

双特异性抗体

双特异性抗体（bispecific monoclonal antibody, BsAb）是一种人工制作出来的可以同时结合两种不同抗原的特殊抗体。双特异性抗体在自然状态下不存在，只能通过人工制备。研究双特异性抗体，对于癌症的免疫治疗有着重大的意义。本文主要对双特异性抗体的结构、作用原理及制备方式做一综述。

作用原理

双特异性抗体的作用机制主要有三种：

- 介导免疫细胞杀伤
- 双靶点信号阻断
- 促进蛋白形成功能性复合体

介导免疫细胞杀伤

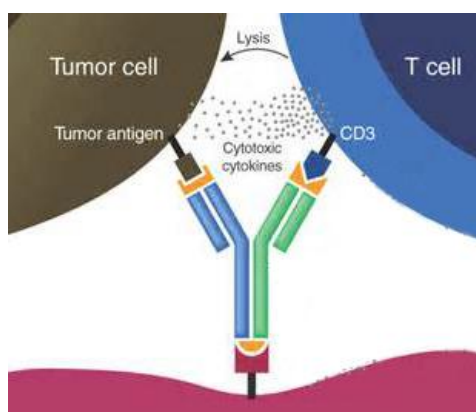


图 1：介导免疫细胞杀伤

双特异性抗体的一个重要作用机制是介导免疫细胞杀伤，双特异性抗体有两条抗原结合臂，其中一条与靶抗原结合，另一条与效应细胞上的标志抗原结合，后者可以激活效应细胞，使其靶向杀灭肿瘤细胞。以 Catumaxomab（卡妥索单抗，2009 年批准上市的双特异性抗体药物）为例，两个抗原结合臂分别结合细胞毒性 T 细胞的 CD3 位点和肿瘤细胞的 EpCAM 位点，从而引导 T 细胞杀伤靶细胞。

双靶点信号阻断

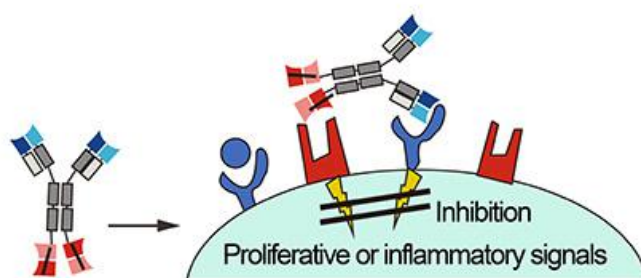


图 2：双靶点信号阻断作用原理

同时结合双靶点，阻断双信号通路是双特异性抗体的另一个重要作用机制。受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs) 是最大的一类酶联受体，在细胞增殖过程中发挥重要调节作用，如 Her 家族等。RTKs 在肿瘤细胞表面异常高表达，导致肿瘤细胞恶性增生，因此也是肿瘤治疗的重要靶点。针对 RTKs 的单靶点单克隆抗体已在肿瘤治疗中得到广泛应用。但是，肿瘤细胞可以通过转换信号通路或通过 HER 家族成员自身或不同成员之间的同源或异源二聚体激活细胞内信号进行免疫逃逸。因此采用双特异性抗体药物同时灭活两个或多个 RTKs 或其配体，可以减少肿瘤细胞逃逸，提高治疗效果。

促进蛋白形成功能性复合体

利用双特异性抗体两个抗原结合臂可以结合不同抗原的特点，两个抗原结合臂分别结合两种特定蛋白分子，形成功能性复合体。利用该种复合体给药，可以减少机体内排斥反应，提高临床治疗效果。

