

炭疽毒素受体与人 IgG1 的 Fc 段融合蛋白 ATR-Fc 在 CHO 细胞中的表达 Expression of ATR-Fc Fusion Protein in CHO Cells

高丽华¹ 胡显文^{1*} 陈 薇^{2*} 徐俊杰² 赵 剑² 陈惠鹏^{1*}

GAO Li-Hua¹, HU Xian-Wen^{1*}, CHEN Wei^{2*}, XU Jun-Jie², ZHAO Jian² and CHEN Hui-Peng^{1*}

1. 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071

2. 军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

1. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

摘 要 ATR-Fc 是人炭疽毒素受体(ATR)的胞外区与人免疫球蛋白 IgG1 的铰链区、CH2 区和 CH3 区组成的融合蛋白。表达该蛋白是为了获得结合 PA 的抗体样分子,通过阻断 PA 与细胞受体的结合,而阻止炭疽致死毒素和水肿因子进入细胞内,可作为预防和治疗炭疽感染的生物制品。将编码炭疽毒素受体 N 端 1-227 氨基酸的基因和编码 Fc 段的基因连接,插入到 pcDNA3.1 的 *Hind* III 和 *Not* I 位点得到表达 ATR-Fc 融合蛋白的真核表达载体 pcDNA3.1/ATR-Fc,并用脂质体方法将该载体转染至 CHO-K1 细胞中,用 G418 筛选并获得 ATR-Fc 表达水平为 $10 \sim 15 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ 的基因工程 CHO 细胞系 ATR-Fc-1D5。采用蛋白 A 纯化重组蛋白,并用 ELISA 法鉴定 ATR-Fc 与 PA 的亲性和 ATR-Fc 可与 PA 特异性结合。

关键词 炭疽毒素受体, Fc 融合蛋白, 重组 CHO 细胞, 抗体类分子, 抗毒素

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)05-0826-06

Abstract ATR-Fc is a fusion protein consisting of extracellular domain of human anthrax toxin receptor(ATR) and a fragment (hinge, CH2, and CH3 domains) of the Fc of human IgG1. The aim of ATR-Fc expression is to get an antibody-like molecule binding to protective antigen(PA), a component of anthrax toxins, this fusion protein may compete with cell surface receptor for PA binding, and block the transport of lethal factor(LF) and edema factor(EF) into cells, thereby act as an antitoxin to prevent and treat anthrax infection. A DNA fragment encoding N-terminal amino acids 1-227 of ATR and human IgG1 Fc was inserted into the *Hind* III and *Not* I sites of pcDNA3.1 to generate the eukaryotic vector pcDNA3.1/ATR-Fc for expression of ATR-Fc fusion protein. Using lipofectine-mediated gene transfer technique, pcDNA3.1/ATR-Fc was transfected into CHO-K1 cells. After selected with G418, a recombinant CHO cell line, ATR-Fc-1D5, whose expression level was about $10 \sim 15 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$, was established. The recombinant protein expressed by the ATR-Fc-1D5 cells was purified with protein A chromatography. The experimental results demonstrated a direct and specific interaction between ATR-Fc and PA assessed by ELISA.

Key words anthrax toxin receptor, Fc-fusion protein, recombinant CHO cell, antibody-like molecule, antitoxin

炭疽热是严重威胁人类健康的传染性疾病,美国疾病控制与预防中心(CDC)将炭疽、鼠疫、天花等列为等级最高的

传染性疾病^[1],这类传染性疾病具有传播速度快、死亡率高、易引发公众恐慌和社会混乱等特点,需要特别对待和严密监

Received: April 7, 2005; Accepted: July 1, 2005.

This work was supported by a grant from The National Sciences Foundation of China(No. 30300016).

