

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0122-04

血管内皮生长因子受体 KDR 的靶向制剂的制备

武 婕¹, 张宏斌¹, 洗 江¹, 杨太成¹, 杨传红¹, 王 捷¹, 郑文玲¹, 赖晃文¹, 陈惠鹏²(1. 广州军区总医院医学实验科, 广州 510010; 2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

[摘 要] 目的: 研究从噬菌体肽库中筛选到的与血管内皮生长因子受体 II(KDR)有特异结合活性的小肽, 做为 KDR 靶向药物的先导物质的应用。方法: 从噬菌体肽库中筛选能特异结合 KDR 的噬菌体克隆, 挑选结合力最强的克隆测序并化学合成小肽 P5, 梯度 ELISA、阻断实验和竞争结合实验测定小肽在体外与 KDR 的结合活性。将 P5 与生物素(NHS-d-Biotin)、BSA 化学偶联, ELISA 法和细胞免疫组化实验检测偶联物与 KDR 的结合活性。结果: 化学合成的小肽 P5 在体外能特异结合 KDR, $K_d = 168.6 \text{ nmol/L}$, 约是 KDR 与配体血管内皮生长因子(VEGF₁₆₅)亲和力的 1/30, P5 能阻断 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合活性, 但不能竞争 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合活性。将 P5 作为导向物质化学合成的 P5-BSA-Biotin, 在体外同样具有与 KDR 和细胞表面 KDR 分子结合的特性。结论: 化学合成的小肽 P5 有望作为先导分子, 在以 KDR 为靶点的肿瘤靶向治疗中得到应用。

[关键词] 血管内皮生长因子受体; 导向; 化学制备

[中图分类号] R730.231 [文献标识码] A

Synthesis and Characterization of Chemical Conjugate Targeting KDR

WU Jie, ZHANG Hong-bin, XIAN Jiang, YANG Tai-cheng, YANG Chuan-hong, WANG Jie, ZHENG Wen-ling, LAI Huang-wen, CHEN Hui-peng (Medical Research Department of Guangzhou General Hospital in Guangzhou Command., Guangzhou 51001, China; 2. Beijing Institute of Radiational Medical Science, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** One strategy for improving the selectivity and toxicity profile of antitumor agents is to design drug carrier systems. Thus a reagent targeting KDR expressed on tumor vasculature was prepared by a peptide binding to KDR specifically which screened from C7 peptide library coupled covalently to NHS-d-Biotin and BSA. **Methods:** A high affinity peptide specific for KDR was screened by phage display. ELISA, Gradient-ELISA, Competitive-ELISA and Blocking-ELISA were used to detect whether synthesized peptide bind to KDR. To explore whether peptide could be used to deliver agent to target site, synthesized peptide was chemically conjugated with large molecule-BSA and NHS-d-Biotin easily detected by avidin. The binding activity to KDR of chemical compound was determined by Cell-ELISA and Cell-immunohistology. **Results:** Synthesized P5 peptide having a dissociation constant (Kd) of about 168.6 nM with KDR was approximately 3 fold lower than Kd of VEGF with KDR. P5 blocked VEGF-KDR interaction while did not competes effectively with VEGF for binding KDR. The chemical conjugate, P5-BSA-Biotin, binds specifically to soluble KDR as well as KDR expressed on human endothelial cells. **Conclusion:** The peptide P5 that home to KDR expressed on tumor vasculature may also be useful in targeting therapies specifically to tumors.

