

· 综 述 ·

# 靶向紧密连接蛋白6的药物在癌症治疗中的研究进展

李桂霞<sup>1</sup>, 毕宇鑫<sup>1</sup>, 郝瑞家<sup>1</sup>, 郑学敏<sup>2</sup>, 王根辈<sup>1</sup>, 李剑<sup>1</sup>, 王鹏银<sup>1\*</sup>

1 天士力生物医药股份有限公司, 天津 300402

2 天士力创世杰(天津)生物制药有限公司, 天津 300402

李桂霞, 毕宇鑫, 郝瑞家, 郑学敏, 王根辈, 李剑, 王鹏银. 靶向紧密连接蛋白6的药物在癌症治疗中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1304-1313.

LI Guixia, BI Yuxin, HAO Ruijia, ZHENG Xuemin, WANG Genbei, LI Jian, WANG Pengyin. Advances of Claudin6-targeting drugs in cancer therapy[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1304-1313.

**摘 要:** 紧密连接蛋白6 (Claudin6, CLDN6)是紧密连接蛋白(Claudins, CLDNs)家族的一员, 在卵巢癌、睾丸癌、子宫颈内膜癌、肝癌和肺腺癌等多种癌症中特异性高表达, 而在成人正常组织中几乎不表达。其能够激活多条通路参与肿瘤发生的多个过程, 包括促进肿瘤生长、迁移和侵袭, 且促进肿瘤化疗耐药。近年来, CLDN6 作为癌症治疗的新靶点引起了研究人员的广泛关注, 针对CLDN6靶点开发了多种类型的抗癌药物, 包括抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)、单克隆抗体、双特异性抗体和嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)。本文简要概述了CLDN6的蛋白结构、表达分布以及在肿瘤中的功能, 并对其作为药靶开发的抗癌药物研发现状和研发思路进行了综述。

**关键词:** CLDNs; CLDN6; 肿瘤; 靶向药物

## Advances of Claudin6-targeting drugs in cancer therapy

LI Guixia<sup>1</sup>, BI Yuxin<sup>1</sup>, HAO Ruijia<sup>1</sup>, ZHENG Xuemin<sup>2</sup>, WANG Genbei<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, WANG Pengyin<sup>1\*</sup>

1 Tasly Biopharmaceuticals Co., Ltd, Tianjin 300402, China

2 Transgene Tasly (Tianjin) Biopharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300402, China

**Abstract:** CLDN6 is a member of the CLDNs family that is specifically and highly expressed in cancers such as ovarian, testicular, endocervical, liver and lung adenocarcinoma, but hardly expressed in adult normal tissues. CLDN6 is able to activate multiple signaling pathways, which

\*Corresponding author. E-mail: wangpengyin@tasly.com

Received: 2022-07-29; Accepted: 2022-10-11; Published online: 2022-10-13

take part in the development and progression of cancer, including promoting tumor growth, migration and invasion, and promoting chemoresistance in cancer. In recent years, CLDN6 has received much attention as a novel target for cancer therapeutics. Many types of anticancer drugs targeting CLDN6 have been developed, including antibody-conjugated drugs (ADC), monoclonal antibodies, bispecific antibodies, and chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy (CAR-T). This paper briefly summarizes the structure, expression and function of CLDN6 in tumors, and reviews the current status and ideas of developing targeted CLDN6 anticancer drugs.

**Keywords:** CLDNs; CLDN6; cancer; targeted drugs

紧密连接蛋白(Claudins, CLDNs)在紧密连接中起着重要的作用,对于调节细胞旁通透性和维持细胞极性至关重要,几乎涉及所有重要的生理和病理过程。近年来,CLDNs已被公认为是癌症发生、发展和转移的关键调节因子,根据其组织依赖性表达模式不同,在多种癌症中发挥不同的作用<sup>[1]</sup>。CLDN6作为CLDNs家族的一员,在非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤<sup>[2]</sup>、子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)<sup>[3]</sup>、胃癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[6]</sup>、卵巢癌<sup>[7]</sup>等多种癌症中特异性表达,且与预后负相关,而在成人正常组织中几乎不表达<sup>[8]</sup>。CLDN6已成为抗癌治疗理想的靶点之一,全球药企及科研机构针对CLDN6也已经开发了抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)、单克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)等多种类型的药物,其中多个产品已经进入临床验证阶段。本文综述了CLDN6的蛋白结构、表达分布以及在肿瘤中的功能,并对其作为药靶开发的抗癌药物的研发现状和研发思路进行了综述。

## 1 CLDN6 概述

### 1.1 CLDN6 的蛋白结构

CLDNs是构成紧密连接蛋白重要的组分,

包括经典的CLDNs (CLDNs 1–10、14、15、17、19)和非经典的CLDNs (CLDNs 11–13、16、18、20–27)至少27个家族成员,CLDN6是CLDNs家族27个成员之一,其cDNA于1995年从外胚层特异性文库中分离得到<sup>[9]</sup>,于2001年从分化胚胎体中被鉴定出来<sup>[10]</sup>。人类CLDN6基因位于16p13.3,包含3个外显子,由220个氨基酸组成,分子量为23 kDa。如图1所示,与其他CLDNs结构一致,CLDN6是一个4次跨膜蛋白,具有1个短的胞质N端和1个C末端胞质结构域,2个胞外环(extracellular loop 1, ECL1和extracellular loop 2, ECL2),1个短的胞内环。ECL1在细胞间交错形成离子选择性孔隙,而ECL2不仅有助于产气荚膜梭菌肠毒素(*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE)的结合,还有助于相对细胞质膜之间的反式相互作用,COOH末端PDZ结合基序(PDZ binding motif)可与具有PDZ结构域[如胞质紧密黏连蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)]的蛋白结合介导细胞信号传导<sup>[11–13]</sup>。

