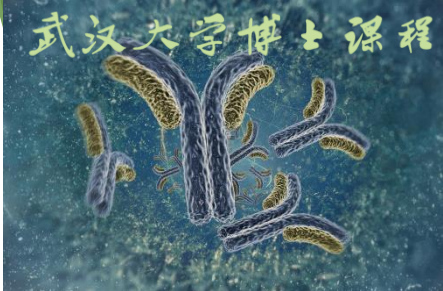


武汉大学博士课程之

现代药学研究新进展

教师：台万一

武汉大学药学院



内容概要

I. 抗体药物及抗体类似物的结构设计与应用

- 抗体基础知识
- 抗体筛选技术
- 抗体药物结构设计
- 抗体表达技术

II. 细胞疗法的研究与应用（CAR-T）

第三节：抗体药物的结构设计与应用

抗体结构设计-目录

本节目录:

上

- ① 抗体人源化
- ② 抗体Fc效应调节与改造
- ③ 抗体片段及衍生物
- ④ 双特异性抗体

中

- ⑤ 抗体-药物偶联技术
- ⑥ 融合抗体
- ⑦ 重链抗体（骆驼抗体）

下

- ⑧ 抗体与免疫检查点疗法
- ⑨ IgM抗体疗法
- ⑩ 复杂抗体衍生物
- ⑪ 单域抗体以及骨架蛋白

抗体人源化 (HAMA反应)

HAMA反应：人抗鼠抗体反应 Human anti-mouse antibody (HAMA)

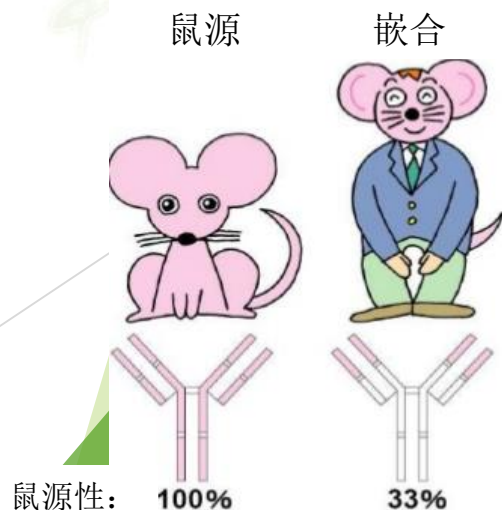
第一个鼠源抗体muromonab在1980s上市使用，医生发现有50%的病人后期对抗体治疗没有反应。

副作用：

- 抗体的快速清除
- 更弱的肿瘤穿透性
- 超敏反应

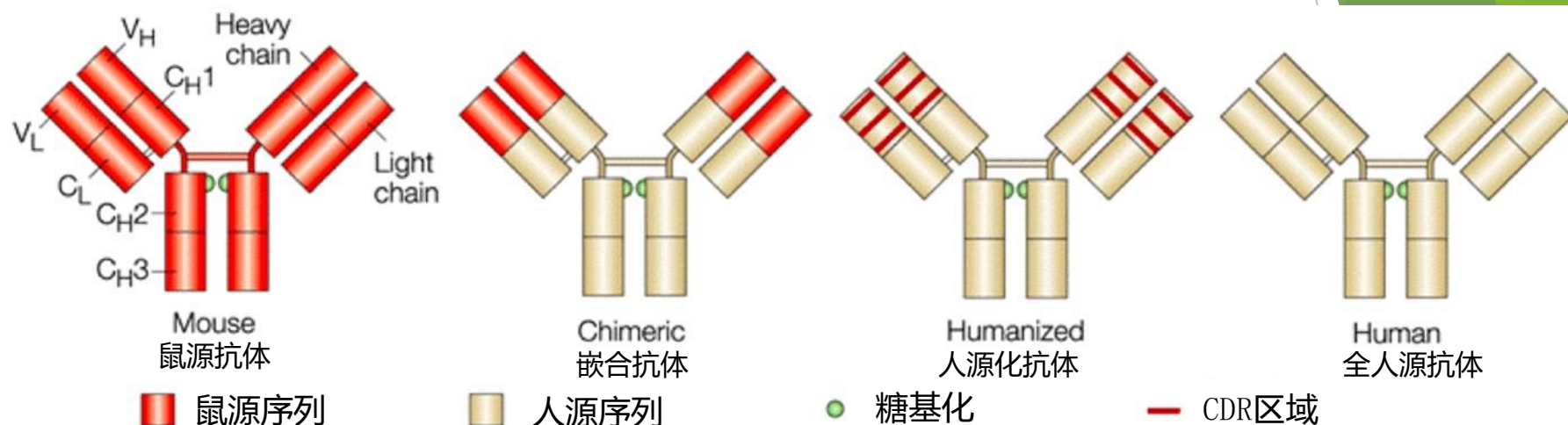


Genetch公司于1997年开发的人鼠嵌合抗体Rituximab才解决了这个问题。



抗体人源化（氨基酸序列人源化）

人源化抗体主要指鼠源单克隆抗体以基因克隆及DNA重组技术改造，重新表达的抗体，其大部分氨基酸序列为人源序列取代，基本保留亲本鼠单克隆抗体的亲和力和特异性，又降低了其异源性，有利应用于人体。



嵌合抗体：

嵌合抗体，即人-鼠嵌合抗体，是在基因水平上将鼠源的可变区（保护 V_H 和 V_L ）移植到人源抗体的恒定区上面，得到一个大部份序列人源化的抗体。

嵌合抗体用于人体所产生的HAMA反应比鼠源单抗明显减弱，人源C区（恒定区）可更有效地介导人体一些免疫反应。

嵌合抗体虽然可以部分解决异种蛋白的排斥问题，但由于其还含有鼠源V区，依然有可能会诱发HAMA反应，干扰抗体疗效，诱发超敏反应，在临床上其应用会受到一定限制。

V_H sequences	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
mouse	EVQLEESGGGLVPGGSLKLSAASGFAPFS	SYDMS	WVRQIPEKRLWVA	KVSSGGGSTYYLDTVQG	RFTISRDNAKNTLYLQMSSLNSEDATAMYYCAR	HNYGSFAY	WGQGTLLVTVSA
human	Q---VQ---AEVR---S-VRV--K---GT--		---A-GQ-F--LG		KL--TV-ESTA-VYME-RN-R-D---V----		-----S
Chimeric	Q---VQ---AEVR---S-VRV--K---GT--		---A-GQ-F--LG		KL--TV-ESTA-VYME-RN-R-D---V----		-----S

抗体人源化（氨基酸序列人源化）

人源化抗体，也叫改型抗体，CDR移植抗体

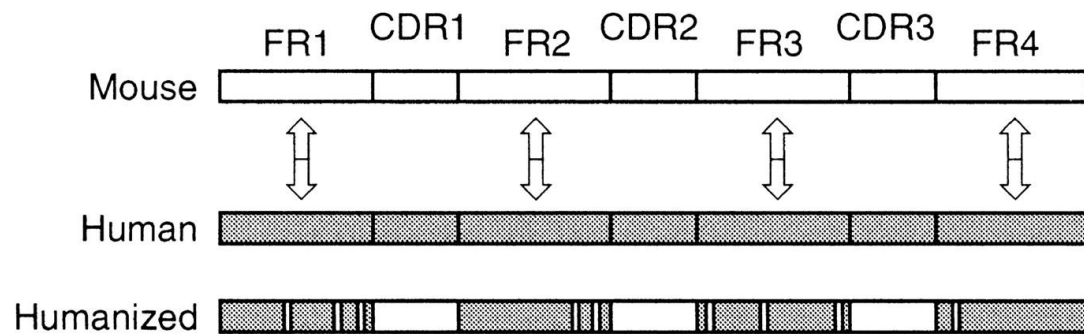
CDR移植抗体是第二代人源化抗体，CDR移植抗体是研究者在嵌合抗体的基础上进一步用人源框架区（FR区）替代鼠源框架区，仅保留了3个鼠源性CDR，其他全部为人源结构，人源性可达90%以上。

但对于特定的抗原分子，FR并不能随意替换。多方面研究均证实，具有支持作用的FR不仅为CDR的构象提供了环境，有时还参与抗体结合。因此简单的CDR移植往往明显降低抗原-抗体结合的亲和力，甚至是丧失抗原抗体结合的能力。

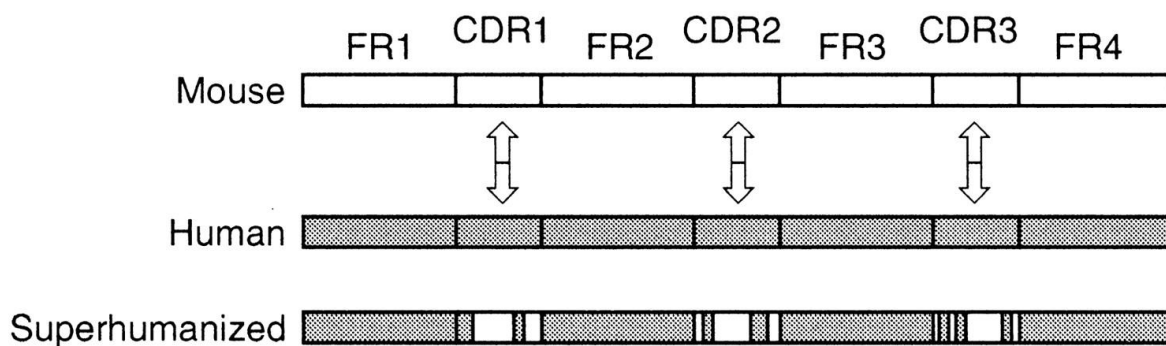
针对这种状况，目前主要有四种策略：

- 1, 同源替换，使用与鼠源对应部分具有较大同源性的FR进行替换；
- 2, 表面重塑，对鼠源CDR和FR表面氨基酸残基进行重塑，以使其类似于人抗体CDR的轮廓或者FR型式；
- 3, 补偿变化，改编关键位置氨基酸残基，以补偿完全的CDR移植；
- 4, 定位保守，人源化单抗以FR保守序列为模板进行人源化，但保留鼠源单抗可变区的关键氨基酸残基。

Conventionally humanized: match frameworks



Superhumanized: match CDRs to human germline



Herceptin的人源化改造

最早发表的人源化技术

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 89, pp. 4285–4289, May 1992
Immunology

Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy

(antibody engineering/site-directed mutagenesis/*c-erbB-2/neu*)

PAUL CARTER*, LEN PRESTA*, CORNELIA M. GORMAN[†], JOHN B. B. RIDGWAY[†], DENNIS HENNER[†],
WAI LEE T. WONG[‡], ANN M. ROWLAND[‡], CLAIRE KOTTS[‡], MONIQUE E. CARVER[‡],
AND H. MICHAEL SHEPARD[§]

Departments of *Protein Engineering, [†]Cell Genetics, [‡]Medicinal and Analytical Chemistry, and [§]Cell Biology, Genentech Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080

Communicated by Hilary Koprowski, January 16, 1992 (received for review February 15, 1991)

ABSTRACT The murine monoclonal antibody mumAb4D5, directed against human epidermal growth factor receptor 2 (p185^{HER2}), specifically inhibits proliferation of human tumor cells overexpressing p185^{HER2}. However, the efficacy of mumAb4D5 in human cancer therapy is likely to be limited by a human anti-mouse antibody response and lack of effector functions. A “humanized” antibody, humAb4D5-1, containing only the antigen binding loops from mumAb4D5 and human variable region framework residues plus IgG1 constant domains was constructed. Light- and heavy-chain variable regions were simultaneously humanized in one step by “gene conversion mutagenesis” using 311-mer and 361-mer preassembled oligonucleotides, respectively. The humAb4D5-1 variant does not block the proliferation of human breast carcinoma SK-BR-3 cells, which overexpress p185^{HER2}, despite tight antigen binding ($K_d = 25$

cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) (15). Such chimeric antibody molecules are still ≈30% rodent in sequence and are capable of eliciting a significant anti-globulin response.

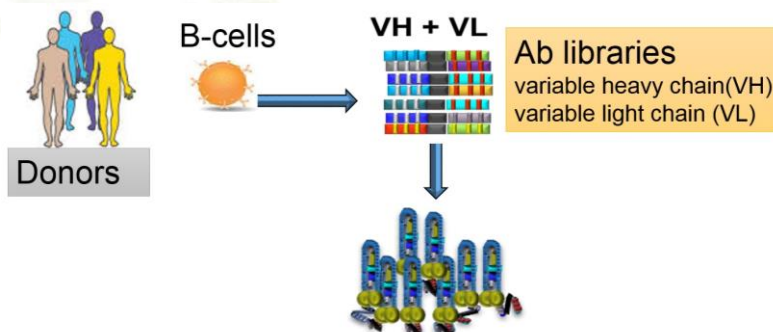
Winter and coworkers (16–18) pioneered the “humanization” of antibody V domains by transplanting the complementarity determining regions (CDRs), which are the hyper-variable loops involved in antigen binding, from rodent antibodies into human V domains. The validity of this approach is supported by the clinical efficacy of a humanized antibody specific for the CAMPATH-1 antigen with two non-Hodgkin lymphoma patients, one of whom had previously developed an anti-globulin response to the parental rat antibody (17, 19). In some cases, transplanting hypervariable loops from rodent antibodies into human frameworks is

全人源化抗体开发方法

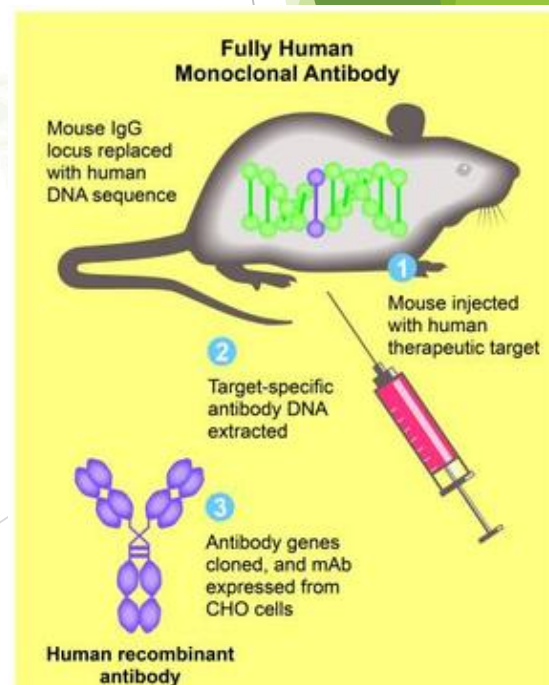
为了彻底消除异源性抗体的不良影响，90年代以后，人们将噬菌体展示技术应用到抗体的表达和克隆上，产生了噬菌体抗体库技术。由此，抗体工程技术进入到了一个新的发展阶段，全人源化抗体的生产和应用也逐渐走向成熟。

全人源化抗体是指将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术，将人类编码抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中，使动物表达人类抗体，达到抗体全人源化的目的。目前已建立多种方法生产完全人源性抗体，主要有**噬菌体展示技术**、**转基因小鼠技术**、核糖体展示技术和RNA-多肽技术。

■ 噬菌体展示全人源抗体



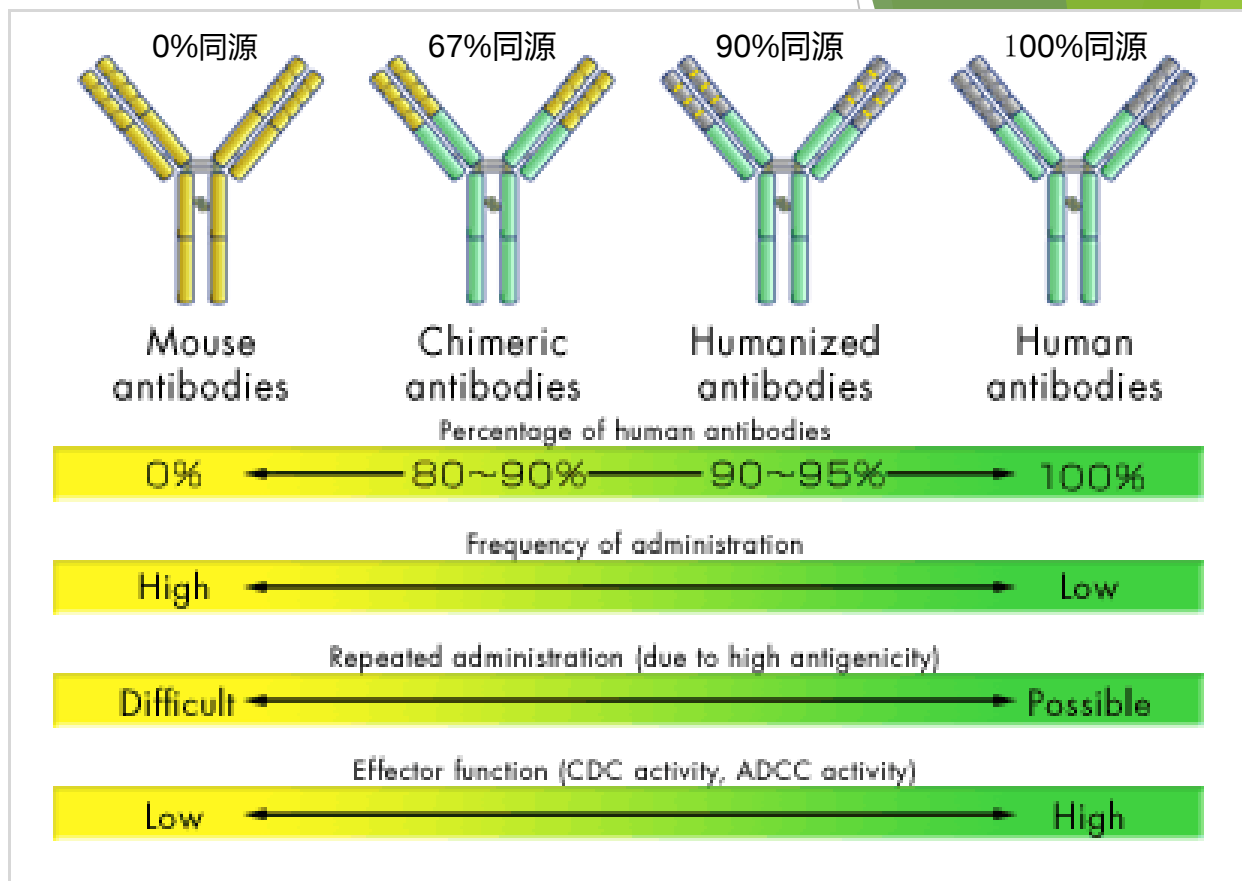
■ 转基因小鼠制备全人源抗体



抗体人源化（人源化的重要性）

抗体人源化对活性的影响。

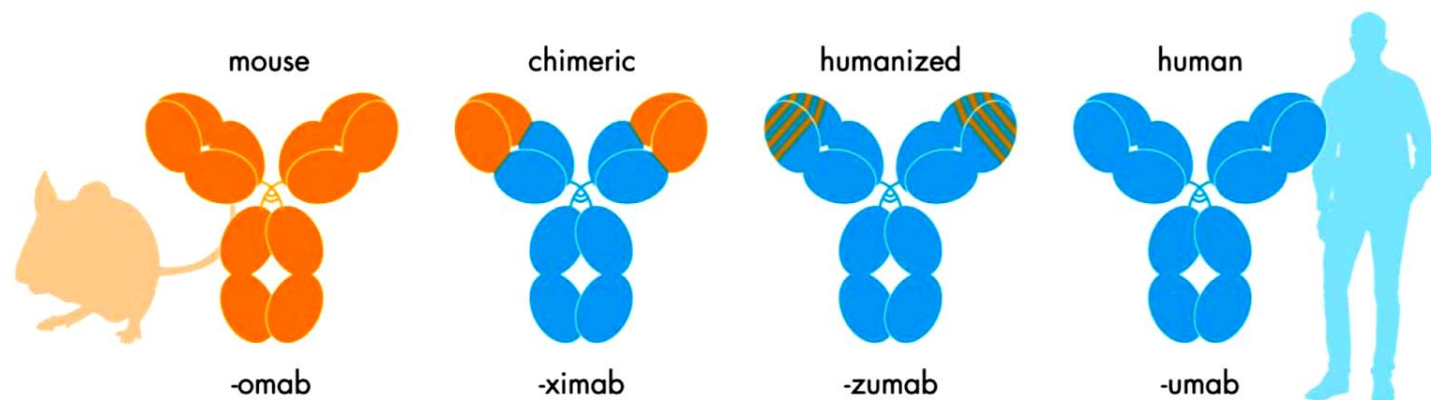
- 人源化后抗体易和人的FcRn受体结合，提高回收，降低清除率，延长血中半衰期，降低给药次数；
- 降低产生免疫反应的几率，更容易重复给药；
- 抗体的Fc效应增强，包括补体效应和细胞毒效应，生理活性更强



鼠源抗体的Fc和人的Fc受体结合差，鼠源抗体在人体内半衰期仅为12小时左右，而鼠源抗体在小鼠体内半衰期可达3天以上。

人的抗体，即人源抗体，和小鼠的Fc受体有一定结合能力，在小鼠内半衰期可达2天以上，但是仍小于在人体内的半衰期，人源抗体在人体内血中半衰期可达一个星期。

人源化抗体的命名规则



mABs, 2017, 9(6), 898-906

TABLE. SOURCE INFIXES OF MONOCLONAL ANTIBODIES

SOURCE INFIX	DEFINITION
-zu-	Humanized
-o-	Mouse
-u-	Fully human
-xi-	Chimeric
-xizu-	Mixed chimeric and human

Note: Source infixes for antibodies prior to 2010. Revised nomenclature can be found in the revised International Nonproprietary Names for Pharmaceuticals.

Monoclonal Antibodies Names

BEVA CI ZU MAB
CE TU Xi MAB
PAN TUM U MAB
RE TU XI MAB
TREME LIM U MAB

Tu/Tum = Tumor, Zu= humanized, Xi =Chimeric, U = fully human

Approved therapeutic antibodies

MOUSE
OKT3
BEXXAR
Zevalin

CHIMERIC
Rituxan
Remicade
Reopro
Simulect
Erbitux

HUMANIZED
Synagis
Herceptin
Zenapax
Myelotarg
Campath
Xolair
Raptiva
Avastin
Tsyabri
(Actemra-Japan)

HUMAN
Humira
Vectibix

人源化抗体的命名规则 (Drug nomenclature)

国际医药品通用名命名基本规则：

Generic naming formula:

Name = prefix + substem(s) + stem

variable

-mab monoclonal antibody
-ib small molecule with inhibitory properties

Monoclonal antibodies 抗体药物

	Target		Source
-ci(r)-	circulatory system	-ximab	chimeric human-mouse
-li(m)-	immune system	-zumab	humanized mouse
-t(u)-	tumor	-mumab	fully human

Small molecules 小分子药物

-tinib	tyrosine kinase inhibitor
-zomib	proteasome inhibitor
-ciclib	cyclin-dependent kinase inhibitor
-parib	poly ADP-ribose polymerase inhibitor

抗体药物名的命名顺序：

Prefix	Original application	Species source	Suffix
Individual	-vi(r)- viral	-o- mouse	-mab
	-ba(c)- bacterial	-a- rat	
	-fun(g)- fungal	-u- human	
	-li(m)- immune	-i- primate	
	-neu(r)- neural	-xi- chimeric	
	-mu(l)- musculoskeletal	-zu- humanized	
	-tu(m)- tumor		
	-ci(r)- circulatory		
例子:			
Nata-	-li-	-zu-	-mab
Alem-	-tu-	-zu-	-mab
Dac-	-li-	-zu-	-mab
Ri-	-tu-	-xi-	-mab

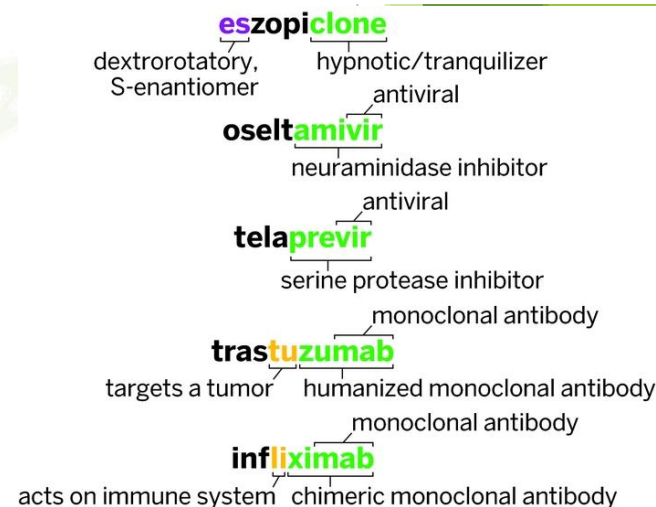
Source: Expert Rev Neurother © 2008 Future Drugs Ltd

医药品一般有三个名字：

- 化学名：
- 通用名： Trastuzumab
- 商品名： Herceptin

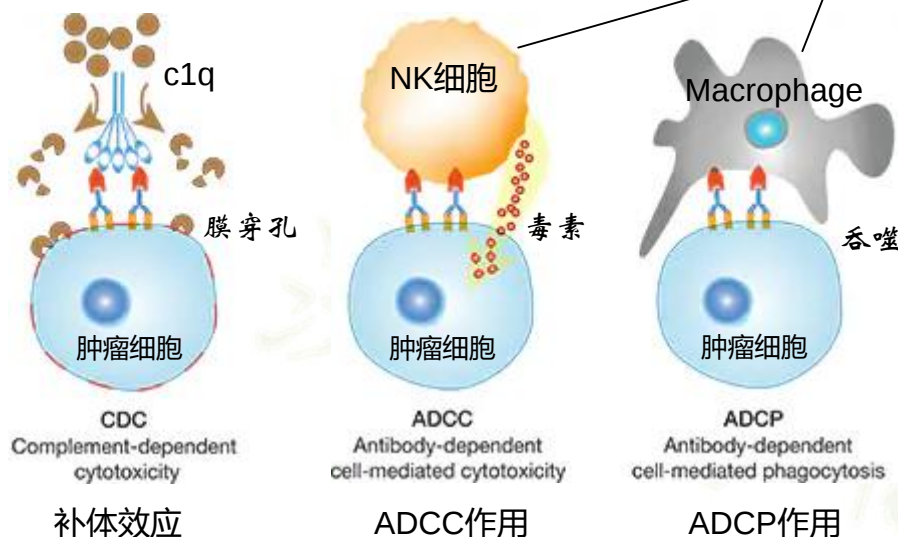


根据药品名识别药品的功能、靶点和结构



抗体Fc的工程改造

Fc介导的杀肿瘤细胞效应
Effector cell (效应细胞)

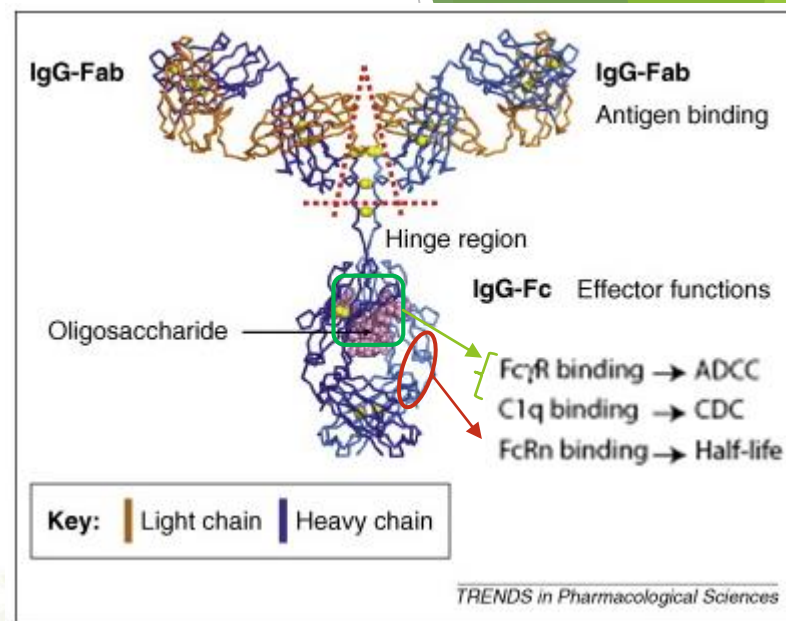


体液免疫

Humoral immunity

细胞免疫

Cell immunity



Fc工程改造的目的:

