

位点特异性抗体药物结合物为癌症治疗 – [新药研究新技术]

位点特异性抗体药物结合物为癌症治疗

Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy

Siler Panowski , Sunil Bhakta , Helga Raab , Paul Polakis 和 Jagath R Junutula*

Genentech , Inc ; South San Francisco , CA USA

关键词: 位点特异性结合, 抗体药物结合物, THIOMAB, 内化, 肿瘤 抗原, 连接物, 细胞毒药物

汤教授注: 基因公司在这篇文章详细介绍了位点特异性抗体药物结合的经验, 需要耐心阅读了解其进展。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929453/pdf/mabs-6-34.pdf>

在过去二十年癌症治疗抗体治疗药已革命。特异性结合肿瘤表面抗原抗体可能是有效治疗药; 但是, 许多未修饰的抗体缺乏治疗活性。作为替代应用以抗体药物结合物(ADCs)方式这些抗体成功地作为引导导弹输送效力细胞毒药物。ADCs 的成功依赖于四个因素—靶点抗原, 抗体, 连接物, 和有效载荷。通过美国食品药品监督管理局最近批准两个 ADCs 标志这些领域中巨大进展, 布妥昔单抗[brentuximab vedotin](Adcetris®)和 ado-曲妥珠单抗[trastuzumab]emtansine (Kadcyla®)。但是, 对许多目前在临床前或临床开发 ADCs 治疗窗仍狭窄而可能需要进一步改进增强这些 ADCs 的治疗潜能。ADCs 的生产是一个领域其中需要改进因为当前方法产生异质性混合物可能包括0-8种药物种类每抗体分子。位点特异性结合最近曾显示消除异质性, 改进结合稳定性, 和增宽治疗窗。在此, 我们综述和描述各种位点特异性结合策略目前被用于 ADCs 生产, 包括使用工程化半胱氨酸残基, 非天然氨基酸, 和酶学结合通过糖基转移酶 s 转谷氨酰胺酶。此外, 我们还总结

些方法中差别和强调至关重要的考虑 党构建下一代 ADC 治疗药。

引言

单克隆抗体(mAbs)由于其对靶抗原的高特异性和亲和力早已是在基础研究不可或缺的工具。对过去二十年,治疗性 mAbs 对宽广范围疾病,包括炎症疾病和癌症医学护理有重大影响。mAbs 的一个至关重要的特点是其高特异性和其与结合靶抗原能力,标记它们为去除通过方法例如补体依赖细胞毒性(CDC)或抗体依赖细胞介导细胞毒性(ADCC)[1]。抗体还可通过结合和抑制靶抗原的功能传授治疗性获益,如曲妥珠单抗(Herceptin®),贝伐单抗[bevacizumab](Avastin®),和西妥昔单抗[cetuximab](Erbix®)[2]的情况。但是,抗体对肿瘤特异性抗原往往缺乏治疗活性[3]。结合至细胞毒药物或放射性核素可能扩展 mAbs 的用途和改进其效力和有效性;从而抗体被用作靶向和输送一个毒性有效载荷至选定疾病组织。这个方法是目前治疗性研究的主要重点。抗体曾被结合至若干细胞毒药物,通过各种连接物化学和在体外和在异种移植研究这些抗体药物结合物(ADCs)有选择地和潜在地杀死抗原-表达肿瘤细胞的能力[4-6]。在临床已证实 ADCs 成功,而现在有两个这类药物在美国上市,ado-曲妥珠单抗 emtansine (Kadcyla®)和布妥昔单抗(Adcetris®)。有超过30个 ADCs 目前正在进行临床研究,在未来可能更多结合物将被批准。

ADC 开发曾是迭代学习过程,ADCs 涉及从鼠类抗体被结合至标准化疗药物至完全人抗体结合至高效力细胞毒药物。我们对 ADCs 了解比过去十年已实质上改进和我们现了解其成功开发需要许多至关重要的因素,包括靶抗原选择,抗体,连接物,和有效载荷。最近见到进展的一个研究领域是结合化学。位点特异性结合的实施,其中结合只发生在工程化半胱氨酸残基或非天然氨基酸例如,已导致 ADC 均质生产和改进 ADC 药代动力学(PK)性质。本综述将集中在位点特异性结合的当前方法,以及我们对 ADCs 的当前和历史了解。

抗体-药物结合物

历史上 ADCs 的历史,为癌症治疗使用药物曾集中在靶向迅速地分裂的癌症细胞化疗。这些化疗药物包括叶酸和嘌呤类似物(氨甲喋呤[*methotrexate*],6-巯基嘌呤[6-*mercaptopurine*]),微管聚合抑制剂/促进剂(长春花生物碱,紫杉烷类)和 DNA 损伤药物(蒽环类[*anthracyclines*],氮芥[*nitrogen mustard*])[7]。这些化合物靶向癌症细胞但还有机体内其他正在分裂细胞,而患者接受治疗经受严重副作用大大限制给药剂量。治疗指数(最大耐受剂量/最小有效剂量)对这些药物是小,导致一个狭窄治疗窗(图1)。为克服药物开发这个障碍和改进治疗性指数,研究人员转向 ADCs。ADCs 的承诺是可选择性地输送毒性化合物至疾病组织,一种概念首先在1900s 年代早期被 Paul Ehrlich 描述为“神奇子弹”[8]。但是,ADC 开发不简单和在1980年代和1990s 年代早期面临若干挑战。几个早期意向在 ADC 开发包括 KS1/4抗体-氨甲喋呤结合物对非小细胞肺癌和 BR96抗体-多柔比星[*doxorubicin*]结合物为转移乳癌[9,10]。两个药物都在临床评价,单尽管定位于肿瘤,结合物显示小或无治疗性获益[11,12]。对这些早期结合物的失败主要原因可能是靶抗原选择差。被靶向 KS1和 BR96抗原最初被选定因为它们伴随癌症细胞表达,但两个抗原也在正常组织表达,导致毒性[11,13]。限制这些结合物成功其他因子是使用或嵌合或鼠类抗体,它可引发一种免疫原性反应,和使用较低效力药物。

Wyeth 和 Celltech 对这些早期 ADCs 改进与开发吉妥珠单抗奥唑米星[*gemtuzumab ozogamicin*](Mylotarg®),一种抗-CD33结合物为急性粒性白血病(AML)治疗。吉妥珠单抗奥唑米星掺入一个高效力卡奇霉素[*calicheamicin*]衍生物有助于改进疗效和一个人源化抗体限制免疫原性[14],但 mAb 药物连接物是不稳定和在48 h 中释放50%结合药物。虽然吉妥珠单抗奥唑米星在临床证实有前途活性和被授权在2000年被美国食品药品监督管理局(FDA)加速批准,该药物随后一线标准医护联用临床数据提出担忧安全性和临床获益以后从市场撤出[15,16]。

来自上述初始 ADC 计划学习到的经验教训被掺入至开发和设计第二代 ADCs，而这两个，布妥昔单抗和 ado-曲妥珠单抗 emtansine，显示令人印象深刻临床疗效和安全性，和最近被 FDA 批准。布妥昔单抗，由 Seattle Genetics 与 Millennium/Takeda 合伙开发为间变性大细胞淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤的治疗，化学上偶联一个抗-CD30嵌合抗体与高效力抗有丝分裂药，monomethyl auristatin E(MMAE)通过蛋白酶可裂解的连接[17]。Ado-曲妥珠单抗 emtansine，由 Genentech 与 ImmunoGen 的 ADC 连接物-药物技术开发，靶向人表皮生长因子受体2(Her2)-阳性乳癌和一个抗-Her2抗体(曲妥珠单抗)与细胞毒药物美登素[maytansine(DM1)]通过一个稳定连接物组合[18]。这些和其他 ADCs 开发得到的知识已导致更好了解 ADCs 功能和其临床性能的方式。

