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多重性质。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。

抗体偶联药物作为新分子实体是21世纪创制的新型药物, 是将单克隆抗体与毒物化合物偶联的双功能分子。本品戈沙妥珠单抗是针对上皮细胞癌高表达的Trop-2蛋白作为抗原, 研制的ADC针对的是首创性靶标, 而且其单抗也未曾批准上市, 因而研制的风险较高。单抗可被癌细胞内吞将ADC带入; 毒性药物选择了伊立替康的活性分子SN-38, 具有中等适度的毒性; 有较高的抗体−毒物比 (DAR = 7.6), 以及适宜的亲水−亲脂性, 都是本品成功的因素, 拼合在一起且安全有效地上市, 亦实属可贵。2020年上市以来, 由于一定程度满足了三阴乳腺癌患者的需求, 全球已有许多国家批准上市, 而且其适应症在不断增加。本栏目初次刊登ADC项目的研制经纬, 由于仅从专利和有限的化学文章得到些不完整的资料和数据, 论述的未必准确, 恳请读者指正。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0914

针对Trop-2抗原蛋白首创的ADC药物戈沙妥珠单抗

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 引言

抗体偶联药物 (antibody-drug conjugate, ADC), 是本世纪诞生的新型药物, 迄今至少已有16款批准上市, 成为肿瘤治疗的新秀。这是一类由抗体 (antibody)、细胞毒性药物 (payload) 和缀合二者的连接基 (linker) 组成的单一分子, 靶向杀伤肿瘤细胞的生物大分子和小分子共价键合的化合物。

ADC的结构由3个元件组成, 如图1a所示, 它们各司其职。图1b简要地展示了起效过程: ADC中的抗体与癌细胞上特异性表达的靶向抗原结合 (1); 经细胞内吞使ADC内化 (2); 形成的内体与溶酶体融合 (3); 在溶酶体中经酶促或化学释放毒性药物 (4); 毒性药物与靶向DNA或微管蛋白结合 (5); 导致细胞凋亡或死亡 (6)。

从结构和功能层面分析, ADC是双功能分子, 抗体的功能是对癌细胞抗原作特异性识别和靶向结合, 实现ADC进入肿瘤组织的推手, 可视作履行药代的功能; 毒性药物与受体靶标 (蛋白或核酸) 作用发挥药效功能。连接基隔开了抗体和毒性药物, 并赋予ADC为单一分子, 以适宜的物理化学性质和空间距离, 保障双功能的展现。

2 本品的细胞靶标和分子靶标

2.1 细胞靶标—Trop-2蛋白 Immunomedic公司研制者最初用多种单克隆抗体与喜树碱类偶联, 例如人源化的人癌胚抗原相关的细胞黏附分子5 (CEACAM5) 单抗、抗IgG-hMN-14单抗 (labetuzumab)、人源化抗EGP-1单抗 (hEGP-1单抗)、人滋养细胞表面抗原2 (trophoblast cell surface antiIgen 2, Trop-2) 的人源化抗体hRS7 IgG1κ (hRS7单抗)、人源化抗CD22单抗及人源化hLL 2单抗 (gratuzumab), 用裸鼠实验治疗, 筛选出hEGP-1单抗和hRS7单抗制备的ADC可内化进入

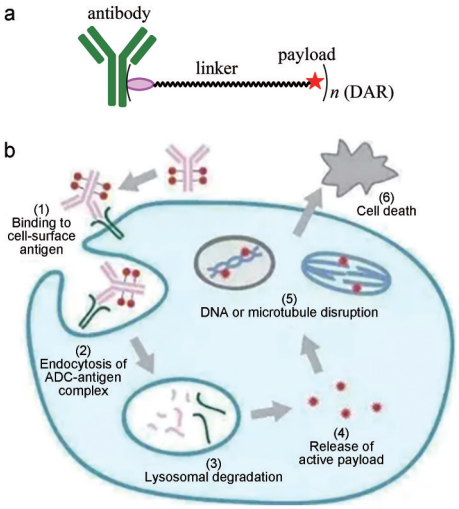


Figure 1 a: Sketch map of antibody-drug conjugate (ADC); b: The process of action of ADC

