

综述

生物工程在医药方面的进展

莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本世纪七十年代后期在分子生物学、生物化学、细胞生物学、微生物学、生化工程以及计算机等学科迅速发展的基础上诞生的生物工程 (Biotechnology) 可定义为: 利用生物体系(微生物细胞、动植物细胞或细胞中的酶), 应用先进的生物学和工程技术(基因工程, 细胞工程, 酶工程和发酵工程), 加工或不加工底物原料, 以提供所需的各种产品(医药、食品、化工、农牧业优良品种等) 或达到某种目的(环保) 的一门新型的跨学科技术。它不同于传统的发酵工程也不同于 Bioengineering。它的问世不仅引起科学家的密切注意也引起社会经济学家, 商界和各国首脑的关切, 因为人们已预见到这门技术很有可能解决人类长期以来难以用常规方法所解决的能源、食品、环境、医药保健等方面的老大难问题。假若将1975年基因工程的DNA重组技术 (rDNA) 的出现作为生物工程问世的起点, 至今不过近十三年的历史。短短的十年中生物工程不论在应用基础还是开发研究方面都取得了惊人的发展, 但从总进程看不过是初露头角, 同时在迅速发展过程中所出现的诸如基础研究的、工艺的、临床的、经济的、产品市场的等方面问题, 也促使人们更冷静地认识到唯有认真对待, 解决这些所面临的问题, 否则生物工程难以最终形成具有巨大经济效益的新型产业。

迄今生物工程在医药方面的应用仍然

是最活跃的, 这并非偶然, 因与医药有关的基础科学无论深度和广度都已有了较好的根底, 因此有条件较快地接受象基因工程、细胞融合、单克隆抗体等新技术。

(一) 激素和其他蛋白类药物

早在1977—1978年, rDNA 技术就被应用于一些人的短肽激素和生长激素释放抑制因子及胰岛素的研究。1982年利用 rDNA 技术在细菌体内生产的胰岛素已准备投放市场。同时人的生长激素和 α -干扰素也先后进入临床试验。此后利用 rDNA 技术克隆并表达人、动物的激素和其他蛋白类药物的工作层出不穷。目前所知至少如下表所列20多种这类蛋白被克隆和表达。有些已先后进入临床预备试验 (preclinical) 或临床试验。可望 1895—1990年分别投放市场, 这将取决于它们的临床结果、成本、市场等因素。

从实用观点看, 利用生物工程技术生产这类药物有可能获得过去难以得到的足够量用于临床, 同时也能大大节省自然资源, 如9 l细菌发酵液所得生长激素释放抑制因子为 5 mg, 相当于50万只羊脑所得; 450 l发酵液所含HGH相当于6万个尸体所得。也唯有得到足够量才能获得确实的临床数据, 才能进行基础研究进一步阐明其机理。如果有些药物能通过临床, 证明安全有效而获得批准生产的话, 将会很有市场的, 例如全世界每年有 300 万人患因肾

名 称

可能的用途

1. 生长激素释放抑制因子(Somatostatin)	治疗脑垂体疾病
2. 胰岛素(Insulin)	糖尿病
3. 人绒毛膜生长激素(Human Chorionic Somatomammotropin HCS)	胎儿发育
4. 耻骨松弛激素(Relaxin)	助产, 关节炎
5. 促红细胞形成素(Erythropoietin EPO)	慢性炎症和肾病所引起的贫血
6. 降(血)钙素(Calcitonin)	骨质疏松症
7. 人生长激素(Human Growth Hormone GH)	侏儒, 伤口愈合
8. 人绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic gonadotropin HCG)	不孕症
9. 人促黄体形成激素(Human Luteinizing Hormone HCH)	不孕症
10. 人血管紧张素原(Human Renin)	用于基础研究, 筛选该酶抑制剂
11. 牛、鸡、猪等动物的生长激素(Growth Hormone of Calves, Chickens and pigs)	增加产奶或加速生长, 增加瘦肉率
12. T细胞生长因子(Interleukin-2)	癌症, AIDs
13. 抗血友病因子(Ⅷ)(Anti-hemophilic Factor Ⅷ)	血友病
14. 干扰素(α , β , γ)(Interferon α, β, γ)	病毒病, 肿瘤
15. 血纤维蛋白溶解原激活剂(Tissue plasminogen Activator TPA)	血栓
16. 人牙齿珐琅蛋白(Human Enamel matrix protein)	补牙
17. 抗胰酶蛋白(α -1-Antitrypsin AAT)	肺气肿
18. 人血清蛋白(Human serum albumin)	人造血浆
19. 尿激酶(Urokinase)	血栓
20. 肠促胰酶肽(Cholecystokinin)	抑制食欲, 减肥剂
21. Auriculin	降血压

病而引起贫血, 估计 EPO 会有 1 亿美元/年的市场; GHG 将会从现在的 7500 万美元扩大至 2 亿美元的市场; 干扰素将从目前的 5 千万扩大至 5 亿美元; 治疗血友病的 Ⅷ因子估计每年全世界会有 2.5 亿美元以上的市场。

