

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Иммуноконъюгаты как препараты таргетной онкотерапии

С.Д. Щеглов*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Степан Дмитриевич Щеглов stepanshcegllov@mail.ru

Химиотерапия онкологических заболеваний сопряжена со значительным риском развития тяжелых побочных эффектов вследствие воздействия цитостатиков на здоровые клетки организма. Таргетная онкотерапия представляет собой инновационный подход к лечению онкологических заболеваний, направленный на специфические белковые структуры и метаболические пути, с высокой долей вероятности присущие опухолевым клеткам. Исторически одними из первых препаратов таргетной терапии, наряду с моноклональными антителами, были апробированы и в дальнейшем одобрены для клинического применения иммуноконъюгаты (ИК). Традиционно ИК описывается как ковалентно связанное с терапевтическим компонентом через линкер моноклональное антитело. За счет векторного компонента данные препараты позволяют применять избирательное воздействие на определенные эпитопы мишени, что значительно повышает терапевтический индекс высокотоксичных противоопухолевых средств. В дополнение к этому таргетная терапия способствует преодолению лекарственной устойчивости опухолей и улучшению прогноза заболевания. При этом фармацевтическая разработка ИК требует всестороннего учета специфических аспектов, таких как физико-химические свойства конъюгируемого вещества, оптимальный выбор изотипа иммуноглобулина класса G, биохимические свойства линкера и методы конъюгации. Всестороннее исследование этих аспектов позволит не только оптимизировать дизайн ИК, но и будет способствовать широкому распространению в клинической практике и расширению спектра применения подобных препаратов. В данном обзоре представлена эволюция концепции «конъюгат антитело – лекарственное средство» в рамках применения данных препаратов в онкотерапии. Рассматриваются и обобщаются также базовые для дизайна ИК аспекты строения и особенности стратегий конъюгации лекарственного вещества с моноклональным антителом.

Ключевые слова: иммуноконъюгат, таргетная терапия, онкология, моноклональное антитело, линкер**Для цитирования:** Щеглов С.Д. Иммуноконъюгаты как препараты таргетной онкотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):36–46.DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Immunoconjugates as drugs of targeted oncotherapy

Stepan D. Shcegllov*N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Stepan Dmitrievich Shcegllov stepanshcegllov@mail.ru

Chemotherapy for cancer is associated with a significant risk of severe side effects due to the effects of cytostatics on healthy cells. Targeted oncotherapy is an innovative approach to cancer treatment that targets specific protein structures and metabolic pathways that are highly likely to be inherent in tumor cells. Historically, immunoconjugates (IC) were among the first targeted therapy agents, along with monoclonal antibodies, to be approbated and subsequently approved for clinical use. Traditionally, an IC is described as a monoclonal antibody covalently linked to a therapeutic component via a linker. Due to their vector component, these drugs allow the application of selective effects on epitope-defined targets, which significantly increases the therapeutic index of highly toxic anti-tumor agents. In addition, targeting therapy helps to overcome drug resistance of tumors and improve the prognosis of the disease. Herewith, the pharmaceutical design of IC requires comprehensive consideration of specific

aspects such as physicochemical properties of the conjugated substance, optimal choice of immunoglobulin class G isotype, biochemical properties of the linker and conjugation methods. A comprehensive study of these aspects will not only optimize the design of IC, but will also contribute to the widespread use in clinical practice and expand the range of applications of such drugs. This review presents the evolution of the antibody – drug conjugate concept in the context of the application of these drugs in oncotherapy. The aspects of structure and specific features of strategies of drug-drug conjugation with monoclonal antibody, which are basic for IC design, are also discussed and summarized.

Keywords: immunoconjugate, targeted therapy, oncology, monoclonal antibody, linker

For citation: Shceglov S.D. Immunoconjugates as drugs of targeted oncotherapy. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):36–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Введение

В настоящее время сохраняется опасная тенденция к росту онкологических заболеваний во всем мире. Так, прогнозируется, что к 2050 г. количество нововыявленных случаев злокачественных новообразований достигнет 35 млн [1].

Сложившаяся вследствие различных экологических и социальных причин неблагоприятная динамика диктует особые требования к повышению эффективности лечения онкологических заболеваний. Традиционная химиотерапия сопряжена с риском нежелательных явлений при системном введении цитостатиков. Механизм действия подобных химиотерапевтических агентов реализуется в отношении как патологических, так и интактных клеток организма, тем самым способствуя развитию побочных эффектов у подавляющего большинства пациентов. При этом общий вклад традиционной химиотерапии в выживаемость пациента может оставаться невысоким, что дополнительно свидетельствует о недостаточной специфичности подобных лекарственных препаратов в отношении опухолей [2, 3].

Преодолеть неспецифическое действие цитостатиков на здоровые ткани организма, тем самым способствуя сглаживанию терапевтического профиля токсичных молекул с одновременным повышением эффективности терапии, становится возможным благодаря применению таргетной (адресной) доставки биологически активных веществ непосредственно к раковым клеткам. Путем нацеливания моноклональных антител (МкАТ) и антител (АТ) соответственно, эпитопами которых являются сверхэкспрессируемые специфические структуры опухолевой клетки, удалось реализовать данную стратегию онкотерапии, способствуя снижению тяжести побочных эффектов. Однако использование только МкАТ может быть недостаточным вследствие их меньшей, по сравнению с нецелевыми препаратами, летальности в отношении раковых клеток. Альтернативой, позволяющей сохранить специфическое действие в отношении патологических клеток, стали иммуноконъюгаты (ИК) – соединения, представляющие собой АТ, ковалентно связанные

(конъюгированные) с молекулой цитостатика. С момента разработки гибридной технологии в 1975 г. и по настоящий момент наблюдается стойкий интерес к данным лекарственным препаратам [3–5].

