

Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний

С.Е. Седых^{1,2}, Г.А. Невинский^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН»;
Россия, 630090 Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 8;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Сергей Евгеньевич Седых sedyh@niboch.nsc.ru

Биспецифичными называют молекулы антител, содержащие 2 разных антигенсвязывающих центра. Особый интерес к молекулам биспецифичных антител обусловлен их терапевтическим применением. Два препарата терапевтических биспецифичных иммуноглобулинов, разрешенные к применению в США и странах Европы, направлены на лечение онкологических заболеваний. Работы, опубликованные в последние годы, посвящены различным способам получения моноклональных биспецифичных антител, исследованию их физико-химических свойств, биологической активности, доклиническим и клиническим испытаниям. Настоящий обзор рассматривает различные подходы к получению противоопухолевых биспецифичных иммуноглобулинов, а также перспективы их практического применения.

Ключевые слова: антитела, иммуноглобулин, биспецифичный иммуноглобулин, терапевтические антитела, моноклональные антитела, онкология, онкологическое заболевание

Для цитирования: Седых С.Е., Невинский Г.А. Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):30–40.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-30-40

Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer

S.E. Sedykh^{1,2}, G.A. Nevinsky^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;
8 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

²Novosibirsk National State Research University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia

Bispecific antibody molecules contain two different antigen-binding centers. Particular interest in bispecific antibodies is due to their therapeutic application. Two preparations of therapeutic bispecific immunoglobulins, approved for use in the US and European countries, are aimed at the treatment of cancer. Studies published in recent years are devoted to various methods of obtaining monoclonal bispecific antibodies, to study their physicochemical properties, biological activity, preclinical and clinical trials. This paper reviews different approaches to the production of antitumor bispecific immunoglobulins, as well as the prospects for their practical application.

Key words: antibodies, immunoglobulin, bispecific immunoglobulin, therapeutic antibodies, monoclonal antibodies, oncology, cancer disease

For citation: Sedykh S.E., Nevinsky G.A. Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer. Uspexhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):30–40.

Введение

Иммуноглобулины — основные белковые компоненты адаптивной иммунной системы, направленной против чужеродных соединений и инфекционных агентов. Молекула иммуноглобулина G (IgG) состоит из 2 легких (L) и двух тяжелых цепей (H), соединенных дисульфидными связями. Антигенсвязывающие центры антител (АТ) образованы гипервариабельными участками тяжелых и легких цепей. Таким образом, молекула АТ содержит 2 одинаковых антигенсвязыва-

ющих сайта (HL-фрагмента) и является моноспецифичной и бивалентной [1].

Моноклональные АТ представляют собой продукты секреции идентичных иммунных клеток, каждая из которых является клоном единственной родительской клетки. Моноклональные АТ — не просто моноспецифичные бивалентные молекулы, они связывают один и тот же эпитоп (фрагмент антигена, узнаваемый АТ), в отличие от поликлональных АТ. В связи с этим моноклональные АТ широко используют для лечения

онкологических заболеваний. Препараты авастин (бевацизумаб, АТ против фактора роста эндотелия сосудов), герцептин (трастузумаб, АТ против рецептора HER2), ритуксан (ритуксимаб, АТ против белка CD20) представлены на фармацевтическом рынке более 10–15 лет. Однако эти и другие препараты моноклональных АТ обычно не способны излечивать рак при монотерапии. Вероятно, это связано с тем, что Т-лимфоциты не принимают активного участия в уничтожении опухоли, а лишь предотвращают связывание молекул ростовых факторов с рецепторами.

Большие надежды направлены на АТ, связывающие 2 антигена и более, а также конъюгированные с агентами для химио- и радиотерапии [1–3]. Биспецифичными называют АТ, содержащие 2 разных антигенсвязывающих центра. В 2015 г. журнал “Nature Reviews Drug Discovery” назвал биспецифичные иммуноглобулины «антителами нового поколения». Разработаны многочисленные противоопухолевые биспецифичные АТ (БсАТ), один антигенсвязывающий центр которых направлен против рецептора CD3 (активирует цитотоксические Т-лимфоциты), а другой – против специфических антигенов опухолевых клеток (CD19, CD20, CD33, CD123, Her2, EpCAM, BCMA, SEA и др.). Сближение цитотоксического Т-лимфоцита и опухолевой клетки в результате связывания БсАТ активирует Т-киллер и способствует уничтожению опухолевой клетки. Разработаны БсАТ для лечения остеопороза, гемофилии, болезни Альцгеймера, аутоиммунных заболеваний [4].

Препараты БсАТ имеют несколько значительных преимуществ перед моноспецифичными АТ. Во-первых, БсАТ направляют специфические эффекторные клетки иммунной системы к опухолевым клеткам-мишеням, усиливая их цитотоксичность. Во-вторых, БсАТ могут обеспечивать большую специфичность связывания, так как взаимодействуют с двумя различными поверхностными антигенами. В-третьих, использование БсАТ позволяет оптимизировать расходы на создание препарата путем снижения стоимости разработки, клинических исследований по сравнению с комбинированной терапией двумя моноспецифичными препаратами. В-четвертых, препараты БсАТ могут одновременно блокировать 2 различных пути патогенеза [5]. В-пятых, использование БсАТ по сравнению с комбинированной терапией двумя моноспецифичными препаратами позволяет снизить затраты на лечение [5, 6].

Препараты терапевтических БсАТ, разрешенные к медицинскому использованию, блинатумомаб и катумаксомаб предназначены для лечения гемобластозов (рака крови – лейкомии и лимфом). Особенностью таких опухолей является то, что в отличие от солидных (опухоли молочной железы, матки, прямой кишки), опухоль, которую можно механически прощупать, в организме часто не образуется. В связи с этим при лейкомии и лимфоме отсутствуют обычные

для многих онкологических патологий симптомы. При этом злокачественные лейкоциты пролиферируют в костном мозге и поступают в огромных количествах в кровотоки в виде отдельных клеток, что позволяет для терапии использовать препараты БсАТ [3].