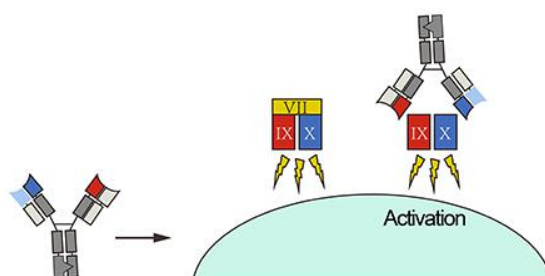
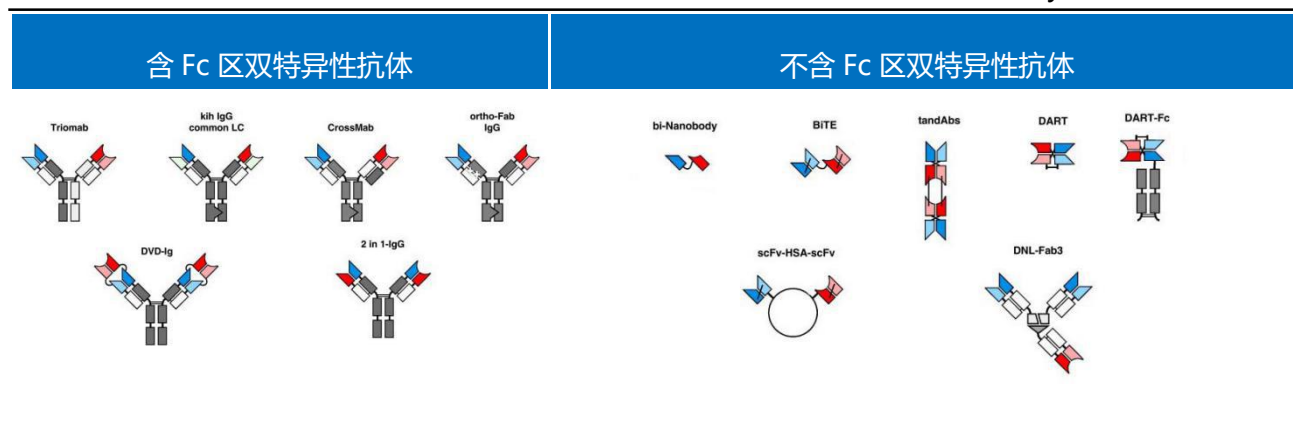


图 3：促进蛋白形成功能性复合体作用原理

双特异性抗体种类

双特异性抗体按结构区分主要有两大类：含 FC 区的双特异性抗体 (IgG-like 双特异性抗体) 与不含 Fc 区的双特异性抗体 (non-IgG-like 双特异性抗体)。含 Fc 区双特异性抗体保持了传统的单克隆抗体的结构，具有两个 Fab 区

和一个 FC 区。但与传统单克隆抗体不同，这两个 Fab 是可以结合不同抗原。此类抗体主要有 Triomabs、DVD-Ig、2 in 1-IgG、kih IgG、CrossMAb 等；不含 Fc 区双特异性抗体缺失了 Fc 区，由两个抗体的 VH 区及 VL 区组成或者由 Fab 片段组成。此类双特异性抗体主要有 BiTE, DART, TandAbs, bi-Nanobody 等。



制备方法

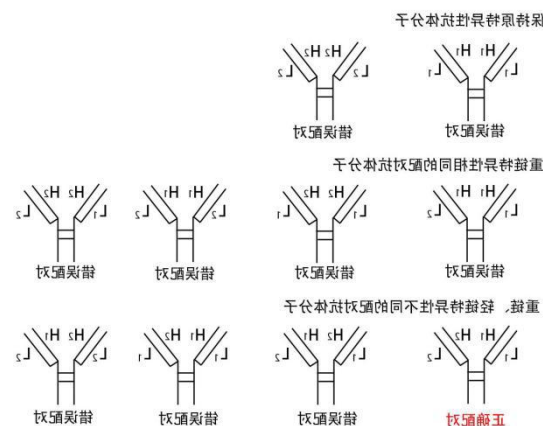
双特异性抗体的制备主要有双杂交瘤细胞法，化学偶联，重组基因制备等方法，每一种制备方法都会产生其独特的结构。

① 化学偶联法

该法最早出现于上世纪 80 年代，其原理是通过化学偶联剂（如邻苯二马来酰亚胺、N-琥珀酰-3-（2-吡啶二硫基）丙酸盐、二硫代酰基苯甲酸等）将两个完整 IgG 或两个 F（ab'）₂ 抗体片段偶联成一种 BsAb。

