

^{188}Re 标记生物分子研究进展

许风华^{1,2} 尹端沚¹ 汪勇先¹

1(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2(中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 ^{188}Re 半衰期只有 16.9 h, 最大 β 射线能量为 2.11 MeV, 同时伴随有适于显像能量为 155 keV 的 γ 射线。因此是一种理想的治疗用放射性核素, 本文综述了 ^{188}Re 生物标记的各种方法及研究进展, ^{188}Re 标记放射性药物用于肿瘤核医学治疗的前景十分令人鼓舞。

关键词 ^{188}Re , 放射性药物, 生物标记

中图分类号 TL92, Q691

放射性药物是人体进行医学诊断和治疗用的某些放射性核素及其标记的单质、化合物或生物制剂。用于临床肿瘤放免治疗的放射性核素, 发射一定能量的 α 射线、 β 射线、俄歇电子或内转换电子, 既能特异性地杀死肿瘤细胞, 又不伤害射程外的正常细胞。在已发现的 2000 多种放射性核素中, 能用于临床治疗者不多。早年常用的 ^{131}I , 其物理和生物学特性均不够理想, 主要是其标记的抗体体内易脱碘、 γ 射线能量较高、半衰期较长以及 β 射线能量较低等。 ^{90}Y 具有较高的 β 射线能量、相对较长的电离路径及合适的物理半衰期, 其缺点在于易沉积在骨骼中引起严重的骨髓抑制现象。 ^{153}Sm 和 ^{186}Re 都是较好的治疗用核素, 但二者都用反应堆生产, 边远地区不易得到而限制了其应用。 ^{188}Re 发射最大能量为 2.11 MeV(79%)和 1.97 MeV(20%)的 β 射线, 射线能量非常接近于 ^{90}Y 的 β 能量, 不仅可杀伤抗原表达阳性的肿瘤细胞, 也对抗原表达阴性的肿瘤细胞具有杀伤作用, 且不会沉积在骨骼中。 ^{188}Re 半衰期为 16.9 h, 可方便地调整给药方式, 提高疗效; 其还伴随发射适于显像的 155 keV γ 射线, 可方便地进行标记药物的辐射剂量估算、生物体内分布等药代动力学的研究。

^{188}Re 由 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ 发生器淋洗得到, 母体 ^{188}W 半衰期为 69 天, 使用方便, 便于在边远地区开展放射性核素治疗。Ficher 大鼠静脉注射发生器淋洗得到的 ^{188}Re -高铼酸钠后的生物分布, 表明 ^{188}Re -高铼酸钠的脏器吸收很低, 并很快通过尿排泄, 其生物学行为非常优异。 ^{188}Re -高铼酸钠在人体内的生物半

衰期 < 10h, 即使 ^{188}Re 标记的放射性药物在体内发生核素脱落, 也不会对人体造成严重的辐射损伤。

Re 和 Tc 均系第 VII 副族, 化学性质活泼, 可通过直接或间接的方法标记单抗、多肽和核酸等生物分子, 制备各种 ^{188}Re 标记的放射性药物。近年来, ^{188}Re 标记化合物的研究十分活跃, 用 ^{188}Re 标记化合物对肿瘤、心血管病及其它疾病进行治疗, 已取得丰硕研究成果并将得到临床应用。

1 标记方法

1.1 直接标记

直接标记法即使用还原剂, 如 2-巯基乙醇(2-ME)、二硫苏糖醇(DTT)、 NaHSO_3 、抗坏血酸和酒石酸亚锡等, 能打开蛋白质的二硫键形成与铼有效结合的巯基(-SH); 用 Sn^{2+} 还原 $^{188}\text{ReO}_4^+$ 为低价态的 Re , 与酒石酸、柠檬酸、葡萄糖酸、葡庚酸等中间配体络合后, 通过配位交换反应与巯基的硫结合, 从而完成蛋白的直接标记(图 1)。中间配体可与 ^{188}Re 保持弱的络合作用, 以使 ^{188}Re 处于稳定低价态, 保证后续配位交换反应得以顺利进行。它又起着稳定 Sn^{2+} 的作用, 减少其水解。葡萄糖酸钠是常用的中间络合剂, 与柠檬酸盐、酒石酸盐相比, 其标记实验条件易掌握、标记物稳定、放化纯度高^[1]。在标记反应中加入适量抗坏血酸保护溶液, 稳定低价态的 Re , 增加标记物的体外稳定性, 又可抑制-SH 的氧化, 提高标记率^[2,3]。这些铼络合物的结构尚不清楚, 一般认为其低价态的 Re 是 V 或 III 价。

