

DOI: 10.13376/j.cblls/2019035

文章编号: 1004-0374(2019)03-0241-07

基于力达霉素的靶向药物与肿瘤治疗

徐 珊^{1,2}, 王艳林^{1*}

(1 三峡大学医学院, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 宜昌 443002; 2 宜昌市疾病预防控制中心, 宜昌 443000)

摘 要: 作为一种抗肿瘤抗生素, 力达霉素 (lidamycin, LDM) 对人类癌细胞显示出很强的细胞毒性。LDM 由一个载体蛋白 (LDP) 和一个具有肿瘤杀伤活性的烯二炔发色团 (AE) 以非共价键方式组合而成, 这一特征使得 LDM 成为构建肿瘤靶向药物的良好材料。通过基因重组技术将具有肿瘤靶向能力的蛋白质和 (或) 多肽与 LDP 偶联, 由此获得具有肿瘤靶向能力的融合蛋白, 在此基础上, 再将 AE 整合到融合蛋白的 LDP 中, 最终得到既具有肿瘤靶向能力, 又具有 LDM 杀伤活性的肿瘤靶向药物。随着研究的逐步深入, 可望有一批基于 LDM 的靶向药物能用于肿瘤的临床治疗。

关键词: 力达霉素; 融合蛋白; 靶向治疗; 肿瘤

中图分类号: R963; R979.1

文献标志码: A

Lidamycin-based targeting drugs and tumor therapy

XU Shan^{1,2}, WANG Yan-Lin^{1*}

(1 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2 Yichang Center for Disease Control and Prevention, Yichang 443000, China)

Abstract: As an anti-tumor antibiotic, lidamycin (LDM) has strong cytotoxicity to human cancer cells. LDM is composed of a carrier protein (LDP) and an active enediyne chromophore (AE) which has tumor-killing activity. LDP combines AE in a non-covalent manner, which makes LDM a good material for constructing tumor-targeting drugs. The tumor targeting fusion proteins could be obtained by coupling the proteins and/or peptide that have tumor targeting ability with LDP through gene recombination technology. And then, AE was integrated into the LDP of the fusion protein, which would finally produce the tumor targeting drugs with both tumor targeting ability and killing activity. With the deepening of research, it is expected that a number of LDM-based targeting drugs can be used in the clinical treatment of cancers.

Key words: lidamycin; fusion protein; targeting therapy; tumor

力达霉素 (lidamycin, LDM) 为一种大分子烯二炔类抗肿瘤抗生素, 它由我国科学家首先发现于湖北省潜江县土壤中分离出的一株链霉菌 (*Streptomyces globisporus* C-1027) 中。LDM 对大多数革兰氏阳性菌有抑菌作用, 但对革兰氏阴性菌和分枝杆菌无效。进一步研究发现, LDM 对多种肿瘤细胞具有强大的杀伤作用, 在肿瘤临床中具有重要的应用前景和价值^[1]。

1 LDM的结构与功能

LDM 由一个活性芳香族发色团 (AE) 和一个酸

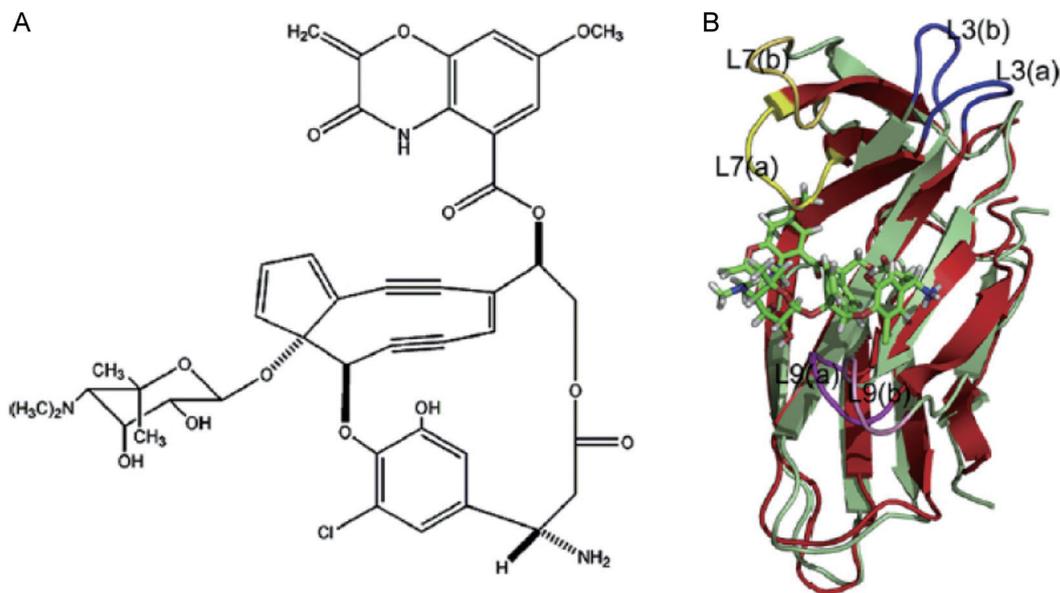
性载体蛋白 (LDP) 以非共价键的方式结合而成 (图 1)^[2]。AE 为 LDM 中发挥抗肿瘤作用的活性部分, 相对分子质量 843 D, 含有一个 9 元环烯二炔结构的活性中心。LDP 由 110 个氨基酸残基构成, 含有 2 个链内二硫键, 相对分子质量 10.5 kD, 它的功能是对 AE 起保护作用^[3]。

