

针对CD33分子的抗体偶联药物的研究进展

张珍珍 丁倩 汤沁 李红蕊 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058)

摘要 单克隆抗体因具有分子量小、毒副作用低、靶向性好等优点, 近年来已成为肿瘤治疗用药的主要方式。CD33分子是免疫球蛋白超家族成员, 同时也是唾液酸依赖的免疫球蛋白样凝集素家族的成员, 在免疫调节过程中具有重要作用。CD33分子特异表达于白血病细胞表面而在造血干细胞中不表达, 因而成为白血病免疫治疗的理想靶点。以CD33为靶点的抗体药物主要有CMA676、HUM195、AVE9633、WM53及HIM3-4等, 目前大多处于临床试验阶段。该实验室也在进行抗CD33全人源抗体的研究, 利用噬菌体展示技术筛选与CD33胞外区特异性结合的单链抗体, 并构建免疫毒素和抗体偶联药物以研究其体内外抗肿瘤作用。该文针对CD33分子及其抗体偶联药物的现状及趋势作一综述。

关键词 CD33分子; 抗体偶联药物; 免疫毒素; 白血病; 靶向治疗

Progress in Antibody-Drug Conjugates Directed against CD33

Zhang Zhenzhen, Ding Qian, Tang Qin, Li Hongrui, Zhan Jinbiao*

(Department of Biochemistry, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract Monoclonal antibody has become an important drug modality for the treatment of cancer, with the advantages of low molecular weight, low toxic effect and precise targeting. CD33 belongs to the immunoglobulin superfamily and is one of the sialic acid dependent IG-like lectin family, which plays an important role in the immune system. Most acute myelocytic leukemia (AML) cells, but not the surface of stem cells, have CD33 overexpression which makes the molecule an ideal target for AML therapy. Several antibody drugs directed against CD33 including CMA676, HUM195, AVE9633, WM53 and HIM3-4 have been reported. In our lab, a phage-displayed human antibody library has been constructed and scFv antibodies specifically targeting against CD33 have been identified. On the basis of the scFv sequences, the specific immunotoxins have been developed and tested the cytotoxicity and anticancer activity *in vitro* and *in vivo*. This review focuses on the structure and function of CD33 and the development of antibody drugs for CD33.

Key words CD33; antibody-drug conjugate; immunotoxins; leukemia; targeted therapy

单克隆抗体只识别一种抗原表位, 可特异结合肿瘤细胞, 从而可以用于肿瘤的诊断和靶向治疗。单克隆抗体由于靶向性好、临床疗效显著, 已逐步

成为国际生物制药领域的热点。自杂交瘤技术创立以来, 单克隆抗体在医学诊断领域扮演了重要的角色, 但由于存在鼠源抗体的免疫源性, 在治疗领域的

收稿日期: 2013-08-05 接受日期: 2013-10-08

浙江省重大科技专项(批准号: 2009C13041)、国家自然科学基金(批准号: 30670424)和中央高校基本科研业务费专项资金资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

Received: August 5, 2013 Accepted: October 8, 2013

This work was supported by the Major Projects of Science and Technology of Zhejiang Province (Grant No.2009C13041), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30670424) and Fundamental Research Funds for the Central Universities

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-11 15:24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0236.html>

作用受到限制。随着近代分子生物学技术的发展,特别是噬菌体展示技术的发展使得人源化单抗的筛选成为可能。近年来,单抗与细胞毒性药物的结合物——抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)也加入到抗癌药物的行列中,并展现出良好的临床治疗效果。

免疫疗法成为继化疗和骨髓移植后治疗白血病的新方法,因其毒副作用低、特异性强等优点而得到广泛应用,在常规化疗和移植过程中联合抗体治疗,也得到了良好的效果。白细胞在正常分化的不同谱系和不同阶段以及活化过程中,会呈现不同的细胞表面标志物,即白细胞分化抗原,血液系统恶性肿瘤细胞会特异性或过量表达某些分化抗原。CD33是髓系分化抗原,主要分布在髓系血细胞,在多种白血病细胞中都有表达,特别是急性髓系白血病(AML),而在正常造血干细胞和其他成熟细胞表面没有表达,因而成为白血病免疫治疗的良好靶点。目前,已有一些抗CD33的抗体药物用于临床治疗,多数还处于临床试验中。针对CD33的抗体药物研发已经成为生物制药领域的一个热点,为白血病的诊断和治疗提供了新的视角。

1 CD33分子概述

CD33分子是一种跨膜糖蛋白,特异性表达于造血系统细胞表面,基因位于人的第19号染色体上。它是免疫球蛋白超家族的一个成员,有两个免疫球蛋白样胞外结构域,同时也是唾液酸黏附免疫球蛋白样凝集素家族的第四个成员,与唾液酸黏附酶、CD22及髓磷脂结合糖蛋白共同组成了黏附素家族^[1]。

1.1 CD33分子的结构及功能

CD33是一个分子量为67 kDa的I型跨膜受体蛋白,由364个氨基酸组成。其N-端位于胞外,末端氨基酸组成一个保守的V-set免疫球蛋白样结构域和一个可变的C2-set结构域,其中V-set与唾液酸特异性识别并结合;胞质尾端有一个免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)和一个ITIM样结构,通过与酪氨酸磷酸酶结合向胞内传递抑制性信号,从而达到调节细胞生长的目的^[2]。CD33分子中的ITIM序列与其他Siglecs不同,其酪氨酸前面的疏水氨基酸被亮氨酸和苏氨酸取代。对其一级结构分析可知,各种生物中CD33分子有高度保守性。人类CD33分子的结构示意图见图1。

