呤氧化酶275000

卵清白蛋白45000脲酶483000

采用凝胶过滤法测定分子量

将分子量分别为25000, 80000, 270000, 670000的Dextran(右旋糖苷)标准品相继上柱(每管收集4.4 ml),苯酚-硫酸法测定洗脱峰,测得洗脱体积Ve。用蓝色葡聚糖(分子量200万)求得外水体积Vo线性回归按同样条件对待测样品进行柱色谱,由回归方程求得其分子量

用SDS-PAGE电泳法测定分子量

以牛血清白蛋白、鸡白蛋白、胰凝乳蛋白酶原、β-乳球蛋白和溶菌酶作分子量标准。溴酚兰为指示剂，定其迁移率为1.0，以各蛋白质相对迁移率对分子量对数作出标准曲线。根据样品的相对迁移率可求得其分子量。

两种方法的用途

凝胶过滤法：

测定完整蛋白质的分子量

SDS-PAGE：

测定蛋白质亚基的分子量

5). 蛋白质二硫键分析

DTNB,化学名称：5,5’-二硫(2-硝基苯甲酸)，Ellman试剂，用于生物样品中巯基测定，与巯基化合物反应时能生成一种黄色化合物，通过比色可进行定量.

#### (二) 纯度分析

1. 目的蛋白质含量测定

1).凯氏定氮法：蛋白质中含氮量几乎是恒定的，平均含氮量为16%，只要测出蛋白质的含氮量，乘以6.25，即为蛋白质的含量。

2).双缩脲法：蛋白质分子具有许多肽键，在碱性溶液中能与铜离子络合呈紫红色，其颜色深浅与蛋白质浓度成正比。

3). Folin-酚试剂法(Lowry)：除了双缩脲反应外，还有苯酚试剂与酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸的呈色反应。灵敏度高，可检测出5微克。

4). 与染料的呈色反应：与氨基黑和考马斯亮蓝结合呈色，与考马斯亮蓝的呈色反应在一定浓度范围内可进行定量测定。

2. 杂质检验

鲎试剂检测热原质

鲎试剂为鲎科动物东方鲎的血液变形细胞溶解物的无菌冷冻干燥品。利用它对微量细菌内毒素(pｇ)能形成凝胶的特点，检测热原质。较之经典的家兔注射法快速、灵敏、简便，且省时、省工、省钱。

#### (三) 生物活性测定

#### (四) 稳定性考察

#### (五)产品一致性的保证

三个批次

送检样品与临床实验样品是相同批次。

# 第七章 重组细胞因子

## 7.1 细胞因子概述

细胞因子按功能分类

干扰素(Interferon, IFN)

白细胞介素(Interleukin, IL)

集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF)

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF)

生长因子(Growth factor, GF)

趋化因子(ChemokineCK)

造血细胞因子(Hematopoieticcytokine)

神经营养因子(Neurotrophicfactor)

细胞因子的作用特点

机体各种细胞均能合成和分泌小分子的糖蛋白或多肽类因子，它们能调节机体的生理功能，参与各种细胞的增殖、分化、凋亡和行使功能，这类物质统称为细胞因子(cytokine)。

①天然细胞因子是由细胞产生的。正常的静息或休止(resting)状态的细胞必须经过激活后才能合成和分泌细胞因子。

通常是由抗原、丝裂原或其它刺激物激活免疫细胞和相关细胞产生。6－8小时后细胞培养上清中即可检测出细胞因子，于24－72小时期间细胞因子水平最高。

但是有些细胞株不需外源刺激就可以自发地分泌某些细胞因子。

②产生和作用具有多向性(pleiotropism):即单一刺激(如抗原、丝裂原、病毒感染等)可使同一种细胞分泌多种细胞因子一种细胞因子由多种不同类型的细胞产生；可作用于多种不同类型的靶细胞。

③合成和分泌是一种自我调控的过程:

通常情况下，细胞因子极少储存，即不以前体形式贮存在细胞内，而是经过适当刺激后迅速合成，然后分泌至细胞外发挥生物学作用。一旦刺激消失后，合成亦迅速停止，已分泌的细胞因子被迅速降解。

④低分子量的分泌型蛋白质，常被糖基化。分子量大小不等，大多数为15－30kD，小者仅8－10kD，一般不超过80kD。

⑤需与靶细胞上的高亲和力受体特异结合后才发挥生物学效应。

⑥生物学效应极强:细胞因子在pmol(10-12M)水平就能发挥显著的生物学效应。这与细胞因子与靶细胞表面特异性受体之间亲和力极高有关，其解离常数在10-12－10-10 M之间。

⑦单一细胞因子可具有多种生物学活性，但多种细胞因子也常具有某些相同或相似的生物学活性。

⑧主要参与免疫反应和炎症反应：

影响反应的强度和持续时间的长短。涉及到感染免疫、肿瘤免疫、自身免疫、移植免疫等诸多方面。

⑨非特异性作用方式:发挥生物学作用且不受MHC限制。

⑩某种细胞因子对靶细胞作用的强弱取决于细胞因子的局部浓度，靶细胞的类型。

⑪天然细胞因子大多是在近距离发挥局部作用。大多是通过自分泌方式(autocrine,即作用于自身产生细胞)和旁分泌方式(paracrine,即作用于邻近的靶细胞)短暂性地产生并在局部发挥作用。

⑫细胞因子网络：细胞因子的作用并不是孤立存在的，它们之间通过合成分泌的相互调节、受体表达的相互调控、生物学效应的相互影响而组成细胞因子网络，也可以取得协同效应，甚至取得两种细胞因子单用时所不具有的新的独特的效应。

## 7.2 干扰素

干扰素(Interferon,IFN): 1957年由Isaacs和Indenmann首次发现，利用灭活的流感病毒作用于鸡胚绒毛尿囊膜后，可使细胞产生一种干扰病毒繁殖的可溶性物质，并把这一物质命名为干扰素。

干扰素是由多种细胞产生的具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的可溶性糖蛋白。

干扰素分子的不均一性。

可根据产生细胞分为3种类型：白细胞产生的为α型；成纤维细胞产生的为β型；T细胞产生的为γ型。根据干扰素的产生细胞、受体和活性等综合因素将其分为2种类型：Ⅰ型(α, β)和Ⅱ型(γ)。

### I 型干扰素：干扰素α、β

来源：白细胞、成纤维细胞、病毒感染的组织细胞等.

功能：抗病毒感染、抗肿瘤生长 免疫调节(较弱）

应用：病毒感染性疾病等，肝炎、SARS

#### α-干扰素

各种亚型的α-干扰素(IFN-α)基因都来自同一祖先，有高度的同源性，成簇分布于人染色体9p21ter上。人IFN-α基因没有内含子，由5´端非编码区、信号肽编码区、IFN-α多肽编码区和3´端非编码区组成。

多种因素可以诱导产生IFN-α，其中RNA病毒(新城疫病毒、滤泡性口炎病毒、仙台病毒等)是最有效的诱生剂。

IFN-α主要由白细胞、B淋巴细胞、病毒诱导的成纤维细胞和一些肿瘤细胞分泌。

性质

IFN-α的等电点是5.7－7.0，功能单位是单体，二聚体仅有20％的活性。氨基酸序列中半光氨酸可形成多聚体，其中一些多聚体具有与单体相似的免疫化学性质和抗病毒活性。IFN-α对热稳定，56℃处理1h保持稳定，4℃可保存6个月。－70℃能够长期保存。

IFN-α对蛋白酶敏感。

结构

IFN-α基因表达产物为188－189个氨基酸的前体，N端23个氨基酸残基是亲水信号肽，分泌出细胞时被切除，活性产物为165－166个氨基酸构成。IFN-α中有4个半光氨酸，分别位于第1、29、98/99和138/139位，第1－98/99、29－138/139之间分别形成二硫键。其中29－138/139之间二硫键对干扰素生物学活性最为重要。

#### β-干扰素(IFN-β)

是由成纤维细胞受病毒或干扰素诱生剂诱导产生的一种具有生物学活性的糖蛋白，胚胎细胞、上皮细胞和一些肿瘤细胞也能分泌干扰素。

定位与性质：

IFN-β基因也位于9p21ter上，IFN-α基因簇的远端。IFN-β与IFN-α基因具有80％的同源性，氨基酸的同源性约为25－30％，集中在20－40和120－150两个区域。第80位Asn是糖基化位点，成熟的IFN-β有20％糖基。IFN-β有3个Cys，其中Cys31－Cys41形成二硫键，与分子正确折叠和功能有关，Cys17与IFN-β功能无关。

结构：

人IFN-β前体是187肽，N端21个氨基酸是信号肽，成熟的IFN-β为含有166个氨基酸的多肽。IFN-β对热稳定，4℃可保存6个月，对pH 2处理稳定，对蛋白酶敏感。

IFN-β的诱生剂与IFN-α相同。

ﵰ基因工程IFN-β

ﵰ用Ser17替代Cys17，称为丝氨酸β干扰素(IFN-βSer)，使大肠杆菌的表达产

物能够正确折叠成高活性的IFN-β。

### II型干扰素（IFN γ)

来源：活化的T细胞和NK细胞产生

功能：免疫调节

提高单核巨噬细胞、树突状细胞的抗原提呈能力

增强Tc细胞和NK细胞的杀伤活性

抑制TH2细胞形成，下调体液免疫应答

趋化作用

抗病毒和抗肿瘤作用

结构

IFN-γ基因位于人12号染色体上，基因产物为166个氨

基酸，N端23个氨基酸为信号肽，在分泌出细胞

时被切除，活性产物由143个氨基酸组成。

天然IFN-γ是一种糖蛋白，在第25位和第97位的Asn处

有两个糖基化位点。而大肠杆菌表达的IFN-γ无

糖基化，但仍具有生物学活性。

IFN-γ分子中没有形成二硫键的Cys，其活性形式是牢固的二聚体或四聚体，单体没有活性。分子中碱性氨基酸较多，主要分布在86－90和128－132区域内。IFN-γ等电点大于pH8.6，具有酸不稳定性。

重组人IFN-γ羧基端能够被蛋白酶在Arg、Lys及其它氨基酸位点多处水解，形成143－127个氨基酸长度不等的分子，这些分子多数具有生物学活性。

IFN-γ主要由抗原、有丝分裂原(Con A PHA)、葡萄球菌肠毒素B和一些细胞因子(IL-1,IL-2, PDGF, EGF, IFN-α等)活化T细胞和NK细胞产生；

而糖皮质激素、1,25-二羟维生素D和某些细胞因子(IL-4,IL-10,IFN-β等)能够抑制IFN-γ的生成。

### 干扰素生物学活性与应用

IFN是机体抗病毒的第一道防线，在免疫系统发挥作用前使细胞形成抗病毒状态。IFN-α/β/ γ均有抗病毒作用。其中Ⅰ型干扰素(IFN-α/β)又称为抗病毒干扰素，其抗病毒活性远高于IFN-γ。此外，IFN具有抗肿瘤和免疫调节活性。

IFN-α：基本用途是对免疫系统正向调节作用，表现在能刺激免疫细胞抵抗癌症或用于治疗诸于肝炎和性病湿疣等感染性疾病。

IFN-α已被用于治疗毛细胞性白血病、尖锐湿疣、慢性活动性丙型肝炎、艾滋病相关卡波济肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、慢性髓细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、黑色素瘤等多种疾病。

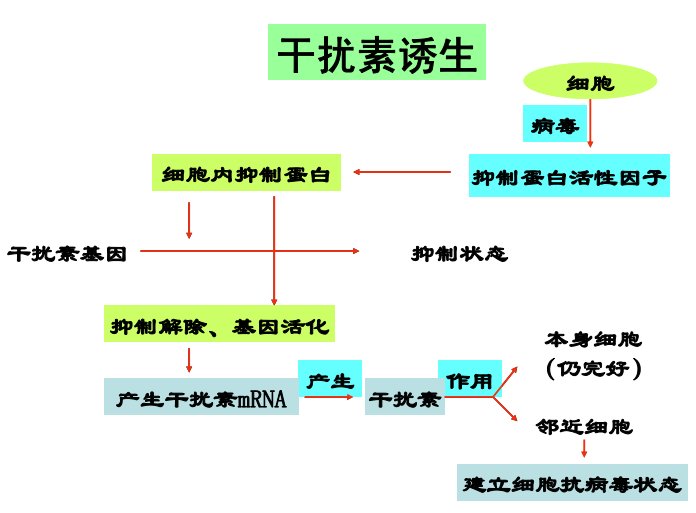
IFN-α产品的浓度和剂量用单位(U)表示。世界卫生组织(WHU)规定，将生产的一批特定干扰素的抗病毒活性与人白细胞干扰素的国际参考制剂的活性比较来确定其单位的大小。

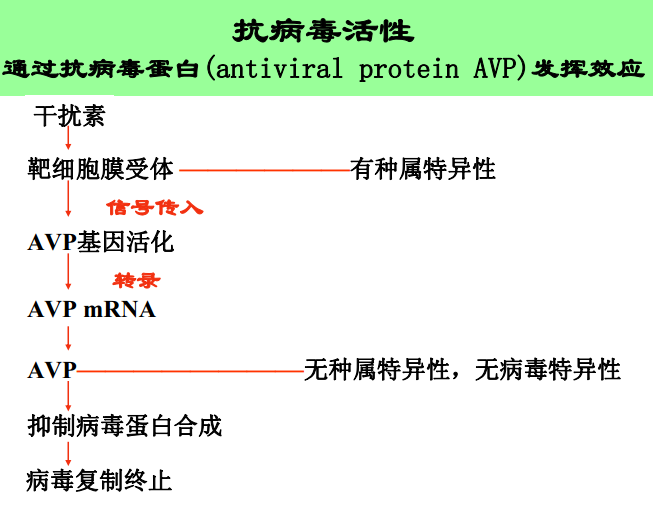
各种形式的IFN-α都是蛋白质，因而不能被冷冻，只能储存在2－8℃的环境中，其溶液不可振荡，以免产生气泡使蛋白质失活。

IFN-β：具有抗病毒和免疫调节功能，通过与特异性细胞受体结合而发挥作用。重组IFN-β已经应用于复发性多发性硬化症(multiple sclercosis,MS)。MS是一种神经系统慢性疾病，多发生在20－40岁的成年人身上(尤其是女性)，表现为围绕中枢神经元周围的髓鞘受损，引起中枢神经功能障碍。

重组β干扰素分为β-1b和β-1a。1993年FDA批准首先是β-1b(商品名Betaseron)上市，然后是β-1a(商品名Avonex)上市。

IFN-γ：具有抗病毒、抗增生和免疫调节的活性。IFN-γ与细胞表面的受体结合，可诱导休眠巨噬细胞和单核细胞的活化。IFN-γ还可增加抗体依赖的细胞毒性(ADCC)和NK细胞活性。主要用于治疗慢性肉芽瘤(chronic granuliomatousdisease, CGD)。CGD是一种罕见的遗传病，病人的巨噬细胞无法吞噬清除病原(如细菌和原生动物)。





## 7.3 白细胞介素类

白细胞介素(interleukin，IL),简称白介素:是由多种细胞分泌的一类具有免疫调节活性的细胞因子。这类物质主要是由白细胞合成，且主要介导白细胞间的相互作用。

白介素是一类低相对分子量的蛋白多肽，通常由一个或几个基因表达合成。目前已经发现并分别命名了23种白介素(IL-1－IL-23)，分子量多在60KD以下。

白介素的生物学功能

参与免疫应答与免疫调节

刺激造血细胞发育、分化和参与损伤组织的修复

参与神经－内分泌系统和细胞因子共同构成细胞间

信号传递的分子系统

参与细胞凋亡和抗肿瘤作用

参与炎症和免疫病理性的组织损害

## 7.4 肿瘤坏死因子(TNFs)

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF):

1975年Carswell等发现接种卡介苗(BCG)的小鼠注射细菌脂多糖(LPS)后，血清中含有一种能杀伤某些肿瘤细胞或使体内肿瘤组织发生血坏死的因子。

1985年Shalaby把巨噬细胞产生的TNF命名为TNF-α，把T淋巴细胞产生的淋巴毒素(lymphotoxin,LT)命名为TNF-β。TNF-α又称恶质素。

### TNFs的结构和性质

TNF-α：是一种单核因子，主要由单核细胞和巨噬细胞产生，LPS是较强的刺激剂。

IFN-γ、M-CSF、GM-CSF对单核细胞/巨噬细胞产生

TNF-α有刺激作用，而PGE(糖皮质激素)则有抑制作用。前单核细胞系U937、前髓细胞系HL-60在PMA(促分裂原)刺激下可产生较高水平的TNF-α。T淋巴细胞、T细胞杂交瘤、T淋巴样细胞系以及NK细胞等在PMA刺激下也可分泌TNF-α。

SAC(含葡萄球菌A蛋白的菌体)、PMA、抗IgM等可刺激正常B细胞产生TNF-α。

此外，中性粒细胞、LAK(淋巴因子激活的杀伤细胞，lymphokineactivated killer cells) 、星状细胞、内皮细胞、平滑肌细胞亦可产生TNF-α。

人和小鼠TNF-α基因分别位于第6号和第17号染色体上，与MHC基因群密切连锁。人TNF-α基因全长约3.6kb，mRNA长1.7kb，由4个Exon和3个Intron组成，编码233个氨基酸，其中内含76个氨基酸的长信号肽。信号肽在翻译过程中不被切除，而是作为跨膜成分，将前体蛋白固定在细胞膜上，成为具有活性的跨膜TNF。膜型TNF经酶解形成分泌型TNF。

成熟的TNF-α为157个氨基酸残基，不需糖基化，其活性单位为三聚体。

人和小鼠TNF-α的氨基酸序列同源性约81％。小鼠TNF-α前体为235个氨基酸残基，信号肽由79个氨基酸残基组成，成熟肽为156个氨基酸。小鼠TNF-α的Asp7位为糖基化位点，但糖基化不影响其生物学功能。

hTNF-α含有一个二硫键(69－101位之间)；小鼠TNF-α第69位与100位Cys之间形成二硫键。人和小鼠TNF-α的两个Cys两边的区域(第45－49和105－130位)高度保守，提示这两个区域在功能上有重要作用。N端前7个氨基酸是其活性非必需的，缺失N端2个氨基酸(Val和Arg)的TNF-α(155个氨基酸)具有更高的生物活性和抗肿瘤效应。

TNF-β

具有分泌型和结合型两种，均由活化的淋巴细胞产生，是一种具有杀伤肿瘤细胞活性的细胞因子。抗原和丝裂原均可刺激T淋巴细胞分泌TNF-β。PMA刺激RPMI1788B淋巴母细胞可分泌高水平TNF-β。

编码TNF-β的基因位于人染色体6p23－q12，全长约3kb，存在于TNF-α基因的上游。人TNF-β由1.4kb mRNA编码，其前体蛋白含233个氨基酸，单一的ORF编码205，其中N端的34个氨基酸为信号肽，C端还有16个氨基酸残基。成熟型人TNF-β分子为171个氨基酸残基，不含Cys残基，在N端62位有一个糖基化位点，TNF-β的糖基化有助于延长其在体内的半衰期。

缺少成熟TNF-βN端23个氨基酸残基时，其生物学活性与成熟的TNF-β相同。

小鼠TNF-β分子由202个氨基酸残基组成，包括33个氨基酸残基的信号肽，成熟分子含169个氨基酸残基，与人TNF-β有79％的同源性。

TNF-β与TNF-α单分子结构十分相似，均由上下两层反向平行的β折叠组成片层并列结构。

### 肿瘤坏死因子的生物效应

杀伤或抑制肿瘤细胞

TNF在体内、体外均能杀死某些肿瘤细胞，或抑制增殖作用(cytostaticaction)。

肿瘤细胞株对TNF-α敏感性有很大的差异，TNF-α对极少数肿瘤细胞甚至有刺激作用。用放线菌素D、丝裂霉素C、放线菌酮等处理肿瘤细胞可明显增强TNF-α杀伤肿瘤细胞活性。

体内肿瘤对TNF-α的反应也有很大的差异，与其体外细胞株对TNF-α的敏感性并不平行。

此外，靶细胞内源性TNF的表达可能会使细胞抵抗外源性TNF的细胞毒作用，因此，通过诱导或抑制内源性TNF的表达可改变细胞对外源性TNF的敏感性。

TNF杀伤肿瘤的可能机理

①直接杀伤或抑制作用：TNF与相应受体结合后向细胞内移，被靶细胞溶酶体摄取导致溶酶体稳定性降低，各种酶外泄，引起细胞溶解。也有认为TNFN激活磷脂酶A2，释放超氧化物而引起DNA断裂，磷脂酶A2抑制剂可降低TNF的抗病效应。TNF可或改变靶细胞糖代谢，使细胞内pH降低，导致细胞凋亡。

②通过TNF对机体免疫功能的调节作用，促进T细胞及其它杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤。

③TNF作用于血管内皮细胞，损伤内皮细胞或导致血管功能紊乱，使血管损伤和血栓形成，造成肿瘤组织的局部血流阻断而发生出血、缺氧坏死。

TNF的其他作用

提高中性粒细胞的吞噬能力，增加过氧化物阴离子产生，增强ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)功能，刺激细胞脱颗粒和分泌髓过氧化物酶。

抗感染

TNF是一种内源性热原质，引起发热，并诱导肝细胞急性期蛋白的合成

促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化

促进细胞增殖和分化

## 7.5 造血细胞因子类药物

造血细胞因子是指对造血有调控作用的细胞因子。

### 造血因子的生物学特性

①都是糖蛋白，且相对分子质量较小；

②人的造血细胞因子基因多数位于第5及第7号染色体长臂；

③主要通过细胞旁分泌途径，即由细胞分泌释放，直接作用于靶细胞，不通过血液循环；也可以是自分泌，即作用于产生细胞因子的细胞本身；只有促红细胞生成素(erythropoietin，EPO)是属于内分泌多肽类，通过血液循环发生作用；

④生理有效浓度极低，用一般生化技术难以测出，但EPO的血浓度可以测出；

⑤由多种造血细胞因子、多种调控方式形成造血调控网络；造血细胞因子的调控作用虽作用于某一发育阶段的造血细胞，既具有一定等级性，但又没有严格的等级性；虽有“细胞系的特异性”但又无严格的特异性；

⑥造血细胞因子具有多能性，同一细胞可产生多种因子，同一因子可有多种靶细胞，不同类细胞可产生同一因子，不同因子可有相同的靶细胞；并且造血细胞因子之间有协同作用，相辅相成，从而获得更大作用；

⑦造血细胞因子必须与靶细胞相应的受体结合，引起细胞内一系列效应酶的活化，使信号逐级放大、传递，最终作用于基因水平，调节细胞功能.

