

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.008

· 基础研究 ·

靶向 EGFR 隐蔽表位的免疫毒素的制备及其对肿瘤细胞的特异性杀伤

李雅婷, 石必枝, 孔娟, 李宗海(上海交通大学医学院附属仁济医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)

[摘要] **目的:**制备靶向表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, *EGFR*)隐蔽表位(287-302)的免疫毒素,并鉴定其生物学功能。**方法:**通过基因工程方法将抗EGFR(287-302)的806单链抗体(806 single-chain antibody fragment, 806scFv)基因经柔性肽与铜绿假单胞菌外毒素A(*Pseudomonas exotoxin A*, PEA)的截短形式PE38KDEL连接,构建原核表达载体pET-22b-806scFv-PE38KDEL并转化至大肠杆菌BL21(DE3)中,经纯化获得该免疫毒素融合蛋白806scFv-PE38KDEL,ELISA和流式细胞术检测其与EGFR的结合活性,间接免疫荧光检测重组免疫毒素的内化作用,CCK-8法检测806scFv-PE38KDEL对人脑胶质瘤细胞U87MG和U87MG-EGFRvⅢ、表皮癌细胞A431、乳腺癌细胞MDA-MB-468、舌癌细胞CAL-27的细胞毒性。**结果:**成功构建重组免疫毒素806scFv-PE38KDEL,诱导表达的蛋白806scFv-PE38KDEL以包涵体形式存在,经纯化后的纯度>95%,经SDS-PAGE和Western blotting鉴定为目的蛋白。806scFv-PE38KDEL能EGFRvⅢ胞外段蛋白结合,还能与外源性表达EGFRvⅢ的肿瘤细胞和高表达EGFR的肿瘤细胞相结合,而与表达低水平EGFR的肿瘤细胞不结合。806scFv介导了重组免疫毒素的内化。806scFv-PE38KDEL对靶细胞有明显的杀伤作用,对过表达EGFRvⅢ的U87MG-EGFRvⅢ细胞IC₅₀值为(5.85±0.03)ng/ml,对EGFR高表达细胞MDA-MB-468、A431、CAL-27的IC₅₀值分别为(162.80±0.06)、(75.72±0.04)、(123.70±0.03)ng/ml。在1μg/ml的质量浓度下,相比PBS对照组,806scFv-PE38KDEL对U87MG-EGFRvⅢ、MDA-MB-468、A431和CAL-27细胞增殖的抑制率均显著增高[(98.67±0.07)% vs (2.45±2.85)%、(86.26±1.01)% vs (0.48±1.76)%、(96.72±0.16)% vs (1.33±1.31)%、(96.29±0.30)% vs (2.00±0.60)%],均P<0.01,而对U87MG细胞几乎没有抑制作用[(3.59±2.09)% vs (0.19±0.95)],P>0.05。**结论:**本研究所制备的靶向EGFR(287-302)表位的重组免疫毒素806scFv-PE38KDEL能特异地结合并杀伤EGFRvⅢ或EGFR高表达的肿瘤细胞。

[关键词] 表皮生长因子受体; 隐蔽表位; 免疫毒素; 单链抗体; 铜绿假单胞菌外毒素A; 肿瘤

[中图分类号] R392.4; R730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0425-07

Preparation of immunotoxin directed to a cryptic epitope in EGFR and its anti-tumor activity

Li Yating, Shi Bizhi, Kong Juan, Li Zonghai (State Key Laboratory of Oncogenes & Related Genes, Cancer Institute of Shanghai, Renji Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare recombinant immunotoxin targeting a cryptic epitope (287-302 residues) in epithelial growth factor receptor (*EGFR*) and to explore its biological properties. **Methods:** Prokaryotic expression vector pET-22b-806scFv-PE38KDEL encoding anti-EGFR (287-302) 806 single-chain antibody (806scFv) fused with PE38KDEL, a truncated form of pseudomonas exotoxin A (PEA), via a flexible peptide was constructed. The immunotoxin fusion protein (806scFv-PE38KDEL) was expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) and purified. The binding capacity of the immunotoxin to EGFR was detected by ELISA and flow cytometry. The internalization of immunotoxin was showed via indirect immunofluorescent assay. The cytotoxicity effect of the immunotoxin on human glioma cell U87MG and U87MG-EGFRvⅢ, epidermis

[基金项目] 上海市科委生物医药重点科技攻关项目资助(No. 10431903700);“十二五”国家重大新药创制专项资助(No. 2012ZX09103301-005)。Project supported by the Key Science and Technology Program in Biological Pharmaceutical Medicine of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No. 10431903700) and the National “Twelfth Five-year Plan” Key Foundation for Development of New Drugs(No. 2012ZX09103301-005)