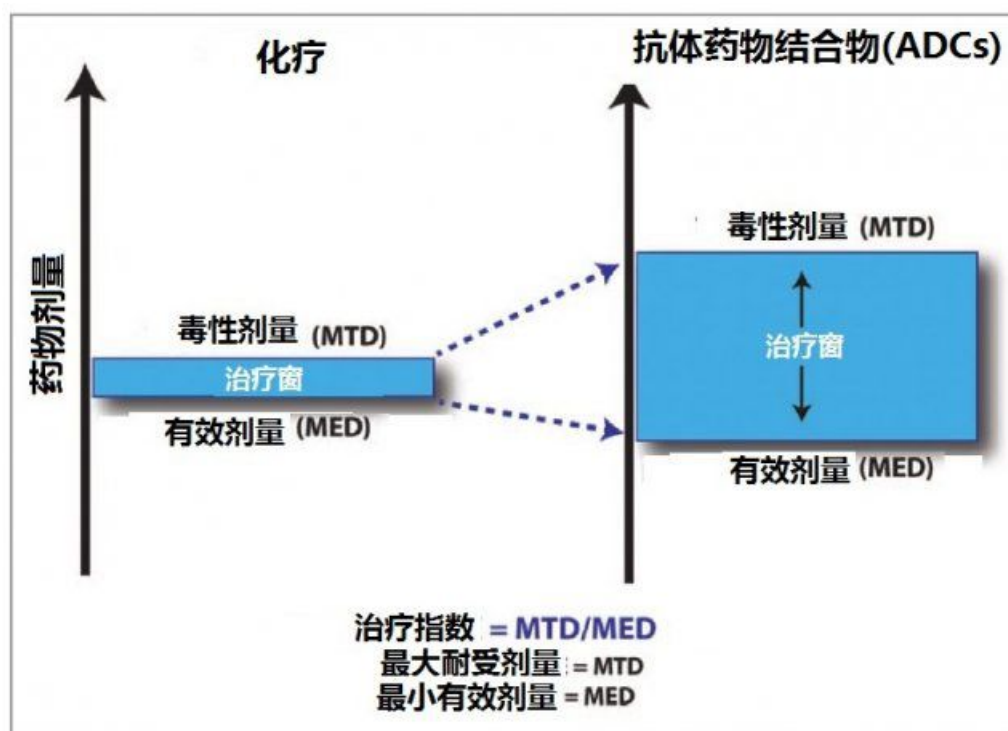


图1. ADCs 扩展治疗窗。与传统化疗癌症治疗比较 ADC 治疗药可能增加疗效和减低毒性。选择输送药物至癌症细胞增加药物达到肿瘤剂量百分率，从而降低最小有效剂量(MED)。增加最大耐受剂量(MTD)，而由于开拓靶向输送较少药物达到正常，非-靶组织。一起考虑，通过使用 ADCs 改善治疗窗。

ADC 功能和作用机制

ADCs 被设计以靶依赖方式杀死癌症细胞和在这个过程第一步是抗体与其抗原结合。肿瘤抗原必须位于细胞表面所有可被循环抗体接近。ADC 结合时，整个抗原-ADC 复合物通过受体-介导内吞被内化(图2)。这个过程一般地发生当一个配体结合在细胞表面受体和启动一个级联事件，包括衔接蛋白[adaptors]和网格蛋白[clathrin]的招募，细胞质膜向内出芽，早期内涵体[endosomes]的形成，和最后转运至晚内涵体和溶酶体[19]。一旦在溶酶体内，ADCs 被裂解和释放游离细胞毒药物至细胞，导致细胞死亡。细胞死亡的作用机制可能根据所用细胞毒类型变化(如，微管蛋白聚合抑制剂例如美登素类和 auristatins 破坏细胞分裂，DNA 相互作用药物 DNA 损伤例如加利利霉素[calicheamicins]和 duocarmycins) [20]。当药物被释放至肿瘤环境癌症周边细胞也可能被杀死通过所谓旁观者效应过程细胞死亡[21]。对有作用的 ADCs，肿瘤细胞必须内侧和周围达到游离毒性药物的阈值水平。因子影响是否符合这个阈值，和从而决定一个 ADC 的成功，包括靶点肿瘤抗原，抗体，连接物和细胞毒药物(图3)。

ADCs 的解剖学

如早期所述肿瘤抗原是重要性，理想肿瘤抗原必须位于细胞表面允许 ADC 结合。肿瘤和正常组织间抗原最好表达不同，在癌症细胞中表达增加。在正常组织表达抗原可能增强结合物被组织摄取，导致毒性和降低对肿瘤可供利用结合物的剂量。肿瘤抗原另一个重要特征是 ADC 结合能够内化。ADC-抗原复合物通过受体介导内吞内化，接着 ADC 在溶酶体内分解，导致最优游离药物释放和有效杀死细胞。该内吞将发生不保证对所有细胞表面抗原，而内化的速率可能变动从迅速至零。最小 ADC 再循环至细胞表面和对最大释放毒性游离药物至细胞也需要增强内化抗原/ADC 输送至溶酶体。因此，理想的应是细胞表面表达肿瘤抗原，在癌症组织中高度上调，ADC 结合内化，和能释放细胞毒药物在细胞内侧[22]。

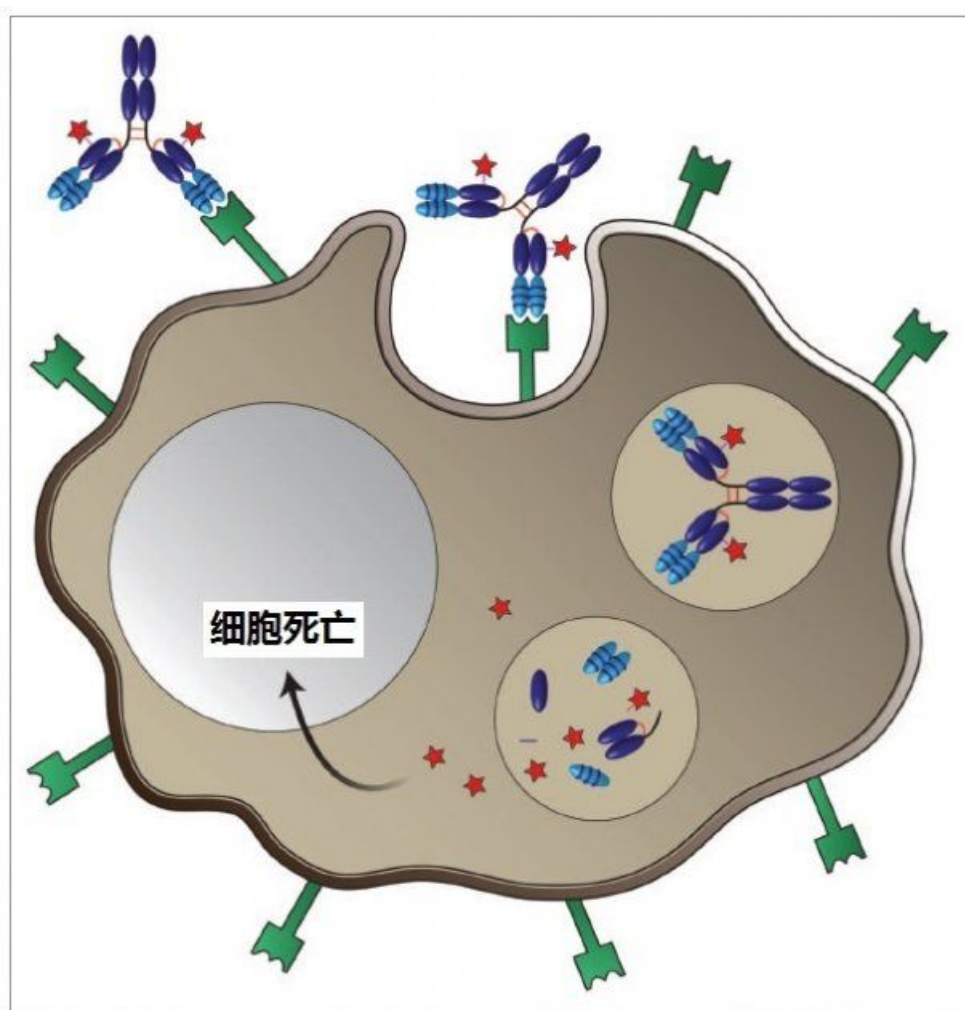


图2.通过 ADCs 细胞毒药物输送至癌症细胞。ADC 的单克隆抗体组分选择性地结合至细胞表面肿瘤抗原，导致 ADC-抗原复合物通过受体介导内吞过程内化。ADC-抗原复合物然后转送至溶酶体隔室和被降解，在细胞内侧释放活性细胞毒药物。依赖于药物作用机制游离药物通过或微管聚合抑制作用或 DNA 结合/损伤致细胞死亡。