### 1.2 CLDN6 的表达分布

CLDN6在胎儿组织中表达,包括胃、胰腺、肺和肾,CLDN6是胚胎干细胞中表达的最早蛋白之一,诱导上皮细胞连接的形成和极性,并参与干细胞向上皮细胞的分化。在成人正常组织中几乎检测不到。越来越多的证据表明CLDN6在

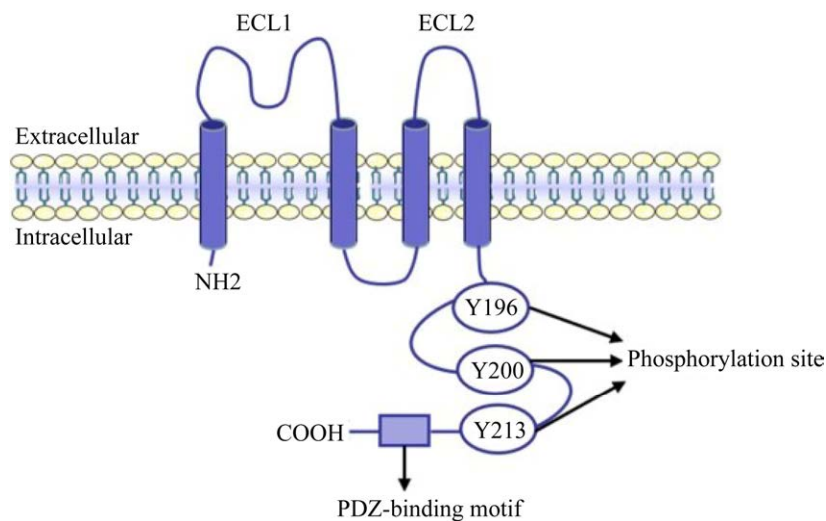


图1 CLDN6结构示意图<sup>[8]</sup>

Figure 1 Structure diagram of CLDN6<sup>[8]</sup>.

多种癌症组织中特异性高表达,包括非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤<sup>[2]</sup>、EC<sup>[3]</sup>、胃癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[6]</sup>、卵巢癌<sup>[7]</sup>等,其异常表达多与癌症患者预后不良相关。

### 1.3 CLDN6 在肿瘤中的功能研究

CLDN6 不仅维持组织的完整性,还具有信号传导特性,有助于细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等多种细胞事件。CLDN6 作为紧密连接分子,在上皮细胞或内皮细胞间粘附中发挥重要的作用,已确定 CLDN6 通过调节核受体活性启动细胞粘附信号,CLDN6 以第二胞外域依赖和 Y196/200 依赖的方式招募并激活 Src 家族激酶 (Src-family kinases, SFKs), SFKs 反过来在 Y196/200 位点磷酸化 CLDN6, SFKs 与 CLDN6-Py196/200 强结合完全激活 SFKs, 激活下游磷脂酰肌醇三激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路,已证明 CLDN6/SFK/PI3K/AKT 生物轴靶向视黄酸受体  $\gamma$  (retinoic acid receptor  $\gamma$ , RAR $\gamma$ ) 和雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor, ER $\alpha$ ), 并激活其活性<sup>[14]</sup>。Cao 等<sup>[3]</sup>发现敲低 CLDN6 可抑制 PI3K/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

(mammalian target of Rapamycin, mTOR) 信号通路,从而抑制子宫内膜癌细胞增殖和迁移。Yu 等<sup>[4]</sup>报道 CLDN6 还可以通过与河马信号通路 (Hippo signaling pathway) 中的大肿瘤抑制因子 (large tumour suppressor kinases 1/2, LATS1/2) 相互作用,减少 LATS1/2 和 Yes 关联蛋白 1 (yes associated protein 1, YAP1) 的磷酸化,从而增加 YAP1 的入核,激活下游靶基因,而且 YAP1 和 snail 同源物 1 (snail1) 相互作用影响上皮细胞间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的过程,增强胃癌细胞的侵袭能力。Huang 等<sup>[5]</sup>发现,CLDN6 在肝癌组织中异常表达,可通过表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)/AKT/mTOR 信号通路促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,沉默 CLDN6 后可显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

CLDN6 在促进耐药方面也发挥重要作用,CLDN6 在乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞中高表达,CLDN6 上调谷胱甘肽 S-转移酶 -P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1) 的表达促进 MCF-7 细胞的化疗耐药<sup>[15]</sup>。在三阴乳腺癌 MDA-MB-231 中,CLDN6 通过激活极性蛋白

AF6/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路和上调肿瘤干细胞特性增强对阿霉素化疗耐药性<sup>[16]</sup>。CLDN6 激活 Hippo 信号并诱导表型从肝谱系向胆谱系转变,使肝癌细胞(hepatic cell carcinoma, HCC)对索拉非尼治疗耐药<sup>[17]</sup>。

