

文章编号:0253-9950(2005)02-0075-07

¹³¹I 标记 NGR 聚乙二醇修饰物及其生物分布

杨顺龙, 褚泰伟, 刘新起, 王祥云

北京大学 化学与分子工程学院 应用化学系, 北京 100871

摘要: 天门冬酰胺酰甘氨酸精氨酸(NGR)是特异性地定位于肿瘤新生血管受体的多肽基序,在肿瘤诊断和治疗方面具有潜在的应用前景。首先用两种单甲基化聚乙二醇(mPEG₁₉₀₀, mPEG₅₀₀₀)对 YGGCNGRC 环肽进行化学修饰,并进行¹³¹I 标记。考察了这些标记物在正常小鼠以及荷乳腺癌 MCF-7 裸鼠体内的分布。结果表明,¹³¹I-mPEG₁₉₀₀-YGGCNGRC 和¹³¹I-mPEG₅₀₀₀-YGGCNGRC 在各个器官和组织中的摄取率与¹³¹I-YGGCNGRC 相比都有所降低,但在肾脏中的摄取率增高。血液初始摄取稍有下降,从血液中清除的速率则无显著差别。用 mPEG₅₀₀₀ 修饰的 NGR 环肽显著地降低了¹³¹I 的脱落。虽然¹³¹I-mPEG₅₀₀₀-YGGCNGRC 在肿瘤中的摄取比¹³¹I-YGGCNGRC 稍低,但肿瘤组织与正常组织的摄取比对多数器官和组织都有所提高,其中肿瘤与肌肉的摄取比由 3.5 ± 1.7 提高到 5.7 ± 2.2。修饰与否对肿瘤与血的摄取比影响不大,由 0.73 ± 0.33 变化至 0.80 ± 0.22。

关键词: 肿瘤新生血管; NGR 多肽; 聚乙二醇;¹³¹I 标记; 生物分布

中图分类号: O615.42 **文献标识码:** A

1998 年 Arap 等^[1]用噬菌体展示技术筛选到具有肿瘤新生血管靶向性的天门冬酰胺酰甘氨酸精氨酸短肽(NGR),它的受体为主要表达在肿瘤新生血管上的 CD13/氨基肽酶 N^[2]。将 NGR 和肿瘤坏死因子(TNF)相连后,可以导向性地把药物带入肿瘤血管,NGR-TNF 的抗肿瘤效果比 TNF 强 30 倍^[3];并且 NGR-TNF 只与肿瘤血管上的 CD13 受体结合,而在表达 CD13 受体的正常肾脏和骨髓细胞中不结合^[4]。肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的生成^[5],因此 NGR 短肽在肿瘤诊断和治疗方面具有潜在的应用前景。

聚乙二醇(PEG)修饰多肽和蛋白药物具有很多优点,如可以改善药物的体内分布,保护药物不受蛋白酶的攻击,降低药物的抗原性等^[6]。Chen^[7]等报道,采用小分子量 mPEG₂₀₀₀ 修饰的精氨酸酰甘氨酸天门冬氨酸(RGD)短肽在血中的清除速度加快,肿瘤摄取随着时间延长而增加。

本文用两种分子量的单甲基化聚乙二醇

(mPEG₁₉₀₀, mPEG₅₀₀₀)修饰含 NGR 序列的

YGGCNGRC (酪氨酸-甘氨酸-甘氨酸-半胱氨酸-天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸-半胱氨酸)环肽,并进行¹³¹I 标记,以考察它们在小鼠体内的生物分布和肿瘤的摄取。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

YGGCNGRC 环肽和 N,N'-羰基二咪唑(CDI),吉尔生化(上海)有限公司;单甲基化聚乙二醇(mPEG),分子量 5000,美国 Sigma 化学公司,分子量 1900,Alfa Aesar 公司;1,3,4,6-四氯-3α,6α 二苯-甘脲(Iodogen),美国 Sigma 化学公司;Na¹³¹I(无载体溶液)由中国原子能科学研究院提供。正常雄性昆明小鼠(20 ± 2)g,中国科学院动物所;荷 MCF-F 人乳腺癌 BALB/C_{nu} 雄性裸鼠(16 ± 2)g,由北京肿瘤医院提供。

收稿日期:2004-12-06; 修订日期:2005-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20301001)

