

^{211}At 标记抗胃癌单抗3H11及其 Fab 片段在荷人胃癌裸小鼠体内的分布*

张叔渊 金建南 刘宁 王娟 罗林 王方元 周懋伦

(四川大学原子核科学技术研究所,成都,610064)

罗德元

(华西医科大学肿瘤研究所,成都,610041)

万文徽 董志伟

(北京肿瘤防治研究所,100034)

利用 HPLC 和 ELISA 法对 ^{211}At -3H11 的分析鉴定表明,间接亲核标记法得到的产品具有3H11的天然性和纯度,并保持其免疫活性。 ^{211}At 在荷瘤裸小鼠体内分布的结果表明, ^{211}At -3H11 Fab 和 ^{211}At -3H11 与胃癌细胞有明显的特异亲和力,注射药物3h后,其胃癌摄取率(%/g)分别为 9.48 ± 0.65 和 4.91 ± 2.05 ,前者的 T/NT 值在12-14h左右明显大于后者。

关键词 ^{211}At McAb 体内分布 胃癌

利用单抗(McAb)与肿瘤抗原的特异性免疫应答,将放射性核素标记到单抗上,发挥单抗的导向作用和放射性核素的细胞毒作用,进行肿瘤内辐射治疗,是当今体内抗癌药物研究的重要发展方向之一^[1,2]。

国内外研究^[3,4]表明,从放射生物学的观点看,加速器生产的 α 放射性核素 ^{211}At 具有广泛的应用前景。 ^{211}At 半衰期短(7.2h),线能量传递值(LET=98.84keV/ μm)非常接近相对辐射生物学效应的最佳值(LET=100keV/ μm),在较短的距离内(55-80 μm ,相当于6-8个细胞范围)发射出较高的能量(6-8MeV),既有利于内辐射治疗,又对周围正常组织损伤小。文献[5]初步证明, ^{211}At 标记抗人胃癌单抗(^{211}At -3H11)有较特异的选择性,能起定位导向治疗裸小鼠荷人胃癌移植瘤的作用。

然而,在标记过程中可能会降低 McAb 的免疫活性,并且, ^{211}At 在体内会部分脱落,以至减少 ^{211}At -McAb 的导向和治疗作用。为此,本文在文献[6]的基础上,试图通过高效液相色谱(HPLC)和酶标免疫测定(ELISA)法对导向药物的质量和免疫活性进行检测,系统比较注射 ^{211}At -3H11Fab、 ^{211}At -3H11和 $^{211}\text{At}^-$ 后, ^{211}At 在荷瘤裸小鼠体内的动力学分布规律,并进行评

* 国家教委博士点基金资助项目

收稿日期:1993-12-07 收到修改稿日期:1994-04-30

价。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

²¹¹At, 四川大学原子核科学技术研究所制备, 其纯度符合生物医学应用要求^[3]; 鼠抗人胃癌单抗3H11 及其片段 3H11Fab, 北京市肿瘤防治研究所提供; 人胃癌细胞 M85 细胞系, 北京市肿瘤防治研究所提供, 作者传代培养(于含15%小牛血清的 RPMI-1640培养液中)。

选6-7周龄 BALB/C 裸小鼠(引进北京医科大学种鼠, 由四川省抗菌素研究所繁殖)作胃癌裸小鼠模型, 体重18-22g, 雌雄兼有, 均于右前腿根部背侧接种 2×10^6 M85细胞, 8-10d 后肿瘤直径为0.5-1.0cm。

334系列高效液相色谱仪(HPLC), 美国 Beckman 公司产品, 用于标记产品的分析鉴定; 7530型紫外-可见分光光度计, 上海分析仪器二厂产品, 单抗及其标记产品(²¹¹At-McAb)的免疫活性是用 ELISA 法, 在该光度计上测 OD492 得到的。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体的标记和质量控制 采用间接亲核标记法^[7,8], 将²¹¹At 与对氨基苯甲酸的重氮盐发生反应, 合成对²¹¹At 苯甲酸(PAtBA), 经酰化反应, 得到混合酸酐。然后分别与 3H11Fab 或 3H11 偶联, 得到标记产品混合物。通过 Sephadex G75 凝胶色谱分离, 制得²¹¹At-McAb 药物。药物的放射化学纯度>99%, 放射性浓度为2.96-5.92MBq/ml, 其放射性比活度为2.96-5.92kBq/ μ g(McAb)。

