



开发抗 CD44 抗体治疗急性髓系白血病*

张涛^{1)**} 屈浩^{2)**} 张丽艳²⁾ 张毅²⁾ 王玫¹⁾ 王冬梅²⁾

何大水²⁾ 黄丽华²⁾ 朱卫彬^{2)***} 张宇光^{1,2)***}

(¹⁾北京协和医学院中国医学科学院血液学研究所血液病医院, 天津 300020; ²⁾协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300384)

摘要 为了探讨抗 CD44 抗体对急性髓系白血病(AML)细胞增殖和分化的影响, 为肿瘤靶向药物的开发提供前提和基础. 应用流式细胞术检测抗 CD44 单克隆抗体 HI313 的亲和力, MTS 检测 HI313 是否抑制 NB4 细胞生长, 并检测细胞周期的变化, 与初筛 AML 病人标本共培养检测其促分化作用. 结果显示 HI313 抑制 NB4 细胞生长, 能使细胞周期停留在 G0/G1 期, 并能有效诱导 AML 病人血细胞的分化. 通过以上实验证明抗 CD44 抗体 HI313 对 NB4 细胞具有增殖抑制作用, 作用机制可能与阻滞细胞周期于 G0/G1 期相关, 并对 AML 病人的细胞有一定的促分化作用, 提示此抗体具有针对 AML 进行靶向治疗的潜力, 为 HI313 人抗体的进一步基因工程改造及临床应用奠定了基础.

关键词 AML, CD44 抗体, 细胞周期, 促分化, 抗体治疗

学科分类号 R392, Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00358

急性髓系白血病(AML)为常见白血病, 是一类起源于造血(或淋巴)干细胞的恶性疾病, 由于干细胞受损, 使得白血病细胞增殖、分化、成熟的能力下降, 而停滞在细胞发育的不同阶段. 未成熟细胞在体内无控制性增殖并积聚, 取代了正常骨髓, 导致正常血细胞数量减少, 骨髓功能丧失. 临床治疗急性白血病的常用手段是化疗, 对机体有严重的毒副作用^[1,2]. 现在趋向于用骨髓移植法. 目前看来这是一个可行的选择, 但需要找到人类白细胞抗原(HLA)匹配的供体. 而且对于疾病活跃期, 或继发性 AML 及难治性 AML 病人, 骨髓移植的预后较差. 人们也试图发现一些新药物来达到促进白血病细胞分化成熟的目的, 其中全反式维甲酸是最成功的例子, 可以诱导 M2b 和 M3 型 AML 细胞的分化成熟, 达到临床上的完全缓解和部分缓解, 但其作用也仅限于这两种亚型, 对其他类型的 AML 基本无用.

随着单克隆抗体技术的成熟, 应用抗体于疾病的诊断和治疗逐渐成为人们关注的热点. 抗体通过与其特定的抗原相结合, 可以携带治疗药物实现在目的细胞上的特异性富集, 或通过信号传导通路或抑制其与天然配体的结合来影响细胞的生命活动. 1999 年 Charrad 等^[3]在 Nature Medicine 首次报道 CD44 抗体治疗白血病, H90 或 A3D8 与白血病细

胞共培养可诱导白血病细胞终末分化, 拉开了 CD44 抗体治疗白血病研究的序幕. CD44 是分布极为广泛的跨膜糖蛋白, 属未分类黏附分子, 具有多种剪切体. CD44 表达于所有的 AML 母细胞上, 已被证实参与正常髓系分化及多种细胞-细胞和细胞-胞外基质的相互作用, 并且具有信号分子的功能. 这些原因使 CD44 成为一个诱导急性白血病原始细胞分化的潜在药物靶点^[4].

关于 CD44 抗体体外诱导白血病细胞的分化成熟和抑增殖作用的机理, 很多文献也都有探讨, 发现其和 c-Jun, c-myc 基因表达的下调有关, 进而影响细胞周期. 但目前为止, 其确切机制仍旧不清楚.

Song 等^[4]前期报道了抗 CD44 单克隆抗体 HI44a (IgG2a)的开发研制, 已证明能够有效诱导急性髓系白血病人 M2-M5 亚型细胞的分化及凋亡, 抑制白血病细胞系 THP-1 增殖, 并且诱导其凋亡. 本文研究的 HI313 (IgG1)是又一株拥有自主知

* 天津市科技创新专项资金, 天津市二十项自主创新产业化重大项目(08FDZDSH03000)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 022-83719876-8062

朱卫彬. E-mail: wb_zhu2001@yahoo.com.cn

张宇光. E-mail: zyg3021@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-06-24, 接受日期: 2008-08-06

识产权的, 已被 HLDAⅧ命名的 CD44 抗体^[9], 我们对其功能进行研究, 并对其作用途径进行了初步探讨, 为治疗性人源化抗体构建提供更多更好的选择机会。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

