

单克隆抗体与平阳霉素偶联物对肿瘤的区域性导向实验治疗

王维刚 徐琳娜 张胜华 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)

摘要 以小鼠 H22 肝癌腹腔内移植和胸腔内移植肿瘤为模型, 观察 3A5-PYM 偶联物对腔内肿瘤的治疗作用, 并以裸鼠移植结肠癌为模型, 观察局部注射的治疗作用。结果表明, 于小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤局部给药, 3A5-PYM 在肿瘤中的浓度较游离 PYM 高, 滞留时间也较长。对小鼠腹腔内或胸腔内移植的肿瘤, 腔内注射 3A5-PYM 比游离 PYM 具有更显著的延长动物生存期的作用。裸鼠皮下移植 HT-29 人结肠癌, 在肿瘤周围注射 3A5-PYM 比 iv 或 ip 给予 3A5-PYM 显示更高的抑瘤率。提示单抗与平阳霉素偶联物在肿瘤的区域性导向治疗中有较好的疗效。

关键词 单克隆抗体; 平阳霉素; 区域性导向治疗; 免疫偶联物

单抗导向药物面临的一个重要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量有限^[1]。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途径^[2,3]。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]。PYM 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^[5]。作为肿瘤化疗药物, PYM 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^[6]。PYM 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。近年来常有单抗-药物偶联物应用于腹腔肿瘤化疗的报道, 特别是应用于卵巢癌的腹腔治疗。卵巢癌常以种植性转移的方式在腹腔内进行扩散。腹腔内化疗可使药物以更高的浓度和肿瘤细胞接触, 是一种比较理想的给药途径^[7,8]。本研究以小鼠 H22 肝癌腹腔内移植和胸腔内移植肿瘤为治疗模型, 探索 3A5-PYM 偶联

物用于腔内肿瘤治疗的可行性。以裸鼠移植结肠癌为模型, 观察局部注射 3A5-PYM 的治疗作用。

材 料 与 方 法

动物 BALB/c(nu/nu)裸小鼠, 18~22 g, ♀, 6~7 周龄。购自中国医学科学院肿瘤研究所。昆明种小鼠, 18~22 g, ♀ ♂ 兼用。购于中国医学科学院实验动物中心。

细胞系 人结肠癌 HT-29 细胞和肝癌 BEL-7402 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液在含 5% CO₂ 的 37℃ 温箱中培养。

药物与试剂 3A5 单抗为本室制备, 是用入肝癌 BEL-7402 细胞免疫大鼠获得的大鼠单抗, 对人结肠癌 HT-29 细胞及小鼠肝癌 H22 也具有较强的免疫反应性, 与人正常组织无交叉反应性。平阳霉素(PYM)由本所许鸿章教授提供。丝裂霉素 C 为日本 Kyowa 公司产品。顺铂为山东德州制药厂产品。Dextran T-40: Pharmacia 公司产品; 高碘酸钠(NaIO₄)和氯代三苯基四氮唑(TTC)为北京化工厂产品; 硼氢化钠(NaBH₄)为 Fluka 公司产品。

偶联物的制备 采用以 Dextran T-40 为

本文于 1996 年 11 月 28 日收到。

国家“九五”科技攻关计划资助项目

中介体的方法制备 3A5-PYM 偶联物,按文献^[9]报道的方法进行。

免疫反应性检测 采用 ELISA 法测定 3A5-PYM 对人结肠癌 HT-29 细胞、小鼠肝癌 H22 细胞的免疫反应性^[10]。

克隆形成测定 采用克隆形成测定法观察 3A5-PYM 对 HT-29 细胞、BEL-7402 细胞的杀伤作用^[3]。

小鼠腹腔内移植肿瘤的治疗试验

(1) 3A5-PYM 对腹水瘤的治疗作用 昆明种小鼠腹腔内接种肝癌 H22 腹水 0.2 ml, 24 h 后开始 ip 3A5-PYM 或 PYM, 两个剂量组按 PYM 计分别为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每 3 d 1 次, 共 3 次。对照组注射生理盐水。观察动物存活时间, 按 ILS [Increase life span, $\text{ILS} = (T/C - 1) \times 100\%$, T: 治疗组动物生存时间, C: 对照组动物生存时间] 判断疗效。实验过程中每周测量动物体重 2 次。

(2) 3A5-PYM 对腹腔肿瘤侵袭程度的影响 肿瘤接种与给药方法同上(每组 10 只小鼠), 按 PYM 计剂量为 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 于接种后 d 12 处死动物, 剖取动物睾丸旁脂肪体, 观察有无肿瘤侵袭现象并称重, 观察病理变化。

