

LAG-3的免疫学功能及其抗体药物的研究进展

田宝俊^{1,2} 于红阳² 徐明波² 曹荣月^{1*} 杨仲璠^{2*}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ²北京双鹭药业股份有限公司, 北京市重组蛋白及其长效制剂工程技术研究中心, 北京 100143)

摘要 淋巴细胞活化因子-3(lymphocyte activation gene-3, LAG-3)又名CD223, 为一类免疫检查点受体蛋白, 主要表达于活化的免疫细胞中。LAG-3分子在生理条件下可维持机体免疫稳态, 在肿瘤微环境中可介导肿瘤细胞的免疫逃逸, 因此, 可将LAG-3作为肿瘤免疫治疗的新靶点进行研究。LAG-3阻断性抗体可有效缓解其他免疫检查点抑制剂导致的患者耐受, 且在药物联用方面具有较好的临床疗效。目前, 国内外有多款抗体药物处于研发阶段, 部分已进入临床后期阶段。该文从结构、表达、功能等多个方面对LAG-3分子进行综述, 并阐述其相关抗体药物的临床研究进展以及市场情况。

关键词 LAG-3; 免疫逃逸; LAG-3抗体; 肿瘤免疫治疗; 抗体药物联用

Advances in the Research of the Immunological Function of LAG-3 and Its Antibody Drugs

TIAN Baojun^{1,2}, YU Hongyang², XU Mingbo², CAO Rongyue^{1*}, YANG Zhongfan^{2*}

(¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²Beijing Shuanglu Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing Engineering Research Center for Recombinant Proteins and Long-Acting Preparations, Beijing 100143, China)

Abstract LAG-3 (lymphocyte activation gene-3), also known as CD223, is a type of immune checkpoint receptor protein, which is primarily expressed in activated immune cells. LAG-3 can maintain immune homeostasis under physiological conditions and mediate the immune escape of tumor cells in the TME (tumor microenvironment). Therefore, LAG-3 can be used as a new target for tumor immunotherapy. LAG-3 blocking antibody can effectively relieve the tolerance caused by other immune checkpoint inhibitors, and has a better clinical effect in drug combination. At present, many LAG-3-related antibody drugs are in the development stage, some of which have entered the clinical stage. This paper systematically reviews the structure, expression, and function of LAG-3, as well as elaborates the clinical research progress and market situation of LAG-3-related antibody drugs.

Keywords LAG-3; immune escape; LAG-3 antibody; tumor immunotherapy; antibody-drug combination

近年来, 诸多研究表明, 肿瘤细胞可借助免疫检查点受体躲避免疫系统的识别和杀伤, 因此阻断免疫检查点受体成为肿瘤免疫治疗的新思路^[1]。目前开发较为成熟的受体靶点包括程序性死亡蛋白1及其配体(programmed cell death 1/programmed cell

death 1 ligand, PD-1/PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4), 但由于在其相关抗体治疗过程中患者出现耐受, 新靶点的寻找与开发成为新的研究热点^[2-5]。

LAG-3分子是一类新型免疫检查点受体, 属于免

收稿日期: 2020-09-19 接受日期: 2020-11-19

*通讯作者。Tel: 025-83271242, E-mail: caorongyuenanjing@126.com; yzhfan2002@163.com

Received: September 19, 2020 Accepted: November 19, 2020

*Corresponding authors. Tel: +86-25-83271242, E-mail: caorongyuenanjing@126.com; yzhfan2002@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5476>

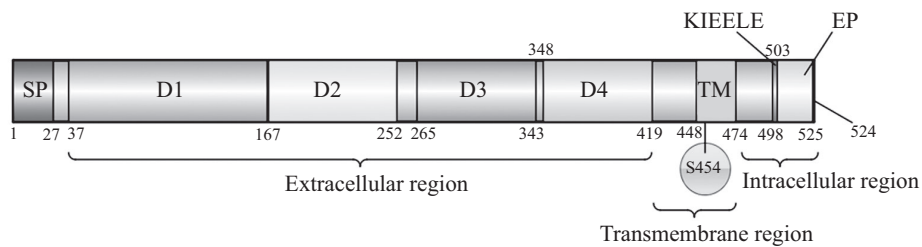


图1 LAG-3蛋白线性结构示意图

Fig.1 Linear structure diagram of LAG-3 protein

疫球蛋白超家族成员。LAG-3分子最早于1990年被发现,法国免疫学家FEDERIC TRIEBEL及其团队^[6]首次分离出LAG-3分子的cDNA克隆,同年发现该分子的免疫调控机制,并于1992年证实主要组织相容性复合体II类分子(major histocompatibility complex II, MHC II)为LAG-3的主要配体^[7]。LAG-3分子可负向调节T细胞,在维持机体免疫系统稳态和促进肿瘤免疫逃逸方面扮演重要角色。作为新靶点之一,LAG-3在肿瘤免疫治疗方面存在巨大潜力。