### 造血细胞因子生物学作用

调节细胞增殖和分化。作用于不同水平的造

血细胞，既促进增殖，又促进分化成熟，

对成熟细胞又能修饰其功能；

### 造血细胞因子的分类

①干扰素家族：α，β和γ三类

②白细胞介素系统：IL-1～IL-18

③集落刺激因子：

粒细胞系集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor，G-CSF)

粒－巨噬细胞系集落刺激因子( granulocyte-macrophage colony stimulating factor，GM-CSF)

巨噬细胞系集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor，M-CSF)

多潜能集落刺激因子(multi-colony stimulating factor，Multi-CSF)，又称白细胞介素－3(interleukin-3，IL-3)；

④促红细胞生成素(erythropoietin，EPO)

⑤干细胞因子(stem cell factor，SCF)

⑥促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)

⑦肿瘤坏死因子(tumournecrosis factor，TNF)

⑧转化生长因子-β(transforminggrowth factor-β,TGF-β)

#### 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)

G-CSF的产生：内毒素、TNF-α和IFN-γ可活化单核细胞和巨噬细胞产生粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor,G-CSF)。此外，成纤维细胞、内皮细胞、星状细胞和骨髓基质细胞等在LPS、IL-1或TNF-α刺激活化后也可分泌G-CSF。某些白血病细胞以及CHu-2人口腔癌细胞、5637人膀胱癌细胞、MIAPa、Ca-2胰腺癌细胞可组成性地表达G-CSF。

粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子是由127个氨基酸组成的蛋白质，可与粒系及单核巨噬细胞前体细胞表面的特异性受体相结合，促进其增殖分化，产生中性粒细胞、嗜酸粒细胞及单核-巨噬细胞。

生物学作用

G-CSF主要作用于中性粒细胞系造血细胞的增殖、分化和活化。在体外G-CSF刺激骨髓造血祖细胞中中性粒细胞集落的形成，延长成熟中性粒细胞的存活时间，活化中性粒细胞，促进其ADCC，超氧阴离子的产生和碱性磷酸酶的合成。

单独G-CSF或与干细胞因子(SCF)协同可促进多能造血干细胞的增殖、干细胞母细胞集落形成以及体内CFU-S(脾集落生成单位，一个造血干细胞)的形成。对人粒细胞、单核细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞以及成肌纤维细胞的趋化作用。

应用

癌症化疗等原因导致中性粒细胞减少症；

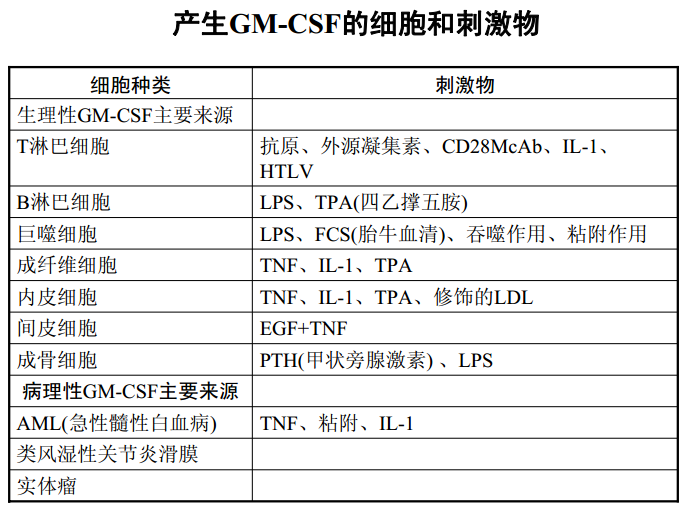
促进骨髓移植后的中性粒细胞数升高。

骨髓发育不良综合症引起的中性粒细胞减少症，再生障碍性贫血引起的中性粒细胞减少症，先天性、特发性中性粒细胞减少症，骨髓增生异常综合症伴中性粒细胞减少症，周期性中性粒细胞减少症。

肿瘤患者注射G-CSF后可提高血循环中中性粒细胞的水平，这种作用可能与缩短某些骨髓细胞进入S期的时间以及增加生成粒细胞的祖细胞数量有关。

#### 粒－巨噬细胞系集落刺激因子(GM-CSF)

GM-CSF的产生:T细胞、B细胞、巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞等均可产生GM-CSF。其中T细胞和巨噬细胞一般在免疫应答或炎症介质刺激过程中直接产生；而内皮细胞、成纤维细胞可能通过IL-1和TNF的诱导而产生。



GM-CSF的生物学作用

体外活性

刺激细胞增殖：包括骨髓细胞，粒细胞，巨噬细胞祖细胞，红样，巨核细胞祖细胞，AML，白血病细胞系，BFU-E，内皮细胞，单核-巨噬细胞，淋巴细胞，骨髓来源树突状细胞祖细胞，成骨肉瘤细胞，腺癌细胞等;

中性粒细胞：存活和蛋白合成，移动抑制，氧化代谢，脱颗粒，细胞因子分泌，再循环，IgA介导吞噬作用，ADCC吞噬和杀死病原体，表面受体调变，花生四烯酸释放，白三烯和PAF(血小板活化因子)合成;

巨噬细胞：细胞因子合成(如IL-1、TNF-α)，杀灭寄生虫，表面受体、抗原表达，杀灭肿瘤，粘附，氧化代谢；

朗罕氏细胞：成熟，存活力和功能。

嗜酸性粒细胞：存活，细胞毒，白三烯合成；

嗜碱性粒细胞：组胺释放；

体内活性

促进造血，嗜酸细胞增多

降低血清胆固醇

髓样细胞增殖综合征

失明和肌肉炎细胞浸润(转基因动物)

#### 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)

M-CSF的产生：多种细胞均可产生M-CSF，包括：成纤维细胞、子宫内膜中分泌型上皮细胞、骨髓基质细胞、脑星状细胞、成骨细胞；LPS等激活的巨噬细胞、B细胞、T细胞和内皮细胞等；此外，多种肿瘤细胞如原粒细胞性白血病、淋巴母细胞性白血病、肺腺癌细胞、乳腺癌和卵巢癌等。

M-CSF分子结构

ﷸ人和小鼠天然M-CSF为糖蛋白，由二硫键连接的同源双体，分子量40～90kDa。人M-CSF前体长度554～256个氨基酸不等，均有32个氨基酸的信号肽和23个氨基酸的穿膜部分。

ﷸ膜结合型M-CSF表达在单层培养的成纤维细胞，可刺激表达M-CSF受体的巨噬细胞的粘附和增殖。

ﷸ成熟M-CSF分子靠近N端150氨基酸在与M-CSF受体结合中起关键作用，人和小鼠M-CSF分子这个区域结构高度保守，其同源性达80%。

M-CSF的生物学作用

主要是促进单核-吞噬细胞(包括破骨细胞在内)的存活、增殖和活化。妊娠妇女尿中M-CSF水平明显增加，可能与胎盘的形成有关。M-CSF是炎症反应中的介质，并可提高巨噬细胞杀伤肿瘤细胞和微生物的能力。人M-CSF可作用于小鼠，而小鼠的M-CSF生物学作用则具有种属的特异性。

#### 多潜能集落刺激因子(Multi-CSF, IL-3)

IL-3的产生:主要由活化T细胞或T细胞克隆产生。小鼠髓样单核细胞系(myelomonocyticcell line) WEHI-3B细胞系可自发产生一定水平的IL-3。此外，胸腺上皮细胞、活化小鼠肥大细胞等也可表达IL-3。由于它能够刺激骨髓细胞多系集落的生长，也是骨髓肥大细胞系特殊的生长因子，故称为多潜能或多系细胞集落刺激因子。

Multi-CSF(IL-3)的结构

人IL-3由5个外显子和4个内含子组成。成熟的IL-3分子由133个氨基酸残基组成，第16位和第18位有2个Cys残基，另有2个N糖基化位点。在体外，糖基不影响IL-3的生物学活性。

IL-3的生物学作用

除具有多重集落刺激作用外，最近发现IL-3可刺激皮肤上皮细胞、CD4-CD8-TCRαβ细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞的增殖，阻止肥大细胞发生程序性细胞死亡。

#### 促红细胞生成素(erythropoietin，EPO)

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种刺激红细胞生成的糖蛋白。

EPO的产生:

(1)肾脏是EPO产生的主要来源，产生EPO细胞为肾小管基底膜外侧的肾小管周围间质细胞，可能是一种肾小管周围毛细血管的内皮细胞。组织氧利用率下降所引起组织缺氧是诱导EPO产生的主要刺激因素。

(2)肝脏中的kuppfer(枯否氏)细胞。

(3)骨髓中的巨噬细胞。

人EPO基因定位于第7号染色体长臂7q11-12，基因组为单拷贝，约5.4kb，有4个Intron和5个Exon。EPO cDNA编码193个氨基酸，包括27个氨基酸的信号肽序列。成熟EPO分子由166个氨基酸组成，分子内有2个二硫键，3个N键糖基化位点和一个O键糖基化位点。

࠸天然EPO是一种含唾液酸的酸性糖蛋白。分子中糖占60％，糖占40％。去糖基化不影响EPO在体外的生物学活性，但却缩短了在体内的半衰期，使其在体内完全丧失活性，因此，糖基化对EPO十分重要。࠸只有在真核细胞中表达的EPO在体内才能发挥作用。

EPO的生物学作用

EPO特异地作用于红细胞样前体，对其它细胞系几乎没有作用。EPO刺激骨髓中红细胞样前体细胞产生红细胞样集落形成单位(CFU-E)和红细胞样爆发形成单位(BFU-E)。CFU-E为迅速分裂的红细胞样前体细胞，对低浓度EPO即有反应；BFU-E则为更不成熟的红细胞样前体细胞，对EPO反应后，其分裂速度较慢。

EPO主要用于肾功衰竭引起的贫血，还可用于类风湿性关节炎、多分性骨髓瘤、非Hodg-kin氏淋巴瘤、AIDS、化疗等原因引起的贫血。1989年美国FDA批准Amgen公司首先将rEPO投放市场。

#### 血小板生成素(thrombopoietin, TPO)

TPO是血小板生成的主要调节因子，主要通过刺激巨核细胞分化、增殖及成熟来调节体内血小板的生成，故又称巨核细胞生长发育因子(Megakaryocytegrowth and development factor,MGDF),因其受体Mpl(由原癌基因c-Mpl编码)发现在先，又称Mpl配体。

人TPO基因定位于3号染色体3q26-28(小鼠为第16号染色体)，含6个Exon和5个Intron，cDNA长1774bp，ORF长1059bp，编码353个氨基酸，其中N端的21个氨基酸为信号肽，成熟蛋白由332个氨基酸组成。

人TPO含有两个结构域，N端结构域含153个氨基酸，是与受体C-MPL结合的区域，具有TPO全部的生物学活性。人TPO和EPO的N端有21％的同源性；而C端的177个氨基酸与任何已知的蛋白均没有同源性，该区域含有多个糖基化位点，去除该区域对TPO的生物活性无明显影响，但其在体内的半衰期明显缩短。

人TPO的生物学活性

刺激巨核细胞分化、成熟，产生血小板是TPO/MPL系统的主要功能。

临床适应症

①放、化疗导致肿瘤病人出现的血小板减少；

②骨髓移植和造血干细胞移植后的血小板减少症；

③其它血小板减少症等。

## 7.6 神经营养因子

是由神经所支配的组织和星形胶质细胞所产生的、一类调节外周和中枢神经元发育、维持和存活的细胞生长因子，其主要亚单位家族是--神经营养素(neurotropins，NT ) 。

神经元的基本功能：

①感受内外环境变化的刺激；

②传导兴奋；

③整合、分析、贮存信息；

④神经-内分泌功能。

在体外对神经元具有神经营养活性的分子

白血病抑制因子(LIF)神经胶质细胞系衍生的神经营养因子(GDNF)

促红细胞生成素(EPO)睫状神经营养因子(CNTF)

粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)

神经营养素－6(NT-6)

转化生长因子－β1(TGF-β1)神经营养素－4/5(NT-4/5)

胰岛素样生长因子(IGF-I和IGF-II)神经营养素－3(NT-3)

血小板衍生生长因子(PDGF)脑源性神经营养因子(BDNF)

成纤维细胞生长因子神经生长因子(NGF)

### 神经生长因子(nerve growth factor,NGF)

NGF的产生：NGF是原形的神经营养素。它由拟交感神经元和胆碱能基底神经元合并释放。也由非神经组织包括唾液腺、前列腺和肥大细胞合成。药用NGF的来源主要是小鼠颌下腺提取、人胎盘提取和基因工程方法生产。

天然的人神经生长因子为含有两个α亚基、一个β亚基和两个γ亚基的非共价键聚合蛋白质。其中β亚基具有全部的NGF生物活性，故通常的NGF特指其β亚基。

基因工程人NGF即是β-NGF。

基因工程技术生产的简单工艺为：将人β-NGF基因克隆到载体pMSGphNGF中，并转入到CHO细胞中进行表达，经分离纯化后可获得重组人NGF产品。

NGF的生物学作用

促神经生长作用；

免疫调节作用；

生殖系统的作用；

对肿瘤细胞的作用；

临床应用

人神经生长因子在临床上主要可以用于治疗Alzheimer’s 病(AD,一种早老性痴呆)和糖尿病所致的外周神经病变。

### 脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophicfactor,BDNF)

BDNF的产生：BDNF是继NGF后发现的第2个神经营养因子，1982年从猪大脑中分离获得。它主要分布于大脑皮层、髓质、小脑、海马等中枢神经系统。在外周的心脏、肺、骨骼肌和坐骨神经也能检测到BDNF的mRNA。

国内外都已成功地用基因工程方法表达了BDNF。即将编码BDNF的核苷酸序列插入到适当的质粒载体中，转化到大肠杆菌或酵母中进行表达，可在发酵液中提取得到rBDNF，再经过分离纯化，即可得到产品。

BDNF的生物学作用

BDNF可维持、促进外周神经嵴和外胚层基板来源的多种感觉神经元的发育、生长与分化，促进胚胎视网膜神经节细胞，多巴胺能神经元以及前脑基底胆碱能神经元、胚胎脊椎神经元和皮质神经元的体外存活。NGF和BDNF均能降低由于低血糖或局部缺血伴随的神经细胞死亡，若在早期使用作用更大。

AD患者海马中BDNF的mRNA水平降低，表明该病与BDNF有一定联系。

BDNF和TrkB在视觉系统广泛分布，视一个比较活跃的因子。BDNF是视网膜神经节细胞的靶源性营养因子，有可能被用于视神经损伤导致视网膜神经节细胞退化的治疗。

BDNF具有促进学习和记忆的功能。

BDNF的临床应用

BDNF可用于治疗肌萎缩性侧索硬化，I，II期临床试验表明，rBDNF的安全性和耐受性均较好，能显著延缓ALS病人呼吸功能衰竭，降低死亡率。

对于治疗糖尿病引起的外周神经病亦有效。

目前，Amgen公司用于治疗肌萎缩性侧索硬化已进入III期临床试验研究，在治疗帕金森病、亨廷顿症以及神经损伤也由良好的治疗前景。

### 胶源性神经营养因子(glialcell-derived neurotrophicfactor, GDNF)

GDNF的产生：GDNF最初在1993年由Lin等从大鼠B49细胞株中分离、纯化获得。在初生小鼠富含多巴胺神经纤维和胞体的脑组织区域包括纹状体和中脑黑质T1星形胶质细胞有GDNF基因表达。在海马组织、脑皮质和中脑也有低水平表达。

在发育个体中，GDNF无论在中枢神经系统还是外周组织都有表达，尤其在皮肤、肾脏、胃和精囊等组织表达量最高。

目前，已成功地用基因工程方法在大肠杆菌表达GDNF。

GDNF的生物学作用

GDNF是多巴胺神经元的有效营养因子；

一种新的运动神经营养因子；

对自主神经元和感觉神经元的营养作用；

GDNF的临床应用

GDNF是一种广谱的神经营养因子，最有希望治疗与黑质多巴胺能神经元退变有关的帕金森病。此外，GDNF对其他神经元，如运动神经元、基底前脑胆碱能神经元、蓝斑的去加肾上腺素能神经元等有具有营养和保护作用，表明GDNF有可能用于治疗一些神经系统退行性疾病，如肌萎缩性侧索硬化症、脊肌肉萎缩、早老性痴呆等。GDNF还可用于治疗癫痫。

### 碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)

bFGF的来源：最初由于其在细胞培养中有促进成纤维细胞分裂增殖的能力而被发现。bFGF是一种细胞分裂原，其家族中已发现14种结构相似的生长因子。研究较清楚的有两种：一种含酸性氨基酸较多，等电点为5.6，命名为酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)；另一种含碱性氨基酸较多，等电点为9.6，称为碱性纤维细胞生长因子(bFGF)。

bFGF可从脑、垂体、视网膜、黄体、肾上腺、胎盘、前列腺和胸腺等来源于中胚层和神经外胚层组织中分离出来。

一些肿瘤细胞如黑色素瘤、软骨瘤和肝肿瘤也存在bFGF。

目前，已可用基因工程方法生产bFGF。

bFGF的生物学作用

bFGF对创伤愈合和软组织修复作用；

与心血管系统的关系：bFGF能促进心肌细胞的增殖，促进周围毛细血管形成；

神经系统的营养作用：bFGF对神经元有维持生存和促进生长作用，可使受损神经元修复和再生。

与肿瘤的关系：bGFG对胃癌尤其是晚期胃癌有治疗作用。

bFGF的临床应用

用于治疗慢性创伤；

骨疾病；

脑神经损害；

消化道溃疡；

促进血管形成和修复等。

# 第八章 重组激素类药物

8.1 胰岛素

8.2 生长激素

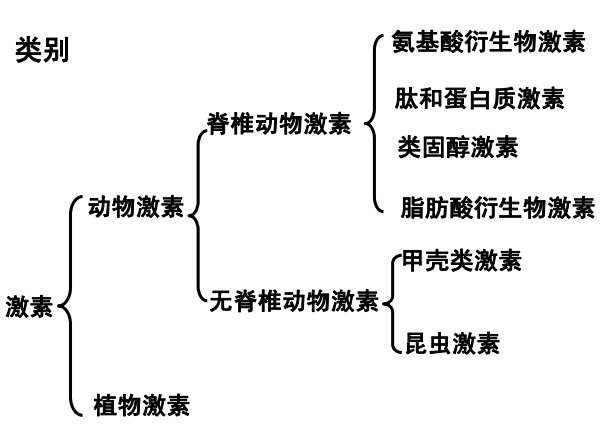
8.3 心素钠及利钠多肽

8.4 促性腺激素

激素的概念和类别

概念:

