

肿瘤生物治疗的抗体研究进展

沈倍奋(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)



沈倍奋 免疫学家,中国工程院院士,一级研究员,博士生导师。主要从事生物化学和免疫学领域的研究,在抗体药物研发以及肿瘤、免疫排斥、自身免疫病等疾病机制及干预策略等领域取得丰硕成果,发表论文 600 余篇、主编专著 5 部,获国家发明专利 30 余项,获国家科技进步奖、国家自然科学基金、军队科技进步奖等 20 余项,2002 年获全军专业技术重大贡献奖、荣获中国“新世纪巾帼发明家”称号,2004 年被授予总后勤部“科学技术一代名师”称号,2008 年获中国免疫学杰出学者奖。在“七五”、“八五”、“九五”期间为“863 计划”生物技术领域专家委员会委员,兼抗体工程专题负责人;现任国家“重大新药创制”重大专项总体专家组成员、中国免疫学会副理事长、中国生物工程学会常务理事、解放军医学科学技术委员会常务委员兼基础医学部主任委员等职务。E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn

[摘要] 抗体已经成为生物制药产业的重要支柱。针对肿瘤生物治疗抗体,介绍了基于抗体工程技术研究的最新进展:包括抗体人源化改造、人源抗体制备、抗体效应功能提高等技术研发情况。基于此,展望抗体研发的新方向。

[关键词] 肿瘤;抗体;生物治疗

[中图分类号] R730.54; R392.11 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2015)02-0166-04

Progress of antibodies in cancer biotherapy

Shen Beifen (Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

[Abstract] The antibody has become an important pillar of the bio pharmaceutical industry. The development of the antibody used to cancer biological therapy was discussed on the basis of antibody engineering technology, including antibody humanization, human antibody preparation, effect function improvement, and so on. Furthermore, the novel direction of antibody research was forecasted.

[Keywords] tumor; antibody; biotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 166-169]

肿瘤生物治疗是继手术、放疗、化疗外的另一种肿瘤治疗模式,近年来发展很快,它主要包括:细胞因子治疗、免疫细胞治疗、基因治疗和抗体治疗等,特别是抗体作为直接的治疗药物广泛用于肿瘤的临床治疗。至 2014 年美国 FDA 已经批准 40 个抗体药物上市,其中 19 个用于肿瘤治疗。肿瘤的生物治疗除了将抗体直接作为药物应用外,也可以与一些细胞因子联合在体外处理从患者体内采集的免疫细胞,然后通过体外培养和扩增后再回输到患者体内,以激发和增强机体自身免疫功能,从而达到治疗癌症的目的。CD3AK 疗法就是其中的一种,它是抗 CD3 单克隆抗体和白介素-2(IL-2)共同激活的杀伤细胞,该细胞具有扩增能力强、体外存活时间较长、细

胞毒活性高、分泌淋巴因子能力强等优点,但这些疗法仍处在研究阶段,需要临床试验进一步证明其疗效。目前肿瘤的生物治疗仍以抗体药物为主,其单独应用或与放疗、化疗药物等联合应用可以消灭残留病灶,防止转移、复发,提高治愈率。2014 年全世界药品销售额前十位的药品中抗体药物就占 5 个(其中 3 个用于治疗肿瘤),抗体药物的迅猛发展得益于抗体工程技术的进步,本文重点介绍抗肿瘤抗体工程技术的最新研究进展。

1 抗体人源化和人源抗体制备技术的进步

最早出现的人源化抗体是人-鼠嵌合抗体,由鼠抗体可变区基因片段连接到人抗体恒定区基因上

获得。一般嵌合抗体的人源化程度可达 70%，大大降低了鼠抗体的免疫原性，例如美国 FDA 批准的 ReoPro, Rituxan, Remicade, Simulect, Synagis 和 Erbitux。嵌合抗体在临床应用中已被证明是安全的，但不能完全消除人抗鼠反应(HAMA)。

