

^{188}Re 直接法标记 CD45 单抗及其体内生物分布研究

郑文莉 李贵平 黄宝丹 杜丽 黄凯

【摘要】 目的 利用 ^{188}Re 直接法标记 CD45 单抗, 探讨其在正常小鼠体内的生物学分布特性。方法 应用 2-巯基乙醇 (2-ME) 还原 CD45 单抗分子中的二硫键形成巯基; 以氯化亚锡作为 ^{188}Re 的还原剂, 葡庚糖酸钠为中间弱配体, ^{188}Re 直接标记 CD45 单抗; PD-10 层析柱分离纯化, 纸层析法测定标记率与放化纯; 鉴定 ^{188}Re -CD45 单抗的体外稳定性; 研究 ^{188}Re -CD45 单抗在正常小鼠体内的生物分布特性。结果 ^{188}Re -CD45 单抗的标记率平均为 $(85.25 \pm 2.63)\%$, PD-10 柱纯化后的放化纯为 $(92.54 \pm 3.56)\%$, 比活度平均为 (2.06 ± 0.07) TBq/mmol; 室温下放置 24 h, ^{188}Re -CD45 单抗放化纯为 $(64.33 \pm 1.53)\%$; 在鼠血清和生理盐水中 37°C 下孵育 24 h 后, 其放化纯仍有 $(64.2 \pm 3.77)\%$ 和 $(56.7 \pm 4.16)\%$ 。小鼠体内生物分布显示, ^{188}Re -CD45 单抗主要分布于肾脏和肝脏, 其次是肺脏、骨骼和血液。结论 ^{188}Re 直接法标记 CD45 单抗的方法简单易行, 标记率较高, 具有良好的体外稳定性; ^{188}Re -CD45 单抗静脉注射后, 体内放射性主要经肾脏排泄, 并在肝脏有较高的浓聚, 符合标记抗体的体内分布规律。

【关键词】 抗原, CD45; 抗体, 单克隆; 放射性同位素; 生物分布; ^{188}Re

Direct-radiolabeling of CD45 monoclonal antibody with rhenium-188 and its biodistribution in normal mice

ZHENG Wen-li, LI Gui-ping, HUANG Bao-dan, DU Li, HUANG Kai. Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: LI Gui-ping, Email: Ligp62@126.com

【Abstract】 **Objective** With direct-labeling method of CD45 McAb with ^{188}Re , to investigate its bio-distribution character in normal mice. **Methods** The disulfide bond in the molecule of CD45 monoclonal antibody was reduced to form a mercapto group by the mercaptoethanol (2-ME). The labeling was conducted by stannous chloride used as reductant of ^{188}Re , and sodium glucoheptonate as intermediate.weak ligands, then ^{188}Re was directly labeled CD45 mAb alone; The reaction mixture was separated and purified through the PD-10 column; Labeling efficiency and radiochemical purity were measured by the paper chromatography. Then stability of ^{188}Re labeled CD45 McAb was determined *in vitro*. The biodistribution in the healthy Kunming mice after intravenous injection of ^{188}Re -CD45 McAb was determined. **Results** The labeling efficiency of ^{188}Re -CD45 McAb was $(85.25 \pm 2.63)\%$, and radiochemical purity was $(92.54 \pm 3.56)\%$. The specific activity was (2.06 ± 0.07) TBq/mmol; The radiochemical purity of ^{188}Re -CD45 McAb was $(64.33 \pm 1.53)\%$ after incubating 24 h in room temperature. While mixed the saline and healthy rat serum at 37°C for 24 h, the radiochemical purity was $(64.2 \pm 3.77)\%$ and $(56.7 \pm 4.16)\%$, respectively. The biodistribution result showed that the radioactivity in body was mainly distributed in kidney and liver, followed by lung, bone and blood. **Conclusion** The method of direct-labeling CD45 McAb with ^{188}Re is not only simple, but also has high labeling efficiency. ^{188}Re -CD45 McAb has good stability *in vitro*. After injected intravenously, radioactive label is mainly excreted through kidneys with a higher accumulation in liver, and it accords with the *in vivo* kinetics characteristic of labeled antibody.

