

抗体偶联药物研究进展

赵文彬, 刘文慧, 徐迎春, 潘利强*, 陈枢青* (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 抗体偶联药物(antibody drug conjugates, ADCs)是通过化学键将毒性小分子与单克隆抗体偶联的靶向抗肿瘤药物, 其充分利用了抗体的特异性和毒性小分子的高抗肿瘤活性, 达到了高效低毒的目的。抗体、连接物以及毒性小分子是 ADCs 的 3 个重要组成部分, 文章介绍了 ADCs 制备中靶点选择, 抗体小型化和人源化改造, 高活性毒性小分子使用, 可断开和不可断开连接物的特点以及越来越受关注的定点偶联策略, 为 ADCs 临床前研发提供依据。

关键词: 抗体偶联药物; 靶向抗肿瘤药物; 抗体; 毒性小分子; 连接物; 靶点; 定点偶联

中图分类号: R282.6 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)02-0238-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.028

Progress in Research on Antibody-Drug Conjugates

ZHAO Wenbin, LIU Wenhui, XU Yingchun, PAN Liqiang*, CHEN Shuqing* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: Antibody drug conjugates(ADCs), which couple monoclonal antibodies(mAb) and cytotoxic drug together by chemical bond, are targeted anticancer drugs. ADCs fully take advantage of the specificity of mAb and the high anticancer activity of cytotoxic drug to achieve the efficiency and low-toxic anticancer effects. Cytotoxic drug, mAb and linker are three significant parts of ADC. In this review, target selection, mAb miniaturization and humanization, potent cytotoxic drug application, characteristics of cleavable and non-cleavable linkers and popular site-specific conjugation were described, which were aim to provide evidence for preclinical studies of ADCs.

KEY WORDS: antibody drug conjugates; targeted anticancer drug; antibody; cytotoxic drug; linker; target; site-specific conjugation

抗体偶联药物(antibody drug conjugates, ADCs)是单克隆抗体与抗肿瘤毒性小分子的偶联产物。抗肿瘤毒性小分子可通过抑制 DNA、RNA、蛋白合成、细胞分裂等对肿瘤细胞进行杀伤, 具有高效的抗肿瘤活性, 然而毒性小分子往往对肿瘤和正常细胞缺乏选择性, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 对正常细胞也有较大不良反应。抗肿瘤抗体可特异识别肿瘤细胞, 虽然具有一定抗肿瘤活性, 但是往往达不到治疗肿瘤的效果。通过化学键将细胞毒药物与单克隆抗体偶联组成 ADCs, 利用抗体可特异性识别肿瘤细胞的特性, 可“精确”地把毒性小分子运送到肿瘤细胞, 在提高肿瘤部位药物浓度同时降低了正常组织、器官的药物浓度, 达到了高效低毒的抗肿瘤效果。美国 FDA 于 2000 年批准了首个抗体偶联药物 gemtuzumab ozogamicin

(Mylotarg[®])(图 1)^[1], 尽管该药由于安全隐患等原因而在 10 年后被撤市, 但是美国 FDA 和欧洲药物管理局于 2011 批准 brentuximab vedotin (SGN-35, Adcetris[®])(图 2)用于治疗霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤^[2], 2013 批准 trastuzumab emtansine(T-DM1, Kadcyla[®])(图 3)用于治疗 HER-2 阳性乳腺癌^[3], 2 个 ADCs 均在临床上取得了令人振奋的治疗效果。目前, 在临床研究阶段的 ADCs 达 50 种(表 1), ADCs 已成为一类重要的新型抗肿瘤药物。

ADCs 主要由抗体、毒性小分子以及连接物组成。一个好的 ADCs 需在体外或血液中稳定, 可准确靶向肿瘤细胞并能被迅速内吞进细胞释放出药物而杀伤肿瘤细胞, 因此其每个元件以及元件组合方式非常重要。早期的 ADCs 由于小分子

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81430081); 中国博士后科学基金第 57 批面上项目(2015M570519)

作者简介: 赵文彬, 男, 博士生 Tel: (0571)88208410 E-mail: pharmacy_zwb@qq.com *通信作者: 潘利强, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (0571)88208410 E-mail: panliqiang@zju.edu.cn 陈枢青, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88208411 E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

