·肿瘤新型放射性药物 ·

## 靶向 CD11b 受体<sup>68</sup>Ga 生物正交点击化学预 定位分子探针的制备及结肠癌模型鼠显像

张颖颖 石岱 徐展 程远 程登峰

上海市影像医学研究所、复旦大学附属中山医院核医学科、复旦大学核医学研究所、复 旦中山医院肿瘤中心 200032

通信作者:程登峰, Email: cheng.dengfeng@zs-hospital.sh.cn

目的 制备一种针对整合素 αM(CD11b)受体的预定位分子探针<sup>68</sup>Ga-1.4.7-三氮杂环 【摘要】 千烷-1.4.7-三乙酸-甘氨酸-精氨酸-谷氨酸-精氨酸-谷氨酸-十一聚乙二醇-1.2.4.5-四嗪/CD11b 抗体 片段-反式-环辛烯「<sup>66</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz/anti-CD11b-F(ab'),-TCO],并通过 microPET 显 像探讨其作为 CD11b 受体靶向分子探针的可行性。方法 采用免疫荧光法检测小鼠巨噬细胞 RAW264.7 膜表面 CD11b 受体的表达情况。将 CD11b 抗体与 TCO 连接,并通过酶切法得到 anti-CD11b-F(ab'),-TCO。对配体 NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz 进行<sup>68</sup>Ga 标记,检测标记率以及放化纯。 进行预定位细胞结合实验,建立 CT26 结肠癌荷瘤裸鼠模型,进行预定位生物分布以及 microPET 显 像实验。用免疫组织化学检查验证肿瘤微环境中 CD11b<sup>+</sup>细胞的浸润情况。用单因素方差分析比较 组间差异。结果 免疫荧光检测结果显示 RAW264.7 细胞膜表面高度表达 CD11b 受体。十二烷基 硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证成功合成 anti-CD11b-F(ab'),-TCO。放射性配体<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz 标记率约为 94.6%,比活度为 7.0~7.4 MBq/µg,放化纯大于 95%。预定 位细胞结合实验证实该分子探针与 CD11b 受体有较好的靶向性。生物分布及显像结果示,在预定位 4、12 以及 24 h 时间间隔下,模型鼠肾放射性摄取较高,表明分子探针通过肾代谢;肿瘤/肌肉比值为 9.23±1.45、12.53±1.36 和 10.74±1.11(F=848.8,P<0.05);在预定位 12 h 注射放射性配体后 1 h 显像, 肿瘤与非靶器官对比度最佳:肿瘤标准摄取值(SUV)为 0.67±0.12.肌肉 SUV 为 0.09±0.04。免疫组织 化学结果示,CT26结肠癌微环境中浸润了大量 CD11b<sup>+</sup>细胞。结论 成功合成预定位分子探针<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz/anti-CD11b-F(ab/),-TCO,该标记物对 CD11b 阳性结肠癌具有较强的靶 向能力,有望用于靶向 CD11b 受体的体内示踪。

【关键词】 抗原, CD11b;同位素标记;镓放射性同位素;点击化学;正电子发射断层显像术;结 肠肿瘤;小鼠

**基金项目:**国家自然科学基金(11875114) DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210701-00218

# Preparation of <sup>68</sup>Ga labeled pre-targeted molecular probe based on bio-orthogonal Diels-Alder click chemistry and CD11b receptor targeted imaging in CT26 colon cancer mouse models

Zhang Yinging, Shi Dai, Xu Zhan, Cheng Yuan, Cheng Dengfeng

Shanghai Institute of Medical Imaging; Department of Nuclear Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University; Nuclear Medicine Institute of Fudan University; Cancer Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Cheng Dengfeng, Email: cheng.dengfeng@zs-hospital.sh.cn

