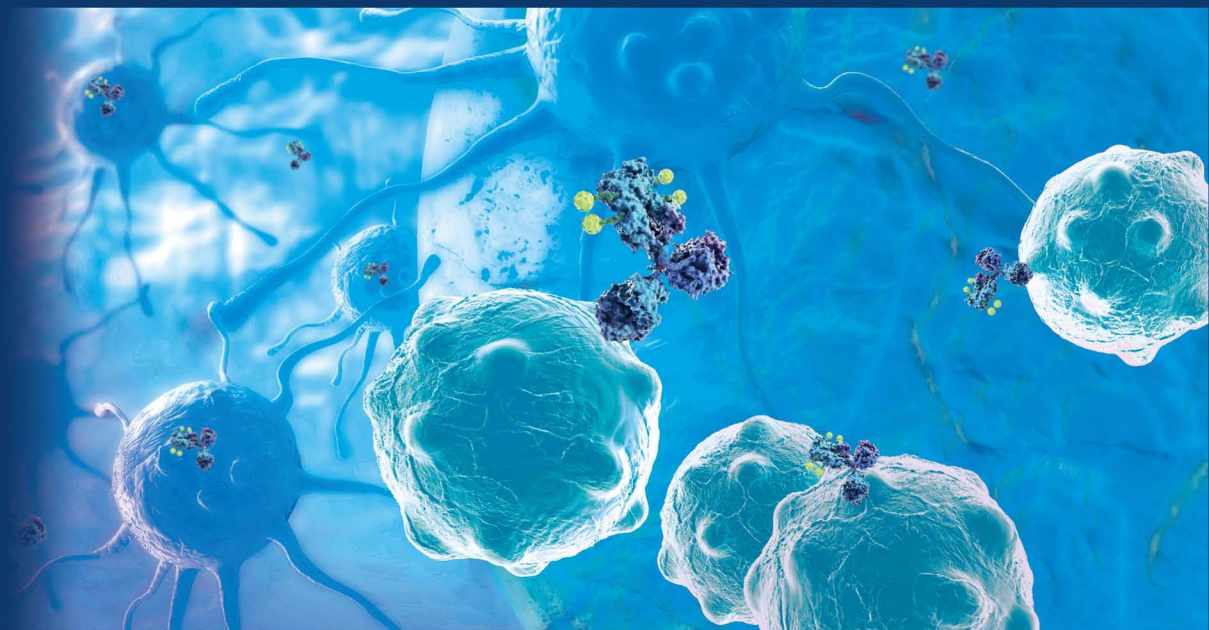




浙江大学重大项目学术研究成果出版工程



Antibody-Drug Conjugates  
and Cellular Metabolic Dynamics

# 抗体偶联药物 及其细胞代谢动力学

陈枢青 詹金彪 编著

 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

# 抗体偶联药物及其细胞代谢动力学

陈枢青 詹金彪 编著

## 图书在版编目(CIP)数据

抗体偶联药物及其细胞代谢动力学 / 陈枢青, 詹金彪编著. — 杭州: 浙江大学出版社, 2019. 11  
ISBN 978-7-308-19728-1

I. ①抗… II. ①陈…②詹… III. ①药物代谢动力学—研究 IV. ①R969.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第256519号

## 抗体偶联药物及其细胞代谢动力学

陈枢青 詹金彪 编著

---

策划编辑 徐有智 许佳颖  
责任编辑 潘晶晶  
责任校对 殷晓彤  
封面设计 周 灵  
出版发行 浙江大学出版社  
(杭州市天目山路148号 邮政编码310007)  
(网址: <http://www.zjupress.com>)  
排 版 杭州兴邦电子印务有限公司  
印 刷 浙江海虹彩色印务有限公司  
开 本 710mm×1000mm 1/16  
印 张 10.5  
字 数 160千  
版 次 2019年11月第1版 2019年11月第1次印刷  
书 号 ISBN 978-7-308-19728-1  
定 价 108.00元

