

DOI: 10.13376/j.cbls/2023053

文章编号: 1004-0374(2023)04-0448-15

## 新型抗体药物在肝细胞癌免疫治疗中的研究进展

李婷婷<sup>1</sup>, 施 维<sup>2</sup>, 刘爱群<sup>1\*</sup>

(1 广西医科大学附属肿瘤医院内镜中心, 南宁 530021; 2 广西医科大学  
实验动物中心, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021)

**摘要:** 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 免疫疗法中最常用的是 IgG 单克隆抗体 (monoclonal antibodies, mAbs), 其具有血清半衰期长、稳定性高、靶向能力强等优点。单克隆抗体药物在临床取得的重大进展推动了各种新型治疗性抗体的发展, 例如抗体-药物偶联物、放射性核素标记抗体、小分子抗体、双特异性细胞激动剂、免疫细胞因子、免疫毒素以及免疫促凋亡分子等。近年来抗体的小型化和多功能化是在复杂肿瘤微环境中治疗 HCC 的富有临床潜力的策略。该文总结了各种类型的新型抗体的结构、作用机制及其在 HCC 免疫治疗中的研究进展, 并对其应用前景进行展望。

**关键词:** 肝细胞癌; 抗体衍生物; 小分子抗体; 双特异性细胞激动剂; 免疫细胞因子

中图分类号: R735.7 文献标志码: A

## Research progress in hepatocellular carcinoma immunotherapy based on antibody derivatives

LI Ting-Ting<sup>1</sup>, SHI Wei<sup>2</sup>, LIU Ai-Qun<sup>1\*</sup>

(1 Department of Endoscopy, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;  
2 Laboratory Animal Center of Guangxi Medical University, International Nanobody Research Center of Guangxi,  
Nanning 530021, China)

**Abstract:** The most commonly used monoclonal antibody in hepatocellular carcinoma immunotherapy is IgG, because of its long serum half-life, high stability, and strong targeted ability. The popularization of IgG mAbs in the clinical application has promoted the development of various novel types of therapeutic antibodies, such as antibody-drug conjugates, radionuclide-labeled antibodies, small molecular antibodies, bispecific T/NK cell engagers, immunocytokines, immunotoxins, and immunopropoptotic molecules. In recent years, miniaturised and multi-functional antibodies have been a flexible and feasible strategy to treat HCC in a complex tumor environment. In this review, we summarized the structure, and action mechanism of various types of novel antibodies, and their research progress in HCC immunotherapy, and looked forward to their application prospects.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; antibody derivatives; small molecule antibody; bispecific T/NK cell engagers; immunocytokines

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝脏恶性肿瘤, 根据全球癌症流行病学数据库 GLOBOCAN 2020 统计, HCC 是全球第六大最常见癌症, 也是导致癌症相关死亡的第三大原因<sup>[1]</sup>, 并且预后很差。近年来, 肿瘤免疫治疗以其较高的安全性和有效性, 成为继手术、放疗、化疗三大传统治疗手段之后的又一种有希望的选择。在肿瘤免

疫治疗中, 抗体药物有着举足轻重的地位, 临床应用最多的是单克隆抗体药物。单克隆抗体被喻为“神奇的子弹”, 通过与肿瘤靶标结合后直接诱导抗体

收稿日期: 2022-08-09; 修回日期: 2023-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560494)

\*通信作者: E-mail: Liuaiqun\_2004@163.com; Tel: 0771-5310521

依赖性细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 和 (或) 抗体依赖性细胞吞噬作用 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 来介导其功能<sup>[2]</sup>, 从而抑制癌细胞活性并消除癌细胞。单克隆抗体在临床的成功应用, 推动了各种类型的抗体衍生物的开发, 例如抗体-药物偶联物, 其使用连接器将细胞毒性药物偶联到单克隆抗体上, 从而选择性攻击和杀死肿瘤细胞, 对正常组织毒性较小<sup>[3]</sup>。其次, 放射性核素标记的抗体在肿瘤免疫治疗中呈现出诊疗一体化的优势。此外, 根据与抗体融合成分的不同, 还可分为抗体-细胞因子/毒素/促凋亡分子等新型融合蛋白, 从而具有靶向功能并且降低全身性不良反应。尽管 IgG 单克隆抗体是目前 HCC 临床治疗中应用广泛的一类肿瘤靶向药物, 但某些缺点限制了其在临床上的进一步推广, 例如渗透性差、Fc 介导的免疫系统旁路激活<sup>[4]</sup>

等。抗体工程的发展促进了不同类型的小分子抗体如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、VHH、scFv 以及双/三特异性 T/NK 细胞激动剂的出现, 这些小分子抗体通常保留亲本抗体的抗原特异性, 但比亲本抗体具有更好的组织渗透性、耐受性以及较少的与 Fc 相关的不良反应<sup>[5]</sup>, 可以弥补单抗类药物的不足, 补充现有的治疗方式, 具有巨大的应用潜力。新型工程抗体旨在利用传统单抗的靶向性实现药物精准治疗, 降低全身毒性, 或者诱导免疫细胞对特定癌细胞启动免疫应答, 发挥免疫系统的内在力量 (图 1)。本文主要就各种类型的新型治疗性抗体的结构、作用机制及其在 HCC 免疫治疗中的研究进展进行综述, 并对新型抗体的发展前景作出展望。

### 1 IgG抗体衍生物介导的抗HCC免疫治疗

#### 1.1 抗体-药物偶联物

抗体-药物偶联物 (antibody-drug conjugates, ADCs)

