

KONJUGÁTY PROTILÁTKA-LÉČIVO, SPOJENÍ VELKÝCH A MALÝCH TERAPEUTICKÝCH MOLEKUL

BOHUMIL KRATOCHVÍL^a a EVA BENEŠOVÁ^b

^a Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
bohumi.kratochvil@vscht.cz, eva.benesova@vscht.cz

Došlo 14.3.23, přijato 18.4.23.

Konjugáty protilátka-léčivo (ADC) jsou velmi aktuální terapeutickou skupinou kancerostatik. Tvoří je monoklonální protilátka, nejčastěji typu IgG, na kterou je přes vhodný linker (kovalentní řetězec) konjugována jedna nebo více molekul cytotoxického léčiva. Konjugovaná forma léčiva má výrazně nižší toxicitu než forma volná, kterou v terapii nelze užívat samostatně. Databáze SÚKL registruje zatím 9 ADC přípravků pro použití v onkologii. Vzhledem k tomu, že možných kombinací párů protilátka-léčivo je obrovské množství, do roku 2025 se očekává „boom“ této oblasti a až čtyřnásobný nárůst prodeje. V krevní cirkulaci směřuje ADC přípravek specificky k antigenu přítomnému na povrchu nádorové buňky. Linker mezi protilátkou a léčivem musí být stabilní v prostředí krevní cirkulace a teprve až po internalizaci konjugátu být v cílové nádorové buňce zcela degradován nebo zůstat vázaný na léčivo po degradaci proteinové části konjugátu (tzv. štěpitelné nebo neštěpitelné linkery). Následně léčivo způsobí různými mechanismy apoptózu nádorové buňky. Léčiva použitá v ADC přípravcích 2. generace byla až 1000krát toxičtější než chemoterapeutikum doxorubicin a jednalo se především o deriváty auristatinů a maytansinů. V současné 3. generaci vyvíjených konjugátů se zkouší i méně toxická léčiva na bázi kamptothecinů, amanitinů aj. Léčivo s linkerem je k mAb připojeno pomocí různých biokonjugáčnických metod. Zde se uplatňuje celá škála technik syntetické chemie, přičemž biokonjugace může být buď nespecifická nebo specifická. Konjugovatelné jsou především periferní aminokyseliny protilátky – cystein, lysin, histidin, tyrosin, glutamin a redukované disulfidové můstky mezi dvěma těžkými nebo mezi těžkým a lehkým řetězcem. Pro specifickou konjugaci byly vyvinuty např. techniky glykoingenýrství, založené na N-glykosylaci protilátky na asparaginu (N297). Konjugáčnické techniky, ale i syntéza „nahé“ humánní mAb jsou předmětem utajovaného „know-how“ řady progresivních firem a laboratoří, které v oblasti ADC přípravků působí.

Klíčová slova: konjugáty protilátka-léčivo, kancerostatika, linker, biokonjugace

Obsah

1. Úvod
2. Molekulární struktura konjugátů protilátka-léčivo
 - 2.1. Linker
 - 2.2. Léčivo
3. Mechanismus terapeutického účinku
4. Příprava konjugátů protilátka-léčivo
 - 4.1. Biosyntéza proteinové části přípravku
 - 4.2. Biokonjugace
5. Závěr

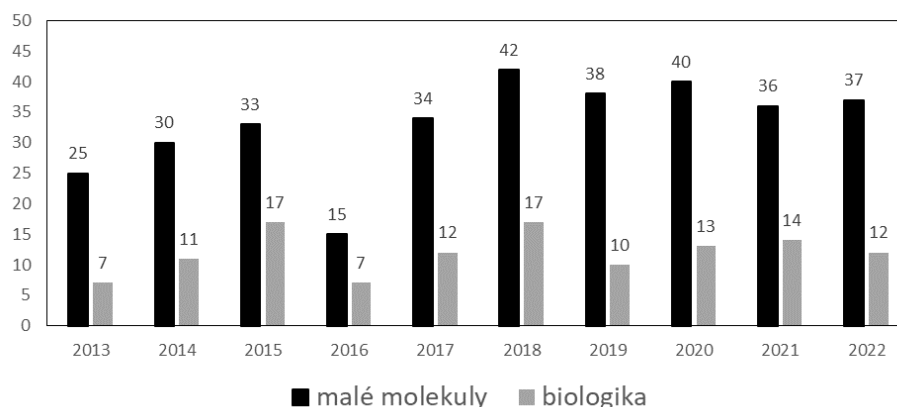
1. Úvod

V roce 2022 publikoval Rádl a spol.¹ referát na téma: Budou léčivy budoucnosti malé molekuly nebo biologická léčiva? Odpovědí na tuto otázku je přesvědčení autorů tohoto článku, že do budoucna trh s léčivy opanuje rozumná rovnováha mezi oběma typy. S tím lze určitě souhlasit,

ale výše uvedený referát nezahrnuje velmi aktuální terapeutickou skupinu kancerostatik, v nichž se právě synergicky kombinují velké a malé molekuly: konjugáty protilátka-léčivo, angl. Antibody-Drug Conjugates (ADC přípravky). Tento předložený referát lze chápat jako volné pokračování tématu o směřování vývoje léčiv do budoucna.

Proporce mezi každoročně nově schvalovanými léčivy obsahujícími buď pouze malé nebo pouze velké molekuly (bioléčiva) je v poslední dekádě ustálená. Podle statistik FDA (cit.²) připadají zhruba dvě třetiny na malé molekuly a jedna třetina na bioléčiva (obr. 1). Dnes se však na trhu velmi dynamicky prosazují kancerostatické ADC přípravky, ve kterých se spojuje jedna velká molekula s malými molekulami do jedné entity. Pokud pomíne me teoretické koncepty a úvahy P. Ehrlicha, G. Mathého a dalších o budoucím směřování v léčbě rakoviny před mnoha desítkami let³, tak historie ADC přípravků začíná v roce 2000, kdy byl firmou Wyeth na trh uveden přípravek Mylotarg pro léčbu leukémie. Ten byl však v roce 2010 dobrovolně v USA stažen firmou Pfizer (ta koupila

Počty schválených léčiv FDA v letech 2013–2022



Obr. 1. Poměr mezi terapeutickými malými a velkými molekulami (biolčivky, biologiky) schválenými FDA za poslední dekádu

firmu Wyeth v roce 2009), protože se neprokázal jeho terapeutický benefit ve srovnání s chemoterapií (léčba malými molekulami). Nicméně po přezkoumání, při změně dávkovacího režimu, v roce 2017 FDA a v roce 2018 EMA Mylotarg opět registrovaly⁴.

