

## 放射性核素标记单克隆抗体

Bhargava KK and Acharya SA

**提 要:** 目前, 分子医学中一个最迫切的问题是运送能中和或修补分子缺陷而专门设计的药物到达指定的靶组织, 以加强疗效, 减少药物对其它组织的毒性反应。单克隆抗体作为一种分子载体, 正日益受到人们的重视。适当的放射性核素和使用更简便、更好的标记方法是达到这一目的的重要步骤。

### 放射性核素的选择

一些核素可以被用来标记单克隆抗体。所用核素的选择是由许多关键因素决定的, 其中最重要的是核素的半衰期与检查所需时间的对应, 首先要考虑的是短半衰期的核素; 射线的能量应该与使用目的相适应, 首先在100keV到200keV之间, 当然治疗目的的应用者除外。最后, 还应使用好的方法来进行抗体的标记。

### 常用的放射性核素及其优缺点

$^{111}\text{In}$ 是最常用的同位素之一, 其价格便宜而且容易得到, 半衰期为8天。它不但可用于研究抗体在靶组织内的动力学变化, 而且还能计算靶本比值作为显像的依据, 但 $^{111}\text{In}$ 是低能 $\beta$ 发射体, 限制了用于显像的有效剂量。 $^{123}\text{I}$ 的半衰期为13小时,  $\gamma$ 线的能量为159keV, 因此很适合于显像, 但价格昂贵使其使用受到了限制。碘同位素的最大缺点是易在靶组织中脱卤素。

$^{111}\text{In}$ 是另一种在放射诊断和治疗中使用的核素, 作为半衰期为68小时的 $\gamma$ 发射体, 其在诊断应用上最有吸引力。 $^{111}\text{In}$ 价格适中, 通常螯合在已和抗体结合的DTPA上, 因为 $^{111}\text{In}$ 与抗体-DTPA的作用是离子性, 所以 $^{111}\text{In}$ 在体内通过网状内皮系统很慢地降解代谢和积累。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的理想物理特征适用于许多核医学应用, 由于它具有短半衰期和优良的放射性特征以及其低辐照吸收剂量, 允许使用较大显像剂量。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的标记方法与 $^{111}\text{In}$ 相似。

### 放射性核素标记单克隆抗体

标记的方法或将需要的同位素连接到抗体上是取决于可用的同位素种类、同位素在组织中的代谢以及抗体的功能基团的特性。目前常用的方法有:

①取代反应: 将放射性核素标记到蛋白质的支链

上, 主要是酪氨酸残基。②共轭连接: 将一新的有机分子(一般为非氨基酸)连接到蛋白质的支链功能基上, 用这种蛋白质——有机分子的复合体作为放射性核素的载体, 核素可以通过共价的方法(如碘化马尿酸)或非共价的方法与之结合(如钨和钨)。通常, 碘的标记可以采用这两种方法, 而 $^{111}\text{In}$ 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的标记则只能用共轭连接的方法。

同位素交换: 这一方法用于将放射性碘标记到有机分子的骨架上, 如制备邻碘马尿酸和间碘苯甲基胍。当然, 这不是直接标记抗体的方法, 制备完成后, 再将含有放射性碘的有机分子连接到蛋白质上。

电子取代: 电子取代是将碘直接标记到单克隆抗体的酪氨酸残基上, 这种方法对所有含有最少一个酪氨酸残基的抗体或蛋白质都适用, 抗体上酪氨酸残基的碘化将产生单碘酪氨酸和/或双碘酪氨酸。除此之外, 蛋白碘化过程中, 组氨酸也能发生同样的反应, 巯基的氧化是另一种可能发生的副反应。

碘是唯一能形成阳离子的卤素,  $\text{I}^+$ 是碘参加交换和取代反应的活性形式。参加反应的碘通常是以碘化物的形式提供的, 活性碘一般是由分子碘在各种氧化剂的作用下还原形成并作为碘化反应中的中间体。许多氧化剂, 如亚硝酸盐、碘酸盐、过硫酸盐及过氧化物等都可用于碘化反应。

氯胺T法: Hunter和Greenwood用氯胺T作为一种温和的氧化剂来产生 $\text{I}^+$ , 这种方法简便而迅速, 通过选择反应物的浓度、反应温度和时间, 可以很方便地控制碘化反应。终止反应时可以加入过量的还原剂, 常用的是偏亚硫酸氢钠。反应中过量的游离碘可用Sephadex柱凝胶过滤与标记蛋白质分开。此法用少量的蛋白质(1~5 $\mu\text{g}$ )即可制备高比度的标记物。

