· 免疫 PET/SPECT 显像 ·

靶向表皮生长因子受体单克隆抗体预定位免疫 PET 显像的实验研究

苑陆杰　李慧玲　盖永康　张永学　兰晓莉
华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科、湖北省分子影像重点实验室，武汉 430022
通信作者：兰晓莉，Email：hzslxl@163.com

【摘要】 目的 采用预定位技术在表皮生长因子受体（EGFR）阳性/阴性荷瘤鼠中探索西妥昔单克隆抗体（简称单抗；Cetuximab）靶向 EGFR 免疫 PET 显像的可行性。**方法** 以反式环辛烯（TCO）-*N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS）修饰 Cetuximab 获得 Cetuximab-TCO。以 2,2′-((6-氨基-1-(4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮烷-1-基)己烷-2-基)氮杂二酰基)二乙酸（L-NETA）为螯合剂，制备 ^{68}Ga-L-NETA-四嗪（Tz）分子探针，测定其标记率、稳定性。体外培养基底样乳腺癌细胞 MDA-MB-468（EGFR+）和 MDA-MB-231（EGFR−），进行细胞摄取及阻断实验。用 Balb/c-nu 小鼠建立 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 皮下荷瘤鼠模型；将 50 μg Cetuximab-TCO 注入荷瘤鼠体内，经过不同时间（48、36、24 和 12 h）后再注射 ^{68}Ga-L-NETA-Tz，利用“TCO-Tz”反应（点击化学特异性结合）实现 ^{68}Ga-L-NETA-Tz 与 Cetuximab-TCO 的体内连接；进行小动物 PET 显像及生物分布实验。数据比较采用单因素方差分析。**结果** 成功制备 ^{68}Ga-L-NETA-Tz 分子探针，标记率>95%，2 h 放化纯>95%。体外细胞摄取实验证实了预定位技术的可行性：先后加入 Cetuximab-TCO 与 ^{68}Ga-L-NETA-Tz 后，1 h 时 MDA-MB-468 细胞摄取率可达（0.69±0.04）%。体内 PET 显像及生物分布实验结果示，提前 36 h 注射 Cetuximab-TCO，MDA-MB-468 荷瘤鼠有最高的肿瘤摄取值[（0.77±0.05）每克组织百分注射剂量率（%ID/g），1 h]及最佳的靶/非靶比值（肿瘤/肌肉：4.67±0.46）；给予过量 Cetuximab 的阻断组、未提前注入 Cetuximab-TCO 组及 MDA-MB-231 组肿瘤未见明显摄取[（0.35±0.01）、（0.39±0.05）、（0.45±0.10）%ID/g；F = 15.50，P = 0.002]。**结论** 采用预定位技术，通过先后注射 Cetuximab-TCO 和 ^{68}Ga-L-NETA-Tz，在荷瘤鼠模型中成功进行了靶向 EGFR 免疫 PET 显像，为单抗免疫 PET 显像提供了一种有效的方法。

【关键词】 抗体，单克隆；受体，表皮生长因子；点击化学；同位素标记；镓放射性同位素；正电子发射断层显像术；乳腺肿瘤；小鼠，裸
基金项目：国家自然科学基金（81630049）
DOI：10.3760/cma.j.cn321828-20211124-00418

Pretargeted immunoPET imaging with epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in mouse models

Yuan Lujie, Li Huiling, Gai Yongkang, Zhang Yongxue, Lan Xiaoli
Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Hubei Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China
Corresponding author: Lan Xiaoli, Email: hzslxl@163.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of pretargeting technique for immunoPET with epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody in EGFR positive/negative tumor bearing mice. **Methods** Cetuximab-*Trans*-cyclooctene (TCO) was obtained by modifying Cetuximab with TCO-*N*-hydroxysuccinimide (NHS). 2,2′-((6-amino-1-(4,7-bis-(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl) hexan-2-yl) azanediyl)-diacetic acid (L-NETA) was used as a chelating agent to prepare the radioligand ^{68}Ga-L-NETA-tetrazine (Tz), then the labeling rate and *in vitro* stability of the product were determined. Human basal breast cancer cells MDA-MB-468 (EGFR+) and MDA-MB-231 (EGFR−) were cultured *in vitro*. *In vitro* experiments were performed to explore the specificity of the probe and the feasibility of pretargeting technique. Nude mice (Balb/c-nu) bearing xenografts of the above two cell lines were established. Cetuximab-TCO (50 μg) was injected into the tumor-bearing mice in advance, then ^{68}Ga-L-NETA-Tz was injected at different time points (48, 36, 24 and 12 h), and pretargeting was realized through "click chemistry". Small-animal PET imaging and biodistribution were performed to evaluate pharmacokinetic properties and specificity of the probe. The one-way analysis of variance was used to compare the data. **Results** The ^{68}Ga-

