

单克隆抗体的展望：过去、现在和将来

Frank H. Deland

提 要：1975年，单克隆抗体制备方法的建立使肿瘤的探测 和治疗方法发生了革命性的变化。但单纯依靠单克隆抗体并未能达到预期的目的，为了获得能被推广的临床结果，还要求配合如生物反应修饰剂等更复杂的技术。

抗肿瘤相关抗原的标记抗体及其产品在肿瘤探测和治疗中的应用，已引起无数科研人员的兴趣和热情。在过去的几年里，文献中出现了数百篇寻找最完美的医用标记抗体的报道。在短时间内取得这么多的成果，几乎使人忘记了在抗体、抗原及两者关系的研究发生大爆炸之前已存在的缓慢发展的科学论据所奠定的基础。

早期的许多免疫学观察是经验的、准确的，但缺乏一个科学的原理。两百年前，Jenner通过对患者接种预防天花的牛痘，证明了免疫性的原理，但他不了解产生了牛痘抗体，也不了解抗体与抗原反应保护了病人，他只是直觉地认识到牛痘产生了某种能与天花“斗争”的物质。十九世纪60年代，在Pasteur发现减弱的微生物抗原能产生针对活性微生物的免疫性之后，许多研究人员进行了类似的研究以获得若干传染病的抗血清。

令人惊奇的是，第一次制备肿瘤抗血清的尝试竟发生在大约一百年前，Hericourt和Richet制备了成骨肉瘤提取物的动物抗血清。用这些抗血清对一个患者治疗的结果给人以充分的鼓舞，随后他们又治疗了五十个以上的成骨肉瘤患者，而那些用正常血清治疗的患者却没有产生任何临床效果。这证实了他们的科研水平。Hericourt和Richet的方法虽然考虑欠周详，但与那些在本世纪中叶首次使用的方法非常相似。

肿瘤抗体的新纪元是随着1929年 Witebsky的一项重要发现开始的，那时他发现了肿瘤的抗原特性。1948年，Pressman和Keighly证明了兔抗鼠肾抗体能用放射性核素标记，并证明标记抗体可集中在鼠肾内。此后，进行了许多利用放射性标记抗肿瘤抗体探测和治疗肿瘤的研究。

大多数人认为，单克隆抗体时代是从1975年 Kohler和Milstein的具有深远影响的工作开始的。然

而，在他们建立杂交瘤技术以前，已出现了一些与此有关的事件。1846年，Dalrymple发现了人多发性骨髓瘤；1848年，Bence Jones在多发性骨髓瘤患者的尿中发现了一种独特的蛋白质。一百多年以后，Burnet提出了一个获得性免疫性的克隆选择学说。此后不久，骨髓瘤蛋白质被看作是免疫球蛋白，而且是天然产生的单克隆抗体。以后，又有一些其它的报告，从而导致 Kohler和Milstein完成了淋巴细胞杂交瘤技术。

1948年，Pressman和Keighly的报告发表后，研究工作开始致力于制备抗肿瘤特异抗原的抗体。虽然许许多多的研究人员认为他们制备了抗不同肿瘤的抗体，但它们针对的是肿瘤相关抗原，而不是肿瘤特异抗原。肿瘤细胞表面或胞浆内的抗原并不仅仅局限于恶性细胞，也能在几种正常组织内发现。令人鼓舞的是，这些抗原的浓度在恶性细胞上比在正常细胞上高，这为鉴别恶性细胞提供了相对定量的基础。即使经过最精心提纯的抗原及其抗体，但最终得到的并不是单一的抗体，可以说是一种多克隆抗体。在制备单一的抗特异抗原的抗体时，杂交瘤技术是一个重要的步骤。然而，正常细胞内存在相同的抗原仍然是一个问题。