Способы получения биспецифичных иммуноглобулинов

БсАТ 1-го поколения были получены химической сшивкой и методом гибридом. В настоящее время препараты БсАТ в основном получают 3 способами: химической конъюгацией с помощью кросслинкеров, методом соматического слияния 2 линий гибридом (технология квадromы), генно-инженерными методами. В зависимости от способа получения и структуры БсАТ отличаются по числу связывающих центров, их геометрии, времени полужизни фармакологического препарата и эффекторным функциям. По механизму действия множество современных препаратов БсАТ, проходящих доклинические и клинические исследования, можно классифицировать на 4 формата: биспецифичные усилители Т-клеточного ответа (bispecific T-cell engager, BiTE), «перенацеливающие» АТ двойной аффинности (DART), гомодимерные АТ, а также трифункциональные БсАТ [7]. Примеры структур БсАТ приведены на рис. 1.

Конъюгирование и ковалентное присоединение фрагментов. БсАТ получают в результате присоединения к amino- или карбоксильному концу моноспецифичных молекул IgG легких или тяжелых цепей с дополнительными антигенсвязывающими участками, однодоменных АТ (вариабельных фрагментов тяжелых или легких цепей), scFv, а также других генно-инженерных конструкций [8]. Наиболее широкое применение находят **IgG с двойными вариабельными доменами (DVD-Ig, см. рис. 1)** [9], в которых к вариабельной части HL-фрагмента молекулы IgG через короткий пептидный линкер добавлена вариабельная часть от другого АТ. Получаемые молекулы являются биспецифичными и бивалентными для каждого антигена [10]. Также получены тетравалентные тетраспецифичные АТ, связывающие EGFR, HER2, HER3 и VEGF, сконструированные сочетанием технологии DVD-Ig с другими подходами [11]. Одним из достоинств БсАТ, сконструированных по данной технологии, является их способность связывать одновременно антигены всеми вариабельными доменами. Особенно это актуально в случае связывания цитокинов и других белков, представленных в крови в низкой концентрации, к тому же препараты DVD-Ig можно вводить реже [12].

Впервые химическая конъюгация для получения БсАТ использована в 1985 г.: два Fab₂, полученных пепсинолизом IgG кролика, были восстановлены, а затем окислены, в результате чего получены биспецифичные Fab₂ [13]. Впоследствии были использованы гомо- и гетеробифункциональные реагенты, взаимодействующие с остатками цистеина, и Fab, полученные генно-инженерным путем. Наиболее современным методом

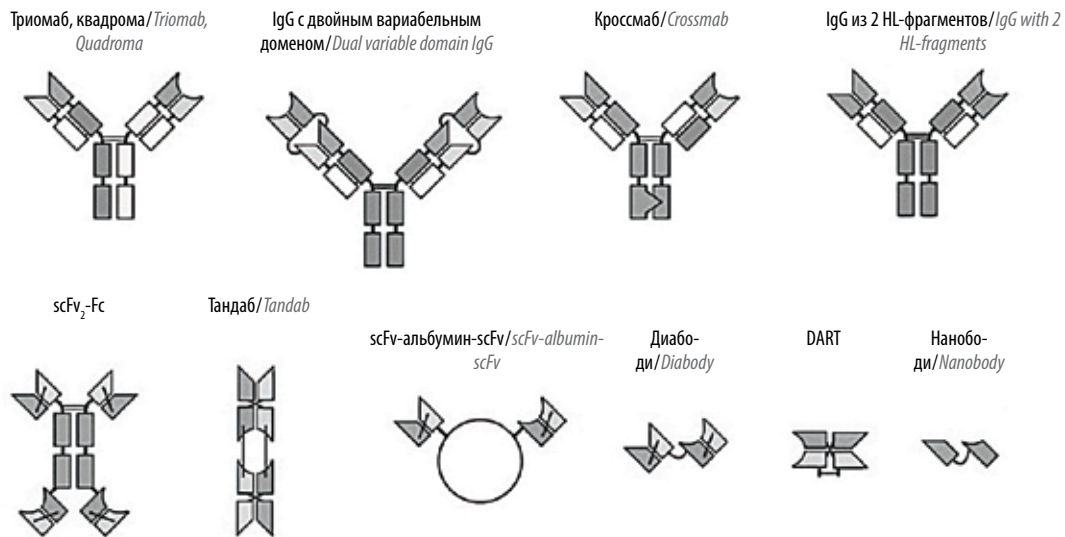


Рис. 1. Различные форматы терапевтических биспецифичных антител
Fig. 1. Various types of therapeutic bispecific antibodies

конъюгирования для получения БсАТ является **технология CovX-Body**, которая заключается в сайт-специфичном присоединении низкомолекулярных лигандов к остаткам лизина [14]. В результате период полувыведения низкомолекулярных лекарственных препаратов значительно увеличивается за счет присоединения к HL-фрагментам.

Для получения Т-лимфоцитов, поверхность которых покрыта БсАТ, используют химическое конъюгирование АТ против CD3 и CD20. В результате получают аутологичные поликлональные активированные Т-лимфоциты, поверхность которых усилена антиген-связывающими центрами против рецептора CD20 [15].

Метод Dock-and-Lock позволяет получать поливалентные, полиспецифичные и полифункциональные конструкции [16]. Для этого молекулу Fab ковалентно связывают линкером с доменом димеризации и докинга с АМР-зависимой протеинкиназы (содержит сульфгидрильную группу), 2-й Fab связывают с закоривающим доменом А-киназы (содержит 2 сульфгидрильные группы). Взаимодействие 2 доменов с АМР-зависимой протеинкиназы приводит к димеризации конструкций, несущих Fab, далее полученный фрагмент связывает домен А-киназы, несущий 3-й Fab. Тройная конструкция далее ковалентно стабилизируется образованием дисульфидных связей [17]. Для полученных таким образом трифункциональных конструкций, содержащих 4 молекулы цитокина ИФН- $\alpha 2b$, соединенных с АТ против CD20 (велтуцумаб), показана эффективность при неходжкинской лимфоме и множественной миеломе [18]. Описано ковалентное присоединение одноцепочечного АТ против CD3 с димером противоопухолевых Fab, биспецифичное связывание конструкции с опухолевыми клетками и Т-лимфоцитами в результате активирует противоопухолевую Т-клеточную цитотоксичность [19].