中国科学院知识创新工程重大项目(KJCXI-SW-08), 国家自然科学基金项目(20501022), 上海市科委“登山计划”项目(06DJ219506)资助

第一作者: 许风华, 女, 1981 年出生, 2006 年于云南农业大学获硕士学位, 现为中国科学院上海应用物理研究所博士研究生, 无机化学专业

通讯作者: 尹端沚

收稿日期: 2008-08-25, 修回日期: 2008-10-28

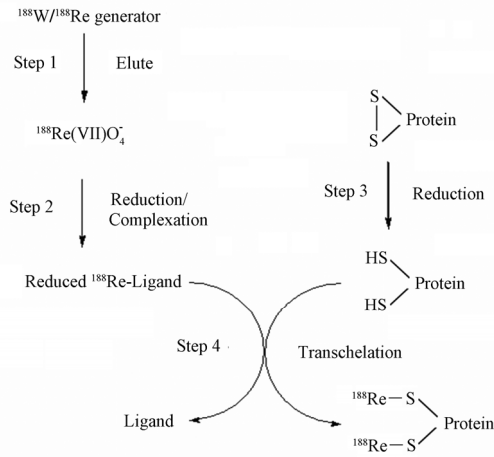


图 1 ^{188}Re 直接标记蛋白原理
Fig.1 Procedures for direct radiolabelling of protein with ^{188}Re

影响标记率的主要因素有： SnCl_2 用量、缓冲液 pH 值、中间配体的种类和用量、反应时间、加入的 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 体积、待标记物浓度等。

直接标记方法易于完成、标记率高。然而，以 Re 为中心的配位原子数和几何构型，目前尚不清楚，很难控制 ^{188}Re 配合物和非特异性结合的稳定性，易发生 ^{188}Re 脱落而被重新氧化。这种方法主要适用于单抗和其片段的标记。因为很多小分子肽并无二硫键，或者某些情况下，二硫键对保持小分子肽的生物活性非常重要，不能被还原。

1.2 间接标记

间接标记是通过双功能螯合剂(BFCA)把 ^{188}Re 和待标记的蛋白或多肽连在一起，这种方法的标记率通常不高，故选择合适的 BFCA 很重要，常用的 BFCA 有 MAG_3 、 N_3S 、 N_2S_2 、 N_4 、DTPA、HYNIC 等，还有一些三肽或四肽也可作为 BFCA。间接标记法分为先标记法和后标记法。

先标记法是先利用 ^{188}Re 和 BFCA 反应生成 ^{188}Re 配合物，再与蛋白或多肽进行连接。化学过程易于确定和控制，对蛋白或肽的活性影响较小，同时可防止金属的非特异性结合，但在临床使用中过于复杂且费时，标记后进行活化和连接会降低纯度，增加质量控制的难度。标记率影响因素主要有两个： ^{188}Re 先标记 BFCA 和 ^{188}Re -BFCA 与待标记物偶联。

后标记法是 BFCA 首先与蛋白或多肽连接形成 BFCA-肽螯合物，后再用 ^{188}Re 进行标记。具有直接标记的优点，肽-BFCA 的使用可大大简化标记过程，但是标记情况复杂，还原剂可能影响肽中半胱氨酸的功能，强碱条件下敏感基团可发生水解，

影响肽的生物活性^[4]。影响标记率的因素主要在 ^{188}Re 标记 BFCA-生物分子螯合物这一步。

1.3 应用前体 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记生物分子

铼和钨羰基化合物 ($\text{fac-}[\text{M}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, $\text{M} = ^{188}\text{Re}$ 、 ^{186}Re 、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$) 标记生物分子已获广泛应用，已实现常压下水溶液中制备，成为目前铼和钨放射性药物研究的热点^[5]。

$\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直接标记生物分子时，标记率低、标记化合物不稳定，有些生物分子也很难直接标记^[6]，因此， $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记生物分子时，中间需 BFCA 连接。生物分子接上 BFCA 后，既能与 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 牢固结合，又由于 BFCA 的分隔避免了位阻作用可免使生物活性受损。 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 可直接与组氨酸的咪唑基团结合，标记含组氨酸残基的单抗或多肽。其 3 个 H_2O 分子易被单齿、两齿或多齿的双功能配体取代，形成含羰基金属的螯合物。这种螯合物易与单抗、多肽等生物分子稳定结合，甚至很小的生物分子也能高比度结合而不丧失其生物活性；前体 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记的生物分子能通过合成类似的非放射性化合物得到表征。目前 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的制备条件不断成熟^[7,8]。但铼须从 +7 还原到低价态，其氧化成高价态的趋势较强，故有关 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记放射性药物的研究不如 $\text{fac-}[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ 那样充分。

2 ^{188}Re 标记生物分子

2.1 ^{188}Re 标记单克隆抗体

由于单抗的多样性、特异性和生物活性，在各种各样的肿瘤中，单抗是被使用的潜在的理想的靶向试剂，因此，单抗(Mab)和其片段 $\text{F}(\text{ab}^+)$ 和 $\text{F}(\text{ab}^{\text{''}})_2$ ，一直被广泛用于携带具有诊断和治疗特性的放射性核素到达靶位置上。将 ^{188}Re 与抗体结合在一起，利用抗体对肿瘤的亲合作用，可把 ^{188}Re 引入到靶器官，达到杀伤癌细胞的目的。各国实验室所用的 ^{188}Re 标记单克隆抗体及其工作综述如下。

BDI-1，所用肿瘤类型是膀胱癌，直接标记，单抗还原剂为 2-ME，标记率 30%，标记单抗的免疫活性为 58.68%，i.v.23 h 后平均 T/NT 为 4.42^[9]。