激素（hormone）是生物体内特殊的腺体或组织产生的，直接分泌到体液中，通过体液运送到特定的部位，从而引起特殊激动作用的一群微量的有机化合物。



## 8.1胰岛素－治疗糖尿病药物

据WHO发布的信息表明，目前全球共有糖尿病患者1.75亿人，预测到2030年将增加1倍，达到3.5亿人。在发达国家及经济较发达地区，糖尿病的发病率很高，如日本7.5%，新加坡8.6%，太平洋岛、美国为6%～8%。我国是仅次于印度的糖尿病人口大国，估计目前国内的糖尿病患者在4000万～5000万人左右，发病率为3.8%。

市场需求：

2005年全世界胰岛素共消费了7吨左右，其中人胰岛素约为4.5吨；而我国2005年胰岛素消费仅为500公斤左右。

预计2010年，国内胰岛素年销售额估计可达20亿元。2004年，我国重组人胰岛素市场基本由进口厂商占有(95%左右的份额)。

药用胰岛素种类

动物胰岛素

–猪胰岛素

–牛胰岛素

人胰岛素

–半生物合成人胰岛素

–重组人胰岛素

胰岛素类似物

–Aspart、Lispro、Determir、Glargine

胰岛素：在蛋白质的研究史上树立了多个里程碑

最早(Banting和Best,1921)发现的一种具有激素作用的蛋白质；

最先结晶(Abel，1926)；

第一个被测定氨基酸序列(Sanger等,1955)；

第一个被人工合成的蛋白质(Du等，1964；龚岳亭等，1965)；

采用基因工程技术批量生产并经美国FDA批准投放市场供临床应用的第一个蛋白质药物(1982年)。

### 胰岛素的结构和性质

胰岛素是胰岛β细胞合成和分泌、由A、B两条多肽链借二硫键连接而成、含51个氨基酸残基的蛋白质激素。A链有21个氨基酸残基，B链有30个；两条肽链有A7-B7和A20-B19的Cys之间形成的两对二硫键相连，A链内部还有一对由A6-All的Cys残基形成的链内二硫键。

人、猪、牛、羊、狗、兔和豚鼠等哺乳动物的胰岛素，都是由51个氨基酸残基组成的单纯蛋白质，都包含有A、B两条多肽链和3个维持其分子空间结构的二硫键。

人、猪和兔胰岛素的一级结构除B30分别是Thr、Ala和Ser外，其余完全相同；牛胰岛素有3处氨基酸不同于人胰岛素，分别在A8、A10和B30位置。

不同哺乳动物胰岛素一级结构的差别虽不影响其生物学活性，但与胰岛素的抗原性密切相关。多次使用后诱导机体产生的抗体将影响其治疗效果。

胰岛素的等电点pH5.3-5.35。用碱或还原剂能使二硫键断裂，胰岛素失活，因此，胰岛素不能口服。

### 功能生物学作用

①促进糖原的生物合成以及葡萄糖的氧化，降低血糖。

②促进蛋白质及脂类的合成代谢。

③促进细胞生长和分化等。

胰岛素对糖代谢的主要作用－降低血糖

①促进细胞对葡萄糖的利用，加速葡萄糖的无氧酵解和有氧氧化；

②促进肝糖原和肌糖原的合成和储存；

③抑制糖原分解和糖异生。

胰岛素对蛋白质代谢的作用

①通过增加肌肉等组织及细胞对氨基酸的提取，促进核糖体对mRNA的翻译，加速蛋白质的合成；

②降低蛋白水解酶活性，抑制蛋白质的分解和氨基酸的氧化。

胰岛素对脂肪代谢的作用

①相继激活乙酰辅酶A羧化酶和丙二酸单酰辅酶A等的活性，促进脂肪酸的合成和碳水化合物转换为脂肪；

②降低细胞内脂解酶的活性而抑制脂肪分解，使酮体生成减少，纠正酮症酸血症的各种症状等。

### 胰岛素的作用机制

主要靶组织：肝脏、肌肉和脂肪组织等。

胰岛素是通过与其靶细胞膜受体的结合，触发一系列的连锁反应而发挥其生物学作用的。

已知胰岛素受体为糖蛋白，是由各2个的α-亚单位(13kD)和β-亚单位(90kD)组成的大分子蛋白复合物。α-亚单位在胞外，含胰岛素结合部位；β-亚单位为跨膜蛋白，其胞内部分含酪氨酸蛋白激酶，胰岛素需与靶细胞膜受体结合，产生一系列的生物效应。

胰岛素可诱导第二信使的形成，它们模拟或具有胰岛素样的活性。胰岛素与α-亚单位结合，移入胞内后激活酪氨酸蛋白激酶，继而催化受体蛋白自身及胞内其他蛋白的酪氨酸残基磷酸化，启动了磷酸化连锁反应(phosphorylationcascade).胰岛素可使葡萄糖载体蛋白(glucose transporter)和其他蛋白质从胞内重新分布到胞膜，从而加速葡萄糖的转运。

### 胰岛素的临床应用

胰岛素仍是治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的唯一药物，对胰岛素缺乏的各型糖尿病均有效。主要用于下列情况：

①重症糖尿病(IDDM，I型)；

②非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)经饮食控制或用口服降血糖药未能控制者；

③糖尿病发生各种急性或严重并发症者，如酮症酸中毒及非酮症高血糖高渗性昏迷(要建立和维持电解质的平衡)。

④合并重度感染、消耗性疾病、高热、妊娠、创伤以及手术的各型糖尿病。

重组DNA技术制造人胰岛素——A B链合成法

人工合成人胰岛素A链和B链基因，分别插入克隆载体质粒所携带的细胞β-半乳糖苷酶基因中；

重组质粒转化大肠杆菌，在细胞中进行复制，并在β-半乳糖苷酶基因的信号序列的控制下，合成mRNA，再翻译出A链和B链蛋白；

A链和B链连接－用溴化氰法。

速效胰岛素的开发

将胰岛素B9位置上极性Ser置换为带负电荷的Asp，把B27位的极性的Thr置换为带负电荷Glu，构建出双突变B9:Ser→Asp和B27:Thr→Glu，由此即制成速效胰岛素。经过改造B9:Ser→Asp和B27:Thr→Glu双突变体能有效地在毫摩尔浓度下解聚为单体，它进入血液的吸收率也比天然胰岛素提高了三倍，仍保持了与天然蛋白相同的主要结构特征。这样，胰岛素分子在中性pH条件下主要以单体形式存在，注入体内后无需解聚进入血液，从而产生速效效应。

长效胰岛素的开发

定点诱变技术定点改造：

A21: Asn→Gly；B27: Thr→Arg、B30:Thr→Thr酰胺；

突变体：在血液中半衰期最长(35.5小时)的一种长效胰岛素.

为什么有长期效应？

B30:Thr→Thr酰胺和B27: Thr→Arg，等电点从Ph5.4升至Ph6.8；A21: Asn→Gly使其在酸性溶液中也不会脱酰胺，保证了稳定性，这样制成pH3.0的可溶制剂，注射后能在生理pH条件下形成结晶，延缓了吸收，半衰期因而延长，有利于低剂量胰岛素基础水平的维持。

高效胰岛素

高效胰岛素类似物的研究开展较早。

单突变体：B10:His→Asp，获得B10 Asp突变体，体外生物活力和受体结合能力均显著升高，约为天然人胰岛素的5倍(1987年由Schwartz等)。

双突变体：B10: His→Asp(去B26～B30), B25:Tyr→Tyr酰胺的人胰岛素突变体，是目前为止人们获得的活力最高的胰岛素类似物，它的体外活力是人胰岛素的11.7倍。

## 8.2 生长激素(growth hormone, GH)

人生长激素(human growth hormone，hGH; somatotrophin)是垂体前叶合成和分泌的一种多肽激素，其分泌受下丘脑的生长激素释放激素及生长抑素的调节。

### 生长激素的结构和性质

人生长激素(hGH)的主要形式：191个氨基酸的单一多肽链构成的球形蛋白。在55-165位和182-189位氨基酸之间有两个分子内二硫键，不含糖基。

机体内的GH为不均一分子，在人的垂体和体液中含有100种以上的hGH分子形式，即hGH是一个蛋白质家簇。

人类基因组中含有两个GH基因，GH-N基因和GH-V基因，与胎盘催乳素(hPL)基因高度同源，共同聚簇于第17号染色体长臂上。

GH-N基因主要在垂体表达，主要表达产物含191个氨基酸残基，该hGH占垂体hGH的70-75％，而占血液中hGH的43％左右。GH-N基因表达的hGH与出生后儿童生长有关，GH-N缺失或异常，儿童生长出现严重障碍；

GH-V基因在妊娠后半期的胎盘中表达，含191个氨基酸残基，其中有13个氨基酸的顺序与GH-N表达产物不同。

GH-V表达的hGH是妊娠母体循环中主要的hGH，此分子有糖基化和非糖基化两种形式。

GH－V产物的功能可能与胎儿生长有关，与产生后儿童生长关系不大。

### 生长激素受体与生长激素结合蛋白

生长激素通过与一个特殊的细胞表面受体结合来发挥它独特的生物学效应。

hGH受体属于Ⅱ型细胞因子受体超家族，由620个氨基酸残基组成的单链跨膜多肽，胞外区有247个氨基酸，有类似免疫球蛋白的结构。hGH受体胞外部分(1-238氨基酸)可脱落，在血液中存在，成为hGH结合蛋白(GHBP)。

生长激素同时与两个受体分子的胞外结构域紧密结合，有效地促进受体二聚体形成。随后经细胞内一系列信号转导过程，产生生物学效应。

生长激素具有种属特异性，是因为细胞表面的生长激素受体具有严格的结合特异性。

### 生长激素的生物学作用

hGH促生长作用：GH刺激机体线性生长是其主要的生理功能。幼年动物切除垂体后生长停止，补充GH后，生长恢复正常。

hGH表达调控异常使hGH缺乏或分泌减少将引起儿童的生长障碍，身材矮小；

如hGH过度分泌在儿童则引起巨人症；在成年骨骺关闭后则引起肢端肥大症。

GH促进生长主要通过两方面的作用：①刺激软骨生长；②促进软

组织特别是肌肉组织的生长。

hGH对代谢的作用：

①促进蛋白合成：生长激素促进氨基酸转运到细胞，胞内合成RNA增多，出现正氮平衡。生长激素刺激肝脏生成胰岛素样生长因子，后者促使细胞分裂、增殖和合成蛋白质；

②调节脂代谢：促进脂肪的降解；

③对糖代谢作用：短期注射生长激素可见胰岛素样效应，产生中度、急性、暂时性低血糖，并伴有对胰岛素释放的抑制；长期生长激素的升高可导致血糖浓度的升高。葡萄糖利用下降又导致胰岛素水平的增高，对胰岛素产生相对不敏感。

对免疫功能的调节：

切除小鼠的垂体腺后，引起胸腺萎缩，注射垂体GH和PRL后可使胸腺恢复。

hGH也调节胸腺素的分泌和产生。在体外，hGH能促进植物血凝素活化的T淋巴细胞的增生，刺激淋巴细胞的DNA合成，使T淋巴细胞IL-2和IFN-Y分泌增加及IL-2受体表达的增加。

### 生长激素的临床应用

20世纪80年代初期，最初在大肠杆菌中表达的hGH域人垂体提取的GH相似，但在N端多了一个Met，为192肽。

1985年美国FDA首先批准了rhGH用于治疗儿童生长激素缺乏症(GHD)。目前国外至少有4家药厂的hGH在我国注册上市用于治疗儿童的GHD。

rhGH的适用范围：①儿童生长激素缺乏症；②在宫内发育不良、特纳综合症、儿童慢性肾功能不全及其他原因所致的身材矮小；③成年生长激素缺乏症；④严重的分解代谢失调异常(如烧伤、手术后)等疾病。

## 8.3 心钠素及利钠多肽家族

心素钠的全称是心房利钠多肽(atrialnatriureticpeptide, ANP),亦称心房利钠因子(atrialnatriuretic factor, ANF)。1983年Debold等首先从大鼠心房组织中分离得到，是具有强大利尿、利钠、扩张血管和降低血压等作用的一种激素。

心钠素及结构与功能相似的利钠多肽构成利钠多肽家族，目前该家族至少包括3种不同的多肽，即心钠素(ANP)、脑钠素(brain natriureticpeptide, BNP)和C型利钠肽(C-type natriureticpeptide, CNP)。

利钠多肽家族成员的结构及其特性

ANP、BNP和CNP都具有一个17个aa的环状结构，其中11个aa位置和种类高度保守，完全一致，被认为是生理功能相似的结构基础。

### 心钠素

人心钠素(hANP)是由28个氨基酸残基组成的活性多肽，含链内二硫键(Cys7-Cys23)，使ANP分子呈环状结构，除第12位的氨基酸(人为Met，其它为Ile)外，哺乳动物的ANP高度保守。

ANP主要由心房肌细胞产生，以颗粒形式存在。

ANP基因还可在肾脏中表达，产生由32个氨基酸组成的尿钠素(urodilatin)，具有较强的舒血管作用，参与肾脏对钠、水的调节。

人、小鼠和大鼠的ANP基因分别位于第1号、第4号和第5号染色体上。

ANP基因为单拷贝，由3个Exon和2个Intron组成，其转录本约1kb，编码151个氨基酸组成的ANP前体(pre-ANP)，经酶切去除N端25个氨基酸的信号肽变成126个氨基酸残基组成的前ANP，又称γ-ANP。

γ-ANP再经酶切加工成活性ANP和N端98个氨基酸组成的N肽。两个反向平衡的α-ANP二聚体构成β-ANP，后者进入外周血液循环后转变为两分子α-ANP，发挥其长效的生理作用。

### 脑钠素(脑利钠多肽)

BNP最先从猪脑组织中发现，但心脏中含量最高，主要由心肌细胞合成分泌。

人的BNP分子由32个氨基酸组成；猪和鼠的BNP分别由26和45个氨基酸组成。BNP中两个Cys之间形成二硫键，使分子呈环状结构。

人、小鼠和大鼠的BNP具有分别位于第1、4和5号染色体上，BNP基因也是单拷贝，由3个Exon和2个Intron组成，表达由134个氨基酸组成的BNP原前体(prepro-BNP)。BNP原前体经加工切除N端26个氨基酸的信号肽，转变成BNP原(27-134位氨基酸)，后者进一步加工产生27-102氨基酸组成的片段和活性的BNP(103-124位氨基酸)。

### C型利钠多肽

CNP于1990年首先从猪脑中分离出，现已发现有两种CNP，一种由22个氨基酸残基组成，另一种由53个氨基酸残基组成；它们来自同一个CNP前体，经不同的加工方式裂解而成。与ANP及BNP相似，两种CNP分子中均有二硫键连接形成的环状结构，但没有C端的延伸区。除中枢神经系统外，血管内皮细胞是CNP主要的产生器官。CNP作为一种局部分泌因子，参与血管舒缩功能的调节。

CNP基因结构与ANP、BNP基因相似，由3个Exon和2个Intron组成，编码126个氨基酸残基构成的CNP原前体(prepro－CNP)，其中N端23个氨基酸为信号肽。去掉信号肽转变为前CNP(24－126氨基酸)，前CNP再经裂解产生两部分，其中一部分为CNP－53(74－126氨基酸)具有生物活性；CNP－52进一步裂解产生CNP的另一种活性形式CNP－22(105－126氨基酸)。

### 利钠多肽的生物学活性

心钠素及其利钠多肽家族的生理作用是通过与膜上的特异性受体－利钠多肽受体(natriureticpeptide receptors, NPR)结合，而将信号转导到细胞内，激活一系列生化反应而实现。

已经发现的利钠多肽受体(natriureticpeptide receptor, NPR)有3种，分别是NPR－A、NPR－B和NPR－C。前两者均为膜上的鸟氨酸环化酶受体，NPR－C又称清除受体。

利钠多肽的主要生理功能包括：

对心血管系统的作用：①ANP能使血管的通透性增加和毛细血管的流体静压升高，使血液成分向血管外移动，从而降低心脏的前负荷；②ANP可提高静脉血容量，并使细胞外液钠水的排放增多；③ANP可降低外周血管交感神经的活性；④降低迷走神经的兴奋域值，可抑制前负荷降低引起的反射性心动过速和血管收缩，使平均动脉压持续性降低；⑤BNP的心血管作用与ANP相似，二者有叠加效应。⑥CNP可能是一种局部作用激素，在外周血循环中的生物学作用不明显。

对肾脏的作用：

①对血流动力学的影响ANP可增加肾血流量；使肾入球动脉扩张，出球动脉收缩，从而使肾小球毛细血管过滤压增高，提高肾小球过滤分数；

②对肾小管的作用ANP可直接作用于肾小管，产生利钠作用。ANP可阻断血管紧张素Ⅱ所引起的近曲小管对钠水的重吸收；还可通过对抗血管加压素的作用阻止肾皮质区的聚合管对水的重吸收等。

对中枢神经系统的作用：

3种利钠多肽，尤其是CNP，均可在大脑中产生。脑组织中的利钠多肽可进一步加强外周组织利钠多肽的作用，如外周利钠多肽的促进肾脏利钠作用，可因阻断口渴和饮水中枢而加强。利钠多肽通过对中枢神经系统与外周作用相互协调，维持水、电解质及内环境的稳定。

### 基因工程心钠素及其临床应用

主要临床应用：

①急性肾功能衰竭的临床治疗；

②慢性心衰的临床治疗；

③肺水肿、肝硬化腹水、甲状腺病及妊娠中毒症等的临床治疗。

日本Suntory公司研制的基因工程28肽α-hANP(商品名：Carperide)已应用于临床，主要用于治疗急性心力衰竭和慢性心衰的急性期。美国SCIOS NOVA公司与Genentech公司合作，完成了心钠素制品的Ⅲ临床试验。

我国完成了重组hANP的动物试验。

ANP和BNP的半衰期很短，是制约其广泛应用和提高疗效的关键问题。

## 8.4 促性腺激素(Gonadotropins)

促性腺激素是一大类激素，它们的初级靶位是性腺。促性腺激素能直接或间接地调节繁殖机能，并影响到第二性征的发育。促性腺激素主要由垂体及其相关组织合成。

促卵泡激素，又称卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)

黄体生成素(luteinizinghormone, LH)在雌、雄性发育和第二性征维持，特别是雌性的繁殖功能方面起重要作用。

人绒毛膜促性腺激素(human chorionicgonadotropin, HCG)由妊娠妇女产生，在怀孕早期的胎儿发育中起重要作用。

FSH和LH由垂体合成和分泌，受下丘脑促性腺激素释放激素的调控。

人黄体生成激素与人FSH具有相同的α亚基，而编码β亚基的基因位于人的第19号染色体上。

人FSH含糖约14％，有4个Exon构成的α亚基基因位于第6号染色体上，有3个Exon的β亚基基因位于第11号染色体上。

编码两个亚基的mRNA分别在粗面内质网翻译后，除去信号肽进入内质网。α亚基由92个氨基酸残基组成，寡糖链连接在Asn52和Asn78位上；β亚基由111个氨基酸组成，寡糖链连接在Asn7和Asn24上。

重组人促卵泡激素

将编码人FSH的α亚基和β亚基的基因cDNA插入到表达载体上，使其转化到受体细胞CHO中表达，可获得具有生物学活性的重组hFSH。

通过在微载体上培养转化了人FSH的α亚基和β亚基的基因cDNA的CHO细胞系，可从培养上清液中纯化出活性重组hFSH制剂。重组hFSH制剂是在欧洲获准广泛应用的第一批生物技术药品中的一种。

DNA重组技术还可辅助天然促性激素的基因修饰，以获得具有更好功效的突变体。如将人绒毛膜促性腺激素β亚基的C端连接到促卵泡激素β亚基的C端上，所得到嵌合体具有与促卵泡激素相同的生物学活性，但血浆半衰期明显延长。

促卵泡激素、黄体生成激素和人绒毛膜促性腺激素均为糖蛋白，包括一个相同的α亚基和一个各异的β亚基，以及不同的糖链组成。

重组促性腺激素的临床应用

重组促卵泡激素

来源：重组乳腺细胞产生相同和CHO细胞；

用途：治疗人类生育能力低下或诱导排卵；

重组黄体生成激素

来源：重组乳腺细胞产生相同和CHO细胞；

用途：诱导动物排卵；

人绒毛膜促性腺激素

在临床上用于下列两类病人：

接受诱导排卵（OI）治疗的女性

激素原因导致的无排卵性不育症（没有排卵），使之产生单个排卵。

接受辅助生殖技术（ART）治疗的女性.

