

# 抗体与药物的位点特异性偶联化学方法学研究进展

仝红娟, 刘斌(陕西国际商贸学院医药学院, 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心, 西安 712046)

**摘要:** 发展高效、安全的肿瘤治疗方法是现代医学的主要挑战之一。目前临床上抗体偶联药物(antibody drug conjugates, ADC)已成为肿瘤治疗最有力的工具之一。传统的 ADC 药物是利用赖氨酸残基作为偶联位点, 其偶联具有高度异质性, 可能会导致药物可重复性差, 治疗指数低下。因此, 如何通过位点特异性偶联来规避这些潜在问题是 ADC 药物研究的重点领域。最近几年, 位点特异性的蛋白化学修饰方法领域取得的重大进展, 也一定程度上促进了均质 ADC 药物的合成。因此, 本文重点对目前用于构建 ADC 的位点特异性化学偶联方法进行综述, 以期为抗体偶联药物偶联化学的发展提供参考。

**关键词:** 抗体偶联药物; 位点特异性; 单克隆抗体; 化学修饰; 靶向治疗

中图分类号: R914.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)22-3030-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.22.020

引用本文: 仝红娟, 刘斌. 抗体与药物的位点特异性偶联化学方法学研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(22): 3030-3037.

## Research Progress on the Chemical Methods for Site-specific Coupling of Antibodies and Drugs

TONG Hongjuan, LIU Bin(School of Pharmacy, Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Collaborative Innovation Center of Green Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine in Shaanxi Province, Xi'an 712046, China)

**ABSTRACT:** One of the main challenges of modern medicine is the development of efficient and safe tumor treatment methods. Antibody drug conjugates(ADC) have clinically become one of the most powerful tools for tumor treatment. Most of coupling strategy of traditional ADC drugs is using the lysine residues as the coupling sites. However, using this strategy may be highly heterogeneous, which may lead to poor drug reproducibility and low therapeutic index. Therefore, how to avoid these potential problems is the key-point of ADC drug research. In recent years, significant advances in the field of site-specific protein chemical modification methods have also partly promoted the synthesis of homogeneous ADC drugs. Therefore, this review focuses on the site-specific chemical coupling methods currently used to construct ADC, in order to provide a reference for the development of antibody-conjugated drug-conjugation chemistry.

**KEYWORDS:** antibody drug conjugates; site specificity; monoclonal antibody; chemical modification; targeted therapy

在过去的半个世纪中, 随着化学疗法的发展, 肿瘤的治疗有了显著的改善<sup>[1]</sup>。使用细胞毒性药物的化疗疗法已成为了多种肿瘤的主要治疗选择。但是由于化疗药物靶向选择性较差, 因此在使用化疗药物时, 患者可能会因为全身严重的不良反应而停药。因此如何提高细胞毒性药物的靶向选择性和降低全身不良反应是当今化疗药物研发的重要趋势<sup>[2]</sup>。在这种情况下, 高细胞毒性药物与细胞靶向分子结合成为了一种潜在的研发策略。其中将高活性的细胞毒性药物与肿瘤高特异性的单克隆抗体偶联构成了新一代治疗肿瘤的药物——抗体偶联药物(antibody drug conjugates, ADC), 有可能从根本上改变肿瘤化学药物的设计方式<sup>[3]</sup>。

ADC 药物由单克隆抗体、连接子(linker)及细胞毒性药物三部分组成<sup>[4]</sup>。ADC 以单克隆抗体为

载体, 将细胞毒性药物运载到肿瘤细胞表面, 与肿瘤细胞表面的抗原结合, 形成抗体抗原复合物, 并在受体介导作用下, 通过内吞作用进入到细胞内, 在细胞内酶、pH 或还原性物质等作用下释放出细胞毒性药物, 从而发挥肿瘤杀伤作用。与普通抗体和小分子药物相比, ADC 兼具了抗体的高特异性、稳定性等特征, 同时也具备细胞毒性药物强力肿瘤杀伤作用, 一方面增强了抗体肿瘤杀伤作用, 另一方面也提高了毒性药物的靶向选择作用, 降低了毒性药物由非靶向引起的不良反应, 提高了药物的疗效和治疗窗口。目前已有 12 种 ADC 药物被美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市, 见表 1, 处在临床试验阶段的 ADC 药物至少有 100 种<sup>[5-6]</sup>。

**基金项目:** 陕西省高校科协青年人才托举计划项目(20210313); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2019JQ-924); 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心重点培育项目(2019XT-1-03)

