

丝裂霉素 C 的免疫结合物对胃癌的导向治疗作用¹

R 979.1

陈陵际, 张素胤, 张家骥, 张周 (中科院上海药物研究所, 上海200031, 中国)

黎松, 陈敏, 张学庸, 陈希陶 (第四军医大学西京医院, 西安700032, 中国)

Effect of targeting treatment of mitomycin C immun-conjugate on stomach neoplasm¹

KEY WORDS monoclonal antibodies; mitomycin C; immunologic cytotoxicity; stomach neoplasms; recombinant interferon alfa; neoplasm antigens; nude mice; subrenal capsule assay

CHEN Ling-Ji, ZHANG Su-Yin, ZHANG Jia-Liu, ZHANG Zhou (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China) LI Song, CHEN Min, ZHANG Xue-Yong, CHEN Xi-Tao (Laboratory of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

A 摘要 用葡聚糖 T-70 作中介, 制成鼠抗人胃癌单克隆抗体 MGb₂-丝裂霉素 C 结合物。该结合物的体外试验显示对靶细胞具选择杀伤作用, 体内实验治疗结果表明, 该结合物组的肿瘤抑制率明显地高于丝裂霉素 C 组, 当 α-重组人干扰素与免疫结合物合并治疗时, α-重组人干扰素对免疫结合物具有增效作用。

ABSTRACT An anti-gastric cancer monoclonal antibody MGb₂-mitomycin C conjugate via dextran T-70 as intermediate (MGb₂-PAD-MMC) was produced, and 28-30 μg molecules of MMC were introduced into 1 g molecule of MGb₂. Ninety-six hours after ip of ¹²⁵I-MGb₂-PAD-MMC (1.48 MBq/22 μg MGb₂ per mouse) to nude mice bearing human gastric cancer SGC-7901, the tumor tissue:blood (T/NT) radioactivity ratio was 2.6, very much higher than that of the control ¹²⁵I-normal IgG-PAD-MMC group (T/NT = 0.20). Single photo computed tomography imaging confirmed the results of biodistribution study. MGb₂-PAD-MMC exhibited selective killing action on the SGC-7901 cells in vitro, which was considered to be mediated by monoclonal antibody MGb₂. Nude mice inoculated with SGC-7901 xenograft in bilateral subrenal capsule were treated by MMC (ip), human recombinant interferon-α (Hu-IFN-α im), MGb₂-PAD-MMC (ip) and MGb₂-PAD-MMC + Hu-IFN-α daily for 5 d beginning 4 h after inoculation. The efficacy of the reagents estimated by the reduction of tumor size and calculated by T/C (%), was 28.3%, 16.4%, 47.8%, and 83.1%, respectively. These results demonstrated that the antitumor effect of MGb₂-PAD-MMC was superior to free MMC, and that the Hu-IFN-α might further enhance the action of MGb₂-PAD-MMC.

关键词 单克隆抗体; 丝裂霉素 C; 免疫细胞毒性; 胃肿瘤; 重组干扰素 α; 肿瘤抗原; 裸小鼠; 肾包膜下检定

抗肿瘤药物导向治疗是抗癌药物和与肿瘤组织有高度亲和力的单克隆抗体交联的结合物, 选择性地浓聚于肿瘤组织, 发挥特异性杀伤作用, 以达到提高疗效的目的。国内外已有关于免疫药物结合物的体内实验研究成功报道^[1,2]。本文报道以抗人胃癌单抗 MGb₂ 通过多醛基葡聚糖 T-70 中介, 与丝裂霉素 C 连接, 观察该免疫药物结合物对人胃癌裸小鼠移植瘤 SGC-7901 抑制作用, 探讨 α-重组人干扰素对该免疫药物结合物体内实验治疗的增强作用。

MATERIALS AND METHODS

抗人胃癌单抗 MGb₂ 为鼠抗人胃癌单克隆抗体 IgG1 亚型^[3], 由第四军医大学西京医院提供。丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 为日本协和发酵工业株式会社生产。α-重组人干扰素 (即 human recombinant interferon-α, Hu-IFN-α) 由第二军医大学生物技术研究所提供, 效价为 1 MIU·ml⁻¹。

免疫结合物制备^[1,2] 葡聚糖 T-70 (MW7 万) 溶于水, 加高碘酸钠避光反应过夜, 氧化为多醛基葡聚糖

Received 1992-01-30

Accepted 1993-04-24

¹ Project supported by the Youth Science Foundation of Shanghai, No 89(YB)05101.

