

## Inmunotoxinas. Síntesis y evaluación biológica preliminar de un conjugado AcM anti T3-ricina cadena A.

Al editor:

A partir de los primeros años de la década del 80, se comenzaron a dar los primeros pasos en la obtención y purificación de moléculas híbridas a partir de toxinas y anticuerpos monoclonales, con el fin de aumentar la especificidad terapéutica en el tratamiento del cáncer. Las llamadas "balas mágicas" o "toxinas quiméricas" se producen a partir de proteínas o drogas con una gran toxicidad y un anticuerpo monoclonal que reconozca las células tumorales (Olnes, 1982; Uhr, 1984 y Vitetta, 1985).

La ricina es una proteína de peso molecular 63 000, que posee dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por un enlace disulfuro. Esta molécula es capaz de inhibir la síntesis de proteínas a nivel celular con dosis de 1 ng/ml y la dosis letal mínima en ratón es de 2,7 mg/kg. Esta fuerte toxicidad se debe a la cadena A, pues la cadena B tiene la función de reconocer ciertos receptores de superficie celular, de manera que la molécula penetre al interior de la célula e inactíve la fracción 60s ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (Fodstad, 1984).

El desarrollo de la producción de anticuerpos monoclonales completa los dos elementos básicos para la preparación de moléculas híbridas, lo que inicia una nueva etapa en la biotecnología y en la quimioterapia del cáncer (Seiler, 1985).

Atendiendo al método reportado por Olnes (1973), la ricina fue aislada de las semillas obtenidas de la planta *Ricinus communis* L., que crece en Cuba, utilizando cromatografía de intercambio catiónico con carboximetil celulosa CM 52 en tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 5,7, y la cadena A fue separada y purificada por cromatografía de afinidad con Sepharose 4B en tampón borato a pH 9 (Fulton, 1986).

El AcM anti T3 es equivalente con OKT3 y su antígeno es encontrado virtualmente en todos los linfocitos T maduros periféricos (Reinherz, 1980; Mauer, 1983) y fue preparado para el acoplamiento con el reactivo heterobifuncional n-succinimidil-3 (-2 pirilditio)-propionato (SPDP) (Pharmacia Fine Chemical) (Carlsson, 1978). Se midió el grado de tiolación estimando la liberación de grupos piridina-2-tiona mediante absorbancia a 343 nm.

El híbrido obtenido por reacción de acoplamiento (cadena A + cadena A-<sup>125</sup>I + anti T3 modificado por tres horas a temperatura ambiente) fue purificado por cromatografía en Ultrogel AcA 44, mostrando dos máximos de absorbancia a 280 nm que coinciden con los máximos de radiactividad (figura 1); la fracción A, que eluye con el volumen de exclusión  $V_{O}$ , fue la seleccionada para llevar a cabo los ensayos biológicos *in vitro*, y el segundo máximo (B) es parte de la cadena A que no reaccionó.

El híbrido anti T3-cadena A purificado, mostró citotoxicidad en un sistema de transformación blástica de linfocitos de sangre periférica en concentraciones de  $10^{-7}$  M (figura 2); esta actividad fue incrementada por la presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 nM y bloqueada por la presencia de anti T3 a concentraciones de  $10^{-6}$  M.

Se puede señalar como conclusión que se obtuvo un híbrido citotóxico y que esta acción depende del reconocimiento específico antígeno-anticuerpo, hecho que se demuestra cuando la actividad es interferida por exceso de anticuerpo.

