

蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

技術佈告欄 Technical Bulletin

抗體藥物複合體之藥物動力學分析
Pharmacokinetic Studies of Antibody Drug Conjugate

介紹抗體藥物複合體常用的
藥物動力學分析方法與項目

值日生
PSS

狂賀！蛋白質藥物分析實驗室零缺失通過 USFDA 查核

焦點新聞 News

 2017明生公司活動回顧-

 國內外參展與研討會活動分享

 參展資訊-

 PHAR-EAST 2018 展會

(攤位：D01，2/28-3/1，Singapore)

抗體藥物複合體之藥物動力學分析

(Pharmacokinetic Studies of Antibody Drug Conjugate)

前言

抗體藥物複合體(Antibody drug conjugate, ADC)是一種結合單株抗體(monoclonal antibody)與小分子藥物的新興生物治療藥物，其結構組成包含抗體藥物、連接子(linker)與小分子毒性藥物(payload)(表一)。開發中或已上市的ADC藥物常見用於治療癌症疾病，藉由抗體對標的抗原之高度專一性，將具有細胞毒性的小分子藥物精準地傳輸至癌細胞處，藉由胞吞(endocytosis)作用進入至癌細胞內，釋放出具有毒殺作用之小分子藥物。這樣的方式能夠盡量減少小分子毒性藥物之系統曝露量(systemic exposure)以降低對正常細胞的毒性傷害，並大幅提升毒性藥物於癌症細胞位置的量，增強對癌症細胞的毒殺作用。除了小分子藥物的毒殺作用以外，單株抗體亦會引發抗體媒介細胞毒殺作用(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)與補體媒介細胞毒殺作用(complement-dependent cytotoxicity)。

Component	Type	Desired characteristics
Payloads	Microtubule inhibitors <ul style="list-style-type: none">• Auristatins (MMAE, MMAF)• Maytansinoids (DM1, DM4)	Potent cytotoxic amenable to linking
	DNA-damaging agents <ul style="list-style-type: none">• Calicheamicin• Ducaromycins• Pyrrolobenzodiazepines (PBD)	
Linkers	RNA polymerase (alpha-amanitin)	Stable in circulation but released in tumor
	Cleavable <ul style="list-style-type: none">• Protease cleavable e.g. valine-citrulline• Acid labile e.g. hydrazone• Disulfide linkers e.g. SPDB, SPP	
Conjugation chemistry	Non-cleavable (e.g. MCC)	Homogenous mixture, stable
	Via lysine residues	
	Via cysteines derived from reduced interchain disulfides	
	Site specific conjugation <ul style="list-style-type: none">• Engineered cysteines• Unnatural amino acids• Enzymatic conjugation	

表一.目前常見的ADC組成成分[1](Biopharmaceutics& Drug Disposition, 2016, 37: 66—74)

抗體與小分子藥物可透過不同類型的linker進行結合，無論哪一種鍵結型式的ADC藥物，其物化結構都同樣具有高度複雜的異質性(heterogeneity)，因此，除化學製造管制(CMC)的分析困難度相當高以外，研究ADC藥物在體內作用的藥物動力學機轉同樣深具挑戰性。無論在前臨床的動物試驗或是臨床階段的人體試驗，以ADC藥物動力學研究而言，需要同時考慮的包含ADC的抗體藥物部分與釋放出來的小分子藥物在體內的濃度變化。蛋白質藥物與小分子藥物在血中濃度分析常用的方法並不相同，因此，本篇報導將介紹如何進行ADC藥物動力學之研究，說明各項常用之分析工具與方法，與必須觀察監控的各項不同藥物型態的濃度變化。

ADC藥物動力學簡介

藥物動力學探討的方向主要有四個：吸收A(Absorption), 分布D(Distribution), 代謝M (Metabolism)與排泄E(Excretion)。ADC進入生物體的方式為靜脈注射或是腹腔注射，其吸收的方式跟一般的抗體藥物很像；故探討ADC的PK重點會放在後面三項(DME)，這三項又合稱為藥物的動態(disposition)。當ADC與腫瘤細胞的目標抗原結合時，會經過受體媒介胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)進入細胞，然後經由核內體(endosome)運輸至溶酶體(lysosome)，而ADC上鍵結的小分子藥物在這過程中經由不同機制(ex. 釋放過程、代謝作用)自抗體上釋放出來，產生細胞毒性後使腫瘤細胞死亡。(圖1)

