

单克隆抗体与链黑菌素免疫偶合物的制备及生物活性

刘亚萍* 吴剑波**

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京, 100050)

摘要 采用不同化学连接方法制备链黑菌素与抗人肝癌单抗 3A5 的免疫偶合物: 1 水溶性碳二亚胺 (EDCI) 连接法; 2 链黑菌素活化酯连接法; 3 葡聚糖 (dextran T-40) 中间体连接法及 4 牛血清白蛋白 (BSA) 中间体连接法。所得偶联物兼有药物和抗体二者的生物活性。偶联物 2 和 3 体外实验对人肝癌 BEL-7402 细胞毒性较游离链黑菌素分别强 62 倍和 17 倍, 对抗原性无关的人咽上皮癌 KB 细胞毒性较链黑菌素弱, 分别相当链黑菌素的 1/11 和 1/13; 表明偶联物对肝癌细胞显示选择性杀伤作用。本文还对链黑菌素的化学连接位点进行了研究。

关键词 单克隆抗体; 链黑菌素; 免疫偶合物; 细胞毒性

单克隆抗体由于具有高度特异性, 可以作为导向载体与抗肿瘤药物偶联, 将药物选择性地运送到靶细胞以实现肿瘤的特异性治疗。链黑菌素 (streptonigrin) 是 1959 年美国首次从 *Streptomyces flocculus* 的培养液中分离得到的⁽¹⁾, 我所于 1984 年从链霉菌 114 的发酵液中分离到该抗生素, 简称 114B。114B 的抗瘤活性强而广, 其临床应用主要因毒副作用大而受到限制^(2,3)。我们采用不同化学连接方法制备链黑菌素与抗人肝癌单抗 3A5 的免疫偶合物, 并考察偶合物的生物活性及对肝癌细胞的杀伤作用。

材 料 和 方 法

试剂 大鼠抗人肝癌单抗 3A5 由本所肿瘤室提供; 3A5 为 IgG 1 型抗体, 对人肝癌 BEL-7402 细胞有强阳性反应, 对人咽上皮癌 KB 细胞呈阴性。链黑菌素由本室姜蓉等提供; 水溶性碳二亚胺 (EDCI) 购于中国军事医学科学院; 羟基替丁二酰亚胺 (NHS) 为 Fluka 公司产品; Dextran T-40 为 Pharmacia 公司产品; N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯 (SPDP) 购于第四军医大学; 氯代三苯基四氯唑 (TTC) 为北京化工厂产品; 细胞培养试剂 RPMI 1640 为 GIBCO 公司产品。

不同化学方法偶联 114B 与 3A5

1 碳二亚胺法: 3A5 2.0 mg 与 EDCI 1.2 mg, 114B 4.0 mg 溶于磷酸缓冲液 (PBS) 2 ml 中, 4℃ 搅拌 5~6 h, 4℃, 12000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 过 Sephadex G-100 层析柱 (1.5 cm × 45 cm), PBS 洗脱, 检测洗脱液抗体活性、抗菌活性以及紫外吸收。

2 活化酯法: 等摩尔数的 114B, 环己基碳二亚胺 (DCC) 及 NHS 溶于少量 DMF 中,

本文于 1991 年 7 月 9 日收到。

*现址: 中国科学技术大学生物系, 合肥 230027

**联系人

室温搅拌 1 h, 4℃ 搅拌 18 h, 密封 4℃ 贮存。取 3A5 2.0 mg, 放入 PBS 中, 在冰浴中逐滴加入活化酯溶液, 4℃ 搅拌 4 h; 反应液分离方法同 1。

