

# 单克隆抗体—表阿霉素免疫偶合物的制备和体外活性

徐风华\* 蒋雪涛

(第二军医大学药学院药剂教研室, 上海 200433)

**摘要** 用双功能试剂己二酰肼制备胺键连接的聚谷氨酸—表阿霉素, 通过控制交联条件, 所得产物克服了大分子自身交联的缺点, 交联率较高。聚谷氨酸的载药量与分子量呈正比, 平均每 8~ 11 个谷氨酸单体连接 1 分子表阿霉素。分子量为 14 300 的聚谷氨酸做载体其载药量为 1: 11, 与单抗交联所得的偶合物 McAb: PGA: PAR 为 1: 2: 22。偶合物较好地保留了抗体活性, 体外细胞毒性较游离药物略有下降, 但表现出单抗介导的靶细胞选择性杀伤作用。本研究用胺键交联法成功地制备了药/抗比高且体外有效的免疫偶合物, 为进一步制备细胞靶向的肿瘤化疗制剂奠定了基础。

**关键词** 表阿霉素; 聚谷氨酸; 单克隆抗体; 免疫偶合物; 靶向作用

单抗是药物的良好靶向性载体, 可用于制备细胞靶向制剂。抗体导向药物包括免疫毒素、免疫核素和免疫化疗药物。由于化疗药物的疗效—剂量—毒性关系较为明确, 与单抗交联, 改变它在体内肿瘤/非瘤组织中的分配, 可以提高疗效, 降低毒副作用, 提高治疗指数。因此, 免疫化疗在肿瘤的导向治疗中具有潜力。

理想的免疫偶合物应该在贮存和体内转运过程中稳定, 到达靶部位后解离释放游离药物。因免疫偶合物的作用机理是偶合物经单抗介导与靶细胞表面抗原结合, 内化入细胞并到达溶酶体, 在溶酶体酸性条件(pH 5.0~ 5.5)<sup>[1]</sup>下释放药物发挥杀细胞作用<sup>[2]</sup>, 故对酸敏感而在中性条件下稳定的连接键有利于药物的靶向作用。阿霉素、柔红霉素通过顺乌头酸键、胺键与大分子交联就是基于此原理设计的, 在保留药物活性及作用选择性方面已初见成效<sup>[2~ 5]</sup>。本实验用聚谷氨酸/羧甲基葡聚糖的酰肼衍生物作载体, 制备胺键连接的表阿霉素免疫偶合物, 并考察偶合物识别靶细胞的特异性和细胞毒性。

## 材 料 和 方 法

**材料** 葡聚糖, MW 40 000(Dextran T-40), Pharmacia 产品。聚谷氨酸钠(polyglutamic acid, sodium salt), Sigma 产品。*N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI), Merck-Schuchardt 产品。羧甲基葡聚糖(carboxymethyl-dextran, CMD)、己二酰肼, 自制。表阿霉素(pharmorubicin, PAR), 意大利爱宝药厂。PD-10 柱(Sephadex G-25 填料), Pharmacia 产品。751G 分光光度计, 上海分析仪器厂。人肝癌细胞株 7721 细胞, 第二军医大学。人正常细胞(羊膜细胞)、抗肝癌细胞膜单克隆抗体(McAb) Hepam-1, 中国科学院上海细胞所提供。

本文于 1995 年 9 月 4 日收到。

本课题为总后医药科技“八五”攻关课题。

\* 现地址: 解放军总医院药材处药理药理学研究室, 北京 100853

方法 免疫偶合物的制备参照文献<sup>[6]</sup>方法并加以改进。对聚谷氨酸(PGA)及羧甲基葡聚糖酰肼化的条件、聚谷氨酰肼与表阿霉素的交联条件进行优化。单克隆抗体的纯化采用辛酸—硫酸铵法<sup>[7]</sup>。Brand<sup>[8]</sup>法测定抗体浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳检查抗体纯度。表阿霉素的含量根据其 495 nm 波长处  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 196$  进行测定。

偶合物中抗体活性测定采用间接免疫荧光法。7721 细胞接种于 96 孔板,待长满时弃去培养液, Hank's 液洗去残留培养基。用固定液固定细胞 20 min, 洗涤, 加一抗, 样品为: 纯化 McAb、氧化型 McAb 及 McAb-PGA-PAR, 浓度分别为 0.63, 0.46, 0.58  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。每孔加样 80  $\mu\text{l}$ , 以 5 倍比稀释 7 孔; 多抗为阳性对照, 磷酸盐缓冲液为阴性对照。4  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 d 后洗净, 加荧光标记的兔抗鼠抗体(二抗), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵 30 min, 洗去游离荧光抗体后于荧光显微镜下观察。