L-NETA-Tz molecular probe was successfully prepared with the labeling yield >95%, and the radiochemical purity was >95% after 2 h. Cetuximab-TCO and ^{68}Ga-L-NETA-Tz were added to MDA-MB-468 cells successively, and the cell uptake rate reached (0.69±0.04)% at 1 h, which demonstrated the feasibility of the pretargeting technique. PET imaging and biodistribution results showed that the best imaging results were obtained in 36 h pre-injection group, in which the tumor uptake was the highest ((0.77±0.05) percentage activity of injection dose per gram of tissue (%ID/g), 1 h) and the tumor/muscle ratio was optimal (4.67±0.46); the tumor uptake in the blocking group, the group without injecting Cetuximab-TCO, and the MDA-MB-231 group were significantly lower ((0.35±0.01), (0.39±0.05), (0.45±0.10) %ID/g; F=15.50, P=0.002). **Conclusions** EGFR targeted immunoPET imaging is successfully performed in mouse models of breast cancer by injecting Cetuximab-TCO and ^{68}Ga-L-NETA-Tz successively. It provides an effective method for immunoPET imaging of monoclonal antibodies.

【**Key words**】 Antibodies, monoclonal; Receptor, epidermal growth factor; Click chemistry; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Positron-emission tomography; Breast neoplasms; Mice, nude

Fund program: National Nature Science Foundation of China (81630049)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211124-00418

放射免疫显像(radioimmunoimaging, RII)是将放射性核素标记的具有靶向性的特异抗体引入体内,并通过核医学设备进行显像的方法,其具有高灵敏、高特异、无创及实时等优点,在肿瘤的早期诊断、评估以及肿瘤发生发展的生物学特性研究等方面有重要作用[1]。但是应用核素直接标记单克隆抗体(简称单抗)显像存在体内结合慢、代谢慢、显像效果不佳、肝脏非特异性摄取较高等缺点,且应用短半衰期核素难以实现[2-3]。

预定位技术采用分开给药的方式,先将抗体注入体内,待其与肿瘤组织充分结合,同时未结合的抗体在血液循环和非靶器官组织中被吞噬或代谢后,再注射放射性核素标记的小分子化合物,使其在体内与抗体特异性结合,达到肿瘤显像且降低本底的目的[4-5]。基于"点击化学"反应的预定位技术已逐渐应用于 RII 中。文献报道四嗪(Tetrazine, Tz)和反式环辛烯(*Trans*-cyclooctene, TCO)之间的反应具有生物正交反应、快速高效和高选择性等优点[6],结构示意图见图 1。因此,本研究组以"TCO-Tz"点击化学反应为基础,通过预定位技术,探索用短半衰期核素^{68}Ga 标记靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的西妥昔单抗(Cetuximab)进行免疫 PET 显像的可行性和特异性。

材料与方法

1.主要材料。细胞、试剂和仪器:人基底样乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);Cetuximab(Merck KGaA,德国);TCO-聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)$_4$-*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)(Click Chemistry Tools,美国);^{68}Ge/^{68}Ga 发生器(Isotope Technologies Garching GmbH,德国);放射性高效液相色谱(radio-high-performance liquid chromatography, radio-HPLC)仪(Shimadzu,日本);γ计数仪(PerkinElmer,美国);小动物 PET(苏州瑞派宁科技有限公司)。雌性 Balb/c-nu 小鼠[70 只,4 周龄,体质量(15±2) g]购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2014-0008],在华中科技大学同济医学院实验动物中心无特殊病原体(specific pathogen-free, SPF)系统中饲养。动物实验操作遵循华中科技大学实验动物管理相关规定。

2. Cetuximab-TCO 的制备和鉴定。Cetuximab 经超滤离心去除甘氨酸等小分子,取 Cetuximab(3 000 μg, 20 nmol)加入溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的 TCO-PEG$_4$-NHS(411 μg,800 nmol)充分混匀,用碳酸盐缓冲液调整 pH 值 为 8.5,置于 4 ℃下反