1.2.2 标记抗体在荷瘤裸小鼠体内的分布 选荷瘤裸小鼠60只, 随机分为三组(实验分两次进行), 每只分别自尾静脉注射 100μ l $2.96 \times 10^5 - 3.7 \times 10^5$ Bq 的²¹¹At-3H11Fab、²¹¹At-3H11 或²¹¹At⁻。分别在3、7、14和24h 后(此时, 注射的药物中²¹¹At 分别衰变到注射量的75%、50%、25%和10%), 从裸小鼠眶后静脉丛取血50-80mg, 然后断颈椎处死。切取所需器官与组织(肝、骨、肾、心、肠、胃、肺和脾等)样品各100-150mg, 全部移植实体瘤及约20mg 连带3mm 左右气管的甲状腺。分别将样品置于测量管中, 在井型 NaI 晶体 γ 探测器(FT-603)和自动定标器(FH-463A)上测量放射性计数率。由于²¹¹At 半衰期短, 为了便于放射性衰变校正, 分别取上述三种注射液各 100μ l 作标准样, 置于相同的测量管中, 与上述生物样品同时测量。最后计算组织摄取率(每克组织摄取放射性占总注射量的百分比, %/g)和肿瘤组织(T)与正常组织(NT)摄取放射性之比(T/NT)。

2 结果和讨论

2.1 ²¹¹At-3H11 和3H11的高效液相色谱分析

利用疏水性色谱柱(TSK 5PW, 7.5mm \times 75mm)进行高效液相色谱分析, 结果示于图1。由图1可知, ²¹¹At-3H11在 HPLC 色谱图上只有一个紫外峰, 与原始 3H11 一致, 在滞留时间 $R_t = 13.40 \pm 0.05$ min 时出现。与紫外峰对应, 还出现了一个放射性色谱峰(见图1(b)); 而未经 Sephadex G75 分离的标记产品, 有多个与紫外峰对应的放射性色谱峰(图1(a)), 它们是²¹¹At⁻、PAtBA 以及²¹¹At-3H11 等的混合物。由此可见, 通过 Sephadex G75 色谱分离能有效地将²¹¹At-3H11药物与未标记上的²¹¹At 和标记过程产生的副产物 PAtBA 分离, 得到纯的导向药物²¹¹At-3H11, 其性质与原始 3H11 的性质一样, 保持了天然性和纯度。²¹¹At-3H11Fab 的