从所用技术路线分析, 不难看出是多种多样, 而且在逐步改进中。如何获得这类蛋白质的基因或 mRNA 是关键, 不少人直接从脏器组织中提取 mRNA, 如 GHG 来自人的胎盘组织; 鸡的则来自鸡的脑垂体。而且常利用动物某些激素 mRNA 或基因与人或其他动物的相应激素的同源性, 来鉴定它们, 如人牙齿珐琅蛋白质基因的获得, 就是先从刚出生两天的乳鼠槽牙表皮细胞中提取总 mRNA, 以此为模板合成 cDNA 并克隆到 pBR322 中; 用 mRNA 做探针进行杂交, 选出能杂交的克隆并提取其质粒。将杂合质粒在体外表达, 并用小鼠的一种珐琅蛋白(amelogenin)的抗体, 做免疫沉淀反应, 来鉴定富含 amelogenin 的

cDNA 的克隆。通过杂交证明该基因与人的相应基因有相当高的同源性^[1]。又如抗血友病 Ⅷ因子基因的获得, 最先只知猪 Ⅷ因子的几个氨基酸序列, 据此人工合成小段 DNA, 以此为探针鉴定出猪 Ⅷ因子的基因克隆, 最后用猪的钓出人的 Ⅷ因子的基因^[2]。抗胰酶(AAT)基因也是先找到狒狒的 AIT 基因, 以此为探针从人的基因库中钓出。鸡的生长激素的 cDNA 鉴定就是用大鼠的或牛的 cDNA 为探针, 其间至少有 78% 的同源性, 禽类和哺乳动物的生长激素(约 190 个氨基酸)之间不过有 40—44 个氨基酸的差别。

早期的工作多将外源基因在原核细菌中表达, 而无法使蛋白糖基化, 即使在真核的酵母中表达, 科学家也不相信这些系统能制造出复杂的哺乳动物蛋白, 像 HCG 这种含糖高达 30% 的蛋白激素, 若在原核中表达不被糖基化而又具有生物活性实难令人相信。以动物细胞为表达体系虽能满足此要求但成本高而且大规模培养技术

当时尚不过关。随着细胞培养技术的改进,加上动物细胞内高效表达体系的建立,为哺乳动物的基因工程蛋白的生产开辟了新途径。其中一种有希望的并已实践成功表达体系即牛乳头状瘤病毒(BPV)—metallothionein*体系(Bovine papillomavirus-metallothionein体系),此病毒为非裂解性的而又能在寄主细胞(鼠类细胞)中以不整合的多拷贝形式存在,并能持久性地侵染寄主细胞,因此是个整理理想的外源基因运载体。以BPV部分序列,metallothionein的启动子和外源基因所构成的运载体,因有BPV的序列可使载体在小鼠细胞内象细菌质粒一样大量扩增,外源基因的表达则受控于metallothionein的启动子,而此启动子又受外界金属如镉的浓度所调控。利用该体系HCG的两个亚基被正确地表达为糖基化的蛋白并有很好的生物活性。HLH、乙型肝炎表面抗原、TPA也同样被表达。至今用基因工程方法被表达的最大蛋白的当属抗血友病Ⅳ因子,由2300多氨基酸组成,比人血清白蛋白大四倍,比 α -干扰素大13倍多。该蛋白也是在哺乳动物细胞中表达的^{3,41}。

并非只有利用基因工程才能生产上述蛋白类药物,随着动物细胞大规模培养技术的不断改进,人们已开始探索利用哺乳动物细胞融合,即类似于生产单克隆抗体的杂交瘤技术来生产它们,如已成功地将人的T淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合,所产生的杂交细胞(Hybricytes)能无限地产生 γ -干扰素。以此类推,似有可能利用胰腺细胞生产胰岛素;脑垂体细胞生产生长激素。甲状腺细胞生产甲状腺素。其优点是融合率比较高,操作比基因工程技术简单,所产生的蛋白都是天然的,可以是糖基化的。

在七十年代后期,临床试验了利用脂

质体(liposome)将淀粉转葡萄糖苷酶(Amyloglucosidase)包被后,施用到病人体内治疗糖原积累病。八十年代初,开始企图用脂质体将某激素或酶的基因包被,转运至体内后,外源DNA若能整合到体细胞的染色体中,并不断表达,就可以达到治疗目的,即所谓基因治疗(Gene therapy)。这类工作虽仍处于初期阶段但已显示大有希望的前景,如将大鼠的前胰岛素原(preproinsulin)基因插入细菌质粒,再用脂质体包被,注射大鼠,6小时后与对照组比较血糖,对照组无变化,而处理组降低33%。检查肝脏内胰岛素含量,处理比对照多两倍。尽管机制不明,但无论如何外源基因表达了有生物活性的胰岛素。利用反转录病毒(Retroviruses)做基因的运载体的工作也已开始,这种病毒感染寄主细胞后并不杀死细胞而能将病毒的基因整合到细胞染色体中。已经制备出只能进入寄主细胞并整合其基因(包括被插入的外源基因)却无感染性的这类病毒。此病毒必须由另一种反转录病毒称之为辅助病毒(Helper)提供外壳蛋白,将病毒RNA装配完整颗粒后转入邻近细胞。利用这种体系已在体外试验治疗Lesch-Nyhan综合症。患者均为男性,因缺HPRT酶基因而不能将嘌呤再合成为核酸,进入青少年时死亡。将患者的细胞于体外用上述体系将HPRT基因转入,该酶活性被表达并与正常人的细胞的水平相当⁵¹。

基因工程的干扰素是最先成功的药物之一,但至今未能投放市场,主要原因是最终的临床效果有待进一步肯定。以 α -干扰素为例,目前已知至少有十多种亚型,临床试验最多的是 α -2 (Schering-plough