O tom, že problematika je vysoce atraktivní, svědčí i připravované speciální číslo časopisu *Molecules*⁵ věnované pouze ADC přípravkům a plánované k vydání v roce 2023.

Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL)⁶ uvádí ve své databázi registrovaných léků v ATC skupině L: cytostatika a imunomodulační léčiva, a podskupině L01F: monoklonální protilátky a konjugáty protilátka-léčivo, celkem 55 registrovaných přípravků, z čehož 9 připadá na ADC přípravky (tab. I).

ADC přípravky se historicky dělí do tří generací, přičemž jednotlivé generace se od sebe liší jak typy použitých protilátek (viz dále), tak typy použitých malých molekul a specifitou a způsobem jejich umístění na molekule protilátky⁷.

Formulace těchto přípravků jsou vesměs kapalné lékové formy pro injekční nebo infuzní aplikaci. Je evidentní, že možných kombinací párů protilátka-léčivo je obrovské množství a zdaleka ne všechny byly syntetizovány a terapeuticky testovány vzhledem k možným cílům. A to je bezesporu výzva a příležitost pro farmaceutický a biotechnologický výzkum. Vývoj dalších generací směřuje k vyšší homogenitě, stabilitě a účinku ADC přípravků⁸.

Tabulka I

Přípravky typu konjugát protilátka-léčivo registrované v databázi SÚKL^{6 a}

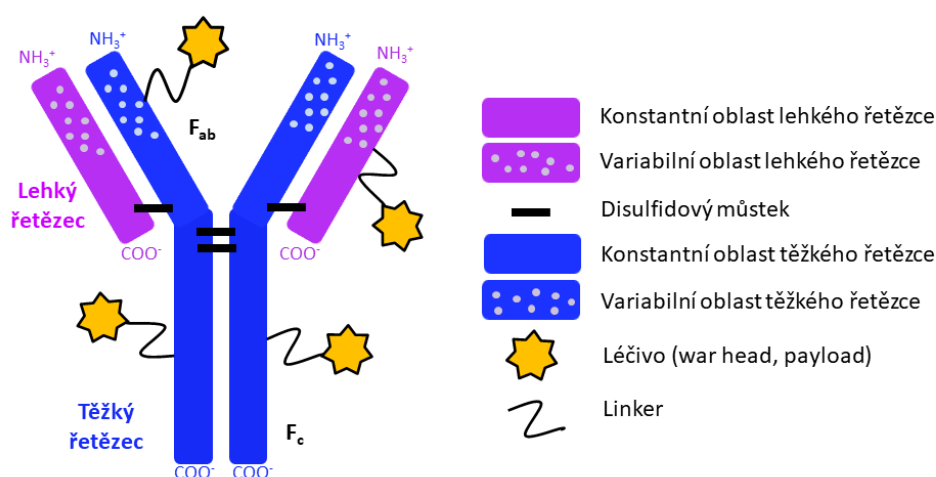
Přípravek	Konjugát protilátka-léčivo	Léčba
Adcetris	brentuximab-vedotin	nádorové onemocnění lymfocytů
Besponsa	inotuzumab-ozogamicin	lymfoblastická leukémie
Blenrep	belantamab-mafodotin	sarkomy kostní dřene
Enhertu	trastuzumab-deruxtekan	karcinom prsu
Kadcyla	trastuzumab-emtansin	karcinom prsu
Mylotarg	gemtuzumab-ozogamicin	myeloidní leukémie
Padcev	enfortumab-vedotin	karcinom močového měchýře
Polivy	polatuzumab-vedotin	difúzní velkobuněčný nádor B-lymfocytů
Trodelvy	sacituzumab-govitekan	karcinom prsu

^a Ne všechny přípravky registrované FDA (ta jich schválila zatím 11) jsou registrované i v Evropě (EMA)

2. Molekulární struktura konjugátů protilátka-léčivo

Jak vyplývá z názvu, ADC přípravek obsahuje velkou molekulu rekombinantní monoklonální protilátky (mAb). V současné době obecně ustupují do pozadí chimérní protilátky, obsahující variabilní oblasti původem z jiného organismu než lidského a konstantní oblasti lidského původu. Tento typ protilátky je využit například v přípravku Adcetris⁹. U většiny současných konjugátů se setkáváme s protilátkami humanizovanými (obsahujícími pouze hypervariabilní oblasti ze zvířete), přičemž vývoj směřuje k plně humánním protilátkám. Výsledkem těchto úprav je výrazně nižší imunogenita použitých protilátek, delší biologický poločas a zlepšení efektorových funkcí^{10,11}. Tyto protilátky, především isotypy IgG, jsou konjugované v různých místech na lehkém nebo těžkém řetězci s jednou nebo více malými molekulami cytotoxického léčiva ($M_r = 300\text{--}1000$), obr. 2. Reálně se vždy jedná o statistický rozptyl, tzn., že na jednu molekulu mAb v léčivém přípravku průměrně připadá 1–8 molekul léčiva (hodnota DAR, Drug Antibody Ratio). Toto léčivo je v terapii někdy označováno jako bojová hlavice nebo užitečný náklad (war head, payload). Konjugovaná forma léčiva má výrazně nižší toxicitu než forma volná, kterou v terapii nelze užívat samostatně. Kovalentní spojka (konjugace) mezi protilátkou a léčivem se označuje jako linker, což je různě dlouhý a funkčně optimalizovaný molekulární řetězec¹². Strukturálně důležitými parametry ADC přípravků, z nichž každý má vliv na finální účinnost, jsou:

- sekvence aminokyselin v mAb,
- posttranslační modifikace mAb,
- pozice konjugace léčivo-linker na mAb,
- struktura linkeru a jeho stabilita,
- průměrné zatížení mAb léčivem (hodnota DAR).