抗体进一步人源化的方法很多，最早是 CDR 移植，将鼠抗体的 CDR 移植到人抗体的相应部位，这样人源化程度可达 90% 以上。另一种常用的人源化方法是表面重塑技术，即鼠抗体框架区表面氨基酸的“人源化”。以后 Dall'Acqua^[1]提出框架改组(framework shuffling)的方法进行抗体人源化改造，这种抗体接近于天然的全人抗体。如果抗原有晶体结构，则可以采用特异性决定基(specificity determining residues, SDR)移植^[2]的方法，将这些决定抗体特异性的关键氨基酸移植到相匹配的人抗体相应位置上。

去免疫原性是另一项专门的平台技术，包括确定和去除鼠抗体上能被 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。迄今为止，经不同人源化方法改造的上市抗体有：Zenapax、Herceptin、Campath、Xolair、Raptiva、Avastin、Tysabri、Actemra、Soliris 等。

上世纪九十年代，抗体库技术的出现为抗体人源化和人源抗体的制备开辟了新途径。该技术在体外模拟了抗体的体内成熟过程，从 B 淋巴细胞中扩增全套抗体的轻链和重链基因，克隆到特定载体上，使抗体展示于噬菌体表面，构成噬菌体抗体库，用抗原筛选出表达相应抗体的噬菌体，经扩增、测序可获得特异性抗体基因。如果 B 细胞来源于人外周血，则可得到全人抗体。

抗体基因除了展示在噬菌体表面，也可以展示在酵母、细菌、哺乳动物细胞表面和核糖体上^[3-6]。特别是核糖体展示技术，由于噬菌体抗体库需要通过生物体转化，受转化效率的影响，一般库容不大。而利用 RNA 技术进行的抗体基因核糖体展示不需要通过生物体转化的过程，它完全在体外无细胞体系中进行，从而避免了文库导入细胞所必需的转化步骤带来的转化效率的限制。但从抗体库中获得的抗体往往亲和力不高，需要进行亲和力成熟的改造。用该方法获得的上市抗体有 Humira 等。

另一个制备人源抗体的有效方法是利用转基因鼠，该鼠敲除了鼠源免疫球蛋白基因组，而转入人免疫球蛋白基因组，因此，用抗原免疫后可产生高滴度的人抗体，如：Vectibix 等。转基因鼠技术解决了抗体库技术中抗体亲和力不高的问题^[7]。

随着结构生物学、计算生物学、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、结构信息以及抗原-抗体相互作用模式分析，合理确定功能抗体识别的靶位，进而应用计算机辅助分子设计理论、高通量虚拟筛选技术开展抗体的从头设计成为研究的热点。由于该方法回避了杂交瘤技术、抗体人源化技术、抗体库技术等，必将有着广泛的应用前景。

2 提高抗体效应功能的策略

治疗性抗体的作用机制有多种，主要可归为 2 个基本类型：一类是依赖于它们的抗原结合功能，例如抗体与抗原结合后阻断或中和靶分子的生物学活性、利用抗体的靶向性，将细胞毒性物质导向到靶部位、抗体与细胞膜抗原结合后诱发信号传导的改变，引起细胞凋亡等；另一类除与它们的抗原结合能力有关外，还与抗体的 Fc 结构有关，如：抗体 Fc 与相应细胞上的 Fc 受体结合，可激发抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和依赖补体的细胞毒效应(CDC)，如：Herceptin、Erbitux 通过 ADCC 发挥治疗作用，Rituxan 则通过 CDC 和 ADCC 发挥作用，因此，改进抗体与 Fc γ Rs 或补体的结合，可以提高它们的治疗效果。根据上述作用机制，可针对性地对抗体药物进行改造，提高其效应功能^[8]。

2.1 改造抗体的 Fc 增加 ADCC 和 CDC 效应

改造抗体 Fc 使之提高与 Fc γ R 的亲和力是改进治疗效果的方法之一。影响 Fc 与 Fc γ R 结合能力的因素有 2 个，一是 Fc γ R 上的氨基酸序列，另一个是 Fc 的糖结构模式(glycoform)，人 IgG1-Fc 连接的寡糖是双触角复合型的，具有一个核心结构，核心结构中有岩藻糖的抗体其 ADCC 效应差，没有岩藻糖的抗体其 ADCC 效应明显提高，岩藻糖的存在与否不影响抗体与抗原结合及 CDC 效应。因此，提高 ADCC 的策略有：(1)在抗体的 Fc 上进行氨基酸突变，选择 ADCC 效应高的突变体；(2)去除抗体 Fc 连接的寡糖上的岩藻糖。2013 年 11 月 FDA 批准的罗氏公司的 Gazyva(obinutuzumab, GA101)就是一种低岩藻糖的人源抗 CD20 抗体^[9]，对于人类弥漫型大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)及套细胞淋巴瘤(MCL)的研究^[10]显示该抗体的活性优于美罗华(rituximab)。