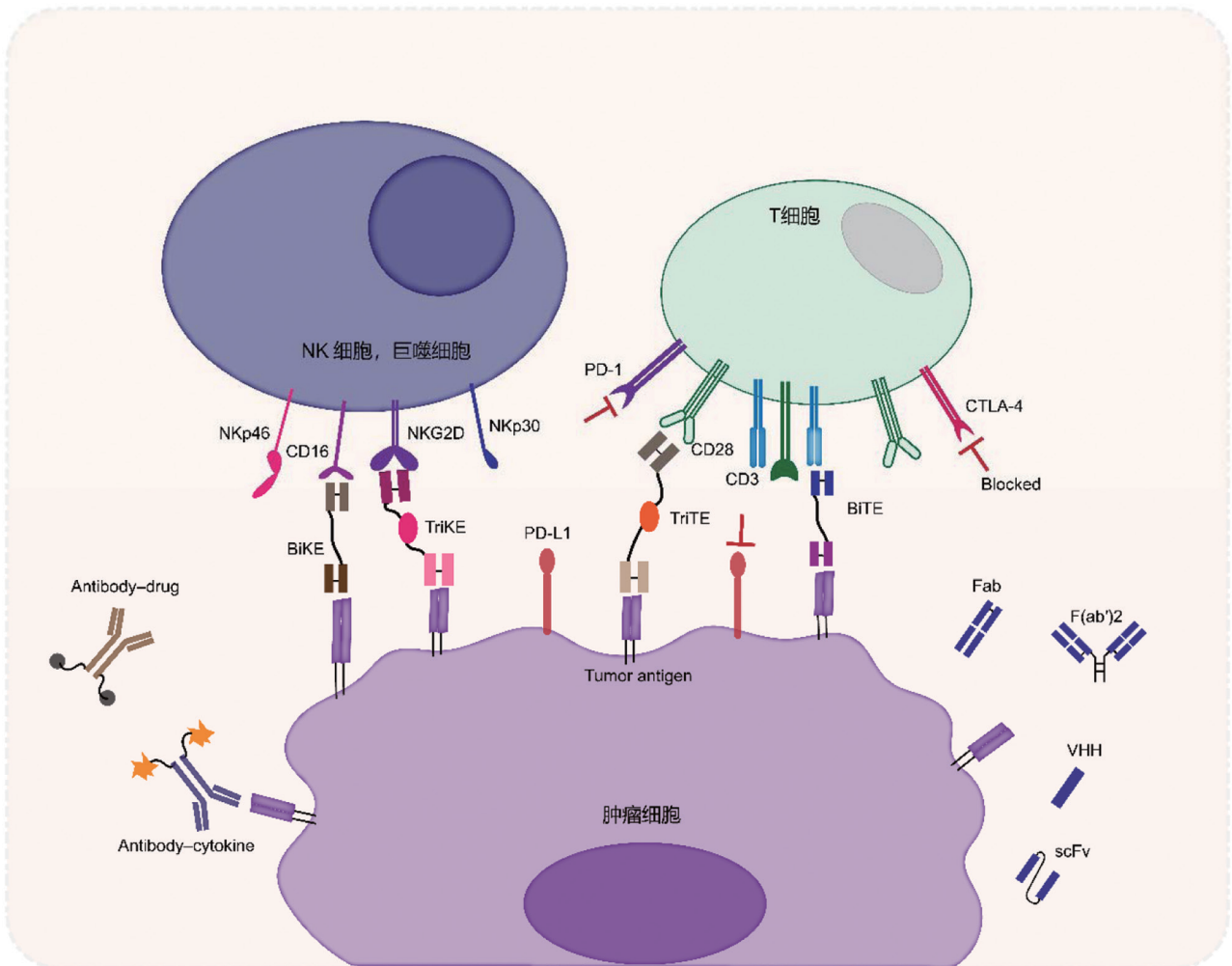


图1 新型治疗性抗体抗肝细胞癌免疫治疗机制示意图

的概念最早由德国科学家/医生“保罗·埃利希”提出,他明确表示使用带有抗体的细胞毒性药物可提高靶向特异性<sup>[6]</sup>。ADC由三个主要组件构成:用于定点递送的单克隆抗体、细胞毒性药物以及连接器<sup>[4]</sup>。当与肿瘤细胞上的靶抗原结合后,ADC可通过受体介导的内吞作用将细胞毒性药物传递到靶细胞的胞质内,并在溶酶体降解期间将毒性药物释放出来,以破坏DNA或以其他方式抑制癌细胞分裂从而杀死癌细胞<sup>[7]</sup>。目前用于构建治疗HCC的ADC的毒性药物主要分为两种类型:第一种是微管蛋白抑制剂,通过抑制微管蛋白聚合,触发G<sub>2</sub>/M期细胞周期阻滞和随后的癌细胞凋亡,包括单甲基氨基蛋白E (monomethyl auristatin E, MMAE)<sup>[8]</sup>、单甲基氨基蛋白F (monomethyl auristatin F, MMAF)<sup>[9]</sup>和梅坦新衍生物 (derivative of maytansine, DM)<sup>[10]</sup>;第二种毒性药物是DNA抑制剂,包括阿霉素(DOX)<sup>[11]</sup>、杜卡霉素(SA)<sup>[12]</sup>和吡咯苯二氮卓(PBD)<sup>[13]</sup>等,它们能够结合DNA双螺旋结构中的微小凹槽,随之进行DNA切割、DNA烷基化或中断DNA复制导致细胞死亡<sup>[7]</sup>。与微管蛋白抑制剂相比,DNA抑制剂作用时间更长、所需剂量更低、疗效更好,成为构建ADC的优先选择<sup>[14]</sup>(表1)。最近,针对HCC在内的晚期实体瘤的ADC临床试验(NCT05293496、NCT05263479、NCT05060276)正在积极开展中(表2)。然而,单克隆抗体的分子量较大,影响其在HCC等实体瘤组织中的扩散和分布,这可能是限制ADC发挥作用的一个重要原因。因此,使用分子量更小、穿透性更强的抗原结合片段作为靶向载体是一种可行的策略。例如,Wu等<sup>[15]</sup>用抗癌胚抗原5T4的纳米抗体n501与SN38构建了一种新型ADC(命名为UdADC),研究发现UdADC的穿透深度远优于传统单抗ADC,并能在肿瘤中更有效地累积,而传统单抗ADC则多停留在肿瘤的浅表面,因此UdADC表现了更高效的抗肿瘤活性。此外,Fan等<sup>[16]</sup>用两种靶向EGFR的纳米抗体与MMAE偶联制备了一款多价、双识别表位的纳米抗体偶联药物,它可更有效地将小分子药物递送进入肿瘤细胞内部发挥作用,这些有希望的平台为开发抗HCC纳米抗体ADC带来了启发。

## 1.2 抗体-放射性核素

放射免疫疗法 (radioimmunotherapy, RIT) 是一种应用治疗性放射性核素标记的抗体介导的靶向治疗策略,可以使核素特异性地攻击高表达相关抗原的肿瘤细胞<sup>[17]</sup>。利卡汀 (<sup>131</sup>I-metuximab, <sup>131</sup>碘-美妥昔

单抗)注射液是中国自主研发的一种新型靶向药物,是由<sup>131</sup>I标记的抗CD147单克隆抗体,2005年利卡汀被我国国家食品药品监督管理局批准用于治疗HCC<sup>[18]</sup>。随后开展的临床研究证明利卡汀治疗能显著延长HCC肝移植术后患者的生存时间;或将利卡汀联合传统抗HCC疗法,也可适当延长晚期HCC患者的生命<sup>[18-20]</sup>。

近年来,放射免疫疗法在肿瘤治疗中呈现出治疗一体化的优势。最近,Martins等<sup>[21]</sup>合成的新型放射治疗探针<sup>177</sup>Lu-DOTA-EB-TMTP1(一种新型的肿瘤归巢肽)获得了广泛关注,该靶向治疗药物也为今后指明了方向。通过使用不同的放射免疫结合物进行诊断/监测成像和治疗,可以提高HCC的早诊率,提高分期的准确性,以此进行更有针对性的治疗。目前,有望用于HCC诊疗的同时具有成像和治疗功能的核素包括<sup>131</sup>I、<sup>64</sup>Cu、<sup>177</sup>Lu、<sup>125</sup>I、<sup>188</sup>Re、<sup>47</sup>Sc,因为它们辐射能量和辐射距离,以及半衰期都较为适中<sup>[21-25]</sup>。此外,比起全长抗体,抗体片段因为分子量小、穿透性强、亲和力高等优势,近年来已成为放射免疫诊断和治疗的理想靶标。例如,Guan等<sup>[26]</sup>用<sup>131</sup>I-GPC3 scFv进行放射免疫成像,观察到抗体能特异性地聚集到HCC肿瘤部位,具有良好的靶向性。Huang等<sup>[27]</sup>的研究结果也显示<sup>131</sup>I-VEGFR2 Fab (<sup>131</sup>I-FA8H1)治疗后的HCC肿瘤发生广泛坏死。然而,放射免疫疗法仍然存在一些挑战。其一是为了实现肿瘤周围健康组织的最小毒性,临床实践中应对患者进行个体化剂量测定,使用基于MIRD的平面/SPECT成像的剂量测定仍然是最传统和最优选的方法之一<sup>[28]</sup>。其次,使用粒子发射器获得治疗性放射核素的过程会产生多个衰变副产物,这些副产物可能会脱靶,从而有可能导致骨髓抑制,使患者出现不同程度的中性粒细胞减少,如何规避是今后需考虑的问题<sup>[29]</sup>。此外,研究中的监测时间无法完全评估放射性肾病和其他毒性,临床活动中应密切监测肾功能情况,及时调整治疗剂量;今后的研究应侧重于减少辐射剂量来降低放射性核素的肾毒性风险,包括充分的水合作用、肾脏保护剂以及核素的结构修饰等<sup>[28]</sup>。

## 1.3 抗体-核酸偶联物

核酸类药物(包括siRNAs和寡核苷酸)可基于碱基互补原理对表达相关蛋白的基因进行调节,而非与靶抗原结合,避免了传统小分子化疗药物面临的不可成药靶点的限制问题。然而核酸药物的递送是研发难点之一,将核酸与特异性抗体偶联使其

表1 用于构建治疗HCC的ADC的药物

靶点及药物分类	药物	中文名	优点	不足	ADCs	研究阶段	参考文献
微管蛋白	MMAE	单甲基氨基蛋白E	微管蛋白在癌细胞内数量多; 抑制血管生成	抗瘤谱较窄, 作用时间较短 IC50值为纳摩尔, 起效药物剂量大且易耐药; 只针对处于细胞分裂期的癌细胞, 对非分裂和静态癌细胞无效; 微管蛋白抑制剂靶点数目远超DNA抑制剂, 需要药物剂量大	SHR-A1403	临床前	[8]
	MMAF	单甲基氨基蛋白F			EV20-sss-vc/MMAF	临床前	[9]
	DMI	美坦新衍生物I			CLDN6-DMI	临床前	[10]
DNA	DNA损伤剂	DOX	作用时间较长; 能作用于整个细胞周期; IC50值仅为皮摩尔, 可以靶向低水平表达的肿瘤抗原; 临床试验中DNA抑制剂的疗效好于微管蛋白抑制剂	细胞选择性差, 对人体有潜在的致突变和致癌作用	MetFab-DOX	临床前	[11]
		SA			MGC018	临床	(NCT05293496)
		PBD			hYP7-PC	临床前	[13]
	拓扑异构酶抑制剂	SN38	喜树碱衍生物		hRS7-SN38	临床	(NCT01631552)

表2 新型抗体治疗HCC的相关临床试验

药物名称	NCT编号	靶点	抗体形式	试验人数	阶段
MGC018	NCT05293496	B7-H3	IgG-杜卡霉素	258	I
HS-20089	NCT05263479	B7-H4	IgG-Topli	177	Ia/Ib
STI-3258	NCT05060276	Trop2	IgG-SN38	30	IB
hRS7-SN38	NCT01631552	Trop2	IgG-SN38	515	I/II
利卡汀	NCT00819650	HAb18G/CD147	<sup>131</sup> I IgG	200	II
利卡汀+TACE	NCT00829465	HAb18G/CD147	<sup>131</sup> I IgG	400	IV
利卡汀+CIK	NCT01758679	HAb18G/CD147	<sup>131</sup> I IgG	120	IV
CSR02-Fab-TF	NCT04601428	PLVAP	Fab-TF	43	I
CAR-GPC3-T	NCT03084380	GPC3	scFv	20	I
CAR-GPC3-T	NCT03198546	GPC3	scFv	30	I
CAR-GPC3-T	NCT03302403	GPC3	scFv	18	/
CAR-OX40-T	NCT04952272	OX40	scFv	50	I
L19-IL2	NCT01058538	ED-B	scFv-cytokine	33	I/II
恩伐福利单抗	NCT05213221	PD-L1	VHH-Fc	39	II
恩伐福利单抗	NCT05024214	PD-L1	VHH-Fc	170	Ib/II
Bintrafusp Alfa	NCT04457778	PD-L1+TGF-β RII	IgG-cytokine	35	I
Bintrafusp Alfa	NCT03436563	PD-L1+TGF-β RII	IgG-cytokine	74	Ib/II
Bintrafusp Alfa	NCT02517398	PD-L1+ TGF-β RII	IgG-cytokine	600	I
KN046	NCT04601610	PD-L1+CTLA-4	BsAb	70	Ib/II
AK104	NCT04728321	PD-1+CTLA-4	BsAb	75	II
AK104	NCT04444167	PD-1+CTLA-4	BsAb	30	Ib/II
KN046	NCT04542837	PD-L1+CTLA-4	BsAb	55	II
XmAb@20717	NCT03517488	PD-1+CTLA-4	BsAb	154	I
XmAb@22841	NCT03849469	LAG3+CTLA-4	BsAb	242	I
XmAb@23104	NCT03752398	PD-1+ICOS	BsAb	234	I

注：杜卡霉素: duocarmycin, DNA烷化剂；TOP1i: 拓扑异构酶1抑制剂；SN38: 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, 7-乙基-10-羟基喜树碱，伊立替康活性代谢产物；TGF-β RII: transforming growth factor beta receptor 2, 转化生长因子β受体2；ICOS: inducible T-cell costimulatory, 诱导性T细胞共刺激分子