3 dextran T-40 中间法: dextran T-40 1.0 g, NaIO₄ 0.33 g, 溶于无盐水 20 ml, 避光搅拌 2 h, 无盐水透析 24 h, 除去未反应的 NaIO₄, 冷干后密封 4℃ 贮存。取氧化的 dextran T-40 6.0 mg, 114B 4.0 mg 溶于 PBS 1.5 ml 中, 4℃ 搅拌 12 h, 加入 McAb 3A5 2.0 mg, 4℃ 搅拌 2 h, 加入 NaBH₄ 溶液 (1.0 mg/ml) 0.2 ml 搅拌 2 h; 偶联物分离方法同 1。

4 BSA 中间法: 取用活化酯法制备的 114B-BSA 连接物 2.0 mg, 加 1,4-二硫代苏糖醇 (DTT 0.05 mol) 溶液 1.5 ml, 室温搅拌 40 min, 经 Sephadex LH-20 柱 (1.2 cm × 30 cm) 分离去未反应的 DTT; 3A5 1.5 mg 与 SPDP 溶液 (0.1 mg/ml) 0.1 ml, 室温搅拌 1 h, Sephadex G-15 除去未反应的 SPDP, 与经 DTT 还原的 BSA-114 B 混合, 4℃ 搅拌 24 h; 产物分离方法同 1。

计算偶联物中 114B 和 3A5 含量及偶联分子比

114B 在 1.0 ~ 10.0 μg/ml 浓度内, A_{370nm} 与浓度 C 的工作曲线为 C_{114B} (μg/ml) = 56.27 A₃₇₀ - 0.713, 相关系数 r = 1.000; McAb 3A5 在 0.1 ~ 1.0 mg/ml 浓度内经 Coomassie 亮蓝染色⁽⁴⁾, 其 A_{595nm} 与浓度成线性关系, C_{3A5} (mg/ml) = 1.10 A₅₉₅; 则 114B 与 3A5

$$\text{偶联分子比为: } 114B/3A5 = \frac{C_{114B}(\mu\text{g/ml})}{C_{3A5}(\mu\text{g/ml})} \times \frac{150}{506}.$$

链黑菌素抑菌活性测定

将过滤灭菌的偶联物及链黑菌素溶液倍比稀释后加于 96 井 U 型培养板, 50 μl/well, 每井加 200 μl 枯草杆菌培养液, 其中含 1% 蛋白胨, 1% 酵母浸膏, 1% 葡萄糖, 2% 枯草杆菌芽胞液和 0.004% TTC 溶液, 37℃ 培养至无样品对照组变红时终止。测每井的 492 nm 吸光值, 对照链黑菌素抑菌效价, 确定偶联物中 114B 含量。

抗体活性 ELISA 测定法

取已用人肝癌 BEL-7402 细胞包被固定的 96 井培养板, 1% BSA, 37℃ 封闭 1 h, PBS-T (T, 吐温 20) 洗 1 次, 加入倍比稀释的待测样品, 放置 37℃ 1 h, PBS-T 洗 3 次; 加入辣根过氧化物酶标记小鼠抗大鼠 Ig 轻链单抗 Mark-3, 37℃ 1 h, PBS-T 洗 3 次; 加入 ELISA 底物反应液, 充分显色后加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶联免疫仪测 492 nm 吸光值, 以 A_{492nm} 对应抗体浓度作图。

克隆生成测定法

取对数生长期的人肝癌 BEL-7402 细胞或人咽上皮癌 KB 细胞, 加于 24 井培养板, 100 cell/1 ml/well, 培养 24 h; 加入 10ⁿ 倍稀释样品, 每井 100 μl, 37℃ 1 h, 无血清 RPMI 1640 洗 1 次, 37℃ 继续培养 6 d, 显微镜下计细胞克隆数 (30 个细胞以上克隆列入计数)。

结 果

不同化学方法连接 114B 与 3A5

在方法 1 中, EDCI 活化 114B (或 3A5) 分子中羧基形成 O-酰基异脲中间体, 该中间体与 3A5 (或 114B) 分子中亲核基团——氨基, 反应形成酰胺键; 方法 2 中, 114B 经 NHS 和 DCC 活化为酯, 与 3A5 分子中氨基缩合生成酰胺键; 方法 3 中, dextran 经 NaIO₄ 氧化

