

肿瘤诊治的新途径——核素标记单克隆抗体技术及其进展

解放军总医院 隆力综述 方永鑫 蒋彦永 夏宗勤*审

提 要: 肿瘤的放射免疫定位(Radioimmuno-detection)和放射免疫治疗(Radioimmunotherapy)是近年来在肿瘤诊治研究中迅速发展起来的一门新技术。本文就放射性核素与单克隆抗体的标记在技术上进行回顾,同时简单地介绍在其应用领域中的一些新进展。

本世纪40年代末到50年代,Pressman及其同事首先用放射性同位素碘标记多克隆抗体作了定位肿瘤的尝试,但多克隆抗体中对抗原特异的抗体所占的比例低,最多也不过10%,而90%以上为不必需的非特异物,因此效果并不理想。直到1975年单克隆抗体McAb产生以后,本世纪初Erllich等人关于治疗肿瘤的“魔弹”设想成为可能。越来越多的研究人员进行了放射性核素标记McAb用于肿瘤诊断和治疗的研究。下面就放射性核素标记单克隆抗体在技术上进行回顾。

一、一步法标记

即放射性核素直接与抗体标记,化学反应和放射标记同时发生,多用于碘和锝的标记。

(一)放射性碘标记抗体

在还原状态(I^-)下,对标记抗体是不发生反应的,只有在活化了的碘离子(I^+)状态下才有可能与抗体标记。这种碘的氧化是由象氯胺T、Iodogen或乳过氧化氢酶这样的氧化剂来完成的。

1. 氯胺T法:由Greenwood等人建立(1963年)。 ^{131}I 、抗体和新鲜氯胺T在缓冲液中充分混合一定时间后,加入还原剂偏重亚硫酸钠以中止氧化,进而用Sephadex G-50层析柱将碘标记的抗体与未标记的抗体分

开。此法速度快,易于操作,能获得极高的有特异活性的标记产物。氯胺T是一种强反应剂,易引起抗体免疫活性的丧失和抗体的变性聚合等[1、2],但由于前述的优点,仍有不少人采用。

2. Iodogen法:Iodogen是1,3,4,6-四氯-3a,6a-二苯基乙脲的商品名称。它难溶于水,所以化学反应发生在固体阶段,蛋白变性极少又容易纯化,能获得极高特异活性的标记产物[2]。关于具体方法,Fra-ker等人有详细描述[3],为颇受欢迎的碘化方法。

(二)放射性锝标记抗体

各家报道的锝直接标记方法中,缓冲系统、pH值及“孵育”时间均不相同,其共同点是都用锡离子作还原剂,即抗体与锝在一个含有氯化亚锡缓冲液的环境中进行标记。还原后的锝将生成三种产物:与抗体联结,形成 ^{99m}Tc 胶体和非还原的 $^{99m}TcO_4^-$ 。Paik等人发现了抗体与 ^{99m}Tc 的两个结合点,一个具有高容量但亲合力低,而另一个为低容量高亲合力点[4]。 ^{99m}Tc 与抗体低亲合力点的结合是脆弱的,易因氧化和反整合而裂解。对此,Rhodes等人认为可用包括抗体与锡离子长时间“孵育”的Pretining法或通过整合剂的间接标记方法解决,从而减少低亲合力点的标记[5]。

二、用螯合剂间接标记

螯合剂是包含一个可与金属离子紧密结合的螯合基和一个可与氨基酸残基反应的功能基的分子,因此也称为双功能螯合剂。利用螯合剂的间接标记是将螯合剂先与抗体(或核素)联结,然后再将核素(或抗体)结合到螯合剂上。这种方法在选择化学反应和核素种类上有很大的灵活性。

目前所用的螯合剂有DTPA(diethylene-triamine-pentaacetic acid)[6], EDTA(ethylene-diamine-tetraacetic acid)[7], DF(deferoxamine)[8], BABE(bromoacetamidobenzyl ethylenediamine-tetraacetic acid)[9]等。下面以报道较多的DTPA为例加以说明。

(一)抗体与螯合剂的联结

常用环DTPA酞与抗体氨基之间的酰化反应进行[6]。联结时,将适当比例的环DTPA酞与抗体放入pH值为7的缓冲液中,在室温中振荡5分钟即可完成。有人研究了不同的DTPA/抗体比值(50、100、150)对抗体联结的影响,发现高比值易导致集合物的形成,但后者可用连续凝胶过滤法使之显著减少[2]。