能够靶向特定的癌细胞可大大提高疗效并降低毒性<sup>[30]</sup>。TAC-001是一种由强效的T-CpG与CD22抗体结合的抗体寡核苷酸偶联物(antibody-oligonucleotide conjugates, AOC)，通过与CD22结合将T-CpG递送给B细胞，进而导致TAC-001的内化以及TLR9信号、B细胞激活，产生一系列免疫反应。目前正在进行临床试验评估TAC-001治疗晚期或转移性实体瘤患者的安全性、药代动力学和初步抗肿瘤活性(NCT05399654)。已有报道证实CpG寡核苷酸联合抗4-1BB抗体可显著延缓HCC生长<sup>[31]</sup>，今后可进一步研究抗4-1BB抗体-CpG寡核苷酸偶联物的抗HCC作用。此外，免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)是当前晚期肝癌治疗中最有前景的疗法之一。PD-1/PD-L1抑制剂(Nivolumab、Pembrolizumab和Camrelizumab)已获批用于晚期HCC的二线治疗，但ICI单药疗效有限，有研究开始开发ARC(antibody-siRNA conjugates, ARC)来操

纵免疫靶点以进行抗癌免疫治疗。最近，Wang等<sup>[32]</sup>报告了一种新型光响应抗体(aPD-L1)-siRNA(siPD-L1)偶联物(PARC)平台，该平台可与癌细胞上的PD-L1特异性结合，引起免疫细胞活性的恢复。内吞后，从ARC释放的siPD-L1转移到细胞质中以降解PD-L1 mRNA，阻止了细胞内PD-L1的连续产生以进一步增强抗癌免疫力。

#### 1.4 抗体导向酶催化前体药

抗体导向酶催化前体药疗法(antibody directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)是一种先进的抗肿瘤策略：利用肿瘤特异性抗体作为载体与前药专一性活化酶偶联，可以使全身给药的无毒前药仅在肿瘤组织内转化为活性抗癌药物，达到局部高浓度，从而克服了常规化疗的缺点，例如肿瘤中药物浓度不足、全身毒性、缺乏对肿瘤细胞的选择性<sup>[33]</sup>。近年来开发的一些ADEPT平台有望成为治疗HCC的候选物，例如，Rosini等<sup>[33]</sup>通过融合识别纤连蛋

白 ED-A (高表达于肿瘤新生血管) 的 F8 抗体和产生 ROS 的酶 DAAO 生成了嵌合蛋白 F8 (scFv)-DAAO-Q144R, 并在荷瘤小鼠中 (CT26 和 U87) 证实其优越的抗肿瘤活性, 且未产生额外毒性。由于血管生成几乎是所有肿瘤的特征, 因此该平台可能适用于治疗 HCC 在内的不同类型的恶性肿瘤。其次, 寻找有潜力的酶对 ADEPT 的成功至关重要。葡糖苷酶也称为羧肽酶 G2 (carboxypeptidase G2, CPG2), 是 ADEPT 常使用的酶, 但其应用受免疫原性和易被血液中的蛋白酶降解限制, AlQahtani 等<sup>[34]</sup>通过聚乙二醇 (PEG) 化和与 HAS (人血清白蛋白) 融合产生了两种稳定且免疫原性较低的 CPG2 变体。因此, 通过 PEG 化或通过 HSA 基因融合来修饰 CPG2 酶是一种有前途的策略, 可以使这些分子在 ADEPT 中发挥最佳作用, 然而目前这两种分子还没有用于抗 HCC 的研究。今后关于 ADEPT 在 HCC 中的研究应侧重于发掘更多新抗原以开发针对 HCC 的特异性抗体, 其次是改造有潜力的酶治疗剂以解决免疫原性和稳定性等问题。

### 1.5 TCRm 抗体

传统的 mAb 疗法依赖于特定的细胞表面分子或可溶性分子作为靶标, 而大多数癌症相关蛋白位于细胞内, 这些是传统 mAb 无法识别的<sup>[35]</sup>。细胞内蛋白质可被蛋白酶体降解形成短肽, 其中一些通过主要组织相容性 I 类 (MHC-I) 复合物呈递在细胞表面, 从而被 CD8<sup>+</sup> T 细胞上的 T 细胞受体 (TCR) 识别<sup>[36]</sup>。但是这个过程受到 TCR 与 pMHC 低结合率的限制, 开发对 pMHC 具有更高亲和力的 T 细胞受体模拟 (T-cell receptor mimic, TCRm) 抗体是一种有希望的新兴策略。TCRm 保留了 mAb 的优点如稳定、高产、生产系统完善, 可以通过免疫动物和杂交瘤技术或通过体外展示技术 (例如噬菌体和酵母展示) 生产<sup>[37]</sup>。此外, 找到合适的靶点是开发抗 HCC TCRm 抗体的基础, 根据来源不同主要分为两类: 第一类是 TAAs (肿瘤相关抗原), 其中当前研究最广的是异常过表达的自身抗原 AFP。最近, Liu 等<sup>[38]</sup>设计了一种高度特异性的 AFP TCRm 抗体, 临床前研究显示其可有效杀伤 AFP 阳性癌细胞, 一名转移性 HCC 患者在治疗 9 个月后完全缓解, 并最终有机会进行肝移植, 显示了 TCRm 抗体治疗 HCC 的潜力。第二类是 TSAs (肿瘤特异性抗原, 也叫新抗原), 包括致癌病毒抗原 (比如 HBV 肽) 和突变抗原<sup>[39]</sup>, 但是 HBV 抗原也在被感染的肝细胞中表达, 因此不能忽视 TCRm 抗体治疗带来的肝

损伤风险; 而近年来发现的一些公共突变抗原 (如 p53、KRAS 和 NeoAgs)<sup>[40-41]</sup> 在多种实体瘤中高表达, 成为治疗 HCC 有潜力的靶点。

TCRm 抗体有望通过靶向胞内抗原来治疗 HCC, 但是其应用于临床仍然面临挑战。pMHC 抗原的低水平表达可能是 TCRm 抗体功效和亲和力的主要障碍, 克服这一障碍的策略是增强 TCRm 抗体的效力 (增强 Fc 结构域功能), 例如诱导免疫效应细胞介导的 ADCC、CDC 和 ADCP<sup>[35]</sup>。此外, 可以将 TCRm 抗体与细胞毒性药物<sup>[42]</sup>、治疗性核素<sup>[35]</sup> 偶联, 或者构建 BsAb<sup>[43]</sup> 来增强效力。今后 TCRm 抗体的研究方向将侧重于发现 HCC 特异性新抗原, 并克服 TCRm 抗体应用于临床的困难, 包括抗原呈递不足、缺乏 MHC 内在化以及与其他表位的交叉反应。

## 2 抗体片段介导的抗 HCC 免疫治疗

### 2.1 Fab

Fab 由 VL、CL 和 VH、CH1 结构域组成, 相对分子质量约 55 kDa。Fab 抗体由于分子量小、稳定性高、靶向性强、组织渗透性好等优势, 并且缺乏 Fc 结构域, 可以规避与 Fc 相关的不良反应。近年来不少研究使用 Fab 抗体作为递送药物的靶向载体, 通过与治疗药物偶联既延长自身半衰期也能将药物精准递送至肿瘤部位。例如, Wang 等<sup>[44]</sup> 开发出一种针对 HCC 肿瘤血管上高表达的蛋白——浆囊泡相关蛋白 (plasmalemmal vesicle associated protein, PLVAP) 的抗体 CSR02, 然后将该抗体的 Fab 部分与组织因子 (tissue factor, TF, 一种启动凝血级联反应的正常人蛋白) 融合得到一种新的重组蛋白 CSR02-Fab-TF。其目的是剥夺 HCC 的血液供应, 导致肿瘤死亡, 而正常肝脏的血供不受影响。临床前研究表明, 输注 CSR02-Fab-TF 可导致 HCC 肿瘤组织坏死, 目前该融合蛋白已进入 I 期临床试验 (NCT04601428) 评估疗效。由于 Fab 只有一个抗原结合结构域, 因此对其靶标的亲和力有所降低。这种缺点在 F(ab')<sub>2</sub> 中不存在, F(ab')<sub>2</sub> 由 2 个 Fab 及铰链区组成, 保留了抗原结合的高亲和力。相同的是, 这两种抗体片段都缺乏 Fc 段, 显著降低了它们的半衰期, 从而降低了它们的脱靶毒性, 同时也缺乏 Fc 介导的功能<sup>[45]</sup>。因此, 这种形式更适合传递药物, 而不是诱导肿瘤杀伤, 通过与细胞毒性药物、核素、细胞因子等有效载荷偶联可以充分发挥它们在 HCC 免疫治疗中的优势<sup>[45-47]</sup>。

## 2.2 scFv

scFv 即单链可变片段 (single-chain variable fragment, scFv), 是由分离的 VH 和 VL 结构域构建, 并通过柔性肽连接体连接而成的小分子蛋白, 分子量约为 25 kDa, 远远小于全长单克隆抗体且保留了亲本抗体的特异性高抗原结合力。例如, 细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 特异性 scFv 抗体可特异性结合 HCC 中高表达的 cyclin D1, 显著抑制 HepG2 细胞生长和增殖<sup>[48]</sup>。然而, 单链抗体稳定性差, 其单独存在时有自发高聚集倾向从而显示出高免疫原性<sup>[7]</sup>。通过将 scFv 多聚化如二价二聚体<sup>[49]</sup>、三价二聚体<sup>[50]</sup>、四价二聚体<sup>[51]</sup>以及构建微型抗体 (scFv-CH3 结构域的二聚体, 缺乏与 Fc 受体相互作用的 CH2 结构域)<sup>[52]</sup>, 或者与细胞因子<sup>[53]</sup>、溶瘤病毒<sup>[54]</sup>、人 IgG1 Fc 结构域<sup>[55]</sup>等融合, 以及构建多特异性抗体 (可靶向多种肿瘤抗原或肿瘤细胞上的不同抗原表位)<sup>[56]</sup>, 可以明显改善 scFv 易聚集、半衰期短的不足。例如, 抗 EpCAM scFv 与假单胞菌外毒素 a (ETA) 融合的单链抗体药物 Vicinium (Sesen Biotech) 已获批用于治疗膀胱癌<sup>[7]</sup>。尽管存在一些不足, 但目前 scFv 在临床上仍然占主导地位, 约有十种 scFv 产品获 FDA 批准和 80 多项临床试验正在进行, 开发基于 scFv 的工程药物在 HCC 治疗方面依然很有必要<sup>[57]</sup>。

