

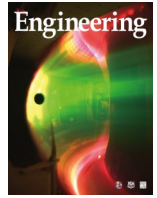


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Immunology—Review

## 提升疗效的修饰型治疗性抗体国内外研究进展

戴济民<sup>a,b</sup>, 张雪芹<sup>a</sup>, 戴竞耀<sup>a,c</sup>, 杨向民<sup>a,\*</sup>, 陈志南<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, National Translational Science Center for Molecular Medicine, State Key Laboratory of Cancer Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

<sup>b</sup> Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

<sup>c</sup> Department of Hepatobiliary Surgery, Air Force Medical Center, Beijing 100142, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 September 2019

Revised 14 April 2020

Accepted 24 June 2020

Available online 28 July 2021

#### 关键词

治疗性抗体

抗体修饰

疗效

抗原

抗体-药物偶联物

双特异性抗体

### 摘要

生物治疗药物市场的繁荣反映了治疗性抗体药物用于治疗癌症、炎症疾病和难治性感染的可行性和有效性。随着抗体药物临床试验和转化研究中出现的结合效率不高、效应功能降低和不良反应频发等问题的解决,治疗性抗体的修饰在抗体药物的研发进程中得到了前所未有的蓬勃发展。为了提升抗体的结合活性、循环中的半衰期、靶细胞的有效性,并最终实现改善抗体药物的疗效,抗体可主要通过以下途径修饰:①糖基化修饰;②抗体恒定区(Fc)改造;③抗体亚类重构;④构建抗体-药物偶联物(ADC);⑤基于单链可变区片段(scFv)的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T);⑥双特异性抗体(bsAb)。过去几十年来全球在修饰型治疗性抗体的领域取得了许多成就,中国作为对于生物治疗药物需求巨大并且拥有巨大研发潜力的国家在该领域亦发挥了积极作用。本文概括了修饰型治疗性抗体在当前国际研究中取得的进展,并在单独的章节中重点介绍了中国在该领域取得的成果。

©2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

在感染、炎症疾病和癌症等疾病的现代治疗学中,治疗性抗体发挥着不可或缺的作用,促进了生物制药的空前发展。截至2020年12月31日,已有106种治疗性抗体获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准。此外,在过去的20年里,抗体产品的全球销售额增长了约450倍——从1997年的3.1亿美元增长到2008年的370亿美元,然后又增长到2018年的约1350亿美元。治疗性抗体广泛应用的同时,也出现了一些问题,诸如由于抗体亲和力低而导致

的疗效不佳,诱导/诱导效应功能的弱效力,循环中的意外降解或细胞内分解代谢,由于不可避免地表达靶向抗原的非靶细胞结合而引起的严重全身毒性,暴露于大剂量的治疗剂。因此,抗体工程改造是必不可少的,以便通过糖工程技术和突变等途径优化正在开发和已开发的治疗性抗体,从而优化抗体的治疗效果以达到控制疾病的进展。

随着对疾病发病的分子机制和微妙的调控网络的揭示,研究人员可通过对治疗性抗体进行重构修饰,以实现精确和工业化的治疗和增强疗效。修饰型治疗性抗体指基于可变区特异性结合的抗体;它们显示出对适应症的总体

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [yxiangmind@163.com](mailto:yxiangmind@163.com) (X.-M. Yang), [znchen@fmmu.edu.cn](mailto:znchen@fmmu.edu.cn) (Z.-N. Chen).

2095-8099/© 2021 The AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2021, 7(11): 1529–1540

引用本文: Ji-Min Dai, Xue-Qin Zhang, Jing-Yao Dai, Xiang-Min Yang, Zhi-Nan Chen. Modified Therapeutic Antibodies: Improving Efficacy. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.030>

功效的改善,如降低死亡率(在保护性治疗中)或发病率(在预防性治疗中)、阻止复发、免受不良反应等。在分子水平上,尽管抗体和抗原的结合是治疗性抗体效力的基础,但恒定区和宿主细胞上相应受体之间的相互作用是不可忽视的,因为它们通过募集和激活效应细胞并通过治疗性抗体的细胞内降解和再循环直接调节免疫应答的效应子功能。每个生物过程都可以被视为治疗性抗体修饰的靶点,以提高疗效。本文主要综述了六种常用的治疗性抗体修饰方法的研究进展,并总结了中国在这一领域的成果。

## 2. 抗体理论和基于结构的功能的演变概述

1888年,Emile Roux [1]首次将抗体应用于治疗,使用多克隆抗血清治疗白喉。考虑到抗体的特异性,Ehrlich在1897年假设与特定化学物质结合的抗体(隐喻为“魔

术子弹”)可用于靶向治疗[2]。Von Behring和Kitasato在19世纪初提出了基于抗体的体液免疫理论[3]。该抗体的结构由Porter于1959年发现[4]; Tonegawa等[5]随后在1974年阐明了抗体可变性的遗传基础。同时,Köhler和Milstein发明了杂交瘤细胞的革命性技术,为治疗性抗体的设计和制造提供了可行途径[6]。这些里程碑式的成就为治疗性抗体的发展奠定了基础。自1986年第一种治疗性抗体orthoclone OKT3获得FDA批准以来,越来越多的抗体药物进入了生物制药市场,极大地推动了生物制药行业的发展。近年来,由于当前肿瘤治疗的局限性以及下一代DNA测序(NGS)、蛋白质组学、基因编辑和计算机辅助筛选等生物医学技术的帮助,修饰型治疗性抗体的研发开始出现。在可预见的未来,修饰型治疗性抗体将在治疗中发挥更大的作用,并在生物制药行业占据更大的份额(表1)。

表1 FDA批准上市的修饰型治疗性抗体和最近五年批准的治疗性抗体清单

Name	Trade name	Company	Target	Indications	Modification	Time
Brentuximab vedotin	Adcetri	Seattle Genetics	CD30	Lymphoma	ADC	2011
Mogamulizumab	Poteligeo	Kyowa Hakko Kirin	CCR4	T cell leukemia	Afucosylation	2012
Obinutuzumab	Gazyva	Roche	CD20	CLL	Afucosylation	2013
Ado-trastuzumab emtansine	Kadcyla	Genentech	HER2	HER2-positive metastatic breast cancer	ADC, Fc amino acid alterations	2013
Vedolizumab	Entyvio	Takeda Pharmaceuticals	$\alpha 4\beta 7$ integrin	Ulcerative colitis, Crohn disease	Fc amino acid alterations	2014
Ramucirumab	Cyramza	Eli Lilly and Co.	VEGFR2	Gastric cancer	Fc amino acid alterations	2014
Pembrolizumab	Keytruda	Merck Sharp & Dohme Corp	PD1	Melanoma	Fc amino acid alterations	2014
Nivolumab	Opdivo	Bristol-Myers Squibb	PD1	Melanoma, NSCLC	Fc amino acid alterations	2014
Blinatumomab	Blinetyo	Amgen	CD19 + CD3	ALL	bsAb	2014
Secukinumab	Cosentyx	Novartis	IL-17	Plaque psoriasis, RA		2015
Dinutuximab	Unituxin	United Therapeutics	GD2	Neuroblastoma		2015
Daratumumab	Darzalex	Johnson & Johnson	CD38	MM		2015
Alirocumab	Praluent	Sanofi	PCSK9	High cholesterol		2015
Evolocumab	Repatha	Amgen	PCSK9	High cholesterol		2015
Necitumumab	Portrazza	Lilly	EGFR	NSCLC	Fc amino acid alterations	2015
Elotuzumab	Empliciti	BMS Abbvie	SLAMF7	MM	—	2015
Mepolizumab	Nucala	GSK	IL-5	Asthma	—	2015
Idarucizumab	Praxbind	BI	Dabigatran	Reverse anticoagulant Pradaxa's blood thinning effects	—	2015
Obiltoxaximab	Anthim	Elusys Therapeutics	Bacillus anthracis anthrax	Inhalational anthrax	—	2016
Ixekizumab	Taltz	Eli Lilly and Co.	IL-17A	Plaque psoriasis	Fc amino acid alterations	2016
Reslizumab	Cinqair	TEVA RESPIRATORY LLC	IL-5	Asthma	—	2016
Atezolizumab	Tecentriq	GENENTECH INC	PD-L1	Urothelial carcinoma, metastatic NSCLC	Fc amino acid alterations	2016
Daclizumab	Zinbryta	BIOGEN	CD25	Multiple sclerosis	—	2016
Ustekinumab	Stelara	Janssen Biotech, Inc	IL-12/IL-23	Psoriatic arthritis	—	2016
Olaratumab	Lartruvo	Eli Lilly And Co.	PDGFR $\alpha$	Sarcoma	—	2016

