

[文章编号] 1007-385X(2004)01-

细胞因子重组融合蛋白研究进展

郝子扬 综述; 张立煌 审阅(浙江大学免疫学研究所, 杭州 310031)

[摘要] 细胞因子重组融合蛋白是一类利用基因工程的方法将编码细胞因子和其他有特定功能的蛋白分子基因序列连接并表达相应蛋白质融合产物。其结构特点为将细胞因子功能活性域与其他分子的活性域融合,各组分可发挥协同作用,使融合蛋白的生物学活性较各单体大大增强。按生物学功能的不同可分为:细胞因子与抗体的融合蛋白、细胞因子与毒素的融合蛋白、不同细胞因子的融合蛋白、细胞因子与细胞因子受体的融合蛋白以及细胞因子与其他分子的融合蛋白。这些兼具特异性和高效性的新型重组融合蛋白有些已走向临床,在抗肿瘤、抗风湿病、抗 HIV 感染等领域发挥作用,为人类疾病的治疗提供新的手段。

[关键词] 融合蛋白; 细胞因子; 抗体; 毒素; 抗肿瘤

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A

* 重组融合蛋白(recombinant chimeric protein)是一种人工合成的蛋白质分子,目前对其尚无明确定义,一般认为是利用基因工程方法将两段或多段编码有功能的蛋白质基因序列连接在一起并表达出相应蛋白质的融合产物。早在 1987 年,Williams 等^[1]便应用基因工程手段将白喉毒素的受体结合部位以白细胞介素-2(IL-2)替代构建出一个重组融合蛋白。而后,重组融合蛋白高效、特异的生物学作用显示出临床应用的广阔前景,引起了学者们的重视,尤其近几年发展迅速。在这些重组蛋白中,绝大多数包含有细胞因子成分,其作用通常可分为两类,即载体靶向作用和/或直接生物学活性。本文根据与细胞因子融合的不同,将细胞因子重组融合蛋白分为以下几类:

1 细胞因子与抗体的融合蛋白

抗肿瘤抗体和细胞因子融合蛋白同时保留抗体和细胞因子功能,表现出较相当量单独抗体和细胞因子更高的抗肿瘤活性,且不伴全身毒性反应^[2]。提示这些特殊融合蛋白分子可在人类癌症治疗中发挥作用。

Peng 等^[3]1999 年构建了一个单链 IL-12-IgG3 融合蛋白,由两部分组成,一是抗 Her2/neu 抗体部分,25%~30% 的人类乳腺癌中 Her2/neu 抗原过度表达,转移性乳腺癌可通过人源化的抗 Her2/neu 抗体有效的被靶向,故可以该特异性抗体为载体将细胞因子导至肿瘤灶;另一部为单链 IL-12(scIL12),Peng 等^[3]把 IL-12 的 p35 和 p40 亚单位通过多肽接头连接(p40.linker.p35)后再与抗 Her2/neu 抗体重链氨基端融合,得到融合蛋白 mscIL-12.Her2.IgG3。流式细胞术检测结果表明,Her2IgG3 和 IL-12 的融合未影响该融合蛋白在细胞表面的解离率、内化和降解,且其中 IL-12 的组分能和 IL-12R 结合。小鼠体内抗肿瘤实验结果显示,从发现肿瘤第 1 天起给予 mscIL-12.her2.IgG3,减缓了肿瘤生长;而从第 6 天起给药,则抑制肿瘤生长,表明 mscIL-12.her2.IgG3 在免

疫功能正常的小鼠体内具有显著抗肿瘤活性。

2003 年,Heuser 等^[4]构建了一种抗 CD30 抗体与 IL-12 的融合蛋白,该蛋白能诱导 IFN- γ 的分泌以及 NK 细胞介导的 Hodgkin 氏淋巴瘤来源的细胞的溶解。Hodgkin 氏病的发病机理部分是由于 Th2 反应占支配地位,伴随失能 T 细胞聚集在恶性 Hodgkin/Reed-Sternberg(H/RS)细胞周围,由 CD30 结合域(HRS3-scFv)和 IL-12 的 p40-p35 亚单位组成的抗 CD30 抗体-IL-12 融合蛋白,可逆转 Th2 极化状态,该蛋白具有特异性结合 CD30 抗原和 IL-12 受体的能力,能刺激 T 细胞分泌 IFN- γ ,并高效诱导 NK 细胞溶解 CD30⁺ 细胞。这些特性使 HRS3-scFv-hi-IL-12 可用于 Hodgkin 氏淋巴瘤的特异性免疫治疗。

