

多肽的放射性标记

朱小华 综述 吴华 审核

【中图分类号】R817; Q516 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2004)11-0850-03

目前,放射性核素标记的多肽作为一类新型显像剂已越来越多应用于肿瘤、感染、血栓等的诊断和治疗。在该类显像剂的研制过程中,多肽的选择、修饰是基础,而放射标记技术则是关键。本文从标记方法、双功能螯合剂和放射性核素 3 个方面进行阐述。

标记方法

多肽的放射性标记方法分为直接标记法和间接标记法两大类。直接标记法的标记过程相对简单,在大多数情况下,放射性核素通过降解多肽分子内的二硫键后与自由巯基结合^[1]。直接标记法较多应用于大分子蛋白质诸如抗体及其片断的标记,也成功应用于血小板受体结合多肽的标记^[2]。然而,直接标记法的标记过程难以控制,也难以了解标记时多肽参与反应的原子数量和放射性核素络合的几何形状,并有可能造成多肽的结构、稳定性、生物活性和药代动力学发生不可预料的变化。对于不含二硫键的多肽直接标记法并不适用,即使对于含二硫键的多肽,环状结构的微小改变对其生物活性也会产生巨大影响。

目前,普遍采用间接标记法,即多肽通过双功能螯合剂(bi-functional chelating agent, BFCA)间接地与放射性的金属离子形成稳定的络合物。由间接标记法制备的多肽放射性药物通常包括 3 个必需的部分:多肽、放射性核素和 BFCA。多肽作为靶向载体,携带发射特征性射线的放射性核素到达体内的靶组织,使之发挥示踪和治疗作用。BFCA 既能与多肽的非活性序列端共价结合,又能与金属离子形成稳定的络合物。为了尽可能地减少多肽与 BFCA 之间的相互影响,人们在二者之间引入了连接基团(linker)或间隔基团(spacer),连接基团可以是长的聚乙二醇或链烃,也可以是多聚氨基酸如 gly-gly-gly、cys-gly-cys、gly-gly-cys 等。这样,既减轻了标记对于多肽的生物活性的影响,又降低了对 BFCA 的配位基团的要求,有助于 BFCA 和放射性核素的选择。

间接标记法亦分成两大类:前标记法和后标记法。前标记法是指先用放射性核素标记 BFCA,然后再与多肽共轭结合。该方法的化学过程明确,容易控制。由于标记和共轭过程分开,可以确保放射性核素直接与 BFCA 相连而不标记多肽的氨基^[3]。但是,先期的标记会削弱 BFCA 与多肽的共轭结合,并且使终产物的纯化变得复杂,加之耗时长,不适合显像的短半衰期的核素。因此,该方法少用。

后标记法是目前最常用的标记方法。即先将多肽与 BFCA 共轭结合,然后再标记放射性核素。在此方法中,BFCA 可以结合在多肽的两端和侧链,甚至可以结合至多肽的骨架上。其化学过程相对简单明了,反应产物单一,便于分离纯化。但是严格的标记条件有时会使多肽的氨基酸序列或骨架结构发生改变,甚至造成放射性药物的分解。况且,BFCA 与多肽结合得越紧密,标记的复合物的刚性就越强,柔顺性越差,将会影响与受体的结合。

双功能螯合剂(BFCA)

理想的 BFCA 既能与多肽的非活性序列端共价结合,又能高效地与放射性核素形成稳定的络合物。

BFCA 通过其分子内的共轭基团如活性酯、异硫氰酸盐、顺丁烯二酰亚胺、酰肼和 α -卤酰胺(α -haloamide)与多肽的功能基团(两侧末端和侧链的氨基和羧基、半胱氨酸的巯基以及酪氨酸的 ρ -羟基苯基)形成共价键。

活性酯的羧基和多肽的氨基形成酰胺键,该过程中副反应的发生比其它大多数的酰胺键形成时少。常用的活性酯包括 ρ -硝基苯基酯、5 氟苯基酯、N-羟基琥珀酰亚胺酯和硫-N-羟基琥珀酰亚胺酯。活性酯的选择不仅由其反应能力决定,而且产物的分离纯化也是重要的考虑因素。当多肽与 BFCA 形成的共轭物不溶于水时,常常采用水溶性的 N-羟基琥珀酰亚胺酯和硫-N-羟基琥珀酰亚胺酯,反之则用可溶于乙醚的 ρ -硝基苯基酯和 5 氟苯基酯。异硫氰酸盐与多肽的氨基形成硫脲键。由于反应最适宜在高 pH 值的环境下进行,因此不适用于对碱性环境敏感的多肽。顺丁烯二酰亚胺与巯基反应形成硫醚键,其反应的最佳 pH 值接近 7, pH 值升高会使顺丁烯二酰亚胺水解失活^[4]。酰肼适用于丝氨酸、苏氨酸和羟赖氨酸等含有 2-氨基乙醇的多肽,这些多肽在 pH 值为 7 的条件下能迅速被高碘酸盐氧化生成醛基。酰肼与多肽的醛基反应形成腙,在 22℃, pH 值为 6~8 的条件下,可保持稳定达 12h^[5]。 α -卤酰胺如氯乙酰胺和溴乙酰胺适合于含有自由 SH 基团的多肽结合^[6]。

