

## 作者简介:

丘小庆, 1954年12月出生, 汉族, 江西寻邬人, 教授, 现任四川大学华西临床医学院生物膜与膜蛋白实验室主任, 四川大学暨中国协和医科大学博士生导师。1982年获中国协和医科大学医学硕士学位(内科, 临床免疫)。1991年获美国Emory大学医学院哲学博士学位(神经生理)。1991-96年在美国Albert Einstein 医学院就读博士后(膜生物物理)。1996年应聘到原华西医科大学、现四川大学华西医院工作至今, 1997年获得国家杰出青年科学基金。

历任北京心血管医疗研究中心内科住院医师、实习研究员, 1997.8-1998.1受邀任美国国立卫生研究院细胞及分子生物物理实验室高级访问科学家。现任中国神经科学学会理事, 《Neuroscience Bulletin》编委。

研究方向与课题: (1) 离子通道蛋白跨膜结构与功能的解析; (2) 改变细菌外毒素靶向功能的生物物理学机制; (3) 应用抗体Fab区中抗原结合区和骨架区构建模拟物的空间设计和机制; (4) 研制与开发抗菌/抗真菌多肽、抗肿瘤/病毒免疫毒素和细胞内给药系统等新型生物来源药物; (5) 探索这些新型生物来源药物的最佳使用和组合形式以形成治疗新方法和策略。

## 代表性论文:

1. Slatin, S, Qiu, XQ, Jakes, KS, & Finkelstein, A. Identification of a translated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature*. 371:158-161 (1994)
2. Qiu, XQ, Jakes, KS, Kienker, P, Finkelstein, A & Slatin, S. Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J. Gen. Physiol.* 107:313-328(1996)
3. Qiu, XQ, et al. An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria, *Nature Biotechnology*, 21(12):1480-85, (2003)
4. Qiu, XQ, et al. A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(3):1184-1189, (2005)
5. Qiu, XQ, et al. Small antibody mimetic comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting, *Nature Biotechnology*, 25(8):921-929, (2007)

## 推荐:

丘小庆在美国《自然·生物》杂志连续发表的两篇文章, 以叙述结果为重点, 连续证明了他为纳米生物机器结构研究带来的一系列惊人应用潜力。本篇文章投稿《前沿科学》, 第一次讲解了有关原理和实验。当前人们普遍关注抗生素药物所遇到的抗药性和副作用等威胁, 基于蛋白质的生物机器应该是一个更绿色、更有效、更具经济效益的革命性实践和发明方向。获悉丘小庆的发明在治疗谷物和畜牧疾病两个方向上已经开始个别实验, 我推荐他的科研和文章, 希望它能启发生物制药行业的发明和灵感。丘的设想和实验需要行业认可和鼓励, 才有可能通过应用得到进一步的检验。希望能赢得生物和植物药物实验的广泛兴趣。如果说在国际上通过基因途径探索战胜疾病的实验和实践已经为医学界带来了新的希望, 以纳米生物机器人人工组合基于蛋白质的导向攻击抗体的应用或许应该也被行业视为一个重要的探索方向。

—罗沛霖

## 摘要：

根据对蛋白质分子结构可塑性和结构重组的理解，本文介绍了如何以来源于不同蛋白质的功能片段和人为设计的多肽片段为部件，组装出一组多结构域融合蛋白。在体外和体内实验中，这些多结构域融合蛋白表现出了我们所期待的特定功能。它们将有可能发展成为一系列新型抗菌和抗肿瘤药物。与现用药物相比，它们的效力更高，靶向性更强，更为安全。它们有可能会很快的代替现用药物，为人类创造更好的福祉。而以这些雏型为基础，则有可能构建出具有更理想功能的蛋白质分子机器。

关键词：线性结构 三维结构 结构域部件 多结构域蛋白质机器

## **Using selected protein fragments to comprise multidomain protein machine, a preliminary exploration**

Xiao-Qing Qiu

(Lab. of Biomembrane & Membrane Protein, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. of China)

Abstract: With understanding about the plasticity and recombination of protein structures, a few multidomain fusion proteins have been comprised with functional fragments of different proteins and artificial derivative peptides. In *in vitro* and *in vivo* experiments, fused proteins behaved demanding functions as we expected. They could be developed as a series of innovative antibiotic and anti-tumor drugs. By comparison with current drugs, they may have higher efficiency, better targeting ability and more safety as more ideal therapeutic agents. Also Based upon these prototypes, it is available to construct molecular protein machine with more ideal functions.

Key words: linear structure three-dimensional structure domain parts multidomain protein machine

# 应用天然蛋白质片段构建蛋白质分子机器的初步尝试

丘小庆

四川大学华西医院生物膜及膜蛋白实验室, 成都 610041

## 1 如何装配蛋白质分子机器

大自然具有种类繁多的蛋白质。遗憾的是, 这些蛋白质往往不仅具有我们欲加以应用的某些生物活性, 同时也具有我们不需要的、甚至是“有害”的其它生物活性。这就需要对蛋白质进行加工和改造, 使之成为满足人类需要的纳米级分子机器。这是人类征服自然的整个宏伟蓝图中最富有想象力和创造力的一部分。无怪乎Albright等早在2000年度Cell/Neuron千禧年合刊的综述中就提出了明确的号召: “利用不同蛋白质的结构域来构建人工多结构域蛋白质机器(Engineered multi-domain protein machine)以满足人类需要, 是21世纪分子生物学研究中最激动人心的挑战之一”<sup>1)</sup>。

人们一直期望能够自由的设计新的蛋白质分子, 以现有技术角度看来, 最快捷的方法应该是通过计算机来设计某种具有特定活性的蛋白质; 然而, 就人类现有的知识水准而言, 暂时还达不到这样的技术水准: 因为目前我们还不能可靠地从化学序列中预测出蛋白质结构, 或者从给出的蛋白质结构中预测出其生物活性。这样的知识水准就限定了我们暂时只能依靠天然蛋白质作为先导物来设计和构建“人工多结构域蛋白质机器”。