白血病细胞系 NB4、THP-1、KG1a 由协和干细胞基因工程有限公司保存。小鼠抗人 CD44 抗体 HI313 (IgG1), 小鼠同型对照抗体 7D11, 荧光素标记抗体 FITC-CD11b、FITC-CD14、FITC-CD15、FITC-CD34, PE-CD45 由协和干细胞基因工程有限公司生产。FITC 标记的羊抗鼠免疫球蛋白抗体购自 Caltag 公司。初诊 AML 病人标本来自中国医学科学院血液学研究所血液病医院。The CycleTESE™ PLUS DNA Reagent Kit 购自 Becton Dickinson 公司。CellTiter 96® AQueous 检测系统中, MTS 购自 Promega 公司, PMS 购自 Sigma 公司。

1.2 HI313 的亲合力检测

HI313 抗体纯品, 起始浓度为 10 mg/L, 经 1:2 倍比稀释, 至最低浓度 7.5 μ g/L。加入 KG1a 或 THP-1 细胞, 5×10^5 个/管, 混匀, 避光孵育 20 min, 加 PBS 洗一次后加入 FITC 标记的羊抗鼠免疫球蛋白抗体, 避光孵育 20 min, 加 PBS 洗一次, 200 μ l PBS 重悬细胞, FACS Calibur 检测, 各抗体浓度细胞的 X_{mean} 值, 以 Graph Pad Prism5 软件分析。

1.3 台盼蓝拒染法计数活细胞检测 HI313 抗体对 NB4 细胞的生长抑制

取生长良好的 NB4 细胞种于 96 孔培养板, 分为 7 组, 空白对照组、3 个不同浓度的实验组及同型对照抗体组。所有组均设 3 个平行孔。细胞为 8 000 个/ml, HI313 及同型对照抗体的 3 种终浓度为: 10 mg/L、20 mg/L 和 50 mg/L。于培养的第 3、4、5 天检测细胞生长情况。台盼蓝拒染法计数活细胞数目, 3 个平行孔计算平均值。

1.4 MTS 法检测 HI313 抗体对 NB4 细胞的生长抑制

取生长良好的 NB4 细胞种于 96 孔培养板, 分为 7 组, 空白对照组、3 个不同浓度的实验组及同型对照抗体组。所有组均设 4 个平行孔。细胞为 8 000 个/孔, HI313 及同型对照抗体的 3 种终浓度为: 10 mg/L、20 mg/L 和 50 mg/L。于培养的第

3、4、5 天检测细胞生长情况。每孔加 MTS 与 PMS 的混合物 20 μ l, 37℃ 孵育 2 h, 混匀后检测 492 nm 吸光度。

1.5 HI313 抗体对 NB4 细胞周期的影响

取生长状态良好的 NB4 细胞种于 24 孔培养板, 分为 3 组, 空白对照组、同型对照抗体组和 HI313 实验组。细胞为 8 000 个/孔, 同型对照抗体和 HI313 抗体的终浓度均为 50 mg/L。于培养的第 3、4、5 天, 使用 The CycleTESE™ PLUS DNA Reagent Kit 检测细胞周期状况。操作按照说明书进行, 简略如下: 1 000 r/min 离心 NB4 细胞 6 min, 吸出上清; 加 125 μ l 的 Solution A (Trypsin) 轻轻混匀, 反应 10 min; 继续加 Solution B (RNase) 轻轻混匀, 反应 10 min; 继续加 Solution C (PI), 轻轻混匀, 反应 10 min, PBS 洗一次, 200 μ l PBS 重悬, FACS Calibur 进行检测。

1.6 HI313 抗体诱导 AML 原始细胞的分化

Ficoll 液分离急性髓系白血病病人原始细胞, 用含 20% FBS 的 RPMI1640 培养液调至 1×10^6 /ml, 种于 24 孔板, 2 ml/孔。分为 3 组: 实验组, 加入 HI313 抗体, 终浓度为 20 mg/L; 空白对照组, PBS; 同型对照抗体组, 加入终浓度为 20 mg/L 的 IgG1 同型对照。于培养的第 3、5、7 天, 收集细胞, 每管加入 PE-CD45 抗体用于设门, 并加入 FITC-CD11b, 或 FITC-CD14 或 FITC-CD15, 闭光孵育 20 min, 加 PBS 洗一次, 200 μ l PBS 重悬细胞, FACS Calibur 检测细胞表面 CD11b、CD14、CD15 的表达。

2 结 果

2.1 HI313 的亲合力

THP-1 和 KG1a 均表达 CD44 抗原, 可以与 HI313 抗体结合。经 PE 标记的 CD44 抗体检测, THP-1 和 KG1a 的 CD44 阳性率分别为 42.22% 和 97.09% (结果未显示), 是两株 CD44 表达水平差异较大的细胞系。根据这两株细胞系与不同浓度的 HI313 反应测得的平均荧光强度, Graphpad 作图, 可以得到 IC_{50} , 代表 HI313 抗体的相对亲合力。THP-1 和 KG1a 的相对亲合力分别为 0.180 2 mg/L 和 0.200 7 mg/L, 相当于标准浓度单位 1.2 nmol/L 和 1.34 nmol/L (图 1)。在平行实验中测得 HI44a 对应这两种细胞的相对亲合力分别为 0.525 1 mg/L 和 0.883 3 mg/L, 相当于标准浓度单位 5.89 nmol/L 和 3.5 nmol/L (结果未显示)。

