

双特异性抗体构建在肿瘤临床治疗中的应用

王璐瑶, 魏振华, 熊伟佳, 白素杭, 喻长远, 杨昭

北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

王璐瑶, 魏振华, 熊伟佳, 等. 双特异性抗体构建在肿瘤临床治疗中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(2): 513-529.

Wang LY, Wei ZH, Xiong WJ, et al. Bispecific antibodies in clinical tumor therapy. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 513-529.

摘要: 双特异性抗体 (Bispecific antibody, BsAb) 是具有两个不同抗原结合位点的抗体, 可分为含 Fc 段和不含 Fc 段的 BsAb, 不同结构的 BsAb 具有不同的特点和应用领域。相比于传统的单克隆抗体, BsAb 的灵敏度和特异性更高。更重要的是, BsAb 具有募集免疫细胞、双重阻断信号通路等功能, 在免疫诊断和治疗中扮演重要角色。随着全球环境的恶化以及人们生活习惯的不规律, 肿瘤的发病率越来越高, 成为仅次于心脑血管疾病的全球第二大致死疾病, 全球每年有 1 200 万新发癌症病例。肿瘤的治疗手段包括手术切除、放化疗和靶向治疗等。肿瘤免疫疗法是近几年新兴的治疗方法, 其通过激发自身免疫系统的能力来清除肿瘤细胞。传统的单抗药物虽在肿瘤靶向治疗和免疫治疗中取得了一定的疗效, 但肿瘤具有高度的异质性和可塑性, 常常引发肿瘤耐药性的出现。双特异性抗体能够同时靶向多个靶点, 目前已用于肿瘤的临床治疗, 并取得了一定的治疗效果。文中就双特异性抗体在肿瘤临床治疗中的研究进展和应用作一综述。

关键词: 双特异性抗体, 肿瘤, 靶向治疗, 免疫治疗

Bispecific antibodies in clinical tumor therapy

Luyao Wang, Zhenhua Wei, Weijia Xiong, Suhang Bai, Changyuan Yu, and Zhao Yang

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: Bispecific antibody (BsAb) has two different antigen-binding sites, divided into the "IgG-like" format and the "non-IgG-like" format. Different formats have different characteristics and applications. BsAb has higher sensitivity and specificity than conventional antibodies, with special functions such as recruitment of immune cells and blocking of dual signaling pathways, playing an important role in immune-diagnosis and therapy. With the deterioration of the global environment and the irregular living habits of people, the incidence of tumor is becoming higher and higher. Tumor becomes the most serious fatal disease threatening human health after cardiovascular disease. There are 12 million estimated new tumor cases each year worldwide. The major clinical treatments of tumor are surgical resection, chemoradiotherapy, target therapy. Tumor immunotherapy is a novel approach for tumor treatment in recent years, and activates human immune system to control

Received: June 6, 2020; **Accepted:** August 4, 2020

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. buctrc201910), Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Special Project (No. 19JCZDJC65800(Z)), National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0105900).

Corresponding author: Zhao Yang. Tel: +86-10-64421335; E-mail: yangzhao@mail.buct.edu.cn

中央高校基本科研业务费 (No. buctrc201910), 京津冀基础研究合作专项 (No. 19JCZDJC65800(Z)), 国家重点研发计划 (No. 2017YFA0105900) 资助。

and kill tumor cells. Although the traditional monoclonal antibodies have already acquired some therapeutic effects in tumor targeted therapy and immunotherapy, they induce drug resistance resulted from the heterogeneity and plasticity of tumors. Binding to two target antigens at the same time, BsAb has been used in the clinical treatment of tumors and obtained promising outcomes. This review elaborates the research progress and applications of bispecific antibody in clinical tumor therapy.

Keywords: bispecific antibody, tumor, target therapy, immunotherapy

双特异性抗体是能同时识别和结合两种不同抗原的抗体,因此可以发挥特殊的功能,例如将免疫细胞特异性与肿瘤细胞连接,增强其杀伤作用;同时结合肿瘤细胞上的两种抗原,阻断双重信号通路,降低肿瘤耐药性等,这些功能使得双特异性抗体相比于单抗而言灵敏度和特异性更高,具有更广阔的应用前景。抗体分子由抗原结合片段 (Antigen-binding fragment, Fab) 和可结晶段 (Crystallizable fragment, Fc) 组成,单克隆抗体只有一种抗原结合片段,因此只能结合一种抗原。1960年, Nisonoff 等^[1]将两个不同的抗原结合片段通过再氧化连接到一起,并证明了该产物可以募集两种不同类型的细胞,首次合成出双特异性抗体,开辟了抗体领域的新道路。双特异性抗体按照是否含有 Fc 段可以分为两类,含 Fc 段的双特异性抗体和不含 Fc 段的双特异性抗体,而每一大类中又可以细分成若干小类。随着抗体技术的飞速发展,科学家们已经制备出了大约 100 种不同类型的双特异性抗体^[2-4]。双特异性抗体以其独特的性质和功能广泛应用于各种领域,包括穿透血脑屏障治疗神经性疾病^[5]、SARS 等传染性疾病的酶联检测^[6]、体内医学成像^[7]、肿瘤免疫治疗^[8]等。

随着全球环境的恶化以及人们不规律的生活习惯,肿瘤的发病率越来越高,成为一种严重危害人类健康的疾病。2018 年全球癌症统计数据显示,2018 年全球癌症新发病例 1 810 万,死亡病例 960 万,其中亚洲新发病例占全球约 50%,死亡病例约占 70%,我国的癌症新发病例 (380.4 万) 和死亡病例 (229.6 万) 更是位居全球第一,情况不容乐观^[9]。2018 年全球新发病率最高的癌症依

次为:肺癌 (11.6%)、乳腺癌 (11.6%)、结直肠癌 (10.2%)、前列腺癌 (7.1%)、胃癌 (5.7%); 全球死亡率最高的癌症依次为:肺癌 (18.4%)、结直肠癌 (9.2%)、胃癌 (8.2%)、乳腺癌 (6.6%)。肿瘤的治疗手段包括手术切除、放化疗以及免疫治疗等。其中手术切除对肿瘤早期患者而言有较好的效果,但是一旦患者处于晚期,手术便不再是治疗的有效手段;放化疗在杀死癌细胞的同时也会侵袭正常细胞,导致副作用的出现。这些传统治疗方法往往不能根治肿瘤,还可能会导致肿瘤的复发和进展^[10]。肿瘤免疫疗法是近几年新兴的治疗方法,通过激发免疫系统自身的能力来对抗肿瘤细胞,包括免疫检查点抑制、过继 T 细胞疗法等。但传统的单抗药物疗效往往有限,可能会引发肿瘤耐药性,且易发生脱靶效应^[11]。此外,肿瘤的发病机制复杂,对多个靶点的同时阻断往往会有更好的治疗效果^[12],因此双特异性抗体应运而生。

双特异性抗体可以同时识别并结合两种不同抗原,灵敏度和特异性要高于单抗药物,减少了脱靶等副作用,有着更好的肿瘤治疗效果。近年来,不同结构的双特异性抗体不断被设计出来并商业化,且其中的一部分已经正在进行临床试验,用于多种肿瘤的治疗,包括非小细胞肺癌、胃癌、非霍奇金淋巴瘤、白血病等^[13]。双特异性抗体介导的双靶向性有着很好的治疗前景,可以在时间或空间上将两种特异性的靶点连接在一起,但是真正应用到临床治疗仍具有一定的挑战。例如,全球首个双特异性抗体药物 Catumaxomab,可以同时与肿瘤表皮黏附因子 EpCAM 和 T 细胞表面 CD3 分子特异性结合, II / III 期临床试验

(NCT00836654) 显示出了较好的治疗效果, 258 例出现恶性腹水的卵巢癌、胃肠癌、乳腺癌、胰腺癌患者, 经 Catumaxomab 给药治疗后, 无穿刺生存期对照组为 11 d, 实验组为 46 d ($P < 0.0001$), 显著延长了患者的生存期^[14]。常见的不良事件是细胞因子释放相关的症状, 包括发热、恶心和呕吐等, 这些不良事件通常是低级或中级的, 且可控可逆^[15], 但在临床试验中, 有受试者出现了急性肝衰竭并死亡^[16]。此外, 针对 T 细胞的双特异性抗体免疫治疗, 会引起细胞因子释放综合征 (Cytokine release syndrome, CRS), 炎性细胞因子如 IL-6 的血清浓度增加^[17], 引起失控的全身炎症反应, 严重的甚至危及生命。由此可见, 双特异性抗体药物在肿瘤治疗方面仍需深入研究, 以减少副作用, 获得更佳临床疗效。在这里, 我们介绍了应用于几种常见肿瘤类型的一些双特异性

