

## • 研究论文 •

## 新型抗体偶联药物 607-LDM 的制备及抗肿瘤活性研究

于 群<sup>1</sup>, 袁佳璐<sup>2,3</sup>, 翟小田<sup>1</sup>, 马 健<sup>2,3</sup>, 苗庆芳<sup>1\*</sup>, 甄永苏<sup>1</sup>

- (1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 国家卫生健康委员会抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050;  
2. 抗体药物国家工程研究中心, 上海 201203; 3. 三生国健药业(上海)股份有限公司, 上海 201203)

**摘要:** 抗体偶联药物 (antibody-drug conjugates, ADCs) 是目前肿瘤治疗药物中最重要的种类之一。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 特异性高表达于乳腺癌和卵巢癌等多种实体肿瘤, 已被证实是 ADC 的理想靶点。力达霉素 (lidamycin, LDM) 是中国医学科学院医药生物技术研究所自主研发的强效烯二炔抗肿瘤抗生素, 其分子具有可拆分和重建的特点, 适于用作 ADC 的“弹头”药物。本研究利用 LDM 的分子特点, 采用特殊“定点偶联”技术, 制备药物抗体比 (drug-to-antibody ratio, DAR) 为 2 的抗 HER2 抗体 607 与力达霉素的 ADC 607-LDM, 并研究其抗肿瘤活性, 结果表明: 607-LDM 在体外对人卵巢癌 SKOV3 和乳腺癌 BT-474 细胞有强烈杀伤活性, 还可诱导二者发生细胞凋亡和 G2/M 期阻滞。在 SKOV3 裸鼠移植模型中 (动物实验符合中国实验动物护理和使用准则, 并经中国医学科学院医药生物技术研究所实验动物伦理委员会批准), 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 607-LDM 尾静脉注射 1 次, 抑瘤率为 72.4%, 显著强于单独抗体组 (30.2%)、LDM 最大耐受剂量组 (50.6%) 及二者联用组 (50.1%)。本研究构建的新型 ADC 药物 607-LDM 有望成为治疗 HER2 阳性肿瘤的候选药物。

**关键词:** 抗体偶联药物; 人表皮生长因子受体 2; 力达霉素; 卵巢癌; 乳腺癌; 抗肿瘤活性

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)02-0496-07

## Preparation and anti-tumor activity of a novel antibody-drug conjugate 607-LDM

YU Qun<sup>1</sup>, YUAN Jia-lu<sup>2,3</sup>, ZHAI Xiao-tian<sup>1</sup>, MA Jian<sup>2,3</sup>, MIAO Qing-fang<sup>1\*</sup>, ZHEN Yong-su<sup>1</sup>

(1. NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2. National Engineering Research Center of Antibody Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Sunshine Guojian Pharmaceutical (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Antibody-drug conjugates (ADCs) are one of the most important classes of anticancer therapeutics. Human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), which is highly expressed in many types of aggressive cancers including breast and ovarian cancer, has been approved as an ideal target for ADCs. Lidamycin (LDM), developed by Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, is an enediyne-containing antibiotic with potent anti-tumor activity. LDM is a promising payload for ADCs. In the present research, using a special site-directed conjugating technology, we made a novel ADC (607-LDM) with a drug-to-antibody ratio (DAR) of 2 and composed of the anti-HER2 antibody 607 and LDM. The new ADC exhibited potent antitumor activity against human ovarian cancer SKOV3 and breast cancer BT-474 cells. It also induced apoptosis and G2/M arrest. In nude mice with SKOV3 xenografts and a tumor volume of 150–200 mm<sup>3</sup>, a single intravenous injection 607-LDM at 1 mg·kg<sup>-1</sup> induced tumor growth inhibition of 72.4%, which was significant compared to either LDM (50.6%) or antibody (30.2%) treatment alone, or both in combination (50.1%,  $P < 0.05$ ). All animal experiments

收稿日期: 2020-07-21; 修回日期: 2020-08-06.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2016-I2M-3-013); 北京市自然科学基金项目 (7202133).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83167179, E-mail: miaoqf@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1225

were performed in accord with National Regulations and approved by the Animal Experiments Ethical Committee of College of Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences. The novel ADC designed in this study, 607-LDM, is a promising candidate for the treatment of HER2-positive cancers.

