

• 新药发现与研究实例简析 •

新药创制是复杂的智力活动, 涉及科学研究、技术创造、产品开发和医疗效果等多维科技活动。每个药物都有自身的研发轨迹, 而构建化学结构是最重要的环节, 因为它涵盖了药效、药代、安全性和生物药剂学等性质。本栏目以药物化学视角, 对有代表性的药物的成功构建, 加以剖析和解读。

抗体偶联药物 (ADC) 是将生物大分子的特异性和载体功能与小分子的毒性作用经共价键整合在一起的药物分子, 是将药效、药代、安全性和稳定性融合在一起的生物单分子药物。抗体和毒性分子确定以后, 选择连结基的长度、裂解性、疏水-亲水性、偶联的化学特征以及每个抗体连接毒性分子的数量 (DAR) 都影响 ADC 在循环血液中的稳定性、在靶细胞的内吞性、毒性分子的释放性和旁杀作用等。本文从第一/三共制药披露的专利文献叙述了德曲妥珠单抗的优化过程, 虽然许多细节未能得知, 但从实例可以大体了解到研制的思路 and 过程, 连接基的化学结构、偶联方式和 DAR 值成为优化的主要内容, 从中可以了解到本品上市两年来已批准 3 种适应症 (乳腺癌、胃癌和非小细胞肺癌) 的巨大成功不是偶然的。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1051

德曲妥珠单抗的研制

郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

1 概说

在经典药物化学中, 拼合原理是将履行两种功能的结构元件拼接成一个分子, 以赋予化合物优良性质。例如形成双靶标药物的两个药效团拼合, 产生协同作用; 将亲电性基团连接于配体形成共价结合药物以提高活性和选择性, 以及前药设计等。

抗体偶联药物 (antibody-drug conjugates, ADC) 可视为更大尺度的分子整合, 是抗体蛋白分子与小分子毒物的共价连接。ADC 是由 3 个片段组成: 抗体、连接基和毒性分子。抗体 (antibody) 是靶向递送和特异性结合的载体, 将整个 ADC 分子输送到有表面抗原的 (癌) 细胞处, 并与抗原结合的物质基础; 连接基 (linker) 是共价偶联抗体和毒性分子的有机链状片段 (其特征在后面叙述); 毒性分子 (payload) 则对癌细胞呈现杀伤之所在。

ADC 的作用机制可概述如下: 由于结构的互补性 ADC 与抗原分子结合成复合物 (图 1-1); 经网格蛋白 (clathrin) 介导发生内吞作用, ADC 进入胞内 (图 1-2); 形成的核内体 (endosome) 中的 ADC 连接基被水解或酶促裂解, 或二硫键被还原裂解等将药物释放到胞质中。不可裂解的连接基则通过核内体与溶酶体融合, 溶酶体将 ADC 药物彻底降解 (图 1-3); 释放到胞浆中的药物通过抑制微管聚合或插入 DNA 双螺旋发挥作用

(图 1-4), 导致靶细胞凋亡 (图 1-5)。毒性分子也可扩散到周围肿瘤细胞中发挥旁杀作用 (bystander effect)。

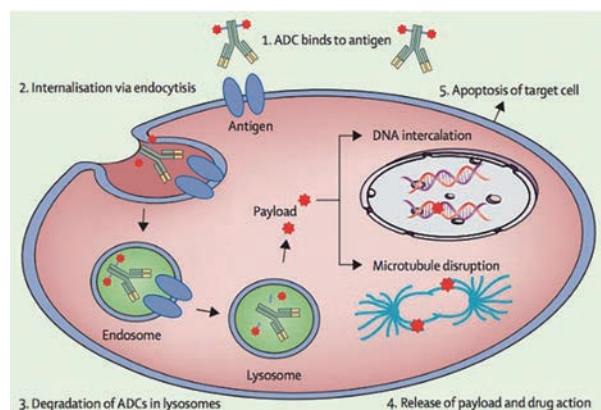


Figure 1 Sketch map for the process of antibody-drug conjugates (ADC)

ADC 作为技术平台, 把药物的药效学 (强度和选择性) 与药动学 (分布和释放以及稳定性等) 通过连接基组装成安全有效稳定可控的药物分子。

从 2000 年辉瑞首创 ADC 药物奥加米星吉妥组单抗 (gemtuzumab ozogamicin) 以来, 迄今已有 10 多个上市。从技术层面而言, 后来的 ADC 是跟随性的研制, 都是选择针对不同靶标的抗体、不同类型的毒性分子, 经不同的连接基共价结合而成新的 ADC 药物。创新