【Key words】 Antigens, CD45; Antibodies, monoclonal; Radioisotopes; Biodistribution; Rhenium-188

放射免疫治疗 (radioimmunotherapy, RIT) 是一种具有良好前景的肿瘤靶向内照射治疗方法。近年来, 随着高亲和力单抗的问世、治疗核素的发展及核素标记技术的改进, RIT 研究领域取得了令人瞩目的成绩。目前, RIT 已成为白血病靶向治疗研究的一个新方向, 已经获 FDA 批准用于临床的有放射性核素标记的抗 CD20 单抗和抗 CD33 单抗, 其中抗 CD20 单抗用于治疗淋巴瘤及 CD20 阳性的淋巴细胞性白血病, 而抗 CD33 单抗用于治疗复发和难治性 AML^[1]。其他进入 I、II 期临床试验的 RIT 药物有抗 CD52 单抗治疗淋巴细胞性白血病等^[2], 抗 CD66 单抗用于造血干细胞移植前的骨髓预处理等^[3-4]。

白血病最常见的靶向抗原是 CD33、CD45、CD66^[5]。CD45 是位于白细胞表面的白细胞共同抗原 (leukocyte common antigen, LCA), 广泛表达于 T、B 淋巴细胞, 大部分血液系统恶性肿瘤, 包括 85%~90% 的急性白血病和粒细胞白血病高水平表达 CD45^[6], 每个细胞有 200 000 个 CD45 结合位点, 与抗 CD45 单抗结合后无明显的内化或脱落^[7], 而其他实体组织细胞则无表达, 是一良好的分子靶标。随着对 CD45 抗原特性研究的深入以及抗 CD45 单克隆抗体的研制成功, 在国外抗 CD45 抗体已用于淋巴细胞系恶性肿瘤的 RIT 靶向治疗, 包括急慢性淋巴细胞白血病^[8]、淋巴瘤^[6], 而国内报道的有关 ¹⁸⁸Re-CD45 单抗的动物实验及临床研究甚少。放射性核素 ¹⁸⁸Re 是一种比较理想的肿瘤靶向治疗核素, 可从 ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re 发生器淋洗获得^[9], ¹⁸⁸Re 同时发射用于治疗用的 β 射线 (2.1 MeV) 与用于显像的 γ 射线 (155 keV), 在肿瘤治疗的同时可对肿瘤疗效进行动态监测与评估。此外, ¹⁸⁸Re 的半衰期较短 (16.9 h), 射线穿透距离短, 对骨髓等正常组织影响小, 并可采用多次给药的方式以提高疗效, 且其照射剂量低, 不需要住院治疗。本文报道利用 ¹⁸⁸Re 直接法标记抗 CD45 单抗, 并观察其在正常小鼠体内的生物分布特性。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物: 昆明种小白鼠 9 只, 4~6 周龄 (雌雄不限), 体重 19~21 g, SPF 级, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物饲养及实验遵守动物伦理学要求。

2. 试剂: 2-巯基乙醇 (2-ME) 购于广州市达晖生物技术有限公司; 氯化亚锡 (SnCl_2) 购于广东光华科技股份有限公司; 葡庚糖酸钠及牛血清白蛋白购于上海伯奥生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒

为碧云天生物技术研究产品。纯化抗人 CD45 单克隆抗体购于生工生物工程 (上海) 有限公司; ¹⁸⁸W-¹⁸⁸Re 发生器购于德国 ITG 公司。

3. 主要仪器: FA604A 电子天平 (上精天电子仪器有限公司), 600 型恒温水箱 (江苏金坛市中大仪器厂), ZD-3 回旋振荡器 (天津市欧诺仪器仪表有限公司), SN-682 型放射免疫 γ 计数器 (上海核福光电仪器有限公司), KDC-2044 低速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司)。

二、CD45 单抗的直接标记方法

1. 单抗的还原: 0.25 mg CD45 单抗 (分子量为 150 kDa, 浓度为 2 mg/ml) 中加入 2-ME (2-ME 与 CD45 单抗的摩尔比约为 8000:1), 混合均匀后室温避光振荡反应 30 min, 混合物经 PD-10 柱分离, 用 0.2 mol/L pH5.0 的醋酸钠缓冲液洗脱, 用紫外分光光度计测 A₂₈₀, 收集蛋白峰。

