

联合靶向免疫检查点CD47与PDL1的抗肿瘤研究进展

高向征 梁可莹 梅圣圣 彭珊珊 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058)

摘要 程序性死亡配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PDL1)是适应性免疫系统中的一个关键的抑制性信号。CD47是先天性免疫系统中的一个关键的“不要吃我”信号,也是适应性免疫反应的调节剂。由于CD47和PDL1分子在许多肿瘤细胞表面过度表达,从而使肿瘤细胞能够逃避机体免疫系统监视。近年来,越来越多的研究聚焦于双重阻断免疫检查点PDL1与CD47分子,以调动先天性和适应性免疫应答,实现协同治疗多种恶性肿瘤的目的。该文就近年来双重阻断PDL1和CD47在肿瘤研究中的进展作一简要综述,这种联合靶向策略可能为开发联合先天性和适应性抗肿瘤免疫反应的高效免疫疗法奠定基础。

关键词 PDL1; CD47; 免疫检查点; 免疫治疗

Anti-Tumor Progress on Dual Blockage of Immune Checkpoints CD47 and PDL1

GAO Xiangzheng, LIANG Keying, MEI Shengsheng, PENG Shanshan, ZHAN Jinbiao*

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

Abstract PDL1 (programmed death 1 ligand 1) is a key inhibitory signal in the adaptive immune system. CD47 is a key “don’t eat me” signal in the innate immune system and also a modulator of adaptive immune responses. The overexpression of CD47 and PDL1 on the surface of most tumor cells is associated with the cancer immune escape. Emerging evidence has indicated that dual targeting of the immune checkpoints PDL1 and CD47 can provide more opportunities for the clearance of malignant cells. This review summarizes the progress on the dual blockage of PDL1 and CD47 for tumor immunotherapy in recent years. The dual blockage synergistic strategy may provide a highly effective combination alternative that modulates both innate and adaptive anti-tumor immunity.

Keywords PDL1; CD47; immune checkpoint; immunotherapy

自2011年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)首次批准抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)抗体——Ipilimumab用于治疗转移性黑色素瘤以来,免疫检查点抑制剂与肿瘤免疫治疗的研究受到日益关注。免疫检查点抑制剂的使

用很大程度上改善了多种转移性和难治性癌症患者的预后^[1-3]。其中,在适应性免疫检查点中,程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death protein 1, PD1)及其配体PDL1(programmed cell death 1 ligand 1, 也称CD274或B7-H1)是最引入瞩目的研究靶标。其研究策略主要是通过阻断PD1/PDL1的相互作用以终

收稿日期: 2020-12-24 接受日期: 2021-01-26

国家自然科学基金(批准号: 81872784)资助的课题

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

Received: December 24, 2020 Accepted: January 26, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81872784)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5522>

止T细胞抑制途径, 进而促进效应T细胞的活化并增强抗肿瘤免疫应答^[2]。尽管PD1或PDL1抗体对先前被认为是终末期癌症的一部分患者已显示出良好的治疗效果, 但许多最初对治疗有反应的患者在随访监测中会发展为进展性疾病^[3]。临床数据显示, 靶向PDL1的治疗适用于高表达PDL1的癌症患者, 在低表达PDL1的患者体内疗效有限^[4]。然而, 有趣的是CD47作为一个公认的先天性免疫系统检查点, 也在大多数肿瘤细胞表面高度表达, 并且多项研究证实CD47在介导肿瘤细胞先天性免疫逃逸过程中发挥着重要作用。众所周知, 在肿瘤复杂的异质性免疫抑制微环境中, 肿瘤细胞可能通过多种机制逃避免疫监视。因此, 仅激活先天性免疫或者适应性免疫应答不足以消除肿瘤细胞, 而同时激活机体这两大免疫系统将会提供一种更有效的治疗策略^[5-6]。因此, 近年来研究者对组合免疫疗法尤其是联合先天性免疫检查点CD47和适应性免疫检查点PDL1抑制剂的兴趣日益浓厚。在本综述中, 简要介绍了近年来关于先天性免疫系统中一个关键的“不要吃我”信号——CD47/SIRPα轴(CD47/signal regulatory protein α axis, CD47/SIRPα axis)以及适应性免疫系统中关键的抑制信号——PD1/PDL1轴(PD1/PDL1 axis)的结构以及功能基础, 并简要分析其研究现状。强调机体免疫系统这两个分支的联合作用对于产生最佳抗肿瘤效果的必要性。重点分析了联合靶向免疫检查点CD47与PDL1以调动先天性免疫系统和适应性免疫系统在肿瘤治疗中的研究进展。

1 先天性免疫系统检查点——CD47/SIRPα轴

1.1 CD47的结构与功能

CD47也被称为整合素相关蛋白(integrin associated protein, IAP), 在正常和病变组织中均广泛表达, 是免疫球蛋白(Ig)超家族的重要成员。CD47的分子量约为 3.5×10^5 道尔顿(Dalton, Da), 包含1个由123个