**Iodo-Beads法:** Markwell采用一种被称为Iodo-Beads的新的氧化剂,它是将N-氯苯磺胺共价地连接在无孔的聚苯乙烯小球上,此试剂在较大的pH和温度变动时仍能有效工作。其方法学上的主要优点是很容易通过从反应物中移去小球来终止反应,而不须使用还原剂。通常,此法的蛋白质回收率>90%。

**Iodogen法:** Fraker和Speck采用Iodogen作蛋白质和细胞膜碘化反应中的氧化剂。Iodogen非常稳定且不溶于水,因而允许蛋白质和碘的溶液在其固相上迅速碘化,并且没有或很少有副反应发生。使用Iodogen时,可将其用氯仿溶解后涂布在反应容器上,当反应终止时,只须将反应物从涂布的容器中倾出即可,不必使用还原剂或离心。此法简便,和氯胺T相比很多研究者更喜欢使用固相的Iodogen作为氧化剂来标记微量的抗体,其标记率很容易达到>60%。但在清洁剂存在的情况下,涂好的Iodogen容易被溶解,如果涂布不合适,碘化反应时Iodogen将会被释放到液相中。

Haiswa等改进了Iodogen方法,典型实验是:将50 $\mu$ g~1mg的抗体和37~370MBq(1~10mCi)的 $^{125}$ I或 $^{131}$ I放入已经涂有100 $\mu$ gIodogen的试管中进行反应,时间大约5分钟,再加入悬有2mg离子交换树脂(AGI-X8)的PBS溶液(含有1%BSA)终止反应,1分钟后,将树脂和反应物通过0.22 $\mu$ m的微孔滤器转移到另一试管。

和氯胺T法相比,Iodogen碘化反应较慢,但却较其它方法简单,完全避免了使用凝胶渗透层析从过量的碘和其它小分子成份中分离出标记的蛋白质的麻烦。普通实验室应首选此法标记抗体。

**酶促碘化反应:** 使用乳过氧化物酶代替化学氧化剂,如氯胺T、Iodogen进行碘的氧化,已经在许多抗体和蛋白质的标记中得到应用,使用酶促方法的优点是除了少量的过氧化氢以外,没有任何化学试剂。因此,这种方法提供了一种较温和的制备高比度碘标记蛋白的途径。在此法中,乳过氧化物酶用来将 $I^-$ 转变为 $I_2$ ,反应在加入 $H_2O_2$ 后开始。此法的缺点是标记蛋白质会被少量碘化的乳过氧化物污染,因此,如果使用这一方法则还需对标记蛋白质进行精制。

David建议使用固定在固体支持物上的乳过氧化物酶来克服上述问题,这种改进技术提供了一个简单的分离酶与标记物的方法。商品化酶株(Bio-

Rad, Richmond, CA)的使用,为蛋白质的标记提供了一种温和的碘化条件。

酶株是由乳过氧化物酶和葡萄糖氧化酶组成,两种酶被小心地混合,以提供最佳的酶促活性所需要的氧化潜能,反应开始时,将葡萄糖加入有酶株、 $Na^{125}I$ 和蛋白质的悬液中,葡萄糖氧化酶开始对葡萄糖发生作用并产生少量的、稳定的 $H_2O_2$ ,乳过氧化物酶利用系统产生的 $H_2O_2$ 催化 $I^-$ 氧化成 $I_2$ ,产生的活性碘再和蛋白质的酪氨酸残基发生反应,反应的终止可以通过离心去掉酶株的方法来实现,将上清液经过Sephadex G-25柱除去多余的 $^{125}I$ 。这种酶促方法在许多方面优于氯胺T法和可溶性酶促方法。

在上述方法中,至少有两个主要的问题有待解决:第一,蛋白质的酪氨酸残基通常是隐蔽的,因此不能被碘化,而需进行一定程度的蛋白质分子展开,所以,如果蛋白质酪氨酸残基上的氢原子被碘置换后会损害蛋白质的生物学活性的话,则碘化方法就不合适;第二,许多蛋白质生物活性的降低是由于其结构的完整性受到损害所引起,这可能是因为蛋白质和碘的直接作用或是由于抗体暴露在氧化剂或还原剂中,破坏了其它蛋白质功能基团,如色氨酸、巯基和羟基氨基酸等。

### 抗体氨基基团的整合

蛋白质氨基基团一般位于分子的表面,通常容易生成衍生物而对分子的完整性干扰较小,在蛋白质化学中,氨基基团衍生是一种简单而通用的技术,将载体分子连接到蛋白质的方法已经成熟。

Balton-Hunter法:N-羟基琥珀酰亚胺酯(OSU)与蛋白质的反应是常用的温和的氨基基团衍生方法之一,此法在生理条件下进行,琥珀酸酯一般较易从相应的酸制得,而且贮存稳定。此法包括碘标记琥珀酸酯分子的制备,通常采用氯胺T方法,然后从氧化剂和还原剂中分离出碘化的OSU,标记好的酯可连接到任何蛋白质的氨基基团上,这种方法标记抗体比蛋白质酪氨酸残基的碘化更温和,碘化的载体分子一般和蛋白质的赖氨酸残基进行结合。