# 第九章 重组溶栓药物

9.1 概述

9.2 链激酶与尿激酶

9.3 葡激酶

9.4 纳豆激酶

9.5 组织纤溶酶原激活剂

9.6 水蛭素

宋后燕:我国自主知识产权新药发明人，复旦大学上海医学院教授。

研发成功国家生物技术一类新药“注射用重组链激酶”已在国内推广应用并出口中东、南亚等国家；“注射用重组葡激酶”、“注射用重组双功能葡激酶”、“注射用重组双功能水蛭素”等亦为一类创新性药物。“一种制备重组链激酶的方法”在瑞士、俄罗斯获发明专利。

## 9.1 概述

血栓栓塞性疾病：如冠心病、心肌梗死、脑栓塞等心脑血管疾病是由于血管中有血栓形成，造成血管腔狭窄或堵塞，血流不畅，致使血管所在脏器和组织发生局部缺血、坏死而引起。各种血栓性疾病已成为许多国家人口死亡和致残的第一位原因。

及时使用溶栓药物治疗是有效抢救血栓性疾病患者的重要措施之一。例如，对于急性心肌梗死患者，在发病的头6小时内给予链激酶或尿激酶并辅以阿司匹林和肝素治疗，能使患者在院病死率下降一半以上，并可大大提高其长期存活率。

### 一、溶栓药物的发展

第一代：尿激酶和链激酶。对血栓的选择性差；链激酶是溶血链球菌的产物，抗原性强，易产生耐药、发烧和过敏等副反应；

第二代：组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(scu-PA)，它们是血纤蛋白特异的，溶栓的特异性较第一代明显提高。

第一、二代溶栓药物已能利用基因工程技术生产，成为临床救治血栓性疾病的有效用药。

其不足：治疗剂量大，血浆半衰期短，疗效和血纤蛋白特异性差，仍易发生再梗塞和并发性出血，特别是颅内出血等。

目前正在寻找更安全、高效的第三代溶栓药物。主要是对第一、二代溶栓药物进行改造，如构建t-PA和scu-PA突变体，t-PA和scu-PA的嵌合体；

血小板或血栓调节蛋白单克隆抗体的缀合物等；

以及在动物或细菌等物种中新发现的活性物质，如蝙蝠纤溶酶原激活剂和葡激酶等。

### 二、血栓形成与溶栓原理

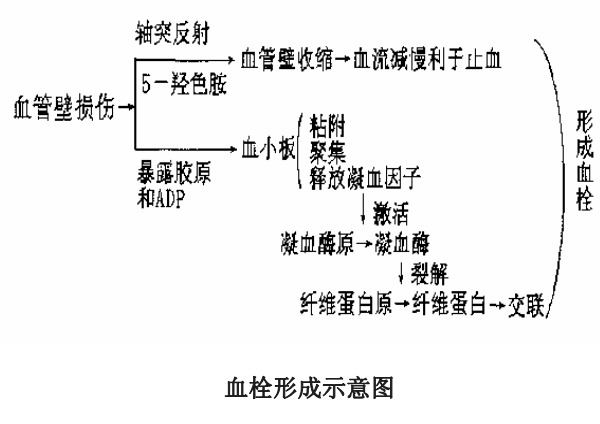
导致血栓形成的因素：

血管壁异常主要是由于物理(如外科手术、放射线及电刺激等)、化学(尼古丁、药物等)和生物因素(动脉粥样硬化斑块、细菌等)等引起血管内皮细胞的损伤，从而降低血管内皮细胞固有的:对血小板的调节作用、抗凝作用和纤溶作用；

血流异常主要指血液粘度改变，以及由于血管变窄、弯曲等引起血流速度等改变，造成血小板易在局部沉积；

血液成分的改变涉及体内的凝血和抗凝系统、纤溶和抗纤溶系统中的各种因子，以及血小板等成分改变等。

这些系统和因子相互制约保持着功能上的平衡。一旦失去平衡，就可引起出血或血栓形成。



凝血过程及凝血和抗凝血因子

凝血过程可分为内源性途径和外源性途径两类。整个凝血过程是一系列凝血因子相继激活，最终生成凝血酶，接着在凝血酶作用下，纤维蛋白原水解成A肽和B肽，由此形成纤维蛋白单体，单体进一步聚合，在血小板、红细胞和白细胞等参与下形成血凝块。

已确定的参与凝血过程的13种凝血因子(Ⅰ-ⅩⅢ)

抗凝血系统中的重要物质

肝素、抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)、C1抑制物(C1INH)、α1-抗胰蛋白酶(α1-AT)、α2-抗纤溶酶(α2-AP)、α2-巨球蛋白(α2-M)及肝素辅因子Ⅱ(HC-Ⅱ)、蛋白质C、蛋白质S、蛋白质C抑制物(APCI)和组织因子途径抑制物(TFPI)等。

纤溶和抗纤溶因子及纤溶过程

纤溶系统由纤溶酶原、纤溶酶原激活剂(t-PA和u-PA)、纤溶酶原激活剂的激活物(激肽释放酶、纤溶酶)和抑制物(PAI-1、PAI-2)，以及纤溶酶抑制物(α2-抗纤溶酶)等组成。

主要生理作用是使体内生成的局部或一过性纤维蛋白凝块随时得到溶解，防止血栓形成，保持腺体排泄通畅，清除伤口凝块以促进伤口愈合等。

人纤溶酶原是单链糖蛋白，在肝脏中合成。在血浆中，纤溶酶原主要以两种形式存在：一是野生型，N端为谷氨酸(Glu)，称Glu1－纤溶酶原，由791个氨基酸组成，其中48个半光氨酸，形成24对二硫键；另一种是截短的形式，N端为赖氨酸(Lys)，由Glu1－纤溶酶原在Lys76-Lys77位肽键水解转化而成，称为Lys77－纤溶酶原。

纤溶酶原中有两个糖基化位点Asn289和Thr346。因糖基化程度不同，可将其分为两种变型：一种是Asn289和Thr346在都有糖链，为Ⅰ型Glu1－纤溶酶原和Lys77－纤溶酶原；另一种变型为只在Thr346有糖链，为Ⅱ型Glu1－纤溶酶原和Lys77－纤溶酶原。在纤溶酶原激活剂作用下，切开Arg561-Val562之间的肽键，纤溶酶原即被激活，转化为纤溶酶。相应地，纤溶酶也有两种形式：Glu1－纤溶酶和Lys77－纤溶酶。

纤溶酶是双链分子，A链为重链，B链为轻链，两者有Cys557-Cys565和Cys547-Cys665两对链间二硫键共价相连。纤溶酶是一种具有胰蛋白酶样特异性的丝氨酸蛋白酶，其活性位点有His603、Asp646和Ser741三者组成。纤溶酶能特异性的水解有Arg-Val形成的肽键。除可水解纤维蛋白外，也可水解纤维蛋白原，凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅸ和Ⅻ等。

纤溶酶逐步水解纤维蛋白，释放一系列片段，统称为纤维蛋白降解产物，它们在生理上具有抗凝作用。

## 9.2 链激酶和尿激酶

### 一、链激酶

链激酶(Streptokinase, SK)是在1933年首先在溶血性链球菌培养液中发现的细胞外菌体蛋白，是最早用于临床的治疗性溶栓药。

链激酶由415氨基酸组成的单链多肽。我国于1994年从链球菌染色体DNA中成功扩增SK基因，并在大肠杆菌中高效表达；于1998年获准批量生产应用临床。

### 链激酶的结构与功能

链激酶分子有3个区：α区：12－150位氨基酸；β区：151－287位氨基酸；γ区：288－372位氨基酸。这三个区都能激活野生型纤溶酶原，其中α区的活性最高，它的活性依赖于纤溶酶的存在；γ区对α区的活性有协同作用，但这种协同作用依赖于α区N端的氨基酸必须是Ile。

链激酶N端的Ile1－Lys59肽段在链激酶激活纤溶酶原的过程中有重要作用，它犹如一个“催化开关(catalytic switch)”，可使纤溶酶原的激活或通过不依赖于血纤蛋白的机制、或通过依赖于血纤蛋白的机制进行。缺失Ile1－Lys59肽段，使链激酶不能对纤溶酶原进行不依赖于血纤蛋白的激活(活性下降600倍)，当与Ile1－Lys59肽段等摩尔共育可恢复其活性。缺失突变体rSKΔ(Ile1－Lys59)的催化活性需要血纤蛋白，但不需要血纤蛋白原。在Ile1－Lys59肽段中，起重要作用的氨基酸残基有Ile1、Val19和Leu42等。

链激酶SK：是非蛋白酶类纤溶酶原激活剂，对纤溶酶原的激活作用是间接的，分3步进行。

①链激酶与纤溶酶原形成等摩尔复合物，发生构象改变，使纤溶酶原部分的活性位点暴露；

②该活性位点催化激活纤溶酶原生成纤溶酶；

③纤溶酶原-链激酶分子转化成为纤溶酶-链激酶复合物。

### 链激酶的应用

链激酶(SK)是一种广泛应用的血栓溶解药物，主要用来治疗的血栓性疾病包括：

①急性心肌梗死；

②肺栓塞。即由栓塞引起的肺动脉阻塞，会引起急性心力衰竭和猝死；

③深静脉血栓形成；

④动脉闭塞(动脉梗阻)等。

链激酶为异源蛋白，对人体具有抗原性，用药后一年内不能反复使用。同时，不少正常人体血浆中可检测出SK抗体，该抗体中和SK活性，因此给药时，应给予足够的剂量。近年来主张“短程大剂量”疗法，即150万IU SK溶于5％葡萄糖溶液100ml中，静脉滴注1h。

重组链激酶

20世纪80年代后期，国内上海医科大学根据从溶血性链球菌分离的溶纤蛋白，测定其N和C端氨基酸序列，作为设计和合成引物的依据，通过PCR扩增了SK基因并进行了改造，实现了在大肠杆菌中的高效表达。

工程菌表达的rSK占菌体总蛋白的65－85％，以包涵体形式存在，经复性处理后纯化，每升发酵液可得600mg纯品，纯度达98－99％，臂活性为10万IU/mg，回收率45％以上。1996年完成Ⅰ、Ⅱ期临床验证，1997年获卫生部Ⅰ类新药证书，1998年获准生产文号，形成商品，进入市场。

通过对rSK进行基因工程改造，可大大提高其使用效力。如将Lys59和Lys386置换成Gln后，用蛋白酶缺陷型枯草杆菌WB600株生产，所得突变体的体外半衰期比与野生型延长21倍，其对纤溶酶原的激活活性不变。

## 二、尿激酶

尿激酶(urokinase,UK)由人肾细胞产生的一种丝氨酸蛋白酶，自尿中分离而得，无抗原性。能直接激活纤溶酶原，使纤溶酶原从精氨酸-缬氨酸处断裂成纤溶酶。UK在肝、肾灭活。t1/2为11～16分。临床应用同SK，用于脑栓塞疗效明显。因价格昂贵，仅用于SK过敏或耐受者。不良反应为出血及发热，较SK少。禁忌证同SK。目前生产上制备尿激酶主要从男性尿液中抽提纯化。尿液中尿激酶含量极低，10吨尿液只能分离出1公斤左右尿激酶。

### 尿激酶的分子结构

尿激酶是一种双链的丝氨酸蛋白酶，有高分子量(54kD)和低分子量(32kD)两种形式。高分子尿激酶由410个氨基酸组成，包含A和B链。

A链含157个氨基酸，由kringle环形区和表皮生长因子区组成。

B链有253个氨基酸，丝氨酸酶活性在B链。A链不稳定，可自溶裂解成各种小片段，当在Lys135－Lys136处裂解时就形成低分子量尿激酶，含276个氨基酸。

### 尿激酶的生物学作用

主要作用是激活血纤维蛋白溶酶原(纤溶酶原)，使其转变成为有活性的血纤维蛋白溶酶(纤溶酶)，从而使血纤维蛋白凝块(血栓)溶解。

尿激酶的临床应用

①治疗急性心肌梗死；②用于治疗脑室内出血；③治疗心绞痛；④其它应用。包括治疗脑血栓、脑栓塞、肺栓塞、人工肾移植、动静脉支血栓以及风湿性关节炎等栓塞性疾病。

## 9.3 葡激酶

葡激酶(Staphylokinase, SAK)是由金黄色葡萄球菌(Staphylocousaureus)溶原性噬菌体所分泌的一种蛋白质。

由于葡激酶的分泌量极少，直接利用金黄色葡萄球菌发酵易被细菌内毒素污染，不仅产量低，而且纯化步骤复杂。

20世纪80年代初，SAKO T等、BehnkeD等和GerlachD等分别从噬菌体SakΦC、Sak42D和金黄色葡萄球菌中提取到葡激酶基因，并成功的在大肠杆菌和枯草杆菌中克隆表达。

### 结构及表达

葡激酶基因编码163个氨基酸残基组成的前体分子，1－27为氨基酸为信号肽序列，成熟的葡激酶有136个氨基酸，是一条单链无二硫键的多肽。成熟的葡激酶容易降解，N端常缺失6或10个氨基酸残基，但活性不受影响。

按噬菌体的不同，葡激酶基因分为3种，即SakΦC、Sak42D和SakSTAR基因。其中，SakΦC基因序列全长1377bp，只有一个ORF，上游包括SD序列、－10区和－35区序列。

CollenD等将去除SAK信号肽编码序列的SAK基因置于tac启动子和两个SD序列的下游，用大肠杆菌进行表达。工程菌经诱导培养，表达产物占菌体蛋白的10％－15％，细菌破碎后，用离子交换层析和疏水层析纯化r-SAK，每ml发酵液中可获得100mg的纯品。

### 生物学作用与作用机理

葡激酶SAK是一种对纤维蛋白高度专一的纤溶蛋白酶原激活物，它本身没有活性，首先与血浆中的纤溶酶原(plasminogen,PLG)形成没有活性的1:1复合物(PLG/SAK) ；在纤溶酶(plasmin, PLM)的作用下，SAK水解掉N端的10个氨基酸,而PLG被PLM/SAK复合物催化为PLM，暴露出活性位点，这样形成PLM/SAK复合物才有活性。

正常情况下，血浆中存在α2－抗纤溶酶，可与葡激酶纤溶酶原复合物中的赖氨酸活性部位迅速结合，形成无纤溶酶活性的大复合物。

SAK有明显的纤维蛋白特异性：

当无纤维蛋白或血栓时，PLM/SAK复合物很快被α2-抗纤溶酶(α2-antiplasmin, α2-AP)灭活(复合物中的纤溶酶原的赖氨酸结合位点被α2-AP占据)，不能激活纤溶系统；

有血栓存在时，纤维蛋白可以通过纤溶酶原上的Lys结合位点(LBS)竞争抑制α2-AP对PLM/SAK复合物的结合，血栓表面上PLG的激活作用增强100倍！从而实现特异溶栓。

另外纤维蛋白与PLM结合后，SAK可以释放出来再循环，增加溶栓效率(一旦复合物形成，PLG反应速度成几何级数增加)。

在遇到血栓中的纤维蛋白时，大复合物中的α2－抗纤溶酶通过纤维蛋白稳定因子与纤维蛋白连接，使α2－抗纤溶酶对葡激酶纤溶酶复合物的抑制减少100倍以上，使葡激酶纤溶酶复合物通过赖氨酸结合到纤维蛋白上，并表现出纤溶活性，溶解纤维蛋白。

### 重组葡激酶

重组葡激酶临床试用于治疗进行心肌梗死。

临床试验表明，葡激酶具有的优点为：用量少；对止血系统干扰小；以及凝前效应低等。缺点为：具有抗原性，诱导抗体产生，不能重复给药。

基因工程改造：改变抗原性；富于抗凝功能；以及延长半衰期等。

寻找SAK变异株

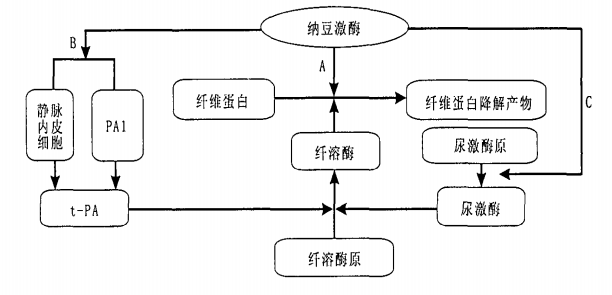
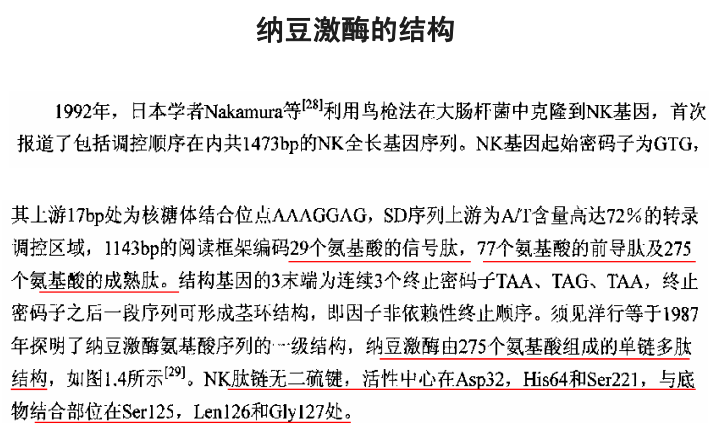
蛋白质工程方法。如：Collen等发现SakSTAR具有三个互不重叠的表面抗原决定簇，在不使其失去活性的前提下，可以通过定点诱变的方法用丙氨酸替代2个或3个氨基酸，从而除去其中两个抗原决定簇，产物为：SakSTARK74E75D77(M8)、SakSTARK35E38(M3)和SakSTARE80D82(M9)。 但是此实验中二者溶栓活性仅为SakSTAR的50%Collen将上述7个氨基酸中的一个或多个翻转为原有的氨基酸，结果意外地发现SakSTARK74(单一地用丙氨酸代Lys74)具有完整的活性。

其它方法：体外分子进化(DNA-shuffling)、基于计算机的分子对接(docking) 。

## 9.4 纳豆激酶

纳豆激酶(Nattokinase, N K; 也称SubtilisinNAT ,SubtilisinBSP) 是由纳豆菌( Bacillus subtilisvar. natto) 产生的一种具有强烈溶栓功能的蛋白酶, 是一种枯草杆菌蛋白酶( Subtilisin)。它是由日本学者于1987 年首次在日本传统食品纳豆中发现提取出来并定名。

纳豆激酶的结构



A纳豆激酶的直接溶栓作用;B激活尿激酶原变成尿激酶;C激活血管内皮细胞产生t-PA;D纳豆激酶的间接溶栓作用, 通过降解和失活PAI-1，增加纤溶作用。

现状

各国已开始积极开发纳豆激酶产品,日本、韩国、朝鲜等许多国家已研制出多种以纳豆激酶为主要成分的产品,大多由纳豆激酶与其他种类的酶制剂复合而成,如菠萝蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等,或添加甘油,蜂蜡及卵磷脂,DHA ,SOD等营养物质,制成粉剂、片剂、软硬胶囊、口服液或保健食品。但是还没有关于临床注射用的纳豆激酶产品的报道,可见在提高纳豆激酶产量及对其纯化生产方面还有待进一步研究。

