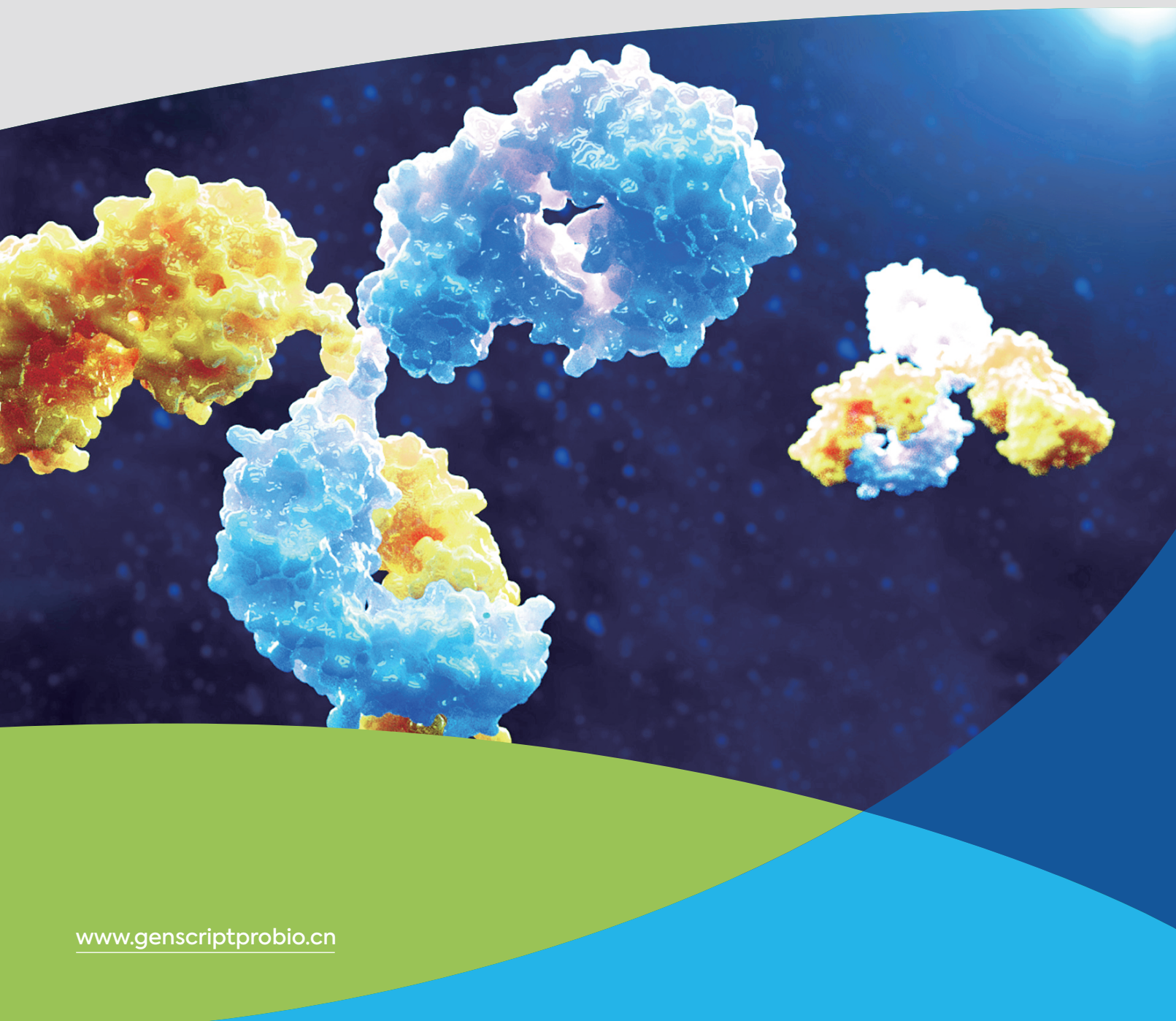


双特异性抗体设计与评价 技术手册



目录

01. 什么是双特异性抗体？	2
双特异性抗体发现概述	2
双特异性抗体发现流程	2
02. 如何基于结构制定双特异性抗体发现策略？	3
双特异性抗体结构	3
双特异性抗体设计考虑因素	3
双特异性抗体的筛选	4
03. 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？	5
体外药效研究	5
体内药理研究	12
04. 如何选择适合的双特异性抗体发现合作伙伴？	13

PROBIO

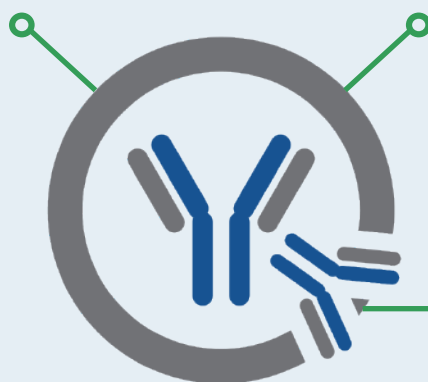
01 什么是双特异性抗体？

双特异性抗体发现概述

双特异性抗体 (bispecific antibody, 以下简称双抗) 是含有两种特异性抗原结合位点的人工抗体, 相对单克隆抗体, 其作用机理在研究中被证明具有更好的疗效和更高的安全性。根据目前临床结果看, 双抗表现出比单抗联合治疗更好的治疗效果, 有望作为第二代抗体治疗药物成为未来重要的临床治疗选择。

通过新作用机理获得更好的疗效

- 引导 T 细胞激活和杀伤作用
- 调节受体信号通路
- 同时靶向多个联合抑制的受体或免疫检查点
- 靶向靶点蛋白的多个表位, 提高中和效应



更加安全

- 脱靶结合率降低, 减小副作用

生产成本更可控

- 只需要生产 1 个分子, 与 2 个分子联用相比, 节省了一倍的投入

图 1: 双特异性抗体的优势

双特异性抗体发现流程

双抗一般由两个亲本单抗组合而成, 在构建双抗分子前, 需要考虑两个亲本单抗的功能性与成药性。筛选到合适的单抗分子后, 经过全序列基因合成和重组表达得到多个双抗候选分子。双抗的筛选和验证与单抗类似, 需要通过抗体的结合阻断筛选得到与双靶点均有较高亲和力的双抗分子, 再通过体外细胞功能实验和体内动物模型验证进一步缩小优质双抗分子的数量, 最后通过早期成药性分析得到双抗临床前候选分子 (PCC) 进入 CMC 阶段, 整个双抗发现时间大概为 6 个月。

