

# 纤维连接蛋白亚型胞外结构域特异性探针<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的制备及 microPET 显像

陈礼平<sup>1</sup> 杨小春<sup>2</sup> 缪银杏<sup>3</sup> 黄洪波<sup>3</sup> 林建国<sup>3</sup>

张雨<sup>1</sup> 冯国开<sup>2</sup> 张伟光<sup>2</sup> 郁春景<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江南大学附属医院核医学科,无锡 214122;<sup>2</sup>中山大学肿瘤防治中心核医学科、华南肿瘤国家重点实验室,广州 510060;<sup>3</sup>国家卫生健康委员会核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室、江苏省原子医学研究所,无锡 214063

陈礼平和杨小春对本文有同等贡献

通信作者:张伟光, Email: zhangwg@sysucc.org.cn; 郁春景, Email: ycj\_wxd1978@163.com

**【摘要】** 目的 制备针对纤维连接蛋白亚型胞外结构域 B (EDB-FN) 的特异性分子探针<sup>18</sup>F-AIF-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-(聚乙二醇)<sub>4</sub>-ZD2 (<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2), 并进行体内外理化性质评价。方法 通过 Al<sup>18</sup>F 一步螯合标记的方法制备<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 通过高效液相色谱 (HPLC) 测定其放化纯和体外稳定性, 测定脂水分配系数 (logP), 并行细胞摄取实验 [将三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (1×10<sup>6</sup>/管) 分为 3 组 (各 3 管), 分别为阳性组、抑制组和控制对照组]。取 MDA-MB-231 荷瘤裸鼠 (n=3; 实验组) 行<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 microPET 显像 (30、60、90 和 120 min), 并与阻断组 (n=3; 注射 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 后 0.5 h 再注射<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2) 进行对照。采用两独立样本 t 检验分析数据。结果 成功制备<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 优化后的放化产率为 (33.8±2.1)% (未行衰变校正, n=8), 放化纯>96%; 37 °C 放置 120 min, <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 在人血清和 PBS 中的放化纯均>93%, 体外稳定性好; 产物比活度为 (11.1±3.2) GBq/μmol; logP 为 -1.43±0.05。注射<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 后 120 min, 阳性组肿瘤细胞摄取为 (1.77±0.28) 百分加样活度 (%AR)/10<sup>6</sup> 个细胞, 抑制组细胞摄取为 (0.76±0.07) %AR/10<sup>6</sup> 个细胞 (t=4.30, P=0.032)。荷瘤裸鼠 microPET 显像示, <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 主要经肝肾代谢, 注射后 60 min 实验组肿瘤摄取为 (1.94±0.21) 每克组织百分注射剂量率 (%ID/g), 注射后 90 min 肿瘤/肌肉比值为 3.80±0.25; 阻断组注射后 60 min 肿瘤摄取为 (0.43±0.09) %ID/g (t=3.18, P=0.006)。结论 <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 制备简单, 标记率高, 体外稳定性好, microPET 显像肿瘤摄取和靶本比高, 特异性良好, 有较长的肿瘤滞留时间, 在 EDB-FN 高表达的三阴性乳腺癌中具有良好的应用前景。

**【关键词】** 纤连蛋白类; 同位素标记; 氟放射性同位素; 正电子发射断层显像术; 体层摄影术, X 线计算机; 乳腺肿瘤; 肿瘤细胞, 培养的; 小鼠, 裸

**基金项目:** 无锡市卫生健康委员会研究项目 (MS201903); 上海市分子影像重点实验室建设项目 (18DZ2260400)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20211216-00440

## Preparation and microPET imaging of extradomain-B fibronectin specific probe <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2

Chen Liping<sup>1</sup>, Yang Xiaochun<sup>2</sup>, Miao Yinxing<sup>3</sup>, Huang Hongbo<sup>3</sup>, Lin Jianguo<sup>3</sup>, Zhang Yu<sup>1</sup>, Feng Guokai<sup>2</sup>, Zhang Weiguang<sup>2</sup>, Yu Chunjing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

<sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, Sun Yat-sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China; <sup>3</sup>NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory

of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

Chen Liping and Yang Xiaochun are contributed equally to the article

Corresponding authors: Zhang Weiguang, Email: zhangwg@sysucc.org.cn; Yu Chunjing, Email: ycj\_wxd1978@163.com

**【Abstract】 Objective** To prepare specific molecular probe <sup>18</sup>F-AIF-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid-(polyethylene glycol)<sub>4</sub>-ZD2 (<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2) for targeting extradomain-B fibronectin (EDB-FN), and evaluate its properties *in vitro* and *in vivo*. **Methods** <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2

was prepared by one-step chelation labeling with  $\text{Al}^{18}\text{F}$ . The radiochemical purity and *in vitro* stability were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The partition coefficient ( $\log P$ ) of  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 was evaluated, and the cell uptake experiment was carried out (triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cells ( $1 \times 10^6$ /tube) were divided into 3 groups ( $n=3$  per group); positive group, inhibition group, control group). MicroPET imaging was performed on MDA-MB-231 bearing nude mice ( $n=3$ ) after  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 injection (30, 60, 90, 120 min) and compared with blocking group ( $n=3$ , NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZQ<sub>2</sub> was preinjected at 0.5 h before  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 injection). Independent-sample *t* test was used to analyze the data. **Results**  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 was successfully prepared. The optimized radiochemical yield was  $(33.8 \pm 2.1)\%$  (undecay corrected,  $n=8$ ) and the radiochemical purity was  $>96\%$ . After incubating 120 min at  $37^\circ\text{C}$ , the radiochemical purity of  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 in human serum and PBS was  $>93\%$ , indicating its good stability *in vitro*. The specific activity was  $(11.1 \pm 3.2)$  GBq/ $\mu\text{mol}$ , and  $\log P$  was  $-1.43 \pm 0.05$ . The uptake value of tumor cells was  $(1.77 \pm 0.28)$  percentage applied activity ( $\%AR$ )/ $10^6$  cells at 120 min post-injection in positive group, and the total uptake value of the inhibition group was  $(0.76 \pm 0.07)$   $\%AR/10^6$  cells ( $t=4.30$ ,  $P=0.032$ ). MicroPET imaging in tumor bearing nude mice showed that  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 was mainly metabolized by the liver and kidneys. The tumor uptake value was  $(1.94 \pm 0.21)$  percentage activity of injection dose per gram of tissue ( $\%ID/g$ ) at 60 min post-injection and the tumor/muscle ratio was  $3.80 \pm 0.25$  at 90 min post-injection in the experimental group, while the tumor uptake value of tumor bearing nude mice in the blocking group was  $(0.43 \pm 0.09)$   $\%ID/g$  at 60 min post-injection ( $t=3.18$ ,  $P=0.006$ ). **Conclusions**  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 can be prepared simply with high labeling rate and good stability *in vitro*, with high tumor uptake and tumor/muscle ratio in microPET imaging, and good specificity and long tumor residence time. The probe has good application prospect in breast cancer with high expression of fibronectin subtype EDB-FN.

**【Key words】** Fibronectins; Isotope labeling; Fluorine radioisotopes; Positron-emission tomography; Tomography, X-ray computed; Breast neoplasms; Tumor cells, cultured; Mice, nude

**Fund program:** Research Projects of Wuxi Health Commission (MS201903); Construction Project of Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging (18DZ2260400)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211216-00440

