

大分子偶联药物研究进展

严靖杰^{1#}, 杨倩^{2#}, 汪小润^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院 药物研究所 天然药物及核药基础与新药创制全国重点实验室, 北京 100050;
2. 国家知识产权局专利局专利审查协作北京中心, 北京 100170)

摘要: 自抗体偶联药物问世以来, 偶联药物的外延被不断拓展, 其靶向配体不再局限于传统单克隆抗体, 有效载荷也在细胞毒类药物的基础上衍生出更多选择。其中, 以生物大分子作为靶向配体, 通过连接子与各类有效载荷连接组成的药物, 统称为大分子偶联药物。本文作者从靶向配体、连接子和有效载荷三方面入手, 系统综述了大分子偶联药物的研究进展, 以期为该领域的后续研发与应用提供参考。

关键词: 靶向治疗; 偶联药物; 靶向配体; 连接子; 有效载荷

中图分类号: R914 **文献标志码:** A

1913 年, 德国科学家 Paul Ehrlich 首次提出了“魔法子弹”的设想, 即通过将毒素(弹头)安装在可靶向肿瘤细胞的载体上, 实现对肿瘤细胞的精准杀伤^[1]。2000 年, 由辉瑞公司研发的抗体偶联药物(antibody-drug conjugates, ADCs) 吉妥单抗成功上市, 让这一设想成为现实。随着 ADCs 药物的兴起, 多肽-药物偶联物(peptide-drug conjugates, PDCs)、适配体-药物偶联物(aptamer-drug conjugates, ApDCs) 等各类偶联药物相继问世, “万物皆可偶联”的理念也逐渐形成。

偶联药物是一类通过人工设计的连接子将具有靶向作用的配体与产生效应的有效载荷共价连接而成的药物。其中, 靶向配体负责特异性识别并结合靶点, 其形式多样, 包括抗体、多肽、核酸适配体等; 有效载荷是发挥预期效应的活性部分, 可选用小分子药物、肽类及蛋白质类药物、核苷酸类药物或放射性核素等; 连接子将靶向配体与有效载荷连接为单一分子, 部分连接子还具有调控有效载荷释放的功能。偶联药物的作用机制如下: 首先, 靶向配体与靶点特异性结合, 介导药物通过内吞、胞饮等途径内化进入细胞; 随后, 可断裂连接子在特定条件(如特定 pH、还原环境、酶解或外源性刺激等)下断裂, 释放出有效载荷发挥作用, 而不可断裂连接子则与有效载荷保持连接且

不影响其发挥效应。渗透性良好的有效载荷在靶细胞凋亡后, 可扩散至邻近细胞继续发挥作用, 该现象称为旁观者效应^[2]。以各类生物大分子为靶向配体, 依托不同有效载荷固有特性赋予其靶向特异性的偶联药物, 被统称为大分子偶联药物。本文作者从靶向配体、连接子、有效载荷三方面综述大分子偶联药物的研究进展, 并进一步梳理该领域的专利申请状况。

1 靶向配体

在偶联药物中, 靶向配体是负责识别并结合特定靶点的功能单元, 其本质为具有特异性结合能力的分子。可应用于大分子偶联药物的靶向配体种类丰富(表 1), 在偶联药物的构建过程中, 靶向配体的选择由目标靶点的特性决定。

选择合适的靶点与靶向配体是大分子偶联药物研发的首要问题。理想的靶点应具备以下特点: 在目标部位特异性表达或高表达、在其他正常部位低表达或不表达^[3]; 应为非分泌型靶点, 以避免在循环系统中与靶向配体结合^[4]; 偶联药物与靶点结合后能够有效内化以发挥作用, 且用药后靶点的表达无明显下调^[5]等。对于抗肿瘤 ADCs, 已报道的靶点主要包括肿瘤细胞表面靶抗原和肿瘤微环境靶抗原两类。在肿瘤细胞表面靶

收稿日期: 2024-12-30

作者简介: #作者贡献等同: 严靖杰(2001-), 男(汉族), 重庆人, 硕士研究生, E-mail: yanjingjie@imm.ac.cn; 杨倩(1983-), 女(汉族), 江苏南京人, 博士, 正高级, 知识产权师, 主要从事创新药物技术分析, E-mail: cpy-yangqian816@163.com; *通信作者: 汪小润(1982-), 男(汉族), 安徽合肥人, 博士, 研究员, 主要从事新药研发, E-mail: wangxiaojian@imm.ac.cn。

抗原中,治疗实体瘤的上市药物靶点有 HER2、EGFR、Nectin-4、TROP-2、TF 和 FR α 等,治疗血液瘤的上市药物靶点包括 CD30、CD33、CD22、CD19、CD79b 和 BCMA 等,在研 ADCs 的靶点则有 HER3、ROR1、MUC1 等。靶向肿瘤微环境的非内化 ADCs,可在一定程度上解决传统 ADCs

难以内化的问题,相关靶点包括 PTK7、LRRC15、CXCR4、CXCL12 等。PDCs 的常见靶点有整合素、氨肽酶 N、生长抑素受体、促黄体激素释放激素受体等。ApDCs 则可靶向 HER2、HER3、BAFF-R、CD30、CD38 和 CD117 等靶点^[6-8]。

Table 1 The targeting ligands used in macromolecule-drug conjugates

Targeting ligand	Molecular weight/kDa	Features
monoclonal antibody	150 - 180	strong specificity, sensitive to temperature
bispecific antibody	60 - 250	dual target
antibody fragment	15 - 50	low molecular weight, better permeability than mAbs
peptide	1 - 10	low molecular weight, better permeability than mAbs
aptamer	6 - 30	low molecular weight, stable, short half-life
non-antibody protein scaffold	6 - 20	low molecular weight
virus-like particles	> 1 000	immunogenicity

1.1 抗体

抗体可分为 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD 五类。其中 IgA、IgM 分别以二聚体和五聚体的形式存在,分子量较大且渗透能力较弱;IgE 在人体内含量极低;IgD 易被蛋白酶降解,半衰期较短;而 IgG 兼具适中的分子量、体内含量以及良好的稳定性,是构建 ADCs 的适宜配体^[9]。IgG 包含 4 个亚型,其中 IgG1 是目前 ADCs 研发中最常用的亚型,现有 ADCs 多采用低免疫原性的人源化或全人源化抗体。

1.1.1 单克隆抗体

单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 能够特异性地识别单一抗原表位,兼具纯度高、灵敏度高、特异性强、交叉反应少、制备成本较低等优点,且其自身具有抗肿瘤活性,是 ADCs 中常用的

靶向配体,被广泛应用于靶向治疗领域。人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 在部分肿瘤中存在过表达,是 ADCs 研发的主流靶点之一。曲妥珠单抗 (trastuzumab) 是一种抗 HER2 的重组人源化单克隆抗体,可用于 HER2 阳性乳腺癌等肿瘤的治疗,同时也作为靶向配体应用于恩美曲妥珠单抗、德曲妥珠单抗等上市及在研 ADCs 中。维迪西妥单抗是我国自主研发的一款创新型 ADCs,其靶向配体为抗 HER2 的迪西妥单抗 (disitamab)。除抗 HER2 单抗外,其他靶点的单克隆抗体也可应用于 ADCs 药物中(表 2)。随着技术的不断发展,相较于传统单克隆抗体,新型抗体展现出独特的应用优势。

Table 2 The commonly used monoclonal antibodies in ADCs

Monoclonal antibody	Targets	Monoclonal antibody	Targets
trastuzumab	HER2	gemtuzumab	CD33
disitamab	HER2	vadastuximab	CD33
patritumab	HER3	brentuximab	CD30
enfortumab	Nectin-4	inotuzumab	CD22
avelumab	PD-L1	sacituzumab	Trop-2

1.1.2 双特异性抗体

双特异性抗体 (bispecific antibody, bsAb) 是通过结构设计及改造得到的含有两种特异性抗原结合位点的新型抗体,可识别两个不同抗原或同一抗原的两个不同表位^[10]。双特异性抗体偶联药物 (bispecific antibody-drug conjugates, bsADCs)

包括双靶点 bsADCs 和双表位 bsADCs 两类,只表达其中一种抗原的正常组织可避免与抗体结合^[11],这不仅增强了对肿瘤组织的选择性,还能克服因单靶点体内表达下降引发的耐药问题。Lee 等^[12]报道了一种由靶向肝配蛋白 A 型受体 2 (ephrin receptor A2, EphA2) 的快速内化抗体和

靶向活化白细胞黏附分子(activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM)的非内化抗体组成的双特异性抗体,并以此构建了 bsADCs,当 EphA2 与 ALCAM 的抗原密度比达到特定阈值时,该双特异性抗体的内化效果优于单克隆抗体及两种抗体的混合物,这表明双特异性抗体为实现非内化抗原向内化抗原的转化提供了有效策略。此外,双特异性抗体可招募 T 细胞杀伤肿瘤细胞,据此设计整合免疫细胞功能的 bsADCs,能进一步丰富抗肿瘤作用机制。

1.1.3 抗体片段

在 ADCs 结构中,抗体的分子量约 150 kDa, 相对较大,不利于药物穿透组织屏障。以抗体片段替代完整抗体,可有效降低分子量、增强渗透性,还能结合完整抗体难以接触到的隐藏表位。抗体片段包括抗原结合片段、单链抗体和纳米抗体等,这类片段与有效载荷形成的偶联物被称为抗体片段偶联物(antibody fragment drug conjugates, AFDCs)。

抗原结合片段是抗体上与抗原特异性结合的功能区域,分子量约 50 kDa。单链抗体是利用基因工程技术获得的人工合成抗体片段,由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接而成,其分子量较抗原结合片段的更小,约 30 kDa,并保留了与抗原结合的特异性。纳米抗体又称单域抗体,仅包含重链抗体的抗原识别区片段,分子量约 15 kDa,为完整传统抗体的十分之一,被认为是最小的抗原结合单位^[13]。纳米抗体既保留了抗原结合活性和良好的稳定性,又具有低免疫原性,其结构中部分疏水性氨基酸被突变为亲水性氨基酸,有效改善了递送效果^[14]。抗体片段虽相较单克隆抗体具有一定优势,但存在代谢速度快的问题,肿瘤组织对其特异性摄取总量不及单克隆抗体^[15],需要通过融合人血清白蛋白、融合白蛋白结合结构域、聚乙二醇化等方式,改善其药物代谢动力学性质^[16-18]。

1.1.4 前抗体

前抗体的概念类似于前药,其轻链端通过连接子偶联掩蔽肽,以此阻断抗体与靶蛋白的结合,而肿瘤微环境中存在相应的蛋白激酶可以切割该连接子,从而使抗体恢复与靶蛋白的结合活性^[11]。前抗体的应用能够提高抗肿瘤 ADCs 对肿瘤细胞的靶向特异性,同时降低其全身系统毒性。

1.2 靶向多肽

部分多肽可通过识别细胞表面受体实现靶向作用,这类多肽被统称为靶向多肽,是构建 PDCs 的关键靶向配体,主要包括细胞靶向肽、细胞穿透肽、自组装肽、反应肽等类型^[19]。