BAC₅，所用肿瘤类型是鼻咽癌，直接标记，单抗还原剂为抗坏血酸，标记率 >80%，免疫活性为 61±15%，室温 24h 放化纯度 >70%，体外对鼻咽癌细胞 CNE-2 及其微球强烈抑制^[10]。

3H11, 所用肿瘤类型是胃癌, 直接标记, 1) 单抗还原剂为 NaHSO_3 , 标记率 >95%, 室温 24 h 放化纯度 >90%^[2]; 2) 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 >95%, 免疫活性 >75%, 在生理盐水或 HAS 中 37°C 24 h ^{188}Re 脱落率均 <5%, i.v. 48 h 后所有 T/NT 均 >2.0^[11]。

Herceptin, 1) 所用肿瘤类型是鼻咽癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 >90%, 免疫活性 >63%, 小牛血清中 37°C 12 h 或 24 h 后 ^{188}Re 脱落率分别为 (3.94±1.60)% 和 (7.14±0.87)%, 体内给药 2 d, 瘤内注射肿瘤摄取 11.53%ID/g, 是 i.v. 的 4 倍, 正常组织摄取均 <1%ID/g, 明显低于 i.v. (>1.5%ID/g)^[12]; 2) 所用肿瘤类型是乳腺癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 >90%, 免疫活性为 65%, 小牛血清中 48 h 有 80-85% 的放射性保留, 体外明显剂量依赖性地抑制 SKBR-3 细胞^[13]。

2F7, 所用肿瘤类型是小细胞肺癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 >90%, 免疫活性为 (75.3±8.3)%, i.p. 48 h 后瘤/血比为 2.8, 72 h 为 3.2^[14]。

HAb18 及 F(ab')_2 , 所用肿瘤类型是肝癌, 直接标记, 1) 单抗还原剂为 NaHSO_3 , 标记率 85-93%, 免疫活性为 91%, 在生理盐水、DTPA 和 Cys 中 24 h 解离率分别为 7%、12% 和 35%, i.v. 68 h 后血、肝、脾、肾的 T/NT 分别为 36.8、3.6、6.1、0.4^[3]; 2) 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 91.7%, 免疫活性为 78%, i.v. 48 h 后瘤/血比最高 19.80, 在荷肝癌裸鼠体内药代动力学符合线性一室模型, 其在肿瘤的半衰期达 32.99 h^[15,16]。

C50, 所用肿瘤类型是结肠癌, 直接标记, 单抗还原剂为抗坏血酸, 标记率 >85%, 室温 24 h 保持稳定, 对小鼠结肠癌模型治疗有效, 优于 5-FU 化疗, 瘤内注射后, 集中在瘤内, 肿瘤生长受到明显抑制, 瘤体缩小, 肿瘤细胞破裂、坏死^[17,18]。

BW250/183, 所用肿瘤类型是白血病, 直接标记, 单抗还原剂为 TCEP, 标记率 (94±3)%, 免疫活性接近 100%, 在 5% HSA 中 37°C 24 h 放射性丧失约 30%, 龙胆酸明显提高其体外稳定性, 静脉滴注后, 全身、红骨髓、肝、脾和肾辐射吸收剂量 (mGy/MBq) 分别为 0.13±0.02、1.45±0.71、0.43±0.21、1.32±0.99 和 0.71±0.17^[19]。

DD-3B6/22 及 F(ab')_2 , 所用肿瘤类型是卵巢癌, 直接标记, 单抗还原剂为 DTT, 标记率 68%, 免疫活性 >75%, 在 PBS 中 4°C、25°C、37°C 温育 24 h、48 h, ^{188}Re 均明显脱落, 在 N_2 保护下, 加入抗坏血酸, 4°C 下, 解离明显降低, i.v. 后, 通过肾脏从血中快速清 ($t_a=2.4\pm0.3$ h, $t_p=3.5\pm0.5$ h), 24 h 在靶区的量是非靶区的 10 倍, 并在靶区持续至少 24 h^[20]。

B43.13, 所用肿瘤类型是卵巢癌, 直接标记, 单抗还原剂为 Photoactivation, 标记率 95%, 免疫活性为 87±5%, 人血清、HSA 和 PBS 中 24 h, 放射性分别保留 80%、84% 和 79%, Cys 竞争 24 h, 放射性只保留 37%, i.v. 48 h 后肿瘤吸收一直保持在较高水平, 瘤/血、瘤/肾、瘤/肝、瘤/肌肉比分别约为 2.5、3.8、3.3、24.0^[21]。

B72.3, 所用肿瘤类型是结直肠癌, 直接标记, 单抗还原剂为酒石酸亚锡, 标记率 80.3%, 免疫活性为 64.7%, i.v. 48 h 后在 LoVo 肿瘤中达最大积聚 (3.49±0.89)%ID/g, 低于 ^{125}I -B72.3, 血中快速清除, 瘤/血比 (2.04±0.44) 高于 ^{125}I -B72.3^[22]。

MN-14, 所用肿瘤类型是胃肠道癌, 直接标记, 单抗还原剂为硫醇 (如 2-ME), 标记率 >95%, 免疫活性为 (83±8.4)%, i.v. 后, 尽管肝、脾和肾吸收比 ^{131}I -MN-14 相对增加, 但只有在中毒剂量时才产生红骨髓抑制^[23]。

