

文章编号:0253-9950(2008)01-0017-06

^{90}Y 标记的不同氨基酸序列的 RGD 环肽的制备及在荷人神经胶质瘤动物模型中的评价

赵慧云¹, 贾兵^{1, 2}, 史纪云^{1, 2}, 王凡^{1, 2, *}

1. 北京大学医学同位素研究中心, 北京 100083;

2. 中国原子能科学研究院同位素研究所, 北京 102413

摘要:制备 ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf)和 ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-c(ERGDf),并对其体外性质进行比较。ITLC和HPLC分析结果表明,在pH=5.5和80℃条件下反应20min,2种标记物的标记率均大于99%,并且2种标记物均具有良好的体外稳定性。荷人神经胶质瘤裸鼠生物分布实验数据表明,2种标记物在各组织的摄取没有显著性差异,且均具有良好的肿瘤靶向性和体内稳定性。2种标记物主要通过肾脏排泄,同时也有一部分标记物通过肝胆系统排泄。良好的体外性质证明,KRGDf环肽和ERGDf环肽均可进一步用于聚合物多肽药物的开发。

关键词: ^{90}Y ;KRGDf环肽;ERGDf环肽;标记;生物分布

中图分类号:O615.4 文献标志码:A

Preparation of ^{90}Y -Labeled Different Cyclic RGD Peptides and Evaluation in Nude Mice Bearing Human Glioma Xenografts

ZHAO Hui-yun¹, JIA Bing^{1, 2}, SHI Ji-yun^{1, 2}, WANG Fan^{1, 2, *}

1. Peking University Medical Isotopes Research Center, Beijing 100083, China;

2. Department of Isotopes, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China

Abstract: ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf) and ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-c(ERGDf) were prepared, and their *in vitro* and *in vivo* properties were compared. ITLC and HPLC show that the labeling yields of both compounds are more than 99% under the optimal conditions (pH=5.5, reacting at 80℃ for 20min), and they are stable *in vitro*. The biodistribution in nude mice bearing human glioma xenografts reveals no significant difference between these two radiolabeled compounds on uptake for all of tissues at the experimental time points; and pretty good tumor targeting and *in vivo* stability; and two radiolabeled compounds are mainly excreted through kidneys, partly excreted through hepatobiliary system. The experimental data demonstrate that both of cyclic KRGDf and cyclic ERGDf are suitable for the further development of polymer-conjugated RGD peptide drugs.

Key words: ^{90}Y ; cyclic KRGDf; cyclic ERGDf; radiolabeling; biodistribution

收稿日期:2006-11-04;修订日期:2007-07-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30640067)

作者简介:赵慧云(1967—),女,北京人,主管技师,从事放射性药物研究

* 通讯联系人:王凡,研究员, wangfan@bjmu.edu.cn

整合素(integrin) $\alpha_v\beta_3$ 是细胞表面一类重要的兼具粘附和信号转导功能的受体,它是由 α 和 β 亚基通过非共价键组成的异二聚体。快速增生的内皮细胞表面和许多肿瘤细胞表面均高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ ^[1]。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 特异性识别细胞外基质中含有 RGD(Arg-Glu-Asp) 序列的蛋白和多肽,调控着肿瘤的血管形成、生长和转移^[2-3]。研究发现实体肿瘤的生长依赖于血管的生成,因此许多研究聚焦在如何抑制这一过程的进行^[4]。含有 RGD 序列的小肽可以起到抑制血管生成的作用^[5],因此 RGD 多肽在癌症治疗中被广泛应用。

放射性标记的多肽是放射性药物的重要组成部分^[6]。目前有很多关于以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为靶点的不同放射性核素标记的 RGD 多肽的研究报道,其中动物实验中涉及的肿瘤模型有神经胶质瘤、黑色素瘤、乳腺癌、骨肉瘤和胰腺癌^[7-12]。使用 ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu 等核素标记多肽时,需要引入适当的双功能螯合剂,而 Bz-DTPA 已被证明是一种有效的双功能螯合剂。在目前已使用的治疗用放射性核素中,由于 ^{90}Y 有合适的半衰期($T_{1/2}=64.0\text{ h}$)、纯 β^- 衰变和中等的 β^- 射线能量($E_{\text{max}}=2.28\text{ MeV}$)、衰变后子体稳定等特点,因而被认为是靶向治疗的首选放射性核素之一。