2. ¹⁸⁸Re 标记 CD45 单抗: 取充满氮气的已封闭的玻璃小瓶一支, 依次加入 400 μ l (37 MBq) Na¹⁸⁸ReO₄ 溶液、5 μ l 2 mol/L 葡庚糖酸钠 (GH) 溶液、13.8 μ l 的含酒石酸 (氯化亚锡/酒石酸摩尔质量比为 1:9) 的氯化亚锡 (133 mmol/L) 溶液, 反应 15 min; 最后加入 0.125 ml 还原 CD45 单抗溶液 (2 mg/ml), 混合均匀, 室温放置 2 h 完成标记。

三、还原单抗巯基数的测定

1. 绘制巯基浓度标准曲线: 配制 DTNB 分析溶液 (0.1 mmol/L): 由 1 体积 10 mmol/L DTNB 标准溶液 (用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释) 加 99 体积的 0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制而成, 现用现配。标准曲线的制作: 25 $^{\circ}$ C 条件下, 用 Tris-HCl 缓冲液稀释半胱氨酸 (Cys) 标准液配成不同浓度的 Cys 标准溶液, 混匀静置 10 min, 紫外分光光度计测定 OD₄₁₂。绘制 OD₄₁₂ 与巯基浓度的线性回归曲线。

2. 测定还原单抗巯基数: 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定洗脱蛋白浓度。取一定量还原后的单抗溶液, 取上述各浓度溶液 0.4 ml 分别加入到 2 ml 预先恒温于 25 $^{\circ}$ C 水中的 DTNB 分析溶液, 混匀静置 15 min, 测定 OD₄₁₂。根据巯基浓度标准曲线计算定量还原后单抗溶液中所含的巯基数。

四、¹⁸⁸Re-CD45 单抗的标记率测定

采用上行纸层析法。固定相为 Whatman 3MM 色谱层析纸。展开剂 I 为丙酮溶液; 展开剂 II 为生理盐水; 展开剂 III 为 V (乙醇): V (氨水): V (水) = 2:1:5 混合溶液。 γ 放射免疫计数器测量层析纸各段放射性计数, 根据标记物中各放射性组分在不同展开剂中的比移值 (R_f) (表 1), 按下式计算 ¹⁸⁸Re-CD45

单抗的标记率: 标记率 (%) = (^{188}Re -单抗 + ^{188}Re -胶体) 放射性计数/总放射性计数 $\times 100\%$ - ^{188}Re -胶体放射性计数/总放射性计数 $\times 100\%$ 。

表1 标记单抗溶液各放射性成分纸层析的分布

| 展开剂 | R_f | | | |
|---------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $^{188}\text{ReO}_4^-$ | ^{188}Re -胶体 | ^{188}Re -单抗 | ^{188}Re -GH |
| 丙酮 | 0.7~0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 生理盐水 | 0.8~0.9 | 0.0 | 0.0 | 0.8~0.9 |
| 乙醇:氨水:水 | 0.8~0.9 | 0.0 | 0.8~0.9 | 0.8~0.9 |

五、 ^{188}Re -CD45 单抗的体外稳定性测定

反应混合物经 PD-10 层析柱过滤, 2000 r/min, 5 min/次, 用 0.5 ml 的醋酸钠缓冲液 (0.2 mol/L pH 5.0) 洗脱 PD-10 层析柱 2 次, 收集过滤的 ^{188}Re -CD45 单抗溶液。取经 PD-10 柱纯化的 ^{188}Re -CD45 单抗溶液 100 μl , 分别加入到 1 ml 的小鼠血清和生理盐水中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中孵育 1、2、4、8、12、24 h, 分别于不同时间点取少量样品纸层析法测定其放化纯, 评价其体外稳定性。

六、正常小鼠体内生物分布实验

1. ^{188}Re -CD45 单抗注射液参考源的制备: 取 ^{188}Re -CD45 单抗溶液 20 $\mu\text{Ci}/0.05\text{ ml}$, 加入 500 ml 容量瓶中, 并加生理盐水或双蒸水定容至 500 ml, 充分混匀, 分别取 1 ml 加入 5 支塑料管内, 测定放射性计数, 计算平均值, 结果乘以 500 作为参考源。