抗体药物, 并对其临床数据进行了汇总分析。

1 双特异性抗体的发展历程

如图 1 所示, 双特异性抗体的研究可以追溯到 1960 年, Nisonoff 等^[1]将两个不同的抗原结合片段通过再氧化连接到一起, 并证明了该产物可以募集两种不同类型的细胞, 首次提出了双特异性抗体的概念。在此基础上, 1983 年, Milstein 等第一次使用融合的两种杂交瘤细胞生产出不对称结构的双特异性抗体, 并证明了该方法较化学合成法的优势, 即避免了后者在处理抗体进行解链时引起蛋白变性导致的抗体失活^[18]。不对称结构与天然抗体结构类似, 具有最低的免疫原性, 在临床治疗方面有着不可替代的优势。但在融合杂交瘤细胞的重链和轻链的随机配对中, 产生了大量的非功能性抗体, 使得双特异性抗体的产率极低,

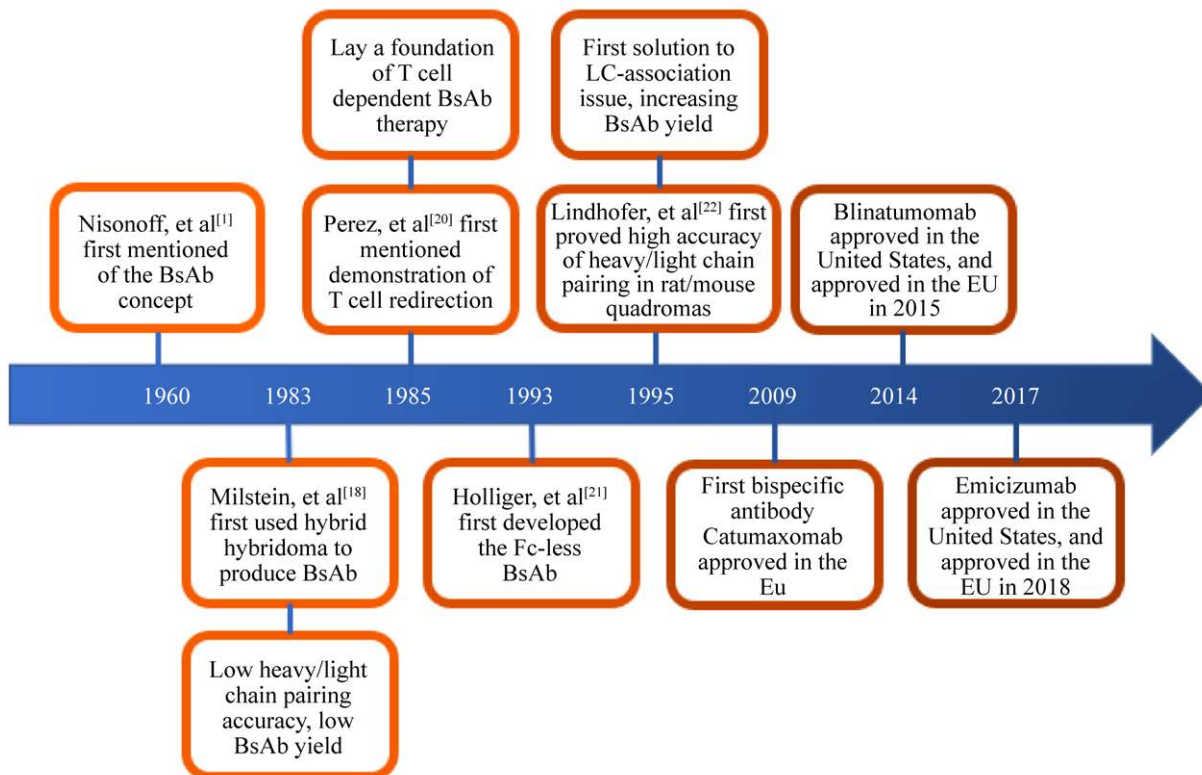


图 1 双特异性抗体的发展历程

Fig. 1 The development of bispecific antibody.

这一现象被称为链交联问题 (Chain-association issue)^[19]。1985 年, Perez 等第一次提出了可以特异性靶向 T 细胞表面受体 T3 和靶细胞表面抗原的双特异性抗体, 研究表明, 该抗体可以特异性连接效应细胞, 使其杀伤第二抗原结合位点结合的靶细胞, 增强抗体依赖的细胞毒作用。该研究使用的靶细胞包括鸡红细胞和异种肿瘤细胞, 揭示了效应细胞的重定向可以用于肿瘤或其他表达特异性表面抗原的病原体的体内治疗^[20], 为基于双特异性抗体的免疫治疗奠定了基础。1993 年, 不含 Fc 段的双特异性抗体, 二价的抗体二聚体 Diabodies 首次出现^[21], Diabodies 抗体分子小、组织穿透能力强, 易于抵达病灶位置, 在免疫治疗中有着重要的作用。1995 年, Lindhofer 等解决了链交联问题, 他们发现大鼠和小鼠杂交瘤的融合, 可以使轻链与重链配对的正确率增加, 这一发现使得双特异性抗体的产率显著增加, 提供了其大规模生产的可能性^[22]。2009 年, 世界上第一个双特异性抗体药物 Catumaxomab 在欧盟获得批准, 用于治疗 EpCAM 阳性的恶性腹水患者。2014 年, Blinatumomab 在美国获得批准, 它是首个双特异性 T 细胞接合器 (Bispecific T cell engager, BiTE) 结构的双特异性抗体药物, 也是首个美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的 CD19 双特异性抗体, 用于前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病的治疗, 并于 2015 年获得欧盟批准。2017 年, Emicizumab 在美国获得批准, 成为血友病领域的首个双特异性抗体药物, 用于存在 VIII 因子抑制物的血友病的常规预防, 并于 2018 年在欧盟获得批准。Emicizumab 的获批预示着血友病的治疗不再局限于传统的凝血因子替代疗法, 而是向免疫疗法和基因疗法迈进。目前双特异性抗体药物正处于发展阶段, 多家生物医药公司都在进行双特异性抗体药物的研发, 更高的投入和更成熟的技术将助力该行业进入黄金时期。

2 双特异性抗体的结构类型

2.1 基本特征

抗体可按功能分为可变区抗原结合片段 Fab 和尾部可结晶片段 Fc。其中, 可变区含有高变区段的氨基酸序列, 它们三维结合在一起形成抗原结合表面, 结合特定的目标抗原, 由于这些氨基酸序列与抗原决定簇互补, 所以又称为互补决定区 (Complementarity-determining region, CDR); 而 Fc 段可以与细胞膜上的 Fc 受体结合, 从而介导各种生物学效应。如图 2A 所示, 标准的抗体有 3 个功能片段, 两个抗原结合片段 Fab 和一个可结晶片段 Fc, 两个 Fab 片段与 Fc 通过铰链区相连, 使得 Fab 段相对于 Fc 段有更大的构象灵活性^[23]。

大多数天然的抗体是由相同的抗原结合位点组成的双价或多价的分子, 左右对称, 轻重链两两相同, 两个抗原结合位点都针对于同一个目标抗原。唯独 IgG4 是个例外, 它的铰链区域不稳定, 使得其 Fab 段可以随机交换, 产生具有两种不同抗原结合位点的二价抗体分子, 是天然的双特异性抗体^[24]。但具有明确特异性的双特异性抗体在自然界中并不存在, 只能通过人工手段进行合成。因为抗原结合位点由轻链、重链的可变区构成, 所以双特异性抗体的合成需要两个不同的轻链和两个不同的重链。随着双特异性抗体研究的深入与科学技术的发展, 双特异性抗体在结构上出现了多种不同的设计策略, 有着各自的优点与缺点, 接下来本文将对双特异性抗体的不同结构进行简单介绍。

2.2 主要类型

2.2.1 不含 Fc 段的双特异性抗体

这是一种最简单的设计方法, 是使抗体分子最小的结构, 即在一个分子中简单地结合多个抗原结合位点, 而不包含 Fc 区域, 因此其结构与天然抗体差别较大, 故也称非 IgG 样结构。由于结

构简单且不含 Fc 区域,其生产较为容易,避免了链交联问题,只需简单地在真核或原核表达系统中同时表达两个多肽链,即可进行这种结构的双特异性抗体的生产^[25],而不需要化学偶联或组装步骤,提高了产量并降低了生产成本,为在细菌等表达系统中构建小分子二价双特异性抗体片段提供了方法。但不含 Fc 的双特异性抗体血浆半衰期较短,给药时需持续静脉滴注或使用缓释剂型给药,且由于片段较小可能出现稳定性差和易聚合失活的问题^[26]。

