



新生物学丛书

抗体偶联药物

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

[瑞士] Laurent Ducry 著
高凯 等译



科学出版社

新生物学丛书

抗体偶联药物

Antibody-Drug Conjugates

[瑞士] Laurent Ducry 著

高凯等译

科学出版社

北京

图字：01-2014-8238 号

内 容 简 介

抗体偶联药物由靶向特异抗原的单克隆抗体与高效细胞毒性的小分子化学药物偶联而成。本书针对抗体偶联药物这一新型的癌症治疗手段，围绕包括其特定靶点和抗体选择、与小分子药物偶联方式等药物设计原理、工艺方法的开发和放大，以及药物质量控制技术部分进行系统总结性论述。本书首先综合叙述了抗体偶联药物的概况和研究进展，并针对抗体偶联药物研发中的关键技术环节，由在相应领域有多年经验的专家分章节予以论述。

本书可供大专院校师生教学使用，也可供从事肿瘤治疗基础研究、药物研发与质量控制等领域的专业人员，以及药品监管机构从业者参考使用。

Translation from English language edition: *Antibody-Drug Conjugates* by Laurent Ducry

Copyright © Springer Science+Business Media New York 2013 All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

抗体偶联药物 / (瑞士)劳伦斯(Laurent, D.)著;高凯等译. —北京:科学出版社, 2015.4

(新生物学丛书)

书名原文: Antibody-Drug Conjugates

ISBN 978-7-03-043368-8

I. ①抗… II. ①劳… ②高… III. ①抗体-药物-研究
IV. ①TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 030238 号

责任编辑: 罗 静 刘 晶 / 责任校对: 彭 涛

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 美光制版

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 4 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015 年 4 月 第一次印刷 印张: 16 3/4

字数: 366 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《新生物学丛书》专家委员会

主 任：蒲慕明

副 主 任：吴家睿

专家委员会成员(按姓氏汉语拼音排序)：

昌增益	陈洛南	陈晔光	邓兴旺	高 福
韩忠朝	贺福初	黄大昉	蒋华良	金 力
康 乐	李家洋	林其谁	马克平	孟安明
裴 钢	饶 毅	饶子和	施一公	舒红兵
王 琛	王梅祥	王小宁	吴仲义	徐安龙
许智宏	薛红卫	詹启敏	张先恩	赵国屏
赵立平	钟 扬	周 琪	周忠和	朱 祯

《抗体偶联药物》译者名单

主 译：高 凯

参译人员(按姓氏笔画排序)：

于传飞 王 兰 王文波 朱 磊 刘春雨

李 萌 张 峰 张伯彦 陈 伟 徐纲领

蔺亚萌

《新生物学丛书》丛书序

当前，一场新的生物学革命正在展开。为此，美国国家科学院研究理事会于2009年发布了一份战略研究报告，提出一个“新生物学”（New Biology）时代即将来临。这个“新生物学”，一方面是生物学内部各种分支学科的重组与融合，另一方面是化学、物理、信息科学、材料科学等众多非生命学科与生物学的紧密交叉与整合。

在这样一个全球生命科学发展变革的时代，我国的生命科学研究也正在高速发展，并进入了一个充满机遇和挑战的黄金期。在这个时期，将会产生许多具有影响力、推动力的科研成果。因此，有必要通过系统性集成和出版相关主题的国内外优秀图书，为后人留下一笔宝贵的“新生物学”时代精神财富。

科学出版社联合国内一批有志于推进生命科学发展的专家与学者，联合打造了一个21世纪中国生命科学的传播平台——《新生物学丛书》。希望通过这套丛书的出版，记录生命科学的进步，传递对生物技术发展的梦想。

《新生物学丛书》下设三个子系列：科学风向标，着重收集科学发展战略和态势分析报告，为科学管理者和科研人员展示科学的最新动向；科学百家园，重点收录国内外专家与学者的科研专著，为专业工作者提供新思想和新方法；科学新视窗，主要发表高级科普著作，为不同领域的研究人员和科学爱好者普及生命科学的前沿知识。

如果说科学出版社是一个“支点”，这套丛书就像一根“杠杆”，那么读者就能够借助这根“杠杆”成为撬动“地球”的人。编委会相信，不同类型的读者都能够从这套丛书中得到新的知识信息，获得思考与启迪。