**作者简介:** 仝红娟, 女, 博士, 副教授 E-mail: dearthj@126.com

表 1 目前已经批准上市的抗体偶联药物

Tab. 1 Antibody drug conjugates which currently approved for marketing

药品名称	靶点	偶联药物	偶联方法	连接子	抗药比	适应证	研发企业	上市时间
Brentuximab vedotin	CD30	MMAE	马来酰亚胺与巯基	Valine-citrulline	~4	霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤	Seagen	2011年08月
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	卡其霉素	活化羧酸酯与赖氨酸	AcBut	2~3	急性髓性白血病	辉瑞	2017年00月
Ado-trastuzumab emtansine	HER2	DM1	活化羧酸酯与赖氨酸	SMCC	~3.5	HER2 阳性乳腺癌	Genentech Inc	2013年02月
Inotuzumab ozogamicin	CD22	卡其霉素	活化羧酸酯与赖氨酸	Hydrazone (4-(4-acetylphenoxy) butanoic acid)	~6	急性淋巴细胞白血病	辉瑞	2017年08月
Polatuzumab vedotin-piiq	CD79b	MMAE	马来酰亚胺与巯基	mc-val-cit-PABC	~4	弥漫大 B 细胞淋巴瘤	Genentech Inc	2019年06月
Enfortumab vedotin	Nectin-4	MMAE	马来酰亚胺与巯基	mc-val-cit-PABC	~4	局部晚期或转移性尿路上皮癌	Seagen/Astellas	2019年12月
Trastuzumab deruxtecan	HER2	exatecan 衍生物	马来酰亚胺与巯基	GFLG	7~8	不可切除或转移性阳性乳腺癌	HER2 阿斯利康	2019年12月
Sacituzumab govitecan	Trop2	SN-38	马来酰亚胺与巯基	Carbonate	~7.6	三阴性乳腺癌	吉利德	2020年04月
belantamab mafodotin	BCMA	MMAF	马来酰亚胺与巯基	mc	~4	多发性骨髓瘤	葛兰素史克	2020年08月
Loncastuximab tesirine	CD19	PDB	马来酰亚胺与巯基	mc-PEG8-val-ala	~2.3	弥漫大 B 细胞淋巴瘤	ADC Therapeutics Sarl	2021年04月
Disitamab vedotin	HER2 TUBR	MMAE	马来酰亚胺与巯基	mc-val-cit-PABC	~4	转移性胃癌	荣昌生物	2021年06月
Tisotumab vedotin	组织因子	MMAE	马来酰亚胺与巯基	mc-val-cit-PABC	3~4	转移性宫颈癌	Genmab/Seagen	2021年09月

尽管 ADC 技术取得了较大进步,但药物相关性仍需要进一步改进,以进一步提高 ADC 疗法的安全性和有效性。ADC 药物的主要挑战之一是 ADC 分子的高度异质性。传统制备 ADC 药物是通过细胞毒性药物与活性氨基酸残基(如赖氨酸残基)偶联反应实现的。通常抗体包括了 80~90 个赖氨酸,而偶联时,抗体通常偶联 0~8 个细胞毒性药物,且位置随机分布在抗体的重链和轻链上,因此通过传统赖氨酸偶联策略生成的 ADC 药物最终有 100 多万种以上,制备 ADC 药物可重复性差<sup>[7-8]</sup>。ADC 药物的高异质性可能导致药物的各批次疗效不同,药物的亲和力、药动学和不良反应均不同,药物的治疗指数低下<sup>[9]</sup>。因此如何精确地控制药物与抗体偶联位置以及偶联产物中药物/抗体偶联的比例(drug to antibody ratio, DAR)是新一代 ADC 药物的研究重点。

### 1 位点特异性偶联方法概述

近年来,许多研究小组都报道了用于制备均质 ADC 药物的位点特异性偶联策略<sup>[10-12]</sup>。部分研究通过基因工程技术在抗体某个位置引入一些特定的反应位点,通过载有药物的基因与抗体特定位点的选择性反应实现位点特异性偶联抗体和药物。其中由 Genentech 公司报道的 Thiomab 技术可能是最早实现位点特异性偶联抗体和药物的策略<sup>[13]</sup>。他们通过基因工程技术在抗体的轻链和重链上插入 2 个

半胱氨酸,半胱氨酸的巯基可以与带有微管相关抑制剂一甲基澳瑞他汀 E(monomethylauristatin E, MMAE)的偶联,得到了 DAR 为 2 的均质的 ADC 药物。也有研究者通过对天然抗体上不同类型糖基的修饰来构建 ADC 药物。抗体上的这些糖基可以在糖苷内切酶作用下暴露出 N-乙酰氨基葡萄糖,再在糖基转移酶的作用下,将经叠氮修饰后的 N-乙酰半乳糖胺链接到抗体的 N-乙酰基葡萄糖上,最后叠氮化修饰的抗体可以通过点击化学反应与炔基链接子毒素特异性反应实现定点偶联抗体和药物<sup>[14]</sup>。

除了对天然抗体修饰之外,Ambrx 公司开发了可以特异性识别非天然氨基酸的 tRNA 和与之对应的氨酰 tRNA 合成酶,可以将非天然的氨基酸(如:乙酰苯丙氨酸、含生物正交功能的叠氮基甲基-L-苯基丙氨酸和叠氮赖氨酸)整合到抗体中。这些非天然氨基酸含有特定的官能团(如:酮基、叠氮等)可以与药物链接子中其他官能团(如:羟胺基团、炔基等)发生特异性反应,从而获得 DAR 均一的 ADC 药物<sup>[15-16]</sup>。

此外,酶具有高特异性和高效性,也有研究者通过一些酶(如转谷氨酰胺酶、甲酰甘氨酸生成酶和分选酶 A 等)识别抗体的特定序列或位点,然后通过酶的催化作用引入一些特定的官能团,实现位点特异性<sup>[15-16]</sup>。

除了基于酶或基因工程方法,许多课题组报道了基于化学方法的位点特异性偶联制备均质 ADC 药物的方法,其在成本和便利性方面有着独特的优势。本文重点综述目前基于化学手段的抗体位点特异性偶联方法的最新进展。

