

本期导读主题: 基因诊断技术、抗新冠抗体药物、高通量药物筛选技术、纳米抗体、多组学肿瘤药物敏感性预测、植物质体转基因技术、肠道微生物与疾病。

以基因工程为基础、细胞工程为导向的现代生物技术在医药领域的广泛应用, 被称之为现代医药生物技术。现代医药生物技术在疾病的诊断、预防和治疗及生物技术药物的研发中的应用, 促进了诸如传染病、恶性肿瘤、心脑血管疾病等重大疾病在诊断、预防、治疗上的技术革命, 已成长为现代工业的支柱产业之一的生物医药产业, 服务于人类的健康事业。

自 2019 年底开始在全球范围内暴发的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 迄今导致 5.38 亿人感染, 633 多万人死亡^[1]。与 2002 年底的 SARS COV-1 引起的非典型肺炎相比, 由于疾病监测体系的完善、特别是病原分离、培养技术和现代测序技术的发展, 在病原诊断方面, 2002 年非典型肺炎确定 SARS COV-1 为病原耗时 5 个月, 而 2019 年新冠肺炎确定 SARS COV-2 为病原仅用不到两周时间。

《生物工程学报》本期出版的医药生物技术专题, 体现了现代医药生物技术及生物技术方法的多样性和宽泛性。

1 突发性传染病病原的基因检测、抗体药物与新药高通量筛选技术

快速准确的分子诊断是控制传染病和疫情暴发的关键工具, 韩勇军等^[2]建立了一种快速

鉴别新冠病毒 (SARS-CoV-2) 的 5 种主要变异株 (alpha、beta、gamma、delta 和 omicron) 的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 体系, 该方法可准确区分出 SARS-CoV-2 野生型和突变型, 与其他呼吸道病原体 ($n=21$) 无交叉, 显示高特异性。该方法最低检测限为 2×10^2 拷贝/mL, 操作简单、快速、成本廉价, 可用于监测 SARS-CoV-2 毒株的变异, 精准指导疫情识别与防控。

自 1998 年预防呼吸合胞病毒的帕利珠单抗药物上市以来, 多种靶向病毒的治疗性抗体药物已成功用于感染性疾病的临床治疗。新型冠状病毒肺炎疫情暴发后, 多种中和抗体药物快速进入临床研究阶段, 展现出积极的治疗及预防效果。王跃、严景华等^[3]对正在开展临床 II/III 期试验的 29 个新型冠状病毒中和抗体药物的临床进展和主要临床试验结果, 特别是被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 或欧洲医药管理局 (European Medicines Agency, EMA) 授权紧急使用 (emergency use authorization, EUA) 的 7 组抗体疗法的疗效进行了全面的总结, 并且对新变异株 omicron 的疗效做了客观总结; 同时也对 6 款国内自主创新抗体品种做了重点介绍, 目前国内 1 组抗体疗法已附条件批准上市。

抗新冠病毒小分子药物的研发与应用从根本上控制新冠疫情具有决定性作用。当前,全球已有 3 款抗新冠病毒小分子药物上市,但基本上都是属于早期研发的抗相关病毒药物的重定位或进行优化而获得的。

新药高通量筛选技术是 20 世纪末至 21 世纪初发展起来的药物发现新技术,其核心就是针对疾病发生的关键靶蛋白建立分子水平的高通量测活技术,可以开展对规模化有机小分子化合物库进行高通量筛选,经过基于细胞水平的高内涵分析,动物体内药效学研究,快速获得药物先导物,再进行结构优化,获得药物候选物,然后经过系统的临床前与临床试验,才能被授权获得上市与生产。这一过程一般要经过 10 年以上的研发。原始创新药物的发现主要通过基于药物靶标活性中心三维结构的计算机辅助药物设计与合成,及基于规模化化合物库的高通量药物筛选。因此,快速高效的高通量药物筛选方法必不可少。闫干干等^[4]建立了基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理的灵敏可靠性的新冠病毒主蛋白酶 (Mpro) 小分子抑制剂高通量筛选模型,闫浩浩等^[5]建立了基于荧光偏振技术 (fluorescence polarization, FP) 和生物素-亲和素反应 (biotin-avidin system, BAS) 的三明治样荧光偏振筛选模型,用于 Mpro 小分子抑制剂的快速筛选方法。为新型抗冠状病毒药物先导化合物的筛选与发现奠定了基础。