* Corresponding author. HU Xian-Wen: Tel: 86-10-66948820; E-mail: hu.xianwen@tsinghua.org.cn

CHEN Wei: Tel: 86-10-66948565; E-mail: CW789661@yahoo.com

CHEN Hui-Peng: Tel: 86-10-66948801; E-mail: ChenHP@nic.bmi.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30300016)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

测。在我国,每年都有炭疽感染的散发病例,根据卫生部公布的 2004 年法定传染病疫情公告(见中华人民共和国卫生部公报 2004 年第 7 期,第 10 期,2005 年第 1 期,http://www.moh.gov.cn/communique/communique.aspx),我国 2004 年仍有 617 人感染炭疽,并且有 6 人死亡。由于炭疽杆菌极易发展成生物武器,并且“911”事件后美国又出现炭疽菌袭击,研究抵御生物恐怖袭击的新方法已成为美国政府优先资助的项目,并且引起各国政府的高度重视。

抗生素如青霉素、强力霉素和 Ciprofloxacin 等能够抑制炭疽杆菌^[2],但是大多数的炭疽热致死病例是由炭疽毒素不可逆的毒性作用导致的。炭疽毒素包括保护抗原(PA)、致死因子(LF)和水肿因子(EF),保护抗原是炭疽毒素的核心成分,它能在细胞水平上促进炭疽感染进展。在没有保护抗原的情况下,炭疽杆菌产生的水肿因子和致死因子对人体是无害的,只有保护抗原与细胞表面的炭疽毒素受体结合形成保护抗原-受体(PA-ATR)复合物,炭疽致死因子和水肿因子在 PA-ATR 复合物的介导下才能进入细胞质内并产生毒性^[3]。因此,保护抗原在炭疽感染中起着举足轻重的作用,保护抗原自然而然成为研制预防和治疗炭疽热新药的有效靶标。

抗体类药物的研究、开发和生产已成为生物制药行业中最重要和最为活跃的领域^[4-6],抗炭疽毒素抗体是预防和治疗炭疽感染最直接和最有效的手段之一^[7-8],有许多抗保护抗原抗体(anti-PA antibodies)在细胞保护实验和动物实验中表现出明显的保护作用,并且在治疗中有明显疗效,由于具有 Fc 段,抗体不仅能结合炭疽毒素 PA,并且可以由抗体 Fc 介导的生物学效应如抗体依赖性细胞介导的细胞毒效应(ADCC)、补体依赖性细胞毒效应(CDC)或免疫调理促进吞噬等作用而杀死炭疽孢子,起到治疗的作用^[9-12]。但是,不是所有的 anti-PA 抗体都有细胞保护作用,相反,如果 anti-PA 抗体不是封闭 PA 与其受体 ATR 结合部位,不仅不能保护细胞,反而能强化致死毒素对巨噬细胞的杀伤作用^[13]。PA 的可溶性受体 ATR 能够结合 PA 并阻止致死毒素对细胞产生杀伤作用^[14],但是,由于可溶性受体半衰期短,而且没有抗体分子的 Fc 段介导的对病原体产生杀伤作用的功能,因此,我们设计了 ATR-Fc 融合蛋白用于中和 PA,它是炭疽毒素 PA 的受体(ATR)与 Fc 的二聚体融合蛋白,理论上既具有与 PA 特异性结合的高亲和力,又含有 Fc 段,具有抗体的效应功能,还具有较长的半衰期,并且由于两段基因来自人,该融合蛋白应具有较低的免疫原性。本文构建了表达 ATR-Fc 融合蛋白的真核表达载体,并且获得了稳定表达 ATR-Fc 融合蛋白的基因工程 CHO 细胞系。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α (道普公司),pUC19 质粒和 CHO-K1 细胞(本室保存),pcDNA3.1 真核表达载体(Invitrogen 公司)源自基因组(含有内含子)的编码人免疫球蛋白 IgG1 Fc 段(铰链区、CH2 区和 CH3 区)的基因(军事医学科学院刘荷中博士

馈赠)。炭疽毒素保护抗原(PA)的受体 ATR 基因,本室化学合成。

限制酶 *Nhe*I、*Bam*H I、*Not*I、*Hind*III 等购自 NEB 公司,T4 DNA 连接酶及高保真 Taq 酶 Pyrobest 购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒提取、PCR 产物回收及酶切产物回收试剂盒均购自 Promega 公司。DNA Marker 购自天为时代公司。

