靶向 nectin-4 的抗体偶联药物制备及活性评价

刘宇轩[1]，刘　忠[2*]

（1. 中国医科大学 - 贝尔法斯特女王大学联合学院，辽宁沈阳 110122；2. 中国医科大学药学院，辽宁沈阳 110122）

摘要：该研究构建了靶向跨膜细胞黏附分子 4（nectin-4）的抗体偶联药物（ADC），并评价了所得 ADC 的功能活性。首先对鼠源抗体进行人源化改造，得到 5 株人源化抗体，通过检测抗体竞争结合能力、亲和力、细胞结合能力、肿瘤细胞内吞效果等，筛选出一株人源化抗体 CH7-2-3。将其与甲基澳瑞他汀 E（MMAE）偶联，构建得到 CH7-2-3-MMAE。体外和小鼠体内活性试验结果显示，CH7-2-3-MMAE 对人乳腺癌细胞（MCF-7 细胞）和人胰腺癌细胞（BxPC-3 细胞）的 EC_{50} 值分别为 11.64 和 15.42 nmol/L；小鼠单次静脉注射给予该药后，D17 时的肿瘤生长抑制率达到 141.3%。研究数据表明，CH7-2-3-MMAE 具有良好的开发前景，可为后续临床前及临床研究提供参考。

关键词：人源化抗体；抗体偶联药物；nectin-4；甲基澳瑞他汀 E；靶向；细胞内吞；抗肿瘤活性

中图分类号：R979.1；TQ464　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)07-0782-08

引用：刘宇轩, 刘忠. 靶向nectin-4的抗体偶联药物制备及活性评价[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(7): 782-789. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2026.07.006

Preparation and Activity Evaluation of an Antibody Conjugated Drug Targeting Nectin-4

LIU Yuxuan[1], LIU Zhong[2*]

(*1. China Medical University - The Queen's University of Belfast Joint College, Shenyang 110122; 2. School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122*)

ABSTRACT: This study constructed an antibody-drug conjugate (ADC) targeting nectin cell adhesion molecule 4 (nectin-4) and evaluated the functional activity of the obtained conjugate. First, murine antibodies were humanized to obtain five humanized antibodies. Through assessments of competitive binding affinity, cell binding capacity, and tumor cell endocytosis efficiency, a humanized antibody, CH7-2-3, was selected. It was then conjugated with monomethyl auristatin E (MMAE) to construct the ADC, CH7-2-3-MMAE. The results of *in vitro* and *in vivo* activity assays showed that CH7-2-3-MMAE exhibited EC_{50} values of 11.64 and 15.42 nmol/L against human breast cancer cells (MCF-7 cells) and human pancreatic cancer cells (BxPC-3 cells), respectively. After a single intravenous injection in mice, the tumor growth inhibition rate reached 141.3% on D17. These data indicated that CH7-2-3-MMAE had promising development potential and provided a reference for its subsequent preclinical and clinical development.

Key Words: humanized antibody; antibody-drug conjugate; nectin-4; monomethyl auristatin E; targeting; endocytosis; antitumor activity

抗体偶联药物（antibody-drug conjugate，ADC）由单克隆抗体和细胞毒性药物通过连接子连接而成[1-2]，可特异性结合肿瘤细胞的表面抗原，经抗原介导的内化作用进入细胞，将细胞毒性药物精准递送至肿瘤细胞内，实现高效杀伤[3]。

当前，关于 ADC 的研究大多聚焦于提高药效、降低不良反应风险，主要策略包括：开发在肿瘤中高表达、在正常组织中表达受限的新靶点，以改善治疗窗口[4]；优化连接子以增强 ADC 在血液循环中的稳定性，实现在肿瘤微环境中特异性释放[5]；探索创新载荷（如具有不同作用机制的毒素，或同

收稿日期：2026-06-15

作者简介：刘宇轩，本科在读。

通信作者：刘　忠，硕士生导师，研究员，从事蛋白质及抗体药物的研究与开发。

时偶联 2 种载荷[6]），以克服耐药性；利用人工智能模型与多组学数据，加速靶点发现与抗体优化，预测连接子稳定性、ADC 药代动力学特性及毒性风险，并指导临床患者分层[7]。这些策略共同推动 ADC 向更精准、高效、安全的方向演进。

细胞黏附分子 4（nectin cell adhesion molecule 4，nectin-4）是一种免疫球蛋白样分子，在细胞黏附中起关键作用[8]，也可通过调控 PI3K/Akt 信号通路参与多种肿瘤发展进程[9]。首个针对 nectin-4 的 ADC，恩诺单抗（enfortumab vedotin-ejfv）已获 FDA 批准用于治疗尿路上皮癌[10]。然而，现有疗法仍面临耐药性、毒性（如皮肤不良反应和周围神经病变）以及适应证范围有限等问题，亟须开发新一代抗 nectin-4 ADC 以优化疗效与安全性。目前，已有多种靶向 nectin-4 的 ADC 处于开发中。例如，CRB-701（SYS6002）[11]，采用新型连接子技术，旨在降低皮肤和眼部毒性，已获得 FDA 2 项快速通道资格；9MW2821[12]，通过选择特定的抗体表位，从结构上降低对正常组织的毒性，临床数据显示其皮肤和眼部不良反应发生率较低；AVZO-103[8]，能同时靶向 nectin-4 和滋养层细胞表面抗原 2（trophoblast cell surface antigen-2，TROP-2），已获 FDA 快速通道资格。

