

^{211}At 偶联 CEA 单克隆抗体的标记及初步动物实验*

刘 宁 张叔渊 金建南
许道权 王 娟 周懋伦

(四川大学原子核科学技术研究所, 成都, 610064)

以砷苯甲酸为中间体, 通过活化羧基反应, 制得了 ^{211}At 偶联癌胚抗原(CEA)单克隆抗体(McAb)。改进了文献报道的方法, 并采用 HPLC 对偶联物进行了分析和鉴定。方法全程标记率不低于 30%, 经凝胶色谱 Sephadex G₇₅ 柱分离得到的偶联物注射液比活度可达 $5.7 \times 10^4 \text{Bq}/\mu\text{g}$ McAb。通过测定 ^{211}At -CEA McAb 和 ^{211}At 在鼠血液和其它组织中的动态曲线, 还讨论了偶联物在动物体内代谢的稳定性。

关键词 ^{211}At , McAb, 间接标记法, HPLC。

一、引 言

核素 ^{211}At ($T_{1/2} = 7.21 \text{h}$), 纯 α 辐射体, α 粒子平均能量为 6.8 MeV。射线在软组织中的射程为 55—80 μm , 相当于 6—8 个细胞范围, 线性能量传输值为 $98.84 \text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, 与内辐射治疗效应最佳值($\sim 100 \text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) 十分接近, 对浓集部位的组织和细胞可产生极大的杀伤作用, 是一种在治疗癌症药物中很有希望的 α 核素^[1-5]。由于离子型 ^{211}At 对肿瘤组织没有特异性, 因此, 将 ^{211}At 与特异性的单克隆抗体(McAb)偶联, 制备成导向药物, 利用抗原抗体的特异免疫应答作用, 杀伤癌细胞, 以期达到降低毒副作用、治愈肿瘤的目的。制备体内代谢稳定、不脱砷并保持 McAb 生物免疫活性的 ^{211}At -McAb 偶联物是药物研究的首要课题。

若沿用碘标记蛋白质的直接氧化亲电方法进行砷化, 标记物在体内不稳定, 严重脱砷^[6-8]。为此, 近年来国外一些学者将 ^{211}At 先制成稳定的砷化苯环化合物, 然后与蛋白质偶联, 制得体内稳定的砷化蛋白质。Friedman, Vaughan 和 Harrison^[9-11] 以砷苯甲酸(PAtBA)为中间体, 制得体内稳定的 ^{211}At 标记牛血清蛋白(BSA)和免疫球蛋白 IgG, 标记率可达 30%^[11]。我们曾采用 SOCl_2 作酰化剂, 实现了 PAtBA 与蛋白质的偶联^[12], 但偶联反应时生成的酸性溶液, 可

* 国家自然科学基金项目

1991年5月29日收到, 1992年1月10日收到修改稿。

能对蛋白质活性产生影响。本文对 PAAtBA 为中间体的间接标记法进行了改进,制得了 ^{211}At -CEA-McAb 偶联物,并用 HPLC 对偶联物进行了分析和鉴定。采用经 Sephadex G₇₅ 凝胶色谱柱分离制备的 ^{211}At -CEA-McAb 注射液注入小鼠体内,进行动物实验并测定了注射 ^{211}At -cEA-McAb 和 $^{211}\text{At}^-$ 后,在小鼠(眼角)血液和甲状腺等组织中 ^{211}At 浓度随时间变化的规律,还评价了偶联物在体内代谢的稳定性。

二、实验部分

1. 材料

(1) ^{211}At 的制备 在四川大学国产 1.2m 回旋加速器上,用 27MeV 的 α 粒子照射铋靶,通过核反应 $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ 制备 ^{211}At ,在 720°C 下干法蒸馏、硅胶柱吸附、0.1mol/l NaOH 溶液洗脱,得到高比度无载体的 Na^{211}At 溶液^[13]。

