

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

李贵平¹,朱承谟²(¹第一军医大学南方医院核医学科,广东广州510515;²上海第二医科大学瑞金医院核医学科,上海200025)

摘要:目的 研究抗癌胚抗原(CEA)单抗与生物素及链霉亲和素(streptavidin,SA)偶联物的制备方法。方法 将CEA单抗按抗体与生物素活化酯物质的量之比为1:15~1:50进行生物素化。抗CEA单抗与SA的偶联采用3-(2-吡啶二巯基丙酸)-N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)化学偶联法制备。抗CEA单抗偶联物的生物活性及免疫活性分别采用间接ELISA方法和放射免疫分析法进行测定。结果 生物素化单抗每分子抗体中约偶联3分子生物素,具有良好的SA结合活性,经SDS-PAGE电泳证实为单一蛋白条带,仍保留95%的免疫活性。SA每分子中含有1~2个巯基,而抗CEA单抗每分子中含有2~3个3-(2-吡啶二巯基丙酸)-N-琥珀酰亚胺酯间接ELISA方法证实偶联物具有良好的生物素结合活性,SDS-PAGE电泳显示单抗-SA偶联物相对分子质量为21000左右,仍保留着原单抗活性的70%左右。结论 所制备的两类抗CEA单抗偶联物基本保持完整的特异性结合肿瘤CEA的性质,可为进一步的预定位显像和治疗应用提供可靠的靶向载体。

关键词: 抗体,单克隆;癌胚抗原;生物素;链霉亲和素

中图分类号:R392-33 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)08-0582-04

Preparation and bioactivity evaluation of the conjugates of carcinoembryonic antigen monoclonal antibody with biotin or streptavidin

LIGui-ping¹,ZHUCheng-mo²

(¹Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract Objective To explore the approach to conjugate streptavidin or biotin with carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibody (CEAmAb) for future studies of pretargeting technique with the avidin-biotin system. Methods Biotin was conjugated to CEA mAb using biotin reagent N-hydroxysuccinimido-biotin and streptavidin was conjugated via a disulfide bond with CEA mAb that was previously crosslinked with N-succinimidyl-3-(2-pyridyl)-dithiopropionate (SPDP) to form the immunoconjugate (CEAmAb-SA). The immunoreactivity of the immunoconjugates was evaluated by means of radioimmunoassay, and the biotin or streptavidin-binding capacity tested by indirect enzyme-linked immunoassay. Results On average, each CEA mAb molecule conjugates with 3 biotin molecules, and the resulted biotinylated CEA mAb retained 95% immunoreactivity of its original antibody and the homogeneity of a pure protein (with relative molecular weight of 150 000) as shown by SDS-PAGE analysis. Each streptavidin molecule possesses 1 or 2 sulfhydryl and a CEA mAb molecule may conjugate approximately 2 or 3 PDP, with the final CEA mAb-SA having a relative molecular weight of 21 000 and the CEA-binding activity about 70% of the original. Indirect enzyme-linked immunoassay showed that immunoconjugate of CEA mAb with biotin or streptavidin had good binding capacity with streptavidin or biotin. Conclusion The immunoconjugates of CEA mAb with streptavidin and biotin retain specific binding capacity to CEA, which provides reliable carrier for pretargeting radioimmunoimaging and therapy.

Key words antibody, monoclonal; carcinoembryonic antigen; biotin; streptavidin

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CEAmAb偶联物进行鉴定

收稿日期:2001-01-09

基金项目:上海市教委博士学科点建设基金资助项目

作者简介:李贵平(1962-),男,安徽宿松人,1999年毕业于上海第二医科大学,博士,主治医师,讲师,电话:020-85142121,E-mail:gp-li@21cn.com

CEAmAb 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 (CEAmAb) 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 0.1 mol/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 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) 和吡啶二硫基丙酰 (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 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 pH 8.2 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 Ellmen 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 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 μ l,¹²⁵I-CEA 100 μ l (8000 min⁻¹) 和 0.1% BSA 150 μ l 混匀,37 温育 3 h,加入 25% PEG₆₀₀₀ 和正常人血清混匀,4、3000 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 R_f 值,标准蛋白作对照,求各峰蛋白的相对分子质量。

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 ¹²⁵I-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)。