HPLC 分析也得到类似的结果(图未列出)。

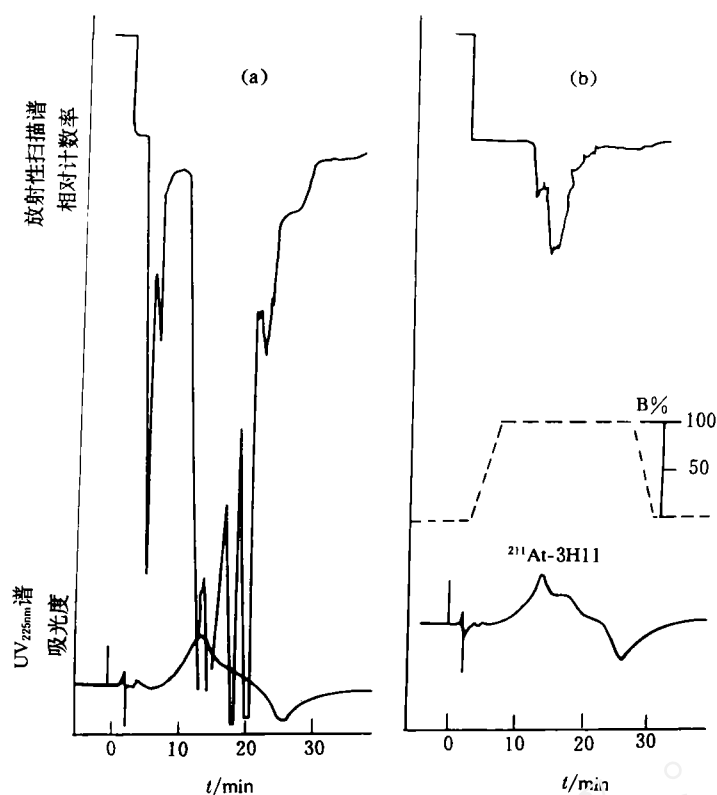


图1 Sephadex G75 分离前后的 ^{211}At 标记 3H11 的 HPLC 色谱图

(a)——分离前; (b)——分离后。

梯度程序:-----

色谱条件: pH = 7.0; 流速 1ml/min;

流动相 A 1.0mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.1mol/ml PBS,

流动相 B 0.1mol/l PBS。

2.2 ^{211}At 标记抗体与非标记抗体免疫活性的比较

酶标免疫测定法(ELISA)检测结果示于图2。图2表明,经 ^{211}At 标记的 3H11 和原始 3H11 与靶细胞 M85 的结合力无显著差异(t 检验, $P > 0.05$)。

2.3 ^{211}At -3H11Fab、 ^{211}At -3H11 或 $^{211}\text{At}^-$ 在荷人胃癌移植瘤中的摄取率变化及在裸小鼠体内的分布

由图3可见,注射 ^{211}At -3H11Fab 后, ^{211}At 能较快地富集于移植瘤,其摄取率(%/g)由3h 的 9.48 ± 0.65 到14h 的 8.42 ± 2.38 ,保持了较高的水平,24h 就较小了;注射 ^{211}At -3H11 后,在整个实验时间内,其摄取率(%/g)的变化不大,从3h 的 4.48 ± 1.65 到24h 的 4.00 ± 1.94 ;而注射 $^{211}\text{At}^-$ 后,在移植瘤中的摄取率(%/g)随注射时间不断减小,从3h 的 3.63 降到24h 的 0.67 。三种变化规律显然与单抗的导向性和亲合力有关。从动力学角度看, ^{211}At -3H11Fab 片段标记物优先集中到裸小鼠的人胃癌移植瘤。因此,它比 ^{211}At -3H11 全抗标记物具有更多更快的选择性

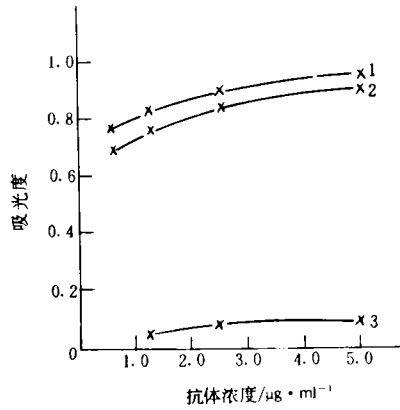


图2 McAb 3H11 标记前后免疫活性的变化
λ = 492nm。
1——3H11; 2——²¹¹At-3H11; 3——IgG。

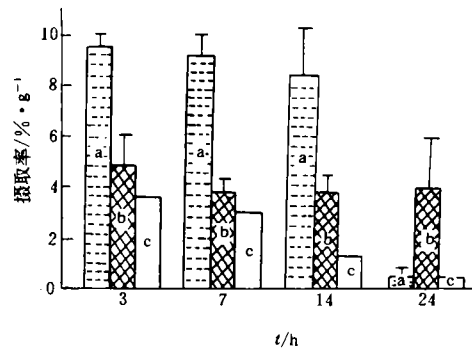


图3 注射²¹¹At-3H11、²¹¹At-3H11Fab 和²¹¹At⁻后移植瘤摄取率的变化
a——²¹¹At-3H11Fab; b——²¹¹At-3H11; c——²¹¹At⁻。