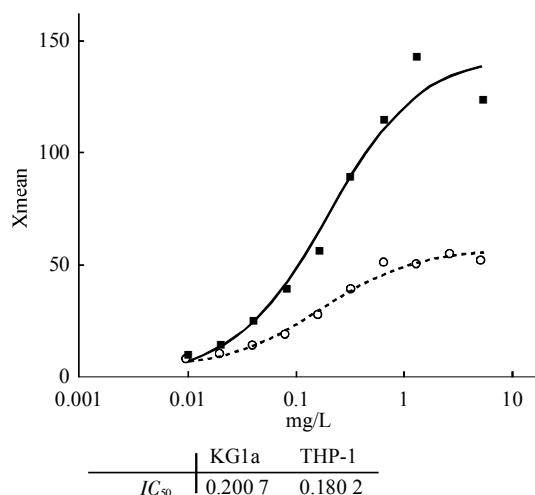


Fig. 1 Affinity of HI313 antibody detected with KG1a and THP-1

KG1a and THP-1 cells were incubated with HI313 antibody, the concentration from 10 mg/L to 0.007 5 mg/L, and detected with FITC-goat anti-mouse IgG. Flow cytometric analysis to get the X mean of each HI313 concentration. All data were analyzed using Graphpad PRISM 3.0. ■—■: KG1a; ○—○: THP-1.

2.2 HI313 对 NB4 细胞增殖的影响

NB4 细胞与 HI313 抗体、同型对照抗体、PBS, 共培养后, 于第 3、4、5 天, 以台盼蓝拒染法计数活细胞数目, 双样本等方差 t 检验统计分析. 从第 4 天开始至第 5 天, HI313 实验组的活细胞数目较对照组均有显著差异 ($P < 0.05$), 且减少程度和浓度正相关(图 2).

NB4 细胞与 HI313 抗体, 同型对照抗体, PBS 共培养后, 以 MTS 方法检测细胞增殖变化.

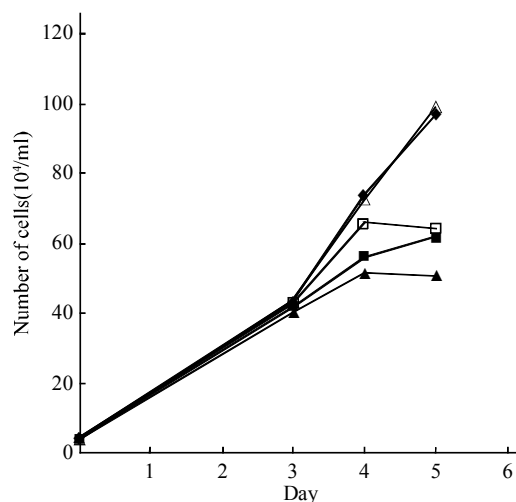


Fig. 2 Cells were treated with different concentration HI313

IgG and PBS for 3~6 days, then used trypan blue exclusion to measure the effect of HI313 inhibiting the NB4 cells proliferation $\bar{x} \pm s$. □—□: HI313, 10 mg/L; ■—■: HI313, 20 mg/L; ▲—▲: HI313, 50 mg/L; ◆—◆: isotypic antibody, 50 mg/L; △—△: PBS.

应用双样本等方差 t 检验方法分析 HI313 抑制 NB4 细胞增殖作用的结果数据.

比较第 3、4、5 天的 A_{492} , HI313 作用组与对照组之间均有明显差异 ($P < 0.05$). 且随时间和浓度增加, P 值均逐渐减小, 显示 HI313 作用效果增大(图 3).

比较不同实验中 HI313 各浓度组之间的抑制率, 随时间增加其差异逐渐减小. 第 3 天, 50 mg/L 组作用明显强于 10 mg/L 和 20 mg/L 组 ($P < 0.05$). 至第 5 天, 3 个浓度组间差别消失 ($P > 0.1$)(图 4).

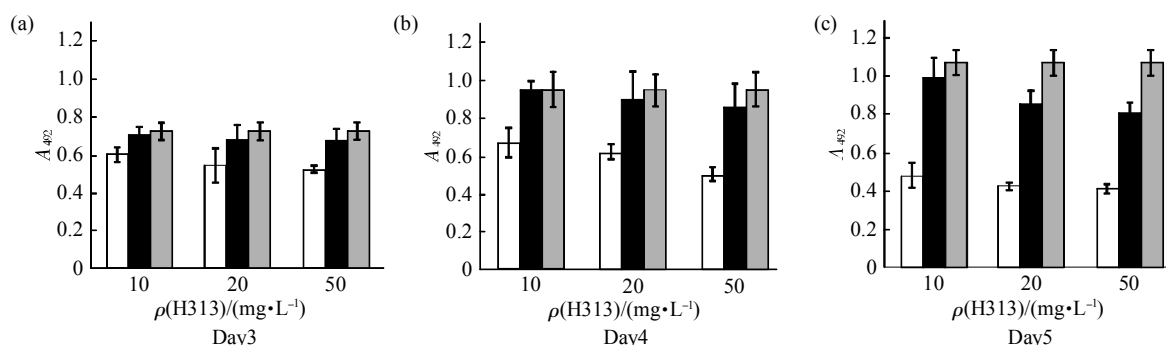


Fig. 3 HI313 antibody inhibits proliferation of NB4 cell line

A total of 8 000/well cells were seeded into 96-well plates and incubated in tetraplicate in the presence of different concentrations of HI313 antibody, isotypic control or PBS. At the indicated times, the proliferation of cells were detected with MTS assay. Absorbance were read at 492 nm. These data are representative of results of three independent experiments. □: HI313; ■: Isotypic control; ▒: PBS.

