

能,同时,也还可能找出哪些是丰余的。

2. 连接通道实验分析数据的积累

六个连接蛋白亚单位组成一个连接子,相邻细胞的两个连接子共同构成间隙连接中央的通道(参阅图1)。已知的连接蛋白至少有13种(参阅表1),连接蛋白这么多,许多细胞都表达不止一种连接蛋白,可以想像,连接蛋白通过各种组合以形成各种类型的通道。通道的性质由组成它的连接蛋白决定,为了了解通道的性质,近年来,对各种连接蛋白的兼容性以及功能进行了实验的分析^[9]。White和Bruzzone(1996)总结了利用成对卵母细胞系统^[4]以及Cx转染的HeLa细胞^[10]的结果(表2)。60个异型连接蛋白组合中,有33个不能形成有功能的通道,大多数Cx能和大约半数测试的对象形成有功能的通道,如Cx32(5/12),但是,也有绝对不相容的,如Cx31只和同型Cx形成功能通道,和其它测试的6个不同型Cx则不形成。Cx40形成异型通道的能力也很有限,只和Cx37与Cx45形成而和Cx26、Cx31、Cx31.1、Cx32、Cx43以及Cx46都不形成,相反,Cx46除了Cx40和所测试的对象都形成异型有功能通道。以上关于各种连接蛋白的兼容性,结合它们的不同渗透性^[11],对一些过去已经发现而无法阐明的现象提供了可能的解释。在胚胎发育过程中,通讯间隔在小鼠胚胎以及果蝇表皮都被描述,而且认为和发育区域相吻合^[12]。在小鼠胚胎,Cx43是最早出现的连接蛋白之一,在4-8细胞期就可以检测到,在发育进程中它逐渐被局限到胚胎本身,在滋养外胚层中不存在。相反,另一个连接蛋白Cx26基因只在滋养外胚层中表达。这种Cx26和Cx43时空不同的表达正和间隙连接通讯间隔相一致。很可能连接

蛋白基因的不同表达对早期鼠胚通讯间隔的形成起着调控的作用。

表2 在细胞间连接通道形成中,鼠类Cx显示不同的兼容性

	Cx26	Cx30	Cx30.3	Cx31	Cx31.1	Cx32	Cx33	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx50
Cx50	+					+			-	-		+	+
Cx46	+					+			-	+		+	
Cx45	-		-	-	-			+	+	+	+		
Cx43	-		+	-	-			-	+	-	+		
Cx40	-			-	-			+	+				
Cx37	-		+	-	-			-	+				
Cx33										-			
Cx32	+	+	+	+	+	+							
Cx31.1	-			-	-								
Cx31	-				+								
Cx30.3	-	-	+										
Cx30	+	+											
Cx26	+												

(+)示功能通道形成,(-)示不形成功能通道^[9]。

参 考 文 献

- [1] Kumar, N. M. and Gilula, N. B. 1996, *Cell*, **84**:381-388.
- [2] Bergoffen, S. S. et al., 1993, *Science*, **262**:2039-2042.
- [3] Dahl, G. et al., 1987, *Science*, **236**:1290-1293.
- [4] Bruzzone, R. et al., 1994, *Neuron*, **13**:1253-1260.
- [5] Paul, D. L. 1995, *Current Opinion Cell Biol.*, **7**:665-672.
- [6] Reaume, A. G. 1995, *Science*, **267**:1831-1833.
- [7] Britz-Gunningham, S. H. et al., 1995, *The New England Journal of Medicine*, **332**:1323-1329.
- [8] Bastide, B. et al., 1996, *J. Membr. Biol.*, **150**:243-253.
- [9] White, T. W. and Bruzzone, R. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:339-350.
- [10] Elfgang, C. et al., 1995, *J. Cell Biol.*, **129**:805-817.
- [11] Veenstra, R. D. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:327-337.
- [12] Lo, C. W. 1996, *J. Bioenergetics and Biomembrane*, **28**:379-385.

