

文章编号:0253-9950(2009)01-0023-05

铼羰基化合物标记含 RGD 的多肽

马玉飞,于俊峰*,周 伟,沈 华,胡伟青,尹端让

中国科学院 上海应用物理研究所,上海 201800

摘要: $\alpha_v\beta_3$ 是一种在包括肿瘤引起的血管增生及肿瘤转移中起重要作用的细胞黏附受体,含 RGD 序列的肽及其类似物可以作为拮抗剂与 $\alpha_v\beta_3$ 正常配体进行竞争结合。本工作以三羰基铼为前体标记了 2 个含有 RGD 序列的多肽,实验结果表明,2 个多肽的标记率和放化纯度均大于 90%,体外稳定性良好。将进一步对其进行生物评价,以判别其是否有潜力发展成为肿瘤治疗剂。

关键词: ^{188}Re ; $\alpha_v\beta_3$; RGD

中图分类号: R817 **文献标志码:** A

Radiolabeling RGD-Peptide Using *fac*- $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

MA Yu-fei, YU Jun-feng*, ZHOU Wei, SHEN Hua, HU Wei-qing, YIN Duan-zhi

Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: Integrin $\alpha_v\beta_3$ is a member of the integrin family, which plays an important role in angiogenesis and tumour metastasis. The peptides containing arginine-glycine-aspartic acid (RGD) sequence can bind to integrin $\alpha_v\beta_3$ selectively. In the present study, we labeled two RGD-peptides via *fac*- $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. The results show that the labeling yields are more than 90% for both of radiolabeled compounds, and they are all stable in phosphate buffered saline and new-born calf serum, even challenged in histidine or cysteine solution. We will evaluate their biological properties to develop radiolabeled agents for tumor therapy.

Key words: ^{188}Re ; $\alpha_v\beta_3$; RGD

血管生成是肿瘤生长和转移的基础,其过程非常复杂,包括广泛意义上的细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的作用,整合素受体在此过程中起到了重要的作用^[1]。整合素是一类跨膜粘附受体家族,是由 α 和 β 亚基通过非共价键组成的异二聚体。除了可调节细胞与细胞外基质的黏附,整合素还可以调节细胞内事件,如控制细胞的形状、转移、增殖和存活^[2-5]。在整合素家族中 $\alpha_v\beta_3$ 最受关注,它不仅在多种实体肿瘤细胞表面有高

表达,而且对所有肿瘤组织的新生血管内皮细胞也有强烈表达;而在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常组织器官中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体表达缺失或几乎不能被探及^[6-8]。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 主要通过与其细胞外基质中的含 RGD (arginine-glycine-aspartic acid) 序列的配体结合发挥作用^[9],因此可以将含 RGD 序列的肽及 RGD 类似物作为拮抗剂与整合素进行特异性结合,从而阻断肿瘤血管上皮细胞增殖的信号传递,终止细胞增殖,使血管不能生

收稿日期:2008-07-18;修订日期:2008-09-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20501022; 32100601);中国科学院知识创新工程重大项目(KJ CXI-SW-08)

作者简介:马玉飞(1981—),女,辽宁鞍山人,博士,无机化学专业

* 通讯联系人:于俊峰, E-mail: yujf@sinap. ac. cn

长,导致肿瘤组织供氧系统中断,进而引起细胞萎缩、凋亡^[10]。自从 ^{125}I -3-iodo-Tyr⁴-cyclo(Arg-Gly-Asp-Tyr(D)-Val)(^{125}I -c-(RGDyV))作为放射性标记的 RGD 类似物被报道以来,筛选和寻找亲和力更好的含 RGD 序列的多肽,通过适当的化学修饰,采用放射性核素比如 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, ^{111}In , ^{188}Re , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{125}I , ^{177}Lu 等对 RGD 多肽及 RGD 类似物进行标记成为放射性药物研究中的热点^[11-17]。放射性标记的 RGD 多肽及其类似物对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性的肿瘤细胞有较高的特异性和亲和力,具有成为肿瘤显像剂或治疗剂的巨大潜力。

^{188}Re 是一种核性质优良且具有广泛市场应用前景的放射性核素。 ^{188}Re 除了发射分支比分别为 79% 和 20%、最大能量为 2.11 MeV 和 1.97 MeV 的 β^- 射线外,还发射分支比为 15% 的 155 keV 的 γ 射线。这一 γ 射线适于显像,可以方便地进行标记药物的辐射剂量估计、生物体内分布等药代动力学的研究。 ^{188}Re 半衰期为 16.9 h,一方面可以防止高能量 β^- 射线可能引起的骨髓损伤,另一方面可以多次给药,提高疗效^[18]。

