

^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的制备及生物评价

史继云^{1,2}, 余子磷¹, 贾 兵^{1,2}, 赵慧云¹, 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: 制备了 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer, 并比较 4 个 PEG 分子的引入对标记条件标记化合物体外稳定性、标记化合物的药代动力学性质及其在小鼠体内生物分布的影响。薄层色谱法(TLC)和高效液相色谱法(HPLC)分析结果表明, 反应液 pH 分别为 4.0 和 6.0 时, 100 °C 反应 15 ~ 20 min, 两种标记化合物的标记率均 > 95%。在生理盐水体系中, 二者均保持良好的稳定性, 放置 72 h 放化纯度仍 > 90%。HPLC 的分析结果和脂水分配系数 $\lg P_{ow}$ 的测定结果显示, ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的脂溶性有所提高。引入 4 个 PEG 分子没有显著改变标记化合物的药代动力学性质及其在小鼠体内的生物分布。

关键词: ^{177}Lu ; RGD 二聚体; PEG; 标记; 生物分布

中图分类号: TQ463; R817-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2007)04-0214-05

Preparation and Evaluation of ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer and ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer

SHI Ji-yun^{1,2}, YU Zi-lin¹, JIA Bing^{1,2}, ZHAO Hui-yun¹, WANG Fan^{1,2}

(1. *Medical Isotopes Research Center, Peking University, Beijing 100083, China;*

2. *Department of Isotopes, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China*)

Abstract: ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer and ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer were prepared, and the effect of PEG4 on labeling conditions and in vitro stability as well as pharmacokinetic properties and biodistribution in normal mice for the radiolabeled compounds was compared. The results of TLC and HPLC show that the labeling yield of two radiolabeled compounds was more than 95% under optimal conditions (pH 4.0 and pH 6.0, respectively, reacting at 100 °C for 15-20 min). The two radiolabeled compounds show pretty good stability in saline. HPLC analyses and $\lg P_{ow}$ values revealed that introducing of PEG4 increased the lipophilic character of radiolabeled compounds, but had no significant changes on pharmacokinetic properties and biodistribution in normal mice.

Key words: ^{177}Lu ; RGD dimer; PEG; labeling; biodistribution

整合素(integrin) $\alpha_v\beta_3$ 是一类由 α 亚基和 β 亚基经非共价键连接而形成的异二聚体跨膜糖蛋白粘附分子,在新生血管内皮细胞表面及多种恶性肿瘤细胞表面有高密度表达,而成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统则无表达或表达极低^[1-2]。含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的小分子多肽是整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂,对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 分子具有高度的选择性与亲和力,具有潜在的临床应用价值^[3]。

近年来,放射性核素标记的RGD多肽化合物已广泛用于肿瘤的显像和治疗研究^[4],这些放射性核素包括¹⁸F、⁶⁴Cu、¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁰Y、¹⁷⁷Lu、⁹⁹Tc^m等。其中,¹⁷⁷Lu由于其良好的物理性质,作为治疗用核素倍受人们青睐:它具有较长的半衰期(6.67 d),可以对肿瘤组织进行较长时间的照射以达到更好的治疗效果;同时发射 γ 射线(113~208 keV)和能量适中的 β^- 粒子(0.49 MeV),在治疗的同时可以通过显像评价治疗效果;由于其在组织中平均射程较短(≤ 2.2 mm),因此将其用于治疗时,可以减少对周围组织的损伤。正是基于这些特点,¹⁷⁷Lu已用于各种放射性药物的研究^[5-9]。

为了改善放射性药物的体内药代动力学性质,提高肿瘤对药物的摄取,多聚体(Multimer)的概念^[10]和引入适当的药代动力学修饰分子(PKM)的方法^[11]已被采用。本工作拟选用RGD二聚体化合物,引入4个聚乙二醇(PEG)修饰基团作为PKM,制备¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer和¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer,并对两种标记化合物的化学性质及体内生物学性质进行比较。

1 实验材料

1.1 试剂及仪器

¹⁷⁷LuCl₃溶液(7.4 TBq/L):美国Perkin Elmer公司;DOTA-Bz-RGD dimer和DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer;美国Purdue大学刘爽教授馈赠(其分子结构示于图1);醋酸钠、醋酸胺、醋酸、乙腈;色谱纯,美国J. T. Baker公司;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高效液相色谱仪(配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,所有实验用水为去离子水(18.2 M Ω),HPLC所用的溶剂在使用前均经0.22 μ m滤膜过滤。

