

· 综 述 ·

## 双特异性抗体在抗病毒方面的研究进展

翟贯星<sup>1</sup>, 陆璐<sup>2</sup>, 路慧丽<sup>3</sup>, 陈代杰<sup>3</sup>

1 上海师范大学 生命科学学院, 上海 200234

2 华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237

3 上海交通大学 药学院, 上海 200240

翟贯星, 陆璐, 路慧丽, 等. 双特异性抗体在抗病毒方面的研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1174–1183.

Zhai GX, Lu L, Lu HL, et al. Advances in research of bispecific antibodies for antiviral therapy. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1174–1183.

**摘要:** 随着基因工程抗体的快速发展, 双特异性抗体技术也日趋成熟。双特异性抗体能够同时结合两个以上不同的抗原表位, 在免疫治疗中具有独特的优势。双特异性抗体已经广泛应用于癌症治疗如黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤以及肝癌、胃癌等, 以及炎症方面的治疗如类风湿性关节炎、牛皮癣与克罗恩病等。双特异性抗体在病毒免疫治疗方面则刚刚起步。文中对双特异性抗体用于病毒免疫治疗的研究进展进行了综述, 特别是在体内外效果较好的产品, 为用于病毒免疫治疗的双特异性抗体药物开发与研究提供一定的参考。

**关键词:** 抗体工程, 抗体治疗, 双特异性抗体, 抗病毒, 免疫治疗

## Advances in research of bispecific antibodies for antiviral therapy

Guanxing Zhai<sup>1</sup>, Lu Lu<sup>2</sup>, Huili Lu<sup>3</sup>, and Daijie Chen<sup>3</sup>

1 College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

2 School of Biological Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

3 School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** With the rapid development of antibody genetic engineering, bispecific antibody technology has been advanced. They are capable of binding two or more different epitopes simultaneously, thus offering specific advantages over natural monoclonal antibodies in immunotherapy. Bispecific antibodies have been successfully used in cancer therapy (e.g. melanoma, Hodgkin's lymphoma, liver cancer, and stomach cancer) and inflammation therapy (e.g. rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease), but are still in their early stage for viral immunotherapy. In this study, we reviewed the research progress of bispecific antibodies for immunotherapy of virus infections, especially those with good effects *in vivo* and *in vitro*, to provide references for the research and development of bispecific antibodies for antiviral treatment.

**Keywords:** antibody engineering, antibody therapy, bispecific antibody, antiviral, immunotherapy

**Received:** January 21, 2019; **Accepted:** May 28, 2019

**Corresponding authors:** Huili Lu. Tel: +86-21-34204631; E-mail: roadeer@sjtu.edu.cn;

Daijie Chen. Tel: +86-21-34204528; E-mail: hccb001@163.com

网络出版时间: 2019-06-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190610.1013.002.html>

病毒是引起多种人类疾病的根源,包括常见疾病如普通感冒、流感、水痘和唇疱疹,以及许多严重的疾病,如埃博拉 (Ebola)、艾滋病、禽流感和 SARS 等<sup>[1]</sup>。此外,病毒也是引发癌症的重要因素,例如肝炎病毒可以发展成慢性病毒感染,导致肝癌<sup>[2]</sup>。抗生素能够有效治疗细菌感染,但设计类似抗生素的安全有效的抗病毒药物比较困难,原因之一是病毒会利用宿主细胞的物质进行复制<sup>[3]</sup>,使得寻找不伤害宿主并且作用于病毒的药物靶点很困难。再者,病毒极易出现变异,从而为靶向药物的设计造成了巨大困难。因此用于抗病毒的药物较少<sup>[4]</sup>。与抗生素不同,现有的大多数抗病毒药物旨在帮助治疗病毒感染,应用的抗病毒药物主要作用是干扰病毒,而不是杀灭病毒,能够作用于病毒复制的各个阶段,并不能完全清除体内的病毒<sup>[5]</sup>。同样,病毒也会产生耐药性,一个关键因素是病毒的基因组不稳定,能够不断变异<sup>[6]</sup>,从而使病毒对于以往有效的治疗方式产生耐药性<sup>[7]</sup>。

抗体药物具有特异性高、安全性好、血清半衰期长等优势,在多个领域,包括抗病毒领域已经显示了较好的应用前景<sup>[8]</sup>。多个候选单克隆抗体药物正处于临床前或临床开发阶段用于慢性病毒(如 HIV-1)以及急性感染(如埃博拉病毒)的治疗<sup>[9-10]</sup>。在抗体特异性针对非宿主(即病毒)表位的情况下,安全性甚至可以比其他针对人体成分的单克隆抗体更好。

抗病毒单克隆抗体 (mAb) 只能靶向单个病毒表面表位,在许多病毒中,同一族不同种或不同株的糖蛋白具有高度的序列可变性,因此单克隆抗体可能对于所有株并不都有效<sup>[11]</sup>。此外,靶向单个表位的单一疗法更容易受到病毒突变的影响,从而产生抗性,并且病毒广泛存在突变逃逸能力,如流感、HIV、埃博拉等的突变<sup>[12-14]</sup>,因此,单一靶标的抗病毒单克隆抗体治疗效果

并不令人满意,而由 2 种或更多种单克隆抗体组成的组合治疗方式正在快速发展。在肿瘤治疗等领域,具有“双靶”或“多靶”功能的双特异性抗体可同时靶向与癌症、增殖或炎症过程相关的多种表面受体或配体<sup>[15]</sup>。这种多重特异性开启了广泛的应用,包括将 T 细胞重定向到肿瘤细胞,同时阻断两种以上不同的信号传导途径,同时靶向不同的疾病介质,并将有效载荷传送到目标位点等。理论上,双特异性抗体同样可应用于抗病毒领域,从多个方面发挥协同或加强的治疗作用。

