

• 综述 •

# 双/多特异性抗体药物差异化研发策略

李栋<sup>1,2\*</sup>

1 荣昌生物制药(烟台)股份有限公司, 山东 烟台 264006

2 上海荣昌生物科技有限公司, 上海 201318

李栋. 双/多特异性抗体药物差异化研发策略[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3974-3984.

LI Dong. Differential discovery strategies of bispecific and multi-specific antibody drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3974-3984.

**摘要:** 双特异性抗体药物相比于治疗性单克隆抗体药物有效性和安全性更强, 逐渐成为新一代的治疗手段。随着基因工程技术的发展和产业的成熟, 双/多特异性抗体药物研究数量不断增加, 应用范围也在不断拓展, 为满足临床需求和创造临床价值奠定了基础。本文综述了双/多特异性抗体药物的研发阶段和适应症、靶点组合、结构形式和作用机制, 并探讨了双/多特异性抗体药物研发的关键点和差异化研发策略, 有助于创新药物的快速发展, 为推动这一类药物的临床转化应用提供了理论支持, 并为临床实践提供了更精准和有效的治疗选择。

**关键词:** 双特异性抗体; 多特异性抗体; 药物靶点; 作用机制; 研发策略

## Differential discovery strategies of bispecific and multi-specific antibody drugs

LI Dong<sup>1,2\*</sup>

1 RemeGen Co., Ltd., Yantai 264006, Shandong, China

2 RemeGen (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201318, China

**Abstract:** Bispecific antibody drugs have enhanced efficacy and safety compared with therapeutic monoclonal antibody drugs, gradually becoming a new generation of effective therapies. With the development of genetic engineering and the maturity of the industry, increasing studies have been carried out on bispecific and multi-specific antibody drugs, and the application indications of these drugs are expanding, which lays a foundation for satisfying the clinical needs and creating clinical values. This paper provides a comprehensive review of the development stages, indications, target

资助项目: 山东省实验室项目(SYS202205)

This work was supported by the Shandong Laboratory Program (SYS202205).

\*Corresponding author. E-mail: dong.li@remegen.com

Received: 2024-03-07; Accepted: 2024-05-16

combinations, structural formats, and mechanisms of bispecific and multi-specific antibody drugs. It also discusses key points and strategies for differentiated drug discovery, facilitating the rapid development of innovative therapies, providing theoretical support for the clinical translation of these drugs, and offering more precise and effective treatment options for clinical practice.

**Keywords:** bispecific antibody; multi-specific antibody; drug targets; mechanism; discovery strategy

双/多特异性抗体可以结合 2 个或 2 个以上不同抗原或者同一抗原的 2 个或 2 个以上不同的表位,克服了单克隆抗体的局限性,增加了药物的多重靶向性、选择性和功能性,从而具有更佳的治疗安全性和有效性<sup>[1-2]</sup>。截至 2024 年 3 月,全球共获批准了 13 款双特异性抗体药物上市(包括 1 款已退市),2023 年全球双特异性抗体药物市场规模约 82 亿美元,预计 2024–2032 年全球双特异性抗体药物市场规模将以 44.4% 的复合年增长率增加,到 2032 年可达 2 246 亿美元<sup>[3]</sup>。由此可见,双/多特异性抗体药物的临床价值和需求空间非常大。目前全球已经开展了上千项双/多特异性抗体研究,主要集中在肿瘤领域,多数处于早期临床试验阶段,且以 T 细胞重定向、程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1)及其配体 PD-L1 组合双特异性抗体为主<sup>[4-5]</sup>。因此,在研究和开发双/多特异性抗体药物时要采用差异化药物研发的策略,从尚未被满足的临床需求出发,选择合适的适应症,根据疾病的致病机理和靶点生物学机制选择合理的靶点组合和结构形式,提高药物的有效性、安全性和可成药性,从而在日益激烈的市场竞争中占据有利地位。本文从全球双/多特异性抗体药物的研发阶段和适应症、靶点组合的选择、结构形式、药物的作用机制和差异化药物特性等方面探讨了双/多特异性抗体药物差异化研发策略。

## 1 双/多特异性抗体药物的研发阶段和适应症

在医药魔方 NextPharma ([www.pharmacube.com/product/nextpharma/index](http://www.pharmacube.com/product/nextpharma/index))数据库中检索发

现,截至 2024 年 3 月,全球双/多特异性抗体药物在研试验数量 1 200 余项,其中约 2/3 处于临床前研究阶段,II/III 和 III 期临床试验的数量相对较少(图 1A),从 II 期临床试验到临床前研究各阶段的研究数量跨越式提升,可见下一代抗体药物的研发浪潮已至。适应症相对集中,主要应用于肿瘤治疗,目前研究数量已超过千项,约占所有双/多特异性抗体药物数量的 83.6%,排名第 2 位的适应症为血液学疾病,占比约为 18.2%,此外还涉及免疫相关疾病、感染、呼吸系统疾病、眼科疾病、皮肤病、代谢疾病、关节炎和神经系统疾病等适应症(图 1B)。

多特异性抗体目前尚没有药物上市,在研数量近 100 项,临床进展最快至 I/II 期临床。在适应症方面,仅检索到 4 个非肿瘤适应症的多特异性抗体处于临床前开发阶段,包括 2 个针对新型冠状病毒、1 个针对阿尔兹海默病和 1 个针对艰难梭菌感染。其余在研多特异性抗体的适应症均为肿瘤,以血液瘤为主,如慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、大 B 细胞淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤。

## 2 双/多特异性抗体药物的靶点组合

选择合适的抗体药物靶点或者靶点组合是抗体类药物研发的关键。CD3 双特异性抗体的研究开始较早,2009 年全球首款靶向 CD3 和 EpCAM 双特异性抗体药物卡妥索单抗(Catumaxomab)被欧盟批准上市,2014 年美国安进公司(Amgen)靶向 CD3 和 CD19 双特异性抗体药物博纳吐单抗(Blinatumomab)被美国 FDA 获批上市,两款靶向 CD3 的双特异性抗体药物的成功获批证明