小鼠胸腔内移植肿瘤的治疗试验 第 1 批: 昆明种小鼠胸腔内接种 H22 腹水 0.1 ml, 24 h 后开始胸腔内注射 3A5-PYM 或 PYM, 按 PYM 计剂量为 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。隔天 1 次, 共 3 次。对照组注射生理盐水。观察动物存活时间。第 2 批: 肿瘤接种与给药方法同上, 增加丝裂霉素(MMC)治疗组和顺铂(CDDP)治疗组, 采用与平阳霉素等毒性剂量($1/50 \text{ LD}_{50}$)进行比较。

肿瘤局部药物滞留浓度的观察 昆明种小鼠右腋皮下接种小鼠肝癌 H22 细胞, 7 d 后瘤旁注射 3A5-PYM 或 PYM, 按 PYM 计剂量为 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。对照组注射生理盐水。于注射后 3, 8, 24 和 48 h 各组分别处死 5 只动物, 无菌剖取肿瘤, 剪碎后装入试管, 称重。各试管加入 1 ml 生理盐水, 置于 -70°C 冰箱, 经 3 次反复冻融后取其上清液, 采用稀释法^[11]测定其

对枯草杆菌的抑菌作用。根据标准 PYM 的最小抑菌浓度(MIC)为参照计算各时间点的瘤内药物残存浓度。

裸鼠移植人结肠癌的治疗试验 将直径 2 mm 的 HT-29 人结肠癌瘤块接种于 BALB/c (nu/nu) 裸鼠右腋皮下。于肿瘤接种后 d 3 开始注射 PYM 或 3A5-PYM 偶联物。分别采用 iv, ip 及 pt(瘤结周围注射)给药法, PYM 剂量为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (3A5-PYM 偶联物用 PYM 相当剂量), 3 d 1 次, 共 7 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, HE 染色, 观察病理变化。

结 果

1 偶联物的免疫反应性

ELISA 检测结果见图 1。3A5-PYM 偶联物保持对人结肠癌 HT-29 细胞和小鼠肝癌 H22 细胞的免疫反应性, 与未偶联的 3A5 单抗的免疫反应性相当。

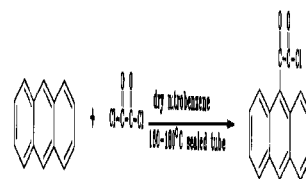


Fig 1 Immunoreactivity of McAb 3A5 and 3A5-PYM conjugates to hepatoma H22 cells determined by ELISA.

2 偶联物对靶细胞的杀伤作用

克隆形成测定的结果显示, 3A5-PYM 偶联物对人结肠癌 HT-29 和人肝癌 BEL-7402 细胞

的 IC₅₀ 分别为 0.6 和 0.02 μmol·L⁻¹。而 PYM 对两种细胞的 IC₅₀ 分别为 10.2 和 0.3

μmol·L⁻¹。3A5-PYM 偶联物对靶细胞的杀伤作用比 PYM 更强(图 2 和图 3)。

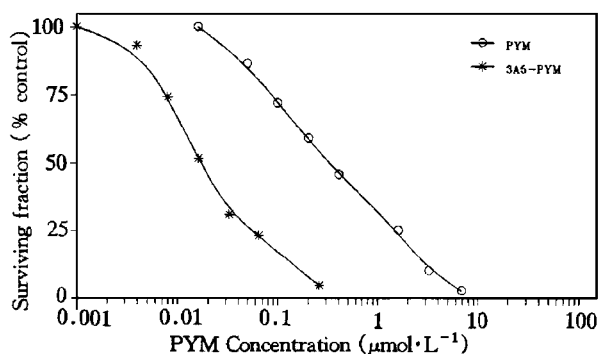


Fig 2 Cytotoxicity of PYM and 3A5-PYM conjugate to hepatoma BEL-7402 cells. Clonogenic assay, 1 h exposure.

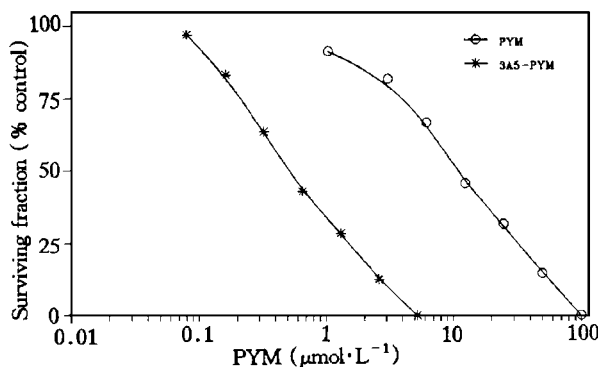


Fig 3 Cytotoxicity of PYM and 3A5-PYM conjugate to colon cancer HT-29 cells. Clonogenic assay, 1 h exposure.