## 1 双特异性抗体的设计方案

双特异性抗体可大致分为两类:免疫球蛋白 G (IgG) 分子和非 IgG 分子<sup>[16]</sup>。IgG 形式双特异性抗体保留 Fc 介导的效应功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)<sup>[17]</sup>、补体依赖性细胞毒性 (CDC)<sup>[18]</sup>和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)<sup>[19]</sup>。大部分双特异性抗体包含 Fc 区的免疫球蛋白,由于其较大的尺寸和 Fc 受体介导的循环而通常具有较长的血清半衰期,并且具有 Fc 介导的抗病毒作用,而非 IgG 形式的双特异性抗体的尺寸较小,相应地组织穿透能力增强<sup>[20]</sup>。病毒免疫治疗中,双特异性抗体与 2 个或多个传统单抗的组合治疗不同,具有单个分子靶向多个表位的优势。此外,双特异性抗体为设计多功能及多价抗体提供了基础与平台,目前处于研发阶段的双特异性抗体大多为 IgG 形式,一些非 IgG 的抗体也正在研发中(图 1)。

## 2 双特异性抗体

双特异性抗体的靶点主要为病毒或宿主的抗原表位<sup>[23-25]</sup>。本文总结了公开发表的各种用于病毒免疫治疗的双特异性抗体的研究,如表 1 所示。根据抗体发挥作用的方式,可分为 3 种主要的类型:

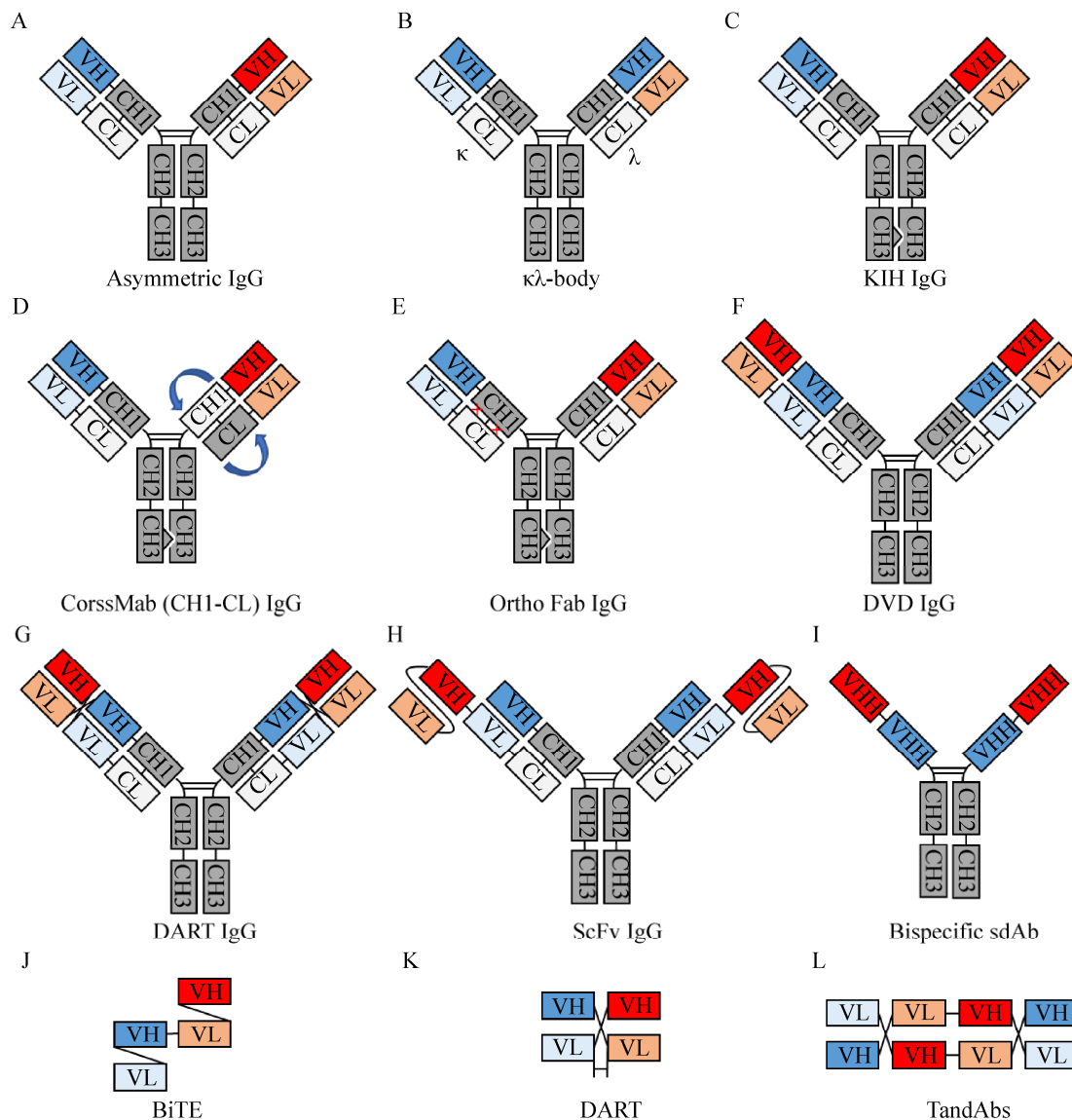


图 1 一些常见的 IgG 型双特异性抗体设计方案 (A: 具有两个不同可变区的非对称 IgG; B: 同时具有 Kappa-lambda 轻链形式的抗体  $\kappa\lambda$ -body IgG; C: 具有纽扣结构 Knobs-into-holes (KIH) 的 IgG; D: CH1 与 CL 进行互换形成 CrossMab (CH1-CL) IgG; E: CH1/CL 进行正交互补突变设计降低错配形成 Ortho-Fab IgG; F: 具有双可变区的 Dual variable domain IgG (DVD-IgG); G: 双亲和力重定向技术连接形成 Dual-affinity re-targeting antibody (DART-IgG); H: 单链可变区 Single-chain variable fragment (ScFv) 融合于 IgG 形成 ScFv-IgG; I: 双特异性单域抗体 Bispecific SdAb; J: 双特异性 T 细胞衔接器 BiTE; K: 双亲和力重定向形成的 DART; L: 四价双特异性串联双特异性抗体 TandAb<sup>[21-22]</sup>)

Fig. 1 Schematic representation of some common bispecific antibody formats. (A) Asymmetric IgG with each arm engages a different epitope. (B) Fuse two antibodies with light chains (one kappa and one lambda) to form  $\kappa\lambda$ -body IgG. (C) Complementary mutations are made in the CH3 domain to form Knobs-into-holes (KIH) IgG. (D) Exchange CH1 and CL to construct CrossMab (CH1-CL) IgG. (E) Cross-complementary mutation design of CH1/CL reduces mismatch formation of Ortho-Fab IgG. (F) A dual-variable domain is fused to HC and LC to form Dual variable domain IgG (DVD-IgG). (G) Dual-affinity re-targeting technique to generate Dual-affinity re-targeting antibody (DART-Ig). (H) A single chain variable fragment (ScFv) can be fused to HC to form scFv-IgG. (I) Bispecific single domain antibody. (J) Bi-specific T-cell engager antibody. (K) Dual-affinity re-targeting antibody. (L) Bispecific tetraivalent TandAb antibody<sup>[21-22]</sup>.

表 1 处于研发阶段的抗病毒双特异性抗体

Table 1 In development of antiviral bispecific antibody

Virus	Target	Format	Result	Reference
<b>1) Targeting 2 distinct viral epitopes</b>				
Influenza	HA proteins	Full-sized IgG antibodies fused via their C termini	Retains the activity and stability of the two fusion antibodies	[26]
	Head of HA protein	DART-IgG	Retained activity and efficacy of original antibodies in mice and ferret models	[27]
HIV-1	Various neutralizing epitopes on Env	Asymmetric IgG (CrossMab)	Retained binding activity of original antibodies; enhanced neutralization of HIV-1 strains; better pharmacokinetic parameters compared to original antibodies	[35]
	Two subunits of Env	scFv-Fc	Preserved the binding specificities of original antibodies; enhanced neutralization compared to original antibodies	[28]
	Different epitopes on adjacent GPs	Asymmetric IgG1 molecule with IgG3 hinge domain	Enhanced therapeutic activity in infected humanized mice compared to original antibodies and bispecific antibody without IgG3 hinge domain	[29]
Hepatitis B	Different epitopes on surface antigen	DVD IgG	Enhanced neutralization activity and inhibition of hepatitis B surface-antigen secretion compared to original antibodies	[30]
Dengue	DII and DIII of E protein	DVD with mutated Fc-domain	Retained antigen binding activity of original antibodies; enhanced neutralization and protection in mouse model; eliminated ADE effect <i>in vitro</i>	[31]
	DII and DIII of surface protein	DART-IgG with mutated Fc-domain	Retained neutralizing activity and therapeutic capacity in mice as original antibodies; enhanced affinity for isolated recombinant DENV surface protein	[32]
Ebola	SUDV and EBOV GP	scFvs of EBOV antibody fused to SUDV-IgG	Exhibit neutralizing activity of original antibodies; high degree post exposure protection of mice from both viruses	[33]
Zika	DIII and DII of E protein	scFv of anti-DIII antibodies fused to anti-DII IgG	Retained high <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> potencies; robustly prevented viral escape	[34]
<b>2) Targeting host and viral epitopes</b>				
HIV-1	Env and CD4	scFv of anti-Env antibodies fused to anti-CD4 IgG	Exhibited exceptional breadth and potency compared to original antibodies; neutralization of strains resistant to original antibodies	[24]
	CD4 and CD4 induced epitope	Anti-CD4i single domain antibody fused to CD4 IgG	Enhanced neutralizing activity and potency compared to original antibodies; neutralization of strains resistant to original antibodies	[36]
	Various neutralizing epitopes on Env and CD4 or CCR5	Asymmetric IgG (CrossMab)	Enhanced neutralizing activity compared to original antibodies; reduction of virus load in infected humanized mice; provided complete protection when administered prior to virus challenge	[37]
Ebola	Receptor binding site of GP and NPC1	DVD IgG	Neutralized all known ebolaviruses and conferred postexposure protection against multiple ebolaviruses in mice	[38]
<b>3) Recruiting host cell machinery</b>				
Dengue	Primate CR1 and DENV GP	Thioester Cross-linked IgGs	Facilitated specific and rapid binding of DENV to human and monkey erythrocytes; clearance of DENV viremia in cynomolgus macaques	[39]
Marburg	Primate CR1 and Marburg GP	Thioester Cross-linked IgGs	Facilitated specific and rapid binding of Marburg GP to monkey and human erythrocytes	[40]
CMV	CD3 and CMV	Thioester Cross-linked IgGs	Redirected specific cytotoxicity to CMV infected cells	[41]
HIV	CD3 and CD4 induced Env	DART-IgG	Mediated CD8+ T-cell clearance infected cells; reduction of latently infected CD4+ T cells <i>in vitro</i> ; <i>in vivo</i> safety in ART-treated HIV-infected patients	[42]