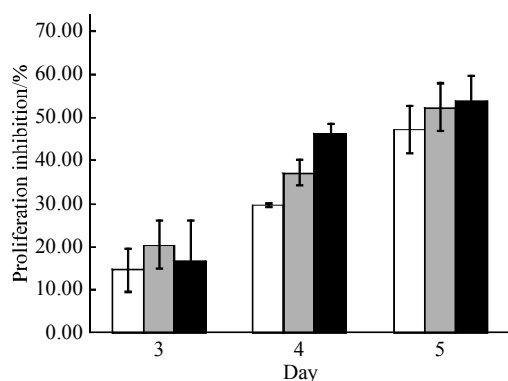


Fig. 4 The inhibiting rate of different concentrations of HI313

Inhibition of proliferation by HI313 antibody was evaluated at each concentration and at different time. Inhibition of proliferation was calculated as $(A_{\text{control group}} - A_{\text{treated group}}) / A_{\text{control group}} \times 100\%$. These data are representative of results of four independent experiments. □: 10 mg/L of HI313; ▒: 20 mg/L of HI313; ■: 50 mg/L of HI313.

同时我们也使用相同浓度的 HI44a 进行了平行实验, 结果显示, 最大浓度组(50 mg/L)的对 NB4 细胞生长的抑制率均不超过 25%(结果未显示).

2.3 HI313 对 NB4 细胞周期分布影响

NB4 细胞与 50 mg/L HI313, 或同型对照抗体, 共培养 3、5 天后, 检测 NB4 细胞周期(图 5), 显示, HI313 组处于 G0/G1 期的细胞数明显多于对照组, 第 3、4、5 天 HI313 组停滞于 G0/G1 期的细胞数分别比同时间对照组多 12.99%、21.77%、96.75%, S 期的值降低(图 6).

2.4 HI313 抗体诱导 AML 原始细胞的分化

截至目前, 我们共得到了 6 例 AML 病人的原始细胞标本, 在与 HI313(20 mg/L)或 HI44a(40 mg/L)共培养后, 检测其表面的髓系成熟标志. 其中 3 个病例, 检测了 72、120、168 h 3 个时间点. 另外 1 例检测了 72、120 h, 1 例只检测了 72 h, 还有 1

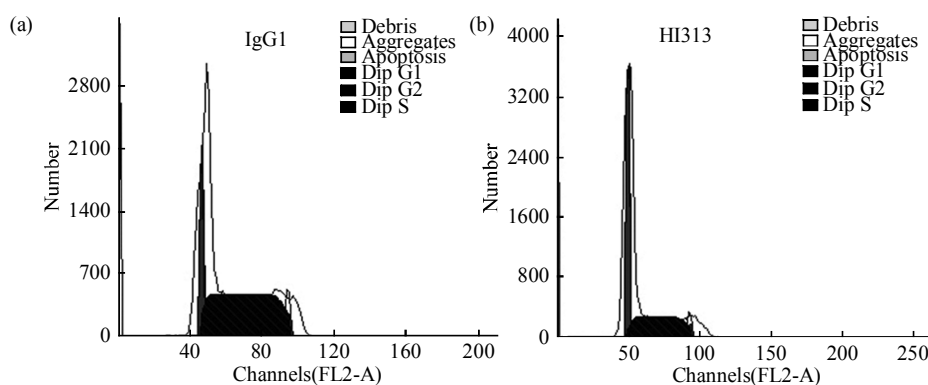


Fig. 5 Cell cycle analysis by flow cytometry and ModFit software

NB4 cells were treated with HI313, IgG1 or PBS for 5 days, and cell cycling was analyzed by flow cytometry and ModFit software.

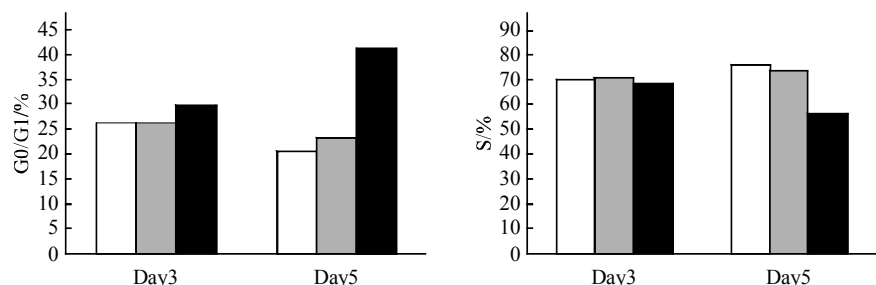


Fig. 6 Percentage of cells at G0/G1 phase and S phase after co-cultured with HI313 antibody, isotypic antibody and PBS

NB4 cells were treated with 50 mg/L of HI313 antibody(□), isotypic antibody(▒) or PBS(■). At day 3 and 5, cells were stained with the CycleTESE™ PLUS DNA reagent kit and analyzed by flow cytometry. Percentage of G0/G1 phase and S phase were provided by ModFit software.