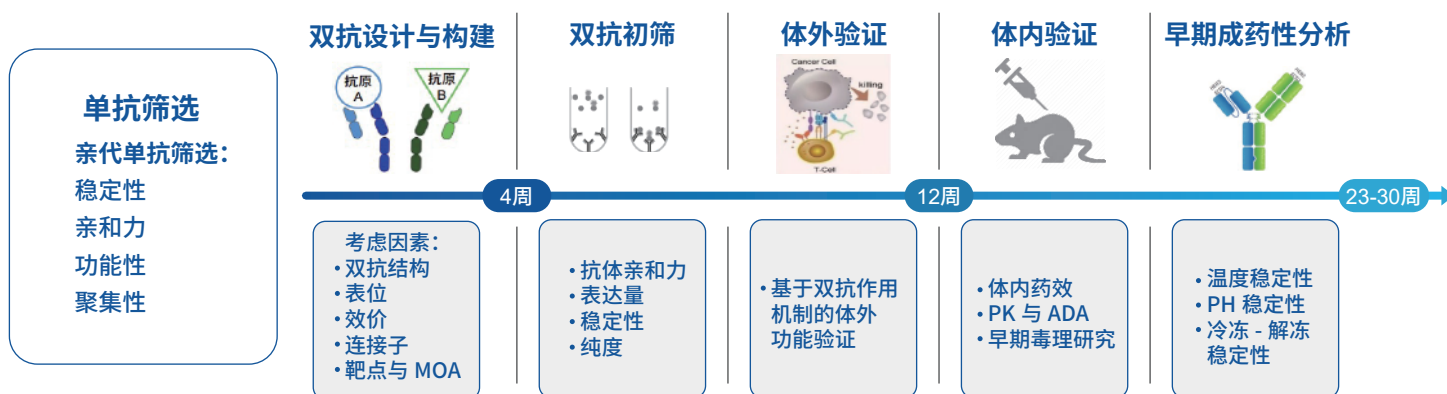


图 2: 双特异性抗体发现流程

02 如何基于结构制定双特异性抗体发现策略？

双特异性抗体结构

经过 60 年的发展,双抗开发技术已逐步成熟,目前已有超过 100 种不同结构的双抗,约 40 个特色双抗技术开发平台,双抗的结构影响其生物学活性和成药性,因此对双抗药物的开发至关重要。双抗可以根据是否含有 Fc 片段分为不含 Fc 片段的片段型双抗和含有 Fc 片段的全长型双抗。全长型双抗可进一步分为组装成一个 IgG 结构的双抗以及在一个 IgG 抗体上额外包含其它结合位点的双抗。

双特异性抗体还可以分为**对称型**和**非对称型**。对于非对称性双抗,很难通过序列改造的手段完全消除异源二聚体存在,常用的蛋白 A 纯化手段难以分离目标产物,往往需要离子交换,疏水交换等进行二次纯化,但它具有更加灵活的空间结构。对称构型双抗可以最直接解决重链和轻链随机配对问题,但是构型会限制作用机制的空间灵活性。

表 1: 常见的双特异性抗体分类

结构类型	含 Fc 的全长双抗	不含 Fc 的片段双抗
结构图		
分子特点	- 含多条链,分子量较大 - 较长的半衰期 - 可设计 ADCC 和 CDC 效应	- 一般为单链,分子量小 - 半衰期短 - 无 Fc 效应功能(如: ADCC/CDC)
优点	- 稳定性较好 - 溶解性较好 - Fc 的存在易纯化	- 副产物少,易生产,产量高 - 可避免轻重链错配
缺点	- 对多条链的转染比例需做研究 - 非对称结构一般表达量较低 - 蛋白易发生聚集、错配、碎片,导致产量低	- 无 Fc,需要开发特定的纯化技术路线以及表达量检测方法 - 稳定性差,易形成聚集,通常需要开发冻干工艺

双特异性抗体设计考虑因素

双抗的结构影响双抗的功能性与成药性,而双抗结构的选择与靶点,作用机制(mechanism of action, MOA)以及适应症的类型有关。在设计双抗时,可基于以下几点考虑因素选择合适的双抗结构:

1

亲和力与效价

- 抗体亲和力并非越高越好,需要结合作用机制
- 效价会影响双抗的疗效和安全性,如 CD3 毒性较大,一般选择单价,而针对肿瘤抗原的抗体价数需要根据其特性决定

2

连接子设计

- 用来连接两个不同抗体的连接子长度、灵活性、氨基酸组成以及连接 IgG 区的铰链区对双抗的疗效都很重要

3

抗原表位

- 抗体表位和靶向细胞之间的距离,两个不同抗原之间的距离,是双抗作用效果和安全性的重要因素

4

抗体大小

- 抗体大,半衰期长,不易进入实体瘤
- 抗体小,半衰期短,通过血管渗出进入实体瘤

02 如何基于结构制定双特异性抗体发现策略？

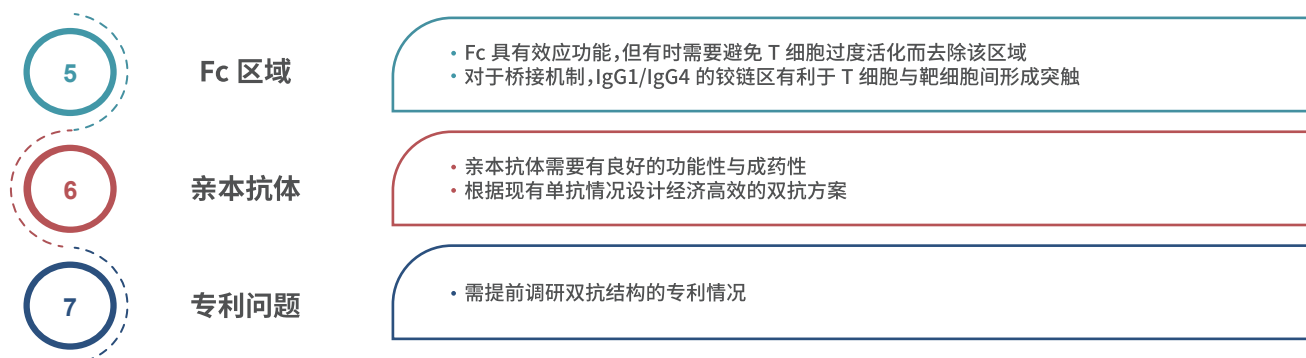


图 3：双特异性抗体设计考虑因素

双特异性抗体的筛选

双特异性抗体药物的疗效与靶点、作用机理、亲代单抗以及双抗结构有着密切关系，一般情况下建议客户至少构建 2 种以上的双抗结构用于后续的筛选，以增加发现功能性抗体分子的概率。一般需要通过 3 轮双抗的筛选，最后得到一个 PCC 分子进入 CMC 阶段。