体外细胞毒性测定采用结晶紫染色法。7721 细胞和羊膜细胞制成悬液, 分别以  $10^4$ /孔接种于 96 孔板。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育使细胞贴壁。加样, 样品终浓度为 10, 2, 0.4, 0.08  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。孵育 36 h 后弃培养液, 结晶紫染液中染色, 加提取液溶解, 于 500 nm 处测定。样品为: 单克隆抗体(McAb)、聚谷氨酰肼(PGA-NHNH<sub>2</sub>)、聚谷氨酸—表阿霉素(PGA-PAR)、单抗—聚谷氨酸—表阿霉素(McAb-PGA-PAR)、单抗与聚谷氨酸—表阿霉素的混合物(McAb+PGA-PAR)、羧甲基葡聚糖—表阿霉素(CMD-PAR)、聚醛基葡聚糖(polyaldehyde dextran, PAD)—表阿霉素(PAD-PAR)、表阿霉素(PAR)及其与单抗的混合物(McAb+PAR)。

## 结 果 和 讨 论

载体聚谷氨酸和羧甲基葡聚糖的酰肼化程度和载药量列于表 1。

**Tab 1 Amount of hydrazide group and pharmorubicin (PAR) introduced to carriers**

Sample	Poly- <i>L</i> -glutamic acid			Poly- <i>D</i> -glutamic acid			Dex-CH <sub>2</sub> -COOH
Molecular weight	34 000	57 000	14 300	14 000	31 400	70 200	40 000
Carrier: -NHNH <sub>2</sub>	1: 47	1: 76	1: 21	1: 22	1: 51	1: 99	1: 52
1-NHNH <sub>2</sub> /X monomer	4.8	5.0	4.5	4.2	4.1	4.7	4.3
Carrier: PAR	1: 26	1: 35	1: 11	1: 10	1: 19	1: 41	1: 10
1 PAR/X monomer	8.6	10.8	8.6	9.3	10.9	11.3	22

在 EDCI 的催化作用下, 聚谷氨酸和羧甲基葡聚糖与己二酰肼反应生成酰肼衍生物。经条件优化, 所得产物平均每 4~5 个单体(谷氨酸或葡萄糖)上引入一个酰肼基, 较文献报道的交联率(每 7~10 个羧基引入一个酰肼基)高<sup>[6]</sup>。

聚谷氨酸—表阿霉素和羧甲基葡聚糖—表阿霉素复合物是药物侧链羰基与载体酰肼基缩合产生的, 属胺键连接。均匀设计实验结果(另文发表)表明表阿霉素的交联率(交联药物量/投药量)主要受 pH 值影响, 在优化条件下可达 39%。聚谷氨酸的载药量在一定范围内随 pH 值降低和表阿霉素用量增加而增加, 产物每 8~11 个谷氨酸单体含 1 分子表阿霉素。羧甲基葡聚糖的载药量比相同分子量(40 kD)聚谷氨酸的载药量低。

大分子物质的自身交联在应用同型双功能试剂(如戊二醛、己二酰肼等)制备偶合物中是较为突出的一个缺点。本实验通过控制条件, 可以获得没有大分子自身聚合的聚谷氨酰肼及聚谷氨酸—表阿霉素复合物(聚丙烯酰胺凝胶电泳证明)。

分子量为 14 300 的聚谷氨酸的载药量为 1: 11, 与单克隆抗体交联, 所得偶合物中 McAb:

PGA: PAR 为 1: 2: 22。

间接免疫荧光实验结果: 阴性对照未染色, 阳性对照染色, 且比样品荧光略强。各样品均见点状荧光染色, 稀释度越高, 染色强度越弱, 至第 6 孔可见, 第 7 孔则未见染色。纯化单抗第 1 孔染色较氧化型单抗和偶合物略强, 其余各孔 3 种样品的染色强度未见明显差异, 说明单抗在氧化和与载体—药物复合物交联后仍保留了识别靶细胞的特异性。偶合物中抗体的活性滴度同纯化的单克隆抗体和氧化型单克隆抗体一样可达到  $0.1 \times 5^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 偶合物较好地保留了原抗体的活性。

偶合物对靶细胞和非靶细胞的 36 h 毒性作用结果见表 2、表 3。可以看到:

**Tab 2 Percent inhibition of targeted cell growth by free pharmorubicin and conjugates ( $n=4$ )**

Sample	Concentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
	10	2.0	0.4	0.08	
McAb	4.3 ± 2.1	4.0 ± 3.5	2.1 ± 2.1	2.7 ± 1.8	—
PGA- NHNH <sub>2</sub>	0.4 ± 0.7	3.6 ± 2.4	6.9 ± 2.5	0 ± 1.2	—
PGA- PAR	73.2 ± 2.0	41.8 ± 3.9	15.8 ± 1.2	1.6 ± 1.8	2.76
McAb- PGA- PAR	82.3 ± 5.4	50.3 ± 4.6	14.6 ± 5.1	3.0 ± 4.0	1.86
McAb+ PGA- PAR	75.2 ± 3.7	46.3 ± 3.2	14.2 ± 5.5	2.4 ± 2.4	2.42
CMD- PAR	86.3 ± 4.0	43.9 ± 2.1	11.6 ± 2.3	1.2 ± 2.4	1.98
PAD- PAR	85.0 ± 5.8	37.8 ± 5.0	15.9 ± 5.7	2.4 ± 4.1	2.15
PAR	89.4 ± 2.5	86.9 ± 2.1	29.9 ± 7.4	4.6 ± 4.7	0.78
McAb+ PAR	93.0 ± 1.8	78.8 ± 2.6	38.1 ± 10.6	9.8 ± 0	0.68

McAb: monoclonal antibody; PGA: polyglutamic acid; PAR: pharmorubicin;  
CMD: carboxymethyl dextran; PAD: polyaldehyde dextran.

**Tab 3 Percent inhibition of non-targeted cell growth by free pharmorubicin and conjugates ( $n=4$ )**

Sample	Concentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
	10	2.0	0.4	0.08	
McAb	0 ± 1.0	0 ± 1.9	0 ± 1.0	0 ± 1.9	—
PGA- NHNH <sub>2</sub>	0 ± 1.0	1.9 ± 1.9	3.2 ± 0.5	0 ± 2.8	—
PGA- PAR	79.3 ± 2.5	23.3 ± 3.3	2.9 ± 2.6	4.2 ± 4.4	3.92
McAb- PGA- PAR	65.0 ± 1.4	21.1 ± 3.2	2.6 ± 2.1	0 ± 0.6	7.29
McAb+ PGA- PAR	68.2 ± 11.6	29.4 ± 5.2	12.7 ± 2.2	8.5 ± 3.9	4.74
CMD- PAR	74.8 ± 11.3	32.6 ± 3.6	9.0 ± 0.6	10.8 ± 0	3.48
PAD- PAR	66.8 ± 8.6	29.4 ± 1.2	12.3 ± 1.5	6.8 ± 0	5.04
PAR	100 ± 0	90.8 ± 1.2	14.8 ± 6.1	12.4 ± 2.0	0.72
McAb+ PAR	100 ± 0	99.0 ± 2.0	21.4 ± 7.3	14.1 ± 4.4	0.59

1 McAb 对肿瘤细胞的平均抑制率为 3.0%, 对正常细胞无影响。但与表阿霉素的协同作用使后者对肿瘤细胞和正常细胞的杀伤作用分别提高 12.8% 和 18.0% ( $P < 0.01$ )。

2 载体—表阿霉素及其与单抗的偶合物、混合物的细胞毒性较游离药物下降, 对靶细胞的 IC<sub>50</sub> ( $2.23 \pm 0.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 平均增加 1.9 倍, 对非靶细胞的 IC<sub>50</sub> ( $4.89 \pm 1.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 平均增加 5.8 倍。

3 偶合物对靶细胞和非靶细胞 36 h 毒性作用的比较 (IC<sub>50</sub> 比值和多因素方差分析结果) 列于表

4. 尽管载体—药物复合物及其与单抗的混合物、偶合物的细胞毒性较游离药物下降,但仍然保留了较好的细胞杀伤活性,且体外呈现出不同程度的选择性细胞毒作用。复合物对靶细胞的毒性作用高于对正常细胞的毒性作用,与它在靶细胞较酸(相对于正常细胞)环境中较易解离的性质相符(稳定性实验结果另见报道)。偶合物的靶细胞选择性毒性明显优于相应的复合物,体现了单抗的导向作用。复合物及偶合物的载药量对细胞毒性及毒性选择性的影响有待进一步研究。

