

anti-PTK7/MET双特异性抗体偶联药物的构建 及其抗肿瘤活性研究

束瑞雪^{1,2,3} 尚诚彰² 金美琴^{1,2,3} 沈月雷^{2,3*}

(¹安徽中医药大学药学院, 合肥 230000; ²百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司, 北京 100000;
³长三角药物高等研究院, 南通 226000)

摘要 该研究旨在构建靶向酪氨酸激酶蛋白7(protein tyrosine kinase 7, PTK7)及细胞间质-上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-MET/MET)的双特异性抗体偶联药物(bispecific antibody-drug conjugate, BsADC), 将其命名为P91M32-ADC, 并对其体内外药效进行初步评价。采用流式荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)和Incucyte检测P91M32在肿瘤细胞系中的结合能力及内吞作用; 采用半胱氨酸偶联技术将靶向PTK7和MET的双特异性抗体分子与微管蛋白抑制剂甲基澳瑞他汀E(monomethyl auristatin E, MMAE)偶联成药物抗体比(drug to antibody ration, DAR)为4的小分子药物; 采用Incucyte比较P91M32-ADC与靶向PTK7和MET的ADC阳性药(分别为ABBV-647 analog-ADC和ABBV-399 analog-ADC)的体外杀伤能力; 最后在体内药效模型中探究P91M32-ADC的体内抑瘤活性。研究发现P91M32-ADC具有较强的肿瘤细胞系结合活性且表现出较ABBV-647 analog-ADC和ABBV-399 analog-ADC更强的内吞和体外杀伤活性, 在所测试的体内药效模型中均体现强烈的抑制肿瘤生长活性。该研究成功构建靶向PTK7/MET的双特异性ADC药物P91M32-ADC, 且结果显示特异性靶向双抗原的P91M32-ADC具有提升PTK7单靶点ADC药效的潜力。

关键词 PTK7; MET; 双特异性抗体偶联药物; 抗肿瘤活性研究

Construction of Anti-PTK7/MET Bispecific Antibody-Drug Conjugate and Study of Its Antitumor Activity

SHU Ruixue^{1,2,3}, SHANG Chengzhang², JIN Meiqin^{1,2,3}, SHEN Yuelei^{2,3*}

(¹Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China; ²Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing) Co., Ltd, Beijing 100000, China; ³Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226000, China)

Abstract A BsADC (bispecific antibody-drug conjugate) targeting PTK7 (protein tyrosine kinase 7) and MET (cellular-mesenchymal epithelial transition factor), named P91M32-ADC. P91M32-ADC was constructed by using Biocytogen's fully human antibody RenLite[®] mice. Both *in vivo* and *in vitro* efficacy were subsequently evaluated. The internalization and anti-tumor efficacy were measured by the FACS (fluorescence activated cell sorting) and Incucyte. This study conjugated the bispecific MET×PTK7 antibody to the monomethyl auristatin E (MMAE payload), by using a Val-Cit (vc) linker, to generate the MET×PTK7 BsADC with an average drug:antibody ratio of approximately 4. Incucyte was used to compare the *in vitro* anti-tumor ability of P91M32-ADC to ABBV-647

收稿日期: 2022-12-12 接受日期: 2023-03-02

江苏省科技计划(批准号: SBE2021050009)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13910401543, E-mail: yuelei.shen@bbctg.com.cn

Received: December 12, 2022 Accepted: March 2, 2023

This work was supported by the Science and Technology Plan Project of Jiangsu Province (Grant No.SBE2021050009)

*Corresponding author. Tel: +86-13910401543, E-mail: yuelei.shen@bbctg.com.cn

analog-ADC and ABBV-399 analog-ADC. Furthermore, the tumor inhibitory activity of P91M32-ADC *in vivo* was explored in the tumor-bearing mice model. These results showed that P91M32-ADC has superior internalization and anti-tumor efficacy both *in vitro* and *in vivo* compared to ABBV-647 analog-ADC. In this experiment, the ADC drug P91M32-ADC targeting PTK7/MET was successfully constructed and the experimental results showed that P91M32-ADC has the potential to improve the efficacy of PTK7 antibody conjugate.

Keywords PTK7; MET; bispecific antibody-drug conjugate; antitumor activity studies

抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)由单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),通过化学接头(linker),连接有效载荷(payload,通常为细胞毒性小分子药物)组成。ADC结合了抗体的特异性靶向和有效载荷高效杀伤的特点,具有准确、高效杀伤癌细胞的优点。ADC被称为“生物导弹”,正在引领靶向癌症治疗的新时代,已成为当前研究和开发抗肿瘤药物的热点之一^[1]。

ADC结构较为复杂,包含了大分子和小分子,各组分间需要协调才能发挥整体效应。除此之外,ADC靶点也是药物设计的关键。一个理想的ADC靶点需要具有一定的内吞作用且在肿瘤中具备较高表达丰度,在正常组织中不表达或表达受限。而很多靶点往往并不能同时具备这些要求。ADC靶点的发现和优化仍然是ADC药物开发最关键的问题。

PTK7是一种无活性的酪氨酸激酶,是存在于细胞表面的受体蛋白^[2]。PTK7作为Wnt信号通路的共受体,参与经典和非经典Wnt途径^[3],且与胚胎发育及肿瘤的发生相关。已有研究表明,PTK7在食管癌、胃癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌、肺癌、卵巢癌等肿瘤组织中表达上调^[4-8]。另外,PTK7被证实三阴性乳腺癌、卵巢癌等肿瘤干细胞(tumor initiating cells, TICs)上表达,同时PTK7还表达于肿瘤血管内皮细胞^[9]。PTK7在肿瘤发生发展中的重要作用,以及在肿瘤中的特异表达使之成为新兴的热点ADC药物开发靶点。ABBV-647/PF-06647020是一款靶向PTK7的ADC药物,在临床前肿瘤模型研究中表现出强大的抑制三阴性乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌作用^[8]。临床I期数据初步展示出抗肿瘤有效性,研究结果显示ABBV-647药物响应人群主要是PTK7表达水平为中表达或高表达的患者,且在响应最好的卵巢癌中客观缓解率仅为27%(给药频率为每3周给药1次)^[10]。这可能与PTK7内吞作用较弱及在肿瘤中表达丰度有限相关。MET作为肿瘤

驱动因子,其通路失调可导致细胞增殖、运动、迁移、血管生成的增加,从而引起肿瘤的发生^[11]。针对MET靶点的ADC药物开发较多,当前(2022年)临床研究进展较快的一款ADC药物Telisotuzumab Vedotin(ABBV-399)处于临床II期,临床前研究显示其在肺腺癌、肺鳞状细胞癌、胃癌和结肠癌中均有抗肿瘤活性^[12],临床I期结果显示,在40例MET表达阳性的非小细胞肺癌患者中,9人(23%)有客观缓解,临床疗效相对有限^[13]。另外,在临床II期实验中可能发生与治疗相关的患者死亡事件,有两名患者死于肺炎,可能与之前接受过免疫治疗有关^[14]。

