

文章编号:0253-9950(2008)02-0070-05

^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的制备 及正常鼠体内生物分布

圣 锋^{1, 2}, 贺巍巍¹, 刘昭飞¹, 赵慧云¹, 贾 兵^{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 ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer, 并对其体外性质进行比较。TLC 和 HPLC 分析结果表明, 在 pH=5.0 和 100 °C 条件下反应 15~20 min, 2 种标记物的标记率均大于 95%, 并且在室温条件下 2 种标记物均保持良好的体外稳定性。HPLC 分析结果和脂水分系数 lg *P* 测定结果证实, ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 的脂溶性高于 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer。生物分布实验数据显示, 注射后 4 h, 除了血液和脾, ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 在其它组织中的摄取明显高于 ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer, ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 的体内稳定性远好于 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer。Bz-DOTA 更适于作为双功能螯合剂用于 RGD dimer 的 ^{177}Lu 标记。

关键词:RGD 二聚体; ^{177}Lu ; DOTA; DTPA; 生物分布

中图分类号:O615.4 文献标志码:A

Preparation of ^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD Dimer and Biodistribution Evaluation in Normal Mice

SHENG Feng^{1, 2}, HE Wei-wei¹, LIU Zhao-fei¹,
ZHAO Hui-yun¹, JIA Bing^{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: ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer and ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer were prepared, and the *in vitro* and *in vivo* properties were compared. TLC and HPLC show that the labeling yields of two radiolabeled compounds are more than 95% under optimal conditions (pH=5.0, reacting at 100 °C for 15-20 min), and the two radiolabeled compounds show pretty good *in vitro* stability. HPLC analyses and lg *P* values reveal that lipophilicity of ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer is higher than ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer. The uptake of ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer in other tissues is significantly higher than that of ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer at 4 h postinjection, except for blood and spleen. The *in vivo* stability of ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer is much better than ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer. Bz-DOTA is an ideal bifunctional chelator for ^{177}Lu labeling of RGD dimer.

收稿日期:2006-11-07; 修订日期:2007-08-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30640067)

作者简介:圣 锋(1981—), 男, 江苏如皋人, 硕士研究生, 分析化学专业

* 通讯联系人:王 凡, 研究员, wangfan@bjmu.edu.cn, 010-82801145

Key words: RGD dimer; ^{177}Lu ; DOTA; DTPA; biodistribution

血管生成 (angiogenesis) 是恶性肿瘤生长和转移所必需的^[1-2]。没有足够的血管, 肿瘤就会坏死或凋亡^[3]。作为与新生血管相关的分子标志物之一的整合素 $\alpha_v\beta_3$ (integrin $\alpha_v\beta_3$) 是一个内皮细胞表面受体, 在新生血管中有高表达, 而在已存在的血管中不表达或表达很低^[3-4]。另外研究也发现某些肿瘤细胞表面也高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ ^[5-6]。正是上述特点使整合素 $\alpha_v\beta_3$ 成为一个非常有吸引力的靶点, 用于肿瘤的诊断和治疗^[1-2, 4]。噬菌体展示研究证实, 含有三肽序列 Arg-Gly-Asp (RGD) 的配体与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 具有特异性和高亲和力^[7], 因此, 用不同放射性核素标记的含 RGD 的多肽放射性药物已经受到广泛关注, 并用于肿瘤的 SPECT 和 PET 显像以及肿瘤治疗的研究^[8-12]。

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, 不同的双功能螯合剂会引起标记物体内性质的改变^[13]; 另外, 在多肽与双功能螯合剂之间引入药代动力学修饰分子 (PKM), 也可以改善标记物的某些体内性质^[14]。众多用于 RGD 多肽标记的核素当中, ^{177}Lu 有着优良的物理性质, 较长的半衰期 (6.67 d), 同时发射 γ 射线 (113 ~ 208 keV) 和 β^- 粒子 (约 497 keV), 既能用于显像又能用于治疗, 是一个有着良好发展前景的核素^[15-16]。

本研究用 ^{177}Lu 标记 2 种连有不同螯合剂的 RGD 多肽衍生物: DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 和 DTPA-Bz-Cys-RGD dimer, 考察 2 种标记物在化学性质以及正常鼠体内生物分布上的差别, 以选

择较优的标记物做进一步研究。在此多肽合成过程中加入 Cys 作为 PKM, 以期改善标记化合物的体内药代动力学性质。在后续研究中将比较不同的 PKM 对标记化合物的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

ICR 小白鼠, 雌性, 约 25 g, 二级, 购自北京大学医学部实验动物部。

1.2 试剂及仪器

$^{177}\text{LuCl}_3$, 美国 Perkin Elmer 公司; DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 及 DTPA-Bz-Cys-RGD dimer, 结构示于图 1, 美国 Purdue 大学刘爽教授馈赠; 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。Whatman NO. 1 滤纸, 英国 Whatman 公司。

