

• 技术交流 •

单克隆抗体TNT-1的纯化、F(ab')₂片段化及其免疫活性的测定

刘 长 征

(实验核医学教研室)

F-M Chen Alan L Epstein

(美国南加州大学医学院病理系)

提 要 TNT-1是一种鼠IgG2a单抗,已用于肿瘤病人的临床试验。本文将介绍从腹水中进一步纯化TNT-1的方法及制备其F(ab')₂片段的条件。经 Protein A 亲和柱层析从小鼠腹水中提取出的IgG,再通过阳离子交换树脂柱Mono S,用缓冲液A(20 mmol/L MES, pH6.3)和缓冲液B(1mol/L NaCl),在快速蛋白液相色谱(FPLC)系统上进行梯度洗脱分离,可制得纯净的 TNT-1 抗体,其免疫活性可达80%~85%;经纯化的 TNT-1,用胃蛋白酶消化,制备 F(ab')₂ 片段,其消化条件是:酶的用量为抗体的1/250, pH 3.8, 温度37℃,时间4~5小时。消化后的混合物,用 protein A 亲和结合法除去完整的IgG,其余的F(ab')₂和Fab'、Fc等片段,在 Mono S 柱上,按前述的条件分离。产物 TNT-1或F(ab')₂的免疫活性,用标记抗体和过量抗原结合的方法测定;分离纯化过程中的洗脱峰,用间接免疫荧光技术监测其活性。结果表明,TNT-1的F(ab')₂片段的制备是成功的,色层分离纯化的方法简便而有效,并已成功地应用于批量生产。

关键词 单克隆抗体 TNT-1 F(ab')₂ 纯化 免疫活性

单克隆抗体在肿瘤检测和治疗方面,正在显示出很大的潜力^[1,2]。单抗 TNT-1就是一个例子。恶性肿瘤坏死细胞膜缺损使得大分子物质包括抗体分子能自由进入胞浆,单抗TNT-1作为一种能与细胞内抗原相结合的 IgG2a,就是根据这一事实,以坏死细胞为靶子,进入并停留在肿瘤坏死组织中。当放射性核素被标记上抗体分子而被载入肿瘤组织时,就可以利用其射线的扫描照像技术,对所在的肿瘤进行检测研究。同时,也可以进行肿瘤治疗学方面的研究。TNT-1在这两方面,已在动物实验中取得成功^[3,4]。

近年的工作表明,单抗的 F(ab')₂片段,在肿瘤检测研究中比完整的抗体更为优越^[5-7]。因为 F(ab')₂在骨髓、肝和脾中的本底明显减少,在8小时内可获得较高的肿瘤浓集,并能减少病人的抗-外来抗体反应,而且有可能应用短寿命的放射性核素进行显象诊断研究。从

IgG单抗制备F(ab')₂的技术已有报道^[8],不过因利用分子扩散层析法来纯化 F(ab')₂,其分辨率和容量都不高,更不能批量生产。本文介绍从 TNT-1 制备 F(ab')₂ 的消化条件及其应用离子交换柱层析法分离纯化 F(ab')₂ 片段的程序,同时,对TNT-1的进一步纯化,及其免疫活性的测定方法,也进行了研究。

材 料 和 方 法

材 料 快速蛋白液相色谱仪(FPLC)、阳离子交换树脂柱 Mono S(HR 5/5)和分子扩散色层柱 superose 12,(瑞士 Pharmacia 产); protein A 及其缓冲液,购自 Bioprobe International Inc.;胃蛋白酶(Sigma)。

从腹水中纯化单抗 TNT-1 将含有单抗 TNT-1 的Balb/C鼠腹水,在高速离心机上以10 000×g的转速,离心10分钟,上清液在0.22

μm的滤膜上过滤,用亲和结合缓冲液按1:1的比例稀释腹水的滤液,混匀后在FPLC系统上,通过protein A层析柱,用此缓冲液淋洗柱子,直到洗出液的蛋白含量接近本底,然后改用亲和洗脱缓冲液淋洗,收集洗出峰的溶液,令其通过sephadex G-25柱,改变溶液为缓冲液A(20 mmol/L MES, pH 6.3),再通过Mono S柱,用缓冲液A淋洗柱子,然后用缓冲液B(1mol/L NaCl),进行梯度洗脱,最后检测各个洗脱峰的活性。

F(ab')₂片段的制备及其分离纯化^[8]

