

## · 综述与译文 ·

# $^{99m}\text{Tc}$ 标记单克隆抗体技术的进展

北京协和医院核医学科 李 军综述 王世真审

**摘 要:** 单克隆抗体的 $^{99m}\text{Tc}$ 标记技术近年来进步很快, 主要包含两个方面: 还原抗体与 $^{99m}\text{Tc}$ 的直接偶联及利用化学合成的双功能联结剂进行抗体与 $^{99m}\text{Tc}$ 的偶联。为了使标记过程能适应临床放免显像的方便使用, 这些标记方法都朝着能够进行一步法标记的药盒方向发展。

由于单克隆抗体(以下简称McAb)的 $^{99m}\text{Tc}$ 标记物具有对肿瘤等病灶进行定位显像的功能, 人们一直在致力于寻找一种快速、简便、标记率高、产物稳定的单克隆抗体 $^{99m}\text{Tc}$ 标记技术, 以便适应临床应用的需要。

### 单克隆抗体的 $^{99m}\text{Tc}$ 直接标记

直接标记法通常包含如下过程(这些过程也可能在同一反应管内同时进行)<sup>[1]</sup>:

①在保持单克隆抗体原有生物学活性的前提下, 将抗体中二硫键还原为游离巯基(-SH); ②保护McAb还原后形成的-SH; ③还原 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ; ④还原态 $^{99m}\text{Tc}$ 在适当弱结合配体存在下, 形成 $^{99m}\text{Tc}$ -配体结合物; ⑤通过配体交换反应, 由 $^{99m}\text{Tc}$ -配体最终形成 $^{99m}\text{Tc}$ -McAb标记物。

迄今为止, 单克隆抗体的还原主要采用了以下两类还原剂: ①用 $\text{SnCl}_2$ 溶液还原McAb或其片段, 这里起还原作用的为金属离子( $\text{Sn}^{2+}$ ); ②使用含-SH的小分子有机物(如2-巯基乙醇)或其它有机小分子(如维生素C)、无机盐(如 $\text{NaBH}_4$ )等, 这里起还原作用的为非金属组分。

用 $\text{SnCl}_2$ 还原蛋白质进行 $^{99m}\text{Tc}$ 标记的最早尝试, 可能是Dreyer和Munze于1969年采用此法标记人血清白蛋白的实验, 当时尚不能将胶体 $^{99m}\text{Tc}$ 与标记产物分离。1971年, Eckelman等使用Sephadex G-25凝

胶柱层析来除去标记过程中锑的水解产物, 但并不能完全除去少量的胶体 $^{99m}\text{Tc}$ 。Paik等<sup>[2]</sup>发现了McAb中有高亲和部位与低亲和部位之分, 并在DTPA存在下观察到 $^{99m}\text{Tc}$ 由低亲和部位向高亲和部位的转移<sup>[3]</sup>, 这实际上就是后来所使用的配体交换法的较早雏型。在 $^{99m}\text{Tc}$ 弱结合配体的存在下, 可在保证原有标记率的同时提高标记物的稳定性, 同时减少了水解产物。 $\text{SnCl}_2$ 还原法经过近十年的发展, Rhodes等于1980年研究出了一种用 $\text{SnCl}_2$ 与McAb过夜保温, 然后再进行 $^{99m}\text{Tc}$ 标记的方法, 此法后来成为许多直接标记法的经典基础。Hawkins等<sup>[4]</sup>改进了此法, 其基本标记方法如下: 5mmol  $\text{SnCl}_2$ , 40mmol邻苯二甲酸钾, 13.4mmol酒石酸钠钾, 配制成0.67ml溶液(pH5.6), 加入1ml(1mg/ml)的抗体, 室温保温21小时, 然后可将混合的反应液冷冻或-70℃保存。使用时, 待其融化后加入 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 洗脱液, 室温保存1小时, 即可得到高标记率的稳定产物。在此法中,  $\text{SnCl}_2$ 起到了还原McAb和 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的双重作用, 还原体系简单, 易于制备成药盒使用。但因抗体还原时间及标记时间较长, 应注意避免操作过程中 $\text{SnCl}_2$ 的氧化。运用此法制备的标记物已成功地用于临床显像。

