



抗体偶联药物的技术现状和展望

刘文超 李鸿峰 胡朝红*

(上海美雅珂生物技术有限公司, 上海 201203)

摘要 抗体偶联药物 (antibody drug conjugate, ADC) 通常由抗体通过链接体与毒素小分子偶联而成, 同时具备抗体的高靶向性和小分子药物的高活性, 使之作为一种新兴的靶向治疗手段, 在肿瘤治疗领域展现出了优秀的疗效和潜力, 成为药物研发领域的新热点。目前全球已有 14 款 ADC 药物获批上市, 处于临床研究阶段的 ADC 候选药物分子超过 140 个。为了进一步提高 ADC 药物的安全性和有效性, 近年来涌现出了各种新颖的技术。本文对 ADC 药物分子的关键元素, 包括抗体、链接体、毒素小分子以及偶联技术等方面的最新研究进展进行总结, 并讨论其优缺点。期望这些讨论能够帮助增加对 ADC 药物研究和开发更加系统的理解, 为研发出更加高效和安全的 ADC 药物带来一些思考。

关键词 抗体偶联药物, 抗体, 链接体, 毒素小分子, 偶联技术

中图分类号 Q5, R9, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0141

抗体偶联药物 (antibody drug conjugate, ADC) 作为一类新兴的大分子靶向药物, 目前主要用于治疗各种肿瘤。ADC 药物由靶向肿瘤细胞过度表达的表面受体的抗体、高活性的细胞毒素小分子和链接体 3 个部分组成。其中, 抗体部分负责将 ADC 药物分子精准运送至靶细胞表面, 链接体负责在靶细胞内或表面释放毒素小分子, 而高活性的细胞毒素小分子则高效地杀伤肿瘤细胞, 因此 ADC 也被通俗地称为“生物导弹”或者“魔法子弹”^[1]。

魔法子弹这一概念是由诺贝尔奖获得者德国科学家 Paul Ehrlich 在 20 世纪初提出的, 特指一类能靶向结合目标病灶进而治愈疾病的一类分子^[2]。而将这一概念实物化为抗体加上毒素小分子这一药物分子形式的时间则是在 1957 年, Mathé 等^[3]将化疗药物甲氨蝶呤通过重氮偶合反应偶联至抗 L1210 白血病细胞的免疫球蛋白上, 该偶联物展现了针对靶细胞 L1210 的细胞增殖抑制作用, 而偶联至常规 β 球蛋白的偶联物则无作用。又经过十多年的发展, 在 1970 年代中期, 有多个利用动物源免疫球蛋白制备的 ADC 在临床试验中展现出了确定的疗效^[4-5]。到 1980 年代, 单克隆抗体开发技术和重组蛋白生产技术的进步^[6-9]、多种肿瘤标志物的

确证^[10-11], 以及对靶点抗原-抗体介导的细胞内吞机制的阐明, 同时在靶点、抗体以及链接体等多个方面给 ADC 药物的技术发展带来了巨大推动力^[12-15], 进而在 1990 年代吸引了药物研发和生物科技公司加大投入 ADC 药物的开发, 并于 2000 年迎来第一个 ADC 药物 Mylotarg[®] 的获批上市^[16]。Mylotarg[®] 是 CD33 靶向的 ADC 用于治疗急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML)。又过去了十多年后, 用于治疗霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin lymphoma, HL) 和间变性大细胞淋巴瘤 (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) 的 CD30 靶向的 Adcetris[®] 在 2011 年获批上市, 用于治疗晚期转移性乳腺癌的 HER2 靶向的 Kadcyla[®] 于 2013 年获批上市。这两款 ADC 药物在晚期肿瘤患者中的显著疗效和良好的安全性, 使得 ADC 药物正式作为一类新型的治疗手段得到肿瘤患者、肿瘤医疗界和生物制药工业界的广泛认可, 迅速成为了全球生物医药学术界以及工业界的热点领域之一, 更值得一提的是日本第一三共公司开发的 HER2 靶向的 ADC 药物 Enhertu[®] 在 2019 年首次获批上市, 其具

* 通讯联系人。

Tel: 021-61637960, E-mail: mary_hu@miracogen.com.cn

收稿日期: 2023-04-11, 接受日期: 2023-04-24

有划时代的意义, 不仅针对HER2高表达的肿瘤有显著疗效, 而且在HER2低表达晚期乳腺癌患者中也表现了明显疗效。截至2023年3月全球已有14款ADC药物获批上市(表1), 其中9款是在近4年

内获批的, 2022年ADC药物全球销售额达到67.8亿美元, 处于临床研究阶段的ADC药物分子则超过140个, 而且呈现逐年快速增长的趋势^[17], 有望给肿瘤患者带来更有效的治疗药物。

Table 1 Marketed ADCs globally
表1 全球目前已获批上市ADC药物

商品名	药品通用名	靶标	适应症	抗体	链接体	毒素	开发者	批准时间
Mylotarg®	Gemtuzumab ozogamicin	CD33	AML	人源化IgG4	脲	卡利霉素	辉瑞(惠氏)	2000 ¹⁾ FDA
Adcetris®	Brentuximab vedotin	CD30	HL、sALCL	人鼠嵌合IgG1	缬氨酸-瓜氨酸	MMAE	西雅图遗传	2011 FDA; 2020中国药监局
Kadcyla®	Trastuzumab ado-emtansine	HER2	mBC	人源化IgG1	硫醚	DM1	罗氏/基因泰克	2013 FDA; 2020中国药监局
Besponsa®	Inotuzumab ozogamicin	CD22	ALL	人源化IgG4	脲	卡利霉素	辉瑞	2017 EMA&FDA; 2021中国药监局
Lumoxiti®	Moxetumomab pasudotox	CD22	R/R HCL	鼠源免疫球蛋白可变区	融合蛋白	假单胞菌外毒素A	阿斯利康	2018 FDA
Polivy®	Polatuzumab vedotin	CD79b	DLBCL	人源化IgG1	缬氨酸-瓜氨酸	MMAE	罗氏/基因泰克	2019 FDA
Padcev®	Enfortumab vedotin	Nectin-4	mUC	人源化IgG1	缬氨酸-瓜氨酸	MMAE	安斯泰来/西雅图遗传	2019 FDA
Enhertu®	Trastuzumab deruxtecan	HER2	mBC	人源化IgG1	四肽	Dxd	第一三共/阿斯利康	2019 FDA; 2023中国药监局
Trodelvy®	Sacituzumab govitecan	Trop-2	mTNBC	人源化IgG1	碳酸酯	SN-38	Immunomedics	2020 FDA; 2022中国药监局
Blenrep®	Belantamab mafodotin	BCMA	R/R MM	人源化IgG1	马来酰亚胺基己酰	MMAF	葛兰素史克	2020 ²⁾ FDA
Zynlonta®	loncastuximab tesirine	CD19	R/R LBCL	人源化IgG1	缬氨酸-丙氨酸	PBD二聚体	ADC Therapeutics	2021 FDA
爱地希®	Disitamab vedotin	HER2	mGC	人源化IgG1	缬氨酸-瓜氨酸	MMAE	荣昌生物	2021中国药监局
Tivdak®	Tisotumab vedotin	TF	mCC	人源化IgG1	缬氨酸-瓜氨酸	MMAE	西雅图遗传/Genmab	2021 FDA
Elahere™	Mirvetuximab soravtansine	FRα	铂治疗失败OC	人源化IgG1	sulfo-SPDB	DM4	ImmunoGen	2022 FDA

¹⁾ 于2010年主动撤市, 2017年重新获批上市。²⁾ 于2022主动撤市。AML: 间变性髓系白血病(anaplastic myeloid leukemia); HL: 霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma); sALCL: 系统性间变性大细胞淋巴瘤(systemic anaplastic large cell lymphoma); mBC: 转移性乳腺癌(metastatic breast cancer); ALL: 急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia); R/R HCL: 复发/难治性毛细胞白血病(relapsed/refractory hairy cell leukemia); DLBCL: 弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma); mUC: 转移性尿路上皮癌(metastatic urothelial cancer); mTNBC: 转移性三阴性乳腺癌(metastatic triple negative breast cancer); R/R MM: 复发/难治性多发性骨髓瘤(relapsed/refractory multiple myeloma); R/R LBCL: 复发/难治性大B细胞淋巴瘤(relapsed/refractory large B cell lymphoma); mGC: 转移性胃癌(metastatic gastric cancer); mCC: 转移性宫颈癌(metastatic cervical cancer); OC: 卵巢癌(ovarian cancer); PBD: pyrrolbenzodiazepine。

这些ADC药物的成功获批上市, 一方面证明了此类新型药物对于肿瘤治疗的显著疗效和潜力, 另一方面这些药物在临床试验和获批上市后大量病人使用过程中也逐步揭示了现有ADC药物的局限

性, 例如脱靶毒性、复杂的药代动力学特性、靶标组织富集度不足、耐药性、实体瘤穿透力不够等^[18]。为了进一步提高ADC药物的疗效, 降低其毒副作用, 各种新颖的技术和解决方案层出不穷。

本文将从 ADC 的关键组分，包括抗体、链接体、毒素小分子以及偶联技术等方面概述其新近的研究进展，讨论目前 ADC 药物开发所面临的挑战和发展机遇。

经典的 ADC 药物由单克隆抗体、链接体和毒素小分子 3 部分组成（图 1a）。每个组成部分发挥着不同的功能：抗体部分负责将 ADC 分子选择性地递送至肿瘤细胞表面，同时通过靶点介导的内吞作用进入到细胞内；链接体则负责在肿瘤细胞内或

者表面高效释放毒素小分子，而在血液循环系统中保持稳定；毒素小分子则负责高效地杀伤肿瘤细胞，有些小分子还同时具备细胞穿膜渗透性，可以通过扩散效应作用于靶细胞周围的肿瘤细胞，起到“旁杀效应（bystander effect）”^[19]（图 1b）。因此，ADC 药物每个组成部分的特性都对其发挥靶向治疗作用至关重要，同时各个组分的选择也都可能会影响到 ADC 的安全性和有效性。

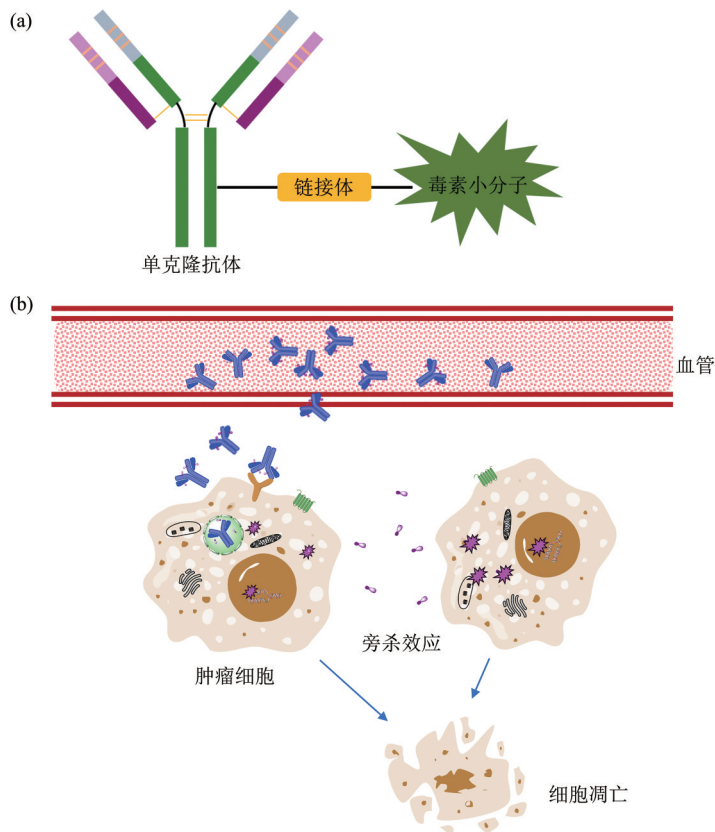


Fig. 1 Structure illustration (a) and mechanism of actions for ADC in killing cancer cells (b)

图1 ADC结构示意图 (a)和ADC杀伤肿瘤细胞的作用机制 (b)

1 抗 体

作为 ADC 药物的主体框架结构和导航系统，理想的抗体组分需具备较低的免疫原性、特异性的靶点结合和高亲和力、较长的半衰期、良好的血液循环系统稳定性以及能介导高效的内吞效应等特性^[20]。抗体是 ADC 分子的主要组成部分，占其分子质量的 80% 以上，ADC 的潜在免疫原性主要来源于抗体。早期的 ADC 药物，由于采用鼠源的抗体，通常会在病人体内引发较强的免疫反应，产生

抗药抗体，进而导致疗效降低和其他副反应^[21]。后来，为了克服免疫原性这一缺点，在单克隆抗体发现技术和基因工程技术进步的加持下，改进和优化出了人鼠嵌合抗体^[22]。人鼠嵌合抗体是由鼠源的抗原结合区（Fab）与人源的恒定区（Fc）嵌合而成^[23]，此种组合大大降低了其免疫原性，采用嵌合抗体的 ADC 也在临床上展现了良好的疗效和耐受性。第二款获批上市的靶向 CD30 的 ADC 药物 Adcetris[®]就是采用人鼠嵌合的抗体，在治疗 霍奇金淋巴瘤（Hodgkin lymphoma）和 ALCL 上展现

了显著的疗效^[24]。然而,也有研究显示在使用嵌合抗体治疗的病人体内,所产生的抗药抗体中的绝大部分是针对其鼠源的Fab区域,这也会影响其疗效^[25]。因此,为了进一步控制和降低免疫原性的风险,人源化抗体应运而生,它仅保留鼠源的抗原抗体结合域(complementarity determining region, CDR),Fc片段及其他框架结构则采用人源的,这样也进一步降低了抗体的免疫原性^[26-27],目前已获得批准上市的14款ADC药物中,有12款采用人源化抗体。最近的一些研究则更进一步,采用全人源抗体替代人源化的抗体开发ADC药物,以期会更进一步降低其免疫原性的风险,目前这一类ADC还处于研究阶段^[28]。