此外,CLDN6 在肿瘤中的功能复杂,还有文献报道 CLDN6 在某些肿瘤中发挥抑癌作用,例如乳腺癌、结肠癌和宫颈癌。CLDN6 可抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖并诱导其凋亡,Guo 等<sup>[18]</sup>证明 CLDN6 可通过介导乳腺癌细胞中的凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal regulating kinase 1, ASK1) p38/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)凋亡信号诱导肿瘤凋亡,还有研究证明 CLDN6 可通过自噬影响乳腺癌的发生<sup>[19]</sup>。Qu 等<sup>[20]</sup>研究发现结肠癌组织低表达 CLDN6,CLDN6 的表达与淋巴结转移呈负相关。同样 CLDN6 在结肠癌细胞系中低表达,过表达 CLDN6 可抑制肿瘤细胞增殖,还会明显抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,这一作用可能是通过激活酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路影响的。在宫颈癌中也发现了类似的结果,CLDN6 在宫颈癌组织中表达下调,CLDN6 的缺失有助于增强宫颈癌细胞的致瘤特性,相反,过表达 CLDN6 可促进宫颈癌细胞凋亡,从而抑制肿瘤生长<sup>[21]</sup>。

## 2 靶向 CLDN6 抗肿瘤药物的研发现状

由于 CLDN6 在多种肿瘤中特异性异常表达,并参与肿瘤发生发展的多个过程,包括促进肿瘤细胞生长、迁移、侵袭、转移,并促进肿瘤

化疗耐药,研究者们尝试开发靶向 CLDN6 的药物来治疗肿瘤,并取得了良好进展。在 clinicalTrials.gov 上检索到针对 CLDN6 靶点的药物登记的临床研究共 6 项,包括 1 项 SC-004 (ADC)、2 项 ASP1650/IMAB207 (单克隆抗体)、1 项 BNT-211 (CLDN6 CAR-T)、1 项 AMG-794 (双特异性抗体)和 1 项 BNT-142 (双特异性抗体)的临床研究。此外,2022 年美国肿瘤研究协会(American Association for Cancer Research, AACR)年会上还展示了多项靶向 CLDN6 的 ADC、单克隆抗体、双特异性抗体,尚处于临床前研究阶段。表 1 列出了已经进入临床阶段的针对 CLDN6 靶点开发的药物,后文将对这些药物进行逐一介绍。

### 2.1 ASP-1650/IMAB027

ASP-1650,也称为 IMAB027,是 Astellas 制药集团通过杂交瘤技术发现的靶向 CLDN6 的单克隆抗体,能够与 CLDN6 特异性结合而不与家族其他成员交叉反应,ASP-1650 在许多表达 CLDN6 的卵巢癌和睾丸癌细胞中诱导抗体依赖性细胞毒性和补体依赖性细胞毒性杀伤肿瘤细胞,在临床前动物模型中观察到抗肿瘤作用,而且与化疗联用增强抗肿瘤作用<sup>[22]</sup>。在已经完成的 1 项 I 期临床研究(NCT02054351)中未观察到剂量限制毒性,所有给药剂量均耐受良好<sup>[23]</sup>。然而,在 2018 年-2020 年在美国开展的 1 项开放标签、单臂 II 期临床研究(NCT03760081)中因未达到主要终点而被终止<sup>[24]</sup>。

### 2.2 SC-004

SC-004 是 AbbVie 公司开发的一种由靶向紧密连接蛋白 6/紧密连接蛋白 9 (Claudin6/9, CLDN6/9) 的抗体与吡咯苯二氮卓类(phenylbiphenyl oxadiazole, PBD)二聚体 DNA 偶联成的 ADC,在 1 项开放标签、I 期临床试验中(NCT03138408),在铂耐药/难治性卵巢癌和子

表 1 针对 CLDN6 靶点开发的药物(截至 2022 年 5 月)

Table 1 Targeted drugs developed for CLDN6 (as of May 2022)

Research and development code/type	Company	Indications	Status
ASP-1650, IMAB027/Monoclonal antibody	Astellas Pharma Inc	Ovarian cancer, seminoma, testicular neoplasm	Phase II, termination
SC-004/ADC	AbbVie	Cancer	Phase I
BNT-211/CAR-T	BioNTech	Non-small cell lung cancer, gastric cancer, testicular cancer, ovarian cancer, endometrial cancer	Phase I/II
AMG-794/CD3×CLDN6/Bispecific antibody	Amgen	Non-small cell lung cancer, ovarian cancer	Phase I
BNT-142/CD3×CLDN6/Bispecific antibody	BioNTech	Cancer	Phase I

宫内膜癌患者中评估了 SC-004 的安全性、耐受性和最大耐受剂量。共入组 24 例患者(11 例卵巢癌和 13 例子宫内膜癌), 患者接受 SC-004 治疗的中位周期数为 2.5 (范围 1–25), 最常见的不良反应事件为疲劳、外周水肿、呕吐、胸腔积液、尿路感染、斑丘疹、贫血、腹泻、食欲下降, 最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)为 0.2 mg/kg (3 周使用一次)。19 例可评估患者中, 14 例(75%)达到最佳疾病缓解, 1 例患者(5%)达到部分缓解, 4 例患者(21%)出现疾病进展。由于耐受性低、活性证据不足以支持继续研究而终止<sup>[25]</sup>。