Li 等^[4]报道了能产生 LDM 的 *S. globisporus* C-1027

收稿日期: 2018-09-25; 修回日期: 2018-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(81372265)

*通信作者: E-mail: 2244524933@qq.com



A: 活性烯二炔发色团(AE); B: LDM (LDP+AE)

图1 LDM的结构^[2]

的完整基因组序列, 该序列包括一个 7 608 611 bp 的线性染色体、一个 167 754 bp 的线性质粒 SGLP1 和一个 7 234 bp 的环状质粒 pSGL1。与 LDM 生物合成相关的基因簇位于线性质粒 SGLP1 中。

研究发现, LDM 在体内外对多种肿瘤细胞具有细胞毒性, 且其杀伤力远高于目前常用的化疗药。依据肿瘤细胞的组织来源和遗传背景的差异, LDM 抑制肿瘤细胞增殖和杀伤肿瘤细胞的机制也复杂多样, 主要包括: (1) 与 DNA 双螺旋的小沟结合, 并引起 DNA 链的断裂和脱碱基化; (2) 抗肿瘤血管生成; (3) 诱导肿瘤细胞发生凋亡、裂亡, 以及出现衰老样表型; (4) 干扰细胞周期, 将细胞阻滞于 G₁ 或 G₂/M 期; (5) 干扰与肿瘤生长相关的信号通路的活性, 如 K-ras、Akt、NF-κB 和 MAPK 信号通路等^[5]。

药代动力学研究发现, 具有选择性 DNA 切割能力的 AE 与 LDP 结合形成的复合物 LDM 在体内外相对稳定, 该复合物进入癌细胞后, 具备药理活性的 AE 才被释放出来。其释放过程需要 LDP 的空间结构中的三个肽环发生局部位移, 这三个肽环分别是 L3 (Val39-Gln42)、L7 (Thr75-Thr79) 和 L9 (Asn97-Leu100)。AE 释放的主要障碍来自这三个环形成的空间屏障, 并且 Ser98 是与 AE 释放过程相关的重要残基。最有利于 AE 释放的方向与 L7 和 L3 的连接线几乎平行, 从这一方向释放 AE 只需要打破 Ser98 和 Pro76 之间的三个氢键和弱的空间屏障阻力^[3]。

温艳清等^[6]通过 HPLC-MS/MS 法测定了 LDM 在大鼠、比格犬、猕猴和人的血浆及肝微粒体中的代谢稳定性, 以及在人肝微粒体中对细胞色素 P450 各亚型酶活性的影响。结果表明, LDM 在 4 个种属动物的血浆中均能发生降解代谢, 其代谢速率为大鼠 > 比格犬 > 人 > 猕猴, 但 LDM 对人细胞色素 P450 各亚类的活性无明显影响。

2 基于LDM的肿瘤靶向药物

LDM 由 LDP 和 AE 组成, 且 AE 和 LDP 可以在一定的体外条件下解离和重构, LDM 的这一特征使得它成为构建抗肿瘤靶向复合药物的理想载荷。将编码 LDP 的 DNA 序列与具有肿瘤组织细胞靶向特性的蛋白质或多肽的 DNA 序列重组, 并在原核或真核细胞中表达, 由此获得的融合蛋白在体外与 AE 重构后, 即可获得含有活性 LDM 的新型肿瘤靶向药物^[2]。

2.1 LDM与抗明胶酶抗体偶联

IV 型胶原酶又名明胶酶, 它在肿瘤组织中高表达并在肿瘤细胞的侵袭和转移中起重要作用, 由此成为肿瘤治疗的潜在靶标。Gao 等^[7]制备了一种由抗明胶酶抗体单链可变片段 (Fv) 和 LDP 组成的融合蛋白 Fv-LDP, 进一步分析发现, Fv-LDP 能特异性地与多种肿瘤细胞结合, 它对人肺巨细胞瘤细胞的亲和力远高于单独的 LDP。Fv-LDP 能抑制肿瘤细胞明胶酶的表达和分泌, 并可通过内吞作用进