② 双杂交瘤融合法

通过细胞融合的方法将两株不同的杂交瘤细胞融合成双杂交瘤细胞株，然后通过常规的杂交瘤筛选法克隆靶细胞。由于双杂交瘤的遗传背景来源于亲代的两种杂交瘤细胞，它必然要产生两种重链和两种轻链分子，而这些轻重链的随机组合的方式至少有 10 种，理论上只有轻重链同源配对、重链与重链异源配对这一种组合配对方式才能产生所需要的 BsAb。利用杂交-杂交瘤方法制备双特异性抗体随机性较大，效率低，但是 BsAb 生物活性较好，抗体结构比较稳定。



利用化学偶联法与双杂交瘤融合法生产出的双特异性抗体为鼠源性，具有较强的免疫源性，且产量低纯度较差，在临床的应用上有很大的制约。

Konck-in-hole 技术

利用 konck-in-hole 技术可以有效解决异源抗体重链正确配对的难题。

制备方法是将一个抗体的重链 CH3 区 366 位体积较小的苏氨酸突变为体积较大的酪氨酸，形成突出的“杵”型结构；将另一个抗体重链 CH3 区 407 位较大的酪氨酸 残基突变成较小的苏氨酸，形成凹陷的“臼”型结构；利用“杵臼”结构的空位阻效应实现两种不同抗体重链间的正确装配。

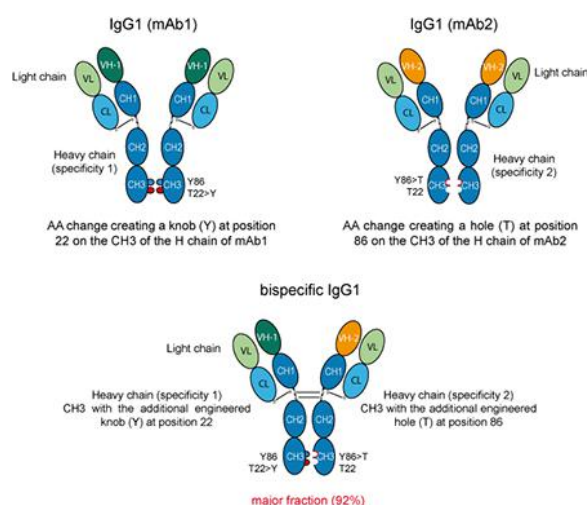


图 5: konck-in-hole 技术

突变后，产品正确装配率由野生型的 57% 提高至 92%，能够满足规模化生产的要求。但重链 CH3 的这一改构方式降低了抗体结构的稳定性，为了克服这一缺点，可以通过噬菌体展示技术进行随机突变筛选。