《新生物学丛书》专家委员会

主任：蒲慕明

副主任：吴家睿

2012年3月

前 言

抗体偶联药物(ADC)是一种有良好应用前景的新型癌症治疗方式,它是由靶向特异性抗原的单克隆抗体与高效细胞毒性的小分子化学药物偶联而成的。FDA于2011年、2013年先后批准了ADC药物 Adcetris[®](brentuximab vedotin)和 Kadcyla[®](trastuzumab emtansine 或 T-DM1)的上市申请,这都证实了此类“被武装”抗体治疗癌症的可行性,同时抗体偶联药物这一领域也引起了外界更多的关注。近年来 ADC 技术领域的研究十分活跃,针对不同的肿瘤类型也涌现了一些抗体偶联候选药物。因此,这些免疫和抗体偶联药物的临床试验也将不断增加,并很有可能替代现有的一些裸抗体药物,成为新一代的抗癌生物疗法。

虽然 ADC 的概念很简单,但是成功设计研发这样的一个“灵巧炸弹”的确是一项非常复杂的工作。尽管近年来我们对抗体偶联药物了解得越来越多,但是还有许多工作需要完成,比如设计寻找确定适合的药物作用靶标、正确地设计单克隆抗体、连接子与有效药物负载,以及可重现和可缩放的偶联工艺。

目前成功的偶联技术归功于开发的新方法。这本书的目的是,针对 ADC 关键技术为这一领域的研究人员提供详细的实验方法。每一个方法都是作者在其实验室经常使用的技术。此外,几个综述章节包含了抗体偶联药物的概况和研究进展。因此,此书面向的读者不仅是那些已经在此领域工作的研究人员,同样适应于没有 ADC 经验的人员。我希望此书能够进一步推动 ADC 药物的研发,并在未来助力于癌症治疗手段的不断完善。

Laurent Ducry

于瑞士 Visp

目 录

《新生物学丛书》丛书序

前言

第 1 章 抗体偶联药物研发进展	1
摘要	1
1 引言	2
2 抗体偶联药物的构成	4
2.1 抗体偶联药物的定义	4
2.2 抗体偶联药物识别的靶点/抗原	5
2.3 细胞毒素药物和连接子	6
2.4 抗体的选择	7
3 目前抗体偶联药物的临床研究结果	8
3.1 维布妥昔单抗(Brentuximab Vedotin/Adcetris®)临床概况	8
3.2 曲妥珠-美坦新衍生物(T-DM1)临床概况	9
3.3 CMC-544 (Inotuzumab Ozogamicin)临床概况	11
3.4 早期临床试验中的其他抗体偶联药物	12
4 挑战与前景	15
致谢	17
参考文献	17
第 2 章 抗体偶联药物靶标选择：关键因素	25
摘要	25
1 引言	25
2 靶标选择的关键因素	25
2.1 特异性	25
2.2 表达水平	26
2.3 内化	26
2.4 靶标的异质性	26
2.5 可及性	27
3 在靶标选择中需考虑的相关因素	27
3.1 鉴别合适的病患群	27
3.2 靶抗原调节	27
4 实例分析：前列腺特异性膜抗原	27
4.1 特异性	27
4.2 表达水平	28
4.3 内化	29
4.4 异质性	30
4.5 可及性	30

4.6 鉴定合适的病患群	31
4.7 靶标的表达是否可调	32
5 结论	33
参考文献	33
第3章 抗体偶联药物中抗体的选择：内化和细胞内定位	36
摘要	36
1 引言	36
2 材料	37
2.1 流式细胞术检测内化所需试剂	37
2.2 细胞内定位检测所需试剂	37
3 方法	38
3.1 流式细胞术检测内化	38
3.2 细胞内定位检测	39
4 注意事项	41
参考文献	42
第4章 抗体偶联药物的负载	43
摘要	43
1 引言	43
2 美登素类化合物	44
3 澳瑞他汀类	47
4 卡奇霉素	49
5 毒伞肽	51
参考文献	53
第5章 抗体偶联药物的连接子技术	60
摘要	60
1 引言	60
2 化学不稳定的连接子	61
2.1 酸不稳定的连接子(胺类)	61
2.2 二硫化物连接子	65
3 酶催化裂解的连接子	67
3.1 肽连接子	67
3.2 β -葡糖苷酸连接子	70
4 不可裂解的连接子	71
5 偶联考量事项	74
6 结论	75
参考文献	76
第6章 药物-接头稳定性的体内水平检测	85
摘要	85
1 引言	85

