

^{68}Ga 标记靶向 Nectin-4 双环肽的制备及乳腺癌显像研究

李励琦¹ 徐悦² 潘栋辉² 严骏杰² 王辛宇² 陈重阳² 王立振² 杨敏² 徐宇平²

¹江南大学附属医院甲状腺乳腺外科,无锡 214122;²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

通信作者:徐宇平, Email: xuyuping@jsinm.org

【摘要】 目的 制备一种新型 ^{68}Ga 标记靶向脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4 (PVRL4, 又称 Nectin-4) 双环肽, 并对其用于乳腺癌显像的可行性进行评价。方法 合成生物素 (Biotin) 修饰的靶向 Nectin-4 双环肽 (简称为 BMIC) Biotin-BMIC, 通过体外细胞染色实验对其靶向性进行初步评价。双环肽 BMIC 经 1,4,7-三氮杂环壬烷 -1,4-二乙酸 (NODA) 修饰制得标记前体 NODA-BMIC, 经一步法标记制备靶向 Nectin-4 探针 ^{68}Ga -NODA-BMIC。应用荷乳腺癌小鼠活体 microPET 显像结合体外实验对该探针显像性能进行考察。采用两独立样本 *t* 检验、重复测量方差分析处理数据。结果 细胞荧光染色初步表明, 荧光标记的双环肽 Biotin-BMIC 在 Nectin-4 阳性 BT474 乳腺癌细胞上较 Nectin-4 阴性 MDA-MB-231 乳腺癌细胞高度聚集。 ^{68}Ga -NODA-BMIC 未校正产率可达 $(71.5 \pm 2.2)\%$, 放化纯 $> 95\%$ 。比活度 $> 3 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ 。温育 10、30、60 和 120 min 后, BT474 乳腺癌细胞较 MDA-MB-231 乳腺癌细胞均有高放射性摄取 ($F = 1302.00, P < 0.001$)。荷瘤鼠 ^{68}Ga -NODA-BMIC microPET 显像表明, BT474 移植瘤较 MDA-MB-231 移植瘤显影清晰, 且对比度良好。注射探针后 10、30、60 和 120 min, BT474 与 MDA-MB-231 移植瘤摄取差异有统计学意义 ($F = 1826.00, P < 0.001$), 其中注射后 60 min BT474 移植瘤的摄取值为 (5.03 ± 0.14) 每克组织百分注射剂量率 ($\% \text{ID}/\text{g}$), 显著高于 MDA-MB-231 移植瘤对应值 [$(0.19 \pm 0.04) \% \text{ID}/\text{g}; t = 79.40, P < 0.001$]。BT474 肿瘤/肌肉 (T/M) 比值高于 MDA-MB-231 ($F = 222.00, P < 0.001$), 其中注射后 60 min 前者 T/M 比值为 24.75 ± 3.10 , 显著优于后者对应值 ($1.30 \pm 0.15; t = 14.31, P = 0.002$)。体内显像结果与离体免疫组织化学分析一致。结论 新型靶向 Nectin-4 双环肽 PET 探针 ^{68}Ga -NODA-BMIC, 合成简便, 标记产率和放化纯满意。探针体内显像性能佳, 靶组织显影清晰, 可能在乳腺癌诊疗中发挥独特作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; 肽类, 环; 同位素标记; 镓放射性同位素; 肿瘤细胞, 培养的; 小鼠

基金项目: 江苏省卫生健康委重点项目 (ZD2021005); 江苏省自然科学基金 (BK20231141); 无锡市“太湖之光”科技攻关 (医疗卫生技术攻关) 项目 (Y20212050)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20240703-00244

Synthesis of a ^{68}Ga -labeled bicyclic peptide targeting Nectin-4 and its application research in breast cancer imaging

Li Liqi¹, Xu Yue², Pan Donghui², Yan Junjie², Wang Xinyu², Chen Chongyang², Wang Lizhen², Yang Min², Xu Yuping²

¹Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ²NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

Corresponding author: Xu Yuping, Email: xuyuping@jsinm.org

【Abstract】 Objective To prepare a novel ^{68}Ga -labeled bicyclic peptide targeting poliovirus receptor related protein 4 (PVRL4, Nectin-4), and evaluate its feasibility for breast cancer imaging via *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods** A Biotin-modified bicyclic peptide targeting Nectin-4, Biotin-BMIC, was synthesized, and its targeting properties were preliminarily evaluated by *in vitro* cell staining experiments. BMIC was modified by 1,4,7-triazonane-1,4-diacetic acid (NODA) and the labeling precursor NODA-BMIC was prepared. A potential PET probe targeting Nectin-4, ^{68}Ga -NODA-BMIC was prepared by one-step labeling strategy. The imaging properties of the probe were investigated by *in vivo* microPET imaging and *in vitro* experiments in mice bearing breast tumors. Data were analyzed by independent-sample *t* test and repeated measures analysis of variance. **Results** Fluorescence staining of the cells showed that the fluorescently labeled bicyclic peptide, Biotin-BMIC, was highly aggregated in Nectin-4 positive BT474 breast