1.2.1 细胞靶向肽

细胞靶向肽分为被动靶向和主动靶向两大类,多数基于细胞靶向肽的 PDCs 均通过主动靶向机制实现传递^[19]。整合素在肿瘤的增殖和迁移过程中发挥重要作用,在肿瘤血管内皮细胞上特异性表达,可与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽特异性结合,该三肽已被广泛应用于 PDCs 的构建^[19]。氨肽酶 N 是一种肿瘤相关的特异性受体,在肿瘤血管生成过程中起到关键作用,天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸短肽可以特异性识别并靶向该受体,研究人员已基于此短肽序列设计出多种药物靶向递送策略^[19]。促黄体激素释放激素是一种十肽化合物,其受体在大多数正常组织中不表达,而在肿瘤细胞表面高表达,可作为肿瘤靶向治疗的有效靶点^[19]。生长抑素受体在瘤周静脉中广泛表达,生长抑素及其类似物可快速内化进入细胞,奥曲肽等生长抑素模拟肽便基于此设计,并可用于 PDCs 构建^[19]。球状 Clq 受体在淋巴管及肿瘤细胞上高表达,Lyp-1 是靶向该受体的一种肿瘤归巢肽,也可用于构建 PDCs^[20]。

1.2.2 细胞穿透肽

细胞穿透肽是一类可穿透细胞膜且不破坏其完整性的短肽,一般由 5~30 个氨基酸组成,其跨膜机制主要包括内吞作用和直接易位^[19]。线性细胞穿透肽结构简单易合成,是细胞穿透肽中的经典结构,如人类免疫缺陷病毒-1 转录激活因子可快速通过细胞膜进入细胞,已被广泛应用于构建跨膜转运型 PDCs^[19]。环状细胞穿透肽较为新颖,相比于线性细胞穿透肽,其细胞膜通透性更高,对蛋白质水解的抗性更强,且与靶点的亲和力也更优^[19]。

1.2.3 自组装肽

自组装肽是一类无需外部刺激,便可通过非共价相互作用从复杂混合物中选择性自发形成一种或多种有序结构的多肽^[19]。与传统多肽相比,自组装肽具有良好的生物相容性、生物降解性和多功能性^[19]。研究人员设计了一种以自组装肽 R-lycosin-I 为靶向配体的偶联药物,该药物表现出更强的抗肿瘤活性^[21]。

1.2.4 反应肽

反应肽是指受到外界刺激时(温度、pH、酶等)发生结构变化的多肽,肿瘤微环境的缺氧状态、弱酸性特征及特异性酶的存在,为反应肽实现靶向性提供了可能^[19]。低 pH 插入肽(pH low insertion peptide, pHLIP)是一种可在酸性条件下发生构象转化并穿过细胞膜进入细胞的多肽,研究人员通过二硫键将 pHLIP 与多柔比星(doxorubicin, DOX)连接,得到偶联药物 pHLIP-SS-DOX,该药物可有效缓解肿瘤的多药耐药现象^[19]。

1.3 核酸适配体

核酸适配体简称适配体,也被称为化学抗体,是通过指数富集的配体系统进化技术筛选得到的单链 DNA 或 RNA 序列,其特异性及亲和力不逊于传统抗体,还具有合成简单、化学修饰灵活、稳定性高、免疫原性低、生产成本低等优点^[22],可作为靶向配体用于 ApDCs 的构建。研究人员设计合成了一种多价适配体-药物偶联物,该偶联物一端为亲水性适配体,另一端连接多个疏水性药物,这样的两亲性使其能够自组装形成纳米胶束,既增强了适配体对核酸酶的抗性,又改善了药物代谢动力学性质^[23]。

1.4 其他靶向配体

1.4.1 非抗体支架蛋白

亲和体是一种非免疫球蛋白类亲和蛋白,由 58 个氨基酸构成,分子量约 6.5 kDa,远小于完整抗体及抗体片段,可在肿瘤组织中实现快速分布^[24]。预设计锚蛋白重复蛋白(designed ankyrin repeat protein, DARPIn)是一类新型结合蛋白,具有分子量小、稳定性高的特点。研究人员以靶向 HER2 的 DARPIn 为靶向配体,设计了一种重组毒素 DARPIn-PE40,其细胞毒性与 HER2 的表达水平密切相关,能强效且持久地抑制无胸腺小鼠异种移植瘤的生长^[25]。Centyrin 是基于 III 型纤连蛋白结构域设计的小型工程蛋白,主要用于寡核苷酸的靶向递送,研究人员通过在其序列中引入半胱氨酸,并与细胞毒类小分子药物 MMAF 偶

联,实现了较高的靶向结合效率^[26]。

1.4.2 聚合物

聚合物-药物偶联物具有较低的免疫原性和良好的稳定性^[27]。常用于偶联物中的聚合物包括聚乙二醇、*N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、聚谷氨酸等,此类偶联物可通过增强通透性和滞留效应,在肿瘤组织中实现被动富集^[28]。此外,在聚合物主链上连接叶酸等靶向分子,还能进一步提升偶联物的靶向性^[29]。

1.4.3 病毒样颗粒

病毒样颗粒是不含遗传物质的病毒衣壳结构,与病毒具有相似的结构与功能,且保留了免疫原性。研究人员合成了一种病毒样颗粒偶联药物 AU-011,该偶联药物可通过肿瘤细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖介导的特异性结合实现肿瘤靶向,并以光敏剂 IRDye700DX 为有效载荷,展现出较强的靶向抗肿瘤活性^[30]。

2 连接子

连接子与偶联药物的疗效和不良反应密切相关,其长度、空间位阻等特性会影响偶联药物发挥目标效应,还会改变药物代谢动力学性质。连接子的结构可以进一步细分为靶向配体连接区、连接子主链区和有效载荷连接区三部分。

2.1 靶向配体连接区

目前偶联技术的研究主要集中在 ADCs 中连接子与抗体的偶联方式,主要包括基于赖氨酸偶联和基于半胱氨酸偶联两种。赖氨酸残基天然丰度高、表面可及性好,是理想的偶联位点,*N*-琥珀酰亚胺酯基团可与抗体的赖氨酸残基形成酰胺键进行偶联(图 1A)。半胱氨酸残基丰度低且亲核性强,有利于连接子与抗体的选择性偶联,马来酰亚胺基团与抗体的半胱氨酸残基通过迈克尔加成反应形成稳定的硫醚键实现偶联(图 1B)。此外,偶联方式还包括引入反应性半胱氨酸、引入合适的非天然氨基酸、改造二硫键以及修饰抗体中的糖基等^[2]。

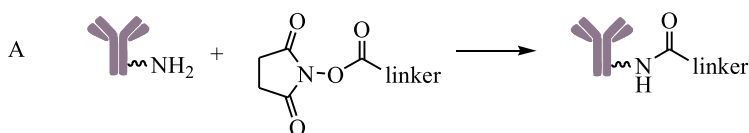
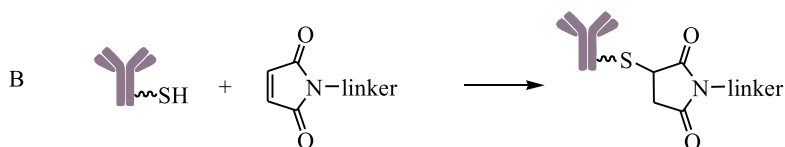


Figure 1 The conjugations based on lysine (A) and cysteine (B)



Continued Figure 1

2.2 连接子主链区

连接子主要分为不可裂解连接子和可裂解连

接子两大类,其研究相对成熟,常用的连接子见表3。

Table 3 The linkers used in macromolecule-drug conjugates

Types	Advantages	Shortcomings
non-cleavable linkers	stable	no bystander effect
acid cleavable linkers	quick release, simple structures	unstable
GSH cleavable linkers	selective release within tumor cells	relying on efficient internalization, heterogeneity in tumor GSH levels
enzyme cleavable linkers	relatively stable, mature technology, beneficial for the bystander effect	tumor microenvironment dependence, limited efficacy in some patients
exogenous stimuli cleavable linkers	avoiding the influence of endogenous factors	side effects of exogenous stimuli, high technical difficulty

2.2.1 不可裂解连接子

不可裂解连接子是早期研究的重点,*N*-琥珀酰亚胺基-4-(*N*-马来酰亚胺甲基)环己基-1-羧酸酯(SMCC,图2)为其代表性连接子^[2]。相较于可裂解连接子,不可裂解连接子在血液循环中具

有更高的稳定性。但此类连接子构建的 ADCs 需经细胞内化,且抗体部分被溶酶体蛋白酶降解后才能释放有效载荷发挥作用;同时硫醚类不可裂解连接子不利于旁观者效应的发挥^[2],因此目前的相关研究主要集中在可裂解连接子上。

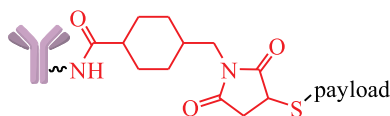


Figure 2 The structure of SMCC linker

2.2.2 可裂解连接子

理想的可裂解连接子需要在血液循环中保持稳定,并在靶点处特异性释放有效载荷。脲键在 pH 值为 7.4 的条件下稳定,在酸性环境中可发生水解,基于此设计的含脲键连接子(图3A),可在肿瘤细胞溶酶体的酸性条件(pH 值为 4.5~5.0)下裂解释放药物^[31],理论上在血液循环中具备良好的稳定性。这一策略已成功应用于吉妥单抗、奥加伊妥珠单抗等上市 ADCs 药物中。但脲键连接子在血液循环中会发生一定程度的水解,导致有效载荷提前释放并产生毒性,实际稳定性未达到预期^[31]。新型含硅醚结构的连接子(图3B)提高了酸可裂解连接子的稳定性,可用于偶联高毒性的有效载荷^[31]。

肿瘤相关的氧化应激常使肿瘤细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平升高,其结构中的巯基

可与二硫键发生反应导致二硫键连接子裂解,进而释放药物(图3C);而血浆中主要含巯基的分子是还原型人血清白蛋白,该分子不与二硫键连接子发生反应,因此这类连接子在血液循环中相对稳定^[32]。目前含二硫键的连接子在 ADCs 中主要应用于美登素类药物的偶联构建。

组织蛋白酶 B 是一种溶酶体内的半胱氨酸蛋白酶,在多种肿瘤细胞中过度表达^[32]。据此,研究人员设计了多种以该酶可水解的多肽链作为连接子的偶联药物。马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸(Val)-瓜氨酸(Cit)-对氨基苄氧羰基(PABC)连接子(图4A)中的 Val-Cit 二肽可被组织蛋白酶 B 裂解,进而触发 PABC 的自发消除,释放出有效载荷。自降解间隔子 PABC 的引入降低了有效载荷对酶切位点的空间位阻,有利于酶发挥催化作用^[2]。

