

- [17] Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Antisense imaging of gene expression in the brain in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(26): 14709-14714.
- [18] Iyer M, Barrio JR, Namavari M, et al. 8-[18F] Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET [J]. J Nucl Med, 2001, 42(1): 96-105.
- [19] Wang ZZ, Qu W, Wang F, et al. Expression of somatostatin receptor reporter gene and its correlation with targeted imaging in vivo for detection of pancreas carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2005, 27(11): 663-666.
- [20] Tsakiridis A, Tzouanacou E, Larralde O, et al. A novel triple fusion reporter system for use in gene trap mutagenesis [J]. Genesis, 2007, 45(6): 353-360.
- [21] Glunde K, Bhujwala ZM. Will magnetic resonance imaging (MRI)-based contrast agents for molecular receptor imaging make their way into the clinic?[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(1):187-188.
- [22] Lewis MR. A "new" reporter in the field of imaging reporter genes: correlating gene expression and function of the sodium/iodide symporter [J]. J Nucl Med, 2006, 47(1): 1-3.
- [23] Winter PM, Neubauer AM, Caruthers SD, et al. Endothelial alpha (v)beta3 integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(9): 2103-2109.
- [24] Harris TD, Kalogeropoulos S, Nguyen T, et al. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin alpha v beta 3 receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18(4): 627-641.
- [25] Meoli DF, Sadeghi MM, Krassilnikova S, et al. Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction [J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1684-1691.
- [26] Inubushi M, Wu JC, Gambhir SS, et al. Positron-emission tomography reporter gene expression imaging in rat myocardium[J]. Circulation, 2003, 107(2): 326-332.
- [27] Wu JC, Chen IY, Wang Y, et al. Molecular imaging of the kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium [J]. Circulation, 2004, 110(6): 685-691.

(收稿日期: 2008-06-10)

放射性碘间接标记抗体方法的研究进展

李楠 李培勇

【摘要】放射性碘标记单克隆抗体已广泛应用于临床疾病的诊治。内化型抗体的应用越来越受到重视,常规运用的碘直接标记法包括 Iodogen 标记法、氯胺-T 标记法等,制备的碘标记单克隆抗体在体内容易脱碘和损伤抗体免疫活性的特性而阻碍了其在体内应用。如何对抗体进行有效的碘标记来减少体内脱碘和抗体免疫活性损伤,对运用碘标记抗体进行肿瘤治疗是十分重要的,研究表明,间接标记法是一种较为恰当的方案。

【关键词】同位素标记;碘放射性同位素;抗体,单克隆

The recent development of the strategy for indirect antibody radiolabel with iodine

LI Nan, LI Pei-yong

(Department of Nuclear Medicine, Shanghai Ruijing Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Radioiodine labeled monoclonal antibodies have been widely used in the diagnosis and treatment of diseases. With the more and more attention which is attached to the application of the internalized McAb. The usual direct labeling methods, including Iodogen and chloramine-T, lead to obvious deiodination and decline of the McAb's immunological activity which impede their utilization in vivo. There is great importance for the tumor treatment with the radioiodine labeled antibodies to invent a new method in order to avoid the disadvantage described above. It is showed that indirect labeling way is a suitable strategy. In this review, we are introducing the recent advance of this method.

【Key words】 Isotope label; Iodine radioisotopes; Antibodies, monoclonal

1 传统直接碘标记方法所暴露的弊端

传统的放射性碘标记法主要采用直接标记的方

式,包括 Iodogen 标记法、氯胺-T 标记法、乳过氧化物酶标记法等,前两种方法使用较为普遍^[1-2],二者都是通过氧化碘化钠,使得碘分子直接结合在化合物酪氨酸苯环羟基的邻位而达到标记的目的,

均能得到较高的标记率。但在对一些内化型抗体的研究中发现,用直接标记方法标记的抗体在体内分布研究中无法得到其相应的特异性结果^[3],如对 EGFRvIII 特异抗体 L8A4 进行碘标记,在荷瘤裸鼠尾静脉注入标记抗体后进行连续的体内放射性分布分析,结果显示,在 6 d 的分析中,正常组织如肝、脾、肾均有较高的放射性摄取,同时血液本底始终高于肿瘤组织^[4]。

1.1 脱碘的主要机制及其影响

(1) 碘原子结合在抗体酪氨酸苯环羟基邻位形成的结构与甲状腺素相似,容易遭到脱碘酶及溶酶体蛋白酶的“误杀”^[5-7]。

(2) 抗体中所含氨基酸残基主要为 L 型,而溶酶体酶对含 L-氨基酸的蛋白质有较高的亲和性,导致其被酶解^[8]。

(3) 被酶解的标记抗体上的碘大都以单碘酪氨酸形式存在^[9-10],很容易通过溶酶体膜及细胞膜游离出肿瘤组织,导致抗体特异的肿瘤组织放射性远低于预期值,同时靶/非靶比值降低。