## 2 基于氨基酸残基选择性偶联反应实现位点特异性偶联

传统的抗体药物偶联是直接通过化学手段将细胞毒性药物与抗体上的赖氨酸残基相连,所获得的 ADC 产物有 100 多万种以上<sup>[7,17]</sup>。相较于赖氨酸、半胱氨酸在抗体中的丰度较低且分布均匀。因此对半胱氨酸的巯基进行修饰更容易得到 DAR 均质的 ADC 药物。

### 2.1 马来酰亚胺与巯基的迈克尔加成偶联策略

马来酰亚胺与巯基的迈克尔加成反应常用于偶联抗体与药物的反应,可以实现反应动力学高达  $10^2 \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  的速率来标记生物分子。目前被 FDA 批准的 2 种巯基修饰 ADC 药物(Brentuximab vedotin 和 Vadastuximab talirine)均采用这种偶联策略。Brentuximab vedotin 的形成是基于马来酰亚胺与巯基发生的迈克尔加成反应,将具有可裂解的连接子微管毒性药物 MMAE 偶联至靶向 CD30 蛋白的布妥昔单抗克隆抗体上,其平均 DAR 约为 4<sup>[18]</sup>。Brentuximab vedotin 与表达 CD30 抗原的肿瘤细胞结合后,经过内吞作用进入到细胞内,在细胞内组织蛋白酶作用下选择性裂解而释放出药物,进而产生对肿瘤靶向杀伤效果。目前, Brentuximab vedotin 已被批准用于霍奇金淋巴瘤和系统性间变大细胞淋巴瘤的治疗。通过马来酰亚胺偶联反应将细胞毒药物 MMAE 与靶向 CD33 的抗体偶联产生的 ADC 药物, Vadastuximab talirine 是美国西雅图基因公司开发的第 3 代具有位点特异性的 ADC 药物。Vadastuximab talirine 具有血液稳定性好、均质性好、细胞毒性强等优点,其 DAR 为 2。除了上述 2 种 ADC 药物,最近批准的 ADC 药物(Polatuzumab vedotin-piiq, Enfortumab vedotin, Trastuzumab deruxtecan, Sacituzumab govitecan 和 Belantamab mafodotin),均是采用了马来酰亚胺与巯基的迈克尔加成策略,见表 1。尽管马来酰亚胺能快速选择性对半胱氨酸进行标记得到均质的 ADC 药物,但是偶联后生成的巯基与马来酰亚胺加成产物在体内稳定差,容易与内源性巯基(如:谷胱甘肽等)发生巯基交换裂解释放出药物,从而

降低肿瘤特异性增加非特异性靶向,导致肿瘤疗效降低和不良反应增加<sup>[9]</sup>。为了克服这些缺点,科学家们试图通过减少硫醇交换(如:水解巯基与马来酰亚胺加成产物的内酰胺环和改善马来酰亚胺结构,见图 1)或者开发新型替代化学类型等方法构建稳定的抗体药物偶联方式<sup>[19]</sup>。

一种提高稳定性的方法是在暴露在内源性巯基之前水解马来酰亚胺-硫醇偶联物的琥珀酰亚胺部分得到开环产物,开环后的产物不会发生后续巯基反应。Fontaine 等<sup>[9]</sup>设计了具有吸电子基团的马来酰亚胺偶联物,通过水解可以明显提高在体内长期稳定性,降低与体内硫醇交换。提高马来酰亚胺的亲电性可以加速巯基与马来酰亚胺加成产物的水解。Christie 等<sup>[20]</sup>发现用 *N*-芳环代替 *N*-烷基获得的 *N*-芳基马来酰亚胺,其加成产物的水解速率较烷基取代增加 100 倍,且表现出优异的稳定性。此外, Huang 等<sup>[21]</sup>发现适当大小的机械力也可以加速马来酰亚胺加成产物的开环水解,从增加偶联物的稳定性。另外,与非水解连接物相比,开环后的 ADC 药物是否能保持或提高 ADC 的治疗效力、稳定性和有效性等都需要综合考虑。Tumey 等<sup>[22]</sup>发现与非水解类似物相比,水解的偶联物在疗效和安全性方面都带来了更高的价值,提高了目前 ADC 治疗固有的低治疗窗。但是在设计药物的时候,还应权衡马来酰亚胺加成产物水解速率和马来酰亚胺迈克尔加成速率。Christie 等<sup>[20]</sup>研究发现由于 *N*-芳基马来酰亚胺在抗体偶联之前暴露在缓冲液中,其与抗体结合效率降低了 30%~50%。

### 2.2 新型不饱和亲电试剂与巯基的位点特异性偶联策略

尽管马来酰亚胺偶联化学是在抗体上选择性地偶联药物的有力工具,但因其偶联产物存在化学不稳定性的缺点,促使人们不断探索抗体中硫醇偶联新方法,这些新方法能够一定程度上解决目前已知的巯基与马来酰亚胺加成产物不稳定的缺点。近几年,研究者们进行了大量科学研究和探索去开发一种不可逆的以及半胱氨酸选择性的偶联抗体新策略。

