

抗体导向的酶催化前体药物疗法

张信平(襄樊市第一人民医院药剂科,湖北 襄樊 441000)

摘要:目的 综述抗体导向的酶催化前体药物疗法(Antibody directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)的研究进展,评价这种技术应用的潜力。**方法** 检索近几年国内外研究 ADEPT 的相关文献,并进行分析、归纳。**结果** “抗体导向的酶催化前体药物疗法”是一种肿瘤靶向治疗两步策略。该策略以巧妙的设计克服了以往单抗作为药物载体的许多缺陷,通过分子与分子靶标、酶与底物(前药)的双重选择性,提高药物对肿瘤细胞的靶向性,降低毒性,克服耐药性。**结论** 抗体导向的酶催化前体药物疗法是一种极有发展前途的肿瘤靶向疗法。

关键词:抗体导向的酶催化前体药物疗法;肿瘤靶向

中图分类号:R962.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2009)04-0280-05

Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy

ZHANG Xinping(*Department of Pharmaceutical, Xiangfan First People's Hospital, Xiangfan 441000, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE This review presents the background and the development of antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT), and evaluates the application potential of the technology. **METHODS** This review analyzes and summarizes the related literatures in recent years. **RESULTS** ADEPT is a novel therapeutic approach that targets an enzyme into tumors to convert a

作者简介:张信平,男,副主任药师 Tel:13797711317 E-mail:Nenlizhang@yahoo.com.cn

relatively nontoxic prodrug into an active cytotoxic agent. This method has a number of advantages, including the reduction of systemic toxicity. **CONCLUSION** ADEPT is a promising technique for the cancer target therapy.

KEY WORDS: antibody directed enzyme prodrug therapy; tumor targeted

抗体导向酶催化前体药物疗法(ADEPT)这一概念最初由 Philpott 等首次提出并由 Bagshawe 和 Senter 进一步发展,其基本思想是将单克隆抗体与活化酶交联,借助抗体识别瘤细胞表面抗原的特性,把酶带到靶部位,无抗癌活性或低活性的前体药物在酶的催化下转化为细胞毒药物,实现抗癌药物在靶部位的特异性释放^[1]。其作用特点表现在:①显著降低药物毒性:由于前药只有被定位于靶部位的酶激活后,才能转化为具有强细胞毒性的药物,减低了对正常组织的杀伤力;②提高肿瘤局部的药物浓度:由于酶分子作用机制的特殊性,单一酶分子具有水解多个前药分子的潜能。以羧肽酶 G2 为例,每个酶分子每秒钟可作用于 800 个苯甲酸氮芥类底物分子,提供了一种放大作用,活性药物以高浓度定位于肿瘤局部。以往的抗体-药物偶联物中,抗体所能携带的药物分子是极其有限的,肿瘤细胞摄入的药物量过少,达不到细胞毒剂量,难以获得满意的临床疗效;③提供旁观者效应(bystander effect):由于 ADEPT 所使用的前药分子多为小分子化合物,被活化酶活化后,可扩散到相邻细胞,杀伤远离靶细胞的肿瘤细胞,有效解决肿瘤细胞表面抗原表达异质性的问题^[2]。

1 ADEPT 的组成

1.1 抗体

ADEPT 的选择性很大程度上取决于抗原、抗体的特异性。理想的靶抗原应为某类或某几类肿瘤细胞所特有,遗憾的是至今未发现这样特异性的抗原。因此,提高 ADEPT 选择性的首要因素是找到高特异性的靶抗原。早期 ADEPT 使用鼠单克隆抗体,特异性高,但对人体具有免疫原性,临床使用后引起人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)反应。目前利用基因工程制备得到的人源化抗体

(humanized antibody)保留了抗体靶向特性,引起的 HAMA 反应较鼠源性单抗引起的反应轻,且血中半衰期延长,疗效更好。

1.2 酶

理想的酶对前药转化率高、37 °C 催化活性高、与抗体的偶联物稳定、与底物作用时不需辅酶、人体内无天然活性抑制剂和底物、来源稳定、易纯化等。目前 ADEPT 使用的前药活化酶分为两类^[2]:①人源酶:其特点是免疫原性低但内源性干扰大,前药易在非靶部位活化而导致系统毒性;②外源酶:一般是来源于微生物的酶,特点是内源性干扰小但重复使用可引起免疫反应。

1.3 抗体-酶偶联物

适宜的抗体-酶偶联物应具有分子量小、免疫原性低、性质稳定、易定位于肿瘤细胞、对肿瘤相关抗原选择性高、保持活性时间长、易从血中清除等特点。早期研制的抗体-酶偶联物则不能满足这些要求。利用 DNA 重组技术构建抗体-酶融合蛋白,该蛋白兼有抗体、酶的特性,且不用单独纯化抗体。

