

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )02-0101-04

· 院士论坛 ·

## 用于肿瘤治疗的抗体及其改造策略

### Antibodies for tumor therapy and their modification strategy

沈倍奋 ( 军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850; E-mail: Shenbf@mx.cei.gov.cn )



肿瘤是当前引起人类死亡的主要疾病之一。近 40 年中, 人类肿瘤的治疗仍主要依靠手术、化疗和放疗。虽然对某些类型肿瘤的治疗是成功的, 但手术结合化疗和放疗尚不能全面降低肿瘤的病死率, 大多数患者化疗后产生耐药、复发, 甚至因肿瘤转移而死亡。肿瘤治疗的目的是尽可能地杀灭瘤细胞, 而不影响正常细胞。抗体由于其特异性高, 对瘤细胞作用的靶向性很强, 理论上可达到特异性杀伤靶细胞的目的; 同时, 抗体用于肿瘤治疗时毒性作用低于小分子药物, 某些抗体药物治疗肿瘤的机制也不同于一般药物, 因此, 抗肿瘤抗体越来越受到人们的重视, 很快将成为全球生物医药领域抗肿瘤的主流。

#### 1 抗肿瘤抗体的发展现状

自 1997 年以来, 每年有 1~4 个治疗性抗体药物被美国 FDA 批准上市, 至 2006 年已有 19 个抗体药物上市, 其中 9 个为抗肿瘤的抗体药物( 表 1 ); 正在进行临床试验和临床前研究的抗体药物有几百种, 占生物技术药物的 30%<sup>[1]</sup>。9 个上市的治疗肿瘤抗体中, 2 个是鼠单抗, 3 个是人-鼠嵌合抗体, 4 个是人源化抗体。

##### 1.1 抗肿瘤抗体的靶抗原分类

抗体治疗作用取决于它所结合的靶抗原的性质, 及抗体本身的结构。目前治疗肿瘤的抗体靶抗原以下几类<sup>[2]</sup>: (1) 靶向实体瘤的抗原主要有 EGF 受体家族, 如 Her2/neu, EGFR, 上皮细胞黏附分子 EpCAM, 癌胚抗原 CEA, TRAIL 受体 DR4 和 DR5, 淋巴毒素  $\beta$  受体等; (2) 靶向淋巴瘤的抗原主要有 CD52, CD20, CD22, CD40 和 CD80 等; (3) 靶向肿瘤基质, 如成纤维细胞激活蛋白 FAP, Tenascin; (4) 靶向肿瘤血管, 如黏连蛋白 ED-B, 睾丸特异性膜蛋白 PSMA 等; (5) 靶向配基, 如 VEGF,  $\alpha$ V $\beta$ 3 等。

表 1 FDA 批准上市的抗肿瘤抗体药物

单抗名称	商品名	靶点	抗体性质	适应证	批准时间
CA17-1A	Panorex	EpCAM	嵌合	结直肠癌	1995.2
Rituximab	Rituxan	CD20	嵌合	淋巴瘤	1997.11
Trastuzumab	Herceptin	HER-2	人源化	乳腺癌	1998.9
Gemtuzumab	Mylotarg	CD33	人源化	白血病	2000.5
Alemtuzumab	Campath-1	HC52	人源化	白血病	2001.5
Ibritumomab-Y90	Zevalin	CD20	鼠源	淋巴瘤	2002.2
Tositumomab-I131	Bexxar	CD20	鼠源	淋巴瘤	2003.6
Cetuximab	Erbix	EGFR	嵌合	结直肠癌	2004.2
Bevacizumab	Avastin	VEGF	人源化	结直肠癌	2004.2

##### 1.2 抗肿瘤抗体的作用机制

分析已上市抗肿瘤抗体的作用机制<sup>[2-3]</sup>, 大致可以分为: (1) 利用抗体的靶向性将细胞毒性物质导向靶部位, 直接杀伤肿瘤细胞<sup>[4]</sup>, 如标记放射性核

素<sup>90</sup>Y 的 Zevalin, 标记<sup>131</sup>I 的 Bexxar, 均用于治疗非霍奇金淋巴瘤; 偶联抗癌药物 calicheamicin 的 Mylotarg

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金资助项目( No. 30490240 )