近年来,三羰基铼作为前体的标记方法得到迅速发展,主要由于其水溶性好,在空气及水溶液(pH=2~12)中稳定性好,配体分子 H_2O 容易被单齿或多齿的双功能配体(含 N—N, N—N—O, N—N—S, P—P, P—P—O, S—S 等键)取代,形成羰基螯合物,且这类螯合物具有易和蛋白、单抗、多肽、氨基酸、糖等生物分子结合等诸多优点。本工作拟利用此前体标记 2 个末端有 His 残基修饰的含 RGD 的多肽,并对其稳定性等性质进行研究,以进一步探讨其成为肿瘤治疗剂的可能性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

硼氢化氨, Aldrich 公司,纯度大于 97%; CO 气体,纯度大于 99.99%, 昆山市新安工业气体有限公司;其余试剂均为分析纯,中国国药(集团)上海化学试剂公司;HPLC 所用试剂在使用前均过滤;实验用水均为二次蒸馏水;GF254 层析硅胶玻璃板,浙江台州四青生化材料厂;QMA Sep-Pak 柱,美国 Waters 公司;注射用生理盐水,上海百特医疗用品有限公司;多肽序列委托吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度 90%;小牛血清,特级,上海实生细胞生物技术有限公司; $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$

医用核素发生器,中国科学院上海应用物理研究所放射性药物研究中心自制。AR-2000 型放射性薄层扫描仪,美国 Bioscan 公司;FJ-391A2 型活度计,北京核仪器厂;SN-697 型双探头 R 计数器,中国科学院上海应用物理研究所日环光电仪器有限公司;磷屏成像系统(storage phosphor system)配有 OptiQuant 图像分析软件,美国 Perkin Elmer 公司;高效液相色谱(HPLC)配有 America PDA-100 紫外检测器、P680 泵,美国戴安公司;HPLC 分析柱为 Macherey-Nagel C₁₈ 反相柱(5 μm , 300 mm \times 3.9 mm)。

1.2 实验方法

1.2.1 $fac\text{-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的制备^[19]

称取约 5 mg $\text{BH}_3 \cdot \text{NH}_3$ 放入干燥西林瓶中,瓶盖密封,并向西林瓶中通 20 min CO 气体。向 1 mL $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ 生理盐水淋洗液中加入 6 μL 质量分数大于 85% 的 H_3PO_4 , 混合均匀后加至已通好 CO 的西林瓶中,75 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 15 min,反应过程中用注射器平衡反应产生的气体。反应结束后立即用冰水冷却终止。采用 GF254 硅胶玻璃板为固定相、 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ (体积比 99:1)为展开剂的放射性薄层色谱(TLC)法测定反应螯合率。反应产物 HPLC 检测采用梯度法:0—3 min 100%B; 3—6 min 75%B; 6—9 min 66%B; 9—20 min 0%B; 20—22 min 0%B; 22—25 min 75%B; 25—40 min 100%B。流动相 A 为甲醇, B 为 TEAP(7 mL 三乙基溴化铵磷酸盐加水近 1 000 mL,用磷酸调节 pH=2.25,定容到 1 000 mL)。流速 1 mL/min。反应混合物最后经 QMA Sep-Pak 柱分离纯化。

1.2.2 RGD 多肽的放射性标记 50 μL RGD 多肽溶液中加入 450 μL 纯化后的前体(多肽的最终浓度为 10^{-5} mol/L),充分混合后在 75 $^\circ\text{C}$ 的孵育器上反应 30 min。反应产物分别用 HPLC 和双展开剂 TLC 法测定反应标记率^[15]。HPLC 流动相 A, 0.1% $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$; B, 0.1% $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ 。梯度:0—30 min 5%B; 30—35 min 60%B; 35—40 min 5%B。流速 1 mL/min。TLC 均以 GF254 硅胶玻璃板为固定相,双展开剂为 100% 乙腈+丙酮/水(体积比为 1:1)。

1.2.3 体外稳定性实验

(1) 取 100 μL 标记化合物(37 MBq/mL)放入 1.5 mL 指型管中,分别加入 500 μL 小牛血清

(CBS)或 pH=7.4 的磷酸缓冲溶液(PBS), 在室温或 37 °C 条件下放置 4 h。分别在 0, 1, 4 h 取样点板, 采用双展开剂 TLC 方法检测标记化合物的放化纯度变化。

(2) 取 100 μL(37 MBq/mL) 标记化合物放入 1.5 mL 指型管中, 分别加入 His 或 Cys(浓度为 10⁻³ mol/L) 溶液 900 μL, 在室温或 37 °C 条件下放置 24 h。分别在 0, 1, 4, 24 h 取样点板, 采用双展开剂 TLC 方法检测标记化合物的稳定性。