2 材料	87
2.1 活体动物阶段	87
2.2 ELISA 分析	88
2.3 TFC-MS/MS 分析	88
3 方法	89
3.1 PK 研究	89
3.2 ELISA: 偶联抗体和总抗体	89
3.3 TFC-MS/MS 游离药物的分析	91
3.4 PK 分析	91
4 注意事项	91
致谢	94
参考文献	95
第 7 章 抗体偶联药物的药代动力学和 ADME 表征	97
摘要	97
1 引言	97
2 ADC 的药代动力学	98
3 ADC PK 鉴定的分析物选择和关键参数	98
3.1 清除	99
3.2 分布容积	100
4 ADC 优化与开发中 PK 的应用	100
5 ADC PK 解释	101
6 ADC ADME 鉴定	102
6.1 ADC 连接子在血浆中的稳定性	102
6.2 ADC 组织分布	103
6.3 ADC 分解代谢/代谢和消除	103
6.4 体外 DDI 评估	104
7 结论	105
致谢	105
参考文献	105
第 8 章 生物制药环境下细胞毒性化合物的安全操作	109
摘要	109
1 引言	109
2 ADC 的工艺	109
3 ADC 的有效负载——细胞毒性药物	110
4 操作人员的职业暴露风险	111
5 风险降低措施	113
5.1 暴露控制	113
5.2 工作环境的监控	114
5.3 个人的保护装备	114
5.4 泄露	115
5.5 废弃物管理	115

6 结论	115
致谢	116
参考文献	116
第9章 针对肿瘤靶向的细胞毒性药物与抗体铰链区巯基之间基于马来酰亚胺的 小试、中试规模偶联	118
摘要	118
1 引言	118
2 材料	120
2.1 实验室供应和设备	120
2.2 试剂	122
3 方法	122
3.1 利用马来酰亚胺 PEG 作为替代药物的模拟偶联	122
3.2 小试(5 mg)规模的 ADC 制备	124
3.3 150 mg 规模的 ADC 制备	130
3.4 HIC 测定药物抗体偶联比(DAR)	133
3.5 聚体的 SE-HPLC 分析	133
3.6 DAR 的 LC-MS 测定	133
4 注释	134
参考文献	137
第10章 通过赖氨酸的偶联方法	139
摘要	139
1 引言	139
2 材料	140
3 方法	141
3.1 一步法偶联	141
3.2 采用 <i>O</i> -琥珀酰亚胺试剂的进行两步法偶联	143
3.3 采用亚氨基硫烷试剂进行两步法偶联	148
4 注释	149
参考文献	149
第11章 基于巯基反应性连接子的位点特异性偶联：改造 THIOMAB	152
摘要	152
1 引言	152
2 材料	153
2.1 位点特异性突变	153
2.2 THIOMAB	153
2.3 偶联	153
2.4 疏水相互作用色谱(HIC)和质谱(LC-MS)分析	154
2.5 细胞表面结合	154
2.6 体外活性	154
3 方法	155
3.1 定点突变	155

3.2 在 HEK293 细胞中的小量 THIOMAB 生产	155
3.3 与含反应性巯基连接子的偶联	156
3.4 定量	157
3.5 改造 ADC 的细胞表面结合	159
3.6 改造 ADC 的体外活性	160
4 注意事项	160
参考文献	162
第 12 章 抗体的细菌谷氨酰胺转胺酶修饰	164
摘要	164
1 引言	164
2 材料	166
2.1 抗体和底物	166
2.2 去糖基化	166
2.3 酶偶联	166
2.4 抗体重链突变	166
2.5 质谱分析	167
3 方法	167
3.1 IgG1 的去糖基化	167
3.2 BTGase 催化偶联	167
3.3 定点突变以及去糖基化 IgG1 的制备	167
3.4 质谱在反应质控中的运用	168
4 注意事项	169
致谢	171
参考文献	171
第 13 章 抗体偶联药物的制剂处方研发	172
摘要	172
1 引言	172
2 ADC 质量属性的工艺过程考量	174
3 ADC 制剂处方开发的考虑因素	174
3.1 物理稳定性	175
3.2 化学稳定性	175
4 稳定性指示方法	177
4.1 药物抗体偶联比率(DAR)的测定	177
4.2 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)检测未偶联的小分子药物	177
4.3 分子排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)分析分子大小异质性	178
4.4 非还原 CE-SDS 法分析分子大小异质性	179
4.5 活性效价	180
5 影响 ADC 制剂处方开发的生物物理因素	180
6 配伍研究和临床注射	182
7 制剂处方的决策	182
参考文献	182

