[文章编号] 1007-385X(2005)01-0076-04

CD20 抗原及治疗性抗 CD20 抗体

王玉刚 综述; 沈倍奋 审阅 (军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室, 北京 100850)

[摘要] CD20 是人类 B 淋巴细胞表面特有的标识。它高表达于所有正常 B 细胞和多数恶性 B 细胞表面, 不会发生明显的内化和脱落, 是治疗非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 理想的靶抗原。其胞外区由 43 个氨基酸残基组成, 但组成的抗原表位却异常多样。目前, 已经有多种针对 CD20 抗原的抗体被 FDA 批准上市, 用于 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的治疗, 都显示出良好的效果。

[关键词] CD20; 抗原表位; 抗 CD20 单克隆抗体

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A

1 免疫治疗理想的靶抗原: CD20

在治疗 B 细胞淋巴瘤时, CD20 分子是理想的靶抗原。它由 297 个氨基酸组成, 分子量为 33 kD, 34 ~ 36 kD 属于非糖基化磷蛋白^[1], 表达于 95% 以上正常或恶化的 B 细胞表面。它起始表达于 pre-B 细胞阶段, 到 B 细胞终端分化成浆细胞时结束, 一直被认为是 B 系细胞表面特有的标识。单核细胞、静息以及激活的 T 细胞、裸细胞以及非淋巴瘤细胞都不表达 CD20 分子。CD20 分子有 4 个跨膜区, 氨基端和羧基端都位于细胞质膜内侧, 在第三跨膜区和第四跨膜区之间, 有一个由 43 个氨基酸残基组成的环区, 构成其主要的抗原表位。CD20 抗原分子比较暴露, 易于接近。CD20 与抗 CD20 抗体结合后内化现象不明显, 因此细胞表面 CD20 分子数量并不因为与抗体结合而大量减少。CD20 也不会发生明显细胞表面脱落的现象, 在人体血清中无游离的 CD20 存在。

虽然 CD20 的功能仍没有完全阐述清楚, 但越来越多的证据表明它具有钙离子通道功能, 是调节 B 细胞增殖、分化信号途径的组分。CD20 位于细胞膜上的脂斑区(lipid rafts)。脂斑区是细胞膜上一个流动而有序的细胞膜微区, 富含鞘磷脂和胆固醇, 被认为是一个信号传导的平台。CD20 与脂斑区 Src 家族的激酶成员(Lyn、Fyn 和 Lck) 以及 PAG(p75/85) 相连, PAG 将 Csk 招集到脂斑区, 从而使 Lyn、Fyn 和 Lck 保持失活状态。当 CD20 在抗体的作用下相互靠近, 发生交联甚至超交联时形成的多聚体发挥钙离子通道的功能, 使细胞外钙离子流入细胞内; 另外, Src 家族的酪氨酸蛋白激酶由于靠近而相互激活, 启动信号传导途径, 动员内源钙库。这两者导致细胞内钙离子浓度的升高, 从而对细胞周期的运行产生影响, 调节细胞增殖与分化, 甚至导致细胞凋亡的发生^[2-3]。

2 抗 CD20 单克隆抗体识别的抗原表位

早期实验结果表明, CD20 胞外 43 个氨基酸残基序列组成了 2 个相互重叠的胞外抗原表位, 一个被绝大多数抗 CD20 抗体所识别, 另一个被具有独特激活效应的抗体 1F5 所识别。但是后来 Polyak 等^[4]发现, 虽然 CD20 胞外区很小, 但是抗 CD20 抗体识别的精细抗原表位却异常多样, 而不是简单的分为两个抗原表位。人源 CD20 胞外区与鼠源 CD20 胞外区 43 个氨基酸残基中约有 16 氨基酸不同。他们以鼠源 CD20 胞外区为模板, 分别将其与人源 CD20 胞外区序列中不同的氨基酸突变成人源 CD20 序列中相应的氨基酸, 证实了不同抗 CD20 抗体所识别的抗原表位具有细微区别(表 1 中 B ~ I 模式)。并证实了 170 位 Ala 和 172 位 Pro 在 CD20 胞外区抗原表位二级结构的维持上起着关键性作用, 它们的改变常会导致抗体识别的抗原表位完全丧失(表 1 中 A 模式)。其结果如表 1 所示。

