

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0237-03

抗 CD3/抗肿瘤抗原双特异性抗体介导 T 淋巴细胞抗肿瘤效应与机制研究进展

姚新生¹综述;王小宁²审阅(1. 南方医科大学生物技术学院分子免疫研究所, 广州 510515; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510641)

[摘要] 双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb;或称双功能抗体 bifunctional antibodies)是指通过化学偶联、细胞工程(双杂交瘤细胞)和基因工程方法制备的一种能在体内外分别与两种特异抗原结合并能产生生物学效应的抗体, BsAb 在肿瘤药物导向治疗、免疫学检测和介导细胞毒作用中广泛应用。通过 BsAb 激活免疫系统抗肿瘤治疗的研究中,发现抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 在介导 T 细胞高效特异的抗肿瘤效应的同时,又可以激发机体自身产生和维持较长时间的免疫保护作用,在卵巢癌等十多种肿瘤研究中显示较好的应用前景。

[关键词] 双特异性抗体; 肿瘤治疗; CD3; 副作用

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A

单克隆抗体 IgG 在用于肿瘤的治疗中,除了和 NK、巨噬细胞结合后,因其同时和非细胞毒作用的细胞如血小板、B 细胞、PMN 等带有 Fc 受体细胞结合在治疗中受到一定程度的限制,近些年抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 介导 T 细胞抗肿瘤受到普遍关注,本文就抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 的概况、抗肿瘤治疗的剂量、效应、效靶比及作用机制进行综述。

1 抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 介导 T 细胞抗肿瘤治疗的类型、剂量、效应、副作用及效靶比

目前抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 制备的方法及类型主要有:化学偶联法制备的 BsF(ab')₂;细胞工程法筛选 BsIgG;基因工程法制备的 BsAb, sc-BsAb, diabody, miniantibody 等,不同类型的抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 研究概况:

卵巢癌:CD3/FBP BsF(ab')₂(临床 I/II 期);CD3/EGFR BsF(ab')₂(临床 I 期),CD3/MOV18BsF(ab')₂(临床 I/II 期);CD3/OV-TL BsF(ab')₂(临床 I/II 期)^[3];CD3/EP-CAM BsF(ab')₂(临床 I 期)^[4]。

乳腺癌:CD3/p185HER2 diabody、BsF(ab')₂(临床 I 期)。

肾癌:CD3/P-glycoprotein BsF(ab')₂; CD3/G250 BsF(ab')₂, CD3/EGFR BsF(ab')₂。

前列腺癌:CD3/EGP-2 diabody、BsF(ab')₂(临床 I 期);CD3/PSA BsIgG、BsF(ab')₂^[5]。

胃肠肿瘤:CD3/sle(a) BsF(ab')₂;直肠癌:CD3/17-1A minibody, CD3/CEA diabody;结肠癌:CD3/c-erb2 BsF(ab')₂(临床 I 期);胆道癌:CD3/MUC1 diabody^[6]。

骨髓瘤:CD3/BFA BsF(ab')₂, CD3/p97 BsIgG, BsF(ab')₂, CD3/Wue-1 BscAb(单链抗体)^[7];Hodgkin 淋巴瘤:CD3/CD30 BsF(ab')₂;恶性神经胶质瘤:CD3/NCAM BsF(ab')(临床 I 期)。

黑色素瘤:CD3/GD2 BsF(ab')₂, Bernhard H 等;CD3/P97 BsF(ab')₂。

AIDS:CD3/CCR5 BsF(ab')₂(临床 I 期)^[8];CD3/gp41 BsF(ab')₂(临床 I 期)^[9];CD3/gp120 BsIgG。

多种耐药肿瘤:CD3/Pgp diabody^[10];B 细胞恶性肿瘤:CD3/CD19(CD3/Hu1D10)BsIgG, BscAb(临床 I 期)^[11]。

抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 抗肿瘤治疗的剂量、效应、副作用及效靶比与 BsAb 类型、肿瘤的类型、BsAb 和 T 淋巴细胞及肿瘤细胞的亲和力等多种因素密切相关,如抗 CD3/抗 EGFR BsAb 的浓度为 4 ng/ml 时,对 EGFR 阳性的肿瘤细胞溶解效应可达 60%,而抗 CD3/抗 GD2 BsAb 的浓度需达到 1 000 ng/ml,才能导致 50% 的 GD2 阳性的肿瘤细胞溶解,提示 BsAb 的杀伤效应受抗体的亲和力影响;抗 CD3/抗上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)单链 BsAb 1 ng/ml 能杀伤高度特异性癌症细胞,小范围的清除原发性的卵巢癌组织,在低效靶比和缺乏 T 淋巴细胞协同刺激因子下,亦证实此 BsAb 能招募 T 淋巴细胞并使之活化为高反应和高效应的杀瘤细胞^[1]。

用抗 CD3/抗 EGFR BsAb 在局部治疗神经胶质瘤时, MRI 扫描有效果并能延长存活期,副作用有短暂的发热、恶心、头痛;抗 CD3/抗 CD30 BsAb 治疗霍奇金病淋巴瘤时,发现 BsAb 不在 CD30 阴性的组织中结合定居,也不进入血液循环,对难控制的病人加大剂量研究,无毒性发生;抗 CD3/抗 CD19 BsAb 治疗淋巴瘤时,在非常低的剂量(10~100 pg/ml),表现出明显的细胞毒作用,最低的效靶比是 2:1。而且在 T 细胞没有提前刺激的情况下,4 h 内发挥作用^[2]。把抗 CD3/抗红血球凝集素-神经氨酸苷酶(HN)BsAb 和抗红血球凝集素-神经氨酸苷酶(HN)/抗 CD28BsAb 设计成肿瘤疫苗:用病毒分子 HN 做为普通的外来抗原锚定于肿瘤细胞,同时介

导抗 CD3 和抗 CD28 T 细胞的协同刺激,在自体 BsAb 结合肿瘤靶细胞和 CTL,交叉活化,同时上调 T 细胞的激活标志,这种重组细胞疫苗策略有高度特异性,快速、经济,能得到比较宽范围的应用。

静脉给以抗 CD3/抗 EGP-2 BsAb 治疗肺癌有较好的治疗效果,毒性包括外周血管收缩,呼吸困难和发热,耐受剂量为 5~8 mg/kg;抗 CD3/CD19BsF(ab')₂ 介导 T 细胞对恶性 B 细胞的杀伤时,发热和寒颤取决于 TNF- α 的释放,每天静脉注射 5~10 mg,在 3 个化疗耐受的非霍奇金淋巴瘤,毒副作用观察有发热、寒颤及轻微的紫癜。

在 AIDS 的治疗中,多种 BsAb 被研究应用,包括:抗 CD3/抗 pg41;抗 CD3/抗 gp120;抗 CD3/抗 CCR5;抗 CD3/抗 HIV env 等均证实有明显的疗效。

2 抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 介导 T 淋巴细胞活化抗肿瘤的机制

抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 能激活 T 淋巴细胞通过释放细胞因子、穿孔素、颗粒酶及 Fas/FasL 等多种方式杀伤肿瘤细胞,即使一个特异性的 TCR-MHC 交互作用已经启动,BsAb 仍能特异性直接介导 CTL 对靶细胞的裂解作用,同时抗 CD3/抗肿瘤 BsAb 诱导 T 细胞激活过程中,也将激发 T 细胞上各种刺激的共刺激分子,激活 T 淋巴细胞及 T 细胞效应不受 MHC 限制,人及小鼠 CTL 克隆与 BsAb 结合后可改变 CTL 杀伤靶细胞的特异性,能杀伤包括自体,异体及异种靶细胞。

2.1 激活 T 淋巴细胞的方式和类型

用抗 CD3/抗 G250 BsAb 治疗肾癌,TCR $\alpha\beta$ ⁺ T 淋巴细胞杀伤效应增强,TCR $\gamma\delta$ ⁺ T 淋巴细胞杀伤作用无变化,而用抗 CD3/抗 MOV18 BsAb 治疗卵巢癌实验表明,TCR $\gamma\delta$ ⁺ T 淋巴细胞具有与其同样的杀伤效应。

