

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0307-03

两种 Icon 嵌合抗体在肿瘤靶向免疫治疗中的应用

王 宁 综述; 王雅杰 审阅(第二军医大学附属长海医院肿瘤科, 上海 200433)

[摘 要] 由于免疫学研究的深入以及抗体技术的开展, 嵌合抗体已经成为免疫治疗中的热点。本综述所及两种结构相似的嵌合抗体 G71-1 Icon 和因子 VII Icon。G71-1 Icon 能抑制黑色素瘤的肿瘤细胞生长和转移; 因子 VII Icon 能破坏多种实体肿瘤所形成的新生血管。黑色素瘤动物实验表明 2 种 Icon 肿瘤内注射不仅可以使注射部位肿瘤生长受到抑制, 而且还可以对远处转移的病灶产生抑制作用; 并且对正常的组织和器官不产生损害。经过动物实验验证, 2 种 Icon 安全并且有效为治疗肿瘤以及抗转移提供了一种新的思路。

[关键词] 凝血致活酶; 因子 VII; 嵌合抗体; 免疫治疗

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

1 Icon 的结构

嵌和抗体“Icon”是“immunoconjugate”的缩写。与一般的嵌合抗体结构不同, Icon 没有轻链, 由 2 条重链通过二硫键相连形成。通常的重链有可变区 VH, 而 Icon 抗体的重链可变区 VH 为因子 VII 或抗体单链可变区片段 scFv 所替代, 恒定区 CH 和 IgG1 抗体相同。因此 Icon 有 2 个功能区: 靶向结构域和效应结构域 Fc。由于靶向结构域的不同, 分为 2 种 Icon: 一种靶向结构域为抗体单链可变区片段 scFv, 与人类黑色素瘤细胞上的同源性抗原相结合; 另一种靶向结构域为因子 VII, 与表达组织因子的肿瘤细胞和新生血管内皮细胞相结合。Fc 片段可以激活由 Fc 受体介导的 ADCC 作用, 从而杀伤靶向细胞^[1-3]。

2 2 种 Icon 的功能和生物特性

将人类黑色素瘤自体的肿瘤细胞接种到患者中, 用噬菌体文库表达抗体单链可变区片段 scFv, 以此作为 G71-1 Icon 的靶向结构域。黑色素瘤相关的硫酸软骨素多糖蛋白 MCSP 在绝大多数黑色素瘤细胞表面表达^[4], 是单链可变区片段 scFv 同源性抗原。G71-1 Icon 的单链可变区片段 scFv 与黑色素瘤细胞表达的硫酸软骨素多糖蛋白 MCSP 特异性结合^[2,3,5], 通过效应结构域 Fc 片段, 激发 NK 细胞和补体对黑色素瘤细胞特异性地溶解和破坏^[3], 从而发挥抗肿瘤效应。动物实验发现, 肿瘤内注射 G71-1 Icon 可以抑制裸鼠黑色素瘤皮肤局部肿瘤, 同时也可以抑制肺部转移病灶^[2,3,5]。

很多威胁人类生命的恶性疾病如癌症和视网膜黄斑变性等, 都和病理性血管生成有关。当肿瘤直径达到或者超过 1~2 mm 时, 经微环境渗透提供的营养物质已经不能保证肿瘤细胞的生长, 此时向肿瘤提供营养的血管逐渐形成。这种宿主组织血循环形成的毛细血管网最终进入肿瘤组织。新生血管对原发肿瘤细胞本身的增殖和

生长是必不可少的, 同时也是肿瘤侵袭转移的必须条件^[6]。因此许多血管生成抑制剂的研究就成为了抗肿瘤转移的研究热点之一。但是, 由于肿瘤血管生成的调节是一个复杂的多因素参与的过程, 目前临床上尚无有效的血管生成抑制剂。本文所讨论的嵌合抗体因子 VII Icon, 并不能阻断新血管的生成, 而是通过免疫反应对病理性新生血管产生破坏作用。