* metallothionein, 为一分子量 ≈ 6600 的小蛋白,含33%半胱氨酸,存在动物组织内。每分子蛋白能结合6个金属离子。

公司产)和 α -A(Hoffmann-La Roche公司)两种,其间只差一个氨基酸。这两种都对黑素瘤和肾癌有些效果,但对乳腺癌、结肠癌和肺癌无效,对白血症的情况也很复杂,对慢性骨髓样白血症(Chronic myelogenous leukemia)和慢性淋巴样细胞白血症(Chronic lymphocytic leukemia)效果很小。最成功的是治疗少年喉乳头状病(juvenile laryngeal papilloma)可以完全抑制其生长并得到控制。 α -干扰素对巨细胞病毒(Cytomegalovirus)的侵染有预防作用。基因工程的 α -干扰素和天然 α -干扰素一样的确对伤风普通感冒(Common cold)的侵染有较好的预防作用,对流感(Influenza)无效,但因其有严重的副作用如鼻粘膜充血、喉痛甚至发烧而不能应用。 α -干扰素的副作用曾认为是由于干扰素制品不纯所致,但进一步研究证实至少某些副作用如全身不适、发烧等是干扰素本身并非制品中的杂质所引起。有人认为副作用很可能与施用剂量有关,低剂量可能反应小而效果好。另一值得注意的现象是若用 α -2的粗制品对乳腺癌就有效,这使人怀疑问题的复杂性可能是我们面临的干扰素种类绝不是三种,仅 α -干扰素已知有10几种,而半年前又从上皮组织中找到新类型,称之为 ϵ (epsilon)。关键可能是要确定能对症下药有效的那种类型或亚型^[1]。基因工程的 β -干扰素与天然的相比极不稳定,究其原因是由于有三个半胱氨酸极易被氧化形成二硫键,若第17位的半胱氨酸不被氧化则可保持活性。用特异的点突变方法变换一个碱基,则半胱氨酸的密码TGT被改为丝氨酸的AGT,不稳定问题迎刃而解。体外测试 β 比 α 在抗病毒侵染和实体瘤更为有效。已证明有希望用于乙型肝炎的防治。 γ -干扰素也正在临床试验中,初试结果使人寄以厚望,因此其

他两种更能有效地刺激体内免疫系统来抑制癌细胞的生长。总之,基因工程干扰素不是万灵药,有待深入细致的耐心工作。目前已知至少有三家较大的公司已失去信心,停止了这方面的工作。而更多的是坚信最终能发挥干扰素应有的功能,从而不断改进使用方法如寻找最适剂量或与其他药物或多种干扰素混合使用。更有雄心勃勃者如Amgen公司总结出13种 α -干扰素氨基酸的多处共同的保守区,并据此组建人工基因进而克隆表达。据说该干扰素比天然的抗病毒活性高15倍,在体外和动物试验中的抗病毒和抗肿瘤的效果也不错^[1]。

基因工程干扰素的另一个正在改进的问题是如何得到高产的糖基化的干扰素。已有些好苗头,如利用昆虫病毒为运载体将 β -干扰素基因在昆虫细胞中表达而达到上述目的。美国农民常用于生防的一种昆虫病毒称苜蓿尺蠖多角体病毒(Autographa Californica),其基因编码一种内含体蛋白(polyhedrin),该蛋白大约占被侵染细胞蛋白的50%,并形成的束状物将病毒颗粒包埋其中。据此推测该蛋白基因的启动子必为极强的启动子^[7]。将 β -干扰素的结构基因与之相联,借助病毒转侵至组织培养的行军虫卵细胞中(Spodoptera frugiperda)卵细胞中。初步结果证明其产量比用酵母细胞为受体的高100倍。该糖基化的干扰素生物活性在体外测试与天然的一样,而且为外泌蛋白。利用可被激素调控的启动子,以动物病毒为运载体,将外源基因在动物细胞中高效表达也初步获得成功,如将鸡 β -珠蛋白基因与可被雌激素(Oestrogen)和黄体酮(progesterone)调控的鸡卵白蛋白基因启动子相联,再将此复合物插入SV₄₀或牛乳头状瘤病毒(BPV)运载体,用此杂合病毒转染鸡输

卵管细胞, 当加激素时则使 β -珠蛋白转录、翻译, 其表达效率比一般情况高1000— 10^6 倍。分子生物学证明, 受激素调控的区域是在启动子上游100—200个碱基并富含A, T的一段DNA序列。假若能将激素受体基因也能组合到上述杂合病毒中, 很可能原来不受激素调节的细胞也能成为寄主。与此类似的高效表达体系是利用二氢叶酸还原酶(DHFR)-氯甲蝶呤-中国仓鼠卵巢细胞(CHO), 组合一个含DHFR-启动子-外源基因的杂合质粒, 用此杂合质粒转侵染CHO细胞系, 并给CHO细胞系高浓度氨甲蝶呤, 该药物是DHFR的竞争性的抑制剂, 故能诱发DHFR的大量合成, 同时也大量合成了外源基因产物。已测试了3—4种蛋白的表达如病毒的蛋白、TPA及几种血液因子最少的产量是10 mg/l, 较好条件下产物可占总分泌蛋白的90%, 细胞蛋白总量的5%。此外, 利用细胞中的强化序列(Enhancer sequence), 选择标记基因和外源基因组成杂合质粒, 并在淋巴样细胞中得到高效表达的试验也获得成功。所有这些动物细胞表达体系连同已广泛使用的SV₄₀-COS体系以及前述用于HCG的BPV-metalliothionein体系都很有希望能替代原核表达体系来大规模生产人或动物的激素或其他蛋白类物质。这是近来基因工程中很值得注意的一个苗头和倾向^[4]。法国巴斯德研究所、美国基因技术公司(Genetech)和综合遗传公司(Integrated Genetics)均用这些系统在哺乳动物细胞中表达了乙型肝炎表面抗原, 现在正处于临床试验阶段。我国预防医学中心病毒学研究所也采用了类似路线并获得了几系分泌乙肝抗原的细胞系。

