

^{211}At 通过 DTPA 酸酐标记 IgG^{*}

刘 宁 金建南 莫尚武 陈恒留 余燕萍

(四川大学原子核科学技术研究所, 辐射物理及技术国家教委开放实验室, 成都 610064)

研究了 ^{211}At 通过二乙撑三胺五乙酸(DTPA)酸酐标记人免疫球蛋白G(IgG)的方法。合成DTPA酸酐后与人IgG反应,制得DTPA-IgG。 ^{211}At 溶液与分离纯化后的DTPA-IgG在室温下反应30 min,经Sephadex G₅₀柱分离纯化,得 ^{211}At -DTPA-IgG的0.1 mol/L PBS淋洗液。整个标记过程可在1.5 h完成,全程标记率在60%以上。测定了 ^{211}At -DTPA-IgG在体外的稳定性,并通过比较标记物与Na ^{211}At 注射液在NIH小鼠体内的分布和代谢,评价了 ^{211}At -DTPA-IgG在体内的稳定性。

关键词 ^{211}At 标记方法 DTPA IgG 稳定性 分布

中图分类号 O·613.45 R·817.9

核素 ^{211}At ($T_{1/2}=7.21\text{ h}$)衰变放出近100%的 α 射线,射线平均能量为6.8 MeV,在软组织中的射程约为6—8个细胞范围(55—80 μm),其传能线密度 L_{Δ} (98.84 keV $\cdot \mu\text{m}^{-1}$)与内照射治疗效应最佳 L_{Δ} 值($\sim 100\text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$)十分接近,具有极强的细胞毒性^[1]。用 ^{211}At 标记的抗肿瘤单克隆抗体及片段在荷瘤动物体内已显示了较好的定位分布和导向治疗作用^[2-4]。 ^{211}At 标记抗体的方法目前一般采用以砷代苯环化合物为中间体的间接标记方法。这些方法用于标记完整单抗时,标记物在体内具有较高的稳定性,但用于抗体片段的 ^{211}At 标记时,标记物在胃、肺、脾和甲状腺等正常组织的摄取显著升高^[5,6]。而一般认为,与完整单抗相比,单抗片段在肿瘤组织的摄取速率更快,达到最大摄取的时间与 ^{211}At 的半衰期更为匹配,可能更适合作为 ^{211}At 导向药物的载体。

二乙撑三胺五乙酸(DTPA)是一种强螯合剂,常用于 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, ^{90}Y , ^{186}Re 和 ^{111}In 等金属核素的抗体标记。砷(At)为原子质量最大的卤族核素,其金属性和变形性比其它任何卤素均明显。在酸溶液中,At可以以正价态的 At^+ 存在。近来,Milesz S等^[7]已利用DTPA在示踪量条件下实现了免疫球蛋白G(IgG)的 ^{211}At 标记,但无进一步的体外稳定性及动物实验研究报道。本文试图采用不同途径,将DTPA酸酐与IgG偶联后,再进行 ^{211}At 标记,制得 ^{211}At -DTPA-IgG标记物。并通过比较 ^{211}At -DTPA-IgG与离子型 $^{211}\text{At}^-$ 在NIH小鼠体内的分布和代谢,评价 ^{211}At -

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1997-03-10 收到修改稿日期: 1997-05-10

刘 宁: 男, 32岁, 放射药物化学专业, 硕士, 副研究员

DTPA-IgG 在体内的稳定性。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 试剂 人 IgG, 成都生物制品所产品; 凝胶 Sephadex G50, Pharmacia 公司进口, 上海化学试剂厂分装; 其它化学试剂均为分析纯; 实验用水为二次重蒸水。

1.1.2 仪器 FH-463 自动定标器, 西安核仪器厂产品; 7530 型分光光度计, 上海分析仪器厂产品; 高效液相色谱仪(HPLC) 为美国 Beckman 公司 334 系列, 配 170 型放射性探测器。