由一个折叠成特定结构的线性氨基酸链构成的蛋白质是用途最广泛的天然生物分子。典型的可溶性蛋白质含有大约200—700个氨基酸, 而12个氨基酸左右的肽就足以成为细胞信号传导的激素。

这些具有特定生物活性的蛋白质的结构十分有趣: 如同原子是由若干种基本粒子组成的一样, 蛋白质分子也是由线性连接的一段、一段的数个至数十个氨基酸组成的片段(称为结构域)组成。这些片段既是整个蛋白质肽链的一个结构组成部分, 本身又在整个蛋白质分子中行使着特定的生物活性。更有趣的是: 人们早就发现这些片段的大部分即使离开了母体蛋白的环境, 仍旧能够行使这样的生物活性。更令人惊讶的是: 如果把这些来自于不同母体蛋白的片段有机的组合在一起, 从结构上来看, 它们就构成了一个全新的蛋白质, 而从功能上来看, 在综合这些片段的功能之后, 它们竟然可以表现出自然界所没有的生物学活性。

让我们简单复习一下经典的热发动机定义: 把加工好的部件循热力学原理装配起来的一种机器。它利用氧气燃烧碳氢化合物, 将燃烧所产生的一部分焓转化成为我们所需要的机械功。同理, 将来自于不同母体蛋白的片段有机的组合在一起, 不也组成了这样的一种机器吗? 与经典的热机相比, 它是用氨基酸残基而不是用金属部件装配而成, 它的尺寸在纳米级别, 它应用原子和分子间的一些相互作用力而不是燃烧来作功, 可是它的转换效率比热机恐怕要高出一至两个数量级。

只要具备足够的想象力, 那么“人工多结构域蛋白质机器”的制造对任何人几乎都是唾手可得的。目前的生物技术方法不仅仅是对结构和功能的修饰, 它还是一种强大的力量, 能够对自然界存在的大量蛋白质进行改造。通过引入一些特定的变化来修饰一些特定的蛋白质, 就可形成一个综合多种功能的蛋白质分子。目前最常用的方法是用DNA重组技术将表达不同多肽或蛋白质结构域的基因组合起来, 形成一个携带所有基因功能的融合蛋白。只要在折叠形成活性结

构的过程中, 这个融合蛋白内的各个功能结构域不相互阻碍, 该蛋白就有可能表现出我们在设计时希望它具有的生物功能。

## 2 装配具有靶向识别功能的简单蛋白质机器

为了实现建造“多结构域蛋白质分子机器”的梦想, 我们所作的第一个尝试, 是构建由两种蛋白质片段组合而成的一个融合蛋白。通过对该融合蛋白的分子结构进行控制, 让这个融合蛋白产生出我们所期待的、能够选择性攻击某一种细胞的靶向攻击能力。

自上世纪90年代起, 人们对一些具有典型可溶性蛋白质分子量(20—70 kDa)的细菌毒素, 如炭疽杆菌毒素、白喉杆菌毒素、绿脓杆菌毒素和大肠菌素等的结构和功能进行了更深入的了解: 这些毒素的工作结构多是单体(monomer)或简单的多聚体(如炭疽杆菌保护性抗原的工作结构是七聚体), 构像单一, 工作效价稳定(强过现有抗菌素数百乃至数千倍), 这些毒素多数由两个组分构成: 一个组分负责与目标细胞结合, 另一个组分负责杀死细胞。如果这两个组分均位于一个蛋白质上, 就是所谓的一元毒素。如果两个组分分别位于不同的两个蛋白质上, 就是二元毒素, 单独给予任一元都没有毒性, 必须同时给予二元才会致病。我们首先选择了一种一元毒素作为第一个基本工作平台, 将数种不同种属来源、不同结构、不同生物学功能的多肽分别融合入这个平台中, 尝试制备具有“设定靶向性”的“多结构域蛋白质机器”。

E1族大肠菌素是大肠杆菌分泌出来去主动杀伤其他株大肠杆菌的一类经典细菌素。自1952年Jacobs发现E1族大肠菌素以来, 其研究已从单纯的微生物学扩展到分子生物学和生物物理学领域<sup>2-3</sup>。现有的抗菌物质大都来源于霉菌和放线菌。它们均以干扰、破坏细菌代谢等生化方式来抗菌, 从而容易诱发细菌产生耐药性。而以E1族大肠菌素为代表的一类细菌素, 却采用了始终没有被残酷的进化竞争所淘汰掉(换言之, 没有诱发“耐药性”)的物理杀菌方式——在细菌胞膜上造成几何缺损(形成泄漏性通道)来达到杀菌的目的。只可惜由于E1族大肠菌素只能识别同种异株的大肠杆菌, 不去攻击其它种细菌, 人类一直未能将其发展成为一种新型抗菌物质。

虽然未能开发成为一种抗菌物质, E1族大肠菌素却成为了跨膜蛋白的标准模式被应用在基础研究中, 自1978年Finkelstein等发现E1族大肠菌素可以在人工脂质膜上形成电压依赖性离子通道之后<sup>4</sup>, 人们才认识到相当一部分细菌毒素的工作机制原来就是在宿主细胞膜上形成离子通道来杀伤它们。1986年Mankovich & Konisky等完成了对两种E1族大肠菌素, 大肠菌素Ia 和 Ib的DNA和氨基酸序列测定<sup>5</sup>; 1989年Parker & Tsemoglou等完成了对大肠菌素A三维结构的初步确定<sup>6</sup>; 1996年Qiu & Finkelstein等完成了大肠菌素Ia实时跨膜结构的测定<sup>7</sup>; 1997年Weiner & Stroud等完成了大肠菌素Ia三维结构的精确确定<sup>8</sup>。