组织因子是一种跨膜糖蛋白, 为因子 VII 的受体。它不仅能够激活凝血的级联反应, 而且在新血管的形成、肿瘤细胞的转移中也发挥重要的作用。众多的研究表明病理性血管的内皮细胞和很多肿瘤细胞表达组织因子, 但是在正常的血管中则不表达^[1,2]。组织因子和因子 VII 形成复合物与其本身的浓度有关, 并且这种结合力可以达到饱和^[7]。Weidner 通过观察血管内皮表面标记物因子 VII, 对比分析肿瘤血管密度和肿瘤转移倾向的关系, 结果呈正相关。实验表明, 组织因子在包括结直肠癌^[8]、前列腺癌^[9]、神经胶质瘤^[10]等多种恶性肿瘤细胞中表达, 并决定该种肿瘤的表型, 提示预后较差^[11-13]。基于病理性血管的这种特殊的性质, Garden 等^[1,2]建立了一种嵌合抗体因子 VII Icon (fVII/Fc Icon), 选用腺病毒载体, 注射到肿瘤实体中。这样腺病毒载体感染的肿瘤细胞就会合成并且分泌因子 VII Icon, 然后释放到血循环中, 循环中的 Icon 和肿瘤血管中的组织因子特异的结合, 产生一系列的靶细胞的裂解反应, 破坏新生血管, 却不损伤正常的血管。因子 VII Icon 能够以高亲和力 and 强特异性与肿瘤血管内皮细胞以及多种肿瘤细胞表面的组织因子结合。和内源性的因子 VII (一个结构域) 比较, Icon 2 个因子 VII 结构域使亲和力增大约 1 000 倍, 所以 Icon 能和内源性的因子 VII 竞争结合靶细胞, 以保证因子 VII 充分发挥抗肿瘤的作用。

Garen 等^[1]在体外实验以及动物模型中对 Icon 的生物特性进行了研究。以前列腺癌为例, 检测 Icon 的血液清除率。静脉单纯注射因子 VII Icon, 监测血浆中 Icon 的

浓度,生物半衰期为1周。在裸鼠肿瘤内注射编码 Icon 的腺病毒抗体后浓度至少可以维持2周^[1]。就 Icon 体内分布而言,瘤体内末次注射 Icon 后2d,灌注生理盐水以清除未结合的 Icon;此后用免疫组化荧光检测 Icon 在肿瘤,肝脏,肾脏等部位的分布。结果只有在肿瘤内有强烈的荧光反应,肾脏和肝脏没有荧光聚集^[1]。这也充分说明了 Icon 不会损伤肿瘤外的正常组织。

静脉注射以及肿瘤内注射2种 Icon,比较发现血清中 G71-1 Icon 的浓度比因子 VII Icon 分别高100倍和5倍,但是注射 G71-1 Icon 的裸鼠并没有表现更强的抗肿瘤效果。因为 G71-1 Icon 只能和黑色素瘤细胞结合,而因子 VII Icon 不仅可以和肿瘤细胞结合,还可以和肿瘤新生血管内皮细胞相结合^[3],因此因子 VII Icon 相对低浓度就可以发挥明显的抗肿瘤效应。

3 Icon 的安全性

安全性是免疫治疗应用于临床的前提。对于 Icon 而言,主要考虑其是否会引起肝脏的损伤、出血和凝血功能紊乱以及正常组织器官的损伤等。在黑色素瘤和前列腺癌的鼠转移模型中,Garen 等^[1-3]针对以上几个方面检验了 Icon 分子的安全性。研究早期,把转染嵌和抗体 Icon 的腺病毒注射到实验裸鼠的尾静脉中,发现由于感染腺病毒的肝细胞不断合成嵌和抗体从而损伤了裸鼠的肝脏^[3]。显然静脉注射 Icon 所造成的肝损不能满足安全性的要求,因此 Garen 等改用瘤体内注射这一方法。2种方法对比发现:对裸鼠肝脏功能谷草转氨酶检测,肿瘤内注射的裸鼠转氨酶始终处于正常水平;尸检裸鼠肝脏,肿瘤内注射的裸鼠肝脏只有极轻微的损伤。将腺病毒载体基因组进行绿色荧光标记,发现荧光主要集中在肿瘤内而不是肝脏,即说明腺病毒感染的为肿瘤局部。就肿瘤局部而言,荧光标记主要集中在细针注射通道附近的肿瘤细胞^[2]。因此肿瘤实体内注射腺病毒载体不会对肝脏产生损伤^[2]。如果实际应用腺病毒载体时没有明显的肿瘤实体可供注射,也可以注射在正常的组织,如肌肉^[2]。由于竞争性结合,内源性因子 VII 与组织因子结合受到阻碍,那么是否会因为凝血途径的抑制而引起出血呢?为了减少由于组织因子引起的弥散性血管内凝血(DIC)的发生,置换因子 VII 的一个氨基酸分子来抑制凝血途径的启动,因此不会产生出血;而这种改变并不影响 Icon 的亲合力^[2]。实验中裸鼠肿瘤局部注射腺病毒载体后,组织学检查并没有发现任何组织和器官出血^[1-2]。此外有研究把凝血反应缺陷的患者的因子 VII 以 10~400 g/kg 体重的浓度注射到正常人中,出血时间 BT 也没有延长^[2]。实验裸鼠中 Icon 的浓度是 PT 病理性延长下限值的 1%,不足以引起出血^[1]。所以,出血并非应用 Icon 嵌和抗体着重考虑的不安全因素。大量免疫组织化学对人类组织的检验发现,大多数正常组织的血管内皮不表达组织因子,但是某些正常组织,如脑,肺,肾小球等均表达组织因子。