---

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社市场运营中心电话(0571)88925591; <http://zjdxcs.tmall.com>

## 前 言

在世界范围内，癌症是发病和死亡的主要原因。据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）统计报道，2015年全球5640万例死亡中，就有880万例死于癌症，即近1/6的死亡由癌症造成。在发达国家，民众生活水平较高，卫生条件较优，医疗技术先进，死于其他疾病的人数逐年减少，突出表现为癌症发病率和死亡率均提高，说明在众多影响民众寿命的疾病中，癌症是最难治的疾病，是对现代医学的挑战。

临床常用的肿瘤治疗方法主要是手术、放疗和化疗，副作用很大，一般患者在开始治疗以后生活质量便急剧下降。分子靶向药物的毒性比一般的化疗药物要轻一些，即时疗效也不错。但是一般3~6个月，肿瘤细胞就会对药物产生耐药性，从而很快进展。治疗肿瘤的抗体类药物也已经有批上市，可供临床医生选择，但是，其总体作用还是过于温和。科学家很早就提出把毒性较大的化疗药物和作用温和而靶向性强的抗体药物偶联起来，组成一个药物用于治疗肿瘤的想法。这种药物被称为抗体偶联药物（antibody-drug conjugates, ADC），其既有强大的细胞毒性，又有精准的肿瘤细胞靶向作用，是理论上毒副作用最小、药效最高的一种药物形式。

ADC的概念最早始于1913年Paul Ehrlich（保罗·埃尔利希）提出的“magic bullet（魔弹）”设想：利用具有疾病机体特异性靶向的化合物做载体，将毒素带入病灶，从而只在靶组织部位发挥作用。受限于落后的单克隆抗体（单抗）制备技术，早期的ADC研究使用的是多克隆抗体，因而发展十分缓慢。1975年，Kohler（科勒）和Milstein（米尔斯坦）开创了杂交瘤

技术，利用杂交瘤细胞制备鼠源单抗，使得单抗在短时间内可以大量制备，从而使ADC的研究取得了划时代的进展。20世纪80年代后期，新兴的分子生物学迅速发展，人们可以对免疫球蛋白（immunoglobulin, Ig）分子进行重组表达，实现了对天然抗体分子的人为改造，加速了抗体及ADC的发展。纵观ADC发展史，经历了三代技术变革。第一代ADC的毒性分子部分采用传统的化疗药物，由于小分子毒性不够强，或者ADC不够稳定而引起全身性毒素释放（毒副作用太大），大多以失败告终。第二代ADC采用毒性更强的小分子（如作用于微管蛋白的海兔毒素类、美登素类和作用于DNA的卡奇霉素类），克服了第一代ADC的弱点，且有两个ADC获得美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准上市。但是第二代ADC采取传统化学偶联技术，通过抗体赖氨酸或者链间二硫键与小分子偶联，其药物抗体偶联比（drug-antibody ratio, DAR）均一性差（0~8个，甚至更高），带来药物体内分布、代谢和排泄的复杂性问题。且第二代ADC偶联的接头稳定性不佳，容易在血液中裂解，造成严重的毒副作用。因此，第三代ADC应运而生，定点偶联技术获得前所未有的发展。先是抗体定点突变引入游离半胱氨酸偶联位点的ThioMab技术，而后是在此基础上改进的ThioBridge桥接技术（甚至可以实现偶联产物DAR的100%均一）。而生物正交化学偶联技术通过引入琥珀酸终止密码子，在抗体序列中插入非天然氨基酸，再与点击化学等技术连用来实现快速的定点偶联。此外，利用分选酶A（sortase A, SrtA）、糖基转移酶、谷氨酰胺转移酶等的酶促偶联方法也逐渐发展起来。为了进一步拓宽ADC的适用范围，PBD（pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯二氮草类）、SN-38（7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, 7-乙基-10-羟基喜树碱）、 $\alpha$ -鹅膏菌素（ $\alpha$ -amanitin）等一些毒性小分子也被尝试用于偶联抗体。

