

· 综述与编译 ·

以多肽导向的靶向造影剂的研究

中国科学院上海药物研究所(上海,200031) 王晓青 谢毓元综述

摘要:近年来,生物靶向造影剂的研究已从单抗和单抗片段 $F(ab)_2$ 、 F_{ab} 深入到更小的多肽片段,即分子识别单位,包括 Fv 片段、抗原结合位点片段及小的生物活性肽。这些小的活性分子能够提供更理想的药代动力学性质,到达靶点和血液清除速度快,穿透能力强,本底小,质量好。现代分子工程技术已能合成出具有较好的标记位点、同时保持生物活性的各类多肽的类似物,使标记多肽成为可能。而种类繁多的功能肽以及它们与受体间高度的特异结合性,则为靶向造影剂的研究提供了广阔的天地。

关键词:多肽 靶向造影剂

在肿瘤及其它病变的早期诊断方法中,虽然近来提出了基因识别法,但仍主要应用各类成像技术。生物靶向造影剂在成像诊断中起着重要作用。本文就多肽作为导向分子的应用前景、放射性及顺磁性标记多肽的方法以及受体显像中一些成功的范例加以简单介绍。

靶向造影剂的研究是从放射性标记的单克隆抗体(McAb)开始的,利用了抗体与抗原之间高度的特异性和亲合力。由于完整抗体甚至 Fab 片段都具有较大的分子量,药代动力学不甚理想^[1],血液清除和到达靶点速度慢、穿透力不强、信噪比低、不易获得好的图像,同时还易引起免疫反应。临床研究表明^[2],由于单抗在体内扩散速度慢,在注射和有效成像之间通常需几天间隔,而核医学中常用的放射性元素^{99m}Tc 的物理半衰期仅为6小时,这种不匹配会降低成像的灵敏度,也可能在扩散过程中造成损伤。另外,IgG 会无选择地在炎症位点积聚,这一现象已用于放射性标记的非特异性多克隆抗体来检测体内炎症,其效果与单抗相同甚至更好,但对于肿瘤等特异性检测则是一种干扰。因此,虽然近十年来人们对 McAb 试用于放免显像进行了广泛的研究,但能实际应用的却寥寥无几。

目前只有欧洲批准的¹¹¹In-DTPA-antimyosin 用于心肌坏死的检测^[3],用于检测结肠癌的¹¹¹In-DTPA-CYT-103 有可能成为美国第一个放射性标记的单抗药物^[4]。

顺磁性标记的单抗作为 MRI 造影剂也已有研究。由于顺磁性元素不存在衰变问题,许多生物大分子如人体白蛋白、抗体和多糖等均可作为导向分子,但由于细胞上抗原位点有限,单抗导向的 MRI 造影剂很难达到磁共振成像的有效浓度。

为了寻找新的更有效的靶向试剂,人们把目光转向了多肽——受体间的特异结合上。它们为靶向药物的研究发展提供了多种新途径。

1 导向多肽

目前用于代替 McAb 或 Fab 片段作为导向分子研究的多肽主要有三类:单链抗原结合蛋白、抗体高变区序列的合成肽和自然界提供的大量生物活性肽。

1.1 单链抗原结合蛋白(sFv)

sFv 是具有抗体中可变区序列的单链片段,保持了对抗原的特异结合性,比 Fab 小 50%,能较快地渗到靶点,已被用于放免研究。例如,对于恶性肿瘤抗体 CC49,sFv 在肿

瘤中达到最大浓度需 30 分钟,而 IgG 需 48~95 小时^[5]。一项比较 IgG、F(ab)₂、Fab 和 sFv 的放免显像研究表明,sFv 单一地在肿瘤中分布,而 IgG 则在肿瘤区域及相邻的血管中有一定浓度,F(ab)₂ 和 Fab 的分布介于两者之间,与它们的大小有关。显像实验表明,sFv 能较快地从循环系统进入靶点,本底浓度很低^[6]。

sFv 可用抗体酶解得到,更多的是利用重组 DNA 技术制备:将抗体中轻链和重链的可变区序列密码用一段专门设计的寡聚核苷酸链相连,然后在大肠杆菌中表达。最后产物中,轻链可变区的 C-端通过一条 12~20 个残基的肽链与重链可变区的 N-端相连。这样得到的 sFv 对抗原结合的特异性与其母体 McAb 相同^[7]。