1.4 前药

设计合理的前体药物应该具有化学性质稳定、无毒或毒性较低等特点,并且是抗体偶联酶的良好底物。抗癌药物结构中已知的活性必需基团是首先选择连接的位置,这样可以屏蔽活性官能团,达到降低毒性的目的。连接官能团与连接键应在正常生理条件下稳定,以减少原型药物的非特异性释放。键合基团多是酯、酰胺、氨基甲酸酯、醚等。

2 ADEPT 的应用

ADEPT 系统的活化酶有多种,抗体-酶治疗方案涉及各种肿瘤,其中羧肽酶 G2 系统已进入临床试验阶段,见表 1^[3]。

表 1 ADEPT, GDEP 和 VDEPT 中使用的活化酶及前药

Tab 1 Bioactivating enzymes and prodrugs used in ADEPT, GDEPT, and VDEPT

酶	前药	药物	参考文献
Nitroreductase	CB 1954	5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxyl-amino-2-nitro-benzamide	Knox et al., 1992
Cytochrome P450	4-Ipomeanol	Unidentified (furan epoxide is speculated)	Mohr et al., 2000a
Cytochrome P450	Ifosfamide	Isophosphoramidate mustard	Klein R et al., 2008
Cytochrome P450	Cyclophosphamide	Phosphoramidate mustard	Klein R et al., 2008
Purine-nucleoside phosphorylase	Fludarabine	2-Fluoroadenine	Huang and Plunkett, 1987

续表 1

酶	前药	药物	参考文献
Purine-nucleoside phosphorylase	MeP-dR	MeP	Sorscher et al. , 1994
Thymidine kinase	Ganciclovir	Ganciclovir-triphosphate nucleotide	Moolten, 1986
Alkaline phosphatase	Etoposide phosphate	Etoposide	Kim KY et al. , 2003
Alkaline phosphatase	Mitomycin C phosphate	Mitomycin C	Senter et al. , 1989
Alkaline phosphatase	POMP	POM	Wallace and Senter, 1991
Alkaline phosphatase	N-(4-phosphonoxy)-phenylacetyl) doxorubicin	Doxorubicin	Vrudhula et al. , 1993a
β -Glucuronidase	Glucuronidated Normitrogen mustard	Oxazolidinone	Papot et al. , 2000
β -Glucuronidase	Glucuronidated 9-amino-camptothecin	9-Aminocamptothecin	Leu et al. , 1999
β -Glucuronidase	Glucuronide mustard	Mustard	Chen KC et al. , 2007
Carboxypeptidase	Methotrexate-amino acids	Methotrexate	Dubowchik and Walker, 1999
Carboxypeptidase	CMDA	Benzoic acid mustard	Blakey et al. , 1993
Penicillin amidase	DPO	Doxorubicin	Kerr et al. , 1990
Penicillin amidase	MeIPO	Melphalan	Kerr et al. , 1990
Penicillin amidase	NHPAP	Palytoxin	Bignami et al. , 1992
Penicillin amidase	N-(phenylacetyl) doxorubicin	Doxorubicin	Zhang Q et al. , 2006
Penicillin amidase	N-(phenylacetyl) melphalan	Melphalan	Vrudhula et al. , 1993a
β -Lactamase	LY 266070	DAVLBHYD	Alderson RF et al. , 2006
β -Lactamase	C-DOX	Doxorubicin	Hudyma et al. , 1993
β -Lactamase	PRODOX	Doxorubicin	Jungheim et al. , 1993
β -Lactamase	CM	Phenylenediamine mustard	Cortez-Retamozo V et al. , 2004
β -Lactamase	CCM	Phenylenediamine mustard	Vrudhula et al. , 1993b
β -Lactamase	Cephalosporin-DACCP	DACCP	Hanessian and Wang, 1993
β -Lactamase	PROTAX	Taxol	Vrudhula VM et al. , 2003
β -Lactamase	Cephalosporin mitomycin C	Mitomycin C	Vrudhula et al. , 1997
β -Lactamase	C-Mel	Melphalan	Kerr et al. , 1998
Cytosine deaminase	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil	Senter et al. , 1991
Methionine γ -lyase	Selenomethionine	Methylselenol	Miki et al. , 2001
Methionine γ -lyase	Trifluoromethionine	CSF2	Coombs and Mottram, 2001

MeP, 6-methylpurine; POMP, p-[N, N-bis (2-chloroethyl) amino]; phenyl phosphate; POM, p-[N, N-bis (2-chloroethyl) amino]; phenol; DAVLBHYD, 4-desacetylvinblastine-3-carboxylic acid hydrazide; DACCP, 4'-carboxyphthalato (1, 2-cyclohexanediamine) platinum; CSF2, carbonothionic difluoride.