1 LAG-3分子结构

LAG-3基因在小鼠体内定位于6号染色体,在人体内定位于12号染色体。LAG-3基因含有8个外显子,跨度为6 Kb,编码生成含525个氨基酸的蛋白质(包含信号肽)。LAG-3分子为I型跨膜蛋白,包括胞外区、跨膜区和胞内区三个部分。胞外区与配体结合,由四个免疫球蛋白超家族结构域构成,其中D1结构域含有一个富含脯氨酸的环状结构域和一个链内二硫键,具有种属特异性,被称为V系免疫球蛋白超家族,D2、D3、D4属于C2系。跨膜-胞内区由三部分构成。(1)潜在的丝氨酸磷酸化位点S454,为酪氨酸激酶的作用位点。(2)高度保守的KIEELE基序,与其他已知的任何蛋白无同源性。WORKMAN等^[8]通过突变体实验研究发现,缺失KIEELE基序的突变体完全失去正常功能,证明该基序与LAG-3分子的功能密切相关。(3)谷氨酸-脯氨酸重复序列,又称EP重复序列,与胞内区的信号转导功能密切相关(图1)。

2 LAG-3分子的表达

LAG-3在生理条件下主要表达于活化的T细胞(CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞)、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)、B细胞和树突状细胞(dendritic

cell, DC)等免疫细胞表面,可负向调节T细胞功能。除此之外,研究人员在炎症性淋巴组织如扁桃体或淋巴结中亦发现少量的LAG-3⁺淋巴细胞^[9]。病理状态下,LAG-3在肿瘤浸润的淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)表面高表达,且其表达水平与肿瘤的发生发展呈正相关。

正常情况下,LAG-3分子常以二聚体的形式表达于细胞膜表面,以便与抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面的MHC II分子特异性结合并发挥作用。LI等^[10]研究发现,在T细胞受到抗原刺激后,细胞膜表面的LAG-3分子会发生断裂,在膜上裂解为两个膜相关的片段p54和p16。其中p54分子量约为54 kDa,包含D1、D2和D3结构域,以可溶形式被释放,即可溶性LAG-3(soluble LAG-3, sLAG-3)。p16为跨膜-胞内部分,分子量约为16 kDa。分子断裂的实质为LAG-3膜近端的D4结构域与跨膜区之间的连接肽被切割,该过程由基质金属蛋白酶ADAM10和ADAM17介导。因此,LAG-3分子在体内一般以两种形式存在:膜LAG-3(membrane LAG-3, mLAG-3或LAG-3)和sLAG-3,二者不只在结构上存在较大差异,其免疫学功能也是截然相反的。

3 LAG-3的免疫学功能

3.1 LAG-3的免疫抑制功能

LAG-3可抑制CD4⁺ T细胞的活性。LAG-3与MHC II相互作用可下调CD4⁺ T细胞的增殖能力和细胞因子分泌水平,加入抗LAG-3抗体后可恢复CD4⁺ T细胞的活性,其具体调控机制尚不明确^[11-12]。LAG-3并非与所有MHC II分子结合,而是选择性地识别并结合抗原肽-MHC II分子复合物(peptide-MHC II, pMHC II),抑制pMHC II应答的CD4⁺ T细胞^[13-14]。值得注意的是,LAG-3已被证明为独立的负向调节因

子,与CD4等其他调节分子不存在竞争关系。实验表明,LAG-3对CD4⁺ T细胞的抑制并不是通过阻断CD4-MHC II或TCR-MHC II之间的相互作用来实现的,而是通过胞内区直接传递抑制信号。新的研究发现,LAG-3可负向调节初始CD4⁺ T细胞的线粒体活动,限制初始CD4⁺ T细胞的正常代谢和扩增,具体调节方式与信号传导及转录激活蛋白5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)和蛋白激酶B密切相关^[15]。

LAG-3可抑制CD8⁺ T细胞的活性。WORKMAN等^[16]使用LAG-3缺陷型小鼠进行实验,发现小鼠体内CD8⁺ T细胞的活性明显高于正常小鼠,推断LAG-3对CD8⁺ T细胞可能具有抑制作用。进一步研究发现,初始CD8⁺ T细胞中LAG-3表达水平较低,肿瘤抗原刺激后其表达量增加,同时观察到LAG-3可明显抑制CD8⁺ T细胞的细胞毒作用^[17-18]。GROSSO等^[19]在小鼠C3-HA自耐受模型系统中测试了LAG-3对HA特异性CD8⁺ T细胞的正常功能的影响,证实LAG-3对CD8⁺ T细胞具有胞内抑制效应。为了进一步评估LAG-3是否直接作用于CD8⁺ T细胞,研究人员进行了LAG-3阻断实验,观察到正常小鼠的前列腺中CD8⁺ T细胞聚集增多且活性显著增强。同时发现CD4⁺ T细胞缺乏的小鼠的前列腺中也出现T细胞的积累,与CD8⁺ T细胞表征吻合。因此证明了LAG-3通过信号转导直接抑制CD8⁺ T细胞,而不依赖于CD4⁺ T细胞与MHC II的作用^[20]。