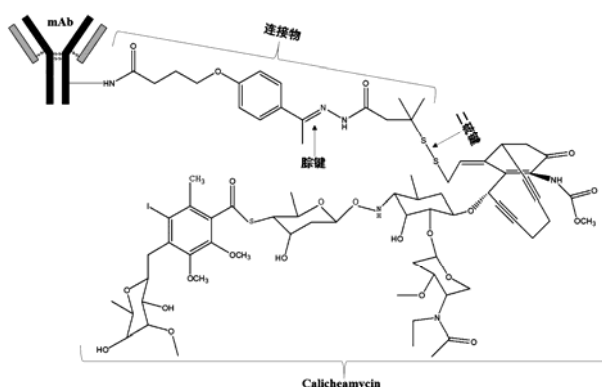


图 1 Mylotarg 的结构
Fig. 1 Structure of Mylotarg

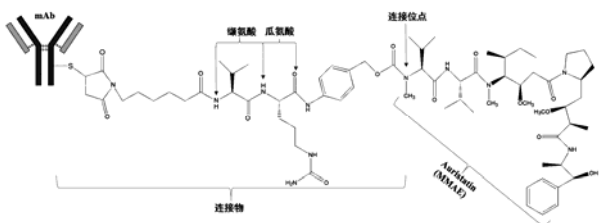


图 2 SGN-35 的结构
Fig. 2 Structure of SGN-35

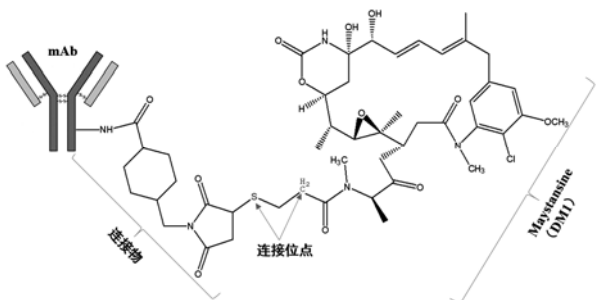


图 3 T-DM1 的结构
Fig. 3 Structure of T-DM1

毒性不够强、连接物稳定性不佳、鼠源抗体免疫原性和内吞等问题导致其治疗效果并不理想，近几十年来，随着鼠源单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及全人源抗体技术的发展，抗体免疫原性问题得到解决；毒性更强的小分子不断发现；肽链、胺键、硫醚、二硫键等连接方式的应用，ADCs 在临床研究中显示出了高效低毒的显著抗肿瘤效果^[4]。此外，传统偶联方法制备的 ADCs 往往均一性不高，药动学、药效以及毒性等难以控制。近年来，研究者们把更多目光放在定点偶联制备高均一性的 ADCs 上^[5]。

1 ADCs 的基本作用原理

理想的抗肿瘤药物需要具备 2 个特点，即对肿瘤细胞具有特异性和高毒性。抗体偶联药物通

过连接物将抗体和毒性小分子偶联在一起，集抗体的特异性和毒性小分子的高抗肿瘤活性于一身。ADCs 需在血液循环中稳定，当达到肿瘤细胞表面，通过抗体特异地与细胞表面抗原结合并以复合物形式被内吞到细胞内，进入细胞的 ADCs 在 pH、还原性物质或酶切等作用下释放出毒性小分子而发挥抗肿瘤活性(图 4)。

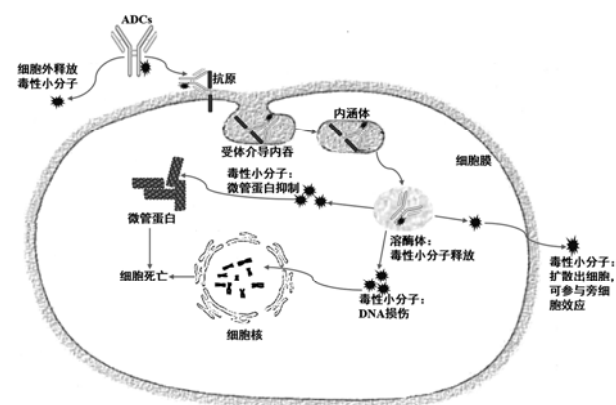


图 4 抗体偶联药物的作用机制
Fig. 4 Anticancer mechanism of antibody drug conjugates

2 靶点

靶点选择是 ADCs 设计的第一步，也是至关重要的一步，选择的靶点应能区分肿瘤细胞和正常细胞。ADCs 的靶点存在于细胞表面，才能顺利地被抗体识别。目前临床上的 ADCs 均选择膜蛋白胞外区作为靶点，这类靶点可以在肿瘤细胞和正常细胞中的表达量上存在差异，如 SGN-35 针对的 CD30 在霍奇金淋巴瘤以及渐变性大细胞淋巴瘤中高表达，而在正常细胞中表达量有限^[2]；T-DM1 针对的 HER-2 在乳腺癌中表达远高于正常的细胞，根据这类靶点设计的 ADCs 主要识别肿瘤细胞，极大地减少了对正常细胞的伤害，但也无法完全避免^[3]。更加理想的靶点则可完全将肿瘤细胞和正常细胞区分开，即仅肿瘤细胞表达该靶点，这一类靶点往往是膜蛋白的胞外突变区域，如 AMG-595(抗 EGFRvIII 单克隆抗体与 DM1 偶联产物)针对的 EGFR 突变体-EGFRvIII 只表达于多形性胶质母细胞瘤等肿瘤细胞表面，所以 AMG-595 只识别肿瘤细胞而可避免对正常细胞的伤害^[6]。此外，有些肿瘤细胞内和跨膜的突变蛋白被消化降解成多肽后可由 MHC I 分子递呈到细胞表面^[7-8]。这些被递呈出来的突变多肽仅在肿瘤细胞表面存在，是潜在的 ADCs 的靶点。

