

双特异性抗体研发进展

张峰, 王开芹, 王兰*

(中国食品药品检定研究院 单克隆抗体产品室 卫生部生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 北京 102629)

摘要: 双特异性抗体 (bsAb) 因可同时特异性结合 2 个不同抗原表位, 拓展了治疗性单克隆抗体的临床应用范围。制备 bsAb 需要对传统的抗体结构进行改造, 在此过程中衍生出了数十种结构, 不同的结构具有不同的作用特点。本综述就当前典型的 bsAb 结构及其原理进行介绍, 对 bsAb 的作用原理进行分析, 并对当前代表性的 bsAb 的研发阶段进行了简单总结。

关键词: 双特异性抗体 (bsAb); 单克隆抗体; 抗体结构; 研发; 进展

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)01-0078-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.01.10

Development in bispecific antibody

ZHANG Feng, WANG Kai-qin, WANG Lan*

(Division of Monoclonal Antibody, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

Abstract: The clinical application of therapeutic monoclonal antibody has been extended by bispecific antibody (bsAb) due to their capacity of binding two different antigenic epitopes. Structure changing would be needed for the construction of bsAb. There are several tens of bsAb structures developed, the specific action characteristics of which are related with their unique bsAb structure. In this review, typical structures and acting principles of bsAb were introduced, the action principle of bsAb was analyzed, and the development stages of representative bsAb were briefly summarized.

Keywords: bispecific antibody (bsAb); monoclonal antibody; antibody structure; research; development

双特异性抗体 (bispecific antibody, bsAb) 为可以同时特异性结合 2 个抗原或抗原表位的单一抗体分子, 通过该作用特点, 达到同时阻断 2 个抗原/表位介导的生物功能或将表达 2 种抗原的细胞拉近而增强两者间相互作用的目的。bsAb 的概念出现在 20 世纪 80 年代, Morrison 等首先通过将不同特异性的单链抗体使用柔性肽段连接后融合表达的方式制备

了第 1 种真正意义上的抗葡聚糖和丹磺酰基的四价 bsAb^[1]。由于技术瓶颈和临床需求不足的限制, bsAb 的发展一直受到阻碍。随着对疾病发病机制的深入了解, 临床上产生了对 bsAb 的需求, 同时治疗性单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) 的飞速发展大大提高了抗体的构建、表达和纯化技术, 使 bsAb 发展具备了克服限制因素的技术和动力。目前 bsAb 已经

* 通信作者 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 53852178; E-mail: zhangfeng5122@163.com

发展出近 70 种结构,包括 Triomab、BiTE、Crossmab、Double Variable Domain (DVD) 等,此外还包括多种确保形成正确 bsAb 结构的技术。根据不同治疗机制和临床需求,bsAb 采用相应的结构,因此也可以说多样性的需求催生了多样性的 bsAb 结构。截至 2016 年,据不完全统计,已有 30 余个 bsAb 进入临床试验,适应症主要为肿瘤和自身免疫性疾病。目前已批准上市的 bsAb 包括 Catumaxomab 和 Blinatumomab,前者采用 Triomab 结构用于治疗上皮细胞粘附分子 (epithelial cell adhesion molecular, EpCAM) 阳性上皮源性转移肿瘤所导致的恶性腹水,后者采用 BiTE 结构用于治疗急性淋巴细胞白血病。本文将就 bsAb 的结

构、功能和应用方面进行介绍。

1 bsAb 结构

为实现能够同时特异性结合 2 个不同抗原表位的能力,多数 bsAb 通过结构设计包含了 2 个不同的抗原结合部位(可变区)。当前有近 70 种 bsAb 结构(图 1),多数通过改造 IgG 获得,少数通过化学偶联或与其他蛋白融合表达获得^[2-5]。根据结构特点,bsAb 大致可以分为 5 类(图 1),包括 IgG 样 bsAb、含附加可变区的 IgG 样 bsAb、串联不同抗原结合片段的 bsAb、融合蛋白型 bsAb、化学偶联 bsAb。多数 bsAb 为双价和四价,少数可达六至八价,下面将就几种典型的 bsAb 结构予以介绍。