2 精准医学、纳米抗体及肠道微生物组学

肿瘤领域一直是精确医学研究与应用的前

沿。精准医学时代肿瘤多组学数据在持续不断地累积,深度学习等人工智能的算法应用在不断拓展,因此高效的组合特征筛选方法和稳健的模型构建方法研究在肿瘤药物敏感性预测领域的应用实践是值得持续关注方向。

肿瘤药物敏感性预测在指导患者临床用药方面具有重要意义。杨晨宇等^[6]基于 GDSC 数据库 198 种药物的细胞系敏感性 IC₅₀ 数据,通过 Stacking 集成学习构建了包含基因表达、基因突变、拷贝数变异数据的多组学癌症药物敏感性预测模型。该模型较已有单组学和多组学模型的准确性和稳定性具有优势。特征基因功能注释和富集分析解析了肿瘤对 sorafenib 潜在的耐药机制,从生物学角度提供了模型可解释性及其应用于临床用药指导的价值。

基于骆驼科动物单链抗体 VHH 结构域的纳米抗体具有分子量小、结构简单、溶解性好、稳定性强和免疫原性低等诸多优势,尤其是可通过吸入给药,在呼吸道病毒感染的防控中具有重要应用价值。张建慧等^[7]在密码子优化的基础上,使用组成型强启动子 Pcdna1,实现了 SARS-CoV-2 中和纳米抗体 Nb20 在里氏木霉中的重组表达。作者巧妙地将 Nb20 与里氏木霉纤维二糖水解酶 CBH I 的 N 端片段融合表达,并在二者间引入胞内 KEX2 蛋白酶切位点,于葡萄糖培养基中摇瓶发酵 48 h 可生产出较高浓度的纳米抗体 Nb20 蛋白。重组表达的纳米抗体能够与 SARS-CoV-2 刺突蛋白的受体结合区相结合,有望用于新型冠状病毒中和抗体的研发。

人体微生物组与疾病的关系是现代医药生物技术研究热点,邓寒丹等^[8]对肠道菌群在肿

瘤发生发展及免疫治疗中作用的研究进展进行了总结,就肠道菌群促进肿瘤发生、发展的主要机制,以及肠道菌群对抗肿瘤免疫治疗的影响和现行通过调节肠道菌群来提高肿瘤治疗效果的方法进行了重点介绍,并提出了其中可能存在的困难和挑战。

肠脑轴是大脑和肠道之间的双向通信系统,除了中枢神经系统和肠神经系统外,还包括肠道微生物群、肠上皮屏障和肠内分泌系统。最近的研究表明,帕金森病(Parkinson's disease, PD)可能起源于肠道,然后进展到脑区,因此肠道菌群可能成为PD诊断和治疗的新靶标。周佳文等^[9]总结了基于肠脑轴探讨 α -突触核蛋白(α -Syn)在大脑和肠道的双向传输关系,尝试探索肠道微生物群对 α -Syn异常聚集的影响。结合目前PD患者的研究和动物模型尤其是非人灵长类实验的研究,希望为PD疾病的筛查和诊断提供参考。

3 基因工程药物、基因治疗、组织工程、核酸药物与微生物药物

活性多肽作为重要的生物技术药物,已经在临床上广泛应用。但像胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在原核生物中表达易于形成包涵体,难于直接获得IGF-1。谢倩等^[10]采用蛋白质结构预测技术筛选出蛋白酶最适配的融合蛋白,再通过基因工程的方法得到高纯度、高活性的IGF-1目的蛋白,为大规模工业化制备IGF-1奠定基础。

CRISPR/Cas9基因编辑技术作为基因治疗最有前景的工具,在临床应用中亟待解决递送

的有效性和安全性问题。非病毒纳米粒子载体,如脂基纳米粒子、聚合物纳米粒子、纳米金颗粒以及生物膜类纳米粒子等,因其生物相容性、安全性和可设计性等特点有望为基因治疗带来新的突破。马跃等^[11]对纳米粒子的特性和基因治疗中CRISPR/Cas9的发展进行了概述,详细归纳了纳米粒子在递送不同形式的CRISPR/Cas9中的应用,并对纳米粒子介导的基因治疗的递送在未来面临的挑战、安全性等方面作出总结论述。

