

文章编号: 1001-098X(2005)01-0015-04

两种 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记双功能螯合剂: NHS-MAG3 和 HYNIC

兰晓莉

摘要 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 在标记蛋白、核酸、多肽和抗体时, 常采用双功能螯合剂作为偶联剂的间接标记法, 以避免直接标记所带来的损伤。研究表明, 近年来常用的两种螯合剂 NHS-MAG3 及 HYNIC 合成路线清晰, 偶联及标记方法成熟, 标记率、放化纯及比活度较高, 为核素分子显像提供了必要的基础条件和广阔的应用前景。

关键词 双功能螯合剂; 巯基乙酰三甘氨酸-N-羟基丁二酰亚胺酯; 胍基尼古酰胺; 锝; 同位素标记

中图分类号 R817.9 文献标识码 A

Two bifunctional chelating agents used in $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ labeling: NHS-MAG3 and HYNIC

LAN Xiao-li

(Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Hua Zhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract When protein, nucleic acid, polypeptide and antibody labeled with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, bifunctional chelating agents (BFCA) are commonly used in order to avoid damages by directly labeling. We choose two BFCA: NHS-MAG3 and HYNIC as representation. The synthesis of these two BFCA is clear and the methods of conjugating and labeling are mature. Through BFCA we can gain high radiolabeling yield, radiochemical purity and specific activity. The usage of BFCA can provide necessary condition for molecular imaging and extensively clinical foreground.

Key Words bifunctional chelating agents; N-hydroxysuccinimidyl S-acetyl-mercaptoacetyltriglycine; hydrazino nictinamide; technetium; isotope labeling

随着分子核医学的发展, 对放射性药物的要求进入了一个新的领域。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 因为其良好的物理性质、较短的半衰期、价廉易得而成为目前核医学检查中最常用、前景最为广阔的放射性核素之一, 因而我们更希望在受体、蛋白质、单克隆抗体、核酸等显像中用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 进行标记, 以期使分子核医学获得更广泛的应用。

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记有直接标记法和间接标记法。直接标记可以通过放射性核素与被标记的蛋白质、肽等的 C 原子形成共价键来实现, 或用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 的配位基团取代已知高亲和力的受体配体结构中的一部分, 使标记物在大小、形状及立体结构上与原配体相似而完成标记。但是直接标记法条件比较激烈, 对蛋白质的损伤比较大, 并且键合不牢固, 容易脱落,

因而目前更多关注的是间接标记法。间接标记法是通过双功能螯合剂 (bifunctional chelating agents, BFCA) 将放射性核素与标记物偶联起来。BFCA 犹如一座桥梁, 一端连接要标记的目标化合物, 另一端络合放射性核素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, 在普通的条件下即可完成标记。通过 BFCA 的应用, 不改变标记物的特性, 键合牢固, 并且可以避免对标记物的损伤, 达到核素显像的要求。常用的 BFCA 如巯基乙酰三甘氨酸-N-羟基丁二酰亚胺酯 (N-hydroxysuccinimidyl-S-acetyl-mercaptoacetyltriglycine, NHS-MAG3) 和胍基尼古酰胺 (hydrazinonictinamide, HYNIC) 在 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记中起重要的作用。

1 NHS-MAG3

1.1 NHS-MAG3 的合成

NHS-MAG3 于 1997 年由 Hnatowich DJ 小组合成^[1], 其反应经四步进行, 前两步用于合成 SATA (S-乙酰基巯基乙酰-N-羟基丁二酰亚胺), 后两步

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271439); 高等学校博士点基金项目(20030487013)

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科

通过 SATA 与三甘氨酸反应生成 S-acetyl-MAG3, 连接 NHS 基团, 最终得到巯基被乙酰基保护的 S-acetyl-NHS-MAG3。

苯甲酰基保护的 MAG3 在活体实验中能很稳定地连接 $^{99}\text{Tc}^m$, 但这种连接剂一方面难于合成, 另一方面在比较苛刻的温度和 pH 值下 (pH 11, 95°C) 才能脱掉保护基团, 这使得一些对温度和 pH 值敏感的大分子难以耐受而不能使用它作为螯合剂^[1], 这样就有了几种替代连接剂, 如 amine oximes, diaminodithiol, hydrazinonicotinamine 和目前常用的乙酰基保护的 MAG3 (S-acetyl-NHS-MAG3)^[2]。应用乙酰基保护替代苯环, 乙酰基易于去除, $^{99}\text{Tc}^m$ 标记时可以在中性 pH 值和室温条件下快速完成。