TNT-1的F(ab')₂的制备是利用胃蛋白酶(pepsin)作消化酶。胃蛋白酶的用量为抗体的1/250,混匀后,用pH为3.0的1mol/L Na citrate,在搅拌条件下,小心地将此酶-抗体混合溶液的pH调到3.8,注意避免因局部的酸度过高而造成蛋白沉淀,然后置于37℃的水浴中消化4~5小时,消化的程度用凝胶过滤法superose 12柱或SDS-聚酰胺凝胶电泳法(PAGE)测定。

在消化后的产物中,除了F(ab')₂外,还有残留的完整的抗体,以及F(ab')₂被进一步消化生成的Fab'/Fc等其它杂质,所以需要进一步分离纯化。具体方法是:将消化后的混合液,通过一个小的protein A柱,尚未被消化的IgG被结合在亲和层析柱上,而F(ab')₂等片段则被淋洗出来。此洗出液改变pH之后通过Mono S柱,利用上述的梯度洗脱法,将F(ab')₂和其它小片段分离。

免疫活性的测定 TNT-1及其F(ab')₂的

免疫活性的测定有间接法和直接法。间接法是利用免疫荧光技术^[9],定性或半定量地检测样品的活性。具体作法简述如下。先将Raji细胞用2%的聚甲醛磷酸盐溶液处理,然后固定在显微镜玻片上(周围有特氟隆铺盖),每片有10个直径为5mm的这样的圆,干燥后将固定有Raji细胞的玻片置入-20℃的丙酮中,让细胞可渗透化3分钟,取出漂洗干净,保存在含有0.02%NaN₃的PBS中待用。使用时,将30μl样品加到固定的Raji细胞上,于37℃下(或室温下),温育40分钟,然后漂

洗干净,再加入荧光标记的羊抗鼠的IgG抗体,又在室温反应30分钟,漂洗干净后在荧光显微镜上检测其荧光的强弱。

直接测定法是利用过量抗原和放射性标记的抗体结合反应的方法,直接测定TNT-1及其F(ab')₂的免疫活性。用氯胺-T氧化法^[10],将I-125标记到抗体分子上,然后取一定量的标记抗体和过量的抗原(即经渗透处理过的Raji细胞),在室温下结合反应40分钟,再加入分离剂sephadex G-10悬浮液,离心分离,测其放射性的结合率,即为样品的免疫活性。

结果和讨论

TNT-1及其F(ab')₂的纯化

用protein A从腹水中分离IgG是一种简易、有效的方法,SDS-PAGE的结果表明,IgG已很好地和腹水中的其它杂质分离。但是,TNT-1的免疫活性仅有45%~50%,说明除了具有活性的IgG2a外,还有其它IgG杂质,需要进一步纯化。在本实验条件下,经protein A纯化的IgG,通过阳离子交换层析柱Mono S后,在梯度20mmol/L MES,15%和40%的1mol/L NaCl处,共有3个洗脱峰(图1)经免疫荧光测定表明,峰1及峰2的荧光为阴性(-),峰3为强阳性(+++),说明前两个峰为无免疫活性的杂质,第3个峰才是产品TNT-1。进一步的测定表明,其免疫活性在80%~85%之间,说明TNT-1抗体已得到很好的纯化。

上述TNT-1的纯化方法,也适合于它的F(ab')₂片段的纯化,在Mono S柱上的洗脱曲线,也有3个洗脱峰(图2),它们的SDS-PAGE谱带表明,峰a应该是Fc及一些小分子肽(已泳出凝胶之外,故无谱带显示),峰b是Fab',峰c是产品F(ab')₂。实践表明,完整的IgG和它的F(ab')₂片段在Mono S柱上的行为完全一致,难于分离,所以采用protein A亲和层析法除去完整的IgG,因此在它们的SDS-PAGE图谱上已无完整的IgG存在。

胃蛋白酶消化制备F(ab')₂

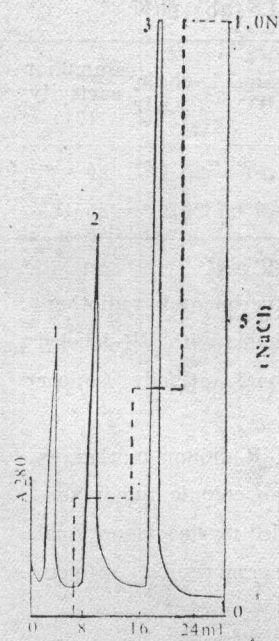


图1 TNT-1腹水的进一步分离
离子交换树脂柱:
Mono S(HR5/5); 缓冲液
A: 20mmol/L MES, pH
6.3; 缓冲液 B: 1mol/L
NaCl; 免疫荧光: 峰1:
(-), 峰2: (-), 峰
3: (+++)