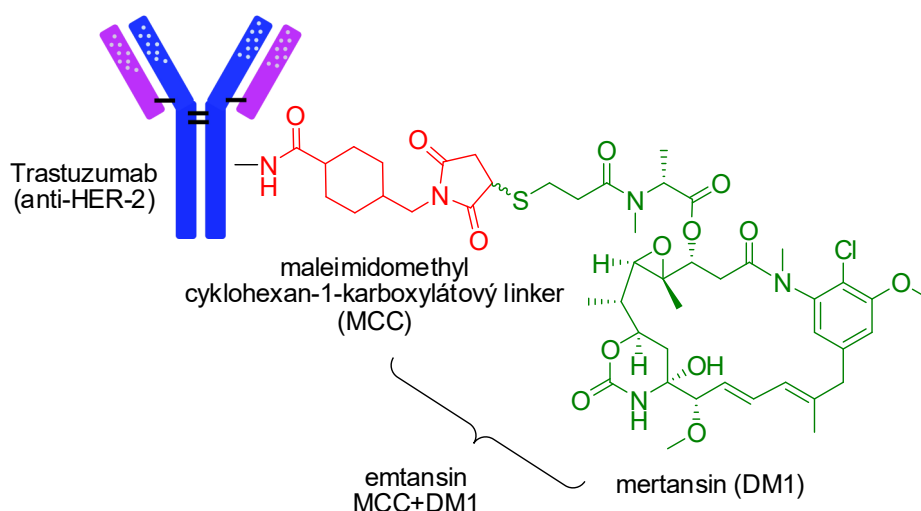


Obr. 2. Schéma molekulární struktury ADC přípravku protilátka-léčivo

Tyto parametry lze určit na základě studia molekulární 3D struktury ADC přípravku. V současnosti jsou k dispozici dvě zásadní experimentální metodiky: RTG monokrystalová difrakce (SCXRD – Single Crystal X-Ray Diffraction) a hmotnostní spektrometrie (MS). U obou metod je však problémem velikost zkoumaných konjugátů. Proto se někdy strukturální studie omezují na fragmenty mAb a sice F_{ab} a F_c (viz obr. 2). Fragmentace ovšem neznamená omezení interpretace struktury zkoumaného konjugátu.

Nejlépe lze molekulární strukturu ADC přípravků studovat pomocí SCXRD (cit.¹³), a příp. dalšími difrakčními technikami (neutronová či elektronová difrakce¹⁴), pokud se podaří vykristalizovat vhodný monokrystal. To ale není vůbec jednoduché a představuje to hlavní omezení difrakčních metod. V databázi PDB (cit.¹⁵) lze nalézt jen několik struktur celých protilátek, ale tisíce konjugátů léčiva s F_{ab} fragmentem, protože fragmenty krystalizují snadněji. Druhou metodou jsou různé techniky hmotnostní spektrometrie, např. ESI/LC/MS nebo CXL/MS, které asi nejlépe umožňují určit vazebné místo léčiva na protilátce a které jsou pro studium konjugátů nabízeny i komerčně¹⁶. Přehledovým článkem o současných strategiích LC/MS pro řešení struktury konjugátů je práce Xiaoyu a spol.¹⁷. Z dalších potenciálních metod přichází v úvahu NMR spektroskopie v roztoku¹⁸ a kryoelektronová mikroskopie¹⁹, ale tyto metody jsou většinou použity v tandemu s MS, protože jejich rozlišení je obecně nižší²⁰.

Ilustrací strukturální studie konjugátu trastuzumabemantansin (přípravek Kadcyca²¹) metodou LC-MS je práce Chena a spol.²² (obr. 3). Trastuzumab obsahuje 88 molekul lysinu a 4 N-koncové skupiny, které lze konjugacími kroky modifikovat. Výsledné konjugáty se skládají z dílčích populací, které se liší počtem připojených léčiv a také umístěním jejich linkerů na trastuzumab. Linker je tvořen



Obr. 3. Trastuzumab-emtansin (Kadcyla)

stabilním thioetherovým můstkem označovaným jako MCC. Kovalentně připojené léčivo se nazývá mertansin (DM1). Pojem emtansin označuje komplex MCC-DM1, tzn. linker-léčivo. V Kadcyle připadá na jednu molekulu trastuzumabu v průměru ~3,5 molekuly léčiva (DAR). Přípravek Kadcyla je vráběn firmou Roche a byl schválen FDA i EMA v roce 2013.

2.1. Linker

Linker je vazebná spojka mezi protilátkou a léčivem (obr. 4). Po intravenózní aplikaci ADC přípravku musí linker vydržet nerozpojený v prostředí krevní cirkulace (působení enzymů). Jinak by došlo k nežádoucímu uvolnění cytotoxického léčiva v necílové tkáni. Teprve v cílové nádorové buňce se linker buď rozpojí (dekonjuguje) nebo zůstane vázaný na léčivo. Linkery proto dělíme na štěpitelné a neštěpitelné. Konstrukce linkeru výrazně ovlivňuje farmakokinetiku a farmakodynamiku, terapeutické parametry a selektivitu ADC přípravku²³.

Štěpitelné linkery jsou konstruovány tak, aby byly stabilní v extracelulárním a nestabilní v intracelulárním prostředí nádorové buňky. Citlivými parametry stability jsou pH, redoxní potenciál nebo přítomnost specifických lysozomálních enzymů. Nejčastějšími typy štěpitelných linkerů²³ jsou:

- hydrazonový linker (štěpitelná je hydrazonová vazba hydrolýzou v kyselém intracelulárním prostředí endozomů (pH 5–6) a lysozomů (pH 4,8)).
- disulfidový linker (štěpitelná je disulfidová vazba hydrolýzou při vyšší koncentraci intracelulárního glutathionu (1–10 mmol l⁻¹)).
- dipeptidový linker (tento linker je štěpen katepsinem B – lysozomální proteasou, která je nadměrně produkována v některých typech nádorových buněk). Nejú-

spěšněji jsou štěpeny vazby Val-Cit a Val-Ala.

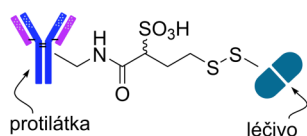
Dalším typem štěpitelných linkerů, který je však využíván méně často než linkery uvedené výše, je β -glukuronidový linker, který je rozpoznáván a hydrolyzován β -glukuronidasou.

Příkladem neštěpitelného linkeru je substituovaný stabilní thioetherový řetězec, který odolává proteolytické degradaci, což zajišťuje vyšší stabilitu celého ADC přípravku. Neštěpitelné linkery ovšem musí být konstruovány tak, aby nesnižovaly účinek připojeného léčiva, příp. vhodně modifikovaly jeho vlastnosti. Po degradaci proteinové části ADC přípravku, tedy protilátky, je na vznikající molekule léčivo-linker zachována nejméně jedna aminokyselina, nejčastěji lysin nebo cystein²³. Jednou z výhod neštěpitelných linkerů je možnost ovlivnění finálních vlastností malé molekuly (léčiva), například jejich hydrofility apod.²⁴. Závěrem je nutné zdůraznit, že v současné době nelze jednoznačně soudit, které typy linkerů jsou pro ACD přípravky vhodnější, zda štěpitelné či neštěpitelné.