(二) 疫苗

疫苗历来是防治难以对付的人、畜传染病的重要方法, 但它并非完美无缺。活

的弱化苗一般说效果好但无法保证可能突变成强毒株; 或更多的情况是变成无免疫原性; 有的疫苗在施用时可能造成有一定比例的病例; 有的病毒如乙型肝炎目前不能体外培养而无法在实验室制造疫苗, 而从病人血制备的疫苗很不安全可能传染一些血液传染的疾病; 有的病毒如口蹄疫病毒, 虽能体外培养但某些株系却生长极差, 现行的疫苗多娇气, 储藏运输甚为不便, 因此, 利用基因工程方法制做亚单位疫苗(Subunit vaccine); 即疫苗只包含病原的主要抗原部分而不包括病原生物的其他基因产物的疫苗应时而兴。从广义上说, 亚单位疫苗包括针对病原细菌的如类毒素疫苗和多糖疫苗, 也包括针对病毒的主要抗原的亚单位疫苗。由于七十年代病毒分子生物学的发展, 特别是病毒基因组织的结构、功能、复制、装配等方面的知识积累, 为迅速地研制病毒的亚单位疫苗提供了基础。一些重要的人、畜病毒如乙型肝炎(HBV)、脊髓灰质炎(Polio)、疱疹(Herps)、流感(Influenza)、狂犬(Rabies)以及口蹄疫(FMDV)等都已表达成功, 有的已进入临床试验如HBV。从现在的进展看, 亚单位疫苗普遍存在的问题是免疫原性的问题。如FMDV全病毒的免疫原性比12S的五聚体(由病毒外壳蛋白组成的空壳)强, 12S的五聚体又比主要表面抗原外壳蛋白亚基Vp₁强^[5]。将Vp₁基因克隆在*E. coli*中表达常常是无实用价值的, 唯美国梅岛制做的A₁₂型的Vp₁克隆在*E. coli*中表达的一种杂蛋白, 在6条牛、2头猪体内测定获得了较高的中和抗体效价, 而欧洲等试验所得O型的基因工程Vp₁在动物体内是无效的^[10]。又如流感的主要表面抗原血凝素(HA)基因克隆在*E. coli*中, 表达的产物虽能在兔或鼠体内诱发抗体但却不能中和有侵染性的

病毒颗粒^[10]。其原因至少可以考虑是: 很可能 *E. coli* 不是最佳表达系统特别是对一些糖蛋白; 或是在完整病毒颗粒中主要表面抗原的构象与单独存在时的不同, 因此开始考虑真核表达系统。已知乙型肝炎的表面抗原(HBsAg)是糖蛋白, 美国首先尝试在较简单的真核生物——酵母中表达。结果表达的产物在电镜下呈颗粒状, 其形状大小都与慢性带毒者血液中所见相似, 在黑猩猩体内有较高的免疫原性^[11,12], Merck公司已开始了人的临床试验。日本也进行了类似的工作, 亚单位成直径为 20—22nm 的颗粒其产率为 5×10^8 分子/酵母细胞^[13]。我国上海生物制品研究所也已成功地在酵母菌中进行了 HBsAg 的表达 (详见本期论文)。其他如疱疹病毒的抗原糖蛋白 gD 也在酵母中得到表达。

提高亚单位疫苗的免疫原性的另一个大胆尝试是, 将亚单位的克隆基因插入另一个比较安全的活苗病毒中制备出多价疫苗。该设想主要出发点是, 如此产生的疫苗不是孤立的被钝化的死疫苗而是活疫苗。美国国立过敏变态反应和传染病研究所和纽约州立卫生部首先选择了世界上至少已普遍使用了 200 年的比较安全的痘苗病毒 (*Vaccinia Virus*), 其理由是它安全有效, 接种简便, 其基因组中含有病毒侵染性所不需要的胸苷激酶 (Thymidine Kinase TK) 基因, 可以做选择标记基因, 痘病毒基因组很大可以容纳较大的外源基因片段, 据测试可容纳多达 25Kb 的外源基因, 而大多数病毒表面抗原基因不过 2Kb 左右。痘病毒基因组很大, 分子量为 10^8 水平, 如何将一个外源基因定位地插入, 若完全按原核细菌的基因操作方法目前尚办不到。采用的技术是很巧妙的, 第一步先将表面抗原基因与痘毒的启动子