1.1.3 $\text{Na } ^{211}\text{At}$ 溶液 在四川大学国产 1.2 m 回旋加速器上, 用 27 MeV 的 α 粒子照射铋靶, 通过核反应 $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ 产生 $^{211}\text{At}^{[8]}$ 。经高温干法蒸馏, 硅胶柱吸附, 0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱即得 $\text{Na } ^{211}\text{At}$ 溶液。用于动物实验时, 用 0.5 mol/L HCl 调 pH 至 7.0, 并用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS) (pH = 7.0) 稀释配成 $\text{Na } ^{211}\text{At}$ 注射液。

1.1.4 实验动物 NIH 系小鼠, 体重 20—22 g, 雌雄兼有, 成都抗菌素卫生研究所提供。

1.2 DTPA 酸酐的合成及确证

按照参考文献[9]的方法, 将 15.7 g DTPA、15.6 mL 乙酸酐和 25 mL 已用氢氧化钠除去水份的吡啶置于 100 mL 烧瓶, 在 $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴中回流反应 24 h。抽滤收集不溶物, 用乙酸酐冲洗 4—5 次, 再用乙醚(使用前用金属钠除去水份)洗涤 3—4 次, 置于 $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥, 得 DTPA 酸酐。产物经四川大学分析测试中心测试, 熔点 $175\text{—}180^\circ\text{C}$ (文献 $175\text{—}185^\circ\text{C}$), 红外光谱(IR) 及核磁共振(NMR) 分析结果均与文献[9]相符。

1.3 DTPA 酸酐与人 IgG 的偶联

40 mg 人 IgG 溶于 1.0 mL 0.1 mol/L NaHCO_3 缓冲溶液(pH = 8.2), 按 DTPA 酸酐与人 IgG 摩尔比为 3:1 加入 DTPA 酸酐。室温下反应 15 min 后, 转入 Sephadex G50 柱(ϕ 2 cm $\times$ 16 cm) 分离纯化, 淋洗液为 0.1 mol/L 的乙酸缓冲液(pH = 6.0)。收集洗脱液, 用分光光度计或 HPLC 测定其蛋白质浓度。HPLC 分析条件为: 排带色谱柱 TSK 4000SW ($13\mu\text{m}$, ϕ 5 mm $\times$ 300 mm), 流动相 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 225 nm。

1.4 ^{211}At 与 DTPA-IgG 的标记

用 0.5 mol/L HCl 溶液调 $\text{Na } ^{211}\text{At}$ 溶液 pH = 6.0。取上述 4.8 g/L DTPA-IgG 洗脱液 0.2—0.4 mL, 加入到已调好 pH 值的 10.0—33.6 MBq $\text{Na } ^{211}\text{At}$ 溶液中, 室温下反应 20—30 min, 不时振摇。转入 Sephadex G50 柱, 淋洗液为 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) 溶液, 收集洗脱液, 测定其放射性浓度和蛋白质浓度, 确定 ^{211}At -DTPA-IgG 峰值。计算放化产额和比活度。同时用 HPLC 方法对淋洗液进行分析鉴定, 洗脱条件同上。但对流出组份同时进行紫外检测和放射性检测, 并画出各自的色谱图。

1.5 标记物的体外稳定性

取 ^{211}At -DTPA-IgG 的 0.1 mol/L PBS 淋洗液(放射性浓度 1.9 MBq/mL, 蛋白质浓度 $258\mu\text{g/mL}$) 0.5 mL, 分别与 0.5 mL 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) 溶液和 0.05 mol/L DTPA 溶液混合。室温放置 24 h。其间分别于 10 h 和 24 h 取样, 用 Sephadex G50 柱分析测定样品含量变化。

1.6 动物实验

将 28 只 NIH 系小鼠按实验设计随机分为两组。通过腹腔分别注射含 0.67 MBq ^{211}At -

DTPA-IgG的 0.1 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.0$) 洗脱液 $200 \mu\text{L}$ 和 2.52 MBq 的 Na^{211}At 注射液 ($200 \mu\text{L}$)。分别在 0.5 h 、 3 h 、 10 h 和 24 h 处死小鼠, 取血、甲状腺等组织器官, 称重, 测定放射性计数。由于 ^{211}At 半衰期较短, 为便于放射性衰变校正, 分别取上述两种注射液各 $10 \mu\text{L}$ 作标样, 与上述生物样品同时测量。最后计算组织摄取率 (每克组织摄取放射性占总注射量的百分比, $\% \text{D} \cdot \text{g}^{-1}$)。由于甲状腺剪取困难, 解剖过程中与周围组织一并切取, 并以 $\% \text{D}$ 表示 ^{211}At 在甲状腺的摄取率。

