

免疫毒素研究与肿瘤治疗

李 钰 云

(军事医学科学院基础医学研究所)

免疫毒素的问世,主要是作为一种导向药物,它是将抗体分子与植物或细菌来源的毒素偶联形成的杂交分子,兼备抗体的特异性和毒素的杀细胞能力。本世纪初,德国药物化学家 Ehrlich 提出了“双功能化学治疗剂”的概念,这种治疗剂由毒素部位和结合部位组成。如果利用对特定器官有亲和力的物质作为载体,就能将药物或毒性物质带到病灶上去。后来又有人提出用抗体作为这样一种载体。但当时由于种种原因,例如可用于结合的药物不多,而且毒性不强;抗体的纯度和特异性差;制备结合物的方法不理想等等,因此定向药物的设想一直未能实现。近年来,随着新的抗癌药物和细胞毒药物的出现,尤其是单克隆抗体的问世,使这一领域又活跃起来。目前导向药物的载体部分并不局限于抗体,另外一些生物大分子,如受体的配基,激素,酶等都可以作为载体起导向作用。而导向药物中的毒性部位也已不仅仅限于植物或细菌毒素。抗肿瘤药物,如道诺霉素、苯丁酸氮芥;放射性同位素,如 ^{125}I 、 ^{131}I 也可以作为毒性部分。本文仅综述抗体与毒素结合物,即免疫毒素内外杀伤和定位研究,以及在异基因骨髓移植和自身骨髓移植的实验和临床研究中的结果。

一、毒素的特点

用于制备免疫毒素的毒素很多,用得最多的是植物毒素和细菌毒素。

植物毒素又分两类,一类是完整毒素也称双链毒素,如蓖麻毒素^[1]、红豆毒素^[2]、莨菪根毒素等,它们的结构与性质相似。以蓖麻毒素为例,它是由分子量为 30000 和 32000 道尔

顿的 A、B 两条链藉助于一个二硫键连接而成。B 链称为结合链,每个 B 链分子上有两个半乳糖结合位点,它能与几乎所有细胞表面糖肽或糖脂的半乳糖末端结合,因此专一性较差。A 链也称为活性链,是蓖麻毒素毒性的体现者,进入细胞以后,可抑制蛋白合成,导致细胞死亡。另一类是单链植物毒素,也叫做单链核糖体失活蛋白(Ribosome-Inactivating-Proteins, RIP)。它们均为分子量为 30000 道尔顿的单个多肽链,性质与特点相似于 RicinA 链。其中天花粉蛋白的氨基酸序列和 A 链很相似^[4]。它们在无细胞蛋白质合成体系中呈现强烈抑制作用而对完整的细胞几乎无毒性。由于它们是天然存在着的单链蛋白,性质稳定,纯化和操作时安全,不混有可能的全毒素,所以用它们制成的免疫毒素具有一些特殊的优点^[5]。

常用的细菌毒素主要有两种:白喉毒素和绿脓杆菌外毒素。它们都是单链多肽,分子量约为 62000,但在结构上不同。白喉毒素的前体分泌出来以后被切除 25 个氨基酸成为成熟的白喉毒素,再经胰蛋白酶有限分解后,形成 A、B 两个大片段,中间由一个二硫键相连^[6,7]。B 片段的功能是与受体结合, A 片段具有催化活性,抑制蛋白合成,导致细胞死亡。绿脓杆菌外毒素分泌出来后,也要经过一个活化过程,该过程可能和白喉毒素不同^[8,9]。绿脓杆菌外毒素分为三个功能区^[10]。区 I 是与特异性受体结合的部位,区 II 具有穿膜的功能,区 III 具有催化抑制蛋白合成的功能。

毒素首先通过 B 链(或 B 片段,或区 I)