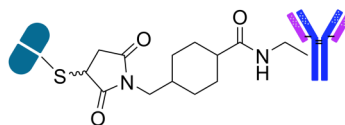
2.2. Léčivo

Požadavky kladené na malou cytotoxickou molekulu – léčivo, jsou vysoké a je náročné je všechny beze zbytku vyplnit. Jde především o dostatečnou účinnost a rozpustnost ve vodě, schopnost obcházet mechanismy způsobující multilékovou rezistenci, nízkou imunogenitu a možnost vytvoření vhodné chemické vazby (handle) pro připojení k linkeru. Během vývoje ADC přípravků se ukázala jako nevhodná např. chemoterapeutická léčiva na bázi doxorubicinu, methotrexátu, rostlinných Vinca alkaloidů (vincristin, vinblastin, vinorelbin) aj. U druhé generace byly jako cytotoxická léčiva použity hlavně deriváty odvozené od dvou skupin antimetabolických látek: auristatinů a maytansinů¹².

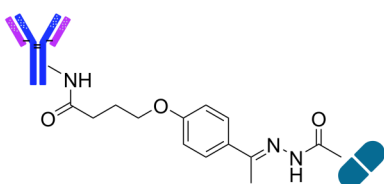
Disulfidový linker



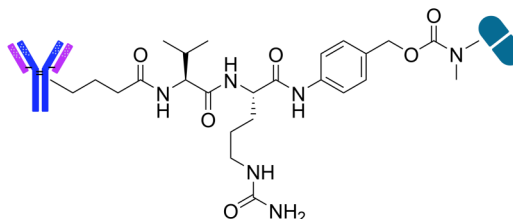
Thioetherový linker



Hydrazonový linker



Dipeptidový linker



Obr. 4. Štěpitelné a neštěpitelné linkery

Auristatiny²⁵ jsou komplexní analoga dolastatinu 10. Tento pentapeptid je metabolitem mořského slimáka zeje ušatého (*Dolabella auricularia*), zvaného mořský zajíc, z kterého může být izolován. Jednotlivé deriváty rozlišujeme písmeny, např. auristatin E, auristatin F, apod. (obr. 5). Kromě toho existují i jejich deriváty, např. monomethylauristatin E, monomethylauristatin F apod. Škála těchto látek je tedy široká. Auristatiny patří mezi tzv. destabilizátory mikrotubulů, neboť svou vazbou rozvracejí potřebnou rovnováhu mezi neustálým přidáváním a odebíráním tubulinových jednotek, a tím zastavují možnost dělení nádorových buněk. To nakonec vede k apoptóze. Tyto látky jsou 100 až 1000krát toxicitější než doxorubicin.

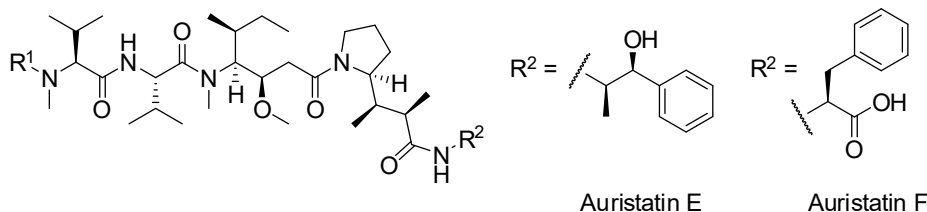
Maytansiny^{25,26} (viz obr. 3) neboli deriváty maytansinu, jsou látky odvozené od makrolidu maytansinu, který lze izolovat z kůry afrického keře *Maytenus ovatus*, ale také z mechů a mikroorganismů. Maytansin inhibuje polymeraci tubulinu, což vede k mitotickému bloku a apoptóze. Mechanismus účinku maytansinů je tedy podobný jako u auristatinů, stejně jako jejich toxicita vzhledem k doxorubicinu (200 až 1000krát toxicitější). Klinické

zkoušky se samotnými maytansiny nebo auristatiny ukázaly, že jim někdy vzhledem k vysoké systémové toxicitě zcela chybí terapeutické okno, tzn., že minimální léčivá koncentrace je současně i minimální toxickou koncentrací.

Léčiva, která působí jiným mechanismem než jako inhibitory tubulinu, jsou kalicheamiciny nebo duokarmyciny, řazené mezi bakteriální protinádorová antibiotika. V obou případech se jedná o látky způsobující poškození DNA. Příkladem ADC přípravku, obsahujícího tento typ léčiv, může být již výše zmiňovaný gemtuzumab-ozogamicin (Mylotarg)^{27,28}.

Současný výzkum se zaměřuje na méně toxická léčiva než jsou inhibitory tubulinu. Slibnou skupinou jsou kamptotheciny (kamptothecin a deriváty topotekan, irinotekan a belotekan). Tyto inhibitory topoisomerasy jsou zhruba stejně toxické jako doxorubicin. Příkladem přípravku obsahujícího tento druh malé molekuly je nedávno schválený sacituzumab-govitecan (Trodelvy)²⁹, viz tab. I.

V dlouhodobé perspektivě budou nepochybně zkoumána všechna léčiva, která nějakým mechanismem ovlivňují buněčný cyklus a vedou k apoptóze. Jedná se např.

Obr. 5. Auristatiny²⁵

o inhibitory topoisomerasy, inhibitory transkripce, Bcl-xl inhibitory, inhibitory tyrosinkinasy, inhibitory HSP90, inhibitory translace, inhibitory proteazomu, léčiva ovlivňující mitochondriální metabolismus aj.³⁰ Testují se amanitiny (obsažené v muchomůrce zelené), pyrrolbenzodiazepiny, indolinobenzodiazepiny³¹, thailanstatin, karmafy-ciny³² aj.

Pro úplnost lze doplnit, že protilátka je možné použít i k cílení radionuklidů. Příkladem je přípravek Zevalin (ibritumomab-tiuxetan)³³, který reprezentuje první schválenou radioimunoterapii. V tomto případě je využívána myší protilátka cílená na antigen CD20, který je přítomen na B-lymfocytech. Jako radionuklid je v tomto případě využíváno yttrium 90 [⁹⁰Y]. Na rozdíl od konjugátů s léčivem není u konjugátů s radionuklidy nutná jejich internalizace do buňky a dochází k usmrcení jak buňky cílové (nádorové), na kterou se konjugát vázal, tak buňek v jejím blízkém okolí³³.