[Key words] KDR; target; chemical conjugate

* 肿瘤治疗的基本方法包括化学药物治疗和放射治疗, 这 2 种治疗在临床使用上都存在毒副作用大的缺点^[1-2]。肿瘤靶向药物是近几年发展起来的一种新型药物, 它的出现解决了常规化疗药物毒副作用大的缺点, 虽然目前在临床应用上还没有普及, 但正逐渐成

为肿瘤靶向药物发展的一种趋势^[3]。血管内皮生长因子受体(kinase domain receptor, KDR)是一类特异表达

[作者简介] 武 婕(1975-), 女, 陕西榆林市人, 博士, 主管技师, 从事生物化学与分子生物学方面研究。

于新生血管内皮细胞表面的受体,它在正常成年人的血管组织中低表达或不表达,而在新生儿或肿瘤病人体内却高表达的一类受体,KDR的表达特异性使其成为肿瘤导向治疗的一个理想靶位点^[4]。以KDR为靶点设计的小分子药物SU5416和PTK787/ZZK222584都已进入临床试验阶段,并有报道SU5416在治疗某些类型的肿瘤患者中有较好的效果^[5-6]。抗KDR的鼠人嵌合单抗在动物实验中也取得较好的抑瘤效果,将单抗与放化疗药物联合治疗肿瘤效果更好^[7]。

本实验从噬菌体肽库中筛选与KDR有特异结合活性的小肽,化学合成小肽,研究小肽在体外与KDR的结合活性,及小肽作为KDR导向药物的先导物质,在体外引导与其偶联的物质与KDR的结合活性。

1 材料与方法

1.1 材料及其来源

噬菌体环7肽库和宿主菌*E. Coli* ER2738 Tc抗性购自England Biolabs公司。KDR/IgGF_C、VEGF₁₆₅购自R&D公司。Albumin, Bovine Serum V(BSA)购自Sigma公司。人IgGF_C片断购自OEM concepts公司。抗M13噬菌体抗体购自Pharmacia公司。HRP-羊抗鼠二抗购自华美公司。抗VEGF₁₆₅多抗购自武汉博士德公司。引物由Bio-Rad公司合成。抗KDR单抗购自北京肿瘤研究所。小肽由Bio-Rad公司合成,呈冻干粉末状,HPLC纯化,纯度达99%以上。生物素(NHS-d-Biotin, MW = 341.4 kD)和羰基乙二胺(EDAC, MW = 191.7 kD)均购自Sigma公司。人胚胎脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人羊膜细胞Wish细胞和人肝癌细胞株SMMC-7721,由广州军区总医院医学实验科杨太成主任和冼江技师提供。96孔酶联板、组织培养板购自Nunc公司。SABC免疫组化试剂盒购自福建迈新公司。

1.2 从噬菌体肽库中筛选与KDR高亲和力的小肽

以KDR为靶分子,利用亲和技术筛选噬菌体肽库,通过不断降低靶分子的浓度、提高洗涤液的强度和竞争性洗脱法,来获得结合力强的噬菌体克隆。从第2轮筛选的结果中,随机挑选了40个噬菌体克隆扩增,采用ELISA法鉴定它们与KDR的结合活性,挑选与KDR亲和力最高的噬菌体克隆测序,依据测序结果化学制备小肽分子。

1.3 合成小肽与KDR的结合活性测定

1.3.1 梯度ELISA检测小肽与KDR的结合活性

将小肽以每孔10 ng,100 ng,1 μg和10 μg的量在碱性环境下包被于酶联板上;依次加入400 μl封闭液、100 ng KDR 100 μl,1 μg/ml抗KDR单抗100 μl,1:

1 000倍稀释的HRP-羊抗鼠二抗100 μl和100 μl OPD及H₂O₂显色液各室温潮湿作用1 h,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪测定A₄₉₀,计算小肽与KDR的Kd。

1.3.2 VEGF与KDR的结合常数Kd值的测定

包被100 ng KDR/孔子酶联板上,封闭后,分别加入10 ng VEGF₁₆₅,20 ng VEGF₁₆₅,100 ng VEGF₁₆₅和200 ng VEGF₁₆₅到包被有KDR的孔中,再依次加入1:100倍稀释的抗VEGF₁₆₅多抗100 μl,1:1 000倍稀释的HRP-羊抗兔二抗100 μl和100 μl OPD及H₂O₂显色液各室温潮湿作用1 h,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪上测定A₄₉₀,计算VEGF₁₆₅与KDR的Kd。