cancer cells compared to those in Nectin-4 negative MDA-MB-231 cells. The uncorrected yield of ^{68}Ga -NODA-BMIC was $(71.5\pm 2.2)\%$ and the radiochemical purity was greater than 95%. The specific activity was greater than $3\text{ GBq}/\mu\text{mol}$. After incubation 10, 30, 60 and 120 min, higher radioactivity uptakes were found in BT474 breast cancer cells compared to those in MDA-MB-231 breast cancer cells respectively ($F=1\ 302.00$, $P<0.001$). MicroPET imaging showed that the BT474 xenograft tumors were clearly visible with favorable contrast. A significant statistical difference in uptakes between BT474 and MDA-MB-231 xenograft tumor uptake at 10, 30, 60, and 120 min after probe injection respectively was existed ($F=1\ 826.00$, $P<0.001$). At 60 min postinjection, the uptake value of BT474 tumors was (5.03 ± 0.14) percentage activity of injection dose per gram of tissue ($\%ID/g$), which was significantly higher than that of MDA-MB-231 tumors ($(0.19\pm 0.04)\%ID/g$; $t=79.40$, $P<0.001$). Meanwhile, the tumor-to-muscle ratios in the former were also greater than those in the latter ($F=222.00$, $P<0.001$). At 60 min postinjection, the tumor-to-muscle ratio in the former was significantly higher than that in the latter (24.75 ± 3.10 vs 1.30 ± 0.15 ; $t=14.31$, $P=0.002$). The results were consistent with the immunohistochemistry staining. **Conclusions** A novel bicyclic peptide PET probe targeting Nectin-4, ^{68}Ga -NODA-BMIC, is easy to be synthesized and owns satisfactory labeling yield and radiological purity. The imaging performance is good and the target tissues could be visualized. It may play a unique role in the diagnosis and treatment of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Peptides, cyclic; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Tumor cells, cultured; Mice

Fund program: Jiangsu Provincial Healthcare Commission Key Projects (ZD2021005); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20231141); Wuxi "Light of Taihu Lake" Science and Technology Research (Medical and Health Technology Research) Project (Y20212050)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240703-00244

乳腺癌是威胁女性健康的首位恶性肿瘤^[1]。靶向治疗可提高患者的生存率及生活质量。近年来,新型乳腺癌靶点已被发现并用于乳腺癌诊疗^[2]。脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4 (poliovirus receptor related protein 4, PVRL4; 又称 Nectin-4) 为新发现的细胞黏附分子,其在正常组织中低表达,但在乳腺癌等实体肿瘤中异常高表达^[3-4]。研究表明,Nectin-4 表达与乳腺癌的病理分级呈正相关,且高表达 Nectin-4 的肿瘤患者预后较差^[3,5]。因此,Nectin-4 是乳腺癌诊疗的潜在生物标志物。

血清学酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 Nectin-4 操作简便,但其灵敏度和特异性较低。以 PET 为代表的分子影像可为疾病早期诊断、治疗药物作用机制探索及疗效评价等提供客观信息^[6]。

多肽是靶向肿瘤受体探针的理想载体^[7-8]。临床前研究显示, ^{68}Ga 标记的双环肽 ^{68}Ga -N188 与 Nectin-4 高度亲和,且在 Nectin-4 阳性尿路上皮癌移植瘤中呈特异性摄取^[9]。本研究拟对其进行修饰,制备新型潜在靶向 Nectin-4 PET 探针 ^{68}Ga -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二乙酸-靶向 Nectin-4 双环肽 (1,4,7-triazonane-1,4-diacetic acid-bicyclic peptide targeting Nectin-4, NODA-BMIC),并通过体内外实验考察该探针用于乳腺癌 Nectin-4 特异性显像的可行性。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要材料与仪器。电子天平 (Sartorius 公司,

德国); C18 固相萃取柱 (Waters 公司, 美国); 放射性核素活度计量仪 (Capintec 公司, 美国); microPET 仪 (Inveon, Siemens 公司, 德国); 小动物麻醉机 (SAR-830/P 型, CWE 公司, 美国); 倒置荧光显微镜 (TH4-200 型, Olympus 公司, 日本); 质谱仪 (ZQ2000 型, Waters 公司, 美国); 半制备型高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (Waters 公司, 美国), 固定相为半制备型 C18 高效液相色谱柱 ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm}\times 10\ \text{mm}$, Phenomenex, 美国), 流动相 A 为含体积分数 0.1% 三氟乙酸的水、B 为含体积分数 0.1% 三氟乙酸的乙腈, 洗脱梯度: 0~2 min 为 95% A, 2.01~32 min 为 95%~35% A, 32.01~35 min 为 35% A, 流速为 $5\ \text{ml}/\text{min}$; 分析型 HPLC 仪 (Waters 公司, 美国), 固定相为分析型 C18 高效液相色谱柱 ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, Phenomenex, 美国), 流动相、梯度条件与制备型 HPLC 一致, 流速为 $1\ \text{ml}/\text{min}$ 。