相较于靶向DNA的基因组编辑技术CRISPR-Cas9系统,近年来靶向RNA的VI型-CRISPR家族CRISPR-C2c2/Cas13a系统研究日渐增多。CRISPR-Cas13a系统具有特异性识别并结合单链RNA序列从而非特异性切割RNA的特点,可应用于检测肿瘤外周血游离核酸,对早期肿瘤患者进行筛查与诊断。张婧等^[12]综述了靶向RNA的CRISPR-Cas13a技术应用于肿瘤诊断与治疗的研究进展,探讨了CRISPR-Cas13a系统对癌症治疗的新思路及存在的局限,并展望了未来可能的研究方向。

外泌体是机体多种细胞分泌的直径约为30-150 nm的具有脂质双层膜含有复杂RNA和蛋白质的微小囊泡,广泛存在并分布于各种体液中,携带和传递重要的信号分子,形成了全新的细胞间信息传递系统。外泌体包含的微小RNA(microRNA, miRNA)与癌症的发生密切相关,可用于癌症的诊断和治疗。将癌症病人血浆外泌体的miRNA通过逆转录的方式构建全长cDNA文库,对某种特定细胞中的基因组的表达状态及表达基因的功能和鉴定可发挥重要作用。因此,基于癌症病人的血浆外泌体的

miRNA 构建全长 cDNA 文库, 能够为癌症发病机制、早期诊断、治疗与预后的研究提供重要信息。

王娜等^[13]探究了如何以酶切法和磁珠分离法解决由引物产生的血浆外泌体 miRNA cDNA 文库构建中非特异性扩增问题, 为癌症病人血浆外泌体 miRNA cDNA 文库的构建提供相关理论指导和技术支撑。

组织工程和再生医学涉及许多不同的人工和生物材料, 经常集成在复合支架中, 其中脱细胞支架是最理想的组织工程用支架。脱细胞支架是指从组织中去除了引起免疫排斥反应的细胞和部分抗原成分的脱细胞基质 (dECM) 支架, 其特点是降低了在体内植入时导致免疫排斥的能力。脱细胞后组织器官原有的细胞外基质结构、一些非抗原活性成分如多糖、胶原蛋白、糖蛋白和纤维连接蛋白等得到保留, 许多天然的细胞结合位点被保存在支架中, 有助于再生过程中细胞的粘附、增殖和分化。目前脱细胞支架已经广泛应用于全器官工程中器官再生、组织修复和重建、生物打印、疾病模型和药物筛选以及细胞培养等方面, 为解决供体和体外模型的短缺提供了新方法。

脱细胞支架是研究组织工程和再生医学的合适平台。杨加敏等^[14]总结了脱细胞支架的制备过程, 包括支架的脱细胞方法、交联方法、灭菌方法和保存方法。同时对目前脱细胞支架在组织工程和生物学中的应用进行了总结, 讨论了脱细胞的制备及应用所面临的问题及挑战, 为脱细胞支架更恰当地应用于组织工程和生物学领域提供了参考。

非编码微小 RNA (microRNA) 涉及许多生

命活动的调节。研究表明, 在自然杀伤 (NK) 细胞中有超过 60 种 miRNA 表达, 在 NK 细胞发育、成熟、活化和细胞毒作用中起重要作用。miRNA 的转录后调控作用涉及 NK 细胞发育的各个阶段。李珊等^[15]总结了 MicroRNA 在 NK 细胞发育分化及功能调控过程中的作用, 并指出 NK 是机体抵抗病原微生物的重要效应细胞。miRNA 作为转录后的关键调控因子, 未来有可能利用它开发出靶向细胞的脂质纳米颗粒包装的 miRNA, 将 miRNA 特异性递送至 NK 细胞或其他免疫细胞, 以改善 NK 细胞或其他免疫细胞的成熟度和功能, 为治疗免疫疾病、维护机体健康提供新途径。

细菌的多糖抗原 (O-多糖或荚膜多糖) 能与适当的载体蛋白发生共价结合, 形成糖蛋白。糖蛋白是 T 细胞依赖型抗原, 能激活 Th 细胞并诱导 B 细胞产生特异性 IgG、IgA 等抗体, 同时产生记忆性 T 细胞和 B 细胞。因此糖蛋白在预防沙门菌感染上具有潜在的应用开发价值。为了实现生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白, 需要将含有糖基化位点的载体蛋白、多糖和寡糖转移酶共表达于同一菌株中, 在寡糖转移酶的作用下, 细菌将多糖链转移到载体蛋白, 并共价连接获得糖蛋白。李梦如等^[16]采用 CRISPR/Cas9 方法构建肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) *waaL* 基因缺失株 SE $\Delta waaL$ 。通过生物法将能表达 O-糖基化系统的寡糖转移酶 (PglI) 和重组铜绿假单胞菌的外毒素 A (rEPA) 或霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 的质粒转入 SE $\Delta waaL$ 中, 使其自身 O 抗原多糖与 rEPA 或 CTB 载体蛋白进行共价结合产生糖蛋白。该研究结果证明肠炎沙门菌缺失 *waaL* 基因后, 在寡糖