### 2.3 BNT-211

BNT211 是 BioNTech 公司开发的一种靶向 CLDN6 的 CAR-T, 是由靶向 CLDN6 的 CAR-T 细胞疗法和编码 CLDN6 的信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)疫苗 CARVac 组成, 疫苗会在抗原呈递细胞表面表达 CLDN6, 刺激体内 CAR-T 细胞的扩增<sup>[26]</sup>。早期临床开发中用于治疗实体肿瘤, 目前处于临床 I/II 期。

2022 年 AACR 大会上<sup>[27]</sup>公布了 CLDN6 CAR-T 与 CARVac I 期临床试验(NCT04503278)数据, 截至 2022 年 1 月 19 日, 16 例晚期实体瘤患者接受了治疗, 包括 8 例睾丸癌、4 例卵巢癌和 4 例其他实体瘤患者, 输注后 6 周在 12 例

可评估的患者中, 有 6 例达到部分缓解(partial response, PR, 病灶缩小 39%–49%), 6 例达到疾病稳定(stable disease, SD), 1 例出现疾病进展(progressive disease, PD), 客观缓解率(objective response rate, ORR)为 42%, 疾病控制率(disease control rate, DCR)为 92%。同时, 表现出较好的安全性, 不良事件和剂量限制毒性可控, 仅观察到 1、2 级细胞因子释放综合征的短暂发生, 无任何神经毒性体征。

### 2.4 AMG-794

AMG-794 是 Amgen 公司开发的一款靶向 CD3×CLDN6 的双特异性抗体, 包含 2 个可变片段结构域单链, 一个与靶细胞上 CLDN6 结合, 另一个与 T 细胞上的 CD3 结合, 能够重定向 T 细胞以杀死表达 CLDN6 的肿瘤细胞。Amgen 公司在 2022 年 AACR 上展示<sup>[28]</sup>, AMG-794 临床前能够有效抑制非小细胞肺癌和上皮性卵巢癌的生长, 且临床前具有可接受的安全性数据, 支持 AMG-794 进入临床开发, 并于 2022 年 4 月在 clinicaltrials.gov 登记了 1 项 AMG-794 在 Claudin6 阳性非小细胞肺癌或上皮卵巢癌患者安全性、耐受性和药代动力学 I 期临床研究(NCT05317078), 即将在临床阶段验证其有效性和安全性。

### 2.5 BNT-142

BNT-142 是 BioNTech 公司开发的另一款靶

向 CD3×CLDN6 的双特异性抗体,其作用机制与 AMG-794 类似,也是通过激活 T 细胞,诱导 T 细胞对 CLDN6 阳性肿瘤细胞进行杀伤。已于 2022 年 3 月在 clinicaltrials.gov 登记了 1 项 BNT-142 在 CLDN6 阳性实体瘤患者中的安全性和初步疗效 I/II 期临床研究(NCT05262530),即将在临床阶段验证其有效性和安全性。

### 3 靶向 CLDN6 抗肿瘤药物的研发思路

目前针对 CLDN6 开发的药物均为生物药物,包括 ADC、单克隆抗体、双特异性抗体、CAR-T,由于单克隆抗体临床有效性受限,未来靶向 CLDN6 的 ADC、双特异性抗体甚至双特异性抗体 ADC、CAR-T、双靶点的 CAR-T 将会是研究热点。

#### 3.1 开发为 ADC 药物

近十年来,ADC 药物已经成为癌症治疗的潜在治疗策略,通常由人源化抗体和小分子药物通过化学可裂解或不可裂解连接子形成<sup>[29]</sup>,实现靶向递送细胞毒药物,降低化学药物引起的全身毒性。前期证据已经证明 CLDN6 在多种癌症组织中特异性高表达,而在正常组织有限表达,是开发 ADC 药物的有益靶点之一。第一代靶向 CLDN6/9 的 ADC 药物 SC-004 因为毒素 PBD 耐受性较差,治疗窗窄而终止<sup>[25]</sup>。Astellas 公司针对该靶点开发了与一甲基澳瑞他汀 E (monomethyl auristatin E, MMAE) 偶联的 ADC 产品 IMAB027-vcMMAE,临床前动物模型中看到了非常好的靶点特异性抗肿瘤作用<sup>[30]</sup>。随着 ADC 技术的发展,更多适合偶联为 ADC 的毒素和连接子被开发,可以通过优化毒素、连接子、药物抗体比等获得更优靶向 CLDN6 的 ADC 药物。

#### 3.2 开发为双特异性抗体

CD3 双特异性抗体(CD3-bispecific antibodies,

CD3-BsAbs)是肿瘤免疫治疗新兴的一种治疗方式,CD3-BsAbs 通过同时结合肿瘤细胞上表达的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)和 T 细胞上的 CD3 发挥作用,CD3-BsAbs 交联这两种细胞形成免疫突触,类似于天然 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)/肽-主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),这种突触可导致 T 细胞活化,从而分泌炎症细胞因子和溶细胞分子,在该过程中杀死肿瘤细胞<sup>[31]</sup>,目前这类疗法已经在临床上成功用于治疗血液瘤,正在实体瘤的临床研究中。BioNTech 公司设计了 1 款抗 CD3×CLDN6 双特异性抗体 6PHU3,体外对肿瘤细胞具有强效杀伤作用,半数最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,  $EC_{50}$ )值在 pg/mL 范围内,体内通过增加肿瘤 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、T<sub>EM</sub> 细胞的浸润显著抑制移植外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的 NSG 小鼠皮下移植瘤的生长,并显著延长小鼠的生存期<sup>[32]</sup>。靶向 CLDN6 和 CD3 的双特异性抗体 AMG-794 和 BNT-142 也正在临床研究中。

