

MYC mRNA expression in human breast cancer xenografts with a [^{99m}Tc]peptide-peptide nucleic acid-peptide chimera. Bioconjug Chem, 2005, 16(1): 70-79.

probed for imaging oncogene mRNA s in tumours. Nucl Med Commun, 2003, 24(8): 857-863.

9 RAO PS, Tian X, Qin W, et al. ^{99m}Tc -peptide-peptide nucleic acid

(收稿日期: 2006-12-23)

$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记免疫磁性纳米微粒的实验研究

冯彦林 谭家驹 梁生 孙静 吴校连 司建华 夏焱云 温广华

【摘要】目的 探讨标记单克隆抗体磁性纳米微粒的实验条件。方法 以 [二(2-吡啶甲基)-氨基]-乙酸(PADA)作为双功能螯合剂, 将 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记到耦联了单克隆抗体的磁性纳米微粒。结果 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记免疫磁性纳米微粒的标记率大于80%, 在小牛血清和生理盐水中48 h后稳定性仍能保持在90%以上。结论 使用PADA作为双功能螯合剂, $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记免疫磁性纳米微粒的标记率高, 稳定性好, 适于进一步体内研究。

【关键词】 同位素标记; 铼; 螯合剂; 磁性纳米微粒

【中国分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)04-0211-04

Labeling of immuno-magnetic nanoparticle with $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

FENG Yan-lin¹, TAN Jia-ju¹, LIANG Sheng², SUN Jing¹, WU Xiao-lian¹, SI Jian-hua¹, XIA Jiao-yun², WEN Guang-hua¹

(1. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Foshan Hospital of Sun Yat-Sen University and The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China; 2. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

【Abstract】 Objective To investigate a fine experiment condition of indirect labeling method that Hepama-1-SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) was labelled with rhenium-188 complex ($[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$). **Methods** The Hepama-1-SPIONs bridged by bifunctional chelating agent 2-picolylamine-N,N-diacetic acid (PADA) was labelled rhenium-188-tricarbonyl complex prepared with high labeling yields. **Results** The labeling rate of $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -PADA-Hepama-1-SPIONs was more than 80%, and was extremely stable in vitro. The labeling rate of $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -PADA-Hepama-1-SPIONs was more than 90% after 48 h in calf serum and isotonic Na chloride. **Conclusions** $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -PADA-Hepama-1-SPIONs shows its fine stability and biological properties, and it is well worth further researching as bio-magnetically targeted radiotherapy for cancer.

【Key words】 Isotope labeling; Rhenium; Chelating agents; Superparamagnetic nanoparticles

本研究以羧基化合物 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 形式作为标记中间体, 选择羧基拖尾的含双吡啶环的 [二(2-吡啶甲基)-氨基]-乙酸 (2-picolylamine-N,N-diacetic acid, PADA) 为双功能螯合剂, 间接标记固

载了单克隆抗体 Hepama-1 的磁性纳米微粒; 并对 ^{188}Re 标记的单克隆抗体的最佳标记条件和标记物的体内外稳定性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

单克隆抗体 Hepama-1 由中科院上海生化细胞所谢弘研究员惠赠, 表面改性的磁微粒子由本课题

作者单位: 1. 528000 广东佛山, 中山大学附属佛山医院 (佛山市第一人民医院) 核医学科 (冯彦林、谭家驹、孙静、吴校连、司建华、温广华); 2. 200000 上海, 中国科学院应用物理研究所 (梁生、夏焱云)

通讯作者: 冯彦林 (E-mail: fylin@fsyyy.com)

组自制¹⁸⁵Re-¹⁸⁶Re。三乙基溴化铵、2, 3, 5, 6-四氟酚、乙基二甲氨基丙基碳二亚胺, 分析纯, 均为 Fluka 公司产品; Na¹⁸⁵ReO₄ 淋洗液, 由上海应用物理研究所放药中心的 ¹⁸⁵W-¹⁸⁶Re 医用核素发生器淋洗; 甲醇为高效液相色谱纯, Tedia 公司产品; 其余试剂均为分析纯或化学纯, 中国医药(集团)上海化学试剂公司产品; 聚酰胺薄膜购自浙江台州四青生化材料厂; Sephadex G-50, 瑞士 Fluka 公司; Sep-Pak® C₁₈ 柱, 美国 Waters 公司产品; 一次性自吸式医用微量吸管, 上海永良医疗用品有限公司; AR-2000 型放射性薄层扫描仪, 美国 Bioscan 公司; 分析柱反相柱 Nucleosil 100-5 C₁₈ (150 mm×4.6 mm), 美国 MACHE-REY-NAGEL 公司。计数率仪, 中科院上海应用物理研究所日环仪器厂; pH-2C 型 pH 酸度计, 上海大普仪器有限责任公司; DYY-4 型稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; SN-697 型 γ 计数器, 中科院上海应用物理研究所日环仪器厂; Thermomixer 型孵育器, 德国 Eppendorf 公司; FJ-391A2 型微机放射性活度计, 北京核仪器厂; AR-2000 型放射性薄层扫描仪, 美国 Bioscan 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中间体 [¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺的合成

