

- [31] KRYCZEK I, ZOU L, RODRIGUEZ P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(4): 871-881.
- [32] KRAMBECK A E, THOMPSON R H, DONG H, et al. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27): 10391-10396.
- [33] ZHANG L, CONEJO-GARCIA J R, KATSAROS D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 203-213.
- [34] TORRES M P, PONNUSAMY M P, LAKSHMANAN I, et al. Immunopathogenesis of ovarian cancer [J]. *Minerva Med*, 2009, 100: 385-400.

• 综 述 •

双特异性抗体在肿瘤免疫治疗中的研究进展

曾静^{1,2}, 郭亚军^{1,3}, 方毅²

(1. 中国人民解放军总医院 肿瘤中心, 北京 100853; 2. 解放军 307 医院 内分泌科, 北京 100071; 3. 第二军医大学 国际合作肿瘤研究所, 上海 200433)

[摘要] 本文主要阐述双特异性抗体的概念、类型、构建及制备方法, 双特异性抗体介导的肿瘤杀伤机制, 以及利用双特异性抗体治疗肿瘤的临床前和临床试验研究的最新进展。

[关键词] 双特异性抗体; 肿瘤; 免疫治疗; 文献综述

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A [文章编号] 1671-7562(2014)05-0589-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7562.2014.05.039

双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)可以同时特异性结合两个不同的抗原, 由于其特异性和双功能性, 在肿瘤免疫治疗中的作用越来越重要。本文主要就 BsAb 的概念、类型、构建及制备方法, BsAb 介导的肿瘤杀伤机制, 以及利用 BsAb 治疗肿瘤的临床前和临床试验研究的最新进展进行综述。

1 BsAb 的概念、类型及制备方法

BsAb 是含有两种不同的抗原结合域的免疫球蛋白分子, 自然状态下不存在, 只能通过人工方法制备。以往 BsAb 的制备方法有杂交瘤法、化学交联法等, 基因工程抗体技术的发展为 BsAb 的研制奠定了基础。

杂交瘤细胞是由 B 细胞和骨髓瘤细胞融合形成的可以产生特异性单克隆抗体的永生化细胞系。两种杂交瘤细胞进一步杂交形成的杂交瘤细胞可以在同一细胞内产生两种不同的轻重链。在同一个细胞内两种

轻重链可以随机组装, 产生 BsAb 分子及一系列无功能的单特异性分子。组装成 BsAb 的概率仅有 1/10^[1]。因此, 要得到单纯的 BsAb, 需要精细的纯化步骤, 如连续使用两个亲和层析柱^[2]。第一个在欧盟被批准用于治疗恶性腹水的 BsAb catumaxomab 就是由杂交瘤技术生产的, 表明用这种方法生产临床治疗用的 BsAb 是可行的^[3]。

化学交联法是将两种抗体或抗体片段进行交联来用于生产 BsAb^[4]。最初使用氧化重组方法进行化学交联, 现在主要使用异型或同型双功能交联剂^[5]。异型双功能交联剂对两种不同的活性基团进行交联。例如氨基和巯基基团。N-琥珀酰-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐 [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP] 先和第 1 个抗体分子的氨基发挥作用, 然后再和第 2 个分子的自由巯基作用, 引入巯基。使用这种异型双功能交联剂的过程中, 会遇到的问题是, 一个抗

[收稿日期] 2013-08-05 [修回日期] 2014-01-26

[作者简介] 曾静(1984-), 女, 山东菏泽人, 主治医师, 在读博士研究生, 主要从事肿瘤的靶向治疗研究。E-mail: zjing1125@163.com

[通信作者] 方毅 E-mail: fangyi307@163.com.

[引文格式] 曾静, 郭亚军, 方毅. 双特异性抗体在肿瘤免疫治疗中的研究进展 [J]. 现代医学, 2014, 42(5): 589-592.