三阴性乳腺癌是恶性程度高、易转移、危害程度高的乳腺癌亚型,其表面缺少相应的受体,给临床诊疗和预后等带来巨大困难。研究特异性靶向三阴性乳腺癌的 PET 小分子探针对提高乳腺癌的诊疗水平、改善患者生存质量具有重要意义<sup>[1]</sup>。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是结缔组织细胞外基质中 1 种丰富的糖蛋白<sup>[2]</sup>,在正常组织发育和组织修复过程中调节细胞粘附、迁移、生长、增殖和伤口愈合。FN 的亚型胞外结构域 B(extradomain-B FN, EDB-FN)参与肿瘤发生、血管生成和转移,且在侵袭性三阴性乳腺癌中高度表达<sup>[3]</sup>,是早期监测三阴性乳腺癌的有效靶点。本研究通过噬菌体展示肽库筛选出 EDB-FN 靶向的小分子肽[命名为 ZD2(CTVRTSADC)<sup>[4]</sup>],修饰得到 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-(聚乙二醇)<sub>4</sub>-ZD2 [1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid-(polyethylene glycol)<sub>4</sub>-ZD2, NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2],标记后制备 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2,并评价其理化性质和体内外特性,为早期监测三阴性乳腺癌的小分子探针开发和研究提供依据。

## 材料与方法

### 一、实验材料与仪器

1.实验材料。标记前体 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2(化学纯 $>96\%$ ,杭州中肽生化有限公司); $\text{AlCl}_3$ (北京百灵

威科技有限公司)、乙酸、无水乙腈、无水乙醇、浓 HCl(国药集团上海化学试剂有限公司);高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)级乙腈(上海凌峰化学试剂有限公司);注射用水(广东艾希德药业有限公司);所有试剂未经纯化直接使用。乳腺癌细胞株 MDA-MB-231[麦睿可(苏州)科技服务有限公司]、实验用 BALB/c 裸鼠(雄性;6只,4~6周龄、体质量 16~20 g)购于上海斯莱克实验动物有限公司[许可证:SCXK(沪)2017-0005]。所有动物实验遵循江南大学附属医院实验动物使用和管理规定。人血清、PBS 购于德国 Boehringer-Ingelheim 公司。无菌滤膜(Millex-GS,0.22  $\mu\text{m}$ ;美国 Millipore 公司);薄层硅胶板(德国 Macherey-Nagel 公司);pH 试纸(上海馨晟试化工科技有限公司)。

2.实验仪器。HM-10 回旋加速器(日本住友公司);CRC-25R 型活度计(美国 CAPINTEC 公司);分析型 HPLC 分析仪(SS420X, Mod201 系列;配可变波长检测器),分析型 C18 柱(美国 GRACE 公司);小动物 microPET 仪(德国 Siemens INVEON); $\gamma$  计数器(安徽中科中佳技术科学仪器有限公司)。

### 二、实验方法

1.  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的制备。基于  $\text{Al}^{18}\text{F}$  螯合法制备 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2<sup>[5]</sup>。将标记前体 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 和  $\text{AlCl}_3$  溶解于乙腈和水中,加

入乙酸调节 pH 值,在水相中与 $^{18}\text{F}^-$ 混合,100 °C 加热 10~15 min,依次通过加水稀释、C18 柱吸附、注射用水清洗、10 mmol/L HCl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 淋洗、无菌滤膜过滤、生理盐水稀释后得到 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 注射液。标记过程通过改变前体量和反应体系 pH 值来优化反应条件。

2.  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的质量控制。采用分析型放射性 HPLC 仪检测注射液放化纯,分析反相柱为 Autima™(5 μm, 4.6 mm×250 mm),采取 218 nm 紫外线和放射性检测器,流速为 1 ml/min,流动相为溶液 A(水,含体积分数 0.1%三氟乙酸)和溶液 B(乙腈,含体积分数 0.1%三氟乙酸)。梯度:0~3 min, 95%A 和 5%B;3.1~20 min, 60%A 和 40%B;20.1~30 min, 95%A 和 5%B。目测产品颜色和澄明度,测定产品 pH 值。

3.  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的体外稳定性和脂水分配系数(logP)的测定。(1)稳定性实验。将 500 μl(约 7.4 MBq) $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 加至 500 μl PBS 或人血清中,37 °C 温育 120 min,取 250 μl 样品与 250 μl 乙腈混合,2 000 r/min 室温离心 2 min(离心半径 1 cm),取上层清液经过无菌滤膜过滤,采用 HPLC 检测其稳定性。(2)logP 测定。将 500 μl 用 PBS 稀释的样品(约 7.4 MBq)加入至 500 μl 正辛醇中;充分混合,室温下涡旋 2 min,2 000 r/min 离心 3 min(离心半径 1 cm);静置后,每层各取 100 μl,用 γ 计数器测定其放射性计数,计算 logP。