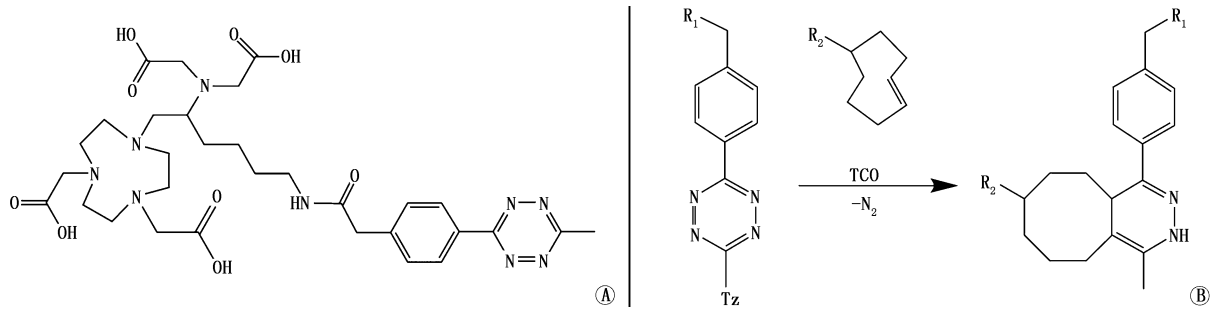

图 1　2,2′-((6-氨基-1-(4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮烷-1-基)己烷-2-基)氮杂二酰基)二乙酸(L-NETA)-四嗪(Tz)结构(A)及"反式环辛烯(TCO)-Tz"反应示意图(B)

应过夜,反应混合物经 5 次超滤离心(4 000 转/min,离心半径 15 cm,离心时间 15 min)除去过量未反应的 TCO-PEG$_4$-NHS,得到 Cetuximab-TCO,经双金鸡纳酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定其浓度。根据文献[7]中方法,测定抗体中连接 TCO 的平均数量。

3. ^{68}Ga-2,2′-((6-氨基-1-(4,7-双(羟甲基)-1,4,7-三氮烷-1-基)己烷-2-基)氮杂二酰基)二乙酸[2,2′-((6-amino-1-(4,7-bis-(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)hexan-2-yl)azanediyl)-diacetic acid, L-NETA]-Tz 的制备和鉴定。用 4 ml 0.05 mol/L 盐酸淋洗^{68}Ge/^{68}Ga 发生器,加入适量醋酸钠(pH = 6.8)将淋洗所得^{68}GaCl$_3$ 的 pH 值调至 4。取 185 MBq ^{68}GaCl$_3$,加入 5 nmol L-NETA-Tz,充分混匀后 100 ℃下反应 10 min,制得^{68}Ga-L-NETA-Tz,产物标记率和血清稳定性(1、2 h)经 radio-HPLC 测定。

4.细胞培养及 EGFR 表达水平测定。MDA-MB-468 细胞用含有体积分数 10%胎牛血清及体积分数 1%青霉素-链霉素双抗的 L15 培养基培养,置于 37 ℃无 CO$_2$ 培养箱中。MDA-MB-231 细胞用含有体积分数 10%胎牛血清及体积分数 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基培养,置于 37 ℃、体积分数 5% CO$_2$ 培养箱中。采用 Western blot 检测细胞的 EGFR 表达水平。

5.体外细胞内化及预定位实验。将 MDA-MB-468 细胞消化重悬,以 1×10^5/孔种植于 24 孔板中,培养过夜待细胞贴壁。(1)细胞内化实验。取 ^{68}Ga-L-NETA-Tz(37 MBq,1 nmol)与 Cetuximab-TCO(150 μg, 1 nmol)混匀后,室温下持续振荡反应 20 min,反应完成后标记混合物经 PD-10 纯化,得到^{68}Ga-L-NETA-Cetuximab。每孔加入 74 kBq ^{68}Ga-L-NETA-Cetuximab,37 ℃下温育不同时间(0.5、1、2 h)后,将放射性培养基吸出置于试管中(上清液)。每孔加入 800 μl 醋酸钠缓冲液(pH=4),37 ℃下温育 10 min 后吸出置于试管中(细胞膜结合部分)[8]。然后每孔各加入 800 μl 1 mol/L NaOH,室温下温育 4 min,待细胞裂解后吸出液体置于试管中(细胞裂解液)。用 γ 计数仪测量上清液、细胞膜结合部分及细胞裂解液的放射性计数。计算细胞摄取率、内化率及细胞膜结合率。