沈倍奋审校。

介导与细胞表面结合,然后局部内陷,成为吞噬体。少量A、B链分开,A链穿过吞噬体膜进入胞浆,作用于核糖体。多数分子或被转移到溶酶体消化掉,或重新返回细胞膜,实现再循环。也有些毒素必须从吞噬体转运到高尔基氏体后,才能释放出A链^[11]。在A链穿膜的过程中,B链起着非常重要的辅助作用,缺乏B链,A链穿膜速度大大降低。B链的这种辅助功能与其半乳糖结合位点是无关的,其机制尚不清楚。可能是B链的疏水区插入胞膜形成A链易于通过的脂性通道。另外,局部pH值的高低对A链的穿膜也有很大影响。白喉毒素、绿脓杆菌外毒素以及蒴苈根毒素必须在低pH条件下进入胞浆^[12],而蓖麻毒素,红豆毒素在高pH条件下更易进入细胞浆^[13]。

毒素如何使核糖体失活,蛋白质合成停止,从而导致细胞死亡,这个最后的效应机制在植物毒素和细菌毒素是不同的。白喉毒素和绿脓杆菌外毒素的A片段或相应的功能区在NAD⁺的存在下,共价修饰肽链延伸因子II,生成ADP-核糖化的肽链延伸因子II,使该因子失去功能,蛋白质合成停止^[14]。蓖麻毒素等植物毒素主要作用于核糖体。A链具有RNA N-糖苷酶活性^[15,16],它作用于真核细胞28S rRNA的A 4324位上的糖苷键,将腺苷水解掉,但RNA骨架仍然保持完整。这个区域是核糖体结合氨酰化tRNA的部位^[17],所以影响核糖体合成蛋白质的功能。A链的催化效率极高,1个A链每分钟可使1500个核糖体失活^[18],1个A链进入细胞即能杀死该细胞。

天然单链植物毒素的作用机制与A链相似,最近有实验证实了商陆抗病毒蛋白(PAP)也是以这种方式作用于核糖体的^[19]。

二、免疫毒素的制备及细胞毒性质

免疫毒素是指由特异抗体和毒素共价或非共价连接而成的杂交分子。根据连接反应的化学性质来分,有非共价连接和共价连接。非共价连接指在适当的反应条件下,例如高pH时,

苯丁酸氮芥能非共价地连接到IgG上,或指抗原抗体的相互作用。Raso^[20]用抗Ricin A链的抗体和抗人IgG抗体组成的杂合分子,将A链释放到有表面Ig的细胞中。非共价连接的结合物在体液中不稳定,现已不多用。

将毒素共价连接到抗体上去的试剂有同型双功能连接剂,如戊二醛,但这类试剂能引起同种分子间的聚合,而异型双功能连接剂就能避免这种缺点。目前常用的该类试剂有3种:3-(2-吡啶二巯基)丙酰-N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)^[21]、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBS)^[22]、2-亚氨基四氢噻吩(2-IT)^[23]。它们的反应过程不完全一样,各有特点,但原理基本相同。就SPDP来说先使SPDP分别与所要连接的蛋白反应形成带有二硫键的SPDP衍生物,然后再还原其中之一,再使两者反应,通过巯基与二硫键的交换形成抗体与毒素的结合物。

一个特定的免疫毒素的性质是由其毒素及所连的单克隆抗体所决定的。免疫毒素的体外实验,其目的是为了鉴定其杀伤效率及对靶细胞的特异性,以提供必要的临床前资料。蛋白质合成抑制试验是一种简单而又最常用的方法。通过观察免疫毒素对相应靶细胞蛋白质合成的抑制,了解免疫毒素有无毒性以及毒性大小。方法的优点是简单,重复性好,适合于动力学观察,适合于任何培养的细胞系。集落形成实验是另一种常用的方法,它测量植入细胞的繁殖分裂能力,优点是较敏感,少量存活细胞也能检测出来。缺点是实验周期较长。此外还有染料排斥法,也是一种检测存活细胞的方法。

免疫毒素分两类,一类是抗体与完整毒素的结合物,另一类是抗体与A链或天然单链毒素的结合物。用完整毒素如蓖麻毒素制备的免疫毒素对相应靶细胞具有强而稳定的毒性,但由于B链的结合位点,它们仍然杀伤具半乳糖残基的非靶细胞,所以在使用时应加0.1 mol/L半乳糖以封闭B链的结合位点,防止非