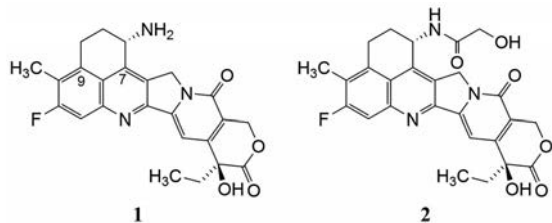
性体现在优化组合,组合的研究内容极其丰富。第一制药和三共2019年上市的德曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan, DS-8201, 商品名Enhertu)是非常突出和成功的范例。

2 三个元件的选择

2.1 抗体 抗体与靶细胞抗原的高特异性和亲和力是研制ADC的先决条件,由于递送的细胞毒分子具有剧烈毒性,递送到肿瘤细胞内而不泄露于血液和正常组织中至关重要,这就要求抗原蛋白在癌细胞高度表达,而正常细胞不(或低)表达。

人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth receptor-2, 简称HER2)被激活时会启动细胞增殖和肿瘤发生的多种信号通路,HER2在多种肿瘤细胞中高表达。例如,15%~30%的浸润型乳腺癌中HER2过度表达,在胃癌中为10%~30%。第一/三共制药认定HER2靶标的可靠性和广泛覆盖性,将重组人源化IgG1 kappa型抗HER2单克隆抗体曲妥珠单抗(trastuzumab, 1998年上市)作为研制ADC基础,因为曲妥珠单抗与HER2有特异亲和力($EC_{50} = 20.1 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2 毒性分子 喜树碱衍生物依沙替康(**1**, exatecan)是拓扑异构酶1的强效抑制剂,结构上是喜树碱7-位和9-位环合的含氨基化合物(Mitsui I, Kumazawa E, Hirota Y, et al. A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors *in vitro* and *in vivo*. Jpn J Cancer Res, 1995, 86: 776-782), **1**的水溶性高于喜树碱,同时也是连接修饰的“把手”。该游离氨基经羟乙酰化,产物称作德鲁替康(**2**, deruxtecan), **2**不仅保持喜树碱类抑制拓扑异构酶1的活性,还可作为与连接基偶联的接头,经甲醛与四肽C端的甘氨酸形成氮杂缩醛,其功能在后面叙述。第一/三共制药拥有**1**和**2**的知识产权,然而二者未能成药,但**2**成就了ADC。



2.3 连接基 在确定了单抗和毒性分子之后,研制ADC主要的大量工作是设计、优化和确定连接基的结构,连接基决定了药效的展示和药代动力学特征。作为ADC药物的桥梁,通过可裂解或不可裂解的连接基将抗体和毒性分子连在一起,这是精细设计的过程,因

为既要有稳定性,防止在循环血液中断裂而暴露毒性分子,又可被特定的肿瘤细胞内吞,并迅速释放出毒性分子而起效。

每个抗体分子能否连接较多的毒性分子(下称药物),使药物与抗体分子比(drug-antibody ratio, DAR)适度,这也是连接基选择时需要反复实验的原因。本品DAR值7.8,超过通常ADC的DAR值3~4,是不寻常的。连接基还决定体内的药代动力学性质,兼有亲水和亲脂性有利于内吞,癌细胞间发生扩散,可发挥旁杀效应(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. Cancer Sci, 2016, 107: 1039-1046);本品的连接基含有可裂解性四肽,四肽的酰胺与德鲁替康的羟基与甲醛缩合成氮杂缩醛,后者在血浆中是稳定的,但进入癌细胞的酸性环境中易于裂解,释放德鲁替康分子。

3 活性评价

3.1 ADC体外抑制乳腺癌细胞生长作用 设计合成的ADC的活性评价,是测定 IC_{50} 的范围。在96孔板上将胎牛血清分别加入一定量的HER2阳性的人乳腺癌KPL-4细胞和HER2阴性(或低表达)人乳腺癌MCF7细胞,温孵过夜,次日每孔分别加入系列稀释浓度的受试液(5倍稀释:1 000、200、40、8、1.6、0.32、0.064 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),温孵5~7天,取定量的细胞液,用CellTiter-Glo仪发光法测定细胞活力,选取可包括50%抑制率的两个相邻浓度(a和b浓度在50%抑制率的两侧, $a > b$),得到的细胞存活率(a和b浓度下相应为c和d),按以下公式计算ADC受试物的 IC_{50} :

$$IC_{50} (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}) = \text{antilog} [(50 - d) \times (\log_{10} b - (\log_{10} a) \div (d - c) + \log_{10} b)] \quad (1)$$

