第 21 卷 第 1 期
2008 年 2 月

同 位 素
Journal of Isotopes

Vol. 21 No. 1
Feb. 2008

重组抗人 CD22 嵌合抗体 SM03 的 ^{125}I 标记及生物活性

路萍萍[1,2]，孟志云[1]，吴英良[2]，王敏伟[2]，窦桂芳[1]

（1. 军事医学科学院 野战输血研究所 新药临床前评价实验室，北京 100850；
2. 沈阳药科大学 药学院 药理系，辽宁 沈阳 110016）

摘要：为了探讨^{125}I 标记的重组抗人 CD22 嵌合抗体 SM03 的生物活性，采用 Iodogen 法进行单克隆抗体 SM03 的^{125}I 标记，Sephacryl S-300 HR 色谱柱分离标记混合物，测定分离后样品的纯度与浓度。采用竞争结合法和酶联免疫吸附法（ELISA）测定纯化后样品的活性。抗体经过放射性标记后，放化纯度＞99%，回收率＞47%。^{125}I-SM03 的生物活性与未标记抗体差异没有显著性，$P=0.907$。用^{125}I-SM03 筛选 CD22 抗原表达量最多的细胞，在 Raji、Daudi 和 Ramos 细胞中，SM03 与 Ramos 细胞的特异性结合量最多，每个细胞的结合量为 1.3 pmol。以上结果表明，Indogen 法可以用于单克隆抗体 SM03 的标记，标记后不影响 SM03 的生物活性。

关键词：^{125}I 标记；人鼠嵌合抗 CD22 单克隆抗体；SM03；生物活性

中图分类号：TQ463；R817；Q697　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1000-7512(2008)01-0020-05

Bioactivity Assays and Application of ^{125}I Labeled Human Mouse Chimeric Anti-CD22 Monoclonal Antibody SM03

LU Ping-ping[1,2], MENG Zhi-yun[1], WU Ying-liang[2],
WANG Min-wei[2], DOU Gui-fang[1]

(1. *Group of Preclinical Evaluation of New Drug*, *Institute of Transfusion Medicine*,
Academy of Military Medical Science, *Beijing* 100850, *China*;
2. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016, *China*)

Abstract: To investigate the bioactivity and application of ^{125}I labeled human mouse chimeric monoclonal SM03, SM03 was labeled with ^{125}I using Indogen method. The labeled mixture was purified by Sephacryl S-300 HR separation chromospectry. The purity and concentration of separated fractions were determined by HPLC and Protein Assay Kit, respectively. Competitive binding method and ELISA method were used for bioactivity assays. ^{125}I-SM03 was applied to screen cell lines which express the most abundant CD22 antigen. The purity

收稿日期：2007-06-04；**修回日期**：2007-12-11
基金项目：北京市科技计划项目（Z0004105040131）
作者简介：路萍萍（1979～），女（汉族），黑龙江伊春人，博士在读，药代动力学专业
通信作者：窦桂芳，女，博士，研究员，E-mail：douguifang@vip.sina.com

and recovery of ^{125}I-SM03 were >99% and >47%, respectively. The bioactivity of ^{125}I-SM03 and SM03 hasn't significant difference in statistics. Ramos cell line had the strongest special radioactivity when ^{125}I-SM03 bound with in Raji, Daudi and Ramos cell lines. Indogen method is a good way to label Human mouse chimeric anti-CD22 monoclonal antibody SM03 and the label will not affect the activity of SM03. The ^{125}I-SM03 not only can be used for detect agent, but also may be put into market for NHL therapy.

Key words: ^{125}I labeling; human mouse chimeric anti-CD22 monoclonal antibody; SM03; bioactivity

非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)形态多样，具有不同的分子特点、临床表征、生物学特征、治疗的反应率和存活率。在过去的几十年中，其主要治疗方法为放疗和化疗。单克隆抗体治疗药物的开发为其提供了新的治疗手段，可以使病人有效地避免放疗或化疗的毒副作用，并减少对这些方法的依赖。抗 CD22 抗体成为其中引人注目的一员，因为它特异性表达于 60%～80%NHL 细胞表面[1]。SM03 是人鼠嵌合单克隆抗体，特异性识别人 CD22 抗原。文献[2]的研究表明，SM03 有可能成为治疗 NHL 的有效药物。本工作拟对 SM03 进行^{125}I 标记，研究^{125}I 的标记是否影响其生物活性；并观察其在 Daudi、Raji 和 Ramos 非霍奇金氏淋巴瘤细胞中的表达，以期为放射性标记 SM03 的临床和非临床应用提供参考。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

