间皮素靶向的双特异性抗体构建及其介导的 NK 细胞抗肿瘤作用研究

余 聪，朱建伟 *

（上海交通大学药学院，细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

摘要：CD16 分子可以强效介导 NK 细胞激活而不需要其他受体的共同参与，在基于自然杀伤（NK）细胞重导向的双特异性抗体（BsAbs）中被广泛选择。间皮素（MSLN）在多种实体瘤中显著过度表达，能促进肿瘤细胞的黏附、迁移、增殖和存活。该研究构建了 1 种靶向 CD16 和 MSLN 的双特异性抗体 16MSLN，通过 Expi293F 细胞表达抗体，经 Protein L 纯化后即能获得高纯度的 16MSLN。细胞试验结果显示，16MSLN 能促进 NK 细胞与靶细胞交联，并特异性增强 NK 细胞对 $MSLN^+$ 肿瘤细胞的杀伤作用。该研究为实体瘤治疗和 MSLN 靶点药物开发提供了参考。

关键词：双特异性抗体；NK 细胞；间皮素；CD16

中图分类号：Q816 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)12-1651-08

引用：余 聪，朱建伟．间皮素靶向的双特异性抗体构建及其介导的 NK 细胞抗肿瘤作用研究［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(12): 1651-1658．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.12.008

Construction of a Bispecific Antibody Targeting Mesothelin with Anti-tumor Activity via NK Cell Activation

YU Cong, ZHU Jianwei*

(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody, MOE, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: CD16 has the capacity to effectively mediate natural killer (NK) cell activation without the necessity for co-engagement of other receptors, making it a widely selected target in bispecific antibodies (BsAbs) based on NK cell redirection. Mesothelin (MSLN) is significantly overexpressed in various solid tumors and can promote tumor cell adhesion, migration, proliferation, and survival. In this study, a bispecific antibody, 16MSLN, targeting both CD16 and MSLN was constructed. The antibody was expressed in Expi293F cells and purified using Protein L to obtain highly pure target antibody. The results of cell experiments indicated that 16MSLN could promote the crosslinking of NK cells with target cells and specifically enhance the killing effect of NK cells on $MSLN^+$ tumor cells. This study provides a reference for the development of NK cell-redirected BsAbs.

Key Words: bispecific antibody; natural killer cell; mesothelin; CD16

双特异性抗体（bispecific antibodies，BsAbs）是一种人工构建的抗体，能特异性结合 2 种不同的抗原或者同一抗原的 2 个不同表位[1]。BsAbs 的构型和作用机制复杂、多样，大多数 BsAbs 是以靶向 T 细胞并强化 T 细胞功能为原理设计的[1—3]。目前，已有多款 CD3 重导向的 BsAbs 药物获批上市，用于各种疾病的治疗，包括德国 Trion Pharma 公司的卡妥索单抗（catumaxomab）和美国 Amgen 公司的博纳吐单抗（blinatumomab）。虽然此类抗体在临床前和临床研究中展现出良好的治疗效果，但存在毒性、免疫原性和实体瘤应答率低等问题[4]。例如：对分化簇 3（cluster of differentiation 3，CD3）具有高亲和力的双特异性抗体可能会过度激活 T 细胞，诱

收稿日期：2024-03-21

作者简介：余 聪（1999—），男，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：朱建伟（1956—），男，博士，讲席教授，从事生物技术药物的研发。

E-mail：jianweiz@sjtu.edu.cn

导细胞因子的大量释放，引发免疫风暴。此外，许多实体瘤通过下调主要组织相容性复合物Ⅰ（major histocompatibility complex Ⅰ，MHC Ⅰ）的表达，使实体瘤变为“冷肿瘤”，以逃避T细胞的识别，阻碍T细胞对其进行有效免疫应答。自然杀伤（natural killer，NK）细胞作为先天免疫细胞，无需预先致敏就能杀伤肿瘤细胞，且相比于T细胞免疫疗法不良反应小，是免疫细胞靶向治疗的理想候选细胞[5—6]。目前，基于NK细胞的肿瘤免疫治疗形式多样，包括免疫检查点抑制剂、CAR-NK、NK细胞重导向的双/三特异性抗体等[7]。CD16是NK细胞表面重要的标志物，能通过与抗体的Fc部分结合或与抗CD16抗体直接交联，激活免疫球蛋白E（immunoglobulin E，IgE）NK细胞受体（FcεRIγ）和CD3ζ链亚单位的免疫受体酪氨酸激活模体（immunoreceptor tyrosine based activation motif，ITAM），发生抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody dependent cell mediated cytotoxicity，ADCC）作用[8]。此外，与人类NK细胞表面的其他激活受体不同，CD16a可以强效介导NK细胞激活而不需要其他受体的共同参与。因此，CD16靶点在基于NK细胞重导向的BsAbs中被广泛选用[9—10]。