DMEM/F12 培养基及加强型小牛血清购自 Hyclone 公司,无血清培养基为本室配制^[15,16],G418 购自 Sigma 公司;Lipofectamine™2000 购自 GIBCO 公司,HRP-羊抗人 Fc 抗体购自北京中山生物工程公司,nProtein A 层析柱购自 Pharmacia 公司。

1.2 分子克隆常规操作

参照分子克隆实验手册^[17]进行。

1.3 ATR-Fc 真核表达载体 pcDNA3.1/ATR-Fc 的构建

将本室获得的测序正确的编码炭疽毒素受体 ATR₁₋₂₂₇ 的基因和用 *Hind*III 和 *Bam*H I 双酶切,回收 ATR 基因片段,同时将连有 CD40-Fc 的表达载体 pcDNA3.1/CD40-Fc 用 *Hind*III 和 *Bam*H I 双酶切,经低熔点胶电泳回收,在 T4 连接酶作用下将上述两段 DNA 连接成 pcDNA3.1/ATR-Fc 表达载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑出的克隆经菌落摇瓶培养,提取质粒行 *Hind*III + *Bam*H I 和 *Hind*III + *Not*I 双酶切鉴定。并进行 ATR-Fc 基因全序列测定。

1.4 重组质粒转染 CHO-K1 细胞及筛选阳性克隆

转染采用 Invitrogen 公司生产的 Lipofectamine™2000 阳离子脂质体转染试剂盒,按照试剂盒说明书操作。转染的 CHO-K1 细胞培养于 5% CO₂、37℃ 温箱。转染 12h 后,换含 10% 加强型小牛血清(Hyclone)的 DMEM/F12 培养基(Hyclone)。48h 后,采用 750 μ g/mL G418(Sigma)筛选培养基加压筛选,每 2~3d 换液 1 次,加压约 12d 后,将抗性细胞克隆用 0.25% 的胰酶消化,用有限稀释法在 96 孔微孔细胞培养板(NUNC 公司)中进行单克隆化培养,即用含 10% 小牛血清和 300 μ g/mL G418 的 DMEM/F12 培养基将细胞稀释至 10 个/mL,在每个微孔中接种 200 μ L 培养基(平均每个孔中含有约 2 个细胞),2 周后出现细胞克隆。换无血清培养基^[15]继续培养 2d,收集培养上清以直接竞争 ELISA 挑选阳性克隆,即将无血清培养上清直接包被 NUNC™酶联板 4℃ 过夜,3% BSA 封闭后加入 HRP 标记山羊抗人 IgG(H+L),孵育后加入 TMB 试剂显色,405nm 测 OD 值。以无血清培养基为阴性对照。

1.5 rCHO 工程细胞的扩大培养、表达蛋白的纯化及 SDS-PAGE 分析

选择表达水平最高的基因重组 CHO 工程细胞系 ATR-Fc-1D5 于 1000mL 转瓶中用含 2% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,待细胞长满瓶壁时,换为无血清培养基^[15],隔天收液,可连续收液 3~4 次。

利用蛋白 A 对 IgG 的特异性吸附作用,采用 nProtein A Sepharose 4 Fast Flow 分离介质(Amersham Biosciences)进行亲和层析,纯化表达蛋白。操作方法参见产品说明。结合的蛋

白用 pH2.5、0.1mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱,并用 2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液将洗脱液 pH 调至 7。纯化后,以紫外分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} 吸光度推算蛋白浓度,蛋白定量公式为 蛋白含量(mg/mL) = $1.45 \times A_{260} - 0.74 \times A_{280}$ 。以 SDS-PAGE 测定蛋白的纯度、分子量。