本研究以 Bz-DTPA 为双功能螯合剂,用 ^{90}Y 标记 2 种不同氨基酸序列的 RGD 环肽,并对其在荷

人神经胶质瘤裸鼠模型中的生物分布进行比较。

1 实验材料

1.1 主要试剂

$^{90}\text{YCl}_3$, 美国 Perkin Elmer 公司; DTPA-Bz-NH-SA-c (KRGDf) 和 DTPA-Bz-NH-c (ERGDf), 结构示于图 1, 美国 M. D. Anderson 癌症中心 Li Chun 教授馈赠; 醋酸钠、醋酸胺、醋酸、乙腈, 色谱纯, 美国 J. T. Baker 公司; 其它化学试剂, 分析纯, 北京试剂公司; 快速薄层层析-硅胶纸(ITLC-SG), 美国 Gelman 公司。

实验所涉及的所有溶液及容器均经去离子处理, 所有实验用水为去离子水(18.2 M Ω), HPLC 所用溶剂在使用前均经 0.22 μm 滤膜过滤。

1.2 仪器

CRC-15R 放射性活度计, 美国 Capintec 公司; 1470-002 全自动 γ 计数仪, 美国 Perkin Elmer 公司; AR-2000 放射性薄层扫描仪, 美国 Bioscan 公司; HP1100 高效液相色谱(带有 Berthold 公司的 LB-509 放射性检测器), 美国安捷伦公司; Agilent Zorbax SB-C18 反相色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 美国安捷伦公司。

1.3 实验动物

BALB/c 裸鼠, 4~5 周龄, 雌性, 约 20 g, 由北京大学医学部实验动物中心提供。

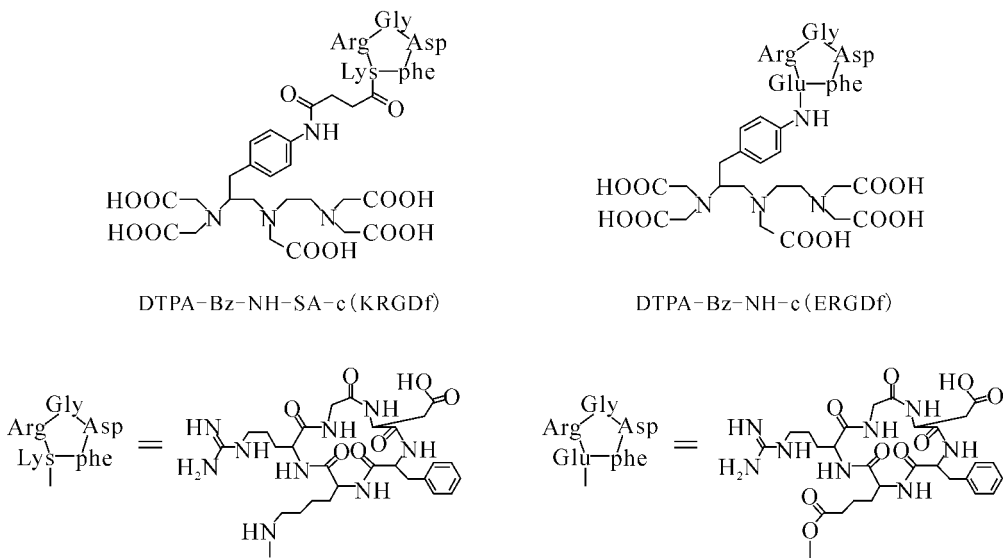


图 1 2 种 RGD 环肽的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of two cyclic RGD peptides

2 实验方法

2.1 DTPA-Bz-NH-SA-c (KRGDf) 和 DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)的⁹⁰Y 标记

在 Eppendorf 管中分别加入 10 μ g 的 DTPA-Bz-NH-SA-c (KRGDf) 和 DTPA-Bz-NH-c (ERGDf) (1.0 g/L, 溶于 H₂O), 再加入 pH 值分别为 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液 200 μ L, 最后加入 20 μ L ⁹⁰YCl₃ (约 74 MBq), 混匀, 80 $^{\circ}$ C 水浴反应 20 min 后取样测量标记率。