除免疫原性外,抗体的高选择性和特异性也对ADC药物的安全性和有效性至关重要,它使得ADC药物能通过结合靶标而富集在肿瘤组织中,而与正常组织不结合或者较低结合^[20]。抗体的选择性与特异性,与靶点的组织分布息息相关。第一,为了降低靶点相关的毒副作用,ADC药物的理想靶点最好是仅在肿瘤细胞表达,而在正常细胞中不表达或者低表达^[29];第二,理想的ADC靶标应为细胞表面抗原,而不是胞内抗原,使之能被循环系统中的ADC药物接触、识别并结合^[30];第三,此靶点抗原最好不是分泌型抗原,因为分泌至循环系统中的抗原会与ADC药物结合后消耗药物而导致其可能无法以高浓度富集于肿瘤组织,影响其安全性和有效性^[31];第四,肿瘤靶点在结合抗体或者ADC后能高效地介导内吞作用,目前主流的ADC药物发挥作用时均需要内吞至细胞内并转运至溶酶体中释放毒素小分子,才能发挥肿瘤细胞杀伤作用^[32],如人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)就是一个理想的靶点,其在某些肿瘤细胞上的表达约为正常组织的100倍^[1, 30],同时它是细胞表面非分泌型受体,能高效地介导ADC药物诸如Kadcyla®、Enhertu®以及爱地希®等HER2靶向ADC药物的内吞。

ADC药物的药效与抗体-靶点抗原的亲合力密切相关,目前大部分的ADC与靶点的亲合力在0.1~1.0 nmol/L的范围内^[18],而目前业界对于抗体最优的亲合力并没有定论。一种假设认为过高的亲合力会导致产生“结合位点屏障”,是指在应用ADC治疗实体瘤时,对靶点结合的高亲合力会导致ADC被限制在肿瘤组织表面而无法穿透到肿瘤

组织内部,从而降低其治疗效果^[33]。而最近Tsumura和同事^[34]对同靶点而亲和力不同的3种ADC分子的药效和穿透效果进行了研究,结果显示高亲和力的ADC会穿透且分布在整个肿瘤组织,而低亲和力的ADC反而只能富集在肿瘤组织表面接近血管的部位,而且这种作用在体积大的肿瘤里才能表现出来。因此,在设计ADC药物时,选择靶点亲和力适当的抗体对于其内吞和药效非常关键^[35]。另外,在选择ADC药物的抗体时,针对同一靶点不同表位的抗体,其内吞效果也不尽相同^[36]。

近些年,除了利用单克隆抗体作为载具的ADC外,也有很多研究尝试使用其他形式的抗体,例如双抗^[37-38]、抗体片段^[39-41]或纳米抗体^[42-44]等来开发ADC,以期进一步提高ADC药物的安全性和有效性。

双抗是一种在单抗的基础上设计出的能同时识别和结合两种不同抗原或同一抗原两个不同表位的一类抗体分子^[45]。这些分子有些与传统的IgG类似,由两个Fab片段与Fc片段通过铰链区结合在一起,两个Fab片段分别识别不同的抗原或表位。另一些分子则设计得更加复杂,通过各种手段在IgG的特定位置附加上第二个抗原结合域^[46]。目前被应用于ADC药物开发的主要是与传统IgG分子结构相似的这一类双抗。目前的研究数据表明,有的双抗ADC能提高肿瘤细胞靶向性,增强靶点介导的内吞作用,从而提高药效,降低对正常组织的毒性^[47-48]。如Sellman等^[49]运用靶向EGFR和cMET的双抗开发出一种ADC,相比与EGFR单抗ADC或者cMET单抗ADC在同时表达两种抗原的肿瘤细胞上有更好的选择性,而且他们认为通过进一步地调整双抗两个结合臂与EGFR和cMET靶点的亲和力,能设计出靶点选择性更高的ADC,从而拓宽其治疗窗。Andreev和同事^[47]则设计了一种靶向HER2和PRLR(prolactin receptor)的双抗ADC,与针对这两个靶点的单抗ADC相比,它具备更好的乳腺癌细胞杀伤效果。同时,他们的研究还阐明了其中的作用原理:双抗ADC由于双靶点结合介导的内吞作用更快更强,因此能递送更多的ADC分子进入胞内,释放更多的毒素小分子从而更有效地杀伤肿瘤细胞。

ADC药物目前面临的挑战之一是分子质量过大,难于穿越各种生物屏障到达并穿透实体瘤肿瘤组织,影响其治疗实体瘤的效果。为了提高ADC

药物治疗实体瘤的效果, 研究者们希望通过缩小抗体框架结构来降低ADC的总体分子大小, 增强其肿瘤穿透力^[1]。作为ADC药物的框架结构, 这些缩小版的抗体首先必须保留其抗原抗体结合能力, 如天然抗体的组件F(ab)₂、F(ab)₂'、Fab和Fv片段等(图2)。另外, 通过抗体工程改造获得的scFv以及Diabody等则有更好的稳定性和靶向效率^[50-51]。还有一类缩小版抗体则是人源化的非典型抗体片段, 如来源于骆驼和羊驼的VHH片段, 以及来源于鲨鱼的VNAR片段等, 这一类通常被称为纳米抗体^[52]。这3种缩小版的抗体都已被用于探索开发缩小版ADC^[53]。在天然抗体片段中, 利用Fab来设计ADC分子的研究较多。Fab片段包括抗体的单侧抗原结合臂, 由抗体的轻链和重链可变区加CH1区段组成, 分子质量约为50 ku, 可通过酶解完整抗体或者重组表达获得^[54-55]。早期的Fab-ADC采用中等活性的化疗药物紫杉醇和阿霉素作为毒素小分子, 其肿瘤抑制活性达不到常规ADC的水平^[55-56]。直到Badescu及其同事^[57]利用赫赛汀的Fab片段与MMAE偶联得到的ADC, 在体外细胞实验中展示出了亚纳摩尔级别的活性, 与常规ADC相当。但是在体内动物实验中, 该ADC在剂量高达20 mg/kg时才展现出了中等程度的肿瘤抑制作用, 与常规ADC的1~10 mg/kg的有效肿

瘤控制剂量相差甚远, 分析原因可能是因为缺少Fc-FcRn循环和较高的泌尿系统清除率导致整体肿瘤暴露量低于常规ADC, 所以整体抗肿瘤活性达不到常规ADC的水平。其他一些以Fab为基础的ADC分子, 有的在体外活性方面就低于常规ADC, 有些则是与Badescu研究组的结果一样, 在体内活性方面不如常规ADC, 因此目前工业界很少此类ADC进入临床研究^[58-60]。以scFv及其衍生物作为载体则是缩小版ADC的另一个研究方向, scFv由抗体的轻链和重链的可变区通过一段短肽或者二硫键链接而成, 其分子质量约为30 ku, 且容易在原核细胞中表达^[61], scFv类的ADC已在多个临床前研究中显示出良好的可开发潜力^[62-65], 在采用特殊的重轻链连接方式后, 可以通过表面赖氨酸偶联高达10个毒素小分子^[51], 在偶联奥瑞他汀(Auristatin)和美登素(Maytansine)后展现出与常规ADC类似的体外肿瘤细胞杀伤活性, 同时其肿瘤穿透力也远高于常规ADC。英国的生物技术公司Antikor的研究显示, 他们的scFv-ADC比常规ADC有更好的耐受性和安全性, 且比Fab等其他抗体片段ADC, 其系统清除慢很多, 与采用白蛋白辅助延长半衰期手段的抗体片段类似^[51], 目前Antikor公司的scFv ADC产品正在临床前开发中^[66]。全球ADC研发先驱者Seagen公司曾经采用

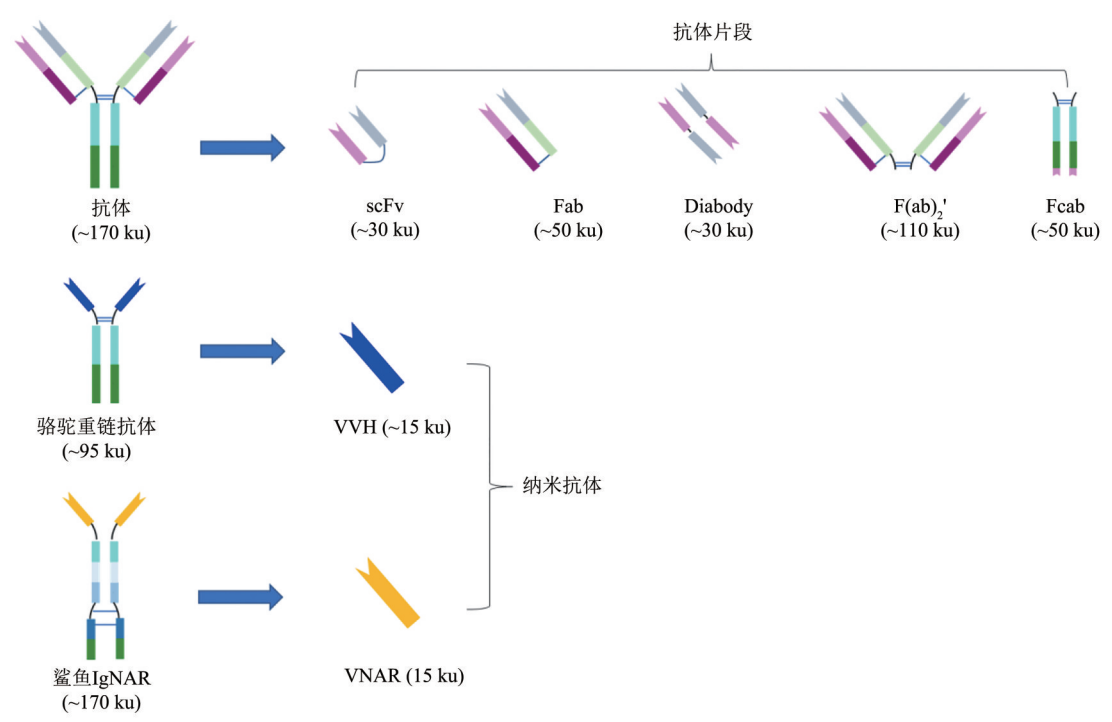


Fig. 2 Structure illustration of IgG fragments and nanobodies utilized in ADCs
图2 用于ADC药物的抗体片段和纳米抗体结构示意图

抗 CD30 的 Diabody 制备 ADC 并与常规 ADC 进行头对头对比研究,结果显示虽然其药效仅为常规 ADC 的 1/3,但是这是在其血液暴露量仅为常规 ADC 1/30 的情况下产生的^[67]。因此,如果通过诸如聚乙二醇化等方法降低其系统清除率,Diabody ADC 有可能会比常规 ADC 有更好的效果^[68]。此外,另一种具备抗原结合能力的抗体 Fc 片段 (Fcab) 介导的 ADC 也展现出了与常规 ADC 相当的体外肿瘤细胞杀伤活性,同时由于其分子质量仅为抗体的 1/3,使得它具备更好的肿瘤穿透力,同时它还具备完整的 Fc 功能,使得它的半衰期较一般抗体片段长 (小鼠血液半衰期为 60~85 h),因此具备一定的开发潜力^[40]。另外,采用纳米抗体的 ADC 也展现出了良好的体外和体内肿瘤杀伤作用,如 Crescendo Biologics 公司的 CB108,就是一种采用人的重链可变区的靶向 PSMA (prostate-specific membrane antigen) 的纳米抗体 ADC,展现出了良好的体内疗效和肿瘤穿透性;同时它还包含有抗白蛋白的结合域,通过与血清白蛋白的结合来延长其半衰期,同时还保留其高肿瘤穿透性^[69]。另一家公司 Elasmogen 也正采用类似的纳米抗体在开发 ADC,其纳米抗体来源于鲨鱼的抗体可变区^[70]。

2 链接体

链接体负责将 ADC 的抗体和细胞毒小分子链接在一起,对于 ADC 药物的安全性和稳定性至关重要^[71]。理想的链接体需要在血液循环中足够稳定,能有效避免 ADC 药物在血液循环中和正常组织中释放毒素小分子并使之保持稳定且非活性状态,而同时又需要能在肿瘤组织和细胞内高效释放毒素小分子^[72]。另外由于毒素分子通常为疏水性强的化学小分子,链接体需要具有良好的亲水性来连接毒素分子以便于后续在水相中与抗体进行偶联反应并避免大量蛋白聚集体的产生而导致 ADC 的产率下降。目前常见的 ADC 链接体有两类:不可剪切链接体和可剪切链接体,它们各有各的特点。近几年,这两类链接体通过不断的改进和优化,开发出了各种能显著提高 ADC 稳定性和亲水性的链接体。

链接体一般包括 4 个分子片段:抗体连接片段、调节片段、酶降解片段和自裂解片段 (表 2)。开发者通常依据毒素小分子的特性以及与抗体连接的方式,并结合对 ADC 分子的影响,开展综合分析评估来筛选上述 4 个片段,最终确定链接体的结构。

Table 2 Characteristics of the components in linker

表2 链接体各个组分功能特点

	片段类型			
	抗体连接片段	调节片段	氨基酸片段	自裂解片段
功能特点	将毒素小分子连接到抗体上	调节链接体-药物的稳定性 调节链接体-药物的水溶性 增加毒素小分子连接数量	被特异性酶识别并裂解,促使毒素小分子从 ADC 中释放	连接酶裂解片段和毒素小分子,在酶裂解片段被特异性剪切后,通过分子内电子转移或亲核反应,释放毒素小分子
结构举例	活性羧酸酯基团 (active carboxyl)	正己酰基 (caproyl) 环己酰基 (cyclohexyl formyl)	缬氨酸-瓜氨酸 (valine-citruline, VC) 缬氨酸-丙氨酸 (valine-alanine, VA)	对氨基苄醇 (PAB) 间氨基苄醇 (OAB)
	马来酰亚胺基团 (maleimide)	聚乙二醇 (PEG) 磺酰胺 (sulfonamide) ^[73]	赖氨酸 (lysine) 甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸 (glycine-glycine-phenylalanine-glycine, GGFG)	N,N'-二甲基乙二胺 (DMEDA) ^[74]
	环辛炔基团 (cyclooctyne)	支链结构 (branch structure)		