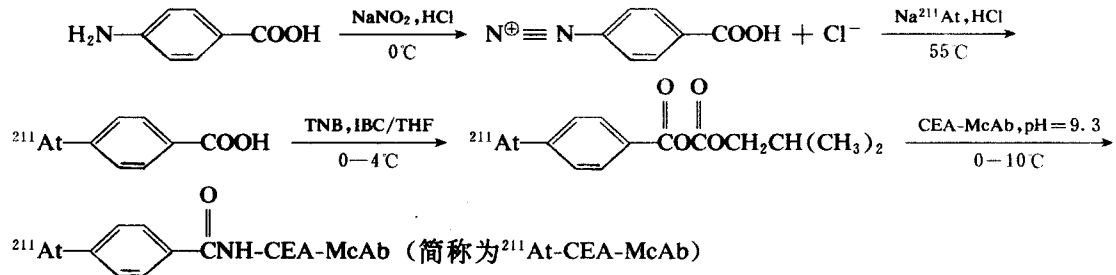
(2) 试剂与仪器 CEA-McAb 溶液,北京生物制品所生产;对氨基苯甲酸(PABA)、乙醚、四氢呋喃(THF)等为分析纯;氯甲酸异丁脂(IBC)、三正丁胺(TNB),化学纯,重蒸后使用;BSA,生化试剂。

凝胶 Sephadex G₇₅:瑞典产,煮沸 4h 后装柱,柱尺寸为 $\phi 12\text{mm} \times 150\text{mm}$ 。HPLC:美国贝克曼公司 334 系列,配 170 型放射性探测器,疏水性(Hydrophobic Interaction)色谱柱为 Sepherogel TSK pheyl 5pw ($\phi_{\text{内}} 7.5\text{mm} \times 75\text{min}$)。FJ-603 井型探头、FH-403 自动定标器,国营 262 厂产。7530 型可见-紫外分光光度计,上海分析仪器厂生产。

(3) 实验动物 NIH 系雄性小鼠,年龄约 45d,体重约 20g,成都生物制品所产。

2. 实验方法

^{211}At 偶联 CEA 单克隆抗体的合成路线如下:



(1) PABA 重氮盐的制备 将 1ml 含 50 μmol PABA 的 4mol/l HCl 溶液保持在 $-5-0^\circ\text{C}$ 冰浴中,在不断搅拌下滴加含 60 μmol 新鲜配制的 NaNO_2 溶液 1ml,反应 10min 后加少许尿素,除去过量 HNO_2 。

(2) PAAtBA 的制备 取上述重氮盐 1 μl (含 25nmol 的 0.1ml 2mol/l HCl 溶液),加入 $(1.85-3.7) \times 10^7 \text{Bq}$ Na^{211}At ,反应 30min 后,在 55°C 水浴中加热 7min 除去氮气,然后在冰水浴中冷却 3min。用 0.5ml 乙醚萃取二次,PAAtBA 和副产物对羟基甲酸(POHBA)均萃取到有机相,合并萃取相,在 $38-40^\circ\text{C}$ 水浴上蒸干,除去乙醚。

(3) 混合酸酐的制备 将上述除去乙醚的 PAAtBA 在 4°C 下冷却,加入 5 μl THF 溶解,然后依次分别加入并溶于 50 μl THF 的 TNB(50nmol) 和 IBC(150nmol),搅拌反应 25min,制得混合酸酐。

(4) PAAtBA 和 CEA-McAb 的偶联 向上述混合酸酐中,加入含 250-500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 的

0.05mol/l 硼酸缓冲溶液 (pH=9.3) 的 CEA-McAb, 约 1h, 温和振荡 5min 后, 继续在 0—10℃ 时反应约 1h, 制得 ^{211}At -CEA-McAb 偶联物。

(5) **偶联物的分离及标记率和比活度的测定** 将反应混合物加入到已预先用约 5mg BSA 的 PBS 溶液饱和过的 Sephadex G₇₅ 柱上, 用 0.1mol/l PBS (pH=7.0) 洗脱, 分离得到的 ^{211}At -CEA-McAb 的洗脱液, 按每份 1ml 收集, 测定放射性计数后, 用双波长 (A_{215} - A_{225}) 紫外吸收法测量蛋白质含量, 确定偶联物的洗脱峰位置和偶联物注射液的比活度, 画出洗脱曲线。根据所得偶联物注射液的放射性与分离前反应混合物的总放射性之比计算标记率。

(6) **^{211}At -CEA-McAb 的 HPLC 分析和鉴定**^[14] 采用疏水性 HPLC 色谱柱和梯度洗脱分析偶联物。色谱条件为: 流动相 A, 1mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 溶于 0.1mol/l 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0); 流动相 B, 0.1mol/l 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0)。梯度洗脱程序见色谱图, 流速 1ml/min, UV 波长 225nm。

