

抗肺癌免疫光敏剂的制备及其杀伤作用^①

陈瑞川 颜江华 杨 栋

(抗癌研究中心)

摘要 以碳二亚胺(EDCI)为连接剂将抗肺癌单克隆抗体(McAb 3D3与血卟啉衍生物(HpD)共价连接,制备成免疫光敏剂.经ELISA法测定及溶血试验,结果表明偶联物保留了McAb的反应性及HpD的光敏活性.偶联物经紫外光谱及荧光光谱扫描分析表明,偶联HpD与非偶联HpD的光谱特性有所差别.体外杀伤试验表明,偶联物的杀伤效率提高了10.5倍,且对非靶细胞的杀伤作用微弱.证明HpD与McAb偶联后,对靶细胞具有特异杀伤作用,可为肿瘤的治疗提供一种新的药物.

关键词 抗体-药物交联物, McAb, HpD, 免疫光敏剂

近年来,光照射疗法(PDT)已逐渐发展成为一种治疗和诊断恶性肿瘤的手段,但由于光敏剂血卟啉衍生物(HpD)对肿瘤组织的选择性不够高,杀伤效果不够理想^[1],以及做PDT治疗的病人有皮肤光敏副反应的缺点,致使其临床应用受到限制^[2].因此更优良的光敏剂研制亟待解决.随着单克隆抗体(McAb)的问世,已有多种药物与之交联以提高药物对肿瘤的杀伤效果.将HpD与抗肿瘤McAb偶联制备成“免疫光敏剂”,就可借助McAb的导向作用增强HpD对肿瘤细胞的特异性,从而提高其诊疗效果^[3].

本文以碳二亚胺(EDCI)为连接剂将抗肺癌McAb3D3与HpD偶联,研究了偶联物对肺癌靶细胞的特异杀伤作用.

1 材料与方 法

抗肺癌McAb-HpD偶联物的制备^[3]及纯度鉴定 取HpD溶液(8.3×10^{-3} mol/l,美国prophorin products Inc产品)0.7 ml,加EDCI(6.1×10^{-2} mol/l, Sigma公司产品)0.3 ml,避光反应30 min,再加入3.5 mg的抗肺癌McAb 3D3(本单位细胞室提供),“室温避光反应6 h后,加10 μ l氨基乙醇,4 $^{\circ}$ C过夜.反应产物过Sephadex G-25层析柱($\phi 1 \times 25$ cm),以0.01 mol/l, pH7.2的PBS洗脱,去除游离的HpD,收集第一洗脱峰,无菌过滤后分装,于-20 $^{\circ}$ C贮存.以Beckman DU-65紫外/可见分光光度计分别测定偶联物McAb及HpD的含量,求出分子比.以薄层硅胶色谱(TCL)鉴定偶联物的纯度;点样量为0.5 μ l,展开剂系统为:乙醇:乙酸=95:5v/v.

偶联物McAb活性的测定 以ELISA法^[3]测定偶联物中McAb 3D3的活性,用同系列浓度的McAb 3D3作平行对照,以正常小鼠IgG为阴性对照.

溶血试验测定偶联物HpD的光敏活性,取绵羊红细胞稀释到 1×10^8 cell/ml,每支管1 ml,加入不同浓度的偶联物,以HpD作平行对照,37 $^{\circ}$ C温育2 h,以630 nm波长的氩离子激

^① 本文1992-02-26收到;福建省自然科学基金资助课题

.. 颜江华,等.单克隆抗体通讯,待发表

光照射,能量密度为 2 J/cm^2 ,然后取上清测 540 nm OD 值,以溶血程度为指标,观察偶联物 HpD 的活性。

偶联 HpD 与非偶联 HpD 的紫外及荧光光谱比较,将 HpD 及偶联物分别以生理盐水稀释后,测定紫外吸收光谱及荧光光谱。荧光激发光波长为 402 nm ,发射光波长为 617.5 nm ,分别测定发射光谱及激发光谱。

体外杀伤试验 将肺癌靶细胞(342)或非靶细胞胃癌细胞(GC7911)及肝癌细胞(7402)(均由本单位细胞室提供)以 RPMI1640 稀释到 $5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$,每支管加 1 ml 细胞,然后加入不同浓度的 HpD 或偶联物,并以正常小鼠抗体-HpD 偶联物作对照。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 2 h 后撤药,再加 1 ml RPMI 1640 继续温育 2 h ,然后照光,光源为 630 nm 波长的氩离子激光,能量密度为 10 J/cm^2 。照光后继续温育 2 h ,然后加入 MTT^[4]($1.2 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$,FluKa 公司产品) $100 \mu\text{l}$,温育 4 h 后,离心去上清,沉淀的细胞中加入 1 ml DMSO 及 $250 \mu\text{l}$ 0.6 mol/l Tris-Gly 缓冲液(pH10.5),于 Beckman DU-65 紫外/可见分光光度计读取 570 nm 处 OD 值,求杀伤率。每个样品三个数据,求平均值。

