

抗 IV 型胶原酶单抗 3G11 与力达霉素偶联物的抗肿瘤作用

王风强, 尚伯杨, 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 观察抗 IV 型胶原酶单抗 3G11 与力达霉素(LDM)偶联物的抗肿瘤作用。方法 用 MTT 法测定其对肿瘤细胞的增殖抑制作用;用小鼠移植性肝癌 H22 观察体内抗肿瘤作用。结果 3G11-LDM 偶联物保留了单抗 3G11 与 IV 型胶原酶和靶细胞 H22 细胞的结合能力,体外试验 H22 细胞显示比游离 LDM 更强的细胞增殖抑制作用。体内 3G11-LDM 偶联物 0.05 和 0.10 mg·kg⁻¹ 对小鼠移植性肝癌 H22 的抑瘤率分别为 87.8% 和 97.2%, 而游离 LDM 0.05 mg·kg⁻¹ 的抑瘤率为 67.1%, 且 3G11-LDM 偶联物组小鼠的中位生存时间比 LDM 组明显延长。结论 3G11-LDM 偶联物对小鼠移植性肝癌 H22 的抑瘤作用比 LDM 强,可能成为抗肿瘤靶向药物。

关键词: IV 型胶原酶; 单克隆抗体; 力达霉素; 免疫偶联物

中图分类号: R979.1; R730.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)07 - 0515 - 05

Antitumor effects of the immunoconjugate composed of lidamycin and monoclonal antibody 3G11

WANG Feng-qiang, SHANG Bo-ying, ZHEN Yong-su*

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

Abstract: **Aim** To study the antitumor effects of an immunoconjugate composed of lidamycin (LDM) and monoclonal antibody 3G11 (3G11-LDM conjugate). **Methods** 3G11-LDM conjugate was prepared by using 2-iminothiolane (2-IT) and *m* maleimidobenzoyl-*N* hydroxy-succinimide ester (MBS) as crosslinkers. The molecular weight of the conjugate was measured on non-reduced SDS-PAGE gel. Immunoreactivity of 3G11-LDM conjugate to type IV collagenase or to hepatoma 22 cells was determined by ELISA. The cytotoxicity of the immunoconjugate to hepatoma 22 cells was examined by MTT assay. Antitumor effects of the 3G11-LDM conjugate *in vivo* were evaluated using subcutaneously transplanted hepatoma 22 tumor model in mice. **Results** The molecular weight of 3G11-LDM conjugate was approximately 160 kDa. 3G11-LDM conjugate retained part of the immunoreactivity of 3G11 to type IV collagenase and hepatoma 22 cells. As compared with free LDM, 3G11-LDM conjugate showed stronger cytotoxicity to hepatoma 22 cells. When administered intravenously (iv × 2 on day 1 and 8), 3G11-LDM conjugate, at doses of 0.05 and 0.10 mg·kg⁻¹, inhibited the growth of hepatoma 22 in mice by 87.8% and 97.2% on day 11, respectively, whereas the unconjugated LDM at 0.05 mg·kg⁻¹ inhibited tumor growth by 67.1%. The median survival times for tumor bearing mice of untreated control, LDM at 0.05 mg·kg⁻¹, 3G11-LDM at 0.05 mg·kg⁻¹, and 3G11-LDM at 0.10 mg·kg⁻¹ were 34, 41.5, 60.5 and 94 d, respectively. Evidently 3G11-LDM was more effective than free LDM in suppressing tumor growth and prolonging the life span of tumor bearing mice. **Conclusion** 3G11-LDM conjugate shows much stronger antitumor effects than equivalent dose of free LDM and may have promising therapeutic potential in cancer treatment.

Key words: type IV collagenase; monoclonal antibody; lidamycin; immunoconjugate

以单抗作为靶向载体,与化疗药物、放射性核素、毒素等“弹头”药物组成免疫偶联物,能显著提高“弹头”药物治疗肿瘤的选择性和特异性^[1]。2000

收稿日期: 2002-09-03

基金项目: 国家重点基础研究 973 项目基金(GI 998051212)。

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 83158065, E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