大肠菌素Ia由三个各含有上百个残基的结构域组成(共626个氨基酸残基), 靠近氨基端的头两个结构域是它的识别部分, 必待该识别部分与靶细菌的特异受体结合之后, 羧基端的通道结构域(175个氨基酸残基)才能插入靶细菌内膜形成致死性离子通道, 离子通道形成之后, 只需十分钟左右的时间就可使细菌内容物大量泄漏, 跨膜钠—钾转运泵能量耗竭, 造成细菌死亡。在微生物领域是这样形容大肠菌素强大杀伤功能的: “One molecule, one kill.” (一个分子杀死一个细胞)。

大肠杆菌是人类及哺乳动物肠道中最普通的共生居民, 大肠杆菌的绝大多数种系对人类无害, 每天有成万亿的大肠杆菌经粪便排出体外<sup>9</sup>。E1族大肠菌素是人类共生菌所产生的外毒素, 其生物功能是杀伤同种异株的大肠杆菌, 却不伤害大肠杆菌的宿主——人类及哺乳动物。在漫长的生物进化中, 在每一个宿主个体的一生里, 肠道中的E1族大肠菌素总会有许多机会(如肠道

感染、出血、痔疮、肠道粘膜吸收/通透功能变化等)与宿主免疫系统相遭遇。久而久之,宿主免疫系统很可能对E1族大肠菌素产生了一定程度的“免疫适应(immuo-adaptation)”。Finkelstein实验室在对E1族大肠菌素三十余年的研究中发现其免疫原性很低,尤其羧基端的通道结构域几乎没有抗原性。据此推理,用E1族大肠菌素为原型装配出来的蛋白质机器对人类的毒性应该也很低。这是我们选择E1族大肠菌素作为“多结构域蛋白质机器”第一个基本工作平台的又一个重要理由。

虽然作为细菌素代表的E1族大肠菌素有如此“优秀”的生物活性,同时却具有一个“致命”的缺陷:“作用范围狭窄,仅对与产生菌有亲缘关系的细菌有杀伤作用。因此在治疗上的应用价值已不被重视(这是现用高等医药院校教科书给出的定义)<sup>10</sup>”。这恰如我们在本文一开头所概括的那样:E1族大肠菌素既具有我们欲加以应用的生物活性(强抗菌能力和低免疫原性),又具有我们不需要的“有害”生物活性(作用范围过窄,无法用于杀伤我们想“消灭”的致病菌)。如果我们能够改变E1族大肠菌素的靶向性,让它去攻击我们想“消灭”的致病菌,这不就可以制备第一种具有“设定靶向性”的“多结构域蛋白质机器”吗?不就提供了验证我们构思的第一个事实依据了吗?

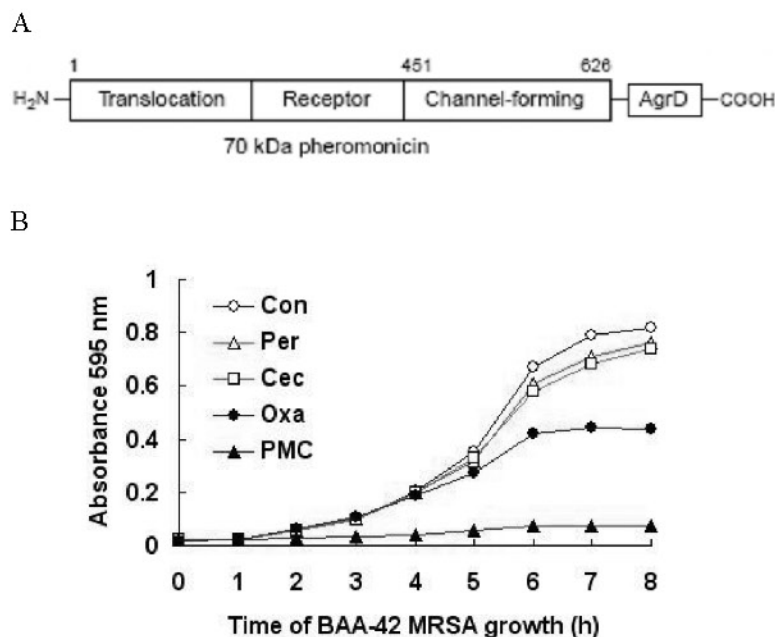


图1 A.构建的抗金葡萄菌多肽结构示意图。野生型大肠菌素Ia由626个氨基酸残基组成, Translocation和Receptor结构域是大肠菌素Ia的信号识别部分, Channel-forming结构域是大肠菌素Ia插入靶细菌胞膜形成离子通道的部分。AgrD是连结在大肠菌素Ia羧基端的金葡萄菌信息素。B. 耐甲氧西林金葡萄菌(MRSA, ATCC BAA-42 标准株)加入到10 ml液体培养基中(共五组),再分别加入(1)对照缓冲液,(2)5  $\mu$ g 穿孔素(Per, Perforin, NCBI CAA01811, 18肽),(3)5  $\mu$ g Cecropin(Cec, NCBI 1F0F\_A, 17肽),(4)5  $\mu$ g 苯唑西林(OXA),(5)5  $\mu$ g抗金葡萄菌多肽(PMC)后振荡培养,以光密度吸收值显示菌生长浊度,结果示抗金葡萄菌多肽抑制了MRSA生长,苯唑西林抑制了约50% MRSA的生长,穿孔素和Cecropin未能抑制MRSA的生长。以微克分子浓度计量,所试穿孔素和Cecropin的浓度比抗金葡萄菌多肽约大30倍,苯唑西林的浓度比抗金葡萄菌多肽约大125倍。