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器购于德国 ITG 公司, 多功能螯合剂 2,2'-(7-(1-羧基-4-(4-异硫氰酸苄基)氨基)-4-氧代丁基)-1,4,7-三嗪-1,4-二基)二乙酸 (2,2'-(7-(1-carboxy-4-(4-isothiocyanatobenzyl) amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl) diacetic acid, p-NCS-benzyl-NODA-GA) 购于上海百灵威化学技术有限公司, 纯度 > 95%。靶向 Nectin-4 多肽 (peptide targeting Nectin-4, MIC) 及生物素修饰产物 Biotin-MIC 均购自上海楚肽生物科技有限公司, 纯度 > 95%; 异氟烷购自上海雅培制药有限公司; 其他试剂

均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

2. 实验细胞与动物。BT474、MDA-MB-231 乳腺癌细胞购自中国上海细胞库。雌性重度免疫缺陷 NCG 小鼠 6 只,6~8 周龄,体质量(24±1) g,购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司。雌性 BALB/c 小鼠 12 只,6~8 周龄,体质量(21±2) g,购于常州卡文斯实验动物有限公司。小鼠均在无特殊病原体环境饲养。动物实验经江苏省原子医学研究所伦理委员会批准(JSINM-2024-039)。实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2024-0016。

二、实验方法

1. 双环肽 BMIC 及 Biotin-BMIC 的制备。BMIC 的合成路线见图 1。室温下将多肽 MIC 与 1,3,5-三丙烯酸基六氢-1,3,5-三嗪(1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine, TATA)按 1:1.3 的物质的量比在 1 mol/L 碳酸氢铵(NH₄HCO₃)的水溶液中反应 60 min。然后加入 1 mol/L L-半胱氨酸盐酸盐溶液反应 60 min。采用半制备型 HPLC 纯化,收集馏分,冻干制得 BMIC。Biotin-BMIC 由 Biotin-MIC 制得,制备方法同上。采用质谱和 HPLC 确证结构,并测定纯度。

2. 标记前体 NODA-BMIC 的制备。合成路线见图 1。称取 BMIC (2.70 mg, 1.25 μmol) 和 p-NCS-benzyl-NODA-GA (0.78 mg, 1.50 μmol) 溶解于二甲基亚砜中,混匀后加入 N,N-二异丙基乙胺,40 °C 反应过夜。采用半制备型 HPLC 进行纯化。收集馏分,冻干。采用质谱和 HPLC 确证结构,并测定纯度。

3. ⁶⁸Ga-NODA-BMIC 的制备。合成路线见图 1。称取 NODA-BMIC 100 μg,加水溶解至 1.5 ml 离心管中。用 0.05 mol/L 盐酸溶液淋洗 ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga 发生器,收集 1 ml ⁶⁸Ga 淋洗液(185 MBq),加入 50 μl 1 mol/L 乙酸钠调节 pH 值至 3~4,然后将混合物转移到上述离心管中。混匀,60 °C 反应 10 min。冷却,5 ml 水稀释后注入活化的 C18 固相萃取柱纯化。使用 0.3 ml 10 mmol/L 盐酸乙醇溶液淋洗得到标记产

物 ⁶⁸Ga-NODA-BMIC。生理盐水稀释后,经 0.22 μm 滤膜过滤至无菌西林瓶中,采用 HPLC 测定放化纯和比活度。

4. 体外稳定性研究。取 100 μl 5 MBq ⁶⁸Ga-NODA-BMIC 溶液,分别与 300 μl 鼠血浆和 300 μl PBS 于 37 °C 温育,定期取样检测放化纯。PBS 直接取样以 HPLC 仪测定放化纯;血浆与等量乙腈混合,室温离心(速率 10 000 转/min,离心半径 4 cm)30 s 收集上清液,0.22 μm 滤膜过滤后,采用 HPLC 检测其稳定性。

5. 蛋白免疫印迹(Western blot)分析。取生长期 BT474 和 MDA-MB-231 细胞,参考文献[10]进行 Western blot 分析。往每个泳道添加 20 μg 细胞裂解蛋白和体积分数 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。分离后,使用亲水聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)薄膜进行跨膜。用特异性 Nectin-4 抗体(1:1 500,武汉三鹰生物技术有限公司)4 °C 温育过夜。将山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗抗体(1:1 000,上海碧云天生物技术股份有限公司)与膜室温温育 2 h。PBS 冲洗后,采用 BeyoECL Plus Western blot 检测系统(上海碧云天生物技术股份有限公司)进行条带可视化检测,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体作为对照。利用 ImageJ 软件对灰度值进行量化分析。

6. 流式细胞术分析。分别将 BT474 和 MDA-MB-231 细胞悬浮于 PBS 中,浓度为 1×10⁶ 个细胞/100 μl。用 0.2 μg Nectin-4/PVRL4 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)对细胞进行染色。固定液封闭后将 Alexa Fluor 488 偶联的 AffiniPure 山羊抗兔 IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司),以 1:1 500 的比例稀释,进行二抗温育。使用 FlowJo V10 软件进行数据分析。

7. 免疫荧光染色实验。将 BT474 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞铺放在 24 孔板(2×10⁵ 个/孔)中,37 °C 温育 24 h。培养基去除后,PBS 洗涤,固定液封闭

