

· FAPI 与肿瘤微环境 ·

靶向成纤维细胞激活蛋白四聚体放射性 探针的构建及其在荷瘤裸鼠中的诊疗 一体化研究

赵亮¹ 陈健豪¹ 逢一臻¹ 方建阳² 郭志德² 吴华¹ 孙龙¹ 林勤³ 陈皓鋆¹

¹厦门大学附属第一医院核医学科及闽南 PET 中心, 厦门 361003; ²厦门大学公共卫生学院分子影像暨转化医学研究中心, 厦门 361102; ³厦门大学附属第一医院放射治疗科, 厦门 361003

通信作者: 陈皓鋆, Email: leochen0821@foxmail.com

【摘要】 目的 制备靶向成纤维细胞激活蛋白(FAP)的四聚体探针 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-4P[FAP 抑制剂(FAPI)]₄, 评价其在 FAP 表达阳性荷瘤裸鼠模型中的生物分布和 PET 显像, 并探讨其用于 FAP 阳性肿瘤治疗的可行性。方法 基于 FAPI-46 单体结构在 4 个 FAPI 活性基团之间各加入 4 个微型聚乙二醇(PEG)(PEG₃), 构建靶向 FAP 的四聚体探针 4P(FAPI)₄, 并经螯合剂 DOTA 偶联完成四聚体探针的⁶⁸Ga 和¹⁷⁷Lu 标记。通过体外细胞实验鉴定四聚体在体外对 FAP 结合性能。在 FAP 表达阳性的 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠模型中进行小动物 PET 显像和生物分布实验, 并行核素靶向内照射治疗的实验研究(共 39 只)。肿瘤摄取数据比较行两独立样本 *t* 检验分析; 核素治疗中肿瘤体积数据的比较采用重复测量方差分析。结果 细胞体外实验显示, DOTA-4P(FAPI)₄ 和单体 FAPI-46 的半数抑制浓度值相似(3.29 和 2.15 nmol/L)。PET 显像及生物分布数据显示, ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu 标记的 FAPI 四聚体具有高度靶向 FAP 的特异性, 且较其单体 FAPI-46 具有更高的肿瘤摄取及更持久的瘤内滞留时间; 注射后 48 h ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 和¹⁷⁷Lu-FAPI-46 肿瘤摄取分别为(18.72±1.32)与(2.72±1.20) 每克组织百分注射剂量率(%ID/g) (*t* = 15.55, *P* < 0.001)。在核素治疗实验中, ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 较¹⁷⁷Lu-FAPI-46 和对照组(100 μl 生理盐水注射)显示出更好的抗肿瘤治疗效果; 在治疗开始后第 2 天, 四聚体治疗组肿瘤体积明显小于对照组(平均值差值 67.19 mm³, *P* = 0.049); 在治疗开始后第 14 天, 四聚体治疗组肿瘤体积明显小于单体治疗组(平均值差值 414.33 mm³, *P* = 0.005)。结论 与 FAPI-46 相比, FAPI 四聚体 DOTA-4P(FAPI)₄ 在肿瘤摄取和滞留方面均有较大幅度的提升, ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 有望成为一种有前景的放射性药物应用于 FAP 阳性肿瘤的核素内照射治疗。

【关键词】 喹啉类; 镓放射性同位素; 镓; 纤维肉瘤; 小鼠, 裸

基金项目: 国家自然科学基金(82071961)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20230221-00042

Development of radiolabeled tetramer that targeting fibroblast activation protein and theranostic research in tumor xenografts

Zhao Liang¹, Chen Jianhao¹, Pang Yizhen¹, Fang Jianyang², Guo Zhide², Wu Hua¹, Sun Long¹, Lin Qin³, Chen Haojun¹

¹Department of Nuclear Medicine & Minnan PET Center, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; ²Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China; ³Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

Corresponding author: Chen Haojun, Email: leochen0821@foxmail.com

【Abstract】 **Objective** To develop a tetramer probe targeting fibroblast activation protein (FAP), named 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-4P(FAP inhibitor (FAPI))₄, evaluate its biodistribution and PET image in FAP-positive-tumor bearing nude mice, and explore its feasibility as a novel radio-regent for treatment of FAP-positive tumor. **Methods** FAP tetramer probe was constructed on the FAPI-46 motif with four mini-polyethylene glycol (PEG)(PEG₃) spacers between the four FAPI motifs, denoted as 4P(FAPI)₄. DOTA was used as the chelator for radiolabeling with ⁶⁸Ga and ¹⁷⁷Lu.