除环DTPA酞法外,还有DTPA羧基酞法[10],O-酞基异脲DTPA法等[11]。

(二)金属离子的螯合

以 ^{111}In 为例,将无载体的氯化 ^{111}In 在醋酸钠溶液中与抗体-DTPA复合物混合,保持反应pH值在5~6[6]。之所以在酸性环境中进行,是因为很多金属离子在中性或微碱性环境中脱水沉淀。常用的是醋酸盐或枸橼酸盐[2]。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的标记与 ^{111}In 类似[12]。先将DTPA-抗体复合物与氯化亚锡在醋酸盐缓冲液中(pH4.5)“孵育”30分钟,温度保持在23℃。再加入 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ “孵育”15分钟。此法对完整抗体、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段和Fab片段均适

用。有人报道过用这种方法在DTPA和IgG的溶液中 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 与抗体的直接标记[13]。

三、关于用螯合剂与抗体特殊部位的联结

发生在抗原结合点上的任何化学变化,都可能导致抗原体对抗原亲合力和特异性的改变,因此从理论上讲,应该将螯合剂有选择地联结在远离抗原结合点的恒定部位。Saccavini等人认为可用Fc段的含糖部位和 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段的巯基进行[2]。但用此法标记 ^{111}In 后发现,抗体在裸鼠体内的免疫学活性和生物学分布与DTPA和抗体随意联结的产物比较,没有什么区别。经分析发现,所谓的含糖部位是随意分散在抗体上的,而并非特异地集中在Fc段。看来用螯合剂与抗体特殊部位的联结须另辟途径。

四、抗原、抗体及核素的选择

(一)抗原的选择

已发现的肿瘤抗原均为肿瘤相关抗原,绝大多数属于肿瘤失控增殖过程中异常增多的物质(分化性抗原)或胚胎性抗原。目前应用较多的是分泌型抗原,如CEA、 αFP 、Ferritin、CA19-9、HCG等。因为它们能出现于血液中,故可用于对病人进行定期的观测,但却因其也能与一部分标记的抗体结合,从而降低靶/非靶比值,影响了放射免疫显像的效果。最近有人研究用非分泌型抗原SSEA定位和治疗消化道肿瘤,能获得较好效果[14]。但因其不存在于血液中,故不能用于监测,须与分泌型抗原或其它监测手段结合起来。

(二)抗体的选择

目前临床使用的抗体为动物抗体(鼠),注射后会产生抗这种抗体的抗体——人抗鼠抗体(HAMA),其中一些抗体可以直接和抗原结合点起反应,也可以引起过敏反应,尤其在反复使用后。因此人们开始探索人-人杂

交瘤技术,以便制备出人单克隆抗体。就动物抗体而言,易引起过敏反应的是Fc段。因此有人考虑用除去了Fc段的Fab片段或F(ab')₂片段,以减少或避免过敏反应的发生^[15]。其方法是利用蛋白水解酶——胃蛋白酶作用于邻近重链的双硫键部位,用它裂解大部分Fc片段,留下两个连在一起的F(ab')₂;而木瓜酶则可除去更大部分的重链,生成两个单价的Fab片段和一个完整的Fc段。

完整抗体IgG是在肝脏和网状内皮系统中代谢的,而Fab片段则主要在肾脏清除^[16]。因此,从理论上讲,Fab片段可以减少非靶性的肝脾放射强度,但Fab片段为单价,与抗原的结合弱于双价的完整抗体,而F(ab')₂既具有二价活性的结合点,又没有免疫原性的Fc段,因此被证明优于完整抗体和Fab片段^[71]。

(三)核素的选择

对于诊断定位来说,要求核素的半衰期要相对地短,其衰变类型是准直效率高的低能的γ辐射,最好不发射β射线,以尽量减少病人吸收的辐射剂量。对内照射来说,则以短半衰期的释放β或/和α射线的核素为宜。

¹³¹I是最早也是到目前为止使用最多的核素。它容易与抗体标记,不易导致对抗体的损伤,生物半衰期较短,其γ射线可以极容易地为γ相机探测到,β射线可用于治疗。但碘标记抗体的最大弱点是其在体内的不稳定,产生的脱卤作用导致示踪剂自器官尤其是肝脏的迅速清除,使肿瘤部位的放射性碘水平降低。另外,由于体内某些器官(如甲状腺)对碘的高摄取性,因此在给病人注射碘标记的抗体前,要先给病人碘化钾或氯化碘溶液,以封闭这些器官对放射性碘的摄取。

目前人们多寻求用金属核素标记抗体。Halpern等人对比了¹¹¹In和¹³¹I在放射免疫显像和它们标记抗体的体内行为,发现¹¹¹In除了在肝脏滞留和价格较贵以外,其它指标均优于¹³¹I^[18]。^{99m}Tc,由于其理想的核素性

质,是另一种广泛应用的诊断核素^[19]。

在治疗上,除了用¹³¹I以外,也选用纯β射线的金属核素。例如,选用⁹⁰Y作为最好的放射核素之一标记单克隆抗体用于治疗,这是基于其适宜的半衰期(64小时),无γ射线,与抗体结合牢固,中度能量的β射线,以及化学性质适合于与DTPA形成螯合物^[20, 24]。此外,还有用²¹²Bi、⁴⁷Sc和¹⁰⁸Pd标记抗体用于治疗的^[21~23]。