这些组织的血管壁具有阻断大分子的作用,所以无论内源性 VII 抑或因子 VII Icon 均无法与其结合。肿瘤血管不具有屏障作用,那么表达组织因子的肿瘤细胞就可以与因子 VII Icon 结合^[3],并且不会引起正常组织和血管的破坏。综合以上几点,可以认为应用 Icon 分子是安全的。

4 Icon 的有效性

除了安全因素,人们最关心的就是 Icon 的有效性。首先对载体的浓度和剂量进行研究。载体浓度和剂量的不同对肿瘤的生长的抑制作用也不同。因子 VII Icon 和 G71-1 Icon 以 5:1 的浓度比混和注射到裸鼠人类黑色素瘤皮肤肿块局部。两种抗体剂量从 7×10^8 IU ~ 6×10^9 IU 不等,在此后连续 5 d 内测量肿瘤体积,发现抗体剂量最大者,抑制肿瘤的效应最强。然后,研究 Icon 对肿瘤生长的抑制效应。肿瘤局部多次注射 Icon,此后监测 19 d。最后一次注射 Icon 后血清中浓度从 (1~2) mg/ml 不等。第 1 次注射 Icon 1 d 后肿瘤体积平均减少 70%,并且在整个实验中没有再次出现增大^[2]。单一注射因子 VII Icon 抑制肿瘤的效应和混和注射 2 种 Icon 相似。这一结果和早期静脉注射 Icon 得出的结论一致^[3]。肿瘤的转移扩散是其致死的主要原因,很多弥散的肿块无法一一注射 Icon 分子,因此检验没有注射 Icon 分子的肿瘤是否同样受到抑制十分必要。Garen 等在裸鼠的黑色素瘤^[2-3]和前列腺癌^[1]模型中验证了这一点。Garen 等将人类黑色素瘤细胞株 TF2 注射到裸鼠的尾静脉中,通过血源性转移形成肺转移病灶。同时皮下注射人类黑色素瘤细胞株 LXSIN,这样同时形成皮肤局部的肿瘤和转移瘤。此后 8 周中,每周注射嵌合抗体 2 次。最后一次注射 Icon 后 2 d 处死裸鼠,进行活检。结果发现两种 Icon 可以同时抑制注射部位肿瘤和远处转移肿瘤^[2]。Garen 等进行的另外一项实验^[3]发现,不仅注射部位的肿瘤生长受到抑制,没有注射以及转移部位的肿瘤也同样被抑制。这项实验为期 6 个月,经过治疗的裸鼠绝大多数肿瘤完全消失,残留肿瘤为坏死组织代替,没有观察到毒性反应^[1-2]。在实际应用嵌和抗体 Icon 时,我们要考虑到免疫排斥的问题,因为免疫排斥反应会影响载体的分泌和合成,继而阻碍了 Icon 发挥作用。Icon 的 2 个结构域为人源化的,所以可以被人体耐受。但是腺病毒载体系统具有很强的免疫原性,多次注射到肿瘤中可能引起免疫排斥反应。为了评价腺病毒抗体引起的免疫排斥反应,采用免疫功能健全的小鼠而不是裸鼠。将带有鼠源化因子 VII/鼠源化 Fc 片断的腺病毒载体注射到免疫功能健全的小鼠尾静脉中。实验结果表明,黑色素瘤的生长同样受到了抑制,因此可以证明 Icon 抑制肿瘤的效应没有受到免疫排斥反应的影响^[2]。综上所述,Icon 是一种安全并且有效的嵌合抗体。