LAG-3可增强调节性T细胞(regulatory T cell, Treg cell)的功能。Treg细胞具有免疫负调节作用,可下调T细胞活性,常见类型有天然调节性T细胞(natural regulatory T cells, nTreg cells)和诱导型调节性T细胞(inducible regulatory T cells, iTreg cells)。LAG-3可正向诱导Treg细胞的活化,激活其免疫抑制功能。HUANG等^[21]发现正常的nTreg细胞在活化状态下可低表达LAG-3,在效应CD4⁺ T细胞存在时表达增强,加入抗LAG-3抗体可显著抑制Treg细胞活性,同时在LAG-3缺陷型小鼠体内检测到nTreg细胞的负调节功能明显下调。后续在正常小鼠模型的研究中,去除小鼠体内所有的nTreg细胞,借助逆转录病毒转导实验向T细胞中转入LAG-3,在转导后细胞存在的情况下,小鼠体内幼稚T细胞的增殖受到抑制,证实LAG-3可重新赋予小鼠nTreg细胞活性。近期有研究表明,产生IL-10的iTreg细胞(又称Tr1细胞)

可特异性表达LAG-3。LAG-3作为Tr1细胞表型标志物的同时,还可调节nTreg细胞功能最大化^[22]。除此之外,CAMISASCHI等^[23]通过对黑色素瘤以及结直肠癌患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、肿瘤淋巴结细胞进行流式分选并分析,发现肿瘤患者体内CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ LAG-3⁺ Treg细胞高度增殖,且富集于肿瘤浸润部位,LAG-3⁺ Treg细胞以接触依赖的方式发挥其抑制活性。同时还检测到该类LAG-3⁺ Treg细胞可分泌大量IL-10和TGF-β1,这些抑制性细胞因子可参与介导Treg细胞功能,其具体作用还有待进一步研究。

到目前为止,尽管LAG-3抑制作用的完整信号通路还未被揭示,但已有部分研究对该问题进行了讨论。HANNIER等^[24]推测,LAG-3可通过干扰TCR信号转导从而下调免疫应答,实验证明LAG-3与CD3高度相关,并且二者交联会抑制T细胞增殖、细胞因子生成和钙生成。WORKMAN等^[8]则通过突变体实验,证明KIEELE基序在LAG-3对效应CD4⁺ T细胞的抑制过程中十分关键。OKAZAKI及其同事^[25]在此基础上展开研究,发现KIEELE基序缺失并没有消除LAG-3的抑制功能,进一步研究表明,LAG-3可能通过KIEELE基序和EP重复序列中的FSAL基序转导两个独立的抑制信号。FSAL基序的氨基酸突变对LAG-3的功能存在显著影响,其序列中的苯丙氨酸和亮氨酸被丙氨酸取代后,LAG-3的抑制能力显著降低。此外,当FSAL基序突变与KIEELE基序缺失同时发生时,LAG-3的抑制能力完全丧失,而KIEELE基序单独缺失并不影响LAG-3的抑制能力。以上结果表明,FSAL基序和KIEELE基序可能是LAG-3信号转导通路中的关键点,然而这些基序如何调节TCR反应和下游分子尚不清楚,目前也尚未发现与这些基序相结合的胞内蛋白,需通过进一步探索来确定LAG-3分子胞内信号转导通路的具体机制。

3.2 sLAG-3的免疫辅助功能

sLAG-3可诱导DC细胞的成熟和活化过程。sLAG-3与其配体结合后引起DC胞内蛋白磷酸化,诱导DC成熟并迁移到二级淋巴管,启动T细胞的活化,同时促进趋化因子和肿瘤坏死因子的产生^[26]。CASATI等^[27]同时使用sLAG-3-Ig和抗原肽作用于PBMC后,观察到其DC表型较单独抗原肽作用下的DC表型更为成熟,因此推测sLAG-3与DC细胞的成

熟密切相关。随后研究人员通过一系列实验证明, sLAG-3作为协同分子, 与CD40/CD40L信号共同作用于DC细胞, 为其达到完全成熟提供关键信号。成熟后的DC细胞可大量分泌IL-12p70, 促使Th1细胞活化, 因此sLAG-3还可作为Th1细胞免疫应答反应的生物标志物^[28]。同时, 共刺激反应还可促进CD8⁺ T细胞的活化、介导细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)的杀伤效应。

sLAG-3的免疫辅助作用对肿瘤治疗具有重要意义, sLAG-3的表达也被认为是部分肿瘤患者预后良好的标志。HE等^[29]对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的血清样本进行酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 发现I、II期患者血清中的sLAG-3水平远高于III、IV期患者, 因此得出sLAG-3的表达可能与肿瘤免疫反应相关的结论, 提高体内sLAG-3水平可作为晚期NSCLC患者的有效治疗方法。除此之外, LI等^[30]在胃癌(gastric carcinoma, GC)患者的血清样本中检测到sLAG-3在患者外周血中呈低表达, sLAG-3的高表达与预后良好呈正相关。小鼠体内实验表明, sLAG-3可抑制肿瘤生长, 促进IL-12和干扰素- γ 的分泌。此外, sLAG-3还能延长荷瘤小鼠的总生存期, 提高小鼠的存活率。