表 1 临床研究阶段的 ADCs

Tab. 1 Clinical-stage ADCs pipeline

药物名称	公司	靶点	抗体	毒性小分子	连接物	临床阶段	适应证
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	Pfizer	CD33	Gemtuzumab	CalichDMH	肟键	上市撤回	急性髓细胞白血病
Brentuximab vedotin (SGN-35)	Takeda/Seattle Genetics	CD30	cAC10	MMAE	vc	上市	霍奇金淋巴瘤, 渐变性大细胞淋巴瘤
Trastuzumab emtansine (T-DM1)	Genentech /ImmunoGen	HER2	Trastuzumab	DM1		上市	乳腺癌
Inotuzumab ozogamicin	Pfizer	CD22	Inotuzumab	CalichDMH	肟键	III期	B 细胞-非霍奇金淋巴瘤, 急性淋巴细胞白血病
Moxetumomab pasudotox	Genencor	CD22	Moxetumomab	PE38		III期	毛细胞白血病
SAR3419	Sanofi	CD19	HuB4	DM4		II 期	非霍奇金淋巴瘤
glembatumumab vedotin	Celldex Therapeutics	NMB	glembatumumab	MMAE	vc	II 期	乳腺癌
L-DOS-47	Helix	CEACAM6	AFAIKL2	尿素酶		II 期	腺细胞肺癌
Labetuzumab-SN-38	Immunomedics	CEA	Labetuzumab	SN-38		II 期	结肠癌, 乳腺癌, 肺癌
MLN-0264	武田公司	GCC		MMAE		II 期	胃癌, 胰腺癌
lifastuzumab vedotin	Roch	NaPi2b	lifastuzumab	vedotin		II 期	卵巢癌
Polatuzumab vedotin	Genentech	CD79b	Polatuzumab	MMAE	vc	II 期	非霍奇金淋巴瘤
Pinatuzumab vedotin	Genentech	CD22	Pinatuzumab	MMAE	vc	II 期	非霍奇金淋巴瘤
PSMA ADC	Progenics	PSMA		MMAE	vc	II 期	前列腺癌
ABT-414	AbbVie	EGFR				II 期	实体瘤
Resimmune	Angimmune	CD3e		白喉类毒素		II 期	皮肤 T 细胞淋巴瘤, 黑色素瘤
SC16LD6.5	StemCentrx		SC16	D6.5		II 期	非小细胞肺癌
Lorvotuzumab mertansine HuN901-DM1 (CDX-011-MMAE) (CDX-011)	ImmunoGen	CD57	HuN901	DM1	SPDB	II 期	小细胞肺癌, 黑色素瘤
	Celldex	GPNMB	CR011	MMAE	vc	II 期	乳腺癌, 黑色素瘤
IMGN-901	ImmunoGen	CD56		DM1	SPP	II 期	转移性结直肠癌, 小细胞肺癌
BT-062	BioTest	CD138		DM4	SPDB	II 期	多发性骨髓瘤, 实体瘤
IMMU-110	Immunomedics	CD74		阿霉素	肟键	II 期	多发性骨髓瘤
IMMU 130	Immunomedics	CEACAM5		SN-38	CL2	II 期	结直肠癌
SAR-408701	ImmunoGen/Sanofi	CEACAM5		美登素的衍生物		II 期	实体瘤
IMMU-132	Immunomedics	EGP-1		SN38		I / II 期	实体瘤
AGS-16M8F	Agensys	ENPP3		MMAF	mc	I 期	肾细胞癌
AMG-172	Amgen	CD27L		DM1	非裂解	I 期	肾癌
AMG-595	Amgen	EGFRvIII		DM1	非裂解	I 期	神经胶质瘤
ASG-5ME	Agensys	SCL44A4	ASG-5	MMAE	vc	I 期	胰腺癌, 前列腺癌
AGS-22M6E	Agensys	连接素-4	Anti-Nectin-4 MAbs	MMAE	vc	I 期	恶性实体瘤
B-B4-DM1		CD138	B-B4	DM1		I 期	黑色素瘤
BAY 94-9343	Bayer	间皮素		DM4	SPDB	I 期	实体瘤
BAY 79-4620	Bayer	CA9	Anti-3ee9	MMAE	vc	I 期	实体瘤
DEDN-6526A	Roch(Genentech)	ET8R		MMAE	vc	I 期	黑色素瘤
IMGN 529	ImmunoGen	CD37		DM1	SMCC	I 期	非霍奇金淋巴瘤
IMGN 853	ImmunoGen	叶酸受体 1		DM4		I 期	卵巢癌, 实体瘤
IMMU-120	Immunomedics	CEACAM5		SN38	CL2	I 期	乳腺癌, 结直肠癌, 肺癌
MDX-1203	BMS (Medarex)	CD70		MGBA	vc	I 期	非霍奇金淋巴瘤, 肾细胞癌
MLN-0264	Millennium	鸟苷酸环化酶 C		MMAE	vc	I 期	胃肠道肿瘤, 实体瘤
PSMA-ADC-1301	Progenics	PSMA		MMAE	vc	I 期	前列腺癌

表 1(续)

药物名称	公司	靶点	抗体	毒性小分子	连接物	临床阶段	适应证
RG-7450	Genentech	STEAP1		MMAE		I 期	前列腺癌
RG-7458	Genentech	MUC16		MMAE		I 期	卵巢癌
RG-7599	Genentech	MUC16		Auristatin		I 期	卵巢癌, 非小细胞肺癌
RG-7636	Genentech	内皮素受体 ETB		MMAE		I 期	黑色素瘤
RG-7600	Genentech					I 期	卵巢癌, 胰腺癌
RG-7598	Genentech					I 期	多发性骨髓瘤
SAR-566658	Sanofi	Muc1		DM4	SPDB	I 期	实体瘤
SGN-75	Seattle Genetics	CD70	h1F6	MMAE	vc	I 期	非霍奇金淋巴瘤, 肾细胞肿瘤
SGN-CD19A	Seattle Genetics	CD19		MMAE	vc	I 期	急性淋巴细胞白血病, 非霍奇金淋巴瘤
1C1-MMAF (MEDI-547)		EphA2	1 C1	MMAF		I 期	卵巢癌, 实体瘤

