

抗体偶联药物及其体内外代谢的研究进展

陶泽萍^{1, 2, 3}, 许波华³, 周璐², 柳庆龙², 张云³, 陶巧玉^{3, 4}, 张金明³, 赵小平^{1, 5*}

1. 上海工程技术大学 化学化工学院, 上海 201620
2. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203
3. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133
4. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012
5. 上海天泽云泰生物医药有限公司, 上海 201210

摘要: 抗体偶联药物(ADC)是由单克隆抗体和细胞毒性有效载荷通过连接子偶联而成, 结合了单克隆抗体的高特异性靶向能力和细胞毒活性小分子高效杀伤作用的优点, 实现了对癌细胞的精准高效清除, 已成为抗癌药物研发的热点之一。自2000年美国食品药品监督管理局(FDA)批准第一个ADC药物吉妥珠单抗(Mylotarg)以来, 迄今全球已有14个ADC药物获批上市。这类新型的抗癌药物正引领癌症靶向治疗的新时代。基于ADC药物的构建核心和抗肿瘤作用机制, 对ADC药物的体内外代谢的研究进展进行综述, 以期从代谢角度为ADC药物的设计、开发、临床前药理、毒理及后续研究提供参考。

关键词: 抗体偶联药物; 抗肿瘤; 靶向治疗; 作用机制; 代谢; 临床前药理; 临床前毒理

中图分类号: R979.1; R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2574-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.024

Research progress of antibody-drug conjugates and their metabolism *in vitro* and *in vivo*

TAO Zeping^{1, 2, 3}, XU Bohua³, ZHOU Lu², LIU Qinglong², ZHANG Yun³, TAO Qiaoyu^{3, 4}, ZHANG Jinming³, ZHAO Xiaoping^{1, 5}

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China
2. Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China
3. Nantong InnoStar Biotech Co., Ltd., Nantong 226133, China
4. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China
5. Shanghai Vitalgen BioPharma Co., Ltd., Shanghai 201210, China

Abstract: Antibody-drug conjugates (ADC) are formed by coupling monoclonal antibodies and cytotoxic payloads through linkers. ADC drugs combine the advantages of high specific targeting ability of monoclonal antibodies and efficient killing effect of small cytotoxic molecules to achieve accurate and efficient removal of cancer cells, and have become one of the hot spots in the research and development of anticancer drugs. Since the food and Drug Administration (FDA) approved the first ADC drug Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) in 2000, so far, 14 ADC drugs have been approved for marketing in the world. This new anticancer drug is leading a new era of cancer targeted therapy. Based on the core construction and anti-tumor mechanism of ADC drugs, the research progress of *in vitro* and *in vivo* metabolism of ADC drugs is reviewed, in order to provide more references for the design, development, preclinical pharmacology / toxicology and follow-up research of ADC drugs from the perspective of metabolism.

Key words: antibody drug conjugates; anti-tumor; targeted therapy; mechanism; metabolism; preclinical pharmacology; preclinical toxicology

收稿日期: 2022-08-17

基金项目: 江苏省创新能力建设计划科技公共服务平台项目(BM2021002)

第一作者: 陶泽萍, 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学及药物代谢动力学。Tel: 15737345206 E-mail: 1490422375@qq.com

*通信作者: 赵小平, 女, 研究员, 博士, 研究方向为药理学及药物代谢动力学。Tel: 13651694804 E-mail: xp.zhao@vitalgen.com

近年来,抗体偶联药物(antibody-drug conjugates, ADC)是发展最快的肿瘤治疗药物类别之一。ADC药物的发展起始于血液肿瘤^[1-3],以人表皮生长因子受体-2(HER2)靶点为代表的创新型ADC药物,如Kadcyla或Enhertu在实体瘤中取得突破性结果^[4-5],同时其他靶点的ADC药物也在临床前研究中显示出良好的效果^[6-10]。自2000年美国食品药品监督管理局(FDA)批准第一个ADC药物吉妥珠单抗(Mylotarg)以来,迄今全球已有14款ADC药物获批上市,其中注射用维迪西妥单抗是我国药企自主研发上市的第一款ADC药物,Adcetris、Kadcyla、Besponsa、Trodely 4款国外上市的ADC药物也同时在中国获批上市。

FDA于2022年2月发布了供企业用的指导原则草案“抗体偶联药物的考虑”^[11],国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)也于近日发布了《抗体偶联药物非临床研究技术指导原则(征求意见稿)》,意在更好地指导和促进ADC药物的研究和开发。ADC药物的研发是以安全性和有效性为原则,但由于ADC药物在血液或非特异性部位过早释放有效载荷而造成脱靶毒性,以及ADC药物在特异性内化后可能产生药理活性代谢物^[12],二者均可能对人体存在一定的潜在毒性,因此,有必要关注ADC药物的代谢研究,了解有效载荷释放机制及其代谢途径,进一步探讨ADC药物的构建核心和抗肿瘤作用机制。本文对ADC药物的体内外代谢的研究进展进行综述,以期从代谢角度为ADC药物的设计、开发、临床前药理或毒理及后续研究提供有益的参考。