**[Abstract] Objective** To prepare a <sup>68</sup>Ga labeled probe targeting integrin alpha M(CD11b) receptor, namely <sup>68</sup>Ga-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid-Glycine-Arginine-Glutamate-Arginine-Glutamate-polyethylene glycol<sub>11</sub>-1,2,4,5-terazine/CD11b antibody- $F(ab')_2$ -trans-cyclooctene (<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz/anti-CD11b-F( $ab')_2$ -TCO), and to explore its feasibility as a molecular probe for CD11b receptor through microPET imaging. **Methods** Immunofluorescence was used to detect the expression of CD11b on the surface of RAW264.7 cell. CD11b specific monoclonal antibody (M1/70) was conjugated with TCO, and anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO fragment was obtained. The ligand NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz was labeled with <sup>68</sup>Ga, and its specific activity and radiochemical purity were detected. Pre-targeted cell binding experiment was conducted to evaluate the binding ability of molecular probe. CT26 colon cancer bearing mouse models were established, and then pre-targeted biodistribution and imaging experiments were performed. Immunohistochemical experiment was used to verify the expression of CD11b receptor

in tumor. The one-way analysis of variance was used to compare the data. **Results** The results of immunofluorescence demonstrated CD11b receptor was highly expressed on the surface of RAW264.7 cell. Anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO fragment was verified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). <sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz was successfully synthesized, with the labeling efficiency of 94.6%. The specific activity was 7.0–7.4 MBq/µg, and the radiochemical purity was higher than 95%. Pre-targeted cell binding experiment confirmed that the molecular probe bound to the CD11b receptor. The biodistribution and imaging experiments showed that the kidney radioactivity uptake was high at pre-targeted 4, 12 and 24 h intervals, which proved that probe was excreted through the urinary system. In addition, molecular probe had higher radioactive uptake at the tumor site, with the tumor/muscle ratios of 9.23±1.45, 12.53±1.36 and 10.74±1.11 (F=848.8, P<0.05). When the radioligand was injected 1 h after the pre-positioned 12 h interval, the images contrast was the best, with the standardized uptake value (SUV) in tumor and muscle of 0.67±0.12, 0.09±0.04, respectively. Immunohistochemistry verified the highly expression of CD11b receptor in tumor. **Conclusions** The pre-targeted molecular probe has targeting ability for CD11b<sup>-</sup>F(ab')<sub>2</sub>-TCO is successfully synthesized. The molecular probe has targeting ability for CD11b<sup>+</sup> colon cancer, and is expected to be used as a tracer targeting CD11b receptor *in vivo*.

[Key words] Antigens, CD11b; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Click chemistry; Positron-emission tomography; Colonic neoplasms; Mice

Fund program: National Nature Science Foundation of China (11875114)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210701-00218

结肠癌是世界范围内第四位常见的恶性肿 瘤<sup>[1]</sup>,其发病率及死亡率较高。目前,结肠癌患者 的预后主要取决于 TNM 分期<sup>[2]</sup>,然而也有研究显示 其预后价值有限<sup>[3]</sup>。因此,寻找有效预测疾病进展 以及疗效评价的靶点十分必要。

肿瘤微环境中的肿瘤相关髓系细胞(tumor-associated myeloid cells, TAM)在结肠癌的发生发展中 起重要作用。TAM 不仅具有预后预测价值,而且会 影响肿瘤疗效<sup>[4-5]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞是 TAM 中的 主要类型,其在结肠肿瘤微环境中大量聚集,在肿瘤 进展、免疫抑制和免疫治疗抵抗中发挥重要作 用<sup>[6]</sup>。整合素 αM(CD11b)是 TAM 膜表面高度表达 的整合素受体<sup>[7]</sup>。研究表明,抑制 CD11b 受体表达 可以减少骨髓细胞向肿瘤环境的募集,减少肿瘤免 疫抑制作用,从而增强肿瘤对放化疗的反应<sup>[8-9]</sup>。

1,2,4,5-四嗪(1,2,4,5-terazine, Tz)和反式-环 辛烯(trans-cyclooctene, TCO)之间的反电子需求[4+ 2] Diels-Alder 环加成(inverse electron demend[4+2] Diels-Alder cycloaddition, IEDDA)生物正交点击化学 系统在体内预定位 PET 显像中的应用受到关注<sup>[10]</sup>。 IEDDA 具有高效的反应速率,可作为较好的生物偶联 工具。在预定位显像中,首先注射 TCO 连接的抗体,待 抗体在靶点积累一段时间后再注入小分子放射性配 体,与 TCO 发生化学反应。放射性配体分子量较小,可 迅速从血液中清除,降低显像背景的放射性<sup>[11-12]</sup>。