③ 基因工程 BsAb

利用基因工程技术制备双特异性抗体是目前最常用的制备方法，其制备原理为利用基因工程技术对传统抗体进行基因工程方面的改造，从而形成多种形式的双特异抗体。

双特异性抗体的应用

- 免疫诊断

临床检测甲胎蛋白、检测癌胚抗原

- 肿瘤放射显影

一端针对肿瘤细胞表面抗原，一端针对半抗原整合剂。后者可以与带放射性核素的半抗原结合。

- 肿瘤药物杀伤

将单克隆抗体与化疗药物、毒素或放射性核素偶联。

- 肿瘤的免疫杀伤

乳腺癌、淋巴细胞白血病、神经胶质瘤

双特异性抗体的发展现状

目前仍有大量双特异性抗体药物处于研究阶段，许多临床试验正在进行。

药物名称	研发公司	靶点	研发状态	适应症
Blinatumomab	安进	CD19 and CD3	III期临床	急性淋巴细胞白血病
MEHD7945A	基因泰克	HER3 and EGFR	II期临床	结直肠癌，头颈癌
ABT-122	AbbVie	TNF and IL-17	II期临床	风湿性关节炎
ABT-981	AbbVie	IL-1 α and IL-1 β	II期临床	骨关节炎
SAR156597	赛诺非	IL-4 and IL-13	II期临床	特发性肺纤维化
MM-111	Merimack	HER2 and HER3	II期临床	胃癌
IMCgp100	Immunocore	GP100 and CD3	II期临床	黑色素瘤
RO5520985	罗氏	ANG2 and VEGFA	II期临床	结直肠癌
XmAb5871	Xencor	CD19 and CD32B	I/II期临床	风湿性关节炎
COVA322	Covagen/强生	TNF and IL-17A	I/IIa期临床	银屑病
ALX-0761	Ablynx	IL-17A and IL-17E	I期临床	银屑病
AFM13	Affimed	CD30 and CD16A	I期临床	霍奇金淋巴瘤
AFM11	Affimed	CD19 and CD3	I期临床	非霍奇金淋巴瘤
MEDI-565	MedImmune	CEA and CD3	I期临床	GI 胰腺癌
Ertumaxomab	Trion	HER2, CD3 and FcR	I期临床	实体瘤
MGD006	MacroGenics	CD123 and CD3	I期临床	急性髓性白血病
MGD007	MacroGenics	GPA33 and CD3	I期临床	结直肠癌
LY3164530	礼来	MET and EGFR	I期临床	结直肠癌

数据来源：Nat Rev Drug Discov;2014;13(11):799-801

表 1：部分处于临床研究中的双特异性抗体

相关阅读

- [双特异性抗体 BITE、DART、DVD-Ig、Triomabs](#)
- [双特异性抗体亲和力测定](#)

更多优质服务推荐

1

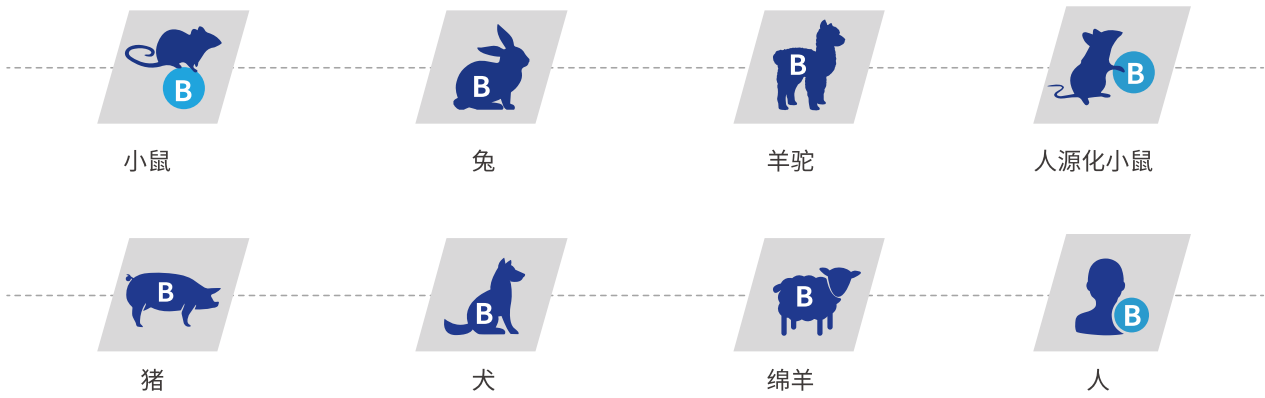
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

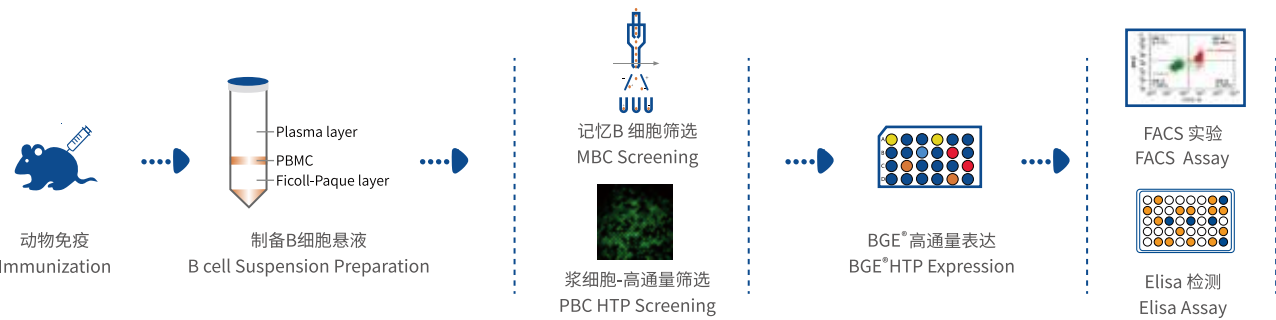
平台优势

 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫	 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失	 重轻链天然配对,亲和力更优
 高通量,周期短,单抗发现快至29天	 ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

