

采用等温滴定量热技术(ITC)和表面电浆共振技术

(SPR)针对癌症的治疗性抗体药物的开发研究

Muneera Beach†, Verna Frasca†, and Stephen Demarest‡. †MicroCal Products Group, GE Healthcare, 22 Industrial Drive East, Northampton, MA . ‡BiogenIdec, 5200 Research Place, San Diego, CA

介绍

揭开信号、激活和调控中所涉及的生物过程中的分子间的相互作用的详细知识是非常重要的。此外，特别是如果这些过程涉及疾病，在分子水平上观察这些过程的能力，以及开发出有利于对这些过程进行干预的方法，就显得尤为重要。ITC和SPR都是在分子水平上观察生物过程的相互作用的有用工具。在这里，我们描述了利用ITC和SPR研究胰岛素样生长因子(IGF-1和IGF-2)与其胰岛素样生长因子受体(IGF-1R)的结合。我们进一步描述了美国CA圣地亚哥Biogen Idec公司的Stephen Demars和他的同事们使用这些技术，来定性对一系列内部开发的抗体不同的抑制机制，目标是开发用于临床应用的最佳治疗分子。

IGF-1R是一个较大的酪氨酸激酶(RTK)跨膜蛋白的受体，能够在大多数体细胞表达。IGF-1R结合构配体IGF-1和IGF-2而被激活。IGF-1R的配体结合到细胞外域，导致细胞质酪氨酸激酶区域的激活，受体自磷酸化作用，下游靶标的磷酸化，如胰岛素受体底物1(IRS-1)，同源性胶原蛋白质(SHC)^[1,2]。IGF-1R被作为在各种癌症的增长中重要调停者^[1,2]，其活性也被认为与肿瘤转移^[2,3]有重要的牵连。人源IGF-1R是一个1368个氨基酸的蛋白质，对其主要结构和三级结构进行了相关表征^[4,5]。N端区域(1-903残基)在细胞外和6个不同的蛋白质结构域组成：N-末端受体L域(L1)，富含半胱氨酸的重复域(CRR)，第二个受体L域(L2)和III型纤连蛋白结构域，表示为FnIII-1，FnIII-2和FnIII3。类似胰岛素受体(IR)，IGF-1R胞外区是负责本构二聚化的一个大的蛋白质界面，其中包括L1，L2 FnIII-1，FnIII-2^[6]。

针对IGF-1R的若干抑制性的治疗抗体已进入II / III期临床试验，人体临床试验的初步结果是令人鼓舞的^[1,7]。从发布的临床试验结果表明：这些抗体的活性和毒性之间的细微差别，这可以归因于不同的活性机制。采用ITC和SPR，我们可以显示：抑制抗IGF-1R抗体可以阻止一个或两个配体的变构象的竞争，这取决于他们的各种抑制抗原表位的识别。研究抑制抗-IGF-1R的抗体的结构与功能的关系(SAR)，在这里为有希望的临床实验中，这些治疗性抗体的活性和安全性的差异，提供了有价值的、更深层次的见解。

材料和方法

蛋白

重组hIGF-1R (1-903)，hIGF-1R (1-903) -Fc，hIGF-1R (1-462) -Fc，mIGF1-1R (1-904) -Fc，由subcloningeach的外域次序所描述(*)。基因编码人源IGF-1和IGF-2与标签组氨酸的基因被克隆、表达，纯化如前所述^[8]。hIGF-1R (1-903)-Fcwere由两个鼠免疫和随后的杂种细胞产生机制在体外库/噬菌体显示产生抗体，如前面所述^[8]。

等温滴定量热ITC

ITC实验在Microcal™公司的iTC200量热仪(GE Healthcare公司)上完成。抑制剂BIIB3 (75μM)，BIIB4 (67μM)，BIIB5 (75μM)，IGF-1 (60μM)，hIGF-1R (1-903) (5μM)在PBS，pH值7.2缓冲液中透析。对于每一个结合反应，测量池(约250μL)中充满5μMhIGF-1R (1-903)。在仪器注射器(40μL)中将1.5或2.0μL滴的抗体或配体滴到测量池中。为了研究抑制性抗体对IGF-1R/IGF-1结合的影响，抗体滴定

到受体以2:1饱和到受体结合位点，随后用IGF-1进行第二组滴定。采用GE医疗所提供的Origin ITC数据分析软件进行数据的积分分析。

表面电浆共振SPR

所有的SPR实验采用Biacore™3000(GE Healthcare)进行，实验温度设置为25°C，使用HBS-EP流动缓冲液，如前所述采用biaeval3.0进行数据评估和分析^[8]。

