



## 抗癌胚抗原单抗与生物素及链霉亲和素偶联物的制备及性能鉴定

预定位系统由第一交联物和第二交联物所组成, 第一交联物指预定位系统中抗肿瘤抗体与特异性标识物的交联物。目前最常用的第一交联物是生物素标记或生物素化的抗体以及链霉亲和素标记或链霉亲和素化的抗体。预定位药代动力学研究表明, 第一交联物肿瘤摄取对于第二交联物的肿瘤摄取是一个限制因素[1]。因此, 制备理想、合适的第一交联物对成功的预定位至关重要。就亲和素-生物素系统预定位而言, 重要的是要充分保持单抗与生物素及链霉亲和素偶联物的生物活性及其结合活性。本研究选用高特异性抗癌胚抗原(CEA mAb), 根据生物素活化酯(BNHS)可与蛋白质分子中的氨基结合的原理进行抗体的生物素化, 应用3-(2-吡啶二巯基丙酸)-N-琥珀酰亚胺酯化学偶联法制备抗CEA单抗与链霉亲和素偶联物, 并对制备的抗CEA mAb偶联物进行鉴定CEA mAb和生物活性测定, 为进一步在荷人结肠癌裸鼠模型中实施预定位放免显像和治疗的实验研究提供理想的第一交联物。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂

抗CEA单克隆抗体(CEA mAb)由上海市免疫学研究所制备; BNHS、四氢噻吩(2-IT)、SPDP、2-巯基乙醇(ETSH)均为Sigma公司产品; 链霉亲和素(SA)由上海市静安区医学化验所提供; 凝胶Sephadex G-200为Pharmacia 公司产品; 其他化学试剂均为分析纯; 实验用水为去离子水。

#### 1.2 方法

1.2.1 CEA mAb生物素偶联物的制备方法 CEA mAb用0.1mol/L、pH 8.5碳酸氢钠缓冲液(CBS)稀释成浓度为: 1 mg/ml, BNHS用DMSO稀释成浓度为20 mg/ml。取1 ml单抗, 按生物素与单抗物质的量之比为1:15~1:50加入BNHS, 混匀后置于室温反应2 h, 继之对4 °C与0.1 mol/L、pH 8.5 CBS 透析即成。CEA mAb生物素偶联物中的生物素分子数鉴定方法采用Green[2]建立的HABA滴定方法。

1.2.2 CEA mAb链霉亲和素偶联物的制备方法 链霉亲和素与2-IT作用, 抗CEA mAb与SPDP作用, 分别导入巯基(-SH)和吡啶二巯基丙酰(PDP), 通过SA分子中引入的-SH与单抗分子中引入的PDP作用将SA与单抗偶联在一起。

1.2.2.1 SPDP对单抗的化学修饰(CEA mAb-PDP) SPDP甲醇溶液(20 mmol/L), 与浓度为5 mg/ml MAb按物质的量之比6:1充分混合, 37 °C反应1 h; 反应完毕, 即刻以pH 7.5、0.2 mol/L PBS透析过夜, 离心取上清液。参照Carlsson法[3]测定MAb结合的PDP数目。1.2.2.2 链霉亲和素巯基化(SA-SH) 将pH8.2、0.2 mol/L PBS透析过的SA加入14.3 mol/L的ETSH, 使其终浓度为50 mmol/L。临时配制2-IT乙醇溶液(50 mmol), 然后按SA与2-IT物质的量之比1:10加入2-IT, 室温反应2 h, 反应结束后以10 mmol/L的乙酸钠透析过夜, 离心取上清液。参照Eilmen法[4]测定SA被修饰的巯基(-SH)数目。