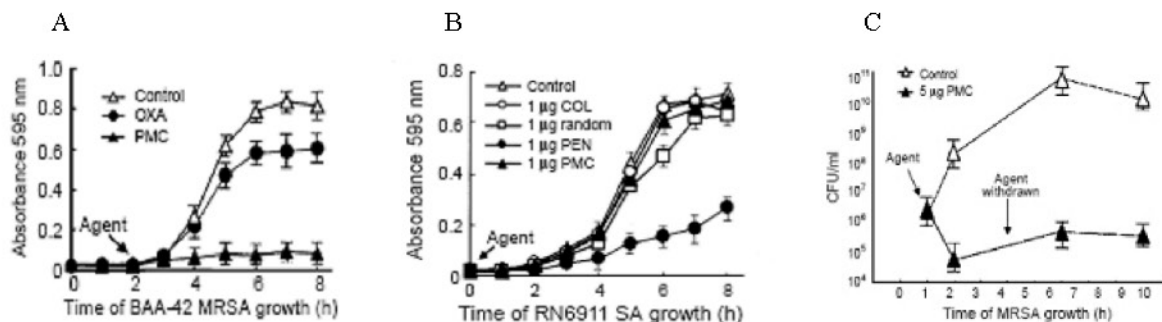


图2 A 耐甲氧西林金葡萄菌 (MRSA, ATCC BAA-42 标准株) 在10 ml液体培养基中振荡培养2小时后, 分别加入对照缓冲液, 5 µg 苯唑西林 (OXA) 和5 µg抗金葡萄菌多肽 (PMC) 后继续振荡培养, 以光密度吸收值显示菌生长浊度, 结果示抗金葡萄菌多肽抑制了MRSA生长, 而苯唑西林未能抑制MRSA生长。B. 实验方法同A, 但菌株换成被敲除了金葡萄菌信息素胞膜受体基因的RN6911(得自NYU Dr. R. Novick实验室), 1 µg 青霉素 (PEN) 可抑制菌生长, 而1 µg抗金葡萄菌多肽 (PMC) 却和野生型大肠菌素Ia (COL) 及对照蛋白 (random) 一样, 未能抑制菌生长; 这提示抗金葡萄菌多肽的抗金葡萄菌效应有赖于金葡萄菌信息素和相应的靶细菌胞膜受体的存在。C. 固体培养基菌落计数结果证实5 µg抗金葡萄菌多肽 (PMC) 对MRSA (ATCC BAA-42 标准株) 有强大的杀菌效力。

首先, 我们选择了金黄色葡萄球菌的信息素 (AgrD)1作为第一个“改变”大肠菌素靶向性的诱导物<sup>11</sup>, 将这个八肽连接到大肠菌素Ia的羧基端上, 构成的融合蛋白(请见图1-2)表现出了单独的金葡萄菌信息素和大肠菌素Ia都不具有的生物活性: 杀灭了现有抗菌素难以对付的、当今医学界谈之色变的耐苯唑西林金葡萄菌<sup>12</sup>。为了验证该结果并非一例偶发事件, 我们又分别利用肠球菌信息素cCF<sub>10</sub>和肺炎链球菌信息素CSP与大肠菌素Ia构建了另外两种抗菌多肽, 它们分别对耐万古霉素肠球菌(请见图3-4) 和耐青霉素肺炎链球菌表现出了强大的杀菌效力<sup>13-14</sup>。有趣的是, 这三种抗菌多肽均只能对抗产生相应信息素的那一种致病菌, 对另两种菌却无杀伤作用。

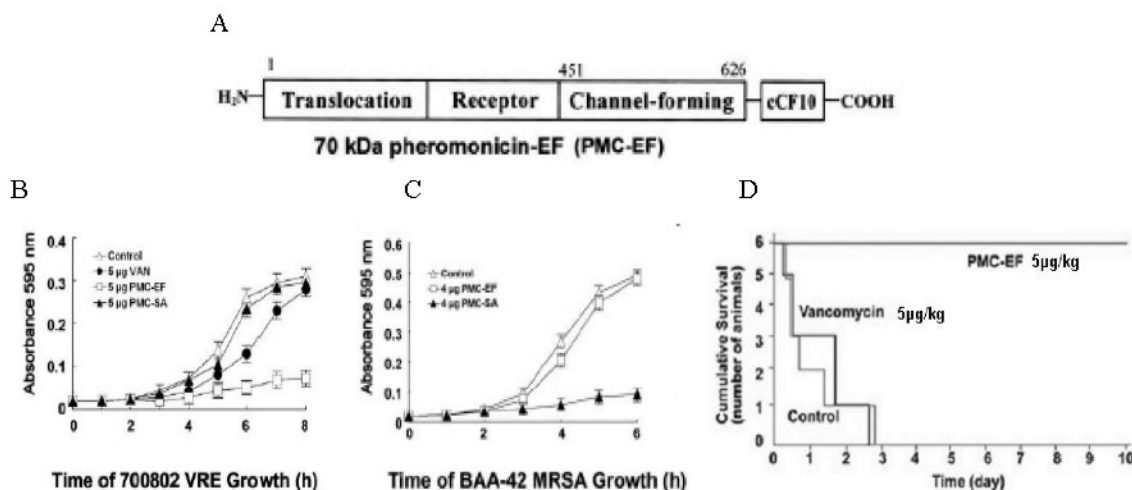


图3. A构建的抗肠球菌多肽结构示意图,CCF10是连结在大肠菌素Ia羧基端的肠球菌信息素。B 耐万古霉素肠球菌 (ATCC 700802标准株) 与对照缓冲液、5 µg 万古霉素 (VAN)、5 µg 抗金葡萄菌多肽 (PMC-SA) 和5 µg 分子量抗肠球菌多肽 (PMC-EF) 分别加入10 ml液体培养基中振荡培养, 结果示抗肠球菌多肽抑制了耐万古霉素肠球菌生长, 而万古霉素和抗金葡萄菌多肽未能抑制肠球菌生长。C. 实验方法同B, 但菌株换成耐甲氧西林金葡萄菌 (ATCC