1 ADC药物简况

1.1 ADC药物的构建核心

ADC药物的构建核心在于3个关键组分和偶联方法。3个关键组分分别为:能与靶标抗原特异性结合的单克隆抗体(mAb)、连接子(linker)、细胞毒性有效载荷(payload)^[13]。目前批准用于临床或正在开发的大多数ADC药物均使用人源化或人单克隆抗体,以确保足够的抗原亲和力和特异性、较长的血清半衰期和最小的免疫原性^[14],抗体部分主要是免疫球蛋白G(IgG)抗体,其中IgG1是最常用的亚型^[15]。根据细胞中的代谢途径,ADC药物使用的连接子包括可裂解和不可裂解两种类型。ADC药物的细胞毒性有效载荷主要包括强效微管蛋白抑制剂、脱氧核糖核酸(DNA)损伤剂和免疫调节剂^[16]。

ADC药物的偶联方法决定了ADC药物的很多

重要属性,如药物抗体比值(DAR)、药动学(PK)、药效学(PD)、治疗指数等。目前,连接抗体和有效载荷的方法包括随机偶联和定点偶联^[17-21]。随机偶联方式主要有赖氨酸残基偶联和半胱氨酸残基偶联两种。该方式的弊端是每一批次的ADC药物产品异质性较大,DAR值分布不均,导致ADC药物的药物动力和药物代谢受到影响^[22]。定点偶联方式,包括反应性半胱氨酸偶联,即Thiomab技术^[23]、非天然氨基酸偶联^[24-25]、酶催化偶联^[26-27]、糖基化偶联^[28]。该方式可生成具有均匀DAR值、高效、良好稳定性和高安全性的ADC药物^[29]。

1.2 ADC药物的抗肿瘤作用机制

ADC药物抗肿瘤作用的核心机制为:ADC药物通过静脉给药,进入体内后,抗体与肿瘤细胞上的靶抗原特异性结合,ADC药物被内吞或内化形成初级内体,随后成熟为次级内体,最终与溶酶体融合,细胞毒性有效载荷通过溶酶体中的化学或酶环境介导释放,靶向DNA或微管导致细胞凋亡或死亡^[30-31];此外ADC药物的抗体成分可与免疫效应细胞结合,从而诱导抗肿瘤免疫,包括补体依赖的细胞毒性作用、抗体依赖的细胞毒作用和抗体依赖的细胞吞噬作用^[32-33];ADC药物的抗体成分还可以特异性地结合肿瘤细胞的表面抗原,抑制抗原受体的下游信号转导以抑制肿瘤生长^[34]。

1.3 全球已获批上市的ADC药物

截至2022年6月,全球已有14款ADC药物获批上市^[31]。药物的商品名称及作用靶点总结如下: Mylotarg以髓系细胞分化抗原CD33为靶点; Adcetris以肿瘤坏死因子受体CD30为靶点; Kadcyla、Enhertu、注射用维迪西妥单抗三者均以HER2为靶点; Besponsa、Lumoxiti均以B细胞表面受体CD22为靶点; Polivy以B细胞表面抗原CD79b为靶点; Padcev以膜蛋白类黏附分子Nectin-4为靶点; Trodely以人滋养细胞表面抗原2(TROP2)为靶点; Blenrep以B细胞成熟抗原(BCMA)为靶点; AKalux以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点; Zynlonca以白细胞分化抗原CD19为靶点; Tivdak以组织因子(TF)为靶点。