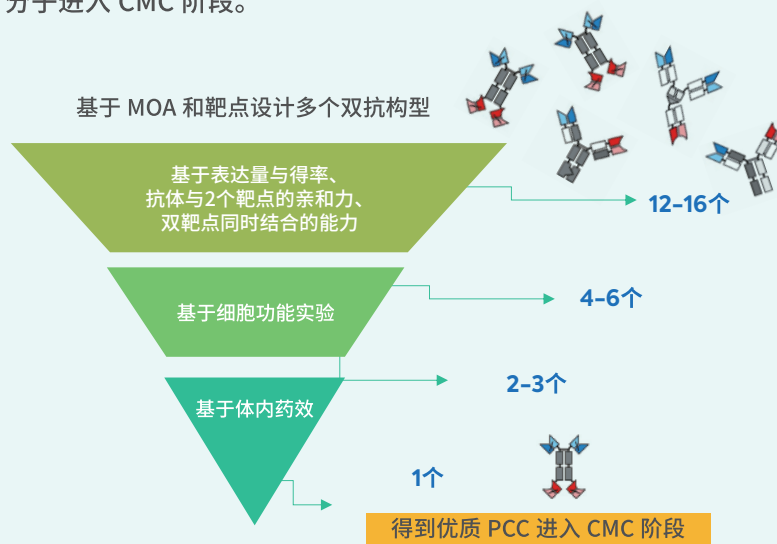


图 4：双特异性抗体筛选与评价流程

小知识：T 细胞桥接作用的双抗结构设计

CD3 是 T 细胞受体 - 共受体 (TCR-CD3) 复合物的的重要组成部分。T 细胞可以通过 TCR 识别肿瘤细胞上的抗原肽 - 主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子复合物。通过 CD3 将激活信号传递到 T 细胞内，进而激活 T 细胞并杀伤肿瘤细胞。肿瘤细胞可以通过下调 MHC 分子等方式进行免疫逃逸。肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA) 在肿瘤细胞中高表达，在健康细胞中也存在但表达水平较低。anti-CD3 x TAA 双抗可以桥接 T 细胞与肿瘤细胞，通过 CD3 抗体激活 T 细胞并特异性杀伤 TAA 高表达的肿瘤细胞。目前 T 细胞桥接是双抗最重要的研究方向之一。

02 如何基于结构制定双特异性抗体发现策略？

靶向 TAA 端的抗体臂

- 靶点特异性,降低对非目标靶点的毒性
- 每个细胞的抗原表达丰度,内化效率不同,需选择不同的双抗结构
- 抗原结合表位靠近细胞膜,适合形成突触(免疫筛选)
- 配体 / 可溶性靶点竞争



靶向 CD3 端的抗体臂

- 亲和力: 对疗效和增加治疗窗口非常重要。
- CRS 范围在 50-200nM, 具有更少的 T 细胞消耗和肿瘤 / PK 分布
- 溶瘤综合征是危险信号
- 抗原表位需要与猴有交叉反应

Fc 端

- T 细胞和靶细胞之间的空间距离
- 效应: CD3 端单价, TAA 端二价增加亲和力,消除激动剂作用
- Fc 功能: 结合 FcRn 以延长半衰期, FcγR 沉默(可降低非特异性聚集和细胞因子产生,增加肿瘤分布和疗效)
- 对成药性、稳定性、可开发性、PK 等产生影响
- T 细胞重定向双抗聚集可能产生严重的安全隐患

图 5: anti-CD3 x TAA 双抗结构设计的考虑因素

双靶点 CART 疗法:

嵌合抗原受体(CAR)T 细胞已经复发性血液系统恶性肿瘤的治疗中取得了显著的成功,但该疗法会出现抗原逃逸和肿瘤复发,目前通过双靶点 CAR-T 识别一种以上肿瘤相关抗原的策略正在被积极探索中。这种策略可以通过使用两种具有不同抗原结合特异性的混合 CAR-T 细胞或能够靶向两种不同抗原的单个 CAR-T 细胞来实现。双靶点 CAR-T 细胞治疗的抗原至少有三种组合: CD19 x CD20、CD19 x CD22 以及 BCMA x CD38。用于双靶点 CAR-T 细胞治疗的主要 CAR 结构包括: 单靶点 CAR 混合、二价串联 CAR、二价环形 CAR 和双顺反子 CAR。

目前双靶点 CAR-T 细胞治疗仍处于早期发现阶段,需要对 CAR 靶点的选择以及 CAR 结构进行优化,并提供更多的临床前和临床相关数据。

参考文献:

1. Ma J, Mo Y, Tang M, Shen J, Qi Y, Zhao W, Huang Y, Xu Y and Qian C (2021) Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application. Front. Immunol. 12:626616. doi: 10.3389/fimmu.2021.626616
2. Wang Q, Chen Y, Park J, et al. Design and production of bispecific antibodies[J]. Antibodies, 2019, 8(3): 43.
3. Current Status and Perspectives of Dual-Targeting Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Treatment of Hematological Malignancies. Cancers (Basel).2022 Jul; 14(13): 3230.
4. Ulrich Brinkmann & Roland E. Kontermann (2017) The making of bispecific antibodies, mAbs, 9:2, 182-212, DOI: 10.1080/19420862.2016.1268307

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

FDA 发布的《双特异性抗体研发指南》中提出了在非临床阶段,需要针对靶点的药理学及毒理学,考察其安全性以及有效性,另外证明与同类单靶点抗体相比,双靶点能够产生更强的协同效应,提供单靶点抗体无法实现的有效性。接下来我们将从体外药效研究和体内药理研究两方面分析如何对双抗进行评价。