**Tab 4 Comparison of the cytotoxicity of pharmorubicin and its conjugates to targeted(T) and non targeted(NT) cells**

Sample	IC <sub>50(T)</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IC <sub>50(NT)</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IC <sub>50(NT)</sub> /IC <sub>50(T)</sub>	P
PAR	0.78	0.72	0.9	0.0035
McAb+ PAR	0.68	0.59	0.9	0.0002
PAD- PAR	2.15	5.04	2.3	0.0705
CMD- PAR	1.98	3.48	1.8	0.0039
PGA- PAR	2.76	3.92	1.4	0.0021
McAb+ PGA- PAR	2.42	4.74	2.0	0.0971
McAb- PGA- PAR	1.86	7.29	3.9	0.0003

由于偶合物的载药量<sup>[9]</sup>及体内转运过程<sup>[10~12]</sup>均影响疗效,故偶合物的体内抑肿瘤活性有待于实验评价。

综上,本研究用双功能试剂己二酰肼制备胺键连接的聚谷氨酸—表阿霉素,通过控制交联条件,所得产物克服了大分子自身交联的缺点,交联率较高。单抗—聚谷氨酸—表阿霉素免疫偶合物较好地保留了药物活性和抗体活性,体外呈现了对靶细胞的选择性杀伤作用,因此,此偶合物有进一步进行体内研究的价值。所建立的制备方法,为深入研究偶合物的作用特点、寻求适于人体内应用的免疫化疗制剂奠定了基础。

### 参 考 文 献

- 1 Kaneko T, Willner D, Monkovic I *et al.* New hydrazone derivatives of adriamycin and their immunoconjugates — a correlation between acid stability and cytotoxicity. *Bioconjug Chem*, 1991, **2**: 133
- 2 Shen WC, Ryser HJP. *Cis*-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **102**: 1048
- 3 Greenfield RS, Kaneko T, Daues A *et al.* Evaluation *in vitro* of adriamycin immunoconjugate synthesized using an acid-sensitive hydrazone linker. *Cancer Res*, 1990, **50**: 6600
- 4 Braslawsky GR, Edson MA, Pearce W *et al.* Antitumor activity of adriamycin (hydrazone-linked) immunoconjugates compared with free adriamycin and specificity of tumor cell killing. *Cancer Res*, 1990, **50**: 6608
- 5 Yang HM, Reisfeld RA. Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 1189

- 6 Galun E, Shouval D, Adler R *et al.* The effect of anti- $\alpha$ -fetoprotein-adriamycin conjugate on a human hepatoma. *Hepatology*, 1990, **11**: 578
- 7 陈伯权, 吴美英, 叶群瑞. 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较. 病毒学报, 1990, **6**: 122
- 8 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248
- 9 Hurwitz E, Waron R, Bernstein A *et al.* The *in vivo* effect of chemotherapeutic drug-antibody conjugates in two murine experimental tumor systems. *Int J Cancer*, 1978, **21**: 747
- 10 Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res*, 1990, **50**(Suppl): 814
- 11 Osdol W, Fujimori K, Weinstein N. An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor nodules: consequences of a "binding site barrier". *Cancer Res*, 1991, **51**: 4776
- 12 董志伟. 肿瘤导向治疗的现状与展望. 单克隆抗体通讯, 1991, **7**(3): 5

## PREPARATION AND *IN VITRO* ACTIVITY OF MONOCLONAL ANTIBODY-PHARMORUBICIN IMMUNOCONJUGATES

FH Xu\* and XT Jiang

(Department of Pharmaceutics, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433)

**ABSTRACT** Bifunctional agent adipic dihydrate was used to form hydrazon bond between polyglutamic acid (PGA) and pharmorubicin (PAR). Under controlled condition, a relatively high rate of conjugation was obtained with no self-condensation. The value of PGA/PAR was in positive portion with the molecular weight (MW) of PGA: per 8~ 11 glutamic acid monomer linking one pharmorubicin. When PGA of MW 14 300 was used as carrier, the ratio of PGA/PAR was 1: 11. After conjugating with anti-hepatoma monoclonal antibody (McAb), an immunoconjugate of McAb: PGA: PAR being 1: 2: 22 was obtained. The immunoconjugate retained the binding activity to targeted cell compared with the purified and the oxidized antibody. Pharmacological studies *in vitro* showed lower cytotoxicity of the immunoconjugate than the free drug, but selective cytotoxicity directed by antibody was observed. Consequently, the immunoconjugate McAb-PGA-PAR with high ratio of drug/McAb as well as moderate targeting cytotoxicity *in vitro* was successfully prepared. That makes it possible for the preparation of cell-targeted drug which is expected to be beneficial to tumor treatment.

**Key words** Pharmorubicin; Polyglutamic acid; Monoclonal antibody; Immunoconjugate; Targeting cytotoxicity

---

\* Address: Division of Material and Pharmacology, General Hospital of PLA, Beijing 100853