

不同交联方法制备的免疫毒素及其体内外特性

汲言山 贺永怀 陈 兴 赵薇薇 沈倍奋

(军事医学科学院基础所, 北京 100850)

提 要

用三种不同的异型双功能交联剂把单抗和完整蓖麻毒素连接起来, 经适当地化获得了高活性免疫毒素 (ITs), 体外试验中蛋白质合成抑制 50% 的浓度 IC_{50} 达到 2.7×10^{-12} mol/L. 以二硫键连接的 ITs 比硫醚键连接的 ITs 细胞毒性高 5—10 倍 ($P < 0.05$), 而硫醚键连接的 ITs 在动物体内代谢慢 1 倍, 且其原型药物维持时间更长, 稳定性更好. 两类 ITs 在体内的代谢产物也不相同.

关键词 免疫毒素, 蓖麻毒素, 蛋白质连接, 单克隆抗体

免疫毒素 (ITs) 是由单克隆抗体连接毒素组成的, 它的作用特点就是有选择地杀伤靶细胞. 为此, 任何能够得到实际应用的 ITs 需要具备如下特性: ① 具有强大的靶细胞杀伤能力. 这除了要求载体单抗有高度的专一性, 还要求其毒素部分有很大的细胞毒性, 毒素比一般化疗药物有更大的毒性, 故常选用毒素作“弹头”. ② 能特异性结合靶细胞并内化. 特异性地结合主要取决于单抗, 内化机理则不很清楚. 有人证明, 完整毒素 B 链有帮助 A 链进入胞内的作用^[1]. ③ 避免在体内被迅速清除, 维持一定的血药浓度. 体内清除取决于两个因素, 其一是交联剂引入的连接键在体内是否易断裂. 其二是被肝脏细胞“捕获”. 用化学方法修饰毒素分子上寡糖链的结果可减低这种“捕获”.

ITs 的第一种应用是体外处理骨髓, 清除其中的 T 细胞或肿瘤细胞, 联合大剂量放、化疗进行骨髓移植, 来治疗淋巴瘤、白血病或其它恶性肿瘤. 这种用途主要要求 ITs 具有强的靶细胞毒性. ITs 的第二种应用是体内治疗, 体内应用时更注重 ITs 的体内稳定性, ITs 原型在体内维持时间长才能达到较好的抗肿瘤效果.

本文选用抗人的白细胞分化抗原的单克隆

抗体 $H_{65}(CD_5)$ 和完整蓖麻毒素 ricin (Ric, R), 用三种异型双功能连接剂, 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸-N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、2-亚氨基四氢噻吩 (2-IT) 和间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS) 分别制备成 ITs, 比较它们的体内外特性, 以寻找适合临床应用的 ITs.

材 料 和 方 法

1. 材料 SPDP: Pharmacia; 2-IT: Sigma; MBS: Pierce, USA; Ultrogel ACA-34: LKB; ^{125}I -NaI: Amersham; 3H -亮氨酸由上海原子能研究所生产.

抗人全 T 细胞的单克隆抗体 H_{65} 属 CD_5 系统.

Molt-4 细胞为人 T 淋巴母细胞系, 引自英国皇家肿瘤研究所. 按常规方法培养.

LACA 小鼠, 雌性, 6 周龄体重 22g 左右.

2. 蓖麻毒素纯化 参照文献[3]改进如下: 以含 4mmol/L 半乳糖的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.7 洗脱蓖麻毒素, 以含 100mmol/L 半乳糖的上述缓冲液再生柱子.

