

抗体偶联核酸药物的研究进展

孙 瑶, 刘 煜*

中国药科大学, 生命科学与技术学院, 江苏 南京

收稿日期: 2024年2月14日; 录用日期: 2024年3月13日; 发布日期: 2024年3月21日

摘 要

核酸药物具有不可替代优越性和应用局限性, 基于抗体的递送系统已成为一种有效的治疗策略, 因此将抗体和寡核苷酸结合以有效融合前者的组织特异性优势和后者的靶点特异性优势已成为新的发展趋势。本文旨在论述制备抗体偶联核酸药物的关键技术及各自优缺点, 为抗体偶联核酸药物的发展提供研究思路。

关键词

抗体偶联核酸药物, 组织特异性, 靶向递送, 制备技术

Research Progress of Antibody-Oligonucleotide Conjugates

Yao Sun, Yu Liu*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Feb. 14th, 2024; accepted: Mar. 13th, 2024; published: Mar. 21st, 2024

Abstract

Nucleic acid drugs have irreplaceable superiority and application limitations, and antibody has become an effective therapeutic strategy as the basis of delivery system. Therefore, the combination of antibody and oligonucleotide to effectively fuse the tissue-specific advantages of the former and the target-specific advantages of the latter has become a new development trend. This review aims to discuss the key techniques of preparing antibody-oligonucleotide conjugates, their benefits and drawbacks, and provide research ideas for the development of antibody-oligonucleotide conjugates.

*通讯作者。

Keywords

Antibody-Oligonucleotide Conjugates, Tissue-Specific, Targeted Delivery, Preparation Techniques

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 核酸药物的研究现状

核酸作为重要的遗传物质, 处于分子生物学中心法则的上游。与在蛋白层面发挥药理作用的传统小分子化学药和抗体类药物不同, 核酸药物(nucleic acid drug)高度依赖碱基互补配对原则参与基因转录和翻译过程, 高效特异性地调控致病基因或 RNA [1], 具有设计方便、特异性强、不易产生耐药、利于快速反应等特点, 可用于治疗病毒感染性疾病、心血管系统疾病、代谢类疾病以及肿瘤等多种疾病[2]。核酸药物通常由天然或修饰的脱氧核糖核苷或核糖核苷聚合而成, 主要包括 DNA、RNA、反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)和核酸适配体(nucleic acid aptamer)等, 其中 RNA 包括小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、小核糖核酸(microRNA, miRNA)、短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)、信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、自扩增 RNA (self-amplifying RNA, saRNA)和环状 RNA (circular RNA, circRNA)等多种类型[3]。

Table 1. Marketed nucleic acid drugs

表 1. 已上市核酸药物

核酸类型	药物名称	靶点	适应症	递送系统	研发公司	获批时间
ASO	Amondys 45	Exon 51 skipping	杜氏肌营养不良症	NA	Sarepta	2021
	Viltepso	Exon 51 skipping	杜氏肌营养不良症	NA	日本新药	2020
	Waylivra	ApoC3	家族性乳糜微粒血症综合征	NA	Ionis	2019
	Vyondys 53	Exon 51 skipping	杜氏肌营养不良症	NA	Sarepta	2019
	Tegsedi	TTR	淀粉样变性的多发性神经病	NA	Ionis	2018
	Spinraza	SMN2	脊髓肌肉萎缩	NA	Ionis、Biogen	2016
	Exondys 51	Exon 51 skipping	杜氏肌营养不良症	NA	Sarepta	2016
	Kynamro	ApoB-100	高胆固醇血症	NA	Ionis	2013 (已退市)
	Vitravene	CMV IE2	巨细胞病毒视网膜炎	NA	Ionis	1998 (已退市)
siRNA	Amvuttra	TTR	淀粉样变性的多发性神经病	GalNAc	Alnylam	2022
	Oxlumo	HAO 1	原发性 1 型高草酸尿症	GalNAc	Alnylam	2020
	Leqvio	PCSK9	高胆固醇血症	GalNAc	Alnylam、Novartis	2020
	Givlaari	ALAS1	急性肝卟啉病	GalNAc	Alnylam	2019
	Onpattro	TTR	家族性淀粉样多发性神经病变	LNP	Alnylam	2018
适配体	Macugen	VEGF165	新生血管性年龄相关性黄斑变性	NA	Pfizer、Eyeteach	2004 (已退市)

自 1998 年第 1 个核酸类药物 Vitravene 被美国 FDA 批准上市后, 多个核酸药物相继进入临床试验, 但被批准上市的少之又少。在时隔 15 年之后, 第 3 个也是首个全身给药的核酸药物 Kynamro 于 2013 年 1 月 29 日被美国 FDA 批准上市, 这掀起了新一轮核酸药物的研究热潮[2]。截至 2023 年 7 月, 全球上市的核酸药物有 9 款 ASO 药物、5 款 siRNA 药物和 1 款核酸适配体, 此外还有 2 款 mRNA 疫苗。这些核酸药物除了靶向肝脏, 还可以应用于眼睛、大脑、肌肉和淋巴系统等, 适应症包括有抗病毒性视网膜炎、家族性高血脂、脊髓型肌萎缩症、杜氏肌肉营养不良、淀粉样变性引起的多发性神经系统疾病、高乳糜微粒血症、急性肝叶淋病、高草酸盐尿症、新冠疫苗等[4] [5]。目前全球已上市的核酸药物具体情况如表 1 所示。

