

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.003

· 基础研究 ·

## 基于靶点人源化小鼠的PD-1/CTLA-4双特异性抗体及其IgG1亚型的抗癌活性评价

胡红梅<sup>1,2,3</sup>, 于秋红<sup>3</sup>, 杨毅<sup>1,2,3</sup>, 沈月雷<sup>1,2,3</sup>, 刘柏宏<sup>3</sup> [1. 江西中医药大学 药学院, 江西 南昌 330004; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司, 北京 102609]

**[摘要]** **目的:** 构建基于靶点人源化小鼠的程序性死亡受体-1(PD-1)/细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)双特异性抗体(BsAb)并对BsAb及其IgG1亚型进行抗癌活性评价和探讨其潜在的作用机制。**方法:** 构建和扩增并纯化不同结构及抗体亚型的PD-1/CTLA-4抗体BsAb1、BsAb2和BsAb3, 对纯化BsAb进行靶点亲和力检测, 采用荧光素酶报告基因实验和FCM检测抗体的生物学活性。基于B-hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4人源化小鼠的MC38-hPD-L1结肠癌细胞移植瘤模型对BsAb进行体内药效评估, 并通过移植瘤组织中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分析PD-1/CTLA-4抗体的作用机制。**结果:** 成功制备的BsAb1、BsAb2及BsAb3对靶点PD-1和CTLA-4均有较强的特异性亲和力、对靶点通路均有不同程度的阻滞活性, 均明显抑制移植瘤的生长( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。IgG1亚型BsAb体内药效更优( $P<0.01$ ), TIL分析发现BsAb2-IgG1明显增加了CTL百分率( $P<0.05$ ), 显著降低了肿瘤浸润Treg细胞百分率( $P<0.01$ ), 使肿瘤免疫微环境更有利于杀伤肿瘤细胞; 增强ADCC活性的Fc突变体亚型BsAb2-SI则不能进一步提高抗肿瘤活性。**结论:** 具有Fc效应功能的IgG1亚型的PD-1/CTLA-4抗体体内抗癌药效更优, 因其可以更好地清除TIL中的Treg细胞。

**[关键词]** 程序性死亡受体-1; 细胞毒性T淋巴细胞抗原-4; 双特异性抗体; 抗体亚型优化; 肿瘤; MC38-hPD-L1结肠癌细胞

**[中图分类号]** R735.3; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)05-0380-07

## Evaluation of anticancer activity of PD-1/CTLA-4 bispecific antibody and its IgG1 isotype based on target humanized mice

HU Hongmei<sup>1,2,3</sup>, YU QiuHong<sup>3</sup>, YANG Yi<sup>1,2,3</sup>, SHEN Yuelie<sup>1,2,3</sup>, LIU Baihong<sup>3</sup> (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226133, Jiangsu, China; 3. Biocytogen [Beijing] Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 102609, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct programmed death-1 (PD-1)/cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) bispecific antibody (BsAb) based on the target humanized mice, evaluate the anticancer activity of BsAb and its IgG1 isotype and investigate its potential working mechanism. **Methods:** Different formats and isotypes of PD-1/CTLA-4 antibodies BsAb1, BsAb2 and BsAb3 were constructed, expanded and purified. The target affinity of purified BsAbs were tested by surface plasmon resonance (SPR), and the biological activity of antibodies were tested by luciferase reporter gene assay and FCM. The efficacy of BsAbs was evaluated *in vivo* based on the MC38-hPD-L1 colon carcinoma cell transplant tumor model in humanized B-hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4 mice. The working mechanism of PD-1/CTLA-4 BsAbs in transplant tumor tissues was investigated by tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) analysis. **Results:** Successfully prepared BsAb1, BsAb2, and BsAb3 all demonstrated relatively strong specific affinity to checkpoint targets PD-1 and CTLA-4, showed different levels of blocker efficacy to target pathways, and significantly suppressed the growth of transplant tumors ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). BsAb with IgG1 isotype was more potent *in vivo* than other isotypes ( $P<0.01$ ). Tumor-infiltrating lymphocyte analysis revealed that BsAb2-IgG1 significantly increased the percentage of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) ( $P<0.05$ ) and significantly decreased the percentage of tumor-infiltrating regulatory T (Treg) cells ( $P<0.01$ ), thus making the tumor immune microenvironment more conducive in killing tumor cells. However, the ADCC-enhanced Fc mutation isotype of BsAb2-SI can not further improve anti-tumor activity. **Conclusion:** The IgG1 PD-1/CTLA-4 antibody with Fc effector function has more potent *in vivo* anticancer efficacy, because it can better remove Treg cells in tumor-infiltrating lymphocytes.