癌细胞中, 最后确定了hRS7单抗为细胞靶标, 也就是靶向携带Trop-2抗原的癌细胞。

Trop-2是一种糖蛋白, 最初认为是滋养细胞的表面标志物, 后来发现与正常组织相比, Trop-2在人类各种上皮细胞癌中高量表达, 包括乳腺癌、肺癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、宫颈癌、头颈癌和卵巢癌等。这种表达差异使Trop-2成为肿瘤治疗的靶标。

Trop-2为跨膜蛋白, 由323个氨基酸构成, 分子质量45 kDa, 包括疏水性前导肽、细胞外结构域、跨膜结构域和胞质尾区。Trop-2虽然在多种肿瘤中高表达并介导信号转导, 但它与多种蛋白结合发生作用, 而且下游信号通路众多, 汇聚成复杂网络。因此, 用小分子药物只抑制这单一靶标或阻断单一信号途径未必能抑制Trop-2功能, ADC却能“放大”Trop-2功能, 即利用癌细胞高表达的特征, 让互补的抗体引入细胞内, 杀伤细胞增殖的关键部件例如核酸或微管蛋白, 事实表明ADC能够实现这一抑制效果。

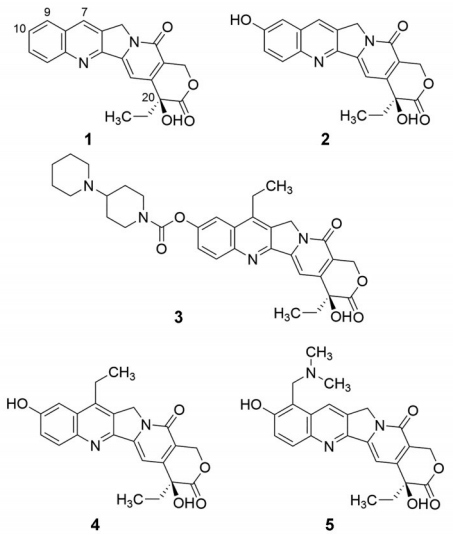
2.2 抗体 Sacituzumab是一种靶向Trop-2的人源化单克隆抗体 (hRS7), 该抗体没有单独获批上市。最初, RS7单克隆抗体是作为一种靶向肺鳞癌的抗体来开发的, 与糖蛋白Trop-2特异性地结合。这个鼠源的单克隆抗体RS7, 经过人源化降低免疫原性, 结构中含有12个半胱氨酸残基, 作为与连接基共价键合的接头。

2.3 分子靶标—拓扑异构酶-1 拓扑异构酶 (topoisomerase) 存在于细胞核内, 功能是切断单链或双链DNA的磷酸二酯键, 然后重新缠绕和封口以改变DNA连环数, 从而控制DNA的拓扑状态。DNA拓扑异构酶分为1型和2型, 拓扑1型具有两种活性: 限制性内切酶活性和连接酶活性, 实现DNA复制过程中切断并重新连接, 从而调节DNA的空间结构。这种在细胞生命中的基本作用使拓扑异构酶-I也成为癌症治疗的重要靶点: 抑制癌细胞的Topo1, 导致DNA链反应断裂, 从而阻止癌细胞的复制和细胞增殖。关键是抑制剂应特异性地进入癌细胞中, 避免杀伤正常细胞的脱靶作用。连接拓扑1抑制剂的ADC具有实现特异分布和杀伤癌细胞的特性。

3 毒性药物—伊利替康的代谢活化物

组成ADC毒性“弹头”不一定是毒性越高越好, 因为有许多因素在时间和空间上影响着识别、结合和释放, 从而改变药效与安全性。这些因素包括抗体对癌细胞抗原的匹配、每个单抗分子接枝“弹头”的载量, 即药物−抗体比值 (drug-antibody ratio, DAR), 以及毒性分子的旁观者效应 (bystander effect), 即游离出的毒物具有穿越细胞膜进入周围癌细胞能力, 扩大杀伤, 以及连接基的尺寸和性质等。