本研究通过人源化改造鼠源抗 nectin-4 单克隆抗体，将亲和力及活性较高的抗体与单甲基奥瑞他汀 E（monomethyl auristatin E，MMAE）偶联，制成人源化 ADC，并通过体外及小鼠体内试验评价该 ADC 药效，以期为后续药物开发提供数据支持。

1 仪器与试药

PowerPac Basic 型核酸电泳仪、Mini-Protean Tetra Cell 型蛋白电泳仪均购于美国 Bio-Rad 公司；Amersham Imager 600 型凝胶成像系统、Biacore T200 型生物分子相互作用仪均购于美国 GE 公司；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Neo2 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；371 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo Fisher 公司）；ZWYC-290A 型恒温摇床（上海智诚分析仪器制造有限公司）。

RPMI-1640 培养基（批号 2191475）、FBS（批号 2068801CP）、Expi™ 293 表达培养基（批号 2277263）、ExpiFectamine™ 转染试剂 293（批号 2474280）、Opti-MEM 培养基（批号 2192861）、青链霉素双抗（批号 1894149）、DMEM 培养基（批号 2367374）均购于美国 Gibco 公司；限制性内切酶 *Hin*d Ⅲ（批号 10119502）、*Eco*R Ⅰ（批号 1017914）、T4 DNA 连接酶（批号 10114462）均购于美国 NEB 公司；质粒小提试剂盒（批号 24921A1）、胶回收试剂盒（批号 AKG2503A）均购于日本 TaKaRa 公司；nectin-4-his 蛋白（批号 LC15AL13116）、nectin-1-hFc 蛋白（批号 LC14SE1512）均购于北京义翘神州科技股份有限公司；羊抗鼠免疫球蛋白（gimmunoglobulin G，IgG）辣根过氧化物酶、羊抗人 IgG-Fc 二抗（美国 Southern Biotech 公司）；CellTiter-Glo® 发光法细胞活力检测试剂（美国 Promega 公司，批号 0000406927）；杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）、基底胶（Matrigel）均购于美国 Corning 公司；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine，TMB）显色液（美国 SeraCare 公司，批号 10573402）；PBS 干粉（北京索莱宝科技有限公司）；吐温 -20（批号 C2404502）、三（2- 羧乙基）膦盐酸盐［*tris*（2-carboxyethyl）phosphine hydrochloride，TCEP，批号 G2409136］均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；脱脂奶粉（北京天成新脉生物技术有限公司）；乙酸钠、乙酸均购于四川金山制药有限公司；三（羟甲基）氨基甲烷［*tris*（hydroxymethyl）aminomethane，Tris，美国 Merk 公司，批号 424042223020］；盐酸（中国西陇科学股份有限公司）；Sensor Chip CM5（批号 10351519），His Capture Kit（批号 10356666）、PrismA 蛋白、甘氨酸 1.5、HBS-EP 缓冲液均购于美国 Cytiva 公司；Alexa Fluor 647 标记的羊抗人 IgG 二抗（美国 Jackson 公司，批号 164232）；MMAE（上海皓元医药股份有限公司，批号 HM-297C-22-20220109）；磷酸钠、异丙醇均购于国药集团化学试剂有限公司；DMSO（德国 Sigma-Aldrich 公司）；恩诺单抗（美国 Astellas Pharma 公司，规格每 1 瓶 30 mg，批号 107486）；维恩妥尤单抗裸抗（本实验室依据专利 WO 2020117373A1 方法进行表达）。

pCDNA3.4 载体（美国 Invitrogen 公司）；nectin-4 阳性人胚肾细胞（293F-nectin-4 细胞，采用 Expi™ 293 表达培养基）由本实验室构建；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0 细胞，ATCC® CRL-1581，采用 DMEM 加 10% FBS 培养）、人乳腺癌细胞（MCF-7 细胞，ATCC® HTB-22，采用 Opti-MEM 加 10% FBS 培养）、人胰腺癌细胞（BxPC-3 细胞，ATCC® CRL-1687，采用 RPMI-1640 加 10% FBS 培养）均购自 ATCC。上述细胞

均于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

18 只 NOG 小鼠，雌性，8 ～ 9 周龄，体质量 18 ～ 20 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（京）2021-0006，实验动物质量合格证编号为 110011231103042376。小鼠使用方案已获得鲁南制药集团股份有限公司实验动物伦理审查委员会批准（伦理审批号 AN-IACUC-2023-040）。

2　方法与结果

2.1　人源化抗体的制备

通过杂交瘤技术[13]获得抗 nectin-4 的鼠源单克隆抗体，将鼠源抗体的轻链和重链可变区序列与 NCBI 网站的人免疫球蛋白基因数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）进行比对。选择与抗体同源度高，同时已被其他已成药的药物使用过的人种系免疫球蛋白重链可变区基因（immunoglobulin gene heavy chain variable region，IGHV）和免疫球蛋白 κ 链可变区（immunoglobulin kappa light chain，IGVK）作为人源化改造的框架。将鼠源抗体的可变区进行同源建模，并选取可变区 3A 内的氨基酸和鼠源抗体比对后进行回复突变，获得 5 种重链可变区序列，编号为 CH7-1-1、CH7-1-3、CH7-1-5、CH7-2-3、CH7-2-4（相关序列见专利 WO 2025157266）。

将获得的人源化抗体重链可变区序列与人 IgG1 抗体的重链恒定区连接，轻链可变区序列与 κ 轻链恒定区连接。在抗体氨基酸序列前添加信号肽序列和 Kozak 序列。委托南京金斯瑞生物科技股份有限公司进行 DNA 序列的优化与合成，并克隆至 pcDNA 3.4 载体。将构建的质粒通过瞬时转染制备人源化抗体。取对数生长期的 293F-nectin-4 细胞，用 Expi™ 293 表达培养基调节细胞密度至每 1 mL 含 3×10^6 个。取 Opti-MEM 培养基 6 mL，加入轻链质粒和重链质粒各 50 μg 作为 a 液；另取 Opti-MEM 培养基 6 mL，加入 ExpiFectamine™ 293 转染试剂 320 μL 作为 b 液。将 a、b 液混匀，静置 15 min，加至细胞中，置摇床中于 37 ℃、8% CO_2、100 r/min 条件下培养 20 h，加入基质胶增强系统 Enhancer Ⅰ 600 μL 和 Enhancer Ⅱ 6 mL。继续培养 5 d，收样，纯化。

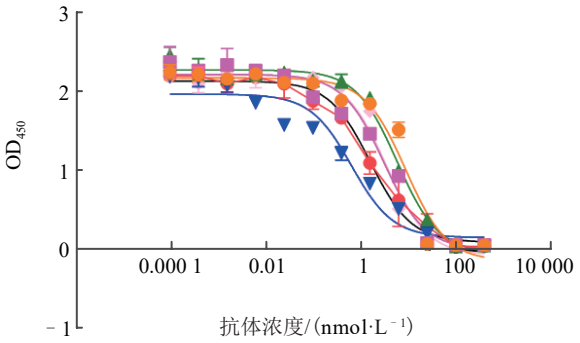
PrismA 亲和色谱法纯化抗体：用 PBS（pH 7.4，下同）平衡 PrismA 亲和柱；取经 0.45 μm 滤膜过滤的细胞培养上清液上样，用 PBS 洗至光密度（OD_{280}）值接近 0；然后用乙酸钠缓冲液（50 mmol/L，pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，用 2 mol/L Tris 调至 pH 6.0，得到纯化的人源化抗体，于 －20 ℃保存备用。

2.2　人源化抗体与 nectin-1-hFC 的竞争能力检测

将 5 种人源化抗体及维恩妥尤单抗裸抗（阳性对照）分别用 2% 脱脂奶粉溶液稀释为 400、100、25、6.25、1.56、0.39、0.098、0.024、0.006、1.526×10^{-3}、3.815×10^{-4}、9.537×10^{-5} nmol/L，作为待测样品溶液。将 nectin-4-his 蛋白用 2% 脱脂奶粉溶液稀释至 2 μg/mL，每孔 100 μL 加至 96 孔板，于 4 ℃过夜包被；弃去上清液，剩余物中加入 2% 脱脂奶粉溶液 300 μL，于 37 ℃封闭 2 h；弃去封闭液，剩余物用 PBST（含 0.05% Tween-20 的 PBS）洗涤 3 次；加入稀释后的抗体和 2 μg/mL 的 nectin-1-hFC 溶液（nectin-4 配体）各 50 μL，于 37 ℃反应 1 h，用 PBST 洗涤 3 次；加入羊抗人 IgG-Fc 二抗 100 μL，于 37 ℃反应 1 h，用 PBST 洗涤 3 次；加入 TMB 显色液 100 μL，于室温显色 10 min，加入 1 mol/L 盐酸 100 μL 终止反应，并用酶标仪检测 OD_{450} 值。结果（图 1）显示，人源化抗体 CH7-1-1、CH7-1-3、CH7-1-5、CH7-2-3、CH7-2-4 和阳性对照 IC_{50} 值分别为 8.812、3.037、5.827、0.641、3.452 和 1.580 nmol/L，可见 CH7-2-3 的 IC_{50} 值低于其他 4 株人源化抗体，也低于阳性对照。

2.3　人源化抗体的亲和力测定

使用生物分子相互作用仪测定 5 种人源化抗体及维恩妥尤单抗裸抗与抗原 nectin-4-his 的亲和力。用 HBS-EP 缓冲液将 5 种人源化抗体及维恩妥尤单抗裸抗原液稀释为 6 μg/mL，作为配体；另用 HBS-EP 缓冲液将 nectin-4-his 稀释为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.781 nmol/L，再加一个零点，作为分析物。用 CM5-HIS 芯片，吸取适量配体、分析物、再生液（甘氨酸 1.5）、HBS-EP 缓冲液，置样品托盘上。程序设置：配体流速和时间 10 μL/min，20 s；分析物流速 30 μL/min；结合时间 100 s；解离时



