Biotechnology Frontier
June 2013, Volume 2, Issue 2, PP.20-24

The Progress in Immunoproapoptotin Molecules Targeting Tumor Cells

Tao Wang[1], Junlin Ren[1], Lintao Jia[2], Angang Yang[1#]

1. Department of Immunology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

2. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

[#]Email: agyang@fmmu.edu.cn

Abstract

Immunoproapoptotin consists of a single-chain antibody against tumor-specific surface marker and an active domain which has the function of translocation and pro-apoptosis. This fused recombinant protein can specifically recognize and kill tumor cells. Immunoproapoptotin comes from immunotoxin which is proved not successful in clinical trials by inducing neutralizing antibody and other side effects due to the heterogenous toxins domains from bacteria or plants. To avoid the immunogenicity of immunotoxin, effectors from human were employed in the 2nd generation of Immunoproapoptotin. However, the translocation domain is still heterogenous and the efficiency of translocation is limited. In the latest progress, a furin cleavage site was used to substitute for the translocation domain and thus enhanced the translocation efficiency and greatly reduced the immunogenicity of Immunoproapoptotin, demonstrating a wide clinical application prospects.

Keywords: Tumor; Target Killing; Immunoproapoptotin Molecule

免疫促凋亡分子靶向杀伤肿瘤的研究进展*

王涛[1]，任君琳[1]，贾林涛[2]，杨安钢[1]

1. 第四军医大学 免疫学教研室，陕西 西安 710032

2. 第四军医生物化学与分子生物学教研室，陕西 西安 710032

摘 要：免疫促凋亡分子是肿瘤特异性表面标记物的单链抗体与具有转位及杀伤功能的活性片段融合表达的重组蛋白，具有靶向识别、高效杀伤肿瘤细胞的特点。免疫促凋亡分子由免疫毒素发展而来，免疫毒素虽然具有较强的杀伤活性和特异性，但是由于其转运、杀伤结构域来源于细菌或植物毒素，临床试验中产生了中和抗体并伴有较强副作用，限制了其应用的范围。第二代免疫促凋亡分子利用人内源性杀伤分子替换了免疫毒素的杀伤结构域，部分解决了免疫毒素的免疫原性问题，但是其未被替代的天然毒素转位结构域仍具有免疫原性且转位效率有限。最新一代免疫促凋亡分子进一步用 furin 位点替代了毒素的转位结构域，在保证特异性及杀伤活性的同时，提高了转位能力并极大地降低了免疫原性，因而具有广泛的临床应用前景。

关键词：肿瘤；靶向杀伤；免疫促凋亡分子

引言

基于抗体技术的抗肿瘤靶向药物研究是肿瘤生物治疗中的一个热点，它们具有比单纯抗体药物更强的杀伤能力。与其他抗肿瘤药物相比，抗体介导的肿瘤靶向药物最大的优势在于能特异性地将药物运输至肿瘤组织，能在提高对肿瘤细胞杀伤效果的同时，最大限度地降低药物对正常组织的非特异毒性。将识别肿瘤细胞

[*]**基金资助：**受国家自然科学基金重点项目(81030045)、面上项目(30701006, 81172147, 81172289)支持资助。

CITATION-Tao Wang, Junlin Ren1, Lintao Jia, et al. The Progress in Immunoproapoptotin Molecules Targeting Tumor Cells[J]. Ivy Publisher: *Biotechnology Frontier*, June 2013, Volume 2, Issue 2, PP.20-24

引用格式-王涛, 任君琳, 贾林涛, 等. 免疫促凋亡分子靶向杀伤肿瘤的研究进展[J]. Ivy Publisher: 生物工程, 2013,2(2): 20-24

