

什么是双特异性抗体？双特异性抗体制备方法有哪些？

产品名称	什么是双特异性抗体？双特异性抗体制备方法有哪些？
公司名称	北京义翘神州科技股份有限公司
价格	.00/件
规格参数	
公司地址	北京市北京经济技术开发区科创十街18号院9号楼
联系电话	400-8909989 15101180634

产品详情

什么是双特异性抗体？

免疫治疗是目前肿瘤治疗的新方向，通过调动机体的免疫系统，增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力，从而控制和杀伤肿瘤细胞。普通的肿瘤治疗性抗体只能结合单一的抗原，而且无法有效地聚集于肿瘤组织处，这可能是其疗效不高或响应率低的一大原因。

双特异性抗体（bsAbs）是一类具有双功能的人工抗体分子，能同时特异性结合两种不同的抗原。它可以把免疫细胞、病毒分子等连接到肿瘤细胞上，增强对靶细胞的杀伤作用；同时可在同一肿瘤细胞上结合不同抗原以增强其结合特异性，减少脱靶毒性等副作用。

双特异性抗体能在靶细胞和功能分子（细胞）间架起桥梁，激发具有导向性的免疫反应，是基因工程抗体的一种，现已成为抗体工程领域的热点，在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。此外，双功能抗体药物还在自身免疫疾病、感染类疾病、组织再生和临床诊断领域也有应用。

作用机制

1.介导免疫细胞杀伤

双特异性抗体可以介导T细胞、NK细胞及巨噬细胞等免疫细胞杀伤。如抗CD3的双特异性抗体能够分别结合T细胞表面CD3分子和癌细胞表面抗原，从而拉近细胞毒性T细胞与癌细胞的距离，引导T细胞直接杀伤癌细胞，而不再依赖于T细胞的双重激活信号。

2.双靶点信号阻断

同时结合双靶点，阻断双信号通路是双特异性抗体的另一个重要作用机制。肿瘤细胞可以通过转换信号通路或通过HER家族成员自身或不同成员之间的同源或异源二聚体激活细胞内信号进行免疫逃逸。采用双特异性抗体药物可以同时灭活两个或多个配体，减少肿瘤细胞逃逸。

3.促进蛋白形成功能性复合体

双特异性抗体的两臂可分别结合两种抗原，形成功能性复合体。针对该复合体的抗体药物，可减少体内排斥反应，提供更好的治疗方案。

双特异性抗体种类

1.含Fc区的双特异性抗体

通过重链配对形成IgG样结构，抗体的Fc结构域可介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用及补体介导的细胞毒作用等生物学功能，且通过现有通用抗体平台技术易于实现产品的纯化。此类双特异性抗体主要有:Triomabs, kihlgG, Cross-Mab, ortho-FablgG, DVD-Ig, two-in-oneIgG, IgG-scFv, scFv2-Fc等。

2.不含Fc区的双特异性抗体

优点是相对分子质量小、可以在原核细胞中表达且更易穿过组织及肿瘤细胞到达靶位点，缺点是由于不含抗体Fc区，不能介导相应的生物学功能且半衰期通常较短。目前，此类双特异性抗体主要有BiTE, DART, TandAbs, bi-Nanobody等。

双特异性抗体在自然状态下不存在，只能通过人工制备，在结构上的设计策略尤为重要。

双特异性抗体制备方法：

双特异性抗体（BsAb）又称双功能抗体，可同时识别两种不同的抗原和表位，并且阻断两种不同的信号通路以发挥作用。

目前双特异性抗体的制备方法主要有化学偶联、双杂交瘤细胞法、重组基因制备法等。

1、化学偶联法

该方法早出现于上世纪80年代，其原理是通过化学偶联剂（如邻苯二马来酰亚胺、N-琥珀酰-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐、二硫代酰基苯甲酸等）将两个完整IgG或两个F(ab)₂抗体片段偶联成一种BsAb，这种方法快速简便，但是容易破坏抗原结合部位从而影响抗体活性，同时交联剂本身的安全性和致癌性也不确定。

图1所示为使用化学偶联法生产的双特异性抗体快速检测食物中的病原菌。

用红细胞与弗氏佐剂完全融合（150mg）混合物注射入雌性家兔，初级免疫21天后注射100mg的红细胞与弗氏佐剂完全融合（150mg）混合物进行二次免疫，第28天后从血浆中获得血清，利用交联红细胞吸附柱获得特异性红细胞抗体。将李斯特菌细胞表面蛋白与弗氏佐剂乳化（100mg）注入雌性家兔进行免疫，21天后增加50mg抗体进行主要免疫，5天后采集血清，将血清纯化并用李斯特菌亲和柱获得anti-Listeria抗体。