Name	Trade name	Company	Target	Indications	Modification	Time
Bezlotoxumab	Zinplava	Merck Sharp & Dohme Corp	Toxin	Clostridium difficile infection	—	2016
Avelumab	Bavencio	Merck KGaA & Pfizer	PD-L1	MCC	—	2017
Ocrelizumab	Ocrevus	Roche	CD20	MS	Fc amino acid alterations	2017
Dupilumab	Dupixent	Regeneron & Sanofi Genzyme	IL-4R $\alpha$	Eczema	Fc amino acid alterations	2017
Sarilumab	Kevzara	Sanofi & Regeneron	IL-6R	RA	—	2017
Durvalumab	Imfinzi	AstraZeneca	PD-L1	Urothelial carcinoma	Fc amino acid alterations	2017
Brodalumab	Siliq	Valeant	IL-17	Plaque psoriasis	—	2017
Gusekumab	Tremfya	J&J	IL-23 p19	Plaque psoriasis	—	2017
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa	Pfizer	CD22	r/r B-ALL	ADC, Fc amino acid alterations	2017
Benralizumab	Fasenra	AstraZeneca	IL-5R	Asthma	Afucosylation	2017
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Wyeth-Ayerst	CD33	ALL	ADC	2017
Emicizumab	Hemlibra	Chugai (Roche)	Factor IXa, X	Hemophilia A	bsAb, Fc amino acid alterations	2017
Tildrakizumab	Ilumya	Sun Pharm	IL-23 p19	Plaque psoriasis	—	2018
Ibalizumab	Trogarzo	TaiMed	CD4	HIV	—	2018
Burosumab	Crysvita	Ultragenyx	FGF23	XLH	—	2018
Erenumab	Aimovig	Amgen	CGRP	Migraine	—	2018
Mogamulizumab	Poteligeo	Kyowa Hakko Kirin	CCR4	r/r Mycosis fungoides or Sézary syndrome	Afucosylation	2018
Lanadelumab	Takhzyro	Shire	Kallikrein	Angioedema	—	2018
Moxetumomab	Lumoxit	AstraZeneca	CD22-immunotoxin	HCL	—	2018
Fremanezumab	Ajovy	Teva	CGRP	Migraine	Fc amino acid alterations	2018
Galcanezumab	Emgality	Eli Lilly	CGRP	Migraine	Fc amino acid alterations	2018
Cemiplimab	Libtayo	Regeneron	PD-1	CSCC	Fc amino acid alterations	2018
Ravulizumab	Ultomiris	Alexion	C5	PNH	Fc amino acid alterations	2018
Caplacizumab	Cablivi	Genzyme Corporation	vWF	aTTP	Nanobody	2019
Romosozumab	Evenity	Amgen	Sclerostin	Osteoporosis	—	2019
Risankizumab	Skyrizi	AbbVie	IL-23	Plaque psoriasis	Fc amino acid alterations	2019
Polatuzumab vedotin	Polivy	Genentech	CD79b	r/r DLBL	ADC, Fc amino acid alterations	2019
Brolucizumab	BEOVU	Novartis	VEGF-A	Macular degeneration	—	2019
Crizanlizumab	Adakveo	Novartis	P-selectin	Sickle-cell disease	Fc amino acid alterations	2019
Enfortumab vedotin	Padcev	Seattle Genetics and Astellas	Nectin-4	Urothelial cancer	ADC	2019
[Fam]-trastuzumab deruxtecan	Enhertu	Astra Zeneca and Daiichi Sankyo	HER2	HER2-positive breast cancer	ADC, Fc amino acid alterations	2019

CD: cell differentiation molecular; Fc: fragment of crystallizable domain; ADC: antibody–drug conjugate; CCR: CC chemokine receptor; ALL: acute lymphatic leukemia; HER: human epidermal growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; PD-1: programmed cell death receptor-1; IL: interleukin; GD: disialoganglioside; PCSK: proprotein convertase subtilisin/kexin; EGFR: epidermal growth factor receptor; SLAMF: signaling lymphocytic activation molecule family; PD-L1: programmed cell death-ligand 1; PDGFR $\alpha$ : platelet-derived growth factor receptor alpha; HIV: human immunodeficiency virus; FGF: fibroblast growth factor; CGRP: calcitonin gene-related peptide; VEGF: vascular endothelial growth factor; aTTP: acquired thrombotic thrombocytopenic purpura; CLL: chronic myeloid leukemia; CSCC: cutaneous squamous cell carcinoma; HCL: hairy cell leukemia; MCC: Merkel cell carcinoma; MM: multiple myeloma; MS: multiple sclerosis; NSCLC: non-small cell lung carcinoma; PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RA: rheumatoid arthritis; r/r B-ALL: relapsed or refractory B cell precursor acute lymphoblastic leukemia; r/r DLBL: relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma; XLH: X-linked hypophosphatemia; vWF: von Willebrand factor.

抗体作为免疫反应的重要效应器,能够识别、中和、清除致病抗原。这些生物学功能受抗体结构决定的特性调节,如结合亲和力和药代动力学。在结构和功能研究期间,抗体在一定条件下可以被木瓜蛋白酶水解,产生两个抗原结合片段(Fab)和一个可结晶结构域片段(Fc)。具体地说,Fab由一个重链可变区(VH)、一个轻链可变区(VL)、一个轻链恒定区(CL)和一个重链恒定区1(CH1)组成。在VH和VL中,分别有三种不同的可变氨基酸序列,它们形成与抗原表位互补的空间构象。这些序列被称为互补决定区(CDR),其余序列被称为框架区(FR)。Fab结构域以单价模式特异性区分和结合抗原或靶细胞。作为Fab修饰,组氨酸(-lgK<sub>a</sub>约为6, K<sub>a</sub>是酸的解离常数)残基点突变为CDR或FR产生了依赖于pH的结合抗体,该抗体能解离酸性内体中的结合抗原,并可循环回血浆以多次结合抗原[7-9]。这种修饰策略已应用于抗白细胞介素-6受体(IL-6R)的萨特利珠单抗(Satralizumab)治疗视神经脊髓炎谱系障碍(NMOSD),并证明复发风险降低[10]。Fc部分由CH2和CH3结构域组成,不具有结合抗原的活性,与靶细胞上的受体(FCR)相互作用,随后引发多种免疫效应,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。Fc修饰,如经工程化改造的抗体糖基化,可增强ADCC效应,从而提升抗体的疗效,如上市的针对T细胞白血病C-C趋化因子受体4型(CCR4)抗体。此外,抗体受体对结合和下游生物过程至关重要。靶细胞上的新生儿Fc受体(FcRn)调节依赖于pH的免疫球蛋白G(IgG)的分解代谢[11-12]。在pH较低(<6.5)的情况下,结合受Fc区组氨酸310(His310)、组氨酸435(His435)和组氨酸436(His436)质子化的调控[13]。质子化导致残基带有正电荷,可与FcRn中带有负电荷的谷氨酸117(Glu117)、谷氨酸132(Glu132)和天冬氨酸137(Asp137)结合[14]。在生理性细胞外环境中,IgG对FcRn的亲和力较弱,导致其从受体释放到循环中[15]。这些结构特征既可以自然调控,也可以人工修饰,以保证治疗性抗体作为生物药物的临床有效性。

### 3. 全球修饰治疗性抗体研究进展

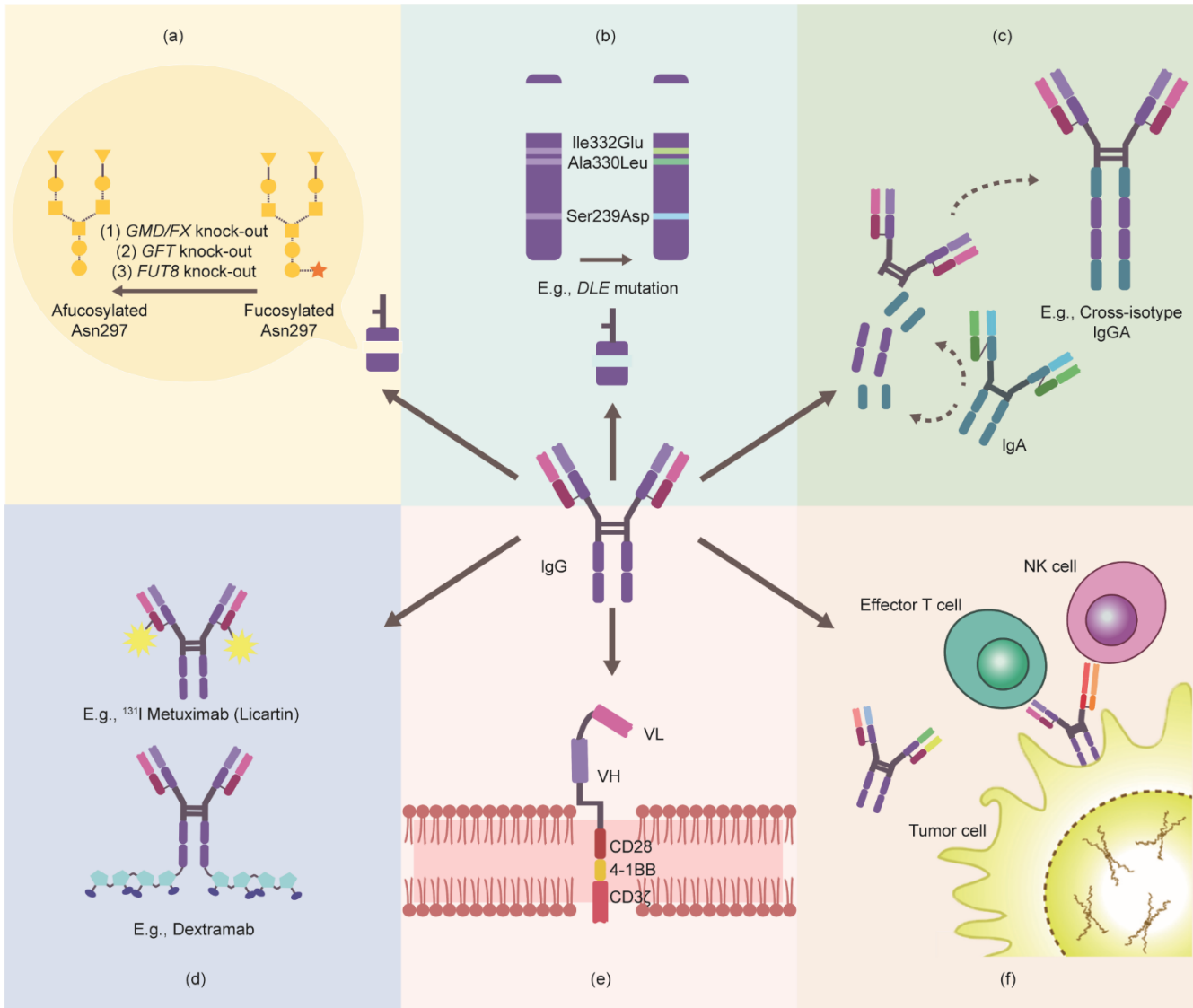
随着全球创新抗体药物的多样性不断呈现,治疗性抗体的修饰已逐渐成为生物医学研究的热点。就功能而言,抗体从患者体内募集免疫成分以执行效应功能,其主要机制包括ADCC效应、补体依赖的细胞毒性(CDC)和抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)[16]。Fcγ受体(FcγR)的参与对于ADCC和ADCP是必需的,因为与抗体CH2