双特异性抗体与肿瘤导向治疗研究新进展

袁金辉 张尚权 严缘昌

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

双特异性单克隆抗体(Bispecific monoclonal antibody,BSAb)是已发展起来的免疫治

疗和细胞生物学基础研究的新课题。它是两亲代单克隆抗体(Mab)的杂交抗体,同时具备了两亲代抗体的特异性,因此可与两种不同的抗原分子结合,显示了功能上的单价性。1983年 Milstein 和 Cuello^[1]第一次利用两次杂交瘤技术制备出抗辣根过氧化物酶和抗生长激素释放抑制因子 BSAb 并应用于免疫组化。至今,人们已利用杂交瘤技术、化学联结法、基因工程法制备出多种类型的 BSAb,且将其应用于肿瘤、感染性疾病、血栓性疾病治疗,免疫组化和免疫检测、疫苗佐剂、细胞生物学研究等领域。尤其在肿瘤治疗方面日益受到重视。自 1985 年 Webb^[2]首次将 BSAb 应用于导向治疗以来,以 BSAb 为载体进行肿瘤导向治疗的研究日渐增多,尤以介导免疫效应细胞的抗肿瘤作用为显著,它克服了免疫效应细胞缺乏对肿瘤细胞的特异性识别能力的缺点,将效应细胞选择性地导向肿瘤细胞,发挥强大的细胞毒作用,这也是单克隆抗体所不能及的。常用于导向治疗的肿瘤有卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、淋巴瘤、神经胶质瘤等,有些已进入临床试验。

一、抗原的选择

利用 BSAb 可同时结合不同抗原分子的两个臂,把效应因子与靶向分子连接起来,将效应因子直接导向肿瘤细胞,从而起到攻击和杀伤靶细胞的作用。

(一) 效应因子的选择

1. 免疫效应细胞 由 T 细胞介导的特异性细胞免疫在机体抗肿瘤免疫应答中起主要作用,另外尚有介导非特异性细胞免疫的 NK 细胞和巨噬细胞等,这些细胞表面均具有特异性的激发分子,当相应的抗体与之结合后,便可将它们激活,使之发挥细胞毒作用。

(1) T 淋巴细胞 激活的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)可以识别并杀伤表达 MHC-I 类抗原的靶细胞。BSAb 将靶细胞的表面分子连接起来,可以使 CTL 对靶细胞造成致死性打击而不受 MHC 限制。目前认为最有效的激活 CTL 活性的表面结构是 CD₃/TCR 复合物^[3]。

已有多种抗 CD₃/抗肿瘤的 BSAb 用于导向 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤并取得显著效果。TCR 是由 α 和 β 两条分子量不同的肽链经双硫键连接组成的异双体,属 Ig 超家族,另外尚有一群表达 TCR $\gamma\delta$ 的淋巴细胞,由均质的细胞毒 T 细胞组成,具有非特异性溶解细胞的活性。CD₂ 也是 T 细胞介导的细胞毒性激活分子,将 CD₂ 或 CD₃、CD₂₈ 连接起来产生共同刺激信号在 T 细胞激活中起重要作用。最近的一项实验证实,抗 TCR $\alpha\beta$ /抗 CD₂ 在体外有很高的促分裂性,在体内很小剂量即诱导 T 细胞激活,后者具有很高的细胞毒性^[24]。CD₂₈ 位于大部分的 CD₄⁺ 和半数的 CD₈⁺ T 细胞上,该分子与其配体反应后可提供类似抗原递呈细胞刺激信号诱导人类 T 细胞产生 IL-2。CD₂₈ 和 CD₃ 的共同作用可增强 T 细胞的细胞毒活性。Kroesen 等^[4]构建出抗 EGP-2 分别和抗 CD₃/CD₅、抗 CD₃/CD₂₈、抗 CD₃/CD₅/CD₂₈ 形成的 BSAb,通过测 CD₆₉ 的表达以及对 T 细胞增殖的诱导和细胞毒性的获得来评价它们激活 T 细胞的能力。结果发现抗 EGP-2 分别和单独的抗 CD₃、抗 CD₅、抗 CD₂₈ MAb 形成的 BSAb 没有显著的 T 细胞诱导作用,而含抗 CD₃/CD₂₈ 的 BSAb 可部分激活 T 细胞,含抗 CD₃/CD₅ 或抗 CD₃/CD₂₈ 的 BSAb 可大大增加激活 T 细胞的能力。更为有趣的是含抗 CD₃/CD₅/CD₂₈ 的 BSAb 可完全激活 T 细胞活性,且加入外源性 IL-2 亦不能再使后者增强。

