

针对肿瘤干细胞的抗体靶向治疗——靶向部分信号通路及细胞表面标志分子

李红蕊¹ 丁倩¹ 陈枢青² 詹金彪^{1*}

(¹浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058; ²浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要 肿瘤干细胞是指肿瘤细胞群体中的未分化细胞, 能够自我更新及无限增殖; 通常具有正常干细胞样的多潜能性, 可以分化产生异质性的肿瘤细胞及组织, 对于传统的化疗药物具有耐药性。肿瘤干细胞与正常干细胞有一定的差异, 如某些信号通路异常活化、细胞表面表达特异的分子等。针对肿瘤干细胞的这些特性, 科学家们提出新的肿瘤治疗策略, 即通过设计特异的抗体药物靶向信号通路或者细胞表面分子等, 从根源上杀死肿瘤起始细胞, 从而达到彻底治愈恶性肿瘤的目的。该文介绍了针对不同信号通路(如Notch和Wnt)或肿瘤细胞表面标志分子(如EpCAM和CD44等)的抗体药物, 并且探讨了抗体药物的优点以及面临的问题。

关键词 肿瘤干细胞; 单克隆抗体; 抗体偶联药物; 免疫毒素; 靶向治疗

Antibody Therapeutics that Target Cancer Stem Cells (CSCs) – for Some Signal Pathways and CSCs Markers

Li Hongrui¹, Ding Qian¹, Chen Shuqing², Zhan Jinbiao^{1*}

(¹Department of Biochemistry, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Cancer stem cells (CSCs) are defined as a kind of undifferentiated cells that can self-renew and differentiate. Like normal stem cells, the CSCs also have multipotency capable of differentiating into different cancer cells with heterogeneity, and are usually resistant to the traditional drug therapies. The differences between CSCs and normal stem cells are the abnormal activation of some signal pathways and the expression of different biomarkers. Targeting the differences, scientists come up with some strategies to kill CSCs, such as using antibodies targeting the CSC markers or signal pathways to stop the growth or activating the apoptosis of CSCs. This review focuses on antibody drugs which target on the CSC-related signal pathways such as Notch and Wnt, and CSCs markers such as EpCAM and CD44, aiming at further developing these novel immunotherapeutics.

Keywords cancer stem cells; monoclonal antibody; antibody-drug conjugate; immunotoxin; target therapy

1 肿瘤干细胞学说

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是指肿瘤细胞群体中的未分化细胞, 能够自我更新及无限增

殖, 具有正常干细胞样的多潜能性, 能够分化产生异质性的肿瘤细胞及组织, 同时对于传统的药物疗法具有耐药性^[1-2]。这一理论解释了恶性肿瘤的基

收稿日期: 2014-06-25 接受日期: 2014-09-19

国家自然科学基金(批准号: 81430081)、浙江省重大科技专项(批准号: 2009C13041)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: June 25, 2014 Accepted: September 19, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81430081), the Department of Science and Technology of Zhejiang Province (Grant No.2009C13041) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China

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

网络出版时间: 2014-12-25 10:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141225.1022.005.html>

本行为和发展规律, 为人类攻克癌症这一难题提供了新的思路。肿瘤干细胞或称肿瘤起始细胞(tumor initiating cell, TIC), 首先是由Lapidot等^[3]在对人类急性白血病细胞的研究中发现的。现已在多种实体瘤中分离鉴定出肿瘤干细胞, 如肝癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、乳腺癌、肺癌以及子宫癌等。

1.1 肿瘤干细胞的特征

肿瘤干细胞在肿瘤组织中所占的比例很小, 但因为其能够无限增殖、分化以及具有耐药性, 可以抵抗常规的化疗及放疗, 是恶性肿瘤易复发和难治愈的主要原因。肿瘤干细胞与正常干细胞相比, 细胞内部关键信号通路异常, 如Wnt信号通路异常活化^[4]; 与普通肿瘤细胞相比, 肿瘤干细胞对药物的敏感性较低, 能够表达多种转运蛋白^[2], 或者通过上皮细胞向间充质细胞的转换(epithelial to mesenchymal transitions, EMT)逃避药物杀伤^[5-7]。肿瘤干细胞与正常细胞在结构上具有相似性, 一般的药物在杀伤肿瘤细胞的同时也会对正常细胞造成损伤^[8]。近年来, 基于肿瘤干细胞理论的治疗策略已经得到了尝试, 针对肿瘤干细胞的特异信号通路或者细胞表面特异分子, 设计单克隆抗体药物; 这些单克隆抗体药物具有特异性强和副作用小的特点, 能够克服目前临床常用化疗药物靶向性差和副作用大的缺点, 从而在源头上杀死肿瘤干细胞, 为肿瘤的治

疗带来光明的应用前景。

1.2 肿瘤干细胞抗体靶向治疗的意义

杀死恶性肿瘤干细胞、抑制肿瘤的转移及复发是肿瘤干细胞研究的重要内容。由于细胞结构上的相似性, 特异性不强的普通抗肿瘤药物也会对正常细胞产生毒害, 有些药物在有效剂量水平之下, 已经对机体带来强烈的毒副作用^[9]。肿瘤干细胞对普通抗癌药物具有耐药性, 而靶向性良好的抗体可以特异识别肿瘤干细胞, 切断关键信号通路或者通过抗体携带的毒素等物质杀死细胞, 达到治疗肿瘤的目的^[10]。特异性的抗体一方面可以起转运作用, 即通过抗原抗体的特异性识别, 将毒素或其他药物转运到靶部位达到治疗效果; 另一方面通过直接与靶细胞相互作用抑制肿瘤细胞的生长。抗体药物的出现及不断完善为肿瘤的临床治疗开启了药物治疗新篇章。

