

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 直接标记单克隆抗体的研究

I. 用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 Fab(3H11) 片段

桑立新 吴永慧 刘 斌 刘元方

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

张梅颖 林保和

(北京肿瘤医院核医学科, 北京 100034)

总结了一种简便、可靠的直接标记法, 并成功地运用此法对含巯基较少的 Fab 片段进行了标记, 得到了很好的标记率和体外稳定性以及较好的对荷瘤裸鼠的体内分布和显像结果。

关键词 直接标记法 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ Fab 片段 自由巯基

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 具有十分理想的核性质, 因而在核医学领域得到了充分的重视。它的不足之处在于半衰期较短(6.02h), 而 IgG 抗体分子量较大, 在短时间内难以到达肿瘤部位并得到较好的背景清除而显像^[1], 因而在一定程度上限制了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记单克隆抗体的实际应用和迅速发展。然而, 采用分子量较小的抗体片段可以在较短时间内到达并得到较好的背景清除^[2,3], 从而克服了上述缺点, 使 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记物临床应用成为可能。

具有快速、简便、标记率高等优点的直接标记法, 主要是利用抗体还原后自由巯基与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 的强位结合得到稳定。直接标记全抗^[4]及 Fab'^[5], F(ab')₂^[6] 片段均已取得了较好的结果, 而 Fab 片段由于与上述全抗或片段相比所含的—SH 数较少^[7-9], 使直接标记十分困难。为了成功地实现 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 对 Fab(3H11) 片段的标记并取得满意体外显像结果, 本文详细研究 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 直接标记 IgG 的各种实验条件, 以建立一种简便可靠的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 IgG 的方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

FT-603 井型闪烁探头和 FT-408 型自动定标器, 北京核仪器厂产品; 80-2 型离心沉淀器, 上海手术器械厂产品; 医用 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器, 中国原子能科学研究院产品; 人丙种球蛋白

收稿日期: 1994-12-22 收到修改稿日期: 1995-07-27

(IgG), 上海生物制品研究所产品; Sephadex G-50 凝胶为 Pharmacia 进口分装; Fab(3H11) 片段由北京市肿瘤研究所提供; MDP 药盒为上海医科大学红旗制药厂生产; 2-巯基乙醇(2-ME), 化学纯, 上海试剂四厂生产; L(+)-抗坏血酸(GR)为东北制药总厂一分厂生产。其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 IgG 标记条件 (1)IgG 分子中双硫键的还原: IgG 在 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液(PB)中, 用过量 2-巯基乙醇(2-ME)在室温下不断搅拌进行还原, 然后用 Sephadex G-50 微型凝胶离心过滤装置离心分离除去多余的 2-ME。(2)还原后抗体中—SH 的保护: 加入 0.05mol 左右的抗坏血酸(AA)进行保护。(3)中间螯合剂的加入: 将骨显像剂 MDP 药盒用 0.9% NaCl 溶液溶解, 并加入到上述还原抗体中。(4)IgG 的标记: 将由发生器淋洗下来的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 加入到上述抗体中, 室温下充分混合一定时间。

1.2.2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -IgG 的体外稳定性测试 在 pH 为 7.0 的 PB 缓冲液中, 向 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -IgG 中分别加入过量的不同摩尔比的 DTPA, 半胱氨酸和 N_2S_2 类双功能连接剂 EO^[10] (本实验室自己合成), 密封放置。分别在不同时间测量体系的标记率, 从而得出标记物在体外的稳定性。

1.2.3 Fab(3H11)片段的标记及核瘤裸鼠实验 Fab(3H11)片段按照标记 IgG 的最佳条件进行标记: 取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -IgG 标记物 200 μl , 腹腔注入一荷瘤(胃癌)裸鼠体内, 在不同时间进行体外显像, 并于 24h 后处死荷瘤鼠, 测量各器官的放射性计数。

2 结果和讨论

2.1 IgG 的还原时间对标记率的影响

初始浓度在 5mg/ml 以上的 IgG 抗体由过量的 2-ME 还原, 2-ME 与 IgG 摩尔比为 1000:1, 还原时间与标记率的关系如图 1 所示。由图 1 看出, 还原反应进行 20min 以后, 标记率可以达到 90% 以上。