Эволюция препаратов конъюгат – моноклональное антитело

С зарождения идеи целенаправленного транспорта цитотоксических молекул прошло уже более века. Еще до создания гибридной технологии Ж. Кёлером и С. Мильштейном предпринимались попытки претворения в жизнь концепции «волшебной пули» П. Эрлиха путем ковалентного и нековалентного связывания различных противоопухолевых агентов с γ -глобулинами. С появлением технологии получения МкАТ, связывающих 1 эпитоп экспрессируемого опухолью антигена, вектор исследований сместился на получение высокоселективных препаратов, насчитывающих сегодня 3 поколения [4, 6, 7].

Первое поколение ИК представляет собой МкАТ, ковалентно связанные с молекулой цитостатика. На ранней стадии разработки таких препаратов считалась достаточной простая конъюгация посредством амидных связей противоопухолевых препаратов с АТ. Полученные АТ, содержащие до 8 молекул лекарственного средства, в большинстве своем были менее эффективны, чем неконъюгированные препараты. Опосредованное связывание АТ с цитостатиками через макромолекулярный носитель, линкер, приводило к образованию ИК с неудовлетворительной фармакокинетикой. Помимо этого, такие препараты вызывали иммунный ответ на АТ мышиноного происхождения. Использование гуманизированных АТ, на 95 % состоящих из иммуноглобулина (Ig) человека, и линкеров, расщепляющихся под действием лизосомальных ферментов опухоли, способствовало совокупному повышению эффективности и безопасности ИК. Примерами таких препаратов являются гемтузумаб озогамидин и инотузумаб озогамидин, в которых цитотоксическим компонентом является производное калихеамицина, расщепляющее двойную цепочку ДНК. Однако данные препараты имеют

ряд недостатков. Обнаружилось, что физиологические условия способствуют медленному гидролизу линкера, что приводит к нецелевой токсичности препарата. Помимо этого, вследствие гидрофобности производное калихеамицина вызывает агрегацию АТ, что способствует увеличению клиренса и иммуногенности препарата. ИК 1-го поколения характеризуется высокой неоднородностью продукта, поскольку его получение основано на беспорядочном присоединении через остатки лизина и цистеина, в результате чего АТ связывает разное количество цитостатика. Таким образом, препараты 1-го поколения не являются совершенными для таргетной онкотерапии и требуют дальнейшей модификации [4, 8–10].

Разработка 2-го поколения ИК была сопряжена с необходимостью оптимизации как таргетного компонента, так и цитотоксической полезной нагрузки с линкером. Использование изотипа МкАТ IgG1 продиктовано его благоприятными технологическими характеристиками, а также его высокой способностью нацеливаться на антиген опухолевых клеток, по сравнению с IgG4 препаратов 1-го поколения. В дополнение были обобщены требования к цитотоксическим веществам, такие как активность в субнанолярных концентрациях, приемлемая растворимость в воде и стабильность в водных растворах. Подходящими кандидатами на роль полезной нагрузки стали ауристатины и майтанзиноиды. Улучшение линкеров позволило добиться стабильности ИК в системном кровотоке. Однако используемые методы конъюгации по-прежнему не решили проблему гетерогенности и опосредованной высокой нагрузкой АТ агрегации препаратов [4, 11, 12].

Эксперименты с нагрузкой АТ позволили определить оптимальное значение параметра DAR (drug-to-antibody ratio – соотношение «лекарство к АТ») ИК. Выяснилось, что снижение лекарственной нагрузки с 8 до 4 молекул на АТ способствует улучшению переносимости препарата, и, хотя активность *in vitro* кратно снижалась, конъюгаты с 4 молекулами цитостатика демонстрируют более высокую экспозицию дозы *in vivo*, тем самым компенсируя сниженную активность. Благодаря внедрению технологии сайт-специфичной конъюгации были получены препараты 3-го поколения, характеризующиеся высокой степенью гомогенности. Для конъюгации предлагаются более эффективные вещества, в частности тубулины, ингибирующие полимеризацию микротрубочек, или пирролобензодиазепины, избирательно связывающиеся с малой бороздкой ДНК. Весьма перспективны вещества-иммуномодуляторы. Оптимизация линкеров ИК 3-го поколения заключается в повышении их гидрофильности, например включением полиэтиленгликолевых (ПЭГ) фрагментов. Подобным образом удастся «солюбилизовать»

относительно гидрофобную молекулу, что в итоге препятствует агрегации конъюгатов. В совокупности препараты 3-го поколения обладают более высокой противоопухолевой активностью, но меньшей токсичностью, тем самым способствуя повышению эффективности онкотерапии [4, 13, 14].

В настоящий момент фармацевтический рынок содержит 15 наименований препаратов-ИК для онкотерапии (табл. 1), 7 из них зарегистрированы в Российской Федерации.

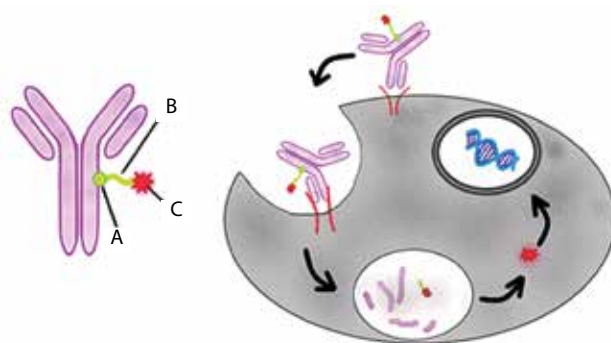
Общий дизайн иммуноконъюгатов

Строение ИК описывается как соединенный с МкАТ посредством химического линкера мощный цитостатический агент [4].

