

文章编号: 0253-9950(2008)02-0093-05

$^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ 标记 DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer 的比较

张 燕^{1, 2}, 贺巍巍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: 分别选用 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 标记 DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer, 比较不同形式的双功能螯合剂对标记条件以及标记物的体外稳定性的影响。考察了反应 pH 值、反应温度和反应时间对标记率的影响。ITLC 和 HPLC 分析结果表明, pH=6.0, 100 °C 下反应 15~20 min, 4 种标记物的标记率均大于 95%; 在生理盐水和牛血清体系中, 4 种标记物均保持良好的稳定性。苄基(Bz)的引入并不影响标记条件和标记物的体外稳定性, 但对整个分子的极性带来了影响。HPLC 分析结果和 lg *P* 测定结果显示, 引入苄基(Bz)使标记物分子的脂溶性略微增加。

关键词: ^{90}Y ; ^{177}Lu ; DOTA; Bz-DOTA; RGD 四聚体

中图分类号: O615.4 文献标志码: A

Comparison of $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ Labeled DOTA-Bz-RGD Tetramer and DOTA-RGD Tetramer

ZHANG Yan^{1, 2}, HE Wei-wei¹, 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: $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ labeled DOTA-Bz-RGD tetramer and DOTA-RGD tetramer were prepared, and the effect of Bz-DOTA and DOTA on labeling conditions and *in vitro* stability of radiolabeled compounds was compared. The labeling conditions, including reaction pH, reaction temperature and reaction time, were investigated. ITLC and HPLC show that the labeling yields of four radiolabeled compounds are more than 95% under optimal conditions (pH=6.0, reacting at 100 °C for 15-20 min); the four radiolabeled compounds show pretty good stability in saline and fetal bovine serum. Although introducing of Bz has no effect on labeling conditions and *in vitro* stability of radiolabeled compounds, it brings a little change on molecule polarity. HPLC analysis and lg *P* values reveal that introducing of Bz increases the lipophilicity of radiolabeled compounds.

Key words: ^{90}Y ; ^{177}Lu ; DOTA; Bz-DOTA; RGD tetramer

收稿日期: 2006-10-26; 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: 张 燕(1982-), 女, 云南昆明人, 硕士, 分析化学专业

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

© Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大环类化合物作为一类非常有效的双功能螯合剂已经用于镧系元素的标记^[1-2]。DOTA 及其衍生物已被证明是一类有效的 DTPA 替代物,能和大量的三价及二价金属核素形成稳定的络合物,其中三价核素包括^{66, 67, 68}Ga, ^{86, 90}Y, ¹¹¹In, ¹⁴⁹Pm, ¹⁷⁷Lu 等,二价核素包括²⁷Mg, ⁴⁷Ca, ⁶⁴Cu 等^[3]。DOTA 与多肽间的连接可以通过 2 种方式实现^[3],一种是 DOTA 的四个羧基中的一个直接与多肽上的氨基相连,另一种方法则通过引入的侧链与多肽相连,例如 p-NCS-Bz-DOTA (图 1)。

整合素(integrin) $\alpha_v\beta_3$ 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^[4-5]。目前许多研究者采用¹⁸F, ¹²⁵I, ⁹⁹Tc^m, ⁹⁰Y, ¹¹¹In 和 ⁶⁴Cu等多种核素对 RGD 多肽进行标记和评价,研究结果显示,大多数 RGD 多肽标记物均具有较高的 integrin $\alpha_v\beta_3$ 亲和力和体外特异选择性,并且在不同肿瘤模型鼠的显像中可以对肿瘤进行准确定位^[6]。各种实验数据表明放射性标记的 RGD 多肽是一种非常有前景的多肽类受体放射性药物^[7]。另外,研究发现 RGD 环形肽的二聚体具有比单体更佳的受体亲和力和体内药代动力学性质,并且四聚体的亲和力有进一步的提高^[7-8]。

本研究选用 RGD 四聚体 DOTA-Bz-RGD

tetramer 和 DOTA-RGD tetramer, 分别用⁹⁰Y 和¹⁷⁷Lu 标记,以比较不同形式的双功能螯合剂是否对标记条件及标记物的体外稳定性产生影响。