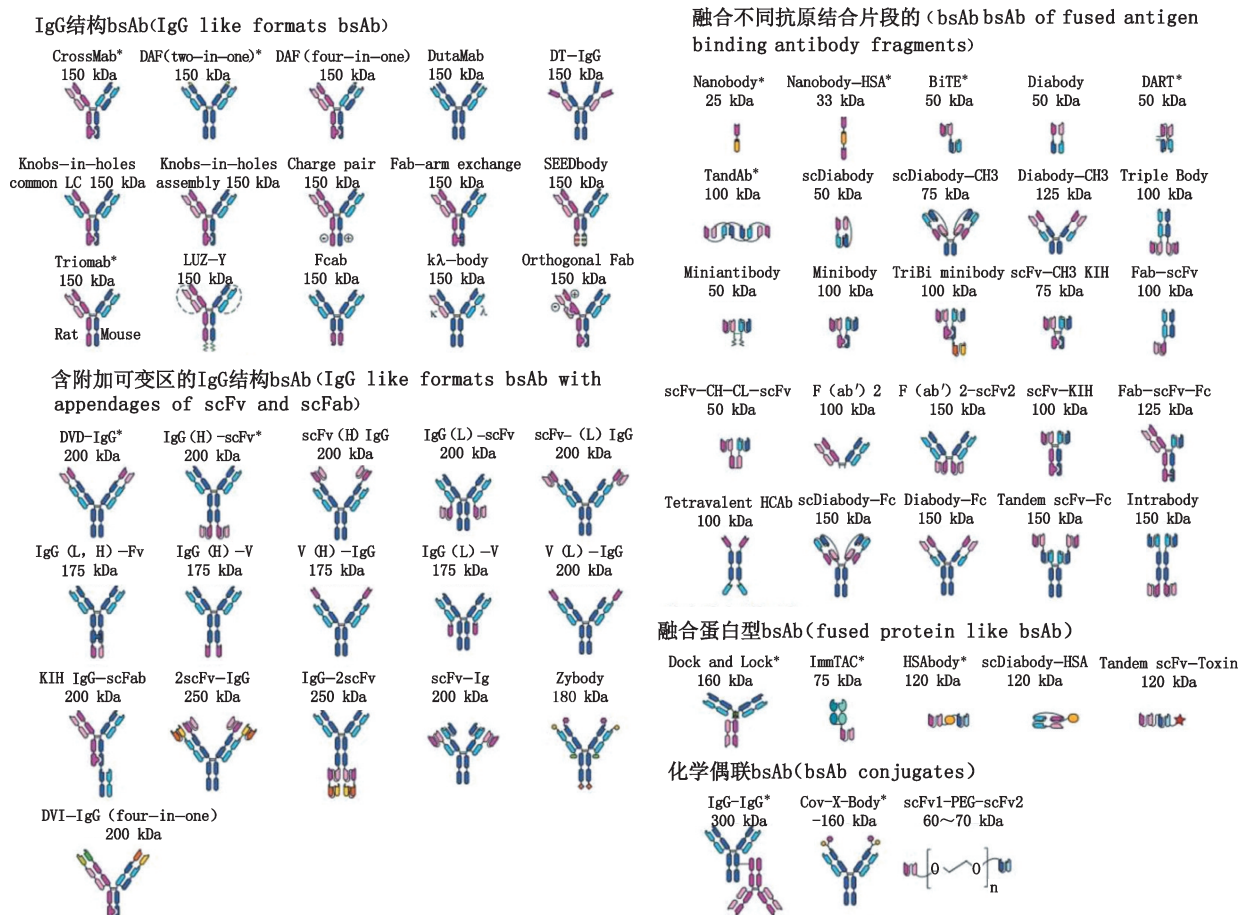


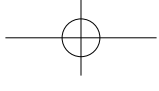
图 1 代表性 bsAb 结构示意图^[31]

Fig. 1 Sketch maps of representative bsAb^[31]

1.1 IgG 样 bsAb

采用重组 DNA 技术可以通过结构改造构建 bsAb。通过结构改造构建的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 样 bsAb 具有完整的可结晶片段 (Fc 片段) [crystallizable fragment (Fc fragment)], 因此该类 bsAb

在结合不同抗原的同时,仍保留了 Fc 片段所介导的抗体介导的细胞毒性效应 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体介导的细胞毒性效应 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 等功能,同时该类 IgG 也保留了通过与新生儿 Fc 受体



(neonatal Fc receptor, FcRn) 结合延长抗体体内半衰期的特点^[6]。但该类 bsAb 制备中面临着确保重链-重链和重链-轻链正确配对的问题,通过 Triomab^[7]、Knob-in-hole (KiH)^[8]、离子桥^[9]、SEED^[10]等技术可提高重-重链正确配对比例,采用二硫键^[11]、离子桥^[8, 12]、Crossmab^[13]等技术可提高重-轻链正确配对的比例。