3 对小鼠腹腔内移植肿瘤的治疗作用

治疗结果见表 1。在两种剂量下, 3A5-PYM 均显示出比游离 PYM 更强的治疗作用。其中 3A5-PYM(3.75 mg·kg⁻¹)组至实验结束时(60 d)尚有 5 只动物存活, 经解剖其中 4 只未发现腹腔内肿瘤及腹水。

治疗组睾丸旁脂肪体外观粗糙, 显著充血和出血, 平均重量分别为 0.277 ± 0.035 g 和 0.231 ± 0.029 g。3A5-PYM 组及正常动物组脂肪外观平滑光亮, 平均重量分别为 0.116 ± 0.027 g 和 0.131 ± 0.030 g。结果表明, 3A5-PYM 对肿瘤侵袭具有显著抑制作用(P < 0.01)。而 PYM 治疗组未见疗效。

Tab 1 Effect of 3A5-PYM conjugate on murine H22 ascites hepatoma

Drug	Dose (mg·kg ⁻¹)	Survival time (d) $\bar{x} \pm s$	ILS (%)	Long term survivor [#]
Control		15.3 ± 2.9		0/10
PYM	2.5	21.0 ± 14.6	37	0/10
3A5-PYM	2.5	38.9 ± 19.5	154*	2/10
Control		12.8 ± 3.0		0/10
PYM	3.75	17.9 ± 4.2	40	0/10
3A5-PYM	3.75	43.3 ± 19.0	238**	5/10

Drugs were administered ip on day 1, 4 and 7 (n = 10). * P < 0.05; ** P < 0.01 (3A5-PYM vs PYM).[#] Determined on day 60.

腹腔内接种的 H22 肝癌细胞通常侵袭睾丸旁的脂肪组织(脂肪体), 该脂肪体外观粗糙, 重量增加。病理组织学检查可见大量的肿瘤细胞浸润脂肪组织并有出血、坏死。因此该脂肪体的重量在一定程度上反映腹腔内移植肿瘤的侵袭情况。实验结束时 H22 对照组及 PYM

4 对小鼠胸腔内移植肿瘤的治疗作用

治疗结果见表 2。在两次实验中, 3A5-PYM 均显示出比游离 PYM 更强的治疗作用。在等毒性剂量下(1/50 LD₅₀), MMC 及顺铂治疗组未见疗效。

Tab 2 Effect of 3A5-PYM conjugate on murine H22 hepatoma transplanted into thoracic cavity

Drug	Dose (mg·kg ⁻¹)	Survival time (d) $\bar{x} \pm s$	ILS (%)	Long term survivor [#]
Control		5.2 ± 1.2		0/10
PYM	3.75	10.0 ± 6.3	92	0/10
3A5-PYM	3.75	22.2 ± 13.1	327**	1/10
Control		6.6 ± 1.4		0/10
PYM	3.75	11.0 ± 3.9	66	0/10
3A5-PYM	3.75	32.0 ± 10.5	384**	2/10
MMC	0.14	8.7 ± 2.6	32	0/10
CDDP	0.34	7.3 ± 1.8	11	0/10

Drugs were administered intrapleurally on day 1, 4 and 7 (n = 10). ** P < 0.01 (3A5-PYM vs PYM).[#] Determined on day 60.

5 肿瘤局部的药物滞留浓度

3A5-PYM 局部给药后结果见图 4。肿瘤内的 PYM 量随着时间的延长而减少, 3A5-PYM 的降低速度比 PYM 慢。给药后 24 h, 3A5-PYM 偶联物组的 PYM 浓度明显高于游离 PYM 组, 相差 4 倍以上, 说明 3A5-PYM 在肿瘤局部滞留时间较长。

6 对裸鼠移植人结肠癌的治疗作用

由图 5 可见, 实验结束时, iv 组 PYM 肿瘤

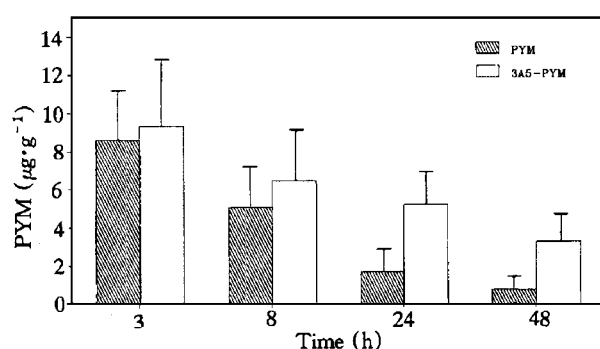


Fig 4 PYM concentration in H22 tumor after peritumoral injection of PYM or 3A5-PYM conjugate. PYM concentration was determined by TTC assay against *B. subtilis* ($n = 5$).