入细胞。在模型动物体内, Fv-LDP 对人肝癌细胞移植瘤的生长抑制率达 44.1%, 将 Fv-LDP 与血管内皮抑素(肿瘤血管生成抑制剂)联合应用时, 肿瘤生长抑制率高达 80.8%。上述研究提示, 即使没有 AE 存在, LDP 本身也具有一定的抗肿瘤功能。

Zhong 等^[8] 构建的靶向药物 dFv-LDP-AE 与 Fv-LDP 相比具有更强的抗肿瘤活性。该靶向药物含有顺式重复的抗明胶酶抗体单链可变片段(dFv), 并将具有抗肿瘤功能的 AE 整合到 LDP 中。这种靶向药物与胶原酶的结合能力更强, 能有效结合到肝癌细胞(HCC)细胞表面, 在 0.1 nmol/L 水平上即可使 HCC 发生 G₂/M 周期阻滞和细胞凋亡。小动物活体成像分析证明, 给药后 30 min 内, FITC 标记的 dFv-LDP-AE 即被富集到肿瘤组织内。对小鼠 H22 和人 Bel-7402 肝癌细胞的分析也发现, 在小鼠可耐受剂量水平给药时, dFv-LDP-AE 与 LDM 对 H22 细胞小鼠移植瘤的生长抑制率分别为 89.5% 和 73.6%, 对 Bel-7402 小鼠移植瘤生长抑制率分别为 87.3% 和 63.4%。该研究组还比较了未整合 AE 的融合蛋白 dFv-LDP 和整合有 AE 的融合蛋白 dFv-LDP-AE 之间抗肿瘤效应的差异, 结果发现, dFv-LDP 对肺癌异种移植瘤的生长抑制率为 77.5%, 而 dFv-LDP-AE 的肿瘤抑制率高达 94.2%。上述研究表明, 将靶向明胶酶的抗体与 LDM 偶联能显著性增强 LDM 的肿瘤靶向性和对肿瘤细胞的杀伤能力。

该课题组随后对 dFv-LDP-AE 复合物作了进一步优化, 他们在上述分子中插入一段富含精氨酸的细胞穿透肽 R (由 9 个精氨酸残基组成的短肽), 由此产生的融合蛋白 dFv-R-LDP-AE 具有更强穿透肿瘤细胞的能力。以 SW-1990 和 PANC-1 胰腺癌细胞为模型的研究表明, 与 dFv-LDP-AE 相比, dFv-R-LDP-AE 对肿瘤细胞具有更高的亲和力和细胞穿透率, 以及更强的细胞毒性, 并能在体外诱导细胞凋亡和坏死。小鼠体内 SW-1990 移植瘤实验中, dFv-LDP、dFv-LDP-AE 和 dFv-R-LDP-AE 的肿瘤抑制率分别为 20.42%、56.31% 和 74.2%^[9]。

封云等^[10] 也构建了一种 LDM 与抗 IV 型胶原酶单抗的免疫偶联物 Fab'-LDM, 并分析其对入纤维肉瘤 HT-1080 细胞侵袭和转移的抑制作用。结果显示, Fab' 片段、LDM 和 Fab'-LDM 对肿瘤生长抑制率分别为 30%、74% 和 86%。对荷瘤小鼠的分析也证实, 上述 3 种生物制剂对 HT-1080 移植瘤的生长均具有抑制作用, 其中 Fab'-LDM 偶联物的抑瘤率最高。

2.2 LDM与抗CD20抗体偶联

CD20 为一种 B 细胞分化抗原, 仅存在于前 B 细胞和成熟 B 细胞的膜表面。重要的是, CD20 在绝大多数 B 细胞淋巴瘤细胞中高表达, 而在正常造血干细胞和其他正常组织中不表达, 由此成为 B 细胞淋巴瘤治疗的重要靶标。根据这一特征, Xin 等^[11] 将抗 CD20 抗体的抗原结合片段与 LDM 中的 LDP 进行基因重组, 由此构建了能靶向 CD20 的融合蛋白 anti-CD20Fab-LDM, 该复合物中抗体部分通过特异性识别和结合 B 细胞淋巴瘤细胞表面的 CD20 而将 LDM 富集到瘤细胞中, 进而发挥其对瘤细胞的杀伤功能。研究结果表明, 与 LDM 相比, anti-CD20Fab-LDM 在体内外对 CD20⁺ B 细胞淋巴瘤细胞具有更强的细胞毒性。体内移植瘤实验中, 静脉给予 anti-CD20Fab-LDM 对 Raji 细胞移植瘤的抑制率达到 85%~90.1%。