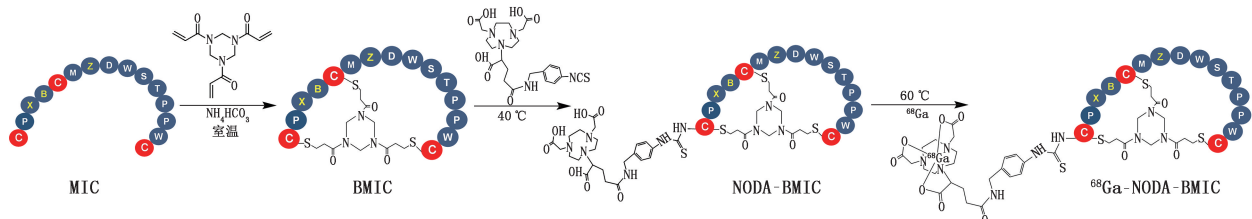


图 1 ⁶⁸Ga-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二乙酸(NODA)-靶向脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4(Nectin-4)双环肽(BMIC)的合成路线。MIC 为靶向 Nectin-4 多肽;B=D-天冬氨酸,C=半胱氨酸,D=天冬氨酸,M=蛋氨酸,P=脯氨酸,S=丝氨酸,T=苏氨酸,W=色氨酸,X=3-(1-萘基)-L-丙氨酸,Z=高精氨酸

后,添加 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Biotin-BMIC 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的链霉抗生物素蛋白[生工生物工程(上海)股份有限公司]以 1:300 比例稀释后与细胞在黑暗环境中温育 30 min。PBS 冲洗后,每孔加入稀释的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液,室温下温育 2~5 min。倒置荧光显微镜观察并采集图像。使用 ImageJ 软件进行分析。

8. 体外细胞摄取实验。分别将 BT474 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞平铺在 24 孔板上温育过夜。PBS 洗涤后加入 37 kBq ^{68}Ga -NODA-BMIC, 平行操作 3 次。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下再次温育。分别在 10、30、60 和 120 min 时,PBS 漂洗细胞 3 次,并用 0.1 mol/L NaOH 溶解。收集溶液,通过 γ 测量仪测定剩余放射性活度。应用加入的总放射性计数对细胞摄取进行归一化,表达值为摄取百分比(percentage absorbed dose, %AD)/ 10^5 个细胞。采用 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ BMIC 进行阻断摄取实验。

9. 荷瘤鼠 microPET 显像。将 1×10^7 个 BT474 或 MDA-MB231 乳腺癌细胞植入每只雌性 NCG 小鼠的右腋窝。正常饲养,待肿瘤体积为 100~300 mm^3 时用于后续动物实验。

荷瘤鼠经体积分数 2%异氟烷麻醉后置于 microPET 仪上,尾静脉注射 200 μl 3.7 MBq ^{68}Ga -NODA-BMIC 生理盐水溶液。注射探针后 10、30、60 和 120 min 进行 10 min 静态扫描。参照文献[11-13]中的方法进行图像重建,并计算肿瘤和主要器官的每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

10. 正常小鼠生物分布。取 BALB/c 小鼠,随机抽签法分成 3 组。每组 4 只,尾静脉注射 200 μl 3.7 MBq ^{68}Ga -NODA-BMIC 生理盐水溶液。分别于注射后 30、60 和 120 min 脱颈处死小鼠,取血液、心、肝、脾、肺、肾等主要脏器,测定质量及放射性计数,计算 %ID/g。

11. 病理分析。荷瘤鼠显像后处死,取瘤体置于固定液中放置 48 h,石蜡包埋。脱水、浸泡和包埋后进行常规 HE 染色处理。另取肿瘤切片,滴加鼠抗人 Nectin-4 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 冲洗后,滴加鼠兔通用二抗(上海碧云天生物技术股份有限公司),室温温育 15 min 后,苏木素染色及封固。光学显微镜下观察染色结果,并对数据进行分析。

三、统计学处理

采用 IBM SPSS 22.0 软件分析数据,符合正态

分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。流式细胞分析组间数据比较采用两独立样本 t 检验,细胞摄取及 microPET 显像定量分析组间数据比较采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ^{68}Ga -NODA-BMIC 的制备与稳定性研究。双环肽 BMIC 的产率为 75%,纯度 >90%。相对分子质量测量值为 2 157.90,与理论计算值(2 157.47)相吻合。HPLC 检测表明,产物纯度 >90%。生物素修饰双环肽 Biotin-BMIC 的产率为 70%,纯度 >90%。相对分子质量测量值为 2 383.04,与理论计算值(2 383.74)相吻合。标记前体 NODA-BMIC 的产率为 50%,纯度 >90%。相对分子质量测量值为 2 679.9,与理论计算值(2 679.0)相吻合。

^{68}Ga -NODA-BMIC 制备可在 30 min 内完成,未校正产率为 $(71.5 \pm 2.2)\%$,放化纯 >95%,比活度 >3 GBq/ μmol 。 ^{68}Ga -NODA-BMIC 体外稳定性良好,其在 PBS 和血浆中放置 2 h 后,放化纯仍 >95%。