取 2~10 mg BH₃·NH₃ 放入一个 10 ml 的洁净干燥安瓿中, 加盖, 密封, 通 CO 气体约 20 min。在 1 ml 无载体 ¹⁸⁶Re-ReO₄ 的生理盐水淋洗液中加入 2~10 μl 浓 H₃PO₄ (>85%), 混匀后注射到安瓿中, 60~80 °C 水浴加热约 15 min。反应过程中, 将一支 10 ml 的注射器插入安瓿中, 用于平衡反应过程中产生的氢气。反应结束后, 安瓿用冰水冷却。采用薄板层析色谱法和高效液相色谱法分析反应产物。

1.2.2 [¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA]⁺的合成

900 μl [¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺溶液与 100 μl PADA (10⁻⁶ mol/L) 混合, 在氮气的保护下, 在孵育器上 75 °C 加热 50 min, 即得反应产物。采用薄板层析色谱法或高效液相色谱测定反应标记率, 混合物使用高效液相色谱分离。

1.2.3 活泼酯 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 的合成

在 75 °C 用氮气流吹干 [¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA]⁺溶液, 在冰水中冷却后加入 500 μl 水, 充分溶解, 再加入 200 μl 100 g/L TFP 乙腈水溶液(乙腈:水体积比为 1:1) 和 50 mg 乙基二甲氨基丙基碳二亚胺, 充分混匀后, 溶液用 0.5 mol/L H₂SO₄ 调 pH 值至

6.0~6.5。室温(25 °C)反应 1 h 后, 加水至 4 ml。混合液使用两个串联的 Sep-Pak® C₁₈ 柱(分离前活化方法: 小柱子先用 20 ml 无水乙醇浸湿, 再用 20 ml 的水淋洗, 保持柱子内充满水, 待用)分离。用 10 ml 水淋洗柱子, 再用 10 ml EtOH/0.01 mol/L 磷酸缓冲液(体积比为 1:5; pH = 7.4)、5 ml 水和 2 ml 无水乙醚依次淋洗, 最后的产物 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 使用 2 ml 无水乙腈洗脱得到。

1.2.4 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-Hepama-1-SPIONs 的合成

活泼酯 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 溶解在 500 μl 生理盐水溶液中, 再加入 500 μl 1 g/L 的 Hepama-1-SPIONs。用 1 mol/L 的 H₂SO₄ 和 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值 6.0~6.5。混合物在孵育器中 37 °C 反应 1 h。放化产率使用新华 1 号纸检测, 生理盐水为展开剂。产物在起点, 而未反应完的 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 的 R_f 在 0.4~0.5 之间。

最后的产物使用体积排阻色谱分离纯化: Sephadex G₅₀ 柱(1 cm×20 cm)预先用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)淋洗 30 min。取反应溶液上柱, 用同样的缓冲液作为淋洗液分离纯化, 流速为 1 ml/min。产物 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-Hepama-1-SPIONs 用带 FDG-101 γ 射线流式探头的放射性检测器检测。

1.3 体外稳定性实验

500 μl ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-Hepama-1-SPIONs 溶液中分别加入 1 ml 生理盐水和 1 ml 小牛血清, 放置孵育器中 37 °C 温育 48 h。分别在时间点 1、4、12、24、48 h 取样, 用新华 1 号纸检测, 展开剂为生理盐水, ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-Hepama-1-SPIONs 的 R_f 值在起点, 而其他副产物均不在起点。

2 结果

2.1 活泼酯 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 的合成

在此反应中, 溶液 pH 值的控制很重要, pH 值的最佳范围为 6.0~6.5。其中加入固体乙基二甲氨基丙基碳二亚胺作为缩合剂, 其目的是加快反应速度。

活泼酯 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 的分离使用两个串联的 Sep-Pak® C₁₈ 柱, 产率达到 80%。用高效液相色谱分析标记化合物 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA 和活泼酯 ¹⁸⁶Re(CO)₃(H₂O)₃-PADA-TFP 时, 它们的保