Предложен метод ковалентного присоединения терапевтических АТ (scFv, диабодди) к альбумину [20] (см. рис. 1), а также к белкам, связывающим альбумин, что в результате приводит к увеличению периода полувыведения препаратов из крови в 5–6 раз. Получение подобных конструкций приводит к трудно предсказуемым результатам, вследствие чего биспецифичные молекулы, образованные в результате слияния разных фрагментов иммуноглобулинов или иммуноглобулинов с другими белками, находят малое применение в исследованиях и для создания новых лекарственных препаратов. Более того, подходы, связанные с получением конъюгатов иммуноглобулинов и их фрагментов, практически не используются ввиду возможности наработки более стабильных слитых рекомбинантных белков [8].

Коэкспрессия 2 генов тяжелых и легких цепей в 1 клетке позволяет получить иммуноглобулины со структурой, подобной IgG (триомаб, квадрама; см. рис. 1). С помощью этого подхода был создан препарат моноклональных БсАТ против CD3 и ЕрсАМ (катумаксаб) [21]. Основная проблема коэкспрессии 2 АТ (например, в случае квадрамы) — образование до 9 нецелевых химерных иммуноглобулинов наряду с целевыми молекулами. Это является следствием того, что тяжелые цепи могут образовывать гомодимеры (вместо гетеродимеров), а легкие цепи могут случайным образом связываться с тяжелыми цепями. Таким образом, к существенным недостаткам данного метода относят низкий выход целевых БсАТ [8].

Увеличение вероятности образования гетеродимеров из 2 разных тяжелых цепей может быть решено с применением подхода **“knobs-into-holes”**, при котором используют 1 тяжелую цепь с мутацией Т366W (“knob” (ручка) — замена на более стерически громоздкую аминокислоту) и 2-ю с мутациями Т366S, L368A,

Y407V (“hole” (отверстие) – замена на меньшую по размеру радикала аминокислоту), для которых термодинамически образование гетеродимеров более выгодно, чем гомодимеров [22]. Наиболее широко в настоящее время используется получение моноспецифичных АТ в 2 разных клеточных линиях, их выделение и последующее объединение *in vitro* [23]. Преимуществом данного подхода является использование уже хорошо охарактеризованных АТ, существенным недостатком – высокая стоимость и трудность получения таких БсАТ [8].

Показана возможность генерации БсАТ, содержащих паратоп, распознающий 2 различных антигена, например, получено АТ против HER2, связывающее VEGF [24], а также АТ против HER3, связывающее EGFR [25]. **Технология Кроссмаб**, разработанная Roche (см. рис. 1), позволила получить тетраспецифичные АТ, связывающие EGFR, HER2, HER3 и VEGF [11]. **Технология DutaMab** (Creative Biolabs, Roche) в каждом антигенсвязывающем центре использует 3 участка для связывания одного и 3 других участков для связывания 2-го антигена, таким образом формируются 2 паратопа. Данная технология позволяет получать БсАТ по технологии моноспецифических АТ. Безусловным недостатком такого подхода является его неуниверсальность – не для каждой пары антигенов возможно подобрать сочетание паратопов внутри одного HL-фрагмента [8].

Описано несколько вариантов БсАТ, не содержащих участков константных доменов, наиболее востребованным является **формат диабоды** (см. рис. 1) – конструкции, экспрессируемые в 1 клетке, в которых фрагменты тяжелых и легких цепей соединены короткими пептидными последовательностями. Для получения таких БсАТ широко используют одноцепочечные фрагменты переменных доменов (scFv). Для получения БсАТ типа диабоды последовательности, кодирующие 2 разных scFv, объединяют в 1 конструкцию, в которой тяжелые цепи экспрессируются в составе 1 полипептида и затем соединяются с соответствующими легкими цепями. Именно по технологии диабоды компания Amgen в эукариотических клетках получила первые ViTE. Это некрупные молекулы scFv, тандемно соединенные гибкими пептидными линкерами, содержащими антигенсвязывающий центр против CD3 и высокоаффинный поверхностный антиген опухолевой клетки [26]. Недостатком таких молекул является их короткая продолжительность жизни в крови, которая связана с небольшим размером и отсутствием Fc. Преимущество данного формата – крайне высокая специфическая противоопухолевая активность, в концентрации до 10 пг/мл (в культурах клеток) [27], по-видимому, 1 молекула ViTE может несколько раз использоваться для уничтожения опухолевых клеток Т-лимфоцитами [28].

Для получения БсАТ используют однодоменные фрагменты АТ, полученные из мышинных и челове-

ских библиотек фаговым дисплеем [29]. **Нанободи** – АТ, полученные от лам и верблюдов, содержат только тяжелые цепи (см. рис. 1). Для получения БсАТ нанободи легко связываются короткими пептидными линкерами [30]. Преимуществами использования однодоменных фрагментов АТ являются их малый размер и, соответственно, легкое проникновение в клетки и доступ к скрытым для IgG антигенам. Существенный недостаток таких малых конструкций – их низкая продолжительность полужизни в крови пациента, в результате чего требуется более частое введение препарата [8]. Наиболее успешным представителем семейства ViTE, без сомнений, является описанный выше препарат блинатумомаб [31].

Соединение 2 пар V_L - и V_H -доменов в 1 полипептиде позволяет получить тетравалентные молекулы **тандаб** (см. рис. 1). Описан препарат TandAb AFM13, сочетающий антигенсвязывающие центры против CD16A и CD30, усиливающий ответ натуральных киллеров при лимфоме Ходжкина. Два антигенсвязывающих участка против каждого из антигенов и отсутствие Fc способствуют увеличению молекулярной массы и стабильности препарата *in vivo* [32].