第 14 章 偶联工艺的开发和放大	185
摘要	185
1 ADC 工艺开发：为何、如何？	185
2 熟悉工艺过程	186
3 寻找理想的工艺参数：利用 DoE 作为工具	187
3.1 制订实验计划	188
3.2 使用 DoE 进行参数筛选的例子	188
4 工艺参数的验证	191
5 规模放大到克级水平及纯化工艺的开发	191
6 临床供应	192
7 通向商业化进程的挑战	193
致谢	193
参考文献	194
第 15 章 纳米载体偶联抗体的方法	195
摘要	195
1 引言	195
2 材料	196
2.1 糖修饰组分	196
2.2 胺或羧酸修饰组分	196
2.3 巯基偶联组分	196
3 方法	197
3.1 通过高碘酸氧化的糖修饰	197
3.2 通过碳二亚胺的氨基或羧基修饰	199
3.3 通过巯基偶联	200
4 注释	204
致谢	205
参考文献	205
第 16 章 紫外/可见分光光度法 (UV/Vis) 测定药物抗体偶联比率 (DAR)	210
摘要	210
1 引言	210
2 材料	212
3 方法	212
3.1 测定药物最大吸收 $\lambda(D)$	212
3.2 测定抗体和药物在 280 nm 和最大吸收 $\lambda(D)$ 处的消光系数 (ϵ)	212
3.3 获取 ADC 样品的吸收光谱	213
3.4 计算 ADC 的平均 DAR	213
4 注意事项	213
致谢	214
参考文献	214

第 17 章 利用疏水作用色谱和反相高效液相色谱法测定药物抗体偶联比率(DAR)和药物负荷分配	216
摘要	216
1 引言	216
2 材料	218
2.1 仪器设备	218
2.2 HIC	218
2.3 RP-HPLC	218
3 方法	218
3.1 HIC	218
3.2 RP-HPLC	220
4 注意事项	222
参考文献	223
第 18 章 用 LC-ESI-MS 测量药物抗体偶联比(DAR)和药物分布	224
摘要	224
1 引言	224
2 材料	225
2.1 设备	225
2.2 试剂	225
3 方法	226
3.1 样品制备	226
3.2 LC-ESI-MS 分析	226
3.3 DAR 和药物分布的计算	228
4 注意事项	229
致谢	229
参考文献	230
第 19 章 成像毛细管等电聚焦测定电荷异质性和未偶联抗体水平	232
摘要	232
1 引言	232
2 材料	233
3 方法	234
4 注意事项	236
参考文献	237
第 20 章 用于测定抗体偶联药物(ADC)生产中的可萃取物/可溶出物的基于风险的科学方法	238
摘要	238
1 引言	238
2 基于风险评估的科学方法	239
3 可萃取物和可溶出物研究运行方案	241

4 结论.....	243
致谢.....	243
参考文献.....	243
索引	245

第 1 章 抗体偶联药物研发进展

Ingrid Sassoon and Véronique Blanc

摘 要

在肿瘤治疗中，虽然许多单独给药的裸抗药物临床疗效有一定的局限性，但毋庸置疑的是，生物治疗手段已在癌症治疗中担当着日益重要的角色。如果将具有治疗应用前景的抗体和小分子化学药物通过偶联反应制备抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)，则可以达到进一步提高抗体疗效的目的。因为 ADC 药物不但能特异性识别肿瘤细胞的表面抗原，而且可利用自身携带的高效小分子药物毒素杀灭肿瘤靶细胞。然而 ADC 药物的设计并不仅仅是简单的组合，它需要对特定肿瘤靶点和其适应证进行全方位考量，并在此基础上将抗体、连接子和小分子药物毒素三部分合理地整合在一起。现阶段大部分进入临床试验的新一代 ADC 药物，都是建立在不断总结第一代 ADC 药物的经验基础上并结合日益更新的技术所研发的。维布妥昔单抗(Adcetris[®])是将抗 CD30 单克隆抗体和一种高效微管生成抑制剂偶联而成的 ADC 药物，用于治疗“霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)”和“间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphomas)”，该产品也是迄今为止唯一成功上市的 ADC 药物。至今总共有 27 种抗体偶联药物进入临床试验(2013 年)，适应证主要涉及恶性血液肿瘤和实体肿瘤治疗。其中，曲妥珠-美坦新衍生物(trastuzumab emtansine, T-DM1)是曲妥珠单抗通过不可切除连接子偶联美坦新衍生物(DM1)构成的。在 III 期临床试验中，该药物对人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性且难治/复发转移性乳腺癌表现出显著疗效。而另一些正在进行临床试验的 ADC 药物，如 CMC-544、SAR3419、CDX-011、PSMA-ADC、BT-062 和 IMGN901，其抗原靶点、连接子及所偶联的药物也越来越多样化，这使我们对 ADC 药物的理解不断深入，同时也使得曾经一度停滞不前的 ADC 药物再次迎来了新的发展机遇。为了提升疗效，ADC 药物依然还面临着各种挑战，主要包括：仍需进一步提高治疗指数、靶点的精准选择、对 ADC 药物作用机制的透彻理解，更好地了解和控制 ADC 药物脱靶效应的毒副作用，以及临床试验方案的优化和确定(包括患者的选择、给药方案的设计等)。