(PAD), 冻干后4℃保存。将PAD与MGB₂在4℃反应20 h后, 再加入MMC, 于4℃反应20 h, 反应混合物再经硼氢化钠在4℃还原2 h, 4000 × g 离心后经sephadex G-50柱层析, 收集首峰。依此方法以非特异性单抗(NIgG)代替MGB₂, 制备非特异性结合物。结合物中MMC含量根据其在363 nm的克分子消光系数为23 000计算, 抗体浓度采用Bradford蛋白定量法^[4]测定。

结合物中MGB₂活性测定 用ELISA^[5]方法, 胃癌细胞SGC-7901加入40孔培养板中(1×10⁵/孔), 待细胞充分附壁生长后, 加入0.25%戊二醛, 在37℃作用10 min, 用磷酸缓冲液(PBS)洗去戊二醛后, 加入不同稀释度的结合物和游离MGB₂, 37℃温育1 h, 用PBS冲洗, 加入兔抗鼠酶标抗体, 37℃温育1 h, 再用PBS冲洗, 加底物, 测absorbance, A。

裸小鼠 远交Swiss或近交BALB/CA裸小鼠, 由中国科学院上海药物研究所提供。鼠龄为6-7 wk, 饲养条件和实验条件同前文^[2]报道。

人胃癌裸小鼠移植瘤SGC-7901^[6] SGC-7901系未分化型胃腺癌, 潜伏期3-4 d, 皮下接种后2 wk, 瘤径可达1 cm。

免疫药物结合物对肿瘤靶细胞和非靶细胞的杀伤试验 人喉癌细胞Hep I为非靶细胞, 人胃癌细胞SGC-7901为靶细胞。将细胞加至96孔培养板, 每孔0.1 ml, 1×10⁴ cell, 同时加入不同药物浓度的MGB₂-PAD-MMC, MMC及NIgG-PAD-MMC, 每孔0.1 ml, 每一浓度有3个平型孔, 于37℃CO₂培养箱内孵育48 h。加噻唑蓝PBS溶液(5 mg·ml⁻¹), 每孔20 μl, 37℃反应4 h, 弃培养液及未反应的噻唑蓝, 每孔加入0.1 ml二甲基亚砜, 测A₄₉₅值, 取平均值, 计算杀伤率。

免疫结合物的体内定位及分布 BALB/CA裸小鼠8只, 皮下荷人胃癌SGC-7901移植瘤, 瘤径均约为1 cm, 随机分为二组, 4只ip ¹²⁵I-MGB₂-PAD-MMC, 每只1.48 MBq/22 μg 蛋白, 4只ip ¹²⁵I-NIgG-PAD-MMC (1.48 MBq/22 μg 蛋白), 于96 h进行单光子发射型计算机断层仪(single photo emission computed tomography, SPECT)显像后活杀, 取瘤组织, 全血及各组织器官, 称重测dpm值, 计算肿瘤、全血及各组织器官的放射性比度(dpm/kg), 并计算T/NT比值。

接种方法及联合治疗试验 以肾包膜下接种移植瘤的方法^[2]进行药敏试验。MMC及MGB₂-PAD-MMC

治疗组于接种后4 h开始治疗, 每天ip 1次, 联合给药组和单用Hu-IFN-α组于接种前4 h先给每只小鼠im Hu-IFN-α 0.25 MIU, 于接种后4 h再ip MGB₂-PAD-MMC, 以后每天均于MGB₂-PAD-MMC给药前4 h, im Hu-IFN-α, 各给药组连续给药5 d, 停药2 d后解剖, 测量瘤径, 评价各给药组的肿瘤抑制率^[2]。全程共8 d。

RESULTS

结合物制备 过量的PAD与MGB₂(或NIgG)发生氨基缩合, 余下的PAD上醛基再与过量MMC进一步发生氨基缩合, 形成了MGB₂(或NIgG)-PAD-MMC三元结合物。结合物中每克分子的MGB₂(或NIgG)可引入28-30克分子的MMC。

结合物中的MGB₂活性测定 由Tab 1可以看出, 在结合物制备过程中, 抗体活性保持良好, 在0.2 nmol浓度时, 结合物中抗体仍能与靶细胞保持较好的结合活力。

Tab 1. Enzyme-linked immunosorbent assay of anti-gastric cancer monoclonal antibody MGB₂-PAD-MMC and free MGB₂ to human gastric cancer cell line SGC-7901. n=3 wells, $\bar{x} \pm s$.

