

长春新碱抗 CD20 免疫脂质体的制备及其对人 B 细胞淋巴瘤的靶向特异性杀伤作用研究

张亚柯 黄玉娇 李英 崔潇 杨玉娇 李军

(聊城大学 药学院,山东 聊城 252059)

摘要 目的:利用单克隆抗体药物的靶向特异性,探索常规化疗药物长春新碱的免疫脂质体制剂制备方法.方法:通过逆向蒸发法制备空白脂质体,pH 值梯度法包裹长春新碱,抗体修饰脂质体制备免疫脂质体制剂.采用流式细胞技术检测免疫脂质体对人 B 淋巴瘤细胞的靶向特异性.通过细胞增殖、细胞毒性实验来验证长春新碱免疫脂质体对人 B 淋巴瘤细胞的杀伤作用.结果:粒径分析表明,制备的空白脂质体平均粒径在 130 nm 左右,包裹长春新碱后脂质体平均粒径在 140-150 nm 左右.流式细胞仪检测结果显示,抗 CD20 免疫脂质体对人 B 淋巴瘤细胞 Romas 和 Raji 细胞具有明显的靶向特异性.细胞增殖、细胞毒性实验表明,包裹长春新碱的抗 CD20 免疫脂质体较非免疫脂质体对人 B 淋巴瘤细胞杀伤效果更好.结论:获得了一种具有免疫靶向的长春新碱脂质体制剂的制备方法,初步的体外实验表明其在人 B 淋巴瘤治疗方向具有潜在的应用前景

关键词 长春新碱;免疫脂质体;B 细胞淋巴瘤;CD20

中图分类号 R945

文献标识码 A

0 引言

免疫脂质体制剂作为靶向制剂的一种,具有精确靶向性、生物相容性好、毒性低、降低给药剂量、避免耐药性^[1]和提高病人用药顺应性等优点^[2,3].CD20 在 95% 以上的 B 淋巴细胞型的非霍奇金淋巴瘤中特异性高表达^[4,5].罗氏公司研发的抗 CD20 单克隆抗体药物美罗华(Rituximab,利妥昔单抗)上市以来,已经有多款以 CD20 为靶点的单克隆抗体药物在全球范围内上市或者处于研发管线^[6],用于复发的或化疗抵抗性非霍奇金淋巴瘤^[7,8].长春新碱作为常规联合化疗用药,在临床上广泛用于非霍奇金淋巴瘤等癌症治疗^[9,10].然而,由于长春新碱对肿瘤细胞和正常体细胞具有非特异性杀伤作用^[11],临床上会引起周围神经病(peripheral neuropathy)、低钠血症(Hyponatremia)等毒副作用^[12].我们制备了长春新碱脂质体,并通过 anti-CD20 单克隆抗体免疫化修饰获得了包裹长春新碱的免疫靶向脂质体制剂^[13],一系列体外实验证实该制剂可以特异性靶向杀伤 B 细胞淋巴瘤细胞^[14].

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

Raji 和 Ramos 细胞(美国标准生物品收藏中心(ATCC));细胞培养基 RPMI-1640、胎牛血清(Thermo Fisher Scientific-GIBCO 公司,美国);鞘磷脂、DSPE-PEG、Mal-PEG2000-DSPE(Avanti,美国);胆固醇(Sigma 公司);50、100、200 nm 孔径聚碳酸酯膜(Whatman 公司);anti-CD20 单克隆抗体(上海张江生物技术有限公司);氯仿、无水乙醇等试剂(J. T. Baker 公司);Cell Counting Kit-8 试剂盒(DOJINDO 公司,日本);硫酸

收稿日期:2019-06-09

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81402512,31401217);山东省研究生教育创新计划项目(SDY14016);山东省研究生教育优质课程(SDYKC18097);山东省高等学校科研计划项目(J13LK17)资助

通讯作者:李军,男,汉族,博士,副教授,研究方向:免疫学、肿瘤免疫与靶向治疗,E-mail:think_a@163.com.