定位,在给药 14h 时仍发挥放射治疗作用。我们的前期实验^[9]表明,瘤细胞经 7.4×10^3 Bq/ml ²¹¹At 体外辐照 15h 左右,就失去生长能力。

注射²¹¹At-3H11Fab、²¹¹At-3H11 和²¹¹At⁻后,荷瘤(M85)裸鼠正常组织中的摄取率随时间变化的曲线示于图4。由图4看出,血液中²¹¹At 含量随时间的变化规律有显著差异。注射离子型²¹¹At⁻后,²¹¹At 迅速从血液中被清除,而注射²¹¹At-3H11Fab 或²¹¹At-3H11 后,开始阶段血液中²¹¹At 含量也以较快速度减少,但较前者缓慢。而且,当注射²¹¹At⁻达到平衡状态时,注射²¹¹At-3H11Fab 和²¹¹At-3H11 的小鼠,血液中²¹¹At 含量仍保持较高水平,分别约为注射²¹¹At⁻含量的4倍和3倍。Spiegelberg 等^[10]认为,IgG 经尾静脉注入小鼠体内后,开始很快从血液中清除,直到一个动态平衡(生物半排期 $T_{1/2} = 0.8h$),此时 IgG 的总量几乎均等地分布在血液中和血管外,此后,血液中 IgG 的减少主要取决于自身的代谢规律,以缓慢下降的趋势排减。鼠抗人胃癌单抗3H11 属 IgG 亚型。可以预料,如果²¹¹At 与3H11或3H11Fab 在体内稳定,则它们在血液中的摄取率随时间变化的规律可能与 IgG 的代谢规律相似。

在正常组织中,²¹¹At 摄取率随时间持续减小的规律是基本一致的,注射后12—14h 左右达到平衡状态。此时,按摄取率的大小可分为三组:最大的有胃、肺、脾,其次是心、肠、肾,最小的有肝、骨、血等。另外,在实验时间范围内,各组织中的摄取率基本是:²¹¹At-3H11Fab > ²¹¹At-3H11 > ²¹¹At⁻,这一结果与文献[11]报道的基本一致。Garg 等^[11]的研究表明,单抗片段和全抗在体内条件下的药物动力学和代谢作用是不同的。全抗3H11 分子量较大,在体内的动力学速度较慢,药物在组织浓集的时间较长,一般 > 24h,而 Fab 片段分子量较小,在体内动力学速度较快,可大大缩短²¹¹At 到达肿瘤组织时间,3—4h 即可达到最高浓集,与²¹¹At 半衰期 ($T_{1/2} = 7.2h$)相匹配。然而,由于 Fab 片段的代谢作用可能使²¹¹At 标记的单抗片段更易降解,转变成其它中间化合物,如脂溶性的 PAtBA 以及降解产生的²¹¹At⁻等,导致正常组织摄取率的普遍增高。总之,上述结果与单抗片段和标记方法有关,提高标记物稳定性,增加肿瘤组织摄取率,降低正常组织的摄取,尚需进一步研究。