研制者选择了毒性中等适度的喜树碱 (**1**, camptothecin) 及其衍生物, 这与日本第一/三共制药研制的治疗非小细胞肺癌的ADC药物 trastuzumab deruxtecan用喜树碱类的策略相同, 包括10-羟基喜树碱 (**2**)、伊利替康 (**3**, irrinotecan)、7-乙基-10-羟基喜树碱 (**4**, SN-38) 和拓扑替康 (**5**, topotecan) 等, 分别制成ADC。**3**和**5**是已上市药物。实验表明**4**作为ADC的弹头活性最好。**3**是**4**的前药, 在体内被酯酶水解, 裂解掉助溶基团—*N*-碳酰连哌啶基, 生成活性化合物**4**。**4**的细胞毒活性强于伊利替康200～2 000倍, 而且对许多恶性肿瘤有疗效, 包括一些难治性癌症。虽然**4**的溶解性差, 未能成药, 但在ADC中已处于细胞内可抑制拓扑异构酶-1。因而选择**4**为本品的“毒性弹头”。



4 连接基及其构建

在确定了抗体和毒性药物之后, 设计并优化连接基成为研制ADC的关键因素, 这是最具有药物化学内涵和挑战的环节。为了使ADC具有选择性疗效和避免脱靶的不良反应, 设计和优化连接基应具有如下性质: ① 在血循环中稳定性高: 在ADC到达靶细胞和内化之前, 不会释放毒性药物, 使脱靶效应降到最低限度; ② 有效释放的最大化: 通过细胞内的酶促或化学降解, 毒性分子应与连接基完全解体, 为此, 连接基与毒性分子的化学键既要稳定又须在靶细胞内酶促或化学作用发生不可逆的分离, 以游离分子与靶标起作用; ③ 高水溶性: 确保ADC以单体形式可溶解于水性介质, 以免过强的疏水性形成聚集体影响与靶抗原结合, 也避免产生抗原反应。因而连接基应调节亲水−疏水间的平衡; ④ 每个抗体分子接枝的连接基−毒性分子有适宜的载量, 即DAR值, 低载药量会降低效力, 而高

载药量则可能对药代动力学 (PK) 和安全性产生影响。

5 研制本项目的合成方略

研制者设计了两个连接基片段, 作为相互连接备用。第一个片段是含有1～12乙二醇单元的聚乙二醇 (PEG), 最后优化成8个乙二醇单元。片段的一端连接乙炔基HC≡C-或叠氮基HN=N$^+$≡N-, 是与第二个片段剂型偶联的基团; 另一端连接氨基醇的氨基, 醇羟基与喜树碱的20-羟基经碳酸酯或羧酸酯键合。如通式**6**或**7**。或者嵌入天然氨基酸 (或肽) 的氨基, 羧基与氨基醇形成酰胺, 末端的羟基与毒性分子的羟基经碳酸酯连接, 即通式**8**和**9**。

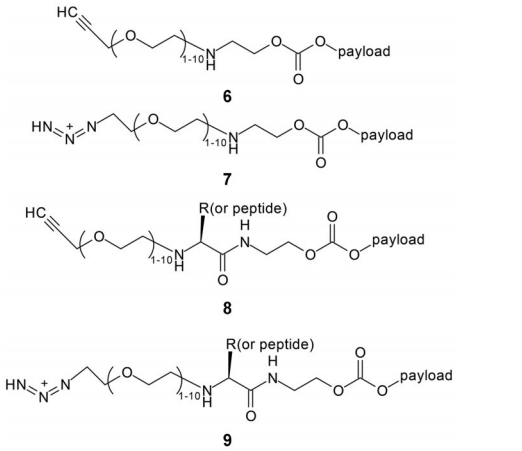


Figure 2 Cycloaddition of azide with acetylene group to prepare key intermediate for ADC

第二个片段一端是拟将与抗体偶联的亲电基团 (后述), 另一端是乙炔基, 两个片段中的叠氮基-N$^-$-N$^+$≡N与单取代乙炔基-C≡CH通过一价铜 (例如CuCl) 催化, 发生环加成反应, 偶联成拟与单抗偶联的最后中间体。叠氮与单取代炔的环加成反应是点击化学的重要分支, 反应条件温和, 可在水溶液反应, 生成单一产物无需色谱分离副产物, 反应具有立体选择性, 环加成得到1,2,3-三氮唑 (图2)。

