

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)15-1391-04

^{99m}Tc 螯合两种抗肝癌单链抗体的标记条件

王军伟¹, 师建国¹, 汪 静², 舒博学³, 刘彦仿¹(第四军医大学¹ 基础部病理学教研室,² 西京医院核医学科 陕西 西安 710033,³ 西安市高新医院核医学科 陕西 西安 710075)

Radiolabeling of 2 kinds of single chain antibodies of anti-hepatocellular carcinoma with ^{99m}Tc

WANG Jun-Wei¹, SHI Jian-Guo¹, WANG Jing², SHU Bo-Xue³, LIU Yan-Fang¹¹Department of Pathology, School of Basic Medicine, ²Department of Nuclear Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ³Department of Nuclear Medicine, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China

【Abstract】 AIM: To study the methods and the conditions of labeling the 2 kinds of single chain antibodies (hdsFv, scFv-PE38) of anti-hepatocellular carcinoma with ^{99m}Tc. **METHODS:** Choosing cyclic diethylenetriaminepentaacetic acid (cDTPA) as chelating agent and using the labeling methods on the basis of traditional approaches, eventually the optimal conjugate conditions between antibodies and cDTPA were determined. The immunactivities of ^{99m}Tc labeled single chain antibodies were verified by linear extrapolation to binding at specific antigen excess. Finally the labeled compound was identified by specific activity and stability *in vitro*. **RESULTS:** The appropriate molar ratio of cDTPA to Ab ranged from 20:1 to 40:1 (hdsFv) and 20:1 to 100:1 (scFv-PE38), and the activity of ^{99m}Tc-pertechnetate, prepared for labeling was both from 37 MBq to 148 MBq. Under these conditions, the labeling efficiency of hdsFv was 62% - 84%, of scFv-PE38 was 68% - 89%, and the results of immunactivities of labeled antibodies were above 60% (*P* < 0.05). **CONCLUSION:** We got the optimal labeling methods of these 2 single chain antibodies chelated with ^{99m}Tc. They kept both antibody's bioactivity and labeling efficiency farthest, which offered an available agent for radioimmunoimaging.

【Keywords】 single chain antibody; ^{99m}Tc isotope labeling; metal chelating agent; liver neoplasms

【摘要】目的:研究两种全新的抗肝癌基因工程单链抗体 hdsFv 和 scFv-PE38 的^{99m}Tc 标记方法及适宜条件以应用于放免显像。方法:选用二乙烯三胺五乙酸环酐(cDTPAa)作为螯

收稿日期 2005-12-15; 接受日期 2006-02-21

作者简介:王军伟, 硕士生(导师师建国)。Tel (029)87701436

Email: wjw7556@126.com

合剂,沿用比较成熟的标记方法,以标记率和标记物免疫活性为指标分别测定两种单链抗体与^{99m}Tc 偶联的适宜条件,并测定标记物的比活度和体外稳定性。结果:其他理化条件不变,cDTPA 与 hdsFv 的浓度比为 20:1 ~ 40:1,^{99m}Tc 活度 37 ~ 148 MBq 时 hdsFv 标记率为 62% ~ 84%;cDTPA 对 scFv-PE38 的浓度比为 20:1 ~ 100:1,^{99m}Tc 活度为 37 ~ 148 MBq 时,scFv-PE38 标记率为 68% ~ 89%;且两种标记单链抗体的免疫活性均在 60% 以上。结论:通过对这两种全新的单链抗体的标记和检测,得到了尽可能保持其原有免疫活性的标记条件,为通过放免显像在活体内检验单链抗体亲瘤性奠定了基础。

