

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.002

· 研究快报 ·

多靶向 VEGF-EGFR 的 Fc 融合蛋白 EVP1 的构建及其结合特性

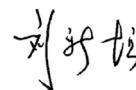
左明辉¹, 金华君², 黎江², 易中梅³, 叶真龙¹, 钱其军^{1,2} (1. 浙江理工大学 新元医学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310018; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 基因—病毒治疗研究室, 上海 200438; 3. 第二军医大学 图书馆, 上海 200433)

创新点评: 一种富有潜力的多靶向抗体类肿瘤治疗药物

EGFR 家族与 VEGF 通路与恶性肿瘤的增殖、存活、转移等密切相关, 是肿瘤靶向治疗非常重要的两类靶标。目前, 已有 4 种针对它们其中之一的单抗经 FDA 批准上市销售。其中, VEGF 单抗 bevacizumab (商品名 Avastin) 市场巨大, 2010 年销售额达 64.6 亿美元。据预测, 到 2014 年, 其年销售额将接近 100 亿美元, 成为全球销售额最高的药物。鉴于这两类通路的重要性, 及它们之间存在的广泛交叉, 众多研究者致力于针对它们多者的抗体及抗体衍生物的研发。2009 年与 2011 年, 生物制药巨头 Genentech 公司基于“two-in-one”策略, 相继开发了同时靶向 VEGF 与 HER2, 以及同时靶向 EGFR 与 HER3 的双特异性抗体, 疗效明显优于针对单个靶标的单抗, 在国际上引起强烈反响。

本期刊登的左明辉等人的论文, 报道了一种能同时结合 VEGF、EGFR、HER2 的 Fc 融合蛋白。作者将高效结合 VEGF 的 FLT1 的特定结构域(第 2 个 IgG 样结构域)、高效结合 EGFR 家族成员的 herstatin C 末端的 79 个氨基酸(Her-in)与经点突变改造后的人 IgG1 Fc 融合。实验表明, 构建获得的融合蛋白 EVP1 与 VEGF、EGFR、HER2 的亲合力常数 K_d 分别达到 0.63、4.55、18.7 nmol/L, EVP1 与 VEGF 的亲合力高于 Avastin ($K_d \approx 1.8$ nmol/L), 与 EGFR、HER2 的亲合力分别略低于 Erbitux ($K_d \approx 0.39$ nmol/L)、Herceptin ($K_d \approx 5$ nmol/L)。EVP1 与“two-in-one”策略构建的双特异性抗体相比, 结合不同靶标的单元相对独立, 在结合一类抗原(如 VEGF)后仍保持结合另一类抗原(如 EGFR)的活性, 有望具有更强的协同效应; 结合的抗原范围更广(包括 VEGF, 及除 HER3 之外的所有 EGFR 家族成员), 适合几乎所有类型肿瘤的治疗; 选用的 Fc 段经过功能区的突变改造, 能介导更强的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC), 具有更长的体内半衰期; 构成融合蛋白的各肽段均来源于人体天然蛋白, 免疫原性低, 不易产生中和抗体。因而, 该融合蛋白具有潜在的抗肿瘤临床应用价值。然而, 目前的结果尚未反映该融合蛋白的体内或体外的抗肿瘤疗效, 有待在后续工作中作重点探讨。总体而言, 该论文提供了一种多靶向 VEGF 与 EGFR 的新药物设计策略, 是一篇不错的探索性论文。

中国科学院院士



[摘要] 目的: 构建能同时靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的 Fc 融合蛋白 EVP1, 并分析其多靶向结合功能, 为后续的抗肿瘤研究奠定基础。方法: 利用 PCR 方法扩增 Herin 基因和 Flt-1 基因 Ig 样第二结构域(Flt-1D2)编码序列, 全序列合成带有点突变的人 IgG1 的 Fc 段编码序列, 利用重组 PCR 方法将 Herin、Flt-1D2 和 Fc 基因依次连接, 构成 Herin-Flt-1D2-Fc 基因(命名为 EVP1 基因)。再将 EVP1 编码基因插入质粒 pDC659, 构建携带 EVP1 基因的腺病毒穿梭质粒 pDC659-EVP1。将质粒 pDC659-EVP1 与腺病毒骨架载体 pPE3-F35 共转染至 293 细胞, 包装获得表达 EVP1 融合蛋白的非增殖型腺病毒 Ad5/35-EVP1, 经 PCR 鉴定, 扩增、纯化病毒, 采用 50% 组织培养感染剂量(TCID₅₀)法测定

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81001013); 上海市优秀学科带头人基金资助项目(No. 10XD1406500)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001013), and the Excellent Academic Leaders of Shanghai (No. 10XD1406500)

[作者简介] 左明辉(1986-), 男, 湖南省永州市人, 硕士生, 主要从事分子肿瘤方面的研究。E-mail: exuberant@yahoo.com

[通信作者] 钱其军(QIAN Qi-jun, corresponding author), E-mail: qianqj@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120529.1703.007.html>