此外,在 ADEPT 系统上发展了叶酸导向的酶前药治疗 (Folate directed enzyme prodrug therapy, FDEPT), 基因导向的酶前药治疗 (Gene directed enzyme prodrug therapy, GDEPT), 病毒导向的酶前药治疗 (Virus directed enzyme prodrug therapy, VDEPT)。GDEPT 或 VDEPT 中, 包裹酶编码基因的 DNA 非病毒或病毒载体被转染到肿瘤细胞, 产生的 mRNA 转录形成功能性酶, 进入细胞内的非毒性药物被表达的功能性酶活化形成毒性药物导致细胞死亡, 见图 1。

3 ADEPT 的缺陷

ADEPT 存在的主要问题是抗体-酶偶联物的免疫原性^[4-5], 限制了多次循环用药, 此外, 在血管不足的肿瘤, 大分子偶联物的转运受限, 即使是血管丰富的肿瘤, 也不可能将抗体-酶偶联物运送到所有的肿瘤细胞^[6-7]; 由于酶水平低, 很难产生致死量的药物浓度; 抗原的差异限制了偶联物与肿瘤细胞的结合; 很难保证在给予前药前将偶联物从循环中彻底清除, 对于半衰期长的偶联物更是如此, 所以极易导致前药在非靶部位的激活。其他诸如抗体的纯化, 抗体-酶偶联物与肿瘤的亲和力都使 ADEPT 进展困难。

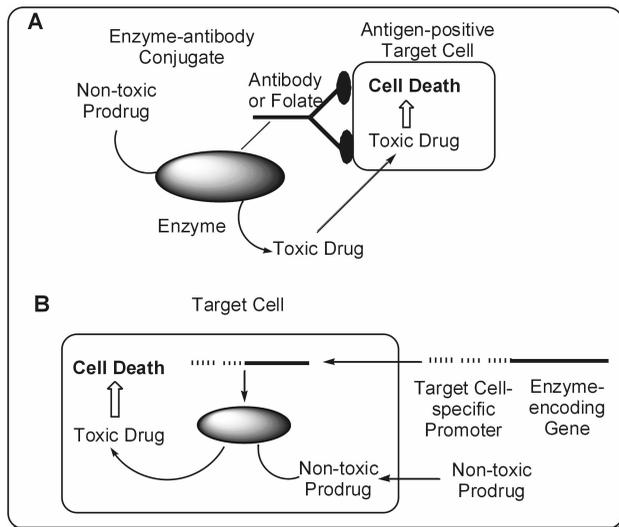


图1 ADEPT, FDEPT, VDEPT 和 GDEPT 的靶向原理

A - 第一步, 抗体酶 (ADEPT) 或叶酸偶联酶 (FDEPT) 靶向结合到抗原表达细胞表面, 第二步, 前药由酶催化激活形成高浓度的毒性原药。大多数情况下, 毒性药物需要穿透细胞膜导致细胞死亡。也有些药物不需透过细胞膜 (如 palytoxin); B - 含编码酶基因 DNA 的非病毒载体 (GDEPT) 或病毒载体 (VDEPT) 靶向到肿瘤细胞。基因转录生成 mRNA 翻译产生活性酶。非毒性的前药在活性酶的催化下形成毒性的原药导致细胞死亡^[3]

Fig 1 Principles of drug targeting, using ADEPT, FDEPT, VDEPT, and GDEPT

A - In an enzyme antibody (ADEPT) or a folate conjugated enzyme (FDEPT) is administered that binds to the surface of antigen-presenting target cells. Subsequently, a prodrug is administered that is activated by the enzyme, resulting in the formation of a toxic drug. In most cases the toxic drug has to penetrate the cell membrane to enable cell death. In some cases the drug can cause cell death without penetration through the cell membrane (e.g., palytoxin); B - a DNA construct containing an enzyme-encoding gene is delivered to the tumor cells using nonviral (GDEPT) or viral (VDEPT) vectors. The gene is transcribed, and the generated mRNA is translated to yield the functional enzyme. The enzyme that is subsequently expressed activates intracellularly a nontoxic prodrug into a toxic drug that causes cell death^[3]