2 细胞因子与毒素的融合蛋白

在一些肿瘤细胞表面存在许多细胞因子受体,可利用细胞因子作为靶向载体将细胞毒素运送到肿瘤微环境以杀伤肿瘤细胞。白喉毒素与细胞因子的重组融合蛋白便是这样一类能直接杀伤靶细胞的免疫制剂^[5]。体外试验表明,白喉毒素-IL-2 的融合蛋白(DAB₃₈₉IL-2)对表达高亲和力 IL-2 受体的细胞株起毒性作用,而缺乏完整的高亲和力受体的细胞株(有 p55 亚单位而无 p75 亚单位)则对该融合毒素相对耐受^[6]。细胞结合该融合毒素后,可观察到类似于 IL-2 刺激之后的情况^[7]即 IL-2、IL-2 受体、c-myc 和 IFN- γ 的 mRNA 的表达增高,蛋白合成在 4~6 h 内开始受抑制,继发的凋亡则在 40~72 h 内发生^[5]。Saleh 等^[8]报道 DAB₃₈₉IL-2 在皮肤 T 细胞淋巴瘤(cutaneous T cell lymphoma, CTCL) I 期临床试验中单独使用显示出显著的临床治疗效果。DAB₃₈₉IL-2 已成为美国食品与药品管理局(FDA)核准的临床治疗药物。

另一种融合毒素是转化生长因子 α (TGF- α)-假单胞菌

[基金项目] 国家 863 课题(2001AA215111)

外毒素 A^[10]。假单胞菌外毒素 A (Pseudomonas exotoxin A, PE) 为不可逆性蛋白合成抑制剂, 将其细胞结合域删除即为 PE40, 仅表现出极低的细胞和动物毒性^[11]。再将编码 TGF- α 的基因与 PE40 基因融合, 表达产物为 TP40, 后者既有 TGF- α 受体结合活性, 又保留 PE 的细胞毒性。某些肿瘤如人类胰腺癌组织过度表达上皮生长因子受体 (EGF-receptor), 其配体之一即 TGF- α 。实验证明 TP40 这一双功能蛋白能抑制或杀伤表达高水平 EGF 受体的肿瘤细胞。

这类融合蛋白中细胞因子成分不仅发挥自身生物学活性, 且作为毒素运输载体, 其综合结果为同时使该细胞因子和毒素浓集到肿瘤局部以特异性加强治疗效果。

3 不同细胞因子的融合蛋白

将两种或多种细胞因子融合在一起的构想是基于这些细胞因子具有相同或相关功能活性, 而各自作用靶点不同, 其融合基因表达产物很可能表现出各个组分之间的协同作用。

1991 年 Curtis 等^[12]报道了第一个由不同细胞因子组成的融合蛋白, 根据 IL-3 和粒细胞/巨嗜细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 在小鼠和灵长类体内刺激造血的协同作用, 构建了融合蛋白 PIXY-321 (GM-CSF-IL-3) 和 PIXY-344 (IL-3-GM-CSF)。两者均在 GM-CSF 与 IL-3 之间引入了一段疏水氨基酸序列从而保证其各自的天然构象以确保其与受体结合^[12]。实验结果表明, 两者对只表达 GM-CSF 受体的细胞株 (HL-60) 或只表达 IL-3 受体的细胞株 (JM-1) 的结合能力与单体大致相同 (略低), 说明该种融合蛋白既可以经 GM-CSF 域又能经 IL-3 域结合相应受体。进一步研究发现, PIXY-321 在刺激骨髓集落形成中较等摩尔数的 GM-CSF 和 IL-3 混合物有更佳的效果^[12]。

继 PIXY321/344 之后, 另一个具有代表性的融合蛋白是胰岛素样生长因子 II-白介素-3 (IGF-II-IL-3)。IGFs 常与其他生长因子一起发挥协同作用, 是最好的二联细胞因子融合蛋白的备选因子。IGF II 可刺激多种组织中细胞的增殖或分化。将 IGF II 与一段信号肽以及胰岛素样的昆虫激素 bombyxin 的 N 端序列融合表达, 便可得到分泌形式的具有生物活性的 BOMIGF^[13]。Difalco 等^[14]制备了一种 BOMIGF 和 IL-3 的融合蛋白, 体外试验中它可刺激正常外周血细胞中的骨髓干细胞集落形成, 体内试验结果亦显示该融合蛋白能动员具有高度增殖活性的骨髓干细胞进入外周血, 进而定居于脾脏而发挥造血功能。