2 肿瘤干细胞的抗体靶向治疗

随着对抗体结构和功能的不断认识, 抗体药物在肿瘤治疗领域正发挥日益重要的作用, 也成为抗肿瘤药物领域的研究热点, 本文讨论了部分处于研发阶段以及研制成功的抗体药物(表1)。抗体药物包括几类: (1)单克隆抗体及其片段, 如单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)、双特异抗体(bispecific

表1 靶向肿瘤干细胞的抗体药物
Table 1 Antibody drugs targeting CSCs

药物名称 Name of the drug	抗体类型 Drug type	靶向通路 Targeted pathway	靶向分子 Targeted molecule	研究阶段 Stage	临床试验编号 Clinical trial number	研发机构 Research institution
OMP-21M18	Mab	Notch	DLL4	Phase 1	NCT00744562	OncoMed Pharmaceuticals, Inc.
A5226A	Mab	Notch	NTC	Preclinical	NA	University of Tokyo
OMP-18R5	Mab	Wnt	FZD	Phase 1	NCT01345201	OncoMed Pharmaceuticals, Inc.
BHQ880	Mab	Wnt	DKK1	Phase 2	NCT01302886	Novartis (Novartis Pharmaceuticals)
Edrecolomab	Mab		EpCAM	Phase 3	NCT00002968	National Cancer Institute
ChiHEA125	Mab		EpCAM	Preclinical	NA	German Cancer Research Center
Adecatumumab	Mab		EpCAM	Phase 2	NCT00866944	Amgen Research (Munich) GmbH
RG7356	Mab		CD44	Preclinical	NA	Roche Holding
MT110	ScFv		EpCAM/ CD3	Phase 1	NCT00635596	Amgen Research (Munich) GmbH
SR1	Mab		CD117	Preclinical	NA	University of Washington Seattle
SWA11	Mab		CD24	Preclinical	NA	West Lebanon, NH, USA

Mab: 单克隆抗体; scFv: 单链抗体; NA: 无。

Mab: monoclonal antibody; scFv: single-chain antibody fragment; NA: not available.

antibody)等; (2)抗体与毒素或化学物质形成的偶联物(antibody-drug conjugates, ADCs), (3)免疫毒素(immunotoxins), 包括抗体和毒素蛋白融合形成的免疫毒素, 如本实验室曾将抗CD33的单链抗体scFv与天花粉蛋白和苦瓜蛋白形成的免疫毒素用于恶性肿瘤的治疗。抗体药物可以通过抗体介导的细胞毒性反应(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体介导的细胞毒性反应(complement dependent cytotoxicity, CDC)、阻断细胞生长的信号通路或者诱导细胞凋亡等机理来杀伤肿瘤细胞。

2.1 针对信号通路的抗体靶向治疗

根据肿瘤干细胞的信号转导途径的特点, 学者已经设计了一些靶向性较强的抗体药物。如针对信号通路的受体或者配体, 可以通过抑制受体与配体的相互作用而阻断信号传递。

2.1.1 针对Notch信号通路的抗体药物 Notch信号通路为细胞间的相互作用传递信号。相邻细胞通过Notch通路进行的信号交换能够调控细胞对各种信号做出反应, 从而对细胞的发育及分化方向产生影响。表达Notch配体的细胞与另一个细胞表面的相应受体识别结合后, 该信号通路即被激活^[11]。已有研究者发现, 在乳腺癌干细胞中Notch信号通路异常活化, 且Notch通过抑制细胞凋亡将乳腺上皮细胞转化为乳腺癌干细胞, 促进肿瘤的发生^[12]。有证据表明, Notch信号通路与肿瘤干细胞的生长有关, 因此可以作为恶性肿瘤治疗的靶点^[12]。针对信号通路的单克隆抗体, 主要通过靶向抑制受体、配体或对信号通路起关键调控作用的蛋白酶而起作用。

DLL4是Notch家族的配体之一, 对肿瘤干细胞的增殖与维持、肿瘤的血管生成均发挥重要作用。抑制DLL4对于恶性肿瘤的治疗具有重要意义^[13]。OMP-21M18是一种靶向DLL4的单克隆抗体药物, 这是第一个进入临床试验阶段的针对Notch信号通路的抗体药物。它是一种人源化的单抗, 半衰期为12 d, 当最大给药剂量为10 mg/kg时仍未达到病人的最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)。该制剂具有微弱的免疫原性, 能够引起高血压, 但是没有明显的症状, 并且其有效治疗剂量小于机体耐受剂量。有学者已经证明, OMP-21M18在人类异体移植模型中起抑制肿瘤生长及降低肿瘤干细胞发生频率的作用^[14]。有关OMP-21M18的更多数据仍在进一步完善之中。