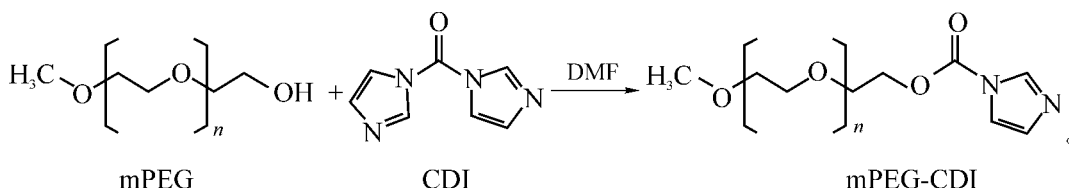
作者简介:杨顺龙(1982-),男,江西景德镇人,硕士研究生,应用化学专业。

Waters 600 E 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Radiomatic 500 TR 液体闪烁计数器, 自动 γ 计数器 (Packard auto-gamma cobra II series counting system), 均为美国 Packard 公司产品; FD-1 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司产品。

Simplicity 185 纯水仪, 美国 Millipore 公司产品; CRC-15R 放射性活度计, 美国 Capintec 公司产品。

1.2 mPEG-CDI 活化物的合成

按文献[8,9]的方法合成。合成反应式如下:

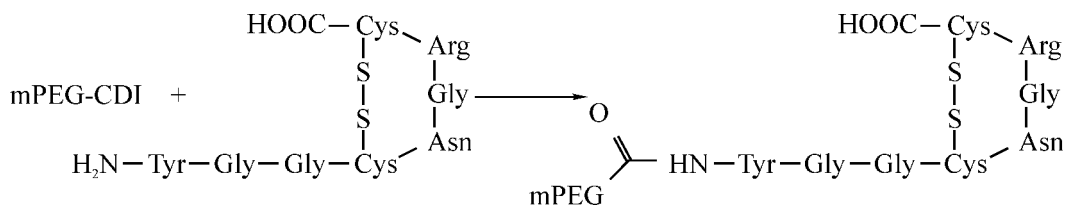


将 2.25 g mPEG₅₀₀₀ (0.45 mmol) 和 0.38 g CDI (2.3 mmol) 溶于 12 mL DMF 中, 室温下搅拌 6 h 后。冷冻干燥除去溶剂 DMF, 残余的乳黄色固体用 5 mL 二氯甲烷溶解后, 加入到 50 mL 乙醚中, 出现大量白色沉淀。搅拌 30 min 后过滤得到白色固体, 将白色固体采用上述方法再处理两次, 过滤后得到的白色固体, 冷冻干燥。最终产品 1.87 g, 产率 81.4 %。

¹H NMR (DMSO-d₆, δ): 3.24 (mPEG 上的 -CH₃); 3.32 ~ 3.78 (mPEG 中的重复单元 -CH₂CH₂O-); 4.50 (mPEG 羟基一端相连的 -CH₂O-); 7.09, 7.60, 8.26 (咪唑环上的 3 个 -CH=)。

mPEG₁₉₀₀-CDI 活化物与 mPEG₅₀₀₀-CDI 活化物合成方法一样, 产率 30.5 %。

1.3 ¹³¹I- YGGCNGRC 和 ¹³¹I-mPEG YGGCNGRC 的制备



将 ¹³¹I- YGGCNGRC 标记液加入 1 mL 聚丙烯管中, 再加入 1.5 mg mPEG₅₀₀₀-CDI (0.29 μ mol) 或 0.6 mg mPEG₁₉₀₀-CDI (0.30 μ mol), 振荡混匀, 室温下静置反应 6 h。上述反应液用 RP-HPLC 分离。用 1.5 mL 聚丙烯管收集流动相, 每管 1 mL, 取放射性最高的 2 管合并。真空干燥除去乙腈, 稀释至 740 kBq/mL 备用。

1.3.1 ¹³¹I- YGGCNGRC 的制备 将 50 μ g YGGCNGRC 环肽溶于 45 μ L 磷酸盐缓冲溶液中 (pH = 7.4), 然后放入已涂好 100 μ g Iodogen 的 1 mL 聚丙烯管中, 再加入 13.5 MBq Na¹³¹I, 漩涡振荡混匀后反应 5 min。反应混合物使用 RP-HPLC 分离: Waters Symmetry C₁₈ 柱 (5 μ m, ϕ 3.9 mm $\times$ 150 mm), 流速 1 mL/min, 梯度淋洗, 时间 0 ~ 25 min, 由 90 % 溶剂 A (1 % 三氟乙酸的水溶液) 和 10 % 溶剂 B (1 % 三氟乙酸的乙腈溶液) 淋洗至 35 % 溶剂 A 和 65 % 溶剂 B, 放射性计数检测。用 1.5 mL 聚丙烯管收集流动相, 每管 1 mL, 收集放射性最高的 1 mL 流动相。真空干燥除去乙腈, 稀释至 740 kBq/mL 备用。