3 抗体

选择合适靶点后, 需要制备对该靶点有良好亲和力的抗体($K_D < 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 从而能有效地识别并结合到肿瘤细胞表面。鼠源单克隆抗体技术的发展, 有效地提高了抗体的特异性和亲和力, 但是鼠源抗体属于外源蛋白, 在人体内清除速率快, 半衰期短, 容易引起人抗鼠抗体反应(human anti-mouse antibody, HAMA); 另外, 鼠源抗体不能在人体内有效地激活补体系统和 Fc 受体相关效应, 在临床应用受到限制。为了解决异源抗体的缺陷, 出现了抗体的人源化改造。抗体的人源化包括嵌合抗体、人源化抗体以及通过噬菌体展示或转基因鼠产生的全人源化抗体^[9]。目前, ADCs 以全人源化的抗体为主, 如上市的 T-DM1、临床 III 期的 Inotuzumab ozogamicin 等均使用了人源化的抗体^[3,10]; 此外, 个别嵌合抗体也有在临床上应用, 如上市的 SGN-35^[2]。

ADCs 选用的 IgG 抗体虽然具有高亲和性, 但是其分子量约 150 kDa, 而毛细血管内皮层以及细胞外的间隙很难透过如此巨大的分子, 导致其进入实体肿瘤部位的量远小于给药的剂量, 因此早期的 ADCs 主要针对血液瘤^[11]。为了使 ADCs 更好地应用到实体肿瘤, 研究者们对抗体进行了小型化改造。小型化抗体主要有 Fab 片段、Fab' 片段、单链抗体 scFv 等, Fab 片段去除了抗体的 Fc 段; Fab' 片段可通过胃蛋白酶切除铰链区获得, 分子量约为全抗体的 1/3; scFv 分子量更小, 仅 Fab' 的一半^[9](图 5)。小型化后的抗体可保留高亲和性和特异性; 由于 Fc 段缺失, 抗体免疫原性降低同时, 也丧失了 Fc 段带来的抗肿瘤效应, 单独使用小型

化抗体抗肿瘤活性往往不理想, 而用小型化抗体偶联毒性小分子制备的 ADCs 具有更强的穿透力, 能更容易穿过血管进入实体肿瘤部位, 极大提高了对实体肿瘤的杀伤作用^[12]。当然抗体分子量减小带来高穿透力的同时, 也使得体内半衰期显著减短, 因此在设计小型化抗体的 ADCs 时要综合考虑多方面因素, 增加小型化抗体对抗原的亲和力尤为重要^[13]。

4 毒性小分子

虽然良好的抗体可特异靶向肿瘤抗原, 但是 ADCs 进入肿瘤细胞尤其是实体瘤细胞需要经历一系列过程, 能到达肿瘤部位的药物很少, 所以小分子的毒性成了其考虑的重要因素(IC₅₀ 一般在

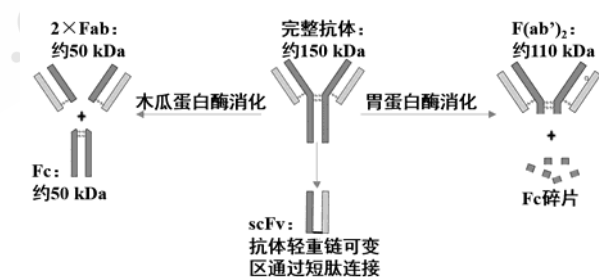


图 5 抗体小型化改造

Fig. 5 Antibody miniaturization

0.01~0.1 nmol·L⁻¹)。早期研究使用常规化疗药物作为毒性小分子, 这些小分子虽然药效和毒性较为清楚, 但是其活性往往达不到 ADCs 制备的要求, 如阿霉素与 BR96 单抗偶联、紫杉醇与 EGFR 抗体偶联制备的 ADCs 由于小分子活性低而止步于临床研究^[14-15]。此外, 选用的毒性小分子应具备能与抗体偶联、在达到作用部位时能释放并保持活性、在溶液中稳定等特点。

