

平阳霉素与单克隆抗体 Fab' 片段偶联物的抗肿瘤作用

刘小云, 刘秀均, 李毅, 王维刚, 甄永苏*

(中国医学科学院·中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研制一种以单抗 Fab' 片段为基础的抗肿瘤导向药物。方法 制备单抗 3A5 Fab' 片段及其与平阳霉素(PYM)偶联物 Fab'-PYM 后,测定 Fab'-PYM 与肿瘤细胞的免疫反应性、偶联物中 PYM 的抑菌活性、对肿瘤细胞的杀伤作用和体内抑瘤作用。结果 Fab' 及 Fab'-PYM 保持了与靶细胞 C26 的免疫反应性;偶联物中 PYM 的抑菌活性为游离 PYM 的 15%;Fab'-PYM 对 C26 细胞的杀伤作用强于 PYM;对非靶细胞 KB 的杀伤作用与 PYM 相似;ip 和 iv 给药, Fab'-PYM 对小鼠皮下接种的肠癌 26 生长抑制作用均强于 3A5-PYM 和 PYM。结论 Fab'-PYM 具有比 PYM 及 3A5-PYM 更强的体内外抗肿瘤作用。

关键词: 单克隆抗体; Fab' 片段; 平阳霉素; 免疫偶联物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R979.14; R979.1; R392.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)09-0649-05

随着两种单克隆抗体 rituxan 和 herceptin 在临床肿瘤治疗中取得令人瞩目的疗效并获得美国 FDA 批准上市,单抗研究重新引起人们的重视^[1,2]。与此同时,一度陷入低谷的单抗导向药物的研究也再度成为生物技术领域的研究热点,迄今为止,已有数种单抗免疫偶联物试用于临床并取得了一定疗效^[3-6]。目前单抗导向药物的研究主要集中于单抗的改造与导向药物分子小型化^[7]。研究^[8-10]表明,单抗的某些片段,如 F(ab)₂, Fab', Fab 和单链抗体(scFv)等不仅保持与抗原的选择性结合能力,而且分子量较小,对肿瘤组织穿透力比完整抗体强。其中 Fab' 片段分子量约为完整抗体的 1/3,结构中既含 Fab,又保留铰链区的巯基,可以选择性地在不同位置与药物偶联,易于控制偶联分子比。此外, Fab' 片段的血浆半衰期较长,有利于发挥药物的疗效,因此 Fab' 片段在作为导向药物载体方面可能有独特的优点^[10]。有关 Fab' 片段用作导向药物载体的报道较少。本室以往的工作^[11,12]表明,大鼠抗人肝癌 BEL-7402 细胞单抗 3A5 与抗肿瘤抗生素平阳霉素(PYM)的偶联物在体内外的抗肿瘤作用比游离平阳霉素更强,有可能在肿瘤区域性导向治疗中发挥重要作用。在此基础上,本文构建了单抗 3A5 Fab' 片段与 PYM 偶联物并观察偶联物的体内外抗肿瘤作用。

材料与方 法

细胞株与瘤株 人口腔鳞癌 KB 细胞和小鼠结肠癌 C26 细胞与瘤株均由本室传代保存。

主要试剂与药品 单抗 3A5 以辛酸-硫酸铵沉淀法从大鼠杂交瘤腹水中纯化,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测其纯度大于 90%。PYM 由本所许鸿章教授提供。多聚赖氨酸(PLL),牛血清白蛋白(BSA),胃蛋白酶,葡聚糖 T-40(dextran T-40),二巯基苏糖醇(DTT),MTT,N-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEMI),辣根过氧化酶标记的羊抗大鼠 IgG 抗体和 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)等均购自 Sigma 公司。

单抗 Fab' 片段的制备 纯化的单抗 3A5 以生理盐水充分透析并调整为 3 mg·mL⁻¹,加等体积 pH 3.7,0.2 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液稀释,以适量胃蛋白酶 37℃消化 6 h,NaOH 中和反应液。反应液经 Sephadex G-150 纯化,浓缩后以 5 mmol·L⁻¹ DTT 还原,DE-52 进一步纯化得单抗 Fab' 片段。