因此,本研究组研发制备了靶向 CD11b 受体的<sup>68</sup>Ga 生物正交点击化学预定位分子探针,并进行 结肠癌鼠模型 microPET 显像,现报道如下。

### 材料与方法

## 一、实验仪器与材料

1.主要仪器及试剂材料。仪器有:高效液相色 谱(high performance liquid chromatography, HPLC; Agilent Technologies 公司,美国); $\gamma$ 放射免疫计数器 (GC-1500,北京科普顺科技有限公司);Sep-Pak C18 柱(SIELC Technologies 公司,美国);microPET/MR 仪(Madic Lab PET/MR,山东麦德盈华科技有限公 司);<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga 发生器(中国同辐股份有限公司)。 2-S-(4-异硫氰酸根合苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸[2-S-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA] 购自美国 Macrocyclics 公司;CD11b 抗体(M1/70)购 自美国 Bioxcell 公司;Tz 以及聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)购自陕西新研博美生物科技有限公 司;小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 以及结肠癌细胞株 CT26 购自中国科学院细胞库。

2.实验动物。雌性 BALB/c 小鼠[44 只,4~6 周 龄,体质量(20±4)g]购于上海杰思杰实验动物有限 公司[许可证号:SCXK(沪)2018-0004]。在复旦大 学附属中山医院实验动物中心无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)屏障系统中饲养小鼠。动 物实验遵照本院实验动物管理办法进行。

二、实验方法

1.细胞培养。对小鼠结肠癌细胞 CT26 以及小 鼠巨噬细胞 RAW264.7 均用含有体积分数 10%胎牛 血清和体积分数 1%青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培 养基培养。细胞置于37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>的培 养箱中。待细胞生长达80%时,将细胞传代。

2. RAW264.7 细胞 CD11b 受体表达的测定。 用常规法进行细胞爬片、固定、封闭,滴加抗兔一抗 CD11b 抗体(1:50),4 ℃过夜,磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤后滴加 CY3 标记的 羊抗兔二抗(1:100),室温避光静置 1 h,再用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色,封片后置于共聚焦荧光显微镜下观察。

3. CD11b 抗体片段-TCO [ anti-CD11b-F( ab'),-TCO]的制备与质量控制。Anti-CD11b-TCO 制备过 程简述如下:使用 0.2 mol/L 的碳酸氢钠将 CD11b 抗体(6.04 mg/ml)溶液的 pH 值调节至 8.5。抗体 溶液中加入 N, N-二甲基甲酰胺 (N, N-dimethylformamide, DMF)以及 TCO 溶液, 使得 TCO 与 anti-CD11b 的物质的量比为 30:1.CD11b 抗体溶液的浓 度为4.2 mg/ml。经纯化后得到最终产物,并计算药 物/抗体比值(drug to antibody ratio, DAR)。Anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 通过 anti-CD11b-TCO(1 mg/ml) 与免疫球蛋白 G 降解酶(20 U/µl;上海翌圣生物科 技股份有限公司)水解制备。将2 ml anti-CD11b-TCO 溶液与100 µl 降解酶混合,加入 Protein A 磁珠 (上海雅酶生物医药科技有限公司)吸附 Fc 片段, 置于磁力架约1 min 后,取上清液。anti-CD11b-F (ab'),-TCO 的纯度通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰 胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行评估。

4. <sup>68</sup>Ga-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-甘 氨酸-精氨酸-谷氨酸-精氨酸-谷氨酸-PEG<sub>11</sub>-Tz(1, 4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid-Glycine-Arginine-Glutamate-Arginine-Glutamate-PEG<sub>11</sub>-Tz,NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz)的制备。前体 NOTA-Polypep-