目前已上市和进入临床的核酸药物所使用的递送载体主要有纳米递送载体(NA)、脂质纳米颗粒(Lipid Nanoparticle, LNP)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、有机聚合物、金属纳米颗粒、细胞穿透肽(CPPs)等。其中较为典型的纳米药物递送系统(NDDS)为可控的靶向给药提供了一种很有前景的策略[6]。NDDS 可通过有机或无机材料制备, 如脂质、聚合物和金颗粒等[7], 其具有靶向递送肿瘤部位、血浆循环延长、药物有效载量大、制备过程中药物释放模式可控等优点[8] [9]。虽然这些传统递送载体已被证明有很大的应用优越性, 但也存在生物稳定性差、内吞体捕获导致低效力、生物毒性和免疫原性等局限性[10], 限制了临床应用的发展。近年来, 以抗体为基础开发的多种药物给药系统(DDSs)已成为一种有效的治疗策略, 例如抗体融合蛋白(antibody fusion protein)、抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)、双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)、抗体偶联寡核苷酸(Antibody oligonucleotide conjugates, AOC), 能够提高生物利用度、给药方便性、降低毒性, 从而实现在癌症治疗中增强患者依从性、调节肿瘤微环境进行联合治疗的优越性[11]。其中, 最为经典的便是抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC), 是通过一个化学链将具有生物活性的小分子药物连接到单克隆抗体的特定部位, 抗体作为递送载体将小分子药物靶向运输到靶标细胞中。ADC 药物通过优化抗体的稳定性、毒性和药代动力学半衰期, 设定合适的药物抗体比, 获得良好的治疗指标。ADC 药物与肿瘤细胞表面表达的抗原结合后, 通过受体介导的内吞作用进入细胞, 释放有效载荷杀死细胞, 其不仅具有化疗的疗效, 而且还能激活免疫效应细胞的 ADCC 和 ADCP 机制[12]。目前已有 11 种具有不同靶点的 ADC 药物已被批准上市, 其适应症包括血液学肿瘤和实体肿瘤, 最常见的不良反应包括周围神经病变、血液学毒性和肝毒性等[11]。

ADC 药物在过去十年中发展迅猛, 尽管其能够通过抗体实现高度靶向性, 但由于其携带的是非选择性有效载荷所以仍会导致非特异性毒性。假如能够使用更精确的有效载荷, 协同组合可能会产生更具靶向选择性和更安全的抗体偶联药物。核酸类药物便有极大潜力成为这类精确的有效载荷, 因为它们能够通过归巢特定基因来阻止蛋白质的产生。相较而言, 核酸药物虽具有选择性, 但是血清稳定性差、膜通透性低、缺乏组织选择性, 抗体则具有更长的半衰期以及良好的靶向递送特性, 因此抗体-寡核苷酸偶联物(AOC)能够将核酸药物的高精度选择性与抗体的靶向递送性相结合, 协同发挥两种技术的优势[13]。

2. 抗体偶联核酸药物的发展现状

2.1. 化学反应偶联抗体和寡核苷酸

“抗体作为递送载体的想法是很自然的, 我们确实从 ADC 中吸取了一些经验, 无论是分子设计方面还是生产制造方面”, Tallac Therapeutics 公司的首席执行官洪万说, 该公司致力于研发抗体偶联寡核苷酸(AOC)药物。ADC 药物多年来的发展确实促进了 AOC 药物的兴起, 因而目前最为成熟的偶联方法是类似于 ADC 药物利用化学反应的直接偶联[14]。AOC 的结构与 ADC 相似, 主要由三部分构成: 发挥组织靶向作用的载体、连接子(linker)、作为有效载荷(payload)的小核酸。AOC 通过连接子和偶联技术将

抗体和小核酸有效结合在一起, 针对抗体靶向的靶标细胞和寡核苷酸特异性沉默的目标基因实现联合靶向治疗, 同时解决不可靶向和小核酸药物的递送问题。成功获得这种通过直接偶联得到的 AOC 药物关键在于三个方面: 有效载荷的效力、连接子的稳定性、偶联抗体和有效载荷的偶联技术[15]。

2.1.1. 有效载荷、连接子和偶联技术

ADC 药物中的有效载荷大多是高细胞毒性药物, 比如 MMAE/MMAF、卡奇霉素、DM1/DM4、SN38/Dxd 等, 选择标准包括稳定性、溶解度和结合力, 并且希望有效载荷在到达靶标部位之前在体循环中能保持高度稳定[16]。对于 AOC 药物来说, 其有效载荷也就是寡核苷酸可以是单链或双链, 可以包括一个或多个修饰过的核苷酸(例如 2'-o-甲基糖修饰、嘌呤或嘧啶修饰)或者一个或多个经过修饰的核苷酸间连接产物。合理修饰过的寡核苷酸能够具有核酸酶抗性, 能够减少毒性、改善细胞摄取效率和核内体逃逸, 能够尽量减少 TLR 刺激或者避开模式识别受体。寡核苷酸的修饰常用的有 2'-修饰的核苷, 指在 2'位置上有糖部分修饰的核苷。比如 2'-4'双环核苷, 其中糖的 2'和 4'位置被桥接; 非双环 2'修饰的核苷, 其中糖部分的 2'位置被取代; 2'修饰核苷的非限制性例子包括: 2'脱氧, 2'-氟(2'-F), 2'-o-甲基(2'-O-Me), 2'-o-甲氧基乙基(2'-O-AP)等[17]。