2. Western blot 分析。Nectin-4 在 BT474 乳腺癌细胞中高度表达,其相对参比蛋白 GAPDH 的表达量为 0.95 ± 0.04 。与之相反,Nectin-4 在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中呈低表达,其相对参比蛋白 GAPDH 的表达量为 0.23 ± 0.07 。

3. 流式细胞术分析。BT474 细胞中荧光信号强度为 (74.5 ± 2.1) 任意单位(arbitrary units, AU),显著高于 MDA-MB-231 细胞对应值 (4.1 ± 0.5) AU ($t = 65.22, P < 0.001$)。

4. 免疫荧光染色实验(图 2)。体外细胞染色结果表明,Biotin-BMIC 与 BT474 乳腺癌细胞温育后荧光强度较高 (0.95 ± 0.04) ,Biotin-BMIC 与 MDA-MB-231 乳腺癌细胞温育后荧光强度微弱 (0.25 ± 0.03) 。

5. 体外细胞摄取实验。如图 3 所示,温育 10、30、60 和 120 min 后,BT474 乳腺癌细胞较 MDA-MB-231 乳腺癌细胞均有高摄取($F = 1 302.00, P < 0.001$)。此外,BT474 乳腺癌细胞摄取也显著高于阻断组 BT474 乳腺癌细胞摄取($F = 2 261.00, P < 0.001$)。温育 60 min 后,BT474 乳腺癌细胞对 ^{68}Ga -NODA-BMIC 的摄取值为 $(0.98 \pm 0.01) \% \text{AD}/10^5$ 个细胞;在过量 BMIC 阻断下,细胞对探针的摄取值降为 $(0.21 \pm 0.05) \% \text{AD}/10^5$ 个细胞;MDA-MB-231 乳腺癌细胞对探针的摄取值为 $(0.19 \pm 0.06) \% \text{AD}/10^5$ 个细胞。

6. 荷瘤鼠 microPET 显像。荷瘤鼠 ^{68}Ga -NODA-

BMIC microPET 显像示人乳腺癌 BT474 移植瘤清晰可见,且与本底对比度良好(图 4),而同期人乳腺癌 MDA-MB-231 移植瘤则显影不清晰。定量分析(表 1)表明,注射⁶⁸Ga-NODA-BMIC 后 10、30、60 和 120 min, BT474 和 MDA-MB-231 移植瘤的摄取值差异有统计学意义($F=1\ 826.00, P<0.001$);其中注射后 60 min BT474 移植瘤摄取值显著高于 MDA-MB-231 移植瘤 [(5.03±0.14)和(0.19±0.04) %ID/g; $t=79.40, P<0.001$]。此外, BT474 肿瘤/肌肉(tumor/muscle, T/M)比值高于 MDA-MB-231 对应值($F=222.00, P<0.001$),其中注射后 60 min,前者 T/M 比值显著优于后者(24.75±3.10 和 1.30±0.15; $t=14.31, P=0.002$)。

7.正常小鼠生物分布(表 2)。⁶⁸Ga-NODA-BMIC 在正常 BALB/c 小鼠血液清除迅速,注射后 30 和 120 min 的摄取值分别为(1.31±0.17) %ID/g 和(0.34±0.07) %ID/g。其在肝脏中有少量摄取,其他除肾外的正常器官摄取均较低,注射后 60 min,对应的摄取值小于 1 %ID/g。肾的摄取最高,提示⁶⁸Ga-NODA-BMIC 主要通过肾排泄。

8.病理分析。病理分析显示, BT474 乳腺癌移植瘤细胞质和细胞膜被染成棕色,细胞核被染成蓝色,提示 BT474 乳腺癌移植瘤的 Nectin-4 表达阳性(图 5A)。阴性对照 MDA-MB-231 移植瘤仅细胞核呈蓝色,细胞质和细胞膜未被染色(图 5B),提示