表面特异性受体的抗体与具有细胞毒性的蛋白质（包括植物、细菌来源的外源性毒素和 RNA 酶等）相连接构成的免疫毒素，它们能够实现将细胞毒性蛋白靶向运输至肿瘤组织，并进而特异性地杀伤肿瘤细胞。对于传统手术、放疗、化疗都无效的血液恶性肿瘤和实体瘤，免疫毒素的应用显示了较好的临床疗效。然而，免疫毒素和免疫毒素样重组分子具有异源性，这就限制了它们的临床应用。本文对免疫促凋亡分子的发展历史、作用机制、给药方式及应用前景做以综述。

1 免疫毒素

免疫毒素是以针对肿瘤细胞表面的特异抗原、糖类结构、细胞因子受体的抗体为导向分子，以偶联的天然毒素蛋白片段为“弹头”的一类靶向药物。

免疫毒素中的毒素蛋白结构域多来自于植物毒素或细菌毒素，这些天然毒素主要通过酶的作用抑制细胞蛋白合成从而发挥杀伤效应。植物毒素包括蓖麻毒素(Ricin)，相思子毒素(Abrin)，美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein, PAP)等；细菌毒素包括绿脓杆菌外毒素 A(Pseudomonas exotoxin A, PEA)、白喉毒素(Diphtheria toxin, DT)、炭疽毒素(Anthrax toxin)、志贺氏毒素(Shiga toxin)、霍乱毒素(Cholera toxin)、百日咳毒素(Pertussis toxin)等。大多数毒素具有典型的 AB 两个结构域，因而被称为 A-B 毒素[1]。A-B 毒素的 A 部分具有酶的活性，在进入细胞后作用于特定靶位引起细胞死亡或特定的生理学效应；B 部分有一个或几个亚单位构成，主要发挥结合细胞表面受体以及将 A 部分转位至胞浆的作用[1]。

通常，A-B 毒素是以无活性的形式存在，它的激活需要蛋白酶解加工。以 PEA 为例，PEA 为包含 3 个功能域的单链蛋白，其中 Domain Ⅰa 是结合结构域，Domain Ⅱ是转位功能域，Domain Ⅲ是 ADP 核糖化酶区，Domain Ⅰb 区的功能尚不清楚，但它含有一个二硫键，将 Domain Ⅱ和 Domain Ⅲ分隔开。当 Domain Ⅰa 结合细胞膜表面的α2 巨球蛋白受体后，PEA 被细胞内吞并经由内吞体到达高尔基体外侧网络[2]，在蛋白内切酶作用下，Domain II 被切割断裂，断裂后的 Domain II 引导 Domain Ⅲ片段从反式网状高尔基体进入内质网并转位至胞浆，在胞浆中 Domain Ⅲ与肽链合成中的延长因子 2(elongation factor 2, EF2)结合，使 EF2 糖基化失活，蛋白合成受阻，引起细胞死亡[3]。

根据 A-B 毒素的结构特点，将天然毒素的 B 部分替换成肿瘤特异性的抗体，就形成了免疫毒素分子。免疫毒素具有稳定性强、渗透性好的特点，这为其临床应用提供了结构基础。目前免疫毒素主要应用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤。如靶向 IL-2 受体的 DAB389IL2(denileukindiftitox, ONTAK)是目前唯一被 FDA 批准用于临床治疗的免疫毒素，它是 IL-2 和截短型 DT 的重组蛋白，主要用于难治性或复发性皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)。ONTAK 的应答率达到 30%，其中完全缓解率达到 10%。大部分病人的皮肤病损得到明显改善。对于慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和非霍奇金淋巴瘤的治疗应答率分别达到 33%和 25%[4]。

Chen SY 等利用抗 HER2 单链抗体 e23sFv 构建重组免疫毒素基因 e23sFv-PE40，转染人 T 淋巴细胞，获得一类能分泌产生免疫毒素新型杀伤细胞，分泌产生的免疫毒素能够特异性识别 HER2 阳性肿瘤细胞，内化并抑制细胞内蛋白合成，发挥杀伤效应。他们首次提出分泌免疫毒素的淋巴细胞策略，开创了基因治疗与免疫治疗相结合的一种治疗肿瘤的新方法[5]。