病毒滴度。用 MOI = 11 的腺病毒 Ad5/35-EVP1 感染 293 细胞, 4 d 后收集细胞培养上清液。采用硫酸铵盐析法和 Protein G 亲和层析对融合蛋白 EVP1 进行纯化。Western blotting 检测细胞培养上清液中融合蛋白 EVP1 的表达, ELISA 法检测细胞培养上清液中融合蛋白 EVP1 的含量。采用间接免疫荧光实验和 Octet Red 96 生物分子相互作用分析仪对融合蛋白 EVP1 的靶向结合特性进行定性和定量检测。**结果:**成功包装出腺病毒 Ad5/35-EVP1, 滴度为 5.4×10^9 PFU/ml。腺病毒 Ad5/35-EVP1-293 细胞系统能有效表达融合蛋白 EVP1; MOI = 11 时, 融合蛋白 EVP1 的表达量为 $(1\ 613.94 \pm 24.65)$ ng/ml。蛋白 EVP1 与高表达 EGFR 的 A431 细胞和高表达 HER2 的人卵巢癌 SK-OV-3 细胞有良好的结合能力, 与抗原 EGFR、HER2、VEGF 结合的亲和力常数 K_d 分别为 4.55、18.70 和 0.63 nmol/L。**结论:**成功制备多靶向融合蛋白 EVP1, 它能高效结合 VEGF、EGFR 受体家族成员, 具有良好的抗肿瘤临床应用价值。

[关键词] 肿瘤; 靶向治疗; 融合蛋白; 血管内皮生长因子; 表皮生长因子受体; Fc 段; 亲和力

[中图分类号] R735.7; R730.51 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2012)03-0239-08

Construction of Fc fusion protein EVP1 targeting members of VEGF-EGFR and its binding affinity

ZUO Ming-hui¹, JIN Hua-jun², LI Jiang², YI Zhong-mei³, YE Zhen-long¹, QIAN Qi-jun^{1,2} (1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 2. Laboratory of Gene-Virology Therapy, Easten Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 3. Library of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the Fc fusion protein EVP1 with high affinity to bind epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and to analyze its multi-target binding affinity for further study of antitumor therapy. **Methods:** The coding sequences of *Herin* and *FLT-1D2* (the second Ig-like domain of *FLT-1* gene) were amplified by PCR individually, and joined to synthesize human IgG1 Fc fragment with point mutations via overlap PCR. Then, the fused open reading frame of *Herin-Flt-1D2-Fc* (named as *EVP1*) was inserted into pDC659 plasmid, an adenoviral shuttle vector. The plasmid of pDC659-EVP1 and pPE3-F35 were co-transfected into 293 cells to package Ad5/35-EVP1, a replication-incompetent adenovirus carrying the *EVP1* coding gene. After identification, amplification, purification and titration determination, the recombinant virus Ad5/35-EVP1 was used to transfect 293 cells at a MOI = 11. Four days post transfection, culture supernatant was collected to enrich and purify the fusion protein EVP1 through ammonium sulfate salting out method and protein G affinity chromatography. Subsequently, Western blotting and ELISA were performed to detect the expression of EVP1. Finally, the binding affinities of EVP1 to EGFR, HER2 and VEGF were both qualitatively identified via indirect immunofluorescent assay and quantitatively determined on the Octet Red 96 Biomolecular Interaction Analysis System. **Results:** The recombinant adenovirus Ad5/35-EVP1 was constructed successfully, and its titer was 5.4×10^9 PFU/ml. With the expression system of Ad5/35-EVP1 and 293 cells, the fusion protein EVP1 could be effectively produced with the expression level being $(1\ 613.94 \pm 24.65)$ ng/ml when MOI = 11. The obtained EVP1 could bind EGFR on A431 cells and HER2 on SK-OV-3 cells with high affinity, and the affinity constants K_d of EGFR, HER2 and VEGF were 4.55, 18.70, and 0.63 nmol/L, respectively. **Conclusion:** The fusion protein EVP1 was constructed successfully, and EVP1 has high binding-affinity to VEGF and EGFR family members, showing a good clinical potent in targeted cancer therapy.

[Key words] tumor; targeted therapy; fusion protein; vascular endothelial growth factor (VEGF); epidermal growth factor receptor (EGFR); Fc fragment; affinity

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 239-246]

近年来单克隆抗体(单抗)药物发展迅猛,仅2010年全球就有30余个单抗药物经批准上市销售,已产生500亿美元以上的年销售额^[1]。然而,对于复杂的恶性肿瘤,其病因复杂,细胞内信号通路冗

