

## 基于酶催化抗体药物偶联物中抗体的定点突变及鉴定

马招兄<sup>1†</sup>, 徐瑶<sup>1†</sup>, 赵虹<sup>2</sup>, 孙福谋<sup>1</sup>, 张鑫荣<sup>1</sup>, 王旻<sup>1\*</sup>, 张娟<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要:** 谷氨酰胺转移酶催化谷氨酰胺与赖氨酸及其衍生物形成异肽键, 可用于抗体与小分子药物的定点偶联。本文在构建的抗人 CD24 嵌合抗体 cG7 的基础上, 定点突变 cG7 获得具有 4 个可催化的谷氨酰胺位点的嵌合抗体 cG7Q。本研究采用 overlap PCR 技术将抗体重链 CH 段第 297 位天冬酰胺突变成谷氨酰胺, 构建含突变重链的真核表达载体。将含突变重链与轻链的载体共转染 CHO-s 细胞, 筛选稳定高产单克隆细胞株, 表达及鉴定目的蛋白 cG7Q, 表面等离子共振法与流式细胞术分析 cG7Q 与人 CD24 分子的结合能力, 乳酸脱氢酶释放实验鉴定定点突变对抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的影响, 结果显示, 经改造的 cG7Q 保持母体单抗的结构和特异性结合能力及部分 ADCC 效应, 为后续制备靶向 CD24 定点偶联药物奠定基础。

**关键词:** 抗体; 定点突变; 谷氨酰胺转移酶; 抗体药物偶联物

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0403-06

## Transglutaminase-based antibody-drug conjugation: antibody site-specific mutation and identification

MA Zhao-xiong<sup>1†</sup>, XU Yao<sup>1†</sup>, ZHAO Hong<sup>2</sup>, SUN Fu-mou<sup>1</sup>, ZHANG Xin-rong<sup>1</sup>,  
WANG Min<sup>1\*</sup>, ZHANG Juan<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;  
2. Zhejiang Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

**Abstract:** Transglutaminase (TG) posttranslational modification of antibody permits more precisely conjugating. Based on the amino acid sequence of an anti-CD24 antibody (cG7), this article is aimed to generate a deglycosylated cG7 mutant (cG7Q). Firstly, we introduced additional glutamines at position 297 (N297Q) by site-directed mutagenesis, and then transfected the recombinant plasmids into CHO-s cells via electroporation method and screened by Dot blot assay. Subsequently, cG7Q was expressed and purified through Protein A affinity chromatography, further identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. Its affinity was detected with surface plasmon resonance and flow cytometry assay, and ADCC effect was determined by lactate dehydrogenase (LDH) release. Eventually, a cG7 mutant, cG7Q was successfully expressed with sequence-specific conjugation sites for further study.

**Key words:** antibody; site-specific mutagenesis; transglutaminase; antibody-drug conjugate

收稿日期: 2016-09-29; 修回日期: 2016-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助 (81473125); 江苏省自然科学基金项目资助 (BK20161459); 华海药业研究生创新基金 (1010040003); 江苏省研究生科研创新计划 (硕士) (KYZZ15\_0190); 大学生创新实验训练项目基金 (SY15090).

†共同第一作者.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271395, E-mail: minwang@cpu.edu.cn;  
Tel / Fax: 86-25-83271483, E-mail: juancpu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0962

抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC) 是通过一个化学连接子将高效的细胞毒素分子偶联到单克隆抗体上, 靶向传递小分子药物到肿瘤病灶部位, 增加毒性分子治疗窗的同时降低其对健康组织的毒副作用。传统的 ADC 药物是依赖抗体表面天然的赖氨酸 (Lys) 残基或通过还原抗体链间二硫键产生的半胱氨酸 (Cys) 的巯基将细胞毒素分子偶联到