1.3.2 ¹³¹I-mPEG- YGGCNGRC 的制备 按文献[8,9]方法合成。合成反应式如下:

1.4 动物实验

各取 ¹³¹I- YGGCNGRC, ¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC 或 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 标记液 100 μ L (~74 kBq), 分别通过尾静脉注射到正常小鼠体内, 在不同时相分别进行小鼠眼眶取血, 断颈处死, 取出心、肺、肝、肾、脾、胃、脑和肌肉等, 用自动 γ 计数器测量放射性计数。每个时

相做 5 只小鼠,取其平均值。

在 BALB/ C nu 裸鼠右侧腋窝皮下用组织包埋的方法接种 MCF-7 人乳腺癌,接种一周后,肿瘤大小约为 0.3~0.5 cm。取 6 只小鼠,分为两组,把 100 μL (≈ 74 kBq) 的¹³¹I- YGGCNGRC 或¹³¹I mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 通过尾静脉注射,2 h 后断颈处死,取出各脏器和肿瘤,测量放射性计数。

2 结果和讨论

2.1 化学合成与标记

在合成 mPEGCDI 时,由于室温下 mPEG₅₀₀₀在乙醚中溶解度比较小,而 mPEG₁₉₀₀在乙醚中具有一定的溶解度,所以 mPEG₁₉₀₀-CDI 的产率较低。

采用 RP-HPLC 法分析¹³¹I 的标记物,并示于图 1。纯的 Na¹³¹I 溶液和 Iodogen 与 Na¹³¹I 反应产物的保留时间均为 1.8 min;¹³¹I 标记的 mPEGCDI 的保留时间为 3.0 min;¹³¹I YGGCNGRC 保留时间为 5.0 min;¹³¹I mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC 放射性检测保留时间为 10.9 min;¹³¹I mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 的保留时间为 12.5 min。¹³¹I 标记 YGGCNGRC 环肽,标记率大于 90 %。用 RP-HPLC 分离后放化纯度大于 95 %。在制备¹³¹I mPEG- YGGCNGRC 时,为了提高产率,用 5 倍摩尔数的 PEGCDI 反应物,产率为 30 %左右。分离后,得到放化纯度 95 %以上的产物。

2.2 生物分布结果

2.2.1 正常小鼠的生物分布 ¹³¹I

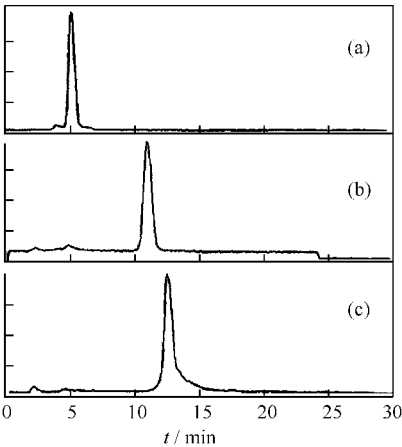


图 1 RP-HPLC 放射性分析结果

Fig. 1 RP-HPLC profile of ¹³¹I YGGCNGRC , ¹³¹I mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC and ¹³¹I mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC ; (a) —¹³¹I YGGCNGRC ; (b) —¹³¹I mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC ; (c) —¹³¹I mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC

YGGCNGRC , ¹³¹I mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC 和¹³¹I mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 在正常小鼠中的分布结果分别列入表 1~3。从表 1 看出,¹³¹I YGGCNGRC 在肾、消化道、肺和血中初始摄取率较高,且清除较慢。胃中浓度很高,可能是血液中的标记物在胃液的高酸度下从胃壁毛细血管中渗出。肠中的标记物来自肝胆排泄和随胃内容物下行。甲状腺的初始摄取不高,随着时间的延长,标记物上的¹³¹I 逐渐脱落。由表 1 可知,部分标记物由肾代谢。