肿瘤坏死因子受体超家族成员 9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, 4-1BB, 亦称为 CD137)是一种在免疫细胞上表达的共刺激肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR),主要表达在活化的 T 细胞上,在初始 T 细胞上缺乏,是 T 细胞协同刺激分子,抗 4-1BB 的抗体能够激活细胞毒性 T 细胞并增加干扰素  $\gamma$  分泌,靶向 4-1BB 的双特异性抗体能够诱导 TAA 来介导 4-1BB 交联和活化,在抗肿瘤治疗方面显示出巨大的潜力<sup>[33]</sup>。PRS-343 (HER2×4-1BB)<sup>[34]</sup>、ABL503 (PD-L1×4-1BB)<sup>[35]</sup>以及 ABL111 (CLDN18.2×4-1BB)<sup>[36]</sup>等靶向 4-1BB 与 TAA 的双特异性抗体均已进入临床验证阶段。此外,靶向 CLDN6×4-1BB 的双特异性抗体 NBL-028 和 TJ-C64B 也正处于临床前

开发阶段<sup>[37]</sup>。

另一种开发双特异性抗体的思路是激活自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)并将其重定向到肿瘤细胞, NK 细胞衔接系统可能比 T 细胞衔接系统具有更好的安全性,同时表现出相似的临床有效性<sup>[38]</sup>。低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$ Fc 段受体 III-A (low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A, CD16A)是一种活化受体,主要在 NK 细胞和巨噬细胞上表达, CD16A 与 TAA 组成双特异性抗体后可以将表达 CD16A 的效应细胞重定向到肿瘤细胞, AFM13 (CD30 $\times$ CD16A)<sup>[39]</sup>、AFM24 (EGFR $\times$ CD16A)<sup>[40]</sup>和 AFM26 (BCMA $\times$ CD16A)<sup>[41]</sup>在临床前均看到不错的疗效,均已进入临床验证阶段。也可以尝试开发靶向 CLDN6 与 CD16A 的双特异性抗体用于抗肿瘤治疗。

分化抗原簇 47 (cluster of differentiation 47, CD47)/信号调节蛋白(signal regulatory protein  $\alpha$ , SIRP $\alpha$ )生物轴被认为在癌细胞逃避吞噬作用中发挥重要作用,阻断该生物轴能够诱导巨噬细胞吞噬肿瘤细胞,激发体内抗肿瘤免疫反应,许多靶向 CD47/SIRP $\alpha$  生物轴的抗体药物正在临床试验中。共同靶向 CD47/SIRP $\alpha$  和 TAA 的双特异性抗体能够提高 CD47 导向抗体的结合特异性,同时作用于肿瘤靶标并调节免疫系统,通过激活巨噬细胞的吞噬效力,肿瘤抗原呈递触发抗原特异性 T 细胞发挥更强的抗肿瘤作用<sup>[42]</sup>。CD47 $\times$ CD20<sup>[43]</sup>和 CD47 $\times$ CD19<sup>[44]</sup>均在临床验证阶段, CLDN18.2 $\times$ CD47 和 SIRP $\alpha$ /CLDN18.2 双特异性抗体也都在积极布局中,临床前效果较好。因此,开发靶向 CLDN6 与 CD47/SIRP $\alpha$  轴的双特异性抗体也是有前景的选择。

另外针对 CLDN6 开发双特异性抗体还可以深挖与其具有协同机制的 TAA 或在目标适应症中共表达的靶点,开发具有协同功效或者增强靶

向特异性降低毒性的双特异性抗体。

### 3.3 开发为 CAR-T 药物

CAR-T 疗法是一种肿瘤治疗精准靶向疗法,能够通过识别肿瘤相关抗原特异性靶向癌细胞, CAR 主要来源于单克隆抗体片段的胞外结合结构域,其与 T 细胞受体复合物的胞内结合结构域连接,通过结合肿瘤抗原以主要组织相容性非依赖性方式激活 T 细胞,从而引起细胞毒性<sup>[45]</sup>。尽管 CAR-T 细胞似乎在治疗血液瘤方面非常有效,但是利用 CAR-T 细胞治疗实体瘤仍然存在许多挑战。例如:肿瘤微环境的免疫抑制作用、CAR-T 细胞向肿瘤部位的转移和肿瘤浸润,以及缺乏癌症特异性实体瘤靶标以减少严重的靶向/非靶向毒性<sup>[46]</sup>。尽管如此,学术界和制药公司都在尝试将 CAR-T 细胞用于实体瘤的治疗, BioNTech 公司开发的 BNT211 由 CLDN6 特异性第二代 CAR 的自体 T 细胞组成,与 CARVac 联合给药,以驱动 CLDN6-CAR-T 细胞对实体瘤的扩增、持续和疗效,目前正在 I/II 期临床评估其用于晚期实体瘤的安全性和有效性<sup>[27]</sup>。随着新型 CAR 结构的不断发展,它可以拥有改变的细胞内共刺激结构域和/或靶向结构域,后者可以由不同的分子组成,如纳米抗体、设计的锚蛋白重复蛋白、配体或受体代替单链可变区片段(single chain variable fragments, scFvs)。再者,所谓的接头 CAR 是通过分裂抗原识别和 CAR 免疫细胞激活而开发出来的。加入肿瘤抗原特异性的单独接头分子和靶向这些接头分子的 CAR 免疫细胞,可以实现更精确和时间有限的治疗<sup>[47]</sup>。因此,可以尝试将 CLDN6 开发为靶向几种抗原的 CAR-T 实现更精准的抗肿瘤治疗。