余或交叉,单一靶点的治疗适用性窄且易产生耐药性,因而多靶向药物已成为抗体领域的重要发展方向^[2]。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor re-

ceptor, EGFR) 家族、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 是肿瘤治疗的重要靶标^[3]。Herstatin 是 EGFR 家族信号通路的天然抑制因子, 由 *HER2* mRNA 在转录后加工过程中选择性剪接形成的异构体所编码, 其蛋白序列由人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 胞外区前两个结构域及 *HER2* 基因的第 8 个内含子所编码 79 个氨基酸所构成^[4,5]。Herstatin 能与 HER2 和 EGFR 高亲和力结合, 抑制 EGFR 家族成员形成异源或同源二聚体, 降低受体酪氨酸磷酸化水平, 抑制肿瘤细胞生长^[6,7]。实验^[8]表明, Herstatin C 末端的 79 个氨基酸(HERIN) 也具有与 HER2 及 EGFR 高效特异结合的特性, 具有较好的抗肿瘤活性。VEGFR1(vascular endothelial growth factor receptor 1, 也称作 FLT1) 是 VEGF 的受体, 主要通过其 Ig 样第 2 结构域(FLT-D2) 高效结合 VEGF 分子^[9-10]。本研究通过蛋白 Linker 将 *Herin*、*Flt-1D2*、改造后的人 IgG1 *Fc* 段融合, 建立高效结合 VEGF、EGFR 家族成员的 Fc 融合蛋白 EVP1, 以期借助 FLT-1D2 高效结合 VEGF 以及 Herin 高效结合 EGFR 家族成员的特性, 使之能同时阻断肿瘤

细胞中非常关键且存在交互应答的 VEGF 与 EGFR 家族信号通路, 在此基础上通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC), 增强抗肿瘤疗效, 并提高蛋白稳定性、延长其体内半衰期。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

腺病毒骨架载体 pPE3-F35、质粒 pDC659、人胚肾细胞株 293 细胞、人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 和人表皮癌细胞株 A431 均为本实验保存。*Fc* 基因由上海生物生化公司合成。Protein G Beads 购自碧云天生物技术公司, 高保真 phusion 酶试剂盒购自 Thermo Scientific 公司, 限制性内切酶购自 NEB 公司, 重组人抗原 VEGF 165 购自 R&D 公司, 重组人抗原 EGFR/ErbB1/HER1 和 ErbB2/HER2 购自 Sino Biological 公司, FITC 标记羊抗人 IgG(H + L)、羊抗人 IgG(H + L) 和 HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体购自康为世纪公司, 羊抗人 IgG 和 HRP 标记鼠抗人 IgG-Fc 抗体购自 Abcam 公司。引物由上海生工生物公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 Primers for PCR

Name	Sequences(5'-3')
<i>Herin</i> up1	GTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTGGTACCCACTCACTGCCCGGAGG
<i>Herin</i> up2	GTC GAATTC GCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTG
<i>Herin</i> down	ACCTCCGCTGAACCGCCTCCACCGCCTTCATACCGGGACAGGTCAAC
<i>Flt-1D2</i> up	CCACCTCCGCCAAGTCCGCGCTCCAGGCAGCGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTAC
<i>Flt-1D2</i> down	TGACACCTCCACCGGTTTGTGCGATGTGTGAGATAG
<i>Fc</i> down	TGA GTCGAC TTACTATTTACCCGGAGAC
VT001	CTGGCCAATACCAACCTTA
VT002	ATATGAGCTCACAATGCTTC
VT605	CCACTAACAACCACAGGCGG
VT606	GGGGATGTGGTCAGCGTAGC

1.2 构建质粒 pDC659-EVP1

以 293 细胞基因组为模板, 引物 *Herin* up1 和 *Herin* down 扩增含有信号肽的 *Herin* 基因; 以 293 细胞基因组为模板, 引物 *Flt-1D2* up 和 *Flt-1D2* down 扩增含有 linker 序列的 *Flt-1D2* 基因; 以 *Herin* 和 *Flt-1D2* 基因为模板, 引物 *Herin* up2 和 *Flt-1D2* down

通过重组 PCR 方法扩增融合基因 *Herin-Flt-1D2*; 以 *Herin-Flt-1D2* 基因和 *Fc* 基因为模板, 引物 *Herin* up2 和 *Flt-1D2* down 利用重组 PCR 方法扩增 *Herin-Flt-1D2-Fc* 基因(命名为 *EVP1* 基因, 图 1)。将质粒 pDC659 和基因 *EVP1* 分别进行 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切, 回收, 连接, 转化 DH5 α 感受态, 挑选重组子, 酶

切鉴定。将酶切鉴定正确的重组子进行测序,并将测序正确的质粒命名为 pDC659-EVP1(图2)。大量制备质粒 pDC659-EVP1。

图1 EVP1 模式图

Fig. 1 Schematic diagram of EVP1

图2 pDC659-EVP1 载体结构图

Fig. 2 Graph of pDC659-EVP1 plasmid

1.3 腺病毒 Ad5/35-EVP1 的包装及滴度测定

将 pPE3-F35 与 pDC659-EVP1 通过 Lipofectamine 2000 试剂共转染至 293 细胞,共转染后 9~14 d 出现病毒空斑,经 3 次病毒空斑纯化,构建非增殖型腺病毒 Ad5/35-EVP1。对其进行 PCR 鉴定,将无野生型病毒的阳性克隆大量扩增,纯化,然后采用 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 法测定腺病毒 Ad5/35-EVP1 的滴度。