1.6 ELISA 检测产物与炭疽毒素保护抗原 (PA) 的特异性结合

以基因重组 PA^[18]按 0.2μg/孔包被 NUNC™ 酶联板,3% BSA 封闭后加入 ATR-Fc 融合蛋白,孵育后充分洗涤,再加入 HRP 标记山羊抗人 IgG (H+L) 酶标多抗,孵育后加入 TMB 试剂显色,405nm 测 OD 值。以 anti-PA 鼠源单克隆抗体(自制)为阳性对照,HRP 酶标二抗为山羊抗小鼠 IgG Fc 多抗,以基因重组肿瘤坏死因子受体(TNFαR)-Fc 融合蛋白(自制)作为对照。在未包被 PA 的微孔中直接包被未转染的 CHO-K1 细胞培养上清为阴性对照,同时,还直接包被 anti-PA 鼠源单克隆抗体为阳性对照。

2 结 果

2.1 ATR-Fc 分子的设计及其真核表达载体的构建

抗体的 Fab 片段的功能是结合抗原,而抗体的 Fc 段则是发挥抗体生物学功能如 CDC、ADCC 或调理作用关键部位,由于炭疽毒素 PA 的受体 ATR 可以特异性高亲和力结合 PA,因此,我们将 ATR 胞外区 N 端 1-227 氨基酸(aa)替代抗体的 Fab 片段,保留抗体的重链恒定区 Fc 段即铰链区、CH2 和 CH3 区,设计出 ATR-Fc 融合蛋白全新抗体样分子(如图 1(a)所示)。该分子由两条相同的单链通过 Fc 段铰链区的三对链间二硫键连接成同源二聚体分子,单链 ATR-Fc 的 1-227aa 为 ATR 段,内部含有一对链内二硫键,其中 1-27aa 为 ATR 的信号肽,228-459aa 为 Fc 段,含有两对链内二硫键,成熟的单链 ATR-Fc(不含信号肽)分子应由 432 个氨基酸残基组成。根据 N-糖基化位点氨基酸序列特征 Asn-X-Ser/Thr,推测该蛋白 ATR 部分存在两个可能的糖基化位点^[14],而 Fc 部分在 CH2 区有一个糖基化位点,因此该融合蛋白是一个空间结构复杂、二硫键多、分子量巨大,含有多个糖基化位点的复杂糖蛋白,用大肠杆菌等表达系统无法正确表达该融合蛋白。我们构建了表达 ATR-Fc 融合蛋白的真核表达载体 pcDNA3.1/ATR-Fc(图 1(b)另文,待发表)。推测用 CHO 细胞表达 ATR-Fc 融合蛋白,可以将该蛋白分泌到胞外,并且在 Fc 的作用下,可以在 CHO 细胞内将 ATR-Fc 正确组装成同源二聚体分子,此外,还可以对翻译后的蛋白进行糖基化修饰,这是简单的原核表达系统无法做到的。

2.2 CHO-K1 细胞的转染及阳性克隆的筛选

真核表达载体 pcDNA3.1/ATR-Fc 用 Lipofectamine™ 2000 阳离子脂质体转染 CHO-K1 细胞后,经过 12d G418 的加压筛选,出现分散的细胞抗性克隆。将抗性克隆消化下,培养基稀释细胞接种到 96 孔微孔细胞培养板中,接种密度为 2 个细胞/孔,进行单克隆培养。培养 2 周后出现由一个细胞扩增形成的细胞集落(图 2a),一般一个微孔中形成单个细胞

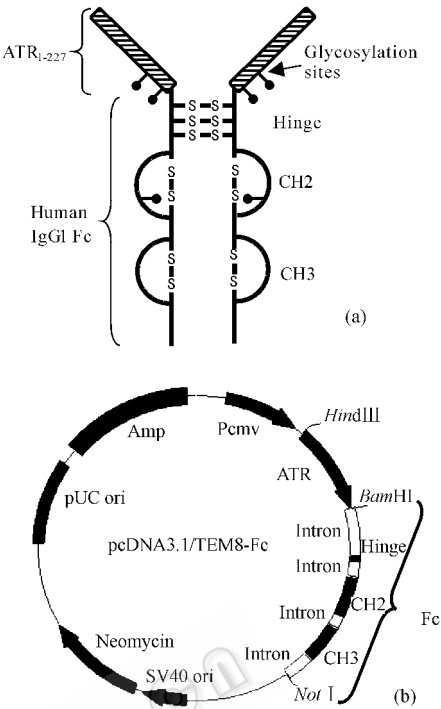


图 1 ATR-Fc 分子的设计及其真核表达载体的构建

Fig. 1 The design of ATR-Fc molecule and construction of eukaryotic expression vector for ATR-Fc