第二类还原方法目前研究得较多, 还原剂种类也较多。Reno和Bottino<sup>[5]</sup>建议采用一系列抗体还原剂: 二硫苏糖醇(DTT)、

$\text{NaBH}_4$ 、硫代磷酸钠、二硫赤藓糖醇(DTE)、2-巯基乙醇(2-ME)、半胱氨酸、N乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽。在标记过程中,使用了 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 弱结合配体(酒石酸盐和葡庚糖酸盐)及还原型抗体的-SH保护剂( $\text{Zn}^{2+}$ )。这里,他们首次使用-SH保护剂 $\text{Zn}^{2+}$ ,以防止还原型抗体在保存过程中重新氧化形成二硫键,这对于还原型抗体的长期冻存及药盒的制备是有利的。-SH的氧化可在溶解氧作用下进行,并且可以为溶液中的微量金属离子( $\text{Cu}(\text{II})$ ,  $\text{Fe}(\text{II})$ )和碱性pH条件所催化。为防止二硫键的形成,可加入金属离子络合剂或者用易于除去的-SH衍生化试剂保护游离-SH。 $\text{Zn}^{2+}$ 的加入可与还原型抗体的-SH形成中间物,标记时, $\text{Zn}^{2+}$ 易于为 $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$ 所取代,而与还原抗体形成更稳定产物。在 $\text{SnCl}_2$ 还原法中,过量的 $\text{Sn}^{2+}$ 也产生了类似 $\text{Zn}^{2+}$ 的作用。

Pak等<sup>[6]</sup>采用了多羟基二羧酸类化合物作为 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的弱结合配体,这类配体(代表物是葡糖二酸)与其他配体一样,能防止水解产物的发生及得到高亲和位标记的稳定产物。他们使用DTT作抗体还原剂,比较了“单管法”(即一步法)药盒与“双管法”药盒的标记产物性能。“单管法”药盒组成为:还原型抗体或片段, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的还原剂( $\text{Sn}^{2+}$ ),水溶性配体(D-葡糖酸)。使用时,直接将 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 洗脱液加入此管保温即可,方法简单,可一步完成。“双管法”则将上述配体、 $\text{Sn}^{2+}$ 与还原型抗体分装两管,待 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 于第一管内还原形成配体结合物后再加入第二管保温。比较的结果说明,“单管法”标记产物的稳定性、标记率、活性等方面均优于“双管法”,并且单管法更适合于Fab'片段的标记。Schwarz和Streins-trasser<sup>[7]</sup>用2-ME作还原剂,以 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -磷酸或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -焦磷酸来标记抗体,标记产物不必进一步纯化。Mather和Ellison<sup>[8]</sup>使用商业化的MDP药盒,也成功地进行了类似的

标记。Garron等<sup>[9]</sup>用2-氨基乙硫醇(AET)作还原剂进行了IgG与Fab'的标记,结果较好。Thakur等<sup>[10]</sup>比较了几种还原剂(2-ME, DTT, DTE, 维生素C)的标记效果,结果表明,用维生素C作还原剂标记率最高、产物免疫活性最好。由于维生素C是强还原剂,可以在体内使-SH活化酶系保持还原状态,并且维生素C无毒性,可直接注射,不象其它还原剂需经过还原后的分离,过量的维生素C(无论是氧化型或还原型)均不必从反应液中除去。另外, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -维生素C中间配合物的生成,可防止 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 胶体的形成,因此不必使用其他配体。总之,使用维生素C制备药盒具有制备过程简单、标记快速、产物稳定、标记率高等诸多优点,可能成为制备药盒的最佳还原剂。

目前,采用这类还原剂的动物实验与临床显像研究都取得了令人满意的结果。药盒的使用方面,Dean等<sup>[11]</sup>以DTT还原抗体,用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -葡糖酸标记抗纤维蛋白抗体。Hansen等<sup>[12]</sup>以药盒法标记抗体片段并进行临床显像,但未提供标记细节。

此外,还有一种还原方法,采用2-亚氨基-4-巯基丁烷作抗体还原剂<sup>[13]</sup>,即将该试剂与IgG以50:1的摩尔比混合,30分钟后,加入MDP或葡庚糖酸盐配制的还原 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 洗脱液,可得到94%的放化产率。Joiris等<sup>[14]</sup>研究了同一标记过程,发现这种还原剂在标记 $\text{F(ab')}_2$ 时不会产生Fab'单价片段,而前述的巯基类还原剂(如DTT等)则会有部分Fab'形成,因此,此还原剂较适合于 $\text{F(ab')}_2$ 与IgG的标记。