本品连接基与抗体的“接头”是顺丁烯二酰亚胺, 与抗体中的半胱氨酸巯基作亲电加成, 发生共价键合。通过调节两个反应物的摩尔比, 可制备抗体接枝不同数量的毒性分子, 即考查DAR值与活性/不良反应的关系。图3是抗体与连接基共价结合的示意图。

连接基与毒性分子的“接头”位置是喜树碱 (或其衍生物) 的20位羟基, 与连接基的羟基经碳酸酯结合成ADC。碳酸酯在中性环境中是稳定的 (血浆pH 7.4), 在癌细胞的微酸性环境容易发生水解, 两处断裂酯键, 游离出20-羟基和分解出CO_2 (HCO_3^-形式), 发生不可逆水解反应。如图4所示。

6 代表性的目标物

该项目初始探索了不同的抗原靶标, 后确定了Trop-2蛋白作为抗原, 为人源化单克隆抗体hRS7, 与共价键合了毒性分子的连接基, 经顺丁烯二酰亚胺与半胱氨酸偶联, 形成目标物ADC。

初期设计合成的化合物**10** (Mab-CL-SN-38) 是连接基疏水性较强的化合物, DAR值5.26, 对L2987细胞抑制活性IC_{50} 3 μmol·L^{-1}, 血浆中稳定性$t_{1/2}$ > 50 h。由于连接基缺少亲水性基团, 溶解性差 (Walker MA, Dubowchik GM, Hofstead SJ, et al. Synthesis of an immunoconjugate of camptothecin. Bioorg Med Chem Lett, 2002, 12: 217−219)。

将**10**中ω-氨基己酸片段换成氨甲基环己甲酸并引入聚乙二醇增加水溶性, 化合物**11** (Mab-CL5-SN-38) 成为极性较强的目标物。

连接基的左半部分 (从丁二酰亚胺到聚乙二醇) 是优化好的片段, 目标物的这部分结构不变, 右半部分是可变片段, 以调节连接基长度、亲水−亲脂比例和断裂游离出毒性分子的连接方式。化合物**12** (Mab-CL1-



Figure 3 The nucleophilic addition of cysteine-SH to maleimide residue

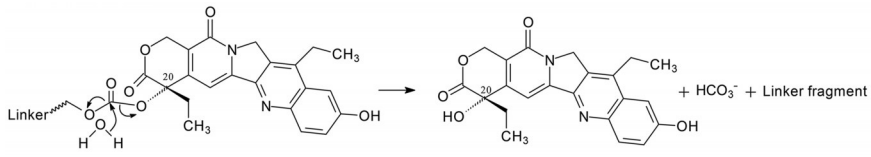
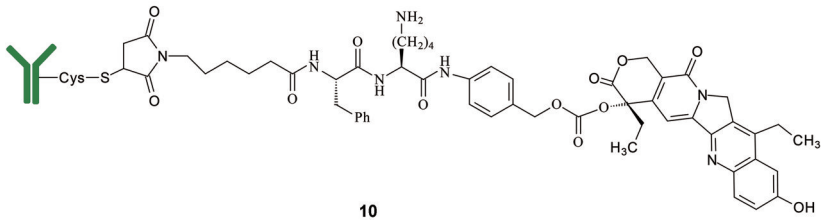
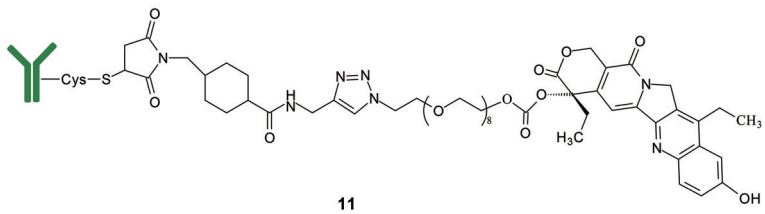


