

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.008

抗人 CD40 单克隆抗体偶联纳米胶束药物载体系统的构建及其生物学特性

郑毅¹, 于洋^{2▲}, 瞿秋霞³, 黄沁³, 邱利焱^{2△}, 张学光¹(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院免疫学系, 江苏苏州 215007; 2. 浙江大学药学院药物制剂研究所, 浙江杭州 310058; 3. 苏州大学附属第一医院江苏省临床免疫研究所, 江苏苏州 215007)

[摘要] **目的:**将抗人 CD40 单克隆抗体 5C11 与 3 种含有不同反应基团的聚合胶束(polymeric micelle, PM)偶联, 构建相应 5C11 偶联的聚合胶束(5C11 coupled polymeric micelle, PM-5C11), 筛选出其中最合适与 5C11 偶联的 PM, 并观察该偶联物的生物学特性。 **方法:**分别合成 3 种不同化学结构的聚合物材料, 制备相应 PM, 与 5C11 偶联后制备 PM-5C11, 选择其中偶联率和生物安全性均较高的作为最适 PM-5C11。将最适 PM-5C11 与人 Burkitt 淋巴瘤 Daudi 细胞株作用, 观测其生物学活性及其被 Daudi 细胞摄取的能力。 **结果:**成功制备了分别含对甲苯磺酸酯基、丙烯基、羧基的 3 种 PM, 其中含对甲苯磺酸酯基和羧基的 PM 与 5C11 的偶联率均明显高于含丙烯基的 PM 的偶联率[(28.08 ± 2.24)%、(29.06 ± 1.37)% vs (21.26 ± 1.04)% , $P < 0.05$]; 由于含羧基的 PM 在制备过程中易残留细胞毒性物质, 故选取含对甲苯磺酸酯基的 PM 作为最适 PM。相应的最适 PM 成功偶联 5C11 形成 PM-5C11, 最适 PM-5C11 显示出 5C11 原有的生物学活性, 并且可被 Daudi 细胞摄取。 **结论:**构建的 3 种 PM 中, 含对甲苯磺酸酯基的 PM 在生物安全性、偶联率及相应 PM-5C11 的生物学活性方面最优, 可作为构建纳米药物载体的最佳选择。

[关键词] CD40 单克隆抗体; 聚合胶束; 纳米药物载体; 肿瘤免疫治疗; Burkitt 淋巴瘤; Daudi 细胞

[中图分类号] R979.1; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0552-07

Construction and biological activity of nano micelles drug delivery system coupled with human CD40 monoclonal antibody

Zheng Yi¹, Yu Yang^{2▲}, Qu Qiuxia³, Huang Qin³, Qiu Liyan^{2△}, Zhang Xueguang¹(1. Department of Immunology, School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Institute of Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 3. Institute of Clinical Immunology of Jiangsu Province, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** A human CD40 monoclonal antibody, 5C11, was coupled with three kinds of polymeric micelles (PMs) containing different chemical groups respectively to construct the corresponding 5C11 coupled polymeric micelles (PM-5C11). The optimal PM for coupling with 5C11 was selected among them, and evaluate its biological activity. **Methods:** Three kinds of copolymers with different chemical composition were synthesized respectively to prepare the corresponding PM and PM-5C11 after coupled with 5C11. The PM-5C11 which exhibited both higher coupling efficiency and greatest biological safety was selected to be the optimal one among them. The optimal PM-5C11 was then interacted with Daudi cell line, derived from human Burkitt lymphoma, to evaluate its biological activity and the cellular uptake by Daudi cells. **Results:** Three kinds of PMs containing tosyl group, allyl group or carboxyl group had been prepared successfully.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101556); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目资助(No. CXZZ11_0110); 苏州市科技发展计划项目(No. SYSD2011084)。 Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101556), the Research Innovation Project for University Graduate Students in Jiangsu Province (No. CXZZ11_0110), and the Science and Technology Development Project of Suzhou (No. SYSD2011084)

[作者简介] 郑毅(1985 -), 男, 河南省漯河市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: zhengyi198575@163.com; 于洋(1985 -), 男, 江苏省泰兴市人, 博士生, 主要从事药物制剂方面的研究, E-mail: yuyang031985@163.com。 ▲共同第一作者

[通信作者] 张学光(Zhang Xueguang, corresponding author), E-mail: xueguangzh@126.com; 邱利焱(Qiu Liyan, co-corresponding author), E-mail: lyqiu@zju.edu.cn。 △共同通信作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1552.003.html>

The coupling efficiencies of 5C11 to PMs containing tosyl group or allyl group were both higher than that to PM containing carboxyl group ($[28.08 \pm 2.24]\%$, $[29.06 \pm 1.37]\%$ vs $[21.26 \pm 1.04]\%$, $P < 0.05$). The PM containing tosyl group was chosen to be the optimal one because cytotoxic reagent remained during the preparation of the PM containing allyl group. The corresponding optimal PM coupled with 5C11 to form PM-5C11, which exhibited the original bioactivity of 5C11 and could be uptaken by Daudi cells. **Conclusion:** Among the three kinds of PMs, the PM containing tosyl group exhibits the best biological safety and the relative higher coupling efficiency; its corresponding PM-5C11 shows the best biological activity. This PM could be the best choice for constructing the nano-drug carrier.