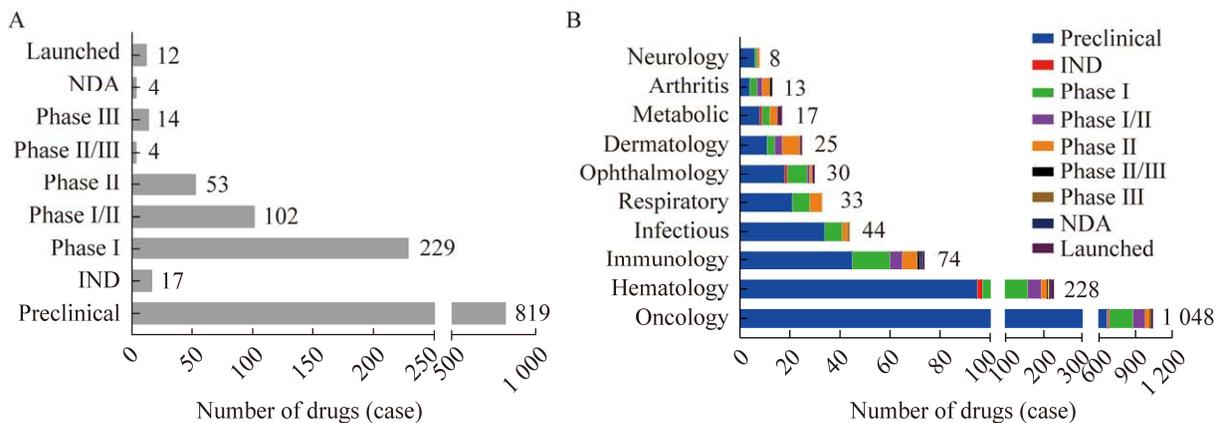


图1 全球双/多特异性抗体药物研发情况 A: 研发阶段和试验数量. B: 适应症分布

Figure 1 Global research and development of bispecific and multi-specific antibody drugs. A: Research and development (R&D) stage and number of tests. B: Distribution of indications. IND: Investigation new drug. NDA: New drug application.

了双特异抗体模式的有效性<sup>[6]</sup>。

目前全球获批上市的 13 款双特异性抗体药物中有 9 款包含 CD3 靶点。在医药魔方 NextPharma 数据库中检索发现,截至 2024 年 3 月,全球已上市或在研的双/多特异性抗体药物试验数量排名前 3 的靶点依次为 CD3、PD-L1 和 PD-1(图 2A)。与 CD3 组合的靶点众多,CD19、CD20、BCMA 等在血液瘤领域被证明潜力较大,HER2、PSMA、EGFR、Claudin-18.2 等靶点组合在实体瘤领域的应用研究也在进行临床验证(图 2B)。PD-1/PD-L1 等免疫检查点抑制剂在临床治疗中获得了巨大成功,以 PD-1/PD-L1 为基础,和 4-1BB、CD47、TIGIT、CD40、CTLA-4、VEGF 等靶点组合的双特异性抗体研究较多(图 2C)。除了 CD3 双特异性抗体和 PD-1/PD-L1 双特异性抗体, VEGF×ANG2、EGFR×cMet、IL17×TNF $\alpha$ 、Factor IX×Factor X 的研究也比较多,并且从肿瘤领域拓展到眼底疾病、自身免疫性疾病、神经性疾病和遗传性疾病,在针对新型冠状病毒的研究中也有一定应用(图 2D)。

目前包括三特异性体和四特异性抗体在内的多抗的研究数量相对较少,竞争尚不激烈<sup>[7]</sup>。

进入临床阶段的多特异型性靶点组合主要包括: CD3×CD28×CD38, CD3×HSA×BCMA, CD3×CD38×BCMA, CD3×CD19×CD20, CD3×CD20×CD79b, NKp46×CD16×CD123, NKp46×CD16×BCMA, NKG2D×CD16×BCMA, NKG2D×CD16×CD33, CD3×PD-L1×4-1BB×CD19, CD3×PD-L1×4-1BB×EGFR VIII, CD3×PD-L1×HER2×HSA, NKp46×CD16A×IL-2R $\beta$ ×CD20。以上靶点组合主要通过结合 2 个 T 细胞或者 NK 细胞上的靶点,介导 T 细胞或 NK 细胞的靶向杀伤;或者结合肿瘤细胞上的 2 个靶点,增强多特异性抗体的靶向性和协同性。需要注意的是,靶点的组合并不是简单的靶点叠加,需要考虑靶点组合的机制合理性、安全性和有效性的平衡以及包括抗体理化特性等因素在内的可成药性。

### 3 双/多特异性抗体药物的结构形式

随着基因工程技术的发展和重组 DNA 技术的应用,双/多特异性抗体已经有 100 种以上的结构形式,这些结构形式具有不同的抗体部分和形式、空间位置、价态、连接肽序列和分子大小<sup>[8]</sup>。根据是否含有可结晶片段(fragment crystallizable,