(1) BiTE

双特异性 T 细胞衔接器 (Bispecific T cell engaging, BiTE) 是典型的,也是结构最简单的不含 Fc 片段的双特异性抗体,如图 2B 所示,它将两个单链抗体 (Single chain Fv, scFv) 由短肽链连接,仅保留两个抗原结合位点以行使功能。虽然 BiTE 结构简单,但由于缺乏 Fc 片段,其血液半衰期较短,易于解离。1995 年, Mack 等^[27]设计出了第一个 BiTE,同时靶向 T 细胞表面 CD3 抗原以及上皮细胞表面 17-1A 抗原,后者是结直肠癌残留癌细胞的有效治疗靶点,将 T 细胞募集至肿瘤细胞表面,激活 T 细胞并杀伤肿瘤细胞。⁵¹Cr 释放实验表明,该双特异性抗体在人类外周血 T 淋巴细胞与 17-1A 阳性的肿瘤细胞共存的环境中,纳摩尔浓度下即具有很高的细胞毒性。Blinatumomab (AMG103/MT103) 是首个 FDA 批准的 BiTE 药物,它能结合急性淋巴细胞白血病患者过度增殖的 B 细胞表面抗原 CD19,在 185 例急性淋巴细胞白血病患者中,疾病完全缓解率为 32%,中位缓解时间 6.7 个月,常见不良反应为发热、头痛、水肿等^[28]。

(2) Diabodies

另一种常见的结构还有二价的抗体二聚体 (Diabodies),它由两个交叉的单链抗体 ScFv 组成,如图 2C 所示,由于连接用的短肽链将每个轻链重链的可变区分隔开,所以只能形成二聚体。研究表明,二聚体抗体相较于亲代抗体的亲和力提

高近 10 倍^[21]。双亲和重定向分子 (Dual affinity re-targeting, DART) 是一种典型的二价抗体结构,将一个抗体的重链可变区 (Variable region of heavy chain, VH) 和轻链可变区 (Variable region of the light chain, VL) 序列与另一个抗体的 VL 和 VH 序列分别连接,这种结构的常见问题是 VH-VL 的亲合力不强,易于解离^[29]。已经报道的解决方法有在两条多肽链的 C 端引入半胱氨酸^[30],以在 VH-VL 间形成二硫键,提高抗体分子稳定性。Flotetuzumab 是一种靶向 CD123 和 CD3 抗原的 DART 结构双特异性抗体,介导 T 细胞对急性髓系白血病细胞的杀伤。临床前研究中,Flotetuzumab 在食蟹猴中耐受性良好,最大耐受剂量在 1 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,开始治疗后 72 h 即观察到 CD123 阳性细胞的杀伤,不良反应包括细胞因子释放短暂增加,红细胞短暂减少,未观察到中性粒细胞或血小板的减少^[31]。

2.2.2 含 Fc 段的双特异性抗体

含 Fc 片段的双特异性抗体与天然抗体结构类似,故又称为类 IgG 样结构双特异性抗体,即保留了 Fc 段的相应功能,如抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体依赖的细胞毒性 (Complement dependent cytotoxicity, CDC)、抗体依赖的细胞介导的吞噬作用 (Antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP) 等,同时又具有双特异性。含 Fc 段的双特异性抗体后期纯化容易,分子量相对较大,具有较高的稳定性,但相应地其组织渗透率较低。此类结构主要包括 Triomabs、杵臼结构 (Knobs-into-holes)、双可变结构域免疫球蛋白 (Dual-Variable Domain Immunoglobulin, DVD-Ig)、scFv2-Fc 等。类 IgG 结构具有较长的血清半衰期,这是大多数生物应用所必须的。此外,还可以通过 Fc 的一系列突变来调节其与 Fc 受体的结合能力,从而调节双特异性抗体的半衰期^[32]。与其他结构相比,类 IgG 结构与原始序列

偏差最小, 这简化了开发过程, 并且降低了双特异性抗体的免疫原性。

(1) TrioMabs

TrioMabs 双特异性抗体技术平台由德国 Fresenius 和 Trion Pharma 公司合作开发^[33]。TrioMabs 是保留 Fc 段结构的双特异性抗体, 如图 2D 所示, 两条 Fab 段分别靶向 T 细胞表面 CD3 和肿瘤细胞表面抗原, Fc 段则募集表达 Fc 受体的效应细胞, 包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞等, 形成功能复合体, 刺激 T 细胞分泌细胞因子, 并杀伤肿瘤细胞^[34]。由于 TrioMabs 同时具有靶向肿瘤细胞、靶向 T 细胞以及招募 Fc 受体表达的效应细胞 3 种功能, 故又称为三功能抗体。

(2) Knobs-into-holes

杵臼结构 (Knobs-into-holes) 双特异性抗体技术由 Genentech 公司研发, 具体原理是将亲代两种抗体其中一个的重链 CH3 区 366 位体积较小

的苏氨酸突变为体积较大的酪氨酸, 形成杵 (Knobs) 结构, 再将另一个抗体重链 CH3 区 407 位体积较大的酪氨酸突变为体积较小的苏氨酸, 形成臼 (Holes) 结构, 再利用杵臼结构的空结构互补特性, 实现两种亲代抗体的正确组装, 如图 2E 所示。突变后的抗体正确组装率由野生型的 57% 提高至 92%^[35], 大大增加了正确组装的效率, 满足了双特异性抗体规模化生产的要求。

(3) DVD-Ig

DVD-Ig 结构由 AbbVie 公司研发, 如图 2F 所示, 在正常抗体的轻重链可变区 N 端分别再连接上另一个抗体的轻链可变区和重链可变区, 形成具有双可变区抗原结合位点的抗体, 实现双特异性的功能^[36]。这种结构的双特异性抗体与普通抗体有相同的 Fc 段, 无需使用特殊方法生产, 采用现有的通用抗体生产技术即可, 大大降低了双特异性抗体的生产难度, 提高了其应用价值。

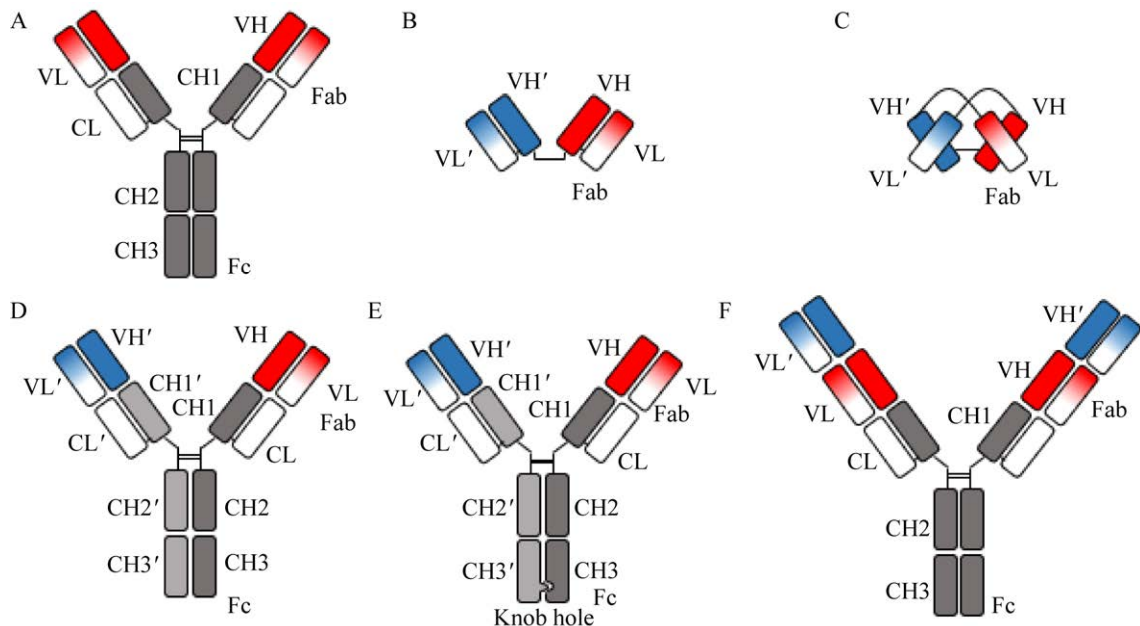


图 2 抗体结构

Fig. 2 Formats of different antibodies. Structure of a natural antibody. (B) Bispecific T-cell engager (BiTE) is composed of two scFvs. (C) Diabodies are composed of two crossed scFvs. (D) TrioMabs contained two Fabs targeting CD3 and tumor cell antigens, respectively. (E) Structure of knobs-into-holes. The CH3 region of one antibody has been mutated to form a knob, and the CH3 region of the other antibody has been mutated to form a hole. (F) Structure of DVD-Ig. The VL and VH domains of another antibody are linked to the terminals of VL and VH domains of a natural antibody, respectively.