The FAP binding characteristics were test by *in vitro* cell competitive binding experiment. Small-animal PET, *in vivo* biodistribution, and radionuclide targeting therapy were performed in HT-1080-FAP tumor bearing nude mice ($n = 39$). Independent-sample *t* test was performed to analyze tumor uptake data, and two-factor repeated measures analysis of variance was utilized to compare tumor volume data in radioactive isotope therapy. **Results** Cell experiment showed that FAPI-tetramer and FAPI-monomer had similar half maximal inhibitory concentration values (3.29 and 2.15 nmol/L). $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ radiolabeled FAPI-tetramer had better tumor uptake and retention than FAPI-monomer in small-animal PET and *in vivo* biodistribution experiment, with the tumor uptake for ^{177}Lu -DOTA-4P(FAPI)₄ and ^{177}Lu -FAPI-46 at 48 h of (18.72±1.32) vs (2.72±1.20) percentage activity of injection dose per gram of tissue (%ID/g) ($t = 15.55$, $P < 0.001$). ^{177}Lu -DOTA-4P(FAPI)₄ group showed best anti-tumor efficacy compared with ^{177}Lu -FAPI-46 and control group in radionuclide targeting therapy. On the 2nd day after the start of treatment, the tumor volume in the tetramer treatment group was significantly smaller than that in the control group (mean difference 67.19 mm³, $P = 0.049$); on the 14th day after the start of treatment, the tumor volume in the tetramer treatment group was significantly smaller than that in the monomer treatment group (mean difference 414.33 mm³, $P = 0.005$). **Conclusion** FAPI-tetramer can improve tumor uptake and retention ability compared with FAPI-46, and ^{177}Lu -DOTA-4P(FAPI)₄ can be a promising radio-agent for FAP-positive tumor therapy.

【Key words】 Quinoline; Gallium radioisotopes; Lutetium; Fibrosarcoma; Mice, nude

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82071961)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230221-00042

肿瘤的发生、发展和转移离不开肿瘤细胞自身的生长和进化。除此之外,肿瘤微环境同样在肿瘤的发展中发挥关键作用^[1]。肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境的主要成分之一,存在于大部分上皮来源的实体瘤中。成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)在 CAFs 细胞膜上呈高表达,而在正常组织细胞中不表达或呈低表达^[2-3],因而成为肿瘤研究的热门靶点。2018 年,德国海德堡大学医院报告了靶向 FAP 的分子探针-FAP 抑制剂(FAP inhibitor, FAPI),并通过正电子核素 ^{68}Ga 标记实现了对多种不同类型肿瘤患者的 PET 显像^[4]。然而, ^{177}Lu 或 ^{90}Y 标记 FAPI-04/46 等 FAPI 内照射治疗药物在晚期肿瘤患者中未能发挥良好的抗肿瘤疗效^[5-6],可能与其在肿瘤中滞留时间较短有关。本研究设计合成了基于 FAPI-46 结构的四聚体探针,命名为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA)-4P(FAPI)₄,评价其在 FAP 表达阳性荷瘤裸鼠模型中的 PET 显像和生物分布,并探讨其作为新型放射性药物用于 FAP 阳性肿瘤治疗的可行性。

材料与方法

1. DOTA-4P(FAPI)₄ 的制备和放射性标记。基于 FAPI-46 基础构建 FAPI 四聚体,在 4 个 FAPI 活性基团之间各加入 4 个微型聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)(PEG₃)间隔,以 DOTA 作为螯合剂用于放射性核素 ^{68}Ga 和 ^{177}Lu 的标记。对于 ^{68}Ga 标记,将 25 nmol 的 FAPI-46 和 DOTA-4P(FAPI)₄ 分别溶于