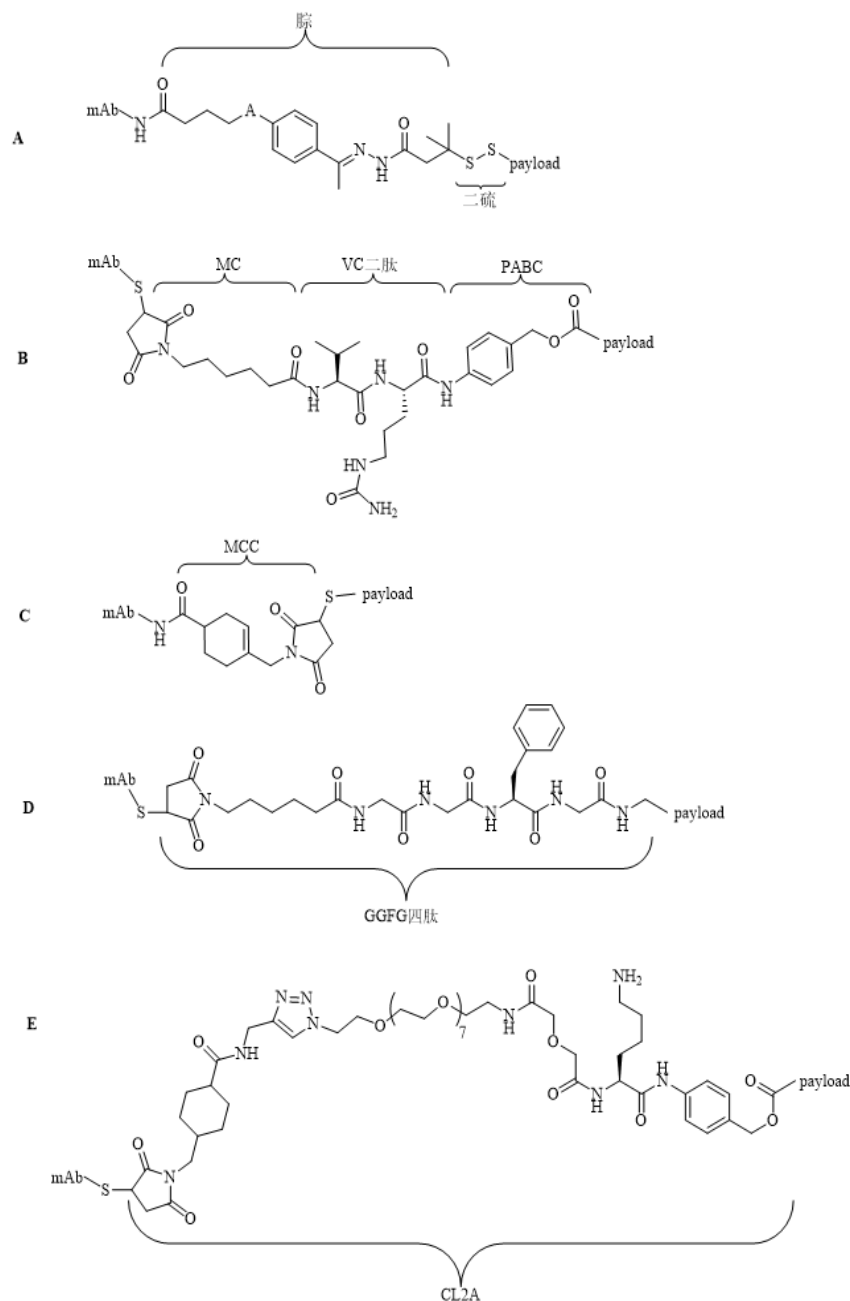
2 ADC药物的代谢

ADC药物作为癌症治疗的常用药,很可能与其他药物配伍使用,且含有高效的细胞毒性有效载荷,因此有效载荷相关代谢在一定程度上影响药效,因为代谢产物可能具有药理学、毒理学潜力和药物-药物相互作用(DDI)。连接子的选择会影响

ADC 药物有效载荷的释放及代谢。连接子可分为两种类型:可裂解连接子和不可裂解连接子^[35]。已上市 ADC 药物中不同的连接子结构见图 1。根据连接子类型的不同,ADC 药物代谢包括两种可能:解偶联代谢与分解代谢。

2.1 解偶联代谢

解偶联代谢指 ADC 药物利用体循环和肿瘤细胞之间的环境差异在初级或次级体内以及溶酶体中释放游离有效载荷,同时保留完整抗体^[35-36]。该方式主要发生在具有可裂解连接子包括化学裂解



A-Mylotarg、Besponsa 使用可裂解腙连接子;B-Adcetris、Lumoxiti、Polivy、Padcev、注射用维迪西妥单抗和 Tivdak 均使用 MC-VC-PABC 连接子(MC-VC-PABC 连接子,将不可裂解的 MC 和可裂解的 VC 二肽连接子与 PABC 间隔子结合),Zynlonca 使用可裂解缬氨酸-丙氨酸(VA)二肽连接子(类似 VC 二肽),Blenrep 使用不可裂解 MC 连接子;C-Kadcyla 中使用不可裂解 MCC 连接子;D-Enhertu 使用可裂解 GGFG 四肽连接子;E-Trodelvy 使用可裂解 CL2A 连接子

A-Mylotarg, Besponsa use a cleavable hydrazone linker; B-Adcetris, Lumoxiti, Polivy, Padcev, Vidicatumumab for injection and Tivdak all use the MC-VC-PABC linker (MC-VC-PABC linker, which binds non-cleavable MC and cleavable VC dipeptide linker to PABC spacer); Zynlonca uses cleavable valine-alanine (VA) dipeptide linker (similar to VC dipeptide); Blenrep uses a non-cleavable MC linker; C-Kadcyla uses a non-cleavable MCC linker; D-Enhertu uses a cleavable GGFG tetrapeptide linker; E-Trodelvy uses a cleavable CL2A linker