7E11C5.3, 所用肿瘤类型是前列腺癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 93.16±2.18%, 免疫活性为 74.86±1.86%, 室温 24 h 放化纯度仍保持 82.46±1.86%, i.v. 后, 肿瘤摄取在 24 h 达高峰, 血液清除迅速, 24 h T/NT 达最大, 瘤/血为 5.90, 至 72 h 仍保持在较高水平^[24]。

Anti-CEA chimeric Ab 与 C50, 所用肿瘤类型是结肠癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 两者的标记率均为 90%, 免疫活性: 前者为 61%, 后者为 65%; 在生理盐水或 HSA 中 37°C 温育 24 h, 放射性脱落均 <5%, ^{188}Re -CEA 嵌合抗体 i.v. 24 h 后, 瘤/肾、瘤/血、瘤/其它脏器比分别为 0.75、0.99、>1.78; 48 h, 为 1.02、1.12、>2.08, 其放射生物学特性及显像效果与 C50 基本相同^[25]。

C595, 所用肿瘤类型是膀胱癌, 1) 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 (62.1±25.8)%, 免疫活性为 (70.4±16.9)%, 其中加入 BSA 和抗坏血酸, 室温 22 h, 放射性保留 54%, 免疫活性由 66% 降为 30%; 不加时放射性保留只有 26%, 而免疫活性降为 8%, 体外膀胱模型中 T/NT 比平均为 7.1:1, 膀胱癌病人 i.v. 后, T/NT 比平均为 3.9:1^[26]; 2) 直接标记与 $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直标, 免疫活性: 前者 95%, 后者 96%, 48 h 后, 前者 <20%, 后者 79%; 两种方法制备的标记物 37°C 保育 48 h, 前者 ^{188}Re 解离严重, 而后者只有轻微脱落; 加入 BSA 可减少放射性解离; 在体外膀胱癌模型中, 两种标记方法制备的标记物均靶向结合于肿瘤^[27]。

h-R3, 1) 所用肿瘤类型是肺腺癌, 直接标记, 单抗还原剂为 2-ME, 标记率 98.5±0.6%, 免疫活性

为 $87.6 \pm 5.6\%$ ，生理盐水中室温 120 h，仍保留 $94.5 \pm 0.53\%$ ；与 DTPA 或 HSA 竞争时，稳定；与人血清 37°C 保育 24 h，30% 转到血清；与 100 mM Cys 37°C 保育 1 h，85% 转到 Cys；i.p. 生物分布研究表明在正常组织中无标记抗体积聚，血中清除半衰期为 $(14.27 \pm 1.32) \text{ h}^{[28]}$ ；2) 所用肿瘤类型是脑瘤、胶质母细胞瘤、肺腺癌，直接标记，单抗还原剂为 2-ME，标记率 $94.91 \pm 0.19\%$ ，免疫活性为 $78\%^{[29]}$ 。

Rituximab，所用肿瘤类型是非霍奇金淋巴瘤 (NHL)，直接标记，单抗还原剂为 2-ME，标记率 $>95\%$ ，甲状腺中无放射性浓集，表明标记物在体内 ^{188}Re 未脱落；静脉滴注 $4.87\text{--}8.72 \text{ GBq}$ 标记物，全身辐射吸收剂量为 0.75 Gy ，肾清除 $T_{1/2} = 12 \text{ h}^{[30]}$ 。

(Biotinylated) ior ceal 及 $\text{F}(\text{ab}')_2$ ，直接标记，单抗还原剂为 2-ME，标记率： $\text{F}(\text{ab}')_2$ ， $>98.5\%$ ，MoAb， $>93\%$ ；免疫活性分别为： 68 ± 1.8 、 65 ± 2.5 ，生物素化的分别为 67 ± 2.1 、 64 ± 2.2 ；注射 ^{188}Re 生物素化标记物后再注射 avidin，血中放射性活性降低约 $50\% \sim 70\%$ ，累计活性降低约 75% ，有效剂量降低约 25% ，表明在体内稳定； ^{188}Re 标记的生物素化的 MoAb 或 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 在鼠体内分布与非生物素化的无明显差异^[31]。

BDI-1，所用肿瘤类型是膀胱癌，先标记法，BFCA 为 NHS-ECM，标记率 $87.4 \pm 5.76\%$ ，免疫活性为 58.7% ，i.v. 24 h 荷人膀胱癌裸鼠的肿瘤中有明显有效的放射性积聚^[32]。

CL3，所用肿瘤类型：结肠癌，先标记法，BFCA 为 NHS-MAG₃，标记率 96.1% ，在 $2/3$ 体积 $0.9\% \text{ NaCl}$ 、 20 mg/mL EDTA 和 $1 \text{ mg/mL NHS-MAG}_3$ 中 37°C 18 h，放射性分别保留 98.0% 、 96.4% 和 77.9% ，i.v. 后，其在小鼠血中有较高保留值 (1 h， $(16.82 \pm 2.17) \% \text{ ID/g}$ ；24 h， $(1.46 \pm 0.77) \% \text{ ID/g}$)^[33]。

