

亲和体分子在影像、治疗和生物技术中的应用

王乐丹 张丽芳

摘 要 亲和体 (affibody) 分子由 58 个氨基酸组成, 蛋白相对分子质量约为 6.5 kDa, 其来自于金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) B 结构域。含有 3 个 α 螺旋结构, 其中该亲和体分子的第 1 及第 2 螺旋中含有 13 个特定位点的氨基酸, 并且这些氨基酸可随机突变, 对其结构无明显影响, 形成可以与任何分子结合的亲和体文库。亲和体的功能和抗体类似, 但也有一些性质是抗体所没有的: 如相对分子质量小、高亲和力、折叠速率快、理化性能稳定、能经受化学修饰等特点, 因此有人称其为“人工抗体”, 在治疗、诊断和生物技术中得到广泛应用。

关键词 亲和体 治疗 诊断 生物技术

中图分类号 R392

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.005

亲和体 (affibody) 是一种衍生于葡萄球菌 A 蛋白 Z 结构域的人工蛋白质分子。为单链结构, 由 58 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 6.5 kDa, 形成 3 个 α 螺旋结构, 其中第 1 及第 2 螺旋中的 13 个特定位点的氨基酸对其结构无明显影响, 分别是 Q9 (谷氨酰胺)、Q10 (谷氨酰胺)、N11 (天冬酰胺)、F13 (苯丙氨酸)、Y14 (酪氨酸)、L17 (亮氨酸)、H18 (组氨酸)、E24 (谷氨酸)、E25 (谷氨酸)、R27 (精氨酸)、N28 (天冬酰胺)、Q32 (谷氨酰胺)、K35 (赖氨酸), 用简并密码子 NNK (K = G 或者 T, 包含 32 种密码子, 囊括了 20 种氨基酸) 替换这 13 个氨基酸的密码子, 形成很多转化体, 理论上包含 32^{13} 个基因序列和 20^{13} 个氨基酸序列, 这些转化体也就组成了 affibody 文库, 用该文库对靶标进行筛选, 可获得能与靶标特异结合的亲和体^[1]。

筛选获得的亲和体与靶分子的结合与抗体和抗原的结合特性相似, 但与抗体相比, 又具有一些独特的优势, 如: 获得方法简便, 通过体外筛选即可获得; 容易制备, 以化学合成方法或原核表达即可大量制备; 同时因为其分子质量小, 在生物体内组织穿透性强, 并且通过血液后, 血浆清除率高, 而且亲和体分子理化性质稳定, 可以通过将其交联或融合表达与标记分子 (如荧光蛋白、生物素等) 结合而不影响其与靶分子的结合能力, 基于以上这些特性, 亲和体有望作

为抗体的替代品, 用于蛋白质识别、分离及纯化、实验诊断、分子显像及靶向治疗等^[2]。在本文中, 我们将回顾亲和体分子作为一种可行的, 有时甚至比抗体更好的替代品, 在治疗、体内成像和生物技术中的应用。

一、亲和体的展示方法

亲和体的展示方法包括噬菌体展示技术、核糖体展示技术、细胞展示技术及蛋白质互补分析技术等, 其中以噬菌体展示技术最为常见。

噬菌体展示技术是以改造的噬菌体为载体, 在噬菌体外壳蛋白基因区定向插入待选的基因片段, 使噬菌体表面能展示这些外源多肽或表达的蛋白质, 通过多次淘洗的方法, 进一步富集表达有这些多肽或蛋白质的噬菌体, 从而得到具有特异性结合的多肽或蛋白质的一种生物学技术^[3]。噬菌体展示技术最大的特点, 是基因型能直接反映表达型, 而且在噬菌体表面展示的外源多肽或蛋白质不影响噬菌体的天然构型及生活周期。目前这项技术已经成功筛选了 A β 、EGFR、HER-2 等多种靶蛋白亲和体。