抗体特异性，亲和力，和药代动力学另一个至关重要的因子影响 ADC 成功是抗体本身。即使完美肿瘤抗原不能靶向如被选定抗体不含有几个至关重要属性。抗体对肿瘤抗原的高特异性是必不可少的。一个抗体与其他抗原交叉反应或显示一般非-特异性结合可能被正常组织不可预知的和在大量摄取，导致 ADC 在到达肿瘤前毒性和去除/消除二者[5,11,13]。为有效摄取至靶细胞抗体还必须与靶点抗原以高亲和力结合($K_d < 10 \text{ nM}$)和它应是免疫原性最小。针对

一个 ADC 安装的免疫反应，例如针对鼠类 ADC 人抗-小鼠抗体(HAMA)，重复周期治疗可预防[23]。重要还选择一个有最佳 PK 性质抗体(较长半衰期与血浆中较慢清除率)[24]。最后，应注意到与抗体相关有些未知因子似乎促进 ADC 活性，如在一项研究中显示只有2/7与 CD22结合的抗体 结合物在体内有效，一种引人注目结果可能不单是由于 PK 性质所致[25]。

连接物选择和细胞内药物释放

肿瘤抗原鉴定后和开发抗体下一步是选择一个适宜连接物/细胞毒性药物。可以预料，药物在 ADC 活性和特征中起主要作用。可能不太直观的是抗体和药物间连接物也非常重要。一个理想连接物应在循环血中稳定，但允许迅速肿瘤细胞内释放活性游离药物。如连接物在血中不稳定，药物将被丢失和 ADC 活性减低[15,26]。

当前正在评价连接物格式可被大致分类为两组：可裂解的连接物(酸不稳定连接物，蛋白酶可裂解的连接物，和二硫键连接物)和非-可裂解的连接物。酸不稳定连接物被设计在血中遇到 pH 水平时稳定，但在溶酶体内低 pH 环境变成不稳定和降解(如，吉妥珠单抗奥唑米星)。蛋白酶-可裂解的连接物也是被设计成在血/血浆中稳定，但在癌症细胞溶酶体内迅速被溶酶体酶裂解释放游离药物。它们有溶酶体内部蛋白酶活性高水平的优点和包括被这些蛋白酶识别和裂解的一个肽序列，如有一个被组织蛋白酶迅速的水解二肽 Val-Cit 连接(如，布妥昔单抗)。

细胞内部释放游离药物(如，抗-CD56-美登素结合物 IMGN-901)。在非-可裂解的类别中连接物提供在血中高稳定性，但完全依赖内化，溶酶体输送，和 ADC 复合物的降解为释放活性药物和杀死癌症细胞(如，ado 曲妥珠单抗 emtansine)。在细胞外间隙可能不释放药物和是不可能杀死邻近肿瘤细胞通过旁观者效应[27]。此外，优化连接物选择依赖于选择的靶抗原。证实有 s 针对7个 B 细胞靶点(CD19，CD20，CD21，CD22，CD79b，和 CD180)可裂解的连接物 ADC 显示在体内疗效。相反，只有靶抗原 被内化和有效输送至溶酶体(CD22和 CD79b)显示有非-可裂解的连接物在体内疗效[28]。在细胞中游离药物释放的特异性是所有连接物主要目标，而对控制高效力药物用于构建 ADCs 的毒性很重要。但是，对上述连接物 s 和连接物选择疗效和毒性间平衡作用变化将最终依赖实验确定正确连接物，靶点抗原和想要有效载荷最优组合。

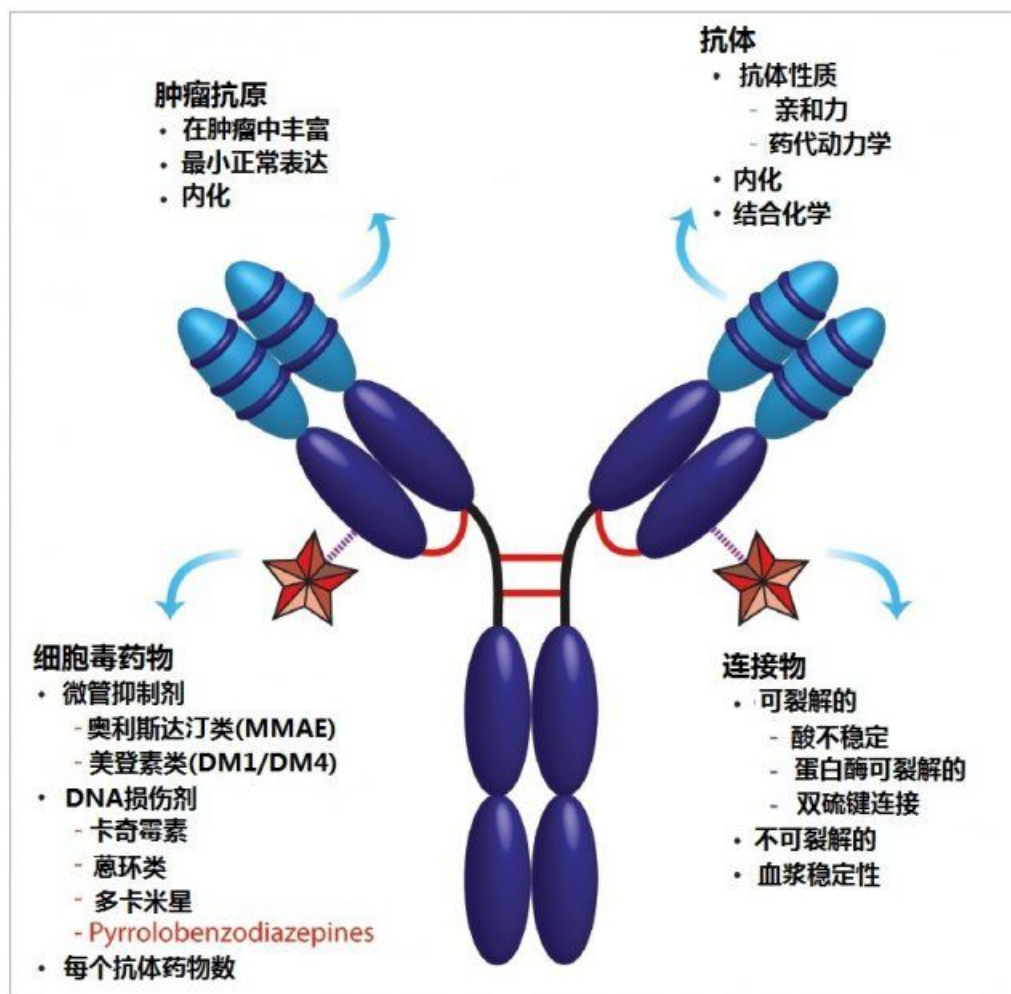


图3. 影响 ADC 治疗药至关重要的因子。ADCs 由一个细胞毒药物借助于一个选定连接物结合至一个单克隆抗体组成。这些组分全部影响 ADC 性能和其优化对成功的结合物开发必不可少。

细胞毒药物

一个 ADC 的成功还依赖于使用最佳药物。被注射抗体定位于一个实体肿瘤的百分率是非常小(0.003–0.08%被注射剂量每克肿瘤)；因此，毒性化合物有低于-纳摩尔浓度效力是可取的[29]。此外，药物为结合必须含适宜官能团和需要在生理条件下稳定。目前正在用于构建 ADCs 药物一般分为两类：微管抑制剂和 DNA-损伤剂。英注意到其他药物例如聚合酶 II 抑制剂，鹅膏蕈碱[α-amanitin]，也在研究中[30]。

微管抑制剂结合微管，微管不稳定化，和致 G2/M 期细胞停止。Auristatins 和美登素类是两类微管抑制剂是目前用于 ADC 开发。MMAE 是一种高效力 auristatin(游离药物 IC₅₀: 10⁻¹¹-10⁻⁹ M)由 Seattle Genetics 开发和用于布妥昔单抗，而 DM1 是一种高效力美登素类(游离药物 IC₅₀: 10⁻¹¹-10⁻⁹ M)被 ImmunoGen 开发和用于 ado-曲妥珠单抗 emtansine[23,31-34]。