[**Key words**] CD40 monoclonal antibody; polymeric micelle; Burkitt; nano-drug carrier; tumor immunotherapy; Burkitt lymphoma; Daudi cell

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 552-558]

CD40 分子是适应性免疫应答过程中重要的协同刺激分子^[1], 激活肿瘤细胞中 CD40 信号能抑制肿瘤生长, 以 CD40 分子为靶点的单克隆抗体治疗肿瘤备受关注^[2-4]。CD40 单抗联合新型纳米免疫佐剂可提高其抗肿瘤效应, 为肿瘤免疫治疗提供了新的途径^[5]。CD40 单抗 5C11 能抑制 CD40 阳性肿瘤细胞的增殖, 提高其对化疗药物的敏感性, 有望与纳米佐剂联合应用, 发挥更好的抗肿瘤作用^[6-7]。聚合胶束 (polymeric micelle, PM) 作为优良的纳米载体, 通过与单克隆抗体偶联, 可携带单抗与药物对肿瘤细胞进行特异性杀伤^[8-10]。PM 与抗体的偶联方法有多种^[11-13], 通过单抗表面的氨基残基可直接与对甲苯磺酸酯基、羧基、丙烯基等发生偶联反应, 偶联后抗体仍然维持其生物学活性^[14-17]。本研究制备了 3 种分别含对甲苯磺酸酯基、羧基、丙烯基的 PM 并偶联至 5C11 单抗, 得到相应偶联 5C11 的 PM (5C11 coupled polymeric micelle, PM-5C11), 然后在保证生物安全性的前提下, 检测 3 种 PM 与 5C11 抗体的偶联率, 并进一步探究最适 PM-5C11 的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人类 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Daudi 购自中科院上海细胞库, 使用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中常规培养。聚乙二醇 (poly ethylene glycol, PEG)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、对甲基苯磺酰氯 (P-toluenesulfonyl chloride, TsCl)、4-二甲氨基吡啶 [4-(dimethylamino)pyridine, DMAP]、辛酸亚锡 [Tin (II) 2-ethylhexanoate, Sn(Oct)₂]、维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000

succinate, TPGS) 均购买于 Sigma 公司, D, L-丙交酯 (D, L-lactide, D, L-LA) 购自于山东医疗器材研究所。抗人 CD40 单克隆抗体 5C11 由本研究所自行制备^[18]。微量蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程公司, G250 染色液购自江苏碧云天公司, PE 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 Beckman 公司, 核磁共振波谱仪 ACF300 购自德国 Bruker 公司, 红外光谱仪 FT/IR-4100 购自日本 JASCO 公司, 粒径分析仪 Nano-S90 购自英国 Malvern 公司, 激光共聚焦显微镜 LSM 410 购自德国蔡司公司。

1.2 3 种聚合物材料的合成

聚乙二醇对甲苯磺酸酯-聚乳酸 (PLA-PEG-OTs) 的合成: 取 PEG 4.6 g、三乙胺 (triethylamine, TEA) 0.3 g, 加入 10 ml 二氯甲烷 (dichloromethane, DCM), 冰水浴搅拌 30 min。恒压漏斗中为溶有 TsCl 0.2 g、DMAP 12.2 mg 的 30 ml DCM 溶液, 缓慢滴加于含 PEG 和 TEA 的 DCM 溶液中, 滴加完后恢复至室温搅拌反应 24 h。依次通过减压蒸馏、过滤、冰乙醚沉淀滤液, 过滤收集, 室温真空干燥得到 HO-PEG-OTs。称取 HO-PEG-OTs 1 g、D, L-LA 0.8 g, 加入适量催化剂 Sn(Oct)₂, 130 °C 反应 24 h。最后将反应产物溶于 DCM, 经冰乙醚沉淀、过滤收集、真空干燥得到 PLA-PEG-OTs。

聚乙二醇丙烯酸酯-聚乳酸 (PLA-PEG-A) 的合成: 基本同 PLA-PEG-OTs, 不同之处为恒压漏斗中为 20 ml 溶解有丙烯酰氯 100 mg 的 DCM 溶液, 纯化 HO-PEG-A 时减压蒸馏后使用四氢呋喃溶解产物后再进行过滤, 其余步骤相同。