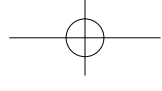
1.1.1 重链-重链的正确配对 由于重链在与抗原结合过程中发挥着重要作用,不同重链间正确配对是构建 bsAb 的前提。采用四杂交瘤 (Quadroma) 技术,融合 2 种杂交瘤细胞可制备 IgG 样的 bsAb^[14]。由于四杂交瘤细胞中不同重链和轻链间为随机配对,目的 bsAb 在总抗体中仅占 10%~20%,且由于目的 bsAb 同副产物之间理化性质非常相似,使该类抗体难于纯化。为提高 bsAb 正确组装的效率,Staerz 等利用小鼠 IgG2a 与大鼠 IgG2b 分子 Fc 片段间易于形成异源二聚体的特点,通过将分泌 IgG2a 亚类抗白细胞分化抗原 3 (cluster of differentiation 3, CD3) 的小鼠杂交瘤细胞与分泌 IgG2b 亚类抗胸腺细胞分化抗原 1.1 (thymocyte differentiation antigen 1.1, Thy-1.1) 大鼠瘤细胞进行二次融合,构建了改良的四杂交瘤细胞,使目的 bsAb 的比例大大提高^[15]。采用该技术制备的 bsAb 除可以通过不同的抗原结合片段 (antigen binding fragment, Fab) 分别结合 2 种不同抗原外,还可通过其 Fc 片段与位于多种免疫细胞表面的 Fc 受体结合,介导免疫细胞对靶细胞的杀伤^[16],因此认为该种 bsAb 具有 3 个结合位点,故又将该结构的 bsAb 称为 Triomab。利用该技术,Trion Pharma 和 Fresenius Biotech 研发了 EpCAM+CD3 (Catumaxomab)、HER2+CD3 (Ertumaxomab)、CD20+CD3 (FBTA05) 等多种 bsAb,其中 Catumaxomab 被欧盟批准用于恶性腹水的治疗,Ertumaxomab 和 FBTA05 目前也已经完成了针对乳腺癌和 B 淋巴瘤的 II 期临床试验。

Triomab bsAb 为鼠源性抗体,为降低潜在的严重免疫原性风险,研究人员希望通过结构改造构建人源 IgG 样 bsAb。根据抗体的 CH3 介导重链二聚体的形成这一功能特点,分别对 2 条重链的 CH3 进行改造,通过电荷排斥/吸引作用或空间位阻作用,可使不同 CH3 倾向于形成异源二聚体的方式构建 bsAb,利用电荷排斥/吸引作用或空间位阻作用改造 CH3 的技术分别称为离子桥技术和 Knob-in-Hole (KiH) 技

术。结构研究发现,2 条重链 CH3 间的 E356-K439、E357-K370、D399-K409 通过电荷吸引作用在二聚体的形成中起主要作用,因此,改变这些位置的氨基酸电荷状态可影响二聚体的形成。在重链 A 中引入 K370E、K409D、K439E 中的至少 2 个突变,重链 B 中引入 E356K、E357K、D399K 突变,可以抑制同源二聚体形成并促进重链异源二聚体的形成。在进一步的改造尝试中,在重链 A 中进行 K409D 突变,重链 B 中进行 D399K 突变,即可高效形成异源二聚体。该类突变理论上可以通过电荷排斥作用抑制同源二聚体的形成,但在实际操作中,重链同源二聚体的比例仍然较高。继续向重链 A 中引入 K392D,向重链 B 中引入 E356K 突变,不仅不能进一步增加异源二聚体的比例,反而使表达量明显下降。也就是说,向 bsAb 抗体中引入更多的离子对型突变不仅不能如理论预期中增加抗体重链正确配对的能力,反而可能影响抗体产量并可能增加免疫原性^[8-9]。除改变 2 条重链的电荷使其形成异源二聚体外,Moore 等还通过结构模拟等方式指导突变,筛选结果表明重链 A 的 A364H、F405A (HA) 突变和重链 B 的 Y349T、T394F (TF) 突变可以提高异源二聚体形成效率,该突变方式与离子对突变方式获得的异源二聚体比例相当,可达 89%^[9]。利用空间位阻效应,Genentech 公司提出了 Knob-in-Hole 方式制备 bsAb 的技术,在 Knob 链中引入 S354C、T366W 突变,在 Hole 链中引入 Y349C、T366S、L368A、Y407V 突变,通过空间位阻增加重链异源二聚体形成比例的同时,采用二硫键稳定已经形成的异源二聚体,使 Konb-in-Hole 抗体的比例达到约 97%^[17]。