氨基酸组成的胞外区、5个高度疏水延伸的跨膜区段以及1个由33个氨基酸组成的短的选择性拼接的胞内区段(图1)。

由于CD47胞内尾部有四种不同的剪接异构体, 从而形成了只在胞质段长度上有差异的四种亚型^[7]。其中2型CD47是在所有循环和免疫细胞中表达最广泛的亚型, 3型与4型主要在神经元细胞、肠黏膜细胞和睾丸细胞中表达, 而1型只在角质形成细胞中有显著的表达。CD47的这些亚型分布在人类和小鼠之间是高度保守的^[8]。目前, 已知的CD47受体主要有三类: 整合素(integrin)、血小板反应蛋白1(thrombospondin 1, TSP1)、SIRPα。其中, SIRPα也属于免疫球蛋白(Ig)超家族, 是一种主要表达在髓系细胞(如单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞)表面的跨膜糖蛋白^[7]。研究表明, CD47/SIRPα相互作用在自我识别和自我体内平衡中起着至关重要的作用, 但研究发现, 它似乎在进化过程中被肿瘤细胞劫持以用于肿瘤细胞的免疫逃逸^[9]。

1.2 CD47/SIRPα轴的研究现状

自将CD47/SIRPα轴鉴定为第一个肿瘤吞噬作用检查点以来, 大量研究聚焦于CD47/SIRPα轴在肿瘤免疫治疗领域的功能与作用^[10-20]。人类癌症广泛表达CD47, 在几乎所有检查的肿瘤类型中都观察到CD47的表达增加, 而且CD47的mRNA表达水平与血液系统恶性肿瘤及大多数实体瘤患者的不良预后密切相关^[11]。CD47主要通过与其受体SIRPα结合传递“不要吃我”信号到巨噬细胞, 从而引发一系列信号级联反应, 最终抑制了巨噬细胞等固有免疫细胞对肿瘤细胞的吞噬作用^[12]。已有研究证明, 阻断CD47/SIRPα轴可以避免肿瘤细胞先天性免疫逃逸, 并且在多种临床前肿瘤模型中测试了CD47阻断性单克隆抗体的抗肿瘤作用, 证明其能够激活CD8阳性T细胞介导的抗肿瘤免疫反应^[13]。在HL60、Kasumi-3以及MV4-11等急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)异种移植小鼠模

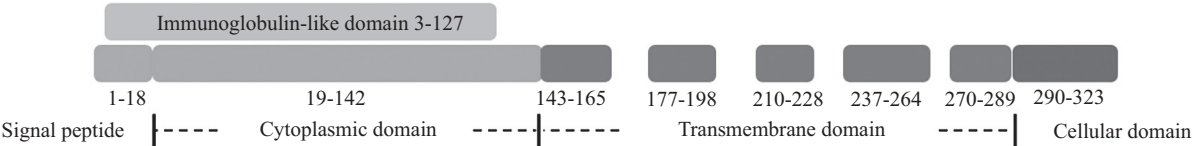


图1 CD47分子一级结构示意图

Fig.1 Primary structure of CD47

型中, CD47的特异性抗体均能有效地抑制白血病细胞的增殖与迁移^[14]。此外, 阻断CD47/SIRP α 轴的治疗策略, 在多种淋巴瘤^[15]、多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、结直肠癌、肝癌^[16]、乳腺癌^[17]等动物肿瘤模型中, 呈现显著的抗肿瘤效果。目前, 靶向CD47/SIRP α 轴的免疫疗法(如人源化抗CD47抗体、抗SIRP α 抗体、SIRP α 融合蛋白等)已经开展多项临床试验, 用于评价其抗肿瘤效果。据报道, 抗CD47单克隆抗体Hu5F9联合利妥昔单抗在复发/难治性非霍奇金淋巴瘤患者的治疗中观察到了显著的临床疗效^[18], 而且在AML患者的临床治疗中Hu5F9也具有良好的客观应答率^[19]。基于一项正在进行的1b期临床研究的阳性结果, 美国FDA已经授予“首创型(first-in-class)”抗CD47单克隆抗体Magrolimab突破性疗法认定, 用于骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)、AML、弥漫大B细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤的治疗^[20]。

作为单一疗法, 阻断CD47/SIRP α 轴的药物已显示出显著的抗肿瘤疗效。然而, 由于CD47的普遍表达, 以红细胞、血小板和其他表达CD47的细胞为代表的“药槽(drug sink)”可能会导致CD47抗体的快速消除以及靶标毒性(例如贫血)^[21]。为了克服这些副作用, 提高治疗的特异性, 研究者提出了靶向CD47和其他肿瘤相关抗原的双特异性抗体或者抗体联合应用的治疗策略, 目前正在临床前及临床研究。有研究采用单细胞测序技术对黑色素瘤患者的肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)进行转录组学分析以及利用流式细胞术分析TILs细胞的蛋白表达水平, 发现CD8阳性T细胞高度表达CD47并促使T细胞衰竭^[22], 这项研究提示, 作为先天性免疫检查点的CD47/SIRP α 轴在适应性免疫系统中的功能也有待更深一步研究。

2 适应性免疫系统检查点——PD1/PDL1轴

2.1 PD1的结构与功能

PD1 也称 CD279是由日本科学家 TASUKU-HONJO^[23]于1992年首次在小鼠身上鉴定发现的。PD1是由PDCDI基因编码的由288个氨基酸组成的I型跨膜糖蛋白, 是B7-CD28超家族成员, 在结构上主要包括1个胞外N端的IgV样结构域、1个疏水的跨膜区和1个胞质尾巴^[24]。其中胞质尾巴含有1个免疫受体酪氨酸抑制基序(immune-receptor tyrosine based inhibitory motif, ITIM)和1个免疫受体酪氨酸转换基序(immune-receptor tyrosine based switch motif, ITSM)(图2)。