3 双特异性抗体在肿瘤治疗中的应用

由于人们不良的生活习惯,以及全球环境的恶化,近几年的肿瘤发病率不断升高,抗肿瘤药物的市场需求正在增加。双特异性抗体在肿瘤治疗中开辟了一个全新的领域,并且有着极其重要的意义。目前已有3种双特异性抗体药物获批上市,另有50多种双特异性抗体正处于临床试验阶段,超过85种处于临床开发阶段。接下来本文将对双特异性抗体在不同类型的肿瘤治疗中的应用进行综述。

3.1 肺癌

肺癌在全球癌症发病率和死亡率排名中占第一位,每年约有160万人死于肺癌,是危害人类生命安全的第一大癌^[37]。临床上把肺癌分为小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC),其中NSCLC占比约85%,是肺癌治疗中的首要研究对象^[38]。NSCLC的治疗有过3个里程碑式的进展,分别是传统的化疗、靶向治疗和免疫治疗。手术切除是I、II期以及部分III A期NSCLC患者最有效的治疗方法,然而术后复发率高,5年总生存率IA期约83%,III A期约36%。肺癌易转移,使得其死亡率较高,想要达到长期生存需要有效的全身治疗^[39]。NSCLC的治疗多以靶向表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)为主。目前已经较成熟的靶向EGFR的抗体药物包括大分子的贝伐珠单抗^[40],以及小分子的EGFR-TKI^[41],这些抗体药物在治疗中的联用,较单纯化疗而言显著提升了疗效。

然而,相当一部分的NSCLC患者存在EGFR的外显子突变。EGFR基因由28个外显子组成,大多数突变发生在第18-21外显子处,其中外显子20的突变是EGFR三大突变类型之一,占有EGFR突变的10%,常见于不吸烟者,与年龄、性别以及肿瘤分期等没有相关性^[42]。EGFR的突

变会导致NSCLC激活c-Met受体途径,从而获得对靶向EGFR疗法的耐药性。因此,美国强生与丹麦Genmab合作开发出针对EGFR和c-Met的双特异性抗体药物JNJ-61186372。Grugan等^[43]在针对JNJ-61186372的研究中发现,该抗体在野生型及EGFR突变型的NSCLC中均具有抗肿瘤活性,且可以引起较强的ADCC作用,且在食蟹猴模型中未出现明显的毒副作用。2019年美国临床肿瘤协会(American society of clinical oncology, ASCO)上公布了JNJ-61186372的I期临床试验(NCT02609776)数据^[44],在108例EGFR突变的晚期NSCLC患者中,疾病控制率(Disease control rate, DCR)达到100%,客观缓解率(Objective response rate, ORR)为30%,3级以上不良反应为9%。2020年3月10日,FDA授予肺癌新药JNJ-61186372(JNJ-6372)突破性治疗的称号,用于治疗EGFR外显子20插入突变,且经铂类化疗后持续进展的转移性NSCLC患者。这将是EGFR外显子20插入突变肺癌患者的首款免疫疗法。

JNJ-61186372的突破性成果将成为NSCLC治疗中的一个重要的里程碑,有望成为攻克EGFR突变型NSCLC耐药的重要武器。多种针对NSCLC的双特异性抗体药物正在进行临床前研究或临床研究^[45-46],期待未来将发现更多的肺癌治疗靶点,开发出更多的有效治疗药物。

3.2 乳腺癌

在世界范围内,乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,每8位女性中就会有1位患乳腺癌,是女性最主要的健康问题^[47]。乳腺癌的治疗方法主要采用手术为主,放化疗及内分泌治疗为辅的综合治疗方法,随着免疫学的发展,以免疫治疗为基础的治疗手段正在成为乳腺癌治疗的重要形式^[48]。乳腺癌的免疫治疗中有两大突破性进展,一是人源性单克隆抗体的应用,第一个应用于临床的单克隆抗体药物是Roche公司研制的抗HER2抗体Herceptin;二是目前正处于发展上升阶段的双特

异性抗体介导的免疫治疗。

人表皮生长因子受体-2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是在 20 世纪 80 年代发现的, 迄今为止乳腺癌中研究比较透彻的基因之一。25% 的乳腺癌高表达 HER2, 是乳腺癌靶向治疗药物的重要靶点。HER2 高表达的乳腺癌亚型预后差、进展快, 主要治疗方法为抗 HER2 治疗^[49], 针对 HER2 的嵌合抗原受体 T 细胞 (Chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 免疫治疗^[50] 和 T 细胞双特异性抗体 (T cell bispecific antibodies, TCB)^[51] 已经被研发出来, 但 HER2-CARs 不仅可以靶向 HER2 阳性的肿瘤细胞, 还可以靶向表达 HER2 的正常细胞, 这导致了心肺衰竭等致命副作用^[52]。因此 Irene 等^[53] 想找到一种肿瘤特异性抗原替代 HER2, 从而防止 TCB 抗体药物对正常组织的靶向性; 他们发现, 约 40% 的 HER2 阳性乳腺癌表达 p95HER2, 这是 HER2 的一个 c 端片段, 在正常组织中不表达, 且实验表明, p95HER2-TCB 对正常组织不具有靶向性, 由此防止了 HER2-TCB 的副作用, 成为 T 细胞重定向和裂解肿瘤细胞的安全靶点。目前该抗体药物已经完成临床前研究, 正在积极筹备临床试验。

ZW25 是 Zymeworks 公司基于 Azymetric™ 平台开发的双特异性抗体, 靶向 HER2 细胞外结构域 2 和 4, 对 HER2 阳性的患者有效且耐受性良好。2018 年 ASCO 大会公布了 ZW25 的 I 期临床试验 (NCT04276493) 数据^[54], ZW25 在多种 HER2 高表达的肿瘤中均具有有效性和良好的耐受性, 20 例乳腺癌患者的响应率为 33%, 且在 HER2 阳性的胃癌及其他实体瘤中也观察到了较好的治疗效果, 总体 ORR 分别为 44% 和 33%, 且耐受性较好, 仅有 1 例患者出现 3 级不良事件^[54]。2019 年 5 月 29 日, FDA 授予 ZW25 快速通道资格, 以加速 ZW25 联合化疗用于 HER2 高表达的肿瘤患者的研究。2020 年 1 月 12 日, Zymeworks

公司宣布启动 ZW25 与 Pfizer 公司的口服 CDK 4/6 抑制剂 Ibrance (Palbociclib) 联合疗法的 II 期试验 (NCT04224272), 并与辉瑞合作共同推进研究。该联合疗法将用于接受过治疗的 HR 阳性、HER2 阳性的局部晚期或转移性乳腺癌患者。

虽然近几年乳腺癌的预后情况得到了改善, 5 年总生存率达到 87%^[55], 但乳腺癌仍是女性中的第一大癌, 诊断和治疗中的突破有赖于免疫治疗的临床转化, 随着新的双特异性抗体药物的研发, 乳腺癌的治疗手段正在不断优化与发展, 以促进乳腺癌的免疫治疗疗效最大化。

3.3 前列腺癌

前列腺癌是前列腺上皮细胞恶性增生所致, 是一种常见的老年男性癌症, 平均诊断年龄在 68 岁左右。前列腺癌的发病率有明显的地区差异, 欧美地区较高, 亚洲地区较低。前列腺癌的发病率和死亡率仅次于肺癌, 是美国男性中第二致命的癌症类型^[56]。目前前列腺癌的主要治疗方法是手术、放疗以及免疫治疗等。去势抵抗性前列腺癌 (Castration-resistant prostate cancer, CRPC) 是一种晚期前列腺癌, 生存率低。大约 10%–20% 的前列腺癌患者在治疗后 5 年的随访期内, 会发展成为去势抵抗性前列腺癌, 常规的治疗手段已经对其失去效果^[57]。

BAY2010112 是 Amgen 公司开发的一种靶向前列腺特异性膜抗原 (Prostate-specific membrane antigen, PSMA) 和 CD3 的 BiTE 双特异性抗体, 介导 T 细胞裂解肿瘤细胞。PSMA 是一种跨膜糖蛋白, 在所有阶段的前列腺癌组织中高表达, 但在正常前列腺组织中表达较低, 是诊断和治疗前列腺癌的理想靶点^[58]。临床前研究显示, BAY2010112 在体外可以特异性裂解多种人前列腺癌细胞系, 且在小鼠实验中有良好的抗肿瘤活性, EC_{50} 为 3.4–6.7 ng/mL^[59]。此外, BAY2010112 还可以抑制 PSMA 阳性癌细胞系在小鼠体内形成肿瘤。2019 年 ASCO 大会公布了 BAY2010112 的