1.2 NHS-MAG3 与目的标记物的偶联及核素标记

自 NHS-MAG3 合成后, 就广泛用于抗体、多肽、蛋白质、寡核苷酸、肽核酸(一种以氨基己酸为骨架连接核酸碱基的寡聚体)和 morpholinos(一种以磷酸胺为骨架连接核酸碱基的寡聚体)等的 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记。NHS-MAG3 的羟基琥珀酰胺端的酰基可以与氨基或羟基等亲核基团反应, 从而将多肽或 DNA 等分子连接到连接剂上; 而它的巯基端上的硫与三甘氨酸上的三个氮则能协同作用, 螯合一个 $^{99}\text{Tc}^m$, 从而完成标记。

标记时通常先将 NHS-MAG3 与目的标记物偶联, 再行标记。

偶联方法: 将目的标记物 (2mg/ml) 溶于 0.1mol/L N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES] 缓冲液 (pH 8.0) 中, NHS-MAG3 (50mg/ml) 溶于无水二甲基甲酰胺 (N,N-dimethyl formamide, DMF) 中, 边振荡边逐滴将 NHS-MAG3 溶液加入目的标记物的 HEPES 溶液中, 终摩尔比为 NHS-MAG3: 目的标记物=10~20:1, 二者在室温条件下, 30min~过夜, 经 P4 柱或 Sephadex 柱纯化, 流动相通常选用 0.25mol/L 醋酸胺缓冲液 (pH 5.2), 然后测量紫外吸光值, 合并峰管, 即为 MAG3-目的标记物。产物经冷冻干燥后置于 -20°C, 可以稳定保存数月。

标记方法: 将 MAG3-目的标记物溶于 0.25 mol/L 醋酸胺溶液, 质量浓度约 0.1 g/L, 新鲜配制酒石酸盐溶液 (pH 9.2) 和氯化亚锡溶液 (1mg/ml 于 0.01mol/L 盐酸中), 振荡 MAG3-目的标记物溶液的同时, 逐滴加入酒石酸盐溶液和氯化亚锡溶液, 最

后加入足量的过锡酸盐溶液, 反应液在室温下放置 15~30 min 后, 经过层析柱以 0.25 mol/L 醋酸胺或生理盐水溶液洗脱纯化。依据紫外吸光值和放射性计数确定峰管并计算标记率。

1.3 标记率及稳定性分析

经上述方法, 应用 NHS-MAG3 偶联并行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 DNA、反义寡核苷酸、小分子肽、抗体、肽核酸和 morpholinos 的标记率分别可达到 84%^[1]、65.2%^[3]、54%^[4]、60~89%^[5,6]、70%^[7] 和 90%^[8], 延长标记时间、提高标记温度基本不影响标记率, 经纯化后的放化纯均可达到 90% 以上。但是, 不进行偶联而直接应用 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记上述目的标记物, 标记率均小于 5%。

NHS-MAG3 与目的标记物偶联后直接进行核素标记与置于 -20°C 保存 3~6 月后再行标记相比较, 标记率无明显差异, 说明偶联物在低温条件下稳定。

体外血清稳定性研究表明, $^{99}\text{Tc}^m$ 标记偶联后的目的标记物与血清在 37°C 下孵育 24h, 在不同时间经高效液相色谱检测, 未见明显血清蛋白结合, 说明标记物体外稳定性较好。

标记物与半胱氨酸竞争 (cysteine challenge) 的研究表明, $^{99}\text{Tc}^m$ 标记偶联后的目的标记物与不同水平的半胱氨酸在 37°C 下孵育 1h, 随半胱氨酸水平的增加, NHS-MAG3 偶联的标记物不稳定性逐渐增加^[1,6], 甚至可以达到 62%^[1]。半胱氨酸竞争主要用于模拟体内含巯基的蛋白或多肽对标记物中放射性金属离子的竞争性络合反应, 在一定程度上可以描述标记物在体内的稳定性。虽然 NHS-MAG3 偶联的标记物对半胱氨酸不稳定, 但是有一些在正常大鼠生物学分布的研究证实, 这种不稳定性在体内可能不受影响^[6]。这方面的影响仍需进行更多的实验研究。