После введения препарата в кровоток таргетный компонент – АТ – распознает и связывается с поверхностными высокоэкспрессируемыми антигенами опухолевых клеток. После интернализации комплекс «конъюгат – рецептор» подвергается лизосомальной деструкции, тем самым высвобождая цитотоксическую полезную нагрузку в биоактивной форме внутри клетки [31]. Следовательно, подобная высокоорганизованная структура ИК требует учета ряда аспектов при фармацевтической разработке. Общий механизм действия данных препаратов представлен на рисунке.

Моноклональное антитело

Одной из первых проблем, возникших в процессе исторического развития данных препаратов, является их иммуногенность, связанная с использованием животного белка. В связи с этим были внедрены биоинженерные методы, давшие возможность получения АТ с аминокислотной последовательностью, на 90–95 % соответствующей человеческой. В дополнение к этому обогащалась методическая база, помогающая исследователям в определении иммуногенности будущих соединений. Так, в настоящее



Общее строение и механизм действия иммуноконъюгатов: А – сайт конъюгации линкера с антителом, В – линкер, С – цитостатический агент

The general structure and mechanism of action of immunoconjugates: А – site of conjugation of linker with antibody, В – linker, С – cytostatic agent

Таблица 1. Одобренные для применения препараты
Table 1. Approved drugs

МНН INN	Торговое наименование Trade name	Антитело Antibody	Линкер Linker	Цитостатик Cytostatic	Показания к применению Indications for use	Ссылка Reference
Гемтузумаб озогамин Gemtuzumab ozogamycin	Милотарг® Mylotarg	Анти-CD33 IgG4 Anti-CD33 IgG4	pH-чувствительный pH-sensitive	Калихеамицин Calicheamicin	CD33 ⁺ острый миелоидный лейкоз CD33 ⁺ acute myeloid leukemia	[15–17]
Брентуксимаб ведотин Brentuximab vedotin	Адцетрис® Adcetris	Анти-CD30 IgG1 Anti-CD30 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	CD30 ⁺ лимфомы (анapластическая крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина) CD30 ⁺ lymphomas (anaplastic large-cell lymphoma, Hodgkin lymphoma)	[15, 16, 18]
Трастузумаб эмтанзин Trastuzumab emtansine	Кадсила® Kadcyla	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Нерасщепляемый тиоэфир (SMCC) Non-cleavable thioester (SMCC)	Мертансин (DM1) Mertansine (DM1)	HER2 ⁺ рак молочной железы HER2 ⁺ breast cancer	[16, 19]
Инотузумаб озогамин Inotuzumab ozogamicin	Биспонса Besponsa	Анти-CD22 IgG4 Anti-CD22 IgG4	pH-чувствительный pH-sensitive	Калихеамицин Calicheamicin	CD22 ⁺ В-клеточный острый лимфобластный лейкоз CD22 ⁺ B-cell acute lymphoblastic leukemia	[15, 16, 20]
Моксетумомаб пасудотокс Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti	Анти-CD22 scFv Anti-CD22 scFv	Рекомбинантный пептидный Recombinant peptide	PE38 (фрагмент экзотоксина синегнойной палочки) PE38 (<i>Pseudomonas</i> exotoxin fragment)	CD22 ⁺ волосатоклеточный лейкоз CD22 ⁺ hairy cell leukemia	[16, 21]
Полатузумаб ведотин Polatuzumab vedotin	Полайви® Polivy	Анти-CD79b IgG1 Anti-CD79b IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma	[15, 16]
Энфортумаб ведотин Enfortumab vedotin	Падцев Онко Padcev Onko	Анти-нектин-4 IgG1 Anti-nectin-4 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Уротелиальный рак Urothelial cancer	[16, 22]
Трастузумаб дерукстекан Trastuzumab deruxtecan	Энхерту Enhertu	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Нерасщепляемый Non-cleavable	Дерукстекан Deruxtecan	HER2 ⁺ рак молочной железы и желудка HER2 ⁺ breast cancer and gastric cancer	[16, 23]
Сацигузумаб говитекан Sacituzumab govitecan	Trodelyv	Анти-Троп-2 IgG1 Anti-Trop-2 IgG1	pH-чувствительный pH-sensitive	SN-38 (говитекан) SN-38 (govitecan)	Трижды негативный рак молочной железы, уротелиальный рак Triple-negative breast cancer, urothelial cancer	[16, 24]

Окончание табл. 1
End of table 1

МНН INN	Торговое наименование Trade name	Антитело Antibody	Линкер Linker	Цитостатик Cytostatic	Показания к применению Indications for use	Ссылка Reference
Белантамаб мафодотин Belantamab mafodotin	Blenrep	Анти-BCMA IgG1 Anti-BCMA IgG1	Нерасщепляемый (малеимидокаприловый) Non-cleavable (maleidocaproyl)	Монометил ауристатин F (MMAE) Monomethyl auristatin F (MMAE)	Множественная миелома Multiple myeloma	[16, 25]
Цетуксимаб сароталокан Cetuximab sarotalocan	Akalux	Анти-EGFR IgG1 Anti-EGFR IgG1	Нерасщепляемый Non-cleavable	IR700 (кремний-содержащий фталоцианин) IR700 (silicon phthalocyanine)	Рак головы и шеи (фотодинамическая терапия) Head and neck cancer (photodynamic therapy)	[16, 26]
Лонкастуксимаб тесирин Loncastuximab tesirine	Zynlonta	Анти-CD19 IgG1 Anti-CD19 IgG1	ПЭГилированный пептидный PEGylated peptide	SG3199 (производное пирролобензодиазепина) SG3199 (pyrrolbenzodiazepine derivative)	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma	[16, 27]
Диситамаб Ведотин Disitamab Vedotin	Aidixi	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	HER2 ⁺ уротелиальный рак, HER2 ⁺ рак желудка/гастроэзофагеального перехода HER2 ⁺ urothelial cancer, HER2 ⁺ gastric cancer/gastro esophageal junction cancer	[16, 28]
Тизотумаб ведотин Tisotumab vedotin	Tivdak	Анти-TF-011 IgG1 Anti-TF-011 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Рецидивирующий или метастатический рак шейки матки Recurrent or metastatic cervical cancer	[16, 29]
Мирветуксимаб соравтансин Mirvetuximab soravtansine	Elahere	Анти-FRa IgG1 Anti-FRa IgG1	Расщепляемый (сульфинированный глутатион-чувствительный) Cleavable (sulfinated glutathione-sensitive)	Равтансин (DM4) Ravtansine (DM4)	FRa ⁺ платинорезистентный эпителиальный рак яичников, фаллопиевых труб, первичный рак брюшины FRa ⁺ platinum resistant epithelial ovarian, fallopian tube, primary peritoneal cancer	[16, 30]