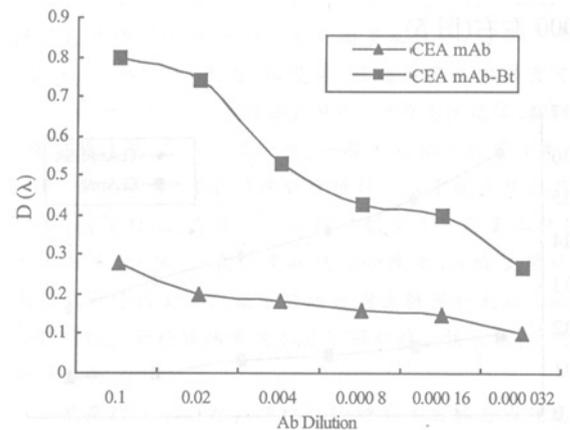


图 1 生物素化 CEA mAb 的 SA 结合活性

Fig.1 SA binding activity of CEA mAb-Bt

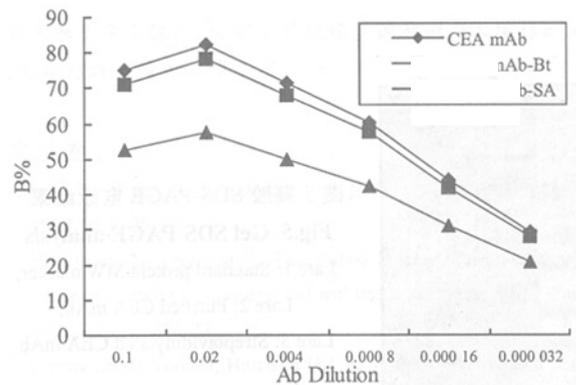


图 2 CEA mAb 偶联物的 CEA 结合活性

Fig.2 CEA binding activity of CEA mAb conjugate

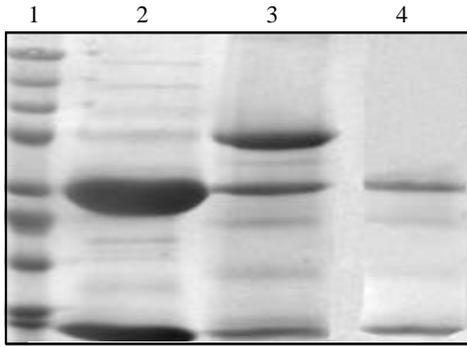


图 3 凝胶 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.3 Gel SDS-PAGE analysis

Lane1:StandardproteinMWmarker;Lane2PurifiedCEAmAb;
Lane3BiotinylatedCEAmAb;Lane4:CEAmAb-SA

2.2 抗 CEAmAb 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 CEAmAb 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 CEAmAb-SA 偶联物的免疫活性为未偶联 CEAmAb 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 210000 左右 (图 5)。

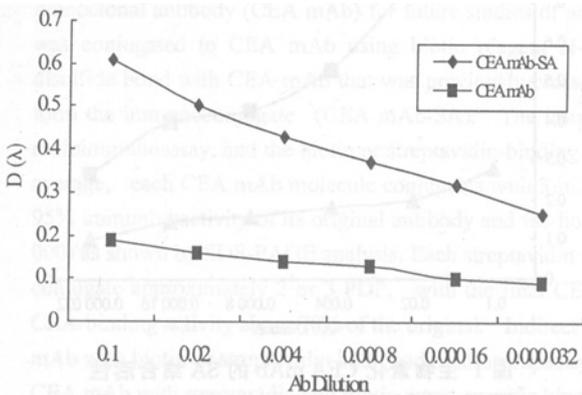


图 4 CEAmAb-SA 偶联物的生物素结合活性
Fig.4 Biotin binding activity of CEAmAb-SA



图 5 凝胶 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.5 Gel SDS-PAGE analysis
Lane1:StandardproteinMWmarker;
Lane 2: PurifiedCEAmAb;
Lane 3: Streptavidinylated CEAmAb

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 CEAmAb 引人注目。许多国家已将 CEAmAb 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 CEAmAb 细胞株 E7B3 的基础上 [5],对 CEAmAb 的生物素化以及 CEAmAb 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 (-NH₂) 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 CEAmAb 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 CEAmAb 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 CEAmAb-SA 偶联物相对分子质量为 210000 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] OsdolIWW, SungC, DetrickRL, etal 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] GreenN. A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin [J]. Biochem J, 1965, 94: 23c-24c.
[3] CarlssonJ, DrevinH, AxenR. 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] EllmanGL. Tissuesulphydrylgroups [J]. ArchBiochem 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] GoldenbergDM, GoldenbergH, SharkeyRM, et al. Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with ^{125}I or $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [J]. Cancer Res, 1990, 50(3):909s-21s.
- [7] PaganelliG, PervezS, SiccardiA, et al. Intraperitoneal radiolocalization of tumors pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies [J]. Int J Cancer, 1990, 45(6):1184-9.
- [8] KobayashiH, SakaharaH, HosonoM, et al. Improved clearance of radiolabeled biotinylated monoclonal antibody following the infusion of avidinase "chase" without decreased accumulation in the target tumor [J]. J Nucl Med, 1994, 35(10):1677-84.
- [9] SungC, OsdolWW. Pharmacokinetic comparison of direct antibody targeting with pretargeting protocols based on streptavidin-biotin binding [J]. J Nucl Med, 1995, 36(5):867-76.
- [10] SungC, OsdolWW, SagaT, et al. Streptavidin distribution in metastatic tumors pretargeted with biotinylated monoclonal antibody: theoretical and experimental pharmacokinetics [J]. Cancer Res, 1994, 54(8):2166-75.