结构域结合的补体系统的补体蛋白1q(C1q)激活CDC。此外,IgG被细胞内吞,可从内体穿核至溶酶体以低FcRn结合亲和力降解[15],或循环回到胞外膜[17-18]。通过抗体FcRn结合测定,可通过修饰来改善循环和半衰期,以改善药效学中的不足。基于修饰型治疗抗体的努力,修饰方式可分为以下几类:①糖基化修饰;②恒定区Fc氨基酸变构;③重构抗体亚类;④抗体-药物偶联物(ADC);⑤嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞的可变区片段单链(scFv);⑥双特异性抗体(bsAb)。根据这一分类,将修饰的治疗性抗体已取得的进展总结如下(图1)。

#### 3.1. 糖基化修饰

抗体的ADCC效应是由Fc与自然杀伤(NK)细胞上表达的相应FcγRIIIa(CD16a)的相互作用触发的,对Fc糖基化状态敏感[19-20]。IgG的Fc区包括天冬酰胺297(Asn297)位的N-连接糖基化位点,其中寡糖链通常由两个N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、三个呈“V”形的甘露糖和两个与甘露糖连接形成双十进制复合聚糖的GlcNAc组成[21]。其他岩藻糖、GlcNAc、唾液酸和半乳糖可连接至核心聚糖结构。Asn297聚糖(在该位点实际上是岩藻糖)直接作用于FcγR结合,可与CD16a上的聚糖碰撞并影响铰链区构象,从而减弱ADCC效应细胞的接合[22-24]。尽管大多数哺乳动物IgG在Asn297处被岩藻糖基化[25-27],但在全面了解Fc区这种位点特异性岩藻糖基化的基础上,已经提出了一些策略。岩藻糖基化过程包括三个步骤:①细胞质中合成的鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖(GDP-岩藻糖)是第一步的底物,来源于GDP-甘露糖。GDP-岩藻糖的转化是由4,6-脱水酶(GMD)和GDP-酮基-6-脱氧甘露糖3,5-差向异构酶/4-还原酶(称为FX)作为主要合成代谢源催化的,称为从头途径[28]。②作为岩藻糖基化反应的底物,合成的GDP-岩藻糖必须转运到内质网(ER)或高尔基体。由*Slc35c1*基因编码的GDP-岩藻糖转运体(GFT)负责向高尔基体的转运[29]。③FUT8是唯一的α-1,6-岩藻糖基转移酶,可通过α-1,6键将岩藻糖转移到N-聚糖上最里面的GlcNAc,进行核心岩藻糖基化[30]。此外,由β-1,4-甘露糖基-糖蛋白4-β-N-乙酰葡糖胺基转移酶(GnT-III)催化产生的二等分GlcNAc可有效诱导四聚化,因为GlcNAc通过1,4-β键与N-聚糖三甘露糖基化核的β-连接甘露糖连接[31]。因此,靶向上述酶以调节岩藻糖基化过程对于抗体糖基化以增强ADCC效应在理论上是可行的。

为了调节与岩藻糖基化相关的酶,通过基因编辑方法,如敲除或锌指核酸酶(ZFN)对生产细胞系进行修饰



**图1.** 修饰型治疗性抗体的常用修饰方法。(a) 糖基化修饰作用针对Fc区CH2结构域中的岩藻糖基化位点天冬酰胺297 (Asn297)。关键酶和转运蛋白是岩藻糖基化的主要调节因子, 包括4,6-脱水酶 (GMD)、鸟苷二磷酸 (GDP)-酮基-6-脱氧甘露糖3,5-差向异构酶/4-还原酶 (FX)、 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶 (FUT8) 和GDP-岩藻糖转运蛋白 (GFT)。对其采用功能丧失策略是一种常规的抗体糖基化修饰。虚线表示可变糖基化, 而实线表示Fc区Asn297聚糖中的核心糖基化。(b) Fc氨基酸变构可改变靶细胞的亲和力和效应功能以及抗体的半衰期。被称为DLE突变的丝氨酸239天冬氨酸 (Ser239Asp) /异亮氨酸332谷氨酸 (Ile332Glu) /丙氨酸330亮氨酸 (Ala330Leu) 就是一个例子。(c) 重构抗体亚类可整合由不同种型免疫球蛋白阐明的不同效应子功能。在所实例的Fc结构域中的融合区, 交叉同种型IgG由CH1a-CH2g-CH3g-CH3a组成。(d) ADC是一种基于特异性抗体导向的细胞毒性药物。这里, 星形代表放射性同位素 $^{131}\text{I}$ , 浅蓝色五边形代表葡聚糖多糖支架, 深蓝色椭圆形代表细胞毒剂。(e) 此处所示的CAR是第三代CAR, 胞内膜中同时存在共刺激结构域CD28和抗人肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (4-1BB)。VH和VL依赖于靶向相应抗原的特异性抗体。(f) bsAb在组件和格式方面差异很大, 并且具有集成功能。NK: 自然杀伤细胞。

是一种常见的方法。Louie等[32]报道了一种FX敲除的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系, 该细胞系可用于产生具有完全非糖基化N-聚糖的抗体。在工业蛋白生产宿主细胞系CHO中, ZFN法对*Slc35c1*和*FUT8*基因的灭活产生了岩藻糖基化抗体, 而对细胞生长、活力或产品质量没有不利影响[31]。三种上市的糖化工程抗体中的两种, 即mogamulizumab (Poteligeo)和benralizumab (Fasenra, MEDI-563), 是在FUT8敲除CHO细胞中产生的。此外, 发现GnT-III和高尔基体常驻酶 $\alpha$ -甘露糖苷酶II ( $\alpha\text{Man II}$ )

的联合过表达导致IgG抗体上的二等分和抗体糖基化聚糖水平最高, 并已应用到商业化抗CD20抗体obinutuzumab (GA101)制备中。奥滨尤妥单抗具有增强的Fc $\gamma$ R亲和力, 是联合苯丁酸氮芥治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL)的一线治疗药物[33-35]。因此, 使用糖工程技术来调节岩藻糖基化的关键酶是修饰型抗体治疗的可行方法, 具有公认的有效性。

除了Asn297糖基化外, 还发现了抗体糖基化的一个潜在应用, 即二半乳糖基化修饰可作为抗体选择性转移穿

过胎盘的主要调节剂。Martinez等[36]揭示,在人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的妇女中,抗体通过胎盘转移的效率受母体IgG特征的影响,如与胎盘表达的Fc $\gamma$ RIIa和Fc $\gamma$ RIIIa的结合,以及Fc区聚糖概况。此外,Fc区聚糖的二等分和去分析修饰与转移效率相关,较低的岩藻糖水平被证明是这一过程中的有利因素。此外,Jennewein等[37]侧重于新生儿疫苗接种,并研究了新生儿和母体抗体的Fc谱。他们发现,以选择性结合FcRn和Fc $\gamma$ RIIIa为特征的二半乳糖基化Fc-聚糖导致了优先抗体转移,以有效利用先天免疫细胞(主要是出生第一天的NK细胞),从而促进了NK细胞脱颗粒和细胞因子分泌的增强[38–39]。这些发现为下一代母体疫苗诱发新生儿辅助抗体提供了新见解。

### 3.2. 抗体恒定区Fc氨基酸改造

由于Fc区的序列变异会影响对FCR以及补体蛋白C1q的特异性和亲和力,因此通过氨基酸突变对该恒定区序列进行修饰可以改变效应蛋白的功能。修饰策略取决于与Fc $\gamma$ R结合的效应,因为Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIc、Fc $\gamma$ RIIIa和Fc $\gamma$ RIIIb是激活受体[40],而Fc $\gamma$ RIIb是唯一发挥抑制作用的受体[21]。鉴于Fc $\gamma$ RIII的ADCC起始作用,研究人员在调控Fc $\gamma$ RIII结合方面已经做了很多工作。随着丝氨酸239天冬氨酸(Ser239Asp)/异亮氨酸332谷氨酸(Ile332Glu)/丙氨酸330亮氨酸(Ala330Leu)的突变(称为DLE),发现Herceptin能募集更多的NK细胞,然后在首次接触时杀死靶细胞,而不管癌症抗原的表达水平如何[41–42]。抗整合素抗体MEDI-522和利妥昔单抗显示出与DLE突变相似的改善疗效[43]。此外,不对称Fc突变启发研究人员在一个抗体Fc区结合不同的突变形式。一条Fc重链中的亮氨酸234酪氨酸(Leu234Tyr)、甘氨酸236色氨酸(Gly236Trp)和Ser298Ala(称为YWA突变)的组合被引入另一条带有DLE突变的重链,从而在体外产生更高效的ADCC效应[44]。至于巨噬细胞通过Fc $\gamma$ RI-Ia结合产生的ADCP效应,在体外发现Ser239Asp/Ile332Glu/Gly236Ala会促进Fc $\gamma$ RIIa依赖的ADCP和Fc $\gamma$ RIII依赖的ADCC活性[45]。然而,鉴于Fc $\gamma$ RIIa与抑制性Fc $\gamma$ RIIb之间的序列相似性为90%,这种突变不可避免地导致对Fc $\gamma$ RIIb的结合亲和力增加了13倍[46]。相反,与Herceptin相比,靶向人表皮生长因子2(HER2)并具有优化突变苯丙氨酸243亮氨酸(Phe243Leu)/精氨酸292脯氨酸(Arg292Pro)/Tyr300Leu/缬氨酸305异亮氨酸(Val305Ile)/Pro396Leu以获得合理比值的玛格妥昔单抗(Margetuximab)显示出更好的ADCC活性[47–48]。

当涉及CDC相关修饰时,不应忽视对ADCC和AD-CP等其他效应因子功能的影响,因为已发现三重突变Ser267Glu、His268Phe和Ser324Thr可通过增加对抑制性Fc $\gamma$ RIIb的亲和力,在很大程度上改善了CDC,但代价是ADCC和ADCP减少[41]。因此,在Fc区序列改变时,应考虑结合激活和抑制Fc $\gamma$ R的比值。