Figure 4 Hydrolysis of carbonate and liberation of payload



10



11

SN38) 是经甘氨酸与20-羟基的单酯基相连的目标物, 极性也比较强。

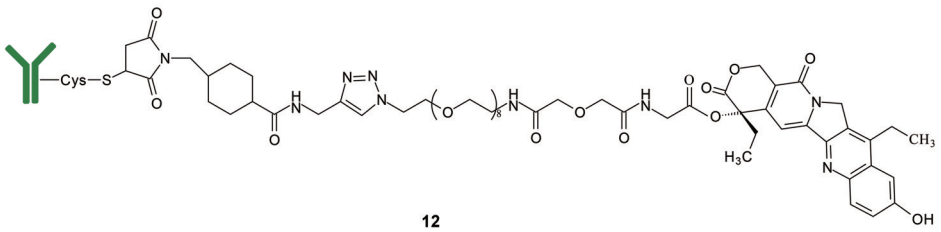
为增加化合物的疏水性, 合成的 **13** (Mab-CL6-SN-38) 是缬氨醇经碳酸酯与20-羟基-SN-38相连, 疏水性略有增加, 在血浆中稳定性有所提高, 而且碳酸酯比单酯更容易水解。

用对氨基苄醇替换 **13** 的缬氨醇以消除手性因素, 化合物 **14** 是另一类连接基的ADC。

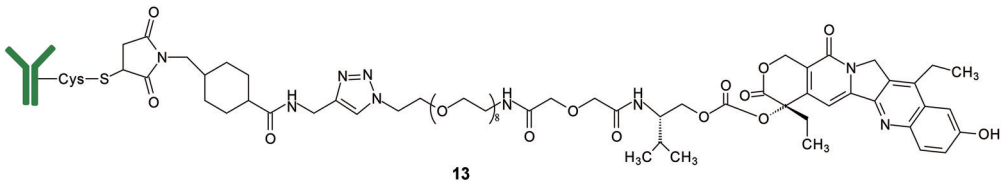
化合物 **15** (Mab-CL2-SN-38) 是在 **13** 的基础上插入赖氨酸片段, **15** 的疏水性进一步提高, 稳定性和活性明显提高。

用对氨基苄醇替换 **15** 的缬氨醇, 消除一个手性中心, 化合物 **16** (Mab-CL2A-SN-38) 的亲水−疏水性变化不大。

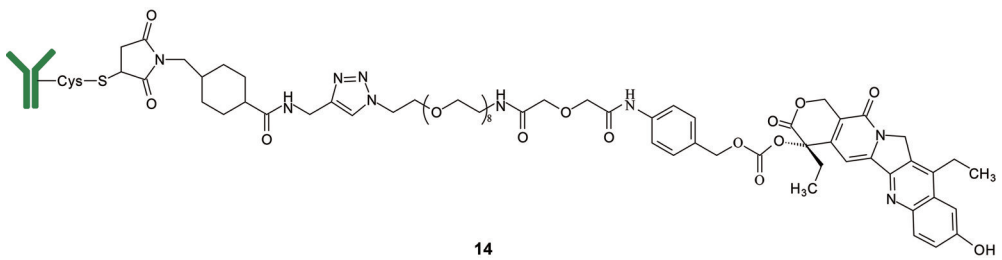
在 **16** 的连接基中嵌入一个苯丙氨酸残基, 目的是增加被溶酶体中组织蛋白酶 B (cathepsin B) 水解位



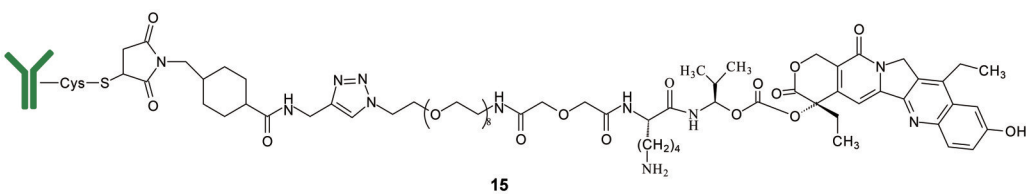
12



13



14



15

点, 有利于连接基解体, Phe-AA 是酶切的位点。然而实验表明嵌入 Phe 并没有提高释放的功能, 因为碳酸酯在细胞内的水解是释放毒性分子的压倒因素。后面将进一步叙述 **16** 和 **17** 的性质。