2 结果与讨论

2.1 标记方法的可靠性

图1为Sephadex G50柱分离纯化 ^{211}At 标记DTPA-IgG反应物的 0.1 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.0$) 洗脱曲线。根据放射性测量和蛋白质含量测定结果, 第一个峰应为 ^{211}At -DTPA-IgG的洗脱峰, 此峰约在第 12 mL 洗脱液前后出现。第二个峰出现在约第 28 mL 洗脱液前后, 无蛋白质含量, 应为游离的 $^{211}\text{At}^-$ 或未标记的小分子 ^{211}At 化合物。

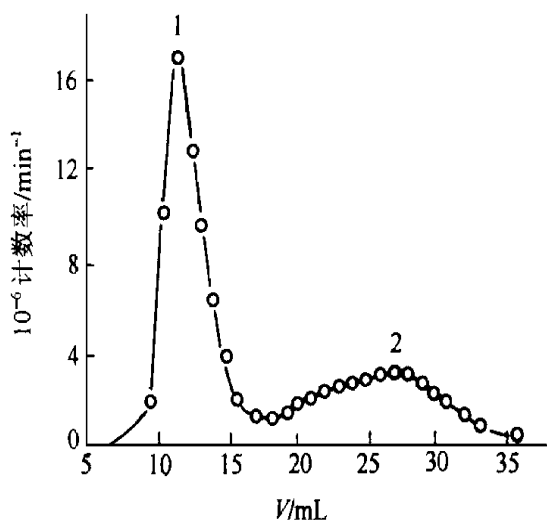


图1 ^{211}At 标记DTPA-IgG的Sephadex G50柱洗脱曲线。

Fig 1 Elution of ^{211}At labeled DTPA-IgG by a Sephadex G50 column

1 — ^{211}At -DTPA-IgG;

2 — $^{211}\text{At}^-$ 或 ^{211}At -DTPA

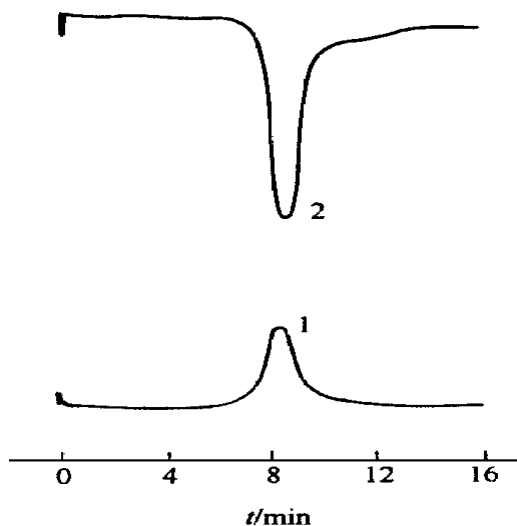


图2 ^{211}At -DTPA-IgG分离纯化后的HPLC色谱图

Fig 2 HPLC analysis of ^{211}At labeled DTPA-IgG after isolated by a Sephadex G50 column

1 — DTPA-IgG;

2 — ^{211}At -DTPA-IgG

用HPLC分析第一个峰洗脱液, 发现仅有单一的紫外吸收峰和对应出现的放射性检测峰 [$R_t = (9.30 \pm 0.05) \text{ min}$], 表明产物为单一的 ^{211}At -DTPA-IgG。同时也表明Sephadex G50柱对 ^{211}At -DTPA-IgG的分离纯化是有效的, 产物可直接用于体内外动物实验。