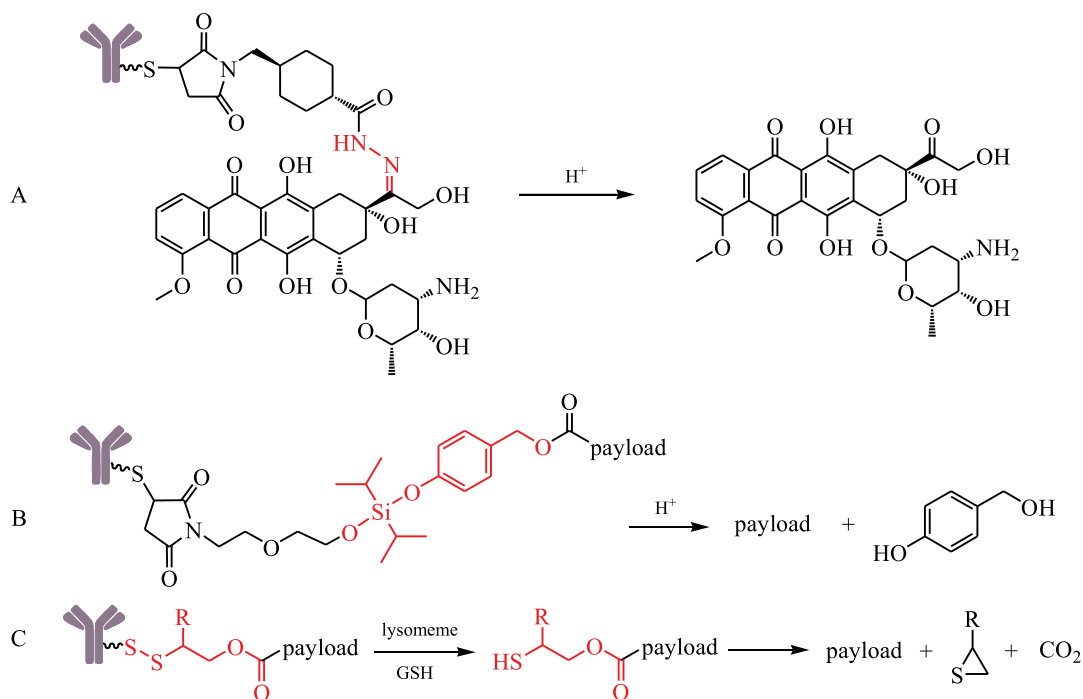


Figure 3 The structures and release mechanisms of acyl hydrazone linker (A), silyl ether-based acid-cleavable linker (B) and glutathione-cleavable linker (C)

上市 ADCs 药物德曲妥珠单抗中使用的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸 (GGFG) 四肽连接子 (图 4B), 同样可被组织蛋白酶 B 裂解, 该连接子具有较高的稳定性, 可使相应的 ADCs 达到较高的药物抗体比率 (drug-to-antibody, DAR)^[33]。DAR 是指平均每个抗体分子上连接的有效载荷数量, 其值通常为 0~8, 是评价 ADCs 的重要参数。DAR 值越大, 单个 ADC 分子所携带的有效载荷越多, 但高 DAR 值可能加快 ADCs 的体内清除速率, 从而降低其治疗效果^[34]。

β -葡萄糖醛酸酶在部分肿瘤细胞中高表达, 且可分泌至细胞外, 可实现连接子的胞外酶促裂解^[32]。研究人员将 β -葡萄糖醛酸酶的底物葡萄糖醛酸连接到自降解间隔子 (图 4C) 上, 通过该酶水解后, 间隔子发生降解并释放有效载荷。这类连接子具有良好的稳定性, 且葡萄糖醛酸的引入提升了其亲水性^[32]。与 β -葡萄糖醛酸酶类似, β -半乳糖苷酶同样在部分肿瘤中过表达, 以该酶可裂解的连接子 (图 4D) 与曲妥珠单抗和有效载荷 MMAE 构建的 ADCs, 相比经典的 Val-Cit-PABC 连接子构建的 ADCs, 具有更好的治疗效果^[32]。

磷酸酶和焦磷酸酶为溶酶体中选择性表达的水解酶, 研究人员在 Val-Cit-PABC 连接子的基础上, 设计了含磷酸和焦磷酸的连接子 (图 4E), 磷

酸基团的引入可改善连接子的水溶性^[2]。硫酸酯酶在部分肿瘤细胞中高表达, 其可裂解的连接子 (图 4F) 对肿瘤细胞具有一定的靶向选择性, 且与经典肽类连接子的效力相近^[2]。

肿瘤微环境中游离 Fe (II) 水平显著升高, 研究人员基于此设计了一种含 1,2,4-三氧烷骨架的 Fe (II) 响应型连接子 (图 5), 该连接子可通过 Fe (II) 与 1,2,4-三氧烷中的 O-O 键发生 Fenton 反应裂解, 再经 β -消除释放有效载荷^[31]。

反式环辛烯 (*trans*-cyclooctene, TCO) 与四嗪间的咕嗪消除反应为快速发生的生物正交反应。研究人员设计了连接子中含有 TCO 结构的 ADCs (图 6A), 可通过与四嗪分子的反应触发有效载荷释放^[35]。后续研究对此类连接子进行了优化, 使用聚乙二醇修饰含 TCO 的连接子 (图 6B), 该修饰后的连接子相较组织蛋白酶 B 可裂解的 Val-Cit-PABC 连接子疗效更佳^[36], 且可应用于非内化靶点^[32,35]。

金属介导的生物正交切割反应也被用于连接子的裂解, 研究人员发现 Cu (I)-BTAA 可快速有效裂解含炔丙基的连接子 (图 6C)^[31]。另有研究表明, 通过三氟硼苯丙氨酸脱除连接子中酚羟基上的叔丁基二甲基硅基 (TBS) 保护基后, 体系发生电子重排 (图 6D), 24 h 内可实现约 90% 的有效载荷释放^[37]。

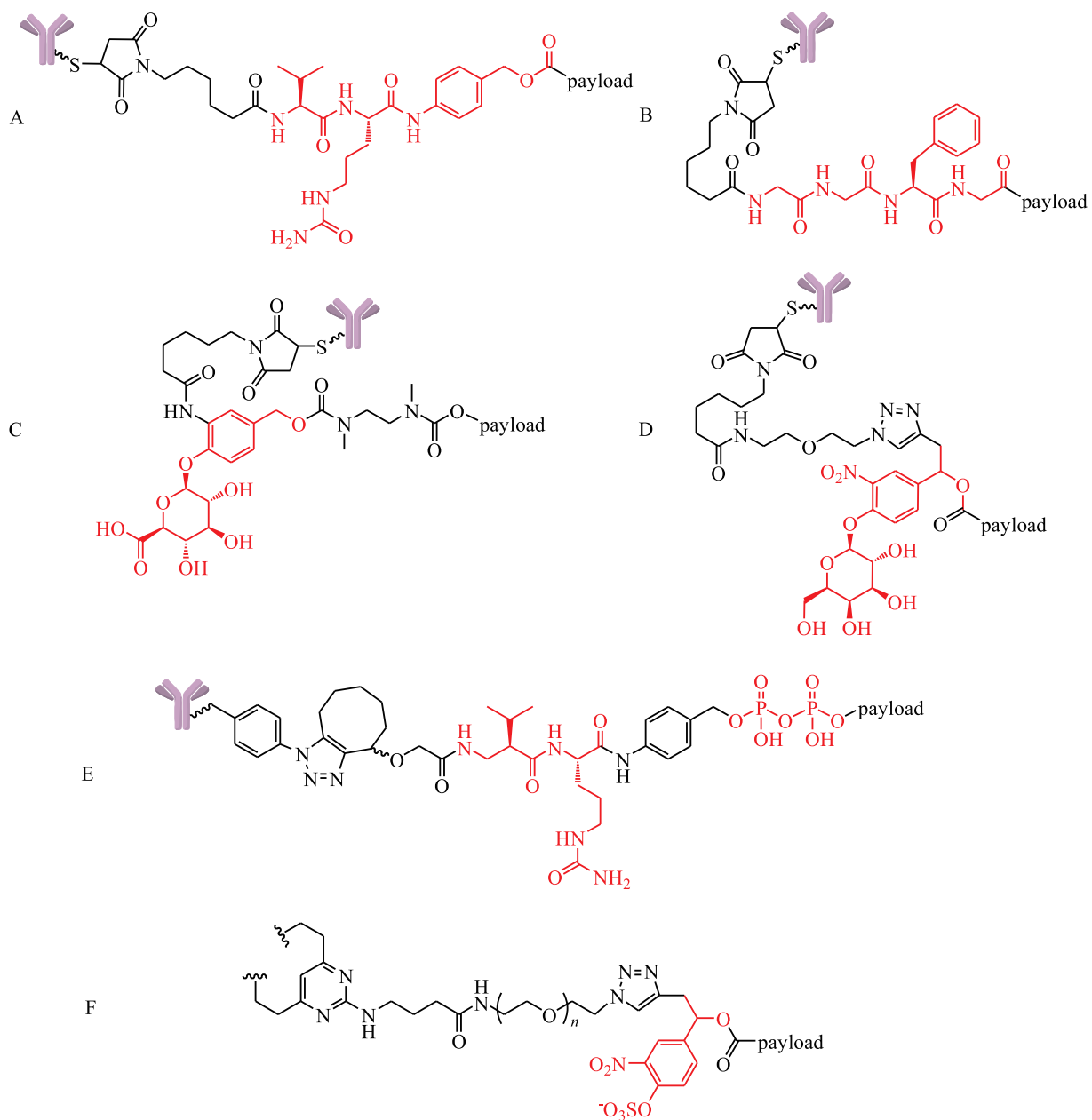


Figure 4 The structures of Val-Cit-PABC linker (A) ,GGFG linker (B) , β -glucuronic linker (C) , β -galactosidase linker (D) , pyrophosphate linker (E) and sulfatase-cleaved linker (F)