间皮素（mesothelin，MSLN）是一种细胞表面糖蛋白，不仅表达于胸膜、腹膜和心包内层的间皮细胞上，在实体肿瘤，包括间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌和胃癌中也广泛、显著过表达。异常的MSLN表达被认为在促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭中起重要作用[11]。因此，MSLN已成为开发实体瘤新型免疫疗法的重要靶标[12—13]。近年来，针对MSLN开发出了多种疗法，包括MSLN靶向的嵌合抗体、免疫毒素、抗体偶联药物、CAR-T等[14]。

双特异性杀伤细胞接合器（bispecific killer cell engager，BiKE）是由抗CD16的scFv和抗肿瘤抗原的scFv通过柔性肽连接而成，可通过与肿瘤抗原的结合以及与NK细胞上CD16受体的直接结合和交联以驱动NK细胞对肿瘤细胞的重定向和裂解，从而绕过对结合单抗Fc段的需要[10]。目前，已有多项关于BiKE在肿瘤治疗方面的研究[10,15—16]被发表，涉及CD19、CD33、CD133等靶点，但靶向MSLN的BiKE鲜有报道。本研究构建了1种靶向CD16和MSLN的双特异性串联抗体16MSLN BiKE，并评估其体外抗肿瘤作用，以期为实体瘤的治疗及MSLN靶点药物的开发提供参考。

1　仪器与试药

Mini Prorean3 Cell型蛋白凝胶电泳仪、T100型PCR仪（美国Bio-Rad公司）；Tanon HE-120Gen型多功能水平电泳槽、Tanon GIS型凝胶成像分析系统、Tanon EPS100型核酸电泳仪（上海天能科技有限公司）；AKTA Avant型蛋白纯化仪（美国Cytiva公司）；LRH-70F型生化培养箱、TS-200B型台式恒温振荡摇床（上海天呈实验仪器制造有限公司）；SS-325型高压灭菌器（致微仪器公司）；Infinite 200 PRO型全自动多功能酶标仪（瑞士Tecan公司）；ZHTY-50E型小型台式恒温振荡培养箱（上海知楚仪器有限公司）；WCI-850CH型大型柜式CO_2振荡培养箱（德国Wiggens公司）；Lynx 4000型落地式冷冻离心机、SERIES 8000 DH型二氧化碳培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）；G2-XS型超高效液相/超临界流体色谱-四极杆串联飞行时间质谱仪（美国Waters公司）；Cyto Flex型流式细胞仪（美国Beckman Coulter公司）。

PrimeSTAR Max Premix（2×）、QuickCut™ *Xba* Ⅰ、10×QuickCut Buffer、T4 DNA连接酶（日本Takara公司）；*Age* Ⅰ-HF限制性内切酶（美国NEB公司）；AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒（美国Axygen公司）；无内毒素质粒大量抽提试剂盒（美国Omega Bio-Tek公司）；OPM-293 CD05培养基（上海奥浦迈生物科技股份有限公司）；RPMI 1640培养基、无酚红1640培养基、胰蛋白酶、FBS（美国Gibco公司）；PEI（线性，相对分子质量25 000，美国Polysciences公司）；嘌呤霉素、无血清细胞冻存液［翌圣生物科技（上海）股份有限公司］；Cyto Tox 96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒（美国Promega公司）；CellTrace CFSE荧光染料、CellTrace Far Red染料、染料和生物素去除柱（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Capto L亲和色谱柱（美国GE公司，5 mL）；蛋白超滤管（截留分子量10 000，美国Merck Millipore公司）；普通型透析袋（截留分子量8 000～14 000，上海源叶生物科技有限公司）；SDS、氢氧化钠、盐酸、过硫酸铵、*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺（*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylenediamine，TEMED）、考马斯亮蓝G250、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、枸橼酸酸、氯

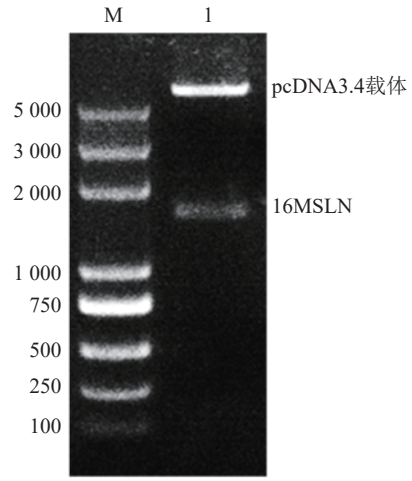
化钾、氯化钠、磷酸二氢钠、DMSO、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）均购自国药集团化学试剂有限公司；5-羧基荧光素-*N*-羟基丁二酰亚胺［5-carboxyfluorescein *N*-succinimidyl ester（5-FAM-NHS），上海高信化玻仪器有限公司］。

大肠埃希菌感受态细胞（DH5α，上海唯地生物技术有限公司）；人原代NK细胞（上海合佑生生物科技有限公司）；真核表达载体pcDNA3.4质粒、人胚肾细胞蛋白高表达系统（Expi293F细胞）、人前列腺癌细胞（PC-3细胞）、人胃癌细胞（NCI-N87细胞）、人肺癌细胞（NCI-H292细胞）、人胚肾细胞（293T细胞）均由本实验室保存；过表达MSLN的前列腺癌细胞（$MSLN^+$ PC-3）由本实验室在PC-3细胞基础上通过慢病毒转染方式构建，培养基采用含10% FBS的1640培养基（含0.5 μg/mL嘌呤霉素）。