2.2 质量控制方法

2.2.1 快速薄层层析法(ITLC) 点样于 ITLC-SG 板(10 mm \times 100 mm), 在 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH=5.0)体系中上行展开, 自然晾干后用放射性薄层扫描仪测量并计算标记率或放射化学纯度。

2.2.2 HPLC 法 流动相为 25 mmol/L, pH=5.0 的醋酸钠缓冲液(A)和乙腈(B), 流速 1.0 mL/min。线性洗脱梯度: 0~2 min, 10% B; 5 min, 15% B; 20 min, 20% B; 25 min, 10% B。所有用于 HPLC 分析的样品上样前均和 10 mmol/L EDTA(体积比 1:1)室温反应 5 min, 以便使 EDTA 能够充分络合游离的⁹⁰Y³⁺。

2.3 体外稳定性实验

将 2 种标记物分别加入到生理盐水中, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 于 1, 4, 8, 12, 24 h 通过 ITLC 法检测标记物的放射化学纯度。

2.4 细胞培养及肿瘤模型建立

U87MG 人神经胶质瘤细胞(上海肿瘤研究所提供)用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中常规培养传代。

取 4~5 周龄裸鼠, 每只右侧上肢腋下接种 U87MG 细胞 2×10^6 个, 饲养于 SPF 级动物房。待肿瘤平均直径达到 0.8~1.0 cm 时用于实验。

2.5 生物分布

将 40 只荷瘤裸鼠随机分成 2 组, 每组 20 只。每组分别经尾静脉注射 2 种不同的标记物(100 μ L, 约 555 kBq), 并于注射后 0.5, 1, 2, 4, 24 h 按组(每组 4 只)将实验小鼠处死, 取血及主要脏器, 称重并测量放射性计数, 经衰变校正后计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g)。

除骨组织外, 其余小鼠组织样品均使用 2 mol/L NaOH 消化, 而后连同注射的标准样品和

骨组织一起用生理盐水调整体积到 1.5 mL, 用 γ 计数器测量放射性计数。

2.6 数据分析

使用 Prism 4.0 软件对实验数据进行分析, $P \leq 0.05$ 被认为有显著性差异。

3 结果和讨论

3.1 DTPA-Bz-NH-SA-c (KRGDf) 和 DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)的⁹⁰Y 标记

pH 对标记率(Y)的影响结果示于图 2。图 2 结果表明, 反应 pH 值对标记率有较大的影响, 在 pH=5~6 时可获得较高的标记率, pH=5.5 时标记率最高, 2 种标记物的标记率均大于 99%。

3.2 质量控制

3.2.1 ITLC 法 在柠檬酸盐缓冲体系中, 游离的⁹⁰Y³⁺ R_f 值为 0.9~1.0, 标记化合物的 R_f 值为 0.0~0.1。

3.2.2 HPLC 分析 ⁹⁰Y 标记物的 HPLC 分析结果示于图 3。⁹⁰Y-EDTA 的保留时间为 3.2 min; ⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf)的保留时间为 11.3 min 和 12.2 min; ⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)的保留时间为 10.2 min 和 11.1 min。根据分析结果可以看出, 2 种标记物分别存在 2 种异构体, 本实验结果同 Wang 等^[13]用¹¹¹In 标记该肽的结果类似。Wang 的实验证实 2 种异构体均具有生物活性。从标记物保留时间的不同可以推断, 由于分子结构的改变使 2 种标记物的极性产生了变化, 2 种标记物的脂溶性会有所不同。

3.3 体外稳定性

标记物的放射化学纯度随时间的变化曲线示

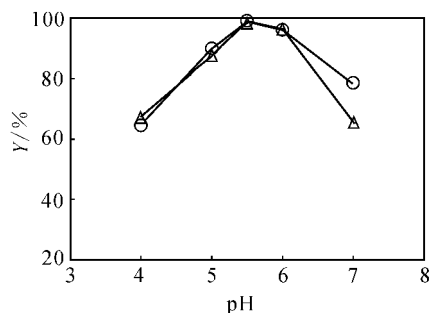


图 2 pH 对标记率的影响

Fig. 2 Effect of pH on labeling yield

△——⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf),

○——⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)