1.4 融合蛋白 EVP1 的表达、纯化

当 293 细胞长满培养瓶底 (175 cm²) 的 90% 时,弃掉培养液,添加 30 ml 新鲜的 DMEM 培养液,并加入 MOI 为 11(预实验结果显示,当腺病毒 Ad5/35-EVP1 MOI 为 11 时,融合蛋白 EVP1 的表达量最高)的腺病毒 Ad5/35-EVP1,感染 2 h 后,每瓶添加 600 μl FBS,于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中继续培养。大约 4 d 后,培养液变黄,细胞全部脱落,即可收集细胞培养液。将细胞培养液 10 000 × g 离心 5 min,取上清液。将盛有蛋白质溶液的塑胶烧杯放在装有冰水的大泡沫盒内,并置于磁力搅拌器上搅拌。边搅拌,边徐徐加入硫酸铵至饱和 (56.8 g/100 ml 蛋白质溶液)。继续搅拌 30 min,10 000 × g 离心 5

min。弃去上清液,将沉淀悬浮于 1~2 倍沉淀物体积的 PBS 缓冲液中。待沉淀溶解 10 min,10 000 × g 离心 5 min,取上清液,于超滤管中进行超滤,除去硫酸铵。用等体积 pH 7.4 的 TBS 缓冲液稀释融合蛋白 EVP1 粗制品,用 0.22 μm 针头滤膜过滤,然后将其加到已平衡好的 protein G 琼脂糖柱,控制好流速 (大约 1 ml/min)。重复上样 2 遍。在洗脱前,用 10 倍体积的 TBS 缓冲液洗柱。用 10 ml pH 2.5 的甘氨酸 HCl 缓冲液洗脱结合的抗体,收集试管中含有 1 ml pH 8.0 Tris-HCl 的缓冲液。将洗脱下来的融合蛋白 EVP1 溶液加到相对分子质量 30 000 的 Amicon Ultra-15 离心超滤管中进行浓缩。

1.5 ELISA 方法检测融合蛋白 EVP1 的浓度

用包被液将羊抗人 IgG 抗体稀释到 1.0 μg/ml,以 100 μl/孔包被酶标反应板,4 °C 过夜。用洗涤液洗 4 次,每次浸泡 5 min,拍干。加入封闭液,100 μl/孔,37 °C 孵育 1 h。用洗涤液洗 4 次,每次浸泡 5 min,拍干。加入样品(用 PBS 缓冲液进行适当稀释)及标准品(经 PBS 缓冲液倍比连续稀释),100 μl/孔,设复孔和对照孔,37 °C 孵育 60 min。用洗涤液洗 4 遍,每次浸泡 5 min,拍干。用封闭液以 1:3 000 稀释 HRP 标记的鼠抗人 IgG-Fc 抗体,100 μl/孔,37 °C 孵育 45 min。用洗涤液洗 4 遍,每次浸泡 5 min,拍干。加入底物液 TMB,100 μl/孔,37 °C 避光显色 10~20 min。当显色满意后,每孔加入 50 μl 终止液终止反应。在酶标仪于 450 nm 处测定 D 值,绘制标准曲线,计算出融合蛋白 EVP1 的浓度。

1.6 Western blotting 检测融合蛋白 EVP1 的表达

取洗脱下来的融合蛋白 EVP1,进行 SDS-PAGE。然后将融合蛋白 EVP1 转移到硝酸纤维素膜上,经 5% 脱脂奶粉在室温封闭 1 h。将膜与一抗羊抗人 IgG(H+L)稀释液(稀释比例为 1:1 000),接触。在室温下孵育 1 h。再将膜与二抗稀释液(稀释比例为 1:10 000)接触,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 充分洗涤,接着与发光工作液接触,室温 1 min。暗室进行压片、曝光、显影和定影。

1.7 间接免疫荧光实验(indirect immunofluorescent assay,IFA)检测 EVP1 和肿瘤细胞的靶向结合

分别以高表达 EGFR 的 A431 细胞和高表达 HER2 的 SK-OV-3 细胞铺 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 孵箱培养;待细胞长至 80%~90% 时,将培养液吸去,1 × PBS 洗 3 次;加多聚甲醛 50 μl/孔,放置 5~10 min;将 96 孔中液体吸去,1 × BSA 洗 3 次,每次浸泡 2 min;实验孔每孔加入 EVP1 50 μl,阳性对照孔分别加入西妥昔单抗(cetuximab)和曲妥珠单抗