**Key words:** antibody-drug conjugate; human epidermal growth factor receptor 2; lidamycin; ovarian cancer; breast cancer; anti-tumor activity

抗体偶联药物 (antibody-drug conjugates, ADCs) 是由单克隆抗体与小分子细胞毒药物通过特定连接子 (linker) 共价连接而成的新型肿瘤靶向药物。抗体作为靶向载体运送细胞毒药物即“效应分子”或“弹头”至肿瘤部位后, 与肿瘤细胞表面抗原特异性结合, 经内吞到达溶酶体, 然后释放细胞毒药物杀伤肿瘤细胞。因此, 与传统化疗药物相比, ADC 可显著改善治疗指数, 减少对正常组织的毒副作用<sup>[1]</sup>。近年来, 随着单克隆抗体技术的发展, 以及新型毒素、连接子和肿瘤靶标的发现, ADCs 药物发展迅速, FDA 仅在 2019 年就批准了 3 种 ADCs 上市, 截至目前, 已有 8 个抗体偶联药物先后获得 FDA 批准上市<sup>[2]</sup>。ADCs 在临床应用中体现了很好的安全性和有效性, 已成为肿瘤靶向治疗领域的研究热点和重要发展方向。当前, 全球已有超过 100 个 ADC 新药处于临床试验的不同阶段<sup>[3]</sup>, 预计在未来 5 年内将有多个 ADC 药物获批上市<sup>[1]</sup>。但是, 目前已上市或在研的 ADC 药物“弹头”的种类非常有限, 绝大多数采用微管抑制剂美登素或海兔毒素 (monomethyl auristatin E, MMAE) 衍生物, 但这类药物依赖于细胞的快速分裂, 对在复发和耐药中起关键作用的休眠的肿瘤细胞无影响, 并且易发生耐药。因此, 寻找与上述药物作用机制不同的新型 ADC“弹头”尤为重要。由于肿瘤细胞表面抗原数量有限 (每个细胞表面  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  个抗原), 并且每个抗体偶联的药物分子数有限 (平均 3.5~4 个), 最后通过 ADC 输送并到达肿瘤细胞的药物分子数很低, 因此“弹头”分子必须有极强的毒性。这也被认为是采用氨甲喋呤、紫杉醇和蒽环类抗生素等毒性一般的传统化疗药物作为“弹头”的 ADC 临床试验失败的主要原因<sup>[4]</sup>。

力达霉素 (lidamycin, LDM) 是从我国湖北潜江县土壤分离得到的一株放线菌分泌的肽类代谢产物, 是一种强效抗肿瘤抗生素。其结构为一条含 110 个氨基酸的辅基蛋白 (apoprotein of LDM, LDP, 10 500 Da) 和一个九元环烯二炔发色团 (active enediyne chromophore of LDM, AE, 843 Da) 组成, AE 是 LDM 活性成分, LDP 起稳定和发色团作用, 二者在体外可进行拆分和重建, 重建后的分子与天然力达霉素的活性相同<sup>[5]</sup>。LDM 具有高效杀伤肿瘤细胞作用, 克隆形成实验显示其对

肿瘤细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 在  $10^{-17} \sim 10^{-16}$  mol·L<sup>-1</sup> 之间, 比多柔比星和丝裂霉素等传统化疗药物强 10 000 倍以上, 是迄今发现活性最强的肽类抗生素之一<sup>[6]</sup>。LDM 和卡奇霉素 (calicheamicin) 同属烯二炔家族, 目前已有两种以卡奇霉素为“弹头”的 ADC (Besponsa 和 Mylotarg) 被批准上市, 因此, 以 LDM 作为“弹头”构建 ADC 极具发展潜力。

HER2 是具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜蛋白, 由胞内的蛋白酪氨酸激酶区、单链跨膜区和胞外的抗体结合区 3 部分组成, 是人表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族成员之一, 参与细胞分化、黏附及运动等重要生理过程<sup>[7,8]</sup>。HER2 可与同家族受体 HER3、HER4 发生异源二聚化从而增强二者与特异性配体的亲和能力, 促进酪氨酸残基磷酸化, 从而介导细胞增殖和肿瘤发生<sup>[9]</sup>。目前, HER2 在乳腺癌中的表达与功能已研究得比较透彻, 15%~30% 的乳腺癌会发生 HER2 基因扩增或过表达, 正常乳腺组织中低表达或不表达, 其高表达与乳腺癌发生发展密切相关, 是重要的临床预后标志物。除乳腺癌以外, HER2 在卵巢癌、结肠癌、非小细胞肺癌、子宫内膜癌、膀胱癌和头颈癌等多种肿瘤中也有部分高表达。HER2 高表达与肿瘤患者不良预后以及耐药性密切相关, 是判断肿瘤恶性程度的独立预后指标<sup>[10-14]</sup>。HER2 已被证实是肿瘤治疗的理想靶标。

607 为三生国健药业 (上海) 股份有限公司制备的抗 HER2 抗体, 为曲妥珠单抗生物类似药, 本研究尝试以 607 为载体, 以力达霉素为“弹头”, 根据 LDM 可拆分和重建的分子特点, 采用 DNA 重组和分子重建相结合的特殊“定点偶联”技术, 制备靶向 HER2 的新型 ADC 607-LDM 并研究其抗肿瘤活性, 为肿瘤靶向治疗提供潜在的候选药物。