(2) 其他的效应细胞 尽管 LGL/NK 细胞和靶细胞导致自然杀伤效能的识别分子尚未研究清楚,但 NK 细胞可以释放细胞毒性分子(perforins、TNF- α)介导肿瘤细胞的杀伤已被证实,且 Fc γ RIII(CD₁₆)分子的激发可以导致这些毒性物质的释放,引起 ADCC 效应。因此,含抗 CD₁₆ 的 BSAb 可激活 NK 细胞发挥细胞毒作用。Weiner 等^[5]已将抗 C-erbB-2/抗 Fc γ RIII 胞外区的 BSAb 用于 I 期临床试验。结果表明此类 BSAb 能提高 NK 细胞和巨噬细胞对靶细胞的溶解。Fc γ RIII 也是巨噬细胞活性的激发分子。Fc γ RI(CD₆₄)只在巨噬细胞、单核

细胞上高表达,是后两者有力的毒性激发分子。

2. 毒性物质 除了连接效应细胞和肿瘤细胞外,BSAb 尚用来将毒性物质导向肿瘤细胞。目前,以 BSAb 作为载体的结合物主要有三种:毒素、化疗药物和核素。

应用最多的毒素是核糖体灭活蛋白(RIPs),其中研究最多的是皂角毒素(saporin)。含 saporin 的 BSAb 将 saporin 导向靶细胞,引起 BSAb-saporin 复合物内在化后,影响靶细胞蛋白合成,从而抑制其生长。有研究表明,混合不同的 BSAb-saporin 可增强治疗效果,可能是通过加强不同的毒素表位同靶细胞表面分子连接增强了这种内在化作用^[6]。最近又有一毒性较小的 RIP-gelonin 出现^[7,8],且联合应用不同的 BSAb-gelonin 也有增效作用^[7]。另外,BSAb 可将靶细胞与酶连接,通过酶的作用使无细胞毒活性的前体物转变为有毒物质,引起高效的靶细胞溶解。董志伟等^[9]利用具有“通用接头”的 BSAb(p210/TNP)可分别介导丝裂霉素 C、阿霉素及 Ricin 对靶细胞的杀伤效应。而利用放射性核素标记的抗半抗原组成的 BSAb,可在体内特异地定位肿瘤,形成高对比度显象,同时它的这种局部分布性减少了因外照射引起的正常组织损伤和全身性副作用,核素的辐射可杀灭单抗不能到达的靶细胞,故可用于肿瘤治疗。

(二) 靶向分子的选择

肿瘤的抗原性是肿瘤免疫学的核心问题,至今尚未能揭示其本质。已知在细胞恶变时,原癌基因的突变、融合、放大等变化,造成大量在质或量上与正常细胞所不同的蛋白的表达,这些蛋白直接与肿瘤细胞恶性转化功能的维持密切相关。因此,选择这些异常表达的癌基因产物作为靶向分子,相应抗体与之结合后可抑制后者的异常作用,同时又可将效应因子导向肿瘤细胞,进而起到双重的抗肿瘤作用。

1. 表皮生长因子受体(EGF-R) EGF-R 是具有酪氨酸激酶活性的 170kD 跨膜糖蛋白,在许多恶性肿瘤中过度表达。EGF-R 及其配体所形成的自、旁分泌环的异常,在促进正常

细胞转化和恶性肿瘤转移中占重要地位。其表达水平升高也与许多肿瘤的预后有关。不少研究^[10,22]提示 EGF-R 是适宜的导向治疗靶向分子。

2. P^{185neu} P^{185neu} 是 HER-2/neu 原癌基因中 c-erbB-2 的产物,为分子量 185kD 的跨膜酪氨酸激酶,与 EGF-R 高度同源,为肿瘤特异性抗原。含抗 P^{185neu} 的 BSAb 显示了很好的靶细胞杀伤效应^[5,11]。

3. 细胞分化抗原 许多血液系统肿瘤细胞表面过多表达某种分子,如淋巴瘤过多表达 CD₃₀、CD₁₉、CD₂₂。这些表面标志可作为 BSAb 的靶向分子介导效应因子对靶细胞的杀伤。