●—CH7-1-1；■—CH7-1-3；▲—CH7-1-5；▼—CH7-2-3；♦—CH7-2-4；●—维恩妥尤单抗裸抗。

图 1 人源化抗体竞争性阻断 nectin-1 的曲线（*n*=3）

Fig.1 Competitive Blockade Curves of Nectin-1 by the Humanized Antibodies (*n*=3)

间 600 s；再生液流速和时间 30 μL/min，30 s。采用 Biacore T200 Control 2.0.2 软件采集表面等离子共振信号，采用 Biacore T200 Evaluation 3.1 分析软件处理数据。按 1 ∶ 1 结合模型拟合亲和动力学曲线，计算亲和力常数（K_D）值。结果（表 1）表明，人源化抗体亲和力均优于阳性对照的（K_D=9.311 7×10^{-9} mol/L）；CH7-2-3 的亲和力较好，K_D 为 1.405 9×10^{-9} mol/L。

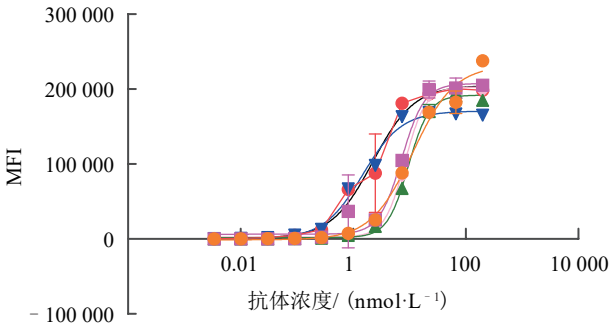
表 1 人源化抗体的亲和力测定结果

Tab.1 Affinity Determination Results of the Humanized Antibodies

抗体名称	K_{on}/(mol^{-1}·L·s^{-1})	K_{off}/(s^{-1})	K_D/(mol·L^{-1})
CH7-1-1	4.736×10^5	3.428×10^{-3}	7.238 2×10^{-9}
CH7-1-3	2.779×10^5	9.450×10^{-4}	3.410 6×10^{-9}
CH7-1-5	2.745×10^5	9.246×10^{-4}	3.368 3×10^{-9}
CH7-2-3	6.942×10^5	0.976×10^{-3}	1.405 9×10^{-9}
CH7-2-4	2.918×10^5	1.123×10^{-3}	3.848 5×10^{-9}
维恩妥尤单抗裸抗	9.880×10^4	9.200×10^{-4}	9.311 7×10^{-9}

2.4 人源化抗体与细胞结合能力检测

取对数生长期的 293F-nectin-4 细胞，以每 1 mL 含有 2×10^6 个细胞的细胞密度，每孔 50 μL 接种到 U 型底 96 孔板中。取 5 种人源化抗体及维恩妥尤单抗裸抗，用 PBS 配制为 200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.091、0.03、0.01、0.003 nmol/L 的待测溶液，每孔 50 μL 加至铺有细胞的 U 型底 96 孔板中，于 37 ℃反应 1 h；离心（200×*g*）5 min，弃上清，剩余物用 PBS 200 μL 洗涤 2 次；每孔加入 Alexa Fluor 647 标记的羊抗人 IgG 二抗（用 PBS 按 1 ∶ 400 稀释）100 μL，于 37 ℃反应 1 h，离心（200×*g*）5 min，沉淀用 DPBS 洗涤 2 次，每孔加入 PBS 200 μL 重悬细胞，用流式细胞仪检测 APC 通道的平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI）并使用 Graphpad Prism 8.0 分析数据。结果（图 2）显示，人源化抗体 CH7-1-1、CH7-1-3、CH7-1-5、CH7-2-3、CH7-2-4 和阳性对照 EC_{50} 值分别为 11.44、7.274、9.529、1.468、8.320 和 2.235 nmol/L，可见 CH7-2-3 的 EC_{50} 值较低，说明其与 293F-nectin-4 细胞的结合能力优于阳性对照。



●—CH7-1-1；■—CH7-1-3；▲—CH7-1-5；▼—CH7-2-3；♦—CH7-2-4；●—维恩妥尤单抗裸抗。

图 2 人源化抗体的细胞结合活性曲线（*n*=3）

Fig.2 Cell-binding Activity Curves of the Humanized Antibodies (*n*=3)

2.5 人源化抗体肿瘤细胞的内吞效果检测

取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每 1 mL 含有 2×10^6 个的细胞密度、每孔 100 μL 加至 U 型底 96 孔板。用 PBS 调整各人源化抗体的质量浓度为 40、8 μg/mL，每孔 100 μL 加至铺有细胞的 U 型底 96 孔板中，混匀，于 4 ℃反应 1 h；用 PBS 洗涤 2 次，用 PBS 200 μL 重悬细胞，平均分到 2 块 U 型底 96 孔板中，分别置 4 和 37 ℃孵育 20 h；离心（500×*g*）3 min，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 Alexa Fluor 647 标记的羊抗人 IgG 二抗（用 PBS 以体积比 1 ∶ 400 稀释）100 μL，于 4 ℃孵育 1 h，用 PBS 洗涤 2 次，