(trastuzumab), 阴性对照组加入 BSA 溶液; 室温放置 1 h, 加入 FITC 标记羊抗人 IgG (H + L) 抗体(按 1:200 比例稀释), 每孔 50 μ l, 避光室温放置 30 min; 将 96 孔板中的液体吸去, 用 1 \times BSA 洗 3 次, 每次浸泡 2 min。将 96 孔板中的液体吸去, 加 1 \times BSA, 30 μ l/孔, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 生物膜层光学干涉技术(biolayer interferometry, BLI)测定 EVP1 与肿瘤细胞靶向结合的亲和力常数

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液将 EVP1 稀释至 10 μ g/ml, 将其加至 96 孔板的第 2 列, 每孔 200 μ l; 用 KB 缓冲液将抗原 EGFR、HER2、VEGF 稀释至 200 nmol/L, 并将 EGFR 加入到第 4 列的 A、E 孔中, 将 HER2 加入到第 4 列的 B、F 孔中, 将 VEGF 加入到第 4 列的 C、G 孔中, 余下的 2 孔加入 KB 缓冲液, 每孔 200 μ l。第 1 列孔中加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液, 在第 3 列中加入 KB 缓冲液, 每孔 200 μ l。在 Octet Red 96 生物分子相互作用分析仪上装载 8 根抗人 IgG Fc 生物传感器, 设定程序, 运行, 分析。

1.9 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pDC659-EVP1 的酶切鉴定

选用 *EcoR* I + *Sal* I、*Xho* I + *Nhe* I 和 *Xba* I + *Hind* III 三组限制性内切酶进行酶切鉴定质粒 pDC659-EVP1。理论上, *EcoR* I + *Sal* I 酶切产物条带大小为(4 713 + 1 359) bp, 结果显示与预期相符(图 3A); *Xho* I + *Nhe* I 酶切产物条带大小为(4 263 + 1 809) bp, 结果显示与预期相符(图 3B); *Xba* I + *Hind* III 酶切产物条带大小为(3 903 + 2 169) bp, 结果显示与预期相符(图 3B)。将这三组酶切鉴定正确的质粒进行测序, 测序结果显示目的基因与 *EVP1* 基因序列完全一致。这些结果表明, 构建的质粒 pDC659-EVP1 正确。

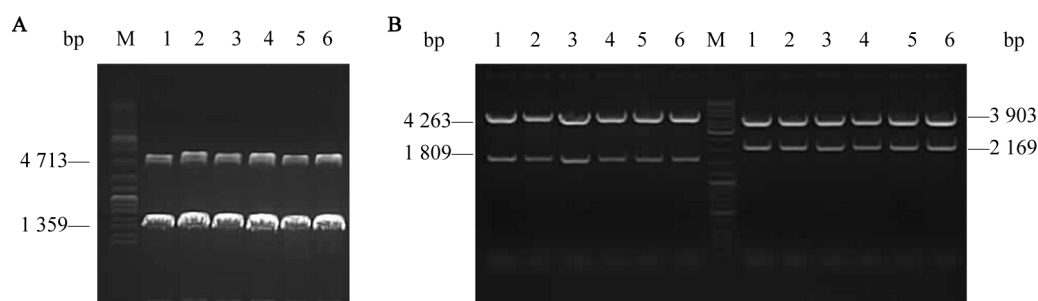


图 3 pDC659-EVP1 质粒的 *EcoR* I + *Sal* I (A), *Xho* I + *Nhe* I (B, 左) 和 *Xba* I + *Hind* III (B, 右) 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pDC659-EVP1 plasmid by *EcoR* I and *Sal* I (A), *Xho* I + *Nhe* I (B, left) and *Xba* I + *Hind* III (B, right) digestion

M: DNA marker; 1-6: 6 clones of pDC659-EVP1 plasmid

2.2 腺病毒 Ad5/35-EVP1 的 PCR 鉴定

以腺病毒 Ad5/35-EVP1 基因组为模板, 用 PCR 方法进行鉴定。电泳结果显示, 扩增出的 EVP1 条带大小与理论值一致(图 4), 说明腺病毒 Ad5/35-EVP1 基因组中存在目的基因 EVP1; 扩增出的 fiber 条带大小正确(图 5A); 在鉴定野生型病毒实验中, 阳性对照可扩增出 731 bp 的条带, 阴性对照无条带, 腺病毒 Ad5/35-EVP1 无条带, 说明腺病毒 Ad5/35-EVP1 中不存在野生型病毒(图 5B)。

2.3 腺病毒 Ad5/35-EVP1 的滴度

腺病毒 Ad5/35-EVP1 经过扩增/纯化后, TCID₅₀ 法测得该病毒滴度为 5.4×10^9 PFU/ml。

2.4 融合蛋白 EVP1 的表达

Western blotting 结果(图 6)显示, 转染腺病毒 Ad5/35-EVP1 的 293 细胞能够表达融合蛋白 EVP1, 其相对分子质量与理论值相符。