长春新碱(Vincristine, VCR)(大连美仑生物公司,中国);Zeta 电位仪 Zetasizer Nano ZS(Malvern 公司,英国);脂质体挤出器 LF-1(Avestin 公司,美国);托利多 XP6 百万分之一超微量天平(梅特勒,德国)。

1.2 脂质体(LP)的制备—薄膜水化法

使用超微量天平,精密称量 39 mg 鞘磷脂、15 mg 胆固醇、12 mg DSPE-PEG、2 mg Mal-PEG2000-DSPE 于 250 mL 茄型旋转蒸发瓶中,溶于 8 mL 氯仿。37 °C 抽真空旋转蒸发 45-60 min 至薄膜形成,高纯氮气吹尽残留氯仿。加入 6 mL 0.3 mol/L pH 4.0 的柠檬酸溶液,顺时针震荡旋转蒸发瓶,把脂质薄膜从瓶壁上洗下来,得到半透明的脂质乳浊液。待水合完后,超声 1 分钟,使用脂质体挤出器,使其依次通过 200、100、50 nm 孔径聚碳酸酯膜,每种膜挤过 10-20 次,得到粒径均一的空白脂质体约 5.5 mL。用截留分子量为 1000 的透析袋在 0.3 mol/L 柠檬酸溶液 (pH 4.0) 1 L 透析 6-8 h/次重复 2 次。每 39 mg 鞘磷脂加入 0.4 mg CFPE [(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein) (ammoniumsalt)],利用上述制备方法制备荧光标记的脂质体 Lip,随后进行 Anti-CD20 Fab'免疫化修饰获得免疫化荧光脂质体 Clip 和 BSA 修饰免疫荧光脂质体 Nlip,免疫化和 BSA 修饰方法如下所述^[15]。

1.3 长春新碱脂质体(LPV, Liposome-Vincristine)制备—pH 值梯度法

取透析后的脂质体溶液 0.2 mL,1 mg/mL 长春新碱溶液 0.5 mL,加入 0.6 mL 1 mol/L Na₂HPO₄ 溶液中;将溶液 pH 值调至 7.0,再加水补至 2 mL 体积,50 °C 水浴孵育 10 min。取脂质体溶液加入到截留分子量为 1000 的透析袋中,置于 1 L PBS 溶液透析,6-8 h/次,共两次。

1.4 Anti-CD20 Fab'免疫化长春新碱脂质体(CLPV)制备

Anti-CD20 Fab'巯基化, Anti-CD20 Fab'与 2-IT(2-Iminoethanolane. HCL,蛋白巯基化试剂),按 1:200 的摩尔比例混合,室温下轻柔摇摆反应 2 h,混匀样品。使用分子量 1000 透析袋,在 1 L 含 5 mM EDTA 的预冷 PBS 透析液中,透析去除未反应的 2-IT,低速轻柔磁力搅拌,4 °C,6-8 h,中间换液两次。通过 BCA 法测蛋白浓度和 Ellman 法测巯基浓度共同计算抗体片段的巯基化程度。使用 Stewart 分析法测定 LPV 脂质度,计算出 Mal-PEG2000-DSPE 浓度。按 Mal-PEG2000-DSPE:Anti-CD20 Fab'摩尔比为 1:10 吸取 LPV 和巯基化的 Anti-CD20 Fab'混匀,于 16 °C 孵育过夜。使用分子量 100000 的透析袋去除游离的 Anti-CD20 Fab',PBS 透析 6 h,每 2 h 换一次液。