此外, 设计分泌 scFv 的 CAR-T 细胞用于治疗 HCC 目前研究火热。Huang 等<sup>[58]</sup>采用抗 c-Met scFv 构建的 CAR-T 细胞在体外有效清除了 c-Met 阳性的 HCC 细胞, 并导致 HCC 异种移植肿瘤消退。类似地, 目前关于 CAR-T 细胞疗法单独或联合传统治疗手段治疗 HCC 的相关临床试验 (NCT03198546、NCT03084380) 正在积极开展中, 疗效尚不清楚。为了进一步提高 CAR 的功能, Pang 等<sup>[59]</sup>在传统 CAR-T 细胞的基础上, 使用抗 GPC3 scFv 构建了分泌 IL-7 和 CCL19 (简称 7 × 19) 的 CAR-T 细胞, 实验结果显示: 7 × 19 CAR-T 细胞抑制 HCC 生长的能力显著强于传统 CAR-T 细胞。随后他们开展的 I 期临床试验 (NCT03198546) 显示, 一例晚期 HCC 患者经 7 × 19 CAR-T 细胞瘤内注射治疗后, 体内的肿瘤细胞在 30 d 后完全消失, 显示了分泌型 CAR-T 细胞治疗 HCC 等实体瘤的巨大潜力。然而, CAR-T 细胞疗法也存在副作用和局限性, 比如细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)、神经毒性和移植物抗宿主病 (GVHD), 通过使用 NK 细胞作为效应细胞可以规避这些不良反应<sup>[60]</sup>。

例如, Leivas 等<sup>[61]</sup>比较了 NKG2D-CAR-NK 细胞和 CD45RA-CAR-T 细胞在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 中的疗效, 相比之下, 自体 NKG2D-CAR-NK 细胞显示出更加强烈的癌细胞毒性, 并且在荷瘤小鼠中完全抑制了 MM 的生长, 没有观察到上述毒副作用。尽管 CAR-NK 细胞疗法的疗效已经在血液恶性肿瘤方面进行了临床测试, 据我们所知, 目前还没有相关临床试验来评估 CAR-NK 细胞在 HCC 治疗中的疗效, 但是一些临床前研究已经初步显示了基于 CAR-NK 的治疗策略在 HCC 免疫疗法中的光明前景<sup>[62-65]</sup>。

## 2.3 VHH

VHH 又叫单域抗体 (single domain antibody, sdAb)、纳米抗体 (nanobody, Nb), 来源于骆驼科动物表达的仅由重链组成的异常抗体上的抗原结合区域。VHH 分子量在 15 kDa 左右, 是目前世界上已知的抗原结合的最小单位。VHH 具有分子量小、渗透性强、抗原亲和力高、生产程序简单等优点, 在 HCC 治疗方面优势显著。最近, 恩伐福利单抗 (恩维达®, Envafolelimab) 获批用于治疗 HCC 等晚期实体瘤治疗, 成为国内首个获批的单域靶向抗体, 开创了皮下注射给药治疗癌症的先河<sup>[66]</sup>。恩伐福利单抗是由 PD-L1 Nb 与人类免疫球蛋白 Fc 片段融合而成的新型蛋白, 由于缺乏轻链, 恩伐福利单抗的分子量比完整的单克隆抗体小, 且更易溶解, 更迅速地穿透组织。Papadopoulos 等<sup>[67]</sup>开展的 I 期临床试验结果显示: 予患者皮下注射 Envafolelimab, 平均有效半衰期可达 23 d, 未报告剂量毒性或注射部位反应, 在晚期实体瘤患者体内具有持久的抗肿瘤活性。此外, 近年来新出现的 VHH 包括针对 HCC 肿瘤特异性靶点的抗 GPC3 Nb<sup>[68]</sup>, 针对肿瘤微环境的抗 PD-1 Nb<sup>[69]</sup>、抗 CTLA-4 Nb<sup>[70]</sup>等, 临床前研究表明使用这些基于纳米抗体的治疗策略有望改善传统单抗在 HCC 组织中穿透力不强的缺点。

以往研究通常把 scFv 用作 CARs 的抗原靶向结构域, 然而, 最近许多研究证实, 基于纳米抗体的 CAR-T/NK 细胞疗法与 scFv 作为肿瘤靶向抗体时具有类似的功能<sup>[71]</sup>。Li 等<sup>[72]</sup>筛选出一种 PD-L1 的特异性纳米抗体 B2, 并使用 B2 构建了针对 PD-L1 的 CAR-T 细胞, 临床前实验证明, PD-L1 CAR (B2) T 细胞能特异性裂解 HCC 细胞, 并阻止了肿瘤转移。此外, PD-L1 CAR (B2) T 细胞与靶向 GPC3 的 CAR-T 联合治疗, 可使小鼠 HCC 消退。为了进一步提高抗原结合亲和力和在肿瘤部位的富集, 目前基于

纳米抗体的研究正朝着二价<sup>[73]</sup>、多价<sup>[74]</sup>、多特异性<sup>[75-77]</sup>和修饰纳米抗体<sup>[78]</sup>的方向前进。

### 3 双、三特异性细胞激动剂介导的抗HCC免疫疗法

#### 3.1 双/三特异性T细胞激动剂

传统的双特异性T细胞激动剂(bispecific T cell engager, BiTE)通常是由两个异质性scFv组成的双特异性抗体,通过分别结合T细胞激活受体(如CD3、CD28)和肿瘤细胞的表面抗原,从而特异性地将T细胞与肿瘤细胞连接起来并介导免疫突触的形成<sup>[79]</sup>。BiTE消除了MHC-TCR识别的必要性,可直接激活T细胞依赖性的肿瘤细胞杀伤<sup>[80]</sup>。例如,临床前实验表明抗GPC3×CD3 BiTE可有效介导T细胞对GPC3阳性肝癌细胞的特异性杀伤<sup>[81]</sup>。为了进一步增强抗肿瘤作用,将BiTE与传统HCC化疗药物联合<sup>[82]</sup>,或使用两种不同的BiTE协同激活T细胞<sup>[83]</sup>,临床前研究均表明联合治疗组的抗HCC效果显著优于其单一治疗组。

尽管BiTE可以有效地重定向T细胞对抗HCC,并显示出强大的抗肿瘤作用。然而,血清半衰期短(血清中约2 h)一直是阻碍其临床应用的主要障碍之一<sup>[84]</sup>,因此通过各种方式改造BiTE以延长其半衰期,或者改变给药方式来延长BiTE的作用时间,是BiTE治疗成功的关键,尤其是对BiTE缺乏反应的HCC等实体癌。最近,开发基于BiTE的多价双特异性抗体<sup>[85]</sup>、将BiTE与白蛋白结构域融合<sup>[86]</sup>在延长半衰期方面效果显著。另一方面,改变传统的静脉给药方式也是一种可行的策略,例如, Khaliq等<sup>[87]</sup>用麻疹病毒(measles virus, MV)构建了表达BiTE的新型溶瘤病毒MV-BiTE,通过瘤内注射的方式治疗原发性结肠癌小鼠,与静脉注射MV-BiTE相比,瘤内注射增加了药物局部浓度并减少全身暴露,直到治疗后48 h,肿瘤内仍能检测到BiTE mRNA表达。为了实现BiTE在体内持续供应,同时规避其潜在毒性,Zhang等<sup>[84]</sup>构建了远红光(far-red light, FRL)反应性转基因系统来调控工程细胞的BiTE产生,可做到按需生产和分泌。然而,如何使细胞系稳定表达BiTE产物,以及体内植入细胞的长期存活,都是今后需考虑改进的方向。此外,抗体免疫原性也是限制BiTE临床应用的一个重要原因,近年来的研究通过使用纳米抗体来构建BiTE<sup>[86]</sup>为双特异性靶向系统带来了新的希望,因为纳米抗体分子量比scFv更小,免疫原性

也更低。

为防止传统单靶向T细胞激动剂的选择压力导致的抗原丢失而造成肿瘤逃逸,并通过提高肿瘤选择性减少非靶向副作用,由此产生了三特异性T细胞激动剂(trispecific T cell engager, TriTE)。Tapia-Galisteo等<sup>[88]</sup>将抗人EpCAM VHH和抗人EGFR VHH分别融合到抗人CD3 scFv的N端和C端,构建了针对两种不同TAA的TriTE(A×O×E),用于结直肠癌的靶向治疗。结果表明A×O×E能使表达EGFR和(或)EpCAM的癌细胞特异性裂解,而它对单阳性靶细胞的杀伤效率较低,导致潜在的肿瘤特异性增强,并可能有助于克服抗原异质性。而异质性被认为是HCC治疗失败的主要原因<sup>[89]</sup>,因此,具有双重识别功能的TriTE有望成为防止HCC肿瘤抗原逃逸的保障。此外,HCC的肿瘤微环境高度抑制和复杂,近年来免疫检查点(尤其是PD-L1)抑制剂在HCC临床治疗中取得重大突破,构建针对免疫检查点(如PD-1、PD-L1和LAG-3)的TriTE临床前研究都显现出良好的应用前景,有望进一步向临床转化<sup>[90-91]</sup>。

#### 3.2 双/三特异性NK细胞激动剂

NK细胞是先天性淋巴细胞家族的典型成员,不需要预先致敏就能激活,主要用于抵御微生物/病毒感染和肿瘤进展<sup>[92]</sup>。双特异性NK细胞激动剂(bispecific NK cell engager, BiKE)的结构与BiTE类似,通过分别靶向NK细胞激活受体(如CD16、NKp30、NKp46和NKG2D)和肿瘤抗原,在二者之间建立细胞溶解桥或突触来驱动针对肿瘤靶点的定向细胞毒性,并增强NK细胞的扩增、存活和启动<sup>[79]</sup>。例如,Wang等<sup>[93]</sup>用抗GPC3 Fab和抗CD16 VHH构建的BiKE,命名为GPC3-S-Fab,能够有效招募NK细胞特异性结合并杀死GPC3阳性肝癌细胞。