2.5 融合蛋白 EVP1 的表达量

腺病毒 Ad5/35-EVP1 (MOI 为 11) 感染 293 细胞大约 4 d 后, 上清液中融合蛋白 EVP1 的浓度为 $(1\ 613.94 \pm 24.65)$ ng/ml。

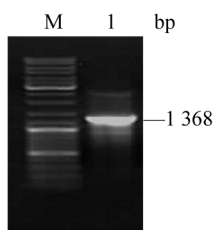


图4 EVPI 基因的鉴定

Fig. 4 Identification of EVPI gene

M: DNA marker; 1: EVPI

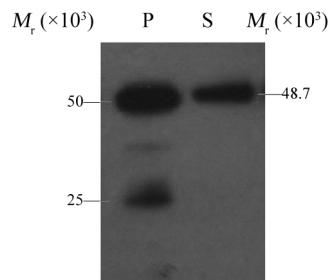


图6 融合蛋白 EVPI 的表达

Fig. 6 Expression of EVPI fusion protein

P: Positive control of cetuximab; S: EVPI fusion protein

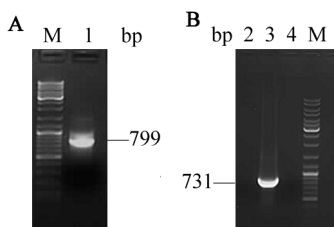


图5 腺病毒 Ad5/35-EVPI 的鉴定

Fig. 5 Identification of Ad5/35-EVPI

A: Identification of Ad5/35 fiber;

B: Identification of wild type adenovirus

M: DNA ladder mix; 1: Fiber gene; 2: Negative control; 3: Positive control of PXC1 plasmid; 4: Ad5/35-EVPI

经硫酸铵盐析提取的总蛋白中含 EVPI (130.14 ± 8.66) μg, 得率约为 80.64%。将这些粗蛋白经 Protein G 亲和层析并浓缩后, 得到的融合蛋白 EVPI 的量为 (69.58 ± 0.99) μg, 得率约为 43.11%。

2.6 融合蛋白 EVPI 与高表达 EGFR 和 HER2 肿瘤细胞的特异靶向结合

在荧光显微镜下可观察到融合蛋白 EVPI 能够结合在高表达 EGFR 的 A431 细胞表面, 也能够结合在高表达 HER2 的 SK-OV-3 细胞表面。结果表明, 融合蛋白 EVPI 与 EGFR 和 HER2 有较好的结合活性(图 7,8)。

2.7 融合蛋白 EVPI 与 EGFR、HER2 和 VEGF 结合的亲和力常数

Octet Red 96 生物分子相互作用分析仪检测结果(图 9)显示, 融合蛋白 EVPI 与 EGFR、HER2、VEGF 结合的亲和力常数 K_d 分别为 4.55、18.70 和 0.63 nmol/L。

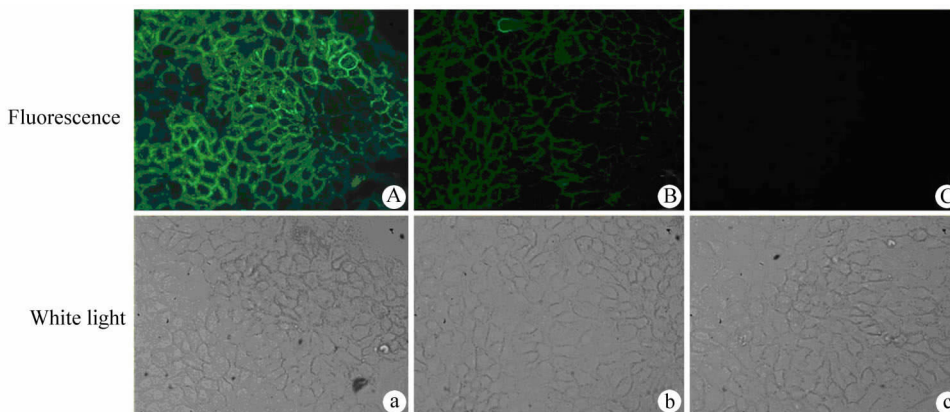


图7 融合蛋白 EVPI 与高表达 EGFR 的 A431 细胞的结合 (×200)

Fig. 7 Binding of fusion protein EVPI with A431 cells highly expressing EGFR(×200)

