

# $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 的制备及生物学评价

李会强 甄志飞 张伟峰 廖曙光 轩昂 付畅 尤阳 高永举 徐俊玲

河南省人民医院、郑州大学人民医院核医学科 450003

通信作者:徐俊玲, Email: xjlhzq@163.com

**【摘要】** 目的 制备 $^{68}\text{Ga}$ -2-(4,7-二乙酸)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-戊二酸(NODAGA)-YHWYGYTPQNVI (GE11),研究其对胰腺癌显像的可行性。方法 GE11 偶联 NODAGA 后用 $^{68}\text{Ga}$  进行标记,测定其标记产率、放化纯、亲水性、体外稳定性和特异性。建立人胰腺癌 BxPC3 荷瘤裸鼠模型 9 只,分别于注射后 30 和 90 min 行 microPET 显像,并在 90 min 时获取主要器官及肿瘤的放射性分布情况。采用配对  $t$  检验分析数据。结果  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 标记产率为 (73.5±5.4)%,放化纯>98%,小鼠血清中温育 120 min 放化纯仍>92%,在 BxPC3 细胞中特异性摄取。MicroPET 图像上可见 $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 在肿瘤部位浓聚。注射后 90 min,肿瘤摄取明显高于正常胰腺[(1.38±0.25)与(0.49±0.07) %ID/g;  $t=12.67, P<0.05$ ],且血液、肌肉和骨骼的摄取低于肿瘤。结论  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 制备过程简单、放化纯高、稳定性好,对胰腺癌有特异靶向性,但由于肾和肝高摄取的影响,其对胰腺肿瘤的显像价值还有待进一步研究。

**【关键词】** GE11 肽;杂环化合物,1 环;镓放射性同位素;正电子发射断层显像术;胰腺肿瘤;肿瘤细胞,培养的;小鼠,裸

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200519-00202

## Synthesis and biological evaluation of $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11

Li Huiqiang, Zhen Zhifei, Zhang Weifeng, Liao Shuguang, Xuan Ang, Fu Chang, You Yang, Gao Yongju, Xu Junling

Department of Nuclear Medicine, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Xu Junling, Email: xjlhzq@163.com

**【Abstract】 Objective** To prepare  $^{68}\text{Ga}$ -2-(4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl) pentanedioic acid (NODAGA)-YHWYGYTPQNVI (GE11) and evaluate its feasibility of PET imaging for pancreatic cancer. **Methods** GE11 peptide was conjugated with NODAGA and then labeled with  $^{68}\text{Ga}$ . The labeling yield, radiochemical purity, hydrophilicity, stability and specificity *in vitro* were determined. Human pancreatic cancer BxPC3 nude mice models ( $n=9$ ) were established. MicroPET imaging was then obtained after 30 and 90 min, and mice were sacrificed at 90 min to acquire the radioactivity distribution of main organs and tumors. Pair  $t$  test was used to analyze the data. **Results** The labeling yield was (73.5±5.4)% and radiochemical purity was more than 98%. After incubation 120 min in mouse serum at 37 °C, radiochemical purity was more than 92%. The uptake was specific in BxPC3 cell lines. MicroPET images showed that  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 could accumulate quickly in tumor. Value of tumor uptake was significantly higher than that of normal pancreas at 90 min ((1.38±0.25) vs (0.49±0.07) %ID/g;  $t=12.67, P<0.05$ ), and the radio-uptake of blood, muscle and bone was lower than that of tumor. **Conclusions**  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 is easy to be prepared with high radiochemical purity and good stability, and can specifically target BxPC3 xenograft tumor. However, due to the high uptake in the kidneys and liver, the value of  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 in PET imaging for pancreatic tumor needs further study.