链接体的稳定性决定了 ADC 药物中的毒素小分子是传递到肿瘤细胞内部还是有可能在运输过程中过早释放并跟随血浆传递到所有组织,显著影响 ADC 药物的安全性和有效性。ADC 药物的稳定性

一般受抗体与链接体的偶联方式、调节片段和氨基酸片段 3 个方面的影响,其中,偶联方式由抗体连接片段决定,常见连接片段的特点及结构举例见表 3。

Table 3 Characteristics and chemical structures of commonly used adaptors

表3 常见连接片段特点及结构举例

连接片段	特性	结构举例
羧酸基团	与赖氨酸形成酰胺键, 结构稳定	
马来酰亚胺基团	通过Michael加成反应连接, 会发生可逆反应, 在血浆中释放链接体-药物, 稳定性相对较弱, 可通过开环方式增加稳定性 [75]	
特异性结构 [73]	通过Click反应等连接, 结构稳定	

除连接片段外, 调节片段和氨基酸片段的结构也对链接体稳定性有影响, 特别是构建氨基酸片段的氨基酸种类和序列, 对链接体的稳定性甚至有决定性的作用。2021年, 李卓荣课题组 [76] 报道了不同链接体与 MMAE 构建的链接体-药物, 发现在氨基酸片段为缬氨酸-瓜氨酸 (VC) 时, 调节片段为环己基组成的链接体比起正己基或苯基组成的链接体更稳定, 而在调节片段为环己基时, 氨基酸片段为甘氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸 (GFLG) 组成的链接体稳定性要远低于其他氨基酸片段组成的链接体。

在调节片段中引入磺酸或聚乙二醇等极性基团, 既能够增强链接体-药物的水溶性, 降低制备 ADC 分子时产生聚集体的几率, 又能够增强毒素小分子克服 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp) 外排效应的能力 [77-78]。Kovtun 等 [77] 研究了分别包括环己基和四聚乙二醇两个调节片段的链接体在 ADC 中的应用, 发现使用四聚乙二醇片段的 ADC 在具

有多药耐药性 (multi-drug resistance) 细胞系 COLO 205^{MDR} CDX 模型中具有更好的细胞杀伤效应, 即使给药剂量降低 1 倍, 也能够有效地抑制肿瘤细胞生长。

总体而言, 链接体的设计对于 ADC 来说至关重要。近些年链接体技术方面也有一些新的扩展, 例如 Bolt 公司的 BDC-1001 和 Silverback 公司的 SBT6050 及 SBT6290 等多款免疫激动剂抗体偶联物 (ISAC) 所采用的在肿瘤微环境释放的一类链接体 [79], 该类 ADC 分子通过抗体与肿瘤细胞表面非内吞靶标或肿瘤微环境中的特异性靶点结合, 然后在肿瘤细胞外释放毒素小分子, 利用毒素小分子的旁杀效应或激活肿瘤组织浸润的免疫细胞, 达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。

与常规 ADC 相比, 非内吞 ADC 对链接体的要求有着显著的区别 (表 4), 需要能够在肿瘤微环境中通过不同的方式有效释放载荷分子, 而不是在细胞内的溶酶体中。

Table 4 Linkers used in non-internalizing ADCs

表4 应用于非内吞ADC药物开发的链接体

链接体结构	释放机制
二硫键 ($R_1-S-S-R_2$)	利用肿瘤细胞死亡时释放出的大量高浓度还原剂 [80]
酯键或碳酸酯	肿瘤微环境中酸性条件下水解 [81]
脒 ($R_3-C(=N-NH-R_1)-R_2$)	肿瘤微环境中酸性条件下水解 [82]
氨基酸片段 (Val-Leu-Lys)	肿瘤微环境血纤维蛋白溶酶水解 [83]

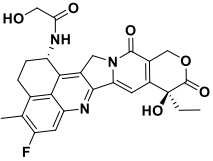
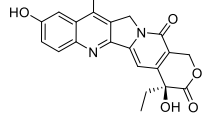
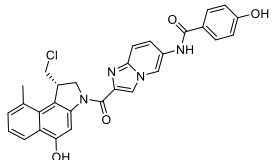
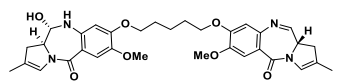
3 毒素小分子

毒素小分子是ADC药物中主要负责执行细胞杀伤功能的组件，它需要具备较高的活性使之能在较低的剂量下有效杀伤肿瘤细胞。目前主流的ADC药物其毒素小分子的细胞抑制的 IC_{50} 基本在 $10^{-9}\sim 10^{-12}$ mol/L范围之间。同时，它还需要具备很好的稳定性，使之在循环系统和溶酶体中保持结构完整和活性。另外，它还需要分子质量足够小，免

疫原性低，也需具备方便与链接体进行化学反应的位点。目前常见的毒素小分子主要包括微管蛋白抑制剂和DNA复制的抑制剂^[84]，随着日本第一三共公司的重磅ADC药物Enhertu®应用拓扑异构酶抑制剂的成功^[85]，越来越多的细胞毒性相对较低的小分子进入到ADC药物开发者的工具箱，如针对拓扑异构酶的喜树碱类^[86-87]、RNA聚合酶抑制剂^[88]、细胞凋亡调控药物等^[89]，常见毒素小分子汇总于表5。

Table 5 Various toxins commonly used in ADCs
表5 用于ADC药物开发的常见毒素小分子

作用机制	Payload类别	代表性化合物	代表ADC	研发机构
微管蛋白抑制剂	Maytansines		Kadcyla®	Genentech
		DM1		
	Auristatins		Elahere®	ImmunoGen
		DM-4		
DNA双链破坏剂	Auristatins		Adcetris®	Seagen
		MMAE	Padcev®	Seagen/Astellas
	Tubulysins		Polivy®	Genentech
		AZ13599185	Tivdak®	Seagen/Genmab
DNA双链破坏剂	Calicheamicin		N.A	MedImmune
		Calicheamicin γ 1		
DNA双链破坏剂	Calicheamicin		Mylotarg®	Pfizer
		Calicheamicin γ 1	Besponsa®	

续表5				
作用机制	Payload类别	代表性化合物	代表ADC	研发机构
DNA插入剂	喜树碱衍生物		Enhertu®	Daiichi Sankyo
		DXd		
DNA烷基化剂	Duocarmycin衍生物		Trodelvy®	Immunomedics
		SN-38		
	PBD双体		N.A	Beyondis
		Seco-DUBA		
			Zynlonta®	ADC Therapeutics
		PBD dimer		

3.1 微管蛋白抑制剂

微管蛋白作为细胞骨架的主要构成物质,除能够支撑细胞结构完整性外,同时还在细胞增殖的有丝分裂阶段具有至关重要的作用。通过抑制微管蛋白的生成和聚集 (polymerization),既能够杀伤肿瘤细胞,也可以抑制肿瘤细胞的快速增殖。常用于ADC构建的微管蛋白抑制剂包括美登素 (Maytansines)、海兔毒素 (Auristatins) 和 Tubulysins 等。

现阶段,已进入商业化的14款ADC药物中,有8款所使用的毒素小分子是该类化合物,其中5款使用 MMAE (海兔毒素衍生物)、1款使用 MMAF (海兔毒素衍生物)、1款使用 DM1 (美登素衍生物) 和1款使用 DM4 (美登素衍生物)。微管蛋白抑制剂类化合物的特点是:杀伤细胞活性高,IC₅₀一般在10⁻⁹~10⁻¹⁰ mol/L之间;具有一定的亲水性,不易引起大分子聚集;起效速度快,短时间内即可杀伤肿瘤细胞。虽然 MMAE 应用广泛,但因其是 Pgp 底物而存在多药耐药性的问题。

而 Tubulysins 类化合物作为微管蛋白抑制剂则不是 Pgp 底物^[90-91]。该类化合物的结构均具有官能团——羧基,这一亲水性基团增加了毒素小分子的极性进而规避了 Pgp 的外排效应,毒素在随着

ADC 分子进入肿瘤细胞后起到杀伤效力,但同时,由于细胞膜穿透能力的降低,无法扩散至周围肿瘤组织,因此也就不具备旁杀效应。

3.2 DNA损伤剂

DNA 损伤剂因作用机制不同而分为3大类:DNA 双链破坏剂、DNA 插入剂和DNA 烷基化剂。DNA 在细胞的生长和增殖过程中至为关键,对其进行破坏,能够高效杀伤肿瘤细胞并抑制其快速增殖。值得注意的是,部分DNA 损伤剂,如PBD dimer 和 Duocarmycins,在动物中高剂量给药时,可能产生延迟毒性^[92],因此在给药周期设计时,应谨慎考虑。

3.2.1 DNA双链破坏剂

DNA 双链破坏剂的化学结构中包含一段烯二炔片段,进入细胞核后,该片段发生 Bergman 环化反应,形成苯环双自由基过渡态,诱导DNA 双键断裂^[93]。此类毒素小分子的代表是卡利霉素衍生物γ1 (calicheamicin gamma 1),辉瑞公司的2款商业化ADC 药物 Mylotarg®和 Besponsa®均使用该类化合物。

3.2.2 DNA插入剂

在DNA 复制和转录阶段,拓扑异构酶I发挥着重要的作用,它以共价键的形式与DNA 形成一个

可裂解的复合物,从而产生一个单链缺口,另一条未受损的单链从缺口中转回,使超螺旋的DNA松弛,以利于复制和转录,当解旋完成后拓扑异构酶I脱离并促使DNA链复原。因此,如果能在拓扑异构酶I与DNA形成可裂解复合物的阶段引入一个分子,能够阻挡未受损单链的回转,就可以阻止DNA的复制和转录,诱导肿瘤细胞死亡^[94-96]。喜树碱就是这样一类拓扑异构酶I抑制剂类化合物,目前已有2款商业化ADC药物Enhertu[®]和Trodelvy[®]使用该类药物作为毒素小分子。喜树碱类化合物的细胞杀伤活性相较于微管蛋白抑制剂弱1~2个数量级,能够扩展ADC药物的治疗窗,提高给药剂量。

3.2.3 DNA烷基化剂

DNA烷基化剂一般能够与DNA小沟结合,之后,利用分子内易与氨基反应的官能团,如碳氮双键或环丙烷结构,与鸟嘌呤或腺嘌呤发生亲核反应,在DNA中形成链间或链内交联,阻止其复制和转录,导致肿瘤细胞死亡。

该类化合物细胞杀伤活性在皮摩尔级别,比微管蛋白抑制剂活性更强,因此,能够大幅降低ADC的给药剂量,但治疗窗也会相应缩小。常用的DNA烷基化试剂为PBD (pyrrolobenzodiazepine) 二聚体^[97]和Duocarmycin^[98-99]两类化合物,目前已进入商业化的ADC中仅有一款使用PBD二聚体作为毒素小分子——CD19靶向的Zynlonta[®]。

3.3 其他毒素小分子

除上述主要已应用于商业化ADC药物的毒素小分子外,其他各类作用机制的毒素也被逐步应用于ADC药物开发中,如Bcl-x_L抑制剂^[89, 100]、RNA剪切酶抑制剂^[101]、RNA聚合酶抑制剂^[88]等。另一类新颖毒素小分子则作用于细胞膜表面靶标或者肿瘤组织基质靶标,用于非内吞型ADC药物的开发,如NKA (Na⁺/K⁺-ATPase, 钠钾离子泵ATP酶)抑制剂^[102-103]、基质金属依赖性蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP)抑制剂^[104]和免疫激动剂^[105]等,其各自的作用机制如表6所示。

Table 6 Emerging toxins used in ADCs and their mechanism of actions

表6 用于ADC药物开发的新型毒素小分子和作用机理

毒素小分子	作用机制	研发机构
Bcl-x _L 抑制剂	抑制Bcl-x _L 功能诱导细胞凋亡	艾伯维
RNA剪切酶抑制剂	抑制mRNA剪切和成熟	辉瑞
RNA聚合酶抑制剂	抑制mRNA的转录	AGENSYS, INC.
NKA 抑制剂	抑制细胞膜表面钠钾离子泵功能	Centrose, LLC
MMP抑制剂	抑制肿瘤基质中金属依赖性蛋白酶	Lifecore
免疫激动剂	激活肿瘤组织浸润免疫细胞以杀伤肿瘤细胞	Silverback Therapeutics

4 偶联技术

ADC药物开发成功的另一个重要元素是将小分子组分(链接体或链接体-毒素小分子)加载在抗体分子上的方式和技术。偶联反应策略和过程,决定了载药量(drug antibody ratio, DAR)和载药分布方式等关键质量属性,与ADC药物的有效性和安全性直接相关。理想的ADC偶联策略或技术需具备如下特点:a. 抗体与小分子结合部分的化学键或基团应足够稳定,确保其在循环系统中的稳定性^[106]; b. 偶联位点不会干扰抗体的功能,特别是与靶点抗原结合的特异性和高亲和力; c. 偶联过程涉及的反应必须有足够高的选择性和反应效率,同时应易于控制载药量和载药分布^[107]。

目前的ADC偶联技术大致可以分为两类,

一种是利用抗体序列中天然的具备反应活性的氨基酸残基(如表面赖氨酸的侧链氨基和链间二硫键还原后的巯基)来介导的偶联技术,目前已上市的13款ADC药物采用此类偶联技术;另一类技术,则是通过化学修饰、基因工程技术或者酶修饰等手段在抗体特定位点引入可供反应的基团,再偶联上毒素小分子,实现特定位点偶联。此类技术主要包括工程化半胱氨酸定点插入^[108]、非天然氨基酸定点插入^[109-110]、酶介导^[111-112]以及N-糖链介导的偶联技术^[113-114]等。目前采用定点偶联的ADC药物均处于临床前或临床研究阶段。