Biotinylated chiBR96，所用肿瘤类型是结肠癌，先标记法，BFCA 为 $\text{MAG}_2\text{-GABA}$ ，标记率 $35\% \sim 40\%$ ，与抗生物素蛋白结合能力为 $80\% \sim 90\%$ ，生物素化的 $^{188}\text{Re-chiBR96}$ 在鼠血清中孵育 2 d，生物素化和标记均保持稳定^[34]。

14f7，所用肿瘤类型是黑色素瘤，先标记法，BFCA 为 S-benzoyl-MAG₃，标记率 46.9% ，在生理盐水和血清中室温孵育 20 h，放射性分别保留 80.0% 和 70.3% ；i.v. 24 h 和 48 h 后，肿瘤摄取分别为 8.80 ± 1.51 和 $7.23 \pm 1.30 \% \text{ ID/g}$ ，瘤/血比为 0.55 和 0.68 ^[35]。

^{188}Re 直接标记单抗，标记率高，体内外较稳定；与碘标记的单抗相比，血液清除快；与 ^{90}Y 标记的单抗相比， ^{188}Re 直接标记的单抗不会沉积在骨骼中

而引起严重的骨髓抑制现象。Juweid 等^[23]用 ^{188}Re 直接标记抗 CEA 的单抗 MN-14，对 11 例胃肠道癌病人放射免疫治疗中进行其体内分布、药代动力学及辐射剂量的研究，结果表明，标记率大于 95% ，标记物无需纯化。 $^{188}\text{Re-MN-14}$ 在肝、脾、肾中吸收均高于 $^{131}\text{I-MN-14}$ ，血液中的生物半衰期为 $(8.2 \pm 4.1) \text{ h}$ ，而全身生物半衰期为 $(107.8 \pm 104.2) \text{ h}$ (全身扫描法) 或 $(98.0 \pm 37.8) \text{ h}$ (收集尿液法)，全身吸收剂量为 $(13.5 \pm 1.35) \text{ cGy/GBq}$ ，最大耐受剂量为 2.22 GBq/m^2 ，仅在中毒剂量时才出现红骨髓受抑制的现象。这种高剂量应用的可行性研究，使 $^{188}\text{Re-MN-14}$ 有望成为放射免疫治疗的生物制剂。

以 S-benzoyl-MAG₃ 等作为 BFCA， ^{188}Re 间接标记单抗越来越受到人们的普遍关注。由于 MAG₃ 中的巯基被苯甲酰基保护，S-benzoyl-MAG₃ 更加稳定，且易于合成，可长期保存；且 $^{188}\text{Re-MAG}_3$ 具有较高的体内外稳定性使其在核医学中应用广泛。J.L Crudo 等^[35]以 S-benzoyl-MAG₃ 为 BFCA，用先标记法 ^{188}Re 间接标记抗黑色素瘤单抗 14f7，标记中无需加入防止 ^{188}Re 重新氧化的保护剂， $^{188}\text{Re-MAG}_3$ 在生理盐水和血清中孵育 20 h，放射性无损失，而 $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-MoAb 14f7}$ 在生理盐水和血清中室温孵育 20 h，放射性分别保留 80% 和 70.3% ，放射性损失可能是由于单抗的氨基和 MAG₃ 的羧基之间形成的酰胺键水解引起的。

^{188}Re 标记抗体目前存在的问题主要有以下几个方面：标记物不稳定，比活度太低；标记后单抗免疫活性损失；标记物在非靶器官中的浓集导致肿瘤的浓集量低等。解决的方法主要有：改变抗体或标记技术；加快血液和正常组织中标记抗体的清除；改变标记抗体的注入方式、提高肿瘤血管的通透性及血流量等。

2.2 ^{188}Re 标记多肽

作为受体的配体，小肽对受体的亲和性比抗体或抗体片段对抗原的亲和性高，其易于合成和修饰，进入体内很少导致免疫反应，容易穿透组织，并且很快从血液中清除。用各种放射性核素标记能与肿瘤表面高表达的某些受体特异性结合的肽类药物，是目前放射性药物研究中广受关注的一个方面。 ^{188}Re 标记的多肽综述如下。

Lanreotide, 1) 所用肿瘤类型是子宫癌、小细胞肺癌， SnCl_2 直接还原标记，标记率 $(96 \pm 2)\%$ ，在血浆中 24 h 放射性保留 68% ，i.v. 后，荷瘤鼠中肿瘤吸收为 $(6.2 \pm 2.9) \% \text{ ID/g}$ ，24 h 瘤/肌肉和瘤/血比分别为 7.1 、 3.3 ^[36]；2) SnCl_2 直接还原标记，标记率

88%~94%，加抗坏血酸后在生理盐水中 37℃ 孵育 6 h，放化纯度仍>95%^[37]；3) SnF_2 直接还原标记，标记率>95%，与 300 倍摩尔比 Cys 37℃ 孵育 2 h 或与 100 倍 Cys 24 h，约有 50% ^{188}Re 脱落^[38]。

Octreotide, SnCl_2 直接还原标记，标记率 (92.6±1.9)%，在生理盐水和人血清中室温 24 h 分别保留 (86.6±1.8)% 和 (84.2±2.7)%^[39]。