**[Key words]** programmed death-1 (PD-1); cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4); bispecific antibody (BsAb); antibody isotype optimization; tumor; MC38-hPD-L1 colon cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(5): 380-386. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.003]

**[基金项目]** 山东省抗体药物创新创业共同体项目(No. 2021CXCYGTT16)

**[作者简介]** 胡红梅(1993—),女,硕士生,主要从事双特异性抗体药物开发的相关研究, E-mail: huhongmei1996@163.com

**[通信作者]** 刘柏宏, E-mail: baihong.liu@bbctg.com.cn; 沈月雷, E-mail: yuelie.shen@bbctg.com.cn

细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)是T细胞上的一种穿膜受体<sup>[1]</sup>,能竞争性地结合抗原提呈细胞上的B7配体,从而抑制T细胞的活化<sup>[2]</sup>。程序性死亡受体-1(PD-1)是一种I型穿膜蛋白<sup>[3]</sup>,当PD-1与其配体(PD-L1)相互作用时,T细胞受体(TCR)信号转导受到干扰,进而抑制T细胞的活化<sup>[4-5]</sup>。双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)是能够同时靶向2个不同抗原或同一个抗原不同表位的抗体<sup>[6-7]</sup>,其能桥联肿瘤细胞与免疫细胞,增强免疫细胞的杀伤功能<sup>[8]</sup>;也能激活或抑制同一靶细胞的多条信号通路,达到增强杀伤靶细胞的目的<sup>[9]</sup>。PD-1/CTLA-4抗体作为最早开发的抗体靶点组合,已有多款药物进入临床阶段。BsAb1单药治疗在晚期肾细胞癌患者中表现出抗肿瘤活性,目前处于临床II期;BsAb2目前处于临床I期,拟用于治疗实体瘤;BsAb3已获批上市,用于治疗宫颈癌。BsAb的潜能受靶点组合、结构、结合表位及价态等多种因素所影响。本研究构建了3种处于临床试验阶段且结构不同的PD-1/CTLA-4抗体,鉴定其功能活性;通过改变其亚型后,进行肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)分析,探讨不同结构及亚型对PD-1/CTLA-4抗体功能活性的影响,为PD-1/CTLA-4抗体及其他BsAb开发的亚型及结构选择提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、实验动物及主要试剂

哺乳动物细胞CHO-S购自Thermo公司,CHO-K1- $\alpha$ APC-hPD-L1细胞、Raji- $\alpha$ APC-CD80/86细胞、Jurkat-Luc-hPD-1细胞、Jurkat-Luc-hCTLA-4细胞、Jurkat-hCTLA-4细胞均购自Promega公司,人源化的小鼠MC38结肠癌细胞由百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司培养提供。

B-hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4人源化小鼠购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司[动物合格证号码:SCXK(苏)2021-0003],实验操作符合实验动物伦理原则。

ExpiCHO™ Expression Medium、ExpiFectamine™ CHO转染试剂盒、OptiPRO培养基、PRMI 1640培养基均购自美国Gibco公司,hPD-1-His及hCTLA-4-His抗原均购自Acros公司,荧光素酶Bio-Lite Luciferase Assay System购自美国Vazyme公司,流式抗体R-PE-Anti-Mouse IgG-Fc、Anti-hIgG-Fc-Alexa Fluor 647均购自美国Jackson公司,IgG1 Isotype、帕博利珠单抗(pabrolizumab)及伊匹木单抗(ipilimumab)均由百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司提供。

### 1.2 BsAb的构建

由通用生物(安徽)股份有限公司合成3个

PD-1/CTLA-4抗体序列。BsAb1基因序列来源于专利CN 109152835A, BsAb2基因序列来源于专利CN 111212658A, BsAb3基因序列来源于专利CN 106967172B。抗体的轻链及重链基因分别构建至pcDNA3.1表达载体。

BsAb1、BsAb2、BsAb3为采用没有Fc效应功能的抗体亚型,将BsAb1和BsAb2分别更换为野生IgG1亚型,命名为BsAb1-IgG1和BsAb2-IgG1。在野生IgG1亚型的基础上将BsAb2突变为ADCC增强亚型(S293D、I332E),命名为BsAb2-SI。

### 1.3 转染、扩增及其纯化

转染当天,用37℃预热的新鲜培养基ExpiCHO™ Expression Medium将CHO-S细胞稀释到密度为 $6 \times 10^6$ 个/mL;取7.68 mL OptiPRO,加入80  $\mu$ g抗体表达质粒,混匀后加入320  $\mu$ L ExpiFectamine™ CHO转染试剂,轻轻吹混匀后迅速将ExpiFectamine™ CHO-DNA复合物加入CHO-S细胞中,将细胞置于36.5℃、8%CO<sub>2</sub>震荡摇床培养箱中培养,2 h后加入ExpiCHO™ Expression Medium培养基(含按照1:100稀释的青霉素和链霉素)继续培养。转染后第2天加入24 mL ExpiCHO™ Feed和600  $\mu$ L ExpiFectamine™ CHO Enhancer,在培养箱中继续培养。转染后7 d收取细胞上清液,采用Protein A亲和层析法纯化。Protein A亲和层析柱用平衡缓冲液平衡5个柱体积,以2 mL/min流速上样,平衡液平衡层析柱,洗脱缓冲液洗脱杂质,平衡层析柱,通过7个柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体;超滤管浓缩,计算其浓度并分装,在-80℃条件下保存。