至于半衰期延长,研究发现四重突变Ser298Ala、Glu333Ala、赖氨酸334丙氨酸(Lys334Ala)和Asn434Ala可增强与FcRn和Fc $\gamma$ R的结合[49]。Glu294缺失导致Fc上Asn297聚糖的唾液酸化更高,并在体内显示出更长的抗体半衰期[50]。由此可以得出结论,血清半衰期调节并不局限于FcRn结合,还包括唾液酸化作用。

### 3.3. 抗体亚类重构

考虑到不同抗体恒定区Fc同种型与其相应的FcRs结合以诱导相应的免疫应答,这类修饰抗体旨在通过用来自不同的同种型/亚类的片段重组和(或)替换天然Fc结构域的片段以形成交叉同种型抗体来增强ADCC和(或)CDC效应,研究人员试图使用多个Fc片段尝试。由于中性粒细胞通过Fc $\alpha$ 受体I(Fc $\alpha$ RI)与免疫球蛋白A(IgA)抗体的Fc结合[51–52],Chintalacheruvu等[53]在 $\gamma$ 1恒定区的末端附加了IgA2的单个结构域,并用 $\alpha$ 1的结构域取代 $\gamma$ 1的CH1结构域,形成称为IgGA的四结构域恒定区(CH1a–CH2g–CH3g–CH3a)。与IgG1相比,该交叉同种型抗体受pH的影响较小,能够介导绵羊红细胞的补体依赖性裂解。Borrok等[54]报道了通过将IgA2的铰链、CH2和CH3融合到IgG1的C端而产生的串联交叉同种型IgG/IgA。在体外,它能够以野生型IgA和IgG的近似亲和力分别结合Fc $\alpha$ RI、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIIIa和FcRn,因此它可以通过中性粒细胞和NK细胞介导ADCC,而C1q结合与IgG1相比受损3倍。

鉴于IgG3在体外对C1q的高亲和力,引入IgG3以产生具有增强的IgG3效应子功能的IgG1/G3跨亚类抗体[55]。更有效的嵌合形式是将CH1和IgG1的铰链区融合到名为1133的IgG3Fc区。即使抗原水平较低,1133的CDC活性也优于IgG1或IgG3[55–56]。此外,在没有预期属性的情况下,可以利用细微的修改来实现重构功能增益。IgG2和IgG4不能像IgG1和IgG3那样诱导CDC[57],根据这一策略,可以通过用IgG3的CH2结构域替换IgG2的CH2结构域,从而赋予CDC活性。此外,改变C1q结合IgG的331位IgG4残基,以引发CDC活性与IgG1匹配,从而产生中等水平的CDC[56]。因此,可引入与抗体特定功能相关的残基,以在相应的Fc结构域中获得功能增

益，从而赋予相应Fc结构域获得性功能。

### 3.4. 抗体-药物偶联物

单克隆抗体源于Paul Ehrlich提出的“魔术子弹”概念，即将细胞毒性剂、放射性药物、免疫毒素等多种效应分子与单抗结合，产生靶向治疗的新模式——ADC [58]。一般而言，ADC由三部分组成：第一个组成部分是单克隆抗体，它与第二个组成部分[作为超毒性有效载荷（或弹头）的效应分子]结合，诱导靶细胞死亡，通过第三个组成部分（一个稳定且可条件生物降解的接头）连接 [59]。ADC在临床实践中的可用性取决于每种成分是否具有适当的特性，包括增强的接头稳定性、突出的功效、充分的有效载荷释放，更重要的是人源化抗体或人抗体作为减弱免疫原性和提高选择性的框架。这方面已经取得了进展，目前共有10款ADC获准临床应用。此外，由Cell-dex/Seattle Genetics开发的针对晚期黑色素瘤靶向糖蛋白NMB (gpNMB)的glembatumumab vedotin (CDX-011)已在第二阶段研究中显示出适度的活性和可接受的安全性特征 [60]，并有望作为ADC获得FDA批准用于临床。

ADC的组成可以看作是对单抗进行修饰以提高其治疗效果的修饰产物。作为ADC疗效的关键决定因素，细胞毒性有效载荷主要靶向DNA（如卡利奇霉素和多卡霉素）或微管蛋白（如美登素碱和奥瑞他汀类）。Szot等 [61]报道了一种强效甲基澳瑞他汀E (MMAE) 连接型ADC，该ADC通过由肿瘤微环境中的基质细胞激活的前体药物引发抗癌活性 (TME)，这被称为药物激活并通过基质释放 (DAaRTS)。肿瘤相关基质细胞释放活性游离药物MMAE，以靶非依赖性方式杀伤附近增殖的肿瘤细胞。这种设计克服了传统ADC局限于抗原阳性患者治疗的问题。

装载大量毒素通常会意外导致亲水性受损，从而损害ADC的生物物理特性，包括溶解度降低、聚集反应降低以及药物抗体比 (DAR) 不超过3~4 [62-64]。Schneider等 [59]开发了一类新的混合ADC，称为dextramabs。治疗性抗体曲妥珠单抗配有多种价葡聚糖多糖，如HER2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系所证明，其DAR升高、亲水性显著、毒性剂负载高效且体外毒性高。

关于接头修饰，由于ADC上的接头也可与可检测标记物如荧光团缔合 [65]，标记抗体的方法通常依赖于通过遗传编码的氨基酸（如游离半胱氨酸残基）对链间二硫化物进行修饰 [66]。这些传统方法有以下缺点：①二硫键还原后半胱氨酸残基的修饰很困难，可能会产生多相混合物 [67]；②在抗体中通过遗传插入非典型氨基酸可能会改变

抗体天然序列及牺牲与靶抗原结合亲和力的风险 [68]。Matos等 [69]通过核心有机化学反应制定了区域选择性赖氨酸方法，其中2-（磺酰基甲基）丙烯酸甲酯（缩写为1c）无需基因工程直接改性抗体天然蛋白序列上的单个赖氨酸残基。曲妥珠单抗的修饰不仅实现了定点特异性荧光标记，产生了曲妥珠单抗-1c-异硫氰酸荧光素 (FITC)，而且在与其未修饰的对应物相同的浓度范围内，保持了曲妥珠单抗对其靶抗原 (HER2/c-erb-2) 的特异性 [70]。通过激酶抑制剂克唑替尼 [已批准用于治疗间变性淋巴瘤激酶 (ALK)-重排非小细胞肺癌 (NSCLC)] 与曲妥单抗-1c中存在的丙烯酸酯偶联，进一步验证了该方法，以构建稳定、功能性ADC的可行性 [71]。ADC曲妥单抗-1c-克唑替尼保持了抗原结合特性，二级结构内容物对表达高水平HER2抗原的SKBR3细胞保持了特异性。

当通过引入额外的成分（包括特殊的接头和有效药物）来修饰抗体药物时，应综合考虑ADC的特性，如亲水性、半衰期和受体亲和力等。

### 3.5. 基于单链可变区片段的嵌合抗原受体T细胞

CAR是由特异性抗体的单链抗体 (scFv) 与细胞内信号转导子、CD3的 $\zeta$ 亚单位 (CD3 $\zeta$ ) 和共刺激域如CD28或抗人肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (4-1BB) 融合而成的蛋白质 [72]。对患者的自体T细胞进行基因工程改造以表达外源CAR，称为CAR-T细胞；随后将它们输注回患者体内以识别特异性抗原并杀死抗原表达细胞，从而用作细胞疗法。CAR可被视为一种由T细胞表达的修饰抗体的特殊形式。可以推断，源自某些抗体的CAR决定了靶点的特异性和治疗效果。2017年，诺华制药公司（瑞士）开发的kymriya (tisagenlecleucel-T, CTL019) 和Kite Pharma Inc.（美国）开发的Yescarta (axicabtagene ciloleucel) 经两次或两次以上全身治疗后，被批准用于复发性或难治性大B细胞淋巴瘤，如弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)。截至2020年12月31日，已有900多项与CAR-T相关的临床研究被注册为临床试验，中国是临床研究最活跃的地区 (420项)，也是所有临床试验中CAR-T研究比例最高的地区，紧随其后的是美国 (261项)。

尽管CAR-T疗法通过强化免疫系统和重定向特定免疫细胞显示出显著的疗效 [73-74]，但该策略存在三个问题：

(1) 治疗后可能出现安全问题。CAR-T最常见的流行性毒性是由抗原表达细胞的识别和杀伤引起的 [75]，其次是细胞因子释放综合征 (CRS) [76] 和脑水肿体现的神经毒性 [77]。降低CAR-T细胞剂量可降低毒性，但代价是

降低了临床有效性[78];因此,IL-6R抗体(托吉利单抗)、IL-6抗体(斯妥昔单抗)、Janus激酶(JAK)抑制剂和皮质类固醇已被用于阻断促炎性IL-6信号,以逆转发热、低血压和缺氧[79–80]。这两种毒性的机制尚不明确,部分原因是缺乏用于临床前研究的信息丰富的动物模型。

(2)靶抗原的特异性和选择可能存在问题。“脱靶效应”毒性会对患者造成意外伤害,因为非癌细胞也会表达靶向抗原[81]。更糟的是,在接受治疗的患者中不断观察到抗原逃逸[82]。因此,发现高度癌症特异性抗原是非常必要的,以防止在病情差的患者中发生额外事件。此外,CAR-T治疗应涵盖包括不同抗原和单一抗原剪接变体的多靶点。