3. Mechanismus terapeutického účinku

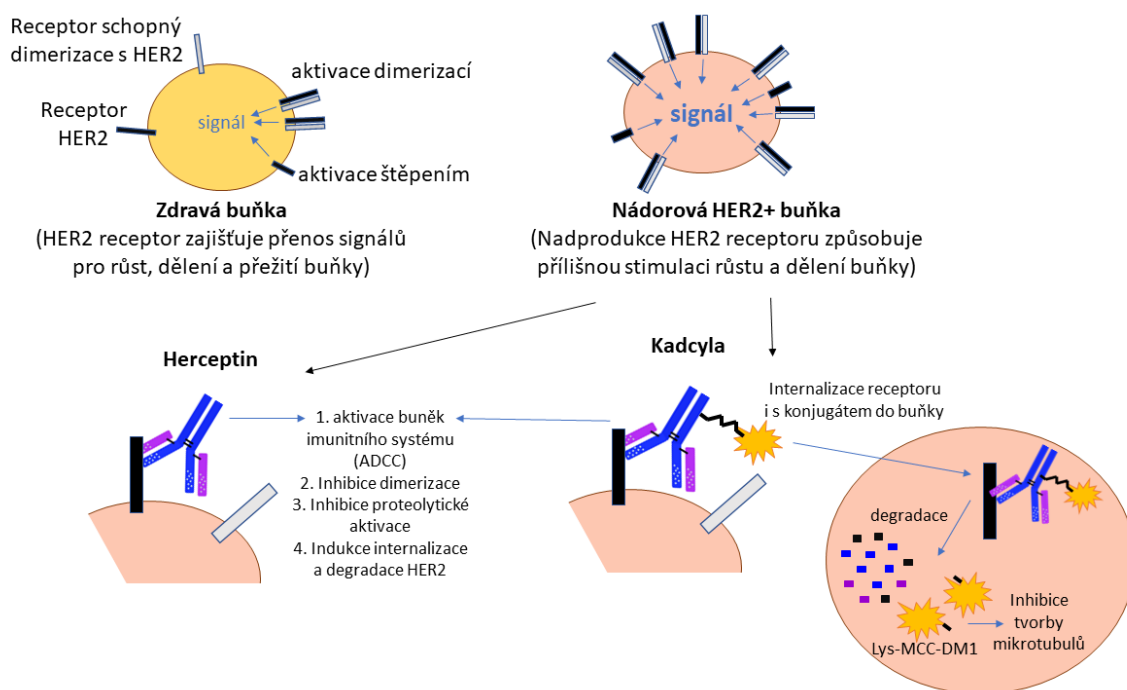
Pro pochopení mechanismu účinku ADC přípravků je nutné si uvědomit, že protilátka zde hraje podstatně větší roli, než by se na první pohled mohlo zdát a není jen prostým nosičem léčiva do cílové nádorové buňky. Konjugát synergicky kombinuje vlastnosti cytotoxické malé molekuly léčiva s důležitými vlastnostmi protilátky, jako je např. selektivní vazba k vhodnému antigenu. Zároveň může být tímto způsobem vhodně ovlivněna stabilita, far-

makokinetika či schopnost překonat mechanismy lékové rezistence. ADC přípravky jsou tedy skvělou kombinací imunoterapie a chemoterapie.

Z hlediska mechanismu účinku ADC přípravek v krevní cirkulaci specificky směřuje k cílovému antigenu, produkovanému na povrchu nádorových buněk. Cílový antigen protilátka musí mít v nádoru vysokou expresi, být na povrchu nádorové buňky snadno přístupný a konečně musí mít výrazné internalizační vlastnosti (umožňující konjugátu snadný vstup do buňky). Současné terapie míří na 8 různých antigenů a receptorů (viz jejich dělení v databázi SÚKL)⁶. Po internalizaci je protilátka degradována a v nádorové buňce působí léčivo volné nebo ve spojení s neštěpitelným linkerem.

Jako názorný příklad terapeutického účinku volné protilátky v kontrastu s mechanismem účinku ADC přípravku může sloužit dvojice sestávající ze samotné humanizované protilátky používané k léčbě HER-2 pozitivní rakoviny prsu a HER-2 pozitivního metastazujícího karcinomu žaludku (přípravek Herceptin, trastuzumab)³⁴ a z přípravku obsahujícího obdobnou protilátku, tentokrát však konjugovanou s cytostatickým léčivem (přípravek Kadcyla, trastuzumab-emtansin), viz obr. 6. I u přípravku Kadcyla je hlavní indikací terapie HER-2 pozitivní rakoviny prsu²¹. Pro tyto typy nádorových onemocnění je typická nadprodukce receptoru, který se účastní řady signálních drah ovlivňujících buněčnou proliferaci a apoptózu³⁵.

Z hlediska terapie je důležitá skutečnost, že není znám žádný extracelulární ligand pro receptor HER-2, který by byl zodpovědný za jeho aktivaci. K té dochází



Obr. 6. Srovnání mechanismu účinku přípravků Herceptin a Kadcyla

během jeho dimerizace s některým dalším členem této rodiny receptorů, přičemž dimerizaci indukují právě ligandy těchto receptorů. Druhou možnou cestou vedoucí k aktivaci receptoru HER-2 je odštěpení jeho extracelulární domény. Působením přípravku Herceptin³⁴, který se specificky váže na extracelulární doménu receptoru HER-2, dochází k zamezení možnosti jeho dimerizace a tím tedy k potlačení signálů směřujících k aktivaci proliferace a inhibici apoptózy. Inhibována je i aktivace receptoru HER-2 odštěpením extracelulární domény. Tím však funkce protilátky (trastuzumab) v přípravku Herceptin nekončí. Fc fragment trastuzumabu je schopen zprostředkovat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC), jejíž aktivace vede ke zničení nádorové buňky. Dalším předpokládaným mechanismem působení Herceptinu je jeho vliv na internalizaci HER-2 receptoru a jeho degradaci^{34,36}.

V přípravku Kadcyla²¹ je primární funkcí protilátky její vazba na HER-2 receptor, zároveň však je ale schopná zprostředkovávat všechny terapeutické účinky, které byly zmíněny výše pro Herceptin. Po vazbě ADC přípravku na HER-2 receptor dochází k internalizaci celé molekuly ADC endocytózou do nitra buňky a následně k proteolytické degradaci protilátky v lysozomu. Degradací této proteinové části celého ADC přípravku dochází k uvolnění cytotoxických produktů – katabolitů (primárně molekuly lysin-MCC-DM1), které inhibují tvorbu mikrotubulů (zabraňují polymerizaci tubulinu) a způsobují tedy apoptózu cílové buňky. Přítomná protilátka umožňuje cílený účinek cytotoxické látky pouze v nádorových buňkách, které nadměrně produkují receptor HER-2. Díky nízké permeabilitě nevykazuje katabolit lysin-MCC-DM1 nežádoucí vedlejší účinky.