然而，在免疫毒素发展的过程中仍然面临很多挑战，其中最主要的是免疫毒素自身的免疫原性。由于免疫毒素的效应片段是外源性的，免疫系统会产生针对毒素的中和抗体，从而大大影响了治疗效果[6]。此外，血浆中高浓度的免疫毒素会引起非特异性的血管渗漏综合征(vascular leak syndrome, VLS)，而免疫毒素应用于实体瘤时，其有限的穿透力也是制约其临床应用的瓶颈之一[7]。

2 以人源性促凋亡蛋白为效应分子的免疫凋亡分子

为降低免疫毒素所具有的免疫原性，研究人员对免疫毒素的结构进行了改造，这些改造主要包括使用人源化的抗体和尽可能地截断或替换天然毒素片段。

细胞凋亡是机体一种高效的内在的死亡模式，由此，研究人员将抗体、膜转运结构域和凋亡效应分子进行重组，构建形成一类新的肿瘤靶向促凋亡蛋白，其作用模式是：识别肿瘤细胞——内化并转运进入肿瘤细胞液——杀伤肿瘤细胞。由于凋亡效应分子可以引发细胞凋亡的级联反应，同时又属于自体蛋白，因此这种靶向促凋亡蛋白的杀伤效率更高，免疫原性也较小。

Jia LT、Zhao J、Xu YM 等人将免疫促凋亡分子的概念引入 HER2 阳性肿瘤的靶向治疗研究。他们分别将 e23sFv-PE40 中具有毒性效应的 PEA domainⅢ置换以人源性的活性 Caspase-3[8]、GrB[9]、Caspase-6[10]、AIF(apoptosis-inducing factor)[11]、tBid[12]，构建了一系列含有内源性杀伤分子的免疫毒素样重组蛋白，这类重组蛋白被称为免疫促凋亡分子。实验证实，针对肿瘤抗原 HER2 的单链抗体、绿脓杆菌外毒素的膜转运结构域(Domain II)与活性型 caspase-3、caspase-6、granzyme B 或 tBid 等组成的融合蛋白，能够靶向杀伤 HER2 阳性肿瘤细胞，显著抑制肿瘤生长，显著延长荷瘤动物存活期[8-12]。与上述研究类似，美国明尼苏达大学 Heidi A 等人将经点突变改造过的人核糖核酸酶作为杀伤分子与 CD7 单链抗体融合构建出的融合蛋白可以有效杀伤急性淋巴细胞白血病细胞[13]，Daken 等也采用人 GrB 作为杀伤分子靶向杀伤肿瘤细胞[14]。由于这些免疫促凋亡蛋白的效应分子是人源化的，因此极大的降低了免疫毒素的免疫原性，并实现对靶细胞的特异性杀伤。

3 以 furin 识别位点连接抗体和内源杀伤分子的新型免疫促凋亡分子

免疫促凋亡分子的免疫原性虽然较免疫毒素而言被大大降低，但是其结构中的 PEA 膜转运结构域长度大于 100 aa，仍是细菌毒素蛋白的组分，对人体仍然具有免疫原性。为进一步降低免疫促凋亡分子的免疫原性，Zhang L 等人对 PEA 膜转运结构域进行不同程度的截短，试图找到 PEA 膜转运最短功能区段。令人兴奋的是，实验表明仅保留 PEA 膜转运结构域中弗林蛋白酶(furin)切割位点和邻近的数个氨基酸残基就能完成切割和膜转运作用，但发挥效力的时间有所延长[15]。