体分子或抗体片段拥有大量的氨基或羧基基团,会导致交联抗体的不均一性^[6]。同型双功能交联剂可以避免这种问题,如二巯基二硝基苯甲酸[5,5'-dithiobis(nitrobenzoic acid),DTNB]和正苯二马来酰亚胺(o-phenylenedimaleimide,o-PDM),已广泛应用于交联两个来源于不同抗体的 Fab 片段来制备 BsAb。用胃蛋白酶消化全抗体分子,再温和还原剩余铰链区的二硫键,就会形成 F(ab) 分子。Fab 分子用上述两种交联剂进行两步孵育,共价连接即成为双特异性 F(ab)₂ 分子^[7]。两种交联剂的作用有所不同,DTNB 主要用于形成二硫键,而 o-PDM 则用于形成稳定的硫醚键。一些由化学交联法制备的 BsAb 已经进入临床试验^[8]。

杂交瘤法生产 BsAb 来源可靠,但由于轻、重链随机配对组装可产生多种抗体分子形式,使得 BsAb 的生产和纯化都变得非常困难。化学交联法交联蛋白酶消化的 Fab 片段制备出的 BsAb 分子,虽然成分较均一,但费时费力且产量很低。而基因工程抗体技术则可以克服上述缺点。

基因工程抗体技术生产出了一系列不同类型的 BsAb。串联单链 BsAb 是将两个单链抗体片段(scFv)通过一个柔性多肽连接而成。这种结构还可以通过继续增加 scFv 的数量,串联为三特异性三元抗体以至多特异性多元抗体^[9]。微型 BsAb(diabodies)是由两个抗体(如 A 抗体和 B 抗体)的可变区组成的异源二聚体,这种组合可以是 VHA-VLB 和 VHB-VLA 组合,也可以是 VLA-VHB 和 VLB-VHA 的组合。每条链单独就可以结合一个抗原,两条链连接到一起就组成一个可以结合两个抗原的 BsAb^[10]。还有一部分基因工程重组 BsAb 是 IgG 样分子结构。最常见的形式是将一个抗体分子的特异性抗原结合域融合到另一个抗体分子轻、重链的 N 端或 C 端。如 DVD-Ig,它是将一个抗体分子的 VH 和 VL 分别通过 linker 结构连接到另一个全抗体的 VH 和 VL 的 N 端,两个亲本抗体具有不同的抗原结合特异性^[11]。因此,组成的四价抗体具有双特异性。DVD-Ig 是一个完全对称的抗体分子。另一种类型的 BsAb 是不对称的,它就是运用“杵臼(knobs-into-holes)技术”和“交叉技术(crossover)”构建的 crossmab,通过将一侧重链 CH3 特定位置上分子质量较小的氨基酸突变为分子质量较大的氨基酸,引入“knob”突变,将另一侧重链 CH3 特定位置上 3 个分子质量较大的氨基酸分别突变为分子质量较小的 3 个氨基酸,引入“hole”突变,通过“杵臼”结构使得来源于两个不同亲本抗体的重链形成稳定的异源二聚体。为避免轻、重链间仍存在一些随机组合,再利用“交叉

技术”将 CH1 和 CL 区交换形成 crossmab 的结构,避免了表达过程中的无意义组合;然后分别在两条重链上再引入两个半胱氨酸残基,和相应轻链上的半胱氨酸残基形成稳定的二硫键,使得 crossmab 结构更为稳定^[12]。另外,还有 IgG-scFv、taFv-Fc、双特异性三价分子、双特异性四价分子等多种形式的 BsAb^[13]。

2 BsAb 介导的肿瘤杀伤机制

2.1 介导细胞毒作用

大部分 BsAb 都设计用于将细胞毒性效应细胞重定向到疾病发展过程中具有重要作用的靶细胞(例如肿瘤细胞)上。对肿瘤细胞,选择可以识别并靶向肿瘤表面相关抗原的单克隆抗体作为亲本抗体;对细胞毒性效应细胞,则是选择靶向细胞毒性效应细胞激活分子的单克隆抗体作为亲本抗体。用这两类亲本抗体制备成可同时靶向肿瘤细胞和效应细胞的 BsAb,可将效应细胞重定向到肿瘤细胞上。虽然第一代单克隆抗体也具有招募免疫细胞的功能,但由于其 Fc 结构域可能不加以区别地同时结合到激活性 Fcγ 受体和抑制性 Fcγ 受体上,其招募免疫细胞效能不足^[14]。相比之下,BsAb 的优点在于,同一抗体分子上有两个抗原结合位点,可以分别识别不同抗原,一个抗原结合域可以特异性地结合 T 细胞或 NK 细胞表面抗原(分别为 CD3 和 CD16),另一个抗原结合域可以结合肿瘤细胞表面抗原,如 CD19、CD20 和 HER2、癌胚抗原 CEA、上皮细胞黏附分子 EpCAM 等,从而将 T 细胞和 NK 细胞带到肿瘤细胞附近,对肿瘤细胞进行杀伤^[15]。