[作者简介] 李雅婷(1981-),女,湖南省郴州市人,硕士,主要从事肿瘤生物治疗的研究。E-mail:woaititita@163.com

[通信作者] 李宗海(Li Zonghai, corresponding author),E-mail:zonghaili@shsci.org

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1256.004.html>

tumor cell A431, breast cancer cell MDA-MB-468 and tongue cancer CAL-27 cell lines were assessed by CCK-8 assay. **Results:** The recombinant immunotoxin 806scFv-PE38KDEL was constructed successfully. The induced expression product 806scFv-PE38KDEL existed in a form of inclusion body and the purity was above 95% after purification. The protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. 806scFv-PE38KDEL can bind to the protein of EGFRvIII extracellular domain and also the cancer cells with exogenous EGFRvIII or with an endogenous EGFR overexpression but not to the cancer cells with a low level of endogenous EGFR. The immuno-fluorescent assay showed that the internalization of immunotoxin was mediated by 806scFv. 806scFv-PE38KDEL showed the cytotoxicity on targeted cells with EGFRvIII overexpression such as U87MG-EGFRvIII cells with IC_{50} values of (5.85 ± 0.03) ng/ml ($P < 0.01$) and EGFR overexpression cancer cells such as MDA-MB-468, A431 and CAL-27 cells with IC_{50} values of (162.80 ± 0.06) ng/ml, (75.72 ± 0.04) ng/ml, (123.70 ± 0.03) ng/ml, respectively. 806scFv-PE38KDEL almost completely inhibited the growth of cancer cells such as U87MG-EGFRvIII, MDA-MB-468, A431 and CAL-27 cells compared the control group, and the inhibitory rates significantly increased ($[98.67 \pm 0.07]\%$ vs $[2.45 \pm 2.85]\%$, $[86.26 \pm 1.01]\%$ vs $[0.48 \pm 1.76]\%$, $[96.72 \pm 0.16]\%$ vs $[1.33 \pm 1.31]\%$, $[96.29 \pm 0.30]\%$ vs $[2.00 \pm 0.60]\%$; $P < 0.01$) but no effect on U87MG cells ($[3.59 \pm 2.09]\%$ vs $[0.19 \pm 0.95]$, $P > 0.05$). **Conclusion:** Recombinant immunotoxin 806scFv-PE38KDEL that targeted to EGFR (287-302) epitope prepared in this study is a candidate cancer therapeutic agent which can selectively bind and significantly inhibit the growth of the cancer cells with EGFRvIII or EGFR overexpression.

[Key words] epidermal growth factor receptor (EGFR); cryptic epitope; immunotoxin; single chain variable fragment (scFv); *Pseudomonas exotoxin A* (PEA); cancer

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 425-431]

重组免疫毒素是利用基因工程技术将具有靶向作用的抗体、配体或细胞因子与毒素相偶联的复合物, 又被称为“生物导弹”^[1]。目前免疫毒素在肿瘤治疗中得到了广泛的研究和应用, 并取得了良好的效果^[2-3]。免疫毒素由于毒性很强, 因此如何避免或尽量减少免疫毒素上的抗体部分与正常细胞结合显得尤为重要。

表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 为受体酪氨酸激酶家族成员, 其正常活化时可促进细胞的生长和增殖, 在多种类型肿瘤细胞中过表达^[4-5]。表皮生长因子受体 III 型变异体 (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII) 是 EGFR 最常见的变异体, 为 EGFR 胞外区 6~273 氨基酸缺失, 广泛存在于脑胶质瘤中, 在非小细胞肺癌、肝癌、乳腺癌、头颈部肿瘤中亦有发现。由于 EGFRvIII 仅存在于恶性肿瘤组织中, 而在正常组织中几乎检测不到, 从而成为了肿瘤靶向治疗理想的靶点^[6-7]。

目前大多数抗 EGFR 抗体, 如西妥昔单抗 (cetuximab, IMC-C225) 不仅能与肿瘤组织的 EGFR 结合, 也能与正常组织的 EGFR 结合。为了找到一个仅与肿瘤组织 EGFR 结合的抗体, 本实验室和 Ludwig 癌症研究中心分别研制了针对 EGFR 隐蔽表位 (287-302) 的单克隆抗体 CH12 及单克隆抗体 806 (monoclonal antibody 806, mAb806)^[8-9], 它们既