由于与多肽结合需要特殊的条件,如 pH 值、温度和反应时间,因此选择合适的 BFCA 很重要。目前常用的 BFCA 有 DT-PA、DOCA、TETA、NOTA、HYNIC 以及多齿状螯合剂等。

DTPA(二乙酰胺五醋酸)属于多胺多羧酸类螯合剂。¹¹¹In 标记多肽时常用 DTPA 作为螯合剂。DTPA 可与大的蛋白质分子如白蛋白、抗体以及小分子的多肽如生长抑素类似物结合。在与大分子的结合时可利用异丁基氯甲酸盐作为连接剂。与小分子多肽结合时,可以选用 DTPA 的衍生物如 DTPA 二环酐(DTPA bicyclic anhydride, cDTPA)和 DTPA 衍生物(3,6-bis(carboxymethyl)-9-((2-maleimidoethyl)-carbamoyl)methyl)-

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院核医学科

作者简介:朱小华(1970-),女,山东人,主治医师,主要从事肿瘤核医学诊断工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171062)

3,6,9-triazaundecanedioic acid, mDTPA)^[7]。CDTPA 可与多肽的氨基端一步法结合。该结合反应在液相进行,操作简单,效率高,反应的副产品和未反应物能通过凝胶电泳的方法去除,结合产物保持受体亲和力,纯化后可贮存至使用前标记。对于含有赖氨酸的多肽,共价结合往往发生在 ε-氨基而不是 N 末端的氨基。由于赖氨酸是生长抑素的活性基团,共价结合将会失去与受体的亲和力,因此该方法不适合生长抑素类似物。为此,Bakker 等^[8]提出了修改的方法,在共价结合前先用 t-Boc 将赖氨酸保护,结合反应后脱保护,从而使 C-DTPA 选择性地与多肽的 N 端氨基反应。mDTPA 溶于各种溶剂,适合于液相和固相多肽合成。其四个羧基均被叔丁基保护,仅含有一个游离的羧基,因此不会与多肽形成不期望的分子内连接。

¹¹¹In 标记 DTPA-多肽结合物时,形成稳定的八面体结构。DTPA 的三个氨基和四个羧基参与配位,第八个位点是酰胺羧基氧。^{99m}Tc 不适合标记 DTPA-多肽结合物,因为^{99m}Tc 与 DTPA 结合位点少,即使^{99m}Tc 处于高浓度,与 DTPA 亲和力也较低。⁹⁰Y 的标记研究正在进行。放射性核素标记 DTPA-多肽结合物时最大的障碍是核素制备过程中产生的微量金属在标记过程中与放射性核素竞争。因此,需要采用 40~70 倍过量的共轭结合物和尽可能高比活度的纯放射性核素参与反应^[8]。

大环氮杂多羧酸配体 DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸)及其衍生物能与许多三价放射性核素如^{66,67,68}Ga、^{86,90}Y、¹¹¹In、¹⁴⁹Pm、¹⁷⁷Lu 和二价放射性核素如²⁷Mg、⁴⁷Ga、⁶⁴Gu 形成稳定的复合物。研究证明 DOTA 及其衍生物较 DTPA 性质优良,已成功应用于多种生长抑素类似物的标记,尤其适用于放射性治疗。De Jong 等^[9]报道⁹⁰Y-DOTA-复合物在体内具有良好的药代动力学特性。

DOTA 与多肽结合的方法有两种。一种方法是 DOTA 的四个羧基中的一个被激活与多肽主要的氨基反应形成稳定的酰胺键。另一种方法适用于含有侧链的 DOTA 衍生物,此时多肽与 DOTA 衍生物的侧链结合。到目前为止已被合成的 DOTA 衍生物有 PA-DOTA、p-NCS-Bz-DOTA、DOTASA (T-Bu)₄ 和 DOTAGA(t-Bu)₄。这些 DOTA 衍生物都与多肽的一个氨基结合。所有放射性核素标记的 DOTA 复合物均形成八