Notch信号通路的另外一个靶点是 γ -分泌酶(γ -secretase), γ -分泌酶抑制剂通过阻断 γ -分泌酶对Notch受体的切割而阻断该信号通路的活化, 起到抑制肿瘤细胞增殖的作用^[15]。尽管 γ -分泌酶抑制剂作为药物已进入临床试验阶段, 但是由于它无法正确区分不同的Notch受体亚型, 致使其他Notch受体如Notch1和Notch2受到抑制, 信号通路被阻断, 从而引起肠道方面的毒副作用。为使药物正确区分不同的Notch受体, Wu等^[16]利用噬菌体展示技术获得分别靶向Notch1和Notch2的抗负调控区(negative regulatory region, NRR)高特异性全人源IgG1单克隆抗体。利用体外亲和实验及小鼠体内试验, 再结合筛选出来的抗负调控区1(NRR1)的抗体可以特异靶向Notch1, 抗NRR2抗体可以特异靶向Notch2, 二者可以抑制Notch信号通路异常的肿瘤干细胞的生长以及血管生成作用。

γ -分泌酶是由催化亚基presenilin、底物识别功能亚基nicastrin(NTC)、七次跨膜蛋白APH1(anterior pharynx defective 1)和 γ -分泌酶的成熟、激活的调控亚基Pen-2(presenilin enhancer-2)四种跨膜蛋白组装形成的蛋白复合体。A5226A是一种靶向NTC的单克隆抗体药物, 能够识别糖基化的成熟NTC胞外区。制备过程是将NTC表达于杆状病毒的表面后, 免疫gp64转基因小鼠从而获得阳性杂交瘤细胞, 最终分泌得到A5226A单克隆抗体。该抗体通过与底物的竞争性抑制来抑制 γ -分泌酶的活性, A5226A在肿瘤移植模型中能够抑制依赖于 γ -分泌酶活性的肿瘤细胞的生长^[17]。A5226A的出现表明, γ -分泌酶复合体的组成成分也可以作为抑制NOTCH信号通路的有效靶点, 这为今后抗肿瘤药物的研究提供了新的研究方向, 具有重要的临床意义。

2.1.2 针对Wnt信号通路的抗体药物 Wnt信号通路的调节作用涉及生命过程的各个方面。在胚胎阶段, Wnt信号通路调控细胞的增殖、形态学变化以及胚胎时期的分化发展方向等; 在成人阶段, 该信号通路用于维持皮肤、血液等系统的内部稳态。在恶性肿瘤干细胞中, 由于Wnt信号通路中组成成分的突变, 致使该信号通路异常活化, 这种现象普遍存在于多种恶性肿瘤组织中^[18], 使得Wnt/ β -catenin信号通路成为治疗恶性肿瘤的有效靶点。

已有报道证实, 抗Wnt-1的抗体能够促进Wnt-1过表达的肝癌细胞凋亡, 并抑制细胞生长。实验结

果显示, 该种抗体能够抑制肝细胞癌细胞系的细胞增殖, 诱发细胞凋亡; 抑制Wnt/ β -catenin信号通路及下游基因的表达; 同时还可以抑制小鼠异体移植肿瘤的生长^[19]。

FZD(Frizzled)是细胞表面的一种G蛋白类似物受体蛋白, 能够介导细胞内的信号传导。FZD具有Wnt配体结合位点, 与相应配体结合后, 活化Wnt/ β -catenin下游基因。FZD10是Frizzled家族中的一员, 抗FZD10的单克隆抗体或者抗体偶联物对于恶性肿瘤的增殖、分化具有一定的抑制作用。Cummings等^[20]筛选得到一系列针对FZD10的单克隆抗体, 可能对表达FZD分子的恶性肿瘤等疾病的治疗有一定的疗效, 该成果现已经申请专利。Gurney等^[21]从HuCAL GOLD噬菌体展示库中筛选得到特异靶向FZD7的Fab段基因后, 将其插入到具有人IgG2全长基因的表达载体中, 进而构建得到全长抗体。OMP-18R5能够靶向FZD家族中的FZD1、FZD2、FZD5、FZD7及FZD8。体内试验及小鼠肿瘤移植模型试验表明, OMP-18R5能够抑制人类乳腺癌、胰腺癌、直肠癌以及肺癌, 降低肿瘤的再生能力。将OMP-18R5与紫杉醇或吉西他滨等化学物质耦联, 制备成的ADC药物显著地抑制了肿瘤的生长。OMP-18R5能够靶向FZD家族的多个成员, 抑制Wnt信号通路, 达到治疗恶性肿瘤的效果, 为临床治疗多种肿瘤提供了新的途径。

DKK1(Dickkopf-1)是一种可溶性的Wnt信号通路拮抗物, 其过表达会影响成骨细胞的分化及代谢, 引起骨吸收增强, 导致骨疾病。抑制DKK1对于治疗多发性骨髓瘤具有一定的效果。BHQ880是一种全人源的、专一靶向抑制DKK1的中和抗体。体外实验表明, BHQ880可以提高成骨细胞的分化能力及成骨细胞的数目, 抑制多发性骨髓瘤细胞的生长^[22]。随后的II期临床试验中, 研究人员检测了BHQ880的安全性、骨代谢以及抗多发性骨髓瘤的活性。对郁积型多发性骨髓瘤病人的临床试验结果表明, 病人对该种药物有较好的耐受性; 副作用包括关节痛、疲劳等症状; 同时显著增强椎体强度, 但是对于骨髓瘤的治疗未表现出显著的疗效^[23]。由于部分病人的试验尚在进行之中, 本次试验的结果尚有待于进一步的总结和评价, 虽然BHQ880在体外及小鼠模型中的治疗效果已经得到部分验证, 但其临床疗效仍有待进一步的证实。

Wnt信号通路的激活有助于细胞的生长、增殖, 已在多种恶性肿瘤组织中观察到Wnt信号通路的异常活化。对该信号通路的抑制或许可以有效抑制或者阻断恶性肿瘤组织的生长。目前处于研发期或临床试验期的几种抗体药物均表现出较好的抗癌效果, 我们可以预期更多、更有效的抗体药物进入成药阶段。