4. 其他 gp⁵² 为小鼠乳腺肿瘤病毒蛋白,已经证实它可作为肿瘤特异性抗原介导再导向细胞的细胞毒性^[12,19]。EPG-2 是广泛的肿瘤相关抗原(pan-carcinoma-associated),在许多肿瘤上表达丰富,而正常只分布在简单上皮组织,可以利用含抗 EGP-2 的 BSAb 进行抗肿瘤研究^[20,29]。实验证实,抗 CD₃/抗叶酸(folate)受体的 BSAb 可介导动物卵巢癌消退^[25]。胎盘碱性磷酸酶(PLAP)和胚胎细胞碱性磷酸酶(GCAP)是人类肿瘤标志,常在生殖腺肿瘤中水平上调,它容易在膜上定位,是非常有用的 BSAb 靶向分子^[23]。另外还有许多针对肿瘤相关抗原的 BSAb 被用来进行肿瘤的导向治疗^[9,13]。

随着研究的深入,人们已经认识到肿瘤血管生长因子、粘附因子和粘附蛋白在肿瘤的生长和转移中具有重要作用,以它们作为靶向分子将是导向治疗的新途径^[14]。

二、BSAb 体外实验及动物实验

1. 卵巢癌 Negri 等^[10]的实验表明抗 EGF-R/抗 CD₃BSAb 可在体外介导 CD₃⁺T 细胞对卵巢癌细胞系 IGROV1 的溶解,用激活的人类淋巴细胞加该 BSAb 治疗荷瘤小鼠,同两者单独应用组及阴性对照组相比,治疗组的生

存期明显延长,提示了此 BSAb 临床应用的可行性。

2. 乳腺癌 Moreno 等^[12]采用同系免疫应答正常的乳腺癌小鼠评价了抗 gp⁵²/抗 CD₃ 的临床应用价值。实验证明它再导向的 T 细胞在体外、体内均能阻抑肿瘤生长,而对照组抗 CD₃/抗 CD₂₅却无此作用。Shalaby 等^[11]的研究表明抗 CD₃/抗 HER-2 可在裸鼠肿瘤组织内特异分布,体外能抑制乳腺癌细胞 SKBR-3 的增殖。

3. 神经胶质瘤 抗 GD₂(神经节苷脂)/抗 FcγRI 的 BSAb 在体外可介导激活的巨噬细胞对 GD₂ 阳性的神经胶质瘤细胞的杀伤,在裸鼠体内也显示了很好的肿瘤组织选择性^[15]。Davico 等^[13]利用免疫组化技术也证实了 BSAb 对神经胶质瘤组织的选择分布性,但这次是以 Tenascin(TN)为肿瘤标记物。该 BSAb 对外周血单个核细胞(PBL)的激活性与抗 CD₃MAb 相似,可使 T 细胞对 TN⁺靶细胞的毒性显著增加。

4. 血液系统肿瘤 Sabrina 等^[7]制备出两种抗 gelonin 的 BSAbD₄ 和 A18,并观察了它们对 Hodgkin's 淋巴瘤细胞的作用。结果发现 D₄ 浓度为 10⁻⁹mol/L 时,L540 细胞蛋白合成受到抑制,其 IC₅₀ 是 5×10⁻¹⁰mol/L,而 A18 的 IC₅₀ 为 8×10⁻¹¹mol/L。两者有协同作用,IC₅₀ 达 6×10⁻¹²mol/L。L428 对此也很敏感,(IC₅₀ 为 6×10⁻¹¹mol/L)。而 COLE 和 T-ALL Jurkat 却抵抗这种毒性效应,但对抗 Saporin 的 BSAb 敏感。提示这种抵抗和 RIPs 的性质有关。French 等^[8]也观察到携带 gelonin 的抗 CD₂₂和抗 CD₃₈两种 BSAb 在体外可高效杀伤淋巴瘤细胞,且后者较前者弱 2—5 倍。David 等^[16]的体外实验亦证明导向 CD₃₈的 BSAb 对急性 T 淋巴细胞白血病细胞的杀伤效应较差。Silla 等^[17]的研究表明抗 CD₃₃/抗 CD₁₆的 BSAb 能激活并增强 NK 细胞对耐药白血病细胞的溶解能力。