OIHSU法,Bhargava和Chervu合成了碘化的OIHSU(邻碘马尿酸N-羟基琥珀酰亚胺酯),它能和蛋白质反应并生成肽键,将标记的马尿酸部分连接到蛋白质的氨基基团上。

使用碘化抗体作肿瘤检查时,其在体内的代谢很快。这种代谢导致了放射性碘进入甲状腺和胃等

器官,也使血液中的放射性增高,影响了肿瘤的显像。Bhargava等建立的OIHSA法利用OSU制备具反应性的放射马尿酸,标记的OSU可在室温下与蛋白质结合,其结合效率约为50%,整个反应对蛋白质的生物活性没有明显的损伤。

此法的主要优点在于标记物代谢所产生的马尿酸进入血液后很快从尿液中清除,不会在血液中产生较强的放射性。另外,标记的马尿酸酯非常稳定,可以制成药盒用于标记任何抗体。

### 碘标记蛋白质的提纯

几乎所有方法标记的蛋白质在用于动物或病人之前,都要将放射性标记的蛋白质从游离的放射性碘和其它缓冲盐中加以提纯。根据副产物和标记抗体或蛋白质的不同,可以采用多种分离技术,这些方法包括简单的透析和凝胶过滤,偶而也使用吸附层析和离子交换层析。最常用的方法是使用分子筛材料如Sephadex将大分子量的抗体从小分子量缓冲盐和载体中分开,Sephadex的选择必须根据所用蛋白质的分子量和要分离的小分子量组分的特性来决定,Sephadex柱在使用前要用白蛋白预处理,以减少Sephadex对蛋白质的非特异性吸附。

### 双功能螯合剂与蛋白质的结合

金属放射性核素的使用:用金属的放射性核素来代替碘进行抗体的标记,是一种可行的选择。很多蛋白质上存在着大量天然的、潜在的金属离子结合位点,然而,使用非特异性结合位点用于临床时,注入活体的蛋白质可能由于与非特异性位点金属离子的结合能力很弱,致使金属离子很可能转移到体内其它的蛋白质上。

降低本底干扰的方法是加强结合位点对金属离子的选择性,加强位点和金属离子的结合能力。这一点可以通过在蛋白质上结合双功能螯合剂来达到。双功能基团包括一个用来牢固地连接金属离子的螯合基团,另一个基团则和蛋白质的氨基酸残基进行共价结合。通常,连接是在赖氨酸的氨基基团上进行的。

### EDTA和DTPA类物质

EDTA及其衍生物形式和许多金属离子、特别是二价金属离子的螯合,在生理条件下是很稳定的。而DTPA的螯合能力较EDTA更强,因而有人建议用其替代EDTA作为金属离子的载体。Krejcarek和Tucker发展了一种简便的方法将DTPA通过混合酞的途径和蛋白质结合,此法已被许多研究者用来将

金属离子连接到不同的蛋白质,尤其是 $^{111}\text{In}$ 。但通过混合酞的途径至少有两个缺点:试剂合成步骤太多,而且结合率不高。Hnatowich等采用环酞的方法将DTPA连接到蛋白质分子上,DTPA环酞是根据Eckelman等的方法使用二酞酐和吡啶合成的,DTPA和HSA的连接是在含有 $0.1\text{mol/L}$  HSA的Hepes缓冲液中加入固体的酞,连接反应大约5分钟,未反应的DTPA可以用透析或柱层析除去。这种带有载体的蛋白质制备物可用各种金属放射性核素标记。DTPA和蛋白质的共轭结合可能发生在抗体赖氨酸残基的氨基端上,这种连接方法较混合酞法更优越,因为环酞较混合酞更稳定,且蛋白质的提纯也简单。在DTPA和蛋白质连接时,尽量提高两种反应物的浓度对反应更有利。如果抗体浓度太低,就必须使用过量的DTPA酞,在这种条件下,控制结合到蛋白质上的DTPA分子数量是困难的,而且结合率下降。通常每个抗体分子不超过一个螯合部位是金属离子结合的最佳条件,如超过这一限度,抗体的免疫活性就会减低。

在肽类和蛋白质的合成中,碳二亚胺激活羧基端与氨基端结合已广为人知,这一方法也在DTPA和蛋白质的反应中使用。通常使用的是水溶性的碳二亚胺(EDC),首先,EDC激活DTPA的羧基端形成邻酰基异脲中间体,此中间产物含有一个活性羧基基团可以和抗体或蛋白质赖氨酸残基上的氨基端起反应,Eckelman和Paik通过改变比值,即在DTPA:抗体和EDC:DTPA分别为300和4时,每克分子蛋白质可以和3~4倍的DTPA发生反应。但是使用此法时,抗体的免疫活性降低到47%。总的来说,碳二亚胺法是麻烦的,与环酞法相比它使更多的蛋白质失活。

