

放射性碘标记单克隆抗体的研究进展

北京协和医院 施绪保综述 王世真审

提 要: 近几年来,用放射性碘标记单克隆抗体的研究进展很快。本文着重介绍碘化单克隆抗体的优缺点,碘化技术的改进,以及碘化产品的生物活性评价。

单克隆抗体(McAb)技术与放射性核素相结合推动了肿瘤导向研究。利用放射性核素标记抗肿瘤McAb进行放射免疫显像(RII)和放射免疫治疗(RIT)有可能成为肿瘤诊治的重要手段^[1]。迄今,大多数实体瘤已能用McAb作RII检查;造血系统恶性肿瘤,部分中枢神经系统肿瘤和某些其它部位肿瘤也已有应用RIT成功的报道,有关综述性文章对此作过系统介绍^[2]。虽然特异McAb和合适的放射性核素是进行RII和RIT的先决条件,但先进的标记技术也是保证McAb能准确有效导向的重要因素。自McAb技术问世以来,新的标记试剂,新的标记方法不断出现,本文仅就近年来有关放射性碘标记McAb的有关进展作一综述。

碘标记单克隆抗体的优缺点

^{131}I 是最早用来标记McAb的核素,现在仍是常用的核素。 ^{131}I 价廉货足,标记方法简单可靠,但 ^{131}I 发射的364keV高能光子不能被 γ 照相机和ECT探测,显像灵敏度下降,而且发射的 β 射线对正常组织有损害;此外, ^{131}I -McAb在体内容易脱碘^[3],因此, ^{131}I 不是进行RII和RIT的理想核素。 ^{125}I 在临床上虽有进行RII成功的报道^[4],但不作为常规应用。 ^{123}I 的半衰期为13小时,其发射的 γ 射线能量为159keV(89%),与 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 相似; ^{123}I 在RII方面呼声很高,与 ^{111}In 齐名,有人将 ^{123}I 和 ^{111}In 标记的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段进行ECT显像称之为第三代RII^[5]。 ^{123}I 在临床的应用范围逐步扩大,已经用于结肠癌、肺

癌、乳癌和炎症的定位诊断^[6~8]。

有人认为, ^{111}In 标记McAb作RII优于 ^{131}I ^[9、10],也有不同意见,究竟谁优尚属有争议的问题。Halpern^[11]比较了两种核素的物理学和生物学特性,认为用于RII各有所长,难分伯仲。Chatal^[12]比较了两种核素的临床显像结果,认为 ^{111}In 和 ^{131}I 显像的特异性基本相同,只是 ^{111}In 进行ECT探测的灵敏度高于 ^{131}I ,而平面显像时, ^{131}I 的灵敏度优于 ^{111}In 。

最近,Larson^[13]撰文声称,对于RII,碘优于 ^{111}In 。尽管在 γ 照相方面, ^{111}In 的能量比 ^{125}I 和 ^{131}I 更为合适,半衰期较 ^{125}I 理想,而且 ^{111}In -McAb在肿瘤组织滞留时间较长,这均有利于 γ 照相。但 ^{111}In 在正常组织中滞留也久,肝细胞能摄取 ^{111}In -McAb和 ^{131}I -McAb, ^{131}I 很快从胞液分泌到细胞外空间,而 ^{111}In 则聚集在肝细胞内^[14]。 ^{111}In 在正常组织滞留时间较长是临床上一个十分棘手的问题,用 ^{111}In -McAb 96.5显像,肝脏浓聚了50%的放射性,而且 ^{111}In 在肝脏的半减期为72~96小时,因而它不适于肝脏显像; ^{111}In -McAb还在结肠浓聚,干扰结肠肿瘤显像,易致假阳性。 ^{131}I -McAb 96.5虽然也有40%浓聚于肝脏,但其滞留时间短,半衰期仅19小时,这是 ^{131}I -McAb在肝组织中脱碘的结果。用 ^{111}In 标记Fab片段,肾脏放射性浓度很高,往往使肾小管受到较大剂量的照射;同样, ^{131}I -Fab片段很快由尿排出,对肾小管影响小。对于 ^{131}I 标记McAb,Larson总结了6个优点:①来源充足,价格低廉;②有良好的