2 方法与结果

2.1 16MSLN抗体表达载体的构建

MSLN可变区序列由美国Jecho实验室基于M912抗体序列进行亲和力成熟筛选得到，CD16可变区序列由REUSCH等[17]通过噬菌体展示技术筛选得到。16MSLN基因序列（图1）从5'端到3'端依次为用于靶向NK细胞的抗人CD16 scFv、连接肽（PSGQAGAAASESLFVSNHAY）、用于靶向$MSLN^+$肿瘤细胞的抗人MSLN scFv。抗人CD16 scFv和抗人MSLN scFv分别由相应单克隆抗体的轻链可变区（V_L）和重链可变区（V_H）通过柔性肽［$(G4S)_3$］串联得到。为了促进产物在表达过程中的高效分泌，在16MSLN抗体前增加了1段信号肽，并在起始密码子序列ATG前添加了kozak序列用于提高蛋白的表达效率。16MSLN基因序列由通用生物（安徽）股份有限公司合成，并以此为模板进行PCR扩增，获取了带有*Xba* Ⅰ及*Age* Ⅰ酶切位点的16MSLN DNA序列。16MSLN基因片段切胶回收后，使用*Xba* Ⅰ及*Age* Ⅰ核酸内切酶对16MSLN DNA和pcDNA3.4载体进行双酶切，之后利用T4 DNA连接酶将2段片段连接。再将酶连产物转化至DH5α感受态细胞中，挑取单克隆阳性菌落培养并抽提质粒，使用*Xba* Ⅰ及*Age* Ⅰ酶进行双酶切鉴定。鉴定结果如图2泳道1所示，16MSLN目的基因序列长度为1 569 bp，酶切结果显示构建的序列成功载入了pcDNA3.4载体。



M—标志物；1—16MSLN-pcDNA3.4质粒的双酶切样品。

图2 16MSLN-pcDNA3.4质粒的双酶切鉴定结果

Fig.2 Identification Result of Double Digestion of 16MSLN-pcDNA3.4 Plasmid

2.2 16MSLN抗体的表达与纯化

采用Expi293F瞬时转染法（PEI法）小规模（300 mL）表达16MSLN双特异性抗体。将Expi293F细胞接种于锥形瓶中，使用OPM-293 CD05培养基于37 ℃、8% CO_2、125 r/min的条件下培养，当细胞密度达到每1 mL含4×10^6个细胞时传代。转染前1 d更换新鲜的培养基，并调整细胞密度为每1 mL含1.5×10^6个细胞，使过夜培养后的细胞密度约为



图1 16MSLN基因元件设计模式图

Fig.1 Design Pattern Diagram of 16MSLN Gene Elements

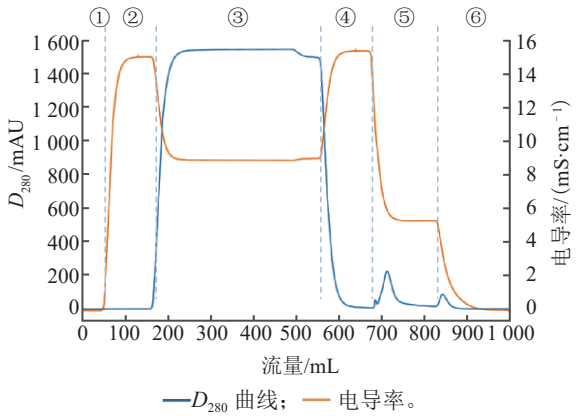
每 1 mL 含 3×10^6 个细胞，培养体积为 300 mL，并确保细胞活率大于 95%。转染当天，提前将 PEI、质粒和培养基于 37 ℃预热 30 min。使用新鲜培养基将 16MSLN-pcDNA3.4 质粒 240 μg 稀释至 40 μg/mL，加 PEI 溶液（1 mg/mL）720 μL，混匀，室温静置 15 ～ 20 min，随后将混合液加至培养基中。转染后 D1，添加 15 mL 的细胞补料，转染 5 d 后，离心（805×*g*）20 min 收取细胞上清。

16MSLN 中的抗人 MSLN scFv 含有 kappa Ⅰ轻链，因此使用 5 mL 的 Capto L 亲和色谱柱纯化蛋白。

蛋白纯化方法：将上样泵置超纯水中，清洗系统及 Capto L 柱（5 mL）；用平衡缓冲液（含 20 mmol/L 磷酸二氢钠和 0.15 mol/L 氯化钠，pH 7.4）清洗 Capto L 至电导率不再变化；取细胞上清过 Capto L 柱，流速为 1 mL/min；使用平衡缓冲液清洗 Capto L 柱，直到 280 nm 处的紫外吸收（D_{280}）曲线不再变化，流速为 2 mL/min；使用洗脱缓冲液（含 100 mmol/L 枸橼酸，pH 3.0）洗脱，当 D_{280} 曲线上升时开始收集洗脱产物，并用 1 mol/L Tris-HCl（pH 9.0）调整洗脱产物的 pH 值至 7.0，以防止蛋白变性。

