

Rituximab 的碘标记方法及其 在正常小鼠体内的生物分布

杜延荣, 方红娟, 陈黎波, 李 方

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院核医学科, 北京 100730)

摘要: 采用 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)方法对 Rituximab(美罗华)进行标记, 并优化标记条件。系统考察了反应时间、NBS 用量、反应温度、反应体积、pH 值及 KI 的加入等条件对¹²⁵I-Rituximab 标记率的影响, 用 ITLC-SG 测定标记率和放化纯度。确定最佳条件为: 反应时间 2~3 min、pH 7.0、室温、反应体积 80 μ L 为反应最优条件。在最佳条件下, 5 次标记实验标记物的放化纯度为 93.9% \pm 1.6%。采用体外结合实验测定储存不同时间¹³¹I-Rituximab 的免疫活性, 结果表明随着¹³¹I-Rituximab 储存时间的增加免疫活性下降。正常小鼠静脉注射¹³¹I-Rituximab 后体内分布显示血液中放射性分布较高, 并可持续 6 d, 表明¹³¹I-Rituximab 体内稳定。异常毒性实验结果表明¹³¹I-Rituximab 毒性低。

关键词: Rituximab; 碘; 标记方法; 生物分布

中图分类号: TQ463.7 R817.3; R817.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7512(2007)02-0073-04

Iodination Conditions of Rituximab and Its Biodistribution in Mice

DU Yan-rong, FANG Hong-juan, CHEN Li-bo, LI Fang

(Department of Nuclear Medicine, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China)

Abstract: The effects of reaction time, amount of the NBS, reaction temperature, volume and pH on the labeling efficiency of ¹²⁵I-Rituximab are systematically studied. The labeling efficiency is more than 92% under the optimum labeling conditions. The labeling efficiency and radiochemical purity are detected by ITLC-SG. Binding test between Raji cells and ¹²⁵I-Rituximab are carried out. The results demonstrate that the binding of ¹³¹I-Rituximab and Raji cells is time dependent. The biodistribution in mice is detected. High distribution of radioactivity that lasted for 6 days is detected in blood after injection of ¹³¹I-Rituximab. It indicates the stability of ¹³¹I-Rituximab in vivo. The acute toxicity of the ¹³¹I-Rituximab is low.

Key words: rituximab; iodine; labeling method; biodistribution

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是最常见的淋巴系统恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率已居恶性肿瘤第 5 位。大多数 NHL 起源于 B 淋巴细胞, 95% 以上的 B 细胞 NHL 表达 CD20 抗原。Rit-

uximab(美罗华)是第一个获准用于治疗 NHL 的单抗产品。它是一种以基因工程技术研制的部分可变区(V 区)为鼠源, 其它部分为人源的高纯度针对 CD20 抗原的人鼠嵌合型单克隆抗体,

尽管其临床应用效果显著,但单独应用美罗华对大约半数复发的惰性淋巴瘤和 2/3 的复发侵袭性 NHL 患者无效^[1-3]。为了增强治疗效果,采用放射性核素标记的抗 CD20 抗体的放射免疫治疗日益受到重视。美国 FDA 已批准⁹⁰Y 标记的抗 CD20 抗体⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin) 用于治疗难治性、复发性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤^[4],但价格较贵。国内外用¹³¹I 标记美罗华治疗非霍奇金淋巴瘤的报道日渐增多^[5-8],但¹³¹I 标记美罗华的标记方法的研究尚未见报道。本工作旨在用 MATHER^[10]报道的 NBS 法探讨 Rituximab 的¹²⁵I 最佳标记方法,观察¹³¹I-Rituximab 的免疫活性及其在正常小鼠体内的代谢分布特征,为进一步研究 NBS 法制备的¹³¹I-Rituximab 对肿瘤的治疗效应提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及材料