近十年来,新型不饱和亲电试剂与巯基的反应性在有机相和水相中的选择性偶联均得到了较多探索,见图 2。Bernardes 等<sup>[23]</sup>报道了一系列能够在水相中实现高半胱氨酸选择性偶联反应的基于羰基丙烯酸化合物。在众多结构中,丙烯酰胺

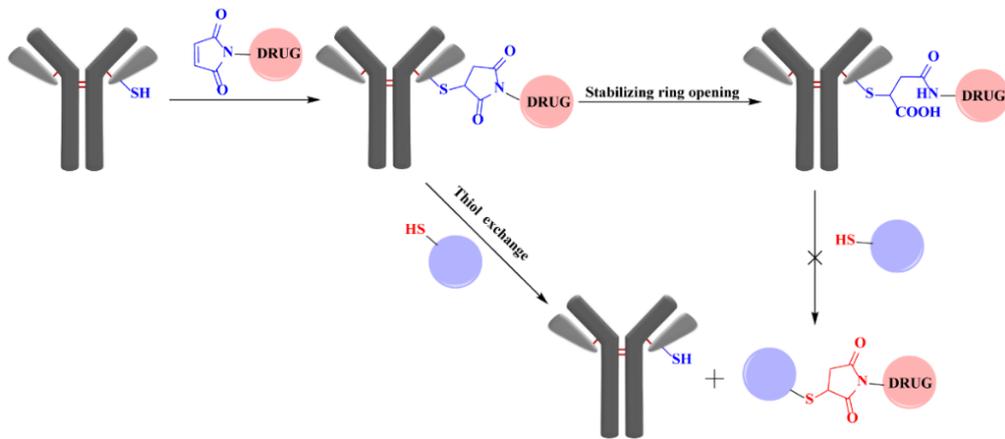


图1 经典马来酰亚胺的迈克尔加成偶联策略和偶联产物的水解稳定化策略

Fig. 1 Classical maleimide Michael addition coupling strategy and hydrolysis stabilization strategy of coupling products

苯甲酰显示出最优的性能,能够通过半胱氨酸选择性偶联细胞毒性药物 MMAE 和肿瘤靶向的曲妥珠单抗,得到均质的 ADC 药物,并且偶联后并不影响抗体的亲和力。Huang 等<sup>[24]</sup>通过调节乙烯基位置的缺电子程度,实现了 *N*-甲基-*N*-苯基乙烯基磺酰胺的半胱氨酸选择性偶联,以制备均质的 ADC 药物。通过合理调节偶联试剂与抗体的当量比值,还可以很好控制 ADC 药物的 DAR,其 DAR 可以从 0.38 增加到 7.74。Matos 等<sup>[25]</sup>通过吡啶氮的季铵化作用可以将乙烯基吡啶和炔基吡啶转变为具有高反应性半胱氨酸的标记试剂。通过该方法可以获得均质的 DAR 为 2 的 ADC 药物,获得的 ADC 药物可耐受硫醇交换且并不影响抗体亲和力。笔者进一

步提出,引入正电荷可能会导致亲水性增强,从而延长 ADC 的循环半衰期或提高其内吞化速率。Kasper 等<sup>[26]</sup>报道了乙炔基磷酸盐作为新的不饱和和亲电试剂,可以通过简单的一锅还原和烷基化快速高效偶联细胞毒性药物 MMAE 和苯妥昔单抗。通过此方法制备的 ADC 药物具有出色的链接稳定性和显著的体内抗肿瘤活性。与经典马来酰亚胺偶联的 ADC 药物的中位生存时间(21 d)相比,磷酸酰胺 ADC 药物可以明显提高小鼠的中位生存时间(48 d)。Tessiter 等<sup>[27]</sup>发现乙炔基苯并恶唑啉酮高价碘试剂不仅可用于选择性地与半胱氨酸偶联,还可以通过 Suzuki-Miyaura 交叉反应和环张力促进的叠氮炔环加成反应进行双正交功能化衍生。

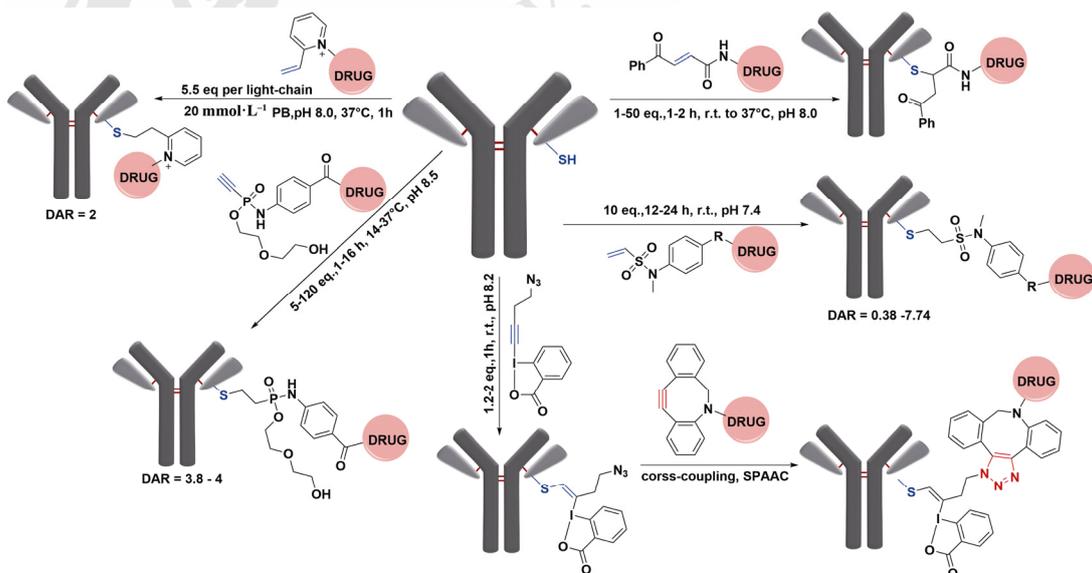


图2 新型不饱和亲电试剂的位点特异性抗体偶联策略

Fig. 2 Novel unsaturated electrophiles for site-specific antibody conjugate strategy