除了在活化的T细胞上表达之外, PD1还表达于活化的B细胞、自然杀伤细胞、单核细胞以及部分肿瘤细胞。目前, PD1具有2个已知的配体: PDL1(也称CD274或B7-H1)和PDL2(也称CD273或B7-DC), 两者均属于B7家族^[24]。其中, PDL1主要表达在肿瘤细胞表面, 通过与PD1胞外IgV样结构结合, 促使PD1的ITSM结构域中的酪氨酸发生磷酸化, 引起下游蛋白激酶Syk和PI3K去磷酸化, 进而抑制下游AKT、ERK等信号通路的活化, 最终抑制T细胞活化所需基因及细胞因子的转录和翻译, 发挥负向调控T细胞活性的功能^[25]。

2.2 PD1/PDL1轴的研究现状

研究表明, PD1/PDL1信号通路的激活是癌细胞进行适应性免疫逃逸的主要机制之一, PD1/PDL1的相互作用主要抑制了肿瘤特异性CD8阳性T细胞的免疫活性, 引起T细胞衰竭, 进而抑制机体抗肿瘤适应性免疫应答^[26], 而阻断该信号通路可以激活衰竭的T细胞并恢复其抗肿瘤能力。由抗体介导的PD1/PDL1轴阻断策略在黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌等多种癌症模型中的研究已经报道。PD1抑制

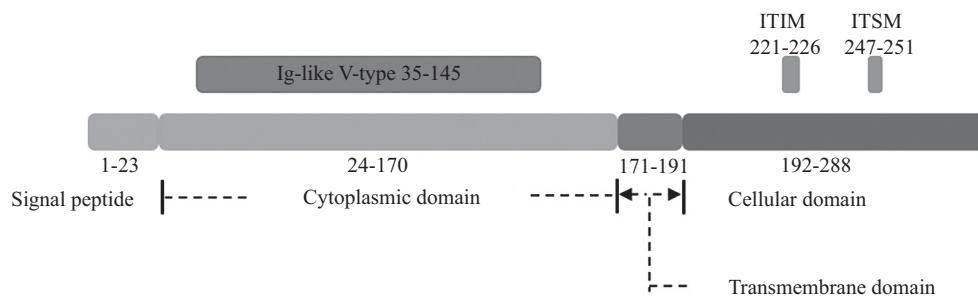


图2 PD1分子一级结构示意图

Fig.2 Primary structure of PD1

剂Pembrolizumab(Keytruda)已经获FDA批准以用于治疗多种癌症,包括黑色素瘤、肺癌、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、尿路上皮癌、胃癌、宫颈癌、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤及高微卫星不稳定的实体瘤^[27]。靶向PDL1的抗体Atezolizumab(Tecentriq)已在临床前研究和临床试验中呈现显著的抗肿瘤作用,并于2016年5月获得FDA的批准上市^[28]。一项针对PDL1阳性的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的3期临床试验数据表明,与铂类双药化疗相比,PD1抗体派姆单抗(Pembrolizumab)的效果更加显著。PD1/PDL1阻滞剂包括纳武单抗(Nivolumab)、Pembrolizumab、卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)等也已应用于临床中黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌、霍奇金淋巴瘤等疾病的治疗^[29]。近年来,PD1/PDL1信号通路阻断这种治疗策略已在临床上取得了成功,这表明PDL1是免疫系统肿瘤逃避的关键分子,也是部分肿瘤免疫治疗的极具潜力的靶标^[30]。

PD1的表达抑制了肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的许多免疫细胞亚群,包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞和巨噬细胞^[31]。小鼠与人的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)表面均表达PD1,而且在小鼠模型或原发性人类癌症中,TAM细胞的PD1表达与抗肿瘤吞噬能力呈负相关且随着疾病恶化而增加。在体内阻断PD1/PDL1轴会增加巨噬细胞的吞噬作用,延长荷瘤小鼠的生存期,表明靶向PD1/PDL1轴也可以通过先天性免疫系统中的巨噬细胞发挥作用^[32],这一发现对于开创新的肿瘤联合疗法具有重要意义。由于肿瘤微环境的异质性,大多数治疗策略都有其局限性,使用阻滞剂靶向PD1/PDL1轴以恢复机体适应性抗肿瘤免疫应答的方案在一些实体瘤中仅达到了30%的客观缓解率^[33],而且大多数患者在持续的治疗中会逐渐出现耐药性或者复发等症状,暗示靶向PD1/PDL1轴的策略不足以应对肿瘤微环境的多重免疫检查点逃逸机制,需要联合其他免疫检查点拮抗分子以提高患者的获益率^[34]。