我国已成功从分泌纳豆激酶的枯草杆菌基因组DNA中扩增得到了纳豆激酶基因,构建了纳豆激酶基因的表达载体,并在大肠杆菌中进行了表达。但尚未有纳豆激酶的口服药剂和保健品得以投产上市。

纳豆激酶的特点

易于提取纯化，成本低廉，溶栓效果好，作用迅速，药效时间长，安全性好，无任何毒副作用等，较目前已开发研制的一些溶栓药物如尿激酶(Urokinase, UK) 、链激酶( St reptokinase, SK) 、组织型纤溶酶原激活剂( Tissue type plasminogenactivator , tPA) 等具有独特的优越性,有望成为一种新型溶栓药物。

当前的溶栓剂缺点及纳豆激酶的优点

当前的溶栓剂缺点：(1)毒性较强、副作用较大; (2)体内半衰期短; (3)价格昂贵；(4)都是静脉注射药物使用不便

纳豆激酶来源于食品安全性高,分子量小,能被消化道吸收。最重要的是NK不但具有溶栓的作用,还能促进体内的t-PA 产生,使之温和、持续的发挥纤溶作用。

纳豆激酶的稳定性

纳豆激酶在低于45 ℃时活性相对稳定,高于60 ℃逐渐失活,反复冻融5 次后,该酶仍能保持95 %以上的活性。

与煮沸的米汤、肉汤或血清蛋白、胃黏液混合可以明显提高该酶的稳定性,甚至在pH2～3 的酸性条件还可保持75 %的活性。

纳豆激酶的高效性

在以大鼠为对象的动物实验中,经过静脉注射发现纳豆激酶的纤溶能力是血纤维蛋白溶酶(plasmin) 的4 倍以上。

纳豆激酶在体内的半衰期则长达8h ,能温和持续的提高血液的纤溶活性。

纳豆激酶的安全性

日本生物科学实验室1999年发表了对小鼠进行大剂量喂服纳豆激酶的10毒性研究报告,结果并未发现畸变现象。

发挥溶纤作用时不水解血浆纤维蛋白原,不易引起出血。

日本上千年来食用纳豆的历史也说明了纳豆激酶的安全性。

健康人口服纳豆激酶的效果

实验表明健康人服用NK,可明显缩短优球蛋白的溶解时间(ELT) ,促进纤溶活性,作用时间可维持2～8 h ,大大长于目前临床上使用的溶栓药物。

此外,口服N K 后优球蛋白的纤溶活性( EFA) 和纤维蛋白降解底物(FDP) 值迅速升高,表明纤维蛋白迅速降解。另外发现t-PA 的量不断增加,第4 d 达到最高,是未服用N K 时的1. 4 倍。

## 9.5 组织纤溶酶原激活剂

组织纤溶酶原激活剂(tissue plasminogenactivator，tPA)最早在人体内发现，它由血管内细胞皮产生。

人的tPA基因位于第8号染色体的p12-q11.2区，全长36594bp，由14个Exon和13个Intron组成。天然的或重组制备的tPA是一个单链分子，含527个氨基酸残基的糖蛋白，有17对二硫键和3个糖基化位点。称单链tPA(singlechain tPA, sctPA)。当受纤溶酶、组织激肽释放酶等的作用，能在Arg275－Ile276肽键处将其裂解为以二硫键连接、由轻链和重链组成的双链tPA(twochain tPA, tctPA)。N端为重链或A链；C端为轻链或B链。

重链包括指状结构域(finger domain)、生长因子同源结构域(growth factor homologous domain)和2个环状或Kringle结构域(K1和K2 domain)。轻链与其它丝氨酸酶有同源性，活性中心由His325、Asp374和Ser481组成。

单链和双链均有生物学活性，但前者的特异性较后者强，而后者的溶栓活性较前者高。pI为7.8－8.6之间，但在pH5.8－8.0较稳定。

三维结构

Ｘ射线晶体衍射示:SAK三维立体结构是椭球形分子,主轴分别为54 Å、42Å、30Å,二级结构则由5条β折叠股构成的β折叠片和1个12个残基构成的α螺旋组成。α螺旋在中间,两边是β折叠股,5个β折叠股包裹在α螺旋之上。Ｎ端的15个氨基酸伸在球体外,非常柔韧。

tPA的生物学活性

tPA对纤维蛋白有很强的亲和力，当血液凝固纤维蛋白形成后，tPA即直接与之结合，纤溶酶原也同时结合，因此，tPA在纤维蛋白表面把纤溶酶原转化为纤溶酶，发挥对纤维蛋白的选择性溶解作用。

tPA的作用是把纤溶酶原在Arg560－Val561处肽键裂解，活化为双链的纤溶酶。

tPA的活性可被纤溶酶原激活剂抑制因子1和纤溶酶原激活剂抑制因子2(PAI-1和PAI-2)所抑制。

重组tPA(rtPA)及其改构

1983年Pennica等从Bowes黑色素瘤细胞系中提取了tPA的cDNA，并在大肠杆菌中表达成功，但由于复性困难，未能形成产品。1987年美国Genetich公司用CHO细胞生产tPA，是第一个被美国FDA批准用动物细胞大规模生产的基因工程产品。

rtPA(Alteplase)与内源性人类tPA是相同的。其不足是它在循环中可迅速被纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)所抑制；在体内的半衰期很短(4－6 min)；治疗时需要持续静脉给药，用量大；且与肝素并用，有出血副作用。

rtPA的改构

①提高rtPA的酶原性

tPA的突出特点是单链形式(酶原)催化活性较高，而酶原性，即双链tPA(酶)与单链tPA的催化效率之比极低(5－10倍)。抑制或降低单链tPA的催化活性，增强双链tPA的催化活性，从而提高酶原性是改构的目标之一。

如将tPA的His144突变成Asp，其突变体tPA(K144D)的酶原性由野生型的9激增到150；将Lys156突变成Tyr，其突变体(K156Y)的酶原性和对血纤蛋白的选择性均明显的增加。

②增强血纤蛋白的特异性和选择性对Pro422进行突变可增强tPA激活纤溶酶原时对血纤蛋白的依赖性。如血纤蛋白对突变体tPA(R275E，P422G)和突变体tPA(R275，P422E)活性的刺激倍数比对野生型分别提高60倍和90倍。

③延长体内半衰期

如将tPA分子的F结构域单独缺失，其半衰期t1/2由4 min增至17.2 min。同时缺失F和E结构域，t1/2进一步增至27.2 min。但F和E结构域双缺失会使对血纤蛋白的亲和力及纤溶活性大为降低。

重组人tPA的临床应用

重组人tPA(alteplasetPA)适用于急性心肌梗死及成年人严重肺梗死的治疗。一般在症状发作后3h内应用，且越早治疗效果越佳。

不良反应：有全身或颅内出血的可能性。或出现过敏反应(0.2－1.8%)；低血压反应(1.7－10.1%)等。对近期有外科手术、外伤及胃肠出血者禁用。

tPA对循环血液中纤溶酶原作用很弱，对与纤维蛋白结合的纤溶酶原作用则强数百倍，所以对血栓部位有一定选择性。t1/2为3分，静脉滴注用于急性心肌梗塞。剂量过大也引起出血。1987 年FDA 批准Genentech的重组tPA(商品名为Alteplase)上市，Alteplase是用重组DNA技术在CHO细胞株中大规模生产tPA；Ecokinase是一种在重组E.coli中表达的，经过改构的人源化tPA。

## 9.6 水蛭素

早在1884年John Haycraft就发现医用水蛭的提取物中含有抗凝血作用的物质。然而，直到1957年Fritz Markwardt才从医用水蛭唾液腺中分离纯化出这种抗凝物质，并命名为水蛭素(Hirudin)。通过鉴定，证实其是一个多肽类化合物，由65～66个氨基酸组成。

天然水蛭蛋白家族具有多种异构体，其氨基酸序列存在一定差异。其N端含有6个Cys残基，形成3对二硫键，使水蛭素N端保持稳定构象。C端富含酸性氨基酸，包括4个Glu和1个Tyr。

水蛭素分子由两个结构域组成，它们分别与凝血酶分子表面两个不同的位点作用。其N端结构域是一个由1～47位氨基酸残基组成的球状致密的核心结构，它与凝血酶的活性位点结合，抑制酶的催化活力；而其带负电荷的C端结构域氨基酸残基(47~65位)则与凝血酶的阴离子结合外侧位点(anion binding exosite)结合，从而抑制凝血酶与纤维蛋白原的相互作用。

水蛭素的羧基端是水蛭素与凝血酶结合所必需的，将其羧基端氨基酸残基去除5～8个后，抗凝血酶活性大大降低；去除9个以上氨基酸残基后几乎完全丧失活性；去除22个氨基酸残基后完全丧失活性。

人工合成水蛭素羧基端肽段活力实验表明，羧基端10肽具有抗凝血酶活性，羧基端12肽是具有最大抗凝活性的最小片段。

重组水蛭素

重组水蛭素的表达：融合表达、非融合表达和分泌表达。

宿主系统包括：大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞等。

重组水蛭素是天然水蛭素的基因重组产物。但在Tyr63无硫酸基，故亦称去硫酸水蛭素。它能与凝血酶以1:1的比例形成紧密但非共价键的结合，能对抗凝血酶的所有药理作用，包括纤维蛋白的形成，FV、FVⅢ和FXⅢ的活性，因此，是作用很强的抗凝血药，且体内和体外均有效。

临床应用

水蛭素可用于各种血栓性疾病，目前应用较多的是急性心肌梗死、不稳定型心绞痛和静脉血栓等。

不良反应与注意事项：水蛭素主要的不良反应为出血，特别是有颅内出血危险，但发生率比肝素低。lepirudin预防术后血栓形成，再阻塞，血液透析等。

# 第十章 反义药物与基因治疗

## 10.1 反义药物

### 反义技术概述

反义技术(antisensetechnology)是采用反义核酸分子(人工合成或生物合成的DNA或RNA，它们能与DNA、RNA互补)抑制、封闭或破坏与疾病发生相关的靶基因表达的一种手段。具有特异性、且操作简单，可用于治疗由于基因突变过度表达所致的肿瘤和遗传疾病，以及抗病毒治疗等。

反义药物是一种具有高度选择性(专一性)的特殊核苷酸类物质，按其化学属性应归属于寡核苷酸类物质。由于它只同人体内对应的mRNA结合，不会影响人体其他组织，故是一种非常安全的药物。

第一个通过FDA认证的反义药物福米韦森(formivirsen, vitravene)由ISIS公司研制, 1998年在美国上市, 是世界上第一个被批准的反义寡核苷酸药物巨细胞病毒(CMV) 复制的抑制剂用于治疗艾滋病患者CMV视网膜炎, 局部治疗新确诊的或对其他疗法无效或不适用的晚期CMV视网膜炎。福米韦生能显著延缓CMV视网膜炎的病情进展, 不良反应是眼内压升高, 轻至中度的可逆性眼内炎症。

2003年又一个反义药物Fuzeon在美国上市。此药是新一代抗艾滋病病毒(HIV)新药，属于病毒的融合阻止剂类药物，能“锁定”HIV基因，使其无法发挥“融合”功能并在人类T淋巴细胞内复制，并最终消亡。Fuzeon的发明在迄今所开发的艾滋病治疗药中堪称为“里程碑”，开创了艾滋病的全新治疗思路。

2006年6月9日，美国FDA又批准了一种新型反义药物在美国上市—ISIS－301012(RASONS)。它是一种专门治疗家族性(遗传性)哮喘的新药，可从源头上遏制哮喘的发生，降低急性哮喘的死亡率。

美国Kalorama咨询公司首席经济师克雷格尔关于反义药物10～15年后的国际市场规模：

治疗精神疾病的反义药物为830亿美元;

治疗肿瘤疾病的反义药物为440~480亿美元

治疗自身免疫系统疾病(如牛皮癣、多发性硬化症、

风湿性关节炎等)的反义药物为420~440亿美元，

抗心血管再狭窄的反义药物为330亿美元，

总合计约2000亿美元。

反义药物分为6类

反义RNA（antisenseRNA）

反义寡核苷酸（antisenseoligodeoxynucleotides，ODNs）

肽核酸（peptide nucleic acids，PNAS）

核酶（ribozyme）和DNAzymeAptamer

小干涉RNA(siRNA)

### 反义RNA

反义RNA (antisenseRNA)是与mRNA互补的RNA分子。

与mRNA分子特异性地互补结合，从而抑制该mRNA的加工与翻译，是原核细胞中基因表达调控的一种方式。许多实验证明，在真核细胞中亦存在反义RNA，但其功能尚未全部明了。

80年代：发现天然反义RNA对基因表达的调控作用。

近年来：通过人工合成反义RNA的基因，并将之导入细胞内，转录出反义RNA，即能抑制特定基因的表达。

阻断某基因的功能，有助于了解该基因对细胞生长和分化的作用。同时也暗示了该方法应用于疾病治疗的可能性。

反义RNA的作用机制

抑制转录：与mRNA 5’互补，形成类似终止子的结构，从而使转录终止。

抑制翻译：与SD结合；与AUG结合；与靶mRNA的非编码区结合、变构，影响与核糖体的结合。

抑制DNA复制：与引物RNA前体互补结合(引物酶在复制起点处合成RNA引物而引发DNA的复制)

反义RNA设计的考虑因素

长的反义RNA并不一定比短的更有效。

在原核生物中针对SD序列及其附近区域的反义RNA可能更有效；在真核生物中，对应于5´端非编码区的反义RNA可能比针对编码区的反义RNA更有效。

尽量避免在反义RNA分子中出现自我互补的二级结构。

设计的反义RNA分子中不应有AUG或开放读框。

还可以将带有ribozyme的RNA连在反义RNA的3´端尾上，当反义RNA与靶mRNA杂交后，即可利用其酶活性来降解靶mRNA。

拷贝数量（双拷贝等）

反义RNA的制备

人工合成RNA（易被细胞的核酸酶降解）

重组DNA（外源cDNA反向插入载体的启动子和转

录终止子之间，构建反义表达载体）

反义RNA导入细胞的方法

显微注射法（人工合成RNA ）

适用于细胞分裂、胚胎发育某一短暂时相的反义技术研究。

共转化法（反义基因的表达载体）

反义技术的基因治疗。

反义RNA的优点和缺点

优点：特异性强

安全（RNA酶水解，不整合）

多靶点（复合反义RNA）

缺点：反义RNA与mRNA互补的亲和力受结合部位两侧的二级、三级结构的影响

### 反义寡核苷酸

antisenseoligodeoxynucleotides(ODNs)

反义DNA

人工合成长度为10～30个碱基的DNA分子及其类似物

反义寡核苷酸的作用机制

细胞质目标

翻译（原核、真核）：防止mRNA和核糖体的结合

细胞核目标

跨过细胞核膜与前体mRNA结合，抑制前体剪接或影响剪接后的mRNA从核中运至细胞质

反义寡核苷酸的制备

可在实验室人工合成

未经修饰，以磷酸二酯骨架[P-O]为基础的ODNs

硫代磷酸型（PS-ODN）：S原子取代磷酸根的羟基，脂溶性，易过膜，提高对核酸酶的稳定性；

研究最深入，应用最广泛；

副作用：凝血时间延长；补体激活（硫代骨架）

双硫代磷酸型：更稳定；难合成

甲基磷酸型：稳定，易吸收，杂交率低

ODNs的化学修饰

烷基化：增加反应性；丫啶环：增加对RNA的亲和力；多聚

赖氨酸：促进穿过细胞膜

反义寡核苷酸导入细胞的方法

通过内吞作用：能量依赖

通过被动扩散机制进入细胞

### 肽核酸

肽核酸（peptide nucleic acids，PNAs）：是一种以肽为骨架的DNA类似物，它是在将反义寡核苷酸的磷酸－糖骨架以肽键取代后得到的一类新型化合物

优点: 是能与互补的DNA、RNA、双链DNA杂交，亲和性高，能像常规的寡核苷酸一样区分错配碱基，能抗核酸酶降解，能以较低的费用大量制备

肽核酸(PNA) 的主链骨架是由N(2-氨基乙基)-甘氨酸与核酸碱基通过亚甲基羰基连接而成的。

其特点：1.与核酸的杂交能力强于核酸间的杂交能力；2.热稳定性高于核酸间的杂交体；3.抗酶解能了极强。由于其非肽和非核酸的结构特点，蛋白酶和核酸酶均不能降解PNA。PNA可以特异性地与DNA或RNA杂交，形成稳定的复合体。PNA由于其自身的特点可以对DNA复制、基因转录、翻译等进行有针对的调控，同时作为杂交探针大大提高了遗传学检测和医疗诊断的效率和灵敏度。

肽核酸的作用机制

转录抑制

翻译抑制

合成

肽核酸主要通过人工合成（类似固相多肽合成）

### 核酶

核酶（ribozyme）：在生物体内能够催化生化反应的核酸类物质，又称“催化RNA”。

作用：RNA的自我裂解、自我剪接、tRNA的转录后加工及染色体DNA终端的合成等，其中尤其重要的是它能够特异性催化RNA剪切。

1981年T.Cech和S.Atman等在研究四膜虫rRNA时发现的；T.Cech用核糖核酸(ribonucleic acid)和酶(enzyme)这两个词“重组”成一个新的词：“Ribozyme”；是指本质为RNA或以RNA为主含有蛋白质辅基的一类具有催化功能的物质。

和传统酶的区别

一般的酶是纯的蛋白质，而核酶是RNA或带有蛋白的RNA；

核酶既是催化剂又是底物。而酶仅催化反应。

核酶的分类

1、异体催化剪切型（大肠杆菌RNaseP）

2、自体催化剪切型(植物类病毒和卫星RNA)

3、第1组内含子自我剪切型(四膜虫大核26SrRNA)

4、第2组内含子自我剪切型

核酶的作用机制

催化性分子

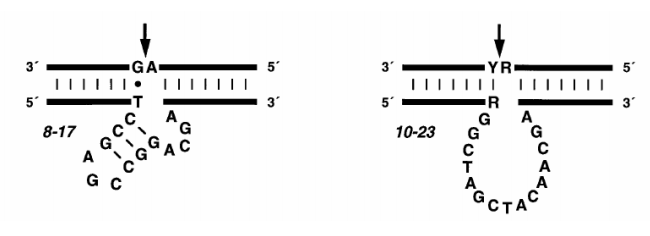
一个核酶分子裂解与之结合的靶向mRNA后，再释放裂解其它靶向mRNA“酶”的活性，有别于反义RNA因此，治疗剂量小

核酶的给药途径

外源性给药方式（注射核酶）

内源性给药方式（核酶基因治疗）

具有RNA切割活性的DNAzyme



上左图即为8－17型脱氧核酶，其两臂分别与底物（上链）的碱基互补配对结合，箭头所示为切割位点

上右图即为10－23型脱氧核酶，其两臂分别与底物（上链）的碱基互补配对结合，箭头所示为切割位点，R＝A或G，Y＝U或C

### RNA干扰

一些小的双链RNA可以高效、特异地阻断体内特定基因表达,促使ｍRNA降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,称为RNA干扰(RNA interference, RNAi,也译作RNA干预或者干涉)

RNAi现象的发现

RNAi，又称为RNA干扰或RNA干涉；是一种由dsRNA所引起的序列特异性基因沉默现象。

1995年，康奈尔大学的研究人员Guo和Kemphues尝试用反义RNA去阻断par-1基因的表达以探讨该基因的功能，结果反义RNA的确能够阻断par-1基因的表达，但是奇怪的是，注入正义链RNA作为对照，也同样阻断了该基因的表达。

Fire等(1998)发现将dsRNA注入线虫体内后可抑制序列同源基因的表达,并证实这种抑制主要作用于转录之后，所以又称转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)。将这一现象称为RNA干扰（RNA interference，简称RNAi）。