治疗髓系白血病。(2)借助依赖抗体的细胞毒作用(ADCC)。当抗体结合到肿瘤细胞表面的抗原上以后,抗体的Fc段就与免疫效应细胞表面的Fc受体结合,人嗜中性细胞表达Fc $\gamma$ R I(CD64)、Fc $\gamma$ R II(CD32)和Fc $\gamma$ R III的B亚型(CD16),而NK细胞上只表达CD16A亚型,这种结构有利于募集adaptor蛋白和激活NK细胞。虽然许多抗肿瘤单抗在体外都能介导ADCC效应,但与临床疗效的关系尚未被证实。Rituxan是一个治疗非霍奇金淋巴瘤的有效抗体,对接受治疗患者的Fc受体多态性分析发现,具有高亲和力Fc受体的患者疗效更好,这一结果表明抗体Fc段与Fc受体相互作用的强弱至少对Rituxan的临床效果是重要的,即ADCC效应是Rituxan作用机制之一<sup>[5]</sup>。(3)依赖补体的细胞毒(CDC)。不同亚类的抗体激发CDC反应的能力不同。虽然IgM激活补体最强,但临床不常用,因为它不能通过血管。IgG1和IgG3能有效地激活经典补体途径,当抗原-抗体形成复合物时,抗体上的CH2就与C1q结合,激活补体途径的级联反应,最后形成攻膜复合物,使细胞裂解<sup>[6]</sup>。抗肿瘤抗体的CDC效应与靶抗原在细胞表面的数量和密度有关。有时虽然CDC不是抗体抗肿瘤的主流,但它产生的各种因子可以提高ADCC效应。(4)改变信号通路。大部分肿瘤细胞过表达生长因子受体,在生长因子刺激下,瘤细胞迅速生长,并对化疗药物不敏感。靶向膜上EGFR的抗体Cetuximab和Panitumumab通过阻断受体与配基的相互作用有效地抑制信号转导<sup>[7]</sup>。另一类抗体如Pertuzumab,它阻断受体的异源二聚化,从而抑制信号转导。有的抗体能使靶抗原丰度降低或清除配基,例如抗EGFR的抗体可以降低肿瘤细胞表面受体的丰度,也可以清除VEGF配基。(5)免疫调变也是某些抗肿瘤抗体的作用机制之一<sup>[8]</sup>,如抗CTLA-4抗体、抗CD40抗体、抗CD137抗体等。

## 2 抗肿瘤抗体的改造策略

抗体应用中反映出来的问题是:鼠抗体部分的免疫原性,裸抗体的效应功能不强。近年来,随着结构生物学、生物信息学、计算机科学的迅速发展,借助已有的抗原/抗体序列、结构信息,可以从理论上建立相关数学模型指导实验。这些理论和技术可用于新一代治疗性抗体的设计和改造,不仅使抗体人源化程度更高,而且可以根据治疗的需要改变抗体分子大小和形式,提高或降低抗体的某些效应功能。

### 2.1 抗体人源化改造

利用现在的分子生物学技术,可以将有应用前

景的鼠单抗改造成各种人源化抗体。抗体改造的基本原则是要保持亲本抗体的特异性。人-鼠嵌合抗体是最初的人源化抗体,即将鼠抗体可变区融合到人抗体IgG的恒定区,例如美国FDA批准的Reo-Pro、Rituxan、Remicade、Simulect和Erbitux。嵌合抗体大大降低了鼠抗体的免疫原性,而保持了亲本抗体的特异性和亲和力。在结构生物学、生物信息学和计算机建模技术的帮助下,实现了进一步的抗体人源化改造,包括超嵌合化(hyper-chimerigation)和Ig表面重塑<sup>[9-10]</sup>。前者通过生物信息学分析、选择与被改造的鼠抗体可变区结构最相近的人Ig为模板,将鼠抗体的CDRs插入模板中相应的CDR区;为了保持亲本抗体的特异性和亲和力,一些支持CDR环区构型的鼠Ig框架区氨基酸也相应地移入人Ig框架区。表面重塑技术是将鼠抗体可变区表面暴露的框架区(FR)残基中与人抗体可变区不同者改为人源的氨基酸。由于可变区表面氨基酸的人源化,降低了免疫原性而不影响可变区的整体空间构象,从而保留其与抗原结合的特异性<sup>[11-12]</sup>。