能靶向 EGFRvIII, 还能与过表达 EGFR 的细胞相结合, 而与正常组织中的 EGFR 几乎不结合, 因此可成为免疫毒素理想的导向分子。在本实验中, 利用这些抗体的单链抗体 (single chain antibody, scFv) 与铜绿假单胞菌外毒素 A (*Pseudomonas exotoxin A*, PEA) 的截短形式 PE38KDEL 进行融合表达, 并在体外实验验证其生物学活性, 以期能为肿瘤靶向治疗提供一种新手段。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

质粒 pCANTAB-5E-806scFv 和 pET-22b-EGF-PE40 由本实验室构建并保存, 人脑胶质瘤细胞 U87MG、人乳腺癌细胞 MDA-MB-468、人表皮癌细胞 A431、人舌癌细胞 CAL-27 均购自美国物种保藏中心, 稳定转染 EGFRvIII 基因的 U87MG 细胞 (U87MG-EGFRvIII 细胞) 由本实验室建株并保存^[10], 原核表达载体 pET-22b (+)、大肠杆菌 Top10、BL21 (DE3) 均为 Novagen 公司产品。KOD plus 酶为 Toyobo 公司产品, Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I 为美国 NEB 公司产品, 质粒抽提和 DNA 凝胶回收试剂盒为美国 Axygen 公司产品; IPTG、甘氨酸、Tris、尿素为 Sigma 公司产品; Ni Sepharose 6 Fast Flow 为 GE healthcare 公司产品, EGFRvIII 胞外段蛋白为本实验室制备并保存; 抗 His-Tag 抗体, FITC-羊

抗鼠 IgG 及 FITC-羊抗兔 IgG 购自上海康成公司;抗 PEA 兔抗购自 Sigma 公司;Cell Counting kit-8 (CCK-8)试剂盒为 Dojindo 产品。

1.2 重组表达质粒 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 的构建

引物 8HF: 5'-GGAATTC CATATG CACCAC-CACCACCACCACGATGTGCAGCTTCAG-3', 8LR: 5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCACGTTTGATTTCAG-3'; 引物 PF: 5'-GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCCGGCGGCAGCCTGGCC-3', PM1: 5'-GCCGGCCGTTGGCCGCGCCGGCCTCGTC-3', 引物 PM2: 5'-GGCCAACGGCCCGCGGACAGCG-3', 引物 PR: 5'-ATAAGAAT GCGGCCG TCA-CAGTTCGTCTTCGGCGTTT CCGGG-3' (加粗字体部分为保护碱基, 方框部分分别为 *Nde* I 和 *Not* I 酶切位点, 单划线部分为 6 个 *His* 基因序列, 波浪线部分为柔性连接肽, 双划线部分为终止密码子, 虚线部分为 *KDEL* 基因序列, 其余部分为目的基因片段)。质粒 pCANTAB-5E-806scFv 为模板, 引物 8HF 和 8LR 经 PCR 扩增 806scFv 基因; pET-22b-EGF-PE40 为模板, 引物 PF 和 PM1 经 PCR 扩增片段一, 引物 PM2 和 PR 经 PCR 扩增片段二, 琼脂糖凝胶电泳鉴定各扩增产物, 纯化后通过重叠 PCR 连接片段一和片段二为 PE38KDEL, 最后再通过重叠 PCR 连接 806scFv 和 PE38KDEL 为 806scFv-PE38KDEL。载体 pET-22b(+) 与 PCR 纯化产物经 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切后, 经 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 连接后的 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 以氨苄霉素筛选阳性克隆, 抽提质粒后经 PCR 和双酶切初步鉴定并测序。

1.3 重组表达质粒转化感受态细菌

将测序正确的重组表达质粒 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 转化感受态细菌 *E. coli* BL21 (DE3), 涂布于含氨苄霉素的 2 × YT 固体平皿中, 挑取单一菌落, 接种于含 100 mg/L 氨苄霉素培养基中, 37 °C 扩大培养, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 30 °C 诱导 4 h 后, 分别收集诱导前和诱导后菌液进行鉴定分析。收集诱导表达后的菌液, 超声裂解后, 4 °C、12 000 × g 离心收集上清和沉淀进行电泳分析。

1.4 Western blotting 鉴定 806scFv-PE38KDEL 免疫毒素

破菌后的沉淀用含 8 mol/L 尿素的结合缓冲液

4 °C 变性过夜, 20 000 × g 离心 30 min 后弃上清保留沉淀, 0.45 μm 滤膜过滤、纯化、透析复性 48 h, 期间更换复性液 5 次 (依次含尿素 6、4、2、1、0 mol/L), 最后用 PBS 透析 3 次。纯化的表达产物 806scFv-PE38KDEL 经凝胶电泳鉴定其纯度, 并以抗 His-tag 抗体为一抗、HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blotting 鉴定。纯化的蛋白经浓缩过滤后 -20 °C 保存备用。