在随后的短短一年中，RNAi现象被广泛地发现存在于真菌、拟南芥、水螅、涡虫、锥虫、斑马鱼等大多数真核生物中。

遗传学研究表明，RNAi是真核生物中一种普遍存在且非常保守的机制。

由于RNAi可以作为一种简单、有效的基因沉默（可替代基因敲除）遗传工具，因而在医药开发、基因治疗和功能基因组研究等方面的应用得到飞速发展。

2001年和2002年连续两年被美国Science评选为年度10大突破技术。

RNAi的基本原理

RNAi是一个依赖ATP的过程，在此过程中，dsRNA(外源或内生)首先被降解为具3’端有2～3nt突出、长21～23bp 的小分子双链RNA，这种RNA称为小干扰RNA(siRNA)。siRNA通过碱基互补配对识别具同源序列的mRNA，并介导其降解。在RNAi过程中一种称为Dicer的核酸酶负责将dsRNA酶切转化为siRNA，siRNA形成之后，与一系列特异性蛋白结合形成siRNA诱导干扰复合体(RISC)，此复合物通过碱基互补配对识别靶mRNA 并使其降解，从而导致特定基因沉默。

在RISC中，起靶序列识别作用的是siRNA的反义链，在ATP存在时，依赖于ATP的解旋酶解开siRNA的双链并将其正义链与靶mRNA置换，mRNA取代正义链与反义链互补，然后由活化的RISC在互补区的中间，距离siRNA反义链3’末端约12bp处切断靶mRNA序列。

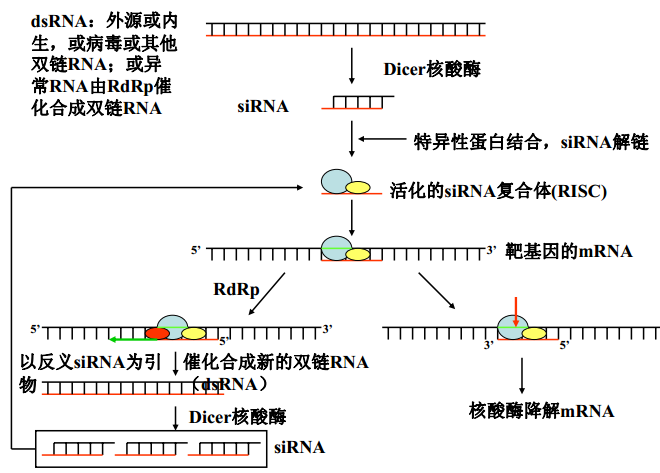
靶基因mRNA

siRNA的反义链

RNAi是生物体抵御外源遗传物质入侵的自我保护机制。

mRNA被酶切破坏，性状无法表达。

RNAi效应具有两个明显的特征，特异性和高效性。干扰的高效性提示在机制中存在信号放大的步骤。许多研究显示RNAi过程中有新的dsRNA分子的合成，当siRNA反义链识别并结合靶mRNA后，siRNA反义链可作为引物，以靶mRNA为模板在依赖于RNA的RNA聚合酶(RdRp) 催化下合成新的dsRNA，然后由Dicer切割产生新的siRNA，新siRNA再去识别新一组mRNA，又产生新的siRNA，经过若干次合成切割循环，沉默信号就会不断放大。正是这种称为靶序列指导的扩增机制赋予了RNAi的高效性和持久性。



疾病治疗

RNAi可以直接用于疾病相关基因的抑制，从而达到疾病治疗或预防的目的。

在治疗病毒性疾病的研究中，可以设计针对病毒基因组RNA的siRNA或针对宿主细胞病毒受体的siRNA来抗病毒，目前针对乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、呼吸道合胞体病毒、流感病毒、脊髓灰质炎病毒、HIV-1、SARS等均取得了令人欣喜的体外病毒抑制作用。

## 10.2 基因治疗

### 概念

美国的联邦食品与药品管理局( FDA) 于1993 年给出“基因治疗”的定义是:“基于修饰活细胞遗传物质而进行的医学干预。细胞可以体外修饰,随后再注入患者体内；或将基因治疗产品直接注入患者体内,使细胞内发生遗传学改变。这种遗传学操纵的目的：预防、治疗、治愈、诊断或缓解人类疾病”

1、体细胞基因治疗( somatic gene therapy)

治疗基因转移到体细胞内使之表达基因产物,以达到治疗目的；

只影响受试者本人,而与后代无关。

2、生殖细胞基因治疗(germlinegene therapy)

将治疗基因转移到患者的生殖细胞或早期胚胎内的一种基因疗法；

永久地改变后代的遗传组成,其目的是要预防后代患特定的遗传疾病。

生殖细胞基因治疗是体细胞基因治疗的延伸与扩展；

各国均禁止将生殖细胞基因治疗用于临床；

我国于1993年制定了《人的体细胞治疗和基因治疗临床研究质控要点》，明确规定仅能进行体细胞基因治疗。

特点

技术路线的多样性；

学科的交叉性；

高风险性；

高度的靶向性。

基因治疗发展经历的3个阶段

第一阶段：70年代－80末，准备时期

又被称为“禁锢时期”

第二阶段：1989－1995年，狂热时期

FDA于1989年批准基因治疗

正式临床试验

第三阶段：1996－现在，理性时期

目前中国有“B型血友病治疗”、“脑瘤自杀基因治疗”和“Ad-P53”已通过国家药审进入临床试用

基因治疗的3原则

安全性(safety)

有效性(efficacy)

稳定性(stability)

伦理原则

1、最后选择原则

某种疾病在所有的疗法均无效或微效时。

2、安全原则

安全不仅仅针对个体，更重要的是针对人类。

3、知情同意原则

基因治疗尚处于实验阶段，必须让患者认识到基因治疗可能的危害

4、公正原则

目前，基因治疗只能用于治病救人

5、保密原则

患者的遗传信息，尤其是基因缺陷不泄露给外界

基因治疗中存在的技术难点

①突变基因定位与定点修复技术未解决,不能去除或纠正异常基因。

②目前的基因导入系统尚不成熟,存在结构不稳定、影响基因组的功能以及治疗基因难以到达靶细胞等隐患；

③转导的外源性基因在细胞内表达难以控制,有一定的随机性，有激活致癌基因或产生野生型病毒的潜在危害；

④无法保障干预生殖细胞基因而不对后代产生医源性的伤害。

### 常用病毒载体系统

反转录病毒

腺病毒

腺相关病毒

单纯疱疹病毒

#### （1）反转录病毒载体

RNA病毒, 基因组大小在8～11kb 之间；

以基因组RNA为模板反转录出双链DNA；

双链DNA能够随机整合到寄主细胞的染色体上, 随着寄主细胞的复制而复制。

1981年，Wei等构建了第1个反转录病毒载体；临床上应用最多的以小鼠白血病病毒为基本骨架构建的反转录病毒载体。

优点:

宿主细胞广泛,能够感染不同生物种类的多种类型细胞;

能高效的感染分裂细胞, 感染率高达100%;

能使外源基因整合到宿主细胞染色体上。

不足之处：

1)不能感染非分裂的细胞;

2)可能产生具有复制能力的病毒;

3)由于是随机整合, 可能引起“插入诱变”;

4)包装外源DNA能力有限, 小于8 kb;

5)要求靶细胞表面要具有反转录病毒的相应受体。

新进展

慢病毒载体的研究和应用（HIV-1)

基因组中存在核定位信号序列, 它能够有效感染并整合到非分裂细胞和最终分化的细胞(除G0期)

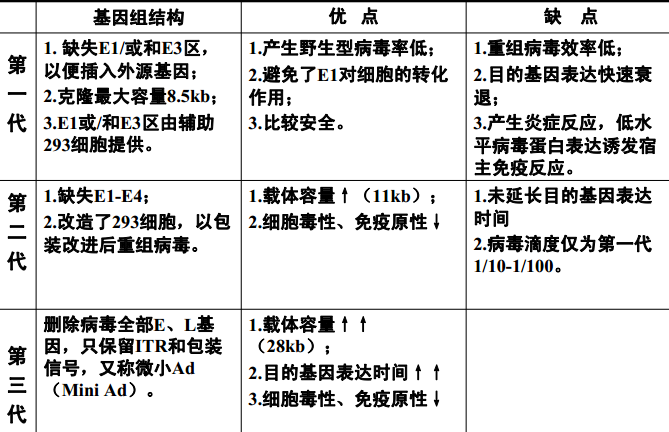
#### （2）腺病毒载体

线性双链的DNA病毒, 基因组为36kb；

不整合到宿主细胞染色体上, 而是以染色体外成分存在；

上皮细胞、角膜和消化道上皮细胞具有天然的嗜性；

与临床疾病相关的腺病毒通常较温和, 很少危及生命



293细胞是由人胚肾细胞经Ad5 DNA片段转染后发生转化而形成的细胞，该基因组中整合有AdE1区的片段，可持续表达E1区蛋白。

优点:

1) 人类是腺病毒的天然宿主, 所以比较安全;

2) 该病毒在体外稳定, 易于制备与纯化;

3) 宿主范围广, 既可感染分裂细胞, 又可感染非分裂细胞;

4)可原位感染, 特别是肺, 可经口服, 喷雾, 气管内滴注等多途径进行治疗;

5) 外源基因表达水平较高。

不足之处:

1)它几乎可以感染所有的细胞, 因此缺乏特异性;

2)不能整合到宿主染色体上, 所以不能持续表达所需产物, 表达时间短暂, 需重复给予载体制剂治疗;

3)因可能刺激免疫反应, 使反复治疗的效果会逐渐降低。

#### （3）腺相关（腺伴随)病毒载体

线性单链的DNA 病毒, 基因组在4.6kb;

繁殖依赖于辅助病毒-腺病毒和疱疹病毒。

生活周期有两个不同的胞内期:

1)缺乏辅助病毒时, 腺相关病毒感染宿主细胞,其基因组会整合到宿主细胞染色体上, 形成潜伏感染状态;

2)当有辅助病毒感染同一个细胞时, 腺相关病毒基因组DNA就会复制。

优点:

目前尚未发现该病毒在人体中致病, 所以比较安全;

感染宿主细胞广泛,包括非分裂细胞和分裂细胞, 特别是能够感染神经元和神经胶质细胞;

能特异整合于人的第19号染色体长臂末端, 减少了插入突变的可能性;

外源基因表达稳定, 3个月至1.5年。

不足之处：

难以大量生产

复制需要辅助病毒

包装外源基因的能力有限, 小于5 kb

临床的应用受到一定限制

亟需建立稳定表达rep和cap的细胞系，但rep表达的毒性可能是其困难所在

#### （4）单纯疱疹病毒载体

基因组长约152kb的双链DNA病毒；

不整合；

对非分裂细胞具有天然的亲和力；

对神经系统细胞具有嗜向性。

多用于帕金森或脑瘤等神经性疾病的治疗；

用作基因转移载体的单纯疱疹病毒主要来源于I型单纯疱疹病毒（HSV-1）

优点:

宿主范围广, 包括大量哺乳动物和鸟类的分裂细胞和非分裂细胞;

载体易于操作;

包装外源基因的能力大, 可插入长达50kb 的外源基因。

不足之处：

野生型单纯疱疹病毒对人类具有明显的致病性, 能够从潜伏状态激活, 所以目前仅限于某些恶性肿瘤的临床治疗试验。

HBV肝靶向性基因治疗载体

用外源目的基因取代一个或多个HBV 编码基因:S/C/P/X; 复制需要通过辅助病毒（包装信号ε缺失）基因组的反式互补来实现。

帕金森病（PD）的基因治疗

酪氨酸羟化酶基因:

L-酪氨酸转换成L-dopa

神经营养因子基因

早老性痴呆（AD)的基因治疗

ß淀粉样蛋白

ß-amiloidprecursor proteinAPP

神经营养因子基因

### 肿瘤基因治疗的基本策略

1. 癌基因表达的反义抑制

利用反义DNA、反义RNA、核酶(Ribozyme)技术，抑制癌基因的表达，可以抑制肿瘤。

c-myc的反义核酸在淋巴瘤细胞中有抗增殖活性。

以反向K-ras质粒转染小细胞肺癌细胞株，抑制了K-ras的表达，并且抑制肿瘤在裸鼠体内的生长,采用ras癌基因特异的核酶，用逆转录病毒导入膀胱癌EJ细胞，发现肿瘤细胞的致癌性和转移性均降低了50％。

2. 抑癌基因克隆和表达

在目前已分离克隆的抑癌基因中，对RB、p53、nm23等在肿瘤治疗方面的作用研究最为深入。

恢复视网膜母细胞瘤、小细胞肺癌等肿瘤细胞中RB基因的表达对于这类肿瘤的治疗具有一定的临床价值；

以野生型p53基因替换肿瘤细胞中突变的p53基因是p53基因治疗最基本的应用策略；

恢复肿瘤细胞中nm23基因的表达对于防止肿瘤的转移具有积极意义。

3.宿主免疫功能增强

向肿瘤细胞和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中导入细胞因子基因或肿瘤相关性抗原基因、B7共刺激分子基因等，可以增强宿主抗肿瘤免疫功能。

目前用于临床的细胞因子有IL-2、TNF-α、IFN-γ、GM-CSF等。

肿瘤细胞逃逸机体免疫反应的原因之一是许多肿瘤细胞缺乏B7共刺激分子，将B7基因导入肿瘤细胞中，再还输小鼠体内。无B7的小鼠1月后半数致死，导入B7的小鼠全部度过3月的实验期。

4 .肿瘤治疗药物前体的转换

又称自杀基因(suicide gene)疗法。将自杀基因导入细胞中，这些基因的产物可将无害的药物前体转变为有毒的产物，从而将细胞杀死。

目前常用的自杀基因有单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因(HSV TK)和细菌的胞嘧啶脱氨酶基因(CD) 。

TK能将无毒的GCV(丙氧鸟苷)转化为有毒的三磷酸GCV，CD能催化5-氟胞嘧啶转化为5－氟尿嘧啶。这些转化产物在DNA复制时掺入DNA分子中，抑制了DNA的合成。

5.多药抗性基因的转移

肿瘤化疗的最大副作用就是骨髓抑制。将多药抗性基因(multi-drug resistance gene,MDR)导入骨髓干细胞，可以控制化疗的副作用。

MDR1基因编码170KD的跨膜P-糖蛋白，作为能量依赖性的药物外运泵，能将化疗药物驱逐出胞外，使细胞获得抗药表型。这一策略能使骨髓耐受大剂量化疗。

1) 直接疗法：纠正突变基因

也就是在原位修复缺陷的基因，以达到治疗目的。这种方法上较理想的基因治疗策略，由于存在某些问题，目前正在努力之中。（未实现）

2) 间接疗法：以正常基因替代致病基因。

导入外源正常基因，代替有缺陷的基因。对靶细胞而言，没有去除或修复有缺陷的基因。

二者均是用DNA重组技术设法修复患者细胞中有缺陷的基因，使细胞恢复正常功能而达到治疗遗传病的目的。

途径

就基因转移的受体细胞不同，基因治疗有两种途径：

(1).生殖细胞基因治疗

(2).体细胞基因治疗

(1).生殖细胞基因治疗

理论上将正常细胞基因转移到患者的生殖细胞（精细胞，卵细胞早期胚胎）使其发育成正常个体。这是理想的治疗方法，从根本上治疗遗传病，使其有害基因不能在人群中播散。

存在的问题

1）靶细胞的遗传修饰至今尚无实质性进展；

2）基因转移效率不高，只能用显微注射方法；

3）只适用于排卵周期短而次数多的动物，很难适用于人类。

（但目前辅助生殖技术的发展较为有效的解决了获取卵细胞的办法。一次可获取少者3-5个，多者十几个）

(2)．体细胞基因治疗（somatic cell gene therapy）

是指将正常基因转移到体细胞，使之表达基因产物，以达到治疗的目的。但有害基因能遗传给后代。

策略

（1）正常基因转移至体外培养的体细胞，有效表达后，再回输到体内。

（2）正常基因导入靶细胞，定位整合到染色体上，准确的替换异常基因，是理想的措施。

（3）随机整合，非特定座位，只要有效的表达即可达到治疗的目的。

（4）体细胞基因理论不必矫正所有的体细胞。

存在的问题

(1) 对特定座位基因转移，目前还存在较大困难；

（2）随机插入可能引起后代的基因突变。

### 基因治疗的方法（The methods of gene therapy）

实施基因治疗的第一个关键性步骤是基因转移

#### 一、基因转移方法

1.正常基因的分离与克隆

基因治疗首先获得目的基因通常从基因组中分离

经克隆

↓

定位

↓

表达

↓

评价表达情况

2.外源基因的转移

通过不同方法，将目的基因转移至受体细胞。

（1）化学法

磷酸钙沉淀法：

目的基因与磷酸钙等物质混合，形成沉淀的DNA微细颗粒，易通过细胞膜进入细胞内，并整合到受体细胞基因组中，在适当条件下得以表达。方法简单，但转化效率低。

Ca2(PO4)2+DNA →混合微细颗粒

（Ca离子浓度125 mmol，DNA 离子浓度

5～0ug/ml。PH 7.0）

↓

沉淀反应20~30min

↓

细胞在沉淀物中暴露5~24h

(2)物理方法

A.电穿孔法（electroporotion）

将细胞至于高压脉冲电场中，通过电压使细胞产生可逆性的穿孔。周围基质中的DNA可渗进细胞，进而表达。瞬间细胞细胞膜核摸通透性增加高压脉冲DNA渗入细胞

(3) 通过同源重组定点插入珠蛋白基因

重组后，插入外源基因外源基因片段带有—neo基因（新霉素抗性基因），重组后的细胞在含有neo 的培养基中生长，没有插入新基因的细胞死亡，将有重组的细胞筛选出来。

(4) 病毒介导基因内转移（Viral mediated transfer）

是通过病毒为载体（vector），将外源基因通过重组技术与病毒重组，然后去感染受体细胞。

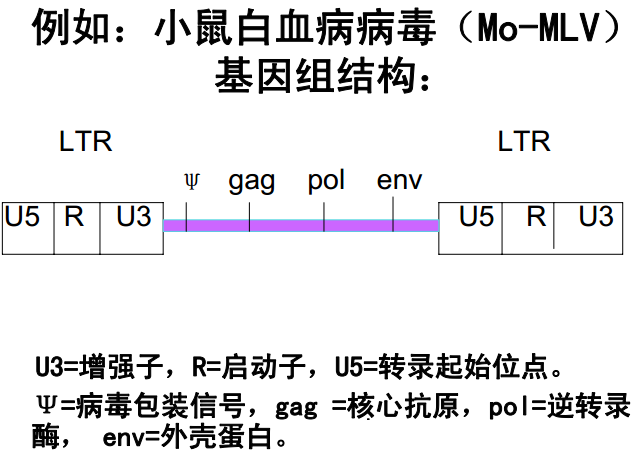
常用的病毒载体

DNA病毒

逆转录病毒(RNA)

逆转录病毒（retrovirus）

目前应用最多的最成功的是逆转录病毒，病毒感染细胞后，其基因组RNA 经逆转录产生双链DNA拷贝，插入宿主染色体形成前病毒（provirus），前病毒转录产生的正链既是病毒RNA，再与前病毒编码的外壳蛋白包装成新的病毒颗粒。完整的病毒颗粒具有插入宿主染色体必需的全套酶系统，适用于介导基因转移。



逆转录病毒载体优点：

①高效感染宿主细胞，转染率可达100%；

②病毒基因和所载的外源基因都可能表达；

③宿主范围广，可同时感染大量细胞并长期存留

缺点

①病毒基因容量有限，一般只能插入7kb左右片段

②病毒随机插入靶细胞基因组中，因病毒具有强大的启动子和增强子，能使插入点附近的基因过度表达或失活，插入的外源基因可能不适当的表达；

③逆转录病毒有致病作用，可能使受体细胞癌变根据逆转录病毒的缺点，人们有目的地将其改造，保留其优点，除去癌基因和病毒基因，保留LTR和ψ包装信号。

#### 二、靶细胞的选择

是指接受外源Gene的体细胞，选择靶细胞的原则：

1）必须较坚固，便于体外培养和进行遗传技术操作；

2）易于由人体分离又便于输回体内，具有增殖优势，生命周期长，能存活几月至几年，或整个生命周期；

3）易于受外源遗传物质转化。

某些代表性细胞

外周血T淋巴细胞、皮肤成纤维细胞较符合上述要求。

此外，造血干细胞—β地中海贫血、严重复合免疫缺陷病等基因治疗。

肝细胞—家族性高胆固醇血症、低密度脂蛋白病的基因治疗。

#### 三、基因治疗存在的问题与论理学

基因治疗的研究与实践中存在若干重要问题，所以更多的是处于研究阶段，临床应用还有待深入。

1.导入基因的持续性和高效表达

如何提高基因的持续高效表达，从下列几方面考虑：

选择高效的基因转移方法；

选择适当的受体细胞（生命周期长的细胞）

选择适当的载体（广泛表达或特异性表达的载体，以使Gene高效表达）

2. Gene治疗与社会伦理道德

体细胞Gene治疗符合伦理道德，没有争议。

生殖细胞Gene治疗可能改变正常人的遗传特征，存在某些争议。然而生殖细胞的基因治疗又是一个不容回避的课题，因为它比体细胞基因治疗更为彻底。所以，随着分子生物学技术的发展，Gen治疗技术的成熟，将回答伦理道德方面的问题，相信生殖细胞的基因治疗将会被人们接受。