式中,a:受试物的a浓度;b:同一受试物的b浓度;c:该受试物a浓度下的细胞存活率;d:该受试物b浓度下的细胞存活率。

每个浓度下细胞存活率(%) = 含有受试物的发光量均值($n = 2$) ÷ 没有受试物的发光量均值($n = 10$) × 100

用同样的方法还测定了受试物对另外7株癌细胞(抗原阳性和抗原阴性)的抑制活性 IC_{50} (从略)。

3.2 对小鼠移植肿瘤的抑制活性 雌性裸鼠分别接种人乳腺、胃癌、黑色素瘤、人非小细胞肺癌、结直肠癌、卵巢癌、食管癌等,接种后第5天尾静脉注射受试物 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,测定1个月内不同时间点的肿瘤生长体积变化,用空白、曲妥珠单抗和已上市的ADC恩特曲妥组单抗(trastuzumab-emtansine)作对照,评价受试物

的活性。

4 化合物的设计

研制者确定了抗体为曲妥组单抗, 药物为依沙替康或德鲁替康, 下一步的设计和优化集中在连接基的变换上。包括与抗体共价结合的化学特征、药物-抗体分子比 (DAR)、连接基长度、调整和优选亲水-亲脂性、稳定性与裂解性的优化、与药物的共价键合方式等。分述如下。

4.1 与抗体结合的共价键 采用最常见的一种结合方式是将抗体成对的二硫键还原为半胱氨酸残基, 巯基与连接基的富马酰亚胺发生亲核加成, 形成 S-C2-琥珀酰亚胺偶联。图 2 是偶联反应的示意图。

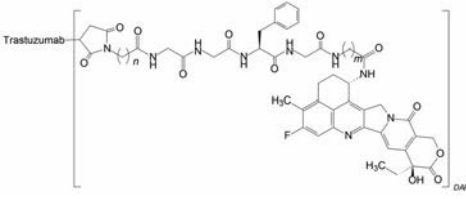
4.2 连接基的选择 连接基的主体是可裂解的四肽, 通过优化得到的 Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG) 具有可裂解性, 容易被胞内蛋白酶水解释放出药物, 也由于 GGFG 极性较强内吞的限制性较低, 因而在优化连接基时序列固定不变。但连接基有一定的疏水性又有利于稳定性, 因而为调整亲水-疏水之间的平衡, 在 GGFG 和琥珀酰亚胺之间加入不同长度的烷基和聚乙二醇基单元, 即乙二醇的有无和数量, 评价目标物的抗癌活性。

连接基另一端若连接依沙替康, 是将氨基通过脂肪酰化; 若是德鲁替康, 端基为羟基, 则与连接基四肽 C 端的甘氨酸胺经与甲醛缩合, 生成氮杂缩醛片段。缩醛在中性或碱性中是稳定的, 在酸性环境则容易分解。癌细胞内呈弱酸性, 所以有利于 ADC 释放出游离的德鲁替康。

4.3 抗体对药物的载荷量和体外活性 ADC 分子中药物在抗体上的载荷量用 DAR 表示, DAR 值是合成中通过反应物的用量来调节的。产物精制后经 LC-MS 确定药物与抗体分子的比值。本项目许多优化内容是连接基相同但有不同的 DAR 值, 考察 DAR 对抗癌活性的影响。由于蛋白质分子偶联反应的复杂性, DAR 值往往是带有分数的平均比值。表 1~4 列出了代表性化合物的组成和活性 (实际合成的 ADC 数量逾百)。报道的体外 IC_{50} 是活性范围。

表 1 的药物是依沙替康, 其伯氨基与四肽 C 端的甘氨酸间不同长度的氨烷基酸 (碳原子数 m) 连接, 四肽的 N 端经酰烷基 (碳原子数为 n) 连接 N-琥珀酰基。活性数据表明 n 、 m 和 DAR 三个变量在有限的 ADC 样本中提取构效关系是困难的。大体的趋势是在 GGFG 基