2.2 放化产额与比活度

由Sephadex G50柱分析测得 ^{211}At 标记DTPA-IgG的标记率为80%左右, 且加入 ^{211}At 放射性活度的多少对标记率无明显影响。由于DTPA-IgG可在标记前预先制备分离, 因此整个标记分离过程可在 1.5 h 内完成。本方法的放化产额 $> 60\%$, 这一结果高于采用对砷苯甲酸为

中间体进行²¹¹A t 标记抗体的放化产额(30%)^[4], 与国外²¹¹A t 的其它标记方法相比也是较高的^[10-12]。

一般加入 1.0—2.0 mg DTPA-IgG 和 10—33.6 MBq Na ²¹¹A t 反应, 所得标记物洗脱液的放射性浓度为 1.05—3.33 MBq/mL, 蛋白质浓度为 0.22—0.45 g/L, 比活度为 2.3—15.0 GBq/g。

2.3 ²¹¹A t-DTPA-IgG 在体外的稳定性

²¹¹A t-DTPA-IgG 与 0.1 mol/L PBS(pH= 7.0)混合, 在室温下放置 10 h 和 24 h, 其含量分别为(91.3±3.12)%和(83.5±2.30)%; 与 0.05 mol/L DTPA 混合 10 h 和 24 h 的含量分别为(91.8±3.41)%和(84.7±2.15)%。可见²¹¹A t-DTPA-IgG 在体外 10 h 和 24 h 的脱砷率分别约为 9% 和 15%, 略高于文献[13]报道的⁹⁰Y-DTPA-IgG 在体外 24 h 解离 11.9% 的结果。考虑到²¹¹A t 的半衰期仅为 7.21 h, ²¹¹A t-DTPA-IgG 在体外的稳定性还是可以的。

2.4 ²¹¹A t-DTPA-IgG 在小鼠体内的分布及稳定性

²¹¹A t-DTPA-IgG 和离子型 Na ²¹¹A t 腹腔注入 NIH 系小鼠后在体内的分布列入表 1。由表 1 可见, ²¹¹A t-DTPA-IgG 和 ²¹¹A t 注入后, 在小鼠体内均呈现全身性分布, 特别在甲状腺、胃、肺、脾等组织的摄取率较高。除甲状腺、胃、肺、脾外, 其他器官组织的²¹¹A t 摄取率几乎随时间增加而降低, 而²¹¹A t 的代谢速度更快。

²¹¹A t-DTPA-IgG 与 Na ²¹¹A t 在血液中摄取率变化规律具有显著差异。虽然二者在血液中

表 1 ²¹¹A t-DTPA-IgG 和 Na ²¹¹A t(²¹¹A t) 在 NIH 小鼠体内的分布

Table 1 Tissue distribution of ²¹¹A t-DTPA-IgG and Na ²¹¹A t in NIH mice % D/g

注射液	组织	0.5 h	3 h	10 h	24 h
Na ²¹¹ A t (n= 4)	血	3.35±0.57	2.25±0.21	0.42±0.13	0.24±0.07
	心	5.75±0.44	4.72±1.20	0.91±0.21	0.45±0.14
	肝	2.11±0.66	2.49±0.87	0.49±0.09	0.23±0.06
	胃	15.48±2.98	17.86±3.09	5.37±1.16	1.93±0.33
	肺	13.73±0.91	13.29±4.11	2.35±0.57	1.05±0.46
	脾	15.55±3.50	19.22±9.49	1.91±0.55	0.49±0.31
	肾	6.85±0.93	5.37±1.27	0.91±0.13	0.49±0.39
	肠	4.03±1.05	3.92±1.08	0.66±0.17	0.31±0.13
	腹腔脂肪	2.97±0.60	1.97±0.38	0.37±0.06	0.21±0.13
²¹¹ A t-DTPA-IgG (n= 3)	甲状腺 ¹⁾	1.07±0.34	3.73±2.07	3.53±1.23	5.09±2.44
	血	3.40±0.04	2.57±0.30	0.81±0.03 ³⁾	0.71±0.14 ³⁾
	心	6.10±0.39	4.01±0.37	1.30±0.04 ²⁾	0.59±0.12
	肝	2.05±0.18	2.18±0.34	0.71±0.06 ²⁾	0.37±0.09
	胃	15.20±1.91	20.35±5.67	5.96±0.55	2.01±0.95
	肺	14.18±1.72	12.11±2.97	2.87±0.16	1.25±0.32
	脾	16.81±2.19	13.52±2.40	2.55±0.36	0.91±0.51
	肾	7.19±0.52	4.34±0.77	1.30±0.09 ³⁾	0.59±0.24
	肠	4.09±0.48	3.42±0.82	0.89±0.06	0.51±0.17
	腹腔脂肪	3.80±0.62	3.15±1.95	0.67±0.05 ³⁾	0.29±0.03
	甲状腺 ¹⁾	1.00±0.54	4.58±0.44	4.46±1.79	5.83±2.23