### 2.3 芳香亲电试剂与巯基的位点特异性偶联

亲电试剂也常用于半胱氨酸位点特异性偶联,见图 3~4。2011 年, Chudasama 等<sup>[28]</sup>研究者首次报道了溴哒嗪二酮和二溴哒嗪二酮(dibromo-1,2-dihydro-pyridazine-3,6-diones, DBPD)介导的与蛋白质和多肽的生物偶联。在这之后,研究者们通过对 DBPD 衍生物进行优化得到 DAR 为 2 或 4 的高均质 ADC 药物<sup>[29-30]</sup>。接着, Zhang 等<sup>[31]</sup>报道了另外一种卤素全氟芳香族试剂用于减少 ADC 药物生产中异质性的方法。该课题组发现 4 个氨基酸构成的肽序列( $\pi$ -钳位)可以有效促进水溶液中半胱氨酸多肽的全氟芳基化。通过这种方法该课题组实现了 MMAF 的全氟芳基衍生物与含有 C 末端  $\pi$ -钳位的曲妥珠单抗的选择性偶联。Luo 等<sup>[32]</sup>报道了一类 1,4-二硝基咪唑(1,4-dinitroimidazoles, DNIm)s), 可作为一种高效的抗体硫醇生物偶联试剂。DNIm)s 在不同的条件下表现出对半胱氨酸或赖氨酸残基不同的特异性。在水性、酸性或中性条件下, DNIm)s 仅表现出巯基选择性,而在弱碱有机溶剂中, DNIm)s 通过开环和闭环机理可以有效修饰赖氨酸残基。这一特性使得 DNIm)s 能将各种官能团与蛋白偶联,生成比马来酰亚胺偶联物更稳定的(4-硝基咪唑)-硫醇键。但是目前还没有报道其用于偶联抗体和细胞毒性药物的研究。

### 2.4 金属介导的巯基位点特异性偶联方法

目前,基于过渡金属的反应已经广泛用于有机合成中,但是用于复杂生物分子的修饰鲜有报道。Vinogradova 等<sup>[33]</sup>报道了过渡金属钯可以快速

选择性地多肽和蛋白质中的半胱氨酸残基芳基化生成的偶联物对酸、碱、氧化剂和外部添加的硫醇均稳定。该课题组通过这个方法将激酶抑制剂凡德他尼的有机钯配合物直接与曲妥珠单抗结合,生成 DAR 为 4.4 的 ADC 药物,见图 4。接着, Gupta 等<sup>[10]</sup>利用铂(II)对硫的高亲和力,促进抗体链间二硫键还原和再链接,来构建稳定的 ADC 药物。与传统马来酰亚胺链接的 ADC 相比,通过这种偶联方法可以明显改善抗体药物复合物的稳定性,并且在体外和体内显示出优异的抗肿瘤功效。

### 2.5 基于二硫键还原再氧化策略实现位点特异性偶联

除了对单个半胱氨酸残基进行偶联外,利用双反应试剂还能对链间的 2 个巯基(二硫键还原产物)进行偶联,制备均质的 ADC 药物,见图 4。最常见的 IgG 抗体在蛋白铰链区包含 4 个链间二硫键,当二硫键被还原时可以产生 8 个半胱氨酸残基,而被还原的半胱氨酸残基可以与连有细胞毒性药物的双反应性试剂反应,将 4 条链重新连接起来,从而替换传统的链间二硫键得到均质的 ADC 药物,见图 3~4。与单个半胱氨酸的偶联策略相比,抗体链间二硫键还原再氧化策略能够更好地控制 DAR 和 ADC 药物的异质性<sup>[34]</sup>。相比于分子内氧化从新形成二硫键,双反应试剂与还原的二硫键的巯基反应更为快速,从而可以有效地避免错误的重新链接,保留了蛋白质的结构和功能。

