

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.003

· 研究快报 ·

## EGFRvⅢ特异性单链抗体的制备及其靶向性能

张庆丽<sup>1,2</sup>, 石必枝<sup>2△</sup>, 蒋华<sup>2</sup>, 周敏<sup>2</sup>, 王海<sup>2</sup>, 孔娟<sup>2</sup>, 谢海龙<sup>1</sup>(1. 南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 上海交通大学医学院上海市肿瘤研究所 癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

**专家点评** 随着生物技术的不断发展和完善, 单克隆抗体对靶分子的特异性识别及其所介导的生物学效应大大提高了疾病临床诊断的准确率和治疗效果, 作为生物药物的单克隆抗体已成为生物医药发展的主要趋势之一。通过噬菌体库技术研制成功的 TNF- $\alpha$  全人抗体 (adalimumab) 自 2002 年被美国 FDA 批准上市后, 其销售额居全球畅销药物的前十位。目前全球进行临床试验的 160 多种抗体药物中, 全人抗体占 15% 左右。如何获得特异性强的全人抗体是抗体药物研制的焦点之一, 不同学科技术的交叉和融合使抗体研制中的许多问题得到了较好的解决, 并为抗体药物工程化研制提供了坚实基础。

本期刊登的张庆丽等人的论文, 报道了一种突变型 EGFR (EGFRvⅢ) 特异性单链抗体 (EGFRvⅢ scFv) 的制备及其靶向性研究。大量研究表明, EGFRvⅢ 在乳腺癌、脑胶质瘤、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤中呈阳性表达, 并与肿瘤的侵袭及肿瘤部位血管发生的调节异常有关。作者选择肿瘤相关的 EGFRvⅢ 为目标靶点, 基于经典噬菌体展示技术构建了 EGFRvⅢ 靶向噬菌体库, 筛选得到 16 个 EGFRvⅢ-scFv 克隆, 取一克隆命名为 EGFRvⅢ-scFv-2A1, 并成功表达可溶性 EGFRvⅢ-scFv-2A1。体外实验表明, EGFRvⅢ-scFv-2A1 可特异结合高表达 EGFRvⅢ 的 HuH7-EGFRvⅢ 肝癌细胞, 但不结合高表达野生型 EGFR 的 HuH7-EGFR 细胞和亲本 HuH7 细胞。在裸鼠体内, 荧光标记的 EGFRvⅢ-scFv-2A1 可特异性结合高表达 EGFRvⅢ 的 U87MG-EGFRvⅢ 移植胶质瘤, 而不结合亲本 U87MG 移植胶质瘤, 显示出 EGFRvⅢ-scFv-2A1 体内对其靶点的高特异性结合能力, 并且 EGFRvⅢ-scFv-2A1 可被机体正常代谢。EGFRvⅢ-scFv-2A1 良好的靶向性为其携带药物进行肿瘤靶向治疗提供了可参考依据, 尽管距离临床应用还有距离, 但该研究对于我国自主研发肿瘤诊断和靶向治疗的全人抗体药物而言, 不失为一次非常有意义的探索和尝试。

军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室主任  
国家高技术研究发展计划(863 计划) 抗体研究专家  
全国中青年医学科技之星、解放军总后勤部科技银星



**[摘要]** 目的: 应用噬菌体展示技术筛选出能与 EGFRvⅢ 特异性结合的单链抗体 (single-chain Fv, scFv), 并研究其靶向性能。方法: 构建 EGFRvⅢ 特异性 scFv 噬菌体库, ELISA 筛选阳性克隆, 阳性 EGFRvⅢ-scFv 质粒重新克隆入 pCANTAB-Thrombin-His 载体, 转化 *E. coli* HB2151, IPTG 诱导可溶性 EGFRvⅢ-scFv 表达。间接免疫荧光及裸鼠活体成像技术鉴定 EGFRvⅢ-scFv 与 EGFRvⅢ 的特异性结合。结果: 成功构建了 EGFRvⅢ-scFv 噬菌体库, ELISA 筛选得到 16 个 EGFRvⅢ-scFv 克隆, 取一克隆命名为 EGFRvⅢ-scFv-2A1。EGFRvⅢ-scFv-2A1 质粒重新克隆入 pCANTAB-Thrombin-His 载体, 成功表达可溶性 EGFRvⅢ-scFv-2A1。EGFRvⅢ-scFv-2A1 在体外可特异性结合 HuH7-EGFRvⅢ 肝癌细胞, 但不结合 HuH7-EGFR 和 HuH7 肝癌细胞; 荧光标记的 EGFRvⅢ-scFv-2A1 裸鼠体内可特异性结合 U87MG-EGFRvⅢ 胶质瘤细胞移植瘤, 而不结合 U87MG 细胞移植瘤。结论: 成功制备的 EGFRvⅢ-scFv-2A1 可特异性靶向结合 EGFRvⅢ, 在肿瘤的诊断和靶向治疗中具有潜在应用价值。