(2)细胞预定位实验。实验组每孔加入 800 μl 含有 Cetuximab-TCO(2 nmol/L)的无血清 L15 培养基,室温温育 1 h 后弃去上清;再每孔加入 800 μl 含有 74 kBq ^{68}Ga-L-NETA-Tz 的 L15 培养基,37 ℃ 温育 1 h。Cetuximab 阻断组加入过量 Cetuximab(100 倍)与 Cetuximab-TCO 共温育(室温),L-NETA-Tz 阻断组加入过量 L-NETA-Tz(100 倍)与^{68}Ga-L-NETA-Tz 共温育(室温),余步骤与实验组相同。同时,设置只加入^{68}Ga-L-NETA-Tz 的对照组。温育完成后吸出放射性上清,用 1 mol/L NaOH 裂解细胞,通过 γ 计数仪测量上清液及细胞裂解液的放射性计数,计算各组细胞摄取率。

6.荷瘤鼠模型的建立。分别将 MDA-MB-468 细胞(1×10^7 个)和 MDA-MB-231 细胞(5×10^6 个)重悬于 100 μl PBS 中,皮下接种于 Balb/c-nu 小鼠右前肢外侧。待肿瘤最大径达 8~10 mm 时,用于在体小动物 PET 显像及生物分布研究。

7.生物分布研究。在注射 Cetuximab-TCO(50 μg, 0.33 nmol)后,对不同预定位时间(48、36、24、12 h)组的 MDA-MB-468 荷瘤鼠(每组 5 只)经尾静脉注射^{68}Ga-L-NETA-Tz(4.44~6.66 MBq),1 h 后麻醉并断颈处死,取出感兴趣组织和器官(血液、脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、小肠、大肠、肌肉、骨和肿瘤),用 γ 计数仪测量放射性计数,经衰减校正后计算每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。同时,设置阻断组[在注射 Cetuximab-TCO 前 1 h 给予过量(50 倍) Cetuximab]、阴性对照组(MDA-MB-231 荷瘤鼠)和未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组(只给予^{68}Ga-L-NETA-Tz),每组 5 只,生物分布研究方法同前。

8.荷瘤鼠的预定位小动物 PET 显像。提前不同的时间(48、36、24、12 h)将 Cetuximab-TCO(50 μg, 0.33 nmol)经尾静脉注射入 MDA-MB-468 荷瘤鼠体内(每个时间组 5 只),经过各预定位时间后每只小鼠再注射^{68}Ga-L-NETA-Tz(5.55 MBq),1 h 后用小动物 PET 显像系统进行静态显像。小鼠显像前给予异氟烷诱导麻醉,显像全程给予异氟烷维持麻醉。阻断组、阴性对照组和未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组的设置同生物分布研究,显像方法同上述步骤。

9.肿瘤免疫组织化学检测。PET 显像结束后,将荷瘤鼠处死并取出肿瘤组织,用体积分数 4%多聚甲醛溶液固定,于 4 ℃放置 24 h 以制备冷冻切片。切片用 PBS 冲洗并用体积分数 3% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 30 min,然后与一抗(兔抗人 EGFR 抗体)在 4 ℃温育过夜,再与二抗[辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记]室温下温育 50 min。切片滴加新鲜配制的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液,用苏木素复染1 min,返蓝液返蓝。切片脱水后

晾干,中性树胶封片。显微镜下随机挑选多个视野拍照采集图像。

10.统计学处理。使用 Prism 6.0 软件进行统计分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析对多组数据进行比较,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结　　果

1. Cetuximab-TCO 鉴定和肿瘤细胞、组织 EGFR 表达鉴定。Cetuximab-TCO 中平均每单位 Cetuximab 中连接 TCO 的数量为 10 个。细胞 Western blot 分析显示 MDA-MB-468 细胞高表达 EGFR,而 MDA-MB-231 细胞 EGFR 表达阴性。肿瘤免疫组织化学检测结果与细胞分析一致:MDA-MB-468 肿瘤组织中 EGFR 表达明显高于 MDA-MB-231 肿瘤组织(图 2)。

2. ^{68}Ga-L-NETA-Tz 的标记率和稳定性。经 radio-HPLC 分析,^{68}Ga-L-NETA-Tz 标记率>95%,无需进一步纯化,比活度为 37 MBq/nmol,总合成时间约为 15 min。将产物置于血清中 2 h 后,放化纯仍>95%,表明其在体外具有较高的稳定性。