例只检测 120 h. 结果显示, HI313 抗体在 20 mg/L 的浓度, 在体外培养条件下, 可以不同程度地促进 AML 原始细胞的分化成熟, 表现为细胞表面的髓

系成熟标志表达量增加. 但对于不同病例, 其结果存在差异. CD11b 一般均有不同程度的增加, 有些病例 CD14 表达增加, 有些病例 CD15 表达增

加. 在同一病例中, CD14 和 CD15 未见同步增加. HI44a 的情况与 HI313 大体一致. 6 例病人 HI313 组和对照组测得的 CD11b、CD14 和 CD15 的阳性率, 结果见表 1. 与对照组比较, HI313 抗

体组 CD11b、CD14 和 CD15 的阳性率变化见图 7. HI44a 组和对照组测得的 CD11b、CD14 和 CD15 的阳性率, 结果见表 2. 与对照组比较, HI44a 抗体组 CD11b、CD14 和 CD15 的阳性率变化见图 8.

Table 1 Change of the mature marker of AML primary cells after co-cultured with 20 mg/L HI313 or isotypic control

			CD11b/%	CD14/%	CD15/%
P1	day 3	HI313	2.28	0.69	28.64
		IgG1	2.89	0.49	33.98
	day 5	HI313	23.96	0.36	45.91
		IgG1	6.56	0.44	40.94
	day 7	HI313	25.49	0.85	77.46
		IgG1	5.07	0.36	69.57
P2	day 3	HI313	6.89	3.55	22.13
		IgG1	7.84	3.40	23.25
	day 5	HI313	5.61	4.17	45.79
		IgG1	4.18	2.35	31.89
	day 7	HI313	7.57	9.82	45.51
		IgG1	4.58	9.87	42.83
P3	day 3	HI313	20.70	11.85	73.82
		IgG1	12.62	7.24	58.25
	day 5	HI313	60.73	60.73	60.73
		IgG1	23.16	4.5	88.96
	day 7	HI313	44.12	47.12	44.88
		IgG1	10.71	3.04	65.66
P4	day 3	HI313	5.02	12.01	79.88
		IgG1	5.57	10.79	77.60
	day 5	HI313	4.80	25.80	69.98
		IgG1	2.03	20.20	66.58
P5	day 3	HI313	7.61	5.89	21.19
		IgG1	7.41	4.01	17.96
P6	day 5	HI313	6.13	1.01	7.33
		IgG1	2.18	0.93	11.79

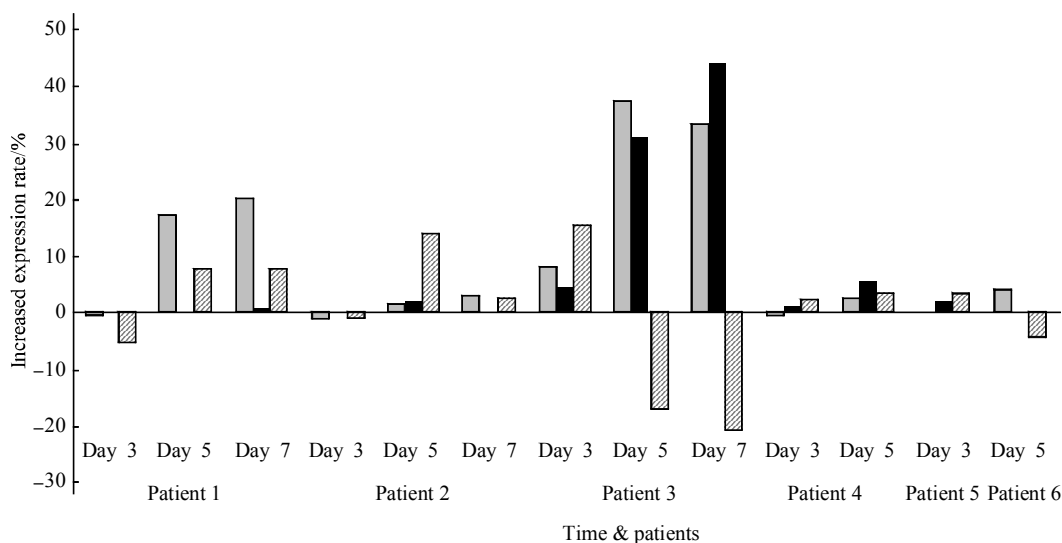


Fig. 7 Increased expression rate of mature markers of AML primary cells after co-culture with 20 mg/L HI313

PBMC of AML patient were isolated with Ficol and co-cultured with HI313, isotypic antibody and PBS. After 3, 5 and 7 days, cells were incubated with PE-CD45 and FITC-CD11b, CD14 and CD15. The expression of CD11b, CD14 and CD15 on CD45 gated cells were measured by flow cytometry. Increased expression rate (%) = percentage of CD11b (gray bar) or CD14 (black bar), or CD15 (stripped bar) expression - percentage of isotypic control.

Table 2 Change of the mature marker of AML primary cells after co-cultured with 20 mg/L HI44a or isotypic control

			CD11b/%	CD14/%	CD15/%
P1	day 3	HI44a	1.51	0.32	26.88
		IgG2a	1.63	0.39	25.90
	day 5	HI44a	6.89	2.02	68.38
		IgG2a	9.53	1.73	60.37
	day 7	HI44a	15.36	2.78	83.49
		IgG2a	13.34	2.21	83.98
P2	day 3	HI44a	6.30	3.61	31.56
		IgG2a	7.39	2.89	21.67
	day 5	HI44a	6.62	3.77	38.81
		IgG2a	7.63	3.25	42.28
	day 7	HI44a	11.89	10.41	64.14
		IgG2a	12.60	10.15	55.87
P3	day 3	HI44a	21.88	14.79	78.84
		IgG2a	10.29	8.26	59.58
	day 5	HI44a	39.81	12.62	90.84
		IgG2a	27.52	5.42	92.14
	day 7	HI44a	14.26	4.33	68.43
		IgG2a	9.35	1.56	70.96
P4	day 3	HI44a	5.72	10.34	79.74
		IgG2a	5.79	8.12	68.60
	day 5	HI44a	3.39	21.83	62.04
		IgG2a	3.98	12.42	49.56
P5	day 3	HI44a	6.48	4.80	26.21
		IgG2a	6.38	3.79	19.12
P6	day 5	HI44a	2.06	0.99	11.57
		IgG2a	1.93	1.19	9.88

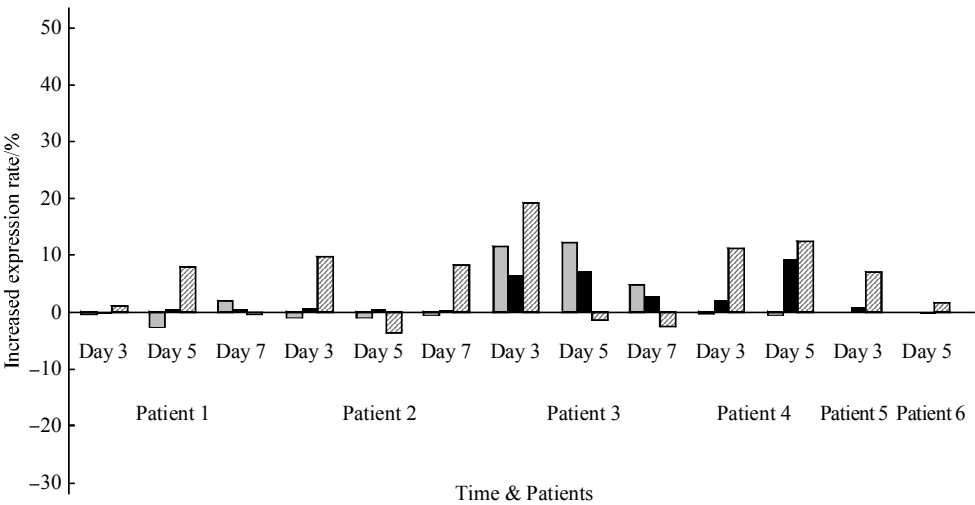


Fig. 8 Increased expression rate of mature markers of AML primary cells after co-culture with 20 mg/L HI44a
PBMC of AML patient were isolated with Ficol and co-cultured with HI44a, isotypic antibody and PBS. After 3, 5 and 7 days, cells were incubated with PE-CD45 and FITC-CD11b, CD14 and CD15. The expression of CD11b, CD14 and CD15 on CD45 gated cells were measured by flow cytometry. Increased expression rate(%) = percentage of CD11b(gray bar) or CD14(black bar), or CD15(stripped bar) expression -percentage of isotypic control.

3 讨 论

基因工程抗体药物越来越成为研究的热点，人们相信它必将成为治疗肿瘤等恶性疾病的有力武器。特别是那些自身具备生物学功能，可以利用生物体本身的机制来达到抑制肿瘤细胞生长，促进其分化成熟或凋亡的抗体药物靶点，因其具有副作用

小、特异性高等特点，更是成为热点中的热点。人 CD44 抗原是兼具黏附作用和信号传导作用的分子，是一个潜在的优秀药物作用靶点^[7]。我们研制的 HI44a 和 HI313 是两株小鼠抗人 CD44 单克隆抗体。2005 年，对于 HI44a 抗体的研究已有报道^[9]。
本项目对 HI313 抗体进行了系统的研究，首先从其亲和力入手，通过两株 CD44 表达水平差异较

大的细胞系, THP-1 和 KG1a, 进行平行实验, 得到了相似的结果, HI313 的相对亲和力水平为 1.2~1.34 nmol/L. 我们同时应用 HI44a 也进行了实验, 相对亲和力水平是 3.5~5.89 nmol/L. 证明 HI313 是一株具有相当高亲和力的抗体, 明显超过了我们前期报道的 HI44a. 这是后续进行基因工程改造、开发抗体药物的重要基础.

2002 年在 Blood 杂志上报道了两株抗 CD44 抗体的研究工作. 这两株抗体——H90 和 A3D8, 可诱导白血病细胞系 THP-1、NB4、HL60 的终末分化, 并抑制其增殖. 同时还发现, 抗体与全反式维甲酸共同使用, 可逆转 KG1a 细胞的分化阻滞, 而抗体 A3D8 还能诱导 NB4 及新鲜采集 M3 细胞凋亡^[6]. 其机制主要是抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物 P27Kip-1 的降解, 阻滞 AML 周期运转, 达到抑制 AML 原始细胞的增殖^[7]. 本次研究证实了我们研发的 HI313 抗体同样具有体外抑制白血病细胞系 NB4 增殖的能力. 其抑制作用与时间正相关, 在第 5 天抑制率达到了 60%. 而在同一实验中, 对照组 HI44a 对 NB4 的抑增殖作用约为 25% (结果未显示). 并初步证实了 HI313 对于 NB4 细胞的生长抑制作用和 G0/G1 期阻滞相关. 通过比较实验组和对照组 G0/G1 期所占比率可以看出, HI313 抗体的阻滞作用随时间增加愈加明显, 至第 5 天达到最大值, HI313 实验组的 G0/G1 期细胞所占比例接近对照组的 2 倍. 这一结果与 MTS 检测细胞系生长状况的结果非常吻合.

我们随机采集了 6 例 AML 初诊病例, 于体外检测 HI313 对 AML 原始细胞的促分化作用. 结果表明, HI313 对于 AML 病人标本具有促分化成熟作用. 值得注意的是, 同一病例 CD11b、CD14 和 CD15 这三个髓系细胞成熟的标志抗原并不总是同步变化, 或者不同病例间 HI313 实验组与同型对照组的最大差异及其出现时间较为多样. 这样的结果的可能解释是, AML 本身就是一种异质性的血细胞分化阻滞, 病态增生的疾病. 不同亚型, 甚至临床分类中的相同亚型, 其细胞组成都不尽相同. AML 原始细胞因其来源和所处阶段的不同可以向粒系或单核系两个方向分化, CD11b 为髓系细胞共同的成熟标志, 但 CD14 和 CD15 分别代表单核系和粒系的特征. 结果显示, 6 例病人的 AML 原始细胞经 HI313 处理后, CD11b 的表达较对照组均有所增加, 且基本上是随时间延长表达也随之增加, 说明 HI313 抗体处理后, AML 细胞均有向成

熟分化的趋势. 对于 CD14 和 CD15, 其变化在不同病例中情况不同. 在 HI313 抗体处理后, 有些病例的 AML 细胞(如病例 3), CD14 的表达增加, 可能说明抗体对诱导细胞向单核系分化. 有些病例(如病例 1、2)CD15 的表达增加, 可能说明抗体诱导细胞向粒系分化. 在同一病例中, CD14 和 CD15 的变化一般相反, 可能是因为抗体一旦诱导白血病细胞向单核系分化发展, 就不再向粒系分化, 反之亦然. 通过这 6 例病例实验, 无论是从成熟标志的表达阳性率还是其平均荧光强度(结果未列出)来看, HI313 均可以不同程度地增加 AML 原始细胞的成熟程度, 其结果趋势与我们先期报道的 HI44a 基本一致. 在本次实验中也使用 HI44a 进行了平行实验, 结果显示, 在 40 mg/L 时, HI44a 也可以诱导这 6 例病人的白血病原代细胞成熟分化, 但促分化效果均小于 20 mg/L 的 HI313.

白血病难以治愈的另一个主要原因是由于存在只占 0.01%~4% 的白血病干细胞. 白血病干细胞具有极强的自我更新能力, 而其分裂处于缓慢甚至是静息状态, 这使得针对快速分裂细胞的化疗药物对肿瘤干细胞难有作为. 寻找与自我更新相关的细胞表面标志物应该是研制针对肿瘤干细胞药物的重点方向. 目前已知, 干细胞的自我更新需要特定的微环境, 其一系列的迁移定位活动都离不开细胞与胞外基质的相互作用^[10~12]. CD44 是细胞表面的一种重要黏附分子, 参与很多细胞-胞外基质的相互作用. 研究发现一株抗 CD44 抗体 H90 可彻底治愈 AML 连续移植的 NOD-SCID 小鼠, 解决了经常发生的复发病病人难以治愈的情况. 在此过程中发现, 抗体除了抑制 AML 白血病细胞增殖外, 更为重要的是发现抗体可改变肿瘤干细胞途径阻止其归巢^[13], 并且对正常的干细胞没有影响^[7]. HI313 作为同是针对 CD44 的抗体, 在体外抑制细胞增殖, 促 AML 原始细胞分化成熟等方面与 H90、A3D8 和 HI44a 具有类似的作用, 我们完全有理由相信, 在选择性清除白血病干细胞, 阻止其归巢的方面, HI313 也应该具有类似的功能. 这方面的实验需要在小鼠体内完成, 这也是我们以后的重点研究方向.