**[关键词]** EGFRvⅢ; scFv; 脑胶质瘤; 肝癌; 移植瘤; 靶向治疗; 活体成像

**[中图分类号]** R392.1; R730.51; R739.41; R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2011)01-0011-04

**[基金项目]** 卫生部“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2009ZX09103-701)。Project supported by the Major Science and Technology Special Program for “Significant New Drug Creation” of Ministry of Health (No. 2009ZX09103-701)

**[作者简介]** 张庆丽 (1983 -), 女, 山东省寿光市人, 硕士生, 主要从事肿瘤抗体治疗研究; 石必枝 (1973 -), 女, 安徽省太湖市人, 硕士, 副研究员, 主要从事肿瘤抗体药物的研发;  $\Delta$  为并列第一作者

**[通信作者]** 谢海龙 (XIE Hai-long, corresponding author)。E-mail: Xhl0078@sina.com.cn

**[网络出版]** 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1122.034.html>

## Preparation of EGFRvⅢ specific single-chain Fv and its targeting activity

ZHANG Qing-li<sup>1,2</sup>, SHI Bi-zhi<sup>2Δ</sup>, JIANG Hua<sup>2</sup>, ZHOU Min<sup>2</sup>, WANG Hai<sup>2</sup>, KONG Juan<sup>2</sup>, XIE Hai-long<sup>1</sup>( 1. Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To screen for EGFRvⅢ specific single-chain Fv ( scFv ) by phage display library and to examine its targeting activity. **Methods:** EGFRvⅢ specific scFv phage library was constructed, and the positive EGFRvⅢ-scFv clone was screened by ELISA. After cloned into pCANTAB-Thrombin-His vector, EGFRvⅢ-scFv plasmid was transformed into *E. coli* HB2151, and soluble EGFRvⅢ-scFv was induced by IPTG. The specific binding activity of EGFRvⅢ-scFv with EGFRvⅢ was studied by indirect immunofluorescence and *in vivo* imaging. **Results:** An EGFRvⅢ-scFv phage library was successfully constructed and 16 EGFRvⅢ-scFv positive clones were identified by ELISA. One clone named EGFRvⅢ-scFv-2A1 was re-cloned into pCANTAB-Thrombin-His vector and soluble EGFRvⅢ-scFv-2A1 was successfully obtained. EGFRvⅢ-scFv-2A1 could specifically bind with HuH7-EGFRvⅢ and HuH7 hepatoma cells, but not with HuH7-EGFR and HuH7 cells *in vitro*. *In vivo*, fluorescence-labeled EGFRvⅢ-scFv-2A1 could only bind with U87MG-EGFRvⅢ glioma cells implanted tumor tissues, but not with that of U87MG cells implanted ones. **Conclusion:** The prepared EGFRvⅢ-scFv-2A1 can specifically bind with EGFRvⅢ, and it might be used for diagnosis and targeted therapy of tumors.

[ **Key words** ] EGFRvⅢ; scFv; glioma; hepatoma; implanted tumor; targeted therapy; *in vivo* imaging

[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 11-13 ]

表皮生长因子受体突变体Ⅲ( epidermal growth factor receptor variant type Ⅲ, EGFRvⅢ )是表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR )最常见的缺失性突变体,缺失了2~7号外显子,在脑胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤细胞中表达,在正常组织中尚未检测到存在<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-5]</sup>发现,EGFRvⅢ可促进正常组织和细胞的增殖,并与肿瘤的侵袭及血管发生的调节异常有关。针对EGFRvⅢ的单克隆抗体已经应用于临床,但是单克隆抗体存在分子量大、免疫原性强等缺点<sup>[6-7]</sup>。

单链抗体( single-chain Fv, scFv )是利用基因工程技术将免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区通过一段肽链连接成重组蛋白而得到的,是与抗原结合的小分子抗体片段,其免疫原性较小,已逐渐成为抗体靶向治疗的重要研究方向<sup>[8]</sup>。噬菌体抗体库( phage antibody library )技术是将体外克隆的抗体基因片段插入噬菌粒载体,将抗体与噬菌体外壳蛋白相融合,并展示于噬菌体表面,然后用靶抗原筛选获得针对该抗原的特异性重组噬菌体抗体。利用此技术能获得特异性强的靶向抗体分子<sup>[9-10]</sup>。本研究通过噬菌体展示技术筛选得到针对EGFRvⅢ胞外段的高亲和力特异性scFv,观察该scFv在体外细胞水平及体内环境中与EGFRvⅢ的特异性结合活性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要实验材料