2 HYNIC

2.1 HYNIC 的合成

HYNIC 由 Abrams MJ 等^[9] 于 1990 年合成。反应以 6-氯尼古丁酸为原料, 经胍基取代、二叔丁基碳酸酯 (BOC) 保护、连接 NHS 及脱去 BOC 等 4 步反应, 最终合成并纯化出 HYNIC。

2.2 HYNIC 与目的标记物的偶联及核素标记

HYNIC 作为一种有效的双功能螯合剂, 在国外从 20 世纪 90 年代初就开始应用, 并广泛用于

DNA、RNA、多肽、蛋白质及抗体的标记,最近有文献报道 HYNIC 还可以用于标记 morpholinos, 效果也较好。由于 HYNIC 较早的应用,在某种程度上促进了核素分子显像和反义显像的发展。

HYNIC 在标记中经常要添加辅助的协同配体 (coligand), 常用的是乙二胺二乙酸 (ethylenediamine diacetic acid, EDDA) 和 N-三(羟甲基)甲基甘氨酸 (N-tris-hydroxymethyl-methylglycine, tricine)。这是因为 HYNIC 实际上只能占据 $^{99}\text{Tc}^m$ 上的一到两个位置, 其他位置要 EDDA 或 tricine 来填补。HYNIC 与 tricine 形成的螯合物 $^{99}\text{Tc}^m$ -(HYNIC-目的标记物-tricine)₂ 的活性很高 ($\geq 74\text{GBq}/\mu\text{mol}$)^[10], 但是 $^{99}\text{Tc}^m$ -(HYNIC-peptide)-(tricine)₂ 在溶液中不稳定, 并可以多种形式存在, 这可能会影响药物的药代动力学及放射性药物在体内的代谢^[11]。HYNIC 与 EDDA 形成的螯合物 $^{99}\text{Tc}^m$ -(HYNIC-目的标记物)-(EDDA)₂ 在溶液中的稳定性较好, 并在 12h 内是稳定的^[10]。

不同的蛋白、多肽或抗体, 可选择不同的协同配体或两种配体同时选用, 而且配体的选择会影响标记率^[12-14]。另外目前国外学者还研制出一些新型协同配体用于 HYNIC 的标记, 如 TPPTS (trisodium triphenylphosphine-3, 3', 3''-trisulfonate)^[13]、BP (3-benzoylpyridine)、AP (3-acetylpyridine)、NGA (galactosyl-neoglycoalbumin) 等等。经一些实验证实, 这些协同配体的应用, 不仅仍可获得较高的标记率, 而且可以增加偶联的稳定性^[11]。

标记时通常先将 HYNIC 与目的标记物偶联, 再行标记。

偶联方法: 将目的标记物 (5~10mg/ml) 溶于磷酸缓冲液或 HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 中, 将 HYNIC 溶于无水 DMF 中, 边振荡边逐滴将 HYNIC 溶液加入目的标记物溶液中, 终摩尔比为 HYNIC:目的标记物=3~60:1, 避光继续振荡反应 1~5h, 加入预先制冷的磷酸缓冲液或氨基己酸溶液 (pH 7.4, 4℃) 终止反应。应用滤膜透析方法纯化, 透析液常用磷酸缓冲液或柠檬酸钠缓冲液 (4℃, 避光, 过夜, 换液 4 次)。纯化后即可冻干保存以供使用, 可以稳定保存数月。

检测 HYNIC 与目的标记物偶联的数量, 可以通过对硝基苯甲醛。因为与蛋白或多肽偶联的 HYNIC 的胍基可以和对硝基苯甲醛反应, 生成相对应的腙 (一对一生成), 测定该腙的特征紫外吸收