通过上述人源化改造的嵌合抗体,在临床应用中已证明是安全的,但不能完全消除人抗鼠抗体的反应(HAMA反应)。去免疫原性是一项专门的平台技术,如Biovation技术<sup>[13]</sup>,它包括确定和去除鼠抗体上能被人T细胞识别的表位,这样的治疗性抗体不再激活T细胞反应和以后的HAMA反应。由该技术改造的抗肿瘤抗体正进行临床前和临床I期试验。目前对使用这类抗体的75个患者的观察,无一出现可检测到的免疫反应。最近,Dallacqua等<sup>[14]</sup>提出框架改组,该技术是将鼠抗体的6个CDR区以正确的阅读框融合到人Ig胚系框架中构建文库。用抗原筛选,由于筛出的抗体框架来源于与之相匹配的CDR序列和结构,因此它保留了与抗原的最好结合,这种抗体接近于天然的全人抗体。如果抗原分子已经有晶体结构,则还可以采用特异性决定基(specificity determining residues, SDR)移植的方法<sup>[15]</sup>。该方法首先需要分析待改造抗体与抗原的结合位点,找出抗原-抗体复合物中抗体与抗原结合的关键氨基酸;然后从抗体数据库中,根据人和鼠CDR间结构相似性选择人Ig模板;最后将这些决定抗体特异性的关键氨基酸移植到框架相匹配的人抗体相应位置上。经不同人源化方法改造的上市抗体有:Zenapax, Herceptin, Synagis, Mylotarg, Campath, Xolair, Raptiva, Avastin等。

### 2.2 提高抗体效应功能的改造

到目前为止,美国FDA批准上市的治疗性抗体

中有一半是抗肿瘤的抗体。根据这些抗体的作用机制可以进行如下改造,以提高其效应功能。

**2.2.1 提高抗体的 ADCC 效应和 CDC 效应** 抗体的不同亚类和亚型,有不同的生物学效应和作用机制。一般治疗肿瘤的抗体大部分都选择 IgG,因为它稳定性好、易纯化和保存。人 IgG 有 4 个亚型,它们与补体及 Fc 受体的结合能力不同。其中 IgG1 和 IgG3 能结合补体和三类 Fc 受体(Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R II 和 Fc $\gamma$ R III); IgG2 结合补体能力很弱,不结合 Fc 受体; IgG4 不结合补体,与 Fc $\gamma$ RI 结合弱,不与其他两类 Fc 受体结合。Fc 受体不仅对 ADCC 效应很重要,对细胞内吞作用、吞噬作用、抗原提呈以及炎性细胞因子的释放都很重要。

根据与 Fc 受体结合的情况,人 IgG1 在激发 ADCC 效应上是最有效的亚型。因此现在临床应用的用于治疗肿瘤的抗体大都选用该亚型,例如治疗非霍奇金淋巴瘤的抗 CD20 抗体美罗华(Rituxan)。已知 IgG 与 Fc $\gamma$ R 的相互作用依赖于 Fc 区域的寡糖类型及铰链区和 CH2 区的某些氨基酸残基。最近发现从 Fc 的 N-糖基化核上除去岩藻糖,可以大大改善与 Fc $\gamma$ R(如 Fc $\gamma$ R III a)的结合,促进 ADCC 活性<sup>[16]</sup>。

2001 年 Shields 等<sup>[17]</sup>对人 IgG1 Fc 与 Fc $\gamma$ R 及各亚型的结合部位进行了突变分析,确定了在 S298A/E333A/K334A 三个位置上都突变的突变体与 Fc $\gamma$ R III a 的结合增加,相应的 ADCC 活性也增加。该突变体去除岩藻糖后,ADCC 活性进一步增加。这些离体实验的结果还须被体内实验证实。

CDC 效应是抗体治疗肿瘤的主要作用机制之一,它依赖于补体成分 C1q 与抗体铰链区和 CH2 的结合,然后激发补体级联反应系统杀死靶细胞。上市的治疗肿瘤的抗体 Herceptin、CampathH1 和 Rituxan 都具有这一功能。Indusogie 等<sup>[18]</sup>用丙氨酸扫描突变体技术研究了 Rituxan 的 CDC 功能域,找出抗体 CH2 结构域中与 C1q 结合的位点 Asp<sup>270</sup>、Lys<sup>322</sup>、Pro<sup>329</sup>和 Pro<sup>331</sup>,及附近的 Lys<sup>326</sup>、Glu<sup>333</sup>经改造可以增加 CDC 效应。