BAA-42 标准株), 抗金葡菌多肽抑制了MRSA生长, 而抗肠球菌多肽未能抑制其生长。D 抗肠球菌多肽对腹腔肠球菌感染小鼠保护作用的体内生存曲线, 相对静脉给药的万古霉素 (几乎无拯救效应), 静脉给药的抗肠球菌多肽表现出了最好的拯救效应。以微克分子浓度计量, 所试万古霉素的浓度比抗肠球菌多肽约大70倍。

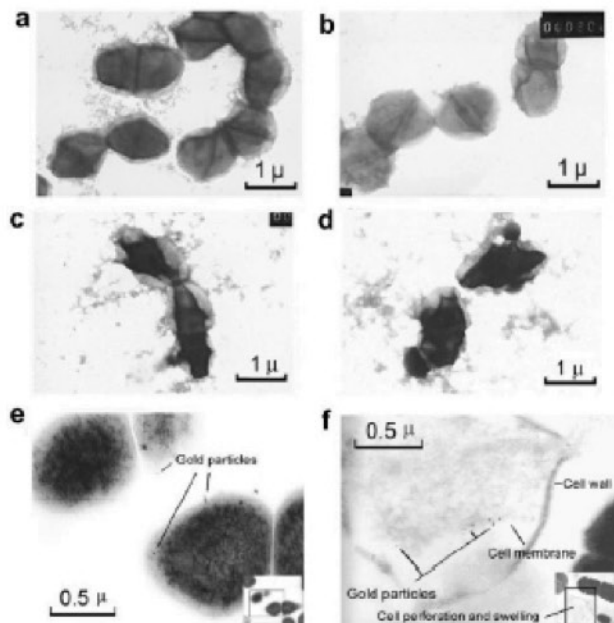


图4 a. 电泳负染的耐万古霉素肠球菌 (ATCC 700802标准株)。b  $5\mu\text{g/ml}$  万古霉素处理2小时后的耐万古霉素肠球菌, 菌的形态与对照相比较变化不大, 但菌染色变浅。c和d.  $5\mu\text{g/ml}$  抗肠球菌多肽处理2小时后的耐万古霉素肠球菌, 与对照相比较菌的形态变化较大: 菌体皱缩, 由椭圆形变未不规则梭状, 染色变深; 这提示抗肠球菌多肽对肠球菌的抗菌机制与万古霉素的抗菌机制不同。e和f. 电镜切片,  $5\mu\text{g/ml}$  抗肠球菌多肽处理耐万古霉素肠球菌后再用抗多肽的二抗 (标有5nm胶体金颗粒) 处理, E图中可见抗体—胶体金颗粒位于菌胞膜处, 且菌胞膜结构已多处消失; F图中可见一涨破的肠球菌, 细胞壁已和胞膜分离, 胶体金颗粒大部位于胞膜上, 这提示抗肠球菌多肽的工作位点在靶菌的胞膜上。e和f右下角小图的放大倍率比图e和f更低, 因此可以看到更多的细菌。小图中的方框显示的就是放大的图e和f。

三种抗菌多肽均表现出了我们在设计时所期望的生物活性：

- 1) 改变了大肠菌素Ia的靶向性，能攻击分泌所连接信息素的它种细菌；
- 2) 保留了大肠菌素Ia的杀伤性，抗菌效力是最有效的青霉素—苯唑西林的上千倍、万古霉素的数百倍。
- 3) 大肠菌素Ia是一种在漫长生物进化中“经久耐用”的杀菌方式，制备的抗菌多肽在长达180小时的诱导试验中始终未诱发出细菌的“耐药性”，而作为对照的现用抗菌素却诱发出了增长数十倍的耐药性；
- 4) 大肠菌素Ia由动物肠内长期共生的大肠杆菌所产生，所选信息素也是动物体内长期共生致病菌所产生，构建的抗菌多肽由这两种天然物质构成，在为期数周的细胞和动物毒性试验中，未产生可察觉的免疫原性和毒性；
- 5) 只需一次体内注射即可控制住致死性细菌感染，让动物存活。