特异性杀伤。

A 链或天然单链制备的免疫毒素避免了 B 链引起的非特异性, 其特异性完全依赖于抗体的特异性, 但遗憾的是, 它们对靶细胞的毒性差异很大, 有的很强, 有的很弱。实验证明所有单链免疫毒素的毒性均比双链免疫毒素差, 这表明了 B 链的辅助功能。人们已做了大量的工作来提高单链免疫毒素的毒性, (1) 与游离 B 链或接上单抗的 B 链同时使用^[24]; (2) 加入灭活病毒如腺病毒^[25], 因为这些病毒能在细胞膜上打孔, 便于免疫毒素穿膜; (3) 加入某些药物如氯化铵、氯奎等亲溶酶体药, 它们能改变溶酶体内 pH 值, 降低溶酶体活性, 从而提高免疫毒素的活性^[26]。

三、免疫毒素的临床应用

研究免疫毒素的最终目的是应用于临床治疗人类的某些疾病, 目前除少数报告已用于临床, 大多数仍处于实验研究阶段。它们的临床应用主要有这样几方面:

(1) **骨髓移植** 这是最有前途的, 也是研究得最成功的一个领域。骨髓移植主要用于治疗血液系统疾病和某些肿瘤, 如白血病、再障性贫血、骨髓转移性肿瘤等。骨髓移植又分两种情况, 即同种异体骨髓移植和自体骨髓移植。前者主要用抗 T 细胞的免疫毒素处理供者的骨髓, 去 T 细胞的骨髓可以预防移植后的 GVHD。1987 年 Filipovich, A.H 等报道了他们的工作^[27]。他们对 17 位急性淋巴细胞白血病患者进行骨髓移植, 并用免疫毒素处理他们相应的 HLA 相配合的供者。患者经大剂量放疗后植入处理过的骨髓。28 天后, 有 12 位患者移植成功, 仅 4 位患者出现二级 GVHD。与其它方法防止 GVHD 的患者比, 这些病人恢复更快, 更好。自体骨髓移植主要用于没有 HLA-MHC 匹配供者的血液病患者。首先将病人的骨髓取出, 然后对病人进行超致死剂量的放疗, 几乎彻底消灭病人体内的白血病细胞。同时对取出的骨髓用免疫毒素处

理, 杀死其中残留的白血病细胞, 然后再输回病人体内。骨髓中白血病细胞清除得越彻底, 病人复发的机会就越少。

(2) **实体瘤治疗** 免疫毒素在实体瘤治疗上有其特殊的情况。主要考虑的因素有: 结合物在体内的稳定性, 肿瘤细胞的异质性, 肿瘤的定位与可接近性, 免疫毒素的生物学分布等。所有这些给实体瘤的治疗带来了很大的困难。目前研究得较多的实体瘤有黑色素瘤及直肠结肠癌。Spitter 等^[28]首先对 22 位恶性转移性黑色素瘤患者作了临床试验, 观察免疫毒素的使用剂量、毒副作用等。1987 年他们又对 46 位化疗失败的患者进行了 II 期临床试验, 进一步观察免疫毒素的效力等问题。结果表明免疫毒素治疗黑色素瘤的效果是肯定的, 今后的努力方向应该放在增强其效力上。

四、问题和展望

免疫毒素在体外已显示出对靶细胞高效的杀伤力, 但在体内应用目前尚未取得根本性突破, 有许多困难尚待克服。(1) 抗体的专一性: 至今所发现的肿瘤标志都是肿瘤相关抗原, 所以相应的单克隆抗体没有绝对的专一性, 解决办法是大规模筛选, 找出专一性更强的单抗。(2) 肿瘤细胞的不均一性: 同一肿瘤可能有几种类型, 它们的表面抗原种类及分布不同, 仅靠一种单抗制成的免疫毒素是难以奏效的。以同一肿瘤的几种单抗制成的免疫毒素混合使用杀伤靶细胞的能力将会更强^[29]。(3) B 链的非特异性结合: 完整毒素的免疫毒素, 因其 B 链能与正常细胞结合, 以致妨碍了在体内的应用, 但由于它比单链免疫毒素的毒性强, 所以不少人致力于研究如何去掉 B 链的非特异性结合。目前主要有两种方案, 一种是化学修饰 B 链使结合位点失去功能; 另一种是用基因工程方法改造 B 链基因, 使其丧失结合半乳糖的能力, 但仍保持增强由 A 链构成的免疫毒素的活性。(4) 免疫毒素的降解和清除: 体内应用的另一障碍是免疫毒素易被单核吞噬细胞