① 增强补体效应

Enhance CDC

Increased C1q binding

K326W/E333S

S267E/H268F/S324T

IgG1/IgG3 cross subclass

E345R/E430G/S440Y

② 增强细胞免疫效果

Enhance ADCC

Increased FcγRIIIa binding

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L

S239D/I332E

S239D/I332F/A330I

Enhance ADCP

Increased FcγRIIIa binding,

Increased FcγRIIIa binding

G236A/S239D/I332E

③ 延长抗体血中半衰期

Increased FcRn binding at pH 6.0

M252Y/S254T/T256E

M428L/N434S

④ 降低或者消除Fc效应

Aglycosylated

Reduced FcγR and C1q binding

N297A or N297Q or N297G

L235E

IgG1: L234A/L235A; IgG4: F234A/L235A

IgG2/IgG4 cross isotype

IgG2: H268Q/V309L/A330S/P331S

IgG2: V234A/G237A/P238S/H268A/

V309L/

A330S/P331S

抗体Fc的工程改造

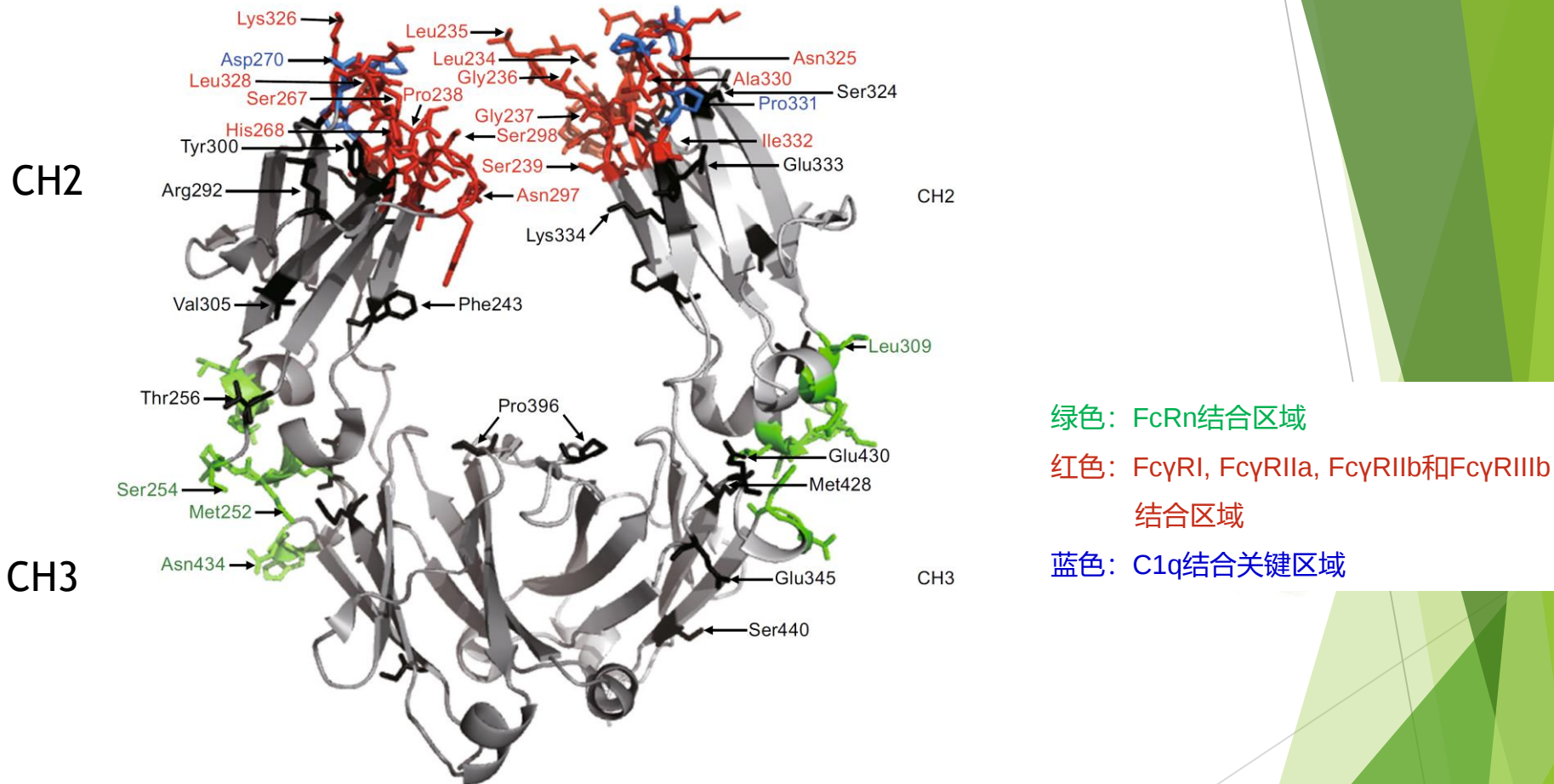


Figure 1. The Fc domain of human IgG1 is shown (PDBID:3AVE). The positions of amino acids described in Table 1 are shown. Key sequence motifs for FcRn interactions are shown in green (L251-S254; L309-Q311; N434-H435) (Oganesyan et al., 2014). Amino acids 5 angstroms proximal to the FcγR:Fc interface for FcγRI (PDBID:4W4O) (Kiyoshi et al., 2015), FcγRIIa (PDBID:3RY6) (Ramsland et al., 2011), FcγRIIb (PDBID:3WJJ) (Mimoto et al., 2013b), and FcγRIIIb (PDBID:1E4K) (Sondermann et al., 2000) as determined with PyMOL are shown in red (P232-S239; D265-D270; Y296-T299; N325-I332). The amino acids that are critical for interactions with C1q are shown in blue (D270, K322, P329, P331) (Idusogie et al., 2000). Amino acids depicted in black were not identified as critical for interactions with FcγRs, FcRn, or C1q. Figure 1 was generated with PyMOL.

抗体Fc的工程改造 (ADCC效应增强术)

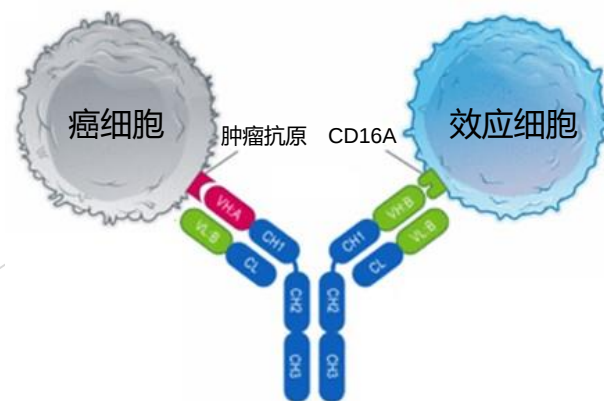
a) Fc的氨基酸突变, 提高和CD16A的亲和力

a) 抗体Fc的去岩藻糖化

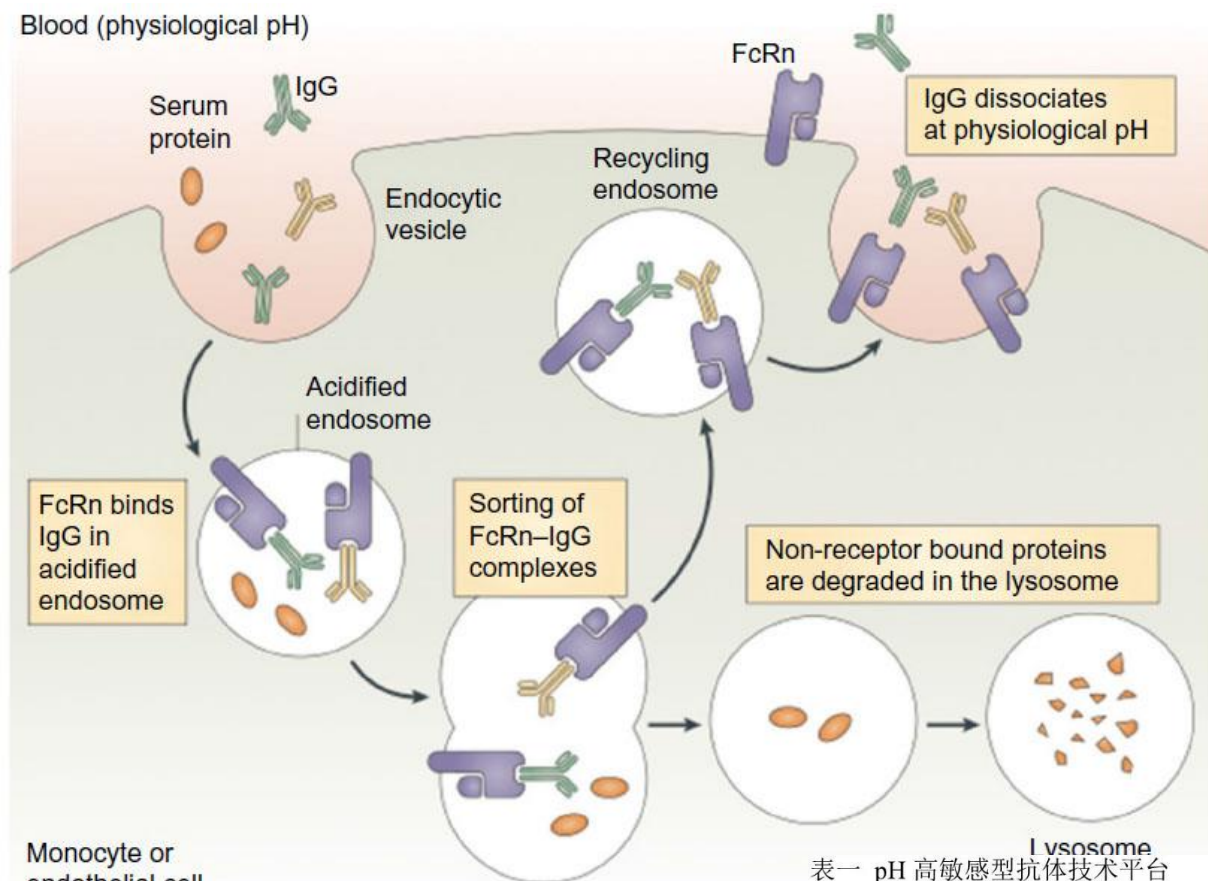
a) 不同Ig亚型Fc的杂合

b) CD16A介导的双特异性抗体

双特异性抗体, 利用特异性识别FcγRIII(CD16)的Fb构建双特异性抗体, 增强对效应细胞的结合, 弥补Fc区的不足。



抗体Fc的工程改造 (血中半衰期)



表一 pH 高敏感型抗体技术平台

由于抗体与的结合是敏感型的形式，抗体通过胞饮作用进入细胞，在酸性的内涵体中，抗体与结合，介导抗体回到细胞外，在胞外中性条件下，与解离。这样避免了其他血液中蛋白通过胞饮作用进入细胞内被溶酶体降解的命运，从而达到长效目的，半衰期长达几周（IgG1、IgG2、IgG4半衰期三周，IgG3为9天）。多家药企尝试改造抗体以特异性提高低pH条件下与FcRn的亲合力，达到进一步长效化的目的。

MedImmune是最早开发pH高敏感型抗体的药企之一，其技术同样是通过Fc几个氨基酸的突变（M252Y/S254T/T256E，因而该技术命名为“YTE”）

技术平台	企业	代表药物	靶点	技术实现途径
YTE	MedImmune	MEDI8897 (T _{1/2} 100 天)	RSV	M252Y/S254T/T256E
Xtend	Xencor	XmAb20717	PD1/CTLA4	M428L/N434S
	Genetech			N434A
SMART-Ig	Chugai	SA237	IL-6R	
Sweeping antibody	Alexion	ALXN1210	C5	

抗体再循环改造技术

FcRn和pH依赖性工程化改造的新型抗C5序贯单克隆抗体回收技术（SMART）抗体

主要体现在pH依赖的抗原抗体结合FcRn抗体“再循环”改造的半衰期延长和对依库珠单抗耐药患者的潜在治疗能力方面。

crovalimab单次给药（20mg/kg）即可抑制食蟹猴补体活性达到2月之久。相比之下，剂量加倍的非pH依赖常规抗体在一个月之后就失去了效果。

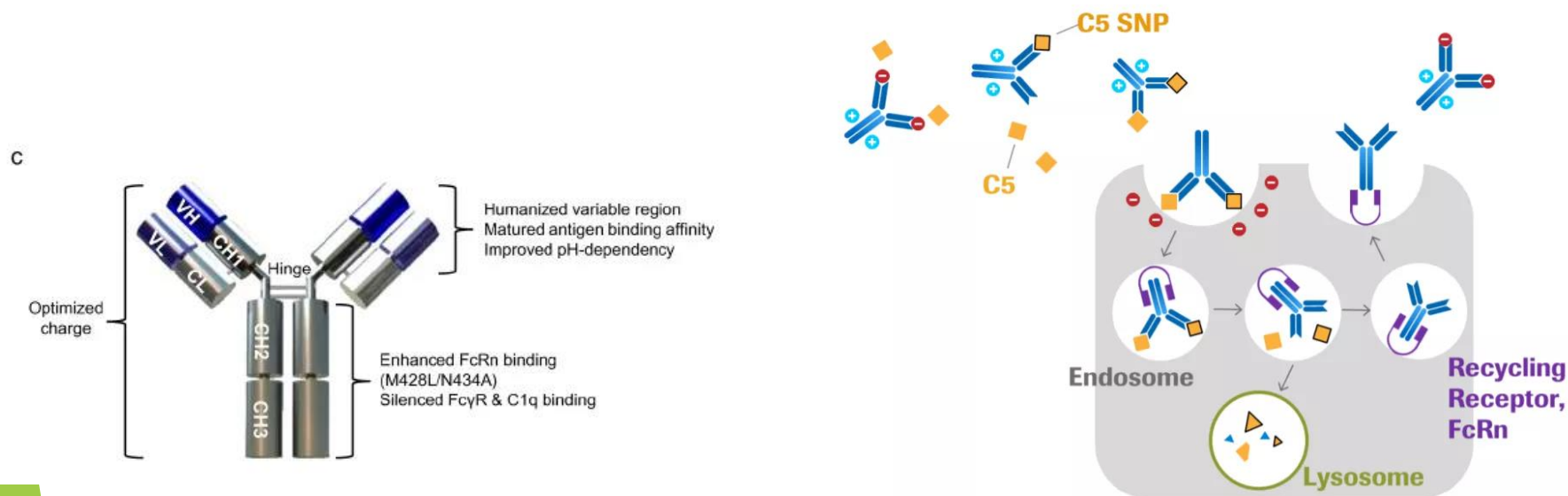
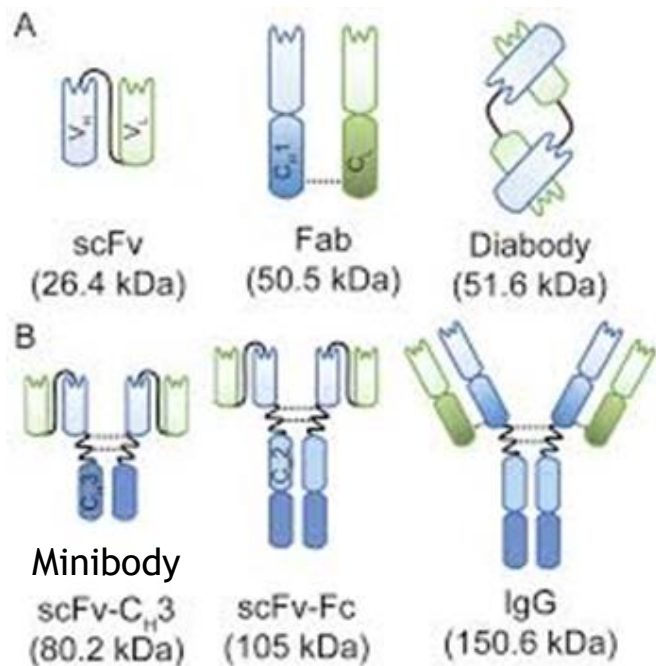
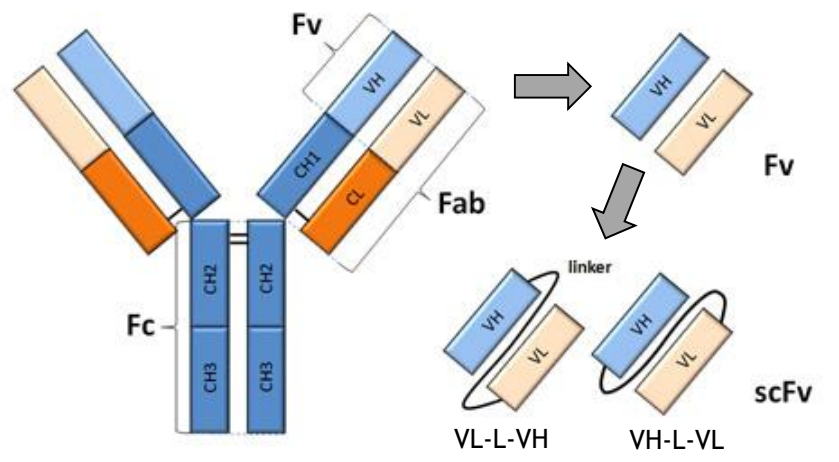


Figure S 1 Crovalimab Mode of Action

抗体片段及衍生物 (主要为抗体片段及scFv衍生物)

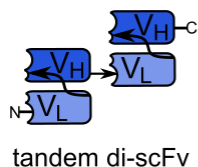


从抗体可变区到scFv的演变

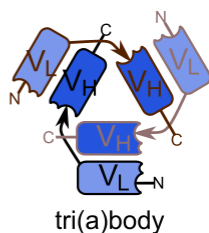
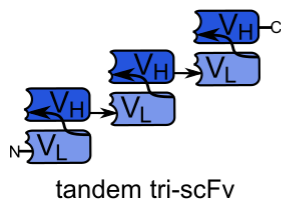


scFv的结构特点:

- VH放在VL前面或者后面影响不大, 都非常常见, tag既可以放N端也可以放C端, 一般C端多一些;
- Linker的长度一般15-20个氨基酸比较好, 太短会倾向于生成Diabody和Triabody, 太长容易引起酶降解或者VL/VH结合不牢靠;
- 最常见的linker序列是GGGGS (or G4S or Gly4Ser)的多个重复, 比如最原始的15-mer (G4S) 3, 后来的18-mer GGSSRSSSSGGGGSGGGG, 以及20-mer (G4S) 4, 另外也有很多其它序列报道;
- scFv的cDNA序列可以通过两步overlapping PCR构建。



二价衍生物

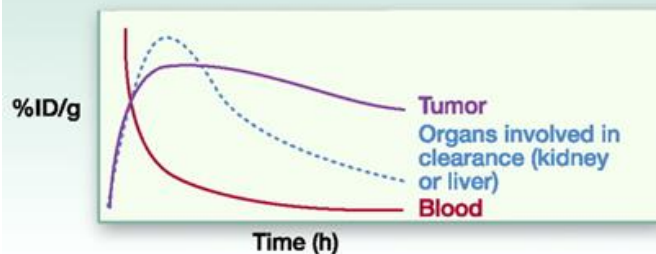


三价衍生物

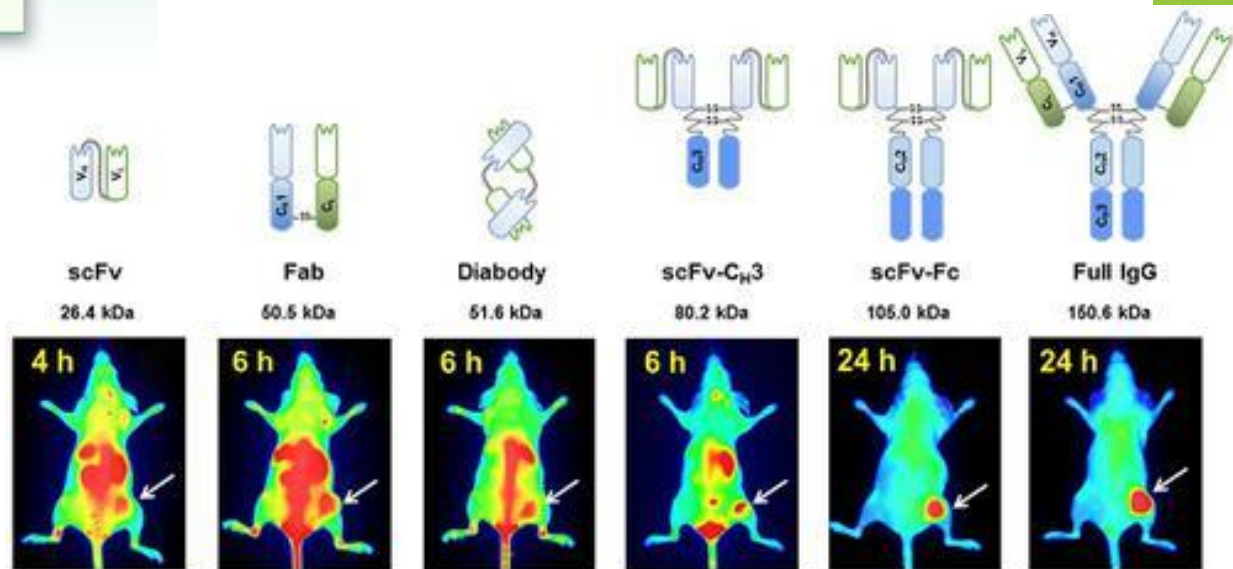
抗体片段及衍生物



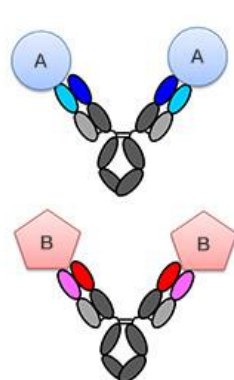
在肿瘤部位的富集与血中半衰期直接相关



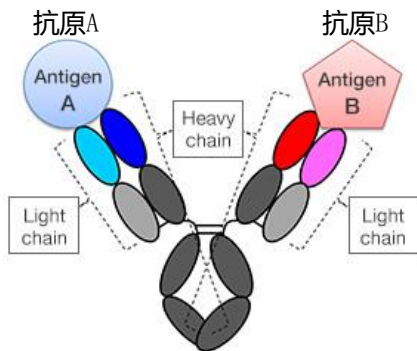
完整的Fc区可以大大增强衍生物的血中半衰期



双特异性抗体 (Bispecific antibody)



Conventional IgG antibody
传统抗体

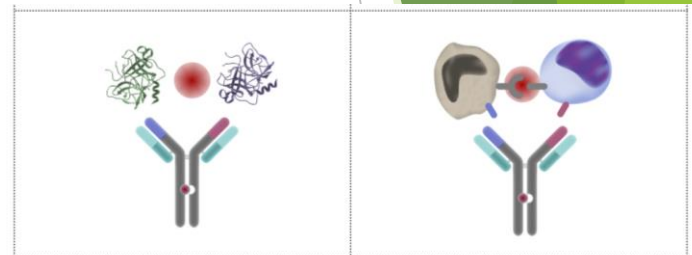


Asymmetric bispecific IgG antibody
双特异性抗体

双特异性抗体是指能同时特异性结合两种抗原或两个表位的抗体分子。

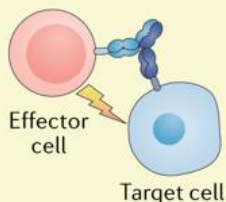
两种基本作用模式：

- (1) 同时结合两个不同的抗原表位
- (2) 同时靶向肿瘤细胞与效应细胞



双特异性抗体的应用场景：

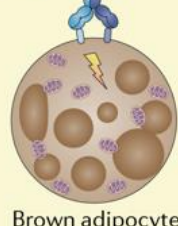
a Bridging cells (in-trans) 桥连细胞



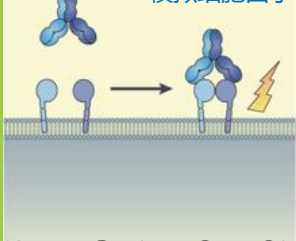
b Receptor inhibition (in-cis) 阻断受体



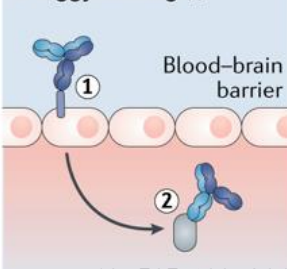
c Receptor activation (in-cis) 桥连激活受体



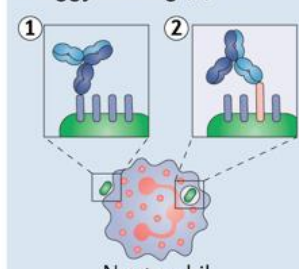
d Co-factor mimetic 模拟细胞因子



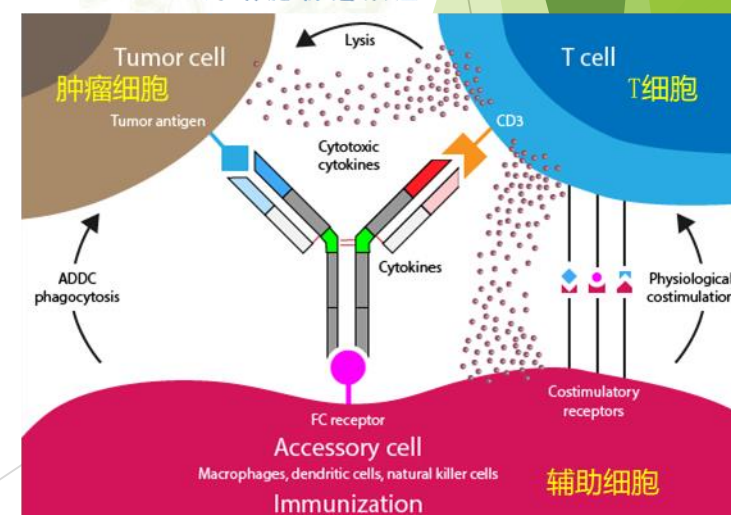
e Piggybacking (I)



f Piggybacking (II)

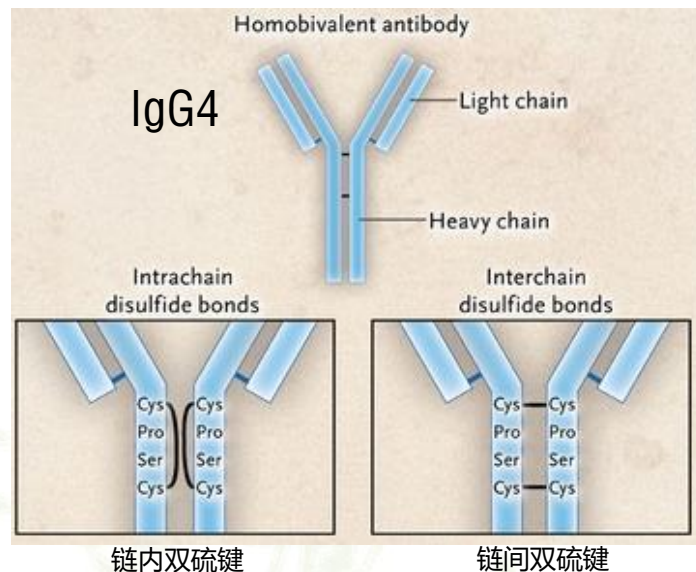
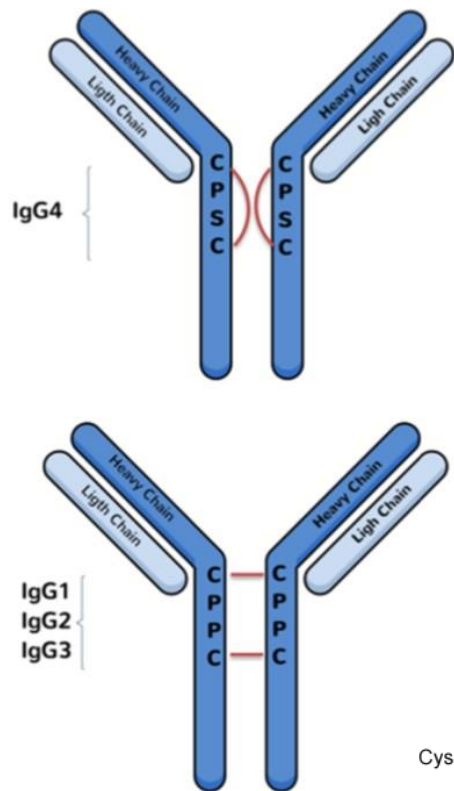