CRC-15R 放射性活度计, 美国 Capintec 公司; 1470-002 全自动 γ 计数器, 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; Universal 32 R 型高速离心机, 德国 Hettich Zentrifugen 公司。

所用缓冲液、枪头、反应管等均经去离子处理, 所有实验用水均为二次去离子水, HPLC 所用的溶剂在使用前均经 0.22 μm 滤膜过滤。

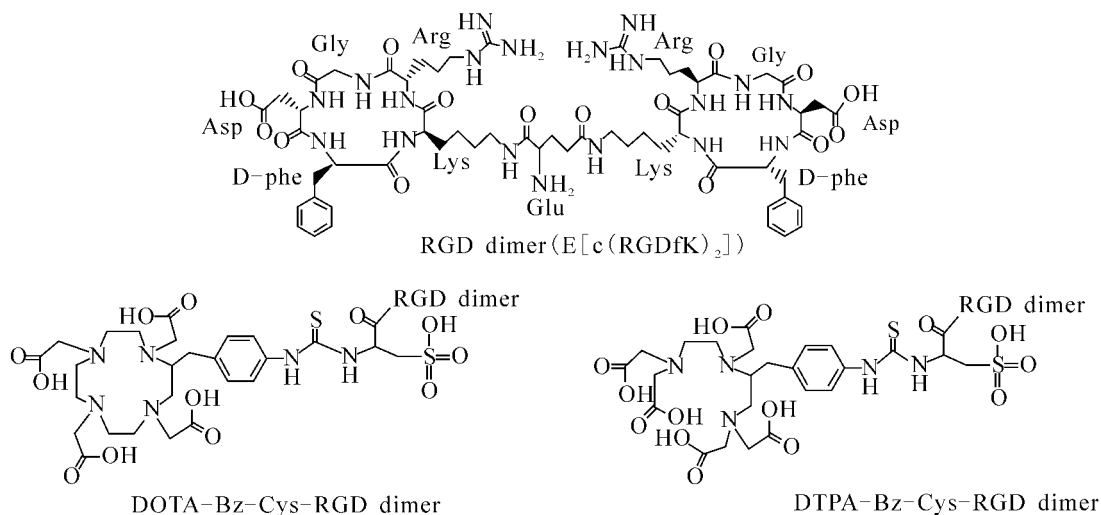


图 1 DOTA / DTPA -Bz-Cys-RGD dimer 的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer

2 实验方法

2.1 ^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的制备

在 Eppendorf (EP) 管中加入 20 μL 的 DOTA-Bz-Cys-RGD dimer (500 mg/L, 溶于去离子水), 加入 pH=5.0 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液 125 μL , 最后加入 5 μL $^{177}\text{LuCl}_3$ (37 MBq), 混合, 100 $^\circ\text{C}$ 反应 15~20 min 后取样进行 TLC 和 HPLC 分析。

^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的制备方法基本同上, 但不需要加热, 在室温下反应 15~20 min 即可。标记后取样进行 TLC 和 HPLC 分析。

2.2 质量控制方法

2.2.1 薄层层析法 (TLC) 点样于 Whatman NO.1 滤纸 (10 mm \times 200 mm) 上, 于体积比 1:1 的丙酮-生理盐水展开体系中上行展开, 晾干后用放射性薄层扫描仪扫描, 计算标记率或放射化学纯度。

2.2.2 HPLC 法 流动相为乙腈和 pH=6.0 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液, 流速为 1.0 mL/min, 洗脱梯度: 0—0 min, 10% 乙腈; 0—10 min, 30% 乙腈; 10—15 min, 80% 乙腈; 15—20 min, 10% 乙腈。上样的样品中均按体积比 1:1 加入 10 mmol/L EDTA。

2.3 标记物的体外稳定性

将 2 种标记物分别稀释于生理盐水, 于室温放置 96 h, 并于期间不同时间点取样, 使用 TLC 法检测标记物的放射化学纯度。

2.4 脂水分配系数测定

将 20 μL 标记物加入到含 480 μL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.4, 0.05 mol/L) 和 500 μL 正辛醇的 EP 管中, 涡旋混匀 1 h 后在 6 000 r/min 条件下离心 30 min, 取等体积有机相和水相测量放射性计数, 计算标记物的脂水分配系数 P (有机相计数/水相计数) 及 $\lg P$ 。

2.5 正常鼠体内生物分布

将 16 只 ICR 小白鼠随机分成 2 组, 每组 8 只。每组分别经尾静脉注射不同的标记物 (100 μL , 185 kBq), 并于注射后 1 h 和 4 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)。