核糖体展示技术 (ribosome display technology, RDT) 是一种利用功能性蛋白间相互作用而进行筛选的新技术, 它是在多聚核糖体展示技术的基础上发展而来。最早由 Plückthun 实验室首先提出, 他们将折叠正确的蛋白及其相应 mRNA 同时结合在核糖体上, 形成蛋白质-核糖体-mRNA 的三聚体, 使目的蛋白的表型和基因型联系起来, 常用于抗体及蛋白质文库的选择、蛋白质体外改造等^[4]。

亲和体文库也可以直接展示在细胞表面, 细胞展示和噬菌体展示类似, 但细胞比噬菌体大, 可使用定量流式细胞术进行文库排序和筛选后的鉴定^[5]。有

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172463); 温州市科技局基金资助项目 (Y20140319)

作者单位: 325000 温州医科大学附属第二医院 (王乐丹); 325000 温州医科大学 (张丽芳)

通讯作者: 张丽芳, 教授, 博士生导师, 电子信箱: zlf@wzmc.net

研究人员将亲和文库在革兰阳性细菌肉葡萄球菌中表达并且展示在细胞表面,进行 TNF- α 亲和体的筛选。新近发展起来的另一个筛选方法是蛋白质互补分析(PCA),它通常用于研究天然蛋白质间相互作用。相比其他展示系统,这种方法的靶标是在细胞内,从而避免了靶蛋白的生产和纯化过程^[6]。另外,由于 PCA 是通过介质中存活克隆来筛选阳性克隆,故可以通过简单的培养完成特异亲和体的筛选。

二、亲和体的应用

1. 在影像学中的应用:在目前常规临床实践中,重要的诊断手段有解剖成像,例如计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI),也有分子水平上功能性或分子成像,如单光子发射光谱仪(SPECT)或正电子发射断层扫描(PET)。分子成像研究中的绝大部分是使用葡萄糖类似物进行的 2 - [¹⁸F] 氟 - 2 - 脱氧 - D - 葡萄糖(¹⁸F - FDG PET),其对检测转移性和复发性疾病及其有用^[7]。然而,¹⁸F - FDG PET 的结果是非特异性的,不能鉴别癌细胞表面特异性受体,如人表皮生长因子受体 2(HER - 2),因此不能用于靶向治疗。理想的成像剂应具有特异性和亲和性。此外,快速的生物分布和组织渗透,使局部浓度富集,以及未结合示踪剂快速清除,从而形成高对比度的肿瘤成像^[8]。最近的研究表明,亲和体分子具有最佳示踪剂的特性,在 HER - 2 特异性分子成像中,亲和体分子可以在给药后的第 1 个小时内找到并结合到靶标,而且未结合部分血液清除率快。

亲和体分子的第 1 例特异性放射性标记是 Orlova^[9]报道的。在这项研究中,亲和体分子 Z_{HER-2,342} 是通过合成制备的肽,将具有 DOTA 的一个化学过程耦合到 N 末端,得到 DOTA - Z_{HER-2,342} - PEP2(ABY - 002)。ABY - 002 是有效的,稳定的温度为 60 ~ 90℃。¹¹¹In - ABY - 002 在 SKOV - 3 荷瘤小鼠体内的分布显示,注射后 1h 有效的肿瘤吸收了 23% ID/g,肿瘤血液比值(T/B)的 1h 后为 12,4h 达到 120。在所有时间点,除肾脏外,肿瘤摄取比所有其他器官的摄取高。快速降低血液中的放射性积累,在尿液中显示快速清除,其主要由肾小球滤过。¹¹¹In - ABY - 002 的快速动力学允许 HER - 2 过度表达的肿瘤在注射后 1h 可视化。双标记实验,即在小鼠异种移植模型中共注射 ⁶⁸Ga - 和亲和体分子与两个不同的放射性金属标记,一是伽马发射器和一个正电子发射体。结果显示相似的肿瘤同时摄取两种分子。然而,⁶⁸Ga - ABY - 002 在血液、肺、脾的放射强度比¹¹¹In -