Srovnání mechanismu účinku obou těchto terapeutik, tedy přípravků Herceptin a Kadcyla, je ilustrováno na obr. 6. Z něj mimo jiné jasně plyne základní rozdíl v působení, zatímco Herceptin do nádorové buňky nevstupuje, konjugát přítomný v přípravku Kadcyla ano.

4. Příprava konjugátů protilátka-léčivo

ADC přípravky zahrnují tři proměnné – protilátku, linker a léčivo a zjevně neexistuje univerzální strategie jejich přípravky. Během vývoje výrobního procesu je nutné se vypořádat s celou řadou otázek, například:

Jak vybrat správnou protilátku? Kde a jak připojit linker k protilátce? Jaký druh linkeru použít? Kolik molekul léčiva připojit? Jak propojit linker a léčivo? Připojit nejdříve linker k léčivu a potom konjugovat s mAb nebo dříve konjugovat linker a mAb a teprve potom na něj připojit léčivo? Jaká je optimální léková zátěž?

Kromě toho je zřejmé, že pro každý ADC přípravek budou odpovědi odlišné. V následujících řádcích budou nastíněny příklady možných strategií syntézy ADC přípravků.

4.1. Biosyntéza proteinové části přípravku

Dříve než je možné přikročit k přípravě ADC přípravku, je nutné vyrobit „nahou“ monoklonální protilátku, což vyžaduje značnou znalost moderních technologií. Podrobný popis všech metod, v současné době využívaných v přípravě chimérních, humanizovaných či plně humánních protilátek, by přesahoval rámec tohoto příspěvku, proto odkazujeme na příslušnou literaturu³⁷. Pro představu uvedeme alespoň jeden z možných přístupů, a to propojení hybridomové technologie a genového inženýrství. Na začátku celého procesu je nezbytné vhodným antigenem imunizovat laboratorní zvíře, obvykle myš. Následuje fúze slezinných buněk, schopných produkovat protilátky, s buňkami nádorovými, které vzniklému hybridomu poskytnou schopnost nekonečného dělení. Tato etapa vývoje protilátky je zakončena výběrem hybridomu produkujícího protilátku o požadované specifitě. V této fázi se stále jedná o protilátku plně myšího původu. Pomocí sekvenování je následně možné zjistit pořadí nukleotidů v sekvenci, kterou je tato myší protilátka kódována¹¹.

V následující fázi je využito skutečnosti, že je známa kompletní nukleotidová sekvence lidského genomu³⁸. Metodami genového inženýrství je pak možné připravit kombinovanou nukleotidovou sekvenci, která obsahuje jak části myšího původu, odvozené od sekvence získané hybridomovou technologií, tak části původu humánního³⁹. Takto získaná sekvence je vložena do buněk vhodných pro produkci. Nejčastěji jsou využívány buňky z vaječnicků křečička čínského (CHO buňky)⁴⁰.

Výše zmiňovaným způsobem je možné získat protilátky chimérní či humanizované. Pro přípravu protilátek plně humánních bylo nutné vyvinout metody ještě sofistikovanější, mezi které patří například metoda fágové displaye či produkce v myších, jejichž genom byl pozměněn tak, aby nebyly schopné produkce myších protilátek, ale pouze protilátek lidských⁴¹.

4.2. Biokonjugace

Následným procesem je biokonjugace (zkráceně konjugace), což je chemická strategie umožňující kovalentní spojení dvou molekul, z nichž alespoň jedna je biomolekula (v případě ADC přípravků monoklonální protilátka). Vývoj těchto metod probíhá již přibližně dvě desetiletí a stále jsou zaváděny techniky nové, které umožňují přesnou kontrolu počtu malých molekul zaváděných do konjugátu a zároveň i míst, ve kterých k vazbě dochází^{42,32}. K dispozici je aktuálně mnoho strategických variant a pestrá škála nástrojů syntetické chemie. Hlavní využívané přístupy zahrnují strategie klasické chemické syntézy a moderní metody biologické katalýzy pomocí specificky působících enzymů⁴³.

Biosyntéza ADC přípravků se potýká s celou řadou specifických problémů, které souvisí mimo jiné se selektivitou procesu. Chemoselektivní modifikace jednoho či více míst na protilátce je tak předmětem „know-how“ řady vývojových a servisních biotechnologických laboratoří,

keré svoje služby nabízejí na webu: Seattle Genetics, Genentech, ImmunoGen, Regeneron, Abzena, Arco Biosystems, Wuxiobiologics, Lonza molecules, Spirogen, Synthon, Medchemexpress aj.

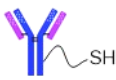
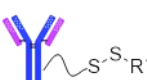
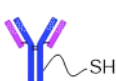
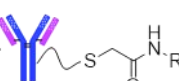
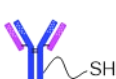
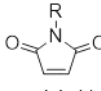
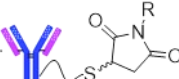
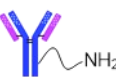
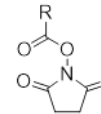
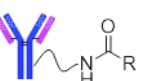
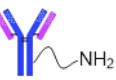
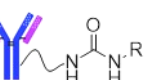
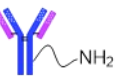
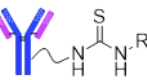
Atraktivními místy pro biokonjugaci na protilátce jsou aminokyseliny situované na vnějším povrchu molekuly proteinu, především tedy aminokyseliny s ionizovatelnou skupinou v postranním řetězci, jako jsou lysin, cystein, histidin nebo tyrosin. Nejčastěji jsou modifikovány skupiny: $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NC}(\text{NH}_2)_2$ atd. U lysinu může nukleofilní skupina $-\text{NH}_2$ například reagovat s elektrofilním *N*-hydroxysukcinimidovým činidlem za vzniku amidu (tab. II)⁴⁴. V tomto případě se jedná o nespecifickou konjugaci, protože molekul lysinů je v protilátce několik desítek (uvádí se, že průměrná protilátka obsahuje cca 80 lysinů) a z toho je přibližně 10 přístupných pro modifikační reakce. Zároveň není možné zaručit, že nebudou modifikovány molekuly lysinů nezbytné pro interakci antigenu a protilátky. Přesto patří tato metodika k jedné z nejpoužívanějších a byla využita

například při přípravě přípravků Besponsa, Mylotarg nebo Kadcyly^{43,45}.