羧基化维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS-COOH) 的合成: 取 TPGS 450 mg、丁二酸酐 150 mg、DMAP 5 mg 及 150 mg TEA, 加入 10 ml 二氧六环, 50 °C 搅拌反应 36 h。反应结束后通过减压蒸馏、冰乙醚沉淀、过滤收集、室温真空干燥得到 TPGS-COOH。

采用氢核磁共振(hydrogen nuclear magnetic resonance, $^1\text{H NMR}$)对 PLA-PEG-OTs 和 PLA-PEG-A 进行结构分析,将其分别溶于氘代氯仿中,使用核磁共振波谱仪进行检测;采用红外光谱仪对 TPGS-COOH 进行测定。

1.3 3种PM的制备

PM均采用丙酮溶剂蒸发法制备^[19]:分别取上述3种聚合物20 mg置于2 ml丙酮中溶解,边搅拌边缓慢加入0.02 mol/L(pH 9.0)的PBS溶液2 ml,混合均匀后于35℃减压蒸馏除去丙酮即得PM溶液,0.22 μm 滤膜过滤,备用。为便于描述,将 PLA-PEG-OTs 制备的PM溶液称为PM 1溶液;PLA-PEG-A 制备的PM溶液称为PM 2溶液;TPGS-COOH 制备的PM溶液称为PM 3溶液。

1.4 3种PM-5C11的制备及纯化

取PM 1或PM 2溶液200 μl (10 mg/ml),加入20 μl 5C11溶液(1.91 mg/ml)混合均匀后,4℃孵育12 h得到PM-5C11溶液。PM 3溶液与5C11偶联反应稍有不同,即在反应液中加入1 mg NHS和1 mg EDC,其他步骤相同。将PM-5C11溶液通过Sephadex G200葡聚糖凝胶柱,0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗脱,1 ml/管为单位收集各时相洗脱液。使用G250染料测定洗脱液中PM,微量蛋白浓度测定试剂盒检测洗脱液中游离5C11,得到3者的洗脱曲线,并依此曲线分离纯化PM-5C11。为便于描述,分离纯化后3种PM-5C11溶液相应称为PM-5C11-1、PM-5C11-2、PM-5C11-3溶液。

1.5 3种PM-5C11的粒径及5C11含量的检测

粒径分析仪上测定3种PM-5C11粒径大小及粒径分布。按BCA法微量蛋白质浓度测定试剂盒说明书绘制标准曲线,检测通过Sephadex G200葡聚糖凝胶柱纯化后3种PM-5C11中5C11的含量,并计算偶联率。偶联率(%)=(PM-5C11中5C11含量/反应中5C11的加入量) $\times 100\%$ 。

1.6 最适PM-5C11生物学活性的检测

Burkitt淋巴瘤Daudi细胞株常规培养,于实验前1 d更换培养液,将处于对数生长期的细胞接种于6孔板中,调节细胞密度至 2×10^5 个/孔,于6孔板内分别加入200 μl PM 1溶液(1.5中检测确认为最适PM-5C11,10 mg/ml)、PM-5C11-1溶液(10 mg/ml)及5 μl 5C11溶液(1.91 mg/ml),37℃孵育48 h后,使用显微镜观察各孔内Daudi细胞是否发生同型聚集。

1.7 激光共聚焦显微镜观察Daudi细胞摄取最适PM-5C11

取PM-5C11-1溶液200 μl 加入到含Daudi细胞的6孔板内(细胞密度同1.6所述),5% CO_2 、37℃条件的培养箱中孵育1 h后,PBS离心洗涤3次。随后使用甩片机将Daudi细胞贴于载玻片上,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗涤3遍,加入0.2% Triton 破膜10 min。PBS洗涤后,加入PE标记的羊抗小鼠IgG二抗,4℃孵育30 min。最后加入10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258核染液室温染色10 min,PBS洗涤、干燥后,滴加50%甘油、封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.8 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含对甲苯磺酸酯基、丙烯基、羧基的3种聚合物的鉴定

使用 $^1\text{H NMR}$ 对聚合物进行结构鉴定,结果(图1A)显示:PLA-PEG-OTs信号峰位于 δ 7.80、7.35(Ar-H), δ 5.17、1.58为PLA特征峰, δ (3.90~3.40)为PEG主链峰,(CH_2OTs)的特征峰位于 δ 4.16,表明PLA-PEG-OTs成功合成,计算相对分子质量为8514。图1B显示:PLA-PEG-A的信号峰位于 δ 6.24、6.08,除PLA和PEG链特征峰外,可见丙烯酸酯(CH_2CHCO_2)的特征峰 δ 5.85,表明PLA-PEG-A成功合成,计算相对分子质量为8531。图1C为TPGS-COOH的合成及其红外光谱图,1738 cm^{-1} 处为羧基中羰基($\text{C}=\text{O}$)的信号峰,结果表明TPGS与丁二酸酐反应生成了TPGS-COOH。