1 实验材料

1.1 主要试剂

⁹⁰YCl₃ 和 ¹⁷⁷LuCl₃ 溶液, 美国 PE 公司; DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer, 美国 Purdue 大学刘爽教授馈赠,其结构示于图 1;醋酸钠、醋酸胺、醋酸、乙腈,色谱纯,美国 J.T. Baker 公司;胎牛血清,北京科贸公司;其他化学试剂,分析纯,北京试剂公司;ITLC-SG, 美国 Gelman 公司。

1.2 仪器设备

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 μ m),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 μ m 滤膜过滤。

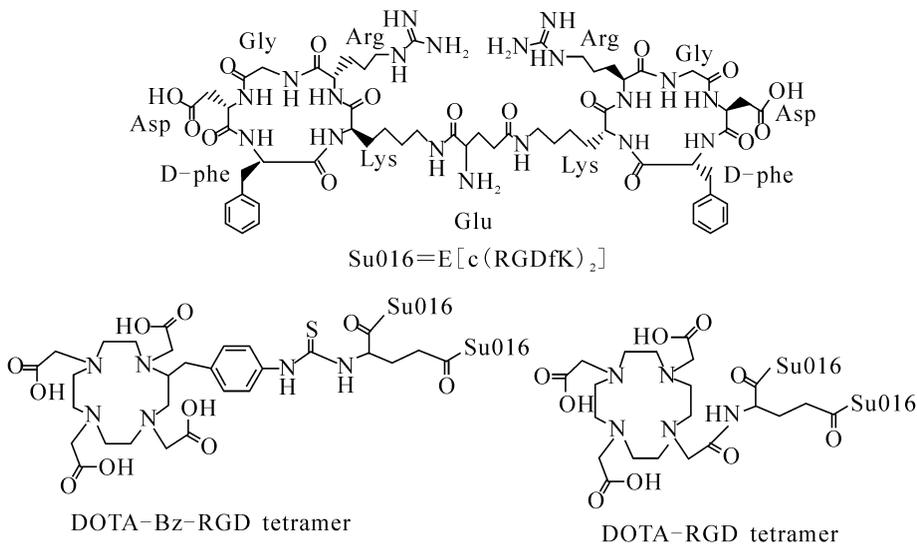


图 1 RGD 四聚体连接不同 DOTA 后的分子结构

Fig. 1 Structure of DOTA conjugates of RGD tetramer

2 实验方法

2.1 ⁹⁰Y-DOTA-Bz-RGD tetramer 和 ⁹⁰Y-DOTA-RGD tetramer 的制备

2.1.1 pH 对标记率的影响 在 EP 管中分别加入 20 μL DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer (500 mg/L, 溶于去离子水), 加入 pH 值分别为 4.0, 5.0, 6.0 和 7.0 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液 125 μL (均使用 Chlex-100 树脂去离子处理), 再加入 5 μL ⁹⁰YCl₃ (37 MBq), 混匀, 100 °C 反应 20 min 后取样分析标记率。

2.1.2 不同反应温度下反应时间对标记率的影响 在 EP 管中分别加入 20 μL DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer (500 mg/L, 溶于去离子水), 加入 pH=6.0 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液 125 μL (均使用 Chlex-100 树脂去离子处理), 再加入 5 μL ⁹⁰YCl₃ (37 MBq), 混匀, 分别于 100 °C 反应 1, 5, 10, 15, 30, 60 min 后取样分析标记率。同样条件下于 50 °C 反应 5, 10, 20, 30, 60 min 后取样分析标记率。室温下反应 5, 15, 30, 60, 120 min 后取样分析标记率。

2.2 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD tetramer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-RGD tetramer 的制备

在 EP 管中分别加入 20 μL DOTA-Bz-RGD tetramer 和 DOTA-RGD tetramer (500 mg/L, 溶于去离子水), 加入 pH=6.0 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液 125 μL, 最后加入 5 μL ¹⁷⁷LuCl₃ (37 MBq), 混匀, 100 °C 反应 15~20 min 后取样进行 ITLC 和 HPLC 分析。

2.3 质量控制方法

2.3.1 快速薄层层析法(ITLC) 点样于 ITLC-SG 板(10 mm×100 mm)上, 于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH=5.0)的展开体系中上行展开, 用放射性薄层扫描仪进行扫描, 计算标记率或放射化学纯度。