用流式细胞仪检测 MFI 值，并按下式计算内吞效率。

$$内吞效率=(MFI_{4℃}-MFI_{37℃})/MFI_{4℃}\times100\%$$

结果（表 2）显示，在质量浓度为 8 μg/mL 时，CH7-1-1、CH7-2-3 的内吞效率为 74%、63%，质量浓度为 40 μg/mL 时的内吞效率分别为 59%、46%，均高于阳性对照。

表 2　MCF-7 细胞对人源化抗体（40 和 8 μg/mL）的内吞效率

Tab.2　Endocytosis Rates of the Humanized Antibodies (40 and 8 μg/mL) in MCF-7 Cells

抗体	40 μg/mL			8 μg/mL		
	MFI		内吞率 / %	MFI		内吞率 / %
	37 ℃	4 ℃		37 ℃	4 ℃	
维恩妥尤单抗裸抗	2 599	3 957	34	2 316	3 774	39
CH7-1-1	1 463	3 595	59	864	3 348	74
CH7-1-3	3 483	4 454	22	2 038	3 365	39
CH7-1-5	3 029	4 007	24	1 756	3 394	48
CH7-2-3	2 322	4 291	46	1 081	2 909	63
CH7-2-4	2 406	3 495	31	1 048	2 877	64

2.6　人源化抗体与 MMAE 的偶联

选取亲和力及活性较高的 CH7-2-3 进行偶联，制备 ADC。取 CH7-2-3 溶液（18.31 mg/mL）5.0 mL，加至 250 mL 玻璃制反应瓶中，磁力搅拌（50 r/min）下添加 1.5 μmol/L TCEP 水溶液 5.83 mL（2.5 eq），室温（25 ℃）、50 r/min 条件下搅拌 2 h，以还原抗体内铰链部的二硫键。向反应体系中缓慢加入含有 3.0 mmol/L 连接子 - 药物接头化合物（Vc-MMAE，参考文献[14]制备）的 DMSO 溶液 82.88 μL（5.0 eq），于室温搅拌（50 r/min）1 h，即得 ADC，命名为 CH7-2-3-MMAE。取 PrismA 蛋白 1 mL 预装柱，用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液（pH 6.5），以流速 2 mL/min 平衡色谱柱；将样品用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液（pH 6.5）稀释 5 倍，经 0.45 μm 滤膜过滤后全部上样，样品流速为 1 mL/min；用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液（pH 6.5），以 2 mL/min 的流速复平衡 20 CV 以上，用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液（pH 3.5），以 2 mL/min 的流速洗脱，收集样品峰，用 2 mol/L Tris 回调至 pH 6.5，作为供试品。

供试品用 PBS 稀释至 1 mg/mL，使用疏水 HPLC 法检测，并按下式计算平均偶联率（drug-to-antibody ratio，DAR）值。

$$DAR=(D0\times0+D1\times1+D2\times2+D3\times3+D4\times4+D5\times5+D6\times6+D7\times7+D8\times8)\times100$$

式中：D0 ～ D8 分别为偶联 0 ～ 8 个毒素分子的 ADC 对应特征峰的峰面积百分数。

色谱条件：色谱柱 Tskgel Butyl-NPR 柱（4.6 mm×35 mm，2.5 μm）；流动相 A 为 50 mmol/L 磷酸钠溶液（pH 7.0），B 为 50 mmol/L 磷酸钠溶液（pH 7.0）和异丙醇混合溶液（体积比 3 ∶ 1），梯度洗脱（表 3）；流速 0.7 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 25 ℃；进样量 40 μL。

表 3　梯度洗脱流程

Tab.3　Gradient Elution Procedure

t/min	A/%	B/%
0	100.0	0
12.0	0	100.0
12.1	100.0	0
20.0	100.0	0

结果（图 3）显示，CH7-2-3-MMAE 的 D0 ～ D8 分别为 5.75%、0、15.11%、6.7%、44.92%、0、22.09%、0 和 5.43%，平均 DAR 值为 4.06。