偶联物制备 取适量 dextran T-40 与高碘酸钠混合,室温避光反应 3 h,去离子水充分透析,冷冻干燥,得多醛基葡聚糖(PAD)。PAD 50 mg 与 PYM 100 mg 混合,4℃避光反应 12 h,加入 Fab' 或 3A5 50 mg,继续搅拌反应 12 h,以硼氢化钠终止反应。反应物经 sephadex G-75(Φ 2.0 cm × 100 cm)纯化得偶联物 Fab'-PYM 和 3A5-PYM。

偶联物中单抗 3A5 或 Fab' 片段及 PYM 的含量

收稿日期: 1999-12-06

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(96-C02-01-15)

作者简介: 甄永苏,男,院士,博士生导师。

* 联系人 Tel: (010)63010985, E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

测定 测定偶联物在 280 nm 处的吸光度,并以考马氏亮蓝染色后测定 595 nm 处的吸光度(A)。按以下公式计算偶联物中各组分含量: Fab' 或 3A5 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $1.456 \times A_{595 \text{ nm}} - 0.017$; PYM ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $0.117 A_{280 \text{ nm}} - 0.233 A_{595 \text{ nm}} + 0.003$ 。偶联物中 Fab' 与 PYM 的分子比为 $\text{Fab}' / \text{PYM} = \text{Fab}' (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) / \text{PYM} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) \times 3/110$ 。

偶联物免疫活性检测 以细胞 ELISA 法进行。在 96 孔培养板中每孔加入 0.01 % 多聚赖氨酸 200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中包被过夜。弃去包被液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次。将对数生长期的 C26 细胞以生理盐水调整为 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 并加至培养板,每孔 50 μL 。800 $\times \text{g}$ 离心 5 min。加 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 0.05 % 每孔戊二醛 50 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 15 min。PBS 洗 3 次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用时先以 1 % BSA 200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, PBS-Tween 20 (PBS-T) 缓冲液洗 3 次。加入倍比稀释的待测样品 50 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, PBS-T 缓冲液洗 3 次。加入辣根过氧化酶标记的羊抗大鼠 IgG 抗体 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, PBS-T 缓冲液洗 5 次。加入酶反应底物 200 μL , 室温避光反应 15 min。以 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸终止反应。立即在酶标仪上测定 492 nm 吸光度。抗体与 KB 细胞的免疫反应性测定,无需以 PLL 预先包被,将细胞按每孔 2×10^4 接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后 PBS 缓冲液洗 3 次,其余操作同 C26 细胞。

偶联物中 PYM 的抑菌活性测定 分别将 PYM, Fab'-PYM 倍比稀释,并将各浓度样品加于 100 μL 的 10 孔培养板中,每孔加 100 μL 。培养基为 1 % 酵母浸膏, 1 % 葡萄糖, 1 % 枯草杆菌芽孢液和 0.04 % TTC。设无菌对照组和无药对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至无药对照组变红色时终止培养。在酶标仪上测定 492 nm 吸光度。以 PYM 抑菌效价为参照,计算 Fab'-PYM 中 PYM 的有效量。

偶联物的细胞毒性测定 按 MTT 法进行。取对数生长期的 KB 和 C26 细胞按每孔 3000 加于 96 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 二氧化碳孵箱培养 24 h。加入 50 μL 无血清 1640 培养液倍比稀释的药物,对照孔加 50 μL 无血清 1640 培养液,继续培养 72 h 后每孔加 0.1 mg 无血清 1640 培养液配制的 MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h, 轻轻吸去培养液,加入 DMSO 150 μL , 振荡 10 min, 在酶标仪上测定 570 nm 吸光度。

偶联物对小鼠移植性结肠癌 C26 的治疗作用 第 1 批实验: 剥取皮下接种传代的结肠癌 C26 瘤

块,以生理盐水制成匀浆,接种于 BALB/c 小鼠腋窝皮下,次日起 ip PYM 或偶联物,隔日给药 1 次,共 6 次。d 14 处死动物,称瘤重,计算抑瘤率。并取心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠及股骨,常规病理学切片,观察药物对主要器官的影响。第 2 批实验: 接种方法同前,接种次日起 iv PYM 或偶联物,隔日给药 1 次,共 7 次。d 14 处死动物,称瘤重计算抑瘤率。