1 ml NaAc(0.25 mol/L 水溶液),随后移至 4 ml $^{68}\text{GaCl}_3$ 溶液(1.3 GBq,0.05 mol/L HCl 溶液)中,95 °C 加热反应 15 min,产物通过 C18 柱(WAT020515,美国 Waters 公司)纯化。对于 ^{177}Lu 标记,将上述前体溶解在 1 ml 0.25 mol/L NH₄OAc(pH=5.6)中,移至 4 ml $^{177}\text{LuCl}_3$ 溶液(1.85 GBq,0.05 mol/L HCl 溶液),随后在 95 °C 下加热反应 30 min,反应后产物通过 C18 柱纯化。使用放射性高效液相色谱法测量产物的纯化纯,并观察其在胎牛血清中存放 4 h 后的稳定性。

2. 细胞摄取和亲和力实验。取 HT-1080-FAP 细胞,即本课题组前期将人源纤维肉瘤细胞株 HT-1080 稳定转染 FAP 基因的细胞株^[7]。在细胞摄取和阻断实验中,将 ^{68}Ga -DOTA-4P(FAPI)₄、 ^{68}Ga -FAPI-46、 ^{68}Ga -DOTA-4P(FAPI)₄ 混合未标记 FAPI-46(11.4 nmol)3 组药物分别加入细胞中温育 60 min。在亲和力测定实验中,将梯度浓度($5.6 \times 10^{-12} \sim 5.6 \times 10^{-4}$ mol/L)的未标记 FAPI-46 或 DOTA-4P(FAPI)₄ 分别加入细胞中,随后加入 ^{68}Ga -FAPI-46 温育 60 min。每个步骤后用 1 ml PBS 洗涤细胞 2 次,然后加入 1 mol/L NaOH(0.5 ml)裂解。使用 γ 计数器(WIZARD 2480,美国 PerkinElmer Instruments 公司)检测样品放射性。

3. 荷瘤裸鼠模型的构建。所有动物实验程序经厦门大学动物护理与伦理委员会批准,并按照《厦门大学实验动物中心护理与使用指南》进行。细胞消化后配制成 5×10^7 /ml 浓度的肿瘤细胞悬液。对于单侧荷瘤裸鼠模型构建,取 100 μl HT-1080-FAP 细胞悬液种于 6~8 周龄 BALB/c 裸鼠(购于北京维通利华实验动物有限公司)的右肩部(36 只);构建

双侧荷瘤裸鼠(左侧 FAP 阴性,右侧 FAP 阳性)模型时,取 100 μ l HT-1080 及 HT-1080-FAP 细胞悬液分别皮下接种于裸鼠的左和右肩部(3 只)。

4. 荷瘤裸鼠的 PET 显像。取 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠 6 只分为 2 组,每组 3 只。经尾静脉对 2 组小鼠注射约 7.4 MBq/只的⁶⁸Ga-FAPI-46 或⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄,分别于注射后 1、2 和 4 h 行静态 PET(microPET,德国 Siemens 公司)显像。对于 FAPI 四聚体探针靶向 FAP 行特异性检测,将双侧荷瘤裸鼠注射约 7.4 MBq/只的⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄,注射后 4 h 行静态 PET 显像。

5. 生物分布研究。取荷瘤裸鼠 15 只用于生物分布实验。按 0.74 MBq/只注射⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 或⁶⁸Ga-FAPI-46 后,四聚体 [⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄]组在注射后 4、24、48 和 72 h 分别处死小鼠(每个时间点 $n=3$);单体(⁶⁸Ga-FAPI-46)组在注射后 48 h 处死小鼠。各组均取肿瘤和重要器官称质量,测量放射性计数,并将数据标准化为每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

6. 放射性核素靶向治疗。当小鼠肿瘤体积达到约 100 mm³ 时,取荷瘤裸鼠 15 只分为 3 组(每组 5 只)进行给药:A 组,100 ml 生理盐水对照;B 组,29.6 MBq ¹⁷⁷Lu-FAPI-46;C 组,29.6 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄。治疗后每 2 d 监测 1 次体质量和肿瘤体积,当平均肿瘤体积超过 1 500 mm³ 或小鼠体质量下降超过 20%时进行安乐死处理。