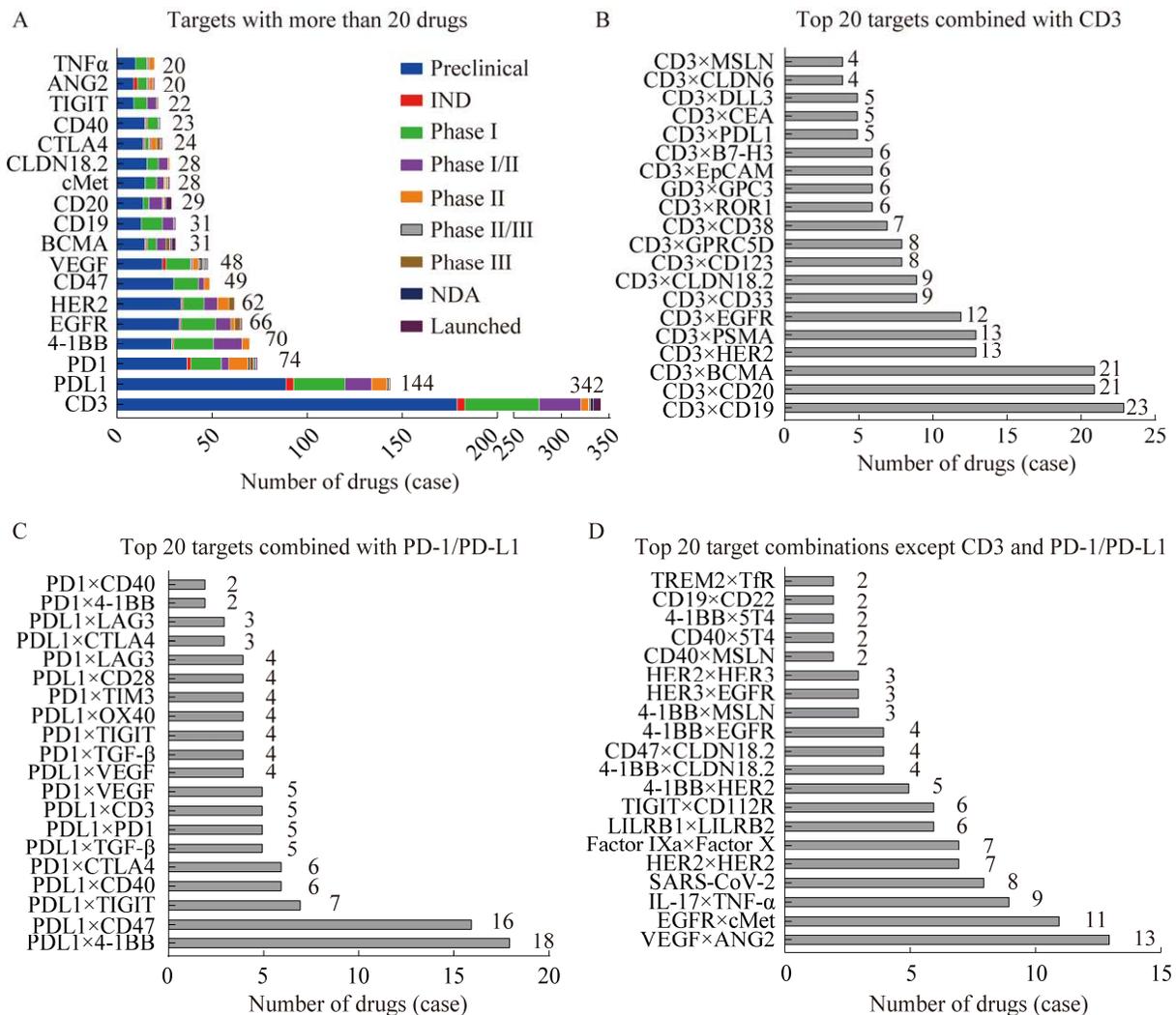


图 2 全球双/多特异性抗体药物靶点和靶点组合 A: 药物数量超过 20 个的靶点. B: 与 CD3 组合前 20 的靶点. C: 与 PD-1/PD-L1 组合前 20 的靶点. D: CD3 和 PD-1/PD-L1 以外的前 20 的药物靶点组合

Figure 2 Global bispecific and multi-specific antibody drug targets and target combinations. A: Targets with more than 20 drugs. B: Top 20 targets combined with CD3. C: Top 20 targets combined with PD-1/PD-L1. D: Top 20 drug target combinations except CD3 and PD-1/PD-L1.

Fc)结构域, 将双/多特异性抗体分为 IgG 样抗体类型和非 IgG 样抗体类型。IgG 样抗体具有 Fc 结构域, 通过突变 Fc 结构域特定氨基酸位点, 可以调节双/多特异性抗体的半衰期和生物学功能, 如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (complement-dependent cytotoxicity, CDC)。Fc 结构域的存在为双/多特

异性抗体的构建提供了更多的方案, 抗体的抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)、单链可变区(single-chain variable fragment, ScFv)或者纳米抗体(nanobody)可以连接在 Fc 的 N 端 C 端, 增加了双/多特异性抗体设计的结构多样性, 有助于双/多特异性抗体的纯化, 提升其溶解度和稳定性, 半衰期也相对更长, 在给药频次上具有优势。非 IgG 样抗体通过连接肽连接两个或多个

抗体片段或纳米抗体,这类抗体分子量小、组织渗透性强、在肾脏清除较快,没有Fc介导的生物学功能,也无法与新生Fc受体(neonatal Fc receptor, FcRn)介导体液中循环利用,导致较短的半衰期,需要多次给药达到有效剂量<sup>[9-10]</sup>。

全球已经获批上市的双特异性抗体药物中,仅靶向CD3和CD19的博纳吐单抗和靶向CD3和Gp100的Tebentafusp为非IgG样抗体形式。博纳吐单抗由靶向CD3抗体的ScFv和靶向CD19抗体的ScFv通过GGGGS连接肽串联组成(图3),用于治疗急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)。Tebentafusp比较特殊,不是严格意义上的双特异性抗体,而是由靶向CD3抗体的ScFv和T细胞受体(T-cell receptor, TCR)蛋白融合而成,介导T细胞和人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)亚型HLA-A\*02:01呈递的gp100肽,激活T细胞活性,裂解肿瘤细胞,用于治疗HLA-A\*02:01阳性的转移性葡萄膜黑色素瘤。

如图3所示,其他获批上市的双特异性抗体药物均是IgG样抗体形式。卡妥索单抗是“1+1”价态的杂交瘤双特异性抗体,由靶向肿瘤EpCAM的小鼠IgG2a和靶向CD3的大鼠IgG2b构成,用于治疗恶性腹水。格罗菲妥单抗(Glofitamab)是“2+1”价态形式的CD3×CD20双特异性抗体,含有2个Fab臂结合B细胞上的CD20,1个Fab臂结合T细胞上的CD3,应用杵臼(knob-into-hole)结构解决重链错配问题,通过链区域交换CrossMab技术将Fab轻链的恒定区CL和重链恒定区CH1互换,解决轻链错配问题。莫妥珠单抗(Mosunetuzumab)是“1+1”价态形式的CD3×CD20双特异性抗体,使用大肠杆菌分别表达后再进行混合组装,从而避免轻链错配,采用杵臼结构防止重链错配,同时Fc端进行了N297突变,去除糖基化位点。法瑞西单抗(Faricimab)是采用