因此, sLAG-3可作为肿瘤治疗辅助药物进行开发, 目前研发较为成熟的相关药物当属Immutep公司的Eftiagimod Alpha(又名IMP321), 其原理是将LAG-3的可溶性二聚体与免疫球蛋白结合形成融合蛋白, 主要用于激活体内未成熟的抗原递呈细胞, 增强患者的免疫应答^[31]。IMP321被证明可以在先天和后天免疫应答中激活大量效应细胞, 临床上可与化疗药物或免疫抑制药物联用, 在肿瘤治疗中起到辅助作用^[32]。BRIGNONE等^[33]将IMP321与紫杉醇联用治疗转移性乳腺癌, 在I/II期临床试验中, 该联合疗法对转移性乳腺癌患者的客观缓解率(objective response rate, ORR)为50%, 高于单用紫杉醇时的25%, 结果显示该疗法具有较好的临床疗效。WANG等^[34]对IMP321联合吉西他滨治疗晚期胰腺癌的方案进行评估, 证明该方案耐受性高且毒性较低。同时在最新的名为TACTI-002的II期临床试验中, 将IMP321与PD-1抑制剂Keytruda联用治疗NSCLC患者, 结果显示平均ORR达到47%, 远高于Keytruda单用时的治疗效果。

4 LAG-3与肿瘤免疫逃逸

TIL表面LAG-3的高表达与肿瘤的发生发展存在一定的关系。在肿瘤抗原刺激下, 微环境中的淋巴细胞表面过表达LAG-3, 其表达水平与患者的生存率以及预后密切相关。HE等^[35]借助免疫组化方法检测到部分NSCLC患者的TIL上存在LAG-3高表达, 且在非腺癌组织中表达较高。QUE等^[36]在对软组织肉瘤(soft tissue sarcoma, STS)的研究中发现, STS患者外周血T细胞相比于健康人的外周血T细胞具有更高的LAG-3表达, 且LAG-3主要表达和定位于肿瘤浸润的CD8⁺ T细胞上, 该现象与患者病理分级高、肿瘤分期晚和生存率低具有相关性。RADWAN等^[37]利用流式细胞术检测到在急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)患者体内, CTLA-4⁺ LAG-3⁺ T细胞亚群数目显著增加, 其中LAG-3表达水平与AML患者分型密切相关。

肿瘤细胞自身可表达LAG-3配体, TIL上高表达的LAG-3与肿瘤细胞表面的相关配体结合可导致T细胞功能减退甚至耗竭, 从而促进肿瘤免疫逃逸, 该现象在CD8⁺ T细胞上尤为明显。BAITSCH等^[38]测定了从黑色素瘤患者体内分离出来的Melan-A特异性CD8⁺ T细胞的基因表达谱, 数据显示该特异性T细胞可表达大量与T细胞耗竭相关的基因, 如LAG-3等。其表面的LAG-3等多种抑制性受体可协同作用, 导致微环境中的T细胞功能减退。GANDHI等^[39]发现, 霍奇金淋巴瘤患者的内源性CD8⁺ T细胞数目增多但反应低下, 其功能与TIL上LAG-3表达水平呈负相关。MATSUZAKI等^[40]在卵巢癌研究中检测到在肿瘤浸润的CD8⁺ T细胞上存在LAG-3过表达, 且CD8⁺ LAG-3⁺ T细胞的细胞因子分泌功能受损严重。

LAG-3介导的肿瘤免疫逃逸相关的配体包括MHC II和纤维蛋白原相关蛋白-1(fibrinogen-like protein 1, FGL-1)。MHC II为LAG-3的经典配体, 在肿瘤细胞表面表达。肿瘤发生初期, MHC II可募集CD4⁺ T细胞, 促进抗肿瘤免疫。随着肿瘤的发展, TIL细胞表面LAG-3分子数目增多, 整体活性增强, 与MHC II结合后抗肿瘤免疫转为免疫抑制。例如黑色素瘤细胞通过表达MHC II来使肿瘤浸润的CD4⁺ T细胞失去原有功能, 从而逃避免疫系统的识别和杀伤^[41]。FGL-1是另一种由肝脏分泌的LAG-3功能性配体, 在正常情况下由肝细胞低水平表达, 在肿瘤发生时表达会显著增加。WANG等^[42]通过“Receptor Array”

系统首次证明LAG-3可与FGL-1结合,随后运用小鼠模型开展研究,证明无论是敲除*FGL-1*基因还是使用FGL-1抗体治疗,都能显著增强小鼠T细胞的活性。同时发现,在小鼠肿瘤模型中阻断FGL-1与LAG-3的结合,可减缓肿瘤发展速度。研究人员分别使用抗FGL-1、抗LAG-3和抗PD-1/PD-L1抗体处理小鼠肿瘤模型,结果表明这些抗体皆可不同程度地延缓肿瘤生长并提高部分小鼠生存率;但当联合阻断FGL-1和PD-1/PD-L1后,小鼠的整体生存率较药物单用时显著提高,证明LAG-3-FGL-1与B7-H1-PD-1通路相互独立,为一种全新的免疫逃逸路径。实验人员还借助微阵列数据库和蛋白质组分析发现FGL-1在NSCLC、前列腺癌、黑色素瘤和结直肠癌等多种实体瘤中都存在高表达,且在NSCLC和黑色素瘤患者中,FGL-1的高表达与PD-1/PD-L1阻断疗法的耐受存在密切关联。