Примечание. МНН — международное непатентованное наименование.

Note. INN — international nonproprietary name.

время в рамках межотраслевого консорциума создается единая база данных иммуногенности, призванная облегчить разработку подобных биотерапевтических препаратов [32, 33].

Другим аспектом оптимизации адресного компонента является выбор изотипа IgG. Наиболее распространенным изотипом, используемым при разработке ИК, является IgG1, специально подобранный исходя из эффекторных функций Fc-фрагмента АТ для реализации АТ-зависимой клеточной цитотоксичности данных препаратов. Однако подобный эффект может оказывать влияние на терапевтический индекс лекарственного препарата. Так, в случае трастузумаба эмтанзина описывается дозозависимая тромбоцитопения, опосредованная Fc-фрагментом АТ, связывающимся с рецепторами (FcR1a) мегакариоцитов, что в конечном итоге приводит к высвобождению цитостатика и угнетению пролиферации тромбоцитов [32, 34].

Изотип IgG2 имеет теоретический потенциал для большей цитостатической нагрузки, обусловленной четырьмя дисульфидными мостиками как сайтами конъюгации, против двух у IgG1. Однако IgG2 менее эффективен в способности индуцировать АТ-зависимую клеточную цитотоксичность. Изотип IgG3 имеет неудовлетворительные фармакокинетические показатели, обусловленные ускоренным протеолизом удлиненной шарнирной области. АТ IgG4, используемые для создания ранних клинически одобренных ИК, в настоящее время являются перспективными для получения гибридных биспецифичных соединений, позволяющих связывать сразу 2 антигена опухолевой клетки, препятствуя развитию резистентности к терапии. Помимо этого, использование IgG4 целесообразно, когда Fc-опосредованные эффекты нежелательны, например, при нацеливании на белки PD-1 при конструировании ингибиторов контрольных точек иммунитета. Таким образом, выбор оптимального изотипа МкАТ первоочередно определяется необходимостью эффекта Fc-фрагмента [11, 32].

Линкер

Молекулярная структура линкера, ковалентно связывающего цитотоксическую полезную нагрузку с АТ, является критическим параметром, определяющим фармакокинетические и фармакодинамические свойства будущего ИК. Прежде всего линкер должен обладать достаточной стабильностью в плазме крови для минимизации системной токсичности, опосредованной преждевременной деструкцией конъюгата. В то же время линкер должен быстро расщепляться и высвобождать цитостатик, как только препарат был захвачен опухолевой клеткой. В зависимости от метаболического процесса в клетках

в большинстве ИК используются 2 типа линкеров: нерасщепляемые и расщепляемые [4, 31].

Нерасщепляемые линкеры, содержащие тиоэфирную или малеимидокаприловую группы, инертны к химическим или ферментативным средам *in vivo*; ИК при попадании в лизосому высвобождает лекарственное средство, ковалентно связанное через линкер с аминокислотным остатком метаболизированного АТ. Такой линкер, как правило, препятствует возникновению так называемого байстендорного эффекта (bystander effect), при котором лекарственное средство диффундирует из целевой клетки и убивает соседние, что может быть полезно в терапии гематологических видов рака [4, 35].

Расщепляемые линкеры используют биохимическое различие между системным кровотоком и микроокружением опухолевых клеток с их клеточным метаболизмом. Подобные линкеры дополнительно можно разделить на химически и ферментативно-расщепляемые. Химически расщепляемые линкеры высвобождают цитостатическую полезную нагрузку в ответ на снижение pH (кислотно-чувствительные) или на нуклеофильную атаку тиолов, таких как глутатион. Некоторые из одобренных ИК содержат линкеры на основе пептидов, чувствительных к лизосомальной протеазе — катепсину В. Кроме того, обнаружилось, что подобные линкеры отличаются высокой стабильностью в системном кровотоке благодаря наличию плазменных ингибиторов протеаз [4, 35, 36].

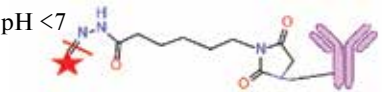
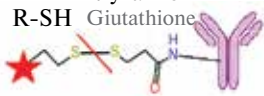
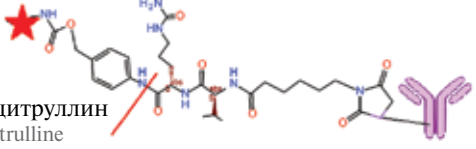
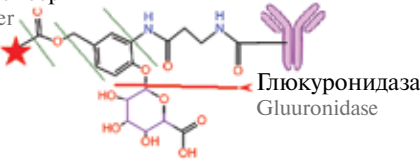
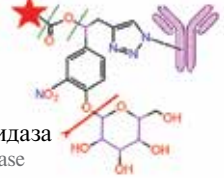
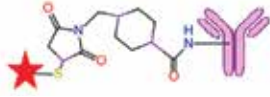
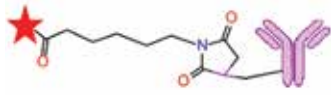
В дополнение к программируемой лабильности линкер должен обладать оптимальной гидрофильностью, препятствующей агрегации АТ. Данная проблема решается путем введения в структуру линкеров сульфонатных, диэфирных и ПЭГилированных групп [31].