1.2 高变区序列的合成肽

高变区是抗体识别功能的结构基础。合成具有高变区序列的多肽片段用于靶向试剂应最为理想,但实验表明,这类合成多肽与抗原结合的特异性未变,而亲和力却大大降低了^[8]。利用先进的分子设计方法解决这个问题,是目前核医学放免显像研究中的一个尖端领域。将精细核磁共振谱与分子模型理论相结合,使人们能够了解特定氨基酸残基对抗原结合性质的影响,从而加以改进与提高,设计并合成出相应的多肽以符合医用的目的。

高变区序列合成多肽用于放免显像的研究已有报道。多个分别具有 16~31 个氨基酸残基的多肽被合成,它们都具有被血小板糖蛋白(Ⅱb/Ⅲa)诱发的抗体 PAC1.1 的高变区序列。这些多肽都有一个三肽结合基团(RYD 或 RGD)和一个金属硫蛋白序列(KCTCCA)用以标记^{99m}Tc,它们与血小板糖蛋白(Ⅱb/Ⅲa)有很高的亲和力。用^{99m}Tc 标记后作为造影剂,在注射后 1~2 小时,得到了兔颈静脉和犬股静脉中的血栓图像,而对比实验中,^{99m}Tc 标记的非特异性多肽不能使

血栓成像^[9]。

1.3 天然生物活性肽

种类繁多的天然生物活性肽是生命活动中不可缺少的信号传递与识别物质,包括各类激素、神经递质、神经调节剂、生长因子、生长抑制因子和细胞激动素等,它们与受体之间的亲和力一般要显著高于抗体抗原作用,且分子量较小,更适于生物靶向造影剂的要求,是目前核医学研究中的一个热点。

在生物活性肽中,从 3~5 个残基的促甲状腺激素释放素(TRH)、脑啡肽和细菌化学诱导肽到 200 多个残基的生长激素,分子量变化很大,但在多数情况下,分子识别位点只局限于序列中的特定区域。如在副甲状腺激素(PTH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)中,生物活性是由 N-端序列提供的。甚至对于很小的肽,如 TRH 和细菌化学诱导肽,C-端的扩展也不会显著影响与受体的结合和生物活性。这样,活性区的相对集中带来一个优势,就是可以在不改变与受体特异结合的情况下修饰非活性序列区,以便于放射性或顺磁性标记,并优化体内代谢。

目前,由配位基团对多肽或蛋白进行非失活修饰,再标以金属离子,已成为靶向造影剂研究中的一个重要方向。对于小肽,这种修饰可直接由固相或液相的化学合成方法得到;对于较大的肽链(多于 50 个残基),则多采用分子克隆而得到多肽样品后再进行化学修饰。

2 放射性与顺磁性标记

一般来讲,标记多肽的技术与标记蛋白相似,通常要考虑以下几个方面:标记核素的选择;标记方法;标记产物的稳定性;在体内的分布特点以及特异性。标记方法主要为直接和间接两种,但由于多肽分子小,可标记位点少,直接标记对分子结构和生物活性的影响更大,所以目前研究中多采用间接标记法,特别是通过双功能螯合剂来进行标记。

2.1 放射性标记

目前核医学中用于显像诊断的放射性核素主要有 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{67}Ga 和 ^{201}Tl 等。其中, ^{18}F 和 ^{11}C 为正电子放射形式,多用于PET神经受体成像; ^{18}F -DG(脱氧葡萄糖)已广泛地应用于肿瘤,特别是脑瘤的显像研究; ^{11}C -D-葡萄糖和 ^{11}C -蛋氨酸也是很有希望的PET脑显像试剂; ^{67}Ga 是经典的检测肿瘤和炎症的显像试剂,灵敏度高,但特异性不强,更多用于炎症的诊断; ^{201}Tl 是 K^+ 类似物,有类似葡萄糖的代谢特征。 ^{201}Tl SPECT诊断肿瘤显示出良好的特异性。适用于标记单抗、蛋白以及多肽的放射性核素主要有 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