CrossMab和杵臼结构技术开发的含有Fc突变的IgG1双特异性抗体,通过靶向结合VEGF-A和Ang-2,阻断2个信号通路,减少血管渗漏和维持血管稳定性,用于治疗湿性年龄相关性黄斑变性(wet age-related macular degeneration, wet AMD)等眼部疾病。艾美赛珠单抗(Emicizumab)是含有共同轻链的“1+1”价态形式的IgG4双特异性抗体,通过在重链上引入氨基酸突变改变电荷避免重链错配,与活化的凝血因子IX和凝血因子X结合,形成复合物,模拟凝血因子VIII的功能,用于治疗血友病A。卡度尼利单抗(Cadonilimab)通过Tetrabody技术开发,靶向PD-1和CTLA-4,将scFv形式的CTLA-4抗体融合于PD-1抗体的C末端,为“2+2”价态形式的肿瘤免疫双特异性抗体。埃纳妥单抗(Elranatamab)是“1+1”价态形式的靶向BCMA和CD3的双特异性抗体,用于治疗复发性或难治性多发性骨髓瘤。

有4款双特异性抗体采用DuoBody技术平台开发<sup>[11-13]</sup>,该技术分别在2种IgG抗体的CH3结构域引入K409R和F405L突变,利用哺乳动物表达系统表达和纯化后,通过可控的抗体臂交换,获得高产量“1+1”价态形式的双特异性抗体。艾普可妥单抗(Epcoritamab)靶向CD3和CD20,用于治疗大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)。埃万妥单抗(Amivantamab)靶向EGFR和cMet,用于治疗含铂化疗失败后病情进展、EGFR 20号外显子插入突变的局部晚期或转移性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),是全球首个治疗实体瘤的双特异性抗体。特立妥单抗(Teclistamab)是靶向CD3和BCMA的IgG4双特异性抗体,通过诱导T细胞重定向杀伤BCMA阳性骨髓瘤细胞,用于治疗多发性骨髓瘤。塔奎妥单抗(Talquetamab)靶向CD3和GPCR5D,用于治疗复发性或难治性成人多发性骨髓瘤。

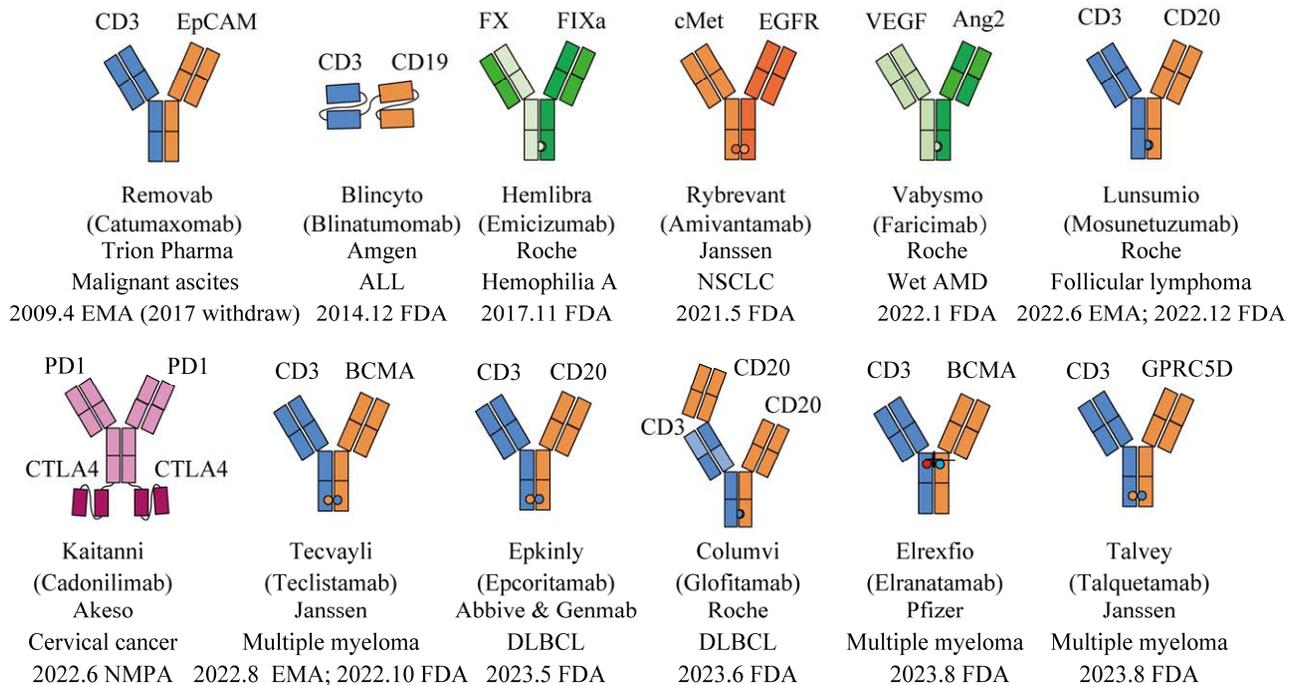


图3 全球获批上市的双特异性抗体药物的结构形式(不包括 Tebentafusp) 抗 CD3 抗体用蓝色表示; 抗肿瘤靶点(EPCAM, CD19, CMET, EGFR, CD20, BCMA, GPRC5D)抗体用橙色表示; 免疫检查点(PD1, CTLA4)抗体用紫色表示; 其他靶点(FX, FIXA, VEGF, ANG2)的抗体用绿色表示

Figure 3 Formats of bispecific antibody drugs approved worldwide (excluding Tebentafusp). Anti-CD3 antibodies are shown in blue; Anti-tumor antibodies are shown in orange; Immune checkpoints antibodies are shown in purple; Other targeted antibodies are shown in green.