结 果

1 Fab' 与 PYM 的偶联

Fab' 与 PYM 的偶联物经 Sephadex G-75 分离,可获 2 个峰(图 1),峰 1 既有抗体活性,又有 PYM 的抑菌活性,为 Fab'-PYM 偶联物。其中 Fab' 与 PYM 的分子比为 1:50,计算偶联物的平均分子量约为 170 kDa。峰 2 仅有抑菌活性,为未与抗体偶联的 PYM。

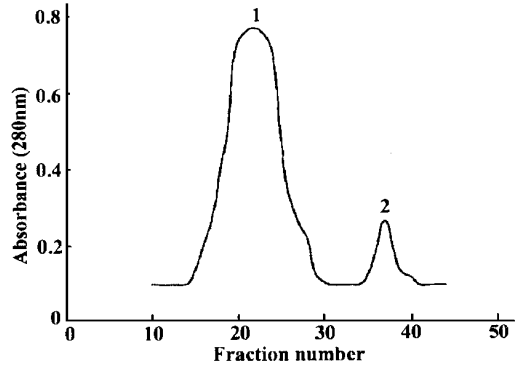


Fig 1 Separation of Fab'-PYM conjugate on sephadex G 75. Column: Sephadex G-75 2.0 cm \times 100 cm. Eluent: 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.4), containing 0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl. Peak 1: Fab'-PYM; Peak 2: Free PYM

2 Fab' 的免疫学活性

细胞 ELISA 法检测抗体及其片段与抗原的免疫反应性,单抗 3A5 及 Fab' 片段均与结肠癌 C26 细胞具有较强免疫反应性, Fab' 与 PYM 偶联后与抗原的免疫反应性略有降低;完整单抗 3A5, 3A5 Fab' 片段及其与 PYM 偶联物与非靶抗原 KB 细胞均无反应(图 2),表明偶联物保持了与靶抗原的选择性反应。

3 偶联物中各组分的含量及 PYM 的抑菌活性

PYM 偶联后生物学活性有所下降,抑菌活性约为游离平阳霉素的 15 %。

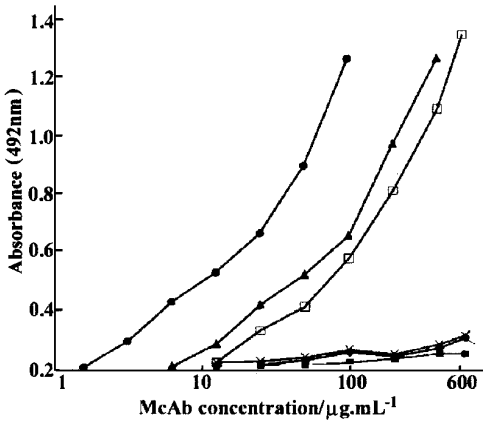


Fig 2 Immunoreactivity of integral McAb 3A5, Fab' fragment and Fab'-PYM conjugate with colon carcinoma 26 cells and KB cells in ELISA. •—• 3A5 (C26); ▲—▲ Fab' (C26); □—□ Fab'-PYM (C26); △—△ 3A5 (KB); ○—○ Fab' (KB); ■—■ Fab'-PYM (KB)

4 偶联物的细胞毒作用

MTT 法检测偶联物与游离药物的细胞毒作用, Fab'-PYM 和游离平阳霉素对靶细胞 C26 的 IC₅₀ 分别为 2.51 µg·mL⁻¹ 和 32.46 µg·mL⁻¹ (图 3); 对非靶细胞 KB 的 IC₅₀ 分别为 5.17 µg·mL⁻¹ 和 3.94 µg·mL⁻¹ (图 4)。表明偶联物对靶细胞 C26 的杀伤作用强于游离 PYM。