### 1.4 表面等离子体共振法检测纯化BsAb的亲合力

采用分子互作仪Biacore 8K对纯化抗体进行亲和力检测,用Protein A芯片传感器分别捕获BsAb1、BsAb2及BsAb3作为配体,以不同浓度的重组人hPD-1-His和重组人hCTLA-4-His抗原作为分析物。使用Protein A芯片在10  $\mu$ L/min的流速下捕获BsAb1、BsAb2及BsAb3 50 s,再以30  $\mu$ L/min的流速使BsAb1、BsAb2及BsAb3与hPD-1-His及hCTLA-4-His抗原结合180 s,解离400 s,得到亲和力曲线。通过分析软件进行数据分析,使用1:1结合模型对结合、解离曲线进行拟合,获得亲和动力学数据。

### 1.5 荧光素酶报告基因实验检测BsAb阻断PD-1/PD-L1及CTLA-4/CD80/CD86的生物活性

将靶细胞CHO-K1- $\alpha$ APC-hPD-L1( $4 \times 10^5$ 个/mL)接种于96孔板中,37℃培养箱培养12 h。去掉96孔板中的培养基,用RPMI 1640培养基稀释待测抗体后加入相应孔中,同时加入效应细胞Jurkat-Luc-hPD-1( $1 \times 10^6$ 个/mL);将96孔板置于37℃培养箱中培养6 h

后,室温中处理 5 min,向 96 孔板中加入荧光素酶底物避光处理 5 min,放入 96 孔板后采用发光检测仪检测荧光信号。依据相对光单位(relative light unit, RLU)和最终检测浓度的对应关系建立相应的量效曲线图。

荧光素酶报告基因检测 BsAb 对 CTLA-4/CD80/86 体外阻断活性。将靶细胞 Raji- $\alpha$ APC-CD80/86( $4 \times 10^6$  个/mL)接种于 96 孔板中,用 RPMI 1640 培养基稀释待测抗体后加入相应孔中,同时加入效应细胞 Jurkat-Luc-hCTLA-4(密度为  $4 \times 10^6$  个/mL),将 96 孔板置于 37 °C 培养箱培养 6 h,室温中处理 5 min,向 96 孔板中加入 75  $\mu$ L 荧光素酶底物避光处理 5 min,置入 96 孔板发光检测仪检测荧光信号。依据 RLU 和最终检测浓度的对应关系建立相应的量效曲线图。

### 1.6 FCM 检测 BsAb 对 B7-1 重组蛋白与 Jurkat-hCTLA-4 细胞结合的阻断能力

选取冻存的 Jurkat-hCTLA-4 细胞并复苏,将检测抗体用 PBS 按 3 倍比稀释 10 个浓度梯度,抗体的最高质量浓度为 60  $\mu$ g/mL,将细胞、检测抗体、终质量浓度为 0.2  $\mu$ g/mL 的 B7-1 配体加入 96 孔板中,在 4 °C 的条件下作用 30 min,清洗 2 次后,每孔加入 50  $\mu$ L R-PE-Anti-Mouse IgG-Fc(1:500 稀释)和 Anti-hIgG-Fc-Alexa Fluor 647(1:5 000 稀释),4 °C 条件下处理 15 min。清洗 2 次后,上机检测。

### 1.7 基于 B-hPD-1/hPD-L1-hCTLA-4 小鼠的 MC38-hPD-L1 结肠癌模型的建立及药效试验

分别在 6~8 周龄的 hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4 人源化小鼠背部接种  $5 \times 10^5$  个 MC38-hPD-L1 细胞,待肿瘤体积(肿瘤体积 =  $0.5 \times$  长径  $\times$  短径<sup>2</sup>)达到 300 mm<sup>3</sup> 时,按照随机法将其随机分为 11 组(每组 6 只)。分组当天按体质量 10  $\mu$ L/g 腹腔注射一次相应浓度的抗体,其中以 PBS 为阴性对照组,帕博利珠单抗(抗 PD-1 抗体)为阳性对照组。每周给药 2 次,同时测量小鼠体质量及肿瘤体积。共给药 4 次,观察 1 周后采用 CO<sub>2</sub> 吸入法安乐死小鼠,将小鼠尸体装入垃圾袋交于医疗垃圾处理部门进行无害化处理。按照公式  $[1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$  计算肿瘤生长抑制率(tumor growth inhibition rate, TGI)。公式中, T<sub>i</sub>: 治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值; T<sub>0</sub>: 治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值; V<sub>i</sub>: 对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值; V<sub>0</sub>: 对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