CCMSH 与 (Arg¹¹)CCMSH，所用肿瘤类型是黑色素瘤， SnCl_2 直接还原标记，i.v. 1 h 后，肿瘤吸收分别为 (15.03±5.20)，(20.44±1.91)%ID/g；24 h 为 (1.94±0.47)，(3.50±2.32)%ID/g^[40]。

CCMSH，所用肿瘤类型是黑色素瘤， SnCl_2 直接还原标记，在 PBS(24 h, 99.9%)、血清(12 h, 99.9%) 或与 DTPA(18 h, 98.4%)、Cys(24 h, 96.7%) 竞争时均稳定^[41]。

RC-160, 1) 酒石酸亚锡直接还原标记，标记率 96.2%，加抗坏血酸组在标记后 24 h 放化纯度为 85%，未加的则为 50%^[42]；2) 所用肿瘤类型是前列腺癌，酒石酸亚锡直接还原标记，标记率 93%~97%，瘤内注射后特异性结合在 DU-145 和 PC-3 肿瘤中^[43]；3) 所用肿瘤类型是前列腺癌，先标记法，BFCA 为 MAG_3 ，i.v. 和瘤内注射 24 h 后，肿瘤吸收分别为 0.28%ID/g 和 9.3%ID/g^[44]。

HGRGD(D)F 与 $\overline{\text{HCRGD(D)FC}}$ ， $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 直接标记，标记率>90%，在 PBS 中室温和 37℃ 孵育 4 h，前者放化纯度分别降为 81% 和 78%；后者分别降为 86% 和 77%^[45]。

BBN, 1) 所用肿瘤类型是前列腺癌， $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 后标记法，BFCA 为 Dpr-SSS，标记率约 40%，体内外实验表明标记物特异性靶向于胃泌素释放肽受体 (GRPR)^[46]；2) 所用肿瘤类型是小细胞肺癌，后标记法，BFCA 为 trisuccin，标记率≥90%^[47]。

a-MSH，所用肿瘤类型是黑色素瘤，后标记法，BFCA 为 CGCG，标记率约 50%，在 PBS 中 25℃ 孵育 24 h 稳定^[48]。

Guhlke 等^[45]用 ^{188}Re 和 $^{99}\text{Tc}^m$ 先标记 BFCA MAG_3 -4-硝基酚酯，后结合赖氨酸保护的 RC-160，再去保护，得到 ^{188}Re 和 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的 RC-160。并进行了两者在正常和荷瘤鼠中的生物学评价，发现二者在正常和荷瘤鼠中的生物分布类似于 ^{131}I -RC-160。二者都迅速从血液中清除并通过肝胆系统排泄，正常器官吸收很少。静脉注射 ^{188}Re - MAG_3 -RC-160 24 h 后，肿瘤(PC-3，人前列腺癌)吸收只有 0.28%ID/g，类似于 ^{131}I -RC-160，而瘤内注射 24 h 后，肿瘤内有明显的吸收，摄取率为

9.3% ID/g。

唐林等^[44]以 $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 为前体标记了含 RGD 的多肽 HGRGD(D)F 和 $\overline{\text{HCRGD(D)FC}}$ 。两个多肽末端组氨酸作为二齿配体，取代前体 $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 分子中的水分子形成羰基配合物。两种标记物的标记率和放化纯度均大于 90%，不用纯化。标记后 4 h ^{188}Re -HGRGD(D)F 在 PBS 中室温下放化纯度为 81%，37℃ 下为 78%；而 ^{188}Re - $\overline{\text{HCRGD(D)FC}}$ 的分别降至 86% 和 77%；两个标记物在小牛血清中稳定性都差于 PBS 中。两个标记物都不会引起红细胞的溶血和凝聚现象，表明这两种标记物均可用作注射用药。

2.3 ^{188}Re 标记核酸

由于脱氧寡核苷酸分子上没有可直接标记的反应基团，目前， ^{188}Re 标记脱氧寡核苷酸几乎都采用通过双功能螯合剂的间接标记法。标记成功的关键在于选用合适的双功能螯合剂，鉴于如上所述 MAG_3 的优点，利用 S-乙酰基-NHS- MAG_3 作为 BFCA， ^{188}Re 标记核酸，得到的标记产物具有较高的标记率、比活度和放化纯度，且体内、外稳定性好，与血清蛋白的非特异性结合低，S-乙酰基-NHS- MAG_3 不会影响寡核苷酸性质，所以一般都采用 NHS- MAG_3 作为 BFCA，后标记法标记核酸。程时武等^[49]先使长度为 18 个碱基的单链大鼠血小板衍生生长因子受体- β mRNA 反义脱氧寡核苷酸 (PDGFR- β mRNA AODN) 与 BFCA NHS- MAG_3 偶联，再标记 ^{188}Re ，标记率为 70%，经 Sep-Pak C18 层析柱纯化后放化纯度>95%，比活度 7.4~11.1×10⁶ MBq/g。加入抗坏血酸后， ^{188}Re - MAG_3 -AODN 在室温生理盐水中及 37℃ 新鲜人血清中稳定性良好，与血清蛋白结合率为 8%~10%， ^{188}Re - MAG_3 -AODN 在小鼠体内仍保持一定的稳定性，在肾、肝中摄取较高。