当CD33表达于细胞膜表面时,它可以作为一个唾液酸依赖的细胞黏附分子发挥作用,在唾液酸存在的环境下介导分子间的互作,进而起到调节靶细胞增殖和分化的作用。CD33分子具有柔性结构域,可以与多种分子结构发生结合,它介导分子间互作的能力取决于造血细胞分化的阶段^[1],并且这种能力可以通过内源性复合双糖来调节。CD33的表达方式说明,它表达于正常和白血病淋巴细胞表面,可以通过表达量差异指示这些细胞的活化状态并给予调节,在免疫系统中作为识别分子发挥着重要作用。

1.2 CD33分子的表达及两种亚型

研究表明,CD33是髓系细胞的特异性白血病抗原,在造血干细胞中不存在而表达在造血细胞亚群中。这一表达沿着骨髓单核细胞的分化持续进行,直到粒细胞阶段才被抑制,但在单核小细胞和小噬

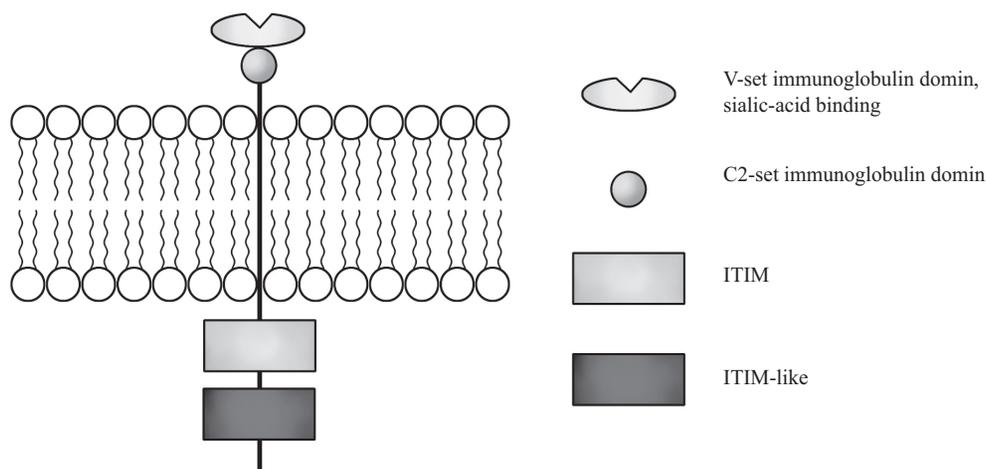


图1 人源CD33分子结构图

Fig.1 Structure of human CD33

细胞中仍然存在。近期针对它在T/B淋巴细胞及NK细胞中的表达得到了一些研究结果: 分裂素及异型抗原激活的人类T细胞和NK细胞的许多亚群在蛋白和核酸水平都表达CD33分子, 其中淋巴系CD33蛋白(CD33m)分子量较小。经实验证明两种亚型有相同的信号肽、免疫球蛋白样结构域C2区、跨膜区及胞内区, 但CD33m缺少位于胞外与配体结合的可变区, 这一可变区是由第二个外显子编码的免疫球蛋白样结构域, 这说明CD33不仅是髓系抗原也是淋巴系抗原, 它的表达存在细胞类型特异性及翻译后修饰, 并以两种剪接突变体形式存在。对新生儿科AML患者的研究发现, CD33在不同白血病细胞表面的表达有很大差异性: CD33表达量增加与不利的疾病特征和低危发病有直接相关性^[3]。

1.3 CD33相关的唾液酸依赖性免疫球蛋白样凝集素(Siglecs)家族

唾液酸依赖性免疫球蛋白样凝集素(Siglecs)是最典型的I型糖蛋白凝集素, 在N-末端具有一个保守的V-set免疫球蛋白样结构域和几个可变的C2-set结构域。依据序列相似性和进化保守性, 将它们分为两类: 一类是唾液酸凝集素(Siglec-1)、CD22(Siglec-2)、MAG(Siglec-4)和最近发现的Siglec-15, 它们之间相关性极低; 另一类是CD33相关的siglect, 它们序列保守性达到50%~99%, 但经过基因缺失、基因转变和外显子重排等复杂的过程迅速进化。人类CD33相关的siglect由9个CD33相关的siglect和1个siglect样蛋白组成。Siglect主要表达于造血和免疫系统, 相比之下, CD33相关的siglect在人类固有的免疫系统中表现出更复杂的表达模式。它们主要表达在自身免疫系统成熟细胞中, 如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、DCs及肥大细胞等。大量研究都表明, CD33相关的siglect在调节白细胞活动中有重要的作用, 包括抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制细胞激活、诱导炎症细胞素分泌及在DC细胞中存在Siglec-H的情况下可以抑制 α -干扰素的产生等, 其中最重要的功能是它们可以通过抑制增生或诱导凋亡来调节细胞生长和生存^[2]。