3.体外细胞实验结果。图 3 示,随温育时间延长,MDA-MB-468 细胞对^{68}Ga-L-NETA-Cetuximab 的总摄取率逐渐增加,与之伴随的抗体内化率也在逐渐升高,但细胞表面仍有部分结合位点。将 Cetuximab-TCO 与 MDA-MB-468 细胞共温育 1 h 后给予^{68}Ga-L-NETA-Tz,通过 TCO 和 Tz 之间的点击化学反应,可将其结合至细胞表面,1 h 的细胞摄取率可达(0.69±0.04)%。而只给予^{68}Ga-L-NETA-Tz 对照组、Cetuximab 阻断组、L-NETA-Tz 阻断组的细胞摄取率显著下降[(0.24±0.05)%、(0.24±0.03)%、(0.40±0.04)%;$F=11.81$,$P<0.001$]。

4.生物分布研究结果。从图 4 可知,在^{68}Ga-L-NETA-Tz 注射入 MDA-MB-468 荷瘤鼠体内后 1 h,肿瘤达到较高的摄取值,以预定位 36 h 组最高[(0.77±0.05) %ID/g];阻断组、未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组和阴性对照组肿瘤摄取值明显降低[(0.35±0.01)、(0.39±0.05)、(0.45±0.10) %ID/g;$F=15.50$,$P=0.002$]。预定位 12、24、36、48 h 组肿瘤/肌肉比值分别为 3.00±0.85、4.40±0.70、4.67±0.46 和 3.79±0.90;阻断组、未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组和阴性对照组肿瘤/肌肉比值分别为 1.94±0.65、1.66±0.22、2.20±0.70,预定位 36 h 组最高,明显高于阻断组和 2 个对照组($F=62.09$,$P<0.001$)。

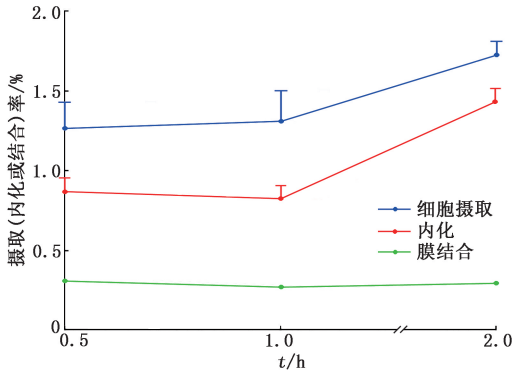

图 3　人基底样乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的^{68}Ga-2,2′-((6-氨基-1-(4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮烷-1-基)己烷-2-基)氨杂二酰基)二乙酸(L-NETA)-西妥昔单克隆抗体(Cetuximab)细胞内化实验结果

5.小动物 PET 静态显像。经不同预定位时间后的 MDA-MB-468 荷瘤鼠经尾静脉注射^{68}Ga-L-NETA-Tz 后 1 h 行小动物 PET 静态显像示,各组均可看到肿瘤显影,以预定位 36 h 组的肿瘤显影最为清晰;同时,肾和膀胱可见明显探针浓聚,而肝未见明显摄取(图 5A)。阻断组、未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组和阴性对照组的小鼠肿瘤部位未见明显探针摄取(图 5B)。

讨　　论

本研究应用了基于“TCO-Tz”点击化学反应的

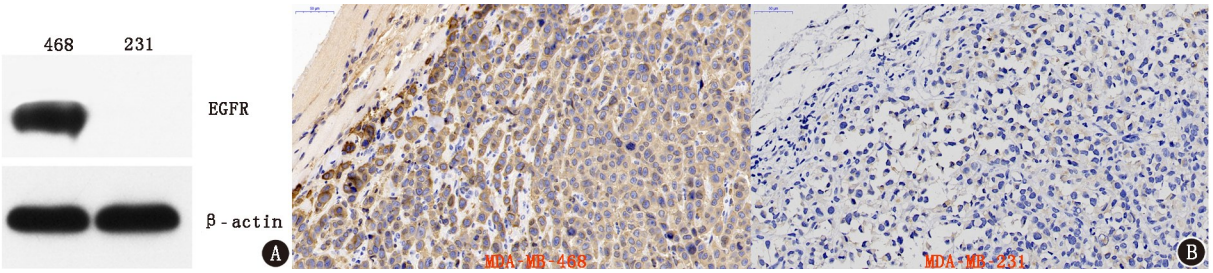

图 2　肿瘤细胞和组织中表皮生长因子受体(EGFR)表达鉴定。A.人基底样乳腺癌细胞 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞的 Western blot 结果示前者 EGFR 表达高[β-肌动蛋白(actin)为内参];B.肿瘤组织免疫组织化学图像[二氨基联苯胺(DAB) ×200]示 MDA-MB-468 肿瘤组织中 EGFR 表达较高