体外药效研究

体外药效评价可以为双抗的早期筛选及后期开发提供数据支持。在前期双抗筛选的过程中,一般会通过单靶点体外药效实验的筛选确定单靶点的抗体候选分子。在组合成双抗后进一步通过体外药效实验评价双抗候选分子的功能。在开展双抗的体外功能实验时,需要同时评价单抗及双抗的功能,需要体现出双抗相较于单抗或者抗体联用的特有优势。

双抗的作用机制较多,主要可分为细胞桥接、双靶点阻断、免疫细胞激活、同一细胞表面蛋白桥接四大类,双抗的体外药效评价方案需要基于不同作用机制设计。同时单一的细胞模型不能完全模拟体内复杂生物体系,故评估双抗候选分子的生物学特性时需要使用多种基于细胞的体外药效实验。

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

细胞桥接机制

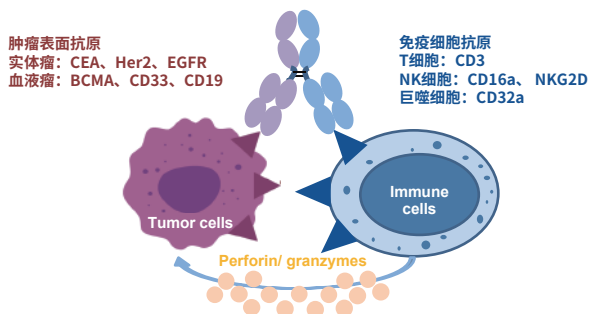


图 6: 细胞桥接机制

目前在研究的双抗管线中，大部分属于细胞桥接作用机制。双抗可以分别结合效应细胞(T 细胞、NK 细胞等免疫细胞)及靶细胞(多为肿瘤细胞)表面的抗原，引起效应细胞的激活及对靶细胞的杀伤。目前双抗研究的机制主要集中在 T 细胞桥接上。

设计细胞桥接类的双抗体外活性实验时，可以通过构建报告基因细胞系评估双抗对效应细胞(T/NK 细胞等)的激活，或者通过体外分离出原代免疫细胞与肿瘤细胞孵育，模拟人体内的免疫环境，进一步验证效应细胞的肿瘤杀伤能力。同时，抗体过度激活 CD3 类的靶点，可能会带来细胞因子风暴，需要通过细胞因子释放实验进行评估。

表 2: 细胞桥接双抗的体外药效评价方法

抗体类型	靶细胞	靶细胞上的靶点	效应细胞	效应细胞上的靶点	体外功能实验
T 细胞桥接	- 过表达TAA的工程细胞系 - 肿瘤细胞系	TAA/TSA	- 各种原代细胞 (T细胞/NK细胞/巨噬细胞/DC 细胞等) - 报告基因细胞系	CD3	- 原代免疫细胞实验 (TDCC等) - 细胞因子释放实验 - 报告基因实验
NK 细胞桥接				NK细胞激活受体 (CD16a、NKG2D、NKp46、NKp30 等)	- 原代免疫细胞实验 (NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤等) - 报告基因实验
Anti-TAA x 刺激性免疫检查点				刺激性免疫检查点 (CD40, 4-1BB, CD28 等)	- 报告基因实验 - 原代免疫细胞实验 (免疫细胞激活、肿瘤细胞杀伤、混合淋巴细胞反应 (MLR)等)
Anti-TAA x TAA/抑制性免疫检查点				NK细胞激活受体 CD16a、巨噬细胞激活受体CD32a	- 报告基因实验 - 原代免疫细胞实验 (ADCP等)

- 肿瘤特异性抗原 (tumor-specific antigen, TSA)

1. Anti-CD3 x TAA 双抗

在双抗细胞桥接作用机制里，T 细胞是较常用的效应细胞类型，其中热门的表面靶点是 CD3，但该机制主要是激活肿瘤浸润 T 细胞，因此对“热肿瘤”以及血液肿瘤的效果相对较好。

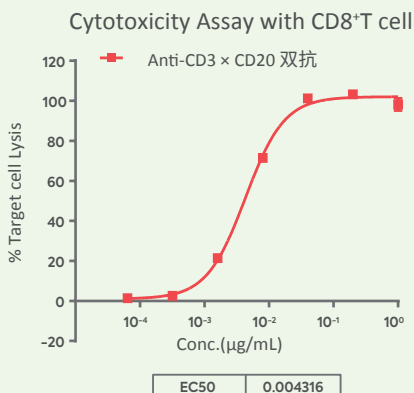
案例分享：

由金斯瑞蓬勃生物自主合成了 anti-CD3 x CD20 双抗，设计了以下体外活性评价方案：

- 通过自主构建的报告基因细胞系验证该双抗对于 T 细胞的激活能力。
- 分离原代 CD8⁺T 细胞进行肿瘤细胞杀伤实验 (TDCC)，评估该双抗的肿瘤细胞杀伤能力。
- 通过检测细胞因子 (IFN- γ 、TNF- α) 的释放进一步评估该双抗对 T 细胞的激活效果。

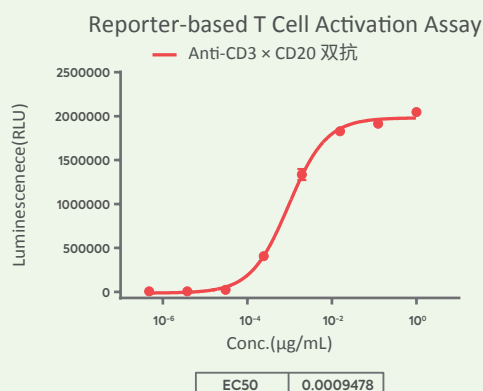
03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

TDCC 实验



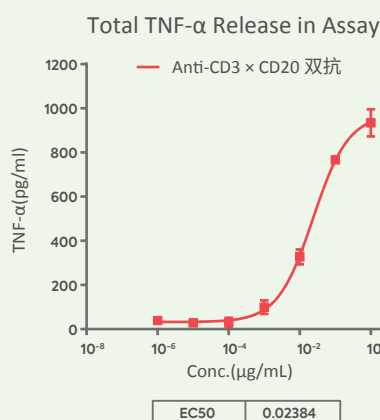
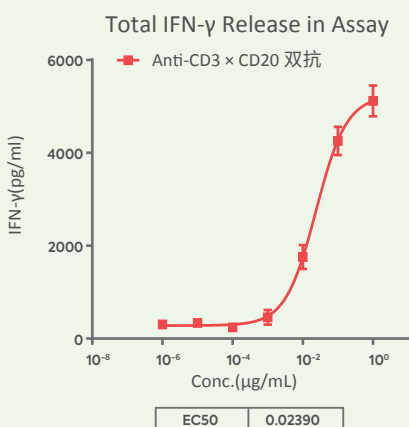
TDCC实验结果显示, anti-CD3 × CD20 双抗可以引起原代CD8⁺ T细胞对CD20高表达的肿瘤细胞的杀伤。