2. 体内生物分布实验: 标记单抗经 0.22 μm 滤器进行除菌除热源后, 取 9 只昆明种小白鼠 (雌雄不限), 通过随机抽样法分成 3 组, 每组 3 只小白鼠, 每只小鼠尾静脉注射放射性剂量为 20 $\mu\text{Ci}/0.05\text{ ml}$, 于注射后 3 h、6 h 及 24 h 分别断颈处死 1 组小白鼠, 收集小鼠心脏血液及主要脏器 (肝、脾、肾、肺、胃、肠、肌肉、股骨和脑), 并进行称重及放射性计数, 经衰变校正后计算各脏器每克组织百分注射剂量率 (%ID/g)。

七、统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、2-ME 法还原 CD45 单抗

根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明, 用 A_{562} 值对溶液中蛋白质浓度线性回归, 得到蛋白质含量标准曲线 (图 1), 其直线方程为 $y = 0.0346x - 0.0026$, $r^2 = 0.999$ 。根据标准曲线计算收集的还原后抗体浓度为 0.285 g/L (0.0019 mmol/L)。

二、还原抗体中巯基含量测定

巯基浓度标准曲线 (图 2) 的直线方程为 $y = 1.5131x - 0.0014$, $r^2 = 0.9998$ 。取还原后抗体溶液 400 μl , 测得 $\text{OD}_{412} = 0.232$, 代入上式计算得到还原后抗体溶液的巯基浓度为 0.1542 mmol/L。通过换算, CD45 单抗经 8000 倍以上的 2-ME 还原后, 平均每个抗体分子含有 81.5 个巯基, 即还原了 40 个二硫键。

三、 ^{188}Re -CD45 单抗标记率与比活度

经多次预实验, 确定最佳标记条件如下: 氯化亚锡与单抗摩尔质量比为 1100 : 1; 氯化亚锡与酒石酸摩尔质量比为 1 : 9; 反应体系 pH 值为 4.5~5.0; 室温下标记反应时间为 2~2.5 h。在上述条件下, ^{188}Re -CD45 单抗标记率为 (85.25 \pm 2.63) %, 经 PD10 柱纯化后, 标记单抗的放化纯为 (92.54 \pm 3.56) %, 比活度为 (2.06 \pm 0.07) TBq/mmol。

四、 ^{188}Re -CD45 单抗体外稳定性

^{188}Re -CD45 单抗分离纯化后, 室温下放置 12 h 的放化纯仍有 (73.6 \pm 3.21) %。其置于小鼠血清和生理盐水中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中孵育 24 h 后, 其放化纯分别为 (64.2 \pm 3.77) % 和 (56.7 \pm 4.16) %, 表明 ^{188}Re -CD45 单抗处于较稳定状态。

五、 ^{188}Re -CD45 单抗在正常小鼠体内的生物分布 体内生物分布结果如图 3 所示。标记单抗在肾脏和肝脏内的放射性分布明显高于其他脏器 (统计参数 $F = 156.852$, $P < 0.05$), 肾脏和肝脏的 %ID/g 在 3 h 和 24 h 分别为 14.46 \pm 1.08 和 7.46 \pm 2.07 及 5.44 \pm 0.95 和 2.70 \pm 0.80; 其次是肺脏、骨骼和血液, 其余脏器内放射性分布较低。

讨 论

放射性核素 ^{188}Re 标记单抗的方法有间接法和直接法两种, 其中直接法又称为配体交换法^[10], 即是利用 ^{188}Re 与配体形成络合物, 再以还原后的标记物置换 ^{188}Re 络合物的配体, 降低反应活化能完成标记。配体与 ^{188}Re 络合能力太弱无法完成标记, 太强则会阻碍置换反应的进行。葡庚糖酸钠、葡萄糖酸钠、柠檬酸盐和酒石酸盐^[11]等是标记反应中常用的络合剂。本实验中选用弱络合剂酒石酸钾钠、葡庚糖酸钠等作为中间配体^[12], 一方面葡萄糖酸钠与 ^{188}Re 形成较弱的络合物, 使处于还原状态的 ^{188}Re 与 CD45 单抗中的二巯基形成稳定的非共价键, 有效地降低 ^{188}Re 反应活化能, 减少 ^{188}Re 胶体的形成, 保证转螯合反应顺利进行; 另一方面酒石酸与 Sn^{2+} 络合防止 SnCl_2 水解形成沉淀, 起稳定 Sn^{2+} 的作用^[13-14]。此反应条件温和, 方法简单, 反应时间短, 易于完成, 纯化后标记率可达 90% 以上,