2 CD33发挥作用的分子机制

CD33分子通过其ITIM模序向胞内传递抑制性信号, 起到阻断细胞内信号通路的作用: CD33分子的胞质尾部有一个ITIM结构及ITIM样结构, 其基本

组成为I/VxYxxL(I:Ile, V:Val, Y:Tyr, L:Leu), 当CD33分子受到外界信号刺激(经药物处理或发生受体交联)时, 其胞内ITIM中的酪氨酸会发生磷酸化进而激活CD33分子。ITIM中的酪氨酸发生磷酸化后可被Src分子上的SH-2结构域识别并结合, 从而招募Src并使之活化。有活性的Src可以进一步通过磷酸化而激活位于胞膜上的酪氨酸磷酸酶-1(SHP-1)及酪氨酸磷酸酶-2(SHP-2)。SHP-1是信号调节的一个多样性配体, 其受体可以是蛋白酪氨酸激酶(PTK)、细胞因子、T/B/NK细胞受体等。SHP-1与其受体结合, 可以使胞内信号分子磷酸化水平减弱从而抑制或阻断已活化的信号传导过程。SHP-1被磷酸化以后可以暴露其SH-2位点, 从而结合有活性的CD33分子进而抑制其信号传导过程。综上, CD33分子的活化及与SHP-1的结合可能会传递抑制性的信号, 并影响邻近膜受体的功能。但目前为止, CD33信号传导上游及下游途径还没有很好地描述, 但很多实验模型都显示其下游传导有Syk、c-Cbl、Vav及ZAP-70的参与^[4-5]。在CD33与细胞耦合的级联放大反应中, 蛋白激酶Syk是个必不可少的因素。功能研究显示, 在髓系细胞中Syk激活与细胞黏附、吞噬、增殖和分化有关, 包括Syk导致PLC- γ 磷酸化而使大量钙离子进入细胞, 后期信号事件如转录因子NF- β 激活等为细胞增殖和凋亡提供了联系^[6]。

3 抗CD33抗体药物

CD33在90%的急性髓系白血病(AML)细胞中有表达, 虽然在髓系造血祖细胞中也有表达, 但在正常造血干细胞中没有表达, 研究证明靶向清除CD33阳性细胞后经过培养可以恢复其造血功能。所以, CD33成为AML特异性免疫治疗的理想靶点, 进而CD33单抗的筛选及利用成为医学界研究的热点。CD33单抗通过ADCC及CDC等介导细胞毒性而产生抗肿瘤效应。免疫治疗发展早期, 曾利用鼠抗CD33单抗M195、p67.7及HIM3-4等研究发现它们能激活补体介导的细胞毒作用、诱导细胞内吞和巨噬细胞趋化等, 但由于鼠源抗体的免疫原性限制了其重复使用。随着抗体人源化技术和抗体工程的发展, 得以成功构建出人源化的抗体, 克服了免疫原性的缺点, 取得良好的临床治疗效果。近年来, 抗体与毒素及药物结合形成抗体偶联物(ADC), 增强了抗体的细胞毒性作用。目前, 有多种抗CD33抗体药物

已经上市或正在临床试验中(表1)。

3.1 hp67.6单抗及其偶联物

3.1.1 单克隆抗体hp67.6 hp67.6是基础和临床研究比较早的一个抗CD33人源化单抗, 主要用于靶向治疗AML。它属于IgG4, 来源于骨髓瘤细胞, 其前体是鼠源性单抗p67.6。后期研究人员利用基因工程技术把p67.6的CDR区与人源IgG4的恒定区结合制备出人源化的hp67.6, 其中包含98%的人源化序列, 克服了其免疫原性, 同时也增加了介导ADCC的作用。

3.1.2 hp67.6抗体偶联物 CMA-676(gemtuzumab ozogamicin, GO), 商品名为Mylotarg, 是由重组人源化单克隆抗体hp67.6与强效细胞毒抗肿瘤抗生素N-乙酰卡奇霉素衍生物(CLM)偶联形成的抗体偶联物

(ADC)^[7]。其结构如图2所示。

3.1.3 CMA-676的作用机制 当药物由静脉注射进入病人体内时, 抗体偶联物(ADC)中的抗体部分会特异性与靶抗原CD33结合, 形成抗原抗体复合物介导细胞的内吞作用, 经内吞形成小泡进入细胞。小泡与胞内溶酶体接触并发生膜融合使抗体进入溶酶体。由于溶酶体内的酸性环境的影响, 连接抗体与毒素的Linker不稳定而发生水解, 释放出CLM。游离CLM进入细胞核内, 通过序列特异性方式与DNA小沟结合, 使脱氧核糖环上的氢原子发生转移, 从而使DNA双螺旋结构发生改变而断裂, 达到诱导肿瘤细胞凋亡的作用。Easter等^[8]在体外实验中发现, 通过ATM/ATR2Chk1/Chk2激酶通路, 卡奇霉素可以

表1 临床应用中的抗CD33抗体偶联物

Table 1 ADC targeted CD33 in the clinical application

抗体偶联物名称 ADC	抗体类型 Type of antibody	偶联物 Conjugates	连接类型 Type of linker	作用机制 Mechanism	适应症 Adaptation disease	试验阶段 Testing stage
CAM-676	IgG4 (hp67.6)	CLM	Acylhydrazone	Induce DNA damage by changing H position of pentose	AML APL ALL	Listed (withdraw in 2010)
HUM195 coupling of isotope	IgG2a (HUM195)	¹³¹ I ⁹⁰ Y; ²¹³ Bi ²²⁵ Ac	Oxidation\ Chelation	Release α , β , γ particles and kill cells directly	AML ALL	I
HUM195 coupling of toxin	IgG2a (HUM195)	rGel	N-succinimidyl3- maleimidopropionate	Hydrolyze 60s glyco- sidic bond in ribosome of eukaryon	AML CMML	I/II
AVE9633	IgG1 (huMy9-6)	DM4	Disulfide linkage	Inhibit combination and assembly of microtubule	AML CML MDS	I
SGN-CD33A	IgG1 (h2H12)	PBD-dim- mer	Peptide linkage	Stop cell cycle damage plastosome and DNA	AML	I

CLM: N-乙酰卡奇霉素衍生物; rGel: 重组多花白树毒蛋白; DM4: 巯基美登素衍生物; PBD: 吡咯开苯并吡庚三烯。

CLM: calicheamicin; rGel: rGelonin; DM4: maytansine; PBD: pyrrolbenzodiazepine.