3 展望

综上所述， ^{188}Re 标记的单抗或其片断、多肽已取得了重要的进展。目前单抗的 ^{188}Re 标记还是主要采用直接标记法，标记率较高(90%左右)，免疫活性分数在 60%~80%，标记物较稳定。多肽的标记倾向于间接标记。另外鉴于 $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的优点，随着制备方法的成熟， $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记的放射性药物将成为核医学研究的热点之一。

同时应该注意到目前 ^{188}Re 标记生物分子仍存在不少问题，如应用双功能螯合剂的标记技术不完善、标记物稳定性较差、比活度低、免疫活性较低、

靶向性差等,但随着研究的不断深入,人源化抗体的应用、多肽的修饰、标记技术的改进、新型双功能螯合剂的研制等,¹⁸⁸Re 标记放射性药物用于肿瘤核医学治疗的前景非常乐观。

参考文献

- 1 Dadachova E, Mirzadeh S. Nucl Med Biol, 1997, **24**: 605–608
- 2 刘文彬, 李玉, 张汉文. 同位素, 1999, **12**(4): 208–211
LIU wenbin, LI yu, ZHANG hanwen. J Iso, 1999, **12**(4): 208–211
- 3 陆巍巍, 王豫庆, 杨志, 等. 同位素, 2000, **13**(2): 65–72
LU weiwei, WANG yuqing, YANG zhi, *et al.* J Iso, 2000, **13**(2): 65–72
- 4 Jeong J M, Chung J K. Cancer Biother Radiopharm, 2003, **18**(5): 707–717
- 5 Alberto R, Schibli R, Egli A, *et al.* J Am Chem Soc, 1998, **120**(31): 7987–7988
- 6 Alberto R, Schibli R, Waibel R, *et al.* Coordi Chem Rev, 1999, 190–192
- 7 Yu J F, Häfeli U O, Xia J Y, *et al.* J Nucl Radiochem, 2005, **27**(2): 87–90
- 8 Park S H, Seifert S, Pietzsch H J. Bioconjugate Chem, 2006, **17**: 223–225
- 9 郭义峰, 俞莉章, 潘柏年, 等. 中华泌尿外科杂志, 2000, **21**(7): 415–417
GUO yifeng, YU lizhang, PAN bainian, *et al.* Chin J Urol, 2000, **21**(7): 415–417
- 10 王国慧, 刘长征, 梁昌盛, 等. 核技术, 2003, **26**(5): 375–379
WANG guohui, LIU changzheng, LIANG changsheng, *et al.* Nucl Tech, 2003, **26**(5): 375–379
- 11 杨志, 林保和, 韩燕, 等. 中华核医学杂志, 1999, **19**(3): 181–182
YANG zhi, LIN baohe, HAN yan, *et al.* Chin J Nucl Med, 1999, **19**(3): 181–182
- 12 李贵平, 黄凯, 张辉, 等. 南方医科大学学报, 2006, **26**(4): 459–462
LI guiping, HUANG kai, ZHANG hui, *et al.* J South Med Uni, 2006, **26**(4): 459–462
- 13 李贵平, 张一帆, 汪勇先, 等. 南方医科大学学报, 2006, **26**(10): 1455–1457
LI guiping, ZHANG yifan, WANG yongxian, *et al.* J South Med Uni, 2006, **26**(10): 1455–1457
- 14 栗波, 苗积生, 徐玮华. 中华核医学杂志, 1998, **18**(4): 199–201
LI bo, MIAO jisheng, XU weihua. Chin J Nucl Med, 1998, **18**(4): 199–201
- 15 边惠洁, 陈志南, 娄超, 等. 肿瘤, 2000, **20**(3): 181–183
BIAN huijie, CHEN zhinan, LOU chao, *et al.* Tumor, 2000, **20**(3): 181–183
- 16 Chao Lou, Zhinan Chen, Huijie Bian, *et al.* World J Gastroenterol, 2002, **8**(1): 69–73
- 17 吾为一, 范我, 鲍君杰, 等. 核技术, 2002, **25**(11): 952–956
WU weiyi, FAN wo, BAO junjie, *et al.* Nucl Tech, 2002, **25**(11): 952–956
- 18 金留根, 邢春根, 吾为一, 等. 苏州大学学报(医学版), 2002, **22**(2): 149–152
JIN liugen, XING chungeng, WU weiyi, *et al.* J Suzhou Uni(Medical Sciences), 2002, **22**(2): 149–152
- 19 Seitz U, Neumaier B, Glatting G, *et al.* Eur J Nucl Med, 1999, **26**(10): 1265–1273
- 20 Schmidt P F, Smith S V, Bundesen P G. Nucl Med Biol, 1998, **25**: 639–649
- 21 Thomas R S, Vijayalakshmi V S, Stefan B, *et al.* Appl Radiat Isot, 1997, **48**(7): 899–906
- 22 Hosono M N, Hosono M, Zamora P O, *et al.* Ann Nucl Med, 1998, **12**(2): 83–88
- 23 Juweid M, Sharkey R M, Swayne L C, *et al.* J Nucl Med, 1998, **39**(1): 34–42
- 24 张勇, 陈维真, 卢汉平, 等. 核技术, 2007, **30**(8): 699–701
ZHANG yong, CHEN weizhen, LU hanping, *et al.* Nucl Tech, 2007, **30**(8): 699–701
- 25 赵泽国, 冉宇靓, 郑蓉, 等. 癌症, 2002, **21**(5): 460–463
ZHAO zeguo, RAN yuliang, ZHENG rong, *et al.* Chin J Cancer, 2002, **21**(5): 460–463
- 26 Murray A, Simms M S, Scholfield D P, *et al.* J Nucl Med, 2001, **42**: 726–732
- 27 Murray A, Scholfield D P, Schibli R, *et al.* J Label Compd Radiopharm, 2001, **44**: S573–S575
- 28 Iznaga-Escobar N, Ramírez I L, Izquierdo J C, *et al.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2003, **25**(9): 703–711
- 29 Gonzalez B, Casaco A, Alvarez P, *et al.* Hum Exp Toxicol, 2000, **19**: 684–692
- 30 Torres-García E, Ferro-Flores G, de Murphy C A, *et al.* Arch Med Res, 2008, **39**(1): 100–109
- 31 Ferro-Flores G, Pimentel-Gonzalez G, *et al.* Nucl Med Biol, 1999, **26**(1): 57–62
- 32 WANG Rongfu, ZHANG Chungli, YU Lizhang, *et al.* J Label Compd Radiopharm, 2001, **44**(6): 437–444