剂量递增 I 期临床试验 (NCT01723475) 初步研究结果^[44], 16 例去势抵抗性前列腺癌患者连续静脉注射 BAY2010112 (5–80 $\mu\text{g}/\text{d}$), 其中 3 例患者的前列腺特异性抗原降低量大于 50%, 另有 2 例完全缓解, 1 例与药物有关的严重不良事件。目前该实验仍在进行, 用不同剂量治疗去势抵抗性的前列腺癌患者, 目的是确定其安全性和耐受性, 以及评估药物代谢动力学和临床疗效。

APVO414 是由 Aptevo Therapeutics 开发的 T 细胞重定向双特异性抗体药物, 用于去势抵抗性前列腺癌的治疗, 同时靶向 PSMA 和 CD3。在临床前研究中, APVO414 显示出刺激 T 细胞增殖和增加其抗癌杀伤能力的作用。这些研究结果首次在 2016 年美国癌症研究协会 (American association for cancer research, AACR) 年会上发表^[60], 结果表明, 体外实验中, APVO414 在低浓度及低效靶比时即有较高的 T 细胞激活及介导肿瘤细胞裂解的作用。小鼠实验分析血浆半衰期为 4 d, 可以显著抑制小鼠体内肿瘤生长^[61]。APVO414 已于 2019 年 8 月完成了 I 期临床试验 (NCT02262910), 结果显示持续给药效果好于每周给药。

前列腺癌是男性高发癌症, 且会在治疗后期发展为去势抵抗性前列腺癌, 去势抵抗性前列腺癌的中位生存期仅为 14 个月左右, 15%–33% 患者会发生肿瘤转移^[62], 增加了死亡风险, 目前仍需要开发有效的治疗手段以满足临床需求, 免疫疗法联合其他多种治疗手段的综合疗法, 将会成为防治前列腺癌的重要手段。

3.4 结直肠癌

结肠直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤, 在美国男性和女性癌症发病率中均排名第三位, 在男性中仅次于肺癌及前列腺癌, 在女性中仅次于肺癌及乳腺癌^[37]。大约 20% 的结直肠癌患者在被确诊时已经出现转移, 对于不可切除的转移性结直肠癌患者, 治疗通常使用化疗联合氟吡嘧啶、奥沙利铂或伊立替康的方法, 但转移性结直肠癌

患者的预后总体仍然非常差, 5 年生存率只有 6%–8% 左右^[63], 因此, 迫切需要治疗结直肠癌患者的新方法。

MGD007 是 MacroGenics 公司研发的一种新型的 gpA33 \times CD3 双特异性抗体, 以糖蛋白 A33 (Glycoprotein A33, gpA33) 阳性细胞为靶标, 通过与表达 CD3 的 T 淋巴细胞的共同结合, 实现识别和清除 gpA33 阳性的结直肠癌细胞。gpA33 在 95% 的原发性和转移性结直肠癌中表达, 是结直肠癌免疫治疗中具有潜力的靶点^[64]。体外实验表明, MGD007 介导了 T 细胞对表达 gpA33 的结直肠癌细胞系的重定向杀伤。对食蟹猴进行的临床前毒理学研究表明, MGD007 可以每周重复给药的情况下保障安全性^[65]。MGD007 目前已进行 I 期临床试验 (NCT02248805)。

OMP-305B83 是 OncoMed 研发的一种靶向 DLL4 (Delta-like ligand 4) 和 VEGF 的双特异性抗体, DLL4 在 Notch-DLL4 肿瘤干细胞信号通路中起重要作用, 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是促进血管生成的主要生长因子, OMP-305B83 可以抑制血管生成, 引发有效的抗肿瘤反应。I 期临床试验 (NCT02298387) 表明, OMP-305B83 可安全使用, 毒副作用可控, 在多种肿瘤类型 (卵巢 12 例、结肠直肠 11 例以及乳腺癌、胰腺癌、子宫癌和子宫内膜癌各 4 例) 中显示出初步的抗肿瘤活性^[66]。2019 年 7 月, FDA 已授予 OMP-305B83 快速通道认证, 并同意了 OMP-305B83 的 II 期临床实验设计, 该研究正在积极筹备中。

虽然结直肠癌的手术疗法、放化疗等技术在逐渐提高, 但是大部分进展期的结直肠癌的有效治疗方法仍是免疫治疗, 通过对治疗靶点和双特异性抗体药物的研究, 免疫治疗将在结直肠癌的治疗中发挥重要的作用。

3.5 胃癌

胃癌的发病率有着明显的地域差别, 亚洲国

家的胃癌发病率和死亡率明显高于欧美非洲等国家^[67]。由于工作压力大, 饮食结构改变等原因, 胃癌的发病率正在趋于年轻化。2019 年国家癌症中心发布全国癌症统计数据显示, 胃癌发病率居我国恶性肿瘤发病率第二位。由于胃癌早期无明显症状, 我国胃癌的早期确诊率仍较低, 大部分患者确诊时已是晚期, 且预后较欧美发达国家仍有差距, 中国的胃癌死亡率是美国的 1.7 倍 ($P < 0.001$)^[68]。早诊早治, 晚期规范治疗, 是我国胃癌诊疗亟待解决的问题。

细胞程序性死亡受体 1 (Programmed cell death protein 1, PD1)、细胞程序性死亡配体 1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PDL1)、细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 单抗在各个肿瘤的免疫治疗中均有一席之地, 但单抗药物疗效有限, 且对部分肿瘤没有明显疗效。AK104 是康方生物研发的国际上首个进入临床试验的 CTLA-4/PD1 双特异性抗体。2019 年癌症免疫治疗协会 (Society for immunotherapy of cancer, SITC) 年会公布, 澳洲开展的 AK104 1A 期递增剂量临床试验 (NCT03261011) 中, 21 位可进行疗效评估患者的 DCR 为 47.6%, ORR 为 28.6%^[69]。2020 年 AACR 会议公布的 AK104 的 II 期临床试验 (NCT03852251) 中, AK104 联合疗法治疗胃癌的控制率在 94.7%, 其中 1 例患者达到完全缓解, 部分患者的最长给药时间超过 42 周, 13 例患者仍在接受治疗^[70]。截至 2020 年 4 月 2 日, ORR 达到 57.9%, DCR 为 94.7%。实验结果显示, AK104 治疗中, 3 级及以上的不良事件发生率为 9.5%, 安全性较 PD1、CTLA-4 单抗明显提升。康方生物表示, 未来还会进行多个 AK104 单独治疗以及 AK104 联合治疗的临床试验, 力争早日上市。

胃癌的发病率高、预后差, 缺乏有效的治疗方法, 近年来随着免疫疗法的飞速发展, 双特异性抗体药物给胃癌治疗带了革命性的改变, 也给

胃癌患者带来了希望。但免疫治疗靶点的选择以及早期诊断仍是胃癌治疗中亟待解决的问题。

3.6 膀胱癌

膀胱癌是一种常见的泌尿系统肿瘤, 中国膀胱癌的发病率在泌尿系统肿瘤中居于首位, 术后复发和转移是导致患者死亡的主要原因^[71]。30 年来, 膀胱癌的临床治疗一直使用相同的、有限的治疗方法, 亚太地区患者的 5 年生存率为 81.9%^[72], 但是近年来, 免疫检查点抑制剂的使用及膀胱微生物群的发现, 都有望改善膀胱癌的治疗方法, 以为患者提供更加持久的缓解^[73]。

B7H3 (B7 homolog 3) 也称 CD276, 高表达于多种肿瘤类型, 已被证明可以促进肿瘤的发展。Ma 等^[74]合成了抗 B7H3 的 BiTE, 体外实验表明, B7H3-BiTE 作用可以有效的介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞, 且可以诱导 IFN- γ 和 TNF- α 的产生^[75]。此外, 通过激活 PI3K/Akt/STAT3 信号通路, B7H3 可以促进膀胱癌细胞的侵袭和转移。这些结果表明 B7H3 可能是膀胱癌治疗的有效靶点。该团队的另一项研究^[76]表明, B7H3-BiTE 可以有效地将 T 细胞重定向到膀胱癌细胞, 且实验组的 T 细胞高表达早期激活标志物 CD69, 这些结果表明, B7H3-BiTE 可以激活 T 细胞并使其杀死肿瘤细胞, 且在耐药细胞株中仍有杀伤作用。小鼠试验表明^[76], B7H3-BiTE 可以有效地抑制皮下和肺转移性异种移植小鼠肿瘤的生长并延长了其生存时间。目前该抗体正处于临床前研究阶段, 旨在为膀胱癌的治疗提供有效的方法。