2.2 3种PM与5C11偶联后PM粒径增大

3种PM的粒径分析结果(图2)显示,PM 1粒径为(27.6 \pm 0.2) nm,偶联5C11后粒径为(35.1 \pm 0.5) nm;PM 2粒径为(28.2 \pm 0.3) nm,偶联5C11后粒径为(35.3 \pm 0.4) nm;PM 3粒径为(19.9 \pm 0.6) nm,偶联5C11后粒径为(29.3 \pm 0.7) nm。多分散指数(polydispersity index, PDI)是反映粒径分布均一性的指标,其数值越小说明PM越均一,通常 $\text{PDI} < 0.5$ 视为PM均一性良好。本研究中,偶联5C11后PM 1的PDI由(0.132 \pm 0.014)变为(0.265 \pm 0.025);PM 2的PDI由(0.163 \pm 0.021)变为(0.210 \pm 0.019);PM 3的PDI由(0.328 \pm 0.034)变为(0.413 \pm 0.041)。结果表明:PM与5C11偶联后粒径及分布有微小变化,偶联前后粒径均较小且分布较均一。

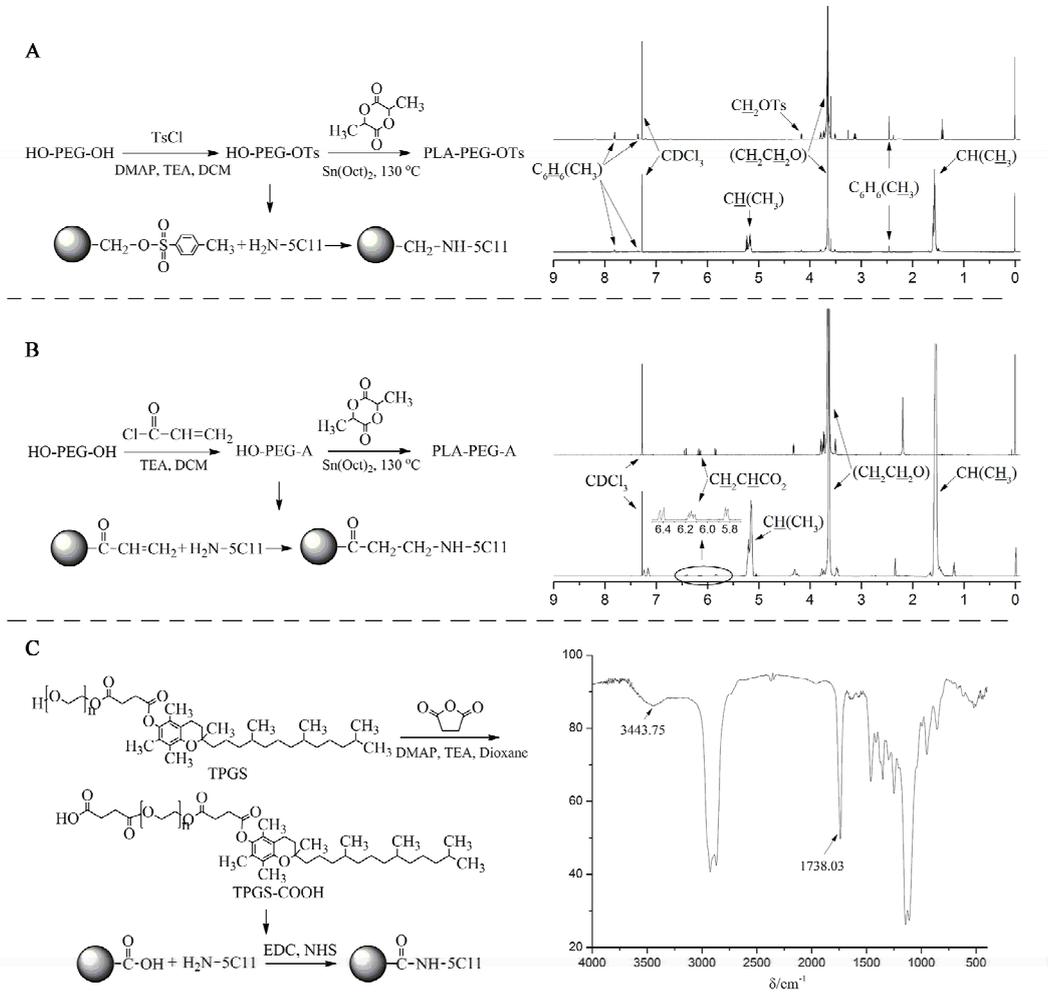


图 1 3 种聚合物的制备及¹H NMR 或红外光谱鉴定

Fig. 1 Preparation and ¹H NMR or infrared spectrum identification of three kinds of copolymers
A: PLA-PEG-OTs; B: PLA-PEG-A; C: TPGS-COOH