5 LAG-3抗体药物

LAG-3抗体药物的作用机理是药物直接结合LAG-3分子或其配体,阻断二者相互作用,下调LAG-3对免疫系统的抑制作用,LAG-3抗体可以在恢复T细胞功能的同时抑制Treg细胞的活性。在以往的研究中,针对PD-1的抗体只能激活T细胞,不能抑制Treg细胞的活性^[4,21,43]。因此,理论上LAG-3抗体具有更好的治疗效果,LAG-3也被认为是一个更具研究价值的靶点。

5.1 国内外在研情况

目前,全球暂无靶向LAG-3抗体产品上市,但国内外多家医药公司已开展LAG-3单抗的研发及临床研究。截至目前,全球共有近30款LAG-3抗体产品在研,LAG-3已成为肿瘤免疫疗法领域最新的研发热点。

国外已有多种LAG-3抗体进入临床试验阶段,其中进展最快的是BMS公司的Relatlimab,作为全球最先进入研发的LAG-3抗体,部分Relatlimab相关的临床试验已进入III期。除此之外,MSD公司等十几家制药企业的LAG-3抗体项目正处于临床试验的不同阶段,适应症包括血液肿瘤以及各类实体瘤等(<https://www.ClinicalTrials.gov/>)。

国内亦有多家企业的LAG-3抗体进入临床试验阶段,包括苏州信达生物制药有限公司的IBI110、南京维立志博生物科技有限公司的LBL-007、江

苏恒瑞医药的SHR-1802以及浙江时迈药业有限公司的DENV3等。2019年4月,信达制药的LAG-3单抗IBI110临床试验申请获受理。同年5月,南京维立志博生物科技有限公司宣布其自主研发的LAG-3全人源单抗LBL-007的进口临床申请获CDE受理。除此之外,杭州科兴生物科技有限公司、天境生物科技(上海)有限公司及三生国健药业(上海)股份有限公司均已开展LAG-3抗体的新药研发工作(表1)(<http://www.chinadrugtrials.org.cn/>)。

5.2 LAG-3单抗与PD-1/PD-L1单抗联用

近年来,PD-1/PD-L1单抗的抗肿瘤疗效显著,被认为是一种非常有前景的肿瘤免疫疗法。Nivolumab于2015年在美国被批准用于治疗晚期黑色素瘤,PD-1/PD-L1单抗自此便成为肿瘤治疗的明星药物。但诸多临床试验表明,并不是所有的肿瘤患者都能对PD-1/PD-L1单抗产生长期反应,患者耐受问题逐渐显现。同时在Relatlimab单药临床试验中,发现用药后肿瘤患者的缓解率远低于PD-1/PD-L1单抗和CTLA-4单抗,因此其单药临床有效性有待考证。

早于2009年,研究人员发现,LAG-3和PD-1在耐受患者的TIL上共表达,提示二者可能会协同促进肿瘤介导的免疫抑制。WOO等^[44]使用接种纤维肉瘤和大肠腺癌的小鼠进行实验,在分别使用抗LAG-3抗体和抗PD-1抗体单药治疗50天后,平均仅有0%~40%的小鼠无瘤生长;在使用抗LAG-3/PD-1联合疗法治疗50天后,分别有70%和80%的小鼠无瘤生长。结果表明,抗LAG-3/PD-1的联合治疗具有协同效应,优于单一治疗。近期匹兹堡大学的研究人员发现,细胞表面的LAG-3表达与基质金属蛋白酶ADAM-10存在关联^[45]。ADAM-10可调节LAG-3信号转导,当部分皮肤癌患者体内出现LAG-3高表达且ADAM-10低表达时,会引起对抗PD-1疗法的耐受,因此可通过抑制LAG-3缓解患者耐受^[45]。在诸多基础研究的支持下,国内外医药研究者将LAG-3/PD-1抗体联用以及增加药物适应症种类作为肿瘤免疫治疗的新思路。

BMS公司作为LAG-3抗体开发先驱之一,早已开展抗体联用相关的临床试验。据ClinicalTrials(<https://www.ClinicalTrials.gov/>)的数据统计,截止到2020年6月,BMS公司已申报29项Relatlimab相关的试验,其中有26项是将Relatlimab与Nivolumab联用治疗多种肿瘤,适用范围涉及黑色素瘤、头颈癌、NSCLC、