## 4 总结与展望

CLDN6 在许多癌症中特异性高表达,且在癌症发病和进展中都发挥了重要的作用,因此可

将 CLDN6 作为肿瘤治疗性药物开发的有效新靶点。目前针对 CLDN6 开发的药物均为生物药物,包括 ADC、单克隆抗体、双特异性抗体、CAR-T,已经有一些产品进入临床试验阶段,但多数仍处于早期开发阶段。不过,靶向 CLDN6 的药物在临床前和早期临床已经看到可喜的疗效,显示了良好的应用前景,相信在未来随着 ADC、双特异性抗体、CAR-T 等生物技术的不断发展,更多靶向 CLDN6 的新药将会涌现,将会在癌症临床治疗方面发挥巨大的作用,同时也应该关注 CLDN6 在不同肿瘤中的差异化功能,在未来临床应用中做到差异化精准治疗。

## REFERENCES

- [1] TABARIÈS S, SIEGEL PM. The role of claudins in cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(9): 1176-1190.
- [2] BIRKS DK, KLEINSCHMIDT-DEMASTERS BK, DONSON AM, BARTON VN, MCNATT SA, FOREMAN NK, HANDLER MH. Claudin 6 is a positive marker for atypical teratoid/rhabdoid tumors[J]. *Brain Pathology*, 2010, 20(1): 140-150.
- [3] CAO X, HE GZ. Knockdown of CLDN6 inhibits cell proliferation and migration via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in endometrial carcinoma cell line HEC-1-B[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2018, 11: 6351-6360.
- [4] YU ST, ZHANG YQ, LI Q, ZHANG ZZ, ZHAO G, XU J. CLDN6 promotes tumor progression through the YAP1-snail1 axis in gastric cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(12): 949.
- [5] HUANG LY, ZHAO CJ, SUN K, YANG DD, YAN LX, LUO D, HE JL, HU XM, WANG R, SHEN XF, XIAO N, ZHONG ZD. Downregulation of CLDN6 inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating EGFR/AKT/mTOR signalling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2020, 38(5): 541-548.
- [6] MATTSSON JS, MICKE P, EDLUND K, LOHR M, JIRSTRÖM K, BERGLUND A, BOTLING J, RAHNENFUEHRER J, MARINCEVIC M, PONTÉN F, EKMAN S, HENGSTLER JG, WÖLL S, SAHIN U, TÜRECI Ö. Abstract A37: ectopic claudin 6 and 18.2 expression as potential treatment target in non-small cell lung cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2014, 20(2\_supplement): A37.
- [7] 刘亚芳, 李久霞, 张广超, 吴琼, 许晓明, 任玥, 于丽娜, 全成实, 李玉林. 紧密连接蛋白 CLDN6 在卵巢癌、肝癌以及脑膜瘤组织中的表达及意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2010, 36(4): 698-702, 822. LIU YF, LI JX, ZHANG GC, WU Q, XU XM, REN Y, YU LN, QUAN CS, LI YL. Expressions of tight junctions protein CLDN6 in ovarian cancer, liver cancer and meningioma tissues and significances[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2010, 36(4): 698-702, 822 (in Chinese).
- [8] QU HN, JIN Q, QUAN CS. CLDN6: from traditional barrier function to emerging roles in cancers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13416.
- [9] HARRISON SM, DUNWOODIE SL, ARKELL RM, LEHRACH H, BEDDINGTON RS. Isolation of novel tissue-specific genes from cDNA libraries representing the individual tissue constituents of the gastrulating mouse embryo[J]. *Development*, 1995, 121(8): 2479-2489.
- [10] TURKSEN K, TROY TC. Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium[J]. *Developmental Dynamics*, 2001, 222(2): 292-300.
- [11] GÜNZEL D, FROMM M. Claudins and other tight junction proteins[J]. *Comprehensive Physiology*, 2012, 2(3): 1819-1852.
- [12] LAL-NAG M, BATTIS M, SANTIN AD, MORIN PJ. Claudin-6: a novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer[J]. *Oncogenesis*, 2012, 1(11): e33.
- [13] CAVALLARO U, DEJANA E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(3): 189-197.
- [14] SUGIMOTO K, ICHIKAWA-TOMIKAWA N, KASHIWAGI K, ENDO C, TANAKA S, SAWADA N, WATABE T, HIGASHI T, CHIBA H. Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(49): 24600-24609.
- [15] YANG ML, LI YR, SHEN XF, RUAN Y, LU Y, JIN XS, SONG PY, GUO YT, ZHANG XL, QU HN, SHAO YJ, QUAN CS. CLDN6 promotes chemoresistance through GSTP1 in human breast cancer[J]. *Journal of*