DNA-损伤剂包括蒽环类，卡奇霉素，多卡米素类[duocarmycins]，和 pyrrolobenzodiazepines (PBDs)。所有这些药物功能通过结合 DNA 的小沟和引起 DNA 直立断裂[stand scission]，烷化，或交联[cross-linking]。细胞毒素是高效力，有游离药物 IC₅₀ <10⁻⁹ M，而 ADCs 掺入这些药物已在临床开拓，包括 inotuzumab ozogamicin，一种

Pfizer 开发的抗 -CD22- 卡奇霉素结合物，和 MDX-1203，一种 Bristol-Myers Squib. 开发的抗 -CD70-duocarmycin[14,20,35-38]。

ADCs 从 BR96-多柔比星和 KS1/4-氨甲喋呤演变至目前上市的布妥昔单抗和 ado-曲妥珠单抗 emtansine 例证了在 ADC 领域许多科学家实质性努力和创新，和需要优化 ADCs 的所有组分，包括抗体，连接物，和有效载荷。ADC 的成功开发依赖于疗效和毒性间微妙平衡的优化(靶点依赖和无关) (图4)。但是，工作还远未结束，而进一步发展对许多未来 ADC 产品的成功必不可少。在 ADC 演变中当前研究的一个领域有助我们采取下一步骤是位点特异性结合。

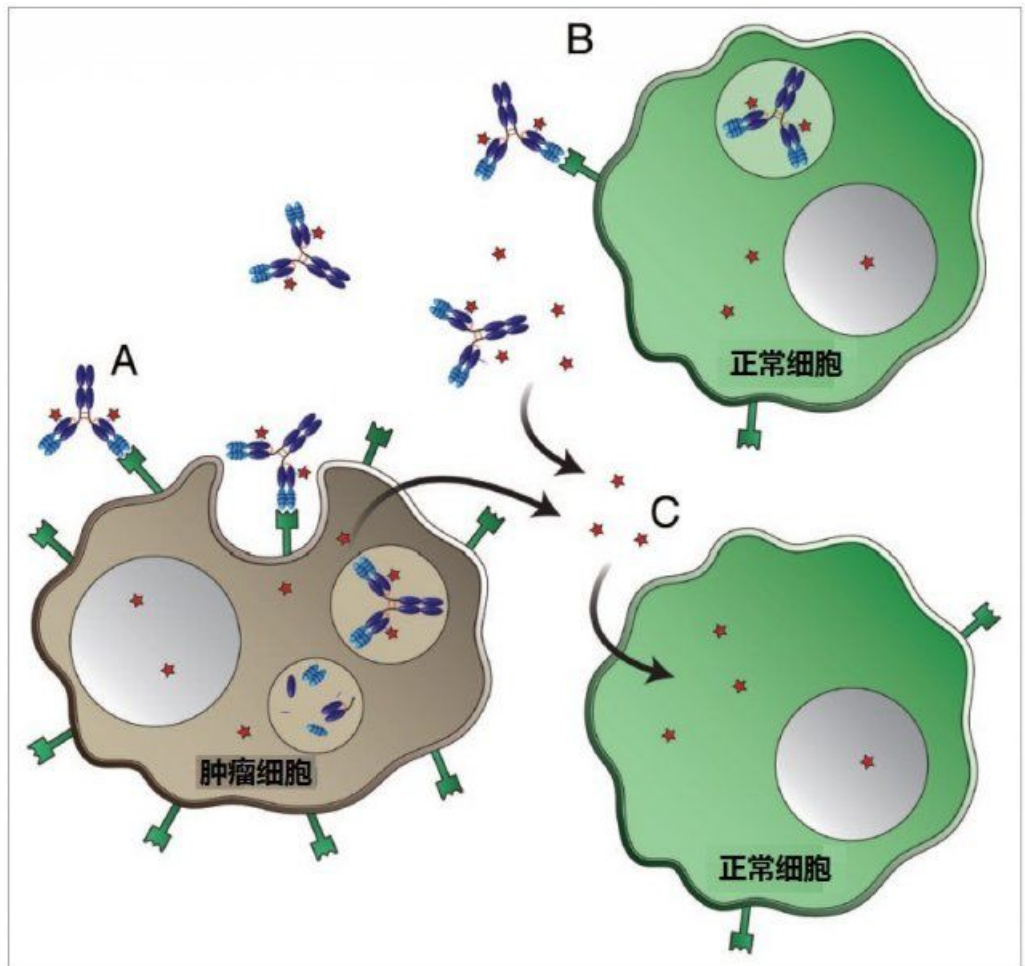


图4. ADC 在体内代谢。一个 ADC 的治疗窗依赖于疗效和毒性之间的微妙平衡的优化。ADCs 的预期效果是靶点-依赖性杀死肿瘤细胞靶点抗原高水平的表达(图 A)。靶点依赖性毒性和杀死表达靶点抗原低水平的正常细胞(B)，或通过游离药物进入正常细胞靶点无关毒性(图 C)。游离药物可能通过在血浆中 ADC 降解代谢或通过不稳定的易变化连接物释放游离药物，可能致副作用。。

位点特异性结合

常规的 ADC 结合过程传统地，连接物-药物至一个抗体的结合发生在溶剂易接近的反应性氨基酸例如赖氨酸或从抗体中链间二硫键还原衍生的半胱氨酸。赖氨酸结合导致0-8个结合物分子每抗体(图5)，而多肽作图曾确定结合发生在重链和轻链二者在~20个不同赖氨酸残基(40个赖氨酸每 mAb)。因此，可能生成大于一百万个不同 ADC 种类[6,39-41]。四个链间二硫键的还原后发生半胱氨酸结合，而结合从而限制至8个被暴露的巯基。连接物药物每抗体可能范围从0-8

个(图5)，生成超过100个不同的 ADC 种类[42]。在一个 ADC 混合物的异质性的多样性为2-倍因为这些 ADC 种类在药物负荷和结合位点中不同。因此，每个种类可能有不同性质，可能导致在体内 PK 性质宽广范围。此外，可能挑战 ADC 生产中批与批一致性和可能需要勤奋的制造能力。位点特异性结合，其中连接物-药物已知数量是始终[consistently]结合至确定位点，是克服这些挑战一种途径[43,44]。异质性被缩小和 ADC 性质更可预测，从批至批有一致结合物生产。药物-与-抗体比值(DAR)被精确地控制和可能被调整至各种连接物药物，生产或2-或4-DAR 位点特异性 ADCs(表1)。从而，位点特异性结合对 ADC 药物开发是一个主要进展和这是毫不奇怪研究人员都集中若干方法实现位点特异性结合。

通过工程化半胱氨酸残基位点特异性结合

氨基酸半胱氨酸含一个反应性巯基在许多蛋白结构和功能中起必不可少作用。长期以来通过半胱氨酸残基硫-反应性探针与蛋白的结合为蛋白标记方法，而也被应用于生成 ADCs。如上所述，这个过程涉及链间二硫键的部分还原和导致一个关于结合位点，药物数每个抗体，和链间二硫键完整数不同 ADCs 异质性混合物[42]。避免异质性的问题和维持二硫键，可被工程化半胱氨酸残基至蛋白，但对这个方法仍有许多挑战。蛋白表面上工程化游离半胱氨酸残基可与其他分子上半胱氨酸形成蛋白二聚体[45]。还有可能引入半胱氨酸与天然半胱氨酸残基分子内配对创建不适当二硫键，导致二硫键移动[shuffling]和可能蛋白失活[46]。用为位点特异性结合半胱氨酸残基引入的成功依赖于选择适当位点其半胱氨酸-取代不改变蛋白结构或功能的能力。要做到这一点，Phage Elisa 发展对反应性巯基的选择(PHESELECTOR)通过引入反应性半胱氨酸残基至一个抗体-Fab(曲妥珠单抗-Fab 4D5)在各种位点，显示在噬菌体上 Fab，和筛选鉴定不干扰抗原结合的反应性半胱氨酸[47]。