采用SPR对BIIB4和BIIB5结合到hIGF-1R (1-903) -Fc、mIGF-1R (1-903) -Fc、hIGF-1R (1-462) -Fc的能力进行抗原表位作图。一个抗人源IgG-Fc抗体通过标准的氨基偶联方法被固定在CM5芯片上(Biacore)，mIGF hIGF-1R (1-903) -Fc-1R (1-904) -Fc或hIGF-1R (1-462) -Fc被捕获到芯片表面，在捕获到受体后，在运行缓冲液时注入40μL BIIB4或BIIB5的Fab片段。

在生物素标记的抗His标签抗体固定到BiacoreSA芯片表面上进行结合IGFs和抗体到hIGF-1R (1-903) 受体的动力学分析⁽⁸⁾。被捕获hIGF-1R (1-903) 在生物素-PENTA-His表面, 并且抗体、抗体Fab或IGF-1被注射到表面, 随后是20分钟解离过程, 由缓冲液流过传感器-芯片表面运行。

在抑制抗体存在或不存在情况下, 使用SPR-hIGF-1R (1-903)-Fc采用标准的氨基偶联方法固定在CM5芯片表面(大约15000个RU), 研究IGF-1与IGF-1R平衡的结合。在这个高的固定水平, IGF-1流过IGF-1R (1-903)-Fc或预先混合hIGF-1R (1-903)和抑制抗体表面将导致质量迁移的有限线性结合曲线, 该曲线的初始速度 V_i (RU/秒), 与流过芯片表面的IGF-1的溶液浓度呈线性关系。IGF-hIGF-1R (1-903)和IGF-1的结合常数由含有sIGF-1R-Fc1的芯片表面流经的IGF-hIGF-1R (1-903)和IGF-1的混合物的量所确定。hIGF-1R (10-903)-Fc传感器芯片表面测量的在每个hIGF-1R (1-903)/IGF-1的混合物中没有结合的IGF-1的浓度。这样就可以测定IGF-1和hIGF-1R (1-903)之间的平衡解离常数 K_D , 结合化学计量 n ⁽⁸⁾。

结合到IGF-1R治疗抗体的抗原表位图

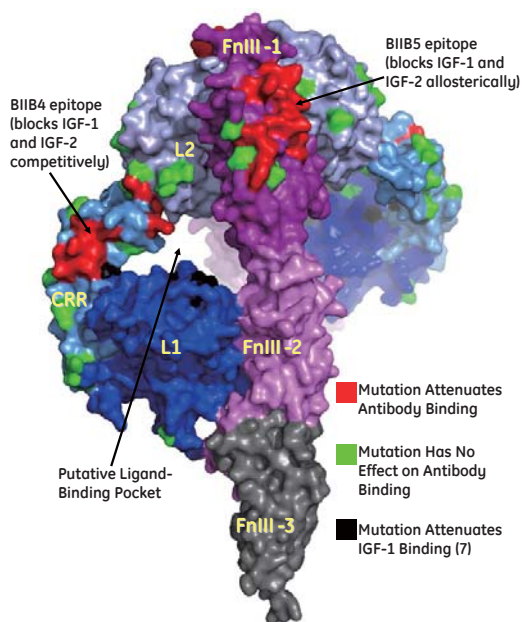


图1.在使用IR和IGF-1R的序列比确定同源位置的基础上, 在IR (6) 胞外域的X-衍射晶体结构表面上的抗原表位BIIB4和BIIB5数据⁽⁸⁾ 该结果显示的详细信息与酶联免疫吸附试验得到的抗原表位图完全一致。

在治疗性抗体存在情况下IGF-1-IGF-1R的结合机理

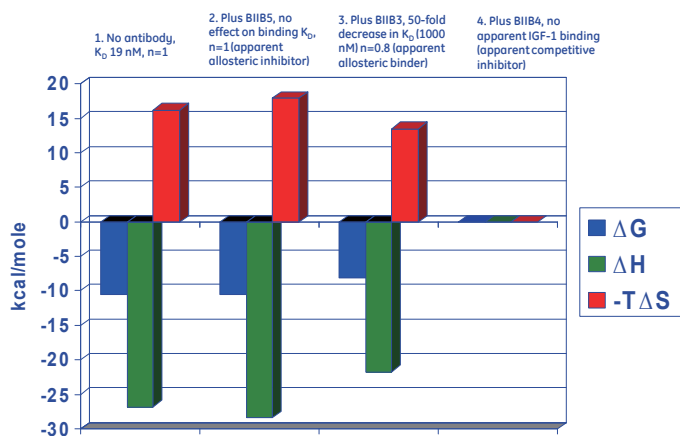


图2在饱和抑制抗体水平下, IGF-1单独结合IGF-1R的能量曲线

类似的研究报道, 研究人员发现, IGF-1结合hIGF-1R (1-903)二聚体的比例为1:1, 这表明, 当一个IGF分子结合时, 会导致受体构象变化, 这样就可能遮蔽第二个高亲和力的结合位点。

ITC-derived temperature dependence of IGF-1 and antibody binding to IGF-1R.