2.2 针对细胞表面标志分子的抗体药物

细胞信号通路或者细胞微环境是由多种因素相互作用而形成的网络, 如肿瘤干细胞周围的其他细胞或者细胞外基质, 通过配体与肿瘤细胞表面受体作用, 经过信号转导影响肿瘤细胞的活动, 已有多种针对肿瘤干细胞表面分子的抗体进入临床试验阶段。Vermeulen等^[24]对直肠癌的研究表明, 普通癌细胞在外界环境, 如成纤维细胞衍生生长因子的影响下, 会重新表达肿瘤干细胞标志分子(biomarker)并获得克隆形成能力。综合各种信号通路或细胞微环境的研究结果来看, 副作用强是现有的抗癌药物所面临的问题, 主要原因是药物靶向性不够, 由于各种信号通路在人体正常细胞中同样发挥重要的作用, 这些药物也会非特异阻断机体正常细胞的生理活动从而产生毒性。解决方法是提高治疗药物的特异性, 而这种特异性来自于肿瘤干细胞表面标志分子的特异性识别, 即将肿瘤干细胞表面特异分子作为靶向抗原, 通过提高抗体与靶向抗原的特异性从而降低抗体药物的毒副作用。

2.2.1 靶向EpCAM的抗体药物

近年来, 作为肿瘤干细胞标志分子之一, 细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecular, EpCAM)的研究受到重视。EpCAM(或者EGP40)是人单一上皮细胞表达的一种跨膜糖蛋白, 具有细胞间黏附功能^[25]。EpCAM介导细胞间的同源性黏附, 通过与钙黏蛋白的相互作用减弱细胞的上皮样特征, 如细胞接触抑制和细胞极性等^[26]。在钙黏蛋白表达前提下, EpCAM在树突细胞中的条件性敲除, 削弱了细胞的迁移及活动能力, 表明EpCAM分子在细胞黏附中起负调控作用^[27]。此外, EpCAM通过提高转录因子c-Myc、细胞周期蛋白等的表达量而促进细胞增殖^[28]。EpCAM与细胞的信号通路有关, 它通过将胞内区释放入细胞核而激活Wnt信号通路。多方面数据表明, 该分子在多种恶性肿瘤组织细胞中过量表达^[29]。EpCAM的过表达对于肿瘤的发生发展具有促进作用。EpCAM的功

能也不仅限于抑制细胞黏附, 同时也在肿瘤细胞的增殖、分化、迁移等过程中发挥作用^[30]。这些特性表明, EpCAM分子可以作为标志分子用于鉴定和靶向恶性肿瘤, 对于癌症的治疗具有重要意义。

Edrecolomab(ED)作为首先报道的靶向EpCAM的抗体, 是一种靶向干细胞的鼠源IgG2a单克隆抗体, 通过激活细胞内源性细胞毒作用而杀死癌细胞。但这种药物的治疗效果有限, 并且会引起过敏等副作用^[31]。Braun等^[32]用ED对乳腺癌转移病人的骨髓细胞进行处理后发现, 它能够减少EpCAM⁺细胞数量。直肠癌II期经手术切除肿瘤的病人使用ED作为辅助治疗手段, 相对于术后不用ED的病人, 其存活期没有明显延长^[33]。Fields等^[34]对ED的临床III期治疗试验表明, 在III期的直肠癌病人中, 将ED作为辅助治疗手段与仅用氟尿嘧啶治疗的患者相比, 未产生显著的疗效, 病人总的存活率也未得到提高。这些数据意味着ED作为一种抗癌药物, 在恶性肿瘤的临床治疗中没有发挥显著的疗效。

Salnikov等^[35]将抗EpCAM的单克隆抗体chiHEA125与特定的RNA聚合酶II抑制剂 α -鹅膏蕈素(α -amanitin)融合成抗体药物偶联物, 在对肺癌的体外试验及针对BxPc-3细胞的胰腺癌小鼠体内试验中, 该耦联药物能降低细胞增殖速率, 促进细胞凋亡; 且治疗效果具有剂量依赖效应, 小鼠也表现出较好的耐受能力。检测该药物对胰腺癌细胞、直肠癌细胞、乳腺癌细胞以及胆管癌细胞的抑制增殖能力试验中, 均取得疗效。后续的小鼠体内试验, 选取胰腺癌BxPc-3细胞建立肿瘤模型。chiHEA125-Ama的肿瘤抑制能力相较于chiHEA125及 α -鹅膏蕈素有较明显的效果, 能够促进细胞凋亡、降低细胞的增殖能力。

MT110是一种双特异抗体, 通过构建两种重组载体, 一种含有能够识别CSCs标志分子EpCAM的基因片段, 一种含有可以特异性识别T细胞表面抗原CD3分子的基因片段, 转染CHO细胞后, 筛选获得正确组装的单链抗体, 其中识别EpCAM位点的蛋白序列位于抗体N-末端。该单链抗体通过提高T细胞对肿瘤干细胞的识别及结合能力进而裂解杀死肿瘤干细胞。利用直肠癌细胞系SW480构建的NOD/SCID小鼠肿瘤模型检测MT110的效果, 发现连续5 d的1 μ g剂量的给药就可以抑制小鼠肿瘤的生长; 来源于病人子宫癌组织细胞构建的小鼠肿瘤模型中,