2.2 介导或阻断细胞信号转导

通过 BsAb 与细胞表面受体或配体的相互作用,可以诱导或阻断信号转导,导致细胞生长停滞或凋亡。Gupta 等^[16]使用可同时靶向 CD20 和 CD74 的 BsAb HexAb,以套细胞淋巴瘤(MCL)原代细胞和白血病及淋巴瘤细胞系为实验对象,获得了比单独或联合使用亲本单克隆抗体更强的杀伤恶性细胞的作用。在探索各种癌症靶向治疗的过程中,BsAb 还常被用于通过靶向表皮生长因子受体 EGFR 和表皮生长因子受体家族的 ErbB2/HER2 来阻断肿瘤细胞的增殖信号转导。可同时靶向 ErbB2 和 ErbB3 的双特异性单链抗体(bssefv),选择性结合 ErbB2/ErbB3 双阳性细胞的灵敏性比结合单阳性细胞的灵敏性增强^[17]。临床前研究表明,BsAb 的抗肿瘤活性决定于 ErbB2 的过表达水平^[18]。血管内皮生长因子(VEGF)^[19]及其受体(VEGFR)^[20]在肿瘤血管新生、肿瘤的生长和转移过程中起重要作用。Lu 等^[21]设计构建了靶向 VEGFR2 两个不同表位的 scFvs 结构的 BsAb,和亲本 scFv 相

比双特异性 scFvs 抗体分子的亲和力增加而解离率降低。靶向 VEGFR2 和 VEGFR3 的 BsAb, 可以阻断 VEGF 的激活并抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移^[22]。同时靶向 EGF 和 IGF-1R 的 IgG 样 BsAb EI-04, 是将特异性靶向 IGF-1R 的 scFv 融合到靶向 EGFR 的特异性 IgG 抗体的 C-末端。该抗体类型是一个双特异性四价单链抗体 IgG 融合蛋白。EI-04 药代动力学特性好, 相比于单独使用亲本单克隆抗体或将两种亲本单克隆抗体联合使用, EI-04 可更有效地阻断 EGFR 和 IGF-1R 磷酸化, 从而阻断下游 Akt 和 ERK 的激活, 产生更强的抑制肿瘤细胞生长和阻断肿瘤细胞周期的效应^[23]。将抗 VEGF 抗体分子的抗原结合域和抗 EGFR 抗体分子的抗原结合域分别融合到 IgG1 抗体重链和轻链恒定区上, 产生的重组人源化 BsAb DT-IgG 可同时靶向 EGFR 和 VEGF, 在裸鼠肿瘤异种移植模型中, 该 DT-IgG BsAb 显示出良好的药效学特性和抗肿瘤活性^[24]。

2.3 对抗肿瘤药物的导向作用

大量已研制出的 BsAb 也可以结合上药物、毒素、酶及细胞因子等, 这样既具有双重靶向作用又起到将药物集中于瘤组织周围, 提高局部治疗浓度, 减轻对正常组织损伤的作用^[25]。很多研究证明 BsAb 连接上化疗药物、毒素或放射性核素, 对肿瘤细胞有很强的杀伤效应。例如, Corvalan 等^[26]将靶向 CEA 的 BsAb 与长春花生物碱或博莱霉素连接, 注入荷瘤小鼠后, 可使药物明显集中于肿瘤组织附近, 而到达肝、肾、脾和骨髓组织药物的量有所减少。使用连接化疗药物的 BsAb 与单独使用化疗药物相比, 在达到同样疗效的情况下, 前者的用药量约为后者的 1/1 000^[27]。

