

新型基因重组白细胞介素-2 的研究开发

刘 堰¹ 欧阳克清¹ 胡应和² 蔡绍哲¹ 李新平¹

(1 重庆大学生物工程学院 重庆 400044) (2 美国 Hugene 公司, San Diego CA 92130)

摘要 本文根据 IL-2 基因定点突变研究所提供的有关 IL-2 结构和功能重要信息,特别是某些关键氨基酸残基的改变对 IL-2 生物活性影响,探讨了 IL-2 和 IL-2 受体相互作用关系、新型 IL-2 的研制方法和变异 IL-2 作用机制,并提出设计新型天然 IL-2 单位点到多位点突变的策略,从而指导研制更有效或毒副作用降低的新型 IL-2 类似物。

关键词 白细胞介素-2(IL-2) 定点突变 白细胞介素-2 类似物

重组蛋白药物在治疗癌症等方面有广阔的应用前景,它可提高机体免疫功能产生抗癌作用。重组蛋白药物中有一大类是重组细胞因子,可调节免疫细胞的增殖和分化,增强组织杀伤癌细胞的能力。迄今,已有近 10 个重组细胞因子被应用于癌症的治疗,包括 IFN、IL-2、GM-CSF、G-CSF、EPO 等。几乎所有治癌的重组蛋白药物都是天然蛋白。虽然这些蛋白在进化过程中已经具有极强的生理和药用功能,但近 100 年来,工业革命极大地改变了人类的生活习惯和生活环境,污染、吸烟、饮食习惯和肥胖是引起各种癌症的主要因素,这些天然蛋白要通过自己进化来对付这一切是不可能的。与此同时,由于生命科学的进展,尤其是分子生物学的发展使人们对包括癌症在内的许多疾病的发病机制有了更深入的了解,有可能通过改变天然蛋白的结构来增强其预防和治疗某种疾病的特异性和有效性。与此同时,开发现有生物产品的新剂型或新变体,这种途径既能缩短新药研究开发费用,较快进入生产阶段,又能申请专利保护。本文将综述 IL-2 基因突变研究提供的其结构和功能关系的重要信息,提出新型基因重组 IL-2 的研究开发思路。

1 开发新型 IL-2 的必要性

IL-2 最主要的功能是激活和促进 T 细胞的增殖与分化,其次也维持其它细胞的生长和繁殖,如 B 细胞、自然杀伤细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)、单核细胞、巨噬细胞和少突神经胶质细胞。因而 IL-2 在治疗肿瘤、免疫缺陷性疾病、肝炎、麻风等疾病中有重要作用。另外,IL-2 具有重要的中枢调控作用,能够影响神经元和神经胶质细胞的存活和生长,具有中枢镇痛功能^[1,2]。自 1976 年 Morgan

及 Ruscetti^[3]首次发现 IL-2 以来,其在临床上得到了广泛的应用。IL-2 原自血液分离制备,价格贵,无法满足科研和临床应用的需要。1983 年, Taniguchi 等^[4]克隆了人 IL-2 的 cDNA,使 rIL-2 的大量生产和研究开发成为可能。目前,利用重组 DNA 技术,已在大肠杆菌、酵母、猴 COS 细胞和昆虫细胞等中获得表达有生物活性的 rIL-2。1991 年,美国 Cetus 生产的 rIL-2 被 FDA 批准上市。我国于 1994 年,由中国科学院上海生化所等 6 个单位研制成功重组 IL-2,至今有 10 余家投产上市,1997 年上半年卫生部又批准 4 家投产,目前已实现了 IL-2 国产化,年产值已超过 1 亿人民币^[5]。