1) 靶向病毒抗原表位; 2) 同时靶向病毒与宿主表位; 3) 靶向宿主细胞表位。以下将进行详细探讨。

### 2.1 靶向病毒抗原表位的双特异性抗体

靶向 2 种不同病毒表位的双特异性抗体可能具有更好的效力和作用广谱性。Wagner 等设计出将 2 个抗流感病毒不同抗原的 IgG 抗体通过分选酶与点击化学进行 C 末端连接融合, 所得到的 C-C 融合的抗体不需要在抗体结构上改变, 具有较好的稳定性与 Fc 受体结合能力, 该抗体二聚体在小鼠模型中保留了两个亲本抗体的活性, 在体外实验中对 H3N2 与 H1N1 流感病毒均有较好的结合能力。然而, C-C 融合可能具有免疫原性, 需进一步研究<sup>[26]</sup>。Zalin 等开发出 2 个针对不同 H5N1 流感病毒株的中和单克隆抗体, 并将 2 个单克隆抗体的可变区与 Fc 融合为双特异性 DART-IgG 抗体。DART-IgG 抗体是由包含 2 个 Fc 融合蛋白链通过聚合作用形成, 一个多肽链通过 Gly-Ser 接头连接第一抗体的轻链可变区 (VL) 和第二抗体的重链可变区 (VH), 并且第二个多肽含有互补可变区。通过 2 个链的异二聚化引起 DART 的组装, 并产生双特异性和四价的单一抗体。在小鼠感染模型中, 抗流感病毒 DART-IgG 具有两种亲本单克隆抗体的广谱活性和保护效力。另外, DART-IgG 在受感染的雪貂模型中表现出 100% 的保护。因此, DART-IgG 疗法是针对 H5N1 禽流感病毒有效的治疗方法<sup>[27]</sup>。

与流感病毒相似, 对于靶向 HIV-1 的包膜蛋白 (Env) 的双特异性抗体, 也具有增强的活性。Asokan 等通过 CrossMab 技术构建非对称双特异性 IgG, 其中每个臂可以单独结合不同的 Env, 这些双特异性抗体在一些情况下显示出比亲本抗体更广的作用范围, 平均能够中和 94%–97% 具有抗原多样性的 206 株 HIV-1, 将具有最高中和活性的双特异性抗体静脉注入恒河猴内, 显示出与其亲本抗体组合相似的药代动力学特性。为了验

证增加亲本抗体的亲和力可以增强抗体的中和活性这一想法, Mouquet 等将工程化的 scFv-Fc IgG 分子, 与 HIV-1 Env 的 2 个不同亚基结合。结果表明, 与亲本抗体相比, 异型结合的抗体增强了中和作用<sup>[28]</sup>。通过设计包含 IgG3 铰链结构域的不对称双特异性 IgG1 分子, Bournazos 等也报道了靶向不同的 HIV-1 Env 的双特异性抗体, IgG3 铰链结构域的长度和灵活性允许抗体进行异二价结合 HIV-1 的 2 个相邻糖蛋白上的表位, 从而增加抗体亲和力, 同时促进靶点失活。与未修饰的不对称双特异性分子相比, 具有修饰的铰链结构域分子在病毒中和以及 HIV-1 感染的人源化小鼠的保护中更具有协同活性, 更具有优越性<sup>[29]</sup>。

Tan 等利用来自抗乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的两种具有协同中和活性的单克隆抗体, 重组获得 DVD 形式的双特异性抗体 C4D2-BsAb。第一个抗体的 VH 和 VL 分别通过短肽接头与第二抗体的重链和轻链的 N 末端基因融合, 从而保留 IgG 分子的 Y 形。这样的结构使得其相对于亲本抗体来说具有更加优异的 HBV 中和活性, 这种活性可能是通过空间位阻或诱导 HBsAg 构象改变来实现的<sup>[30]</sup>。Shi 等基于 2 个抗 DENV 的单克隆抗体 1A1D-2 (1A1D) 与 2A10G6 (2A10) 设计出 DVD 形式的双特异性抗体 DVD-1A1D-2A10, 其中, 1A1D1 抗体能够与 E-DIII 结合从而阻止病毒附着在细胞表面, 同时 2A10 抗体能与 E-DII 结合进而能够阻止病毒与内体膜融合。双特异性抗体 DVD-1A1D-2A1 同时保留了两个亲本抗体的抗原结合活性, 更重要的是, 此双特异性抗体无论在体外还是在体内, 与亲本抗体相比具有更好的 DENV 中和效果。为了消除抗体依赖性感染增强作用 (ADE), DVD-1A1D-2A10 经过设计能够防止其与 Fc $\gamma$ R (Fc-gamma receptors) 的相互作用。综合分析, DVD-1A1D-2A10 抗体能够同时针对病毒入侵宿主细胞的附着和融合阶段, 广泛中和