ADC药物主要的杀伤机制是ADC结合抗原后发生内吞作用,进入细胞内溶酶体(低pH/还原/蛋白酶)环境中释放细胞毒素小分子实现肿瘤的杀伤。有研究表明,通过靶向两个肿瘤抗原的ADC药物可促进内吞作用,从而提高肿瘤杀伤效果^[15]。PTK7与MET均在三阴性乳腺癌^[4,16-17]、肺癌^[18-19]、胃癌^[8,20]等癌症中存在表达。本研究通过对人源性组织异种移植(patient-derived xenografts, PDX)模型进行免疫荧光分析也证实PTK7/MET在肺癌、胃癌和乳腺癌中存在共表达。因此,本研究假设通过构建靶向PTK7/MET的双特异性抗体偶联药物,以提高单靶点抗体的内吞作用从而增强抗肿瘤活性。本研究成功构建anti-PTK7/MET双特异性抗体偶联药物分子P91M32-ADC,并对其表征和体内外抗肿瘤活性研究。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 实验所需要的NCI-H1975(人肺腺癌细胞)、NCI-H292(人肺支气管黏液上皮样癌细胞)、HCC1954(人乳腺导管癌细胞)、MDA-MB-468(人三阴性乳腺癌细胞)、BXP-3(人原位胰腺癌细胞)、HCC827(人非小细胞肺癌细胞)、NCI-H1650(人非小细胞肺癌细胞)、HeL

a(人宫颈癌细胞)、NCI-N87(人胃癌细胞)均由本实验室保存。

1.1.2 实验仪器 生物安全柜(型号为SBC-1300IIA2)购自上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 细胞培养箱(型号为Thermo311)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 细胞计数仪(型号为CI1000)购自上海睿钰生物科技有限公司; 流式细胞仪(型号为iQue 3-BR)购自德国Sartorius公司; 离心机(型号为Sc-3610)购自安徽中科中佳科学仪器有限公司; 水浴锅(型号为DK-8D)购自上海一恒科学仪器有限公司; Incucyte购自德国Sartorius公司; 液相色谱仪(型号为1260 Affinity、1290)购自美国Agilent公司; Akoya Polaris购自美国Akoya公司。

1.1.3 实验耗材 离心管(货号为339651)购自丹麦Nunc公司; 100 μ L枪头、200 μ L枪头、10 μ L枪头(货号分别为T-1000-B-R-S、T-1000-Y-R-S、T-300-R-S)均购自美国Axygen公司; 96孔圆底板(货号为163320)购自丹麦Nunc公司; 96孔平底板(货号为3599)购自美国Corning公司; PBS(货号为P1020-500)购自北京索莱宝科技有限公司; 独立包装的无菌加样槽(货号为13-681-501)、Gibco Trypsin-EDTA(货号为25200056)、OptiPRO™ SFM3(货号为12309019)、ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit(货号为A29129)、Gibco RPMI 1640 Medium(1 \times)(货号为11875085)、Gibco Leibovitz's L-15 Medium(货号为11415064)、Phospho-c-Met(Tyr1230, Tyr1234, Tyr1235) Polyclonal Antibody(货号为44-888G)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; ATCC Eagle's Minimum Essential Medium(货号为0101015)购自美国ATCC; 胎牛血清(货号为FBSSA500-S)购自澳大利亚AusGeneX公司; PTK7/CCK4 Antibody(货号为NBP1-88157)购自美国Novus Biologicals公司; Anti-DKK1抗体(货号为ab61275)购自美国Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 构建双特异性抗体分子 将通过免疫全人抗体共轻链RenLite小鼠获得PTK7的单克隆抗体P91表达质粒Fc编码序列, 突变改造成Knob结构; 获得的MET单克隆抗体M32表达质粒Fc编码序列, 突变改造为Hole结构, 取上述的Knob及Hole质粒各40 μ g与80 μ g共轻链质粒混合均匀后依照使用说明书加入适量的OptiPRO™ SFM3、ExpiFectamine™ CHO Reagent试剂混匀, 转移入密度为 6×10^6 个/mL、体积

为200 mL的ExpiCHO-S™细胞中。在转染后24 h和7天按使用说明书加入增强剂及补料, 转染后14天收样。4 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心30 min, 去除底部细胞, 再使用0.22 μ m过滤器过滤; 用Protein A柱子纯化, 最后用超滤管将抗体蛋白的溶液置换成1 \times PBS溶液。得到的抗体蛋白使用体积排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)进行纯度检测, 使用质谱(mass spectrometry, MS)进行分子量检测。

1.2.2 肿瘤组织切片免疫荧光染色 将实验所需的胃癌、肺癌、乳腺癌的石蜡切片40 $^{\circ}$ C水浴30 min至切片处于展开状态, 并将切片贴在胶粘载玻片上。将样本置于二甲苯溶液中脱蜡10 min, 重复上述步骤2次。在无水乙醇中清洗切片5 min, 重复上述步骤1次。接着将组织样品依次在95%乙醇、70%乙醇、纯水中水化5 min。煮沸预先配制的柠檬酸盐。在柠檬酸盐中热修复15 min(微波低火焰每隔5 min, 停止加热1 min), 自然冷却至室温。PBS冲洗3次, 每次3 min。10%山羊血清封闭液37 $^{\circ}$ C封闭30 min。去除封闭液后将Phospho-c-Met(Tyr1230、Tyr1234、Tyr1235) Polyclonal Antibody涂抹在组织上, 37 $^{\circ}$ C条件下孵育30 min。PBS清洗切片3次, 每次3 min。组织上涂抹Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)溶液, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min。PBS清洗切片3次, 每次3 min。将Opal染料涂抹在组织上, 在37 $^{\circ}$ C下孵育15 min, PBS清洗切片3次, 每次3 min。重复上述操作, 使用抗体(名称为: PTK7/CCK4 Antibody)对肿瘤组织切片进行染色。滴入DAPI染色液, 避光孵育10 min。PBS冲洗3次, 每次3 min。使用全组织切片多色荧光定量分析仪及HALO进行结果分析。