抗 CD3/抗 erbB-2BsAb 能激活 CD4⁺ 和 TCR $\gamma\delta$ ⁺ T 淋巴细胞,抗 CD3/抗独特型 B 淋巴细胞白血病细胞 BsAb 能特异和同源血清 IgM (从 B-CLL 病人)及带有 CD3 标记的细胞结合,提高 LAK 细胞的杀伤效应;抗 CD3/抗 HER2 BsF(ab')₂ 能激活 CD8⁺ NKT 成功的改道杀伤肿瘤细胞,提示通过 BsAb 提供了一种过继免疫治疗肿瘤的新措施^[12]。

Ohmi Y^[12] 等用抗鼠 CD3/抗人 c-erbB-2BsAb 和卵清蛋白特异性 Th1 或 Th2 细胞及 c-erbB-2-阳性细胞(CMS7HE)作用, Th1 细胞表现为较高水平的 BsAb 依赖,发挥细胞毒作用于 CMS7HE 肿瘤细胞强于 Th2 细胞, Th1 细胞对 CMS7HE 肿瘤细胞在 BsAb 的激发下,产生 IFN- γ , IL-2 和 TNF- α , 在抗人 c-erbB-2-阳性肿瘤细胞植入裸鼠后, BsAb 激活的 Th1 细胞在体内发挥效应,表明 Th1 也可有效应用于过继免疫治疗。

抗 CD3/抗 17-1A BsAb 激活细胞发现 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞两个亚群有不同动力学细胞的毒性, CD8⁺ T 细胞在 4 h 达到最大杀瘤效应, CD4⁺ T 细胞需要 20 h, 达到同样水平的效应,二者的作用和是否加入 CD28 抗体关系不大。

抗 CD3 / 抗独特型 BsAb 治疗 Balb/c 小鼠 BCL1 淋巴瘤,多点注射 BsAb 和抗 CD28 单抗协同 BsAb 用于激活静止的 T 淋巴细胞,在体内研究表明,能激活记忆 T 淋巴细胞,增强他们的抗肿瘤性,但是不能完全激活裸 T 淋巴细胞;抗 CD3/抗 CD10 BsAb 通过激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞阻止 BMT 后白血病的复发,但用抗 CD3/抗 CD22 BsAb 介导淋巴瘤细胞免疫毒性,在体外实验证实是通过 LAK-T 淋巴细胞,而非 T 淋巴细胞;抗 CD3/抗 CA19-9 BsAb 的治疗下,导致 Th1 方向的分化,同时补充 MHC 非依赖的淋巴因子激活的杀伤细胞 LAK 的细胞毒作用,有可能直接对抗异源的肿瘤。

通过基因敲除和刺激,使细胞分泌两种 BsAb(抗 α -CEA/抗 α -CD3 和抗 B7/抗 α -CEA),证实这两种 BsAb 能结合并激活新的靶 T 淋巴细胞,通过细胞毒作用完全废除肿瘤的生长,而且在肿瘤部位引入少量这种细胞能抑制肿瘤的移植,尽管这种方法非常的复杂,但运用自体基因修饰产生细胞打开了一个新的双功能抗体治疗癌症的新的方法—通过基因策略治疗癌症^[13]。

2.2 活化 T 淋巴细胞释放细胞因子的效应机制

以上证实抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 因激活 T 淋巴细胞的类型不同,产生的细胞因子效应机制亦多样化。用抗 CD3 和抗 HER2/neu 制备的 BsAb 在杀伤 HER2/neu 阳性的肿瘤细胞时,通过分泌 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF(浓度分别为 1 699, 922, 和 3 092 pg/ml/10⁶ 细胞/24 h)作用于肿瘤细胞^[14](抗 CD3/抗 EGFR 的 BsAb 亦可使 T 分泌 IFN- γ , TNF 及 GM-CSF);在用 BsAb 局部治疗神经胶质瘤时,发现 IL-2 和 TNF 的水平升高;用抗 CD3/抗 CD19 BsAb 和抗 CD28 协同刺激分子抗体,激活骨髓 T 淋巴细胞治疗 B 淋巴细胞急性白血病,骨髓标本和 BsAb 及抗 CD28 共同孵育 10 d, FCM 检测 T 淋巴细胞和 B 肿瘤细胞的表面标志,同时检测上清液中的细胞因子 IFN- γ , IL-2, IL-4 和 IL-12 增加^[15]。