表1 LAG-3抗体药物全球在研情况
Table1 Global development of LAG-3 antibody drugs

药物名称 Drug name	药物形式 Drug form	原研机构 Research institution	临床获批日期 Clinical approval date	临床适应症 Clinical indications
Relatlimab	IgG4 McAb	BMS	October, 2013	Stage I: advanced melanoma, advanced solid tumor, extensive solid tumor Stage II: microsatellite stable advanced colorectal cancer, advanced soft tissue sarcoma, head and neck cancer, non-small cell lung cancer, gastric cancer or gastroesophageal junction adenocarcinoma, advanced renal cell carcinoma
GSK2831781	IgG1 McAb	GSK	July, 2014	Stage I: plaque psoriasis Stage II: ulcerative colitis
LAG-525	IgG4 McAb	Novartis	June, 2015	Stage I: triple negative breast cancer, advanced solid tumor Stage II: metastatic melanoma, non-small cell lung cancer, gastric adenocarcinoma, esophageal adenocarcinoma, soft tissue sarcoma, ovarian adenocarcinoma, neuroendocrine tumors
MK4280	IgG4 McAb	Merck	March, 2016	Stage I: advanced solid tumor Stage II: Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, B cell lymphoma, non-small cell lung cancer
TSR-033	IgG4 McAb	TESARO	June, 2016	Stage I: advanced metastatic solid tumor
RENG3767	IgG4 McAb	Regeneron	November, 2016	Stage I: malignant tumor
BI-754111	IgG4 McAb	BI	May, 2017	Stage I: advanced non-small cell lung cancer Stage II: advanced solid tumor
MGD013	BsAb	Zlab and Macro Genics	July, 2017	Stage I: advanced liver cancer, advanced solid tumor, hematological tumor, gastric cancer, gastroesophageal cancer Stage III: gastric cancer
FS118	BsAb	F-star	February, 2018	Stage I: advanced cancer, metastatic tumor
Sym022	IgG4 McAb	Symphogen A/S	April, 2018	Stage I: advanced solid tumor, malignant tumor, lymphoma
INCAGN 02385	IgG1-Fc	International Sàrl	May, 2018	Stage I: microsatellite instability endometrial cancer, gastric cancer, melanoma
IBI110	IgG4 McAb	Innovent	April, 2019	Stage I: advanced malignant tumor
LBL-007	IgG4 McAb	Leads Biolabs	December, 2019	Stage I: advanced solid tumor and advanced lymphoma
SHR-1802	IgG4 McAb	Hengrui Medicine	April, 2020	Stage I: malignant tumor
DNV3	McAb	Centry Med	November, 2020	Stage I: metastatic solid tumor, lymphoma

McAb: 单克隆抗体; BsAb: 双特异性抗体。

McAb: monoclonal antibody; BsAb: bispecific antibody.

结直肠癌等。2017年9月, BMS公司在ESMO年会上公布, 在Relatlimab和Nivolumab联用治疗黑色素瘤的I/II a期临床试验中发现, 该疗法对抗PD-1/PD-L1免疫疗法耐受的黑色素瘤患者具有一定的治疗效果。68名受试者的平均ORR为12.5%, 疾病控制率达64%, 且TIL上表达LAG-3的患者(>1%)的ORR比LAG-3阴性患者高三倍以上, 证明Relatlimab/Nivolum-

ab联用对LAG-3阳性的黑色素瘤患者效果更佳。在安全性方面, Relatlimab/Nivolumab联用与Nivolumab单独用药的不良反应发生率相近。68名患者中, 最常见的3~4级副作用为腹泻(4%)、肠炎(4%)和肺炎(3%)。试验中约10%的患者由于严重的副作用而停药, 但目前整体安全性处于可耐受范围内, 其具体的毒副作用还有待后续临床验证^[46]。这些结果表

明, Relatlimab/Nivolumab联合疗法有望解决抗PD-1抗体使用中存在的耐药问题。目前, BMS公司还在进一步推进Relatlimab与多种PD-1/PD-L1抑制剂联用的临床试验, 旨在深入测试该疗法的安全性以及扩大治疗范围。MSD公司紧随其后, 截止到2020年6月, MSD公司已有三项与LAG-3单抗MK4280相关的试验申报临床, 主要为MK4280与其旗下抗PD-1明星药物Keytruda联用, 适应症涉及血液恶性肿瘤、非小细胞肺癌以及实体瘤等, 其中有两项已进入II期临床。2018年, MSD公司公布MK4280与Keytruda联用治疗扩散性实体瘤的I/II期临床数据, 结果表明, 两种药物联用的疾病控制率远高于单药组(<https://www.ClinicalTrials.gov/>)。