5 偶联物对 BALB/c 小鼠移植性肠癌 26 模型的治疗作用

剂量在 5 mg·kg⁻¹, Fab'-PYM 及 PYM 抑瘤率分别为 77% 和 56% (表 1), 偶联物的抑瘤作用强于游离药物 (P < 0.05)。iv 5 mg·kg⁻¹, Fab'-PYM, 3A5-PYM 及 PYM 抑瘤率分别为 89%, 73% 和 70%, Fab'-PYM 的抑瘤作用明显强于 3A5-PYM 和 PYM (P < 0.01); iv 10 mg·kg⁻¹, Fab'-PYM 和 PYM 抑瘤率分别为 91% 和 79%, 二者有显著性差异 (P < 0.01) (表 2)。表明 Fab'-PYM 具有比游离

药物及完整抗体与平阳霉素偶联物更高的体内抑瘤效果。

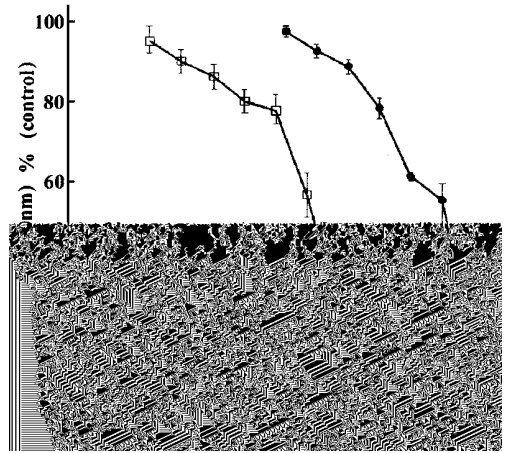


Fig 3 Cytotoxicity of Fab'-PYM against colon carcinoma 26 cells. The IC₅₀ values of Fab'-PYM and PYM are 2.51 µg·mL⁻¹ and 32.46 µg·mL⁻¹, respectively. Data are means, n = 3. •—• PYM; ○—○ Fab'-PYM

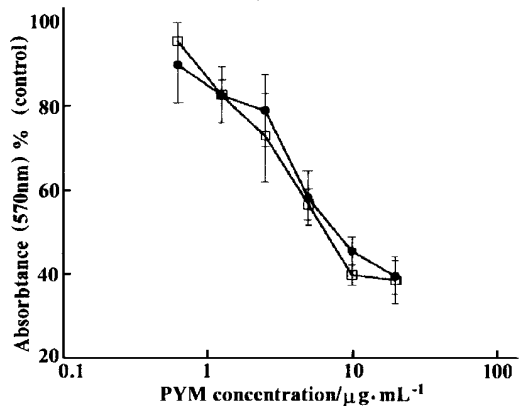


Fig 4 Cytotoxicity of Fab'-PYM and PYM against KB cells. There is no significant difference between Fab'-PYM and PYM. The IC₅₀ values of Fab'-PYM and PYM are 5.17 µg·mL⁻¹ and 3.94 µg·mL⁻¹, respectively. Data are means, n = 3. •—• PYM; ○—○ Fab'-PYM

Tab 1 Inhibitory effects of pinyangmycin(PYM) and Fab'-PYM on the growth of colon carcinoma 26 in BALB/c mice(x̄ ± s)

Treat ment ^a	Dose/ mg·kg ⁻¹	No. of mice		Body weight change/ g	Tumor weight ^b / mg	Inhibition/ %
		Initial	End			
PBS		8	8	+ 2.9	1593 ± 346	
PYM	5	8	8	+ 1.5	707 ± 406	56* *
Fab'-PYM	5	8	8	+ 1.3	370 ± 69	77* * *

^aBALB/c mice were inoculated sc with colon carcinoma 26 cells. Twenty-four h after tumor cells inoculation, groups of 8 animals received ip injections of either PYM(5 mg·kg⁻¹), 3A5 Fab'-PYM (5 mg·kg⁻¹), or phosphate buffer solution (PBS) every other day for a total of 6 injections. ^bThe tumor weight was measured on day 14. * P < 0.05 vs PYM; * * P < 0.01 vs PBS

Tab 2 Inhibitory effects of PYM and Fab'-PYM on the growth of colon carcinoma 26 in BALB/c mice($\bar{x} \pm s$)