单道谱仪:北京核仪器厂产品;CRC-15R 放射性核素活度计:美国 Capintec 公司产品;Rituximab(100 mg/10 ml):瑞士罗氏公司产品;Na¹²⁵I、Na¹³¹I:原子高科股份有限公司产品;N-溴代琥珀酰亚胺(NBS):Sigma 公司产品;人血清白蛋白:华兰生物制品有限公司产品;ITLC-SG:美国 Pall 公司产品;人 Raji 细胞:本院血液科提供;其余所有试剂均为国产,分析纯(A.R 级)。

1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠 30 只,体重 18~22 g,随机分为六组,每组 5 只,雌雄不限,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

2 试验方法

本试验采用 NBS 作为氧化剂进行碘标记。

2.1 Rituximab 的¹²⁵I 标记方法

标记瓶中加入 5 μ L Rituximab 和 10 μ L (3.7 MBq) Na¹²⁵I,混匀后加入一定量 0.5 g/L 的 NBS 溶液,适量的 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(PB),保持其它条件不变,分别考察反应时间、氧化剂用量、反应体积、pH 值、温度和碘载体(KI)的加入对¹²⁵I-Rituximab 标记率的影响。标记完成后加入 100 μ L 2% HSA 溶液终止反应,取样测标记率。用 ITLC-SG 法测标记率和放化纯度,展开剂为 V(甲醇):V(生理盐水)=85:15。

2.2 ¹²⁵I-Rituximab 标记物的体外稳定性

将标记物分成两份,一份室温放置,一份 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置,分别测定标记物标记后 24 h 内不同时间的放化纯度。

2.3 ¹³¹I-Rituximab 的免疫活性测定

采用细胞免疫结合率测定法测定¹³¹I-Rituximab 的免疫活性。将体外培养的人 Raji 细胞制备成含细胞数 3.5×10^5 个/ μ L,分别加入 50 μ L 标记后于 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置不同时间、放化纯度大于 94% 的¹³¹I-Rituximab 稀释液(放射性计数为 6×10^5 /min),非特异结合(NBS)管加入 5 μ L Rituximab,用 FCS-PBS 补足体积,分别于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,测定各管的总放射性计数,2 000 r/min 离心 3 min,吸出上清液,加入 FCS-PBS 200 μ L 离心洗涤三次,测沉淀细胞的放射性计数,计算放置不同时间的¹³¹I-Rituximab 的体外结合率。

2.4 安全性检查

按照中国药典 2005 版二部附录方法进行无菌、无细菌内毒素和异常毒性检查。

2.5 ¹³¹I-Rituximab 在小鼠体内生物分布

每只小鼠经尾静脉注射 0.1 mL 3.7 MBq 放化纯度为 94% 的¹³¹I-Rituximab。注射后于 1、4、24、36、72 和 144 h 从动物眼部取血 100 μ L 后将其断颈处死,解剖取出各主要脏器,称重并测定其放射性计数。计算每克脏器放射性摄取百分比(%/g)。

3 结果

3.1 最佳标记条件的确定

对 Rituximab 的碘标记条件进行了研究,使标记率 > 92%,不需纯化可直接使用。

3.1.1 反应时间对标记率的影响 反应时间对标记率的影响示于图 1。由图 1 可知标记率在 1 min 之内随时间延长而快速提高,而 2 min 以后,标记率的提高出现平台,反应 2~10 min 标记率都能达到 90% 以上。最终本实验确定反应时间为 2~3 min。

3.1.2 氧化剂的用量对标记率的影响 氧化剂的用量对标记率的影响示于图 2。由图 2 可知,Rituximab 为 50 μ g,Na¹²⁵I 为 3.7 MBq 时,氧化剂 NBS 的量为 1~4 μ g,标记率基本恒定。其含量过大或过小都会使标记率下降。因此选择 NBS 用量为 1~4 μ g。