Concentration/ μmol·L ⁻¹	Absorbance at 495 nm	
	MGB ₂ -PAD-MMC	MGB ₂
Control	0.03±0.01	0.03±0.01
2	0.56±0.03	0.62±0.03
0.2	0.48±0.01	0.54±0.01
0.02	0.45±0.07	0.46±0.04
0.002	0.38±0.02	0.42±0.02
0.0002	0.23±0.00	0.26±0.04

免疫药物结合物对肿瘤靶细胞和非靶细胞的杀伤试验 不同浓度(指MMC浓度)MGB₂-PAD-MMC, MMC及NIgG-PAD-MMC对肿瘤靶细胞和非靶细胞的杀伤作用见Tab 2。MMC与MGB₂连接后对靶细胞的杀伤作用与游离MMC相似, 而对非靶细胞的杀伤作用也显著降低。

Tab 2. Effects of anti-gastric cancer monoclonal antibody MGB₂-mitomycin C (MMC) conjugate via dextran T-70 (MGB₂-PAD-MMC), normal mouse IgG-MMC conjugate via dextran T-70 (NIgG-PAD-MMC) and free MMC on human laryngocarcinoma cells (Hep-II) and human gastric cancer cells (SGC-7901), 48 h later. n=3 wells.

Tumor	MMC/ μg·ml ⁻¹	MGB ₂ - PAD-MMC	Inhibition rates/%	
			MIgG- PAD-MMC	MMC
Hep-II	10	42.2	—	96.7
	1	26.7	—	42.2
	0.1	10	—	22.8
	0.01	6.7	—	11.7
	0.001	3.3	—	5.6
	IC ₅₀	38.4	—	0.85
SGC-7901	10	95	38	94
	1	68	32	52
	0.1	30	18	24
	0.01	18	10	18
	0.001	14	0	14
	IC ₅₀	0.35	15.2	0.23

表明：特异性结合物到达肿瘤部位较多，T/NT 比值也高，瘤血比为2.6±0.9。而非特异性结合物到达肿瘤部位较少，T/NT 比值也降低，瘤血比为0.20±0.18。

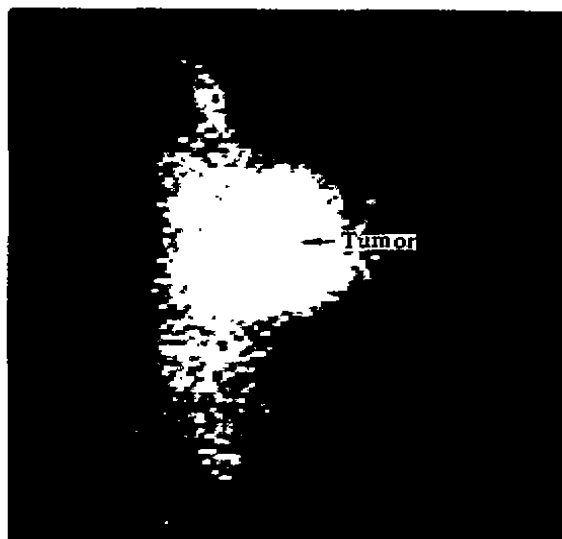


Fig 1. Single photo emission computed tomography of a Swiss nude mouse bearing human gastric carcinoma SGC-7901 injected with ¹²⁵I labeled anti-gastric cancer monoclonal antibody MGB₂-mitomycin C conjugate via T-70 (96 h later).

结合物体内定位和生物学分布 ¹²⁵I-MGB₂-PAD-MMC ip 后96 h 的 SPECT 显像结果 (Fig 1) 显示：肿瘤成像明显，显像轮廓与肿瘤外形相符。¹²⁵I-MGB₂-PAD-MMC、¹²⁵I-NIGG-PAD-MMC 在荷瘤裸小鼠体内分布 (见 Tab 3)

Tab 3. Tissue distribution of ¹²⁵I-MGB₂-PAD-MMC and ¹²⁵I-NIGG-PAD-MMC in Swiss nude mice bearing human gastric carcinoma xenografts (SGC-7901) 12 d after ip. n=4 mice. $\bar{x} \pm s$.