5. 胃肠肿瘤 sLe^x 是表达在人类各种肿瘤上的糖蛋白或糖脂。体外实验表明抗 sLe^x/

抗 CD₃ 的 BSAb 可增强激活的 T 细胞对胃肠肿瘤细胞的毒性,还可以激发 CD₄⁺T 细胞产生 IL-2。动物实验也显示出其强大的抗结肠癌活性^[18]具有“通用接头”的抗胃癌 BSAb 对体外培养的靶细胞有明显的杀伤效应。另一抗 P40/抗 CD₃BSAb 可介导 PBLs 对胃癌细胞的溶解作用,并且在一定浓度范围内(<1.0μg/ml)呈剂量依赖关系。当 BSAb 浓度一定时(<1.0μg/ml),随着效靶比的增加,其所介导的杀伤效应亦明显增加,且具有特异性。动物实验也表明该 BSAb 介导的免疫活性细胞对裸鼠皮下移植的胃癌有明显的治疗作用,实验组肿瘤全部消退^[9]。

6. 肺癌及肺转移癌: Bakacs 等^[19]第一次报道了单独应用 BSAb 可抑制实体瘤的生长。他们给免疫应答正常的乳腺癌肺转移小鼠腹腔内注射抗 CD₃/抗 gp⁵²,结果显著延长了小鼠的生存期。而 Kroesen 等^[20]的研究显示,联合应用抗 EGP-2/抗 TCR 和 IL-2 几乎使免疫应答正常小鼠的肺鳞癌全部消退,单独应用却甚少有此作用。Christophe 等^[21]的研究也表明联合应用 BSAb 和免疫刺激剂 β 葡聚糖有中和黑色素瘤细胞的作用,能使已建立的肺转移瘤显著消退,单独应用作用甚微。

另外,有人^[22]发现抗 EGF-R/抗 CD₃ 的浓度为 1ng/ml 即可在体外显著提高激活的 T 细胞对 EGF-R 表达阳性的结肠癌、肺癌、乳癌细胞的毒性,对 EGF-R 表达阴性的黑色素瘤细胞无此作用。另外,不但对肾癌细胞有杀伤作用,对低表达 EGF-R 的正常肾细胞也有杀伤作用。提示局部应用 BSAb 是癌症治疗的有效途径。Karine 等^[23]在 GCAP 转基因小鼠基础上建立了 PLAP 和 GCAP 表达阳性的纤维肉瘤模型,对识别 PLAP、GCAP 和 CD₃BSAb 的活性进行了研究。结果显示该 BSAb 能有效地激活 T 细胞,导致肿瘤细胞溶解。治疗组较非治疗组明显有效,局部治疗组肿瘤体积明显减小。Tuttl 等^[24]发明了两步 BSAb 法:先用一 BSAb 非特异性激活 T 细胞,再用另一 BSAb 将 T 细胞导向靶细胞。识别 TCRα β 和 CD₂ 的

BSAb 在体外有很高的促分裂性,在体内很小剂量(50—100 μ g)即可诱导 T 细胞激活、增殖,并选择性激活 CD₃⁺T 细胞,使其在 72 小时内增加 20 倍,与抗 TCR MAb 形成显著对比。混合抗 CD₂ 和抗 TCR 的 MAb 在体内、体外均无此功效。此激活的 T 细胞有很高的细胞毒性,再用第二个 BSAb(抗 TCR/抗肿瘤)将它们导向肿瘤细胞。此方法应用于动物实验显示了很好的抗肿瘤效果。