Temperature (°C)	ΔH° (kcal/mol)	$-T\Delta S^\circ$ (kcal/mol)	ΔG° (kcal/mol)	K_D (nM)	Stoichiometry of binding (n)
IGF-1					
5	-16.4±0.5	5.6	-10.8	3.3±6.0	0.93
25	-26.8±0.6	16.2	-10.6	19±9	1.00
37 ^a	-33.4±0.5	23.6	-9.8	130±60	1.02
BIIB5					
5 ^b	-11.3±0.8	-	-	-	0.89
15 ^c	-14.4±0.6	-	-	-	0.98
25 ^b	-20.1±2.5	7.8 ^d	-12.3 ^d	1±0.2 ^d	0.98
37 ^c	-29.2±0.4	-	-	-	0.97
BIIB4					
5 ^b	-6.7±1.0	-	-	-	0.90
25	-26.6±0.6	15.1 ^d	-11.5 ^d	4±0.5 ^d	0.91
37 ^c	-39.5±1.2	-	-	-	0.70
BIIB3					
25 ^c	-14.1±0.6	-	-	-	0.84

^aAverage of three experiments.

^bAverage of two experiments.

^cTight binding resulted in too few points in the transition region to measure K_D .

^dDetermined using both SPR and ITC experiments.

表1. ITC的测量表明, IGF-1与IGF-1R结合的亲和力具有强烈的温度依赖性: 随着温度的升高从5至37°C, 结合变弱, (见表3和图4A)。根据近及远紫外CD温度依赖性研究(数据未显示): 在5和50°C之间, 不管IGF-1, 还是hIGF-1R (1-903)都没有显示结构性变化。在37°C时IGF-1结合的焓补偿相对比较大, 这表明一个或两个反应后形成的由于复杂构成。复杂构成的CD光谱与单个蛋白质的CD光谱总和相比较后表明: 在结合后结构的有序性⁽⁸⁾。有序结构很可能可以与受体相连, 就像与已知是螺旋结构的配基一样。

ITC和CD光谱研究(结果未显示)表明: 在结合IGF-1时, BIIB4和BIIB5均对IGF-1R产生诱导受体构象变化, 包括使该受体多肽区域有序。与IGF-1或BIIB5(各自530和560千卡/摩尔/°C)相比, BIIB4显示出较大的结合 C_p° (990千卡/摩尔/°C, 这里 C_p° 是结合的摩尔热容量)

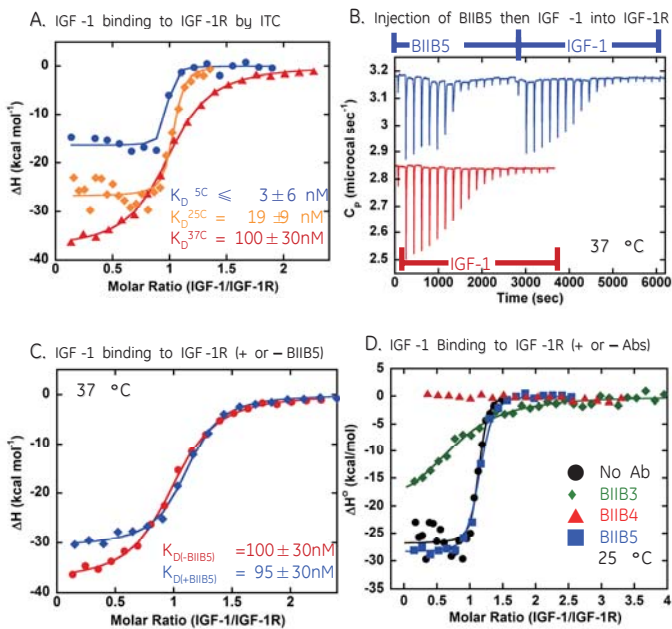


图3. 分别在缺乏和存在饱和抑制抗体水平下, IGF-1与IGF-1RITC结合的ITC实验结果。A.分别在5°C (●)、25°C (◆)和37°C (▲)下, IGF-1与hIGF-1R (1-903) 结合的温度依赖性。B. 在37°C下, 在IGF-1之后双滴定BIIB5原始ITC曲线。C. 在37°C下, 在缺乏 (●)和存在 (◆) BIIB5下, IGF-1结合hIGF-1R (1-903) 的ITC。D. 在25°C下, 在缺乏和存在BIIB3, BIIB4和BIIB5 (两倍过量) 饱和水平下, IGF-1与hIGF-1R (1-903) 结合的ITC曲线。