尽管BiKE可以增强NK细胞的激活,但不能维持它们的生存。为了消除这一不足,Zheng等<sup>[94]</sup>用抗B7-H3 scFv、IL-15和抗CD16 VHH设计了一个三特异性NK细胞激动剂(trispecific killer cell engagers, TriKE)平台(称为Cam1615B7H3),其中IL-15可以刺激NK细胞继续存活和增殖,进一步促进NK细胞对肿瘤细胞的杀伤。研究发现Cam1615-B7H3对HCC在内的多种B7-H3阳性实体瘤细胞显示出有效和特异的NK细胞诱导的杀伤,同时在卵巢癌CDX模型中也证明了这一点。Li等<sup>[95]</sup>用抗PD-L1-VHH和抗CD16a-VHH以及IL15/IL-15Rα构建了



针对 PD-L1 阳性肿瘤的新型 TriKE 平台 PD-L1-CD16a-IL15, 并验证了该平台能够有效驱动 NK 细胞特异性杀伤 PD-L1 过表达的癌细胞。Kaminski 等<sup>[96]</sup>用抗 TEM8 scFv、IL-15 和抗 CD16 Nb 构建的针对 TEM8 (一种在肿瘤基质细胞选择性上调的表面抗原)的 TriKE 平台 cam1615TEM8 临床前实验显示 cam1615TEM8 介导的 NK 细胞疗法在抑制肿瘤生长、血管生成方面效果显著。以上研究表明, 这些现有的 TriKE 平台能够有效驱动 NK 细胞特异性杀伤过表达特定抗原的癌细胞, 且未观察到毒性, 充分发挥了机体的先天性免疫功能, 并且以上平台针对的抗原在 HCC 等多种实体瘤中都存在高度表达, 今后可进一步验证其对抗 HCC 的效力。

### 3.3 肿瘤微环境特异性激活双特异性抗体

为了克服肿瘤外毒性, 研究者开始利用肿瘤微环境(如低 pH、低氧、特定蛋白酶等)来开发条件活性双特异性 T 细胞激动剂<sup>[97]</sup>。此类药物只有抵达肿瘤微环境才被激活, 从而避免正常组织毒性。例如目前已进入临床研究的 COBRA<sup>TM</sup> (Conditional Bispecific Redirected Activation) 平台, 它的分子结构为 aEGFR sdAb—aCD3 V<sub>H</sub>—aCD3 V<sub>L</sub>—aEGFR sdAb—酶解接头—inactive V<sub>L</sub>—inactive V<sub>H</sub>—aHSA sdAb。其中有活性的抗 CD3 的重链/轻链单链可变区(scFv V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>), 通过可被 MMP 酶解的接头在 C 端连接无活性的可变区片段(V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>), N 端连接肿瘤靶向单域抗体(sdAb), 并用抗人血清白蛋白(HSA) sdAb 来延长半衰期, 也有一些分子用无活性 Fc 结构域代替<sup>[97]</sup>。到了肿瘤局部, 半抗体由肿瘤微环境的 MMP 酶解 V<sub>H</sub> 与 V<sub>L</sub> 之间的接头, 暴露 CD3 抗体的活性片段, 通过抗体识别肿瘤, CD3 抗体活性片段招募并激活 T 细胞, 发挥抗肿瘤活性<sup>[98]</sup>。Dettling 等<sup>[99]</sup>利用 COBRA<sup>TM</sup> 平台技术设计的条件活性 T 细胞激动剂 TAK-186, 可诱导小鼠体内 EGFR 阳性实体瘤的消退。今后可利用现有的平台技术设计治疗 HCC 的条件活性双特异性 T 细胞接合器。目前这类药物面临的最大挑战之一是选择合适的蛋白水解接头序列与合适的肿瘤靶向抗体偶联以用于合适的临床适应症, 因为过于敏感的肽接头可能导致药物的非特异性激活, 从而导致肿瘤外毒性; 而过于严格的序列将没有足够的功效, 迫使更高和更长的剂量, 并可能诱导抗药物抗体反应<sup>[97]</sup>。此外, 也有研究开发仅在低 pH 或高 ATP 肿瘤微环境中激活的双特异性抗体来增强其特异性, 为抗 HCC 治疗提供了有希望的平台<sup>[100-102]</sup>。

## 4 抗体-细胞因子/毒素/促凋亡分子融合蛋白介导的抗HCC免疫疗法

### 4.1 抗体-细胞因子融合蛋白

细胞因子是第一种获批用于肿瘤免疫治疗的药物类型。然而, 细胞因子的一些固有特性极大地阻碍了其治疗用途, 如循环半衰期短、作用范围广、靶向性弱以及剂量依赖性毒副作用导致的治疗窗窄<sup>[103]</sup>。因此, 将细胞因子与抗体融合使之局限于肿瘤部位是克服以上缺点的一种有效策略, 利用抗体作为靶向传递的载体, 将细胞因子准确投递到相应的肿瘤部位, 避免游离细胞因子的全身毒性, 这种抗体-细胞因子融合蛋白被称为“免疫细胞因子(immunocytokines, ICs)”<sup>[104-105]</sup>。

为了进一步增强抗肿瘤效果, 免疫细胞因子的结构已经得到了很大发展, 并且还在不断升级中。例如, De Luca 等<sup>[106]</sup>构建的基于 IL-2 和 TNF 的双免疫细胞因子, 临床试验发现其在 IIIB/C 期黑色素瘤患者中可实现完全缓解。另外一种新型细胞因子衍生物产品称为“细胞因子激动剂”(engager cytokines), 也就是分别由 BiTE 和 BiKE 发展而来的 TriTE 和 TriKE。这种设计的优点是, 一个臂靶向肿瘤抗原, 一个臂与 T/NK 细胞受体结合, 人为地在 T/NK 细胞和肿瘤细胞之间形成免疫突触, 交联的细胞因子刺激 T/NK 细胞继续增殖存活和诱导更大的细胞毒性<sup>[103]</sup>。研究表明, HCC 通过多种机制建立其复杂的免疫抑制性 TME, 使其难以攻破, 而具有促炎作用的细胞因子可以抵消 TME 中的免疫抑制, 全身给药可以激活免疫系统, 但是毒性太大, 因此, 通过将细胞因子与抗体融合可综合两者优势, 使疗效和安全性提高, 且广泛的抗体形式(如 scFv、VHH、BiTE)和丰富的细胞因子种类为设计免疫细胞因子以治疗 HCC 提供了极大的灵活性<sup>[45]</sup>。

### 4.2 抗体-毒素融合蛋白

抗体-毒素融合蛋白也称为免疫毒素(immunotoxins, Its), 是由抗原结合部分和毒素组成的蛋白质指示化合物, 可以特异性地与癌细胞结合, 并有效地诱导细胞死亡。所选毒素可以是细菌毒素, 如假单胞菌外毒素、白喉毒素或志贺毒素, 也可以是植物毒素, 如蓖麻毒素、皂角蛋白和胶凝蛋白<sup>[107]</sup>。Hashemi Yeganeh 等<sup>[108]</sup>将不含结合域的截短白喉毒素(DT389)与抗 GPC3 scFv (YP7) 融合成抗 HCC 的新型白喉免疫毒素(DT389-YP7)。DT389-YP7 通过诱导凋亡、阻滞细胞周期和抑制细胞运动等机制,

显著抑制 HCC 细胞的生长。使用免疫毒素有许多优点, 包括副作用少、生产系统简单、可在微生物宿主中表达和制备。然而, 还有一些尚未解决的问题限制了免疫毒素在临床上的应用。其一是免疫原性, 免疫毒素的蛋白质属性是导致免疫过敏反应和抗药物抗体 (anti-drug antibodies, ADA) 产生的主要原因<sup>[109]</sup>。血管渗漏综合征 (vascular leak syndrome, VLS) 是免疫毒素的另一个主要副作用, 发生这种情况是由于毒素上具有一组基序, 使免疫毒素有可能附着在血管内皮细胞上, 进而损伤内皮细胞使血管通透性增加, 引起液体和蛋白质外渗, 导致间质水肿, 严重时可导致心、肺功能衰竭<sup>[110]</sup>。最后是肝毒性, 由此导致一些临床试验终止。为了克服 ADA、VLS 和肝毒性, 近年来逐渐出现了一些有希望的策略, 包括通过 B 或 T 细胞表位的缺失 / 突变、使用人源化抗体来降低毒素的免疫原性, 其次是诱导引起 VLS 的基序缺失 / 突变来防止其潜在毒性<sup>[107]</sup>, 以及采用不含 Fc 结构域的小分子抗体或对 Fc 结构域进行特定突变可以预防肝毒性。

#### 4.3 抗体-促凋亡分子融合蛋白

选择性诱导肿瘤细胞凋亡也是一种很有前途的抗癌策略。免疫促凋亡分子 (immunoproapoptotic molecules) 不需要免疫细胞和细胞因子的参与, 主要由靶向性抗体、易位结构域和人类凋亡蛋白 (如半胱天冬酶、颗粒酶 B) 组成<sup>[111]</sup>。据研究报道, 使用内源性促凋亡分子如 caspase-3、caspase-6、颗粒

酶 B、TBID 以及凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 代替毒素, 可降低免疫毒素的免疫原性及其相关副作用<sup>[112]</sup>。例如, Wahl 等<sup>[113]</sup>将肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 的重组三聚体形式表达为一条单链 (命名为 scTRAIL), 然后用抗 EGFR scFv 与 scTRAIL 融合, 实验结果显示: 该融合蛋白 ( $\alpha$ EGFR-scTRAIL) 选择性结合 EGFR 阳性 HCC 细胞并使之凋亡, 没有对健康肝组织造成损伤。

