

# 新型分子探针<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 监测 PD-1 表达水平的临床前研究

朱怡蓉 孔维唯 尤嘉熙 倪凯茹 张兵 刘增礼 石怡珍 洪智慧

苏州大学附属第二医院核医学科, 苏州 215004

通信作者: 洪智慧, Email: hongzhahui515@126.com

**【摘要】** 目的 设计合成靶向程序性细胞死亡受体 1 (PD-1) 新型分子探针<sup>89</sup>Zr-去铁胺 (DFO)-G4C2, 探究其在荷瘤小鼠体内的生物分布并行 microPET/CT 显像。方法 DFO 偶联抗 PD-1 单克隆抗体 G4C2 合成 DFO-G4C2, 采用流式细胞术和表面等离子共振技术评估 DFO-G4C2 的亲合力及结合特异性。进行<sup>89</sup>Zr 标记, 得到<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2, 分析其标记率及体外稳定性。建立 PD-1 表达阳性的 CT26 结直肠癌荷瘤小鼠模型, 通过 microPET/CT 显像及体内生物分布探讨<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 的潜在临床应用价值, 并在 4T1 乳腺癌模型中验证该分子探针在不同肿瘤模型中显像效果。采用两独立样本 *t* 检验分析数据。结果 DFO-G4C2 亲和力常数  $K_D$  值为  $(0.55 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$ , 与小鼠 PD-1 蛋白的结合率为  $(61.82 \pm 8.49)\%$ 。<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 的标记率为  $(98.76 \pm 0.51)\%$ , 在溶媒和入血清中放置 144 h 的标记率分别为  $(93.07 \pm 2.16)\%$  和  $(83.42 \pm 3.21)\%$ 。CT26 荷瘤小鼠 microPET/CT 显像示肿瘤组织有明显<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 摄取, 在注射后 72 h 肿瘤摄取值为  $(10.47 \pm 0.34)$  每克组织百分注射剂量率 (%ID/g), 而注射过量未标记抗体的阻断组的肿瘤摄取值为  $(6.26 \pm 1.03)$  %ID/g, 明显低于实验组肿瘤摄取值 ( $t=6.67, P=0.003$ )。体内生物分布结果与 microPET/CT 显像基本一致。4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型 microPET/CT 显像结果与 CT26 模型相似。结论 基于<sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 分子探针的免疫 PET 显像可以无创、可视化地评估肿瘤微环境中 PD-1 表达水平, 有望成为一种用于 PD-1 抑制剂免疫治疗监测的分子影像学新技术。

**【关键词】** 程序性细胞死亡受体 1; 同位素标记; 铅; 结直肠肿瘤; 乳腺肿瘤; 正电子发射断层显像术; 小鼠

**基金项目:** 上海市分子影像学重点实验室一般项目 (KFKT-2023-23); 放射医学与辐射防护国家重点实验室资助项目 (GZK1202240); 国家卫生健康委核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室开放课题 (KF202205); 苏州大学附属第二医院科研预研基金项目 (SDFEYJC2113)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20231019-00078

## Preclinical study of a novel molecular probe <sup>89</sup>Zr DFO-G4C2 for monitoring PD-1 expression levels

Zhu Yirong, Kong Weiwei, You Jiaxi, Ni Kairu, Zhang Bing, Liu Zengli, Shi Yizhen, Hong Zhihui

Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China

Corresponding author: Hong Zhihui, Email: hongzhahui515@126.com

**【Abstract】** **Objective** To design and synthesize <sup>89</sup>Zr-deferoxamine (DFO)-G4C2, a novel molecular probe targeting programmed cell death receptor 1 (PD-1), and evaluate its *in vivo* biodistribution and microPET/CT imaging characteristics in tumor-bearing mice. **Methods** DFO-G4C2 was prepared by coupling DFO with G4C2, a monoclonal antibody targeting PD-1. The affinity and binding specificity of this amalgamation were subsequently assessed through the implementation of flow cytometry and surface plasmon resonance techniques. The molecular probe <sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 was achieved by labeling DFO-G4C2 with the radioisotope <sup>89</sup>Zr, and the labeling efficiency and *in vitro* stability of <sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 were determined. Mouse models laden with CT26 colorectal cancer cells expressing PD-1 were established, followed by *in vivo* biodistribution and microPET/CT imaging studies, to explore the potential clinical value of <sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2. Additionally, the validity of this molecular probe was verified in 4T1 breast cancer models, affirming its efficacy as an imaging tool across different tumor models. Independent-sample *t* test was used to analyze the data. **Results** DFO-G4C2 exhibited an affinity constant  $K_D$  of  $(0.55 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$ , indicating a strong binding affinity. The binding rate to mouse PD-1 protein was determined to be  $(61.82 \pm 8.49)\%$ . The labeling rate of <sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 reached a high level of  $(98.76 \pm 0.51)\%$ . Furthermore, the labeling rates in lysate and human serum after 144 h were measured to be  $(93.07 \pm 2.16)\%$  and  $(83.42 \pm 3.21)\%$ , respectively. MicroPET/CT imaging of CT26 tumor-bearing mice injected with <sup>89</sup>Zr-DFO-G4C2 showcased pronounced radioactivity uptake in the tumor tissue. At 72 h post-injection, the tumor uptake value reached  $(10.47 \pm 0.34)$  per-

centage activity of injection dose per gram of tissue (%ID/g). The tumor uptake observed in the blocked experimental group, wherein an excess of unlabeled antibody was administered, was significantly lower at  $(6.26 \pm 1.03)$  %ID/g in comparison to the non-blocked group ( $t=6.67$ ,  $P=0.003$ ). The *in vivo* biodistribution results were consistent with the observed microPET/CT imaging outcomes. MicroPET/CT imaging observations in the 4T1 breast cancer bearing mouse model were analogous to those obtained from the CT26 model. **Conclusion** ImmunoPET based on the  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 molecular probe can non-invasively and visually assess the PD-1 expression level of tumors *in vivo*, and it is expected to be a new molecular imaging technique for immunotherapy monitoring of PD-1 inhibitors.

**【Key words】** Programmed cell death receptor 1; Isotope labeling; Zirconium; Colorectal neoplasms; Breast neoplasms; Positron-emission tomography; Mice

**Fund program:** Construction Project of Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging (KFKT-2023-23); Project of State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection (GZK1202240); Open Program of NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine and Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine (KF202205); The Second Affiliated Hospital of Soochow University Research Pre-Research Fund Project (SDFEYJC2113)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20231019-00078

免疫疗法已经成为一种重要的临床治疗手段<sup>[1]</sup>,但临床实践发现其只对部分患者有效,并且通过单次局部肿瘤活组织检查(简称活检)得到的单一标志物表达高低进行免疫治疗患者筛选并非最佳<sup>[2]</sup>。免疫 PET 显像(immunoPET)具有高特异性、灵敏度和分辨率,为临床行免疫治疗患者的入组筛选、疗效评估提供了指导<sup>[3]</sup>。目前已经有多种靶向程序性细胞死亡受体 1(programmed cell death receptor 1, PD-1)放射性探针的临床前或临床试验研究<sup>[4]</sup>,如 Hettich 等<sup>[5]</sup>使用 $^{64}\text{Cu}$  标记抗小鼠 PD-1 抗体,图像显示淋巴结和脾脏对显像剂有特异性摄取; Niemeijer 等<sup>[6]</sup>用 $^{89}\text{Zr}$  标记纳武利尤单抗抗体(简称单抗),在 13 例晚期非小细胞肺癌患者中进行 PD-1 PET 显像,免疫组织化学检测证实肿瘤摄取显像剂与肿瘤浸润 PD-1 阳性免疫细胞相关,并与临床反应具有相关性。因此,靶向 PD-1 的免疫 PET 显像可以更全面、直观、精准地显示全身 PD-1 表达情况。本研究采用双功能螯合剂去铁胺(deferoxamine, DFO)偶联国产化鼠源性抗 PD-1 单抗 G4C2,利用 $^{89}\text{Zr}$  标记 DFO-G4C2,探讨 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 分子探针用于免疫 PET 显像的可行性。

## 材料与方法

### 一、仪器与材料

1. 主要实验仪器。放射性薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)扫描仪(美国 Bioscan 公司);  $\gamma$  放射免疫计数器(美国 PerkinElmer 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); Super Nova microPET/CT[平生医疗科技(昆山)有限公司]; Waters E2695 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(美国 Waters 公司)。