1965年，Gold和Freedman在结肠癌中发现并分离出癌胚抗原(CEA)一事，推动了标记抗体在闪烁显像和治疗中的应用研究。此后便出现了一些CEA抗体应用方面的研究报告，有些研究令人沮丧，有些研究则振奋人心。后者的成功是由于应用了减少本底干扰的计算机数据处理方法。

在单克隆抗体出现以前，肿瘤标志物主要通过名称来辨别，如甲胎蛋白(一种癌胚抗原)、人绒毛膜促性腺激素(异位激素)、酸性磷酸酶(酶)和黑色素瘤(肿瘤相关抗原)等。单克隆抗体为以前不可能进行的肿瘤免疫学研究提供了可能。Kohler和Mils-

tein的报告发表后,建立了用字母和数字来辨别几百种抗体的方法。发现新的抗肿瘤抗体的可能性似乎是不受限制的,例如,已经有了针对同一抗原中不同抗原决定簇的单克隆抗体。

抗体技术在肿瘤的诊断和治疗方法中的成功应用,将取决于对抗原和抗体的选择。由于肿瘤相关抗原也能在正常器官的细胞上发现,所以必需选择那些在肿瘤细胞上的含量比在正常细胞上高得多的抗原。从以往使用多克隆抗体的经验中,已得到了抗原浓度在正常和异常细胞上不同的证据。不过,仍有必要用杂交瘤克隆化的方法来选择那些由不同抗原决定簇产生的最有希望的抗体。在选择应用于临床研究的抗体时,对某些方面必须加以评价,例如,虽然所用的抗体与循环中抗原的反应在体外显像过程中不存在严重的问题,但在体内血液成分和骨髓细胞上有交叉反应的抗原则限制了应当投入的抗体量。另一方面,假如在血细胞上有重要的抗原决定簇位点,则在仔细检验剂量的情况下,可考虑应用高亲和力抗体来治疗。

在同一肿瘤内选择抗体时,一个重要的问题是已用免疫学方法所证明的肿瘤细胞的多样性。在对39例乳腺癌患者的研究中,Schlom和Weeks针对乳房上皮用四个单克隆抗体证明了十种抗原表现型。在同一肿瘤组织内的细胞表现型的多样性,可用荧光活化细胞分类仪及免疫过氧化物酶染色法来证明,它包括细胞点染、细胞浆染色弥散和细胞膜尖染等。Schlom和Weeks发现,抗体与处于细胞周期S期的细胞表面抗原决定簇有最强的反应。因为肿瘤细胞可能处于细胞周期的不同期,所以这一发现也许可以解释何以在同一肿瘤内抗体浓度不尽相同以及用免疫过氧化物酶法染色的显微镜切片中所观察到的结果也不一样。

在转移性病变的探测和治疗中发现了一个有关特异性的问题。Poste等将未经过克隆而具有多种不同转移特性(包括非转移性克隆)的黑色素瘤细胞系移植到小鼠体内,形成肿瘤。与原来的肿瘤相比较,一部分转移性肿瘤有与原发肿瘤相同的转移特性,而另一些转移瘤则是一些具有不同转移特性的克隆。有意义的是,在不均一转移瘤中,克隆的变异范围比在亲代瘤细胞系中克隆的差别要小得多。从而有可能选择一个针对原发性肿瘤的抗原决定簇的抗体,但这一决定簇并不出现在转移瘤中。Fogel等用不同的方法也证明了免疫选择可能与转移

的发生有关。

在选择抗体时考虑的其它因素还包括免疫球蛋白的类型、放射性核素标记的影响和抗体片段的应用。IgG和IgG_{2a}似乎优于其它类型的免疫球蛋白,蛋白A和羟基磷灰石层析分别适用于有效地提纯IgG和IgG_{2a},而且IgG_{2a}还有一个优点,就是它可杀死瘤细胞。