近年来,虽然基因工程 IL-2 应用于肝炎及某些癌症的治疗已取得令人瞩目的成果,但在一些病人中大剂量,长时间用药可引起副反应,如发热、寒战、恶心、呕吐、腹泻、头晕、不适和低血压。鉴于 rIL-2 特异性差,副作用大,促使人们研究特异性强和杀伤力更大的重组 IL-2。近年来美国科学家构建了以白喉杆菌(DT)外毒素为主体的 IL-2-毒素蛋白,证明它们能在体内外高度特异性地杀伤高表达相应细胞因子受体的肿瘤细胞。1991 年 FDA 迅速批准了 DAB486-IL-2 的 I 期临床研究。随后又批准了 DAB389-IL-2,它比 DAB486-IL-2 短 97 个氨基酸,半寿期更长,药动学更好,杀伤力大于 DAB486-IL-2 的 10 倍之多。用 DAB389-IL-2 治疗 CTCL 已进入 II 期临床。同时也在进行 DAB389-IL-2 治疗严重斑块型牛皮癣和爱滋病的 III 期临床研究,取得了十分鼓舞人心的结果。另外,科技工作者也希望通过定向改造 IL-2 的分子结构,使其成为具有高活性、低毒的超级 IL-2 或具免疫抑制功能的拮抗剂或部分拮抗剂,后者用于治疗白血病、自身免疫疾病和抗移植

物免疫排斥反应中阻断 IL-2 活性。为此国内外科学家们从 IL-2 的结构-功能出发,通过揭示 IL-2 结构亚区某些甚至单个氨基酸的功能,采用蛋白质工程技术,根据需要设计 IL-2 的单位点到多位点突变,从而产生 IL-2 的新型类似物^[6,7]。

2 IL-2、IL-2R相互作用关系与新型 IL-2 开发

人 IL-2 的原初翻译产物为 155 个氨基酸残基的多肽,经翻译后修饰,切除前 20 个氨基酸残基的信号肽。另一个翻译后修饰是 58 位和 105 位的 2 个半胱氨酸残基形成二硫键,最终才形成成熟的含 133 个氨基酸残基,并有生物活性的 IL-2。人 IL-2 以单体存在,二级结构有 4 个反平行螺旋^[8]。IL-2 基因位于染色体 4q26 - 28,长度为 3,662bp,有 3 个内含子和 4 个外显子。外显子 1 编码 5 非翻译区、20 个信号肽和前 29 个氨基酸;外显子 2、3 分别编码 20 和 48 个氨基酸,外显子 4 编码最后 36 个氨基酸和 3 非翻译区。人 IL-2mRNA 为 963bp,其 3 非编码区也有与 mRNA 降解有关的 Poly(A)尾。

IL-2 对 T 细胞等的激活作用是靠与细胞表面的 IL-2 受体(IL-2R)结合来实现的。现已发现,IL-2 受体是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的异多聚体糖蛋白。IL-2 及其 IL-2R 不同亚基的结合关系对指导新型 IL-2 的研制有重要意义。IL-2R 的三个亚基可形成具高亲和力的功能复合物 IL-2R_h ($K_d = 10 - 11\text{mol/L}$),虽然 IL-2R_h 和 IL-2R_h 也可形成高亲和力受体复合物,但无生物学功能也不能被 IL-2 活化,而 IL-2R_h 和 IL-2R_h 可形成中等亲和力的受体复合物 IL-2R_m ($K_d = 10 - 9\text{mol/L}$),受 IL-2 激活后有生物学活性^[9]。IL-2R_m 亚基是低亲和力受体形式 ($K_d = 10 - 8\text{mol/L}$),它与 IL-2 的结合无法传导细胞内增殖信号。由于在不同细胞或不同发育阶段的同种细胞以及疾病的不同状态下,IL-2 受体亚基可以表达不同,从而形成不同的受体复合物如 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 和 $\beta\gamma$ 。所以,有针对性地设计和生产特异的 IL-2 变异蛋白(muteins),使其结合不同淋巴细胞上特异受体复合物,并活化相应细胞类型。这样既可达到增强药效,同时降低药物的副作用。例如,LAKE 细胞前体表达高水平的 IL-2R_h 复合物,受 IL-2 活化后可攻击和裂解癌细胞;巨噬细胞也表达 $\alpha\beta$ 复合物也可被 IL-2 激活;单核细胞表达大量 α 和小量 β ,而 NK 细胞表达大量 α 和小量 β ,它们分别形成中等亲和力的 $\alpha\beta$ 受体,与高浓度 IL-2 结合形成三聚体后激活单核细胞或 NK 细胞;活化的 T 细胞表面表达 α 、 β 和 γ 链,过量的 γ 有