3 联合靶向先天性及适应性免疫系统——CD47/SIRPα轴与PD1/PDL1轴

3.1 先天性及适应性免疫系统的联系

人体免疫系统有两个重要的分支:先天性免疫系统是一个进化较久的系统,效应细胞主要包括树

突状细胞、NK细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等,可以持续扫描身体并经常通过吞噬作用“吃掉”细菌或病毒来清除外来入侵者^[35];适应性免疫系统是基于先前接触病原体获得的记忆,可以提供更具针对性和更强的反应,效应细胞主要有T和B淋巴细胞。作为机体的第一道防线,天然免疫系统是通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)或内源性损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)而被启动的^[36]。在癌症模型中,肿瘤细胞的更新或压力增加可能导致源自于肿瘤内源性的DAMPs的释放或暴露增多,除了引起肿瘤细胞的免疫源性死亡外,吞噬细胞上的PRR也可以检测到这些DAMPs以启动免疫炎症反应。当在吞噬作用检查点阻断的情况下(例如阻断CD47/SIRPα轴),一旦肿瘤细胞被摄取,细胞外和细胞内先天免疫感应途径都会为抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)(主要包括吞噬细胞、树突状细胞等)引起的先天性免疫系统激活提供潜在的机制。通过Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)或cGAS-STING途径激活产生的I型干扰素会增强APC细胞的成熟及其通过MHCs分子交叉呈递肿瘤衍生抗原的能力,上调共刺激分子并引发效应T细胞反应^[37]。抗CD47抗体介导的巨噬细胞吞噬作用可以触发CD8阳性T细胞激活,这可能依赖于MHC-I类分子对吞噬作用产生的肿瘤相关抗原的呈递作用^[38]。另有研究表明,用抗CD47抗体治疗表达胞质卵清蛋白的肿瘤细胞,将会增加免疫细胞对卵清蛋白肽(SIINFEKL)的吞噬作用及交叉呈递作用,通过MHC-I分子呈递给表达卵清蛋白特异性TCR的细胞毒性T淋巴细胞前体(OT-1细胞)。该MHC-I/SIINFEKL复合物结合并激活此前体细胞,从而触发适应性免疫应答^[38]。先天性免疫系统和适应性免疫系统的这种桥接对于肿瘤的长期控制及治疗至关重要。

CD47阻断性单克隆抗体已在人类淋巴瘤、膀胱癌、结肠癌、成胶质细胞瘤、乳腺癌等多种体外肿瘤模型中显示出抗肿瘤功效^[11]。不过由于CD47在人体组织中的表达谱较广,单独阻断CD47的策略会产生贫血等毒副作用。此外,尽管靶向PD1/PDL1轴的免疫疗法在临床取得了成功,但是临床数据仅显示出有限的响应率。研究报道,多数患者在接受靶向PD1/PDL1轴治疗策略时,会出现原发性耐药并

对PD1/PDL1阻断没有反应,也有部分患者在最初反应后产生了获得性耐药^[39]。众所周知,靶向PD1/PDL1轴的策略主要是通过恢复并增强CD8阳性T细胞的功能,但肿瘤也可以通过TME来阻碍T细胞的作用。其中患者对于靶向PD1/PDL1轴治疗策略产生原发性耐药可能的原因,包括:肿瘤抗原免疫原性不足、主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)功能失调、不可逆的T细胞衰竭、干扰素 γ 信号传导受阻、免疫抑制性TME等。而获得性耐药的机制,可能包括:肿瘤细胞亚克隆的免疫编辑、补偿性抑制信号、T细胞的再耗竭等^[40]。因此,通过阻断CD47/SIRP α 轴以恢复肿瘤微环境中吞噬细胞等活性,并增强其抗原提呈能力,联合PD1/PDL1轴阻断从而最大程度上改善肿瘤微环境的抑制性状态,有望解决单独CD47阻断的脱靶及PDL1阻断的响应率低等问题。最近, PAPADAKI等^[41]首次证明了CD47和PDL1在乳腺癌患者的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)中的共表达与转移性乳腺癌患者的不良预后有关,表明先天性和适应性免疫逃逸机制在肿瘤细胞转移中的潜在作用。总

之,先天性免疫和适应性免疫系统之间存在紧密的联系,通过靶向PD1/PDL1轴和CD47/SIRP α 轴的阻断剂的联合使用,可能增强肿瘤免疫治疗的有效性。

3.2 联合靶向CD47/SIRP α 轴与PD1/PDL1轴的策略

旨在以最大限度调动机体自身的免疫系统以杀伤肿瘤细胞,大量研究集中于联合靶向先天性免疫检查点CD47与适应性免疫检查点PDL1以恢复机体两大免疫系统的功能。研究报道,MYC原癌基因在细胞的生长、增殖、代谢、迁移和免疫逃逸中起到重要作用^[42],在肿瘤进化过程中,高水平的MYC表达导致肿瘤细胞表面CD47和PDL1表达增加,同时抑制先天性和适应性免疫应答并促进肿瘤生长,而抑制MYC基因可以降低肿瘤细胞CD47和PDL1的mRNA及蛋白表达水平^[43]。因此,PDL1及CD47在肿瘤细胞中呈现高表达水平并同时受到MYC基因的调控,这提示免疫治疗的一个新思路,即同时靶向CD47及PDL1免疫检查点可以产生联合效应。多项临床研究也正在开展以确定其治疗效果,关于联合靶向CD47/SIRP α 轴与PD1/PDL1轴在临床前以及早期临床研究(表1)中的治疗策略主要集中在以下两

表1 联合CD47/SIRP α 轴与PD1/PDL1轴靶向策略的临床研究

Table 1 The clinical trials of dual blockage of immune checkpoints CD47/SIRP α and PD1/PDL1