tide-PEG<sub>11</sub>-Tz 的合成过程(图 1) 简述如下:多肽链 具体氨基酸序列为 Gly-Arg-Glu-Arg-Glu。各个氨基 酸以及 p-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA 均在活化剂 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯 N,N-二异丙基乙胺(N,N-diisopropylethylamine, DIEA)反应下联结而成,得到化 合物1。在化合物2和3的溶液中加入三乙胺。待 反应完全后,旋干并分离得到化合物4。搅拌下向 化合物4的二氯甲烷和 DMF 混合溶液中依次加入 N-羟基丁二酰亚胺和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳 二亚胺盐酸盐,反应完全并纯化浓缩得到化合物5。 向化合物1中加入DIEA以及化合物5,室温搅拌1h 后,用反相制备 HPLC 纯化得到目标化合物。取前体 药物加入 0.25 mol/L 醋酸钠溶液中, 用 0.05 mol/L 盐 酸溶液于<sup>68</sup> Ge/<sup>68</sup> Ga 发生器中淋洗<sup>68</sup> GaCl<sub>3</sub>(0.70~ 0.74 GBq)。将洗脱液与前体溶液混合,常温放置 反应 10 min.用 HPLC 进行放射性产物的标记率、放 化纯及放射化学产率测定与计算。

5.预定位细胞结合实验。将 RAW264.7 细胞以  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种于 24 孔板中,将铺好的细胞 孔板分为 4 组:实验组中加入 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO(每孔 100 nmol/L),对照组 1 中加入 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>(每孔 100 nmol/L),均室温温育 2 h 后加入放射性配体 0.2  $\mu$ g(7.77 MBq/ $\mu$ g);对照组 2 每孔加入 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 与<sup>68</sup> Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz 体外反应所得到的<sup>68</sup>Ga-NOTA-anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>(7.77 MBq/ $\mu$ g);阻断组每孔加入 100 倍过量的 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>(10  $\mu$ mol/L)。待室温温育 1 h 后,将细胞悬液转移至  $\gamma$  计数管中,测得细胞结合管中放射性计数(计数 · min<sup>-1</sup>)。

6.移植瘤模型的制备。按常规方法在 37 ℃恒 温培养箱中培养鼠源结肠癌细胞CT26,制成细胞悬



**图1** 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-甘氨酸-精氨酸-谷氨酸-精氨酸-谷氨酸-十一聚乙二醇-1,2,4,5-四嗪(NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz)合成路线图。DMF为*N*,*N*-二甲基甲酰胺;EDCl为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;HOSu为*N*-羟基丁二酰亚胺

液,接种于 BALB/c 雌鼠腋窝下(1×10<sup>6</sup>/100 μl),正 常饲养,待接种部位肿瘤长至 100~300 mm<sup>3</sup> 时,即 移植瘤模型小鼠构建成功,可用于后续实验。

7.预定位生物分布实验。取皮下荷 CT26 结肠肿 瘤雌性 BALB/c 雌鼠 16 只,按完全随机法分成 4 组 (每组 4 只):3 个实验组(预定位 4、12、24 h 组)均经尾 静脉注射抗体 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100  $\mu$ g/只(抗 体剂量参考文献[13-14]),再分别于 4、12 以及 24 h 后注射<sup>68</sup> Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz (7.4 MBq, 100  $\mu$ l),注射后 1 h 颈椎脱臼处死;对照组预先注 射非特异性抗体免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100  $\mu$ g/只(1  $\mu$ g/ $\mu$ l),12 h 后注射上 述同剂量放射性配体,注射后 1 h 处死。分离器官 或组织(心、肺、肝、小肠、大肠、脾、肾、骨、肌肉、肿 瘤)并用  $\gamma$  计数器测放射性计数,通过衰减矫正后 分析数据,用每克组织百分注射剂量率 (percentage of the injected dose per gram of tissue, %ID/g) 表示 放射性摄取。

8.预定位 microPET 显像。取皮下荷 CT26 结肠肿 瘤雌性 BALB/c 鼠 16 只,分组情况与生物分布实验相 似,用于判断预定位最佳时间点,不同的是注射放射性 配体(11.1 MBq/只,100 μl)后 1 h 进行 microPET 显像。 为判断显像最佳时间点,另取 12 只小鼠分 3 组(每 组 4 只),均预定位 12 h,分别在注射放射性配体后 30 min、1 h 以及 2 h 显像。于显像前 5 min 用异氟 烷麻醉小鼠(氧气 0.8 L/min,异氟烷 2.0 L/min),在 扫描过程中持续麻醉。采用三维模式,microPET 扫 描 30 min,使用有序子集最大期望值迭代法进行图 像重建。观察放射性聚集情况,并测定肿瘤、肌肉标 准摄取值(standardized uptake value, SUV)。