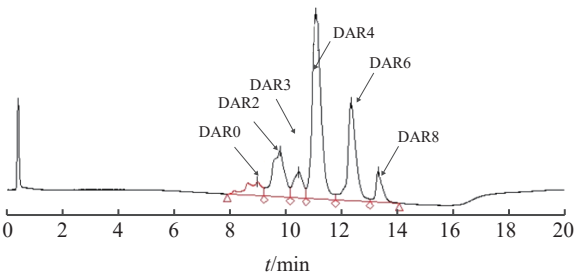


图 3　抗体偶联药物 DAR 值测定图谱

Fig.3　Spectrum of DAR Value Determination for the Antibody-conjugated Drugs

2.7　ADC 对肿瘤细胞杀伤测定

选取表达 nectin-4 的 MCF-7 细胞和 BxPC-3 细胞作为靶细胞来评价 CH7-2-3-MMAE 对体外肿瘤细胞的杀伤活性。

取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每 1 mL 含有 1×10^4 个细胞的密度，每孔 100 μL 铺在 96 孔板中；取对照药（恩诺单抗）、供试品（CH7-2-3-MMAE）分别用 DMEM 培养基（含 10％的 FBS）稀释为 130、43.33、14.44、4.81、1.604、0.535、0.017、0.059、0.020 nmol/L 的样品溶液，每孔 50 μL 加至 96 孔板中，混匀，每个浓度点设 3 复孔；在 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中孵育 5 d；每孔加入 CellTiter-Glo® 细胞活力检测试剂 50 μL，采用酶标仪检测，采用拟合四参数曲线计算杀伤 EC_{50} 值。

取对数生长期的 BxPC-3 细胞，以每 1 mL 含有 1×10^4 个细胞的密度，每孔 100 μL 铺在 96 孔板中；取恩诺单抗、CH7-2-3-MMAE 分别用 1640 培养基（含 10％的 FBS）稀释为 400、66.67、11.11、1.85、0.309、0.051、8.6×10^{-3}、1.4×10^{-3}、2.4×10^{-4} nmol/L 的样品溶液，每孔 50 μL 加至 96 孔板中，混匀，每个浓度点设 3 复孔；在 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中孵育 5 d；每孔加入 CellTiter-Glo® 细胞活力检测试剂 50 μL，采用酶标仪检测，并采用拟合四参数曲线计算 EC_{50} 值。

结果（图 4）显示，CH7-2-3-MMAE 对 MCF-7 细胞和 BxPC-3 细胞杀伤作用的 EC_{50} 分别为 11.64 和 15.42 nmol/L，恩诺单抗则分别为 16.82 和 68.00 nmol/L。这说明 CH7-2-3-MMAE 对表达 nectin-4 的肿瘤细胞的杀伤效果明显优于恩诺单抗。

2.8 ADC 的体内活性评价

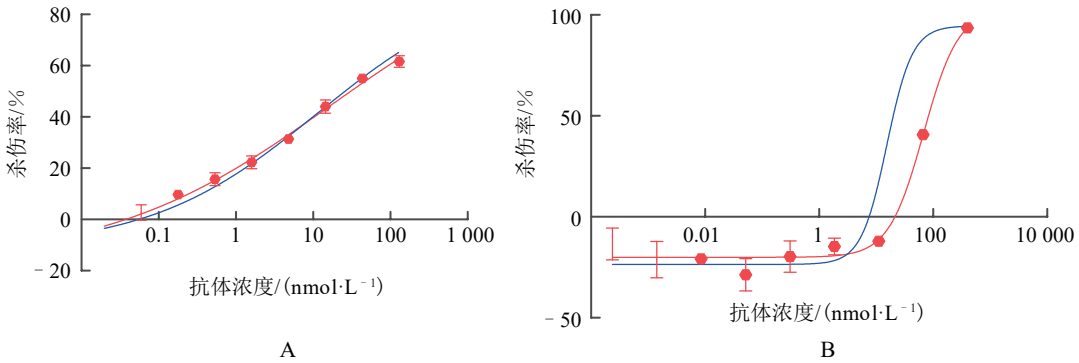
利用雌性 NOG 小鼠建立人胰腺癌细胞 BxPC-3 皮下移植瘤模型，考察 ADC 分子对该模型的治疗作用。取连续培养 10 代之前的 BxPC-3 细胞，用 RPMI 1640 培养基（含 10％的 FBS）稀释为每 1 mL 含有 1×10^8 个细胞的悬液，与 Matrigel 以体积比 1 ∶ 1 混合，于雌性 NOG 小鼠右侧胁肋部皮下接种，每只 0.1 mL，即每只小鼠 BxPC-3 细胞的接种量是 5×10^6 个细胞。当小鼠平均肿瘤体积达到约 145 mm^3 时，将小鼠按肿瘤体积和体质量随机分为 3 组，分别为 PBS 处理组（空白组）、恩诺单抗治疗组、CH7-2-3-MMAE 治疗组，每组 6 只。将分组当天定义为 D0，于 D0 尾静脉注射给药 1 次，给药剂量为 6 mg/kg（每次给药 120 μL）。每周测量肿瘤体积（V）和小鼠体质量 2 ～ 3 次，并按下式计算各给药组的肿瘤抑制率（tumor growth inhibition，TGI）。

$$V=[D\times d^2]/2$$

$$TGI=1-(V_{Tn}-V_{T0})/(V_{Cn}-V_{C0})\times100\%$$

式中：D 为肿瘤的最大直径；d 为肿瘤最小直径；V_{Tn}、V_{Cn} 分别为第 n 天治疗组与空白组的肿瘤体积；V_{T0}、V_{C0} 分别为 d0 治疗组与空白组的肿瘤体积。