抗体表面。目前,已有超过 50 种 ADC 药物进入临床试验阶段,已通过 FDA 认证的 brentuximab vedotin<sup>[1]</sup>和 trastuzumab emtansine<sup>[2]</sup>也是通过这两种方法制备的。但是这两种方法制备的 ADC 药物都存在严重的产物异质性<sup>[3]</sup>,主要表现在偶联位点的不确定和偶联药物数量的多样性,而每一种类型的 ADC 都有独特的体内药物动力学、药效学 and 安全性<sup>[4,5]</sup>。近年来,研究人员多采用基因工程的手段对抗体进行改造,从而实现抗体药物的定点偶联,常用的定点偶联方法有引入改造的半胱氨酸<sup>[6]</sup>或插入非天然氨基酸<sup>[7]</sup>作为偶联位点,其次是通过酶法进行偶联,常用的酶有甲酰甘氨酸生成酶和谷氨酰胺转移酶<sup>[8,9]</sup>。

微生物来源的谷氨酰胺转移酶 (microbial transglutaminase, MTG) 能催化谷氨酰胺的  $\gamma$ -羧基酰氨与赖氨酸及其结构类似物的伯氨形成异肽键<sup>[10]</sup>。研究表明 MTG 能识别抗体重链第 295 位谷氨酰胺作为反应底物来偶联毒素,形成偶联比 (DAR) 为 2 的 ADC 药物<sup>[11]</sup>。但是,单克隆抗体 IgG1 在 297 位天门冬酰胺位点有保守的糖基化位点,糖基化所形成的空间位置阻止了 MTG 直接识别 295 位的谷氨酰胺,因此偶联前需要进行复杂的去糖基化过程。

白细胞分化抗原 CD24 (cluster of differentiation 24) 作为一种高度糖基化蛋白分子<sup>[12]</sup>,过表达于多种肿瘤细胞表面,包括肝癌、结肠直肠癌、B 细胞淋巴瘤、乳腺癌和小细胞肺癌等,而在正常组织细胞中低表达甚至不表达<sup>[13–15]</sup>。本实验室通过杂交瘤技术获得了拥有自主知识产权的抗人 CD24 单克隆抗体 G7,并证明其在体内外具有良好的靶向性<sup>[16,17]</sup>,然而 G7 为鼠源抗体,会诱发人抗鼠抗体反应。本研究将对本实验室进行人源化嵌合改造的抗 CD24 单克隆抗体 cG7 进行定点突变,将抗体重链 Fc 段保守糖基化位点 297 位天门冬酰胺 (N297) 突变成谷氨酰胺 (N297Q),去糖基化的同时增加 2 个可进行定点偶联的谷氨酰胺位点,以此为基础得到能利用谷氨酰胺转移酶定点偶联 4 个毒素小分子的抗体 cG7Q,用于后续靶向 CD24 分子的定点偶联 ADC 药物的研究。

## 材料与方法

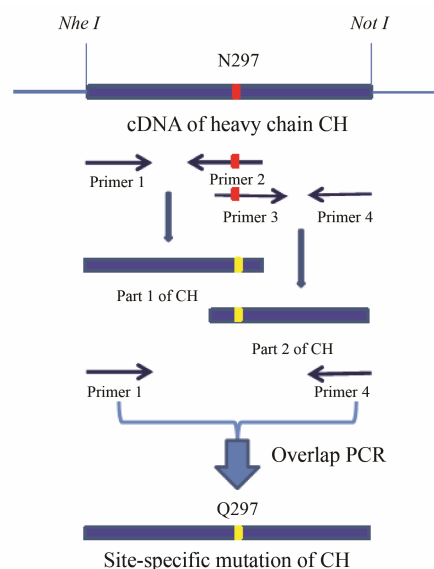
**药物和试剂** 本实验室通过杂交瘤技术获得抗人 CD24 的鼠源单克隆抗体 G7, cG7 为用人源的西妥昔单抗的 Fc 段替代 G7 的 Fc 段形成的嵌合抗体。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 载体 pMH3、pCApuro, 中国仓鼠卵巢

细胞 CHO-s 为本实验室保存。限制性内切酶、DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; PCR 产物纯化、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工; 细胞电击杯购自 Bio-Rad 公司; ECL 显色液购自 Millipore 公司; Goat-anti-human IgG-FITC antibody 购自上海生工; Goat-anti-human IgG1 (H+L)-HRP antibody 购自 Pierce 公司; 1 mL (0.7 cm $\times$ 2.5 cm) 装 HiTrap Protein A HP (Sepharose high performance) 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司; DNA 合成和测序及 PCR 引物合成由金斯瑞公司完成。其他所用试剂均为进口或国产纯。