将未经分离的偶联混合物及经凝胶色谱分离的各淋洗组份 5—20 μl 进行 HPLC 分离, 对流出组份同时进行紫外 (UV) 和放射性检测, 在双臂记录仪上画出各自的色谱图。

(7) **^{211}At -CEA-McAb 偶联物的动物实验** 取由 Sephadex G₇₅ 分离得到的 ^{211}At -CEA-McAb 注射液。实验组每只小鼠经尾静脉注射约 $(2.22—2.96) \times 10^5 \text{Bq}$ 的 ^{211}At -CEA-McAb, 对照组注射等量的 Na^{211}At 溶液, 然后按预定的时间经眼角眶静脉取血后处死动物, 解剖, 取各主要器官, 称重和测量放射性。通过比较二组小鼠血液和甲状腺等组织中测量的 ^{211}At 浓度的动态曲线, 以评价 ^{211}At -CEA-McAb 在体内代谢的稳定性。

三、结果与讨论

1. 偶联物的分离、分析和鉴定

用 Sephadex G₇₅ 色谱柱分离纯化 ^{211}At -CEA-McAb 偶联物, 结果如图 1 所示。洗脱组份的第一个峰为偶联物峰, 此峰约在第 10ml 0.1mol/l PBS 洗脱液前后出现。并与第二个峰 (杂质峰) 有较好的分离。

偶联产物的 HPLC 分析结果与其在 Sephadex G₇₅ 柱分离的洗脱结果相似 (图 2—3), 但 HPLC 对杂质峰的分离更为完全。经凝胶色谱分离的偶联混合物的洗脱组分分析结果与预期相同 (图 3—4), 即第一个峰洗脱液在 HPLC 出现单一的紫外峰 (CEA-McAb) 和放射性峰 (^{211}At -CEA-McAb), 显示凝胶 Sephadex G₇₅ 色谱的分离是完全的, 得到的 ^{211}At -CEA-McAb 洗脱液可直接进行动物实验。

结果表明, 本实验 HPLC 对偶联物进行分析和鉴定, 能快速得到结果, 可望应用在制备色谱上, 成为 ^{211}At -CEA-McAb 的分离纯化手段。

2. 重氮盐用量对 ^{211}At 偶联 CEA-McAb 碘化率的影响

根据反应机理, 过量重氮盐与 Na^{211}At 反应生成 PAtBA 的同时, 将产生大量副产物 POHBA , 偶联时与 PAtBA 竞争, 消耗蛋白质用量, 导致标记率降低。Friedman 和 Vaughan 等^[9—10] 所用重氮盐摩尔数 ($46\mu\text{mol}$, 10^{-5}mol) 远高于 ^{211}At 和蛋白质的摩尔数 (10^{-9}mol), 反应中生成大量的 POHBA 没有进行分离, 标记率很低 ($<10\%$)。Harrison^[11] 在降低重氮盐用量的同时, 采用离子对反相 HPLC 将 PAtBA 从杂质 POHBA 等中分离出来, 显著地提高了标记率 (达 30%)。本文研究了不同重氮盐用量对 ^{211}At -CEA-McAb 全程标记率的影响 (表 1)。结果表明,