目前, ADCs 选用的小分子以作用于 DNA 的 Calicheamicin(CLM) 和 作用于 微 管 蛋 白 的 auristatins(MMAE、MMAF)、maytansinoids(DM1、DM3、DM4)为主。CLM 属 烯 二 炔 类 抗 菌 药 物, 可 通过 辅 助 性 基 团 与 DNA 结 合 并 嵌 入 双 螺 旋 的 小 沟 中 导 致 DNA 分 子 断 裂, 大 量 损 伤 遗 传 物 质 而 起 到 抗 肿 瘤 作 用。CLM 由 Lederle 实 验 室 从 棘 孢 小 单 孢 菌 中 分 离, 有 $\text{CLM}\beta_1^{\text{Br}}$ 、 γ_1^{Br} 、 α_2^{I} 、 α_3^{I} 、 β_1^{I} 、 γ_1^{I} 、 δ_1^{I} , 其 中 $\text{CLM}\gamma_1^{\text{I}}$ 的 抗 肿 瘤 活 性 最 高 ($\text{IC}_{50} < 0.001 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[16]。Mylotarg[®] 是 首 个 以 CLM 为 “弹 头” 的 ADC, 其 通 过 不 稳 定 的 4-(4-乙 酰 苯 氧)丁 酸 把 抗 CD33 单 克 隆 抗 体 与 CLM 共 价 连 接(图 1), 于 2000 年 被 美 国 FDA 批 准 用 于 治 疗 60 岁 以 上 一 线 化 疗 失 败 的 急 性 髓 细 胞 白 血 病(AML)的 治 疗^[1]。除 Mylotarg[®] 之 外, 通 过 同 样 方 式 将 CLM 与 抗 CD22 单 克 隆 抗 体 偶 联 的 Inotuzumab ozogamicin 已 进 入 临 床 III 期 研 究 阶 段^[10]。Auristatins 和 maytansinoids 均 属 于 微 管 蛋 白 抑 制 类 药 物, 2 种 小 分 子 通 过 抑 制 微 管 蛋 白 功 能 阻 止 染 色 体 的 迁 移, 阻 滞 细 胞 周 期 而 达 到 抗 肿 瘤 的 效 应, 它 们 的 体 外 $\text{IC}_{50} < 0.01 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17]。目 前 临 床 上 在 研 的 ADCs 大 部 分 选 择 auristatins、maytansinoids 及 其 衍 生 物 作 为 负 载 小 分 子, 其 中 SGN-35 以 MMAE 为 “弹 头”, T-DM1 以 DM1 为 “弹 头”(图 2~3)。

5 连接物

连接物是抗体与毒性小分子之间的桥梁。理想的连接物必须在体外和循环系统中稳定以避免 ADCs 带来的系统毒性, 当 ADCs 被内吞后, 连接物能有效地断开并释放出有活性的小分子从而杀伤肿瘤细胞。连接物分为可断开和不可断开 2 类。可断开的连接物(脘连接、肽连接、二硫键连接)能在内涵体(endosome)或者溶酶体(lysosome)中通过水解、酶切等形式释放出小分子, 小分子扩散到作用部位, 发挥活性; 扩散出的小分子有可能游离到细胞外, 对靶向细胞附近的细胞产生旁细胞效应(bystander killing)。不可断开的连接物(硫醚连接)需要溶酶体对内吞进细胞的 ADCs 进行消化降解后释放小分子药物, 所以小分子药物往往带有赖氨酸或者半胱氨酸(小分子偶联位点); 由于小分子上带有的氨基酸带电荷, 往往不能扩散到细胞外, 所以利用不可断开连接物偶联的 ADCs 一般不具有旁细胞效应^[18]。

脘连接是典型的酸不稳定性连接方式, 采用

该连接方式的主要是 CLM(图 1)。以脘连接为基础的 ADCs 在血液中稳定, 当偶联物进入到细胞内涵体或者溶酶体的弱酸性环境时, 连接物断开释放出小分子而发挥活性, 但是这类 ADCs 往往稳定性不佳, 在小鼠或人血浆中半衰期一般 $\leq 3 \text{ d}$ ^[19]。Mylotarg[®] 和 Inotuzumab ozogamicin 采用了脘连接将 CLM 与单克隆抗体偶联, 由于稳定性原因, Mylotarg[®] 使用后毒性大于单用化疗药物、效果也并不显著, 于 2010 年被美国 FDA 撤回, Inotuzumab ozogamicin 没有显著延长患者的存活时间, 终止在临床 III 期未能上市^[1,10,19]。

肽连接利用了溶酶体蛋白酶(如 cathepsin B)识别并切断连接多肽释放出药物^[20]。通过比较细胞毒性、血浆稳定性以及 cathepsin B 的酶切效率, 研究者们发现 MC-Phe-Lys-PABC 和 MC-Val-Cit-PABC 具备良好的 ADCs 连接物的特征, 尤其是 MC-Val-Cit-PABC(图 2)已被广泛地应用于 ADCs 制备, 包括处于临床研究阶段的 CDX-011、ASN-5ME、BY79-4620 等^[20-21]。Doronina 等^[22]研究发现, 通过肽连接获得的 cAC10-vcMMAE 的稳定性以及体内活性远超过通过脘键连接获得的 cAC10-MMAE, 前者经过西雅图遗传学公司(Seattle Genetics)的研发, 在 2011 年被美国 FDA 批准上市, 即 SGN-35, 该 ADC 在体液中稳定, 一旦进入靶细胞, 在溶酶体内迅速酶切释放出 MMAE, 作用于微管蛋白抑制肿瘤细胞分裂达到杀伤肿瘤细胞的效果。

二硫键连接是 ADCs 中另一种常见的偶联方式, 该连接物在水溶液或者血液中稳定, 在富含谷胱甘肽等还原性物质的条件下, 二硫键很容易被打开而释放出药物, 所以二硫键连接属谷胱甘肽敏感型连接(图 1)^[23]。二硫键连接比较有代表性的是在 maytansinoids 与抗体偶联中的使用, 如 SAR3419(抗 CD19 抗体与 maytansinoids 偶联)、BT-062(抗 CD138 抗体与 maytansinoids 偶联)等(表 1)。此外, 通过调整二硫键邻近 C 原子的阻碍程度, 可以控制交换反应速率, 从而调整偶联物的稳定性^[23]。