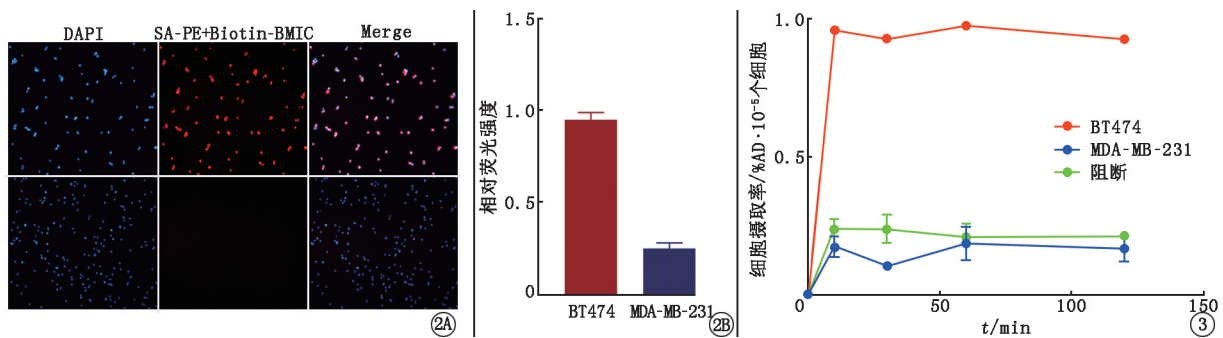


图 2 BT474(上排)和 MDA-MB-231(下排)乳腺癌细胞免疫荧光染色(×10)图(2A)及定量分析(2B)。可见 Biotin-BMIC 与 BT474 乳腺癌细胞温育后荧光强度较高, Biotin-BMIC 与 MDA-MB-231 乳腺癌细胞温育后荧光强度微弱。Biotin 为生物素, BMIC 为靶向脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4(Nectin-4) 双环肽, DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基咪唑, Merge 为融合, PE 为藻红蛋白, SA 为链霉抗生物素蛋白 图 3 BT474 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞对⁶⁸Ga-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二乙酸(NODA)-BMIC 的摄取。可见 BT474 乳腺癌细胞对⁶⁸Ga-NODA-BMIC 的摄取显著高于阻断组和 MDA-MB-231 细胞摄取。%AD·10⁻⁵个细胞为每 10⁵个细胞的摄取百分比

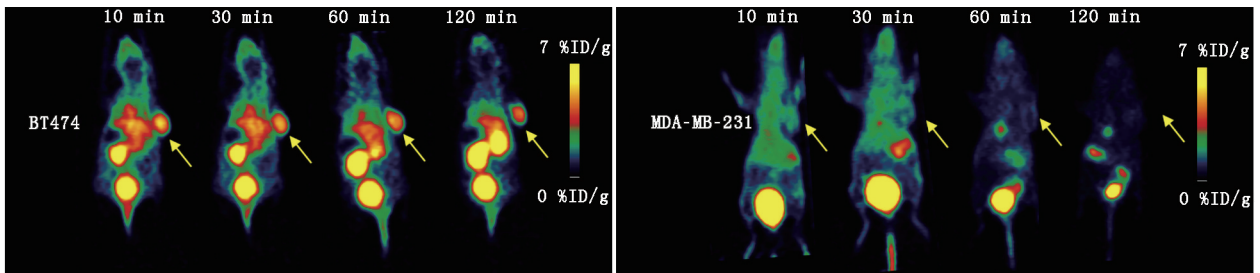


图 4 荷瘤鼠注射⁶⁸Ga-NODA-BMIC 后不同时间点 microPET 显像图(箭头示肿瘤)。⁶⁸Ga-NODA-BMIC 在 BT474 移植瘤中较 MDA-MB-231 肿瘤高度浓聚和滞留; %ID/g 为每克组织百分注射剂量率

表 1 ⁶⁸Ga-NODA-BMIC 注射后不同时间点在荷瘤鼠体内主要器官摄取值(%ID/g; $\bar{x}\pm s$)

器官	BT474				MDA-MB-231			
	10 min	30 min	60 min	120 min	10 min	30 min	60 min	120 min
肿瘤	5.83±0.52	5.75±0.32	5.03±0.14	4.93±0.15	1.23±0.18	0.68±0.03	0.19±0.04	0.15±0.05
肌肉	0.51±0.10	0.38±0.11	0.21±0.03	0.15±0.03	0.39±0.10	0.32±0.09	0.18±0.06	0.11±0.03
肾	18.88±1.05	8.01±1.50	7.04±1.90	6.08±0.97	10.35±1.13	5.85±0.50	5.64±0.90	3.69±0.97
肝	2.22±0.12	2.12±0.24	1.79±0.13	0.90±0.09	1.52±0.10	1.23±0.08	0.60±0.07	0.50±0.11
肿瘤/肌肉	11.50±1.08	15.40±2.10	24.75±3.10	33.26±4.29	2.34±0.55	2.20±0.70	1.30±0.15	1.40±0.29

注:每个时间点荷瘤鼠 3 只; %ID/g 为每克组织百分注射剂量率, BMIC 为靶向脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4(Nectin-4) 双环肽, NODA 为 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二乙酸

表 2 ^{68}Ga -NODA-BMIC 注射后不同时间点在正常 BALB/c 小鼠体内的生物分布 (%ID/g; $\bar{x}\pm s$)

器官	30 min	60 min	120 min
血液	1.31±0.17	0.63±0.08	0.34±0.07
脑	0.10±0.03	0.11±0.01	0.04±0.00
心	1.18±0.14	0.58±0.05	0.22±0.02
肝	2.03±0.14	1.62±0.11	0.82±0.15
脾	0.61±0.16	0.43±0.12	0.21±0.11
肺	1.35±0.28	0.93±0.17	0.51±0.09
肾	19.39±1.27	12.76±1.73	9.81±1.19
胃	1.13±0.39	0.82±0.45	0.24±0.05
肠	1.18±0.11	0.76±0.15	0.32±0.10
肌肉	0.40±0.12	0.28±0.04	0.14±0.03
胰腺	1.29±0.30	0.76±0.21	0.46±0.06
骨	0.47±0.04	0.23±0.08	0.17±0.05

注:每个时间点小鼠 4 只;%ID/g 为每克组织百分注射剂量率, BMIC 为靶向脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4(Nectin-4) 双环肽, NODA 为 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二乙酸

MDA-MB-231 移植瘤的 Nectin-4 表达阴性。

讨 论

Nectin-4 是具有高潜力的癌症治疗新靶点,其可促进正常乳腺上皮细胞向恶性细胞转化,并在肿瘤形成后促进癌组织浸润及远处转移^[14-15]。靶向乳腺癌 Nectin-4 策略为乳腺癌诊疗提供了一种新的可视化和治疗手段。

目前,鲜见靶向 Nectin-4 双环肽类探针用于乳腺癌 PET 显像的报道。高精氨酸(HArg)与精氨酸(Arg)结构相似,差别仅在末端氨基部位。推测将双环肽 N188 中 Arg 取代成 HArg 不会对多肽的亲合力产生显著影响。体外研究表明,将靶向 Nectin-4 双环肽类似物中羧基残基 Hyp¹ 和 Hyp¹⁰ 分别替换成脯氨酸 Pro¹ 和 Pro¹⁰ 后,抑制常数分别对应减小约 70 和 20 倍^[16]。因此,笔者推测将双环肽 N188 中的 Hyp¹³ 替换成 Pro¹³,可能提高多肽与 Nectin-4 亲和性。据此,本研究设计并合成了新型潜在靶向 Nectin-4 双环肽 BMIC 用于乳腺癌诊疗。

体外 Western blot 分析和流式细胞术分析结果

表明,BT474 乳腺癌细胞中的 Nectin-4 水平比 MDA-MB-231 乳腺癌细胞分别高出约 3 和 17 倍 $[0.95\pm 0.04$ 与 0.23 ± 0.07 ; (74.5 ± 2.1) 与 (4.1 ± 0.5) AU],提示 BT474 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞分别为 Nectin-4 阳性和阴性肿瘤细胞。

体外细胞染色实验表明,荧光标记的双环肽在 BT474 乳腺癌细胞上较 MDA-MB-231 乳腺癌细胞高度聚集,且前者荧光强度约为后者的 4 倍 $(0.95\pm 0.04$ 与 $0.25\pm 0.03)$,提示 BMIC 与 Nectin-4 高度亲和。因此,本研究拟对 BMIC 进行核素标记,并通过活体显像实验对其显像性能进行评价。

目前, ^{68}Ga 标记靶向 Nectin-4 双环肽使用 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)为螯合剂。与其相比,NODA 具有更小的环,其对一些特定离子(例如 ^{68}Ga)的螯合效率高于 DOTA。实验证实,使用 NODA 作为螯合剂进行 ^{68}Ga 标记的多环肽 ^{68}Ga -NODA-BMIC,产率高于 ^{68}Ga -N188 对应值 $[(71.5\pm 2.2)\%$ 与 $50.3\%]$ ^[9],这有利于加速靶向 Nectin-4 PET 探针的临床转化。

体外细胞摄取实验进一步证实, ^{68}Ga -NODA-BMIC 与乳腺癌细胞中的 Nectin-4 特异性结合。荷瘤鼠 microPET 显像表明,探针在 BT474 移植瘤中高度滞留,尾静脉注射 ^{68}Ga -NODA-BMIC 后 120 min,肿瘤摄取值 $[(4.93\pm 0.15)\%$ ID/g]为初始(注射 10 min 时)摄取值 $[(5.83\pm 0.52)\%$ ID/g]的 80%以上。MicroPET 显像也发现,注射探针后 10、120 min,BT474 移植瘤对探针摄取较同期 MDA-MB-231 移植瘤 $[(1.23\pm 0.18)$ 、 $(0.15\pm 0.05)\%$ ID/g]分别提高约 5、30 倍。上述研究与体外细胞染色实验及病理分析结果相一致,表明 ^{68}Ga -NODA-BMIC 具有良好的体内 Nectin-4 靶向性。此外,注射探针后 60 min,肝对 ^{68}Ga -NODA-BMIC 的摄取值低于同期 ^{68}Ga -N188 对应值 $[(1.79\pm 0.13)$ 与 $(4.95\pm 0.10)\%$ ID/g],前者肿瘤与肝的摄取比值(约 3)也显著高于后者(约 1)^[9]。高靶-非

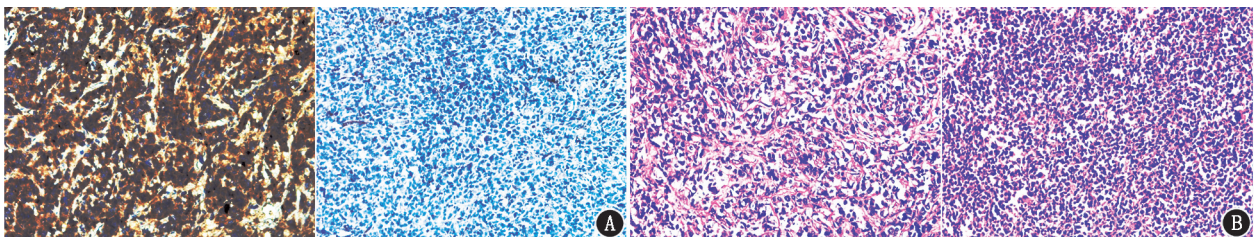


图 5 BT474(左)和 MDA-MB-231(右)乳腺癌移植瘤免疫组织化学[链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法 $\times 10$]图(A)及 HE 染色($\times 10$)图(B)。可见 BT474 乳腺癌移植瘤的脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 4(Nectin-4) 表达呈阳性,MDA-MB-231 移植瘤的 Nectin-4 表达呈阴性

