

公務人員高級三等考試試題

一、目前許多癌症常常使用嵌合式單株抗體（Chimeric antibody）或人源化單株抗體（Humanized antibody）作成之標靶藥物來治療。

（一）請說明如何將老鼠得來之單株抗體轉成嵌合式單株抗體或人源化單株抗體？（8分）

（二）請問單株抗體標靶藥物與傳統之化療藥物特性與治療方式有何不同？（6分）

（三）請以美國 FDA 核准上市第一個治療癌症的單株抗體 Rituxan（Rituximab）為例，說明其用來治療何種癌症及其分子作用機制？（6分）

■ 試題解析（一）

1. 嵌合式單株抗體：

（1）定義：變異區來自老鼠，固定區來自人類之單株抗體。

（2）作法：

（a）將特定抗原注射入老鼠體內使其產生免疫反應，篩選生產 Ab 效價較高之 B cell。

（b）純化 B cell 之 mRNA 並反轉錄為 cDNA，取其 Fab 區。

（c）收集人類 B cell 之 mRNA 並反轉錄為 cDNA，取其 Fc 區。

（d）分別將 Fab 區及 Fc 區基因序列進行重組，完成重組抗體基因重組。

（e）此重組抗體基因送入真核哺乳細胞表現系統中（例如 CHO cell），進行大量表現，即可得到嵌合式單株抗體。

2. 人源化單株抗體：

（1）定義：抗原決定區序列（CDR）來自老鼠，其餘序列皆來自人類之單株抗體。

（2）作法：與嵌合式單株抗體製法類似，僅差異在人源化單株抗體取老鼠 B cell 抗體基因之 CDR 區（此區已確認具有抗原結合專一性），其餘序列取自人類抗體基因。

■ 試題解析（二）

1. 單株抗體標靶藥物：

（1）特色：高專一性、低細胞毒性、低免疫排斥性、低副作用、使用劑量低。

（2）治療方式：以癌細胞所特有且穩定表現之標靶分子為目標，所開發之單株抗體，可利用此單株抗體攜帶放射性物質或免疫毒素，予以有效對癌

細胞進行毒殺作用，或誘發免疫作用，可避免傳統化療藥物之缺點，減少正常體細胞的傷害，降低副作用減少患者不適。

2. 傳統化療藥物：

- (1) 特色：無專一性、具有細胞毒性常引發副作用、可能引發嚴重性免疫反應、造成正常體細胞死亡。
- (2) 治療方式：使用能量代謝抑制劑或核苷酸與核酸代謝抑制劑，例如 hexokinase inhibitor (醣解作用抑制劑)、topoisomerase inhibitor (或使用抑制葉酸代謝之抑制劑)，使癌細胞無法獲得能量或無法合成核苷酸，抑制其生長並引發其死亡，但此類藥劑缺乏專一性，對於正常體細胞亦會破壞，引發強烈副作用。

■ 試題解析 (三)

Rituxan 為 chimeric mAb，用於治療 non-Hodgkin's lymphoma，此單株抗體可專一性結合於表面含有 CD20 之過量表現或功能異常之 B cell，促進 NK 細胞進行辨識及毒殺。

二、純化各種蛋白質時，常常會使用膠體過濾法 (gel filtration)，離子交換樹脂法 (ion exchange)，或親合層析管柱 (affinity column) 層析法來純化，現在你有 X、Y 和 Z 三個蛋白質混合在一起。(X 蛋白質的等電點 $pI=5.2$ ；Y 蛋白質的等電點 $pI=6.2$ ；Z 蛋白質的等電點 $pI=7.2$)。

- (一) 利用膠體過濾法純化時，Y 蛋白質先流出，接著 Z 蛋白質流出，最後是 X 蛋白質流出，請排出三者分子量之大小，並說明你的理由。(5 分)
- (二) 利用 DEAE 陰離子交換樹脂法純化時，所使用純化的溶液之 pH 值為 6.2，請問你能用來純化 X、Y、Z 中的那一個蛋白質，並說明你的理由。(5 分)
- (三) 你想要藉由比對其胺基酸序列來鑑定此三種蛋白質，請詳述你應用的技術方法及操作流程？(10 分)

■ 試題解析 (一)

膠體過濾法可將蛋白質混合物依分子量大小不同分離，因小分子蛋白質可進入膠體孔洞，移動距離長，而大分子蛋白質無法進入膠體孔洞，移動距離較短。因此大分子蛋白質流出管柱所需時間短，但小分子蛋白質流出管柱所需時間較長，因此三者分子量大小： $Y > Z > X$ 。

■ 試題解析 (二)