药物名称 Drug	药物形式 Design	研发公司 Sponsor	用药方案 Interventions	研究开始时间 Start date	试验状态 Status	试验阶段 Progress	适应症 Indications	临床试验编号 Clinical study No.
TTI-621	SIRP α -Fc protein	Trillium Therapeutics Inc.	TTI-621+PD-L1 inhibitor	September, 2016	Terminated	Phase 1	Solid tumors/ mycosis fungoides	NCT02890368
			TTI-621+Nivolumab	January, 2016	Recruiting	Phase 1	Hematologic malignancies/ solid tumors	NCT02663518
			TTI-622+PD-1 inhibitor	May, 2018	Recruiting	Phase 1	Lymphoma/ myeloma	NCT03530683
ALX148	CD47 blocker-Fc	ALX Oncology Inc.	ALX148+ Pembrolizumab	February, 2017	Recruiting	Phase 1	Metastatic cancer/solid tumor	NCT03013218
HX009	Bispecific antibody: CD47/PD-L1	Waterstone Hanxbio Pty Ltd.	HX009 only	June, 2019	Recruiting	Phase 1	Advanced solid tumors	NCT04097769
IBI322	Bispecific antibody: CD47/PD-L1	Innovent Biologics (Suzhou) Co. Ltd.	IBI322 only	April, 2021	Not yet recruiting	Phase 1	Advanced malignancies in American subjects	NCT04338659
				July, 2020	Recruiting	Phase 1	Advanced malignancies in Chinese subjects	NCT04328831

个部分。

3.2.1 双特异性抗体靶向策略 双特异性抗体(Bi-specific Antibodies, BsAbs)是指能特异性识别肿瘤细胞表面的两种抗原, 并通过亲和力稳定结合于靶细胞的分子。目前, 双特异性抗体的制备方法主要包括: 双杂交瘤细胞、化学偶联、基因工程等, 涉及的技术主要有 KiH(Konbs-into-holes)、CrossMAb、ART-Ig、DART、TandAb等^[44]。利用基因工程技术制备双特异性抗体是目前最常用的制备方法, 其原理为通过基因工程技术对已知的抗体功能区进行结构改造以制备多种形式的双特异性抗体^[45]。

设计抗CD47/PDL1的BsAbs将CD47阻断引向PDL1阳性的恶性细胞, 并远离仅表达CD47的PDL1阴性的正常细胞, 为解决CD47/SIRPα阻断性单克隆抗体在肿瘤治疗过程中产生显著的红细胞(red blood cell, RBC)毒性以及靶标介导快速清除作用提供了解决方案^[46]。WANG等^[47]利用“KiH技术”设计了一种CD47/PDL1双特异性抗体——IBI322, 这种抗体以单价的形式低亲和力结合CD47, 二价的形式高亲和力结合PDL1。经验证IBI322可以有选择性地结合CD47和PDL1双阳性肿瘤细胞, 不仅可以有效地阻断CD47/SIRPα信号转导并触发强烈的肿瘤细胞吞噬作用, 而且IBI322能够特异性地积聚在PDL1阳性肿瘤中阻断PD1/PDL1轴相互作用。这种BsAbs在诱导肿瘤消退中表现出双靶向疗法的联合效果, 且对CD47单阳性细胞(如人RBC)的影响极小。HUANG等^[48]在人源化抗体H8(抗PD1的IgG抗体)基础上, 通过特殊的Linker将人SIRPα的膜外部分连接到H8重链的C-端获得双特异性抗体——HX009, 可以同时靶向PD1和CD47分子。该双特异性抗体可以显著激活免疫系统, 比单靶向抗体呈现出更强的肿瘤杀伤能力。

抗体融合蛋白作为双特异性抗体一种重要的形式, 是指在基因水平上将抗体(片段)与其他效应蛋白基因融合构建表达载体, 然后在原核或者真核表达系统中表达的重组蛋白。因此, 该重组蛋白既具有抗体的特性又具有融合蛋白的功能。基于抗PDL1抗体Atezolizumab和CV1(高亲和性SIRPα)单体的可变区VH和VL, LIU等^[5]使用“KiH”技术构建了一种靶向CD47和PDL1的双重靶向融合蛋白(又称IAB), 采用100 mg/kg剂量的IAB在具有免疫能力的MC38小鼠模型中显现出有效的抗肿瘤活性, 且未观

察到明显的血液毒性; 研究还证实了CD8阳性T细胞和巨噬细胞都是IAB抗肿瘤作用所必需的。LIU等^[30]使用高亲和力的抗PDL1和低亲和力的SIRPα制备出双特异性抗PDL1/SIRPα异二聚体, 在免疫完全的小鼠肿瘤模型中发现与SIRPα-Fc单独处理相比, 该异二聚体可有效靶向肿瘤细胞并显著增强肿瘤杀伤作用, 而结合RBC的能力很弱。总之, 这些研究表明, 双特异性阻断肿瘤细胞免疫抑制信号CD47和PDL1是肿瘤免疫疗法的一种优化策略。

3.2.2 抗体联合靶向策略 由于肿瘤微环境具有高度异质性, 目前免疫检查点抑制剂的单独使用产生的应答率(10%~35%)有限, 同时也会产生不可避免的耐药问题, 因此能够获得持久疗效的患者仍然为数不多^[33]。随着单克隆抗体药物的快速的发展, 近年来, 在临床实践中采用不同的单抗进行联合靶向的策略引起越来越多的关注。