为多聚醛，与 114B 和 3A5 的氨基缩合形成 Schiff 氏键，经 NaBH_4 还原后稳定。

图 1 为方法 3 反应混合物经 Sephadex G-100 分离的洗脱曲线，第一峰经 Coomassie 亮蓝染色后在 595 nm 有紫外吸收，同时具有抗体活性和抗枯草杆菌活性，为 114B 与 3A5 的偶联物；第二峰仅有抗菌活性，为未偶联的 114B。

方法 4 中，114B-BSA (114B/BSA=43:1) 经 DTT 还原，BSA 中二硫键断裂生成 114B-BSA-SH，与经 SPDP 引入吡啶二硫基团的 3A5 发生巯基-二硫键交换反应，在 BSA 与 3A5 分子间引入二硫键；产物经 Sephadex G-100 分离，只显示一个洗脱峰，经检测具有抗体活性及抗菌活性。

图 2 为各种偶联物的紫外吸收光谱，与未偶联的 114B 及 3A5 比较，偶联物同时兼有 3A5 在 280 nm 及 114B 在 370 nm 吸收峰的特性；偶联物 2 和 4 吸收峰较 114B 发生了明显红移。

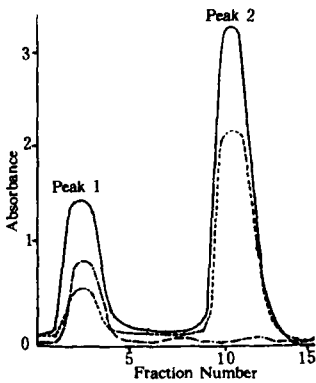


Fig 1 Elution profile of the dextran T-40 treated of mixture 3A5 and 114B. Key: (-) O.D. at 280 nm; (--) O.D. at 370 nm; (-·-·) O.D. at 595 nm.

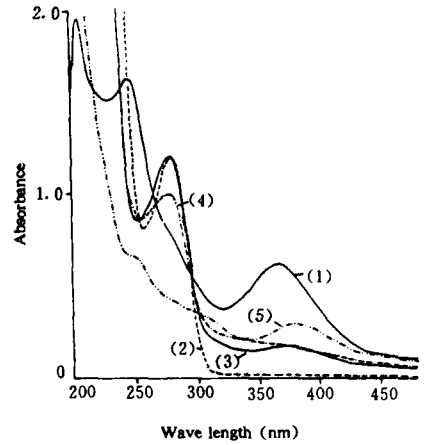


Fig 2 Absorption spectra. (1)114B; (2)3A5; (3)114B-3A5 (method 2); (4)114B-dextran-3A5; (method 3); (5)114B-BSA-3A5 (method 4)

114B 与 3A5 偶联分子比

测定偶联物在 370 nm 处和经 Coomassie 亮蓝染色后 595 nm 处的吸光值，代入公式计算 114B/3A5 偶联分子比，结果列表 1。

偶联物抗体及药物活性保留情况

由图 3 可见，活化酯法 2 基本保留原抗体活性，方法 1 与 3 抗体活性部分损失，而方法 4 抗体活性几乎完全丢失。

Tab 1. Comparison of streptonigrin (114B)-McAb 3A5 conjugates made by different linkage methods

Conjugates	Molar ratio of 114B/3A5	Antibody activity (%)	Drug activity (%)	Protein recovery (%)
1 114B-3A5 (EDCI)	1	66.5	6.25	Not done
2 114B-3A5 (Active ester)	2~6	82~100	12.5	76
3 114B-Dex-3A5	4	73.0	15.6	40
4 114B-BSA-3A5	27	8.9	2.5	Not done