ADC研发技术正逐渐发展和成熟。2000年，美国FDA批准了首个ADC上市，其为Pfizer（辉瑞）公司的Mylotarg<sup>®</sup>（gemtuzumab ozogamicin）。该药物靶向抗原CD33，用于治疗急性髓细胞性白血病（acute myeloid leukemia, AML），于2010年6月由于临床显示疗效不佳且反而增加了患者死亡率而被撤市。后来对CD33研究发现，其2号外显子的单核苷酸突变

rs12459419 (C > T; Ala14Val) 造成截短的剪切变体缺少 CD33 抗体 hP67.6 识别的表位, 即 IgV 结构域, 使得 Mylotarg<sup>®</sup> 的抗体部分无法识别 CD33 抗原而失效。降低剂量, 更改适应证后, Mylotarg<sup>®</sup> 于 2017 年 9 月再度获得 FDA 批准上市。其间, Seattle Genetics (西雅图遗传学) 公司的 Adcetris<sup>®</sup> (brentuximab vedotin, 抗原为 CD30)、罗氏 (Roche) 旗下 Genentech 公司的 Kadcyla<sup>®</sup> (ado-trastuzumab emtansine, T-DM1; 抗原为 HER2) 和辉瑞的 Besponsa<sup>®</sup> (inotuzumab ozogamicin, 抗原为 CD22) 分别于 2011 年、2013 年和 2017 年上市。Kadcyla<sup>®</sup> 对曲妥珠单抗 (trastuzumab) 不敏感的 HER2 阳性的乳腺癌患者也有疗效, 且降低了不良反应, 上市以来销量持续增长, 2018 年年销售额达到 10 亿美元。Kadcyla<sup>®</sup> 的成功将 ADC 研究推向高潮, 制药界对于 ADC 的开发热情持续高涨。2018 年 9 月, 美国 FDA 批准了 AstraZeneca (阿斯利康) 公司靶向 CD22、治疗毛细胞白血病的 Lumoxiti<sup>®</sup> (moxetumomab pasudotox-tdfk); 2019 年 6 月, 美国 FDA 又批准了 Genentech 公司靶向 CD79b、治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的 Polivy<sup>®</sup> (polatuzumab vedotin-piiq)。截至 2019 年 10 月, 全球已有 200 多个 ADC 新药进入临床试验。

抗体偶联药物由抗体、接头和效应分子 3 部分组成。每个部分的选择以及各个部分的组合形式都能影响 ADC 最终的成药, 再加上人体内环境的复杂性, 使得 ADC 的成药性面临着严峻的挑战。ADC 的理性设计是否有规律可循, 什么是影响 ADC 成药性的关键性问题, 如何评价这些关键问题对 ADC 成药性的影响, 这些都成了 ADC 研究和产业化过程亟须解决的问题。

浙江大学药学院精准医学与生物技术药物研究室是我国最早进入抗体偶联药物研究领域的实验室之一, 不仅探索了定点偶联技术、酶促偶联技术, 还进行了新型 ADC 靶点研究、非抗体类靶向分子偶联物研究, 最早提出了 XDC (X-drug conjugates) 的概念, 设计的新型抗体偶联药物已经转让给制药企业进行后续开发。2014 年, 研究团队得到了国家自然科学基金重点项目“抗体偶联药物细胞代谢动力学对药效学的作用机理研究 (No. 81430081)”资助, 进行新型抗体偶联药物设计中的有关细胞药物代谢动

力学研究，以评估各有关因素对新型抗体偶联药物成药性的影响，从而提高抗体偶联药物设计的成功率。承担这个项目以来，课题组对多个因素进行了探索，并获得了不少研究成果。基于已有的项目研究成果和国内外发表的相关学术论文，我们编写了本书来综述这个领域的研究成果，为抗体偶联药物领域的研究者提供参考。