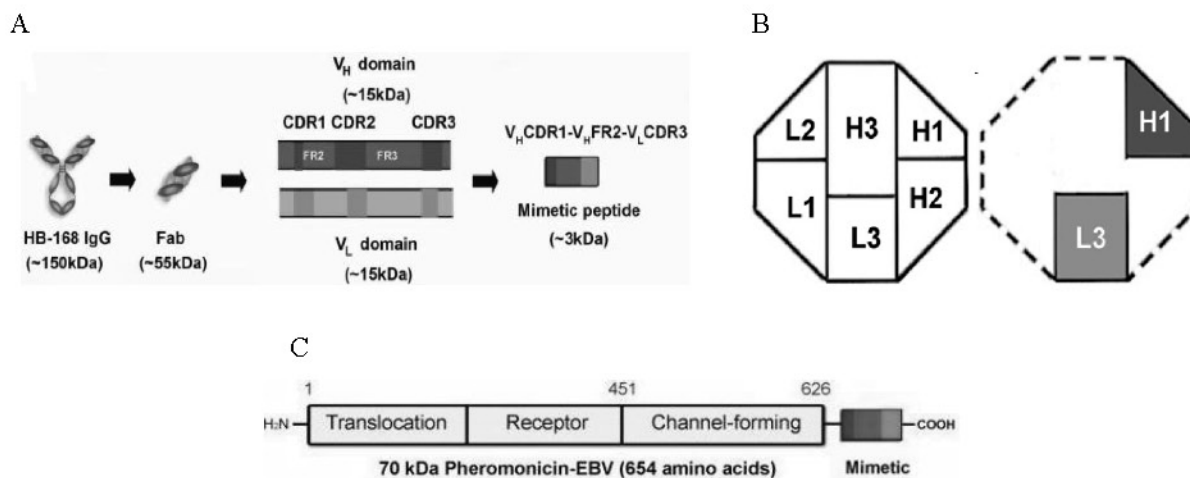
### 3 构建更精巧的识别部件

实现了对原核细胞的攻击之后，我们又开始梦想能否构建出“靶向”攻击真核细胞的“蛋白质机器”。这就需要寻找可以识别真核细胞的有效活性物质。迄今为止，在动植物、微生物中所发现的有效活性物质中能够最有效识别单个分子的物质，依然是抗体。但是天然的抗体是无法利用的：最小的天然抗体都由一千五百余个氨基酸残基组成，对于我们要构建的“蛋白质机器”而言，实在是太庞大了。其实为了避免天然抗体尺寸庞大的弊病，人们早就在设计 and 制备尺寸更小、亲和力更强的抗体变构物，如Fab、单链抗体（scFv）和工程化变构物（多价变构体，单域抗体）。其中一部分已成功投入应用<sup>15</sup>。只可惜这些变构物离我们的使用要求还是有相当的距离：a) 由数百个氨基酸残基组成，太大（如Fab、单链抗体等），b) 用DNA重组技术不大好构建，c) 它们依然不能十分有效的识别正常细胞和肿瘤细胞，d) 它们不能有效的到达实体肿瘤深处。

在未来三十年内，全球药物市场30—40%的药物都将是生物技术药物，而这些生物技术药物的一半都将是抗体衍生物或模拟物，其年销售额度将以数百亿美元计<sup>15</sup>。人类的需求量是如此之大、如此之急迫，可全球研究者们至今仍在为如何构建更“理想”的抗体模拟物大伤脑筋。

抗体就象一个“Y”字母，两个短臂的末端就是它识别和结合抗原的六个抗原结合区所在（请见图5A）。如果取横截剖面来看，它们分别是位于重链的抗原结合区1（H1）、抗原结合区2（H2）、抗原结合区3（H3）和位于轻链的抗原结合区1（L1）、抗原结合区2（L2）、抗原结合区3（L3）（请见图5B）。从横截面图上可以发现，H3和L3位于中央，被H1、H2、L1、L2所包围着。而功能研究发现，H3和L3是具体与抗原结合的部分，其余四个结合区（H1、H2、L1、L2）则是诱导、帮助H3和L3去完成与抗原的结合。请注意，天然抗体的功能不仅是识别，还要与抗原结合才能最终完成它的生物学功能。因此它需要六个抗原结合区组成这样一个复杂的空间结构。





**图5** A显示如何从抗体Fab臂的重链和轻链6个抗原结合区中选择两个（V<sub>H</sub>CDR1, V<sub>L</sub>CDR3），再在重链和轻链中选择一个骨架区（V<sub>H</sub>FR2）将这两个抗原结合区线性连接起来，就构成了分子量仅有三千的抗体模拟物。B如果把图A中重、轻链上的六个抗原结合区用横截的二维平面来显示，可见重链结合区3（H3）和轻链结合区3（L3）位于中央，被重链结合区1和2（H1、H2）以及轻链结合区1和2（L1、L2）所包围着（左图）。我们选择了重链结合区1和轻链结合区3来构建抗体模拟物（右图）。C 构建的抗肿瘤多肽结构示意图。Mimetic, 连结在大肠菌素Ia羧基端的抗体模拟物。

六个抗原结合区组成的空间结构对我们就过于繁复了。因为我们只需要可以诱导融合的一个蛋白质片段去完成“靶向攻击”的一个简单结构就足够了。那么根据物理学的杠杆原理、几何学两点决定一线的定理，我们可不可以只用两个结合区来组成一个“简单的发夹”以完成与抗原的识别呢？当然，单纯靠两个结合区还不足以构成这样的简单结构，因为它们只够组成“发夹”的两个端点。参照原始抗体的构造，这两个结合区之间还必须有一个连接部分来支撑它们构成“发夹”。基于这样的边界条件，我们顺利成章的利用天然抗体的六个抗原结合区衍生出了四种这样的组合：H1—L3、H2—L3、L1—H3、L2—H3。它们的连接部分或采用重链中连接H1和H2的骨架区2，或采用轻链中连接L1和L2的骨架区2。同时还设计了由重链骨架区2连接的H1—H3和H3—L3作为对照。通过对这些组合进行体外和体内功能测试，我们发现由重链骨架区2连接的H1—L3模拟物所表现出的活性最为理想（请见图5A）。这样的抗体模拟物分子量仅有三千<sup>16</sup>。非常有趣的是，该模拟物的尺寸虽然比IgG（分子量十五万）和IgM（分子量一百万）抗体分子小了五十至三百倍，却保留了比它大上五十至三百倍的原型蛋白质分子的基本生物活性：能够特异地识别某一种抗原<sup>16</sup>。

近来人们逐渐发现大部分肿瘤表面抗原虽然在肿瘤细胞表面上最多，却往往也存在于一些正常细胞的表面。这就给靶向识别造成了相当的困难。为了更好的识别和攻击抗原，世界上科学家们设计的抗体模拟物都是拼命地增强与抗原的亲合力。但这样做所带来的副作用恰恰就是难以区分肿瘤细胞和正常细胞；同时这样的抗体模拟物在实体肿瘤的边缘部分就可能被肿瘤细胞上的抗原消耗光了，因而难以到达肿瘤深处。而我们的设计构思正好与传统的理念反其道而行之：我们就是要通过减数使用抗原结合区（由天然抗体的六个减少到我们构建的模拟物中的两个）来有意识地削弱模拟物对抗原的亲合力：经测试发现它的亲合力只有原始抗体的十分之一到百分之一<sup>16</sup>。被有意识削弱的亲合力就如同电子线路中的滤波器一样，它只能与具有一定阈值数量和强度的抗原亲和，不能与低于该阈值数量和强度的抗原亲和。亲合力被有意识削弱的抗体模拟物在体外/体内试验中表现出了如下特点：1）在免疫力正常的动物荷瘤模型中只攻