SOCKOLOSKY等^[49]使用一种来自羊驼的新型抗CD47结构域的抗体, 体外研究发现该抗体增强了巨噬细胞介导的抗体依赖性细胞吞噬作用(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), 但在黑色素瘤B16F10同源基因小鼠模型中发现单独使用此抗体或与一些抗肿瘤抗体联合使用并未观察到明显的治疗效果。令人惊讶的是当与PDL1阻断剂联合使用时, 不仅大大提高了响应率, 而且产生了持久的肿瘤免疫应答, 表明先天性和适应性免疫途径在治疗性反应中均起着重要作用。LIAN等^[6]证实了CD47与PDL1在一系列小鼠癌细胞中表达, 并以小鼠4T1肿瘤细胞为模型, 使用抗体联合阻断CD47和PDL1免疫检查点。与单一抗体或空白对照组相比, 肿瘤抑制效果最佳且肺部转移明显降低, 未观察到明显的全身毒性及器官损伤。双重阻断CD47与PDL1在循环肿瘤细胞中作为免疫治疗策略可能比仅CD47或PDL1单独阻断的疗法更加有效。TAO等^[50]在食管鳞状细胞癌临床前模型中研究靶向CD47的抗肿瘤免疫反应时发现, 经过抗CD47处理后的肿瘤中, T细胞呈现更高的PD1和CTLA-4的表达水平, 表明T细胞发生了活化; 当联合抗CD47抗体与免疫检查点PDL1及CTLA-4阻断时发现肿瘤得到了较好的控制且延长了小鼠的生存期。而且在临床食管鳞状细胞癌患者中CD47的表达与CD8阳性T细胞浸润呈负相关, 这暗示抗CD47可能会以DC依赖性方式增强抗肿瘤炎症反应和T细胞募集。KUO等^[51]

报道了一种抗SIRP α 的人源化抗体AB21(hAB21), 该抗体以高亲和力结合人、食蟹猴和小鼠的SIRP α , 并阻断与CD47的相互作用。在MC38小鼠肿瘤模型中使用hAB21会促进脾脏和肿瘤中的DC细胞活化, 当进一步与抗PD1/PDL1轴阻断剂联合使用时, 可同时促进CD4阳性和CD8阳性T细胞效应子功能并降低CD4阳性调节性T细胞的活性, 从而清除MC38肿瘤并产生持久免疫效果。这表明, 可以通过联合使用靶向PD1/PDL1轴相互作用的T细胞免疫检查点拮抗剂来进一步增强hAB21活性。CUI等^[52]在肺纤维化的小鼠模型中测试了抗PD1/PDL1抗体联合抗CD47抗体的阻断作用, 通过每周进行一系列的肺部高分辨率CT成像, 发现相对于单独使用抗体的对照组, 这种联合治疗下的肺部纤维化显著减少。另外也有研究报道, 在结肠癌的同系小鼠模型中, 抗SIRP α 抗体与抗PD1抗体的组合相对于单一药物产生了更强的抗肿瘤免疫应答^[53]。

HSU等^[54]发现在肿瘤细胞与巨噬细胞共培养实验中, 雷帕霉素(rapamycin, R)和羟氯喹(hydroxy-chloroquine, Q)的处理可以降低CD47与SIRP α 在肿瘤细胞与巨噬细胞的表达水平, 并且R/Q与抗PD1阻滞剂的组合在肿瘤治疗中具有协同作用, 这为CD47/SIRP α 轴与PD1/PDL1轴的联合靶向治疗策略提供了理论依据。最近的一项研究也表明, 化学疗法可以通过低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)诱导乳腺癌细胞CD47、CD73和PDL1的表达, 从而促进了乳腺癌细胞的免疫逃避^[55]。MATSUKUMA等^[56]在诱导的肿瘤干样细胞(cancer stem-like cell, CSLC)中, 发现HIF的表达也有所增加。因此, 在CSLC中可能存在相同的逃逸机制(表达CD47和PDL1等免疫抑制信号)。众所周知, 在临床中的一些化疗药物可以直接杀死肿瘤细胞, 也有部分药物可能通过对肿瘤细胞施加压力, 并诱导“来吃我”的信号——钙网蛋白(calreticulin, CRT)。CRT的暴露作为主要的“来吃我”信号, 是通过增强巨噬细胞或DC细胞对肿瘤细胞的吞噬作用, 进而刺激抗肿瘤T细胞免疫应答的产生。事实上, 化疗药物阿霉素的预处理可显著提高抗PDL1/SIRP α 双靶向融合蛋白的抗肿瘤效果, 这表明CRT可能与双特异性靶向PDL1/CD47策略产生协同作用^[30]。然而, 应该指出的是, 并非所有的化疗药物都有利于诱导免疫源性细胞死亡。因此, 双重阻断PDL1/CD47的疗法是否

与化疗药物或与哪些药物有协同效应还有待进一步研究。另外, 关于癌细胞表达“别吃我”的信号CD47与“来吃我”的信号CRT之间是否存在线性关系还有待探讨。

综上所述, 这两种靶向策略在临床前肿瘤模型中均表现出良好的治疗效果, 而目前在临床中的研究正处于初级阶段, 尚无临床效果报道。临床试验中正在进行的靶向CD47/SIRP α 轴及PD1/PDL1轴的抗体联合策略主要集中于前期已经验证临床效果可观或者已经上市的药物组合上。而相比于单克隆抗体药物或者抗体联合靶向策略, 双特异性抗体可以同时精准靶向肿瘤细胞两种抗原, 有效降低脱靶产生的毒副作用。而且, 进一步优化抗CD47抗体臂的亲和力不仅对药物安全性和药代动力学很重要, 而且也会影响在全身性给药情况下的抗肿瘤功效^[57]。因此, 在设计同时靶向人CD47/PDL1的双特异性抗体进行肿瘤治疗干预时, CD47阻断臂亲和力也有待进一步优化, 以增强药物对靶细胞的杀伤作用并降低脱靶等毒副作用的产生。目前关于联合靶向CD47/SIRP α 轴及PD1/PDL1轴的双特异性抗体药物的设计呈现多样性, 因此, 如何选择最优化双特异性抗体的形式将会面临更多的挑战。