不同细胞因子的融合蛋白作用靶细胞的范围比单细胞因子与其他分子融合蛋白更广。各细胞因子成分均可与相应受体结合, 各自发挥作用。若两个细胞因子组分互相作为载体并各自发挥相关的生物学活性, 可能发挥协同作用。

4 细胞因子与细胞因子受体的融合蛋白

通过将体内发挥作用时相互依赖或者所具有的协同作用细胞因子与细胞因子受体基因重组, 可大大促进其生物

学活性的发挥。

IL-6 在肝细胞的增殖中起着增强作用^[15]。IL-6 和 IL-6R α (gp80) 的结合使其易于和另一个受体——IL-6R β (gp130) 结合。IL-6R α 尚以可溶性蛋白的形式存在。sIL-6R 与 IL-6 结合后, 靶细胞对 IL-6 的敏感性增高, 并可使仅表达膜结合型 IL-6R 的细胞 (IL-6R α -gp130⁺) 对 IL-6 起反应。在 sIL-6R/IL-6 双基因转染的小鼠中, sIL-6R 发挥锚定 IL-6 的作用, 延长血浆 IL-6 半衰期, 同时细胞对 IL-6 的敏感性显著提高^[16]。

基于以上几点, Fischer^[17]等用基因重组的方法构建了一种 IL-6-sIL-6R 融合蛋白 hyper-IL-6。在 gp130⁺ 细胞上, 该融合蛋白表现出了完全的生物学活性, 而所需浓度仅为非融合形式的 IL-6 和 sIL-6R 的 100 至 1 000 分之一, 因而被用于在体外有效的扩增造血祖细胞, 且该作用具有剂量依赖关系。进一步的大鼠体内试验表明, hyper-IL-6 可逆转 D-gal 引起的亚致死性或致死性肝毒性损伤, 且此作用不可被 IL-6 替代^[16]。

5 细胞因子与其他分子的融合蛋白

细胞因子还被设计与其他生物活性分子如某些肿瘤相关抗原, 信号转导途径中的相关分子等融合。

Aqeilan 等^[18]报道了一个新的人融合蛋白 IL-2-Bax 用于靶向治疗。Bax 属于 Bcl-2 蛋白家族, 为促凋亡因子。诱导 Bax 表达便可介导细胞凋亡而不需要附加的细胞死亡刺激信号, 且通过凋亡途径杀伤靶细胞可使组织损伤和全身性反应降至最低。研究表明, 该融合蛋白介导的靶细胞凋亡呈剂量依赖关系。靶向性细胞因子和凋亡蛋白融合产物在体内及体外可选择性杀伤特定类型细胞, 开创了疾病靶向治疗新视野。

Reinartz 等^[19]将 IL-6 与抗独特型单克隆抗体重组, 制备了 chACA125-IL-6 融合蛋白并将其用于卵巢癌研究。小鼠抗独特型单抗 ACA125 模拟卵巢癌细胞上的 CA125 抗原, 可诱导抗-抗独特型抗体 (Ab3) 反应, 该反应与卵巢癌患者生存时间呈正相关。试验结果表明融合蛋白接种后抗 CA125 (Ab3) 的浓度较 IL-6 与 chACA125 联用高, 且未观察到抗人 IL-6 抗体产生, 而联用情况下可以检测到抗人 IL-6 抗体产生。综上, chACA125-IL-6 融合蛋白通过 IL-6 区域直接刺激 ACA125 特异性 B 细胞而简单联用 IL-6 则从整体上增强免疫反应。通过增强抗原特异性体液免疫反应, 抗原-IL-6 融合蛋白将改善疫苗接种方法和抗肿瘤免疫治疗手段。

由于细胞因子种类繁多且每一细胞因子的作用又具有多样性, 而在体内环境中各种细胞因子间相互作用更为复杂, 因而细胞因子融合蛋白研究几乎涵盖所有常见细胞因子。但凡在功能上相关的细胞因子或相关的分子, 若其融合产物的生物学活性能够大于或者等于各个组分简单相加的结果, 即具有其他单体分子无法比拟的高效性, 便有构建融合分子的意义; 或者, 在与特定的靶向性分子结合之后, 具有一定毒性的细胞因子能有选择的、特异的浓集于病灶局部,