6 思考与展望

目前, LAG-3抗体的临床研究主要集中在与其他免疫检查点抑制剂的联用方面, 如PD-1/PD-L1、CTLA-4以及吲哚胺2,3-双加氧化酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)等, 在解决药物耐受问题的同时, 也提高了LAG-3抗体的临床有效率。除了药物联用外, 对LAG-3抗体进行功能性改造也是未来研究的主流方向之一, 可从两个方面进行设计。一是设计LAG-3双特异性抗体, 使抗体可特异性结合两种靶点, 达到共抑制的目的。例如Macro Genics公司利用双亲和重新定位(dual-affinity Re-targeting, DART)技术, 设计出了可与PD-1和LAG-3特异性结合的四价双功能抗体分子MGD013; F-star公司在抗体的Fc端引入LAG-3抗原结合位点, 抗体可变区用于识别PD-L1抗原, 构成三价双功能抗体FS118^[47]。体外实验结果显示, FS118的体外肿瘤抑制效果优于两种抗体联用, 可有效解决患者耐受问题。二是借助基因工程或蛋白质工程手段, 直接改造传统LAG-3抗体结构, 增强药物的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)^[48]。Merck公司旗下的抗PD-1/PD-L1药物Avelumab在设计上使用具有强ADCC活性的IgG1亚型, 保留了可诱导ADCC效应的天然Fc片段。在解除肿瘤细胞免疫逃逸的同时, 还可借助ADCC作用介导NK细胞杀伤肿瘤, 可以此作为参考对LAG-3抗体进行适当改造。同时现有部分LAG-3抗体的单药治疗临床效果不佳, 可能原因是由于这些抗体主要针对MHC II配体所致, 而新近研究证明,

FGL-1才是LAG-3分子最主要的配体, 因此该类抗体不能完全阻断肿瘤免疫逃逸, 未来可针对FGL-1进行抗体药物研发。

虽然目前LAG-3单抗的研发如火如荼, 但该靶点尚且存在诸多未解决的问题, 总结为以下几点: (1) LAG-3分子下调T细胞活性的完整信号通路仍不清楚; (2) LAG-3分子配体众多, 各配体之间存在未知关联; (3) LAG-3分子与其他免疫检查点分子存在协同作用, 作用机理尚不明确。若能解决这些问题, LAG-3分子及其相关药物的研究将获得显著进展。

参考文献 (References)

- [1] VILLADOLID J, AMIN A. Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: update on management of immune-related toxicities [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(5): 560.
- [2] BLANK C, GAJEWSKI T F, MACKENSEN A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(4): 307-14.
- [3] CHENG L, XIONG C, JINGNAN L, et al. Advances of PD-1/PD-L1 signaling pathway in immune escape and treatment for Non-small cell lung cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(10): 734-40.
- [4] WANG X, BAO Z, ZHANG X, et al. Effectiveness and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of solid tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59901.
- [5] BRUNNER-WEINZIERL M C, RUDD C E. CTLA-4 and PD-1 control of T-cell motility and migration: implications for tumor immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2737.
- [6] TRIEBEL F, JITSUKAWA S, BAIXERAS E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4 [J]. *J Exp Med*, 1990, 171(5): 1393-405.
- [7] BAIXERAS E, HUARD B, MIOSEC C, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(2): 327-37.
- [8] WORKMAN C J, DUGGER K J, VIGNALI D A. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3 [J]. *J Immunol*, 2002, 169(10): 5392-5.
- [9] HUARD B, TOURNIER M, HERCEND T, et al. Lymphocyte activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4⁺ T lymphocytes [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(12): 3216-21.
- [10] LI N, WANG Y, FORBES K, et al. Metalloproteases regulate T - cell proliferation and effector function via LAG-3 [J]. *EMBO J*, 2007, 26(2): 494-504.
- [11] HANG J, LIU W, XIE T, et al. Elevated LAG-3 on CD4⁺ T cells negatively correlates with neutralizing antibody response during HCV infection [J]. *Immunol Lett*, 2019, 212: 46-52.
- [12] YU X, HUANG X, CHEN X, et al. Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody for cancer immunotherapy [C]. *MAbs Taylor Francis*, 2019, 11(6):