关键词：抗体偶联药物，癌症，细胞毒，连接子，抗体，美坦新，奥瑞他汀(Auristatin)，卡奇霉素(Calicheamicin)，曲妥珠-美坦新衍生物(T-DM1)，SGN-35，CMC-544

1 引言

几十年来，肿瘤学的深入研究一直在为战胜癌症并且延长患者生命这一目标而努力奋斗。如今抗肿瘤生物药(如抗体、多肽和蛋白质)在肿瘤治疗药物中也逐渐占有一席之地，通常这些生物药物会与放疗和化疗药物联合使用。虽然抗体药物与小分子药物相比具有许多优势，如：①抗体药物对抗原阳性的肿瘤细胞具有高度特异性，因此可降低因药物脱靶效应对正常组织的毒性；②具有更长的半衰期等。但迄今为止只有 13 种肿瘤治疗的抗体药物获准上市^[1]。这也再次说明确定一个靶点并通过该靶点抗原的表达水平来调控影响肿瘤增长的困难性，以及单克隆抗体药物单独给药时其临床疗效的局限性。而利用毒素、细胞毒素药物以及放射性核素改造修饰的抗体或抗体片段，已被公认为是一种既能高效杀伤靶细胞，又能实现对正常细胞和组织具有较低毒副作用的有效方法。已有部分诸如此类的抗体上市，如通过基因工程手段将人白细胞介素-2(可与白细胞介素-2 受体结合)和白喉毒素融合而成的地尼白介素(Ontak[®])，其适应证为顽固性或易复发的表皮 T 细胞淋巴瘤的治疗。替伊莫单抗(Zevalin[®])和¹³¹I-托西莫单抗(Bexxar[®])是两种分别与⁹⁰Y和¹³¹I偶联的鼠源抗 CD20 单克隆抗体，用于难治/复发性的滤泡性淋巴瘤治疗，而维布妥昔单抗(Adcetris[®])则是在抗 CD30 单克隆抗体上偶联了高效的微管抑制剂，用于治疗霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。

针对改造抗体提升其疗效的思路并不是近年才兴起的，早在 20 世纪 70 年代，科研文献里就已出现 ADC 药物于动物模型中研究的报道。虽然基于鼠源 IgG 研发的 ADC 药物临床疗效不尽如人意，但自 80 年代起，已经有 ADC 药物获准进入临床试验研究。直到 2000 年，第一个 ADC 药物，即一种将抗 CD33 单克隆抗体与卡奇霉素(强效 DNA 结合毒素)偶联的新型药物——吉姆单抗/奥佐米星(Mylotarg[®])，因其可显著降低患者髓细胞恶性增殖而获得美国 FDA 批准，主要用于急性髓性白血病的治疗^[2, 3]。然而经该 ADC 药物上市许可后的研究(SWOG S0106)数据证实，其存在严重的安全隐患，并且无法证实患者的临床获益性^[4]，因此 2010 年该产品即被开发其的辉瑞公司撤市。

本章将专注于现阶段正在进行临床研究的 ADC 药物(表 1-1)。第一部分我们将为读者介绍来自第一代 ADC 药物研发的总结经验，以及在 ADC 药物设计研发过程中应用的各种改良技术，这些经验和对正处于不同临床研究阶段的新型 ADC 药物的研发会有良好的指导作用。第二部分将介绍至今最为成功的 ADC 药物——Adcetris 的临床研究。第三部分则从现有临床前和临床研究中，在对已获得 ADC 药物的安全性和有效性关键参数的充分理解的基础上，对 ADC 药物探索和研发的进展予以综述。如今越来越多的 ADC 药物获准进入临床研究，不断彰显着临床医生和制药公司对 ADC 药物疗效的关注及信心，ADC 势必会为癌症患者带来更多的福音。