然而, 免疫促凋亡分子的体内抗肿瘤活性可能因缺乏足够的特异性、血浆中的渗透性差和半衰期短受到影响<sup>[114-115]</sup>。解决这些问题的对策是使免疫促凋亡分子在肿瘤部位积聚时间更长, 浓度更高。在最近几年, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 作为肿瘤生物疗法的细胞载体已被深入研究<sup>[116]</sup>。Yan 等<sup>[112]</sup>采用 MSCs 用于生产和运送他们设计的一种新型  $\gamma$ -脱氨基蛋白 ( $\gamma$ -seminoprotein,  $\gamma$ -SM) 靶向免疫促凋亡分子 SCFV-FDT-TBID, 该工程 MSC (MSC.SCFV-FDT-TBID) 将靶向  $\gamma$ -SM 阳性肿瘤细胞并释放融合蛋白诱导前列腺癌细胞凋亡。小鼠体内实验表明, MSC.SCFV-FDT-TBID 显著抑制  $\gamma$ -SM 阳性肿瘤生长且没有毒副作用。总的来说, 使用小分子抗体作为免疫促凋亡分子的靶标以提高其渗透性, 以及将其与载体偶联使更高浓度的药物在肿瘤局部富集是治疗 HCC 等实体瘤的主要策略。

表3 常见的用于构建抗体偶联物或新型抗体平台的HCC靶抗原

定位	靶点	构建的抗体偶联物或新型抗体平台	
胞外	B7-H3	ADC (NCT05293496)、核素标记抗体、CAR (CD70/B7-H3 scFv)-T、BiTE (B7-H3/CD3)、BiKE (B7-H3/CD16)、TriKE (B7-H3/IL-15/CD16) <sup>[94]</sup>	
	GPC3	核素标记抗体 <sup>[26]</sup> 、CAR (GPC3 scFv)-T <sup>[59]</sup> 、BiKE (GPC3/CD16) <sup>[93]</sup> 、BiTE (GPC3/CD3) <sup>[81]</sup> 、免疫毒素 <sup>[108]</sup>	
	PD-L1	ARC <sup>[32]</sup> 、Fc融合抗体 <sup>[66]</sup> 、CAR (PD-L1 Nb)-T <sup>[72]</sup> 、BsAb (Bintrafusp alfa)、TriKE (PD-L1-CD16a-IL15) <sup>[95]</sup>	
	EGFR	核素标记抗体、免疫促凋亡分子 <sup>[113]</sup> 、肿瘤微环境特异性激活BiTE <sup>[99]</sup>	
	c-Met	ADC (NCT03398720)、CAR (c-Met scFv)-T <sup>[58]</sup>	
	B7-H4	ADC (NCT05263479)	
	CD147	ADC (Anti-CD147 ILs-DOX)、核素标记抗体 <sup>[18]</sup>	
	ED-A	抗体导向酶催化前体药 <sup>[33]</sup>	
	ED-B	免疫细胞因子 (NCT01058538)	
	PD-1	BsAb (PD-1/CTLA-4)	
	CTLA-4	BsAb (PD-1/CTLA-4)	
	胞内	AFP	TCRm抗体平台 <sup>[38]</sup>
		p53	TCRm抗体平台 <sup>[40]</sup>
KRAS		TCRm抗体平台 <sup>[40]</sup>	
NeoAgs		TCRm抗体平台 <sup>[41]</sup>	
其他有潜力的靶点: LAG3; 4-1BB; TEM8 (一种在肿瘤基质中高表达的表面抗原)等			

表4 治疗HCC的各种新型抗体的优缺点

新型抗体分类	优势	存在问题	有希望的策略	研究进度	参考文献
抗体-药物偶联物	提高肿瘤中局部药物浓度; 避免全身毒性; 提高肿瘤细胞靶向性	分子量太大不利于其在HCC细胞中的扩散和分布	使用分子量更小、穿透性更强的抗原结合片段作为靶向载体	临床	[14]
抗体-核酸偶联物	实现基因靶向治疗; 减少药物用量, 同时解决核酸肿瘤靶向和递送问题	体内逃逸; siRNA的负电荷使偶联物不容易进入细胞; 抗体与siRNA偶联期间产生的空间位阻会降低偶联效率	优化连接器; 靶向内吞途径中普遍存在的受体; 适当改造核酸使偶联效率提高	临床前	[32]
核素标记抗体	诊疗一体化	对周围健康组织的放射性损伤; 放射性副产物导致的血细胞减少和骨髓毒性; 放射性肾病等其他脏器毒性	制定个性化治疗剂量; 采取措施减少对肾脏的辐射剂量	临床	[18]
抗体导向酶催化前体药	克服了常规化疗的缺点, 包括肿瘤中药物浓度不足、全身毒性、缺乏对肿瘤细胞的选择性	抗体-酶复合物的免疫原性; 重复给药时产生耐药性	发掘更多针对HCC的特异性抗原; 改造有潜力的酶治疗剂以减轻免疫原性和增加稳定性	临床前	[33]
TCRm抗体	针对胞内抗原衍生的表位; 血清半衰期长	可能与具有相同肽序列的蛋白发生交叉反应; MHC限制、MHC下调; 仅限于细胞外靶标, 表位密度低	增强TCRm抗体效力; 鉴定出强免疫原性的T细胞表位(包括新抗原和TCR); 开发高特异性的TCRm抗体, 防止脱靶识别效应	临床I期	[38]
抗体片段	分子量小、稳定性高、靶向性强、组织渗透性好; 生产程序简单, 成本较低; 以规避与Fc相关的不良反应	半衰期短; 无法完全保留亲本抗体特性	构建多聚体、多特异性抗体; 与细胞因子等成分融合, 与载药系统偶联	临床	[44,59,66]
双特异性T/NK细胞激动剂	重定向CTL特异性靶向肿瘤细胞	半衰期短; 引起CRS、DIC、神经毒性; 长期治疗产生免疫耐受	开发基于BiTE的多价双特异性抗体、融合蛋白、CARs; 改变传统给药方式	临床	[81-83,93-95]
肿瘤微环境特异性激活双特异性抗体	只在肿瘤微环境被激活, 更大程度避免肿瘤外毒性	与Fc介导的CRS; 实体瘤中渗透性差; 非肿瘤毒性可以降低, 无法避免	继续发掘HCC的特异性抗原; 与人蛋白、无活性Fc结构域等融合以延长半衰期	临床	[98]
抗体-细胞因子	防止全身毒性; 提高肿瘤部位药物浓度; 改善药代动力学	剂量依赖性毒副作用	降低给药频率	临床前	[105]
抗体-毒素	毒素易得; 生产系统简单	免疫原性; 肝毒性; 血管渗漏综合征	使用人源化抗体; B或T细胞表位的缺失/突变; VLS试剂基序的缺失/突变; 使用不含Fc段的抗体或将Fc进行特定突变	临床前	[85]
抗体-促凋亡分子	可降低免疫毒素的免疫原性及其相关副作用	缺乏足够的特异性; 血浆中的渗透性差	与载体偶联提高药物局部浓度	临床前	[90]

## 5 总结与展望

文中我们回顾了新型治疗性抗体在 HCC 免疫治疗中的研究进展, 主要包括抗体偶联物、TCR $\alpha$  抗体、双 / 三特异性细胞激动剂、抗体片段 (如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv 和 VHH)、免疫细胞因子、免疫毒素以及免疫促凋亡分子。随着工程技术的发展, 各种为满足临床需求的新型抗体被开发出来 (表 3)。然而, 大部分产品尚处于临床前阶段, 仍需大量的临床试验评估其疗效, 探索最佳给药途径和最优剂量。小型化和多功能化是目前抗体发展的两个主要方向, 在我们看来, 积极探索新抗原、提高靶组织的药物富集浓度、开发控释制剂以减少系统副作用, 同时激发先天性和适应性免疫细胞的协同抗肿瘤作用以及研发诊治一体化的新方法有望进一步改善治疗效果。虽说上述产品为 HCC 的治疗带来了新的希望, 但由于 HCC 是一种高异质性的恶性肿瘤, 复杂的 TME、缺乏独特的肿瘤抗原以及效应细胞浸润不良等问题, 单剂免疫治疗往往不能获得满意的效果。此外, 每种产品都有其独特的优势, 同时伴随着严重的剂量依赖性副作用 (表 4), 包括耐药、细胞因子风暴等, 因此, 组合不同的免疫疗法或者与经典治疗技术相结合是抗 HCC 治疗的重要途径。如何联合其他治疗策略使有效性和安全性最大化, 如何根据患者情况制定个性化方案, 是今后需考虑的问题。