9.肿瘤组织免疫组织化学检测。将显像后的肿 瘤模型鼠处死,并取下肿瘤,立即放入体积分数4% 多聚甲醛中固定。不同浓度乙醇脱水后,石蜡包埋, 组织切片(5μm)。按常规方法进行 HE 以及免疫 组织化学染色,在肿瘤切片中加抗兔一抗 CD11b 抗 体(1:50;美国 Abcam 公司)4℃温育 2 h,再加二抗 (1:150),室温避光静置 1 h。显微镜下观察并采集 图像。

10.统计学处理。采用 Graphpad Prism 8.01 和 IBM SPSS 23.0 软件进行统计分析及绘图。符合正 态分布的定量资料以 x±x 表示,进行 Levene 方差齐 性检验,采用单因素方差分析对多组方差齐性数据 进行比较,方差不齐的数据行 Kruskai-Wallis 检验。 P<0.05 为差异有统计学意义。

#### 结 果

1. RAW264.7 细胞的 CD11b 受体表达结果。 免疫荧光共聚焦检测结果(图 2)示, CD11b 受体表 达于 RAW264.7 细胞膜表面。

2.前体药物的制备及质量控制。成功合成 anti-CD11b-TCO 偶联物,纯度为 95.58%, DAR 为 14.54。 SDS-PAGE 证实(图 3) anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 片 段位于 100 kDa 条带处,且纯度较高。

3.放射性配体的标记以及质量控制。经制备型 HPLC 纯化后,获得纯度为 93.7% 的红色固体前体。 经<sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub>反应得<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz,标记 率为 94.6%。该放射性配体比活度为 7.0~7.4 MBq/µg, 放化纯高于 95%;体外稳定性好,在 PBS 中室温放 置 4 h 后放化纯度仍大于 95%。

4.预定位细胞结合实验。预定位实验组放射性 计数为(44 660.12±4 246.95)计数 · min<sup>-1</sup>,阻断组 因 RAW264.7 细胞表面 CD11b 受体被大量 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>抗体结合,呈现较低的放射性计数 [(3 380.06±447.07)计数 · min<sup>-1</sup>],对照组1最低



**图 2** 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞 CD11b 表达的免疫荧光共聚焦检测结果(×100)。A.细胞核被 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染成 蓝色;B.红色荧光显示为细胞膜表面 CD11b 受体;C.图 1A 和图 1B 的融合图



**图 3** CD11b 抗体片段-反式-环辛烯 [anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO]的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳图。M:蛋白质 标志



**图4** 各组荷 CT26 结肠肿瘤鼠(每组4只)的预定位生物分布 实验结果。预定位4、12、24h组小鼠于尾静脉注射 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100 μg 预定位相应时间,再注射<sup>68</sup>Ga-1, 4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-甘氨酸-精氨酸-谷氨酸-精氨 酸-谷氨酸-十一聚乙二醇-1,2,4,5-四嗪(NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz)7.4 MBq,1h后测放射性分布。对照组注射非特异性 抗体免疫球蛋白(Ig)G-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100 μg。预定位分子探针 经肾代谢,肿瘤放射性摄取明显高于除肾外其他器官。%ID/g 为 每克组织百分注射剂量率

[(747.47±130.52)计数 · min<sup>-1</sup>; H=26.244, P<0.05]; 对 照组 2[(43 785.44±2 951.36)计数 · min<sup>-1</sup>]与实验组相 比,差异没有统计学意义(H=1.125, P>0.05)。 5.预定位生物分布实验。各组主要脏器及肿瘤 放射性分布情况见图 4。实验组肿瘤部位放射性聚 集明显高于除肾以外的其他器官;而对照组肿瘤部 位放射性积累水平较低,为(1.14±0.52)%ID/g。 预定位 4、12 以及 24 h 组的肿瘤/血液比值分别为 1.34±0.54、2.23±0.36 和 1.92±0.22,肿瘤/肌肉比值 为 9.23±1.45、12.53±1.36 和 10.74±1.11,其中预定 位 12 h 组最高(F值:161.5、848.8,P<0.05)。12 h 间隔组为最佳预定位的时间间隔。