蛋白质标记化学;③在正常组织滞留时间短;④与 ^{125}I 或 ^{123}I 配合,能进行标记McAb显像;⑤可用于诊断和治疗;⑥适于标记Fab片段。

单克隆抗体标记方法及其改进

近20年来,碘标记技术经过了相当大的改革,旨在建立一种既不影响标记物生物活性、产品的比放射性又符合应用要求的标记方法。McAb的特殊性质(均一性)和特别用途(RII和RIT)决定了需要采用合适的碘化技术以尽量减轻其活性损伤程度。目前最常用的方法是氯胺T(Ch-T)法,也有人采用乳过氧化酶法标记McAb,这两种方法对Ab产生明显的化学损伤。有些氨基酸残基,如色氨酸、蛋氨酸和苯丙氨酸对氧化剂较敏感,接触后,容易被破坏^[15]。利用固相碘化剂Iodogen标记McAb明显降低了蛋白质损伤程度,Iodogen的疏水性使得在标记时蛋白质与氧化剂直接接触面积减少。用这种方法标记McAb成功率较高,但也有不成功的报道^[16]。将Ch-T共价交联到聚苯乙烯小珠上,称为Iodo-beads,标记时将小珠放在McAb和碘的混合液中,室温反应15分钟,移出小珠即终止反应。一粒小珠的标记率约35%,加5粒可达100%。Iodo-beads法的标记效率高,比直接Ch-T法温和^[16]。

以上的标记方法均碘化酪氨酸,如果酪氨酸位于抗体活性中心,引入碘后则容易使抗体活性下降。用Bolton-Hunter试剂标记赖氨酸可弥补上述方法的不足,这是一种非常温和的标记方法,对McAb活性的损伤程度较小。如Hayes^[18]用该技术标记McAb DF₃,产品中具有免疫活性的抗体只占65%,另35%的McAb受损;但用10 μg Iodogen标记,活性部分仅存13%,而87%的McAb丧失活性。不过,用Bolton-Hunter试剂标记McAb时,其产品的比放射性不足。

另一种较温和的碘化McAb方法是微电化学技术。此法在1964年就用于碘化多肽物

质,其原理是通过电解碘化物,使激活的碘与McAb反应。早期的标记装置较复杂,使该技术不易推广,改良的装置则很简单^[15]。Schoening^[19]介绍了经改良后的这种技术:将铂或钨电极置于蒸馏水稀释的放射性碘中,在0~40℃、12V条件下电解4~12小时,碘沉积在电极上。电解充分后,反复冲洗、擦干,置于Ab溶液中(0~20℃)搅拌1小时,用阳离子交换树脂去除游离碘。该技术的优点是:①产品比放射性高;②不改变Ab免疫活性;③0℃标记,反应条件温和;④标记时间相对短;⑤McAb不接触其它化学物质。

McAb用于RII和RIT,往往需要进行大剂量碘(>370MBq)标记,反应体积较大(>1.0ml),这与常规的蛋白质碘化不同。因此,需要用简单、快速、安全、可靠、高效、无菌的标记方法碘化McAb。Haisma^[20]建立的“一瓶标记法”能满足这种需求:在预先涂好Iodogen的小瓶内,加入放射性碘和McAb,反应完全后加离子交换树脂吸附游离碘,立即抽出反应液,过滤除菌,产品即可给病人注射。用此法标记McAb OC125,标记率可达90%,树脂吸附游离碘的效率达98~100%,抗体活性影响较小,结合抗原在80%以上。

影响碘化McAb对肿瘤诊治效果的一个重要因素是标记物在体内脱碘,原因是体内脱碘酶作用于碘苯基,估计每天的脱碘率为8%^[13]。为此,Zalutsky^[21]建立了一种联接标记技术,使标记物在体内基本不发生脱碘现象。该方法分两步完成,首先将碘标记在ATE[N-succinimidyl3-(tri-N-butylstannyl)benzoate]上,然后再与McAb连接。在一般条件下,每个Ab分子约联接0.2个碘原子。此法的优点是①Ab免疫活性影响较小,最大结合率大于70~76%;②Ab在体内脱碘少,甲状腺对碘的摄取率不超过总剂量的0.1%,仅为Iodogen法的1/60;③ATE

标记Ab在体内的代谢物排出快,因为标记物不以游离碘的形式代谢,而是转变为mIBA,后者与甘氨酸结合成马尿酸,迅速随尿排出;④在载瘤裸鼠中,ATE标记McAb能获得较高的T/NT比值。因此,作者认为,这种技术有可能成为一种有价值的McAb碘化方法。

近来,还报道了一种体内碘化McAb进行RII的新技术^[22]:亲和素与生物素有有很高的亲和力($K_a = 10^{-15}$),利用这种特性,首先将生物素联接在Ab分子上,静脉注射,待足量McAb聚集在肿瘤组织后,再注射碘标记的亲和素,后者与生物素结合,使放射性碘导向并定位于肿瘤。若给于第二抗体,能加速体内游离的McAb清除,使本底下降,有利于显像。这种方法给药后只需60分钟即可显像,而直接标记则至少要3天才能较清楚地显示肿瘤,缺点是该系统与正常组织的结合较多,尤其在肝、肾。