噬菌粒pCANTAB5E-Thrombin由pCANTAB-5E改造而来,在pCANTAB-5E限制性酶切位点Not I之后插入了凝血蛋白酶切割位点的序列。pCANTAB5E-Thrombin-His是将pCANTAB5E-Thrombin的E-tag标签改造为His标签。菌种*E. coli* HB2151、*E. coli* ER2738和表达重组噬菌体细胞Hpd3、肝癌细胞系HuH7、脑胶质瘤细胞系U87MG为本实验室保存,稳定转染EGFR、EGFRvⅢ的细胞株HuH7-EGFR、HuH7-EGFRvⅢ和U87MG-EGFRvⅢ细胞由本实验室经慢病毒感染所得<sup>[11]</sup>。裸鼠,雌性,体重15~18g,SPF环境饲养,由上海交通大学上海市肿瘤研究所动物中心提供[实验动物合格证号为SCXK(沪)2007-0001]。

所有引物均由Invitrogen公司合成。Anti-E-tag抗体、荧光素Cy5.5<sup>TM</sup> Mono NHS ester购自Amersham Biosciences公司,限制性内切酶Sfi I、Not I和T4 DNA聚合酶均购自NEB公司,DNA marker DL2000、IPTG购自TaKaRa公司。免疫抗原肽PEP3(LEEKKGNYVVT DHC)由吉尔生化公司合成,EGFRvⅢ重组蛋白由本实验室表达鉴定<sup>[12]</sup>。抗体纯化柱Ni Sepharose 4 Fast Flow购自GE公司。

## 1.2 EGFRv III 单链抗体库的构建

EGFRv III 单链抗体(EGFRv III-scFv)库的构建参考文献[13]。简言之,将针对 EGFRv III 突变位点设计合成的抗原 PEP3-KLH 与完全弗氏佐剂混合后,皮下多点免疫 BALB/c 小鼠,3 次免疫后取小鼠脾脏抽提总 RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,Heavy primers、Light primers 为引物扩增  $V_H$ 、 $V_L$  基因,再 PCR 拼接成 scFv 片段,经 *Sfi* I 和 *Not* I 酶切,同时酶切载体 PCANTAB-Thrombin,连接后转化感受态细胞 Hpd3,加入含氨苄青霉素 100  $\mu\text{g/L}$  和卡那霉素 50  $\mu\text{g/L}$  的  $2 \times \text{YT}(2 \times \text{YT-AK})$  丰富培养基中,37  $^\circ\text{C}$  培养 1 h,梯度稀释涂板过夜,计数 EGFRv III-scFv 库的滴度,其余全部涂大皿培养过夜。次日刮下皿中细菌共 3 ml,取 0.5 ml 加入到 300 ml  $2 \times \text{YT-AK}$  中(培养至  $D_{600}$  值小于 0.1),37  $^\circ\text{C}$  过夜培养,离心收集上清。吸取上清用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤器过滤,即为初级 EGFRv III-scFv 库。另外,以 S1、S6 为引物,挑取梯度稀释涂板的单克隆作菌落 PCR,鉴定 EGFRv III-scFv 库的阳性率。

## 1.3 EGFRv III-scFv 的筛选<sup>[14]</sup>

用 PBS 稀释 PEP3-BSA,包被免疫管,2  $\mu\text{g/管}$ ,4  $^\circ\text{C}$  过夜。5% 奶粉封闭,37  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h,加入经封闭缓冲液稀释的 EGFRv III-scFv 重组噬菌体  $1 \times 10^{12}$  个,37  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h。0.5% PBST 和 PBS 各洗 20 次,加入 Thrombin 2 U,酶切结合的 EGFRv III-scFv,使结合的噬菌体抗体通过酶切洗脱下来,37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。将对数生长期的 EGFRv III-scFv 噬菌体超感染 Hpd3 细胞,加入免疫管中,37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。4 000  $\times g$  离心 10 min,用  $2 \times \text{YT-AK}$  培养基洗涤 1 次,再用 1 ml 重悬,取 1  $\mu\text{l}$  重悬液稀释滴定计数 EGFRv III-scFv 噬菌体,扩增准备下一轮筛选。重复筛选 2 轮后,第 4 轮筛选 EGFRv III-scFv 噬菌体感染菌 *E. coli* ER2738,进行诱导 EGFRv III-scFv 表达。