讨 论

单抗导向药物经区域性给药后(包括动脉灌注, 腔内给药, 瘤内或瘤旁给药), 由于其具有大分子的药代动力学性质, 使得偶联物在肿瘤部位滞留时间延长, 局部浓度高, 且减少了非肿瘤组织如网状内皮系统对导向药物的摄取, 从而具有独特的应用价值, 成为导向治疗中值得重视的给药途径。

近年来单抗导向药物在卵巢癌治疗中的应用受到广泛关注, 特别是腹腔内注射单抗偶联物可使肿瘤部位药物浓度增高, 从而提高疗效并降低毒性。Hnatowich 等报道^[7]用⁹⁰Y 标记单抗 OC125, 对 12 名卵巢癌患者经腹腔给药 (3-21 mCi ⁹⁰Y) 进行治疗, 取得一定效果, 其中一例存活 21 个月。Heal 等报道^[12]用¹³¹I 标记单抗 HMFG1, 实验证明, 经腹腔给药后, 瘤块、

抑制率为 58%, 3A5-PYM 为 79%; pt(瘤结周围给药)组 PYM 肿瘤抑制率为 73%, 3A5-PYM 为 96%, ip 组 PYM 为 52%, 3A5-PYM 为 61%(均为 $P < 0.01$)。结果显示, 与 PYM 相比, 3A5-PYM 对裸鼠移植人结肠癌 HT-29 具有更强的治疗作用。在给药途径方面, 治疗效果 $pt > iv > ip$ 。瘤结周围给药(pt)的疗效明显高于 iv 或 ip 给药。

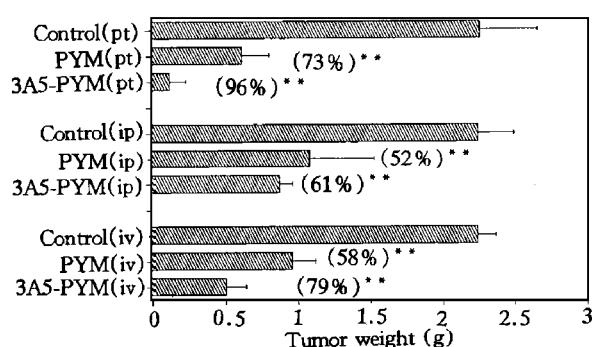


Fig 5 Inhibition by PYM and 3A5-PYM of colon cancer xenograft in nude mice ($n = 5$), ** $P < 0.01$. pt, peritumoral injection. Dose: $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Numbers in parenthesis indicate the inhibition rates on the growth of tumor.

腹水消退。临床研究显示: 6 位患卵巢癌及结肠癌的女性患者腹腔给予¹³¹I-HMFG1, 结果有 2 例存活且状况良好, 其中一例完全缓解。死亡 4 例中一例曾显示部分缓解。我们的研究结果表明, 3A5-PYM 偶联物腔内注射对小鼠腹腔及胸腔内肿瘤有显著的治疗作用, 可控制腔内肿瘤的侵袭并延长动物生存期; 而且 3A5-PYM 偶联物的疗效比游离 PYM 更强。

肿瘤局部注射单抗导向药物是引人注目的区域导向治疗新方向。已有研究证明^[13], 瘤内注射大分子导向药物可以显著提高肿瘤局部药物浓度, 并取得一定临床治疗效果。Kitamura 等^[14]在裸鼠移植结肠癌模型, 瘤内或瘤旁注射¹²⁵I 标记单抗, 在肿瘤和同侧区域淋巴结均显示高浓度与较长时间的滞留; 瘤内注射单抗与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。我们实验室的研究^[3]也发现