【关键词】单链抗体;^{99m}Tc 同位素标记;金属螯合剂;肝肿瘤
【中图分类号】R817.9 **【文献标识码】**A

0 引言

经基因工程改造的人源化二硫键稳定的单链抗体 hdsFv 和在此基础上融合了绿脓杆菌外毒素 A (Pseudomonas exotoxin A, PE) 基因的单链抗体 scFv-PE38 是两种针对肝癌细胞有特异亲和力的全新抗体。在体外试验中,两种单链抗体均对 80% 以上的肝实体癌组织表现出较高的亲和性,这使得两种单链抗体有望成为肝癌诊疗的有效靶向工具^[1-2]。二乙烯三胺五乙酸(DTPA)是一种强双功能络合剂,其标记方法比较成熟,反应时间短,在最佳条件下,很少破坏蛋白质的构型,对蛋白质的功能影响小。我们选用二乙烯三胺五乙酸环酐(cDTPAa)作为螯合剂,^{99m}Tc 作为核素示踪剂,在文献方法的基础上,探索针对两种单链抗体的放射活性与免疫活性之间达到优化组合时的标记条件,并测定体外稳定性,为其能够应用于活体内的放免显像打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人源化二硫键稳定的单链抗体 hdsFv (28 ku)和融合单链抗体 scFv-PE38(66 ku),均由第四军医大学病理学教研室刘彦仿教授惠赠;cDTPA (分析纯, Sigma 公司);Sephadex G-50 柱(Pharmacia 公司);Whatman 1 号薄层层析纸(英国 Whatman 公司);^{99m}Tc O₄⁻(⁹⁰Mo-^{99m}Tc 发生器,广州希埃核医药中心);SnCl₂·2H₂O(优纯极,天津克米欧公司);肝癌株 SMMC-7721(本实验室保存);BCA 试剂盒(碧

云天生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 适宜标记条件的确定

1.2.1.1 cDTPA 与单链抗体以不同的浓度比反应 依照文献 [3-4] 设定的反应条件。ScFv-PE38 的磷酸盐缓冲液浓度为 2 g/L (3×10^{-5} mol/L), hdsFv 的磷酸盐缓冲液浓度为 850 mg/L (3×10^{-5} mol/L), pH 8.0; cDTPA 溶于二甲基甲酰胺成不同浓度, 以 0 浓度作为对照组。cDTPA 和抗体反应时相应的 cDTPA:单链抗体浓度比为 0, 2:1, 20:1, 40:1, 100:1, 200:1, 室温下 (20℃ ~ 25℃) 反应 30 min。反应产物过 G-50 柱脱去未反应的游离螯合剂, 淋洗液为 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲液 (pH 6.5), 洗出液测 $A_{280\text{nm}}$ 值, 收集蛋白峰, 测定浓度, 而后加入 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 随即加入新鲜配制的 1 g/L 的 SnCl_2 溶液 5 ~ 10 μL (溶剂为 50 mmol/L 盐酸) 反应在室温下进行 30 min。分别设立 37, 74, 148, 296 MBq 的活度剂量组进行对比试验。

1.2.1.2 纸层析法测定各成分 Rf (比移率) 值、胶体含量及标记率 分别以无水丙酮和 100 mL/L 三氯乙酸为展开剂, 以最终反应混合物为样品, 根据文献 [5] 测定并计算样品 Rf 值和放射性标记率。将 Whatman I 层析纸经体积分数为 1% ~ 2% 人血清白蛋白预处理, 以水:乙醇:5 mol/L 氨水 (体积比 5:2:1) 为展开剂测胶体含量。

1.2.1.3 纯化标记产物及放化纯度鉴定 将标记反应完成后再进行 12.0 cm \times 0.8 cm 的 G-50 凝胶柱层析脱盐纯化, 淋洗液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 洗脱液在活度计上测放射性, 同时监测 $A_{280\text{nm}}$ 值。纯化后的样品用与上述相同的纸层析方法进行放化纯度鉴定。

1.2.1.4 测定标记单链抗体的免疫活性 肝癌株

SMMC-7721 培养于含 100 mL/L BSA 的 RPMI 1640 中, 重悬分离后用同等体积的 5 mL/L 戊二醛室温下固定 30 min, 洗涤后重悬于含 10 mL/L BSA 的 PBS 中并细胞计数。已纯化的标记 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的单链抗体的起始浓度为 1 g/L, 倍比稀释 6 个梯度, 分别加入细胞悬液管内, 4℃ 震荡 2 h 进行反应。反应后测每管放射性 (T), 洗去未结合的标记单链抗体, 再测每管放射性 (B), 同时做封闭对照, 即用未标记的单链抗体 50 μg 与标记单链抗体竞争结合抗原位点, 以分析非特异性结合的影响。以 T/B 为纵轴, 以 T 值倒数为横轴, 直线回归分析得到标记单链抗体的活性百分比 [6]。

1.2.1.5 标记物比活度的测定和适宜标记条件的确定 从应用角度出发, 选择活性分数和标记率均大于 60% 的实验组进行比活度测定。在比活度测定结果的基础上再同时对对照单链抗体免疫活性分数大于 70%、比活度大于 185 GBq/g 的标记条件作为最适宜标记条件。