3. 单抗-毒素结合物的制备 ① 以 SPDP 为连接剂, 参见文献[4]. ② 以 2-IT 为连接

剂^[1], Ric 对 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 pH8.5 透析并调节成约 15mg/ml 的浓度,按克分子比加入 4 倍过量的 2-IT,于室温下反应 30min,再加入 6 倍量的 Ellman's 试剂室温反应 30min,反应混合物对 pH6.6 的 PBS 透析过夜,或过 Sephadex G-25,用 PBS 洗脱蛋白质峰为 A。单抗 H₆₅ 对上述硼酸缓冲液透析并调至 10mg/ml,加入 3 倍量的 2-IT 于室温下反应 30min 后立即过 Sephadex G-25 柱除去未反应的 2-IT,用 pH6.6 的 PBS 平衡并洗脱柱子,收集蛋白峰 B 速与 A 混合,室温下搅拌反应 1—2h,加 NEM 终止反应。③以 MBS 为连接剂^[6],单抗 H₆₅ 与 2-IT 反应同上得 B, Ric 浓缩成 30mg/ml 对 PBS pH6.6 透析,加入 3 倍量的 MBS (溶于二甲基甲酰胺),室温反应 20min,立即过 Sephadex G-25 离心柱,收集的蛋白峰速与上述 B 混合,室温搅拌反应 0.5—1h,加 NEM 终止反应。

4. 单抗-毒素结合物的纯化 单抗与毒素连接的混合物,用超滤法浓缩至 2ml,上 Ultrogel ACA-34 层析柱 ($\phi 1.6\text{cm} \times 100\text{cm}$),用含 0.1mol/L NaCl 的 0.1mol/L 磷酸盐 pH7.5 洗脱,在波长 280nm 下检测蛋白峰,分步收集。取第一峰和第二峰的前半部分,超滤浓缩至 2ml,上酸化的 Sepharose 4B 柱,用含 0.1mol/L NaCl 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.5 平衡柱子和洗脱杂蛋白,再加 50mmol/L 半乳糖洗脱结合物。

5. 亮氨酸掺入抑制试验 见文献[7]。

6. 药物代谢动力学与体内稳定性试验

ITs、H₆₅ 和 Ric 在体内的代谢符合二室动力学模型,血药浓度的变化可以用下列双指数方程描述: $C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$,用线性回归把血药浓度的变化分为快、慢两个时相,用实验数据求出两相的半衰期表示代谢速率的快慢。实验先取一定量的 ITs、H₆₅ 和 Ric,分别在氯胺 T 存在下标记 ¹²⁵I(NaI),标记率 80—90%,用 Sephadex G-25 柱除去游离的 NaI,蛋白质样品的比放射性 $>10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ 蛋白。

(1) 药代动力学:取一定量放射性碘标记

的 ITs、H₆₅ 和 Ric 各加等体积的 PBS-A 混匀,给小鼠尾静脉注射 100 μl ,同时另取 10 μl 测总注入放射量,于 5,15,30min,1,2,5,8,24h 从尾静脉取血 10 μl 。用 γ 计数仪测定每个血样的 cpm 值。24h 后处死小鼠,取出脏器制样,连同 24h 内的尿样一起测 cpm 值。

(2) 体内稳定性:取一定量上述标记的 ITs、H₆₅ 和 Ric 各加等体积的生理盐水混匀,每只成年 LACA 小鼠尾静脉注射 100 μl ,于 5min,1,2,5,8,24h 各取尾静脉血 20 μl ,加 20 μl PBS,10000r/min 离心 5min,取 20 μl 上清作 SDS-PAGE 染色。干胶后作放射自显影。

实验结果

1. ITs 的纯化 反应混合物过 Ultrogel ACA-34 层析柱,各蛋白质成分按分子量分离如图 1。

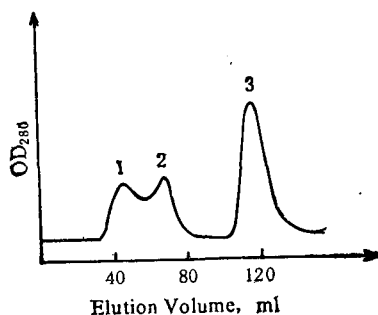


图 1 Ultrogel ACA-34 柱分离 ITs
Fig. 1 Purification of ITs by ultrogel ACA-34 column

峰 1: ITs; 峰 2: 游离 H₆₅; 峰 3: 游离 Ric
1: ITs 2: free H₆₅ 3: free Ric

ITs 不能与游离的单抗 H₆₅ 完全分开,其后果是 H₆₅ 与 ITs 竞争靶细胞上相同的抗原,直接影响到 ITs 的作用效果。为了将 H₆₅ 从 ITs 中完全除去,把峰 1 和峰 2 的前半部分再通过酸化的 Sepharose 4B 柱进一步分离。由于这种柱子可以特异地结合 ITs 分子中 Ric 之 B 链,因此可以结合 ITs 而不能结合游离的 H₆₅,从而把它们分开。用 50mmol/L 半乳糖洗脱下来的成分是 ITs 纯品。