- 1139-48.
- [13] MARUHASHI T, OKAZAKI I M, SUGIURA D, et al. LAG-3 inhibits the activation of CD4⁺ T cells that recognize stable pMHC II through its conformation-dependent recognition of pMHC II [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(12): 1415-26.
- [14] HOFFMANN M M, SLANSKY J E. T-cell receptor affinity in the age of cancer immunotherapy [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(7): 862-70.
- [15] PREVITE D M, MARTINS C P, O'CONNOR E C, et al. Lymphocyte activation gene-3 maintains mitochondrial and metabolic quiescence in naive CD4⁺ T cells [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(1): 129-41.e4.
- [16] WORKMAN C J, VIGNALI D A. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223) [J]. *J Immunol*, 2005, 174(2): 688-95.
- [17] GRYWALSKA E, PASIARSKI M, GÓŹDŹ S, et al. Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6505.
- [18] ASCIONE A, ARENACCIO C, MALLANO A, et al. Development of a novel human phage display-derived anti-LAG3 scFv antibody targeting CD8⁺ T lymphocyte exhaustion [J]. *BMC Biotechnol*, 2019, 19(1): 1-15.
- [19] GROSSO J F, KELLEHER C C, HARRIS T J, et al. LAG-3 regulates CD8⁺ T cell accumulation and effector function in murine self-and tumor-tolerance systems [J]. *J Clin Investig*, 2007, 117(11): 3383-92.
- [20] MEI Z, HUANG J, QIAO B, et al. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 1-9.
- [21] HUANG C T, WORKMAN C J, FLIES D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells [J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 503-13.
- [22] OKAMURA T, YAMAMOTO K, FUJIO K. Early growth response gene 2-expressing CD4⁺ LAG3⁺ regulatory T cells: the therapeutic potential for treating autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 340.
- [23] CAMISASCHI C, CASATI C, RINI F, et al. LAG-3 expression defines a subset of CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells that are expanded at tumor sites [J]. *J Immunol*, 2010, 184(11): 6545-51.
- [24] HANNIER S, TOURNIER M, BISMUTH G, et al. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling [J]. *J Immunol*, 1998, 161(8): 4058-65.
- [25] MAEDA T K, SUGIURA D, OKAZAKI I M, et al. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(15): 6017-26.
- [26] AVICE M N, SARFATI M, TRIEBEL F, et al. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF- α and IL-12 production by monocytes and dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 2748-53.
- [27] CASATI C, CAMISASCHI C, NOVELLINO L, et al. Human lymphocyte activation gene-3 molecules expressed by activated T cells deliver costimulation signal for dendritic cell activation [J]. *J Immunol*, 2008, 180(6): 3782-8.
- [28] LIENHARDT C, AZZURRI A, AMEDEI A, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo* [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(6): 1605-13.
- [29] HE Y, WANG Y, ZHAO S, et al. sLAG-3 in non-small cell lung cancer patients' serum [J]. *OncoTargets Ther*, 2018, 11: 4781.
- [30] LI N, JILISIHAN B, WANG W, et al. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8⁺ T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 23(3): 341-51.
- [31] BRIGNONE C, GRYGAR C, MARCU M, et al. IMP321 (sLAG-3) safety and T cell response potentiation using an influenza vaccine as a model antigen: a single-blind phase I study [J]. *Vaccine*, 2007, 25(24): 4641-50.
- [32] FOUGERAY S, BRIGNONE C, TRIEBEL F. A soluble LAG-3 protein as an immunopotentiator for therapeutic vaccines: pre-clinical evaluation of IMP321 [J]. *Vaccine*, 2006, 24(26): 5426-33.
- [33] BRIGNONE C, GUTIERREZ M, MEFTI F, et al. First-line chemotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity [J]. *J Transl Med*, 2010, 8(1): 1-11.
- [34] WANG-GILLAM A, PLAMBECK-SUESS S, GOEDEGE-BUURE P, et al. A phase I study of IMP321 and gemcitabine as the front-line therapy in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(3): 707-13.
- [35] HE Y, YU H, ROZEBOOM L, et al. LAG-3 protein expression in non-small cell lung cancer and its relationship with PD-1/PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(5): 814-23.
- [36] QUE Y, FANG Z, GUAN Y, et al. LAG-3 expression on tumor-infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival [J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(2): 331.
- [37] RADWAN S M, ELLEBOUDY N S, NABIH N A, et al. The immune checkpoints Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and Lymphocyte activation gene-3 expression is up-regulated in acute myeloid leukemia [J]. *HLA*, 2020, 96(1): 3-12.
- [38] BAITSCH L, BAUMGAERTNER P, DEVÈVRE E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients [J]. *J Clin Investig*, 2011, 121(6): 2350-60.
- [39] GANDHI M K, LAMBLEY E, DURAISWAMY J, et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8⁺ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients [J]. *Blood*, 2006, 108(7): 2280-9.
- [40] MATSUZAKI J, GNJATIC S, MHAWECH-FAUCEGLIA P, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 7875-80.
- [41] DONIA M, ANDERSEN R, KJELDSEN J W, et al. Aberrant expression of MHC class II in melanoma attracts inflammatory tumor-specific CD4⁺ T cells, which dampen CD8⁺ T cell anti-tumor reactivity [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(18): 3747-59.
- [42] WANG J, SANMAMED M F, DATAR I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3 [J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 334-47.e12.
- [43] JIANG Z, ZHANYU P, XIUBAO R. Progress of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2017, 20(2): 138-42.
- [44] WOO S R, TURNIS M E, GOLDBERG M V, et al. Immune in-

- hibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(4): 917-27.
- [45] ANDREWS L P, SOMASUNDARAM A, MOSKOVITZ J M, et al. Resistance to PD1 blockade in the absence of metalloprotease-mediated LAG3 shedding [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(49): eabc2728.
- [46] ASCIERTO P, BONO P, BHATIA S, et al. LBA18Efficacy of BMS-986016, a monoclonal antibody that targets lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), in combination with nivolumab in pts with melanoma who progressed during prior anti-PD-1/PD-L1 therapy (mel prior IO) in all-comer and biomarker-enriched populations [J]. *Ann Oncol*, 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx440.011.
- [47] KRAMAN M, FAROUDI M, ALLEN N L, et al. FS118, a bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-L1, enhances T-Cell activation resulting in potent antitumor activity [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(13): 3333-44.
- [48] 宗会芳. 用CRISPR/Cas9技术改造CHO细胞株生产高ADCC活性的抗体药物[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.