4 ADEPT 的优化

目前, 改善 ADEPT 系统的主要方法有: ①采用三步法: 在不影响酶在肿瘤组织活性的前提下, 加速酶从循环系统清除。即在二步系统的基础上, 在抗体-酶定位于靶部位后, 给予针对抗体-酶的抗体, 清除循环中可能存在的免疫偶联物^[3]; ②与血管抑制剂联合应用: 抗血管剂能选择性阻断肿瘤血管导致广泛坏死; ③应用 GDEPT 或 VDEPT 法^[8]; 但这两种方法中, 前药必须穿透细胞膜在细胞内活化, 且基因的选择性转染也非常困难。此外, 诸如插入诱变、抗 DNA 抗体、局部感染、肿瘤块的溃烂的风险也限制了 GDEPT 的应用; 而大多数病毒载体都已经过修饰

不具有复制能力, 且仍有反转为野生型的风险; ④构建人源酶突变体: 这种酶既能避免由人源酶导致的前药在非肿瘤组织的活化, 又能避免非人源酶引起的免疫反应, 还能增强酶对前药的催化活性, 使前药成为酶的高特异性底物。⑤开发新的快速、有效的小分子靶向载体: 当前的转运系统仅能靶向 10% ~ 55% 的细胞。物理、化学转运方式包括电穿孔、直接细胞内注射、钙磷酸盐共沉淀法在体外试验很成功, 但临床应用仅适合能从体内取出并能方便复位的组织。此外, GDEPT 存在风险而且需要多重步骤才能产生功能酶。ADEPT 的抗体-酶偶联物分子太大, 很难渗透到肿瘤细胞, 因此期待能改变现有的基因转运载体或开发新的载体。与抗体相比, 叶酸与叶酸受体的亲和力 (Kd 约 0.1 nM) 比单克隆抗体对肿瘤细胞表面的受体亲和力强 100 倍以上, 且叶酸具有免疫原性低、易于修饰、体积小 (Mr = 441.4 Da)、易穿透肿瘤、化学和生物稳定性高、成本低、易贮存等优点^[9-11]。以叶酸替代 ADEPT 中起导向作用的抗体的 FDEPT 可能具有很大的发展潜力。Zhang 等将青霉素 G 酰化酶 (PGA) 与叶酸相连得到叶酸-PGA 偶联酶, 该酶可特异性的水解前药 DOXP (苯乙酰胺-阿霉素), 释放出活性的阿霉素。由于叶酸的靶向作用, 叶酸-PGA 偶联酶联合阿霉素前药 DOXP 提高了阿霉素对 FR (+) HeLa 和 SKOV3 细胞的敏感性^[12]。

5 结论

抗体导向的酶催化前体药物治疗以巧妙的设计克服了以往单抗作为药物载体的许多缺陷, 通过分子与分子靶标, 酶与底物 (前药) 的双重选择性, 提高药物对肿瘤细胞的选择性, 降低毒性, 克服耐药性。优化 ADEPT, 发展 GDEPT, VDEPT 或 FDEPT, 导向的酶催化前体药物治疗已成为当前极有发展潜力, 应用多样化的肿瘤靶向疗法。

REFERENCES

- [1] BAGSHAW K D, SHARMA S K, BEGENT R H. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(11): 1777-1789.
- [2] DEONARAIN M P, EPENETOS A A. Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles [J]. Br J Cancer, 1994, 70(5): 786-794.
- [3] ROOSEBOOM M. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(1): 53-102.
- [4] SHARMA S K. Immune response in ADEPT [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1996, 22(3): 269-288.
- [5] HARDING F A, LIU A D, STICKLER M, et al. A beta-

lactamase with reduced immunogenicity for the targeted delivery of chemotherapeutics using antibody-directed enzyme prodrug therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(11):1791-1800.

- [6] IZNAGA-ESCOBAR N, MISHRA A K, PEREZ-RODRIGUEZ R. Factors affecting pharmacokinetics of monoclonal antibodies: A review article [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2004, 26(2):123-127.
- [7] SCHAEDEL O, REITER Y. Antibodies and their fragments as anti-cancer agents [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(3):363-378.
- [8] MAYER A, SHARMA S K, TOLNER B, et al. Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) [J]. Br J Cancer, 2004, 90(12):2402-2410.
- [9] PAULOS C M, REDDY J A, LEAMON C P, et al. Ligand

binding and kinetics of folate receptor recycling *in vivo*: impact on receptor-mediated drug delivery [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(6):1406-1414.

- [10] HILGENBRINK A R, LOW P S. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics [J]. J Pharm Sci, 2005, 94(10):2135-2146.
- [11] LOW P S. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(8):1055-1058.
- [12] ZHANG Q, XIANG G, ZHANG Y, et al. Increase of doxorubicin sensitivity for folate receptor positive cells when given as the prodrug N-(phenylacetyl) doxorubicin in combination with folate-conjugated PGA [J]. J Pharm Sci, 2006, 95(10):2266-2275.

收稿日期:2008-01-02