Основные виды линкеров ИК представлены в табл. 2.

Цитотоксическая полезная нагрузка

Природа конъюгируемого цитотоксического агента имеет большое значение, поскольку механизм его действия будет определять общую стратегию терапии. Ранние разработки ИК, содержащие традиционные химиотерапевтические средства, не обладали достаточной эффективностью, поскольку их полезные нагрузки были недостаточно мощными. Ограниченная локализация АТ на опухолевой клетке, низкая экспрессия антигена и неэффективная интернализация могут привести к очень низким концентрациям лекарственного вещества в клетке. Следовательно, полезная нагрузка должна быть чрезвычайно токсичной, то есть с IC_{50} , приближающейся к субнанолярным значениям. Помимо этого подобное вещество должно быть небольшим по размеру, обладать приемлемой растворимостью в водных буферных

Таблица 2. Основные линкеры иммуноконъюгатов
Table 2. Main linkers of immunoconjugates

Группа линкеров Group of linkers	Подгруппа Subgroup	Пример структуры Example of structure	Ссылка Reference
Расщепляемые Cleavable	рН-чувствительные линкеры pH-sensitive linkers	pH < 7 	[15, 37]
	Восстанавливаемые линкеры Reducible linkers	Глутатион R-SH Glutathione 	[15, 38]
	Пептидные линкеры Peptide linkers	Валин-цитруллин Valine-Citrulline 	[15, 39]
	Расщепляемые глюкуронидазой линкеры Glucuronidase cleavable linkers	Распадаемый спейсер Disintegrating spacer 	[15]
	Расщепляемые галактозидазой линкеры Galactosidase cleavable linkers	 Галактозидаза Galactosidase	[15, 40]
Нерасщепляемые Non-cleavable	Тиоэфирные линкеры Thioether linkers		[15, 41]
	Малеимидакаприловые линкеры Maleimidocaproyl linkers		[15, 41]

растворах для облегчения конъюгации с АТ, а также быть достаточно стабильным в плазме крови, учитывая длительный период полувыведения препаратов на основе МкАТ [42, 43]. Различные варианты полезной нагрузки АТ представлены в табл. 3.

Методы конъюгации

Немаловажным аспектом, определяющим конечную структуру и биофармацевтические свойства препарата, является способ конъюгации полезной нагрузки с МкАТ. В зависимости от выбранного метода реакционная смесь содержит ИК с переменным значением DAR. Поскольку полезная нагрузка часто имеет гидрофобную природу, повышение DAR может снижать стабильность препарата, но улучшать его

эффективность *in vitro*. При этом подобный ИК будет обладать более низким значением периода полувыведения, для чего придется применять более гидрофильные линкеры [31, 45]. Таким образом, общая стратегия конъюгирования подбирается на основе свойств цитотоксической нагрузки.

Ранние методы конъюгации основывались на реакционной способности нативных аминокислот для связывания лекарств с АТ. Первичный амин бокового радикала лизина легко вступает в реакцию с активированными группами линкерных фрагментов, обеспечивая лизинспецифическую конъюгацию. При всем том IgG содержат избыток подобных сайтов конъюгации, приводящих к значительной гетерогенности продукта. Так, отмечается практически 50-про-

Таблица 3. Лекарственные вещества, выступающие в качестве полезной нагрузки [4, 44]
Table 3. Drugs acting as a payload [4, 44]

Группа веществ Group of drugs	Механизм действия Mechanism of action	Примеры Examples
Вещества, наце- ленные на микро- трубочки Microtubules-targeting drugs	Нарушают полимеризацию тубулина, тем самым блоки- руя митотическое деление быстрорастущих опухолевых клеток. К подобной группе также относят ингибиторы кинезина, участвующего в непосредственном образова- нии веретен деления Disrupt tubulin polymerization, thereby blocking mitotic division of rapidly growing tumor cells. This group also includes inhibitors of kinesin, which is involved in the direct formation of division spindles	Майтанзиноиды Maytansinoids
		Ауристатины Auristatins
		Эрибулин Eribulin
		Тубулизины Tubulysins
		Криптофицины Cryptophycins
Вещества, наце- ленные на ДНК DNA-targeting drugs	Воздействуют на полный клеточный цикл опухолевой клетки путем расщепления двойной цепочки ДНК (эне- диины), ингибирования топоизомеразы (экзатеканы), а также алкилирования (PBD, дуокармицины) Affect the complete cell cycle of the tumor cell by cleaving the DNA double strand (enediynes), inhibiting topoisomerase (exatecans), and alkylating (PBD, duocarmycins)	Энедиины (каликхеамицины, унциала- мицины) Enediynes (calicheamicins, uncialamycins)
		Экзатеканы Exatecans
		Пирролобензодиазепины (PBD) Pyrrolobenzodiazepines (PBD)
		Дуокармицины Duocarmycins
Вещества, наце- ленные на РНК RNA-targeting drugs	Ингибируют сплайсинг РНК (тайланстатины) или про- цесс транскрипции (аматоксины). Ожидается, что ис- пользование данных веществ позволит преодолеть про- блему резистентности к терапии антимитотическими агентами ряда медленно пролиферирующих опухолей Inhibit RNA splicing (thailanstatins) or the transcription process (amatoxins). The use of these drugs is expected to overcome the problem of resistance to therapy with antimitotic agents in a number of slowly proliferating tumors	Тайланстатины Thailanstatins
		Аматоксины Amatoxins
Иммуотропные вещества Immunotropic drugs	Стимулируют врожденный иммунный ответ против опухоли и способствуют мобилизации опухолеспеци- фичных иммунокомпетентных клеток. Stimulate anti-tumor innate immune response and promote mobilization of tumor-specific immunocompetent cells	Агонисты Toll-подобных рецепторов Toll-like receptor agonists
		Агонисты сигнального пути STING Agonists of the STING pathway

центное содержание неконъюгированных АТ в пре-
парате Милотарг® (гемтузумаб озогамидин), которые
могут конкурировать с конъюгированными за погло-
щение клетками-мишенями. Помимо этого, такая
стохастическая конъюгация может затрагивать обла-
сти, определяющие комплементарность АТ (comple-
mentarity-determining regions, CDR), что в итоге может
снижать ее авидность [46–48].