### 间接标记法及其与直接标记法的比较

最早用于 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 抗体标记的双功能联结剂是DTPA,然而,人们不久就发现DTPA即使在高浓度时也不能防止 $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$ 与抗体非特异的结合,因而易于解离。Tolman等<sup>[15]</sup>首先采用金属硫蛋白(Metallothionein,

简称MT)作为双功能联结剂。Brown等<sup>[16]</sup>的结果证明, McAb-MT用<sup>99m</sup>Tc-葡庚糖酸标记时, 仅有极少量非特异结合, 标记产物稳定, 不需标记后纯化。他们后来的实验<sup>[17]</sup>则表明, F(ab')<sub>2</sub>-MT因能快速定位, T/NT比值较高, 更适于临床显像的要求。Arano等<sup>[18, 19]</sup>使用半卡巴脲作双功能联结剂标记<sup>99m</sup>Tc, 但有20%的非特异结合, 标记过程需3小时, 且胃、肝内本底较高。应用较为成功的合成类双功能联结剂是Fritzberg等<sup>[20, 21]</sup>研制的二硫二氮(N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>)配体。起初采用先偶联McAb, 再标记<sup>99m</sup>Tc的过程, 结果发现非特异结合量大, 产物易于解离。后来所采用的将<sup>99m</sup>Tc与N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>配体结合, 或与大环胺类配体结合<sup>[22]</sup>后再偶联McAb的过程, 解决了这一问题, 但步骤较多, 需纯化除去未偶联的配体<sup>[23]</sup>。

此法的药盒化标记产物<sup>[21, 24-26]</sup>已用于许多抗体的临床显像, 取得了良好结果。Dean等<sup>[11]</sup>采用先偶联抗体再标记<sup>99m</sup>Tc的方法对Fab'进行了标记, Fab'的游离-SH通过顺丁烯二酰亚胺联结一硫三氮(N<sub>3</sub>S)配体, 再以<sup>99m</sup>Tc-葡糖酸进行<sup>99m</sup>Tc的标记。N<sub>3</sub>S配体结合了抗体的-SH, 排除了<sup>99m</sup>Tc直接标记抗体的位点, 也使<sup>99m</sup>Tc结合位置远离抗原结合部位, 因而较适合于Fab'片段的标记。另外, Najafi等<sup>[27]</sup>合成了N<sub>2</sub>S<sub>4</sub>配体, 此配体含-SH较多, 易于与抗体偶联, 余下的-SH可用于络合<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 但因其易于氧化, 因而给合成和贮存增加了困难。

间接法中因双功能联结剂与McAb的氨基结合, 其中有些氨基位于抗体可变区, 从而可能影响其免疫活性; 双功能联结剂合成的高价格、步骤复杂、需标记后的纯化处理等弱点都影响了它的推广应用; 另外, 经化学修饰后的抗体可能成为免疫原。与之相比, 直接标记法具有经济、方便、产物稳定、活性高等诸多优点, 因而作为临床放免

显像药盒的制备方法可望得到迅速推广。

### 参考文献

- 1 Rhodes BA. Nucl Med Biol, 1991; 18(7): 667-676
- 2 Paik CH et al. Int J Nucl Med Biol, 1985; 12(1): 3-8
- 3 Paik CH et al. Nucl Med Biol, 1986; 13(4): 359-362
- 4 Hawkins EB et al. Antibody Immunconj Radiopharm, 1990; 3(1): 17-25
- 5 Reno JM & Bottino BJ. Radiolabeled Proteins, especially antibodies, and their preparation and use as diagnostic and therapeutic agents. Eur Pat Appl EP237150 A2; 1987
- 6 Pak KY et al. Method for labeling antibodies with isotopic technetium or rhenium. their use in immunotherapy and scintigraphy, and kits for performing the method. Int Pat WO 88/07382; 1988
- 7 Schwarz A et al. J Nucl Med, 1987; 28(4): 721 (Abstr)
- 8 Mather SJ et al. J Nucl Med, 1990; 31(5): 692-697
- 9 Garron JY et al. Nucl Med Biol, 1991; 18(7): 695-783
- 10 Thakur ML et al. Nucl Med Biol, 1991; 18(2): 227-233
- 11 Dean RT et al. New facile methods for stably labeling antibodies with technetium-99m. In: Nicolini M et al eds. Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine. New York, Raven, 1990: 605-607
- 12 Hansen HJ et al. Cancer Res, 1990; 50(Suppl): 794-798
- 13 Goedemans WT et al. J Nucl Med Allied Sci, 1989; 33(3): 286
- 14 Joiris E et al. Nucl Med Biol, 1991; 18(3): 353-356
- 15 Tolman GL et al. J Nucl Med, 1985; 26(4): 438 (Abstr)
- 16 Brown BA et al. Analyt Biochem, 1988; 172(1): 22-28
- 17 Brown BA et al. Cancer Res, 1990; 50(Suppl): 835-839
- 18 Arano Y et al. Appl Radiat Isot, 1986; 37(7): 587-592
- 19 Arano Y et al. J Nucl Med, 1987; 28(6): 1027-1033
- 20 Fritzberg AE et al. J Nucl Med, 1986;