## 4 双/多特异性抗体药物的作用机制

单克隆抗体药物涉及多种作用机制<sup>[14]</sup>, 双/多特异性抗体药物靶向 2 个或 2 个以上的靶点, 因此作用机制比单克隆抗体药物更为复杂<sup>[15-16]</sup>, 主要包括:

(1) 靶向效应细胞(如 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞)和肿瘤细胞, 介导效应细胞杀伤肿瘤细胞(图 4A)。CD3 双/多特异性抗体即属于该作用机制, 通过靶向 T 细胞上的 CD3, 介导 T 细胞对肿瘤细胞的细胞毒作用。

(2) 靶向抑制性 T 细胞(Treg 细胞)和肿瘤细胞, 介导 NK 细胞或巨噬细胞等效应细胞清除 Treg

细胞和肿瘤细胞(图 4B)。例如 CTLA-4×CD47 双特异性抗体, 通过靶向 CTLA-4 清除 Treg, 解除免疫抑制, 同时抑制 CD47 传递的“别吃我(don't eat me)”信号, 促使巨噬细胞吞噬肿瘤细胞。

(3) 同时靶向肿瘤细胞上的 2 个或多个不同的靶抗原(图 4C)。例如靶向 EGFR 和 cMet 的埃万妥单抗, 通过诱导效应细胞杀伤肿瘤细胞, 也可以促进受体和抗体复合物的内吞和降解, 抑制细胞增殖。

(4) 同时靶向效应细胞上的两个靶抗原(图 4D)。例如卡度尼利单抗, 结合共表达 PD-1 和 CTLA-4 的 T 细胞, 解除免疫抑制, 发挥 T 细胞活性。

(5) 靶向游离的细胞因子和效应细胞/肿瘤细胞(图 4E)。例如 RC148 双特异性抗体, 靶向

VEGF 和 PD-1, 解除肿瘤免疫抑制微环境, 抑制肿瘤促血管新生信号, 发挥 T 细胞活性。

(6) 靶向抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)和效应细胞(图 4F)。例如 CLEC9A 和 PD-1 双特异性抗体, 促进传统 I 型树突状细胞(cDC1)和 T 细胞之间的联合, 增强参与抗肿瘤免疫细胞间的相互作用。

(7) 利用特异性配体或抗体运送生物治疗药物跨越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 并进入脑内与靶抗原结合(图 4G)。例如靶向转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)和  $\text{A}\beta$  的 Gantenerumab 双特异性抗体, 目前正在评价其对轻度至中度阿尔兹海默病患者的疗效。

(8) 模拟体内酶或者辅助因子, 结合特定的蛋白分子, 形成功能性复合体(图 4H)。例如艾美赛珠单抗, 与活化的凝血因子 IXa 和 X 结合,

形成复合物, 从而恢复凝血机制的正常功能。

(9) 靶向 2 个或 2 个以上的游离的细胞因子或配体, 抑制其与受体的结合及信号通路(图 4I)。例如法瑞西单抗, 靶向 2 种促血管新生相关的细胞因子 VEGF-A 和 Ang-2, 用于眼部疾病的治疗。

(10) 靶向正常组织中的 B 细胞或者 T 细胞以及正常环境中 2 种或 2 种以上的靶抗原, 用于自身免疫性疾病的治疗(图 4J)。例如 Blys $\times$ April 双特异性抗体以及 IL17A $\times$ IL17F 双特异性抗体。

## 5 双/多特异性抗体药物的差异化特性

双特异性抗体药物已经在临床上获得成功, 新一代双/多特异性抗体的研发需要克服目前双/多特异性抗体药物中的不足, 研发具有差异化特

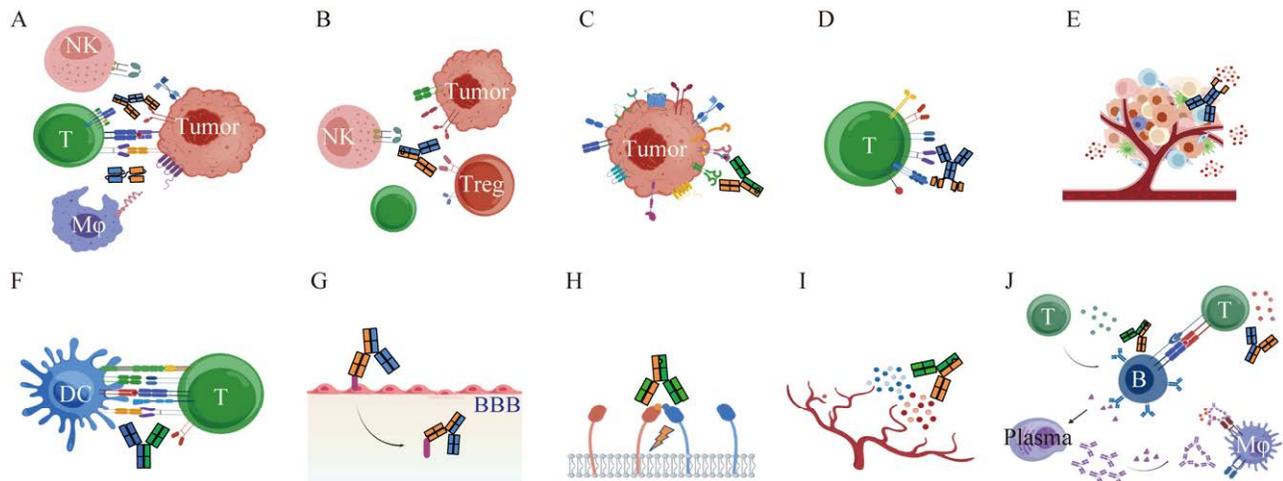


图 4 双/多特异性抗体的作用机制 A: 介导效应细胞杀伤肿瘤细胞. B: 介导效应细胞清除免疫抑制细胞和肿瘤. C: 靶向肿瘤细胞不同的靶抗原或表位. D: 靶向效应细胞上不同的靶抗原. E: 靶向游离的细胞因子和效应细胞/肿瘤细胞. F: 靶向抗原递呈细胞和效应细胞. G: 跨越血脑屏障. H: 模拟功能复合物. I: 靶向不同的细胞因子或配体. J: 靶向正常组织中的细胞或抗原

Figure 4 Mechanism of action of bispecific and multi-specific antibodies. A: Mediate effector cells to kill tumor cells. B: Mediate effector cells to clear immunosuppressive cells and tumor cells. C: Target different antigens or epitopes of tumor cells. D: Target different antigens on effector cells. E: Target free cytokines and effector cells/tumor cells. F: Target antigen presenting cells and effector cells. G: Cross the blood-brain barrier. H: Simulated functional complex. I: Target different cytokines or ligands. J: Target cells or antigens in normal tissue.