靶比值可能有利于提高腹部转移灶的检测率。正常小鼠分布表明,⁶⁸Ga-NODA-BMIC 在正常组织中快速清除。骨的摄取低于 1 %ID/g,提示该探针在体内稳定性良好。

综上,本研究成功制备一种新型靶向乳腺癌 Nectin-4 PET 双环肽类探针⁶⁸Ga-NODA-BMIC。探针靶向性强,药代性能良好,可能在乳腺癌的精准诊疗中发挥独特作用。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李励琦:研究设计、研究实施、论文撰写;徐悦、王辛宇、王立振:研究实施、数据采集;潘栋辉、严俊杰、陈重阳:数据采集与分析;杨敏:统计学分析、研究指导;徐宇平:论文修改、统计学分析、经费支持、研究指导

参 考 文 献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74 (3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- [2] Colomer R, González-Farré B, Ballesteros AI, et al. Biomarkers in breast cancer 2024: an updated consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology [J]. Clin Transl Oncol, 2024, 26 (12): 2935-2951. DOI: 10.1007/s12094-024-03541-1.
- [3] Chatterjee S, Sinha S, Kundu CN. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): a potential target for cancer therapy [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 174516. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174516.
- [4] Sethy C, Goutam K, Nayak D, et al. Clinical significance of a PVRL 4 encoded gene Nectin-4 in metastasis and angiogenesis for tumor relapse[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(1): 245-259. DOI:10.1007/s00432-019-03055-2.
- [5] Wang H, Sun D, Chen J, et al. Nectin-4 has emerged as a compelling target for breast cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 960: 176129. DOI:10.1016/j.ejphar.2023.176129.
- [6] Schwenck J, Sonanini D, Cotton JM, et al. Advances in PET imaging of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23 (7): 474-490. DOI:10.1038/s41568-023-00576-4.
- [7] Dalm S, Duan H, Iagaru A. Gastrin releasing peptide receptors-targeted PET diagnostics and radionuclide therapy for prostate cancer management: preclinical and clinical developments of the past 5 years[J]. PET Clin, 2024, 19 (3): 401-415. DOI:10.1016/j.cpet.2024.03.004.
- [8] Di Franco M, Zanoni L, Fortunati E, et al. Radionuclide theranostics in neuroendocrine neoplasms: an update[J]. Curr Oncol Rep, 2024, 26(5): 538-550. DOI:10.1007/s11912-024-01526-5.
- [9] Duan X, Xia L, Zhang Z, et al. First-in-human study of the radioligand ⁶⁸Ga-N188 targeting nectin-4 for PET/CT imaging of advanced urothelial carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(17): 3395-3407. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-23-0609.
- [10] Tan S, Ding X, Pan D, et al. Synthesis and characterization of a novel PET tracer for noninvasive evaluation of FGL1 status in tumors[J]. Mol Pharm, 2024, 21 (7): 3425-3433. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00137.
- [11] 王辛宇,刘青峰,刘宇航,等.⁸⁹Zr 标记间充质干细胞的制备及对系统性红斑狼疮小鼠的 PET 监测[J].中华核医学与分子影像杂志, 2023, 43(2): 106-110. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211126-00419.
Wang XY, Liu QF, Liu YH, et al. Preparation of ⁸⁹Zr-labeled mesenchymal stem cells and PET monitoring in mice with systemic lupus erythematosus[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2023, 43 (2): 106-110. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211126-00419.
- [12] 王立振,徐宇平,潘栋辉,等.⁶⁸Ga 标记 HER2 亲和体显像剂的 microPET 显像及生物分布[J].中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40 (9): 538-544. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191011-00221.
Wang LZ, Xu YP, Pan DH, et al. MicroPET and biodistribution of ⁶⁸Ga-labeled human epidermal growth factor receptor 2 binding affibody imaging probe[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40 (9): 538-544. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191011-00221.
- [13] Zhou W, Zhang J, Wang X, et al. Radiolabeled tracing techniques illuminating blood pharmacokinetics in nanomedicine[J]. Nano Biomed, 2024, 16(1): 48-63. DOI:10.26599/NBE.2024.9290048.
- [14] Liu CH, Leu SJ, Lee CH, et al. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies targeting the breast cancer tumor marker nectin-4[J]. Front Immunol, 2024, 14: 1292019. DOI:10.3389/fimmu.2023.1292019.
- [15] Sethy C, Goutam K, Das B, et al. Nectin-4 promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer by regulating CXCR4-LYVE-1 axis[J]. Vascul Pharmacol, 2021, 140: 106865. DOI: 10.1016/j.vph.2021.106865.
- [16] Mudd GE, Scott H, Chen L, et al. Discovery of BT8009: a nectin-4 targeting bicycle toxin conjugate for the treatment of cancer[J]. J Med Chem, 2022, 65 (21): 14337-14347. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00065.

(收稿日期:2024-07-03)