(3)可能存在对自体T细胞疗效的高估。在肿瘤微环境中,T细胞免疫受复杂网络的调节,尤其是实体瘤,包括但不限于免疫检查点,如程序性细胞死亡-配体1(PD-L1)和代谢改变,如缺氧和氧化应激等。因此,T细胞的免疫效力会受到损害[83]。此外,与癌症治疗相关的免疫缺陷会使患者的免疫状态和功能恶化。值得欣慰的是,转录激活子样效应核酸酶(TALEN)和簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas9等基因组编辑技术已被应用于T细胞工程,以增强CAR-T细胞的功能[84–85]。此外,在当前进行的研究中,研究结果已表明来自健康供体的通用CAR-T细胞可潜在地避免免疫状态的损害[84–86],如主要组织相容性复合体(MHC)的固有屏障被消除[87–88]。因此,对于特异性修饰的抗体形式CAR,在免疫调节网络、最佳抗原选择和复杂的亲和力调节(尤其是通过基因工程)方面仍有许多需要探索的地方。

### 3.6. 双特异性抗体

双特异性抗体(bsAb)是指一个大的重组分子家族,其被设计为识别两个疾病相关靶标或一个分子中的不同靶位,这打破了天然的IgG结构形式[89],实行抑制单个靶点可能无法达到显著的功效。总的来说,bsAbs的构建策略旨在实现如期望的临床疗效、优化的理化性质、最小或无免疫原性风险以及可扩展性、可制造性等优势,避免知识产权问题。通过科研人员的不断探索,当前已经产生了大约100种不同形式的bsAb形式[89],这些不同形式大体上可以分为两大类:带有Fc区域的和没有Fc区域的。在这些形式中,有比较公认的基因工程抗体片段,如scFv[来自Llama(VHH)的单结构域抗体]和Fab,被用作构建模块,即作为制备bsAb的基本模块[90–92]。这些片段的范围从串联的scFv/VHH到预期靶点的IgG样分子[89,93–94]。在此,我们描述了bsAb类型的候选抗体作为下一

代基于优化抗体的治疗潜力,以及临床开发情况。

到目前为止,超过85种bsAbs正在临床开发中,其中约20多种商业化技术平台可用于bsAbs治疗药物的开发[89]。在已开发的bsAbs中,有两种类型已经上市:blinatummab(CD3×CD19,其中×表示两种抗原特异性的组合)[95],一种用于急性淋巴白血病(ALL)和B细胞-ALL的基于片段的双特异性T细胞接合物(BiTCE);用于常规预防甲型血友病患者的全尺寸双特异性IgG-emizumab[凝血因子IXa(cFIXa)×凝血因子X(cFX)和(或)凝血因子Xa(cFXa)]。

bsAbs可根据所结合的细胞进行分类,即作为激活T细胞(CD3<sup>+</sup>)以启动T细胞受体(TCR)信号传导的BiTCE或作为CD16a相关的bsAb,其可激活NK细胞(CD16a<sup>+</sup>)和树突细胞(DC)以诱导ADCC效应。到目前为止,共有158个BiTCE,靶点主要集中在CD19(13个)、表皮生长因子受体(EGFR)(12个)、HER2(11个)、B细胞成熟抗原(BCMA)(10个)和前列腺特异性膜抗原(PSMA)(8个)等。重定向优化细胞杀伤(ROCK)技术平台开发了与CD16a结合的bsAb AFM24(EGFR×CD16a)、AFM26(BCMA×CD16a)和AFM13(CD30×CD16a)。它们对CD16-158V和CD16-158F编码的不同同种型的CD16a均表现出相似的亲和力,克服了CD16-158F对Fc区亲和力较低的优点。AFM24和AFM26在体外对靶细胞的杀伤能力更强,而AFM1在I/II期临床研究中的安全性和耐受性均可接受,且临床总体应答率(ORR)较高。

按照双特异性抗体机制对bsAb进行分类也是可行的,如下所示。①组合型bsAbs可被设计为抗体的混合物,该类药物可以减轻患者的经济负担。然而,在开发过程中固定的各组分比例不能根据不同患者的情况进行个性化设置。同样,药效学和耐受性的优化也存在困难[89]。②专性bsAb是指具有连接结合域的bsAb,这些结合域产生抗体混合物无法实现的新功能。时间专性bsAb负责协调组件的顺序结合。例如,结合第一结构域通过使远端靶目标易于接触,从而促进第二结构域的功能。空间专性bsAb发挥依赖于结构域同时结合的功能。因此,靶向抗原在空间中重新分布,并在这种以空间bsAb为主的定位下促进下游效应。空间专性bsAb的相互作用模式类似于效应细胞与抗原呈递细胞或酶及其底物之间的相互作用模式。根据这一分类,图2显示了已注册的bsAb临床研究的阶段和进展<sup>†</sup>。

随着创新理念的出现,创新的概念可能会引领这个领

<sup>†</sup> <https://clinicaltrials.gov>.



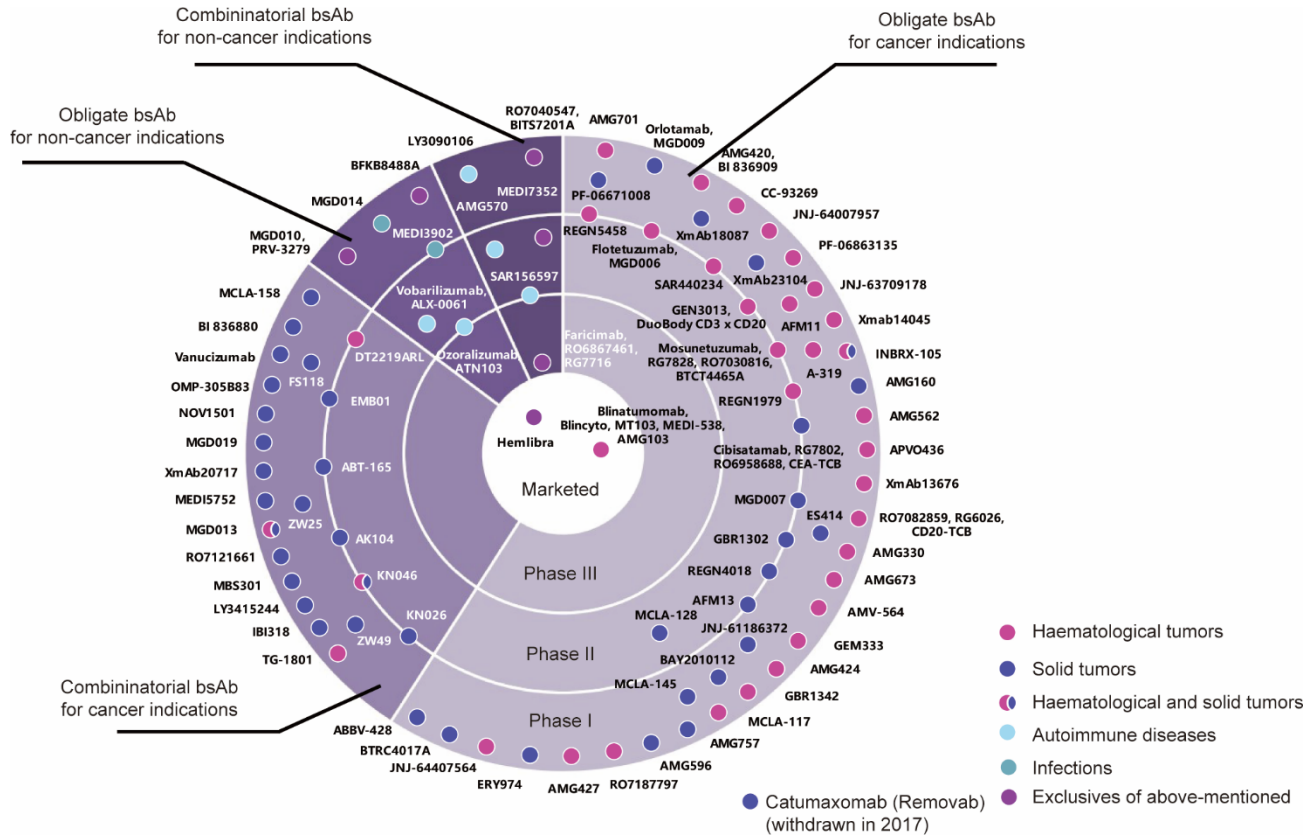


图2. bsAb 临床试验阶段的更新总结。在 Labrijn 等[89]审查分类后, 根据适应症对已注册的 bsAb 进行了分类 (数据于 2019 年 9 月获得)。肿瘤是 bsAb 批准的主要研究疾病, 比例为 85.2% (75/88)。其中, 45 种 bsAb 用于实体肿瘤, 37 种 bsAb 用于血液肿瘤。值得注意的是, 用于 HIV 感染的 MGD014 (CD3 × HIV-1 Env) 和用于预防绿脓杆菌肺炎的 MEDI 3902 [pslexopolysaccharide (Psl) × 绿脓杆菌 (PcrV) V-抗原] 带来了为难治性感染管理的希望。2017 年, 因商业原因停用了 Catumaxomab [CD3 × 上皮细胞黏附分子 (EpcAM)], 因其在低剂量时出现致死性毒性。

域的未来方向。通过 mRNA 或 DNA 编码的治疗性 bsAb 的非蛋白质递送缩短生产周期以获得药用级的核酸产品是有吸引力的。Stadler 等[96]描述了一种基于片段的 BiTCE [CD3 × 紧密连接蛋白 claudin 6 (CLDN6)], 由经过优化的核苷修饰的 mRNA 编码, 在体内可持续产生抗体。通过基于聚合物和 (或) 基于脂质的制剂静脉给药后, 可以确保肝脏中的靶向性和后续翻译。该系统被证明与相应的纯化蛋白递送 bsAb 一样有效。由于具有更好的热稳定性, DNA 编码形式的 bsAb 递送能够实现不太严格的转移条件和相对长期的储存。类似的研究显示: Petal 等[97]和 Digiandomenico 等[98]证明了 DNA 可编码的对称 bsAb 形式, 其在体内可持续表达靶向致病成分, 如绿脓杆菌的 V-抗原 (PcrV) 和绿脓杆菌的 pslexopolysaccharide (Psl)。与蛋白质递送系统相比, 这一革新在功效上与前者几乎没有差异。此外, Labrijn 等[89]利用了一条 J 链, 该链与 IgA 和 IgM 的天然框架相连, 并将其连接到效应细胞靶向臂上。这种设计被证明允许设计具有 1 + 4 双特异性形式, 如二聚体 IgA 的情况, 或设计具有 1 + 10 双特异性形式, 如五聚体 IgM 的情况, 其可以诱导以低水平表达的更高亲和力