峰的吸光度, 通过朗伯比尔定律, 即可算出每分子蛋白或多肽引入 HYNIC 的数量。

标记方法: 因加入的协同配体不同及目的标记物不同而有所差异。以 Annexin V 为例, 可依次向 HYNIC-Annexin V 中加入新鲜配制的氯化亚锡、tricine 及 $^{99}\text{Tc}^m$, 混匀, 室温放置 20min, 经 Sephadex G-25 柱纯化后测量标记率。以 Tyr³-octreotate (生长抑素的八肽类似物) 为例, 先将 EDDA 和 tricine 溶液混匀, 再依次向混合液中加入 HYNIC-Tyr³-octreotate、 $^{99}\text{Tc}^m$ 和新鲜配制的氯化亚锡, 70℃水浴 30min 后, 终止反应, 以 Sep-Pak 反向色谱柱纯化后计算标记率。

2.3 标记率及稳定性分析

应用 HYNIC 作为双功能螯合剂也取得了较高的标记率。HYNIC 偶联后, DNA 标记率可达 70%^[15]、多肽达 85%^[16]、抗体达 90%^[9]、细胞因子达 85%^[13]、蛋白达 95%^[17], morpholinos 60%~80%^[18]。经纯化后放化纯可达 90% 以上, 并且可以获得很高的比活度, 甚至可达 74GBq/ μmol 。但是, 不进行偶联而直接应用 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记上述目的标记物, 标记率均小于 10%。

对标记率的影响因素进行分析发现, 目的标记物的质量浓度、HYNIC 与目的标记物的摩尔比、tricine 与 EDDA 的选择、标记时间的长短及温度的选择等都是影响以 HYNIC 为螯合剂的标记率的主要因素^[12,17]。

体外血清稳定性的研究表明, 因偶联目的标记物及协同配体的不同而有所差异: HYNIC 与寡核苷酸偶联时, 因为较高的非特异性血清蛋白结合而限制了其应用; $^{99}\text{Tc}^m$ -HYNIC-RGD (一种多肽) 应用 tricine 为协同配体时, 其血清蛋白结合率高达 80%~90%, 而用 EDDA 为协同配体, 血清蛋白结合率仅为 10%^[14]; HYNIC 偶联奥曲肽的实验中, EDDA 复合物较 tricine 有更好的稳定性, 蛋白结合较少, 血中清除更快^[9]; HYNIC 与一些大分子蛋白偶联时, 非特异性结合不明显, 在血清中稳定性较好^[20]。

标记物与半胱氨酸竞争研究表明, 以 HYNIC 为螯合剂, 在半胱氨酸质量浓度超出 500 倍时, 半胱氨酸的转偶联作用 <1%^[11,14], 说明 HYNIC 偶联物在半胱氨酸中稳定。

3 两种螯合剂的比较

NHS-MAG3 与 HYNIC 在应用中有相似之处,

如两者均可用于蛋白、核酸、抗体、多肽等的偶联及标记, ^{99m}Tc 标记后, 均可得到较高的标记率、放化纯和比活度, 且两者无明显差异。但是, 两种螯合剂目前均无商品出售, 需自行合成。

两种螯合剂在应用中也有不同之处, 见表 1。

表 1 NHS-MAG3 与 HYNIC 的比较

	NHS-MAG3	HYNIC
合成价格	稍贵	稍廉
偶联过程	相对简单, 耗时少	复杂, 耗时长
协同配体	不需要	需要
影响标记率	因素较少	因素较多
比活度	高	非常高
血清蛋白结合	无	因目的标记物和协同配体不同而有差异
半胱氨酸竞争	不稳定	稳定

HYNIC 和 NHS-MAG3 用于 ^{99m}Tc 间接标记蛋白、核酸、多肽、抗体等, 避免了直接标记法的损伤, 并可以得到较高的标记率、放化纯和比活度。目前应用 HYNIC 和 NHS-MAG3 为螯合剂的分子显像、反义显像和受体显像, 已经用于肿瘤、炎症、心血管系统疾病、血栓、器官移植和凋亡显像等实验研究中, 一些显像在国外已经进入 I 期和 II 期临床。还有一些实验室正在开展应用两种螯合剂进行其他核素(如 ^{188}Re) 标记的研究^[18], 以期更为广泛地应用于核素治疗的领域中。两种双功能螯合剂的开发和应用, 不仅给一些疾病的诊断和治疗带来了福音, 更为分子核医学的发展提供了基础和动力。