2 结果与讨论

2.1 前体 fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的合成

反应后产物经 TLC 检测, ¹⁸⁸ReO₂ 的 R_f = 0.0~0.2, fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的 R_f = 0.4~0.6, ¹⁸⁸ReO₄⁻ 的 R_f = 0.8~1.0。HPLC 检测 fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的保留时间约为 5 min。结果表明, 前体产率大于 80%。混合物经 Sep-Pek 柱分离后, 前体的放射化学纯度大于 95%(图 1)。

2.2 多肽的标记

本工作设计的 2 个含 RGD 的多肽列分别为: HGRGDGRGDF (D) (P10) 和 HCRGDCF(D)CRGDC(P12)。标记后可能的结构式示于图 2。

经 HPLC 检测分析, ¹⁸⁸ReO₄⁻ 和 fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的保留时间约为 5 min; ¹⁸⁸Re-P10 保留时间为 19.5 min; ¹⁸⁸Re-P12 的保留时间为 22.5 min。TLC 和 HPLC 的检测结果

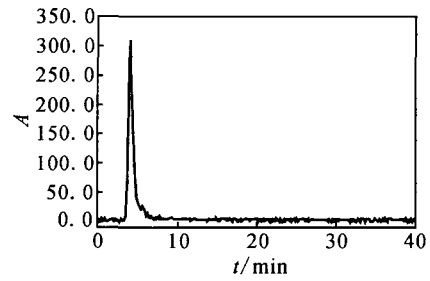


图 1 fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of the fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺

表明, 2 种肽的标记率均大于 95%(图 3)。

2.3 体外稳定性实验

(1) 2 个放射性标记的含 RGD 序列的多肽分别与小牛血清和 PBS 混合, 在室温或 37 °C 条件下孵育 4 h。2 种标记化合物标记率变化示于图 4。由图 4 可知, 2 个标记肽在 4 h 内的标记率变化都不大。4 h 后, 2 个标记肽在实验条件下的标记率均大于 87%。总体来说, P12 的稳定性要好于 P10。原因可能是 P12 的肽链中含有 2 个二硫键, 使得肽链固定, 更加稳定。

(2) 2 种标记肽分别与摩尔比过量 1 000 倍的 His 或 Cys 溶液混合, 在室温及 37 °C 条件下孵育 24 h。0, 1, 4, 24 h 通过双展开剂 TLC 检测化合物的标记率(图 5)。在实验条件下, 24 h 后, 2 个化合物的标记率均大于 85%。说明标记物比较稳定。

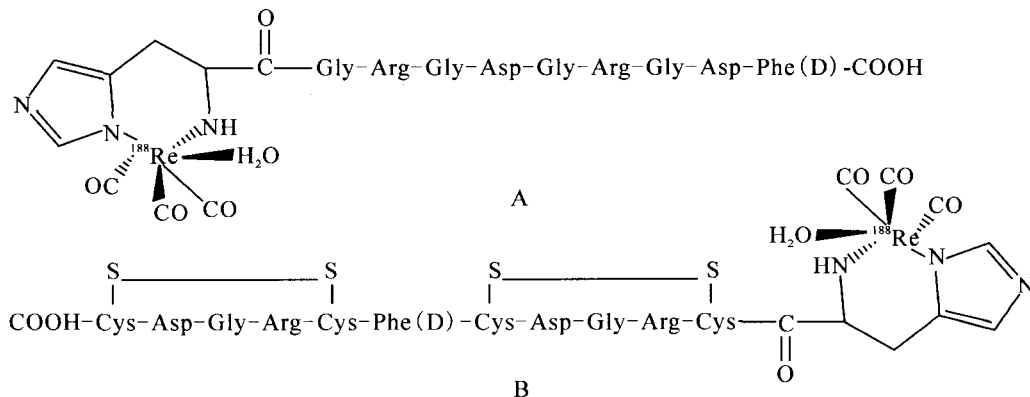


图 2 ¹⁸⁸Re-多肽可能的结构示意图
Fig. 2 Possible structures of ¹⁸⁸Re-peptides
A——¹⁸⁸Re-P10, B——¹⁸⁸Re-P12