(a) Structure of homodimeric ATR-Fc fusion protein ;(b) Structure of eukaryotic expression vector for expression of ATR-Fc.

克隆的几率为 30% ~ 50%。将单个细胞克隆的微孔换成无血清培养基^[15]培养 3d 后,收集培养上清用直接 ELISA 筛选阳性克隆,表达水平较高的阳性细胞克隆出现的几率约为 20% ~ 30%(图 2b)。

2.3 表达 ATR-Fc 融合蛋白的 CHO 工程细胞的扩大培养及产物纯化

选择表达水平较高的单克隆细胞系 ATR-Fc-1D5 用 1000mL 转瓶扩大培养,每 2d 收集无血清培养上清。收集的上清用蛋白 A 亲和层析柱分离纯化,用 pH2.5 的甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱,有一明显的洗脱峰,收集做 SDS-PAGE 和 ELISA 分析。1000mL 的上清经纯化后可以得到蛋白浓度约 0.9 mg/mL 的收集液 30mL,即该细胞在转瓶中的表达水平约 27 mg/L,细胞的表达水平约 10 ~ 15μg/(10⁶ cells·d)。

2.4 SDS-PAGE 分析基因重组产物

如果 ATR-Fc 融合蛋白能够在 CHO 细胞中正确表达,表达的蛋白预计应是同源二聚体抗体样分子,即 ATR-Fc 单链在铰链区通过链间二硫键连接成二聚体(见图 1a)。单链 ATR-Fc 分子共有 459 个氨基酸残基,其中前 27 个氨基酸为 ATR 的信号肽,胞外分泌到细胞培养上清中时被切除,所以实际的单链 ATR-Fc 有 432aa,二聚体为 864aa。由于 ATR 和 Fc 段都有糖基化位点^[14],因此单链 ATR-Fc 的分子量预期在 60 ~ 65kD。亲和层析纯化得到的 ATR-Fc 融合蛋白,分别在还原和非还原条件下进行 SDS-PAGE 分析,考马斯亮蓝染色。在非还原条件下,在 120 ~ 130kD 处有一条蛋白带,而在

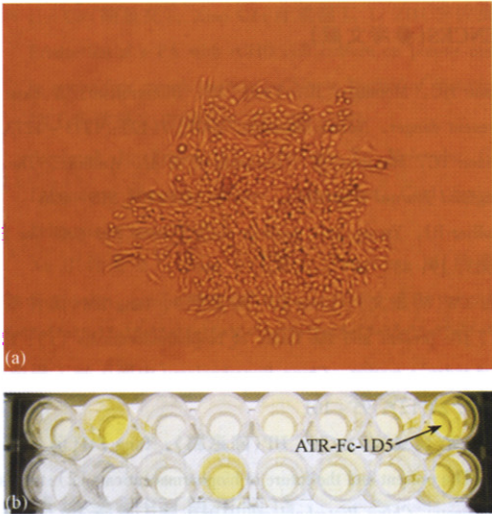


图2 表达 ATR-Fc 的基因重组 CHO 细胞阳性克隆的筛选
Fig. 2 Screening of positive recombinant CHO cell clones which expressing ATR-Fc fusion protein

(a) Recombinant CHO cell clone ATR-Fc-1D5 expressing ATR-Fc;
(b) Screening of positive clones by direct ELISA.