人们用放射性核素标记肿瘤抗体作为定位诊断和治疗肿瘤的新途径,至今已有四十余年了,目前大多仍处于探索阶段。尽管如此,由于肿瘤研究中的核素标记抗体用于定位和治疗是一种既能定位又能定性的方式,有着其它手段所不能比拟的优越性,因此多数学者的态度是积极乐观的。近来有的研究人员探索用小型手提式γ探测仪,在手术中探测肿瘤及其转移灶的位置,可以发现体积更小更隐蔽的病灶,使肿瘤定位技术又向前迈进了一步^[24~26]。可以预料,随着人们对肿瘤认识的深入和标记技术的提高,这项技术会逐步完善,成为人们诊治肿瘤的新手段。

参 考 文 献

1. Mather SJ, et al; Int J Radiat App Instrum 1986, (A)37(8):727~733
2. Saccavini IC, et al; Int J Nucl Med Biol 1986, 13(2):191~194
3. Fraker PJ, et al; Biochem Biophys Res Commun 1978, 80:849~857
4. Paik CH, et al; Int J Nucl Med Biol 1985, 12(1):3~8
5. Rhodes BA, et al; J Nucl Med 1986, 27(5):685~693
6. Hnatowich DJ, et al; Int J Appl Radiat Isot 1982, 33:327~332
7. Yeh SM, et al; J Radioanal Chem 1979, 53:327~336
8. Yokoyama A, et al; J Nucl Med Biol 1982, 23:909~914

- 74:386
4. Mbaaya JCN, et al; Lancet 1988, I(8588):733
5. Goo YS, et al; Gastroenterology 1989, 96 (3):690
6. 杨永青、肖祥熊编著:放射免疫分析的正常值和异常值, 同济大学出版社 1988, p130
7. 伏见尚子:最新医学 1982, 37:128
8. 朱建民,等:中华内分泌代谢杂志 1987, 3(2):83
9. Christlieb AR, et al; Diabetes 1978, 27 (7):732
10. Christlieb AR, et al; Am J Med 1982, 6:1372
11. 陈玉心,等:南京医学院学报 1987, 7 (2):114
12. 吴增常,等:中华内分泌代谢杂志 1987, 3(4):211
13. Ensink JW, et al; Diabetes Care 1980, 3:285
14. Geremia BB, et al; J Clin Invest 1984, 73:1532
15. Paolisso G, et al; Diabetes 1987, 36(5):566
16. 陈名道:国外医学内分泌分册 1982, 2:60
17. Press M, et al; N Engl J Med 1984, 310 (13):810
18. 松野一彦ラ:临床病理 1981, 29(4):364
19. Barnes AJ, et al; Lancet I 1985, (8444):1465
20. Krassowski J, et al; Acta Endocrinologica 1988, 117:255
21. Press M, et al; N Engl J Med 1984, 310 (13):810
22. 松野一彦ラ:临床病理 1981, 29(4):364
23. Singer DE, et al; Diabetes 1989, 38:350

(上接第76页)

9. Goodwin DA, et al; J Nucl Med 1985, 26(5):493-502
10. Krejcarek GE, et al; Biochem Biophys Res Commun 1977, 77:581~585
11. Paik CH, et al; J Nucl Med 1985, 26 (5):482~487
12. Childs RL, et al; J Nucl Med 1985, 26 (3):293~299
13. Hnatowich DJ, et al; J Nucl Med 1983, 24:544
14. Ballou B, et al; J Surg Oncol 1986, 31 (1):1~12
15. Larson SM, et al; J Nucl Med 1983, 24:123~129
16. Larson SM, et al; JAMA 1983, 149:811~812
17. Larson SM, et al; In Proc 3rd World Cong Nucl Med Biol, Paris 1982, IV:3666~3669
18. Halpern SE, et al; Int J Nucl Med Biol 1986, 13(2):195~201
19. Kanellos J, et al; JNCI 1986, 77(2):431~439
20. Wessels BW, et al; Med Phys 1984, 11:638~645
21. Larson SM, et al; In Current Concepts in Diagnostic Nuclear Medicine 1984, 1:13~16
22. Fawwaz RA, et al; J Nucl Med 1984, 25:796
23. Hnatowich DJ, et al; J Nucl Med 1985, 26:503~509
24. Martin, DT, et al; Am J Surg 1985, 150 (12):672~675
25. O'Dwyer PJ, et al; Arch Surg 1986, 121 (12):1391~1394
26. Sickel - Santanello BJ, et al; Dis Colon Rectum 1987, 30:761~764