1.2.2 体外稳定性的测定 取 cDTPA 与单链抗体浓度比 20:1, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 活度 74 MBq 条件下的纯化标记物, 静置, 在 24 h 内每 6 h 取 3 份样本, 应用凝聚柱层析测定解离率。

2 结果

2.1 cDTPA 与单链抗体以不同浓度比反应后的各成分 Rf 值、胶体含量及标记率

2.1.1 Rf 值 在丙酮体系中, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的 Rf 为 0.9 ~ 1.0, 单链抗体的 Rf 为 0; 在 100 mL/L 三氯乙酸体系中, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的 Rf 为 0.6 ~ 0.7, 单链抗体 Rf 为 0; 在水—乙醇—氨水系统中, 胶体 Rf 为 0, 单链抗体为 0.4 ~ 0.5, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 为 0.6 ~ 0.8。

表 1 不同 cDTPA 浓度比和不同 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 活度对标记率的影响

($n=3, \bar{x} \pm s$)

单链抗体	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 活度 (MBq)	不同 cDTPA 浓度比下的标记率					
		0	2:1	20:1	40:1	100:1	200:1
hdsFv	37	0.23 \pm 0.12	0.41 \pm 0.08	0.80 \pm 0.01	0.84 \pm 0.02	0.88 \pm 0.03	0.92 \pm 0.02
	74	0.25 \pm 0.11	0.51 \pm 0.10	0.74 \pm 0.04	0.85 \pm 0.01	0.86 \pm 0.06	0.91 \pm 0.02
	148	0.19 \pm 0.14	0.48 \pm 0.04	0.62 \pm 0.14	0.77 \pm 0.03	0.83 \pm 0.00	0.85 \pm 0.07
	296	0.16 \pm 0.06	0.25 \pm 0.07	0.35 \pm 0.01	0.44 \pm 0.10	0.59 \pm 0.11	0.62 \pm 0.09
scFv-PE38	37	0.22 \pm 0.11	0.48 \pm 0.06	0.72 \pm 0.09	0.86 \pm 0.03	0.89 \pm 0.01	0.88 \pm 0.03
	74	0.16 \pm 0.12	0.55 \pm 0.05	0.69 \pm 0.07	0.80 \pm 0.04	0.84 \pm 0.04	0.92 \pm 0.05
	148	0.11 \pm 0.03	0.51 \pm 0.11	0.68 \pm 0.12	0.77 \pm 0.05	0.82 \pm 0.10	0.90 \pm 0.02
	296	0.06 \pm 0.05	0.36 \pm 0.12	0.55 \pm 0.03	0.65 \pm 0.08	0.70 \pm 0.09	0.82 \pm 0.00

2.1.2 胶体含量 对照组的胶体含量为最高,在^{99m}Tc活度 296 MBq 时达到了 55% (hdsFv) 和 43% (scFv-PE38) 加入螯合剂后,胶体量明显减少,随着螯合剂反应量的增加,胶体含量呈下降趋势。在 cDT-PA 浓度比 200:1, ^{99m}Tc 活度在 37 MBq 时,两种单链抗体的标记混合物中的胶体含量均小于 1%。

2.1.3 标记率 不同 cDTPA 浓度比和^{99m}Tc 活度的不同对标记率的影响见表 1。试验中未加螯合剂的对照组标记率最低,加入螯合剂后标记率明显上升,并且随着螯合剂浓度比的增加标记率也随之上升;另一方面随着投入^{99m}Tc 的活度增加,标记率却随之递减。

2.2 标记物的纯化及放化纯鉴定 标记物的纯化洗脱结果见图 1。洗脱曲线 A_{280nm} 为单峰,放射性洗脱曲线呈现两个峰,其第一峰与 A_{280nm} 峰吻合,证明放射性第一峰即标记的单链抗体峰。经柱层析后的标记物再用纸层析测得放化纯在 93% ~ 98% 胶体含量未

能测出。

2.3 不同标记率的单链抗体免疫活性 不同 cDT-PA 浓度比和^{99m}Tc 活度的不同对单链抗体活性的影响见表 2。在 T/B 对 T 的点图上用直线回归分析,利用回归方程求出直线在 Y 轴上的截距,该截距的倒数即是单链抗体的活性分数。方程的检验 P < 0.05, 相关性显著。