## 材料与amp;方法

**实验材料和试剂** 人 HER2 重组蛋白购自北京义翘神州科技股份有限公司, MTT 购于 Sigma 公司, BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix 购于北京兰博利德生物科技有限公司; 蛋白分子量标准、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、凋亡周期检测试剂盒等购于

Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗人 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术公司; 抗 HER2 抗体 607 重组表达载体、融合蛋白重组表达载体 pTT 由三生国健药业 (上海) 股份有限公司保存, LDP 表达载体由中国医学科学院医药生物技术研究所以保存。

HER2 高表达的人卵巢癌细胞系 SKOV3 和人乳腺癌细胞系 BT474、HEK293E 细胞由三生国健药业 (上海) 股份有限公司保存; 7~9 周龄雌性 BALB/c 裸鼠, 18~20 g, 购自北京安凯毅博生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2012-0009。动物实验符合中国实验动物护理和使用准则, 并经中国医学科学院医药生物技术研究所以实验动物伦理委员会批准。

**融合蛋白 607-LDP 构建表达及纯化** 采用 PCR 技术将融合蛋白 607-LDP [607-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-LDP] 基因克隆至 PTT5 表达载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  进行扩增, 然后提取质粒, 经测序鉴定序列无误后瞬时转染 HEK293E 细胞, 经无血清培养后收集上清, 采用 Protein A 亲和柱进行纯化, 获得 607 抗体和融合蛋白 607-LDP。将纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 凝胶电泳和 HPLC 法检测抗体的纯度, 并用 BCA 试剂盒 (标准品为牛血清免疫球蛋白 BGG) 测定抗体的浓度。

**ELISA 法检测融合蛋白 607-LDP 与重组人 HER2 抗原的亲合活性** 96 孔板包被重组人 HER2 抗原, 每孔 1  $\mu$ g, 并用 2% BSA 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗 3 次, 加入 10 倍梯度稀释的 607-LDP 或 607, 浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001 和 0.000 1 nmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 洗 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG 二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 避光条件下加入 TMB 底物溶液进行显色反应, 避光孵育 15 min, 加入浓度为 2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用酶标仪测定光吸收值 A<sub>450</sub>。

**融合蛋白 607-LDP 与发色团 AE 组装** 采用 HPLC 分离 LDM 发色团, 色谱柱为 (Jupiter5U C4, 1 500 mm $\times$  100 mm), 流动相为水-乙腈-三氟乙酸 = 78%:22%:0.05%, 350 nm 检测吸收值, 收集 AE, 将 AE 与 607-LDP 蛋白按 3:1 分子比混合, 4  $^{\circ}$ C 避光搅拌 14 h, 过夜组装后用 50 000 MW 超滤管超滤, 除去游离的 AE, 反相 HPLC (C4, 300 A) 在 350 nm 处检测吸收值, 制作浓度/峰面积的标准曲线, 计算组装效率, 得到组装后的强化融合蛋白 607-LDM。

**MTT 法检测 607-LDM 对肿瘤细胞杀伤抑制作用** 将对数生长的 HER2 高表达的人卵巢癌 SKOV3 和人乳腺癌 BT474 肿瘤细胞经 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 制成适当浓度的单细胞悬液, 计数, 稀释成适宜浓度铺板, 37%、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 待细胞贴壁生

长后, 加入不同浓度梯度的药物培养 48 h。然后每孔加入 MTT 溶液 10  $\mu$ L (10 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 培养 4 h, 弃上清, 每孔加入二甲亚砜 150  $\mu$ L, 室温震荡 10 min, 酶标仪测定 570 nm 处的吸光值 (A<sub>570</sub>)。实验设置无药对照组和无细胞空白对照组, 按照公式计算细胞存活率并算出 IC<sub>50</sub> 值: 细胞存活率 = (加药组 A<sub>570</sub> 值 - 空白对照组 A<sub>570</sub> 值) / (对照组 A<sub>570</sub> 值 - 空白对照组 A<sub>570</sub> 值)  $\times$  100%。

**Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测 607-LDM 诱导肿瘤细胞凋亡作用** 将对数生长期的 SKOV3 和 BT474 细胞计数后稀释成适宜浓度铺 6 孔板, 24 h 后给药, 继续培养 24 h, 然后小心收集细胞培养液到离心管内备用。0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 终止消化后细胞悬液与前面收集的上清液混合, 1 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 然后加入冰浴预冷的 PBS 洗涤 2 次, 冰浴备用。

加入预先配置好的 Annexin V 结合缓冲液, 制成细胞数为每毫升 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个的细胞悬液, 取出细胞悬液 100  $\mu$ L 加入到新的 EP 管中, 向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 结合物 5  $\mu$ L, 再加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 溶液 5  $\mu$ L, 室温下避光放置 15 min, 加入 1 $\times$ Annexin V 结合缓冲液 400  $\mu$ L, 用 200 目滤网过滤样品后冰浴避光存放, 待流式细胞仪加样检测 (具体参照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明处理)。