4.1 表面赖氨酸侧链氨基介导的偶联技术

赖氨酸残基的一些特性使其成为蛋白质生物偶联的首选:a. 在蛋白质包括抗体中广泛存在; b. 在蛋白质表面分布较多且易于接触; c. 其侧链ε位氨

基具备良好的化学反应活性^[115]。利用具备反应活性的羧酸酯基团, 如氮-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 的连接体, 即可与赖氨酸的 ϵ 位氨基反应形成共价键实现小分子偶联^[116], 操作过程简单易行。这些优点使得它成为蛋白质标记的常用手段, 早期的ADC药物也采用此类偶联技术, 如Mylotarg[®]和Besponsa[®], 而且后来的Kadcyla[®]和2022年获批的Elahere[®]也是采用此技术。

由于IgG分子上大约有80~90个赖氨酸残基, 其中有约一半是可以被修饰的^[115], 此种偶联技术虽然可以通过控制反应条件来控制平均DAR值, 但是控制偶联位点就很困难, 而导致其单个抗体上可能出现的偶联位点组合如果按照完全随机的理论计算可高达数百万种^[116-117], 此类ADC药物的载药量分布不均一, 成为由不同载药量的偶联物亚群组成的混合物, 而不同的载药量, 会对ADC的药效和药代动力学特性产生影响^[118-119]。另外, 由于赖氨酸分布在整个抗体表面, 偶联如果发生在抗原抗体结合域, 就有可能干扰ADC与靶点抗原的结合能力^[120]。尽管此技术存在天生的产生不均一性偶联的特点, 近些年对Kadcyla[®] (T-DM1) 结构的深入研究显示, 通过合理的工艺设计和深度工艺开发, 在合理的工艺控制条件下, 仍能将批次间以及不同生产规模的ADC产物中偶联位点分布和载药量保持高度一致^[121], 这也就是应用该技术的Mylotarg[®]、Besponsa[®]、Kadcyla[®]和Elahere[®]能开发成功的关键之一。采用此技术的ADC会根据链接体和毒素小分子的特性以及工艺的可控性和收率等, 去选择使用一步法或者两步法来合成ADC分子 (图3a)。一步法是先将链接体和毒素小分子连接, 再通过链接体上的反应基团与抗体表面的赖氨酸侧链氨基偶联; 而两步法则使用具备双功能基团的链接体上的一个反应基团与抗体上赖氨酸侧链氨基偶联完成抗体修饰, 之后链接体上的另一个功能基团再与毒素小分子偶联制成ADC分子^[122]。

4.2 抗体链间二硫键介导的偶联技术

半胱氨酸残基由于其还原状态的巯基具备极强的亲核性^[123], 使它成为另一个特殊属性的生物偶联媒介。以IgG1为例, 它总共含有16对二硫键, 其中12对为链内二硫键包裹在其结构内部而不易修饰, 而4对链间二硫键则暴露于溶液中可以被还原剂打开 (图3b), 从而产生最多8个可供反应的自由巯基^[124-125]。虽然通过控制还原剂的比例可以很好地控制产物的平均DAR值, 但是除了完全打

开4对二硫键并全部偶联上毒素小分子的ADC药物 (如Enhertu[®]和二硫键桥接技术介导的ADC^[126]), 其他通过部分还原和偶联的ADC其载药量分布依然是非均一的。不过得益于有限数量的巯基, 其异质性要远低于赖氨酸介导的偶联, 主要的载药量组分 (isomer) 是载有0、2、4、6、8个小分子的组分^[127]。利用巯基的偶联反应, 通常通过与氮取代的马来酰胺基团产生1,4位的Michael加成反应来实现, 这个反应速度快且反应条件温和, 很适用于偶联反应^[128]。

有研究表明采用此类偶联技术的ADC可能会由于打开抗体的链间二硫键而导致抗体的完整性和稳定性受到影响^[129-130], 但是Seagen公司的科学家们通过对CD30靶向的Adcetris[®]药物分子深入的结构研究发现, 尽管将IgG1抗体的四对链间二硫键都打开, 偶联上8个MMAE毒素小分子对抗体的高级结构仅引起微小的变化, 而且这些变化对ADC的整体稳定性并无实际意义的影响^[131], 当然这种偶联方式是否会对抗体的完整性和稳定性造成影响可能不能一概而论, 而是需要对各异的ADC药物分子及其抗体在偶联前后进行仔细的结构分析对比。此类偶联技术的另一个需要关注的点是, 其偶联化学基团巯基琥珀酰亚胺有发生反Michael加成反应的倾向, 从而使所偶联的小分子转移至血清中带巯基的蛋白质上, 影响其血浆中稳定性^[132]。但是, 抗体链间二硫键介导的偶联技术对比其他技术, 有着许多明显的优点, 比如其生产工艺相对简单, 反应条件易于控制以及得率高等, 使之成为目前ADC药物开发中应用最为广泛的技术。目前已上市的14款ADC药物中有9款采用此技术。

另外, 利用抗体链间二硫键介导的偶联也能实现定点偶联, 如将IgG1的全部8个经过链间二硫键还原后的巯基都偶联上毒素小分子的Enhertu[®], 还有就是链间二硫键桥接技术。

二硫键桥接技术通过还原剂将IgG1的4对链间二硫键完全打开, 再采用带有两个可与巯基反应基团的叉状双接头, 同时与打开的一对链间二硫键反应, 将打开的二硫键通过链接体上的双接头重新链接起来, 实现一对链间二硫键一个链接体分子, 同时恢复了抗体的链间连接和结构稳定性^[133] (图3c)。而载药量则由每个链接体上携带的细胞毒分子数量所决定, 可以为4、8或16^[134]。此类技术无需基因工程改造, 使用天然的链间二硫键就可以实现, 但是需要设计合适的携带双巯基反应基团的链

接体。目前有多种二硫键桥接定点偶联技术,如双砜(bis-sulfones)技术^[57, 135]、下一代马来酰胺(next-generation maleimides, NGMs)技术^[136]、马来酰肼(pyridazinediones, PDs)技术^[137]以及C-Lock™技术^[138],都已被用于ADC药物开发和探索中。采用双砜技术偶联产生的符合预期的一对链间二硫键一个链接体分子的组分大约占比75%~85%,需要进一步使用疏水层析纯化,才可使目标组分达到95%以上^[139]。OBI Pharma公司运用双砜技术将MMAE偶联至抗-GloboH的抗体上开发出ADC药物候选分子OBI-999,用于治疗胰腺癌和胃癌,目前正在临床研究中^[140]。也正是在对此分子的结构研究中发现这一ADC中存在两种异构体,一种是完全按照天然抗体二硫键重新桥接的方式,另一种则是一种“半抗体形式”,即重链铰链区的二硫键经桥接后形成了链内桥接形式,而两个重链间则是分离状态,无共价键结合,目前尚不知此异构体是否会影响药效。而NGMs技术偶联产物,也与双砜技术一样,存在两种偶联异构体,一种是天然抗体形式,另一种则是“半抗体形式”,同样也会跟常规的马来酰胺一样在血液发生巯基交换反应而导致小分子提前释放^[136, 140],目前此类偶联技术的ADC尚未进入临床研究中。马来酰肼技术比起前两种技术的优势在于,其制成的偶联产物血清稳定性较好,而且此类偶联物目标产物——天然二硫键桥接形式的ADC占比可达90%以上^[137],因此被认为是目前最佳的二硫键桥接方式之一。而C-Lock™技术则是由Concortis Biotherapeutics所开发,其代表作为Sorrento Therapeutics所开发的STI-6129^[141]和Zova Biotherapeutics所开发的ZV0508^[138],分别靶向CD38和5T4,毒素小分子均为多司他汀(Duostatin)。二硫键桥接技术目前仍在不断推陈出新,期望能解决偶联桥接导致的“半抗体”异构体问题,改善血清稳定性,提高此类ADC的安全性和有效性。

4.3 工程化半胱氨酸定点偶联技术

工程化半胱氨酸偶联技术是在抗体表面指定位点引入半胱氨酸而实现定点和均一性偶联的一类技术(图3d),如Genentech公司的THIOMAB™技术^[107]。在一份发表的研究中,通过基因工程技术将半胱氨酸通过点突变的形式引入到一个抗MUC16靶点的单抗重链114位(A144C),通过CHO细胞表达纯化后,经过TCEP部分还原将114位的半胱氨酸的巯基暴露出来,再以硫酸铜氧化被

打开的链间二硫键,最后再与携带有马来酰胺基团的小分子vcMMAE反应,所产生的ADC药物平均DAR值为1.6。THIOMAB™ ADC与通过链间二硫键介导的DAR值为3.1的ADC相比,尽管载药偏低但是其体内动物模型药效并无区别,且展现出了更好的安全性,同时血清清除率要远低于非均一ADC,而且THIOMAB™ ADC经过工艺优化后可以达到平均DAR为2,产物中DAR2的组分占比超过90%^[107]。THIOMAB™和其他一些类似技术在进行偶联前,均需要通过还原去除抗体在细胞培养过程中所引入的半胱氨酸上的配基。有意思的是,一篇文献报道,在赫赛汀的轻链124位(Q124C)突变引入半胱氨酸,这种抗体表达后纯化时其124位半胱氨酸由于空间位阻的原因而没有和配基结合,因此可以直接用于偶联反应,而且其偶联产物均一,DAR值为2^[142],这一发现对于进一步优化THIOMAB™技术,简化生产工艺有所启迪。另外还有一些与THIOMAB™类似的技术,如通过基因工程在特定位点插入半胱氨酸而不是由点突变获得,还有在多个位点同时引入半胱氨酸以增加载药量的尝试。该技术已在体内外临床前研究中展示了其疗效和安全性^[143-144],目前已有使用此类技术的ADC药物进入临床研究中^[145]。近期,辉瑞公司研究发现了一种新型的制备此类ADC的生产技术,避免了先完全还原后氧化工艺,采用一步法实现定点偶联,简化工艺的同时降低了还原氧化过程产生的抗体二硫键错配等风险^[146]。他们运用一种含有Ellman试剂DTNB(5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸))的培养基来表达生产含有工程化半胱氨酸突变的抗体,使得生产出来的抗体其半胱氨酸上的巯基保护基团为TNB而不是半胱氨酸或谷胱甘肽。此TNB与半胱氨酸形成的二硫键,能被具备温和还原能力的还原剂TSPP(三苯基膦三间磺酸盐)还原,而同时抗体的链间二硫键依然保持稳定,还原产生的巯基与链接体-毒素小分子偶联即可形成定点偶联ADC。此技术产出的ADC药效与采用常规THIOMAB™技术的ADC等同,却不含有THIOMAB™技术制成的ADC中常见的二硫键错配异构体以及片段。

在开发工程化半胱氨酸偶联技术时,半胱氨酸引入的位点选择对于ADC的药代动力学特性和毒副作用都有影响,因此需要谨慎筛选合适的位点来进行基因工程改造和偶联。如Ma等^[147]在一个人源化抗IL13Rα2(interleukin 13 receptor subunit

alpha 2) 抗体的恒定区引入了一系列的半胱氨酸突变, 然后利用这些工程化的抗体制备ADC, 之后在大鼠和小鼠中对这些ADC进行了药效、药代动力学和毒理研究。结果显示, 所有的定点偶联ADC都比常规ADC有更好的体内药效和耐受性, 而不同位点偶联的ADC之间则展现了出了不同的血清清除率和脱靶毒性, 某些位点偶联的ADC(L443C)比起其他的具备更低毒副作用和更长的半衰期^[147]。

4.4 非天然氨基酸定点偶联技术

非天然氨基酸定点偶联技术的核心是通过基因工程技术以及对表达体系的tRNA编码改造, 将带有反应活性基团的非天然氨基酸引入到抗体的预定位置, 从而介导定点偶联(图3e)^[148]。此类技术比较常用的非天然氨基酸有对乙酰苯丙氨酸、叠氮取代甲基苯丙氨酸和叠氮取代型赖氨酸。运用此类技术开发的ADC分子, 已被证明具备高均一性的载药量和载药分布, 且具备优秀的活性和稳定性, 其安全性也很好, 因此吸引了很多学术界和医药生物技术公司对此类技术进行探索和开发^[149]。目前采用此类技术的代表性ADC药物是Ambrx和浙江医药联合开发的ARX788^[150], ARX788的靶点是HER2, 运用的非天然氨基酸是对乙酰苯丙氨酸, 通过肟键与链接体药物结合, 采用的链接体为不可剪切的聚乙二醇, 毒素小分子为Amberstatin, 平均载药量为1.9。此外, 生物技术公司Sutro也有两个采用此类技术的ADC药物分子处于临床研究中, 分别是STRO-001^[151]和STRO-002^[152-153], 它们运用的非天然氨基酸为叠氮取代甲基苯丙氨酸, 通过点击化学(click-chemistry)反应完成偶联。STRO-001是以抗CD74抗体为载体通过一种不可剪切的链接体与美登素偶联而成, 平均载药量为2, 临床研究的适应症为DLBCL。STRO-2则是靶向叶酸受体的ADC, 运用可剪切VC(valine-citrulline)链接体及微管抑制剂SC209为毒素小分子, 平均载药量为4, 临床I期研究的结果显示此ADC具有良好的耐受性、可控的副反应, 以及治疗卵巢癌的潜力^[154]。除了这些ADC分子外, 还有其他一些采用非天然氨基酸定点偶联的ADC药物处于临床前研究中, 而且采用此类技术开发ADC的项目仍在快速增加中^[155-156]。但是此类ADC技术的缺点也很明显, 携带非天然氨基酸的抗体表达量通常偏低, 成本较高, 且引入非天然氨基酸可能会产生免疫原性增高的风险。