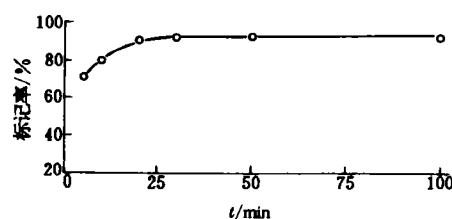


图 1 IgG 抗体还原时间对标记率的影响

2.2 标记反应时间对标记率的影响

室温下, IgG 抗体由过量 1000 倍以上的 2-ME 还原, 并加入抗坏血酸、MDP 药盒及 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 后, 标记反应时间与标记率的关系示于图 2。由图 2 可见, 在 15—20min 标记反应即完成。

2.3 IgG 浓度对标记率的影响

在相同标记条件下, 使用不同浓度的 IgG 所得到的标记率与 IgG 浓度关系示于图 3。由图 3 可见, 当体系中 IgG 最终浓度 $\rho_{\text{IgG}} < 2\text{mg/ml}$ (相应初始浓度 $\rho_{\text{IgG}}^0 = 5.0\text{mg/ml}$) 时, 标记率 $< 90\%$, 为了得到较高的标记率, 被标记抗体的初始浓度不应太低。体系中的 IgG 的浓度越高, 则标记率也越高。

2.4 2-ME 与 IgG 的摩尔比对标记率的影响

当 IgG 初始浓度在 5mg/ml 以上时, 2-ME 与 IgG 的摩尔比 R 与标记率的关系示于图 4。由图 4 可见, R 在 800 以上时, 标记率可达到 90% 以上, 但随该比值的增加, 标记率上升不明显。

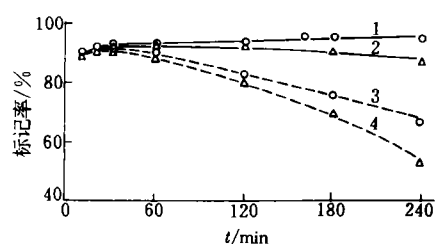


图2 标记反应时间对标记率的影响

$\rho_{\text{IgG}}^0/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$: 1, 2 — ~ 5 , 3, 4 — 2;
1, 3 — 还原后加入 AA, 2, 4 — 还原后不加 AA。

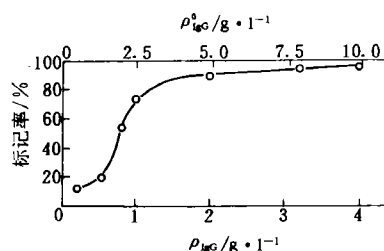


图3 IgG 浓度对标记率的影响

2.5 MDP 药盒的加入量对标记率的影响

大于 5mg/ml 抗体经过量的 2-ME 还原后, 加入抗坏血酸和由 $5\text{ml } 0.9\%$ NaCl 溶解的 MDP 药盒以及 $50\mu\text{l } ^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 进行标记, 药盒的加入体积对标记率的影响示于图 5。由图 5 可看出, 当药盒的加入体积在 $40\text{--}90\mu\text{l}$, 即加入的 Sn^{2+} 质量在 $4\text{--}6\mu\text{g}$ 时, 标记结果比较满意。