连接子是将有效载荷和抗体连接起来的重要部件, 它的化学性质和偶联位点对于药物的稳定性、药代动力学、药效学特性、治疗窗口等方面有至关重要的影响[18]。连接子应具有足够的稳定性和内化时快速裂解以释放有效载荷的能力[19]。连接子包括至少一个共价键, 可以是单键比如二硫键或二硫桥, 也可以是多个共价键。根据有效载荷释放机制, 目前常用的分为可裂解和不可裂解连接子。可裂解连接子主要包括蛋白酶敏感型、pH 敏感型、谷胱甘肽敏感型连接子, 它们通常只在细胞内可切割, 在细胞外环境中稳定。(1) 蛋白酶敏感型连接子通常由肽序列组成, 主要包括缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-瓜氨酸序列, 长度可为 2~10 个氨基酸不等。(2) pH 敏感连接子是一种在高或低 pH 环境中容易降解的共价连接剂, 主要包括脘或环缩脘。(3) 谷胱甘肽敏感连接子主要包括二硫基, 其包括至少一种氨基酸比如半胱氨酸残基[17]。不可裂解连接子通过与抗体的氨基酸残基形成不可还原的键, 提高在血液中的稳定性, 主要依赖于抗体的溶酶体降解以释放有效载荷, 因此需要一个有效的内化过程和最佳的运输途径至溶酶体[20]。

与 ADC 药物相同, AOC 药物的临床成功不仅取决于有效载荷的效力和连接子的稳定性, 同样也取决于连接各部件的生物偶联技术。为了确保良好的药代动力学特性, 需要有效载荷和抗体之间精确且位点特异性的偶联技术[21]。第一代和第二代偶联技术是基于内源性氨基酸的传统非特异性或随机结合的方法, 使用三(2-羧乙基)膦酸盐(TCEP)等还原剂将抗体的链间二硫键部分还原, 生成的位置异构的半胱氨酸和赖氨酸能够诱导产生多种 DARs (DAR 代表的是每个抗体上连接小分子药物的平均数量)。相比之下, 第三代偶联技术大多是通过位点特异性结合天然或非天然氨基酸设计的, 能够生成具有良好 DARs 的均匀的抗体药物偶联物, 这种位点特异性工程偶联技术限制了药物在抗体之中的分布[22]。目前被广泛探究的偶联技术如表 2 所示[15]。

Table 2. Widely explored coupling techniques and reactions in antibody oligonucleotide conjugates design

表 2. 抗体偶联药物设计中广泛探究的偶联技术和反应

随机(非特异性)偶联技术	位点特异性偶联技术
赖氨酸酰胺偶联物: 胺类反应	工程半胱氨酸残基(硫单抗): 硫醇反应
半胱氨酸偶联: 硫醇反应	酶偶联
	聚糖偶联
	工程非天然氨基酸(UAA): 兼容的 UAA 侧链反应
	C/N 端选择性偶联

针对 AOC 而言, 广泛的直接偶联方法便是将一个可连接的基团添加到寡核苷酸上并直接偶联到抗体的赖氨酸、半胱氨酸或工程氨基酸上, 这种方法可以使用在 ADC 中探索发现的多种功能不同的连接子, 比如可裂解或不可裂解连接子、二硫键等[23]。其中, 由 Genentech 公司开发的位点特异性半胱氨酸工程抗体—硫单抗, 是一种能够控制抗体偶联药物中 DAR 的有效方法, 其通过在抗体上引入一种工程位点特异性半胱氨酸提高了抗体偶联药物在体内的整体有效性。硫单抗通过利用不涉及结构二硫键的工程化反应性半胱氨酸, 在抗体上实现所需位点的选择性和均匀修饰, 进一步的, 寡核苷酸可以通过 SMCC 和 SPDB 等连接子与硫单抗偶联[24]。相较于较大的鱼精蛋白或亲和蛋白复合物, 这种偶联方法的优点是连接子较小并且对整体偶联产物的影响较小。但是这种方法制备所得 AOC 由于未加入溶酶体逃逸剂可能会导致寡核苷酸从溶酶体中缓慢逃逸, 从而影响 AOC 的活性[13]。Junutula 等人首先报道了一种硫单抗策略, 用工程化半胱氨酸残基取代了 anti-MUC16 抗体重链 114 位的丙氨酸, 工程化位置内的反应性硫醇能够与马来酰亚胺负载的连接子反应, 合成的 anti-MUC16 ADC 在异种移植小鼠模型中表现出较好活性[25]。有文献提到, 若是针对具体的 siRNA 这类的寡核苷酸, 其连接子通常需要偶联到正义链, 因为反义链是用于合成 RNA 诱导沉默复合物(RISC)以沉默基因的链。目前基于化学反应的直接偶联法具有最大的灵活性和成熟性, 是制备 AOC 药物的首选方法[26]。

2.1.2. 发展情况

尽管目前有很多较为成熟的技术可以将核酸递送至肝细胞, 但是针对其他组织细胞表面受体的技术还亟待完善, 抗体作为递送载体虽仍处于早期发展阶段, 但具有巨大发展潜力[27]。抗体和细胞表面受体之间的特异性相互作用能够将其传递到其他技术无法触及的组织或细胞亚群中, 目前已有多种受体成功用于 siRNA 的靶向递送, 包括 HIV gp160 蛋白、HER2、CD7 (T 细胞标记物)、CD71 (转铁蛋白受体, 在心脏和骨骼肌中高表达)、TMEFF2 [28]。