表 1 ¹³¹I YGGCNGRC 在正常小鼠中的生物分布

Table 1 Biodistribution of ¹³¹I YGGCNGRC in normal mice

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
肝(Liver)	3.98 ± 0.06	2.31 ± 0.74	1.63 ± 0.30	1.56 ± 0.50	0.79 ± 0.41
心(Heart)	5.47 ± 1.73	2.55 ± 0.66	1.69 ± 0.25	1.66 ± 0.37	0.95 ± 0.35
肾(Kidney)	8.64 ± 2.24	5.47 ± 2.02	3.76 ± 0.89	2.67 ± 0.88	1.79 ± 0.45
肺(Lung)	6.82 ± 1.74	4.54 ± 1.41	2.60 ± 0.10	2.75 ± 0.75	1.54 ± 0.63

续表

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
脾(Spleen)	5.02 ±1.43	3.26 ±1.05	2.09 ±0.33	1.94 ±0.56	1.12 ±0.35
胃(Stomach)	15.98 ±4.75	14.44 ±5.24	8.52 ±1.21	8.27 ±3.51	3.02 ±1.77
小肠(Small intestine)	4.60 ±1.99	3.43 ±1.32	2.05 ±0.03	1.57 ±0.59	1.02 ±0.55
大肠(Large intestine)	3.40 ±1.14	2.94 ±0.99	2.82 ±0.67	1.73 ±0.57	1.37 ±0.70
肌肉(Muscle)	4.45 ±1.51	1.99 ±0.61	0.87 ±0.10	1.33 ±0.65	0.86 ±0.42
血(Blood)	9.92 ±2.46	6.48 ±1.86	3.97 ±0.14	3.77 ±1.30	2.00 ±0.85
脑(Brain)	1.29 ±0.51	0.47 ±0.15	0.24 ±0.02	0.27 ±0.04	0.18 ±0.08
甲状腺(Thyroid gland)	0.29 ±0.07	0.71 ±0.13	1.34 ±0.65	1.66 ±0.39	2.43 ±0.55

注(Notes) : n = 5;甲状腺数据为 % (Thyroid uptake expressed in %)

表 2 ¹³¹I-mPEG₉₀₀- YGGC NGRC 在正常小鼠中的生物分布

Table 2 Biodistribution of ¹³¹I-mPEG₉₀₀- YGGC NGRC in normal mice

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
肝(Liver)	3.97 ±0.53	1.56 ±0.13	1.41 ±0.33	0.80 ±0.22	0.35 ±0.12
心(Heart)	2.62 ±0.38	1.11 ±0.22	0.93 ±0.22	0.71 ±0.29	0.31 ±0.10
肾(Kidney)	25.61 ±11.32	7.80 ±1.13	6.18 ±1.85	3.10 ±0.77	1.99 ±1.31
肺(Lung)	4.00 ±0.84	2.02 ±0.19	2.22 ±0.64	1.31 ±0.36	0.66 ±0.18
脾(Spleen)	2.11 ±0.31	1.20 ±0.15	1.36 ±0.36	0.89 ±0.33	0.44 ±0.12
胃(Stomach)	3.85 ±1.22	6.06 ±1.23	8.52 ±2.80	3.83 ±1.18	1.36 ±0.51
小肠(Small intestine)	2.24 ±0.65	1.22 ±0.11	1.36 ±0.26	1.17 ±0.45	0.55 ±0.14
大肠(Large intestine)	1.54 ±0.31	1.11 ±0.22	0.85 ±0.17	1.43 ±0.55	1.62 ±1.01
肌肉(Muscle)	1.82 ±0.27	0.66 ±0.15	0.57 ±0.12	0.34 ±0.08	0.21 ±0.05
血(Blood)	6.18 ±1.04	2.72 ±0.41	2.63 ±0.61	1.71 ±0.54	0.96 ±0.46
脑(Brain)	0.47 ±0.07	0.20 ±0.05	0.20 ±0.06	0.14 ±0.07	0.08 ±0.05
甲状腺(Thyroid gland)	0.11 ±0.02	0.36 ±0.19	0.57 ±0.30	1.47 ±1.16	1.94 ±0.38

注(Notes) : n = 5;甲状腺数据为 % (Thyroid uptake expressed in %)

表 3 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGC NGRC 在正常小鼠中的生物分布

Table 3 Biodistribution of ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGC NGRC in normal mice