4 结语与展望

宿主的免疫系统通常是阻止肿瘤形成的主要屏障。当宿主免疫系统无法阻止肿瘤形成时, 免疫应答的激活可能有助于肿瘤消退。利用机体自身免疫系统抵抗癌症正在成为一种日益有效的治疗选择, 它可以在多种癌症类型中产生显著而持久的反应。大部分极具潜力的免疫检查点阻断疗法虽取得不错的肿瘤治疗效果, 但显著的应答仍局限于少数患者^[58], 作为单药疗法, 免疫检查点抑制剂的响应率只有10%~35%^[59]。为了提高这类疗法的临床疗效, 科学家们设计了许多临床试验来测试将不同免疫疗法进行组合的可能性。另外, 组合疗法还包括将免疫疗法与标准疗法联用。最近的临床或临床前研究表明, 抗PDL1抗体与其他检查点的拮抗剂(如CTLA-4、LAG-3^[60])联合使用可产生叠加或协同的抗肿瘤免疫力。基于PD1/PDL1轴的抗体的肿瘤免疫疗法已被证明切实有效, 但也存在患者获益率(20%~40%)较低的局限性, 而CD47靶向药物则可以弥补PD1/PDL1轴抗体的不足, 因为通过CD47靶向

而激活的巨噬细胞可以将肿瘤抗原递呈给T细胞, 具有抗肿瘤免疫放大效应。总之, 鉴于肿瘤细胞逐渐进化为同时利用先天性和适应性检查点来规避抗肿瘤免疫应答, 通过设计联合靶向肿瘤细胞的CD47和PDL1的多种策略, 桥接了机体自身的先天性和适应性免疫系统, 代表肿瘤免疫疗法的一种极具潜力的改进策略, 有望为临床癌症患者提高其获益率带来福音。

参考文献 (References)

- [1] CARBONE D P, RECK M, PAZ-ARES L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(25): 2415-26.
- [2] NGHIEM P T, BHATIA S, LIPSON E J, et al. PD-1 blockade with pembrolizumab in advanced Merkel-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(26): 2542-52.
- [3] DARVIN P, TOOR S M, SASIDHARAN NAIR V, et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(12): 1-11.
- [4] SIMEONE E, ASCIERTO P A. Anti-PD-1 and PD-L1 antibodies in metastatic melanoma [J]. *Melanoma Manag*, 2017, 4(4): 175-8.
- [5] LIU B, GUO H, XU J, et al. Elimination of tumor by CD47/PD-L1 dual-targeting fusion protein that engages innate and adaptive immune responses [J]. *MAbs*, 2018, 10(2): 315-24.
- [6] LIAN S, XIE R, YE Y, et al. Dual blockage of both PD-L1 and CD47 enhances immunotherapy against circulating tumor cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4532.
- [7] ZHANG X, FAN J, JU D. Insights into CD47/SIRP α axis-targeting tumor immunotherapy [J]. *Antib Ther*, 2018, 1(2): 37-42.
- [8] SICK E, JEANNE A, SCHNEIDER C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(7): 1415-30.
- [9] CIOFFI M, TRABULO S, HIDALGO M, et al. Inhibition of CD47 effectively targets pancreatic cancer stem cells via dual mechanisms [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2325-37.
- [10] FENG M, JIANG W, KIM B Y S, et al. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(10): 568-86.
- [11] WILLINGHAM S B, VOLKMER J P, GENTLES A J, et al. The CD47-signal regulatory protein α (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6662-7.
- [12] CHESTER C, MARABELLE A, HOUOT R, et al. Dual antibody therapy to harness the innate anti-tumor immune response to enhance antibody targeting of tumors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 33: 1-8.
- [13] LIU X, PU Y, CRON K, et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors [J]. *Nat Med*, 2015, 21(10): 1209-15.
- [14] PIETSCH E C, DONG J, CARDOSO R, et al. Anti-leukemic activity and tolerability of anti-human CD47 monoclonal antibodies [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(2): e536.
- [15] XU L, WANG S, LI J, et al. CD47/SIRP α blocking enhances CD19/CD3-bispecific T cell engager antibody-mediated lysis of B cell malignancies [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(3): 739-45.
- [16] RODRIGUEZ M M, FIORE E, BAYO J, et al. 4Mu decreases CD47 expression on hepatic cancer stem cells and primes a potent antitumor T cell response induced by interleukin-12 [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2738-50.
- [17] FELIZ-MOSQUEA Y R, CHRISTENSEN A A, WILSON A S, et al. Combination of anthracyclines and anti-CD47 therapy inhibit invasive breast cancer growth while preventing cardiac toxicity by regulation of autophagy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 172(1): 69-82.
- [18] ADVANI R, FLINN I, POPPLEWELL L, et al. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-hodgkin's lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(18): 1711-21.
- [19] SALLMAN D A, DONNELLAN W B, ASCH A S, et al. The first-in-class anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is active and well tolerated alone or with azacitidine in AML and MDS patients: initial phase 1b results [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15_suppl): 7009.
- [20] SALLMAN D A, MALKI M A, ASCH A S, et al. Tolerability and efficacy of the first-in-class anti-CD47 antibody magrolimab combined with azacitidine in MDS and AML patients: phase 1b results [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15_suppl): 7507.
- [21] DHEILLY E, MOINE V, BROYER L, et al. Selective blockade of the ubiquitous checkpoint receptor CD47 is enabled by dual-targeting bispecific antibodies [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 523-33.
- [22] AVICE M N, RUBIO M, SERGERIE M, et al. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy [J]. *J Immunol*, 2001, 167(5): 2459-68.
- [23] OKAZAKI T, HONJO T. PD1 and PD1 ligands: from discovery to clinical application [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(7): 813-24.
- [24] DONG H, ZHU G, TAMADA K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. *Nat Med*, 1999, 5(12): 1365-9.
- [25] TAUBE J M, KLEIN A, BRAHMER J R, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19): 5064-74.
- [26] POWLES T, EDER J P, FINE G D, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer [J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 558-62.
- [27] RECK M, RODRÍGUEZ-ABREU D, ROBINSON A G, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1823-33.
- [28] WEINSTOCK C, KHOZIN S, SUZMAN D, et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: atezolizumab for metastatic non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16): 4534-9.
- [29] CHEN L, HAN X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-91.
- [30] LIU X, LIU L, REN Z, et al. Dual targeting of innate and adaptive checkpoints on tumor cells limits immune evasion [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(8): 2101-11.