图 1 已上市 ADC 药物中不同的连接子结构

Fig. 1 Schematic diagram of different linker structures in marketed ADC drugs

连接子(脞键和二硫键)和酶裂解连接子(肽键)的ADC药物中。

具有脞键的ADC药物在血液循环中通常是稳定的,但在内化至靶向癌细胞后,在溶酶体(pH 4.8)和核内体(pH 5.5~6.2)中水解释放游离有效载荷^[37]。二硫键连接子对还原性谷胱甘肽(GSH)敏感^[38];血液中GSH的浓度明显低于癌细胞内的浓度^[39],因此,具有二硫键连接子的ADC药物在血液系统中保持稳定,在GSH水平较高的癌细胞中还原释放游离有效载荷。Mylotarg(图1-A)同时具有脞键和二硫键,内化后脞键可以在内体酸性环境中水解,释放出卡奇霉素前体,后被GSH还原为游离的活性卡奇霉素。后者结合到DNA小槽上,并经历伯格曼环化反应,产生高活性的双自由基,导致DNA双链切割^[40]。但Mylotarg连接子并不稳定,导致卡奇霉素在血浆循环中过早释放^[41],产生严重脱靶毒性以致退出市场。肽类连接子已应用于多种ADC药物^[42],对溶酶体蛋白酶(如组织蛋白酶B)敏感。组织蛋白酶B通常在癌细胞中过表达,使有效载荷能够在癌细胞附近精准释放^[43]。Adcetris(图1-B)靶向CD30阳性肿瘤细胞,内化后缬氨酸-瓜氨酸二肽可裂解连接子降解,释放有效载荷甲基澳瑞他汀E(MMAE)杀伤靶细胞,并通过质膜扩散到邻近的癌细胞,杀伤CD30阴性肿瘤细胞,即旁观者效应^[40]。Enhertu(图1-D)具有可裂解的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(GGFG)四肽连接子,在细胞内经酶水解释放游离的有效载荷DXd,与拓扑异构酶I-DNA可裂解复合物结合,从而诱导双链DNA断裂,最终导致肿瘤细胞凋亡^[44]。同时,DXd具有高度的膜渗透性,可通过旁观者效应杀伤肿瘤微环境中HER2低表达或不表达的肿瘤细胞^[45]。

2.2 分解代谢

分解代谢指ADC药物抗体部分经溶酶体蛋白酶降解,分解代谢形成带有氨基酸残基和(或)连接子的有效载荷及其代谢产物^[46]。这种方式主要发生在具有不可裂解连接子的ADC药物中^[46]。

Kadcyla(图1-C)小分子毒素DM1通过不可裂解连接子4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(MCC)偶联到曲妥珠单抗的赖氨酸(Lys)残基上,经蛋白水解酶水解,形成活性代谢物Lys-MCC-DM1,而不是游离的DM1;Lys-MCC-DM1全部结合到微管蛋白上,抑制微管的正常组装,从而使肿瘤细胞分裂停滞,最后造成细胞凋亡^[47]。由于Lys-MCC-DM1中的Lys部分在细胞内环境中带电,不

能自由地穿过细胞膜,不具有旁观者效应,只靶向抗原阳性细胞^[40,47-48]。ADC药物Blenrep将有效载荷甲基澳瑞他汀F(MMAF)通过不可裂解连接子马来酰亚胺乙酰基(MC)偶联到抗体的半胱氨酸残基上,与BCMA结合后被蛋白酶水解释放,含有氨基酸残基和连接子的MMAF活性代谢产物,破坏微管蛋白,导致细胞凋亡^[49]。

综上,ADC药物根据其连接子类型及有效载荷,代谢可能生成游离有效载荷或其结构类似物,在体内均可能经药物代谢酶介导而进一步代谢,产生更多得有效载荷相关活性代谢产物,故有必要关注ADC药物有效载荷的释放及代谢。

3 ADC药物代谢的研究方法

3.1 体外方法

文献报道了多种体外研究方法,用于研究ADC药物的有效载荷释放和代谢,包括ADC药物的体外血浆稳定性、与表达靶抗原的癌细胞孵育、与肝S9组分孵育以及与蛋白酶孵育。

3.1.1 体外血浆稳定性 ADC药物的体外稳定性通常在不同物种(包括临床前物种和人类)的血浆中进行,并在药物发现阶段开展研究^[50],以评估连接子的稳定性和解偶联机制,确定是否会过早分解。这是由于ADC药物中的有效载荷具有强毒性,给药后的过早释放可能引起脱靶效应,对人体造成严重损伤。Mylotary中不耐酸脞连接子的不稳定导致细胞毒性有效载荷卡奇霉素过早在血浆中释放而引起全身毒性^[51];Enhertu中的DXd,第21天在小鼠、大鼠、猴子和人血浆中的释放率为1.2%~3.9%^[52],与Adcetris、Besponsa^[53-54]等其他ADC的释放率比较,相当或更低。这些结果表明Enhertu同其他ADC类似,在体外血浆中是稳定的。

3.1.2 与表达靶抗原的癌细胞孵育 ADC药物主要用于癌症的治疗,且根据其抗肿瘤作用机制,表达靶抗原的癌细胞适用于研究ADC药物有效载荷释放和代谢。Okeley等^[55]采用¹⁴C标记的MMAE制备Adcetris,基于放射性检测和液相色谱-质谱分析相结合的方法测定CD30⁺和CD30⁻细胞系细胞内Adcetris的代谢情况。并利用CD30⁺和CD30⁻混合培养的肿瘤细胞测定Adcetris的旁观者效应。结果在CD30⁺癌细胞内,检测到MMAE从Adcetris有效释放,并且由于其膜的通透性,能够对CD30⁻细胞发挥细胞毒活性,研究确定了Adcetris活性的分子基础。Erickson等^[56]在体外使用COLO205肿瘤细胞研究了具有二硫化物和硫醚连接子的美登素衍生

物(huC242-SPDB-DM4和huC242-SMCC-DM1)代谢。结果表明,赖氨酸结合物是huC242-SMCC-DM1的唯一代谢产物,而huC242-SPDB-DM4在体外形成Lys-Ne-SPDB-DM4、*S*-甲基-DM4、DM4(游离型)和*S*-半胱氨酸-DM4多个代谢产物。Rock等^[48]首次介绍了富集特定细胞器(溶酶体)的方法,研究带有不可裂解连接子的ADC药物(CD70 mAb-MCC-DM1)在786-0细胞内的代谢,并用高分辨率质谱鉴定代谢产物,结果仅检测到代谢产物Lys-MCC-DM1。利用该方法,可以在体外细胞系中建立更高层次的浓度-活性关系,有助于了解ADC药物发挥活性所需的代谢产物浓度。Yang等^[57]使用新型具有不可裂解连接子的肝细胞生长因子受体(c-Met)ADC药物SHR-A1403在高c-Met水平的癌细胞MKN45中进行体外孵育,结果在不同时间点的该细胞孵育样品中均鉴定出2种有效载荷相关的活性代谢产物,二者均可诱导微管蛋白聚集。Shastri等^[24]使用新的具有稳定脲键的ADC药物ARX788在HER2阳性(HCC1954)细胞、HER2阴性(MDA-MB-468)细胞、人肝细胞和猴肝细胞中进行体外孵育。结果仅在阳性细胞内检测到ARX788的唯一代谢产物pAF-AS269,而人和猴肝细胞中均未发现ARX788的代谢物。研究表明,ARX788中不可切割连接子定点偶联后形成的脲键具有高度稳定性,未释放游离的AS269有效载荷。

总的来说,癌细胞体系有助于研究ADC药物的早期代谢,但由于I期代谢酶下调和II期代谢酶上调,该方法在理解完全代谢方面的作用可能相对有限^[58]。

3.1.3 与肝S9组分孵育 肝S9组分包含所有主要的药物代谢酶,不依赖药物的渗透性,不依赖转运体,对细胞毒性药物不敏感。此外,S9组分可以在pH 7.4下使用,也可以酸化以模拟溶酶体环境(ADC的降解部位)的pH值。因此,该体系可用于研究完整ADC药物有效载荷的释放和代谢。Bessire等^[59]分别使用具有可裂解和不可裂解连接子的ADC药物与酸化S9组分、小鼠慢性肝功能衰竭(CLF)肝脏和组织蛋白酶共孵育,分析检测释放的有效载荷相关代谢产物。结果显示,具有可裂解和不可裂解连接子的ADC药物在酸化S9组分中均能释放有效载荷相关代谢产物,但前者对效果更好,后者释放率非常低。

3.1.4 与蛋白酶孵育 蛋白酶参与降解细胞外基质和蛋白质,它们与癌症的进展,特别是侵袭和转

移密切相关^[58]。ADC药物Adcetris中,MMAE通过缬氨酸-瓜氨酸连接子与特异性抗体cAC10连接,并被组织蛋白酶B靶向切割释放^[60]。组织蛋白酶B与ADC药物Cbr96-vc-MMAE共孵育,通过水解对氨基苯基和肽链之间的酰胺键,最终释放MMAE活性代谢物^[61]。Li等^[62]将组织蛋白酶B以及其他3种半胱氨酸蛋白酶(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和组织蛋白酶L),分别与具有缬氨酸-瓜氨酸连接子的ADC样品溶液共孵育,使用反相高效液相色谱法测定游离有效载荷释放量。结果4种半胱氨酸蛋白酶均能在相同的二肽位置从连接子上释放有效载荷,其中木瓜蛋白酶释放的游离有效载荷量最高,表明木瓜蛋白酶从该类型ADC药物中释放有效载荷方面具有更高的效率、选择性和特异性,这些酶均可用于ADC药物的早期优化。

综上所述,研究ADC药物代谢的体外方法日渐丰富,应根据ADC药物的连接子类型、化学结构以及可能发生的代谢反应选择最直接(或最简单)的体系进行体外研究。

3.2 体内方法

ADC药物的体内代谢研究通常使用放射性标记法进行。放射同位素检测灵敏度高,可以用于血浆、尿液、胆汁和粪便中的代谢产物分析。

3.2.1 ADC药物在荷瘤小鼠体内的代谢 ADC药物在体内的小分子毒素和小分子毒素代谢产物较低,对检测灵敏度要求很高,因此通常使用³H标记ADC进行相关研究。在BT-474EEI肿瘤小鼠体内研究^{[3}H]标记的Kadcyla或T-SPP-^{[3}H]DM1的代谢^[63]。给小鼠iv ADC药物300 μg·kg⁻¹,在给药后不同时间点采集血液样本,对照组给予非靶向ADC药物治疗,分析肿瘤匀浆液的总放射性,并使用有机提取物检测代谢产物。肿瘤提取物的高效液相色谱分析揭示了代谢产物主要为Lys-MCC-DM1、Lys-SPP-DM1和DM1。体内数据与体外BT-474EE1乳腺癌细胞得到数据一致。Walles等^[64]用^{[3}H]标记的ADC药物(^{[3}H]DM1-LNL897)在雌性荷瘤小鼠中进行了代谢研究,基于液相色谱-串联质谱数据,证明了Lys-MCC-DM1是唯一可检测到的均匀分布在肿瘤和肝组织中的代谢产物,在血清和排泄物中鉴定出Lys-MCC-DM1、MCC-DM1、DM1的赖氨酸结合物和半胱氨酸结合物为主要代谢产物。Bolleddula等^[65]静脉给予荷瘤小鼠5 mg·kg⁻¹ ADC药物^{[3}H]TAK-164(相当于90 mg·kg⁻¹有效载荷),采集血液、肿瘤和肝组织,基于液相色谱法和放射性