硫醚连接是与前面 3 种连接方式不同的、不可断开的连接。该连接方式制备的 ADCs 在细胞溶酶体中降解, 释放出带有连接物以及连接部位氨基酸的药物而发挥抗肿瘤效应, 所以只有在被修饰情况下依然保持活性的小分子才适合选用硫

醚连接。T-DM1 是硫醚连接最成功的应用实例,该偶联物是抗 HER2 单克隆抗体与 DM1 的连接产物。其在血液中非常稳定,进入溶酶体内被降解,释放出的 lysine-MCC-DM1 与游离的 DM1 有相似的活性,在临床研究中被证明对 HER2 阳性晚期乳腺癌具有良好疗效(图 3)^[3,24]。另外如 SGN75(抗 CD70 抗体与 MMAF 偶联)、IMGN529(抗 CD37 抗体与 DM1 偶联)等也采用了硫醚连接(表 1)。

6 偶联方法

良好的 ADCs 除了选择合适的组件外,组件之间的连接方式也至关重要。抗体本身存在很多氨基酸可用于偶联,利用天然氨基酸残基偶联往往获得不同药物抗体比例(Drug to antibody ratio, DAR)以及小分子偶联位置的 ADCs 混合物。DAR 不同或小分子偶联位置不同的 ADCs 往往具有不同的亲和力、内吞性质、药效、PK 以及毒性,给药物质量控制、临床使用带来困难,对 ADCs 开发不利。为了降低 ADCs 异质性,定点偶联技术不断发展(图 6)。

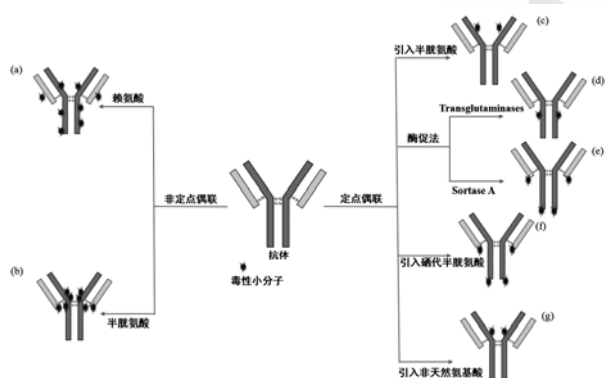


图 6 偶联方法

Fig. 6 Conjugation methods

6.1 非定点偶联

非定点偶联获得的 ADCs 的 DAR 以及小分子偶联位置不定,主要通过赖氨酸或半胱氨酸残基,利用化学方法将小分子与抗体偶联,这类偶联方法往往不需要对抗体进行修饰或改造。

IgG 上有超过 80 个赖氨酸,其中有 20 多个适合偶联^[25]。Mylotarg[®] 直接利用赖氨酸侧链氨基与丁酸形成稳定的酰胺键将 CLM 与 gemtuzumab 连接在一起^[1]。由于抗体上赖氨酸数量较多,因此利用赖氨酸偶联获得的 ADCs 的 DAR 差异大,Acchione 等^[26]报道该偶联方法获得 ADCs 混合体

系的平均 DAR 为 6~14。

相对于赖氨酸,半胱氨酸在抗体中含量较少,且分布均匀。人 IgG 恒定区含有 16 对半胱氨酸(12 对链内和 4 对链间半胱氨酸),4 对链间半胱氨酸更容易与溶剂接近,较适合用于偶联^[27]。利用半胱氨酸进行偶联需选择合适的氧化还原条件,既可以打开链间以便于连接,又不影响链内二硫键以及抗体的稳定性;通过该方法可获得 DAR 在 0、2、4、6、8 之间的 ADCs,且偶联位置相对固定。为了获得更均一的 ADCs,McDonagh 等^[28]用丝氨酸取代部分形成链间二硫键的半胱氨酸,使得 8 个可偶联的半胱氨酸降低到 4 个,这些突变体与 MMAE 偶联获得几乎定量收率(89%~96%)、DAR 在 0、2、4 的 ADCs,通过 hydrophobic interaction chromatography(HIC)纯化后,可获得接近均一的 ADC(80% DAR=4)。Badescu 等^[29]利用双硫醇将药物和一对链间二硫键连接,保持了抗体链间的二硫键桥,维持抗体稳定性,同时 ADCs 的 DAR 可以通过调整药物摩尔量与抗体二硫键桥数量的比例得到一定程度控制。

6.2 定点偶联

非定点偶联方法很难获得真正均一的 ADCs,人们越来越关注通过定点偶联的方法生产高均一性的新一代 ADCs,目前较常用的定点偶联方法有:在抗体中引入新的半胱氨酸用于偶联、引入非天然氨基酸后通过生物正交反应偶联和酶催化偶联。

在抗体中引入新的半胱氨酸是早期定点偶联的一种方案。通过噬菌体展示技术确定合适的突变或插入位点,寻找合适的还原以及氧化条件使得偶联反应在温和条件下进行,并不打开天然抗体的二硫键,从而将偶联反应控制在引入的半胱氨酸上,达到定点偶联的目的。Junutula 等^[30]在抗体特定部位引入具有活性的半胱氨酸,重组表达出抗体(THIOMABs),THIOMABs 在温和的还原条件下与小分子偶联,其中有 92%左右的 ADCs 的 DAR=2, >98%的抗体偶联上小分子,极大提高了偶联产物的均一性,在药效、毒性以及半衰期方面体现了多种优势。