通过化学反应偶联获得的 AOC 药物连接子小, 相较于通过电荷作用偶联的 AOC 药物更加稳定, 并且这种直接偶联法具备更大的灵活性, 但仍需要合理选择连接子及其偶联技术。由于这种 AOC 药物不含有溶酶体逃逸剂, 可能会导致寡核苷酸从溶酶体中缓慢逃逸, 从而影响 AOC 活性, 这一点不同于 ADC, 因此在工艺开发时需要重点考量[29]。制备传统的 ADC 药物面临的挑战包括有连接子带来的异质性、疏水性、聚集性、不稳定性, 有效载荷的大小及其电荷对偶联物也有显著影响, 这些挑战在 AOC 中都被放大了。比如 ADC 中被偶联的小分子药物分子量一般小于 2 kDa, 而 AOC 中被偶联的寡核苷酸分子量较大, 可以大于 10 kDa, 这意味寡核苷酸对偶联物的物理和化学性质影响将大于小分子[13]。

目前全球在研的抗体偶联核酸药物主要出自四家公司, 包括 Avidity Biosciences、Dyne Therapeutics、Tallac、Denali, 其中 Avidity 公司是开发 AOC 药物的先驱。首个进入临床的抗体偶联核酸药物为 Avidity Biosciences 的 AOC1001, 由 3 部分组成: 靶向转铁蛋白受体 1 (TfR1) 的全长单抗、连接子、靶向 DMPK mRNA 的 siRNA, 适应症为强直性肌营养不良 I 型(DM1)。TfR1 在细胞表面广泛表达, 可将铁转运到细胞中, 而肌肉细胞需要大量的铁, 这使得靶向 TfR1 将药物递送至肌肉细胞效果显著。AOC1001 通过靶向 TfR1 递送 DMPK mRNA 的 siRNA 来敲低突变 DMPK 的表达水平, 从而释放 MBNL 使其发挥正常功能来治疗疾病[30]。Avidity Biosciences 的 AOC1020 也于 2022 年 9 月进入临床, 其包括靶向转铁蛋白受体 1 (TfR1) 的全长单抗、连接子、靶向 DUX4 mRNA 的 siRNA, 适应症为面肩肱型肌营养不良(FSHD), 该药物通过降低 DUX4 的表达治疗 FSHD。同样的, ASOs 也能够与抗体偶联发挥作用, 比如与靶向 CD44 (一种神经干细胞标记物)、EPHA2 和 EGFR 的抗体偶联[31]。靶向骨骼肌等组织的抗体-siRNA/ASO 偶联物, 目前主要由 Avidity Biosciences、Dyne Therapeutics 公司开发[28]。全球目前在研的抗体偶联核酸药物具体情况如表 3 所示。

Table 3. Antibody-oligonucleotide conjugates under development
表 3. 在研的抗体偶联核酸药物

药物名称	靶点	适应症	抗体	有效载荷	研发公司	研发阶段
AOC 1001	肌肉	强直性肌营养不良型 I 型(DM1)	TfR1-mAb	DMPKsiRNA	Avidity	临床 II 期
AOC 1044	肌肉	假肥大型肌营养不良(DMD)	TfR1-mAb	Exon-44-skipping PMO	Avidity	临床 I 期(2022)
AOC 1020	肌肉	面肩肱型肌营养不良症(FSHD)	TfR1-mAb	DUX4 siRNA	Avidity	临床 I 期(2022)
DYNE-251	肌肉	DMD	TfR1-Fab	Exon-51-skipping PMO	Dyne	临床 I 期(2022)
DYNE-101	肌肉	DM1	TfR1-Fab	DMPK ASO	Dyne	临床 I 期(2022)
DYNE-301	肌肉	FSHD	TfR1-Fab	DUX4 ASO	Dyne	新药临床研究审批(2022)
TAC-001	B 细胞	Cancer	CD22-mAb	CpG (TLR9 agonist)	Tallac	临床 I 期(2022)
ALTA-002	树突状细胞	Cancer	SIRP α -mAb	CpG (TLR9agonist)	Tallac/ALX Oncology	新药临床研究审批(2022)
NA	脑	NA	TfR1-mAb, via Fc	Undisclosed ASO	Denali/Secarna	临床前研究
NA	肿瘤和肌肉	NA	入胞抗体	Undisclosed	Gennao Bio	临床前研究

2.2. 通过结合寡核苷酸的蛋白偶联抗体

目前较为成熟的递送载体如脂质体、无机纳米颗粒、聚合物等在临床应用中都受到一些限制, 比如在血清中聚集、过大的颗粒大小、生物毒性、免疫原性等, 基于结合寡核苷酸的蛋白将其递送的方法有潜力解决传统载体的这些问题。能够结合核酸的蛋白主要有两种: 一种是通过电荷相互作用结合核酸的蛋白; 一种是天然的 RNA 结合蛋白, 能够以与序列无关的方式与双链 RNA 结合[32]。

2.2.1. 基于电荷相互作用结合寡核苷酸的蛋白

鱼精蛋白是一种天然的阳离子蛋白, 可以把带负电的核酸分子络合成纳米级别的核酸颗粒, 保护其不被血清中的酶降解, 并且鱼精蛋白可以作为溶酶体逃逸剂促进寡核苷酸的胞质递送[33]。由于鱼精蛋白易于与细胞膜相互作用, 因此它可以作为一种转染系统。无论是将 DNA 传递到细胞核, 还是将 mRNA 传递到细胞质, 鱼精蛋白都已被证明可以有效地保护运载物免受酶降解, 改善其在细胞内的摄取[34]。鱼精蛋白包含三个结构域: 中心是富含精氨酸的 DNA 结合结构域, 包括一系列锚定序列, 比如 3~11 个连续精氨酸残基以促进肽-DNA 结合[35], 两侧是含有半胱氨酸残基的短肽链。除了鱼精蛋白, 类似于八聚/九聚精氨酸、八聚组氨酸这样的具有多聚氨基酸序列的穿膜肽也常用于结合核酸序列[36]。