16MSLN 蛋白纯化过程中 D_{280} 及电导率的变化如图 3 所示。

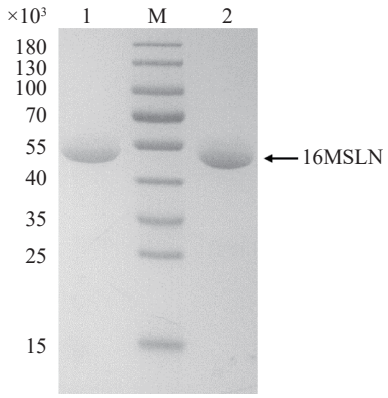
使用透析袋将洗脱产物的溶剂置换为 PBS，使用超滤管（截留分子量 10 000）超滤浓缩（4 ℃，3 220×*g*，30 min），通过 BCA 法测量浓度后于 －80 ℃长期保存。最终得到蛋白产物 12 mg。将蛋白液加入 1.5 mL Ep 管中，向其中加入含有还原剂二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）或不含 DTT 的 5×SDS-PAGE 上样缓冲液，混匀后于 95 ℃加热 10 min，离心（12 000×*g*）5 min。取上清液，通过 SDS-PAGE 电泳验证蛋白在还原形式和非还原形式的纯化结果。结果如图 4 所示。16MSLN 蛋白的条带单一，纯度较高，且条带出现的位置与预期相符。



①—前处理；②—前平衡；③—上样；④—后平衡；⑤—洗脱；⑥—后处理。

图 3　16MSLN 抗体纯化过程中 D_{280} 及电导率的变化

Fig.3　Changes in D_{280} and Conductivity during the Purification Process of 16MSLN Antibody



M—标志物；1—蛋白非还原形式；2—蛋白还原形式

图 4　通过 SDS-PAGE 鉴定 16MSLN 抗体

Fig.4　Identification of 16MSLN Antibody by SDS-PAGE

2.3　16MSLN 抗体的体外结合活性

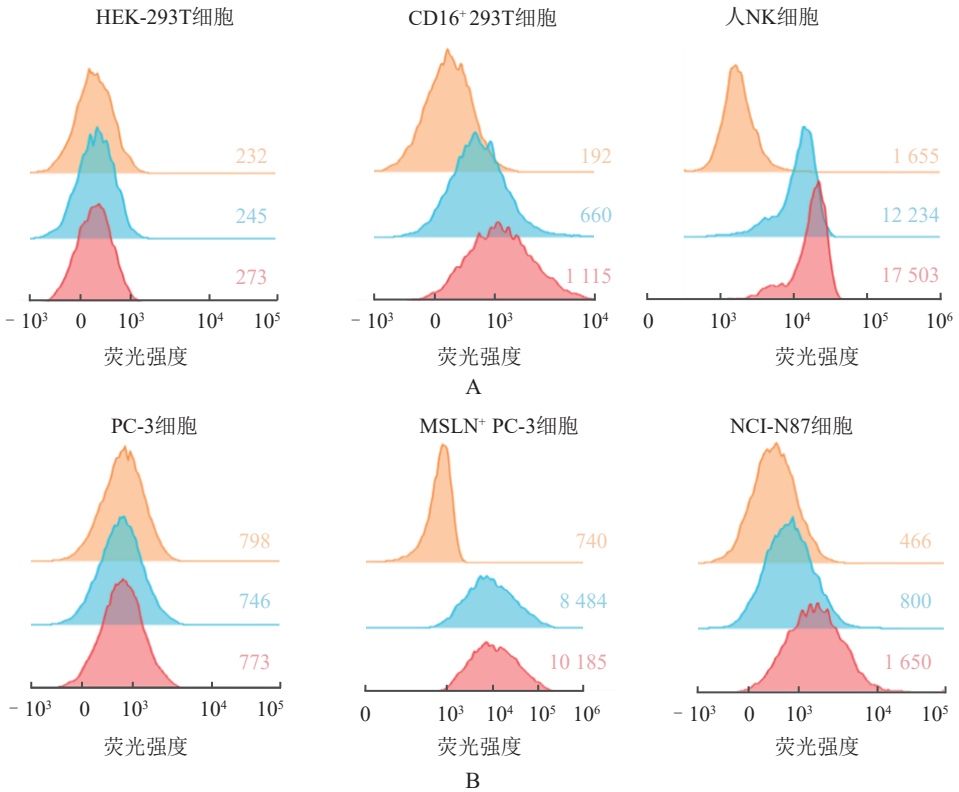
16MSLN 双特异性抗体不含 Fc 端，无法使用流式细胞术采用常规二抗检测结合活性，因此需要用荧光染料标记 16MSLN 抗体。取 5-FAM NHS 溶液（用 DMSO 配制，质量浓度为 1 mg/mL）10 μL 与 2 mg/mL 的 16MSLN 抗体溶液 100 μL，混合，于 4 ℃孵育过夜。使用染料和生物素去除柱，按说明书去除未结合的染料。

