

人单克隆抗体与平阳霉素偶联物治疗乳腺癌实验研究*

王维刚 王树蕙** 薛玉川 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;

**中国医学科学院、中国协和医科大学基础医学研究所,北京 100005)

摘要 抗乳腺癌人单抗 CM1 用 Dextran T-40 为中介体的方法与平阳霉素(PYM)偶联,体外实验显示 CM1-PYM 偶联物对人乳腺癌细胞的 IC_{50} (抑制 50% 克隆生成浓度)为 $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;游离 PYM 为 $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。裸鼠体内实验证明,局部给予 CM1-PYM 偶联物($2.5 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对移植的人乳腺癌抑制率达 95%,等剂量平阳霉素为 58%。结果表明人单抗 CM1-平阳霉素偶联物对乳腺癌有显著疗效,偶联物对肿瘤的抑制作用比游离平阳霉素更强。

关键词 人单克隆抗体;平阳霉素;乳腺癌;免疫偶联物。

由于鼠源性单克隆抗体(单抗)在人体使用可引起人抗鼠抗体反应,研制人源性单抗偶联物在肿瘤导向治疗中有重要意义。CM1 是抗乳腺癌人单克隆抗体,免疫组化观察表明,CM1 与被检乳腺癌均呈阳性反应,与所检的人正常组织均无反应。用放射性同位素 ^{131}I 标记后用于裸鼠移植瘤和人体的放射免疫显像均可进行肿瘤定位^[1~3],表明该单抗具有特异性,可能用于乳腺癌的诊断和治疗。平阳霉素(博莱霉素 A5)是临床较常用的抗肿瘤抗生素。实验研究证明,平阳霉素(PYM)对裸鼠移植人体肿瘤有明显抑制作用^[4,5]。平阳霉素与抗人肝癌大鼠单克隆抗体 3A5 的偶联物对靶细胞具有选择性杀伤作用^[6]。本研究用抗乳腺癌人单抗 CM1 与 PYM 偶联,观察其对乳腺癌的实验治疗作用。

材料与 方法

动物 BALB/c(nu/nu)裸小鼠,雌性,6~7 周龄。购于中国医学科学院肿瘤研究所。

细胞系 人乳腺癌 CAMA 细胞由协和医院外科实验室提供,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在含 5% CO_2 的 37℃ 温箱中培养。

药物和试剂 抗乳腺癌人单抗 CM1 为 IgM 型单抗,与人乳腺癌 CAMA 细胞呈强阳性反应。PYM 为中国医学科学院医药生物技术研究所许鸿章教授提供。Dextran T-40 为 Pharmacia 公司产品。高碘酸钠和氯代三苯基四氮唑(TTC)为北京化工厂产品。硼氢化钠为 Fluka 公司产品。PEG 6000 为 Merck 公司产品。

人单抗 CM1 纯化^[7] CM1 腹水以等量 PBS 稀释后,加入 SiO_2 粉末适量,室温下振荡 30 min, $10\,000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收取上清液。加入 PEG 6000 使成 6% 浓度,置冰浴 15 min $10\,000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集沉淀,沉淀以 PBS 复性后,再以 6% PEG 沉淀,离心收集沉淀物以 PBS(含 $0.5 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$)溶解备用,并以 ELISA 法检测抗体反应性。

单抗 CM1 与 PYM 偶联^[9] 将 500 mg Dextran T-40 溶于 100 ml $0.03 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaIO}_4$ 溶液中,室温避光搅拌反应 3 h,经去离子水充分透析后冷冻干燥保存于 -20°C 。取氧化的 Dextran

T-40 适量与平阳霉素适量溶于 PBS 中,于 4℃ 避光反应 12 h,加入 CM1 适量继续反应 12 h,以 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaBH}_4$ 溶液适量还原 2 h,反应物经 Sephadex G-75 葡聚糖凝胶柱(2 cm×95 cm)分离得到 CM1-PYM 偶联物。偶联物中 CM1 与 PYM 含量计算及偶联物中 PYM 生物学活性测定参照文献^[9]。偶联物中 CM1 抗体反应性以 ELISA 法测定。

克隆形成测定 取对数生长期 CAMA 细胞种入 96 井培养板,每井 50 个细胞。培养 24 h,加入待测样品后放置 37℃ 温育 1 h。以无血清 RPMI 1640 培养液洗 3 次,加入新鲜培养液培养 7 天,镜下计数细胞集落。