年5月,美国FDA批准了第一个单抗免疫偶联物 Mylotarg 用于治疗急性复发性粒细胞性白血病,取得了良好效果^[21]。最近,获得FDA批准的放射免疫偶联物 Zevalin 的上市表明,使用鼠源性单抗研制的单抗靶向药物可应用于临床。该免疫偶联物将放射性核素 Yttrium-90 标记于鼠源性的抗 CD20 单抗上,用于 Rituxan 治疗无效的非霍奇金淋巴瘤^[3]。近年来,基质金属蛋白酶(MMPs)因与恶性肿瘤的生长、转移和血管生成关系密切而成为引人注目的研制抗癌药物的分子靶点^[4,5]。以MMPs家族中与肿瘤生长和转移关系最为密切的成员IV型胶原酶作为抗原,制备了抗IV型胶原酶单抗,该抗体能够与IV型胶原酶特异性结合并抑制其活性,由其衍生的抗体片段在肿瘤治疗中显示出良好的靶向性和选择性^[6,7]。

本研究使用的“弹头”药物力达霉素(lidamycin, LDM,又称Cl027)是从我国湖北省潜江市土壤中分离得到的一株链霉菌中产生的,体外试验对癌细胞的杀伤作用比阿霉素强万倍以上。力达霉素的分子结构是由一条肽链(MW 10.5 kDa)和一个九元环烯二炔发色团(MW 845 kDa)组成;发色团为其活性部分,蛋白肽链对发色团的结构和活性起稳定作用^[8,9]。在与单抗偶联时利用其蛋白部分,可减小偶联对其活性的影响。由于以上特点,力达霉素是研制单抗靶向药物理想的高效“弹头”药物。以此为基础,本研究以单抗3G11作为靶向载体,制备了其力达霉素的偶联物,并对偶联物的体内外抗肿瘤作用进行了研究。

材料和方法

肿瘤与细胞株 肝癌细胞株 H22,小鼠肝癌 H22 移植性肿瘤(用 H22 腹水细胞在小鼠体内传代)。

实验动物 体重为 19~21 g 的昆明种♀小鼠,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

药品与试剂 抗IV型胶原酶单抗3G11为用辛酸-硫酸铵两步沉淀法从接种杂交瘤3G11的BALB/c小鼠腹水中制备得到,以羟基磷灰石柱纯化。力达霉素(LDM)由本所金莲舫教授提供。多聚赖氨酸、牛血清白蛋白、2-亚氨基四氢噻吩(2-IT)、N-羟基琥珀酰亚胺基间-(N-马来酰亚胺基)苯甲酸酯(MBS)、四氮唑蓝(MTT)、IV型胶原酶、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体等均购自Sigma公司;蛋白质分子量标准购自Pharmacia公司;其他化学试剂均为市售分析纯。

仪器 Beckman J2- HS 低温高速离心机;岛津

UV-120-02 型紫外可见分光光度计;Bio-Rad Model 3550 型微板读数仪;Forma Scientific CO₂ 培养箱。

单抗3G11与力达霉素免疫偶联物(3G11-LDM)的制备 取纯化的单抗3G11以0.05 mol·L⁻¹硼酸缓冲液pH 8.0调整为5 g·L⁻¹,加入4 g·L⁻¹ 2-IT,在充氮气的条件下于室温反应40 min。反应结束后,置截留分子量为30 kDa的离心浓缩管中,以0.05 mol·L⁻¹ (pH 6.8)磷酸盐缓冲液(PBS)进行缓冲液交换,并离心除去未反应的2-IT。另取LDM溶解于0.05 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.8)中,调整为5 g·L⁻¹,搅拌下加入过量的10 g·L⁻¹ MBS(溶于DMF)。室温反应40 min,然后置截留分子量为10 kDa的透析袋中,于0.05 mol·L⁻¹ (pH 6.8)的PBS中充分透析16 h。透析完毕,立即与经2-IT修饰的抗体进行偶联反应,室温过夜。反应液置截留分子量为30 kDa的超滤离心浓缩管中,离心超滤3~4次,去除未参与偶联反应的经MBS修饰的LDM,得到单抗3G11-LDM偶联物。

偶联物分子量的测定 以非还原型SDS-PAGE法进行,浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为7.5%。