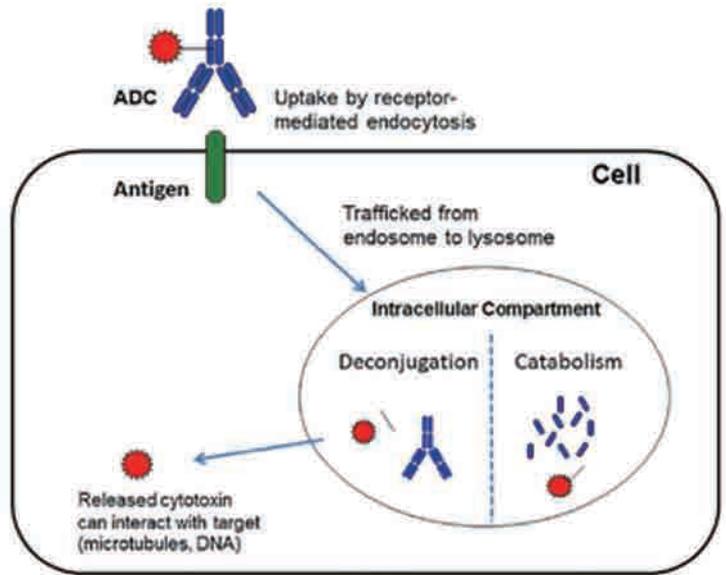


圖1. ADC在體內之動態(disposition)示意圖[1]
(Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2016,37: 66—74)

一般的抗體藥物經由目標媒介胞吞與非專一性胞吞等作用機制進入細胞後便自然的藉由蛋白質水解代謝過程自人體清除，然而ADC上因為鍵結著小分子藥物，即使蛋白質水解後的殘渣碎片可能都還具有毒性，所以必須特別注意ADC代謝產物是否有安全疑慮或是與藥物間產生交互作用(DDI, Drug-Drug Interaction)。此外ADC的組成結構也對PK有影響，大致列舉幾種：

1. 抗體：為ADC之骨幹，影響ADC生物活性分布(distribution)最大的因素。
 2. 鍵結方式：釋出藥物的方式，影響代謝(metabolism/catabolism)。
 3. 鍵結位置：影響ADC在血液中的穩定度(stability)[3]。
 4. 小分子藥物：影響毒性(toxicity)。
- 其中鍵結方式也影響其分析方法的選擇。

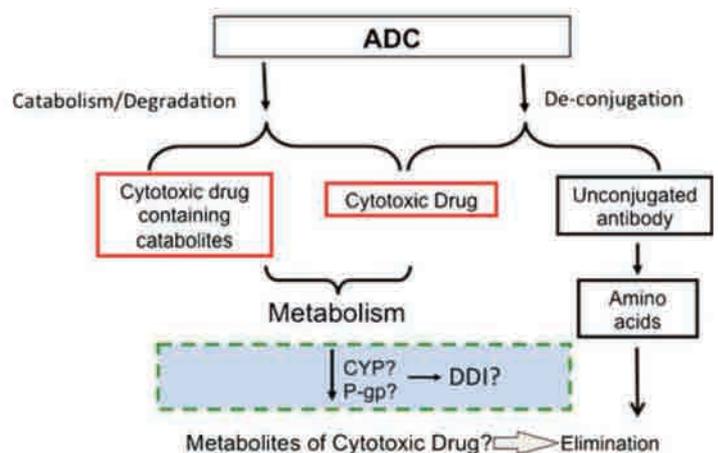


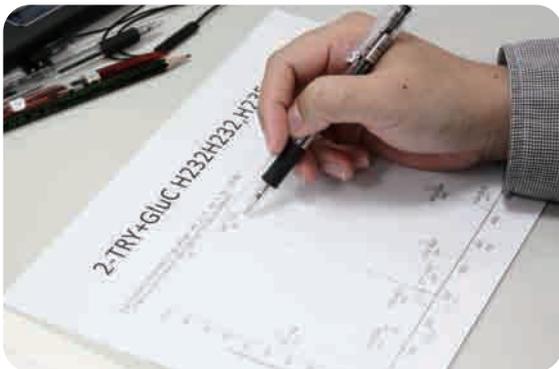
圖2. ADC代謝流程示意圖

(CYP: cytochrome P450 ; P-gp: P-glycoprotein)
[2](Pharmaceutical Research,2012, 29: 2354—2366)