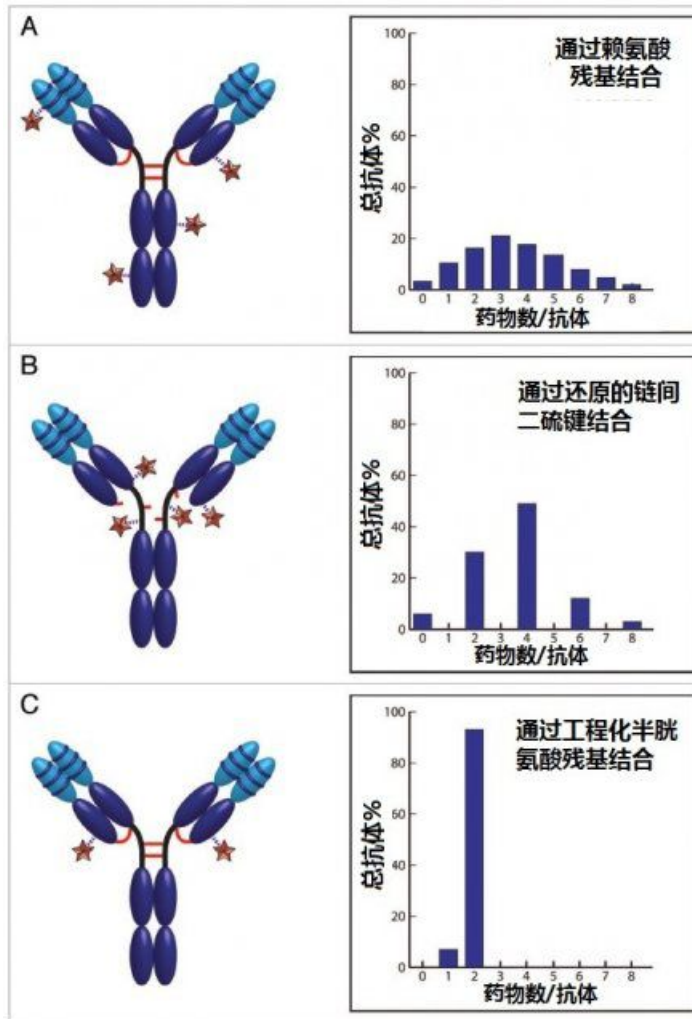


图5.对 ADC 开发结合方法。ADC 用传统结合通过赖氨酸残基或链间二硫键还原生产导致药物与抗体比值(DAR)和结合位点位置两方面高异质性。位点特异性结合大大减低这个异质性。(A)赖氨酸结合导致 DAR 为0-8和潜在结合在~40 赖氨酸残基/mAb。(B)通过还原链间二硫键结合 导致 DAR 为0-8和潜在结合在8个半胱氨酸残基每 mAb。(C)利用两个工程化半胱氨酸残基位点特异性结合导致 DAR 为0-2和结合在两个位点/mAb。如果需要通过工程化四个位点 DAR 可被加倍。图内显示数据是既往发表再绘图[40,41,43]。

研究为确定这个方法与全长 mAbs，结合一个细胞毒药物至一个抗-MUC16 mAb 确定这个方法的通用性和有效性[43]。根据 PHESELECTOR 分析结果，重链丙氨酸114(Kabat 编号)被选择作为一种最适位点为半胱氨酸替代。与常规的半胱氨酸结合不一样，其中药物被结合至抗体重链和轻链二者，利用工程化半胱氨酸位点结合只发生在重链在工程化半胱氨酸残基，工程化巯基抗体(THIOMAB)结合物有大于92%含两个药物(图5)。根据这些结果，结合至工程化半胱氨酸是既有效又特异性，尤其是与常规的半胱氨酸结合比较。重要的是，在这个位置半胱氨酸取代与原始抗-MUC16抗体比较，不改变 HC-A114C 抗-MUC16THIOMAB 的抗原结合。这些结果是重要的因为它们证实发现的对半胱氨酸结合最优位点也可用一个抗-HER2 Fab 和 PHESELECTOR 方法应用至全长抗体，而数据现显示这些位点对位点特异性结合与其他 mAbs(曲妥珠单抗 THIOMAB，抗-CD22 THIOMAB，抗-Steap1 THIOMAB 和抗-TenB2 THIOMAB)工作良好[48-50]。

通过比较抗-MUC16药物结合物(ADCs)和 HC-A114C 工程化抗-MUC16 THIOMAB 药物结合物(TDCs)的传统治疗窗接着强调位点特异性结合的重要性。比较两个结合物的疗效和尽管有减低药物负荷(~2药物每 TDC 相比~3.5药物每 ADC)，位点特异性 THIOMAB 结合物两者在体外和在体内研究是一样活性和有效，从而提供在半数药物剂量等同疗

效。有趣的是，工程化位点特异性 TDC 结合物在大鼠和食蟹猴毒性模型与传统 ADC 结合物比较也都较好耐受 [40,43] 与常规的 ADCs 比较动物给予抗-MUC16位点特异性 TDCs 显示减低肝和骨髓毒性。在一起考虑，上述 结果显示位点特异性 TDCs 显示比常规的 ADCs 等同疗效和更大安全性和因此有改进治疗窗，进一步强调位点特异性结合的获益[43]。

非天然氨基酸和硒半胱氨酸

对位点特异性结合第二个策略中心在用生物-正交反应性柄氨基酸的插入例如第21个氨基酸，硒半胱氨酸，和非天然氨基酸，乙酰苯丙氨酸[acetylphenylalanine](pAcPhe)。为应用这些氨基酸曾开发两种方法和两者都利用终止密码子，但一个掺入硒半胱氨酸(Sec)通过配对乳白密码子[opal stop codon]，即 UGA，用一个硒半胱氨酸(Sec)插入序列和其他掺入 acetylphenylalanine 在琥珀终止密码子[amber stop codon]，UAG，利用一个 tRNA/氨酰 tRNA 合成酶对[aminoacyltRNA synthetase pair]。

在第一种方法应用硒半胱氨酸，是非常相似于经典氨基酸，半胱氨酸，但在硫原子位置上含一个硒原子。硒酸基(盐或酯)与硫醇基(盐或酯)相对物比较是一个更反应性亲核性,致使其中硒半胱氨酸被选定激活条件下它服从与亲电性化合物结合。在哺乳动物中已知约25个含硒蛋白，包括蛋白例如谷胱甘肽过氧化物酶[glutathione peroxidases]和 thioreductases[51]。在正常条件下，UGA 密码子对转录终止；但是，在存在硒半胱氨酸(Sec)插入序列(SECIS) 位于含硒蛋白的3' UTR，通过一个 mRNA 二级机构的形成和硒半胱氨酸(Sec)被插入在 UGA 密码子阻止终止[52]。通过插入 UGA 密码子和一个 SECIS 在基因的3' 端硒半胱氨酸(Sec)插入可被工程化至非-Sec 编码基因。最近在 Sec 标记和随后 mAbs 的位点特异性结合中用这个技术[53]。对位点特异性结合第二种方法利用非天然氨基酸，对乙酰苯丙氨酸[p-acetylphenylalanine](pAcPhe)。pAcPhe 含一个酮基可选择性地结合至一个含烷基胺类药物通过一个胍连接。掺入 pAcPhe 至一个抗体 ,在所需的位置琥珀终止密码子被取代至抗体。然后抗体 cDNA 被共表达 co-expressed 与琥珀抑制因子[amber suppressor]tRNA 和适当地配对突变体 tRNA 合成酶。这个 tRNA 合成酶负荷 pAcPhe 至或琥珀 tRNA 和从而 pAcPhe 在琥珀位点 UAG 被掺入至抗体[54,55]。为测试用位点特异性 ADC 结合这个概念的可行性，琥珀终止密码子被在曲妥珠单抗全长抗-Her2 IgG 基因重链上一个丙氨酸残基(A114)取代，被鉴定的相同结合位点和 THIOMABs 的工程化中描述。然后在有正确琥珀抑制转移核糖核酸[correct amber suppressor tRNA]/氨酰基-RNA 合成酶对的一株中国仓鼠卵巢细胞株中被表达成功地生产含 pAcPhe 抗-Her2 IgG。A 连接物有一个烷基胺基[alkoxy-amine]被附着至细胞毒药物，auristatin F，和然后结合至 pAcPhe 抗-Her2 IgG。结合物 在体内有活性和证实用非天然氨基酸生成位点特异性 ADCs 的可行性[56]。上述实例 pAcPhe 外，也在位点特异性结合利用相似过程涉及匹配 tRNA/氨酰基-RNA 合成酶对研究使用其他非天然氨基酸[57,58]。最近在体外转录和翻译方法为抗体表达发展和可能为位点特异性非天然氨基酸的掺入制定[59]。