用放射性核素标记抗体的目标是保持抗体的免疫反应性。在标记和纯化时,都要进行放射性测量。为了得到最可信的结果,标记和纯化后至少要保持75%的免疫反应性。从整体分布来看,用放射性碘标记较为可取,但抗体的脱碘是一个缺点。碘可能与循环系中的其它蛋白质结合,或被甲状腺吸收,从而减少了到达细胞抗原决定簇的标记抗体的浓度。另一方面,铟标记抗体在整体中是较稳定的,但标记化合物在肝内的选择性聚集给肝转移性病变的探测造成了困难。

抗肿瘤相关抗原的免疫球蛋白整体有其固有的缺点,而IgG的片段则无这些缺点。免疫球蛋白整体是由具有免疫活性的两条重链和两条轻链通过二硫键与非特异部位连接而成,通常用“Y”形状表示。Y的两个上臂为免疫活性部分,底下的非特异部分被称作Fc段。胃蛋白酶对它的裂解发生在二硫键的Fc侧,可使Fc段从臂上脱下。剩下的部分称F(ab')₂段,因为保持结合位点的两部分还连在一起。如果用木瓜蛋白酶裂解,则Y的两臂分别从Fc段分离。

完整抗体的Fc段可以非特异地与带适当受体的多种细胞相结合,这个现象在甲状腺中已被多次观察到。有时,虽然某个患者已经接受了足够的碘封闭,甲状腺内的放射性吸收还可以很高,而另一些接受同样碘封闭的患者,碘浓度则很低。由于在许多器官内存在Fc受体,一部分免疫球蛋白被结合到并非要探测的细胞上,因而与有问题的部位相混淆。

对目标受体提供免疫球蛋白的过程,需要IgG从血管内逸出到细胞外间隙。较大分子量的化合物自然很少有可能通透血管壁,而免疫球蛋白片段F(ab')₂或Fab比IgG整体明显要小些,虽然大小的不同不能直接解释片段可以通过血管壁,但是间接的证据证明,在使用片段时,定位于肿瘤的抗体比使用免疫球蛋白整体时要多。O'Connor和Bale观察到的在肿瘤内新生血管的通透性比正常管壁内的新生

血管大这一现象,也可解释IgG整体与片段血管通透性的明显不同。在经免疫抑制后移植人结肠癌的小鼠内,使用F(ab')₂时的肿瘤/组织放射性比为使用完整抗体时的6倍,而以肿瘤/血液比表示时,则为13倍。这表明片段从血管内排出更快。虽然片段的肿瘤/组织比大于完整抗体,但完整抗体在肿瘤内的放射性绝对计数更高些。在用γ照相机显像时,由于片段与完整抗体在肿瘤内的放射性绝对计数不同,因此出现了一个在以下两者之间选择的问题:①用片段时,计数较低,显像分辨率亦较差;②用完整抗体时,须通过计算机处理以改善肿瘤/非肿瘤比值。

为减少非靶组织的放射性标记抗体从而改善分辨率的一些方法已经被提出。方法之一是在加入第一抗体后24小时,加入一个用脂质体包裹的抗第一抗体的第二抗体,两小时内就可观察到循环系中的第一抗体明显减少。此法的缺点是脂质体能被肝脏吸收,故不能辨别有无肝脏病变。另一方法也使用了一个第二抗体(无脂质体),并已得到了适度的成功。根据这些作者的报告,非靶组织的第一抗体减少,且第二抗体也不被肝脏所吸收。在第二抗体加入后四小时内,血中的放射性水平降低了四倍。在第一抗体加入后48小时到第二抗体加入后24小时,肿瘤内的放射性水平没有多少变化。