**PI 染色结合流式细胞仪检测 607-LDM 诱导肿瘤细胞周期调节作用** 细胞处理部分同凋亡检测, 向洗涤后冰浴备用的细胞团中加入冰浴预冷的 70% 乙醇制成细胞悬液, 4  $^{\circ}$ C 固定 24 h, 3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 残留约 50  $\mu$ L 左右的 70% 乙醇, 避免吸走细胞沉淀, 轻轻弹击离心管管底松散细胞, 加入配置好的碘化丙啶染色液 (具体步骤参照凋亡周期检测试剂盒说明), 37  $^{\circ}$ C 避光温育 30 min, 用 200 目滤网过滤, 流式细胞仪于 488 nm 激发波长检测。

**607-LDM 对裸鼠 SKOV-3 移植瘤模型的抑瘤作用** 采用人卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植模型评价抗体偶联药物 607-LDM 的体内抗肿瘤疗效。选取雌性 BALB/c 裸鼠, 7~9 周龄, 体重 18~20 g, 每只接种 7 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞和等体积混合基质胶 (Matrigel) 的悬液 200  $\mu$ L 至右侧腋窝皮下。待瘤体体积达 150~200 mm<sup>3</sup> 时, 将小鼠按照肿瘤大小和体重随机分组, 使组间肿瘤大小平均值接近、各组体重平均值接近, 每组 6 只, 共 8 组。尾静脉注射给药, 给药方案: 607 (1.0 和 5.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), LDM (0.05 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 607 (1.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>) + LDM (0.05 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 607-LDM (0.6、0.8 和 1.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 给药 1 次, 对照组不做处理。实验期间, 密切观察肿瘤生长和小鼠体重的变化, 每隔 2~3 天测量肿瘤直径 (长径和短径) 和小鼠体重。根据公

式  $V = ab^2/2$  计算肿瘤体积 ( $a$ : 肿瘤长径;  $b$ : 肿瘤短径), 绘制肿瘤生长曲线并根据公式  $[1 - (\text{终末体积}_{\text{给药组}} - \text{初始体积}_{\text{给药组}}) / (\text{终末体积}_{\text{对照组}} - \text{初始体积}_{\text{对照组}})] \times 100\%$  计算抑瘤率。

**统计学方法** 实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 处理, 表示为  $\bar{x} \pm s$ 。两组间的差异性比较采用 Student's  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 结果

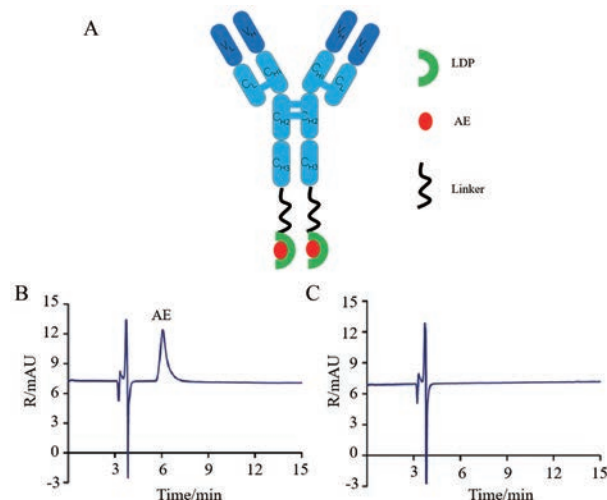
### 1 融合蛋白 607-LDP 纯度检测及亲和活性分析

采用 SDS-PAGE 对纯化后的融合蛋白 607-LDP 进行鉴定, 结果表明: 还原条件下 607 重链分子质量约为 50 kDa, 607-LDP 重链由于连接了 LDP (10 kDa) 分子质量约 60 kDa, 二者轻链分子质量均约 25 kDa, 与理论分子量相符 (图 1A)。通过 HPLC 高效液相色谱法检测融合蛋白 607-LDP 纯度, 纯度达到 98% 以上 (图 1B), 纯化后产量为  $23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ELISA 法检测融合蛋白 607-LDP 及 607 抗体与 HER2 抗原的亲和活性 (图 1C), 607-LDP 与抗原的亲和曲线与裸抗体 607 基本一致, 证明将 LDP 融合在 607 抗体重链 C 端并没有影响其亲和活性。

### 2 融合蛋白 607-LDP 与 LDM 发色团 AE 的组装

LDM 由辅基蛋白 LDP 与活性发色团 AE 通过非共价键连接构成, 当有机溶剂存在时, LDP 与 AE 之间的非共价键破坏, 二者分离。除去有机溶剂后, 二者可重新组装, 且组装后产物活性与天然 LDM 相似, LDM 发色团 AE 在 340 nm 波长处有特征吸收峰。采用有机溶剂对 LDM 的辅基蛋白 LDP 与发色团 AE 进行拆分, 利用凝胶色谱柱分离 AE, 再与融合蛋白 607-LDP 进行组装, 即获得 ADC 药物 607-LDM (图 2A)。图 2B 表明组装后的 607-LDM 在 340 nm 处有发色团的特征吸收峰, 说明融合蛋白 607-LDP 和发色团 AE 组装成功。图 2C 表示超滤后的蛋白溶液中不存在游离 AE, 说明游离