2.3.2 HPLC 法 流动相为乙腈和 0.01 mol/L, pH=6.0 的磷酸缓冲液, 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。上样样品均按照体积比 1:1 加入 10 mmol/L EDTA。

2.4 标记物的体外稳定性研究

2.4.1 ⁹⁰Y 标记物的体外稳定性 将⁹⁰Y 的 2 种标记物分别稀释到生理盐水和胎牛血清(FBS)

中, 于室温孵育, 并于孵育后 1, 2, 4, 8, 12, 24 h, 使用 ITLC 法检测标记物的放射化学纯度。

2.4.2 ¹⁷⁷Lu 标记物的体外稳定性 将¹⁷⁷Lu 的 2 种标记物分别于标记后直接放置、稀释到生理盐水和胎牛血清(FBS)中, 于室温孵育, 并于孵育后 1, 2, 4, 8, 12, 48, 72, 144 h, 使用 ITLC 法检测标记物的放射化学纯度。

2.5 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 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 $\lg P$ 。

3 结果和讨论

3.1 各种因素对标记率的影响

3.1.1 pH 对标记率的影响 不同 pH 下标记率的测定结果示于图 2a。由图 2a 可看出, pH=5~6 时即可获得较高的标记率, pH=6.0 时标记率最高。

3.1.2 不同温度下反应时间对标记率的影响 100 °C, 50 °C 和室温条件下不同反应时间时的标记率测定结果示于图 2b, 2c, 2d。图 2 结果表明, 标记物在 100 °C 时反应 10 min, 标记率可达 95% 以上, 并且随着反应时间的延长, 标记率趋于稳定。据文献[9]报道, DOTA 的⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu 标记在 100 °C 时反应 5 min 即可达到最高标记率。标记物在 50 °C 时反应 60 min, 标记率仅达 60% 左右。而在室温条件下, 标记率随着反应时间的延长缓慢增加, 到 120 min 时标记率仍不到 20%。

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⁺和¹⁷⁷Lu³⁺离子的 R_f 值为 0.9~1.0, 标记化合物的 R_f 值为 0.0~0.1。实验结果表明, 可以用 ITLC 法测定⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTA-RGD tetramer 和⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD tetramer 的标记率和放射化学纯度。在最佳反应条件下, 2 种化合物的⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu 标记率均达到 95% 以上。

3.2.2 HPLC 分析 4 种标记物的 HPLC 分析结果示于图 3。⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-EDTA 的保留时间为 3~4 min, ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD tetramer 的保留时间略微滞后于⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTA-RGD tetramer, 表明苄基(Bz)的引入对整个分子的极性带来了影响, 分子的脂溶性略微增加。

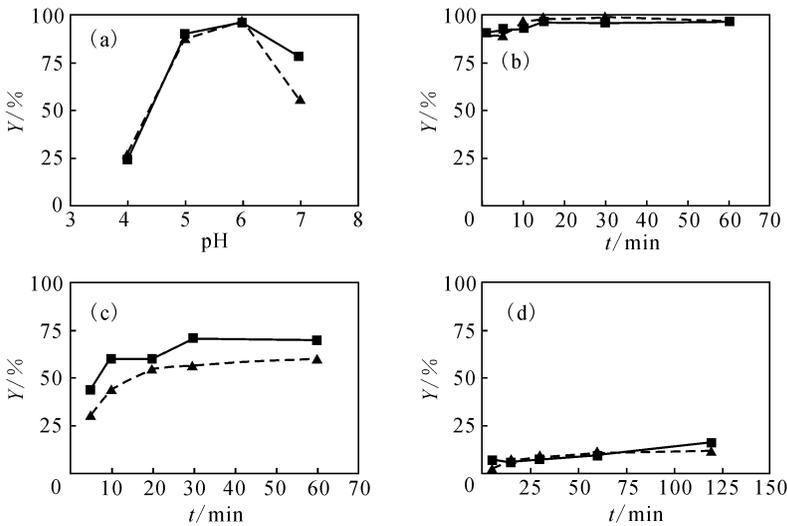


图 2 RGD 四聚体连接不同形式的 DOTA 后 ^{90}Y 螯合动力学

Fig. 2 ^{90}Y chelate kinetics of DOTA conjugates of RGD tetramer

■ — ^{90}Y -DOTA-Bz-RGD tetramer, ▲ — ^{90}Y -DOTA-RGD tetramer

(a) — pH, (b) — 100 °C, (c) — 50 °C, (d) — 室温 (Room temperature)