6.预定位显像实验。图 5 显示实验组肿瘤部位 放射性摄取高于肝、肌肉、肺、肠道等器官。肾以及 膀胱是主要的放射性浓聚器官,说明放射性配体以 及 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 经过泌尿道排泄。肿瘤 与本底对比度良好。阻断组肿瘤摄取明显降低。预 定位 4、12、24 h 组及对照组 1 h 显像肿瘤 SUV 分别 为 0.34±0.02、0.59±0.05、0.42±0.11、0.12±0.04,肌 肉 SUV 分别为 0.10±0.04、0.08±0.05、0.08±0.02、 0.09±0.04。预定位 12 h 组肿瘤与肌肉对比度优于 其他组(F=66.29, P<0.05)。预定位 12 h 的 30 min、 1 h 及 2 h 显像组肿瘤 SUV 分别为 0.42±0.05、0.67± 0.12 以及 0.33±0.08,肌肉 SUV 分别为 0.11±0.03、 0.09±0.04 以及 0.07±0.06。1 h 显像点的肿瘤与肌 肉对比度最佳(F=31.86,P<0.05)。因此,预定位 12 h 注射放射性配体,1 h 后显像最优。

7.肿瘤组织病理结果。荷 CT26 结肠癌模型鼠肿 瘤组织 HE 染色及 CD11b 受体免疫组织化学检测结 果示肿瘤微环境中浸润大量 CD11b<sup>+</sup>细胞(图 6)。

#### 讨 论

放射免疫显像传统的方法为长半衰期核素标记 抗体。Nigam 等<sup>[15]</sup>用长半衰期核素<sup>89</sup>Zr 标记 CD11b 抗体,并对神经胶质瘤中 CD11b 受体表达情况进行 研究。Hoffmann 等<sup>[16]</sup>则使用<sup>64</sup>Cu-NOTA-anti-CD11b 研究 CD11b 受体与乳腺癌转移情况。但<sup>89</sup>Zr、<sup>64</sup>Cu 等长半衰期核素会在肝、脾以及骨骼等非靶器官长



**图 5** 各组荷 CT26 结肠肿瘤鼠预定位 microPET 显像图(箭头示肿瘤部位)。对预定位 4 h 组(A)、12 h 组(B)、24 h 组(C)于尾静脉注射 anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100 μg 预定位相应时间,再注射<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz 7.4 MBq 后 1 h 显像;对照组(D)预注射非特异 性抗体 IgC-F(ab')<sub>2</sub>-TCO 100 μg。另 3 个预定位 12 h 组(E)分别于注射放射性配体后 30 min、1 h、2 h 显像,1 h 显像效果最佳



**图 6** 荷 CT26 结肠肿瘤模型鼠肿瘤组织免疫组化结果。A. HE 染色图(×100)示细胞核呈蓝色,细胞质呈红色;B. CD11b 受体免疫组织化学染色[链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连 结(SP)法×200]示肿瘤细胞微环境中浸润大量棕黄色 CD11b<sup>+</sup>细胞(所示区域对应 A 中红框区域)

时间浓聚,造成脏器的累积辐射剂量过大,靶/非靶 值下降。Rashidian 等<sup>[17]</sup>使用<sup>18</sup>F标记新型 CD11b 纳米抗体进行研究,但在大量使用抗体进行治疗时 纳米抗体的免疫原性问题将不可避免。

预定位策略以抗体与放射性配体解偶为基础,提高靶/非靶比值,从而提高图像对比度,减少非靶器官辐射损伤<sup>[18]</sup>。周慧敏和朱小华<sup>[19]</sup>总结了目前4类主要的预靶向显像亲和偶联系统。其中,IEDDA研究相对成熟,分子修饰简单,对抗体影响较小。作为整合素分子,CD11b具有高丰度、高特异性以及潜在的免疫治疗价值等优点<sup>[8]</sup>。通过研发靶向 CD11b受体的分子探针,可对肿瘤微环境进行可视化探究。