调控基因联结; 第二将痘病毒的 TK 基因插入某一细菌质粒; 第三将抗原基因-启动子复合片段插入细菌质粒上的 TK 基因中, 因此 TK 基因被抑制不能表达; 第四将杂合质粒与野生型正常的痘病毒同时转入寄主细胞系中。因质粒上外源基因两侧有与正常痘病毒的同源序列 (TK 基因), 所以可通过体内重组产生出只有外源基因产物表达而无 TK 酶产生的杂种病毒, 也正是达到了把外源基因定位地插入 TK 基因的目的。最后通过适当的培养基和受体细胞, 只允许不产生 TK 酶的病毒存活而选出所需的病毒。将 HBsAg 用此法构成的 HBsAg/痘病毒重组体, 在兔内引起的中和抗体可达到完全保护所需抗体的 20 倍。但最近用黑猩猩的试验, 接种后观察了 14 周只有低水平的短暂的免疫反应, 再用 HBV 攻毒后才产生高效价抗体, 因此正在寻找更好的启动子以达到高效表达。去年底两家又都成功地构建成流感/痘病毒, 接种兔或仓鼠后所产生的抗体与初次感染流感者相当并有保护作用。最近又组成了疱疹/痘病毒, 用小鼠试验得 100% 的保护。疱疹病毒包括了单纯疱疹 I 型和 II 型都已成功, 但 II 型尚未见动物试验结果。估计这些疫苗至少还需要 2—3 年才能进行临床试验^[14-18]。现已制成能同时预防 I 型疱疹、乙型肝炎和流感的痘苗病毒重组体, 并在兔和小鼠体内诱发抗体。最近法国 Transgen 公司将狂犬病毒外膜上一种有高度免疫原性的糖蛋白 (505 个氨基酸) 基因插痘苗病毒中, 该重组痘病毒在兔体内有 100% 的预防效果。我国也正在利用重组痘病毒的方法研制一些病毒的疫苗。尽管该方法初步获得令人鼓舞的成功, 但仍需进一步改进使更加安全, 更能高效表达, 同时也应注意这个路线的潜在危险, 即把国际卫生组织已宣布被消灭了的天花病的活

疫苗又被重新引进。

近年来随着分子生物学、分子免疫学、生物化学的发展,人工合成短肽疫苗的工作逐渐被重视,并取得显著的进展。当然这类工作在现阶段与其说是研制实用的疫苗,不如说是对发展疫苗、解决疫苗作用机理的重要应用基础研究。已知引起产生中和抗体的抗原,往往取决于具有完整空间结构的蛋白表面的一些亲水氨基酸,即所谓抗原决定簇,因此根据某一蛋白的基因碱基序列有可能推论抗原决定簇的位置。用人工合成蛋白质的化学技术来合成这些推论性的抗原决定簇短肽可能就有免疫原性。用FMDV的Vp₁和流感的HA表面抗原的试验都证实了这种理论。如FMDV-Vp₁由231AA组成,发现在141—160氨基酸处是富集Arg、Asp和Lys等亲水氨基酸,也是不同毒株容易改变序列的区域。人工合成该小肽并与载体相联后注射兔子和豚鼠,产生有保护性的中和抗体,最近据说25μg的合成肽即可保护牛不受感染^[18-20]。模拟Polio-Vp₁的序列所合成的短肽中找到5个与能中和病毒的单克隆抗体有反应,若注射兔,只有一个短肽在一只兔内引发了中和抗体。令人感兴趣的是那些注射了无免疫原性短肽的兔子再注射一次病毒后可诱发极高效价的中和抗体,未注射短肽的或注射了无关的短肽的兔子则毫无反应^[10]。流感的HA以善变来迅速逃避抗体的中和而著称,将HA和NA(流感病毒颗粒包膜蛋白-血凝素和神经氨酸酶)分别制备其亚单位疫苗并测试其免疫原性:HA的能产生中和抗体防止病毒侵染,而NA的不能引发中和抗体却能抑制病毒在体内运转和扩散,显然只施用NA亚单位疫苗虽不能防止病毒侵染也可能防止疾病的发生。这种所谓允许侵染的疫苗有可能是对对象流感这类抗原易

突变、易漂移的有效办法。因此有人在考虑用人工合成方法来制作这种允许病毒侵染的疫苗^[10]。人工合成HBsAg段只有26个氨基酸的短肽在兔体内有较强的免疫反应并产生高效假抗体。这些抗体与病人血样中的病毒有极强的反应。正在进行动物试验探索作为疫苗的可能性^[21]。尽管从实用观点人工合成短肽暂时尚不能普遍应用,但却是研究抗原决定簇的结构与功能,免疫原性的机理,以及不同毒株与抗原决定簇的关系等基础课题的有力工具。与单抗技术结合使用相信更是潜力无穷。最近利用合成myohemerythrin蛋白的多个短肽证明,诱发抗体的抗原决定簇不仅与蛋白质空间结构表面的亲水氨基酸基团有关,也取决于该基团中原子的移动性(Atomic mobility)^[22]。

细菌病原的基因工程疫苗最早的一个应是荷兰和美国的针对幼畜腹泻病原——毒素型*E. coli*所获得的亚单位疫苗。他们是将K₈₈的菌毛(pili)抗原和热不稳定毒素的亚单位B(LT-B)的决定簇克隆到*E. coli* K₁₂中而获得的,对猪有较好的免疫效果,去年已开始投放市场。我国上海植物生理研究所等单位也研制成功K₈₈抗原工程菌,制成了抗仔猪黄痢病实验菌苗(详见本期论文)。现用的霍乱疫苗是灭活的菌体,非口服活疫苗,其效果较差。自然感染霍乱后机体可获得极高的免疫力,这说明有可能找到病原菌主要抗原并利用基因工程方法研究疫苗,但遗憾的是目前尚不知其主要抗原在何处,因此无法象前述病毒亚单位研制所使用的技术路线,而是采取了不同的路线。已知霍乱菌(*Vibrio cholera*)致病机理是由于它本身编码的毒素,毒素由六个亚基构成,一个A亚基能刺激肠内粘膜造成水泻,5个相同的B亚基仅负责将毒素分子与胞膜上的