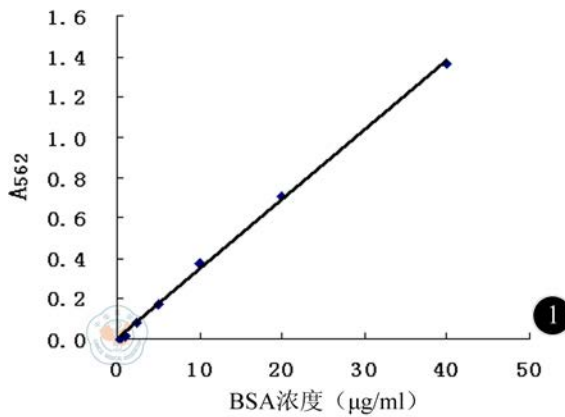


图1 蛋白质含量的标准曲线

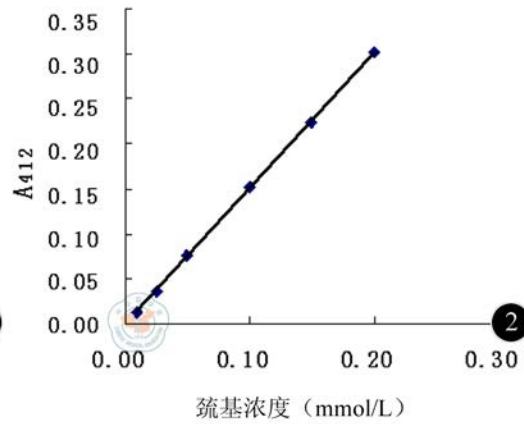


图2 巯基浓度标准曲线

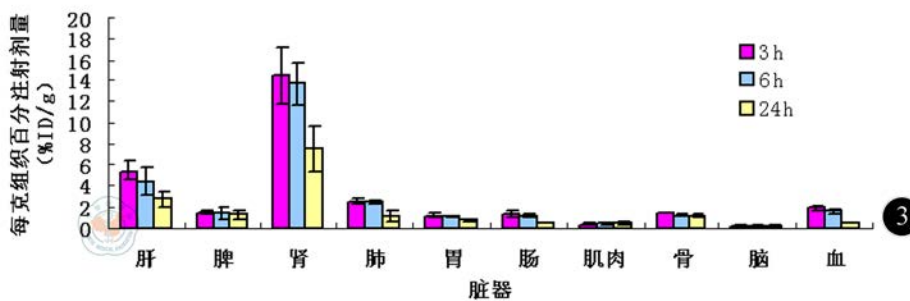


图3 ¹⁸⁸Re-CD45单抗在正常小鼠体内的生物分布

能够满足体外抗体研究的要求。

¹⁸⁸Re 标记单抗的关键问题之一是 ¹⁸⁸ReO₄⁻ 的还原^[15]。将 ¹⁸⁸ReO₄⁻ 中+7 价铼还原为可被络合的低价态铼相对困难,需采用高浓度的 SnCl₂ 进行还原,但高浓度的 SnCl₂ 易形成沉淀,使 ¹⁸⁸Re-Sn 胶体增加而降低放化纯^[14]。通过多次实验并参考相关文献,133 mmol/L 氯化亚锡溶液浓度可获得较高的标记率,同时加入酒石酸防止 SnCl₂ 水解形成沉淀,减少放射性胶体的形成。

¹⁸⁸ReO₄⁻ 进行还原时,反应体系在 pH<4.0 的偏酸性环境下,氯化亚锡不易被水解形成沉淀,有利于发挥亚锡离子的还原特性,但低 pH 环境将影响标记物的生物活性,且不利于实行体内实验;pH>5.5 易使 ¹⁸⁸Re 从+4 价态氧化回+7 价态的 ¹⁸⁸ReO₄⁻^[16],pH 在 4.5~5.0 时可防止 Sn 和 Re 形成不溶性氧化物^[9],优点是保持蛋白生物活性。Sailerova 等^[17]研究提示:无氧环境且不破坏蛋白活性的前提下,尽量考虑低 pH 标记。本实验将反应体系 pH 调配在 4.5~5.0 之间。另外,¹⁸⁸Re 标记抗体是个缓慢的过程,要有足够的反应时间,但在室温下放置 24 h 的放化纯表明,反应时间为 2~3 h 的标记率较高,用纸层析法测定的标记率平均为(85.25±2.63)%。可能是由于随着时间延长放射性核素发生衰变或氯化亚锡发生水解及氧化而导致其失去还原能力,使 ¹⁸⁸Re-胶体, ¹⁸⁸Re-GH 等这些中间产物增加,