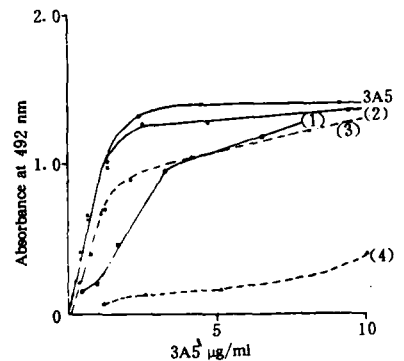


Fig 3 Antibody activity of unconjugated McAb 3A5 and conjugates of 114B and 3A5 (method 1, 2, 3 and 4) determined by Elisa.

以未偶联 3A5 能够饱和全部抗原的最低浓度, 即 $C_{3A5} = 0.003 \text{ mg/ml}$ 时, 偶联物与未偶联 3A5 的吸光值之比衡量抗体活性保留情况, 结果见表 1。

114B 活性保留值 = 抑菌法测得 114B 效价 / 光谱法测定 114B 浓度 $\times 100$, 结果列入表 1。

偶联物 114B-3A5 (活化酯法即方法 2) 及 114B-Dex-3A5 (方法 3) 的体外细胞毒性

表 2 为它们对两种细胞的 IC_{50} ; 以 IC_{50} 比较, 114B-3A5 (2) 和 114B-Dex-3A5 (3) 对肝癌细胞毒性分别较 114B 强 62 倍和 17 倍, 对 KB 细胞毒性比 114B 弱, 分别相当 114B 的 1/11 和 1/13, 表明偶联物对肝癌细胞显示选择性杀伤作用。

Tab 2 Effect of streptonigrin (114B) and its monoclonal antibody conjugates on the survival of liver cancer BEL-7402 cells and KB cells

	IC_{50} (ng/ml as free 114B)	
	BEL-7402	KB
Streptonigrin (114B)	22.4	0.372
114B-3A5 (2)	0.355	4.90
114B-Dex-3A5	1.23	4.16

Determined by clonogenic assay. Cells exposed to drugs for 1 hour.

* 50% inhibition of cell growth.

讨 论

理想的免疫偶合物应是偶合物同时保持原有的抗体结合靶细胞的能力及药物的细胞毒性, 这在很大程度上决定于抗体与药物连接的方式及分子比。因此, 选择合适的连接基团、连接方法和方式尤为重要^(6,7)。我们采用四种连接方法制备 114B 与 McAb 3A5 偶联物; 方法 1, 2 为直接连接法, 由于 EDCI 可同时导致 3A5 和 114B 的同分子间缩合, 产生单抗聚合沉淀及副交叉反应, 抗体和药物活性损失大。活化酯法反应中, 仅是 114B 分子的羧基与 3A5 的氨基缩合, 避免了 3A5 的同分子聚合, 抗体活性保留完好; 偶联物药物活性为原活性的 12.5%, 有一定程度损失, 这是由于偶联反应及偶联后单抗大分子的空间位阻封闭了 114B 的活性基团所致。为了能在 3A5 分子上连接更多 114B 分子, 我们采用间接法偶联 114B 与 3A5, 以 dextran 为中间体制备的 114B-Dex-3A5 偶联物, 114B/3A5 分子比为 4:1, 与直接法相比并未提高, 原因是由于 114B 在水中溶解度小, 使偶联率受到限制, 氧化 dextran 连接法不能避免单抗的同分子聚合, 偶联物抗体活性有所降低, 114B 活性保留 15.6%, 较 2 法稍强; 这是由于在 114B 和 3A5 分子间引入 dextran 中间桥后, 单抗对 114B 活性基团的空间位阻降低。在 BSA 中间体连接法中, 偶联 114B 分子数目较大, 但抗体活性几乎完全损失, 原因是偶联 114B 数目过多导致抗体沉淀, 且抗体受到的空间位阻较大。四种连接方法中, 活化酯法最为有效, 较好地保存了抗体与药物二者的活性, 蛋白回收率为 76%; 虽然 114B 偶联数目仍然较少, 但 114B 细胞毒性极强, 微量 114B 即可达到杀伤细胞作用, 偶联物能够提高 114B 对肿瘤组织的选择性, 即使其偶联率低也可满足杀伤靶细胞的需要。