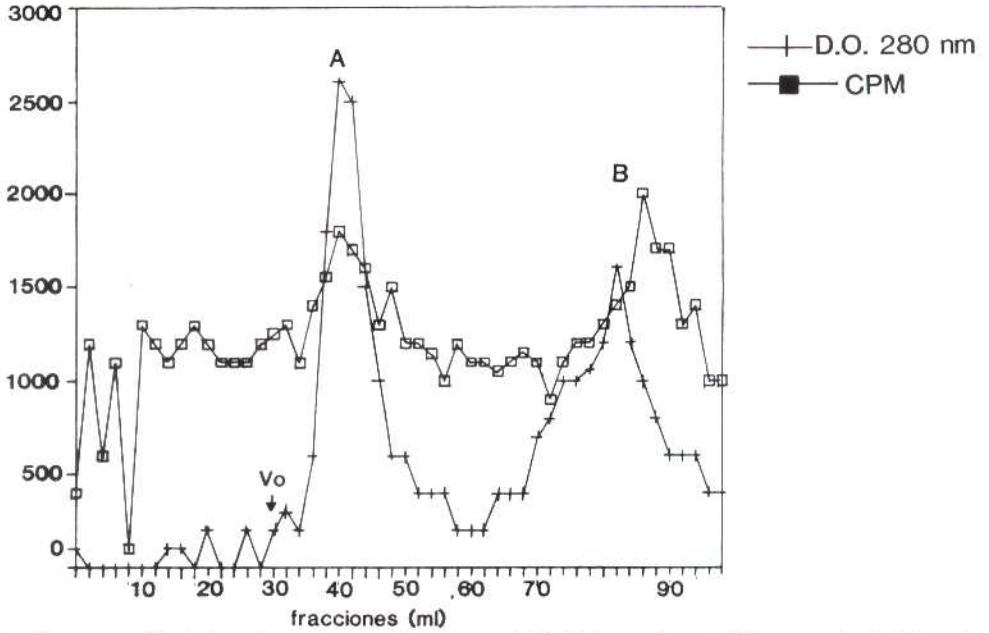


FIG. 1. Cromatografía del producto de reacción entre anti T3-PDP + cadena A-SH en matriz de Ultrogel AcA44 (LKB),  $V_t = 75$  ml (PBS pH 7.2).

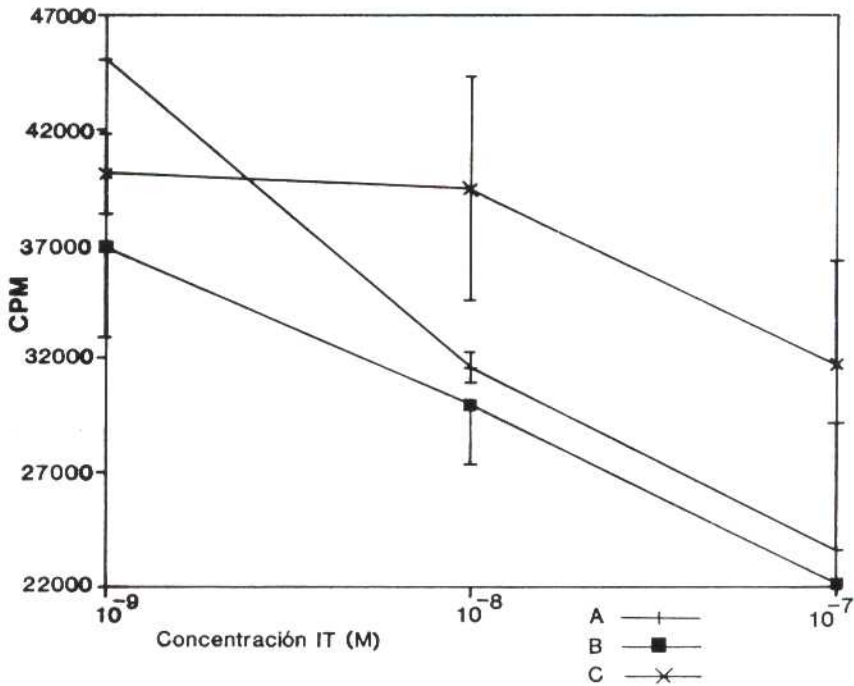


FIG. 2. Inhibición de la transformación blástica en linfocitos de sangre periférica ( $10^5$  células + pozo) por la IT anti T3-cadena A purificada. A: IT; B: IT +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM + anti T3 ( $10^{-6}$  M). La incorporación de timidina ( $^3\text{H}$ ) se expresa en cpm. Células + FHA (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como control incorporaron 39 770 + 4 942 cpm.

## REFERENCIAS

- CARLSSON, J.; H. DREVIN y R. AXEN (1978). *Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidil 3-(2-pyridildithio) propionate, a new heterobifunctional reagent.* Biochem. J., **173**: 723-737.
- FODSTAD, O. *et al.* (1984\*). *Phase I. Study of the plant protein ricin.* Cancer Research **44**: 862-865.
- FULTON, J. R. *et al.* (1984). *Purification of ricin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and B chains and characterization of their toxicity.* The Journal of Biological Chemistry (**261**) 12: 5314-5319.
- MEWER, S. C. *et al.* (1983). *Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function: Relationship to the T3 molecular complex.* J. Exp. Med. **157**: 705-719.
- OLNES, S. y A. PIHL (1982). *Chimeric Toxins.* Pharmac. Ther. **15**: 355-381.
- OLNES, S. y A. PIHL (1983). *Different biological properties of the two constituents peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis.* Biochemistry (**12**) 16: 3121-3126.
- REINHERZ, F. L. *et al.* (1980). *A monoclonal antibody blocking human T cell function.* Eur. J. Immunol. **10**: 758-762.
- SEILER, R. *et al.* (1985). *Monoclonal antibodies: Their chemistry, functions, and possible uses.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **24**: 139-160.
- UHR, J. W. (1984). *Immunotoxins: harnessing nature's poisons.* The Journal of Immunology (**133**) 6, i-x.
- VITOTTA, E. S. y W. J. UHR (1985). *Immunotoxins.* Ann. Rev. Immunol. **3**: 197-212.

Rafael Magadán Figueroa, Cristina María Mateo  
de Acosta del Río y Agustín Lage Dávila  
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional  
de Oncología y Radiobiología (INOR), MINSAP,  
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba