

亲和素放大促排在抗CEA单抗第二步法定位放免显像中的实验研究

预定位技术在肿瘤放免显像和治疗中的应用,为解决抗体在瘤内缓慢的低摄取和从血液及其它正常组织中的慢清除等问题提供了新的方法。目前应用生物素化单抗和放射性标记链霉亲和素(SA)的第二步法定位放免显像,在动物实验和临床研究中已取得一定的成果[1]。但是血循环中游离的生物素化单抗和内源性生物素可干扰随后注入的标记SA与肿瘤的结合[1][2]。亲和素(Av)能在肝内迅速聚集,注射Av可将血循环中的生物素化抗体迅速清除掉[1]。为了增加标记物在肿瘤内的摄取和血液中的清除,本实验在荷人结肠癌裸鼠模型中成功实现预定位第二步法的基础上,在生物素化抗CEA单抗(mAb-Bt)预定位后,先注射Av来追踪循环中的生物素化单抗和内源性生物素并与其结合而将其清除,然后再注射 ^{153}Sm -SA靶向肿瘤作显像剂,观察Av放大促排(chase)对 ^{153}Sm -SA体内分布及瘤内浓聚的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

生物素活化酯(BNSH)、DTPA-生物胞素(DB2)和Av均为Sigma公司产品;链霉亲和素(Streptavidin, SA)由上海市静安区医学化验所提供; $^{153}\text{SmCl}_3$ 由中国原子能科学研究院提供。CEA mAb由上海市免疫学研究所制备。

1.2 抗CEA单抗的生物素化

BNSH/DMSO溶液(20 mg/ml)滴加至mAb(1mg/ml)的碳酸氢盐缓冲液(CBS)中,使生物素与单抗物质的量之比为15~50;室温放置2 h,微量离心柱法纯化。间接酶联免疫吸附法(ELISA)鉴定生物素活性,SDS-PAGE测定生物素化单抗纯度。

1.3 ^{153}Sm 标记DB₂及SA

按文献[3]所述的标记方法操作。

1.4 ^{153}Sm 直接标记CEA mAb

取纯化的CEA mAb-DTPA偶联物溶液0.1 ml,加入约40 MBq的 $^{153}\text{SmCl}_3$ (比活度为22.2 GBq/ml),室温反应20 min,即得 ^{153}Sm -DTPA-CEA mAb偶联物。用纸层析法测标记率和放化纯度,以30%硝酸胺处理过的新华I号滤纸作为支持物,展开剂为:磷酸三丁酯/丁酮/乙酸乙酯(4:10:3)。间接ELISA法鉴定标记物的免疫活性。

1.5 荷人结肠癌裸鼠模型

荷人结肠癌裸鼠由中科院上海药物所裸鼠动物房提供。癌组织块接种于4周龄裸鼠前肢皮下,待肿瘤长至 $0.5\sim 1\text{ cm}^3$ 时,用于体内分布和显像研究。

1.6 荷人结肠癌裸鼠模型的体内分布和定位显像

荷瘤裸鼠分3组,每组6只:(1)亲和素放大促排实验组:尾静脉注射100 μg mAb-Bt,48 h后腹腔注射Av 80 μg ,0.5 h再腹腔注射 ^{153}Sm -SA 3.7 MBq/15 μg ;(2)第二步法组:尾静脉注射100 μg mAb-Bt,48 h后腹腔注射 ^{153}Sm -SA 3.7 MBq/15 μg ;(3)直接标记法组:在开始实验后48 h腹腔注射 ^{153}Sm -CEA mAb 3.7 MBq/20 μg 。上述3组裸鼠在注射放射性标记物后4 h和24 h进行SPECT(Siemens ZLC3700)显像,显像后每一时相分别处死裸鼠,分离肿瘤及各脏器,计算靶/非靶(T/NT)放射性活度比值。

1.7 统计学分析

各组间T/NT比值比较采用方差分析的Student-Newman-Keuls法检验。

2 结果

2.1 标记物鉴定

^{153}Sm -CEA mAb的免疫活性为50%左右；SDS-PAGE示生物素化单抗仍呈现与未生物素化单抗相同的单一蛋白条带。 ^{153}Sm -CEA mAb、 ^{153}Sm -DB₂及 ^{153}Sm -SA标记率分别为56%、大于80%和大于95%。