^{123}I 和 ^{131}I 多用于体外研究,可通过有亲电取代基的酪氨酸(Tyr)直接标记,也可通过预先准备的标记试剂与多肽反应间接实现。放射性碘标记在体外放射免疫分析测定中取得了成功,但在显像诊断中,产生的体内脱卤作用可能引起毒性,加之 ^{123}I 比较昂贵, ^{131}I 成像质量差,均不适于显像研究。

^{111}In 的半衰期为2.8天,成像质量好,已广泛用于标记单抗和白细胞,且多采用间接标记法。 ^{111}In 与双功能螯合剂DTPA能形成非常稳定的配合物($K_{\text{ML}} = 29.0, \text{pH}7.4$)^[10],大大降低了肝脏的放射性积累,从而使 ^{111}In -DTPA-McAb具有广阔的医用前景。在多肽标记方面,目前成功的两个多肽靶向造影剂 ^{111}In -DTPA-Octreotide和 ^{111}In -DTPA-FormLF均以 ^{111}In 标记^[11,12], ^{111}In -DTPA配合物的稳定性为重要因素,但 ^{111}In 的半衰期相对较长,与多肽分子的生物半衰期不匹配,故人们更倾向于使用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的直接标记是通过降解二硫键后与自由巯基结合,在单抗标记中应用较多,对于多肽则不适用,因为许多小肽不含二硫键,而对含二硫键的肽,环状结构的微小改变对生物活性都会产生巨大影响。例如,小的环状肽催产素(oxytocin)和抗利尿素(vaso-

pressin),在环上仅增加一个 CH_2 (由高半胱氨酸取代半胱氨酸),生物活性就显著地降低^[13]。Thakur等人^[14]的实验证实,由二硫键降解而直接标记的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Octreotide其受体亲和力降低了四个数量级。因此, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的标记中也更多地采用了间接方法,特别是双功能螯合剂,它们既能与多肽或蛋白的非活性序列端共价结合,又能与金属离子形成稳定的配合物,目前在核医学中已被广泛应用。

2.2 顺磁性标记

顺磁性元素能对其周围的水质子的弛豫时间产生影响,故可用作MRI造影剂。常用的顺磁性元素有 $\text{Mn}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 和 $\text{Gd}(\text{III})$ 等。

$\text{Mn}(\text{II})$ 和 $\text{Fe}(\text{III})$ 为过渡金属,均有5个未成对电子,它们在MRI造影剂的早期研究中起了重要作用。但由于它们的弛豫率比 $\text{Gd}(\text{III})$ 弱,目前多限于金属酶或磁性分子筛用作MRI造影剂的研究中^[15]。

$\text{Gd}(\text{III})$ 是镧系元素,有7个未成对电子,是稳定元素中弛豫率最高的,其反应性与碱土金属相似,能与体内各种生物配体发生作用。因此,以 $\text{Gd}(\text{III})$ 为基础的MRI造影剂都选用 $\text{Gd}(\text{III})$ 的稳定配合物,有极强的热力学稳定性和动力学惰性,以防止体内解离,如已经商品化的小分子造影剂 Gd -DTPA-2NMG、 Gd -DOTA-NMG、 Gd (HP-DOTA)等。顺磁标记蛋白、多肽几乎都采用了双功能螯合基团的间接标记。

2.3 双功能螯合剂和间接标记法

体内稳定性是一切含金属类药物的先决条件。为了防止金属解离出来引起毒性,各类配体已被广泛使用。在生物靶向造影剂的研究中,配体不仅要能与重金属离子形成稳定的配合物,还要能与导向分子如多肽、蛋白或单抗稳定地共价结合,同时不影响其生物活性。目前最常用的双功能螯合剂是多胺多羧酸类配体及其衍生物,如DTPA。最近的实验表明,大环氮杂多羧酸配体DOTA(1,4,7,