### 1.8 FCM 检测 BsAb 及其 IgG1 亚型对 MC38-hPD-L1 结肠癌移植瘤组织中 TIL 的影响

基于 B-hPD-1/hPD-L1/hCTLA-4 人源化小鼠建立结肠癌模型,待肿瘤达到 180~220 mm<sup>3</sup> 时随机分组,在

分组当天、第 4 天及第 7 天各组分别注射 BsAb2、BsAb2-IgG1、BsAb2-SI,共给药 3 次;末次给药后第 3 天取肿瘤组织进行 TIL 分析。将肿瘤组织剪碎,加入 Miltenyi Tumor Dissociation Kit 的消化酶,置于 GentleMACS Octo dissociator 组织处理仪中制备成单细胞悬液;计数,离心 5 min 后,根据细胞密度进行重悬。对细胞进行 FCM 染色标记及上机检测分析。

### 1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7 统计学软件对实验数据进行分析。呈正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示;在体外阻断实验中,原始数据统计分析采用 One-way ANOVA;在药效实验中,多组间及多组的两组间数据比较采用 Student *t* 检验;在 TIL 分析中,两组间数据比较采用单因素方差分析 One-way ANOVA 和 Dunnett *t* 检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 3 种 BsAb

不同结构的 3 种 PD-1/CTLA-4 抗体如图 1A 所示, BsAb1 为非对称结构,结合价态为单价结合,重链采用 knob into hole 突变防止错配; BsAb2 为对称型 IgG-ScFv 结构,结合价态为双价结合,在 CTLA-4 单抗的 C 端融合抗 PD-1 抗体的单链可变区 ScFv 结构域; BsAb3 同样采用对称型的 IgG-ScFv 结构,与 BsAb2 的区别为 BsAb3 是在 PD-1 单抗的 C 端融合抗 CTLA-4 的单链可变区 ScFv 结构域。通过 CHO 表达生产并使用 Protein A 纯化,其理论分子量分别为 147 000、197 000、199 000;更换亚型后表达纯化的抗体理论分子量与母本相同;SDS-PAGE 检测结果(图 1B)显示, BsAb1、BsAb2、BsAb3 在非还原条件下的分子量分别为 135 000~180 000、245 000 左右、180 000~245 000,其突变后 BsAb1-IgG1、BsAb2-IgG1、BsAb2-SI 的分子量分别为 135 000~180 000、245 000 左右、180 000~245 000。结果表明,成功构建并表达出与预期分子量相符的 BsAb。

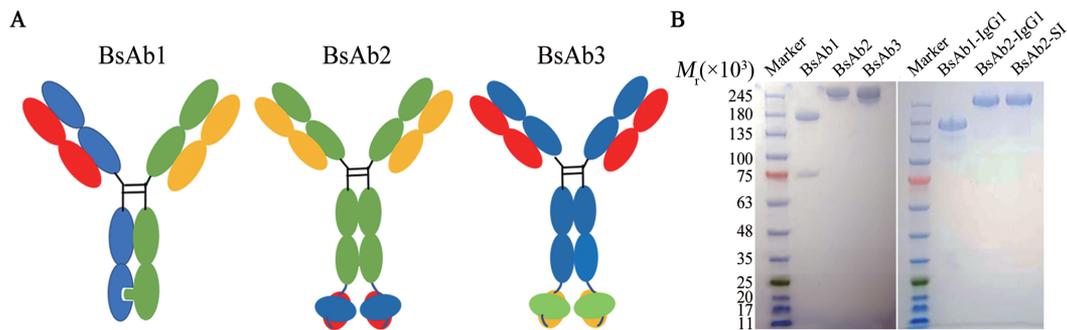
### 2.2 新构建 BsAb 可特异性结合重组人 CTLA-4 及 PD-1 蛋白

表面等离子体共振法检测结果(表 1)显示,其中 BsAb1、BsAb2 和 BsAb3 与重组人 CTLA-4 结合的 KD 值分别为  $3.88 \times 10^{-9}$ 、 $1.54 \times 10^{-8}$  和  $6.22 \times 10^{-9}$  mol/L; BsAb1、BsAb2 和 BsAb3 与重组人 PD-1 结合的 KD 值分别为  $6.23 \times 10^{-9}$ 、 $1.00 \times 10^{-8}$  和  $1.06 \times 10^{-8}$  mol/L。结果表明,成功构建的 BsAb 均能够与 PD-1 和 CTLA-4 特异性地结合,其中 BsAb1 与 CTLA-4 及 PD-1 的亲合力相对最高。

2.3 BsAb1、BsAb2、BsAb3均能在体外阻断PD-1/PD-L1通路而BsAb2具有相对更强的CTLA-4/CD80/86通路阻断活性

荧光素酶报告基因法检测结果(图2A)表明, BsAb1、BsAb2、BsAb3均可以阻断PD-1/PD-L1信号通路, 展现出剂量依赖性的NFAT信号激活活性; BsAb2具有阻断CTLA-4/CD80/86相互作用的活性, 而BsAb1、BsAb3对CTLA-4/CD80/86有较弱的阻断作用。FCM检测结果(图2B)显示, BsAb2能够有效