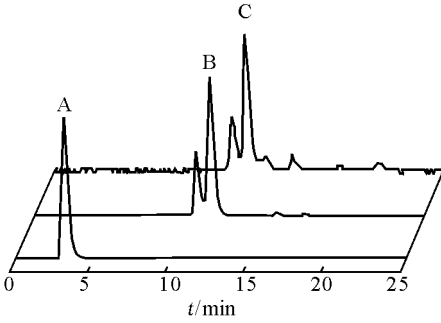
图 3 ^{90}Y 标记物的放射性 HPLC 图谱

Fig. 3 Radio-HPLC chromatogram of three ^{90}Y -labeled compounds
 A— ^{90}Y -EDTA,
 B— ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-c(ERGDf),
 C— ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf)

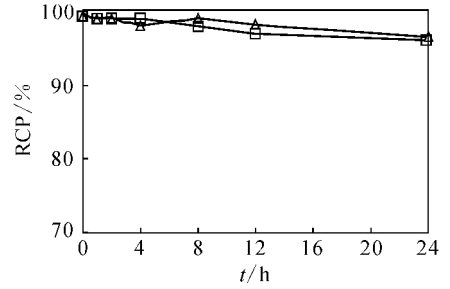


图 4 2 种标记物的体外稳定性

Fig. 4 *In vitro* stability of two ^{90}Y -labeled cyclic RGD peptides
 □— ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf),
 △— ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)

于图 4。从图 4 的实验结果可以看出,2 种标记物在生理盐水中放置 24 h 后,放射化学纯度仍保持在 95% 以上,体外稳定性良好。作为双功能螯合剂的 Bz-DTPA 由于引入一个苄基实现了与 RGD 环肽的偶联,并未占用任何一个游离的羧基,因而 ^{90}Y 与 Bz-DTPA 络合的稳定性要高于未引入苄基而直接与 RGD 偶联的 DTPA。

3.4 生物分布

本研究中 2 种标记物在荷人神经胶质瘤裸鼠的体内生物分布数据列于表 1。在观察的 5 个时相中 2 种标记物在小鼠体内的生物分布数据没有显著性差异 ($P > 0.05$)。2 种标记物均有较好的

肿瘤靶向性。肝、肠和肾均有较高的吸收,显示 2 种标记物代谢途径相似,主要通过肾脏排泄,同时也有相当一部分标记物通过肝胆排泄。2 种标记物在血液中的放射性摄取均较低,血液清除快,符合多肽药物的特点。 ^{90}Y 为亲骨核素,游离的 $^{90}\text{Y}^{3+}$ 易沉积于骨组织上,本实验中骨组织的放射性摄取随时间呈降低趋势,显示标记物具有良好的体内稳定性。2 种标记物的瘤对血的 T/NT 比值随时间呈增加趋势(图 5),注射后 24 h, ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf) 的 T/NT 比值为 121.0, ^{90}Y -DTPA-Bz-NH-c(ERGDf) 的 T/NT 比值为 87.4;瘤对肌肉的 T/NT 比值呈稳定趋势,未随时间有明显变化。

表 1 2 种标记物在荷人神经胶质瘤裸鼠的体内生物分布

Table 1 Biodistribution of two ^{90}Y -labeled cyclic RGD peptides in nude mice bearing human glioma xenografts