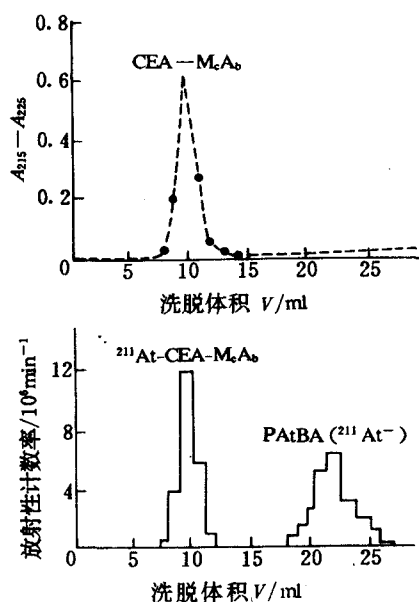


图1 ^{211}At 偶联 CEA-McAb 产物的 Sephadex G_{75} 洗脱曲线

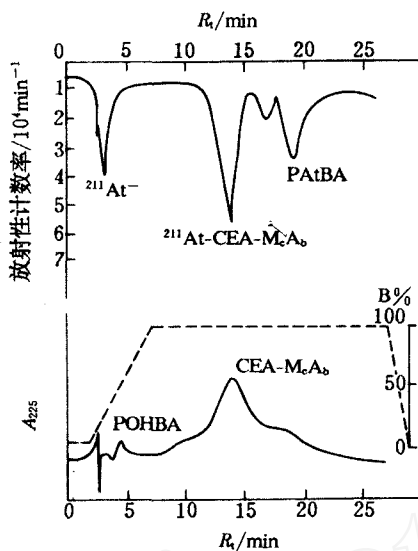


图2 ^{211}At 偶联 CEA-McAb 产物的 HPLC 色谱图
--- 为梯度程序; X_B 为流动相 B%; UV 波长为 225nm.

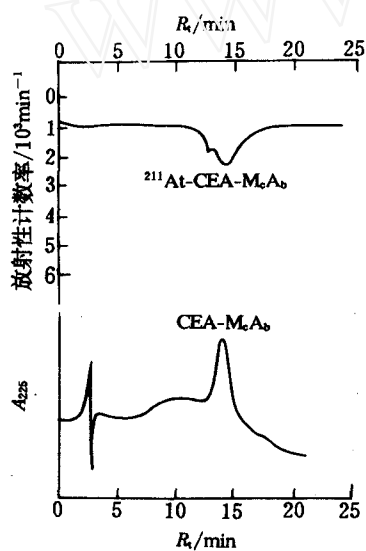


图3 Sephadex G_{75} 分离后第一个峰的 HPLC 色谱图
UV 波长为 225nm.

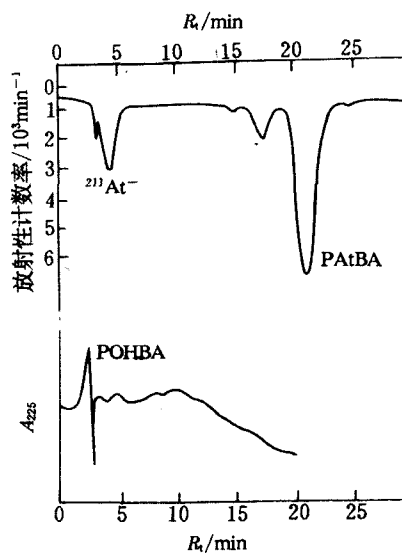


图4 Sephadex G_{75} 分离后第二个峰的 HPLC 色谱图
UV 波长为 225nm.

降低重氮盐用量,可提高标记率。当重氮盐用量($\sim 10^{-8}$ mol)与(CEA-McAb(0.25mg , $\sim 10^{-9}$ mol)二者摩尔数相当时,产率可达 30%。由于本法重氮盐用量小,因而产生的 POHBA 量不多。

不用 HPLC 预分离纯化 PAtBA 也能得到与 Harrison 方法相近的标记率。

表 1 重氮盐用量对²¹¹At 偶联 CEA-McAb 的影响

重氮盐用量		CEA-McAb 量		全程 标记率/%
nmol	mol	μg	mol	
5×10 ⁴	~10 ⁻⁴	250	~10 ⁻⁹	3
5×10 ³	~10 ⁻⁵	250	~10 ⁻⁹	7
5×10 ²	~10 ⁻⁶	250	~10 ⁻⁹	15
5×10	~10 ⁻⁷	250	~10 ⁻⁹	28
2×10	~10 ⁻⁸	250	~10 ⁻⁹	30

3. 酰化反应

中间体 PAtBA 与蛋白质偶联前需要与酰化剂反应生成混合酸酐,活化羧基。用 IBC 做酰化剂,反应需在无水条件下进行,文献报道在乙醚相蒸干后采用减压蒸馏除去可能残存的水分^[10,11]。本实验表明,只要小心操作,萃取分离醚相时不带入水分,并适当降低 TNB 和 IBC 用量,这样可省略减压蒸馏操作,对在本实验条件下制备的²¹¹At-CEA-McAb 偶联物的标记率结果无明显影响。

4. 标记率与比活度

由 Sephadex G₇₅ 色谱分离制得的偶联物与上柱前反应混合物的放射性之比,测得²¹¹At-CEA-McAb 偶联物的标记率为 50%,全程标记率约为 30%。由蛋白质含量测定的结果表明,加入 (1.85—3.70)×10⁷Bq Na²¹¹At 和 250—500μg CEA-McAb 条件下,制备的偶联物注射液的比活度为 (0.93—3.70)×10⁴Bq/μg McAb。

5. ²¹¹At-CEA-McAb 偶联物在体内的分布及代谢稳定性

注射²¹¹At-CEA-McAb 后,在小鼠体内分布实验结果表明,各脏器的组织摄取率随时间变化,开始很快达到最大摄取率,然后逐渐衰减,2—3h 后趋于平衡(图 5),其分布规律与我们以前²¹¹At 标记 IgG 研究工作中,²¹¹At-IgG 在体内分布的结果相似^[12]。

研究表明^[15],IgG 经尾静脉注入体内后其在血液中的分布有比较特征的规律:开始很快从血液中清除,随即达到动态平衡(生物半排出期 $T_{1/2} = 0.8\text{h}$),此时,IgG 的总含量几乎均等地分布在血液中和血管外。此后,血液中的 IgG 含量主要按自身的代谢规律以缓慢下降的趋势排减(生物半排出期 $T_{1/2} = 24\text{h}$),基本上保持恒定。本实验所用 CEA-McAb 属免疫球蛋白 IgG 的亚型。可以预料,如果制备的²¹¹At-CEA-McAb 在体内稳定,则它在血液中的摄取率 $D\%/g$ 随时间变化的规律可能与 IgG 的代谢规律相似,²¹¹At 以²¹¹At-CEA-McAb 形式分布应比以²¹¹At⁻形式分布在血液中的衰减要慢得多。

图 6 为²¹¹At-CEA-McAb 和 Na²¹¹At 在小鼠血中的摄取率动态变化曲线。可见,²¹¹At-CEA-

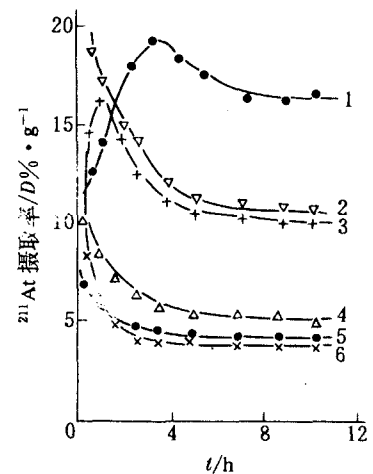


图 5 ²¹¹At-CEA-McAb 在小鼠脏器中的分布
1——胃;2——肺;3——脾
4——肾;5——心;6——肝。

McAb 和 $^{211}\text{At}^-$ 注入体内后都很快地从血液中清除,但前者在注入体内 6h 左右随即达到一个动态平衡,此后,血液中 ^{211}At 的衰减速率变得更为缓慢。而 $^{211}\text{At}^-$ 注入体内后在血液中的衰减一直较快。且注入剂量在 24h 的摄取率 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ ($\sim 3.0\%$) 显著高于 Na^{211}At ($\sim 0.3\%$)。如果 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 在血液中严重脱靶,则其摄取率随时间很快地下降,最后与 Na^{211}At 动态曲线趋于一致。显然, $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 在鼠血中动态变化规律与上述 IgG 在血中的含量变化规律较为相似。这表明 ^{211}At 在血液中是以 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 的形式存在的, ^{211}At 与 CEA-McAb 连接的键在体内是稳定的。

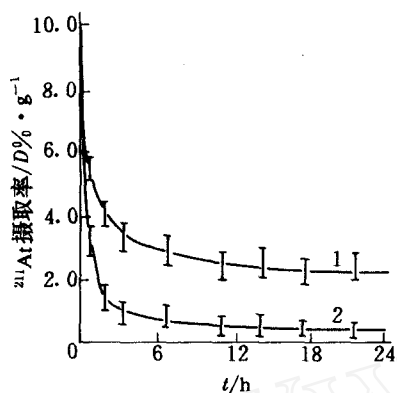


图 6 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 和 $^{211}\text{At}^-$ 在小鼠血中的动态变化曲线
1—— $^{211}\text{At-CEA-McAb}$; 2—— Na^{211}At 。