图2 $F(ab')_2$ 片段的分离

右图为离子交换柱层析分离。层析柱: Mono S (HR 16/10); 淋洗条件同图1。峰a为Fc及其它小片段杂质; 峰b为Fab, 峰c为 $F(ab')_2$ 。左图为右图相应峰的SDS-PAGE (10%)结果

从IgG制备 $F(ab')_2$ 片段, 其产额决定于消化的条件, 例如, 酶的用量, 消化的pH值、温度和时间等, 尤其是pH值影响很大: 过高则消化难于进行, 过低则消化难于控制, 另外, 消化的时间也是重要的因素, 消化时间越长, 生成的 $F(ab')_2$ 越多, 与此同时, Fab'及Fc

等其它小片段也随之增多。图3是TNT-1消化3h(a)和5h(b)的分子扩散层析曲线(superose 12的FPLC), 峰1是完整的抗体, 峰2是 $F(ab')_2$, 其它峰是Fab'、Fc及其它小分子肽。因此, 为了获得较高的 $F(ab')_2$ 产额, 就要使抗体能充分被消化, 又要防止 $F(ab')_2$ 被进一步被消化。在本实验条件下, 将消化时间控制在4~5h为宜, 这时大约有80%~90%的抗体被消化, 而产生的其它小片段还不很多。

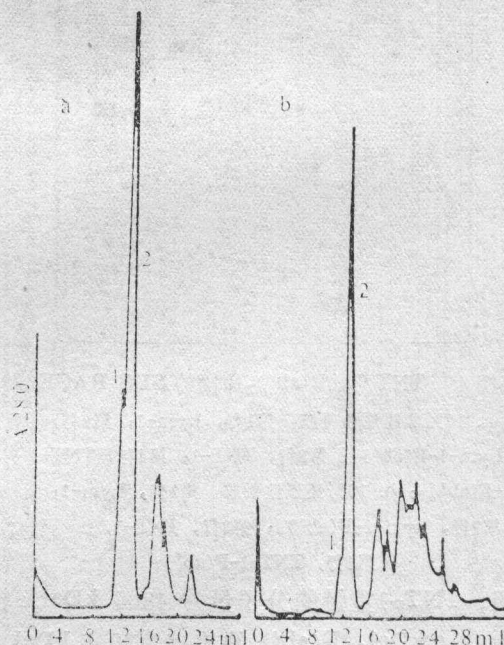


图3 胃蛋白酶消化TNT-1的层析曲线
消化条件: 酶: 抗体=1:250; pH: 3.8; 消化
时间: a. 3h, b. 5h。层析柱: superose 12
(HR10/30); 缓冲液: PBS, pH 7.5, 样品体积:
50 μ l, 淋洗速度: 0.8ml/min。峰1: TNT-1,
峰2: $F(ab')_2$ 片段

$F(ab')_2$ 的质量控制

经分离纯化后的 $F(ab')_2$, 从3个方面进行质量检查: ① superose 12 凝胶过滤层析分析。产品 $F(ab')_2$ 经过 Superose 12 柱后, 仅有一个单一的洗出峰, 说明产品中已无完整的TNT-1和Fab'、Fc等其它小片段。② SDS-PAGE 谱带分析。图4是TNT-1及其 $F(ab')_2$ 的SDS-PAGE结果, 为了便于比较, 图中同时列出已知的单抗LYM-1

(IgG 2a) 及其 $F(ab')_2$ (图4a, 1, 2道), 从图中可以看到, 不论是TNT-1还是 $F(ab')_2$ 片段 (图4a, 3, 4道), 都有较高的蛋白纯度, 它们的分子量分别是228kDal 和118kDal。在还原条件下的 SDS-PAGE 结果 (图4b, 3, 4道)

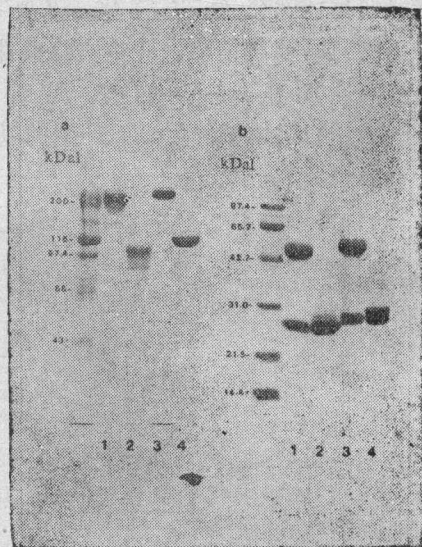


图4 TNT及其 $F(ab')_2$ 片段的 SDS-PAGE

a. 10%非还原性凝胶: 第1行, Lym-1; 第2行, Lym-1- $F(ab')_2$; 第3行, TNT-1; 第4行, TNT-1- $F(ab')_2$; b. 10%还原性凝胶: 第1行, Lym-1; 第2行, Lym-1- $F(ab')_2$; 第3行, TNT-1; 第4行, TNT-1- $F(ab')_2$