1.5 BSA 修饰长春新碱脂质体(NCLPV)对照脂质体制备

制备方法与 CLPV 的制备流程相同,只是用 BSA(牛血清白蛋白)替代 Anti-CD20 Fab',其他条件不变。

1.6 粒径测定

使用英国 Malvern 公司 Zetasizer Nano ZS 分析仪测定样品的粒径与 zeta 电位,每份样品重复 3 次。

1.7 包封率测定

配制 1 mg/mL VCR 水溶液,倍比稀释得到 0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL 溶液。紫外分光光度计(Agilent 公司),用 400 μL 1%的 TritonX-100,298 nm 调零。分别取 100 μL 各浓度的长春新碱溶液加入 700 μL 1%的 TritonX-100 溶液,制定标准曲线。取已透析好的长春新碱脂质体 50 μL 加入 350 μL 1%的 TritonX-100,涡旋 1 min,室温放置 5 min。检测其 298 nm 处光吸收度,代入建好的标准曲线,即可得到脂质体包封长春新碱的浓度。通过公式计算包封率,包封率=(脂质体中包封的药物/制备脂质体所加药物总量)×100%

1.8 免疫脂质体的靶向特异性检测

制备插入 CFPE(488 nm 激发发绿光荧光染料)的空白脂质体(Lip)。分别用上述修饰方法用 anti-CD20-Fab'和 BSA 修饰 Lip,透析去除未连接的抗体和 BSA 获得免疫荧光脂质体 Clip 和 Nlip。将 Clip、Nlip 和 Lip 分别与 Raji 和 Ramos 细胞孵育,4 °C,1 h。然后使用 BD 流式细胞仪进行荧光检测。

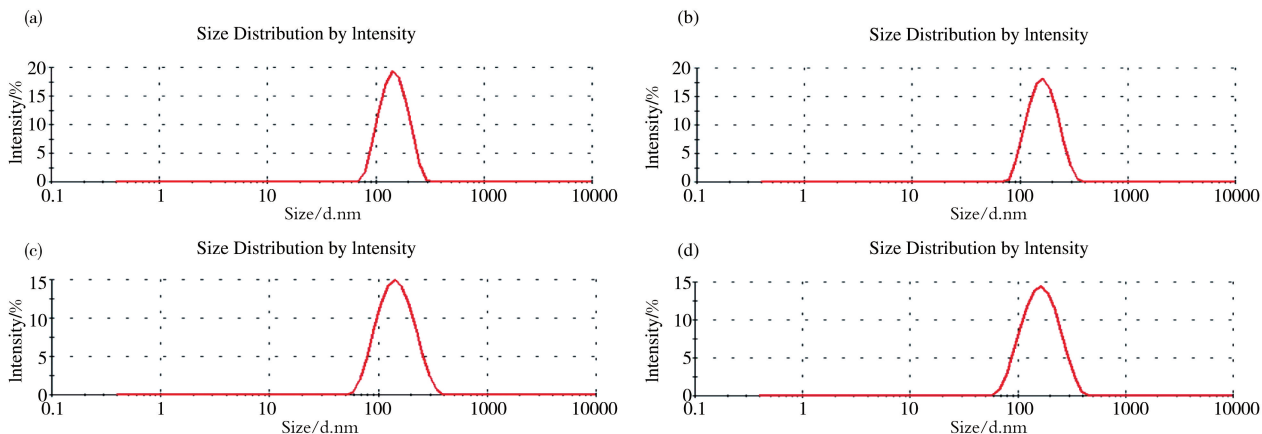
1.9 细胞杀伤实验

以每孔 3000 个细胞分别接种 Raji 和 Ramos 细胞于 96 孔培养板(每孔 100 μL)。每孔加入 9 μg/mL、3 μg/mL、1 μg/mL、0.3 μg/mL 的 CLPV、NCLPV 和长春新碱溶液。每种药物设 3 个复孔,另设不加药物对照组。37 °C,7% CO₂ 中继续培养。分别在给药后 24 h 和 48 h,使用 CCK-8 Kit 试剂盒测定细胞的增殖效率。

2 结果与分析

2.1 脂质体粒径检测

应用英国 Malvern 公司的 Zeta 电位仪 Zetasizer Nano ZS 分别检测空载脂质体 LP、包封长春新碱脂质体 LPV、anti-CD20 Fab'免疫化长春新碱脂质体 CLPV 和 BSA 修饰长春新碱脂质体 NCLPV 粒径. 结果显示脂质体在经过脂质体挤出器多次挤出后, LP, LPV, CLPV, NCLPV 的平均粒径分别为 134、140、141、150 nm, 四种脂质体平均粒径均小于 200 nm, 分布均匀, 呈正态性, 跨距较小(图 1).