4.5 酶介导的定点偶联技术

酶类由于具备很好的位点或氨基酸序列选择性, 且其最佳活性条件与抗体的舒适条件一致, 因此也被广泛用于介导定点偶联。酶类或者通过直接将小分子药物转移至特定氨基酸序列上, 或者通过将含反应基团的链接体引入到抗体特定位点从而达成定点偶联(图3f)^[156]。目前比较常见的用于定点偶联的酶有谷氨酰胺转移酶(transglutaminase, TG)^[157]和甲酰甘氨酸生成酶(formylglycine-generating enzyme, FGE)^[111]。谷氨酰胺转移酶能特异性介导蛋白质中谷氨酰胺末端的甲酰胺与赖氨酸上的侧链氨基反应形成共价键, 其中微生物来源的谷氨酰胺转移酶(mTG)在介导偶联方面最为常用。mTG介导的定点偶联策略有4种: 第一种采用基因工程技术或糖苷酶解将抗体上糖苷切除, 使295位上的谷氨酰胺暴露以供mTG修饰; 第二种是运用基因工程技术将mTG特异识别序列(如LLQG等)添加到重链或轻链的C端以供mTG定点偶联; 第三种则可直接利用抗体末端赖氨酸残基或者利用基因工程在末端引入赖氨酸残基再利用mTG来修饰; 最后一种是将这几种方法组合, 以达到增加偶联位点和载药量的目的^[158]。在将修饰基团引入特定位点后, 可以采用前述的各种偶联化学反应, 如click反应和Michael加成反应等, 实现毒素小分子的定点偶联。采用mTG修饰的ADC目前均在研究探索阶段, 一些研究显示对比常规ADC, 其在动物模型中的肿瘤抑制活性更好且持续时间更长^[157, 159-160]。

甲酰甘氨酸生成酶(FGE)能将特定序列CXPXR(X可为任意氨基酸除了脯氨酸)中的半胱氨酸残基进行氧化生产甲酰甘氨酸^[161], 甲酰甘氨酸上的醛基可与带有肟或者羟胺基团的小分子药物偶联^[162]。这一技术被称为SMARTag®技术^[163], 它通过将SMARTag®(CXPXR)整合至抗体的特定位置, 如轻链或重链的C端, 接着以FGE处理产生反应基团, 介导定点偶联。利用这一技术的ADC目前有一款进入了临床研究阶段, 其靶标为CD22, 在抗体两个重链C端连接有SMARTag®, 通过不可剪切链接体与美登素偶联, 在临床前和I期临床试验中均展现出良好的疗效和安全性^[164-165]。

4.6 糖链介导的定点偶联技术

在所有抗体的重链CH2区域都有一个保守的N-糖链位点, N-297^[166]。利用N-糖链来介导偶联

具有先天优势。首先N-糖链的位点远离抗体的抗原抗体结合区,此处偶联一般不会干扰其抗原结合能力;其次,N-糖基化的方式在各种抗体都十分保守,利于糖链修饰技术在不同种抗体中的应用,且无需基因工程改造,使用天然抗体即可;再者就是糖链是由碳水化合物组成,理化性质与蛋白质和氨基酸截然不同,因此从化学反应的角度利于偶联

位点的特异性^[113, 166]。糖链定点偶联技术主要有通过氧化修饰和糖苷酶修饰两种途径。糖苷氧化修饰技术主要用于抗体标记,通过高浓度氧化剂作用于糖链末端的糖苷的二醇基团使之产生醛基,再用含肟或者羟胺基团的链接体小分子与之反应,实现定点偶联。由于期间需要使用高浓度的氧化剂,如 NaIO_4 ,对抗体的氨基酸残基的破坏会导致理化性

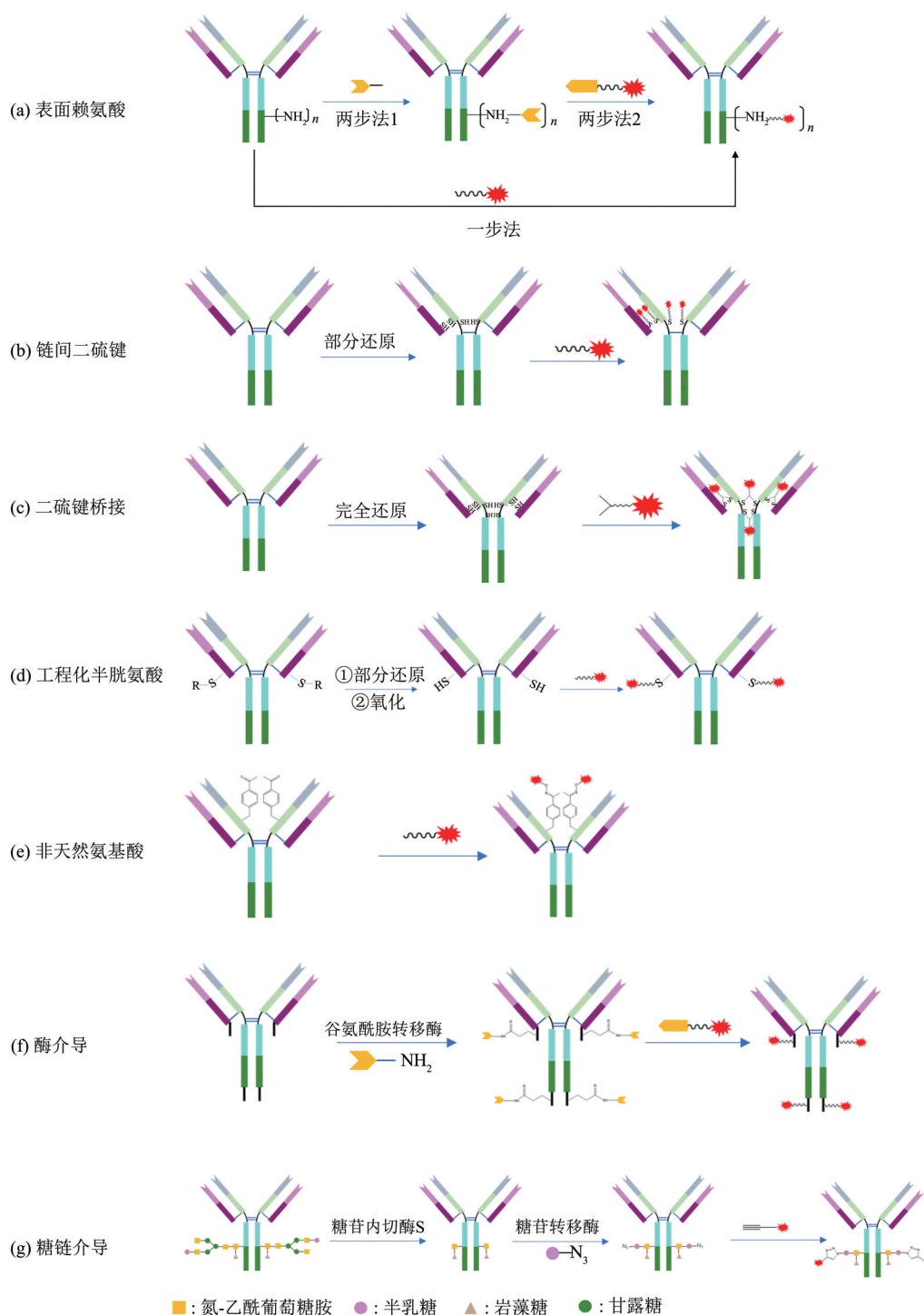


Fig. 3 Various conjugation technologies utilized in ADCs

图3 ADC的各种偶联技术

质甚至药代动力学特性发生改变^[167], 因此很少用于ADC药物的开发。目前用于ADC药物开发的主流糖链偶联技术大都采用糖苷酶技术, 其中最为成熟的当属荷兰Synaffix公司开发的GlycoConnect™技术^[168-170], 目前已授权全球多家ADC药物开发企业, 多个产品也正在开展临床研究^[171]。该技术首先使用糖苷内切酶将糖链切除只剩余最核心的氮乙酰葡萄糖胺, 再使用糖苷转移酶将携带有反应基团的糖苷衍生物(如叠氮取代的乙酰半乳糖胺)结合至核心糖苷上完成定点修饰, 最后以click化学反应与链接体药物反应, 达成糖链介导的定点偶联(图3g)^[169]。采用GlycoConnect™技术的ADC有两个偶联位点, 其载药量取决于每个链接体携带的小分子药物的数量, 其修饰和偶联效率可以达到90%以上, 在体内和体外实验中展现出优于常规ADC的药效和循环系统稳定性。另外还有一些糖苷酶介导的偶联技术, 其技术路线与GlycoConnect™相似, 只是将携带反应基团的糖苷更换为糖链, 又或者采用半乳糖苷酶将糖链末端的半乳糖切除, 再以转移酶将糖苷或糖链衍生物连接到抗体糖链末端^[172-174]; 还有一种就是在抗体表达过程中用带反应基团的岩藻糖衍生物替换天然的岩藻糖, 将其引入到糖链岩藻糖的位点以实现定点修饰和偶联^[175-176]。糖链定点偶联技术由于上述的天然优势, 使之成为定点偶联技术的重要发展方向。然而, 这类技术也有其相应的限制, 如需要特殊的试剂和糖苷酶, 而且由于偶联位点只有两个, 因此其载药量选择较少, 而且糖链被修饰后对ADC整体药效和药代动力学的影响还需要进一步研究和评估。

5 ADC药物未来发展方向

从第一个ADC药物在2000年获批上市到现在的20多年间, 共计14款ADC药物获批上市, 这期间ADC药物已经在偶联技术、链接体和毒素小分子方面取得显著发展, 使得其疗效和安全性得到了很大的提高, 也吸引了学术界和工业界对该领域的持续关注和投入, 同时使得ADC技术得到了更进一步的快速发展, 为未来ADC药物的设计和开发提供了广阔的前景。

在ADC药物的靶点选择方面, 除了肿瘤细胞表面靶点外, 肿瘤微环境的靶点是该领域的新热点之一^[177]。此类靶点通常包括肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的表皮细胞^[178]和成

纤维细胞抗原^[179-180]。此类靶点, 因其分布在肿瘤组织周围, 比肿瘤组织更容易从血液循环接触到ADC分子; 再者, 此类组织细胞比起肿瘤细胞受到基因突变影响小的多, 因此产生耐药性的可能性也降低; 作用于此类靶点除了能运用毒素小分子杀伤肿瘤细胞外, 还可能产生抗血管生成等协同抑制肿瘤增殖的作用; 最重要一点, TME抗原很少或者几乎不在正常组织表达^[181]。LRRC15(leucine-rich repeat containing 15)就是此类靶点的代表, 它在多种肿瘤的微环境里的成纤维细胞膜表面有高表达, 而在正常组织不表达^[178]。艾伯维公司的ABBV-085则是针对LRRC15开发的新型ADC^[181], 由抗LRRC15抗体和MMAE偶联而成, 在含有LRRC15阳性基质的肿瘤中展现了良好的活性和安全性^[182]。另一种肿瘤基质靶点的ADC, 则同时运用了另一种新型毒素小分子释放机制——非内吞依赖性的释放^[183-184], 如靶向肿瘤组织中的不溶性纤维蛋白(insoluble fibrin, IF)的一种ADC^[185], 运用抗IF抗体和MMAE经血纤维蛋白溶酶特异性剪切的肽段偶联而成, 动物实验研究结果显示它仅在与IF结合后释放MMAE, 而释放的MMAE除了杀伤肿瘤细胞外还能破坏肿瘤中的血管, 起到协同杀伤作用, 展示了其开发潜力。

由于目前限制ADC效力的一个重要因素是其分子尺寸太大, 使之不容易穿透毛细血管以及肿瘤基质等屏障到达肿瘤细胞, 从而阻碍了其在实体瘤治疗方面的效果^[184]。因此, 针对这一局限性, 研究者们尝试了各种手段缩小ADC尺寸, 包括前述的抗体片段或纳米抗体等形式的ADC^[51]。此外, 还有一类利用更小尺寸非抗体框架的ADC, 其抗体部分由一段有靶向结合能力的多肽替代以进一步增加其穿透力, 这一多肽由化学合成得到^[186-187]。目前已报道的最小分子质量的一类多肽框架ADC, 是一类被称为双环多肽(bicyclic peptide)的肽段, 分子质量仅1.5~2 ku^[186], 其次是一类被称为“Pentarin”的分子^[188], 分子质量为2~5 ku, 二者分别由生物技术公司Bicycle Therapeutics和Tarveda公司所开发的技术, 其代表性ADC产品分别是BT5528^[186]和PEN-221^[189]。BT5528的靶点为EphA2(Ephrin A2)受体, 由靶向EphA2的双环多肽与MMAE偶联而成, 其与靶点的亲和力1.9 nmol/L。小鼠荷瘤实验研究结果显示, 它能快速被肿瘤吸收且能持续地聚集在肿瘤组织中。而且临床前毒理实验显示, 它没有观察到同靶点常规

ADC MEDI-547的相关毒性,该分子目前在临床研究中。而PEN-221目前也在临床研究中,它是由靶向生长激素抑制受体2 (SSTR-2) 的奥曲肽衍生物与DM1偶联形成,它与靶点的亲和力很高在51 pmol/L左右。动物实验结果显示1~2 mg/kg的剂量下就能很好地抑制肝肿瘤和肺肿瘤,且在I期临床试验中已展现出其疗效和安全性。此类ADC开发的最大挑战就是其血液清除率太快,将来如能克服此缺点将会进一步拓展其治疗适应症,如脑肿瘤和一些血管分布很少的实体瘤。

另一些尝试主要是在载荷方面,如通过在抗体上偶联两种不同的细胞毒小分子,以应对肿瘤组织中癌细胞的高度异质性和耐药性^[190]。Seagen公司的研究者们通过在抗CD30抗体cAC10上同时偶联上MMAE和MMAF,首次在动物实验中展现出了双载荷ADC能有效地杀伤对MMAE-ADC有耐药性的肿瘤细胞^[129]。Yamazaki和同事^[190]则将此研究更进一步,利用定点偶联技术,以及含多载荷连接位点的链接体,可以调整两种不同细胞毒小分子的比例,构建出MMAE+MMAF分别为2+2、4+2和2+4等组合的HER2靶向ADC分子。动物实验显示,双载荷ADC比起单载荷ADC或者联合使用两种单载荷ADC,针对HER2阳性的杂合型加复发性乳腺癌肿瘤组织有更好的疗效,且不同的载荷比例显示不同的抗肿瘤活性,为将来克服肿瘤的异质性和耐药性提供了一种新的思路。