报告基因实验



报告基因实验结果显示, anti-CD3 × CD20双抗可以引发T细胞激活信号通路。

细胞因子释放实验



T细胞因子释放实验结果显示, anti-CD3×CD20 双抗在一定浓度下可以引起原代CD8⁺ T细胞中IFN-γ、TNF-α的释放。

图 7: anti-CD3 x CD20 双抗体外功能验证

实验结果显示, anti-CD3 x CD20 双抗可以剂量依赖性地激活 T 细胞并杀伤 CD20 高表达的肿瘤细胞。报告基因实验与原代 CD8⁺ T 细胞实验结果相符。

2. 基于 NK 细胞桥接的双抗

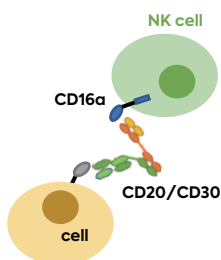


图 8: NK 细胞桥接机制

双抗可以通过靶向 NK 细胞上的激活性受体 (CD16a、NKG2D、NKp46、NKp30 等) 及靶细胞上的 TAA, 激活 NK 细胞并特异性杀伤 TAA 高表达的肿瘤细胞, NK 细胞产生的细胞因子谱与 T 细胞有所不同, 且 NK 细胞在体内的占比较少, 所以靶向 NK 细胞发生细胞因子风暴的风险比较低。

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

案例分享：

由金斯瑞蓬勃生物构建了自主合成了 anti-CD16a x CD20 双抗,设计了以下体外活性评价方案：

1. 通过自主构建的报告基因细胞系验证该双抗对于 NK 细胞的激活。
2. 通过将 NK 细胞和 CD20 高表达的肿瘤细胞孵育,进行杀伤实验,评估该双抗对肿瘤细胞的杀伤能力。

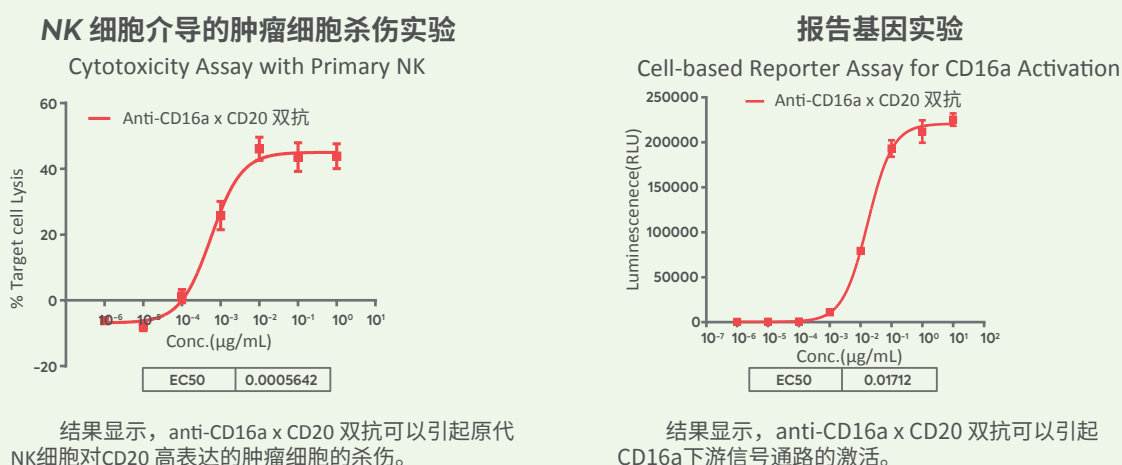


图 9: anti-CD16a x CD20 双抗体外功能验证

实验结果显示, anti-CD16a x CD20 可以剂量依赖性地激活 NK 细胞并杀伤 CD20 高表达的肿瘤细胞。报告基因实验与原代 NK 细胞实验结果相符。

3. Anti-TAA x 刺激性免疫检查点双抗

4-1BB、CD40 等共刺激性免疫检查点属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的刺激性检查点分子,大多表达于 T 细胞、DC 细胞等免疫细胞表面,在交联的情况下会被激活,利用这种机制设计的双抗,可以使双抗只在 TAA 过表达的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中激活免疫细胞。相较于免疫激动剂单抗,可在增强抗体疗效的同时,减少正常组织或外周血中免疫细胞的激活,具有更好的安全性。

案例分享：

由金斯瑞蓬勃生物自主合成了一个 anti-4-1BB x TAA 双抗,设计了以下体外活性评价方案：

1. 通过 4-1BB 报告基因细胞系验证该双抗对于 T 细胞的激活能力。
2. 通过将报告基因细胞系和 CHO-K1 或者过表达 TAA 的 CHO-K1 细胞孵育,评估 TAA 对于该双抗的成簇效果。

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

报告基因实验

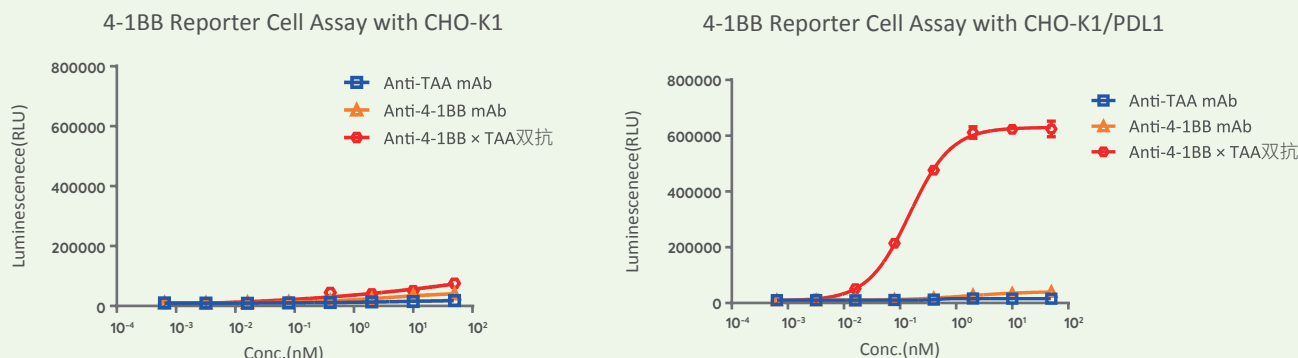


图 10: anti-4-1BB x TAA 双抗体外功能验证

4-1BB 报告基因实验结果显示，anti-4-1BB x TAA 双抗在过表达 TAA 的 CHO-K1 细胞与 4-1BB 报告基因细胞共孵育的体系中，可以显著激活 4-1BB 信号通路（右图）。但是，anti-4-1BB x TAA 双抗在 CHO-K1 细胞与 4-1BB 报告基因细胞共孵育的体系中，4-1BB 信号通路的激活十分微弱（左图）。