参 考 文 献

- Winnard P Jr, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24(5): 425-432.
- 齐传民, 郭雪峰, 张华北, 等. 新 N3S 型类肽配体的合成及其小鼠体内的生物分布研究[J]. 药学学报, 2002, 37(6): 428-432.
- 高再荣, 张凯军, 张永学. Survivin 反义寡核苷酸的 ^{99m}Tc 标记及在肝癌细胞中的表达[J]. 放射学实践, 2004, 19(1): 50-52.
- Hnatowich DJ, Qu T, Chang F, et al. Labeling peptide with technetium-99m using a bifunctional chelator of a N-hydroxysuccinimide ester of mercaptoacetyltryglycine[J]. J Nucl Med, 1998, 39(1): 56-64.
- Gano L, Patry'cio L, Marques E, et al. Human polyclonal immunoglobulin labelled with technetium-99m via NHS-MAG3: A comparison of radiochemical behavior and biological efficacy with other labelling methods[J]. Nucl Med Biol, 1998, 25(4): 395-403.
- Lei K, Rusckowski M, Chang F, et al. Technetium-99m antibodies labeled with MAG3 and SHNH: an in vitro and animal in vivo comparison[J]. Nucl Med Biol, 1996, 23(7): 917-922.

- Wang Y, Chang F, Zhang Y, et al. Pretargeting with amplification using polymeric peptide nucleic acid[J]. Bioconjug Chem, 2001, 12(5): 807-816.
- Liu G, Zhang S, He J, et al. Improving the labeling of S-acetyl NHS-MAG (3)-conjugated morpholino oligomers [J]. Bioconjug Chem, 2002, 13(4): 893-897.
- Abrams MJ, Juweid M, Abrams M J, et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats[J]. J Nucl Med, 1990, 31(12): 2022-2028.
- Edwards DS, Liu S. ^{99m}Tc -labelling of hydrazinonicotinamide (HYNIC) modified highly potent small molecules: problems and solutions[J]. Transition Met Chem, 1997, 22(4): 425-426.
- Ono M, Arano Y, Mukai T, et al. Control of radioactivity pharmacokinetics of ^{99m}Tc -HYNIC-labeled polypeptides derivatized with ternary ligand complexes[J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(3): 491-501.
- Verbeke K, Kieffer D, Vanderheyden JL, et al. Optimization of the preparation of ^{99m}Tc -labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use[J]. Nucl Med Biol, 2003, 30(7): 771-778.
- Rennen HJJM, van Eerd J E, Oyen W J G, et al. Effects of coligand variation on the in vivo characteristics of Tc-99m-labeled interleukin-8 in detection of infection[J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(2): 370-377.
- Su ZF, 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(2): 141-149.
- Zhang YM, Liu CB, Liu N, et al. Electrostatic binding with tat and other cationic peptides increases cell accumulation of ^{99m}Tc -anti-sense DNAs without entrapment[J]. Mol Imaging Biol, 2003, 5(4): 240-247.
- Welling M M, Visentinb R, Feitsmaa HJJ, et al. Infection detection in mice using ^{99m}Tc -labeled HYNIC and N2S2 chelate conjugated to the antimicrobial peptide UBI 29-41[J]. Nucl Med Biol, 2004, 31(4): 503-509.
- Rennen HJJM, Boerman OC, Koenders E B, et al. Labeling proteins with Tc-99m via Hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction[J]. Nucl Med Biol, 2000, 27(6): 599-604.
- He J, Liu C, Vanderheyden JL, et al. Radiolabelling morpholinos with ^{188}Re tricarbonyl provides improved in vitro and in vivo stability to re-oxidation[J]. Nucl Med Commun, 2004, 25(7): 731-736.
- Liu S, Edwards DS, Ziegler MC, et al. ^{99m}Tc -labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors[J]. Bioconjugate Chem, 2001, 12(4): 624-629.
- Rennen HJJM, Makarewicz J, Oyen WJG, et al. The effect of molecular weight on nonspecific accumulation of ^{99m}Tc -labeled proteins in inflammatory foci[J]. Nucl Med Biol, 2001, 28(4): 401-408.