1.2 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。

2 实验方法

2.1 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer和¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer的制备

2.1.1 pH对标记率的影响 在Eppendorf(EP)管中分别加入20 μ L DOTA-Bz-RGD dimer和DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer(500 mg/L,溶于去离子水),然后加入125 μ L 0.2 mol/L、pH分别为3.0、4.0、5.0、6.0和7.0的醋酸缓冲溶液(均使用Chlex-100树脂去离子处理),再加入5 μ L ¹⁷⁷LuCl₃(37 MBq),混匀,100 $^{\circ}$ C下反应20 min,取样分析标记率。

2.1.2 反应温度、反应时间对标记率的影响 在EP管中分别加入20 μ L DOTA-Bz-RGD dimer和DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer(500 mg/L,溶于去离子水),加入125 μ L 0.2 mol/L pH分别为4.0和6.0的醋酸缓冲溶液(均使用Chlex-100树脂去离子处理),再加入5 μ L ¹⁷⁷LuCl₃(37 MBq),混匀,分别于室温、50和100 $^{\circ}$ C下反应1、5、10、15、30、60 min,取样分析标记率。

2.2 质量控制方法

2.2.1 薄层层析法(TLC) 将标记物点样于Whatman No. 1滤纸(10~200 mm)上,于V(丙酮):V(生理盐水)=1:1的展开体系中上行展开,用放射性薄层扫描仪进行扫描,计算标记率和放化纯度。

2.2.2 HPLC法 流动相为乙腈和0.01 mol/L pH 6.0的磷酸缓冲液(PBS),流速为1.0 mL/min,洗脱梯度:0~10 min,10%~30%乙腈;10~15 min,30%~80%乙腈;15~20 min,80%~10%乙腈。标记物在进行HPLC分析前,按照体积比1:1加入10 mmol/L的EDTA。

2.3 脂水分配系数测定

将20 μ L标记物加入到含480 μ L PBS(pH=7.4, 0.05 mol/L)和500 μ L的正辛醇的EP

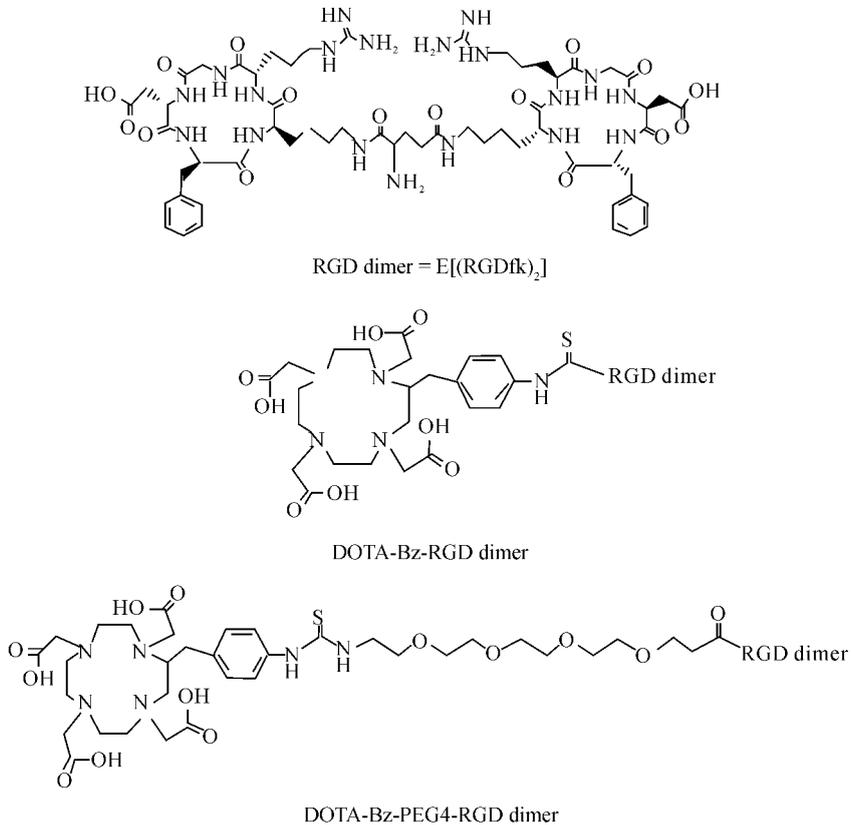


图 1 DOTA-Bz-RGD dimer 和 DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的结构式