此外,还有将ADC中传统的细胞毒小分子载荷替换为蛋白毒素^[190]、细胞因子^[191]、蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC)^[192]和小核酸^[193]作为载荷,用于治疗癌症和其他疾病。如Avidity Biosciences的AOC 1001靶向肌肉组织上靶点TfR1 (transferrin receptor 1),其siRNA作用于DMPK mRNA,用于治疗一种罕见的肌肉病变^[194-195]。目前这些种类的偶联药物还处于早期研发阶段,有的已经开始进入临床研究阶段,有的才刚刚完成概念验证,都还面临各种各样的挑战,相信将来随着各种技术的进步和成熟,特别是对疾病机理的更深入理解,加上人工智能辅助药物设计技术等,这些新形式的ADC药物会得到进一步的发展,造福更多患者。

6 结 论

ADC药物设计的本质是利用抗体的高选择性靶向运输能力将具有生物学效应的小分子药物,如

细胞毒小分子药物高效地递送至病灶发挥治疗作用,既是一种新型药物分子,又是一种靶向递送系统。在这一体系内,抗体、链接体、小分子以及偶联技术等关键要素都需要作为一个整体来综合考虑,针对靶点的生物学特征以及疾病的特性和机理,选择合适的组件和技术对于开发成功的ADC药物至关重要。为了进一步发掘ADC药物的潜力,国内外在各个关键要素上都正在进行大量的研究,为开发新一代的ADC药物持续充实工具库,并提供源源不断的新思路。这些新思路包括:选择靶向肿瘤微环境的抗体并结合使用细胞外释放机制的链接体药物,解决靶点相关的耐药性;使用分子质量较小的抗体片段或者纳米抗体开发ADC,提高肿瘤组织穿透力;选择亲水性更好的链接体改善ADC的载药量和理化性质;使用不同作用机制的小分子药物,降低毒副作用并拓展ADC药物的应用领域;选择定点偶联技术改善载药均一性和药代动力学特性等。相信在ADC领域研究者的共同努力下,克服现有ADC的缺点和挑战,下一代的ADC药物将会给肿瘤的靶向治疗带来新惊喜,使更多的肿瘤患者获益。另外,作为一种递送系统,相信将来ADC药物必将用于更加广泛的领域,如中枢神经疾病、遗传疾病和感染性疾病等领域,作为真正高效的“魔法子弹”去消灭疾病,拯救生命。

参 考 文 献

- [1] Fu Z, Li S, Han S, *et al.* Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 93
- [2] Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 473-480
- [3] Mathé G, Ba L, Bernard J M. Effet sur la leucémie 1210 de la souris d’une combinaison par diazotation d’A-méthoptérine et de gammaglobulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C R Acad Sci*, 1958, 246: 1626-1628
- [4] Ghose T, Norvell S T, Guclu A, *et al.* Immunochemotherapy of malignant melanoma with chlorambucil-bound antimelanoma globulins: preliminary results in patients with disseminated disease. *J Natl Cancer Inst*, 1977, 58(4): 845-852
- [5] Ghose T, Norvell S T, Guclu A, *et al.* Immunochemotherapy of human malignant melanoma with chlorambucil-carrying antibody. *Eur J Cancer* (1965), 1975, 11(5): 321-326
- [6] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497
- [7] Jones P T, Dear P H, Foote J, *et al.* Replacing the complementarity-

- determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, **321**(6069): 522-525
- [8] Ortho Multicenter Transplant Study Group. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med*, 1985, **313**(6): 337-342
- [9] Morrison S L, Johnson M J, Herzenberg L A, *et al.* Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(21): 6851-6855
- [10] Van De Vijver M J, Peterse J L, Mooi W J, *et al.* Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med*, 1988, **319**(19): 1239-1245
- [11] Kim K J, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature*, 1993, **362**(6423): 841-844
- [12] Shen W C, Ryser H J. Poly (L-lysine) and poly (D-lysine) conjugates of methotrexate: different inhibitory effect on drug resistant cells. *Mol Pharm*, 1979, **16**(2): 614-622
- [13] Duncan R, Lloyd J B, Kopecek J. Degradation of side chains of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers by lysosomal enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, **94**(1): 284-290
- [14] Gallego J, Price M R, Baldwin R W. Preparation of four daunomycin-monoclonal antibody 791T/36 conjugates with anti-tumour activity. *Int J Cancer*, 1984, **33**(6): 737-744
- [15] Manabe Y, Tsubota T, Haruta Y, *et al.* Production of a monoclonal antibody-methotrexate conjugate utilizing dextran T-40 and its biologic activity. *J Lab Clin Med*, 1984, **104**(3): 445-454
- [16] Ducry L, Stump B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem*, 2010, **21**(1): 5-13
- [17] Samantasinghar A, Sunildutt N P, Ahmed F, *et al.* A comprehensive review of key factors affecting the efficacy of antibody drug conjugate. *Biomed Pharmacother*, 2023, **161**: 114408
- [18] Jin Y, Schladetsch M A, Huang X, *et al.* Stepping forward in antibody-drug conjugate development. *Pharmacol Ther*, 2022, **229**: 107917
- [19] Giugliano F, Corti C, Tarantino P, *et al.* Bystander effect of antibody-drug conjugates: fact or fiction?. *Curr Oncol Rep*, 2022, **24**(7): 809-817
- [20] De Cecco M, Galbraith D N, McDermott L L. What makes a good antibody-drug conjugate?. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, **21**(7): 841-847
- [21] Hock M B, Thudium K E, Carrasco-Triguero M, *et al.* Immunogenicity of antibody drug conjugates: bioanalytical methods and monitoring strategy for a novel therapeutic modality. *AAPS J*, 2015, **17**(1): 35-43
- [22] Abdollahpour-Alitappeh M, Lotfinia M, Gharibi T, *et al.* Antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy: strategies, challenges, and successes. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(5): 5628-5642
- [23] Amiri M M, Jeddi-Tehrani M, Kazemi T, *et al.* Construction and characterization of a new chimeric antibody against HER2. *Immunotherapy*, 2013, **5**(7): 703-715
- [24] De Claro R A, McGinn K, Kwitkowski V, *et al.* U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(21): 5845-5849
- [25] Carter P J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**(5): 343-357
- [26] Waldmann H. Human monoclonal antibodies: the benefits of humanization //Steinitz M. *Human Monoclonal Antibodies*. New York: Humana, 2019: 1-10
- [27] Kurella V B, Gali R. Structure guided homology model based design and engineering of mouse antibodies for humanization. *Bioinformation*, 2014, **10**(4): 180-186
- [28] Hellmann I, Waldmeier L, Bannwarth-Escher M C, *et al.* Novel antibody drug conjugates targeting tumor-associated receptor tyrosine kinase ROR2 by functional screening of fully human antibody libraries using transpo-mAb display on progenitor B cells. *Frontiers Immunol*, 2018, **9**: 2490
- [29] Damelin M, Zhong W, Myers J, *et al.* Evolving strategies for target selection for antibody-drug conjugates. *Pharm Res*, 2015, **32**(11): 3494-3507
- [30] Diamantis N, Banerji U. Antibody-drug conjugates--an emerging class of cancer treatment. *Br J Cancer*, 2016, **114**(4): 362-367
- [31] Ritchie M, Tchistiakova L, Scott N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *MAbs*, 2013, **5**(1): 13-21
- [32] Sadekar S, Figueroa I, Tabrizi M. Antibody drug conjugates: application of quantitative pharmacology in modality design and target selection. *AAPS J*, 2015, **17**(4): 828-836
- [33] Van Dongen G. Improving tumor penetration of antibodies and antibody-drug conjugates: taking away the barriers for trojan horses. *Cancer Res*, 2021, **81**(15): 3956-3957
- [34] Tsumura R, Manabe S, Takashima H, *et al.* Influence of the dissociation rate constant on the intra-tumor distribution of antibody-drug conjugate against tissue factor. *J Control Release*, 2018, **284**: 49-56
- [35] Durbin K R, Phipps C, Liao X. Mechanistic modeling of antibody-drug conjugate internalization at the cellular level reveals inefficient processing steps. *Mol Cancer Ther*, 2018, **17**(6): 1341-1351
- [36] Pedersen M W, Jacobsen H J, Koefoed K, *et al.* SYM004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy. *Cancer Res*, 2010, **70**(2): 588-597
- [37] Hong Y, Nam S M, Moon A. Antibody-drug conjugates and bispecific antibodies targeting cancers: applications of click chemistry. *Arch Pharm Res*, 2023, **46**(3): 131-148
- [38] Perez Bay A E, Faulkner D, Dasilva J O, *et al.* A bispecific METxMET antibody-drug conjugate with cleavable linker is processed in recycling and late endosomes. *Mol Cancer Ther*, 2023, **22**(3): 357-370
- [39] Wei D, Tao Z, Shi Q, *et al.* Selective photokilling of colorectal

- tumors by near-infrared photoimmunotherapy with a GPA33-targeted single-chain antibody variable fragment conjugate. *Mol Pharm*, 2020, **17**(7): 2508-2517
- [40] Jäger S, Wagner T R, Rasche N, *et al.* Generation and biological evaluation of fc antigen binding fragment-drug conjugates as a novel antibody-based format for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem*, 2021, **32**(8): 1699-1710
- [41] Kalinovsky D V, Kholodenko I V, Kibardin A V, *et al.* Minibody-based and scFv-based antibody fragment-drug conjugates selectively eliminate GD2-positive tumor cells. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(2): 1239
- [42] André A S, Dias J N R, Aguiar S, *et al.* Rabbit derived VL single-domains as promising scaffolds to generate antibody-drug conjugates. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 4837
- [43] Sun X, Zhou C, Xia S, *et al.* Small molecule-nanobody conjugate induced proximity controls intracellular processes and modulates endogenous unligandable targets. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 1635
- [44] Zhao L, Meng F, Li Y, *et al.* Multivalent nanobody conjugate with rigid, reactive oxygen species scavenging scaffold for multi-target therapy of Alzheimer's disease. *Adv Mater*, 2023: e2210879
- [45] Falchi L, Vardhana S A, Salles G A. Bispecific antibodies for the treatment of B-cell lymphoma: promises, unknowns, and opportunities. *Blood*, 2023, **141**(5): 467-480
- [46] Zhang T, Lin Y, Gao Q. Bispecific antibodies targeting immunomodulatory checkpoints for cancer therapy. *Cancer Biol Med*, 2023, **20**(3): 181-195
- [47] Andreev J, Thambi N, Perez Bay A E, *et al.* Bispecific antibodies and antibody-drug conjugates (ADCs) bridging HER2 and prolactin receptor improve efficacy of HER2 ADCs. *Mol Cancer Ther*, 2017, **16**(4): 681-693
- [48] Shim H. Bispecific antibodies and antibody-drug conjugates for cancer therapy: technological considerations. *Biomolecules*, 2020, **10**(3): 360
- [49] Sellmann C, Doerner A, Knuehl C, *et al.* Balancing selectivity and efficacy of bispecific epidermal growth factor receptor (EGFR) × c-MET antibodies and antibody-drug conjugates. *J Biol Chem*, 2016, **291**(48): 25106-25119
- [50] Deonarain M P, Yahioğlu G. Current strategies for the discovery and bioconjugation of smaller, targetable drug conjugates tailored for solid tumor therapy. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, **16**(6): 613-624
- [51] Deonarain M P, Xue Q. Tackling solid tumour therapy with small-format drug conjugates. *Antib Ther*, 2020, **3**(4): 237-245
- [52] Panikar S S, Banu N, Haramati J, *et al.* Nanobodies as efficient drug-carriers: progress and trends in chemotherapy. *J Control Release*, 2021, **334**: 389-412
- [53] Su J, Liu X, Guo S, *et al.* Nanobodies: a new potential for prostate cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023. doi: 10.1007/s00432-022-04515-y
- [54] Zhao Y, Gutshall L, Jiang H, *et al.* Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: papain digestion of mAb and transient expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif*, 2009, **67**(2): 182-189
- [55] Chen X, Ding G, Gao Q, *et al.* A human anti-c-Met Fab fragment conjugated with doxorubicin as targeted chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e63093
- [56] Wang X, Zhu J, Zhao P, *et al.* *In vitro* efficacy of immuno-chemotherapy with anti-EGFR human Fab-Taxol conjugate on A431 epidermoid carcinoma cells. *Cancer Biol Ther*, 2007, **6**(6): 980-987
- [57] Badescu G, Bryant P, Bird M, *et al.* Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates. *Bioconjug Chem*, 2014, **25**(6): 1124-1136
- [58] Mao Y, Wang X, Zheng F, *et al.* The tumor-inhibitory effectiveness of a novel anti-Trop2 Fab conjugate in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 2016, **7**(17): 24810-24823
- [59] Zhou Z, Zhang J, Zhang Y, *et al.* Specific conjugation of the hinge region for homogeneous preparation of antibody fragment-drug conjugate: a case study for doxorubicin-PEG-anti-CD20 Fab' synthesis. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(1): 238-246
- [60] Puthenveetil S, Loganzo F, He H, *et al.* Natural product splicing inhibitors: a new class of antibody-drug conjugate (ADC) payloads. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(8): 1880-1888
- [61] Crivianu-Gaita V, Thompson M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosens Bioelectron*, 2016, **85**: 32-45
- [62] Safdari Y, Ahmadzadeh V, Khalili M, *et al.* Use of single chain antibody derivatives for targeted drug delivery. *Mol Med*, 2016, **22**: 258-270
- [63] Chen L, Liu Y H, Li Y H, *et al.* Anti-hepatoma human single-chain Fv antibody and adriamycin conjugates with potent antitumor activity. *Int Immunopharmacol*, 2014, **18**(1): 20-26
- [64] Zhao S, Zhao G, Xie H, *et al.* A conjugate of an anti-midkine single-chain variable fragment to doxorubicin inhibits tumor growth. *Braz J Med Biol Res*, 2012, **45**(3): 230-237
- [65] Kuimova M K, Bhatti M, Deonarain M, *et al.* Fluorescence characterisation of multiply-loaded anti-HER2 single chain Fv-photosensitizer conjugates suitable for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, **6**(9): 933-939
- [66] Antikor. Antikor business[M/OL]. Stevenage: Antikor, 2023 [2023-04-22]. <https://www.antikor.co.uk/investors/antikor-business>
- [67] Kim K M, McDonagh C F, Westendorf L, *et al.* Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(8): 2486-2497
- [68] Richards D A. Exploring alternative antibody scaffolds: antibody fragments and antibody mimics for targeted drug delivery. *Drug Discov Today Technol*, 2018, **30**: 35-46
- [69] Nessler I, Khera E, Vance S, *et al.* Increased tumor penetration of single-domain antibody-drug conjugates improves *in vivo* efficacy in prostate cancer models. *Cancer Res*, 2020, **80**(6): 1268-1278
- [70] Ubah O C, Buschhaus M J, Ferguson L, *et al.* Next-generation flexible formats of VNAR domains expand the drug platform's utility and developability. *Biochem Soc Trans*, 2018, **46**(6): 1559-1565