Davis 等发现人 IgG 和 IgA 的 CH3 区不能彼此结合,而将结构相似的 beta 链片段置入后两者可以形成 IgG 样的异源二聚体^[10],将该类 bsAb 称为 SEED (strand exchanged engineered domain, SEED) 抗体。利用该原理,Muda 等在西妥昔 (Cetuximab) 的基础上开发了一系列 bsAb,但关于该技术的具体应用尚未见后继报道^[18]。Wranik 等发明了“LUZ-Y”结构的 bsAb,该模式中,通过使用柔性肽段连接重轻链的方式确保重轻链配对的同时,采用在重链末端融合表达亮氨酸拉链的方式确保异源二聚体的形成^[19]。

通过四杂交瘤或 CH3 改造技术可有效确保 bsAb 异源重链之间的正确配对,在此基础上,重轻链之间的正确配对成为摆在 bsAb 开发者面前的另一



个重要障碍。

1.1.2 重链-轻链的正确配对 目前开发了多种确保重链-重链正确配对的技术,可以使重链异源二聚体的比例占比达到 90% 左右,但若不通过一定手段确保重链-轻链间的正确配对,则随机配对产生的抗体中,目的 bsAb 的含量仅占 25%。因此,研究人员进一步开发了多种技术以确保重轻链间的正确配对。

首先想到的方式为模仿 KiH 技术,对重轻链作用表面的氨基酸进行改造。Zhu 等通过在 2 对重轻链组合的轻链中分别引入 Y87A 或 F98M 突变,对应的重链分别引入 V37F 或 L45W 突变,可以确保不同特异性的重轻链间的正确配对^[11],但该方式不具有广泛的适用性而仅适用于作为实验对象的抗体。由于 VL-CL/VH-CH 为异源二聚体,且 VL-CL/VH-CH 的结构多变,因此通过氨基酸突变来确保重轻链间正确配对的难度较大。另一种确保重轻链间正确配对的方式为采用共有轻链。由于重链,特别是重链的互补决定区(complementarity-determining region, CDR) 3 在抗体的特异性和亲和力中发挥决定性作用,而轻链则为辅助作用,因此,对轻链的要求较低,通过噬菌体展示技术,可以在固定轻链的情况下,筛选具有不同特异性的重链用于 bsAb 的构建。通过共有轻链,Jackman 等构建了针对 Fcε 受体 I (FcεRI) 和 Fcγ 受体 II b (FcγRIIb) 的 bsAb^[20]。虽然共有轻链技术不存在重轻链错配的问题,但该结构 bsAb 的开发难度大,且不能确保所有的抗原配对均能筛选到合适的共有轻链,因此至今未见采用该结构的 bsAb 进入临床。

当前最常用的促进 bsAb 中重轻链正确配对的技术为 Genentech 开发的 Crossmab 技术,由于 CL-CH1 间可通过结构互补作用形成异源二聚体,且 CL-CL 和 CH1-CH1 间具有排斥作用,因此通过将 bsAb 的 1 个 Fab 臂中的 VL-VH 或 CL-CH1 在重轻链间进行互换,另 1 个 Fab 臂不进行改动,这样形成的 VH-CL 或 VL-CH1 轻链与正常的 VH-CH1 间相互排斥,可在一定程度上避免 2 条 Fab 臂中轻链的错配。Crossmab bsAb 的组装过程中也会有部分副产物产生,如 VL-VH 的互换可能会形成 VH-CL+VH-CH1 的错配产物,而 CL-CH1 的互换可能会形成 VL-CH1+VL-CL 的副产物^[13]。虽然有上述副产物的产生,在采用异源轻链构建的 bsAb 中,使

用 Crossmab 技术仍可获得很高的重轻链正确配对比例。此外,对 Crossmab bsAb 的研究发现,结构域的交换对 bsAb 的活性、稳定性和表达效率没有产生显著影响。利用 Crossmab 技术,Genentech 构建了抗 Ang-2/VEGF bsAb,可同时抑制 2 种血管生成因子的生物学作用,在肿瘤和年龄相关湿性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD) 治疗中的效果好于单独使用 2 个母抗体的治疗效果,目前该抗体已经进入 I 期临床试验。