注:(A)空载脂质体 LP,(B)包封长春新碱脂质体 LPV,(C)anti-CD20 Fab'免疫化长春新碱脂质体 CLPV,(D) BSA 修饰长春新碱脂质体 NCLPV 粒径.

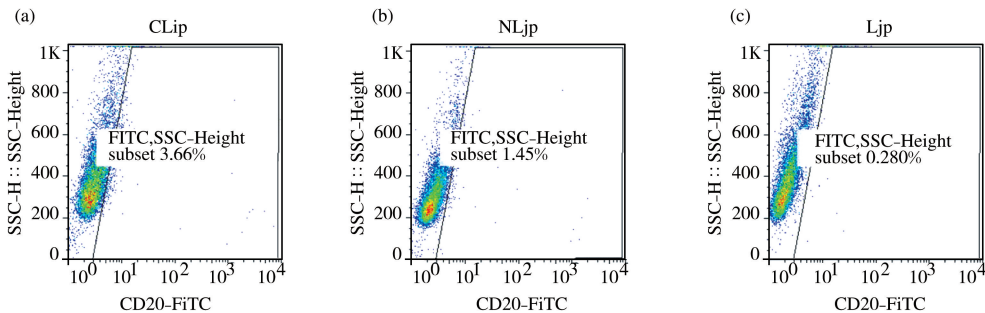
图 1 脂质体粒径检测

2.2 包封率

首先制备长春新碱 1% 的 TritonX-100 溶液 298 nm 浓度-光吸收标准曲线(图 2), 50 μ L 制备好的长春新碱脂质体加入 350 μ L 1% 的 TritonX-100 测得 OD 值 0.365, 将测得的 OD 值代入方程 $y=1.7304x-0.007$, OD 值为 Y 值, 计算可得浓度为 0.215 mg/mL, 包裹的总体积为 2 mL, 即: $0.215 \text{ mg/mL} \times 2 \text{ mL} = 0.43 \text{ mg}$, 脂质体制备时长春新碱投料量为 0.5 mg, 所以测得包封率. 包封率 = (脂质体中包封的药物/制备脂质体所加药物总量) $\times 100\% = 0.43/0.5 \times 100\% = 86\%$.

2.3 免疫化脂质体与 CD20 阳性细胞的结合特异性

荧光标记的脂质体 Lip, Anti-CD20 Fab'免疫化荧光脂质体 Clip 和 BSA 修饰免疫荧光脂质体 Nlip, 分别与 CHO 细胞($\text{CD}20^-$)、Raji 细胞($\text{CD}20^+$)以及 Ramos 细胞($\text{CD}20^+$)孵育, 流式细胞仪检测他们与 CHO 细胞(图 3)、Raji 细胞(图 4)以及 Ramos 细胞(图 5)的结合特异性. 三种脂质体与 CHO 均几乎不能结合, Clip 可以与 $\text{CD}20^+$ 细胞 Raji 和 Ramos 高亲和力特异性结合(结合率分别达到 90.3% 和 83.0%), 非免疫化 Lip 与 BSA 修饰 Nlip 与 $\text{CD}20^+$ 细胞 Raji 和 Ramos 几乎不能结合.



注:(A)Clip 与 CHO 细胞的结合率为 3.66%;(B)Nlip 与 CHO 细胞的结合率为 1.45%;(C)Lip 与 CHO 细胞的结合率为 0.280%.