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
肝(Liver)	6.43 ±1.89	3.22 ±1.86	1.38 ±0.35	1.26 ±0.30	0.70 ±0.24
心(Heart)	3.28 ±0.61	1.70 ±0.90	1.02 ±0.17	0.85 ±0.30	0.51 ±0.25
肾(Kidney)	46.1 ±18.80	16.33 ±6.11	11.29 ±3.56	5.38 ±2.15	3.71 ±1.04
肺(Lung)	5.33 ±0.94	2.79 ±1.12	1.55 ±0.24	1.61 ±0.64	0.98 ±0.41
脾(Spleen)	3.48 ±1.35	2.06 ±0.71	1.30 ±0.30	1.27 ±0.22	0.74 ±0.31
胃(Stomach)	5.40 ±0.59	8.19 ±3.74	6.12 ±1.95	5.96 ±1.37	4.36 ±1.86
小肠(Small intestine)	2.60 ±0.94	2.87 ±1.84	1.61 ±0.38	1.50 ±0.40	1.03 ±0.61

续表

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
大肠(Large intestine)	2.15 ±0.67	1.70 ±0.54	1.11 ±0.11	2.02 ±0.97	1.98 ±0.88
肌肉(Muscle)	2.57 ±0.73	1.56 ±0.66	0.76 ±0.24	0.59 ±0.21	0.35 ±0.13
血(Blood)	8.22 ±1.37	4.54 ±1.77	2.50 ±0.47	2.29 ±0.58	1.41 ±0.51
脑(Brain)	0.54 ±0.15	0.35 ±0.22	0.16 ±0.07	0.19 ±0.17	0.06 ±0.03
甲状腺(Thyroid gland)	0.17 ±0.03	0.32 ±0.04	0.52 ±0.09	0.93 ±0.14	1.23 ±0.50

注(Notes) : n=3;甲状腺数据为 %(Thyroid uptake expressed in %)

从表 1~3 看出,用 mPEG 修饰过的 NGR 环肽在各个器官和组织中的摄取率都有所降低,但是在肾脏中的摄取率增高(5 min 时的摄取率(%/ g) 分别为:¹³¹I- YGGCNGRC , 8.6 ±2.2;¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC , 26 ±11; ¹³¹I-mPEG₆₀₀₀- YGGCNGRC , 46 ±19。后二者与前者的差异分别为显著($p < 0.05$)和非常显著($p < 0.01$)。同时,通过肾脏代谢的速度似有加快(30 min 与 5 min 摄取率之比为:¹³¹I- YGGCNGRC , 0.63 ±0.29; ¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC , 0.30 ±0.14; ¹³¹I-mPEG₆₀₀₀- YGGCNGRC , 0.35 ±0.20), 但无统计学意义。在肝的初始摄取方面, mPEG₁₉₀₀ 修饰的 NGR 与未修饰的 NGR 基本相同(5 min 时的摄取率(%/ g) 为:¹³¹I- YGGCNGRC , 4.0 ±1.1; ¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC , 4.0 ±0.5)。但 mPEG₆₀₀₀ 修饰的 NGR 环肽的肝脏摄取率也有所提高($p < 0.05$) (¹³¹I-mPEG₆₀₀₀- YGGCNGRC : 6.4 ±1.9), 代谢速度没有显著性差别($p > 0.05$) (30 min 与 5 min 摄取率之比为:¹³¹I- YGGCNGRC , 0.58 ±0.24; ¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC , 0.39 ±0.06; ¹³¹I-mPEG₆₀₀₀- YGGCNGRC , 0.50 ±0.33)。另外,在血液初始浓度方面, mPEG₁₉₀₀ 和

mPEG₆₀₀₀ 修饰 NGR 环肽(5 min 时的摄取率分别为(6.2 ±1.0) %/ g 和(8.2 ±1.4) %/ g) 与未修饰的 NGR(5 min 时为(9.9 ±2.5) %/ g) 相比,稍有下降(P 分别为 < 0.05 和 > 0.05)。从血液清除则无显著性差别($P > 0.05$)。Yamaoka 等^[6]研究了 mPEG 在体内的血液循环时间与其分子量的关系,发现小分子量的 PEG 在体内代谢非常快,3000 分子量的 PEG 的生物半排期只有 18 min,而大于 30000 分子量的 PEG 分子在体内的循环时间可以大大延长,190 kDa 的 PEG 半排期就延长至一天。所以可能采用小分子量 mPEG 修饰可以缩短环肽在体内的血清除时间。Chen 等^[7]用 mPEG₂₀₀₀ 修饰定位于肿瘤新生血管 $\alpha_v\beta_3$ 受体的 RGD 短肽序列,结果发现经 mPEG 修饰后的短肽的血清除速度有所加快。另外,由于 mPEG₁₉₀₀ 分子量更小,代谢更快些,所以器官和组织的摄取率比 mPEG₆₀₀₀ 修饰产物更低一点。