Catumaxomab 的细胞桥连效应

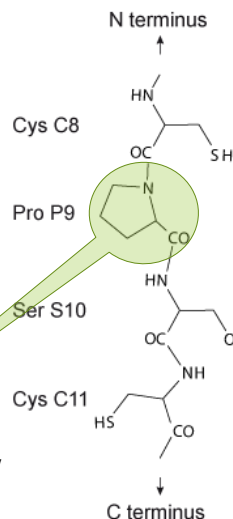


天然双特异性抗体IgG4的形成机制

IgG4与其他IgG亚型的不同



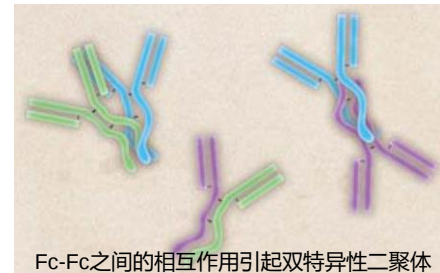
IgG4链内与链间双硫键的动态平衡



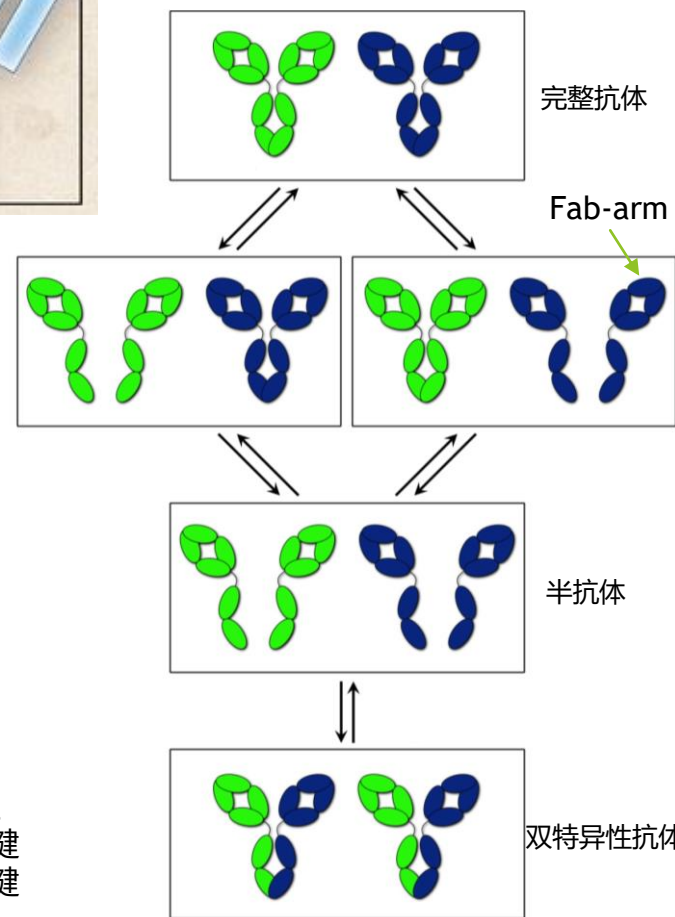
Proline的侧链扭矩很大，是有名的2维结构破坏者

Pro-Pro的扭矩较大不能形成链内双硫键而Pro-Ser的扭矩小，可形成链内双硫键

IgG4的三种双特异性结构模式



IgG4的Fab-arm exchange机制

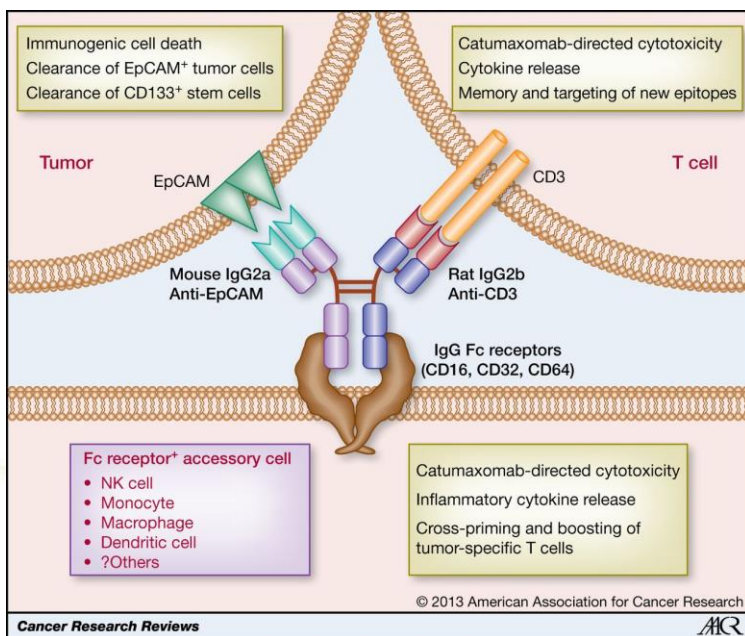


双特异性抗体应用实例

国内外双特异性抗体的开发和资本运作非常火热

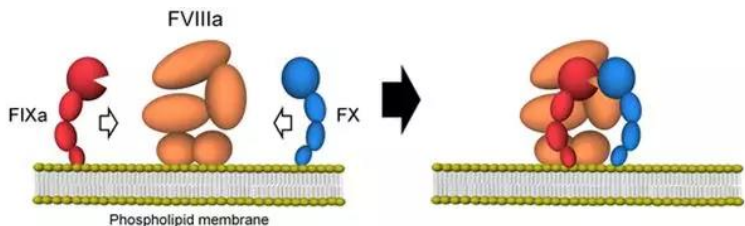
武汉大学博士课程

- Catumaxomab** 是 bispecific T-cell engaging (BiTE) antibody，一端结合肿瘤抗原EpCAM，另一端也结合T细胞的CD3，Fc结合CD16A（效应细胞表面Fc受体），增强ADCC效应。

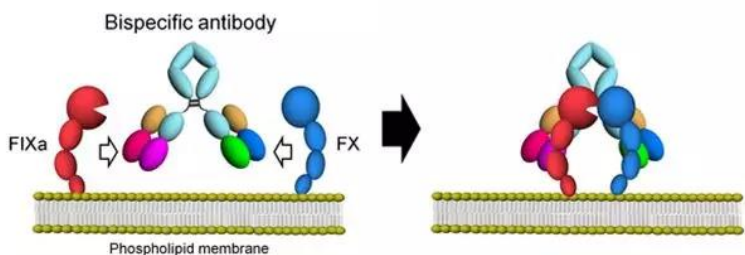


Cancer Res. 2013 Sep 15;73(18):5613-7

- Emicizumab** 模拟凝血因子VIIIa，用于A型血友病的出血预防治疗，年销售额10亿美元



凝血因子VIIIa同时结合FIXa和FX激活，激活凝血途径

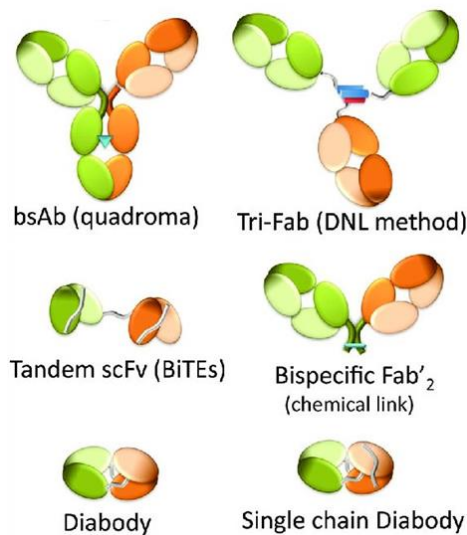


双特异性抗体Emicizumab模拟FVIIIa的功能，实现激活凝血途径的功能。

时间	出让方	引进方	项目	首付款	总额
2018/1/8	Merus	先声药业	利用 Merus 专有的 Biconics® 技术平台开发和商业化多种双特异性抗体	NA	NA
2018/1/17	岸迈生物	信达生物	多个靶标的双特异性抗体开发、技术转让	NA	1.20
2018/4/22	Inhibrx	科望生物	ES101 (INBRX-105)	NA	NA
2018/4/23	岸迈生物	特瑞思药业	针对肿瘤治疗的双特异性抗体项目 FIT012/TRS008	NA	NA
2018/7/13	上海衍绎	步长制药	CD19×CD3 Fc 双特异性抗体分子 B-193	NA	0.70
2018/8/7	Glenmark	和铂医药	TJD5 及数个双特异性抗体	NA	1.20
2018/9/26	药明生物	天境生物	利用 WuXiBody 开发三个双抗	NA	NA
2018/11/27	Zymeworks	百济神州	两款在研 HER2 靶向双特异性抗体药物	0.40	3.90
2018/11/27	Zymeworks	百济神州	在 Azymetic™ 和 Efect™ 平台进行至多三种其他双特异性抗体	0.20	7.02
2018/11/28	药明生物	ABL Bio	8 个抗体新药独家研发与临床生产战略合作	NA	2.20
2018/11/30	天境生物	TRACON	CD73 抗体 TJD5 及未来数个双特异性抗体	NA	NA
2018/11/30	MacroGenics	再鼎医药	Margetuximab，双抗 MGD013 和处于临床前的多特异性分子 TRIDENT	0.25	1.65
2018/12/10	药明生物	腾盛博药	包括 WuXiBody™ 双抗平台在内的药明生物一体化生物制药技术赋能平台	NA	NA
2018/12/10	药明生物	安科生物	一种针对肿瘤免疫治疗的全新双特异性抗体药物开发的各环节展开合作	NA	NA
2019/1/2	药明生物	正大天晴	某双特异性抗体	NA	NA
2019/1/10	Merus	贝达药业	EGFR 和 c-Met 双靶点的双特异性抗体	NA	NA
2019/2/12	TeneoOne	艾伯维	独家选择权收购 TeneoOne，领导 TNB-383B 后续的全球开发和推广	0.9	NA
2019/3/4	Abpro	正大天晴	利用 Abpro 抗体发现平台 DiversImmune 开发多种双特异性抗体疗法	0.6	40
2019/2/5	默克	GSK	针对 TGF-β 和 PD-L1 靶点的双功能抗体	NA	NA

双特异性抗体

Bispecific T-cell engagers (BiTEs)



mAbs 2009 1(6):539-47

常见双特异性分子及临床开发情况

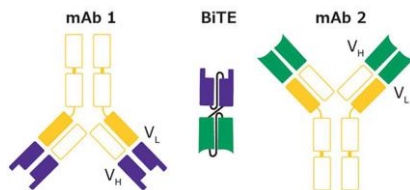
Name	Format	Target	Cancer type	Stage	Ref.
MDX-210	(Fab') ₂	HER2 × CD64	Breast/ovarian	Phase I	13
MDX-H210	(Fab') ₂	HER2 × CD64	Breast/ovarian	Phase I	9
MDX-447	(Fab') ₂	EGFR × CD64	Lung, colorectal...	Phase I	12
HRS-3/A9	(Fab') ₂	CD30 × CD16	Hodgkin Disease	Phase I	14, 15
Her2Bi	Cross-linked IgGs	HER2 × CD3	Breast/prostate	Phase I/2	19
CD20Bi	Cross-linked IgGs	CD20 × CD3	Multiple myeloma	Phase I	*
Catumaxomab	Triomab	EpCAM × CD3	Malignant ascites	EMEA appr.	27
Ertumaxomab	Triomab	HER2 × CD3	Metastatic breast	Phase 2	29
Bi20	Triomab	CD20 × CD3	B-cell malignancies	Phase I	32
rM28	Dimeric TaFv	NG2 × CD28	Melanoma	Phase I/2	40
Blinatumomab	BiTE	CD19 × CD3	NHL and B-ALL	Phase I and 2	54
MT110	BiTE	EpCAM × CD3	Lung, colorectal...	Phase I	55
TF2	DNL triFab	CEA × HSG	Colorectal	Phase I	61

*ClinicalTrials.gov Identifier, NCT00938626.

很多双特异性抗体是抗体片段

比如BiTE (Bispecific T cell engager)

Amgen 专利



- 总数大于90个项目
- 到2019年有3个上市catumaxomab、blinatumomab和caplacizumab
- 90%的双特异性抗体针对肿瘤，包括各种实体瘤
- 有11个项目治理其它疾病，比如黄斑变性、红斑狼疮、银屑病、荨麻疹等

双特异性抗体作用机制

双特异性抗体的双靶点选择主要分四类

1. 以immune cell engager为设计原理 (占比约60%)

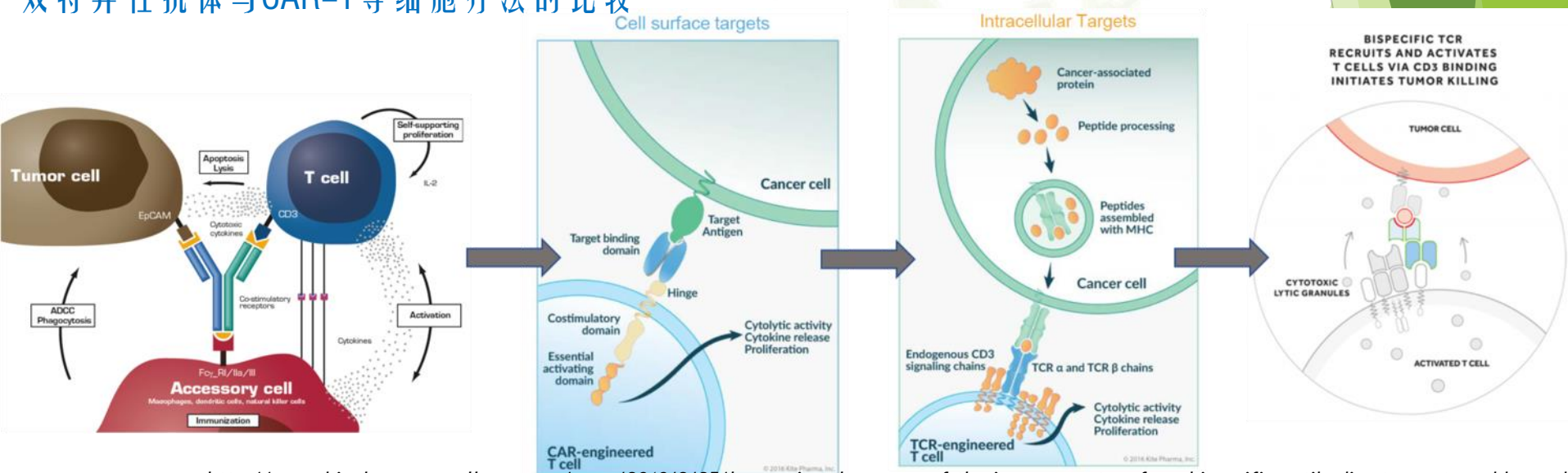
目的是激活和重定位免疫细胞, 促进免疫细胞对癌细胞的杀伤作用。

一个靶点为肿瘤细胞表面抗原,
另一个为, 免疫细胞上的蛋白,

如果招募T细胞, 靶点比如CD3、4-1BB、B7-H3。CD3最常见。

如果招募NK细胞, 靶点可用CD30和CD16A. (Affirmed Therapeutics)

双特异性抗体与CAR-T等细胞疗法的比较



双特异性抗体作用机制

双特异性抗体的双靶点选择主要分四类

2. 两个靶点分别靶向免疫细胞上的两个不同受体

目的是促进免疫细胞的激活或者阻断免疫细胞的受抑制。

比如MGD-013抗体靶向PD-1和LAG-3; MGD009抗体靶向B7-H3和CD3, 从而可以增强T细胞的抗肿瘤活性

3. 两个靶点分别为癌细胞上面的两个靶点

目的是抑制代偿作用或起到协同作用效果。

典型代表是同时靶向c-met和EGFR多个抗体, 包括礼来的LY3164530、强生的JNJ-61186372等, 通过同时阻断EGFR下游的信号通路抑制EGFR对c-met的信号通路的代偿作用, 以期起到更好的杀伤癌细胞的作用。

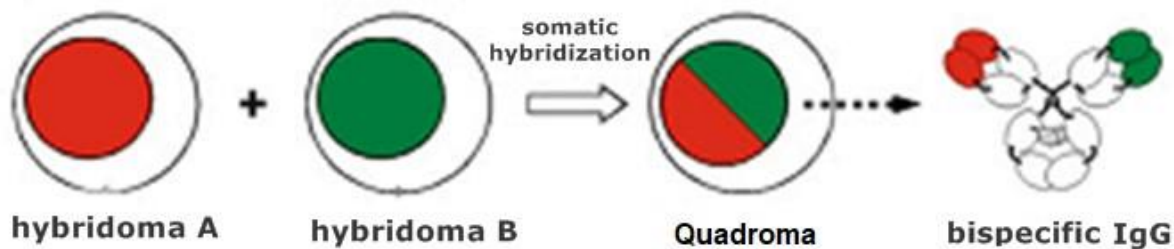
4. 靶向癌细胞表面同一抗原的不同表位, 发挥“1+1>2”的抑制作用

最经典的靶点是HER2/neu基于单个抗体的双表位的抑制体现出的效果超出单纯叠加作用的新机制和更好的效果。相关项目不下5个。

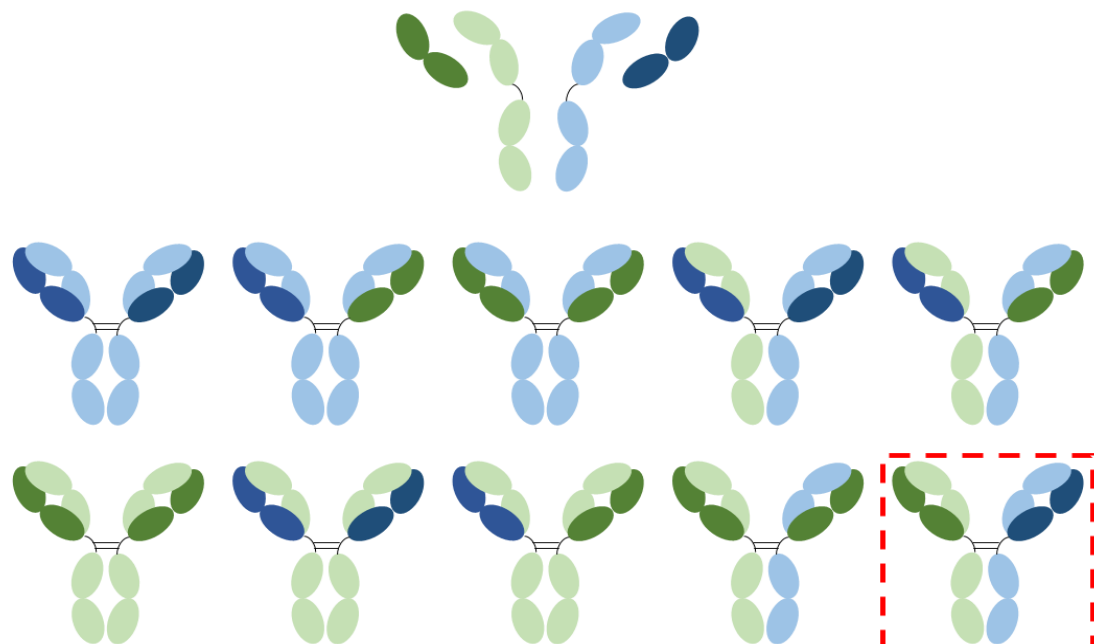
双特异性抗体构建方法

- 常规方法（Quadromas），即杂交-杂交瘤技术（Hybrid-hybridoma Technology）

四杂交瘤（Quadroma）技术诞生于1983年，融合2种杂交瘤细胞可制备双特异性抗体。



- 四杂交瘤细胞分泌的抗体组合模式

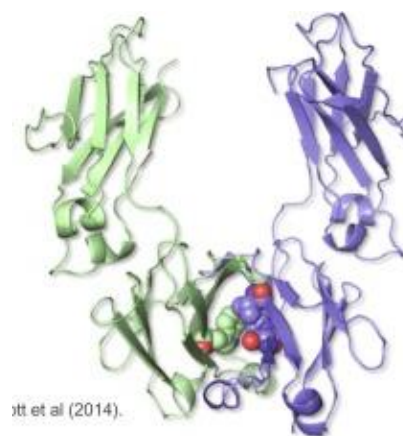
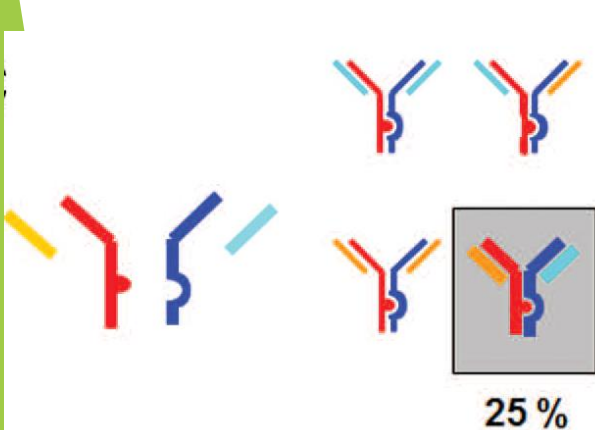
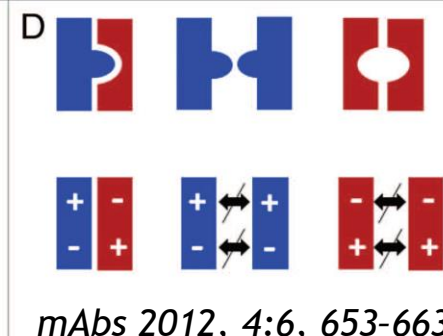
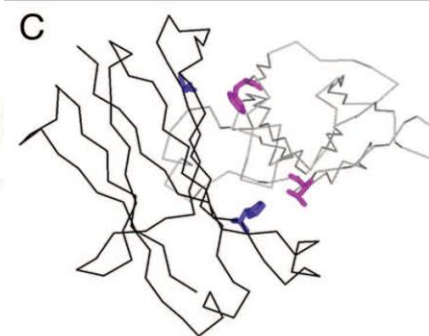
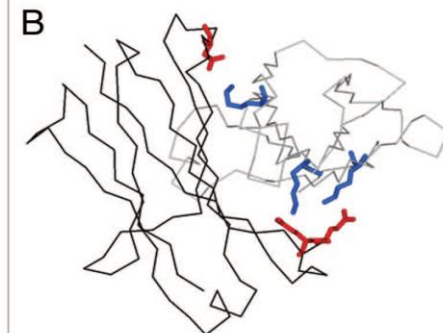
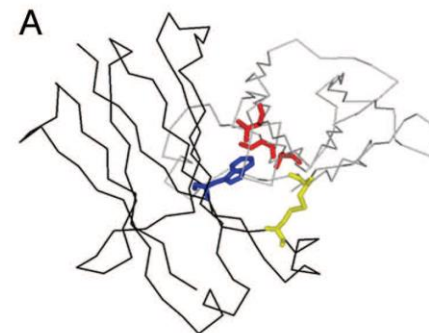
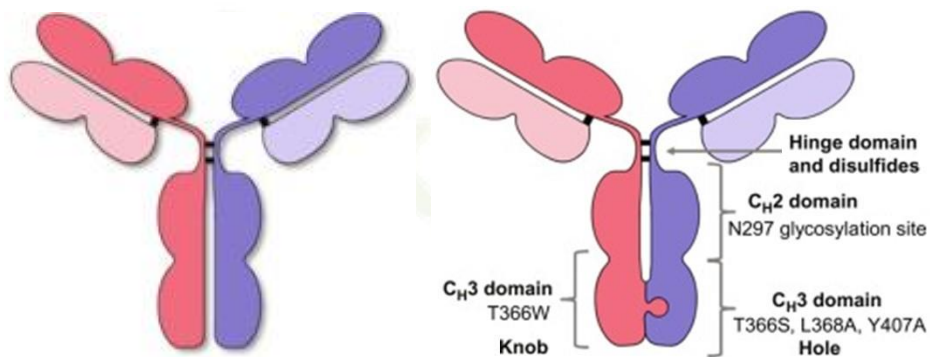


12.5%

四杂交瘤细胞可以分泌生成4个抗体组件（2种轻链和两种重链），总有16种可能的组装模式。其中有6种是重复的，包括期望的双特异性抗体，所以总共有10种可能。目标抗体的总产率是12.5%（6.25%×2）。所有组装模式中仅有目标抗体有双特异性。

双特异性抗体构建方法

- Knob in Hole 技术 口袋



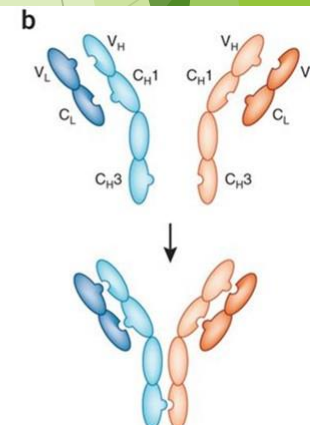
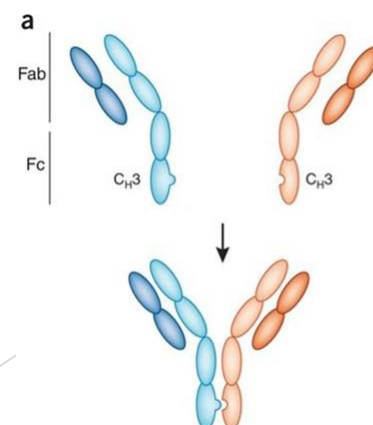
a

Fab

Fc

C_H2

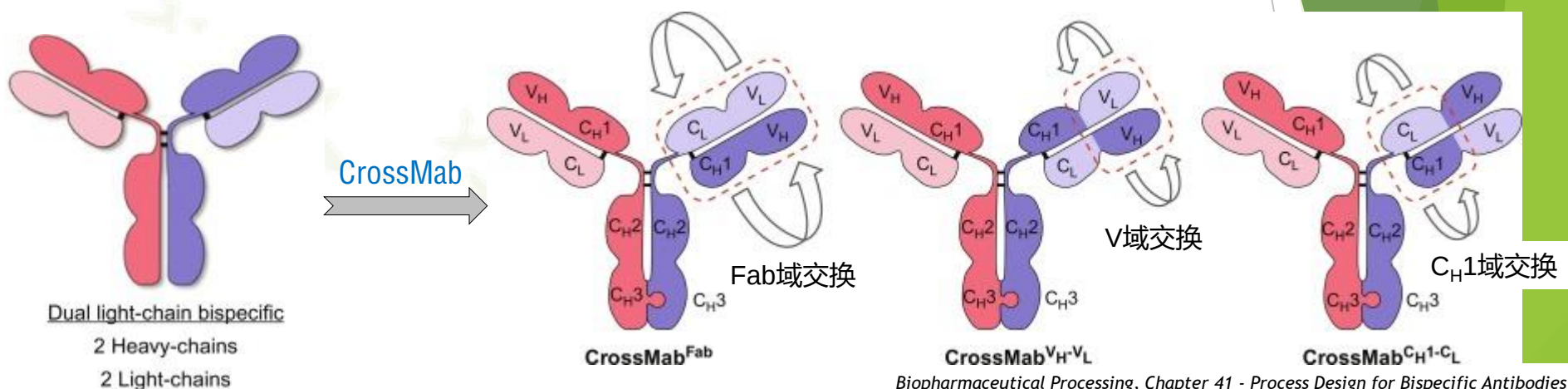
C_H3



双特异性抗体构建方法

• CrossMab 技术 域交换

CrossMab技术是Roche公司（罗氏制药）在2010年左右开发的双特异性抗体构建方法，相对于1997年出现的Knob in hole技术，CrossMab技术是一个更新的技术。但是这两种技术各有优劣，一般可以结合应用，更好的构建双特异性抗体。

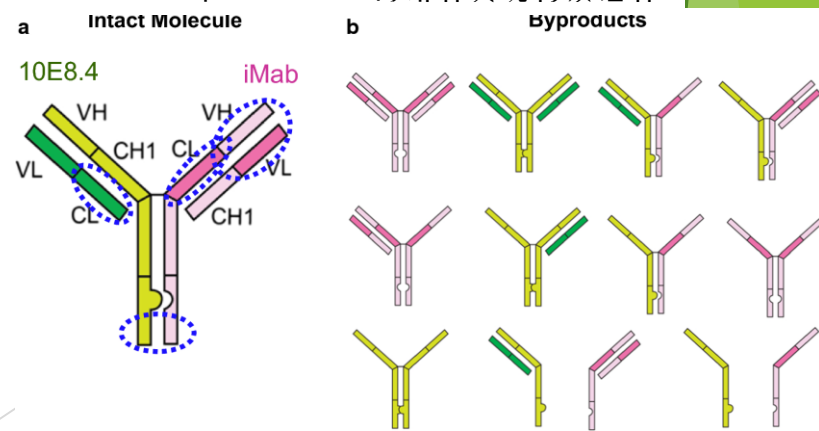


Biopharmaceutical Processing, Chapter 41 - Process Design for Bispecific Antibodies

缺点:

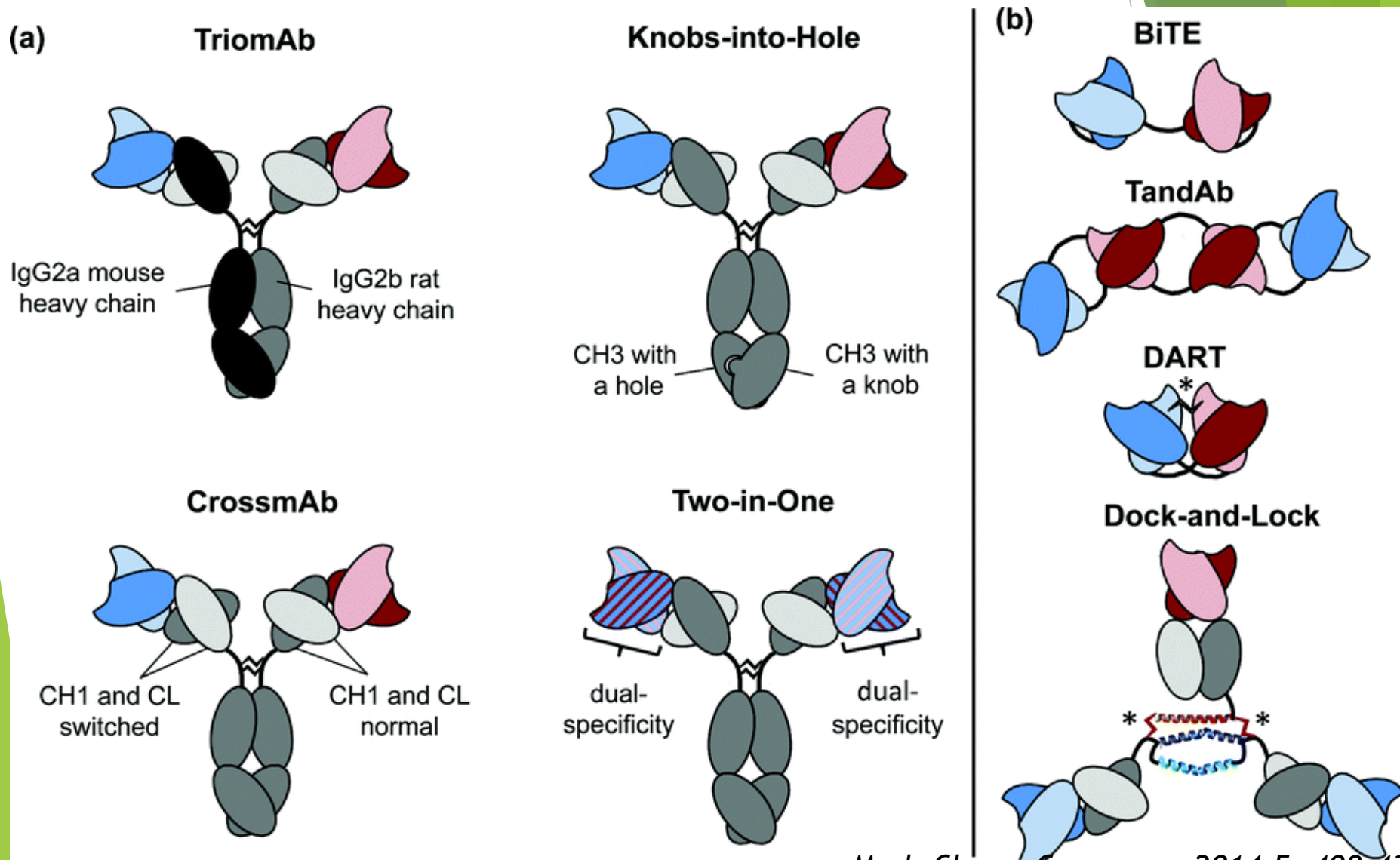
- 一个抗体上面可用的次数和地方有限
- 域交换后有较大产生免疫反应的风险
- 域交换有可能对抗体的稳定性产生负面影响

Knob in hole 和 CrossMab 的结合实现高效组合

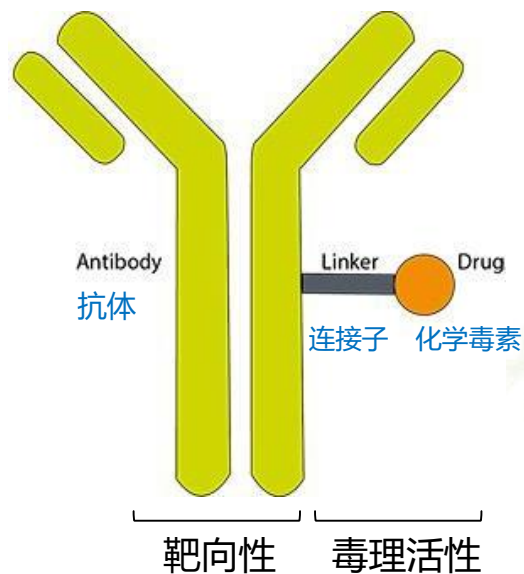


双特异性抗体构建方法

双特异性抗体的其它构建方法



抗体-药物偶联技术



由重组单克隆抗体 (mAb) 通过合成接头共价结合细胞毒性化学物质 (称为弹头) 组成, 不仅具有高度细胞毒性的小分子药物的抗肿瘤效力, 也结合了mAb的高选择性, 稳定性和有利的药代动力学特征。

抗体-药物偶联物有三个重要部件组成: 单克隆抗体、连接子和化学毒素弹头。

- 抗体主要提供高度靶向性, 并利用其Fc域提供一个长循环的药代动力学优势。
- 连接子链接药物, 决定链接的选择性, 化学药物释放方式
- 化学毒素是对抗体的杀细胞效果的增强, 往往选择强毒性化合物, 起主要的杀癌细胞效果。

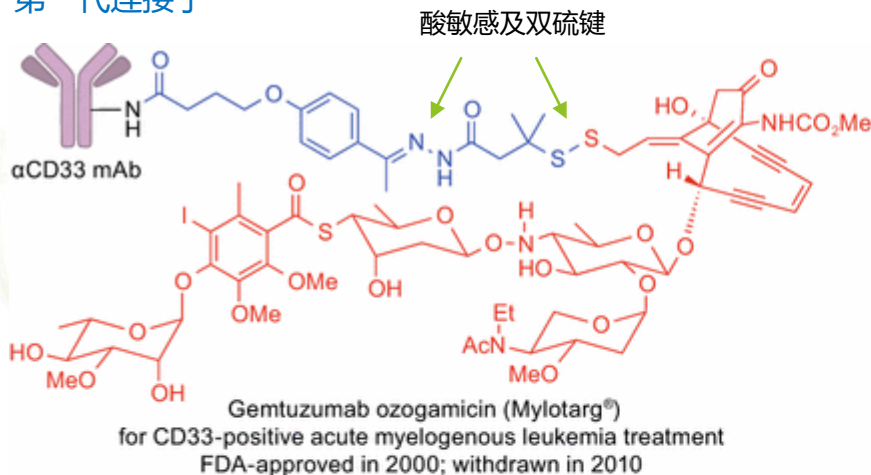
附表.FDA已批准的抗体药物偶联物, 更多的在临床试验

Name	Ingredients	Company	Target	Indications	Approval date
Mylotarg	Gemtuzumab Ozogamicin	Pfizer	CD33	Acute myeloid leukemia	May 2000 September 2017
Adcetris	Brentuximab Vedotin	Seattle Genetics	CD30	Hodgkin's Lymphoma, anaplastic large cell lymphoma	August 2011
Kadcyla	Ado-Trastuzumab Emstansine	Roche	HER-2	Breast cancer	February 2013
Besponsa	Inotuzumab Ozogamicin	Pfizer	CD-22	Acute lymphoblastic leukemia	August 2017

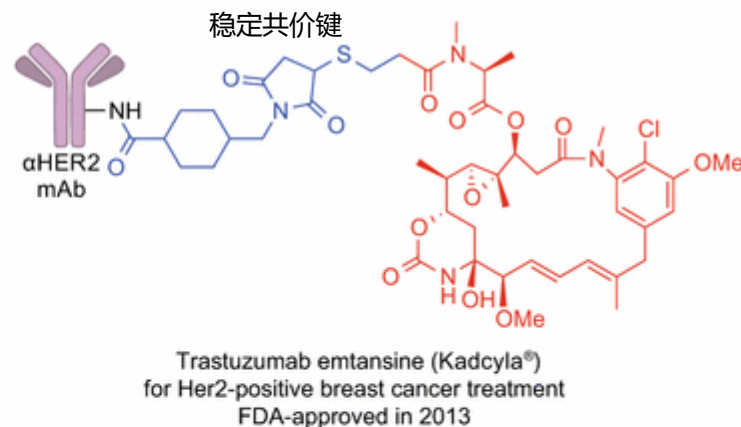
抗体-药物偶联技术

经典连接子

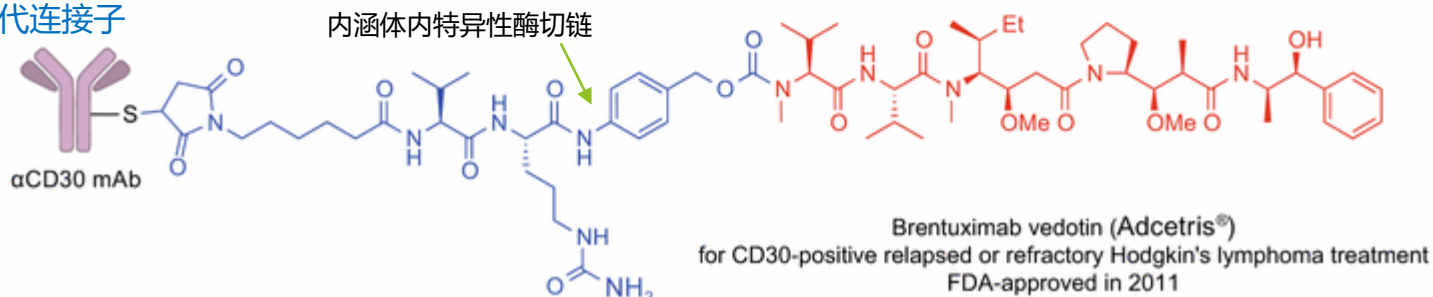
第一代连接子



第二代连接子



第三代连接子

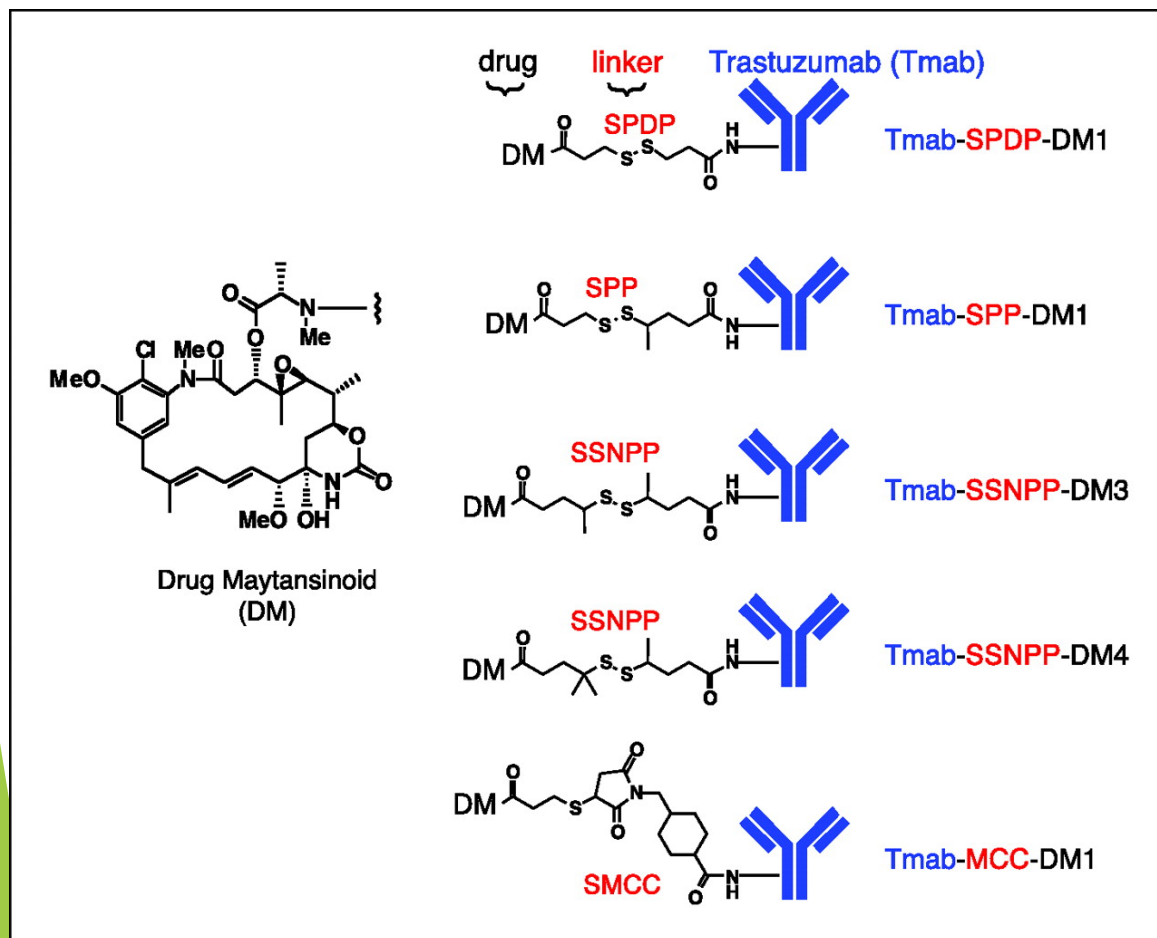


连接子:

- 酸切断
- 还原切断
- 酶切断
- 不可切断

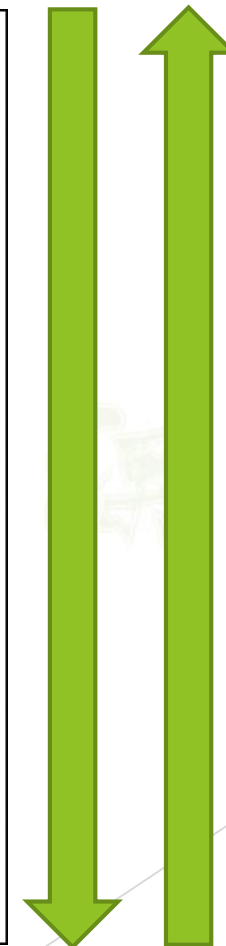
抗体-药物偶联技术

连接子的稳定性非常重要



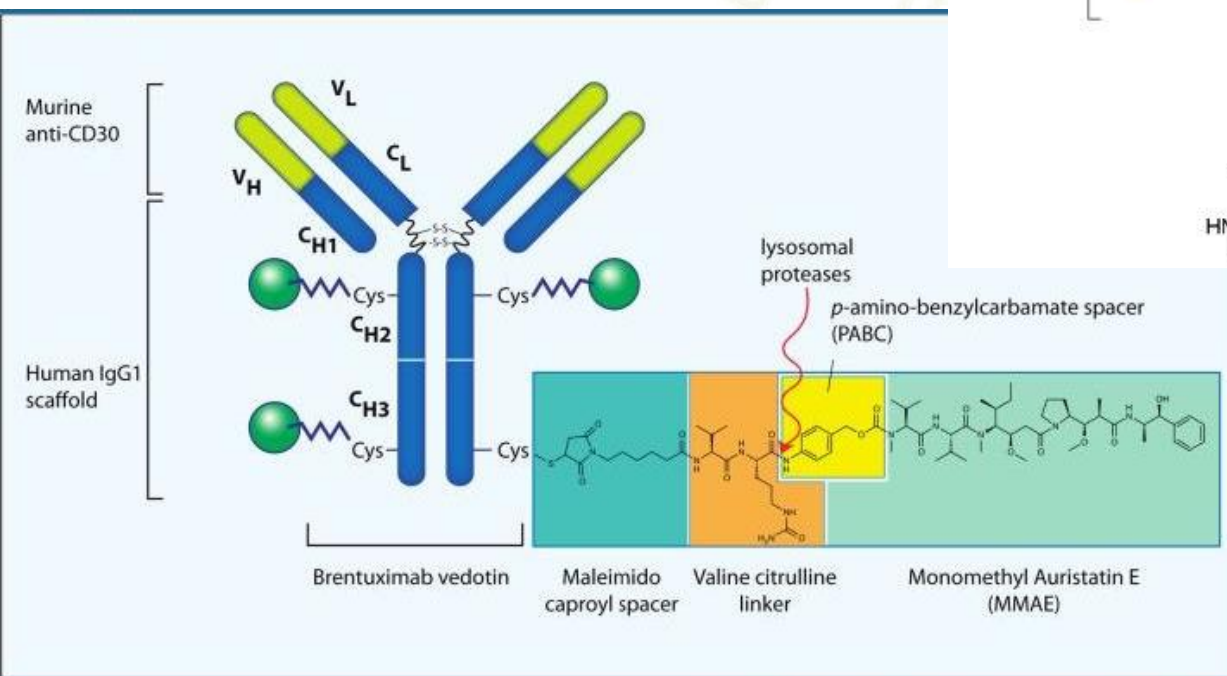
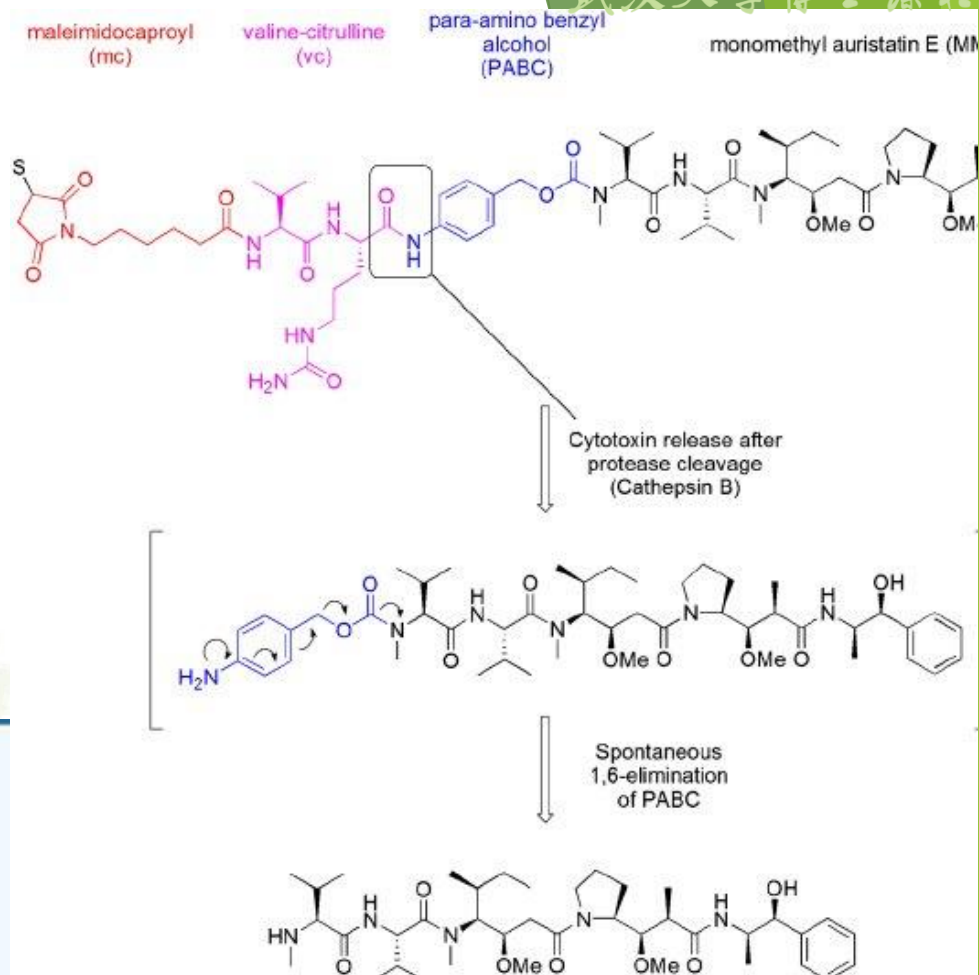
稳定性

毒性



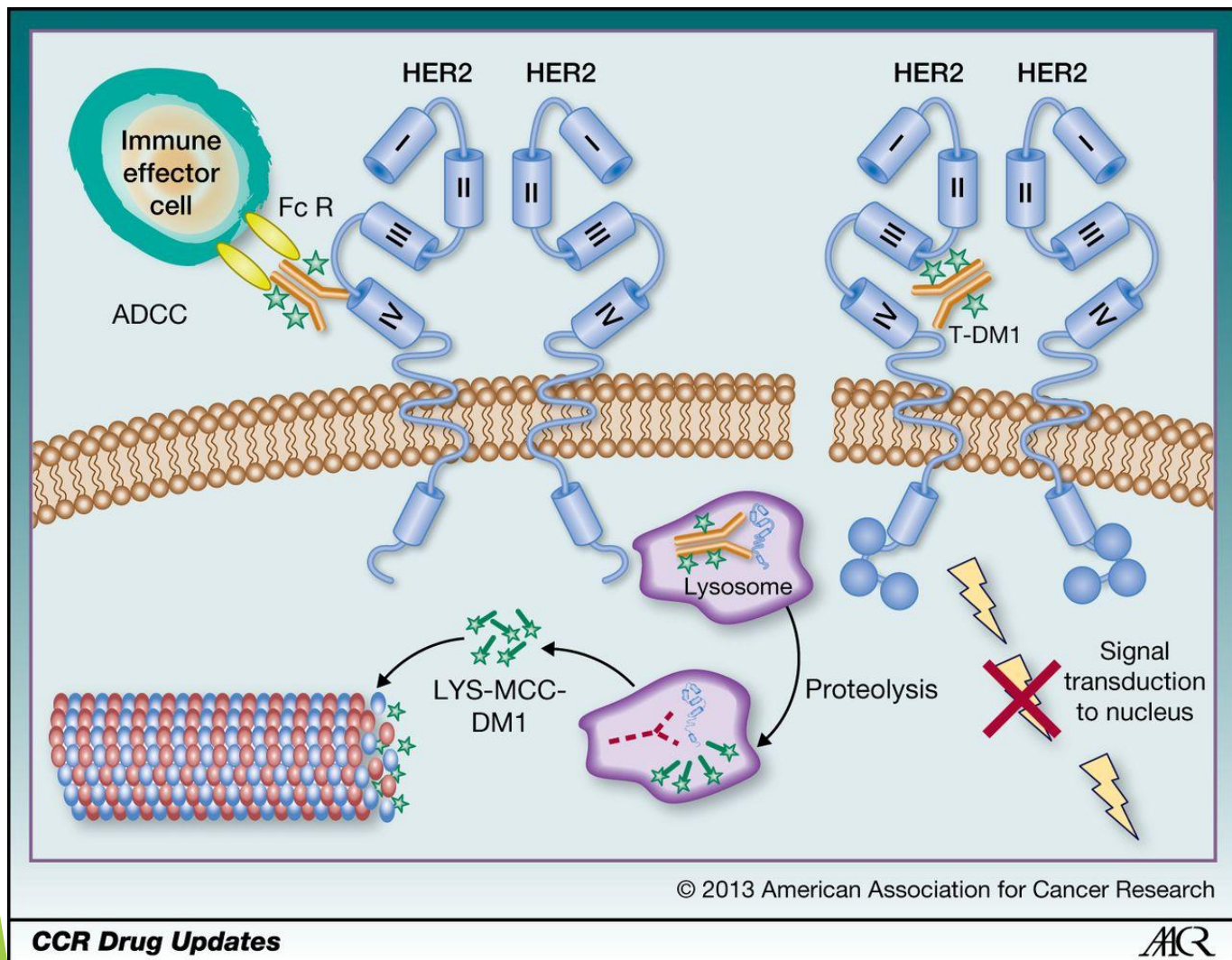
抗体-药物偶联技术

Val-Cit-PAB技术



抗体-药物偶联技术

作用机制：化学毒素的杀细胞作用与抗体阻断作用的联合作用



常用化学毒素

最强的化学毒素:

$IC_{50} : 10^{-10} \sim 10^{-11} M$

微管蛋白抑制剂

MMAE

DM1/DM4

DNA烷化剂

Calicheamicin

Anthracyclines

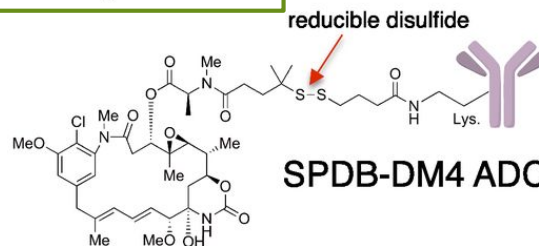
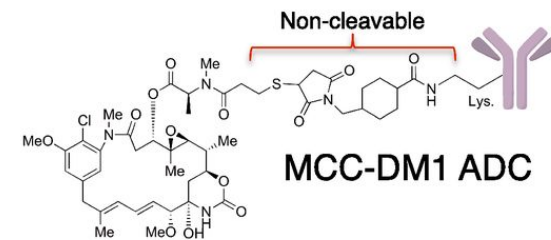
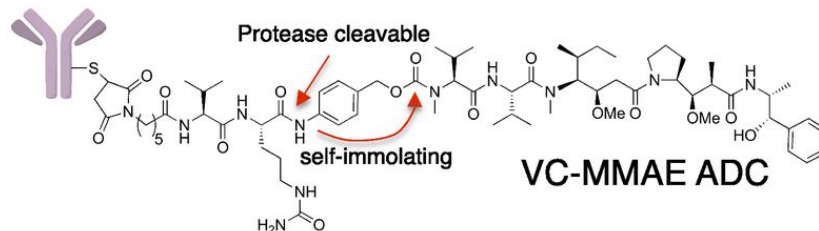
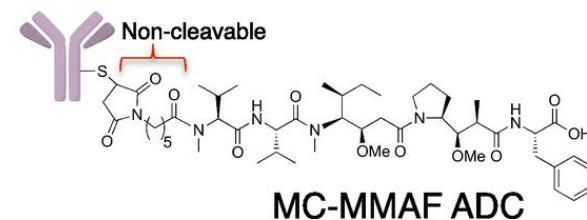
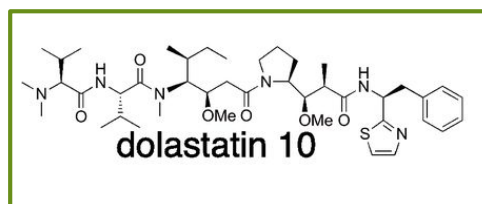
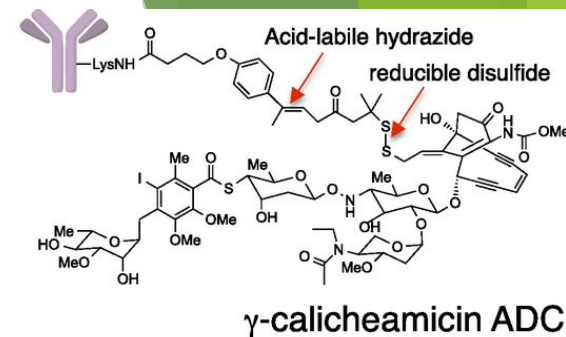
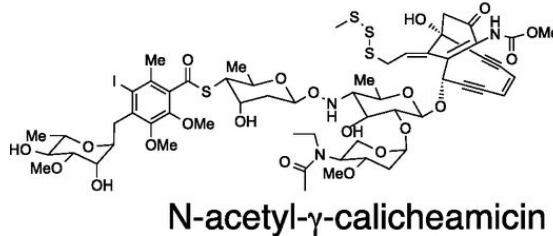
Duocarmycins

Pyrrolobenzodiazepines

抗体-药物的最佳偶联比例:

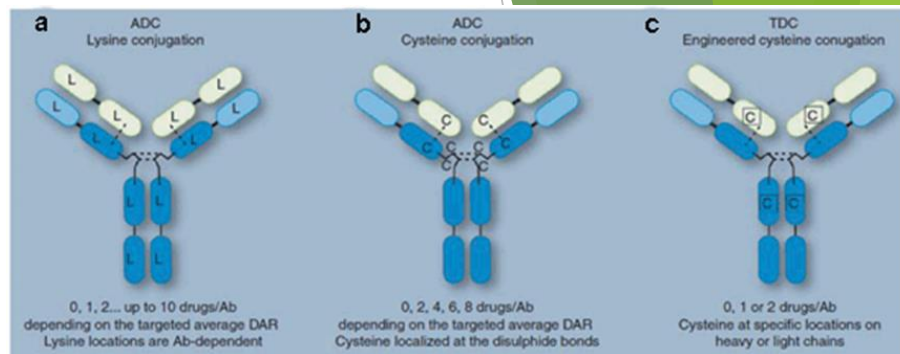
1:4 (magic ratio)