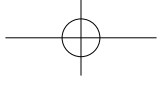
1.2 含附加可变区的 IgG 样 bsAb

通过融合蛋白的方式,在重链和/或轻链上增加其他特异性的抗原结合片段,可以将传统 IgG 改造为 bsAb。增加的抗原结合片段可以为单域抗体、单链抗体或其他抗原结合蛋白,称为附加可变区^[21]。含附加可变区的 IgG 样 bsAb 的最简单形式为在重链或轻链的 N 端或 C 端融合单链抗体或单域抗体的结构形式。除上述结构形式之外,附加可变区 IgG 样 bsAb 的另 1 种结构形式为双可变区(dual variable domain, DVD) IgG,即通过在 IgG 的重链和轻链的 N 端分别增加 1 个其他特异性抗体的重链和轻链的可变区,使抗体可以特异性结合 2 个不同抗原^[22]。在 DVD 技术基础上结合与 KiH 和 Crossmab 技术还可以制备四特异性抗体^[23]。这种结构的 bsAb 可以避免 IgG 样结构 bsAb 中存在的重链-重链和重链-轻链错配的问题。目前 Abbvie&Abott 公司的 DVD 结构 bsAb 的构建技术较为成熟,该企业开发的用于治疗类风湿性关节炎的 IL17+TNFα DVD-IgG 和用于治疗骨性关节炎的 IL1α+IL-1β DVD-IgG 均已完成 II 期临床试验。

1.3 片段连接 bsAb

串联片段 bsAb 为通过连接肽将不同的 Fab、单链抗体、单域抗体或抗原结合片段等结构以一定的排列顺序予以连接而获得的 bsAb,片段连接 bsAb 的 VH-VL 正确配对需借助多种机制,包括连接肽(BiTE、scDiabody 等)、二硫键(miniantibody)、CH3 KiH(sc-Diabody-CH3、scFV-CH3) 等。该类抗体由于缺乏恒定区,特别是缺乏 Fc 片段,半衰期较短,而且其表达量和表达后的细胞内稳定性一般低于传统 IgG^[24]。同时,多数的该类抗体在纯化过程中难以采用亲和纯化手段,因此其纯化工艺和成品中的杂质分析也较传统 IgG 复杂^[25-26]。

由于片段连接 bsAb 体内半衰期短,活性阻断为



治疗机制的 bsAb 不适合采用该类设计。片段连接 bsAb 多为一端抗肿瘤特异性 / 相关抗原, 另一端抗 CD3 抗体, 通过将 T 细胞招募至肿瘤细胞周围并激活, 借助 T 细胞杀伤效应达到治疗效果, 与此同时, 还可在一定程度上获得免疫记忆效应, 其中最典型的为 Amgen 制备的 Blinatumomab。该 BiTEbsAb 通过柔性肽段将 CD19 和抗 CD3 scFv 连接, 通过招募 T 细胞至 CD19⁺ 的 B 淋巴瘤细胞周围达到治疗作用^[27], Blinatumomab 目前已被 FDA 批准用于急性淋巴细胞白血病的治疗, 并表现出良好的疗效。

1.4 融合蛋白型 bsAb 和化学偶联型 bsAb

融合蛋白型和化学偶联型 bsAb 结构上具有相似性, 均为通过连接子(蛋白、连接分子等)将不同特异性的抗体 / 抗体片段(IgG、Fab、scFv 等)进行连接, 形成可同时结合 2 个或以上抗原的蛋白分子。

融合蛋白型 bsAb 与片段连接型 bsAb 不同, 后者通过柔性的连接肽连接 2 个抗原结合蛋白, 连接肽

仅具有保持分子完整性的功能, 而融合蛋白型 bsAb 中, 2 个抗原结合蛋白融合于载体蛋白上, 载体蛋白除确保分子完整性外, 还具有其他功能, 如, 抗体与白蛋白融合后可延长抗体片段的半衰期^[28], 抗 CD3 抗体与 T 细胞受体融合后可以拓展 T 细胞的识别范围^[29]。

化学偶联型 bsAb 中, 首先需分别制备 2 个抗体 / 抗体片段后, 通过化学键将两者偶联或将两者同时与载体蛋白偶联, 其制备过程本身增加了产物的复杂性, 增加了产品的质控难度。最近新发展起来的一种化学偶联型 bsAb 结构为 CovX-Body, 该结构中, 通过将 1 个具有治疗作用的小的抗原结合肽与已有抗体偶联, 构建 bsAb 的同时, 延长了抗原结合肽的半衰期^[30]。