裸鼠移植人乳腺癌实验治疗 将直径 2 mm 的 CAMA 人乳腺癌瘤块接种于体重 20~22 g 的 BALB/c(nu/nu)裸鼠右腋皮下。于肿瘤接种后第 10 d 在瘤结周围皮下注射 PYM 或 CM1-PYM 偶联物。PYM 剂量为 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (CM1-PYM 偶联物用 PYM 相当剂量),3 d 一次,共 3 次。对照动物注射生理盐水。各组均为 5 只动物。治疗期间每周两次测量肿瘤长径 a(cm)以及相垂直的短径 b(cm)并按下式计算瘤重 W(g): $W = (a \times b^2) \times 1/2$ 。于 30 d 后处死动物,取心、肺、肝、脾、肾、小肠和股骨髓等标本用 Bouin 氏液固定,常规石蜡切片, H. E. 染色,观察病理变化。

结 果

单抗 CM1 纯化

PEG 法纯化的 CM1 单抗经细胞 ELISA 法测定反应性,结果显示纯化的 CM1 抗体与原腹水对 CAMA 细胞均呈较强阳性反应,两者活性大致相当。

单抗 CM1 与 PYM 偶联

偶联反应物经 Sephadex G-75 柱分离,其洗脱液经紫外监测有两个峰。经 ELISA 检测和枯草杆菌抑菌试验,证实第 1 峰为 CM1-PYM 偶联物,第 2 峰为未偶联的游离 PYM(图 1)。经考马斯亮蓝染色测定及 280 nm 吸收度测定,计算偶联物的 CM1 与 PYM 分子比为 CM1 : PYM = 1 : 250。

偶联物中 CM1 抗体反应性测定

将游离 CM1 单抗与 CM1-PYM 偶联物分别以 PBS 倍比稀释成一系列浓度,用 ELISA 法测定它们对靶细胞 CAMA 的反应性。结果表明偶联物中 CM1 反应性未见明显改变(图 2)。

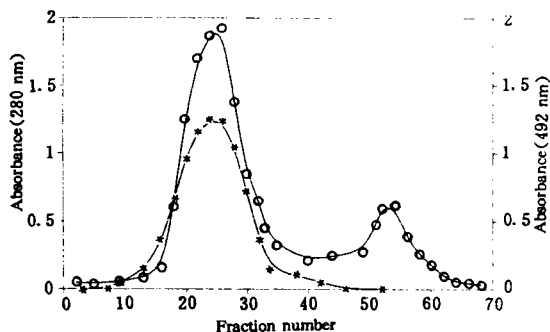


Fig 1 Separation of CM1-PYM conjugate through G-75 column. ○ — ○ UV (280 nm); × — × ELISA (492 nm).

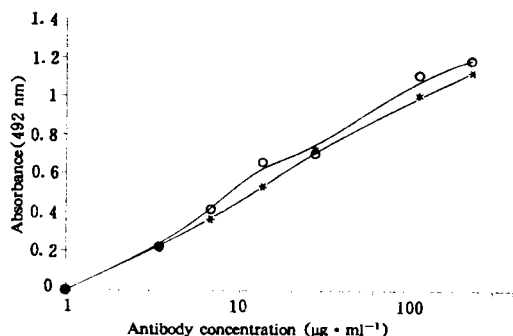


Fig 2 Antibody reactivity of McAb CM1 and CM1-PYM conjugate by ELISA. ○ — ○ CM1; × — × CM1-PYM.

偶联物中 PYM 活性测定

用 TTC 法测定同等浓度的游离 PYM 与 CM1-PYM 对枯草杆菌抑菌效价,然后计算偶联物中 PYM 实际效价。本研究 CM1-PYM 偶联物中 PYM 保留原活性 20%。

对靶细胞的杀伤作用

克隆形成测定结果,药物与细胞作用 1 h, 偶联物及游离 PYM 对 CAMA 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 0.35 和 4.0 μmol · L⁻¹。偶联物对靶细胞的杀伤力比游离 PYM 强(图 3)。

裸鼠移植人乳腺癌的实验治疗

CM1-PYM 对移植人乳腺癌 CAMA 肿瘤生长有显著抑制作用,其抑制率高于等剂量游离平阳霉素(图 4)。实验结束时(图 5),游离 PYM 的两个剂量组(1.25 mg · kg⁻¹和 2.5 mg · kg⁻¹)组肿瘤抑制率分别为 49%和 58%(*P* < 0.05); CM1-PYM 1.25 mg · kg⁻¹组和 CM1-PYM 2.5 mg · kg⁻¹组抑制率分别为 86%和 95%(*P* < 0.01)。动物的心、肺、肝、脾、肾、小肠等脏器的病理组织检查未发现毒性变化。