1.2.3 肿瘤细胞结合实验 将P91M32、ABBV-647 analog、ABBV-399 analog、P91、M32、Isotype control稀释至10 μ g/mL后置于4 $^{\circ}$ C冰箱备用。取对数生长期的HCC827、NCI-H1975、NCI-H292、NCI-H1650、BXPC-3、HCC1954、HeLa、NCI-N87、MDA-MB-468肿瘤细胞, 按照每孔 1×10^5 个细胞的数量进行铺板。将上述已稀释好的样品分别加入不同的肿瘤细胞中并混匀, 加入的细胞与样品的体积比为1:1, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30 min, 之后每孔加入150 μ L的1 \times PBS后在1 200 r/min条件下离心3 min, 弃去上清; 每孔加入50 μ L, 浓度为0.3 μ g/mL的Alexa Fluor® 647-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcg fragment specific直标抗体

染料孵育15 min, 使用1× PBS对细胞抗体复合物进行清洗; 加入50 μL的1× PBS重悬细胞, 流式细胞仪检测。

对于抗体多浓度结合实验, 将浓度为5 μg/mL的P91M32、ABBV-647 analog、ABBV-399 analog、P91、M32、Isotype control抗体经过二倍倍比稀释, 得到10个浓度梯度, 与NCI-H1975、HCC827肿瘤细胞进行结合实验; 与NCI-H292的多浓度结合实验, 采用初始浓度为7.5 μg/mL, 经1.6倍同样稀释10个浓度梯度的上述样品进行结合实验, 后续操作同上述步骤。使用Flowjo V10进行数据分析。

1.2.4 抗体内吞实验 将处于对数生长期的肿瘤细胞通过胰酶进行消化后收集于离心管中, 离心机1 200 r/min离心3 min, 弃去上清, 加入新鲜的完全培养基重悬。将NCI-H292和NCI-H1975细胞分别接种至96孔平底板中, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱; MDA-MB-468肿瘤细胞放置于37 °C、无CO₂的培养箱。培养24 h细胞贴壁后弃去培养基, 每孔加入50 μL含2%胎牛血清的新鲜培养基, 再加入50 μL经Incucyte Fabfluor-pH Antibody Labeling Dyes染料(Fabfluor-pH为pH敏感染料, 当与测试抗体孵育内吞进入酸性环境的细胞溶酶体后, 染料将特异性发光)标记后的抗体混合物, 放置于Incucyte仪器中孵育。设置在Phase及Red条件下拍摄1天, 每1 h拍摄1次。

1.2.5 抗体分子偶联及检测 采用链间半胱氨酸偶联技术将抗体与vc-MMAE偶联成DAR值为4的ADC药物。将抗体蛋白浓度调整至5 mg/mL后加入适当的三(2-羧乙基)膦盐酸盐[Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP], 25 °C下还原2 h; 加入适量预冷的75% DMSO溶液, 之后加入与抗体蛋白摩尔比为6:1的5 mmol/L vc-MMAE溶液, 25 °C条件下反应1 h; 加入与vc-MMAE摩尔比为4:1的浓度为10 mmol/L的半胱氨酸终止反应。超滤去除残留的小分子。

采用疏水作用高效液相色谱法(hydrophobic interaction chromatography, HIC)、反相高效液相色谱法(reversed-phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)和SEC分别检测ADC药物的DAR值分布、小分子残留和ADC纯度。

1.2.6 肿瘤细胞的杀伤实验 将处于对数生长期的肿瘤细胞消化收集离心后, 弃去上清并加入新鲜

的完全培养基重悬, 再将其均匀接种至96孔平底板中, 每孔细胞体积为100 μL; 待肿瘤细胞贴壁后加入等体积的经梯度稀释后的ADC药物。放置于Incucyte仪器中, 设置Phase条件下拍摄3天, 每4 h拍照1次。

1.2.7 体内药效实验 通过皮下接种, 构建MDA-MB-468、HCC827、NCI-H1975的异种肿瘤模型(cell derived xenograft, CDX)。实验分为以下几组: 样品组(P91M32-ADC组); 阴性对照组(PBS组、Isotype control-ADC组); 阳性对照组(ABBV-647 analog-ADC组、ABBV-399 analog-ADC组); MDA-MB-468模型中增加母本单抗组(P91-ADC组、M32-ADC组)。平均肿瘤体积达到200 mm³后进行分组, 每组5只小鼠。MDA-MB-468、NCI-H1975模型在分组后第0天及第7天进行尾静脉给药, 给药剂量均为3 mg/kg; HCC827模型在分组后第0天进行单次尾静脉给药, 给药剂量为1.5 mg/kg。每周进行2次小鼠体质量和肿瘤体积测量并记录。对于肿瘤体积超过2 000 mm³的小鼠进行安乐死处理。本研究中动物实验均符合中国实验动物护理和使用准则, 并经百奥赛图实验动物伦理委员会批准(批准号: PS-01-2209097)。

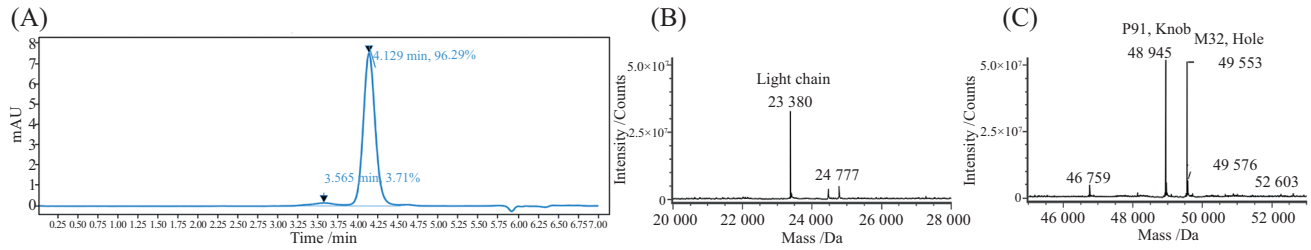
2 结果

2.1 构建P91M32双特异性抗体分子

利用全人抗体共轻链小鼠RenLite平台, 分别获得靶向PTK7的P91和靶向MET的M32单抗, 通过“knobs-into-holes”技术构建获得P91M32双特异性抗体分子, 其SEC、质谱分析结果见下图1。SEC的结果显示该分子的纯度为96.29%(图1A)。为了确定蛋白表达是否存在轻重链错误配对的情况, 利用质谱对P91M32蛋白进行分子量分析。使用GPMW version 9.2预测P91的Knob链相对分子质量范围在48 939.65 Da~48 951.75 Da, M32的Hole链相对分子质量范围在49 548.11 Da~49 560.20 Da。经质谱分析, 结果显示轻链的分子量为23 380 Da, 重链P91 Knob与M32 Hole的分子量分别为48 945 Da、49 553 Da, 实际相对分子质量与理论相对分子质量符合, 证明P91M32表达正确且纯度高。