随着膀胱癌治疗的研究重点转变为免疫调节治疗, 膀胱癌的免疫疗法的研究还仅仅是个开始, 多种有效的治疗靶点已经被发现^[77], 双特异性抗体在膀胱癌治疗中有着巨大的潜力与广阔的应用前景。

3.7 非霍奇金淋巴瘤

淋巴瘤是一种免疫系统的实体瘤, 其中霍奇金淋巴瘤约占 10%, 其余 90% 左右均是非霍奇

金淋巴瘤^[78]。非霍奇金淋巴瘤有广泛的组织学表型和临床特征, 使得其诊断非常困难^[79]。非霍奇金淋巴瘤的主要症状是淋巴结、脾脏、胸腺等淋巴器官的病变, 依据病变细胞类型分为 B 细胞、T 细胞、自然杀伤 T 细胞非霍奇金淋巴瘤, 临床约 70%–85% 为 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。非霍奇金淋巴瘤的治疗先后经历了传统的化疗及免疫化疗联合疗法, 目前的免疫疗法主要有免疫检查点抑制剂、CAR-T 以及双特异性抗体等手段。

CD20-BiTE 在淋巴瘤治疗领域中有其极其广阔的应用前景, 目前国外已有多个 CD20-BiTE 处于临床试验阶段, 并在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中显现出了较好的治疗效果。2018 年美国血液病学会 (American society of hematology, ASH) 上宣布了 REGN1979 在治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中的 I 期临床试验 (NCT02290951) 数据^[80]。该药物由 Regeneron 研发, 同时靶向 CD20 和 CD3 抗原。10 例复发性难治性非霍奇金淋巴瘤患者的 ORR 为 100%, 其中 80% 达到了完全缓解。该药物下一步计划开展 II 期临床试验, 并继续进行剂量递增试验。

RG6026 是罗氏研发的一种 CD20-TCB, 与其他 CD20 双特异性抗体相比具更强的 CD20 亲和力, 也相对有更好的治疗效果。在 I 期剂量递增临床试验 (NCT03075696) 中, 共 87 例患者接受了 600 μg 至 25 mg RG6026 给药剂量的治疗, 包括非霍奇金淋巴瘤 79 例、滤泡性淋巴瘤 8 例。非霍奇金淋巴瘤组 ORR 为 46%, 完全缓解率 (Complete response, CR) 为 29%, 在高剂量组 (10–25 mg 给药剂量) 中, ORR 为 55%, CR 为 37%, 表明 RG6026 治疗效果存在剂量依赖性。整个实验过程中, 未发现耐药性个体, 外周血和肿瘤活检发现 T 细胞持续激活且快速增殖, 侧面体现了 RG6026 的抗肿瘤作用机制^[81]。

淋巴瘤是血液系统疾病中最为常见的肿瘤之一, 而非霍奇金淋巴瘤又占其中的绝大部分, 针

对非霍奇金淋巴瘤的双特异性抗体药物正处于发展时期, 在非霍奇金淋巴瘤治疗领域中正显示出极为广阔的应用前景, 值得期待双特异性抗体给非霍奇金淋巴瘤带来更多的治疗效益。

3.8 多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤是一种恶性血液肿瘤, 目前无治愈方法, 它的成因在于 B 细胞的失控增殖。多发性骨髓瘤的死亡率极高, 中位生存期不到 5 年^[82]。致病机理复杂, 动物模型有限, 缺乏表面有效靶点, 使得多发性骨髓瘤的疗法开发有着许多挑战。2015 年, 针对多发性骨髓瘤的靶向 CD38 和靶向 SLAMF7 的两款单克隆抗体经过 3 期临床试验表明其有效性和安全性, 被批准用于治疗复发性及难治性的多发性骨髓瘤^[83], 是其免疫治疗方面的突破性进展。然而这两种抗原在正常组织中也有表达^[84], 这限制了它们的临床实用, 亟待研发基于其他靶点的抗体药物。

EM801 是 EngMab 研发的一种 B 细胞成熟抗原 (B cell maturation antigen, BCMA) 靶向的 TCB, BCMA 是肿瘤坏死因子受体超家族 17 中的一种跨膜糖蛋白, 在所有多发性骨髓瘤患者的癌细胞中均有明显的高表达, 但在正常浆细胞以及正常组织中不表达, 可以作为多发性骨髓瘤的治疗靶点。实验表明, EM801 可以增加 CD3 阳性 T 细胞与骨髓瘤细胞的交联, 此外还可以增加 CD4 阳性和 CD8 阳性 T 细胞的激活, 增加 IFN-γ、颗粒酶 B、穿孔素的分泌^[85]。目前 EM801 仍在进行临床前研究, 对于临床试验也在积极准备。

JNJ-7957 是 Johnson & Johnson 旗下子公司 Janssen 的靶向 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体, 用于复发性/难治性的多发性骨髓瘤治疗。临床前研究^[86]显示, JNJ-7957 在 4 株多发性骨髓瘤细胞系, 48 名患者的肿瘤样本, 5 名原发性 B 细胞白血病中存在有效抗肿瘤活性。高 T 细胞密度或高效靶比会促进 JNJ-7957 的抗肿瘤活性, PD1/PDL1 信号通路对其影响不大。JNJ-7957 的 I 期剂量递增临床

试验 (NCT04108195) 目前正在进行, 详细数据尚未发布。

Amgen 公司 AMG420 是靶向 BCMA 的 BiTE 双特异性抗体, 在首次人体试验中, 42 例复发性/难治性多发性骨髓瘤患者有 25 例停止疾病进展, 7 例发生不良事件, 4 例死亡, 3 例完成 10 个用药周期, 1 例退出, 2 例仍在治疗。其中 2 例死亡是由 AE、流感/曲霉病和腺病毒相关肝炎引起的, 2 例由多发性神经病变引起, ORR 为 31%, 最大耐受剂量 400 $\mu\text{g}/\text{d}$, 整体响应率 70%, 有效性及安全性在可接受范围内^[87]。目前 AMG420 的 I 期临床试验 (NCT03836053) 正在进行中。

多发性骨髓瘤的免疫疗法正在迅速发展, 多种双特异性抗体药物在进行临床研究, 有望给患者提供有效的治疗, 成为抗击多发性骨髓瘤的新武器。

3.9 白血病

白血病是一种血液和骨髓的恶性肿瘤, 常见于青少年和青壮年人群中^[88]。白血病按发病情况分为急性白血病和慢性白血病, 急性白血病平均生存期短, 若不经积极治疗, 甚至诊断数天后即死亡, 而慢性白血病的预期寿命在 1-3 年左右^[89]。急性白血病按照发病细胞及发病机制进行分型, 而不是根据病程进展, 例如常见的急性白血病有急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性单核细胞白血病等。

AMG330 是 Amgen 公司研发的一种靶向 CD33 的 T 细胞重定向双特异性抗体, 体外实验显示可以激活 T 细胞, 使其表达 CD69、CD25, 释放细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-2 等。CD33 是一种细胞表面的跨膜糖蛋白, 在大于 90% 的急性髓细胞白血病患者的癌细胞中表达^[90]。目前, 针对 CD33 的免疫治疗已有很多种, 包括单克隆抗体, 抗体-药物联合治疗, T 细胞重定向的双特异性抗体等^[91]。小鼠实验中, AMG330 的治疗显著延长了人 T 细胞过继移植的免疫缺陷小鼠的生

存期^[92]。但由于少部分健康的骨髓细胞也表达 CD33, 导致了 CD33 靶向治疗有一定的肿瘤外毒性。AMG330 的 I 期临床试验 (NCT02520427) 正在进行, 目的是确定 AMG330 在复发性/难治性急性髓系白血病中持续静脉给药在成人受试者中是否安全且可耐受, 并确定最大耐受剂量和/或生物活性剂量。这项研究将在多个地点进行, 并进行剂量递增试验。

2014 年, 美国 FDA 批准了 Amgen 公司研发的 CD19 靶向的 BiTE blinatumomab 用于复发性/难治性的急性淋巴细胞白血病的治疗, 2015 年, 欧盟也批准该药上市。II 期临床试验 (NCT01466179) 中, 189 名复发性/难治性白血病患者接受了 5 个周期, 每个周期 4 周的持续静脉给药治疗, 阳性受试者接受了 blinatumomab 治疗, CR 为 40%, 2% 的患者出现了 3 级不良事件。5 年的随访数据表明, 接受 blinatumomab 治疗可以使患者达到 MRD (急性淋巴细胞白血病复发的重要预测因子) 阴性的完全缓解, 延长生存期, 中位总生存期达 36.5 个月^[93]。