2 部分已批准的和进入临床试验阶段的 bsAb

表 1 列出了部分已经批准上市和当前处于临床阶段的 bsAb。

表 1 部分已批准上市和处于临床试验阶段的 bsAb

Tab. 1 Partial bsAbs approved and in clinical trial

名称 (name)	结构 (format)	靶位 (target)	适应症 (indication)	研发阶段 (status)
Catumaxomab	Triomab	EpCAM+CD3	EpCAM 阳性肿瘤 (EpCAM-positive tumors), 恶性腹水 (malignant ascites)	批准上市 (欧盟) (approved in EU)
Ertumaxomab	Triomab	HER2+CD3	Her2/Neu 阳性实体瘤 (Her2/Neu-positive advanced solid tumors)	I/II 期临床 (phase I/II)
FBTA05	Triomab	CD20+CD3	白血病 (leukemia)	I/II 期临床 (phase I/II)
RG7221 (RO5520985)	CrossMAb	Ang-2+VEGF	恶性肿瘤 (neoplasms)	II 期临床 (phase II)
RG7716	CrossMAb	Ang-2+VEGF	湿性黄斑变性 (wet AMD)	II 期临床 (phase II)
MGD006	DART	CD123+CD3	复发性 / 难治性急性髓细胞白血病 (relapsed/refractory AML)	I 期临床 (phase I)
MGD007	DART	gpA33+CD3	结肠癌 (colorectal carcinoma)	I 期临床 (phase I)
TF2	Dock and lock	CEA+ HSG	结肠癌 (colorectal cancer)	I 期临床 (phase I)
OMP-305B83	DVD-Ig	DLL4+VEGF	进展性恶性实体瘤 (advanced solid tumor malignancies)	I 期临床 (phase I)
ABT122	DVD-IgG	TNF α +IL17	类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)	I/II 期临床 (phase I/II)
ABT981	DVD-IgG	IL1 α +IL1 β	骨性关节炎 (osteoarthritis)	I/II 期临床 (phase I/II)
RG7813 (RO6895882)	ScFv-IgG	CEA+ IL2	CEA 阳性恶性肿瘤 (advanced and/or metastatic solidCEA+tumors)	I 期临床 (phase I)
SAR156597	scFv-IgG	IL4+IL13	特发性肺纤维化 (Idiopathic pulmonary fibrosis)	I/II 期临床已完成 (phase I/II completed)
MM-141	scFv-IgG	IGF-IR $\times$ HER3	肝癌 (hepatocellular carcinoma)	I 期临床 (phase I)
LY3164530	OrthoFab-IgG	MET+EGFR	恶性肿瘤 (advanced or metastatic cancer)	I 期临床 (phase I)

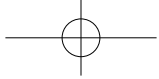


表 1(续)

名称 (name)	结构 (format)	靶位 (target)	适应症 (indication)	研发阶段 (status)
COVA322	IgG-fynomer	TNF- α +IL17A	斑块性银屑病 (plaque psoriasis)	I/II 期临床 (phase I/II)
Blinatumomab	BiTE	CD19+CD3	急性 B 淋巴细胞白血病 (precursor B-cell ALL)	批准上市 (美国) (approved in US)
Solitumab (MT110, AMG 110)	BiTE	EpCAM+CD3	实体瘤 (solid tumors)	I 期临床已完成 (phase I completed)
AMG 330	BiTE	CD33+CD3	复发性/难治性急性髓细胞白血病 (relapsed/refractory AML)	I 期临床 (phase I)
MT112 (BAY2010112)	BiTE	PSMA+CD3	前列腺肿瘤 (prostatic neoplasms)	I 期临床 (phase I)
MT111 (MEDI-565)	BiTE	CEA+CD3	胃肠道腺癌 (gastrointestinal adenocarcinomas)	I 期临床 (phase I)
MSB0010841	Nanobody	IL-17A/F	银屑病 (Psoriasis)	I 期临床 (phase I)
ALX-0061	Nanobody	IL-6R+HSA	类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)	I/II 期临床已完成 (phase I/II completed)
rM28	Tandem scFv	CD28+HMVMAA	恶性黑色素瘤 (metastatic melanoma)	I/II 期临床 (phase I/II)
DT2219ARL	2 scFv linked to diphtheria toxin	CD19+CD22	B 细胞白血病/淋巴瘤 (B cell leukemia or lymphoma)	I 期临床 (phase I)
IMCgp100	ImmTAC	CD3+ gp100	恶性黑色素瘤 (malignant melanoma)	I 期临床 (phase I)
AFM13	TandAb	CD30+CD16A	复发性/难治性何杰金淋巴瘤 (relapsed or refractory hodgkinlymphoma)	II 期临床 (phase II)
AFM11	TandAb	CD30+CD19	CD19 阳性的复发性/难治性 B 淋巴细胞瘤 (relapsed and/or refractory CD19-positive B cell NHL)	I 期临床 (phase I)
MM-111	HSA body	HER2+HER3	胃肠道肿瘤 (gastrointestinal adenocarcinomas)	I 期临床已完成 (phase I completed)