- [31] KARYAMPUDI L, LAMICHHANE P, KREMPSKI J, et al. PD-1 blunts the function of ovarian tumor-infiltrating dendritic cells by inactivating NF- κ B [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(2): 239-50.
- [32] GORDON S R, MAUTE R L, DULKEN B W, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 495-9.
- [33] EGGERMONT A M M, BLANK C U, MANDALA M, et al. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1789-801.
- [34] CHEN X, XU J, GUO Q, et al. Therapeutic efficacy of an anti-PD-L1 antibody based immunocytokine in a metastatic mouse model of colorectal cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(2): 160-5.
- [35] SABRY M, LOWDELL M W. Killers at the crossroads: the use of innate immune cells in adoptive cellular therapy of cancer [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(9): 974-84.
- [36] PANDEY S, KAWAI T, AKIRA S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 7(1): a016246.
- [37] RAKOFF-NAHOUM S, MEDZHITOV R. Toll-like receptors and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(1): 57-63.
- [38] TSENG D, VOLKMER J P, WILLINGHAM S B, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): 11103-8.
- [39] SHARMA P, HU-LIESKOVAN S, WARGO J A, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-23.
- [40] LEI Q, WANG D, SUN K, et al. Resistance mechanisms of anti-PD1/PDL1 therapy in solid tumors [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 672.
- [41] PAPADAKI M A, KOUTSOPOULOS A V, TSOULFAS P G, et al. Clinical relevance of immune checkpoints on circulating tumor cells in breast cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(2): 376.
- [42] WU C H, VAN RIGGELEN J, YETIL A, et al. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(32): 13028-33.
- [43] CASEY S C, TONG L, LI Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1 [J]. *Science*, 2016, 352(6282): 227-31.
- [44] ZHANG J, YI J, ZHOU P. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects [J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 126-45.
- [45] KLEIN C, SCHAEFER W, REGULA J T, et al. Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology [J]. *Methods*, 2019, 154: 21-31.
- [46] DHEILLY E, MOINE V, BROYER L, et al. Selective blockade of the ubiquitous checkpoint receptor CD47 is enabled by dual-targeting bispecific antibodies [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 523-33.
- [47] WANG Y, NI H, ZHOU S, et al. Tumor-selective blockade of CD47 signaling with a CD47/PD-L1 bispecific antibody for enhanced anti-tumor activity and limited toxicity [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 70(2): 365-76.
- [48] CHEN W, YUAN Y, JIANG X. Antibody and antibody fragments for cancer immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2020, 328: 395-406.
- [49] SOCKOLOSKY J T, DOUGAN M, INGRAM J R, et al. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(19): E2646-54.
- [50] TAO H, QIAN P, WANG F, et al. Targeting CD47 enhances the efficacy of anti-PD-1 and CTLA-4 in an esophageal squamous cell cancer preclinical model [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(9): 1579-87.
- [51] KUO T C, CHEN A, HARRABI O, et al. Targeting the myeloid checkpoint receptor SIRP α potentiates innate and adaptive immune responses to promote anti-tumor activity [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 160.
- [52] CUI L, CHEN S Y, LERBS T, et al. Activation of JUN in fibroblasts promotes pro-fibrotic programme and modulates protective immunity [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2795.
- [53] WEISKOPF K, RING A M, SCHNORR P J, et al. Improving macrophage responses to therapeutic antibodies by molecular engineering of SIRP α variants [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(9): e25773.
- [54] HSU S P C, CHEN Y C, CHIANG H C, et al. Rapamycin and hydroxychloroquine combination alters macrophage polarization and sensitizes glioblastoma to immune checkpoint inhibitors [J]. *J Neurooncol*, 2020, 146(3): 417-26.
- [55] SAMANTA D, PARK Y, NI X, et al. Chemotherapy induces enrichment of CD47⁺/CD73⁺/PDL1⁺ immune evasive triple-negative breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(6): E1239-48.
- [56] MATSUKUMA S, YOSHIMURA K, UENO T, et al. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(11): 1599-609.
- [57] DHEILLY E, MAJOCCHI S, MOINE V, et al. Tumor-directed blockade of CD47 with bispecific antibodies induces adaptive antitumor immunity [J]. *Antibodies*, 2018, 7(1): 3.
- [58] MOYNIHAN K D, OPEL C F, SZETO G L, et al. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses [J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1402-10.
- [59] TOPALIAN S L, DRAKE C G, PARDOLL D M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 450-61.
- [60] WOO S R, TURNIS M E, GOLDBERG M V, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(4): 917-27.