7. 统计学处理。采用 IBM SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,不符合正态分布的定量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。采用两独立样本 t 检验分析肿瘤摄取数据的差异,采用重复测量方差分析探讨放射性核素治疗中肿瘤体积数据变化,判断不同干预措施随时间的变化对肿瘤体积大小的影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DOTA-4P(FAPI)₄ 的制备及检测。成功合成 4 个 PEG₃ 基团和 DOTA 螯合剂的 FAPI 四聚体。⁶⁸Ga 和 ¹⁷⁷Lu 的标记产率均>90%,放化纯均超过 95%;两者标记产物的比活度分别为 22 和 12 GBq/ μ mol。⁶⁸Ga 与 ¹⁷⁷Lu 标记的四聚体与胎牛血清常温下共温育 4 h 后未观察到显著的脱金属和游离放射性,表明其具有高度稳定性。

2. 细胞摄取与亲和力实验。在细胞摄取实验中,HT-1080-FAP 细胞对⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 的摄取明显高于⁶⁸Ga-FAPI-46 [(42.37 \pm 6.14)%与 (21.58 \pm 0.40)%; $t=6.76$, $P=0.001$]。阻断实验中,未标记的前体(FAPI-46)明显抑制了⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 与 FAP 的结合[(3.28 \pm 0.76)%; $t=12.64$, $P<0.001$],抑制率为 92.26%,证实了⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 靶向 FAP 蛋白的特异性。细胞亲和力实验中,FAPI 单体和四聚体的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值分别为 2.15 和 3.29 nmol/L。

3. ⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠中的 PET 显像。注射后 1~4 h,静态 PET 显像示⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 在肿瘤中一直保持较高的显像剂浓聚(图 1A)。正常脏器中摄取较低,图像具有良好的靶/本底比。在与相同剂量和比活度的⁶⁸Ga-FAPI-46 对比实验中,2 种探针的体内分布模式相似。PET 半定量结果显示,⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 和⁶⁸Ga-FAPI-46 的肿瘤摄取在注射后 1 h 差异无统计学意义[(9.90 \pm 0.87)与 (9.70 \pm 0.78) %ID/g; $t=0.30$, $P=0.782$],但注射后 4 h 肿瘤对⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 的摄取明显高于⁶⁸Ga-FAPI-46[(10.57 \pm 0.76)与 (7.00 \pm 0.87) %ID/g; $t=5.31$, $P=0.006$]。

双侧荷瘤裸鼠模型在注射⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 后 4 h 行小动物 PET/CT 显像(图 1B),右侧 FAP 阳性肿瘤清晰可见,肿瘤与本底对比度高,而左侧 FAP 阴性肿瘤摄取明显低于右侧阳性肿瘤[(0.89 \pm 0.13)与 (10.57 \pm 0.76) %ID/g; $t=-22.55$, $P<0.001$];肿瘤摄取减少 91.58%,表明⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 靶向 FAP 有体内特异性。

4. ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠中的生物分布。生物分布结果显示,¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 注射后 4 h 的肿瘤摄取达(20.90 \pm 1.69) %ID/g,且清除相对缓慢,在注射后 24、48 及 72 h 仍高达(20.43 \pm 3.22)、(18.72 \pm 1.32)和(17.41 \pm 2.12) %ID/g(表 1)。¹⁷⁷Lu-FAPI-46 注射后 48 h 肿瘤摄取仅为(2.72 \pm 1.20) %ID/g,明显低于¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ ($t=15.55$, $P<0.001$)。在正常脏器中,¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 主要聚集于肝脏、肾脏和脾脏,余正常脏器的显像剂摄取均维持在较低水平。

5. ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠中的核素治疗实验。核素靶向治疗实验中,对

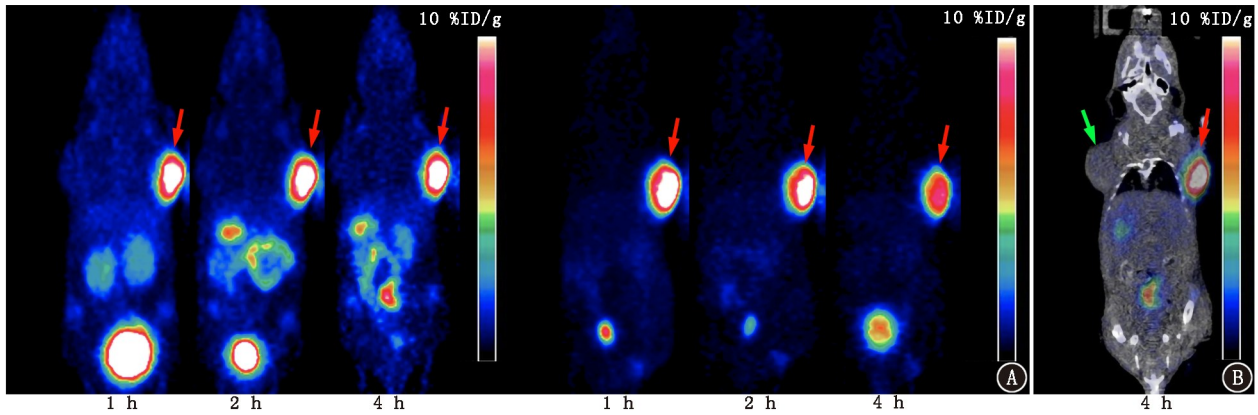


图 1 注射不同药物后不同时间点 HT-1080-成纤维细胞激活蛋白(FAP)荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像图。A. ⁶⁸Ga-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-4P FAP 抑制剂(FAPI)₄(左)和⁶⁸Ga-FAPI-46(右)在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠中的 PET 显像代表图,肿瘤对⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 的摄取从 1~4 h 保持不变,对⁶⁸Ga-FAPI-46 摄取从 1~4 h 逐渐降低(箭头示肿瘤);B. ⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAPI)₄ 在双侧荷瘤裸鼠(左侧 FAP 阴性,右侧 FAP 阳性)中的 PET/CT 显像图,可见肿瘤中探针分别呈阳性摄取(红箭头示)和阴性摄取(绿箭头示);%ID/g 为每克组织百分注射剂量率

表 1 ¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 及¹⁷⁷Lu-FAPI-46 注射后不同时间在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠体内的生物分布结果[%ID/g; $\bar{x} \pm s$ 或 $M(Q_1, Q_3)$]

脏器或肿瘤	¹⁷⁷ Lu-DOTA-4P(FAPI) ₄				¹⁷⁷ Lu-FAPI-46
	4 h	24 h	48 h	72 h	48 h
心脏	3.62±0.33	1.66±0.08	1.60±0.59	1.30±0.27	0.14±0.13
肝脏	5.28±1.12	6.28±0.66	6.60±1.34	7.52±1.03	0.60±0.18
肺	4.12±0.86	1.83±0.26	0.92±0.13	0.95±0.46	0.09(0.04, 0.32)
肾脏	4.39±0.26	5.68±1.20	6.17±0.82	6.65±0.87	0.54±0.21
脾脏	3.49±0.68	4.51±0.48	5.00±0.94	5.40±1.67	0.45±0.31
胃	1.85±0.95	1.00±0.15	0.74±0.19	1.32±0.59	0.12±0.06
骨骼	2.73±1.01	3.81±0.45	2.81±0.78	2.99±0.43	1.20±0.38
肌肉	3.98±1.10	2.01±0.51	1.88±0.39	1.40±0.31	0.43±0.22
小肠	1.59±0.43	1.23±0.14	1.15±0.20	1.00±0.33	0.09±0.05
血液	7.70±0.58	1.77±0.33	0.35±0.03	0.15±0.04	0.01(0.01, 0.21)
脑	0.33±0.07	0.25±0.05	0.21±0.09	0.28±0.11	0.08±0.12
肿瘤	20.90±1.69	20.43±3.22	18.72±1.32	17.41±2.12	2.72±1.20

注:%ID/g 为每克组织百分注射剂量率, DOTA 为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸, FAP 为成纤维细胞激活蛋白, FAPI 为 FAP 抑制剂

对照组(A组)中肿瘤生长最迅速,第 18 天时全部 5 只小鼠均因肿瘤体积大于 1 500 mm³ 而被安乐死;¹⁷⁷Lu-FAPI-46 治疗组(B组)中观察到肿瘤生长较对照组相对延迟,但仍然持续生长,第 28 天时 5 只小鼠中的 4 只因肿瘤体积大于 1 500 mm³ 被安乐死;在¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAPI)₄ 治疗组(C组)中,肿瘤生长明显受抑,肿瘤体积从第 6 天开始缩小,但在第 14 天时肿瘤体积再次缓慢增大,第 28 天时肿瘤体积为 (257.81±176.86) mm³(图 2)。