组织 (Tissues)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage of the injected dose per gram of tissue mass) / (%ID · g ⁻¹)				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	24 h
^{90}Y -KRGDf					
血 (Blood)	0.85 ± 0.15	0.17 ± 0.08	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
肝 (Liver)	2.88 ± 0.37	2.64 ± 0.44	2.30 ± 0.33	2.08 ± 0.73	1.76 ± 0.32
脾 (Spleen)	1.89 ± 0.17	1.73 ± 0.35	1.54 ± 0.23	1.47 ± 0.64	1.99 ± 0.15
肾 (Kidney)	5.84 ± 1.05	3.65 ± 0.34	3.58 ± 0.33	2.97 ± 0.64	2.30 ± 0.32
胃 (Stomach)	3.17 ± 0.28	2.10 ± 0.47	1.44 ± 0.14	1.57 ± 0.24	1.00 ± 0.26
肠 (Intestines)	3.61 ± 0.70	4.10 ± 0.76	4.15 ± 0.51	3.08 ± 1.00	2.03 ± 0.12
心 (Heart)	1.05 ± 0.12	0.56 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.40 ± 0.12	0.35 ± 0.05
肺 (Lung)	2.38 ± 0.33	1.04 ± 0.23	0.85 ± 0.11	0.75 ± 0.25	0.57 ± 0.09
肌肉 (Muscle)	0.70 ± 0.11	0.34 ± 0.08	0.29 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.01
骨 (Bone)	1.12 ± 0.09	0.28 ± 0.10	0.47 ± 0.07	0.31 ± 0.15	0.56 ± 0.14
肿瘤 (Tumor)	3.30 ± 0.60	2.20 ± 0.83	1.85 ± 0.41	1.87 ± 0.10	0.99 ± 0.02

续表

	组织(Tissues)	每克组织百分注射剂量率(Percentage of the injected dose per gram of tissue mass) / (%ID · g ⁻¹)				
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	24 h
⁹⁰ Y-ERGDf	血(Blood)	0.94±0.25	0.26±0.07	0.05±0.03	0.03±0.00	0.01±0.00
	肝(Liver)	2.90±0.41	3.54±0.72	3.08±0.80	2.43±0.56	2.02±0.18
	脾(Spleen)	2.63±0.82	1.83±0.45	2.00±0.39	2.33±0.76	1.56±0.29
	肾(Kidney)	5.64±1.09	3.85±0.41	2.91±0.42	2.83±0.56	2.43±0.09
	胃(Stomach)	3.86±0.39	2.92±0.24	2.13±0.33	1.93±0.27	1.29±0.29
	肠(Intestines)	5.10±0.18	5.06±0.83	4.45±1.13	3.42±1.00	2.16±0.27
	心(Heart)	1.11±0.24	0.78±0.11	0.54±0.11	0.51±0.07	0.44±0.07
	肺(Lung)	2.65±0.54	1.68±0.32	1.09±0.20	0.93±0.13	0.73±0.10
	肌肉(Muscle)	0.67±0.10	0.42±0.08	0.32±0.02	0.29±0.03	0.23±0.03
	骨(Bone)	0.91±0.29	0.76±0.26	0.73±0.14	0.77±0.45	0.65±0.16
	肿瘤(Tumor)	3.19±0.80	2.64±0.59	1.93±0.28	1.91±0.56	1.21±0.49

注(Note): n=4

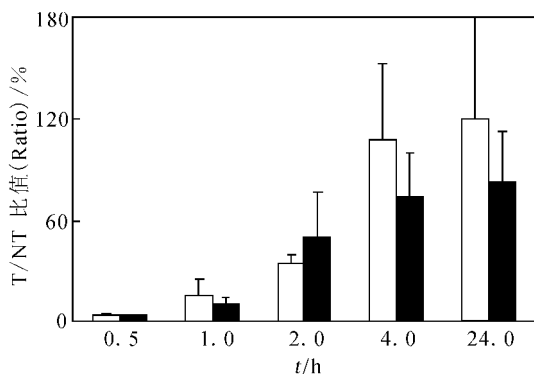


图 5 2 种标记物肿瘤与血 T/NT 比值

Fig. 5 T/NT ratios of tumor vs blood

□——⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf),■——⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)

Haubner 等^[11]最早报道了放射性标记的 RGD 多肽用于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体显像的研究工作,使用碘标记的 RGD 环肽 c(RGDyV)在注射后 4 h 肿瘤(M21 黑色素瘤)的摄取仅为 0.41 %ID/g,并且该标记物主要通过肝胆排泄,导致肝脏对放射性摄取偏高。随后的大量研究工作集中在如何改变放射性标记的 RGD 多肽的药代动力学性质及提高它的亲和力上。取代 RGD 分子中的缬氨酸为赖氨酸或者连接上亲水的糖基和 PEG,可以提高标记物的肾排谢^[8,14]。尽管本研究中含有谷氨酸的标记物⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-c(ERGDf)和含有赖氨酸的标记物⁹⁰Y-DTPA-Bz-NH-SA-c(KRGDf)在肝脏的摄取没有明显差别