MT110能够清除肿瘤组织; 这样的结果说明, MT110对于表达EpCAM的恶性肿瘤具有治疗效果^[36]。研究者在多种肿瘤组织中检测了MT110抗体的治疗效果。如胰腺癌中, 同时对几种不同的胰腺癌细胞系及人胰腺癌细胞进行给药验证。结果表明, MT110能够活化T细胞, 促进人胰腺癌细胞的裂解, 引发细胞凋亡并且降低胰腺癌细胞的肿瘤形成能力^[37]。临床I期对不同肿瘤患者的安全性试验表明, MT110具有较小的毒副作用, 机体也具有较好的耐受, 更进一步的临床试验结果尚未发布^[38]。

此外, 还有人源化的3622W94抗体、人工改造的人源ING-1以及人源Adecatumumab, 这些抗体均专一靶向EpCAM分子。Münz等^[39]和Imrich等^[40]对这五种抗体的亲和性、抗原表位识别能力等进行试验比较, 发现3622W94及ING-1对EpCAM的亲和性很高, 可引起机体的急性胰腺炎副作用。Adecatumumab现已进入临床试验阶段。Adecatumumab是抗EpCAM的人源IgG1单克隆抗体, Schmidt等^[41]将Adecatumumab与多西紫杉醇连接起来, 靶向EpCAM阳性细胞, 对于乳腺癌复发晚期阶段的病人的治疗取得良好的效果。临床IB试验通过将Adecatumumab与多西他赛联合给药, 探明了该药物在不同给药间隔中的最大耐受剂量及副作用症状, 并且在EpCAM表达的恶性肿瘤组织中观察到明显的临床治疗效果。

2.2.2 靶向CD44的抗体药物 CD44是一个多功能受体, 是Wnt/ β -catenin信号通路的下游靶向分子。其主要在细胞与细胞和细胞与基质间的相互作用中发挥功能, 同时也参与透明质酸的摄取和消化及细胞介导的耐药性^[42]。对直肠癌病人组织进行研究发现, CD44特异表达于直肠癌干细胞的表面; 利用RNA干扰技术阻断CD44的合成后, 能够干扰克隆的形成, 并且影响直肠癌干细胞在肿瘤移植模型中的成瘤能力^[43]。CD44还可以作为乳腺癌干细胞^[44]、白血病干细胞^[45]等的标志分子用于分离及靶向治疗。

RG7356, 又称为RO5429083或ARH460-16-2, 是特异性靶向CD44分子的全人源IgG1单克隆抗体药物。RG7356对于CD44⁺肿瘤具有一定的疗效, 如慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)。Danielle等^[46]将RG7356用⁸⁹Zr(Zirconium-89)标记为⁸⁹Zr-RG7356后, 检测其在小鼠肿瘤模型包括CD44⁺

有应答效应的MDA-MB-231肿瘤、CD44⁺无应答效应的PL45肿瘤、CD44⁻无应答效应的HepG2肿瘤及猴子体内的分布情况。结果表明, 89Zr-RG7356在MDA-MB-231及PL45的吸收及分布情况相似, 约为HepG2肿瘤分布量的9倍; 89Zr-RG7356在猴子体内主要分布于骨髓、外周血及唾液腺中。结果说明, RG7356能够很好的识别地CD44⁺细胞, 但难以引起细胞的抗肿瘤应答。

Hellqvist等^[45]对构建成功的人BC(blast crisis)白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)肿瘤模型分别进行RG7356、达沙替尼(Dasatinib)单独和联合给药, 并用IgG作为对照, 检测对比RG7356对CML的体内治疗效果。结果显示, RG7356和Dasatinib能取得相同的治疗效果, 二者联合用药几乎可以完全杀死LSC; Dasatinib能杀死髓样肉瘤和大部分细胞, 但是对于LSC却没有效果; 而RG7356能够减少一半数量的骨髓LSC。这样的结果证明, 靶向CD44的该单抗药物具有良好的效果, 使得我们思考将二者进行联合用药。

这些实验数据均表明, RG7356具有治疗CD44⁺肿瘤的潜在价值, 临床前期及临床I期的研究显示出该抗体针对CD44抗原的良好靶向性, 可以通过耦联药物或者毒素分子制成ADC药物来进一步提高抗体的抗肿瘤疗效。

2.2.3 靶向CD117(c-Kit)的抗体药物 CD117, 或称为c-Kit(cancer kit proto-oncogene), 是一种酪氨酸激酶跨膜受体蛋白, 由位于人类4号染色体上的kit肿瘤原癌基因编码, 能够与干细胞因子(stem cell factor, SCF)识别并结合^[47]。CD117与SCF的识别并结合对于参与血管生成的干细胞的生长发育起关键作用^[48]。CD117是MAPK和PI3K信号通路的正调控因子; 各项对于肿瘤干细胞的研究表明, CD117分布于某些实体瘤的干细胞表面, 如卵巢癌^[49]和胰腺癌^[50]; 肿瘤移植模型表明, CD117⁺细胞在免疫缺陷小鼠体内的成瘤速度要显著高于CD117⁻细胞群^[51], 此外肿瘤干细胞中的CD117基因突变率较高, 且突变后CD117异常活化, 并促进肿瘤细胞的增殖^[52]。因此, CD117成为肿瘤干细胞靶向治疗的药物靶点之一。