#### 四、基因治疗的现状与前景

体细胞基因治疗临床实验已经开始，生殖细胞Gene治疗正在完善。进行基因治疗必须具备一定条件。

具备下列条件

选择适合的疾病，清楚疾病的发病机理，Gene的结构和功能。

被纠正的基因已克隆，并清楚Gene表达与调控机制与条件。

选择适当的受体细胞并在体外有效表达。

安全有效的基因转移方法，以及供利用的动物模型。

基因治疗实例

1. 复合免疫缺陷综合征的基因治疗(人类成功例子)ADA缺乏症—致死性疾病，患者由于腺苷酸脱氨酶（ADA）缺乏。

ADA-Gene + vector （逆转录病毒）

重组分子患者T 细胞IL-2刺激C分裂

导入

细胞生长分裂

10天

Gene表达

回输患儿体内

1~2月治疗一次10个月

患儿体内ADA水平达正常人的25%

2. 乙型血友病

XR ，患者凝血因子Ⅸ缺乏，Ⅸ因子基因定位在Xq26.3～q27.2。临床表现，易出血，凝血时间长，轻伤、小手术后常出血不止。发病率为1/30000。

例如：我国学者薛京伦实施的FⅨ的基因治疗。

逆转录病毒载体+ FⅨcDNA重组体

5` LTR FⅨneo SV PSO LTR 3`

导入仓鼠细胞（CHO ）→FⅨ表达；

导入乙型血友病患者皮肤成纤维细胞（体外培养）→FⅨ表达；

导入乙型血友病患者皮肤成纤维细胞（体外培养）→回植病人皮下→FⅨ基因表达，FⅨ基表达水平达正常人的5%。

是我国基因治疗成功的例子。

3. 黑色素瘤的基因治疗

肿瘤基因治疗是人们十分关注的问题，进行了广泛的探索。研究发现，肿瘤浸润淋巴细胞—TIL，它积聚肿瘤部位，并在该处持续存在而无副作用，利用此特点协助治疗肿瘤。

例：细胞因子基因治疗和肿瘤坏死因子基因治疗

①IL-2 Gene②TNF-Gene

（白介2）（肿瘤坏死因子）

逆转录病毒载体

导入

TIL（体外培养的自体细胞）

回植患者体内

TIL进入自体肿瘤部位，提高细胞因子杀伤肿瘤

细胞的作用。

4.自杀基因的基因治疗

原理：即用(逆转录)病毒载体将编码某种酶的基因(自杀基因)转染到肿瘤细胞中，此酶可将一种无害的药物前体转变为细胞毒复合物，进而杀伤肿瘤细胞(肿瘤细胞不能复制而死亡)。这种基因载体只能在特定的组织或肿瘤中表达，而正常细胞中不表达。

自杀基因+ 病毒载体

转染

重组载体

药物前体(无毒)

Gene→酶→↓

药物复合物(有毒)

细胞死亡

例如：

单纯疱疹病毒哺乳动物细胞

HSV Gene-TK

（在肿瘤细胞中表达,正常细胞中不表达）Gene—TK

GCV（胸苷类似物）

TdR

P p

GCV---p

抑制DNA合成脱氧胸苷酸

肿瘤细胞死亡

邻近细胞死亡/凋亡（旁观者效应）

# 第十一章 抗体工程制药

抗体工程

通过对抗体分子结构和功能关系的研究，有计划地对抗体基因序列进行改造，改善抗体的某些功能的技术。

抗抗体体是是对对其抗原有其抗原有极强专极强专一性的一性的巡弋巡弋飞弹飞弹

研究 以免疫转印法检测特定抗原

医疗 以毒素连结抗体攻击病变細胞

检验 以ELISA 侦测特定病原体

第一个上市的单克隆抗体药物：

针对EGF受体的IgG1单克隆抗体－治疗结直肠癌

整体水平抗体生成技术：多克隆抗体（抗血清）

细胞工程抗体生成技术：单克隆抗体

基因工程抗体生成技术：

嵌合抗体、改形抗体

“小型化抗体”（单链抗体）

组合抗体库技术

噬菌体抗体库技术

Ig基因转基因小鼠

抗体真核表达技术

## 第一代免疫血清

用抗原免疫动物来获得多克隆抗体，以1890年德国军医贝林(Behring)发现白喉抗毒素为代表。并成功使用白喉抗毒素血清治愈白喉病人。此后，白喉抗毒素血清被迅速推广，使白喉的病死率从62%降到10%。

缺点：特异性差,易出现交叉反应。

多克隆抗体(polyclonal antibody)

指由不同B细胞克隆产生的针对抗原物质中多种抗原决定簇的多种抗体混合物。

如:免疫血清(含多种特异性抗体)

实际意义：

（1）预防、治疗感染性疾病，

如：破伤风抗毒素血清Ᏸ抗破伤风，胎盘球蛋白Ᏸ抗病毒感染等

副作用：Ᏸ超敏反应

（2）临床诊断，如：肥达氏反应--伤寒、副伤寒

缺点：特异性差。

传统抗血清

抗原

免疫

所有抗体混合

## 第二代单克隆抗体

以1975年Kohler和Milstein创建杂交瘤技术制备单克隆抗体为代表；

杂交瘤技术：将具有无限繁殖能力、不能分泌抗体的骨髓瘤细胞与具有抗体分泌能力、不能无限繁殖的B细胞，在一定条件下进行细胞融合，产生既能无限繁殖又能分泌抗体的杂交瘤细胞。

由单一克隆的杂交瘤细胞分泌的抗体，只针对于一个抗原决定簇—单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)

单克隆抗体优点：

①高度纯一

②高度专一

应用：

疾病的论断和治疗(生物导弹)

生物大分子的鉴定、定位和分离纯化

细胞器的鉴定、定位和分离

特定细胞或病毒的鉴定、定位和分离

单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)

### 杂交瘤技术产生的3个技术关键

1. B淋巴细胞与骨髓瘤细胞的特性：

B淋巴细胞(B lymphocytes)：

接受抗原刺激后，能分泌针对该抗原的特异性抗体，在体液免疫中具有重要功能。

B淋巴细胞本身是一种终末分化细胞，通常不再进行细胞分裂，存活一段时间后便会死亡——短命细胞

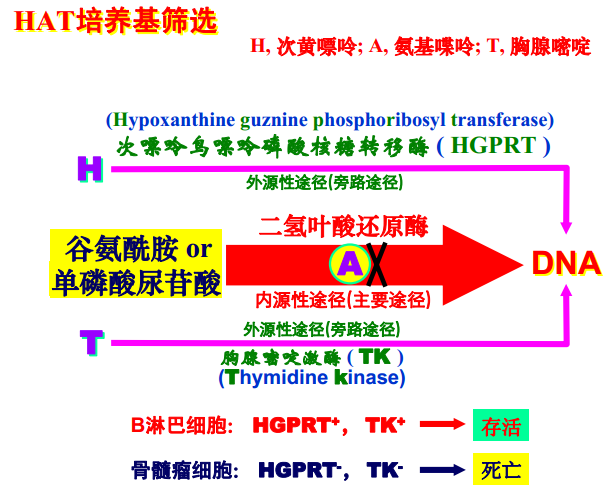
骨髓瘤细胞(myelomacells):

恶性增殖的转化细胞，只要营养条件适合可永远分裂和存活——长命细胞

经筛选与驯化，现已建立多种骨髓瘤细胞株——没有抗体分泌物

2. 细胞融合技术：

3. 杂交瘤细胞的筛选：



### 杂交瘤技术的操作流程

#### 动物免疫：

目的：

在细胞融合后获在细胞融合后获得尽可能多的分得尽可能多的分泌针对于该目标泌针对于该目标抗原的特异性抗抗原的特异性抗体的杂交瘤细胞体的杂交瘤细胞..

免疫途径：

☺常规免疫法 “稳妥；优势克隆”

☺脾内一次性免疫法 ““省时；省抗原省时；省抗原””

☺短程免疫法 “省时”

☺体外免疫法 “操作繁琐”

常用免疫方法：

皮下注射

腹腔注射

静脉注射

常规免疫法：

第1次免疫：抗原+福氏完全佐剂

第2次免疫：抗原+福氏不完全佐剂

第3次免疫：抗原+不加佐剂

第4次免疫：抗原+不加佐剂

(皮下注射或静脉注射)

(皮下注射)

(皮下注射)

(静脉注射)

皮下注射

腹腔注射

静脉注射

免疫途径：免疫途径：

#### 细胞融合及HAT筛选

病毒介导的细胞融合病毒介导的细胞融合

PEGPEG介导细胞融合介导细胞融合

电激融合电激融合

细胞融合方法：细胞融合方法：

细胞悬液的制备与融合细胞悬液的制备与融合细胞悬液的制备与融合

(1) (1) 脾细胞悬液的制备：脾细胞悬液的制备：最后一次免疫后第最后一次免疫后第33天制备天制备

(2) (2) 骨髓瘤细胞悬液的制备：骨髓瘤细胞悬液的制备：于对数生长期制备于对数生长期制备

(3) (3) 细胞融合：细胞融合：50%PEG(1000~4000)50%PEG(1000~4000), pH8.0, , pH8.0,

C, 1minC, 1min

HAT培养基的筛选：HATHAT培养基的筛选：培养基的筛选：

融合后细胞混合液融合后细胞混合液

HATHAT培养基培养基

2 weeks later2 weeks later

HTHT培养基培养基

正常培养基正常培养基

1 week later1 week later

抗体的检测抗体的检测

要求：

简便、快速、敏感;

在短时间内能检测大量样品

常用方法：常用方法：

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbentassay, ELISA)

间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescence, IFA)

放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)

双相扩散法

克隆化克隆化克隆化

常用克隆化方法：常用克隆化方法：常用克隆化方法：

有限稀释法有限稀释法

软琼脂平板法软琼脂平板法

显微操作法显微操作法

龜龜8080个细胞个细胞/96/96孔孔

龜龜饲养细胞饲养细胞(feeder cells)(feeder cells)

ELISAELISA法检测单克隆杂交瘤细胞的培养上法检测单克隆杂交瘤细胞的培养上清，选出分泌特异性抗体的阳性孔，所分泌抗体清，选出分泌特异性抗体的阳性孔，所分泌抗体即为即为单克隆抗体。单克隆抗体。

大规模培养——批量生产单克隆抗体大规模培养大规模培养————批量生产单克隆抗体批量生产单克隆抗体

常用的大规模培养方法：常用的大规模培养方法：常用的大规模培养方法：

动物接种法动物接种法

转瓶培养法转瓶培养法

细胞培养罐法细胞培养罐法

Έ盐析

Έ凝胶过虑

Έ离子交换

Έ亲和层析

Έ辛酸沉淀法

单抗纯化方法：

### 单克隆抗体特性

理化性状高度均一，生物活性专一，只与一种抗原表位发生反应，特异性强，纯度高，易于实验标准化和大量制备

缺点

作为异源蛋白,可在体内诱发抗鼠抗体的生成,使其半衰期缩短,药效降低,应用次数越多,药效越小;

大剂量鼠源性异源蛋白的使用还可能引起超敏反应;

人源杂交瘤细胞系存在建株难、易出现染色体丢失的问题,更存在不能用抗原去免疫人体的问题;

McAb生产成本较高,价格昂贵,难以普及应用;

B细胞与骨髓瘤细胞的融合率低,难以获得稀有抗体;

作为完整的抗体分子,相对分子质量较大,很难通过血管间隙,吸收率较差。

## 第三代基因工程抗体

利用重组DNA 和蛋白质工程技术,对抗体基因进行加工改造和重新装配,经转染适当的受体细胞所表达的抗体分子。

以1994年Winter以基因工程方法制备抗体为代表。

其主要工作包括: 一是运用DNA重组技术对已有的McAb进行“人源化”和“小型化”的改造;二是用噬菌体抗体库技术筛选、克隆新的McAb。

### 小鼠McAb的人源化

①嵌合抗体：小鼠McAbV 区与人抗体C区拼接形成“人鼠嵌合抗体”。

方法：建立分泌鼠源性特异性McAb的杂交瘤,从中克隆V 区基因,再克隆人抗体C 区基因,将两者连接成嵌合基因后插入载体,最后在真核系统或原核系统表达嵌合抗体分子。

在一定程度上降低了抗鼠抗体的生成。

1998年8 月美国食品药品管理局正式批准抗肿瘤坏死因子α(tumornecrosis factorα, TNFα) 的人鼠嵌合抗体应用于慢性肠炎,是首例作为慢性病治疗药品上市。

②人源化抗体

小鼠的CDR 序列移植到人抗体V 区框架中,产生CDR 移植抗体,即人源化抗体。

③完全人源抗体

将小鼠免疫球蛋白(immunoglobulin , Ig) 基因敲除,转以人Ig轻、重链基因片段(约1.8 Mb) ,抗原刺激后,在小鼠体内产生针对该抗原的人Ig,再经杂交瘤技术大量生产。

### 小分子抗体

Ig可以被分解为不同的片段,如F(ab’)2、Fab 和Fc;含重链、轻链V区的Fv片段。

这些小片段相对分子质量小、穿透力强、抗原性低、并可在原核系统表达。

它们既可与抗原结合,还可以相互结合成为双特异性抗体,或与适当物质(酶、生物素、荧光素、同位素、药物、毒素或细胞因子等) 结合。

ScFv（单链抗体）和DsFv（二硫键稳定型Fv 抗体）

ScFv是将抗体重链、轻链V区通过一段连接肽连接而成的抗体V 区单链片段。

其连接肽一般为15 个氨基酸,序列为( Gly4Ser) 3 。

与完整抗体及Fab段相比,具有在非靶向组织中滞留时间短、血液清除快、组织穿透力强以及特异性高、可在体外用免疫学方法筛选等优点;尤其可在细菌中表达,易于基因工程大量生产,并可构建与其他效应分子连接的融合蛋白。

DsFv是在轻链、重链V 区适当部位各引入1 个半胱氨酸,形成以二硫键固定的Fv 段。其结合能力及稳定性均优于ScFv，用DsFv构建的免疫制剂已进入临床试用前期阶段。

BsAb（双特异抗体）

BsAb是在ScFv的基础上,用第3条连接肽将2个或2 个以上具有不同抗原特异性的ScFv串联起来,因此具有多个不同的抗原结合位点,将药物、酶、放射性核素等富集到靶位。

大小仅为IgG的1/3 或F(ab’)2的1/2 ,是相对分子质量最小的双功能抗体。

抗CD19/抗CD3 双特异性antibody ,可介导T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

噬菌体抗体库技术

Repertoire of antibodies displayed on phages

PCR扩增抗体全套V区基因，重组到噬菌体载体，并通过与单链噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白，使Fab或ScFv表达在噬菌体表面，形成噬菌体抗体库。

采用亲和层析将固相化抗原与抗体库孵育，通过数次“吸附－洗脱－扩增”筛选出特异性噬菌体抗体，感染大肠杆菌后增殖、表达、活化,从而获得大量特异性抗体。

基本方法

目的基因

抗体库技术的载体

淘筛（panning）

表达与鉴定

表达载体:较广泛使用的是以噬菌粒为基础的载体。

构建方法：

提取B 淋巴细胞RNA, RT－PCR 扩增V 区基因;

用2种内切酶分别对纯化的轻链PCR 产物及表达载体进行双酶切后分离纯化、连接,电击转化感受态细菌并扩大培养,提取质粒,即为轻链库；

再分别对经纯化的重链PCR 产物和轻链库进行双酶切,纯化回收后连接,电击转化感受态细菌,加入辅助噬菌体进行培养,离心取上清,加入PEG 沉淀噬菌体颗粒,即得噬菌体抗体库。

特点

模拟全套天然抗体库

避开了人工免疫和杂交瘤技术

可获得高亲和力的人源化抗体

噬菌体表面展示系统(phage surface display system)

1990年Mc Cafferty等成功地建立了噬菌体表面展示系统，通过将抗溶菌酶单链抗体基因克隆于fd噬菌体基因3的下游，使ScFv以融合蛋白的形式展示于噬菌体表面，利用亲和层析，两轮富集达106倍。该技术的成功给抗体基因的筛选工作带来了革命性的变革。

噬菌体表面展示文库技术的要点

从免疫或未被免疫的B细胞中PCR扩增抗体全套基因片段

随机克隆入相应载体形成组合文库

将基因组合文库插入噬菌体编码膜蛋白的基因g3或g8 的先导系列的紧靠下游

外源基因表达多肽以融合蛋白形式展示在外壳蛋白N端

用固相化抗原经“亲和结合一洗脱一扩增”数个循环直接、方便、简捷、高效地筛选出表达特异性好、亲和力强的抗体噬菌体库。

筛选到的噬菌体再将基因g3或g8切除后，转入大肠杆菌，

使翻译出的抗体分泌到细菌的质周腔内，形成游离的抗体片段，经过纯化即可获得目的抗体。

该项技术的优点:

Ṉ将抗体的基因型和表型紧密联系起来;

Ṉ可绕过杂交瘤技术，不需要复杂的基因工程技术;

Ṉ抗体基因筛选的范围广;

Ṉ技术稳定、可靠、生产周期短;可规模化生产;

Ṉ适用范围广，既可用于抗体制备，也适用于其它蛋白如激素、酶、药物、随机多肽等的生产。

噬菌体抗体库技术的发展具有很大优越性。它简单易行，筛选容量大，效率高，绕过了细胞融合及免疫等步骤，而且在表型一基因型的统一和识别一增殖过程上模拟了B细胞的成熟过程，从而在实际应用上具有很大意义。

抗体治疗药物

放射性核素标记的抗体治疗药物

抗癌药物偶联的抗体药物

毒素偶联的抗体药物

# 第十二章 基因工程疫苗

在历史上，人类所从事的科学探索中，没有哪一项比疫苗科学所产生的成果应用于传染病的预防更具现实意义。

疫苗学上最早、最成功的事例：

牛痘(接种) ——预防天花

1980年5月世界卫生组织宣布人类成功消灭天花

## 疫苗的种类

### 传统疫苗

减毒活疫苗

应用毒力变异获得毒力降低或无毒株制备而成

灭活疫苗

用物理、化学方法杀死微生物

### 新型疫苗

①亚单位新型疫苗

②结合疫苗

③合成肽疫苗（抗原肽疫苗）

④基因工程疫苗

\*重组抗原疫苗

\*重组载体疫苗

\*DNA疫苗

\*转基因植物疫苗

传统疫苗的局限性

动物和人类的病毒需要在动物细胞中培养,这使得疫苗生产的成本很高;

疫苗中的致病物质在疫苗生产过程中有可能没有完全杀死或充分减毒,这会导致疫苗中含有强毒性致病物质,进而使得疾病在更大的范围内传播;

减毒菌株有可能会发生突变;

有些疾病(例如艾滋病) 用传统的疫苗防治收效甚微等。

### 基因工程疫苗的概念

种类

亚单位疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗、肽疫苗等

基因工程疫(菌)苗是一类通过DNA重组技术,获得病原体保护性抗原物质,通过免疫接种，能够有效刺激机体产生相应免疫应答,从而达到防御病原体入侵疫苗制品。

#### 基因工程亚单位疫苗（subunit vaccine)

定义：只含有病原体的一种或几种抗原,而不含有病原体的其他遗传信息。

特点：不含有感染性组分,因而无须灭活,也无致病性。

研制亚单位疫苗的原则

1、明确编码具有免疫活性的特定抗原的基因结构：选择病原体表面糖蛋白编码基因；

易变异的病毒(如A型流感病毒) 则可选择各亚型共有的核心蛋白的主要保护性抗原基因序列。

2、合适的表达系统用于生产克隆基因产物。用于亚单位疫苗生产的表达系统主要有大肠埃希氏菌、枯草杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳类细胞、转基因植物、转基因动物(乳腺反应器)。