使全身性的不良反应降至最低点,即具有某些单体细胞因子所不具有的特异性,也是融合蛋白的研究方向之一。但在进行融合蛋白构建时,分子大小也是决定该产品最终功效的因素之一。如在 PIXY321 的后续临床实验中发现,其虽能加速造血功能的恢复,但在第二轮使用时由于抗 PIXY321 中和抗体的产生而抑制了其造血活性^[20]。因此在构建细胞因子融合蛋白时,必须慎重选择所融合的细胞因子并且在设计中尽可能降低分子量以减少免疫原性。若能很好解决抗原性问题,细胞因子融合蛋白应用前景将非常广阔。最近,一些抗肝纤维化细胞因子和细胞因子受体融合蛋白开始引起研究者兴趣,这类融合蛋白的构建可能会为逆转肝纤维化的进程提供一种疗法,并给细胞因子融合蛋白新分子的构建提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Williams DP, Parker K, Bacha P, *et al.* Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2: Genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein[J]. *Protein Eng.* 1987, 1(6): 493-498.
[2] Penichet ML, Morrison SL. Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 248(1-2): 91-101.
[3] Peng LS, Penichet ML, Morrison SL. A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity[J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 250-258.
[4] Heuser C, Diehl V, Abken H, *et al.* Anti-CD30-IL-12 antibody-cytokine fusion protein that induces IFN-gamma secretion of T cells and NK cell-mediated lysis of Hodgkin's lymphoma-derived tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(4): 545-552.
[5] Foss FM. Interleukin-2 fusion toxin: Targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 941: 166-176.
[6] Kiyokawa T, Williams DP, Snider CE, *et al.* Protein engineering of DAB-IL-2 fusion toxins to increase biologic potency[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 636: 331-339.
[7] Walz G, Zanker B, Brand K, *et al.* Sequential effects of interleukin 2-diphtheria toxin fusion protein on T-cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(23): 9485-9488.
[8] Saleh MN, LeMaistre CF, Kuzel TM, *et al.* Antitumor activity of DAB389IL-2 fusion toxin in mycosis fungoides[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39(1): 63-73.

[9] Wick MJ, Frank DW, Storey DG, *et al.* Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 335-363.
[10] Baldwin RL, Kobrin MS, Tran T, *et al.* Cytotoxic effects of TGF-alpha-*Pseudomonas* exotoxin A fusion protein in human pancreatic carcinoma cells[J]. *Pancreas*, 1996, 13(1): 16-21.
[11] Kondo T, FitzGerald D, Chaudhary VK, *et al.* Activity of immunotoxins constructed with modified *Pseudomonas* exotoxin A lacking the cell recognition domain[J]. *J Biol Chem*. 1988, 263(19): 9470-9475.
[12] Curtis BM, Williams DE, Broxmeyer HE, *et al.* Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(13): 5809-5813.
[13] Congote LF, Li Q. Accurate processing and secretion in the baculovirus expression system of an erythroid-cell-stimulating factor consisting of a chimaera of insulin-like growth factor II and an insect insulin-like peptide[J]. *Biochem J*, 1994, 299 (Pt 1): 101-107.
[14] Difalco MR, Congote LF. Preparation of a recombinant chimaera of insulin-like growth factor II and interleukin 3 with high proliferative potency for haemopoietic cells[J]. *Biochem J*, 1997, 326 (Pt 2): 407-413.
[15] Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice [J]. *Science*. 1996, 274(5291): 1379-1383.
[16] Galun E, Zeira E, Pappo O, *et al.* Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury[J]. *FASEB J*, 2000, 14(13): 1979-1987.
[17] Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, *et al.* A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(2): 142-145.
[18] Aqeilan R, Yarkoni S, Lorberboum-Galski H. Interleukin 2-Bax: a novel prototype of human chimeric proteins for targeted therapy[J]. *FEBS Lett*, 1999, 457(2): 271-276.
[19] Reinartz S, Hombach A, Kohler S, *et al.* Interleukin-6 fused to an anti-idiotypic antibody in a vaccine increases the specific humoral immune response against CA125⁺ (MUC-16) ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3234-3240.
[20] Miller LL, Korn EL, Stevens DS, *et al.* Abrogation of the hematological and biological activities of the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein PIXY321 by neutralizing anti-PIXY321 antibodies in cancer patients receiving high-dose carboplatin[J]. *Blood*, 1999, 93(10): 3250-3258.

[收稿日期] 2003 - 10 - 08

[修回日期] 2003 - 11 - 21