每个抗体分子偶联2-4个药物分子

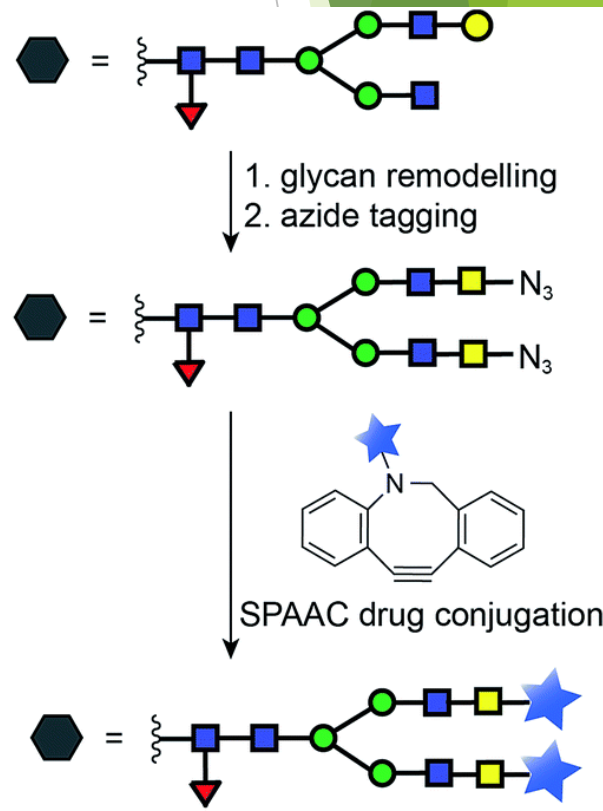
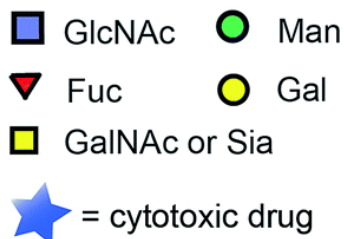
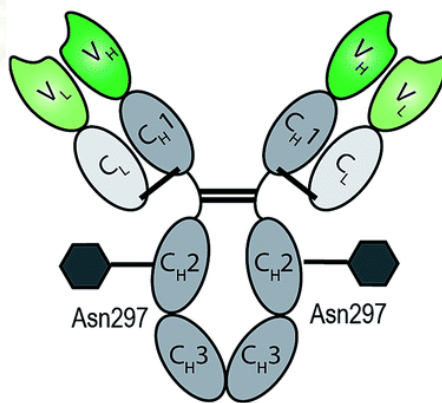


抗体-药物偶联方法

- 直接标记到抗体表面氨基或者游离的巯基



- 酶催化定点标记



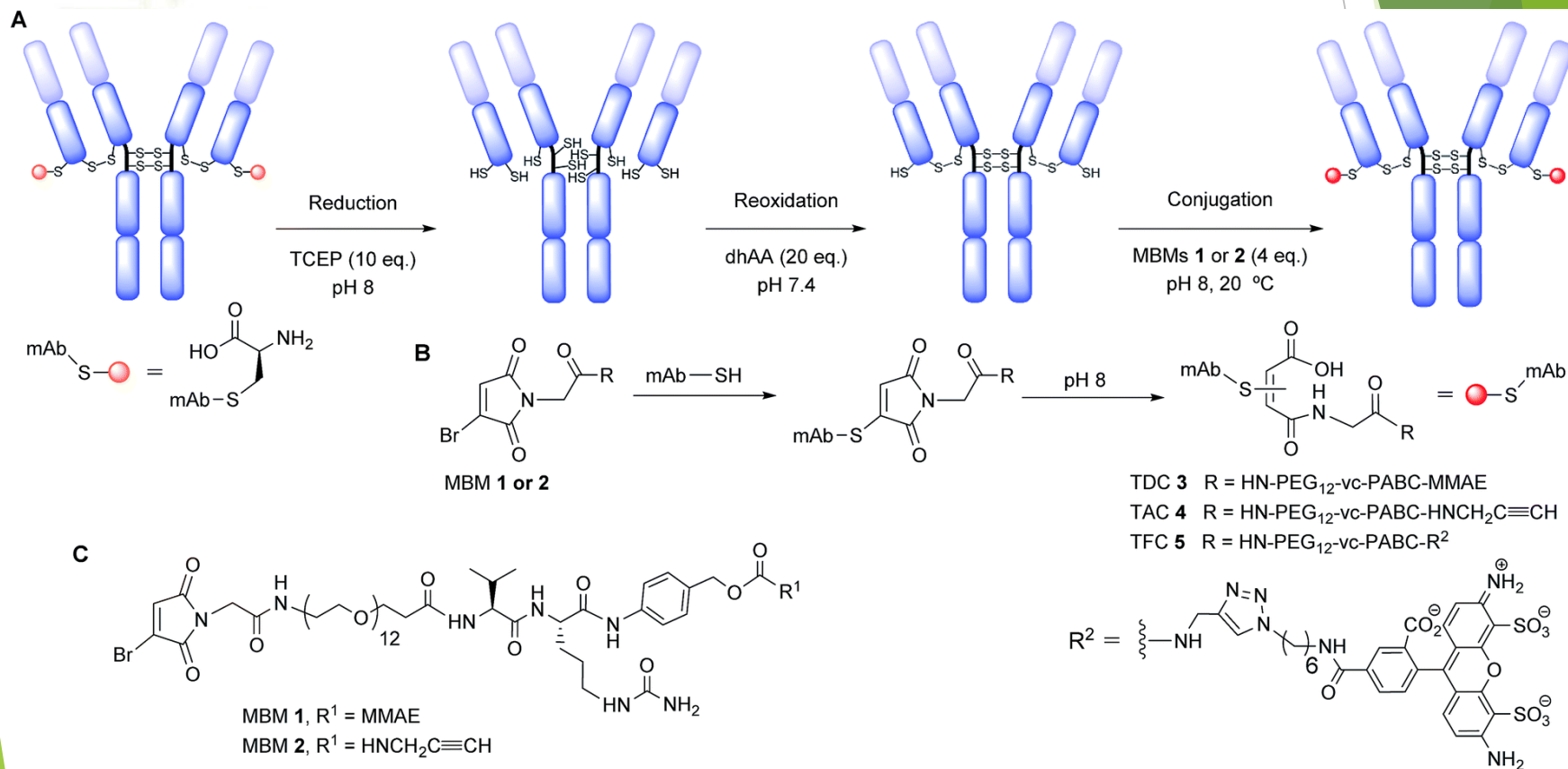
- 糖基标记

抗体-药物偶联方法

• THIOMAB™ 技术 (Roche, 罗氏制药)

优点：定点标记、偶联标记的药物少、偶联物稳定

缺点：需要在特定位点基因突变为Cys



融合抗体

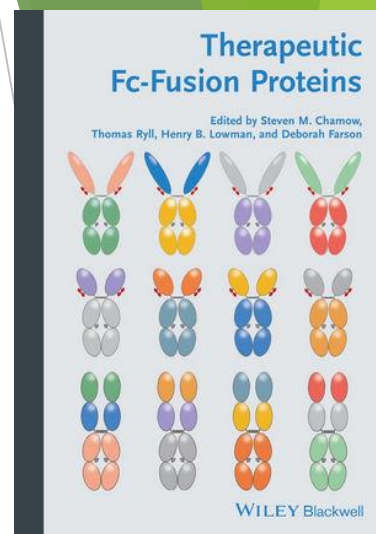
在抗体上面或者抗体片段上面，在基因层面上融合其它功能蛋白质，实现治疗目的。

最常见的是在融合其它蛋白质在抗体的Fc上面，即Fc融合蛋白。

参考书目：

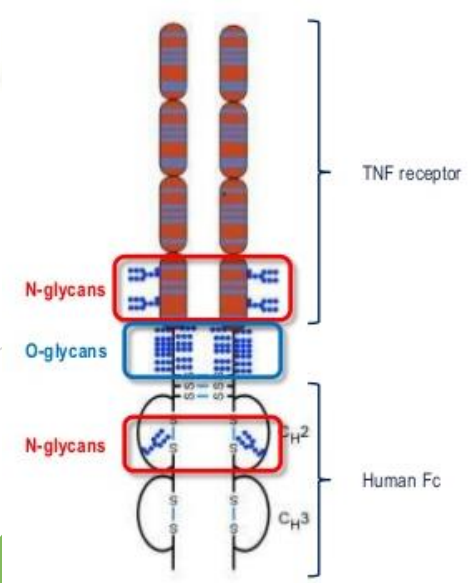
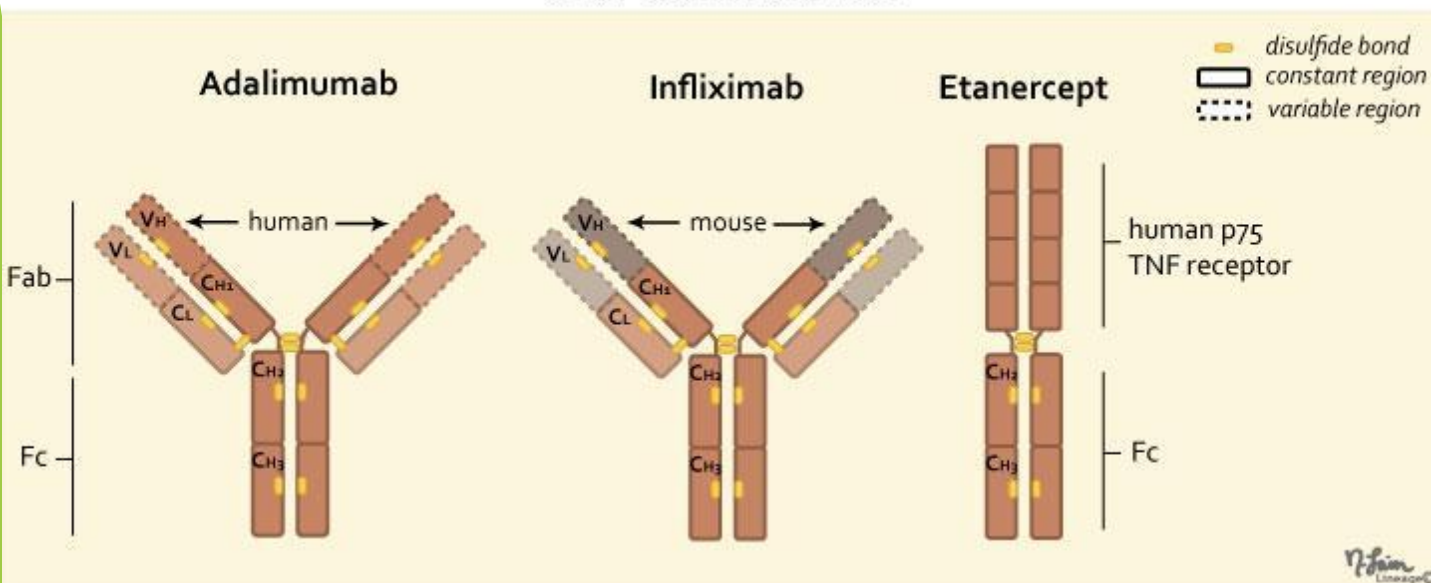
Therapeutic Fc-Fusion Proteins

Steven M. Chamow (Editor) ISBN: 978-3-527-33317-2 March 2014 Wiley-Blackwell
400 Pages

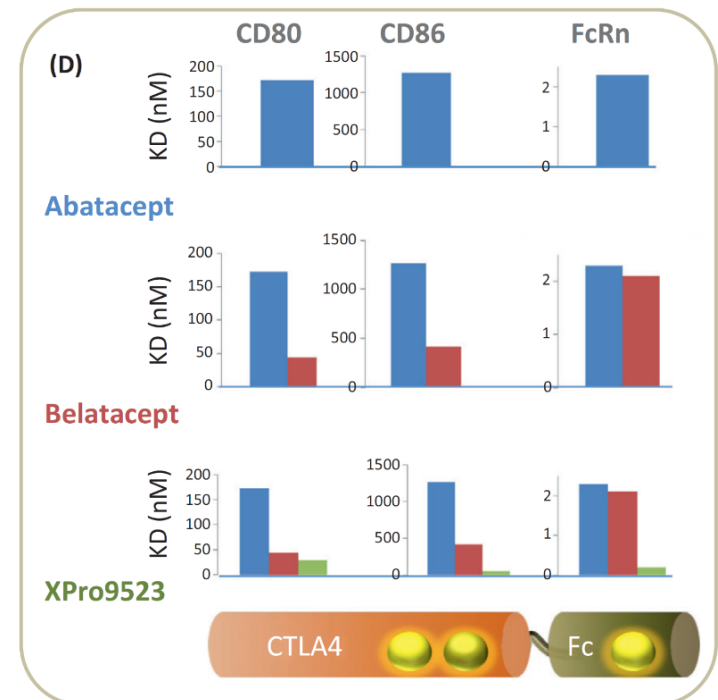
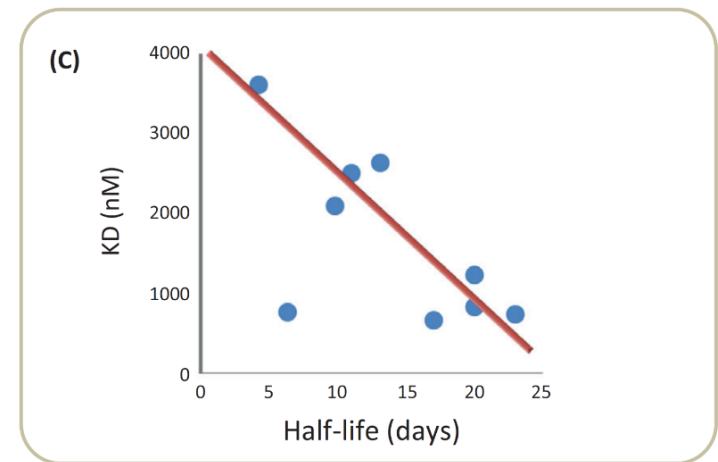
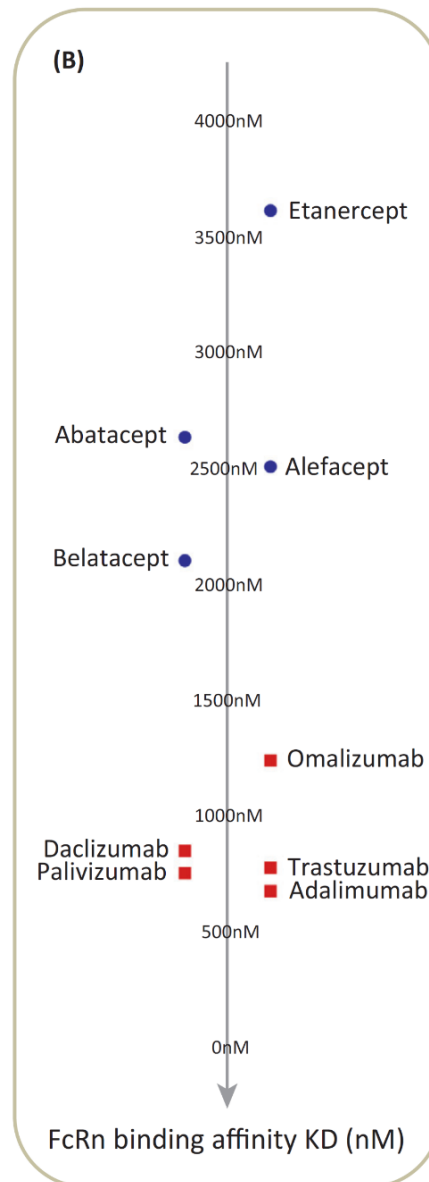
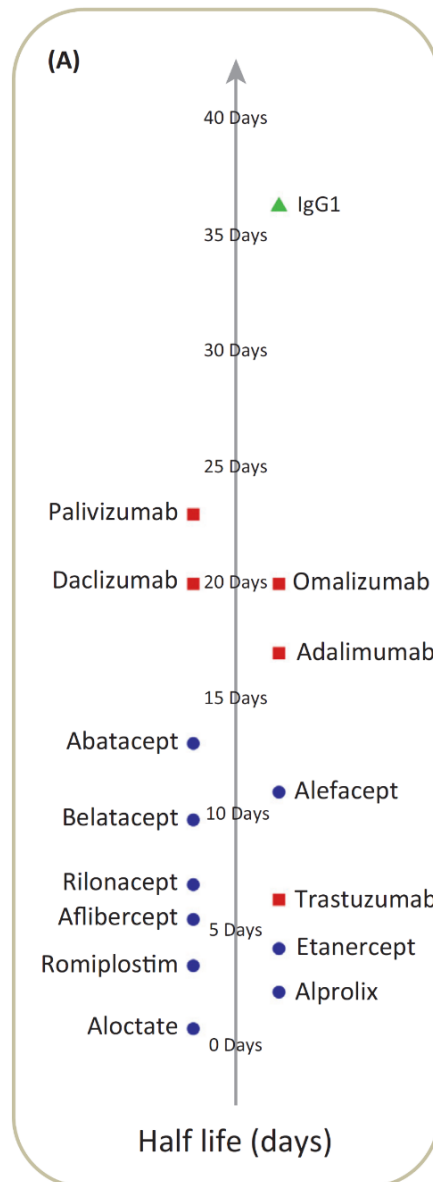


经典案例

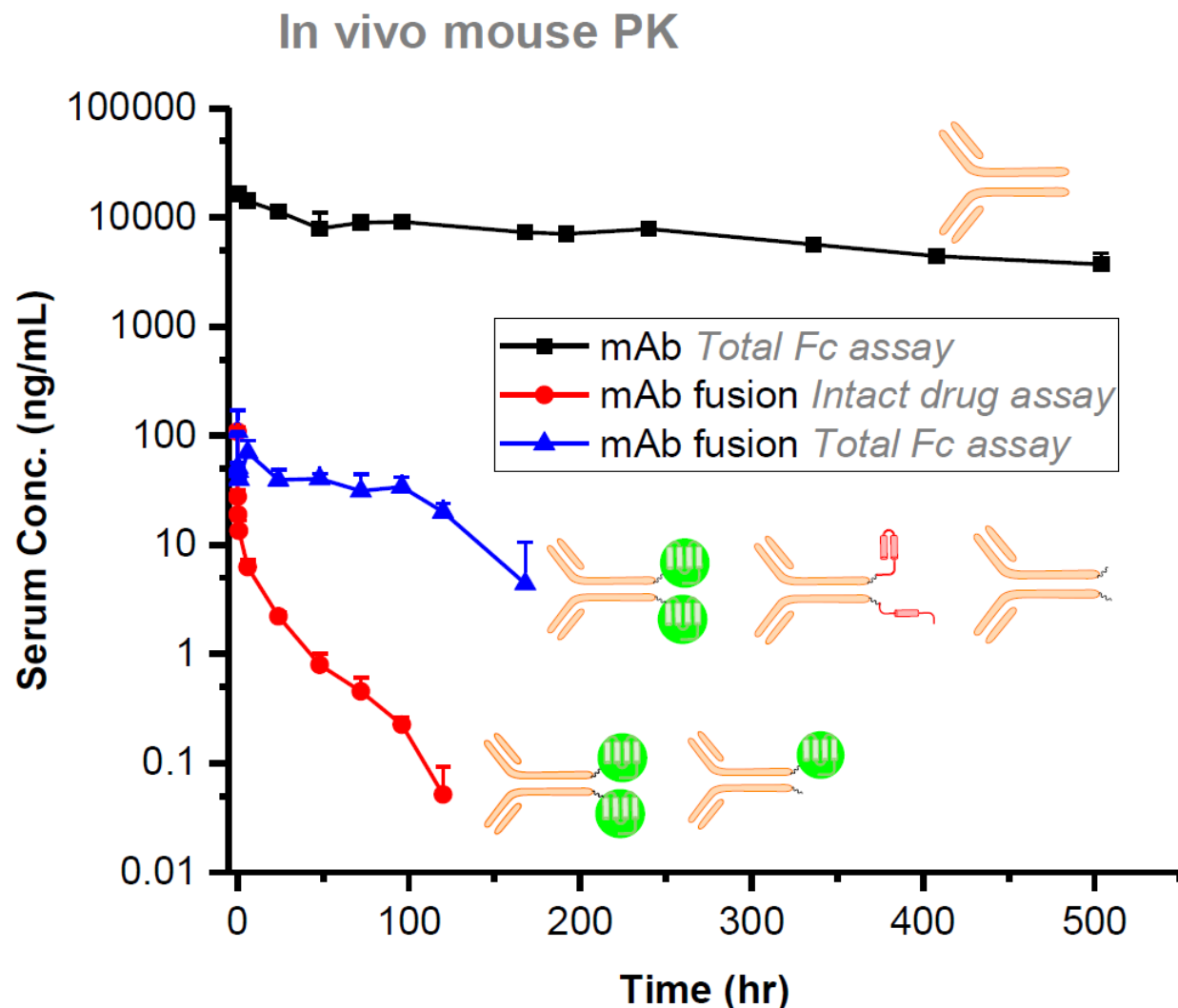
TNF- α Inhibitors



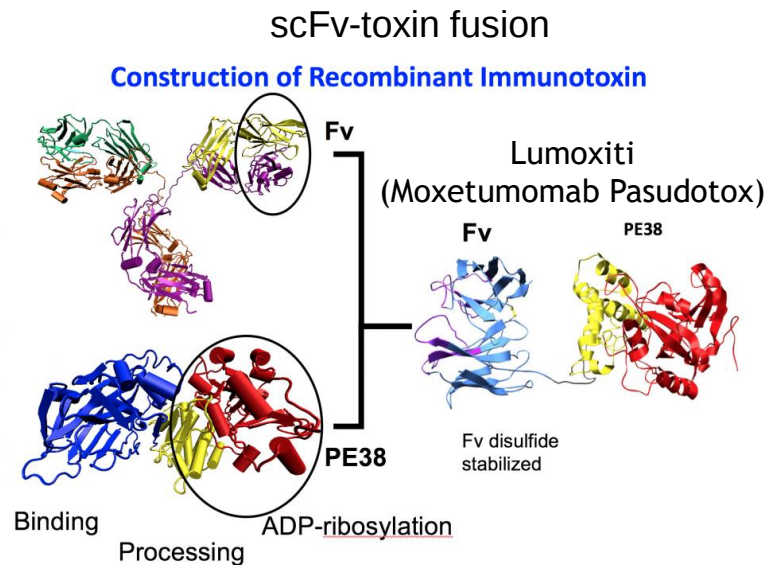
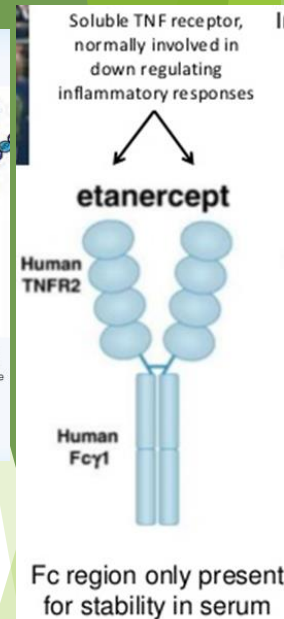
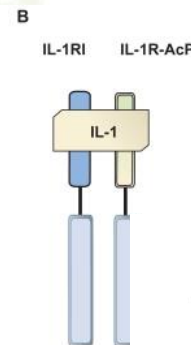
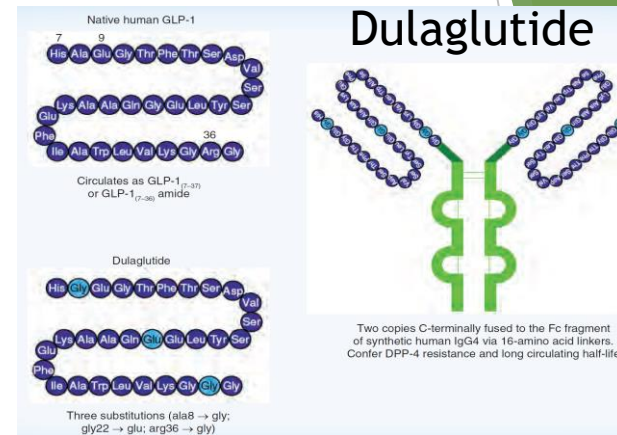
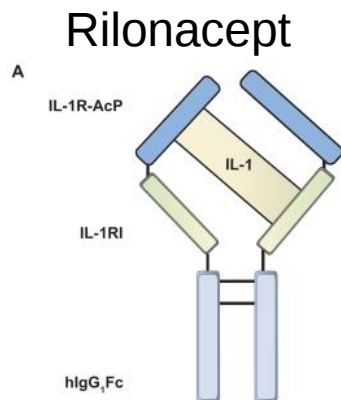
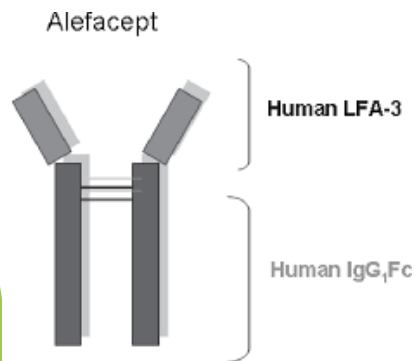
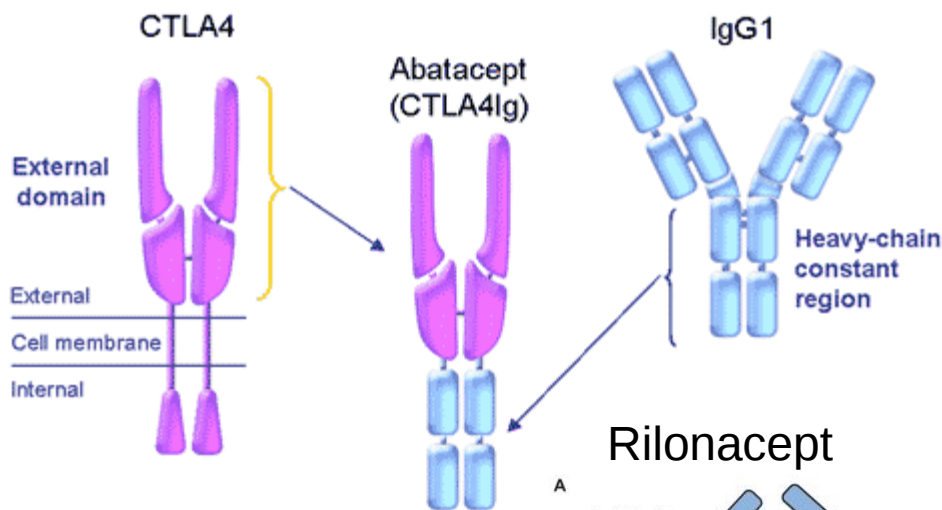
融合抗体 - 融合抗体的结构与血中半衰期的关系



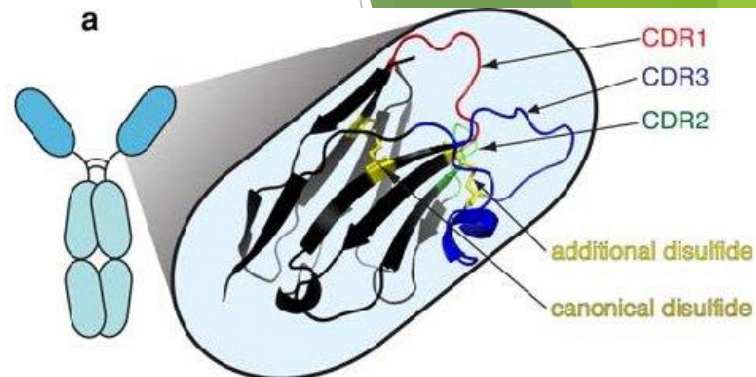
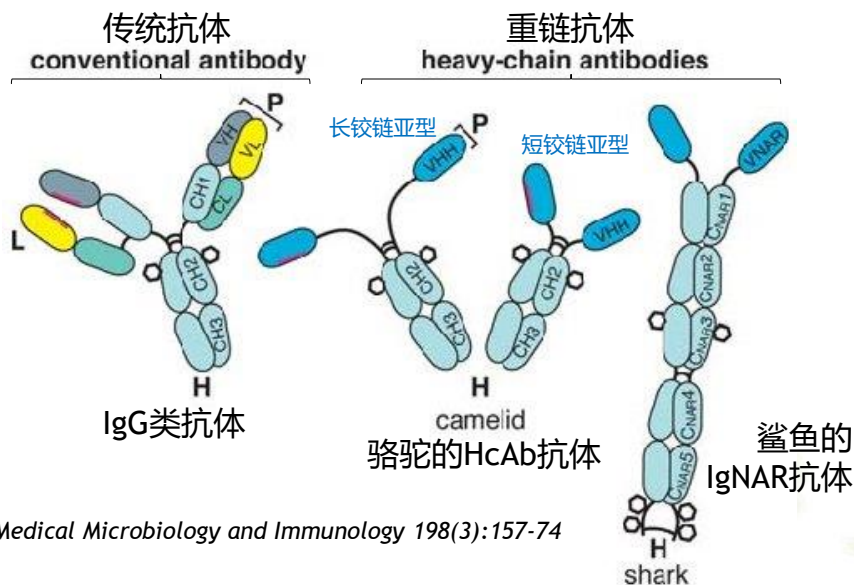
蛋白融合对抗体半衰期的影响