系统清除。原因是这些细胞上有甘露糖受体，而蓖麻毒素的 A、B 链上又富有甘露糖寡糖侧链。解决办法是用高碘酸氧化破坏甘露糖末端或用酶法将糖链降解。(5) 免疫毒素的免疫原性：迄今为止所用单抗均是小鼠来源，对人具有免疫原性，而且毒蛋白也是一种异种蛋白。后者可以用更换毒素种类来解决，前者则最好用人单抗来取代鼠单抗。另一个有希望的解决方法是制备嵌合抗体，即用人免疫球蛋白的恒定区代替鼠抗体中重链的恒定区，这样可以减轻鼠单抗在人体内的免疫反应^[30]。更理想的是用毒蛋白的 A 链基因取代单抗恒定区基因，使表达产物本身即为一种免疫毒素。

免疫毒素仍然是一个很年轻的领域，在克服前面所述的一些障碍之后，将会产生新一代的免疫毒素。不难设想，它们终将成为肿瘤治疗中最强有力的“魔弹”。

摘 要

抗体与毒素的结合物称免疫毒素，是导向药物的一种，它能特异性杀伤靶细胞。本文综述了免疫毒素中常用毒素的特点和抑制蛋白质合成的机理，以及由它们组成的免疫毒素的细胞毒性质，临床应用的初步效果及目前存在的主要问题及克服方法。

参 考 文 献

- [1] Jimenez A. and Vasquez D., 1985, *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 649.
- [2] Olsnes S. and Pihl A., 1973, *Eur. J. Biochem.*, 35: 179.
- [3] Refsnes K. et al., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79: 1176.
- [4] Zhang X. and Wang J., 1986, *Nature.*, 321: 477.
- [5] Stirpe F. and Barbieri L., 1986, *FEBS Lett.*, 195: 1.
- [6] Greenfield L. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 6853.
- [7] Ratti G. et al., 1983, *Nucl. Acids Res.*, 11: 6589.
- [8] Lory S. and Collier R. J., 1980, *Infect Immun.*, 28: 494.
- [9] Leppla S. H. et al., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8: 532.
- [10] Hwang J. et al., 1989, *Cell*, 48: 129.
- [11] Olsnes S. et al., 1985, *Biochem. Soc. Symp.*, 150: 171.
- [12] Sandvig K. and Olsnes S., 1980, *J. Cell Biol.*, 187: 828.
- [13] Sandvig K. and Olsnes S., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 7504.
- [14] Nicholson G. L. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70: 1672.
- [15] Yaeta E. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262(12): 5908.
- [16] Yaeta E. and Kunio T., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262(17): 8128.
- [17] Endo Y. and Wool I. G., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 8054.
- [18] Olsnes S. et al., 1976, In *Receptors and Recognition*, Series B, ed. by P. Cuatrecasas, pp. 129-173. Chapman and Hall, London.
- [19] Endo Y. and Tsurugi K., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 8128.
- [20] Raso V. et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62: 93.
- [21] Carlsson J. et al., 1978, *Biochem. J.*, 173: 723.
- [22] Lin F. F. et al., 1979, *Biochemistry.*, 18: 690.
- [23] King T. P. et al., 1978, *Biochemistry*, 17: 1499.
- [24] Vitetta E. S. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6332.
- [25] Seth P. et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4: 1528.
- [26] Casellas P. et al., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 9359.
- [27] Filipovich A. H. et al., 1987, *Transplantation.*, 44: 62.
- [28] Spitler L. E. et al., 1987, *Cancer Res.*, 47: 1717.
- [29] Vallera D. A. et al., 1983, *Science*, 222: 512.
- [30] Boulianne G. L. et al., 1984, *Nature.*, 312: 643.