检测,证明血浆和肿瘤样品中IGN-P1苯胺和磺化IGN-P1苯胺为主要代谢产物。体内数据与体外大鼠肝脏三联体和组织蛋白酶B中得到的数据类似。

3.2.2 大鼠质量平衡研究 质量平衡研究主要用于确定ADC药物的消除速率和途径,并确定分子的代谢分布。3种获批的ADC药物(Mylotarg、Adcetris和Kadcyla)均进行了临床前质量平衡研究^[63,66-67]。Kadcyla的质量平衡研究^[67],给大鼠单次静脉给予13 mg·kg⁻¹(1 326 mg·m⁻²DM1)的Tmab-MCC-[³H]DM1,研究了血浆、尿液、胆汁和粪便,以评估质量平衡并鉴定代谢产物。样品使用酶联免疫吸附测定(ELISA)、液体闪烁计数器(LSC)进行分析。大部分血浆放射性在乙腈可沉淀部分(99%),表明血浆中存在少量[³H]T-DM1等相关物质;在乙腈可溶部分的粪便中发现了大部分放射性剂量(63%),表明DM1及其代谢产物主要通过粪便排泄;在胆管插管的大鼠中,放射性物质有50%通过胆汁排出,表明胆汁清除是主要途径。检测到的代谢产物为DM1、MCC-DM1和Lys-MCC-DM1。Yip等^[68]给SD大鼠单次iv ADC药物Polivy,采集血浆、尿液、胆汁和粪便样品,分析放射性以评估质量平衡。大部分血浆放射性在乙腈可沉淀部分(>95%),表明血浆中大部分MMAE仍然与抗体偶联,少量为游离MMAE和含有MMAE的代谢产物;在乙腈可溶部分的粪便中发现了大部分放射性剂量(>80%),表明Polivy主要以[³H]-MMAE或含有[³H]-MMAE的小分子代谢产物形式通过粪便排泄;在胆管插管的大鼠中,放射性剂量有67%通过胆汁排出,表明胆汁清除是主要途径。Shastri等^[24]给大鼠单次iv 20 mg·kg⁻¹剂量ADC药物¹⁴C-ARX788,研究了尿液和粪便,以评估质量平衡,样品使用LSC进行分析。结果粪便中放射性剂量超过70%,尿液中放射性占11.4%,表明粪便排泄是主要途径,其次是尿液排泄。因此,推断胆汁可能在ARX788的排泄中起关键作用。

4 结语

目前,在全球不同国家获批上市的14种ADC药物中,有1/2主要用于治疗血液系统恶性肿瘤,其余主要用于治疗实体肿瘤^[31]。虽然数百种具有新技术和新适应证的ADC药物正在临床试验中,但根据既往研究历史,很可能存在较高的停药率。大多数ADC药物由于缺乏安全性或有效性,往往在临床发展的早期阶段就宣告研发失败,这表明将ADC药物从临床前发现转化为积极的临床结果仍存在

挑战。

单克隆抗体、有效载荷、连接子的类型、偶联方法均可能调节ADC药物的代谢,进而影响ADC药物的安全性或有效性。ADC药物应在体循环中保持稳定,并在细胞内环境中根据pH值、还原能力或蛋白水解酶的催化特性释放有效载荷。故在体循环中观察到的ADC药物有效载荷相关代谢产物极低,因此,在许多情况下,DDI的潜力极小。然而,ADC药物可能在肝脏中代谢,释放很大一部分结合有效载荷,作为正常分解代谢清除的一部分,有效载荷相关代谢产物在肝脏中的浓度可能高于血浆中的浓度,由此产生许多无法预测的毒理或药理效应,影响ADC药物的安全性或有效性。

ADC药物代谢的研究方法基本类似,经过代谢过程释放的有效载荷相关代谢产物并不丰富,且没有通用的检测方法可以应用于不同的连接子类型,因此对ADC药物代谢产物的鉴定及表征具有一定难度。若未能通过仪器直接进行鉴定和表征,也可以通过推断早期发现阶段,从总抗体、结合抗体、游离抗体和裸抗分析获得的数据,采用各种间接方法来确定ADC药物的分解代谢。同时使用放射性标记的ADC药物对体内外的代谢也有很好的研究价值。

此外,在研发过程中除了对ADC药物本身进行基础研究外,可在早期同时对其代谢产物进行鉴定和表征,了解分子的结构和功能关系,寻求代谢产物可能具有的药理学、毒理学和DDI潜力,从分子基础上更好地诠释ADC药物的安全性或有效性,降低后期开发中失败的风险,推动研发出更加低毒高效的ADC药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sievers E L. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(5): 893-901.
- [2] Pro B, Advani R, Brice P, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: Results of a phase II study [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(18): 2190-2196.
- [3] Younes A, Gopal A K, Smith S E, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(18): 2183-2189.