Fang 等^[12] 也制备了一种由抗 CD20 抗体单链可变片段(scFv)与 LDP 偶联的融合蛋白 scFv-LDP, ELISA 和间接免疫荧光细胞化学染色测定发现, 该融合蛋白能特异性地与 CD20 阳性的淋巴瘤细胞结合。进一步将 AE 组装到此融合蛋白中后, 获得一种靶向药物复合体 scFv-LDP-AE, 该靶向药物对 CD20 阳性的 Raji 和 Daudi 细胞有很强的细胞毒性。模型小鼠体内实验也表明, scFv-LDP-AE (0.3 mg/kg) 对接种的 CD20⁺ B 细胞淋巴瘤的生长抑制率达 79.3%, 而 LDM (0.05 mg/kg) 的抑制率仅为 68.6%。

2.3 LDM与EGFR配体或抗体偶联

表皮生长因子受体(EGFR)在多种肿瘤细胞中过表达, 并与肿瘤的恶性行为密切相关, 由此成为肿瘤治疗的重要靶点^[13]。

Sheng 等^[14] 制备了一种由抗 EGFR 抗体单链可变片段(scFv)与 LDP 偶联的融合蛋白 Fv-LDP, 然后再加入 AE 以组装生成 Fv-LDP-AE。分析发现, 融合蛋白 Fv-LDP 能特异性结合到 EGFR 过表达的癌细胞表面, 并通过受体介导的内吞作用内化到细胞质中。在表皮癌细胞 A431 移植瘤模型中, Fv-LDP、Fv、LDP 和 Fv+LDP 的肿瘤抑制率分别为 63.6%、46.7%、48.5% 和 49.9%, 而 Fv-LDP-AE 的抑制率达到 89.2%。上述研究结果提示, 与抗 EGFR 抗体偶联能大幅增加 LDM 的肿瘤杀伤能力。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)主要通过死亡受体 4(DR4)和死亡受体 5(DR5)结合而启动外源性细胞凋亡途径, 而上皮生长因子(EGF) C 末端 22 个氨基酸所形成的肽环(Ec), 足以高亲

和性地与 EGFR 结合。在此基础上, Zhu 等^[15] 构建了一种新型双特异性和双功能 LDP 融合蛋白 Ec-LDP-TRAIL, 并研究其抗肿瘤效应。结果发现, 这种融合蛋白具有双特异性, 能有效结合到 EGFR 和 (或) DR4、DR5 高表达的癌细胞表面, 而对低表达 EGFR 和 DR4 / DR5 细胞的结合能力较差。体内功效研究结果表明, 用 Ec-LDP-TRAIL (10 mg/kg) 处理荷瘤实验动物时, 对肿瘤 (上皮样癌 A431 细胞移植瘤) 生长的抑制率达 80.19%。当进一步将 AE 装配到 Ec-LDP-TRAIL 融合蛋白后, 所得 Ec-LDP-TRAIL-AE 因同时具备凋亡诱导能力和 LDM 的活性而显示出更强的肿瘤杀伤能力, 能显著抑制裸鼠 A431 异种移植瘤的生长。

Xu 等^[16] 基于 EGFR 和 MMP-2 的过表达在非小细胞肺癌 (NSCLC) 的发生和发展中的重要作用, 通过基因工程和分子重构制备了能同时靶向 EGFR 和 MMP-2 的融合蛋白 Ec-LDP-TIMP2 和 Ec-LDP (AE)-TIMP2。在这两种融合蛋白中, Ec 能识别和结合 EGFR, 而 TIMP2 则为一种内源性基质金属蛋白酶抑制剂, 可结合 MMP2 并抑制其功能。组织芯片分析发现, 与非癌对照组织相比, Ec-LDP-TIMP2 对人 NSCLC 标本显示出更高的结合能力和选择性; 体内成像分析也证实, Ec-LDP-TIMP2 可特异性地在人 NSCLC 移植瘤中富集, 而 Ec-LDP (AE)-TIMP2 能显著抑制无胸腺小鼠中 H460 移植瘤的生长。

除 EGFR 外, 胰岛素样生长因子受体 (IGF-R) 也在多种肿瘤细胞表面高表达。有鉴于此, Guo 等^[17] 构建了含有 EGF (EGFR 特异性配体)、IGF (IGF-R 特异性配体) 和 LDM 的新型双特异性融合蛋白 EGF-IGF-LDP-AE, 并研究其对非小细胞肺癌 (NSCLC) 的抗癌活性。分析表明, 与单特异性蛋白复合物相比, EGF-IGF-LDP-AE 融合蛋白能更高亲和性地与 NSCLC 细胞结合, 并显示出更强的细胞毒性 ($IC_{50} < 10^{-11}$ mol/L)。该融合蛋白可抑制细胞周期 (G_2/M 期细胞大幅增加) 并诱导细胞凋亡。用 EGF-IGF-LDP-AE 预处理小鼠, 能阻遏 EGF 和 IGF 诱导的相应受体的磷酸化, 并抑制下游 AKT 和 ERK 信号分子的活化。

促吞噬肽 (tuftsin, TF) 是从噬白细胞的 IgG 中分离得到的一种具有免疫调节功能的短肽 (Thr-Lys-Pro-Arg), 它能够通过刺激免疫细胞的吞噬作用而非特异性激活宿主的免疫系统, 继而发挥抗肿瘤效应^[18]。基于这一发现, Liu 等^[19] 利用基因工程技

术制备了系列包含 TF 的融合蛋白, 包括 LDP-TF、Ec-LDP-TF 和 Ec-LDM-TF。进一步分析发现, 与 LDP 相比, 含有 TF 的融合蛋白能显著增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬活性。此外, Ec-LDP-TF 还显著抑制人表皮样癌 A431 异种移植瘤的生长, 并上调瘤体中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达水平。装配有 AE 的 Ec-LDM-TF 对肿瘤的杀伤能力更强, 对 A431 细胞异种移植瘤的生长抑制达 90.9%。值得注意的是, Ec-LDM-TF 还引起 A431 细胞中 CD47 的表达显著下调, 而细胞表面的 CD47 是一种能抑制肿瘤免疫的拒吞噬 (do not eat me) 信号分子, 对 CD47 表达的抑制将进一步增强免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。上述结果提示, 基于 TF、LDM 和 EGFR 的靶向融合蛋白能发挥高效抗肿瘤效应, 具有重要的临床应用前景。

在多种肿瘤中, EGFR 常与人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 共表达, 并在细胞恶性转化中相互协同, 因此靶向抑制 EGFR 和 HER2 成为一种重要的肿瘤治疗策略。Guo 等^[20] 构建了一种由靶向结合 EGFR 的短肽 Ec、靶向结合 HER2 的寡肽 Hr 和 LDM 组成的双特异性融合蛋白 Ec-LDP-Hr-AE, 该融合蛋白在体内均能有效抑制肿瘤生长, 并在体内肿瘤组织中靶向富集。

CD13 是一种具有促癌作用的氨肽酶, 它能像 MMP 一样分解基膜和 IV 型胶原蛋白, 促癌细胞黏附和肿瘤血管生成。Sheng 等^[21] 制备了一种 EGFR/CD13 双靶向特异性的融合蛋白 ER (Fv)-LDP-NGR, 其中 ER (Fv) 抗 EGFR 抗体的单链可变片段, NGR 为靶向 CD13 的五肽 (Cys-Asn-Gly-Arg-Cys) 三连体。在此基础上, 再将 AE 结合到 LDP 中, 由此得到 ER(Fv)-LDP-NGR-AE。与单特异性融合蛋白 ER(Fv)-LDP 和 LDP-NGR 相比, 双特异性融合蛋白 ER(Fv)-LDP-NGR 显示对 EGFR/CD13 过表达的肿瘤细胞更高的亲和力, 以及更强的细胞毒性。在胸腺小鼠模型中, ER(Fv)-LDP-NGR-AE 能显著抑制 EGFR/CD13 高表达 MCF-7 异种移植瘤和 EGFR 高表达 A431 异种移植瘤的生长, 抑制率分别为 86.3% 和 81.4%。

2.4 LDM 与其他生物分子偶联

富含精氨酸的寡肽属于细胞穿透肽的一种, 它们能被活细胞高效摄取, 可在细胞质和核质中自由扩散, 由此成为向肿瘤细胞靶向递送药物的有力工具。Ru 等^[22] 通过 DNA 重组技术制备了一种由细胞穿透肽 (Arg) 9 和 LDP 组成的融合蛋白 (Arg) 9-LDP, 然后通过分子重组将 AE 装配到 LDP 中,

由此获得融合蛋白 (Arg) 9-LDP-AE。细胞水平上的研究显示, (Arg) 9-LDP 可以快速进入肿瘤细胞, 而吞噬是 (Arg) 9 介导复合物进入细胞的主要途径。对多种不同癌细胞系的分析证实, (Arg) 9-LDP-AE 比 LDM 的细胞毒性更强。在小鼠肝癌模型中, (Arg) 9-LDP-AE (0.3 mg/kg) 的肿瘤生长抑制率为 89.2%, 而 LDM (0.05 mg/kg) 抑制率为 74.6%。此外, 在裸鼠的神经胶质瘤 U87 细胞异种移植瘤模型中, (Arg) 9-LDP-AE (0.2 mg/kg) 的肿瘤生长抑制率为 88.8%, 而 LDM (0.05 mg/kg) 仅为 62.9%。用药期间, 所有组小鼠均未观察到明显的毒性作用。上述研究结果提示, 融合蛋白 (Arg) 9-LDP-AE 比 LDM 有更强的抗肿瘤活性, 有用于神经胶质瘤治疗的前景。

在多种癌细胞和人类癌组织临床样品中观察到有组织因子 (TF) 的过表达, 由此使得 TF 成为癌症治疗的理想靶点。Zhang 等^[23]报道了一种能够用于癌症治疗的融合蛋白 hIFVII-LDP-AE, 它由力达霉素 (LDP-AE) 与人凝血因子 VII 的轻链 (hIFVII) 缀合而成。凝血因子 VII 由两部分构成, N 末端 20 kD 的肽段称之为轻链, 能与 TF 高亲和性结合, C 端 30 kD 的肽段称之为重链, 具备启动凝血过程的功能。hIFVII-LDP-AE 能与肿瘤细胞上表达的 TF 特异性结合, 导致融合蛋白内化和由 LDM 诱导的细胞毒性。在 BALB/c 裸鼠移植瘤实验中, 两次静脉注射该融合蛋白可使 NCI-H292 移植瘤的生长速度降低 15%, 且小鼠无明显体重下降和炎症反应。上述研究结果表明, hIFVII-LDP-AE 能有效用于肺癌的治疗, 而且毒性小, 具有潜在的临床应用价值。该研究组还研发了靶向小鼠 TF 的融合蛋白 mlFVII-LDP-AE, 分析结果表明, mlFVII-LDP-AE 也能够有效抑制小鼠结肠癌的生长和转移^[24]。

CD30 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 属肿瘤坏死因子受体超家族成员。研究发现, CD30 在霍奇金淋巴瘤 (HL) 和退行性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 细胞中过度表达。Wang 等^[25]制备了一种由抗 CD30 抗体和 LDM 偶联的复合物抗 CD30-LDM。该融合蛋白能与瘤细胞表面 CD30 特异性和高亲和性地结合, 并可以内化到靶细胞中。抗 CD30-LDM 在体内外均显示出明显的肿瘤靶向能力和抗肿瘤效应, 能诱导细胞凋亡和导致 G₂/M 周期阻滞, 对 Karpas299 移植瘤的抑制效率达 87.86%。这些研究结果提示, 该 LDM 复合物具备治疗 CD30⁺ 淋巴瘤的潜在价值。

内皮抑素 (ES) 具备抑制内皮细胞增殖、迁移、侵袭的能力, 可特异性靶向肿瘤血管, 阻断肿瘤血

管生成, 并在多种动物模型中显示出抗肿瘤活性。Jiang 等^[26]首先构建了两种内皮抑素与 LDP 的融合蛋白: ES-LDP (ES 与 LDP 的 N 端连接) 和 LDP-ES (ES 与 LDP 的 C 端连接)。利用伤口愈合分析和内皮细胞管道形成测定法分析发现, ES-LDP 和 LDP-ES 均具有抑制血管内皮细胞迁移和新血管生成的能力。ES-LDP 可在肿瘤中富集并抑制肿瘤生长和转移。当将 AE 整合到融合蛋白中后, 所得 ES-LDP-AE 在实验小鼠体内表现出对肺癌细胞更显著的杀伤能力。

MMP-14 在多种人类实体瘤中高度表达, 并成为抗癌药物的潜在分子靶点。基于金属蛋白酶 2 的组织抑制剂 (TIMP2) 能与 MMP-14 特异性相互作用这一特征, Xu 等^[27]设计并制备了基于 TIMP2 和 AE 双功能的融合蛋白 LDP (AE)-TIMP2, 并分析该融合蛋白与 MMP-14 的结合特性, 以及在裸鼠体内对人食管癌 KYSE150 和人纤维肉瘤 HT1080 异种移植瘤的治疗功效。组织芯片分析发现, 该融合蛋白能高亲和性地与肿瘤组织结合, 但与匹配的正常对照组织结合能力较弱。体内分析也证实, LDP (AE)-TIMP2 能在肿瘤组织中靶向富集, 并显著性抑制移植瘤的生长。上述研究提示, 内源性 MMP-14 结合蛋白 TIMP2 可以作为肿瘤靶向治疗的引导载体。