所有 4 种血清型的 DENV 而没有 ADE 的风险, 因此其作为针对 DENV 的新型抗病毒策略具有巨大潜力<sup>[31]</sup>。此外, Brien 等报道了 IgG 融合的 DART 蛋白, 也将其改造使之缺乏 Fc- $\gamma$ -R 结合能力并且能同时结合 DENV 病毒粒子表面 2 个不同的空间表位 DII 和 DIII。改造过的分子在体外具有中和活性及小鼠 ADE 疾病模型中的治疗作用, 并且观察到四价 DART-Ig 对 DENV E 蛋白亲合力的改善并未在体外和体内转化为更好的病毒抑制活性, 这可能是由于 DENV 病毒体的类似二十面体结构, 排除了同时识别相邻表位所必需的结合几何结构<sup>[32]</sup>。2015 年, Frei 等用抗体工程的方法开发出针对埃博拉病毒新型的双特异性抗体, 其中萨伊伊波拉病毒 (Zaire, Ebola 亚种) 的特异性抗体的 scFv 与苏丹病毒 (SUDV, Ebola 亚种) 特异性抗体的 N 末端和 C 末端融合。这两个病毒虽然差异较大, 但从 1976 年至 2014 年共同占了埃博拉病毒相关死亡人数的 95%。双特异性分子表现出有效的中和作用, 这些双特异性抗体对两种埃博拉糖蛋白假型病毒以及真正的病原体都表现出了有效的中和作用, 并且对两种病毒感染的小鼠具有高度 (在一种情况下为 100%) 暴露后的保护<sup>[33]</sup>。2017 年, Wang 等开发了一种抗寨卡病毒 (ZIKA) 的双特异性抗体 FIT-1, 其由 ZKA190 单克隆抗体和针对 E 蛋白 DII 抗原的第二种抗体组成。除了保持高的体外和体内效力外, FIT-1 还能有效地阻止病毒逃逸, 因此可以将其开发为 ZIKV 的免疫疗法<sup>[34]</sup>。

## 2.2 同时靶向病毒与宿主表位的双特异性抗体

靶向病毒与宿主表位的双特异性抗体分别靶向病毒的表位与免疫细胞的表位, 有利于细胞毒性 T 细胞等锚定病毒并进行杀灭。机体抗病毒反应主要依赖于 T 细胞, 包括细胞毒性 T 细胞 (CD8+) 能够杀死被病毒感染的细胞, 诱导型 T 细胞 (CD4+) 能够释放细胞因子如肿瘤坏死因子与  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 等。Pace 等开发了一种针

对 HIV 的双特异性抗体, 是由广泛中和抗 Env 抗体的 scFv 通过 Gly-Ser 接头与人源化抗 CD4 抗体的 N 末端融合而成<sup>[24]</sup>。与此相似, Sun 等设计了另一种特异性抗体, 是由 2 个拷贝的 CD4 诱导的 Env 表位的单域抗体通过 Gly-Ser 接头与抗 CD4 抗体的 C 末端融合而成, 两种双特异性分子均显示出改善的抗病毒活性, 能够中和在体外表现出对亲本抗体耐药的病毒株<sup>[36]</sup>。为了设计保持正常 IgG 结构的协同双特异性抗体, Huang 等应用 CrossMab 技术开发了不对称 IgG, 其中 Fab 采用抗 CD4 或抗 CCR5 抗体, 其中两种分子在一组 HIV-1 分离株中显示出增加的中和活性, 并且一种抗体显著降低了 HIV 感染的人源化小鼠的病毒载量<sup>[37]</sup>。

与 HIV 不同, Ebola 的保守丝状病毒糖蛋白 GP (Glycoprotein) 与其宿主细胞表面受体 Niemann-Pick C1 (NPC1) 之间的必需相互作用作为 mAb 靶标。但是, 由于其形成胞内体的原因, 这种作用受到影响。Wec 等描述了靶向这种相互作用的双特异性抗体策略, 其中对 NPC1 特异性的 mAb 或 GP 受体结合位点与针对保守的表面暴露的 GP 表位的 mAb 偶联。此双特异性抗体为 DVD 形式的 IgG。双特异性抗体通过将所有已知的埃博拉病毒结合, 将其传递至内膜并中和, 能够对小鼠多种埃博拉病毒暴露后起到保护作用。Wec 形象地将这种双特异性抗体比作“特洛伊木马”, 具有广泛的抗丝状病毒免疫治疗潜力<sup>[38]</sup>。

## 2.3 招募宿主细胞的双特异性抗体

双特异性抗体分子也可用于招募宿主细胞免疫系统。基于此点, Hahn 等开发了针对登革热病毒的双特异性复合物 HPs (Heteropolymers), 灵长类 E 补体受体 1 特异性的单克隆抗体与另一种对靶抗原具有特异性的单克隆抗体通过硫醚键交联, 该 HP 显示了与登革热糖蛋白和灭活马尔堡病毒结合的病毒免疫治疗潜力, 并能在体外特异性结合猴和人红细胞及各自抗原。此外, 当登革