Furin 又称成对碱性氨基酸蛋白酶，是体内一种重要的蛋白内切酶。许多前体蛋白都含有 Furin 的切割序列，Furin 对这些前体蛋白的切割是这些前体蛋白转化为成熟、有生物学功能的分子的必需步骤[16]。多种毒素进入细胞并发挥细胞毒作用都依赖于 Furin 的切割。一些细菌毒素如炭疽毒素、败血梭状芽胞杆菌 α 毒素和气单胞菌溶素在细胞膜表面被 Furin 切割活化；而 A-B 毒素则多在早期内体中被 Furin 切割活化。在毒素与受体结合后，A-B 毒素被内吞进入内体，在内体中 Furin 将 A-B 切开，然后有细胞毒性作用的 B 结构域通过不同的途径进入胞浆，并对细胞进行杀伤[17]。值得注意的是，由于连接 A 和 B 两部分的酶切序列在不同的毒素中存在差异，Furin 对这些毒素的切割效率也相差较大。例如 Furin 对 DT 的切割效率比 PEA 要高出一倍[18]。

根据上述研究基础，Wang T 等人优化了 furin 识别位点序列，并构建了以 furin 识别位点连接抗体和内源杀伤分子的新型免疫促凋亡分子。研究表明，新型免疫促凋亡分子不仅能够特异性的识别并内化进入 HER2 阳性的肿瘤细胞，而且还能有效携带杀伤分子进入胞浆并最终引起肿瘤细胞的凋亡[19-21]。Mahmud 等也采用了含有 furin 位点的 PEA252-366 序列连接单链抗体和人 AIF 分子，对 HER2 阳性肿瘤细胞实现了靶向杀伤[22]。研究表明，该类免疫促凋亡分子实现了与以 GGGS 作为连接序列的免疫促凋亡分子基本相似的瘤细胞的杀伤效率[23]。由于最大限度地降低了外源性序列的存在，新型免疫促凋亡分子的免疫原性被大大降低，这为其临床应用提供了必要的基础。

4 免疫促凋亡分子临床应用展望

近年来，随着新的单克隆抗体的不断涌现，包括免疫毒素在内的基于抗体的靶向治疗方案大量进入临床实验阶段。凭借特异性好、杀伤效果强等优点，免疫毒素的相关临床试验取得了相当的效果，为肿瘤的生物治疗展现了新的希望[4, 7]。随着相关研究在过去二十年中取得的巨大进展，免疫毒素的安全性越来越受到重视。在注重杀伤效果的同时强调对免疫毒素分子进行改造以提高其安全性已成为免疫毒素分子未来发展的必由之路[6, 7]。

在探索抗体介导的抗肿瘤靶向药物的过程中，我们通过对免疫毒素结构的不断改造，获得了特异性好、免疫原性低、杀伤能力强的新型免疫促凋亡分子。免疫促凋亡分子的潜在临床应用方案包括免疫治疗和基因治疗等。除了利用基因工程获得抗肿瘤蛋白后通过静脉或瘤内注射发挥治疗作用之外，还可以将肿瘤靶向凋亡蛋白的基因通过体外或体内途径修饰患者自体细胞（淋巴细胞等），使之在信号肽的引导下分泌目的蛋白，后者进入血液循环，在全身范围内识别肿瘤细胞，促进肿瘤细胞凋亡。具体而言，通过体外分离并修饰患者的淋巴细胞，经免疫磁珠筛选后进行静脉回输，使之在体内持续分泌目的蛋白，有效地杀伤原发和转移病灶区的肿瘤细胞，发挥长期的治疗和免疫监视作用。