Терапевтические биспецифичные иммуноглобулины

Препарат блинатумомаб разрешен к применению в США, а препарат катумаксомаб – в Европе. Большое количество препаратов для лечения онкологических заболеваний в настоящее время проходят доклинические и клинические исследования (см. таблицу) [33]. Терапевтические БсАТ, представленные на рынке, а также проходящие клинические и доклинические испытания, сблизжают Т-лимфоциты или натуральные киллеры с клетками, экспрессирующими на поверхности специфические антигены (противоопухолевые БсАТ).

Блинатумомаб. Препарат блинатумомаб (Amgen) – первый представитель ViTE, разрешенный к использованию в США. Впервые эффективность блинатумомаба в качестве терапевтического препарата против В-клеточной опухоли показана в 2008 г. у 38 пациентов с рефрактерной неходжкинской лимфомой [34]. В конце 2014 г. в США получено одобрение для лечения острого лимфобластного лейкоза без филадельфийской хромосомы в качестве препарата 2-й линии [35], в Евросоюзе препарат зарегистрирован в 2015 г. Терапия блинатумомабом приводит к истощению числа В-лимфоцитов и их предшественников в периферической крови, которое постепенно восстанавливается после окончания лечения [34]. Механизм действия препарата изображен на рис. 2.

Биспецифичная молекула блинатумомаба разработана по технологии диабоды: 1-й антигенсвязывающий центр направлен против белка CD19 на поверхности В-лимфоцитов, 2-й – против рецептора CD30 поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Одноцепочечная структура блинатумомаба, состоящего

Клинические исследования противоопухолевых биспецифичных антител
Clinical trials of antitumor bispecific antibodies

Тип биспецифичных антител Type of bispecific antibody	Механизм действия Mechanisms of action	Название, шифр Name, code	Мишень Target	Заболевание Disease	Фаза клинических исследований Clinical trial phase
Диабоды (усилители Т-клеточного ответа, BiTE) Diabody (bi-specific T-cell engager, BiTE)		Блинаutumаб, AMG 103, MT-103 Blinatumab, AMG 103, MT-103	CD19 + CD3	Острая лимфобластная лейкемия Acute lymphoblastic lymphoma	Разрешен Approved
		Солиতোмаб, AMG 110, MT-110 Solitomab, AMG 110, MT-110	ЕpСAM + CD3	Рак легкого, желудка, прямой кишки, молочной железы, предстательной железы, яичников Cancers of the lung, stomach, rectum, breast, prostate, ovaries	I (завершена) I (completed)
Квадрома, триомаб Quadroma, triomab	Привлечение Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам Recruitment of T lymphocytes to tumor cells	AMG 111, MT-111, MEDI-565	CEA + CD3	Аденокарцинома кишечника Small intestinal adenocarcinoma	I (завершена) I (completed)
		Пасотуксизумаб, AMG 112, MT-112 Pasotuxizumab, AMG 112, MT-112	PSMA + CD3	Рак предстательной железы Prostate cancer	I
		AMG 330	CD33 + CD3	Острая миелоидная лейкемия Acute myeloid leukemia	I
		AMG 420, VI 836909	VCMA + CD3	Множественная миелома Multiple myeloma	I
Перенацеливающие антитела двойной аффинности (DART) Dual-affinity re-targeting antibodies (DART)		Катумаксомаб Catumaxomab	ЕpСAM + CD3	Опухолевые асциты Malignant ascites	Разрешен Approved
		Эртумуксомаб Ertumaxomab	HER2 + CD3	Рак молочной железы Breast cancer	II
		FBTA05	CD20 + CD3	В-клеточная лимфома B-cell lymphoma	I/II
		PF-06671008	P-кадгерин + CD3 P-cadherin + CD3	Солидные опухоли Solid tumors	I
		Флотетузумаб, MGD006 Flotetuzumab, MGD006	CD123 + CD3	Острая миелоидная лейкемия Acute myeloid leukemia	I
		MGD007	gpA33 + CD3	Рак прямой кишки Rectal cancer	I
		MGD009	B7-H3 + CD3	Рак кожи, прямой кишки, яичников, предстательной железы, поджелудочной железы Cancers of the skin, rectum, ovaries, prostate, pancreas	I
		MGD011, JNJ-64052781	CD19 + CD3	В-клеточные опухоли B-cell tumors	II

Окончание таблицы
End of table

Тип биспецифичных антител Type of bispecific antibody	Механизм действия Mechanisms of action	Название, шифр Name, code	Мишень Target	Заболевание Disease	Фаза клинических исследований Clinical trial phase
Тандаб Tandab	Привлечение Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам Recruitment of T lymphocytes to tumor cells	AFM11	CD19 + CD3	Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma	I
		AFM13	CD30 + gpA33	Ходжкинская лимфома Hodgkin's lymphoma	II
		Вануцизумаб RG7221 Vanucizumab, RG7221	Ангиопоэтин 2 + VEGF Angiopoietin 2 + VEGF	Рак прямой кишки Rectal cancer	II (завершена) II (completed)
Кроссмаб Crossmab	Направленный апоптоз Directed apoptosis	RG7802	CEA + CD3	Солидные опухоли Solid tumors	I
		RG7386	FAP + DR5	Солидные опухоли Solid tumors	I
IgG с двойным вариабельным доменом Dual variable domain IgG	Блокировка цитокинов воспаления Inhibition of inflammatory cytokines		DLL4 + VEGF	Солидные опухоли Solid tumors	I