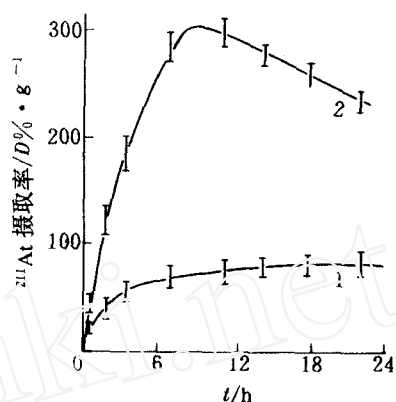


图 7 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 和 $^{211}\text{At}^-$ 在小鼠甲状腺的动态变化曲线
1—— $^{211}\text{At-CEA-McAb}$; 2—— Na^{211}At 。

游离 $^{211}\text{At}^-$ 与 I^- 一样,对甲状腺组织有明显浓集^[16]。如果 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 在体内脱靶,则脱落的 ^{211}At 将象 $^{211}\text{At}^-$ 一样浓集到甲状腺。图 7 为注射 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 和 Na^{211}At 后,小鼠甲状腺对 ^{211}At 的吸收。注射 $^{211}\text{At}^-$ 后组织吸收增长很快,约 6h 达到最高峰。而注射偶联物后吸收增长缓慢,2—3h 后趋于平衡,整个实验过程未出现峰值,且甲状腺的摄取率, $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 比 $^{211}\text{At}^-$ 低得多,没有发现 ^{211}At 在甲状腺浓集的现象。

从上述 ^{211}At 在血液和甲状腺中的特殊分布规律及实验结果表明,本法制备的 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 在体内是稳定的,无明显的脱靶现象。

四、小 结

1. 改进了文献报道的方法,制得了 $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 偶联物,方法全程标记率约为 30%,偶联物注射液比活度可达 $3.7 \times 10^4 \text{Bq}/\mu\text{g McAb}$ 。
2. HPLC 对偶联物的分析和鉴定既快速,又可靠。
3. $^{211}\text{At-CEA-McAb}$ 在体内代谢是稳定的,没有明显的脱靶现象。

参 考 文 献

- [1]Hofer K G. Bull Cancer(Paris), 1980,67:343.
 [2]Brown I. Int J Appl Radiat Isot,1986,37:789.
 [3]王喜忠,等. 大自然,1988,7:79.
 [4]Meyer G J, et al. Labelled Compd Radiopharm,1976,12:449.
 [5]Smit J A, et al. CLin Exp Immunol,1973,14:107.
 [6]Aaij C, et al. J Appl Radiat Isot, 1975,26:25.
 [7]Visser G W M, et al. Int J Appl Radiat Isot,1981,32:913.
 [8]Vaughan A T M, et al. Int J Nucl Biol,1978,5:229.
 [9]Friedman A M, et al. Int J Appl Med Biol,1977,4:219.
 [10]Vaughan A T, M, et al. Int J Appl Radiat Isot,1979,30:576.
 [11]Harrison A, et al. Int J Appl Radiat Isot,1984,35:1005.
 [12]弋昌厚,金建南,张叔渊,等. 同位素,1988,1:15.
 [13]周懋伦,等. 四川大学学报(自然科学版),1986,3:8.
 [14]张叔渊,等.²¹¹At 标记 CEA-McAb 的 HPLC 分析鉴定和分离纯化研究,四川省放射化学与化工及同位素学术讨论会文集,成都,1989年,11月.
 [15]Spiegelberg H L, et al. J Exp Med,1965,121:323.
 [16]Brown I, et al. Int J Appl Radiat Isot,1984.35:843.

LABELLING CEA-McAb WITH ²¹¹At AND ITS
 PRELIMINARY ANIMAL EXPERIMENT

LIU NING ZHANG SHUYUAN JIN JIANNAN
 XU DAOQUAN WANG JUAN ZHOU MAOLUN

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

ABSTRACT

The synthesis of ²¹¹At labelled CEA monoclonal antibody is performed by an activating reaction of carboxy via para-astato-benzoic interaction. The ²¹¹At-CEA-McAb conjugate is separated by a sephadex G₇₅ column and then analysed and identified by hydrophobic interaction HPLC. It contains at least 30% of initial activity of ²¹¹At with the specific radioactivity, up to 3.7×10^4 Bq/ μ g McAb. The stability in vivo of the conjugate is discussed by determining dynamic curve in mouse blood and other tissues.

Key words ²¹¹At, McAb, Indirect Labelling, HPLC.