基于鱼精蛋白偶联抗体和寡核苷酸主要有两种方式, 一种是直接表达出包含有抗体 scFv 和鱼精蛋白片段的融合蛋白(scFv/tP)。Huilin Zhang 等人通过重叠延伸 PCR 成功构建了单链抗 EGFR 抗体(scFv)和鱼精蛋白片段(tP)融合蛋白(scFV/tP)的表达载体, 并转入大肠杆菌 TOP10F' 中进行表达。利用该载体将人翅样基因(hWAPL)的 siRNA 有效递送入宫颈癌 HeLa 细胞中, hWAPL mRNA 表达水平降低 97.23%, HeLa 细胞增殖能力下降 66.71%, 为 EGFR 阳性宫颈癌的靶向基因治疗提供了一种新策略[37]。另一种则是利用 sulfo-SMCC 这种双功能交联剂, 其中的 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS ester)能与伯胺反应形成稳定的酰胺键, 马来酰亚胺与巯基反应形成稳定的硫醚键, 从而 sulfo-SMCC 既能够通过氨基与硫酸鱼精蛋白偶联, 又能够通过半胱氨酸残基与抗体偶联, 进而实现抗体与寡核苷酸的偶联。Nicole Bäumer 等人利用 sulfo-SMCC

和鱼精蛋白开发了一种具有靶向抗体并且能够通过静电络合保护 siRNA 的递送载体, 将功能性 siRNA 递送到 AML 细胞中, 特异性沉默 AML 中 DNMT3A 和 FLT3 两个致癌基因, 从而抑制 AML 细胞系的体外克隆生长及体内模型中的肿瘤生长, 显著提高小鼠的存活率。通过这种方法所得的递送载体比直接抗体-siRNA 偶联物具有更高的稳定性, 组装过程中相对较大的靶向抗体被迫分布在纳米载体球壳外部, 而偶联的鱼精蛋白则保护着 siRNA/游离鱼精蛋白的核心结构, 构成了一个稳定的球形结构。这种载体能够以最佳的组分比例在水溶液中自发组装实现静电平衡, 并且也可以应用于其他复杂的阴离子分子[38]。但是这种偶联方式由于抗体与寡核苷酸的结合是通过可逆的离子相互作用启动的, 因此很难控制准确的寡核苷酸-抗体比例(OAR), 而且在 pH 或盐浓度显著变化时偶联物的稳定性也会发生较大变化[39]。

2.2.2. RNA 结合蛋白

RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)通常被认为是通过一个或多个 RNA 结合结构域(RBD)来结合 RNA 并改变结合 RNA 命运或功能的蛋白质。RNA 与蛋白相互作用一般是由对于 RNA 有精确结合作用的蛋白基序发挥作用, 并且负责 RNA 识别的结构具有相当大的多样性, RNA 结合结构域数量与结构组合上的多样性使其可以识别多种多样的底物。RNA 结合蛋白种类有很多, 比如 TRBP [40]、Dttat [41]、PKR [42]等。

类似的, 基于 RNA 结合蛋白偶联抗体和寡核苷酸主要也有两种方式, 直接表达包含有抗体和 RNA 结合蛋白的融合蛋白, 以及利用 sulfo-SMCC 等交联剂将分别表达的抗体和 RNA 结合蛋白连接。Ghulam Hassan Dar 等人设计了一个包含有 RNA 结合蛋白的 dsRNA 结合域(TRBP2)和 ErbB2 结合体(AF)的融合蛋白, 它能够选择性地靶向 siRNA 运输到过 HER-2 表达的癌细胞和组织中, 显著沉默参与细胞增殖的选定基因, 抑制了肿瘤增殖[40]。由于寡核苷酸本身带有负电荷, 因此载体需要正电荷来对其保护, 但在给药和体内循环的过程中, 应避免带有多余的正电荷, 以减少血清蛋白的聚集、毒性和非特异性吸附[43]。因此, Yifan Yang 等人设计了一种优化的 siRNA 递送平台, 主要通过由 pH 敏感型电荷屏蔽序列、蛋白酶裂解位点以及超电荷聚多肽三部分组成的可激活超电荷聚多肽(activatable supercharged polypeptide, ASCP), 实现将各种生物活性物质(包括多肽、蛋白、小分子化合物、siRNA)靶向递送进入肿瘤细胞质内并发挥其生物功能。其中, 作者将 ASCP 融合到一个双链 RNA 结合域(RBD)上, 主要筛选了四种 RBD: MS2、dTAT、TAT、PKR, 结果显示 PKR 具有最好的作用效果, 其偶联 siRNA 后的基因沉默效果与 Lipo3000 相当, 能够显著沉默靶标基因从而获得最佳的治疗三阴性乳腺癌(TNBC)效果[42]。