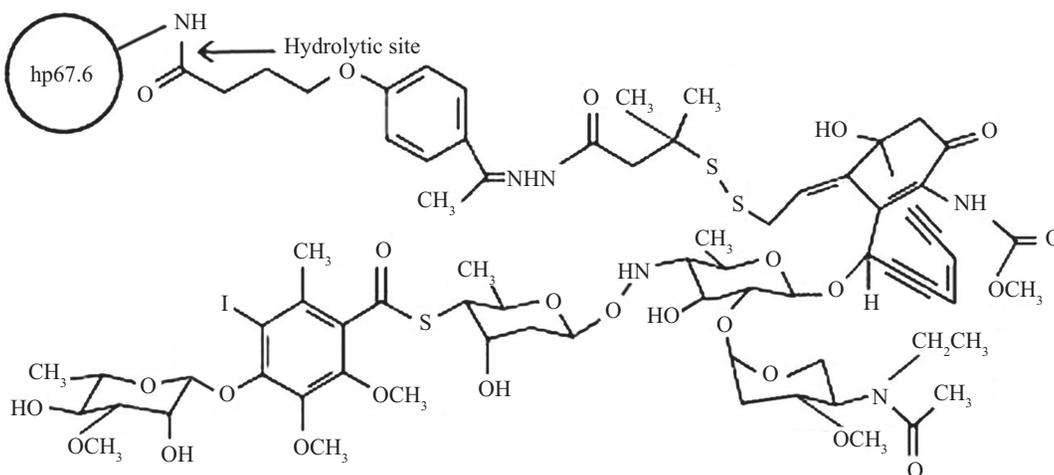


图2 CMA-676结构图

Fig.2 Structure diagram of CMA-676

使靶细胞停滞在G₂期,并通过Caspase途径诱导细胞凋亡。

3.1.4 CMA-676的功能 2000年5月,CMA-676被FDA正式批准作为单药治疗年龄大于60岁、首次复发并不能进行其他化疗的老年AML病人。此外,也有关于使用CMA-676治疗儿童AML的试验报道。作为首个被批准用于AML治疗的免疫制剂,它极大推动了后期对肿瘤特异性抗原的研究及抗肿瘤免疫药物的应用。但是,CMA-676是通过快速审查程序通过上市,近来很多临床数据显示该药除了有明显的肝脏毒性外还存在新的安全问题,且药效与已有药物相比没有更多的优势,2010年辉瑞公司宣布自愿将其撤出美国市场。近几年,CMA-676与其他疗法联合使用治疗白血病的临床试验仍在进行,在改进临床用药方案后,有可能重回市场。下面就CMA-676的功能作简单介绍。

Larson等^[9]的试验证明,CMA-676单药可治疗复发及难治性AML:剂量安全试验中每次静脉滴注剂量为(0.25~9) mg/m²,两周后重复给药一次。结果有8例患者骨髓祖细胞恢复正常,其中5例白细胞计数恢复正常,3例血小板计数同时也恢复;在粒细胞明显增加的9位患者中,有8例在用药后出现粒细胞缺乏,其中1例在二次用药后50天死于败血症,期间并没有发现剂量依赖性的细胞毒副作用。随后的II期试验对104例复发AML进行了用药。标准剂量为9 mg/m²,同样两周后重复一次。结果有32例患者重新获得完全缓解(CR),其中3位预后接受化疗,14位接受了干细胞移植,后死亡2例。另外15例未进行缓解后治疗的患者保持无病生存。这一试验证明,该药可以选择性地杀伤病人体内的肿瘤细胞,具有缓解症状的作用。其后,美国和欧洲多家治疗中心展开试验,观察CMA-676单药治疗复发难治性急性白血病的疗效。对CD33阳性细胞株的体外研究发现,CMA-676主要通过非凋亡途径诱导细胞死亡,其细胞毒性与表面抗原数量有关,并呈剂量依赖性关系。治疗过程中主要的不良反应为转氨酶升高、胆红素升高等肝脏毒性和骨髓可逆性抑制等。

CMA-676还可与化疗药物共同作用来治疗复发及难治性AML:目前化疗仍是治疗AML主要的手段,通常在治疗方案中会大量使用化疗药物如阿糖胞苷、去甲氧基柔红霉素和足叶乙苷等,它们在信号转导中导致细胞毒性的作用机制也是近来才被

广泛了解。由于它们在信号传导方面与抗CD33单抗有相似性,所以采用CD33单抗与化疗药物结合使用来治疗AML是一个新进展。Larisa等^[10]实验显示CMA-676的联合使用显著提高了ara-C或IDA介导的对增殖和细胞集落形成的抑制作用,而对VP-16或6-硫代鸟嘌呤介导的抑制作用却没有影响。原因是ara-C或IDA可以诱导SHP-1和SHP-2蛋白酪氨酸磷酸酶发生磷酸化作用并且促使Lyn/SHP-1复合物形成,而VP-16或6-硫代鸟嘌呤却没有这种功能。Amadori等^[11]的临床试验证明,CMA-676与MICE方案结合取得了更好的疗效:继CMA-676后进行MICE方案的缓解治疗,CR率由22.8%升高到35.1%,CRq也由12.3%升高至19.3%。其他化疗药物与CMA-676联合使用的临床试验也相继进行,证明联合用药可以引起更强的抑制增殖作用和细胞毒性作用,但对患者的毒性也相应增加。