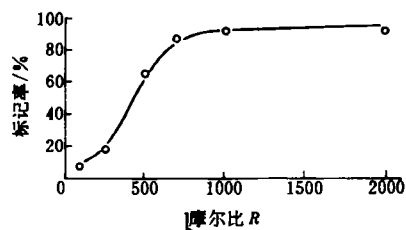


图4 2-ME 与 IgG 摩尔比对标记率的影响

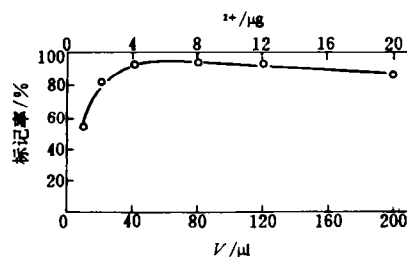


图5 MDP 药盒加入体积对标记率的影响

2.6 标记物体外稳定性

在不同的竞争试剂和竞争条件下, 标记物的稳定性示于图 6。由图 6 可见, 标记物在由 DTPA 等强螯合剂的竞争下, 即使在螯合剂大量过量的情况, 较长时间内对标记物的影响也不大, 说明标记物具有相当的稳定性。当由含 $-\text{SH}$ 的半胱氨酸竞争时, 标记脱落显著, 说明标记主要是通过 $-\text{SH}$ 来完成的设想是正确的。而当 N_2S_2 类竞争试剂 EC 进行竞争实验时, 在极小过量比的情况下, 标记率迅速下降, 说明产物中 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 与还原抗体的键合方式很可能是 N_2S_2 , N_3S 类, 而由于此时所采用的 N 为抗体中赖氨酸或组氨酸残基上的 N, 从空间位阻及配位环的大小来考虑, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -抗体通过 N_2S_2 , N_3S 式的键合不如经由 N_2S_2 类配体的键合稳定, 故当加入 N_2S_2 类竞争试剂时, 标记物迅速脱落。

综上所述, 标记物自身在 16h 内无明显自身分解现象, 亦无胶体产生, 说明标记是比较成功的。

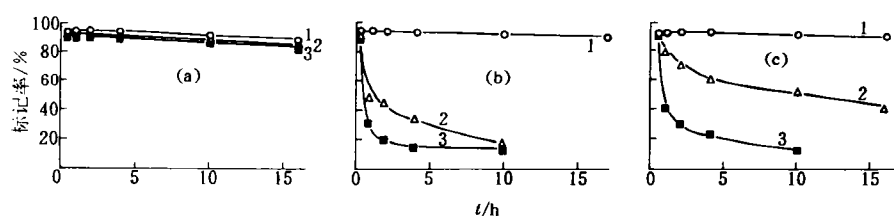


图 6 各种竞争条件下标记物的稳定性

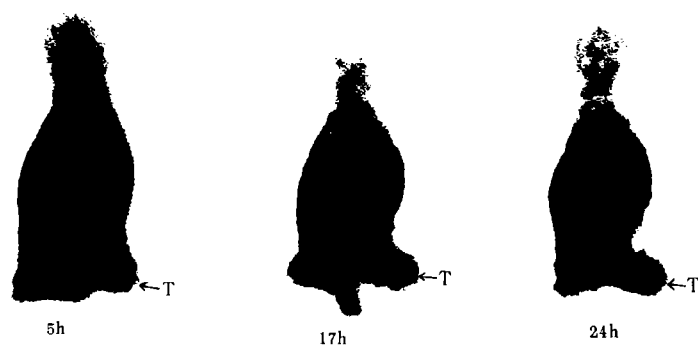
(a): 1——无 DTPA, 2——DTPA(100:1), 3——DTPA(500:1);
 (b): 1——无半胱氨酸, 2——半胱氨酸(50:1), 3——半胱氨酸(200:1);
 (c): 1——无 EC, 2——EC(10:1), 3——EC(50:1)。

2.7 Fab(3H11)的标记条件及结果

3.33mg/ml 的 Fab(3H11)片段由过量 1000 倍的 2-ME 还原 30min 后,离心分离除去多余的 2-ME,加入过量 800 倍的 AA 和 40 μ l MDP 药盒溶液,加入 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$,标记反应进行 30min,标记率可达 82%,放射性比活度为 0.89TBq/g,抗体活性保持良好。经 Sephadex G-50 凝胶微型离心柱分离纯化一次后,标记产物的放射化学纯度可达 90%。

2.8 Fab(3H11)- $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 在荷瘤裸鼠体内的分布及显像结果

取 200 μ l Fab(3H11)- $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 腹腔注射一荷瘤(胃癌)裸鼠体内,5h 后显像即可分辨肿瘤部位,17h 和 24h 的显像结果更加清晰,本底干净,放射性在骨上聚集不多,说明标记是比较成功的,且标记物在体内有一定的稳定性。在不同的时间对裸鼠的显像结果示于图 7。

图 7 Fab(3H11)- $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 在荷瘤裸鼠体内的显像结果

24h 后处死荷瘤裸鼠,测得每克肿瘤组织(T)与每克正常组织(N)摄取的放射性之比 $R_{\text{T/N}}$ 如下:血,2.07;肝,0.95;心,3.33;肾,0.05;骨,2.51;胃,1.07。虽然 Fab 含较少的一SH,但仍得到较高的标记率和清晰的显像结果。