## 1.4 ELISA 检测 EGFRv III-scFv 表达阳性克隆

挑取 4 轮筛选后的 EGFRv III-scFv 克隆,接种于含 2% 葡萄糖的  $2 \times \text{YT-AK}$ ,30  $^\circ\text{C}$ 、200  $\times g$  摇床培养过夜,再以 1:100 重新接种于 200 ml  $2 \times \text{YT-AK}$  中,至  $D_{600}$  值约 0.5 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30  $^\circ\text{C}$ 、200  $\times g$  诱导过夜。取上清 50  $\mu\text{l}$  加入到分别包被 50 ng/孔 PEP-3-BSA 蛋白和 EGFRv III 胞外区重组蛋白的 96 孔板中,37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。Anti-E-tag 为一抗,1:1 000 稀释,50  $\mu\text{l/孔}$ ,37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h,HRP 标记羊抗鼠 1:1 000 稀释,50  $\mu\text{l/孔}$ ,37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。100  $\mu\text{l/孔}$  ABTS 显色,37  $^\circ\text{C}$  孵育 5 min。BSA 作为阴性对照。酶标仪测定  $D_{405}$  值,设定比阴性对照值

高 3 倍以上为阳性。ELISA 检测阳性 EGFRv III-scFv 克隆送 Invitrogen 公司测序。

## 1.5 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测可溶性 EGFRv III-scFv 的表达

EGFRv III-scFv 阳性克隆抽提质粒后重新改造为 pCANTAB5E-Thrombin-His,转化 *E. coli* HB2151,挑取单克隆,30  $^\circ\text{C}$ 、200  $\times g$  培养过夜,至  $D_{600}$  值为 0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30  $^\circ\text{C}$  诱导 8 h,12 000  $\times g$  离心,取上清硫酸铵沉淀后透析,再过 Ni Sepharose 4 Fast Flow 纯化可溶性 EGFRv III-scFv,通过 SDS-PAGE 分析表达情况。以 HRP 标记的 anti-His 抗体为一抗,对可溶性 EGFRv III-scFv 进行 Western blotting 鉴定。

## 1.6 间接免疫荧光鉴定 EGFRv III-scFv 特异靶向性

HuH7, HuH7-EGFR, HuH7-EGFRv III 细胞接种 24 孔板,第 2 天细胞生长至 70% 左右,用 4% 多聚甲醛和 0.1% Tritonx-100 固定通透,0.5% BSA 封闭。筛选得到的 EGFRv III-scFv 作为一抗,1:200 稀释室温孵育 2 h, FITC 标记的 anti-His 作为二抗,1:50 稀释室温孵育 30 min。PBS:甘油为 1:9 的封片剂封片,每片 30  $\mu\text{l}$ 。荧光显微镜下观察结果。

## 1.7 活体成像实验研究裸鼠体内 EGFRv III-scFv 的特异靶向性

取 4 只裸鼠,每只裸鼠分别左侧腋下皮下注射  $6 \times 10^6$  个 U87MG 细胞,右侧腋下皮下注射相同数量 U87MG-EGFRv III 细胞,培养 2 周成瘤,肿瘤直径不超过 1.5 cm。每只裸鼠尾静脉注射 60  $\mu\text{g}$  荧光素 Cy5.5<sup>TM</sup> Mono NHS ester 标记的 EGFRv III-scFv,24 h 后,活体成像系统 EGFRv III-scFv 在体内与 U87MG-EGFRv III 细胞的结合情况。

## 2 结果

### 2.1 EGFRv III-scFv 库的构建及其初步鉴定

经 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切的 EGFRv III 片段和 pCANTAB-Thrombin 载体以摩尔比 5:1 进行连接,电转化 Hpd3 细胞,获得初级 EGFRv III-scFv 噬菌体库,库容为  $2.23 \times 10^8$ 。随机挑取 15 个克隆,以 S1、S6 为引物,对菌落进行 PCR 扩增,均能扩增出分子量大约为 900 bp 的 EGFRv III 片段(图 1)。

### 2.2 EGFRv III-scFv 库的 ELISA 筛选和测序鉴定

以 PEP3-BSA 和 EGFRv III 重组蛋白为抗原对 EGFRv III-scFv 噬菌体库进行筛选,第 4 轮筛选后挑取 46 个克隆进行 ELISA 检测。酶标仪测定显示,经 PEP3-BSA 筛选和 EGFRv III 重组蛋白筛选,同时有 27 个 EGFRv III-scFv 克隆的  $D_{405}$  值均高于阴性对照