热特异性 HP 用于受感染的食蟹猴时,证实了对登革热病毒血症的治疗效果<sup>[39-40]</sup>。

设计能够激活和引导细胞毒性 T 细胞对靶点作用的双特异性分子是一大趋势。包含抗原特异性臂和抗 CD3 臂的抗体,其激活并将细胞毒性 CD8<sup>+</sup> T 细胞重定向至抗原特异性细胞<sup>[43]</sup>。T 细胞在癌症免疫疗法中取得了巨大成功,因而采用类似策略清除病毒本身或感染细胞的可能性很大。因此,在针对巨细胞病毒 (CMV) 的治疗中, Lum 等将抗 CD3 激活的 T 细胞 (ATCs) 通过化学异源偶联与抗 CD3×CMV 双特异性抗体 (CMVBi) 结合并靶向清除 CMV 感染的细胞。极低剂量的 CMVBi, 低至 0.01 ng/10<sup>6</sup> ATCs 能够介导针对 CMV 感染的靶细胞的特异性细胞毒性 (SC)。在特定的效应物-靶标比例下,能够显著增强对 CMV 感染靶标的杀伤。这种非主要组织相容性复合物 (MHC) 限制性靶向 CMV 的策略可用于预防或治疗异基因干细胞移植或器官移植后的 CMV 感染<sup>[41]</sup>。在 HIV 免疫治疗中, Sung 等开发了一种免疫治疗方式,旨在改善 T 细胞介导的 HIV-1 感染细胞的清除。具体而言,通过采用双亲和 DART 抗体,可同时结合 2 种不同的细胞表面分子。该 DART 具有单价 HIV-1 包膜结合 (Env 结合) 臂,该臂来自广泛结合的抗体依赖性细胞毒性介导抗体,能够与 HIV 感染的靶细胞结合,该臂与单价 CD3 结合臂偶联,招募细胞溶解效应 T 细胞 (称为 HIV×CD3 DART)。因此,这些 DART 重定向多克隆 T 细胞以特异性地接触并杀死表达 Env 的细胞,包括不同 HIV-1 亚型感染的 CD4<sup>+</sup> T 细胞,从而避免了对 HIV 特异性免疫的需要。使用来自抑制性抗逆转录病毒疗法 (ART) 患者的淋巴细胞,证明 DART 介导 CD8<sup>+</sup> T 细胞能够清除被 HIV-1 株 JR-CSF 重复感染或感染了从 HIV 感染患者分离病毒的静息期 CD4<sup>+</sup> T 细胞。此外,在诱导潜伏期的病毒表达后, DART 能够介导 CD8<sup>+</sup> T 细胞能对静息期 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 HIV 的清

除作用。与 HIV 潜伏期抗逆转录病毒药物相结合, HIV×CD3 DART 有可能成为有效的免疫治疗剂,以清除 HIV 感染者的潜伏期 HIV-1<sup>[42]</sup>。

### 3 双特异性抗体的研发趋势

理想的治疗性双特异性抗体具有体内半衰期长、组织渗透性强等特性<sup>[44]</sup>。目前处于开发中的大多数双特异性抗体为 IgG 全长形式,这种形式的分子具有较好的稳定性和效应功能,但它们的大尺寸限制了其组织穿透能力。相反,抗体片段类的分子如 scFv、Fab, 缺少 Fc 段的抗体片段由于半衰期较短,有时需要 PEG 修饰等方法延长其血清半衰期<sup>[45]</sup>才能适合临床需求,但由于其较小的尺寸而具有更高的渗透能力,也是开发的方向之一。而双特异性抗体的制备依赖于平台技术,理想的开发过程需要从发现、临床前研究到临床生产的整个链条进行开发,以便在短时间内快速发现有效的抗体组合并进行临床级别的制备。在设计抗体形式时,简化结构和生产过程以及利用强大的生产平台是关键。

在病毒免疫疗法的特定背景下,双特异性及多特异性抗体的药物代谢动力学和免疫原性对成药性非常重要,但目前仍很少受到关注。一方面,融合分子的性质可能导致某些组合中的构象变化或错误折叠,从而影响 IgG 免疫缀合物的药代动力学<sup>[46]</sup>。另一方面,双特异性抗体的大分子量特性,加之其可能发生聚合,导致潜在的免疫原性风险<sup>[47]</sup>,尤其与免疫增强剂结合使用则可能会引发人体强烈的免疫反应。我们期待着越来越多的治疗性的双特异性抗体进入临床试验甚至应用于临床治疗,能够提供更坚实的数据,帮助研究者不断提高对免疫原性及药代动力学的研究水平。

双特异性抗体的质量控制问题是其发展的最大制约因素,传统的单克隆抗体在质量控制上需要考虑抗体的鉴别、结构与理化特性、生物学活性分析、纯度和杂质、安全性等问题。双特异性

抗体与单克隆抗体相比,其结构及生产工艺相比更为复杂,需要更多考虑其错配情况及目的产物的效率、结构与理化特性、生物学活性。首先,在设计双特异性抗体的时候,需要对抗体结构进行更好的设计,以降低错配率及提高产物效率,例如采用 CrossMab 技术能够减少重链与轻链的错配情况<sup>[48]</sup>。其次,在生产过程中,需要优化生产工艺,尽量减少副产物的产生,提高所需样品的纯度及稳定性。最后是对双特异性抗体的各种指标进行检测,检测主要侧重在以下几个方面:对产物效率及错配情况的检测,可采用液质谱联用(LC-MS)、疏水作用色谱(HIC)、二维 LC-MS,能够有效地检测双特异性抗体的错配情况及产物的效率<sup>[49]</sup>。结构与理化特性主要对其聚体与降解物、电荷异质性、完整与还原分子量、氨基酸序列覆盖率、糖基化、翻译后修饰、二硫键、高级结构等进行检测,目前采用的技术有尺寸排阻色谱(SEC-HPLC)、毛细管电泳(CE)、超高效液相色谱(UPLC-FLD)、埃德曼降解法(Edman degradation)、阳离子交换色谱(CEX-HPLC)、圆二色谱(CD)、差示扫描量热法(DSC)、傅里叶转换红外光谱(FTIR)等技术。生物学活性检测方面主要检测抗体的 FcR 结合活性、亲和力以及功能生物学活性方面,可以采用 ELISA、Biacore、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)、混合淋巴性反应(MLR)检测等。随着较多的新的检测技术的发展,能够推进双特异性抗体的制备及质控技术快速发展。

值得探讨的是,嵌合抗原受体 T(CAR-T) 细胞治疗作为一种新型的免疫治疗方式,通过对患者的自体 T 细胞进行遗传修饰以表达对肿瘤抗原特异的抗体,从而靶向肿瘤进行治疗。靶向 CD3 的双特异性抗体与某些 CAR-T 分子的设计有异曲同工之妙,作用机制也类似,因此 CAR-T 细胞治疗对双特异性抗体的设计和研究具有借鉴意义。除了针对白血病和淋巴瘤的 CAR-T 已经取得