1.2.2.3 CEA mAb-SA偶联物的制备 将上述CEA mAb-PDP和SA-SH按物质的量之比1:3混合, 置于4 °C反应48 h, 反应结束后, 经过Sephadex G-200分离纯化。

1.2.3 CEA mAb偶联物的结合活性鉴定方法 采用间接ELISA法[5], 以未修饰的CEA mAb作为阴性对照。

1.2.4 CEA mAb 偶联物的免疫活性鉴定方法 采用放射免疫分析法(RIA), 并与未修饰的CEA mAb进行对照。RIA方法如下: 偶联物50  $\mu\text{l}$ ,  $^{125}\text{I}$ -CEA 100  $\mu\text{l}$  ( $8\ 000\ \text{min}^{-1}$ ), 和0.1%BSA 150  $\mu\text{l}$  混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育3 h, 加入25%PEG<sub>6000</sub> 和正常人血清混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min, 20 min后测沉淀放射性计数, 计算其结合率(B%)。

1.2.5 CEA mAb偶联物的蛋白定量 采用改良Lowry's法测定。

1.2.6 SDS-PAGE测定CEA mAb偶联物蛋白的分子量 采用12%的凝胶浓度, SDS-PAGE不连续系统, 考马氏亮兰染色, 根据各蛋白迁移率计算Rf值, 标准蛋白作对照, 求各峰蛋白的相对分子量。

## 2 结果

### 2.1 抗CEA mAb的生物素化

生物素化单抗经HABA滴定方法测得每分子抗体中约偶联3分子生物素; 间接ELISA方法证实具有良好的SA结合活性(图1), 偶联抗体与 $^{125}\text{I}$ -CEA结合活性为原CEA mAb的95%以上(图2); 在还原条件下(ETSH)SDS-PAGE结果显示生物素化单抗仍呈现与原CEA mAb相同的单一蛋白条带(图3)。