此外,CMA-676对APL也有一定的治疗效果:急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓细胞白血病(AML)的一种特殊类型,在临床治疗中很常见,有原发性和继发性两种。研究早期利用维A酸(ATRA)诱导分化疗法治疗APL并获得极高的CR率及长期生存率。但其复发率极高,并且复发后仍面临药物的选择和治疗欠佳的问题。2002年美国首先用CMA-676治疗12例复发的APL患者,一个疗程后有8例重新获得CR。之后美国FDA批准CMA-676用来治疗老年复发的APL。之后,Francesco等^[12]单独用CMA-676治疗分子水平复发的16例APL患者,连续使用两次后有9例获得分子水平的缓解,使用三次后有13例达到MR,但由于其产生的肝脏毒性作用不能再继续使用,2例在使用过程中病情恶化。后期14例中有7例在不同时间复发,再次使用CMA-676后又有2例完全缓解。由此可知,用CMA-676单药治疗复发APL是有效果的,但是为了降低复发率,达到MR后还应该进行后期治疗。Estey等^[13]在APL患者中用维A酸(ATRA)与CMA-676共同治疗。方法是在白细胞数量得到缓解以后,用ATRA两周再停两周,CMA-676每五周使用一次,连续使用8次,最后使APL的CR率达到84%并减轻了对患者本身的毒性。说明CMA-676与ATRA配合使用可以取得更好的效果。

还有报道证明,CMA-676用于治疗其他类型白血病:Giudad等^[14]报道B-细胞来源的急性淋巴细胞

白血病(ALL)患者CD33的表达率也很高, 达到80%左右。Colay等^[15]证明, 无论在体外还是体内, CMA-676对于表达CD33的ALL细胞都有作用。另外, 体外单独用卡奇毒素也证明其对ALL细胞的杀伤力要远远高于AML。最近亦有研究者用CMA-676单药治疗ALL也获得了良好的缓解效果。目前尚未观察到CMA-676对慢性髓系白血病(CML)的治疗, 有报道用CMA-676治疗CML急变患者均未获得缓解。

3.2 单抗HuM195及偶联物

3.2.1 单克隆抗体HuM195 M195是由有活性的CD33阳性人类白血病原始粒细胞免疫小鼠得到的IgG2a单克隆抗体^[16]。流式细胞数据显示, M195的反应局限于髓系祖细胞, 而没有出现在更成熟的髓系细胞。临床I期实验用¹³¹I做标签显示, M195与靶细胞结合以后会被迅速内化, 在使用剂量超过5 mg/m²时结合位点就趋于饱和。人源化抗体HUM-195是由M195的CDR与人类IgG1重组形成的。与M195相比, HUM-195有更高的亲和力, 并且可以诱导ADCC和CDC。在临床I期试验中, HUM-195表现出低的免疫原性, 剂量阈值在10 mg/m²以上。

3.2.2 HuM195的功能 HuM195具有靶向治疗AML的作用: Caron等^[16]复发/难治性AML患者进行了临床I期试验, 采用的方法是以4个剂量组(0.5, 1.0, 3.0, 10.0 mg/m²)逐级给药, 间隔3~4天静脉滴注一次, 三周为一个疗程。用药后低剂量组未表现出明显的不良反应, 高剂量组出现滴注反应, 如发热、寒战、呼吸困难等症状, 但13例患者均未出现剂量有关的毒性症状。用¹³¹I标记显示, 浓度为3.0 mg/m²时达到最佳状态, 其在体内的半衰期为51 h, 所以Caron等推荐间隔72 h给药3.0 mg/m²为最佳治疗方案。II期临床中用超饱和剂量对9例AML患者进行治疗^[12]。连续四天给药HuM195, 剂量为(12~36) mg/m², 并在第15~18 d加强一次。其中1例难治性患者在接受两次IA方案(去甲氧柔红霉素-阿糖胞苷)诱导后仍存在8%的祖细胞, 但经HuM195治疗后获得CR并维持了4年; 3例患者经HuM195治疗骨髓祖细胞阳性率下降, 另外5例呈病情缓解趋势。说明HuM195具有抗肿瘤效应并有很好的耐受性, 适用于肿瘤负荷比较低的患者, 可用于其他方法缓解后残留病灶的清除。

HuM195可与化疗药物联合使用治疗AML: Feldman等^[17]对治疗无效或治疗后复发的AML患者给予单独化疗或化疗联合单克隆抗体HuM195治疗。

在接受联合治疗的94例病人中, 27例达到完全缓解, 13例部分缓解, 总有效率为43%。而在单独应用化疗的97例病人中, 20例完全缓解, 5例部分缓解, 有效率为26%。结果显示, 这种联合用药方法有助于提高病人对治疗的敏感性, 但HuM195是否应该用于AML病人的初期治疗中尚需深入研究。

此外, HuM195还可用于治疗APL: 15例APL患者经维A酸诱导缓解后进行HuM195的治疗, 采用每周两次, 每次3 mg/m²的剂量, 维持三周后再进行LA巩固方案。结果是维A酸诱导后1例出现PML/RAR α 阴性, 使用HuM195后有5例转阴, 巩固治疗后11例转阴。还有其他HuM195治疗APL的临床试验都表明HuM195有治疗APL的作用, 可以有效降低其肿瘤负荷。