三、BSAb 临床试验

1. 卵巢癌 OC/TR 为特异性识别 CD₃ 和 MOv18 的 BSAb,MOv18 为高亲和性 folate 结合蛋白 gp³⁸。Canevari 等^[25]用 OC/TR 的 F(ab')₂ 片段治疗晚期卵巢癌。他们给 28 例术后患者腹腔内注入 OC/TR 及体外激活的自身 T 淋巴细胞,联合应用 IL-2。在 26 个可评价的患者中,7 个病情恶化未行剖腹探查术,19 个经外科和组织学评价的患者中,3 个完全缓解(分别持续了 26 个月、23 个月和 18 个月),1 个腹膜内完全缓解而腹膜后淋巴结进展,3 个部分缓解,7 个病情稳定,余下的病情恶化。腹膜内完全缓解,缓解率为 27%。免疫治疗相关的毒性反应包括中度发热、恶心、呕吐和疲劳,大部分患者可查出抗鼠抗体(HAMA)。结果提示,局部应用 BSAb 再导向 T 淋巴细胞可使肿瘤消退。Lamers 等^[26]则研究了 OC/TR F(ab')₂ 临床应用中的 HAMA 反应及其对 BSAb 介导的细胞毒性的干扰。他们对 8 例卵巢癌患者进行 I/II 两个阶段临床试验。第 I 阶段(0 至 3 天),包括腹腔内注射(i. p.)数目渐增的 T 淋巴细胞(10⁶—10⁹),加上低剂量 IL-2。第 II 阶段(6 至 13 天,27 至 33 天)每天 i. p. 10⁹T 淋巴细胞、2mg 溶解的 BSAb 和低剂量 IL-2。结果发现所有患者均出现 HAMA,其中大部分是针对 BSAb 独特性的(即抗 CD₃ 和抗 MOv18)。含有 HAMA 的腹腔内液可以抑制 BSAb 介导的 T 细胞对 MOv18⁺卵巢癌细胞的细胞毒作用。Valone 等^[27]选择晚期的乳腺癌和卵巢癌病例进行 Ia/Ib 期临床试验,测定了识

别 Fc γ RI 和 HER-2/neu 癌基因产物的 BSAb MDX-210 的最大耐受量(MTD)及最佳生物学剂量(OBD)。静脉内注入(i. v.)MDX-210,剂量为 0.35—10.0mg/m²。多数患者仅有一过性的 1—2 级发热、不适、高血压,有两例患者在 10.0mg/m² 时有 3 级高血压。注射 1—2 小时后可见单核细胞及淋巴细胞减少,无其他血液学变化。剂量 \geq 3.5mg/m² 时,单核细胞 Fc γ RI 的饱和度 \geq 80%,血浆浓度为 1 μ g/ml。剂量 \geq 7.0mg/m² 时,前者产生 TNF- α 、IL-6、G-CSF 的水平升高。最后得出:MDX-210 在耐受剂量有免疫学活性,其 MTD 和 OBD 为 7—10 mg/m²。

2. 肾癌 BIS-1 为抗 CD₃/抗 EGP-2 的 BSAb F(ab')₂ 片段。Kroesen 等^[28]进行了 I 期临床试验,研究了 BIS-1 的毒性和免疫调节效应。他们给肾癌患者 i. v. BIS-1,联合皮下注射(s. c.)IL-2,可测得血中 TNF- α 、IFN- γ 升高。BIS-1 同循环 T 淋巴细胞的结合呈剂量依赖性。剂量为 3 和 5 μ g/kg 时,PBLs 的杀伤活性增加,超过 5 μ g/kg 后这种活性反而下降,剂量依赖性消失。副作用有发冷、外周血管收缩及暂时性呼吸困难。治疗的 14 例患者中,1 例肺转移,5 例病情稳定持续 3 个月,8 例病情进展。BIS-1 的 MTD 为 5 μ g/kg。Janssen^[29]的进一步研究发现,该 BSAb 与 PBLs 的结合在注射后 2 小时达最高,以后便迅速下降,继之 TNF- α 浓度升高,PBL、巨噬细胞、嗜酸性细胞减少。推测该现象系因 BIS-1 F(ab')₂ 结合 T 细胞离开血液循环,而后与 EGP-2 结合诱导 TNF- α 分泌。初步结果提示,BIS-1F(ab')₂ 合并 IL-2 治疗可诱导局部 T 细胞活化,获得特异的抗 EGP-2⁺肿瘤细胞的毒性。

3. 血液系统肿瘤 French 等^[30]用携带 saporin 的抗 CD₂₂BSAb 治疗了 4 例化疗后的低级末期 B 细胞淋巴瘤,i. v. BSAb 剂量为 1—4mg,毒性反应小(I 级),治疗后 1—2 天有发热、乏力和肌痛,1 例出现 HAMA 和抗 saporin 抗体反应,3 例血液受侵袭的患者循环血中肿瘤细胞被清除,2 例合并胸腹水者胸腹水均消