1.2 直接标记法对抗体的影响

直接标记法对抗体的影响主要是在标记过程中氧化剂对抗体活性结构的破坏以及碘离子对抗体可变区活性基团酪氨酸位点的占用导致了抗体特异性降低^[11-12]。因此,采用一种新型的间接标记方法来避免或减轻上述现象成为目前研究的关键。

2 间接碘标记方法的进展

2.1 3-(4-羟苯基)-丙酸-N-琥珀酰胺酯[(succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl) propionate), Bolton-Hunter] 标记法

几乎在直接碘标记法诞生的同阶段, Bolton-Hunter 标记法被发明出来,为间接标记化合物开辟了先河。该法的特点是首先将碘标记在 Bolton-Hunter 试剂的苯环上,再将标记试剂与抗体连接。相对于直接法,采用这种方法标记的蛋白质和多肽在体内表现出较低的脱碘率和较高的活性。但它的标记率比较低,只有 15%~30%,由于标记碘仍位于苯环羟基的邻位,仍然较容易与苯环脱离,因此无法对抗体进行有效的体内示踪^[13-15]。

2.2 3-碘苯甲酸-N-琥珀酰亚胺酯[(N-succinimidyl-3-iodo-benzoate, SIB) 标记法

在 20 世纪 80 年代,人们开始尝试用亲电子脱

锡反应来标记一系列带有琥珀酰亚胺酯的化合物,如 SIB,它们与 Bolton-Hunter 试剂结构上的区别在于其少了苯环上的标记位点邻位的羟基,避免了与甲状腺素的结构相似,这被认为是相对与 Bolton-Hunter 标记法甲状腺摄碘减少 99% 的主要原因,同时 Bolton-Hunter 试剂苯环与活性酯间的两个甲基被去除而降低了对碘标记的干扰。通过预锡化的方法可以得到较高放射活性的碘标记 SIB(达 80%),因此该标记方法对抗体的标记率达到 Bolton-Hunter 标记法的 2 倍。在一定程度上提高了对抗体体内动力学的反应^[16]。

2.3 酪氨酸纤维二糖(tyramine cellobiose, TCB) 标记法

为了减少标记抗体在溶酶体中的降解,Zalutsky 等^[16]采用 TCB 作为标记体,这种标记复合物对溶酶体中的酶不敏感,提高了放射性碘在细胞内的停留,采用 TCB 标记法标记的抗体 L8A4 与 Iodogen 标记法标记的同一种抗体于高表达 EGFRvIII 的细胞进行培养后 7 h 进行细胞内放射性水平分析发现, Iodogen 标记组细胞中的放射性水平仅占投入量的 15%,而 TCB 标记组则达到了 30%。然而,TCB 标记法可以导致较强的蛋白交联以及这种方法伴随的放射性碘在正常组织的集聚,让人无法接受^[17]。

2.4 5-碘-3-吡啶甲酸-N-琥珀酰亚胺酯(N-succinimidyl-5-iodo-3-pyridinecarboxylate, SIPC) 标记法

考虑到带正电荷的物质如氯喹能够集聚在溶酶体中^[18], Reist 等^[17]设计了一种在溶酶体环境中带一价正电荷的标记模板 SIPC,它的带电位点位于吡啶氮环上。与 TCB 标记法类似,这种标记模板和蛋白的复合物同样对溶酶体酶有一定惰性。与 SIB 标记法标记相同的抗 EGFRvIII 型抗体 L8A4 相比,SIPC 标记法有效减轻了脱碘现象,肿瘤单位放射性、靶/非靶比值更高,它的优势在于所带正电荷导致的溶酶体内滞留作用。并且相对于 Iodogen 标记法,SIPC 标记法对抗体活性的影响明显减少,而在对同等抗体的标记中,TCB 标记法标记的抗体活性比 Iodogen 标记法低 11%~35%。

2.5 4-胍甲基-3-碘代苯甲酸-N-琥珀酰亚胺酯(N-succinimidyl-4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate, SGMIB) 标记法