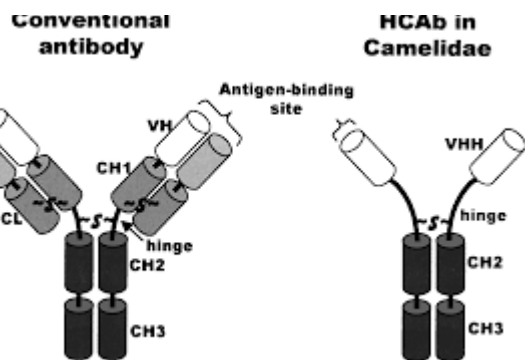
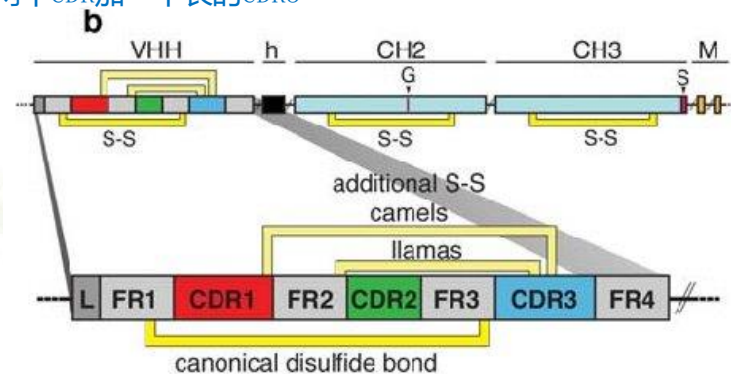
融合抗体 - 融合抗体的经典案例分析



重链抗体（骆驼抗体与鲨鱼抗体）

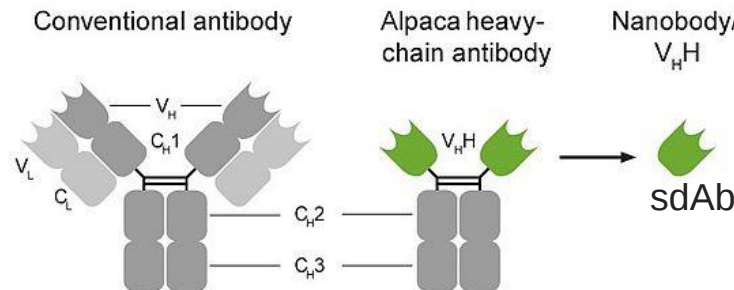


特色：两个CDR加一个长的CDR3

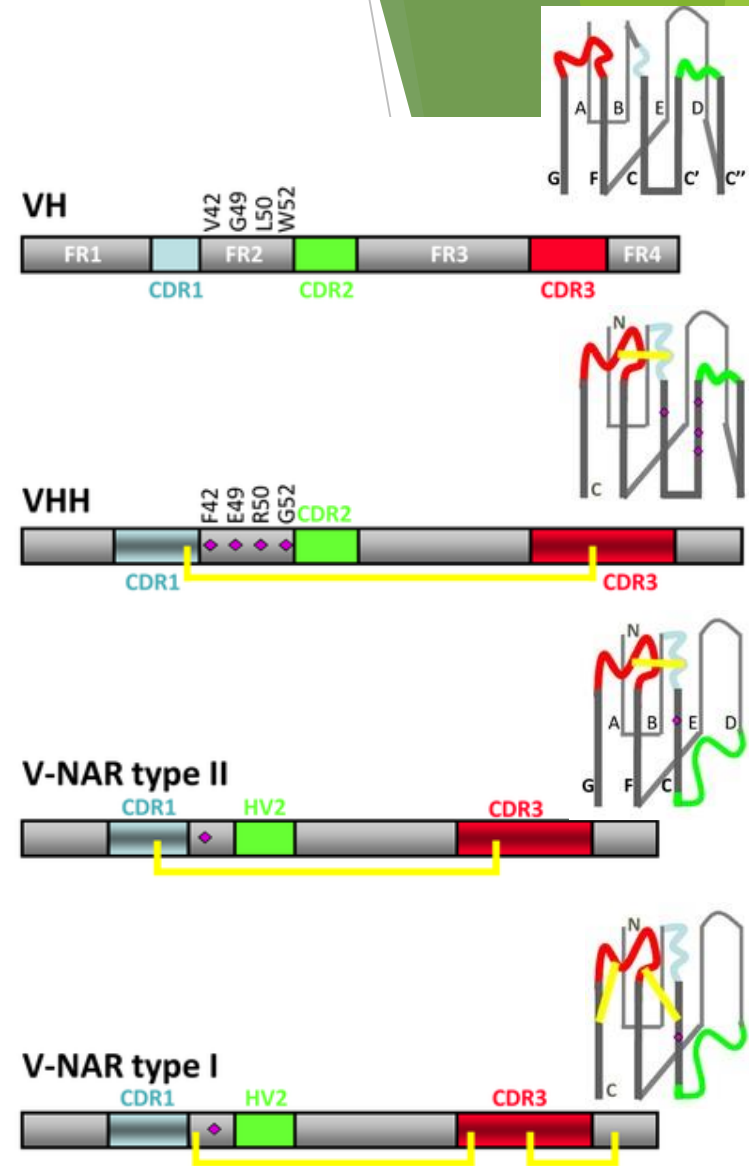
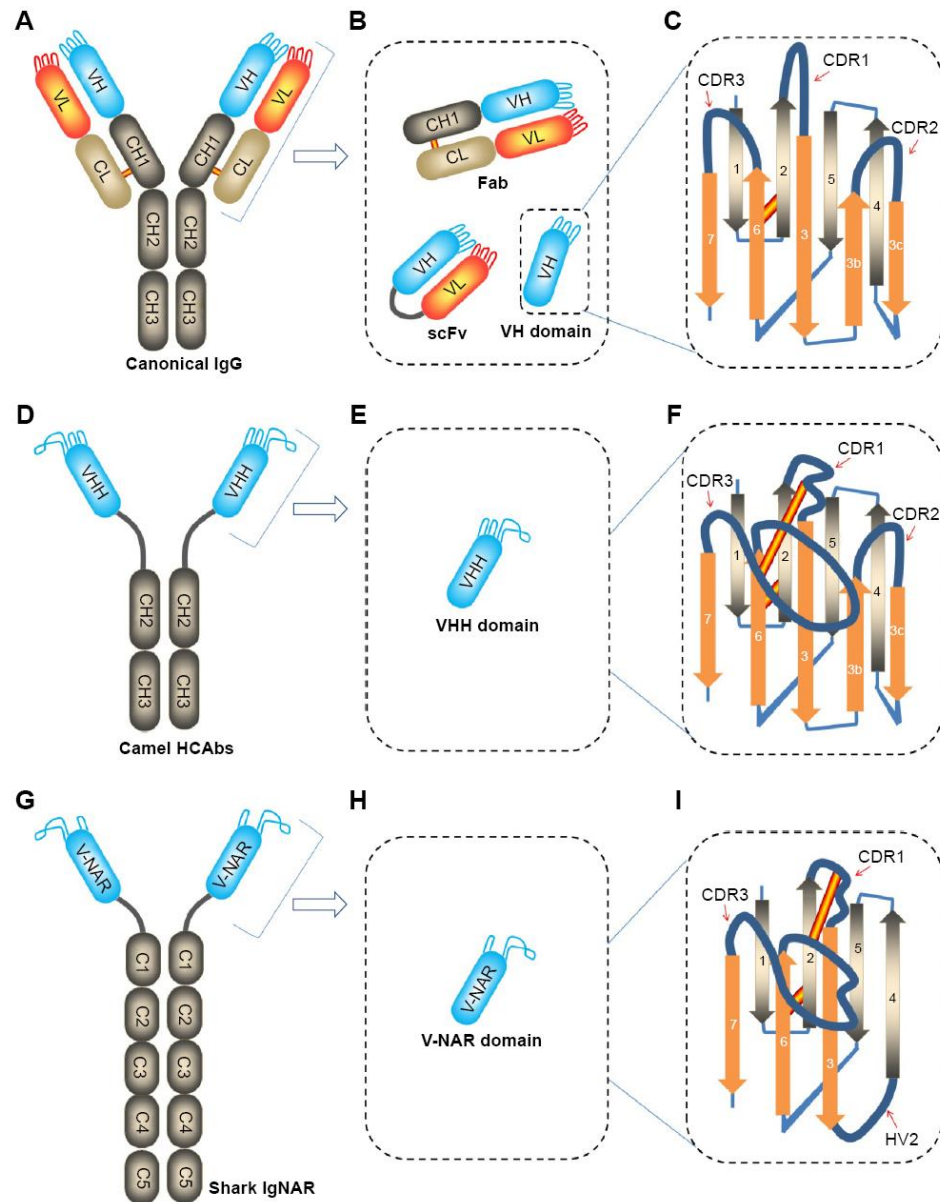


从hcAb到单域抗体（nanobody）

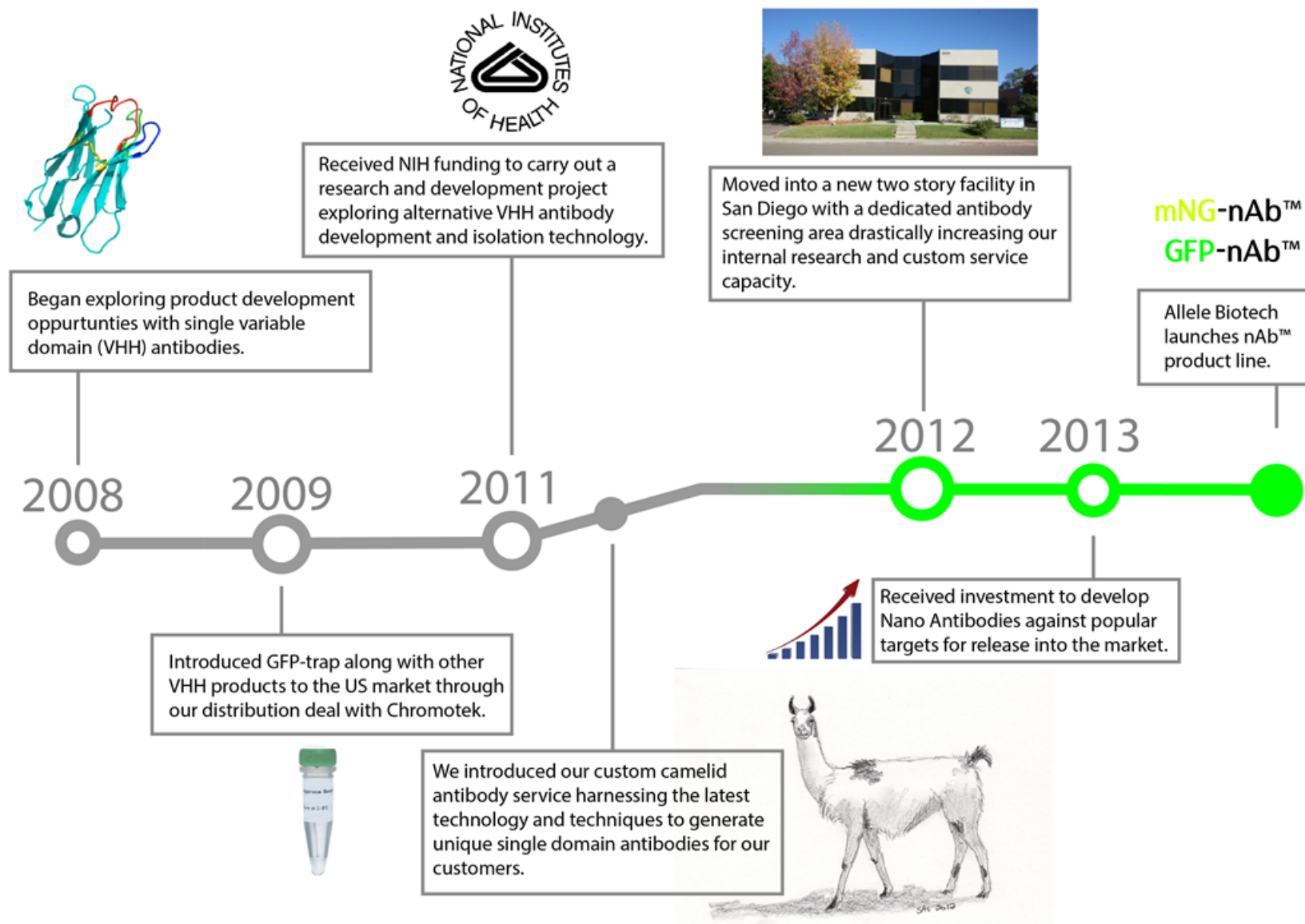
×	容忍极端温度和pH值	✓
×	识别难识别抗原	✓
×	组织穿透能力	✓
×	生物利用度	✓



三种抗体的可变区比较

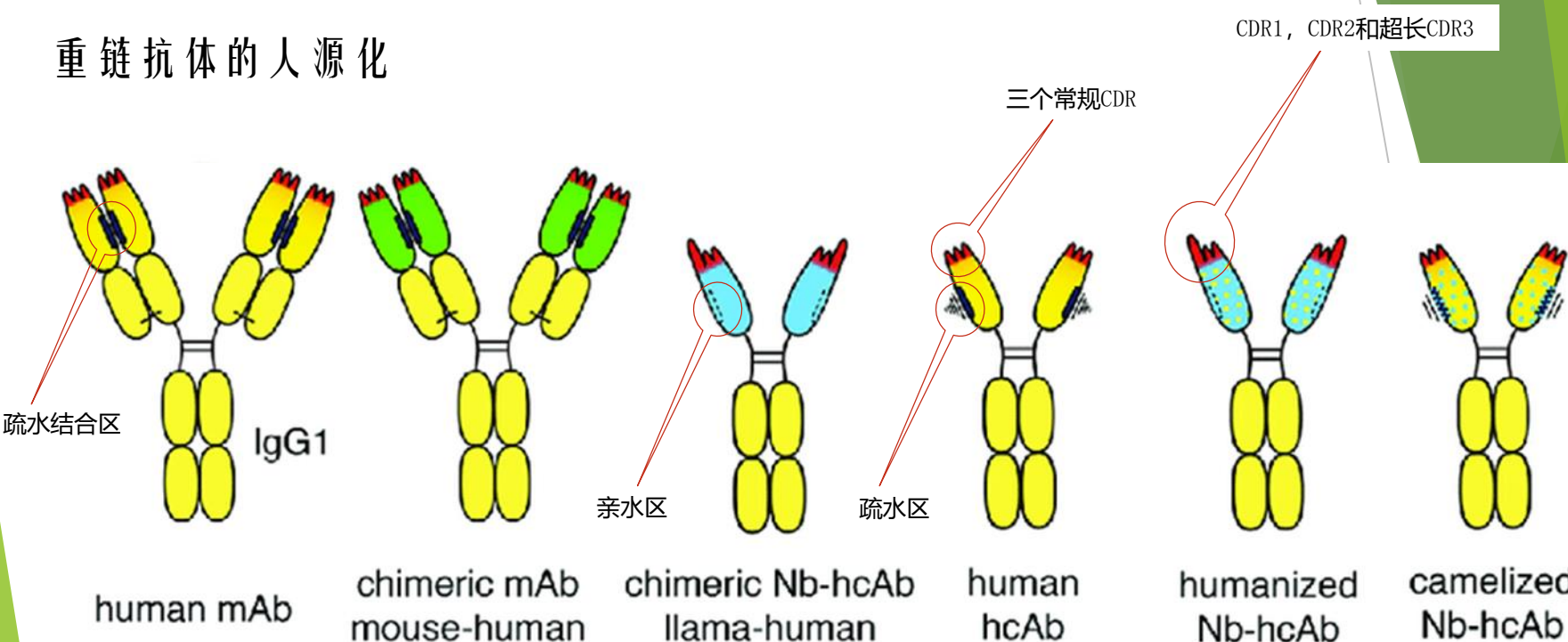


最重要的重链抗体-骆驼抗体的发展史



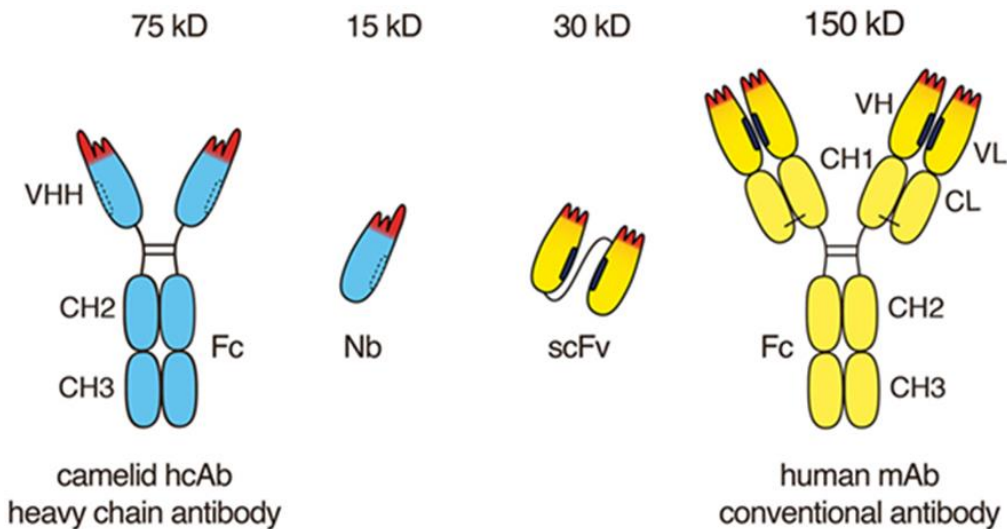
重链抗体与人IgG抗体的比较

重链抗体的人源化

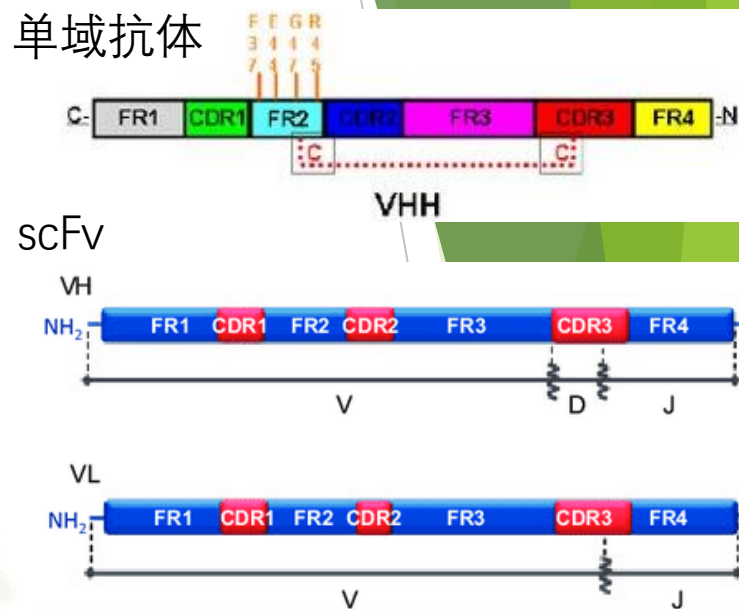


模仿hcAb结构，利用人源IgG序列模仿的全人源hcAb。

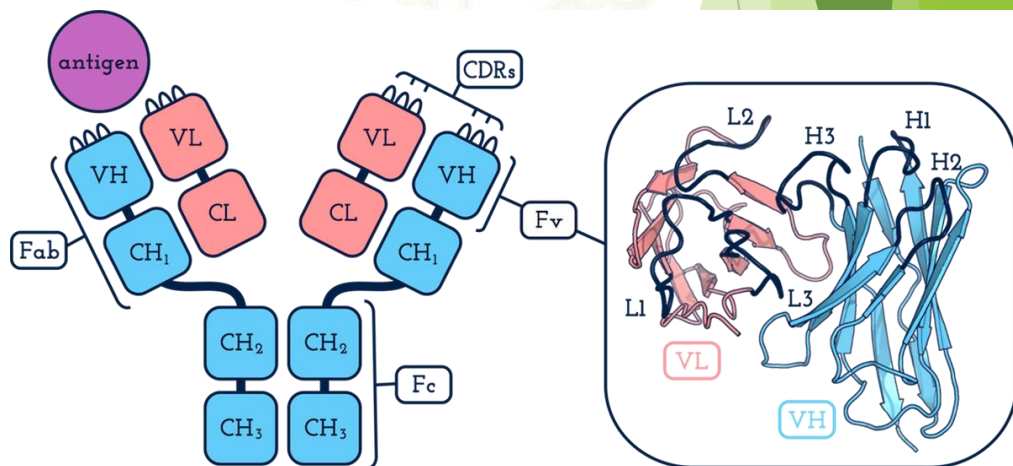
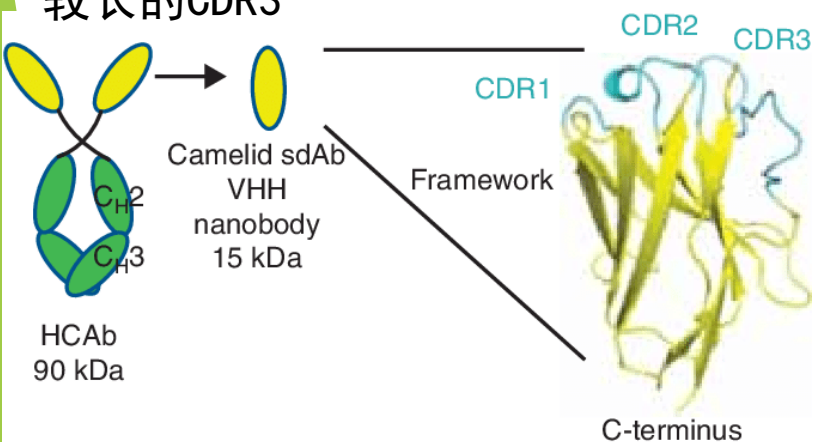
单域抗体与scFv的比较



单域抗体



较长的CDR3



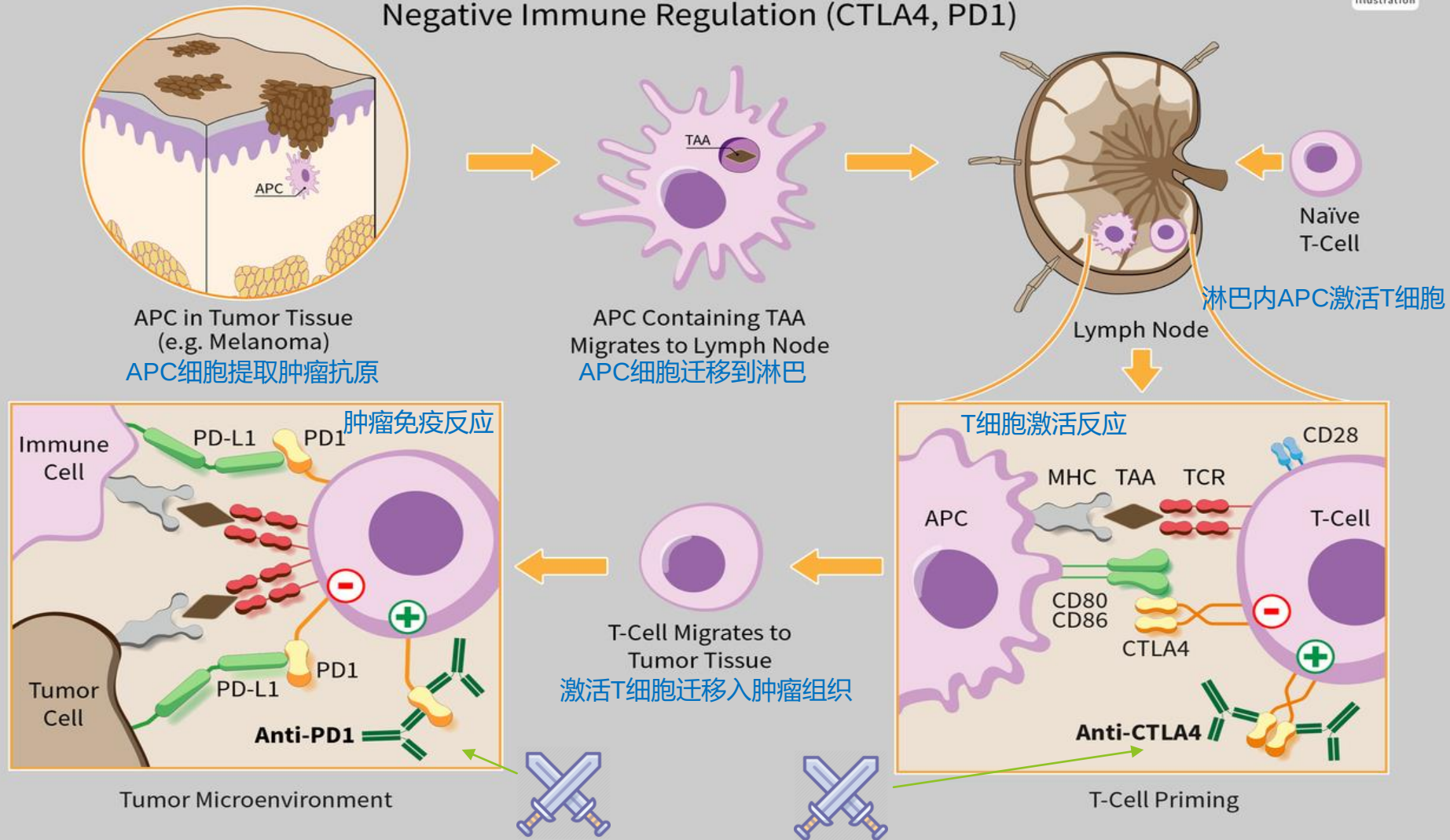
抗体与免疫检查点疗法

肿瘤免疫原理与免疫检查点

APC – Antigen-Presenting Cell
TAA – Tumor-Associated Antigen
TCR – T-Cell Receptor
Illustration: www.hegasy.de

Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018 2018诺贝尔生理医学奖

Cancer Therapy by Inhibition of Negative Immune Regulation (CTLA4, PD1)