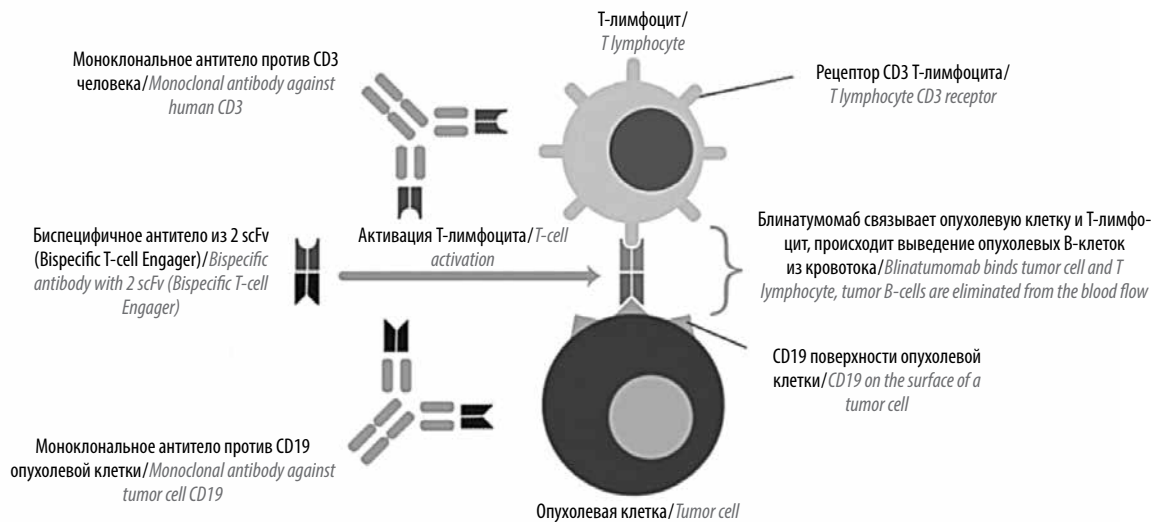


Рис. 2. Механизм терапевтического действия препарата блинатумомаб. В результате связывания биспецифичных антител с антигеном CD19 на поверхности опухолевых клеток и CD3 на поверхности Т-лимфоцитов происходит сближение Т-лимфоцита с опухолевой клеткой
Fig. 2. Mechanism of blinatumomab's therapeutic action. Bispecific antibodies bind CD19 antigen on the surface of tumor cells and CD3 on the surface of T-cells, and the cell come together

из двух scFv, позволяет сравнительно легко получать белок в мономерной форме в значительных количествах и обуславливает ее широкий терапевтический потенциал применения при лимфоме и лейкомии [36]. К сожалению, эта же особенность является причиной, по которой требуется постоянное внутривенное введение препарата. Молекула блинатумомаба направляет первичные CD3-положительные Т-клетки против CD19-положительных клеток лимфомы и обеспечивает цитотоксичность препарата при очень низких концентрациях (10–100 пг/мл) [37]. Важным преимуществом препарата является то, что он направляет цитотоксические Т-лимфоциты к опухолевым В-клеткам в обход Т-клеточного рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости [38].

У взрослых пациентов с рецидивирующей острой лимфобластной лейкомией терапия блинатумомабом дает полностью положительный результат у 72 % больных, а достижение минимальной остаточной болезни (клетки опухоли, остающиеся в организме после достижения ремиссии) происходит у 88 % пациентов; средняя продолжительность жизни после терапии составляет 9 мес [39]. У пациентов с неходжкинской лимфомой препарат показал хорошую эффективность (в клинических испытаниях при монотерапии). Терапия блинатумомабом значительно превосходит терапию моноклональными АТ при намного более низкой конечной концентрации в крови [40]. В настоящее время проходят клинические исследования препарата для лечения неходжкинских лимфом. Также продемонстрировано, что блинатумомаб эффективен в достижении минимальной остаточной болезни у пациентов после индукционной и консолидационной терапии [41]. Показано, что причинами случаев низкой эффективности терапии блинатумомабом при рефрактерной

и рецидивирующей острой лимфобластной лейкомии являются отсутствие CD19 на поверхности лимфоцитов и экстрамедуллярный гематопоэз (образование лимфоцитов вне костного мозга) [42].

После начала введения блинатумомаба число В-лимфоцитов в течение 2 сут снижается менее чем до 1 кл/мкл и остается практически не детектируемым до конца терапии. Напротив, число Т-лимфоцитов снижается у всех пациентов до минимального уровня в течение 1 сут и затем восстанавливается до нормы через нескольких дней, более того, в течение 2–3 нед число Т-лимфоцитов удваивается [43].

Антитела против других антигенов (например, CD79b), разработанные по технологии BiTE, направлены для лечения миелоидной лейкомии и лимфомы (см. таблицу) и в настоящее время проходят клинические испытания [44].

Катумаксомаб. Препарат катумаксомаб (Removab, Trion Pharma) был первым биспецифичным трифункциональным препаратом, одобренным в 2009 г. Европейским медицинским агентством для лечения злокачественных асцитов. Показана эффективность препарата в отношении асцитов, вторичных к эпителиальным формам рака, особенно рака желудка [45–48]. Катумаксомаб является полноразмерным АТ, произведенным по технологии квадromы: гетеродимеры тяжелых и легких цепей мышиноного моноклона против CD3 (IgG2a) и крысиного моноклона (IgG2b) против молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), секретируемые соответствующими гибридами, объединяют в составе одной биспецифичной молекулы (рис. 3), которая также связывает рецептор Fc [49]. Использование HL-фрагментов АТ, полученных из организмов разных хозяев, позволяет снизить вероятность образования биспецифичных молекул