1.5 ELISA 法检测重组 806scFv-PE38KDEL 与 EGFRv III 胞外段蛋白的结合活性

将制备的 EGFRv III 胞外段蛋白以每孔 50 ng, 4 °C 包板过夜, PBS 洗 2 次后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 37 °C 封闭 1 h, PBS 洗 2 次, 加入纯化后经倍比稀释的 806scFv-PE38KDEL 融合蛋白 100 μl/孔, 37 °C 1 h。用含 0.5% Tween 20 的 PBST 洗 4 次后加入抗 His-Tag 抗体 (5% 脱脂奶粉 PBS 1:1 000 稀释, 50 μl/孔), 37 °C 孵育 1 h 后洗 4 次, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (5% 脱脂奶粉 PBS 1:1 000 稀释, 50 μl/孔), 37 °C 孵育 1 h。加入 ABTS 显色液, 置于 37 °C、10 min 后用酶标仪于波长 405 nm 处测定各孔光密度 (*D*) 值。

1.6 流式细胞术检测重组 806scFv-PE38KDEL 免疫毒素与细胞的结合能力

收集稳定转染 EGFRv III 的 U87MG 细胞 (U87MG-EGFRv III); EGFR 高表达的细胞 (MDA-MB-468)、A431、CAL-27 及 U87MG, 1 000 × g 离心 5 min, 每管 2 × 10⁶ 个细胞, PBS (含 1% NBS) 洗 2 次后加入纯化后的 806scFv-PE38KDEL (含 1% NBS 的 PBS 稀释至 10 μg/ml, 100 μl/管), 阴性对照管加入稀释液, 4 °C 孵育 1 h。洗涤 2 次后加入抗 His-Tag 抗体 (含 1% NBS 的 PBS 1:50 稀释, 100 μl/管), 4 °C 孵育 1 h。洗涤 2 次后再加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (含 1% NBS 的 PBS 1:50 稀释, 100 μl/管), 4 °C 孵育 1 h。洗涤 2 次后每管加入 200 μl PBS 进行流式检测。

1.7 间接免疫荧光检测重组 U87MG-EGFRv III 免疫毒素的内化作用

将生长良好的 U87MG、U87MG-EGFRv III 细胞以每孔 5 × 10⁴ 个细胞接种于 24 孔板的玻片上, 培养过夜。然后加入 20 μg/ml 的 806scFv-PE38KDEL 免疫毒素, 37 °C 细胞培养箱孵育 3 h, 洗涤 3 次, 固定通透后, 再加入抗 PEA 兔抗 (1:50 稀释) 37 °C 孵育 1 h; 洗涤 3 次后再加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:50 稀释) 37 °C 孵育 1 h, DAPI 染色。洗涤 3 次, 甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察重组 U87MG-EGFRv III 免疫毒素内化情况。

1.8 CCK-8 法检测重组 U87MG-EGFRv III 免疫毒素对细胞的毒性作用

将生长良好的 U87MG、U87MG-EGFRv III 细胞 (1×10^3 个/孔); MDA-MB-468、A431、CAL-27 细胞 (3×10^3 个/孔) 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ l, 24 h 后分别加入对数稀释的 806scFv-PE38KDEL 免疫毒素, 每个浓度设置 5 个复孔, 阴性对照孔中加入等量 PBS。培养 72 h 后弃上清, 每孔加入 100 μ l 含 10% CCK-8 液的完全培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 酶标仪测定波长 450 nm 处各孔光密度 (D) 值。使用 GraphPad Prism 5 计算 IC_{50} 值。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS15.0 统计软件, 各组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 重组表达载体

由于在改造 CH12 和 mAb806 单抗成为单链抗体时, 发现只有 mAb806 衍化的单链抗体保留了较好的与 EGFR 抗原结合的能力(资料未显示), 因此, 将 mAb806 的单链抗体作为靶向元件与 PE38KDEL 进行融合表达。构建好的重组免疫毒素表达载体 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 经 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切后, 得到预期 1 800 bp 片段(图 1), 测序结果正确, 表明构建成功。