2. 主要试剂。草酸锆 [ $^{89}\text{Zr}$ ] 溶液购自南京江原

安迪科正电子研究发展有限公司; G4C2 抗体由上海君实生物医药科技股份有限公司馈赠; 细胞培养相关试剂购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 细胞培养相关耗材购自美国 Corning 公司; DFO 购自美国 Macrocyclics 公司。

3. 细胞株与实验动物。小鼠结直肠癌 CT26 细胞株与小鼠乳腺癌 4T1 细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司); BALB/c 小鼠购自杭州子源实验动物科技有限公司, 54 只, 雌性, 6~8 周龄, 体质量 19~21 g, 无特殊病原体级环境中饲养。所有动物实验由苏州大学伦理委员会批准(SUDA20230213A04)。实验动物使用许可证号: SCXK(浙)2019-0004。

### 二、实验方法

1. DFO-G4C2 的制备及质量控制。取抗 PD-1 单抗 G4C2 溶液(质量浓度为 11.4 mg/ml)加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=9.0)和适量  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液(0.1 mol/L), 调整溶液 pH 值至 9.0 左右备用。按照 DFO 与 G4C2 抗体质量比 9:1, 称取 DFO 溶于二甲基亚砜中配制成 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的溶液。将溶解后的 DFO 溶液分 3 次缓慢加入到 G4C2 抗体溶液中, 在 37  $^\circ\text{C}$  氮吹仪中反应 120 min。反应结束后用 PD-10 脱盐柱分离纯化, 再用  $100 \times 10^3$  超滤管浓缩洗涤 2 次, 收集纯化产物 DFO-G4C2。利用 HPLC 鉴定分析是否偶联成功: 以  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$  缓冲溶液(pH=6.8)为流动相, 取修饰后样品 10  $\mu\text{l}$  进样, 进样流速 1 ml/min。应用表面等离子共振技术鉴定分析 DFO-G4C2 的亲合力, 流式细胞仪检测 DFO-G4C2 结合特异性。

2.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 的制备及质量控制。取 37~74 MBq  $^{89}\text{Zr}$  至反应瓶, 加入 9 倍体积的 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonic acid, HEPES)缓冲液, 利用 1 mol/L

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液( $\text{pH}=10$ )调节反应体系  $\text{pH}$  值至 7, 随后加入 DFO-G4C2 溶液,  $37^\circ\text{C}$  反应 15 min, 得到 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 溶液。用毛细管取少量 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 溶液点于色谱纸下端 1 cm 处, 置于 0.5 mol/L 柠檬酸溶液中, 然后取出放置于色谱仪上测定产物标记率。取 1.85~3.70 MBq (200  $\mu\text{l}$ )  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 置于离心管中, 加入 500  $\mu\text{l}$  人血清或溶媒中, 混匀后置于铅罐内, 室温下保存, TLC 法检测 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在不同时间点(6、24、48、72、96、120 和 144 h) 的标记率。

3. 荷瘤小鼠模型构建。分别取对数生长期的 CT26 及 4T1 细胞, PBS 重悬调整细胞浓度为  $1\times 10^6$  个/100  $\mu\text{l}$ , 接种于 BALB/c 小鼠右后肢根部皮下。定期观察小鼠的肿瘤生长情况, 用游标卡尺测量记录皮下移植瘤长短径, 计算肿瘤生长体积, 待瘤体生长至 200~300  $\text{mm}^3$  进行后续实验。

4. 荷瘤小鼠 microPET/CT 显像。取 CT26 荷瘤小鼠 12 只, 依据随机数字表法随机分为实验组( $n=6$ )和阻断组( $n=6$ ), 2 组分别经尾静脉注射( $3.7\pm 0.1$ ) MBq (100  $\mu\text{l}$ )  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 和( $3.7\pm 0.1$ ) MBq (100  $\mu\text{l}$ )  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2+1.2 mg G4C2 抗体, 给予体积分数 1%~2% 异氟烷气体麻醉 5 min 后, 分别于注射后不同时间点(2、24、48、72、96、120、144 h) 进行 microPET/CT 图像采集, PET 扫描时间为 10 min, CT 扫描时间为 2.5 min。采用三维重建方法进行图像重建, 获得 CT 衰减校正后的荷瘤小鼠 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 体内分布图像, 使用 PMOD 软件勾画重要器官及组织 ROI, 计算每克组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g), 绘制各重要器官及组织的时间-放射性曲线 (time-activity curve, TAC)。取 4T1 荷瘤小鼠 6 只进行 microPET/CT 显像, 注射、显像及图像处理方法同前。