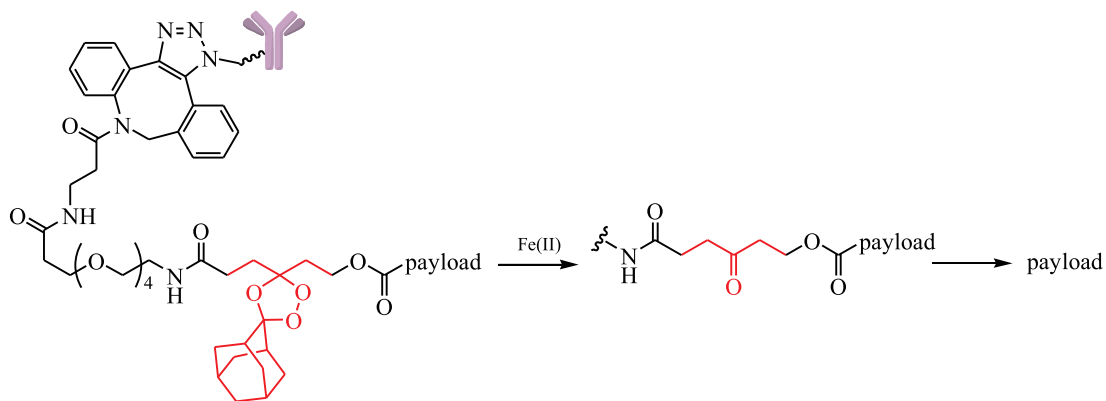


Figure 5 The structure and release mechanism of Fe(II) cleavable linker

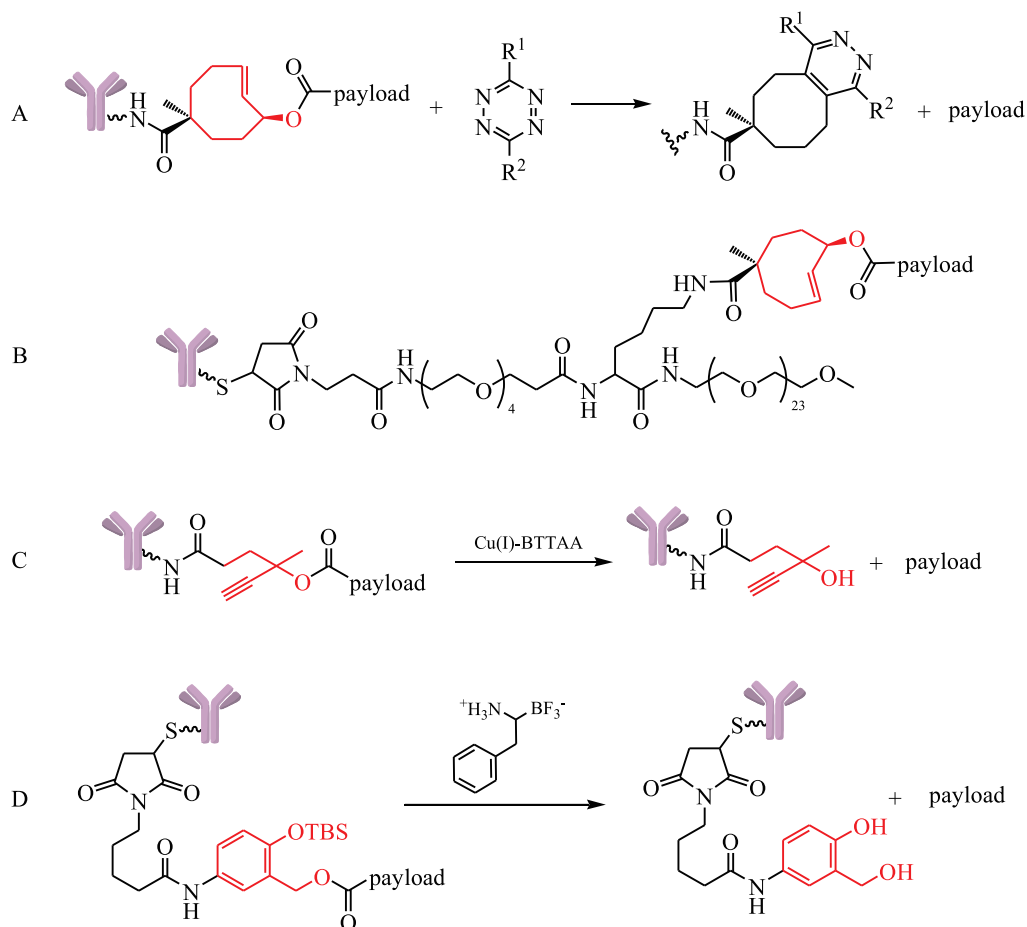


Figure 6 The structures and release mechanisms of biorthogonal-cleavable linkers

与生物正交反应裂解的连接子类似,光响应可裂解连接子同样依靠外源性刺激触发裂解,减少了内源性因素个体差异对有效载荷释放的影响。研究人员设计了基于七甲川菁荧光团骨架的

光裂解连接子(图7A),可在近红外光(near infrared, NIR)照射区域内释放有效载荷^[31];在连接子中引入邻硝基苄基结构(图7B),则可在紫外光(ultraviolet light, UV)照射下触发连接子裂解^[31]。

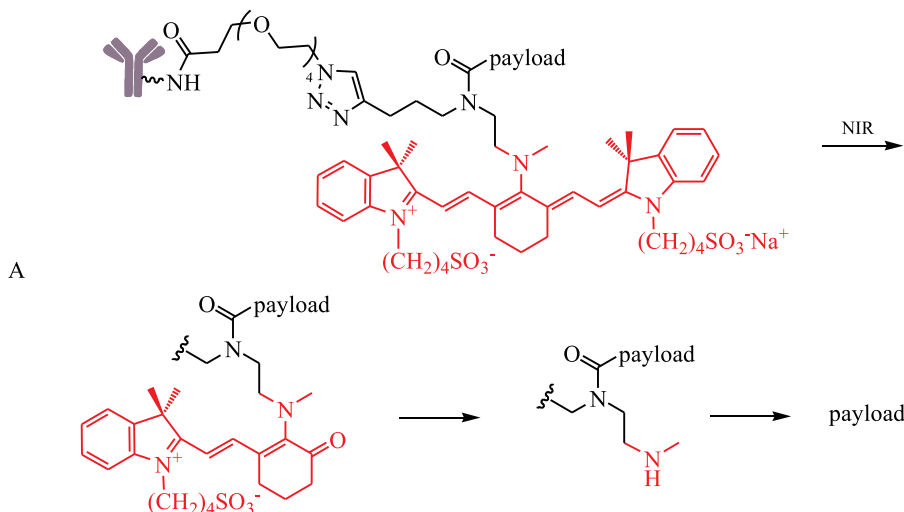
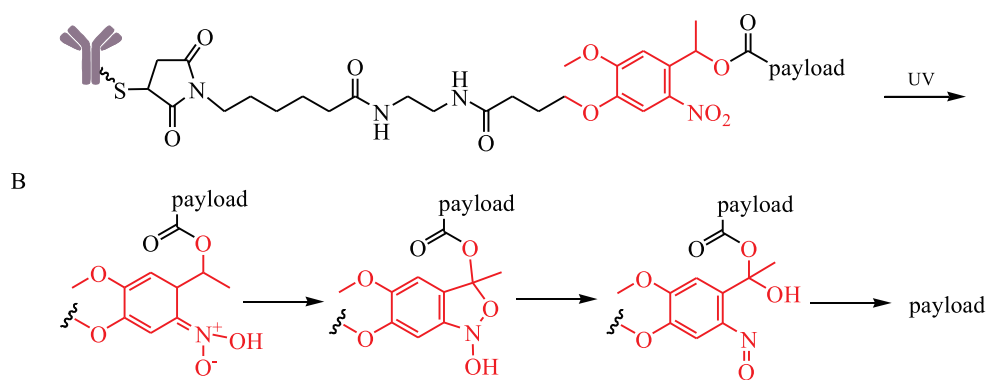


Figure 7 The structures and release mechanisms of NIR-cleavable linker (A) and UV-cleavable linker (B)



Continued Figure 7

2.3 有效载荷连接区

2.3.1 自降解间隔子

自降解间隔子是一类共价连接的分子结构,能在特定刺激下触发级联反应,从而实现目标分子的释放。在偶联药物中,自降解间隔子可将连

接子的可断裂部分与有效载荷相连,在特定条件下,其可通过1,4-、1,6-和1,8-消除反应(图8A)或五元、六元环化反应(图8B)发生断裂,进而释放出有效载荷^[38]。

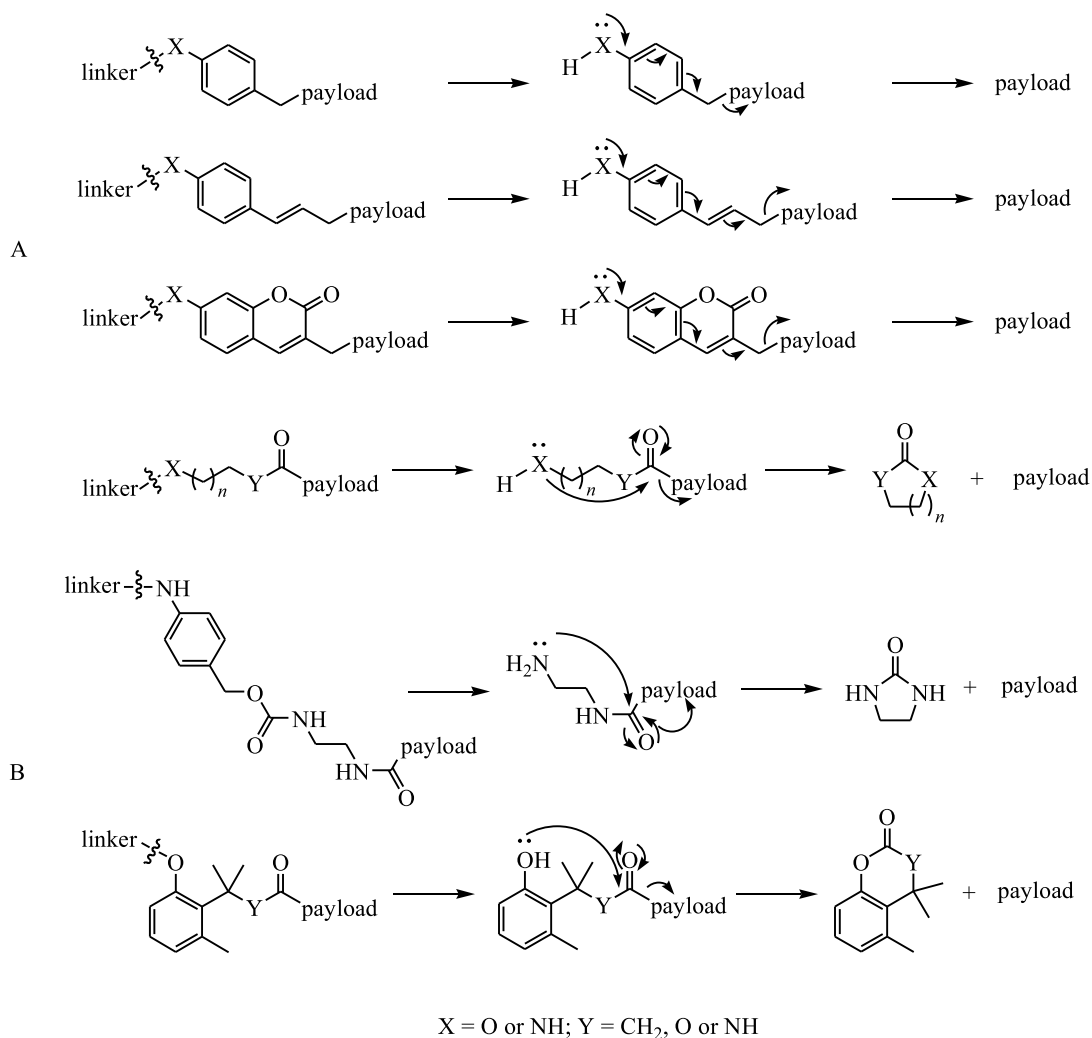


Figure 8 The release mechanisms of self-immolative spacers relying on elimination (A) and cyclization (B)

2.3.2 螯合剂

放射性核素偶联药物 (radionuclide-drug conjugates, RDCs) 由靶向配体、连接子、螯合剂和放射性核素组成。RDCs 通常使用不可断裂连接子, 其一端与靶向配体偶联, 另一端通过螯合剂与放射性核素结合。目前 RDCs 中常用的螯合剂包