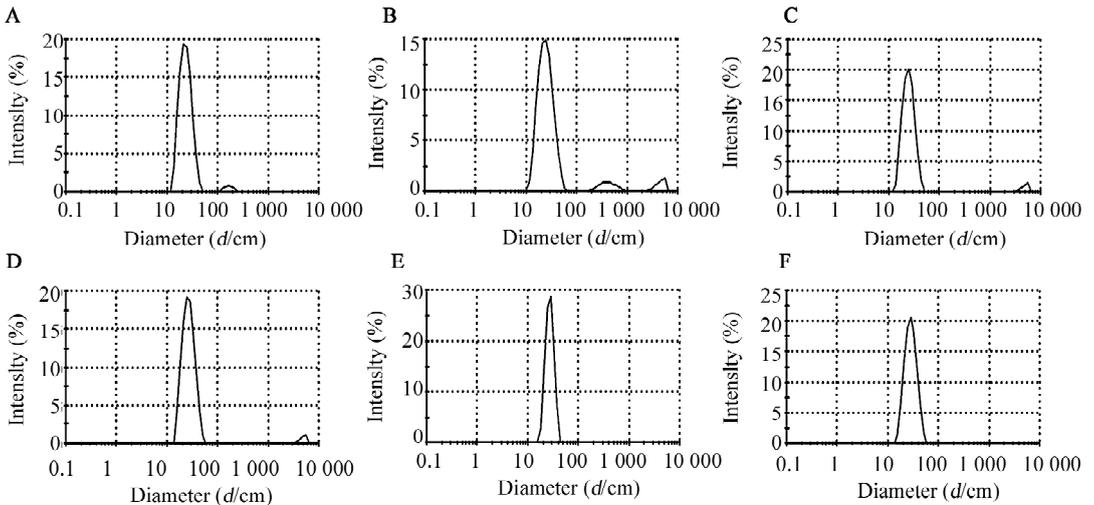


图 2 PM 和 PM-5C11s 平均粒径分布

Fig. 2 Mean diameter distribution of PM and PM-5C11

A: PM 1; B: PM-5C11-1; C: PM 2; D: PM-5C11-2; E: PM 3; F: PM-5C11-3

2.3 3 种 PM-5C11 的有效分离纯化

紫外分光光度法测定 G250 染液联合微量蛋白浓度测定试剂盒检测各时相洗脱液反应后的 *D* 值, 得到 3 种 PM-5C11 的洗脱曲线。结果(图 3)显示, PM-5C11-1 于第 4~7 ml 时洗脱; PM-5C11-2 于第 3~6 ml 时洗脱; PM-5C11-3 于第 3~7 ml 时洗脱; 而游离 5C11 于第 12~16 ml 时洗脱, 得到 3 种纯化的 PM-5C11。

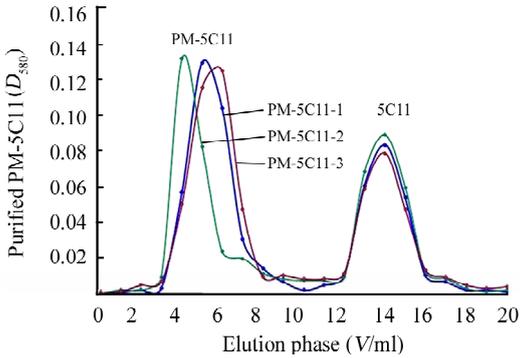


图 3 紫外分光光度法检测 3 种 PM-5C11 各时相洗脱液 *D* 值

Fig. 3 Detection of *D* value of three kinds of PM-5C11 in different elution phases by ultraviolet spectrophotometry

2.4 PM-5C11-1 为最适偶联物

微量蛋白浓度测定试剂盒标准曲线及 3 种 PM-5C11 中 5C11 的含量检测结果显示, PM-5C11-1 溶液中 5C11 含量为 $(10.73 \pm 0.86) \mu\text{g}$, 偶联率为 $(28.08 \pm 2.24)\%$; PM-5C11-2 溶液中 5C11 含量为 $(8.12 \pm 0.40) \mu\text{g}$, 偶联率为 $(21.26 \pm 1.04)\%$; PM-5C11-3 溶液中 5C11 含量为 $(11.1 \pm 0.52) \mu\text{g}$, 偶联率为 $(29.06 \pm 1.37)\%$ 。因此, PM-5C11-2 溶液偶联率明显低于其他两者的偶联率 ($P < 0.05$)。由于 PM-5C11-2 偶联率较低, 而 PM-5C11-3 制备过程中引入了具有潜在细胞毒性的 EDC 和 NHS, 综合考虑生物安全性与偶联率, 本研究选择 PM-5C11-1 作为最适 PM-5C11。