退,3例淋巴结易触及者淋巴结缩小至少50%,脾大者在第三次注射后三天明显缩小,4例患者的血小板计数(分别为18、23、43、 $45 \times 10^9/L$)升至 $100 \times 10^9/L$,且维持超过3周,1例完全消除了严重的中性白细胞减少症。所有患者都显示了快而有益的反应,虽持续时间短(不超过28天),但为进一步的研究打下基础。Cast等^[31]则利用识别 CD_3 及 CD_{10} 的BSAb治疗了3例已产生耐药的non-hodgkin's淋巴瘤,i.v. BSAb的剂量由 $10\mu g$ 增至 $5mg$;总剂量 $12.9mg$,临床毒性作用小,有中度发热及血小板减少,未发现HAMA,其 $t_{1/2}$ 为10.5小时,(注射 $2.5mg$,高峰 $200-300\mu g/ml$)。注射后TNF- α 和溶解的 CD_8 分子升高,IL-2R一定程度升高,IFN- γ 、IL-4或溶解的 CD_4 未升高,无单核细胞激活的证据(IL-6、IL-8及IL-1 β 在血清中未升高)。临床毒性反应可能是 CD_8^+ T细胞的激活和细胞因子的释放所致。3例患者中,虽曾有淋巴结及脾肿大减轻,但最终两例在几个月内死亡,一例接受放疗,临床效果有限。Hattori等^[32]用识别 CD_3 及 CD_{10} 的BSAb来阻止骨髓移植(BMT)后白血病复发,BMT后14天测激活的 CD_4^+ 、 CD_8^+ 抗肿瘤效应T细胞的产生。发现两种T细胞自身无抗 CD_{10}^+ 白血病细胞的作用,但加入BSAb后可明显地杀伤靶细胞,且可促使 CD_4^+ 细胞产生IL-2、IFN- α 。

另外,2B1是一个识别C-erbB-2和Fc γ RI的BSAb,它可以提高NK细胞及巨噬细胞对过表达c-erbB-2产物的恶性细胞的杀伤能力。Weiner等^[5]对其进行了I期临床试验,治疗了15例过表达c-erbB-2的肿瘤患者,在第1、4、5、6、7、8天单独i.v. 2B1。3例患者每天剂量为 $1.0mg/m^2$,6例为 $2.5mg/m^2$,另外6例为 $5.0mg/m^2$ 。一过性的毒性为发热、寒颤、恶心、呕吐和白血球减少,有2例化疗引起骨髓抑制的患者在剂量为 $5.0mg/m^2$ 时出现血小板减少症。2B1的 $t_{1/2}$ 为20小时,可诱导血清中的TNF- α 、IL-6、IL-8升高100多倍。14例患者出现HAMA。该15例中,1例乳腺癌胸壁浸润厚度变薄,2例结肠癌患者的胸腹水吸收,1例结

肠癌肝转移者肝浸润消退,表明用2B1治疗有很强的免疫学效果,其MTD及对化疗造成骨髓抑制患者I期试验剂量为 $2.5mg/m^2$ 。

四、BSAb 导向治疗的机理

1. BSAb将效应细胞与靶细胞连接起来,从而杀伤靶细胞。新近的一项研究^[3]提示在BSAb介导的细胞杀伤中,细胞凋亡和溶解密切相关。

2. 促进细胞因子的产生和释放,如TNF- α 、IL-2等,这些因子具有辅助或独立的抗肿瘤作用。

3. 与毒性物质相结合,到达靶器官后释放活性物质,杀伤肿瘤细胞。

4. 通过依赖抗体的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)溶解肿瘤细胞。

5. 通过与肿瘤细胞表面的某些成分(如生长因子受体)结合来干扰肿瘤的生长和分化。

五、存在的问题及努力方向

有限的临床研究已证实BSAb毒副作用小,而且有些已取得较好的临床效果。但是,要作为常规临床应用,尚有赖于克服HAMA反应^[33]。解决这一问题的主要途径是抗体的人源化及制备人源抗体^[14]。如人鼠嵌合抗体(chimeric antibody)、改形抗体(reshaping antibody),均可极大地降低HAMA反应。利用组合抗体库技术及噬菌体抗体库技术可直接制备人源抗体。转入Ig基因小鼠也为产生人源抗体提供了免疫对象。表位印膜选择技术(epitope imprinted selection)、抗体的表面修饰(venering)技术是抗体人源化的新途径。