从经典马来酰亚胺出发, Behrens 等<sup>[35]</sup>设计了一种可将细胞毒性药物 MMAF 的二溴马来酰亚胺

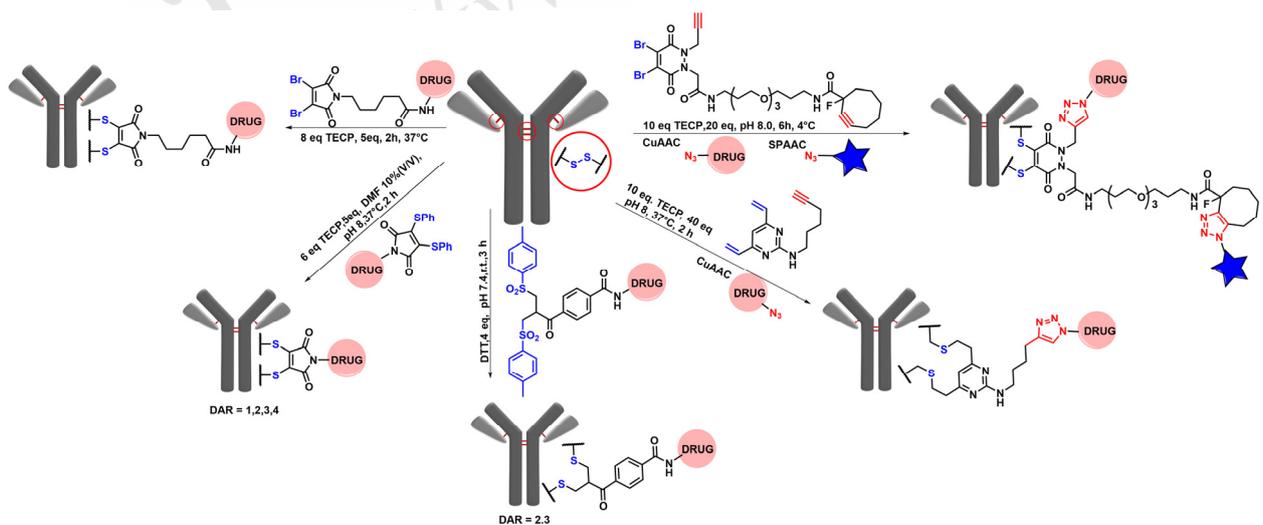


图 3 芳香亲电试剂的位点特异性抗体药物偶联

Fig. 3 Aromatic electrophiles for site-specific antibody drug conjugate

衍生物与抗体链间二硫键硫醇共价偶联的新方法，并成功制备了均质(DAR=4)的且化学稳定的ADC药物。几乎同一时间，Schumacher等<sup>[36]</sup>报道了能够有效地控制DAR和修饰位点的新一代马来酰亚胺(next generation maleimides, NGMs)试剂。该课题组利用NGMs试剂偶联细胞毒性药物阿霉素和曲妥珠单抗制备了一系列DAR控制为1, 2, 3和4的ADC药物，并都具有完全的抗体药物活性。Badescu等<sup>[37]</sup>研究者报道了首次利用双烷基化的双硫试剂偶联还原的天然抗体二硫键的策略，这个策略也被称为ThioBridge。该课题组将载有细胞毒性药物MMAE的双烷基化试剂与还原的曲妥珠单抗偶联，其抗体转化效率为78%，平均DAR为2.3，未偶联的抗体<1%。MMAE-曲妥珠单抗偶联物在37℃血清中能稳定存在>5d，并且在体外和体内肿瘤模型中均显示出有效的抗肿瘤活性。基于离去基团和链间半胱氨酸反应策略，Maruani等<sup>[38]</sup>开发了具有双点击功能基团的二溴吡嗪二酮试剂，可以使曲妥珠单抗能同时被细胞毒性药物和荧光基团修饰，见图3。Walsh等<sup>[39]</sup>报道了一种新型二乙烯基嘧啶试剂用于偶联天然抗体链间二硫键。二乙烯基嘧啶试剂还能通过末端炔基与叠氮的点击化学反应偶联细胞毒性药物MMAE，生成具有高度血浆稳定性和良好的靶向治疗效果的ADC药物。

## 2.6 其他氨基酸残基位点特异性偶联

尽管通过化学手段对半胱氨酸残基位点特异性偶联制备均质ADC药物取得了较大进展，但是

对其他低反应活性的氨基酸残基，如酪氨酸、色氨酸、丝氨酸和蛋氨酸等进行位点特异性修饰，可能会得到更均质的ADC药物。在这些氨基酸修饰中，关于对酪氨酸的酚羟基进行修饰的研究较为深入，其中包括重氮化合物与酪氨酸酚羟基的邻位发生的偶氮偶合反应，其反应速率快，反应条件温和，对酪氨酸选择性好<sup>[40]</sup>；Joshi等<sup>[41]</sup>报道的曼尼希反应，已经用于对各种酶中的酪氨酸进行化学修饰；Tilley等<sup>[42]</sup>研究者报道的利用金属钼催化产生 $\pi$ -烯丙基钼络合物也可以用于酪氨酸的选择性修饰；Seim等<sup>[43]</sup>利用硝酸铈铵作为催化剂也实现了对酪氨酸的选择性修饰。目前有关于丝氨酸、色氨酸、甲硫氨酸等的修饰方法的报道较少，本文不做综述。

## 3 总结与展望

传统的ADC药物是直接通过化学手段将细胞毒性药物与抗体上的赖氨酸残基相连。但是通过赖氨酸偶联方法所得的ADC药物产物异质性较大，导致药物的亲和力、药动学和不良反应均不太理想。近年来，许多研究小组都致力于开发精确控制药物和抗体偶联位置及药物抗体偶联比例的新型偶联方法。通过基因工程或酶催化的方法引入特定的氨基酸残基或化学官能团与载有药物的其他官能团发生反应，能够实现位点特异性修饰。通过利用特定的选择性化学反应直接对单克隆抗体进行位点选择性的修饰，制备均质性高和具有理想DAR值的ADC药物是目前研究的热点。基于化学手段位点特异性将细胞毒性药物和抗体