Table 1 Structure and activity of ADC attaching to exatecan.
DAR: Drug-antibody ratio



Compd.	n	m	DAR	$IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$
3	5	3	2.6	< 0.1
4	2	3	3.1	< 0.1
5	5	3	7.3	$1 > IC_{50} > 0.1$
6	2	3	6.1	< 0.1
7	5	2	2.0	$1 > IC_{50} > 0.1$
8	5	2	3.8	< 0.1
9	2	2	3.7	$1 > IC_{50} > 0.1$
10	2	2	6.6	< 0.1
11	2	2	1.9	> 100
12	2	2	3.0	—
13	5	5	1.7	$100 > IC_{50} > 1$
14	5	5	2.5	$1 > IC_{50} > 0.1$
15	3	2	4.7	$1 > IC_{50} > 0.1$
16	3	2	8.5	$1 > IC_{50} > 0.1$
17	5	4	1.8	$1 > IC_{50} > 0.1$
18	5	4	3.4	< 0.1

础上增加疏水性有利于活性, 例如 $n + m = 9, 10$ 的化合物活性强于 4 和 5; 高 DAR 值活性一般强于低 DAR 值。

表 2 的化合物类型是在四肽 N 端与琥珀酰亚胺间的烷基之间插入乙二醇片段, 以提高连接基的亲水性, 表中 n 虽然是 2 个碳, 但在乙二醇与酰胺之间增加了 2 个碳原子, 构效关系提示, 加入乙二醇片段对活性的影响不显著, 例如 19 与 8 的 DAR 值相近, 活性略有降低, 23 比 19 多一个乙二醇基, 活性相同。该系列 ADC 活性也与 DAR 值呈正相关。

表 3 的药物是德鲁替康, 它与连接基共价结合的方式是羟基与四肽 C 端的酰胺经甲醛缩合成氮杂缩醛, 四肽 N 端是由 N-琥珀酰亚胺基己酰基连接, N-己酰基是优化得出的, 因而余下的设计是优化抗体的载荷量 (DAR)。基于表 1 和 2 得出的 DAR 值越高活性越强的趋势, 密集制备了高 DAR 值的 ADC, 可惜在专利中多数化合物的活性未曾报道。此外, 该连接基中加入乙二醇片段, 活性也未提升。

表 4 的化合物是在德鲁替康的羟基与 C 端甘氨酸胺之间用亚乙基连接, 此时已完全失去了缩醛的结构,

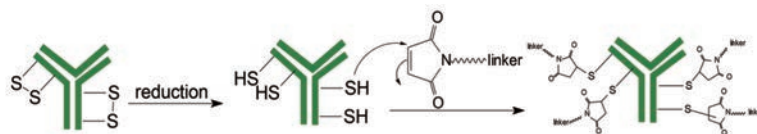
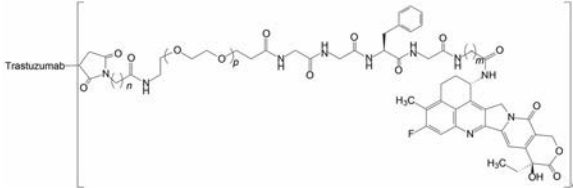
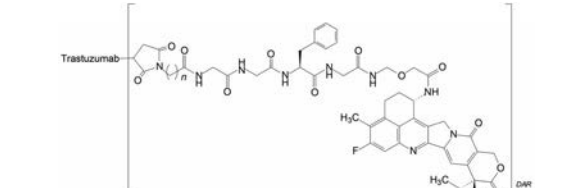


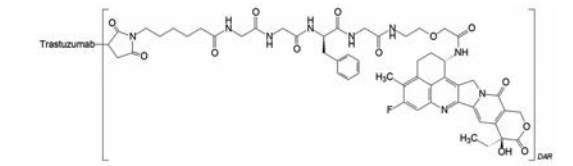
Figure 2 Sketch map of covalent binding between antibody and linker

Table 2 Structure and activity of ADC with the payload exatecan and linker containing PEG fragment