靶向致病驱动因子的抗体。灵活和更少的约束结构赋予了 bsAb 在发挥功能和提高临床管理疗效方面具有无可比拟的优势。随着商业化技术平台的繁荣和完善, 应充分利用双特异性改构和优化, 探索新的治疗靶点 (策略)。

#### 4. 中国修饰型治疗性抗体研究进展

近年来, 中国在引进和吸收先进技术的基础上, 在治疗性抗体研发方面取得了不少突破。肿瘤免疫检查点抗体就是其中一个例子, 目前已有 25 种治疗性抗体在中国国家药品监督管理局药品审评中心 (CDE) 注册。其中, 上海 Medipharm 生物技术有限公司开发的 Toripalimab (JS-001) 是国内临床试验中第一种抗程序性细胞死亡受体-1 (PD-1) 的单抗, 已被中国国家药品监督管理局 (NMPA) 有条件批准用于治疗不可切除或转移性黑色素瘤[99]。2019 年 5 月, 江苏恒瑞制药股份有限公司开发的人源化 IgG4-κ 抗 PD-1 单克隆抗体 Camrelizumab (SHR-1210) 获得有条件的批准上市, 用于治疗复发性或难治性经典型霍奇金淋巴瘤[100]。这些国内开发的产品代表了中国在生物

治疗药物创新和发展方面的潜力和能力。

在修饰型治疗性抗体领域，国家重点开发计划项目“精准医学研究”启动了修饰抗体和免疫细胞研究项目。这些项目将针对临床精准医学的修饰型治疗性抗体的战略，构建和探索相关遗传表型检测试剂和方法，与建立基于生物制剂的个性化治疗相结合。近年来，中国在修饰型治疗性抗体的研究取得了广泛发展。附录A中的表S1展示了中国学者开发并已获中国CDE批准用于临床试验的修饰型治疗性抗体药物。

#### 4.1. 糖基化修饰

在2014—2015年埃博拉病毒病（EVD）暴发期间，由北京美宝生物科技有限公司开发的称为MIL77的单克隆抗体混合物治愈了来自英国和意大利的两名埃博拉病毒（EBOV）感染患者。该研究通过对表达MIL77的CHO细胞进行了糖工程改造，防止岩藻糖基化，从而证明了抗体糖基化修饰在有效治疗抗体产生中的作用[101–102]。此外，在三个月内及时完成了MIL77的高效构建和生产。MIL77单抗的生产展示了中国在生物制药行业的速度和能力。MIL77于2017年获得NMPA的临床批准，并进行了一期临床研究。

在肿瘤治疗相关治疗方面，陈志南院士等[103]开发了Metuzumab (HcHAb18)，这是一种针对CD147的亲合力优化且经抗体糖基化的人-鼠嵌合IgG1单克隆抗体，具有增强的ADCC效应。该成果于2016年被中国医药生物技术协会列入“中药生物技术十大进展”，新型单克隆抗体HcHAb18作为一种独立创新的生物产品，已被用于非小细胞肺癌患者，该抗体基于前期针对肝癌的美妥昔单抗，经过人源化和抗体糖基化等修饰。Metuzumab通过靶向在NSCLC中高度表达的CD147，增强了抗体的ADCC效应，并使肿瘤细胞对化疗及化疗药物联合用药敏感[103]。

#### 4.2. 抗体-药物偶联物

2019年9月初，中国台湾省的一家生物制药公司OBI Pharma, Inc. 宣布，FDA已接受其新型一流名为OBI-999的ADC临床新药（IND）申请。该ADC采用专有接头技术，在癌症治疗中保持一致的DAR，其基础是以Globo-H（一种在多达15种上皮癌中高度表达的鞘糖脂）为靶点。在临床前研究中，OBI-999在乳腺癌细胞和异种移植模型中引发细胞凋亡并抑制转移[104]。这些发现为深入了解肿瘤细胞的异常糖基化和实体肿瘤的原始治疗靶点提供了线索，OBI-99目前处于I/II期临床试验。

放射免疫疗法（RIT）作为抗体ADC的一种，用特异性亲本抗体的引导作用靶向病灶内的肿瘤细胞，并通过放射性标记发挥杀伤作用，是靶向治疗的重要组成部分。<sup>131</sup>I标记的小鼠/人嵌合单克隆抗体chTNT是上海Medi-pharm生物技术有限公司开发的一种基于肿瘤坏死治疗抗体的放射性核素增强ADC，利用抗原靶向所有退化细胞[105–106]。43例患者的<sup>131</sup>I-chTNT介导的RIT对晚期肺癌具有显著的治疗作用[106]。名为Licartin™的<sup>131</sup>I美妥昔单抗注射液是一种<sup>131</sup>I偶联的抗CD147抗体美妥昔单抗，是经Zhang等[103]和Chen等[107]修饰的ADC药物。该药在原发性肝细胞癌（HCC）患者的治疗中证明了其安全性和活性。在晚期HCC，Licartin™可有效预防原位肝移植（OLT）后肿瘤复发，肿瘤复发率显著降低30.4%，生存率提高20.6% [108]。另一种新型抗CD147 ADC通过名为HcHAb18-DM1的不可裂解硫醚接头（SMCC）与强效细胞毒性药物微管蛋白抑制剂美登木素衍生物1（DM1）偶联。对于NSCLC，与对照组相比，在体外观察到HcHAb18-DM1处理组的有丝分裂纺锤体形成和抗增殖活性受到干扰。同时，在给予HcHAb18-DM1的A549异种移植裸鼠中，肿瘤重量和体积下降支持HcHAb18-DM1在针对CD147阳性NSCLC的临床治疗中具有良好的前景[109]。

#### 4.3. 嵌合抗原受体T细胞

在美国FDA两种CAR-T治疗药物获得批准后，中国CDE于2017年年底开始接受CAR-T产品新药开发申请。截至2019年，中国已接受32项IND CAR-T申请，其中13项已获批用于临床研究。就靶点而言，32个应用中有27个靶向CD19，4个靶向BCMA，1个靶向实体瘤的磷脂酰肌醇蛋白聚糖3（GCP3）。因此，后续可能需要开发新的可选靶点，尤其是实体瘤和通用CAR-T。

#### 4.4. 双特异性抗体

目前，已有13项针对5种经中国国家医药产品管理局（NMPA）批准的bsAb的临床试验正在进行中。其中，由Alphamab股份有限公司（中国）开发的首个同类产品KN046 [PD-L1 × 细胞毒性T淋巴细胞抗原-4（CTLA-4）]，已表现出有效的PD-1/PD-L1和CTLA-4阻断作用，具有潜在的免疫检查点抑制和抗肿瘤活性。该抗体可恢复免疫功能，并激活针对肿瘤细胞的持续细胞毒性T淋巴细胞（CTL）介导的免疫应答。HER2 × HER2 bsAb（Alphamab公司）和上皮细胞黏附分子（EpCAM）× CD3 bsAb（武汉YZY生物医药股份有限公司）的临床试验也已获批。因此，中国正在进行的bsAb临床试验证明了其

在该领域设计和生产多种功能抗体的潜力。

## 5. 前景和结论

考虑到治疗性抗体在治疗肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和许多其他疾病方面取得的非凡成就，可以预见未来会产生更多有效的抗体治疗药物，即具有更高特异性、更强疗效、更低毒性和更好药代动力学特征。治疗性抗体的修饰代表了一种有希望且不可逆的趋势，即改构优化抗体并克服研发管线中候选分子的潜在限制。在本文中，我们描述了六类经修饰的治疗性抗体：①糖基化修饰；②Fc氨基酸改变；③抗体亚类重构；④药物偶联物ADC；⑤用于CAR-T细胞的单链抗体；⑥双特异抗体bsAb。许多修饰生物治疗药物已获得市场准入，目前仍有多多个在进行加速研究或临床试验。中国在这一领域取得了突破性进展，包括研发了ADC的治疗实体、CAR-T产品，并实施了修饰型治疗性抗体的临床研究。

新技术平台的不断构建和更新迭代正在进行，这为治疗性抗体的创新和修饰铺平了道路。例如，HexaBody技术提供了新一代效应器功能增强型治疗药物[110–111]。重链抗体(HCAb)包括羊驼单结构域抗体(sdAb, 也称为纳米抗体)和乳突抗原受体[免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR), 也称为IgNAR(VNAR)可变结构域]的可变区[112–113]。两者均具有相对较小的分子量(约15 kDa)、较低的免疫原性、较宽的抗原谱和较高的渗透能力[114–115]。纳米抗体[用于血栓性血小板减少性紫癜(TTP)]和VNAR产品(用于神经系统疾病、自身免疫性疾病等)的潜在应用, 显示了治疗性HCAb的优势和有前途的未来[114–116]。考虑到治疗性抗体的热稳定性(高达70 °C)[117]、蛋白水解稳定性(在胃液和肠液中)和可溶性[118], 研究人员仍将在治疗性抗体的给药方面进行探索。通过延长在循环中的半衰期并保持sdAb的有效浓度, 以避免低分子量引起的过量清除仍然很重要。必须持续观察和随访sdAb的治疗效果, 以使其能够全球市场上销售, 并用作一线治疗。此外, 将聚合物聚乙二醇(PEG), 即聚乙二醇化, 附着在抗体片段表面会延长抗体在循环中的半衰期并降低免疫原性。本文中, 我们认为Fc-融合蛋白是抗体的衍生物, 由于不包含单抗的可变区, 因此Fc-融合蛋白并未在本文中进行讨论[119]。当前, 抗体人源化仍然是治疗性单克隆抗体的开发重要途径, 是治疗性抗体研发的独立过程, 因此, 在本文中并未将其总结为一般的抗体修饰方法。