- 27(6):957-958
21. Fritzberg AE et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85(11):4025-4029
22. Franz J et al. Nucl Med Biol, 1987; 14(6):569-572
23. Salk D et al. Semin Oncol, 1988; 15(6):608-618
24. Vanderheyden JL et al. Structural and Biological equivalence of technetium and rhenium diamide dithiolate complexes; application to antibody labeling. In: Nicolini M et al eds. Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine. New York; Raven, 1990:623-629
25. Serafini AN et al. Clin Nucl Med, 1989; 14(8):580-587
26. Schroff KW et al. Radioimaging of melanoma with  $^{99m}\text{Tc}$ -label monoclonal antibodies. In: Ferrone S ed. New York; Springer, 1990:344-354
27. Najafi A et al. Nucl Med Biol, 1991; 18(2):179-185

## 供体内应用的单克隆抗体的制备

Colnaghi MI

**摘 要:** 采用一种新颖的方法制备出供体内应用的单抗制剂。用这种方法制备的单抗制剂克服了第一代单抗的不足, 且特异性达100%, 灵敏度高于80%。

适合体内应用特别是用于治疗抗肿瘤单克隆抗体的选择与制备是一件既复杂又耗时的事情。

事实上, 这些单抗必须具备以下特点: ①严格的肿瘤限制性; ②合适的抗体类型(IgG优于IgM, IgG亚类的选择取决于体内的用途); ③良好的亲合力, 至少达到 $10^9\text{mol}^{-1}$ 。

与这些单抗产生有关的靶抗原必须具备以下条件: ①局限化(指抗原存在于细胞膜的表面); ②均一表达(指所有的肿瘤细胞都存在抗原分子); ③单位细胞的抗原密度; ④一定的化学性质。第③点会影响抗原抗体复合物内在化的能力, 而内在化又影响治疗方法的选择。

不幸的是, 第一代鼠抗人肿瘤单克隆抗体并不具备以上品质, 它们通常是针对那些强免疫源性的糖蛋白或糖脂分子所表达的抗原表位, 而一些正常细胞也拥有这些抗原表位。为此, 人们尝试用不同的方法制备更适用于抗肿瘤的第三代单抗。采用鼠脾细胞免疫制备杂交瘤的级联免疫方法(Cascade

Immunization Procedure)的结果令人满意。该法的机理是从免疫的抗原物质中, 除去第一代单抗能识别的强免疫源性抗原表位。通过这种方法已制备出一些适合体内使用的抗卵巢癌单克隆抗体, 其中的两株单克隆抗体(MOv18和MOv19)能识别同一抗原(gp38)分子上的两个不同表位, 从而满足体内使用的需要。用MOv18对卵巢癌病人进行的初步闪烁显像研究结果显示, 这类单抗能局限于肿瘤细胞上, 特异性达100%, 灵敏度高于80%。图1介绍的是有关这些特别单克隆抗体制备的进一步方法。当得到的单抗是识别抗原分子上非特有的表位时, 可用这种方法。即用现有的单抗致敏鼠红细胞(MRBC), 然后与来自肿瘤细胞的可溶性提取物反应, 这样可能把经过选择的分子暴露给鼠免疫系统, 非特有的抗原表位因为与接有MRBC的单抗相连而被遮掩起来, 于是其他更特有的抗原表位便可被免疫识别。

影响体内使用鼠单抗的另一个问题是其对人体的免疫源性。事实上, 异源性蛋白质在病人体内会诱导人抗鼠抗体(HAMA)的