1.3.3 小肽阻断VEGF₁₆₅与KDR结合的实验

包被20 ng VEGF₁₆₅/孔子酶联板,加入预先混合好的100 ng KDR与不同量小肽(100 ng KDR、100 ng KDR + 10 ng小肽、100 ng KDR + 100 ng小肽、100 ng KDR + 1 μg小肽和100 g KDR + 10 μg小肽)37℃潮湿孵育1 h,依次加入100 μg/ml抗KDR单抗,1:1 000倍稀释的HRP-羊抗鼠二抗100 μl和100 μl OPD及H₂O₂显色液,各室温潮湿缓摇1 h。待呈现黄色后,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪上测定A₄₉₀。

1.3.4 小肽与VEGF₁₆₅竞争结合KDR的实验

包被100 ng KDR/孔子酶联板上,400 μl封闭液封闭后,分别加入20 ng VEGF₁₆₅与10 μg,1 μg,100 ng,10 ng小肽的混合液,室温湿盒孵育1 h,依次加入1:100倍稀释的抗VEGF₁₆₅多抗100 μl,1:1 000倍稀释的HRP-羊抗兔二抗100 μl和100 μl OPD及H₂O₂显色液,各室温潮湿缓摇1 h。待呈现黄色后,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪上测定A₄₉₀。

1.3.5 小肽抑制VEGF₁₆₅刺激HUVEC生长活性的实验

将生长状态良好HUVEC细胞以每孔5 000个接种于96孔细胞培养板上,每孔中依次加入20 ng VEGF₁₆₅,20 ng VEGF₁₆₅ + 3.5 mg/ml P5 5 μl,20 ng VEGF₁₆₅ + 3.5 mg/ml P5 10 μl和20 ng VEGF₁₆₅ + 3.5 mg/ml P5 15 μl,每个加样重复3个孔,置于CO₂培养箱培养48~72 h,MTT法检测每孔的活细胞数目。

1.4 合成小肽作为先导物质制备化学偶联物

吸20 μl 1 g/L NHS-d-biotin(DMSO溶解)到20 μl 10 g/L透析过的BSA溶液中,室温缓摇振荡4 h,超滤离心弃掉反应底物中游离的NHS-d-biotin。加10 μl 5 g/L的小肽([小肽]:[NHS-d-biotin] = 1:1)和10 μg EDAC到上述反应底物中,并用0.1 mol/L PBS(pH7.5)定容到反应总体积为500 μl,室温缓摇过夜。超滤离心弃掉反应底物中游离的小肽,即为制备的化

学偶联物 P5-BSA-Biotin。

1.5 P5-BSA-Biotin 结合活性的测定

1.5.1 ELISA 鉴定 P5-BSA-Biotin 与 KDR 的结合活性

将 100 ng P5-BSA-Biotin 和 100 ng BSA-Biotin 包被酶联板,依次加入 400 μl 封闭液、100 μl 100 ng KDR、1 μg/ml 抗 KDR 单抗 100 μl、1:1 000 倍稀释的 HRP-羊抗鼠二抗 100 μl 和 100 μl OPD 及 H₂O₂ 显色液各室温潮湿作用 1 h,酶标仪测定 A₄₉₀。

1.5.2 细胞免疫组化检测 P5-BSA-Biotin 与细胞表面 KDR 的结合活性

让生长状态良好的 HUVEC、Wish 和 SMMC-7721 细胞贴盖玻片生长,待细胞铺满盖玻片后,用 4% 甲醛固定细胞 30 min,使细胞牢固贴于盖波片上,然后按照常规免疫组化试剂盒进行操作。

2 结果

2.1 筛选与 KDR 高亲和力的小肽

经 ELISA 鉴定(重复实验 3 次)噬菌体克隆 5 与 KDR 结合活性最强(图 1),依据测序结果化学合成噬菌体克隆 5 呈现的小肽 P5,序列为:N' A-C-H-V-I-L-H-P-R-C-G C',MW = 1 206 kD。