分别取人 293T 细胞（$CD16^-$）、$CD16^+$ 293T 细胞、NCI-N87 细胞、野生型 PC-3 细胞（$MSLN^-$）、$MSLN^+$ PC-3 细胞和人 NK 细胞适量，均约含 2×10^5 个细胞，离心（300×*g*）5 min，沉淀用含 2% FBS 的 PBS 溶液（以下称为“FACS”）100 μL 重悬，轻轻吹吸、混匀后，加入不同质量浓度的 16MSLN-5-FAM 抗体，于 4 ℃孵育 30 min。分别加入 FACS 1 mL 清洗细胞，离心（300×*g*）5 min，弃上清，重复 2 次后，用 FACS 200 μL 重悬细胞，用流式细胞仪检

测 16MSLN 结合活性。结果如图 5 所示。$CD16^-$ 293T 细胞组的平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI）无明显变化，而 $CD16^+$ 293T 细胞和人 NK 细胞的 MFI 值随着 16MSLN 抗体质量浓度的增加而增加，说明 16MSLN 抗体可以特异性地结合 $CD16^+$ 的细胞。$MSLN^-$ PC-3 细胞的 MFI 值无明显变化，而 $MSLN^+$ PC-3 细胞和 NCI-N87 细胞的 MFI 值随着 16MSLN 抗体质量浓度的增大而增加，说明 16MSLN 抗体也可以特异性地结合 $MSLN^+$ 的细胞。

2.4 16MSLN 抗体促进 NK 细胞与靶细胞交联

为了验证 16MSLN 抗体能否介导 NK 细胞与 $MSLN^+$ 肿瘤细胞的交联，使用流式细胞仪检测了 NK 细胞与 $MSLN^+$ PC-3 细胞的交联情况。收集 $MSLN^+$ PC-3 细胞并计数后，离心（300×*g*）5 min。沉淀用 PBS 重悬，调整细胞密度为每 1 mL 含 1×10^6 个细胞。向 1.5 mL Ep 管中加入上述所得的细胞悬液 1 mL，并加入 CFSE 荧光染料溶液（终浓度为 5 μmol/L），混匀后放入 37 ℃培养箱中避光孵育 10 min。离心（300×*g*）5 min，沉淀用完全培养基（含 10% FBS 的 1640 培养基）终止染色，置冰上或于 4 ℃孵育 10 min。离心（300×*g*）5 min，弃上清，重复 2 次，去除未结合的 CFSE 荧光染料。使用 Far Red 染料标记 NK 细胞，标记方法与 CFSE 荧光标记 $MSLN^+$ PC-3 细胞一致。分别取细胞浓度为每 1 mL 含 4×10^6 个的、标记后的 $MSLN^+$ PC-3 细胞和 NK 细胞 50 μL，各置 1.5 mL Ep 管中，并快速加入 16MSLN 抗体（终质量浓度为 100 μg/mL）或等量的 PBS，离心（300×*g*）1 min，立刻放入 37 ℃培养箱中避光孵育 30 min。完成后立即加入 1%多聚甲醛（用 PBS 将 4%多聚甲醛稀释为 1%）1 mL，4 ℃避光孵育 20 min。离心（300×*g*）5 min，沉淀用 1%的多聚甲醛 200 μL 重悬。使用流式细胞仪检测 NK 细胞与 $MSLN^+$ PC-3 细胞的交联情况，按式①计算 NK 细胞交联率。



A—16MSLN 抗体与 $CD16^+$ 细胞的结合活性；B—16MSLN 抗体与 $MSLN^+$ 细胞的结合活性。（图中数字表示 MFI 值。）

—PBS；—5 μg/mL 16MSLN-5-FAM；—50 μg/mL 16MSLN-5-FAM。

图 5 16MSLN 抗体的良好结合活性

Fig.5 Good Binding Activities of 16MSLN Antibody

$$\text{NK 细胞交联率} = \frac{\text{Far Red 标记的 CFSE}^+ \text{ 细胞群比例}}{\text{Far Red}^+ \text{ 细胞群比例}} \times 100\% \quad ①$$