表1.为生成位点特异性ADCs使用的方法				
	工程化半胱氨酸残基	非天然氨基酸	硒半胱氨酸	酶结合(谷氨酰胺标记,糖工程, FGE)
抗体工程化需要	半胱氨酸替代	琥珀终止密码子替代	添插入硒半胱氨酸序列	添加谷氨酰胺标记或醚标记,无对糖工程化或对预先存在谷氨酰胺标记 (Gln-295)
细胞株工程化需要	无	细胞株表达正交 tRNA/aaRS	无	细胞株过表达甲酰甘氨酸生成酶(FGE)为FGE方法,无对其他方法
抗体表达时需要另外试剂	无	非天然氨基酸	亚硝酸钠	无
为结合需要酶	无	无	无	糖基转移酶,转谷氨酰胺酶,
结合位点定位	任何位置	任何位置	C-端(其他未知位置)	Asn-297为糖工程,预先存在谷氨酰胺标记(Gln-295)或任何定位对其他方法
药物 - 与 抗体 比值 (DAR)	2或4	2或4	2	2对糖工程, 2或4对谷氨酰胺标记和FGE
结合化学	马来酰亚胺, 溴乙酰胺	胺类, Click化学	马来酰亚胺	Click化学,转酰胺, hydrozino-Pictet-Spengler化学
开拓位点特异性抗体结合方法研究机构	Genentech, MedImmune, Seattle Genetics	Allozyne, Ambrx, Sutro	每个国立癌症研究所	Innate Pharma, Glycos, Pfizer, Redwood Bioscience, SynAffix

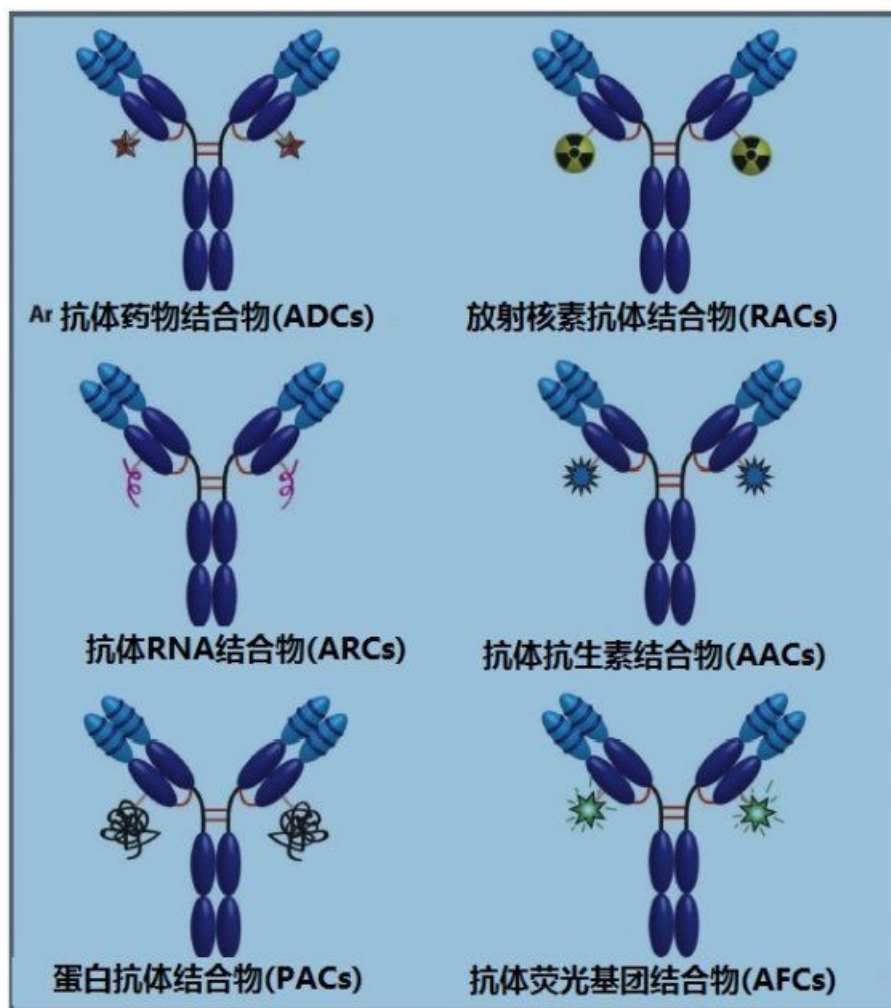


图6.位点特异性抗体结合物的应用。分子与单克隆抗体的位点特异性结合有广泛范围应用。位点特异性结合减低结合物异质性和改进稳定性和功能。在此代表若干可能抗体结合物和包括为癌症治疗抗体-药物结合物(ADCs)，为成像放射核素-抗体结合物(RACs)，抗体-抗生素结合物(AACs)与感染疾病斗争，和为成像和检测抗体荧光基团结合物(AFCs)。

酶学结合：糖基转移酶和转谷氨酰胺酶

在位点特异性结合中另一个策略正在开拓酶催化键形成的使用。两个平台，一个基于糖基转移酶和第二个基于转谷氨酰胺酶，最近被开发和似乎有前途。糖基转移酶平台用一个突变体糖基转移酶化学上附着活性糖部分至抗体上一个糖基化位点。然后选择的分子可被结合至糖部分上的化学柄。在第二个平台中，转谷氨酰胺酶被用于在连接物/药物间一个胺基上形成一个键和抗体上一个工程化谷氨酰胺残基。正在研究两个平台为生产ADCs和在下文更详细探讨。糖基转移酶是涉及寡核苷酸合成中一个大蛋白家族和负责从一个被激活的糖核苷酸转移糖残基至一个糖接受体或糖蛋白/脂质。已知几个糖基转移酶的结构和揭示糖供体特异性是由催化袋中少数氨基酸决定[60]。利用这个知识，糖基转移酶的袋内残基被突变，B4Gal-T1，至破坏供体特异性和允许化学上反应性糖残基，2-酮-Gal的转移[61]。这个技术允许转移化学上反应性糖至一个含糖基化位点的任何脂质或蛋白的能力。

人类IgG抗体含一个N-糖基化位点在Fc片段的保守的Asn-297处。聚糖附着至这个位点一般是复合物，但可能被去糖基化下至G0，一个糖基转移酶突变体能够转移C2-酮-Gal有高效[62]。然后C2-酮Gal活性化学柄可被偶联至

有一个正交反应性基的生物分子。这个方法被成功地使用位点特异性结合对抗-Her2抗体,曲妥珠单抗,与 Alexa Fluor 488 氨基乙酰胺和应是对位点特异性 ADC 生成一种可行的技术[62]。

第二个平台利用转谷氨酰胺酶催化游离胺基和一个谷氨酰胺侧链间一个共价键的形成。来自商品买到的 *Streptovorticillium mobaraense*(mTG)的转谷氨酰胺酶和被广泛的使用作为一种 蛋白交联剂[63]。mTG 不识别任何天然存在糖基化抗体 Fc 区内的谷氨酰胺残基,但的确识别一个“谷氨酰胺标记”可被工程化至一个抗体[64]。谷氨酰胺标记, LLQG, 是工程化至靶向表皮生长因子受体一个抗体的不变结构域不同位点。然后 mTG 被用于这些位点结合物与荧光团或 monomethyl dolastatin 10 (MMAD)和发现有良好生物物理性质和高程度结合的几个位点。mTG 还能够结合物至抗-Her2和抗-M1S1抗体上谷氨酰胺标记。一个抗-M1S1-vc-MMAD 结合物显示强在体外和在体内活性,提示结合用这个方法不改变抗体结合或亲和力并证实这个方法在 ADCs 的位点特异性结合中的用途[65]。