括 DOTA、TETA、NOTA 等(图 9)^[39]。

2.3.3 物理作用

多柔比星是临床应用广泛的抗肿瘤药物, 其与双链 DNA 产生非共价相互作用, 故将适配体与多柔比星进行物理偶联, 可实现多柔比星的靶向递送^[40]。

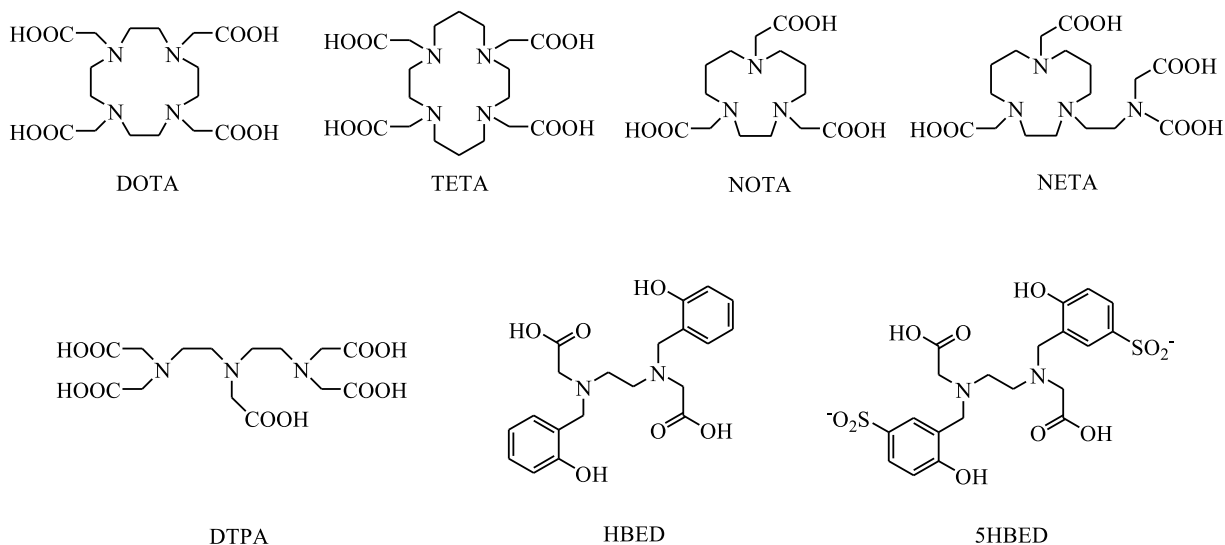


Figure 9 The commonly used chelators in RDCs

3 有效载荷

有效载荷是偶联药物结构中发挥药效的关键部分, 主要包括小分子药物、多肽及蛋白质、核酸、

放射性核素等。随着技术的不断发展, 越来越多的新型有效载荷被逐步应用于偶联药物的研发中, 这也进一步拓展了偶联药物的临床应用领域(表 4)。

Table 4 The application of macromolecule-drug conjugates and some corresponding payloads

Applications	Payloads
anti-tumor	cytotoxic drugs, immunomodulators
anti-inflammatory	glucocorticoids, β -carbolines
anti-infection	vancomycin, zanamivir
central nervous system drugs	galantamine, trolox
diagnosis	radionuclide

3.1 小分子药物

3.1.1 细胞毒类抗肿瘤药物

静脉给药后, 仅有约 2% 的 ADCs 能抵达肿瘤部位, 且当 DAR 值大于 4 时, ADCs 的溶解度通常会下降, 进而影响其药物代谢动力学性质。因此传统 ADCs 的有效载荷多为高活性细胞毒类药物^[41-42], 包括 MMAE、美登素衍生物、PBD 二聚体等微管蛋白抑制剂和 DNA 损伤剂等

(图 10)^[43]。

为降低毒性及不良反应, 研究人员基于生物正交脱笼反应设计了一种抗体-前药偶联物, 以反式环辛烯修饰的多柔比星前药 TCO-DOX (图 10) 为有效载荷, 借助四嗪分子作为触发器在肿瘤细胞内特异性激活, 从而发挥治疗作用并降低全身毒性^[44]。

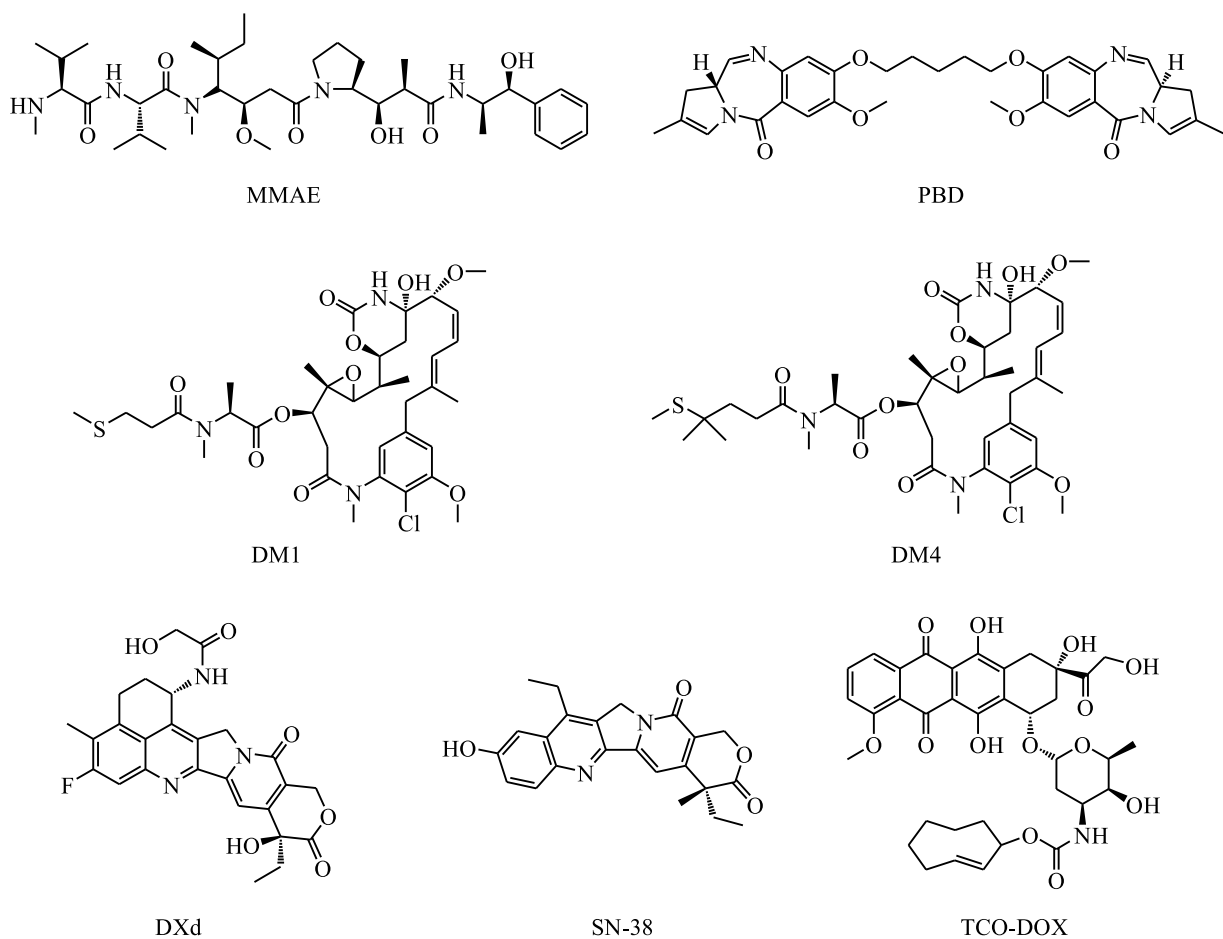


Figure 10 The structures of commonly used cytotoxic drugs in ADCs

3.1.2 免疫调节剂

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类天然识别受体,可识别外源性高度保守的病原相关分子模式及内源性应激损伤信号分子模式,进而激活机体产生免疫细胞应答。研究人员设计了一种 TLR7/8 双激动剂 D18(图 11),并将其与抗体偶联得到免疫调节型抗体-药物偶联物,也被称为抗体-免疫刺激偶联物,可用于肿瘤免疫治

疗^[45]。干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)是参与固有免疫反应的信号转导分子,STING 的激活能够诱导有效的免疫反应,但其异常激活会引发自身免疫性疾病。研究人员报道了一种以 STING 激动剂为有效载荷的 ADCs 药物 XMT-2056(图 11),该药物在临床前研究中表现出强效的抗肿瘤活性,但其安全性仍有待进一步验证^[46]。

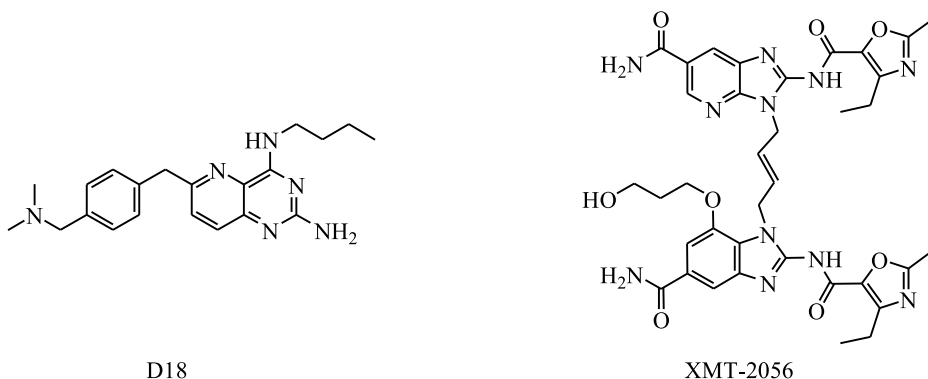


Figure 11 The structures of D18 and XMT-2056

长春碱等部分细胞毒类药物存在免疫刺激活性,可通过直接杀伤肿瘤细胞、促进树突状细胞成熟的方式增强抗肿瘤免疫,发挥双重治疗作用^[47]。

3.1.3 抗炎药物

糖皮质激素被广泛用于治疗各种自身免疫性和炎症性疾病,但其引发的不良反应限制了全身给药。研究人员开发了一种抗体-糖皮质激素偶联物,以改善糖皮质激素临床应用的安全性^[48]。

β -咔啉是一类天然存在的生物碱,具有良好的抗氧化活性。基于 β -咔啉类生物碱构建的PDCs,可在抑制介导炎症反应的脂质过氧化过程中发挥关键作用,从而有效降低机体氧化应激水平^[49]。

3.1.4 抗感染药物

抗感染药物用于治疗病原体引发的感染性疾病,主要包括抗生素和抗病毒药物等。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现和快速传播,使得金黄色葡萄球菌感染的临床治疗愈发困难。万古霉素作为糖肽类抗生素,长期以来一直是治疗MRSA感染的一线药物,但随着万古霉素的广泛应用,万古霉素中介耐药性金黄色葡萄球菌(VISA)和耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)也相继出现。针对这一问题,研究人员开发了数种以万古霉素为有效载荷的PDCs,其对MRSA、VISA以及VRSA的抑制效果显著优于万古霉素单体^[49]。此外,研究人员还开发了一种抗体-抗生素偶联物(antibody-antibiotic conjugates, AACs),该偶联物主要针对细胞内的金黄色葡萄球菌,以利福霉素衍生物为有效载荷,通过可断裂连接子与抗金黄色葡萄球菌抗体偶联,在治疗菌血症方面效果优于万古霉素^[50]。由此可见,基于抗生素构建的PDCs和AACs,有望提高抗生素对相关感染性疾病的疗效。