Young 等^[31]发现密码子可分配给非天然氨基酸并能在翻译时将非天然氨基酸引入抗体中。利用这个原理,Axup 等^[32]成功地在抗 Her2 单克隆

抗体 Fab 段的重链部分引入 p-乙酰苯丙氨酸 (pAcPhe), 该重组抗体与带有烷氧基胺的 auristatin 形成稳定的脲键, 将小分子定点偶联到抗体上。研究表明, 通过该方法制备的 ADCs 超过 95% 的成分 DAR=2, 在体内外活性以及药动学上显著提高, 但是由于 pAcPhe 利用率低, 且脲键形成所需反应时间较长, 限制了其应用。

硒代半胱氨酸(Sec)是可由 UGA(终止密码子)编码的天然氨基酸, Sec 插入蛋白质中仅需要在 cDNA 的末端进行硒代半胱氨酸插入元件的修饰。在抗体的末端引入 2 个或 4 个 Sec 后, 带有马来亚酰胺或碘乙酰胺的小分子与抗体上的 Sec 形成硒醚从而将小分子定点偶联到抗体上^[33]。

酶促偶联是另一种有效的定点偶联策略, 目前常用的是 Sortase A(Sort A)和 transglutaminases (mTGs)。Sortase A 是从金黄色葡萄球菌中分离的催化转肽反应的酶, 其 184 位的半胱氨酸亲核攻击 LPXTG(X 表示天然氨基酸中任意一种)苏氨酸和甘氨酸之间的肽键, 形成共价硫代中间体, 同时释放出甘氨酸以及其羧基末端肽段。该中间体通过捕获溶剂中的甘氨酸从而在苏氨酸和捕获的甘氨酸之间形成新的肽键, 释放出 Sortase A 酶进行下一步催化^[34]。Sortase A 催化连接在 ADCs 的定点偶联中已有应用, Beerli 等^[35]用 Sortase A 催化 LPETG 修饰的 cAC10 抗体和 Trastuzumab 分别与 GGGGG 五肽修饰的 MMAE 和 maytansinoids 偶联, 获得的 ADCs 超过 80% 组分 DAR=4, 并与经典偶联方式获得 ADCs 显示类似的体内外活性。mTGs 同样是来自细菌的酶, 可催化谷氨酰胺与烷基伯胺共价连接。mTGs 无法识别糖基化天然抗体上的谷氨酰胺, 但是可以识别抗体中引入的谷氨酰胺标签(LLQG)^[36]。抗 EGFR 抗体恒定区不同位置加入谷氨酰胺标签后, 在 mTGs 催化下与 MMAD 偶联反应, 获得 ADCs 约 99% 组分 DAR=2, 且具有良好的生物学活性^[36]。利用 mTGs 催化带谷氨酰胺标签的抗 M1S1 抗体与 MMAD 偶联的产物显示了良好的体内外抗肿瘤活性。此外, Dennler 等^[37]对 297 位天冬酰胺去糖基化暴露出 295 位谷氨酰胺用于 mTGs 催化偶联获得均一的 DAR=2 的偶联产物, 他们进一步将 297 位天冬酰胺突变为谷氨酰胺后, 提供 4 个 mTGs 催化偶联位点, 获得均一的 DAR=4 的偶联产物。

Drake 等^[38]把酶促偶联和非天然氨基酸定点偶联结合在一起。在抗体中引入 CXPXR(X 是苏氨酸、酪氨酸、丙氨酸和甘氨酸任意一种)后, 将重组抗体与甲酰甘氨酸酶(FGE)共表达, FGE 可将半胱氨酸的残基氧化形成甲酰甘氨酸。小分子可与甲酰甘氨酸的醛基反应形成 Hydrazino-iso-Pictet-Spengler(HIPS)连接从而达到定点偶联目的。

7 小结与展望

21 世纪以来, ADCs 研发大潮拉开序幕, SGN-35、T-DM1 的上市和临床上 ADCs 振奋人心的表现使其越来越受到关注。然而, ADCs 研发是一个非常复杂的过程, 抗体、毒性小分子、连接物以及它们的组合方式都会影响到 ADCs 最终的成药性, 加上人体是一个非常复杂的环境, 建立合适的 ADCs 设计各个环节的体内外评价方法至关重要。寻找新的毒性更强的小分子, 优化连接物使其在稳定性以及在肿瘤内释放小分子效率达到最佳平衡, 开发有效的定点偶联方法从而设计高活性、低毒性且具有良好药动学性质的 ADCs 是新一代 ADCs 的研发目标。肿瘤具有高异质性特征, 在靶点选择方面, 挑战主要集中在靶点抗原在肿瘤中表达方式、靶点的异质性以及内吞效率等, 使设计的 ADCs 能有效区分肿瘤和正常组织且具有良好的药效。在研究者不断努力下, ADCs 作为靶向治疗药物在肿瘤以及其他疾病中将展示出更多惊喜。