击所荷肿瘤，而不攻击正常机体；2)。能够深入到实体肿瘤的核心部位<sup>16</sup>。

以上述抗体模拟物、大肠菌素Ia和炭疽保护性抗原为蓝本，我们构建出了一系列新型抗肿瘤和抗淋巴细胞的融合蛋白(请见图5C)。在鼠/大鼠荷瘤模型中有效地杀灭了恶性淋巴瘤、肺癌、卵巢癌等危害人类的恶性肿瘤(请见图6)<sup>16</sup>。在细胞模型中成功的完成了对转染HBV、HCV全基因人肝癌细胞、T淋巴白血病细胞、B淋巴白血病细胞、感染EB病毒的鼻咽癌和淋巴肉瘤细胞的靶向性攻击。

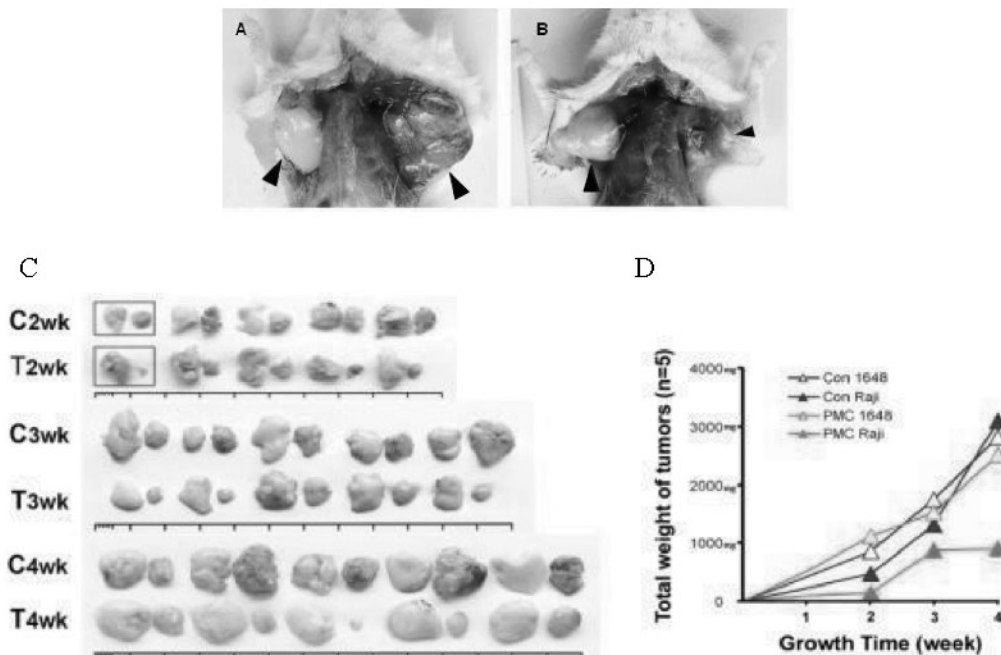


图6. SCID鼠两腋下均接种了非洲儿童恶性淋巴瘤,左侧肉瘤细胞表面无抗肿瘤多肽所针对的抗原,右侧肉瘤细胞表面有抗原。A. 显示的是对照鼠接种30日后两侧肿瘤的大小(箭头所指)。B. 接种肿瘤一周后,腹腔注射抗肿瘤多肽三周,左侧无抗原肉瘤大小如对照组,右侧有抗原肉瘤大小只有对照组的十分之一左右。

C.方框内为一只鼠的两个肉瘤,左无抗原,右有抗原。C2wk, 两周对照鼠,共5只, T2wk, 两周治疗鼠,共5只, C3wk, 三周对照鼠,共5只, T3wk, 三周治疗鼠,共5只, C4wk, 四周对照鼠,共5只, T4wk, 四周治疗鼠,共5只。D. C图中每组5只鼠的肿瘤总重量,Con 1648, 对照组无抗原肉瘤总重,Con Raji, 对照组有抗原肉瘤总重, PMC 1648, 抗肿瘤多肽处理组无抗原肉瘤总重, PMC Raji, 抗肿瘤多肽处理组有抗原肉瘤总重。这些结果显示,在抗体模拟物的引导下,经血循环进入肿瘤的抗肿瘤多肽在实验动物体内选择性的攻击了我们指令攻击的肿瘤,而没有攻击位于同一个动物体内,没有携带识别物的同源肿瘤。

这里特别要指出的是: 1) 以抗CD8 和抗CD23抗体模拟物和大肠菌素Ia为先导物构建的两种免疫毒素分别攻击了T淋巴白血病细胞(T淋巴细胞来源)和非洲儿童恶性淋巴瘤细胞(B淋巴细胞来源)<sup>16</sup>。这意味着只要选择正确的抗体模拟物,我们可以分别攻击如下种系相近的目标细胞:T淋巴细胞和B淋巴细胞、它们的亚群、其它血细胞;这还意味着(a)我们构建的免疫毒素可以在具有正常免疫功能的动物体内工作,(b)只要抗体模拟物设计得巧妙,构建的

免疫毒素甚至可以攻击跨种系的目标细胞。

### 4 展望

经过为期十年的研究，我们以数种细菌信息素、抗体模拟物、大肠菌素和炭疽毒素等为模本，构建了数种融合蛋白（抗菌多肽和免疫毒素，请见图7，图中仅显示了部分制备物）。它们均特异的攻击了我们选定的靶细菌或靶细胞，其杀伤效力远远高于现有抗菌素和免疫毒素，而毒副作用却远低于现有抗菌素和免疫毒素。它们将有可能发展成为一系列新型抗菌和抗肿瘤药物。与现用药物相比，它们的效力更高，靶向性更强，更为安全。随着生物技术水准的迅速进步，这样的生物技术药物可能会很快的代替现用药物，为人类创造更好的福祉。可是这些构建出来的融合蛋白还远远未能表达出我们所企求的结构和功能水准——人工多结构域蛋白质机器所应该具有的理想境界，充其量它们只能算做是蛋白质分子机器的一个雏型。那么，什么才是理想的人工多结构域蛋白质机器呢？我们的理解是，必是具有来源于三个以上不同蛋白质的结构域所组成，表达了这几个结构域在母体蛋白里所具有的功能之融合蛋白，才有资格被命名为“人工多结构域蛋白质机器”。因此我们必须继续努力，才能最后构建出理想的“人工多结构域蛋白质机器”。