A, a: A431 cells + Cetuximab; B, b: A431 cells + EVPI; C, c: A431 cells + BSA

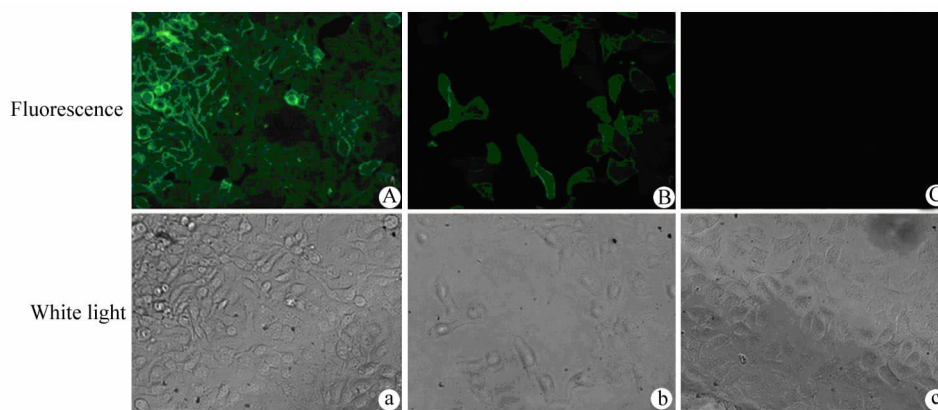


图8 融合蛋白 EVP1 与高表达 HER2 的 SK-OV-3 细胞的结合(×200)

Fig. 8 Binding of EVP1 fusion protein with SK-OV-3 cells highly expressing HER2(×200)

A, a: SK-OV-3 cells + Herceptin; B, b: SK-OV-3 cells + EVP1; C, c: SK-OV-3 cells + BSA

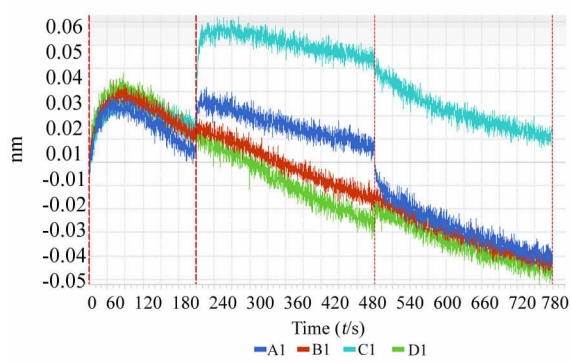


图9 融合蛋白 EVP1 与 EGFR、HER2、VEGF 结合的亲和力常数

Fig. 9 Affinity constants of EVP1 fusion protein with EGFR, HER2 and VEGF

A1: Interaction between EVP1 fusion protein and EGFR, $R_2 = 0.968308$; B1: Interaction between EVP1 fusion protein and HER2, $R_2 = 0.940764$; C1: Interaction between EVP1 fusion protein and VEGF, $R_2 = 0.99038$; D1: Negative control

3 讨论

EGFR 与配体(如 EGF)结合后,可以形成同源二聚体或异源二聚体,引发胞内区酪氨酸残基的自身磷酸化,激活下游一系列复杂的细胞信号转导途径,如 MAPK、PI3K/AKT、Jak2/STAT3 等^[11]。研究结果^[12]表明,在多种类型的肿瘤细胞中 EGFR 家族蛋白异常过量表达,或突变后持续活化,与肿瘤恶性增殖、抗凋亡、耐药、侵袭、转移、新生血管生成及患者的不良预后等紧密相关。VEGF 是一种肝素结合生长因子,可通过与血管内皮细胞表面的 VEGF 受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEG-

FR)结合,促进血管内皮细胞增殖,在体内诱导血管新生^[13]。研究^[14]表明,肿瘤细胞可大量分泌 VEGF,刺激肿瘤新生血管的生成,促进肿瘤的生长;VEGF 的过表达是肿瘤转移的早期特征,与肿瘤患者的总体生存率与无瘤生存率都呈负相关。EGFR 家族与 VEGF 通路存在交联(cross-talk)。研究^[15]表明,VEGF 启动子中存在 EGFR 家族通路下游转录因子 STAT3 与 Sp1 的结合位点,EGFR 家族信号通路的激活,可促进肿瘤细胞分泌 VEGF,通过旁分泌方式促进血管新生。应用 EGFR 单抗治疗 A431 移植瘤,可使 VEGF 的表达量下降,从而抑制肿瘤血管生成^[16]。肿瘤细胞对 EGFR 靶向药产生的抗药性,与 VEGF 表达水平的提高密切相关^[17-18];反之,应用 EGFR 抑制剂与 VEGFR 抑制剂联合治疗,可成功消除肿瘤细胞对 EGFR 抑制剂的耐药性^[19]。

目前已有 4 种抗 EGFR 家族蛋白或 VEGF 的单克隆抗体上市^[6],包括抗 EGFR 的单抗 cetuximab (Erbix)与 panitumumab (Vectibix),抗 HER2 的单抗 trastuzumab (Herceptin),抗 VEGF 的单抗 bevacizumab (Avastin)。与化疗药相比,这些单抗药物作用特异性强,不良反应小,在临床上取得了较好的疗效。然而,肿瘤是一种多基因复杂疾病,多个单抗联合治疗,其疗效优于一个单抗的治疗。如 EGFR 单抗 cetuximab 与 HER2 单抗 trastuzumab 的联合治疗胰腺癌具有协同效应,其疗效比相同剂量的单抗治疗高 4 倍以上^[20];针对 EGFR 不同抗原决定簇的单抗 cetuximab 和 panitumumab 联合治疗,其疗效优于两者的单一治疗,能快速促进抗原 EGFR 的内化与降解,显著抑制肿瘤细胞生长^[21];针对 EGFR 单抗 cetuximab 与针对 VEGF 受体 VEGFR2 单抗 DC101

