

## 放射性核素标记单克隆抗体的化学研究

北京大学技术物理系 李毕忠综述

中国医学科学院协和医院 王世真审

### 一、前言

单克隆抗体技术是近十年来迅速发展起来的一项重大生物学技术,也是免疫学中的一场革命。

在体内,由一个B细胞衍生的所有浆细胞属于一个纯系,或称“克隆”。用同一克隆的所有细胞产生的抗体都是对同一抗原决定簇特异的,具有相同的化学结构和生物活性。1975年, K<sub>u</sub>hler和M<sub>i</sub>lstein<sup>[1]</sup>将免疫B细胞和能够在体外长期培养的肿瘤细胞,在融合剂的作用下,融合成了兼有两种亲本特性的细胞。这种杂交瘤细胞既能产生对免疫原特异的抗体,又能在体外生长,而且能从中分离出单个细胞进行扩大培养,从而获得了产生单克隆抗体(McAb)的纯系。

单克隆抗体技术具有突出的优点:1)可以用复杂的抗原免疫动物制备出高度特异的单克隆抗体,且用小鼠腹水制备的抗体,其效价比免疫血清高得多,使用时可高度稀释,这样可以避免杂质的干扰。2)杂交株一旦建成,就可以长期冰冻保存,需要时复苏,扩大培养,制备抗体,因而可以反复、无限量地生产“同质”抗体,给实验室提供质量恒定的标准制剂。

单克隆抗体技术的发展使它与放射性同位素应用技术结下了不解之缘。恶性肿瘤之所以是当前对人们生命最有威胁的疾病,是因为至今我们还没有掌握诊断和治疗它的方法。从Pressman等人<sup>[2,3]</sup>从事抗体定位的早期研究到现在,人们利用亲和提纯的多克隆抗体对肿瘤相关的特征标记物,如癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen, CEA)、人绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotrop-

in, HCG)和 $\alpha$ -甲胎蛋白( $\alpha$ -Fetoprotein,  $\alpha$ -FP)的结合,在肿瘤异体移植的动物作体外显象,并在一定程度取得了成功。但是,这些抗体的肿瘤特异性不太强,而且很明显,它们对缺乏上述“特异”抗原的肿瘤就无能为力<sup>[4]</sup>。因此,单克隆抗体技术一出现就引起了许多研究者的极大关注。目前人们能用放射性标记的单克隆抗体诊断人黑色素瘤、结肠直肠癌、神经母细胞瘤、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌等,另外还用于探查血栓和梗塞。除诊断外,人们也用放射性标记的单克隆抗体作治疗肿瘤的试验。与此同时,单克隆抗体的放射性核素标记技术也有了很大进展。对这个问题,国外已经发表过一些综述文章<sup>[5~8]</sup>。

### 二、单克隆抗体放射性标记的几个问题

#### 1. 标记用的单克隆抗体

通常用于标记的是完整单克隆抗体,但用完整单克隆抗体经胃蛋白酶切割后的双价抗体碎片 $F(ab')_2$ 更为优越<sup>[9]</sup>。 $F(ab')_2$ 在肿瘤显象中比完整单克隆抗体及单价的Fab碎片更好,更有利于血液清除,而且消除了抗体Fc碎片的免疫毒性。

#### 2. 放射性核素

放射性核素的选择可以从两个方面来考虑,一个是用于诊断和实验性方面,另一个是用于肿瘤和其他疾病的治疗目的。用于诊断时,要求核素发射能量在30~300KeV的 $\gamma$ 射线,或者是进行能产生0.511 MeV  $\gamma$ 射线的 $\beta^+$ 衰变。这样既可得到好的显象效果,又把对病人的辐射剂量降得最低。而用于治疗目的的核素则要求能发射很高能量的 $\alpha$ 粒子或 $\beta$ 粒子,这些高能电离辐射可以杀死肿瘤细胞。目前大部分工作

还是着眼于前者, 作治疗研究的尚很少报道, 其主要原因还在于体内的辐射损伤, 以及单克隆抗体也不是如想象中的那样具有高度的肿瘤特异性。考虑到单克隆抗体在体内到达抗原位点的时间一般需要24小时左右, 所以核素的半衰期不宜短于3小时左右。这与一般放射性药物中对核素的要求有所不同。