由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的获得性免疫缺陷综合征治疗难度较高,研究人员采用点击化学方法,将抗病毒三萜类化合物皂甙元与肽P26进行偶联,所得偶联物可有效抑制HIV侵入宿主细胞^[49]。扎那米韦是一种神经氨酸酶抑制剂,临床常用于甲型和乙型流感的治疗。研究人员以扎那米韦为有效载荷,将其与靶向流感病毒表面血凝素的全人源单克隆抗体MEDI8852偶联,该偶联物针对甲

型和乙型流感病毒导致的致死性感染,能够为小鼠提供强效且持久的保护作用^[51]。

3.1.5 中枢神经系统药物

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,目前尚无彻底根治的方法。加兰他敏是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,研究人员将其与多肽偶联,并引入烟酸基团进行修饰,以此提升偶联物的渗透性,增强其穿透血脑屏障的能力^[49]。该偶联物能有效逆转东莨菪碱诱导的小鼠记忆障碍,且在体外实验中,表现出优于加兰他敏单体的胆碱酯酶抑制效力和抗氧化活性^[49]。AD的发病机制与 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)沉积物的形成和积累有关,为减轻氧化损伤并抑制AD患者大脑中A β 的自聚集,研究人员设计了一系列PDCs,其中包括以维生素E的自由基清除活性片段Trolox为有效载荷与多肽构建的PDCs,这类偶联物可有效抑制A β 的聚集^[49]。

吗啡、芬太尼等阿片类药物虽为强效镇痛药物,但其存在明显不良反应且具有成瘾性。为提高受体靶向特异性并减少镇痛相关毒性作用,研究人员设计了一系列靶向 κ -阿片受体的PDCs,与小分子药物单体相比,这些偶联物表现出更强的受体亲和力与作用效力。

3.2 多肽及蛋白质类

3.2.1 免疫毒素

重组免疫毒素由靶向肿瘤的抗体片段和蛋白质毒素两部分构成,此类蛋白质毒素的毒性与传统ADCs中的细胞毒类小分子药物相当甚至更强,主要包括细菌性毒素、植物性毒素和人性蛋白毒素等^[52-53]。其中,源自铜绿假单胞菌外毒素的PE38,是偶联药物构建中应用广泛的有效载荷,例如上市药物鲁磨西替^[54]。

3.2.2 酶

抗体导向酶促前药治疗是一种靶向治疗策略。前药分子可被特定的酶激活,而靶向肿瘤的抗体-酶偶联物能将前药的激活过程局限于肿瘤细胞周边,从而避免对正常细胞产生毒性,且同一种酶可激活多个前药分子,导致肿瘤部位生成大量活性药物,即产生扩增效应^[55]。

3.2.3 其他蛋白质

研究人员开发了一种适配体-白蛋白偶联物,该偶联物可有效延长适配体的体内半衰期并增强

其稳定性,同时保留适配体对靶点的特异性结合能力^[56]。此外,有研究报道了一种被称为“oligo-body”的适配体-抗体偶联物,该偶联物通过将可替宁与适配体偶联、再特异性结合抗可替宁抗体,改善了适配体的药物代谢动力学性质,且不影响其靶点结合活性,同时提升了对肿瘤组织的渗透性^[57]。EGFR 适配体-ErbB2 抗体偶联物、EGFR 适配体-PD-L1 抗体偶联物也有相关研究报道,其中 EGFR 适配体-PD-L1 抗体偶联物可激活 T 细胞,从而杀伤肿瘤细胞^[58]。

3.3 核酸类

核酸类药物包括 mRNA、siRNA 和反义寡核苷酸等,可应用于抗肿瘤、抗病毒及增强免疫等领域。核酸类药物通过与特定基因相互作用来影响蛋白质合成,属于一类更为精准的有效载荷^[59]。核酸类药物的应用优势显著,但其递送过程具有一定挑战性,主要受限于核酸类药物易被核酸酶降解、物理化学特性不利于穿透细胞膜等因素^[60]。

AOC-1001 是第一个进入临床试验的抗体-寡核苷酸偶联药物,其目标适应症为 1 型肌肉强直症,该偶联物以 siRNA 为有效载荷,通过不可裂解连接子与抗体偶联^[61]。

另有研究报道,适配体与 miRNA 的偶联物可用于治疗胶质母细胞瘤,能有效抑制胶质母细胞瘤干细胞的增殖活性^[62]。适配体良好的靶向能力在 siRNA 传递方面也显示出巨大的潜力,例如有研究报道了一种光激活型适配体-siRNA 偶联物,该偶联物可通过光照裂解连接子以激活 siRNA,进而触发其介导的基因沉默效应^[63]。

3.4 放射性核素

放射性核素偶联药物(RDCs)以放射性核素为有效载荷,通过电离辐射的方式杀伤肿瘤细胞,可有效避免肿瘤细胞产生耐药性。研究表明,应用于 RDCs 中的理想放射性核素需具备以下基本参数:放射性核素释放能量低于 40 keV;粒子路径长度较短(50 ~ 80 μm),且具有约 100 keV· μm^{-1} 的高线性能量转移值;半衰期在 30 min 至 10 d 之间;衰变产生的子核素性质稳定,半衰期大于 60 d^[64]。

根据 RDCs 的用途,可分为诊断型核素药物和治疗型核素药物两类。靶向配体可通过偶联不同功能的放射性核素,实现 RDCs 的诊断和/或治

疗作用。

3.4.1 诊断型核素药物

诊断型核素药物的有效载荷主要以发射 γ 射线的核素为主,包括 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 等,其产生的射线可被特定仪器检测,从而实现疾病诊断的目的。有研究报道, ^{89}Zr 标记单抗可用于 PET-CT 成像以此监测 CAR-T 细胞疗法的治疗效果^[65]。此外, ^{68}Ga -DOTATATE、 ^{64}Cu -DOTATATE 等药物,均以生长抑素类似物奥曲肽为靶向配体,已被广泛应用于 PET-CT 诊断中^[66-67]。

3.4.2 治疗型核素药物

治疗型核素药物的有效载荷通常为发射 α 、 β 等短程粒子的核素,这类核素具有较高的线性能量转移值,能显著杀伤肿瘤细胞。镧氧奥曲肽是第一个肽受体放射性核素治疗药物,其由放射性核素 ^{177}Lu 与生长抑素类似物 DOTA-TATE 偶联而成,能够靶向结合表达生长抑素受体的肿瘤细胞^[68]。 ^{177}Lu -DOTA-rosopantamb (TLX591) 是一款靶向前列腺特异性膜抗原的核素偶联药物,目前已进入临床研究阶段^[69]。

RDCs 的连接子无需发生断裂,这类药物的稳定性与多功能性优势显著,但仍存在一定局限性,例如放射性核素的半衰期限制、对靶向特异性的高要求,以及核素原料供应、药物储运等外界因素等。

3.5 其他有效载荷

3.5.1 光敏剂

Akalux 是一种抗体-光敏剂偶联物,由靶向 EGFR 的西妥昔单抗与光敏剂 IRDye700DX 偶联制备而成。其有效载荷 IRDye700DX 是一种水溶性硅酞菁衍生物,经近红外光照射激活后可产生活性氧,进而杀伤肿瘤细胞,实现光动力治疗效果,并诱导肿瘤细胞发生免疫原性死亡^[70]。

3.5.2 降解剂

研究人员以降解剂为有效载荷,将其与抗体偶联得到降解剂-抗体偶联物,该偶联物可将降解剂特异性传递到肿瘤相关细胞中,诱导靶蛋白降解,同时改善降解剂的药物代谢动力学性质^[71-72]。

蛋白水解靶向嵌合体(proteolysis-targeting chimeras, PROTACs)是一种能够降解细胞内靶蛋白的异双功能分子。GNE-987 是一种靶向降解溴结构域蛋白 4 的 PROTAC 分子,研究人员以

GENE-987 为有效载荷,通过含二硫键的可断裂连接器与靶向 C 型凝集素样分子 1 的抗体偶联,得到的偶联物在小鼠异种移植模型实验中表现出良好的体内活性及稳定性^[73]。

溶酶体靶向嵌合体 (lysosome-targeting chimeras, LYTACs) 适用于细胞外及膜相关蛋白的降解^[74]。研究人员开发了一种适配体与 LYTACs 的偶联物,该偶联物可快速且有效地靶向降解间质-上皮转化因子和蛋白酪氨酸激酶 7 等相关膜蛋白,具有良好的应用前景^[75]。

分子胶相较于 PROTACs,具有更优的成药理化性质和 ADME 特性,将其作为有效载荷与抗体偶联得到分子胶-抗体偶联物,有望降低分子胶的系统毒性^[76]。

3.5.3 生物治疗性药物

生物治疗性药物包括细胞、细菌和病毒等,这些物质同样可作为大分子偶联药物的有效载荷。

自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 是一类参与抗肿瘤、抗病毒及免疫调节的免疫细胞,无需预先致敏就能非特异性杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞,但 NK 细胞自身缺乏固有的肿瘤靶向能力。借助化学酶法可制备抗体与 NK 细胞的偶联物,即抗体-细胞偶联物^[77]。研究人员通过代谢糖工程技术,在 NK-92 细胞表面引入叠氮基团,再利用点击化学反应将其与炔基修饰的西妥昔单抗偶联,成功构建西妥昔单抗-NK-92 细胞偶联物^[78]。该策略使 NK 细胞获得了肿瘤靶向能力,为抗肿瘤免疫治疗提供了新途径。此外,研究人员对巨噬细胞表面进行修饰,并将其与肿瘤靶向适配体偶联,显著提高了巨噬细胞对肿瘤细胞的识别能力,该方法有望应用于肿瘤靶向免疫治疗^[79]。

细菌介导的肿瘤治疗受限于其剂量依赖性不良反应和全身毒性,对肿瘤生长的抑制效率较低^[80]。研究人员通过酰胺缩合反应将适配体与减毒鼠伤寒沙门氏菌偶联,所得偶联物在荷瘤小鼠模型中展现出显著的抗肿瘤疗效,并可有效诱导肿瘤内的免疫应答^[80]。

腺相关病毒载体 (adeno-associated virus vector, AAV2) 是一种非致病性、低免疫原性的基因治疗载体。研究人员开发了一种多价适配体与 AAV2 的偶联物 G-sgc8-AAV2,其具有较高的靶

向亲和力、结构稳定性以及高效的基因转染能力^[81]。

3.5.4 生物聚合物

生物聚合物主要分为多聚核苷酸、多肽和多糖三大类,常见种类包括壳聚糖、透明质酸、肝素等。这类物质具有高分子量的特性,可作为高效的药物递送载体,有望应用于疾病诊断和治疗领域^[82]。

3.5.5 双载荷偶联物

双载荷抗体-药物偶联物可在同一抗体分子上偶联两种不同的有效载荷,既能显示出强大的抗肿瘤活性,同时两种具有互补作用的载荷能克服肿瘤细胞的耐药性。已有研究报道,一种双载荷 ADCs 以理化性质互补的细胞毒类药物 MMAE 和 MMAF 作为有效载荷,其 DAR 值可达 16^[83]。