联合治疗胰腺癌与结肠癌也具有协同效应, 疗效优于每个单抗的单独治疗^[22]。Genetech 公司研制的能同时靶向 VEGF 与 HER2 的双特异抗体的疗效明显优于同剂量的 avastin 与 herceptin (HER2 单抗) 治疗, 显示多靶向抗体的广阔前景^[23]。

本研究中, 通过蛋白 linker 将 Herin、FLT1-D2、人 IgG1 Fc 段融合, 建立高效结合 VEGF、EGFR 家族成员的 Fc 融合蛋白 EVP1 (中国发明专利申请号 201210043214.8), 以期借助 FLT1-D2 高效结合 VEGF 以及 HERIN 高效结合 EGFR 家族成员的特性, 使之能同时阻断肿瘤细胞非常关键且存在交联的 VEGF 与 EGFR 家族信号通路。在此基础上通过抗体 Fc 段的 ADCC 效应, 增强抗肿瘤疗效, 并提高蛋白稳定性和延长蛋白的体内半衰期。结果表明, 该融合蛋白 EVP1 能高效结合 VEGF、EGFR、HER2, 与 3 者的亲和力 K_d 分别为 0.63、4.55、18.70 nmol/L, 其与 VEGF 的亲和力高于 beracizumab ($K_d \approx 1.8$ nmol/L), 与 EGFR、HER2 的亲和力分别略低于 cetuximab ($K_d \approx 0.39$ nmol/L)、trastuzumab ($K_d \approx 5$ nmol/L)。结果说明, EVP1 具有良好的多靶向结合特性和潜在抗肿瘤活性, 且构成融合蛋白的肽段均来自于人体天然蛋白, 免疫原性低, 不易产生中和抗体, 因而具有良好的抗肿瘤临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Dhimolea E, Reichert JM. World bispecific antibody summit, September 27-28, 2011, Boston, MA [J]. MAbs, 2012, 4(1): 4-16.
- [2] Demarest SJ, Hariharan K, Dong J. Emerging antibody combinations in oncology [J]. MAbs, 2011, 3(4): 338-351.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [4] Koletsa T, Kostopoulos I, Charalambous E, et al. A splice variant of HER2 corresponding to Herstatin is expressed in the noncancerous breast and in breast carcinomas [J]. Neoplasia, 2008, 10(7): 687-696.
- [5] Doherty JK, Bond C, Jardim A, et al. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10869-10874.
- [6] Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(12): 1774-1780.
- [7] Staverosky JA, Muldoon LL, Guo S, et al. Herstatin, an autoinhibitor of the epidermal growth factor receptor family, blocks the intracranial growth of glioblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 335-340.
- [8] Lv M, Qiao C, Jiang N, et al. The peptide derived from erbB2 auto-inhibitor herstatin shared in the same epitope and function with functional antibody 2C4 [J]. Mol Biotechnol, 2012, 51(2): 174-182.
- [9] Wang TF, Lockhart AC. Afibercept in the treatment of metastatic colorectal cancer [J]. Clin Med Insights Oncol, 2012, 6(1): 19-30.
- [10] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): A dual regulator for angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2006, 9(4): 225-230.
- [11] Burgess AW. EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets [J]. Growth Factors, 2008, 26(5): 263-274.
- [12] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(7): 505-516.
- [13] Tugues S, Koch S, Gualandi L, et al. Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer [J]. Mol Aspects Med, 2011, 32(2): 88-111.
- [14] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. Nature, 2011, 473(7347): 298-307.
- [15] Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, et al. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis [J]. Pharmacol Ther, 2011, 131(1): 80-90.
- [16] Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells *in vitro* and *in vivo*: Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors [J]. Am J Pathol, 1997, 151(6): 1523-1530.
- [17] Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies *in vivo*: A role for altered tumor angiogenesis [J]. Cancer Res, 2001, 61(13): 5090-5101.
- [18] Bianco R, Rosa R, Damiano V, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5069-5080.
- [19] Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3484-3494.
- [20] Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, et al. *In vivo* therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(11): 3356-3362.
- [21] Tonra JR, Deevi DS, Corcoran E, et al. Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(7 Pt 1): 2197-2207.
- [22] Skartved NJ, Jacobsen HJ, Pedersen MW, et al. Preclinical pharmacokinetics and safety of Sym004: A synergistic antibody mixture directed against epidermal growth factor receptor [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(18): 5962-5972.
- [23] Bostrom J, Yu S, Kan D, et al. Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site [J]. Science, 2009, 323(5921): 1610-1614.

[收稿日期] 2012-03-12 [修回日期] 2012-04-29

[本文编辑] 韩丹