管中, 涡旋混匀 1 h, 6 000 r/min 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_{ow} (有机相计数/水相计数) 及 $\lg P_{ow}$ 。

2.4 标记物的体外稳定性

将两种标记物分别置于生理盐水中, 在 37 °C 的恒温水浴中孵育, 并于孵育后 2、4、6、8、10、24、48 和 72 h 用 TLC 法检测标记化合物的放化纯度。

2.5 动物实验

2.5.1 标记物的药代动力学 将 10 只 ICR 小白鼠随机分成两组, 每组 5 只。一组经尾静脉注射 100 μ L 185 kBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer, 另一组经尾静脉注射 100 μ L 185 kBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer。于注射后 1、5、15、30、60、120 min 取尾静脉血, 称质量并测量放射性计数, 经衰变校正后计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g), 绘制血液清除曲线。

2.5.2 标记物在正常小鼠体内的生物分布 将 16 只 ICR 小白鼠随机分成两组, 每组 8 只。每组分别经尾静脉注射 100 μ L 185 kBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-

PEG4-RGD dimer。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, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果与讨论

3.1 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的制备

3.1.1 反应液 pH 的选择 反应液 pH 对标记率的影响示于图 2。由图 2 可以看出, 制备 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 的最佳 pH 为 4.0, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的最佳 pH 为 6.0。其最大标记率均 $> 95\%$ 。

3.1.2 反应温度、反应时间对标记率的影响 反应温度、反应时间对标记率的影响示于图 3。由图 3 可以看出, 室温下反应 60 min, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的标记率分别小于 20% 和 40%。提高反应温度, 在 50 °C 下反应 60

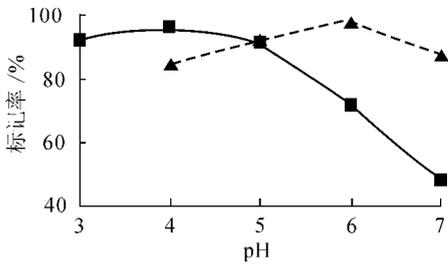


图 2 反应液 pH 对标记率的影响
■——DOTA; ▲——DOTA-PEG4

min, ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 的标记率可以达到约 90%, 而 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的标记率仍只有约 50%。在 100 °C 下反应 10 min, 两种标记化合物的标记率均可达到 95% 以上, 并随着反应时间的延长, 标记率趋于稳定。因此, 选择在 100 °C 下反应 15~20 min。

3.2 质量控制

在 TLC 方法中, 游离的 $^{177}\text{Lu}^{3+}$ 的 R_f 为 0.0~0.1, 标记化合物的 R_f 为 0.9~1.0。该结果表明, 可以用 TLC 法测定 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的标记率和放化纯度。

两种标记物的 HPLC 分析结果示于图 4。由图 4 可以看出, ^{177}Lu -EDTA 的保留时间为 3~4 min, ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 的保留时间为 9.5 min, ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的保留时间为 11.8 min, 表明 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 分子的脂溶性有所增加。

以上结果表明, TLC 和 HPLC 两种质控方法均可用于 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 标记率和放化纯度的检测, 所得结果在实验误差范围内一致。

3.3 脂水分配系数测定

化合物的脂水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。 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的 $\lg P_{ow}$ 分别为 $-3.468 \pm 0.090 (n=3)$ 和 $-2.657 \pm 0.054 (n=3)$ 。该结果表明, ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的脂溶性高于 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer, 与 HPLC 的分析结果一致。

3.4 标记物的体外稳定性

两种标记物在生理盐水中均有良好的稳定性, 在 37 °C 下孵育 72 h, 其放化纯度均 >90%。

3.5 动物实验

3.5.1 标记物的药代动力学 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 在正常小鼠体内血液清除实验结果示于图 5。由图 5 可以看出, 二者均符合二室代谢模型, 其中 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 分布相半衰期为 2.2 min, 消除相半衰期为 12.6 min。 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 分布相半衰期为 2.4 min, 消除相半衰期为 10.7 min。两种标记化合物在血液中的药代动力学性质十分相似, 血液清除快, 符合多肽药物的特点。