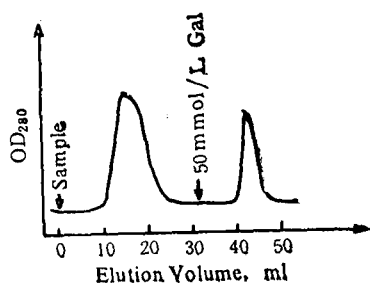


图2 酸化-sepharose 柱纯化 ITs
Fig. 2 Purification of ITs by
acidic-sepharose 4B column

2. ITs 的体外细胞毒性 上面制备的 ITs 连同单纯的 Ric 一起测定其对 Molt-4 细胞的蛋白质合成抑制,用半数抑制浓度 IC_{50} 表示其毒性,结果如图 3 和表 1。

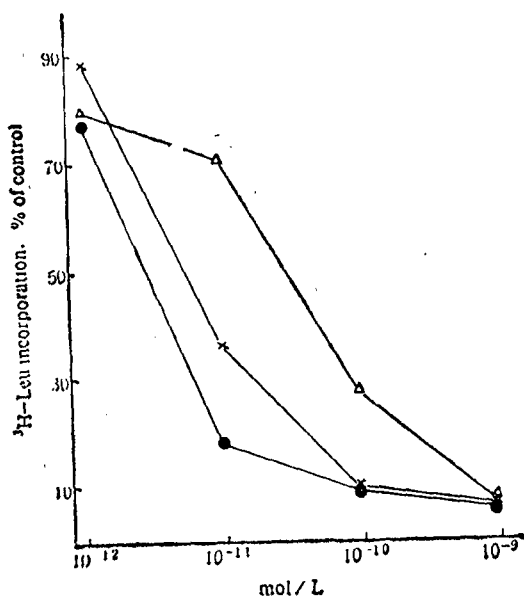


图3 ITs 对 Molt-4 细胞株的毒性效应
Fig. 3 Effect of ITs on Molt-4 cell line
●: H_{63} -SPDP-R ×: H_{63} -IT-R △: H_{63} -MBS-R

试验数据表明,①经过适当的连接和纯化,制备的 ITs 的细胞毒性和特异性基本没有降低。②以二硫键 (SPDP, 2-IT) 连接的 ITs 比以硫醚键 (MBS) 连接的 ITs 细胞毒性大 5—10 倍,有显著性差异。体外细胞毒试验显示,二硫键比硫醚键优越。

表 1 ITs 对 Molt-4 细胞的体外细胞毒性
Table 1 Cytotoxicity of ITs to Molt-4 cells
in vitro

No.	ITs	IC_{50}	t test
1	H_{63} -SPDP-Ric	$2.7 \pm 0.7 \times 10^{-12}$	$P^{1)} < 0.05$
2	H_{63} -IT-Ric	$5.1 \pm 0.1 \times 10^{-12}$	$P^{1)} < 0.05$
3	H_{63} -MBS-Ric	$2.8 \pm 0.3 \times 10^{-11}$	
	Ric	$3.8 \pm 0.5 \times 10^{-11}$	