3G11-LDM偶联物的免疫反应性检测 以ELISA方法进行测定。将IV型胶原酶以PBS缓冲液配制成10 mg·L⁻¹的溶液,按100 μL/井包被96井板,然后置4℃过夜。H22细胞的固定:在96井培养板中加入0.01%多聚赖氨酸,200 μL/井,4℃湿盒中包被过夜。弃去包被液,PBS洗1次。将对数生长期的H22细胞,按每井10万细胞加至培养板。800×g离心5 min后,弃去上清液,加入4℃预冷的0.05%戊二醛50 μL/井,固定15 min。已包被IV型胶原酶或固定H22细胞的96井板用PBS洗3次后,继用1%BSA 200 μL/井,封闭过夜。然后用含0.05%Tween-20的PBS缓冲液(PBST)洗3次。加入倍比稀释的单抗3G11和3G11-LDM偶联物,50 μL/井,每个浓度设3个平行井,37℃孵育50 min。以PBST洗板3次,然后加入1:2500倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体,50 μL/井,37℃孵育50 min。温育后,以PBST洗板6次。然后,加入邻苯二胺底物反应液100 μL/井,室温避光反应10 min。立即以2 mol·L⁻¹硫酸100 μL/井终止反应,在酶标仪上测定490 nm吸光值(A₄₉₀)。观察单抗3G11及3G11-LDM偶联物对IV型胶原酶和H22细胞的免疫反应性。

细胞增殖抑制实验 用MTT法检测。取对数生长期的H22细胞按3000/井加于96井培养板中,100 μL/井。在37℃,5%CO₂的孵箱中培养24 h后,加

入用无血清 1640 培养液稀释的药物 $100 \mu\text{L}/\text{井}$; 阴性对照井加无血清 1640 培养液 $100 \mu\text{L}$ 。每浓度设 3 个平行井。继续培养 48 ~ 72 h 后, 每井加入无血清 1640 培养液配制的 MTT ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $50 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h, 轻轻吸去培养液, 加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 振摇 15 min, 在酶标仪上测定 560 nm 吸光值 (A_{560})。每次实验均设无药对照井和无细胞对照井各 3 个, 按公式计算细胞存活率和 IC_{50} 。

3G11-LDM 偶联物对小鼠移植性肝癌 H22 的治疗作用 取小鼠肝癌 H22 腹水, 常规接种于昆明小鼠腋窝皮下, 随机分组, 每组 10 只动物。接种肿瘤后 24 h (d1) 开始治疗, d8 重复给药 1 次。对照组 iv 生理盐水 $0.2 \text{ mL}/\text{只}$; 其余各组分别 iv 单抗 3G11 ($0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), LDM ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 3G11 和 LDM 的混合物 ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 以及 3G11-LDM 偶联物 ($0.025, 0.05$ 和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组), 每只动物 iv 量均为 0.2 mL 。实验期间, 每 3 ~ 4 d 测量一次肿瘤的长径 (a) 及与之垂直的短径 (b), 并记录动物体重。以公式 $V=1/2 ab^2$ 计算瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线, 并计算抑瘤率。实验期间, 观察动物死亡情况, 计算各组动物的中位生存时间。

统计学处理 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析用 t 检验进行统计学处理。

结果

1 3G11-LDM 偶联物的制备与分子质量

纯化的单抗 3G11 与巯基引入试剂 2-IT 反应, 可在其分子中的氨基部位引入巯基, 利用该巯基与经过 MBS 修饰的 LDM 反应, 可以通过形成硫醚键将两者偶联起来。SDS-PAGE 电泳结果显示, 偶联物的分子量为 160 kDa 左右, 恰好在抗体分子 (150 kDa) 基础上增加了一个 LDM 的分子大小, 推测偶联产物中单抗 3G11 与 LDM 的分子比为 1:1 (图 1)。

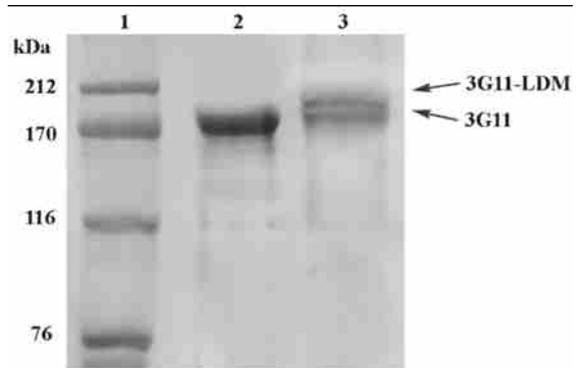
2 3G11-LDM 偶联物与 IV 型胶原酶和肝癌 H22 细胞的免疫反应性

以 ELISA 方法测定, 单抗 3G11-LDM 偶联物保留了单抗 3G11 与 IV 型胶原酶以及表达 IV 型胶原酶的 H22 细胞的免疫结合活性, 但偶联后抗体与抗原的结合能力约降低 5 ~ 10 倍 (图 2, 3)。