重复测量方差分析示数据不满足球形假设,表明各时间点指标变量存在变异,且每组各干预措施下的肿瘤体积随时间变化而变化(F 值:3.75~48.16,均 $P < 0.05$)。组间比较示,在治疗开始后第 0 天,A~C 组

间肿瘤体积的差异无统计学意义($F = 0.86, P = 0.450$)。在治疗开始后第 2 天,C 组肿瘤体积明显小于 A 组(平均值差值 67.19 mm³, $P = 0.049$),但 C 组肿瘤体积与 B 组差异无统计学意义($P = 0.999$)。在治疗开始后第 14 天,C 组肿瘤体积明显小于 B 组(平均值差值 414.33 mm³, $P = 0.005$)。第 8 天后至 4 周的监测时间内,C 组中观察到最佳的抗肿瘤疗效,且与 A、B 2 组间肿瘤体积的差异随时间逐渐增大。3 组实验动物未观察到明显的体质量下降。

讨 论

作为一种广谱的肿瘤靶点,靶向 FAP 的分子影像技术近年来在肿瘤诊断中展现出了良好的临床应

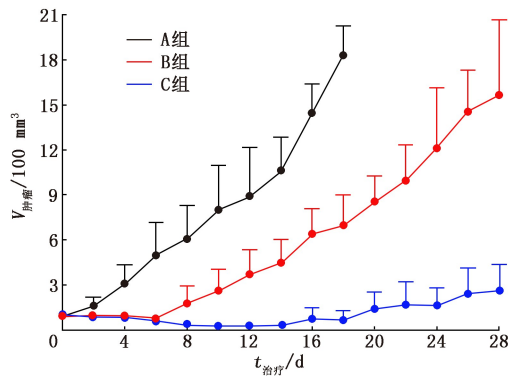


图2 不同治疗方案组 HT-1080-成纤维细胞激活蛋白(FAP)荷瘤裸鼠的肿瘤体积变化曲线。A组(黑线)注射 100 μ l 生理盐水,B组(红线)注射 29.6 MBq 的¹⁷⁷Lu-FAP 抑制剂(FAP)-46,C组(蓝线)注射 29.6 MBq 的¹⁷⁷Lu-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-4P(FAP)₄。可见 A 组肿瘤生长最迅速;B 组肿瘤生长较 A 组相对延迟,但仍然持续生长;C 组肿瘤生长明显受抑制,肿瘤体积明显小于 A、B 2 组

用前景,也推进了靶向 FAP 核素治疗相关研究的发展。但多项基于 FAPI 核素靶向治疗的临床试验结果显示,其抗肿瘤疗效并不理想^[5-6],可能的原因:目前应用的 FAPI 探针大多为小分子抑制剂,影响了放射性核素在肿瘤病灶中的滞留。为提高靶向 FAP 的核素治疗效果,研究者们对已有的 FAPI 探针进行了一系列的化学改构,以期改善 FAPI 的体内药代动力学性质。例如,通过伊文思蓝(Evens blue, EB;一种白蛋白结合剂)的共价修饰构建出 EB-FAPI 以及基于新型环肽结构的 FAP 多肽探针 FAP-2286,均明显延长了放射性探针在肿瘤内的滞留,进而提高了抗肿瘤治疗效果^[8-9]。

除上述策略外,利用多聚化的多价效应增强肿瘤摄取和滞留也是探针改构优化中的重要方法。前期研究中,本课题组在 FAPI-46 探针基础上设计合成了一种新型二聚体探针 DOTA-2P(FAP)₂^[10]。动物实验及初步的临床研究数据显示,⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAP)₂ 较⁶⁸Ga-FAP-46 具有更高的肿瘤摄取和更长的肿瘤滞留。有研究者也报告了类似结果,其构建的 FAPI 二聚体 DOTA.(SA.FAPi)₂(其中 SA 为方酸)、DOTAGA.(SA.FAPi)₂ 和 BiOncoFAP 在肿瘤中的摄取均高于单体 FAPI-46^[11-12]。因此,多聚化可能是一种有效的探针优化策略,基于 FAPI 四聚体的构建有望进一步提升其在肿瘤中的摄取并延长滞留时间。