这将直接影响标记物标记率。实验中标记物在室温下放置 12 h 后放化纯下降至(73.6±3.21)%,故标记时间不宜太长。因此,为了提高标记物的标记率,混合反应后标记物需经分离、纯化,使其满足体内实验研究的要求。目前,标记物的纯化方法较多,主要有层析法、离子交换法、凝胶过滤及高效液相色谱法,本实验采用的是 PD-10 柱层析法,能有效地分离标记单抗及未结合核素^[18]。

参照 Iznaga-Escobar^[9,19]法测定还原抗体的巯基数。由于抗体还原所用 2-ME 过量会干扰还原抗体巯基数测定,因此也需将还原抗体纯化,本实验经 100 K 过滤器高速离心,收集高度浓缩还原单抗并用缓冲液进行稀释后,对还原抗体的巯基数进行了分析,经计算还原抗体的巯基数为 40 个/分子,说明抗体还原后能够提供放射性核素结合的结合位点,有利于标记反应的进行。

综上,本研究制备的 ¹⁸⁸Re-CD45 单抗标记率较高,在室温下稳定性好。且标记物与血清蛋白混合后置于 37 °C 水浴箱中的体外稳定性结果表明:与血清蛋白无明显结合,稳定性良好。将 ¹⁸⁸Re-CD45 单抗经尾静脉注入正常小鼠体内并观察其在体内的生物分布,结果显示肾脏的放射性最高,肾脏的%ID/g 在 3 h 和 24 h 分别为 14.46±1.08 和 7.46±2.07;其次是肝脏,

其%ID/g在3h和24h分别为 5.44 ± 0.95 和 2.70 ± 0.80 ;而肺脏、骨骼和血液的%ID/g在24h分别为 1.14 ± 0.55 、 1.10 ± 0.18 和 0.48 ± 0.06 ;其余脏器内放射性分布则较低。动物体内分布结果表明, $^{188}\text{Re-CD45}$ 单抗在3h肝脏内有较高放射性浓聚,但其随时间延长放射性分布明显降低,而肠道的放射性分布并不因肝脏的降低而增加,主要原因可能是标记过程中生成了较多的放射性核素胶体^[20];另外,使用的PD-10柱分离纯化并不能有效去除放射性核素胶体,使含有少量胶体的标记物经静脉注入后,被肝脏的网状内皮细胞吞噬^[21],形成了非特异性的肝脏摄取;最重要的是,本实验标记单抗主要经泌尿系排泄,并不表现为肝肠循环的体内分布特性。因此,实验中应控制 SnCl_2 剂量及浓度等标记条件^[22],减少放射性核素胶体的生成,是降低肝非特异性摄取的关键。标记物在正常小鼠体内分布,结果显示胃放射性分布较低,并随时间延长降低,和胃、肠、肌肉分布无显著差异,表明标记物引入体内后稳定性好,并不因血液的稀释作用及pH值的变化而解离^[23],与标记物体外稳定性的测定结果相符。实验结果表明 $^{188}\text{Re-CD45}$ 单抗符合抗体的体内放射性分布规律,研究结果为下一步白血病荷瘤裸鼠模型的RIT治疗提供实验基础。