3.1.3 反应体积对标记率的影响 体积对标记率的影响示于图 3。磷酸缓冲液主要作用是调节反应体系中的 pH 值。由图 3 可见,当 PB 体

积过小时、溶液 pH 缓冲不够时, 标记率也不高; 标记率随着反应体积增大而达到最大标记率, 之后随体积的增大而降低。这可能是由于体积增大, 反应基团的有效浓度降低, 分子相互作用相对减弱, 因此标记率下降。提示在大剂量标记时应注意将总体积控制在一定范围, 体积过大时可适当提高 PB 的浓度以便减小反应总体积。因此本次实验选择体积为 80 μL 。

3.1.4 pH 对标记率的影响 pH 对标记率的影响示于图 4。由图 4 显示, 在其它条件保持不变时, pH 为 6.0~7.0 时标记率随 pH 增大而升高; 到 7.0 时标记率达到最高, 随后再增大 pH, 标记率反而有所下降。因此本次实验确定 pH7.0 为最佳反应条件。

3.1.5 温度对标记率的影响 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 和室温条件下, 标记率有所不同, 分别为 70% 和 91%, 室温条件下标记率较高。由于反应时间较短, 温度对抗体的影响不大, 室温标记效果较好。因此选

择在室温下标记。

3.1.6 碘载体 (KI) 的加入对标记率的影响

碘载体 (KI) 的加入对标记率的影响列于表 1。表 1 显示加入 10 μL 10^{-8} mol/L KI (相当于放射性放大 1 000 倍) 对标记率影响不大, 加入 10^{-6} mol/L KI 的量超过 10 μL , 标记率迅速下降, 说明此时 I^{-} 已过量较多。

3.2 ^{125}I -Rituximab 的体外稳定性

^{125}I -Rituximab 在室温放置或冰箱放置, 稳定性均好, 冰箱放置 24 h 时其放化纯度基本稳定, 保持在 91%~93%。室温放置放化纯度有所下降, 由 $93\% \pm 1.2\%$ 下降到 $88.5\% \pm 0.6\%$ ($n=3$), 24 h 放化纯度下降 $<5\%$ 。

3.3 质控方法

ITLC-SG 法测定的标记率或放化纯度各组分 R_f : ^{125}I -Rituximab 为 0~0.2, Na^{125}I 为 0.8~1.0。

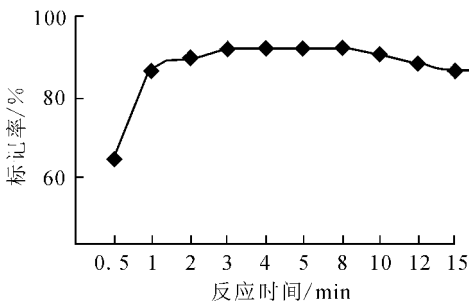


图 1 反应时间对标记率的影响

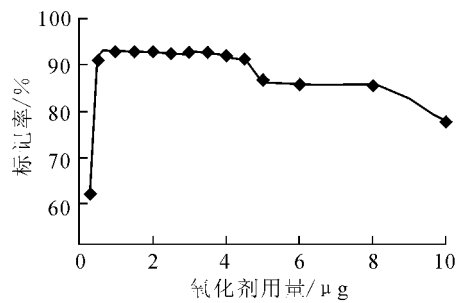


图 2 氧化剂 NBS 用量对标记率的影响

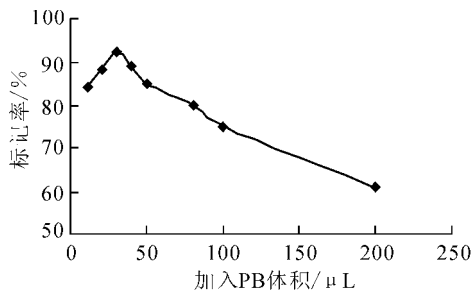


图 3 体积对标记率的影响

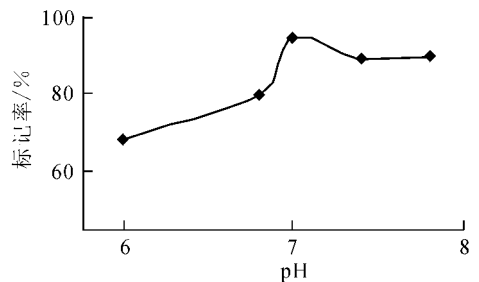


图 4 pH 对标记率的影响

表 1 碘载体 (KI) 的加入对标记率的影响 ($n=3$)

