

¹³¹I-BDI-1 在荷人膀胱癌裸鼠体内的药代动力学研究

郝攀,张春丽,马超,马欢,陈雪琪,殷雷,闫平,王荣福
(北京大学第一医院,北京 100034)

摘要: [目的] 用 ¹³¹I 标记人膀胱癌特异性单克隆抗体 BDI-1, 探讨其在荷瘤裸鼠体内的生物分布及药代动力学参数, 为其作为膀胱癌诊断和治疗的新型靶向药物提供基础数据。[方法] 用 Ch-T 法进行 BDI-1 的 ¹³¹I 标记, 标记完成后, 采用 Sephadex G-25 分离纯化, 用纸层析法测定标记产物的放化纯度, 经尾静脉注入到荷人膀胱癌裸鼠体内, 在不同时间处死裸鼠, 测定裸鼠体内生物分布, 采用 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。[结果] 静注后, ¹³¹I-BDI-1 主要分布于荷瘤裸鼠肝脏、脾脏、肾脏和肿瘤等组织。血液药一时曲线符合开放性二房室分布模型, 其中分布相半衰期 [$t_{1/2(\alpha)}$] 为 0.1693h, 消除相半衰期 [$t_{1/2(\beta)}$] 为 69.315h, 峰值时间 t_{max} 为 0.033h, 平均血浆清除率为 67.154L/(h·kg), 曲线下面积 AUC_{0-4} 为 904.006mg/L·h⁻¹; 药物在肿瘤中摄取的峰时为 72h。[结论] ¹³¹I-BDI-1 在荷人膀胱癌裸鼠中具有特异的肿瘤摄取, 其在血液中清除较快, 而在肿瘤中具有较快的吸收半衰期及较长的清除半衰期, 适合作为一种肿瘤的靶向诊断与治疗药物。

关键词: 药代动力学; 膀胱肿瘤; 组织分布; 裸鼠; BDI

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)04-0275-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.04.B004

Study on Biodistribution and Pharmacokinetic of ¹³¹I-BDI-1 in Nude Mice Bearing Human Bladder Carcinoma

HAO Pan, ZHANG Chun-li, MA Chao, et al.

(Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the biodistribution and pharmacokinetics of ¹³¹I-BDI-1 in nude mice model bearing human bladder cancer, for the basic data used as a new targeted drug. [Methods] Anti human bladder carcinoma monoclonal antibodies BDI-1 was labeled with ¹³¹I by chloramine-T method to prepare ¹³¹I-BDI-1 at room temperature. The radio-chemical purity was tested with paper chromatography. Nude mice bearing human bladder cancer were injected of ¹³¹I-BDI-1 via tail vein. Then the mice were sacrificed at different time. Its biodistribution was analyzed. DAS 2.0 was used to calculate pharmacokinetics. [Results] The biodistribution data showed that ¹³¹I-BDI-1 accumulated mainly in liver, spleen, kidney and tumor. It was indicative of a two-compartment model with the main pharmacokinetic parameters as follows: $t_{1/2(\alpha)}$, $t_{1/2(\beta)}$ and t_{max} were 0.1693h, 69.315h, 0.033h respectively. CL, k_{10} , k_{12} and k_{21} were 67.154L/(h·kg), 6.021h⁻¹, 1.103h⁻¹, 0.88h⁻¹ respectively. The $AUC_{(0-4)}$ was 904.006mg/L·h⁻¹. The highest time tumor uptake of ¹³¹I-BDI-1 was 72h. [Conclusion] ¹³¹I-BDI-1 in nude mice model bearing human bladder cancer has a specific tumor intake, and in the blood it clears up faster. The $t_{1/2(\beta)}$ and CL suggest that it could be applied in guiding diagnosis and treatment for bladder cancer.

Subject words: pharmacokinetic; bladder neoplasms; biodistribution; nude mice; BDI

膀胱癌是泌尿系中最常见的恶性肿瘤之一,在

我国泌尿系肿瘤中,其发病率有逐年升高的趋势^[1]。

基金项目: 北京市自然科学基金(7112129); 卫生部重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室开放课题基金(KF201101)

通讯作者: 张春丽, 研究员, 博士; 北京大学第一医院核医学科, 北京市西城区西什库大街8号(100034); E-mail: zhangcl0326@sina.com