3 BsAb 在肿瘤免疫治疗中的临床研究

目前, 已在实验室中设计并生产出超过 40 种不同的类型的 BsAb, 但哪些类型的 BsAb 可以进入临床应用仍难以预见。根据体外研究和动物实验结果, 一些 BsAb 的 I 期和 II 期临床试验已经展开^[28-29]。已发现 BsAb 在体内有生物活性的证据, 包括降低血清中的肿瘤抗原水平(如前列腺特异性抗原), 减少转移部位的疼痛和皮肤转移的炎症反应等^[30]。而在肿瘤部位观察到的生物效应则表明一些类型的 BsAb 可有效地穿透肿瘤组织。现阶段的临床试验仅限于“细胞因子风暴”引发的毒性作用研究或 BsAb 复杂的药代动力学研究^[31], 它强调治疗性抗体在体内的稳定性和半衰期长的重要性。此外, T 细胞重定向 BsAb 动员和活化 T 细胞及 NK 细胞的探索却遇到了阻碍, 因此最近开始专注于 BsAb 靶向骨髓效应细胞。BsAb 与生长因子

(如 G-CSF/GM-CSF) 和细胞因子(如 IFN- γ) 等在肿瘤部位联合使用, 导致越来越多髓系效应细胞的活化^[32]。一些 BsAb 可促进肿瘤组织部位髓系效应细胞的浸润。用 BsAb “武装”的髓系细胞对卵巢癌进行过继治疗已经取得了令人鼓舞的结果^[33]。

4 展 望

BsAb 药物发展所面临的主要困难, 如生产效率低和药代动力学性能差等, 已经逐步被克服。各种 BsAb 类型的免疫原性问题需要进一步进行临床评价, 或许可以通过脱免疫的方法进行解决。已有几种 BsAb 目前正在进行或即将进入临床试验^[34]。而一些新的 BsAb 类型, 例如 crossmab 和 DVD-Ig 具有很好的发展前景。在未来, BsAb 必将在肿瘤免疫治疗中发挥重要的作用。而在筛选特异性肿瘤表面抗原、设计构建结构更为简单稳定的 BsAb 类型、选择高效表达系统、寻求更简化的生产步骤等方面仍需继续努力探索。

[参考文献]

- [1] MILSTEIN C, CUELLO A C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry [J]. *Nature*, 1983, 305(5934): 537-540.
- [2] ORII H, YAMAGUCHI T, WATANABE K. Single-step cloning of a hybridoma producing a monoclonal antibody against a target protein [J]. *Anal Biochem* 2013, 434(1): 52-53.
- [3] SEBASTIAN M. Review of catumaxomab in the treatment of malignant ascites [J]. *Cancer Manag Res* 2010, 2: 283-286.
- [4] PAULUS H. Preparation and biomedical applications of bispecific antibodies [J]. *Behring Inst Mitt*, 1985(78): 118-132.
- [5] GRAZIANO R F, GUPTILL P. Chemical production of bispecific antibodies [J]. *Methods Mol Biol* 2004, 283: 71-85.
- [6] BRENNAN M, DAVISON P F, PAULUS H. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments [J]. *Science*, 1985, 229(4708): 81-83.
- [7] GLENNIE M J, MCBRIDE H M, WORTH A T, et al. Preparation and performance of bispecific F(ab')₂ antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragment [J]. *J Immunol*, 1987, 139(7): 2367-2375.
- [8] THAKUR A, LUM L G. Cancer therapy with bispecific antibodies: clinical experience [J]. *Curr Opin Mol Ther* 2010, 12(3): 340-349.
- [9] KELLNER C, BRUENKE J, STIEGLMAIER J, et al. A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells [J]. *J Immunother* 2008, 31(9): 871-84.
- [10] HOLLIGER P, WINTER G. Diabodies: small bispecific anti-