离子型²¹¹At⁻与¹³¹I⁻相似,有亲甲状腺的性质,6h 左右出现高峰,摄取率高达300%/g 以

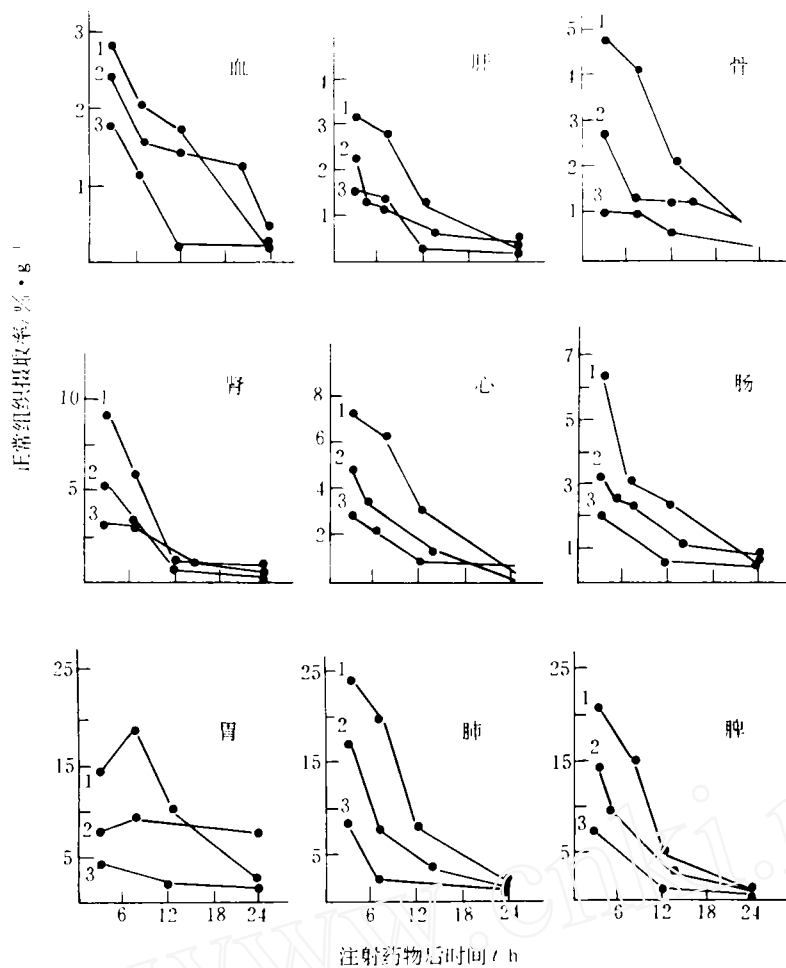


图4 荷瘤(M85)裸鼠正常组织摄取率的变化

1— ^{211}At -3H11Fab; 2— ^{211}At -3H11; 3— $^{211}\text{At}^-$ 。

上。因此， $^{211}\text{At}^-$ 从 ^{211}At 标记抗体脱落的结果必然导致 $^{211}\text{At}^-$ 在甲状腺组织中富集，然而，在整个实验时间内未观察到与之类似的现象，二者的甲状腺摄取率均保持在较低水平 $\sim 8\%/g$ 。临床应用时，往往用碘预饱和，以抑制 $^{211}\text{At}^-$ 在甲状腺中富集。

2.4 荷瘤裸鼠的 T/NT 值随时间的变化

^{211}At -3H11Fab 和 ^{211}At -3H11 的肿瘤组织 (T) 和正常组织 (NT) 摄取放射性之比值 (T/NT) 随时间的变化示于图5。由图5可见，在实验时间内 ^{211}At -3H11Fab 的 T/NT 值高于 ^{211}At -3H11。特别值得注意的是注射 ^{211}At -3H11Fab 后，12—14h 有最大的 T/NT 值。此时，瘤/血 = 5.30 ± 0.53 ，瘤/肝 = 4.74 ± 0.47 ，瘤/骨 = 3.36 ± 1.15 ，瘤/肠 = 3.10 ± 1.30 ，瘤/心 = 2.13 ± 0.96 ，瘤/肾 = 2.10 ± 0.66 ，瘤/脾 = 1.04 ± 0.53 ，瘤/胃 = 0.74 ± 0.52 ，瘤/肺 = 0.71 ± 0.27 ，而注射 ^{211}At -3H11 后，其各组织的 T/NT 值基本保持相对恒定，只是在24h左右才有升高的趋势。