提高 CDC 效应的策略有：(1)突变恒定区的氨基酸，增强其与 C1q 的结合能力，提高 CDC 效应，(2)将人 IgG1 和 IgG3 重链恒定区序列进行 DNA 改组(DNA shuffling)，筛选出 CDC 活性高的组合。

2.2 以抗体为导向载体的免疫结合物

免疫结合物是以抗体或抗体片段为载体连接放射性核素、药物或毒素构成。这些细胞毒性物质大大增强了抗体杀伤靶细胞的能力。2002 年和 2003 年美国 FDA 分别批准在抗 CD20 抗体上连接放射性同位素 Y^{90} 和 I^{131} 的 Zevalin 和 Bexxar 用于治疗淋巴瘤。抗体交联小分子细胞毒药物也称 ADC (antibody-drug conjugate) 药物, 2011 年美国 FDA 批准的 Brentuximab vedotin (Adcetris) 是抗 CD30 抗体与 monometauristatin E 的化学偶联物, 治疗霍奇金淋巴瘤和复发性间变性大细胞淋巴瘤。2013 年批准 Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla, T-DM1) 是抗 Her2 抗体上交联 DM1, 治疗乳腺癌^[11]。ADC 药物的概念很早就提出来了, 早期的 ADC 药物由于抗体的特异性差、细胞毒分子的毒性不够强、交联的接头分子不够稳定等原因, 在实际应用时效果不理想, 2000 年批准的 Mylotarg (抗 CD33 抗体上连接 ozogamicin 治疗白血病) 因为疗效不明显, 毒性较大于 2010 年撤市。近年来组成 ADC 药物的抗体、linker 和细胞毒分子的研究都有很大进展, 表现在: 特异性好、免疫原性低且易内化的抗体; 在人体血液循环中稳定, 不被降解, 而到达靶细胞后断裂的 linker, 如二硫化交联剂、酸敏感和肽酶敏感的交联剂等; 以及细胞毒性极高的药物分子, 如刺孢霉素、美登素、甲基奥他汀 E 等, 在一个抗体分子上只要交联 3 或 4 个细胞毒分子就足以杀死靶细胞。目前 ADC 药物发展渐趋成熟, 成为世界各大制药公司进行抗体药物研发的热点之一。

2.3 双特异性抗体

大部分疾病都涉及多个靶点或多种信号通路, 因此, 双特异性或多特异性抗体就可以同时与两种以上抗原发生反应, 并使之交联, 因此, 双特异性抗体可更好地行使效应分子的功能, 目前双特异性抗体从作用机制上可分为双重信号阻断型和抗 CD3⁺ T 细胞介导的双特异性抗体; 从结构上可分为由单链抗体或 Fab 区组成的小型抗体和全抗体, 如: BiTE (bispecific T-cell engager)、DVD (dual-variable domain); 从制备上可分为单细胞内表达和双细胞系表达结合体外装配等方式。2009 年欧盟批准双特异性抗体 catumaxomab 上市, 治疗癌性腹水, 该抗体同时针对肿瘤细胞上的上皮细胞粘附分子 (EPCAM) 及淋巴细胞上的 CD3 分子。2014 年美国 FDA 批准的 Blincyto 是抗 CD19 和 CD3 的 BiTE 型双特异性抗体, 它们可以通过激活 T 细胞来杀死肿瘤细胞^[12-13]。