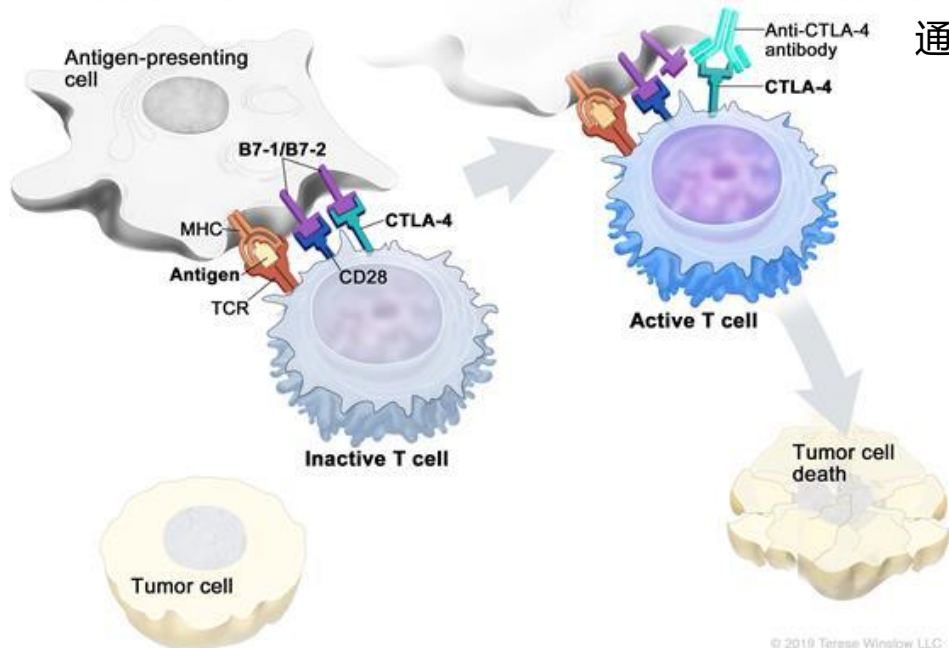
抗体在免疫检查点的狙击战

检查点1：T细胞的激活

CTLA-4/B7 binding inhibits T cell activation

Blocking CTLA-4 allows T cell killing of tumor cell

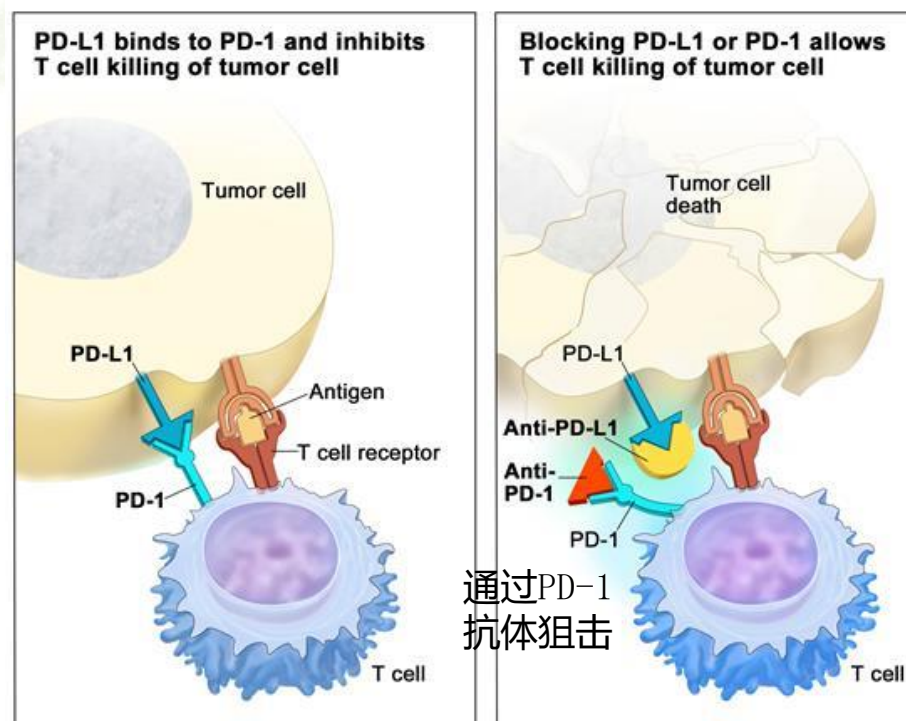
通过CTLA-4抗体狙击



检查点2：肿瘤细胞的免疫识别

PD-L1 binds to PD-1 and inhibits T cell killing of tumor cell

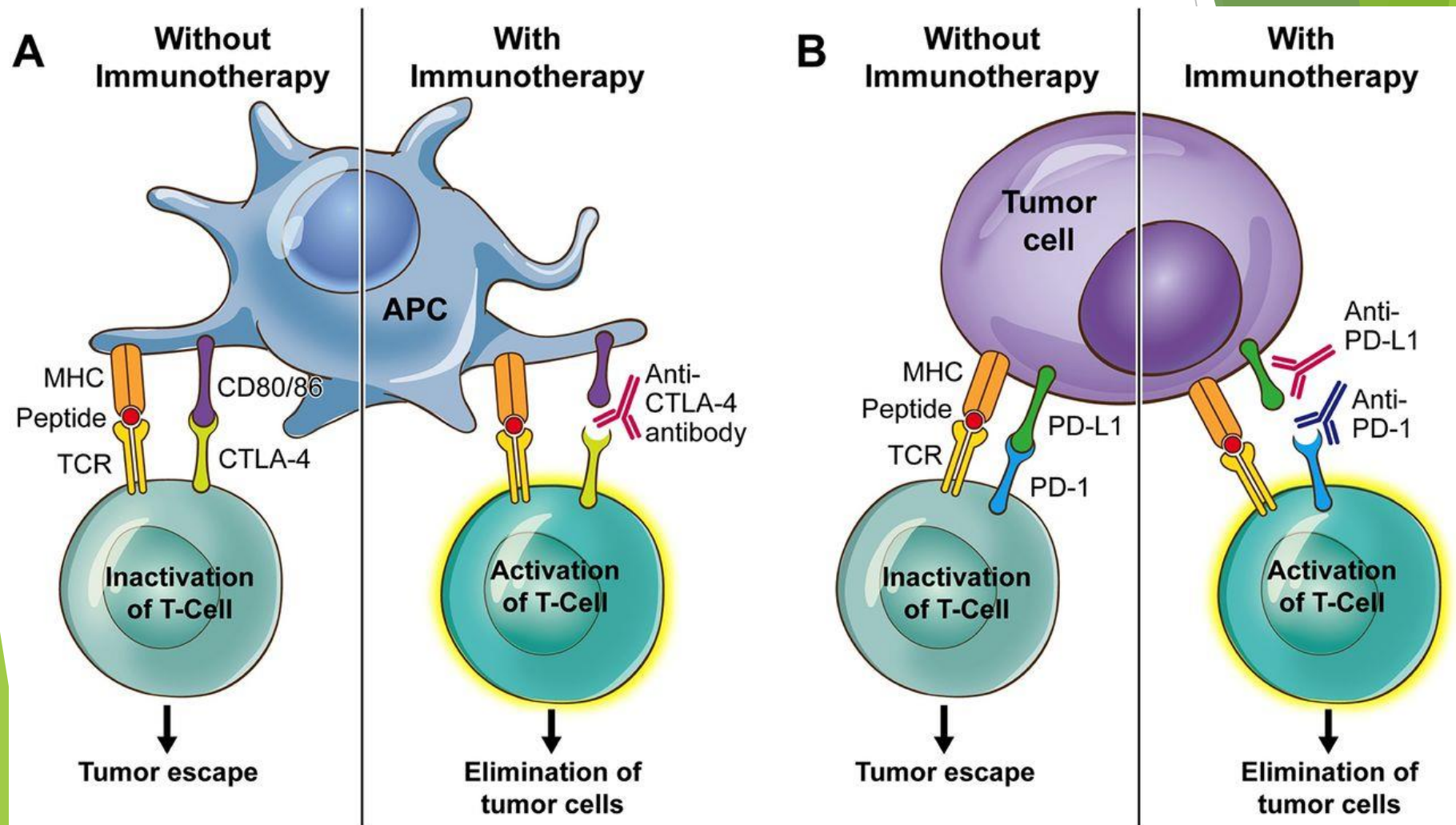
Blocking PD-L1 or PD-1 allows T cell killing of tumor cell



通过PD-1
抗体狙击

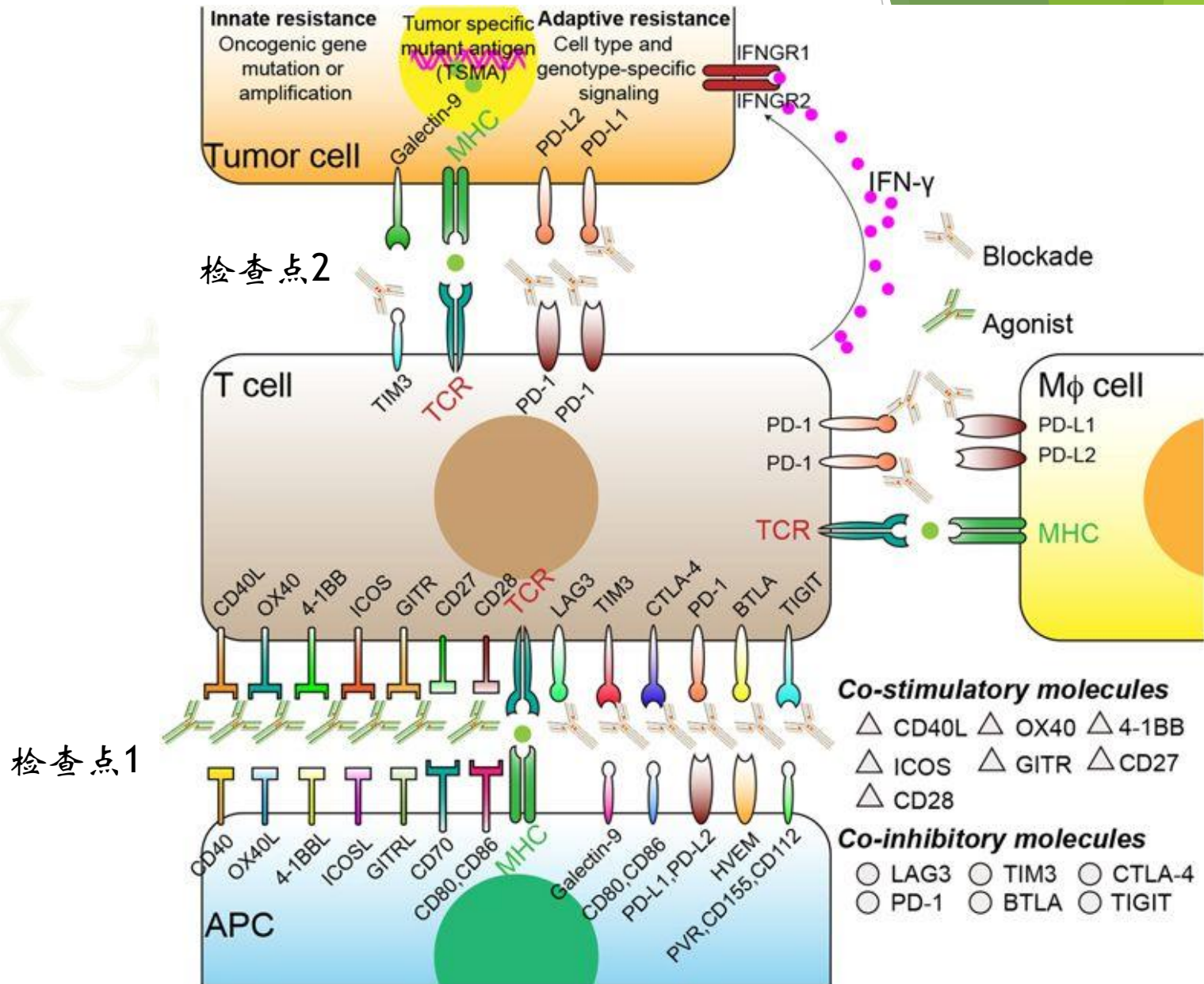
抗体与免疫检查点疗法

两种最经典，最常见的免疫检查点抗体疗法



抗体与免疫检查点疗法

目前已知两个免疫检查点相关位点。



免疫检查点疗法市场

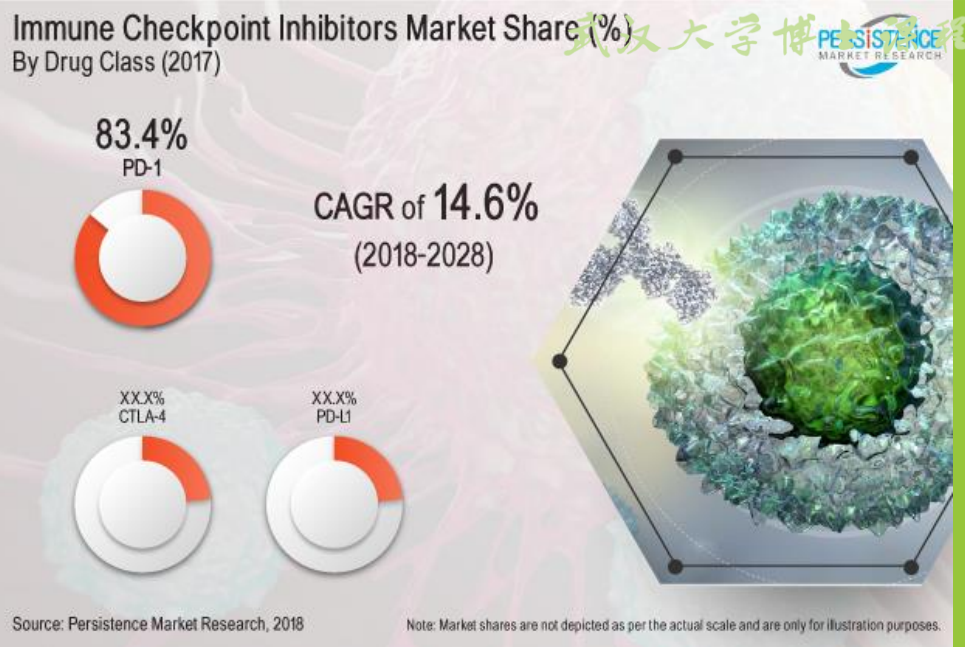


¥17918.00

【可瑞达】帕博利珠单抗注射液
100mg/4ml
规格: 100mg/4ml*1支

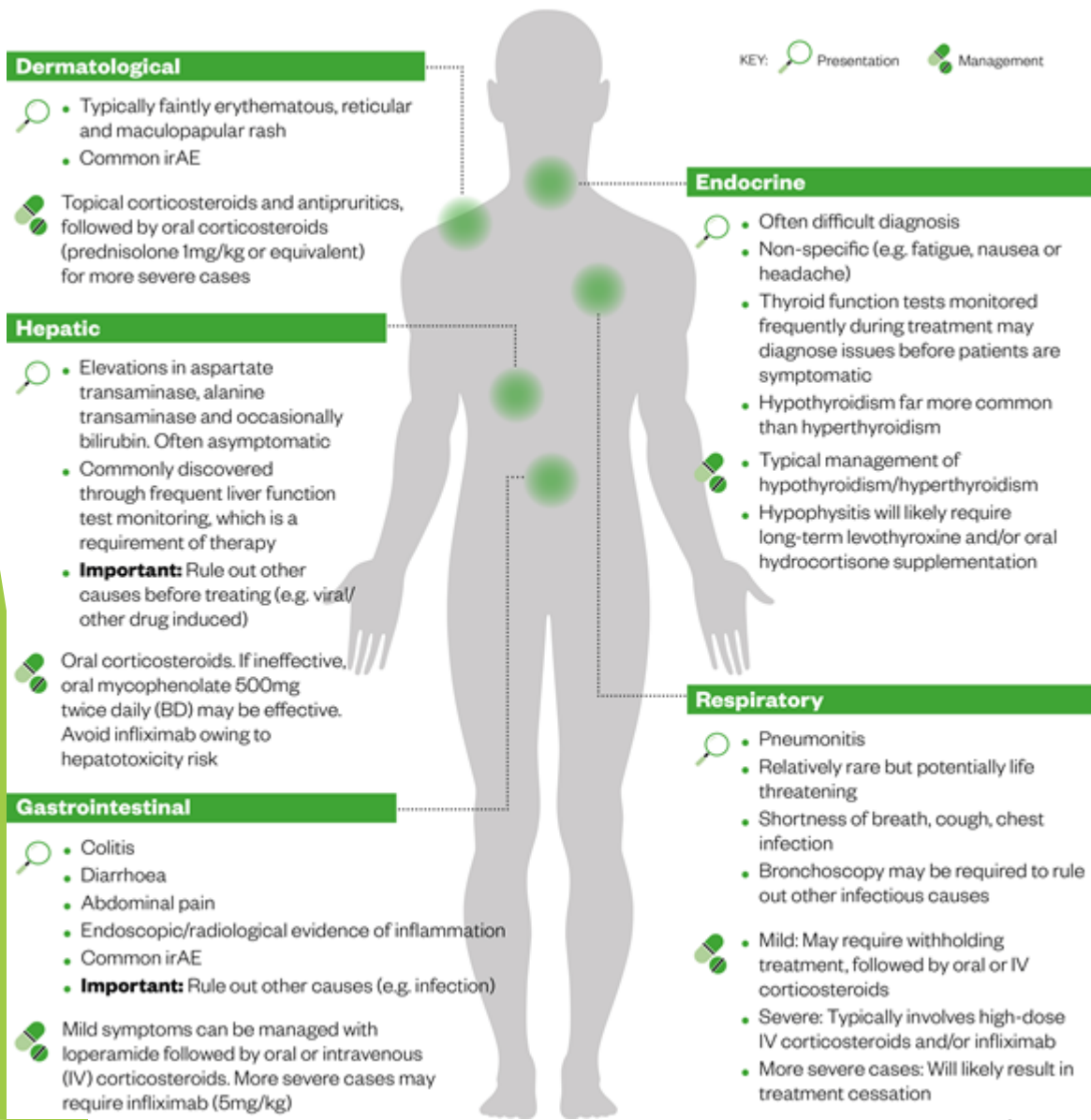
可瑞达，10大畅销药王第三名，年销售额98亿美元

已上市抗体产品

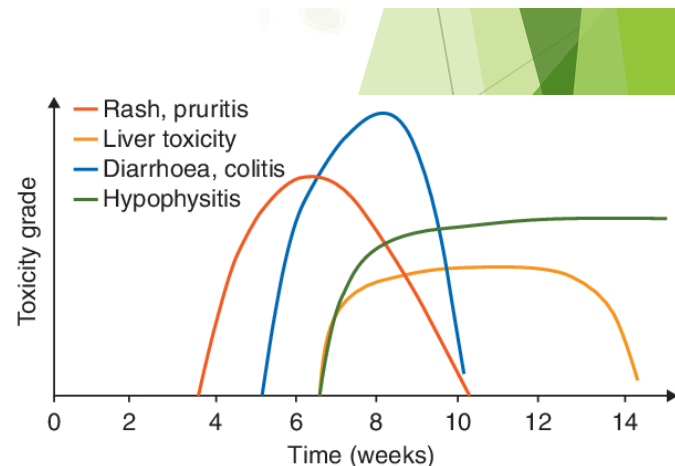


Brand Name	Generic Name	Target	Approved	Sponsor
Keytruda	pembrolizumab	PD-1	2014	MRK
Opdivo	nivolumab	PD-1	2014	BMJ
Tecentriq	atezolizumab	PD-L1	2016	Roche
Imfinzi	durvalumab	PD-L1	2017	AZN
Bavencio	avelumab	PD-L1	2017	MRK KGaA
Yervoy	Ipilimumab	CTLA-4	2011	BMJ

免疫检查点疗法的缺陷和挑战

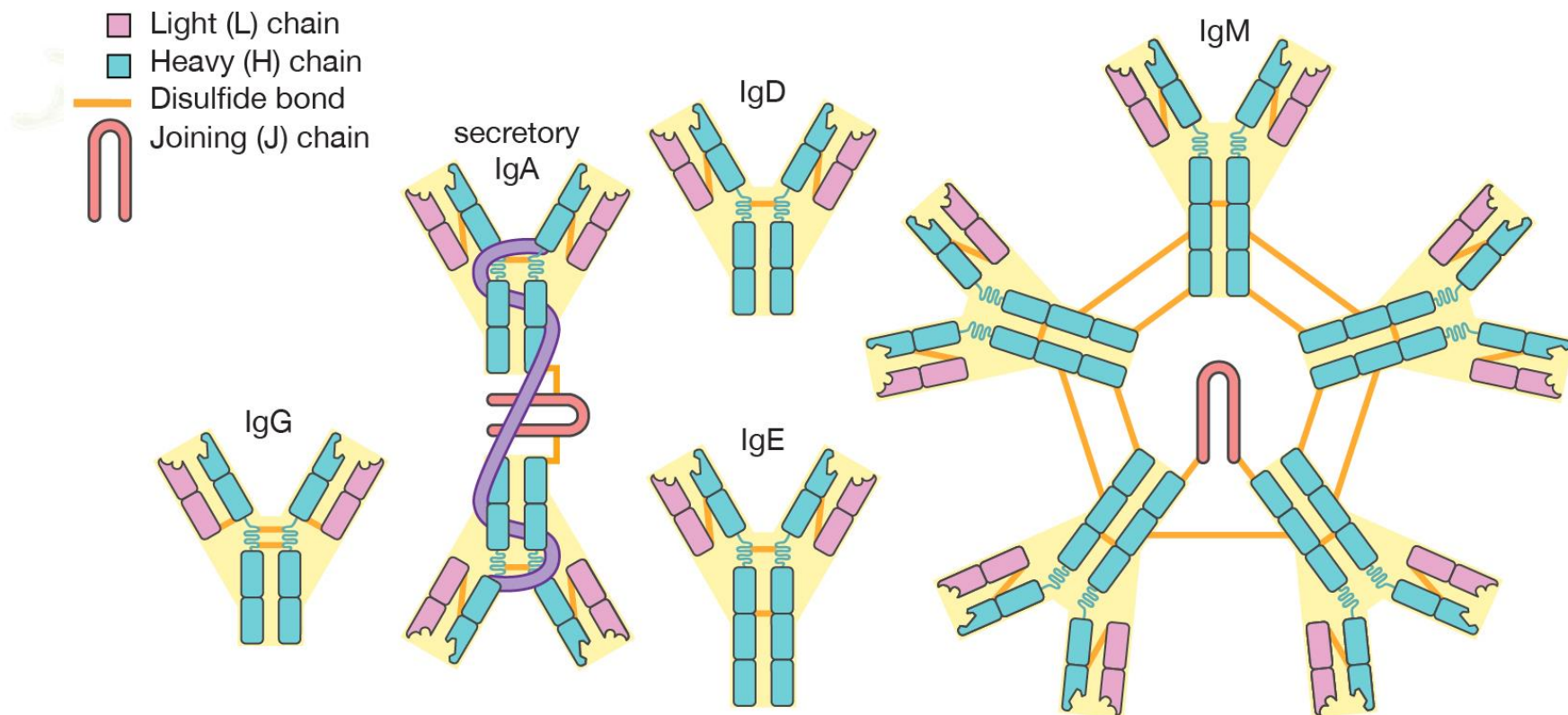


免疫检查点阻断可以通过增强免疫系统的活性而引起炎症副作用，这些副作用常被称为免疫相关不良事件。尽管任何器官系统都可能受到影响，但免疫相关不良事件最常累及胃肠道、内分泌腺、皮肤和肝脏。中枢神经系统和心血管系统、肺、肌肉骨骼系统以及血液系统也可受累，但与前几个系统器官相比受累较少。潜在的免疫相关不良事件的范围广泛，需要各个临床科室的医护人员进行多学科协作处理。



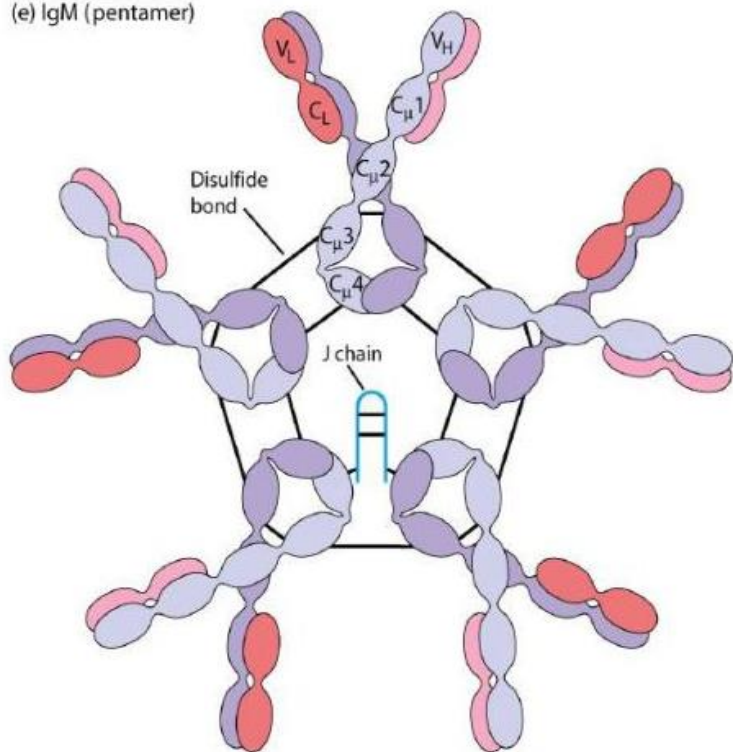
IgM 抗体疗法

人的Ig抗体亚型



IgM的特点

(e) IgM (pentamer)

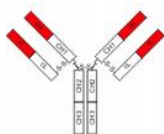


IgM的特点:

- IgM是免疫系统应敌抗原后产生的第一个可以结合抗原的抗体
- 占血清中抗体总量的5-10%;
- 在B细胞上面以单体出现出现, 而不是5聚体;
- 五聚体型式的IgM是分泌型抗体, 像常规IgG抗体一样;
- IgM的五聚体结构是通过糖基化的J chain蛋白聚在一起的;
- IgM拥有10个Fab (即10个结合位点), 抗原结合能力最强;
- IgM的补体激活能力也是所以抗体种型中最强的;
- 像IgA一样, IgM也可以分泌到肠粘膜表面 (mucosal surface) 。

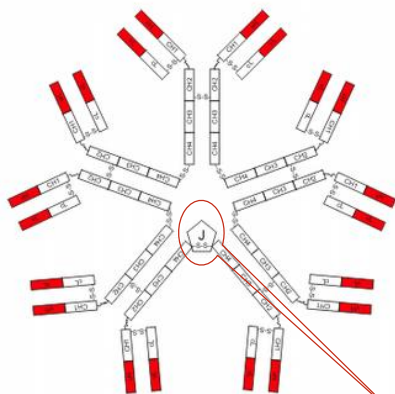
IgM 抗体的结构

(A) IgG
普通IgG



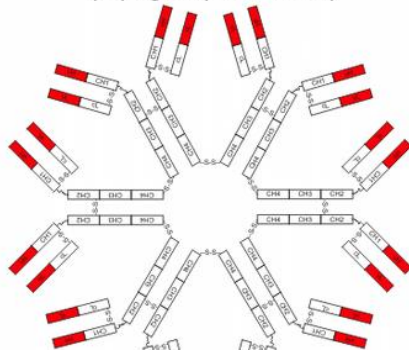
~150 kDa

(B) IgM (pentamer)
常规五聚IgM



~950 kDa

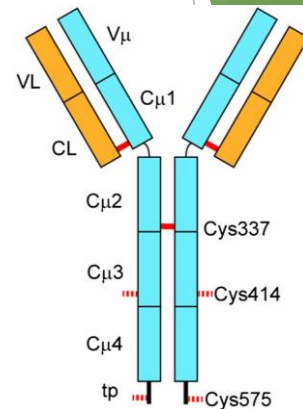
(C) IgM (hexamer)
六聚IgM



~1100 kDa

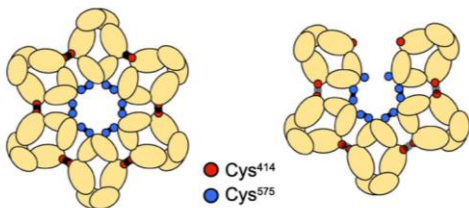
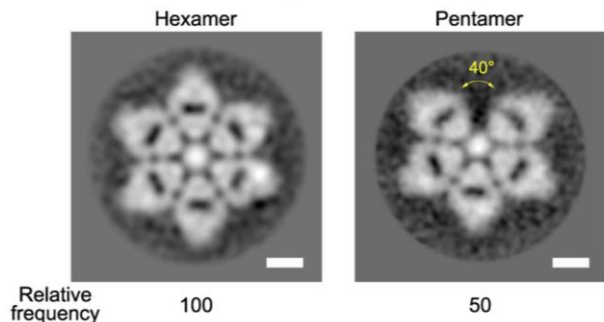
J chain

IgM的单体结构

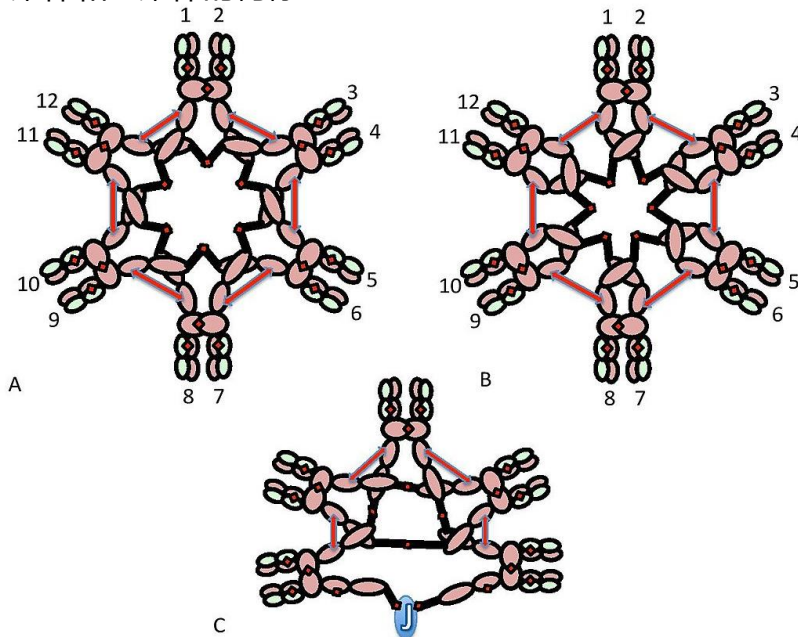


IgM的原子扫描电镜

Mouse IgM-Fc without J chain



IgM六聚体和五聚体的构像



IgM抗体的医用价值

全球专业开发IgM抗体的公司，位于加州的IGM Biosciences (IGMS) 在NASDAQ上市，IPO发行价为16美元，募集1.75亿美元。上市首日大涨51.88%，股价达24.3美元，市值为6.26亿美元。

IgM相比IgG具有以下生物学优势：

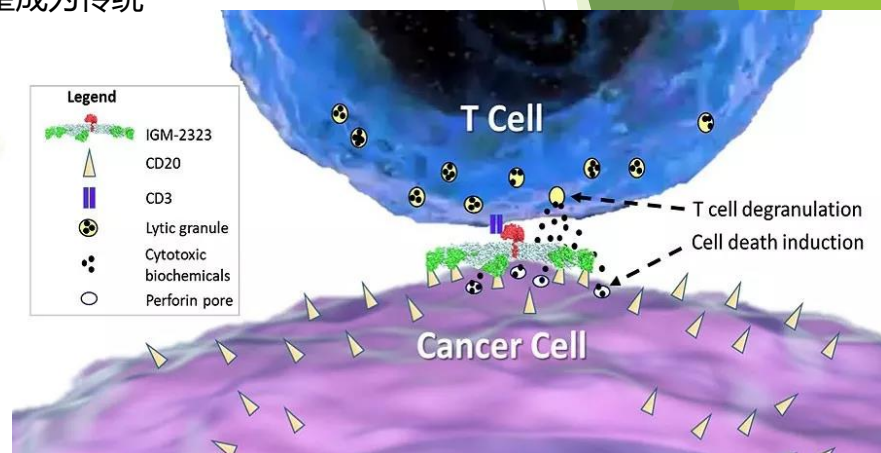
- 1、与肿瘤相关碳水化合物和糖基化蛋白等困难靶点的结合更强，可极大扩展癌症靶点的范围；
- 2、交联细胞表面受体的能力更强，可以显著增强细胞信号用于杀死癌细胞或刺激T细胞；
- 3、极大增强补体依赖性细胞毒性（CDC）杀死癌细胞而不需要免疫细胞的存在。