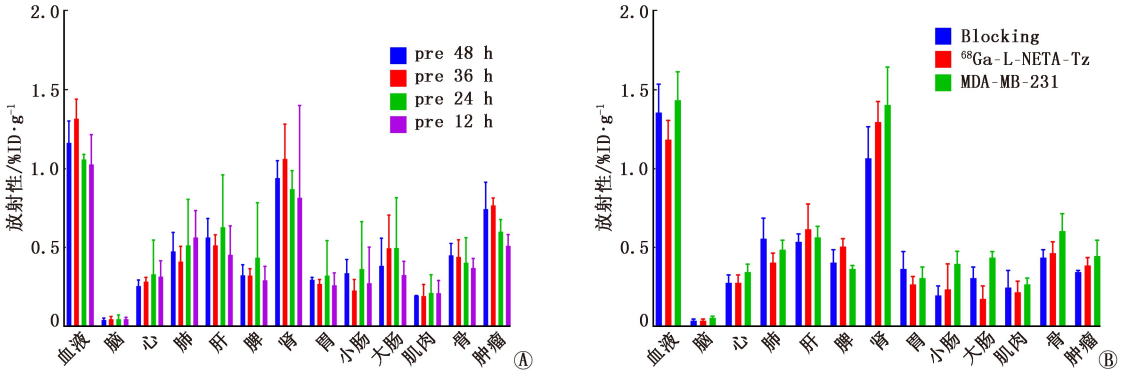

图 4　各组荷瘤鼠($n=5$)注射^{68}Ga-2,2′-((6-氨基-1-(4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮烷-1-基)己烷-2-基)氮杂二酰基)二乙酸(L-NETA)-四嗪(Tz)后 1 h 的放射性生物分布(%ID·g^{-1}为每克组织百分注射剂量率)。A. 预定位(pre)12、24、36、48 h 组人基底样乳腺癌 MDA-MB-468 荷瘤鼠的生物分布;B.阻断组[Blocking;过量注射西妥昔单克隆抗体(Cetuximab)]、未提前注入 Cetuximab-反式环辛烯(TCO)对照组(^{68}Ga-L-NETA-Tz)、阴性对照组(MDA-MB-231)的生物分布

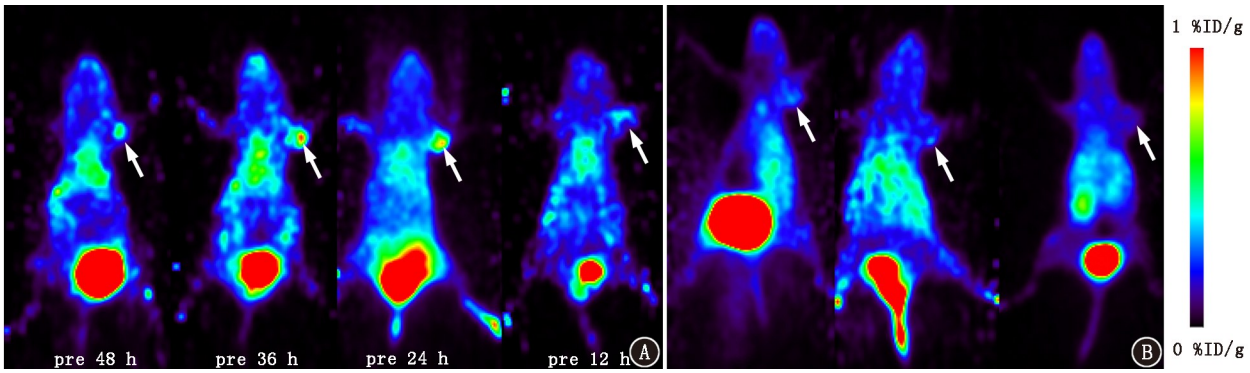

图 5　荷瘤鼠小动物 PET 静态显像图(箭头示肿瘤部位)。A. pre12、24、36、48 h 组人基底样乳腺癌 MDA-MB-468 荷瘤鼠注射^{68}Ga-L-NETA-Tz 后 1 h 显像示,肿瘤均显影,pre 36 h 显影最清晰;B.阻断组(过量注射 Cetuximab;左图)、未提前注入 Cetuximab-TCO 对照组(中图)、阴性对照组[pre 36 h(MDA-MB-231);右图] 注射^{68}Ga-L-NETA-Tz 后 1 h 显像示,肿瘤部位未见明显摄取