ADC藥物動力學研究之挑戰^[1]

1. 體外 (*in vitro*) 實驗資訊有限

體外 (*in vitro*) 實驗驗證可模擬體內ADME情形的小分子藥物不同，目前抗體和ADC進行體外實驗只能得到有限的資訊。舉例來說：在體外進行實驗時，肺與肝細胞吸收ADC的方式會因為缺乏目標的表現而難以偵測。最常於體外進行的ADC實驗是測定ADC在血液中的穩定性(linker stability)。其他方面的測定：生物活體分布(biodistribution)、累積(accumulation)、代謝(catabolism)等，以ADC的作用方式來說，體內實驗較具有其研究機轉之代表性。



2. 物種間的差異

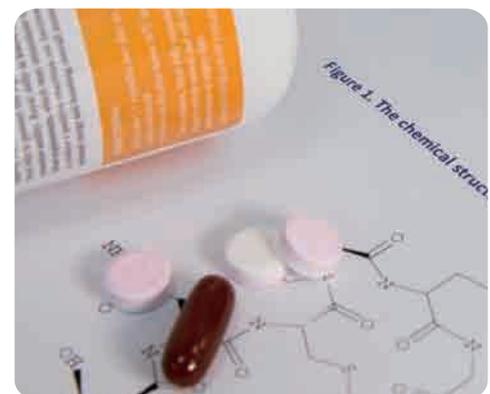
和普通的抗體藥物相同，ADC的PK特性也跟物種相關，動物實驗和人體實驗的結果可能還是有差距，例如抗體受器的差異、清除率(clearance)。除此之外，ADC還必須考慮鍵結穩定度(linker stability)和釋放小分子藥物(deconjugation)的過程在物種間的差異；鍵結穩定度可以借助體外實驗獲取資訊，然而藥物釋放至代謝與轉換的過程在物種間的差異則必須經過許多研究，這可能會影響藥物的效力(efficacy)與毒性(toxicity)。

3. 高度分子異質性

每個抗體接上的小分子藥物數量不同，鍵結抗體的位置和化學合成的方法也不同，例如：Lysine型ADC與Cysteine型ADC。而ADC的DAR (drug to antibody ratio)會影響穩定度、溶解度、抗原結合力、清除率與生物活體分布，因此相同種類的ADC如果具有不同的DAR會產生不同的PK模式。研究指出通常DAR增加時，清除率會提升，藥物到達臟器的速度會變快，但毒性(toxicity)會增強且藥物耐受性(tolerability)降低；DAR減少時則會相反。而在生物體內的生物轉化(biotransformation)與代謝過程中，ADC的異質性可能還會產生額外變化與其他產物，增加分析難度。

4. 生物檢體分析困難度高

因為有著高度異質性的不同分子(不同種DAR、未鍵結的小分子藥物、抗體)，使選擇適合並具有代表性的檢測物質相當困難。而生物體內的動態變化產生的生物轉化與代謝作用亦使分析複雜度提升，尤其是不同DAR的藥物對於同樣實驗的反應不一定相同，這些都是開發ADC定量分析方法的挑戰。