利于和 β 链先聚合,与 IL-2 结合后再结合 α 链形成高亲和力受体-IL-2 复合物,进而传递信号,引起细胞增殖反应。细胞反应后, α 、 β 和 γ 解离,细胞对 IL-2 不再敏感;人肿瘤细胞也有 IL-2 受体表达,IL-2 与肿瘤细胞上的受体复合物结合后可抑制肿瘤细胞的增殖,由于不同的癌细胞表达各自特殊的 IL-2 受体复合物,故相应的 IL-2 受体促效剂可只攻击癌细胞,减少对正常细胞的损害。

3 新型 IL-2 的研制方法

IL-2 结构-功能关系的研究 阐明其一级结构对空间结构和活性的影响,是了解 IL-2 的分子机制及研制新型 IL-2 的基础。虽然 IL-2 在 3.0Å 时的 X-射线晶体结构揭示了其三维分子结构^[10],但由于晶体结构的分辨力不高,且又无 IL-2 与其受体结合的晶体结构作研究材料,所以用传统方法很难研究 IL-2 的结构与功能关系(SAR)。通过蛋白质工程技术,可改变 IL-2 氨基酸残基,以研究 IL-2 分子中某些残基对其生物活性及与受体亚基结合关系的影响,筛选、鉴定 IL-2 分子结构或功能中起重要作用的关键残基。IL-2 的诱变工作不仅提供了更多有关蛋白质结构与功能的重要信息,而且还有助于新型 IL-2 的设计和研制。通常,变异 IL-2 的研制有两种方法:

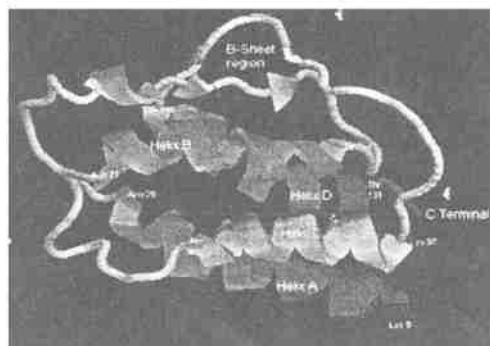


图 1 IL-2 立体结构图

3.1 寡核苷酸介导的定位突变(U-DNA 定点突变法)

即利用已设计并合成好的寡核苷酸与靶 DNA 杂交,在克隆 cDNA 的预定位点导入突变,然后在适当的宿主细胞——载体系统中表达业已改变的基因。通过比较突变体蛋白与野生型蛋白的性质,鉴定出对蛋白质结构完整性和生物功能至关重要的结构域或个别氨基酸残基。U-DNA 定点突变存在操作复杂,筛选困难,工作周期长的缺点,属于早期的诱发方法。国内研究者发现:由天然 IL-2 中 125 位

cys 点突变为 ala 或 ser 得到的 Ala¹²⁵ IL-2 和 Ser¹²⁵ IL-2 具有不会形成二聚体,比活性高,热稳定性好,体内半衰期延长等优点。目前,两种新型 IL-2 已通过中试,进入临床试验阶段^[7]。

3.2 定点 PCR 突变 (site directed mutations PCR, SDM-PCR)

它是通过引物与模板碱基错配,利用 PCR 技术对基因结构进行改造、修饰、突变的方法。SDM-PCR 技术可用于线型、环型 DNA 模板,为基因的突变提供了快速、有效的方法。线型 PCR 突变有突变效率高的优点,而环型 PCR 突变可直接将 PCR 产物导入宿主细胞,不需将 PCR 扩增产物与载体亚克隆、筛选等繁琐的工作。

4 变异 IL-2 作用机制与新型 IL-2 的开发

IL-2 的变异蛋白按其在生物学中的作用大体分成三种类型:促效剂或部分促效剂 (agonist or partial agonist),即比活高、分子稳定性好和体内半衰期延长的 IL-2 类似物;拮抗剂 (antagonist),即能够与高亲和力 IL-2 受体 (IL-2R) 结合,但仅有很少或无生物活性的类似物;部分拮抗剂 (partial antagonist),即保持有与中等亲和力的 IL-2 受体 (IL-2R) 结合特性,仍有少量生物活性的类似物。研究这些 IL-2 类似物的作用机制,不仅在理论上对于阐明重组细胞因子的结构和功能关系有重要意义,而且在实践中对于进一步开发和研制新型 IL-2 有很大的指导作用。