性的抗体药物,达到更好疗效、更小副作用和更佳成药性的目的。

### 5.1 双/多特异性抗体的靶点组合选择

在研双特异性抗体药物多以细胞桥接介导免疫细胞杀伤为主要机制,如 T 细胞重定向和解除 PD-1/PD-L1 介导的免疫抑制,靶点大多数为临床经过验证的成熟靶点,这类靶点组合可以降低双/多特异性抗体研发失败的风险,但因选择高度集中,竞争非常激烈<sup>[17-18]</sup>。在靶点组合选择时应考虑差异化的潜力靶点组合,这类靶点与特定肿瘤的关联性高,且具有研发潜力,如治疗小细胞肺癌的 CD3×DLL3 双特异性抗体和治疗转移性趋势性前列腺癌的 CD3×STEAP1 双特异性抗体。另外,为了克服现有双特异性抗体药效的不足,可以在效应细胞和靶细胞增加协同的靶点进行多特异性抗体的开发,增加结合特异性,将药物重定向至肿瘤局部,提升效应细胞杀伤肿瘤细胞的能力和准确性,降低脱靶毒性,如 CD3×CD28×CD38 和 CD3×BCMA×GPC5D 三特异性抗体。

双特异性抗体介导 2 个细胞发挥作用的难度要远高于作用于同一个细胞上的 2 个靶点。靶向 T 细胞上共表达的 PD-1 和 CTLA-4 的卡度尼单抗在针对晚期实体肿瘤临床研究中显示出良好的肿瘤反应率和可控的安全性<sup>[19]</sup>。靶向肿瘤细胞 EGFR 和 cMet 的埃万妥单抗参与 NSCLC 中的 2 种不同驱动信号通路,克服酪氨酸激酶抑制剂结合位点的耐药性。对于 EGFR ex20ins 突变晚期 NSCLC 患者,埃万妥单抗联合化疗的疗效优于化疗<sup>[20]</sup>。因此,在靶点组合上选择同一细胞上具有交互作用或共同信号通路的 2 个或多个靶点可以实现更佳的安全性和疗效,也具有更好的可成药性。

### 5.2 双/多特异性抗体的作用特异性

增加双/多特异性抗体靶向作用的特异性可以避免攻击正常细胞,从而保证药物的安全性,

最理想的策略是选择仅在实体瘤中表达的靶点,但这类靶点非常有限,因此可以根据肿瘤微环境的特征,如 pH 值和蛋白水解酶的表达差异,进行 pH 依赖的双/多特异性抗体药物或者前药技术开发<sup>[21]</sup>。例如 Janux 公司利用前药技术开发了肿瘤激活免疫疗法双特异性抗体平台,该平台开发的双特异性抗体因遮蔽肽的存在,在血清中不结合靶抗原,从而避免健康组织中 T 细胞的活化,而在肿瘤组织中,双特异性抗体上的可切割连接子被特异性地切割并释放出遮蔽肽,增强了 T 细胞的特异性激活和对肿瘤细胞的杀伤,提高药物的安全性和有效性。应用该平台开发的治疗前列腺癌的 CD3×PSMA 双特异性抗体和治疗实体瘤的 CD3×EGFR 在临床试验中获得了初步的积极数据。

### 5.3 双/多特异性抗体的结构设计

双/多特异性抗体药物的设计应结合生物学机制和靶点的特性进行设计,根据是否需要 Fc 结构域选择 IgG 样抗体设计和非 IgG 样抗体设计。药物的结构可以决定双特异性抗体的治疗效果、药代动力学特征和稳定性。例如在 CD3 双特异性抗体设计中,通常选择单价的 CD3 结合臂,实现肿瘤依赖性的 T 细胞激活功能,避免由于 CD3 分子在 T 细胞表面交联而引起的细胞过度激活或细胞因子释放,而靶向肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)的抗体价数可以选择单价或者双价,如已经获批的 3 款 CD3×CD20 双特异性抗体中均为 IgG 样抗体设计,但结构设计不同,其中莫妥珠单抗和艾普可妥单抗为“1+1”价态设计,格罗菲妥单抗为“2+1”价态设计,靶向 CD20 抗体为双价<sup>[22]</sup>。多抗的结构组合和设计更为复杂,如在 CD3×CD28×CD38 研究中,不同抗体的结构形式和空间位置决定了抗体的活性差异以及对 T 细胞激活、杀伤活性的贡献<sup>[23]</sup>。

#### 5.4 双/多特异性抗体的抗原结合表位

双/多特异性抗体的抗原结合表位应该与生物学功能和空间距离相匹配,如靶向 HER2 的双表位(胞外第 II 和第 IV 结构域)抗体 Zanidatamab。该双特异性抗体以反式方式与邻近的 HER2 结合,在细胞表面形成 HER2 聚集簇和极化帽,与曲妥珠单抗和帕妥珠单抗联合治疗相比,Zanidatamab 具有独特的结合方式和增强的功能。此外,Zanidatamab 介导 HER2 内化并使其表达下调,抑制细胞信号传导和肿瘤生长,并通过 Fc 结构域发挥 ADCC、CDC 和抗体依赖性细胞吞噬(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)作用<sup>[24]</sup>。在开发 T 细胞重定向双/多特异性抗体药物时,应考虑 CD3 抗体和靶向不同肿瘤的抗体的抗原结合表位,因为在免疫突触的形成过程中,APC 细胞和 T 细胞之间的距离约为 13–15 nm,当距离大于 15 nm 时,T 细胞活化就会大幅下降。因此,在研究 CD3 双/多特异性抗体时,需要将双/多特异性抗体介导的肿瘤细胞和 T 细胞之间的距离拉近至 15 nm 以内,如选择针对肿瘤细胞表面抗原近膜端表位的抗体或者使用更加紧凑的抗体结构设计,形成有效的免疫突触,从而增强 T 细胞的靶向杀伤能力<sup>[25]</sup>。

#### 5.5 双/多特异性抗体的亲和力选择

双/多特异性抗体的亲和力要考虑生物学特性和理化性质,亲和力并非越高越好<sup>[26]</sup>。在 CD3 双特异性抗体研究中发现,低亲和力的 CD3 抗体更有利于双特异性抗体在肿瘤中的分布,并且避免了 CD3 介导的药物在血液中的快速清除和在脾、淋巴结等含 T 细胞的组织上的富集,根据搭配最适原则构建的 CD3 双/多特异性抗体,倾向性激活 T 细胞裂解,避免分泌大量促炎因子,减少细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)的风险。在 EGFR×cMet 双特异性抗体研究中发现,选择高亲和力的 EGFR 双特异性抗体的药效不如低亲和力的药效,由于正常