- [4] Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(19): 1783-1791.
- [5] Doi T, Shitara K, Naito Y, et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumor activity of trastuzumab deruxtecan (DS-8201), a HER2-targeting antibody - drug conjugate, in patients with advanced breast and gastric or gastro-oesophageal tumours: A phase 1 dose-escalation study [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(11): 1512-1522.
- [6] Capone E, Giansanti F, Ponziani S, et al. EV20-Sap, a novel anti-HER-3 antibody-drug conjugate, displays promising antitumor activity in melanoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95412-95424.
- [7] Capone E, Lamolinara A, D'Agostino D, et al. EV20-mediated delivery of cytotoxic auristatin MMAF exhibits potent therapeutic efficacy in cutaneous melanoma [J]. *Control Release*, 2018, 277: 48-56.
- [8] Bourillon L, Bourgier C, Gaborit N, et al. An auristatin-based antibody-drug conjugate targeting HER3 enhances the radiation response in pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(7): 1838-1851.
- [9] Abrams T, Connor A, Fanton C, et al. Preclinical antitumor activity of a novel anti-c-KIT antibody-drug conjugate against mutant and wild-type c-KIT-positive solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(17): 4297-4308.
- [10] Cheng X, Li J, Tanaka K, et al. MORAb-202, an antibody-drug conjugate utilizing humanized anti-human FR α farletuzumab and the microtubule-targeting agent eribulin, has potent antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(12): 2665-2675.
- [11] 萧惠来. FDA"抗体偶联药物的考虑"供企业用的指导原则草案介绍 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(6): 1017-1022.
Xiao H L. Introduction of FDA's "Considerations for Antibody Conjugates" Draft Guidance for Industry [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(6): 1017-1022.
- [12] Kraynov E, Kamath A V, Walles M, et al. Current approaches for absorption, distribution, metabolism, and excretion characterization of antibody-drug conjugates: An Industry white paper [J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(5): 617-623.
- [13] Koganemaru S, Kuboki Y, Koga Y, et al. U3-1402, a novel HER3-targeting antibody - drug conjugate, for the treatment of colorectal cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(11): 2043-2050.
- [14] Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: Recent advances in conjugation and linker chemistries [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 33-46.
- [15] Panowski S, Bhakta S, Raab H, et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy [J]. *MAbs*, 2014, 6(1): 34-45.
- [16] Dudley A C. Tumor endothelial cells [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(3): a006536.
- [17] Brun M P, Gauzy L L. Protocols for lysine conjugation [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1045: 173-187.
- [18] Beck A, Goetsch L, Dumontet C, et al. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(5): 315-337.
- [19] Hagihara Y, Saerens D. Engineering disulfide bonds within an antibody [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(11): 2016-2023.
- [20] Gordon M R, Canakci M, Li L, et al. Field guide to challenges and opportunities in antibody-drug conjugates for chemists [J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(11): 2198-2215.
- [21] Nadkarni D V. Conjugations to endogenous cysteine residues [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2078: 37-49.
- [22] Matsuda Y, Mendelsohn B A. An overview of process development for antibody-drug conjugates produced by chemical conjugation technology [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, 21(7): 963-975.
- [23] Junutula J R, Raab H, Clark S, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(8): 925-932.
- [24] Shastri P N, Zhu J, Skidmore L, et al. Nonclinical development of next-generation site-specific HER2-targeting antibody-drug conjugate (ARX788) for breast cancer treatment [J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(9): 1822-1832.
- [25] Hallam T J, Wold E, Wahl A, et al. Antibody conjugates with unnatural amino acids [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(6): 1848-1862.
- [26] Rao C, Rangan V S, Deshpande S. Challenges in antibody-drug conjugate discovery: A bioconjugation and analytical perspective [J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(13): 1561-1564.
- [27] Kim E G, Kim K M. Strategies and advancement in antibody-drug conjugate optimization for targeted cancer therapeutics [J]. *Biomol Ther*, 2015, 23(6): 493-509.
- [28] Agarwal P, Bertozzi C R. Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development [J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(2): 176-192.
- [29] Zhou Q. Site-specific antibody conjugation for ADC and beyond [J]. *Biomedicines*, 2017, 5(4): 64.
- [30] Birrer M J, Moore K N, Betella I, et al. Antibody-drug conjugate-based therapeutics: State of the science [J]. *J*