REFERENCES

- [1] SOROKIN P. Mylotarg approved for patients with CD33+ acute myeloid leukemia [J]. Clin J Oncol Nurs, 2000, 4(6): 279-280.
- [2] DENG C, PAN B, O'CONNOR O A. Brentuximab vedotin [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 22-27.
- [3] KROP I, WINER E P. Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(1): 15-20.
- [4] RICART A D, TOLCHER A W. Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4(4): 245-255.
- [5] PANOWSKI S, BHAKTA S, RAAB H, et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy [J]. mAbs, 2014, 6(1): 34-45.
- [6] HAMBLETT K J, KOZLOSKY C J, SIU S, et al. AMG 595, an Anti-EGFRvIII Antibody-Drug Conjugate, Induces Potent Antitumor Activity against EGFRvIII-Expressing Glioblastoma [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(7): 1614-1624.
- [7] YAMADA T, AZUMA K, MUTA E, et al. EGFR T790M mutation as a possible target for immunotherapy; identification of HLA-A*0201-restricted T cell epitopes derived from the

- EGFR T790M mutation [J]. PloS one, 2013, 8(11): e78389.
- [8] SOMASUNDARAM R, SWOBODA R, CAPUTO L, et al. Human leukocyte antigen-A2-restricted CTL responses to mutated BRAF peptides in melanoma patients [J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3287-3293.
 - [9] 王平, 吕小英, 范守城. 基因工程抗体研究进展及其临床应用[J]. 重庆三峡学院学报, 2010, 26(3): 124-127.
 - [10] THOMAS X. Inotuzumab ozogamicin in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Expert Opin Inv Drug, 2012, 21(6): 871-878.
 - [11] ROBERT M, DAVID M. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates [J]. Ca-cancer J Clin, 2006, 56(4): 226-243.
 - [12] 甄永苏. 抗体药物与肿瘤靶向治疗[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(2): 1-2.
 - [13] ZAHND C, KAWA M, STUMPP M T, et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size [J]. Cancer Res, 2010, 70(4): 1595-1605.
 - [14] TOLCHER A W, SUGARMAN S, GELMON K A, et al. Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(2): 478-484.
 - [15] WU X, OJIMA I. Tumor specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates [J]. Curr Med Chem, 2004, 11(4): 429-438.
 - [16] SISSI C, MORO S, CROTHERS D M. Novel insights on the DNA interaction of calicheamicin gamma1 (I) [J]. Biopolymers, 2015, 103(8): 449-459.
 - [17] KLUTE K, NACKOS E, TASAKI S, et al. Microtubule inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy [J]. OncoTargets Ther, 2014(7): 2227-2236.
 - [18] ERICKSON H K, WIDDISON W C, MAYO M F, et al. Tumor delivery and *in vivo* processing of disulfide-linked and thioether-linked antibody-maytansinoid conjugates [J]. Bioconjugate Chem, 2010, 21(1): 84-92.
 - [19] DUCRY L, STUMP B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies [J]. Bioconjugate Chem, 2010, 21(1): 5-13.
 - [20] DUBOWCHIK G M, FIRESTONE R A. Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8(23): 3341-3346.
 - [21] DUBOWCHIK G M, FIRESTONE R A, PADILLA L, et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific *in vitro* anticancer activity [J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(4): 855-869.
 - [22] DORONINA S O, TOKI B E, TORGOV M Y, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 778-784.
 - [23] SAITO G, SWANSON J A, LEE K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2003, 55(2): 199-215.
 - [24] LEWIS PHILLIPS G D, LI G, DUGGER D L, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate [J]. Cancer Res, 2008, 68(22): 9280-9290.
 - [25] CHARI R V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs [J]. Accounts Chem Res, 2008, 41(1): 98-107.
 - [26] 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.
 - [27] SUN M M, BEAM K S, CERVENY C G, et al. Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides [J]. Bioconjugate Chem, 2005, 16(5): 1282-1290.
 - [28] MCDONAGH C F, TURCOTT E, WESTENDORF L, et al. Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment [J]. Protein Eng Des Sel, 2006, 19(7): 299-307.
 - [29] BADESCU G, BRYANT P, BIRD M, et al. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates [J]. Bioconjugate Chem, 2014, 25(6): 1124-1136.
 - [30] 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.
 - [31] YOUNG T S, SCHULTZ P G. Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon [J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11039-11044.
 - [32] AXUP J Y, BAJJURI K M, RITLAND M, et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids [J]. PNAS, 2012, 109(40): 16101-16106.
 - [33] HOFER T, SKEFFINGTON L R, CHAPMAN C M, et al. Molecularly defined antibody conjugation through a selenocysteine interface [J]. Biochemistry, 2009, 48(50): 12047-12057.
 - [34] TON-THAT H, LIU G, MAZMANIAN S K, et al. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif [J]. PNAS, 1999, 96(22): 12424-12429.
 - [35] BEERLI R R, HELL T, MERKEL A S, et al. Sortase enzyme-mediated generation of site-specifically conjugated antibody drug conjugates with high *in vitro* and *in vivo* potency [J]. PloS one, 2015, 10(7): e0131177.
 - [36] STROP P, LIU S H, DORYWALSKA M, et al. Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates [J]. Chem Biol, 2013, 20(2): 161-167.
 - [37] DENNLER P, CHIOTELLIS A, FISCHER E, et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates [J]. Bioconjugate Chem, 2014, 25(3): 569-578.
 - [38] DRAKE P M, ALBERS A E, BAKER J, et al. Aldehyde tag coupled with HIPS chemistry enables the production of ADCs conjugated site-specifically to different antibody regions with distinct *in vivo* efficacy and PK outcomes [J]. Bioconjugate Chem, 2014, 25(7): 1331-1341.

收稿日期: 2015-08-17