ABY - 002 显著低。因此,图像的对比度是 ⁶⁸Ga - ABY - 002 PET 图像比¹¹¹In - ABY - 002 略胜一筹。近日,HER - 2 靶向亲和体被连接到超顺磁性氧化铁颗粒对肿瘤进行靶向造影,结果在肿瘤部位可见带有亲和体亲和性的超顺磁性氧化铁颗粒信号。实验证明,亲和体分子可以带有大量的各种放射性核素,因此亲和体用做 SPECT 或 PET 示踪剂是可能的^[10]。

2. 在靶向治疗的应用:亲和体分子在影像学中的应用,其实是通过将放射性核素作为它的有效负载来实现的,如果选用治疗肿瘤的药物替代放射性核素来充当亲和体分子的负载,那么通过连接亲和体分子和抗肿瘤药物,或者载有抗肿瘤药物的给药系统,就可实现肿瘤的靶向治疗。目前亲和体分子在药物载体方面的应用大多是将亲和体分子连接到纳米粒表面,纳米粒是由高分子材料制备的具有“核 - 壳结构”的材料,通过亲和体的特异性和亲和性,使纳米粒达到靶向的功能^[11]。Alexis 等^[12]将亲和体分子 Cys - Z_{HER-2,342} 偶联到纳米粒表面,制备了靶向纳米粒,同时设置非靶向纳米粒为对照,用 SKBR - 3 和 SKOV - 3 两个细胞系来评估它们的外摄取和细胞毒性,结果显示两种细胞系中靶向纳米粒组的细胞摄取率和杀伤活性均优于非靶向纳米粒组,说明其制备的靶向纳米粒具有应用前景。

也有研究者通过基因重组技术将毒素的编码基因与亲和体分子进行克隆融合重组,经在体外细菌中表达、纯化,制备出免疫毒素,以亲和体作为导向分子,将毒素靶向癌细胞,达到治疗的目的。最新研究表明,Zielinski 等^[13]在 HER - 2 的高特异性高亲和体分子上融合免疫毒性蛋白 PE38,制备了 HER - 2 的高亲和的毒性分子亲和体,按照 0.25mg/kg 的剂量尾静脉注射于接种了 HER - 2 高表达的卵巢癌细胞 SK - OV - 3 的肿瘤模型裸鼠,连续注射 6 次,30 天后肿瘤消失。于脂质体双层插入 HER - 2 特异性的亲和体分子也可靶向杀伤 HER - 2 高表达的肿瘤细胞,从而提高治疗效果和安全效果。这些为肿瘤的治疗提供了更为有效的新的治疗手段。

3. 在生物技术中的应用:由于亲和体分子具有和抗体相似的亲和性,而且结构稳定,分子质量小,故已被广泛地用于抗体的生物分离,如亲和层析、免疫沉淀等生物技术。目前,亲和体 AB 公司与 GE Healthcare 公司一起研制亲和体的改进方式,如碱稳定版本,为耐受性提高到碱处理再生在亲和层析中。近来有研究表明,亲和体分子在酶联免疫吸附测定和免疫

组化的应用中也取得了相应的进展。Friedman 等^[14]还用亲和体分子作为荧光探针检测细胞表面 EGFR 和 HER-2 受体的表达水平。有关 ELISA 设置中,亲和体分子作为亲和探针固定在蛋白质微阵列。例如,在一项研究中将二聚体的亲和体分子与 IgA 抗体, IgE 抗体, IgG 抗体, 肿瘤坏死因子, 胰岛素和 Taq 聚合酶亲和体, 分别固定在硫醇葡聚糖微阵列载玻片, 随后孵化与荧光标记的分析物, 露出各自靶蛋白的特异性结合, 而且没有观察到交叉反应。

总之, 亲和体分子代表了一类新的亲和性配体, 由于其具有分子质量小、结合力高、特异性强、靶向浓聚迅速、血液清除快等优点, 在过去的 20 年中, 在成像、靶向治疗和生物技术等方面得到了广泛研究。目前已经成功地用亲和体分子诊断 HER-2 表达阳性的癌症患者, 而且也有将亲和体分子作为 IgG 亲和纯化柱的亲和配体, 商业化后年销售额达数千万元。目前亲和体分子的应用领域日益广泛, 随着更多亲和体的开发, 亲和体有望替代抗体, 完成目标蛋白检测、分离、肿瘤影像诊断及治疗等作用。