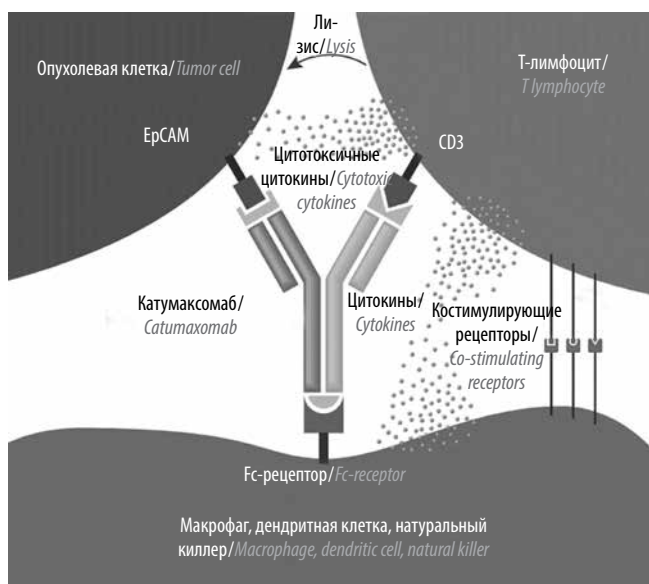


Рис. 3. Механизм терапевтического действия препарата катумаксомаб. Препарат связывает молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) на поверхности опухолевой клетки, CD3 на поверхности Т-лимфоцита и Fcγ-рецептор на поверхности вспомогательных иммунных клеток. В результате достигается эффект элиминирования опухолевых клеток по механизму Т-клеточной цитотоксичности, токсичности цитокинов, фагоцитоза и антителозависимой клеточной токсичности

Fig. 3. Mechanism of catumaxomab's therapeutic action. The drug binds epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) on the surface of tumor cells, CD3 on the surface of T lymphocytes, and на Fcγ-receptor on the surface of accessory immune cells. As a result, tumor cells are eliminated through T-cell cytotoxicity, cytokine cytotoxicity, phagocytosis and antibody-dependent cytotoxicity mechanisms

с неправильно спаренными легкими цепями, так как легкие цепи АТ крысы преимущественно взаимодействуют с тяжелыми цепями крысы, и наоборот, легкие цепи АТ мыши предпочтительно ассоциируют с тяжелыми цепями мыши [49].

Успех катумаксомаб в клинических испытаниях и терапии, по-видимому, связан с тем, что для Т-лимфоцитов и данного препарата БсАТ отсутствует какой-либо барьер проникновения в асцитную опухоль. В отличие от блинатумомаба, противоопухолевое действие катумаксомаб обусловлено колокализацией Т-лимфоцита, опухолевой клетки, экспрессирующей EpCAM, и клетки, на которой находится рецептор к Fc (макрофаг, дендритная клетка, нормальный киллер). Таким образом, катумаксомаб не только сближает опухолевую клетку с CD3-цитотоксическим лимфоцитом, но и стимулирует несколько механизмов, опосредованных Fc: комплементзависимую цитотоксичность, АТ-зависимую цитотоксичность, а также АТ-зависимый фагоцитоз [50].

Взаимодействие клеток иммунной системы пациента с клетками опухоли приводит к формированию сложной реакции, в результате которой опухолевые клетки элиминируются. Результаты исследований показали несколько механизмов цитотоксичности: лизис,

опосредованный Т-лимфоцитами, действие цитокинов (интерлейкины 1β, 2, 6, 12; хемокин CCL18), фагоцитоз, а также цитотоксичность, опосредованную АТ. Сравнение эффективности индивидуальных моноклональных АТ мыши и крысы (против CD3 и EpCAM) продемонстрировало намного меньший противоопухолевый потенциал по сравнению с БсАТ [47]. Катумаксомаб имеет высокий терапевтический потенциал при весьма приемлемой безопасности: требуется внутрибрюшинное введение низких доз (10–100 мг) препарата 4–5 раз с интервалом в 10–14 дней [31]. Интересно, что одним из побочных эффектов терапии катумаксомабом является образование АТ против иммуноглобулинов мыши и крысы, причем иммунный ответ против иммуноглобулинов мыши коррелирует с положительным ответом на терапию [51].

Препараты, проходящие доклинические и клинические испытания

Противоопухолевые БсАТ, проходящие клинические и доклинические испытания, как правило, содержат 1 антигенсвязывающий центр против CD3, который привлекает Т-лимфоцит к опухолевой клетке. Другой антигенсвязывающий центр может быть направлен против опухолевых антигенов – CD19, CD20, CD33, CD123, HER1, HER2, CEA, GD2, простатического специфического антигена, gpA33 и других белков. Результаты клинических испытаний БсАТ представлены во многих источниках и частично суммированы в таблице.

Перспективы

Два препарата БсАТ, получивших к настоящему времени разрешения на применение в качестве лекарственных средств, направлены на лечение онкологических заболеваний. В перспективе можно ожидать создание новых платформ, которые позволят выстроить полный процесс от получения до доклинических испытаний БсАТ. При разработке противоопухолевых препаратов, с одной стороны, требуется поиск новых комбинаций мишеней для повышения эффективности терапии и снижения побочных эффектов терапии, с другой – следует учитывать особенности конкретных опухолей. БсАТ могут быть использованы в комбинации с другими лекарственными препаратами, например, контролирующими клеточный цикл, ингибиторами индоламин-диоксигеназы и вакцинами. Сегодня нет сомнений в том, что для успешной борьбы с онкологическими заболеваниями требуется непрерывная разработка новых подходов к получению БсАТ.

Дизайн новых препаратов БсАТ, вероятно, будет включать способность связывать 2 и более опухолевых антигена в сочетании со сближением Т-лимфоцитов и вспомогательных клеток в иммунный синапс. Особенно важной представляется задача увеличения специфичности и чувствительности БсАТ, а также снижения цитотоксичности в отношении неопухолевых

клеток. В настоящее время трудноразрешимой задачей считается увеличение выхода БсАТ из гибридом, а также снижение стоимости препаратов.

Относительно универсальным является способ получения БсАТ в результате обмена IgG HL-фрагментами, который возможен между природными IgG4 [52], а также между IgG1 с мутацией в СН3-домене [53] и IgG2 через дисульфидные линкеры [54]. Согласно данным литературы обмен в крови и молоке с образованием биспецифических молекул подвергаются IgG всех подклассов [55–57]. Однако обмен HL-фрагментами между терапевтическими молекулами биспецифических IgG4 и собственными IgG4 пациента приводит к образованию БсАТ, не обладающих изначальными свойствами [58], что накладывает значительные ограничения на данный подход.