的 3 倍以上, 阳性率为 58.7%( 图 2 )。

取筛选后 ELISA 检测值都高于 1.0 的 16 个 EGFRv III -scFv 克隆进行序列测定, 结果表明序列均一致。取其中一个 EGFRv III -scFv 克隆为代命名 EGFRv III -scFv-2A1, 氨基酸序列见表 1。

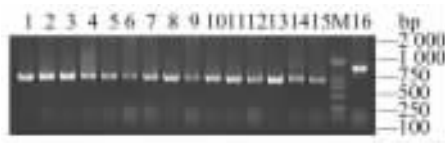


图 1 PCR 鉴定初级 EGFRv III -scFv 噬菌体库  
Fig. 1 Identification of primary EGFRv III -scFv phage library by PCR

M: Marker; 1-15: PCR products of 15 clones from primary EGFRv III -scFv phage library; 16: Self-linkage vector control

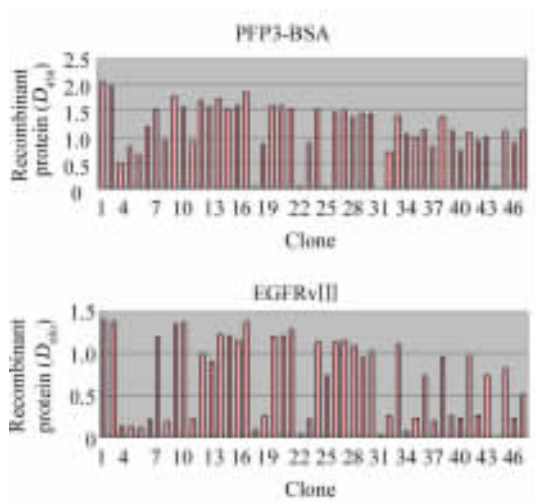


图 2 EGFRv III -scFv 库的 ELISA 分析  
Fig. 2 EGFRv III -scFv library analyzed by ELISA

### 2.3 EGFRv III -scFv-2A1 的可溶性表达

将 EGFRv III -scFv-2A1 质粒重新克隆入 pCANT-AB-Thrombin-His 载体, 转化 *E. coli* HB2151, IPTG 诱导, 上清沉淀后经 Ni Sepharose 4 Fast Flow 纯化, SDS-PAGE 分析, 结果显示在 31 000 处有条带( 图 3A ), 与预测 EGFRv III -scFv 相对分子质量相符。Western blotting 结果显示, 在 31 000 处有特异条带, 与 EGFRv III -scFv 相对分子质量大小相符( 图 3B )。

### 2.4 EGFRv III -scFv-2A1 与 HuH7-EGFRv III 细胞的特异性靶向结合

HuH7、HuH7-EGFR、HuH7-EGFRv III 细胞接种 24 孔板, 细胞生长至 70% 左右, 固定通透后封闭。用 EGFRv III -scFv-2A1 作一抗, FITC 标记的 anti-His 作为二抗, 间接免疫荧光结果显示, HuH7-EGFRv III

细胞荧光较强, 而 HuH7 细胞和 HuH7-EGFR 细胞几乎无荧光( 图 4 )。结果提示, 体外 EGFRv III -scFv-2A1 可特异性靶向结合 HuH7-EGFRv III 细胞。

表 1 EGFRv III -scFv-2A1 的氨基酸序列

Tab. 1 Amino acid sequence of EGFRv III -scFv-2A1

| Amino acid sequence   | Length( aa ) |
|---|--------------|
| VKLLFAIPLVVPFYAAQPAMAQVQLKQSGA<br>ELVKPGASVKLSCKASGYTFTKYWMHWIK     | 60           |
| QRPGQGLEWIG E INP SNGRANYNEKFKRKA<br>TLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTM | 120          |
| GDYGYRYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGG<br>GGSDIVLTQSPASLA VSLGQRATISCKASQ    | 180          |
| SVDYDGD SYMNWYQKPGQPPKLLIYAASNL<br>ESGIPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDA      | 240          |
| ATYYCQQSNE DPWTFGGGTKLEIKRAALVP<br>RGSWAAGAPVYPDPLEPRAA             | 292          |