参考文献

- Kronqvist N, Malm M, Göstring L, *et al.* Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3 - specific Affibody molecules[J]. Protein Eng Des Sel, 2011, 24(4): 385 - 396
 - Orlova A, Feldwisch J, Abrahmsén L, *et al.* Update: affibody molecules for molecular imaging and therapy for cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(5): 573 - 584
 - Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(6): 849 - 858
 - Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(10): 4937 - 4942
 - Kronqvist N, Lofblom J, Jonsson A, *et al.* A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry[J]. Protein Eng Des Sel, 2008, 21(4): 247 - 255
 - Koch H, Gräfe N, Schiess R, *et al.* Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 357(2): 427 - 441
 - Brindle K. New approaches for imaging tumour responses to treatment[J]. Nat Rev Cancer 2008, 8(2): 94 - 107
 - Tolmachev V, Orlova A, Nilsson FY, *et al.* Affibody molecules: potential for in vivo imaging of molecular targets for cancer therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(4): 555 - 568
 - Orlova A. Synthetic affibody molecules: a novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2 - expressing malignant tumors[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 2178 - 2186
 - Gong H, Kovar J, Little G, *et al.* In vivo imaging of xenograft tumors using an epidermal growth factor receptor - specific affibody molecule labeled with a near - infrared fluorophore[J]. Neoplasia, 2010, 12(2): 139 - 149
 - Feldwisch J. Design of an optimized scaffold for affibody molecules[J]. J Mol Biol, 2010, 398(2): 232 - 247
 - Alexis F, Basto P, Levy - Nissenbaum E, *et al.* HER - 2 - targeted nanoparticle - affibody bioconjugates for cancer therapy[J]. Chem Med Chem, 2008, 3(12): 1839 - 1843
 - Zielinski R, Lyakhov I, Hassan M, *et al.* HER2 - affitoxin: a potent therapeutic agent for the treatment of HER2 - overexpressing tumors[J]. Clinical Cancer Research, 2011, 17(15): 5071 - 5081
 - Friedman M, Lindstrom S, Ekerljung L, *et al.* Engineering and characterization of a bispecific HER2 x EGFR - binding affibody molecule[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2009, 54(2): 121 - 131
- (收稿日期: 2015 - 01 - 14)
(修回日期: 2015 - 02 - 26)
-
- (上接第 4 页)
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, *et al.* Interferon alfa - 2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group[J]. N Engl J Med, 1998, 339(21): 1485 - 1492
 - Poynard T, Marcellin P, Lee SS, *et al.* Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT)[J]. Lancet, 1998, 352(9138): 1426 - 1432
 - Lu L, Nakano T, He Y, *et al.* Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. J Med Virol, 2005, 75(4): 538 - 549
 - Poordad F, Mccone J Jr, Bacon BR, *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection[J]. N Engl J Med, 2011, 364(13): 1195 - 1206
 - Jacobson IM, McHutchison JG, Dushieiko G, *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection[J]. N Engl J Med, 2011, 364(25): 2405 - 2416
 - Im GY, Dieterich DT. Direct - acting antiviral agents in patients with hepatitis C cirrhosis[J]. Gastroenterol Hepatol, 2012, 8(11): 727 - 765
 - Lawitz E, Mangia D, Alessandra M. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection[J]. N Engl J Med, 2013, 368(20): 1878 - 1887
 - Stefan Z, Geoffrey MD, Riina S, *et al.* Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3[J]. N Engl J Med, 2014, 370(21): 1993 - 2001
 - Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies and challenges[J]. Gastroenterology, 2014, 146(5): 1176 - 1192
 - Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez - Torres M, *et al.* Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection[J]. N Engl J Med, 2014, 370(3): 211 - 221
- (收稿日期: 2015 - 05 - 27)
(修回日期: 2015 - 06 - 05)