Compd.	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	DAR	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
19	2	3	1	3.6	1 > IC ₅₀ > 0.1
20	2	3	1	6.9	< 0.1
21	2	3	1	6.2	—
22	2	3	2	3.4	1 > IC ₅₀ > 0.1
23	2	3	2	6.0	< 0.1
24	2	2	1	1.9	—
25	2	2	1	3.9	100 > IC ₅₀ > 1
26	2	2	2	3.2	1 > IC ₅₀ > 0.1
27	2	2	2	6.2	1 > IC ₅₀ > 0.1

Table 3 Structure and activity of ADC with the payload deruxtecane and aza-acetal


Compd.	<i>n</i>	DAR	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
28	5	2.9	> 100
29	5	5.6	100 > IC ₅₀ > 1
30	5	5.2	—
31	5	3.0	—
32	5	6.2	—
33	5	6.6	—
34	5	6.1	—
35	5	6.0	1 > IC ₅₀ > 0.1
36	5	6.2	—
37	5	6.3	—
38	5	7.8	—

Table 4 Structure and activity of ADC with the payload deruxtecane derivative


Compd.	DAR	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
39	3.7	1 > IC ₅₀ > 0.1
40	6.9	< 0.1
41	7.0	< 0.1

报道的体外活性虽然较好,但没有进一步的体内活性评价,或许是难以裂解释放毒性分子的缘故。

4.4 体内活性 综合专利公布的40个实施例的构效

关系,难以明确地选择出化合物进行深入的体内评价,或许研制者从上百个化合物的活性数据归纳出明确的方向,笔者不得而知。然而大概率的优势连接基片段,是用① 氮杂缩醛连接德鲁替康;② 四肽N端链接疏水片段以调节亲水-疏水平衡;③ 抗体与药物间距离不宜过长;④ 高DAR值有利于活性。因而很自然地将目标化合物聚焦于化合物**38**(专利中却未报道其体外活性)。

体内评价是用雌性裸鼠接种患者的癌细胞,包括乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌、结直肠癌等HER2阳性、低表达或阴性癌细胞,一定时间后尾静脉注射ADC化合物10 mg·kg⁻¹,同时随机分组小鼠作空白对照、曲妥昔单抗和阳性对照药恩特曲妥组单抗(剂量均为10 mg·kg⁻¹),测定1个月内肿瘤体积的变化。

图3A是**29**(5C-GGFG-NH-CH₂-O-deruxtecane)_{5,6}对移植人乳腺癌HER2阳性细胞的裸鼠抑制活性(时间-肿瘤体积作图,下同),结果显著强于曲妥组单抗,但仍未完全抑制肿瘤的生长。

图3B是**30**(5C-GGFG-NH-CH₂-O-deruxtecane)_{5,2}和**21**(2C-CONH-2C-glycol-GGFG-NH-3C-CO-exatecan)对移植人胃癌HER2阳性癌细胞生长的影响,**30**完全抑制了肿瘤生长。

图3C比较了**21**(2C-CONH-2C-glycol-GGFG-NH-3C-CO-exatecan)、**31**(5C-GGFG-NH-CH₂-O-deruxtecane)_{3,0}和**32**(5C-GGFG-NH-CH₂-O-deruxtecane)_{6,2}对另一株人乳腺癌生长的活性,此时**21**的活性强于**31**和**32**。

图3D是**33**(5C-GGFG-NH-CH₂-O-deruxtecane)_{6,6}对人胰腺癌弱表达HER2癌细胞的抑制作用,呈现显著活性。图3E和F是**38**分别抑制乳腺癌患者和结直肠癌患者低表达HER2细胞移植裸鼠生长活性,与阳性对照药恩特曲妥组单抗比较,显示显著的抗癌活性。图3G说明**38**可抑制非小细胞肺癌患者HER2中等程度表达的癌细胞生长,而恩特曲妥组单抗ADC无效。图3H提示**38**对食管癌患者高表达HER2癌细胞生长也有抑制活性。图3I表明**38**对人卵巢癌生长的抑制作用。

5 德曲妥单抗批准上市

第一/三共制药确定**38**为候选化合物,定名为德曲妥单抗,经临床试验证明,对转移性乳腺癌中并已接受过2种以上抗HER2药物治疗的HER2阳性、不可切除性或转移性乳腺癌成人患者有良好的治疗效果,于2019年12月在美国上市(Cortés J, Kim SB, Chung WP, et al. Trastuzumab deruxtecane versus trastuzumab emtansine for breast cancer. N Engl J Med, 2022, 386: 1143–1154)。2021年1月又批准治疗已接受过曲妥珠