抗 CD3/抗 CD19 BsAb 在体外和 PBMC、恶性淋巴细胞共同孵育中,能产生 IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, 可溶性 CD4、CD8 和 CD25,但细胞因子的水平及方式和细胞毒并不同步;SCID 小鼠灌注 PBMC 和 EBV,用抗 CD3/抗 CD19 BsAb 和 CD28 单克隆抗体治疗 3 d,结果显示,B 淋巴瘤细胞受到抑制,特异性 T 淋巴细胞产生,CD28 单克隆抗体没有明显的影响,效应取决于 B7-1 在 B 淋巴瘤细胞的表达,和对照组比较,血清中的 IL-10 提高,局部应用抗 CD3/抗 AMOC-31 BsAb 治疗癌症,通过改变 T 细胞的应答而实现,IL-6、TNF、可溶性 CD8 等均明显变化。

3 抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 可通过 Fas/FasL、穿孔素颗粒酶途径、黏附分子等的表达介导的肿瘤细胞溶解

抗 CD3/ BsAb 通过上调激活的自体 T 淋巴细胞表面抗原的表达,提高淋巴瘤 B 细胞 CD95 的水平,尽管抗 CD95 的抗体未能介导淋巴瘤细胞的调亡,但试验表明抗 CD3/抗 CD19 BsAb 介导的 B-CLL 细胞死亡至少有一部份是通过调亡酶途径来实现的^[16];肿瘤相关的淋巴细胞 TALs,在体外没

有预先刺激,和抗 CD3/抗 HEA125 BsAb 共同作用,TALs 表达早期的标志 CD69,但是 CD95 阴性,只有一小亚型的 CD4⁺ TALs 表达 CD25,但对自身肿瘤的溶解,刺激与不刺激的 TALs 没有区别,此研究提供了一种新的思路治疗卵巢癌和乳腺癌,预先刺激增殖的 PBMCs 能够被不需刺激的 TALs 和 BsAb 局部范围治疗所取代^[17]。

抗 CD3 抗 CD30 / BsAb 治疗霍奇金淋巴瘤时,发现 T 细胞激活产生高水平的细胞因子,和细胞毒分子如穿孔素,丝氨酸蛋白酶 A 和 B 的 mRNA 的表达,而抗 CD3/抗 BCL1 独特型 BsAb 引起细胞死亡的机制:用激活的 LAK T 细胞治疗穿孔素敲除或 FasL 缺陷的小鼠,结果表明,在 BsAb 介导 LAK T 淋巴细胞杀伤 BCL1 细胞的过程中,是 Fas 途径而非穿孔素途径。

其他一些研究发现,黏附分子等在抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 抗肿瘤时发挥一定的作用。Azuma A 研究发现预先给以 IFN- γ 能提高 BsAb 激活 LAK 细胞,通过上调 ICAM-1 在肿瘤细胞的表达,提高免疫细胞对肿瘤细胞的敏感性,增强 LAK 细胞在肺小细胞癌中的过继免疫治疗作用;抗 CD3 /抗 NCAM (OE-1) BsAb,能分别激活 CCR7⁺ 为主的记忆 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞(小部分 CCR7 为受动器的细胞);4-1BB 配体(4-1BBL)、TNF 基因超家族和 4-1BB (CDw137)表达于激活的 T 淋巴细胞,传递 T 淋巴细胞激活和增长的协同刺激信号,能同时增强抗 MUC1/抗 CD3BsAb 激活 LAK 细胞和 PBMC 来源 T 细胞,产生 IFN- γ , IL-2, GM-CSF,证实 4-1BBL 基因治疗癌症的可能性^[18-19]。