### 3. 标记方法的选择

对所选用的标记方法要求反应迅速, 易于操作, 标记率和标记产物的放射性比度高, 放射性核素与单克隆抗体的联接必须牢固, 以保证在体内的稳定性, 而且必须保持单克隆抗体的生物活性和免疫活性。

### 三、常用的单克隆抗体放射性标记法

单克隆抗体的放射性标记虽然也有自然标记, 如把 $^{75}\text{Se}$ -蛋氨酸引入免疫球蛋白中的报道<sup>[10]</sup>, 但是目前所用的绝大部分标记方法是外接一个放射性核素或带放射性核素的基团。外接标记的各种方法按核素性质可分为金属和非金属两大类。最常见的非金属核素标记是直接靠共价结合, 金属标记则在许多情况下要依靠双功能联结剂 (Bifunctional Conjugate) 来完成。

#### (一) 放射性碘和卤族元素的标记

放射性碘是单克隆抗体放射性核素标记中用得最多的核素, 其标记方法也最为经典。

##### 1. 直接法

直接法是利用氧化剂把 $\text{I}^-$ 氧化为单质碘, 共价连接到单克隆抗体的酪氨酸残基上, 操作简单, 在许多场合能得到满意的结果。常用于单克隆抗体标记的有乳过氧化物酶法、氯胺-T法和碘化剂法<sup>[11]</sup>。但是由于直接法对酪氨酸残基进行了化学修饰, 因而在某些情况下将降低单克隆抗体的生物活性和免疫活性。另外, 经常还因为氧化剂的氧化作用而使单克隆抗体部分或全部失活, 因此要尽可能使用温和的氧化剂。目前较好的是碘化剂法, 所得产物的放射性比度高, 失活少。

##### 2. 间接法

间接法是先把 $^*\text{I}$ 接到一个预先选好的小分

子上, 如3-(4-羟基-5- $^*\text{I}$ 代苯)丙酸琥珀酰亚胺酯和3,5-二 $^*\text{I}$ -4-羟基苯甲亚胺羧酸甲酯, 然后把这种小分子与单克隆抗体相连。最近有人报道一种通过与单克隆抗体上的巯基形成硫醚键而相连的小分子, N-2-(3- $^*\text{I}$ -4-羟基苯)乙基-2-碘代乙酰胺<sup>[12]</sup>, 用这种试剂连接单克隆抗体不损害它与抗原的结合能力。间接法的优点是避免了氧化剂对单克隆抗体的直接接触失活, 但是它却引进了一个较大的基团, 而且需要操作水平较高的专门人员。

与碘同族的重卤素砷由于其同位素 $^{211}\text{At}$ 发射高能量 $\alpha$ 粒子而引起人们在治疗方面的兴趣。它的标记方法也是一种间接法<sup>[13]</sup>。 $^{211}\text{At}$ 先形成中间产物对-砷代苯甲酸, 制成混合酸酐后与单克隆抗体通过酰基化反应而结合。

由于 $^{131}\text{I}$ 和 $^{125}\text{I}$ 的易得性和它们简单易行的标记方法, 用碘标记的单克隆抗体在肿瘤的诊断和研究中应用很广泛。但遗憾的是 $^{131}\text{I}$ 除了 $\gamma$ 射线外, 还有 $\beta$ 射线;  $^{125}\text{I}$ 的 $\gamma$ 能量却偏低(25 KeV)。核素性质很好的 $^{123}\text{I}$ , 在大量制备时却要求具备质子能量较高的回旋加速器, 其生产困难, 价格昂贵。因此, 人们渐渐地把注意力转移到庞大的金属放射性队伍中去寻找理想的放射性核素, 它们当中有许多核素性质是符合放射性药物性质的要求。