Treatment ^a	Dose/ mg·kg ⁻¹	No. of mice		Body weight change/ g	Tumor weight ^{b/} mg	Inhibition/ %
		Initial	End			
PBS		10	10	+1.2	768 ± 222	
PYM	5	10	10	-0.5	230 ± 90	70**
	10	10	10	-1.8	158 ± 34	79**
Fab'-PYM	5	10	10	-0.6	88 ± 19	89** .△△
	10	10	10	-1.0	72 ± 16	91** .△△
3A5-PYM	5	10	10	-2.3	204 ± 29	73**

^aBALB/c mice were inoculated sc with colon carcinoma 26 cells. Twenty-four h after tumor cells inoculation, groups of 10 animals each received iv injections of either PYM(5 or 10 mg·kg⁻¹), Fab'-PYM(5 or 10 mg·kg⁻¹), 3A5-PYM(5 mg·kg⁻¹), or phosphate buffer solution (PBS) every other day for a total of 7 injections. ^bThe tumor weight was measured on day 14. ** P < 0.01 vs PBS; △△ P < 0.01 vs equivalent PYM

6 病理组织学观察

组织学切片检查表明,5 mg·kg⁻¹剂量下,动物心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠及股骨均无明显变化,提示在治疗剂量下所观察的器官无病理性改变。

讨 论

以单抗为载体的免疫偶联物可以增强化疗药物的靶向性而提高疗效或降低毒性。抗体片段在作为导向药物载体方面具有比完整单抗更多的优点。单抗片段及其与毒素的偶联物的体内分布更具特异性,肿瘤组织对抗体片段与毒素偶联物的摄取量明显提高^[13,14]。Fab'片段结构与Fab片段相似,具备对肿瘤组织穿透力较强,血浆半衰期长的优点,同时Fab'片段还保留了铰链区的巯基,可以选择性地在不同部位偶联药物。此外,由于去除了抗体的Fc段,不仅有利于减少鼠源性抗体在人体应用时诱发的人抗鼠抗体反应,也可降低网状内皮系统对抗体的摄取,从而增强药物的靶向性,提高药物疗效和降低药物毒性。

平阳霉素是临床常用的抗肿瘤抗生素,完整抗体3A5与平阳霉素的偶联物在体外对靶细胞的杀伤作用明显强于游离平阳霉素^[11]。小鼠抗人肺腺癌L-342细胞单抗3D3与平阳霉素的免疫偶联物在体外对L-342细胞的杀伤作用也强于游离平阳霉素^[15]。据报道^[12],单抗3A5与平阳霉素的偶联物瘤旁给药具有良好的抗肿瘤作用,提示该偶联物用于肿瘤区域性导向治疗的可能性。由于Fab'片段分子量仅为完整抗体的1/3,本实验构建的单抗3A5的Fab'片段与平阳霉素的偶联物分子明显小于

完整抗体与平阳霉素的偶联物,将有助于提高偶联物在肿瘤组织中的穿透力,体内实验结果表明,Fab'-PYM偶联物腹腔注射和静脉注射给药,均有较游离药物更高的疗效,同时也优于完整抗体与平阳霉素的偶联物,预计将有较好的应用前景。

REFERENCES:

[1] Dickman S. Antibodies stage a comeback in cancer treatment [J]. *Science*, 1998, **280**(22):1196 - 1197.

[2] Ockert D, Schmitz M, Hampl M, et al. Advances in cancer immunotherapy [J]. *Immunol Today*, 1999, **20**(2):63 - 65.

[3] Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, et al. Selective ablation of active myeloid leukemia using antibody targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate [J]. *Blood*, 1999, **93**(11):3678 - 3684.

[4] Juweid ME, Hajjar G, Swayne LC, et al. Phase I/II trial of ¹³¹I-MN-14 F(ab)2 anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody in the treatment of patients with metastatic medullary thyroid carcinoma [J]. *Cancer*, 1999, **85**(8):1828 - 1842.

[5] Tolcher AW, Sugarman S, Gelmon KA, et al. Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, **17**(2):478 - 484.

[6] De Nardo SJ, De Nardo GL, Kukis DL, et al. ⁶⁷Cu-2IT-BAT-Lym-1 pharmacokinetics, radiation dosimetry, toxicity and tumor regression in patients with lymphoma [J]. *J Nucl Med*, 1999, **40**(2):302 - 310.