目前常使用的分析方法有：ELISA、LC-MS和SPECT/CT

1. ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

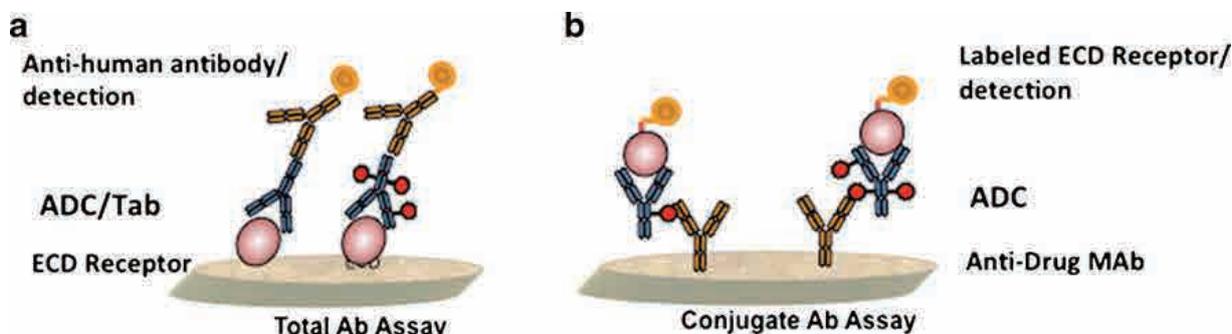


圖3. ELISA分析示意圖

(Tab: Total antibody; ECD: extracellular domain)[2](Pharmaceutical Research, 2012, 29: 2354—2366)

a. 偵測抗體總濃度(Total antibody, Tab)

Tab的濃度包含未鍵結(DAR=0)與已鍵結(DAR \geq 1)小分子藥物的ADC，Tab的PK模式描述了ADC的PK表現和抗體本身相近，並且可做為精確評估隨時間經過生物體內(*in vivo*)穩定性與完整性的最佳指標。Tab的PK模式為ADC最佳化的關鍵，特別是衡量鍵結後的影響和篩選出最適當的鍵結藥物。

b. 偵測已鍵結藥物的抗體濃度(Conjugated antibody)

偵測人體循環系統內具有活性(DAR>0)的ADC時常使用ELISA作為主要的方法，也是大部分ADC的PK分析基礎。然而這方面的實驗數據解讀相當困難，主因是有兩種反應會同時進行，使此方法偵測到的ADC濃度減少：循環系統本身的排除作用(elimination)與ADC上鍵結的藥物(cytotoxin)完全掉落(deconjugation)，變成DAR=0的狀態，這種情況會造成偵測上的偏差。此外，不同payload的ADC靈敏度(sensitivity)和效價(potency)也不盡相同，因此實驗得到的ADC濃度不見得能夠實際反應出藥物反應與濃度的關係。

c. 偵測已鍵結抗體的藥物濃度(Antibody conjugated drug)

利用ELISA和競爭型ELISA搭配的方式可偵測已鍵結藥物(conjugated drug)的濃度。以和MMAE鍵結的ADC舉例：先利用ELISA抓住血液樣品中的ADC，再利用酵素cathepsin B使ADC上的MMAE分離，接著使用HRP-MMAE和anti-MMAE antibody與分離後的MMAE進行競爭型ELISA，即可偵測出抗體上的MMAE總濃度。不過這種方法又有另一個缺點，就是只專注於已鍵結藥物(conjugated drug)的濃度，無法看出不同DAR的鍵結藥物(conjugated drug)在濃度相同時，進入體內可能導致不一樣的藥物反應。

d. 偵測小分子藥物(cytotoxin)以及其代謝產物

從ADC釋出的小分子藥物以及代謝產物可能使ADC藥物效力(efficacy)降低與毒性(toxicity)增加，也有可能產生藥品間交互作用(DDI, Drug-Drug Interaction)。目前大多利用特別設計的ELISA[4]，以及使用LC-MS[5]。兩種方法相較，ELISA能夠同時偵測多種相近結構的小分子藥物，LC-MS則較能針對特定的小分子藥物結構進行偵測。實驗前應該要先對目標小分子藥物的特性與代謝產物有充分了解後再開始進行。

彙整以上ELISA實驗後可以大致得出藥物濃度與時間的關係圖(圖4)