提高抗体效应功能的方法有很多, 在进行抗体改造的时候, 应该有目的地选择合适的方法进行。

3 新靶点抗体

肿瘤免疫治疗是一种通过激活人体自身免疫系统来对抗肿瘤的治疗方法, 在了解抗肿瘤免疫的产生和调节机制后, 提示至少在几个阶段可以进行治疗性干预, 其中克服肿瘤部位的免疫抑制尤为重要, 因此, 除了直接针对肿瘤的靶点外, 将人体自身免疫系统的抑制分子作为靶点, 特别是针对免疫检查点的抗体在肿瘤治疗中取得显著成绩, 例如: 2011 年美国 FDA 批准的抗 CTLA-4 全人抗体 Ipilimumab 不仅在黑素瘤, 而且在肾癌和肺癌患者中均取得令人惊喜的疗效, 另一个免疫检查点分子 PD1 的阻断抗体 Nivolumab 和 Pembrolizumab 于 2014 年被批准上市, 治疗晚期黑素瘤, 显示较好疗效。其它适应症, 如非小细胞肺癌正在进行临床试验^[14]。MEDI4736 和 MPDL3280A 是两个靶向 PD1 配体 PD-L1 的抗体, 目前正在进行治疗非小细胞肺癌的 III 期临床试验。其它可以作为新靶点的免疫检查点分子有: LAG3 (淋巴细胞活化基因 3 蛋白), KIR (杀伤细胞免疫球蛋白样受体), IDO1 (吡啶胺 2,3-双加氧酶 1), 4-1BB (肿瘤坏死因子受体超家族成员 9) 和 OX40 (肿瘤坏死因子受体超家族成员 4)。

4 展 望

作为治疗制剂, 抗体最早用于病原微生物感染引发的疾病治疗。随着基因工程技术趋于成熟, 抗体研发进入了新的阶段。今后几年抗肿瘤抗体药物的发展趋向: (1) 抗体上连接细胞毒性分子, 即 ADC 药物; (2) 敲除抗体 Fc 上的岩藻糖, 增加 ADCC 效应; (3) 利用免疫系统上的靶分子制备双特异性抗体等。

[参 考 文 献]

- [1] Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, et al. Antibody humanization by framework shuffling [J]. *Methods*, 2005, 36(1): 43-60.
- [2] Kashmiri SV, Depascalis R, Gonzales WR, et al. SDR grafting-a new approach to antibody humanization [J]. *Methods*, 2005, 36(1): 25-34.
- [3] Mazor Y, Blarcom TV, Mabry R, et al. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(5): 563-565.
- [4] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(1): 28-40.

- [5] He M, Khan F. Ribosome display, next-generation display technologies for production of antibodies in vitro [J]. *Exp Rev Proteomics*, 2005, 2(3): 421-430.
- [6] Mitchell Ho, Ira Pastan. Mammalian cell display for antibody engineering [J]. *Met Protocols*, 2009, 525: 337-350.
- [7] Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9):1117-1125.
- [8] Kubota T, Niwa R, Satoh M, et al. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions [J]. *Cancer Science*, 2009, 100(9): 1566-1572.
- [9] Goede V, Klein C, Stilgenbauer S. Obinutuzumab (GA101) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell non-Hodgkin's lymphomas: A glycoengineered type II CD20 antibody [J]. *Oncol Res Treat*, 2015, 38(4):185-192.
- [10] Morschhauser FA, Cartron G, Thieblemont C, et al. Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma or mantle - cell lymphoma: Results from the phase II GAUGUIN study [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(23): 2912-2919.
- [11] Peddi PF, Hurvitz SA. Ado - trastuzumab emtansine (T-DM1) in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive metastatic breast cancer: Latest evidence and clinical potential [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, 6(5): 202-209.
- [12] Hoffman LM, Gore L. Blinatumomab, a bi-specific anti-CD19/CD3 BiTE(®) antibody for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: Perspectives and current pediatric applications [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 63.
- [13] Zimmerman Z, Maniar T, Nagorsen D. Unleashing the clinical power of T cells: CD19/CD3 bi-specific T cell engager (BiTE ®) antibody construct blinatumomab as a potential therapy [J]. *Int Immunol*, 2015, 27(1): 31-37.
- [14] Rajan A, Gulley JL. Nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) in patients with advanced non - small cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2014, 3(6): 403-405.
- [收稿日期] 2015 -03 -01 [修回日期] 2015 -03 -10
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公共利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 www.chictr.org, 公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

(本刊编辑部)