通过甲状腺的摄取率比较,经过 mPEG₁₉₀₀ 和 mPEG₆₀₀₀ 修饰的 NGR 环肽与未经修饰的 NGR 环肽在注射后 4 h 分别为(1.94 ±0.38) , (1.23 ±0.50) 和(2.43 ±0.55) % , 用 mPEG₆₀₀₀ 修饰 NGR 环肽显著地 ($P < 0.01$) 降低了¹³¹I 的脱落,而用 mPEG₁₉₀₀ 修饰对于抑制¹³¹I 的脱落作用不大。这可能是因为分子量大的 mPEG 对肽的保护性更好,在体内稳定。

2.2.2 荷瘤裸鼠的生物分布 1998 年 Arap^[11]等在乳腺癌模型中用噬菌体展示技术得到特异结合的 NGR 序列,所以本文考察¹³¹I-mPEG₆₀₀₀- YGGCNGRC 和¹³¹I- YGGCNGRC 在荷乳腺癌 MCF-7 的 BALB/ C nu 裸鼠中的肿瘤摄取。结果

表 4 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 和 ¹³¹I- YGGCNGRC 在荷瘤小鼠中的生物分布

Table 4 Biodistribution of ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC and ¹³¹I- YGGCNGRC in tumor-bearing nude mice

器官(Organ)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)	
	¹³¹ I- YGGCNGRC	¹³¹ I-mPEG ₅₀₀₀ - YGGCNGRC
肝(Liver)	1.42 ±0.51	1.06 ±0.31
心(Heart)	1.16 ±0.36	0.75 ±0.05
肾(Kidney)	3.97 ±0.53	8.81 ±1.09
肺(Lung)	2.33 ±0.74	1.83 ±0.56
脾(Spleen)	1.86 ±0.75	0.84 ±0.02
胃(Stomach)	13.79 ±1.99	2.42 ±0.08
小肠(Small intestine)	2.24 ±0.40	0.93 ±0.06
大肠(Large intestine)	1.60 ±0.29	1.03 ±0.25
肌肉(Muscle)	0.79 ±0.30	0.34 ±0.09
血(Blood)	3.84 ±1.37	2.45 ±0.04
肿瘤(Tumor)	2.79 ±0.78	1.95 ±0.53
脑(Brain)	0.23 ±0.08	0.14 ±0.06
甲状腺(Thyroid gland)	2.17 ±0.80	0.48 ±0.01

注(Notes) : n = 3;甲状腺数据为 %(Thyroid uptake expressed in %) ;注射后 2 h(2 h post injection)

列入表 4。从表 4 可看出, ¹³¹I- YGGCNGRC 和 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 和在荷瘤鼠中的生物分布和在正常鼠中的结果类似。注射后 2 h, ¹³¹I- YGGCNGRC 在肿瘤中达到 (2.79 ±0.78) %/g, 而 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 在肿瘤中的摄取稍低, 为 (1.95 ±0.53) %/g。¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 在肿瘤与大多数器官和组织的比值都比 ¹³¹I- YGGCNGRC 有所提高, 其中肿瘤与肌肉的摄取比由 3.5 ±1.7 提高到 5.7 ±2.2, 肿瘤与脾的摄取比由 1.5 ±0.7 提高到 2.3 ±0.6 等, 但无统计学意义 (P>0.05)。修饰与否对肿瘤与血的摄取比值影响不大 (0.73 ±0.33 ~ 0.80 ±0.22)。由于实验裸鼠的样本太小 (n = 3), 目前还难以对 mPEG 修饰是否能改善 NGR 的特异性作出结论。

3 结 论

(1) 采用 ¹³¹I 标记了 YGGCNGRC 环肽, 并用分子量 1900 和 5000 的单甲基化聚乙二醇对其进行化学修饰, 得到了放化纯度大于 95 % 的