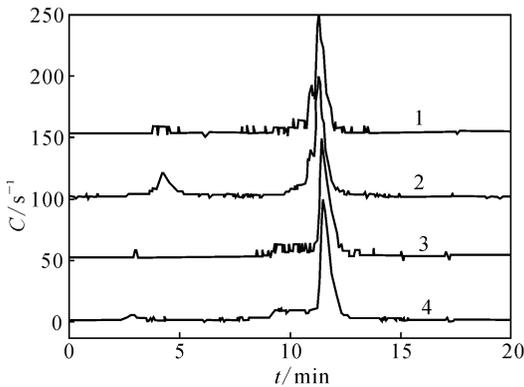


图 3 4 种标记物的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC analysis of 4 radiolabeled compounds

1 — ^{90}Y -DOTA-RGD tetramer, $t_{\text{R}} = 11.289$ min;

2 — ^{177}Lu -DOTA-RGD tetramer, $t_{\text{R}} = 11.295$ min;

3 — ^{90}Y -DOTA-Bz-RGD tetramer, $t_{\text{R}} = 11.483$ min;

4 — ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD tetramer, $t_{\text{R}} = 11.496$ min

图中前端 3~4 min 处的小峰为 $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -EDTA

(The small peaks at 3~4 min present $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -EDTA)

3.3 标记物的体外稳定性

3.3.1 ^{90}Y 标记物的体外稳定性 不同条件下, ^{90}Y -DOTA-RGD tetramer 和 ^{90}Y -DOTA-Bz-RGD tetramer 的稳定性测定结果示于图 4a 和 4b。2 种标记物在生理盐水和牛血清中室温放置 24 h 后放射化学纯度仍保持在 90% 以上, 体外稳定性均良好。

3.3.2 ^{177}Lu 标记物的体外稳定性 为进一步研究 2 种形式的 DOTA 在稳定性方面的差异, 采用 3 种体系测定 2 种标记物长时间放置的稳定性, 测定结果示于图 4c, 4d 和 4e。室温下随着放置时间的延长, 标记物放射化学纯度缓慢下降, 放置 48 h 放射化学纯度保持 90% 以上, 放置 144 h 放射化学纯度仍保持 80% 以上, 在相同的时间点 2 种标记物的放射化学纯度差异不大。

3.4 脂水分配系数的测定

分配系数可以用于评价标记物的水溶性, 分配系数越大, 说明标记物的脂溶性越好^[5]。 ^{177}Lu -DOTA-RGD tetramer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD tetramer 的 $\lg P$ 分别为 -2.662 ± 0.204 ($n=3$) 和 -2.369 ± 0.066 ($n=3$)。结果显示 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD tetramer 的脂溶性略好于 ^{177}Lu -DOTA-RGD tetramer, 说明苄基(Bz)的引入提高了标记物的脂溶性, 与 HPLC 的分析结果一致。

4 结论

(1) 使用 2 种不同形式的 DOTA 螯合 2 种镧系元素 ^{90}Y 和 ^{177}Lu , 在优化条件下, 即 $\text{pH} = 6.0$ 、反应温度 100 °C 下反应 15~20 min, 标记率可以达到 95% 以上。苄基(Bz)的引入不影响 DOTA 对 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 的螯合动力学。

(2) ^{90}Y 和 ^{177}Lu 标记物的 HPLC 分析结果

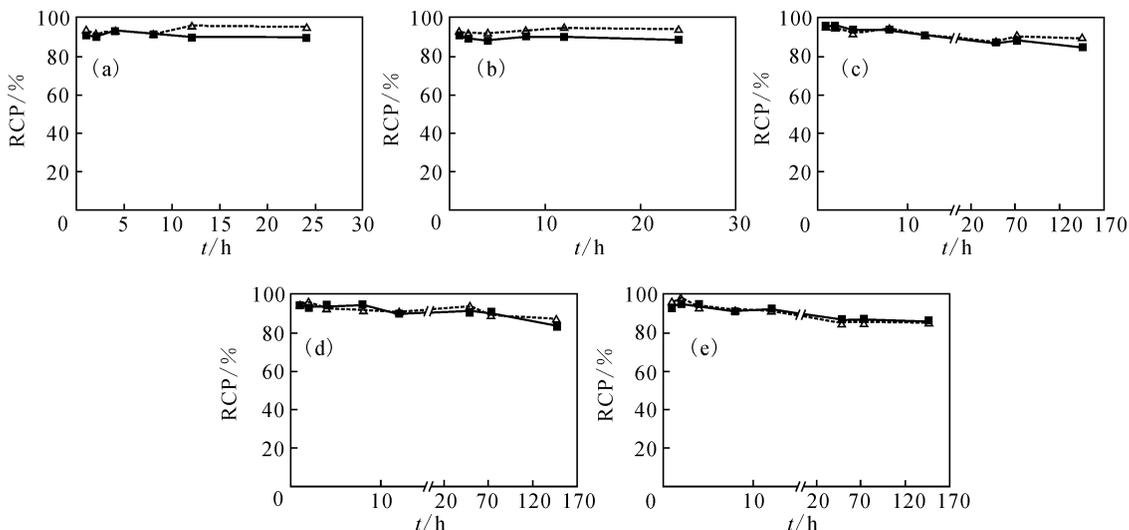


图4 标记物在不同体系中的体外稳定性

Fig. 4 Solution stability of radiolabeled compounds

■——DOTA-Bz-RGD tetramer, △——DOTA-RGD tetramer

(a) ——⁹⁰Y 标记物, 生理盐水 (⁹⁰Y-compounds in saline); (b) ——⁹⁰Y 标记物, 胎牛血清 (⁹⁰Y-compounds in FBS);

(c) ——¹⁷⁷Lu 标记物, 直接放置 (¹⁷⁷Lu-compounds in labeling solution);

(d) ——¹⁷⁷Lu 标记物, 生理盐水 (¹⁷⁷Lu-compounds in saline); (e) ——¹⁷⁷Lu 标记物, 胎牛血清 (¹⁷⁷Lu-compounds in FBS)

显示, 苜基(Bz)的引入对整个分子的极性带来了影响, 分子的脂溶性略微增加。lg *P* 值的测定结果也说明这一点。

(3) 在室温条件下, 4 种标记物在各种测试体系中均显示良好的体外稳定性。

据文献报道, 带有苜基(Bz)的 DOTA 与 DOTA 有不同的电性^[10], 而电性和极性的变化可能对化合物在体内的生物分布产生影响。本工作将通过荷瘤裸鼠实验进一步验证 2 种不同形式的 DOTA 对标记物体内行为的影响。

参考文献:

- [1] Liu S, Edwards D S. Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12: 7-34.
- [2] Stimmel J B, Stockstill M E, Frederick C K, Jr. Yttrium-⁹⁰ Chelation Properties of Tetraazetaraacetic Acid Macrocycles, Diethylenetriaminepentaacetic Acid Analogues, and a Novel Terpyridine Acyclic Chelator [J]. *Bioconjug Chem*, 1995, 6: 219-225.
- [3] Fichna J, Janecka A. Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 3-17.
- [4] Harris T D, Kalogeropoulo S, Nguen 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.
- [5] 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.
- [6] Liu S. Radiolabeled Multimeric Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers for Tumor Imaging [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3: 472-487.
- [7] Hauber R, Wester H J. Radiolabeled Tracers for Imaging of Tumor Angiogenesis and Evaluation of Anti-Angiogenic Therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 1 439-1 455.
- [8] Wu Y, Zhang X Z, Xiong Z M, et al. MicroPET Imaging of Glioma Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression Using ⁶⁴Cu-Labeled Tetrameric RGD Peptide [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(10): 1 707-1 718.
- [9] Liu S, Cheung E, Ziegler M C, et al. ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu Labeling of a DOTA-Conjugated Vitronectin Receptor Antagonist Useful for Tumor Therapy [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12(4): 559-568.
- [10] Uzgiris E E, Cline H, Moasser B, et al. Conformation and Structure of Polymeric Contrast Agents for Medical Imaging [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 54-61.