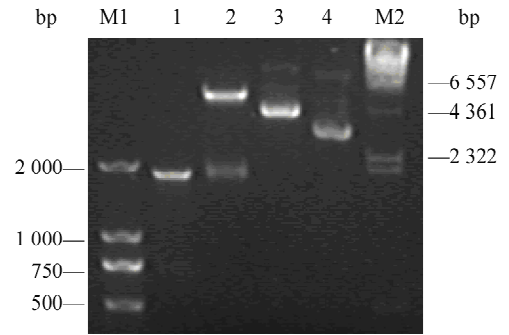


图 1 重组质粒 pET-22b-806scFv-PE38KDEL 的 *Nde* I / *Not* I 双酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid 806scFv-PE38KDEL by *Nde* I / *Not* I double digestion

M1: DS2000 DNA marker; 1: PCR product; 2: pET-22b-806scFv-PE38KDEL digested by enzyme *Nde* I / *Not* I; 3: pET-22b-806scFv-PE38KDEL; 4: pET-22b(+); M2: λ /Hind III DNA marker

2.2 重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 的表达纯化和鉴定

将 IPTG 诱导表达后的产物经 SDS-PAGE 分析, 结果(图 2A)显示, 经诱导表达 4 h 后, 在相对分子质量约 65 000 处出现一条明显的诱导表达带与所构建的重组免疫毒素分子量大小相符。纯化后的蛋白经 Western blotting 鉴定为目的片段所表达的重组蛋白, 纯度大于 95%, 并经 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析纯化后的 806scFv-PE38KDEL 蛋白(图 2B、C)。

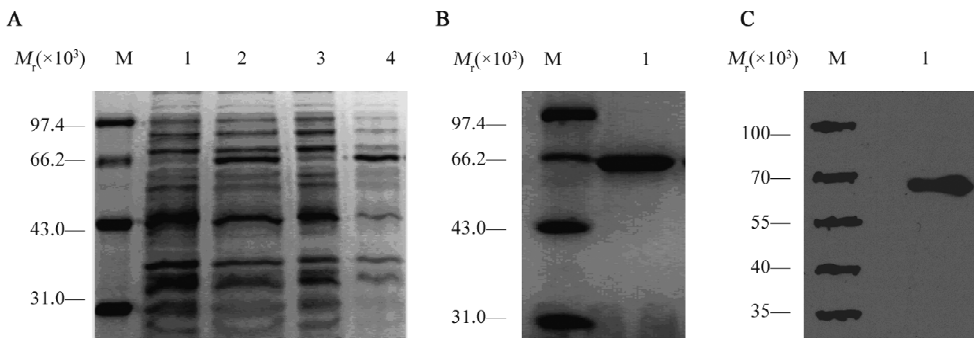


图 2 806scFv-PE38KDEL 的纯化和鉴定

Fig.2 Purification and identification of 806scFv-PE38KDEL

A: SDS-PAGE analysis of 806scFv-PE38KDEL expression products. M: Protein marker; 1: pET-22b-806scFv-PE38KDEL without IPTG induction; 2: pET-22b-806scFv-PE38KDEL with IPTG induction; 3: Supernatant of induced expression product by ultrasonication; 4: Precipitation of induced expression product by ultrasonication. B: SDS-PAGE analysis of the purified immunotoxin; M: Protein marker; 1: Purified immunotoxin. C: Western blotting analysis of the purified immunotoxin; M: Protein marker; 1: Purified immunotoxin

2.3 重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 与 EGFRv III 抗原结合

EGFRv III 的胞外段蛋白包被 ELISA 板, 加入不同浓度的纯化免疫毒素 806scFv-PE38KDEL, 采用间

接 ELISA 检测其结合活性。结果(图 3)表明,随着加入的重组免疫毒素量的增加, D_{405} 值也相应增加 ($r = 0.795, P < 0.01$),说明免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 能与 EGFRv III 蛋白抗原相结合,具有很好的结合活性。

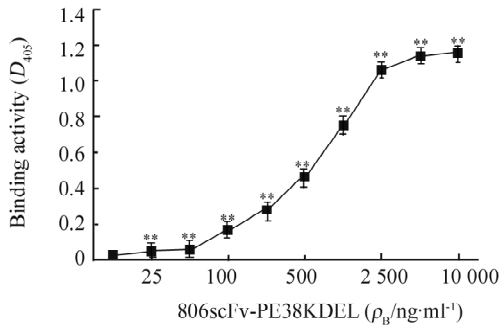


图 3 806scFv-PE38KDEL 与 EGFRv III 抗原的结合活性
Fig. 3 Binding activity of 806scFv-PE38KDEL with EGFRv III antigen
** $P < 0.01$ vs 0 ng/ml group

2.4 免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 特异性结合表达 EGFRv III 和高表达 EGFR 的肿瘤细胞系

为进一步观察免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 是否能与表达 EGFRv III 或 EGFR 的肿瘤细胞结合,采