表明, TNT-1重链的分子量为 48.5 kDal, 轻链为28.6 kDal; $F(ab')_2$ 的重链为30.5 kDal, 轻链为28.6kDal。③免疫活性分析。免疫活性无疑是抗体的一个很重要的指标。本实验利用两种分析方法测定 TNT-1及其 $F(ab')_2$ 的免疫活性。实践表明, 间接测定法在抗体的纯化过程中非常有用, 有助于寻找抗体的洗出峰, 监测分离方法的效果, 方法简便、快速, 而且能同时进行很多样品的测定。直接分析法则能给出最后产品的活性。现将它们的分析结果列于附表中。

以上的结果表明, TNT-1及其 $F(ab')_2$ 片段, 不论是它们的蛋白纯度, 还是免疫活性, 均达到实验研究的要求, 同时也说明本方法是实用的, 简便而有效, 并且也已经成功地应用于批量生产。

附表 TNT-1其 $F(ab')_2$ 的性质

MAb	Whole IgG (kDal)	H-chain (kDal)	L-chain (kDal)	Immunor- eactivity (%)
TNT-1	228	48.5	28.6	80~85
$F(ab')_2$	118	30.5	28.6	80~85

参 考 文 献

1. Badger C, et al. Experimental radiotherapy of murine lymphoma with ^{131}I -labeled antithy 1.1 monoclonal antibody. *Cancer Res* 1985; 45:1536
2. Sharkey RM, et al. Radioimmunotherapy of the GW-39 human colonic tumor xenograft with ^{131}I -labeled murine monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1987; 47:5672
3. Epstein AL, et al. A novel method for the detection of necrotic lesions in human cancers. *Cancer Res* 1988; 48:5842
4. F-M Chen, et al. Tumor necrosis treatment of ME-180 human cervical carcinoma model with ^{131}I -labeled TNT-1 monoclonal antibody. *Cancer Res* 1989; 49:4578
5. Buragy GL, et al. Imaging with ^{131}I -labeled monoclonal antibodies to a high-molecular weight melanoma-associated antigen in patients with melanoma. *Cancer Res* 1985; 45:3378
6. Munz DL, et al. Improved radioimmunotherapy of human-tumor xenografts by a mixture of monoclonal antibody $F(ab')_2$ fragments. *J Nucl Med* 1986; 27:1739
7. Wahl RL, et al. Improved radioimaging and therapy localization with monoclonal $F(ab')_2$. *J Nucl Med* 1983; 24:316
8. Parham P. On the fragmentation of monoclonal IgG₁, IgG2a, IgG2b from BALB/c mice. *J Immunology* 1983; 131:2855
9. Epstein A L. Immunobiochemical characterization with monoclonal antibodies of Epstein-Barr virus-associated early antigens in chemically induced cells. *J Virology* 1984; 50:372

10. Greenwood FG, et al. The preparation of
 ^{125}I -labeled human growth hormone of

high specific radioactivity. *Biochem J*
 1963; 89:114

CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR PURIFICATION OF TNT-1 AND PREPARATION OF ITS F(ab')_2 FRAGMENTS

Liu Changzheng

(Department of Nuclear Medicine)

F-M Chen Alan L. Epstein

(Department of Pathology, University of Southern California School of Medicine)

TNT-1 is a murine IgG2a monoclonal antibody which has been used for clinical patients trials in patients. This paper describes methods for further purification of TNT-1 from patients ascite and preparation of F(ab')_2 fragments of TNT-1. The IgG was separated from their ascite by protein A affinity chromatography, and then further separated by cation exchange chromatography (Mono S column) on FPLC system. Digestion of TNT-1 with pepsin was optimized and performed at pH 3.8, pepsin/antibody ratio of 1/250, and 4~5 hours of incubation at 37°C. The F(ab')_2 fragment was purified by protein A and Mono S columns procedures using FPLC system. Kinetics of digestion and protein purity were studied by using superose 12 FPLC and SDS-PAGE. Immunoreactivities were determined by both methods of indirect immunofluorescence and direct radioimmunoassay. The results revealed that the chromatographic procedures are practical, simple, and effective, and have been successfully used to produce gram quantities of clinical grade F(ab')_2 fragment for the diagnosis of cancer in patients.

Key words Monoclonal antibody TNT-1 F(ab')_2 Purification
 Immunoreactivity