人鼠嵌合抗 CD22 单克隆抗体 SM03(批号：SP-004-030616-003，浓度 9.1 g·L^{-1})：深圳龙瑞公司产品；Iodogen：Sigma 公司产品；Na^{125}I(放化纯度>99%)：Amersham 公司产品；CD22 抗原：Peprotech 公司产品；生物素标记试剂盒：美国 PEIRCE 公司产品；蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit, Lot # E160978)：美国 PEIRCE 公司产品；CD22 抗原 ELISA 竞争结合试剂盒：晶美公司定制；荧光异硫氰-SM03(FITC-SM03)：SinaMab Inc 公司产品；SM03 标准蛋白：深圳龙瑞公司提供。

Daudi、Raji 和 Ramos 非霍奇金氏淋巴瘤细胞：美国 ATCC 公司产品，培养于 RPMI 1640 完全培养基中，置 37℃、5% CO_2 培养箱中。

1.2　主要仪器

Agilent 1100 高效液相色谱分析仪：美国 Agilent Technologies 公司，配有 G1311A 四元泵、G1314A 可调波长 UV 检测器、G1316A 恒温箱、真空脱气机及 Agilent 化学工作站；Sephacryl S-300 HR (1 cm×50 cm) 凝胶制备柱：美国 Pharmacia 公司；TSK-GEL G3000SWXLcolumn (5 μm, 250 mm×7.8 mm) 色谱柱：日本 TOSOH 公司；γ 放射性检测仪：美国 PACKARD 公司；ELX-810 型酶联仪：美国 Bio-tek 公司；CO_2 细胞培养箱：上海力申科学仪器有限公司；Wallac Wizard 1470 自动 γ 计数器：美国 Perkin Elmer 公司。

2　实验方法

2.1　^{125}I- SM03 的标记及放化纯度测定

利用 Iodogen 法进行 SM03 的^{125}I 标记。标记反应混合物经 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱分离纯化，洗脱液为 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS)，流速 60 mL/h。分部收集洗脱液，Wallac 1470γ 计数仪测定其 γ 放射性，在放射性峰处同时监测蛋白浓度。用凝胶高效液相色谱(SHPLC)法测定标记物的放化纯度。

2.2　^{125}I-SM03 与 SM03 竞争实验

取 25 mL 培养瓶中培养的对数生长期的 Ramos 淋巴瘤细胞，用 RPMI 1640 无血清培养基调细胞浓度为 10^5/mL，加入 1.5 mL 离心管中，每管 100 μL。将 SM03 稀释成 10 个浓度的样品，依次为 3.15、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.000 1、0.000 01 g/L，各取 100 μL 加入到前述离心管中，每个浓度设两个复管。^{125}I-SM03的稀释终浓度为 0.010 5 g/L，各取 100 μL 也分别加入到前述离心管中。所有样品混匀后，将离心管置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 h 后取出。每管加 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 洗涤，用 γ 计数器计数。

用酶联板包被 CD22 抗原，取 SM03 2 mg/L，依次 2 倍梯度稀释至终浓度为 0.156 mg/L；^{125}I-SM03 稀释至与 SM03 相同系列浓度；生物素标记 SM03 稀释为 2.5 mg/L。各取 200 μL SM03 和^{125}I-SM03 分别与稀释后的生物素-

SM03 按体积比 1∶1 混合，混合后的样品按每孔 100 μL 加至 96 孔酶联板，每个浓度设 2 个复孔，空白孔加样品稀释液。酶联板在 37 ℃下孵育 2 h 后洗板，按每孔 100 μL 加亲和素-辣根过氧化酶，37 ℃下孵育 1 h。洗板，显色，终止。用酶标仪在 450 nm 处测定每孔的 OD。

2.3 ^{125}I-SM03 的初步应用

取适量对数生长期的 Raji、Daudi 和 Ramos 细胞，离心去除培养液，用 PBS 溶液洗涤后，加入无血清 RPMI-1640 培养液调细胞浓度至 1×10^5/mL。取 9 支 0.5 mL 离心管，分别在各管加 100 μL Raji、Daudi 和 Ramos 细胞溶液，每种细胞设 3 个平行样品。与 ^{125}I-SM03 和 PBS 共孵育的细胞组作为总结合组，与 ^{125}I-SM03 和 SM03 共孵育的细胞组作为非特异性结合组。总结合组加入 10 mg/L ^{125}I-SM03 和 PBS；非特异性结合组加入未标记的 SM03 和 ^{125}I-SM03，未标记 SM03 最终浓度为 ^{125}I-SM03 浓度的 300 倍。每组设 3 个平行样品。将样品在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养 3 h，然后于 4 ℃放置 0.5 h。离心，弃上清。洗涤未结合的 ^{125}I-SM03。γ 计数仪测定与细胞结合的 γ 计数。