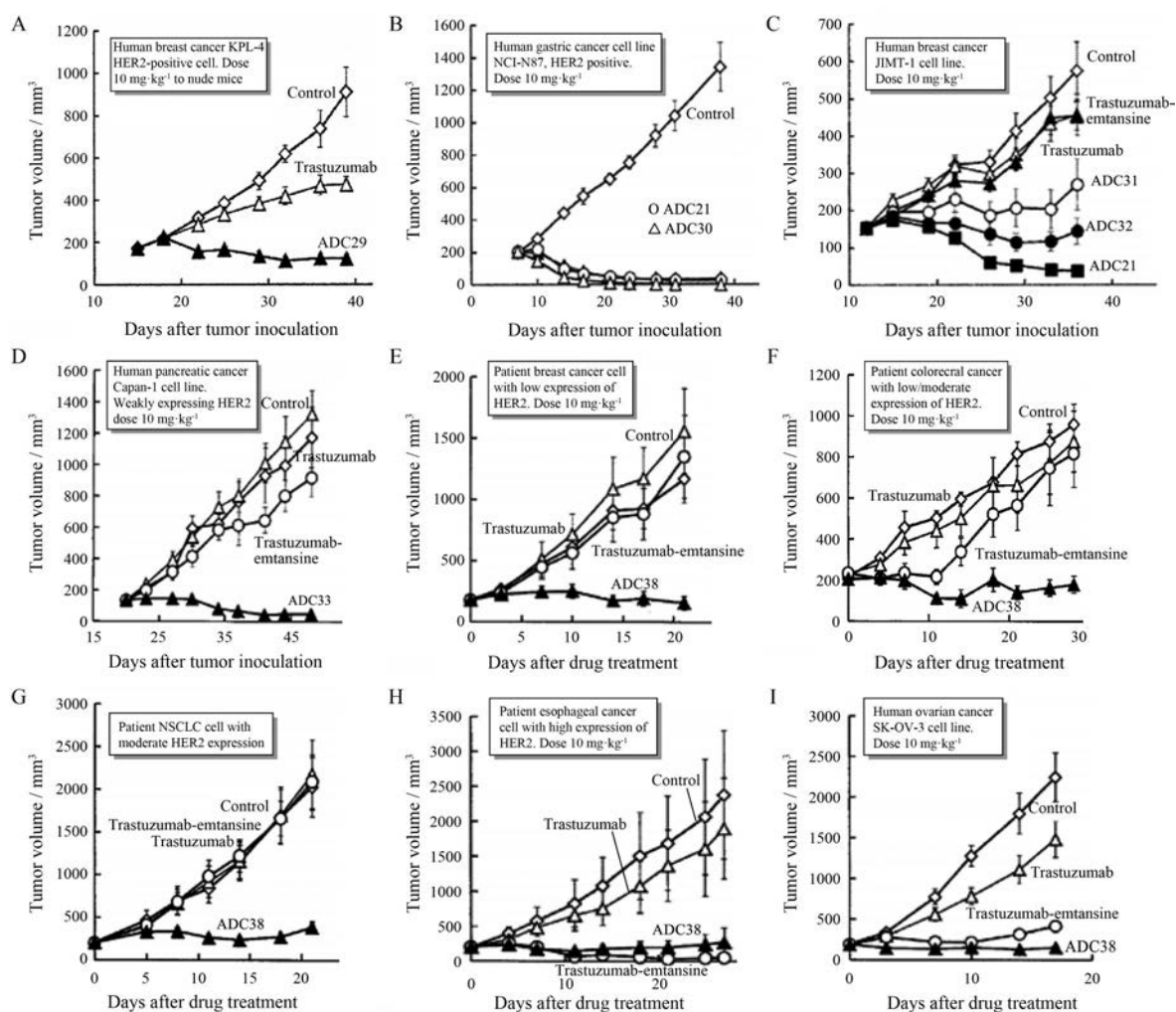
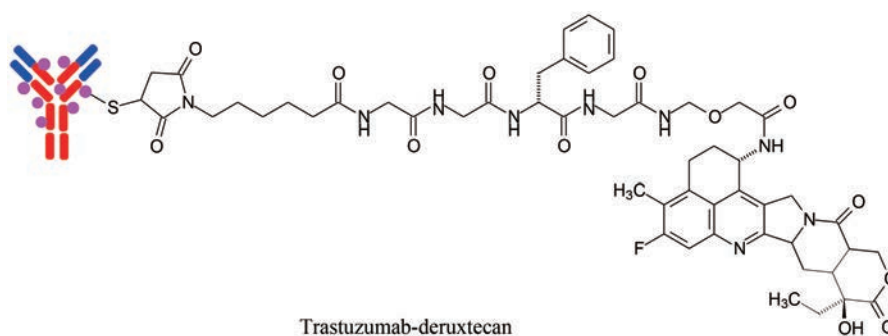