图 1 阳性噬菌体 ELISA 结果

Fig.1 The positive phage of ELISA results

2.2 小肽 P5 与 KDR 的结合活性测定

小肽 P5 的梯度 ELISA 结果:P5 与 KDR 的结合活性随着小肽浓度的增加而增加,P5 与 KDR 的 Kd = 168.6 nmol/L。

VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合常数测定:VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合力随着 VEGF₁₆₅ 浓度的增加而增加,双导数作图法得 VEGF 与 KDR 的 Kd = 5.36 nmol/L。

小肽阻断 VEGF₁₆₅ 与 KDR 结合实验的结果:当小肽量大于 100 ng,小肽就具备了阻断 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合活性,且随着小肽浓度的增加,KDR 与 VEGF₁₆₅ 的结合活性逐渐降低。

小肽与 VEGF₁₆₅ 竞争结合 KDR 的结果:小肽对 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合没有明显的竞争作用。

小肽抑制 VEGF₁₆₅ 刺激 HUVEC 细胞生长的结果:MTT 法结果表明小肽 P5 在培养液中,对 VEGF₁₆₅ 刺激细胞生长的活性没有影响。

2.3 化学偶联物的制备结果

NHS-d-Biotin 通过 NHS 与氨基酸中的 α-NH₂ 发生缩合反应: Biotin-NHS + NH₂-BSA → Biotin-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-BSA 催化剂 EDAC 催化 Biotin-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-BSA 的 -COOH 与 P5 的 α-NH₂ 在中性条件下生成酰胺键: Biotin-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-BSA + NH₂-P5 EDAC Biotin-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-BSA-CO-NH-肽

2.4 化学偶联物 P5-BSA-Biotin 的结合活性测定结果

2.4.1 ELISA 结果

P5-BSA-Biotin 与 KDR 结合呈阳性,BSA-Biotin 与 KDR 结合呈阴性,两者都不与封闭液结合(图 2)。

图 2 P5-BSA-Biotin 的 ELISA 结果

Fig.2 The results of P5-BSA-Biotin ELISA

2.4.2 细胞免疫组化结果

P5-BSA-Biotin 与 HUVEC 细胞和 SMMC - 7721 细胞结合呈阳性反应,与 Wish 细胞结合呈阴性反应,结果如(图 3)。

图 3 HUVEC,SMMC-7721,Wish 细胞的免疫组化结果

Fig.3 The immunohistology of HUVEC cell SMMC-7721 and Wish cell

A: HUVEC; B: SMMC-7721; C: Wish

3 讨论

血管内皮生长因子与肿瘤发生、发展密切相关,而

血管内皮生长因子受体 KDR 的表达特异性使其成为一个很好的治疗肿瘤的靶位点。以 KDR 为靶不但可从抑制新生血管形成方面来抑制肿瘤生长,而且还可从降低药物毒副作用来提高抑瘤效果^[8]。因此本课题主要是寻找一条具有特异结合 KDR 活性的小肽,将其作为靶向治疗肿瘤的先导物质制备靶向药物,为从上述两方面治疗肿瘤奠定一定基础。

经过 ELISA 验证,噬菌体克隆 5 与 KDR 结合力最强,但为了验证小肽在化学合成的状态下是否仍然能结合 KDR,依据测序结果化学合成了小肽 P5,梯度 ELISA 表明 P5 与 KDR 的结合呈浓度正相关,Kd 值显示 P5 与 KDR 的亲合力约是 VEGF₁₆₅ 与 KDR 亲和力的 1/30,说明化学合成小肽在体外也具有 KDR 的结合活性。VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合曲线表明,VEGF₁₆₅ 量在 10 ng 到 20 ng 之间时,VEGF₁₆₅ 与 KDR 结合的量效关系最明显,因此选择 20 ng VEGF₁₆₅ 做竞争结合实验。竞争结合实验中用 KDR 包板,将 VEGF₁₆₅ 和小肽 P5 混合液同时加到酶联板中,小肽对 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合没有抑制作用,说明小肽不能与 VEGF₁₆₅ 竞争结合 KDR,这一结果与细胞刺激实验结果相符,HUVEC 是 VEGF₁₆₅ 的效应细胞,培养液中加入小肽对 VEGF₁₆₅ 刺激 HUVEC 的生长没有影响。阻断实验中用 VEGF₁₆₅ 包板,将预先混合的小肽、KDR 的混合液加到酶联板中,当小肽 P5 浓度大于 100 ng/100 μ l,可以阻断 VEGF₁₆₅ 与 KDR 的结合,且阻断作用与小肽浓度呈正相关。竞争结合实验与阻断实验结果的不吻合有可能说明:VEGF₁₆₅ 与 KDR 的亲合力大于小肽 P5 与 KDR 的亲合力,但小肽 P5 与 KDR 的具体作用机理,仍需设计更精确的实验去验证。P5 在体外不能抑制 VEGF₁₆₅ 刺激细胞生长的活性,进说明 P5 虽然结合 KDR,P5 与 KDR 的结合活性使其具备了作为先导物质的可能性,为了进一步验证 P5 与其它物质偶联后是否仍能与 KDR 结