4.1 突变使局部空间结构破坏

蛋白质空间结构与其生物活性之间存在密切关系,对蛋白质折叠和包装起关键作用的某些氨基酸残基的改变,将引起其空间构象改变,导致蛋白质生物活性及亲和力的变化。众所周知,脯氨酸残基由于没有-NH 和可自由旋转的 γ -碳原子,在蛋白质多肽链中凡是出现脯氨酸或羟脯氨酸的部位很容易产生转角,都不可能形成 α 螺旋结构。如将 IL-2 的 B 螺旋区的 Gln-52、Leu-53 和 Lys-54 分别改为 Pro 后,螺旋程度下降,生物活性也急剧下降^[13],且引入 Pro 越多,螺旋度下降越大,生物活性损失也越严重。另一方面,IL-2 本身的两个脯氨酸残基 (Pro-47 和 Pro-65) 被认为与维持 IL-2 的构象有关,故对于受体的结合以及保持生物活性很重要。1997 年, Lee 报道了用 PCR 诱变得到两种天然 IL-2 的部分拮抗剂^[14],研究证实当 Pro-47 突变为 Asn-47 或 Asp-47 后,两种变异 IL-2 蛋白的生物活性分别下降 50 和

700 倍,与高亲和力受体结合的亲和力分别增加了 180 和 90 倍;而 Gln-47、Gln-65 和 Ala-65 突变,由于空间结构很少改变,因此仍保持其生物活性和高亲和力。推测其原因为:第 47 位 Pro 变为 Asn 或 Asp 的突变因扰乱 IL-2 蛋白核心的疏水微环境,改变了 IL-2 的二级结构和整体空间构象,从而导致以上两种变异蛋白的生物活性降低和亲和性的改变。

4.2 突变使 IL-2 与 IL-2R 不同亚基的结合关系改变

IL-2 分子中不同位点与 IL-2R 不同亚基结合作用的方式是不一样的,表现出有一定次序和规律的结合。IL-2 一般先与 α 亚基迅速结合,再与 β 亚基结合后进一步与 γ 亚基结合诱发增殖信号的传导,随后 α 亚基解离进入再循环。定点突变的研究表明:IL-2 的一些氨基酸残基对于受体亚基的选择是非常重要的。首先,Asp-20 和 Leu-17 对于结合 IL-2R α 亚基起关键作用,研究证实当 Leu-17 突变为 Asp 后,IL-2 生物活性显著下降主要由于突变影响 IL-2 与 α 亚基的结合,却并非空间结构变化所致^[15]。其次,Arg-38、Phe-42 和 Gln-62 是结合 IL-2R β 亚基的关键残基,表现出 42 位、38 位和 62 位的突变蛋白有完全不同的特性^[16,17]。例如,Ala⁴²-IL-2 和 Leu⁶²-IL-2 突变蛋白完全失去了与 IL-2R α 和 IL-2R β 的结合活性,但对于结合 IL-2R γ 没有影响,这种突变蛋白在表达受体复合物的细胞中仍然具有生物学活性。类似的结果也在 Arg-38 突变为 Gln-38 中观察到,其与 IL-2R β 结合的亲和性降低 20 倍,但在表达 IL-2R α 的细胞中仍保持有增殖活性。相反,Arg62-IL-2 丧失了结合 IL-2R α 和 IL-2R β 的能力,故不能刺激 IL-2 依赖性细胞的生长。另外, Gln-126 是 IL-2 与其受体 γ 亚基结合的关键残基^[18]。突变体蛋白 (Asp126-IL-2) 与 IL-2R γ 复合体仍有较高的亲和力,与 IL-2R α 复合体亲和力也表现正常,但与 IL-2R β 的结合能力完全丧失,故生物活性急剧下降,表现为可部分竞争抑制天然 IL-2 与 IL-2R 的结合。以上说明 IL-2 不同氨基酸残基对不同 IL-2 受体亚基的组合的敏感性和选择性是有很大差异,导致变异 IL-2 蛋白表现出不同的生物学功能。

4.3 突变同时使局部空间结构和受体亚基间结合关系改变

在多数情况下,局部空间结构的破坏和不同亚基间结合关系的改变并非是完全独立、不相联系的,突变的两种效果也有可能综合出现。例如,第 20 位 Asp 用 Arg 替代后,既破坏了 20 位残基局部空间结