2.5 PM 1 偶联不影响 5C11 的生物学活性

Daudi 细胞与 PM-5C11-1 溶液孵育 48 h 后, 结果(图 4)出现了与游离 5C11 孵育后同样的 Daudi 细胞同型聚集现象, 而 Daudi 细胞与 PM 1 溶液孵育后未出现该现象, 表明 5C11 不仅成功偶联到 PM 1 上, 且不影响 5C11 的生物学活性。

2.6 最适 PM-5C11 被 Daudi 细胞有效摄取

PM-5C11-1 溶液与 Daudi 细胞孵育 1 h 后, 通过 PE 标记荧光二抗破膜示踪 PM-5C11 中的 5C11。激

光共聚焦显微镜下可观察到 Daudi 细胞内出现红色荧光, 表明 PM-5C11-1 与 Daudi 细胞结合后能被细胞所摄取(图 5)。

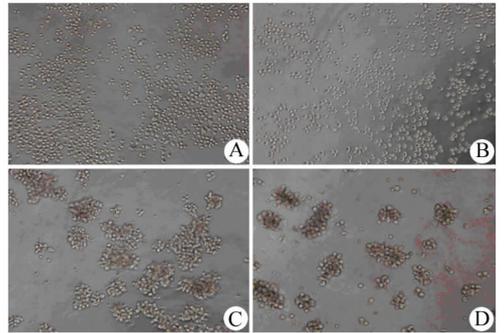


图 4 PM 1 偶联不影响 5C11 诱导的 Daudi 细胞同型聚集

Fig. 4 PM 1 coupling had little influence on Daudi cell homotypic aggregation induced by 5C11

A: Ctrl ($\times 100$); B: PM 1 ($\times 100$);
C: 5C11 ($\times 200$); D: PM-5C11-1 ($\times 200$)

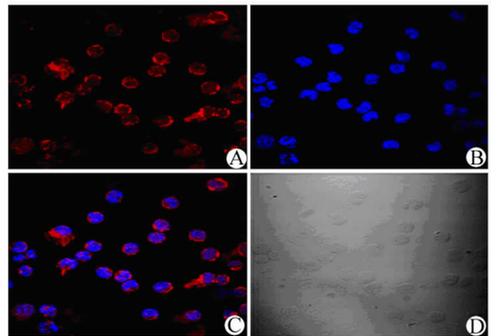


图 5 激光共聚焦显微镜观察 Daudi 细胞摄取 PM-5C11-1($\times 630$)

Fig. 5 PM-5C11-1 uptake by Daudi cells observed by laser scanning confocal microscopy($\times 630$)

A: Anti-5C11 and PM-5C11-IgG-PE; B: Hoechst;
C: Merge; D: Light microscope

3 讨论

PM 作为纳米药物载体的一种, 因为其微小的体积、亲水的表面以及特定的稳定性, 使其能通过实体瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)聚集到肿瘤部位。该被动靶向作用使其作为药物载体治疗肿瘤, 具有十分广阔的应用前景^[9-10]。有研究^[20]报道, 使用具有主动靶向作用的单克隆抗体偶联纳米药物载体可靶向杀伤白血病干细胞, 进一步表明了将两者联合应用的优越性。

本研究合成了 3 种具有不同反应基团的聚合物,即含有对甲苯磺酸酯基(- OTs)的 PLA-PEG-OTs,含有丙烯基(- CH = CH-CH₃)的 PLA-PEG-A,以及含有羧基(- COOH)的 TPGS-COOH,纳米化后与抗人 CD40 单抗 5C11 上的氨基进行偶联,制备 3 种 PM-5C11,并比较这 3 种 PM 与 5C11 的偶联效果,从而综合筛选出适宜 PM-5C11。