2 结果

偶联物的鉴定 薄层硅胶色谱分析结果显示,偶联物仍位于原点,而 HpD 的 Rf 值为 0.87 ,表明偶联物中游离的 HpD 已基本去除。紫外/可见分光光度计测定偶联物的 McAb 与 HpD 的分子比为 $1:30$ 。ELISA 法测定偶联后的 McAb 活性为原 McAb 活性的 95% 左右,而偶联后的 HpD 的溶血值与原 HpD 近似,表明 HpD 与 McAb 偶联后二者基本上保持原有活性。

偶联 HpD 与非偶联 HpD 的紫外吸收光谱及荧光光谱比较见图 1, HpD 在生理盐水中的最大吸收峰为 376.0 nm ,而偶联 HpD 的最大吸收峰为 383.5 nm ,即 HpD 与 McAb 偶联后其吸收峰发生了红移。图 2 所示,发射光波长定为 617.5 nm 时, HpD(b) 及偶联 HpD(a) 的激发光谱, HpD 及偶联 HpD 的四个激发峰位置相近,但 HpD 的后三个激发峰均比第一个(402 nm)高,而偶联 HpD 的第一个激发峰比后三个高,即偶联后 HpD 的最大激发波长蓝移。图 3 示,激发光波长定为 402 nm 时 HpD(b) 及偶联 HpD(a) 的发射光谱,偶联 HpD 的第一个发射峰(578 nm)较高,与 HpD 的第一个发射峰形成明显的差别。

偶联物及非偶联 HpD 对肺癌靶细胞的杀伤效果比较 见图 4,当 HpD 浓度为 $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 时(终浓度),偶联物对肺癌靶细胞的杀伤效果比单纯 HpD 高 10.5 倍。

偶联物的特异性杀伤作用 由图 5 可见,在 HpD 浓度为 $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 时,偶联物对胃癌细胞(GC7911)及肝癌细胞(7402)的杀伤作用微弱,而对肺癌靶细胞的杀伤作用是这两者的近 10 倍,表明 McAb 与 HpD 偶联后,仍保持其原有的特异结合性。

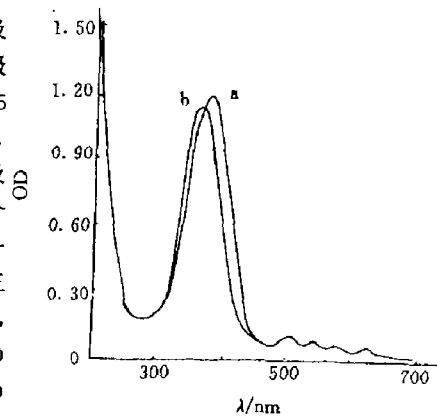


图 1 紫外吸收光谱

Fig. 1 UV absorbance spectra

a. 单抗-HpD 偶联物 b. 非偶联 HpD

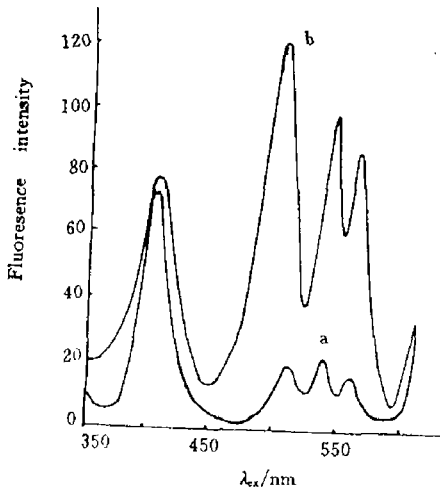


图2 荧光激发光谱($\lambda_{em}=617.2\text{ nm}$)
Fig. 2 Fluorescence spectra ($\lambda_{em}=617.2\text{ nm}$)
a. 单抗-HpD 偶联物
b. 非偶联 HpD

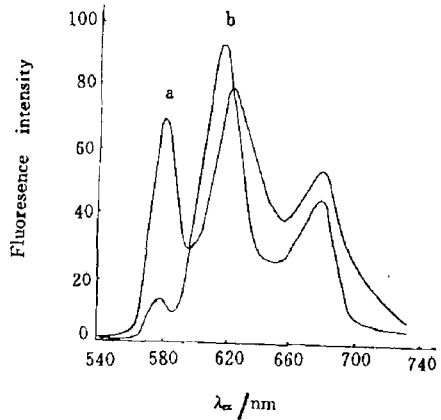


图3 荧光发射光谱($\lambda_{ex}=402\text{ nm}$)
Fig. 3 Fluorescence spectra ($\lambda_{em}=402\text{ nm}$)
a. 单抗-HpD 偶联物
b. 非偶联 HpD