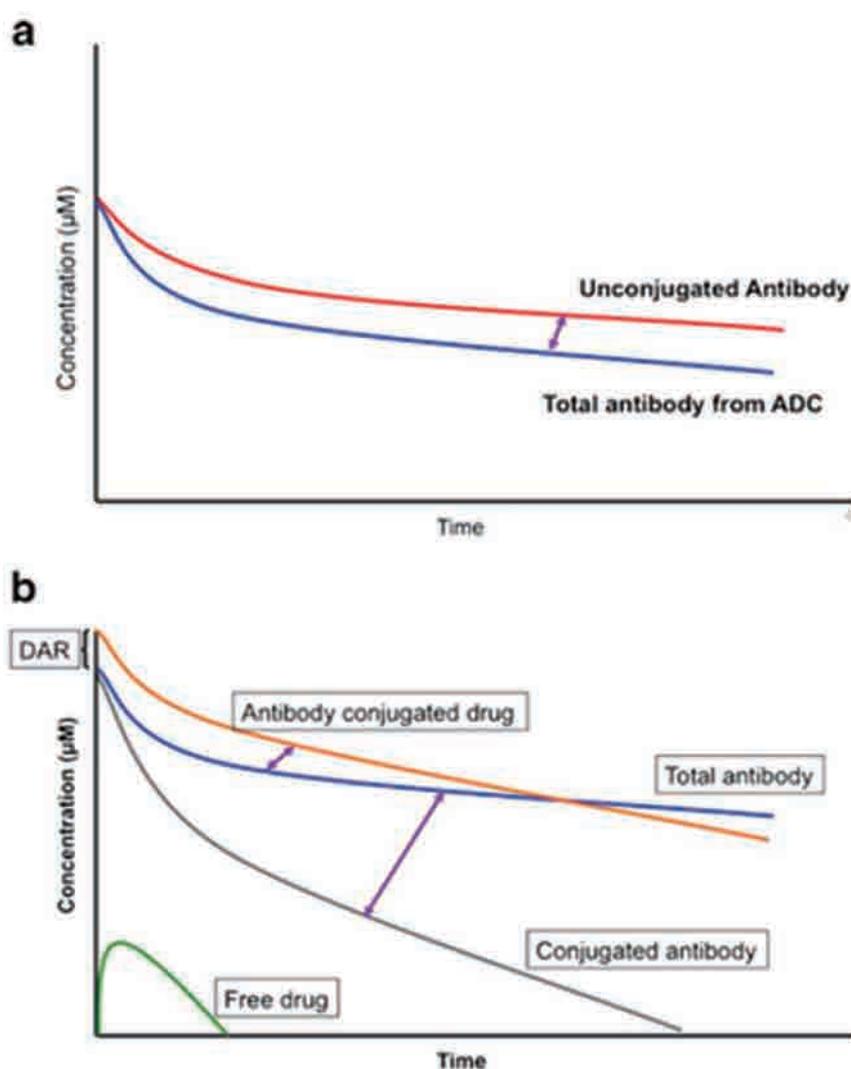


圖4.典型的濃度與時間變化圖[2](Pharmaceutical Research, 2012, 29: 2354—2366)

(a)紫色箭頭代表鍵結後造成清除率(clearance)差異

(b)橘線起始濃度高於藍線，這之間的差距即為DAR

2. LC-MS

a. 偵測體內(in vivo) 抗體藥物負載量(payloads)轉變：affinity capture-LC-MS

使用上面覆蓋有鏈親合素(streptavidin)塗層的特製磁珠加上生物素化(biotinylated)的目標抗原，就能使血漿樣品中的ADC結合在目標抗原上並從樣品中分離出來，經清洗純化後就能上機分析血液樣品中ADC的payload分布(圖5)，計算不同時期生物體內DAR和payload分布的變化。