阻断CTLA-4与B7的结合, BsAb1、BsAb3对CTLA-4与B7的阻断作用较弱, 此结果与荧光素酶报告基因实验检测结果一致。结果表明, 3种BsAb均具有在体外阻断PD-1/PD-L1信号通路的生物活性, 其中BsAb2阻断CTLA-4/CD80/86相互作用的活性相对BsAb1及BsAb3更强, 但3种BsAb激活NFAT信号强度的RLU值均低于阳性对照帕博利珠单抗及伊匹木单抗(抗CTLA-4抗体)。



A: 抗体结构图, 红色为PD-1轻链, 蓝色为PD-1重链, 黄色为CTLA-4轻链, 绿色为CTLA-4重链; B: 抗体纯化结果  
图1 PD-1/CTLA-4抗体结构示意图及纯化效果

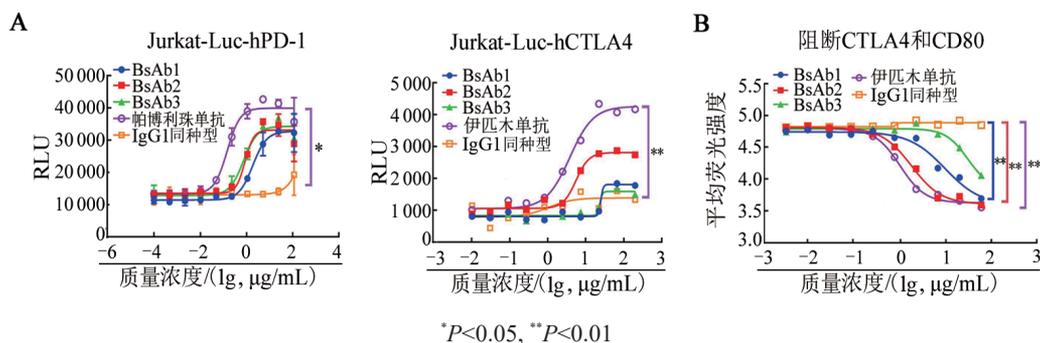
表1 BsAb与CTLA-4或PD-1蛋白结合的亲和力

样品	分析抗体	Ka[(mol/L) <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Kd/(s <sup>-1</sup> )	KD/(mol/L)
BsAb1	hCTLA-4-His	9.87×10 <sup>4</sup>	3.83×10 <sup>-4</sup>	3.88×10 <sup>-9</sup>
BsAb2	hCTLA-4-His	1.01×10 <sup>5</sup>	1.56×10 <sup>-3</sup>	1.54×10 <sup>-8</sup>
BsAb3	hCTLA-4-His	9.96×10 <sup>4</sup>	6.20×10 <sup>-4</sup>	6.22×10 <sup>-9</sup>
BsAb1	hPD-1-His	6.00×10 <sup>4</sup>	3.74×10 <sup>-4</sup>	6.23×10 <sup>-9</sup>
BsAb2	hPD-1-His	2.23×10 <sup>4</sup>	2.23×10 <sup>-4</sup>	1.00×10 <sup>-8</sup>
BsAb3	hPD-1-His	9.69×10 <sup>3</sup>	1.03×10 <sup>-4</sup>	1.06×10 <sup>-8</sup>

Ka: 结合常数 (association constant); kd: 解离常数 (dissociation constant); KD: 亲和力常数 (affinity constant)

2.4 新构建BsAb抑制B-hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4小鼠结肠癌细胞移植瘤的生长

小鼠体内药效实验结果表明, 在低剂量给药条件下(图3A和3B), BsAb1的TGI为76.9%, BsAb2的TGI为70.0%, BsAb3的TGI为18.3%; 在高剂量给药条件下(图3B), BsAb1的TGI为93.7% (P<0.05), BsAb2的TGI为130.5% (P<0.01), BsAb3的TGI为46.3%。结果说明, 3种BsAb均具有不同程度的抑制肿瘤生长的作用。



A: 荧光素酶报告基因实验检测BsAb对PD-1和CTLA-4的阻断活性; B: FCM检测BsAb对CTLA-4的阻断活性  
图2 新构建BsAb对PD-1/CTLA-4信号通路的阻断活性