抗人 CD24 嵌合抗体突变体 cG7Q 的设计与构建以抗人 CD24 嵌合抗体 cG7 重链的 CH 段为模板,设计两对含有突变位点的引物 (表 1) primer 1、primer 2 和 primer 3、primer 4, 分别以两对引物进行 PCR 扩增,将 PCR 产物分别纯化作为模板,以 primer 1、primer 4 为引物进行 overlap PCR 得到重链 CH 段突变体,过程详见图 1。将得到的突变基因与 T 载体连接进行测序鉴定,选取突变成功的菌体单克隆提取质粒,通过双酶切、酶连插入到含重链 VH 部分的表达载体 pMH3、pCApuro, 构成重组质粒 HT-pMH3、

**Table 1** Primer oligonucleotide used in the overlap PCR to construct the cG7Q

Primer	Sequence (5'→3')
1	AGTGCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC
2	CGCTGACCACACGGTACGTGCTTTGGTACTGCT
3	AGCAGTACCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
4	TTGCGGCCGCAATCTAGAGCTTACTATTTACCC



**Figure 1** Introduction of mutation N297Q by site-directed mutagenesis using standard overlap PCR techniques (Red/yellow stripes, mutation)

HT-pCApuro。将重组子转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 基因测序鉴定阳性克隆。

**电穿孔法转染 CHO-s 及加压筛选稳定高产单克隆细胞株** 采用抗体重链重组质粒 HT-pMH3、HT-pCApuro 和抗体轻链质粒 L-pMH3、L-pCApuro 电穿孔法共同转染 CHO-s 细胞。于 0.4 cm 的电击杯中, 160 V 电击 15 ms, 将电击后的细胞加到含 10 mL 培养基的平皿中, 37 °C 培养箱内培养。待细胞贴壁, 加入终质量浓度为 900  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的遗传霉素 (G418) 对细胞进行加压筛选, 克隆形成, 挑单克隆于 96、24 孔板培养, 取培养上清 4  $\mu\text{L}$  点于醋酸纤维素膜上, Dot blot 检测抗体的表达量, 筛选稳定高产单克隆细胞株, 共进行两轮单克隆细胞株筛选。

**纯化及鉴定表达产物 cG7Q** 取稳定高产单克隆细胞株的静息发酵液上清于 5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 °C 离心 30 min, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜抽滤。参照 GE 公司 Hi-Trap Protein A 柱说明书, 以 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速上样, 再用 10 倍柱体积的平衡缓冲液去除非特异性吸附后用洗脱液洗脱, 收集洗脱液用 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris 溶液中和。取纯化后的蛋白进行还原和非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 并用 HRP 标记的羊抗人 IgG (H+L) 进行 Western blot 检测。

**表面等离子共振法 (SPR) 检测 cG7QmAb 的亲合力** 采用 SPR, 偶联合适浓度的抗体 cG7Q 或 cG7 于 CM5 芯片。梯度稀释的 CD24-GST 抗原以恒定流速进样, 让偶联在芯片上的抗体与样品中的 CD24-GST 结合, 记录响应值 (RU) 的变化。理论上抗体和 CD24-GST 蛋白是按 1:2 的比例结合, 因此选择二价模型进行拟合。用 Biacore X100 自带软件, 分析结合常数  $K_a$  和解离常数  $K_d$ , 计算得平衡解离常数  $K_D$  ( $K_d/K_a$ )。