每个细胞结合的 SM03 量的计算方法：

每个细胞结合 SM03 的量＝(每管细胞结合 ^{125}I-SM03 的总放射性－非特异性结合放射性)×^{125}I-SM03 的放射性/每管加入细胞的数量

2.4 FITC-SM03 与淋巴瘤细胞表面抗原的结合

取适量对数生长期 Raji、Daudi 和 Ramos 细胞，离心去除培养液。用含 1% 叠氮钠的 PBS 溶液洗涤两次，用含 1% BSA 的 PBS 调细胞密度至 4×10^6/mL，加入 1.5 mL 离心管中，每管 0.5 mL。每管加入 4 μL FITC -SM03，以 7721 细胞作阴性对照。将加有淋巴瘤细胞的离心管置于冰上孵育 30 min，离心，用 PBS 洗涤。细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min，离心，弃上清，细胞用 PBS 洗涤，然后用 0.5 mL PBS 重悬。样品直接送检或放置 4 ℃冰箱 1 周内检测。

3 结果与讨论

3.1 ^{125}I- SM03 的放化纯度测定

SM03 和 ^{125}I-SM03 的液相色谱图示于图 1。SHPLC 法 3 次重复测定 ^{125}I- SM03 的放化纯度为 99.2%±0.5%。对比图 1A 与图 1B，可以看出，SM03 和 ^{125}I-SM03 的保留时间相同，均为 7.8 min。这表明标记后的 SM03 没有裂解或集聚。

^{125}I-SM03 纯化后的放射性和蛋白浓度曲线示于图 2。由图 2 可以看出，标记混合物经 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析后，放射性主峰与蛋白质主峰重叠，洗脱保留体积为 12.0 mL。蛋白 BCA 法定量测试结果表明，洗脱出的放射性主峰为 ^{125}I-SM03。Sephacryl S-300 HR 层析蛋白质回收率为 69.8%；γ 计数器检测放射性，放射性回收率为 47.0%。

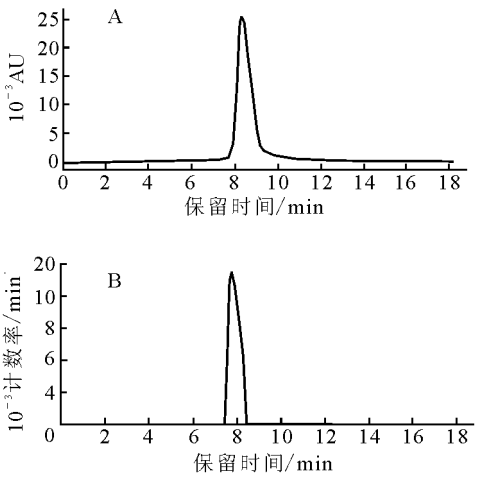

图 1 SM03 (A) 和 ^{125}I-SM03 (B) 的液相色谱图

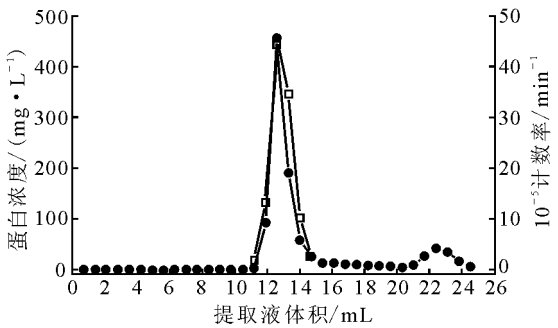

图 2 ^{125}I-SM03 纯化后的放射性和蛋白浓度曲线

●——放射性；□——蛋白浓度

3.2 ^{125}I-SM03 标记前后生物活性的鉴定

^{125}I-SM03 与 SM03 竞争结合 Ramos 细胞表面上 CD22 的 S 型曲线图示于图 3。由图 3 可见，SM03 浓度是 ^{125}I-SM03 浓度 0.001～300 倍时，SM03 对 ^{125}I-SM03 有竞争结合作用，SM03 和 ^{125}I-SM03 与 CD22 抗原结合的竞争呈剂量依赖性，说明 ^{125}I-SM03 和 SM03 与 Ramos 细胞结合是同一位点，^{125}I-SM03 对 CD22 抗原的高亲和力没有因为 ^{125}I 标记而破坏。^{125}I-SM03 和 SM03 与 CD22 抗原的结合活性比较示于图 4。图 4 显示，标记前后 SM03 对 CD22 包被板浓度-吸光度曲线的半数最大结合浓度相近，分别为