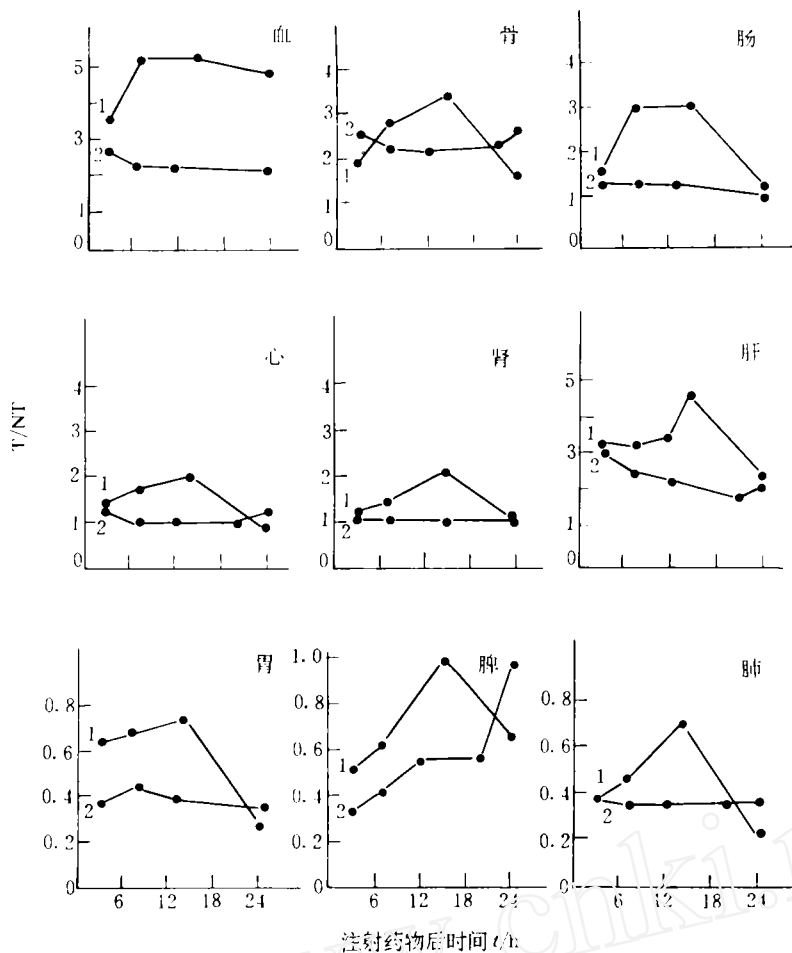


图5 荷瘤(M85)裸鼠 T/NT 值随时间变化
1—²¹¹At-3H11Fab; 2—²¹¹At-3H11。

根据 Bateman 等^[12]的理论计算,在人体内注射全身剂量为3Sv 的²¹¹At-McAb 导向药物,如果药物在肿瘤细胞上的选择性结合能力比正常组织高3倍,10⁴个肿瘤细胞经辐射杀伤后仅有1.9个肿瘤细胞存活,如果选择性结合能力高6倍,则10⁸个肿瘤细胞经辐射杀伤后,可能仅有3.5个肿瘤细胞存活。

3 结 论

注射²¹¹At-3H11Fab 或²¹¹At-3H11 后,药物在荷瘤裸小鼠体内的选择导向作用是明显的,作为放免治疗具有乐观的应用前景。然而,有效地降低正常组织中的摄取率,特别是提高肿瘤组织的摄取率,以增大 T/NT 值,将更有利于实际应用。文献[13]报道,同一种抗体对肿瘤抗原表达的异质性,说明胃癌细胞 M85 细胞系仅代表某一胃癌患者组织细胞的群体而非全部胃癌患者。因此,由某一胃癌患者制备的单抗只能与该患者胃癌细胞结合,或者采用多种单抗互补,有可能克服这一障碍,获得更理想的结果。