2.6 统计学分析

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

3 结果和讨论

3.1 标记物的制备及质控

在 TLC 方法中, 游离的 $^{177}\text{Lu}^{3+}$ 离子的 R_f 值为 0.0~0.1, 标记化合物的 R_f 值为 0.9~1.0。实验结果表明, 可以用 TLC 法测定 ^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的标记率和放射化学纯度。本研究条件下制备的 2 种标记化合物的标记率均达到 95% 以上。

2 种标记物的 HPLC 分析结果示于图 2。 ^{177}Lu -EDTA 的保留时间为 3~4 min, ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 的保留时间 (约 9.5 min) 略微滞后于 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer (约 9.0 min), 表明 ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 分子的脂溶性略微增加。

2 种质控方法测得的结果相吻合。

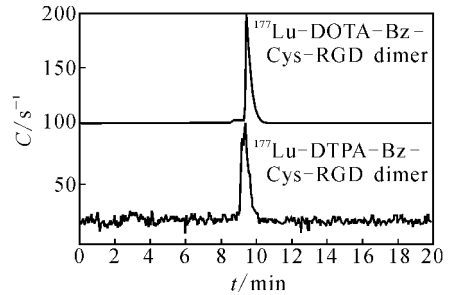


图 2 ^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的 HPLC 谱图

Fig. 2 Radio-HPLC chromatogram of ^{177}Lu -DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer

3.2 标记物的体外稳定性

2 种标记物均具有良好的体外稳定性, 室温放置 96 h, 放射化学纯度仍都保持在 90% 以上。

3.3 脂水分配系数测定

脂水分配系数可以用于评价标记物的脂溶性, 分配系数越大说明标记物的脂溶性越好。 ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的 $\lg P$ 分别为 -3.52 ± 0.27 ($n=3$) 和 -3.96 ± 0.12 ($n=3$), 表明 ^{177}Lu -DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 的脂溶性略高于 ^{177}Lu -DTPA-Bz-Cys-RGD dimer, 与 HPLC 的分析结果一致。

3.4 正常鼠体内生物分布

表 1 列出 2 种标记物在小白鼠体内生物分布数据以及统计学分析结果。尽管 2 种标记物仅仅在双功能螯合剂上存在差别,但这一差别确实对标记物的体内行为产生了影响。在注射后 1 h,仅有肾脏的摄取存在显著性差异,而在注射后 4 h,除了血液和脾的摄取没有显著性差异外,其它组织的摄取均存在显著性差异。2 种标记物在肾中的摄取均较高,说明它们在体内主要经泌尿系统进行排泄,尤其是¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 在肾中的摄取明显高于¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer,说明其水溶性更好,HPLC 分析结果和 lg *P* 值的测定结果也证实了该点。

¹⁷⁷Lu 为亲骨核素,游离的¹⁷⁷Lu³⁺ 会被骨组

织摄取。实验数据表明,无论在注射后 1 h 还是注射后 4 h,¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 在骨中的摄取均高于¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer,并且¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 在骨中的摄取有增高趋势,而¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 没有,这说明 Bz-DOTA 作为双功能螯合剂所形成的标记物在体内具有更好的稳定性。在注射后 4 h,除了血液和脾,¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 在各组织的摄取均高于¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer,造成全身放射性本底较高,从这一点来讲,Bz-DOTA 更适于作为双功能螯合剂用于 RGD dimer 的¹⁷⁷Lu 标记。