2.2 裸鼠显像

亲和素放大促排实验组在注射 ^{153}Sm -SA后的4 h即见肿瘤部位有放射性浓聚，24 h显像清楚(图1)。各/时相肝、脾、肾等部位均显像。而二步法组和直接标记法组4 h肿瘤部位未见明显放射性浓聚。

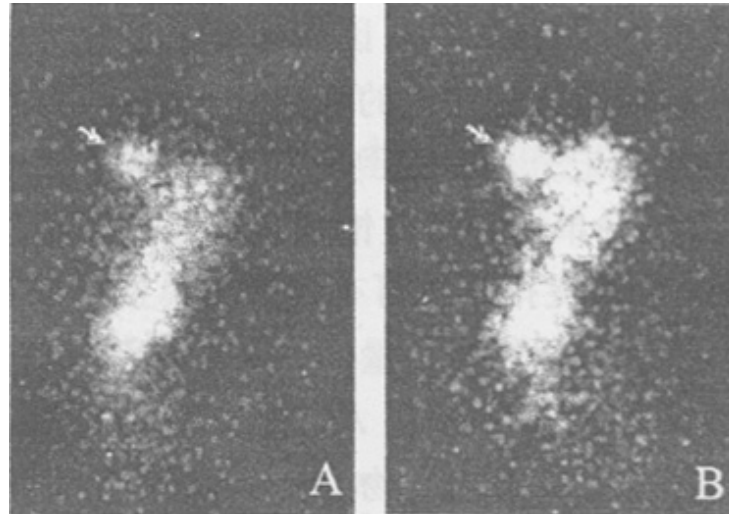


图1 荷人结肠癌裸鼠亲和素追击的二步法预定位RII 注射放射性标记物后4 h (A)和24 h (B)肿瘤处见放射性浓聚(箭头示)

Fig.1 Two-step pretargeting radioimmunoimaging of a mouse bearing human colon cancer

Images were obtained at 4 h (A) and 24 h (B) after radiolabel injection (indicated by arrow-head)

2.3 生物学分布测定

亲和素放大促排实验组瘤/血比值在注药后4 h和24 h分别为 1.549 ± 0.058 和 4.623 ± 1.076 ，而二步法组和直接标记法组则分别为 1.004 ± 0.221 和 2.028 ± 0.367 及 0.260 ± 0.084 和 0.847 ± 0.368 。各组间比较均有显著性差异($P < 0.05$) (表1)。

表 1 各组荷瘤裸鼠体内生物分布的 T/NT 比值 ($\bar{x}\pm s$)tab.1 Tumor to normal tissue ratios of biodistribution in various groups of nude mice bearing human colon cancer xenografts ($Mean\pm SD$)

Organs	Tumor to normal tissue ratio					
	Avidin chase		Two-step pretargeting		¹⁵³ Sm-CEA McAb	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Liver	0.542±0.098	1.169±0.089	0.444±0.082	1.055±0.154	0.274±0.115	0.650±0.112
Spleen	0.737±0.075	1.552±0.017	0.596±0.098	1.158±0.073	0.296±0.118	1.006±0.234
Kidney	0.428±0.070	0.603±0.090	0.402±0.078	0.465±0.083	0.173±0.068	0.413±0.087
Bone	4.186±0.891	9.346±1.323	2.185±0.599	6.479±1.305	0.564±0.106	1.624±0.269
Lung	4.580±0.237	11.295±2.480	2.715±0.596	5.783±0.823	1.057±0.158	2.312±0.572
Muscle	5.284±0.442	12.717±1.333	3.865±1.133	8.146±0.998	1.057±0.155	3.282±0.400
Heart	5.805±0.575	17.116±1.733	5.037±1.257	11.686±2.298	1.441±0.255	3.212±0.481
Blood	1.549±0.058*	4.623±1.076**	1.004±0.221*	2.028±0.367**	0.260±0.084	0.847±0.368

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the ratios at 4 h, 24 h after ¹⁵³Sm-SA injection in the other 2 groups respectively