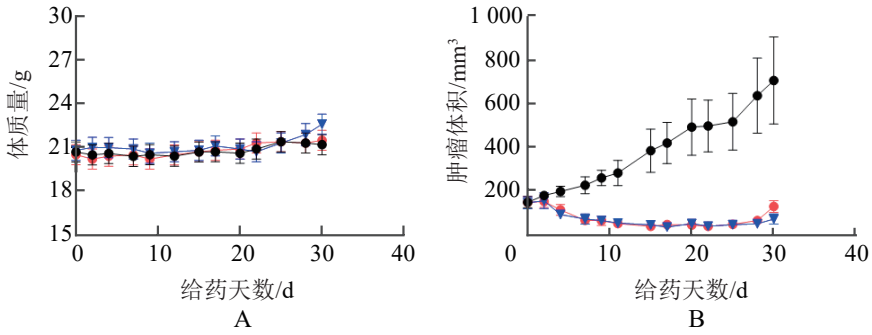
结果（图 5、表 4）显示，CH7-2-3-MMAE 具有显著的抗肿瘤作用，且在 D17 时肿瘤体积达到最小值（33.7 mm^3），肿瘤抑制率达到最大值（141.3％），之后肿瘤体积有所增大，在 D30 时肿瘤体积为 70.6 mm^3，肿瘤抑制率为 113.4％。而恩诺单抗在 D17 的肿瘤体积达到最小值（45.1 mm^3），肿瘤抑制率为 137.4％，在 D30 时肿瘤体积为 127.9 mm^3，肿



▼—CH7-2-3-MMAE；●—恩诺单抗。

图 4 ADC 对 MCF-7 细胞（A）和 BxPC-3 细胞（B）的杀伤效果（n=3）

Fig.4 Killing Effects of the ADC against MCF-7 Cells (A) and BxPC-3 Cells (B, n=3)



●—PBS 处理组；▼—CH7-2-3-MMAE 治疗组；●—恩诺单抗治疗组。

图 5　体内试验中小鼠体质量（A）和肿瘤体积（B）的变化（*n*=6）

Fig.5　Changes in Body Weight (A) and Tumor Volume (B) of Mice during *in vivo* Experiments (*n*=6)

瘤抑制率为 103.2%。上述结果说明，在相同剂量下，CH7-2-3-MMAE 抑制肿瘤生长的效果显著优于恩诺单抗（P<0.05）。CH7-2-3-MMAE 治疗组小鼠体质量在后期明显增长，说明在该剂量下，小鼠对 CH7-2-3-MMAE 耐受性良好。

表 4　ADC 的体内活性试验结果（*n*=6）

Tab.4　*In vivo* Activity Test Results of the ADC (*n*=6)

组别	平均肿瘤体积 /mm³			TGI/%	
	D0	D17	D30	D17	D30
PBS 处理组	147.3	416.8	702.5	—	—
恩诺单抗治疗组	145.9	45.1	127.9	137.4	103.2
CH7-2-3-MMAE 治疗组	144.9	33.7	70.6	141.3	113.4

3　总结

目前，恩诺单抗长期应用会导致 nectin-4 表达下调、溶酶体功能改变、微管蛋白异构体表达变化、药物外排泵（MDR1/ABCB1）过表达，从而产生耐药性[15]。一些新型 ADC 通过提高抗体亲和力，引入位点特异性偶联技术（如 THIOMAB 技术），可降低 ADC 的异质性[16]，从而提高疗效并降低毒性。本研究主要通过提高抗体亲和力，希望得到靶向性更好的 ADC。本研究构建了高亲和力的人源化抗体 CH7-2-3，其竞争性阻断 nectin-1 的 IC_{50} 值为 0.641 nmol/L，与 293F-nectin-4 细胞结合的 EC_{50} 值为 1.468 nmol/L，与恩诺单抗相当；其与抗原 nectin-4 的亲和力为 $1.405\ 9\times10^{-9}$ mol/L，优于恩诺单抗。因此，选取 CH7-2-3 与 MMAE 偶联，制备靶向 nectin-4 的 ADC（CH7-2-3-MMAE），其 DAR 达到 4.06。体外活性试验结果显示，CH7-2-3-MMAE 对 MCF-7 细胞和 BxPC-3 细胞的 EC_{50} 分别为 11.64 和 15.42 nmol/L，均优于恩诺单抗（EC_{50} 分别为 16.82 和 68.00 nmol/L）。动物试验结果显示，给药后 D17 和 D30 时，CH7-2-3-MMAE 对雌性 NOG 小鼠 BxPC3 细胞皮下移植瘤的肿瘤抑制率分别为 141.3%、113.4%，优于对照品恩诺单抗（分别为 137.4%、103.2%）。综上所述，本研究构建的 CH7-2-3-MMAE 的活性略高于恩诺单抗，并展现出提高疗效、降低毒性的潜力，为进一步的药物开发提供了理论依据。

参考文献：

[1] Li C Z, Zhang C, Li Z, *et al*. Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody-drug conjugates in cancer patients: learning from eight first-in-human Phase 1 studies [J]. *MAbs*, 2020, **12**(1): 1699768.

[2] 赵丽丽, 朱玉强, 李朋, 等. 抗体偶联药物的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(10): 1243-1251.