**流式细胞技术检测 cG7QmAb 的细胞抗原结合率** 消化制备 CD24 阳性肝癌细胞 Huh-7、BEL-7402 和 CD24 阴性结肠癌细胞 HCT-116 的细胞悬液, 设置实验组、阴性对照组。阴性对照组用脱脂牛奶封闭; 实验组用 200  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 cG7Q 或 cG7 在 4 °C 条件下孵育 1 h, 用含 2% 胎牛血清的 PBS 溶液洗涤, 于 1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速下低温离心 5 min, 弃上清, 重复洗涤 2 次, 加入按 1:1 000 稀释的 goat-anti-human IgG-FITC antibody, 避光冰浴 1 h, 洗涤同上, 最后用 500  $\mu\text{L}$  PBS 溶液重悬细胞, 上流式细胞仪, 设置合适参数检测。

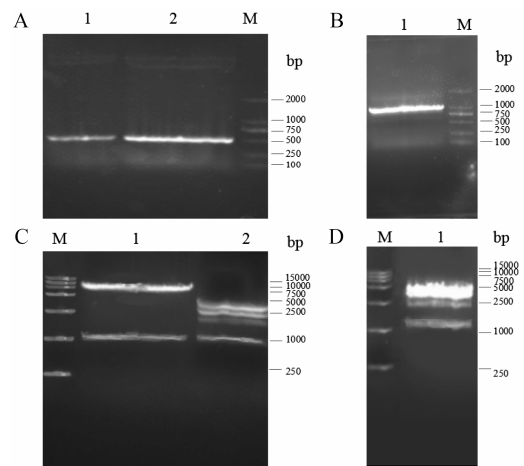
**抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 检测** 提取人外周血单个核细胞 PBMCs 作为效应细胞, CD24 高表达肝癌细胞 BEL-7402 或 Huh-7 作为靶细

胞, 将效应细胞和靶细胞于 37 °C 共孵育 4 h。根据 CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书, 取 50  $\mu\text{L}$  共孵育上清, 检测靶细胞裂解释放的乳酸脱氢酶 (LDH) 量。实验组抗体为 cG7Q 或 cG7; 5 个对照组为: 效应细胞自发 LDH 释放、靶细胞自发 LDH 释放、靶细胞最大 LDH 释放、裂解液体积校正对照及培养基背景对照。计算每组效应细胞与靶细胞比例 (效靶比) 的细胞毒性百分比公式: 细胞毒性 (%) = (实验组-效应细胞自发组-靶细胞自发组)/(靶细胞最大组-靶细胞自发组) $\times$ 100。

## 结果

### 1 G7Q 重链恒定区基因 CH 定点突变及 HT-pMH3、HT-pCApuro 重组质粒的构建和鉴定

cG7 重链 CH 基因定点突变示意图 (图 1), 将 CH 基因前半段和后半段 PCR 产物及 overlap PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2), lane 1、lane 2 为 CH 基因前半段和后半段产物, 分别在 571 bp、481 bp 出现目的条带 (A 图); 二者 overlap PCR 突变拼接的条带大小为 1 023 bp (B 图)。将 overlap PCR 产物连接到 T 载体进行测序鉴定, 通过双酶切 (*Not I*、*Nhe I*) 将突变成功的重链 CH 基因分别替换连接至含有 cG7 抗体原始重链的 pMH3、pCApuro 载体, 双酶切琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2), lane 1 分别为 pMH3、pCApuro 载体双酶切 (C、D 图), lane 2 为携带突变重链基因的

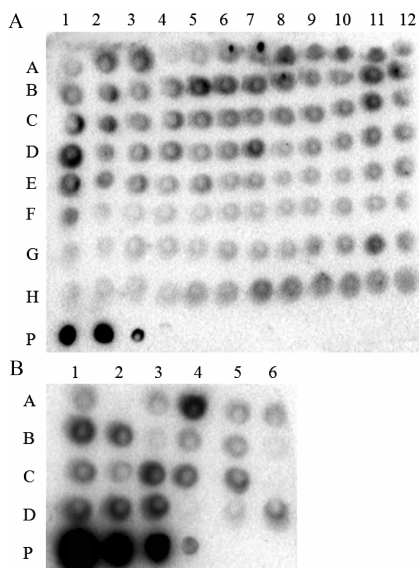


**Figure 2** Construction of the HT-pMH3, HT-pCApuro plasmid. A: Amplification of the two parts of the antibody CH-chain by PCR; Lane 1: Part 1 of the CH (571 bp); Lane 2: Part 2 of the CH (481 bp). B: Combination of the two parts by overlap PCR; Lane 1: Overlap PCR product (1 023 bp). C, D: Double digestion of the plasmids and the overlap PCR product in T plasmid; Lane 1: pCApuro and pMH3 plasmid; Lane 2: overlap PCR product in T plasmid. M: Marker