### [参 考 文 献]

- [1] Chakraborty E, Sarkar D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC). *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 2798
- [2] Gong J, Koido S, Calderwood SK. Cell fusion: from hybridoma to dendritic cell-based vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7: 1055-68
- [3] Tarantino P, Carmagnani Pestana R, Corti C, et al. Antibody-drug conjugates: smart chemotherapy delivery across tumor histologies. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72: 165-82
- [4] Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 220-33
- [5] Kholodenko RV, Kalinovsky DV, Doronin II, et al. Antibody fragments as potential biopharmaceuticals for cancer therapy: success and limitations. *Curr Med Chem*, 2019, 26: 396-426
- [6] Murali M, Kumar AR, Nair B, et al. Antibody-drug conjugate as targeted therapeutics against hepatocellular carcinoma: preclinical studies and clinical relevance. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24: 407-31
- [7] Jin S, Sun Y, Liang X, et al. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 39
- [8] Yang CY, Wang L, Sun X, et al. SHR-A1403, a novel c-Met antibody-drug conjugate, exerts encouraging anti-tumor activity in c-Met-overexpressing models. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 971-9
- [9] D'Agostino D, Gentile R, Ponziani S, et al. EV20-sss-vc/MMAF, an HER-3 targeting antibody-drug conjugate displays antitumor activity in liver cancer. *Oncol Rep*, 2021, 45: 776-85
- [10] Kong FE, Li GM, Tang YQ, et al. Targeting tumor lineage plasticity in hepatocellular carcinoma using an anti-CLDN6 antibody-drug conjugate. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabb6282
- [11] Ma Z, He H, Sun F, et al. Selective targeted delivery of doxorubicin via conjugating to anti-CD24 antibody results in enhanced antitumor potency for hepatocellular carcinoma both *in vitro* and *in vivo*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143: 1929-40
- [12] Sun F, Wang T, Jiang J, et al. Engineering a high-affinity humanized anti-CD24 antibody to target hepatocellular carcinoma by a novel CDR grafting design. *Oncotarget*, 2017, 8: 51238-52
- [13] Peters C, Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep*, 2015, 35: e00225
- [14] Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, et al. DS-8201a, a novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 5097-108
- [15] Wu Y, Li Q, Kong Y, et al. A highly stable human single-domain antibody-drug conjugate exhibits superior penetration and treatment of solid tumors. *Mol Ther*, 2022, 30: 2785-99
- [16] Fan J, Zhuang X, Yang X, et al. A multivalent biparatopic EGFR-targeting nanobody drug conjugate displays potent anticancer activity in solid tumor models. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 320
- [17] Wu L, Shen F, Xia Y, et al. Evolving role of radiopharmaceuticals in hepatocellular carcinoma treatment. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16: 1155-65
- [18] Zhu ZX, Liao MH, Wang XX, et al. Transcatheter arterial chemoembolization plus <sup>131</sup>I-labelled metuximab versus transcatheter arterial chemoembolization alone in intermediate/advanced stage hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Korean J Radiol*, 2016, 17: 882-92
- [19] Chen H, Nan G, Wei D, et al. Hepatic artery injection of <sup>131</sup>I-Metuximab combined with transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective nonrandomized, multicenter clinical trial. *J Nucl Med*, 2022, 63: 556-9
- [20] Li J, Qin L, Ding EC, et al. Efficacy and safety of licartin with repeated administration in treatment of HCC patients after liver transplantation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2018,

- 98: 2645-9
- [21] Martins CD, Kramer-Marek G, Oyen WJG. Radioimmunotherapy for delivery of cytotoxic radioisotopes: current status and challenges. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15: 185-96
- [22] Yao L, Wen X, Guo W, et al. Novel radiolabeled TMTP1 for long-acting hepatocellular carcinoma therapeutics. *Mol Pharm*, 2022, 19: 3178-86
- [23] Shih YH, Peng CL, Weng MF, et al. Evaluation efficacy of rhenium-188-loaded micro-particles for radiotherapy in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Mol Pharm*, 2019, 16: 1083-91
- [24] Poojari R, Mohanty B, Kadwad V, et al. Combinatorial cetuximab targeted polymeric nanocomplexes reduce PRC1 level and abrogate growth of metastatic hepatocellular carcinoma *in vivo* with efficient radionuclide uptake. *Nanomedicine*, 2022, 41: 102529
- [25] Müller C, Bunka M, Haller S, et al. Promising prospects for <sup>44</sup>Sc-/<sup>47</sup>Sc-based theragnostics: application of <sup>47</sup>Sc for radionuclide tumor therapy in mice. *J Nucl Med*, 2014, 55: 1658-64
- [26] Guan L, Wu W, Pang H, et al. Anti-GPC3 single-chain scFv antibody acts as an agent for radio-immunoimaging in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res*, 2019, 11: 7422-31
- [27] Huang J, Tang Q, Wang C, et al. Molecularly targeted therapy of human hepatocellular carcinoma xenografts with radio-iodinated anti-VEGFR2 murine-human chimeric Fab. *Sci Rep*, 2015, 5: 10660
- [28] Tu J, Ji J, Wu F, et al. Effectiveness of combined (131) I-chTNT and radiofrequency ablation therapy in treating advanced hepatocellular carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71: 777-84
- [29] Parihar AS, Chopra S, Prasad V. Nephrotoxicity after radionuclide therapies. *Transl Oncol*, 2022, 15: 101295
- [30] Huggins IJ, Medina CA, Springer AD, et al. Site selective antibody-oligonucleotide conjugation via microbial transglutaminase. *Molecules*, 2019, 24: 3287
- [31] Ma S, Yang X, Zhou H, et al. Combination of CpG oligodeoxynucleotide and anti-4-1BB antibody in the treatment of multiple hepatocellular carcinoma in mice. *Oncol Targets Ther*, 2020, 13: 6997-7005
- [32] Wang X, Xiao X, Feng Y, et al. A photoresponsive antibody-siRNA conjugate for activatable immunogene therapy of cancer. *Chem Sci*, 2022, 13: 5345-52
- [33] Rosini E, Volpi NA, Ziffels B, et al. An antibody-based enzymatic therapy for cancer treatment: the selective localization of D-amino acid oxidase to EDA fibronectin. *Nanomedicine*, 2021, 36: 102424
- [34] AlQahtani AD, Al-Mansoori L, Bashraheel SS, et al. Production of "biobetter" glucarpidase variants to improve drug detoxification and antibody directed enzyme prodrug therapy for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 127: 79-91
- [35] Chang AY, Gejman RS, Brea EJ, et al. Opportunities and challenges for TCR mimic antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16: 979-87
- [36] Xu Y, Salazar GT, Zhang N, et al. T-cell receptor mimic (TCRm) antibody therapeutics against intracellular proteins. *Antib Ther*, 2019, 2: 22-32
- [37] Høydahl LS, Frick R, Sandlie I, et al. Targeting the MHC ligandome by use of TCR-like antibodies. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8: 32
- [38] Liu C, Liu H, Dasgupta M, et al. Validation and promise of a TCR mimic antibody for cancer immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 2022, 12: 12068
- [39] Duan Z, Ho M. T-cell receptor mimic antibodies for cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20: 1533-41
- [40] Duan Z, Ho M. Targeting the cancer neoantigens p53 and KRAS with TCR mimic antibodies. *Antib Ther*, 2021, 4: 208-11
- [41] Dao T, Mun SS, Molvi Z, et al. A TCR mimic monoclonal antibody reactive with the "public" phospho-neoantigen pIRS2/HLA-A\*02:01 complex. *JCI Insight*, 2022, 7: e151624
- [42] Shen Y, Wei X, Jin S, et al. TCR-mimic antibody-drug conjugates targeting intracellular tumor-specific mutant antigen KRAS G12V mutation. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15: 777-85
- [43] Shen Y, Li YM, Zhou JJ, et al. The antitumor activity of TCR-mimic antibody-drug conjugates (TCRm-ADCs) targeting the intracellular wilms tumor 1 (WT1) oncoprotein. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3912
- [44] Wang YH, Cheng TY, Chen TY, et al. Plasmalemmal vesicle associated protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2014, 14: 815
- [45] Gout DY, Groen LS, van Egmond M. The present and future of immunocytokines for cancer treatment. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79: 509
- [46] Chen X, Ding G, Gao Q, et al. A human anti-c-Met Fab fragment conjugated with doxorubicin as targeted chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013, 8: e63093
- [47] Jin C, Bai L, Lin L, et al. Paclitaxel-loaded nanoparticles decorated with bivalent fragment HAB18 F(ab')<sub>2</sub> and cell penetrating peptide for improved therapeutic effect on hepatocellular carcinoma. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46: 1076-84
- [48] Wu Y, Tang W, Cao Y, et al. A cyclin D1-specific single-chain variable fragment antibody that inhibits HepG2 cell growth and proliferation. *Biotechnol J*, 2020, 15: e1900430
- [49] Opaliński Ł, Sokołowska-Wędzina A, Szczepara M, et al. Antibody-induced dimerization of FGFR1 promotes receptor endocytosis independently of its kinase activity. *Sci Rep*, 2017, 7: 7121
- [50] Aschmoneit N, Steinlein S, Kühl L, et al. A scDb-based trivalent bispecific antibody for T-cell-mediated killing of HER3-expressing cancer cells. *Sci Rep*, 2021, 11: 13880
- [51] Lu CY, Chen GJ, Tai PH, et al. Tetravalent anti-CD20/CD3 bispecific antibody for the treatment of B cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473: 808-13
- [52] Fujiwara K, Akiba H, Tsuji AB, et al. <sup>64</sup>Cu-labeled