- Experimental & Clinical Cancer Research, 2017, 36(1): 157.
- [16] YANG ML, LI YR, RUAN Y, LU Y, LIN DJ, XIE YP, DONG B, DANG QH, QUAN CS. CLDN6 enhances chemoresistance to ADM via AF-6/ERKs pathway in TNBC cell line MDAMB231[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2018, 443(1/2): 169-180.
- [17] KONG FE, LI GM, TANG YQ, XI SY, LOONG JHC, LI MM, LI HL, CHENG W, ZHU WJ, MO JQ, GONG YF, TANG H, ZHAO Y, ZHANG Y, MA S, GUAN XY, MA NF, XIE MB, LIU M. Targeting tumor lineage plasticity in hepatocellular carcinoma using an anti-CLDN6 antibody-drug conjugate[J]. Science Translational Medicine, 2021, 13(579): eabb6282.
- [18] GUO YX, LIN DJ, ZHANG MZ, ZHANG XW, LI YR, YANG R, LU Y, JIN XS, YANG ML, WANG MM, ZHAO S, QUAN CS. CLDN6-induced apoptosis via regulating ASK1-p38/JNK signaling in breast cancer MCF-7 cells[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(6): 2435-2444.
- [19] SONG PY, LI YR, DONG Y, LIANG YY, QU HN, QI D, LU Y, JIN XS, GUO YT, JIA YY, WANG XQ, XU WH, QUAN CS. Estrogen receptor  $\beta$  inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019, 38(1): 354.
- [20] QU HN, WANG M, WANG MM, LIU YY, QUAN CS. The expression and the tumor suppressor role of CLDN6 in colon cancer[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2022, 477(12): 2883-2893.
- [21] ZHANG XW, RUAN Y, LI YR, LIN DJ, QUAN CS. Tight junction protein claudin-6 inhibits growth and induces the apoptosis of cervical carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Medical Oncology, 2015, 32(5): 148.
- [22] TÜRECI Ö, KREUZBERG M, WALTER K, WÖLL S, SCHMITT R, MITNACHT-KRAUS R, NAKAJO I, YAMADA T, SAHIN U. Abstract 882: the anti-claudin 6 antibody, IMAB027, induces antibody-dependent cellular and complement-dependent cytotoxicity in claudin 6-expressing cancer cells[J]. Cancer Research, 2018, 78(13\_Supplement): 882.
- [23] SAHIN U, JAEGER D, MARME F, MAVRATZAS A, KRAUSS J, de GREVE J, VERGOTE I, TÜRECI Ö. First-in-human phase I/II dose-escalation study of IMAB027 in patients with recurrent advanced ovarian cancer (OVAR): preliminary data of phase I part[J]. Journal of Clinical Oncology, 2015, 33(15\_supplement): 5537.
- [24] ADRA N, VAUGHN DJ, EINHORN LH, HANNA NH, FUNT SA, ROSALES M, AROZULLAH A, FELDMAN DR. A phase II study assessing the safety and efficacy of ASP1650 in male patients with relapsed refractory germ cell tumors[J]. Investigational New Drugs, 2022, 40(5): 1087-1094.
- [25] HAMILTON E, FLEMING GF, THAKER PH, SUBBIAH V, CHEN C, FONG A, BRICKMAN D, MOORE K. Abstract CT124: first-in-human study of SC-004, an antibody-drug conjugate targeting CLDN6/9, in patients with epithelial ovarian cancers[J]. Cancer Research, 2020, 80(16\_supplement): CT124.
- [26] REINHARD K, RENGSTL B, OEHM P, MICHEL K, BILLMEIER A, HAYDUK N, KLEIN O, KUNA K, OUCHAN Y, WÖLL S, CHRIST E, WEBER D, SUCHAN M, BUKUR T, BIRTEL M, JAHNDEL V, MROZ K, HOBOHM K, KRANZ L, DIKEN M, et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors[J]. Science, 2020, 367(6476): 446-453.
- [27] HAANEN J, BAG, MACKENSEN A, KOENECKE C, ALSDORF W, WAGNER-DROUET E, HEUDOBLE D, BORCHMANN P, BOKEMEYER C, KLOBUCH S, DESUKI A, LÜKE F, WIEGERT E, SCHULZ C, RENGSTL B, PREUßNER L, TÜRECI Ö, SAHIN U. Abstract CT002: BNT211: a phase I trial to evaluate safety and efficacy of CLDN6 CAR-T cells and CARVac-mediated *in vivo* expansion in patients with CLDN6-positive advanced solid tumors[J]. Cancer Research, 2022, 82(12\_Supplement): CT002.
- [28] PHAM E, HENN A, SABLE B, WAHL J, CONNER K, MATTHES K, GUPTA S, YABUT R, AEFNER F, WILSON KL, ANLAHR J, DAHLHOFF C, KALE V, FRIEDRICH M, RAUM T, KUFER P, COXON A, STIENEN S, BAILIS JM. Abstract 5202: AMG 794, a claudin 6-targeted half-life extended (HLE) bispecific T cell engager (BITE<sup>®</sup>) molecule for non-small cell lung cancer and epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Research, 2022, 82(12\_Supplement): 5202.
- [29] MARTÍN-SABROSO C, LOZZA I, TORRES-SUÁREZ AI, FRAGUAS-SÁNCHEZ AI. Antibody-antineoplastic conjugates in gynecological malignancies: current status and future perspectives[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1705.
- [30] TÜRECI Ö, KREUZBERG M, WALTER K, WÖLL S, SCHMITT R, YAMADA T, NAKAJO I, SAHIN U. Abstract 1778: preclinical characterization of the safety and antitumor activity of IMAB027-vcMMAE, an anti-claudin 6 antibody-drug conjugate[J]. Cancer