2.2 肿瘤组织切片免疫荧光染色

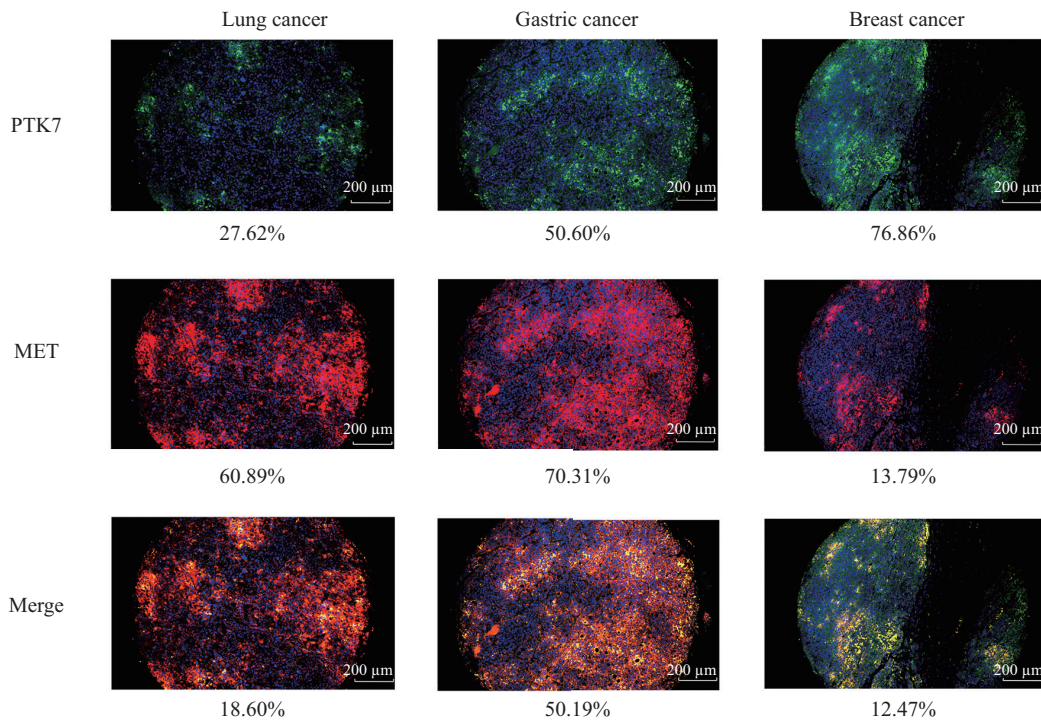
PTK7、MET在肺癌、胃癌、乳腺癌组织切片中的染色结果见下图2, 结果显示PTK7、MET在三种癌症组织中均存在不同程度的共表达, 且在胃癌



使用HPLC和MS对表达出的抗体蛋白性质进行检测。A: 使用 Agilent 1290 HPLC及XBridge Protein BEH SEC 200 Å, 3.5 μm, 7.8 mm×300 mm 色谱柱, 对稀释至1 mg/mL的样品进行SEC纯度检测; B: 对抗体分子进行切糖还原后, 使用质谱检测轻链的分子量结果; C: 对抗体分子进行切糖还原后, 使用质谱检测重链的分子量结果。

HPLC and MS were used to characterize the properties of the expressed antibody proteins. A: Agilent 1290 HPLC chromatograph and XBridge Protein BEH SEC 200A, 3.5 μm, 7.8 mm × 300 mm column were used to test the SEC purity of the samples which were diluted to 1 mg/mL; B: molecular weight of the light chain was detected by mass spectrometry after sugar reduction reaction of the antibody protein; C: molecular weight of the heavy chain was detected by mass spectrometry after sugar reduction reaction of antibody protein.

图1 SEC及MS检测P91M32
Fig.1 SEC and MS analysis of P91M32



使用免疫荧光染色对肿瘤组织进行分析, 图中PTK7显示为绿色荧光, MET显示为红色荧光, 共表达部分显示为黄色荧光。图片下方的百分比为肺癌、胃癌、乳腺癌中所展现荧光的比例。

Immunofluorescence staining was used to analyze the tumor tissues. As shown in the figure, PTK7 was detected in green fluorescence, MET was detected in red fluorescence, and the co-expression part was detected in yellow fluorescence. The number at the bottom of the figure, represents the percentage that the lung, gastric and breast PDX (patient-derived xenograft) samples detected in the corresponding fluorescence.

图2 PTK7与MET在肺癌、胃癌、乳腺癌PDX中的共表达情况

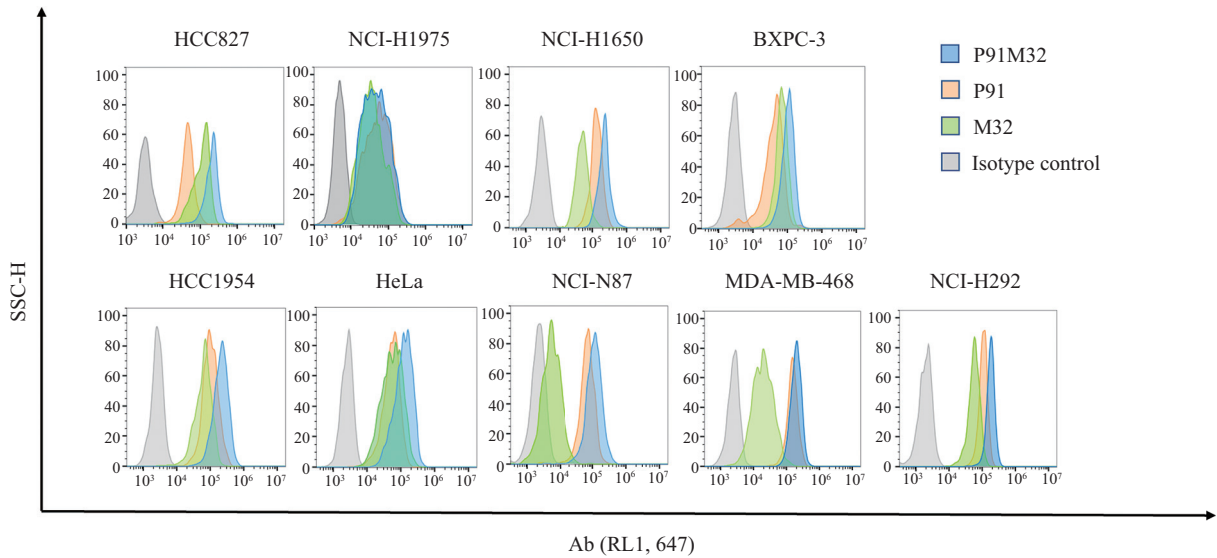
Fig.2 Co-expression of PTK7 and MET in the lung cancer, the gastric cancer and the breast cancer PDX samples