KI 浓度/(mol · L ⁻¹)	不同体积(μL)KI 的标记率/%				
	0	5	10	20	50
10^{-8}	92.8 ± 1.1	91.1 ± 1.2	91.2 ± 1.4		89.5 ± 1.7 84.5 ± 2.1
10^{-6}		85.4 ± 1.8	85.2 ± 3.5	53.4 ± 3.1	

3.4 ^{131}I -Rituximab 的免疫活性测定

将 ^{131}I -Rituximab 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别储存 0、1、2、3 d, 其结合率分别为 $53.1\% \pm 3.3\%$ 、 $42.5\% \pm 2.9\%$ 、 $23.3\% \pm 1.6\%$ 、 $10.1\% \pm 0.8\%$, 可以看出, 标记物的免疫活性随储存时间的增加而降低。

3.5 ^{131}I -Rituximab 的安全性检查

^{131}I -Rituximab 注射液普通菌和真菌培养均为阴性, 细菌内毒素检查也为阴性。给小鼠注射相当于 60 kg 人体注射剂量 100 倍的标记物 ^{131}I -Rituximab 溶液, 48 h 内小鼠活动情况正常, 无

死亡, 符合药典规定。

3.7 小鼠体内生物分布

标记物 ^{131}I -Rituximab 在正常小鼠体内的分布列于表 2。表 2 显示, ^{131}I -Rituximab 主要分布在血液中, 其次在血液含量丰富的器官如心脏和肺中放射性分布也较高, 6 d 后上述器官放射性分布仍然较高, 符合其为抗 CD20 抗体的分布特性^[7~9], 血液浓度高有利于其与淋巴肿瘤细胞表面的抗原结合。

表 2 ^{131}I -Rituximab 的小鼠体内分布 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

器官	不同时间的放射性摄取/(%·g ⁻¹)					
	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h	144 h
血	6.41±0.55	5.72±0.57	4.44±0.39	3.19±0.13	2.66±0.27	2.25±0.23
心	2.22±0.26	2.36±0.46	1.50±0.13	1.06±0.09	1.10±0.08	1.02±0.07
肝	1.38±0.14	1.35±0.14	1.28±0.10	0.53±0.04	0.40±0.09	0.32±0.05
脾	2.07±0.09	2.17±0.14	1.41±0.07	0.58±0.04	0.68±0.09	0.60±0.02
肾	2.06±0.10	1.94±0.06	1.52±0.08	0.92±0.11	0.90±0.07	0.63±0.09
肺	3.62±0.27	2.47±0.46	1.98±0.06	1.57±0.15	1.51±0.17	1.23±0.19
胃	1.98±0.12	2.11±0.20	0.53±0.10	0.55±0.13	0.69±0.06	0.44±0.10
脑	0.27±0.02	0.22±0.03	0.16±0.01	0.13±0.01	0.14±0.02	0.09±0.01
骨	1.38±0.22	0.97±0.05	0.77±0.04	0.61±0.08	0.62±0.07	0.52±0.04
小肠	1.20±0.26	1.34±0.19	1.16±0.08	0.87±0.11	0.54±0.09	0.32±0.03
肌肉	0.39±0.10	0.42±0.05	0.38±0.02	0.38±0.04	0.37±0.05	0.34±0.03

4 讨论

在碘标记单抗的众多方法中, 以氨基-T 法和 Iodogen 法最为常用, 但这两种方法标记率不高, 而且不适于大量标记。Mather 等^[10]报道的 NBS 法具有标记率高, 标记量大等优点, 是一种理想的标记方法, 近年来逐渐被人们采用。但对不同的单抗, 标记的条件可能会有所不同, 因此我们对 Rituximab 的碘标记条件进行了研究, 使标记率达到 92% 以上, 不需纯化可直接使用, 在进行大剂量标记时, 可大大减少对操作者的辐射。