4.  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 细胞摄取和抑制实验。用质量分数 0.25%胰蛋白酶溶液消化三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞。根据实验方案,将 MDA-MB-231 细胞( $1\times 10^6$ /管)分成 3 组各 3 管。第 1 组为阳性组,加入 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2(1~2 μl,  $3.7\times 10^{-2}$  MBq);第 2 组为抑制组,实验前 30 min 加入 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2(100 μl, 50 μmol/L),再加入 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2(1~2 μl,  $3.7\times 10^{-2}$  MBq);第 3 组不加细胞,直接加入 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2(1~2 μl,  $3.7\times 10^{-2}$  MBq)作为对照组对照。所有样品在体积分数 5% CO<sub>2</sub> 和 37 °C 下培养 15、30、60 和 120 min。在每个时间点,细胞在冷 PBS(500 μl)中洗涤 2 次,离心(12 000 r/min, 3 min, 离心半径 1 cm),丢弃上清液。用 γ 计数器测定采集细胞的放射性计数,计算百分加样活度(percentage of applied radioactivity, %AR)。

5. 荷瘤裸鼠 microPET 显像。用异氟烷和氧气混

合物麻醉小鼠,俯卧位置于 microPET 仪中。取 3 只荷瘤裸鼠(实验组),经尾静脉每只分别注射 100~200 μl(3.7~7.4 MBq) $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2,并于注射后 30、60、90 和 120 min 行静态 PET 显像。使用德国 Siemens IRW 软件分析重建后的图像,计算每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。在阻断实验中,提前 30 min 向荷瘤裸鼠( $n=3$ ;阻断组)按体质量注射 5 mg/kg NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2,再注射 100~200 μl(3.7~7.4 MBq) $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2,于注射后 30、60 和 90 min 行静态 PET 显像。阻断实验显像分析同实验组。

6. 统计学处理。采用 Origin 8.5 软件行数据分析和绘图。符合正态分布的定量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。2 组间比较采用两独立样本  $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 产物的标记优化和质量控制。 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的放射合成路线见图 1。标记时间约 30 min,优化后的标记产率为(33.8±2.1)%(未衰变校正, $n=8$ ),放化纯>96%,比活度(11.1±3.2) GBq/μmol。 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的放射性峰保留时间为 21.6 min,NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的紫外吸收峰保留时间为 19.9 min。当前体量为 60 μg、pH 值为 4~5 时,探针标记产率超过 30%。

2. 产物的体外稳定性和 logP。37 °C 下温育 120 min 后,产物在 PBS 和人血清中仍保持稳定,放化纯均>93%。产物 logP 为-1.43±0.05,表明其为亲水性小分子肽。

3. 细胞摄取和抑制实验。阳性组 MDA-MB-231 细胞对 $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的摄取从注射后 15 min 的(0.11±0.03) %AR/ $10^6$  个细胞增加至注射后 120 min 的(1.77±0.28) %AR/ $10^6$  个细胞。同时,抑制组细胞摄取从 15 min 时的(0.07±0.05) %AR/ $10^6$  个细胞增至 120 min 时的(0.76±0.07) %AR/ $10^6$  个细胞。与阳性组相比,在 120 min 时,抑制组细胞摄取减少至 43%( $t=4.30$ ,  $P=0.032$ ),表明 MDA-MB-231 细胞对该探针具有良好的特异性摄取。

4. 荷瘤裸鼠 microPET 显像(图 2)。注射探针后 30、60、90、120 min,实验组 BALB/c 裸鼠膀胱和肝内有较高的显像剂浓聚,表明探针主要通过肝和泌尿系统排泄。注射后 60 和 90 min,实验组小鼠肿瘤摄取分别为(1.94±0.21)和(1.15±0.25) %ID/g;