[3] Aman P S, Dhaval K S. Measurement and mathematical characterization of cell-level pharmacokinetics of antibody-drug conjugates: a case study with trastuzumab-vc-MMAE [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, **45**(11): 1120-1132.

[4] Zhu B, Wang X Y, Shimura T, *et al*. Development of potent antibody drug conjugates against ICAM1^{+} cancer cells in preclinical models of cholangiocarcinoma [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2023, **7**(1): 93.

[5] Su D, Zhang D L. Linker design impacts antibody-drug

conjugate pharmacokinetics and efficacy via modulating the stability and payload release efficiency [J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 687926.

[6] Beauchemin N, Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, **32** (3/4): 643-671.

[7] Lu Y, Huang W J, Li Y X, *et al*. Leveraging artificial intelligence in antibody-drug conjugate development: from target identification to clinical translation in oncology [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2025, **9** (1): 374.

[8] Chatterjee S, Sinha S, Kundu C N. Nectin cell adhesion molecule-4 (nectin-4): a potential target for cancer therapy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, **911**: 174516.

[9] Li K Y, Zhou Y J, Zang M L, *et al*. Therapeutic prospects of nectin-4 in cancer: applications and value [J]. *Front Oncol*, 2024, **14**: 1354543.

[10] Challita-Eid P M, Satpayev D, Yang P, *et al*. Enfortumab vedotin antibody-drug conjugate targeting nectin-4 is a highly potent therapeutic agent in multiple preclinical cancer models [J]. *Cancer Res*, 2016, **76** (10): 3003-3013.

[11] Perez C A, Gandhi N J, Mosalpuria K, *et al*. Phase Ⅰ dose-escalation study of the next-generation nectin-4 targeting antibody-drug conjugate CRB-701 (SYS6002) in US and UK patients with urothelial cancer and other solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2025, **43** (5_suppl): 807.

[12] FANG P, YOU M, WEN H Y, *et al*. Structural basis of nectin-4 recognition by the antibody-drug conjugate 9MW2821 [J]. *J Biol Chem*, 2025, **301** (12): 110816.

[13] Holzlöhner P, Hanack K. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology [J]. *J Vis Exp*, 2017 (119): 54832.

[14] Abdollahpour-Alitappeh M, Habibi-Anbouhi M, Balalaie S, *et al*. A new and simple non-chromatographic method for isolation of drug/linker constructs: Vc-MMAE evaluation [J]. *J HerbMed Pharmacol*, 2017, **6** (4): 153-159.

[15] Khoury R, Saleh K, Khalife N, *et al*. Mechanisms of resistance to antibody-drug conjugates [J]. *Cancers*, 2023, **24** (11): 9674.

[16] Panowski S, Bhakta S, Raab H, *et al*. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy [J]. *MAbs*, 2014, **6** (1): 34-45.

（上接第 767 页）

药工业杂志, 2009, **40** (10): 724-725.

[3] 张瑞宽. 5-甲基吡嗪-2-羧酸的制备方法: CN02137987.4 [P]. 2003-01-22.

[4] 陈文华, 陈绘如, 张玉秀. 阿昔莫司的合成工艺改进[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49** (2): 175-177.

[5] 骆广生, 吕成阳, 王凯, 等. 微化工技术[M]. 1版. 北京: 化学工业出版社, 2020: 10-27.

[6] Gutmann B, Weigl U, Cox D P, *et al*. Batch-and continuous-flow aerobic oxidation of 14-hydroxy opioids to 1,3-oxazolidines: a concise synthesis of noroxymorphone [J]. *Chemistry*, 2016, **22** (30): 10393-10398.

[7] 董阳阳. 金属卟啉催化氧气氧化2,5-二甲基吡嗪的研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2013: 1-10.

[8] Kon Y, Nakashima T, Yada A, *et al*. Pt-catalyzed selective oxidation of alcohols to aldehydes with hydrogen peroxide using continuous flow reactors [J]. *Org Biomol Chem*, 2021, **19** (5): 1115-1121.

[9] 丁全有, 黄长如, 李鹏飞. 连续流反应器及工艺设计[M]. 1版, 北京: 化学工业出版社, 2020: 1-3.

[10] Gutmann B, Cantillo D, Kappe C O. Continuous-flow technology: a tool for the safe manufacturing of active pharmaceutical ingredients [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54** (23): 6688-6728.

[11] 薛潇, 商敏静, 苏远海. 微反应器内药物连续流合成的研究进展[J]. 化工学报, 2024, **75** (4): 1439-1454.

[12] 刘全, 张钊, 邵先钊, 等. 连续流反应技术在药物分子合成中的研究进展[J]. 安徽化工, 2020, **46** (5): 11-13.

[13] 王淑娜, 刘波, 赵长森, 等. 连续流制备过氧化新癸酸叔丁酯[J]. 聚氯乙烯, 2024, **52** (7): 14-16.

[14] Mahbub P, Duke M. Scalability of advanced oxidation processes (AOPs) in industrial applications: a review [J]. *J Environ Manage*, 2023, **345**: 1-10.