本研究制备了新型预定位分子探针<sup>48</sup> Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz/anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO。Anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub> 片段分子量较小,血液清除速度快,使 图像质量提高。抗体剪切为F(ab')<sub>2</sub> 片段有以下优点: (1)抗体与受体的特异性结合部位主要为F(ab')<sub>2</sub> 段, 当抗体只保留 F(ab')<sub>2</sub> 片段时,可减少非特异性结 合<sup>[20]</sup>。(2)笔者将全链抗体经过蛋白酶水解剪切后 得到的 F(ab')<sub>2</sub> 片段分子量为100 kDa,其在体内循 环时间缩短,预定位4 h 即可显像,缩短了预定位时 间。(3) F(ab')<sub>2</sub> 片段经肾代谢<sup>[21]</sup>,腹部放射信号 背景较低,对胃肠道肿瘤显影效果影响较小。

本研究预定位分子探针放射性配体<sup>68</sup>Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz 中的多肽链由 García 等<sup>[22]</sup>研 究发现,多肽链可以增加分子探针的亲水性,使之经 肾代谢,而添加 PEG<sub>11</sub>基团同样能增加亲水性。生 物分布和 microPET 结果也证实该预定位分子探针 通过泌尿系排泄。经肾排泄可降低腹部背景信号, 增加对胃肠道肿瘤的检出效果。

本研究预定位细胞结合实验显示,实验组的细胞摄取远高于阻断组以及对照组1,表明 CD11b 抗体经过 TCO 分子修饰后仍然具有抗体活性,为后续

的动物显像实验奠定了理论基础。实验组与对照组 2 的细胞结合差异没有统计学意义(P>0.05),提示 预定位方法与在体外完成点击化学的分子探针对 CD11b受体的结合力没有差异。

预定位策略提前将抗体注射体内,使其充分与 靶部位受体结合,然后再注射放射性配体,时间间隔 一般为 24、48、72 及 96 h<sup>[23]</sup>。预定位时间间隔较 长,在实验实施以及临床实用性方面表现不佳,为此 本研究组将 CD11b 抗体通过酶解法剪切为 F(ab')。 片段,以缩短预定位时间。本研究设定了4、12、24 h 3个预定位时间,结果示预定位12h组小鼠肿瘤与 肌肉对比度最高,12 h 为最佳预定位时间;多时间 点显像结果示,预定位12h注射放射性配体,以1h 后显像最优。Nigam 等<sup>[15]</sup>的研究示,<sup>89</sup>Zr-去铁胺 (Deferoxamine, DFO)-anti-CD11b 在注射后 72 h 的 生物分布中肝、脾、骨骼等正常组织呈高度放射性浓 聚。而在本研究中, anti-CD11b-F(ab'), -TCO 经过一定 时间体内循环,充分靶向肿瘤微环境中 CD11b<sup>+</sup>细胞, 并通过泌尿系统排泄。肝、脾以及骨骼等部位没有明 显的放射性浓聚,短半衰期核素的应用减少了器官辐 射累积时间。因此预定位分子探针在增加图像对比度 以及降低正常器官累积辐射伤害具有明显优势。

综上,本研究成功制备了预定位分子探针<sup>68</sup> Ga-NOTA-Polypeptide-PEG<sub>11</sub>-Tz/anti-CD11b-F(ab')<sub>2</sub>-TCO, 该标记物对 CD11b 阳性结肠癌具有较强的靶向能 力,有望用于靶向 CD11b 受体的体内示踪。该标记 物对 CD11b 阳性结肠癌具有较强的靶向能力。在 降低非靶器官放射性聚集、提高图像清晰度方面,预 定位方法展现出较突出优势。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- George AT, Aggarwal S, Dharmavaram S, et al. Regional variations in UK colorectal cancer screening and mortality[J]. Lancet, 2018, 392 (10144): 277-278. DOI: 10.1016/S0140-6736 (18) 31208-X.
- [2] Keller DS, Berho M, Perez RO, et al. The multidisciplinary management of rectal cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(7): 414-429. DOI:10.1038/s41575-020-0275-y.
- [3] Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (7): 1891-1899. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2830.
- [4] Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability [J]. Immunity, 2016, 44(3): 698-711. DOI:10.1016/j.immuni.2016.02.025.
- [5] Galon J, Angell HK, Bedognetti D, et al. The continuum of cancer

immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures[J]. Immunity, 2013, 39(1): 11-26. DOI:10.1016/j.immuni.2013.07.008.