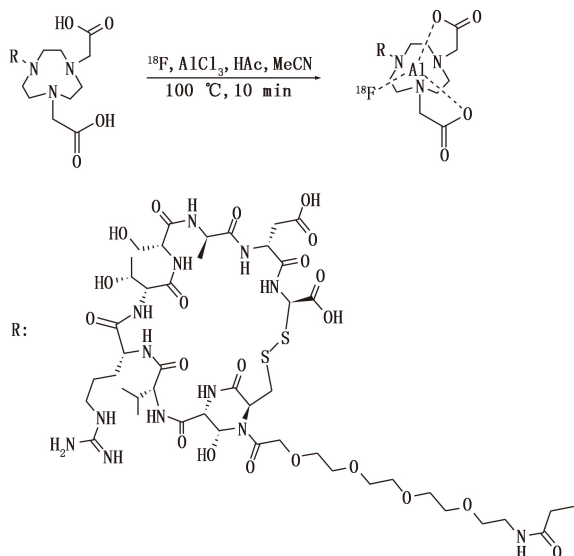


图 1  $^{18}\text{F}$ -AIF-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-(聚乙二醇)<sub>4</sub>-ZD2 (NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2) 的合成路线图。HAc 为乙酸, MeCN 为乙腈

阻断组小鼠肿瘤摄取分别为  $(0.43 \pm 0.09)$  和  $(0.61 \pm 0.11)$  %ID/g ( $t = 3.18, P = 0.006; t = 2.78, P = 0.014$ )。注射后 90 min, 实验组小鼠肿瘤/肌肉比值达  $3.80 \pm 0.25$ , 阻断组肿瘤/肌肉比值为  $2.31 \pm 0.13$  ( $t = 4.30, P = 0.014$ )。注射后 60 和 90 min, 阻断组的肿瘤放射性摄取 (%ID/g) 分别为实验组的 22% 和 53%, 表明探针在荷瘤裸鼠体内明显受抑。

## 讨 论

EDB-FN 在多种肿瘤中过度表达<sup>[6-7]</sup>。三阴性乳腺癌侵袭程度高, 早期发现对肿瘤治疗有重要价值。

尽管针对三阴性乳腺癌, 研究者已制备荧光分子探针西妥昔单抗克隆抗体 (QD-Cetuximab) 和  $^{188}\text{Re}$ -环九肽探针<sup>[8-9]</sup>, 但制备和应用均有一定的局限性, 因此需设计能够满足早期监测三阴性乳腺癌的小分子 PET 探针。

本课题组前期通过噬菌体展示肽库筛选出 EDB-FN 靶向的小分子肽 ZD2, 利用  $^{99}\text{Tc}^m$ -联胍尼克酰胺 (hydrazinonicotinamide, HYNIC)-ZD2 成功对 EDB-FN 阳性乳腺癌小鼠进行 SPECT 显像<sup>[10]</sup>。本研究对小分子肽 ZD2 结构进行修饰, 引入 PEG 和 NOTA 环结构, 得到 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 标记完成的探针  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 在 PBS 和人血清中温育 120 min 后放化纯均 >93%, logP 为  $-1.43 \pm 0.05$ , 提示具有良好的稳定性和亲水性。本研究通过一步  $\text{Al}^{18}\text{F}$  螯合标记的方法, 经 Sep-pak C18 柱纯化后, 无需 HPLC 分离即可简单高效地制备 PET 探针  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 将 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 (60~80 μg) 和  $\text{AlCl}_3$  (10~12 nmol) 置于真空瓶中可制备冻干粉试剂盒, 方便实验室制备产品, 满足实验显像研究需求。

体外细胞摄取结果表明, MDA-MB-231 肿瘤细胞对探针  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 的摄取从注射后 15 min 的  $(0.11 \pm 0.03)$  %AR/ $10^6$  个细胞上升至 120 min 时的  $(1.77 \pm 0.28)$  %AR/ $10^6$  个细胞。