受体相联。先将能在人体内产生较好免疫性的霍乱菌的毒素基因克隆，在体外用限制性内切酶将A亚基中主要的A₁部份切去94%而保留全部的A₂和B亚基的基因，使其不能合成完整毒素。通过适合的质粒将此缺失的毒素基因引入带有完整毒素基因的原始菌株，经体内重组，选出原始菌的毒素分子被有缺失的毒素基因所替代的后代，从而创造了能产生较好免疫反应却不能产生完整毒素的菌株用做疫苗。10个健康人吞服此无毒菌株后一个月，再接种强株，只有1人罹病但其余的仍有轻度腹泻，看来似乎霍乱菌内尚有能造成腹泻的其他未知因子^[23]，该疫苗有望不久即可应用。利用基因工程方法分离，鉴定梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)和麻疯病菌(*Mycobacterium leprae*)的特异抗原来研制疫苗也有很大进展。已将梅毒螺旋菌体的基因在*E. coli* K12中做成基因库并从中筛选出特异抗原的基因并表达成功，从而得到大量的该抗原，可用于诊断也有望制成疫苗^[18]。

研制疟疾的基因工程疫苗也为很多国家特别是第三世界各国所关注，目前也取得很大进展。其主要设想是针对疟原虫生活史中三个主要时期即子孢子、裂殖子和有性配子期来鉴定各自重要的保护性抗原的基因，然后克隆、表达用做疫苗。对子孢子的研究进展最好已找到能中和侵袭性的单克隆抗体，其抗原为细胞表面蛋白，其基因(猴疟原虫的，*P. Knowlesi*)已被克隆，其决定簇为12个氨基酸短肽，用人工合成的这段短肽能中和子孢子。对裂殖子也鉴定出140k和66k(也是在*P. Knowlesi*)两种蛋白，可抑制其对红细胞的侵染。裂殖子细胞的表面主要蛋白也被鉴定它先是为200K的大蛋白，在进入细胞表面前加工成小片段，用此蛋白免疫小鼠后对疟原虫

有抗性。用人的疟原虫(*P. falciparum*)也鉴定出类似的蛋白。对有性时期研究进展较差。从疟原虫生活史看最终的疫苗应当包括针对这三个时期的特异性抗原，这样子孢子期的可大大减少蚊虫引入体内的侵袭性虫体数目；裂殖子的可减少破坏红细胞的虫体，而有性配子的则可大大减少蚊虫传播机率^[18,24]。据估计可望于五年内在全世界使用^[25]。

尽管基因工程的亚单位疫苗或人工合成短肽疫苗在应用上存在着这样或那样的问题，但它们的出现的确给使用了上百年的传统研制疫苗的方法带来了革命性的变化，也使一些过去无法制备疫苗的老大难问题获得解决的可能。相信前进中所遇到的困难问题最终会获得解决，同时进一步研究病毒毒力的突变，弱株作为疫苗的遗传学和生物化学的分子基础的条件和方法已经具备，有理由相信不久的将来，或许是本世纪末或下世纪初，完全有可能改造、重组甚至合成出更加安全、有效而又便宜的各种病毒的疫苗。

(三) 单克隆抗体

单克隆在医药方面的应用仍是以诊断为主，治疗方面在积极研究中，利用单抗于发酵后处理大规模提纯抗原类物质也在日趋成熟中。自单抗方面出现后由于其高度特异性和能较大量地不断供应的特点首先利用于体外诊断。在体外测定血或尿中各种激素、各种特殊的蛋白、血型、各种药物、诊断细菌性或病毒性病原等方法如雨后春笋，为此西方专家估计到1990年约有50%的现行常规诊断方法将被单抗方法所替代^[26]。近年来体外诊断在不断地向广度发展的同时，特别注意到临床诊断要求快速、简便、灵敏、多能的特点。所以所谓临床诊断盒风行一时，目前已批准80种诊断盒。如法国输血中心大量制备了可

分辨A, B和AB型的单抗血型诊断盒。英国Celltech制备可以诊断先天畸形脊柱裂(spina bifida)和肝癌的单抗诊断盒。这后两种病主要诊断标记物是甲胎蛋白。为了快速灵敏,将针对甲胎蛋白的单抗包被乳胶球(Latex),加入欲测样,反应后再加第二种有放射标记的甲胎蛋白单抗,放射性单抗与已被乳胶球捕获的抗原再次反应,加入10%蔗糖溶液,10min后乳胶球下沉,去上清后可直接测放射性含量。与此类似的方法是诊断卵巢癌,已知病人血中含有癌细胞分泌的特异蛋白CA125。先将CA125-单抗包被聚苯乙烯的小球,再加同位素标记的单抗,最后用伽玛测量仪测量,此法假阳性率低,阳性率80%。Centocor公司已制成卵巢癌和胃、肠肿瘤两种早期诊断盒,已在意大利、西德和西班牙等国投放市场。用单抗检测结、直肠癌病人血中特异的糖脂类化合物(Monosialoganglioside)或检测胰腺癌病人血中特殊的抗原物质都可能达到早期诊断目的^[27]。针对细菌病原的类似的诊断盒如乳胶球上分别包被脑膜炎的三种病菌的单抗(Hemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, 和 streptococcus),取病人脊髓液测试,10min即可得结果而常规方法需几天时间。对造成败血症的六种类型的细菌也已制备联合的单抗,在动物体内试验有明显的效果。Centocor公司还制备了能测知心脏病发作后心肌损伤程度的单抗,利用它测量病人血中肌球蛋白(myosin)就能区分心肌是致死了还是仅仅损伤^[27]。家庭用简便诊断盒也日益受到重视,如将单抗做成能起颜色反应的小药杆,浸入妇女尿中即可根据颜色反应测知促黄体生长激素(Luteinizing hormone)从而得知妇女确切排卵期,可用于避孕;同理也可用于畜牧的人工授精,提高受孕率。据估计前者可有三亿美