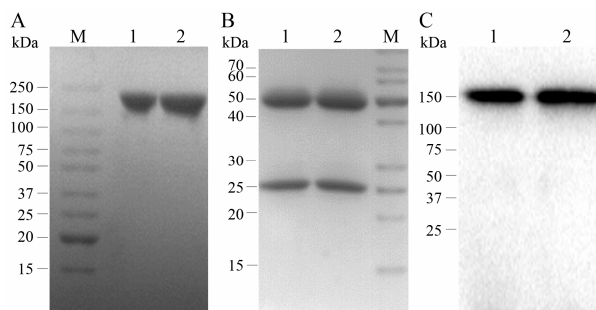
T 载体双酶切 (C 图)。将构建好的重组质粒载体 HT-pMH3、HT-pCApuro, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单克隆测序验证。

## 2 Dot blot 挑选稳定高产单克隆细胞株及 SDS-PAGE 电泳、Western blot 鉴定纯化产物

通过电穿孔法将重组质粒载体共转染 CHO-s, 经 G418 筛选后随机挑选 96 个克隆于 96 孔板中, 吸取上清进行 Dot blot 检测 (图 3); 挑选 24 个表达量较高的克隆于 24 孔板中亚培养。Dot blot 检测选出表达量相对较高的两个克隆, 分别于细胞培养皿中亚培养, 进行第二轮筛选。Dot blot 检测第一轮筛选 96 孔板目的蛋白表达量 (A) 及第二轮筛选 24 孔板中目的蛋白表达量 (B)。将筛选出的高产单克隆细胞株静息发酵, 收集发酵上清用 HiTrap Protein A 柱分离纯化得到目的蛋白 cG7Q (图 4), 非还原和还原条件下检测目的蛋白分子量和装配。cG7Q 和 cG7 在非还原条件下检测到二者在 150 kDa 处的主带 (A), 在还原条件下检测到 cG7Q、cG7 在 50 kDa 处的重链和 25 kDa 处的轻链 (B); 纯化后的 cG7Q 在非还原条件下 Western blot 鉴定, 使用 goat-anti-human IgG1 (H+L)-HRP antibody 检测, lane 1、lane 2 对应 cG7Q 和 cG7 (C), 进一步说明 cG7Q 表达正确。综上所述, 定点突变后的 cG7Q 保持母体单抗的结构且蛋白表达装配完好, 纯化达到电泳纯。



**Figure 3** Selection of the stably transfected clones. A, B: Semi-quantitative determination of the target protein by Dot blot. The high-yield clones in 96-well plate (A) was selected to a 24-well plate (B) and three preferable clones B1, C3, A4 in 24-well plate was selected, P1, P2, P3 represents the standard substance and the concentrations are 50, 25, 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectively



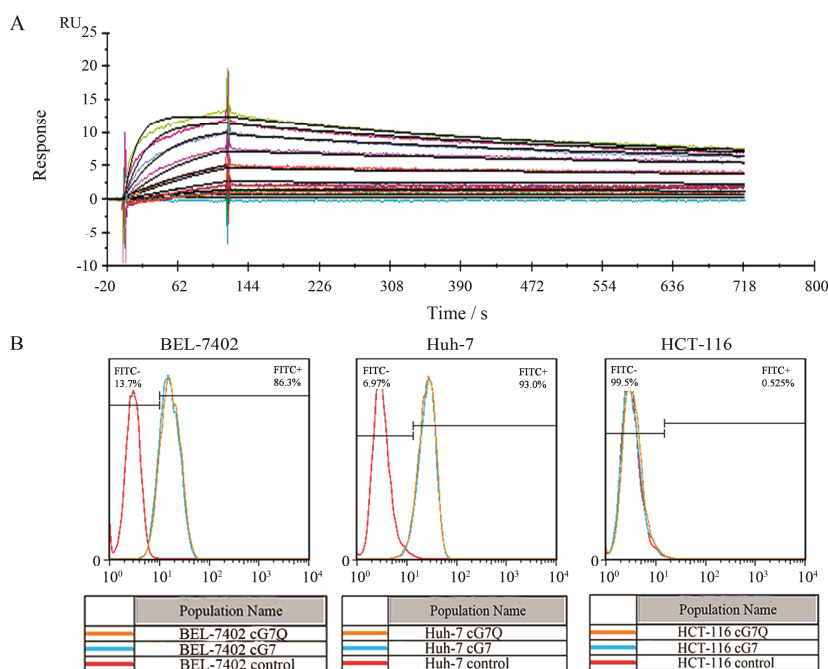
**Figure 4** Purification and identification of cG7Q. A: SDS-PAGE analysis of the purified cG7Q and cG7 under non-reducing conditions; Lane 1: cG7Q (150 kDa); Lane 2: cG7 (150 kDa). B: SDS-PAGE analysis of the purified cG7Q under reducing conditions; Lane 1, Lane 2: cG7Q, cG7, the heavy chain (50 kDa), the light chain (25 kDa). C: Western blot analysis of the purified cG7Q; Lane 1: cG7Q; Lane 2: cG7

## 3 SPR 测定 cG7Q 亲和力与流式细胞术验证 cG7Q 与 CD24<sup>+</sup> 肿瘤细胞株的结合率

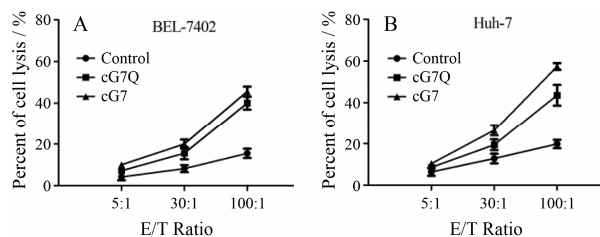
在 Biacore-X100 亲和力分析平台上进行亲和力分析, 获得具体的亲和力常数 (图 5A), cG7Q 亲和力常数  $K_D$  (M):  $8.62\text{E}-10$ ;  $K_{on}$  (1/Ms):  $8.38\text{E}+05$ ;  $K_{off}$  (1/s):  $7.23\text{E}-04$ ; 对比母体单抗 cG7 亲和力常数  $K_D$  (M):  $1.91\text{E}-10$ ;  $K_{on}$  (1/Ms):  $1.76\text{E}+06$ ;  $K_{off}$  (1/s):  $3.36\text{E}-4$  (结果未显示), 可以看出对于 CD24 抗原, cG7Q 对抗原的亲和力仅略有下降。流式细胞术检测抗体与细胞表面 CD24 抗原的结合情况 (图 5B), cG7Q 和 cG7 对 CD24 阴性的细胞株 HCT-116 均无结合; 而 cG7Q 和 cG7 对 CD24 阳性细胞株 BEL-7402 的结合率分别为 86.3%、86.0%; 对 CD24 阳性细胞株 Huh-7 结合率分别为 93.0%、92.8%。由此可见 cG7Q 和 cG7 对 CD24 表达阳性细胞株均有结合且结合能力相当。综上所述, 改造后的 cG7Q 保持亲本抗体 cG7 与抗原的亲和力及特异性结合能力。

## 4 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 检测结果

ADCC 实验选用 PBMCs 作为效应细胞, BEL-7402 和 Huh-7 作为靶细胞, 在效靶比充足 100 : 1 时摸索合适药物浓度, 设置 6 个药物质量浓度 (0.01、0.1、1、10、100 和 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 选择达到细胞裂解率平台期的药物质量浓度为最佳给药质量浓度, 即 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $665\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。将效应细胞 PBMCs 分别与靶细胞 BEL-7402 或 Huh-7 共孵育, 检测细胞毒性 (图 6)。设置效靶比梯度 5 : 1、30 : 1 和 100 : 1, 设置定点突变抗体 cG7Q 和母体单抗 cG7 实验组, 同时设置空白对照组 (只将 PBMCs 细胞和 BEL-7402 或 Huh-7 共孵育, 不加药)。结果可见, 随着效应细胞