**【Key words】** GE11 peptide; Heterocyclic compounds, 1-ring; Gallium radioisotopes; Positron-emission tomography; Pancreatic neoplasms; Tumor cells, cultured; Mice, nude

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200519-00202

胰腺癌是恶性程度很高的消化系统肿瘤,其发病率和死亡率逐年上升,多数患者在初次就诊时已失去手术机会,因此早期诊断对治疗和提高患者生存率尤为重要。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)至少在 70% 的人类肿瘤中存在过表达<sup>[1]</sup>,且其过表达与肿瘤生成转移、

治疗耐药性、预后差等相关<sup>[2-3]</sup>。YHWYGYTPQNVI (GE11)多肽是 EGFR 的配体,能有效地与 EGFR 相结合<sup>[4]</sup>,故用适当核素标记 GE11 可对 EGFR 阳性肿瘤进行无创显像。目前,已有研究者用多种核素对 GE11 进行标记,并评估其对肺癌、卵巢癌和皮肤癌等的显像价值<sup>[5-7]</sup>。本研究用 $^{68}\text{Ga}$  标记 GE11 得

到 $^{68}\text{Ga}$ -2-(4,7-二乙酸)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-戊二酸[2-(4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)pentanedioic acid, NODAGA]-GE11(图1),通过细胞实验和 microPET 显像来评估其对胰腺癌显像的可行性。

## 材料与方法

### 一、主要材料与仪器

1. 细胞株和实验动物。BALB/c-nu 裸鼠,雄性( $n=9$ ),5~6 周龄,体质量 15~22 g,无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级,由北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2016-0006]提供。人胰腺癌 BxPC3 细胞由美国俄勒冈健康与科学大学曾德兴教授提供。

2. 实验试剂。细胞培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered solution, PBS)、小鼠血清、NODAGA-*N*-羧基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、GE11(ThermoFisher Scientific 公司,美国);*N,N*-二异丙基乙胺(*N,N*-diisopropylethylamine, DIEA)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma-Aldrich 公司,美国)。

3. 实验仪器。 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  发生器(Eckert & Ziegler 公司,德国);放射性高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪、半制备 HPLC、半制备 C18 柱(Waters 公司,美国);microPET/CT(Siemens 公司,德国); $\gamma$  计数器(PerkinElmer 公司,美国)。

### 二、实验方法

1. NODAGA-GE11 的合成。GE11(2.58 mg)溶于 100  $\mu\text{l}$  DMSO 中,加入 10  $\mu\text{l}$  DIEA 和 100  $\mu\text{l}$  NODAGA-NHS 酯(3.24 mg)的 DMSO 溶液,40  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h。半制备 HPLC 分离纯化,产物用质谱进行结构

表征。

2.  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 的合成。用 0.8 ml HCl(0.01 mol/L)和体积分数 98%丙酮混合液淋洗 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  发生器,收集并在 95  $^{\circ}\text{C}$  加热 10~15 min,体积约 20  $\mu\text{l}$ ,活度 222~296 MBq。加入 400  $\mu\text{l}$  乙酸-乙酸钠缓冲液(pH=4.5)和 20 nmol NODAGA-GE11,90  $^{\circ}\text{C}$  加热 15 min。放射性 HPLC 测放化纯,调节 pH 值至中性,得标记物注射液待用。

3.  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-GE11 的质量控制。(1)目测观察产品颜色和澄明度。(2)用放射性 HPLC 测放化纯。色谱柱为 Luna C18 ODS2 柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm),流动相 A:含体积分数 0.1%三氟乙酸的水,流动相 B:含体积分数 0.1%三氟乙酸的乙腈,流速:1.5 ml/min;洗脱梯度:0~2 min,100% A;2.01~22 min,100%~50% A;22.01~25 min,50%~100% A。(3)亲水性。标记物加入 PBS 和正辛醇混合液(V:V=1:1)振荡 30 min,室温离心 5 min(离心半径 3 cm,4 000 r/min),各相取 10  $\mu\text{l}$  用  $\gamma$  计数器计数(重复 5 次)。分配系数为正辛醇组分和 PBS 组分中放射性计数平均值比值的 log 值。(4)稳定性。标记物加入小鼠血清中温育,在 30、60、90 和 120 min 取 100  $\mu\text{l}$  样品加入乙腈,振荡离心(离心半径 3 cm,4 000 r/min,室温离心 5 min),取上清液测放化纯。

4. 细胞摄取阻断实验。细胞种于 24 孔板,每孔数量约  $1\times 10^5$  个。实验时移除培养基并用 1 ml PBS 冲洗,加入 500  $\mu\text{l}$  培养液。每孔加 185 kBq 标记物,于 30、60 和 120 min 收获细胞并用  $\gamma$  计数器计数,计算细胞摄取百分数。阻断实验加入过量(1 000 倍)GE11 温育 30 min 后,余步骤同细胞摄取实验。