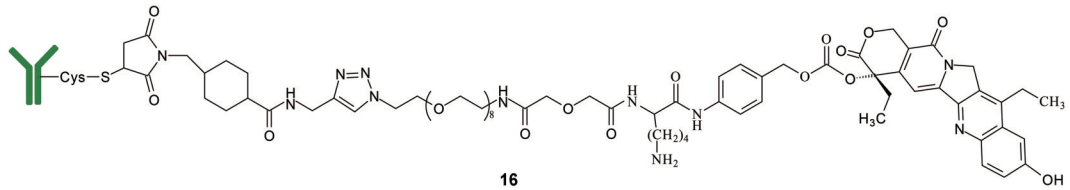
化合物 **18** 的连接基与 SN-38 结合是两个 N-甲氨基甲酸酯置换, 得到的 **18** 的分子尺度加大。

17 的碳酸苄酯中间嵌入甘氨酸, 得到极性和尺度增大的化合物 **19**。

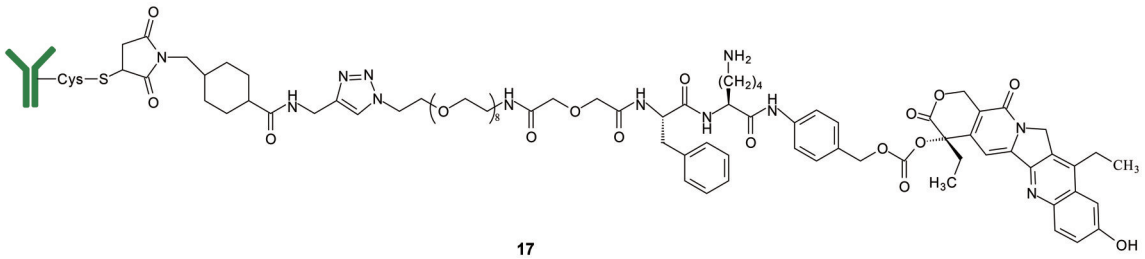
这些目标化合物是笔者从期刊和专利 (权利要求) 汇集而成的 (Govindan SV, Moon SJ, Goldenber DM. Immunocojugates with an intracellularly-cleavable linkage. US 7999083 B2; Govindan SV, Moon SJ, Goldenber DM. Immunocojugates with an intracellularly-cleavable linkage. US 8759496 B2)。文献报道了部分化合物的体外细胞活性, 但因 ADC 连接了不同的单抗, 因而报道的活性数据, 半衰期和 DAR 值的可比性意义不大 (Moon SJ, Govindan SV, Cardillo TM, et al. Antibody conjugates of 7-ethyl-10 hydroxycamptothecin (SN-38) for targeted cancer chemotherapy. J Med Chem, 2008, 51: 6916−6926)。本文列出的目标化合物是试图分析研制者在优化连接基的思路和变换路径, 供读者参考。表 1 列出的目标 ADC 的活性、DAR 值和在磷酸缓冲液以及人血清中的半衰期 (稳定性)。抗体除 **10** 为 Trop-2-IgG 单抗外均为拉贝株单 labetuzumab, 提示尽管 ADC 的抗体和毒性分子相同, 但不同的连接基导致药物−抗体比值 (DAR) 不同, 不过由于样本少难以归纳出规律; 同样, ADC 在血清中的稳定性也随着连接基的变化而不同, 然而它们体外对结肠癌细胞活性却很相近。

Table 1 DAR values, *in vitro* stability at 37 ℃ and activity on colon adenocarcinoma cell line. a: On L2987 cell line; b: Not test

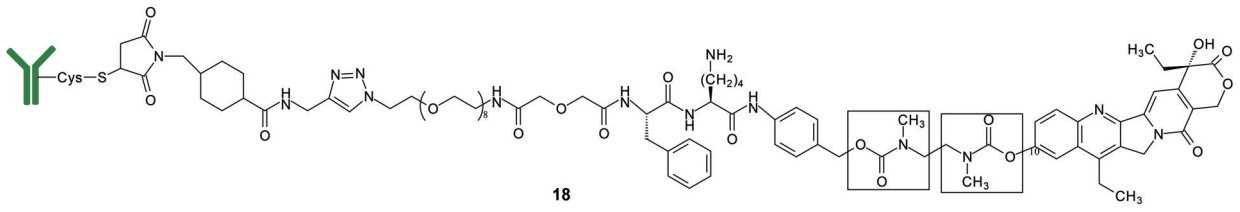
Compd.	Link group to C-20-OH	DAR value	Half life/h		K_d /nmol·L^{-1}
			PBS	Hunan serum	
10	Carbonate[a]	5.3	–[b]	>50	3 000
11	Glycine ester	6.9	18.7	14.4	2.4
12	Carbonate	7.1	8.6	10.8	1.4
14	Carbonate	–[b]	27.6	32.2	–[b]
16	Carbonate	7.6	–[b]	–[b]	–[b]
17	Carbonate	4.0	30.1	31.2	1.4
19	Glycine ester	5.5	48.8	–[b]	1.5