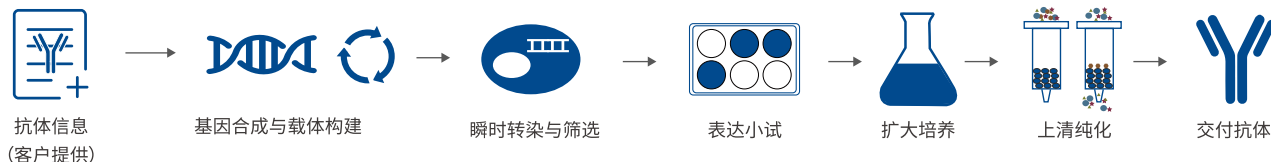
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

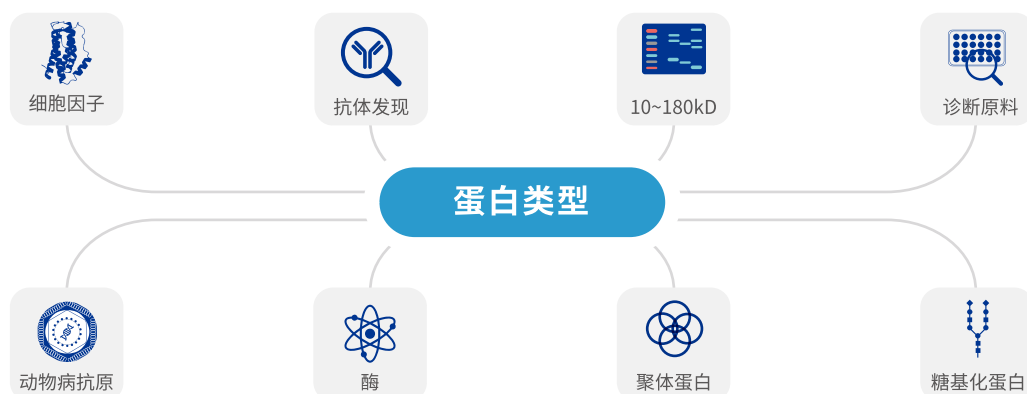


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

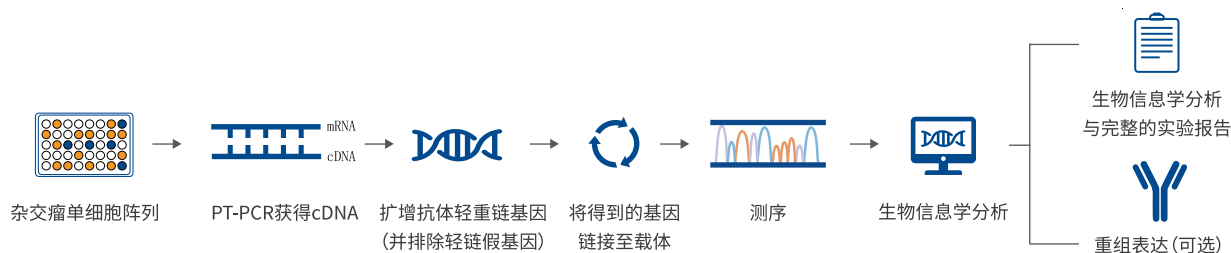
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

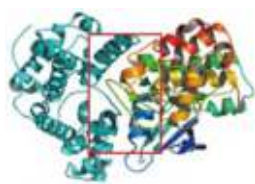


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



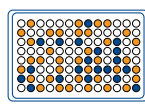
基因合成&质粒抽提



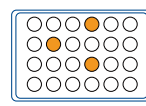
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L