留时间分别为 16.0 min 和 19.7 min。

2.2 pH 值对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 放化产率的影响

反应溶液的 pH 值对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化产率影响很大。当 pH 值为 6.0-6.5 时, 放化产率达到最高。可能的原因是活泼酯 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-TFP}$ 与 Hepama-1-SPIONs 的游离氨基反应时, 同时伴有活泼酯的水解反应。当 $\text{pH}>7$ 时, 水解反应变成主要的反应, 当 $\text{pH}<6$ 时, 放化产率也不高(见图 1)。

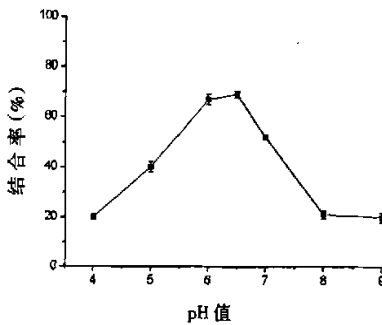


图 1 pH 值对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 放化产率的影响
(时间为 1 h, 温度为 37℃, 免疫磁性微粒为 0.5 mg)

2.3 反应时间和温度对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 放化产率的影响

反应时间和温度对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化产率也有一定的影响。如图 2 和图 3 所示, 最佳反应时间为 1.0 h, 因考虑到反应过程中同时伴有水解反应, 时间长对反应不利。最佳反应温度为 37℃, 反应温度过高对蛋白质的活性有很大的影响。

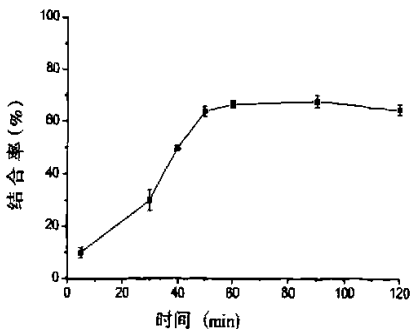


图 2 反应时间对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化产率的影响
(温度为 37℃, pH 值为 6.0-6.5, 免疫磁性微粒为 0.5 mg)

综合上述结果, 可以得到最佳反应条件是: 反应时间为 1 h, 温度为 37℃, $\text{pH}6.0\sim6.5$ 在最佳反应条件下, 合成 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放射化学产率为 82% 左右; 在同样反应条件下, 合成 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-Hepama-1-SPIONs}$ 放化产率只能达到 50%~60%。

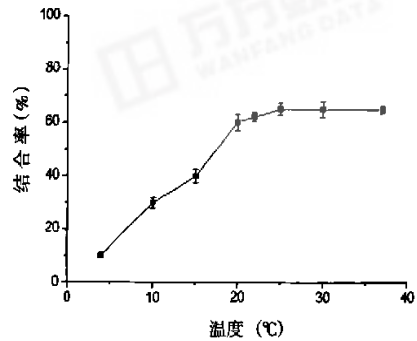


图 3 反应温度对 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化产率的影响
(时间为 1 h, pH 值为 6.0-6.5, 免疫磁性微粒为 0.5 mg)

2.4 体外稳定性实验

$^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 在生理盐水和小牛血清中都比较稳定, 37℃温育 48 h 后, 放化纯度都能达到 90%。而标记化合物 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-Hepama-1-SPIONs}$ 在同样的条件下放化纯度不到 60%。

3 讨论

放射性标记的单克隆抗体对特定肿瘤的专一性强, 近年来得到很大发展^[4]。然而, 到目前为止用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 直接标记单克隆抗体还没有比较理想的方法。传统的标记技术是利用含硫化合物(如半胱氨酸(Cys))中的硫与核素形成配位化合物。但是这些含硫化合物通常是用化学和遗传学方法引入单克隆抗体, 没有结合上的含硫化合物在单克隆抗体合成和储存的过程中会阻止二硫键断裂, 导致蛋白错折叠, 从而使生物活性降低。另外, 引入双功能螯合剂(如四齿的 S_2N_2 、 N_3S 及 S-Bz-MAG_3 等), 使用核素 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 等间接标记抗体也有许多报道^[5-8], 但是在这些间接标记方法中, 都是用还原剂 SnCl_2 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 使七价化合物被还原成五价化合物进行标记, 虽然锡和铈化学性质类似, 但 ^{186}Re 和 ^{188}Re 标记单克隆抗体的条件更难控制, SnCl_2 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 的用量及 pH 值对标记率的影响很大, 且标记