标准

安全

有效

亚单位疫苗优点

避免了直接使用病原物而使接受者可能致病的危险;

利用纯化的蛋白质作为免疫原,可以避免由于外源蛋白、核酸的混杂而造成的副作用;

一种潜在的标记疫苗,很容易鉴别免疫原和隐性感染以及强毒感染后耐过动物;

免疫效力要比一般的灭活疫苗高且安全经济;

操作简便,成本低,适应于工业化生产。

亚单位疫苗缺点

不具有感染性,所以它不能激活MHCⅠ分子(主要组织相容性抗原Ⅰ),也就是很难激活杀伤性CD8 T 细胞,因而激活的免疫反应不及活载体疫苗;

疫苗要辅以佐剂,免疫剂量相对核酸疫苗等要大一些。

#### 病毒样颗粒疫苗(Virus like particles)

用于免疫的抗原物质模拟了其天然结构，诱导的体液和细胞免疫反应具有更强的针对性，保护效果更好。

#### 基因工程活载体疫苗

用基因工程的方法对细菌和病毒进行改造,使之成为重组活疫苗(live recombinant vaccine)。这种重组活疫苗可以是非致病性微生物通过基因工程的方法使之携带并表达某种特定病原体的抗原决定簇基因,产生免疫原性;也可以是致病性微生物通过基因工程的方法修饰或去掉毒性基因以后,仍保持免疫原性。在这种疫苗中,抗原决定簇的构象与致病性病原体抗原的构象相同或者至少非常相似。

#### 基因突变疫苗及基因缺失疫苗

人为地使病毒的某一基因完全缺失或发生突变从而使该病毒的野毒株毒力减弱,不再引起临床疾病,但仍能感染宿主并诱发保护性免疫力。

最具代表性的成功的例子：猪伪狂犬病毒(PRV) 糖蛋白E 基因(原称gI基因) 缺失(gE-) 及胸腺核苷酸激酶基因突变失活( TK-) 株的活疫苗。

复制性活载体重组病毒疫苗

以某种非致病性病毒(株)为载体来携带并表达其他强致病性病毒的保护性抗原基因。

常作为载体的病毒有痘苗病毒、禽痘病毒(FPV)、火鸡疱疹病毒(HVT)、腺病毒等。

在实验室条件下应用比较成功例子：能表达禽流感病毒血凝素(HA)基因的重组FPV。

人用疫苗的焦点是安全性,畜禽用疫苗除安全性外还要考虑成本效益。选择理想的载体是活载体疫苗研制及应用成功的关键。

活载体疫苗优点

活载体疫苗可同时启动机体细胞免疫和体液免疫,避免了灭活疫苗免疫效力不足的缺陷;

活载体疫苗可以同时构成多价以至多联疫苗，疫苗用量少,免疫保护持续时间长、效果好,

不须添加佐剂,降低了成本。

活载体疫苗缺点

基因缺失疫苗株可与野生型强毒株进行基因重组,从而使重组病毒毒力增强；

痘苗病毒能在哺乳动物体内复制,而与天花病毒类似的痘苗病毒在动物上应用可能进化出对人类有致病性的新病毒,引起未种痘病毒疫苗人群感染。

活载体疫苗在二次免疫时还会诱发针对载体的排斥反应等。

#### 肽疫苗

肽疫苗(peptide vaccine)是由类似于抗原决定簇的小肽(约20～40 个氨基酸)构成。

将其连在一个蛋白载体上,增加稳定性,同时也可提高免疫原性。

限制因素

作为抗原决定簇的肽段不能太长,而且要连续,但在有的病毒中抗原决定簇是由很多氨基酸组成的,而且这些氨基酸有可能散布在蛋白的不同区域,这样要制造肽疫苗就有一定的困难；

要求肽段的构象必须与完整病毒上的抗原决定簇构象一致；

要求选定单一的抗原决定簇必须要有足够强的免疫原性。

#### 核酸疫苗(nucleic vaccine)

又名基因疫苗(gene vaccine) 或DNA 疫苗(DNA vaccine)：是将一种或多种抗原编码基因克隆到真核表达载体上构建成重组DNA质粒(plasmid)，将其直接注入到体内，抗原基因在机体细胞内表达，进而激活机体免疫系统,因此也称为DNA免疫。

核酸疫苗的产生与发展

DechuTang进行开创性的实验: 把人生长激素基因(hGH)重组质粒以金颗粒包被的形式轰击入小鼠耳部皮肤,做免疫沉淀和免疫印迹,证实有抗hGH抗体产生。

Ｍerck实验室的Liu和她的同事随后报道了直接注射A型流感病毒保守的核蛋白抗原基因表达质粒于小鼠能使之免于该疾病,基因免疫从此进入医学和疾病预防研究。

之后,关于基因免疫的文献越来越多,有的开始用黑猩猩等类人灵长类动物作实验,有的则已进入临床实验。

核酸疫苗的抗原蛋白是在免疫对象体内产生的。

核酸疫苗能引起多种免疫反应:体液免疫反应,细胞毒T淋巴细胞免疫反应和辅助T细胞反应。

目前已有多种分别针对艾滋病、流感、癌症等疾病的基因疫苗进入临床试验阶段。

针对狂犬病、猪瘟、麻疹和过敏等各种疾病的基因疫苗研究也在进行中。

基因疫苗的构建

明确编码具有免疫活性的特定抗原的基因结构；

选择合适的质粒载体：

质粒载体启动子多为来源于病毒基因组的巨细胞病毒(CMV)早期启动子,具有很强的转录激活作用;

疫苗DNA中还可包含一些合适的增强子、终止子、内含子、免疫激活序列及多聚腺苷酸信号。

基因疫苗导入动物体的方法和途径

直接注射：注射法可将质粒直接注入肌肉、皮内、皮下、免疫器官以及血液。肌肉注射最原始,研究最充分,效果也好,TH1和TH2辅助的免疫反应都能产生,尤其是TH1辅助的MHCⅠ类分子限制性的CTL细胞免疫反应更令人瞩目。HCV核心蛋白产生的抗体没有保护作用。

基因枪轰击:金颗粒包被轰击法(particle bombardment)所需核酸量较前者少1000倍,而且能诱发强烈的TH2介导的IFN-γ释放型的IgG体液免疫反应,CTL反应则常不显著。

因此,目的蛋白能诱发保护性抗体免疫反应的话,以高压氦气为推动力的基因枪轰击法不失为一上策。

鼻内滴注：粘膜局部免疫。

DNA疫苗的优点

抗原合成和递呈过程与病原的自然感染相似,通过MHCⅠ类和Ⅱ类分子直接呈递给免疫系统。编码正确折叠的糖基化抗原分子。

易于构建和制备：操作DNA要比生产蛋白抗原简单得多,可很快地获得抗原基因,根据其表位的特点进行分子设计,这对于对付HIV、HCV这样经常发生变异的RNA病毒来说尤其显得重要,可以近似同步地跟踪病毒相似株的演变,直接瞄准病毒优势克隆进行免疫攻击。

化学稳定性：DNA比蛋白质稳定得多,便于保存和运输, 成本低廉,适于规模化生产。

顾虑、安全性等考虑

是否与细胞染色体组整合？插入突变可能导致癌基因活化或抑癌基因失活,如果基因疫苗散布到生殖细胞并发生整合则影响更为深远。不过,就目前研究观察尚未发现整合案例。

抗DNA免疫反应,质粒DNA会不会诱发抗双链DNA的自身免疫反应,造成象系统性红斑狼疮的后果,特别是质粒DNA中含原核基因组中常见的CpG基序(motif),易形成抗原决定簇。据现有材料看,这个危险性不大,没有超过对照水平,可能质粒本身骨架小而且注射量不多, DNA本身抗原性也不强。

免疫耐受,这个事实已在疟疾基因免疫实验中看到。

哺乳动物效果差,实验动物越大,基因免疫效果越差,小鼠抗体反应很高,猴子则可能不然。

种与种之间免疫的遗传差异？

注射后抗原基因的表达调控。ＤＮＡ输入机体, 质粒及其抗原基因的命运不再受研究者的掌握。

基因疫苗转染APC

核酸疫苗直接转染巨噬细胞和树突状细胞两种APC都能够在体外培养的Ｔ细胞中诱导特异性CTL,表明核酸疫苗直接转染APC是诱导免疫应答的有效途径。

核酸疫苗在APC内表达的蛋白质抗原作为“内源性抗原”,经胞浆内的蛋白酶降解形成8～10个氨基酸组成的肽,被内质网膜上的抗原肽转运机构(TAP)转入内质网腔,与MHCⅠ类分子形成聚合体,再与β2 微球蛋白形成三分子复合体,经高尔基体到达APC膜表面,被Ｔ细胞的受体识别,这是诱导CTL最有效的途径。

为了证明APC直接摄取质粒DNA而不是摄取质粒表达的蛋白诱导免疫应答,将鼠巨细胞病毒的衣壳蛋白(LCMV-NP)基因连结在泛素基因上构建融合蛋白,以使表达的外源蛋白在细胞内迅速被水解,其结果表达的蛋白不释放到细胞外而使抗体无应答,但CTL功能仍然很强。

瑞典Paul Klenerman在Nature上报告这样一个发现: 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)这个非逆转录RNA病毒可受特定宿主细胞的内源性逆转录酶作用而以互补DNA的形式长期存在于宿主细胞中,造成终身免疫。

看来自然界早就存在基因免疫并将它用于免疫记忆

DNA疫苗的规范

1、相关文件

1996 年12月, FDA 公布了一份协助DNA疫苗开发者的指导性文件《质粒DNA疫苗预防传染病指征的考虑要点》。

世界卫生组织(WHO) 也公布了《DNA疫苗质量保证的WHO准则》。

欧洲共同体有关当局也制定了规章《基因转移医药制品质量、临床前及临床方面》。

DNA疫苗载体及宿主菌

测定DNA载体的全长核苷酸序列，以及与已知人类基因的同源性比较和分析。

DNA载体的控制元件和选择标记的序列与来源，如：真核启动子、增强子、终止序列、抗生素抗性标记等进行分析。使用无抗性标记的DNA载体，若需要抗性标记，则可使用抗卡那霉素或新霉素的抗性标记。避免使用抗青霉素标记。

对DNA载体的安全性进行研究和分析，尤其对病毒性启动子、哺乳动物细胞或病毒终止子的安全性进行研究分析。若使用非常用性或特殊的控制元件，应提供其安全性、对基因产物表达的影响以及其利弊权衡等进行分析。

明确宿主菌的基因型、原型、细菌的来源以及制备克隆菌群的方法步骤和所用实验材料。

目的基因

明确目的基因来源的病原体及其它相关生物分子的基因序列及结构，并与我国主要流行株的核苷酸和氨基酸同源性进行分析以及明确其血清型、基因型和亚型，对该种基因型或血清型的流行情况进行分析，若存在不同的血清型或基因型，应对所选择的血清型或基因型与其它血清型或基因型交叉反应或交叉保护性进行分析和研究。

对目的基因的序列、大小、来源以及表达产物的预计大小进行分析；明确目的基因选择的依据以及其表达蛋白在预防中的作用。

若对目的基因进行了修饰，应对其修饰后的基因序列以及修饰后基因与人类已知基因序列的同源性进行分析。若在表达的目的重组蛋白以外有其它氨基酸寡肽同时表达时，应对寡肽的作用和选择的依据进行分析。并对基因修饰或重组的利弊进行分析。

重组质粒的构建过程

提供重组体质粒构建的详细步骤及每一步的鉴定及确证方法。

重组质粒库：构建完成后应建立重组质粒库，对重组质粒应进行全基因序列分析，尤其对DNA载体的控制元件和选择标记基因有无变异进行分析。对插入的目的基因序列进行分析，检查有无变异。

应当对重组质粒的转化、扩增及纯化条件进行优化。对重组质粒库中质粒的浓度、含量等进行分析。对重组质粒的保存条件以及稳定性进行研究。

表达产物的鉴定

将重组质粒转化合适的哺乳动物细胞，对转化条件进行优化。

建立对表达产物的分析方法，包括表达产物的大小、特征等。

建立对表达产物的免疫学反应的特征进行分析的方法。

DNA疫苗的生产工艺

（一）建立菌种库：对转化大肠杆菌的条件进行优化。建立原始种子库。对种子库的遗传稳定性进行分析，要明确该种子库可以传代的次数。在此基础上建立主细胞库和工作细胞库，并应保证该类细胞库无噬菌体和其它外源因子的污染；并对细菌的遗传背景进行分析和检测，保证细胞库中细菌的遗传背景包括染色体组型、表型未发生改变；应检测细菌的形态学，保证细菌的均一性；应检测导入基因的存在状态。并对工作细胞库的规模、保存条件、扩增条件、传代过程中质粒的稳定性（拷贝数及表达量）、允许的传代次数等进行研究。

（二）对工作细胞库扩增的条件进行优化，并制定相应的质控指标。

（三）应对DNA制备与纯化工艺中各种条件进行优化，建立稳定的纯化工艺，并制定相应的质控指标，而且为进行临床试验，应建立符合GMP要求的生产的环境。

（四）对佐剂或呈递物质的要求

如果在重组DNA终制品中使用佐剂或呈递物质，则对以下问题进行研究或提供相关材料:

1．对于已经明确有佐剂效应或者已经商品化的佐剂和呈递物质，只需提供该类制剂的组分或化学组成，国内外使用该类制剂的情况，无需再进行毒理和安全性研究。若国内外均未使用过该类佐剂,则必须对其作用原理、安全性及佐剂效应进行详细的研究并建立切实可行的评价方法。

2．对该类制剂的制备工艺进行优化，若使用脂质体或多肽类物质时，由于脂质体的形成及多肽类合成过程的随机性，不可能达到一般化学合成物的均一性及纯度，为此应对不同批号间保证安全有效的可以达到的最大均一性的程度进行研究，并制定可以接受的质量标准。

3．若该类制剂需与重组DNA制品结合，则应对结合工艺进行优化，建立检测结合率、结合均一性的方法，并制定结合标准。

（五）若与调节免疫反应的因子等同时表达，则应对这类分子进行详细的分析，包括因子的大小、表达量及免疫学反应等。若这种因子未批准上市，则应对这类分子进行单独的药理和毒理学研究。

产品的质量检定与要求

(1)外观检查：根据样品的特征建立外观的质量标准。

(2) pH值检测：可根据一般生物制品的要求建立标准,一般为7．2±0．5。

(3) DNA含量的检测，应建立检测含量的方法，其实测值应与制品的标示量相符。

(4)纯度：主要是评价纯化的重组DNA制品中是否含有宿主RNA、DNA和蛋白的污染。

(5) 质粒大小的均一性和结构的分析：主要是分析超螺旋结构与线性和松弛性质粒的比例，一般采用琼脂糖凝胶电泳的方法对制品进行电泳分析，并用扫描仪对电泳结果进行扫描，分析各带型所占的比例，一般要求环状结构的重组质粒所占的比例在90%以上。

(6) 鉴别实验：主要是对重组质粒的特征以及是否含有正确的插入片段进行分析。至少用三对以上限制性内切酶对重组质粒进行酶切，对酶切产物分别进行电泳分析，观察是否有特征性的带型；用PCR方法对插入片段进行扩增或用特征性的酶切方法分析插入的基因片段的大小是否与预计的大小一致。

(7)体外效力实验：

体外转染哺乳动物细胞，检测其表达量，需建立定量检测表达抗原的方法以及表达抗原的定量标准，并对该检测方法的敏感性以及定量的准确性进行验证；还应检测表达抗原的图谱，其各表达目的抗原的大小应与预计大小相同，应建立相应的方法并进行验证。制定各表达抗原的量和图谱的质量控制标准。

(8)无菌实验：应检测需氧菌、厌氧菌以及支原体等，制品中应无该类微生物的污染。

(9)热原实验：主要检测制品中有无热原物质，可用鲎试剂检测细菌的内毒素，要求内毒素的含量不高于0．01EU/μg；每个人用剂量不超过20EU，也可以用其它方法检测制品的热原。

(10)抗生素及其它添加物质残余量的检测:在纯化制品中对抗菌素的含量应进行限制，因此，应建立检测抗菌素的检测方法并制定抗生素残留量的要求。在重组DNA的培养和纯化工艺中，可能需要一些其它物质或基质，如纯化工艺中可能需要乙醇，应在纯化制品中限制其含量，因此，应建立检测方法并制定残留量的标准。

(11)安全性实验：该实验是控制该类制品质量的重要指标，由于该制品与一般生物制品相比又有其特殊性，因此，在安全性方面除了考虑一般的安全性实验，还应考虑该制品的特异性安全性。一般性安全实验：主要用小鼠和豚鼠进行实验，一般小鼠腹腔接种一个人用剂量，豚鼠接种5个人用剂量。

(12) 稳定性实验：由于DNA超螺旋结构的不稳定性，而且超螺旋结构的比例多少可能影响重组DNA的转染率，因此，在该类制品的稳定性实验中应主要考虑超螺旋结构的稳定性。应建立检测超螺旋质粒稳定性的实验方法，并建立相应的质量标准。

(13)生物效价：如果DNA制剂是通过免疫反应发生作用的，则应评价其体液免疫和细胞免疫的生物效价。在评价体液免疫效价时，应选择实验动物的品系，建立检测动物血清抗体的诊断试剂，并对该类试剂进行验证，可以计算小鼠ED50以及抗体产生的滴度，如有必要和可行，还应当建立评价抗体质量的方法，对抗体的质进行评价；在评价细胞免疫效价时，应当建立检测评价细胞免疫的方法（如特异性CTL反应的方法或Elispot方法等），也可通过对细胞因子的定量检测评价其细胞免疫情况，如属于常规检定项目，该类方法应稳定、重复性好、可操作性强，并制定相应的质量标准。若已有蛋白类疫苗，其评价方法应参照有关蛋白类疫苗的评价方法。若有动物模型，可进行动物保护性实验。

(14)佐剂或呈递物质的质量评价：如在最终重组DNA制品含有佐剂或呈递物质，则应建立检测该类物质的量以及与重组DNA结合率的方法，并制定质量标准。

基因疫苗：进展

mRNA基因免疫由于RNA不如DNA那样稳定,而且缺乏能够有效的结合各种组织或器官的细胞内RNA转移的机制,所以极大地限制了RNA转基因表达。从临床角度来说,RNA疫苗比DNA更理想,因为RNA分子在正常生理条件下是过渡性的,明显不会与染色体DNA直接结合,因此消除或大大降低了转基因细胞内插入突变的可能性。

Qiu等人成功地制备出了RNA疫苗。他们采用基因枪轰击法将RNA转移到不同的哺乳动物体细胞中,并表达基因产物,诱导出持续、强烈的抗体反应,抗体滴度可高达1∶25600。尽管与DNA相比,RNA接种效果低很多,但强化轰击后可弥补这一不足。

表达库免疫(expression library immunization,ELI)基因疫苗尽管前景良好,但有一个问题是,无法知道病原体的哪个/些基因应当包括进基因免疫载体中。特别是对基因组较大的病原体,如细菌和寄生虫来说这个问题就更为突出。解决这个难题的出路就是表达库免疫。

其方法是,先消化切割基因组DNA,使之成为保护性基因。再将酶切片段分别与真核表达载体连接。用全部或者部分基因库给许多动物免疫接种,从而了解基因组或解体病原体的多个表达蛋白中哪一部分可以产生有效的免疫保护作用。

粘膜基因免疫：粘膜免疫是抵御粘膜感染的第一道屏障,对于阻止病原体的淋巴组织和全身扩散具有重要作用。性传播疾病,包括AIDS是从生殖道粘膜传播的,Wang等从阴道粘膜接种HIV-1包膜区基因可使阴道产生免疫球蛋白,它能够与HIV-1包膜特异性地结合,并可中和HIV-1的感染性。如果同时进行全身接种,就会产生有效的粘膜和全身免疫。而鼻腔内共接种IL-12和GM-CSF则能诱导很强的粘膜和细胞免疫,血清、粪便和阴道内IgA明显升高。从鼻粘膜接种编码麻疹病毒血凝素的DNA质粒也产生了HA特异的CTL。