2.3. 通过亲和性连接和核酸杂交偶联抗体和寡核苷酸

相较于前面介绍的两种偶联方式, 这部分的方法相对而言应用较少。第一种是通过 Avidin 与 Streptavidin-Biotin 进行的偶联, 利用寡核苷酸上标记的生物素和亲和素之间的强相互作用将抗体与寡核苷酸偶联。具体步骤可以将硫醇修饰的 DNA 化学连接到马来酰亚胺激活的链霉亲和素上, 再与各种生物素化蛋白非共价连接。进一步的, 可以直接利用链霉亲和素的四个生物素结合位点将生物素化的抗体和生物素化的寡核苷酸直接相连[13]。这种方法制备所得偶联物优点是在体内具有较好稳定性, 阳离子复合物会因为盐浓度变化而聚集在体内, 但生物素复合物对这种影响具有耐受性。不过虽然这种方法结合效果较强, 但它仍然需要用到上述所提到的直接偶联的方法, 制备步骤也较为繁琐[44]。

第二种方法是将一条单链寡核苷酸首先偶联到抗体上, 另一条互补链通过杂交方式偶联以形成一个双链 AOC。小分子药物也可以通过插入双链寡核苷酸来装载, 或者直接偶联到互补链上[45]。双链杂交的动力学比点击化学和其他共轭方法快几个数量, 因此这种方法具备优越的速率和特异性[46]。寡核苷酸的长度对于杂交方法非常重要, 如果序列过短, 双链结构在血浆中会不够稳定; 如果序列过长, 会比较容易形成二级结构[47]。这种杂交技术在诊断方面非常有应用前景, 但用于生产治疗性药物则工艺挑战性较大。

3. 抗体偶联核酸药物的展望

抗体偶联核酸药物最初是作为一种诊断工具, 现在已经逐步发展为新的治疗方式。它能够利用单克隆抗体特异性靶向组织和细胞的优势, 将其与小核酸靶点特异性的优势相结合, 解决目前小核酸药物仅能通过 LNP (脂质纳米颗粒)、GalNAc (N-乙酰半乳糖胺) 递送系统靶向肝脏的问题, 将这类药物的治疗潜力扩大到肝脏之外[48]。比如 Sugo 等人利用靶向转铁蛋白受体 1 (TfR1) 的抗体将寡核苷酸递送至骨骼肌和心脏组织, 他们在啮齿动物中证明了该 TfR1 抗体片段(Fab)-siRNA 偶联物能够减少肌肉中 Mstn mRNA 的表达[49]。在此基础上, Barbora 等人在非人类灵长类动物中进一步验证靶向 TfR1 的 AOCs 的药理活性, 结果表明 mRNA 在骨骼和心脏(横纹)肌肉中沉默效果最大, 在其他主要器官中最小或没有沉默活性。AOCs 的组织 PKPD 显示, mRNA 的沉默活性主要是由横纹肌中受体介导的 siRNA 递送驱动的, 因此横纹肌与其他组织相比具有明显的选择活性[50]。可见 AOCs PKPD 特性确实能够扩大至更高级别物种。AOCs 平台的另一关键优势是一种单一抗体可以用于一种组织类型中的多种疾病, 其中寡核苷酸成分可以根据治疗靶点进行设计更换。这些不可替代的优势为抗体偶联核酸药物的发展奠定了坚实基础。

作为一种前沿技术, 抗体偶联核酸药物也存在着诸多挑战。无论是非偶联、配体偶联还是纳米载体包裹的寡核苷酸, 都会经历从早期核内体(EEs)运输到晚期核内体(LEs), 然后到下游多囊泡体(MVBs), 最后到溶酶体(LYs)进行降解的过程[51]。整个过程中, 寡核苷酸经历了 pH (7.4~4.5) 的环境变化, 并且由于寡核苷酸是聚阴离子大分子, 逃逸核内体脂质双分子层到达胞内是一个主要问题。因此, 利用化学修饰提高寡核苷酸的稳定性和生物利用度[52], 以及解决核内体逃逸成为影响寡核苷酸治疗效果[53]的限制因素。目前很少有报道成功克服了这两大难关, 并且核内体逃逸的机制可能会导致核内体破裂, 将大量的腔内内容物释放到细胞质中, 激活先天免疫系统和其他毒性途径, 从而缩小寡核苷酸治疗指数[54]。因此, 为了解决核内体问题, 保持好增强核内体逃逸以获得更好疗效和安全性之间的平衡是至关重要的[55]。这些也均是抗体偶联核酸药物未来发展亟待解决的问题。

展望未来, 相信随着抗体和核酸药物领域的发展, 寡核苷酸将能够不断提高稳定性、膜通透性和核内体逃逸能力, 连接子将不断被改进而更具优越性[13], 偶联技术将不断进步而更好地开发新型偶联物, 这些进展都将为抗体偶联核酸药物提供新的发展机遇, 使之成为精准医疗的重要武器。

参考文献

- [1] Lchelt, U. and Wagner, E. (2015) Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chemical Reviews*, **115**, 11043-11078. <https://doi.org/10.1021/cr5006793>
- [2] Kurreck, J. (2003) Antisense Technologies. Improvement through Novel Chemical Modifications. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 1628-1644. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>
- [3] Moreno, P.M.D. and Pêgo, A.P. (2014) Therapeutic Antisense Oligonucleotides against Cancer: Hurdling to the Clinic. *Frontiers in Chemistry*, **2**, Article No. 87. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00087>
- [4] Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., et al. (2020) Therapeutic SiRNA: State of the Art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 101. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- [5] Roberts, T.C., Langer, R. and Wood, M.J.A. (2020) Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **19**, 673-694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- [6] Chen, D., Liu, X., Lu, X., et al. (2023) Nanoparticle Drug Delivery Systems for Synergistic Delivery of Tumor Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, **16**, Article ID: 1111991. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1111991>
- [7] Ulldemolins, A., Seras-Franzoso, J., Andrade, F., et al. (2021) Perspectives of Nano-Carrier Drug Delivery Systems to Overcome Cancer Drug Resistance in the Clinics. *Cancer Drug Resistance*, **4**, 44-68. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.59>
- [8] Wei, G., Wang, Y., Yang, G., et al. (2021) Recent Progress in Nanomedicine for Enhanced Cancer Chemotherapy. *Theranostics*, **11**, 6370-6392. <https://doi.org/10.7150/thno.57828>
- [9] Sheoran, S., Arora, S., Samsonraj, R., et al. (2022) Lipid-Based Nanoparticles for Treatment of Cancer. *Heliyon*, **8**,