AE 已去除干净。在反向高效液相色谱 (RP-HPLC) 条件下, 607-LDM 可解离出融合蛋白 607-LDP 和发色团 AE, 通过计算峰面积可检测 607-LDP 和 AE 的组装效率。检测成功组装 ADC 后的 AE 吸收峰面积是 113.2, 根据 LDM 浓度与 AE 吸收峰面积的标准曲线, 计算组装效率为 82%。



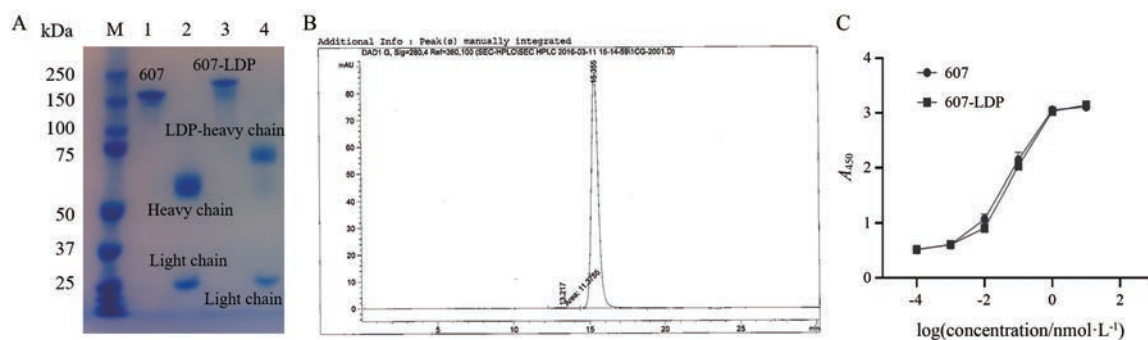
**Figure 2** Molecular reconstitution of 607-LDP and AE. A: Schematic structure of 607-LDM; B: RP-HPLC analysis of 607-LDM using a Vydac C4 300 A column at 340 nm; C: Analysis of the residual free AE after ultrafiltration by RP-HPLC. AE: Active enediyne chromophore of LDM

### 3 607-LDM 对肿瘤细胞有强烈的杀伤作用

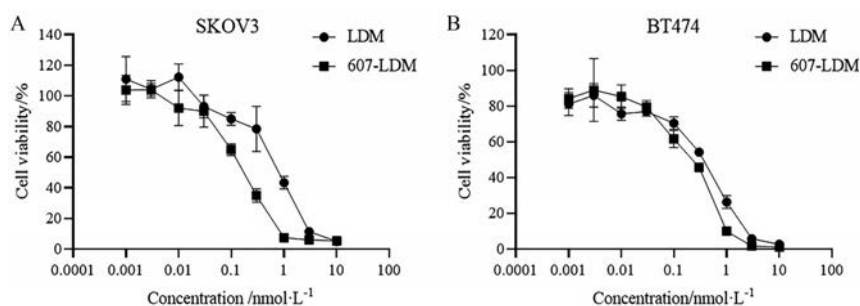
采用 MTT 法检测抗体偶联药物 607-LDM 以及单药 LDM 对肿瘤细胞生长的抑制作用。结果表明, LDM 单药对 HER2 阳性的 SKOV3 和 BT474 有强烈的杀伤作用,  $IC_{50}$  值分别为  $0.042$  和  $0.171 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 而 607-LDM 的杀伤活性则强于 LDM 单药, 对上述两种细胞的  $IC_{50}$  值分别为  $0.028$  和  $0.056 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 3)。

### 4 607-LDM 可诱导肿瘤细胞凋亡

SKOV3 和 BT474 细胞经过 607-LDM 处理 24 h



**Figure 1** Analysis of purified fusion protein 607-LDP by SDS-PAGE (A), HPLC (B) and ELISA (C). Lane M: Protein marker; Lane 1: 607 under non-reducing condition; Lane 2: 607 under reducing condition; Lane 3: 607-LDP under non-reducing condition; Lane 4: 607-LDP under reducing condition. 607: Anti-HER2 antibody; LDP: Apoprotein of lidamycin (LDM)



**Figure 3** Cell viabilities of SKOV3 (A) and BT474 (B) cells treated with different concentration of 607-LDM and LDM for 48 h by MTT

后, Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞仪检测 607-LDM 对肿瘤细胞的凋亡诱导作用, 结果如图 4 所示, 分别得到早期凋亡 (右下象限)、中晚期凋亡 (右上象限)、坏死 (左上象限)、以及活细胞 (左下象限) 的比例。可以看出, 随着药物浓度的增大, 活细胞比例减少, 凋亡细胞比例明显上升, 表明 607-LDM 可呈浓度依赖性诱导肿瘤细胞凋亡。

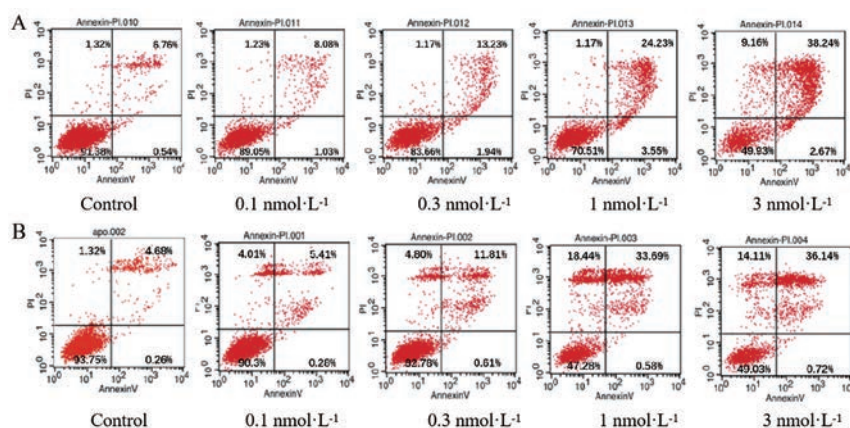
**5 607-LDM 可诱导肿瘤细胞 G2/M 期阻滞**

PI 染色结合流式细胞仪检测 607-LDM 对细胞周期的影响, 结果显示: 在 0.003、0.01 和 0.03 nmol·L<sup>-1</sup> 时,

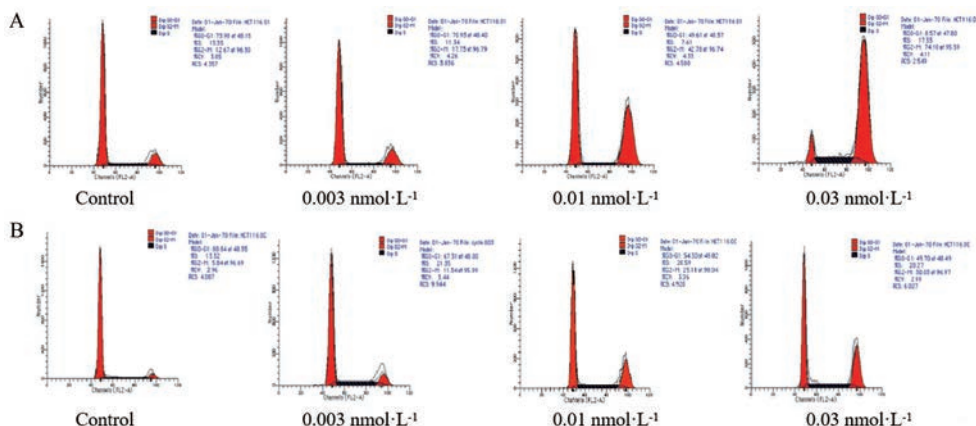
607-LDM 可诱导 SKOV3 细胞 (图 5A) 和 BT474 细胞 (图 5B) 明显的 G2/M 期阻滞, 且呈浓度依赖性。

**6 抗体偶联药物 607-LDM 对卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植瘤的生长抑制作用**

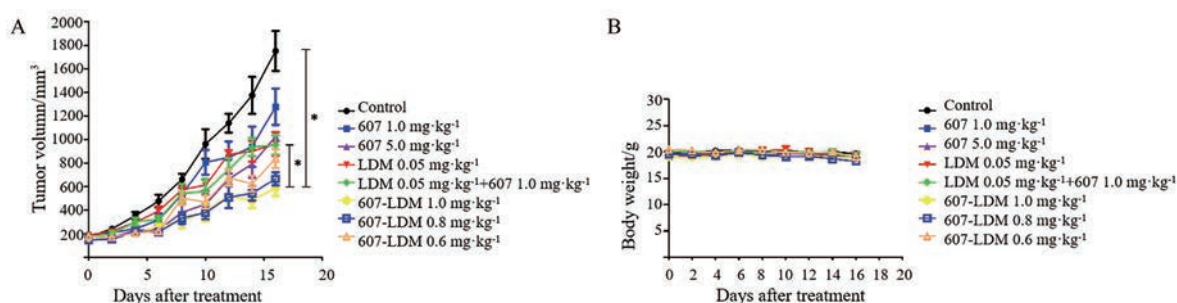
采用人卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植模型检测抗体偶联药物 607-LDM 的体内抗肿瘤疗效, 结果显示: 不同剂量的 607-LDM 给药组肿瘤生长速度均有明显不同程度的减慢, 且呈现剂量依赖性关系。607-LDM 在 0.6、0.8 和 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下对 SKOV3 裸鼠移植瘤的抑瘤率分别为 58.4%、67.3% 和 72.4%, 而单独 607 抗体