还原条件下,在 60~65kD 处有一条明显的蛋白带,并且没有其他的蛋白带(图 3)。由于还原条件下所有二硫键包括链间二硫键都被打断,测得的分子量为单链 ATR-Fc 分子,而非还原条件下不同肽链仍通过二硫键连接,在非还原条件下的分子量正好是还原条件下分子量的 2 倍,表明我们获得的 ATR-Fc 融合蛋白为同源二聚体抗体样分子,与预期的结果相符。

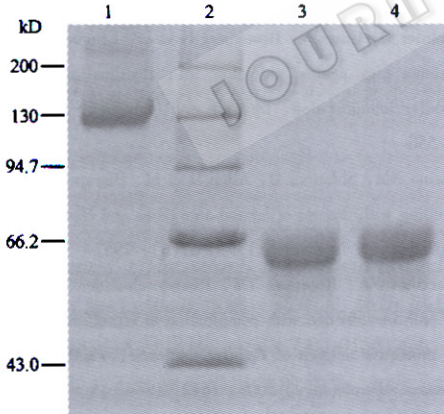


图3 表达产物 ATR-Fc 的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression product
1: nonreducing condition; 2: protein marker;
3,4: reducing condition.

2.5 ELISA 检测基因重组产物 ATR-Fc 与基因重组 PA 的相互作用

用 ELISA 方法初步确定了表达的 ATR-Fc 与炭疽毒素保护抗原 PA 具有特异性结合的能力(图 5)。该蛋白与 PA 的结合能力,与 anti-PA 单克隆抗体相似,表明与人 IgG1 Fc 融合后,不影响 ATR 与其配体 PA 的结合,这个结果与其他受体-Fc 融合蛋白相似,例如 TNFaR-Fc 融合蛋白(Enbrel)与 TNFa

的亲合力比 sTNFaR 高 50~1000 倍^[19],更高的亲合力更有利于结合和中和炭疽毒素。此外,由于测定 ATR-Fc 与 PA 相互作用时使用的酶标二抗为抗人 IgG Fc 的多抗,表明 ATR-Fc 分子中 Fc 段为人 IgG Fc,并且与 ATR 融合后仍保持抗体 Fc 的生物学特性。非常有趣和令人意外的是,本来作为阴性对照的重组 TNFaR-Fc 融合蛋白,ELISA 结果却表明该融合蛋白与 PA 有中等强度的结合能力(图 4)。我们正在测定重组 TNFaR-Fc 融合蛋白与 PA 的亲合力,以及验证 TNFaR-Fc 在炭疽毒素 PA + LF 细胞致死实验中能否起到中和毒素和保护细胞的作用。如果证明 TNFaR-Fc 融合蛋白可与 PA 结合,那么可以推断 TNFaR 可能是炭疽毒素 PA 的第三种细胞受体,并且 Enbrel 可能在防治炭疽感染中有一定的作用。



图4 ELISA 检测 ATR-Fc 与炭疽毒素保护抗原的亲合力
Fig.4 Affinity detection of ATR-Fc binding to protective antigen (PA)

- 1: PA + mouse anti-PA MAb + HRP-labeled goat anti-mouse IgG Fc;
- 2: PA + ATR-Fc + HRP-labeled goat anti-human IgG Fc;
- 3: PA + Enbrel + HRP-labeled goat anti-human IgG Fc;
- 4: CHO-K1 supernatant + HRP-labeled goat anti-human IgG Fc;
- 5: mouse anti-PA MAb + HRP-labeled goat anti-mouse IgG Fc.