在发现单克隆抗体以前,从动物制备的多克隆抗体应用很广泛。这些肿瘤标记物通常根据器官功能来分类,如癌胚抗原、异位激素、酶和组织相关抗原等。癌胚和组织相关抗原是多源性的,可发现于多种器官的细胞,例如癌胚抗原可存在于呼吸道、消化道、表皮、子宫颈、阴道和膀胱等。由于不同种类的多源性抗原由许多抗原决定簇组成,随着单克隆抗体的出现,需要一个新的命名方法。通常的单克隆抗体命名法是依器官而定的,如乳房、结肠等。如果一个独特的单克隆抗体是针对乳房的,但还不能说仅仅对乳房特异。例如,10-3D-2与肺、结肠、胎盘和黑色素瘤都有交叉反应;HMFG与肺、子宫和卵巢有交叉反应;以及3.15.C₃与结肠有交叉反应等。有一个较为满意的抗B72.3抗原的抗体,与正常成熟细胞相比,它与肿瘤细胞有高亲和力。估计这个抗体能与50%的乳癌发生反应。另外又发现6个抗B72.3抗原的抗体。根据肿瘤摄取注射剂量(每克剂量)的百分数和肿瘤/非肿瘤比值,它们均优于前面的那个抗体。

Muraro等也报道了一组针对五个结肠癌的单克

隆抗体。根据它们与肿瘤细胞表面的反应,分为五个明显不同的类型,它们与良性或细胞生长异常的结肠病变以及成熟的正常组织无交叉反应,但与乳癌有交叉反应。

虽然已有了针对一些器官的抗原决定簇的单克隆抗体,包括对结肠、乳房、肺、子宫颈、卵巢、胰腺、前列腺等,但它们都与其它器官的细胞发生交叉反应。由此推断,几乎不存在一个真正的肿瘤特异抗原及其抗体。Schlom和Weeks对此已作了很好的概括。

✎ 抗相同肿瘤不同抗原决定簇的单克隆抗体的出现,启发人们将这些抗体混合起来,以增加抗体在肿瘤中的浓度,即配成一个“混合剂”。不幸的是,这个方法不一定是有用的。Sharkey等评价了四个GW-39人结肠癌单克隆抗体在肿瘤中的定位,发现有两个单克隆抗体的浓度高于山羊多克隆抗体,而另外两个则较低。虽然具有统计学差异,但它们的肿瘤/非肿瘤之比都不够突出(按>1.5来衡量),表明这个发现可能无生物学意义。比完整抗体具有更大肿瘤浓度的两个抗体的混合物,未能提供比单个单克隆抗体更好的显像。

免疫淋巴闪烁显像是放射免疫显像的一个发展方向。诊断方法与胶体淋巴闪烁显像类似,即在监护下,于淋巴结的淋巴回流区域皮下注射放射性标记抗体。已观察到淋巴结能俘获抗转移肿瘤的标记抗体,因为在淋巴结中有抗体-抗原反应特性。肿瘤淋巴回流区域外的淋巴结内有标记抗体的俘获具有临床意义。在早期对乳癌患者的研究中,显像发现患者对侧腋窝有标记抗体的俘获,其中三例的对侧腋窝淋巴结无明显肿大。在Thompson等对类似病例的报告中,也观察到在两个患者的对侧腋窝有放射性摄取。淋巴结活检结果是非恶性的,但后来其中一个患者的对侧淋巴结有明显的肿大,活检发现恶性细胞阳性。对此的解释是,在没有转移性肿瘤时,淋巴结吸收了对侧乳房病变部位流落的抗原。这个现象后来在一个阴唇癌的病例中得到了证实,其阴阜两侧许多含有放射性的淋巴结实际并没有肿瘤。为了得到确实的证据,从这些淋巴结中提取到了抗原。肿瘤或非肿瘤淋巴回流区域的淋巴结吸收抗原的这一临床发现,没有被深入地研究,可这些信息对治疗方法的选择也许是很重要的,所以还需继续研究。