3.5.2 标记物在正常小鼠体内的生物分布

^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 和 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 在正常小鼠体内的生物分布列于表 1。从表 1 可以看出, 除了在注射后 1 h 肝和胃中的放射性摄取有显著差异外, 其它组织对这 2 种标记物的摄取均无显著性差异。注射后 1 h ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 在肝和胃中的摄取高于 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 在肝和胃中的摄取, 但其代谢较快, 注射后 4 h 肝和胃中的 ^{177}Lu -DOTA-Bz-RGD dimer 已低于 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer。 ^{177}Lu -DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 在肝和胃中代谢较慢, 与其脂溶性较高有关。两种标记物在肾和肝中的摄取相对较高, 说明它们经肾脏排泄的同时, 也有一部分经肝胆系统排泄。

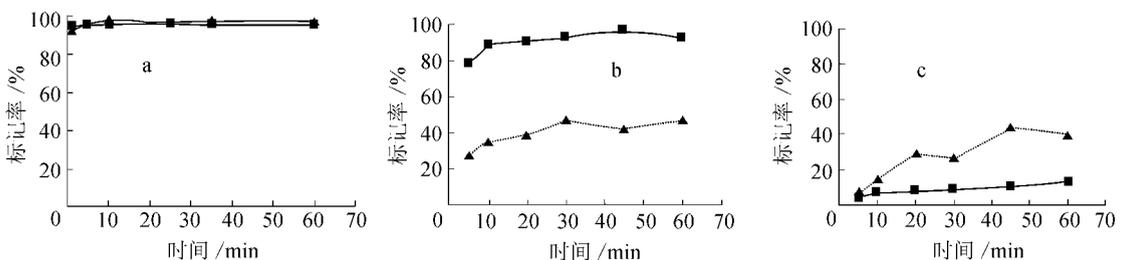


图 3 反应温度对标记率的影响

a——100 °C; b——50 °C; c——室温; ■——DOTA; ▲——DOTA-PEG4

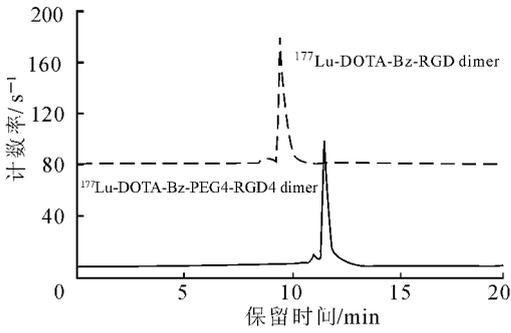


图 4 两种标记化合物的 HPLC 谱图

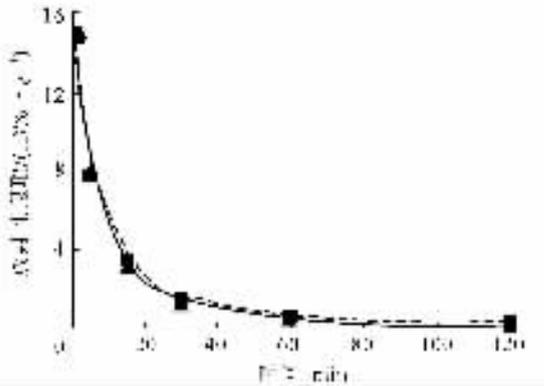


图 5 两种标记化合物的血液清除曲线
■——DOTA; ▲——DOTA-PEG4

Chen 等^[11]的研究表明,引入多聚体 PEG (相对分子质量=2 000)并不影响多肽分子与肿瘤细胞表达的 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力,但却能显著降低肾脏对标记化合物的摄取,同时延长标记化合物在肿瘤的滞留时间。在本实验中仅引入 4 个 PEG 分子,还不足以改变标记化合物的药代动力学性质。在后续的研究中,应将多聚体 PEG 的相对分子质量提高到 2 000 以上,并比较不同相对分子质量的多聚体 PEG 对标记化合物的药代动力学及肿瘤摄取的影响。