综上所述, 由于 CD44 分子本身的生物学功能特性, 决定了其可能成为一个治疗急性髓系白血病的优秀药物靶点, HI313 是一株具有高亲和力的小鼠抗人 CD44 抗体, 通过实验, 我们已经证明, 它具有体外抑制白血病细胞系增殖、促进 AML 原始

细胞分化成熟的功能, 也证实了其抑增殖促分化是通过调控细胞周期来实现的. 而且通过初步的 AML 病人标本的研究, 证实其对白血病细胞的促分化作用. 在此基础上, 我们将进一步深入、细化地研究 HI313 抗体对于白血病治疗方面的可能途径和机制, 同时也将展开对 HI313 的基因工程改造来制备可行的治疗性抗体.

参 考 文 献

- 1 Reff M E, Hariharan K, Braslawsky G. Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control*, 2002, **9**(2): 152~166
- 2 Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, **414**(6859): 105~111
- 3 Charrad R S, Li Y, Delpech B, *et al.* Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 1999, **5**(6): 6692~6761
- 4 Ponta H, Sherman L, Herrlich P A. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Oncogene*, 2003, **4**(1): 33~45
- 5 Song G L, Liao X L, Zhou L, *et al.* HI44a, an anti CD44 monoclonal antibody, induces differentiation and apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 2004, **28**(10): 10892~10961
- 6 Swart B, Mikhail P S, Matthew P W, *et al.* The HLDA8 blind panel: findings and conclusions. *J Immun Meth*, **305** (2005): 75~83
- 7 Bairey O, Zimra Y, Rabizadeh E, *et al.* Expression of adhesion molecules on leukemic B cells from chronic lymphocytic leukemia patients with predominantly splenic manifestations. *Isr Med Assoc J*. 2004, **6**(3): 147~151
- 8 Charrad R S, Gadhoun Z, Q I J, *et al.* Effects of anti- CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood*, 2002, **99** (1): 2902~2991
- 9 Gadhoun Z, Leibov I M P, Q I J, *et al.* CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell p proliferation *via*. *Blood*, 2004, **103** (3): 1059~1068
- 10 LH. Neaves W B. Nonnal stem cells and cancer stem cells. *The Niche Matters Cancer Res*, 2006, **66**(9): 4553~4557
- 11 Michael F, Clarke, John E, *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006, **66**(19): 9339~9344
- 12 Song L L, Miele L. Cancer stem cells: an old idea that's new again: implications for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, **7**: 431~438
- 13 Jin L Q, Hope K J, Zhai Q L, *et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemia stem cells. *Nature Medicine*, 2006, **12**(24): 1167~1174

Development of Anti-CD44 Therapeutic Antibody for Acute Myeloid Leukemia*

ZHANG Tao^{1)**}, QU Hao^{2)**}, ZHANG Li-Yan²⁾, ZHANG Yi²⁾, WANG Mei¹⁾, WANG Dong-Mei²⁾,
HE Da-Shui²⁾, HUANG Li-Hua²⁾, ZHU Wei-Bin^{2)***}, ZHANG Yu-Guang^{1,2)***}

⁽¹⁾Institute of Hematology & Hospital of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

⁽²⁾Union Stem Cell & Gene Engineering Company Limited, Tianjin 300384, China)

Abstract An anti-CD44 monoclonal antibody, HI313, as a potential tool to treat Acute Myeloid Leukemia (AML) have been developed. The binding affinity of HI313 was measured by flow cytometry; suppression of NB4 cell line proliferation induced by HI313 was measured by MTS; effects of HI313 on cell cycle were assessed by flow cytometry; AML cell differentiation was assessed by detecting cell surface markers CD11b, CD14 and CD15. The results show that anti-CD44 antibody HI313 has relative high affinity to cells both high and low expression of CD44 and effectively suppressed the proliferation of NB4 cell line through blocking of cell cycle progress at G0/G1 phase. Furthermore, HI313 antibody can induce differentiation of cancer cells from AML patients. In conclusion, CD44 is a valid target for AML treatment and HI313 monoclonal antibody is a good candidate for therapeutic antibody development.

Key words AML, CD44 antibody, cell cycle, differentiation, antibody therapy

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00358

*This work was supported by grant from Tianjin Technology Innovative Special Fund, Tianjin 20 Independent Innovation & Industrialization Key Projects (08FDZDSH03000).

**QU Hao and ZHANG Tao contributed equally to this work.

***Corresponding authors. Tel: 86-22-83719876-8062

ZHU Wei-Bin. E-mail: wb_zhu2001@yahoo.com

ZHANG Yu-Guang. E-mail: zyg3021@yahoo.com.cn

Received: June 24, 2008 Accepted: August 6, 2008