预定位技术,将具有生物长半衰期的单抗用短半衰期核素^{68}Ga 标记后进行荷瘤鼠免疫 PET 显像。预定位技术由 2 个要素组成:放射性配体和能够同时结合肿瘤抗原和放射性配体的抗体[4,9]。其主要步骤如下:(1)注射抗体;(2)抗体识别肿瘤表面特异性抗原并在血液及非靶组织中清除;(3)注射小分子放射性配体;(4)抗体和放射性配体在体内特异性结合,未结合的小分子放射性配体在体内快速清除。研究表明,通过预定位技术可增加 RII 中放射性药物在肿瘤部位的浓聚,提高肿瘤靶/非靶比值[10-11]。本研究中先给予 Cetuxiamab-TCO,待 Cetuximab 特异性结合至肿瘤表面 EGFR 抗原及其在血液和肝等非靶组织中清除后,再给予小分子放射性配体^{68}Ga-L-NETA-Tz。后者可迅速到达肿瘤部位并通过 TCO 和 Tz 之间特异、高速的点击化学反应,使^{68}Ga 结合至肿瘤组织。细胞体外实验证实了 Cetuximab 与 EGFR 的结合特异性和“TCO-Tz”反应的特异性,表明预定位技术可行;小动物 PET 显像和生物分布研究结果示,在 EGFR 阳性 MDA-MB-468 荷瘤鼠中可看到肿瘤清晰显影,而阻断组、阴性对照组(MDA-MB-231)中肿瘤摄取明显降低,也表明探针对 EGFR 有高度靶向特异性。另外,荷瘤鼠血液和肾放射性摄取值较高,显像示肾和膀胱有明显探针浓聚,肝中未见明显摄取,说明该探针主要经肾代谢。

本研究结果示,当提前 36 h 给予 Cetuximab-TCO 时可达到最佳肿瘤摄取和靶/非靶比值。可能原因为:与较短的预定位时间(12、24 h)相比,经过更长时间(36 h)后,血液循环中游离、未结合至肿瘤组织的抗体水平较低,使更多的放射性配体结合至肿瘤组织;为提高肿瘤对药物的摄取,嵌合抗体 Cetuximab 在与细胞表面 EGFR 的抗原结合域结合后可内化至细胞膜内[12],而预定位时间进一步延长后(48 h),Cetuximab 的内化增加,细胞表面可结合的 Cetuximab-TCO 相应减少。通过细胞内化实验可知,随着时间延长,虽然细胞摄取率和抗体内化率逐

渐增高,但细胞膜表面仍有部分结合位点。细胞实验和在体动物实验均表明,当仅给予放射性配体^{68}Ga-L-NETA-Tz 时,细胞和肿瘤组织的摄取极低,提示放射性配体无法进入细胞膜内,主要通过结合细胞膜表面抗体而达到肿瘤显像的目的。Houghton 等[13]的研究也表明,利用可内化的抗体和无法进入细胞内的放射性配体进行预定位显像可行。

在未来的研究中,对于预定位中的可内化抗体,可以通过化学修饰改变放射性配体的亲脂性,使其进入细胞膜内,与已内化的抗体结合。由于 TCO 亲脂性优于 Tz,已有研究使用"反向"方法,即在预定位技术中将 Tz 与抗体连接,而 TCO 连接到放射性配体中[14]。另外,本研究中注射^{68}Ga-L-NETA-Tz 1 h 后,荷瘤鼠血液中放射性摄取较高,这种高血液本底水平与血液循环中仍存在未结合至肿瘤组织的 Cetuximab-TCO 有关[15]。针对长血液半衰期的单抗,可在预定位中使用"清除剂"[16-17],即在注射放射性配体之前,注射"清除剂"清除血液中游离抗体以提高肿瘤部位 TCO 和 Tz 之间的反应产率,以及减少抗体和放射性配体间的注射间隔时间,使更多的抗体存在于肿瘤细胞表面。但目前有效的 TCO"清除剂"仍处于合成研发阶段,开发"清除剂"和亲脂性更强的放射性配体将成为未来重要的研究方向。

综上,本研究成功应用基于"TCO-Tz"点击化学反应的预定位技术,通过先后给予荷瘤鼠注射 Cetuximab-TCO 和^{68}Ga-L-NETA-Tz,使其在适合的时间充分地特异性结合,成功使肿瘤显影,肿瘤组织摄取明显增高,同时非靶器官摄取降低。这为免疫 PET 显像提供了一种有效的方法。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　苑陆杰、李慧玲:研究实施、论文撰写;盖永康:统计分析;张永学、兰晓莉:研究设计、研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] 陈丽春,王亮亮,苏新辉,等. ^{131}I 标记抗神经纤毛蛋白-2 单克隆抗体在荷肺腺癌裸鼠中的生物分布及显像[J].中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(1): 37-41. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.01.009.
Chen LC, Wang LL, Su XH, et al. Imaging and biodistribution of ^{131}I labeled anti-neuropilin-2 monoclonal antibody in lung adenocarcinoma-bearing mice[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(1): 37-41. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.01.009.