用本实验室的稳定转染 EGFRv III 的肿瘤细胞株 U87MG-EGFRv III 及相对应的细胞 U87MG; 高表达 EGFR 的肿瘤细胞株 MDA-MB-468、A431、CAL-27,用流式细胞术检测重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 与 EGFRv III 或 EGFR 的结合能力。检测结果(图 4)显示,与 PBS 组相比,806scFv-PE38KDEL 与 U87MG-EGFRv III 细胞的结合能力最强 [(275.4 ± 35.54) vs (3.63 ± 0.41) , $P < 0.05$],并且也可与 MDA-MB-468 [(4.66 ± 0.26) vs (2.34 ± 0.05) , $P < 0.05$], A431 [(14.59 ± 0.41) vs (3.21 ± 0.11) , $P < 0.05$] 和 CAL-27 细胞 [(11.51 ± 1.63) vs (2.87 ± 0.38) , $P < 0.05$] 结合,但与 U87MG 细胞几乎不结合 [(3.88 ± 0.73) vs (3.35 ± 0.41) , $P > 0.05$]。

2.5 免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 能被 U87MG-EGFRv III 细胞内化

间接免疫荧光检测结果(图 5)显示,10 $\mu\text{g/ml}$ 质量浓度的免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 分别与 U87MG、U87MG-EGFRv III 细胞孵育后,在 U87MG-EGFRv III 细胞中可见有大量的 806scFv-PE38KDEL 内化进入胞质,而在 U87MG 细胞中几乎看不到荧光。提示 U87MG-EGFRv III 细胞上表达的 EGFRv III 能结合 806scFv-PE38KDEL,介导了免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 进入到细胞内,从而发挥毒素的毒性作用。

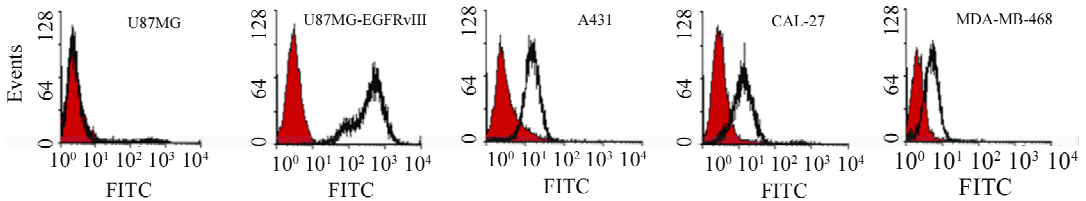


图 4 流式细胞术检测免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 与不同肿瘤细胞的结合能力
Fig. 4 Binding ability of 806scFv-PE38KDEL with different cancer cells by FCM analysis

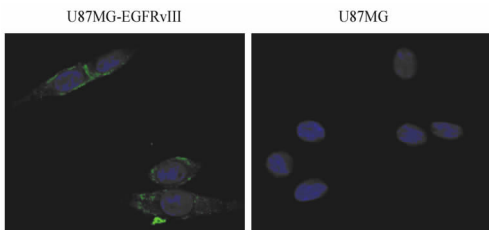


图 5 间接免疫荧光检测 806scFv-PE38KDEL 在 U87MG-EGFRv III 和 U87MG 细胞中的内化情况 ($\times 1000$)
Fig. 5 Internalization of 806scFv-PE38KDEL in the U87MG and U87MG-EGFRv III cells by indirect immuno-fluorescent assay ($\times 1000$)

2.6 免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 对表达 EGFRv III 和高表达 EGFR 肿瘤细胞系的杀伤作用

CCK-8 检测结果(图 6)显示,806scFv-PE38KDEL 对 U87MG-EGFRv III、MDA-MB-468、A431、CAL-27 细胞均有杀伤毒性,经过 72 h 处理后,其对细胞的 IC_{50} 值分别为 (5.85 ± 0.03) ng/ml、 (162.80 ± 0.06) ng/ml、 (75.72 ± 0.04) ng/ml、 (123.70 ± 0.03) ng/ml,而对 U87MG 细胞的 IC_{50} 值为 (330832.00 ± 0.48) ng/ml。免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 在 1 $\mu\text{g/ml}$ 的质量浓度下,相比 PBS 对照组,806scFv-PE38KDEL 几乎能完全抑制 U87MG-