通过基因修饰自体细胞（如淋巴细胞），使之分泌肿瘤靶向杀伤蛋白，形成了肿瘤系统治疗的新方法，其主要特点是：（1）长期持续性：基因修饰的淋巴细胞（或肌肉、肿瘤细胞）合成的肿瘤靶向凋亡蛋白，在尚来不及正确折叠时，即在信号肽的引导下通过内质网—高尔基体途径分泌到细胞外，因此分泌细胞本身生物学活性不受影响，回输入患者体内后可以长时间存活，并持续分泌肿瘤靶向凋亡蛋白，长期发挥免疫监视和杀伤作用。（2）分布广泛性：自体细胞分泌的肿瘤靶向凋亡蛋白，可以通过血液循环到达全身各处，同时基于淋巴细胞本身的特性，分泌细胞亦可以在全身范围内循环，聚集在肿瘤周围和进入到肿瘤组织内，并能够向淋巴结中归巢和定居，这对于原发病灶和转移到远处的、手术无法切除的细小病灶区的肿瘤细胞，同样具有强的杀伤作用。此外，由于经修饰的淋巴细胞可以在趋化作用下浸润至肿瘤组织内部，这也克服了传统免疫毒素对实体瘤穿透能力有限这一缺陷，使免疫促凋亡分子具有了更广阔的临床应用前景。

5 结语

基于抗体技术的抗肿瘤靶向药物发展经历了由肿瘤特异性单链抗体和天然毒素重组而成的免疫毒素到含有人源性活性杀伤分子的第二代免疫毒素，再到几乎没有外源片段的免疫促凋亡分子，其对肿瘤细胞的杀伤作用不断得到增强而免疫原性却不断地降低。免疫促凋亡分子特异性强、杀伤活性高和免疫原性小的特点决定了其有利于临床长期反复使用，并且其给药途径灵活，能突破实体瘤外致密的包裹层对肿瘤进行杀伤，这些对于肿瘤的治疗具有重要的理论意义和实用价值，具有广阔的临床应用前景。

REFERENCES

[1] Madhumathi J, Verma RS. Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. Curr Opin Microbiol. 2012 Jun; 15(3): 300-9

[2] Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. J Biol Chem. 1992 Jun 25; 267(18): 12420-3

[3] Adkins I, Holubova J, Kosova M, Sadilkova L. Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Jun; 13(8): 1446-73

[4] Frankel AE, Fleming DR, Hall PD, Powell BL, Black JH, Leftwich C, Gartenhaus R. A phase II study of DT fusion protein denileukindiftitox in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res. 2003 Sep 1; 9(10 Pt 1): 3555-61

[5] Chen SY, Yang AG, Chen JD, Kute T, King CR, Collier J, Cong Y, Yao C, Huang XF. Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. Nature. 1997 Jan 2; 385(6611): 78-80

[6] Litvak-Greenfeld D, Benhar I. Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates. Adv Drug Deliv Rev. 2012 Dec; 64(15): 1782-99

[7] Govindan SV, Goldenberg DM. Designing immunoconjugates for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther. 2012 Jul; 12(7): 873-90

[8] Jia LT, Zhang LH, Yu CJ, Zhao J, Xu YM, Gui JH, Jin M, Ji ZL, Wen WH, Wang CJ, Chen SY, Yang AG. Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3. Cancer Res. 2003 Jun 15; 63(12): 3257-62

[9] Zhao J, Zhang LH, Jia LT, Zhang L, Xu YM, Wang Z, Yu CJ, Peng WD, Wen WH, Wang CJ, Chen SY, Yang AG. Secreted

antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells. J Biol Chem. 2004 May 14; 279(20): 21343-8

[10] Xu YM, Wang LF, Jia LT, Qiu XC, Zhao J, Yu CJ, Zhang R, Zhu F, Wang CJ, Jin BQ, Chen SY, Yang AG. A caspase-6 and anti-human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) antibody chimeric molecule suppresses the growth of HER2-overexpressing tumors. J Immunol. 2004 Jul 1; 173(1): 61-7

[11] Yu CJ, Jia LT, Meng YL, Zhao J, Zhang Y, Qiu XC, Xu YM, Wen WH, Yao LB, Fan DM, Jin BQ, Chen SY, Yang AG. Selective proapoptotic activity of a secreted recombinant antibody/AIF fusion protein in carcinomas overexpressing HER2. Gene Ther. 2006 Feb; 13(4): 313-20