感谢国家自然科学基金委员会对项目（No. 81430081；No. 81872784）的支持！感谢浙江大学出版社樊晓燕老师、许佳颖老师和潘晶晶老师的帮助和鼓励！感谢实验室课题组全体成员几年来的努力付出，以及詹金彪、梁可莹、M. Saleem（M. 萨利姆）、M. Kalim（M. 卡利姆）、来骏、韦小越、赵文彬、刘文慧、樊建声、仇驰道、白雪飞、张颖、沈莹等在本书编写过程中付出的努力！

陈枢青  
2019年10月

# 目 录

第1章 抗体偶联药物的基本概念和结构	1
1.1 基本概念	1
1.2 用于ADC合成的抗体	4
1.3 接头	6
1.4 效应分子	7
1.5 挑战和展望	10
第2章 抗体偶联药物的靶点与其特异性作用的关系	13
2.1 引言	13
2.2 肿瘤相关性抗原	14
2.3 肿瘤特异性抗原	15
2.4 小结	22
第3章 抗体偶联药物的内吞与活性的关系	27
3.1 引言	27
3.2 评价内吞的实验步骤	28
3.3 提高内吞效率的方法	30
3.4 小结	35

第4章 抗体偶联药物的内吞和细胞内的转运过程	39
4.1 引言	39
4.2 ADC内吞途径	40
4.3 内吞后囊泡转运途径	43
4.4 ADC降解后的药物释放	44
4.5 ADC细胞内转运定位的研究方法	45
4.6 小结	47
第5章 抗体偶联药物的体内分布和代谢	51
5.1 引言	51
5.2 ADC在细胞内发挥作用的机制	52
5.3 ADC体内分布和胞内代谢的实验步骤	55
5.4 小结	58
第6章 小型化抗体在抗体偶联药物中的应用	63
6.1 引言	63
6.2 小型化抗体偶联物的研究	64
6.3 小型化抗体的研究进展	73
6.4 小结	76
第7章 抗体偶联药物新型载体的研究	79
7.1 引言	79
7.2 TRAIL作为偶联物载体的可行性研究	80
7.3 其他新型载体的研究进展	89
7.4 小结	93

第8章 定点偶联技术及应用	97
8.1 引言	97
8.2 突变半胱氨酸定点偶联	102
8.3 Sortase A定点偶联	105
8.4 质谱鉴定偶联位点	108
8.5 小结	110
第9章 抗体偶联药物的药物抗体偶联比测定方法	115
9.1 引言	115
9.2 RP-HPLC和HIC测定DAR的实验步骤	116
9.3 LC-MS测定DAR的实验步骤	120
9.4 小结	130
第10章 抗体偶联药物的药物代谢动力学研究	133
10.1 引言	133
10.2 ELISA方法在ADC药物代谢动力学研究中的应用	143
10.3 流式细胞技术在ADC药物代谢动力学研究中的应用	147
10.4 小结	152
索 引	155

# 第1章 抗体偶联药物的基本概念和结构

## 1.1 基本概念

100多年前，德国科学家Paul Ehrlich提出“魔弹(magic bullet)”设想——用抗体来递送药物。随着生物技术的进步，他的设想变为了现实，抗体药物靶向治疗已经成为全球临床肿瘤治疗的热点。除了传统的人源化单克隆抗体以外，近年来，通过基因工程和化学合成技术的完美结合，各种新形式的抗体药物不断涌现。其中，抗体与细胞毒性药物的结合物，被称为抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)，作为一种高效的抗体药物而倍受关注。

广义的ADC通常由抗体、接头(linker)和效应分子3部分组成。根据效应分子的不同，可将ADC分为化学偶联物(效应分子为小分子细胞毒素)、免疫毒素(效应分子为蛋白类毒素)、放射性免疫偶联物(效应分子为放射性同位素)等3类。狭义的ADC，是指化学偶联物，即单克隆抗体-小分子细胞毒素的偶联物，本书中如果没有特别说明，指的都是这类ADC。与化疗药物和传统的单克隆抗体相较而言，ADC的优势在于：ADC的组成决定了其既具有单克隆抗体的靶向性，又具有小分子细胞毒性药物的特质。ADC对肿瘤细胞的杀伤能力大部分取决于其在细胞中的内吞效率以及释放的小分子药物对细胞的毒性。ADC被内吞进入细胞后，主要通过溶酶体(lysosome)降解，释放出细胞毒性物质，后者通过解聚微管蛋白或者断裂双链DNA等作用，而对靶细胞产生杀伤作用。