双靶点阻断机制

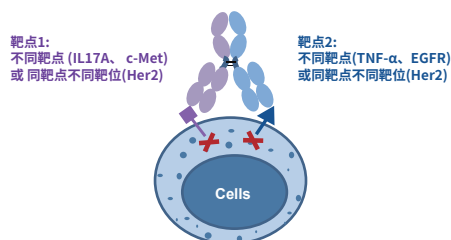


图 11: 双靶点阻断机制

双靶点阻断是双抗重要的靶向机制，常用于肿瘤治疗和自身免疫性疾病治疗领域。肿瘤细胞可以通过补偿信号通路或同靶点不同表位之间的同源或异源二聚体激活细胞内信号进行逃逸或产生耐药性。因此双抗通过同时靶向两个靶点，可以减少肿瘤细胞逃逸，克服耐药性，提高治疗效果。

基于双靶点阻断的作用机制，需要根据具体的靶点设计体外活性检测方案。比如，双抗阻断了对应靶点的信号通路，可以通过设计报告基因实验、信号通路蛋白相关的磷酸化检测实验等来评估双抗的活性。由于某些信号通路的激活会引起下游细胞因子 / 趋化因子的释放，或者影响细胞增殖，可以通过设计细胞因子 / 趋化因子释放实验、细胞增殖实验，对抗体的活性进行评估。对于胞外核苷酸酶家族的靶点（比如 CD39 和 CD73），蛋白 / 细胞酶活实验是判断抗体活性的重要评价方法。有些双抗靶点，除了可以介导细胞内的信号通路，本身也是 TAA，所以设计双抗时可以引入有 Fc 功能的抗体设计，对于这类的双抗，需要通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 等实验评价抗体 Fc 端的功能活性。

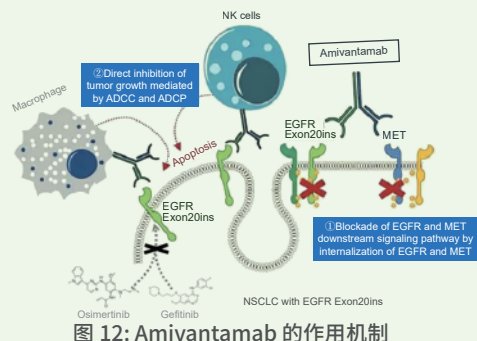
表 3: 双靶点阻断双抗的体外药效评价方法

抗体类型	靶点组合	体外功能实验
阻断血管生成/肿瘤发生	VEGF x ANG2、Her2 x Her2、EGFR x c-Met、VEGF x DLL4 等	1. 信号通路实验 2. 报告基因实验 3. 酶活实验 4. 细胞因子/趋化因子释放实验 5. 抗体内化实验 6. 细胞增殖实验 7. 原代细胞实验 (ADCC、MLR等)
靶向肿瘤生长微环境	TGFβ x PDL1、TGFβ x CD73、TGFβ x CD39等	
炎症/自身免疫性疾病通路	TNFα x IL17A、IL4 x IL13、BAFF x IL17A 等	
阻断血管生成/肿瘤发生 x 免疫检查点抑制剂	VEGF x PD1、EGFR x PD1、Her2 x PD1 等	

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

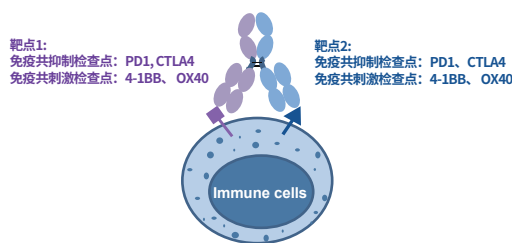
阻断血管生成 / 肿瘤发生的双抗

血管生成促进肿瘤的生长，促进其恶化、扩散和转移。双抗能同时阻断超过一个血管生成的通路，如 VEGF、DLL4 等，增强抗血管生成的效果。



2021 年 5 月 21 日，FDA 首次批准了 Amivantamab（商品名 RYBRENT），用于治疗在接受含铂化疗期间或之后病情进展、表皮生长因子受体（EGFR）基因第 20 号外显子有插入突变的转移性非小细胞肺癌（NSCLC）患者。Amivantamab 是一种同时靶向 EGFR 和 c-Met 的双抗，它能够通过阻断配体结合，来阻断 EGFR 和 c-Met 信号。同时，双抗可以结合肿瘤细胞表面高表达的 EGFR 和 c-Met，介导免疫效应细胞（如自然杀伤细胞和巨噬细胞）通过 ADCC 机制靶向肿瘤细胞进行杀伤。

免疫细胞激活机制



随着免疫疗法研发的推进，以 PD1 等单抗为代表的药物已经取得了突破性的进展。然而，临床上采用免疫检查点单抗药物治疗的患者，客观应答率 (objective response rate, ORR) 仍然比较低。因此，以联合用药产生的协同效应为理论基础，旨在加强免疫细胞的激活，靶向两个免疫细胞表面靶点的双抗已成为研究热点。根据免疫检查点的类型，该类双抗可以分为：免疫检查点抑制剂 x 免疫检查点抑制剂、免疫检查点抑制剂 x 免疫检查点激动剂、免疫检查点激动剂 x 免疫检查点激动剂。

设计免疫细胞激活类双抗的体外活性检测方案，可以基于其靶点选择不同组合的单靶点报告基因细胞系，或构建双靶点报告基因细胞系，来验证双抗对 2 个靶点的激活能力。同时可以进行原代细胞实验进一步验证双抗对免疫细胞的激活能力，并比较双抗相对于单抗的优势。