CD117的小分子抑制剂(如imatinib)能够有效杀死大部分肿瘤细胞, 但是治疗后期肿瘤细胞会产生耐药性, 肿瘤细胞发生变异以及肿瘤的复发致使该药物丧失抗肿瘤疗效^[53]。以胃肠道间质瘤

(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)为例, imatinib在治疗之初能够快速杀死大部分的肿瘤细胞, 但是后期高比例病人会复发。SR1是一种通过筛选获得的单克隆抗体, 能够特异靶向识别人源CD117分子, 并阻断其与SCF的结合, 从而抑制造血功能^[54]。对SR1进行的临床前研究发现, 对imatinib处理过的细胞系进行SR1给药处理, 结果表明, SR1能够减缓细胞的生长速度, 降低GISTs细胞表面的CD117表达量; 通过促进巨噬细胞的吞噬作用引起抗肿瘤免疫等^[52,55]。体外试验结果给了我们期望, 但是仅仅体外的细胞试验难以模拟真实的体内环境, 因而后续的动物试验及临床试验的结果才能最终指明靶向CD117的单克隆抗体SR1能否作为一种药物进入临床治疗。SR1的前期效果也给我们思考, 即通过筛选等方法获得更多特异性靶向CD117的单克隆抗体药物, 并且可以同小分子药物共同使用, 发挥不同的功效以彻底消灭肿瘤组织。

2.2.4 靶向CD24的抗体药物 人类CD24是一种只含有30个氨基酸分子的膜蛋白, 具有脂类样特征; 该蛋白高度糖基化, 通过糖基化的磷脂酰基醇锚定在细胞膜上^[56]。CD24参与淋巴细胞的成熟过程, 调控前体细胞的增殖及细胞更新的平衡状态^[57]。CD24分布于恶性肿瘤细胞的表面, 如骨肉瘤^[58]。在卵巢癌中, CD24⁺细胞表现出干细胞样特征, 如能够自我更新及分化, 其异体移植的肿瘤形成能力也远远高于CD24⁻细胞^[59]。CD24在肿瘤细胞表面高表达, 会改变细胞的增殖及黏附能力, 并且影响STAT3信号通路, 该结果已被CD24基因敲除实验和抗体靶向抑制实验所证实^[60], 并且侧面反映了抗体靶向CD24治疗恶性肿瘤的可行性。然而, 并非所有类型的肿瘤干细胞都是CD24⁺。如另一种女性中常见的乳腺癌, CD24和CD44分子共同作为乳腺癌干细胞的标志分子, 但是干细胞构型应为CD44^{high}/CD24^{low}^[61]。

已经成熟的靶向CD24的单克隆抗体(如SN3b、ML-5及SWA11)已经应用于CD24分子相关的科学研究领域^[56], 但是真正用于抗体靶向治疗的单克隆抗体却很少。SWA11是一种鼠源的单克隆抗体, 它识别结合人CD24的胞外区。研究人员已进行了针对不同肿瘤的SWA11靶向试验。如在结肠癌和胰腺癌的体外试验中, SWA11能够抑制这两种癌症细胞系的生长, 下调CD24的表达量^[62]; 在乳腺癌体外试验中, SWA11能够抑制肿瘤的生长及血管生成, 改

变细胞因子的内环境从而影响肿瘤^[63]。Shapira等^[64]将SWA11与假单胞菌外毒素衍生物PE38通过Fc段的ZZ结构域连接获得SWA11-ZZ-PE38免疫毒素,用于人结肠直肠癌构建的小鼠移植模型的肿瘤杀伤。结果表明,SWA11能够将PE38运送到直肠癌干细胞部位,引发细胞的凋亡,对正常组织不产生毒性。SWA11是一种鼠源单抗,在对人体进行试验时需要检测其免疫原性,或者保留该抗体的可变区,对其Fc段进行人源化处理等,其本身能否作为抗癌药物以及其临床试验效果尚未报道,我们期待能见到好的疗效。

3 结语与展望

恶性肿瘤是威胁人类健康的重大疾病,发病率不仅逐年上升,而且呈现年轻化趋势。肿瘤治疗一直是基础和临床科学研究的热点。自肿瘤干细胞学说提出以来,人们看到了治愈肿瘤的曙光,即杀死处于核心地位的肿瘤干细胞,阻断肿瘤细胞的再生和转移潜力,最终治愈恶性肿瘤。

本文介绍的抗体药物,目的在于靶向杀死肿瘤干细胞。针对肿瘤干细胞的抗体药物面临两大问题,一是靶标分子问题,如对靶标分子了解不够全面。随着研究的不断深入,人们对肿瘤标志分子的认识也越来越多,甚至推翻了之前的看法。如一直被视为CSCs标志分子的CD133分子,证据表明有些CD133的细胞也具有肿瘤干细胞特性,如肿瘤形成能力等^[65-66]。寻找到合适的标志分子,对于抗体药物的靶向治疗具有重要意义。问题之二是抗体药物本身。现有的非靶向抗癌药物尽管对于恶性肿瘤的治疗具有一定的效果,但是由于特异性不强致使副作用较强,或者治疗不彻底易复发,难以成为理想的抗癌药物。而抗体药物的不足之处在于,一些单克隆抗体能够有效识别靶向抗原,但却难以杀死肿瘤干细胞。通过抗体与毒素共价键相连接,进入机体后,利用机体内酶的切割从而将毒素释放到靶部位。这种方法可能面临着药物免疫原性、释放以及恶性肿瘤细胞表达抗原的异质性问题^[67]。不同的恶性肿瘤组织其肿瘤形成原因、细胞表面标志分子种类以及标志分子的表达量都有差异。因此,可能需要针对特定的肿瘤组织研究相应的抗体药物。