3 结 论

按照本文研究的实验条件进行单克隆抗体及片段的直接标记,得到了理想的标记结果;标记过程中由于加入了抗氧化剂抗坏血酸,整个操作可以在室温、空气下进行; Sn^{2+} 是通过骨显像剂药盒与中间螯合剂一起加入体系的,避免了微量 Sn^{2+} 的配制和水解方面的困难,减少了胶体生成的可能性;中间螯合剂(骨显像剂)的加入造成了一个与蛋白质有竞争能力的结合还原态 $^{99}\text{Tc}^m$ 的竞争环境,使标记结合位为强结合位的几率增大,从而增加了标记物的稳定性;从标记物在裸鼠体内分布的 $R_{T/N}$ 值来看,标记物在肾中浓集严重,这是选用 $^{99}\text{Tc}^m$ 核素进行直接标记普遍存在的问题。

参 考 文 献

- 1 Burchiel SW. Tumor Imaging. New York: Masson Publishing, 1982. 125—139.
- 2 Wahl RL, Parker CW, Philpott GW. Improved Radioimaging and Tumor Localization With Monoclonal F(ab')_2 . J Nucl Med, 1983, 24(4): 316—325.
- 3 Siccardi AG, Buraggi GL, Callegaro I, et al. Multicenter Study of Immunoscintigraphy With Radiolabeled Monoclonal Antibodies in Patients with Melanoma. Cancer Res, 1986, 46(9): 4817—4822.
- 4 Garron JY, Moinereau M, Pasqualini R, et al. Direct $^{99}\text{Tc}^m$ Labeling of Monoclonal Antibodies: Radiolabeling and in Vitro Stability. Int J Nucl Med Biol, 1991, 18(7): 685.
- 5 Hansen HJ, Jones AL, Sharkey RM, et al. Preclinical Evaluation of an “Instant” $^{99}\text{Tc}^m$ -Labeling Kit for Antibody Imaging. Cancer Res, 1990, 5(3 suppl): 794s—798s.
- 6 Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, et al. Technetium-99m Labeling of Murine Monoclonal Antibody Fragments. J Nucl Med, 1986, 27(5): 685—693.
- 7 Paik CH, Phan LN, Hong JJ, et al. The Labeling of High Affinity Sites of Antibodies With $^{99}\text{Tc}^m$. Int J Nucl Med Biol, 1985, 12(1): 3—8.
- 8 Khaw BA, Strauss HW, Carralbo A, et al. Technetium-99m Labeling of Antibodies to Cardiac Myosin Fab and to Human Fibrinogen. J Nucl Med, 1982, 23(11): 1011—1019.
- 9 Eckelman WC, Paik CH, Steigman J. Three Approaches to Radiolabeling Antibodies With $^{99}\text{Tc}^m$. Int J Nucl Med Biol, 1989, 16(2): 171—176.
- 10 曲彤. 通过 EC 用 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记单克隆抗体的化学研究[博士学位论文]. 北京: 北京大学技术物理系, 1993.

STUDY ON A DIRECT METHOD FOR $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ LABELING OF MONOCLONAL ANTIBODY

I. DIRECT LABELING OF Fab (3H11) FRAGMENTS WITH $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$

Sang Lixin Wu Yonghui Liu Bin Liu Yuanfang

(*Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871*)

Zhang Meiyong Lin Baohe

(*Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034*)

ABSTRACT

A direct method for technetium labeling of monoclonal antibody based on Schwarz method with some amelioration for labeling both intact MoAb and its fragments is investigated. This method employs 1000 molar excess of 2-mercaptoethanol (2-ME); MoAb to reduce a large fraction of disulfide bonds to free sulfhydryl groups. The MoAb is incubated for 30 minutes at room temperature. After an excess of 2-ME has been separated from reduced MoAb by Sephadex G50 centrifugation columns, a 500—1000 molar excess of ascorbic acid (AA); MoAb is introduced to MoAb solution to protect the free -SH against oxidation. Then solutions of MDP and pertechnetate are added to the reduced antibody and left in place to react for 20 minutes at room temperature. The radiolabeling yields have been obtained to be greater than 90% for intact MoAb and 60%—82% for 3H11 Fab fragments. A high specific activity, 0.96MBq/g, has been achieved. The immunoreactivity is retained. Biodistribution of the Tc-labeled antibodies is measured in tumor bearing nude mice. T/N ratios slightly better than those reported previously have been obtained. The data show that this method is applicable to tumor localization.

Key words Direct labeling $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ Fab fragments Free sulfhydryl groups