在某些情况,需要用双核素标记同一McAb,如Khaw^[10]用¹²⁵I和¹¹¹In同时标记McAb³²³/A₉。方法是将抗体先与双功能联接剂DTPA相接后进行碘化,再加¹¹¹In形成双标记产物,这种产品主要用于评价两种核素的定位效果。双核素标记也可用能量不同的两种碘进行^[13]。

理想的标记产品是单碘标记,即一个Ab标记上一个碘原子。单碘标记McAb的比放射性约444kBq/μg蛋白质,也有报道是555kBq/μg^[17]。各种McAb标记方法不尽相同,也就是说,同一种McAb用不同的方法标记,产品的免疫活性丢失程度不一样。因此,每种McAb应选择1~2种较为合适的标记方法。

抗体碘化后免疫活性的评价

碘化McAb的免疫活性直接影响肿瘤定位诊断和导向治疗的效果,因此需要有一个直接方法进行评价。任何标记方法都不同程度地影响抗体免疫活性,而McAb的均一性

使其对标记损伤往往表现出“全或无”(all or nothing)^[23]。导致Ab活性丢失的原因有①位阻效应:核素引入抗体活性中心,致使抗原与抗体反应时,空间位阻增大;②化学损伤:McAb与氧化剂和还原剂直接接触,敏感的氨基酸残基被损伤,研究表明,McAb对氧化剂尤为敏感^[18];③辐射损伤:射线对抗体是一种有害因子。另外,各种标记方法引起的损伤程度和方式不完全相同,McAb的一、二、三级结构对标记方法的敏感性亦各异,这都增加了估计抗体免疫活性的复杂性。

较早的研究中,采用碘标记抗体的最大结合率、抗原阳性肿瘤细胞与标记抗体的结合率、蛋白A结合标记抗体的比值和系列增量抗原与标记抗体结合所产生的坪值等指标来评价标记Ab的免疫活性,这些定性或半定量方法难以标准化,在实验室之间不能建立可比性。对于每种标记的McAb,必须确定的参数是标记抗体的亲和常数和免疫活性分数(immunoreactive fraction)。

亲和常数反映抗体与肿瘤抗原的亲和力,除与抗体本身特异性有关外,标记损伤是降低亲和力的重要因素。如用10μg、1μg Iodogen和Bolton-Hunter试剂标记McAb DF₃,亲和常数分别为 1.03×10^8 、 2.78×10^8 和 3.97×10^8 L/mol,表明Bolton-Hunter试剂对McAb损伤比Iodogen小,且小剂量Iodogen比大剂量对McAb的损伤程度轻。目前测定McAb亲和常数的方法仍是Scatchard分析^[24]。采用肿瘤细胞抽提液测定亲和常数不能反映McAb与活肿瘤细胞的亲和力,而用细胞悬液较符合实际情况。本法还可估计每个细胞最大结合的Ab分子数。如此测出的亲和常数称为表观亲和常数,不代表具有免疫活性的一部分标记抗体的亲和力,需用标记Ab的免疫活性分数加以校正。

Matzku^[23]强调,任何McAb标记后都必须测定免疫活性分数和亲和常数。由Lin-

dmol^[17]建立的 McAb 免疫活性分数测定方法能准确客观地反映标记Ab的损伤程度,此法已得到广泛应用。该方法的原理简单,根据质量作用定义得出:

$$[B] = K_a[F][T-B] \quad (1)$$

式中, K_a 为解离常数, $[B]$ 为结合抗体浓度, $[F]$ 为游离抗原浓度, $[T-B]$ 为未结合抗体浓度。如果总抗体浓度中只有一部分抗体(用 r 表示)具有免疫活性, 那么等式(1)变为:

$$[B] = K_a[F][rT-B] \quad (2)$$

经转换后可写成:

$$\frac{[T]}{[B]} = \frac{1}{r} + \frac{1}{rK_a[F]} \quad (3)$$

这是一个双倒数直线方程, $[T]/[B]$ 随游离抗原 $[F]$ 而变化。当 $[F]$ 无限大时, $[T]/[B] = 1/r$, 为纵坐标上的截距, 其倒数 r 就是标记抗体的免疫活性分数。实际测定时, 细胞系列稀释后与标记 Ab 反应, 以 $[T]/[B]$ 对 $1/[F]$ 作图, 得一直线, 外推到纵坐标, 计算截距的倒数。与传统定性方法相比, 该法不仅能定量, 而且操作简单、结果准确、测定时间短、可比性强。非结合分数的标记抗体往往反映RIT时的本底和 RIT 时非肿瘤组织中的非特异照射。作者推荐, 这种测定方法可常规用于测定放射性标记抗体的免疫活性, 还可用于其它类型的标记, 如确定导向毒素、导向药物的免疫活性分数等。