**Figure 4** Apoptosis analysis of SKOV3 (A) and BT474 (B) cells treated with 607-LDM for 24 h via Annexin V-FITC/PI staining by flow cytometry. Untreated cells were used as control



**Figure 5** 607-LDM induced G2/M phase arrest in SKOV3 (A) and BT474 (B) cells treated with 0.003, 0.01 and 0.03 nmol·L<sup>-1</sup> for 24 h



**Figure 6** *In vivo* antitumor efficacy of 607-LDM against SKOV3 cell xenograft tumors. A: The tumor growth curves of tumor-bearing mice after injection with different doses of drugs; B: Body weight shifting in tumor bearing mice. The drugs were injected intravenously once on day 0.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$

在 1.0 和 5.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的抑瘤率分别为 30.2% 和 46.7%, LDM 最大耐受剂量 0.05  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的抑瘤率为 50.6%, 607 抗体 (1.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和 LDM (0.05  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 联合给药组抑瘤率为 50.1% (图 6A)。与 LDM (0.05  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 或 607 抗体 (1.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 及二者联用相比, 607-LDM (1.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 组抑瘤率 (72.4%) 有显著差异 ( $P < 0.05$ )。实验期间上述各组裸鼠状态良好, 活动饮食正常且未出现死亡, 给药组体重无明显下降 (图 6B)。上述结果说明, 抗体偶联药物 607-LDM 相比单药 LDM 或 607 裸抗及二者联合具有更好的抗肿瘤活性。

## 讨论

目前, 已有多款以 HER2 为靶点的抗肿瘤药物上市, 包括抗体药物、抗体偶联药物和小分子酪氨酸激酶抑制剂<sup>[15,16]</sup>。然而, 作为最易发生突变的蛋白酪氨酸激酶家族成员之一, HER2 耐药型肿瘤相比野生型更易侵袭和转移, 且恶性程度大。肿瘤对 HER2 抗体耐药的主要原因是细胞通过减少抗体与 HER2 受体结合, 增强可替代 HER2 的酪氨酸激酶受体家族下游通路的调节及改变其他信号通路进而产生耐药<sup>[9]</sup>。T-DM1 是由妥珠单抗与微管抑制剂类药物美登素衍生物 DM1 偶联而成的 ADC, 与单纯抗体药物不同的是, 它不依赖 HER2 介导的下游通路调节, 而是利用单抗的靶向作用将效应分子 DM1 运至肿瘤细胞内, 然后释放 DM1, 从而发挥其抑制肿瘤细胞生长和促进凋亡等作用。因此, T-DM1 在很大程度上克服了由于仅依赖与 HER2 结合进而介导下游信号通路发挥抗肿瘤作用的单抗和小分子酪氨酸激酶抑制剂药物的耐药问题。但是, 研究表明 T-DM1 也会出现耐药, 主要原因是 DM1 诱导 P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白、乳腺癌抗性蛋白过表达及微管蛋白突变等<sup>[17]</sup>, 因此采用与微管抑制剂类药物不同作用机制的强效细胞毒药物作为效应分子则有可能克服现有药物 T-DM1 的耐药问题。与 DM1 不同,

作为烯二炔家族的新成员, LDM 通过断裂 DNA 发挥强效细胞毒作用, 是 ADC 的理想效应分子。本研究以 LDM 为弹头制备的新型抗 HER2 抗体 ADC 607-LDM, 不仅为 HER2 阳性恶性肿瘤治疗提供了新的候选药物分子, 还可能用于 T-DM1 耐药的肿瘤。