构,同时也影响突变蛋白与含有 亚基的受体复合物的结合,导致 IL-2 完全失去生物活性^[19]。另据文献^[20]报道 Val¹⁵ IL-2 也可部分拮抗天然 IL-2 的作用,因替换残基在空间上造成 IL-2 与 IL-2R 亚基结合的微环境有轻微扰动,从而干扰了 IL-2 有关残基与 IL-2R 亚基间的结合,故生物活性剧烈下降,但仍保留部分与高亲和力受体结合的能力,表现为在较高浓度下可部分拮抗天然 IL-2 对 CILL-2 细胞的刺激作用。IL-2 与镇痛作用关系的研究也提供了类似的证据。王等^[1]研究了 IL-2 中共九个芳香族氨基酸残基对止痛作用的影响,他们的研究结果证明: Phe-44, Tyr-45, Tyr-107 和 Phe-117 的变异蛋白仍保持有免疫活性,但止痛作用明显降低,提示这四个芳香族氨基酸残基可在四级结构水平上形成 Tyr-X-X-Phe 基序,并通过与鸦片受体相互作用行使其止痛功能。

4.4 配-受体分选运输动力学机制

IL-2/IL-2R 复合物通过受体介导的胞吞作用内化进入酸性内体区室后,野生型 IL-2 连同 IL-2R 往往被分选进入溶酶体中降解,而释放的 亚基返回到细胞表面重新进入再循环^[21]。含两个邻接点突变的 IL-2 (L18M/L19S)^[22],又名 2D1,在结构完整性和与高亲和力 IL-2 受体结合能力两方面,都与野生型 IL-2 相同,但是,在通过高亲和力 IL-2 受体介导内化进入酸性内体区室后,由突变蛋白带来的内体区室中 PH 值的微小变化干扰了配-受体相互作用,导致变异 IL-2 和 IL-2 受体复合物在胞内的分选运输过程改变,内化的 2D1 中有一部分未被分选入溶酶体中降解,而存留下来,且被分选进入重新再循环。表现出经测定的 2D1 半衰期比野生型 IL-2 长 36 小时,因此 2D1 变异蛋白的促细胞分裂增殖作用得到很大增强。而且,这种受体介导的分选运输机制可能还是一种普遍存在的机制,因为在对上皮生长因子 (EGF)^[23,34] 以及低密度脂蛋白和胰岛素受体系统^[25] 研究中,也发现有类似的胞内分选运输情况存在。

以上有关变异 IL-2 蛋白作用机制的探讨,给我们一个启示:在加强对 IL-2 结构和功能关系研究的同时,还要充分重视 IL-2R 亚基组合方式以及细胞水平的药物动力学研究。优化设计和研制 IL-2 突变蛋白,以期达到治疗目的,同时使其在体内的毒副作用降到最低限度。迄今,绝大多数突变蛋白的设计和产生基于 X 射线结构研究或一些重要氨基酸残基,如半胱氨酸、脯氨酸、芳香族氨基酸和一些带

电残基。有鉴于此,我们提出三种思路来设计生产更具选择性和优势的 IL-2 突变蛋白:第一,Ala 步行法,即有系统地用 Ala 替代每个氨基酸,产生 100 多种突变蛋白,并分别检测其生物活性;第二,体外扫描饱和和诱变法,即用其它 19 个氨基酸残基在同一位点替代一些重要氨基酸残基,然后分析突变蛋白的结合特性和生物学活性;第三,基础 Ala 步行和饱和诱变试验的结果,做双位点或多位点突变。

尽管这些方法非常耗时和费力,但将获得蛋白结构和功能关系的极为有用信息。目前,我们已构建好合适的 IL-2 双位点和三位点突变质粒,正在进一步作表达和纯化研究。同样,此策略还适用于其它重组蛋白药物的研究。我国的基因工程药物大部分停留在仿制水平,重复多,水平不高,浪费太大,对已有重组蛋白药物进行改造,既突出了创新,又节省了时间和经费,不失为一条可行之路。