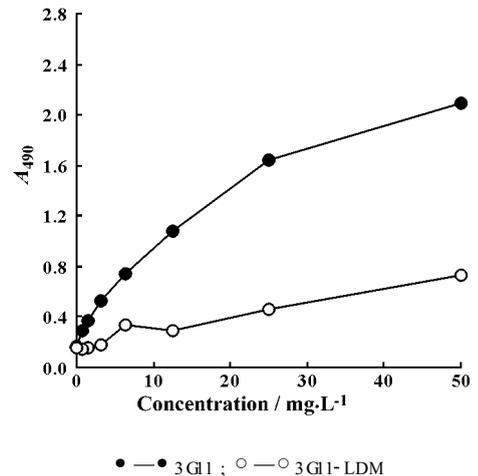
3 3G11-LDM 偶联物及 LDM 对体外培养的肝癌 H22 细胞的增殖抑制作用

以 MTT 法测定 3G11-LDM 偶联物及 LDM 对体外培养的 H22 细胞的细胞毒作用。结果显示, 按单抗 3G11 与 LDM 的偶联分子比为 1:1 计算, 相当浓度的

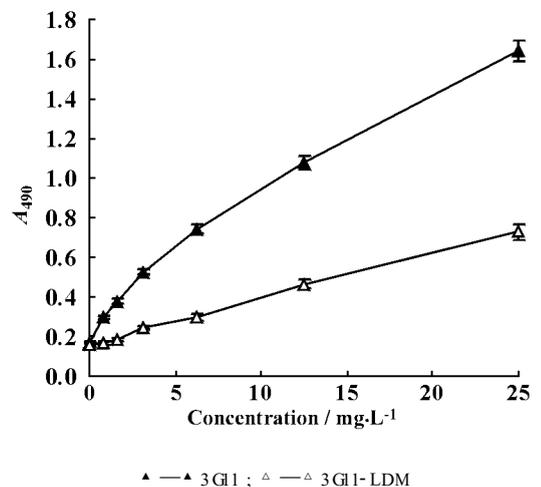
3G11-LDM 偶联物与游离 LDM 相比, 对肝癌 H22 细胞的增殖抑制作用显著增强, LDM 和 3G11-LDM 偶联物对肝癌 H22 细胞的增殖抑制的 IC_{50} 分别为 6.15×10^{-11} 和 $5.06 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4)。



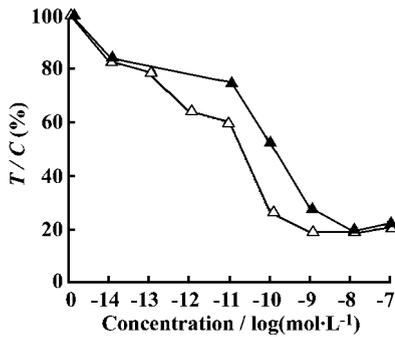
1: Marker; 2: 3G11; 3: 3G11-LDM immun conjugate; LDM: Lidamycin
Figure 1 Analysis of 3G11-LDM conjugate using 7.5% SDS-PAGE gel



●—● 3G11; ○—○ 3G11-LDM
Figure 2 Immunoreactivity of mAb 3G11 and 3G11-LDM conjugate with type IV collagenase



▲—▲ 3G11; △—△ 3G11-LDM
Figure 3 Immunoreactivity of mAb 3G11 and 3G11-LDM conjugate with H22 cells