与传统的化学偶联方法不同, 本研究利用 LDM 分子可组装和重建的分子特点, 采用一种特殊“定点偶联”方法实现 ADC 药物的构建。首先, 利用基因工程技术, 将 LDM 的辅基蛋白 LDP 通过连接肽融合到 607 抗体重链 C 端, 得到融合蛋白 607-LDP。然后, 通过有机溶剂分离得到 LDM 的活性发色团 AE, 利用分子组装法将 AE 与 607-LDP 重新组装, 得到极具杀伤活性且药物抗体比 (DAR) 理论上为 2 (抗体的 2 条重链各连接 1 个 LDM 分子) 的新型 ADC 药物 607-LDM。该方法既有效避免了传统非定点化学偶联带来的药物结合位置及数量的不可控、稳定性低和不均一等问题<sup>[18]</sup>, 又克服了传统定点偶联技术复杂的抗体修饰和连接肽的合成过程。此外, 本实验室已成功构建抗 CD30 抗体与 LDM 的 ADC anti-CD30-LDM<sup>[19]</sup>, 证明经过基因工程技术将 LDM 的辅基蛋白 LDP 通过连接肽连接于抗体 VL 可变区 N 端是可行的, 且对于抗体亲和性和靶向性无影响。本研究采用了与前期工作不同的设计, 将辅基蛋白 LDP 通过  $(\text{G}_4\text{S})_3$  连接于抗体重链 C 端, 以避免可能出现的抗体可变区连接 LDP 影响其亲和性和活性的问题。从理论上讲, C 末端融合异源蛋白可能会影响抗体的抗体依赖的细胞介导的细胞毒效应, 但 ADC 的抗肿瘤功能主要由“弹头”药物实现。从实验结果来看, 607-LDM 对抗原阳性肿瘤细胞有强烈的杀伤作用, 活性强于游离 LDM, 因此 C 末端连接 LDM 是可行的。本研究为以 LDM 为“弹头”的 ADC 药物提供另一可行的连接位点, 该方法还具有可通过哺乳动物细胞大量制备、操作简便和产品均一性好等优势。

本研究构建的新型靶向 HER2 的 ADC 药物 607-

LDM,具有良好的体内外抗肿瘤活性。MTT结果显示抗体偶联药物 607-LDM 对 HER2 阳性的 SKOV-3 和 BT474 细胞相比于单药 LDM 具有更强的增殖抑制及杀伤活性。在 SKOV-3 移植瘤抑制实验中,尾静脉注射给药 1 次,607-LDM 相比抗体或 LDM 单药及二者联合组具有更好的抑瘤效果 ( $P < 0.05$ ),且各实验组动物体重无明显下降,因此,607-LDM 具有良好的体内外抗肿瘤活性及安全性。以上结果说明,607-LDM 可作为一种新型极具发展潜力的治疗 HER2 阳性恶性肿瘤的候选抗体偶联药物。

**作者贡献:** 于群、翟小田完成了 607-LDM 的体内外抗肿瘤活性研究;袁佳璐、马健完成了 607-LDP 融合蛋白的构建、表达、纯化及亲和活性研究;于群、苗庆芳完成了论文初稿;苗庆芳、甄永苏设计并指导了所有实验;苗庆芳完成了论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Birrer MJ, Moore KN, Betella I, et al. Antibody-drug conjugate-based therapeutics: state of the science [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2019, 111: 538-549.
- [2] Zhang ZB, Wang Y, Bai Y. Consideration of antibody drug conjugates development and regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1971-1977.
- [3] Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394: 793-804.
- [4] Beck A, Goetsch L, Dumontet C, et al. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 315-337.
- [5] Shao RG, Zhen YS. Relationship between the molecular composition of C1027, a new macromolecular antibiotic with enediyne chromophore, and its antitumor activity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1995, 30: 336-342.
- [6] Zhen YS, Xue YC, Shao RG. Antitumor activity of the new enediyne antibiotic C1027 [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 1994, 19: 164-168.
- [7] Elster N, Collins DM, Toomey S, et al. HER2-family signalling mechanisms, clinical implications and targeting in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 149: 5-15.
- [8] Miller T, Hosford S. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2014, 7: 203-215.
- [9] Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms underlying the action and synergism of trastuzumab and pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10: 342.
- [10] Day KC, Hiles GL, Kozminsky M, et al. HER2 and EGFR overexpression support metastatic progression of prostate cancer to bone [J]. *Cancer Res*, 2016, 77: 74-85.
- [11] Connell CM, Doherty GJ. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers [J]. *Esmo Open*, 2017, 2: e000279.
- [12] Curea FG, Hebbbar M, Ilie SM, et al. Current targeted therapies in HER2-positive gastric adenocarcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2017, 32: 351-363.
- [13] Salvia AL, Lopez-Gomez V, Garcia-Carbonero R. HER2-targeted therapy: an emerging strategy in advanced colorectal cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28: 29-38.
- [14] Black JD, Salvatore L, Emiliano C, et al. PIK3CA oncogenic mutations represent a major mechanism of resistance to trastuzumab in HER2/neu overexpressing uterine serous carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113: 1020-1026.
- [15] Smith MB, Reardon J, Olson EM. Pertuzumab for the treatment of patients with previously untreated HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2012, 48: 713-722.
- [16] Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 724-734.
- [17] Wang H, Wang W, Xu Y, et al. Aberrant intracellular metabolism of T-DM1 confers T-DM1 resistance in human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108: 1458-1468.
- [18] Boylan NJ, Zhou W, Proos RJ, et al. Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 1008-1016.
- [19] Wang R, Li L, Zhang S, et al. A novel enediyne-integrated antibody-drug conjugate shows promising antitumor efficacy against CD30<sup>+</sup> lymphomas [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12: 339-355.