- Research, 2018, 78(13\_Supplement): 1778.
- [31] MIDDELBURG J, KEMPER K, ENGELBERTS P, LABRIJN AF, SCHURMAN J, HALL TV. Overcoming challenges for CD3-bispecific antibody therapy in solid tumors[J]. *Cancers*, 2021, 13(2): 287.
- [32] STADLER CR, BÄHR-MAHMUD H, PLUM LM, SCHMOLDT K, KÖLSCH AC, TÜRECI Ö, SAHIN U. Characterization of the first-in-class T-cell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(3): e1091555.
- [33] YOU G, WON J, LEE Y, MOON D, PARK Y, LEE SH, LEE SW. Bispecific antibodies: a smart arsenal for cancer immunotherapies[J]. *Vaccines*, 2021, 9(7): 724.
- [34] ROTHE C, SKERRA A. Anticalin<sup>®</sup> proteins as therapeutic agents in human diseases[J]. *BioDrugs*, 2018, 32(3): 233-243.
- [35] JEONG S, PARK E, KIM HD, SUNG E, KIM H, JEON J, KIM Y, JUNG UJ, SON YG, HONG Y, LEE H, LEE S, LIM Y, WON J, JEON M, HWANG S, FANG L, JIANG WQ, WANG ZY, SHIN EC, et al. Novel anti-4-1BB×PD-L1 bispecific antibody augments anti-tumor immunity through tumor-directed T-cell activation and checkpoint blockade[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(7): e002428.
- [36] JIANG WQ, FANG L, WANG ZY, GUO TB, PARK E, SUNG E, JUNG J. Abstract 5644: claudin 18.2×4-1BB bispecific antibody induced potent tumor inhibition through tumor-specific 4-1BB activation[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(16\_supplement): 5644.
- [37] NIE SW, WANG ZZ, MOSCOSO-CASTRO M, D'SOUZA P, LEI C, XU JQ, GU JJ. Biology drives the discovery of bispecific antibodies as innovative therapeutics[J]. *Antibody Therapeutics*, 2020, 3(1): 18-62.
- [38] CHIANG SCC, THEORELL J, ENTESARIAN M, MEETHS M, MASTAFA M, AL-HERZ W, FRISK P, GILMOUR KC, IFVERSEN M, LANGENSKIÖLD C, MACHACZKA M, NAQVI A, PAYNE J, PEREZ-MARTINEZ A, SABEL M, UNAL E, UNAL S, WINIARSKI J, BRYCESON YT. Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1345-1356.
- [39] WU JJ, FU JP, ZHANG MZ, LIU DL. AFM13: a first-in-class tetravalent bispecific anti-CD30/CD16A antibody for NK cell-mediated immunotherapy[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2015, 8(1): 96.
- [40] WINGERT S, REUSCH U, KNACKMUSS S, KLUGE M, DAMRAT M, PAHL J, SCHNIEGLER-MATTOX U, MUELLER T, FUCEK I, ELLWANGER K, TESAR M, HANEKE T, KOCH J, TREDER M, FISCHER W, RAJKOVIC E. Preclinical evaluation of AFM24, a novel CD16A-specific innate immune cell engager targeting EGFR-positive tumors[J]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1950264.
- [41] GANTKE T, REUSCH U, KELLNER C, ELLWANGER K, FUCEK I, WEICHEL M, KERBER A, PEIPP M, TREDER M. AFM26 is a novel, highly potent BCMA/CD16A-directed bispecific antibody for high affinity NK-cell engagement in multiple myeloma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35(15\_supplement): 8045.
- [42] YANG Y, YANG Z, YANG Y. Potential role of CD47-directed bispecific antibodies in cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 686031.
- [43] PICCIONE EC, JUAREZ S, LIU J, TSENG S, RYAN CE, NARAYANAN C, WANG LJ, WEISKOPF K, MAJETI R. A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selectively binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells[J]. *MAbs*, 2015, 7(5): 946-956.
- [44] DHEILLY E, MOINE V, BROYER L, SALGADO-PIRES S, JOHNSON Z, PAPAIOANNOU A, CONS L, CALLOUD S, MAJOCCHI S, NELSON R, ROUSSEAU F, FERLIN W, KOSCO-VILBOIS M, FISCHER N, MASTERNAK K. Selective blockade of the ubiquitous checkpoint receptor CD47 is enabled by dual-targeting bispecific antibodies[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(2): 523-533.
- [45] HARTMANN J, SCHÜBLER-LENZ M, BONDANZA A, BUCHHOLZ CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2017, 9(9): 1183-1197.
- [46] MA S, LI XC, WANG XY, CHENG L, LI Z, ZHANG CZ, YE ZL, QIAN QJ. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(12): 2548-2560.
- [47] ALBINGER N, HARTMANN J, ULLRICH E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany[J]. *Gene Therapy*, 2021, 28(9): 513-527.

(本文责编 陈宏宇)