3.2.3 HuM195偶联物 HuM195本身已具有杀伤肿瘤细胞的作用, 但其作用效果比较低, 剂量需求大。为了增强HuM195的抗肿瘤效应, 放射性同位素及毒素分子被用来与之偶联。

同位素与HuM195偶联可以显著增强其抗肿瘤效应, 抗体靶向后同位素可以通过释放高能量的射线来杀灭白细胞抗原。最初选用的同位素是¹³¹I, ¹³¹I释放的 β 粒子穿透距离为0.7 mm, 与靶细胞结合后不需内吞即可在胞外直接杀伤白细胞, 可用于骨髓移植前的清除。但¹³¹I在释放 β 粒子的同时也释放 γ 粒子, 患者输注后需要隔离, 给治疗带来了诸多不便, 而且¹³¹I还可与单抗的酪氨酸结合而影响其生物活性。后来研究人员又采用⁹⁰Yi与HuM195相偶连, ⁹⁰Yi虽然不释放 γ 粒子, 但它释放的 β 粒子穿透距离为5 mm, 在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤了周围的正常细胞, 不利于患者的恢复。近年来开始使用²¹³Bi进行偶联, 由于²¹³Bi可以释放穿透距离为50~80 μ m的 α 粒子, 弥补了以上两者的缺点。对小鼠的实验及体外细胞实验都说明CD33正常组织物²¹³Bi摄取, 且肾脏也未出现吸收。后期的临床试验对²¹³Bi-HuM195的安全性及杀伤力进行了研究, 当使用剂量达到100 mCi并与足量阿糖胞苷一起使用时, 在患者中没有出现明显的毒性, 但出现了显著的骨髓抑制作用。近来, 又出现了铯225与HuM19的偶联物²²⁵Ac-HuM19的形式, 铯225是铯族同位素^[18], 它的半衰期长, 其衰变时可产生高能的 α 粒子, 可选择性杀伤肿瘤细胞及周围细胞, 对正常细胞没有危害。目前, 为了测定²²⁵Ac-HuM195的最佳使用剂量, 针对²²⁵Ac-HuM195的I期

临床试验正在进行中。

此外, HuM195还可与毒素蛋白偶联来增强杀伤作用: HUM195/rGel是HUM-195与重组多花白树毒蛋白(rGel)通过N-琥珀酰亚胺基-3-丙酸酯键连接而成。利用基因工程技术在rGel的C-末端连接一个半胱氨酸,使rGel与抗体发生特异性结合。rGel具有RNA特异性的N-糖苷酶活性,可专一性地水解真核细胞核糖体60S亚基上腺嘌呤的N-糖苷键而使核糖体失活,它也是蛋白质生物合成的有效抑制剂。此外,它也具有类似DNase活性和糖基化酶活性,可降解细胞核DNA。多次体外模型试验证明, HUM195/rGel偶联物具有显著的特异性细胞毒性作用^[19-20]。把HL-60细胞与正常的骨髓细胞混合制作骨髓模型,用HUM195-rGelonin孵育后冻融,模仿骨髓清除的过程,结果处于正常细胞中的白血病细胞呈2的对数形式减少。临床I期试验证明, HUM-195/rGel具有很好的耐受性,并且在难治性AML患者中有较好的细胞毒性。与化疗药物结合的其他试验也证实了HUM-195/rGel对CD33阳性的恶性白血病人有临床疗效^[20]。

3.3 抗体偶联药物AVE9633

AVE9633由巯基美登素衍生物DM4与单抗huMy9-6通过一个二硫键连接而成,其中huMy9-6是抗CD33的人源化IgG1单抗^[21],每个抗体分子平均连接3.5个DM4分子。美登素是一种天然高效的微管蛋白抑制剂,其抗癌作用比著名的长春花碱强十倍,主要用于淋巴瘤和骨癌的治疗,具有明显疗效。此外,它对卵巢癌、乳腺癌、鼻咽癌也有强烈的抗肿瘤活性,但其作为抗肿瘤药物在临床试验中因具有全身毒性而失败^[22]。与CD33结合后, AVE9633通过内化进入胞内释放DM4,游离的DM4分子结合到微管蛋白的长春花结合位点。DM4通过抑制微管聚合及装配而发挥作用,并且在增殖细胞及分裂周期的G₂/M期有活性^[23]。

根据其体外临床前活性,用AVE9633单药治疗复发、难治性CD33阳性AML患者的临床I期试验共招募54名患者,分为3个试验方案^[24];初始试验中,21天为一个周期,22例患者在第1天输注了(15~260) mg/m²。随着第一剂量水平的完成,另外两个28天为一个周期的试验随之进行;其中一组20例患者在第1天和第8天输注(30~150) mg/m²,另外一组12例患者分别在第1天、第4天和第7天输注(30~90) mg/m²。最主要

的副反应是输注相关反应,但在首次接受输注后,54例患者未出现药物不适反应。总体来看, huMy9-6-DM4的不同输注方案具有同等的药代动力学参数。在Day1方案中半衰期与剂量有轻微关系,在最高剂量时达到4天,且只有在剂量达到75 mg/m²时才能检测出游离的DM4分子。与预期相似,在Day1/8及Day1/4/7方案中, huMy9-6-DM4的血浆浓度分别在第8天及第4天、第7天出现增长,半衰期也有类似的现象。在Day1/8方案中,剂量浓度达到105 mg/m²时才能检测到游离的DM4,而Day1/4/7中只检测到低水平的游离DM4,约为(1~3) ng/mL,在所有输注过程中未发现DM4的积累。S-Methyl-DM4(AVE9633内化后一种有活性的新陈代谢产物)也只有在Day1/4/7方案中检测出。只有一个病人在接受11个周期的治疗后出现了抗huMy9-6-DM4的抗体,所有患者均未出现抗DM4抗体。Day1/8方案中有两个病人对AVE9633有应答。只有Day1/8方案中出现了MTD,其他两个方案由于没有活性在未达到MTD之前停止。与AVE9633在体外试验中具有强的细胞毒性相比,临床试验没有得到理想结果。