CD20 胞外区小环不能够使之具有如此之多细微抗原表位的差异。实验结果表明 CD20 可以复合体的形式存在, 一个 CD20 复合体由几个 CD20 分子和一个或一些附加成分组成。有些抗体识别的是由几个 CD20 分子构成的空间表位, 如 2H7 识别的抗原表位比 B1 识别的抗原表位更加依赖于 CD20 多聚体的存在。1F5、B1 和 2H7 都不能够通过免疫印迹的方式与 CD20 抗原结合, 表明这些抗体识别的抗原表位是一个空间表位^[4]。

3 治疗性抗 CD20 抗体

近年来, NHL 发病率逐渐攀升, 严重危害着人类健康。以前的治疗方法无法治愈, 患者最终因淋巴瘤的复发而死亡。研究新型药物用于 NHL 的治疗成为一种必然趋势。抗 CD20 单克隆抗体是一个新的有效抑制肿瘤细胞增长

的治疗方案,在治疗 NHL 中的地位将会逐步提高。

表 1 抗 CD20 抗体与 CD20 胞外区突变体的反应

CD20 模式*	胞外环区的突变体▼	抗 CD20 单克隆抗体▽						
		B1	2H7	1F5	CAT 13.6E12	Rituxan	L27	LT20
人源 CD20 胞外区	KISHFLKMESLNFIIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCY	###	###	###	###	###	###	###
鼠源 CD20 胞外区	tl-----rr-el-qtsk— - vd—d-----s-s-----n	-	-	-	-	-	-	-
A	-----s-s-----	-	-	-	NT [△]	NT	NT	NT
B	tl-----rr-el-qtsk— - vd—d-----s-P-----n	++	-	+/-	NT	NT	NT	NT
C	tl-----rr-el-qtsk— - vd—d----A-P-----n	###	+/-	++	-	###	###	###
D	tl-----rr-el-qtsk— - vd—d----A-P-----Y	###	+/-	++	-	###	###	###
E	tl-----rr-el-qtsk— - IN—N---A-P-----Y	###	###	##	###	###	###	###
F	tl-----rr-el-RAHT—vd—d--- A-P-----Y	++	++	++	+	###	++	###
G	tl-----rr-NF-qtsk— vd—d--- A-P-----Y	++	++	+	-	###	++	###
H	tl-----ES-el-qtsk— vd—d--- A-P-----Y	###	###	++	###	###	###	
I	KI-----rr-el-qtsk— - vd—d--- A-P-----Y	++	+	+	-	++	++	++

▲:引自文献 [4]; *:本列中 A-I 为不同的 CD20 模式; ▼本列中大写字母代表人源 CD20 序列,小写字母代表鼠源 CD20 序列,横杠代表鼠源 CD20 氨基酸序列与人源 CD20 氨基酸序列相同的部分; ▽的所有列中反应强度从弱阳性(+/-)到强阳性(###); △:NT 表明没有测试

3.1 IDEC-C2B8

IDEC-C2B8,又名 Rituximab,商品名为美罗华,1997 年由 FDA 批准上市。它是一个人鼠嵌合抗体,包含鼠源抗 CD20 单克隆抗体 2B8(Ibritumomab)的可变区和人源 IgG1 重链及 κ 链的恒定区,用于 B 细胞淋巴瘤的治疗。美罗华与其亲本抗体具有相似的亲和力与人组织反应活性,在人体内具有更长的半衰期,更小的免疫原性^[5],基本上不会诱发机体产生 HAMA 反应。由于人源 Fc 比鼠源 Fc 能更好与人源补体及效应细胞相互作用,美罗华补体介导的细胞溶解作用(CDC)和抗体介导的细胞毒作用(ADCC)都得到了提高,从而提高了抗体的反应率,延长了反应时间。

3.2 ZEVALIN

2002 年 2 月, FDA 批准了第一个放射性免疫治疗药物——Zevalin。该药由 IDEC 制药公司生产,通用名 Ibritumomab Tiuxetan。FDA 批准此药用于治疗复发性或难治性低恶性度/滤泡性或转化的 B 细胞 NHL,其中包括美罗华难治性的滤泡性 NHL。该产品由小鼠 IgG1-κ 单克隆抗体 2B8(Ibritumomab)连接同位素⁹⁰Y 用于肿瘤治疗。其单抗部分对 CD20 具有极高的特异亲和性^[6]。⁹⁰Y 是一个高能量的单纯释放 β 射线的放射性同位素(2.3 MeV),约 90% 的能力集中在 5 mm 以内,不仅可以杀伤与抗体接合的细胞,还可以杀伤直径范围 12 mm 以内的恶性细胞。⁹⁰Y 的半衰期(64 h)与抗体在体内的生物半衰期一致,因此尿液中⁹⁰Y 的很少,可以忽略