Jiná syntetická strategie cílí v protilátce IgG1 na čtyři disulfidové můstky tvořené thiolovými skupinami v postranních řetězcích cysteinů, dva spojující lehký a těžký řetězec a dva umístěné v pantové oblasti těžkých řetězců (viz obr. 2). Redukce těchto čtyř můstků, např. tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP), generuje osm thiolových skupin, které jsou schopné reagovat např. s maleimidovým linkerem (tab. II), což umožňuje vazbu až osmi molekul léčiva (maximální hodnota DAR = 8). Tato technologie byla využita například při výrobě přípravku Adcetris⁴³. Ještě modernějším přístupem je pak produkce protilátek, do jejichž sekvence je pomocí genetické úpravy vnesen nový cystein, který může být cíleně modifikován za vzniku ADC přípravku (THIOMAB)^{43,46}.

Vzhledem k tomu, že všechny monoklonální protilátky jsou *N*-glykosylované buď na asparaginu (N297) nebo v jeho nejbližším okolí (jedná se tedy o umístění na Fc fragmentu), tak technika tzv. glykoinkženýrství umožňuje

Tabulka II
Modifikace postranních řetězců vnějších cysteinů a lysinů v protilátce⁴⁴

Funkční skupina v postranním aminokyselinovém řetězci	Činidlo	Produkt
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	$\begin{matrix} R' \\ \\ R-S-S-R \\ \\ R \end{matrix}$ disulfid	S-S můstek 
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	$\begin{matrix} O \\ \\ I-CH_2-NH-R \end{matrix}$ jodacetamidové činidlo	thioether 
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	 maleimid	thioether 
aminoskupina Lys 	 <i>N</i> -hydroxysukcinimidový ester (NHS)	amid 
aminoskupina Lys 	$\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$ isokyanát	vazba přes močovinu 
aminoskupina Lys 	$\text{S}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$ isothiokyanát	vazba přes thiomčovinu 

konjugaci s léčivem na sacharidové části protilátky⁴⁷. V tomto případě se jedná o polohově-specifickou konjugaci a její výhody jsou nasnadě – možnost kontroly DAR a heterogenity vznikajícího produktu. Právě v průběhu těchto procesů jsou často využívány vysoce specifické katalytické schopnosti enzymů⁴³. Lze zvolit přímou konjugaci léčiva spojeného s linkerem na protilátku nebo nejdříve syntetizovat tzv. bioortogonální vazbu, která je potom funkcionalizována léčivem. Běžným příkladem bioortogonálních reakcí jsou ketonové a aldehydové modifikační reakce⁴⁴. V tomto scénáři se ketonová nebo aldehydová funkční skupina spojí s proteinem pomocí aminoxy skupiny (H₂N–O–) nebo karbohydrazidové skupiny (–C(=O)–NH–NH₂) za vzniku stabilních oximových nebo hydrazonových vazeb.

V předcházejících odstavcích byly představeny jen některé z možných metod biokonjugace. Pro ucelenější výčet a podrobnější popis doporučujeme souhrnné publikace^{32,43}.

Závěrem popisu technologie ADC přípravků je nutné připomenout, že samotnou syntézou proces nekončí. Výsledný produkt je nutné vhodně purifikovat, aby splňoval požadavky kladené na léčivé přípravky. Vzhledem k rozdílným vlastnostem jednotlivých ADC přípravků bylo vyvinuto jen velmi málo obecných technik pro čištění produktů biokonjugací reakcí. Používány bývají různé chromatografické techniky (gelová permeační chromatografie, afinitní či ionexová chromatografie, chromatografie s hydrofobní interakcí apod.), obvykle v kombinaci s tangenciální filtrací. V řadě případů je však třeba vyvinout purifikační metody jedinečné pro zvolenou biokonjugací reakci^{32,40,48}.

5. Závěr

ADC konjugáty představují „boom“ v léčbě rakoviny. V současnosti je ve vývoji asi 200 ADC přípravků a do roku 2025 se očekává jejich až čtyřnásobný nárůst prodeje⁴⁹. To však neznamená konec chemoterapeutik a dalších úspěšných kancerostatik široce používaných v současné terapii. Účelem je léčbu co nejpřesněji zacílit pouze na nádorové buňky a vyhnout se poškození buněk zdravých, tzn. omezit velmi nepříjemné vedlejší účinky. A v tomto ohledu jsou ADC konjugáty významným krokem vpřed. I proto se uvažuje v budoucnu o jejich využití i v dalších indikacích (ateroskleróza, bakterémie apod.)⁵⁰. Vývoj v nejbližší době ukáže, zda naděje vkládané do ADC přípravků budou naplněny.

Seznam zkratk

ADC	Antibody-Drug Conjugate
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
API	Active Pharmaceutical Ingredient
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická
Bcl-xl	transmembránový protein
CD20	B-lymfocytární antigen CD20

CXL-MS	Chemical Crosslinking-Mass Spectrometry
DAR	Drug Antibody Ratio
DMI	maytansine derivative
ECI-LC-MS	Electrospray-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
F _{ab}	fragment antigen-binding region
F _c	fragment crystallizable region
HER-2	Human Epidermal Growth Factor receptor 2
HSP90	Heat shock protein 90
mAb	monoclonal antibody
MCC	4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylate
PDB	Protein Data Bank
SCXRD	Single Crystal X-Ray Diffraction
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TCEP	tris(2-carboxyethyl) phosphine
Val-Cit	valin-citrulin
Val-Ala	valin-alanin

LITERATURA

- Rádl S., Dammer O., Ridvan L.: *Chem. Listy* 116, 471 (2022).
- <https://www.fda.gov/>, staženo 20. 1. 2023.
- Advances in the Pharmaceutical Sciences Series 17. Antibody-Drug Conjugates (Wang J., Shen W.-C., Zaro J. L., ed.) Springer, Berlin 2015.
- Miletín M.: *Klin. Farmakol. Farm.* 32, 32 (2018).
- https://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/ADC_Cancer, staženo 30. 1. 2023.
- https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/, staženo 20. 4. 2023.
- <https://www.biochempeg.com/article/125.html>, staženo 5. 3. 2023.
- Khongorzul P., Ling C. J., Khan F. U., Ihsan A. U., Zhang J.: *Mol. Cancer Res.* 18, 3 (2020).
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adcetris-epar-product-information_cs.pdf, staženo 19. 2. 2023.
- Fu Z., Li S., Han S., Shi C., Zhany Y: *Signal. Transduct. Target. Ther.* 7, 93 (2022).
- Si Y., Melkonian A. L., Curry K. C., Xu Y., Tidwell M., Liu M., Zaky A. F., Liu X.: *Chin. J. Chem. Eng.* 30, 301 (2021).
- Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaia N.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 16, 315 (2017).
- Wlodawer A.: *FEBS J.* 288, 5786 (2021).
- Palatinus L., Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 115, 368 (2021).
- <https://www.rcsb.org/>, staženo 23. 1. 2023.
- https://www.enovatia.com/antibody-drug-conjugate-ms/?gelid=EAIAIQobChMInPenV6zW_AIVAjcYCh1FVQgsEAAAYBCAAEgJ0qvD_BwE, staženo 21. 1. 2023.
- Xiaoyu Z., Shihan H., Chao X., Bo A., Jun Q.: *J. Pharm. Anal.* 10, 209 (2020).