参 考 文 献

- [1] Brethon B, Auvrignon A, Galambrun C, et al. Efficacy and tolerability of gemtuzumab ozogamicin (anti-CD33 monoclonal antibody, CMA-676, Mylotarg) in children with relapsed/refractory myeloid leukemia. *BMC Cancer*, 2006, 6: 172.
- [2] Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab in CLL and Other Lymphoid Neoplasms. *Cancer Investigation*, 2006, 24: 718-725.
- [3] Zenz T, Glatting G, Schlenk RF, et al. Targeted marrow irradiation with radioactively labeled anti-CD66 monoclonal antibody prior to allogeneic stem cell transplantation for patients with leukemia: results of a phase I-II study. *Haematologica*, 2006, 91: 285-286.
- [4] Bunjes D. ^{188}Re -labeled Anti-CD66 Monoclonal Antibody in Stem Cell Transplantation for Patients with High-risk Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 2002, 43: 2125-2131.
- [5] Kotzerke J, Bunjes D, Scheinberg DA. Radioimmunoconjugates in acute leukemia treatment: the future is radiant. *Bone Marrow Transplant*, 2005, 36: 1021-1026.
- [6] Dahlke MH, Larsen SR, Rasko JE, et al. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45: 229-236.
- [7] Press OW, Howell-Clark J, Anderson S, et al. Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood*, 1994, 83: 1390-1397.
- [8] Orozco JJ, Back T, Kenoyer A, et al. Anti-CD45 radioimmunotherapy using ^{211}At with bone marrow transplantation prolongs survival in a disseminated murine leukemia model. *Blood*, 2013.
- [9] Iznaga-Escobar N. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with rhenium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors--a review of radiolabeling characteristics, quality control and *in vitro* stability studies. *Appl Radiat Isot*, 2001, 54: 399-406.
- [10] Kozminski P, Gniazdowska E, Fuks L, et al. '2+1' tricarbonylrhenium(I)/tricarbonylrhenium(I) mixed-ligand complexes with methyl thiosalicylate and isocyanide ligands as potential precursors of radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot*, 2011, 69: 436-442.
- [11] Schmidt PF, Smith SV, Bundesen PG. ^{188}Re DD-3B6/22 Fab' for use in therapy of ovarian cancer: labelling and animal studies. *Nucl Med Biol*, 1998, 25: 639-649.
- [12] Garnuszek P, Pawlak D, Maurin M, et al. Comparison of chromatographic methods for quality control of DMSA complexes with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{188}Re at (III) and (V) oxidation states. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 2012, 15: 95-100.
- [13] Iznaga-Escobar N, Ramirez IL, Izquierdo JC, et al. ^{188}Re -labeled anti-epidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody h-R3: labeling conditions, *in vitro* and *in vivo* stability. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2003, 25: 703-711.
- [14] Xu F, Zhou W, Hu W, et al. Study of direct labeling antibody with ^{188}Re . *Journal of Isotopes*, 2009, 1: 5.
- [15] Pillai MR, Dash A, Knapp FF. Rhenium-188: Availability from the $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generator and Status of Current Applications. *Curr Radiopharm*, 2012.
- [16] Dadachova E, Mirzadeh S. The role of tin in the direct labelling of proteins with Rhenium-188. *Nucl Med Biol*, 1997, 24: 605-608.
- [17] Sailerova E, Billingham MW. A study of factors affecting the labelling of tartrate with ^{188}Re and the transchelation of the ^{188}Re from the tartrate to a protein. *Appl Radiat Isot*, 2003, 59: 311-319.
- [18] Ogawa K, Kawashima H, Kinuya S, et al. Preparation and evaluation of $^{186/188}\text{Re}$ -labeled antibody (A7) for radioimmunotherapy with rhenium(I) tricarbonyl core as a chelate site. *Ann Nucl Med*, 2009, 23: 843-848.
- [19] 许风华, 周伟, 胡伟青, 等. ^{188}Re 直接标记抗体方法研究. *同位素*, 2009, 22: 18-22.
- [20] Pillai MR, Dash A, Knapp FJ. Rhenium-188: availability from the $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator and status of current applications. *Curr Radiopharm*, 2012, 5: 228-243.
- [21] Jankovic D, Vranjes-Djuric S, Djokic D, et al. ^{90}Y -labeled tin fluoride colloid as a promising therapeutic agent: preparation, characterization, and biological study in rats. *J Pharm Sci*, 2012, 101: 2194-2203.
- [22] Cui W, Zhang Y, Xu X, et al. Synthesis and ^{188}Re radiolabelling of dendrimer polyamide amine (PAMAM) folic acid conjugate. *Med Chem*, 2012, 8: 727-731.
- [23] 刘长滨, 徐白萱, 张锦明, 等. ^{188}Re 标记 Morpholino 寡核苷酸体外稳定性及生物分布. *军医进修学院学报*, 2012, 33: 382-386.

(收稿日期: 2013-06-17)

(本文编辑: 吴莹)