0.200 mg/L 和 0.203 mg/L。单因素方差分析结果表明标记前后 SM03 与 CD22 的结合性质差异无统计学意义（$P=0.907$）。

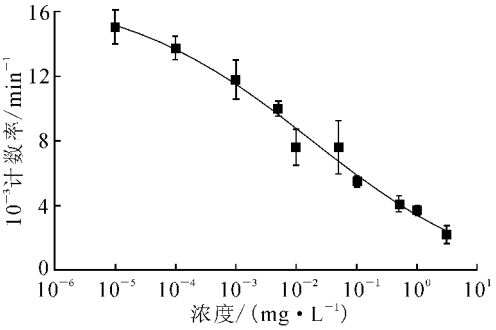

图 3　^{125}I-SM03 与 SM03 竞争结合 Ramos 细胞表面上 CD22 的 S 型曲线

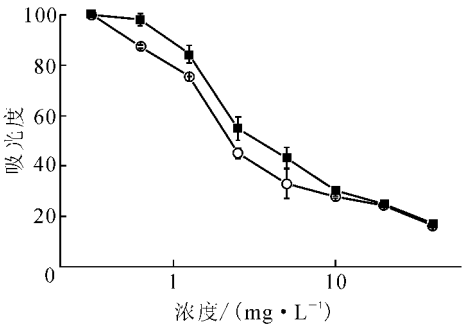

图 4　^{125}I-SM03 和 SM03 与 CD22 抗原的结合活性比较

■——^{125}I-SM03；○——SM03

3.3　不同淋巴瘤细胞表面 CD22 抗原的表达量

标记前后 SM03 与 CD22 抗原结合实验结果示于图 5。由图 5 可见，Raji、Daudi 与 Ramos 细胞株均属于高表达 CD22 的人非霍奇金氏淋巴瘤细胞，存在与 ^{125}I-SM03 的特异性结合。根据总结合量与非特异性结合量的差值计算特异性结合[4-5]，并比较 3 株细胞的特异性结合量，结果表明，Raji、Daudi 细胞对 ^{125}I-SM03 的结合量远少于 Ramos 细胞。根据 ^{125}I-SM03 的活度，可以得出每个 Ramos 细胞结合 ^{125}I-SM03 量为 20 pg(0.13 fmol)，与 Daudi 和 Raji 细胞结合量为 8.8 pg(0.06 fmol)和 10.2 pg(0.07 fmol)。

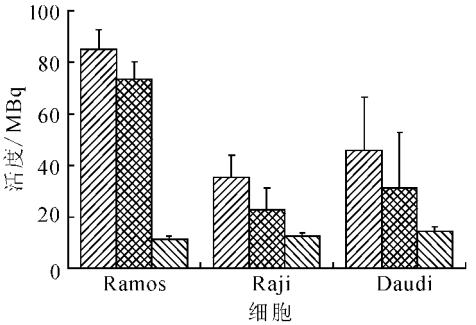

图 5　Raji、Daudi 和 Ramos 细胞与 ^{125}I-SM03 的结合

▨——总结合量；▩——特异性结合量；▧——非特异性结合量

3.4　FITC-SM03 与淋巴瘤细胞表面抗原结合

用流式细胞仪测定了 FITC-SM03 与 7721、Raji、Daudi 与 Ramos 细胞株的结合能力，结果示于图 6，由图 6 可知，^{125}I-SM03 与 Raji、Daudi 与 Ramos 细胞株的结合特点与 FITC-SM03 相似。Ramos 细胞结合量最多，其次为 Daudi 和 Raji 细胞。阴性对照 7721 细胞与 SM03 没有结合。以上结果表明，Ramos 表达 CD22 的量较多。样品中 FITC 荧光标记细胞大于总细胞数的 92%，显示绝大多数的淋巴瘤细胞表达 CD22 抗原。荧光抗体标记实验证明 Ramos 细胞表面 CD22 抗原表达量最丰富，这与 ^{125}I-SM03 标记后测定淋巴瘤细胞表面 CD22 抗原量的结果相同。