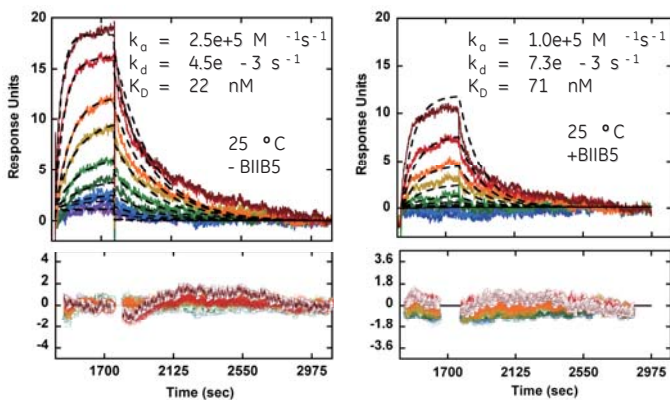


图4. 在25°C时, 在缺乏和存在500 μ MBIIB5的情况下, IGF-1结合hIGF-1R (1-903)的SPR动力学曲线。在SPR研究中, IGF-1的浓度是从64 μ M到0.125 μ M, 按1:1的系列稀释。

IGF-1/IGF-1R binding parameters determined at 25 °C in the absence and presence of saturated levels of inhibitory antibodies.

IGF-1R Antibody Complex	ITC Results					Equilibrium SPR results	
	ΔH° (kcal/mol)	$-T\Delta S^\circ$ (kcal/mol)	ΔG° (kcal/mol)	K_D (nM)	n°	K_D (nM)	n°
IGF-1R	-26.8±0.6	16.2	-10.6	19±9	1.00	11±2	0.66
IGF-1R/BIIB5 ^b	-28.4±2.0	17.9	-10.5	20±4	1.09	150±15	0.65
IGF-1R/BIIB3 ^b	-21.7±1.8	13.5	-8.2	1000±100	0.80	300±40	0.5
IGF-1R/BIIB4 ^c	-	-	-	-	-	-	-

表2. 在25 °C时, 在缺乏和饱和抑制抗体水平下, IGF-1/IGF-1R结合参数测定。

- a IGF-1/hIGF-1R(1-903) 结合的比例。
 b 表观变构抑制剂。
 c 表观竞争抑制剂。
 d 未观察到IGF-1结合。

结论

在这项研究中, ITC和SPR被用来确定治疗抑制抗体的作用机制。测定焓、熵、KD和化学计量, 以便更深入地了解了这些竞争和变构性抑制剂。SPR可以用来确定受体抗原表位的仪器, 阐明结合动力学和平衡结合。此外, ITC和SPR配合其他筛选方法以用来完善治疗性抗体的完全表征。

目前IGF-1R的抗体酶抑制剂种类繁多, 包括那些变构抑制或竞争性抑制, 或者那些能抑制一个或两个配体的存在, 这样会造成问题, 因为在临床试验上, 每类抗体都可能存在相对有效性的问题。对于将抑制机制用于实现临床结果有多么重要? 当然, 这里所描述的结果表明: 抗IGF-1R的抑制剂的种类和范围很广, 发生作用的机制也多样。一个额外的复杂情况下是一些抑制抗体将导致IGF-1R的内化和下调。目前还不清楚是否受体下调或受体抑制/配体阻滞将在治疗设置下起主导作用。治疗活性可能取决于肿瘤的表型, 构件的内生化状态和IGF-1或IGF-2的可利用度, 无论在血清中或在肿瘤微环境下。据了解, 目前在临床试验中的抗体阻断配体和受体的下调行为显示频谱。这将是很有趣的, 去看看是否这些治疗性抗体的特定的配体阻断特性将导致这些分子在临床上任何疗效的差异化。

参考文献

- Chitnis, M. M. et al. The Type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.* 14,6364-6370 (2008).
- Pollak, M. N. et al. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Rev. Cancer* 4,505-518 (2004).
- Baserga, R. et al. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* 107,873-877 (2003).
- Lawrence, M. C. et al. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17,699-705 (2007).
- Adams, T. E. et al. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 57,1050-1093 (2000).
- McKern, N. M. et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443,218-221 (2006).
- Rodon, J. et al. Early drug development of inhibitors of the insulin-like growth factor-I receptor pathway: Lessons from the first clinical trials. *Mol. Cancer Ther.* 7,2575-2588 (2008).
- Doern, A. et al. Characterization of inhibitory anti-insulin-like growth factor receptor antibodies with different epitopespecificity and ligand-blocking properties: Implications for mechanism of action in vivo. *J. Biol. Chem.* 284,10254-10267 (2009).