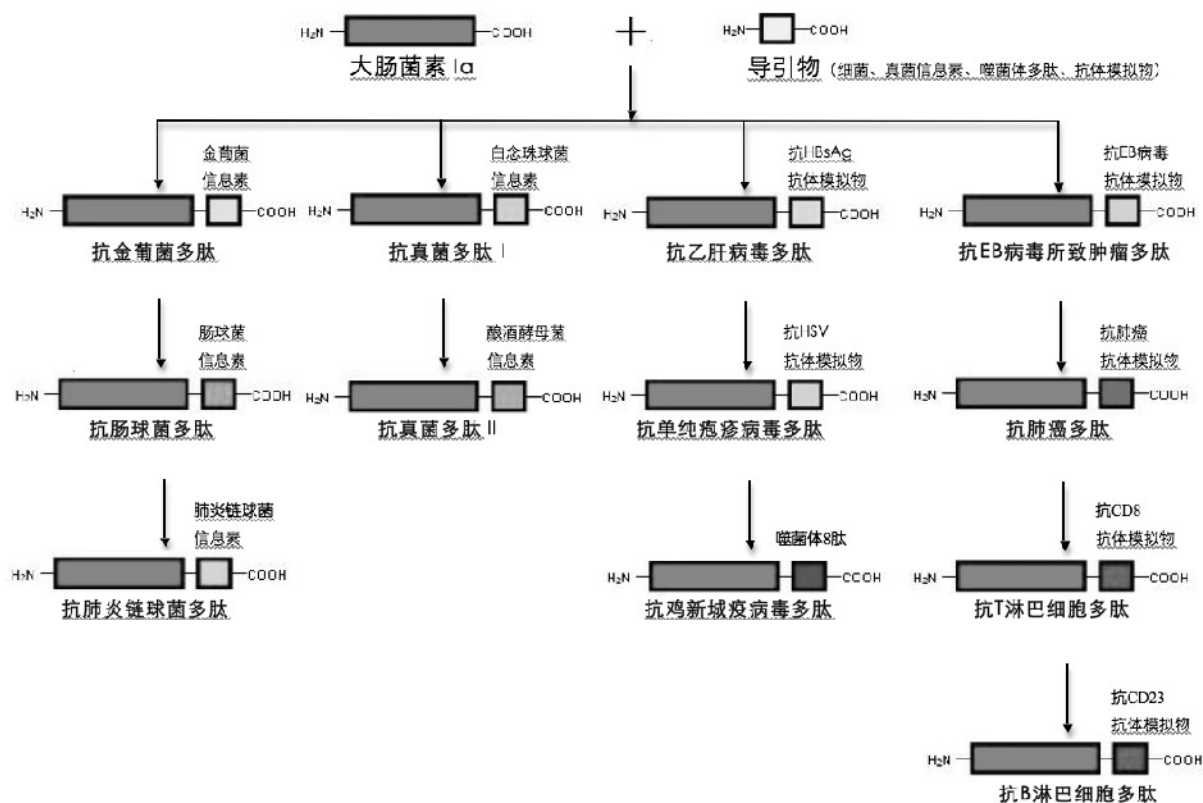


图7

## 参考文献:

- 1 Albright et al. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. Cell, 100, Neuron, 25, S1-S55 (2000)
- 2 Jacob, F, Siminovitch, L & Wollman, E. Sur la biosynthese d'une colicine et son mode d'action. Ann. Pasteur Inst. 83:295-315 (1952)
- 3 Kienker, PK, Karen, SJ & Finkelstein, A. Protein translocation across planar bilayers by the colicin Ia channel-forming domain. J Gen. Physiol. 116:587-97 (2000)
- 4 Schein, SJ, Kagan, BL & Finkelstein, A. Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. Nature, 417:746-750 (1978)
- 5 Mankovich, JL, Hsu, CH & Konisky, J. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of Colicin Ia and Ib. J Bacteriol. 168:228-236 (1986)
- 6 Parker, MW, Pattus, F, Tucker, AD & Tsernoglou, D. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. Nature. 337:93-96 (1989)
- 7 Qiu, XQ et al. Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. J Gen Physiol 107:313-328 (1996)
- 8 Weiner, MD et al. Crystal structure of colicin Ia. Nature. 385:461-464 (1997)
- 9 Postgate, Microbes and man, 2000, Cambridge University Press, 中译本57页, 中国青年出版社, 2007
- 10 陆德源主编, 医学微生物学第五版, 36页, 2001, 人民卫生出版社
- 11 Ji, G, Beavis, RC & Novick, RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. PNAS. 92:12055-12059 (1995)
- 12 Qiu, XQ, et al. An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria, Nature Biotechnology, 21(12):1480-85 (2003)
- 13 Qiu, XQ, et al. A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(3):1184-1189, (2005)
- 14 秦燕, 张杰, 孙亮, 戴萍, 丘小庆. 抗肺炎链球菌工程多肽体内外抗菌活性研究. 四川大学学报(医学版). 38(1):109-112 (2007)
- 15 Hoolinger, P & Hudson, P. Engineering antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology, 23:1126-1136 (2005)
- 16 Qiu, XQ, et al. Small antibody mimetic comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. Nature Biotechnology, 25(8):921-929, (2007)