4 小 结

¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 分别在 pH 4.0 和 6.0 的反应体系中,100 °C 下反应 15~20 min, 标记率均可达到 95% 以上,并且两种标记化合物均具有良好的体外稳定性。HPLC 的分析结果和脂水分配系数 $\lg P_{ow}$ 的测定结果证实, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 的脂溶性有所提高。引入 4 个 PEG 分子没有显著改变标记化合物的药代动力学性质和小鼠的体内生物分布。

表 1 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-RGD dimer 和 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-PEG4-RGD dimer 在小鼠体内的生物分布 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组织	放射性摄取/(%ID · g ⁻¹)			
	1 h		4 h	
	不含-PEG	含 PEG4	不含-PEG	含 PEG4
血	0.346 ± 0.028	0.315 ± 0.034	0.051 ± 0.015	0.056 ± 0.015
心	1.272 ± 0.066	0.966 ± 0.084	0.798 ± 0.045	0.718 ± 0.052
肝	3.042 ± 0.191 ¹⁾	2.046 ± 0.154 ¹⁾	2.218 ± 0.263	2.226 ± 0.228
脾	1.873 ± 0.129	1.546 ± 0.087	1.537 ± 0.128	1.637 ± 0.107
肺	2.558 ± 0.107	2.149 ± 0.148	0.985 ± 0.289	1.748 ± 0.161
肾	7.559 ± 0.365	6.394 ± 0.410	5.056 ± 0.144	5.375 ± 0.165
肠	5.465 ± 0.386	6.131 ± 0.650	4.202 ± 0.363	3.872 ± 0.368
胃	4.279 ± 0.216 ¹⁾	3.310 ± 0.244 ¹⁾	2.836 ± 0.104	3.036 ± 0.186
骨	1.658 ± 0.206	0.889 ± 0.382	0.886 ± 0.107	1.208 ± 0.248
肉	1.028 ± 0.108	0.680 ± 0.052	0.638 ± 0.035	0.650 ± 0.101

注:1) 含 PEG 与不含 PEG 相比 $P < 0.05$

参考文献:

[1] RUOSLAHTI E. Specialization of Tumour Vasculature[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 83-90.

[2] 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.

[3] 李前伟. 肿瘤整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体显像的研究现状[J]. 国外医学:放射医学核医学分册, 2003, 27 (5): 198-200.

(下转第 223 页)

- [4] LIU S. Integrin $\alpha_v\beta_3$ Targeted Radiotracers for Tumor Imaging: a Review[J]. Mol Pharm, 2006, 3(5): 472-487.
- [5] SMITH CJ, GALIB H, SIECKMAN GL, et al. Radiochemical Investigations of ^{177}Lu -DOTA-8-Aoc-BBN[7-14] NH_2 : an in Vitro/in Vivo Assessment of the Targeting Ability of This New Radiopharmaceutical for PC-3 Human Prostate Cancer Cells[J]. Nucl Med Biol, 2003, 30: 101-109.
- [6] JONG MD, BREEMAN WA, BERNARD BF, et al. [^{177}Lu -DOTA 0 , Tyr 3] Octreotate for Somatostatin Receptor-targeted Radionuclide Therapy [J]. Int J Cancer, 2001, 92(5): 628-633.
- [7] BANERJEE S, DAS T, CHAKRABORTY S, et al. ^{177}Lu -DOTA-lanreotide: a Novel Tracer as a Targeted Agent for Tumor Therapy[J]. Nucl Med Biol, 2004, (6): 753-759.
- [8] CREMONESI M, FERRARI M, BODEI L, et al. Dosimetry in Peptide Radionuclide Receptor Therapy: a Review[J]. J Nucl Med, 2006, 47(9): 1467-1475.
- [9] LIU S, THOMAS DH, CHARLES EE, et al. Anaerobic ^{90}Y - and ^{177}Lu -Labeling of a DOTA-Conjugated Nonpeptide Vitronectin Receptor Antagonist [J]. Bioconj Chem, 2003, 4: 1030-1037.
- [10] THUMSHIRNG, HERSELU, GOODMAN SL, et al. Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation[J]. Chem Eur J, 2003, 9: 2717-2725.
- [11] CHEN X, PARK R, SHAHINIAN AH, et al. Pharmacokinetics and Tumor Retention of ^{125}I -labeled RGD Peptide Are Improved by PEGylation [J]. Nucl Med Biol, 2004, 31: 11-19.