总之,抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 制备方法多样,其治疗剂量、效靶比、副作用与以下多种因素相关:(1)BsAb 与相应肿瘤细胞和 T 淋巴细胞的亲和力;(2)BsAb 分子量和制备工艺;(3)BsAb 的体内药代动力学等。抗 CD3/抗肿瘤抗原 BsAb 激活 T 淋巴细胞抗肿瘤的机制复杂,主要包括:(1)能激活 TCR $\gamma\delta$ ⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺ T 淋巴细胞的,同时能激活 TCR $\alpha\beta$ ⁺ 不同的亚类,其选择激活机制目前不明确;(2)激活后的 T 淋巴细胞杀伤肿瘤方式多样,目前未找到共性;(3)激活 T 淋巴细胞的信号的转导机制和正常情况下 T 细胞活化异同有待探讨;(4)激活 T 淋巴细胞的 MHC 限制性和第二信号作用等目前还没有完成阐明。

[参考文献]

- Wimberger P, Xiang W, Mayr D, *et al*. Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(2): 241-248.
- Loffler A, Kufer P, Lutterbuse R, *et al*. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19/CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes[J]. *Blood*, 2000, 95(6): 2098-103.
- van Ravenswaay Claassen HH, van de Griend RJ, Mezzanzanica D, *et al*. Analysis of production, purification, and cytolytic potential of bi-specific antibodies reactive with ovarian-carcinoma-associated antigens and the T-cell antigen CD3[J]. *Int J Cancer*. 1993, 55(1): 128-136.
- Wimberger P, Xiang W, Mayr D, *et al*. Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(2): 241-248.
- Katzenwadel A, Schleer H, Gierschner D, *et al*. Construction and *in vivo* evaluation of an anti-PSA/anti-CD3 bispecific antibody for the immunotherapy of prostate cancer[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3A): 1551-1555.
- Takemura S, Kudo T, Asano R, *et al*. A mutated superantigen SEA D227A fusion diabody specific to MUC1 and CD3 in targeted cancer immunotherapy for bile duct carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(1): 33-44.
- Honemann D, Kufer P, Rimpler MM, *et al*. A novel recombinant bispecific single-chain antibody, bscWue-1 x CD3, induces T-cell-mediated cytotoxicity towards human multiple myeloma cells[J]. *Leukemia*, 2004, 18(3): 636-644.
- Bruhl H, Cihak J, Stangassinger M, *et al*. Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: A new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV[J]. *J Immunol*, 2001, 166(4): 2420-2426.
- Yin S, Okada N, Okada H. Elimination of latently HIV-1-infected cells by lymphoblasts armed with bifunctional antibody[J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45(1): 101-108.
- Gao Y, Xiong D, Yang M, *et al*. Efficient inhibition of multidrug-resistant human tumors with a recombinant bispecific anti-P-glycoprotein/anti-CD3 diabody[J]. *Leukemia*, 2004, 18(3): 513-520.
- Gruen M, Bommert K, Bargou RC. T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19/CD3 specific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(7): 625-632.
- Ohmi Y, Shiku H, Nishimura T. Tumor-specific targeting of T helper type 1 (Th1) cells by anti-CD3/anti-c-ErbB-2 bispecific antibody[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1999, 48(8): 456-462.
- Blanco B, Holliger P, Vile RG, *et al*. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells[J]. *J Immunol*, 2003, 171(2): 1070-1077.
- Sen M, Wankowski DM, Garlie NK, *et al*. Use of anti-CD3/anti-HER2/neu bispecific antibody for redirecting cytotoxicity of activated T cells toward HER2/neu + tumors[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10(2): 247-260.
- Pfesser A, Brandl M, Salih H, *et al*. Role of target antigen in bispecific-antibody-mediated killing of human glioblastoma cells: A pre-clinical study[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(4): 612-616.
- Loffler A, Gruen M, Wuchter C, *et al*. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct[J]. *Leukemia*, 2003, 17(5): 900-909.
- Strauss G, Guckel B, Wallwiener D, *et al*. Without prior stimulation, tumor-associated lymphocytes from malignant effusions lyse autologous tumor cells in the presence of bispecific antibody HEA125xOKT3[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(1): 171-180.
- Jensen M, Ernestus K, Kemshead J, *et al*. The bi-specific CD3 x NCAM antibody: A model to preactivate T cells prior to tumour cell lysis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134(2): 253-263.
- Yoshida H, Katayose Y, Unno M, *et al*. A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(2): 97-106.