在裸鼠接种人乳腺癌 CAMA 的瘤旁给予抗乳腺癌人单抗 CM1-PYM 偶联物,对肿瘤生长的抑制率达 95%,高于等剂量平阳霉素(58%)。

本项研究结果显示,局部给予 3A5-PYM 可以提高肿瘤局部药物浓度,延长药物在肿瘤的滞留时间。这一结果为局部给予单抗-药物偶联物治疗相关肿瘤提供了基础。对裸鼠移植人结肠癌 HT-29 的治疗结果表明,瘤旁注射 3A5-PYM 偶联物的抑瘤率达 96%,明显高于静脉注射或腹腔内注射给药。与游离 PYM 相比,3A5-PYM 偶联物对裸鼠移植人结肠癌 HT-29 具有更强的治疗作用。

以上研究表明,单抗导向药物腔内给药对于腹腔内或胸腔内生长、侵袭的肿瘤有较强的疗效;在实体瘤局部给药对肿瘤具有更强的抑制作用。提示肿瘤区域性导向治疗具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Pimm MV, Paul MA, Ogumuyiwa Y, *et al.* Biodistribution and tumour localization of a daunomycin-mono-clonal antibody conjugate in nude mice with human tumour xenografts. *Cancer Immunol Immunother*, 1988, **27**:267
- 2 甄永苏. 抗肿瘤导向药物研究的现状与展望. 药学学报, 1994, **29**:1
- 3 王维刚, 王树惠, 薛玉川, 等. 人单克隆抗体与平阳霉素偶联物治疗乳腺癌实验研究. 药学学报, 1995, **30**:583
- 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, 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
- 6 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

- 7 Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rose PG, *et al.* Intraperitoneal therapy of ovarian cancer with yttrium-90-labeled monoclonal antibodies: preliminary observations. *Antibody Immunoconjug Radiopharm*, 1991, **4**:359
- 8 Markman M. Intraperitoneal therapy for treatment of malignant disease principally confined to the peritoneal cavity. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1993, **14**:15
- 9 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 Comm*, 1983, **115**:1009
- 10 Douillard JY, Hoffman T. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol*, 1983, **92**:168
- 11 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. 药学学报, 1991, **26**:331
- 12 Heal A, Tyson I, Greenberg H, *et al.* Pharmacokinetics, dosimetry and clinical evaluation of ¹³¹I HMFG1 MoAb in the therapy of colorectal and ovarian carcinoma. *Antibody Immunoconjug Radiopharm*, 1992, **5**:1
- 13 Takakura Y, Hashida M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995, **18**:207
- 14 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

USE OF MONOCLONAL ANTIBODY-PINYANGMYCIN CONJUGATE IN EXPERIMENTAL REGIONAL TARGETING THERAPY OF TUMOR

WG Wang, LN Xu, SH Zhang, YC Xue and YS Zhen

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

ABSTRACT McAb 3A5, a rat monoclonal antibody, was linked to pingyangmycin (PYM), an antitumor antibiotic identical to bleomycin A5 currently in clinical use, employing Dextran T-40 as an intermediate agent. The 3A5-PYM conjugate retained complete immunoreactivity of McAb 3A5. Determined by clonogenic assay with colon cancer HT-29 cells, the IC_{50} values for 3A5-PYM conjugate and free PYM were $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Hepatoma H22 ascites was transplanted into the peritoneal or thoracic cavity of mice. On the next day, 3A5-PYM or PYM, were injected into the cavity. Therapeutic effect was evaluated on the survival time of mice. For intraperitoneal tumor, the ILS(%) values were 238% for 3A5-PYM and 40% for PYM. For intrapleural tumor, the ILS(%) values were 384% for 3A5-PYM and 66% for PYM. Murine hepatoma H22 was transplanted sc into mice and 3A5-PYM conjugate or free PYM were injected peritumorally. As determined by antimicrobial assay, the administration of 3A5-PYM showed higher concentration and longer retention time in the tumor than that of free PYM. Tumor fragments of human colon cancer HT-29 were transplanted sc into nude mice. Then 3A5-PYM or PYM was injected iv, ip or pt (peritumorally) 3 days after inoculation, twice a week, with a total of 7 injections. Tumor growth inhibition was evaluated 4 weeks later. The inhibition rates on the growth of colon cancer xenografts were as follows: (1) for iv route, 58% by PYM, 79% by 3A5-PYM; (2) for ip route, 52% by PYM, 61% by 3A5-PYM; and (3) for pt route, 73% by PYM, 96% by 3A5-PYM. These results indicate that 3A5-PYM conjugate is highly effective against targeted human cancer xenograft and mouse tumor when administered peritumorally or intracavitarily.

KEY WORDS Monoclonal antibody; Pingyangmycin; Immunoconjugate; Regional targeting tumor therapy