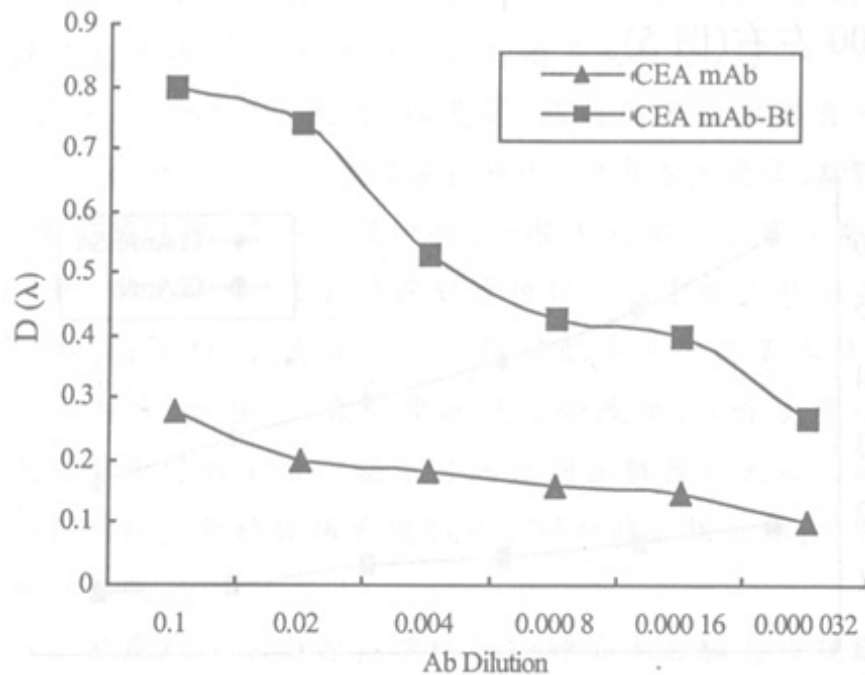


图1 生物素化CEA mAb的SA结合活性  
Fig.1 SA binding activity of CEA mAb-Bt

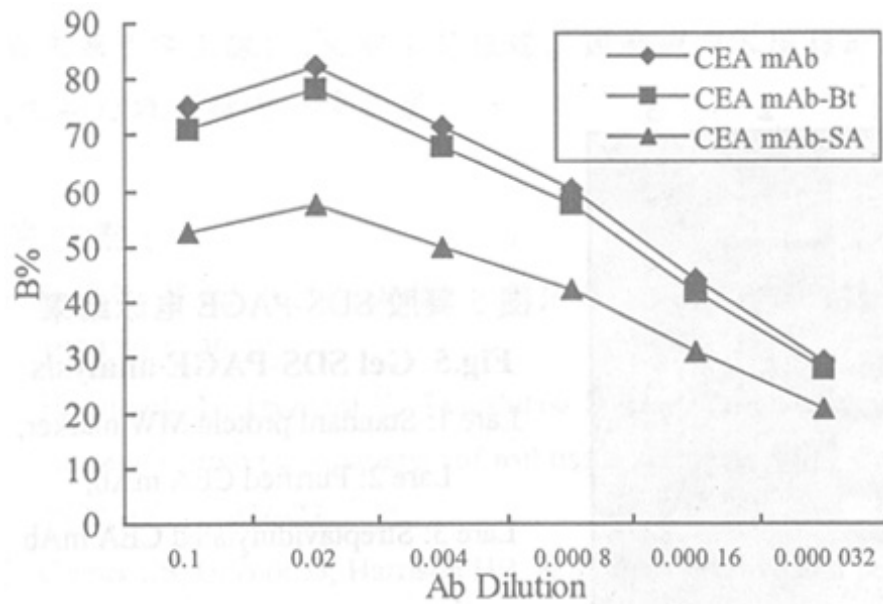


图2 CEA mAb偶联物的CEA结合活性  
Fig.2 CEA binding activity of CEA mAb conjugate

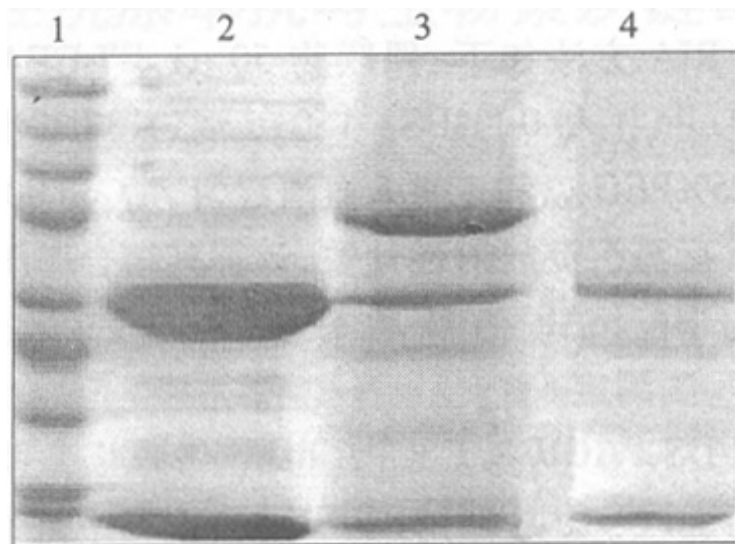


图3 凝胶SDS-PAGE电泳结果  
Fig.3 Gel SDS-PAGE analysis  
Lane 1: Standard protein MW marker; Lane 2 :Purified CEA mAb;  
Lane 3 :Biotinylated CEA mAb; Lane 4: CEA mAb-SA

## 2.2 抗CECEA mAb与亲和素的化学修饰

链霉亲和素经2-IT修饰，通过Ellman's试剂检测引入的巯基数，每分子SA中含有1~2个巯基；而CEA mAb经SPDP修饰，按文献[3]方法检测引入的PDP数，每分子MAb中含有2~3个PDP。制备的CEA mAb-SA偶联物的免疫活性为未偶联CEA mAb的70%左右(图2)，具有与生物素结合的能力(图4)。经SDS-PAGE电泳证实其相对分子质量为210 000左右(图5)。