[2] Camacho X, García MF, Calzada V, et al. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc chelate-conjugated bevacizumab[J]. Curr Radiopharm, 2013, 6(1): 12-19. DOI:10.2174/1874471011306010003.

[3] 谢亦驰,周小林,郝丽君,等. ^{99}Tc^{m}-抗 ProGRP(31-98)单克隆抗体 D-D3 在荷小细胞肺癌裸鼠的体内生物分布及放射免疫显像研究[J].中华核医学与分子影像杂志, 2015, 35(5): 359-363. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.05.006.
Xie YC, Zhou XL, Hao LJ, et al. Biodistribution and radioimmunoimaging of ^{99}Tc^{m}-labeled anti-ProGRP monoclonal antibody D-D3 in nude mice bearing SCLC xenografts[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 35(5): 359-363. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.05.006.

[4] Reardan DT, Meares CF, Goodwin DA, et al. Antibodies against metal chelates[J]. Nature, 1985, 316(6025): 265-268. DOI:10.1038/316265a0.

[5] Hnatowich DJ, Virzi F, Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications[J]. J Nucl Med, 1987, 28(8): 1294-1302.

[6] Meyer JP, Adumeau P, Lewis JS, et al. Click chemistry and radiochemistry: the first 10 years[J]. Bioconjug Chem, 2016, 27(12): 2791-2807. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.6b00561.

[7] Adumeau P, Carnazza KE, Brand C, et al. A pretargeted approach for the multimodal PET/NIRF imaging of colorectal cancer[J]. Theranostics, 2016, 6(12): 2267-2277. DOI:10.7150/thno.16744.

[8] Gai Y, Sun L, Hui W, et al. New bifunctional chelator p-SCN-PhPr-NE3TA for Copper-64: synthesis, peptidomimetic conjugation, radiolabeling, and evaluation for PET imaging[J]. Inorg Chem, 2016, 55(14): 6892-6901. DOI:10.1021/acs.inorgchem.6b00395.

[9] Rondon A, Degoul F. Antibody pretargeting based on bioorthogonal click chemistry for cancer imaging and targeted radionuclide therapy[J]. Bioconjug Chem, 2020, 31(2): 159-173. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.9b00761.

[10] Patra M, Zarschler K, Pietzsch HJ, et al. New insights into the pretargeting approach to image and treat tumours[J]. Chem Soc Rev, 2016, 45(23): 6415-6431. DOI:10.1039/c5cs00784d.

[11] Bailly C, Bodet-Milin C, Rousseau C, et al. Pretargeting for imaging and therapy in oncological nuclear medicine[J]. EJNMMI Radiopharm Chem, 2017, 2(1): 6. DOI:10.1186/s41181-017-0026-8.

[12] Göstring L, Chew MT, Orlova A, et al. Quantification of internalization of EGFR-binding affibody molecules: methodological aspects[J]. Int J Oncol, 2010, 36(4): 757-763. DOI:10.3892/ijo_00000551.

[13] Houghton JL, Zeglis BM, Abdel-Atti D, et al. Pretargeted immuno-PET of pancreatic cancer: overcoming circulating antigen and antibody internalization to reduce radiation doses[J]. J Nucl Med, 2016, 57(3): 453-459. DOI:10.2967/jnumed.115.163824.

[14] Li Z, Cai H, Hassink M, et al. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of ^{18}F labeled probes[J]. Chem Commun (Camb), 2010, 46(42): 8043-8045. DOI:10.1039/c0cc03078c.

[15] Evans HL, Nguyen QD, Carroll LS, et al. A bioorthogonal ^{68}Ga-labelling strategy for rapid *in vivo* imaging[J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(67): 9557-9560. DOI:10.1039/c4cc03903c.

[16] 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.

[17] Rossin R, van Duijnhoven SM, Läppchen T, et al. Trans-cyclooctene tag with improved properties for tumor pretargeting with the diels-alder reaction[J]. Mol Pharm, 2014, 11(9): 3090-3096. DOI:10.1021/mp500275a.

(收稿日期:2021-11-24)