Другая стратегия конъюгации основана на реакци-
онной способности тиольной группы предварительно
восстановленных цистеинов. АТ изотипов IgG1 и G4
имеют 4 межцепочные дисульфидные связи, которые
легче восстанавливаются дитиотреитолом, по сравне-
нию с аналогичными внутрицепочными, а значит, чис-

ло потенциальных сайтов конъюгации кратно сокра-
щается. Подобный метод способствует улучшению
гомогенности получаемого препарата и является наи-
более часто используемым. Однако восстановление
межцепочной дисульфидной связи может разрушить
целостность АТ, из-за чего становится необходимым
конъюгировать уже тяжелые цепи между собой с по-
мощью цистеинсвязывающих групп [4, 46, 49, 50].

Достижения генной инженерии сделали возмож-
ным сайт-специфичную конъюгацию цитостатиков
с АТ. Данный способ реализуется посредством констру-
ирования АТ со специально введенными группами,
такими как цистеин, глутамин. Так же используются
неприродные аминокислоты (p-ацетилфенилаланин)

Таблица 4. Сравнительная характеристика некоторых методов конъюгации

Table 4. Comparative characteristics of some conjugation methods

Группа методов Group of methods	Конъюгация Conjugation	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Ссылка Reference
Стохастическая конъюгация Stochastic conjugation	По остаткам лизина Conjugation by lysine residues	Простота и быстрота метода Simplicity and rapidity of the method	Высокая гетерогенность конъюгатов High heterogeneity of conjugates Низкий терапевтический индекс Low therapeutic index Неконтролируемый процесс Uncontrolled process	[4, 53]
	По остаткам восстановленных цистеинов Conjugation by reduced cysteine residues	Сниженная гетерогенность смеси Reduced heterogeneity of the mixture	Структура антитела может быть нарушена The antibody structure may be broken Возможность преждевременного высвобождения нагрузки при использовании малеимидных линкеров Potential for premature payload release when using maleimide linkers	[4, 46, 54]
Сайт-специфичная конъюгация Site-specific conjugation	По сконструированным цистеинам (технология ThioMab) Conjugation by engineered cysteines (ThioMab technology)	Высокая эффективность конъюгации (~90 %) High efficiency of conjugation (~90 %) Высокая гомогенность конъюгатов High homogeneity of conjugates Масштабируемый процесс Scalable process	Потенциальная нестабильность <i>in vivo</i> Potential instability <i>in vivo</i>	[4, 50]
	По сконструированным неприродным аминокислотам Conjugation by engineered unnatural amino acids	Высокая гомогенность конъюгатов High homogeneity of conjugates Высокая эффективность конъюгации High efficiency of conjugation Процесс конъюгации масштабируемый The conjugation process is scalable	Конъюгация по сайту p-ацетилфенилаланина происходит при pH ~5, что исключает конъюгацию ацидофобных веществ Conjugation at the p-acetylphenylalanine site occurs at pH ~5, which precludes conjugation of acidophobic drugs Потенциальная иммуногенность Potential immunogenicity Дополнительно требуется специфичная к ненатуральным аминокислотам эффективной транспортной РНК-синтазы An efficient transport RNA synthetase specific for non-natural amino acids is required	[4, 14, 55]
	Ферментассоциированное лигирование Enzyme-assisted ligation	DAR = 2–4 Высокая эффективность конъюгации High efficiency of conjugation	Необходима аминокислотная последовательность распознавания для фермента, что сопряжено с риском иммуногенности An amino acid recognition sequence for the enzyme is required, which carries a risk of immunogenicity	[4, 14]

или короткие пептидные метки. В дальнейшем осуществляется химическая или химико-энзиматическая конъюгация с получением более гомогенного продукта. Несмотря на улучшенное распределение DAR, стратегия имеет ряд ограничений. Прежде всего введение неприродных аминокислот в структуру АТ способно повысить риск нежелательных реакций со стороны иммунной системы пациента. Нарботка подобных ИК в терапевтических целях требует отработанной технологии инженерии клеточных линий — продуцентов модифицированных МкАТ [51, 52]. Следовательно, значительно усложняются требо-

вания к материально-технической базе организаций, занятых разработкой и промышленным производством подобных препаратов.