- body fragments [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,1997 ,45 (3-4) : 128-130.
- [11] 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) : 1290-1297.
- [12] SCHAEFER W ,REGULA J T ,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) : 11187-11192.
- [13] MULLER D ,KONTERMANN R E. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: current perspectives [J]. *Bio Drugs* , 2010 24(2) : 89-98.
- [14] RACHID Z ,MACPHEE M ,WILLIAMS C ,et al. Design and synthesis of new stabilized combi-triazenes for targeting solid tumors expressing the epidermal growth factor receptor(EGFR) or its closest homologue HER2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2009 ,19(18) : 5505-5509.
- [15] SATTA A ,MEZZANZANICA D ,TURATTI F ,et al. Redirection of T-cell effector functions for cancer therapy: bispecific antibodies and chimeric antigen receptors [J]. *Future Oncol* , 2013 9(4) : 527-539.
- [16] GUPTA P ,GOLDENBERG D M ,ROSSI E A ,et al. Dual-targeting immunotherapy of lymphoma: potent cytotoxicity of anti-CD20/CD74 bispecific antibodies in mantle cell and other lymphomas [J]. *Blood* 2012 ,119(16) : 3767-3778.
- [17] ROBINSON M K ,HODGE K M ,HORAK E ,et al. Targeting ErbB2 and ErbB3 with a bispecific single-chain Fv enhances targeting selectivity and induces a therapeutic effect *in vitro* [J]. *Br J Cancer* 2008 99(9) : 1415-1425.
- [18] McDONAGH C F ,HUHALOV A ,HARMS B D ,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) : 582-593.
- [19] 孙燕 姜藻. 胃癌分子靶向治疗的现状及研究进展 [J]. *东南大学学报: 医学版* 2013 32(2) : 235-238.
- [20] 黄毅 石欣 黄聪 等. 血管内皮生长因子单克隆抗体抗胰腺癌的机制及临床前的研究进展 [J]. *东南大学学报: 医学版* 2011 30(5) : 788-792.
- [21] LU D ,KOTANIDES H ,JIMENEZ X ,et al. Acquired antagonistic activity of a bispecific diabody directed against two different epitopes on vascular endothelial growth factor receptor 2 [J]. *J Immunol Methods* ,1999 230(1-2) : 159-171.
- [22] JIMENEZ X ,LU D ,BRENNAN L ,et al. A recombinant fully human bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3 [J]. *Mol Cancer Ther* 2005 4(3) : 427-434.
- [23] DONG J ,SERENO A ,AIVAZIAN D ,et al. A stable IgG-like bispecific antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity [J]. *MAbs* 2011 3(3) : 273-288.
- [24] BURDEN R E ,GORMLEY J A ,JAQUIN T J ,et al. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis [J]. *Clin Cancer Res* ,2009 ,15(19) : 6042-6051.
- [25] KONTERMANN R E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics [J]. *Curr Opin Biotechnol* ,2011 ,22(6) : 868-876.
- [26] CORVALAN J R ,SMITH W ,GORE V A ,et al. Increased therapeutic effect of vinca alkaloids targeted to tumour by a hybrid-hybrid monoclonal antibody [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,1987 24(2) : 138-143.
- [27] SMITH W ,GORE V A ,BRANDON D R ,et al. Suppression of well-established tumour xenografts by a hybrid-hybrid monoclonal antibody and vinblastine [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,1990 31(3) : 157-163.
- [28] KONTERMANN R E. Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2005 26(1) : 1-9.
- [29] WUNDERLICH J R ,MEZZANZANICA D ,GARRIDO M A , et al. Bispecific antibodies and retargeted cellular cytotoxicity: novel approaches to cancer therapy [J]. *Int J Clin Lab Res* ,1992 22(1) : 17-20.
- [30] van SPIEL A B ,van OJIK H H ,van de WINKEL J G. Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies [J]. *Immunol Today* 2000 21(8) : 391-397.
- [31] BAEUERLE P A ,REINHARDT C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy [J]. *Cancer Res* 2009 69(12) : 4941-4944.
- [32] PULLARKAT V ,DEO Y ,LINK J ,et al. A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu [J]. *Cancer Immunol Immunother* , 1999 48(1) : 9-21.
- [33] CANEVARI S ,STOTER G ,ARIENTI F ,et al. Regression of advanced ovarian carcinoma by intraperitoneal treatment with autologous T lymphocytes retargeted by a bispecific monoclonal antibody [J]. *J Natl Cancer Inst* ,1995 ,87(19) : 1463-1469.
- [34] FURY M G ,LIPTON A ,SMITH K M ,et al. A phase-I trial of the epidermal growth factor receptor directed bispecific antibody MDX-447 without and with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,2008 57(2) : 155-163.