**Figure 5** Affinity and binding capacity analysis. A: Affinity of cG7Q binding to human CD24 antigen measured by SPR, experimental results for the real-time binding of CD24 to immobilized cG7Q showed that the association rate increased with increasing concentration of the CD24 antigen. B: cG7Q and cG7 demonstrated relatively high binding signals with Huh-7, BEL-7402, but not with the CD24-negative HCT-116 cells, and the binding rate of cG7Q and cG7 is almost the same



**Figure 6** Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. A, B: Cytotoxicity assay to assess the PBMCs dependent killing of BEL-7402 or Huh-7 cells in the presence of cG7Q or cG7. The control group is the co-cultured cells absence of the antibody. The increase of cell lysis was weakened slightly upon treatment with cG7Q compared to cG7 because of deglycosylated of the cG7Q heavy chain

数量的增加, PBMCs 对 BEL-7402 和 Huh-7 细胞的杀伤作用呈依赖型增长 (6A, B), 在效靶比最高 100 : 1 时, cG7Q 和 cG7 对 BEL-7402 的细胞裂解率分别为 40.0%、45.6%; cG7Q 和 cG7 对 Huh-7 的细胞裂解率分别为 43.6%、57.4%。在相同效靶比的情况下, cG7Q 组的细胞裂解率均低于 cG7 组, 表明对 cG7 保守糖基化位点突变对抗体的 ADCC 效应有一定影响, 但 cG7Q 仍能在 PBMCs 中发挥对靶细胞的杀伤力。

## 讨论

肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 全球 50% 以上的肝癌发生在我国<sup>[18]</sup>, 因此开发靶向肝癌的定点偶联

ADC 药物极具应用前景。ADC 药物利用抗体的靶向性, 将杀伤力强大的小分子药物带入肿瘤细胞内, 显著提高药物的安全性。基于传统偶联技术制备的 ADC 药物为混合物<sup>[19, 20]</sup>, 本文设计利用酶法进行偶联, 该方法一般需要人为改造抗体, 使抗体产生可被特定酶所识别的氨基酸序列, 再通过酶对底物的特异性, 修饰特定的氨基酸残基从而实现抗体的定点偶联。利用甲酰甘氨酸生成酶偶联, 需在抗体上引入一个五肽序列作为酶识别的底物, 外源序列的引入可能存在免疫源性, 而利用谷氨酰胺转移酶催化实现定点偶联, 只需突变抗体上的一对位点。微生物来源的谷氨酰胺转移酶 (MTG) 是一种廉价易得的酶, 它对谷氨酰胺 (Glu) 残基具有独特的选择性, 而 MTG 对赖氨酸的选择性不高, 它可以识别赖氨酸及其结构类似物中的伯胺<sup>[21]</sup>, 因而可以设计一种带有伯胺的接头, 通过接头上的伯胺与抗体上特定的谷氨酰胺反应, 进而实现抗体与药物的定点偶联。在后续实验中, 将设计合成一种含缬氨酸-瓜氨酸的二肽接头, 一端为伯胺, 一端连接高毒性的微管蛋白抑制剂 MMAE。这种二肽接头能被溶酶体中的蛋白酶降解, 使 ADC 药物在靶细胞内释放细胞毒小分子, 提高药物在血液循环中的稳定性, 减少脱靶效应<sup>[22]</sup>。