#### (二) 金属放射性核素通过双功能试剂的联接标记

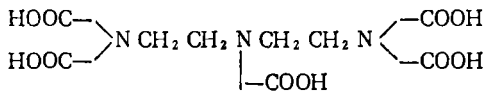
金属放射性核素的标记显得比碘标记困难些。人们在研究的初期是让蛋白质和金属直接反应, 利用蛋白质分子中的羧基、氨基和巯基等与金属离子络合而把金属标记到蛋白质上。这种方法的缺陷在于: ①标记的机制和结合的部位不清楚, 单克隆抗体本身的活性基团常被用来结合放射性金属, 引起标记产物的失活。②在许多情况下, 这种结合能力不够强, 不能在体内稳定存在。

近来, 许多研究者在探索所谓的包含双功能联结剂的放射性药物。双功能联结剂是一种大分子标记试剂, 它一边带着一个络合基团, 另一边带着一个能够与大分子形成共价键的功

缛团。因此，在使双功能联结剂与大分子连接后，再让放射性金属离子与这些特异位点络合，我们就得到了含有双功能联结剂的放射性药物。双功能联结剂两个方面的功能具有同等重要性，它既要与金属形成稳定的络合物，又要易于与单克隆抗体相联。它往往带有羧基或氨基，以便与单克隆抗体缩合。

### 1. 二乙撑三胺五乙酸(DTPA)

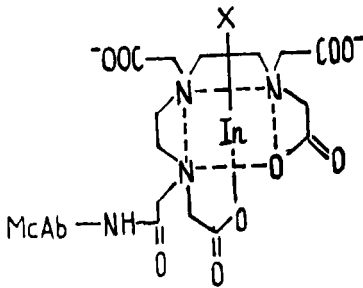
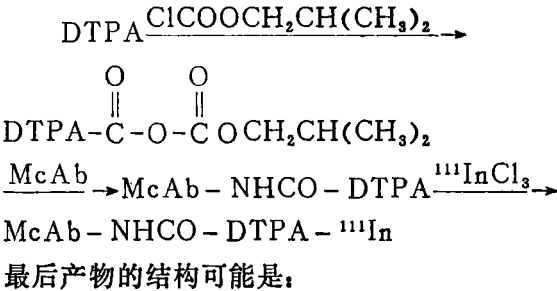
DTPA是目前使用最广，效果最好的一种双功能联结剂。它与EDTA具有相类似的化学结构：



DTPA与许多金属能形成很稳定的络合物。目前用DTPA作双功能联结剂标记单克隆抗体的就有<sup>111</sup>In、<sup>99m</sup>Tc[14]、<sup>90</sup>Y[15]等。单克隆抗体与DTPA的联接可用混合酸酐法和双环酸酐法。

#### ①混合酸酐法

这种联接法首先用一种用于肽合成的普通试剂氯甲酸异丁酯(IBC)来制备DTPA混合酸酐，用这个混合酸酐再和蛋白质的游离氨基形成酰胺键，最后与<sup>111</sup>In络合[11,16,17]。



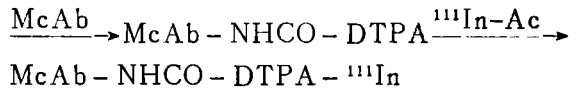
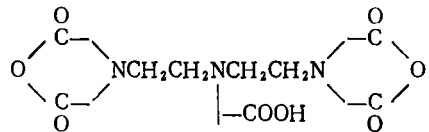
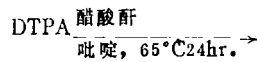
反应中间产物DTPA混合酸酐的浓度可用光度法或二氧化碳法测定，抗体浓度可用紫外光度计测定。每个抗体所联接的铟原子数根据

标记的放射性强度计算。最后产物用亲和层析柱分离得到活性抗体。

反应物的比例IBC/DTPA、DTPA混合酸酐/McAb对抗体活性和标记抗体的比活度有很大影响。IBC/DTPA太小(=1)或太大(=4.2)的结果分别是标记产物比度太低(0.3In/McAb)和使抗体失活(活性为0)。DTPA混合酸酐/McAb也有类似的效果。当IBC/DTPA=2.1，DTPA混合酸酐/McAb=1173时，抗体活性为63.6%(未标记的抗体活性为87.4%)，每个抗体分子结合3.1个铟原子。