3 bsAb 效应

3.1 招募免疫效应细胞

细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 在抗肿瘤免疫反应中具有重要作用,但肿瘤细胞可通过多种机制逃避免疫细胞的攻击^[32]。抗 CD3+ 抗肿瘤特异性抗原 (tumor specific antigen, TSA)/肿瘤相关抗原 (tumor association antigen, TAA) bsAb 可通过其独特的功能,招募免疫效应细胞,特别是 CTL,至肿瘤细胞周围,增加两者的接触,使免疫效应细胞短暂激活并杀伤肿瘤细胞^[33]。除 CTL 外,具有 Fc 片段的 bsAb 还可以招募自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞 (CD16a)、单核细胞 (CD32a) 和粒细胞 (CD64),增强抗肿瘤免疫效应。该类 bsAb 较多,其结构形式也多种多样,如抗 EpCAM+CD3 的 Catumaxomab (Triomab)、抗 CD19+CD3 的 Blinatumomab (BiTE) 和抗 CD123+CD3 的 MGD006

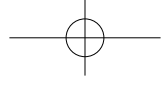
(DART) 等^[33-34]。

3.2 阻断生长/增殖信号传导通路

在部分肿瘤中,细胞表面的生长因子受体及其下游的信号转导通路参与了肿瘤的形成和维持,如 HER2、EGFR 等,阻断这些受体可以抑制肿瘤的生长。在部分肿瘤中,可能多种受体同时参与了肿瘤的形成,此时,需要同时阻断 2 种或 2 种以上受体的信号转导过程以达到更好的治疗效果。如抗 HER2+HER3 的 MM-111 (HSA 融合 bsAb)、抗 IGF-1R+HER3 的 MM-141 (scFv-IgGs)、抗 EHFR+HER3 的 Duligotuzumab (DAF) 等^[35-37]。

3.3 阻断肿瘤新生血管生成

新生血管生成是肿瘤发展过程中的重要促进因素之一,多个血管生成因素参与了该过程,包括血管生成因子受体 2 (vein endothelial growth factor receptor, VEGFR)、VEGFR3、VEGFA、angiopoietin-2



(Ang-2)、血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factors, PDGFs)等。根据目前的研究结果, VEGFA 和 Ang-2 在肿瘤新生血管的生成中起到了重要作用。RG7221 为 Crossmab 结构的抗 VEGFA+Ang-2 bsAb, 目前已经进入临床 II 期^[38]。

3.4 阻断细胞因子

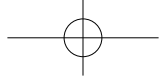
多种细胞因子参与了自身免疫病的发生, 如 TNF α 、IL-6、IL-17、IL-1、IL-12 等。bsAb 可以同时阻断 2 种或 2 种以上细胞因子的生物学效应, 在部分自身免疫性疾病的治疗中具有独特的优势, 如抗 IL-13+IL-4 的 SAR156597(scFv-IgG)、抗 IL-6R+HSA 的 ALX-0061(Nanobodies)和抗 TNF α +IL-17 的 ABT-122(DVD)等^[39-40]。

4 前瞻

由于 bsAb 的特点, 其在肿瘤、自身免疫病和炎症性疾病等方面表现出极大的临床应用前景, 同时结构的多样性和复杂性使其在设计、生产和质控中存在很大的难点。虽然目前仅批准了 2 个 bsAb, 但数十个在研 bsAb 已经进入临床研究阶段, 其中数个制品展现出良好的应用前景, 相信随着越来越多的 bsAb 获批上市, 相应的技术亦会随之建立发展和完善, 并推动 bsAb 产品进一步向前发展。