本实验选择用放射活度小、半衰期长的 ^{125}I 代替放射活度大、半衰期短的 ^{131}I , 研究 ^{131}I 与 Rituximab 的最佳标记条件, 是基于它们的化学性质相同, 所以 ^{125}I 和 ^{131}I 与抗体结合的最佳标记条件基本相同, 且 ^{125}I 易于个人防护。找出最佳配比条件后, 用 ^{131}I 与 Rituximab 重复标记了

三次, 标记率与用 ^{125}I 标 Rituximab 的标记率基本相同。

由本实验确定, 反应时间 2~3 min、pH 7.0、室温、反应体积 $80\text{ }\mu\text{L}$ 为最优条件。本实验中 ^{125}I -Rituximab 为 $50\text{ }\mu\text{g}$, 3.7 MBq , 加入相当于放射性碘离子 1 000 倍的碘化钾, 对标记率影响不大, 但实际操作中为了确保较高标记率, 标记大剂量放射性碘时仍需将单抗及其它试剂剂量按比例放大。

虽然标记物在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存时放化纯度变化不大, 但体外结合实验证明, 随着储存时间延长, ^{131}I -Rituximab 的免疫活性下降, 提示标记物在标记完成后应尽快使用。正常小鼠血中放射性分布较高, 且 6 d 后仍较高, 说明 ^{131}I -Rituximab 体内稳定性好, 有利于其在肿瘤组织停留。

(下转 82 页)

参考文献:

- [1] 刘韬. B 细胞非霍奇金淋巴瘤的放射免疫治疗[J]. 现代肿瘤医学, 2003, 11(3): 228-230.
- [2] WITZIG TE, VUKOV AM, HABERMANN T M, et al. Rituximab Therapy for Patients With Newly Diagnosed, Advanced-stage, Follicular Grade I Non-Hodgkin's Lymphoma: A Phase II Trial in the North Central Cancer Treatment Group[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(6): 1 103-1 108.
- [3] MCLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, Link BK, et al. Rituximab Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy for Relapsed Indolent Lymphoma: Half of Patients Respond to a Four-dose Treatment Program[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(8): 2 825-2 833.
- [4] DARLENE M, FINK-BENNET T, KATHY T. ⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan in the Treatment of Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma[J]. J Nucl Med Tech, 2003, 31(2): 61-68.
- [5] ANDREAS OS, FRANZ B, MAREK K, et al. ¹³¹I-Rituximab; Relationship Between Immunoreactivity and Specific Activity[J]. J Nucl Med, 2004, (10): 1 784-1 790.
- [6] MAREN B, INGRID R, STEFANIE S, et al. Radioimmunotherapy Using ¹³¹I-rituximab in Patients with Advanced Stage B-cell non-Hodgkin's Lymphoma; Initial Experience[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005, 32(10): 1 225-1 233.
- [7] 李囡, 林保和, 扬志, 等. CD20 阳性 B 细胞 NHL ¹³¹I-美罗华放射免疫治疗剂量个体化的临床初步研究[J]. 同位素, 2004, 17(4): 204-209.
- [8] 魏莉, 罗荣城, 张军一, 等. ¹³¹I-rituximab 对 B 细胞淋巴瘤细胞生物学效应的试验研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(2): 211-213.
- [9] CRISTIAN A, ANGELIKA BD, MAREK K, et al. Repeated Injections of ¹³¹I-Rituximab Show Patient-Specific Stable Biodistribution and Tissue Kinetics[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(8): 943-951.
- [10] MATHER SJ, WARD BG. High Efficiency Iodination of Monoclonal Antibodies for Radiotherapy[J]. J Nucl Med, 1987, 28(6): 1 034-1 036.