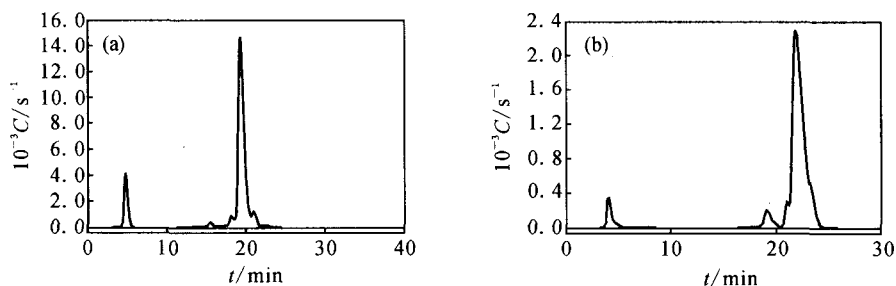
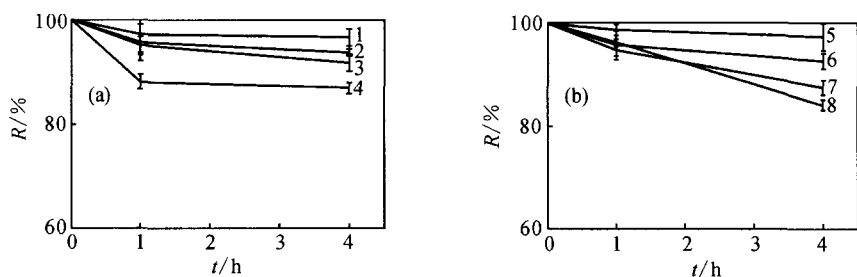
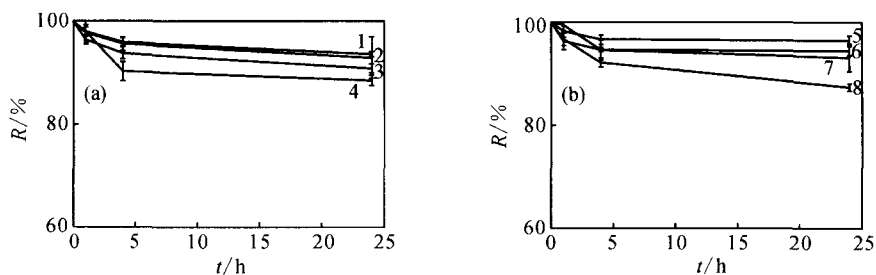
图 3 ^{188}Re 标记多肽的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of the two radiolabeled peptides

(a)—— ^{188}Re -P10, $t_{1/2}=19.5$ min; (b)—— ^{188}Re -P12, $t_{1/2}=22.5$ min图 4 小牛血清 CBS 和 pH=7.4 的磷酸缓冲溶液 PBS 中 ^{188}Re -P10(a), ^{188}Re -P12(b) 的体外稳定性
Fig. 4 *Vitro* stability of ^{188}Re -P10(a) and ^{188}Re -P12(b) in new-born calf serum (CBS) or phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4)1——P10-PBS, 室温(Room temperature); 2——P10-CBS, 37 °C; 3——P10-PBS, 37 °C;
4——P10-CBS, 室温(Room temperature); 5——P12-PBS, 室温(Room temperature);
6——P12-CBS, 室温(Room temperature); 7——P12-CBS, 37 °C; 8——P12-PBS, 37 °C图 5 ^{188}Re -P10(a), ^{188}Re -P12(b) 在 His 或 Cys 溶液中的稳定性Fig. 5 Stability of ^{188}Re -P10(a) and ^{188}Re -P12(b) in His or Cys solution1——P10-Cys, 37 °C; 2——P10-His, 37 °C; 3——P10-Cys, 室温(Room temperature);
4——P10-His, 室温(Room temperature); 5——P12-Cys, 37 °C; 6——P12-His, 37 °C;
7——P12-His, 室温(Room temperature); 8——P12-Cys, 室温(Room temperature)

2.4 讨论

本课题组试图研究一系列不同结构的 RGD 多肽 ^{188}Re 标记化合物对肿瘤靶向性的影响,在此前采用该法已标记了 2 个小肽 HGRGD-(D)F 及 $\overline{\text{HCRGD(D)FC}}$ 。生物评价结果表明,2 个标记肽

在肿瘤中都有一定的浓集,在血液中的清除较快,大多数脏器组织中的放射性残留少,滞留时间短^[15]。

有文献报道^[2]表明,环形含 RGD 多肽的生物活性好于线肽,有 2 个二硫键的环肽对肿瘤新生血管内皮细胞的抑制效率是含单个二硫键环肽

的 20 倍, 是线型 RGD 多肽的 200 倍; 多聚的 RGD 多肽或其他聚合物与 RGD 多肽的偶联物在肿瘤中的摄取与相应的单肽相比, 也有很大提高^[20]。因此, 本工作设计了 2 个新的 RGD 多肽, 肽链中分别含有 2 个 RGD 序列或 2 个二硫键, 并成功地进行了标记。体外稳定性结果表明, 2 个标记多肽在实验条件下稳定性较好。对比之前的 2 个 RGD 多肽^[15], 本实验所作结果都比之有所提高。下一步将继续进行细胞结合实验和肿瘤靶向实验, 希望得到比单个线性 RGD 或环肽更好的生物评价结果。