了很大的进展外<sup>[50]</sup>,目前已有针对病毒感染的 CAR-T 治疗方法的研究,其中,研究人员将人表皮生长因子受体 2-CAR (HER2-CAR) 置于能识别巨细胞病毒(CMV)的 T 细胞中。这些 CMV 特异性细胞毒性 T 细胞(CMV-T 细胞)更加活跃,它们对病毒以及肿瘤细胞都具有免疫反应,目前这种 CMV 特异性 CAR-T 已经处于临床 I 期<sup>[51]</sup>。在另一项研究中,EBV 特异性 CAR-T 细胞能够识别并杀死 EB 病毒(EBV)感染的细胞,从而防止 EBV 相关的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)复发<sup>[52]</sup>。虽然针对病毒的 CAR-T 研究不多,我们预期这将成为一个重要的研究方向,并为开发新型的抗病毒双特异性抗体药物开拓思路。

## 4 总结

双特异性抗体的研发在肿瘤治疗领域已取得了巨大进步,而在病毒的免疫治疗方面尚处于起步阶段,而双特异性抗体作用途径及作用机制的前期积累,能够为其抗病毒治疗提供研究借鉴。此外,双特异性抗体由于结构复杂,其制备和质控均较为困难,随着近年来基因工程、蛋白质工程研究的进步,新的技术不断涌现,已能够较好地解决这些难题,例如本团队采用具有自剪接功能的天然分裂式 split-intein 设计的 BAPTS (Bispecific antibodies by protein trans-splicing) 技术平台即可实现双特异性抗体的高效制备<sup>[53]</sup>,从而推动新型双特异性抗体在抗病毒领域的研究和开发。

本文综述了应用于病毒治疗的各种双特异性抗体的研发现状及未来趋势,希望为本领域的研究人员提供一定的参考。总之,在单一靶点的单克隆抗体药物不能完全提供治疗效果的情况下,双特异性抗体能够发挥更好的附加效果或协同效果,从而增强病毒的免疫治疗效果,将双特异性抗体单独使用与其他抗病毒疗法联合,必将成为开发下一代疗法的机会。



## REFERENCES

- [1] Reperant LA, Osterhaus ADME. AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? *Vaccine*, 2017, 35(35): 4470–4474.
- [2] Ringehan M, McKeating JA, Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer. *Philos Trans Roy Soc B: Biol Sci*, 2017, 372(1732): 20160274.
- [3] Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: replication and pathogenesis. *J Hepatol*, 2016, 64(S1): S102–S116.
- [4] de Clercq E, Li GD. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(3): 695–747.
- [5] Calland N, Sahuc ME, Belouzard S, et al. Polyphenols inhibit hepatitis C virus entry by a new mechanism of action. *J Virol*, 2015, 89(19): 10053–10063.
- [6] Hoenen T, Safronetz D, Groseth A, et al. Mutation rate and genotype variation of Ebola virus from Mali case sequences. *Science*, 2015, 348(6230): 117–119.
- [7] Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, et al. 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*, 2014, 22(3): 642–643.
- [8] Graham BS, Ambrosino DM. History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. *Curr Opin HIV AIDS*, 2015, 10(3): 129–134.
- [9] Caskey M, Klein F, Lorenzi JCC, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature*, 2015, 522(7557): 487–491.
- [10] Qiu XG, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014, 514(7520): 47–53.
- [11] Pierce BG, Keck ZY, Lau P, et al. Global mapping of antibody recognition of the hepatitis C virus E2 glycoprotein: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(45): E6946–E6954.
- [12] Dingens AS, Haddox HK, Overbaugh J, et al. Comprehensive mapping of HIV-1 escape from a broadly neutralizing antibody. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(6): 777–787.e4.
- [13] Kugelman JR, Kugelman-Tonos J, Ladner JT, et al. Emergence of Ebola virus escape variants in infected nonhuman primates treated with the MB-003 antibody cocktail. *Cell Rep*, 2015, 12(12): 2111–2120.
- [14] Doud MB, Lee JM, Bloom JD. How single mutations affect viral escape from broad and narrow antibodies to H1 influenza hemagglutinin. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1386.
- [15] Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discovery Today*, 2015, 20(7): 838–847.
- [16] Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, et al. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 195–208.
- [17] Kline JB, Kennedy RP, Albone E, et al. Tumor antigen CA125 suppresses antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) via direct antibody binding and suppressed Fc- $\gamma$  receptor engagement. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52045–52060.
- [18] Kellner C, Derer S, Klausz K, et al. Fc glyco- and Fc protein-engineering: design of antibody variants with improved ADCC and CDC activity//Nevoltris D, Chames P, Eds. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, 2018: 381–397.
- [19] Kang TH, Lee CH, Delidakis G, et al. An engineered human Fc variant with exquisite selectivity for Fc $\gamma$ RIIIa<sub>V158</sub> reveals that ligation of Fc $\gamma$ RIIIa mediates potent antibody dependent cellular phagocytosis with GM-CSF-differentiated macrophages. *Front Immunol*, 2019, 10: 562.
- [20] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 715–725.
- [21] Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, et al. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des, Devel Ther*, 2018, 12: 195–208.
- [22] Nyakatura EK, Soare AY, Lai JR. Bispecific antibodies for viral immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(4): 836–842.
- [23] Lu D, Zhu ZP. Construction and production of an IgG-like tetravalent bispecific antibody, IgG-single-chain Fv fusion//Steinitz M, Ed. *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2014: 185–213.
- [24] Pace CS, Song RJ, Ochsenbauer C, et al. Bispecific antibodies directed to CD4 domain 2 and HIV envelope exhibit exceptional breadth and picomolar potency against HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(33): 13540–13545.
- [25] Fischer N, Léger O. Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathobiology*, 2007, 74(1): 3–14.
- [26] Wagner K, Kwakkenbos MJ, Claassen YB, et al. Bispecific antibody generated with sortase and click chemistry has broad antiinfluenza virus activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): 16820–16825.
- [27] Zanin M, Keck ZY, Rainey GJ, et al. An anti-H5N1 influenza virus FcDART antibody is a highly efficacious therapeutic agent and prophylactic against H5N1 influenza virus infection. *J Virol*, 2015, 89(8): 4549–4561.
- [28] Mouquet H, Warncke M, Scheid JF, et al. Enhanced

- HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(3): 875–880.
- [29] Bournazos S, Gazumyan A, Seaman MS, et al. Bispecific anti-HIV-1 antibodies with enhanced breadth and potency. *Cell*, 2016, 165(7): 1609–1620.
- [30] Tan WL, Meng YC, Li H, et al. A bispecific antibody against two different epitopes on hepatitis B surface antigen has potent hepatitis B virus neutralizing activity. *mAbs*, 2013, 5(6): 946–955.
- [31] Shi X, Deng YQ, Wang HJ, et al. A bispecific antibody effectively neutralizes all four serotypes of dengue virus by simultaneous blocking virus attachment and fusion. *mAbs*, 2016, 8(3): 574–584.
- [32] Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Williams KL, et al. Protection by immunoglobulin dual-affinity retargeting antibodies against dengue virus. *J Virol*, 2013, 87(13): 7747–7753.
- [33] Frei JC, Nyakatura EK, Zak SE, et al. Bispecific antibody affords complete post-exposure protection of mice from both Ebola (Zaire) and Sudan viruses. *Sci Rep*, 2016, 6: 19193.
- [34] Wang JQ, Bardelli M, Espinosa DA, et al. A human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*, 2017, 171(1): 229–241.e15.
- [35] Asokan M, Rudicell RS, Louder M, et al. Bispecific antibodies targeting different epitopes on the HIV-1 envelope exhibit broad and potent neutralization. *J Virol*, 2015, 89(24): 12501–12512.
- [36] Sun M, Pace CS, Yao X, et al. Rational design and characterization of the novel, broad and potent bispecific HIV-1 neutralizing antibody iMabm36. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 66(5): 473–483.
- [37] Huang YX, Yu J, Lanzi A, et al. Engineered bispecific antibodies with exquisite HIV-1-neutralizing activity. *Cell*, 2016, 165(7): 1621–1631.
- [38] Wec AZ, Nyakatura EK, Herbert AS, et al. A “Trojan horse” bispecific-antibody strategy for broad protection against ebolaviruses. *Science*, 2016, 354(6310): 350–354.
- [39] Hahn CS, French OG, Foley P, et al. Bispecific monoclonal antibodies mediate binding of dengue virus to erythrocytes in a monkey model of passive viremia. *J Immunol*, 2001, 166(2): 1057–1065.
- [40] Nardin A, Sutherland WM, Hevey M, et al. Quantitative studies of heteropolymer-mediated binding of inactivated Marburg virus to the complement receptor on primate erythrocytes. *J Immunol Methods*, 1998, 211(1/2): 21–31.
- [41] Lum LG, Ramesh M, Thakur A, et al. Targeting cytomegalovirus-infected cells using T cells armed with anti-CD3 × anti-CMV bispecific antibody. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(7): 1012–1022.
- [42] Sung JAM, Pickeral J, Liu LQ, et al. Dual-affinity Re-targeting proteins direct T cell-mediated cytolysis of latently HIV-infected cells. *J Clin Invest*, 2015, 125(11): 4077–4090.
- [43] Varghese B, Menon J, Rodriguez L, et al. CD20xCD3 bispecific fully human antibody induces potent anti-tumor activity against CD20-expressing tumors in immune competent mice humanized for CD20 and CD3. *Blood*, 2015, 126: 818.
- [44] Chen Y, Xu Y. Pharmacokinetics of bispecific antibody. *Curr Pharmacol Rep*, 2017, 3(3): 126–137.
- [45] Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(2): 220–233.
- [46] Rossi EA, Chang CH, Cardillo TM, et al. Optimization of multivalent bispecific antibodies and immunocytokines with improved in vivo properties. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(1): 63–71.
- [47] Runcie K, Budman DR, John V, et al. Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics. *Mol Med*, 2018, 24(1): 50.
- [48] Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *mAbs*, 2016, 8(6): 1010–1020.
- [49] Wang CL, Vemulapalli B, Cao MY, et al. A systematic approach for analysis and characterization of mispairing in bispecific antibodies with asymmetric architecture. *mAbs*, 2018, 10(8): 1226–1235.
- [50] June CH, O’Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, 359(6382): 1361–1365.
- [51] Ahmed N, Brawley V, Hegde M, et al. Autologous HER2 CMV bispecific CAR T cells are safe and demonstrate clinical benefit for glioblastoma in a Phase I trial. *J Immunother Cancer*, 2015, 3(Suppl 2): O11.
- [52] Onea AS, Jazirehi AR. CD19 chimeric antigen receptor (CD19 CAR)-redirected adoptive T-cell immunotherapy for the treatment of relapsed or refractory B-cell Non-Hodgkin’s Lymphomas. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(2): 403–424.
- [53] Han L, Chen JS, Ding K, et al. Efficient generation of bispecific IgG antibodies by split intein mediated protein trans-splicing system. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8360.

(本文责编 郝丽芳)