此外糖基转移酶和转谷氨酰胺酶,为在蛋白标记使用曾开拓其他酶[66]。一个这类酶,甲酰甘氨酸生成酶,识别 CxPxR 序列和氧化一个半胱氨酸残基形成甲酰甘氨酸,从而生成一个有醛标记蛋白。然后醛基可被结合至通过 hydrazino-Pictet-Spengler 化学选择的分子。这个技术似乎有前途和在位点特异性抗体标记中使用研究[67,68]。

位点特异性抗体结合物的应用

在许多应用 MAbs 是很有用处的范围从基础研究至疾病治疗。与 mAbs 结合物广泛各种分子能力曾进一步增加其功能。传统结合是通过附着分子至抗体上反应性赖氨酸或半胱氨酸残基进行。但是,结合利用这些方法可能发生若干不同位点和至不同程度,导致结合物种类的巨大异质性。已出现位点特异性结合作为减低异质性和改进抗体结合物一致性和功能性方法。

目前研究下若干位点特异性结合方法和在前面几节详细描述五种方法。这些方法所有导致位点特异性结合,但方法间存在几种差别,包括对抗体的遗传修饰要求,对结合使用的酶,和结合位点数和/或位置(表1)。

如上详细讨论, ADC 发展获益很大来自位点特异性结合因为在制造异质性和治疗窗增加的改进。最近,位点特异性方法还曾允许深入研究如何结合位点修饰在体内 ADC 稳定性和治疗活性[50]。在这个研究中,使用工程化半胱氨酸技术生成三种不同曲妥珠单抗 TH1OMABs,一个有高度易接近的结合位点(Fc-S396C),一个有部分地隐藏位点在一个正性电荷环境(LC-V205C),而一个有部分地隐藏位点在一个中性环境(HC-A114C)。细胞毒药物, monomethyl auristatin E (MMAE),被结合至三个曲妥珠单抗变种利用蛋白酶可裂解的连接物和被确定在体内治疗性疗效[50]。尽管相似药物负荷和亲和力,三个变种显示不同治疗活性。这个变异活性是由于在体内连接物稳定性是结构中和结合位点周围化学环境差异造成的。高溶剂-易接近的位点允许连接物-药物与白蛋白,半胱氨酸,或在血浆中还原谷胱甘肽马来酰亚胺交换。有最大治疗活性结合物在一个正性电荷环境含部分地隐藏巯基位点,允许琥珀酰亚胺环水解,防止马来酰亚胺交换和改进结合物稳定性[50]。没有位点特异性结合这个重要发现也不会可能。

位点特异性结合的另一应用是生成放射性核素抗体结合物(RACs)为使用作为治疗药或影像剂。目前有两个上市的 RACs,替伊莫单抗 ibritumomab tiuxetan(Zevalin®)和托西莫单抗[tositumomab](Bexxar®),为治疗淋巴瘤,其中放射性核素是通过抗-CD20 mAbs 靶向肿瘤[69]。两个这些分子是通过常规的结合生成,但它们和未来治疗性 RACs 将从使用位点特异性结合可能获益。在方法中也可能使用 RACs 例如免疫正电子发射断层扫描(ImmunoPET 或 iPET),在体内跟踪和定量抗体或为诊断目的。例如,工程化半胱氨酸残基被用于生成曲妥珠单抗 TH1OMABs,随后用 89Zr 标记。这些曲妥珠单抗 TH1OMAB 89Zr RACs 然后被成功地用于在 ImmunoPET 实验追踪在体内结合物分布和肿瘤摄取[70]。抗体也可结合至许多其他分子为研究和治疗药应用。当前抗体结合物包括抗体 RNA 结合物(ARCs)为干扰 siRNAs 的输送[71,72],抗体抗生素结合物(AACs)靶向病原体[73,74],抗体荧光体结合物(AFCs)为影像和实验室试剂[50],和蛋白抗体结合物(PACs)为 the 癌症治疗[75-77]。位点特异性结合可能被开拓为用这些结合物和将可能改

进其生产，稳定性，和均质性(图6)。对位点特异性结合方法学的发展已扩展 mAbs 的用途至许多令人激动未来应用，确保对这些强有力分子在研究和治疗药的第一线显著位置。

参考文献

1. Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2012; 22:3-13; PMID:22245472; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.009>
2. Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1073-8; PMID:16151394; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0905-1073>
3. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 2009; 100:1566-72; PMID:19538497; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01222.x>
4. Lambert JM. Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:543-9; PMID:16087399; <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2005.04.017>
5. Senter PD. Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2009; 13:235-44; PMID:19414278; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.023>
6. Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1137-46; PMID:16151407; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1141>
7. DeVita VT Jr., Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68:8643-53; PMID:18974103; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
8. Schwartz RS. Paul Ehrlich' s magic bullets. *N Engl J Med* 2004; 350:1079-80; PMID:15014180; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp048021>
9. Trail PA, Willner D, Lasch SJ, Henderson AJ, Hofstead S, Casazza AM, Firestone RA, Hellström I, Hellström KE. Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates. *Science* 1993; 261:212-5; PMID:8327892; <http://dx.doi.org/10.1126/science.8327892>
10. Varki N, Reisfeld R, Walter L. Effects of monoclonal antibody-drug conjugates on the in vivo growth of human tumors established in nude mice. New York: Alan R. Liss Inc, 1985.
11. Elias DJ, Hirschowitz L, Kline LE, Kroener JF, Dillman RO, Walker LE, Robb JA, Timms RM. Phase I clinical comparative study of monoclonal antibody KS1/4 and KS1/4-methotrexate immunconjugate in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50:4154-9; PMID:2162255
12. Saleh MN, Sugarman S, Murray J, Ostroff JB, Healey D, Jones D, et al. Phase I trial of the anti-Lewis Y drug immunoconjugate BR96-doxorubicin in patients with lewis Y-expressing epithelial tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000; 18:2282-92.

13. Tolcher AW, Sugarman S, Gelmon KA, Cohen R, Saleh M, Isaacs C, et al. Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; 17:478-84.

14. Sievers EL, Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:522-7; PMID:11673694; <http://dx.doi.org/10.1097/00001622-200111000-00016>

15. Ravandi F. Gemtuzumab ozogamicin: one size does not fit all—the case for personalized therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29:349-51.

16. Petersdorf S, Kopecky K, Stuart R. Preliminary results of Southwest Oncology Group Study S0106: An international intergroup phase 3 randomized trial comparing the addition of gemtuzumab ozogamicin to standard induction therapy versus standard induction therapy followed by a second randomization to post-consolidation gemtuzumab ozogamicin versus no additional therapy for previously untreated acute myeloid leukemia. [abstract 790]. *Blood* 2009; 114:326

17. Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol* 2012; 30:631-7; PMID:22781692; <http://dx.doi.org/10.1038/>

nbt.2289

18. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 2008; 68:9280-90; PMID:19010901; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1776>

19. Ritchie M, Tchistiakova L, Scott N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *MAbs* 2013; 5:13-21; PMID:23221464; <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.22854>

20. Sievers EL, Senter PD. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med* 2013; 64:15-29; PMID:23043493; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-050311-201823>

21. Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, Xie H, Ruberti MF, Phinney SJ, Leece BA, Chittenden T, Blättler WA, Goldmacher VS. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Res* 2006; 66:3214-21; PMID:16540673; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3973>

22. Teicher BA. Antibody-drug conjugate targets. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9:982-1004; PMID:20025606; <http://dx.doi.org/10.2174/156800909790192365>

23. Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 2008; 41:98-107; PMID:17705444; <http://dx.doi.org/10.1021/ar700108g>

24. Alley SC, Zhang X, Okeley NM, Anderson M, Law CL, Senter PD, Benjamin DR. The pharmacologic basis

for antibody-auristatin conjugate activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330:932-8; PMID:19498104; <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.109.155549>

25. Polson AG, Williams M, Gray AM, Fuji RN, Poon KA, McBride J, Raab H, Januario T, Go M, Lau J, et al. Anti-CD22-MCC-DM1: an antibody-drug conjugate with a stable linker for the treatment of non-Hodgkin' s lymphoma. *Leukemia* 2010; 24:1566-73; PMID:20596033; <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.141>

26. Carter PJ, Senter PD. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J* 2008; 14:154-69; PMID:18536555; <http://dx.doi.org/10.1097/PPO.0b013e318172d704>

27. Ducry L, Stump B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem* 2010; 21:5-13; PMID:19769391; <http://dx.doi.org/10.1021/bc9002019>

28. Polson AG, Calemene-Fenau J, Chan P, Chang W, Christensen E, Clark S, de Sauvage FJ, Eaton D, Elkins K, Elliott JM, et al. Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin' s lymphoma:target and linker-drug selection. *Cancer Res* 2009; 69:2358-64; PMID:19258515; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2250>

29. Sedlacek H-H, Seemeean G, Hoffmann D, Czech J, Lorenz P. Antibodies as carriers of cytotoxicity. *Contributions to Oncology* 1992; 43:1-145

30. Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, Herr I, Anderl J, Faulstich H. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:622-34; PMID:22457476; <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djs140>

31. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cervený CG, Chace DF, DeBlanc RL, Gearing RP, Bovee TD, Siegall CB, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2003; 21:778-84; PMID:12778055; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt832>

32. Gerber HP, Kung-Sutherland M, Stone I, Morris-Tilden C, Miyamoto J, McCormick R, Alley SC, Okeley N, Hayes B, Hernandez-Ilizaliturri FJ, et al. Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin

antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against

rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. *Blood* 2009; 113:4352-61; PMID:19147785; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-09-179143>

33. Kupchan SM, Komoda Y, Court WA, Thomas GJ, Smith RM, Karim A, Gilmore CJ, Haltiwanger RC, Bryan RF. Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J Am Chem Soc* 1972; 94:1354-6; PMID:5062169; <http://dx.doi.org/10.1021/ja00759a054>

34. Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science* 1975; 189:1002-5; PMID:1241159; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1241159>

35. Boger DL, Patane MA, Jin Q, Kitos PA. Design, synthesis and evaluation of bouvardin, deoxybouvardin and RA-I-XIV pharmacophore analogs. *Bioorg Med Chem* 1994; 2:85-100; PMID:7922127;

[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)82005-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896(00)82005-2)

36. Thorson JS, Sievers EL, Ahlert J, Shepard E, Whitwam RE, Onwueme KC, Ruppen M. Understanding and exploiting nature's chemical arsenal: the past, present and future of calicheamicin research. *Curr Pharm Des* 2000; 6:1841-79; PMID:11102565; <http://dx.doi.org/10.2174/1381612003398564>

37. Boger DL, Johnson DS. CC-1065 and the duocarmycins: unraveling the keys to a new class of naturally derived DNA alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:3642-9; PMID:7731958; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.9.3642>

38. Hartley JA. The development of pyrrolobenzodiazepines as antitumour agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20:733-44; PMID:21457108; <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2011.573477>

39. Wang L, Amphlett G, Blattler WA, Lambert JM, Zhang W. Structural characterization of the maytansinoid monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2005; 14:2436-46.

40. Junutula JR, Flagella KM, Graham RA, Parsons KL, Ha E, Raab H, et al. Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010; 16:4769-78.

41. Dere R, Yi JH, Lei C, Saad OM, Huang C, Li Y, Baudys J, Kaur S. PK assays for antibody-drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine. *Bioanalysis* 2013; 5:1025-40; PMID:23641694; <http://dx.doi.org/10.4155/bio.13.72>

42. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MM, Lenox J, Cervený CG, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10:7063-70.

43. Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol* 2008; 26:925-32; PMID:18641636; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1480>

44. McDonagh CF, Turcott E, Westendorf L, Webster JB, Alley SC, Kim K, Andreyka J, Stone I, Hamblett KJ, Francisco JA, et al. Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment. *Protein Eng Des Sel* 2006; 19:299-307; PMID:16644914; <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzl013>

45. Woo HJ, Lotz MM, Jung JU, Mercurio AM. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *J Biol Chem* 1991; 266:18419-22;

PMID:1917966

46. Wootton SK, Yoo D. Homo-oligomerization of the

porcine reproductive and respiratory syndrome virus

nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol* 2003; 77:4546-57; PMID:12663761;

<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.8.4546-4557.2003>

47. Junutula JR, Bhakta S, Raab H, Ervin KE, Eigenbrot C, Vandlen R, Scheller RH, Lowman HB. Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J Immunol Methods* 2008; 332:41-52; PMID:18230399; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2007.12.011>

48. Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, Bumbaca D, Valle NR, Kozak KR, Fourie A, Chuh J, Koppada N, Saad O, et al. Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of anti-STEAP1 antibody-drug conjugates in rats. *Bioconjug Chem* 2011; 22:1994-2004; PMID:21913715; <http://dx.doi.org/10.1021/bc200212a>

49. Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, Stainton SL, Yu SF, Lacap JA, et al. Differential effects of predosing on tumor and tissue uptake of an ¹¹¹In-labeled anti-TENB2 antibody-drug conjugate. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 2012; 53:1454-61.

50. Shen BQ, Xu K, Liu L, Raab H, Bhakta S, Kenrick M, Parsons-Repointe KL, Tien J, Yu SF, Mai E, et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol* 2012; 30:184-9; PMID:22267010; <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2108>

51. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003; 300:1439-43; PMID:12775843; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1083516>

52. Caban K, Copeland PR. Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:73-81; PMID:16416259; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5402-y>

53. Hofer T, Skeffington LR, Chapman CM, Rader C. Molecularly defined antibody conjugation through a selenocysteine interface. *Biochemistry* 2009; 48:12047-57; PMID:19894757; <http://dx.doi.org/10.1021/bi901744t>

54. Liu W, Brock A, Chen S, Chen S, Schultz PG. Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nat Methods* 2007; 4:239-44; PMID:17322890; <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1016>

55. Wang L, Zhang Z, Brock A, Schultz PG. Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:56-61; PMID:12518054; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0234824100>

56. Axup JY, Bajjuri KM, Ritland M, Hutchins BM, Kim CH, Kazane SA, Halder R, Forsyth JS, Santidrian AF, Stafin K, et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:16101-6; PMID:22988081; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1211023109>

57. Young TS, Ahmad I, Yin JA, Schultz PG. An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E.*

coli. J Mol Biol 2010; 395:361-74; PMID:19852970; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.030>

58. Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, Bertozzi CR. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:19-24; PMID:11752401; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.012583299>

59. Yin G, Garces ED, Yang J, Zhang J, Tran C, Steiner AR, et al. Aglycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable in vitro transcriptiontranslation system. MAbs 2012; 4; PMID:22377750

60. Qasba PK, Ramakrishnan B, Boeggeman E. Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases.

Trends Biochem Sci 2005; 30:53-

62; PMID:15653326; <http://dx.doi.org/10.1016/j.j>

tibs.2004.11.005

61. Ramakrishnan B, Qasba PK. Structure-based design

of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens beta 4Gal-T1 donor specificity. J Biol Chem 2002; 277:20833-9; PMID:11916963; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111183200>

62. Boeggeman E, Ramakrishnan B, Pasek M, Manzoni M, Puri A, Loomis KH, Waybright TJ, Qasba PK. Site specific conjugation of fluoroprobes to the remodeled Fc N-glycans of monoclonal antibodies using mutant glycosyltransferases: application for cell surface antigen detection. Bioconjug Chem 2009; 20:1228-36; PMID:19425533; <http://dx.doi.org/10.1021/bc900103p>

63. Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64:447-54; PMID:14740191; <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1539-5>

64. Jeger S, Zimmermann K, Blanc A, Grünberg J, Honer M, Hunziker P, Struthers H, Schibli R. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angew Chem Int Ed Engl 2010; 49:9995-7; PMID:21110357; <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201004243>

65. Strop P, Liu SH, Dorywalska M, Delaria K, Dushin RG, Tran TT, Ho WH, Farias S, Casas MG, Abdiche Y, et al. Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. Chem Biol 2013; 20:161-7; PMID:23438745; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.010>

66. Sunbul M, Yin J. Site specific protein labeling by enzymatic posttranslational modification. Org Biomol Chem 2009; 7:3361-71; PMID:19675886; <http://dx.doi.org/10.1039/b908687k>

67. Carrico IS, Carlson BL, Bertozzi CR. Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. Nat Chem Biol 2007; 3:321-2; PMID:17450134; <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio878&nbs>