- minibody D2101 visualizes CDH17-positive gastric cancer xenografts with short waiting time. *Nucl Med Commun*, 2020, 41: 688-95
- [53] Ongaro T, Gouyou B, Stringhini M, et al. A novel format for recombinant antibody-interleukin-2 fusion proteins exhibits superior tumor-targeting properties *in vivo*. *Oncotarget*, 2020, 11: 3698-711
- [54] Lei GL, Wang LP, Dong SH, et al. A recombinant influenza virus with a CTLA4-specific scFv inhibits tumor growth in a mouse model. *Cell Biol Int*, 2021, 45: 1202-10
- [55] Zhu H, Yang B, Yang X, et al. A novel antibody fragment targeting HAb18G/CD147 with cytotoxicity and decreased immunogenicity. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 1035-44
- [56] Park JA, Cheung NV. Overcoming tumor heterogeneity by *ex vivo* arming of T cells using multiple bispecific antibodies. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e003771
- [57] Asaadi Y, Jouneghani FF, Janani S, et al. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomark Res*, 2021, 9: 87
- [58] Huang X, Guo J, Li T, et al. c-Met-targeted chimeric antigen receptor T cells inhibit hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Res*, 2021, 36: 10-21
- [59] Pang N, Shi J, Qin L, et al. IL-7 and CCL19-secreting CAR-T cell therapy for tumors with positive glypican-3 or mesothelin. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 118
- [60] Ebrahimiyan H, Tamimi A, Shokoochian B, et al. Novel insights in CAR-NK cells beyond CAR-T cell technology; promising advantages. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108587
- [61] Leivas A, Valeri A, Córdoba L, et al. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 2021, 11: 146
- [62] Yu M, Luo H, Fan M, et al. Development of GPC3-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2018, 26: 366-78
- [63] Zhao J, Lin L, Luo Y, et al. Optimization of GPC3-specific chimeric antigen receptor structure and its effect on killing hepatocellular carcinoma cells. *Bioengineered*, 2021, 12: 3674-83
- [64] Huang Y, Zeng J, Liu T, et al. DNAM1 and 2B4 costimulatory domains enhance the cytotoxicity of anti-GPC3 chimeric antigen receptor-modified natural killer cells against hepatocellular cancer cells *in vitro*. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 3247-55
- [65] Tseng HC, Xiong W, Badeti S, et al. Efficacy of anti-CD147 chimeric antigen receptors targeting hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*, 2020, 11: 4810
- [66] Markham A. Envafolelimab: first approval. *Drugs*, 2022, 82: 235-40
- [67] Papadopoulos KP, Harb W, Peer CJ, et al. First-in-human phase I study of Envafolelimab, a novel subcutaneous single-domain anti-PD-L1 antibody, in patients with advanced solid tumors. *Oncologist*, 2021, 26: e1514-25
- [68] Xia L, Teng Q, Chen Q, et al. Preparation and characterization of anti-GPC3 nanobody against hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2197-205
- [69] Shi W, Yang X, Xie S, et al. A new PD-1-specific nanobody enhances the antitumor activity of T-cells in synergy with dendritic cell vaccine. *Cancer Lett*, 2021, 522: 184-97
- [70] Tang Z, Mo F, Liu A, et al. A nanobody against cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 increases the antitumor effects of specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15: 2229-39
- [71] SafarzadehKozani P, Naseri A, Mirarefin SMJ, et al. Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Biomark Res*, 2022, 10: 24
- [72] Li D, English H, Hong J, et al. A novel PD-L1-targeted shark VNAR single-domain-based CAR-T cell strategy for treating breast cancer and liver cancer. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 849-63
- [73] Albert S, Arndt C, Koristka S, et al. From mono- to bivalent: improving theranostic properties of target modules for redirection of UniCAR T cells against EGFR-expressing tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, 2018, 9: 25597-616
- [74] Liu J, Toy R, Vantucci C, et al. Bifunctional janus particles as multivalent synthetic nanoparticle antibodies (SNAbs) for selective depletion of target cells. *Nano Lett*, 2021, 21: 875-86
- [75] Zhai T, Wang C, Xu Y, et al. Generation of a safe and efficacious llama single-domain antibody fragment (VHH) targeting the membrane-proximal region of 4-1BB for engineering therapeutic bispecific antibodies for cancer. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002131
- [76] Dong J, Huang B, Wang B, et al. Development of humanized tri-specific nanobodies with potent neutralization for SARS-CoV-2. *Sci Rep*, 2020, 10: 17806
- [77] Wang J, Kang G, Yuan H, et al. Research progress and applications of multivalent, multispecific and modified nanobodies for disease treatment. *Front Immunol*, 2022, 12: 838082
- [78] Pille J, van Lith SA, van Hest JC, et al. Self-assembling VHH-Elastin-like peptides for photodynamic nanomedicine. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 1302-10
- [79] Phung SK, Miller JS, Felices M. Bi-specific and Tri-specific NK cell engagers: the new avenue of targeted NK cell immunotherapy. *Mol Diagn Ther*, 2021, 25: 577-92
- [80] Huang SL, Wang YM, Wang QY, et al. Mechanisms and clinical trials of hepatocellular carcinoma immunotherapy. *Front Genet*, 2021, 12: 691391
- [81] Bi Y, Jiang H, Wang P, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with a GPC3-targeted bispecific T cell engager. *Oncotarget*, 2017, 8: 52866-76
- [82] Chen X, Chen Y, Liang R, et al. Combination therapy of hepatocellular carcinoma by GPC3-targeted bispecific antibody and irinotecan is potent in suppressing tumor growth in mice. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21: 149-58
- [83] Quitt O, Luo S, Meyer M, et al. T-cell engager antibodies enable T cells to control HBV infection and to target HBsAg-positive hepatoma in mice. *J Hepatol*, 2021, 75: 1058-71
- [84] Zhang C, Shi Y, Wu L, et al. Far-red light triggered

- production of bispecific T cell engagers (BiTEs) from engineered cells for antitumor application. *ACS Synth Biol*, 2022, 11: 888-99
- [85] Yu L, Huang N, Sun H, et al. Development of a tetravalent T-cell engaging bispecific antibody against glypican-3 for hepatocellular carcinoma. *J Immunother*, 2021, 44: 106-13
- [86] Mandrup OA, Ong SC, Lykkemark S, et al. Programmable half-life and anti-tumour effects of bispecific T-cell engager-albumin fusions with tuned FcRn affinity. *Commun Biol*, 2021, 4: 310
- [87] Khaliq H, Baugh R, Dyer A, et al. Oncolytic herpes virus expressing PD-L1 BiTE for cancer therapy: exploiting tumor immunosuppression as an opportunity for targeted immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e001292
- [88] Tapia-Galisteo A, Sánchez Rodríguez Í, Aguilar-Sopeña O, et al. Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 2022, 11: 2034355
- [89] Dong LQ, Peng LH, Ma LJ, et al. Heterogeneous immunogenomic features and distinct escape mechanisms in multifocal hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2020, 72: 896-908
- [90] Passariello M, Yoshioka A, Takahashi K, et al. Novel tri-specific tribodies induce strong T cell activation and anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 269
- [91] Warmuth S, Gunde T, Snell D, et al. Engineering of a trispecific tumor-targeted immunotherapy incorporating 4-1BB co-stimulation and PD-L1 blockade. *Oncoimmunology*, 2021, 10: 2004661
- [92] Borrego F, Larrucea S, Solana R, et al. Editorial: NK cell-based cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2016, 7: 249
- [93] Wang Y, Liu J, Pan H, et al. A GPC3-targeting bispecific antibody, GPC3-S-Fab, with potent cytotoxicity. *J Vis Exp*, 2018, (137): 57588
- [94] Zheng Y, Liao N, Wu Y, et al. High expression of B7-H2 or B7-H3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 4315-25
- [95] Li Y, Wu L, Liu Y, et al. A novel multifunctional anti-PD-L1-CD16a-IL15 induces potent cancer cell killing in PD-L1-positive tumour cells. *Transl Oncol*, 2022, 21: 101424
- [96] Kaminski MF, Bendzick L, Hopps R, et al. TEM8 Tri-specific Killer Engager binds both tumor and tumor stroma to specifically engage natural killer cell anti-tumor activity. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e004725
- [97] Chen TT. Conditionally active T cell engagers for the treatment of solid tumors: rationale and clinical development. *Expert Opin Biol Ther*, 2022, 22: 955-63
- [98] Panchal A, Seto P, Wall R, et al. COBRA™: a highly potent conditionally active T cell engager engineered for the treatment of solid tumors. *MAbs*, 2020, 12: 1792130
- [99] Dettling DE, Kwok E, Quach L, et al. Regression of EGFR positive established solid tumors in mice with the conditionally active T cell engager TAK-186. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e004336
- [100] Zhou F, Fu T, Huang Q, et al. Hypoxia-activated PEGylated conditional aptamer/antibody for cancer imaging with improved specificity. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 18421-7
- [101] Sharp L, Chang C, Frey G, et al. Potent CAB CTLA4 antibody to reduce immune side effects and toxicities associated with single-agent and combination cancer immuno therapies. *Cancer Res*, 2019, 79: 2708
- [102] Chang C, Frey G, Sharp L, et al. Novel conditionally active biologic (CAB) antibody targeting EpCAM demonstrates anti-tumor efficacy *in vivo*. *Cancer Res*, 2019, 79: 356
- [103] Zheng X, Wu Y, Bi J, et al. The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19: 192-209
- [104] Hutmacher C, Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 141: 67-91
- [105] Lin X, Li H, Li X, et al. A single-chain variable fragment antibody/chemokine fusion protein targeting human endoglin to enhance the anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17: 1574-83
- [106] De Luca R, Neri D. Potentiation of PD-L1 blockade with a potency-matched dualcytokine-antibody fusion protein leads to cancer eradication in BALB/c-derived tumors but not in other mouse strains. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67: 1381-91
- [107] Heiat M, Hashemi Yeganeh H, Alavian SM, et al. Immunotoxins immunotherapy against hepatocellular carcinoma: a promising prospect. *Toxins (Basel)*, 2021, 13: 719
- [108] Hashemi Yeganeh H, Heiat M, Kieliszek M, et al. DT389-YP7, a recombinant immunotoxin against glypican-3 that inhibits hepatocellular cancer cells: an *in vitro* study. *Toxins (Basel)*, 2021, 13: 749
- [109] Khan DA. Hypersensitivity and immunologic reactions to biologics: opportunities for the allergist ann. *Allergy Asthma Immunol*, 2016, 117: 115-20
- [110] Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*, 1997, 37: 117-32
- [111] Yan B, Ouyang Q, Zhao Z, et al. Potent killing of HBV-related hepatocellular carcinoma by a chimeric protein of anti-HBsAg single-chain antibody and truncated Bid. *Biomaterials*, 2013, 34: 4880-9
- [112] Yan F, Li X, Li N, et al. Immunoproapoptotic molecule scFv-Fdt-tBid modified mesenchymal stem cells for prostate cancer dual-targeted therapy. *Cancer Lett*, 2017, 402: 32-42
- [113] Wahl K, Siegemund M, Lehner F, et al. Increased apoptosis induction in hepatocellular carcinoma by a novel tumor-targeted TRAIL fusion protein combined with bortezomib. *Hepatology*, 2013, 57: 625-36
- [114] Ghetie V, Vitetta ES. Chemical construction of immunotoxins. *Mol Biotechnol*, 2001, 18: 251-68
- [115] Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, et al. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 559-65
- [116] Sun XY, Nong J, Qin K, et al. Mesenchymal stem cell-mediated cancer therapy: a dual-targeted strategy of personalized medicine. *World J Stem Cells*, 2011, 3: 96-103