转移酶 PglI 的作用下可以将自身 O 抗原多糖链共价连接到载体蛋白 rEPA 和 CTB 上, 形成糖蛋白, 为生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白并进一步制备糖蛋白疫苗的研究奠定了基础。

植物作为生物反应器生产多肽及蛋白药物可以有效降低生产成本, 已受到越来越多的关注。植物作为生物反应器可以通过细胞核转基因技术和质体(叶绿体)转基因技术成功实现。质体转基因技术通过同源重组将外源基因定点整合到植物的质体基因组上, 不会出现由于随机插入而导致的基因失活现象。由于大部分物质体基因组遗传方式为母系遗传, 外源基因通过花粉产生基因漂移的概率极低。以烟草为例, 每个烟草叶肉细胞含有高达 10 000 个质体基因组拷贝, 因此整合到质体基因组上的外源基因具有极高的表达潜力。利用植物生产生物药物的成本是中国仓鼠卵巢细胞作为生产系统生产生物药物成本的千分之一。同时, 植物生物反应器生产重组蛋白时, 植物体内不会产生人源病原体或者毒素, 大大提高了植物生物反应器生产系统的安全性。

吴梦婷等^[17]将抗人源白介素-6 单链抗体(IL-6 scFv) 基因在质体转基因烟草中成功转录和翻译, 其产生的功能性抗人源 IL-6 scFv 在质体转基因烟草叶片中的含量可占到总可溶性蛋白的 1%, 达到 41 mg/kg 鲜重。抗人源 IL-6 scFv 的高表达量也表明了利用质体转基因植物低成本生产 scFv 的潜力。现在, 通过质体工程已成功生产用于治疗老年痴呆症、糖尿病、高血压、血友病、视网膜病以及艾滋病等众多疾病的药物。因此, 通过植物质体工程大量生产抗人源 IL-6 scFv 具有较高的商业化生产前景。

近年来全球抗生素耐药问题日趋严重, 罹患各种癌症人数也在逐年增加, 亟需开发新型治疗药物。嗜盐微生物作为一类特殊的极端环境微生物, 具有代谢多样性丰富、营养需求较低和能适应恶劣条件等特点, 是发现新型微生物药物的重要来源。目前, 国内外学者已从嗜盐微生物中分离出了多种次级代谢产物和功能酶, 具有明显的抗菌和/或抗肿瘤等活性。刘妮娜等^[18]综述了嗜盐微生物及其相关产物在抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、生物医学材料以及药物载体等生物医学方面的作用, 尤其对近年来在嗜盐微生物中发现的新型抗菌和抗肿瘤物质以及嗜盐微生物特有的代谢产物四氢嘧啶等进行了总结, 并对其后续在生物医药领域的开发和产业化应用进行了展望。

REFERENCES

- [1] 新型冠状病毒肺炎疫情实时大数据报告[EB/OL]. [2022-06-09]. <https://voice.baidu.com/act/newpneumonia/newpneumonia>.
- [2] 韩勇军, 刘琪琦. 实时荧光定量 PCR 快速鉴别新型冠状病毒主要变异株. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2224-2235.
Han YJ, Liu QQ. Rapid identification of SARS-CoV-2 main variants using real-time quantitative PCR assay. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2224-2235 (in Chinese).
- [3] 王跃, 严景华, 史瑞. 抗新型冠状病毒中和抗体药物临床研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2061-2068.
Wang Y, Yan JH, Shi R. Clinical progress of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2061-2068 (in Chinese).
- [4] 闫干干, 李东升, 威海燕, 等. 新冠病毒主蛋白酶小分子抑制剂荧光共振能量转移高通量筛选模型的优化与应用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2236-2249.
Yan GG, Li DS, Qi HY, et al. Discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using an optimized FRET-based high-throughput screening assay. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2236-2249 (in Chinese).
- [5] 闫浩浩, 闫干干, 威海燕, 等. 新型三明治样荧光偏