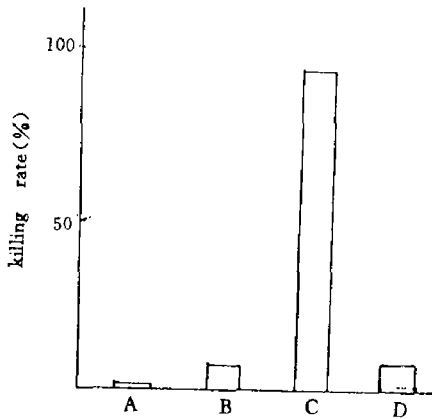


图4 偶联物对靶细胞的杀伤作用
Fig. 4 Killing rate of drug to target cell
A. 单抗-HpD 偶联物(不照光)
B. 非偶联 HpD
C. 单抗-HpD 偶联物
D. 正常小鼠抗体-HpD 偶联物

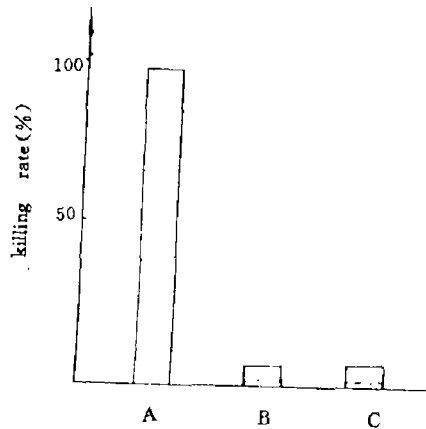


图5 偶联物对不同癌细胞株的杀伤作用
Fig. 5 Killing rate of drug to different cells
A. 靶细胞
B. 胃癌细胞(GC7911)
C. 肝癌细胞(7402)

3 讨 论

Mew 等^[3]将 Hp 与抗小鼠横纹肌肉瘤 McAb 制备成交联物。许树旭^[2]等将 HpD 与抗胃癌 McAb 制备成免疫光敏剂。两者均证明 Hp 或 HpD 经与 McAb 偶联后对靶细胞的杀伤作用有显著的提高。我们将 HpD 与抗肺癌 McAb 3D3 偶联,并对偶联物进行了一系列的分析鉴定。结果表明偶联是成功的。偶联物对靶细胞的杀伤效果较单纯 HpD 提高了 10.5 倍,且对非靶细胞的杀伤效果微弱,说明 HpD 经与 McAb 偶联后具有显著的特异杀伤作用。我们还对偶联物及 HpD 进行了紫外吸收光谱及荧光光谱分析,发现 HpD 与 McAb 交联后,两种光谱特性均有改变,特别是其激发光谱的改变,即最大激发波长兰移,这是否意味着在临床应用及实验研究时应选择短波段光源,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Doughter T. J. et al. Photoradiation in the Treatment of Recurrent Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* . 1979, 62: 231~239
- 2 许树旭 等. 单克隆抗体-血卟啉衍生物交联物抗胃癌作用的实验研究. *药学报*, 1989, 24(6): 401~406
- 3 Mew D et al. Photoinmunotherapy: Treatment of Animal Tumors with Tumor-Specific Monoclonal Antibody-Hematoporphyrin Conjugates. *J. Immunol.* . 1983, 130(3): 1743~1749
- 4 Plumb J A et al. Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Res.* 1989, 49(16): 4435~4440

The Preparation and Killing Acticity Anti-Lung Cancer Immunophotosensitizer

Chen Ruichuan Yan Jianghua Yang Dong
(Cancer Research Center)

Abstract In this paper, hematoporphyrin derivative (HpD) was covalently conjugated with monoclonal antibody directed to the lung cancer cell 342. Analyzed with TCL, ELISA and hemolysis of red blood cells. the conjugate was proved that both HpD and McAb retained their original biological activity and specificity, respectively. But the UV absorbance spectra and fluorescence spectra of free HpD and conjugated HpD showed obvious difference. In the presence of light, the conjugate showed 10.5 fold greater cytotoxicity than free HpD at an equivalent HpD conc. for target cancer cell in vitro, but no cytotoxicity for non-target cancer cell. The result demonstrated that the anti-tumor specificity of the conjugated HpD had been greatly improved and implied that it is possible by using lower dose of drug to minimize undesired side effect. The homing ability of the specific McAb-HpD conjugate may permit a realistic photoimmunotherapy procedure.

Key words McAb-drugs conjugate, McAb, HpD, Immunophotosensitizer