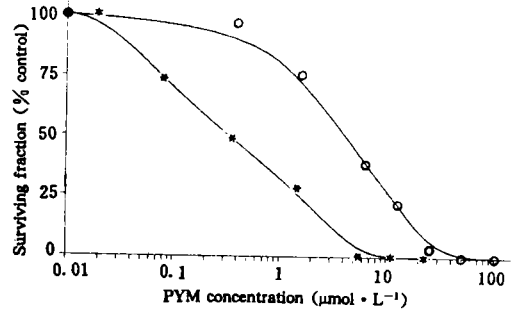


Fig 3 Cytotoxicity of CM1-PYM conjugate and PYM to mammary cancer CAMA cells. Clonogenic assay, 1 h exposure. ○ — ○ PYM; × — × CM1-PYM.

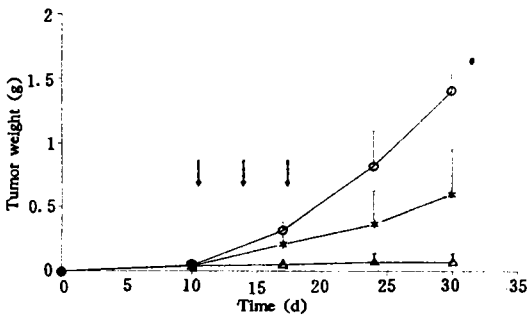


Fig 4 Inhibitory effect of CM1-PYM conjugate and free PYM on the growth of mammary cancer CAMA xenograft in nude mice. Doses; PYM, 2.5 mg · kg⁻¹; CM1-PYM, equivalent dose of PYM 2.5 mg · kg⁻¹. Peri-tumoral injection (*n* = 5). ○ — ○ Control; × — × PYM; △ — △ CM1-PYM.

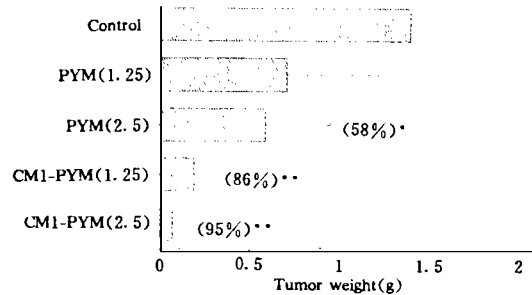


Fig 5 Inhibition by CM1-PYM conjugate and free PYM on mammary cancer xenograft in nude mice. Numbers in parenthesis following PYM or CM1-PYM indicate equivalent PYM doses in mg · kg⁻¹ (*n* = 5). **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

讨 论

目前研制的大多数抗肿瘤导向药物均使用鼠源性单抗制备,临床使用可导致人抗鼠抗体(HAMA)反应。在黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌和卵巢癌患者,HAMA 发生率高达 100%。HAMA 对注入的单抗导向药物起中和作用,从而抵消其疗效。因此,研究者普遍关注的是使鼠单抗人源化。本研究采用抗乳腺癌人单抗 CM1 作为导向载体,为解决以上问题提供了一条新途径。

单抗导向药物面临的另一问题是静脉给药时肿瘤组织单抗摄取量甚低,偶联物实际到达肿瘤细胞尤其是实体瘤深部细胞的数量有限。综合已报道的研究资料表明,局部注射是提高偶联物在肿瘤内浓度并提高疗效的可行办法^[10]。据报道,在裸鼠移植结肠癌模型,瘤内或瘤旁注

射¹²⁵I 标记单抗,肿瘤和同侧区域淋巴结均显示高浓度与较长时间的滞留;瘤内注射单抗一新制癌菌素偶联物可完全抑制肿瘤生长,疗效优于静脉注射^[11]。由于单抗局部注射后在淋巴道呈现高浓度^[12],单抗-药物偶联物在原发肿瘤局部注射有可能对淋巴转移癌有更好的疗效。而平阳霉素的特点是对注射局部无明显刺激作用,临床可用于肌肉注射^[13~15]。平阳霉素局部给药不导致组织损伤,是研制局部注射用单抗偶联物较为理想的“弹头”药物。

本研究结果表明,CM1-PYM 偶联物仍保持单抗对人乳腺癌细胞的免疫反应性,对乳腺癌细胞有较强的杀伤作用。裸鼠移植人乳腺癌实验治疗结果显示,瘤旁局部给予 CM1-PYM 偶联物可明显抑制肿瘤生长,其抑制率达 95%,而相当剂量的游离 PYM 为 58%。CM1-PYM 偶联物显示出比游离 PYM 更明显的治疗作用。根据各脏器病理组织学检查结果,偶联物治疗组未发现任何毒性变化。以上研究提示,人单抗 CM1-平阳霉素偶联物可能用于治疗乳腺癌及其淋巴结转移,展示了应用的前景。