中的共表达程度最高。

2.3 P91M32与PTK7/MET不同表达水平肿瘤细胞系的结合活性

P91M32、M32、P91与多种肿瘤细胞系的结合情况如图3所示。由图3可看出P91M32与九种不

同类型肿瘤细胞系均有较强的结合活性。同时P91/M32对所有测试肿瘤细胞均具有不同程度的结合活性, 说明PTK7/MET在肿瘤中存在广泛共表达。测试的所有九种细胞系其PTK7和MET具有不同的表达水平组合, 但均可以看出P91M32双抗的细胞亲

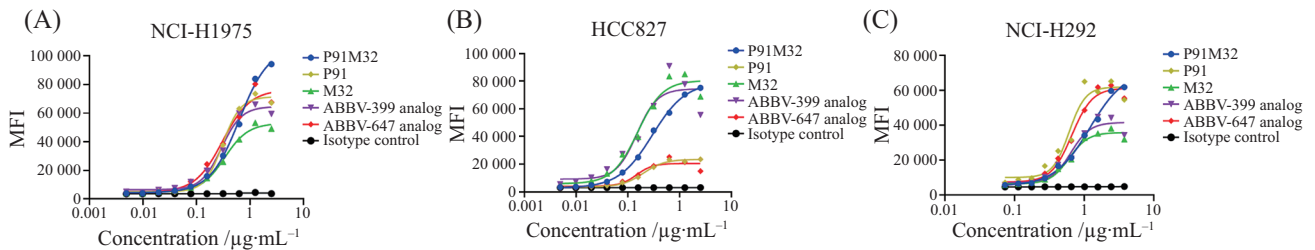


FACS检测抗体与多种肿瘤细胞系的结合情况。抗体工作浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ 。

FACS was used to detect the binding activity of the antibodies in a series of tumor cell lines. The working concentration of antibodies is 5 $\mu\text{g/mL}$.

图3 P91M32、P91、M32在多种肿瘤细胞中的结合活性

Fig.3 Binding activity of P91M32, P91 and M32 in multi-tumor cells



使用FACS检测经梯度稀释的抗体与NCI-H1975(A)、HCC827(B)和NCI-H292(C)的亲合力。

FACS measures the binding ability of antibodies to NCI-H1975 (A), HCC827 (B), NCI-H1975 (C) in various concentrations.

图4 抗体与不同肿瘤细胞结合的 EC_{50} 曲线图

Fig.4 The EC_{50} binding ability plot of antibody molecules to tumor cells

和力对比P91及M32具有不同程度的增强。这说明, P91M32同时靶向肿瘤细胞上的PTK7/MET抗原可能产生更强的细胞亲和力。

为进一步探究双抗在PTK7、MET不同表达水平的肿瘤细胞系上亲和力特征,选择在上述结合实验中测试得到的具有不同PTK7/MET表达水平的肿瘤细胞: HCC827细胞($PTK7^{low}/MET^{moderate}$, 分别使用上标“low”、“moderate”、“high”指代表达水平的“低”、“中”、“高”,下同), NCI-H1975细胞($PTK7^{moderate}/MET^{moderate}$), NCI-H292细胞($PTK7^{high}/MET^{moderate}$), 测试P91M32、P91和M32的半数有效浓度(half maximal effective concentration, EC_{50})。由图4A可见P91M32分子对NCI-H1975的结合具有更高的平台期,说明在PTK7/MET共表达水平接近的肿瘤细胞中, P91M32具备增强亲和力的能力。在HCC827肿瘤细胞中P91M32

亲和力优于P91及ABBV-647 analog(图4B); NCI-H292细胞中P91M32结合能力强于M32及ABBV-399 analog(图4C),说明在PTK7/MET表达水平一高一低的肿瘤细胞系中, P91M32均体现出偏向表达水平高靶点的亲和力。

2.4 P91M32的内吞性质

为进一步研究抗体在肿瘤细胞中的内吞动力学,将P91M32、P91和M32母本单抗及阳性药分别与NCI-H1975($PTK7^{moderate}/MET^{moderate}$)、NCI-H292($PTK7^{high}/MET^{moderate}$)、MDA-MB-468($PTK7^{high}/MET^{low}$)肿瘤细胞共同孵育24 h,并在Incucyte仪器中进行连续拍摄观察。当抗体-二抗复合物结合细胞表面抗原发生内吞,复合物进入溶酶体后,在溶酶体酸性环境下二抗上标记的pH敏感染料发出红色荧光,所以红色区域可表示抗体内吞进入细胞的数量和强度

(图5)。抗体在三个肿瘤细胞中内吞动力学见图6。首先,结果显示在三种测试的细胞系中,无论MET表达水平高低, M32内吞活性均高于P91及ABBV-647 analog, 提示MET靶点内吞速度较PTK7快。其次,在MDA-MB-468细胞中P91M32内吞作用强于P91和M32, 显示出双抗的内吞协同作用。另外,有趣的是,即使在不同PTK7/MET表达水平的NCI-H292、NCI-H1975和MDA-MB-468肿瘤细胞中, P91M32的内吞作用均强于阳性药 ABBV-399 analog、ABBV-647 analog。这说明P91M32通过靶向肿瘤细胞上双抗原, 其内吞活性有所提高, 由此可推测P91M32具备潜在的更强肿瘤杀伤能力。