#### ②双环酸酐法

DTPA双环酸酐法[12,18]是由Hnatowich首先应用到大分子的联接标记上的。



反应物的比例DTPA酸酐/McAb影响抗体二聚体的形成和抗体免疫活性的保留。二聚体的量由TSK3000高效液相色谱分离后经紫外光谱测定。标记率和DTPA/McAb是根据标记上的<sup>111</sup>In计算得到的。

环状酸酐法的联接率大约40%。当平均每个抗体分子所联接的DTPA分子数增加时，形成的二聚体量也增加，而抗体的免疫活性却降低。当DTPA酸酐/McAb=2.5时，效果良好，每个抗体上联接一个DTPA分子，这时没有二聚体形成，免疫活性为74%。

### 2. 二(硫代半卡巴腓)(DTS)

与<sup>111</sup>In类似，有人用DTPA作双功能联结剂结合<sup>99m</sup>Tc，但更为引人注目的是Yokoyama和Arano等人[19]选择的对-羧乙基苯二肟-二(N-甲基硫代半卡巴腓)(CE-DTS)。这种双功能联结剂的结构是：



单克隆抗体的应用涉及到医学、生物化学、放射化学和络合物化学等诸学科,是一项综合性较强的技术。放射性标记的单克隆抗体在癌症等疾病的诊断中已经具有明显的潜力,但在应用于体内放射性治疗方面却刚开始。而且在当前,用放射性标记的单克隆抗体来诊断或治疗均呈现出不够强的肿瘤特异性。因此,如何继续改进单克隆抗体的标记技术,如何扩大其应用范围都值得进一步研究。

### 参考文献

1. Kuhler G et al, Nature (London) 256: 495, 1975.
2. Piessman D et al, Cancer 6: 69, 1953.
3. Piessman D et al, Cancer Res 17: 845, 1957.
4. Mann BD et al, Cancer 54: 1318, 1984.
5. Goldenberg DM et al, J Biol Response Modif 1: 121, 1982.
6. Hazra DK et al, Nucl Med Commun 3: 210, 1982.
7. Meares CF, American Chemistry Society—Division of Nuclear Chemistry and Technology (ACS—DNCT) 189th ACS national Meeting (Miami Beach, Florida): (Abstract) No14, 1985.
8. Wolf W, ACS—DNCT 189th ACS National Meeting (Miami Beach, Florida): (Abstract) No49, 1985.
9. Wahl RL et, J Nucl Med 24: 316, 1983.
10. Wolf W et al, ACS—DNCT 189th National Meeting (Miami Beach, Florida): (Abstract) No63, 1985.
11. Saccavini JC et al, IAEA—CN—45/9 (Tokyo, Japan), 1984.
12. Wyeth P et al, Fifth Int Symp Radiopharm Chem (Tokyo): (Abstract) P100, 1984.
13. Bateman WJ et al, Int J Nucl Med Biol 10: 241, 1983.
14. Hnatowich DJ et al, Fifth Int Symp Radiopharm Chem (Tokyo): (Abstract) P.1, 1984.
15. Hnatowich DJ, ACS—DNCT 189th ACS National Meeting (Florida): (Abstract) No46, 1985.
16. Paik CH et al, J Nucl Med 24: 932, 1983.
17. Yokoyama A, IAEA—CM—45/106 (Tokyo), 1984.
18. Hnatowich DJ et al, J Appl Radiat Isot 33: 327, 1982.
19. Arano Y et al, IAEA—CN—45/68 (Tokyo), 1984.
20. Arano Y et al, Fifth Int Symp on Radiopharm Chem (Tokyo): (Abstract) P32, 1984.
21. Meares C F et al, Fifth Int Symp on Radiopharm Chem (Tokyo): (Abstract) P40, 1984.
22. Schmall B et al, ACS—DNCT 189th ACS National Meeting (Florida): (Abstract) No16, 1985.
23. Sundrehagen E et al, Eur J Nucl Med 8: 447, 1983.
24. Lindmo T et al, J Immunol Methods 72: 77, 1984.
25. Otsuka FL et al, Fifth Int Symp on Radiopharm Chem (Tokyo): (Abstract) P110, 1984.