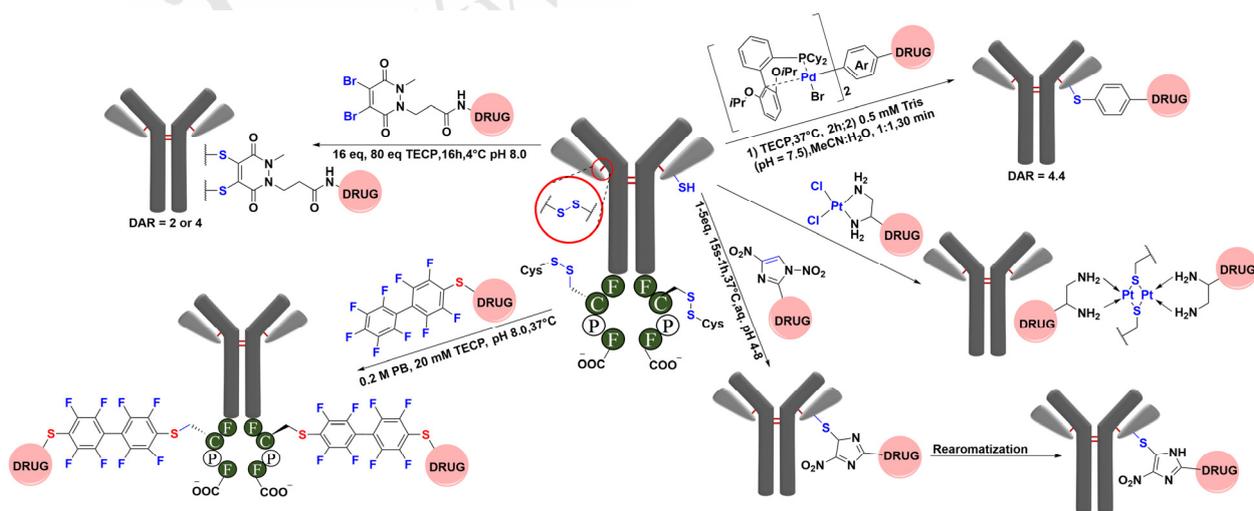


图4 基于二硫键还原再氧化策略实现位点特异性偶联

Fig. 4 Disulfide bond reduction and reoxidation strategies for site-specific antibody drug conjugate

偶联在成本和便利性方面有着独特的优势。目前该领域正在快速发展阶段,随着大量新型选择性抗体偶联试剂的不断发展,在不久的将来,部分新型的位点选择性偶联试剂与其他生物技术结合,将在ADC药物的研发中扮演重要作用。