2.5 BsAb的IgG亚型对小鼠结肠癌移植瘤生长的影响  
将BsAb1更换为IgG1亚型, BsAb2更换为IgG1亚型和增强ADCC活性的IgG1-SI亚型, 通过体内药

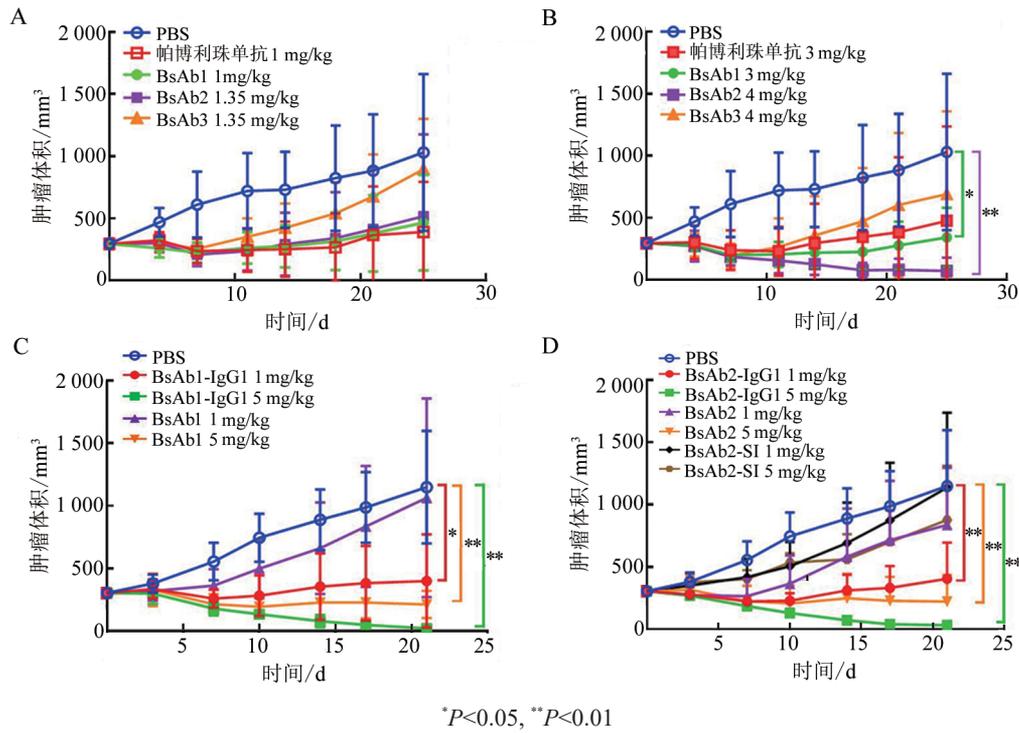
效验证实验结果(图3C和3D)发现, 在剂量为1 mg/kg给药时, BsAb1-IgG1的TGI为88.7% (P<0.05), BsAb1的TGI为10.1%, BsAb2-IgG1的TGI为88.3%

( $P<0.01$ ), BsAb2 的 TGI 为 36.9%, BsAb2-SI 的 TGI 为 1.5%。在剂量为 5 mg/kg 给药时, BsAb1-IgG1 的 TGI 为 133.8% ( $P<0.01$ ), BsAb1 的 TGI 为 111.0% ( $P<0.01$ ), BsAb2-IgG1 的 TGI 为 132.4% ( $P<0.01$ ), BsAb2 的 TGI 为 110.0% ( $P<0.01$ ), BsAb2-SI 的 TGI 为 32.2%。结果显示, 在 BsAb2 中, BsAb1-IgG1 较无 Fc 效应功能的 BsAb1 展现出了更好的抑制肿瘤活性 (图 3C); 在 BsAb2 中, 同样发现 BsAb2-IgG1 的药效最好, 无 Fc 效应功能的 BsAb2 次之, 而增强 ADCC 活性的 BsAb2-SI 反而最差 (图 3D)。

上述实验结果表明, 3 种 BsAb 均具有不同程度的抑制小鼠结肠癌细胞移植瘤生长的活性, 如将 BsAb 亚型更换至 IgG1 时, 抑制肿瘤活性得到进一步的增强。

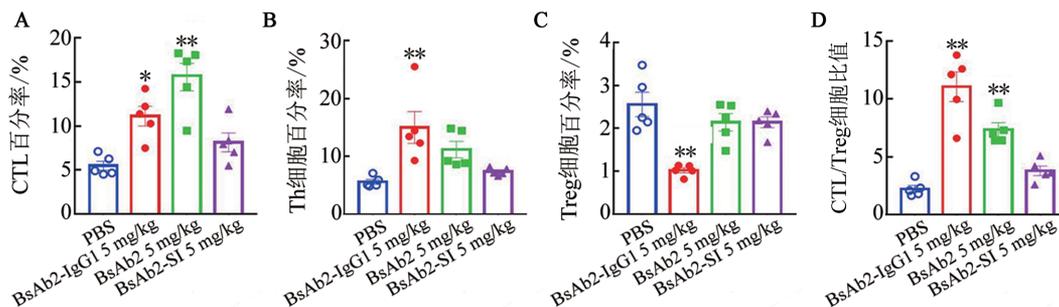
### 2.6 IgG1 亚型 BsAb 可更好地清除 TIL 中的 Treg 细胞