通过增加 2-巯基乙磺酸钠盐和 2-巯基乙醇的浓度（0-60mM），从而有效还原单抗和多抗之间的二硫键，单源抗体通过添加等体积的2倍浓度的蒸馏水溶解的 2-巯基乙磺酸钠盐（60mM），将此溶液与混合了1mg鼠源单克隆的anti-L、产单核细胞LZH1IgG1和鼠源单克隆IgG2a上调的对抗人红细胞膜表面蛋白（protein4.2（2G-12））的PBS溶液中，37℃ 孵育25min。随后单价的抗体暴露在氧化条件下，再通过针对3种缓冲液的PBS进行透析，pH7.4，4℃ 24h。用同样的方法使用人类红细胞或L-单核细胞表面抗原纯化

，单克隆和多克隆的双特异性抗体通过含有亲本抗体的亲和柱进行纯化，从而获得含有两种抗体的双特异性抗体。

首先获得抗肿瘤（-T）和抗半抗原（-H）的Fab片段的抗体。先将抗肿瘤Fab'与双功能的N,N'-o-苯乙烯-二马来酰亚胺（PDM）连接，随后将抗半抗原的Fab'片段加入，形成稳定的Fab' × Fab'的双特异性抗体。

2、双杂交瘤融合法

通过细胞融合的方法将2株不同的杂交瘤细胞融合成双杂交瘤细胞株，然后通过常规的杂交瘤筛选法克隆靶细胞。

由于双杂交瘤的遗传背景来源于亲代的两种杂交瘤细胞，它必然要产生2种重链和2种轻链分子，而这些轻重链的随机组合配对方式才能产生所需的BsAb。利用双杂交瘤方法制备BsAb随机性较大，效率低，但是BsAb生物活性较好，抗体结构比较稳定。利用Knock-in-hole技术可以有效解决异源抗体重链正确配对的难题。

制备方法是将一个抗体的重链CH3区366位体积较小的苏氨酸突变为体积较大的酪氨酸，形成突出的“杵”型结构；

将另一个抗体重链CH3区407位较大的缬氨酸残基突变成较小的苏氨酸，形成凹陷的“臼”型结构；

利用“杵臼”结构的空位阻效应实现两种不同抗体重链间的正确装配。

每个杂交瘤细胞预先与特异性抗原刺激进而产生特异性的单克隆抗体。将此两个表达特异性抗体的细胞融合在一起，获得杂交瘤细胞且同时具有两个亲本的重链和轻链，此融合的杂交瘤细胞能够同时表达双亲的和两者混合的免疫原性。

此双细胞融合技术是产生双特异性抗体的基础，但由此产生的双特异性抗体产量低且具有较强的产物异质性。随机产生的两种重链和轻链可以产生10种不同的分子结构且只有一种具有双特异性抗体的功能。通过双杂交瘤产生有功能双特异性抗体的比例是不可预知的，工作量较大，从杂交瘤细胞产生的所有种类的双特异性抗体筛选出需要的双抗是个十分困难的工作。

双特异性抗体构建示意图

抗体在自然状态下的成熟过程中，重链先通过二聚体作用，随后轻链与之配对。由于抗体分子装配的临界状态，维持这个过程是十分合适的，在这个过程中重链/重链和重链/轻链的组合是自然发生的。因此，我们选择合成的两个抗体臂，其中一个臂具有二聚体的Fc结构域，另一个则没有。并将两个抗体臂分别在哺乳动物细胞中表达，以此来消除重/轻链的错配。选择对功能影响较小的绞链区连接两个臂，连接方法可以通过化学法或酶方法完成，在此方法中，选择了一个裂解肽，能够通过“PTS”催化作用将两个臂连接。两个mAbs携带必要的内源肽组分并通过“PTS”功能连接，如图4所示。我们把此分子结构叫做“BAPTS”（双特异性抗体通过蛋白质反式剪接），此方法解决了重/轻链错配的问题。此“Knobs-into-Holes”或者别的Fc工程方法都能够用于此方法进而提高重链/轻链的错配问题。

3、重组基因

利用基因工程技术制备BsAb是目前常用的制备方法，其制备原理为利用基因工程技术对传统抗体进行基因工程方面的改造，从而形成多种形式的双特性抗体。

主要通过两种途径实现，其一是将编码两种单抗的重/轻链基因同时转入骨髓瘤细胞系，或是将一种单抗的轻、重链基因转入可分泌另外一种单抗的杂交瘤细胞中；其二是通过构建单链抗体制备的。

其分子构成主要包括hBS14 (anti-CEACAM5 × anti-679HSG) 和几个反式-Fab (TF) 片段结构，每一个都能结合一个不同的肿瘤抗原，但所有的抗原都是anti-HSG半抗原结合抗体。

其中hBs14结构由单克隆抗体获得，反式-Fab中的Dock-and-Lock结构由2个单独的克隆产生。其中一个产物为抗肿瘤蛋白质，使用二聚域 (DDD2) 肽序列和对接结构，半胱氨酸放在一个重要的位置成为一个设计的DDD2结构。Fab-DDD2组成一个二聚体，此二聚体结构有一个对接结构与将会与锚定结构域连接，并用2个半胱氨酸 (AD2) 修饰。这个结构将会一方面结合肿瘤，另一方面结合半抗原。

更多双特异性抗体生产服务尽在义翘神州网！来源：<https://cn.sinobiological.com/services/bispecific-antibody-service>