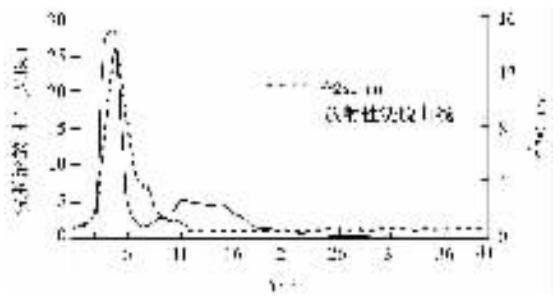


图 1 标记物的凝胶色谱层析洗脱曲线

表 2 不同 cDTPA 浓度比和不同^{99m}Tc 活度对单链抗体活性的影响

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

单链抗体	^{99m} Tc 活度 (MBq)	不同 cDTPA 浓度比下的单链抗体活性分数					
		0	2:1	20:1	40:1	100:1	200:1
hdsFv	37	0.54 ± 0.14	0.90 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.59 ± 0.21	0.33 ± 0.25
	74	0.55 ± 0.19	0.85 ± 0.06	0.80 ± 0.05	0.73 ± 0.07	0.53 ± 0.12	0.27 ± 0.18
	148	0.41 ± 0.05	0.86 ± 0.01	0.75 ± 0.00	0.60 ± 0.13	0.56 ± 0.03	0.18 ± 0.08
	296	0.20 ± 0.12	0.72 ± 0.02	0.66 ± 0.08	0.55 ± 0.12	0.49 ± 0.14	0.16 ± 0.09
scFv-PE38	37	0.39 ± 0.21	0.85 ± 0.04	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.05	0.71 ± 0.12	0.58 ± 0.15
	74	0.30 ± 0.03	0.88 ± 0.01	0.77 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.62 ± 0.07	0.56 ± 0.19
	148	0.22 ± 0.10	0.82 ± 0.02	0.77 ± 0.06	0.70 ± 0.02	0.60 ± 0.07	0.41 ± 0.06
	296	0.11 ± 0.03	0.69 ± 0.14	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.11	0.46 ± 0.13	0.39 ± 0.14

2.4 标记物比活度的测定和最适宜标记条件的确定

2.4.1 标记单链抗体比活度测定 从表 1 2 中选择活性分数和标记率均大于 60% 的实验组。对于 hds-Fv 选择螯合剂的浓度比在 20:1 ~ 40:1 之间, ^{99m}Tc 的活度从 37 ~ 148 MBq 标记条件下的标记物进行比活度测定; scFv-PE38 则选择螯合剂浓度比在 20:1 ~ 100:1, ^{99m}Tc 活度 37 ~ 148 MBq 条件下的标记物进行比活度测定(表 3)。

2.4.2 单链抗体免疫活性分数大于 70% ,比活度大于 185 GBq/g 的标记条件 hdsFv 的标记条件: cDT-PA:hdsFv 为 20:1 时,标记得活度为 74 ~ 148 MBq, cDTPA:hdsFv 为 40:1 时,标记得活度为 74 MBq; scFv-PE38 的标记条件: cDTPA:scFv-PE38 在 20:1 到 40:1 范围内,标记得活度为 148 MBq。

2.5 体外稳定性的测定 12 h 内两种单链抗体的解离率相近而且均小于 5% ,说明两种单链抗体在

^{99m}Tc 的半衰期内都是很稳定的。24 h scFv-PE38 的解离率高于 hdsFv 的 2 倍,表明前者的稳定性较后者差(表 4)。

表 3 标记单链抗体比活度测定

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

单链抗体	^{99m} Tc 活度 (MBq)	比活度 (GBq/g)		
		20:1 *	40:1	100:1
hdsFv	37	185 ± 3	173 ± 5	—
	74	288 ± 5	524 ± 6	—
	148	573 ± 114	670 ± 30	—
scFv-PE38	37	74 ± 9	127 ± 4	103 ± 1
	74	176 ± 17	179 ± 8	239 ± 11
	148	287 ± 55	368 ± 24	364 ± 45

* cDTPA 和单链抗体的浓度比。

表4 标记单链抗体体外解离率(%) ($n=3, \bar{x} \pm s$)

标记单链抗体	6 h	12 h	18 h	24 h
hdsFv- ^{99m} Tc	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.4	8.4 ± 0.2	11.7 ± 1.0
scFv-PE38- ^{99m} Tc	2.4 ± 0.5	4.1 ± 0.2	11.0 ± 2.2	24.2 ± 7.3