4 大分子偶联药物专利状况

自 2000 年首个抗体偶联药物吉妥单抗获批上市以来,该类药物便成为制药行业的研发焦点。根据 Incopat 专利数据库的检索结果,全球范围内相关专利申请量呈稳步增长趋势,2010 年之后的增长速度明显加快,考虑到 2023 年和 2024 年部分专利申请尚未公开,推测其申请量将持续攀升 (图 12A,虚线是 2023 年和 2024 年目前已公开专利数量)。

从配体类型的专利分布来看,抗体类配体仍占有较大比重,肽与核酸适配体相关的专利申请量相当,病毒样颗粒类配体的专利占比较低 (图 12B),这一分布特征与各类配体的技术成熟度一致。

从专利申请人的国别分布分析,美国申请人的专利占比达 45%,这与美国制药行业发达、医药企业技术领先的现状相符合;中国申请人的专利占比为 26%,显著高于日本、韩国和欧洲各国 (图 12C)。

在大分子偶联药物专利申请数量的排名中,前列席位基本被全球知名的医药企业占据 (图 12D),其中西雅图基因、再生元、美迪明等制药公司的研发活跃度较高,且已有相关新品种成功上市,预计未来将持续推进该领域的专利申请工作。

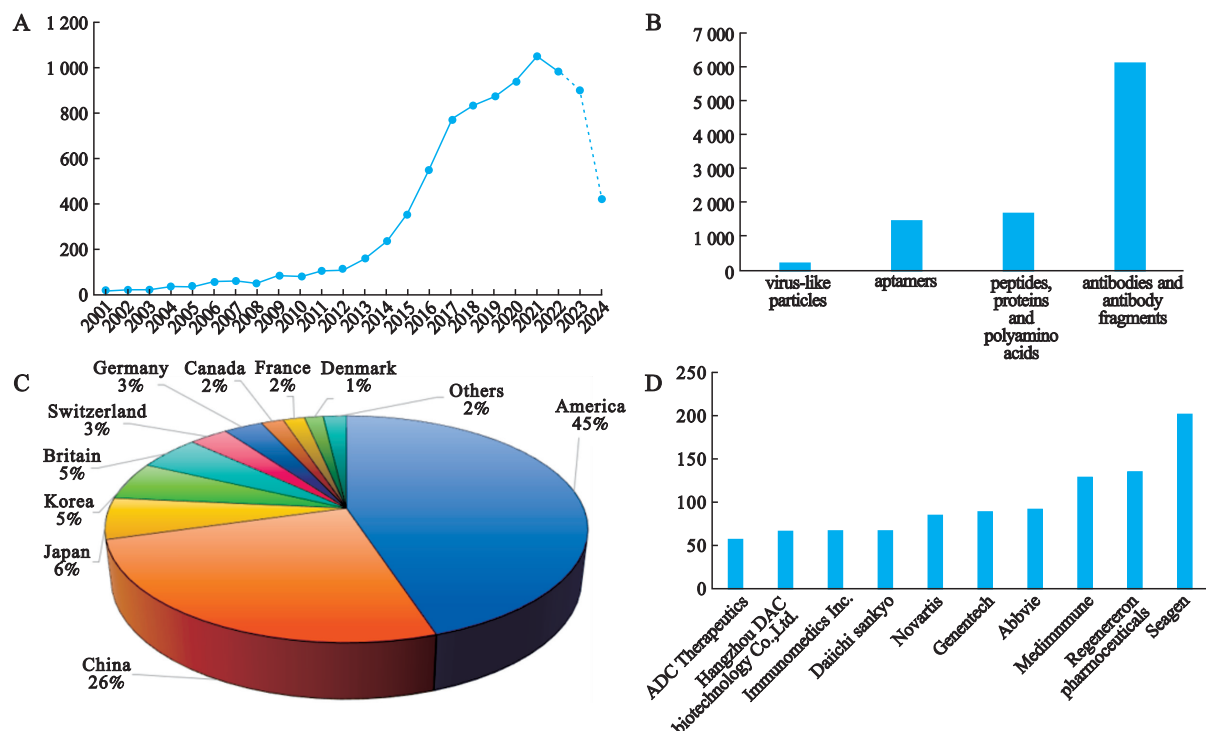


Figure 12 Patent application landscape of macromolecule-drug conjugates: global patent application trend (A); patent distribution of major technical branches (B); geographic distribution of patent applicants by country (C); key patent applicants (D)

5 总结与展望

大分子偶联药物为高毒性或难以全身给药的有效载荷提供了一种安全高效的递送策略。本综述聚焦于靶向配体、连接子和有效载荷三大核心部分,梳理了大分子偶联药物的研究进展和专利申请情况。在“万物皆可偶联”的模块化设计理念驱动下,研究人员通过合理组合不同的靶向配体、连接子与有效载荷,持续构建新型偶联药物,其应用场景也在不断拓展。

目前的大分子偶联药物仍存在一定的局限性,例如复杂的药物代谢动力学特征、难以避免的不良反应以及机制尚未明确的耐药性问题等。大分子偶联药物的研发需要统筹考量靶向配体的选择、偶联方式与位点、合适的连接子及有效载荷等多重因素。面对这一复杂体系,人工智能技术的应用有望为研发进程注入新动力。

研究人员建立了 ADCs 数据库 ADCdb,共收集了 6 572 个 ADCs 的相关信息,涵盖抗体、连接子、有效载荷和靶点等内容,填补了目前该领域系统性数据的空白,为 ADCs 的研发提供了坚实的数据支持^[84]。ADCdb 采用以抗原为中心的组织架构,将抗原与对应特异性结合的抗体相关联,可

进一步检索得到与之相关的 ADCs 详细信息,有助于探索不同 ADCs 与其组分间的相关性,从而发现基于定量构效关系分析的新型 ADCs^[84]。此外,PDCs 数据库 ConjuPepDB 包含了 1 645 个 PDCs 的详细信息,对推动 PDCs 领域的发展具有积极作用^[85]。研究人员还开发了深度学习模型 ADCNet,创造性地结合了 ESM-2 和 FG-BERT 大语言模型,通过学习 ADCs 的抗原和抗体蛋白序列、连接子、有效载荷及 DAR 值,可初步预测 ADCs 的活性,在测试集上该模型的平均预测准确率达到了 87.12%,交叉验证、消融实验和外部独立测试结果进一步验证了其稳定性^[86],显著提升了 ADCs 的研发效率。可以预见,随着技术的发展,靶向特异性更强的配体、稳定性和药物代谢动力学性质更佳连接子以及作用机制更为新颖的有效载荷将不断出现。

参考文献:

- [1] STREBHARDT K, ULLRICH A. Paul Ehrlich' s magic bullet concept 100 years of progress [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8: 473 - 480.
- [2] KOSTOVA V, DESOS P, STARCK J B, et al. The chemistry behind ADCs [J]. Pharmaceuticals (Ba-

- sel), 2021, 14(5): 442.
- [3] SADEKAR S, FIGUEROA I, TABRIZI M. Antibody drug conjugates: application of quantitative pharmacology in modality design and target selection [J]. AAPS J, 2015, 17(4): 828 – 836.
- [4] RITCHIE M, TCHISTIAKOVA L, SCOTT N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates [J]. MAbs, 2013, 5(1): 13 – 21.
- [5] DIAMANTIS N, BANERJI U. Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment [J]. Brit J Cancer, 2016, 114(4): 362 – 367.
- [6] KATOH M. Antibody-drug conjugate targeting protein tyrosine kinase 7, a receptor tyrosine kinase-like molecule involved in WNT and vascular endothelial growth factor signaling: effects on cancer stem cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis [J]. Ann Transl Med, 2017, 5(23): 462.
- [7] RAY U, PATHOULAS C L, THIRUSANGU P, et al. Exploiting LRRC15 as a novel therapeutic target in cancer [J]. Cancer Res, 2022, 82(9): 1675 – 1681.
- [8] HEIDEGGER I, FOTAKIS G, OFFERMANN A, et al. Comprehensive characterization of the prostate tumor microenvironment identifies CXCR4/CXCL12 crosstalk as a novel antiangiogenic therapeutic target in prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 132.
- [9] JIN Y M, SCHLADETSCH M A, HUANG X T, et al. Stepping forward in antibody-drug conjugate development [J]. Pharmacol Ther, 2022, 229: 107917.
- [10] LABRIJN A F, JANMAAT M L, REICHERT J M, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(8): 585 – 608.
- [11] CARTER P J, LAZAR G A. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit' [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(3): 197 – 223.
- [12] LEE N K, SU Y, BIDLINGMAIER S, et al. Manipulation of cell-type selective antibody internalization by a guide-effector bispecific design [J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18(6): 1092 – 1103.
- [13] EWERT S, CAMBILLAU C, CONRATH K, et al. Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains [J]. Biochemistry, 2002, 41: 3628 – 3636.
- [14] HARMSSEN M M, De HAARD H J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(1): 13 – 22.
- [15] DEBIE P, LAFONT C, DEFRISE M, et al. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours [J]. J Control Release, 2020, 317: 34 – 42.
- [16] MULLER D, KARLE A, MEISSBURGER B, et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin [J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12650 – 12660.
- [17] NILVEBRANT J, HOBBER S. The albumin-binding domain as a scaffold for protein engineering [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2013, 6(7): e201303009.
- [18] CALICETI P, VERONESE F M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(10): 1261 – 1277.
- [19] GONG L M, ZHAO H M, LIU Y H, et al. Research advances in peptide-drug conjugates [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(9): 3659 – 3677.
- [20] FOGAL V, ZHANG L, KRAJEWSKI S, et al. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma [J]. Cancer Res, 2008, 68(17): 7210 – 7218.
- [21] ZHANG Q Q, ZHANG P, JIAN S D, et al. Drug-bearing peptide-based nanospheres for the inhibition of metastasis and growth of cancer [J]. Mol Pharm, 2020, 17(9): 3165 – 3176.
- [22] HE J X, DUAN Q, RAN C Y, et al. Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(4): 1358 – 1370.
- [23] GENG Z M, WANG L, LIU K, et al. Enhancing anti-PD-1 immunotherapy by nanomicelles self-assembled from multivalent aptamer drug conjugates [J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(28): 15459 – 15465.
- [24] FELDWISCH J, TOLMACHEV V, LENDEL C, et al. Design of an optimized scaffold for affibody molecules [J]. J Mol Biol, 2010, 398(2): 232 – 247.
- [25] SOKOLOVA E, PROSHKINA G, KUTOVA O, et al. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect *in vitro* and a potent antitumor activity *in vivo* [J]. J Control Release, 2016, 233: 48 – 56.
- [26] GOLDBERG S D, CARDOSO R M, LIN T, et al. Engineering a targeted delivery platform using cen-