虽然相对于 Iodogen 标记法,SIPC 标记法放射性碘在细胞内的停留提高了 65%,但这种优势却

极其短暂,在24 h后肿瘤中的放射性就会显著降低^[19],说明SIPC在溶酶体中的产物稳定性较差,不利于对抗体分布作长时间的观察和以后有可能用到的放射性碘治疗工作。Vaidyanathan等^[20]在SIB标记法基础上,在其苯环上引入一个胍基,制成模板SGMIB,希望它的更强碱性能提高产物在溶酶体内的稳定性,他们将SIPC标记法和Iodogen标记法作为对照,结果显示,SGMIB标记法和SIPC标记法的甲状腺摄取碘相对于Iodogen标记法都有显著降低,说明二者均具有较好的抗脱碘性,同时对抗体免疫活性的影响也基本相同;体外实验表明,SGMIB标记法细胞中的放射性计数是SIPC标记法的3~4倍,在之后的裸鼠体内实验中,采用SGMIB标记法标记的单位肿瘤细胞的放射性在1, 2, 3, 6 d比SIPC标记法分别高(25±7)%, (28±5)%, (28±7)%以及41±10%,说明SGMIB的细胞内产物稳定性更高。不过在正常组织当中,SGMIB标记法的放射性集聚也高于SIPC标记法,这可能是由于很多正常组织的细胞表面均带有负电荷所致^[21]。

2.6 Pentapeptide(D-KRYRR)标记法

同样是将标记模板引入正电荷以及降低它被溶酶体酶识别,Foulon等^[22]采用了另一种思路:将3个必需氨基酸中碱性最强(pH=13.2)的精氨酸接到标记酪氨酸位点旁,再加上一个用于连接抗体的赖氨酸,形成标记模板五肽KRYRR;同时,由于溶酶体酶对含有L型氨基酸的多肽有较强的水解作用^[9],KRYRR中全部采用D型氨基酸。在用D-KRYRR标记L8A4的同时,L-KRYRR以及Iodogen标记法被用作对照,结果表明,D-KRYRR标记法中单位肿瘤的放射性强度在各个测量时间都高于Iodogen法4~5倍。在与L-KRYRR的对比中,D-氨基酸的优势充分体现出来,从甲状腺摄取碘相对于后者明显降低可知,D-氨基酸在很大程度上降低了脱碘。之后,Foulon等^[22]又将它与SIPC标记法在同等环境下进行研究,发现在降低脱碘方面更胜一筹,分析可能是由于它的结构在溶酶体低pH环境中更加稳定。相对于SIPC,D-KRYRR在极大促进肿瘤摄取时,也显著提高了正常组织(如肝、脾、肾)的放射性摄取,即使这样也没有影响靶/非靶比值的增高。因此,提高溶酶体内停留比降低被溶酶体酶识别在提高肿瘤摄取标记抗体时具有更重

要的地位^[23]。

2.7 3-碘-4-磷酸苄基苯甲酸甲酯(3-iodo-4-phosphonomethylbenzoate, SIPMB)标记法

虽然采用带正电荷物质在促进细胞内放射性停留的作用明显,但如上所述,很多正常组织均带负电荷,由于静电的作用会导致正常组织的放射性吸收量增加,尤其表现为肾脏计数的升高。对糖基化Fab片段以及铜复合物的研究中发现,带负电荷的分子能有效避免在肾脏近曲小管的重吸收^[24-25],基于这种观点,Shankar等^[22]建立了一种在溶酶体pH下带负电荷的标记模板SIPMB,这种结构同样是以SIB为基础,但与SGMIB所连接的带正电的胍基相反,SIPMB连接了一个磷酸根。采用与SGMIB同等条件下的细胞及动物模型实验,结果显示,采用SIPMB标记法标记的¹²⁵I-SIPMB抗体在细胞及动物肿瘤中的放射性浓聚与SGMIB标记法标记的¹²⁵I-SGMIB抗体相似,均为Iodogen标记法的3~4倍,但理论上减少正常组织特别是肾脏放射性浓聚特性并没有体现出来,考虑是由于全抗体的分子质量较大(>150×10³)而不能被肾脏滤过所致。为此,该课题组又用SIPMB标记法标记了抗EGFRvIII的抗体片段MRI-I,并用以上的多种方法做对比,结果令人失望,SIPMB法标记的MRI-I在肾脏的聚集远高于其他方法,同时由于肾脏的高摄取还导致了肿瘤组织放射性的降低。说明肾脏的摄取是由多种因素决定的^[19],Akizawa等^[26]总结到分子形状、电荷大小及其分布排列是决定肾脏摄取的主要因素。

3 结语

目前开发出用于碘标记的多种新方法,包括SGMIB、D-KRYRR、SIPMA标记法,均可以有效降低标记药物在体内的脱碘并提高肿瘤组织的摄取,虽然同时也带来了正常组织的摄取增高,但相比于Iodogen、Bolton-Hunter、SIB标记法,它们更能明确反映肿瘤特异抗体在体内的分布和代谢过程,并为下一步分析抗体治疗效果以及采用¹³¹I进行放射性治疗打下良好的基础。然而,也不能因此忽视了这些标记化合物在正常组织中的放射性聚集以及合成复杂等缺点。研究一种合成简单、体内稳定强、能很好表达抗体特异性的标记方法,仍将是今后工作的主要方向。