注: 1) ²¹¹A t 在甲状腺的摄取率以% D 表示; 2) 与 Na ²¹¹A t 结果比较, 差异显著(P < 0.05, t 检验); 3) 与 Na ²¹¹A t 结果比较, 差异极显著(P < 0.01, t 检验)

的摄取率随时间变化均呈下降趋势,但 $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在血液中的摄取率下降要缓慢得多,注射后 10 h 和 24 h,其在血液中的摄取率仍保持在较高水平,分别为同期 $\text{Na}^{211}\text{A t}$ 在血液中摄取率的 1.93 倍和 2.96 倍。Spiegelberg 等^[14]认为 IgG 注入小鼠后很快扩散到整个体腔而导致血液中 IgG 含量的快速下降,直到一个暂时平衡状态。然后,血液中 IgG 含量的进一步下降主要取决于 IgG 在动物体内的代谢作用。从 $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在血液中的摄取率变化及与 $\text{Na}^{211}\text{A t}$ 结果的比较,可以看出 $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在体内具有一定的稳定性。

离子型 $^{211}\text{A t}^-$ 对甲状腺组织具有亲和性^[1]。根据文献^[15]用静脉给药所得结果, $\text{Na}^{211}\text{A t}$ 在甲状腺的最大摄取出现在 6 h 左右,其摄取率可达 $311\% \cdot \text{g}^{-1}$ 。本次实验采用腹腔给药,从结果看来, $\text{Na}^{211}\text{A t}$ 在甲状腺的摄取在 3—10 h 维持暂时平衡,10 h 后逐渐增加。除 0.5 h 时间点外, $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在甲状腺的摄取均大于 $\text{Na}^{211}\text{A t}$ 在甲状腺的摄取率。尽管二者在甲状腺摄取值的差别并无显著意义($P > 0.05$, t 检验),但与采用其它实验方法所得 $^{211}\text{A t}$ 标记物在甲状腺摄取率的比较^[12,16]可以看出: $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在体内可能存在着缓慢脱碘现象,解离的 $^{211}\text{A t}$ 主要滞留在甲状腺。考虑到一般 $^{211}\text{A t}$ 标记抗体片段在小鼠体内的分布和代谢有别于 $^{211}\text{A t}$ 标记完整单抗(IgG),因此本标记方法能否适宜于抗体片段的 $^{211}\text{A t}$ 标记尚需作进一步研究。

3 结 论

- (1) $^{211}\text{A t}$ 可通过 DTPA 酸酐标记 IgG,其标记率约为 80%,放化产额 $> 60\%$,整个标记分离过程可在 1.5 h 内完成。
- (2) $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 标记物在体外具有一定的稳定性。
- (3) $^{211}\text{A t-DTPA-IgG}$ 在小鼠体内可能存在着缓慢脱碘现象。