体外细胞实验中,HT-1080-FAP 细胞对⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAP)₄ 表现出较⁶⁸Ga-FAP-46 更高的摄取,表明随着 FAP 结合基因数目的增加,可致肿瘤

局部 FAPI 浓聚增高,增加了放射性探针与 FAP 的结合,并降低其解离速率。此外,⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAP)₄ 能被未标记的 FAPI-46 冷前体特异性阻断,验证了 DOTA-4P(FAP)₄ 对 FAP 靶点结合的特异性。细胞亲和力实验中,DOTA-4P(FAP)₄ 与 FAPI-46 相似的 IC₅₀ 值表明多聚化策略对 FAP 靶点的亲和力影响极小。

小动物 PET 显像实验中,四聚体较单体表现出了更持久的瘤内滞留时间。在同一荷瘤裸鼠双侧分别构建目标靶点 FAP 阴性和阳性的肿瘤模型,2 种肿瘤间显像剂摄取存在明显差异,表明肿瘤病灶中⁶⁸Ga-DOTA-4P(FAP)₄ 的摄取为 FAP 介导的特异性摄取^[13]。生物分布实验表明,¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAP)₄ 在注射后能长时间稳定地滞留于肿瘤,72 h 肿瘤摄取仍高达(17.41 \pm 2.12) % ID/g,滞留时间较¹⁷⁷Lu-FAP-46 大幅提升。在放射靶向治疗实验中,¹⁷⁷Lu 标记的 FAPI 四聚体能有效抑制 HT-1080-FAP 肿瘤的生长,其治疗效果明显优于对照组和¹⁷⁷Lu-FAP-46 治疗组,表明¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAP)₄ 有望成为一种有前景的放射性治疗药物。

需注意的是,部分正常脏器,尤其是肝、肾及脾脏对¹⁷⁷Lu-DOTA-4P(FAP)₄ 的摄取高于¹⁷⁷Lu-FAP-46,增高的生理性摄取可能会增加放射性药物在正常脏器中的吸收剂量。因此,将来的研究仍需进一步探索 FAPI 探针的优化改构策略,在提高肿瘤摄取的同时,降低其在正常脏器中的生理性摄取。由于 FAPI 单体在临床 PET 显像中已显示出良好的靶/本比,故四聚体的研发目的侧重于提高肿瘤放射靶向治疗的疗效。在转染模型 HT-1080-FAP 中,由于 FAP 高度表达,四聚体肿瘤摄取及滞留相较于二聚体的优势并不明显,且在正常脏器中的本底摄取更高。然而基于肿瘤的异质性特征,临床仍有较多呈 FAP 中度表达的肿瘤病灶,对于此部分肿瘤,四聚体的摄取及滞留可能较二聚体更有优势,有望表现出更好的抗肿瘤治疗效果,但需要进一步验证及探索基础及临床数据。

本研究存在以下不足。(1)未行¹⁷⁷Lu 标记四聚体与单体的 SPECT 显像对比,只进行了相应生物分布的研究。(2)实验鼠数量相对有限,研究中的肿瘤细胞和小鼠模型是基于转染 FAP 的细胞株,而非肿瘤相关成纤维细胞及人源肿瘤异种移植模型(patient-derived tumor xenograft, PDX),不能真实反映人体肿瘤微环境,后续应在更多数量的 PDX 模型中进一步研究。