双特异性抗体药物在复发性/难治性白血病中治疗中初见成效, 随着对白血病生物学特征与治疗靶点研究的深入, 双特异性抗体有望联合常规治疗, 提高白血病患者缓解率, 延长生存期。

4 总结与展望

双特异性抗体是具有两个不同的抗原结合位点的抗体, 相比于传统的单克隆抗体, 有更好的敏感性和特异性。自 1960 年 Nisonoff 等^[1]首次提出双特异性抗体的概念以来, 双特异性抗体药物正开启着分子医学的新领域。但目前已获批上市的双特异性抗体药物仍较少, 大多数药物处于临床前开发阶段或临床研究阶段 (表 1)。由于双特异性抗体在肿瘤免疫中存在巨大的潜力, 目前的研究重点集中在肿瘤治疗中。

表 1 文中涉及的双特异性抗体及其临床信息

Table 1 Bispecific antibodies and their clinical information mentioned above

Name	Company	Target	Format	Adaptation disease	Clinical Phase	References
JNJ-61186372	Johnson & Johnson/ Genmab	EGFR/c-Met	IgG1 diabody	NSCLC	I (NCT02609776)	[43]
p95HER2-TCB	—	p95HER2/CD3	CrossMab-Fab	BC	—	[53]
ZW25	Zymeworks	HER2 ECD2/4	Fab-scFv-Fc	BC, HER2 ⁺ solid tumors	II (NCT04224272)	[54]
BAY2010112	Amgen/Bayer	PSMA/CD3	BiTE	PRAD	I (NCT01723475)	[59]
APVO414	Aptevo Therapeutics	PSMA/CD3E	scFv-IgG	PRAD	I (NCT02262910)	[61]
MGD007	MacroGenics	gpA33/CD3	DART	COADREAD	I (NCT02248805)	[65]
OMP-305B83	OncoMed	DLL4/VeGF	DVD-Ig	solid tumors	I (NCT02298387)	[66]
AK104	Akesobio	CTLA4/PD1	CrossMab-Fab	STAD	II (NCT03852251)	[69]
REGN1979	Regeneron	CD20/CD3	BiTE	NHL	I (NCT02290951)	[80]
RG6026	Roche	CD20/CD3		NHL	I (NCT03075696)	[81]
EM801	EngMab	BCMA/CD3	TCB	MM	—	[85]
JNJ-7957	Johnson & Johnson/ Genmab	BCMA/CD3	duobody	MM	I (NCT04108195)	[86]
AMG420	Amgen	BCMA/CD3	BiTE	MM	I (NCT03836053)	[87]
AMG330	Amgen	CD33/CD3	BiTE	AML	I (NCT02520427)	[92]
blinatumomab	Amgen	CD19/CD3	BiTE	ALL	III (NCT03476239)	[93]

肿瘤是严重危害人类生病健康的疾病之一，随着全球环境的恶化以及人们不规律的生活习惯，癌症的发病率越来越高，情况不容乐观。传统的肿瘤治疗方法往往不能彻底根治，还可能会导致肿瘤的复发和进展。肿瘤免疫疗法是近几年新兴的肿瘤治疗方法，通过激发免疫系统自身的能力来清除肿瘤细胞，其中双特异性抗体药物就是一个极具潜力及发展前景的免疫治疗药物。

双特异性抗体相比于普通抗体，在肿瘤治疗方面显示出较大的优势。双特异性抗体在肿瘤治疗中的一个重要机制就是介导免疫细胞杀伤，同时靶向肿瘤抗原与效应细胞抗原，激活效应细胞杀伤靶细胞。此外双特异性抗体还可以进行双靶点信号同时阻断，有效防止肿瘤耐药性的产生。双特异性抗体有许多结构，它们影响到抗体分子的合成、半衰期、Fc介导的免疫效应等，根据临床适应症选择合适的抗体结构，将对免疫治疗产生重要助益。

目前双特异性抗体在多种肿瘤类型治疗中的

应用处于临床前研究或以进入临床研究阶段，但仍存在许多挑战，包括抗体产品产量低、纯化过程复杂、临床转化困难、仍存在一定的肿瘤外靶向的毒副作用等。国内对双特异性抗体的研究仍处于发展阶段，随着科技的发展与研究的深入，相信双特异性抗体在肿瘤治疗领域仍有很大的发展空间，为癌症治疗带去希望。

REFERENCES

- [1] Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. *Science*, 1960, 132(3441): 1770-1771.
- [2] Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *mAbs*, 2017, 9(2): 182-212.
- [3] Nutt NB, Grossberg AL, Pressman D. Raised bispecific anti-*p*-azophenylphosphorylcholine antibodies reactive with nitroiodohydroxyphenylacetyl. *Immunochemistry*, 1976, 13(7): 559-564.
- [4] Bode C, Runge MS, Branscomb EE, et al. Antibody-directed fibrinolysis. An antibody specific for both fibrin and tissue plasminogen activator. *J*

- Biol Chem, 1989, 264(2): 944-948.
- [5] Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y, et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2014, 6(261): 261ra154.
- [6] Sunwoo HH, Palaniyappan A, Ganguly A, et al. Quantitative and sensitive detection of the SARS-CoV spike protein using bispecific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay. *J Virol Methods*, 2013, 187(1): 72-78.
- [7] Sharkey RM, Karacay H, McBride WJ, et al. Bispecific antibody pretargeting of radionuclides for immuno-single-photon emission computed tomography and immuno-positron emission tomography molecular imaging: an update. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18): 5577s-5585s.
- [8] Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: a review. *Pharmacol Ther*, 2018, 185: 122-134.
- [9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [10] Wanat M, Boulton M, Watson E. Patients' experience with cancer recurrence: a meta-ethnography. *Psycho-Oncology*, 2016, 25(3): 242-252.
- [11] 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.
- [12] Zhou GY, Sprengers D, Boor PPC, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating T cells in hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 1107-1119.e10.
- [13] Liu DL, Zhao JJ, Song YP, et al. Clinical trial update on bispecific antibodies, antibody-drug conjugates, and antibody-containing regimens for acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 15.
- [14] Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer*, 2010, 127(9): 2209-2221.
- [15] Borlak J, Länger F, Spanel R, et al. Immune-mediated liver injury of the cancer therapeutic antibody catumaxomab targeting EpCAM, CD3 and Fcγ receptors. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28059-28074.
- [16] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-748.
- [17] Fudenberg H, Drews G, Nisonoff A. Serologic demonstration of dual specificity of rabbit bivalent hybrid antibody. *J Exp Med*, 1964, 119(1): 151-166.
- [18] Milstein C, Cuello AC. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, 1983, 305(5934): 537-540.
- [19] Wang Q, Chen YQ, Park J, et al. Design and production of bispecific antibodies. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8(3): 43.
- [20] Perez P, Hoffman RW, Shaw S, et al. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature*, 1985, 316(6026): 354-356.
- [21] Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(14): 6444-6448.
- [22] Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, et al. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol*, 1995, 155(1): 219-225.
- [23] Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, et al. Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8(4): 55.
- [24] van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, 2007, 317(5844): 1554-1557.
- [25] Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(5/6): 671-685.
- [26] Topp MS, Kufer P, Gökbuget N, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal

- residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol*, 2011, 29(18): 2493-2498.
- [27] Mack M, Riethmüller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 7021-7025.
- [28] Przepiorka D, Ko CW, Deisseroth A, et al. FDA Approval: blinatumomab. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4035-4039.
- [29] Herold EM, John C, Weber B, et al. Determinants of the assembly and function of antibody variable domains. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12276.
- [30] Zhao JX, Yang L, Gu ZN, et al. Stabilization of the single-chain fragment variable by an interdomain disulfide bond and its effect on antibody affinity. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(1): 1-11.
- [31] Chichili GR, Huang L, Li H, et al. A CD3×CD123 bispecific DART for redirecting host T cells to myelogenous leukemia: preclinical activity and safety in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2015, 7(289): 289ra82.
- [32] Acheampong DO. Bispecific antibody (bsAb) construct formats and their application in cancer therapy. *Protein Pept Lett*, 2019, 26(7): 479-493.
- [33] Ruf P, Gires O, Jäger M, et al. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer*, 2007, 97(3): 315-321.
- [34] Buhmann R, Michael S, Juergen H, et al. Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3×anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dose-escalating Phase I/II -trial. *J Transl Med*, 2013, 11: 160.
- [35] Ridgway JBB, Presta LG, Carter P, et al. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*, 1996, 9(7): 617-621.
- [36] Gu JM, Yang JS, Chang Q, et al. Identification of anti-ErbB2 dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) proteins with unique activities. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97292.
- [37] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [38] Jänne PA, Engelman JA, Johnson BE. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *J Clin Oncol*, 2005, 23(14): 3227-3234.
- [39] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454.
- [40] Assoun S, Brosseau S, Steinmetz C, et al. Bevacizumab in advanced lung cancer: state of the art. *Future Oncol*, 2017, 13(28): 2515-2535.
- [41] Ahn MJ, Sun JM, Lee SH, et al. EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(4): 465-469.
- [42] Jorge SE, Lucena-Araujo AR, Yasuda H, et al. EGFR exon 20 insertion mutations display sensitivity to Hsp90 inhibition in preclinical models and lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6548-6555.
- [43] Grugan KD, Dorn K, Jarantow SW, et al. Fc-mediated activity of EGFR X c-Met bispecific antibody JNJ-61186372 enhanced killing of lung cancer cells. *mAbs*, 2017, 9(1): 114-126.
- [44] Martin YDP. 2019 ASCO annual meeting. *Lancet Oncol*, 2019, 20(7): 909-910.
- [45] Li JF, Niu YY, Xing YL, et al. A novel bispecific c-MET/CTLA-4 antibody targeting lung cancer stem cell-like cells with therapeutic potential in human non-small-cell lung cancer. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20171278.
- [46] Guo XF, Zhu XF, Cao HY, et al. A bispecific enediyne-energized fusion protein targeting both epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor 1 receptor showing enhanced antitumor efficacy against non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 27286-27299.
- [47] DeSantis C, Ma JM, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 52-62.
- [48] Yu LY, Tang J, Zhang CM, et al. New

- immunotherapy strategies in breast cancer. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(1): 68.
- [49] Tao ZQ, Shi AM, Lu CT, et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(2): 333-338.
- [50] Zhao YB, Wang QJ, Yang SC, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol*, 2009, 183(9): 5563-5574.
- [51] Kiewe P, Hasmüller S, Kahlert S, et al. Phase I trial of the trifunctional anti-HER2×anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 3085-3091.
- [52] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing *ERBB2*. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851.
- [53] Ruiz IR, Vicario R, Morancho B, et al. p95HER2-T cell bispecific antibody for breast cancer treatment. *Sci Transl Med*, 2018, 10(461): eaat1445.
- [54] Bartsch R, Bergen E. ASCO 2018: highlights in HER2-positive metastatic breast cancer. *Memo*, 2018, 11(4): 280-283.
- [55] Wörmann B. Breast cancer: basics, screening, diagnostics and treatment. *Med Monatsschr Pharm*, 2017, 40(2): 55-64.
- [56] Gomella LG. Prostate cancer statistics: anything you want them to be. *Can J Urol*, 2017, 24(1): 8603-8604.
- [57] Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*, 2011, 65(11): 1180-1192.
- [58] Donin NM, Reiter RE. Why targeting PSMA is a game changer in the management of prostate cancer. *J Nucl Med*, 2018, 59(2): 177-182.
- [59] Friedrich M, Raum T, Lutterbuesse R, et al. Regression of human prostate cancer xenografts in mice by AMG 212/BAY2010112, a novel PSMA/CD3-bispecific BiTE antibody cross-reactive with non-human primate antigens. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(12): 2664-2673.
- [60] Davidson NE, Armstrong SA, Coussens LM, et al. AACR cancer progress report 2016. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(Suppl 19): S1-S137.
- [61] Hernandez-Hoyos G, Sewell T, Bader R, et al. MOR209/ES414, a novel bispecific antibody targeting PSMA for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(9): 2155-2165.
- [62] Amaral TMS, Macedo D, Fernandes I, et al. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Prostate Cancer*, 2012, 2012: 327253.
- [63] Watanabe J, Suwa Y, Ota M, et al. Clinicopathological and prognostic evaluations of mixed adenoneuroendocrine carcinoma of the colon and rectum: a case-matched study. *Dis Colon Rectum*, 2016, 59(12): 1160-1167.
- [64] Murer P, Plüss L, Neri D. A novel human monoclonal antibody specific to the A33 glycoprotein recognizes colorectal cancer and inhibits metastasis. *mAbs*, 2020, 12(1): 1714371.
- [65] Hurwitz H, Crocenzi T, Lohr J, et al. A phase I, first-in-human, open label, dose escalation study of MGD007, a humanized gpA33×CD3 dual-affinity re-targeting (DART[®]) protein in patients with relapsed/refractory metastatic colorectal carcinoma. *J Immunother Cancer*, 2014, 2(S3): P86.
- [66] Jimeno A, Moore KN, Gordon M, et al. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid tumors. *Clinical Trial*, 2019, 37(3): 461-472.
- [67] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [68] Strong VE, Wu AW, Selby LV, et al. Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China. *J Surg Oncol*, 2015, 112(1): 31-37.
- [69] Markman B, Tran B, Prawira A, et al. A Phase 1 study of AK104, a tetrameric bispecific antibody that targets PD-1 and CTLA-4 in patients with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(S1): 283.
- [70] Sidaway P. From AACR 2020 (part 1). *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 390.
- [71] Pang C, Guan YY, Li HB, et al. Urologic cancer in

- China. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(6): 497-501.
- [72] Yee DS, Ishill NM, Lowrance WT, et al. Ethnic differences in bladder cancer survival. *Urology*, 2011, 78(3): 544-549.
- [73] Grayson M. Bladder cancer. *Nature*, 2017, 551(7679): S33.
- [74] Ma J, Ma P, Zhao CH, et al. B7-H3 as a promising target for cytotoxicity T cell in human cancer therapy. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29480-29491.
- [75] Ma WR, Ma J, Ma P, et al. Targeting immunotherapy for bladder cancer using anti-CD3×B7-H3 bispecific antibody. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 5167-5177.
- [76] Ma WR, Ma J, Lei T, et al. Targeting immunotherapy for bladder cancer by using anti-CD3×CD155 bispecific antibody. *J Cancer*, 2019, 10(21): 5153-5161.
- [77] Ma J, Ge J, Xue X, et al. Targeting bladder cancer using activated T cells armed with bispecific antibodies. *Oncol Rep*, 2018, 39(3): 1245-1252.
- [78] Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. *Prim Care*, 2016, 43(4): 661-675.
- [79] Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 2012, 380(9844): 848-857.
- [80] Topp MS, Arnason J, Advani R, et al. Clinical activity of REGN1979, an anti-CD20×anti-CD3 bispecific antibody (AB) in patients (PTS) with (W/) relapsed/refractory (R/R) B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL). *Hematol Oncol*, 2019, 37(S2): 90-92.
- [81] Bacac M, Umana P, Herter S, et al. CD20 Tcb (RG6026), a novel “2:1” T cell bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Blood*, 2016, 128(22): 1836.
- [82] Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: a unique malignancy. *Semin Oncol*, 2016, 43(6): 676-681.
- [83] Cho SF, Lin L, Xing LJ, et al. Monoclonal antibody: a new treatment strategy against multiple myeloma. *Antibodies (Basel)*, 2017, 6(4): 18.
- [84] Cho SF, Anderson KC, Tai YT, et al. Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in multiple myeloma: potential uses of BCMA-based immunotherapy. *Front Immunol*, 2018, 9: 1821.
- [85] Seckinger A, Delgado JA, Moser S, et al. Target expression, generation, preclinical activity, and pharmacokinetics of the BCMA-T cell bispecific antibody EM801 for multiple myeloma treatment. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 396-410.
- [86] Frerichs KA, Broekmans MEC, Marin Soto JA, et al. Preclinical activity of JNJ-7957, a novel BCMA×CD3 bispecific antibody for the treatment of multiple myeloma, is potentiated by daratumumab. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(9): 2203-2215.
- [87] Topp MS, Duell J, Zugmaier G, et al. Anti-B-cell maturation antigen BiTE molecule AMG 420 induces responses in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2020, 38(8): 775-783.
- [88] Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Prog Tumor Res*, 2016, 43: 87-100.
- [89] Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2016, 104: 169-182.
- [90] Hauswirth AW, Florian S, Printz D, et al. Expression of the target receptor CD33 in CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺ AML stem cells. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(1): 73-82.
- [91] Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, et al. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012, 119(26): 6198-6208.
- [92] Friedrich M, Henn A, Raum T, et al. Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33-bispecific T-cell-engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(6): 1549-1557.
- [93] Topp MS, Gökbuget N, Stein AA, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2015, 16(1): 57-66.

(本文责编 陈宏宇)