在上述的绝大多数方法中,双功能螯合剂的羧化物里有一个用来和抗体分子发生共价结合,剩下的四个羧化物和放射性核素的螯合没有未和抗体结合的DTPA牢固。为了克服这一缺点,Breckbiel等合成了1-对苯甲基异硫氰酸(DTPA),这种化合物的五个羧化物都能有效地结合放射性金属核素,载体分子和蛋白质的结合是通过化合物的异硫氰酸盐基团与抗体的氨基基团结合,此螯合剂对金属核素表现了良好的亲和能力。通过肿瘤显像观察,这种蛋白质的衍生物对 $^{111}\text{In}$ 的结合能力比其它的蛋白质衍生物都强。

(下转第31页)

-抗基因型抗体,能改善抗体的免疫活性,排除无关IgG的干扰,提高T/NT比值。

### 参 考 文 献

1. Varki NM, et al: Cancer Res 1984, 44: 681
2. Shani J, et al: Nucl Med Biol 1986, 13: 379
3. Brown DT & Moore M: Br J Cancer 1982, 46: 794
4. Kasai M, et al: J Surg Res 1981, 30: 403
5. Kasai M, et al: Transplant Proc 1981, 13: 1942
6. Mulshine JL, et al: J Immunol 1983, 131: 497
7. Cuttitta F, et al: Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 4591
8. Rosen ST, et al: Cancer Res 1984, 44: 2052
9. Zimmer AM, et al: Hybridoma 1985, 4: 1
10. Okabe T & Takaku F: Jpn J Clin Oncol 1986, 16: 243
11. Imai K, et al: J Immunol 1984, 132: 2992
12. Brenner BG, et al: Cancer Res 1982, 42: 3187
13. Chan SYT, et al: Br J Cancer 1986, 54: 761
14. Keeling F, et al: Nucl Med Commun 1986, 7: 307
15. Goldenberg DM, et al: N Engl J Med 1978, 298: 1384
16. Goldenberg DM, et al: Cancer Res 1980, 40: 2984
17. DeLand FH & Goldenberg DM: Semin Nucl Med 1985, 15: 2
18. Kim EE, et al: J Nucl Med 1980, 21: P54
19. Riva P, et al: J Nucl Med 1986, 27: 881
20. Riva P, et al: Br J Cancer 1986, 54: 538
21. Perkins AC, et al: Nucl Med Commun 1986, 7: 729
22. Dreyfuss AI, et al: Hybridoma 1988, 7: 1
23. Endo K, et al: J Natl Cancer Inst 1988, 80: 835
24. Larson SM, et al: Nucl Med Biol 1989, 16: VII
25. Mathieu A, et al: Behr Int Mitt 1984, 74: 72
26. Dazord L, et al: Cancer Immunol Immunother 1987, 24: 263
27. Dazord L, et al: Nucl Med Biol 1989, 16: 179

(上接第38页)

### 部位特异共轭连接

多数碘化方法或双功能整合剂的共轭结合是发生在抗体的氨基酸支链上,支链功能基团的衍生可能会使抗体的免疫学特性减少, Brown等发明了一种替代技术,利用抗体的碳水化合物部分作为整合的位点,这种结合是部位特异的,因为它局限在抗体的糖链上,这与其它方法产生的随机的结合是不同的。这种技术的主要优点是双功能整合剂是连接在羧化物上,而羧化物又通常位于抗体的Fc片断。因此,抗原结合部位所在的Fab片断的结构所受的干扰很小。这种衍生方法对抗体的免疫反应性没有影响,因而在体内的抗原结合特异性较其它方法要高,这些独特的方面使之非常有用。另外,可以结合大量的整合基团而不损害抗体的免疫学活性。

### 结 论

Larson等报道,如果平均每分子抗体中标记碘原子超过0.3个,就出现明显的免疫活性丧失。通常,碘化的程度越高、抗体的免疫活性损伤越严重。有时对酪氨酸的修饰也会减少蛋白质的活性。因此,任何标记好的抗体在用于临床以前,都应使用细胞结合分析来检查其免疫活性。

对一个特定的系统,没有一种方法是完美无缺的,不同的方法通过不同的途径作用于蛋白质。因此,选择一种简便且对蛋白质生物学活性损伤较小的方法是很重要的。

[Semin Nucl Med 1989, 19(8): 187~201

(英文)秦 凤节译 田嘉禾校]