Tissue (T/NT)	¹²⁵ I-MGB ₂ -PAD-MMC		¹²⁵ I-NIGG-PAD-MMC	
	dpm·mg ⁻¹	T/NT	dpm·mg ⁻¹	T/NT
Tumor	8 538±175		328±33	
Blood	3 283±38	2.6±0.9	1 595±50	0.20±0.18
Liver	1 185±57	7.2±1.3	362±32	0.91±0.04
Pancreas	1 217±50	7.0±2.2	328±40	1.10±0.52
Spleen	1 016±33	8.4±1.8	425±33	0.77±0.20
Stomach	372±40	23.2±5.3	113±27	2.90±1.21
Kidney	568±37	15.4±4.1	443±32	0.74±0.14
Intestine	1 122±77	7.6±1.6	152±33	2.20±0.41
Heart	950±55	9.3±3.2	450±45	0.73±0.04
Lung	1 552±90	5.5±2.1	468±40	0.70±0.19
Skin	897±50	9.5±0.9	343±43	0.96±0.15
Muscle	450±52	19.3±4.2	163±38	2.03±0.21

MGb₂-PAD-MMC 对荷人胃癌移植瘤 SGC-7901裸小鼠的疗效及 Hu-IFN-α 的体内增效作用 由Tab 4可见, 单用MMC (1mg·kg⁻¹)治疗组的肿瘤生长抑制率为28.3%, 单用结合物(含 MMC 1 mg·kg⁻¹, 含 MGb₂ 15 mg·kg⁻¹)治疗组的肿瘤生长抑制率为47.8%, 而 α-重组人干扰素(0.25 MIU/鼠)和结合物(含 MMC 1 mg·kg⁻¹, 含 MGb₂ 15 mg·kg⁻¹)联合用药组的肿瘤生长抑制率为83.1%。单用 α-重组人干扰素(0.25 MIU/鼠)组, 其肿瘤生长抑制率仅为16.4%。经 t 检验证明结合物组明显高于 MMC 组, 联合用药组又明显高于结合物组。

DISCUSSION

本文所用的鼠抗人胃癌单抗 MGb₂ 对 SGC-7901具有高度的亲和力, 由它制备的免疫药物结合物的细胞毒结果表明, MMC 与 MGb₂ 连接后, 对靶细胞的杀伤作用与游离 MMC 相似, 而对非靶细胞的杀伤作用则显著降低, 这可说明 MGb₂-PAD-MMC 对靶细胞有选择杀伤作用。我们用 MGb₂-PAD-MMC

在皮下型裸小鼠移植瘤模型体内定位观察结果显示, 结合物能较好地集中于肿瘤组织, 进一步的体内实验治疗结果表明, MGb₂-PAD-MMC 组的疗效显著地优于 MMC 组, 这表明该结合物具导向治疗作用。

近年来, 很多研究结果表明, 用不同交联方法制备的结合物经体内试验存在明显差异。如以人血清白蛋白(HSA)作为中介体, 制备的结合物体内试验时, 结合物被肝、脾等脏器的非特异性摄取明显增加, 而用葡聚糖作为中介体则有成功的报道^[2], 用 dextran T-40作中介制备的结合物的抗体与药物克分子比为1:20。本文报道用 dextran T-70作中介, 制备 MGb₂-PAD-MMC 结合物, 一分子 MGb₂ 引入了28-30个分子的 MMC, 不仅抗体活性保持良好, 而且节省了单抗的用量。

肿瘤相关抗原表达异质性是导向治疗中另一个有待解决的问题, 许多学者倾向于应用合株抗体克服这一不足。然而如能提高肿瘤细胞单抗相应抗原的表达将可进一步提高疗效。近年来, 相继有学者证实 IFN-α 有提高肿瘤相关抗原表达的作用^[7-9]。我们曾以 Hu-IFN-α

Tab 4. Effects of monoclonal antibody-drug conjugates on nude mice inoculated with SGC-7901 under subrenal capsule and enhancement of effect of MGb₂-PAD-MMC conjugate by human recombinant intreferon-α (Hu-IFN-α). Hu-IFN-α by im, else by ip. n=4-8 capsules, $\bar{x} \pm s$. *P<0.05, **P<0.01 vs control group. †P<0.01 vs MMC, ‡P<0.001 vs MGb₂-PAD-MMC.