## REFERENCES

- [1] DEVITA V T JR, CHU E. A history of cancer chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21): 8643-8653.
- [2] WANG Z Y, CHEN Y J, ZHANG Z J, et al. Application progress of prodrug for the research of the targeted antitumor drugs[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(18): 2323-2332.
- [3] DIAMANTIS N, BANERJI U. Antibody-drug conjugates: An emerging class of cancer treatment[J]. *Br J Cancer*, 2016, 114(4): 362-367.
- [4] ZHAO W B, LIU W H, XU Y C, et al. Progress in research on antibody-drug conjugates[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2016, 33(2): 238-245.
- [5] YAO X J. Research progress of antibody drug conjugates[J]. *Chin Foreign Med Res(中外医学研究)*, 2020, 18(12): 185-188.
- [6] XIE Y Y, DAI X H, YE Z Y, et al. Clinical application and drug resistance optimization strategy of antibody-conjugated drug[J]. *Drugs Clin(现代药物与临床)*, 2021, 36(7): 1520-1526.
- [7] WANG L T, AMPHLETT G, BLÄTTLER W A, et al. Structural characterization of the maytansinoid-monooclonal antibody immunoconjugate, HuN901-DM1, by mass spectrometry[J]. *Protein Sci*, 2005, 14(9): 2436-2446.
- [8] PANOWSKI S, BHAKTA S, RAAB H, et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy[J]. *mAbs*, 2014, 6(1): 34-45.
- [9] FONTAINE S D, REID R, ROBINSON L, et al. Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(1): 145-152.
- [10] GUPTA N, KANCHARLA J, KAUSHIK S, et al. Development of a facile antibody-drug conjugate platform for increased stability and homogeneity[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(3): 2387-2395.
- [11] SHEN B Q, XU K Y, LIU L N, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(2): 184-189.
- [12] JUNUTULA J R, RAAB H, CLARK S, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(8): 925-932.
- [13] HASHIDA S, IMAGAWA M, INOUE S, et al. More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge[J]. *J Appl Biochem*, 1984, 6(1/2): 56-63.
- [14] VAN GEEL R, WIJDEVEN M A, HEESBEEN R, et al. Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(11): 2233-2242.
- [15] LI M Y, WANG L, MA N N. Application of site-specific conjugation techniques in antibody-drug conjugates[J]. *Prog Pharm Sci(药学进展)*, 2021, 3(45): 180-187.
- [16] SUN Y, HUANG R, SUN B. Advances in the study of site-specific antibody-drug conjugates[J]. *Acta Pharm Sin(药理学学报)*, 2015, 50(10): 1225-1231.
- [17] ACCHIONE M, KWON H, JOCHHEIM C M, et al. Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal stability of model antibody-drug conjugates[J]. *mAbs*, 2012, 4(3): 362-372.
- [18] SCOTT L J. Brentuximab vedotin: A review in CD30-positive Hodgkin lymphoma[J]. *Drugs*, 2017, 77(4): 435-445.
- [19] RAVASCO J M J M, FAUSTINO H, TRINDADE A, et al. Bioconjugation with maleimides: A useful tool for chemical biology[J]. *Chemistry*, 2019, 25(1): 43-59.
- [20] CHRISTIE R J, FLEMING R, BEZABEH B, et al. Stabilization of cysteine-linked antibody drug conjugates with N-aryl maleimides[J]. *J Control Release*, 2015, 220(Pt B): 660-670.
- [21] HUANG W M, WU X, GAO X, et al. Maleimide-thiol adducts stabilized through stretching[J]. *Nat Chem*, 2019, 11(4): 310-319.
- [22] TUMEY L N, CHARATI M, HE T, et al. Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: Impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy[J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(10): 1871-1880.
- [23] BERNARDIM B, CAL P M, MATOS M J, et al. Stoichiometric and irreversible cysteine-selective protein modification using carbonylacrylic reagents[J]. *Nat Commun*, 2016(7): 13128.
- [24] HUANG R, LI Z H, SHENG Y, et al. *N*-methyl-*N*-phenylvinylsulfonamides for cysteine-selective conjugation[J]. *Org Lett*, 2018, 20(20): 6526-6529.
- [25] MATOS M J, NAVO C D, HAKALA T, et al. Quaternization of vinyl/alkynyl pyridine enables ultrafast cysteine-selective protein modification and charge modulation[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(20): 6640-6644.
- [26] KASPER M A, STENGL A, OCHTROP P, et al. Ethynylphosphonamidates for the rapid and cysteine-selective generation of efficacious antibody-drug conjugates[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(34): 11631-11636.
- [27] TESSIER R, CEBALLOS J, GUIDOTTI N, et al. "Doubly orthogonal" labeling of peptides and proteins[J]. *Chem*, 2019, 5(8): 2243-2263.
- [28] CHUDASAMA V, SMITH M E B, SCHUMACHER F F, et al. Bromopyridazinedione-mediated protein and peptide bioconjugation[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(31): 8781-8783.
- [29] LEE M T W, MARUANI A, RICHARDS D A, et al. Enabling the controlled assembly of antibody conjugates with a loading of two modules without antibody engineering[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(3): 2056-2060.
- [30] BAHOU C, RICHARDS D A, MARUANI A, et al. Highly homogeneous antibody modification through optimisation of the synthesis and conjugation of functionalised dibromopyridazinediones[J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16(8): 2056-2060.

- 1359-1366.
- [31] ZHANG C, WELBORN M, ZHU T Y, et al.  $\Pi$ -clamp-mediated cysteine conjugation[J]. *Nat Chem*, 2016, 8(2): 120-128.
- [32] LUO Q F, TAO Y Q, SHENG W J, et al. Dinitroimidazoles as bifunctional bioconjugation reagents for protein functionalization and peptide macrocyclization[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 142.
- [33] VINOGRADOVA E V, ZHANG C, SPOKOYNY A M, et al. Organometallic palladium reagents for cysteine bioconjugation[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 687-691.
- [34] HUANG R, CHEN H L, JIANG B. Disulfide re-bridging for the construction of homogeneous antibody-drug conjugates[J]. *Chin J Nat(自然杂志)*, 2021, 43(5): 323-334.
- [35] BEHRENS C R, HA E H, CHINN L L, et al. Antibody-drug conjugates(ADCs) derived from interchain cysteine cross-linking demonstrate improved homogeneity and other pharmacological properties over conventional heterogeneous ADCs[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(11): 3986-3998.
- [36] SCHUMACHER F F, NUNES J P M, MARUANI A, et al. Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody-drug conjugates via native disulfide bond bridging[J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12(37): 7261-7269.
- [37] BADESCU G, BRYANT P, BIRD M, et al. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates[J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(6): 1124-1136.
- [38] MARUANI A, SMITH M E B, MIRANDA E, et al. A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy[J]. *Nat Commun*, 2015(6): 6645.
- [39] WALSH S J, OMARJEE S, GALLOWAY W R J D, et al. A general approach for the site-selective modification of native proteins, enabling the generation of stable and functional antibody-drug conjugates[J]. *Chem Sci*, 2018, 10(3): 694-700.
- [40] HOOKER J M, KOVACS E W, FRANCIS M B. Interior surface modification of bacteriophage MS2[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12): 3718-3719.
- [41] JOSHI N S, WHITAKER L R, FRANCIS M B. A three-component Mannich-type reaction for selective tyrosine bioconjugation[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(49): 15942-15943.
- [42] TILLEY S D, FRANCIS M B. Tyrosine-selective protein alkylation using pi-allylpalladium complexes[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(4): 1080-1081.
- [43] SEIM K L, OBERMEYER A C, FRANCIS M B. Oxidative modification of native protein residues using cerium(IV) ammonium nitrate[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(42): 16970-16976.

收稿日期: 2021-12-08  
(本文责编: 曹粤锋)