随着抗肿瘤相关抗原抗体的发展,用其治疗肿

瘤的可能性是显而易见的,然而迄今为止值得大书特书的结果却少得出乎预料。在应用放射性标记抗体以前,对免疫疗法已有所研究,并发现是有欠缺的。抗肿瘤抗体最常用 ^{131}I 标记,因为 γ 辐射可以显像, β 辐射可能有助于胞溶。Beierwaltes和Khazaeli发现 ^{131}I -间碘苄基胍(MIBG)在肾上腺髓质肿瘤中的摄取与 ^{131}I 在充分分化的甲状腺癌中的摄取有基本相同的生物半衰期。在肾上腺内每克摄取剂量的百分数与在甲状腺治疗中者相同,没有达到肿瘤的消除。他们还发现,当用MIBG标记单克隆抗体或片段时,器官摄取减少。

Denardo等提出,标记治疗用抗体的放射性核素应该具有1~3天的物理半衰期、能穿透0.5~30个细胞直径的较大能量储存和一个简单的衰变至基态的过程。Denardo等提到的放射性核素是 ^{67}Ga ,它可释放丰富的用于治疗 β 粒子和适当的用于显像的 γ 辐射(93和184keV)。 ^{67}Ga 标记抗人B细胞淋巴瘤单克隆抗体的生物学分布是令人满意的:在第3天肿瘤摄取为注入剂量/克的14.7%,这个水平可持续到第5天,而在正常组织中,放射性从第1天便开始减少。

使用 ^{10}B 标记抗体的中子俘获治疗在肿瘤免疫疗法中是一个令人感兴趣的方法。当 ^{10}B 吸收热中子时,形成了 α 粒子及反冲 ^7Li 离子,具有2.4MeV的平均总动能,组织射程 $<10\mu$ 。目前5在研究的标记方法是:将大量 ^{10}B 连接到抗体上但不影响其免疫活性。

Etlinger等研究了用放射性标记抗体、化学疗法和外照射相结合的方法治疗肝癌。他们报告,在28例肝癌患者中,11例有所缓解。用抗体治疗时,6例患者中有4例出现缓解,5例不宜动手术的肺癌患者经抗体和外照射结合治疗,有4例出现缓解。在另外一些报告中,也有用放射性标记抗

体治疗肿瘤后出现缓解的报道,但治愈率较低。

对与非放射性核素结合的单克隆抗体已有所研究。Smyth等评价了用N-乙酰溶肉瘤素结合的单克隆抗体(anti-Ly-2)与基因重组人坏死肿瘤因子[α (rTNF-2)]的联合治疗。他们发现有30%的小鼠肿瘤出现了部分或全部消退。抗体与适当的放射性核素结合也可以加速肿瘤的消退。

在改善抗体、更大规模抗体生产方法、选择适当抗体的程序、放射性核素的选择、核素与抗体的联结方法以及显像技术如断层等方面的开发已有了显著的发展,研究加强了前面提及的两个论点:即①可能不存在对肿瘤特异的抗体;②甚至使用最纯的抗体,肿瘤的抗体浓度范围也仍不能达到显像和治疗所要求的最适量。开发抗体在临床的成功应用,可能需要生物反应修饰剂,如用基因重组的干扰素来加强恶性细胞表面的抗原表达。用遗传工程制备的单克隆抗体可能增强抗原与抗体的结合,而有利于肿瘤的探测和治疗。免疫组织化学在肿瘤的探测和治疗中是一个有用的工具。测定一组抗体与患者肿瘤的亲和能力,并由那些具有最高亲和力的抗体组成一个混合剂,选择一个低辐射剂量和具有适合目前显像设备能量的放射性核素标记,也可加强肿瘤的探测。用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 这样的放射性核素标记时,可加大标记抗体的投入量,从而改善统计学结果。使用抗体片段可增加肿瘤/非肿瘤之比。最后,发射断层,特别是使用一个能量适合断层仪器的放射性核素的断层,可较平面显像增加2~3倍的靶/非靶比值。在开发出精致的生物修饰剂以及遗传工程技术能被普遍使用以前,为了得到最佳结果,特别是显像,应该使用一切可以利用的方法。

[Semin Nucl Med 1989, 19(3) 158~165(英文)]

朱锡霞节译 林 汉校