5. 荷瘤裸鼠模型建立。右肩处注射  $2\times 10^6$  个 BxPC3 细胞,饲养 10 d 左右至肿瘤最大径约 1 cm

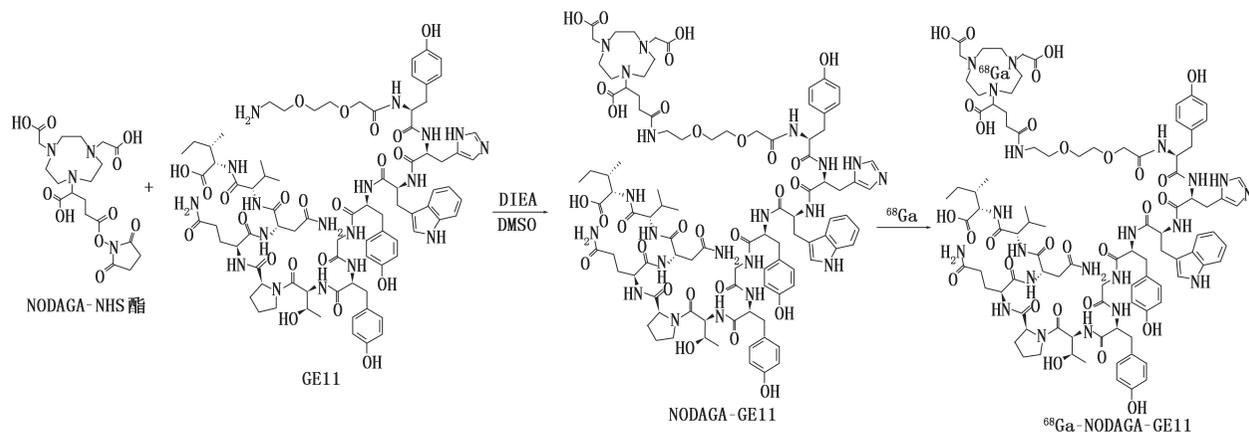


图1  $^{68}\text{Ga}$ -2-(4,7-二乙酸)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-戊二酸(NODAGA)-YHWYGYTPQNV1(GE11)合成路线。DIEA为*N,N*-二异丙基乙胺,DMSO为二甲基亚砜,NHS为*N*-羧基琥珀酰亚胺

时用于 microPET 显像和生物分布实验。

6. 生物分布实验。取 3 只荷瘤裸鼠, 经尾静脉注射 5.55 MBq 标记物并于注射后 90 min 处死, 取血液、肾、肝、肺、脾、胰、肌肉、肠道、骨骼和肌肉等, 称质量并测量放射性计数, 计算每克组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

7. MicroPET 显像。荷瘤裸鼠 (3 只/组) 水合氯醛麻醉后经尾静脉注射 5.55 MBq 标记物, 于注射后 30 和 90 min 行 microPET/CT 显像, 采集 15 min。用 ASIProVM 软件对图像进行感兴趣区定量分析, 计算 %ID/g; 阻断组 ( $n = 3$ ) 提前 30 min 注射过量 GE11, 余步骤同摄取组。

8. 统计学处理。采用 GraphPad 6.0 软件处理数据, 符合正态分布的定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用配对  $t$  检验分析数据,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. NODAGA-GE11 的合成及标记。NODAGA-NHS 酯与 GE11 多肽偶联后得到 NODAGA-GE11 (质谱图分子离子峰为 2 044.8, 与相对分子质量一致)。标记时间约为 25 min, 产率为 (73.5±5.4)%, 得无色透明液体, 放化纯 >98%, pH 值为 6.5~7.5, 油水分配系数为 -2.56±0.02, 小鼠血清中温育 120 min 放化纯大于 92%。

2. 体外细胞摄取阻断实验。标记物温育 30、60 和 120 min, 细胞摄取越来越高, 分别为 (8.86±0.70)、(13.21±1.05) 和 (18.11±1.59) %/10<sup>6</sup> 个细胞。阻断组的细胞摄取较非阻断组的降低约 50% ( $t = 28.33, P < 0.05$ )。