Заключение

Разработка новых подходов для получения БсАТ позволила создать различные варианты перспективных производных иммуноглобулинов для применения в терапии. Получаемые молекулы отличаются от природных IgG по фармакокинетике, времени полужизни в крови, способности проникать в опухоль, размерам, валентности и наличию Fc. Блокирование сразу нескольких биологических путей позволяет БсАТ проявлять синергический эффект, недостижимый при введении смеси моноспецифических молекул. Работы последних лет указывают на то, что в перспективе будут получены БсАТ из комбинаций разработанных ранее методов, направленные на лечение самых разных заболеваний, при которых ключевую роль может играть одновременное связывание нескольких специфических антигенов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern technologies for creating synthetic antibodies for clinical application. *Acta Naturae* 2009;1(1):32–50. PMID: 22649585.
- Redman J.M., Hill E.M., AlDeghaither D., Weiner L.M. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol* 2015;67(2):28–45. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.04.002. PMID: 25911943.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E. et al. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering. *Russian Chemical Reviews* 2015;84(1):1–26. DOI: 10.1070/RCR4459.
- Василенко Е.А., Мохонов В.В., Горшкова Е.Н., Астраханцева И.В. Биспецифические антитела: формы и области применения. Молекулярная биология 2018;52(3):380–93. DOI: 10.7868/S0026898418030035. [Vasilenko E.A., Mokhonov V.V., Gorshkova E.N., Astrakhantseva I.V. Bispecific antibodies: types and applications. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2018;52(3):380–93. (In Russ.)].
- Zhang X., Yang Y., Fan D., Xiong D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Exp Hematol Oncol* 2017;6(1):12. DOI: 10.1186/s40164-017-0072-7. PMID: 28469973.
- Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* 2012;4(2):182–97. DOI: 10.4161/mabs.4.2.19000. PMID: 22453100.
- Sedykh S., Prinz V., Buneva V., Nevinsky G. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Design, Development and Therapy* 2018;12:195–208. DOI: 10.2147/DDDT.S151282.
- Spieß C., Zhai Q., Carter P.J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol* 2015;67(2):95–106. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.01.003. PMID: 25637431.
- Wu C., Ying H., Grinnell C. et al. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1290–7. DOI: 10.1038/nbt1345. PMID: 17934452.
- Jakob C.G., Edalji R., Judge R. et al. Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecule. *MAbs* 2013;5(3):358–63. DOI: 10.4161/mabs.23977. PMID: 23549062.
- Hu S., Fu W., Xu W. et al. Four-in-one antibodies have superior cancer inhibitory activity against EGFR, HER2, HER3, and VEGF through disruption of HER/MET crosstalk. *Cancer Res* 2015;75(1):159–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1670. PMID: 25371409.
- Correia I., Sung J., Burton R. et al. The structure of dual-variable-domain immunoglobulin molecules alone and bound to antigen. *MAbs* 2013;5(3):364–72. DOI: 10.4161/mabs.24258. PMID: 23572180.
- Brennan M., Davison P.F., Paulus H. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science (New York, NY)* 1985;229(4708):81–3.
- Doppalapudi V.R., Tryder N., Li L. et al. Chemically programmed antibodies: Endothelin receptor targeting CovX-Bodies-TM. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17(2):501–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.10.009. PMID: 17055724.
- Lum L.G., Thakur A., Liu Q. et al. CD20-targeted T cells after stem cell transplantation for high risk and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(6):925–33. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.03.010. PMID: 23529012.
- Chang C.H., Rossi E.A., Goldenberg D.M. The dock-and-lock method: a novel platform technology for building multivalent, multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity. *Clin Cancer Res* 2007;13(18):5586s–91s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1217.
- Rossi E.A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M. et al. Hexavalent bispecific antibodies represent a new class of anticancer therapeutics: 1. Properties of anti-CD20/CD22 antibodies in lymphoma. *Blood* 2009;113(24):6161–71. DOI: 10.1182/blood-2008-10-187138. PMID: 19372261.
- Rossi E.A., Rossi D.L., Stein R. et al. A bispecific antibody-*ifn* 2b immunocytokine targeting CD20 and HLA-DR is highly toxic to human lymphoma and multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2010;70(19):7600–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2126.
- Rossi D.L., Rossi E.A., Cardillo T.M. et al. A new class of bispecific antibodies to redirect T cells for cancer immunotherapy. *MAbs* 2014;6(2):381–91. DOI: 10.4161/mabs.27385. PMID: 24492297.
- Müller D., Karle A., Meißburger B. et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 2007;282(17):12650–60. DOI: 10.1074/jbc.M700820200. PMID: 17347147.
- Chelius D., Ruf P., Gruber P. et al. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *MAbs* 2010;2(3):309–19. DOI: 10.4161/mabs.2.3.11791. PMID: 20418662.

22. Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* 1997;270(1):26–35. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1116. PMID: 9231898.
23. Rispens T., Meesters J., den Bleker T.H. et al. Fc-Fc interactions of human IgG4 require dissociation of heavy chains and are formed predominantly by the intra-chain hinge isomer. *Mol Immunol* 2013;53(1–2):35–42. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.06.012. PMID: 22784992.
24. Bostrom J., Yu S.F., Kan D. et al. Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* 2009;323(5921):1610–4. DOI: 10.1126/science.1165480. PMID: 19299620.
25. Schaefer G., Haber L., Crocker L.M. et al. A Two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer Cell* 2011;20(4):472–86. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.09.003. PMID: 22014573.
26. Baeuerle P.A., Kufer P., Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009;11(1):22–30. PMID: 19169956.
27. Dreier T., Lorenczewski G., Brandl C. et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer* 2002;100(6):690–7. DOI: 10.1002/ijc.10557. PMID: 12209608.
28. Haas C., Krinmer E., Brischwein K. et al. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology* 2009;214(6):441–53. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.11.014. PMID: 19157637.
29. Davies J., Riechmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology* 1995;13(5):475–9. PMID: 9634788.
30. Els Conrath K., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 2001;276(10):7346–50. DOI: 10.1074/jbc.M007734200. PMID: 11053416.
31. Kontermann R.E., Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 2015;20(7):838–47. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.02.008. PMID: 25728220.
32. Rothe A., Sasse S., Topp M.S. et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125(26):4024–31. DOI: 10.1182/blood-2014-12-614636. PMID: 25887777.
33. Thakur A., Lum L.G. “NextGen” biologics: bispecific antibodies and emerging clinical results. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16(5):675–88. DOI: 10.1517/14712598.2016.1150996. PMID: 26848610.
34. Bargou R., Leo E., Zugmaier G. et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321(5891):974–7. DOI: 10.1126/science.1158545. PMID: 18703743.
35. Nuñez-Prado N., Compte M., Harwood S. et al. The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discov Today* 2015;20(5):588–94. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.02.013. PMID: 25757598.
36. Löffler A., Kufer P., Lutterbüse R. et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000;95(6):2098–103. PMID: 10706880.
37. Wu J., Fu J., Zhang M., Liu D. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol* 2015;8:104. DOI: 10.1186/s13045-015-0195-4. PMID: 26337639.
38. Goebeler M.E., Bargou R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy. *Leuk Lymphoma* 2016;57(5):1021–32. DOI: 10.3109/10428194.2016.1161185. PMID: 27050240.
39. Topp M.S., Gokbuget N., Zugmaier G. et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* 2012;120(26):5185–7. DOI: 10.1182/blood-2012-07-441030. PMID: 23024237.
40. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G. et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014;32(36):4134–40. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.3247.
41. Topp M.S., Kufer P., Gökbuget N. et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol* 2011;29(18):2493–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.7270. PMID: 21576633.
42. Aldoss I., Song J., Stiller T. et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumomab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92(9):858–65. DOI: 10.1002/ajh.24783. PMID: 28494518.
43. Klinger M., Brandl C., Zugmaier G. et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 2012;119(26):6226–33. DOI: 10.1182/blood-2012-01-400515. PMID: 22592608.
44. Frankel S.R., Baeuerle P.A. Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17(3):385–92. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.029. PMID: 23623807.
45. Heiss M.M., Murawa P., Koralewski P. et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010;127(9):2209–21. DOI: 10.1002/ijc.25423. PMID: 20473913.
46. Seimetz D., Lindhofer H., Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM×anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010;36(6):458–67. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.03.001.
47. Linke R., Klein A., Seimetz D. Catumaxomab: clinical development and future directions. *MAbs* 2010;2(2):129–36. DOI: 10.4161/mabs.2.2.11221. PMID: 20190561.
48. Chames P., Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs* 2009;1(6):539–47. PMID: 20073127.
49. Lindhofer H., Mocikar R., Steipe B., Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol* 1995;155(1):219–25. PMID: 7602098.
50. Ruf P. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 2001;98(8):2526–34. DOI: 10.1182/blood.V98.8.2526. PMID: 11588051.
51. Ott M.G., Marmé F., Moldenhauer G. et al. Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int J Cancer* 2012;130(9):2195–203. DOI: 10.1002/ijc.26258. PMID: 21702044.
52. van der Neut Kolfshoten M., Schuurman J., Losen M. et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007;317(5844):1554–7. DOI: 10.1126/science.1144603. PMID: 17872445.
53. Labrijn A.F., Meesters J.I., de Goeij B.E. et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(13):5145–50. DOI: 10.1073/pnas.1220145110. PMID: 23479652.
54. Patterson J.T., Gros E., Zhou H. et al. Chemically generated IgG2 bispecific antibodies through disulfide bridging. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(16):3647–52. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.021. PMID: 28720505.

55. Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human milk IgGs contain various combinations of different antigen-binding sites resulting in multiple variants of their bispecificity. *PloS One* 2012;7(8):e42942. DOI: 10.1371/journal.pone.0042942. PMID: 22912765.
56. Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human milk sIgA molecules contain various combinations of different antigen-binding sites resulting in a multiple binding specificity of antibodies and enzymatic activities of abzymes. *PloS One* 2012;7(11):e48756. DOI: 10.1371/journal.pone.0048756. PMID: 23133657.
57. Sedykh S.E., Lekchnov E.A., Prince V.V. et al. Half molecular exchange of IgGs in the blood of healthy humans: chimeric lambda-kappa-immunoglobulins containing HL fragments of antibodies of different subclasses (IgG1–IgG4). *Mol Biosyst* 2016;12(10):3186–95. DOI: 10.1039/C6MB00479B. PMID: 27506137.
58. Labrijn A.F., Buijsse A.O., van den Bremer E.T.J. et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2009;27(8):767–71. DOI: 10.1038/nbt.1553. PMID: 19620983.

Вклад авторов

С.Е. Седых: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Г.А. Невинский: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи.

Authors' contributions

S.E. Sedykh: obtaining data for analysis reviewing of publications of the article's theme, article writing;

G.A. Nevinsky: reviewing of publications of the article's theme, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.Е. Седых/S.E. Sedykh: <https://orcid.org/0000-0003-0882-8171>

Г.А. Невинский/G.A. Nevinsky: <https://orcid.org/0000-0002-4988-8923>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 16-34-60066 мол_а_дк, № 16-04-00603 а, гранта Президента РФ по государственной поддержке молодых российских ученых № МК-410.2017.4.

Financing. The study was performed with financial support from the Russian Foundation for Basic Research, scientific projects No. 16-34-60066 мол_а_дк, No. 16-04-00603 а; grant from the President of Russian Federation in support of young Russian scientists No. МК-410.2017.4.