参 考 文 献

- [1] Lambrecht FY, Durkan K, Yildirim Y, et al. Labeling of acetaminophen with I-131 and biodistribution in rats [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2006, 54(2): 245-247.
- [2] Panjideh H, Da Silva Coelho VC, Dermedde J, et al. Biodistribution and efficacy of [¹²⁵I]A33scFv: CDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer[J]. Int J Oncol, 2008, 32(4): 925-930.
- [3] Stein R, Govindan SV, Hayes M, et al. Advantage of a residualizing iodine radiolabel in the therapy of a colon cancer xenograft targeted with an anticarcino embryonic antigen monoclonal antibody[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(7): 2727-2734.
- [4] Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts[J]. Cancer Res, 1995, 55(19): 4375-4382.
- [5] Gereben B, Zeöld A, Dentice M, et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(4): 570-590.
- [6] Köhler J. Thyroid hormone metabolism and action [J]. Z Arztl Fortbild Qualitatssich, 2004, 98(Suppl 5): 17-24.
- [7] Bianco AC, Larsen PR. Cellular and structural biology of the deiodinases[J]. Thyroid, 2005, 15(8): 776-786.
- [8] Pujals S, Fernández-Carneado J, Ludevid MD, et al. D-SAP: a new, noncytotoxic, and fully protease resistant cell-penetrating peptide [J]. ChemMedChem, 2008, 3(2): 296-301.
- [9] Govindan SV, Stein R, Qu Z, et al. Preclinical therapy of breast cancer with a radioiodinated humanized anti-ECP-1 monoclonal antibody: advantage of a residualizing iodine radiolabel[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(2): 173-182.
- [10] Stein R, Govindan SV, Mattes MJ, et al. Improved iodine radiolabels for monoclonal antibody therapy [J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 111-118.
- [11] Holmberg M, Stibius KB, Ndoni S, et al. Protein aggregation and degradation during iodine labeling and its consequences for protein adsorption to biomaterials[J]. Anal Biochem, 2007, 361(1): 120-125.
- [12] Hayes DF, Noska MA, Kufe DW, et al. Effect of radioiodination on the binding of monoclonal antibody DF3 to breast carcinoma cells [J]. Nucl Med Biol, 1988, 15(3): 235-241.
- [13] Song SH, Jung KH, Paik JY, et al. Distribution and pharmacokinetic analysis of angiostatin radioiodine labeled with high stability[J]. Nucl Med Biol, 2005, 32(8): 845-850.
- [14] Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent[J]. Biochem J, 1973, 133(3): 529-539.
- [15] Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Preparation of N-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate: an agent for the indirect radioiodination of proteins[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 707-713.
- [16] Zalutsky MR, Xu FJ, Yu Y, et al. Radioiodinated antibody targeting of the HER-2/neu oncprotein: effects of labeling method on cellular processing and tissue distribution[J]. Nucl Med Biol, 1999, 26(7): 781-790.
- [17] Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate[J]. Cancer Res, 1996, 56(21): 4970-4977.
- [18] Michihara A, Toda K, Kubo T, et al. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(6): 947-951.
- [19] Shankar S, Vaidyanathan G, Kuan CT. Antie pidermal growth factor variant III scFv fragment: effect of radioiodination method on tumor targeting and normal tissue clearance [J]. Nucl Med Biol, 2006, 33(1): 101-110.
- [20] Vaidyanathan G, Affleck DJ, Bigner DD, et al. Improved xenograft targeting of tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III antibody labeled using N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate[J]. Nucl Med Biol, 2002, 29(1): 1-11.
- [21] Shankar S, Vaidyanathan G, Affleck DJ, et al. Evaluation of an internalizing monoclonal antibody labeled using N-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodo-4-phosphonomethylbenzoate ([¹²⁵I]SIPMB), a negatively charged substituent bearing acylation agent [J]. Nucl Med Biol, 2004, 31(7): 909-919.
- [22] Foulon CF, Reist CJ, Bigner DD, et al. Radioiodination via D-amino acid peptide enhances cellular retention and tumor xenograft targeting of an internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4453-4460.
- [23] Foulon CF, Welsh PC, Bigner DD, et al. Positively charged templates for labeling internalizing antibodies: comparison of N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate and the D-amino acid peptide KRYRR[J]. Nucl Med Biol, 2001, 28(7): 769-777.
- [24] Kobayashi H, Le N, Kim IS, et al. The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points[J]. Cancer Res, 1999, 59(2): 422-430.
- [25] Jones-Wilson TM, Deal KA, Anderson CJ, et al. The in vivo behavior of Copper-64-labeled azamacrocyclic complexes [J]. Nucl Med Biol, 1998, 25(6): 523-530.
- [26] Akizawa H, Uehara T, Arano Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(12): 1319-1328.

(收稿日期: 2008-06-08)