参考文献

- [1] Yang Wang, Li Li, Jiangfeng Liu. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 230(3):542 - 545
- [2] 蒋春雷,徐荻,周月芳等. 中国科学(C 辑),1996, 26(1):9 - 12
- [3] Morgan DA, Ruscetti FW and Gallo R. Science, 1976, 193: 1007
- [4] Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., et al. Nature, 1983, 302: 305 - 310
- [5] 夏春风:中国医药情报,1999,5(2):86 - 88
- [6] 于忠国,刘东升,张智清,中华微生物学和免疫学杂志,1995, 15(3): 172 - 175
- [7] 唐建伟,刘爱萍,虞建良. 生物工程学报,1996,12(4):448 - 454
- [8] 孙卫民,王惠琴,细胞因子研究方法论,人民出版社,1999, 387 - 403
- [9] Nakamura Y, Russell SM, Leonard WJ et al. Nature, 1994, 369: 330 - 331
- [10] Banzan J F. Science, 1992, 257:410 - 412
- [11] Alice Wnag, Shi-Da Lu, and David F. Mark. Science. 1984, 224: 1431 - 1432
- [12] Yang Rong, Nancy Lee and Shu-mei Liang. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992, 188(2):949 - 955
- [13] 周月芳,王志勇,徐荻等,生物化学与生物物理学报,1996, 28(1): 64 - 68
- [14] Betty L. Lee and Thome L. Ciardelli, Biochemical and biophysical research communications, 1997, 233: 309 - 315
- [15] 徐荻,蒋春雷,曹蕾等,生物化学与生物物理学报,1995,27(2):153 - 156
- [16] Saue, K., Nachman, M., and Spence, C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88: 4636
- [17] Zhi yong Wang, Zhongcheng Zheng, and Lanyin Sun, et al. Eur. J. Immunol. 1995, 25: 1212 - 1216

[18] 王志勇,郑仲承,孙兰英等,中国科学,1996,26(6):487-495

[19] 徐荻,蒋春蕾,石颖等,生物化学与生物物理学报,1994,26(1):1-5

[20] 王志勇,郑仲承,孙兰英等,生物化学与生物物理进展,1995,22(5):4546-451

[21] Hemer. A., Subtil. A., Lieb. M., et al. J. Cell Biol, 1995, 129: 55-64

[22] Fallon, E.M., Liparoto, S.F., Lee. K. J., et al. The Journal of

Biological chemistry, 2000. 275(10): 6790-6797

[23] Reddy, C. C., Niyogi, S. K., Wells. A., et al. Nat. Biotechnol, 1996,14. 1696-1699

[24] French. A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S. K., et al. J. Biol. Chem 1995, 270, 4334-4340

[25] Kadowaki, H., Kadowaki, T., Cama, A., et al, J. Biol. Chem, 1990, 265. 21285-21296

工业生物技术前沿讲习班

由中国生物工程学会及所属的工业与环境生物技术专业委员会主办、国家科技部生物工程开发中心、中国科学院生命科学与生物技术局协办的“工业生物技术前沿讲习班”定于2002年8月26日至28日在大连市大连理工大学举行。

讲习班安排了由杨胜利和欧阳平凯两位院士等高级专家班子领衔主讲的报告是：

- 孟广震教授

曹竹安教授

杨胜利院士

赵学明教授

赵国屏教授

张先恩教授

林章凜教授

黄 力教授

杨克迁教授

金 城教授

陈国强教授

欧阳平凯院士

张启先教授
- 迎接生物技术的第三个浪潮导论

生物催化剂将在新世纪大放异彩

代谢工程研究进展

代谢工程研究及应用潜力

微生物基因组

DNA Shuffling 原理及应用

生物分子的定向进化及其应用

未培养微生物基因资源的研究与利用

组合生物合成研究进展及产业意义

糖生物学与生物技术

生物工程与生物材料

21 世纪生物加工技术展望

21 世纪工业生物技术新产业预测

会议注册费标准:在读硕、博士生每人 500 元(凭证),会员每人 600 元,非会员每人 700 元,食宿及往返交通费自理,报名截止日期:7 月 26 日。会议报到日期:2002 年 8 月 25 日,会议地点:大连理工大学新新宾馆。参加此次讲习班的人员请将注册费寄至中国生物工程学会(汇款时注明“讲习班会议款”),联系人:王连琴、何德华,地址:北京市中关村北四环西路 33 号(100080),电话:010-62562548(传真),62539102,E-mail:csbt@mail.las.ac.cn,详细信息请浏览网址:www.las.ac.cn, www.biotech.org.cn 或向学会办公室索取正式通知。