面体结构。

HYNIC(2-hydrazinonicotinic acid)可用于标记 γ 球蛋白、趋化性多肽和生长抑素类似物^[10,11]。由于它仅仅占据放射性核素的一至两个结合位点,因此需要联合配体如 tricine 或 ED-DA 协同其完成放射性核素的立体配位^[12]。联合配体的协同作用有助于改善放射性药物的性质,如亲水性和药代动力学性质。但是,联合配体的应用使得化学反应和合成更复杂,并产生多种可能的产物。而且,HYNIC-联合配体一共轭物的稳定性低^[3]。选择合适的配体以增强 HYNIC-联合配体一共轭物稳定性的研究正在进行,到目前为止,膦被认为是最满意的联合配体。HYNIC 常用于生长抑素类似物的标记。二者结合的理想形式是 HYNIC 的羧基与多肽的 N 端氨基结合而不与位于活性位点的赖氨酸结合,但目前的研究尚未取得满意的结果。

TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid)是用 Cu 标记多肽进行靶向治疗时研究最多的螯合剂,用于生长抑素类似物标记。NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)可与固相和液相多肽的 N 末端结合,被⁶⁷Ga 和¹¹¹In 标记。多齿状螯合剂包括 N₃S(三酰胺硫醇),N₂S₂(二酰胺二硫醇),N₂S₄(二酰胺四硫醇)及其众多含硫和氮原子的衍生物。常常用于^{99m}Tc、¹⁸⁶Re 和¹⁸⁸Re 标记蛋白质、多肽和寡核苷酸。MAG₃ 和 MAG₂GABA 也是常用的螯合剂,其分子中含有间隔基团。

应用不同的 BFCA 标记产物的生物行为可能不同。Zhang 等^[13]研究显示,^{99m}Tc 标记反义 DNA 时应用不同的螯合剂肿瘤细胞的摄取各不相同,细胞摄取的高低顺序是 DTPA>HYNIC(tercine)>MAG₃。Ruszkowski 等^[14]用 4 种不同的 BFCA(NHI-MAG₃、MAS₃、HYNIC、DTPA)比较^{99m}Tc 标记多肽在不同动物的生物分布和炎症灶的摄取,发现炎症灶的摄取与 BFCA 无关,而生物分布随 BFCA 而不同,且各种动物实验结果相似。

放射性核素

不同的放射性核素具有各自的配位化学位点,因此必须与带有特异的供体原子和配体框架的特异的 BFCA 结合。放射

性核素的选择需考虑放射性核素的半衰期、衰变方式、价格和获取的难易程度。其中,半衰期是关键。对于诊断用放射性核素,理想的半衰期应尽可能短且满足标记及显像。目前用于标记多肽的放射性核素有⁶⁴Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、^{99m}Tc、¹¹¹In、¹⁴⁹Pm 和¹⁷⁷Lu。其物理性质见表 1。

表 1 用于多肽标记的放射性核素的物理性质

放射性核素	半衰期(h)	γ 能量(keV)	β ⁻ 能量(keV)	β ⁺ 能量(keV)	衰变方式(%)
⁶⁴ Gu	12.7	—	579	653	β ⁺ (17.4) β ⁻ (39) EC
⁶⁶ Ga	9.5	—	—	4150935	β ⁺ (56)EC(44)
⁶⁷ Ga	78.3	9193185 296388	—	—	EC(100)
⁶⁸ Ga	1.1	—	—	1880770	β ⁺ (90)EC(10)
⁸⁶ Y	14.7	—	—	233520191603 12481043	β ⁺ (33)EC(66)
⁹⁰ Y	64.1	—	2288	—	β ⁻ (72)
^{99m} Tc	6.0	141	—	—	IT(100)
¹¹¹ In	67.9	245172	—	—	EC(100)
¹⁴⁹ Pm	53.0	286	1070	—	β ⁻ (95.9)
¹⁷⁷ Lu	160.8	—	236	—	β ⁻ (100)

参考文献:

- [1] Zamora PO, Gohlke S, Bender H, et al. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with ¹⁸⁸Re-RC-160, a directly radiolabeled somatostatin analogue[J]. Int J Cancer, 1996, 65(2): 214-220.
- [2] Lister-Jones J, Knight LC, Maurer AH, et al. Thrombus imaging with a technetium-99m-labeled, activated platelet receptor-binding peptide[J]. J Nucl Med, 1996, 37(5): 775-781.
- [3] Liu S, Edwards DS. ^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals[J]. Chem Rev, 1999, 99(9): 2235-2268.
- [4] Meares CF. Chelating agents for the binding of metals to antibodies[J]. Nucl Med Biol, 1986, 13(4): 311-318.
- [5] Geoghegan KF, Stroh JG. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modofocation at N-terminal serine[J]. Bioconjugate Chem, 1992, 3(2): 138-146.
- [6] Pearson DA, Lister-Jones J, McBride WJ, et al. Somatostatin receptor-binding peptides labeled with technetium-99m: chemistry and initial biological studies[J]. J Med Chem, 1996, 39(7): 1361-1371.
- [7] Arano Y, Akizawa H, Uezono T, et al. Conventional and high-yield synthesis of DTPA conjugated peptides: application of a monoreactive DTPA to DTPA-D-Phe1-octreotide synthesis[J]. Bioconjugate Chem, 1997, 8(3): 442-446.
- [8] Bakker WH, Albert R, Bruns C, et al. (¹¹¹In-DTPA-D-Phe)-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors; synthesis, radiolabeling and in vitro validation[J]. Life Sci, 1991, 49(22): 1583-1591.
- [9] de Jong M, Bakker WH, Krenning EP, et al. Yttrium-90 and indium-111 labeling, receptor binding and biodistribution of (DOTA0, D-Phe1, Tyr3) octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy[J]. Eur J Nucl Med, 1997, 24(4): 368-371.
- [10] Bangard M, Behe M, Gohlke S, et al. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new ^{99m}Tc-tricine- HYNIC-d-Phe1-Tyr3-octreotide; first results in patients and comparison with ¹¹¹In-DTPA-d-Phe1-octreotide[J]. Eur J Nucl Med, 2000, 27(6): 628-637.
- [11] Decristoforo C, Melandez-Alafort L, Sosabowski JK, et al. ^{99m}Tc-HYNIC-Tyr3-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors; preclinical evaluation and comparison with ¹¹¹In-octreotide[J]. J Nucl Med, 2000, 41(6): 1114-1119.
- [12] Edwards DS, Liu S, Barrett JA, et al. New and versatile ternary ligand system for technetium radiopharmaceuticals; water soluble phosphines and tricine as coligands in labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic glycoprotein II b/III a receptor antagonist with ^{99m}Tc[J]. Bioconjugate Chem, 1997, 8(2): 146-154.
- [13] Zhang YM, Liu N, Zhu ZH, et al. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA[J]. Eur J Nucl Med, 2000, 27(11): 1700-1707.
- [14] Ruszkowski M, Qu T, Gupta S, et al. A comparison in monkeys of (^{99m}Tc) labeled to a peptide by 4 methods[J]. J Nucl Med, 2001, 42(12): 1870-1877.

(收稿日期: 2004-02-13 修回日期: 2004-04-13)

书 讯

《放射学实践》编辑的《第四届全国放射学术会议论文汇编》共收录论文近 200 篇, 其中含 25 篇专家讲座, 包括《脑缺血的影像学诊断》(戴建平)、《颅神经的 MR 成像》(祁吉)、《肺内多发小结节病变的 HRCT 诊断》(马大庆)、《肝细胞性结节及小肝癌分型及 CT/MRI 诊断进展》(周诚)、《脑梗死前期脑局部低灌注的影像学检查》(高培毅)、《心脏大血管 MRI 进展》(李坤成)、《肺血管成像与介入治疗》(肖湘生)、《MSCT 在冠心病中的应用》(张国桢)、《胰腺影像学检查进展》(陈克敏)、《胃的多层 CT 检查》(陈克敏)、《肝脏 MRI 对比剂现状与进展》(曾蒙苏)、《fMRI 在中国的研究现状》(冯晓源)、《小肠疾病的影像学检查》(章士正)、《肿瘤(肺癌)血管生成的影像学检查》(张敏鸣)、《肝外门静脉系统: 正常与异常》(宋彬)、《氢质子磁共振波谱(¹H MRS)在脑肿瘤诊断与鉴别诊断中的应用》(鱼博浪)、《肝脏高场强双梯度磁共振扩散成像的技术探讨》(肖恩华)、《肝癌 TACE 疗效的磁共振扩散成像动态观察》(肖恩华)、《数字化放射科——对放射工作者的新挑战》(孟俊非)、《颈部间隙囊性肿块的 CT 和 MRI 诊断》(徐坚民)、《小肝癌经动脉超选择性肝段、亚肝段联合栓塞治疗的临床研究》(张晓磷)、《先天性耳畸形的 CT 和 MRI 表现》(韩萍)、《消化道出血及小肠病变多排 CT 的临床应用》(胡道予)、《克隆氏病及并发症影像学诊断》(胡道予)和《胎儿 MRI 检查》(夏黎明)。

本汇编资料翔实, 装帧精美。定价: 32 元/册(含邮资)。