- E09403. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09403>
- [10] Setten, R.L., Rossi, J.J. and Han, S.P. (2019) The Current State and Future Directions of RNAi-Based Therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 421-446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- [11] Chen, Z., Kankala, R.K., Yang, Z., *et al.* (2022) Antibody-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy: Mechanisms, Challenges, and Prospects. *Theranostics*, **12**, 3719-3746. <https://doi.org/10.7150/thno.72594>
- [12] Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., *et al.* (2017) Strategies and Challenges for the Next Generation of Antibody-Drug Conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery*, **16**, 315-337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
- [13] Dugal-Tessier, J., Thirumalairajan, S. and Jain, N. (2021) Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A Twist to Antibody-Drug Conjugates. *Journal of Clinical Medicine*, **10**, Article No. 838. <https://doi.org/10.3390/jcm10040838>
- [14] Mullard, A. (2022) Antibody-Oligonucleotide Conjugates Enter the Clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, **21**, 6-8. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00213-5>
- [15] Maiti, R., Patel, B., Patel, N., *et al.* (2023) Antibody Drug Conjugates as Targeted Cancer Therapy: Past Development, Present Challenges and Future Opportunities. *Archives of Pharmacal Research*, **46**, 361-388. <https://doi.org/10.1007/s12272-023-01447-0>
- [16] Tang, H., Liu, Y., Yu, Z., *et al.* (2019) The Analysis of Key Factors Related to ADCs Structural Design. *Frontiers in Pharmacology*, **10**, Article No. 373. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00373>
- [17] Dyne Therapeutics, Inc. (2023) Muscle Targeting Complexes and Uses Thereof for Treating Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. US, US11638761B2.
- [18] van Geel, R., Wijdeven, M.A., Heesbeen, R., *et al.* (2015) Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, **26**, 2233-2242. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00224>
- [19] Lyon, R.P., Bovee, T.D., Doronina, S.O., *et al.* (2015) Reducing Hydrophobicity of Homogeneous Antibody-Drug Conjugates Improves Pharmacokinetics and Therapeutic Index. *Nature Biotechnology*, **33**, 733-735. <https://doi.org/10.1038/nbt.3212>
- [20] Chau, C.H., Steeg, P.S. and Figg, W.D. (2019) Antibody-Drug Conjugates for Cancer. *The Lancet*, **394**, 793-804. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31774-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31774-X)
- [21] Tsuchikama, K. and An, Z. (2018) Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries. *Protein & Cell*, **9**, 33-46. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0323-0>
- [22] Drenkard, D., Becke, F., Langstein, J., *et al.* (2007) CD137 Is Expressed on Blood Vessel Walls at Sites of Inflammation and Enhances Monocyte Migratory Activity. *FASEB Journal*, **21**, 456-463. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4739com>
- [23] Jain, N., Smith, S.W., Ghone, S., *et al.* (2015) Current ADC Linker Chemistry. *Pharmaceutical Research*, **32**, 3526-3540. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1657-7>
- [24] Zacharias, N., Podust, V.N., Kajihara, K.K., *et al.* (2022) A Homogeneous High-DAR Antibody-Drug Conjugate Platform Combining THIOMAB Antibodies and XTEN Polypeptides. *Chemical Science*, **13**, 3147-3160. <https://doi.org/10.1039/D1SC05243H>
- [25] Kostova, V., *et al.* (2021) The Chemistry Behind ADCs. *Pharmaceuticals*, **14**, 442-488. <https://doi.org/10.3390/ph14050442>
- [26] Winkler, J. (2013) Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Applications. *Therapeutic Delivery*, **4**, 791-809. <https://doi.org/10.4155/tde.13.47>
- [27] Carter, P.J. and Senter, P.D. (2013) Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy. *Annual Review of Medicine*, **64**, 15-29. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050311-201823>
- [28] Roberts, T.C., Langer, R., *et al.* (2020) Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **19**, 673-694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- [29] Matsuda, Y. and Mendelsohn, B.A. (2021) An Overview of Process Development for Antibody-Drug Conjugates Produced by Chemical Conjugation Technology. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **21**, 963-975. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1846714>
- [30] Avidity Biosciences LLC (2018) Nucleic Acid-Polypeptide Compositions and Uses Thereof. AU, AU2017240799A1.
- [31] Arnold, A.E., Malek-Adamian, E., Le, P.U., *et al.* (2018) Antibody-Antisense Oligonucleotide Conjugate Downregulates a Key Gene in Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, **11**, 518-527. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.004>
- [32] Tai, W., Li, J., Corey, E., *et al.* (2018) A Ribonucleoprotein Octamer for Targeted siRNA Delivery (Vol 2, Pg 326, 2018). *Nature Biomedical Engineering*, **2**, 326-337. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0214-1>
- [33] Lu, H., Wang, D., Kazane, S., *et al.* (2013) Site-Specific Antibody-Polymer Conjugates for siRNA Delivery. *Journal*