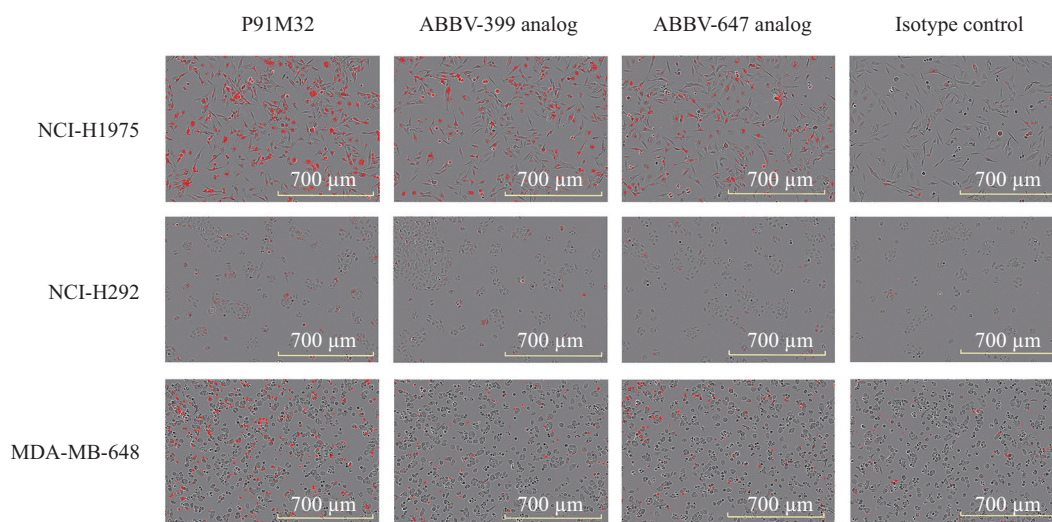
2.5 抗体偶联药物的制备及鉴定

本研究采用半胱氨酸偶联的方法进行抗体偶

联。P91M32-ADC的DAR值分布见图7A。对于DAR值分布的判断, 由裸抗HIC的出峰位置为5 min可得出DAR值为0的位置, 后续偶数峰的DAR值分别为2、4、6、8。根据各色谱峰的峰面积乘以对应的DAR值之和除以总峰面积的计算方法得到P91M32-ADC的DAR值为4.20。SEC检测显示ADC纯度非常高(图7B)。另外, RP-HPLC检测小分子残留的结果可看出对比小分子药物标准品(图7C), P91M32-ADC并未检测到小分子毒素残留(图7D)。上述结果显示, 通过半胱氨酸偶联的方法得到DAR值为4.20且纯度较高的P91M32-ADC。P91、M32及对照药抗体均采用同样的方法得到抗体偶联药物。

2.6 抗体偶联药物对肿瘤细胞杀伤能力

通过Incucyte连续拍摄, 获得肿瘤细胞生长数

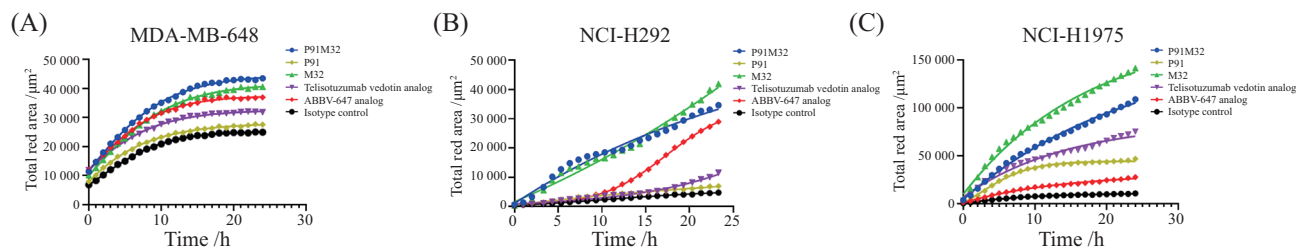


Incucyte拍摄肿瘤细胞内吞24 h后荧光信号。视野中的红色荧光为内吞信号。

Incucyte captured tumor cells for 24 h and showed red fluorescence in the visual field.

图5 Incucyte检测抗体内吞

Fig.5 Endocytosis of antibodies were characterized by Incucyte

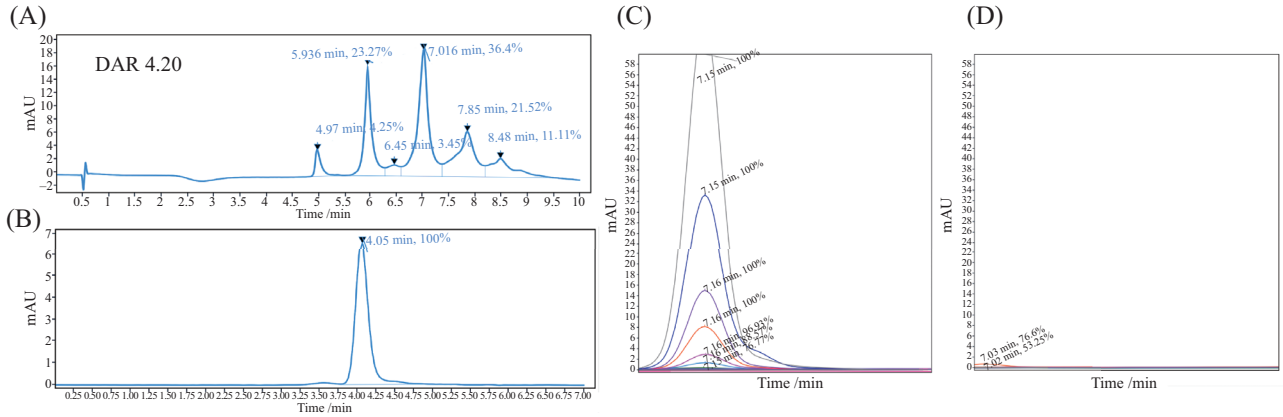


使用Incucyte仪器检测MDA-MB-468(A)、NCI-H292(B)和NCI-H1975(C)肿瘤细胞24 h内抗体内吞情况。拍摄间隔为1 h, 共24 h; 设置红色荧光信号收集通道。

The Incucyte was used to detect the endocytosis ability of antibodies in different cell lines within 24 h. MDA-MB-468 cell line (A); NCI-H292 cell line (B); and NCI-H1975 cell line (C). Shooting interval is 1 h, 24 h in total. The red fluorescence was set as the signal collection channel.

图6 抗体在肿瘤细胞中的内吞动力学曲线

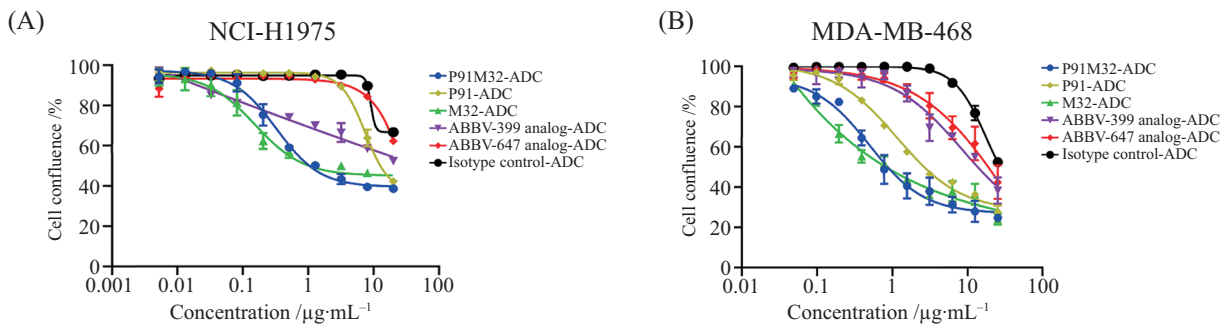
Fig.6 Internalization fluorescence curve of antibody proteins in tumor cells



使用HPLC对P91M32-ADC进行表征。A: HIC检测ADC的DAR值分布; B: SEC检测ADC的纯度; C: 利用小分子标准品设置RP-HPLC标准曲线; D: RP-HPLC检测样品残留。

P91M32-ADC was characterized by HPLC. A: DAR value distribution of the ADC was detected by HIC; B: the purity of the ADC was characterized by SEC; C: RP-HPLC was used to detect small molecule standards with different concentrations, and standard curves were set; D: RP-HPLC was used to detect sample residues.