Заключение

Достижения научно-технического прогресса сделали возможным доставку биологически активных веществ непосредственно к опухолевым клеткам, минимизируя токсический эффект в отношении здоровых тканей. Как препараты таргетной онкотерапии ИК в настоящее время все еще находятся на этапе своего развития, несмотря на его более чем полувековую

историю. Их число и перспективы применения растут, десятки подобных соединений уже получили разрешение на медицинское применение, другие находятся в разработке, на доклинических и клинических исследованиях. Вместе с тем фармацевтическая разработка подобных препаратов должна учи-

тывать множество исходных данных: начиная от целевого антигена и заканчивая биотехнологическими аспектами производства. Несомненно, что дальнейшие исследования в подборе векторных компонентов, химии линкеров и методов конъюгации приблизят человека к получению «волшебных пуль» Эрлиха.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. World Health Organization / Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Available at: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Accessed: 17.02.2024.
2. Pearce A., Haas M., Viney R. et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS One* 2017;12(10):e0184360. DOI: 10.1371/journal.pone
3. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* 2019;54(2):407–19. DOI: 10.3892/ijo.2018.4661
4. Fu Z., Li S., Han S. et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):93. DOI: 10.1038/s41392-022-00947-7
5. Shefet-Carasso L., Benhar I. Antibody-targeted drugs and drug resistance — challenges and solutions. *Drug Resist Updat* 2015;18:36–46. DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.001
6. Mathe G., Tran Ba Lo., Bernard J. Effet sur la leucémie 1210 de la souris d’une combinaison par diazotation d’A-méthoptérine et de gamma-globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958;246(10):1626–8. Mathe G., Tran Ba Lo., Bernard J. Effect on mouse leukemia 1210 of a combination by diazo-reaction of amethopterin and gamma-globulins from hamsters inoculated with such leukemia by heterografts. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958;246(10):1626–8. (In French).
7. Ghose T., Nigam S.P. Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer* 1972;29(5):1398–400. DOI: 10.1002/1097-0142(197205)29:5<1398::aid-cnrcr280290542>3.0.co;2-d
8. Chari R.V. Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;31(1-2):89–104. DOI: 10.1016/s0169-409x(97)00095-1
9. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):237–44. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244 Budchanov Yu.I. Monoclonal antibodies: From development to clinical application. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2016;9(3):237–44. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244
10. Walker S., Landovitz R., Ding W.D. et al. Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4608–12. DOI: 10.1073/pnas.89.10.4608
11. Vukovic N., van Elsas A., Verbeek J.S., Zaiss D.M.W. Isotype selection for antibody-based cancer therapy. *Clin Exp Immunol* 2021;203(3):351–65. DOI:10.1111/cei.13545
12. Chari R.V. Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 2008;41(1):98–107. DOI: 10.1021/ar700108g
13. Hamblett K.J., Senter P.D., Chace D.F. et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):7063–70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0789
14. Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(5):315–37. DOI: 10.1038/nrd.2016.268
15. Sheyi R., de la Torre B.G., Albericio F. Linkers: An assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate. *Pharmaceutics* 2022;14(2):396. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020396
16. Ruan D.Y., Wu H.X., Meng Q., Xu R.H. Development of antibody-drug conjugates in cancer: Overview and prospects. *Cancer Commun (Lond)* 2024;44(1):3–22. DOI: 10.1002/cac2.12517
17. Swaminathan M., Cortes J.E. Update on the role of gemtuzumab-ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2023;14:20406207231154708. DOI: 10.1177/20406207231154708
18. Lai C., Kandahari A.M., Ujjani C. The evolving role of brentuximab vedotin in classical hodgkin lymphoma. *Blood Lymphat Cancer* 2019;9:63–71. DOI: 10.2147/BLCTT.S231821
19. Ferraro E., Drago J.Z., Modi S. Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: State of the art and future directions. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):84. DOI: 10.1186/s13058-021-01459-y
20. Cox E., Wade R., Peron M. et al. the clinical and cost effectiveness of inotuzumab ozogamicin for the treatment of adult relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: An evidence review group evaluation of a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics* 2019;37(9):1081–91. DOI: 10.1007/s40273-019-00779-4
21. Lin A.Y., Dinner S.N. Moxetumomab pasudotox for hairy cell leukemia: Preclinical development to FDA approval. *Blood Adv* 2019;3(19):2905–10. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000507
22. Wong R.L., Yu E.Y. Enfortumab vedotin in the treatment of urothelial cancers and beyond. *Future Oncol* 2022;18(27):3067–84. DOI: 10.2217/fon-2022-0328
23. Indini A., Rijavec E., Grossi F. Trastuzumab deruxtecan: Changing the destiny of HER2 expressing solid tumors. *Int J Mol Sci* 2021;22(9):4774. DOI: 10.3390/ijms22094774
24. Pavone G., Motta L., Martorana F. et al. A new kid on the block: Sacituzumab govitecan for the treatment of breast cancer and other solid tumors. *Molecules* 2021;26(23):7294. DOI: 10.3390/molecules26237294
25. Lassiter G., Bergeron C., Guedry R. et al. Belantamab mafodotin to treat multiple myeloma: A comprehensive review of disease, drug efficacy and side effects. *Curr Oncol* 2021;28(1):640–60. DOI: 10.3390/curroncol28010063
26. Gomes-da-Silva L.C., Kepp O., Kroemer G. Regulatory approval of photodynamic therapy: Photodynamic therapy that induces immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2020;9(1):1841393. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1841393
27. Lee A. Loncastumab tesirine: First approval. *Drugs* 2021;81(10):1229–33. DOI: 10.1007/s40265-021-01550-w
28. Shi F., Liu Y., Zhou X. et al. Disitamab vedotin: A novel antibody-drug conjugates for cancer therapy.