3 讨论

Av具有加快生物素化单抗从血中清除并向肝脾聚集的作用,即促排作用[4]。Kobayashi等[4][5]对肿瘤放免显像(RII)时利用注射的Av作为追击物(chaser),达到核素标记生物素化单抗的促排目的。Kobayashi将其称为亲和素放大促排系统,并进行了广泛深入的研究,获得了较理想的抗体生物学分布结果。本研究在进行皮下荷人结肠癌裸鼠模型预定位RII时将亲和素放大促排系统引入二步法中,发挥其追踪促排作用,即先静脉注射生物素化抗CEA单抗以定位于肿瘤处,48 h后经腹腔注射Av以追踪血液中游离的生物素化单抗并促进血中生物素化单抗的清除,30 min后给予¹⁵³Sm-SA。结果表明¹⁵³Sm-SA可特异性定位于已预定位至肿瘤的生物素化单抗上。Av注射可降低血中生物素化单抗的水平,且不影响标记SA在瘤内的聚集,Av放大促排所得T/NT比值约为二步法的2倍多。因此,Av放大促排的引入可使血中放射性水平降低,T/NT比值增加。

在二步法预定位中,常需等待相当长一段时间以使血中单抗浓度得以降低,因为即使少量单抗滞留在血中仍可迅速与随后注入的标记分子结合。因此为了确保游离的标记分子渗透到肿瘤内并经肾脏过滤和排泄,循环中的单抗必须被饱和或清除掉。通过引入四价的Av放大促排系统可有效降低单抗血浓度。为最大限度地提高靶位信息量同时又加快清除血本底,应对不同的注射途径所用Av剂量、Av放大促排系统每抗体分子上结合的生物素分子数目、生物素化抗体的使用剂量及预定位的时间等进行优化[4][6]。此外,本实验中Av放大促排对二步法T/NT比值的提高作用较文献报道低,可能与生物素化单抗的生物素化水平较低有关,因为Av的促排作用取决于单抗的生物素化程度[6][7]。

参考文献:

[1] Saga T, Weinstein JN, Jeong JM, et al. Two-step targeting of experimental lung metastases with biotinylated antibody and radiolabeled streptavidin[J]. Cancer Res, 1994, 54:2160-5.

[2] Rusckowski M, Fogarasi M, Fritz B, et al. Effect of endogenous biotin on the applications of streptavidin and biotin in mice[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24: 263-8.

李贵平,朱承谟,江旭峰,等.亲和素-生物素系统的标记及其生物学分布动力学研究[J].核技术,1999,22(11):686-9.

[4] Kobayashi H, Sakahara H, Hosono M, et al. Improved clearance of radiolabeled biotinylated monoclonal antibody following the infusion of avidin as a "chase" without

decreased accumulation in the target tumor[J]. J Nucl Med, 1994, 35:1677-84.

[5] Kobayashi H, Sakahara H, Endo K, et al. Repeating the avidin "chase" markedly improved the biodistribution of radiolabeled biotinylated antibodies and promoted the excretion of additional background radioactivity[J]. Eur J Cancer, 1995, 31:1689-96.

[6] Paganelli G, Pervez S, Siccardi A, et al. Intraperitoneal radiolocalization of tumors pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies[J]. Int J Cancer, 1990, 45:1184-9.

[7] Sinitsyn VV, Mamontova AG, Checkneva YY, et al. Rapid blood clearance of biotinylated IgG after infusion of avidin[J]. J Nucl Med, 1989, 30: 66-9.

参考文献:

[1] Saga T, Weinstein JN, Jeong JM, et al. Two-step targeting of experimental lung metastases with biotinylated antibody and radiolabeled streptavidin[J]. Cancer Res, 1994, 54:2160-5.

[2] Rusckowski M, Fogarasi M, Fritz B, et al. Effect of endogenous biotin on the applications of streptavidin and biotin in mice[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24: 263-8.

李贵平, 朱承谟, 江旭峰, 等. 亲和素-生物素系统的标记及其生物学分布动力学研究[J]. 核技术, 1999, 22(11): 686-9.

[4] Kobayashi H, Sakahara H, Hosono M, et al. Improved clearance of radiolabeled biotinylated monoclonal antibody following the infusion of avidin as a "chase" without decreased accumulation in the target tumor[J]. J Nucl Med, 1994, 35:1677-84.

[5] Kobayashi H, Sakahara H, Endo K, et al. Repeating the avidin "chase" markedly improved the biodistribution of radiolabeled biotinylated antibodies and promoted the excretion of additional background radioactivity[J]. Eur J Cancer, 1995, 31:1689-96.

[6] Paganelli G, Pervez S, Siccardi A, et al. Intraperitoneal radiolocalization of tumors pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies[J]. Int J Cancer, 1990, 45:1184-9.

[7] Sinitsyn VV, Mamontova AG, Checkneva YY, et al. Rapid blood clearance of biotinylated IgG after infusion of avidin[J]. J Nucl Med, 1989, 30: 66-9.