图 3 免疫化和非免疫化脂质体与 CHO 细胞的结合特异性

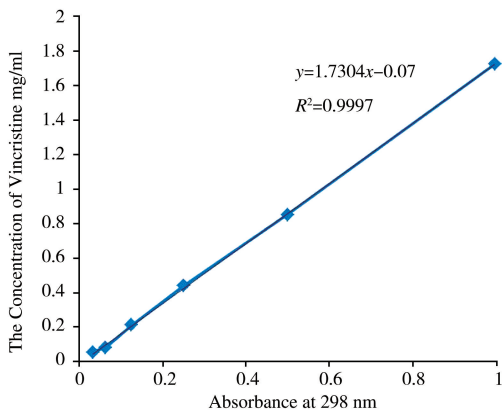
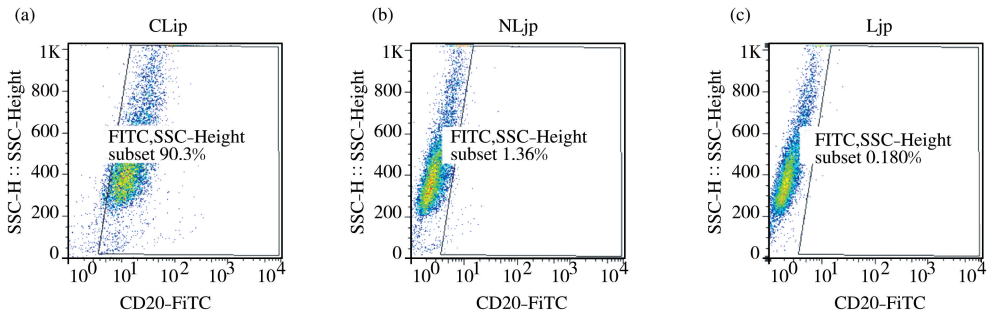
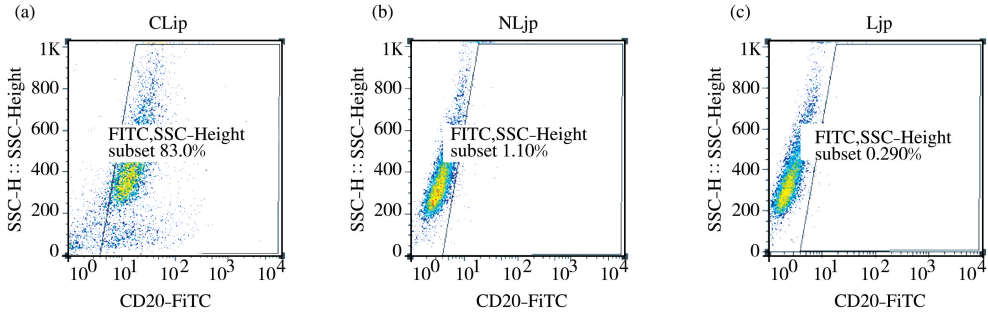


图 2 标准曲线



注:(A) Clip 与 Raji 细胞的结合率为 90.3%;(B)Nlip 与 Raji 细胞的结合率为 1.36%;(C)Lip 与 Raji 细胞的结合率为 0.180%。

图 4 免疫化和非免疫化脂质体与 Raji 细胞的结合特异性



注:(A)Clip 与 Ramos 细胞的结合率为 83.0%;(B)Nlip 与 Ramos 细胞的结合率为 1.10%;(C)Lip 与 Ramos 细胞的结合率为 0.290%。

图 5 免疫化和非免疫化脂质体与 Ramos 细胞的结合特异性

2.4 CLPV、NCLPV 和 VCR 对 B 淋巴瘤细胞的靶向杀伤

CLPV 与 NCLPV 和 VCR 分别以 0.3,1,3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四个不同浓度梯度处理 Raji 和 Ramos 细胞 24 h 和 48 h,CCK-8 kit 试剂盒检测细胞增值率,计算 IC_{50} (表 1),检测 CLPV 与 NCLPV 和 VCR 对 Raji 和 Ramos 细胞的杀伤毒性.结果表明结果免疫化长春新碱脂质体 24 h,48 h IC_{50} 值均远低于 NCLPV 和 VCR. CLPV 较 NCLPV 和 VCR 显著的提高了对 B 淋巴瘤细胞的杀伤作用 ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$),而 NCLPV 和 VCR 的杀伤效果较低;从时间点上观察,48 h 的 CLPV、NCLPV 和 VCR 的细胞杀伤效果差距比 24 h 的差距更为明显.含有相同长春新碱浓度的 CLPV 对 B 淋巴瘤细胞杀伤效果比 NCLPV 和 VCR 的杀伤效果要提高 10%-25%(图 6).