- Drug Deliv 2022;29(1):1335–44.
DOI: 10.1080/10717544.2022.2069883
29. Markham A. Tisotumab vedotin: First approval. *Drugs* 2021;81(18):2141–7. DOI: 10.1007/s40265-021-01633-8
 30. Heo Y.A. Mirvetuximab soravtansine: First approval. *Drugs* 2023;83(3):265–73. DOI: 10.1007/s40265-023-01834-3
 31. Tsuchikama K., An Z. Antibody-drug conjugates: Recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* 2018;9(1):33–46. DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0
 32. Lucas A.T., Moody A., Schorzman A.N., Zamboni W.C. Importance and considerations of antibody engineering in antibody-drug conjugates development from a clinical pharmacologist's perspective. *Antibodies (Basel)* 2021;10(3):30. DOI: 10.3390/antib10030030
 33. Tourdot S., Baltrunkonis D., Denies S. et al. Proceedings of the 14th European immunogenicity platform open symposium on immunogenicity of biopharmaceuticals. *MAbs* 2024;16(1):2324801. DOI: 10.1080/19420862.2024.2324801
 34. Uppal H., Doudement E., Mahapatra K. et al. Potential mechanisms for thrombocytopenia development with trastuzumab emtansine (T-DM1). *Clin Cancer Res* 2015;21(1):123–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2093
 35. Bargh J.D., Isidro-Llobet A., Parker J.S., Spring D.R. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev* 2019;48(16):4361–74. DOI: 10.1039/c8cs00676h
 36. Dubowchik G.M., Firestone R.A., Padilla L. et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific *in vitro* anticancer activity. *Bioconj Chem* 2002;13(4):855–69. DOI: 10.1021/bc025536j
 37. Willner D., Trail P.A., Hofstead S.J. et al. (6-Maleimidocaproyl) hydrazone of doxorubicin – A new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin. *Bioconj Chem* 1993;4(6):521–7. DOI: 10.1021/bc00024a015
 38. Kellogg B.A., Garrett L., Kovtun Y. et al. Disulfide-linked antibody-maytansinoid conjugates: Optimization of *in vivo* activity by varying the steric hindrance at carbon atoms adjacent to the disulfide linkage. *Bioconj Chem* 2011;22(4):717–27. DOI: 10.1021/bc100480a
 39. Caculitan N.G., Dela Cruz Chuh J., Ma Y. et al. Cathepsin B is dispensable for cellular processing of cathepsin B-cleavable antibody-drug conjugates. *Cancer Res* 2017;77(24):7027–37. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2391
 40. Kolodych S., Michel C., Delacroix S. et al. Development and evaluation of β -galactosidase-sensitive antibody-drug conjugates. *Eur J Med Chem* 2017;142:376–82. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.008
 41. Lu J., Jiang F., Lu A., Zhang G. Linkers having a crucial role in antibody-drug conjugates. *Int J Mol Sci* 2016;17(4):561. DOI: 10.3390/ijms17040561
 42. Conilh L., Sadilkova L., Viricel W., Dumontet C. Payload diversification: A key step in the development of antibody-drug conjugates. *J Hematol Oncol* 2023;16(1):3. DOI: 10.1186/s13045-022-01397-y
 43. Anderl J., Faulstich H., Hechler T., Kulke M. Antibody-drug conjugate payloads. *Methods Mol Biol* 2013;1045:51–70. DOI: 10.1007/978-1-62703-541-5_4
 44. Wang Z., Li H., Gou L. et al. Antibody-drug conjugates: Recent advances in payloads. *Acta Pharm Sin B* 2023;13(10):4025–59. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.06.015
 45. Buecheler J.W., Winzer M., Weber C., Gieseler H. Alteration of physicochemical properties for antibody-drug conjugates and their impact on stability. *J Pharm Sci* 2020;109(1):161–8. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.08.006
 46. Goulet D.R., Atkins W.M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *J Pharm Sci* 2020;109(1):74–103. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.05.031
 47. Chio T.I., Bane S.L. Click chemistry conjugations. *Methods Mol Biol* 2020;2078:83–97. DOI: 10.1007/978-1-4939-9929-3_6
 48. Sadiki A., Vaidya S.R., Abdollahi M. et al. Site-specific conjugation of native antibody. *Antib Ther* 2020;3(4):271–84. DOI: 10.1093/abt/tbaa027
 49. Hagihara Y., Saerens D. Engineering disulfide bonds within an antibody. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844(11):2016–23. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.07.005
 50. Gordon M.R., Canakci M., Li L. et al. Field guide to challenges and opportunities in antibody-drug conjugates for chemists. *Bioconj Chem* 2015;26(11):2198–215. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00399
 51. Zhou Q. Site-Specific Antibody Conjugation with Payloads beyond Cytotoxins. *Molecules* 2023;28(3):917. DOI: 10.3390/molecules28030917
 52. Hallam T.J., Smider V.V. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med Chem* 2014;6(11):1309–24. DOI: 10.4155/fmc.14.79
 53. Kostova V., Désos P., Starck J.B., Kotschy A. The chemistry behind ADCs. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14(5):442. DOI: 10.3390/ph14050442
 54. Behrens C.R., Ha E.H., Chinn L.L. et al. Antibody-drug conjugates (ADCs) Derived from interchain cysteine cross-linking demonstrate improved homogeneity and other pharmacological properties over conventional heterogeneous ADCs. *Mol Pharm* 2015;12(11):3986–98. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00432
 55. Hallam T.J., Wold E., Wahl A., Smider V.V. Antibody conjugates with unnatural amino acids. *Mol Pharm* 2015;12(6):1848–62. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00082

Благодарность. Автор выражает благодарность за помощь в написании данной обзорной статьи сотрудникам лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России А.П. Колпаксиди и М.В. Дмитриевой.

Gratitude. The author expresses gratitude for the help in writing this review article to the staff of the Laboratory for the Development of dosage forms of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia Alexander P. Kolpaksidi and Maria V. Dmitrieva.

ORCID автора / ORCID of author

С.Д. Щеглов / S.D. Shceglov: <https://orcid.org/0009-0002-0777-0422>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № 123021500025-1 «Разработка нового класса противоопухолевых препаратов, основанных на таргетной стимуляции сигнального пути STING в злокачественных новообразованиях».

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No 123021500025-1 “Development of a new class of antitumor drugs based on targeting stimulation of the STING signaling pathway in malignant neoplasms”.

Статья поступила: 11.03.2024. **Принята в печать:** 22.04.2024.

Article received: 11.03.2024. **Accepted for publication:** 22.04.2024.