修饰抗体在研发中主要面临以下四个问题。首先, 仍

然迫切需要揭示详细具体的靶点分子相互作用和微妙的调节机制, 因为适当的治疗靶点是抗体治疗的设计、制造、修饰和临床疗效的基础。其次, 需要进行更多的临床前研究, 以解决生物制品包括但不限于ADC和CAR-T治疗出现的耐药性问题[120–123]。再次, 重视生物信息学在修饰型治疗性抗体领域的研发工作, 结合许多基于高通量筛选的方法(如噬菌体展示和丙氨酸扫描突变)共同用于抗体修饰, 如治疗性抗体的Fc区改变[49,124–126]。最后, 精准医学已扩展到生物制药领域, 这也包括探索氨基酸水平的位点特异性靶标[127], 以及研发和验证经修饰的抗体产品的免疫原性评估[128]。

简而言之, 通过对治疗性抗体的修饰可以实现精确靶向, 提高抗体的特异性、消除不良反应和提高疗效, 从而控制难以解决的疾病进程并提供更合理的治疗选择。修饰型治疗性抗体的优效增效作用推动了生物制药行业的增长和进步, 从长远来看, 这将产生更多有效和更易获得的临床治疗方法。

## 致谢

本研究得到国家重点基础研究发展计划项目(2015CB553701)和国家高技术研究发展计划项目(2019ZX09732001)资助。

## Authors' contributions

Ji-Min Dai wrote the original draft, while Xue-Qin Zhang and Jing-Yao Dai were involved in the writing in terms of reviewing and editing. Xiang-Min Yang and Zhi-Nan Chen were involved in the conceptualization, editing, and collection of statistical data, and Zhi-Nan Chen was involved in funding acquisition.

## Compliance with ethics guidelines

Ji-Min Dai, Xue-Qin Zhang, Jing-Yao Dai, Xiang-Min Yang, and Zhi-Nan Chen declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online

at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.030>.

## References

- [1] Ramon G. The discovery of diphtheria toxic and its consequences: homage to Emile Roux. *Bull Acad Natl Med* 1953;137(30–31):516–9.
- [2] Ehrlich P. Die Wertbemessung des Diphtherieheilsersums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch* 1897;6:299–326. German.
- [3] Von Behring E, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* 1890;16(49):1113–4. German.
- [4] Porter RR. The hydrolysis of rabbit c-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959;73(1):119–26.
- [5] Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71 (10):4027–31.
- [6] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–7.
- [7] Igawa T, Ishii S, Tachibana T, Maeda A, Higuchi Y, Shimaoka S, et al. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol* 2010;28(11):1203–7.
- [8] Chaparro-Riggers J, Liang H, DeVay RM, Bai L, Sutton JE, Chen W, et al. Increasing serum half-life and extending cholesterol lowering *in vivo* by engineering antibody with pH-sensitive binding to PCSK9. *J Biol Chem* 2012;287(14):11090–7.
- [9] Igawa T, Mimoto F, Hattori K. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844(11):1943–50.
- [10] Yamamura T, Kleiter I, Fujihara K, Palace J, Greenberg B, Zakrzewska-Pniewska B, et al. Trial of satralizumab in neuromyelitis optica spectrum disorder. *N Engl J Med* 2019;381(22):2114–24.
- [11] Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 1994;372(6504):379–83.
- [12] Sockolosky JT, Szoka FC. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv Drug Delivery Rev* 2015;91:109–24.
- [13] Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, Bjorkman PJ. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry* 1995;34(45):14649–57.
- [14] Martin WL, West AP, Gan Lu, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. *Mol Cell* 2001;7(4):867–77.
- [15] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):715–25.
- [16] Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;10(5):317–27.
- [17] Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor. *FcRn J Immunol* 2004;172(4):2021–9.
- [18] Rodewald R. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol* 1976;71(2):666–9.
- [19] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006;24(1):19–28.
- [20] Malphettes L, Freyvert Y, Chang J, Liu PQ, Chan E, Miller JC, et al. Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. *Biotechnol Bioeng* 2010;106(5):774–83.
- [21] Saunders K. Conceptual approaches to modulating antibody effector functions and circulation half-life. *Front Immunol* 2019;10:1296.
- [22] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277 (30):26733–40.
- [23] Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003;278(5):3466–73.
- [24] Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Shinkawa T, Uchida K, Nakamura K, et al. Defucosylated chimeric anti-C-C chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 2004;64(6):2127–33.
- [25] Hamako J, Matsui T, Ozeki Y, Mizuochi T, Titani K. Comparative studies of asparagine-linked sugar chains of immunoglobulin G from eleven mammalian species. *Comp Biochem Phys B Comp Biochem* 1993;106 (4):949–54.
- [26] Jefferis R, Lund J, Mizutani H, Nakagawa H, Kawazoe Y, Arata Y, et al. A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins. *Biochem J* 1990;268(3):529–37.
- [27] Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000;10(5):477.
- [28] Tonetti M, Sturla L, Bisso A, Benatti U, De Flora A. Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *J Biol Chem* 1996;271(44):27274–9.
- [29] Song Z. Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease. *Mol Aspects Med* 2013;34(2–3):590–600.
- [30] Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, Inoue S, Ikeda Y, Wang W, et al. The α1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473(1):9–20.
- [31] Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z. The, “less-is-more” in therapeutic antibodies: afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *mAbs* 2018;10(5):693–711.
- [32] Louie S, Haley B, Marshall B, Heidersbach A, Yim M, Brozynski M, et al. FX knockout CHO hosts can express desired ratios of fucosylated or afucosylated antibodies with high titers and comparable product quality. *Biotechnol Bioeng* 2017;114(3):632–44.
- [33] Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous β1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* 2006;93(5):851–61.
- [34] Laurie HS, Sarit EA, Douglas AS, Mangel J, Randy DG, Fine G, et al. A phase I study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 2012;119 (22):5118–25.
- [35] Salles G, Morschhauser F, Lamy T, Milpied N, Thieblemont C, Tilly H, et al. Phase I study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood* 2012;119(22):5126.
- [36] Martinez DR, Fong Y, Li SH, Yang F, Jennewein MF, Weiner JA, et al. Fc characteristics mediate selective placental transfer of IgG in HIV-infected women. *Cell* 2019;178(1):190–201.
- [37] Jennewein MF, Goldfarb I, Dolatshahi S, Cosgrove C, Noelette FJ, Krykbaeva M, et al. Fc glycan-mediated regulation of placental antibody transfer. *Cell* 2019;178(1):202–15.
- [38] Vanessa LH. Innate immunity of neonates and infants. *Front Immunol* 2018;9:1759.
- [39] Lee YC, Lin SJ. Neonatal natural killer cell function: relevance to antiviral immune defense. *Clin Dev Immunol* 2013;2013(2):427696.
- [40] Nimmerjahn F, Jeffrey VR. Fc receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):34–47.
- [41] Moore GL, Chen H, Karki S, Greg A. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *Mabs* 2010;2(2):181–9.
- [42] Romain G, Senyukov V, Rey VN, Merouane A, Kelton W, Liadi I, et al. Antibody Fc engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells. *Blood* 2014;124(22):3241–9.
- [43] Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem* 2006;281 (33):23514–24.
- [44] Mimoto F, Igawa T, Kuramochi T, Katada H, Kadono S, Kamikawa T, et al. Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. *Mabs* 2013;5(2):229–36.
- [45] Richards J, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(8):2517–27.
- [46] Rankin CT, Veri MC, Gorlatov S, Tuailon N, Burke S, Huang L, et al. CD32B, the human inhibitory Fcγ-receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood* 2006;108(7):2384–91.
- [47] Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, et al. Antitumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc receptor binding properties. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R123.
- [48] Bang YJ, Giaccone G, Im SA, Oh DY, Bauer TM, Nordstrom JL, et al. First-in-human phase I study of margetuximab (MGAH22), an Fc-modified chimeric monoclonal antibody, in patients with HER2-positive advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2017;28(4):855–61.
- [49] Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII,