相对于传统的放化疗治疗方式,抗体药物的治疗具有高选择性、低毒副作用、可有效抑制肿瘤的

转移和复发等特点,因此受到研究人员的青睐。寻找能够在肿瘤细胞中表达的新的标志分子,对于恶性肿瘤的临床治疗及新药研发都具有重大的意义。尽管针对肿瘤干细胞设计的抗体药物仍面临很多的问题,但是这一策略对于恶性肿瘤的治疗无疑具有光明的前景。

参考文献 (References)

- 1 Valent P, Bonnet D, Maria RD, Lapidot T, Copland M, Melo JV, *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(11): 767-75.
- 2 Moitra K, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: Insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89(4): 491-502.
- 3 Tsvee L, Chrstlan S, Josef V, Barbara M, Trang H, Jullo CC, *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 365(17): 645-8.
- 4 Cai C, Zhu X. The Wnt/ β -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mol Med Rep* 2012; 5(5): 1191-6.
- 5 Chow EKH. Implication of cancer stem cells in cancer drug development and drug delivery. *Jala J Lab Autom* 2013; 18(1): 6-11.
- 6 Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29(34): 4741-51.
- 7 Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(9): 1219-26.
- 8 Veerander PSG, Jordi CP, Erik HJD. The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2009; 85(11): 955-62.
- 9 Nagahiro S. Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Treat Rev* 2012; 38(1): 63-7.
- 10 Nate NW, Sanford HB, Phillip RD, Daniel AV. A bispecific EpCAM/CD133-targeted toxin is effective against carcinoma. *Target Oncol* 2014; 9(3): 239-49.
- 11 Spyros AT, Matthew DR, Robert JL. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
- 12 Spyros S, Rob B, Clarke, Keith B. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1517-25.
- 13 Austin G, Timothy H. Anti-DLL4, a cancer therapeutic with multiple mechanisms of action. *Vasc Cell* 2011; 3(1): 1-4.
- 14 Smith DC, Eisenberg P, Stagg R, Manikhas G, Pavlovskiy A, Sikic B, *et al.* A first-in-human, phase 1 trial of the anti-DLL4 antibody (OMP-21M18) targeting cancer stem cells (CSC) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24): 6295-303.
- 15 Le MS, Tian LW. Notch signaling, γ -secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res* 2007; 67(5): 1879-82.
- 16 Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen

- Y, *et al.* Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010; 464(7219): 1052-7.
- 17 Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Yanagimoto MS, *et al.* Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 2012; 31(6): 787-98.
- 18 Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin Ther Tar* 2011; 15(7): 873-87.
- 19 Wei W, Chua MS, Grepper S, So SK. Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009; 8: 76.
- 20 Cummings WJ, Yabuki M, Leppard JB, Wood CL, Maizels N, Allison DS, *et al.* Anti-Fzd10 monoclonal antibodies and methods for their use. U.S. Patent Application 2012; 13/571,151.
- 21 Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, *et al.* Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(29): 11717-22.
- 22 Mariateresa F, Pierfrancesco T, Teru H, Sonia V, Puru N, Seth AE, *et al.* Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 2009; 114(2): 371-9.
- 23 Nikhil C, Munshi , Rafat A, Joseph TB, William B, Thierry F, *et al.* Early evidence of anabolic bone activity of BHQ880, a fully human anti-DKK1 neutralizing antibody: Results of a phase 2 study in previously untreated patients with smoldering multiple myeloma at risk for progression. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012; 120(21): 331.
- 24 Louis V, Felipe DS, Maartje VH, Kate C, Joan HJ, Tijana B, *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010; 12(5): 468-76.
- 25 Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *Cell Biol* 1994; 125(2): 437-46.
- 26 Ulrike S, Vincenzo C, Ben NG. EpCAM: Structure and function in health and disease. *BBA-Biomembranes* 2013; 1828(8): 1989-2001.
- 27 Gaiser MR, Lämmermann T, Feng X, Igyarto BZ, Kaplan DH, Tessarollo L. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(15): E889-97.
- 28 Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23(34): 5748-58.
- 29 Hwang EYC, Yu CH, Cheng SJ, Chang JYF, Chen HM, Chiang CP. Decreased expression of Ep-CAM protein is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(1): 87-93.
- 30 Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Marschner AK. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treat Rev* 2012; 38(1): 68-75.
- 31 Adkins JC, Spencer CM. Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A). *Drugs* 1998; 56(4): 619-26.
- 32 Braun S, Hepp F, Kentenich CRM, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, *et al.* Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12): 3999-4004.
- 33 Niedzwiecki D, Bertagnolli MM, Warren RS, Compton CC, Kemeny NE, Benson AB, *et al.* Documenting the natural history of patients with resected stage II adenocarcinoma of the colon after random assignment to adjuvant treatment with edrecolomab or observation: Results from CALGB 9581. *J Clin Oncol* 2011; 29(23): 3146-52.
- 34 Fields ALA, Keller A, Schwartzberg L, Bernard S, Kaedinal C, Cohen A, *et al.* Adjuvant therapy with the monoclonal antibody Edrecolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve overall survival of patients with stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(12): 1941-7.
- 35 Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, Herr I, Anderl J, Faulstich H, *et al.* Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer* 2012; 104(8): 622-34.
- 36 Brischwein K, Schlereth B, Guller B, Steiger C, Wolf A, Lutterbues R, *et al.* MT110: A novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 2006; 43(8): 1129-43.
- 37 Cioffi M, Dorado J, Baeuerle PA, Heeschen C. EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18(2): 465-74.
- 38 Fiedler WM, Ritter B, Seggewiss R, Bokemeyer C, Fettes P, Klinger M, *et al.* Phase I safety and pharmacology study of the EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110 in patients with metastatic colorectal, gastric, or lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2010; 28(15): 2573.
- 39 Münz M, Murr A, Kvesic M, Rau D, Mangold S, Pflanz S, *et al.* Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies. *Cancer Cell Int* 2010; 10(1): 44.
- 40 Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* 2012; 6(1): 30-8.
- 41 Schmidt M, Rüttinger D, Sebastian M, Hanusch CA, Marschner N, Baeuerle PA, *et al.* Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. *Ann Oncol* 2012; 23(9): 2306-13.
- 42 Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Lin HY, Jones RJ, Kuitase I, Wang H, *et al.* Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: Therapeutic implications. *Leukemia* 2014; 28(2): 373-83.
- 43 Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, *et al.* CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21): 6751-60.
- 44 Iqbal J, Chong PY, Tan PH. Breast cancer stem cells: An update. *J Clin Pathol* 2013; 66(6): 485-90.
- 45 Holm F, Mason CN, Runza V, Weigand S, Sadarangani A, Hellqvist E, *et al.* CD44 monoclonal antibody-enhanced clearance of chronic myeloid leukemia stem cells from the malignant niche. *Blood* 2013; 122(21): 858.
- 46 Vugts DJ, Heuveling D, Walsum M, Weigand S, Bergstrom M, Dongen GA, *et al.* Preclinical evaluation of 89Zr-labeled anti-