参考文献

- [1] COLOMA MJ, MORRISON SL. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(2): 159
- [2] CHAN AC, CARTER PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(5): 301
- [3] KONTERMANN RE. Dual targeting strategies with bispecific antibodies [J]. *MAbs*, 2012, 4(2): 182
- [4] BYRNE H, CONROY PJ, WHISSTOCK JC, *et al.* A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(11): 621
- [5] JOST C, PLUCKTHUN A. Engineered proteins with desired specificity: DARPins, other alternative scaffolds and bispecific IgGs [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 27: 102
- [6] RIDGWAY JB, PRESTA LG, CARTER P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization [J]. *Protein Eng*, 1996, 9(7): 617
- [7] YAN L, BECKMAN R. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(10 Suppl): S565
- [8] GUNASEKARAN K, PENTONY M, SHEN M, *et al.* Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19637
- [9] MOORE GL, BAUTISTA C, PONG E, *et al.* A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens [J]. *mAbs*, 2011, 3(6): 546
- [10] DAVIS JH, APERLO C, LI Y, *et al.* SEED bodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(4): 195
- [11] ZHU Z, PRESTA LG, ZAPATA G, *et al.* Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation [J]. *Protein Sci*, 1997, 6(4): 781
- [12] IGAWA T, TSUNODA H, KIKUCHI Y, *et al.* VH/VL interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(8): 667
- [13] SCHAEFER W, REGULA JT, BAHNER M, *et al.* Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(27): 11187
- [14] YAN L, BECKMAN RA. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 565
- [15] STAERZ UD, BEVAN MJ. Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(5): 1453
- [16] ZEIDLER R, REISBACH G, WOLLENBERG B, *et al.* Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing [J]. *J Immunol*, 1999, 163(3): 1246
- [17] CARTER P. Bispecific human IgG by design [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 248(1-2): 7
- [18] MUDA M, GROSS AW, DAWSON JP, *et al.* Therapeutic assessment of SEED: a new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific antibodies [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2011, 24(5): 447
- [19] WRANIK BJ, CHRISTENSEN EL, SCHAEFER G, *et al.* LUZ-Y, a novel platform for the mammalian cell production of full-length IgG-bispecific antibodies [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43331
- [20] JACKMAN J, CHEN Y, HUANG A, *et al.* Development of a two-part strategy to identify a therapeutic human bispecific antibody that inhibits IgE receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(27): 20850
- [21] LAFLEUR DW, ABRAMYAN D, KANAKARAJ P, *et al.* Monoclonal antibody therapeutics with up to five specificities: functional enhancement through fusion of target-specific peptides [J]. *MAbs*, 2013, 5(2): 208
- [22] JAKOB CG, EDALJI R, JUDGE RA, *et al.* Structure reveals



- function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig) molecule [J]. *MAbs*, 2013, 5(3): 358
- [23] WU C, YING H, GRINNELL C, *et al.* Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1290
- [24] STORK R, MULLER D, KONTERMANN RE. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2007, 20(11): 569
- [25] TAN PH, SANDMAIER BM, STAYTON PS. Contributions of a highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency [J]. *Biophys J*, 1998, 75(3): 1473
- [26] PERCHIACCA JM, TESSIER PM. Engineering aggregation-resistant antibodies [J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2012, 3: 263
- [27] WOLF E, HOFMEISTER R, KUFER P, *et al.* BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(18): 1237
- [28] MULLER D, KARLE A, MEISSBURGER B, *et al.* Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(17): 12650
- [29] OATES J, JAKOBSEN BK. ImmTACs: novel bi-specific agents for targeted cancer therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(2): e22891
- [30] DOPPALAPUDI VR, HUANG J, LIU D, *et al.* Chemical generation of bispecific antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(52): 22611
- [31] SPIESS C, ZHAI Q, CARTER PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies [J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2 Pt A): 95
- [32] FAN D, LI Z, ZHANG X, *et al.* AntiCD3Fv fused to human interleukin-3 deletion variant redirected T cells against human acute myeloid leukemic stem cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 18
- [33] ZUGMAIER G, KLINGER M, SCHMIDT M, *et al.* Clinical overview of anti-CD19 BiTE ((R)) and ex vivo data from anti-CD33 BiTE ((R)) as examples for retargeting T cells in hematologic malignancies [J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2 Pt A): 58
- [34] KONTERMANN RE, BRINKMANN U. Bispecific antibodies [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(7): 838
- [35] MCDONAGH CF, HUHALOV A, HARMS BD, *et al.* Antitumor activity of a novel bispecific antibody that targets the ErbB2/ErbB3 oncogenic unit and inhibits heregulin-induced activation of ErbB3 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(3): 582
- [36] FITZGERALD JB, JOHNSON BW, BAUM J, *et al.* MM-141, an IGF-IR-and ErbB3-directed bispecific antibody, overcomes network adaptations that limit activity of IGF-IR inhibitors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(2): 410
- [37] HILL AG, FINDLAY MP, BURGE ME, *et al.* Phase II study of the dual EGFR/HER3 inhibitor duligotuzumab (MEHD7945A) versus cetuximab in combination with FOLFIRI in second-line RAS wild-type metastatic colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(10): 2276
- [38] KIENAST Y, KLEIN C, SCHEUER W, *et al.* Ang-2-VEGF-A Cross Mab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(24): 6730
- [39] WILLIAMS SC. Small nanobody drugs win big backing from pharma [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1355
- [40] KINGWELL K. InterMune and Boehringer blaze trails for idiopathic pulmonary fibrosis drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(7): 483

(本文于 2018 年 12 月 1 日收到)