[12] Qiu XC, Xu YM, Wang F, Fan QY, Wang LF, Ma BA, Jia LT, Zhao J, Meng YL, Yao LB, Chen SY, Yang AG. Single-chain antibody/activated BID chimeric protein effectively suppresses HER2-positive tumor growth. Mol Cancer Ther. 2008 Jul; 7(7): 1890-9

[13] Erickson HA, Jund MD, Pennell CA. Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition. Protein Eng Des Sel 2006; 19: 37-45

[14] DalkenB, Giesubel U, Knauer SK, Wels WS. Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factordomains for cell recognition. Cell Death Differ. 2006; 13: 576-585

[15] Zhang L, Zhao J, Wang T, Yu CJ, Jia LT, Duan YY, Yao LB, Chen SY, Yang AG. HER2-targeting recombinant protein with truncated pseudomonas exotoxin A translocation domain efficiently kills breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2008 Aug; 7(8): 1226-31

[16] Seidah NG. The proproteinconvertases, 20 years later. Methods Mol Biol. 2011; 768: 23-57

[17] Seidah NG. What lies ahead for the proproteinconvertases? Ann N Y Acad Sci. 2011 Mar; 1220: 149-61

[18] Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(10): 753-766

[19] Wang T, Zhao J, Ren JL, Zhang L, Wen WH, Zhang R, Qin WW, Jia LT, Yao LB, Zhang YQ, Chen SY, Yang AG. Recombinant immunoproapoptotic proteins with furin site can translocate and kill HER2-positive cancer cells. Cancer Res. 2007 Dec 15; 67(24): 11830-9

[20] Ren JL, Meng YL, Hu B, Jia LT, Zhang R, Xu YM, Xie QS, Zhang YQ, Jin BQ, Chen SY, Wang T, Yang AG. The effect of direct translocation across endosomes on the cytotoxicity of the recombinant protein e23sFv-Fdt-casp6 to HER2 positive gastric cancer cells. Biomaterials. 2011 Oct; 32(30): 7641-50

[21] Wang F, Ren J, Qiu XC, Wang LF, Zhu Q, Zhang YQ, Huan Y, Meng YL, Yao LB, Chen SY, Xu YM, Yang AG. Selective cytotoxicity to HER2-positive tumor cells by a recombinant e23sFv-TD-tBID protein containing a furin cleavage sequence. Clin Cancer Res. 2010 Apr 15; 16(8): 2284-94

[22] Mahmud H, DälkenB,and Wels W.S. Induction of programmed cell death in ErbB2/HER2-expressingcancer cells by targeted delivery of apoptosis-inducing factor. Mol Cancer Ther. 2009; 8(6): 1526-1535

[23] Cao Y, Marks JD, Marks JW, Cheung LH, Kim S, Rosenblum MG. Construction and characterization of novel, recombinant immunotoxins targeting the Her2/neu oncogene product: in vitro and in vivo studies. Cancer Res. 2009 Dec 1; 69(23): 8987-95

【作者简介】



[1] 王涛（1976-），男，汉族，博士，副教授，研究方向：肿瘤发生及生物治疗，学习经历：2010.11-2012.10 美国南加州大学从事博士后研究；2000 年、2003 年和 2006 在第四军医大学分别获得学士、硕士和博士学位。

Email: wangt@fmmu.edu.cn

[2] 任君琳（1980-），女，汉族，博士，讲师，研究方向：肿瘤靶向治疗，学习经历：2003 年、2007 年和 2010 在第四军医大学分别获得学士、硕士和博士学位。

Email: junlin_ren@163.com

[3] 贾林涛（1972-），男，汉族，博士，教授，研究方向肿瘤发生及生物治疗，学习经历：2005.07-2007.12 月和 2008.11 月-2009.12 月分别在加拿大多伦多大学和渥太华大学从事博士后研究；1995 年和 1998 年在西北大学生物系分别获得学士和硕士学位，2001 年在第四军医大学获得博士学位。

Email: jialth@fmmu.edu.cn