**2.2.2 免疫细胞因子和双特异性抗体** 除了在抗体上交联放射性核素、药物或毒素可以提高抗体的细胞毒活性外,免疫细胞因子和双特异性抗体也是提高抗体细胞毒活性的策略。免疫细胞因子是抗体与细胞因子的融合蛋白,它赋予细胞因子靶向肿瘤细胞的能力,从而降低细胞因子治疗时的系统性毒性作用。各种细胞因子可以融合在完整抗体或单链抗体的 N 端或 C 端,它们的抗肿瘤效应可能来自于浸润肿瘤的效应细胞的激活,不仅细胞因子激活免

疫细胞,而且可以通过抗体上 Fc 与相应 Fc $\gamma$ R 结合,引起 ADCC 效应,进一步增加抗肿瘤作用<sup>[19]</sup>。

双特异性抗体是可以结合两个不同抗原的抗体。一个抗原结合部位是针对肿瘤相关抗原,另一个是靶向免疫活性细胞,如 T 细胞、NK 细胞等。早期的双功能抗体是通过化学交联或杂交瘤技术获得,抗体形式比较单一;利用 DNA 重组技术可以克服早期双功能抗体的缺陷。以抗体轻、重链可变区为基本单元,可以根据需要来设计不同形式的新型双功能抗体:如缺失 Fc 的抗体,它们不能诱导 Fc 介导的不良反应;多价(三价或四价)的双特异性抗体、小分子抗体,前者可以增加与靶抗原结合的亲和力,后者易掺入肿瘤细胞<sup>[20]</sup>。

### 2.3 抗体为基础的基因治疗

抗体用于肿瘤治疗一般是采用静脉注射,需要量很大,例如 Rituxan, 1 个疗程约需 2 g 抗体;而且单克隆抗体在人体内的半衰期很短,约 2~3 d,人源化抗体半衰期也只能达到 10~20 d,抗体为基础的基因治疗可以克服上述缺点。利用基因工程修饰的细胞在体内分泌可溶性抗体可以替代注射纯化的抗体进行肿瘤治疗。基因工程技术可以修饰自身细胞,然后通过 *ex vivo* 方式注入体内,或将基因工程修饰的异种细胞用微囊技术包裹后注射,或用病毒载体直接转入抗体基因,例如在荷人卵巢癌的裸鼠上注入腺病毒为载体的抗 erbB-2 单链抗体,肿瘤生长明显抑制<sup>[21-22]</sup>。

由于肿瘤细胞免疫原性差,并且很难获得大量肿瘤特异的 MHC-限制的细胞毒性 T 细胞(CTL)。因此,使肿瘤过继性细胞免疫治疗受到很大限制。现在有些新方法将 CTL 靶向到肿瘤细胞表面相应的抗原上,嵌合免疫受体(CIR)就是其中之一<sup>[23]</sup>。它是将一个识别单元融合在穿膜区和胞内区的信号分子上,一般常用抗体的 ScFv 作为识别单元,信号分子可以是一类结构和功能上相关的蛋白,包括 TCR 相关的多肽( $\zeta$  或  $\epsilon$ )和一些 Fc 受体。这一方法已经在各种动物模型上被试验,转入肿瘤特异 CIR 的 T 细胞聚集在肿瘤部位,抑制肿瘤生长。

治疗性抗体作为药物,在设计和改造时除了考虑免疫原性外,还需要考虑亲和力、稳定性、效应功能、半寿期、组织渗透力和组织分布等。随着各种技术的发展,抗肿瘤抗体的改造将适应不同的治疗需要,使抗体药物在肿瘤治疗中发挥更大的作用。