为了延长和重复应用BSAb,可选择抗同一肿瘤的不同独特性构建BSAb,以减少HAMA反应^[26]。

另外,肿瘤的间质内压较高,影响了抗体及其偶合物在肿瘤部位的摄取。目前多利用BSAb的F(ab')₂片段。更小型化的BSAb已

经建立^[34]。Mack等^[34]制备的CD₃/17-1A为通过Gly-Ser连接子连接的两个不同的单链Fv片段(bispecific single-chain antibody),分子量为60KDa,与抗原结合能力好且易纯化,体外、动物模型及I期临床均显示了对17-1A阳性肿瘤强烈的细胞毒性。

随着以上问题的解决(抗体人源化及小型化),将把BSAb导向治疗推向一个新高度,使之成为继手术、化疗、放疗之后的新的肿瘤辅助治疗手段。

参考文献

- [1] Milstein C and Cuello A. C., 1983, *Nature*, 305:537-540.
- [2] Webb K S., et al., 1985, *Cancer Treat. Rep.*, 69(6):663-672.
- [3] Kroesen B J., et al., 1996, *Br. J. Cancer*, 73:721-727.
- [4] Kroesen B J., et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:4409-4415.
- [5] Weiner, et al., 1995, *Cancer Res.*, 55(20):4586-4593.
- [6] French R R., et al., 1991, *Cancer Res.*, 51(9):2353-2361.
- [7] Sabrina S., et al., 1995, *Br. J. Haemat.*, 90:572-577.
- [8] French R R., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 71(5):986-994.
- [9] 董志伟等, 1995, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2(2):99-103.
- [10] Negri D R M., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 72:928-933.
- [11] Shalaby, et al., 1995, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 74(2):185-192.
- [12] Moreno M B., et al., 1995, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 40(3):182-190.
- [13] Davico B., et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61(4):509-515.
- [14] 董志伟, 1995, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2(4):240.
- [15] Michon J., et al., 1995, *Europ. J. Cancer*, 31A:631-636.
- [16] David J., et al., 1995, *Haematological Oncology*, 13(4):185-200.
- [17] Silla, et al., 1995, *Br. J. Haemat.*, 89(4):712-718.
- [18] Ohta S., et al., 1995, *Immunology Letters*, 44(1):35-40.
- [19] Bakacs T., et al., 1995, *Int. J. Immunol.*, 7(6):947-955.
- [20] Kroensen B J., et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61(6):812-818.
- [21] Christophe P., et al., 1996, *Int. J. cancer*, 65:377-382.
- [22] Knuth A., et al., 1994, *Europ. J. Cancer*, 30A(8):1103-1107.
- [23] Karine A S., 1995, *Cancer Res.*, 55:4383-4390.
- [24] Tutl, et al., 1995, *J. Immunol.*, 155(6):2960-2971.
- [25] Canevari S., et al., 1995, *J. Nat. Cancer Inst.*, 87(19):1463-1469.
- [26] Cor H J Lamers, et al., *Int. J. Cancer*, 60:450-457.
- [27] Valone Frank H., 1995, *J. Clin. Oncol.*, 13(9):2281-2292.
- [28] Kroesen B J., et al., 1994, *Br. J. Cancer*, 70:652-661.
- [29] Janssen R A J., et al., 1995, *Br. J. Cancer*, 72(3):795-799.
- [30] French Ruth R., et al., 1995, *Lancet*, 346(8969):223-224.
- [31] De Gast, et al., 1995, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 40(6):390-396.
- [32] Hattori K., et al., 1995, *Bone Marrow Transplantation*, 15(2):193-198.
- [33] Gideon D M Beun, et al., 1994, *Immunology Today*, 15(1):11-15.
- [34] Mack M., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(15):7021-7025.

细胞凋亡与坏死的鉴别及研究方法进展

程尉新 金丽娟

(第一军医大学病理生理教研室 广州 510515)

1972年, Kerr等^[1]首次提出细胞凋亡的概念, 由于对这种细胞死亡的新模式研究有助于

理解胚胎发育、免疫耐受、细胞群体稳定等重要生命现象, 并对认识、治疗艾滋病、癌症这些威