- [71] Sheyi R, De La Torre B G, Albericio F. Linkers: an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(2): 396
- [72] Marmé F. Antibody-drug conjugates for breast cancer. *Oncol Res Treat*, 2022, **45**(1-2): 26-36
- [73] Verkade J M M, Wijdeven M A, Van Geel R, *et al.* A polar sulfamide spacer significantly enhances the manufacturability, stability, and therapeutic index of antibody-drug conjugates. *Antibodies (Basel)*, 2018, **7**(1): 12
- [74] Sagi A, Segal E, Satchi-Fainaro R, *et al.* Remarkable drug-release enhancement with an elimination-based AB3 self-immolative dendritic amplifier. *Bioorg Med Chem*, 2007, **15**(11): 3720-3727
- [75] Lyon R P, Setter J R, Bovee T D, *et al.* Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(10): 1059-1062
- [76] Hu X, Jiang H, Bai W, *et al.* Synthesis, characterization, and targeted chemotherapy of SCT200-linker-monomethyl auristatin E conjugates. *Eur J Med Chem*, 2021, **216**: 113297
- [77] Kovtun Y V, Audette C A, Mayo M F, *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. *Cancer Res*, 2010, **70**(6): 2528-2537
- [78] He J, Yu S F, Yee S, *et al.* Characterization of *in vivo* biotransformations for trastuzumab emtansine by high-resolution accurate-mass mass spectrometry. *MAbs*, 2018, **10**(7): 960-967
- [79] Ashman N, Bargh J D, Spring D R. Non-internalising antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(22): 9182-9202
- [80] Bernardes G J, Casi G, Trüssel S, *et al.* A traceless vascular-targeting antibody-drug conjugate for cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(4): 941-944
- [81] Govindan S V, Cardillo T M, Moon S J, *et al.* CEACAM5-targeted therapy of human colonic and pancreatic cancer xenografts with potent labetuzumab-SN-38 immunoconjugates. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(19): 6052-6061
- [82] DiJoseph J F, Dougher M M, Armellino D C, *et al.* CD20-specific antibody-targeted chemotherapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma using calicheamicin-conjugated rituximab. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, **56**(7): 1107-1117
- [83] Fuchigami H, Manabe S, Yasunaga M, *et al.* Chemotherapy payload of anti-insoluble fibrin antibody-drug conjugate is released specifically upon binding to fibrin. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 14211
- [84] Conilh L, Sadilkova L, Viricel W, *et al.* Payload diversification: a key step in the development of antibody-drug conjugates. *J Hematol Oncol*, 2023, **16**(1): 3
- [85] Ogita Y, Aida T, Hagihara K, *et al.* DS-8201a, A novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res*, 2016, **22**(20): 5097-5108
- [86] Weng W, Meng T, Zhao Q, *et al.* Antibody-exatecan conjugates with a novel self-immolative moiety overcome resistance in colon and lung cancer. *Cancer Discov*, 2023, **13**(4): 950-973
- [87] Bartsch R. Trastuzumab-deruxtecan: an investigational agent for the treatment of HER2-positive breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, **29**(9): 901-910
- [88] Pahl A, Lutz C, Hechler T. Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates. *Drug Discov Today Technol*, 2018, **30**: 85-89
- [89] Abbvie. A study with abbv-155 alone and in combination with taxane therapy in adults with relapsed and/or refractory solid tumors[M/OL]. North Chicago: Abbvie, 2023[2023-04-22]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03595059>
- [90] Kularatne S A, Venkatesh C, Santhapuram H K, *et al.* Synthesis and biological analysis of prostate-specific membrane antigen-targeted anticancer prodrugs. *J Med Chem*, 2010, **53**(21): 7767-7777
- [91] Reddy J A, Dorton R, Dawson A, *et al.* *In vivo* structural activity and optimization studies of folate-tubulysin conjugates. *Mol Pharm*, 2009, **6**(5): 1518-1525
- [92] Owonikoko T K, Hussain A, Stadler W M, *et al.* First-in-human multicenter phase I study of BMS-936561 (MDX-1203), an antibody-drug conjugate targeting CD70. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, **77**(1): 155-162
- [93] Liang Z X. Complexity and simplicity in the biosynthesis of enediyne natural products. *Nat Prod Rep*, 2010, **27**(4): 499-528
- [94] Tsao Y P, Russo A, Nyamuswa G, *et al.* Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer Res*, 1993, **53**(24): 5908-5914
- [95] Hertzberg R P, Caranfa M J, Hecht S M. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 1989, **28**(11): 4629-4638
- [96] Bendixen C, Thomsen B, Alsner J, *et al.* Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. *Biochemistry*, 1990, **29**(23): 5613-5619
- [97] Mantaj J, Jackson P J, Rahman K M, *et al.* From anthracycline to pyrrolbenzodiazepine (PBD)-containing antibody-drug conjugates (ADCs). *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(2): 462-488
- [98] Carter C A, Waud W R, Li L H, *et al.* Preclinical antitumor activity of bizelesin in mice. *Clin Cancer Res*, 1996, **2**(7): 1143-1149
- [99] Chari R V, Jackel K A, Bourret L A, *et al.* Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res*, 1995, **55**(18): 4079-4084
- [100] Zhang X, Thummuri D, Liu X, *et al.* Discovery of PROTAC BCL-X_L degraders as potent anticancer agents with low on-target platelet toxicity. *Eur J Med Chem*, 2020, **192**: 112186
- [101] He H, Ratnayake A S, Janso J E, *et al.* Cytotoxic spliceostatsins from *Burkholderia* sp. and their semisynthetic analogues. *J Nat Prod*, 2014, **77**(8): 1864-1870
- [102] Marshall D J, Harried S S, Murphy J L, *et al.* Extracellular antibody drug conjugates exploiting the proximity of two proteins. *Mol Ther*, 2016, **24**(10): 1760-1770
- [103] Jang S, Yu X M, Montemayor-Garcia C, *et al.* Dysadherin specific

- drug conjugates for the treatment of thyroid cancers with aggressive phenotypes. *Oncotarget*, 2017, **8**(15): 24457-24468
- [104] Love E A, Sattikar A, Cook H, *et al.* Developing an antibody-drug conjugate approach to selective inhibition of an extracellular protein. *Chembiochem*, 2019, **20**(6): 754-758
- [105] Fang S, Brems B M, Olawode E O, *et al.* Design and characterization of immune-stimulating imidazo[4, 5-c]quinoline antibody-drug conjugates. *Mol Pharm*, 2022, **19**(9): 3228-3241
- [106] Strop P, Liu S H, Dorywalska M, *et al.* Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem Biol*, 2013, **20**(2): 161-167
- [107] Junutula J R, Raab H, Clark S, *et al.* Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(8): 925-932
- [108] Adhikari P, Zacharias N, Ohri R, *et al.* Site-specific conjugation to cys-engineered THIOMAB™ antibodies//Tumey L N. *Antibody-Drug Conjugates*. New York: Humana, 2020: 51-69
- [109] Oller-Salvia B. Genetic encoding of a non-canonical amino acid for the generation of antibody-drug conjugates through a fast bioorthogonal reaction. *J Vis Exp*, 2018(139): e58066
- [110] Rezhdo A, Islam M, Huang M, *et al.* Future prospects for noncanonical amino acids in biological therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, **60**: 168-178
- [111] Krüger T, Dierks T, Sewald N. Formylglycine-generating enzymes for site-specific bioconjugation. *Biol Chem*, 2019, **400**(3): 289-297
- [112] Dai Z, Zhang X N, Nasertorabi F, *et al.* Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates by ADP-ribosyl cyclases. *Sci Adv*, 2020, **6**(23): eaba6752
- [113] Manabe S, Yamaguchi Y. Antibody glycoengineering and homogeneous antibody-drug conjugate preparation. *Chem Rec*, 2021, **21**(11): 3005-3014
- [114] Chon H, Kanamori S, Hibino K, *et al.* ez-ADiCon: a novel glyco-remodeling based strategy that enables preparation of homogenous antibody-drug conjugates *via* one-step enzymatic transglycosylation with payload-preloaded bi-antennary glycan complexes. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023, **80**: 129117
- [115] Jain N, Smith S W, Ghone S, *et al.* Current ADC linker chemistry. *Pharm Res*, 2015, **32**(11): 3526-3540
- [116] Mädler S, Bich C, Touboul D, *et al.* Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom*, 2009, **44**(5): 694-706
- [117] Su D, Kozak K R, Sadowsky J, *et al.* Modulating antibody-drug conjugate payload metabolism by conjugation site and linker modification. *Bioconjug Chem*, 2018, **29**(4): 1155-1167
- [118] Hamblett K J, Senter P D, Chace D F, *et al.* Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(20): 7063-7070
- [119] Sang H, Wan N, Lu G, *et al.* Conjugation site analysis of lysine-conjugated ADCs//Tumey L N. *Antibody-Drug Conjugates*. New York: Humana, 2020: 235-250
- [120] Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, *et al.* Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs*, 2011, **3**(2): 161-172
- [121] Kim M T, Chen Y, Marhoul J, *et al.* Statistical modeling of the drug load distribution on trastuzumab emtansine (Kadcyla), a lysine-linked antibody drug conjugate. *Bioconjug Chem*, 2014, **25**(7): 1223-1232
- [122] Chari R V J, Miller M L, Widdison W C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(15): 3796-3827
- [123] Chalker J M, Bernardes G J, Lin Y A, *et al.* Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *ChemAsian J*, 2009, **4**(5): 630-640
- [124] Song Y, Cai H, Tan Z, *et al.* Mechanistic insights into inter-chain disulfide bond reduction of IgG1 and IgG4 antibodies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, **106**(3): 1057-1066
- [125] Liu H, Chumsae C, Gaza-Bulsecu G, *et al.* Ranking the susceptibility of disulfide bonds in human IgG1 antibodies by reduction, differential alkylation, and LC-MS analysis. *Anal Chem*, 2010, **82**(12): 5219-5226
- [126] Bird M, Nunes J, Frigerio M. Bridged cysteine conjugations//Tumey L N. *Antibody-Drug Conjugates*. New York: Humana, 2020: 113-129
- [127] Valliere-Douglass J F, Hengel S M, Pan L Y. Approaches to interchain cysteine-linked ADC characterization by mass spectrometry. *Mol Pharm*, 2015, **12**(6): 1774-1783
- [128] Ochtrup P, Hackenberger C P R. Recent advances of thiol-selective bioconjugation reactions. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, **58**: 28-36
- [129] Levengood M R, Zhang X, Hunter J H, *et al.* Orthogonal cysteine protection enables homogeneous multi-drug antibody-drug conjugates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(3): 733-737
- [130] Guo J, Kumar S, Chipley M, *et al.* Characterization and higher-order structure assessment of an interchain cysteine-based ADC: impact of drug loading and distribution on the mechanism of aggregation. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(3): 604-615
- [131] Chiu D, Pan L, Fay L, *et al.* Structural characterization of a monomethylauristatin-E based ADC that contains 8 drugs conjugated at interchain cysteine residues. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **205**: 114309
- [132] Szijj P A, Bahou C, Chudasama V. Minireview: addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates. *Drug Discov Today Technol*, 2018, **30**: 27-34
- [133] Hanby A R, Walsh S J, Counsell A J, *et al.* Antibody dual-functionalisation enabled through a modular divinylpyrimidine disulfide rebridging strategy. *Chem Commun*, 2022, **58**(67): 9401-9404
- [134] Dannheim F M, Walsh S J, Orozco C T, *et al.* All-in-one disulfide bridging enables the generation of antibody conjugates with modular cargo loading. *Chem Sci*, 2022, **13**(30): 8781-8790
- [135] Huang R, Sheng Y, Wei D, *et al.* Bis(vinylsulfonyl)piperazines as efficient linkers for highly homogeneous antibody-drug conjugates. *Eur J Med Chem*, 2020, **190**: 112080
- [136] Morais M, Forte N, Chudasama V, *et al.* Application of next-generation maleimides (NGMs) to site-selective antibody conjugation//Sam Massa N D. *Bioconjugation*. New York:

- Humana, 2019: 15-24
- [137] Greene M K, Chen T, Robinson E, *et al.* Controlled coupling of an ultrapotent auristatin warhead to cetuximab yields a next-generation antibody-drug conjugate for EGFR-targeted therapy of KRAS mutant pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 2020, **123**(10): 1502-1512
- [138] Shi B, Wu M, Li Z, *et al.* Antitumor activity of a 5T4 targeting antibody drug conjugate with a novel payload derived from MMAF via C-Lock linker. *Cancer Med*, 2019, **8**(4): 1793-1805
- [139] Pabst M, McDowell W, Manin A, *et al.* Modulation of drug-linker design to enhance *in vivo* potency of homogeneous antibody-drug conjugates. *J Control Release*, 2017, **253**: 160-164
- [140] Yang M C, Shia C S, Li W F, *et al.* Preclinical studies of OBI-999: a novel globo H-targeting antibody-drug conjugate. *Mol Cancer Ther*, 2021, **20**(6): 1121-1132
- [141] Li L, Tong W, Lau M, *et al.* Preclinical development of an anti-CD38 antibody-drug conjugate for treatment of hematological malignancies. *Blood*, 2019, **134**(Supplement_1): 5621-5621
- [142] Shinmi D, Taguchi E, Iwano J, *et al.* One-step conjugation method for site-specific antibody-drug conjugates through reactive cysteine-engineered antibodies. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(5): 1324-1331
- [143] Pillow T H, Adhikari P, Blake R A, *et al.* Antibody conjugation of a chimeric BET degrader enables *in vivo* activity. *ChemMedChem*, 2020, **15**(1): 17-25
- [144] Neumann C S, Olivas K C, Anderson M E, *et al.* Targeted delivery of cytotoxic NAMPT inhibitors using antibody-drug conjugates. *Mol Cancer Ther*, 2018, **17**(12): 2633-2642
- [145] Kovtun Y, Jones G E, Adams S, *et al.* A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMG632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv*, 2018, **2**(8): 848-858
- [146] Procopio-Melino R, Kotch F W, Prasad A S, *et al.* Cysteine metabolic engineering and selective disulfide reduction produce superior antibody-drug-conjugates. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 7262
- [147] Ma D, Jin F, Barletta F, *et al.* Abstract 644: impact of conjugation site on pharmacokinetics and off-target toxicity of site-specific antibody drug conjugates. *Cancer Res*, 2015, **75**(15_Supplement): 644-644
- [148] Hallam T J, Wold E, Wahl A, *et al.* Antibody conjugates with unnatural amino acids. *Mol Pharm*, 2015, **12**(6): 1848-1862
- [149] Hallam T J, Smider V V. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med Chem*, 2014, **6**(11): 1309-1324
- [150] Barok M, Le Joncour V, Martins A, *et al.* ARX788, a novel anti-HER2 antibody-drug conjugate, shows anti-tumor effects in preclinical models of trastuzumab emtansine-resistant HER2-positive breast cancer and gastric cancer. *Cancer Lett*, 2020, **473**: 156-163
- [151] Molina A, Yu A, Abrahams C, *et al.* STRO-001, a novel anti-CD74 antibody drug conjugate (ADC) for treatment of B-cell non-hodgkin's lymphomas (NHL). *Hematol Oncol*, 2017, **35**(S2): 255-256
- [152] Tang T, Le Q, Castro S, *et al.* Targeting FOLR1 in high-risk CBF2AT3-GLIS2 pediatric AML with STRO-002 FOLR1-antibody-drug conjugate. *Blood Adv*, 2022, **6**(22): 5933-5937
- [153] Li X, Zhou S, Abrahams C L, *et al.* Discovery of STRO-002, a novel homogeneous ADC targeting folate receptor alpha, for the treatment of ovarian and endometrial cancers. *Mol Cancer Ther*, 2023, **22**(2): 155-167
- [154] Naumann R W, Uyar D, Moroney J W, *et al.* Abstract CT125: STRO-002-GM1, a first in human, phase I study of STRO-002, an anti-folate receptor alpha (FR α) antibody drug conjugate (ADC), in patients with advanced platinum-resistant/refractory epithelial ovarian cancer (OC), including fallopian tube or primary peritoneal cancers. *Cancer Res*, 2020, **80**(16_Supplement): CT125
- [155] Nilchan N, Li X, Pedzisa L, *et al.* Dual-mechanistic antibody-drug conjugate via site-specific selenocysteine/cysteine conjugation. *Antib Ther*, 2019, **2**(4): 71-78
- [156] Brandish P E, Palmieri A, Antonenko S, *et al.* Development of anti-CD74 antibody-drug conjugates to target glucocorticoids to immune cells. *Bioconjug Chem*, 2018, **29**(7): 2357-2369
- [157] Schneider H, Deweid L, Avrutina O, *et al.* Recent progress in transglutaminase-mediated assembly of antibody-drug conjugates. *Anal Biochem*, 2020, **595**: 113615
- [158] Walsh S J, Bargh J D, Dannheim F M, *et al.* Site-selective modification strategies in antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev*, 2021, **50**(2): 1305-1353
- [159] Dickgiesser S, Rieker M, Mueller-Pompalla D, *et al.* Site-specific conjugation of native antibodies using engineered microbial transglutaminases. *Bioconjug Chem*, 2020, **31**(4): 1070-1076
- [160] Spidel J L, Albane E F. Efficient production of homogeneous lysine-based antibody conjugates using microbial transglutaminase//Sam Massa N D. *Bioconjugation*. New York: Humana, 2019: 53-65
- [161] Appel M J, Bertozzi C R. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications. *ACS Chem Biol*, 2015, **10**(1): 72-84
- [162] Agarwal P, Kudirka R, Albers A E, *et al.* Hydrazino-Pictet-Spengler ligation as a biocompatible method for the generation of stable protein conjugates. *Bioconjug Chem*, 2013, **24**(6): 846-851
- [163] Liu J, Barfield R M, Rabuka D. Site-specific bioconjugation using SMARTag[®] technology: a practical and effective chemoenzymatic approach to generate antibody-drug conjugates//Sam Massa N D. *Bioconjugation*. New York: Humana, 2019: 131-147
- [164] Drake P M, Carlson A, McFarland J M, *et al.* CAT-02-106, a site-specifically conjugated anti-CD22 antibody bearing an MDR1-resistant maytansine payload yields excellent efficacy and safety in preclinical models. *Mol Cancer Ther*, 2018, **17**(1): 161-168
- [165] Hernandez-Ilizaliturri F J, Flinn I W, Kuruvilla J, *et al.* A phase I pharmacokinetic (pk) and safety study of Trph-222 in patients with relapsed/refractory B-Cell non-hodgkin lymphoma (R/R NHL): dose-escalation results. *Blood*, 2020, **136**(Supplement 1): 41-42
- [166] Polmear J, Good-Jacobson K L. Antibody glycosylation directs innate and adaptive immune collaboration. *Curr Opin Immunol*, 2022, **74**: 125-132
- [167] Vaccaro C, Zhou J, Ober R J, *et al.* Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels. *Nat*

- Biotechnol, 2005, **23**(10): 1283-1288
- [168] Wijdeven M A, Van Geel R, Hoogenboom J H, *et al.* Enzymatic glycan remodeling-metal free click (GlycoConnect™) provides homogenous antibody-drug conjugates with improved stability and therapeutic index without sequence engineering. *MAbs*, 2022, **14**(1): 2078466
- [169] 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. *Bioconjug Chem*, 2015, **26**(11): 2233-2242
- [170] De Bever L, Popal S, Van Schaik J, *et al.* Generation of DAR1 antibody-drug conjugates for ultrapotent payloads using tailored GlycoConnect technology. *Bioconjug Chem*, 2023, **34**(3): 538-548
- [171] Synaffix. Hitting the antibody-drug conjugate sweet spot[M/OL]. Netherlands: Synaffix, 2023 [2023-04-22]. <https://www.nature.com/articles/d43747-022-00069-7>
- [172] Parsons T B, Struwe W B, Gault J, *et al.* Optimal synthetic glycosylation of a therapeutic antibody. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(7): 2361-2367
- [173] Zhu Z, Ramakrishnan B, Li J, *et al.* Site-specific antibody-drug conjugation through an engineered glycotransferase and a chemically reactive sugar. *MAbs*, 2014, **6**(5): 1190-1200
- [174] Tang F, Yang Y, Tang Y, *et al.* One-pot N-glycosylation remodeling of IgG with non-natural sialylglycopeptides enables glycosite-specific and dual-payload antibody-drug conjugates. *Org Biomol Chem*, 2016, **14**(40): 9501-9518
- [175] Zuberbühler K, Casi G, Bernardes G J, *et al.* Fucose-specific conjugation of hydrazide derivatives to a vascular-targeting monoclonal antibody in IgG format. *Chem Commun*, 2012, **48**(56): 7100-7102
- [176] Okeley N M, Toki B E, Zhang X, *et al.* Metabolic engineering of monoclonal antibody carbohydrates for antibody-drug conjugation. *Bioconjug Chem*, 2013, **24**(10): 1650-1655
- [177] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*, 2021, **221**: 107753
- [178] Purcell J W, Tanlimco S G, Hickson J, *et al.* LRRC15 is a novel mesenchymal protein and stromal target for antibody-drug conjugates. *Cancer Res*, 2018, **78**(14): 4059-4072
- [179] Yap M L, Mcfadyen J D, Wang X, *et al.* Activated platelets in the tumor microenvironment for targeting of antibody-drug conjugates to tumors and metastases. *Theranostics*, 2019, **9**(4): 1154-1169
- [180] Joubert N, Denevault-Sabourin C, Bryden F, *et al.* Towards antibody-drug conjugates and prodrug strategies with extracellular stimuli-responsive drug delivery in the tumor microenvironment for cancer therapy. *Eur J Med Chem*, 2017, **142**: 393-415
- [181] Mathur R, Weiner G J. Picking the optimal target for antibody-drug conjugates. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2013. doi: 10.14694/EdBook_AM.2013.33.e103
- [182] Demetri G D, Luke J J, Hollebecque A, *et al.* First-in-human phase I study of ABBV-085, an antibody-drug conjugate targeting LRRC15, in sarcomas and other advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(13): 3556-3566
- [183] Giansanti F, Capone E, Ponziani S, *et al.* Secreted Gal-3BP is a novel promising target for non-internalizing antibody-drug conjugates. *J Control Release*, 2019, **294**: 176-184
- [184] Gébleux R, Stringhini M, Casanova R, *et al.* Non-internalizing antibody-drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix. *Int J Cancer*, 2017, **140**(7): 1670-1679
- [185] Matsumura Y. Cancer stromal targeting therapy to overcome the pitfall of EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154-155**: 142-150
- [186] Bennett G, Brown A, Mudd G, *et al.* MMAE delivery using the bicycle toxin conjugate BT5528. *Mol Cancer Ther*, 2020, **19**(7): 1385-1394
- [187] Zhu Y S, Tang K, Lü J. Peptide-drug conjugate-based novel molecular drug delivery system in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, **42**(10): 857-869
- [188] Bilodeau M T, Shinde R, White B, *et al.* Abstract 3674: Pentarins: improved tumor targeting through nanoparticle encapsulation of miniaturized biologic drug conjugates. *Cancer Res*, 2015, **75**(15_Supplement): 3674
- [189] White B H, Whalen K, Kriksiukaite K, *et al.* Discovery of an SSTR2-targeting maytansinoid conjugate (PEN-221) with potent activity *in vitro* and *in vivo*. *J Med Chem*, 2019, **62**(5): 2708-2719
- [190] Yamazaki C M, Yamaguchi A, Anami Y, *et al.* Antibody-drug conjugates with dual payloads for combating breast tumor heterogeneity and drug resistance. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3528
- [191] Weide B, Eigentler T, Catania C, *et al.* A phase II study of the L19IL2 immunocytokine in combination with dacarbazine in advanced metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, **68**(9): 1547-1559
- [192] Maneiro M A, Forte N, Shchepinova M M, *et al.* Antibody-PROTAC conjugates enable HER2-dependent targeted protein degradation of BRD4. *ACS Chem Biol*, 2020, **15**(6): 1306-1312
- [193] Cao W, Li R, Pei X, *et al.* Antibody-siRNA conjugates (ARC): emerging siRNA drug formulation. *Med Drug Discov*, 2022, **15**: 100128
- [194] Mullard A. Antibody-oligonucleotide conjugates enter the clinic. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, **21**(1): 6-8
- [195] Johnson N, Day J, Hamel J, *et al.* Study design of AOC 1001-CS1, a phase 1/2 clinical trial evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AOC 1001 administered intravenously to adult patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1) (MARINA) (S23.006). *Neurology*, 2022, **98**(18 Supplement): 2711

Technology Advancement in Development of Antibody Drug Conjugates

LIU Wen-Chao, LI Hong-Feng, HU Chao-Hong*

(Shanghai Miracogen Inc., Shanghai 201203, China)

Abstract Antibody drug conjugate (ADC) is typically composed of a monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic small molecule drug *via* a linker. It is an emerging and promising class of targeted cancer therapeutics, combining both the highly cytotoxic activity of chemical drugs and highly targeting ability and specificity of monoclonal antibody. Fourteen ADCs have been approved for marketing so far worldwide, and more than 140 ADC drug candidates have been investigated in clinical studies. Various ADC technologies have been well developed to manufacture these ADC drugs in commercial scale as well as clinical scale. In this review, we describe the molecular structure, mechanisms of action and development history of ADCs. We then provide an overview of the current landscape and recent advances in each key element of ADCs, including antibody, linker, payload and conjugation, and their advantages and disadvantages. Future directions in ADC development may encompass smaller sized forms of antibodies such as antibody fragments and nanobodies to improve the penetration and accumulation of ADCs in the solid tumors. Novel linkers are also being tested to enhance the stability in circulation systems and reduce off-target toxicities. Emerging payloads of new functional mechanisms are also explored in the construction of ADCs to overcome the drug resistance resulted from currently used payloads of marketed ADCs. Various site-specific conjugation technologies have been adopted to reduce the heterogeneity of drug-load species and optimize the pharmacokinetic properties of ADCs. This review article aims to enhance systemic understanding and careful considerations in designing an ADC drug with improved efficacy and safety.

Key words antibody drug conjugate, antibody, linker, payload, conjugation

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0141

* Corresponding author.

Tel: 86-21-61637960, E-mail: mary_hu@miracogen.com.cn

Received: April 11, 2023 Accepted: April 24, 2023