体外细胞毒性实验中, 对有靶抗原表达的细胞 (BEL-7402), 偶联物显示了比游离 114B 强的细胞毒性, 而对抗原性无关的细胞 (KB), 则细胞毒性较 114B 弱, 说明偶联物细胞毒性强弱与细胞表面靶抗原表达多少直接相关。偶联物 114B-Dex-3A5 对 BEL-7402 细胞毒性较 114B-3A5 (2) 弱, 这与 114B-Dex-3A5 的抗体活性损失较大相对应, 提示偶联物对肝癌细胞的选择性杀伤作用是由抗体介导的。

在偶联物 2,4 UV 谱中, 114B 吸收峰较游离 114B 明显红移, 推测是由于 114B 分子中的羧基与 3A5 分子的氨基形成酰胺键, 使吸收峰向长波移动; 由此推定, 活化酯法反应 114B 的连接基团为羧基。在方法 3 中, 114B 则是通过分子中氨基与 dextran 偶联。

致谢 本工作得到甄永苏教授的指导与帮助。

参 考 文 献

- 1 Rao KV, Cullen WP. Streptonigrin, an antitumor substance I. Isolation and characterization. *Antibiot Annu* 1959 ~ 1960; 950.
- 2 Edward WH, et al. Clinical experience with streptonigrin. *Cancer Chemother Rep* 1961; 12: 99.
- 3 Hackethal CA, et al. Clinical observation on the effects of streptonigrin in patients with neoplastic disease. *Antibiot Chemother* 1961; 11: 178.
- 4 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.
- 5 Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989: 18.47 ~ 18.60.
- 6 Ghose TI, et al. Preparation of antibody-linked cytotoxic agents. *Methods Enzymol* 1983; 93: 280.
- 7 Reisfeld RA, et al. Promises, problems, and prospects of monoclonal antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Antibody Immunoconjugates Radiopharm* 1989; 2: 217.

PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF MONOCLONAL ANTIBODY—STREP- TONIGRIN IMMUNOCONJUGATES

YP Liu and JB Wu

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT The clinic use of streptonigrin (114B), a highly active antitumor antibiotic, is limited by its detrimental effects on normal tissues. In an attempt to improve its specificity streptonigrin was conjugated to anti-human hepatoma monoclonal antibody 3A5 by four different chemical linkage methods. The first method was via water-soluble carbodiimide (EDCI) to create conjugates (1); in the second, an active ester of streptonigrin was applied as a reactive intermediate (2); and in the other two, spacers were put to use for coupling streptonigrin to McAb 3A5-Dextran T-40 (3) or McAb 3A5-bovin serum albumin (BSA) (4). The conjugates showed biological activities and UV spectral characteristics of streptonigrin and 3A5. As determined by clonogenic assay with human hepatoma BEL-7402 cells for 1 hour exposure, the IC_{50} for conjugate (2), conjugate (3) and streptonigrin were 0.355 ng/ml, 1.23 ng/ml and 22.4 ng/ml, respectively. The potency of conjugates (2) and (3) were 63-fold and 18-fold stronger than that of free streptonigrin. Clonogenic assay with KB cells which weakly react with 3A5 by Elisa showed that the potency of conjugate (2) and (3) were 11-fold and 13-fold weaker than free streptonigrin, respectively. The results suggest that the conjugates of McAb 3A5 and streptonigrin show specific cytotoxicity to target liver cancer cells. The linkage groups of streptonigrin were also discussed.

Key words Monoclonal antibody; Streptonigrin; Immunoconjugate; Cytotoxicity