1) No. 1 与 No. 3 比较 2) No. 2 与 No. 3 比较
3) Mean $\pm$ SD

1) Comparison of 1 to 3 2) Comparison of 2 to 3
3) Mean $\pm$ SD

3. 药物代谢动力学 ^{125}I 标记的 ITs 静脉注射后,血中的放射性百分率随时间变化如图 4。

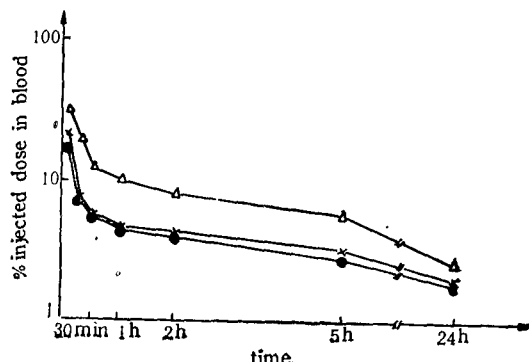


图4 ITs 在血液中的清除

Fig. 4 Blood clearance of ITs

×: H_{63} -SPDP-R ●: H_{63} -IT-R ○: H_{63} -MBS-R

从图 4 中看出,以 MBS 连接的 ITs 在体内代谢较其余两种 ITs 慢。动力学参数见表 2。

把表 2 中的 $T_{0.5}$ 值相互比较得出:①不同连接方式制备的 ITs 的体内代谢快慢主要差别在第一时相。以硫醚键连接的 ITs 的半衰期比以二硫键连接的 ITs 的半衰期长 1 倍,前者的代谢速度慢。第二时相各种 ITs 的代谢速度相似,但 MBS 连接的 ITs 维持着较高的血药浓度。②从 $T_{0.5}$ 看, Ric 代谢最快, H_{63} 代谢最慢, ITs 代谢速度在前两者之间, ITs 在第一时相代谢速度类似于 Ric, 第二时相则较接近于 H_{63} 。

表 2 ITs、Ric 及 H₆₅ 的药代动力学数据
Table 2 Pharmacokinetic data for ITs
H₆₅ and Ric

ITs	T _{0.5} (min)	T _{0.5} (h)	A	B
H ₆₅ -SPDP-Ric	20.3	21.7	96.1	3.9
H ₆₅ -IT-Ric	21.5	19.9	96.4	3.6
H ₆₅ -MBS-Ric	42.2	19.8	93.4	6.6
Ric	18.5	4.6	96.8	3.2
H ₆₅	72.2	41.4	77.2	22.8

从各脏器及尿中的放射性含量看(表3),由抗人T细胞单抗 H₆₅ 和蓖麻毒素R组成的 ITs 在体内降解后大部分经尿排出体外,没有在各脏器中大量储留。而且硫醚键连接的 ITs 之代谢物中放射性百分含量相对较低。

表 3 注射 ITs24 小时,各脏器及尿中的放射性¹⁾
Table 3 Radioactivity of liver, spleen, kidney
and urine in 24h after ITs injection²⁾

ITs	liver	spleen	kidney	24小时尿
H ₆₅ -IT-R	0.77± 0.09 ¹⁾	0.29± 0.02	0.42± 0.12	27.0± 6.5
H ₆₅ -MBS-R	1.2± 0.30	0.06± 0.01	0.30± 0.14	20.3± 0.3

1) Mean±SD 2) 注射剂量的百分数

1) Mean±SD 2) % injected dose

4. 体内稳定性 注射 ITs 的小鼠尾静脉血清作 SDS-PAGE 和放射自显影如图 5。

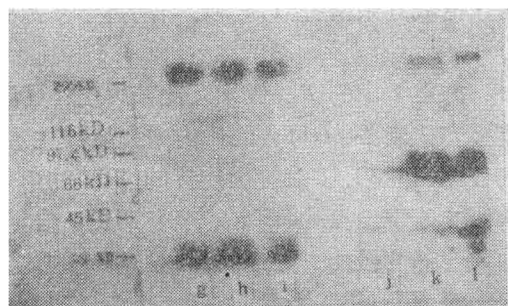


图 5 ITs 在体内的稳定性

Fig. 5 Stability of ITs in vivo

H₆₅-MBS-Ric: g: 5h; h: 8h; i: 24h

H₆₅-IT-Ric: j: 24h; k: 8h; l: 5h

可以得出如下结论,①以硫醚键(MBS)连接的 ITs 在体内比以二硫键(2-IT)连接的 ITs 代谢慢,这与前面的动力学结果一致。②以硫醚键连接的 ITs 在体内代谢慢主要表现在其原型 ITs(Mw 约 210kD)的浓度维持时间较长。说明它在体内的稳定性较好。③两种 ITs 的降解机理是不同的,以二硫键连接的 ITs 在体内首先明显地被还原性物质断开某些二硫键,产生了分子量 60kD 左右的大片段和分子量 30kD 左右的小片段。而以硫醚键连接的 ITs 则直接被降解成 30kD 左右的小片段,这个过程较为缓慢。