含对甲苯磺酸酯基团的材料常用于蛋白质的化学修饰和固定化酶,尤其在固定化酶的应用中,该方法偶联条件温和、产物稳定、与酶偶联率高^[21]。此外,已有文献^[22]报道使用含 - OTs 基团的 PM 偶联抗体或 DNA,只需在偏碱性缓冲液中搅拌孵育即可。从本研究结果来看,含 - OTs 基团的 PM 与 5C11 抗体偶联方法简单,反应条件温和,抗体偶联率相对较高,为(28.08 ± 2.24)%。含丙烯酸酯基团的 PM 一般用于与含有巯基蛋白的偶联反应,本研究中含丙烯酸酯基团的 PM 与 5C11 抗体偶联方法同样简单,但抗体偶联率较含 - OTs 基团的 PM 低很多,原因可能在于该基团与氨基的反应活性低于与巯基的反应活性。含有羧基的 PM 在蛋白偶联中应用最为广泛,大部分文献报道的纳米载体修饰单抗都是通过羧基与氨基反应进行的。但该方法在偶联反应中引入了具有潜在细胞毒性的试剂,如 EDC 和 NHS。研究发现残留的 EDC 与 NHS 具有一定的细胞毒性,反应完后如未能完全除去,会存在潜在的危险性。因此,使用该方法偶联抗体,生物安全性问题值得关注。本研究采用了含有羧基的 TPGS 制备 PM,再进行 5C11 抗体偶联反应,偶联率为(29.06 ± 1.37)%,稍高于含-OTs 的 PM 的偶联率(28.08 ± 2.24)%。因此,综合这三种 PM 的偶联效果,以及反应物的生物安全性,本研究选择 PLA-PEG-OTs 制备的 PM 作为与 5C11 抗体偶联的最佳 PM。

抗体偶联至 PM 表面后不应影响其本身相应的生物学活性。5C11 是激发型 CD40 单抗,前期研究^[18]发现,使用该抗体与 Daudi 细胞作用后会发​​生细胞同型聚集的现象。在优先考虑生物安全性的前提下,本研究选择了偶联率较高的 PM-5C11-1 作为最合适的 PM-5C11。PM-5C11-1 与 Daudi 细胞孵育 48 h 后,Daudi 细胞发生同样的聚集现象,与使用游离 5C11 孵育 48 h 后的现象一致,而 PM 1 溶液孵育组则未观察到此现象。该结果从另一方面佐证了 PM-5C11-1 中 5C11 的成功偶联,而且还表明 5C11 偶联 PM 后,不影响 5C11 诱导 Daudi 细胞株发生同型聚集的功能。在此基础上,通过 PE 标记的羊抗

小鼠 IgG 二抗示踪与 Daudi 细胞作用后 PM-5C11-1 中的 5C11 抗体,显示 PM-5C11-1 与 Daudi 细胞结合后可以被摄取进入细胞内。

本研究结果为偶联抗体纳米药物载体的选择提供了一个简便的方案,并为研究纳米药物载体包载药物的能力及载药后对肿瘤的杀伤作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L) [J]. *Crit Rev Immunol*, 1996, 16(1): 59-108.
- [2] Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, et al. Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870, 893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7): 876-883.
- [3] Khubchandani S, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ. Dacetuzumab, a humanized mAb against CD40 for the treatment of hematological malignancies [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(6): 579-587.
- [4] Bensinger W, Maziarz RT, Jagannath S, et al. A phase I study of lucatumumab, a fully human anti-CD40 antagonist monoclonal antibody administered intravenously to patients with relapsed or refractory multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2012, 159(1): 58-66.
- [5] Zhong W, Hansen R, Li B, et al. Effect of yeast-derived β-glucan in conjunction with bevacizumab for the treatment of human lung adenocarcinoma in subcutaneous and orthotopic xenograft models [J]. *J Immunother*, 2009, 32(7): 703-712.
- [6] Qi CJ, Zheng L, Zhou X, et al. Cross-linking of CD40 using anti-CD40 antibody, 5C11, has different effects on XG2 multiple myeloma cells [J]. *Immunol Lett*, 2004, 93(2/3): 151-158.
- [7] 黄沁, 瞿秋霞, 张学光. 激发型 CD40 单抗对宫颈癌细胞株 SiHa 化疗敏感性的影响 [J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(4): 261-264.
- [8] Sutton D, Nasongkla N, Blanco E, et al. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(6): 1029-1046.
- [9] Fay F, Scott CJ. Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 381-394.
- [10] Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(2): 147-159.
- [11] Xu S, Liu Y, Tai HC, et al. Synthesis of transferrin (Tf) conjugated liposomes via staudinger ligation [J]. *Int J Pharm*, 2011, 404(1/2): 205-210.
- [12] Zhang P, Hu L, Yin Q, et al. Transferrin-conjugated polyphosphoester hybrid micelle loading paclitaxel for brain-targeting delivery: Synthesis, preparation and *in vivo* evaluation [J]. *J Control Release*, 2012, 159(3): 429-434.
- [13] Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, et al. Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treat-