表 1 制备的各种脂质体的 IC_{50} 值

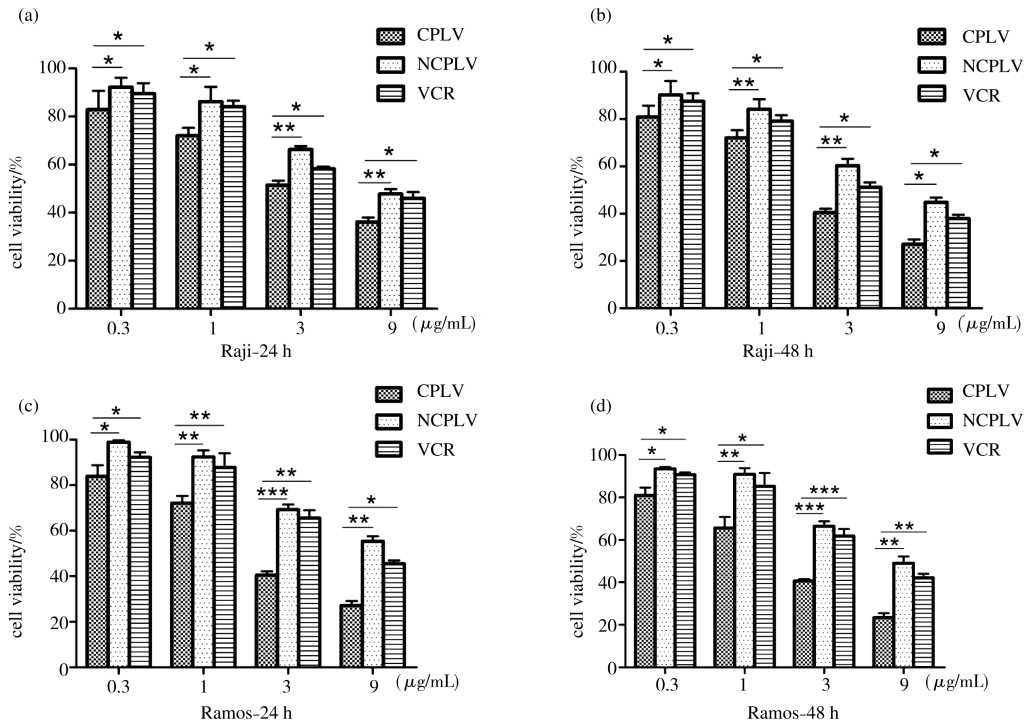
B 肿瘤细胞	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度)		
	CLPV	NCLPV	VCR
Raji-24 h	3.66 \pm 0.2	8.09 \pm 0.41	6.58 \pm 0.19
Ramos-24 h	3.16 \pm 0.27	7.96 \pm 0.33	7.53 \pm 0.17
Raji-48 h	3.01 \pm 0.33	8.41 \pm 0.42	7.01 \pm 0.31
Ramos-48 h	2.09 \pm 0.21	8.24 \pm 0.25	8.17 \pm 0.27

3 讨论

恶性肿瘤现已超越心脑血管疾病成为全球第一位的死亡病因.据 2011 年公布的全球最新最全的癌症统计数据,2008 年全世界约有 1270 万癌症新增患者,760 万人死于癌症.世界卫生组织估计到 2020 年前,全球每年新增癌症患者将达到 1500 万.