- FcγRIII, and FcγRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem* 2001;276(9):6591–604.
- [50] Bas M, Terrier A, Jacque E, Dehenne A, Pochet-Béghin V, Béghin C, et al. Fc sialylation prolongs serum half-life of therapeutic antibodies. *J Immunol* 2019; 202(5):1582–94.
- [51] Braster R, O’ Toole T, van Egmond M. Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer. *Methods* 2014;65(1):28–37.
- [52] Alyssa DG, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2011;71(7):2411–6.
- [53] Chintalacharuvu KR, Vuong LU, Loi LA, Larrick JW, Morrison SL. Hybrid IgA2/IgG1 antibodies with tailor-made effector functions. *Clin Immunol* 2001; 101(1):21–31.
- [54] Borrok MJ, Luheshi NM, Beyaz N, Davies GC, Legg JW, Wu H, et al. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with FcαRI (CD89) binding. *Mabs* 2015;7(4):743–51.
- [55] Natsume A, In M, Takamura H, Nakagawa T, Shimizu Y, Kitajima K, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res* 2008;68(10):3863–72.
- [56] Natsume A, Shimizu YY, Satoh M, Shitara K, Niwa R. Engineered anti-CD20 antibodies with enhanced complement-activating capacity mediate potent anti-lymphoma activity. *Cancer Sci* 2010;100(12):2411–8.
- [57] Sensel MG, Kane LM, Morrison SL. Amino acid differences in the N-terminus of C<sub>1q</sub>2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. *Mol Immunol* 1997;34(14):1019–29.
- [58] Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2015;15(6):361–70.
- [59] Schneider H, Deweid L, Pirzer T, Yanakieva D, Englert S, Becker B, et al. Dextramabs: a novel format of antibody-drug conjugates featuring a multivalent polysaccharide scaffold. *ChemistryOpen* 2019;8(3):354–7.
- [60] Ott PA, Pavlick AC, Johnson DB, Hart LL, Infante JR, Luke JJ, et al. A phase 2 study of glembatumumab vedotin, an antibody-drug conjugate targeting glycoprotein NMB, in patients with advanced melanoma. *Cancer* 2019;125(7): 1113–23.
- [61] Szot C, Saha S, Zhang XM, Zhu Z, Hilton MB, Morris K, et al. Tumor stroma-targeted antibody-drug conjugate triggers localized anticancer drug release. *J Clin Invest* 2018;128(7):2927–43.
- [62] Lambert JM, Berkenblit A. Antibody-drug conjugates for cancer treatment. *Annu Rev Med* 2018;69:191–207.
- [63] Lambert JM, Morris CQ. Antibody-drug conjugates (ADCs) for personalized treatment of solid tumors: a review. *Adv Ther* 2017;34(5):1015–35.
- [64] Chen B, Gianolio DA, Stefano JE, Manning CM, Gregory RC, Busch MM, et al. Design, synthesis, and *in vitro* evaluation of multivalent drug linkers for high-drug-load antibody-drug conjugates. *ChemMedChem* 2018;13(8):790–4.
- [65] Krall N, da Cruz FP, Boutourea O, Bernardes GJ. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat Chem* 2016;8(2): 103–13.
- [66] Chudasama V, Maruani A, Caddick S. Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates. *Nat Chem* 2016;8(2):114–9.
- [67] Lyon RP, Bovee TD, Doronina SO, Burke PJ, Hunter JH, Neff-LaFord HD, et al. Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat Biotechnol* 2015;33(7): 733–5.
- [68] Zhang C, Welborn M, Zhu T, Yang NJ, Santos MS, Van Voorhis T, et al. p-Clamp-mediated cysteine conjugation. *Nat Chem* 2016;8(2):120–8.
- [69] Matos MJ, Oliveira B, Martínez-Sáez N, Guerreiro A, Cal PMSD, Bertoldo J, et al. Chemo- and regioselective lysine modification on native proteins. *J Am Chem Soc* 2018;140(11):4004–17.
- [70] Merlin JL, Barberi-Heyob M, Bachmann N. *In vitro* comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin) combined with paclitaxel (Taxol) or docetaxel (Taxotere) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 2002; 13(11):1743–8.
- [71] Cui JJ, Tran-Dubé M, Shen H, Nambu M, Kung PP, Pairish M, et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J Med Chem* 2011;54(18):6342–63.
- [72] June CH, O’ Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018;359(6382):1361–5.
- [73] Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell-maturation-antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* 2016;128(13):1688–700.
- [74] Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, et al. Chimeric antigen receptor T Cells against CD19 for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(11):1040–7.
- [75] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010;18(4):843–51.
- [76] Kalos M, Bruce LL, David LP, Katz S, Stephan AG, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; 3(95): 95ra73.
- [77] Gust J, Hay KA, Hana LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discovery* 2017; 7(12):1404–19.
- [78] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol* 2015;33(15):1688–96.
- [79] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012;119(12):2709–20.
- [80] Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365(8):725–33.
- [81] Cor HL, Stefan S, van Steenberg S, van Elzakker P, van Krimpen B, Corrien G, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2013;21(4):904–12.
- [82] Orouke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CART cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017;9(399):eaa0984.
- [83] Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015;348(6230):74–80.
- [84] Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CART cells. *Sci Transl Med* 2017;9(374):eaaj2013.
- [85] Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011;365(18):1673–83.
- [86] Gornallusse GG, Hirata RK, Funk SE, Rioloobos L, Lopes VS, Manske G, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 2017;35(8):765–72.
- [87] Zakrzewski JL, Suh D, Markley JC, Smith OM, King C, Goldberg GL, et al. Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat Biotechnol* 2008;26(4):453–61.
- [88] Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood* 2012;119(24):5697–705.
- [89] Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PW. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discovery* 2019;18(8):585–608.
- [90] Suurs FV, Lub-De HM, de Vries E, de Groot D. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacol Ther* 2019;201:103–19.
- [91] Alibakhshi A, Abarghoi Kahaki F, Ahangarzadeh S, Yaghoobi H, Yarian F, Arezumand R, et al. Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *J Controlled Release* 2017;268:323–34.
- [92] Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol* 2012;2012: 1–15.
- [93] Bezabeh B, Fleming R, Fazenbaker C, Zhong H, Coffman K, Yu XQ, et al. Insertion of scFv into the hinge domain of full-length IgG1 monoclonal antibody results in tetravalent bispecific molecule with robust properties. *mAbs* 2017;9(2):240–56.
- [94] Schmohl JU, Felices M, Taras E, Miller JS, Vallera DA. Enhanced ADCC and NK cell activation of an anticarcinoma bispecific antibody by genetic insertion of a modified IL-15 cross-linker. *Mol Ther* 2016;24(7):1312–22.
- [95] G. kbuget N, Dombret H, Bonifacio M, Reichle A, Graux C, Faul C, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2018;131(14):1522–31.
- [96] Stadler CR, B. hr-Mahmud H, Celik L, Heibich B, Roth AS, Roth RP, et al. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies. *Nat Med* 2017;23(7):815–7.
- [97] Patel A, Digiandomenico A, Keller AE, Smith TRF, Park DH, Ramos S, et al. An engineered bispecific DNA-encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. *Nat Commun* 2017; 8(1):637.
- [98] Digiandomenico A, Keller AE, Gao C, Rainey GJ, Warriner P, Camara MM, et

- al. A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Transl Med* 2014;6(262):262ra155.
- [99] Keam SJ. Toripalimab: first global approval. *Drugs* 2019;79(5):573–8.
- [100] Mo H, Huang J, Xu J, Chen X, Wu D, Qu D, et al. Safety, anti-tumour activity, and pharmacokinetics of fixed-dose SHR-1210, an anti-PD-1 antibody in advanced solid tumours: a dose-escalation, phase 1 study. *Br J Cancer* 2018;119(5):538–45.
- [101] Qiu X, Audet J, Lv M, He S, Wong G, Wei H, et al. Two-mAb cocktail protects macaques against the Makona variant of Ebola virus. *Sci Transl Med* 2016;8(329):329ra33.
- [102] Li H, Yu F, Xia S, Yu Y, Wang Q, Lv M, et al. Chemically modified human serum albumin potentially blocks entry of ebola pseudoviruses and viruslike particles. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(4). e02168-16.
- [103] Zhang Z, Zhang Y, Sun Q, Feng F, Huhe M, Mi L, et al. Preclinical pharmacokinetics, tolerability, and pharmacodynamics of metuzumab, a novel CD147 human–mouse chimeric and glycoengineered antibody. *Mol Cancer Ther* 2015;14(1):162–73.
- [104] Chuang PK, Hsiao M, Hsu TL, Chang CF, Wu CY, Chen BR, et al. Signaling pathway of globo-series glycosphingolipids and  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase V ( $\beta$ 3GalT5) in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(9):3518–23.
- [105] Epstein AL, Chen FM, Taylor CR. A novel method for the detection of necrotic lesions in human cancers. *Cancer Res* 1988;48(20):5842–8.
- [106] Yu L, Ju DW, Chen W, Li T, Xu Z, Jiang C, et al.  $^{131}\text{I}$ -chTNT radioimmunotherapy of 43 patients with advanced lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2006;21(1):5–14.
- [107] Chen ZN, Mi L, Xu J, Song F, Zhang Q, Zhang Z, et al. Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine( $^{131}\text{I}$ ) metuximab injection: clinical phase I/II trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65(2):435–44.
- [108] Xu J, Shen ZY, Chen XG, Zhang Q, Bian HJ, Zhu P, et al. A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2007;45(2):269–76.
- [109] Huhe M, Lou J, Zhu Y, Zhao Y, Shi Y, Wang B, et al. A novel antibody-drug conjugate, HcHAb18-DM1, has potent anti-tumor activity against human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;513(4):1083–91.
- [110] Gulati S, Beurskens FJ, de Kreuk BJ, Roza M, Zheng B, Deoliveira RB, et al. Complement alone drives efficacy of a chimeric anticonococcal monoclonal antibody. *PLoS Biol* 2019;17(6):e3000323.
- [111] De Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, et al. A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface. *PLoS Biol* 2016;14(1):e1002344.
- [112] Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: historical perspective and future outlook. *Front Immunol* 2017;8:1589.
- [113] Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, JARGBarbosa, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 1994;7(9):1129–35.
- [114] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1995;374(6518):168–73.
- [115] Dooley H, Flajnik MF, Porter AJ. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol* 2003;40(1):25–33.
- [116] Mazepa MA, Masias C, Chaturvedi S. How targeted therapy disrupts the treatment paradigm for acquired TTP: the risks, benefits, and unknowns. *Blood* 2019;134(5):415–20.
- [117] Liu JL, Zabetakis D, Brown JC, Anderson GP, Goldman ER. Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies. *Mol Immunol* 2014;59(2):194–9.
- [118] Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bommel AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72(3):544–51.
- [119] Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* 2018;9(1):15–32.
- [120] Vernieri C, Milano M, Brambilla M, Mennitto A, Maggi C, Cona MS, et al. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2019;139:53–66.
- [121] Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al. Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncolytics* 2018;11:127–37.
- [122] Schneider D, Xiong Y, Wu D, N. ile V, Schmitz S, Haso W, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer* 2017;5(1):42.
- [123] Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016;126(10):3814–26.
- [124] Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(11):4005–10.
- [125] Ljungars A, Svensson C, Carlsson A, Birgersson E, Tornberg UC, Frendeus B, et al. Deep mining of complex antibody phage pools generated by cell panning enables discovery of rare antibodies binding new targets and epitopes. *Front Pharmacol* 2019;10:847.
- [126] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, et al. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol* 1997;15(7):637–40.
- [127] Hwang LA, Phang BH, Liew OW, Iqbal J, Koh XH, Koh XY, et al. Monoclonal antibodies against specific p53 hotspot mutants as potential tools for precision medicine. *Cell Rep* 2018;22(1):299–312.
- [128] Mojtahed PS, Ulsh.fer T, Gabriel LA, Henke M, K. hm M, Behrens F, et al. Immunogenicity assay development and validation for biological therapy as exemplified by ustekinumab. *Clin Exp Immunol* 2019;196(2):259–67.