FCM 对小鼠结肠癌细胞移植瘤组织中 TIL 分析结果 (图 4) 显示, 与 PBS 组比较, BsAb2 组和 BsAb2-IgG1 组 CTL 百分率显著升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), BsAb2-IgG1 可显著升高 Th 细胞百分率 ( $P<0.01$ ) 并能显著降低 Treg 细胞的比例 ( $P<0.01$ ), 从而引起 CTL/Treg 的比值增大 ( $P<0.01$ ), 使肿瘤免疫微环境更有利于杀伤肿瘤细胞; 而增强 ADCC 活性的 BsAb2-SI 组的 CTL、Treg 细胞百分率均无明显变化 (均  $P>0.05$ )。结果表明, 更换 BsAb 亚型为 IgG1 较无 Fc 效应功能的抗体亚型能增加 TIL 中 CTL 百分率并降低 Treg 细胞百分率, 但进一步增强 ADCC 活性的 SI 亚型则对免疫细胞亚群的变化无显著影响。



A: BsAb1~BsAb3 低剂量给药后肿瘤生长趋势图; B: BsAb1~BsAb3 高剂量给药后肿瘤生长趋势图; C: BsAb1 不同亚型给药后肿瘤生长趋势图; D: BsAb2 不同亚型给药后肿瘤生长趋势图

图 3 BsAb 及其 IgG1 亚型对 B-hPD-1-hPD-L1-hCTLA-4 小鼠结肠癌细胞移植瘤生长的影响



与 PBS 组比较,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$

图 4 BsAb 及其 IgG1 亚型对结肠癌移植瘤组织中 CTL(A)及其 Th 细胞(B)、Treg 细胞(C)和 CTL/Treg 细胞比值(D)的影响

### 3 讨论

NISONOFF等<sup>[10]</sup>在1960年首次提出了BsAb的概念, MILSTEIN等<sup>[11]</sup>在1983年制备了首个具有完整免疫球蛋白G(IgG)结构的BsAb。2009年,第1个治疗性BsAb卡妥索单抗(catumaxomab, 靶向CD3和EpCAM)上市<sup>[12]</sup>;2014年,第2个BsAb药物博纳吐单抗(blinatumomab, 靶向CD3和CD19)<sup>[13]</sup>获批;2017年,罗氏公司推出第3个获批BsAb药物依米珠单抗(emicizumab, 靶向FIXa和FX)<sup>[14]</sup>;2022年,罗氏公司法瑞西单抗(faricimab, 靶向ANG-2和VEGF-A)获批<sup>[15]</sup>,同年中国首个自主研发的BsAb卡度尼利单抗(candonilimab, 靶向PD-1和CTLA-4)获批<sup>[16]</sup>。

PD-1/CTLA-4抗体是PD-1抗体中开发最早的,多种药物已处于临床开发阶段,目前已在国内上市了卡度尼利单抗<sup>[17]</sup>。选择CTLA-4靶点与PD-1靶点进行组合开发BsAb的首要因素可能是基于这2个靶点的伊匹木单抗与纳武利尤单抗(nivolumab)联用的协同有效性已得到临床验证<sup>[18-19]</sup>。然而,PD-1/CTLA-4抗体开发过程中抗体亚型的选择也存在尚待解决的问题,CTLA-4单抗的开发常采用IgG1亚型,临床前研究其作用机制主要是通过Fc效应功能介导的ADCC作用杀伤Treg细胞,进而发挥抗肿瘤的作用<sup>[20-23]</sup>。PD-1单抗的开发则常采用弱Fc效应功能的IgG4亚型。临床上的PD-1/CTLA-4抗体均采用无Fc效应功能的亚型,可能考虑为避免对效应T细胞的非特异性杀伤。采用无Fc效应功能的亚型也会抑制CTLA-4抗体清除Treg细胞的功能。目前,临床上尚无PD-1/CTLA-4抗体与单抗的头对头比较结果,PD-1/CTLA-4抗体能否发挥2个靶点的协同增效作用,尚需进一步观察。本研究基于靶点人源化小鼠,对3个BsAb,即PD-1/CTLA-4抗体进行了体内药效评估,均展现出了不同程度的抑制肿瘤的活性。

本研究观察了更换抗体亚型能否进一步提高BsAb的抗肿瘤活性,以BsAb1和BsAb2为研究对象,对不同抗体亚型进行体内药效评估,结果发现具有Fc效应功能的IgG1亚型体内药效更优。进一步通过TIL分析发现,IgG1亚型可以更好地清除TIL中的Treg细胞,引起CTL/Treg细胞的比值增大,使肿瘤免疫微环境更有利于杀伤肿瘤细胞,而进一步增强ADCC的Fc突变体亚型则不能带来更好的药效获益。本研究发现,通过对PD-1/CTLA-4抗体亚型的优化可以实现阻断PD-1信号通路的同时,通过Fc效应功能发挥ADCC作用以实现Treg细胞的清除,进而更大程度地发挥CTLA-4抗体的功能。本研究

也有继续值得探索的地方,如增强ADCC亚型的BsAb2抑制肿瘤活性降低是否可能由于半衰期降低或对效应T细胞产生了负面影响;其他结构BsAb的增强ADCC亚型能否进一步增强抑制肿瘤活性;在其他肿瘤模型中是否具有类似的现象等。