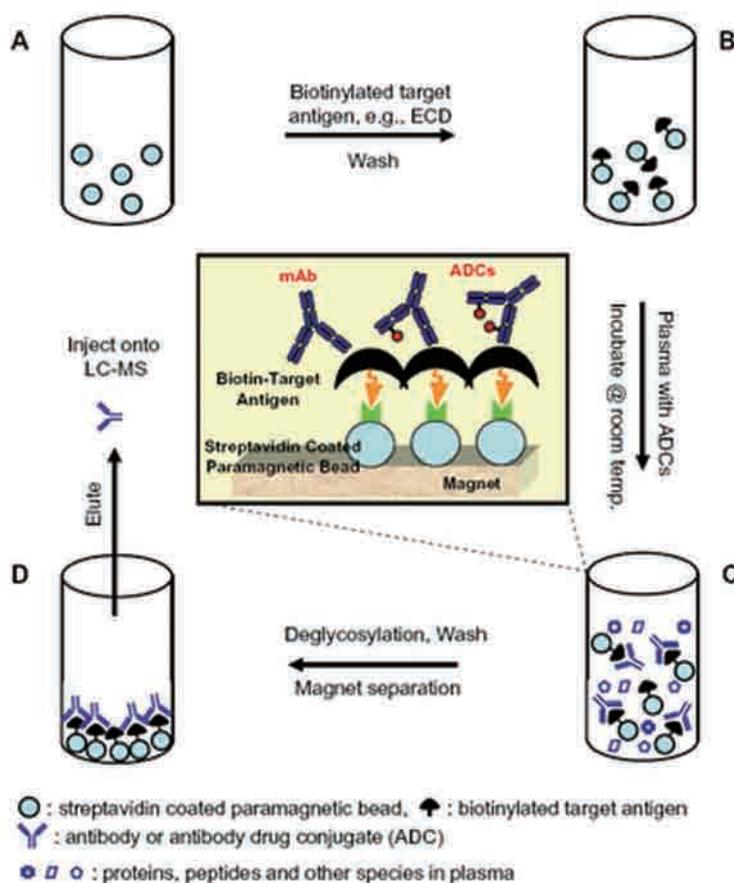


圖5. Affinity capture LC-MS示意圖^[6]

(ECD: extracellular domain) (Analytical Biochemistry, 2011, 412: 56—66)

b. 偵測小分子藥物與代謝產物：SPE(Solid phase extraction)-LC-MS/MS^[5]

一些小分子藥物和其代謝物可使用簡單的方式進行純化，例如DM1和DM1相關代謝產物。樣品經沉澱處理取上清液並進行還原後，可直接使用碳18管柱進行固相萃取，接著直接上機利用LC-MS/MS分析定量，即可比較不同時間內DM1與其代謝產物在血液中濃度的消長。

c. 偵測小分子藥物在ADC上的鍵結位置：酵素水解加上LC-MS/MS^[7]

將ADC以適合的蛋白質切割酵素水解後以LC-MS/MS進行分析，可從肽圖譜中判讀小分子藥物在ADC上的鍵結位置。

3. SPECT(Single Photon Emission Computed Tomography)/ PET(Positron Emission Tomography)：可偵測生物活性分布(Biodistribution)^[8]

有些ADC的目標抗原在正常細胞也會有低量表現，這可能會對正常組織的細胞造成毒性，為了瞭解ADC在腫瘤細胞與正常組織間的分布，可利用同位素標定ADC，接著用SPECT或是PET得到影像數據，就能得知ADC在不同組織間代謝與累積的情況。

結語

作為一個抗體療法與小分子藥物的複合體藥物，ADC展現了獨特的藥理與藥物動力學特性。現今研發了許多新的鍵結方式與連接子，而相關的活體外與臨床前的研究資訊也越來越豐富，加上各種新穎的PK/PD模式應用開發，這些有力的工具能夠協助解決ADC的PK難題。因此，如何將ADC在活體外的PK模式轉換成活體內也能應用的模式會是未來的關鍵。

參考文獻

1. Kamath, A. V. & Iyer, S. Challenges and advances in the assessment of the disposition of antibody-drug conjugates: Assessment of Antibody-Drug Conjugate Disposition. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 37, 66—74 (2016).
2. Lin, K. & Tibbitts, J. Pharmacokinetic Considerations for Antibody Drug Conjugates. *Pharmaceutical Research* 29, 2354—2366 (2012).
3. Shen, B.-Q. et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nature Biotechnology* 30, 184—189 (2012).
4. Salomon, P. L. & Singh, R. Sensitive ELISA Method for the Measurement of Catabolites of Antibody—Drug Conjugates (ADCs) in Target Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics* 12, 1752—1761 (2015).

5. Dere, R. et al. PK assays for antibody—drug conjugates: case study with ado-trastuzumabemtansine. *Bioanalysis* 5, 1025—1040 (2013).
6. Xu, K. et al. Characterization of intact antibody—drug conjugates from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography—mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 412, 56—66 (2011).
7. Wang, L., Amphlett, G., Blättler, W. A., Lambert, J. M. & Zhang, W. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Science* 14, 2436—2446 (2005).
8. Boswell, C. A., Bumbaca, D., Fielder, P. J. & Khawli, L. A. Compartmental Tissue Distribution of Antibody Therapeutics: Experimental Approaches and Interpretations. *The AAPS Journal* 14, 612—618 (2012).