EGFRv III 细胞[(98. 67 ± 0. 07)% vs (2. 45 ± 2. 85)% , $P < 0. 01$]、MDA-MB-468 细胞[(86. 26 ± 1. 01)% vs (0. 48 ± 1. 76)% , $P < 0. 01$]、A431 细胞[(96. 72 ± 0. 16)% vs (1. 33 ± 1. 31)% , $P < 0. 01$]和 CAL-27 细胞[(96. 29 ± 0. 30)% vs (2. 00 ± 0. 60)% , $P < 0. 01$]的生长, 而对 U87MG 细胞的生长几乎没有抑制作用[(3. 59 ± 2. 09)% vs (0. 19 ± 0. 95)% , $P > 0. 05$]。

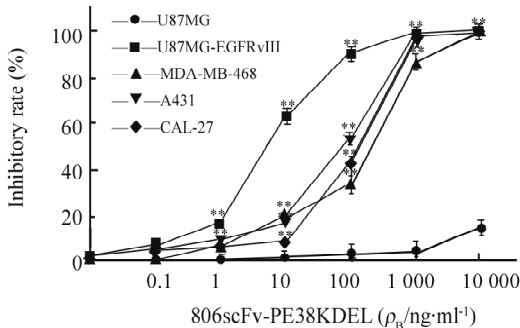


图 6 不同浓度 806scFv-PE38KDEL 作用 72 h 后对不同肿瘤细胞的杀伤作用

Fig. 6 Cytotoxicity of 806scFv-PE38KDEL at different concentrations against different cancer cells after treatment for 72 h

* * $P < 0. 01$ vs 0 ng/ml group

3 讨论

免疫毒素是靶向性治疗肿瘤的代表性药物,也是当前免疫学研究的热点之一,它克服了传统肿瘤治疗的化疗和放疗的缺陷,既具有特异性的识别功能,有很好的选择性作用,又具有相比单克隆抗体更强的毒性作用^[11]。单链抗体克服了传统单克隆抗体分子量大的缺点,由于其分子量小,免疫原性低且有良好的组织穿透力,易于进入实体瘤中,而且由于其保留了单克隆抗体中抗原特异性结合的可变区,因此非常适合作为免疫毒素的载体部分^[12]。PEA 是由铜绿假单胞菌分泌的一种非常强烈的细菌外毒素,由 3 个结构域组成,本研究选取了去除了结合区 I a、部分 I b 区而得到的截短形式 PE38,并将其 C 末端的 REDLK 替换为 KDEL 氨基酸序列,研究^[13-14]表明 KDEL 可增强免疫毒素从高尔基体至内质网的转运从而增强其毒性能力。在单抗改造成单链抗体的过程中,由于空间构象变化,有可能导致单链抗体丧失了亲本单抗原有的结合能力。本课题组自主研发的单抗 CH12 在改造成单链抗体的过程中恰恰出现了这种情况,而 mAb806 改造的单链抗体

保留了原有的结合活性。

本研究通过基因工程方法将 mAb806 的单链抗体基因与 PE38KDEL 基因融合表达免疫毒素。构建和表达的重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 主要以包涵体的形式存在。包涵体由于其产量高、避免蛋白水解酶的破坏、杂蛋白含量低利于纯化等特点,是最有效的生产克隆方法之一^[15]。通过对复性条件的摸索发现,表达的 806scFv-PE38KDEL 在连续梯度稀释透析复性的方法中比较稳定,没有发现明显的聚集现象。复性后的蛋白经过纯化后对纯化的重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 进行活性鉴定,结果表明,806scFv-PE38KDEL 能与表达有 EGFRv III 和高表达 EGFR 的肿瘤细胞相结合,而与低表达 EGFR 的肿瘤细胞 U87MG 几乎不结合,具有良好的结合能力和靶向特异性。激光共聚焦显微镜下显示,免疫毒素 806scFv-PE38KDEL 能与 U87MG-EGFRv III 细胞结合,从而介导了其对重组免疫毒素的内化作用,而不结合的 U87MG 细胞内无重组免疫毒素的内化,表明 806scFv-PE38KDEL 是由 806scFv 介导进入细胞从而发挥 PE38KDEL 的毒性作用。体外细胞毒性实验也显示了 806scFv-PE38KDEL 在较低的浓度下即能对表达 EGFRv III 和高表达 EGFR 的肿瘤细胞产生较强的抑制作用,而对低表达 EGFR 的 U87MG 肿瘤细胞几乎没有抑制作用,显示该免疫毒素针对表达靶抗原的肿瘤细胞的高效抑制作用。806scFv-PE38KDEL 对高表达 EGFR 的肿瘤细胞的毒性显著低于 EGFRv III 阳性的肿瘤细胞,可能是因为该单链抗体与过表达的 EGFR 的结合能力还不是很强。因此,要想提高 806scFv-PE38KDEL 对高表达 EGFR 的肿瘤细胞的毒性,可能要进一步提高 806scFv 与 EGFR 的结合能力。