- of the American Chemical Society, **135**, 13885-13891. <https://doi.org/10.1021/ja4059525>
- [34] Scheicher, B., Schachner-Nedherer, A.L. and Zimmer, A. (2015) Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles: Recent Advances in Drug Delivery and Drug Targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.009>
- [35] Ruseska, I., Fresacher, K., Petschacher, C., et al. (2021) Use of Protamine in Nanopharmaceuticals—A Review. *Nanomaterials (Basel)*, **11**, 1508-1550. <https://doi.org/10.3390/nano11061508>
- [36] Tang, B., Zaro, J.L., Shen, Y., et al. (2018) Acid-Sensitive Hybrid Polymeric Micelles Containing a Reversibly Activatable Cell-Penetrating Peptide for Tumor-Specific Cytoplasm Targeting. *Journal of Controlled Release*, **279**, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.016>
- [37] Zhang, H., Mao, Y., Zhang, F., et al. (2014) The Inhibitory Effect of a New ScFv/TP Protein as SiRNA Delivery System to Target HWAPL in Cervical Carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **391**, 77-84. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-1989-3>
- [38] Bumer, N., Scheller, A., Wittmann, L., et al. (2022) Electrostatic Anti-CD33-Antibody-Protamine Nanocarriers as Platform for a Targeted Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, 171-197. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01390-5>
- [39] Qian, L., Lin, X., Gao, X., et al. (2023) The Dawn of a New Era: Targeting the “Undruggables” with Antibody-Based Therapeutics. *Chemical Reviews*, **123**, 7782-7853. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00915>
- [40] Dar, G.H., Gopal, V. and Rao, M. (2015) Conformation-Dependent Binding and Tumor-Targeted Delivery of SiRNA by a Designed TRBP2: Affibody Fusion Protein. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, **11**, 1455-1466. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.017>
- [41] Larance, R., Tripti, R., Devesh, R., et al. (2017) *In Silico* Analyses of Subtype Specific HIV-1 Tat-TAR RNA Interaction Reveals the Structural Determinants for Viral Activity. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1467-1476. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01467>
- [42] Yang, Y., Zhu, H., Liu, D., et al. (2023) A Versatile Platform for the Tumor-Targeted Intracellular Delivery of Peptides, Proteins, and SiRNA. *Advanced Functional Materials*, **33**, Article ID: 2301011. <https://doi.org/10.1002/adfm.202301011>
- [43] Dong, Y., Siegwart, D.J. and Anderson, D.G. (2019) Strategies, Design, and Chemistry in SiRNA Delivery Systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **144**, 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.004>
- [44] Bolcato-Bellemin, A.L., Bonnet, M.E., Creusat, G., et al. (2007) Sticky Overhangs Enhance SiRNA-Mediated Gene Silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 16050-16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707831104>
- [45] Liu, T., Song, P., Märcher, A., et al. (2019) Selective Delivery of Doxorubicin to EGFR+ Cancer Cells by Cetuximab-DNA Conjugates. *ChemBioChem*, **20**, 1014-1018. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800685>
- [46] Zhang, J.X., Fang, J.Z., Duan, W., et al. (2018) Predicting DNA Hybridization Kinetics from Sequence. *Nature Chemistry*, **10**, 91-98. <https://doi.org/10.1038/nchem.2877>
- [47] Wiener, J., Kokotek, D., Rosowski, S., et al. (2020) Preparation of Single- and Double-Oligonucleotide Antibody Conjugates and Their Application for Protein Analytics. *Scientific Reports*, **10**, 1457-1468. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58238-6>
- [48] Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., et al. (2019) Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjugate Chemistry*, **30**, 366-383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>
- [49] Sugo, T., Terada, M., Oikawa, T., et al. (2016) Development of Antibody-SiRNA Conjugate Targeted to Cardiac and Skeletal Muscles. *Journal of Controlled Release*, **237**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.036>
- [50] Malecova, B., Burke, R.S., Cochran, M., et al. (2023) Targeted Tissue Delivery of RNA Therapeutics Using Antibody-Oligonucleotide Conjugates (AOCs). *Nucleic Acids Research*, **51**, 5901-5910. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad415>
- [51] Scott, C.C., Vacca, F. and Gruenberg, J. (2014) Endosome Maturation, Transport and Functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **31**, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>
- [52] Hassler, M.R., Turanov, A.A., Alterman, J.F., et al. (2018) Comparison of Partially and Fully Chemically-Modified SiRNA in Conjugate-Mediated Delivery *In Vivo*. *Nucleic Acids Research*, **46**, 2185-2196. <https://doi.org/10.1093/nar/gky037>
- [53] Juliano, R.L. (2018) Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. *Nucleic Acid Therapeutics*, **28**, 166-177. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0727>
- [54] Dowdy, S.F., Setten, R.L., Cui, X.S., et al. (2022) Delivery of RNA Therapeutics: The Great Endosomal Escape! *Nucleic Acid Therapeutics*, **32**, 361-368. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0004>
- [55] Mangla, P., Vicentini, Q. and Biscans, A. (2023) Therapeutic Oligonucleotides: An Outlook on Chemical Strategies to Improve Endosomal Trafficking. *Cells*, **12**, 2253-2291. <https://doi.org/10.3390/cells12182253>