DEAE 陰離子交換樹脂內具有正電荷基團 DEAE (diethylaminoethanol)，可結合具有負電荷蛋白質，使用純化緩衝液 pH 值為 6.2 時，X 蛋白質為負電，Y 蛋白質不帶電，Z 蛋白質為正電，因此唯有 X 蛋白質會吸附於 DEAE 陰離子交換樹脂內得以純化。

■ 試題解析 (三)

利用 Tandem MS 將此三種蛋白質利用 ESI 進行離子化，進行第一次 MS，依 m/z 不同有不同移動效率，並使用 He 氣體使蛋白質分子撞擊產生小片段，經由第二次 MS，分析每次撞擊片段之分子量大小，鑑定蛋白質胺基酸序列與身分。

三、利用生物技術設計個人化醫療，避免異體排斥已逐漸成為目前的趨勢。

- (一) 如何利用樹突狀細胞 (dendritic cells) 針對肝臟腫瘤可切除的癌症病患設計客製化的治療？請敘述原理及流程。(10 分)
- (二) 對於嚴重的糖尿病患而言，如何利用進行個人化醫療以製造其胰島素的貝塔細胞 (beta cells)？請分別以基因轉殖和核轉殖的方式各提議一個方法並敘述其原理。(10 分)

■ 試題解析 (一)

將樹突狀細胞由病患體內取出，加入肝臟腫瘤抗原共同培養或以基因轉殖方式使樹突狀細胞表現肝臟腫瘤抗原後送回原病患體內，予以活化病患 TH 及 Tc cell，可有效毒殺肝癌細胞。

■ 試題解析 (二)

1. 基因轉殖方式製造 beta cells：

方法一：病患可能因 beta cells 之胰島素基因缺陷 (異常摺疊或者缺乏 signal peptide)，因此可使用反轉錄病毒載體進行 beta cell 基因治療 (ex vivo)，再送回患者體內，使其 beta cell 可正常合成並分泌胰島素，完成治療。

方法二：(利用 iPSCs)

- (1) 將病患成體細胞取出進行體外培養，以 retrovirus vector 送入四種 TFs (Oct3/4、Sox2、Klf4 及 c-myc)。
- (2) 使成體細胞再程序化形成類似胚胎幹細胞潛能的 iPS cells。
- (3) 給予可誘導分化為 beta cells 之 growth factors，使之形成具有正常製造胰島素功能之 beta cells。
- (4) 送回原病患體內穩定表現胰島素。

2. 體細胞核轉移方式製造 beta cells：

- (1) 以 microinjection 方式將病患體細胞核送入去核卵母細胞進行融合。
- (2) 將融合細胞培養至囊胚期，取出 inner cell mass，培養成 ES cell。
- (3) 給予可誘導分化為 beta cells 之 growth factors，使之形成具有正常製造胰島素功能之 beta cells。
- (4) 送回原病患體內穩定表現胰島素。

四、2006 年諾貝爾生理及醫學獎由兩位美國科學家 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 共同獲得，以表彰他們發現干擾基因表達 (RNAi) 的現象。因此若想要使生物體某一特定基因沈默 (gene silencing)，常常會使用此一技術，請寫出 RNAi 與基因剔除 (gene knockout) 之操作流程及原理。(20 分)

■ 試題解析

1. RNAi 乃因外源性或內生性之 miRNA 或 siRNA 所引發，藉由形成 RISC 結構，與互補之目標 mRNA 序列結合，引發目標 mRNA 發生降解或轉譯抑制現象。操作流程：

- (1) 以 micro injection 方式送入 morpholino oligo RNA、dsRNA 或利用 retroviral vector 送入 shRNA gene 至目標細胞內表現。
- (2) 經由 Dicer 切割後成為成熟 siRNA 或 miRNA，並與多種蛋白質形成 RISC。
- (3) RISC 結合目標 mRNA 序列並可由 slicer 引發降解或抑制 mRNA 轉譯現象。

2. gene knockout 可利用 Cre-lox p system (屬於 site-specific recombination)，透過 Cre recombinase 專一性辨認含 lox p 序列 (具重複序列之 DNA) 位置，並移除 lox p 序列間之 DNA，達成特定基因序列剔除之目的 (稱為條件式基因剔除)，其操作流程如下：

- (1) 製備可表現 Cre recombinase 之公鼠。
- (2) 製備在目標欲剔除基因的兩側有 loxp 序列之母鼠。
- (3) 使兩者交配，挑選同型合子，所產生子代可在特定生理條件下 (或特定誘發條件) 而表現 Cre recombinase，辨識 lox p 序列使目標基因剔除，產生 gene knockout mice。