[7] Zhen YS. Anticancer immunoconjugates: Current status and prospects [J]. *Acta Pharm Sin*(in Chinese), 1994, **29**(1):1 - 8.

[8] Burak WE Jr, Depalatis L, Nines R, et al. Biodistribution and localization of radiolabeled NR-LU-10 Fab fragment in human breast cancer xenograft [J].

Nucl Med Biol, 1998, **25**(7): 633 - 637.

- [9] Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies [J]. *Q J Nucl Med*, 1998, **42**(4): 225 - 241.
- [10] Behr TM, Behe M, Stabin MG, *et al.* High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi versus ⁹⁰Y-labeled C017-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model [J]. *Cancer Res*, 1999, **59**(11): 2635 - 2643.
- [11] Jiang M, Huang J, Xue W, *et al.* Characterization of a rat monoclonal antibody against hepatoma and cytotoxicity of its pingyangmycin conjugate against hepatoma cells [J]. *Chin J Microbiol Immunol* (in Chinese), 1991, **11**(4): 230 - 233.
- [12] Wang WG, Xu LN, Zhang SH, *et al.* Use of monoclonal antibody-pingyangmycin conjugate in experimental regional targeting therapy of tumor [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, **32**(9): 669 - 674.
- [13] Behr TM, Mentsoudis S, Sharkey RM, *et al.* Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radioimmunotherapy: Influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy [J]. *Int J Cancer*, 1998, **77**(6): 787 - 795.
- [14] Kobayashi H, Han ES, Kim IS, *et al.* Similarities in the biodistribution of iodine-labeled anti-Tac single-chain disulfide-stabilized Fv fragment and anti-Tac disulfide-stabilized Fv fragment [J]. *Nucl Med Biol*, 1998, **25**(4): 387 - 393.
- [15] Su JH, Yan JH, Lin BZ, *et al.* Preparation and cytotoxicity of conjugate composed of pingyangmycin and monoclonal antibody against human lung cancer [J]. *Chin J Clin Oncol* (in Chinese), 1996, **23**(6): 437 - 439.

ANTITUMOR EFFECTS OF PINGYANGMYCIN CONJUGATED WITH Fab' FRAGMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY

LIU Xiaoyun, LIU Xirjun, LI Yi, WANG Weigang, ZHEN Yongsu

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an immunoconjugate with targeting antitumor effects by linking the Fab' fragment of McAb to pingyangmycin (PYM). **METHODS** McAb 3A5 was digested with pepsin to obtain Fab' fragment. Linking between Fab' and PYM was mediated by dextran T-40. Immunoreactivity of Fab' was determined by ELISA. Bacteria inhibitory activity of the conjugate was determined by TTC assay. Cytotoxicity to carcinoma cells was determined by MTT assay and antitumor effects *in vivo* were assessed in BALB/c mice transplanted with colon carcinoma 26 (C26). **RESULTS** The Fab'-PYM conjugate retained immunoreactivity with C26 cells, the target cells. The IC₅₀ values of Fab'-PYM and PYM to C26 cells were 2.51 μg·mL⁻¹ and 32.46 μg·mL⁻¹, respectively. Fab'-PYM and PYM displayed similar cytotoxicity to KB cells, the non-target cells. By intraperitoneal dose of 5 mg·kg⁻¹ × 6, Fab'-PYM and PYM suppressed the growth of colon carcinoma 26 by 77% and 56%, respectively. By intravenous dose of 5 mg·kg⁻¹ × 7, Fab'-PYM, 3A5-PYM and PYM inhibited the growth of colon carcinoma 26 by 89%, 73% and 70%, respectively. Fab'-PYM was found to be more effective against target tumor than 3A5-PYM and PYM (*P* < 0.01). With higher tolerable dose of 10 mg·kg⁻¹ × 7, iv, the inhibition of tumor growth by Fab'-PYM reached 91%. **CONCLUSION** Fab'-PYM conjugate characterized by smaller size of the molecule displayed higher antitumor effects than 3A5-PYM and free PYM.

KEY WORDS: monoclonal antibody; Fab' fragment; pingyangmycin; immunoconjugate; antitumor activity