2017明生公司活動回顧

賀！明生生物科技蛋白質分析實驗室於2017年12月零缺失通過USFDA查核！

明生生物科技於2017年12月接受了美國食品藥物管理局USFDA的查核，此次查核是國內藥廠於美國申請ANDA藥品查驗登記送審中，有關CMC部分委託之藥品分析案件進行查核。此次查核結果已收到來自USFDA之報告(EIR)，查核報告說明明生生物科技已建構完善的品質系統，能針對設施、儀器、材料與分析流程做有效的管控。報告亦呈現該試驗相關的數據記錄與文件等皆完整且正確反映分析結果。此次查核是國內首宗針對GMP藥品委外分析試驗單位進行查核，實驗室維持一貫之高品質標準，首次接受USFDA查核即零缺失(No Inspectional Observations)通過，實屬難能可貴之結果。

明生蛋白質藥物分析實驗室於2012年成為國內第一個通過TFDA GLP查核之蛋白質藥物特性分析實驗室，今年又成為首次通過US FDA的GMP藥品專業委託試驗機構。實驗室正著手將GMP規範中與試驗分析相關的品質項目，完整導入實驗室的分析品項中，在GLP生化分析實驗室之外，建構符合GMP規範的專業藥物分析實驗室，以因應更完整藥物分析需求，接受GMP藥廠的原料藥或是藥物成品的品管分析委託案。明生公司一向秉持高規格的品質系統，品保觀念已內化至試驗分析的日常，在品質保證下提供各項CRO服務。



國內外參展活動分享

明生公司2017年積極參與海外展覽活動，包含6月底的BIOtech Japan 2017及10月份的BioJapan 2017等亞洲大型的生技醫藥展會，與更多的國際生技產業人員進行交流與連結，開拓更多元的商業合作模式。不僅如此，明生也參與國內生物科技一年一度大展的BioTaiwan展會，藉由參展的方式了解研發人員分析需求，進而開發更多的分析技術，滿足市場的需求。明生團隊亦受邀到中國蒲公英論壇廣州年會進行專題演講，講題內容為生物藥品檢定方法的建立，為生物藥品生產開發的特性分析項目進行深入的探討。中國在藥品生產的品質管控日趨嚴格與成熟，中國正式加入ICH協會成員，顯見CFDA將會對藥品生產管制做更嚴謹的審查。蛋白質科技處每年一度的盛事-蛋白質藥物開發研討會邀請到多位深具生物藥品開發經驗的講者與生技界的菁英同場交流，從中學習更多的分析經驗以及法規實務經驗分享，得到許多業界先進的回饋，透過彼此學習帶動人員的成長，感謝共襄盛舉的先進夥伴，明生公司會持續精進並茁壯。

2018參展預告

PHAR-EAST 2018展會(攤位：D01，2/28-3/1，Singapore)

Asia's Pharma & Biotech Festival in Singapore

明生公司將於2月28日至3月1日參加於新加坡(Suntec Singapore International Exhibition & Convention Centre)舉辦之PHAR-EAST 2018 展會(原BioPharma Asia Convention展會)，該活動是亞洲最大藥品開發的聯合展會，每年皆吸引超過兩千人的與會。今年講題包含 Immunotherapy、Vaccine、Biosimilars、Cell&Gene therapy與法規及市場等專題討論，預料將吸引亞太區各大生技藥廠參與此屆高峰會議。今年度是明生擴大服務品項的元年，我們將積極建構前臨床試驗設施，提供前臨床動物與藥理學試驗，並導入GMP概念，強化GMP試驗分析服務，在台灣創立唯一符合GMP品質管控需求的專業藥品分析實驗室。明生公司將在會場展示說明藥品分析項目的解決方案，在大小分子藥物分析服務基礎上，提供由藥品製造與前臨床至臨床階段的各項專業服務，支援全球藥品開發的需求，獲得法規單位審批的認可，提升國際市場的競爭力。明生團隊會落實品質方案並與國際市場接軌，歡迎各位生技產業的夥伴與先進蒞臨現場與我們相互交流。

PHAR-EAST

ASIA'S PHARMA & BIOTECH FESTIVAL

1 - 2 March, Suntec Singapore

Innovation. Commercialisation. Access

攤位：D01，2/28-3/1，Singapore

JOIN US NOW!