不计^[7]。Zevalin 在肿瘤部位的分布相当于在正常器官分布的 850 倍^[8];正常细胞不受射线危害,对正常器官的放射性在可接受安全值之下^[9]。不需要对病人和医务人员进行保护性隔离^[6]。Zevalin 与其天然抗体具有相似的高的抗原特异性,人组织反应性,潜伏期安全性,在体外、体内的稳定性良好。

3.3 BEXXAR

2003 年 6 月 27 日, FDA 批准 Bexxar (Tositumomab 和¹³¹I Tositumomab)用于治疗癌细胞已经或未发生转移,对美罗华有耐药性,化疗后又复发的 CD20⁺、滤泡性 NHL。它由鼠源单克隆抗体——抗 B1 单克隆抗体(Tositumomab, IgG2a-λ)与放射性同位素¹³¹I 共价偶联而成。¹³¹I 同时释放治疗性的 β 射线和高穿透性的 γ 射线:低能量的 β 射线(0.6 MeV)可以杀伤直径 2 mm 以内的恶性细胞,γ 射线用于精确剂量测定和生物分布研究。根据剂量测定结果可以确定针对个体的抗体用量,最大限度减少血液系统的毒性。Bexxar 是第一个根据患者个体不同来确定用药剂量的抗体制剂。由于¹³¹I-tositumomab 和¹³¹I 在体内的清除速率存在个体差异,在对病人用药之前确定个体用量是必要的。接受 Bexxar 治疗的患者需要在实施放射性保护的病房内进行^[7,10]。在对复发低恶性度转移的 NHL 患者的治疗中, Bexxar 比其冷抗体形式(anti-B1 mAb)有更高的反应率,更长的反应持续时间。

目前上市的这三种抗体都可以通过 CDC、ADCC、诱导

CD20⁺ 细胞发生凋亡或直接抑制恶性 B 细胞的增殖来发挥其治疗效果^[8]。不同的是 Zevalin 和 Bexxar 通过抗体介导放射性同位素到肿瘤部分,发挥放射性细胞毒直接杀伤肿瘤细胞,克服了放疗不能全身给药的缺点;与单纯免疫治疗相比,表现出更强杀伤邻近肿瘤细胞的能力。

多中心临床试验结果表明:目前上市的这三种抗体单独使用都获得了很好疗效。其中美罗华与化疗药物 CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松)联合使用治疗低恶性度或滤泡性 NHL,效果要好于单独使用的效果^[11]。Bexxar 与化疗药物联合使用有协同的治疗效果。Zevalin 和 Bexxar 用来治疗对美罗华治疗有抗性的患者有良好效果^[6,8]。

4 治疗 NHL 中存在问题

对美罗华治疗有反应的 B 细胞 NHL 患者中,复发患者对使用美罗华再次治疗的反应率小于 50%。患者抵抗使用美罗华二次治疗的原因可能是其经过治疗之后,造成了细胞表面 CD20 抗原的丢失,或者亚克隆选择了 CD20⁻ 的 B 淋巴瘤细胞^[12]。不同研究团体都发现了靶细胞表面 CD20 抗原丧失表达的现象。由于许多在经过抗 CD20 抗体治疗后复发的患者没有经过生物活检以确定肿瘤细胞下调表达 CD20 抗原的程度,不能够确定这种现象实际发生的频率^[13-14]。鉴于 CD20 抗原表达的变动性,Haidar 等指出:在使用美罗华治疗 B 细胞淋巴瘤之前确定 CD20 分子在恶性 B 淋巴瘤细胞表面表达是必要的^[12]。

5 展望

使用抗 CD20 抗体治疗 NHL 的费用高,部分患者还发生了 HAMA 和 HACA 的反应,如何使治疗方案更加完善,还需要进一步的探索。

AME-133 是在美罗华基础上应用分子进化的方法构建出的人源化抗 CD20 抗体。它的免疫原性更低,亲和力更高,介导 ADCC 的能力更强,临床应用前景更好。Davies 等^[15] 人将鼠源糖基化酶基因转入到表达人鼠嵌合抗体的 CHO 细胞,表达出的糖基化抗体以 10~20 倍低的浓度就可达到与其亲本相同杀伤 CD20⁺ 靶细胞的效果。IMMU-106 是一种改型抗体,进一步降低了鼠源性,可以通过 ADCC、CDC 和诱导凋亡机制来发挥其抑瘤效果。