收稿日期: 2014-10-15; **修回日期:** 2014-12-07

自 1978 年 Goldenberg 首次成功地应用 ¹³¹I 标记的癌胚抗原(CEA)的特异抗体进行恶性肿瘤的体外显像诊断以来,放射免疫显像(radioimmunology imaging, RII)与放射免疫治疗(radioimmunology therapy, RIT)

则引起了研究者的广泛关注。抗人膀胱癌单克隆抗体 BDI-1 是针对人膀胱癌细胞系 BIU-87 制备的单克隆抗体, 它能与人膀胱癌相关抗原的特殊结合靶位点进行特异性结合, 体外酶联免疫分析结果表明, BDI-1 对膀胱癌组织和人膀胱癌细胞系 BIU-87、E-J 呈强阳性反应, 而对正常膀胱组织及正常人外周血淋巴细胞、ABO 血型红细胞、人骨髓细胞等正常组织细胞呈阴性反应, 与大多数胚胎组织无反应。而 ^{131}I 可与该抗体形成偶联物作为导向制剂, 对膀胱癌进行诊断和治疗^[2,3]。作为放射性药物, 不仅要求 ^{131}I -BDI-1 在靶组织中具有较高的摄取率, 而且要求药物具有适合于诊断或治疗的药代动力学性质。本研究探讨 ^{131}I -BDI-1 在荷瘤膀胱癌裸鼠体内的吸收及分布, 获得药代动力学参数, 了解药物在靶器官及其他器官中的富集情况, 为其作为新药在临床中的应用提供基础数据和依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BDI-1 由杭州九源公司提供; Na^{131}I 溶液由中国原子能科学研究院同位素所提供; 氯胺-T (ChT): 上海国药集团化学试剂有限公司产品, 纯度 >98%; Sephadex™ G25: Amersham Bioscience (AB 公司) 产品; 其他试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司; 纸层析所用层析纸为新华 1 号滤纸; BALB/c 裸鼠 27 只 (雌性, 体重 20~22g, 4~6 周龄, 实验动物质量合格证编号 No. 1140700034836) 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 符合实验动物质量标准; 膀胱癌 EJ 细胞购自北京大学医学部病理实验室; 培养液 RPMI-1640: GIBCO 化学试剂公司供给; 牛血清白蛋白来源于中国医学科学院; 双抗 (青霉素、链霉素)、0.25% 胰蛋白酶 (含 0.025% EDTA)、PBS 液 (pH7.4)、冻存液均购自中国协和医科大学基础医学细胞中心。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和裸鼠模型的建立

人膀胱癌 EJ 细胞常规培养于 RPMI-1640+10% 胎牛血清的基础培养基中, 置于 5% CO_2 、37℃ 恒定湿度的细胞培养箱中培养。取对数生长的细胞, 消化后收集。选用 BALB/c 裸鼠 27 只 (雌性, 性情较温顺,

体重 20~22g, 4~6 周龄)。将上述培养的细胞悬液 150 μl (5×10^6 个细胞) 以皮下注射的方式注入到每只小鼠右前肢根部。待实体瘤长至直径约 0.8~1.0cm 时用于实验。实验前 3 天开始给裸鼠饮用 0.5% 碘化钠溶液以封闭甲状腺组织。

1.2.2 ^{131}I -BDI-1 的制备

采用 ChT 法标记 BDI-1, 将浓度为 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的单克隆抗体 (McAb) 50 μl , 置于适量的 pH7.4、0.5mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 然后向上述混合液中加入 20 μl Na^{131}I 溶液, 同时加入 ChT 溶液, 使 ChT 的终浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 反应体积不超过 200 μl , 震荡反应 2.5min 后, 加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 终止反应 0.5min。将标记产物经 Sephadex G25 柱层析分离纯化, 收集第一个峰, 即为 ^{131}I -BDI-1; 采用纸层析法鉴定标记率与放化纯度, 展开剂为正丁醇: 无水乙醇: 氢氧化铵 (0.5mol/L) = 5:1:2 (体积比), Rf 为 0~0.1。

1.2.3 ^{131}I -BDI-1 的纯化

将饱和过的 Sephadex G25 装柱, 将上述反应混合物上柱后, 用 pH7.4 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗, 收集淋洗液 1ml/管, 对每管进行放射性计数。对第一个峰值, 采用纸层析法鉴定放化纯度, 展开剂为正丁醇: 无水乙醇: 氢氧化铵 (0.5mol/L) = 5:1:2 (体积比); 最终产品的放化纯度 $\geq 90\%$ ^[4]。