BsAb的开发目前尚无统一程式化方式,相对单抗更具有“个性化”。重要的是选取何种靶点组合、结构及抗体亚型可以带来独特的生物学效应,进而提高有效性和安全性,并保证了可开发性。BsAb由于可以结合2个靶点,或作用于不同的细胞亚群,因此体外研究较难全面地反映BsAb的实际作用机制。本研究建立基于靶点人源化小鼠PD-1/CTLA-4的BsAb的体内药效评估体系,研究了不同结构及亚型对BsAb功能活性的影响,对PD-1/CTLA-4抗体及其他BsAb开发的亚型及结构选择具有新的借鉴意义。

### [参考文献]

- [1] ROTTE A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 255[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567914/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1259-z.
- [2] HOSSEINI A, GHARIBI T, MAROFI F, *et al.* CTLA-4: from mechanism to autoimmune therapy[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106221[2022-12-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007707/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106221.
- [3] 张丽娜, 杨艳芳, 姜战胜. PD-1/PD-L1抑制剂治疗三阴性乳腺癌的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(8): 844-849. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.012.
- [4] JIANG Y S, CHEN M, NIE H, *et al.* PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations[J/OL]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15(5): 1111-1122[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6605868/>. DOI: 10.1080/21645515.2019.1571892.
- [5] ARASANZ H, GATO-CAÑAS M, ZUAZO M, *et al.* PD1 signal transduction pathways in T cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51936-51945. DOI: 10.18632/oncotarget.17232.
- [6] ZHANG J, YI J Z, ZHOU P F. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects[J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 126-145. DOI: 10.1093/abt/tbaa011.
- [7] THAKUR A, HUANG M, LUM L G. Bispecific antibody based therapeutics: strengths and challenges[J]. *Blood Rev*, 2018, 32(4): 339-347. DOI: 10.1016/j.blre.2018.02.004.
- [8] 赵晓翠, 李冉冉, 胡亚利, 等. 靶向抗PD-1/CD19双特异性抗体的表达与活性鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(4): 359-364. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.007.
- [9] SUURS F V, LUB-DE HOOGHE M N, DE VRIES E G E, *et al.* A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 201: 103-119. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.04.006.
- [10] NISONOFF A, WISSLER F C, LIPMAN L N. Properties of the

- major component of a peptic digest of rabbit antibody[J]. *Science*, 1960, 132(3441): 1770-1771. DOI: 10.1126/science.132.3441.1770.
- [11] MILSTEIN C, CUELLO A C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry[J]. *Nature*, 1983, 305(5934): 537-540. DOI: 10.1038/305537a0.
- [12] SEIMETZ D, LINDHOFER H, BOKEMEYER C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36(6): 458-467. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.03.001.
- [13] GOEBELER M E, BARGOU R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy[J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(5): 1021-1032. DOI: 10.3109/10428194.2016.1161185.
- [14] BLAIR H A. Emicizumab: a review in haemophilia A[J]. *Drugs*, 2019, 79(15): 1697-1707. DOI: 10.1007/s40265-019-01200-2.
- [15] SHIRLEY M. Faricimab: first approval[J]. *Drugs*, 2022, 82(7): 825-830. DOI: 10.1007/s40265-022-01713-3.
- [16] KANG J Y, SUN T L, ZHANG Y. Immunotherapeutic progress and application of bispecific antibody in cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1020003[2022-12-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36341333/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1020003.
- [17] KEAM S J. Cadonilimab: first approval[J]. *Drugs*, 2022, 82(12): 1333-1339. DOI: 10.1007/s40265-022-01761-9.
- [18] HELLMANN M D, PAZ-ARES L, BERNABE CARO R, *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(21): 2020-2031. DOI: 10.1056/nejmoa1910231.
- [19] 周晓燕, 毛雅珍, 王晓贤, 等. 纳武单抗联合伊匹单抗对比纳武单抗单用方案治疗恶性肿瘤有效性和安全性的 Meta 分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(5): 464-471. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.011.
- [20] ROMANO E, KUSIO-KOBIALKA M, FOUKAS P G, *et al.* Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells *ex vivo* by nonclassical monocytes in melanoma patients [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(19): 6140-6145[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434760/>. DOI: 10.1073/pnas.1417320112.
- [21] GAN X, SHAN Q Q, LI H, *et al.* An anti-CTLA-4 heavy chain-only antibody with enhanced Treg depletion shows excellent preclinical efficacy and safety profile[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(32): e2200879119[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9371702/>. DOI: 10.1073/pnas.2200879119.
- [22] ARCE VARGAS F, FURNESS A J S, LITCHFIELD K, *et al.* Fc effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 antibodies[J/OL]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 649-663. e4[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904288/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.010.
- [23] SELBY M J, ENGELHARDT J J, QUIGLEY M, *et al.* Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(1): 32-42. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0013.

[收稿日期] 2022-12-08

[修回日期] 2023-04-24

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超