5 展望

因子 VII Icon 发挥作用和肿瘤的种类没有关系,组织

因子在肿瘤血管内皮细胞和多种肿瘤细胞中都有表达,所以嵌合抗体 Icon 对人类很多肿瘤都有效。具体应用 Icon 时,要注意肿瘤细胞必须易于被腺病毒载体携带,导入体内后能够合成分泌嵌合抗体。很多人类和裸鼠的肿瘤细胞株,例如人类黑色素瘤细胞(LXSN, TF2 和 Yusac2),前列腺癌(LnCap),乳腺癌(BT20),胰腺癌(Colo357),肾癌(Caki),胃癌(MS)和神经母细胞瘤(A204)经过实验验证都可以通过腺病毒载体,合成并且分泌嵌合抗体^[2]。

因子 VII Icon 对新生血管的破坏不仅仅应用在抗肿瘤领域中,对于一切病理性新生血管都有破坏作用。一种在发达国家中引起失明的主要疾病老年性黄斑变性和脉络膜病理性新生血管形成有关,这种疾病导致黄斑水肿、变性,视力丧失。Bora 等^[14]用因子 VII Icon 破坏新生血管的效应治疗黄斑变性,通过裸鼠和猪的动物实验显示 Icon 可以根除病理性血管,而且对正常的血管无损伤。

动物实验中,应用因子 VII Icon 为 mfVII/hFc Icon。为了 Icon 应用于临床试验中,Hu 等^[1]用 hfVII/hFc Icon 代替 mfVII/hFc Icon。通过荧光激活细胞分类术 FACS 分别检测 mfVII/hFc Icon 和 hfVII/hFc Icon 对鼠组织因子和人类组织因子的亲和力,结果发现前者对鼠组织因子和人类组织因子的亲和力大于后者。因为 hfVII/hFc Icon 对鼠组织因子亲和力很微弱,而 Icon 发挥作用必须依赖于与肿瘤血管内皮组织因子的结合,故它的有效性不能通过鼠的肿瘤模型来验证^[1]。那么对 hfVII/hFc Icon 的进一步研究就要采用其他的方法。

Icon 是一种非常有临床应用前景的免疫分子。根据临床前这些实验数据,Icon 的 I 期临床试验即将在加拿大的 San Diego 癌症中心和荷兰的 Amsterdam 癌症中心进行^[2]。

综上所述,嵌合抗体 Icon 是治疗肿瘤新生血管形成的一种新的思路,它通过靶向结构域不同的特异性以及效应结构域 Fc 的细胞毒作用达到靶向治疗的作用,是治疗肿瘤的一个新策略。

[参考文献]

[1] Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(21): 12180-121805.

[2] Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 9221-9225.

[3] Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(14): 8161-8166.

[4] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [J]. New Engl J Med, 1995, 333(26): 1757-1763.

[5] Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues [J]. Am J Pathol, 1989, 134(5): 1087-1097.

[6] Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: Will it work? [J]. Trends Pharmacol Sci, 1998, 19(6): 216-222.

[7] Siddiqui FA, Amirkhosravi A, Amaya M, et al. Purification and properties of human melanoma cell tissue factor [J]. Clin Appl Thromb/Hem, 2001, 7(4): 289-295.

[8] Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer [J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(5): 417-422.

[9] Ohta S, Wada H, Nakazaki T, et al. Expression of tissue factor is associated with clinical features and angiogenesis in prostate cancer [J]. Anticancer Res, 2002, 22(5): 2991-2996.

[10] Guan M, Jin J, Su B, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma [J]. Clin Biochem, 2002, 35(4): 321-325.

[11] Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, et al. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer [J]. Br J Surg, 1995, 82: 1101-1104.

[12] Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, et al. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease [J]. Nat Med, 1996, 2: 209-215.

[13] Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. [J] Cancer. 1996, 77: 1877-1883.

[14] Bora PS, Hu Z, Tezel TH, et al. Immunotherapy for choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model simulating exudative (wet) macular degeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(5): 2679-2684.

[收稿日期] 2004 - 03 - 16

[修回日期] 2004 - 08 - 10

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》