3. MicroPET 显像。注射 <sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 后 30 和 90 min, 肿瘤出现明显的浓聚 (图 2), 摄取值分别为 (1.54±0.18) 和 (1.16±0.13) %ID/g, 肝、肾和膀胱是主要的非特异性摄取器官, 注射后 30 min, 肾和肝的摄取值分别为 (13.72±2.58) 和 (5.61±0.87) %ID/g, 注射后 90 min 肾和肝的摄取下降明显 [分别为 (6.03±0.71) 和 (2.05±0.22) %ID/g], 而肌肉和骨骼变化不大。注射后 90 min 用 GE11 多肽进行阻断, 肿瘤部位摄取较非阻断组下降明显 [(0.52±0.19) %ID/g]。

4. 体内生物分布。注射后 90 min, <sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 在肿瘤有明显摄取, 且高于正常胰腺 [(1.38±0.25) 与 (0.49±0.07) %ID/g;  $t = 12.67, P < 0.05$ ]。肾、肝和肠道内也有较高摄取, 分别为 (7.79±0.14)、

(2.74±0.09) 和 (2.96±0.31) %ID/g (图 3)。血液、肌肉和骨骼的摄取低于肿瘤, 肿瘤/血液、肿瘤/肌肉和肿瘤/骨骼的摄取比值分别为 3.56±0.85、4.78±0.55 和 2.66±0.36。

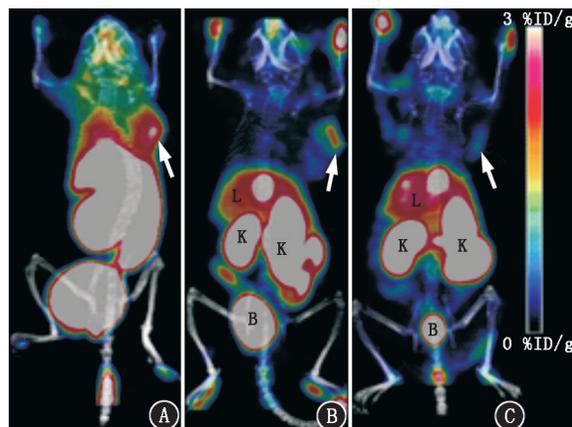


图 2 注射 <sup>68</sup>Ga-2-(4,7-二乙酰)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-戊二酸 (NODAGA)-YHWYGYTPQNVI (GE11) 后不同时间人胰腺腺癌 BxPC3 荷瘤裸鼠 microPET 显像图 (箭头、K、L、B 分别示肿瘤、肾、肝和膀胱)。A. 30 min; B. 90 min; C. 90 min (阻断组)。%ID/g 为每克组织百分注射剂量率

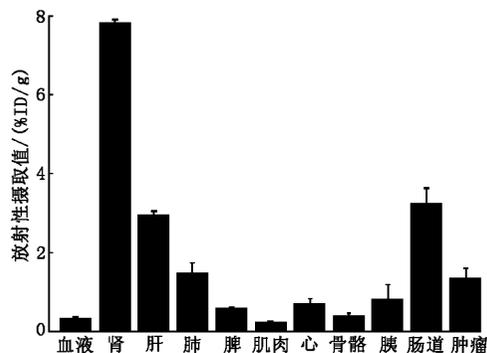


图 3 注射 <sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 后 90 min 人胰腺腺癌 BxPC3 荷瘤裸鼠体内的生物分布 ( $n = 3$ )

## 讨 论

胰腺癌恶性程度高、早诊早治率低, 是临床预后最差的恶性肿瘤之一。<sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖 (fluorodeoxyglucose, FDG) PET/CT 显像技术在肿瘤诊断方面有着独特的优势<sup>[8]</sup>。EGFR 在胰腺癌细胞中过表达<sup>[9]</sup>, GE11 与 EGFR 有高亲和力, 故核素标记 GE11 可用于胰腺癌早期 PET 显像。本研究用 <sup>68</sup>Ga 标记 GE11 多肽, 产率及放化纯高, 具有较好的亲水性和体外稳定性。

体外细胞实验中, 标记物在 BxPC3 细胞中特异性摄取。MicroPET 显像可见肿瘤部位明显浓聚, 表明标记物对肿瘤的靶向性较好。虽然肿瘤摄取在注射后 90 min 有所降低, 但并不明显。在预先阻断