- 33 贾芳, 孟昭兴, 胡久华, 等. 核技术, 2001, **24**(8): 716–720
JIA fang, MENG shaoxing, HU jiu hua, *et al.* Nucl Tech, 2001, **24**(8): 716–720
- 34 Chen J Q, Strand S E, Tennvall J, *et al.* J Nucl Med, 1997, **38**: 1934–1939
- 35 Crudo J L, Edreira M M, Obenau E R, *et al.* J Radioanalyt Nucl Chem, 2004, **261**(2): 337–342
- 36 Consuelo A M, Martha P L, Guillermina F F, *et al.* Nucl Med Biol, 2001, **28**: 319–326
- 37 白红升, 金小海, 樊红强, 等. 同位素, 2002, **15**(1): 24–28
BAI hongsheng, JIN xiaohai, FAN hongqiang, *et al.* J Iso, 2002, **15**(1): 24–28
- 38 Verdera S, Balter H. Cell Mol Biol, 2002, **48**(7): 741–5
- 39 章斌, 吴翼伟, 范我, 等. 中华核医学杂志, 2003, **23**(1): 55–56
ZHANG bin, WU yiwei, FAN wo, *et al.* Chin J Nucl Med, 2003, **23**(1): 55–56
- 40 Miao Y, Owen N K, Whitener D, *et al.* Int J Cancer, 2002, **101**(5): 480–487
- 41 Giblin M F, Wang N, Hoffman T J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **65**(22): 12814–12818
- 42 汪静, 王连刚, 邓敬兰, 等. 中华核医学杂志, 2002, **22**(3): 177–178
WANG jing, WANG liangang, DENG jinglan, *et al.* Chin J Nucl Med, 2002, **22**(3): 177–178
- 43 Zamora P O, Gulhke S, Bender H, *et al.* Int J Cancer, 1996, **65**(2): 214–220
- 44 Gulhke S, Schaffland A, Zamora P O, *et al.* Nucl Med Biol, 1998, **25**(7): 621–631
- 45 唐林, 于俊峰, 夏皎云, 等. 同位素, 2006, **19**(1): 17–21
TANG lin, YU junfeng, XIA jiaoyun, *et al.* J Iso, 2006, **19**(1): 17–21
- 46 Smith C J, Sieckman G L, Owen N K, *et al.* Anticancer Res, 2003, **23**(1): 63–70
- 47 Safavy A, Khazaeli M B, Qin H, *et al.* Cancer, 1997, **80**(12): 2354–2359
- 48 Chen J, Giblin M F, Wang N, *et al.* Nucl Med Biol, 1999, **26**(6): 687–693
- 49 程时武, 侯英萍, 张晓慧, 等. 中华核医学杂志, 2005, **25**(5): 308–310
CHENG shiwu, HOU yingping, ZHANG xiaohui, *et al.* Chin J Nucl Med, 2005, **25**(5): 308–310

Recent progresses in ^{188}Re labeling biomolecules

XU Fenghua^{1,2} YIN Duanzhi¹ WANG Yongxian¹

¹ (Shanghai Institute of Applied Physics, China Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

² (Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract ^{188}Re ($T_{1/2}=16.9\text{h}$) is an ideal and attractive therapeutic radionuclide ($E_{\beta\text{max}}=2.11\text{MeV}$) with emission of γ ($E_{\gamma}=155\text{keV}$) suitable for imaging. This paper reviews the methods and progresses in researches on ^{188}Re labeling biomolecules. It is encouraging that ^{188}Re -labeled radiopharmaceuticals have prospective applications in cancer therapy.

Key words ^{188}Re , Radiopharmaceutical, Bio-labeling

CLC TL92, Q691