经体外实验证明,在AML细胞中P-蛋白的活化可以减弱AVE9633和DM4的细胞毒性,但P-蛋白却不是AVE9633化学耐受的最主要机制。其他机制如微管改变在AVE9633化学耐受中起到重要的作用。

3.4 抗体偶联药物SGN-CD33A

SGN-CD33A是由人源化的抗CD33单抗IgG1与吡咯开苯并吡啶三烯(pyrrolobenzodiazepine, PBD)二聚物偶联而成^[25]。接头序列含有缬氨酸-丙氨酸二肽,能够被蛋白酶识别切割,并通过基因工程设计有两个半胱氨酸残基,使得每个抗体可以装载两个PBD二聚体,从而增加了药效。这种通过工程手段添加半胱氨酸的方法成为抗体疗法的新手段,改造过的抗体称为EC-mAB。偶联的PBD是一类抗肿瘤药物,通过与DNA发生共价结合或交联而发挥作用引起DNA损伤。

在体外进行的AML细胞系实验中,荧光显微镜下可见SGN-CD33A快速内化并转运至溶酶体。一经摄取,SGN-CD33A可通过自身组蛋白2AX磷酸化诱导DNA损伤,进而通过使G₂-M期细胞停滞、线粒体膜破坏、细胞凋亡蛋白酶活性提高等最终致使细胞死亡。另外,SGN-CD33A对体内早期的AML细胞及小鼠异体移植均有作用。与GO不同,SGN-

CD33A对多药耐药表型也有明显效果。前期试验均显示SGN-CD33A具有CD33靶向的抗肿瘤作用, 针对该抗体药物的临床试验正在进行中。

3.5 其他抗CD33单抗

除了以上几种研究较多的抗体偶联物以外, 在抗体研究发展的前期还出现过WM5、HIM3-4等单抗, 其中WM5是美国BD公司生产的一株抗CD33单克隆抗体, 目前主要作为一抗辅助研究CD33分子及相关抗体。HIM3-4是中国医学科学院血液学研究所免疫室制备的一株鼠源性抗CD33单克隆抗体IgG1, 并经过国际人类白细胞分化抗原协作组会议正式命名(国际编号VMA112、VIMA47), 但前期实验表明HIM3-4诱导细胞凋亡的作用不明显。

3.6 抗体药物治疗引起的毒副作用及耐药性

使用抗体治疗所引起的细胞毒性分为造血系统和非造血系统两方面。造血系统方面, CD33虽然未表达于造血干细胞, 但在正常的各祖细胞及单核细胞中都有表达, CMA-676、HUM195等在杀伤肿瘤细胞的同时也对正常白细胞造成了影响, 临床表现为普遍的可逆性骨髓抑制。非造血方面的毒性主要是肝脏毒性, 表现出转氨酶水平升高、高胆红素血症、肝静脉阻塞综合征(VOD)等。输液反映主要是寒战、恶心、发热等, 可以通过应用糖皮质激素得到缓解。

使用抗体所产生的耐药性受多种因素影响。其中CMA-676是P-蛋白介导的药物外排所引起的, 多次体外和临床试验都表明卡奇霉素与多药耐药P蛋白的作用底物有相似的大小和结构, 因而会在P-蛋白的作用下排出胞外。此外, 表面抗原CD33表达改变导致逃逸靶向攻击, 处于G₂期细胞本身对毒性药物不敏感, 细胞内信号通路或凋亡机制发生改变等都有可能影响靶向抗体的作用效果。

4 CD33分子用于相关白血病的诊断

白血病具有复杂多变的发展过程, 因而有很多分型, 有些亚型之间形态学相似, 加之化疗对细胞状态也有影响, 给诊断带来许多困难。应用一组抗白细胞分化抗原单克隆抗体(McAb)检测白血病细胞的表面标志, 可客观地反映细胞的来源和分化阶段, 准确鉴别白血病类型。辨别免疫分型可提高白血病诊断的准确性, 为进一步分类治疗提供可靠的依据, 并且特殊类型的白血病必须通过免疫分型来诊断。

包括CD33在内(CD14、CD123、MPO及CD68R等其他分子)的免疫组化在AML及CML等白血病诊断中具有重要的作用^[26]。

5 讨论与展望

鉴于以往化疗和放疗等手段毒副作用大, 白血病一直是临床治疗的难点, 抗体和抗体偶联药物的使用可以提高靶向性和降低毒副作用。然而, AML的起源还不清楚, 它们是起源于造血干细胞的改变还是发生在更成熟的祖细胞中的遗传事件的结果, 对此一直存在争论。因此, AML的发生机制可能在生物学、治疗及预防等方面具有重要意义。近年来, 研究人员对肿瘤干细胞这一概念给予了高度重视, 治疗过程中不能根除肿瘤干细胞就代表可能会引起疾病复发或治疗失败。利用肿瘤干细胞作为靶点可以治疗人类许多恶性疾病, 靶向肿瘤干细胞的研究及治疗正在尝试中^[27]。

虽然抗体及其偶联物在肿瘤治疗中表现出巨大的应用前景, 但仍然存在很多问题。常见的毒副作用有输注引起的高烧、恶心、战栗, 肝脏毒性、骨髓抑制、对正常细胞的毒副作用及患者自身产生的免疫原性等。另外, 抗体研制周期长、制备过程复杂, 临床用药需求剂量大、纯度要求高且价格昂贵等, 这些因素都限制了抗体药物的大量使用。抗体偶联药物和人源化免疫毒素可以克服一些缺点, 使得抗体药物向小型化和高效化方向发展, 今后可能成为抗体药物的主流, 成为肿瘤治疗的有力武器。