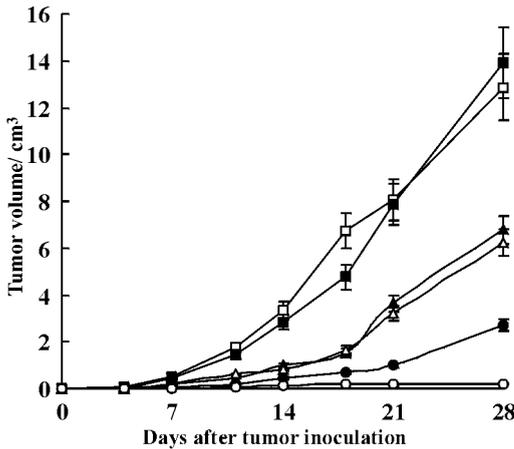


▲ —▲ LDM; △ —△ 3G11-LDM

Figure 4 Growth inhibition effect of 3G11-LDM conjugate and LDM on hepatoma 22 cells *in vitro* by MIT assay

4 3G11-LDM 偶联物对小鼠皮下移植性肝癌 H22 的治疗作用

昆明小鼠皮下接种肿瘤,接种后 d 1 和 d 8 *iv* 给药,共 2 次。观察小鼠皮下移植性肝癌 H22 的肿瘤生长曲线。结果显示,3G11-LDM 偶联物 0.025, 0.05 和 0.1 mg·kg⁻¹ 3 个剂量均能显著地抑制或延迟小鼠移植性肝癌 H22 的生长,其中 0.05 和 0.1 mg·kg⁻¹ 两个剂量的偶联物的抑瘤作用比 0.05 mg·kg⁻¹ 的游离 LDM 强(图 5)。按肿瘤体积进行比较,实验 d 11, 3G11-LDM 偶联物 0.025, 0.05 和 0.1 mg·kg⁻¹ 的抑瘤率分别为 66.3%, 87.8% 和 97.2% (3 组均无动物死亡,平均体重增长 3.5 ~ 6.6 g),而 0.05 mg·kg⁻¹ 的游



□ —□ Control; ■ —■ 3G11 0.75 mg·kg⁻¹; ▲ —▲ LDM 0.05 mg·kg⁻¹; △ —△ 3G11-LDM 0.025 mg·kg⁻¹; ● —● 3G11-LDM 0.05 mg·kg⁻¹; ○ —○ 3G11-LDM 0.10 mg·kg⁻¹

Figure 5 Inhibition of the growth of hepatoma 22 by LDM and 3G11-LDM conjugate in mice. Hepatoma 22 cells were inoculated subcutaneously and LDM or 3G11-LDM was administered intravenously 24 h and 8 d, respectively, after tumor transplantation. n = 10

离 LDM 的抑瘤率为 67.1% (无动物死亡,平均体重增长 7.5 g),单抗 3G11 组的抑瘤率为 22.2% (无动物死亡,平均体重增长 9.3 g),单抗 3G11 与 LDM 混合组的抑瘤率为 82.5%。3G11-LDM 偶联物 0.05 mg·kg⁻¹ 与同等剂量的游离 LDM 相比较,抑瘤作用显著增强 (P < 0.05)。

各组动物的中位生存时间表明,对照组为 34 d, LDM 0.05 mg·kg⁻¹ 剂量组为 41.5 d, 3G11-LDM 偶联物 0.025, 0.05 和 0.1 mg·kg⁻¹ 3 个剂量组分别为 52.5 d, 60.5 d 和 94 d (图 6)。与等剂量的游离 LDM 相比, 3G11-LDM 偶联物显著延长荷瘤动物的生存时间 (P < 0.05)。

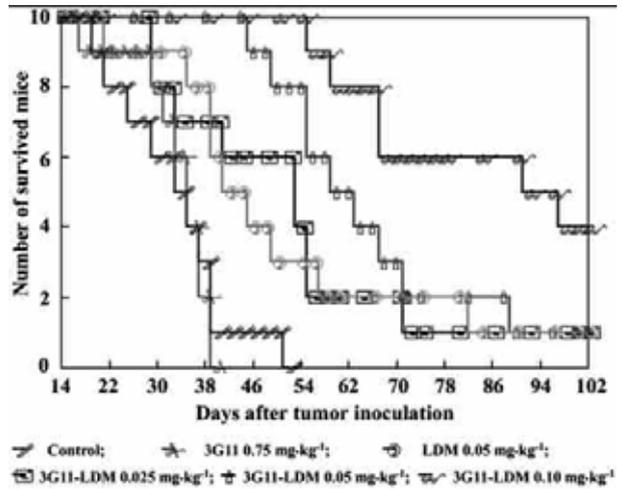


Figure 6 Increase of the life span of hepatoma 22-bearing mice treated with LDM or 3G11-LDM conjugate. Hepatoma 22 cells were inoculated subcutaneously and LDM or 3G11-LDM was administered intravenously 24 h and 8 d, respectively, after tumor transplantation. n = 10