10-四氮杂环十二烷四乙酸)能与重金属离子形成更加稳定的配合物,使得 DOTA 及其衍生物在生物标记方面更具应用潜力。

利用双功能螯合剂标记多肽一般是先将螯合剂与多肽共价结合,再标记金属离子,这样得到的反应产物单一,便于分离提纯。

此外,人们还提出一种巧妙的连接思路^[16],即通过一个小分子的连接基团,把导向分子(蛋白、多肽等)与标记配合物连接起来。连接基团可以是 α -氨基酸、 β -氨基酸或者小肽等。这样,就可以减少导向分子与标记基团之间的相互影响,既减轻了标记对于生物活性的影响,又降低了对配位基团的要求,也扩大了选择范围。在某些情况下,可以将多个多肽分子结合于一点,以增加亲和力;在另外一些情况下,又可将多个标记基团结合于一点,增强标记浓度。这种方法对于标记蛋白与单抗也同样适用,但对易受标记影响的多肽最有吸引力。

3 应用范例

生物活性肽引导的靶向试剂具有巨大的应用潜力。虽然这方面的研究才刚刚起步,但一些重要的显像剂已被发展起来。

3.1 生长激素释放抑制素(SRIH)

SRIH 是一种小的调节肽,其主要作用是对多种激素如生长激素、促甲状腺激素、胰岛素、脉管活化肠肽和肠促胰腺肽等的抑制。特别是,SRIH 的受体在多种人体肿瘤及转移瘤中出现。多项研究表明,SRIH 及其类似物对肿瘤生长有抑制作用。虽然有关 SRIH 体内成像的研究早见于 1976 年,但由于 SRIH 天然肽在血浆及组织蛋白酶作用下很快降解,并且 SRIH 对肿瘤生长的抑制作用最近才清楚,所以进一步的研究只是在最近几年才发展起来。具有抗生物降解性的 SRIH 类似物已被合成出来,其中 Octreotide 已用于肿瘤治疗。用¹²³I-Tyr-Octreotide 最先得到了肿瘤图像^[17],但¹²³I 纯品不易制备,价

格贵,并且在肝脏、膀胱及消化道中有放射性积累,干扰了这些部位的检测。于是,人们用 DTPA 与 Octreotide 的 N-端结合,再以¹¹¹In-标记,得到了较好的结果。注射后 24 小时,90%的¹¹¹In-DTPA-Octreotide 从肾脏排出,在肝胆部位的积聚非常少,且成像质量好,是应用多肽成功的一个靶向试剂^[11]。

目前,寻找^{99m}Tc 标记的 SRIH 类似物是这方面研究的热点。^{99m}Tc 标记的 Octreotide 和^{99m}Tc-Sandostatin 已有研究报道。

3.2 趋化性多肽

对感染位点迅速而准确的诊断是十分重要的。目前常用的诊断试剂是⁶⁷Ga 柠檬酸和放射性标记的白细胞,两者都需要注射后至少 24 小时方能成像,而且标记细胞过程复杂,并伴随着血液操作可能带来的潜在危险。

趋化性多肽 For-MLF 是一种细菌产物,分子量小,与炎症细胞有很强的结合力,对白细胞产生趋化性。构效关系研究表明,For-MLF 的 C-端可以扩展,而不会显著影响其生物活性和受体结合力,十分适于标记。已用固相多肽合成法合成了四种趋化性多肽的类似物 For-NleLFK、For-NleLFK(NH₂)、For-MLFNH(CH₂)NH₂ 与 For-NleFNleyk 和 DTPA 连接后,再标以¹¹¹In。显像实验证明,这些肽均保持了生物活性和受体结合力,在体内的分布和代谢情况也相似,在注射后 2 小时,可得到满意的感染部位图像^[12]。

用^{99m}Tc 标记多肽的方法已提出:通过胍基烟酰胺与赖氨酸残基的 ϵ -NH₂反应,再标记^{99m}Tc。这种方法得到的趋化性多肽标记物保持了高度的生物活性和受体结合力,其成像性质与¹¹¹In-DTPA 趋化性多肽相似^[18]。