合,选择易于检测的 NHS-d-Biotin 与 P5 偶联,为了方便分离反应底物中的小分子反应产物,选择对免疫组化没有影响的大分子 BSA 进行第二步偶联来提高反应产物的分子量。ELISA 实验和细胞免疫组化结果表明偶联物不但在体外能与包被的 KDR 分子结合,而且还可以与细胞表面表达的 KDR 分子结合。小肽 P5 与其他物质化学偶联后仍能将与之偶联的物质带到 KDR 部位,下一步准备做动物实验来进一步验证 P5 在体内的导向性,体外实验初步说明噬菌体肽库筛选的 P5,有进一步深入研究的价值和作为肿瘤靶向治疗的先导物质的潜在应用性。

[参考文献]

- [1] Chari RVJ. Targeted delivery of chemotherapeutics: Tumor-activated prodrug therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 31: 89-104.
- [2] Barinaga M. Peptide-guided cancer drugs show promise in mice [J]. *Science*, 1998, 279: 323-324.
- [3] Nilsson F, Tarli L, Viti F, *et al.* The use of phage display for the development of tumor targeting agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 43: 165-196.
- [4] Waltnerberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 26988-26995.
- [5] Figg WD, Kruger EA, Price DK, *et al.* Inhibition of angiogenesis: Treatment options for patients with metastatic prostate cancer. *Invest New Drugs*, 2002, 20: 183-194.
- [6] Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target[J]. *Therapeutic focus*, 2002, 6: 1005-1024.
- [7] Klement G, Huang P, Mayer B, *et al.* Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 221-232.
- [8] Ramakrishnan S, Wild R, Nojima D. Targeting tumor vasculature using VEGF toxin conjugates[J]. *Methods Mol Biol*, 2001, 166: 219-234.

[收稿日期] 2002 - 11 - 04

[修回日期] 2003 - 01 - 15

《临床肿瘤学杂志》征订启事

《临床肿瘤学杂志》是面向全国的学术类科技期刊。本刊已被国家科技部信息中心选为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊和《万方数据——数字化期刊群》数据库来源期刊,并被北京大学图书馆《中文科技期刊目录》、《中国医学文摘(肿瘤学)》及《中国肿瘤年鉴》等收录,被 CNKI《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、CSCO 网站(www.cscoc.org.cn)选为全文收录来源期刊。本刊侧重肿瘤临床,并结合基础研究,以肿瘤专业工作者及其他医药卫生人员为主要读者对象。主要刊登肿瘤防治新成果、新进展和新经验,深受广大肿瘤研究工作者的厚爱。

《临床肿瘤学杂志》为双月刊,国际标准刊号:ISSN 1009-0460,国内统一刊号:CN32-1577/R。大十六开本,每期 80 页,采用进口铜板激光照排、胶印,国内外公开发行。邮发代号:28-267,单价 9 元,全年 54 元,全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至南京市杨公井 34 标 34 号《临床肿瘤学杂志》编辑部补订,邮编:210002,电话:(025) 6648090-615。