3 讨论

预防和治疗炭疽热的最有效和最直接的方法之一是应用抗 PA 抗原的人源(化)抗体。用抗体来防治炭疽感染可能是最有效的手段,因为抗体不仅能预防感染^[9-11],而且能杀灭病菌和孢子^[12]并中和炭疽毒素,起到治疗的作用。与接种炭疽疫苗需要一段时间使机体产生免疫力相比,注射特异性抗体后,血液中的抗炭疽毒素的抗体浓度能迅速提高到相当的水平,因而即便遇到生物恐怖袭击,注射抗 PA 抗体后人体可以立即产生对炭疽杆菌的免疫力,并且可持续一个月以上,用药非常灵活。与抗生素治疗相比,抗体不仅能够中和炭疽杆菌产生的致命毒素,使机体迅速康复,而且对耐药性炭疽菌株的感染也有预防和治疗的功效。2003 年 6 月美国 FDA 已批准了美国 Human Genome Sciences 公司研制开发的基因工程 anti-PA 人源抗体 ABthrax 的临床试验。多项动物实验模型的实验表明,单一剂量的 ABthrax 能非常显著地提高吸入致死剂量的炭疽孢子的兔子和灵长类动物的存活率(见该公司网站: www.hgsi.com/news/press/03-06-25_abthrax_ind.html)。文献[9-11]中预防和治疗炭疽的抗体一般来自接种过 PA 疫苗的人体血清,来源有限,存在传播其他疾病的危险。而且有证据表明^[13],不是所有 anti-PA 的抗体对预防和治疗有效,相反在细胞保护实验中发现,许多不是封闭 PA 与其受体结合区域的抗体,甚至可以强化 LeTx 对细胞的毒性, Mohamed 等用 PA 免疫小鼠获得的与 PA 具有高亲和力的

anti-PA 单克隆抗体,有 50% ~ 67% 的抗体不仅不能对受试细胞产生保护作用,反而能促进 L_eTx 对细胞的杀伤作用^[13],因此来源于 PA 免疫的血清特异性抗 PA 多抗,其中有相当一部分可能会促进病情的发展。

此外,治疗性单克隆抗体的有效性很大程度上取决于抗体与抗原的亲合力,高亲和力抗体既能有效保护机体抵御抗原侵袭,又能大大降低使用剂量。一般来说抗体与抗原的亲合力(K_d)提高一个数量级,抗体的剂量相应就可降低一个数量级。Maynard *et al.* 研制了多种抗炭疽毒素 PA 抗原的单克隆抗体^[20],研究表明:在炭疽感染细胞模型中,抗体对细胞和实验动物的保护性随着亲和力的增加而增加,亲和力较低的抗体($K_d \approx 10^{-8}$ mol/L),保护力较差甚至没有保护能力,而亲和力高的单链抗体($K_d \approx 10^{-10}$ mol/L),细胞保护能力可达 90% ~ 100%,可见抗体与抗原的高亲和力是研发成功抗体药物的关键之一。