讨 论

制备 ITs 的反应混合物中含有游离的单抗和过量的蓖麻毒素,通过 Ultrogel ACA-34 柱可以把过量的蓖麻毒素完全除去,但不能把游离的单抗完全除去。单抗与 ITs 竞争靶细胞上相同的结合部位,结果就抑制了 ITs 的作用。由于每批 ITs 含有游离单抗的量不同,故引起 ITs 体外细胞毒性的较大波动。采用酸化 Sepharose 4B 柱进一步纯化 ITs, 利用 ITs 中 Ric B 链对此凝胶柱的亲合作用把游离单抗除去后,不仅解决了上述问题,而且使 ITs 体外细胞毒性有较大幅度的提高。

经过适当制备和纯化可以获得具有高靶细胞毒性的 ITs。特别是以二硫键连接的 ITs, 其体外靶细胞毒性更高。在 10⁻⁸mol/L 浓度时很容易地杀伤 3 个 log 即 99.9% 的靶细胞,此浓度对非靶细胞如造血干、祖细胞没有明显的影响^[8]。而且 ITs 在体外应用时还可以用 100mmol/L 半乳糖完全阻断蓖麻毒素可能引起的非特异性杀伤^[9]。用 ITs 清除骨髓 T 细胞联合大剂量放、化疗进行异体骨髓移植来治疗白血病及其它恶性肿瘤具有光明的前景。目前国内正在作临床试验。

在体内维持一定的血药浓度是取得预期治疗效果的基础。从血药浓度随时间的变化看,以硫醚键连接的 ITs 在体内代谢慢,较适合于体内应用。综合 ITs 的体外靶细胞毒性和体

内稳定性分析,虽然以二硫键连接的 ITs 体外靶细胞毒性高 5—10 倍,但它在体内代谢快、稳定性差、药物原型维持时间短,并且可能由于二硫键的断裂产生非特异细胞毒性。实验中注意到,注射二硫键连接的 ITs 的小鼠精神状态不好,懒于行动,浑身无力,而注射以硫醚键连接的 ITs 的小鼠活动能力强,精神状态良好。因此,体内使用硫醚键连接的 ITs 可能会有更佳的效果。以二硫键连接的 ITs 较适合于体外应用。

参 考 文 献

1 Youle R J, Neville D M. *J Biol Chem*, 1982;

- 257: 1598
 2 Thorpe P, E Detre S I, Foxwell B M J *et al.* *Eur J Biochem*, 1985;147: 197
 3 贺永怀,刘演波,陈兴,沈倍奋. 生物化学与生物物理进展,1987;(6): 64
 4 沈倍奋,姚志建,张建宗等. 中华微生物学与免疫学杂志,1985;5: 209
 5 Thorpe P E, Wallace P E, Knowles P P *et al.* *Cancer Research*, 1988; 48: 6396
 6 Marsh J W, Neville D M. *Protein Tailoring for Food and Medical Uses*. New York: Marcel Dekker Inc, 1986: 291—396.
 7 Pietersz G A, Kanellos J, Mckenzie F C. *Cancer Research*, 1988; 48: 4469
 8 黎燕,沈倍奋,陈兴,贺永怀等. 中国免疫学杂志, 1989; 5: 197

[本文于 1990 年 9 月 1 日收到,1991 年

1 月 24 日修回]

IMMUNOTOXINS PREPARED WITH DIFFERENT COUPLING METHODS AND THEIR CHARACTERISTICS IN VITRO AND IN VIVO

Ji Yanshan, He Yonghuai, Chen Xing, Zhao Weiwei, Shen Beifen

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT

A monoclonal antibody (H_{65}) was coupled to ricin using three different cross-agents respectively. Immunotoxins (ITs) with greater cytotoxic potency were obtained through a proper scheme. The ITs reduced the 3H -leucine incorporation of Molt-4 cells by 50% at a concentration (IC_{50}) of 2.7×10^{-12} mol/L.

ITs prepared with disulfide bond is 5—10 fold more cytotoxic in vitro than those prepared with thioether bond. The speed of metabolism of the latter in *vivo* is two times slower than that of the former. Because these two kinds of ITs have different degradation products, their metabolism pathways in *vivo* may be different also.

Key words Immunotoxins, Ricin, Monoclonal antibody