综上,本研究结果表明放射性标记的 FAPI 四聚体较单体 FAPI-46 在肿瘤摄取和滞留时间方面均有较大程度提升。 ^{177}Lu -DOTA-4P (FAPI)₄ 在 HT-1080-FAP 荷瘤裸鼠模型中显示出了良好的抗肿瘤疗效。这种多聚化研究策略有望为靶向 FAP 放射性探针的优化策略提供新的研究方向。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 赵亮:研究实施、论文撰写;陈健豪、逢一臻、方建阳:研究实施、统计学分析;郭志德、吴华、孙龙、林勤:研究指导;陈皓莹:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(10): 669-680. DOI:10.1038/s41568-021-00378-6.
- [2] 谈健伶,兰晓莉,张永学.放射性核素标记的成纤维细胞激活蛋白靶向分子探针的研究进展[J].中华核医学与分子影像杂志, 2021, 41(3): 180-184. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200310-00094.
Tan JL, Lan XL, Zhang YX. Research progress of radionuclide labeled fibroblast activation protein targeted molecular probes[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2021, 41(3): 180-184. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200310-00094.
- [3] 麻广宇,徐白萱,张锦明.成纤维细胞激活蛋白抑制剂在核医学诊疗中的应用[J].中华核医学与分子影像杂志, 2021, 41(2): 116-118. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200305-00090.
Ma GY, Xu BX, Zhang JM. Application of fibroblast activation protein inhibitors in the diagnosis and treatment of nuclear medicine [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2021, 41(2): 116-118. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200305-00090.
- [4] Kratochwil C, Flechsig P, Lindner T, et al. ^{68}Ga -FAPI PET/CT: tracer uptake in 28 different kinds of cancer[J]. J Nucl Med, 2019, 60(6): 801-805. DOI:10.2967/jnumed.119.227967.
- [5] Ferdinandus J, Costa PF, Kessler L, et al. Initial clinical experience with ^{90}Y -FAPI-46 radioligand therapy for advanced-stage solid tumors: a case series of 9 patients[J]. J Nucl Med, 2022, 63(5): 727-734. DOI:10.2967/jnumed.121.262468.
- [6] Kuyumcu S, Kovan B, Sanli Y, et al. Safety of fibroblast activation protein-targeted radionuclide therapy by a low-dose dosimetric approach using ^{177}Lu -FAPI04[J]. Clin Nucl Med, 2021, 46(8): 641-646. DOI:10.1097/RLU.0000000000003667.
- [7] Zhao L, Chen J, Pang Y, et al. Development of fibroblast activation protein inhibitor-based dimeric radiotracers with improved tumor retention and antitumor efficacy[J]. Mol Pharm, 2022, 19(10): 3640-3651. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.2c00424.
- [8] Xu M, Zhang P, Ding J, et al. Albumin binder-conjugated fibroblast activation protein inhibitor radiopharmaceuticals for cancer therapy[J]. J Nucl Med, 2022, 63(6): 952-958. DOI:10.2967/jnumed.121.262533.
- [9] Baum RP, Schuchardt C, Singh A, et al. Feasibility, biodistribution, and preliminary dosimetry in peptide-targeted radionuclide therapy of diverse adenocarcinomas using ^{177}Lu -FAP-2286: first-in-humans results[J]. J Nucl Med, 2022, 63(3): 415-423. DOI:10.2967/jnumed.120.259192.
- [10] Zhao L, Niu B, Fang J, et al. Synthesis, preclinical evaluation, and a pilot clinical PET imaging study of ^{68}Ga -labeled FAPI dimer [J]. J Nucl Med, 2022, 63(6): 862-868. DOI:10.2967/jnumed.121.263016.
- [11] Ballal S, Yadav MP, Moon ES, et al. Novel fibroblast activation protein inhibitor-based targeted theranostics for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer patients: a pilot study[J]. Thyroid, 2022, 32(1): 65-77. DOI:10.1089/thy.2021.0412.
- [12] Galbiati A, Zana A, Bocci M, et al. A dimeric FAP-targeting small-molecule radioconjugate with high and prolonged tumor uptake[J]. J Nucl Med, 2022, 63(12): 1852-1858. DOI:10.2967/jnumed.122.264036.
- [13] Backhaus P, Gierse F, Burg MC, et al. Translational imaging of the fibroblast activation protein (FAP) using the new ligand [^{68}Ga]Ga-OncoFAP-DOTAGA[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 49(6): 1822-1832. DOI:10.1007/s00259-021-05653-0.

(收稿日期:2023-02-21)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物者,在描述中应符合以下要求:(1)品种、品系描述清楚;(2)强调来源;(3)遗传背景;(4)微生物学质量;(5)明确体质量;(6)明确等级;(7)明确饲养环境和实验环境;(8)明确性别;(9)有无质量合格证;(10)有对饲养方式的描述(如饲养类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);(11)所有动物数量准确;(12)详细描述动物的健康状况;(13)对实验动物的处理方式有单独清楚的交代;(14)全部有对照,部分可采用双因素方差分析。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。卫生部课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

本刊编辑部