研究既能够与 PA 高亲和力结合,又能特异性封闭 PA 与其细胞受体结合区域的抗体类药物,是成功研制预防和治疗炭疽感染的炭疽抗毒素的关键。本文研究得到的基因重组 ATR-Fc 融合蛋白便具有以上两个特征。在长期进化过程中受体与配体的结合一般亲和力很高,而且由于可溶性受体是细胞受体的胞外区,它封闭的位点正是配体与细胞受体结合的区域。受体-Fc 融合蛋白已成为研制治疗性抗体类药物的一个热门领域。FDA 已批准上市的治疗中重度类风湿关节炎的药物 Enbrel(TNF α -Fc 融合蛋白)和治疗重度银屑病 AMEVI(CD2 的受体 LFA-3-Fc 融合蛋白)^[6]在临床中的出色表现,证明了这种融合蛋白同样可以取得和抗体一样甚至更好的疗效。这种融合蛋白可与抗原高亲和力结合,相当于抗体的 Fab 片段,而 Fc 段又提供了抗体的生物学活性,它有以下特点:(1)无抗原性,两段蛋白均来自人体;(2)亲和力高,一般配体和受体的亲和力都较高($K_d \sim 10^{-10}$ mol/L);(3)不用担心病毒或菌株等抗原的突变,抗体只是针对抗原的一个表位,一旦该抗原的表位突变,抗体可能失去与抗原的亲合力,而如果抗原突变导致抗原与受体不结合,则这种抗原(即病原体)便失去了致病能力,如果抗原的突变不会影响其与受体的结合,则受体-Fc 融合蛋白同样可以将抗原捕获并清除;(4)也具有抗体的 ADCC 效应和 CDC 效应;(5)半衰期长,与人源抗体相近(10 ~ 20d 左右)。目前国内外还没有研制 ATR-Fc 融合蛋白的报道。我们获得了表达水平较高的表达 ATR-Fc 的基因工程 CHO 细胞系 ATR-Fc-1D5,该细胞系的表达水平约 $10 \sim 15 \mu g(10^6 \text{ cells} \cdot d)$,并且连续传代培养 1 年,表达水平没有变化,为系统研究该融合蛋白的生物学性质奠定了基础。ELISA 证实 ATR-Fc 可与 PA 特异性结合,并且在细胞保护实验中显示,ATR-Fc 可明显抑制炭疽毒素对细胞的杀伤作用(待发表),该融合蛋白值得进一步研究并开发成防治炭疽感染的抗体类药物。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lane HC, Montagne JL, Fauci AS. Bioterrorism: A clear and present danger. *Nature Medicine*, 2001, **7**(12): 1271 - 1273
- [2] Dixon TC, Meselson M, Guillemin J *et al.* Anthrax. *The New England Journal of Medicine*, 1999, **341**(11): 815 - 826
- [3] Collier RJ, Young JA. Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, **19**: 45 - 70
- [4] Hu XW(胡显文), Chen HP(陈惠鹏), Tang ZM(汤仲明) *et al.* The present and the future of biopharmaceuticals (1): history and today's market. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2004, **24**(12): 95 - 101
- [5] Hu XW(胡显文), Chen HP(陈惠鹏), Tang ZM(汤仲明) *et al.* The present and the future of biopharmaceuticals (2): trends and prospects. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2005, **25**(1): 86 - 93
- [6] Hu XW(胡显文), Chen HP(陈惠鹏), Tang ZM(汤仲明) *et al.* Comparison of approval biomedicines among USA, EU and China. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2005, **25**(2): 82 - 94
- [7] Casadevall A. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological Weapons. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8**(8): 833 - 841
- [8] Enserink M. 'Borrowed immunity' may save future victims. *Science*, 2002, **295**: 777
- [9] Martha A Wild. Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(11): 1305 - 1306
- [10] Kobiler D, Gozes Y, Rosenberg H *et al.* Efficiency of protection of Guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive Immunization. *Infection and Immunity*, 2002, **70**(2): 544 - 550
- [11] Cirino NM, Sblattero D, Allen D *et al.* Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. *Infection and Immunity*, 1999, **67**(6): 2957 - 2963
- [12] Karginov VA, Robinson TM, Riemenschneider J *et al.* Treatment of anthrax infection with combination of ciprofloxacin and antibodies to protective antigen of *Bacillus anthracis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, **1642**: 1 - 4
- [13] Mohamed N, Li J, Ferreira CS *et al.* Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infection and Immunity*, 2004, **72**(6): 3276 - 3283
- [14] Bradley KA, Mogridge J, Mourez M *et al.* Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, 2001, **414**(8): 225 - 229
- [15] Hu XW(胡显文), Xiao CZ(肖成祖), Li ZH(李佐虎) *et al.* Effects of serum concentration and dissolved oxygen on production of prourokinase with rCHO cell culture. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 2001, **12**(3): 198 - 201

- [16] Hu XW(胡显文), Xiao CZ(肖成祖), Li ZH(李佐虎) *et al.*. Production of u-PA with rCHO cell culture on porous microcarriers in serum-free growth medium. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000 , **16** (3) : 387 – 391
- [17] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [18] Xu JJ(许俊杰), Dong DY(董大勇), Chen W(陈薇) *et al.*. Expression , purification and characterization of the recombinant anthrax protective antigen. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004 , **20** (5) : 652 – 655
- [19] Baumgartner SW. Tumor necrosis factor inactivation in the management of rheumatoid arthritis. *Southern Medical Journal* , 2000 , **93** (8) : 753 – 759
- [20] Maynard JA , Maassen CBM , Leppla SH *et al.* Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nature Biotechnology* , 2002 , **20** : 597 – 601
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>