图7 HPLC检测ADC性质
Fig.7 HPLC detects ADC properties



A: 使用Incucyte检测ADC药物抑制NCI-H1975肿瘤细胞生长曲线; B: 使用Incucyte检测ADC药物抑制MDA-MB-468肿瘤细胞生长曲线。

A: Incucyte was used to detect the inhibition ability of ADC drugs towards NCI-H1975 tumor cells. B: Incucyte was used to detect the inhibition ability of ADC candidates on MDA-MB-468 tumor cells.

图8 ADC药物体外杀伤
Fig.8 *In vitro* killing ability of ADC candidates

据(细胞汇合度)。将肿瘤细胞汇合度的数据导入GraphPad Prism 8得到杀伤曲线(图8)。结果显示, P91M32-ADC在NCI-H1975和MDA-MB-468中均具有较强肿瘤细胞杀伤活性, 且均强于ABBV-399 analog-ADC、ABBV-647 analog-ADC, 这与2.4中P91M32内吞作用较ABBV-399 analog和ABBV-647 analog有所增强的结果显示出一致性, 说明双抗内吞能力的增强有利于ADC药物有效递送小分子毒素, 相应提高了单靶点药物对肿瘤细胞的杀伤能力。值得一提的是, 在两个细胞中, 与P91-ADC比较, P91M32-ADC杀伤肿瘤细胞的能力均有所提升, 体现出P91M32-ADC具备潜在提高临床抗肿瘤活性的能力。

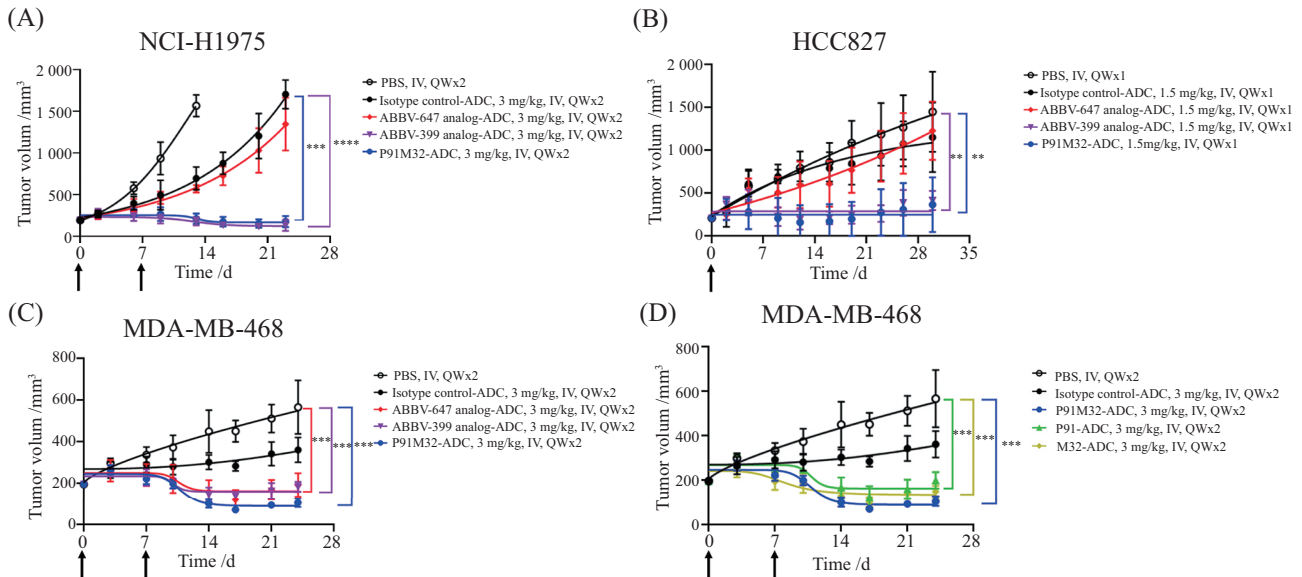
2.7 体内抗肿瘤活性

体内药效的CDX模型中, P91M32-ADC均

有较好的抑制肿瘤生长能力。在HCC827和NCI-H1975模型中P91M32-ADC药效均优于PTK7阳性药ABBV-647 analog-ADC, 与MET阳性药ABBV-399 analog-ADC药效相当(图9A和图9B)。P91M32-ADC在MDA-MB-468模型中表现出优于ABBV-647 analog-ADC和ABBV-399 analog-ADC的抑制肿瘤生长效果(图9C), 另外值得注意的是, P91M32-ADC在此模型中对比母本单抗ADC(P91-ADC、M32-ADC)表现出一定的协同作用(图9D), 抗体在肿瘤细胞中内吞作用的结果中亦表现出相同的协同作用, 说明靶向双抗原的双抗ADC增强了抗肿瘤活性。

3 总结及展望

ADC药物结合了抗体的靶向性和细胞毒素的



A: ADC药物在NCI-H1975的体内肿瘤模型中抑制肿瘤生长能力; B: ADC药物在HCC827的体内肿瘤模型中抑制肿瘤生长能力; C: 在MDA-MB-468体内肿瘤模型中P91M32与阳性药(ABBV-647 analog-ADC、ABBV-399 analog-ADC)抑制肿瘤生长能力对比; D: 在MDA-MB-468体内肿瘤模型中P91M32与母本单抗(P91-ADC、M32-ADC)抑制肿瘤生长能力对比。箭头所示为给药时间点。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: the inhibition ability of ADC candidates in NCI-H1975 CDX model; B: the inhibition ability of ADC candidates in HCC827 CDX model; C: Comparison of tumor growth inhibition ability between P91M32 and positive drugs (ABBV-647 analog-ADC, ABBV-399 analog-ADC) in MDA-MB-468 *in vivo* model; D: comparison of tumor growth inhibition ability between P91M32 and maternal monoclonal antibodies (P91-ADC, M32-ADC) in MDA-MB-468 *in vivo* model. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图9 ADC药物体内药效