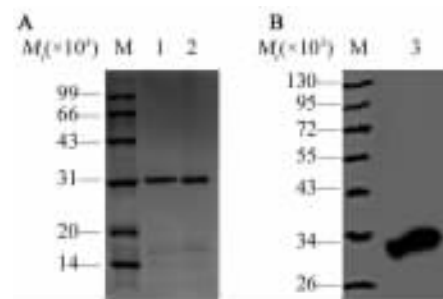


图 3 EGFRv III -scFv-2A1 的可溶性表达与 Western blotting 鉴定

Fig. 3 Expression of soluble EGFRv III -scFv-2A1 and its identification by Western blotting analysis

A: SDS-PAGE; B: Western blotting; M: Marker; 1: Analysis of EGFRv III -scFv-2A1 by SDS-PAGE; 2: Analysis of EGFRv III -scFv-2A1 by Western blotting

### 2.5 活体成像技术可观察到体内 EGFRv III -scFv-2A1 与 U87MG-EGFRv III 细胞的特异性靶向结合

每只裸鼠左侧皮下注射 U87MG 细胞, 右侧注射 U87MG-EGFRv III 细胞, 2 周后成瘤。每只裸鼠尾静脉注射荧光标记的 EGFRv III -scFv-2A1, 24 h 后, 活体成像系统观察荧光标记的 EGFRv III -scFv-2A1 在体内与 U87MG-EGFRv III 细胞的结合情况。结果显示, EGFRv III -scFv-2A1 主要结合在 EGFRv III 过表达的 U87MG-EGFRv III 移植瘤组织中, 而 U87MG 细

胞移植瘤组织几乎没有荧光,而且荧光标记 EGFRvⅢ-scFv-2A1 主要从膀胱途径代谢(图5)。

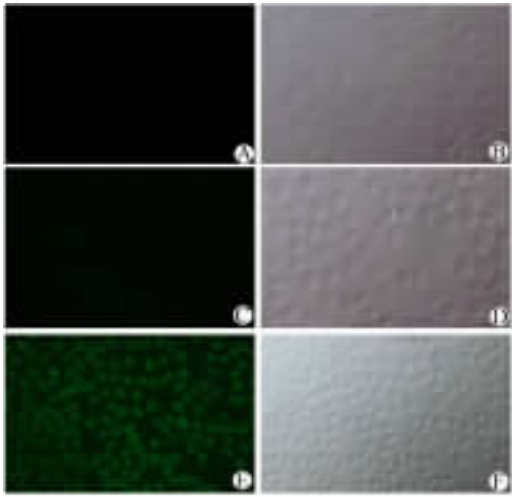


图4 免疫荧光检测 EGFRvⅢ-scFv-2A1 与 HuH7-EGFRvⅢ细胞的结合(×400)

Fig.4 Immunofluorescence analysis of EGFRvⅢ-scFv-2A1 binding with HuH7-EGFRvⅢ cells(×400)

A, B: HuH7 cells; C, D: HuH7-EGFRvⅢ cells;  
E, F: HuH7-EGFRvⅢ cells

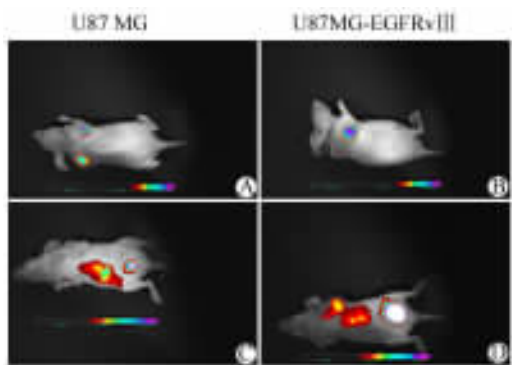


图5 活体成像研究体内 EGFRvⅢ-scFv-2A1 与 U87MG-EGFRvⅢ移植瘤组织的结合

Fig.5 Binding of EGFRvⅢ-scFv-2A1 with U87MG-EGFRvⅢ implanted tumor tissues by *in vivo* imaging

A, B: Binding of EGFRvⅢ-scFv-2A1 with U87MG-EGFRvⅢ implanted tumor tissues *in vivo* (left limb: U87MG cells; right limb: U87MG-EGFRvⅢ cells); C, D: EGFRvⅢ-scFv-2A1 metabolized through bladder

### 3 讨论

PEP-3 是针对 EGFRvⅢ突变融合区部分设计的 13 个氨基酸多肽序列,具有很强的特异性<sup>[15]</sup>。本研究通过用 PEP-3-KLH 免疫小鼠,然后构建抗 EGFRv