目前针对 EGFR 的重组免疫毒素主要有 TP38 和 MR1-1KDEL。TP38 为 EGFR 的配体转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) 融合 PE38 的嵌合蛋白,TP38 在 2003 年已经进入临床 I / II,用于治疗恶性脑胶质瘤,接受 TP38 治疗的 20 例脑胶质瘤患者的中位生存期为 28 周,但 2003 年后即没有此免疫毒素的任何进展报道^[16]。由于 TP38 主要靶向 EGFR,而在人体正常组织中亦有 EGFR 的表达,因此可能对正常器官产生毒副作用。MR1-1KDEL 为针对 EGFRv III 的单链抗体 MR1-1 融合 PE38KDEL 的免疫毒素,已被批准用于治疗恶性脑胶质瘤的临床 I 期实验 (NCT01009866)。MR1-1 主要是针对缺失突变型 EGFR 胞外区连接处的多肽,仅识别表达 EGFRv III 的细胞,应用范围窄^[17]。

此外,在 EGFRv III 阳性的肿瘤组织中,往往伴随着 EGFR 的过表达与扩增。而且由于肿瘤异质性的存在,往往在一个患者的肿瘤组织中并不是所有肿瘤细胞都有 EGFRv III 的表达^[18]。而 mAb806 和 CH12 单抗是针对 EGFR 的隐蔽表位(287-302)的单克隆抗体。该表位在 EGFR 激活、突变和过表达时暴露,而正常情况不暴露^[19]。因此,由 mAb806 的单链抗体融合 PE38KDEL 的免疫毒素 806scFv-PE38KDEL,有望成为高度肿瘤靶向的免疫毒素。

综上所述,本研究成功制备了重组免疫毒素 806scFv-PE38KDEL,其对过表达 EGFR 或有 EGFRv III 表达的肿瘤细胞有良好的靶向结合能力和特异杀伤能力,为含有这些 EGFR 表达异常的恶性肿瘤提供了新的候选靶向治疗制剂。

[参 考 文 献]

- [1] Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy [J]. AAPS J, 2006, 8(3): 532-551.
- [2] Foss FM. DAB (389) IL-2 (ONTAK): A novel fusion toxin therapy for lymphoma [J]. Clin Lymphoma, 2000, 1(2): 110-117.
- [3] Kreitman RJ, Tallman MS, Robak T, et al. Phase I trial of anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(15): 1822-1828.
- [4] Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, et al. The epidermal growth factor receptor: From development to tumorigenesis [J]. Differentiation, 2007, 75(9): 770-787.
- [5] Friedman HS, Bigner DD. Glioblastoma multiforme and the epidermal growth factor receptor [J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 1997-1999.
- [6] Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRv III): Characterization and utilization as an immunotherapeutic target [J]. J Neurovirol, 1998, 4(2): 148-158.
- [7] Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRv III) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(17): 5064-5073.
- [8] Jiang H, Wang H, Tan Z, et al. Growth suppression of human hepatocellular carcinoma xenografts by a monoclonal antibody CH12 directed to epidermal growth factor receptor variant III [J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 5913-5920.
- [9] Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR [J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5355-5361.
- [10] 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.
- [11] Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, et al. Immunotoxin therapy of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(7): 559-565.
- [12] Hagemeyer CE, von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D, et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents [J]. Thromb Haemost, 2009, 101(6): 1012-1019.
- [13] Weldon JE, Pastan I. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer [J]. FEBS J, 2011, 278(23): 4683-4700.
- [14] Kreitman RJ, Pastan I. Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor [J]. Biochem J, 1995, 307(1): 29-37.
- [15] Clark EDB. Refolding of recombinant proteins [J]. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(2): 157-163.
- [16] Sampson JH, Akabani G, Archer GE, et al. Progress report of a phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the *Pseudomonas* exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors [J]. J Neurooncol, 2003, 65(1): 27-35.
- [17] Beers R, Chowdhury P, Bigner D, et al. Immunotoxins with increased activity against epidermal growth factor receptor v III -expressing cells produced by antibody phage display [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(7): 2835-2843.
- [18] Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma [J]. Genes Dev, 2010, 24(16): 1731-1745.
- [19] 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.

[收稿日期] 2013 - 02 - 15

[修回日期] 2013 - 05 - 10

[本文编辑] 周玲琳

本期广告目录

沈阳三生制药有限责任公司	封二
华威国际(香港)有限公司北京华威中仪科技有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四
上海白泽生物基因发展有限公司	插页