组织中也表达 EGFR,高亲和力的抗体会导致“抗原沉默”效应,从而产生较弱的生物利用度和较短的体内半衰期。

## 6 讨论与展望

双/多特异性抗体较单克隆抗体在有效性和安全性上均有潜在优势,然而复杂的结构形式和作用机制导致了开发难度的增加。与双特异性抗体相比,多特异性抗体含有多个抗体片段,可以更好地发挥靶点间协同作用,实现减毒增效的目的,但在成药性上更具有挑战性。为了实现良好的生物学功能和理化特性需要解决诸多问题,如抗体片段空间位阻问题,可通过不同结构形式的模拟组合结合实验表征和活性验证来确定最佳的结构形式;轻链错配和重链错配问题,可通过杵臼结构和电荷作用等方法解决<sup>[27]</sup>。此外,纳米抗体作为单域抗体,结合抗原不需要轻链,同时具有分子量小、表达量高和稳定性强等优点,被广泛应用于双/多特异性抗体药物的开发中。相较于分子量大的双/多特异性抗体,分子量小的双/多特异性抗体更容易渗透进入肿瘤组织,影响抗体药物的活性;同时,小尺寸的双特异性抗体相比天然抗体更容易被肾脏清除,在体内的半衰期更短。因此,双/多特异性抗体的大小需要根据所针对的适应症、组织渗透能力、半衰期、免疫激活等方面综合考量,如通过多个纳米抗体组合或者将传统抗体与纳米抗体相结合来实现合理的大小和结构设计。

国内外在研双/多特异性抗体多以介导免疫细胞杀伤为主要机制,包括以抗 CD3 为代表的 T 细胞重定向,以抗 PD-1/PD-L1 为代表的双/三重免疫检查点抑制剂以及双/多重信号阻断。然而国内外在研发方向上有明显差异,国外主要为 T 细胞重定向,占比达 61.66%,其次为双重信号阻断抗体,占比为 19.17%,免疫检查点抑制剂仅占 7.25%;而国内更倾向于免疫检查点抑制的开发,

占比达 41.77%,其次为共定位阻断和双表位抗体,占比均为 18.99%,T 细胞重定向较国外研发较少,占比为 12.66%<sup>[28]</sup>。研发布局的差异与已经获批上市的双抗药物一致,国内首个获批上市的药物为靶向 PD-1 和 CTLA-4 的双抗,而国外有多个 T 细胞重定位双抗获批上市。在适应症选择上,国内外均以肿瘤治疗为主,但国外研究更为多元,涉及血友病、代谢疾病、眼科疾病和自身免疫性疾病等领域。在技术平台上,国外相对成熟,如 Genmab 公司的 DuoBody 平台、罗氏公司的 Crossmab 平台、艾伯维的 DVD-IgG 平台、安进公司的 BiTE 等;国内公司也在积极开发双抗平台,如康方生物的 Tetrabody 平台、友芝友公司的 YBody 平台、岸迈生物的 FIT-IgG 平台、荣昌生物的 HiBody 和 VBody 平台,通过临床试验可以验证这些双/多特异性抗体技术平台的应用潜力。

在双/多特异性抗体的开发过程中,应遵循国家药监局药品审评中心(center for drug evaluation, CDE)发布的“双特异性抗体类抗肿瘤药物临床研发技术指导原则”。在双/多特异性抗体立项和目标产品特性设计和差异化策略制定时,要提前进行临床试验风险控制、最佳给药策略、临床试验设计、免疫原性、生物标志物开发等方面的考量,包括双/多特异性抗体药物的结构特征、作用机制、靶点相关的安全性特征和同靶点产品的安全性信息;与 2 个或多个靶点的结合差异和复杂结合动力学对疗效安全性的影响;与单抗或者单抗联用相比的潜在优势的生物学机制等。

因此,在双/多特异性抗体药物的开发过程中,需要以满足临床需要为根本,从生物学机制出发,选择合适的靶点组合和结构形式,开发出满足安全性、有效性、免疫原性、理化特性、药代和药动和生产可及性特性要求的差异化双/多特异性抗体药物,并遵循临床研发指导原则,实现超越标准治疗的治疗方法,从而满足尚未被满足的临床需求,创造临床价值和社会价值。

## REFERENCES

- [1] BLANCO B, DOMÍNGUEZ-ALONSO C, ALVAREZ-VALLINA L. Bispecific immunomodulatory antibodies for cancer immunotherapy[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2021, 27(20): 5457-5464.
- [2] YAO Y, HU YY, WANG F. Trispecific antibodies for cancer immunotherapy[J]. *Immunology*, 2023, 169(4): 389-399.
- [3] Bispecific antibodies market size, share & trends analysis report[EB/OL]. [2024-05-16]. <https://straitresearch.com/report/bispecific-antibodies-market>.
- [4] van de DONK NWCJ, ZWEEGMAN S. T-cell-engaging bispecific antibodies in cancer[J]. *Lancet*, 2023, 402(10396): 142-158.
- [5] ZHANG TC, LIN YP, GAO Q. Bispecific antibodies targeting immunomodulatory checkpoints for cancer therapy[J]. *Cancer Biology & Medicine*, 2023, 20(3): 181-195.
- [6] TAPIA-GALISTEO A, ÁLVAREZ-VALLINA L, SANZ L. Bi- and trispecific immune cell engagers for immunotherapy of hematological malignancies[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2023, 16(1): 83.
- [7] TAPIA-GALISTEO A, COMPTE M, ÁLVAREZ-VALLINA L, SANZ L. When three is not a crowd: trispecific antibodies for enhanced cancer immunotherapy[J]. *Theranostics*, 2023, 13(3): 1028-1041.
- [8] MARUANI A. Bispecifics and antibody-drug conjugates: A positive synergy[J]. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2018, 30: 55-61.
- [9] SEGUES A, HUANG S, SIJTS A, BERRAONDO P, ZAISS DM. Opportunities and challenges of bi-specific antibodies[J]. *International review of cell and molecular biology*, 2022, 369: 45-70.
- [10] HOSSEINI SS, KHALILI S, BARADARAN B, BIDAR N, SHAHBAZI MA, MOSAFER J, HASHEMZAEI M, MOKHTARZADEH A, HAMBLIN MR. Bispecific monoclonal antibodies for targeted immunotherapy of solid tumors: recent advances and clinical trials[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2021, 167: 1030-1047.
- [11] LABRIJN AF, RISPENS T, MEESTERS J, ROSE RJ, den BLEKER TH, LOVERIX S, van den BREMER ETJ, NEIJSEN J, VINK T, LASTERS I, AALBERSE RC, HECK AJR, van de WINKEL JGJ, SCHUURMAN J, PARREN PWHI. Species-specific determinants in the IgG CH<sub>3</sub> domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> interaction strength[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187(6): 3238-3246.
- [12] LABRIJN AF, MEESTERS JI, de GOEIJ BECG, van den BREMER ETJ, NEIJSEN J, van KAMPEN MD,