Ⅲ的噬菌体 EGFRvⅢ-scFv 库,并用 PEP-3-BSA 和 EGFRvⅢ重组蛋白对所构建的 EGFRvⅢ-scFv 库进行筛选,获得了针对 EGFRvⅢ的特异性 EGFRvⅢ-scFv。ELISA 筛选获得 16 个阳性 EGFRvⅢ-scFv 克隆,取其中一个为代表命名为 2A1(即 EGFRvⅢ-scFv-2A1)。实验过程中采用了本实验室自主构建的重组噬菌体细胞 Hpd3,该细胞缺失了噬菌体基因Ⅲ,使噬菌粒编码的 PⅢ蛋白成为唯一来源,避免了野生型 PⅢ的表达,从而能更高效地筛选到高效价的 EGFRvⅢ-scFv<sup>[14]</sup>。免疫荧光和体内实验结果分别显示,EGFRvⅢ-scFv-2A1 可特异性结合高表达 EGFRvⅢ的 HuH7-EGFRvⅢ和 U87MG-EGFRvⅢ细胞。

活体成像技术与传统技术相比,能够对同一实验对象进行不同时间点的观察,减少实验动物个体间的差异,所得结果直观可靠,能够反映细胞或基因表达的空间和时间分布,了解活体动物体内的相关基因的功能和相互作用<sup>[16]</sup>,已成为研究动物体内细胞及分子事件的有力手段<sup>[17]</sup>。本研究通过活体成像研究,证明了 EGFRvⅢ-scFv-2A1 在体内与 U87MG-EGFRvⅢ细胞移植瘤的特异性结合,并且直观地观察到了 EGFRvⅢ-scFv-2A1 在体内的代谢途径,为进一步研究提供了重要的实验依据。

针对 EGFRvⅢ的单克隆抗体已应用于临床。但是由于抗体本身存在分子量较大,免疫原性强等缺点,使得其临床应用具有一定的局限性。而 EGFRvⅢ-scFv 的免疫原性较小,用于肿瘤诊断和治疗时组织穿透能力强,体内成像时本底较低。EGFRvⅢ-scFv 偶联效应分子或者药物后,能够应用于肿瘤及其他疾病的分子靶向治疗<sup>[18]</sup>。本研究筛选出的 EGFRvⅢ-scFv-2A1 可特异性靶向结合高表达 EGFRvⅢ的 HuH7-EGFRvⅢ和 U87MG-EGFRvⅢ细胞,此单链抗体在肿瘤的影像诊断和靶向治疗中具备潜在的应用价值。

### [参考文献]

- [1] Pedersen NW, Meltorn M, Damstrup L, et al. The type Ⅲ epidermal growth factor receptor mutation [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12(6): 745-760.
- [2] Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8(2): 83-96.
- [3] Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvⅢ gene [J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(10): 1251-1259.
- [4] Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced

- tumorigenicity [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91( 16 ): 7727-7731.
- [ 5 ] Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma [ J ]. Ped Neu, 1996, 24( 1 ): 41-49.
- [ 6 ] Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104( 10 ): 4071-4076.
- [ 7 ] Fukai J, Nishio K, Itakura T, et al. Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III [ J ]. Cancer Sci, 2008, 99( 10 ): 2062-2069.
- [ 8 ] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains [ J ]. Nat Biotech, 2005, 23( 9 ): 1126-1136.
- [ 9 ] Marty C, Langer-Machova Z, Sigrist S, et al. Isolation and characterization of a EGFRv III-scFv antibody specific for tumor endothelial marker 1 ( TEM1 ), a new reagent for targeted tumor therapy [ J ]. Cancer Lett, 2006, 235( 2 ): 298-308.
- [ 10 ] Kurosawa G, Sumitomo M, Ukai Y, et al. Selection and analysis of anti-cancer antibodies for cancer therapy obtained from antibody phage library [ J ]. Cancer Sci, 2011, 102( 1 ): 175-181.
- [ 11 ] 王华茂. 抗 EGFRv III 单克隆抗体制备及其在肝癌治疗中的应用 [ D ]. 上海: 复旦大学医学院, 2009.
- [ 12 ] 江秀玲, 毕富勇, 王华茂, 等. 稳定表达 EGFR v III ex 的 NIH3T3 细胞株的建立及免疫原性分析 [ J ]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23( 7 ): 612-615.
- [ 13 ] 周敏, 石必枝, 顾健人, 等. 抗 EGFRv III 噬菌体抗体库的构建和筛选 [ J ]. 中国生物工程杂志, 2010, 30( 4 ): 1-7.
- [ 14 ] Shi B, Wang H, Guo S, et al. Protein III -based single-chain antibody phage display using bacterial cells bearing an additional genome of a gene-III-lacking helper phage [ J ]. Biotechniques, 2007, 42( 6 ): 760-765.
- [ 15 ] Heimberger AB, Crotty LE, Archer GE, et al. Epidermal growth factor receptor v III peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors [ J ]. Clin Cancer Res, 2003, 9( 11 ): 4247-4254.
- [ 16 ] 闫明霞, 刘蕾, 樊德水, 等. 人肺癌裸小鼠模型活体成像的动态观察 [ J ]. 肿瘤, 2008, 28( 10 ): 833-836.
- [ 17 ] Garcia T, Jackson A, Bachelier R, et al. A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis [ J ]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25( 1 ): 33-42.
- [ 18 ] Miller BR, Demarest SJ, Lugovskoy A, et al. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies [ J ]. Protein Eng Des Sel, 2010, 23( 7 ): 549-557.
- [ 收稿日期 ] 2010 - 12 - 15 [ 修回日期 ] 2011 - 01 - 20  
[ 本文编辑 ] 韩 丹