在 microPET 显像研究中, 实验组 MDA-MB-231 荷瘤裸鼠在注射后 60 min 出现较高的肿瘤摄取, 并持续至注射后 120 min。注射后 60~90 min, 尽管肿瘤摄取降低, 但肿瘤/肌肉比值升高至  $3.80 \pm 0.25$ 。  $^{18}\text{F}$ -

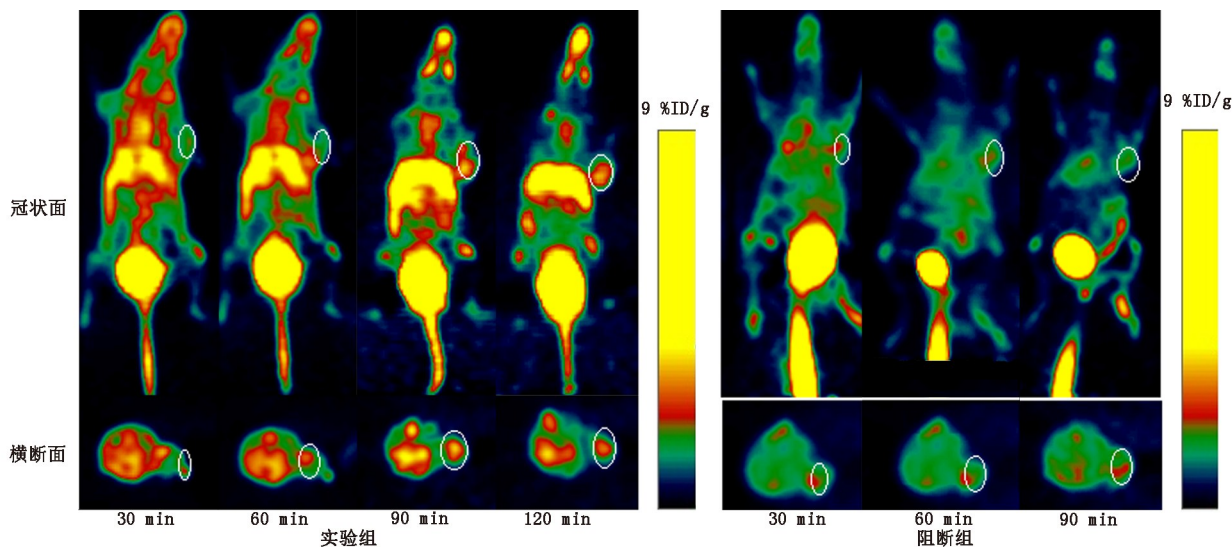


图 2 显像剂注射后不同时间三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 荷瘤裸鼠 microPET 显像图 (每组 3 只小鼠)。实验组和阻断组均注射  $^{18}\text{F}$ -AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 阻断组提前 0.5 h 注射过量 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2, 注射后 60、90 和 120 min, 探针主要聚集于肿瘤处 (椭圆示), 相同时间点阻断组摄取明显降低。%ID/g 为每克组织百分注射剂量率

AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 为亲水性探针,因此初期在非特异性器官(主要在肝肾和肠道等代谢器官)中有高摄取,随时间变化清除速度加快,靶本比逐渐升高,表明探针具有较好的靶向性。体内阻断实验显示,通过与未标记的 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 共注射,在注射后 60 和 90 min,阻断组的肿瘤放射性摄取(%ID/g)分别为对照组的 22%和 53%,提示肿瘤对该探针有较高的特异性摄取。同时,肝脏摄取明显受抑,这是因为 NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 通过肝肾代谢,抑制了<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 摄取。

<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2 在三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤模型中具有较高的肿瘤摄取、快速清除率和较高的肿瘤/肌肉比值,提示其在筛查 EDB-FN 过度表达的三阴性乳腺癌中具有潜在的应用价值。与其他已开发的 EDB-FN 靶向显像探针相比,该探针放射性标记方法简单,可高活度合成,易满足常规 PET 显像使用。但该探针注射后 90 min 肝肾摄取较高,这限制了其在肝肾部位肿瘤的显像应用。后期需进一步优化探针结构,降低其在肝肾部位的摄取,以提高显像效果。