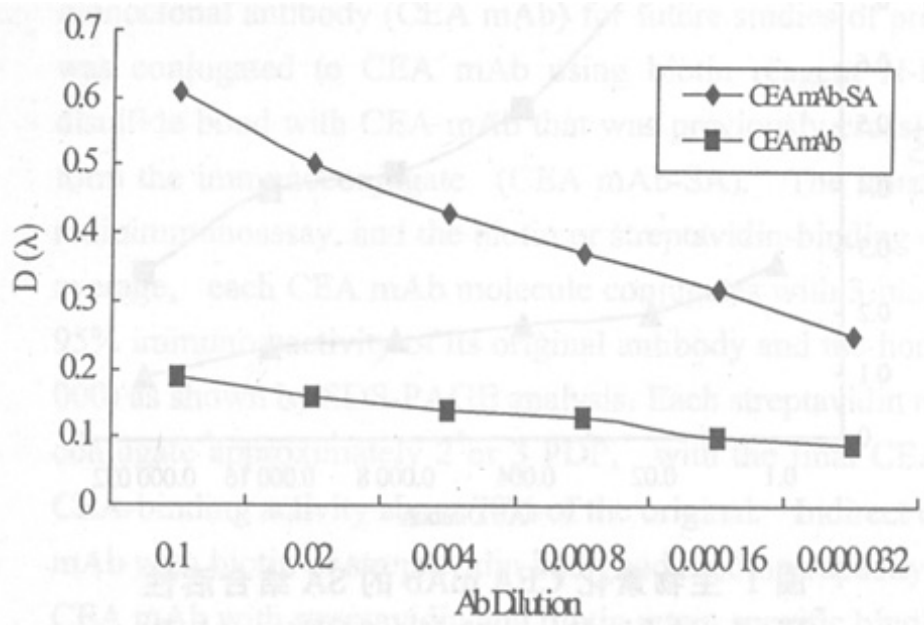


图4 CEA mAb-SA偶联物的生物素结合活性  
Fig.4 Biotin binding activity of CEA mAb-SA

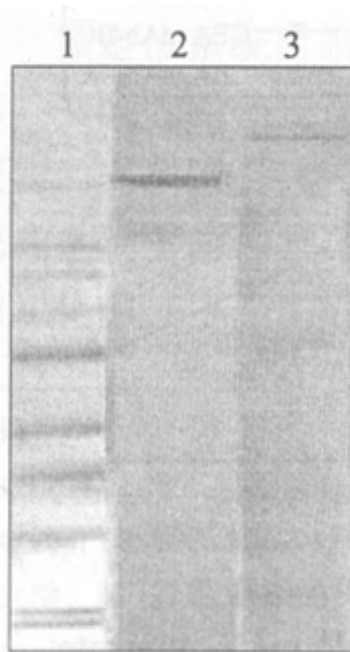


图5 凝胶SDS-PAGE电泳结果  
Fig.5 Gel SDS-PAGE analysis  
Lane 1: Standard protein MW marker;  
Lane 2: Purified CEA mAb;  
Lane 3: Streptavidinylated CEA mAb

### 3 讨论

利用杂交瘤技术制备单克隆抗体这一新的方法，部分解决了抗癌抗体开发中所遇到的抗血清特异性差及难于制备等技术问题。在已研制的百余种抗癌单克隆抗体中，尤以CEA mAb引人注目。许多国家已将CEA mAb投入了临床应用[6]。本文在采用杂交瘤技术获得了高特异性、高亲和力的抗CEA mAb细胞株E7B3的基础上