化学药物治疗是当今癌症治疗的主要手段之一,临床上有超过 40 种常用化疗药物用于治疗各种癌症.然而化疗药物往往因其对正常细胞和癌症细胞无差别的毒性而“杀敌一千,自损八百”,引起严重的毒副作用.要进一步提高恶性肿瘤的医疗水平,除了研发新药,开发现有临床药物的新剂型,提高其对癌症组织的靶向性是一条切实可行的思路.自 1965 年 Bangham 等人发现了脂质体以来,经过众多科研人员近五十年的不

懈努力,脂质体以其生物体内可降解,毒性低,无免疫原性,肝、脾网状内皮系统的被动靶向性等特性,作为药物传递系统取得了许多里程碑式的工作,如:pH 梯度包埋法的发明,长循环脂质体(隐型脂质体)的制备及主动靶向脂质体的发明等.现如今已经有阿霉素脂质体注射液 Doxil,紫杉醇脂质体 Taxosomes,阿霉素柠檬酸盐脂质体注射液 Myocet 等多个脂质体药物上市.



注:(A)处理 Raji 细胞 24 h;(B)处理 Raji 细胞 48 h;(C)处理 Ramos 细胞 24 h;(D)处理 Ramos 细胞 48 h (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

图 6 CLPV、NCLPV 和 VCR 对 B 淋巴瘤细胞的靶向杀伤

本课题结合当前最先进的脂质体制备技术和单克隆抗体药物的研发成果,探索一种以 $CD20^+$ 非霍奇金淋巴瘤为靶点的长循环免疫脂质体制备方法.以鞘磷脂、胆固醇、DSPE-PEG、Mal-PEG2000-DSPE 为处方脂材制备脂质体,以 pH 梯度法 DSPE-PEG 的加入使脂质体表面 PEG 化,获得长循环脂质体(隐型脂质体)降低脂质体的被动靶向性,以 anti- $CD20$ Fab' 对脂质体进行免疫化修饰,使脂质体具有主动靶向性.

通过粒径和包封率对制备的脂质体进行表征分析.粒径分析表明,我们获得的长循环空白脂质体(LP)平均粒径为 134 nm. pH 梯度法封装长春新碱后获得的长循环长春新碱脂质体(LPV)粒径较 LP 略有增大,平均粒径为 140 nm.而对 LPV 进行 anti- $CD20$ Fab' 修饰最终获得长循环长春新碱免疫脂质体(CLPV),平均粒径 141 nm,较 LPV 几乎没有变化.以上结果表明我们制备的长循环空白脂质体(LP),长循环长春新碱脂质体(LPV),长循环长春新碱免疫脂质体(CLPV)平均粒径均在 150 nm 以下,作为药物载体具有很好的粒径分布范围,而且粒径分析图也表明粒径分布均匀,呈正态性,且跨距较小.包封率分析表明,我们获得了 86% 的包封率,说明 pH 梯度法在将来的长春新碱脂质体工业化制备过程中具有良好的应用前景.

体外抗肿瘤实验表明获得的长春新碱免疫脂质体其具有较好的生物活性.结合特异性分析表明 anti- $CD20$ 修饰脂质体对 $CD20^+$ 阳性的 Raji 和 Ramos 具有 90% 和 83% 的结合率,而非修饰脂质体和 BSA 修饰脂质体对照与两种细胞的结合率均低于 5%.然而 anti- $CD20$ 修饰脂质体同非修饰脂质体和 BSA 修饰脂质体一样与 $CD20^-$ 的 CHO 细胞结合率均低于 5%,结合实验说明 anti- $CD20$ 修饰使脂质体其具有了与 $CD20^+$ 细胞的超强的靶向性特异性和超高的亲和力,这就为脂质体特异性递药到肿瘤组织提供了保证.

体外杀伤实验表明在相同长春新碱给药浓度的情况下,长春新碱免疫脂质体(CLPV)比 BSA 修饰长春新碱脂质体(NCLPV)和游离长春新碱(VCR)对 $CD20^+$ 细胞 Raji 细胞和 Ramos 的 24 h 和 48 h 杀伤能力都更强,杀伤效率提高 10-25% 左右. IC_{50} 计算得到 CLPV 的对 Raji 和 Ramos 细胞的 24 h, 48 h 杀伤的 IC_{50} 值都是 NCLPV 和 VCR 50% 以下,预示着临床上可以显著降低给药剂量,进一步降低药物毒性.以上实验表明 Anti- $CD20$ Fab' 通过提高长春新碱脂质体对 $CD20^+$ 的靶向特异性和结合效率赋予了长春新碱脂质体良好的体外抗肿瘤细胞的活性.