顺磁性标记的多肽 MRI 造影剂的研究也已开始,但目前尚无满意的结果。

4 发展前景

除上面介绍的生长激素抑制素和趋化性多肽外,各类生长因子作为导向分子的研究

业已展开,在肿瘤及损伤处,这些多肽的受体都有高度的表达。例如,用肿瘤生长因子(TGF)识别神经损伤产生的受体;用成纤维细胞生长因子(FGF)确定损伤区;用血小板衍生生长因子(PDGF)识别血管损伤及可能的梗塞区;用表皮生长因子(EGF)识别神经胶质瘤等等。此外,神经多肽Y和肠促胰酶肽标记后可用于脑部厌腻中心的检测。到目前为止,有超过300种的受体和它们的激动剂已被认识,每一种都有其潜在的应用前景。

多肽应用于生物靶向造影剂尚处于起步阶段,其主要优点有:①药代动力学性质好,能很快达到靶点和从血液中清除;②能够合成具有生物活性的类似物,适于标记;③体内分布性质好,本底少;④成像快。

显然,以多肽导向的靶向造影剂为快速、准确地诊断肿瘤及其它病变提供了有力的武器。通过化学家、生物化学家和临床医师们的共同努力,它必将成为二十一世纪诊断医学发展的重要基础。

参考文献

- 1 Meares CF et al. Nucl Med Biol, 1986;13:311
- 2 Gansow OA. Nucl Med Biol, 1991;18:369
- 3 Morguet AJ et al. J Nucl Med, 1992;33:223
- 4 Gillette RW et al. J Immunol Methods, 1989; 124:277
- 5 Milenic DE et al. Cancer Res, 1991;51:6363
- 6 Yokata T et al. Cancer Res, 1992;52:3402
- 7 Bird RE et al. Science, 1989;242:423
- 8 Riechmann L et al. J Mol Biol, 1992;20:913
- 9 Knight LC et al. J Nucl Med, 1990;31:757
- 10 Taliaferro CH et al. Inorg Chem, 1984;23: 1188
- 11 Bakker WH et al. Life Sci, 1991;49:1583
- 12 Fischman AJ et al. J Nucl Med, 1991;32:483
- 13 Jurisson S et al. Chem Rev, 1993;93:1137
- 14 Thakur ML et al. J Labeled Compd Radiopharm, 1993;32:365
- 15 Nagasawa O. JP 04224523(Cheical Abstract, 1993;118(1):3149w)
- 16 Vera DR et al. J Nucl Med, 1985;26:1157
- 17 Bakker WH et al. J Nucl Med, 1990;31:1501
- 18 Babich JW et al. J Nucl Med, 1993;34:1964

(收稿日期:1995-01-09)

显示脑肿瘤活力的四种 SPECT 显像剂

上海医科大学华山医院核医学科(上海,200040) 赵晋华 综述 林祥通 审校

摘要:肿瘤细胞活力的体内显像和测定可帮助确定肿瘤恶性程度的分级,鉴别诊断肿瘤复发与坏死,具有临床实用价值。本文扼要介绍 ^{201}Tl 、 ^{123}I -MT、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI及 ^{131}I -UdR等四种可在体内测定脑肿瘤细胞活力的SPECT显像剂。

关键词:脑肿瘤 肿瘤细胞活力 SPECT显像剂

颅内恶性肿瘤的生物学特征、临床表现与肿瘤的增殖活力、代谢活力密切相关。测定肿瘤细胞活力可用于估计肿瘤生长潜力、恶性程度以及患者的预后。目前用 ^{11}C 标记的氨基酸或胸腺嘧啶脱氧核苷进行正电子发射型计算机断层(PET)显像可以测定肿瘤的增殖活力,用 ^{18}F -脱氧葡萄糖(^{18}F -DG)进行

PET显像可以测定肿瘤的代谢活力,但PET检查价格昂贵,且只有少数科研单位及大医院才能开展该项工作,而单光子发射型计算机断层(SPECT)显像的使用则比较广泛。积极开发和应用能反映脑肿瘤活力的SPECT显像剂对于脑肿瘤的早期诊断、治疗效果的评价等具有非常重要的实际意义。