- ment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and bio-distribution in mice [J]. J Control Release, 2010, 144(3): 324-331.
- [14] Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention [J]. Mol Pharm, 2005, 2(5): 373-383.
- [15] Liu Y, Li K, Liu B, et al. A strategy for precision engineering of nanoparticles of biodegradable copolymers for quantitative control of targeted drug delivery [J]. Biomaterials, 2010, 31(35): 9145-9155.
- [16] Zhao J, Mi Y, Liu Y, et al. Quantitative control of targeting effect of anticancer drugs formulated by ligand-conjugated nanoparticles of biodegradable copolymer blend [J]. Biomaterials, 2012, 33(6): 1948-1958.
- [17] Torchilin VP, Lukyanov AN, Gao Z, et al. Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10): 6039-6044.
- [18] Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, et al. An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line [J]. Hybridoma, 1999, 18(6): 471-478.
- [19] Aliabadi HM, Elhasi S, Mahmud A, et al. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: The effect of solvent composition on micellar properties and drug loading [J]. Int J Pharm, 2007, 329(1-2): 158-165.
- [20] Zhang J, Tang Y, Li S, et al. Targeting of the B-lineage leukemia stem cells and their progeny with norecantharidin encapsulated liposomes modified with a novel CD19 monoclonal antibody 2E8 *in vitro* [J]. J Drug Target, 2010, 18(9): 675-687.
- [21] 冯万祥,施惠娟,诸镇祺. 抑肽酶的亲和层析--Tosyl(对甲苯磺酰氯)在固定化酶上的应用 [J]. 药物生物技术, 1995, 2(4): 20-23.
- [22] Oishi M, Nagasaki Y, Itaka K, et al. Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(6): 1624-1625.
- [收稿日期] 2013 - 05 - 05 [修回日期] 2013 - 07 - 17
[本文编辑] 韩丹,周玲琳

· 科技动态 ·

Fc 受体 TRIM21 通过识别细胞内抗体结合的病原体诱导免疫信号的活化

固有免疫反应是由能够识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的受体介导的,这些受体统称模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),包括 Toll 样受体、RIG-I 和 MDA5 等。这些模式识别受体在识别相应配体后,能通过活化下游信号,诱导炎症细胞因子和干扰素的产生,从而在抵抗和清除病原微生物的感染、维持机体免疫系统的稳态方面发挥重要的作用。但是,在细菌或病毒感染过程中是否存在一些新的能识别病原并活化固有免疫反应的方式仍有待进一步研究。

在病毒感染细胞的过程中,针对病毒的抗体可以附着于病毒表面进入细胞。抗体结合的病毒能够与胞内抗体受体 TRIM21 的 PRYSPRY 结构域结合。TRIM21 识别病毒-抗体复合物后,能以抗体依赖的细胞内中和效应(antibody-dependent intracellular neutralization, ADIN)诱导病毒的降解。但是 TRIM21 在识别病毒-抗体复合物后对免疫反应产生的影响尚不明确。该研究发现腺病毒-抗体复合物刺激小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEFs)能诱导 NF- κ B 报告基因的活化,而单独腺病毒感染或抗体刺激无法活化 NF- κ B 报告基因。在 TRIM21 基因敲除小鼠的 MEFs 中,腺病毒-抗体复合物无法诱导 NF- κ B 报告基因的活化,而重建 TRIM21 可以恢复这种活化效应,从而说明 TRIM21 能识别细胞内腺病毒-抗体复合物并促发 NF- κ B 信号活化。此外,作者证实 TRIM21 能识别不同种属和类型的抗体,而且这种识别依赖 TRIM21 与 Fc 段的直接结合。TRIM21 具有 E3 泛素连接酶的活性,它的 RING 结构域能催化形成 Lys63(K63)泛素化,并在腺病毒-抗体复合物的信号活化中发挥重要作用。TRIM21 识别病毒-抗体复合物后依赖 NF- κ B、AP-1 和 IRF 信号通路活化下游信号,从而促进 IL-6、CCL10、CCL4、TNF- α 等炎症细胞因子的产生,增强细胞对病毒的抵抗能力。该研究还发现,TRIM21 对病毒-抗体复合物的识别不具有病原特异性,胞内感染的无包膜病毒或细菌(如沙门菌)均能通过 TRIM21 活化固有免疫信号。而且 TRIM21 信号的活化不依赖于已知的 Fc 受体、PRRs 和 ADIN。最后,该研究在人肺成纤维细胞和小鼠骨髓来源的巨噬细胞等原代细胞中进一步证实了 TRIM21 能识别病毒-抗体复合物,活化下游信号,促进炎症细胞因子的产生。

综上所述,该研究 TRIM21 能识别细胞内病原-抗体复合物并活化固有免疫信号,揭示了一种全新的活化固有免疫的病原识别机制,为感染性疾病的治疗和疫苗的研发提供了新的思路。