抗 CD20-抗 CD3 双特异抗体,保持了亲本抗 CD3 单克隆抗体刺激 PBL 增殖的能力,并可以交联人的 T 淋巴细胞和肿瘤细胞,从而促进 T 淋巴细胞对瘤细胞的杀伤作用,第一次用实验结果支持双特异抗体具有用于治疗 CD20⁺ 的 B 淋巴瘤的潜能^[16]。抗 CD20-抗 CD89 双特异抗体可以招集嗜中性粒细胞作为效应细胞去裂解 CD20⁺ 的肿瘤细胞。

Kunala 等发现:在体外,低剂量照射能够大大并稳定提高 CD20 抗原的表达。Huang 和 Roberts 等则探索调动自身免疫系统的治疗方案。他们将 CD20 抗原与人源 IgG 的 Fc 或钥孔蓝蛋白相连,注入小鼠体内,诱导其产生针对自身抗原的反应^[17-18]。Haisma 等人进行了抗体定向的酶-前药治

疗方案的探索。他们构建了 ScFv 和人 β -葡萄糖苷酸酶的融合蛋白。该融合蛋白保留了其亲本抗体 1H4 的亲合力和结合特异性以及酶的催化活性。当融合蛋白与 Daudi 细胞结合后,前药显示了与其药物形式阿霉素相近的抑制肿瘤细胞增长的活性。上述这些探索都为以后治疗 NHL 提供了良好的思路。

[参考文献]

- [1] Tedder TF, McIntyre G, Schlossman SF. Heterogeneity in the B1 (CD20) cell surface molecule expressed by human B-lymphocytes [J]. *Mol Immunol*, 1988, 25(12): 1321-1330.
- [2] Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: Signaling through lipid rafts [J]. *Immunology*, 2002, 107(2): 176-182.
- [3] Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48(12): 673-683.
- [4] Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure [J]. *Blood*, 2002, 99(9): 3256-3262.
- [5] Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin [J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1392-1398.
- [6] Krasner C, Joyce RM. Zevalin: 90yttrium labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan), a new treatment for non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2001, 2(4): 341-349.
- [7] Bischof Delaloye A. The role of nuclear medicine in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44 Suppl 4: S29-36.
- [8] Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas [J]. *Blood*, 2003, 101(2): 391-397.
- [9] Alcindor T, Witzig TE. Radioimmunotherapy with yttrium-90 ibritumomab tiuxetan for patients with relapsed CD20 + B-cell non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2002, 3(4): 275-282.
- [10] Vose JM. Bexxar: Novel radioimmunotherapy for the treatment of low-grade and transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Oncologist*, 2004, 9(2): 160-172.
- [11] van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, et al. Treatment of relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma with a combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibodies (rituximab) and G-CSF: Final report on safety and efficacy [J]. *Leukemia*, 2003, 17(8): 1658-1664.
- [12] Haidar JH, Shamseddine A, Salem Z, et al. Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy [J]. *Eur J Haematol*, 2003, 70(5): 330-332.
- [13] Clarke LE, Bayerl MG, Ehmann WC, et al. Cutaneous B-cell lymphoma with loss of CD20 immunoreactivity after rituximab therapy [J]. *J Cutan Pathol*, 2003, 30(7): 459-462.
- [14] Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation

of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2003, 102(10): 3514-3520.

[15] Stein R, Qu Z, Chen S, *et al.* Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMM106, and its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8): 2868-2878.

[16] Xiong D, Xu Y, Liu H, *et al.* Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 x anti-CD3 bispecific antibody [J]. *Cancer Lett*, 2002, 177(1): 29-39.

[17] Huang J, Sheu JJ, Wu SC, *et al.* Down regulation of B cells by immunization with a fusion protein of a self CD20 peptide and a foreign IgG. Fc fragment [J]. *Immunol Lett*, 2002, 81(1): 49-58.

[18] Roberts WK, Livingston PO, Agus DB, *et al.* Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3748-3755.