Fig.9 *In vivo* efficacy studies of ADC candidates

高效杀伤,极大地提高了临床抗肿瘤疗效。ADC药物是个复杂的系统,包括了三个基本要素:抗体、连接子和有效载荷。成功的ADC取决于这三者的有机结合,而靶点的选择是其基础。理想的ADC药物靶点需要在肿瘤中特异性表达,同时靶向抗体具备较好的内吞特性,实现高效递送有效载荷。但实际上肿瘤抗原(tumour antigens)极少具备较好的在肿瘤中特异表达的性质,同时很多靶点也缺乏快速内吞特性。而双抗ADC通过靶向肿瘤细胞表面的双抗原,能潜在增强内吞作用,提高肿瘤杀伤效果^[21]。

通过测试和不同PTK7/MET表达水平组合的细胞系亲和力,我们发现与PTK7/MET各自母本单抗(P91和M32)相比, P91M32双抗具有亲和力增加的趋势,提示通过靶向双抗原的双价结合,提高了双抗的抗原结合丰度,从而增强了抗体对细胞系的亲和力。而ADC靶点的丰度以及抗体对靶点的亲和力,对于更有效富集ADC产生更强的肿瘤抑制效果非常关键。一般而言,ADC临床疗效与靶点的表达水平具有依赖性^[22]。

在测试的NCI-H1975、NCI-H292和MDA-MB-468三种细胞系中,我们发现PTK7内吞性质均

偏弱,即使在PTK7表达较高的NCI-H292中(图4C),PTK7抗体内吞也弱于MET,这说明靶点的内在性质可能决定其内吞能力(图6B)。而相较于PTK7母本单抗P91, P91M32双抗分子内吞能力显著提高,提示P91M32通过靶向MET,利用MET靶点的快速内吞能力,促进了PTK7靶点的内吞。体外杀伤中也体现出如内吞实验同样的趋势, P91M32-ADC提升了P91-ADC的杀伤效果,说明内吞能力的提高是ADC杀伤能力的关键。在体内肿瘤模型药效实验中,也能看到类似结果。在NCI-H1975和HCC827体内药效模型中,即使PTK7阳性药ABBV-647 analog-ADC几乎不响应, P91M32-ADC依然具备很强的抗肿瘤活性,提示P91M32-ADC通过提升内吞能力实现了小分子在肿瘤细胞中的有效递送,从而实现更强的肿瘤杀伤效果。特别是, P91M32-ADC在三阴性乳腺癌模型MDA-MB-468中,药效强于PTK7/MET的母本单抗ADC,体现出协同作用。同时,在所有三种模型中, P91M32-ADC都具备强烈的抗肿瘤活性,具有类似或强于ABBV-399 analog-ADC/ABBV-647 analog-ADC的肿瘤抑制效果,提示P91M32-ADC在临床中对不同PTK7/MET表达患者人群的广泛有效性。

总体而言,本研究成功构建具备高纯度的靶向PTK7/MET的双特异性抗体偶联药物P91M32-ADC,提高了单靶点抗体内吞活性和体内外抗肿瘤活性,证实了双特异性抗体偶联药物是未来ADC药物开发领域的有力策略。

参考文献 (References)

- [1] FU Z, LI S, HAN S, et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 93.
- [2] PERADZIRYI H T N, BORCHERS A. The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 524(1): 71-6.
- [3] BERGER H, WODARZ A, BORCHERS A. PTK7 faces the Wnt in development and disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 31.
- [4] CUI N P, QIAO S, JIANG S, et al. Protein tyrosine kinase 7 regulates EGFR/Akt signaling pathway and correlates with malignant progression in triple-negative breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 699889.
- [5] MENG L, SEFAH K, O'DONOGHUE M B, et al. Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14018.
- [6] BIE J, HU X, YANG M, et al. PTK7 promotes the malignant properties of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell lines [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(2): 356-65.
- [7] CHEN R, KHATRI P, MAZUR P K, et al. A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(10): 2892-902.
- [8] OZCELIK M, ERCELEP O, KESER S, et al. PTK-7 expression in gastric cancer: a prognostic determinant [J]. *Balkan Med J*, 2020, 37(2): 91-7.
- [9] DAMELIN M, BANKOVICH A, BERNSTEIN J, et al. A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(372): eaag2611.
- [10] MAITLAND M L, SACHDEV J C, SHARMA M R, et al. First-in-human study of PF-06647020 (cofetuzumab pelidotin), an antibody-drug conjugate targeting protein tyrosine kinase 7, in advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(16): 4511-20.
- [11] LEE M, JAIN P, WANG F, et al. MET alterations and their impact on the future of non-small cell lung cancer (NSCLC) targeted therapies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25(4): 249-68.
- [12] WANG J, ANDERSON M G, OLEKSIJEV A, et al. ABBV-399, a c-Met antibody-drug conjugate that targets both met-amplified and c-met-overexpressing tumors, irrespective of MET pathway dependence [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(4): 992-1000.
- [13] CAMIDGE D R, MORGENZSTERN D, HEIST R S, et al. Phase I study of 2- or 3-week dosing of telisotuzumab vedotin, an antibody-drug conjugate targeting c-met, monotherapy in patients with advanced non-small cell lung carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(21): 5781-92.
- [14] WAQAR S N, REDMAN M W, ARNOLD S M, et al. A phase II study of telisotuzumab vedotin in patients with c-MET-positive Stage IV or recurrent squamous cell lung cancer (LUNG-MAP Sub-study S1400K, NCT03574753) [J]. *Clin Lung Cancer*, 2021, 22(3): 170-7.
- [15] ANDREEV J, THAMBI N, PEREZ BAY A E, et al. Bispecific antibodies and antibody-drug conjugates (ADCs) bridging HER2 and prolactin receptor improve efficacy of HER2 ADCs [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(4): 681-93.
- [16] BREEN L, GAULE P B, CANONICI A, et al. Targeting c-Met in triple negative breast cancer: preclinical studies using the c-Met inhibitor, Cpd A [J]. *Invest New Drugs*, 2020, 38(5): 1365-72.
- [17] KIM Y J, CHOI J S, SEO J, et al. MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(10): 2424-36.
- [18] FRIEDLAENDER A, DRILON A, BANNA G L, et al. The ME-Teoric rise of MET in lung cancer [J]. *Cancer*, 2020, 126(22): 4826-37.
- [19] JIE Y, LIU G, FENG L, et al. PTK7-targeting CAR T-cells for the treatment of lung cancer and other malignancies [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 665970.
- [20] PENG Z, ZHU Y, WANG Q, et al. Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84502.
- [21] MARUANI A. Bispecifics and antibody-drug conjugates: a positive synergy [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2018, 30: 55-61.
- [22] TARANTINO P, CARMAGNANI PESTANA R, CORTI C, et al. Antibody-drug conjugates: smart chemotherapy delivery across tumor histologies [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 72(2): 165-82.