- Natl Cancer Inst, 2019, 111(6): 538-549.
- [31] Fu Z, Li S, Han S, et al. Antibody drug conjugate: The "biological missile" for targeted cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 93.
- [32] Tai Y T, Mayes P A, Acharya C, et al. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma [J]. Blood, 2014, 123(20): 3128-3138.
- [33] Radocha J, van de Donk NWCJ, Weisel K. Monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in multiple myeloma [J]. Cancers, 2021, 13(7): 1571.
- [34] Oostra D R, Macrae E R. Role of trastuzumab emtansine in the treatment of HER2-positive breast cancer [J]. Breast Cancer: Dove Med Press, 2014, 6: 103-113.
- [35] Lu J, Jiang F, Lu A, et al. Linkers having a crucial role in antibody-drug conjugates [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 561.
- [36] Bargh J D, Isidro-Llobet A, Parker J S, et al. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates [J]. Chem Soc Rev, 2019, 48(16): 4361-4374.
- [37] Nolting B. Linker technologies for antibody-drug conjugates [J]. Methods Mol Biol, 2013, 1045: 71-100.
- [38] Zhang D, Fourie-O'Donohue A, Dragovich P S, et al. Catalytic cleavage of disulfide bonds in small molecules and linkers of antibody-drug conjugates [J]. Drug Metab Dispos, 2019, 47(10): 1156-1163.
- [39] Estrela J M, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43(2): 143-181.
- [40] Joubert N, Beck A, Dumontet C, et al. Antibody-drug conjugates: The last decade [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(9): 245.
- [41] Trail P A, Willner D, Lasch S J, et al. Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates [J]. Science, 1993, 261(5118): 212-215.
- [42] Doronina S O, Bovee T D, Meyer D W, et al. Novel peptide linkers for highly potent antibody-auristatin conjugate [J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(10): 1960-1963.
- [43] Gondi C S, Rao J S. Cathepsin B as a cancer target [J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(3): 281-291.
- [44] Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(10): 789-802.
- [45] Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity [J]. Cancer Sci, 2016, 107(7): 1039-1046.
- [46] 高华晔, 李娴静, 钟书霖, 等. 单克隆抗体药物及抗体偶联药物的药代动力学研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2019, 27(3): 4.
- Gao H Y, Li X J, Zhong S L, et al. Advances in pharmacokinetics of monoclonal antibody drugs and antibody conjugates [J]. Pharm Clin Res, 2019, 27(3): 4.
- [47] Erickson H K, Lambert J M. ADME of antibody-maytansinoid conjugates [J]. AAPS J, 2012, 14(4): 799-805.
- [48] Rock B M, Tometsko M E, Patel S K, et al. Intracellular catabolism of an antibody drug conjugate with a noncleavable linker [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(9): 1341-1344.
- [49] Dean A Q, Luo S, Twomey J D, et al. Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges [J]. MAbs, 2021, 13(1): e1951427.
- [50] Shen B Q, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(2): 184-189.
- [51] Ducry L, Stump B. Antibody-drug conjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies [J]. Bioconjug Chem, 2010, 21(1): 5-13.
- [52] Ogitani 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 [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(20): 5097-5108.
- [53] Francisco J A, Cerveny C G, Meyer D L, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity [J]. Blood. 2003, 102(4): 1458-1465.
- [54] DiJoseph J F, Khandke K, Dougher M M, et al. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin): A CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin [J]. Hematol Meeting Rep, 2008, 5: 74-77.
- [55] Okeley N M, Miyamoto J B, Zhang X, et al. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(3): 888-897.
- [56] Erickson H K, Park P U, Widdison W C, et al. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing [J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4426-4433.
- [57] Yang C Y, Zhao X P, Sun X, et al. Preclinical pharmacokinetics of a novel anti-c-Met antibody-drug conjugate, SHR-A1403, in rodents and non-human primates [J]. Xenobiotica, 2019, 49(9): 1097-1105.
- [58] Shadid M, Bowlin S, Bolleddula J. Catabolism of

- antibody drug conjugates and characterization methods [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(12): 2933-2945.
- [59] Bessire A J, Ballard T E, Charati M, et al. Determination of antibody-drug conjugate released payload species using directed *in vitro* assays and mass spectrometric interrogation [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27(7): 1645-1654.
- [60] Doronina S O, Toki B E, Torgov M Y, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 778-784.
- [61] Weidle U H, Tiefenthaler G, Georges G. Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2014, 11(2): 67-79.
- [62] Li Y, Gu C, Gruenhagen J, et al. An enzymatic deconjugation method for the analysis of small molecule active drugs on antibody-drug conjugates [J]. *MAbs*, 2016, 8(4): 698-705.
- [63] Wyeth Ayerst. NDA 21174 Medical Review(s) [EB/OL]. (2016-01-27) [2022-07-19]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21174_MYLOTARG_medr.pdf.
- [64] Walles M, Rudolph B, Wolf T, et al. New insights in tissue distribution, metabolism, and excretion of [^3H] -labeled antibody maytansinoid conjugates in female tumor-bearing nude rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(7): 897-910.
- [65] Bolleddula J, Shah A, Shadid M, et al. Pharmacokinetics and catabolism of [^3H] TAK-164, a guanylyl cyclase C targeted antibody-drug conjugate [J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48(11): 1239-1245.
- [66] Seattle Genetics, Inc. 125399Orig1s000 Pharmacology Review(s) [EB/OL]. (2017-01-15) [2022-07-19]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125399Orig1s000PharmR.pdf.
- [67] Shen B Q, Bumbaca D, Saad O, et al. Catabolic fate and pharmacokinetic characterization of trastuzumab emtansine (T-DM1): An emphasis on preclinical and clinical catabolism [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(7): 901-910.
- [68] Yip V, Lee M V, Saad O M, et al. Preclinical characterization of the distribution, catabolism, and elimination of a polatuzumab vedotin-piiq (POLIVY[®]) antibody-drug conjugate in sprague dawley rats [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(6): 1323.

[责任编辑 李红珠]