2 种标记物在血液中的摄取均较低,血液清除快,符合多肽药物的特点。

表 1 ¹⁷⁷Lu-DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的正常小鼠体内生物分布

Table 1 Biodistribution of ¹⁷⁷Lu-DOTA/DTPA-Bz-Cys-RGD dimer in mice

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)					
	1 h			4 h		
	¹⁷⁷ Lu-DOTA-RGD	¹⁷⁷ Lu-DTPA-RGD	<i>P</i>	¹⁷⁷ Lu-DOTA-RGD	¹⁷⁷ Lu-DTPA-RGD	<i>P</i>
血(Blood)	0.346 ± 0.049	0.352 ± 0.056	NS	0.120 ± 0.018	0.098 ± 0.031	NS
心(Heart)	1.339 ± 0.079	1.669 ± 0.233	NS	0.960 ± 0.051	1.382 ± 0.026	0.000 3
肝(Liver)	3.768 ± 0.676	3.154 ± 0.081	NS	3.154 ± 0.081	4.793 ± 0.196	0.000 2
脾(Spleen)	2.039 ± 0.074	2.250 ± 0.360	NS	2.250 ± 0.360	2.228 ± 0.241	NS
肺(Lung)	2.852 ± 0.155	3.653 ± 0.362	NS	2.075 ± 0.039	2.694 ± 0.136	0.004 6
肾(Kidney)	7.528 ± 0.171	21.701 ± 3.476	0.006 5	6.815 ± 0.383	31.51 ± 2.467	<0.000 1
胃(Stomach)	4.448 ± 0.276	4.743 ± 0.565	NS	3.504 ± 0.056	4.980 ± 0.165	0.000 1
小肠(Small intestine)	3.034 ± 0.262	4.218 ± 0.702	NS	2.665 ± 0.088	3.649 ± 0.193	0.003 6
肉(Muscle)	0.875 ± 0.076	1.050 ± 0.145	NS	0.617 ± 0.062	0.948 ± 0.109	0.037 8
骨(Bone)	2.385 ± 0.231	3.132 ± 0.569	NS	2.187 ± 0.124	3.370 ± 0.138	0.000 7

注(Note): *n* = 4; *T* 检验, *P* < 0.05 为有显著差异, NS 为无显著差异(*T* examination, *P* < 0.05 is significant difference, NS is no significant difference)

4 结 论

本研究工作分别采用 Bz-DOTA 和 Bz-DTPA 作为双功能螯合剂制备¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 和¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer,在本研究选取的标记条件下,二者的标记率均大于 95%,且均表现出良好的体外稳定性。但是,尽管¹⁷⁷Lu-DTPA-Bz-Cys-RGD dimer 的制备更加容易,不需加热,在室温条件下即可完成,但其在体内稳定性却远不如¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer。在下一步的研究工作中,将通过荷瘤裸鼠实验进一步

对¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-Cys-RGD dimer 进行评价,以期研制出适于肿瘤显像诊断和治疗的多肽放射性药物。

参考文献:

- [1] Carmeliet P. Angiogenesis in Health and Disease [J]. Nat Med, 2003, 9: 653-660.
- [2] Folkman J. Tumor Angiogenesis; Therapeutic Implications [J]. New Eng J Med, 1971, 285: 1 182-1 186.
- [3] Brooks P C, Clark R A, Cheresch D A. Requirement of Vascular Integrin $\alpha_v\beta_3$ for Angiogenesis [J]. Sci-

- ence, 1994, 264: 569-571.
- [4] Ruoslahti E. Specialization of Tumour Vasculature [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 83-90.
- [5] Sengupla S, Chattopadhyay N, Mitra A, et al. Role of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Receptors in Breast Tumor [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2001, 20: 585-590.
- [6] 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.
- [7] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v Integrins as Receptors for Tumor Targeting by Circulating Ligands [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 542-546.
- [8] Haubner R, Wester H J, Reuning U, et al. Radio-labeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists; A New Class of Tracers for Tumor Imaging [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40: 1 061-1 071.
- [9] Haubner R, Wester H J, Burkhart F, et al. Glyco-lated RGD-Containing Peptides: Tracer for Tumor Targeting and Angiogenesis Imaging With Improved Biokinetics [J]. *J Nucl Med*, 2001, 42: 326-336.
- [10] Marcel L J, Wim J O, Ingrid D, et al. Tumor Tar-geting With Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Binding Pep-tides in a Nude Mouse Model [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 6 146-6 151.
- [11] Haubner R, Bruchertseifer F, Bock M, et al. Syn-thesis and Biological Evaluation of ^{99m}Tc -Labeled Cyclic RGD Peptide for Imaging Integrin $\alpha_v\beta_3$ Ex-pression [J]. *Nuklearmedizin*, 2004, 43: 26-32.
- [12] Chen X Y, Park R, Tohme M, et al. MicroPET and Autoradiographic Imaging of Breast Cancer $\alpha_v\beta_3$ -In-tegrin Expression Using ^{18}F - and ^{64}Cu -Labeled RGD Peptide [J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 41-49.
- [13] Liu S, Edwards D S. Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals [J]. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12: 7-34.
- [14] Chen X Y, Park R, Shahinian A H, et al. Pharma-cokinetics and Tumor Retention of ^{125}I -Labeled RGD Peptide Are Improved by PEGylation [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31: 11-19.
- [15] Liu S, Cheung E, Rajopadyhe M, et al. ^{90}Y - and ^{177}Lu -Labeling of a DOTA-Conjugated Vitronectin Receptor Antagonist for Tumor Therapy [J]. *Bio-conjugate Chem*, 2001, 12: 559-568.
- [16] Liu S, Harris T D, Ellars C E, et al. Anaerobic ^{90}Y - and ^{177}Lu -Labeling of a DOTA-Conjugated Nonpeptide Vitronectin Receptor Antagonist [J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 1 030-1 037.