- CD44 monoclonal antibody RG7356 in mice and cynomolgus monkeys. *MAbs* 2014; 6(2): 567-75.
- 47 Shamloula MM, Gheida SF, Elsakka AM. Immunohistochemical expression of CD117 and CD34 as stem cell markers in intradermal nevi, dysplastic nevi, and malignant melanomas. *Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society* 2013; 10(1):10-7.
- 48 Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell B* 1999; 31(10): 1053-74.
- 49 Ojeda BD, Rueda BR, Buckanovich RJ. Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett* 2012; 322(1): 1-7.
- 50 Amsterdam A, Raanan C, Polin N, Mezer E, Givol D, Schreiber L. Modulation of c-kit expression in pancreatic adenocarcinoma: A novel stem cell marker responsible for the progression of the disease. *Acta Histochem* 2014; 116(1): 197-203.
- 51 Luo L, Zeng J, Liang B, Zhao Z, Sun L, Cao D, *et al.* Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(2): 596-602.
- 52 Edris B, Willingham SB, Weiskopf K, Volkmer AK, Volkmer JP, Muhlenberg T, *et al.* Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9): 3501-6.
- 53 Deangelo DJ, Chen L, Guerin A, Styles A, Giguere DP, Wu EQ. Impact of timely switching from imatinib to a second-generation tyrosine kinase inhibitor after 12-month complete cytogenetic response failure: A chart review analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14(3): 245-51.
- 54 Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, Birkett NC, Smith KA, Bernstein ID, *et al.* Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood* 1992; 79(2): 338-46.
- 55 Edris B, Willingham S, Weiskopf K, Volkmer AK, Volkmer JP, Muhlenberg T, *et al.* Use of a KIT-specific monoclonal antibody to bypass imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncoimmunology* 2013; 2(6): e24452.
- 56 Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, Konig AK, *et al.* Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest* 2010; 90(7): 1102-16.
- 57 Shapira S, Kazanov D, Weisbaltt S, Starr A, Aeber N, Kraus S. The CD24 protein inducible expression system is an ideal tool to explore the potential of CD24 as an oncogene and a target for immunotherapy *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2011; 286(47): 40548-55.
- 58 Zhang YH, Wang ZY, Hao FY, Zhang L. Cluster of differentiation 24 monoclonal antibody induces apoptosis in the osteosarcoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(14): 2038-41.
- 59 Cao MQ, Choi YP, Kang S, Youn JH, Cho NH. CD24⁺ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 2010; 29(18): 2672-80.
- 60 Bretz NP, Salnikov AV, Perne C, Keller S, Wang X, Mierke CT, *et al.* CD24 controls Src/STAT3 activity in human tumors. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(22): 3863-79.
- 61 Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, *et al.* Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol* 2013; 66(3): 187-91.
- 62 Sagiv E, Starr A, Rozoviski U, Khosravi R, Altevogt P, Wang T, *et al.* Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2803-12.
- 63 Salnikov AV, Bretz NP, Perne C, Hazin J, Keller S, Fogel M, *et al.* Antibody targeting of CD24 efficiently retards growth and influences cytokine milieu in experimental carcinomas. *Brit J Cancer* 2013; 108(7): 1449-59.
- 64 Shapira S, Shapira A, Starr A, Kazanov D, Kraus S, Benhar I, *et al.* An immunconjugate of anti-CD24 and pseudomonas exotoxin selectively kills human colorectal tumors in mice. *Gastroenterology* 2011; 140(3): 935-46.
- 65 Beier CP, Beier D. CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 3: 701-10.
- 66 Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, *et al.* CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116. *Radiother Oncol* 2010; 94(3): 375-83.
- 67 Teicher BA, Chari RV. Antibody conjugate therapeutics: Challenges and potential. *Clin Cancer Res* 2011; 17(20): 6389-97.