参考文献:

- [1] Zhang Xianzhong, Chen Xiaoyuan. Preparation and Characterization of $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3 - \text{BPy} - \text{RGD}$ Complex as $\alpha_v\beta_3$ Integrin Receptor-Targeted Imaging Agent[J]. *Appl Radiat Isot*, 2007, 65: 70-78.
- [2] 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.
- [3] Merdith J E, Fazeli B, Schwartz M A. The Extracellular Matrix as a Cell Survival Factor[J]. *Mol Biol Cell*, 1993, 4(9): 953-961.
- [4] Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, et al. Integrins in Invasive Growth[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 999-1006.
- [5] Nicosia R F, Bonanno E. Inhibition of Angiogenesis *in Vitro* by RGD-Containing Synthetic Peptide [J]. *Am J Pathol*, 1991, 138: 829-833.
- [6] De S, Razorenova O, McCabe N P, et al. VEGF-Integrin Interplay Controls Tumor Growth and Vascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 7589-7594.
- [7] Robinson S D, Reynolds L E, Wyder L, et al. β_3 -Integrin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor-A-Dependent Permeability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 2108-2114.
- [8] Friedlander M, Brooks P C, Shaffer R W, et al. Definition of Two Angiogenic Pathways by Distinct α Integrins[J]. *Science*, 1995, 270: 1500-1502.
- [9] 张雷. 整合素与肿瘤[J]. *重庆医学*, 2003, 32(9): 1261.
- [10] Kim J W, Lee H S. Tumor Targeting by Doxorubicin-RGD-4C Peptide Conjugate in an Orthotopic Mouse Hepatoma Model [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14: 529-535.
- [11] Chen X Y, Liu S, Hou Y P, et al. MicroPET Imaging of Breast Cancer α_v -Integrin Expression With ^{64}Cu -Labeled Dimeric RGD Peptides [J]. *Mol Imag Biol*, 2004, 6(5): 356-359.
- [12] Chen X Y, Park R, Shahinian A H, et al. Pharmacokinetics and Tumor Retention of ^{125}I -Labeled RGD Peptide are Improved by PEGylation [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31: 11-19.
- [13] Haubner R, Brucheritseifer M, Bock M, et al. Synthesis and Biological Evaluation of a $^{99}\text{Tc}^m$ -Labelled Cyclic RGD Peptide for Imaging $\alpha_v\beta_3$ Expression[J]. *Nuklearmedizin*, 2004, 43: 26-32.
- [14] Psimadas D, Fani M, Zikos C, et al. Study of the Labeling of Two Novel RGD-Peptidic Derivatives With the Precursor $^{99}\text{Tc}^m(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ and Evaluation for Early Angiogenesis Detection in Cancer [J]. *Appl Radiat Isot*, 2004, 31: 11-19.
- [15] 唐林, 于俊峰, 郑明强, 等. 铼 ^{188}Re 羰基化合物标记含 RGD 的环肽及其生物分布[J]. *核技术*, 2006, 29(6): 50-54.
- [16] Dijkgraaf I, Kruijtzter J A W, Frielink C, et al. $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Targeting of Intraperitoneally Growing Tumours With a Radiolabeled RGD Peptide [J]. *Int J Cancer*, 2006, 120: 605-610.
- [17] Dijkgraaf I, Kruijtzter J A W, Liu S, et al. Improved Targeting of the $\alpha_v\beta_3$ Integrin by Multimerisation of RGD Peptides[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2007, 34: 267-273.
- [18] Zhang X L, Zhang C F, Li J L, et al. Progress on Studying ^{188}Re Labeled Peptide [J]. *Nucl Tech*, 2002, 25(7): 587-592.
- [19] Yu Junfeng, Häfeli Urs O, Xia Jiaoyun, et al. Radiolabelling of Poly(Histidine) Derivatized Biodegradable Microspheres With the ^{188}Re Tricarbonyl Complex $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ [J]. *Nucl Med Comm*, 2005, 26(5): 453-458.
- [20] Wester H J. Molecular Targeting With Peptides or Peptide-Polymer Conjugates: Just a Question of Size [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(12): 1940-1945.