肾周脂肪肉瘤 2 例报告

齐 桓, 郑少斌 (第一军医大学南方医院泌尿外科, 广东 广州 510515)

关键词: 脂肪肉瘤; 手术治疗

中图分类号: R735.4 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2001)08-0585-01

1 临床资料

例 1, 男, 67 岁。因左腰部隐痛不适 1 年余入院。体检: 左侧肋下可扪及一 6.0cm×5.0cm 肿块, 质中等偏硬, 表面光滑, 上极不能触清, 活动度差, 轻压痛。B 超示脾肾间隙混合性占位, 以实性为主。CT 示左侧肾上腺区巨大呈分叶状肿块影, 大小约 13.0 cm×9.0 cm, 内部密度不均匀强化, 与左肾界线较清, 将左肾向内下方推移。肾动脉插管造影示左肾血管及分支未见明显异常, 左肾上方肿块未见明显供血动脉。术前诊断左肾上腺占位病变, 行剖腹探查术, 肿物位于左肾上方, 大小约 15.0 cm×12.0 cm×10.0 cm, 包膜完整, 将左肾向内下方压迫、移位, 与周围组织无粘连。完整切除肿物。在取出的肿物内上方又发现两个鸡蛋大小包膜完整的肿块, 将肿块切除。肿物切面为胶冻样黄色组织, 质量为 3.5 kg。病理报告为粘液性脂肪肉瘤 (多发性)。术后 4 个月无复发。

例 2, 女, 47 岁。因腹胀、左腹部肿块 3 个月入院。体检: 左侧腹部可扪及肿物, 质中等, 边界不清。B 超示腹腔左侧 11.0 cm×8.0 cm 肿块。CT 示左侧腹部不规则混合密度灶, 10.0 cm×8.0 cm, 增强后肿物周边为高密度, 中心无强化。剖腹探查见肿物来源于肾周脂肪囊, 大小约 12.0 cm×10.0 cm×8.0 cm, 包膜完整, 将左肾向下推移, 侵犯肾周筋膜、腰大肌、腹膜等。行左肾及肿物完全切除术。病理诊断为粘液性脂肪肉瘤。术后 1 年无复发。

2 讨论

收稿日期: 2000-09-20

作者简介: 齐 桓 (1972-), 男, 吉林人, 1996 年毕业于第一军医大学, 本科, 医师, 电话: 020-85142217

肾周脂肪肉瘤指起源于肾周脂肪囊间隙内的脂肪肉瘤, 本病不易早期发现, 出现症状时肿瘤多已较大。表现为腰背疼痛、腹胀、腹部肿块、乏力、消瘦等, 压迫周围组织器官可引起肾积水、精索静脉曲张等相应症状^[1]。肿瘤恶性程度低, 膨胀性生长, 有完整包膜, 多不具浸润性, 一般不侵犯肾脏集合系统, 血尿少见, 罕见转移。CT 的诊断价值较大, CT 能清楚地显示肿瘤边界, 密度较低, 有类似脂肪样组织密度为其基本特征, 有些可见有液化、坏死、囊性变及钙化等改变, 并能发现肿瘤与肾脂肪囊或肾脏关系, 显示肿物致周围脏器和大血管的受压与移位情况。肾动脉插管造影可了解肿瘤血供来源, 对明确诊断帮助不大。

一般采取手术治疗, 单纯切除肿瘤术后容易出现局部复发, 在确认对侧肾功能正常情况下, 行患侧肾脏、肾周脂肪组织的根治性切除, 可减少肿瘤复发, 提高生存率。目前国内外腹膜后脂肪肉瘤 5 年生存率为 32.3%^[2]。Casper 等^[3]认为脂肪肉瘤的化疗效果不肯定, 复发肿瘤应争取再次切除。本组 1 例肿瘤来源于肾上腺区, 文献未见报道。因两例病人随访时间尚短, 远期疗效有待进一步观察。

参考文献:

- [1] 陆福年. 肾周围巨大脂肪肉瘤 1 例报告 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1989, 10(1):29-30.
- [2] HashimotoH, DaimaruY, TakeshitassS, et al. Prognostic significance of histologic parameters of soft tissue sarcomas [J]. Cancer, 1992, 70(11):2816-22.
- [3] CasperES, GaynorJJ, HarrisonHB, et al. Preoperative and postoperative adjuvant combination chemotherapy for adults with high grade soft tissue sarcoma [J]. Cancer, 1994, 73(6):1644-51.