讨论

力达霉素的分子结构由蛋白肽链和发色团两个部分组成,其蛋白部分本身没有细胞毒性,而是对发色团的结构和活性起稳定作用。根据这一特点,可采用力达霉素蛋白部分中的氨基和羧基等活性基团与抗体进行偶联。本研究以 2-IT 和 MBS 作为交联剂,将单抗 3G11 与力达霉素的蛋白部分通过形成稳定的硫醚键进行偶联,获得了以 1:1 分子比连接产物为主的单抗 3G11-LDM 偶联物,由于硫醚键在血浆中非常稳定,可在进入细胞后经溶酶体降解释放出药物,易于发挥导向作用。

研究表明,3G11-LDM 偶联物与 IV 型胶原酶或 H22 细胞的结合能力均比游离的单抗 3G11 有所降低,但仍保留了抗原结合活性。以静脉给药两次的

方式,体内治疗小鼠移植性肝癌 H22,3G11-LDM 偶联物 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 与游离 LDM $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量比较,体内的抗肿瘤作用显著增强。而且,3G11-LDM 偶联物 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可达到与 LDM $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 相当的肿瘤生长抑制作用。上述结果提示,单抗 3G11 与 LDM 构成的偶联物提高了肿瘤治疗的选择性,具有比 LDM 更高的疗效。

肝癌 H22 细胞具有较强的分泌和表达 IV 型胶原酶的能力,单抗 3G11 及 3G11-LDM 偶联物均与 H22 细胞呈现出良好的免疫结合活性。因此,3G11-LDM 偶联物的抗肿瘤作用的增强可能取决于以下两个因素。一是通过抗 IV 型胶原酶单抗 3G11 携带 LDM 到达肿瘤部位实现特异性结合,提高了在肿瘤部位释放的力达霉素的浓度,从而发挥更强的抑瘤作用。二是偶联物的抗体部分对 IV 型胶原酶的结合导致了对 IV 型胶原酶活性的抑制,从而影响肿瘤细胞穿透基底膜的能力和肿瘤的新血管生成,与具有血管生成抑制作用及较强细胞毒作用的抗肿瘤抗生素力达霉素共同显示对肿瘤生长的抑制作用^[10]。3G11-LDM 偶联物在动物实验中取得的良好疗效,为进一步研究和开发以力达霉素作为“弹头”的单抗靶向药物提供依据。

References:

[1] Zhen YS. Advances in research on monoclonal antibody agents for cancer therapy [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医

学科学院学报), 2000, **22**(1): 9 - 13.

- [2] Bross PF, Beitz J, Chen G, *et al*. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**(6): 1490 - 1496.
- [3] Gordon LI, Witzig TE, Wiseman GA, *et al*. Yttrium 90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Semin Oncol*, 2002, **29**(1 Suppl 2): 87 - 92.
- [4] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, *et al*. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications [J]. *J Clin Oncol*, 2000, **18**(5): 1135 - 1149.
- [5] McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression [J]. *Mol Med Today*, 2000, **6**(4): 149 - 156.
- [6] Liu XY, Zhen YS. Antitumor effects of monoclonal antibody Fab' fragment containing immunoconjugates [J]. *Chin Med Sci J*, 2002, **17**(1): 1 - 6.
- [7] Tang Y, Zhen YS. Expression of anti-type IV collagenase scFv fragment and inhibition of tumor cell invasion [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2001, **20**(8): 801 - 805.
- [8] Xu YJ, Li DD, Zhen YS. Mode of action of C-1027, a new macromolecular antitumor antibiotic with highly potent cytotoxicity, on human BEL-7402 cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1990, **27**(1): 41 - 46.
- [9] Xu YJ, Zhen YS, Goldberg IH. C1027 chromophore, a potent new enediyne antitumor antibiotic, induces sequence-specific double-strand DNA cleavage [J]. *Biochemistry*, 1994, **33**(19): 5947 - 5954.
- [10] Zhen HY, Xue YC, Zhen YS. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of an antitumor antibiotics-C1027 [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1997, **77**(9): 657 - 660.