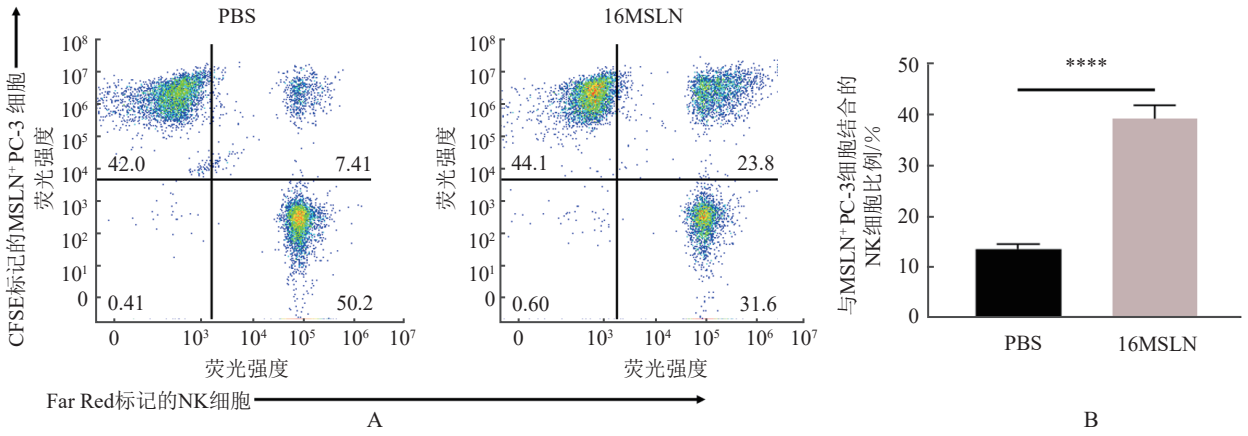
Far Red 标记的 $CFSE^+$ 细胞即为 NK 细胞与肿瘤细胞交联后群体。结果如图 6 所示（采用双侧非配对 *t* 检验分析），相较于 PBS 处理组，16MSLN 抗体处理组 Far Red 标记的 $CFSE^+$ 细胞群比例明显更高；16MSLN 抗体处理组 NK 细胞的交联率达到 40.2%，显著高于 PBS 处理组的 13.9%。该结果说明 16MSLN 抗体能够促进 NK 细胞与 $MSLN^+$ PC-3 细胞的交联。

2.5　16MSLN 抗体增强 NK 细胞体外杀伤能力

为了探究 16MSLN 抗体能否促进 NK 细胞特异性杀伤 $MSLN^+$ 肿瘤细胞，通过 Cyto Tox 96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒检测体外肿瘤细胞裂解情况。以每孔 1×10^4 个细胞的密度将 $MSLN^+$ PC-3 细胞接种在平底 96 孔板中，使用含 2%灭活血清的无酚红 1640 培养基贴壁培养过夜。为了探究不同效应细胞和靶细胞的比率（以下简称“效靶比”）下 16MSLN 对 NK 细胞体外杀伤能力的促进作用，分别按照 0.625 ∶ 1、1.25 ∶ 1、2.5 ∶ 1、5 ∶ 1 的效靶比加入 NK 细胞，每孔加入 16MSLN 抗体（终浓度为 10 nmol/L），然后用含 2%灭活血清的无酚红 1640 培养基补至 100 μL。此外，为了探究抗体浓度对 NK 细胞体外杀伤能力的影响，以 5 ∶ 1 的效靶比加入 NK 细胞，并向每孔加入不同浓度的 16MSLN 抗体，使终浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01 和 0.001 nmol/L。同时设置靶细胞自发释放对照组（每孔 1×10^4 个 $MSLN^+$ PC-3 细胞，不含 NK 细胞和抗体）、NK 细胞自发释放对照组（向每孔分别加入 5×10^4、2.5×10^4、1.25×10^4 和 0.625×10^4 个 NK 细胞，不含靶细胞和抗体）、靶细胞最大释放对照组（每孔含 1×10^4 个 $MSLN^+$ PC-3 细胞，在收集上清液前 45 min，将 10× 裂解液 10 μL 加至孔中）和体积校正对照组（将 10× 裂解液 10 μL 加至含 100 μL 培养基的孔中）。各组细胞离心 (300×*g*)3 min，以确保 2 种细胞发生接触，然后于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 24 h，再离心 (300×*g*)4 min；分别取各组样品 50 μL，加入 Cyto Tox 96® 试剂 50 μL，室温下避光孵育 30 min。加入试剂盒中的终止液后，在 1 h 内用酶标仪检测 OD_{490} 值。除靶细胞最大释放对照组所得的 OD_{490} 值须减去体积校正对照组的 OD_{490} 值外，其余组测得的 OD_{490} 值皆须减去本底对照的 OD_{490} 值。照式②计算细胞毒性值。

结果如图 7 所示（采用双因素方差分析进行统

$$\text{细胞毒性} = \frac{\text{试验组 } OD_{490} \text{ 值} - \text{效应细胞自发释放对照组 } OD_{490} \text{ 值} - \text{靶细胞自发释放对照组 } OD_{490} \text{ 值}}{\text{靶细胞最大释放对照组 } OD_{490} \text{ 值} - \text{靶细胞自发释放对照组 } OD_{490} \text{ 值}} \times 100\% \quad ②$$