综上,本研究采用一步 Al<sup>18</sup>F 标记方法,在 30 min 内制备了靶向 EDB-FN 的探针<sup>18</sup>F-AIF-NOTA-PEG<sub>4</sub>-ZD2,放化产率高,放化纯高。探针在体外具有良好的稳定性和亲水性,对三阴性乳腺癌裸鼠 microPET 显像效果较好,具有良好的肿瘤细胞摄取和较高的肿瘤/肌肉比值。该小分子肽 PET 探针简单、经济、可制备成冻干粉试剂盒,具有一定的临床应用价值。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 陈礼平:研究实施、论文撰写;杨小春、缪银杏:研究实施、数据采集;黄洪波、张雨:数据采集、动物显像;林建国、冯国开、张伟光:研究指导、论文修改;郁春景:研究指导、经费支持

## 参 考 文 献

[1] 周淑玲,杨文涛.三阴性乳腺癌的临床病理特征及分子研究进展[J].中国癌症杂志,2013,(8):603-608. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2013.08.007.

Zhou SL, Yang WT. Advance of clinicopathological and molecular research of triple negative breast cancer[J]. Chin Oncol, 2013, (8): 603-608. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2013.08.007.

[2] Zollinger AJ, Smith ML. Fibronectin, the extracellular glue[J]. Matrix Biol, 2017, 60-61: 27-37. DOI:10.1016/j.matbio.2016.07.011.

[3] Ayat NR, Vaidya A, Yeung GA, et al. Effective MR molecular imaging of triple negative breast cancer with an EDB-fibronectin-specific contrast agent at reduced doses[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1351. DOI:10.3389/fonc.2019.01351.

[4] Han Z, Zhou Z, Shi X, et al. EDB fibronectin specific peptide for prostate cancer targeting[J]. Bioconjug Chem, 2015, 26(5): 830-838. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00178.

[5] Liu S, Liu H, Jiang H, et al. One-step radiosynthesis of <sup>18</sup>F-AIF-NOTA-RGD<sub>2</sub> for tumor angiogenesis PET imaging[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38(9): 1732-1741. DOI:10.1007/s00259-011-1847-4.

[6] Gao S, Qin J, Sergeeva O, et al. Synthesis and assessment of ZD2-(<sup>68</sup>Ga-NOTA) specific to extradomain B fibronectin in tumor microenvironment for PET imaging of pancreatic cancer[J]. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 9(5): 216-229.

[7] Han Z, Sergeeva O, Roelle S, et al. Preparation and evaluation of ZD2 peptide <sup>64</sup>Cu-DOTA conjugate as a positron emission tomography probe for detection and characterization of prostate cancer[J]. ACS Omega, 2019, 4(1): 1185-1190. DOI:10.1021/acso-mega.8b02729.

[8] 汪文霞,刘振,盖永康,等.靶向 EGFR 可见光量子点用于三阴乳腺癌显像的实验研究[J].中华核医学与分子影像杂志,2020,40(5):260-267. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00214. Wang WX, Liu Z, Gai YK, et al. Visible light emitted quantum dots targeting EGFR in triple-negative breast cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(5): 260-267. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00214.

[9] 陈萱,周洁,刘雪昂,等.不同标记方法对<sup>188</sup>Re-环九肽新型探针靶向三阴性乳腺癌的影响[J].中华核医学与分子影像杂志,2018,38(10):681-684. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.10.008. Chen X, Zhou J, Liu XA, et al. The effect of c(CGRRAGGSC) labeled with <sup>188</sup>Re using different methods on targeting the triple-negative breast cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(10): 681-684. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.10.008.

[10] Ye XX, Zhao YY, Wang Q, et al. EDB fibronectin-specific SPECT probe <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-ZD2 for breast cancer detection[J]. ACS Omega, 2017, 2(6): 2459-2468. DOI:10.1021/acso-mega.7b00226.

(收稿日期:2021-12-16)