- 振筛选模型在新型冠状病毒主蛋白酶小分子抑制剂筛选中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2352-2364.
- Yan HH, Yan GG, Qi HY, et al. Identifying SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a novel sandwich-like fluorescence polarization screening assay. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2352-2364 (in Chinese).
- [6] 杨晨雨, 刘振浩, 代培斌, 等. 基于多组学数据的肿瘤药物敏感性预测. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2201-2212.
- Yang CY, Liu ZH, Dai PB, et al. Predicting tumor drug sensitivity with multi-omics data. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2201-2212 (in Chinese).
- [7] 张建慧, 李佳骏, 高丽伟, 等. SARS-CoV-2 中和纳米抗体在里氏木霉中的重组表达. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2250-2258.
- Zhang JH, Li JJ, Gao LW, et al. Expression of a SARS-CoV-2 neutralizing nanobody in *Trichoderma reesei*. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2250-2258 (in Chinese).
- [8] 邓寒丹, 范兴丽. 肠道菌群在肿瘤发生发展及免疫治疗中作用的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2105-2119.
- Deng HD, Fan XL. The role of intestinal microbiota in tumor occurrence, development and immunotherapy: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2105-2119 (in Chinese).
- [9] 周佳文, 王正波. 基于肠脑轴传播 α -突触核蛋白诱发帕金森病的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2120-2127.
- Zhou JW, Wang ZB. Advances in Parkinson's disease induced by α -synuclein transmitted through the gut-brain axis. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2120-2127 (in Chinese).
- [10] 谢倩, 李冠霖, 李颖, 等. 基于蛋白质结构预测的胰岛素样生长因子-1 的制备及活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2259-2268.
- Xie Q, Li GL, Li Y, et al. Preparation and activity evaluation of insulin-like growth factor 1 based on protein structure prediction. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2259-2268 (in Chinese).
- [11] 马跃, 邓莉, 李善刚. 纳米粒子在 CRISPR/Cas9 基因治疗中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2087-2104.
- Ma Y, Deng L, Li SG. Application of nanoparticles in CRISPR/Cas9-based gene therapy. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2087-2104 (in Chinese).
- [12] 张婧, 罗佳豪, 赵奕君, 等. CRISPR-Cas13a 系统用于肿瘤诊断与治疗的进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2079-2086.
- Zhang J, Luo JH, Zhao YJ, et al. Advances of using CRISPR-Cas13a system for tumor diagnosis and treatment. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2079-2086 (in Chinese).
- [13] 王娜, 何飞, 郁宏伟, 等. 在 cDNA 文库构建中探究癌症病人血浆外泌体 miRNA 的特异性扩增. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2213-2223.
- Wang N, He F, Yu HW, et al. Specific amplification of plasma exosome miRNA in cancer patients for construction of cDNA library. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2213-2223 (in Chinese).
- [14] 杨加敏, 胥义, 党航宇, 等. 组织器官脱细胞支架的制备及研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2169-2186.
- Yang JM, Xu Y, Dang HY, et al. Preparation of tissue and organ decellularized scaffolds: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2169-2186 (in Chinese).
- [15] 李珊, 方敏, 卢娇. MicroRNA 在自然杀伤细胞发育分化及功能调控过程中的作用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2069-2078.
- Li S, Fang M, Lu J. The role of microRNA in the developmental and functional regulation of NK cells. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2069-2078 (in Chinese).
- [16] 李梦如, 刘恩, 张文芊, 等. 生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2377-2388.
- Li MR, Liu E, Zhang WY, et al. Biosynthesis of *Salmonella enteritidis* O antigen-based glycoproteins. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2377-2388 (in Chinese).
- [17] 吴梦婷, 王海涛, 张森, 等. 利用植物质体转基因技术高效表达抗人源白介素 6 单链抗体. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2269-2280.
- Wu MT, Wang HT, Zhang M, et al. High-level expression of anti-interleukin-6 single chain variable fragment through plastid transformation technology. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2269-2280 (in Chinese).
- [18] 刘妮娜, 崔甜琦, 高翔, 等. 嗜盐微生物在生物医药领域的应用研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2153-2168.
- Liu NN, Cui TQ, Gao X, et al. Advances in the biomedical application research of halophilic microorganisms. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2153-2168 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)