## · 科技动态 ·

### Mucin 1 的异常表达: 炎症性肠病和胰腺炎的桥梁

在美国超过 100 万人患有炎症性肠病( inflammatory bowel disease, IBD ), 我国 IBD 的发病率也逐年升高。20% ~ 40% 的 IBD 患者伴有肠外并发症( extraintestinal manifestation, EIM ), 增加了患者的病死率。EIM 以胰腺炎和胰腺功能不全较为常见, IBD 患者并发胰腺炎的原因还不是十分清楚, 甚至有学者认为胰腺炎并非真正的 EIM, 可能是治疗药物的毒性作用。该文报道了 IBD 患者并发胰腺炎的可能机制。

Mucin 1 是一种广泛表达于导管上皮细胞的跨膜糖蛋白, 其多肽骨架由多个串联的重复序列( variable number of tandem repeats, VNTR ) 组成。正常导管上皮细胞中 Mucin 1 的 VNTR 结构域高度糖基化, 而 IBD 患者结肠上皮组织中高表达一种 VNTR 结构域低糖基化的突变型 Mucin 1。

该研究从突变型 Mucin 1 特异性 TCR 转基因小鼠中分离出突变型 Mucin 1 特异性 T 细胞( 简称 MT 细胞 ), 体外全氟聚醚( perfluoropolyether, PEPE ) 标记后, 回输至正常或 IBD 小鼠, 通过核磁共振( nuclear magnetic resonance, NMR ) 光谱法定量分析 MT 细胞在小鼠体内的分布情况。结果发现, IBD 小鼠结肠组织中 MT 细胞数量显著高于正常小鼠结肠组织中 MT 细胞的数量。有趣的是, IBD 小鼠中, 回输的 MT 细胞不仅定位至结肠组织, 还有较多 MT 细胞定位至胰腺组织, 胰腺是突变型 Mucin 1 在肠外的另一个表达部位。进一步免疫组化染色的结果也证实了上述现象。因此, 胰腺导管上皮细胞中突变型 Mucin 1 的高表达和由此导致的炎症反应可能是 IBD 并发胰腺炎的重要因素, 胰腺炎并非 IBD 治疗过程中药物的毒性作用。

总之, 小鼠 IBD 中突变型 Mucin 1 的高表达与 EIM( 如胰腺炎 ) 密切相关。正常情况下, Mucin 1 位于结肠导管上皮细胞的顶部, 不能活化免疫系统, 但随着 IBD 炎症的进展, 肠道炎症、损伤、修复的反复循环, 新生的导管上皮细胞会失去极性, 表达低糖基化突变型 Mucin 1。这种低糖基化突变可能暴露了 Mucin 1 蛋白的抗原表位, 通过活化免疫细胞, 分泌大量炎症因子, 如 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。这些炎症因子作用于机体其他部位( 如胰腺 ), 导致胰腺组织中 Mucin 1 的低糖基化突变和高表达, 参与胰腺炎的发生。此外, 由于 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等炎症因子参与 IBD 以及伴发的胰腺炎, 因此, 拮抗 TNF- $\alpha$  等可能是治疗 IBD 及 EIM 的新策略。

[ 陈佩钦 摘译, 徐红梅 审阅. Kadayakkara DK, Beatty PL, Turner TMS, et al. Pancreas, 2010, 39( 4 ): 510 - 515 ]