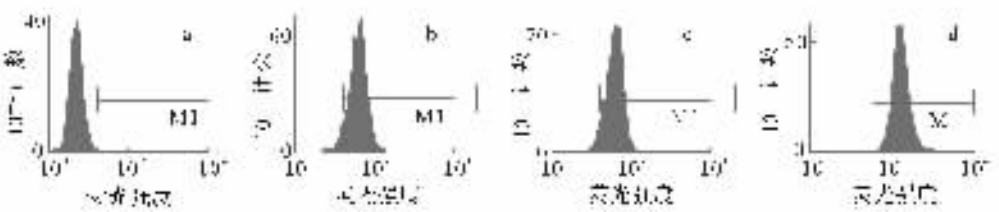

图 6　FITC-SM03 与淋巴细胞表面抗厚的结合

a——7721 细胞；b——Daudi 细胞；c——Raji 细胞；d——Ramos 细胞；M1——与 CD22 结合的细胞范围

4 结 论

在本实验中，采用 Indogen 方法对嵌合抗体 SM03 进行了 ^{125}I 标记，标记后 SM03 活性与未标记抗体的活性没有统计学差异，即 ^{125}I 与抗体结合没有影响它与抗原的结合能力，说明 Indogen 方法可以用于 SM03 的 ^{125}I 标记，并且不会影响抗体生物活性。Ramos 细胞为 CD22 抗原表达量最多的细胞，但并不意味着 SM03 对与 Ramos 具有相似细胞结构和生物特性的淋巴瘤有更好的杀伤作用，已有文献[3]证明，抗体的治疗作用与抗原的表达量无必然相关性，只能作为参考。有研究[6]表明，CD22 抗原的表达量要远低于 CD20 抗原。但表达量低并不意味着治疗效果差，因为不同抗体作为靶点的治疗机理是不同的。CD20 抗原主要作用机理是对靶细胞的杀伤作用，而 CD22 抗原主要作用机理是对靶细胞的调理作用。本研究小组正在申请将 SM03 用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤和自身免疫性疾病（如红斑狼疮）的临床实验。

参考文献：

[1] CESANO A, GAYKO U, BRANNAN C, et al. Differential Expression of CD22 in Indolent and Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma: Implications for Targeted Immunotherapy[J]. Blood, 2002, 100: 350.

[2] YANG L, LI DF, FENG XY, et al. Construction and Characterization of Recombinant Anti-B-lymphoma Chemeric Antibody[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2006, 15(3): 186-192.

[3] van HORSSEN PJ, van OOSTERHOUT Yv Jm, WITTET DE, et al. Cytotoxic Potency of CD22-Ricin A Depends on Intracellular Routing Rather than on the Number of Internalized Molecules[J]. Scandinavian J Immunology, 1995, 41 (6): 563-569.

[4] CATCHARD G. The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions[J]. Ann NY Acad Sci 1991, 51: 660-672.

[5] HU Ruihai, ZHANG Ying, ZHAO Minghui. Transferrin Receptor and Fc α/μ Receptor May Not Be the Major IgA1 Receptor on Human Mesangial Cells[J]. Chinese Medical Journal, 2005, 118(9): 781-785.

[6] ROSSMANN ED, LUNDIN J, LENKEI R, et al. Variability in B-cell Antigen Expression: Implications for the Treatment of B-Cell Lymphomas and Leukemias With Monoclonal Antibodies[J]. Hematol J, 2001, 2(5): 300-306.

专利简讯：

将铀(Ⅵ)与锕系元素(Ⅳ)和/或锕系元素(Ⅵ)分离的方法及其应用

【公开日】2007.11.21 【分类号】G21C19/46

【公开号】CN101076868 【申请日】2004.11.17 【申请号】200480020544.9

【申请人】原子能委员会；通用核材料公司

【文摘】本发明涉及一种从选自除铀(Ⅵ)以外的锕系元素(Ⅳ)和锕系元素(Ⅵ)的一种或多种锕系元素分离铀(Ⅵ)的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：a)使不与水混溶、含有所述铀和一种或多种所述锕系元素的有机相与含有至少一种缺位杂多阴离子的酸性水溶液接触，如果所述锕系元素或至少一种所述锕系元素为锕系元素(Ⅵ)，则该有机相还要与可以选择性还原该锕系元素(Ⅵ)的还原剂接触；b)从所述水溶液中分离所述有机相。应用：乏核燃料再处理，稀土、钍和/或铀矿石的处理。