物的稳定性也比得差。

近年来, Waibel 等^[9,10]成功地运用 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ 核标记了单克隆抗体和小抗体片段, 主要是利用 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ 和单克隆抗体与小抗体片段中的 N 或 C 末端的组氨酸(His)形成螯合物进行标记, 在缓冲液(pH=7.4)中, 37℃时, 其标记率>90%, 比活度高达33 GBq/mg。加入 100 倍的未标记的组氨酸进行竞争实验, 只有少量标记后的单克隆抗体发生降解, 从而证实 N 或 C 末端 His 被标记的特异性和稳定性。而研究 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记单克隆抗体的标记化合物很少^[11]。我们在研究中采用 PADA 作为双功能螯合剂, 使用 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记耦联了单克隆抗体的磁性纳米微粒。在最佳实验条件下, 最终的产物 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的标记率大于 82%。在小牛血清和生理盐水中(37℃), 48 h 后 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化纯度为 90%。而在同样最佳反应条件下, 研究了 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直接标记免疫磁性微粒, 标记率仅为 50%-60%, 在小牛血清和生理盐水中不稳定, 48 h 后 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-Hepama-1-SPIONs}$ 的放化纯度小于 60%。即: 用 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直接标记免疫磁性微粒的标记率及稳定性都远不如间接标记免疫磁性微粒的标记率及稳定性。其原因很可能是, $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直接标记免疫磁性微粒时, 中间体 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 中的水分子与 Hepama-1 中氨基由于空间位阻很难配位。

由于 Hepama-1 是一个大分子蛋白, 有一定的空间构型, 导致直接标记时标记率不高。稳定性比较差的原因是: 中间体 $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 与免疫磁性微粒反应时, 有一部分是靠吸附在单克隆抗体表面, 不是靠单克隆抗体中的氨基与金属中心形成配位键。使用化合物 PADA 作为双功能螯合剂, 先标记, 再转换为活泼酯间接标记免疫磁性微粒, 是通过活泼酯与单抗中的氨基形成化学键而得到产物 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\text{-PADA-免疫磁性微粒}$, 放化产率和稳定性都比较高。因此, 使用 PADA 作为双功能

螯合剂, $[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 间接标记单克隆抗体的标记率高, 稳定性好。

参 考 文 献

- 1 谭家驹, 张阳德, 冯彦林, 等. 一种新型生物-磁双重靶向纳米材料的制备. 中国医学工程杂志, 2007, 15(5): 387-391.
- 2 冯彦林, 谭家驹, 张春富, 等. 肿瘤靶向治疗用白蛋白磁性纳米粒子的 ^{188}Re (^{188}Re) 标记(英文). 中国医学工程杂志, 2003, 11(6): 5-8.
- 3 谭家驹, 张春富, 冯彦林, 等. 靶向治疗用 Fe_3O_4 及其白蛋白包被磁性纳米粒子的制备(英文). 中国医学工程杂志, 2003, 11(6): 30-32.
- 4 Robinson MK, Weiner LM, Adams GP. Improving monoclonal antibodies for cancer therapy, *Drug Develop Res*, 2004, 61(3): 172-187.
- 5 Najafi A, Alauddin MM, Sosa A, et al. The evaluation of ^{188}Re -labeled antibodies using N_3S_2 chelate in vitro and in vivo using tumor-bearing nude mice. *Nucl Med Biol*, 1992, 19(3): 202-205.
- 6 Visser GWM, Gerritsen M, Herscheid JDM, et al. Labeling of monoclonal antibodies with rhenium-186 using the MAC3 chelate for radioimmunotherapy of cancer: A technical protocol. *J Nucl Med*, 1993, 34(11): 1953-1962.
- 7 贾芳, 孟昭兴, 胡久华, 等. ^{188}Re 间接标记单克隆抗体的研究. 核技术, 2001, 24(8): 716-719.
- 8 Gog FB, Visser GWM, Klok R, et al. Monoclonal antibodies labelled with rhenium-186 using the MAC3 chelate: Relationship between the number of chelated groups and biodistribution characteristics. *J Nucl Med*, 1996, 37(2): 352-362.
- 9 Waibel R, Alberto R, Willuda J, et al. Stable one-step technetium-99m labeling of his-tagged recombinant proteins with a novel $\text{Tc}(\text{D})$ -carbonyl complex. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9): 897-901.
- 10 Willuda J, Honegger A, Waibel R, et al. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5758-5767.
- 11 Murray A, Scholfield DP, Schibli R, et al. A preliminary comparison of methods for production of ^{188}Re -C595 antibodies for radioimmunotherapy of bladder cancer. *J Label Compd Radiopharm*, 2001, 44(Suppl): S573-S575.

(收稿日期: 2006-12-17)