- [6] Zhong X, Chen B, Yang Z. The role of tumor-associated macrophages in colorectal carcinoma progression[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(1): 356-365. DOI:10.1159/000486816.
- [7] Yin Y, Yao S, Hu Y, et al. The immune-microenvironment confers chemoresistance of colorectal cancer through macrophage-derived IL6[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(23): 7375-7387. DOI:10. 1158/1078-0432.CCR-17-1283.
- [8] Ahn GO, Tseng D, Liao CH, et al. Inhibition of Mac-1 (CD11b/ CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(18): 8363-8368. DOI:10.1073/pnas.0911378107.
- [9] Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity[J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 5379. DOI:10.1038/s41467-018-07387-4.
- [10] Wang M, Svatunek D, Rohlfing K, et al. Conformationally strained trans-cyclooctene (sTCO) enables the rapid construction of <sup>18</sup>F-PET probes via tetrazine ligation[J]. Theranostics, 2016, 6(6): 887-895. DOI:10.7150/thno.14742.
- [11] Rossin R, Robillard MS. Pretargeted imaging using bioorthogonal chemistry in mice[J]. Curr Opin Chem Biol, 2014, 21: 161-169. DOI:10.1016/j.cbpa.2014.07.023.
- [12] Nichols B, Qin Z, Yang J, et al. <sup>68</sup>Ga chelating bioorthogonal tetrazine polymers for the multistep labeling of cancer biomarkers[J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(40): 5215-5217. DOI:10. 1039/c3cc49530b.
- [13] Rossin R, Läppchen T, van den Bosch SM, et al. Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: *in vivo* chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody [J]. J Nucl Med, 2013, 54 (11): 1989-1995. DOI: 10.2967/jnumed. 113. 123745.
- [14] Rossin R, van den Bosch SM, Ten Hoeve W, et al. Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems[J]. Bioconjug Chem, 2013, 24(7): 1210-1217. DOI:10.1021/bc400153y.

- [15] Nigam S, McCarl L, Kumar R, et al. Preclinical immunoPET imaging of glioblastoma-infiltrating myeloid cells using Zirconium-89 labeled anti-CD11b antibody [J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22 (3): 685-694. DOI:10.1007/s11307-019-01427-1.
- [16] Hoffmann S, Reck DI, Maurer A, et al. Visualization and quantification of *in vivo* homing kinetics of myeloid-derived suppressor cells in primary and metastatic cancer[J]. Theranostics, 2019, 9(20): 5869-5885. DOI:10.7150/thno.33275.
- [17] Rashidian M, Keliher EJ, Bilate AM, et al. Noninvasive imaging of immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112 (19): 6146-6151. DOI:10.1073/pnas.1502609112.
- [18] Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJ, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step[J]. J Nucl Med, 2003, 44(3): 400-411.
- [19] 周慧敏,朱小华.预靶向策略在抗体放射性标记中的研究进展
  [J].中华核医学与分子影像杂志,2020,40(2):118-121.
  DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2020.02.013.
  Zhou HM, Zhu XH. Research progress of pretargeting strategies in antibody radiolabeling[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(2):118-121. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2020.02. 013.
- [20] Oude Munnink TH, de Vries EG, Vedelaar SR, et al. Lapatinib and 17AAG reduce <sup>89</sup>Zr-trastuzumab-F(ab')<sub>2</sub> uptake in SKBR3 tumor xenografts [J]. Mol Pharm, 2012, 9(11): 2995-3002. DOI:10.1021/mp3002182.
- [21] Sham JG, Kievit FM, Grierson JR, et al. Glypican-3-targeting F(ab')<sub>2</sub> for <sup>89</sup>Zr PET of hepatocellular carcinoma[J]. J Nucl Med, 2014, 55(12): 2032-2037. DOI:10.2967/jnumed.114.145102.
- [22] García MF, Gallazzi F, Junqueira MS, et al. Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5] tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with <sup>99m</sup>Tc[J]. Org Biomol Chem, 2018, 16 (29): 5275-5285. DOI:10.1039/c8ob01255e.
- [23] Schubert M, Bergmann R, Förster C, et al. Novel tumor pretargeting system based on complementary l-configured oligonucleotides [J]. Bioconjug Chem, 2017, 28(4): 1176-1188. DOI:10.1021/ acs.bioconjchem.7b00045.

(收稿日期:2021-07-01)