癌症靶向肽 (CTP) 是通过噬菌体展示技术获得的一类能与肿瘤细胞特异性结合的小分子多肽, 将 CTP 与小分子治疗药物偶联是药物靶向递送的新策略。在众多的 CTP 中, NGR (Asn-Gly-Arg) 是一种特异性靶向在肿瘤血管中表达的 CD13 的小分子三肽。在此基础上, Li 等^[28]构建了一种 NGR-LDM 融合蛋白, 与单纯 LDM 相比, NGR-LDM 显示出对 CD13⁺ 肿瘤具有更强的靶向性和更高的细胞毒性。

CD123 是白细胞介素 -3 (IL-3) 受体的 α 亚基, 因其仅在急性髓细胞性白血病 (AML) 干细胞上过表达而成为 AML 的治疗靶标。Zhang 等^[29]首先构建了一种 IL3-LDP 融合蛋白, 然后在体外与 AE 组装形成 IL3-LDM。分析结果表明, IL3-LDM 能抑制 AML 中 CD123⁺ 干样细胞的集落形成能力, 但对 CD123 阴性的正常脐带血细胞无影响。模型动物分析发现, IL3-LDM 连续多次处理后, 荷瘤实验动物无瘤生存期显著延长, 癌细胞浸润明显减少。此外, 该融合蛋白还能诱导肿瘤细胞凋亡, 并导致 G₂/M 阻滞。上述研究结果提示, IL3-LDM 具备用