Figure 3 *In vivo* anti-breast cancer growth of 29 (A); anti-gastric cancer of 21 and 30 (B); comparison of 21, 31 and 32 for inhibition of breast cancer growth (C); anti-pancreatic cancer activity of 33 (D); activity of 38 for inhibiting tumor growth of patient breast cancer cell with low expression of HER2 (E); activity of 38 for inhibiting tumor growth of patient colorectal cancer cell with low/moderate expression of HER2 (F); activity of 38 for inhibiting tumor growth of patient non-small cell lung cancer (NSCLC) with moderate expression of HER2 (G); activity of 38 for inhibiting tumor growth of patient esophageal cancer cell with high expression of HER2 (H); activity of 38 for inhibiting tumor growth of human ovarian cancer cell (I). (Naito H, Ogitali Y, Masuda T, et al. Anti-HER2 antibody-drug conjugate. US Patent 2016/0333112 A1, Nov 17, 2006)



单抗治疗的局部晚期或转移性HER2阳性胃癌或胃食管交界腺癌的成人患者。德曲妥珠单抗成为10年来首个获FDA批准用于治疗胃癌的HER2靶向ADC药

物。2022年8月FDA又批准治疗携带激活性HER2突变的无法切除或转移性非小细胞肺癌患者。本品对结直肠癌的临床试验得到了明显效果,当前没有用于

HER2 阳性结直肠癌患者的特异性治疗药物, 而德曲妥珠单抗在肿瘤缓解率和疾病控制率方面的独特优势有望为 HER2 阳性结直肠癌患者的治疗带来希望。

6 后记

本品自 2019 年批准上市治疗 HER2 阳性或阴性低表达乳腺癌以来, 又相继批准了治疗胃癌和非小细胞肺癌, 而且效果显著, 一定程度满足了患者的需求, 显示出本品是一款卓越的“广谱”ADC 药物。

6.1 德曲妥珠单抗的分子效率 本品临床用量是 $5.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (乳腺癌) 和 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (胃癌), 21 天内静脉输注 1 次。依据本品的分子量 $\text{MW} = 153\,495$ (其中单抗 $145\,531.3 \pm 7.8$ 个连接的药物分子), 6 mg ADC 计算, 药物最大释放量为 0.31 mg 。拓扑替康的常用量为 $2 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, 按体表面积 1.5 m^2 , 大约剂量为 1.8 mg ; 伊立替康的推荐剂量为 $350 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, 一次用量大约 525 mg , 去除盐酸和 3 个结晶水以及前药中的甲酰基二哌啶的脱落, 有效药物量为 300 mg 。显然本品治疗量大大低

于两个替康药物用量, 而且效果显著优胜二者, 提示 ADC 特异性结合提高了德鲁替康的靶向性, 因而有很高的用药效率。

6.2 抗体的选择 HER2 在多种癌症中高表达, 选择对其抗原特异性结合的曲妥组单抗, 预示了临床应用的广谱抗癌效果。目前已批准用于乳腺癌、胃癌和非小细胞肺癌, 结直肠癌也呈现良好的治疗效果。

6.3 连接基的设计和药物分子的选择 选择可裂解的连接基中包含四肽 GGFG 和氮杂缩醛, 保障了在癌细胞内吞之前的稳定性, 又在癌细胞内蛋白酶水解和弱酸性环境中缩醛的分解 (甲醛与德鲁替康等摩尔量, 也有细胞毒作用), 体现了对 ADC 的治疗要求。德鲁替康可渗透过膜到邻近的细胞中, 发挥旁杀效应。此外, 德鲁替康的 E 环是六元内酯, 在酸性环境中是稳定的, 中性或弱碱性条件下容易代谢开环失去活性, 从而避免了不良反应。本品的高 DAR 值也是高效抗癌的结构特征。