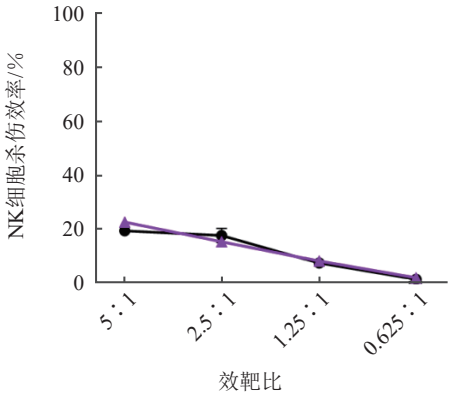
A—经 16MSLN 或 PBS 处理后，NK 细胞与 $MSLN^+$ PC-3 细胞的交联情况；B—A 图中 NK 细胞交联率的统计结果（**** 表示 $P<0.000\ 1$；$n=3$）。

图 6　16MSLN 抗体促进人 NK 细胞与 $MSLN^+$ PC-3 细胞交联

Fig.6　16MSLN Antibody Promotes the Cross-linking of Human NK Cells with $MSLN^+$ PC-3 Cells

计）。在不同的效靶比下，16MSLN 抗体处理组 NK 细胞的细胞毒性都明显高于 PBS 组，且随着效靶比的增加而增强。此外，随着 16MSLN 抗体浓度的增加，NK 细胞的体外杀伤能力增强，最终进入平台期，EC_{50} 为 0.008 7 nmol/L，说明 16MSLN 可以显著促进 NK 细胞杀伤 $MSLN^+$ PC-3 细胞。

为了验证 16MSLN 抗体促 NK 细胞杀伤的特异性，选择了不表达 MSLN 的 PC-3 细胞进行杀伤试验，试验方法同上。结果如图 8 所示（采用双因素方法分析进行统计），16MSLN 抗体对 NK 细胞杀伤 $MSLN^-$ 的野生型 PC-3 细胞无促进作用，说明 16MSLN 抗体对 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的促进作用是具有特异性的。



▲—16MSLN 抗体；●—PBS；2 组间无显著性差异。

图 8 16MSLN 对 NK 细胞杀伤野生型 PC-3 细胞的影响（*n*=3）

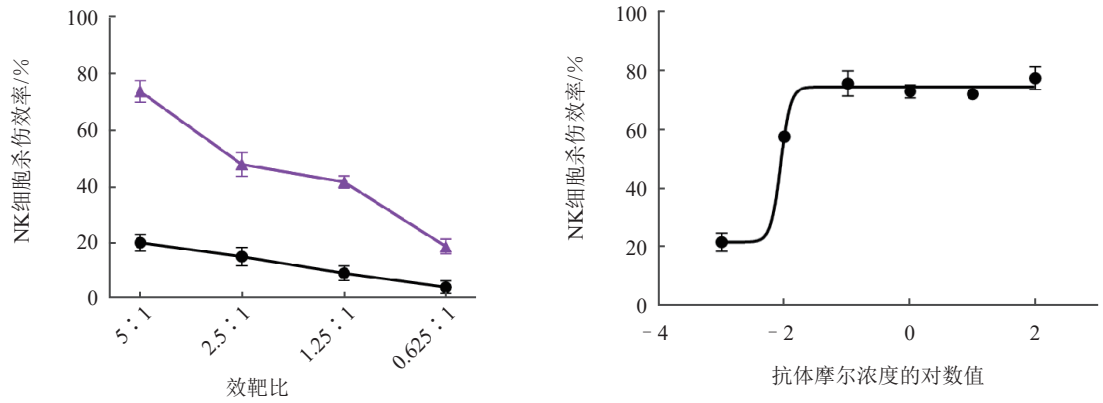
Fig.8 Impact of 16MSLN Antibody on the Killing Ability of NK Cells against Wild Type PC-3 Cells (*n*=3)

3 讨论

目前，绝大部分处于临床试验阶段的 BsAbs 都是基于 T 细胞开发的，但 T 细胞的过度激活可能会造成一些严重不良反应，包括细胞因子释放综合征和神经毒性[1,18]。近年来，NK 细胞因具有更好的安全性以及在对抗冷肿瘤时展现出的独到优势而被广泛研究。

本研究设计了 1 种新型双特异性串联抗体 16MSLN，N 端是 1 段抗人 CD16 scFv（用于靶向 NK 细胞），C 端是 1 段抗人 MSLN scFv（用于靶向 $MSLN^+$ 肿瘤细胞）。细胞试验结果显示，16MSLN 能与 $MSLN^+$ PC-3 细胞特异性结合，并介导 NK 细胞杀伤 $MSLN^+$ PC-3 细胞，而对 $MSLN^-$ 的野生型 PC-3 细胞无杀伤活性，说明 16MSLN 抗体具有良好的治疗效果及安全性。

有研究者通过大肠埃希菌表达了 1 种由美洲驼单结构域抗体构建的靶向 CD16 和 MSLN 的 Fab 样双特异性抗体，用于三阴性乳腺癌的治疗[19]。与其相比，16MSLN 抗体中相应靶点的抗体序列皆为人源化抗体序列，且通过真核系统表达，免疫原性更低。重组人 IL-15 由于具有优异的免疫刺激作用而成为有