参 考 文 献

- [1] Sayour E J, De Leon G. Systemic activation of antigen presenting cells via RNA-loaded nanoparticles[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(1):1-6.
- [2] Langer Robert. Drug delivery and targeting[J]. *Nature*, 1998, 392:5-10.
- [3] Kurimoto S, Yoshinaga N. PEG-oligoRNA hybridization of mRNA for developing sterically stable lipid nanoparticles toward in vivo administration[J]. *Molecules*, 2019, 24(7):1-12.
- [4] Massing U, Fuxius S. Selectivity and effectiveness[J]. *Drug Resist*, 2000, 3:171-177.
- [5] Kazuo Maruyama. PEG-immunoliposome[J]. *Bioscience Reports*, 2002, 22:251-266.
- [6] Paszko E, Senge M O. Immunoliposomes[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(31):5239-5277.
- [7] Allen T M, Ahmad I, Lopes D E, et al. Immunoliposome-mediated targeting of anti-cancer drugs in vivo[J]. *Biochem Soc Trans*, 1995, 23:1073-1079.
- [8] Thomas F, Tedder, Pablo Engel. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes[J]. *Immunol*, 1994, 15:450-454.
- [9] Plosker Greg L, Figgitt David P. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Drugs*, 2003, 63:803-843.
- [10] Hauptrock B, Hess G. Rituximab in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Biologics*, 2008, 2:619-633.
- [11] Allen Theresa M, Cullis Pieter R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1):36-38.
- [12] Davis Thomas A, Grillo-Lopez. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment[J]. *Clinical Oncology*, 2000, 18:3135-3143.
- [13] Urruticoechea A, Alemany R J, Balart A, et al. Recent advances in cancer therapy: an overview[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, 16:3-10.
- [14] Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M. Global cancer statistics[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61:69-90.
- [15] Michael R, Zaragoza Michael L, Ritchey Andrew Walter. Neurourologic consequences of accidental intrathecal vincristine: a case report[J]. *Medical and Pediatric Oncology*, 1995, 24:61-62.

The Preparation of Vincristine Encapsulated Anti-CD20 Immunoliposomes and the Preliminary Study of Its Target-Specificity and to Human B cell Lymphoma Cell

ZHANG Ya-ke HUANG Yu-jiao LI Ying CUI Xiao YANG Yu-jiao LI Jun

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Objective: To explore a preparation method of vincristine encapsulated immunoliposomes dependent on the target specificity of monoclonal antibody drugs. Methods: Blank liposomes were prepared by reverse-phase evaporation and then the vincristine was encapsulated by pH gradient method. Immunoliposomes were prepared by the conjugation of thiol modified antibodies with maleimide modified PEGylated liposomes. Flow cytometry was used to test the specificity of immunoliposomes targeting human B lymphoma cells. Cell proliferation and cytotoxicity experiments were used to test cytotoxicity of vincristine immunoliposomes to human B lymphoma cells. Results: Size analysis showed that the average particle sizes of the blank liposomes, vincristine encapsulated liposomes and vincristine immunoliposomes were 130 nm, 140 nm and 141 nm, respectively. Flow cytometry results showed that the anti-CD20 modified immunoliposomes specifically target the human B lymphoma cells. Cell proliferation and cytotoxicity experiments showed that the anti-CD20 modified vincristine immunoliposomes kill the human B lymphoma cells more effectively than vincristine non-immunoliposomes and free vincristine. Conclusion: Obtain a preparation method of vincristine immunoliposomes formulation. Characterization and preliminary analysis of in vitro experiments showed that it has potential applications in the treatment of human B lymphoma.

Key words vincristine; immunoliposome; B cell lymphoma; anti-CD20 antibody