¹³¹I-mPEG₁₉₀₀- YGGCNGRC, ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 和 ¹³¹I- YGGCNGRC。

(2) NGR 环肽在肾脏、胃和血中的摄取率较高, 血中的清除较慢。经过 mPEG 修饰的 NGR 环肽提高了在肾脏和肝脏中的摄取率, 但是清除较快, 三者的血液清除速度则无显著性差别。另外, 放射性碘标记的 mPEG 修饰的 NGR 环肽表现出更好的体内稳定性。

(3) ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 和 ¹³¹I- YGGCNGRC 在荷瘤裸鼠的肿瘤中有一定的摄取, 而且 ¹³¹I-mPEG₅₀₀₀- YGGCNGRC 的肿瘤与非靶的摄取比值有所改善, 但由于实验样本太小, 尚无统计学意义。该技术要应用于肿瘤的诊断或治疗仍需要进一步的研究和探索。

参考文献:

[1] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model[J]. Science, 1998, 279:377 ~380.
[2] Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, et al. Amin-

opeptidase N is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis[J]. Cancer Res, 2000, 60:722~727.

[3] Curnis F, Sacchi A, Borgna L, et al. Enhancement of Tumor Necrosis Factor an Antitumor Immunotherapeutic Properties by Targeted Delivery to Aminopeptidase N (CD13) [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18:1 185~1 190.

[4] Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, et al. Differential Binding of Drugs Containing the NGR Motif to CD13 Isoforms in Tumor Vessels, Epithelia, and Myeloid Cells [J]. Cancer Res, 2002, 62: 867 ~ 874.

[5] Bergers G, Benjamin L E. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3:401~ 410.

[6] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and Tissue Uptake of Poly(ethylene glycol) with Different Molecular Weights After Intravenous Administration to Mice[J]. J Pharm Sci, 1994, 83:601 ~ 606.

[7] Chen X Y, Park R, Shahinian A H, et al. Pharmacokinetics and Tumor Retention of ¹²⁵I-labeled RGD Peptide are Improved by PEGylation[J]. Nucl Med Biol, 2004, 31:11~19.

[8] Beauchamp C O, Gonias S L, Menapace D P, et al. A New Procedure for the Synthesis of Polyethylene Glycol-protein Adducts; Effects on Function, Receptor Recognition, and Clearance of Superoxide Dismutase, Lactoferrin, and α_2 Macroglobulin[J]. Anal Biochem, 1983, 131:25~33.

[9] Miron T, Wilchek M. A Simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene Glycol for Coupling to Proteins[J]. Bioconjugate Chem, 1993, 4:568~569.

Radioiodination and Biodistribution of PEGylated NGR Peptides

YANG Shun-long, CHU Tai-wei, LIU Xin-qi, WANG Xiang-yun

Department of Applied Chemistry, College of Chemistry and Molecular Engineering,
Peking University, Beijing 100871, China

Abstract :The NGR peptide is a ligand specifically binding to tumor angiogenic blood vessels, and thus has potential usage in the diagnosis and therapy of tumor. In this study, the cyclic peptide

YGGCN GRC is chemically modified by conjugation with a low molecular weight monomethoxy polyethylene glycol (mPEG, M. W. 1 900 or 5 000). They are labeled with ¹³¹I by using the Iodogen method. The biodistribution results in normal mice and nude mice bearing MCF-7 breast carcinoma show that ¹³¹I-PEG₁₉₀₀-YGGCN GRC and ¹³¹I-PEG₅₀₀₀-YGGCN GRC have lower uptake in most organs and tissues, but higher renal uptake than ¹³¹I-YGGCN GRC. Their early uptake in blood is lowered and their retention kept approximately the same as ¹³¹I-YGGCN GRC. The deiodination from ¹³¹I-PEG₅₀₀₀-YGGCN GRC is significantly lower than from ¹³¹I-YGGCN GRC. Although the tumor uptake of ¹³¹I-PEG₅₀₀₀-YGGCN GRC is a little bit less than ¹³¹I-YGGCN GRC, the uptake ratio of tumor to normal tissue is increased for most examined organs. The tumor/ muscle ratio is increased from 3.5 ±1.7 to 5.7 ±2.2. Modification of cyclic NGR peptide with mPEG does not remarkably alter the tumor/ blood ratio.

Key words :tumor angiogenic blood vessels; NGR peptide; PEGylation; radioiodination; biodistribution