- STRUMANE K, VERPLOEGEN S, KUNDU A, GRAMER MJ, van BERKEL PHC, van de WINKEL JGJ, SCHUURMAN J, PARREN PWHI. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(13): 5145-5150.
- [13] LABRIJN AF, MEESTERS JI, PRIEM P, de JONG RN, van den BREMER ETJ, van KAMPEN MD, GERRITSEN AF, SCHUURMAN J, PARREN PWHI. Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1[J]. Nature Protocols, 2014, 9: 2450-2463.
- [14] 李栋. 治疗性抗体药物差异化研发策略[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2327-2333.
- LI D. Differential discovery strategies of therapeutic antibody drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11): 2327-2333 (in Chinese).
- [15] LABRIJN AF, JANMAAT ML, REICHERT JM, PARREN PWHI. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18: 585-608.
- [16] ZHANG J, YI JZ, ZHOU PF. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects[J]. Antibody Therapeutics, 2020, 3(2): 126-145.
- [17] SUN YZ, YU XM, WANG X, YUAN K, WANG GF, HU LR, ZHANG GY, PEI WL, WANG LP, SUN CL, YANG P. Bispecific antibodies in cancer therapy: target selection and regulatory requirements[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2023, 13(9): 3583-3597.
- [18] WEI J, YANG YY, WANG G, LIU M. Current landscape and future directions of bispecific antibodies in cancer immunotherapy[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1035276.
- [19] GAO XY, XU N, LI ZY, SHEN L, JI K, ZHENG Z, LIU D, LOU HM, BAI L, LIU TS, LI YX, LI YZ, FAN QX, FENG M, ZHONG HJ, HUANG Y, LOU G, WANG J, LIN XY, CHEN Y, et al. Safety and antitumour activity of cadonilimab, an anti-PD-1/CTLA-4 bispecific antibody, for patients with advanced solid tumours (COMPASSION-03): a multicentre, open-label, phase 1b/2 trial[J]. The Lancet Oncology, 2023, 24(10): 1134-1146.
- [20] ZHOU CC, TANG KJ, CHO BC, LIU BG, PAZ-ARES L, CHENG S, KITAZONO S, THIAGARAJAN M, GOLDMAN JW, SABARI JK, SANBORN RE, MANSFIELD AS, HUNG JY, BOYER M, POPAT S, MOURÃO DIAS J, FELIP E, MAJEM M, GUMUS M, KIM SW, ONO A, XIE J, BHATTACHARYA A, AGRAWAL T, SHREEVE SM, KNOBLAUCH RE, PARK K, GIRARD N. Amivantamab plus Chemotherapy in NSCLC with *EGFR* Exon 20 Insertions[J]. New England Journal of Medicine, 2023, 389(22): 2039-2051.
- [21] MAEJIMA A, SUZUKI S, MAKABE K, KUMAGAI I, ASANO R. Incorporation of a repeated polypeptide sequence in therapeutic antibodies as a universal masking procedure: a case study of T cell-engaging bispecific antibodies[J]. New Biotechnology, 2023, 77: 80-89.
- [22] RADHAKRISHNAN VS, DAVIES AJ. Bispecific antibodies in indolent B-cell lymphomas[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 14: 1295599.
- [23] WU L, SEUNG E, XU L, RAO E, LORD DM, WEI RR, CORTEZ-RETAMOZO V, OSPINA B, POSTERNAK V, ULINSKI G, PIEPENHAGEN P, FRANCESCONI E, EL-MURR N, BEIL C, KIRBY P, LI AQ, FRETLAND J, VICENTE R, DENG GJ, DABDOUBI T, et al. Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation[J]. Nature Cancer, 2020, 1: 86-98.
- [24] WEISSER NE, SANCHES M, ESCOBAR-CABRERA E, O'TOOLE J, WHALEN E, CHAN PWY, WICKMAN G, ABRAHAM L, CHOI K, HARBOURNE B, SAMIOTAKIS A, ROJAS AH, VOLKERS G, WONG J, ATKINSON CE, BAARDSNES J, WORRALL LJ, BROWMAN D, SMITH EE, BAICHO P, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity[J]. Nature Communications, 2023, 14: 1394.
- [25] DICKOPF S, GEORGES GJ, BRINKMANN U. Format and geometries matter: structure-based design defines the functionality of bispecific antibodies[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 1221-1227.
- [26] HABER L, OLSON K, KELLY MP, CRAWFORD A, DiLILLO DJ, TAVARÉ R, ULLMAN E, MAO S, CANOVA L, SINESHCHEKOVA O, FINNEY J, PAWASHE A, PATEL S, MCKAY R, RIZVI S, DAMKO E, CHIU D, VAZZANA K, RAM P, MOHRS K, et al. Generation of T-cell-redirecting bispecific antibodies with differentiated profiles of cytokine release and biodistribution by CD3 affinity tuning[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 14397.
- [27] NIE SW, WANG ZZ, MOSCOSO-CASTRO M, D'SOUZA P, LEI C, XU JQ, GU JJ. Biology drives the discovery of bispecific antibodies as innovative therapeutics[J]. Antibody Therapeutics, 2020, 3(1): 18-62.
- [28] ZHANG ZH, LUO F, CAO JX, LU FT, ZHANG Y, MA YX, ZENG KM, ZHANG L, ZHAO HY. Anticancer bispecific antibody R&D advances: a study focusing on research trend worldwide and in China[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2021, 14(1): 124.

(本文责编 陈宏宇)