元,后者约有一亿美元的市场。

体内诊断主要是利用同位素标记的单抗注入体内配合X-光断层扫描技术定位癌细胞,但此法目前最大问题是特异性不强,有癌细胞的地方可聚集较高的放射性,但非癌细胞位置也有。如利用¹³¹I-单抗定位结肠直肠癌只有40—50%的患者被检出,目前还不能用于临床有待进一步研究^[28]。

利用单抗防治人畜疾病成功的实例还是极少的。1983年加拿大批准应用商品名Genecol 99的畜用口服单抗可防治由E. coli st B₄所引起的小牛腹泻。该单抗可阻止病原菌附着在肠壁上而达到防治的目的,大面积试验可使50%以上的牛受到保护,美国FDA已批准应用。利用单抗治疗人的癌症如白血症、淋巴肉瘤早在1980年左右美国斯坦福大学的医学中心即已开始尝试,用每个病人癌细胞免疫小鼠所制备的单抗做被动免疫治疗可使病情有短暂的改进和癌细胞减少,但大多数病例是肿瘤细胞数目不久又回升。最近报道英国利用单抗治疗成神经细胞瘤(Neuroblastoma)获得初步成效,是先用肿瘤细胞的单抗处理骨髓,然后再用外被单抗并被磁化了的聚苯乙烯小球处理,最后将整个复合物:单抗-肿瘤细胞-单抗-磁化球用高功率的磁铁除去而达到体外净化骨髓的目的。已有20个小孩被治疗,至今已一年多,肿瘤仍处于缓解状态^[29]。在澳大利亚也用类似方法治疗过慢性淋巴细胞白血症,治疗后已15个月仍处于无病状态。这两个例子是利用单抗做体外治疗从而避免了异源抗体注入体内所引起的过敏反应^[29]。不管是体内诊断或是体内治疗用单抗都理应是人细胞系的而不是小鼠或大鼠的,因此制备人细胞系的单抗杂交瘤即成为关键。由于人骨髓瘤细胞很难在组

织培养中生长, 或生长速度极慢而且也找不到不产生自己本身Ig的细胞系, 另一方面无法像制备鼠杂交瘤那样体内免疫, 然后取免疫脾细胞, 因此人-人的杂交瘤进展缓慢, 但近两年已出现了一些人的杂交瘤:

1. 人×鼠杂交瘤: 如取患乳腺癌病人淋巴结的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 所得杂交瘤能产生乳腺癌抗原的单抗, 但缺点是杂交瘤不稳定, 很易失去人的染色体而停止产生抗体, 但也发现有些是稳定的杂交瘤^[28]。又如最近用免疫后的人外周血淋巴细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合制备的破伤风成白喉抗毒素的杂交瘤可产生保护性单抗, 无论在体外检测或体内防治都有效^[30]。

2. 人×人杂交瘤: 取免疫的人体淋巴细胞与能快速生长无限繁殖的淋巴母细胞融合制备了破伤风抗毒素的杂交瘤, 但抗体产量很低, 假若用EB病毒转化的淋巴母细胞则产量可增加10-100倍。又如从患肺癌病人淋巴结中取B淋巴细胞与能在无血清培养基中繁殖的淋巴母细胞融合得到了识别肺癌抗原的单抗。也有用免疫的B淋巴细胞与人的癌细胞系融合选出杂交瘤的。总的看来有望在1-2年内获得活力较强的用于体内的单抗。

将同位素或药物与单抗偶联进行体内治疗的工作也取得一些进展, 同时也发现一些待解决的问题, 如用同位素-单抗注入血管结果不令人满意, 因单抗在体内丢失了同位素。将蓖麻蛋白(Ricin)的有毒性的肽链与白血病的多克隆抗体联结, 几乎杀死了患白血症小鼠的骨髓中所有的肿瘤细胞而不破坏干细胞(stem cell)。将蓖麻毒蛋白偶联单抗治疗小鼠白血症的工作也在进行中。在类似的利用单抗治疗肿瘤的试验中还发现病人体内存在着可与单抗

结合的一些因子阻碍单抗与靶细胞的结合; 同时肿瘤体本身的研究结果更使问题复杂化, 如某种类型的肿瘤并非所有同类肿瘤都具有同样的特异抗原, 就是在同一肿瘤中的细胞其细胞表面抗原也是不均一的。看来利用单抗进行临床治疗前还需进行大量基础工作^[28]。

利用单抗的高度特异性在大规模后处理中纯化一些抗原物质已有不少成功实例, 如做成免疫吸附柱纯化干扰素, 或从尿液中提纯尿激酶都为从发酵液中简便、有效地分离提纯含量极微的抗原物质开辟了一个新途径。最近有利用一些酶的单抗与sepharose-蛋白A非共价联结做成该酶的固定化载体^[31]。