于临床白血病靶向治疗的潜在价值。

3 小结

作为一种抗肿瘤抗生素，LDM对人类癌细胞显示出极强的细胞毒性。LDM由一个载体蛋白LDP和一个具有肿瘤杀伤活性的烯二炔发色团(AE)以非共价键方式组合而成，这一特征使得LDM成为构建肿瘤靶向药物的良好材料。通过基因重组技术将具有肿瘤靶向能力的蛋白质和(或)多肽与LDP偶联，由此获得具有肿瘤靶向能力的融合蛋白，在此基础上，再将AE整合到融合蛋白的LDP中，最终得到既具有肿瘤靶向能力，又具有LDM杀伤活性的肿瘤靶向药物。多个研究小组在细胞和实验动物水平上的分析，证实了这些基于LDM的药物复合体对肿瘤细胞的靶向性和杀伤功能，还有研究者正在对这类药物的制备技术进行优化以达到工业生产和临床试验申报的要求^[30]。但至今对这类复合靶向药物的研发主要还处在实验室的基础研究阶段，将它们用于临床肿瘤患者是否同样有效，以及它们对人体是否具有毒副作用等问题均须进一步探索。相信随着研究的逐步深入，可望有一批基于LDM的靶向药物能用于临床肿瘤的治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Hu J, Xue Y, Xie M, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027. I. Discovery, taxonomy of producing organism, fermentation and biological activity. *J Antibiot*, 1988, 41: 1575-9
- [2] Wang Y, Zhao X, Yu H, et al. Releasing of the chromophore from the drug delivery protein C-1027: a molecular dynamics simulations study. *J Struct Biol*, 2010, 172: 284-93
- [3] 邵荣光, 甄永苏. 新烯二炔类大分子抗肿瘤抗生素C1027的分子构成与活性关系. *药学报*, 1995, 30: 336-42
- [4] Li X, Lei X, Zhang C, et al. Complete genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, the producer of an enediynes antibiotic lidamycin. *J Biotechnol*, 2016, 222: 9-10
- [5] 陈淑珍, 甄永苏, 邵荣光. 力达霉素抗肿瘤作用及其分子机制研究新进展. *中国抗生素杂志*, 2010, 35: 401-7, 413
- [6] 温艳清, 孟志云, 陈淑珍, 等. 力达霉素的体外代谢. *药学报*, 2011, 46: 1132-6
- [7] Gao R, Li L, Shang B, et al. A gelatinases-targeting scFv-based fusion protein shows enhanced antitumor activity with endostar against hepatoma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117: 105-6
- [8] Zhong GS, Wu MN, Guo XF, et al. Antitumor activities of dFv-LDP-AE: an enediynes-energized fusion protein targeting tumor-associated antigen gelatinases. *Oncol Rep*, 2012, 28: 1193-9
- [9] Zhong G, Xu Z, Yang R, et al. An arginine-rich cell penetrating peptide contained anti-gelatinase scFv-LDM fusion protein shows potent antitumor efficacy in pancreatic cancer. *J Cancer*, 2018, 9: 674-82
- [10] 封云, 何红伟, 李保卫, 等. 抗IV型胶原酶抗体Fab'片段力达霉素偶联物的抗肿瘤侵袭转移作用. *药学报*, 2011, 46: 1462-5
- [11] Xin C, Ye S, Ming Y, et al. Efficient inhibition of B-cell lymphoma xenografts with a novel recombinant fusion protein: anti-CD20Fab-LDM. *Gene Ther*, 2010, 17: 1234-43
- [12] Fang H, Miao Q, Zhang S, et al. Antitumor effects of an engineered and energized fusion protein consisting of an anti-CD20 scFv fragment and lidamycin. *Sci Chin: Life Sci*, 2011, 54: 255-62
- [13] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 2006, 366: 2-16
- [14] Sheng W, Shang Y, Miao Q, et al. Antitumor efficacy of the scFv-based fusion protein and its enediynes-energized analogue directed against epidermal growth factor receptor. *Anti cancer Drugs*, 2012, 23: 406-16
- [15] Zhu D, Wang X, Shang Y, et al. A bispecific fusion protein and a bifunctional enediynes-energized fusion protein consisting of TRAIL, EGFR peptide ligand, and apoprotein of lidamycin against EGFR and DR4/5 show potent antitumor activity. *Anticancer Drugs*, 2015, 26: 64-73
- [16] Xu J, Du Y, Liu X, et al. Recombinant EGFR/MMP-2 bi-targeted fusion protein markedly binding to non-small cell lung carcinoma and exerting potent therapeutic efficacy. *Pharmacol Res*, 2017, 126: 66-76
- [17] Guo XF, Zhu XF, Cao HY, et al. A bispecific enediynes-energized fusion protein targeting both epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor 1 receptor showing enhanced antitumor efficacy against non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2017, 8: 27286-99
- [18] Nishioka K. Anti-tumour effect of the physiological tetrapeptide, tuftsin. *Br J Cancer*, 1979, 39: 342-5
- [19] Liu WJ, Liu XJ, Li L, et al. Tuftsin-based, EGFR-targeting fusion protein and its enediynes-energized analog show high antitumor efficacy associated with CD47 down-regulation. *Cancer Immunol Immun*, 2014, 63: 1261-72
- [20] Guo XF, Zhu XF, Shang Y, et al. A bispecific enediynes-energized fusion protein containing ligand-based and antibody-based oligopeptides against epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2 shows potent antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 2085-94
- [21] Sheng W, Shang Yh Li L, et al. An EGFR/CD13 bispecific fusion protein and its enediynes-energized analog show potent antitumor activity. *Anticancer Drugs*, 2014, 25: 82-91
- [22] Ru Q, Shang B, Miao Q, et al. A cell penetrating peptide-integrated and enediynes-energized fusion protein shows

- potent antitumor activity. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2012, 47: 781-9
- [23] Zhang Q, Liu XJ, Hu L, et al. Factor VII light chain-targeted lidamycin targets tissue factor-overexpressing tumor cells for cancer therapy. *Int J Mol Med*, 2012, 29: 409-15
- [24] Zhang Q, Liu X, Li C, et al. Tissue factor-targeted lidamycin inhibits growth and metastasis of colon carcinoma. *Oncol Lett*, 2013, 6: 801-6
- [25] Wang R, Li L, Zhang S, et al. A novel enediyne-integrated antibody-drug conjugate shows promising antitumor efficacy against CD30⁺ lymphomas. *Mol Oncol*, 2018, 12: 339-55
- [26] Jiang WG, Lu XA, Shang BY, et al. Genetically engineered endostatin-lidamycin fusion proteins effectively inhibit tumor growth and metastasis. *BMC Cancer*, 2013, 13: 479
- [27] Xu J, Liu X, Li L, et al. An engineered TIMP2-based and enediyne-integrated fusion protein for targeting MMP-14 shows potent antitumor efficacy. *Oncotarget*, 2015, 6: 26322
- [28] Li W, Li X, Huang T, et al. Engineered production of cancer targeting peptide (CTP)-containing C-1027 in *Streptomyces globisporus* and biological evaluation. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24: 3887-92
- [29] Zhang Y, Liu R, Fan D, et al. The novel structure make LDM effectively remove CD123⁺ AML stem cells in combination with interleukin 3. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16: 1514-25
- [30] 叶程, 曹睿, 宋文凭, 等. 双靶向配体化力达霉素DTLL的制备优化和稳定性研究. *中国医药生物技术*, 2018, 13: 193-200