参 考 文 献

- 1 Zalutsky MR, Moseley RP, Benjamin, et al. Monoclonal Antibody and F(ab')₂ Fragment Delivery to Tumor Patients With Glioma. *Cancer Research*, 1990, 50: 4105.
- 2 Link EM, Brown I, Robert, et al. Uptake and Therapeutic Effectiveness of ¹²⁵I- and ²¹¹At-Methylene Blue for Pigmented Melanoma in an Animal Model System. *Cancer Research*, 1989, 49: 4332.
- 3 周懋伦, 金建南, 张叔渊, 等. ²¹¹At 制备及其质量控制. *四川大学学报*, 1986, (3): 84.
- 4 Brown I, Carpenter RN. α -Particle Endoradiotherapy: Experimental Studies With ²¹¹At- and Tumor-Affinic ²¹¹At-Biomolecules. *Radiochimica Acta*, 1989, 47: 143.
- 5 罗德元, 周懋伦, 罗 林, 等. ²¹¹At 标记胃癌单克隆抗体治疗裸小鼠皮下人胃癌移植瘤的病理组织学变化. *高技术通讯*, 1992, 2: 24.
- 6 张叔渊, 金建南, 刘 宁等. ²¹¹At-CEA-McAb 导向药物的稳定性及动物体内分布. *四川大学学报*, 1992, 29(4): 575.
- 7 Harrison A, Roylel. Preparation of a ²¹¹At-IgG Conjugate Which Is Stable in Vivo. *Int J Appl Radiat Isot*, 1984, 35(11): 1005.
- 8 刘 宁, 张叔渊, 金建南, 等. ²¹¹At 偶联抗 CEA 单克隆抗体的标记及初步动物实验. *核化学与放射化学*, 1992, 14(3): 159.
- 9 王喜忠, 周懋伦, 王子淑, 等. 离子型²¹¹At 对实验性艾氏腹水癌细胞的体外杀伤作用. *四川大学学报*, 1989, 26(2): 240.
- 10 Spiegelberg HL, Weigle WO. Catabolism of IgG and Its Biological Half-Life. *J Exp Med*, 1965, 121: 323.
- 11 Garg PK, Harrison GL, Zalutsky MR. Comparative Tissue Distribution in Mice of the α -Emitter ²¹¹At and ¹³¹I as Labels of a Monoclonal Antibody and F(ab')₂ Fragment. *Cancer Research*, 1990, 50: 3514.
- 12 Bateman WJ, Vaughan ATM, Brown G. Tumor Localization of ²¹¹At Labelled Monoclonal Antibody to a Sub-cutaneous Human Heterograft in the Nude Mouse I. *Int J Nucl Med Biol*, 1983, 10(4): 241.
- 13 张梅颖, 朱家瑞, 许小宝, 等. ¹³¹I 标记抗胃癌单克隆抗体 3G9 在荷瘤裸鼠体内定位的研究. *中华肿瘤杂志*, 1989, 11(2): 35.

TISSUE BIODISTRIBUTION IN NUDE MICE OF THE α -EMITTER ²¹¹At LABELING A MONOCLONAL ANTIBODY 3H11 AND ITS Fab FRAGMENT AGAINST GASTRIC CANCER

ZHANG SHUYUAN JIN JIANNAN LIU NING WANG JUAN

LUO LIN WANG FANCYUAN ZHOU MAOLUN

(Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu, 610064)

LUO DEYUAN

(Institute of Cancer Research, West China University of Medical Sciences, Chengdu, 610041)

WAN WENHUI DONG ZHIWEI

(Beijing Institute of Cancer Research, 100034)

ABSTRACT

The quality and immunoreactivity of ²¹¹At labelled 3H11 are measured by HPLC and ELISA assay, respectively. The biodistribution is performed in nude mice bearing subcutaneous heterograft of human gastric cancer cells following, i. v. injection of ²¹¹At-3H11, ²¹¹At-3H11Fab and Na ²¹¹At, respectively. It is demonstrated that the pharmacokinetics of the astatinated Fab fragment appear to be well suited to 7. 2h half-life of ²¹¹At, since tumor uptake remains high (~10%/g) from 3 to 14h after i. v. injection.

Key words ²¹¹At McAb Biodistribution Human gastric Cancer