3 讨论

由于 cDTPA 螯合蛋白的方法在国内外都比较成熟,故在标记试验中,取影响抗体免疫活性的主要因素来进行对比,同时对还原剂 SnCl₂ 的量和反应中的 pH 值这两个非常关键的影响因素进行了摸索。SnCl₂ 用量与锡的量有一定关系,且成平台效应,即锡量固定时,SnCl₂ 用量低于某个最小值时标记率大幅度下降,高于某个最大值时反应溶液出现混浊,凝胶过滤不能得到 A_{280 nm} 峰,锡量增加时,平台也相应改变。最终以标记率为标准,将 SnCl₂ 溶液定为 1 g/L,该浓度既避免了稀释溶液引起副反应,又不至于影响 pH 值。理论上在中性和碱性溶液中,^{99m}Tc 易于形成不溶性氧化物,故实验中第一次凝胶层析使用 pH 为 6.5 的缓冲液,锡标记反应即是在该 pH 值下进行,在其他步骤中 pH 偏中性,对于已标记的抗体影响较小。

理论上,在其他理化条件固定且^{99m}Tc 比活度不变时,螯合于抗体上的螯合剂数量决定了放射性核素的标记率。由于不能直接测定每个抗体上接合的 cDTPA 分子数,所以最终以^{99m}Tc 的标记率来间接反映 cDTPA 螯合于抗体上的数量。由于标记率与^{99m}Tc 的活度有直接关系,故需要设立不同的^{99m}Tc 活度水平来进行对比试验。标记物的比活度过高会增加非靶组织的本底,导致 T/NT 下降,过低又会延长显像时间,得不到清晰的图像,或消耗过多昂贵的抗体,所以测定标记物的比活度可用于进一步选择标记方案。

两种单链抗体尽管分子质量差别 2.35 倍,但在标记过程中的理化性质与检测结果却非常相似。Lanteigne 等^[7]认为 DTPA 与蛋白质的结合在一级结构上依赖于与赖氨酸残基的 ε-氨基酰化,在空间结构上依赖于蛋白质的 α 螺旋的数量,所以依据该理论可以推断两种单链抗体的空间结构大体相似。单链抗体 scFv-PE38 是包涵体变性后再复性得到的可

溶性产物,其功能集团比 hdsFv 多,分子形态比 hdsFv 复杂,这有可能是其标记物体外解离率高于 hdsFv 的原因。

试验中设立对照组是由于单链抗体在不用螯合剂的情况下依然有 50% 的标记率,过程简单快速,但活性实验中发现直接标记的单链抗体活性很低。在凝胶电泳中发现,直接标记的两种单链抗体电泳条带中多出两条大小不等的染色带,这表示在直接标记过程中单链抗体被破坏,造成单链抗体的不稳定和活性丧失,证明了直接标记的方法不适用于这两种抗体。试验中用以选择最适宜标记条件的标准,是在考虑了单链抗体试验用量、应用于放免显像的用量以及预期的显像质量和效果后确定的。这些标准下的标记条件最终对显像是否有最优化的作用,还有待于进一步的放免显像试验。

致谢 本文在撰写过程中承蒙第四军医大学西京医院核医学科邓敬兰教授的指导与修正,在此致以最崇高的敬意和真挚的感谢。

【参考文献】

- [1] 袁清安,俞伟源. 肝癌特异性鼠源及人源化单链抗体基因的构建及在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 86-90.
- [2] 赵君,孙志伟,刘彦仿. 二硫键稳定的抗肝癌单链抗体-PE38 融合基因的构建、表达与功能检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(6): 896-898.
- [3] Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, et al. Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride[J]. J Nucl Med, 1983, 24(12): 1158-1163.
- [4] Mary R, Tong Q, Suresh G, et al. A comparison in monkeys of ^{99m}Tc labeled to a peptide by 4 methods[J]. J Nucl Med, 2001, 42(12): 1870-1877.
- [5] 边惠洁,陈志南. 标记肝癌单抗片段 HAb18 F(ab')₂ 方法改进及放免显像实验研究[J]. 中华核医学杂志, 1999, 19(4): 219-221.
- [6] 苗积生,沈毅. 放射性核素标记单克隆抗体(McAb)免疫反应活性分数的测定[J]. 同位素, 1996, 9(2): 85-88.
- [7] Lanteigne D, Hnatowich DJ. The labeling of DTPA-coupled proteins with ^{99m}Tc[J]. Int J Appl Radiat Isot, 1984, 35(7): 617-621.

编辑 王睿