IgM抗体具有结合位点多、结合能力强、细胞因子风暴更低、CDC效应更强等一些传统IgG不具备的优势，发挥传统IgG难以实现的生物学效应，有望成为传统IgG之外治疗性抗体的重要补充。

应用领域

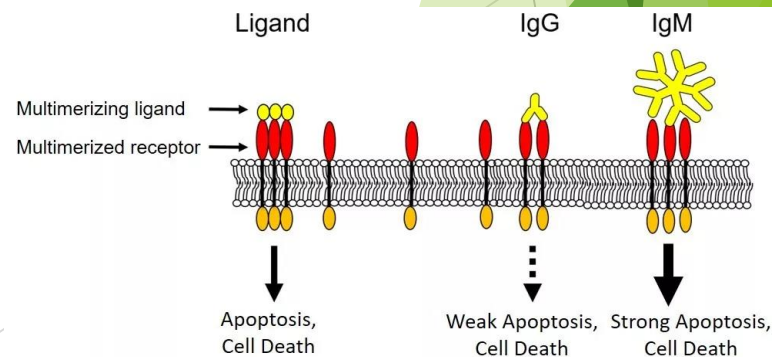
1、双特异性抗体（T cell engagers）及更高抗原结合能力

IGM-2323拥有10个CD20的结合位点和1个CD3结合位点，因此其对表达CD20的癌细胞具有比基于IgG的CD20抗体更强的结合能力，对于低表达的癌细胞也具有较强的杀伤效果。

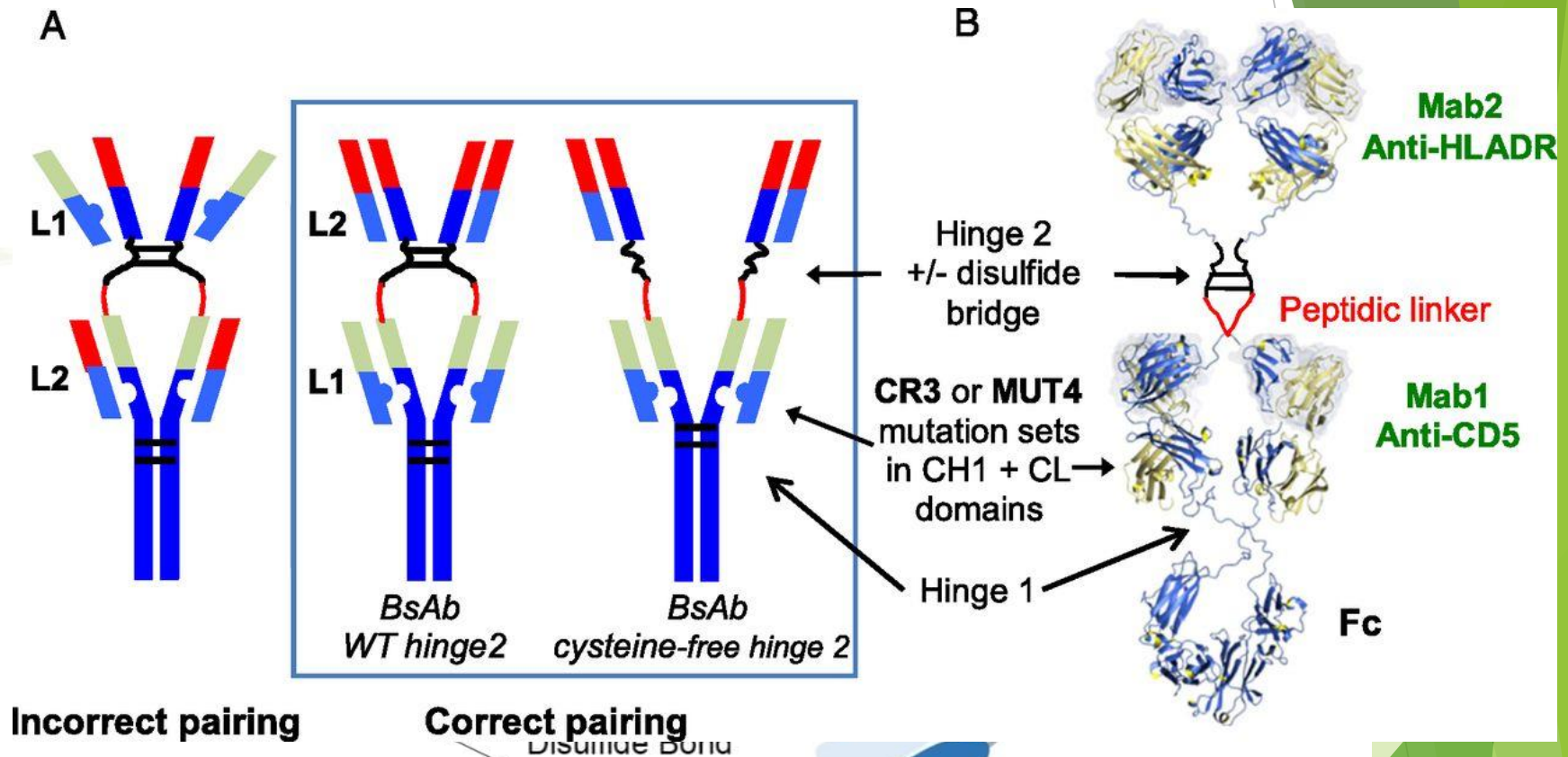


2、受体交联激动剂

激活肿瘤坏死因子受体超家族（TNFrSF）受体一般需要三个或多个受体在肿瘤细胞表面交联形成复合体，发送程序性死亡信号杀死肿瘤细胞。IGM Biosciences利用IgM具有多个结合位点的特性，激活TNFrSF受体，发送程序性死亡信号杀死肿瘤细胞，而常规IgG难以激活TNFrSF受体。

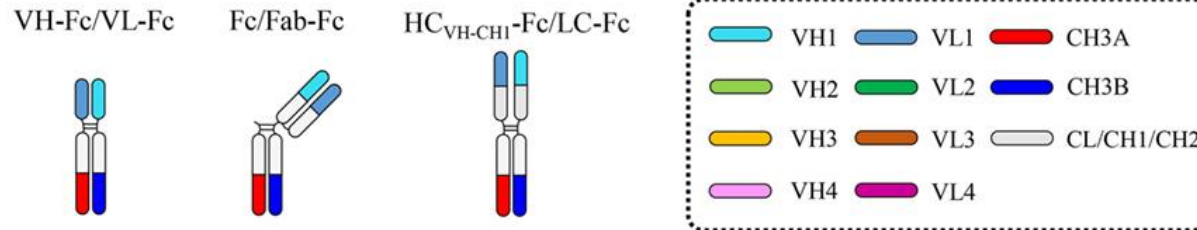


复杂抗体衍生物

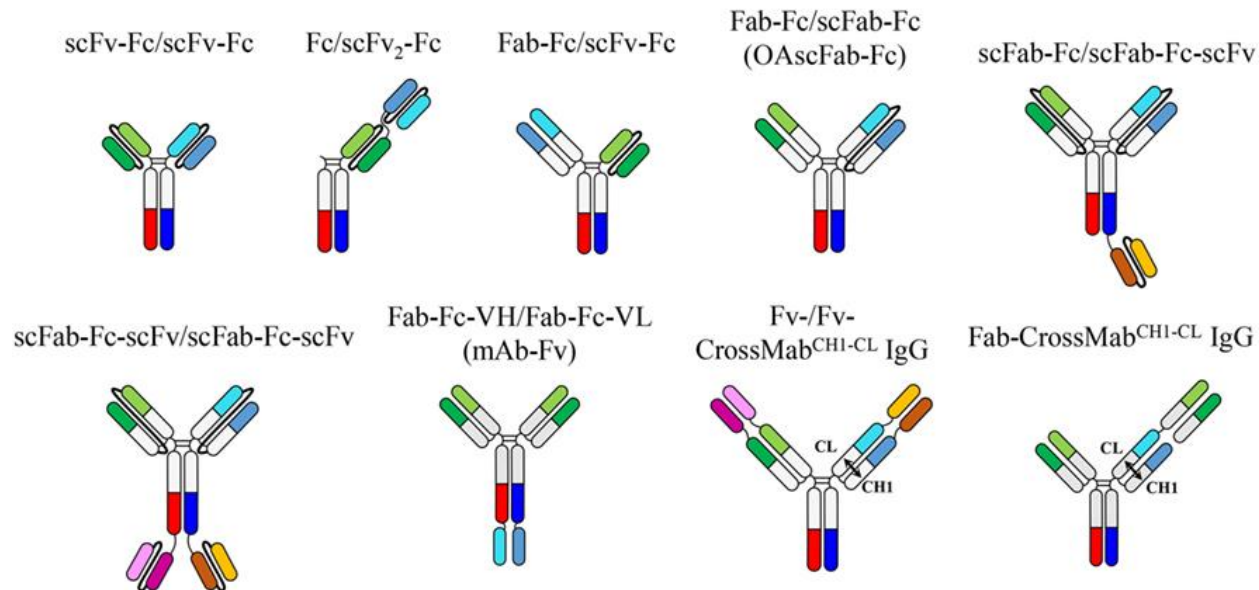


复杂抗体衍生物的结构

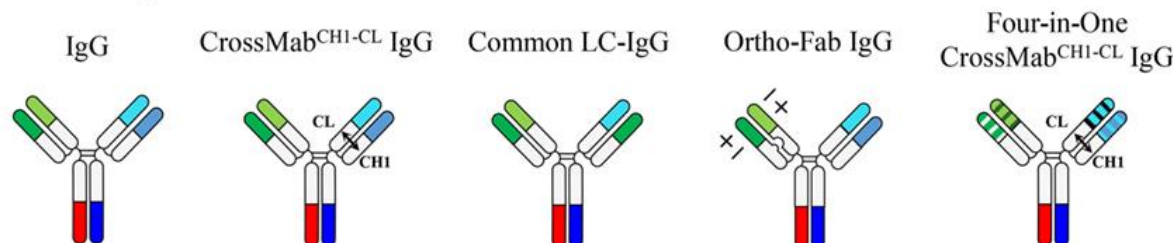
A Monospecific and monovalent antibodies



B IgG-like formats with appendages of scFv and scFab



C Intact IgG formats with correct LC association

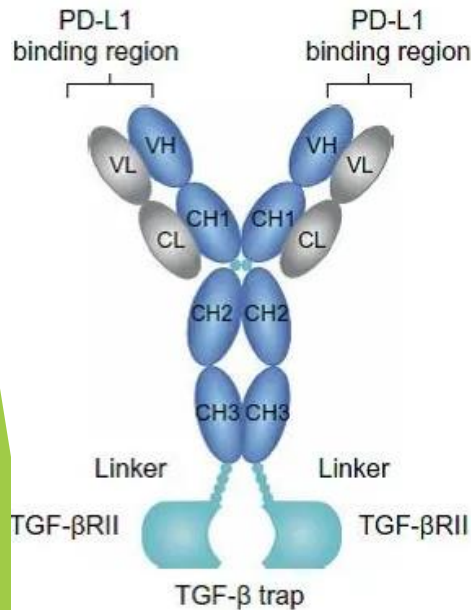


复杂抗体衍生物的结构

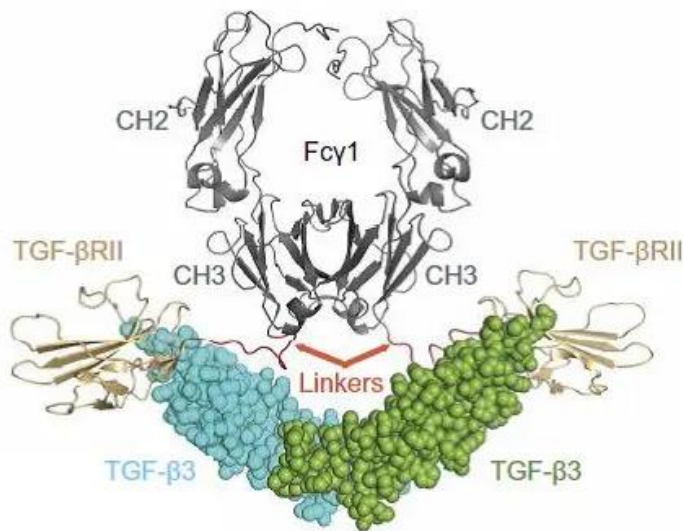
免疫检查点PD-1或其配体PD-L1的抗体已被批准用于治疗多种晚期癌症，然而，在多数肿瘤患者中只对不到20%的患者有效。相关研究已发现TGF- β 是使得免疫检查点抑制剂失效的一个重要原因。另外，在肿瘤微环境中的TGF- β （转化生长因子）在调节性T细胞（Tregs）发育中发挥重要作用。许多晚期癌症中都有Treg浸润，并且这种浸润与预后不良密切相关。

M7824由与TGF- β 受体2蛋白的细胞外结构域连接的抗PD-L1单抗组成，可同时靶向这两个常见的癌细胞信号通路。有效率提高到80%以上。

A M7824 structure



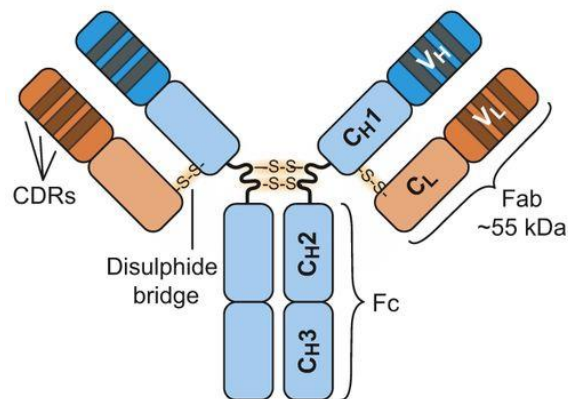
B Computer generated model



拟抗体 (Antibody mimetic)

拟抗体是一种功能与抗体类似，但结构与之完全没有任何关系的有机化合物，它可以与抗原特异结合。通常它是人造的肽或者蛋白质，摩尔质量介于3至20kDa之间。

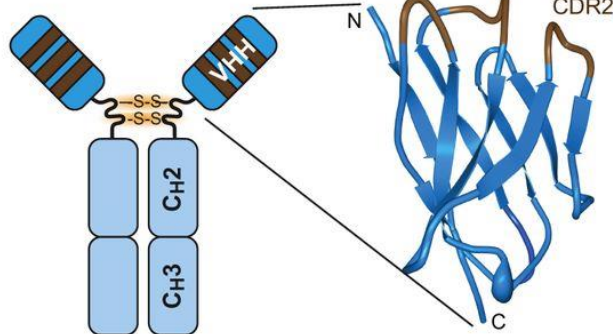
A Human IgG (~150 kDa)



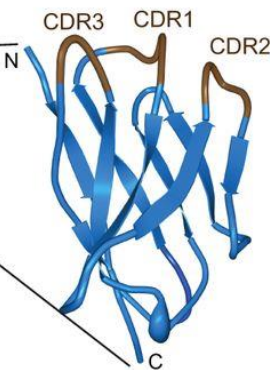
B scFv (~28 kDa)



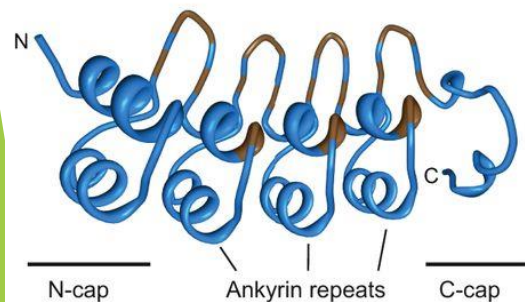
C Camelid HcAB (~96 kDa)



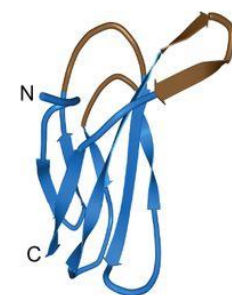
D Nanobody (~12-15 kDa)



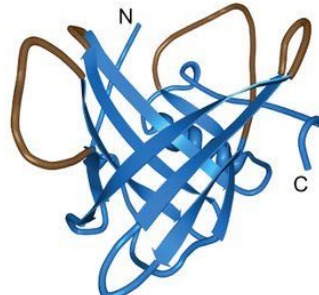
E Designed ankyrin repeat proteins (~14-21 kDa)



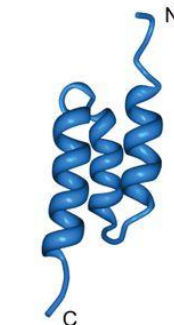
F Monobody (~10 kDa)



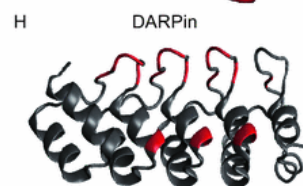
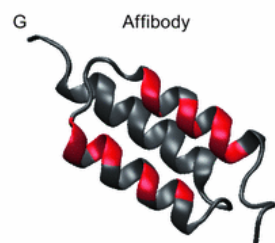
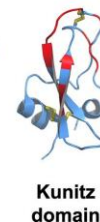
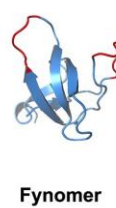
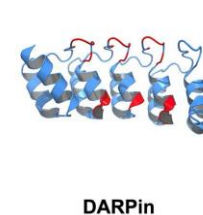
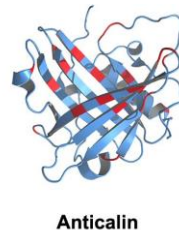
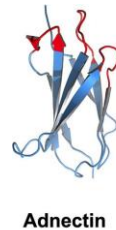
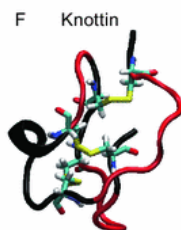
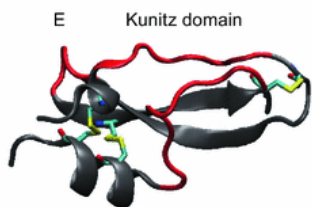
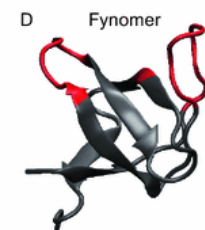
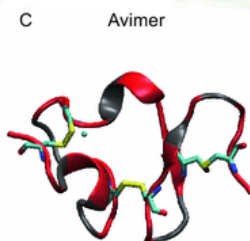
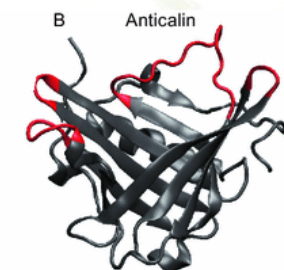
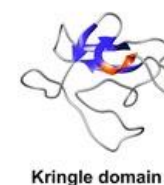
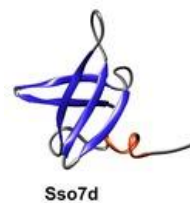
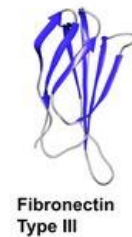
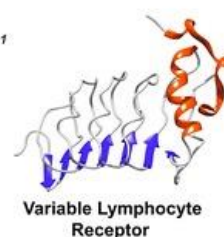
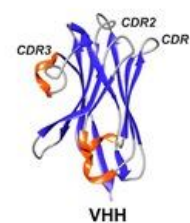
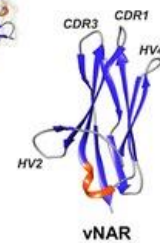
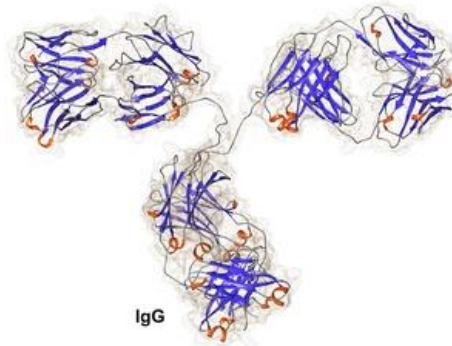
G Anticalin (~20 kDa)



H Affibody (~7 kDa)



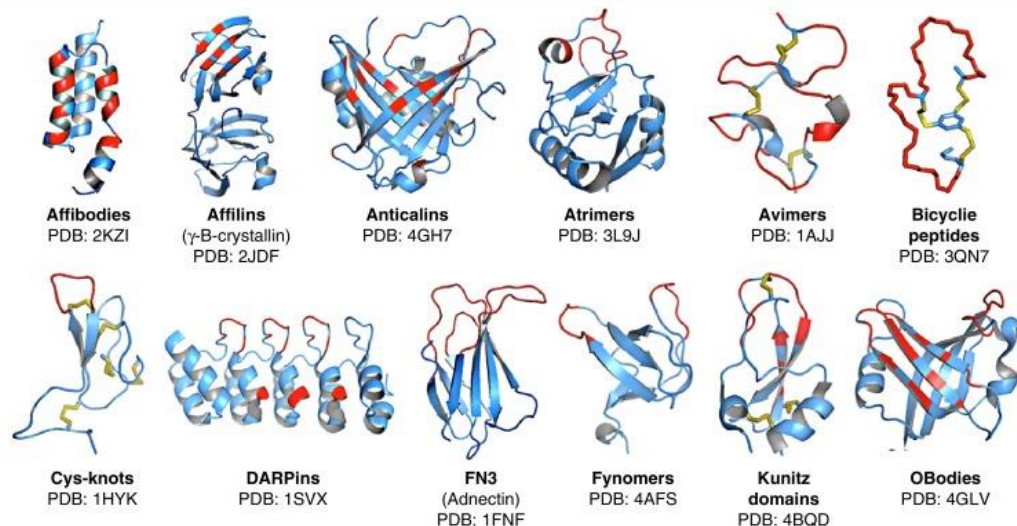
各种拟抗体



拟抗体性质比较

拟抗体相对于抗体来说，通常都具有更好的溶解性，组织穿透能力，更好的热稳定性和酶稳定性，以及相对较低的生产成本。拟抗体正被开发用于治疗与医学诊断上

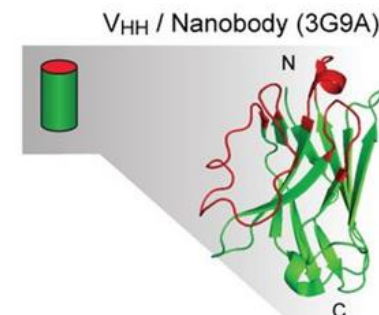
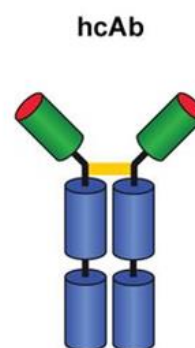
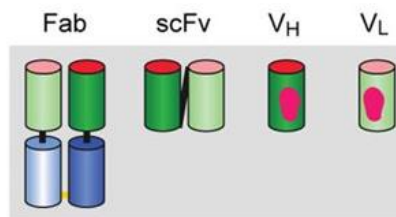
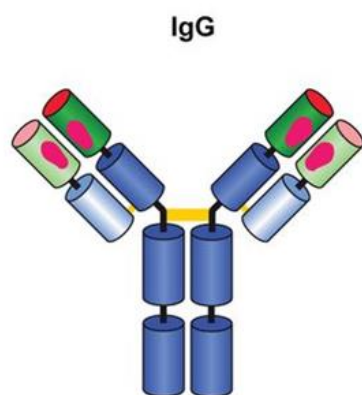
某些拟抗体具有和抗体类似的 β 折叠结构。



Scaffold	Parental protein	Structure	Randomization	MW (kDa)
Affibodies	Z domain (protein A)	α -helical	Helix randomization	6
Affilins	γ -B-crystallin	β -sheet	Beta-strand randomization	20
	Ubiquitin	α/β	Beta-strand randomization	10
Anticalins	Lipocalin	β -sheet +	Loop randomization	20
		α -helical terminus	Beta-strand randomization	
Atrimers	C-type lectin (tetranection)	α/β	Loop randomization	3×20
Avimers	A-domain	Ca^{2+} binding	Loop randomization	4
Bicyclic peptides	Peptide	Chemically constrained	Loop randomization	2
Cys-knots	Peptide	β -sheet	Loop randomization	4
DARPin	Ankyrin repeats	Disulfide constrained	Loop randomization	14-21
		α -helical + β -turn	Helix randomization	
FN3 scaffolds (Adnectins, Centyrins, Pronectins, Tn3)	Fibronectin (type III)	β -sheet	Beta-strand randomization	10
		β -sheet	Loop randomization	
Fynomers	SH3 domain (fyn kinase)	β -sheet	Loop randomization	7
Kunitz domains	Serine protease inhibitor	α/β	Loop randomization	7
		Disulfide constrained	Loop randomization	
OBodies	OB-fold	β -sheet	Beta-strand randomization	12

最著名的抗体与最著名的拟抗体

A Immunoglobulins

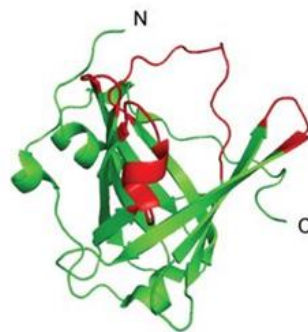


B Non-Immunoglobulin Binder Scaffolds

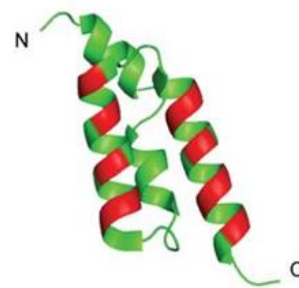
Natural Binder Scaffolds



Monobody (3QWQ)

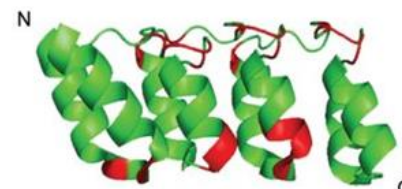


Anticalin (4GH7)



Affibody (2KZI)

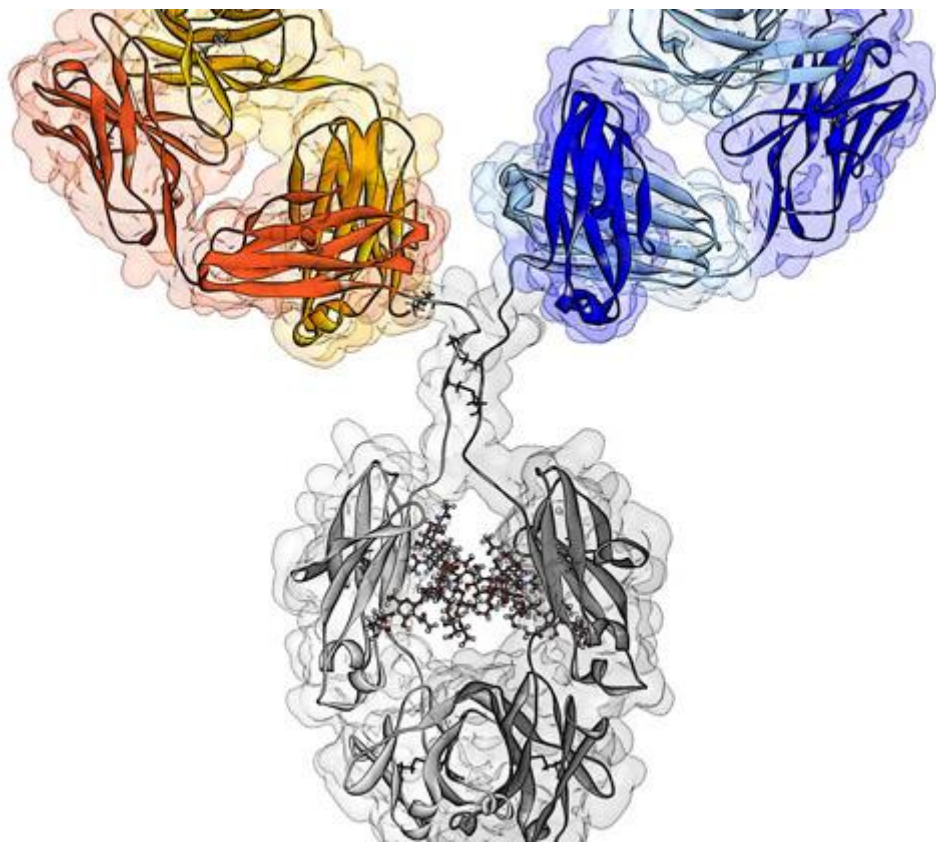
Designed Repeat Binder Scaffolds



DARPin (3HGO)

武汉大学博士课程之

抗体药物结构设计学



抗体表达

表达细胞与糖基化

https://en.wikipedia.org/wiki/N-linked_glycosylation