[5], 对CEA mAb的生物素化以及CEA mAb与SA的偶联物进行鉴定和生物活性测定, 为进一步的预定位显像和治疗提供可靠的靶向载体。

单抗在碱性环境中通过BNSH易于生物素化, 一般生物素偶合至单抗的赖氨酸残基上, 若氨基(-NH<sub>2</sub>)修饰过多将增加抗体免疫活性丧失的几率。因此, 对单抗的生物素化条件要进行控制和最优化。一般认为, 每抗体分子上结合2~3个生物素分子不影响抗体的免疫活性及药代动力学特征[7][8]。本研究按CEA mAb与BNSH物质的量之比1:15~1:50进行生物素化, 每分子抗体中约偶联3分子生物素, 且具有良好的SA结合活性, 偶联后SDS-PAGE证实为单一蛋白条带, 且仍保留95%的免疫活性。当然若能使用长臂生物素活化酯与单抗交联, 则可使生物素免遭空间位阻效应而造成抗体活性下降并促进与抗体结合而发挥作用[8]。链霉亲和素由四个亚基组成, 只需其中一个亚基就可将其连接至MAb上。本实验应用SPDP化学偶联法制备抗CEA mAb与链霉亲和素偶联物, 免疫活性检测结果说明其与CEA具有特异结合反应, 而仍保留着原MAb活性的70%左右。图3显示所制备的CEA mAb-SA偶联物相对分子质量为210 000左右, 单抗与SA偶联后因分子量增加了近40%, 则可能具有较缓慢的药代动力学特征[9][10]。这两类抗CEAMAb偶联物基本保持完整的特异性结合肿瘤CEA的性质, 此外, 抗CEAMAb很少被肿瘤细胞内化, 当与肿瘤细胞上CEA结合后可滞留相当长的时间, 使得标记物引入前肿瘤未结合的抗体得以清除。因此它们的制备为亲和素-生物素系统预定位放免显像的下一步实验研究奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] Osdol WW, Sung C, Dedrick RL, et al. A distributed pharmacokinetic model of two-step imaging and treatment protocols: Application to streptavidin-conjugated monoclonal antibodies and radiolabeled biotin[J]. J Nucl Med, 1993, 34(9):1552-64.

[2] Green N. A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin[J]. Biochem J, 1965, 94:23c-24c.

[3] Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent[J]. Biochem J, 1987, 173:723-37.

[4] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups[J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 82:70-7.

[5] 葛海良, 徐龙, 张惠珍, 等. 抗CEA单抗-天花粉蛋白偶联物在荷人结肠癌裸鼠体内的放免定位显像[J]. 中华核医学杂志, 1993, 13(1):14-6.

[6] Goldenberg DM, Goldenberg H, Sharkey RM, et al. Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with <sup>123</sup>I or <sup>99m</sup>Tc[J]. Cancer Res, 1990, 50(3):909s-21s.

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

[8] 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(10):1677-84.

[9] Sung C, Osdol WW. Pharmacokinetic comparison of direct antibody targeting with pretargeting protocols based on streptavidin-biotin binding[J]. J Nucl Med, 1995, 36(5):867-76.

[10] Sung C, Osdol WW, Saga T, et al. Streptavidin distribution in metastatic tumors pretargeted with a biotinylated monoclonal antibody: theoretical and experimental pharmacokinetics[J]. Cancer Res, 1994, 54(8):2166-75.

#### 参考文献:

[1] Osdol WW, Sung C, Dedrick RL, et al. A distributed pharmacokinetic model of

two-step imaging and treatment protocols: Application to streptavidin-conjugated monoclonal antibodies and radiolabeled biotin[J]. J Nucl Med, 1993, 34(9):1552-64.

[2] Green N. A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin[J]. Biochem J, 1965, 94:23c-24c.

[3] Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent[J]. Biochem J, 1987, 173:723-37.

[4] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups[J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 82:70-7.

[5] 葛海良, 徐 龙, 张惠珍, 等. 抗CEA单抗-天花粉蛋白偶联物在荷人结肠癌裸鼠体内的放免定位显像[J]. 中华核医学杂志, 1993, 13(1):14-6.

[6] Goldenberg DM, Goldenberg H, Sharkey RM, et al. Clinical studies of cancer radioimmuno-detection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with  $^{123}\text{I}$  or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [J]. Cancer Res, 1990, 50(3):909s-21s.

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

[8] 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(10):1677-84.

[9] Sung C, Osdol WW. Pharmacokinetic comparison of direct antibody targeting with pretargeting protocols based on streptavidin-biotin binding[J]. J Nucl Med, 1995, 36(5):867-76.

[10] Sung C, Osdol WW, Saga T, et al. Streptavidin distribution in metastatic tumors pretargeted with a biotinylated monoclonal antibody: theoretical and experimental pharmacokinetics[J]. Cancer Res, 1994, 54(8):2166-75.