Drug	dose/mg·kg ⁻¹		Tumor size/mm			Body wt d 8/d 0	Inhibition rates of tumor size/%
	Drug	MoAb	d 0	d 8	d 0-d 8		
Control	—	—	1.46±0.20	4.39±0.22	2.93±0.28	1.07	—
MMC	1	—	1.33±0.18	3.44±0.17	2.1±0.3	1.10	28.3*
Hu-IFN-α	0.25 MIU	—	1.25±0.09	3.44±0.17	2.45±0.21	1.04	16.4*
MGb ₂ -PAD-MMC	1	10	1.4±0.18	2.93±0.16	1.53±0.28	1.08	47.8†
MGb ₂ -PAD-MMC +Hu-IFN-α	1 0.25 MIU	10 —	0.33±0.16	1.8±0.3	0.48±0.23	1.00	83.1‡

作用于荷人胃癌 SGC-7901 裸小鼠, 观察到胃癌单抗(MGb₂)-药物交联物结合至肿瘤组织也显著增加. 本文用 Hu-IFN-α 进行增敏试验结果说明: 用 Hu-IFN-α 对免疫结合物导向治疗有增强作用, 这既证实了 Hu-IFN-α 具有增加 MGb₂ 相关抗原的表达能力, 同时也为导向治疗的临床研究展现出诱人的前景.

REFERENCES

- 1 Manabe Y, Tsubota T, Haruta Y, Kataoka K, Okazaki M, Haisa S, et al. Production of a monoclonal antibody-mitomycin C conjugate, utilizing dextran T-40, and its biological activity. *Biochem Pharmacol* 1985; 34 : 289-91.
- 2 Zhang SY, Li S, Chen LJ, Shu YH, Zhang XY, Chen XT. Effects of immuno-drug conjugates on growth of human gastric cancer xenograft in subrenal capsule of nude mice. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 556-60.
- 3 Fan DM, Zhang XY, Chen XT, Mu ZX, Hu JL, Chen BJ, et al. Mouse and human monoclonal antibodies against gastric cancer; preparation and clinical applica-

- tion. *Chin Med J* 1988; 101 : 488.
- 4 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248-54.
- 5 Iwasa S, Konishi E, Konodo K, Suzuki T, Akaza H and Nijima T. Selective cytotoxicity of drug-mono-clonal antibody conjugates against murine bladder tumor cells. *Chem Pharm Bull* 1987; 35 : 1128.
- 6 Wang LB, Qian BW, Xia YX. Establishment of human gastric carcinoma nude mice model. *Tumor* 1987; 7 : 52-4.
- 7 Broden EC. Augmented tumor-associated antigen expression by interferons. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80 : 148-9.
- 8 Greiner JW, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D, Fisher PB, et al. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions *in vivo*. *Science* 1987; 235 : 885-8.
- 9 Rosenblum MG, Lamki LM, Murray JL, Carlo DJ, Gutterman JU. Interferon-induced changes in pharmacokinetics and tumor uptake of ¹¹¹In-labeled antineoplastic antibody 96.5 in melanoma patients. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80 : 160-5.

《中国生化药物杂志》征订启事

《中国生化药物杂志》(原名《生化药物杂志》)为全国生化制药情报中心站编辑出版的技术性刊物, 主要内容有: 新生化药物(动物、植物、微生物及海洋生物等来源); 动物资源的利用; 生化药物剂型研究; 新工艺、新技术、新材料的应用及工艺改革; 先进生化制药设备和仪器的推广和应用; 开发生化制品的新途径; 生化药物的理化分析、药理学和临床医学; 生化制药工业管理等.

《中国生化药物杂志》创刊于1976年, 是国内生化制药行业唯一的专业性期刊, 可供生化制药工作者、科技人员、教学人员及医药卫生人员阅读.

《中国生化药物杂志》国内统一刊号为CN32-1355/R, 季刊, 16开本, 国内公开发行, 季中出版, 并可刊登广告. 每期定价3.20元, 全年4期12.80元. 可在全国各地邮局订阅, 邮发代号28-233.

边远地区如有订不到者, 或错过邮局订阅者, 可来信与本刊编辑部联系邮购(地址: 南京市下关区宝塔桥168号 邮编210015).

欢迎订阅《中国生化药物杂志》.