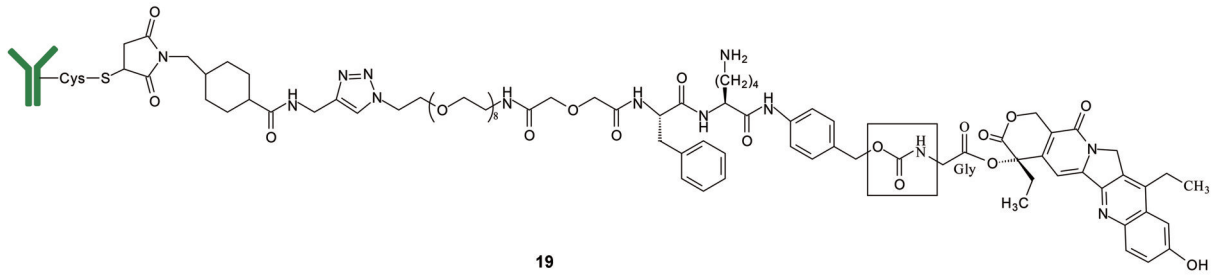
16



17



18



19

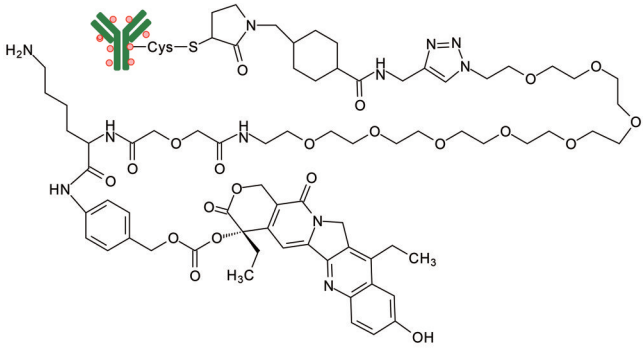
7　戈沙妥珠单抗

进一步评价连接Trop-2-IgG单抗的ADC目标物，优选出化合物**16**和**17**，比较二者的各种参数列于表2 (Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, et al. Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys. Clin Cancer Res, 2011, 17: 3157−3169)。

16和**17**的体外活性、安全性和其他性质没有显著性差异，遂确定**16**为候选ADC，代号为IMMU-132，优化抗体与SN-38比值**16**的DAR值为7.6，半衰期为16 h，清除率为0.002 $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$。用移植胃癌裸鼠治疗4周，每周给药两次，每次14 $mg \cdot kg^{-1}$，治疗效果显著强于对照组伊立替康。**16**命名为戈沙妥珠单抗 (sacituzumab govitecan，商品名Trodelvy)，经临床前和临床试验，表明治疗无法切除局部晚期或转移性三阴性乳腺癌(TNBC)患者效果显著，2020年FDA批准上市，用于治疗转移性TNBC患者，成为首创性Trop-2靶向ADC。2021年FDA扩大了戈沙妥珠单抗的适应症，包括三阴乳腺癌、乳腺癌和尿路上皮癌。戈沙妥珠单抗已在全球包括我国在内的多个国家获得批准，用于转移性三阴乳腺癌的二线治疗。

Table 2　Comparison of several parameters between compounds **16** and **17**

Compd.	No. of linker chirality	DAR	Free of SN-38/%	Human serum half-life /h	Cell binding *Ki* /$nmol \cdot L^{-1}$	Cytotoxicity IC_{50} /$nmol \cdot L^{-1}$
16	1	6.1	0.6	20.3	1.09	4.24
17	2	6.2	0.7	22.1	1.19	4.12



Sacituzumab govitecan