[关键词] 抗体药物;抗肿瘤;分子改造;靶向性

[中图分类号] R392.11 [文献标志码] A

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Sang JK, Youngwoo P, Hyo JH. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies[ J ]. *Mol Cell*, 2005, 20( 1 ): 17-29.
- [ 2 ] Gregory PA, Louis MW. Monoclonal antibody therapy of cancer [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1147-1157.
- [ 3 ] Tanner JE. Designing antibodies for oncology[ J ]. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24( 4 ): 585-598.
- [ 4 ] Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: Prospects and challenges for immunoconjugates[ J ]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23( 9 ): 1137-1146.
- [ 5 ] Cartron G, Dacheux L, Salles G, *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc $\gamma$ R III a gene[ J ]. *Blood*, 2002, 99( 3 ): 754-758.
- [ 6 ] Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, *et al.* Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy[ J ]. *Trends Immunol*, 2004, 25( 3 ): 158-164.
- [ 7 ] Li S, Schmltz KR, Jeffrey PD, *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab[ J ]. *Cancer Cell*, 2005, 7( 4 ): 301-311.
- [ 8 ] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity[ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 3 ): 1089-1096.
- [ 9 ] Gilliland LK, Walsh LA, Frewin MR, *et al.* Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies[ J ]. *J Immunol*, 1999, 162( 6 ): 3363-3671.
- [ 10 ] Marvin JS, Zhu ZP. Computation-based design and engineering of protein and antibody therapeutics[ J ]. *Drug Design Rev*, 2005, 2: 419-425.
- [ 11 ] Morea V, Lesk AM, Tramontano A. Antibody modeling: Implications for engineering and design[ J ]. *Methods*, 2000, 20( 3 ): 267-279.
- [ 12 ] Hwang WY, Almagro JC, Buss TN. Use of human germline gene in a CDR homology-based approach to antibody humanization[ J ]. *Methods*, 2005, 36( 1 ): 35-42.
- [ 13 ] Hellendoorn K, Jones T, Watkins J, *et al.* Limiting the risk of immunogenicity by identification and removal of T cell epitopes ( Delimmunisation<sup>TM</sup> ) [ J ]. *Cancer Cell International*, 2004, 4( suppl ): s20.
- [ 14 ] Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, *et al.* Antibody humanization by framework shuffling[ J ]. *Methods*, 2005, 36( 1 ): 43-60.
- [ 15 ] Kashmiri SV, Depascalis R, Gonzales WR, *et al.* SDR grafting-a new approach to antibody humanization[ J ]. *Methods*, 2005, 36( 1 ): 25-34.
- [ 16 ] Shields RL, Lai J, Keck R, *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc $\gamma$ R III and antibody-dependent cellular toxicity[ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277( 30 ): 26733-26740.
- [ 17 ] Shields RL, Namenuk AK, Hong K, *et al.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc $\gamma$ R I, Fc $\gamma$ R II, Fc $\gamma$ R III, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc $\gamma$ R [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276( 9 ): 6591-6604.
- [ 18 ] Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, *et al.* Engineered antibodies with increased activity to recruit complement [ J ]. *J Immunol*, 2001, 166( 4 ): 2571-2575.
- [ 19 ] Helguera G, Morrison SL, Penichet ML. Antibody-cytokine fusion proteins harnessing the combined power of cytokines and antibodies for cancer therapy[ J ]. *Clin Immunol*, 2002, 103( 3 ): 233-246.
- [ 20 ] Kontermann RE. Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy[ J ]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26( 1 ): 1-9.
- [ 21 ] Sang L, Blanco B, Alvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: Teaching old "magic bullets" new tricks[ J ]. *Trends Immunol*, 2004, 25( 2 ): 85-91.
- [ 22 ] Pelegrin M, Gros L, Dreja H, *et al.* Monoclonal antibody-based genetic immunotherapy[ J ]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4( 3 ): 347-356.
- [ 23 ] Baxevasis CN, Papamichail M. Targeting of tumor cells by lymphocytes engineered to express chimeric receptor genes[ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53( 10 ): 893-903.

[ 收稿日期 ] 2006 - 12 - 11

[ 修回日期 ] 2007 - 01 - 30

[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》，文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方，均应使用阿拉伯数字。（1）公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字，如20世纪90年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08等；年份不能用简称，“1998年”不能写作“98年”。（2）物理量量值必须使用阿拉伯数字。（3）非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字，如3支、5根等。（4）数值范围的表达要求：5万至10万应写成5万~10万，不能写成5~10万； $3 \times 10^9$ 至 $5 \times 10^9$ 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ，或 $(3 \sim 5) \times 10^9$ ，不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$ ；60%至70%不能写成60~70%，应写成60%~70%； $25.5 \pm 0.5$  mg应写成 $(25.5 \pm 0.5)$  mg。（5）带单位的量值相乘时，每个数值后单位不能省略，如4 mm×2 mm×3 mm，不能写成 $4 \times 2 \times 3$  mm或 $4 \times 2 \times 3$  mm<sup>3</sup>。

（本刊编辑部）