1.2.4 荷瘤裸鼠生物学分布

将荷瘤鼠按不同时相随机分为 9 组, 每组 3 只, 分别经尾静脉注射 222kBq (100 μl) ^{131}I -BDI-1, 于注射后 0.25、0.5、1、3、6、18、24、48、72h 眼球取血 200 μl 后处死小鼠, 称量并测定血液样品的放射性计数 (counts per minute, cpm), cpm 经衰减校正后除以 γ 计数仪的探测效率换算为血液放射性浓度 (即 kBq/ml), 绘制时间—放射性浓度图^[5,6]。同时取肿瘤和主要脏器组织并称其重量, 用 γ 井型计数器测定其放射性计数, 计算每克组织放射性摄取百分数 (%ID/g)。

1.2.5 药代动力学参数计算

应用药代动力学软件 DAS 2.0, 将软件中药物浓度用血液放射性浓度替换, 对小鼠的血液放射性浓度—时间数据进行分析, 利用一、二、三室模型进行曲线拟合, 同时, 将 1、1/C、1/CC 作为权重系数 (C 为血液的放射性浓度) 对不同时相的放射性浓度进行判断, 得出最佳房室模型, 并计算其相关的药代动

力学参数^[7]。

2 结果

2.1 ¹³¹I-BDI-1 在组织中的生物分布曲线

¹³¹I-BDI-1 在荷瘤裸鼠体内部分器官的生物分布曲线图显示(Figure 1),尾静脉注射 ¹³¹I-BDI-1 15min 后,心、肝、肺、肾放射性摄取较多,随着时间延长而持续下降,而肿瘤放射性计数随时间延长而增长,在注射后 72h 肿瘤组织的摄取率达 3.77 ± 0.02 ;血液的清除较快,但注射后 72h 仍明显高于其他组织(Figure 2)。

2.2 ¹³¹I-BDI-1 血液药代动力学参数

利用 DAS 2.0 软件进行分析,得出 ¹³¹I-BDI-1 在荷瘤裸鼠体内的药代动力学过程符合权重为 1/C 的二室模型,模拟得到它在血液中的药代动力学方程为:

$$CL(t) = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

其中,CL 为平均血浆清除率,是指单位时间从体内消除的含药血浆体积,其单位为 L/(h·kg),表示从血中清除药物的速率或效率。公式中,A、B 是经验常数, α 为分布速率常数或快配置速率常数, β 为消除速率常数或慢配置速率常数, α 和 β 代表两个指数项(分布相和消除相)的特征,A、B、 α 、 β 又称为混杂参数(hybrid parameter),它们由模型参数 k_{10} 、 k_{12} 、 k_{21} 构成(Table 1)。