参考文献 (References)

- 1 Robillard N, Wuilleme S, Lode L, Magrangeas F, Minvielle S, Avetloiseau H. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target. *Leukemia* 2005; 19: 2021-2.
- 2 Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 255-66.
- 3 Pollard JA, Ho PA, Bernstein ID, Walter RB, Meshinchi S, Alonzo TA, *et al*. Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2012; 119(12): 3705-11.
- 4 Lorenz U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: Two phosphatases functioning at many levels. *Rev Immunol* 2009; 228(1): 342-59.
- 5 Walter RB, Raden BW, Zeng R, Hausermann P, Bernstein ID, Cooper JA. ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: Role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. *J Leuk Bio* 2008; 83(1): 200-1.
- 6 Balaian L, Ball ED. Anti-CD33 monoclonal antibodies enhance

- the cytotoxic effects of cytosine arabinoside and idarubicin on acute myeloid leukemia cells through similarities in their signaling pathways. *Exp Hematol* 2005; 33: 199-211.
- 7 王妍, 韩燕星, 蒋建东. 刺孢霉素族抗生菌的研究进展. *中国新药杂志*(Wang Yan, Han Yanxing, Jiang Jiandong. *Progress in calicheamicins. Chinese Journal of New Drugs*) 2007; 16(17): 1341-5.
- 8 Ravandi F, Ester EH, Appelbaum FR, Lo-Coco F, Schiffer CA, Larson RA, *et al.* Gemtuzumab Ozogamicin: Time to Resurrect? *J Clin Oncol* 2012; 30(32): 3921-3.
- 9 Larson RA, Sievers EL, Stadtman EA, Lowenberg B, Estey EH, Dombret H, *et al.* Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 2005; 104(7): 1442-52.
- 10 Pagano L, Fianchi L, Caira M, Rutella S and Leone G. The role of gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients. *Oncogene* 2007; 26: 3679-90.
- 11 Amadori S, Suci S, Willemze R, Mandelli F, Selleslag D, Stauder R. Sequential administration of gemtuzumab ozogamicin and conventional chemotherapy as first line therapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: A phase II study (AML-15) of the EORTC and GIMEMA leukemia groups. *Haematol* 2004; 89(8): 950-6.
- 12 Lo-Coco F, Cimino G, Breccia M, Noguera NI, Diverio D, Finolezzi E, *et al.* Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2004; 10(4): 1182-5.
- 13 Estey EH, Giles FJ, Beran M, O'Brien S, Pierce SA, Faderl SH, *et al.* Experience with gemtuzumab ozogamicin ("mylotarg") and all-trans retinoic acid in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2002; 99(11): 4222-4.
- 14 Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, *et al.* Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 16(12): 3774-81.
- 15 Golay J, Gaetano ND, Amico D, Cittera E, Barbui AM, Giavazzi R, Biondi A, Rambaldi A, *et al.* Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) has therapeutic activity against CD33⁺ acute lymphoblastic leukaemias *in vitro* and *in vivo*. *BJH* 2004; 128(3): 310-7.
- 16 Caron PC, Dumont L, Scheinberg DA. Supersaturating infusional humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1998; 4(6): 1421-8.
- 17 Feldman E, Kalaycio M, Weiner G, Frankel S, Schulman P, Schwartzberg L, *et al.* Treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia with humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195. *Leukemia* 2003; 17: 314-8.
- 18 Scheinberg DA, McDevitt MR. Actinium-225 in targeted alpha-particle therapeutic applications. *Curr Radiopharm* 2011; 4(4): 306-20.
- 19 Lyu MA, Cao YJ, Mohamedali KA, Rosenblum MG. Cell-targeting fusion constructs containing recombinant gelonin. *Methods Enzymol* 2012; 502: 167-214.
- 20 Borthakur G, Rosenblum M, Daver N, Ravandi F, Faderl S, Freireich E, *et al.* Phase I study of an anti-CD33 immunotoxin, humanized monoclonal antibody M195 conjugated to recombinant gelonin (HUM-195/rGEL), in patients with advanced myeloid malignancies. *Haematologica* 2013; 98(2): 217-21.
- 21 Widdison WC, Wilhelm SD, Cavanagh EE, Whiteman KR, Leece BA, Kovtun KR, *et al.* Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer. *J Med Chem* 2006; 49(14): 4392-408.
- 22 Lambert JM. Antibody-maytansinoid conjugates: A new strategy for the treatment of cancer. *Drugs Fut* 2010; 35: 471-80.
- 13 Lopus M, Oroudjev E, Wilson L, Wilhelm W, Chari R, Jordan MA. Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(10): 2689-99.
- 24 Lapusan S, Vidriales MB, Thomas X, Botton S, Vekhoff A, Tang R, *et al.* Phase I studies of AVE9633, an anti-CD33 antibody-maytansinoid conjugate, in adult patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Invest New Drugs* 2012; 30(3): 1121-31.
- 25 Kung Sutherland MS, Walter RB, Jeffrey SC, Burke PJ, Yu C, Kostner H, *et al.* SGN-CD33A: A novel CD33-targeting antibody-drug conjugate utilizing a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML. *Blood* 2013; 122(8): 1455-63.
- 26 Rollins-Raval MA, Roth CG. The value of immunohistochemistry for CD14, CD123, CD33, myeloperoxidase and CD68R in the diagnosis of acute and chronic myelomonocytic leukaemias. *Histopathology* 2012; 60(6): 933-42.
- 27 Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* 2012; 119(26): 6198-208.