18. Orts J., Gossert A. D.: *Methods* 3, 138 (2018).
19. Pal S., Ganesan K., Eswaran S.: *IUBMB Life* 70, 947 (2018).
20. Singh S. B.: *J. Nat. Prod.* 85, 666 (2022).
21. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kadcyla-epar-product-information_cs.pdf, staženo 20. 12. 2022.
22. Chen L., Wang L., Shion H., Yu C., Yu Y. Q., Zhu L., Li M., Chen W., Gao K.: *MABS* 8, 1210 (2016).
23. https://adc.bocsci.com/resource/linkers-a-crucial-factor-in-antibody-drug-conjugates.html?gclid=EAaIaQobChMlptboosjg_AIVj9CyCh2OaAAT EAAAYAiAAEgKpm_D_BwE, staženo 25. 1. 2023.
24. Kovtun Y. a 18 spoluautorů: *Cancer Res.* 70, 2528 (2010).
25. Maderna A., Leverett C. A.: *Mol. Pharmaceutics* 12, 1798 (2015).
26. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/maytansinoid>, staženo 26. 1. 2023.
27. Bouchard H., Viskov C., Garcia-Echeverria C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5357 (2014).
28. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mylotarg-epar-product-information_cs.pdf, staženo 9. 3. 2023.
29. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trodelyv-epar-product-information_cs.pdf, staženo 9. 3. 2023.
30. Conilh L., Sadilkova L., Viricel W., Dumontet C.: *J. Hematol. Oncol.* 16, 3 (2023). doi.org/10.1186/s13045-022-01397-y.
31. Baath S., Laws M., Rahman K. M.: *Molecules* 26, 2943 (2021).
32. Kostova V., Désos P., Starck J.-B., Kotschy A.: *Pharmaceutics* 14, 442 (2021).
33. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zevalin-epar-product-information_cs.pdf, staženo 14. 2. 2023.
34. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_cs.pdf, staženo 20. 12. 2022.
35. Neves H., Kwok H. F.: *BBA Clin.* 3, 280 (2015).
36. Gutierrez C., Schiff R.: *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 55 (2011).
37. <https://www.proteogenix.science/scientific-corner/antibody-production/how-are-mouse-monoclonal-antibodies-humanized-current-approaches-and-limitations/>, staženo 31. 1. 2023.
38. <https://www.hugo-international.org/history/>, staženo 14. 2. 2023.
39. <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/chimeric-monoclonal-antibody>, staženo 14. 2. 2023.
40. Matsuda Y.: *J. Sep. Sci.* 45, 27 (2022).
41. <https://medium.com/techskill-brew/antibody-engineering-fully-human-monoclonal-antibodies-part-3-b7d87d45aab8>, staženo 5. 3. 2023.
42. Stephanopoulos N., Francis, M. B.: *Nat. Chem. Biol.* 7, 876 (2011).
43. Tsuchikama K., An Z.: *Protein Cell* 9, 33 (2018).
44. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation), staženo 1. 2. 2023.
45. Chen Y., Kim M. T., Zheng L., Deperalta G., Jacobson F.: *BioconjugChem* 27, 2037 (2016).
46. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra04606e>, staženo 22. 3. 2023.
47. <https://www.acrobiosystems.com>, staženo 1. 2. 2023.
48. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/tangential-flow-filtration-antibody-drug-conjugate-manufacturing>, staženo 9. 3. 2023.
49. Gavenda A.: *Chemagazin XXXII (5)*, 8 (2022).
50. Pettinato M. C.: *Antibodies* 10, 42 (2021).

B. Kratochvíl^a and E. Benešová^b (^a *Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague,* ^b *Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Czech Republic*): **Antibody-Drug Conjugates, the Combination of Large and Small Therapeutic Molecules**

Antibody-drug conjugates are a promising therapeutic class of cytostatic agents. They consist of a monoclonal antibody, usually of the IgG type, to which one or more molecules of a cytotoxic drug are conjugated via a suitable linker (covalent chain). The conjugated form of the drug has significantly lower toxicity than the free form, which cannot be used alone in therapy. The Czech State Institute for Drug Control database has so far registered 9 antibody-drug conjugates for use in oncology. Given the vast number of possible combinations of antibody-drug pairs, a boom in sales is expected by 2025. In the blood circulation, the antibody-drug conjugate specifically targets the antigen expressed on the surface of the tumor cell. The linker between the antibody and the drug must be stable in the blood circulation environment and only be completely degraded in the target tumor cell after internalization of the conjugate or remain bound to the drug after degradation of the protein part of the conjugate (the so-called cleavable or non-cleavable linkers). Subsequently, the drug causes apoptosis of the tumor cell by various mechanisms. The drugs used in the 2nd generation antibody-drug conjugates were up to 1,000 times more toxic than the chemotherapeutic drug doxorubicin and were mainly auristatin and maytansine derivatives. Less toxic drugs based on camptothecins, amanitins, etc. are also being tested in the current 3rd generation of conjugates under development. The linker drug is attached to the antibody by various bioconjugation methods. Here, a range of synthetic chemistry techniques are applied, and bioconjugation can be either non-specific or specific. In particular, the peripheral amino acids of the antibody – cysteine, lysine, histidine, tyrosine, glutamine and reduced disulfide

bridges between the two heavy chains or between the heavy and light chains – are conjugated. For a specific conjugation, e.g. glycoengineering techniques based on N-glycosylation of antibody on asparagine (N297) have been developed. Conjugation techniques, as well as the synthesis of "naked" human antibodies are the subject of classified "know-how" of a number of commercial progressive companies and laboratories.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: antibody-drug conjugates, cancerostatics, linker, bioconjugation