从2000年FDA批准首个ADC上市起，至2019年已经有6种ADC被批准上市，200多项ADC的临床试验正在进行中([www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov))，

其中至少有20种ADC已经处于II~III期临床试验<sup>[1-3]</sup>，这些ADC大概各有一半针对血液肿瘤和实体肿瘤，见表1.1、表1.2。

表 1.1 FDA 批准上市的 ADC 药物

公司	ADC	靶抗原	毒素	适应证	批准日期
Seattle Genetics	Adcetris® (brentuximab vedotin)	CD30	MMAE	毛细胞白血病和系统型间变性大细胞淋巴瘤	2011年8月FDA加速批准，2015年8月完全批准
Genentech/Roche	Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansine, T-DM1)	HER2 (ErbB2)	DM1	HER2阳性乳腺癌	2013年2月FDA完全批准
Wyeth/Pfizer	Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin)	CD33	刺孢霉素	急性髓细胞性白血病	2000年5月由FDA加速批准，2010年撤回，2017年重新申请批准
Pfizer	Besponsa® (inotuzumab ozogamicin)	CD22	刺孢霉素	B细胞型急性淋巴性白血病和其他B细胞型血液病	2017年8月FDA完全批准
AstraZeneca	Lumoxiti® (moxetumomab pasudotox-tdfk)	CD22	截短型PE38	毛细胞白血病	2018年9月FDA完全批准
Genentech/Roche	Polivy® (polatuzumab vedotin-piiq)	CD79b	MMAE	弥漫性大B细胞淋巴瘤	2019年6月FDA完全批准

注：CD为分化抗原簇（cluster of differentiation），MMAE为单甲基澳瑞他汀E（monomethyl auristatin E），DM1为美登素衍生物1（methylmaytansine 1），HER2为人类表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2）。

表 1.2 处于 II ~ III 期临床试验的 ADC 药物

公司	ADC	靶抗原	毒素	适应证	临床试验阶段	临床试验编号
Immunomedics	Labetuzumab govitecan	CEACAM5	SN-38	转移性结直肠癌	II期	NCT01605318
GlaxoSmithKline/Iqvia Pty	Belantamab mafodotin	BCMA	MMAF	多发性骨髓瘤	II期	NCT03544281
Progenics Pharmaceuticals	PSMA-ADC	PSMA	MMAE	前列腺癌	II期	NCT01695044, NCT02020135
Children's Oncology Group/National Cancer Institute	Lorvotuzumab mertansine	CD56	DM1	胸膜肺母细胞瘤、复发性恶性周围神经鞘膜瘤、复发性神经母细胞瘤、复发性横纹肌肉瘤、复发性滑膜肉瘤、儿童肾母细胞瘤	II期	NCT02452554