结 语

对于RIT和RIT, 放射性碘仍应用得最多, 预计在今后若干年内, 还没有一种核素能完全取代碘。因此, 建立理想的碘化 McAb 技术具有一定的实用价值。碘化Ab的技术较多, 既有行之有效的方法, 又有苗头初露的新技术, 老方法应不断完善或淘汰, 新技术也应推广试用。在我国, 开展RIT研究已有很多年, 绝大多数单位仍用 Ch-T 法碘化 McAb^[25~31], 应该试用其它方法, 或建立

新的标记技术, 还必须研究一些质量控制方法, 用以评价McAb标记后的免疫活性。

参 考 文 献

1. Zimmer AM, et al; Hybridoma 1985, 4 : 1
2. 王世真, 施绪保; 核科学与工程 1987, 7 : 266
3. Hayes DF, et al; Cancer Res 1986, 46 : 3 157
4. Blair SD, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 322
5. Delaloye B, et al; J Clin Invest 1986, 77 : 301
6. Bradwell AR, et al; Immunol Today 1985, 6 : 163
7. Clarke S, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 321
8. Kroiss A, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 322
9. Perkins AC, et al; Nucl Med Commun 1986, 7 : 729
10. Khaw BA, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 362
11. Halpern SE; Int J Nucl Med Biol 1986, 13 : 191
12. Chatal JF, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : C5
13. Larson SM & Carrasquillo JA; Nucl Med Biol 1988, 15 : 231
14. Steinstrasser A, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 322
15. Wong ZM, et al; Nucl Med Biol 1988, 15 : 505
16. Goding JW; Monoclonal Antibodies, Principles and Practice 1983, p125
17. Lindmo T, et al; J Immunol Methods 1984, 72 : 77
18. Hayes DF, et al; Nucl Med Biol 1988, 15 : 235
19. Schoening R, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14 : 252

(下转第52页)

参考文献

1. 木村修治, 他: 癌の臨床 1987, 33 (別冊):37
2. Toivanen A, et al; Cancer 1984, 54: 2919
3. Schulof RS, et al; Cancer 1985, 55: 974
4. 横殿玲子: 癌の臨床 1987, 33:1229
5. 御厨修一, 他: 癌の臨床 1983, 29: 1521
6. Kingsley DPE; Br J Radiol 1975, 48: 863
7. 御厨修一, 他: 癌の臨床 1987, 33: 1239
8. 土屋武彦: 日本医放会誌 1976, 36: 922
9. 山下孝: 日本医放会誌 1981, 41:887
10. Tsuchiya T, et al; J Radiat Res 1983, 24:345
11. 土屋武彦: 癌の臨床 1983, 29:1499
12. 刘树铮: 中华放射医学与防护杂志 1987, 7:241
13. 坂本澄彦, 他: Oncologia 1987, 20:86
14. 宫本美弥子, 他: 癌の臨床 1987, 33: 1211
15. Shimogawara I, et al; Cancer 1982, 49 :1456
16. 上出利光, 他: 臨床免疫 1986, 18:62
17. 今中一文: 日本医放会誌 1983, 43: 355
18. 廣田佐栄子, 他: 日本医放会誌 1986, 46:1331
19. 小川恭弘, 他: 日癌治 1982, 17:752
20. 今中一文, 他: 日癌治 1984, 19:1438
21. Ogawa Y, et al; 日本医放会誌 1987, 47:845
22. 小川恭弘, 他: Oncologia 1987, 20:94
23. Shah S; Cancer Res 1981, 41:1742
24. 上池修, 他: 日本医放会誌 1986, 46: 1439
25. Ibayashi Y, et al; J Immunol 1985, 134 :648
26. 伊東恭悟, 他: Oncologia 1987, 20:71
27. Song CW, et al; Radiat Res 1978, 75: 586
28. 横殿玲子, 他: 日本医放会誌1987, 47: 998
29. 橋武彦: 癌の臨床 1974, 20:84
30. Yata J, et al; Int J Cancer 1970, 5: 394
31. 小川恭弘, 他: 癌の臨床 1987, 33: 1221
32. 廣田佐栄子, 他: 日本医放会誌 1988, 48:370

(上接第73页)

20. Haisma HJ, et al; J Nucl Med 1986, 27 :1890
21. Zalutsky MR & Narula AS; Cancer Res 1988, 48:1446
22. Oehr P, et al; Eur J Nucl Med 1988, 14:240
23. Matzku S, et al; Eur J Nucl Med 1985, 11:260
24. Trucco M & Petris S; Immunological Methods 1981, 2:1-26
25. Chen YF, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):44
26. Chen ZZ, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):47
27. Deng JL, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):64
28. Liu WH, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):143
29. Shi XB, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):197
30. Wang HQ, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):226
31. Zhang MY, et al; Proc CAMS PUMC 1988, 3 (suppl 1):262