($P>0.1$),但在注射后 1 h 和 2 h,其肝脏的放射性摄取分别为 (3.54 ± 0.72) , (3.08 ± 0.80) %ID/g 和 (2.64 ± 0.44) , (2.30 ± 0.33) %ID/g,说明赖氨酸取代后的标记物与谷氨酸取代后的标记物相比,能够降低肝脏的摄取。

聚合物多肽药物可进一步提高肿瘤对药物的摄取,以便更有效地对肿瘤进行治疗^[15]。含有谷氨酸和含赖氨酸的 RGD 环肽具有相似的体内外性质,而它们却分别具有游离的氨基和羧基,因而可以分别用于具有不同表面修饰功能基团的靶向高分子聚合物药物的研究,为肿瘤治疗带来新的方法。

参考文献:

- [1] Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD)-Peptide Binds to Both Tumor and Tumor Endothelial Cells *in Vivo* [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5 139-5 143.
- [2] Harris T D, Kalogeropoulo S, Ngugen 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: 627-641.
- [3] Su Z F, He J, Rusckowski M, et al. *In Vitro* Cell Studies of Technetium-99m Labeled RGD-HYNIC Peptide, a Comparison of Tricine and EDDA as Co-Ligands [J]. *Nucl Med Biol*, 2003, 30: 141-149.
- [4] Liekens S, Declercq E, Neyts J. Angiogenesis: Regulators and Linical Applications [J]. *Biochem*

- Pharmacol, 2001, 61: 253-270.
- [5] Allman R, Cowburn P, Mason M. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of a Cyclic Peptide With Affinity for the $\alpha_v\beta_3$ Integrin in Human Melanoma Cells[J]. Eur J Cancer, 2000, 36: 410-422.
- [6] Boerman O C, Oyen W J, Corstens F H. Radio-Labeled Receptor-Binding Peptides: A New Class of Radiopharmaceuticals[J]. Semin Nucl Med, 2000, 30: 195-208.
- [7] Liu S, Cheung E, Rajopadhye M, et al. Isomerism and Solution Dynamics of ^{90}Y -Labeled DTPA-Biomolecule Conjugates[J]. Bioconjug Chem, 2001, 12: 84-91.
- [8] Haubner R, Wester H J, Burkhart F, et al. Glycosylated RGD-Containing Peptides: Tracer for Tumor Targeting and Angiogenesis Imaging With Improved Biokinetics[J]. J Nucl Med, 2001, 42: 326-336.
- [9] Van Hagen P M, Breeman W A, Bernard H F, et al. Evaluation of a Radiolabelled Cyclic DTPA-RGD Analogue for Tumour Imaging and Radionuclide Therapy[J]. Int J Cancer, 2000, 90: 186-198.
- [10] Sivolapenko G B, Skarlos D, Pectasides D, et al. Imaging of Metastatic Melanoma Utilising a Technetium-99m Labelled RGD-Containing Synthetic Peptide[J]. Eur J Nucl Med, 1998, 25: 1 383-1 389.
- [11] Haubner R, Wester H J, Reuning U, et al. Radio-labeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists: A New Class of Tracers for Tumor Targeting [J]. J Nucl Med, 1999, 40: 1 061-1 071.
- [12] Haubner R, Wester H J, Weber W A, et al. Non-invasive Imaging of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Expression Using ^{18}F -Labeled RGD-Containing Glycopeptide and Positron Emission Tomography[J]. Cancer Res, 2001, 61: 1 781-1 785.
- [13] Wang W, McMurray J S, Wu Q P, et al. Convenient Solid-Phase Synthesis of Diethylenetriaminepenta-Acetic Acid (DTPA)-Conjugated Cyclic RGD Peptide Analogues[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2005, 20: 547-556.
- [14] Chen X, Park R, Shahinian A H, et al. Pharmacokinetics and Tumor Retention of ^{125}I -Labeled RGD Peptide Are Improved by PEGylation [J]. Nucl Med Biol, 2004, 31: 11-19.
- [15] Wester H J, Kessler H. Molecular Targeting With Peptides or Peptide-Polymer Conjugates: Just a Question of Size? [J]. J Nucl Med, 2005, 46: 1 940-1 945.