

- 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}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 10^9mol^{-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

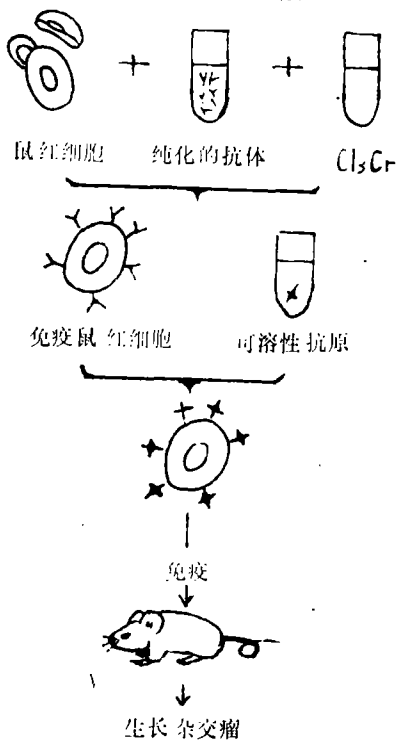


图1 制备针对新的抗原表位的单克隆抗体的可能方法

产生,这会妨碍治疗的效果。为了克服这种困难,应使用人单抗,但尽管付出了许多努力,至今尚未获得合适的人单抗制剂。

最近,鼠单抗嵌合的蛋白基因工程提供了一个替代方法,即将鼠单抗上完整的V区转移到人抗体的C区,便能使人抗体转变成“人”单抗。另一种方法是以鼠抗体的CDRs代替整个鼠抗体的V区,再与人抗体的C区嵌合。近来发现,PCR(聚合酶链反应)技术特别适合免疫球蛋白V区基因的克隆和表达,这些人工化的单抗制剂在人体内具有低的免疫源性。

好的可供体内使用的单抗还需要进行一些处理,此过程可能会遇到一些其他的问题,比如放射性标记会减低单抗的免疫反应性等。

有一些方法可以用来清除变性的单抗,

其中最希望的方法是抗独特型亲和层析法,即在亲和层析中,应用抗独特型Ab2单抗回收结合部分的单抗。这样能使免疫反应性从最初的40%增加到80%。下表为提高单抗免疫反应性的方法。

表 提高单抗免疫反应性的方法

a. 改进标记方法

b. 通过抗独特型单克隆抗体的亲和层析法,或纯化抗原柱的亲和层析法除去变性的单克隆抗体

抗独特型单抗用于提纯供体内使用的单抗,包括单价和杂交的杂交瘤产生的双功能单抗。这些单抗可将未知特异性的一些T细胞重新聚集到肿瘤处,以便于T细胞特异地杀死肿瘤细胞。产生MOv18的杂交瘤已被开发出一个双功能单抗制剂,能特异地再识别一个CD3/TCR复合物。双功能单价单抗桥接CD3/TCR复合物与gp38分子,激活T细胞,且MOv18识别gp38分子等,结果T细胞便特异地杀死MOv18阳性的卵巢癌细胞。

杂交的杂交瘤不仅能产生合适的双功能单抗,而且还能分泌其他种类的抗体包括双价亲代抗体。为了避免出现下列效应,即①有反应活力的单抗分子被稀释;②对靶细胞的结合反应受到竞争;③相关的肿瘤抗原被覆盖;④效应细胞的互相残杀,特别是存在亲代抗CD3的相关分子时,必须从免疫球蛋白中分离出功能性的杂交单抗分子。

使用抗MOv18独特型单抗对杂交的杂交瘤分泌产物在抗独特型柱上进行亲和层析,能分出双价抗-CD3抗体的未结合部分。此外,如果该法和HCA-HPLC相结合,不仅可从抗体复合物中清除与亲代相关的分子,而且还可清除无反应能力的重组分子。经抗独特型亲和层析后,滞留时间与双价MOv18或双特异性杂交分子等相应的抗体分子,在非结合部分得到回收。经两次纯化步骤后的杂交单抗分子比仅仅经过亲和层析的单抗分子活力提高10倍;另外,与粗制品

相比,一次纯化过的抗体已表现出非常好的效果。

在对荷人卵巢癌裸鼠的临床前研究中,抗卵巢癌/抗CD3双功能单抗,无论体内还

是体外,都能特异地介导对肿瘤的攻击。

[Nucl Med Biol 1991; 18(1): 15~18(英文)]

秦秋平节译 林 汉校

肿瘤定位中的单克隆抗体预着靶技术:

亲和素-生物素系统

Paganelli G et al

摘 要:亲和素与生物素之间具有极高的亲和力,而且一分子亲和素上有四个生物素结合位点,生物素在血液中又能迅速清除。两步法与三步法预着靶技术都是利用单克隆抗体的肿瘤特异性与亲和素和生物素的上述特点相结合,为肿瘤定位研究中如何迅速降低本底,获得瘤/非瘤高比值提出了新的希望。

如何降低血液及正常组织中的高本底,已成为单克隆抗体导向探测及治疗肿瘤的主要问题。预着靶技术利用单克隆抗体的高度特异性,预先注射抗体,使之在肿瘤部位聚集后再注射一种既能快速自血中清除又能被前述抗体捕获的标记(放射性核素或药物)物质,以达到迅速降低本底、增大靶/非靶比值的目。

预着靶的生物学和化学

亲和素-生物素系统(A-B系统)

亲和素是一族对生物素具有高亲和力和高特异性的蛋白质。它由四个亚基组成,分子量约为65 000(每个亚基的分子量约为16 000),每个亚基上都有一个生物素结合位点,故每分子亲和素能与四分子生物素结合。二者的亲和力非常高(K_D 达到 10^{-15} mol数量级),在实际应用中这种结合被视为不可逆过程。

亲和素存在于两栖类、爬行虫类和鸟类的卵白中,近又发现链霉菌能产生一种链霉菌亲和素。它与鸟亲和素具有相同的结合生物素特性,但又有如下不同:①鸟亲和

素属于糖蛋白,每个亚单位上都有一个寡聚糖单位单一分支(由甘露糖和葡萄糖胺组成)。链霉菌亲和素不属糖蛋白;②鸟亲和素为强碱性蛋白,其等电点为10.5,链霉菌亲和素的等电点为5~8.用化学修饰法可使鸟亲和素变成等电点近中性的衍生物,而不影响其结合特性。

研究表明,亲和素的每个亚单位由两个互相垂直的 β -片层构成,扭曲后形成一个“袋穴”结构,此处为生物素结合位点。

由于亲和素分子上成对的生物素结合位点相距较近,在与生物素化分子结合时会存在空间位阻,所以每分子亲和素在与生物素化大分子结合时,难以表现其四价的结合特性。生物素结合位点富含非极性氨基酸,而生物素分子表面也是非极性的。用化学修饰的方法已证实结合位点的四个色氨酸残基对于结合生物素起极重要的作用。“袋穴”的底部为肽链分子的氨基末端。结合部位的入口位于分子表面稍下的位置。

生物素又称维生素H,由含有一个脲基的脂杂环“头”部和末端为羧基的脂肪链“尾”部组成。Green等的研究表明,“头”