续表

公司	ADC	靶抗原	毒素	适应证	临床试验阶段	临床试验编号
Biotest Pharmaceuticals	Indatuximab ravtansine	CD138	DM4	多发性骨髓瘤	II期	NCT01638936
Seattle Genetics	Denintuzumab mafodotin	CD19	MMAF	B细胞淋巴瘤	II期	NCT02592876
ImmunoGen	Coltuximab ravtansine	CD19	DM4	弥漫性大B细胞淋巴瘤	II期	NCT01534715
ImmunoGen	Naratuximab emtansine	CD37	DM1	非霍奇金淋巴瘤	II期	NCT01638936
Sanofi	SAR408701	CEACAM5	DM4	实体瘤	II期	NCT02575781
Sanofi	SAR428926	LAMP1	DM4	实体瘤	II期	NCT02561962
Bayer	Anetumab ravtansine	间皮素	DM4	间皮瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌	II期	NCT02610140, NCT03023722, NCT03455556
Celldex Therapeutics	Glembatumumab vedotin	素瘤蛋白B	MMAE	素瘤蛋白B高表达的三阴性乳腺癌	II期	NCT01997333
Sanofi	SAR566658	CA6	DM4	三阴性乳腺癌	II期	NCT02984683
Astellas Pharma	AGS-16C3F	磷酸二酯酶3	MMAF	转移性肾细胞癌	II期	NCT02639182
Daiichi Sankyo/AstraZeneca UK	Trastuzumab deruxtecan	HER2	拓扑异构酶I抑制剂 (deruxtecan)	HER2阳性乳腺癌	III期	NCT03734029
Synthon Biopharmaceuticals	Trastuzumab duocarmazine	HER2	duocarmazine	HER2阳性转移性乳腺癌	III期	NCT03262935
Astellas Pharma/Seattle Genetics	Enfortumab vedotin	结合素-4	MMAE	输尿管癌、尿路上皮癌、膀胱癌	III期	NCT03474107
AbbVie/Radiation Therapy Oncology Group	Depatuxizumab mafodotin	EGFRv III	MMAF	恶性胶质瘤、胶质肉瘤	III期	NCT02573324
Immunomedics	Sacituzumab govitecan	Trop-2	SN-38	三阴性乳腺癌、尿道上皮肿瘤	III期	NCT02574455
ImmunoGen/Merck Sharp & Dohme Corp	Mirvetuximab soravtansine	叶酸受体 $\alpha$ (FolRa)	DM4	子宫内膜癌	III期	NCT02631876
AbbVie	Rovalpituzumab tesirine (Rova-T)	DLL3	PBD二聚物	小细胞肺癌	III期	NCT03033511, NCT03061812

注：CEACAM5为癌胚抗原相关细胞黏附分子5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5)，BCMA为B细胞成熟抗原 (B-cell maturation antigen)，MMAF为单甲基澳瑞他汀F (monomethyl auristatin F)，PSMA为前列腺特异性膜抗原 (prostate specific membrane antigen)，DM4为美登素衍生物4 (methylmaytansine 4)，LAMP1为溶酶体相关膜蛋白1 (lysosome-associated membrane protein 1)，CA6为碳酸酐酶6 (carbonic anhydrase 6)，EGFR为表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)，DLL3为 $\delta$ 样蛋白3 (delta-like protein 3)。

## 1.2 用于ADC合成的抗体

抗体是ADC的制导部件，它可以将细胞毒素弹头带到肿瘤细胞表面。理论上，能起靶向运输作用的其他分子也可以扮演抗体的角色，如配体分子TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体)可以携带毒素分子MMAE, 通过与肿瘤细胞表面的死亡受体4(death receptor 4, DR4)/死亡受体5(death receptor 5, DR5)结合而呈现抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>, 相关内容见本书第7章。

抗体的选择取决于疾病的靶标。原则上, 任何在肿瘤细胞表面表达的抗原, 包括多肽、蛋白质、糖类、脂类等都可以成为ADC的靶标。理想的靶标是指那些仅在肿瘤细胞表面表达, 而在正常细胞表面不表达的抗原。一般来说, 在正常的组织中不表达或低表达的肿瘤特异性抗原或肿瘤相关性抗原, 可以作为合适的候选靶抗原。例如, 表达在恶性肿瘤细胞上的分化抗原或者受体可作为抗体治疗的靶标。白细胞分化抗原, 即分化抗原簇(CD)分子, 在过去的5年中已经成为血液肿瘤治疗的重要靶抗原<sup>[2, 3, 5]</sup>, 常用的靶抗原有CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD37、CD70、CD79、CD203、CD138等, 见表1.1—1.3。