参 考 文 献

- 1 王树葱,孙月英,苏小玲等. 抗乳腺癌人单克隆抗体 CM-1 的制备和初步鉴定. 中国医学科学院学报,1991,13: 45
- 2 么崇正,杨子义,李方等. 乳腺癌人单克隆抗体用于裸鼠移植瘤显像. 肿瘤,1991,11: 148
- 3 王树葱,孙月英,苏小玲等. 抗乳腺癌人单克隆抗体 CM1 用于人乳腺癌诊断的实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志,1990,4: 509
- 4 甄永苏,章兆和,吴淑英等. 平阳霉素对小鼠移植人鼻咽癌细胞的抑制作用. 中国医学科学院学报,1986,8: 51
- 5 江敏,甄永苏. 平阳霉素对裸鼠移植的人体肝癌和胃癌的抑制作用. 中华肿瘤杂志,1988,10: 357
- 6 江敏,黄静,薛伟等. 抗肝癌大鼠单克隆抗体 3A5 的特性及其平阳霉素偶联物的抗肿瘤活性. 中华微生物学和免疫学杂志,1991,11: 230
- 7 Neoh SH, Gordon C, Potter A *et al.* The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid. *J Immunol Methods*, 1986,91: 231
- 8 Manabe Y, Tsubota T, Haruta Y *et al.* Production of monoclonal antibody-bleomycin conjugate utilizing Dextran T-40 and the antigen-targeting cytotoxicity of the conjugate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983,115: 1009
- 9 彭泽,甄永苏. 单克隆抗体与博来霉素 A6 偶联物对肝癌的实验研究. 药学报,1991,26: 331
- 10 甄永苏. 抗肿瘤导向药物研究的现状与展望. 药学报,1994,29: 1
- 11 Kitamura K, Takahashi T, Kotani T *et al.* Local administration of monoclonal antibody-drug conjugate: a new strategy to reduce the local recurrence of colorectal cancer. *Cancer Res*, 1992,52: 6323
- 12 Weinstein JN, Parker RJ, Keenan AM *et al.* Monoclonal antibodies in the lymphatics: toward the diagnosis and therapy of tumor metastases. *Science*, 1982,218: 1334
- 13 Zhen YS, Li DD, Li Q *et al.* Studies on antitumor effect and pharmacology of pingyangmycin. In: Wu HX, ed. *Topics on Cancer Chemotherapy*. Beijing: China Academic Publishers, 1981: 211~224
- 14 Ye ZS. Results of clinical trials of pingyangmycin, a new antitumor agent. In: Wu HX, ed. *Topics on Cancer Chemotherapy*. Beijing: China Academic Publishers, 1981: 409~414
- 15 甄永苏,李电东. 平阳霉素抗肿瘤作用研究. 中国肿瘤临床,1992,19: 58

EFFECT OF THE CONJUGATE COMPOSED OF A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AND PINGYANGMYCIN ON MAMMARY CANCER

WG Wang, SH Wang* , YC Xue and YS Zhen

*(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050; * Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005)*

ABSTRACT To avoid or reduce the induction of human anti-mouse antibody reaction, it is important to use human antibody for the preparation of therapeutic immunoconjugate. CM1, a human monoclonal antibody directed against mammary cancer, was linked to pingyangmycin (PYM), an antitumor antibiotic identical to bleomycin A5 currently in clinical use, employing Dextran T-40 as an intermediate agent. As determined by clonogenic assay with mammary cancer CAMA cells, the IC_{50} values for CM1-PYM conjugate and free PYM were $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Mammary cancer CAMA was transplanted sc in nude mice. Peritumoral injection of CM1-PYM conjugate at doses of $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ inhibited the growth of CAMA xenograft by 86% and 95% ($P < 0.01$), whereas the injection of equivalent doses of free PYM inhibited CAMA xenograft by 49% and 58% ($P < 0.05$), respectively. CM1-PYM conjugate showed remarkable suppression on CAMA xenograft and the inhibitory effect of CM1-PYM conjugate was much higher than that of free PYM. By histo-pathological examination, no toxic changes were found in the heart, lung, liver, intestines, kidney, spleen and bone marrow of the CM1-PYM- or PYM-treated animals. These results suggest that local administration of the immunoconjugate composed of a human monoclonal antibody and pingyangmycin is highly effective and the conjugate may be useful in therapy for human breast cancer.

Key words Human monoclonal antibody; Pingyangmycin; Immunoconjugate; Mammary cancer