无论是用于临床诊断, 或是用于后处理提纯, 单抗的需用量日益增大; 利用动物细胞体系表达一些激素、疫苗或动物体内蛋白质愈来愈受到重视, 所有这些都促使大规模的动物细胞培养或杂交瘤细胞的培养提到日程。受到重视的方法有以下几种:

1. 微囊法: 为美国Damon Biotech公司专利大规模生产单抗, 成功地用于鼠×鼠, 人×鼠或人×人杂交瘤, 其方法是将细胞悬浮于藻酸钠溶液, 迫使其通过可形成滴的装置而滴入CaCl₂溶液后则形成凝胶小球, 细胞被固定化; 先用聚-L-赖氨酸洗再用聚乙烯胺(Polyvinylamine)溶液则在界面形成半渗透膜。此法最大优点是细胞在培养过程中废物可不断排出而分泌出单抗积累在微囊中, 提纯抗体时很简便只需破碎囊膜, 离心分离即可, 而且纯度和产量都比悬浮培养法好, 产量为90μg/10⁶细胞, 而悬浮法为100—200ng/10⁶细胞, 纯度为总蛋白的52%, 而悬浮法则不到1%。1000 l的培养液(细胞密度为1.1×10⁷/ml)即可生产1 kg的单抗, 相当于5

万个小鼠的产量。此法也可用于培养重组的细菌或其他动物细胞^[32,33]。

2. 活牛法：美国 Bio-Response 公司将活牛淋巴液导出经过滤系统去除混杂的细胞和干扰杂交瘤细胞生长的物质后导入杂交瘤培养小室，在进入室前补给氨基酸、维生素、O₂和CO₂，淋巴液离开小室也经过半渗透膜最后返回牛体内。每头牛可维持10个小室。此法也可生产kg计的单抗。去年该公司18头牛每月可生产2 kg。人们怀疑此法生产的单抗会杂有牛体内的一些污染物，故认为可用于工业大规模提纯^[32]。

3. 悬浮法：英国 Celltech 公司基本上是用常规发酵法的大罐悬浮培养，生产规模已达300 l，年产量为1kg。此法优点是易于操作。

4. 重组细菌发酵法：将杂交瘤抗体的重、轻链基因用DNA重组法转至*E. coli*或酵母中表达，然后将重、轻链在体外重组成完整的抗体，此法用癌胚抗原(CEA, Carcinoembryonic antigen)已试验成功。此法主要优点是成本低，可大量生产^[34]。

参 考 文 献

- [1] Yanchinki S.: *Biotechnology*, 2(2):116, 1984.
- [2] Beardsley T.: *Nature*, 309(5963):3, 1984.
- [3] Kolata G.: *Science*, 223(4638):805, 1984.
- [4] Wilson, T.: *Biotechnology*, 2(9):753, 1984.
- [5] Kolata G.: *Science*, 223(4643):1376, 1984.
- [6] poluledge T.: *Biotechnology*, 2(3):214, 1984.
- [7] Smith, G.E. et al.: *y. virol.*, 45, 215, 1983.
- [8] Brown F.: *Trends in Biochem Science*, 6(12):325, 1984.
- [9] Moore D.M. et al.: *Science*, 214:1125, 1981.
- [10] Wilson T.: *Biotechnology*, 2(1):29, 1984.
- [11] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 298:347, 1982.
- [12] McAleer W.G. et al.: *Nature*, 307:178, 1984.
- [13] Miyachara, A. et al.: *Current Biotech.*, Abs No:1, item 154, April 1984.
- [14] Smith G.L. et al.: *Nature*, 302:490, 1983.
- [15] Smith G.L. et al.: *PNAS(USA)*, 80(23):7155, 1983.
- [16] Panicali, D. et al.: *PNAS(USA)*, 80:5364, 1983.
- [17] paoletti E. et al.: *PNAS(USA)*, 81:193, 1984.
- [18] Brown F. et al.: *Microbiological science*, 1(5):123, 1984.
- [19] Bittle G. et al.: *Nature*, 298:30, 1982.
- [20] Pfaff, E. et al.: *The EMBO y.*, 1(7):869, 1984.
- [21] *Chemical & Engineering News*, 23, April 1984.
- [22] Lerner R.A. et al.: *Sixth International congress of virol. Abstracts*, p1, 1984.
- [23] Kaper G.B. et al.: *Biotechnology*, 2(4):345, 1984.
- [24] *New Scientist*, No. 1411, p.8, May, 24, 1984.
- [25] *Science News*, vol 126, No.6 p.87, August 11, 1984.
- [26] Cox, R. *proceeding of Biotech*, 83:405, 1983.
- [27] Lamb Gohn: *New scientist*, 100(1383):419, 1983.
- [28] Mark G.: *Science*, 216:283, 1982.
- [29] *Biotechnol. Newswatch*, March, 5, 1984.
- [30] Insel, R.A. et al.: *Current Biotechnol. Abstract Item 2338*, guly 1984.
- [31] solomon, B. et al.: *Biotechnology*, 2(8)709, 1984.
- [32] Klausner, A.: *Biotechnology*, 1(9)736, 1983.
- [33] Grdina, T. A. and A.P. Garvis.: *proceeding of Biotech* 84 vol I A235, 1984.
- [34] Klausner, A.: *Biotechnology*, 1(9)736, 1983.