在研发、生产及应力条件下，容易产生不完整或者错配的双抗，相比于使用两个单靶点细胞分别评价双抗的两个靶点，双靶点报告基因法可以通过活性实验，准确表征样本中正确配对的双抗，准确评估双抗的活性，而且相较于分别进行 2 个单靶点细胞实验能节省费用。

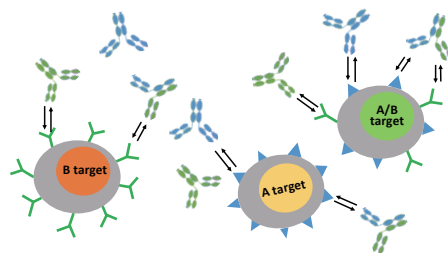


表 4: 免疫细胞激活双抗的体外药效评价方法

抗体类型	靶点组合	体外功能实验
免疫检查点抑制剂 x 免疫检查点抑制剂	PD-1 x TIGIT、PD-1 x CTLA4等	1. 报告基因实验 2. 原代免疫细胞实验(免疫细胞激活、MLR 等)
免疫检查点抑制剂 x 免疫检查点激动剂	PD-1 x 4-1BB、PD-1 x OX40等	
免疫检查点激动剂 x 免疫检查点激动剂	4-1BB x CD40、4-1BB x OX40等	

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

同一细胞表面蛋白桥接

双抗的两个抗原结合臂可以结合同一细胞表面的两种抗原，通过细胞表面蛋白复合体的形成，引发细胞下游信号通路。比如已上市用于治疗血友病的双抗 Emicizumab，可以模拟凝血因子 VIII，靶向桥连凝血因子 IXa 和凝血因子 X 促进凝血酶的产生，降低血友病患者的出血率。双抗还可以通过结合肿瘤细胞表面的促凋亡受体和 TAA，引发肿瘤细胞凋亡。

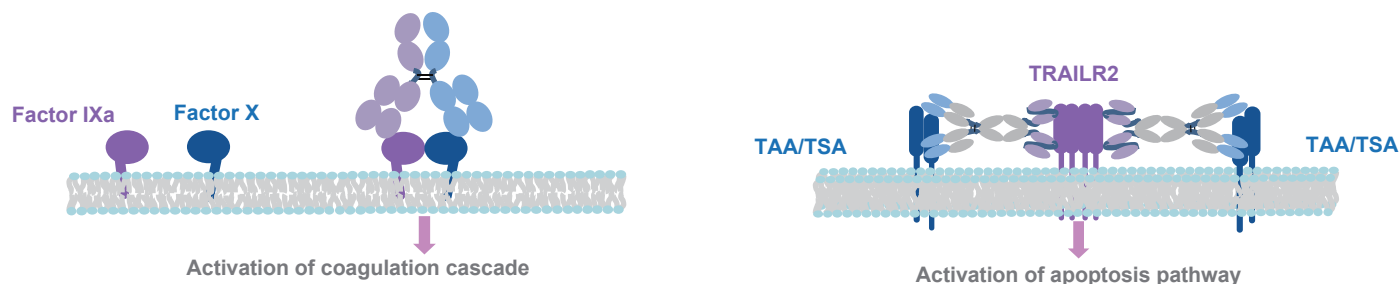


图 15: 同一细胞表面蛋白桥接

对于同一细胞表面蛋白桥接类的双抗，可以根据具体的作用机制设计体外实验，比如凝血因子相关的双抗，可以通过测定凝血时间评价双抗的活性。

表 5: 同一细胞表面蛋白桥接双抗的体外药效评价方法

抗体类型	靶点组合	体外功能实验
激活细胞凋亡信号通路	DR5 x TAA等	细胞活性实验等
激活凝血通路	凝血因子IXa x 凝血因子X等	凝血时间测定等

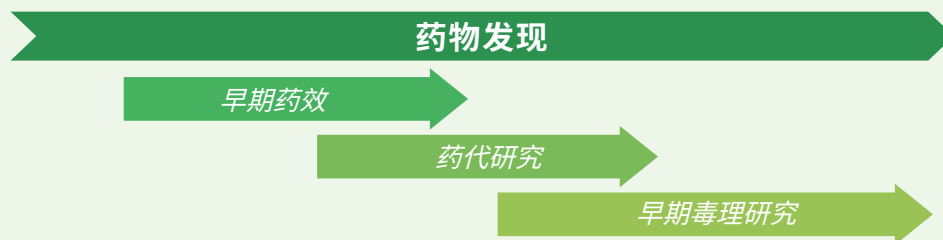
参考文献:

1. Tian Z, Liu M, Zhang Y, Wang X. Bispecific T cell engagers: an emerging therapy for management of hematologic malignancies. J Hematol Oncol. 2021 May 3;14(1):75. doi: 10.1186/s13045-021-01084-4. PMID: 33941237; PMCID: PMC8091790.
2. Demaria O, Gauthier L, Debroas G, Vivier E. Natural killer cell engagers in cancer immunotherapy: Next generation of immuno-oncology treatments. Eur J Immunol. 2021 Aug;51(8):1934-1942. doi: 10.1002/eji.202048953. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34145579.
3. Jeong S, Park E, Kim HD, Sung E, Kim H, Jeon J, Kim Y, Jung UJ, Son YG, Hong Y, Lee H, Lee S, Lim Y, Won J, Jeon M, Hwang S, Fang L, Jiang W, Wang Z, Shin EC, Park SH, Jung J. Novel anti-4-1BB×PD-L1 bispecific antibody augments anti-tumor immunity through tumor-directed T-cell activation and checkpoint blockade. J Immunother Cancer. 2021 Jul;9(7):e002428. doi: 10.1136/jitc-2021-002428. PMID: 34230109; PMCID: PMC8261887.
4. Chester C, Sanmamed M F, Wang J, et al. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies[J]. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2018, 131(1): 49-57.
5. Roland Kontermann (2012) Dual targeting strategies with bispecific antibodies, mAbs, 4:2, 182-197, DOI: 10.4161/mabs.4.2.19000
6. Mohammadi M, Jeddi-Tehrani M, Golsaz-Shirazi F, Arjmand M, Bahadori T, Judaki MA, Shiravi F, Zare HA, Haghighat FN, Mobini M, Amiri MM and Shokri F (2021) A Novel Anti-HER2 Bispecific Antibody With Potent Tumor Inhibitory Effects In Vitro and In Vivo. Front. Immunol. 11:600883. doi: 10.3389/fimmu.2020.600883
7. Burton EM, Tawbi HA. Bispecific Antibodies to PD-1 and CTLA4: Doubling Down on T Cells to Decouple Efficacy from Toxicity. Cancer Discov. 2021 May;11(5):1008-1010. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0257. PMID: 33947716.
8. Ma L, Gai J, Qiao P, Li Y, Li X, Zhu M, Li G, Wan Y. A novel bispecific nanobody with PD-L1/TIGIT dual immune checkpoint blockade. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Oct 15;531(2):144-151. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.07.072. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32782142.
9. Park K, John T, Kim S W, et al. Amivantamab (JNJ-61186372), an anti-EGFR-MET bispecific antibody, in patients with EGFR exon 20 insertion (exon20ins)-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. 2020.
10. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, Ishii S, Soeda T, Muto A, Kawabe Y, Igawa T, Tsunoda H, Nogami K, Shima M, Hattori K. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. Thromb Haemost. 2017 Jun 28;117(7):1348-1357. doi: 10.1160/TH17-01-0030. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28451690; PMCID: PMC6292136.
11. García-Martínez JM, Wang S, Weishaupl C, Wernitznig A, Chetta P, Pinto C, Ho J, Dutcher D, Gorman PN, Kroe-Barrett R, Rinnenthal J, Giragossian C, Impagnatiello MA, Tirapu I, Hilberg F, Kraut N, Pearson M, Kuenkele KP. Selective Tumor Cell Apoptosis and Tumor Regression in CDH17-Positive Colorectal Cancer Models using BI 905711, a Novel Liver-Sparing TRAILR2 Agonist. Mol Cancer Ther. 2021 Jan;20(1):96-108. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0253. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037135.

03 如何基于作用机制全面评价双特异性抗体功能？

体内药理研究

双抗的早期体内药理研究也需要基于作用机制进行设计，研究流程和其他药物相似，一般包含基于动物模型的早期药效研究、药代研究和早期毒理研究。



早期体内药效研究

对体内药效模型的选择可以依据抗体本身特性，还要考虑相关的转基因动物 / 细胞模型构建难度和成本。如果双抗可以人鼠交叉，或者有替代抗体时可以选择同系移植瘤模型，如果双抗的作用机理为通过激活免疫细胞杀伤肿瘤，则可以考虑使用免疫系统人源化模型。下表是不同作用机制的双抗可以选择的体内药效模型：

表 6：基于双抗作用机制选择体内药效模型

双抗作用机制	体内药效模型
分别靶向肿瘤细胞和免疫细胞	1.免疫系统人源化模型 2.转基因动物/细胞模型
分别靶向发病进程中两个不同的信号传导通路	1.免疫系统人源化模型 2.转基因动物/细胞模型 3.免疫缺陷鼠皮下异种移植瘤模型
同时靶向肿瘤细胞表面不同的抗原或表位	1.转基因动物/细胞模型 2.免疫缺陷鼠皮下异种移植瘤模型 3.病人来源肿瘤异种移植模型

早期体内药代研究

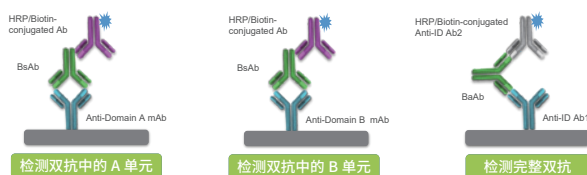


图 16：双特异性抗体的药代动力学分析策略

双抗的药代动力学检测策略较之单抗更加复杂。首先需要采用间接 ELISA 法针对双抗不同的两个靶点进行检测，其次需要采用双抗夹心 ELISA 法检测完整的双抗，最后拟合出 3 条药时曲线，通过比较 3 条药时曲线的重合度，来判断双抗分子在体内的结构稳定性。

早期毒理研究

与单抗药物相比，双抗药物常常出现蛋白水解、聚集、物理不稳定性和产量低的趋势。双抗分子常常在动物体内诱发抗药物抗体，从而危及长期的毒理学研究，而双特异性抗体可能表现出较差的药代动力学行为，并通过非标准途径清除。因此早期的毒理学研究具有指导意义。

参考文献：

1. Ma M, Colletti K, Yang T Y, et al. Bioanalytical challenges and unique considerations to support pharmacokinetic characterization of bispecific biotherapeutics[J]. Bioanalysis, 2019, 11(05): 427-435.
2. Glutazumab, anovel long-lasting GLP-1/anti-GLP-1R antibody fusion protein, exerts anti-diabetic effects through targeting dual receptor binding sites. Biochem Pharmacol. 2018, 150:46-53.
3. Labrijn A F, Janmaat M L, Reichert J M, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline[J]. Nature reviews Drug discovery, 2019, 18(8): 585-608.

04 如何选择合适的双抗发现合作伙伴

双抗在早期发现阶段就需要考虑其功能性与成药性,因此需要选择优质且合适的双抗发现合作伙伴,从而提高获得双抗 PCC 分子的概率。一般需要从以下几个维度综合考量双抗发现合作伙伴的能力。

经验	双抗药物作用机理复杂,因而需要寻找对靶点和机理有深刻理解,拥有多个成功双抗发现项目经验的合作伙伴
技术平台	双抗发现流程复杂,同时拥有:靶点发现、抗体构建、高通量筛选、体外功能性评价、体内药理研究、成药性分析平台的合作伙伴有助于获得双抗 PCC 分子
周期	双抗发现各环节环环相扣,合作伙伴需要有专业的项目管理能力,节省项目时间
价格	需要考虑合作伙伴是否收取授权费用

金斯瑞蓬勃生物拥有 18 年生物药开发经验,是您最优的双抗发现合作伙伴:

丰富的双抗发现经验

- 超过 20 个双特异性抗体药开发项目经验
- 5 个战略合作伙伴
- 最快的项目已获得 IND 批件

定制化双抗结构

- 可与任何 mAb 或 sdAb 序列兼容
- 基于靶点、双抗作用机理提供兼具成药性与药效的定制化双抗结构设计方案
- 无需收取商业授权费

全面的双抗发现平台

- 从靶点发现到临床前候选分子
- 全面的抗体发现平台
- 基于靶点与 MOA 的体外药效与体内药理解决方案

PROBIO