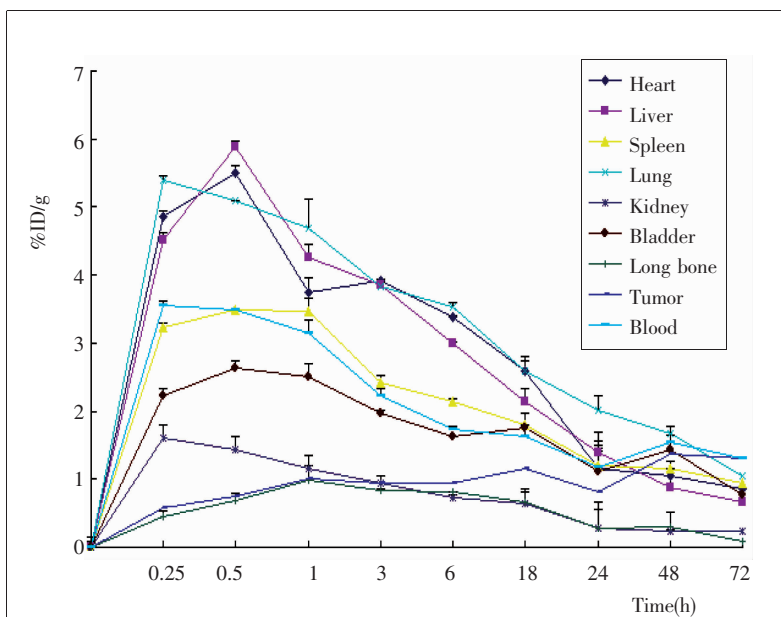


Figure 1 The curves of biodistribution of ¹³¹I-BDI-1 in tumor models

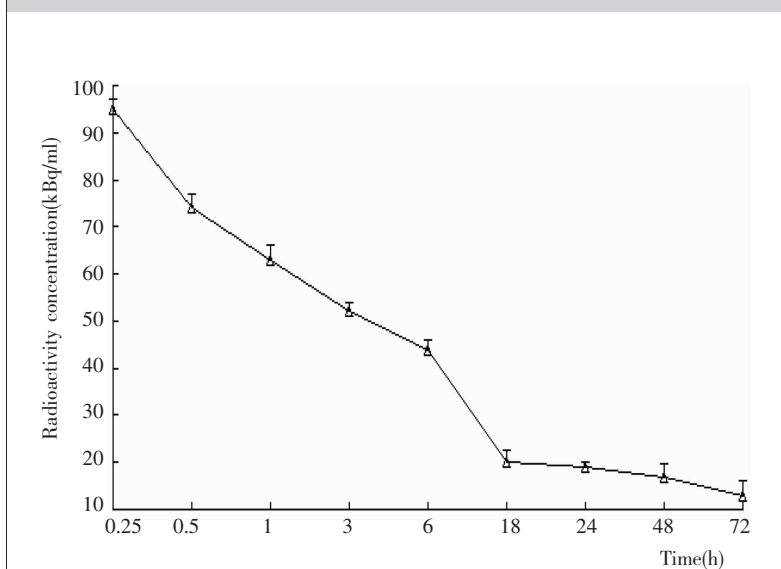


Figure 2 The radioactivity concentration of ¹³¹I-BDI-1 in the mice tumor models

Table 1 The pharmacokinetic of ¹³¹I-BDI-1 in nude mice bearing human bladder carcinoma

Parameters	Unit	Value	Parameters	Unit	Value	Parameters	Value
t _{1/2α}	h	0.1693	AUC(0-t)	mg/L·h	904.006	A	3.404
t _{1/2β}	h	69.315	AUC(0-∞)	mg/L·h	1114.56	α	19.86
V ₁	L/kg	0.142	AUMC(0-t)		79913.5	B	0.496
CL	L/h/kg	67.154	AUMC(0-∞)		84399.4	β	0.399
AUC(0-t)	mg/L·h	6297.556	MRT(0-t)	h	88.399		
AUC(0-∞)	mg/L·h	8018.138	MRT(0-∞)	h	75.725	AIC	-44.496
K ₁₀	1/h	6.021	VRT(0-t)	h ²	1972.51	AE	1.109
K ₁₂	1/h	1.103	VRT(0-∞)	h ²	2318.59	RE	0.002
K ₂₁	1/h	0.488	Tmax	h	0.0333	R2	0.98

3 讨论

抗膀胱癌单克隆抗体 BDI-1 为分子量约为 15×10^4 的 IgG 分子, 可以和膀胱癌细胞特异性结合, 具有进行肿瘤显像或治疗的潜在应用价值^[8,9]。然而, 要成为适用于临床的新的靶向药物, 不仅要求有高度的靶向特异性结合能力, 还要有良好的药代动力学性能, 为此, 本研究对 ^{131}I -BDI-1 的药代动力学进行了研究。本实验中生物分布数据表明泌尿系统排泄是 ^{131}I -BDI-1 的主要排泄途径。肝脏较大的放射性摄取可能与 ^{131}I -BDI-1 分子量较大、经肝脏代谢有关。随时间延长, 肿瘤与其他脏器(除血液外)相比, 放射性曲线下下降缓慢, 15min~72h 内, 肿瘤摄取率在 72h 最高, 为 3.77。表明 ^{131}I -BDI-1 具有良好的肿瘤靶向性和较长的滞留时间, 有利于肿瘤的靶向显像与靶向治疗^[10-12]。

^{131}I -BDI-1 在裸鼠体内的药代动力学行为符合二室开放模型, 快速分布相 α 反映了血浆向全身组织器官分布的快慢, 慢分布相 β 反映了标记抗体在体内的清除速度^[13]。 ^{131}I -BDI-1 的血药浓度在初期下降较快, 其后清除比较缓慢, 其分布半衰期为 0.1693h, 反映了血液中药物浓度达到最大值的一半时间。清除半衰期为 69.315h, 时间较长表示该药物在血液中维持时间较长, 从体内清除速率较慢, 使得药物出现了较高的曲线下面积 $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 为 $904.006 \text{ mg/L} \cdot \text{h}^{-1}$, 表明该药物的生物利用率较高。良好的药代动力学特征, 预示着 ^{131}I -BDI-1 将有可能应用于肿瘤的靶向治疗^[14]。

参考文献:

- [1] Wang RF. Molecular functional diagnosis and targeted therapy for tumor[J]. Journal of Chinese Oncology, 2010, 16(6):421-422.[王荣福. 肿瘤分子功能显像诊断与靶向治疗[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(6):421-422.]
- [2] Bai Y, Wang Y, Zhou LJ, et al. Vector construction eukaryotic expression of anti-human bladder tumor chimeric antibody[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2001, 33(5):402-406.[白银, 王琰, 周丽君, 等. 抗人膀胱癌人一鼠嵌合抗体真核表达载体的构建和表达[J]. 北京大学学报(医学版), 2001, 33(5):402-406.]
- [3] Shen BF. Progress in antibody drugs[J]. Journal of Second Military Medical University, 2002, 23(10):1047-1049.[沈倍奋. 抗体药物研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(10):1047-1049.]
- [4] Zhang CL, Wang RF, Zhang L, et al. ^{131}I labeling and bioactivity evaluation of a novel RGD dimer targeted to integrin $\alpha\text{v}\beta3$ receptor[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2011, 43(2):295-300.[张春丽, 王荣福, 张丽, 等. 靶向整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 受体的新型 RGD 肽二聚体的 ^{131}I 标记与生物活性的初步评价[J]. 北京大学学报(医学版), 2011, 43(2):295-300.]
- [5] Wei CM, Wang BJ, Ma Y, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of ^3H -norcantharidin in mice[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2007, 42(5):516-519.[魏春敏, 王本杰, 马娅, 等. 3H-去甲斑蝥素小鼠体内药代动力学组与组织分布[J]. 药学报, 2007, 42(5):516-519.]
- [6] Wang RF, Liu M, Zhang CL, et al. Study on pharmacokinetics and acute toxicity of human telomerase reverse transcriptase antisense oligonucleotide molecular probe[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2009, 25(5):422-425.[王荣福, 刘萌, 张春丽, 等. 人端粒酶催化亚单位反义分子探针的药代动力学与急性毒性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(5):422-425.]
- [7] Zeng YL. Two computational problems in drug metabolism and pharmacokinetics: determine the number of weights and the model of the housing compartment linear mathematics of the original data[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1980, 15(9):571-576.[曾衍霖. 药物代谢动力学中的二个计算问题: 原始数据的权重与线性数学模型中房室数的确定[J]. 药学报, 1980, 15(9):571-576.]
- [8] Zhang CL, Hao P, Cheng Y, et al. The biodistribution and imaging of ^{131}I -c(RGD)2 in mice bearing different kinds of tumor[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(11):875-880.[张春丽, 郝攀, 成彧, 等. 在荷不同类型肿瘤小鼠中的生物分布与显像研究[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(11):875-880.]
- [9] Zhao Q, Wang F, Wang RF, et al. Radiation dose and pharmacokinetic analysis of molecular probe ^{131}I -RRL targeting tumor angiogenesis[J]. Chinese Journal of Interventional Imaging and Therapy, 2014, 11(3):172-176.[赵倩, 王飞, 王荣福, 等. 肿瘤血管靶向分子探针 ^{131}I -RRL 的辐射吸收剂量及代谢动力学分析[J]. 中国介入影像与治疗学, 2014, 11(3):172-176.]
- [10] Kang L, Wang RF, Yan P, et al. Cellular uptake study on radiolabeled telomerase-targeted small interference RNA in hepatocarcinoma cells[J]. Journal of Chinese Oncology, 2010, 16(6):438-441.[康磊, 王荣福, 闫平, 等. 放射性标记的端粒酶靶向 RNA 探针在肝肿瘤细胞中的摄取研究[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(6):438-441.]
- [11] Xia Lu, Ping Yan, Rong-fu Wang, et al. Use of radioiodinated peptide Arg-Arg-Leu targeted to neovascularization as well as tumor cells in molecular tumor imaging[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2012, 24(1):52-59.
- [12] Wu JM, Ren TC, Yu M. The development of pharmaceuticals and clinical research of noreantharidin[J]. Chin Pharm, 2002, 37(4):566-569.
- [13] Yu M, Zhou H, Liu X, et al. Study on biodistribution and imaging of radioiodinated arginine-arginine-leucine peptide in nude mice bearing human prostate carcinoma[J]. Ann Nucl Med, 2010, 24(1):13-19.
- [14] Joyal JL, Barrett JA, Marquis JC, et al. Preclinical evaluation of an ^{131}I -labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(10):4045-4053.