表1.3 其他用于血液肿瘤治疗的CD分子

靶抗原	ADC名称	细胞毒素	适应证	临床试验阶段(试验号)
CD56	Lorvotuzumab mertansine	DM1	Wilms瘤(肾母细胞瘤)、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤和其他CD56阳性肿瘤	II期 (NCT02452554)
CD70	SGN-75	MMAF	肾细胞癌、非霍奇金淋巴瘤	I期 (NCT0101591)
	MDX-1203	DNA alkylating cytotoxic drug A		I期 (NCT00944905)
CD74	HLL1-DOX	doxorubicin	多发性骨髓瘤	I、II期 (NCT01101594)
CD138	BT-062	DM4	多发性骨髓瘤	I、II期 (NCT01638936)

在实体瘤治疗方面, 常用的靶抗原包括: ①各种生长因子受体和蛋白质类抗原, 如表皮生长因子受体(EGFR)、人类表皮生长因子受体2(HER2)、

滋养层细胞表面抗原2(trophoblast cell-surface antigen 2, Trop-2)、间皮素(mesothelin)、叶酸受体(folate receptor 1, FolR1)、PSMA、DLL3、非转移性黑色素瘤糖蛋白B(glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, gpNMB)、CA6等<sup>[1]</sup>。ADC通过与这类抗原结合抑制肿瘤细胞的生长和诱导细胞凋亡。T-DM1是第一个成功的ADC, 采用HER2作为靶标。ADC中的单抗成分抢先与HER2结合, 可阻止HER2与相应的生长因子结合, 从而抑制乳腺肿瘤细胞的增殖; 同时, 内吞的毒素分子在溶酶体中释放, 加速了肿瘤细胞的死亡<sup>[6]</sup>。T-DM1在HER2阳性乳腺癌和胃癌治疗上取得成功。正在开发的针对其他实体瘤的靶点很多, 已经进入III期临床试验的有EGFR、Trop-2、DLL3和FolR1(见表1.2)。②针对肿瘤新生血管内皮生长因子, 包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管内皮生长因子受体(VEGF receptor, VEGFR)、endoglin等。Endoglin是一种内皮因子, 参与调节转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号传导的跨膜蛋白。以endoglin为靶点的ADC, 对胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme)的效用正在研究中<sup>[7]</sup>。

完整的抗体相对分子质量较大(如IgG, 相对分子质量为150 kDa)。尽管完整的抗体有体内半衰期较长的优势, 但小分子抗体片段可能更容易透过实体肿瘤。目前, 抗体片段如单链抗体片段(single-chain antibody fragment/single-chain variable fragment, scFv)、抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)、F(ab)<sup>2</sup>、微抗体(minibody)、纳米抗体(nanobody)、微型双功能抗体(diabody)等, 在ADC设计中也得到了广泛的应用。

抗体和靶标的选择对于ADC的成功起着关键的作用<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞表面靶抗原的表达数量、抗原分子的内吞能力、抗体与抗原的结合力、复合物的内吞效率以及抗原分子循环等因素都会影响到ADC的活性。合成ADC的理想抗体或抗体片段能高效识别并结合绝大部分肿瘤表面的靶抗原, 并能有效地被肿瘤细胞内吞, 进而转运到溶酶体降解并释放出细胞毒素, 从而摧毁肿瘤细胞。释放出的毒素分子还可以通过旁观者效应(bystander effect)进一步扩大对肿瘤细胞的杀伤范围<sup>[8]</sup>。

### 1.3 接头

接头 (linker) 是ADC结构中的关键成分之一, 它需要满足以下两个条件: ①保持药物在血液循环中的稳定性, 以避免药物脱落而对正常组织产生伤害; ②到达肿瘤组织后, 在靶细胞中必须使药物有效释放, 产生抗肿瘤活性<sup>[9]</sup>。实际上, 根据抗体和毒素分子的差异, 需要设计不同的接头。有时候相同的接头在不同的ADC中会呈现不同的性能。

经过20多年的实践和改进, 抗体与毒素分子的连接技术已经日趋完善。根据稳定性的差异, 可以将接头分为两类: 可裂解型接头和不可裂解型接头<sup>[9, 10]</sup>。可裂解型接头又包括化学裂解型接头和酶催化裂解型接头两种。化学裂解型接头又可以分为酸不稳定性腙键 (hydrazone) 接头和二硫键接头。酶催化裂解型接头主要是指肽链接头和葡萄糖醛酸接头。不可裂解型接头则以硫醚键接头为代表。