EGFR 后,肿瘤摄取明显降低。荷瘤裸鼠生物分布实验结果显示,肿瘤的摄取明显高于正常胰腺,且在血液、肌肉和骨骼中的摄取明显低于肿瘤,这为在胰腺肿瘤诊断中的应用奠定了基础。临床常用的<sup>18</sup>F-FDG 是非特异肿瘤显像剂,胰腺癌患者常伴有高血糖和葡萄糖耐受不良,会导致<sup>18</sup>F-FDG PET/CT 显像出现假阳性<sup>[10]</sup>。<sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 具有特异性,且不受血清葡萄糖限制,更有利于胰腺肿瘤的鉴别诊断。然而,在本研究考察的时间范围内,肾和肝的高摄取导致腹部背景高,对胰腺肿瘤的诊断产生一定影响。Rahmanian 等<sup>[6]</sup>的研究中,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 标记的 GE11 分子探针在注射后 4 和 24 h 正常小鼠中肾的摄取为(12.3±1.5)和(2.2±1.1) %ID/g,表明 GE11 多肽在体内代谢较慢,故用长半衰期核素标记 GE11 并延长代谢时间有利于腹部肿瘤 PET 显像。另外,在分子探针结构中引入适当的连接分子改变其药代动力学也是提高显像效果的可能手段<sup>[11]</sup>。

综上,<sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 的标记方法简单,产率高,稳定性好,对 BxPC3 细胞有特异的肿瘤靶向性,能清晰勾画肿瘤形态,在肿瘤中的摄取高于正常胰腺。由于<sup>68</sup>Ga-NODAGA-GE11 主要经过肾和肝代谢,而肾和肝的高摄取导致腹部本底高,故其对胰腺肿瘤的显像价值还有待进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy[J]. *Drugs*, 2000, 60 Suppl 1: 15-23; discussion 41-42. DOI:10.2165/0000-3495-200060001-00002.
- [2] Mamot C, Drummond DC, Greiser U, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFR VIII-overexpressing tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3154-3161.
- [3] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor

receptor (EGFR) signaling in cancer[J]. *Gene*, 2006, 366(1): 2-16. DOI:10.1016/j.gene.2005.10.018.

- [4] Li Z, Zhao R, Wu X, et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics[J]. *FASEB J*, 2005, 19(14): 1978-1985. DOI:10.1096/fj.05-4058.com.
- [5] Chen CJ, Chan CH, Lin KL, et al. <sup>68</sup>Ga-labelled NOTA-RGD-GE11 peptide for dual integrin and EGFR-targeted tumour imaging[J]. *Nucl Med Biol*, 2019, 68-69: 22-30. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2018.11.003.
- [6] Rahmanian N, Hosseinimehr SJ, Khalaj A, et al. <sup>99m</sup>Tc labeled HYNIC-EDDA/tricine-GE11 peptide as a successful tumor targeting agent[J]. *Med Chem Res*, 2018, 27: 890-902. DOI:10.1007/s00044-017-2111-7.
- [7] Striese F, Sihver W, Gao F, et al. Exploring pitfalls of <sup>64</sup>Cu-labeled EGFR-targeting peptide GE11 as a potential PET tracer[J]. *Amino Acids*, 2018, 50(10): 1415-1431. DOI:10.1007/s00726-018-2616-5.
- [8] 吴冰,石洪成,陈曙光,等. <sup>18</sup>F-FDG PET/CT 显像在胰腺肿瘤诊断中的应用价值[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2015, 35(2): 92-96. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.02.004.  
Wu B, Shi HC, Chen SG, et al. Diagnostic value of <sup>18</sup>F-FDG PET/CT in patients with pancreatic neoplasm[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 35(2): 92-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.02.004.
- [9] Zhang Y, Banerjee S, Wang ZW, et al. Epidermal growth factor receptor-related protein inhibits cell growth and induces apoptosis of BxPC3 pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3877-3882. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-3654.
- [10] 种欢欢,兰晓莉. PET/CT 在胰腺癌诊治中的应用及与增强 CT 和 MRI 的比较[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2017, 37(10): 654-659. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.10.014.  
Zhong HH, Lan XL. Application and comparison of PET/CT, contrast enhanced CT and MRI in the clinical management of pancreatic cancer[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2017, 37(10): 654-659. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.10.014.
- [11] Prasanphanich AF, Lane SR, Figueroa SD, et al. The effects of linking substituents on the *in vivo* behavior of site-directed, peptide-based, diagnostic radiopharmaceuticals[J]. *In Vivo*, 2007, 21(1): 1-16.

(收稿日期:2020-05-19)