- tyrins [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2016, 29 (12): 563–572.
- [27] THAKOR P, BHAVANA V, SHARMA R, et al. Polymer-drug conjugates: recent advances and future perspectives [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25 (9): 1718–1726.
- [28] EKLADIOUS I, COLSON Y L, GRINSTAFF M W. Polymer-drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(4): 273–294.
- [29] LEE S J, SHIM Y H, OH J S, et al. Folic-acid-conjugated pullulan/poly (DL-lactide-co-glycolide) graft copolymer nanoparticles for folate-receptor-mediated drug delivery [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10: 43.
- [30] KINES R C, VARSAVSKY I, CHOUDHARY S, et al. An infrared dye-conjugated virus-like particle for the treatment of primary uveal melanoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(2): 565–574.
- [31] SU Z, XIAO D, XIE F, et al. Antibody-drug conjugates: recent advances in linker chemistry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3889–3907.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] SUN X X, PONTE J F, YODER N C, et al. Effects of drug-antibody ratio on pharmacokinetics, biodistribution, efficacy, and tolerability of antibody-maytansinoid conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(5): 1371–1381.
- [35] ROSSIN R, Van DUINHoven S M, TENHOEVE W, et al. Triggered drug release from an antibody-drug conjugate using fast "click-to-release" chemistry in mice [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27(7): 1697–1706.
- [36] ROSSIN R, VERSTEEGEN R M, WU J, et al. Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumor activity in mice [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1484.
- [37] WANG Q Y, WANG Y P, DING J J, et al. A bioorthogonal system reveals antitumor immune function of pyroptosis [J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 421–426.
- [38] ALOUANE A, LABRUERE R, Le SAUX T, et al. Self-immolative spacers: kinetic aspects, structure-property relationships, and applications [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(26): 7492–7509.
- [39] PELTEK O O, MUSLIMOV A R, ZYUZIN M V, et al. Current outlook on radionuclide delivery systems: from design consideration to translation into clinics [J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 90.
- [40] BAGALKOT V, FAROKHZAD O C, LANGER R, et al. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(48): 8149–8152.
- [41] ZHAO P X, ZHANG Y B, LI W Q, et al. Recent advances of antibody drug conjugates for clinical applications [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1589–1600.
- [42] MCCOMBS J R, OWEN S C. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry [J]. *AAPS J*, 2015, 17(2): 339–351.
- [43] PETERS C, BROWN S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(4): e00225.
- [44] LIN F, CHEN L, ZHANG H, et al. Bioorthogonal prodrug-antibody conjugates for on-target and on-demand chemotherapy [J]. *CCS Chem*, 2019, 1(2): 226–236.
- [45] HE L, WANG L L, WANG Z S, et al. Immune modulating antibody-drug conjugate (IM-ADC) for cancer immunotherapy [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(21): 15716–15726.
- [46] DUVALL J R, THOMAS J D, BUKHALID R A, et al. Discovery and optimization of a STING agonist platform for application in antibody drug conjugates [J]. *J Med Chem*, 2023, 66(15): 10715–10733.
- [47] TANAKA H, MATSUSHIMA H, NISHIBU A, et al. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17): 6987–6994.
- [48] HAN A, OLSEN O, D'SOUZA C, et al. Development of novel glucocorticoids for use in antibody-drug conjugates for the treatment of inflammatory diseases [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(16): 11958–11971.
- [49] DEAN T T, JELÚ-REYES J, ALLEN A L C, et al. Peptide-drug conjugates: an emerging direction for the next generation of peptide therapeutics [J]. *J Med*

- Chem,2024,67(3): 1641 – 1661.
- [50] LEHAR S M, PILLOW T, XU M, et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*[J]. Nature,2015,527(7578): 323 – 328.
- [51] LIU X, BALLIGAND T, Le GALL C, et al. A monoclonal anti-hemagglutinin stem antibody modified with zanamivir protects against both influenza A and B viruses [J]. PNAS, 2025, 122 (15): e2424889122.
- [52] CAO L, LI Q Y, TONG Z, et al. HER2-specific immunotoxins constructed based on single-domain antibodies and the improved toxin PE24X7[J]. Int J Pharm,2020,574: 118939.
- [53] WU T, ZHU J W. Recent development and optimization of pseudomonas aeruginosa exotoxin immunotoxins in cancer therapeutic applications [J]. Int Immunopharmacol,2021,96: 107759.
- [54] DHILLON S. Moxetumomab pasudotox: first global approval[J]. Drugs,2018,78(16): 1763 – 1767.
- [55] FRANCIS R J, SHARMA S K, SPRINGER C, et al. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy(ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours[J]. Br J Cancer,2002,87(6): 600 – 607.
- [56] KUHLMANN M, HAMMING J B R, VOLDUM A, et al. An albumin-oligonucleotide assembly for potential combinatorial drug delivery and half-life extension applications[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017,9: 284 – 293.
- [57] HEO K, MIN S W, SUNG H J, et al. An aptamer-antibody complex (oligobody) as a novel delivery platform for targeted cancer therapies[J]. J Control Release,2016,229: 1 – 9.
- [58] PASSARIELLO M, CAMORANI S, VETREI C, et al. Novel human bispecific aptamer-antibody conjugates for efficient cancer cell killing [J]. Cancers (Basel),2019,11(9): 1268.
- [59] DUGAL-TESSIER J, THIRUMALAIRAJAN S, JAIN N. Antibody-oligonucleotide conjugates: a twist to antibody-drug conjugates [J]. J Clin Med, 2021,10(4): 838.
- [60] KULKARNI J A, WITZIGMANN D, THOMSON S B, et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics[J]. Nat Nanotechnol,2021,16(6): 630 – 643.
- [61] PASCUAL-GILABERT M, ARTERO R, LOPEZ-CASTEL A. The myotonic dystrophy type 1 drug development pipeline: 2022 edition[J]. Drug Discov Today,2023,28(3): 103489.
- [62] ESPOSITO C L, NUZZO S, KUMAR S A, et al. A combined microRNA-based targeted therapeutic approach to eradicate glioblastoma stem-like cells [J]. J Control Release,2016,238: 43 – 57.
- [63] ZHANG L L, CHEN C M, FAN X L, et al. Photomodulating gene expression by using caged siRNAs with single-aptamer modification [J]. ChemBioChem,2018,19(12): 1259 – 1263.
- [64] KITSON S L. Application of radionuclides and antibody-drug conjugates to target cancer [J]. Cancer Stud Mol Med Open J,2014,1(1): 8 – 15.
- [65] SIMONETTA F, ALAM I S, LOHMEYER J K, et al. Molecular imaging of chimeric antigen receptor T cells by ICOS-immunoPET [J]. Clin Cancer Res, 2021,27(4): 1058 – 1068.
- [66] SADOWSKI S M, NEYCHEV V, MILLO C, et al. Prospective study of ⁶⁸Ga-DOTATATE positron emission tomography/computed tomography for detecting gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors and unknown primary sites[J]. J Clin Oncol, 2016,34(6): 588 – 596.
- [67] PFEIFER A, KNIGGE U, MORTENSEN J, et al. Clinical PET of neuroendocrine tumors using ⁶⁴Cu-DOTATATE: first-in-humans study [J]. J Nucl Med,2012,53(8): 1207 – 1215.
- [68] HENNRICH U, KOPKA K. Lutathera((R)): the first FDA- and EMA-approved radiopharmaceutical for peptide receptor radionuclide therapy [J]. Pharmaceuticals (Basel),2019,12(3): 114.
- [69] NGUYEN H, HIRD K, CARDACI J, et al. Lutetium-177 labelled anti-PSMA monoclonal antibody (Lu-TLX591) therapy for metastatic prostate cancer: treatment toxicity and outcomes [J]. Mol Diagn Ther,2024,28(3): 291 – 299.
- [70] GOMES-DA-SILVA L C, KEPP O, KROEMER G. Regulatory approval of photoimmunotherapy: photodynamic therapy that induces immunogenic cell death [J]. Oncoimmunology,2020,9(1): 1841393.
- [71] DRAGOVICH P S. Degradable-antibody conjugates [J]. Chem Soc Rev,2022,51(10): 3886 – 3897.
- [72] HONG K B, AN H C. Degradable-antibody conjugates: emerging new modality [J]. J Med Chem, 2023,66(1): 140 – 148.
- [73] PILLOW T H, ADHIKARI P, BLAKE R A, et al. Antibody conjugation of a chimeric BET degrader enables *in vivo* activity [J]. ChemMedChem, 2019, 15(1): 17 – 25.

- [74] BANIK S M, PEDRAM K, WISNOVSKY S, et al. Lysosome-targeting chimeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 291–297.
- [75] MIAO Y Y, GAO Q Q, MAO M H, et al. Bispecific aptamer chimeras enable targeted protein degradation on cell membranes[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(20): 11267–11271.
- [76] POUDEL Y B, THAKORE R R, CHEKLER E P. The new frontier: merging molecular glue degrader and antibody-drug conjugate modalities to overcome strategic challenges [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(18): 15996–16001.
- [77] LI J, CHEN M K, LIU Z L, et al. A single-step chemoenzymatic reaction for the construction of antibody-cell conjugates [J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(12): 1633–1641.
- [78] WANG X W, LUO X, TIAN Y P, et al. Equipping natural killer cells with cetuximab through metabolic glycoengineering and bioorthogonal reaction for targeted treatment of KRAS mutant colorectal cancer [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(4): 724–730.
- [79] SUGIMOTO S, IWASAKI Y. Surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers for enhancing the immune response against tumor cells [J]. *Bioconjug Chem*, 2018, 29(12): 4160–4167.
- [80] GENG Z M, CAO Z P, LIU R, et al. Aptamer-assisted tumor localization of bacteria for enhanced biotherapy[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6584.
- [81] WU Y, ZHANG L Q, CUI C, et al. Enhanced targeted gene transduction: AAV2 vectors conjugated to multiple aptamers *via* reducible disulfide linkages [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(1): 2–5.
- [82] CHAVDA V P, BALAR P C, TELI D, et al. Antibody-biopolymer conjugates in oncology: a review [J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2605.
- [83] LEVENGOOD M R, ZHANG X Q, HUNTER J H, et al. Orthogonal cysteine protection enables homogeneous multi-drug antibody-drug conjugates [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 56(3): 733–737.
- [84] SHEN L T, SUN X N, CHEN Z, et al. ADCdb: the database of antibody-drug conjugates [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(1): 1097–1109.
- [85] BALOGH B, IVANCZI M, NIZAMI B, et al. ConjuPepDB: a database of peptide-drug conjugates [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(1): 1102–1112.
- [86] CHEN L Y, LI B S, CHEN Y H, et al. ADCNet: a unified framework for predicting the activity of antibody-drug conjugates [J]. *Brief Bioinform*, 2025, 26(3): 228.

Recent advances in the macromolecule-drug conjugates

YAN Jingjie^{1#}, YANG Qian^{2#}, WANG Xiaojian^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Patent Examination Cooperation (Beijing) Center of the Patent Office, National Intellectual Property Administration of China, Beijing 100170, China)

Abstract: Since the emergence of antibody-drug conjugates, the extension of conjugated drugs has been continuously expanded. The targeting ligands are no longer limited to traditional monoclonal antibodies, and more options for payloads have been derived on the basis of cytotoxic drugs. Among them, the drugs composed of biomacromolecules as targeting ligands connected to various payloads through various linkers can be collectively referred to as macromolecule-drug conjugates. Herein, the research progress of macromolecule-drug conjugates is systematically reviewed from three aspects: targeting ligands, linkers and payloads, in order to provide a reference for the future research, development and application in this field.

Key words: targeted therapy; conjugated drug; targeting ligand; linker; payload