[收稿日期] 2004-07-21

[修回日期] 2004-10-10

[本文编辑] 韩丹, 王莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0079-01

小鼠 SLC 基因真核表达载体的构建及表达

侯丽^{1,2}, 赵跃然^{1,2}, 王来城¹, 焦玉莲¹, 张捷¹, 马春燕¹, 崔彬¹ (1. 山东大学山东省立医院科研中心, 济南 250021; 2. 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

次级淋巴组织趋化因子(secondary lymphoid tissue chemokine, SLC)是重要的 CC 趋化因子,对多种免疫细胞特别是 T 淋巴细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)及 NK 细胞具有趋化作用。研究证实,SLC 通过募集 T 淋巴细胞、DC 和 NK 等免疫效应细胞到肿瘤组织、促进细胞因子的释放以增强肿瘤局部非特异性免疫以及抑制肿瘤血管生成等作用,达到其显著的抗肿瘤效果,是目前肿瘤免疫治疗的理想效应分子。为了进一步探索 SLC 在肿瘤基因治疗中的应用,我们构建了小鼠 SLC 基因的真核表达载体 pVAX1-mSLC,为今后开展体内基因治疗肿瘤奠定基础。

重组质粒 pMD-mSLC、载体 pVAX1 及大肠杆菌 TOP10 由本室保存;引物由上海博亚生物公司合成;COS-7 细胞株购自中国科学院上海生化与细胞生物学研究所;限制性内切酶及 T₄DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均为 MBI 公司产品;DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品;大鼠抗 mSLC mAb 为 R&D 公司产品;酶标二抗兔抗大鼠 IgG-HRP 购自博士德公司;RIPA 细胞裂解液购自申能博彩生物科技有限公司;ECL(enhanced chemiluminescence)化学发光检测试剂盒为 Santa Cruz 公司产品。质粒提取、酶切、连接及转化的主要方法均按常规进行。pMD-mSLC 和 pVAX1 载体均用 BamH I 和 Xba I 双酶切,回收目的基因和载体片段,用 T₄DNA 连接酶将目的片段定向插入到 pVAX1 的相应酶切位点。转化大肠杆菌 TOP10,挑取卡那霉素抗性克隆,行菌落 PCR 初步筛选。引物序列为:上游:5'-ATG ACT CTG AGC CTC CTT AGC-3';下游:5'-TT CCA GAC TTA GAG GTT CCC-3',PCR 扩增产物为 327 bp。扩增阳性菌落,抽提质粒 DNA,利用 HinD III 单酶切鉴定阳性重组子。细胞转染按 BTX ECM830 电穿孔仪转

染哺乳动物细胞方案将重组真核表达质粒转入 COS-7 细胞。转染 72 h 后,分别收集细胞和上清,按照 RIPA 裂解液使用说明进行操作,取细胞裂解液与经 PEG 8 000 浓缩的培养上清混合,Bradford 比色法测定蛋白浓度。常规 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗、二抗反应后,ECL 化学发光试剂盒检测蛋白表达。结果菌落 PCR 和 HinD III 单酶切证实重组质粒 pVAX1-mSLC 构建成功,Western blotting 证实 mSLC 在转染 COS-7 细胞 72 h 后瞬时表达。

次级淋巴组织趋化因子(SLC)又称为 CCL21(CC chemokine ligand 21)、6CKine 等,是重要的 CC 趋化因子成员。国外学者的研究表明,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用的免疫细胞,包括 T 细胞、DC 和 NK 细胞,膜表面均表达 SLC 的受体 CCR7。SLC 通过与 CCR7 结合,募集免疫活性细胞向肿瘤局部迁移、浸润,刺激它们产生 IFN- γ 、GM-CSF、IL-12 等细胞因子,增强非特异性免疫,抑制肿瘤血管生成,因而具有显著的抗肿瘤作用。为研究 SLC 免疫基因治疗肿瘤的特异性作用,我们成功构建了小鼠 SLC 基因的真核表达载体,并实现了在哺乳动物细胞中的瞬时表达,为下一步研究 mSLC 体内基因治疗肿瘤作用提供了实验材料和条件。

[关键词] 次级淋巴组织趋化因子;真核表达;COS-7 细胞;电穿孔

[中图分类号] R573

[文献标识码] D

[收稿日期] 2004-10-18

[修回日期] 2004-12-10

[本文编辑] 韩丹, 王莹

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371304)资助