腙键接头: 主要是利用正常组织与肿瘤组织 (弱酸性) 代谢的不同, 以及血液、细胞器中pH的差异而设计的。腙键接头在循环系统中并不稳定, 经过24 h, 有5%~6%的细胞毒素脱落, 但大部分仍集结在肿瘤部位, 在肿瘤细胞的溶酶体 (pH 5.0) 中释放。

二硫键接头: ADC常用的接头, 是根据二硫键能在细胞内的还原性环境中被分解, 而在循环系统中保持稳定的特征设计的。目前, 二硫键接头常用于定点偶联的ADC的合成, 通过基因工程的方法在L链 (light chain, 轻链) 或者H链 (heavy chain, 重链) 的特定位置引入Cys (半胱氨酸, cysteine), 然后利用Cys上的巯基进行合成反应。常在二硫键接头的一端引入1~2个甲基修饰, 以提高其在血液循环体系中的稳定性。在细胞内, 尤其在相对缺氧的肿瘤细胞内, 还原性谷胱甘肽的浓度非常高, 以致ADC中的二硫键能顺利裂解并释放出细胞毒素。

肽接头: 在血清中有较好的稳定性, 因为血清中存在蛋白酶抑制剂, 并且不合适的pH使蛋白酶难以发挥分解作用。在细胞内, 特别是在肿瘤细胞内的溶酶体中, 存在高活性蛋白酶 (cathepsin), 可以分解特定的二肽键, 常见的是含有缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit, VC) 的二肽接头 (由Seattle

Genetics 公司开发的专利技术，为广泛应用的接头之一)。另外，近年来也有研究者在用分选酶A (sortase A, SrtA) 进行定点连接时，用LPETG 五肽序列作为特异的接头<sup>[11]</sup>。我们实验室也进行了这方面的研究。

**葡萄糖醛酸接头：**葡萄糖醛酸接头的作用原理与二肽接头相似，ADC 中的葡萄糖醛酸基团在肿瘤细胞内被葡萄糖醛酸酶水解，释放出细胞毒素。这类接头亲水性强，可以降低ADC 的分子聚合性，提高ADC 在循环系统中的稳定性。

**硫醚键接头：**属于不可裂解型接头，稳定性非常高，这类接头只能通过单抗的多肽链在溶酶体中的完全降解而断裂。在肿瘤细胞内，ADC 的抗体部分在溶酶体内可以被完全降解，释放出带有Lys (赖氨酸, lysine) 的毒素分子 (Lys-毒素复合物，具有游离毒素分子相似的活性)。这类接头被成功用于T-DM1 的合成，显示出较高的稳定性和疗效。

**双功能接头：**上述接头不仅可以单独使用，还可以联合使用。目前，常用的双功能交联剂包括3-(2-吡啶二巯基) 丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 [*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP；二硫键接头]、琥珀酰亚胺-4-(*N*-马来酰亚胺) 环己烷-1-羧酸酯 [succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, SMCC；硫醚键接头] 等，通常在抗体多肽链的Lys 残基和Cys 残基上进行连接，有时加上间隔分子 (spacer) 以保证抗体的活性并提高效应分子的释放效率，呈现更好的治疗效果<sup>[9, 10]</sup>。

近年来，也有通过在抗体多肽链中引入非天然氨基酸，再进行定点偶联合成ADC 的报道<sup>[12]</sup>。总之，通过选择合适的接头，在抗体多肽链的适当位点偶联适当个数的毒素分子，进行合成工艺路线的设计和摸索，是提高ADC 疗效的关键。

## 1.4 效应分子

理论上，对细胞具有较大杀伤作用的毒性物质（如化学药物、毒素、放射性同位素等）都可以作为ADC 的效应分子。但实际上，由于通过循环