参 考 文 献

- 1 刘 宁,金建南. $^{211}\text{A t}$ 标记的放射治疗药物的新进展. 同位素, 1996, 9(2): 110
- 2 Wilbur DS, Vessella, Strany JE, et al Preparation and Evaluation of Para- $(^{211}\text{A t})$ astatobenzoyl Labeled Antirenal Cell Carcinoma Antibody A6H F (ab^1): In Vivo Distribution Comparison With Para- (^{125}I) iodobenzoyl Labeled A6H F (ab^1)₂ Nucl Med Biol, 1993, 20: 197
- 3 Zalutsky MR, Garg PK, Schuster JM, et al Effective Treatment of Experimental Human Neoplastic Meningitis (NM) With Intrathecal Astatine-211 Monoclonal Antibody (McAb). J Nucl Med, 1991, 33: 922
- 4 Liu Ning, Jin Jiannan, Zhang Shuyuan, et al Astatine-211 Labeling of a Monoclonal Antibody and Its Fab Fragment: Synthesis, Immunoreactivity and Experimental Therapy. J Lab Compd Radiopharm, 1995, 36: 1105
- 5 Garg PK, Harrison CL, Zalutsky MR. Comparative Tissue Distribution in Mice of the α -Emitter and ^{131}I as Labels of a Monoclonal Antibody and F(ab^1)₂ Fragment Cancer Res, 1990, 50: 3514
- 6 张叔渊,金建南,刘 宁,等. $^{211}\text{A t}$ 标记抗胃癌单抗 3H11 及其 Fab 片段在荷人胃癌裸小鼠体内的分布. 核化学与放射化学, 1994, 16(3): 166
- 7 Milesz S, Norseev YuV, Szűts Z, et al Characterization of DTPA Complexes and Conjugated Antibodies of Astatine J Radioanal Nucl Chem (Letters), 1989, 137: 365
- 8 周懋伦,金建南,张叔渊,等. $^{211}\text{A t}$ 的制备及质量控制. 四川大学学报, 1986, 23: 84

- 9 Hnatow ich DJ, Langne WW, Childs RL. The Preparation and Labeling of DTPA-coupled Albumin. *Int J Appl Radiat Isot*, 1982, 33: 327
- 10 Zalutsky MR, Narula AS. Astatination of Protein Using N-Succinimidyl Tri-*n*-butylstannyl Benzoate. *Intermediate Appl Radiat Isot*, 1988, 39: 227
- 11 Wunderlich G, Fischer S, Dreyer R, et al. A Simple Method Labeling Proteins With ^{211}At via Diazoized Aromatic Diamine. *J Radioanal Nucl Chem (Letters)*, 1987, 117: 197
- 12 Garg S, Garg DK, Zalutsky MR. Labeling Monoclonal Antibodies (McAbs) With ^{211}At Using N-Succinimidyl-5-(^{211}At)astato-3-phosphoridine-carboxylate (SAPC). *J Nucl Med*, 1993, 34: 99
- 13 张锦明, 林琼芳, 金小海. ^{90}Y 标记抗体的双功能络合剂的研究——异硫氰苄基DTPA 与环化DTPA 酞酐的比较. *核化学与放射化学*, 1993, 15: 219-223
- 14 Spiegelberg HL, Weigle WO. Catabolism of IgG and Its Biological Half-life. *J Exp Med*, 1965, 121: 323
- 15 张叔渊, 许道权, 金树珊, 等. 砷-211 在小白鼠体内的分布及碘存在的影响. *四川大学学报*, 1987, 24: 451
- 16 张叔渊, 金建南, 刘 宁, 等. ^{211}At -CEA McAb 导向药物的稳定性及动物体内分布. *四川大学学报*, 1992, 29: 579

LABELING IgG WITH ^{211}At VIA DTPA ANHYDRIDE

Liu Ning Jin Jiannan Mo Shangwu Chen Hengliu Yu Yanping

(Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064)

ABSTRACT

A method for labeling human IgG with ^{211}At via DTPA anhydride is described. DTPA-IgG is prepared and ^{211}At is conjugated to human IgG by adding Na ^{211}At to DTPA-IgG and reaction for 30 min at room temperature. The astatinated IgG is isolated by a Sephadex G50 column and identified by size exclusion HPLC. The labeling procedure is executed in 1.5 h and at least 60% of the added ^{211}At are found in the product. The stability of ^{211}At -DTPA-IgG in vitro and vivo is evaluated.

Key words ^{211}At Labeling method DTPA IgG Stability Biodistribution