A—不同效靶比下，16MSLN 抗体对 NK 细胞杀伤 $MSLN^+$ PC-3 细胞效率的影响（▲—16MSLN 抗体；●—PBS；P<0.000 1，表示 2 组间有极显著差异）；B—不同浓度 16MSLN 抗体处理时，NK 细胞杀伤 $MSLN^+$ PC-3 细胞的效率。

图 7 16MSLN 抗体特异性增强 NK 细胞体外杀伤能力的考察结果（*n*=3）

Fig.7 Investigation Results of 16MSLN Antibody Specifically Enhanced the Killing Ability of NK Cells *in vitro* (*n*=3)

效的肿瘤免疫治疗候选物[20]。有研究者在靶向 CD19 的双特异性串联抗体 1619 BiKE 中间加入了 1 段修饰的 IL-15 序列，形成了三特异性抗体 161519，其能够与 NK 细胞表面的 IL-15 Rα 结合，相较于 1619 抗体，161519 抗体显著促进了 NK 细胞对 $CD19^+$ 肿瘤细胞的杀伤，且能够维持 NK 细胞的存活与增殖[15]。因此，后续可在 16MSLN 抗体中间加入 1 段 IL-15 连接子，构建三特异性抗体 1615MSLN，并比较 2 种抗体在体内外对 NK 细胞的影响，为 NK 细胞重导向的 BsAbs 开发提供更多参考。此外，本课题组后续还将继续探究 16MSLN 的体内外治疗效果，并设计动物试验进一步验证 16MSLN 抗体的治疗效果。

参考文献：

[1] SPIESS C, ZHAI Q T, CARTER P J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies [J]. *Mol Immunol*, 2015, **67**(2 Pt A): 95-106.

[2] PAN Z D, CHEN J, XIAO X D, *et al*. Characterization of a novel bispecific antibody targeting tissue factor-positive tumors with T cell engagement [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(4): 1928-1942.

[3] CHEN J, PAN Z D, HAN L, *et al*. A novel bispecific antibody targeting CD3 and Lewis Y with potent therapeutic efficacy against gastric cancer [J]. *Biomedicines*, 2021, **9**(8): 1059.

[4] ZHOU S J, LIU M G, REN F, *et al*. The landscape of bispecific T cell engager in cancer treatment [J]. *Biomarker Res*, 2021, **9**(1): 38.

[5] KENNEDY L B, SALAMA A K S. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, **70**(2): 86-104.

[6] VIVIER E, RAULET D H, MORETTA A, *et al*. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells [J]. *Science*, 2011, **331**(6013): 44-49.

[7] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, **18**(2): 85-100.

[8] BOURNAZOS S, RAVETCH J V. Ravetch, fcgamma receptor function and the design of vaccination strategies [J]. *Immunity*, 2017, **47**(2): 224-233.

[9] VALLERA D A, FERRONE S, KODAL B, *et al*. NK-cell-mediated targeting of various solid tumors using a B7-H3 tri-specific killer engager *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancers* (Basel), 2020, **12**(9): 2659.

[10] ARVINDAM U S, VAN HAUTEN P M M, SCHIRM D, *et al*. A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killing of AML cells [J]. *Leukemia*, 2021, **35**(6): 1586-1596.

[11] SERVAIS E L, COLOVOS C, RODRIGUEZ L, *et al*. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(9): 2478-2489.

[12] HAGERTY B L, TAKABE K. Biology of mesothelin and clinical implications: a review of existing literature [J]. *World J Oncol*, 2023, **14**(5): 340-349.

[13] KLAMPATSA A, DIMOU V, ALBELDA S M. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, **21**(4): 473-486.

[14] HASSAN R, THOMAS A, ALEWINE C, *et al*. Mesothelin immunotherapy for cancer: Ready for prime time? [J]. *J Clin Oncol*, 2016, **34**(34): 4171-4179.

[15] CHENG Y, ZHENG X D, WANG X F, *et al*. Trispecific killer engager 161519 enhances natural killer cell function and provides anti-tumor activity against CD19-positive cancers [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, **17**(4): 1026-1038.

[16] REUSING S B, VALLERA D A, MANSER A R, *et al*. CD16×CD33 bispecific killer cell engager (BiKE) as potential immunotherapeutic in pediatric patients with AML and biphenotypic ALL [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, **70**(12): 3701-3708.

[17] REUSCH U, BURKHARDT C, FUCEK I, *et al*. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30 tumor cells [J]. *MABs*, 2014, **6**(3): 727-738.

[18] KHADKA R H, SAKEMURA R, KENDERIAN S S, *et al*. Management of cytokine release syndrome: an update on emerging antigen-specific T cell engaging immunotherapies [J]. *Immunotherapy*, 2019, **11**(10): 851-857.

[19] DEL BANO J, FLORÈS-FLORÈS R, JOSSELIN E, *et al*. A bispecific antibody-based approach for targeting mesothelin in triple negative breast cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, **10**: 1593.

[20] SHI W Q, LV L Y, LIU N, *et al*. A novel anti-PD-L1/IL-15 immunocytokine overcomes resistance to PD-L1 blockade and elicits potent antitumor immunity [J]. *Mol Ther*, 2023, **31**(1): 66-77.