鉴于 G7 对 CD24 过表达的肝癌具有良好的靶向性, 本文在嵌合抗体 cG7 的基础上, 定点改造 cG7 的

重链 CH 段, 得到 cG7Q。抗体可变区不变, 表面等离子共振及流式结果证明, cG7Q 保持母体单抗 cG7 对抗原的结合能力, 可用于进一步研究靶向 CD24 的抗体药物偶联物, 也可将定点改造的 Fc 片段与其他抗体可变区拼接, 制备靶向其他肿瘤表面标记物的定点偶联 ADC 药物。抗体的 ADCC 效应依赖抗体 Fc 段与效应细胞的 Fc $\gamma$  受体结合而发挥作用, 文中将 cG7 第 297 位保守糖基化位点突变, 使抗体 Fc 段减少了一个糖基化位点, 实验结果表明 cG7Q 的 ADCC 效应相较于亲本抗体的 ADCC 效应, 强度有所降低。Lhospice 等研究<sup>[23]</sup>显示, 297 位去糖基化的抗体 cAC10Q 的 Fc 段与 Fc $\gamma$ R 的结合力变弱, 减少了 ADC 药物脱靶时对 Fc $\gamma$ R 阳性正常细胞的毒性, 体内数据显示, cAC10Q 在肝和肾脏中的富集明显减少, 与已上市的前替诺昔单抗相比, 显著提高了小鼠的体内耐受, 因此, 本研究预期突变体将具有优于野生型抗体的体内稳定性与毒副作用。

本文成功表达出具有 4 个谷氨酰胺偶联位点的 cG7Q, 后续可通过谷氨酰胺转移酶将可降解的含有伯胺的毒素接头偶联到抗体天然的 295 位的谷氨酰胺以及突变的 297 位谷氨酰胺位点上, 制备偶联比均一的靶向人 CD24 的 ADC 药物, 为 CD24 高表达肝癌提供潜在的治疗研究方案。

## References

- [1] Ansell SM. Brentuximab vedotin [J]. *Blood*, 2014, 124: 3197–3200.
- [2] LoRusso PM, Weiss D, Guardino E, et al. Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 6437–6447.
- [3] Wang L, Amphlett G, Blättler WA, et al. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immun-conjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry [J]. *Protein Sci*, 2005, 14: 2436–2446.
- [4] Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, et al. Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of anti-STEAP1 antibody-drug conjugates in rats [J]. *Bioconjug Chem*, 2011, 22: 1994–2004.
- [5] Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 7063–7070.
- [6] Bhakta S, Raab H, Junutula JR. Engineering THIOMABS for site-specific conjugation of thiol-reactive linkers [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1045: 189–203.
- [7] Hallam TJ, Wold E, Wahl A, et al. Antibody conjugates with unnatural amino acids [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1848–1862.
- [8] Behrens CR, Liu B. Methods for site-specific drug conjugation to antibodies [J]. *MAbs*, 2014, 6: 46–53.
- [9] Zhou Q, Kim J. Advances in the development of site-specific antibody-drug conjugation [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15: 828–836.
- [10] Mindt TL, Jungi V, Wyss S, et al. Modification of different IgG1 antibodies *via* glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 271–278.
- [11] Denninger P, Chiotellis A, Fischer E, et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25: 569–578.
- [12] Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule [J]. *J Mol Histol*, 2004, 35: 255–262.
- [13] Lee JH, Kim SH, Lee ES, et al. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22: 1149–1156.
- [14] Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59 Suppl 2: S351–S354.
- [15] Hong YP, Li ZD, Prasoon P, et al. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: from basic research to clinical use [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7: 980–992.
- [16] He H, Tu X, Zhang J, et al. A novel antibody targeting CD24 and hepatocellular carcinoma *in vivo* by near-infrared fluorescence imaging [J]. *Immunobiology*, 2015, 220: 1328–1336.
- [17] Wang T, Sun F, Xie W, et al. A bispecific protein rG7S-MICA recruits natural killer cells and enhances NKG2D-mediated immunosurveillance against hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2016, 372: 166–178.
- [18] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58: 71–96.
- [19] Panowski S, Bhakta S, Raab H, et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy [J]. *MAbs*, 2014, 6: 34–45.
- [20] Sun Y, Huang R, Sun BW. Advances in the study of site-specific antibody-drug conjugates [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1225–1231.
- [21] Fontana A, Spolaore B, Mero A, et al. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 13–28.
- [22] Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 778–784.
- [23] Lhospice F, Brégeon D, Belmont C, et al. Site-specific conjugation of monomethyl auristatin E to anti-CD30 antibodies improves their pharmacokinetics and therapeutic index in rodent models [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1863–1871.