5. 荷瘤小鼠体内生物分布实验。取 CT26 荷瘤小鼠阻断与实验组、4T1 荷瘤小鼠各 12 只 (随机数字表法分为 2 组: 72 h 和 144 h, 每组 6 只) 进行体内生物分布实验。分别于注射后 72 h 和 144 h 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 解剖取出肿瘤、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、肌肉、骨骼 (右下肢胫骨)、脑组织及关节 (右下肢膝关节) 等, 清洗、称质量, 测量放射性计数, 计算各器官组织的 %ID/g。

6. 统计学处理。应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计作图, 每种实验重复 3 次, 符合正态分布的定量数据用  $\bar{x}\pm s$  表示, 2 组数据间差异性分析采用两独立样本  $t$  检验。  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. DFO-G4C2 的制备及质量控制。HPLC 检测示 DFO-G4C2 与未标记 G4C2 相比其出峰时间不同、峰型不一致, 表明 DFO-G4C2 偶联成功。表面等离子共振技术检测 G4C2 与 DFO-G4C2 的亲合力常数  $K_D$  值分别为 ( $0.51\pm 0.01$ )  $\mu\text{mol/L}$  和 ( $0.55\pm 0.02$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 两者的亲和力差异无统计学意义 ( $t=2.53$ ,  $P=0.063$ )。经过刺激活化后的小鼠 T 淋巴细胞与 DFO-G4C2 相结合, 结合率为 ( $61.82\pm 8.49$ )%。

2.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 的制备及质量控制。TLC 检测 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 标记率为 ( $98.76\pm 0.51$ )%。其室温放置于溶媒、人血清中 144 h 后标记率分别为 ( $93.07\pm 2.16$ )%、( $83.42\pm 3.21$ )%, 其体外及模拟体内稳定性良好。

3. 荷瘤小鼠 microPET/CT 显像。实验组 CT26 荷瘤小鼠注射 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 后 24 h, 肿瘤部位有较明显显像剂摄取, 并且随着时间延长摄取逐渐从瘤体外周向中心增高 (图 1A), TAC 示 72 h 肿瘤摄取值达到 ( $10.47\pm 0.34$ ) %ID/g; 阻断组肿瘤组织显影欠清晰 (图 1B), 72 h 肿瘤组织最高摄取值为 ( $6.26\pm 1.03$ ) %ID/g, 明显低于实验组肿瘤摄取值 ( $t=6.67$ ,  $P=0.003$ )。实验组脾脏摄取值相对较稳定, 约为 ( $7.38\pm 1.07$ ) %ID/g, 阻断组脾脏未见明确显影, 摄取值为 ( $2.68\pm 0.36$ ) %ID/g ( $t=18.00$ ,  $P<0.001$ ), 其余器官组织本底摄取较未阻断组明显降低, 表明肿瘤组织和各器官组织对 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 的摄取可被预先注入的过量 G4C2 抗体阻断。4T1 乳腺癌荷瘤小鼠显像示注射后 24 h 即可观察到肿瘤显影 (图 1C), 随着时间延长显像剂摄取逐渐增加, 72 h 达到最高值 ( $10.86\pm 1.10$ ) %ID/g。此外, 96 h 时观察到小鼠右侧腋下出现 1 个点状异常显像剂浓聚影, 120、144 h 摄取逐渐增高, 显影清晰, 显像完成后解剖小鼠, 结合图像考虑该异常浓聚灶为淋巴结转移病灶。

4. 荷瘤小鼠体内生物分布实验。 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在荷瘤小鼠的体内分布情况与 microPET/CT 显像结果基本吻合。注射后 144 h, CT26 荷瘤小鼠实验组和阻断组 (表 1) 的肿瘤摄取值分别为 ( $12.98\pm 0.25$ ) %ID/g 和 ( $5.58\pm 1.67$ ) %ID/g ( $t=7.60$ ,  $P=0.002$ ), 脾脏摄取值分别为 ( $13.10\pm 1.24$ ) %ID/g 和 ( $4.86\pm 1.21$ ) %ID/g ( $t=8.26$ ,  $P=0.001$ ), 组间差异均有统计学意义。4T1 荷瘤小鼠与 CT26 荷瘤小鼠类似, 144 h 肿瘤摄取值为 ( $13.07\pm 1.96$ ) %ID/g (表 2)。

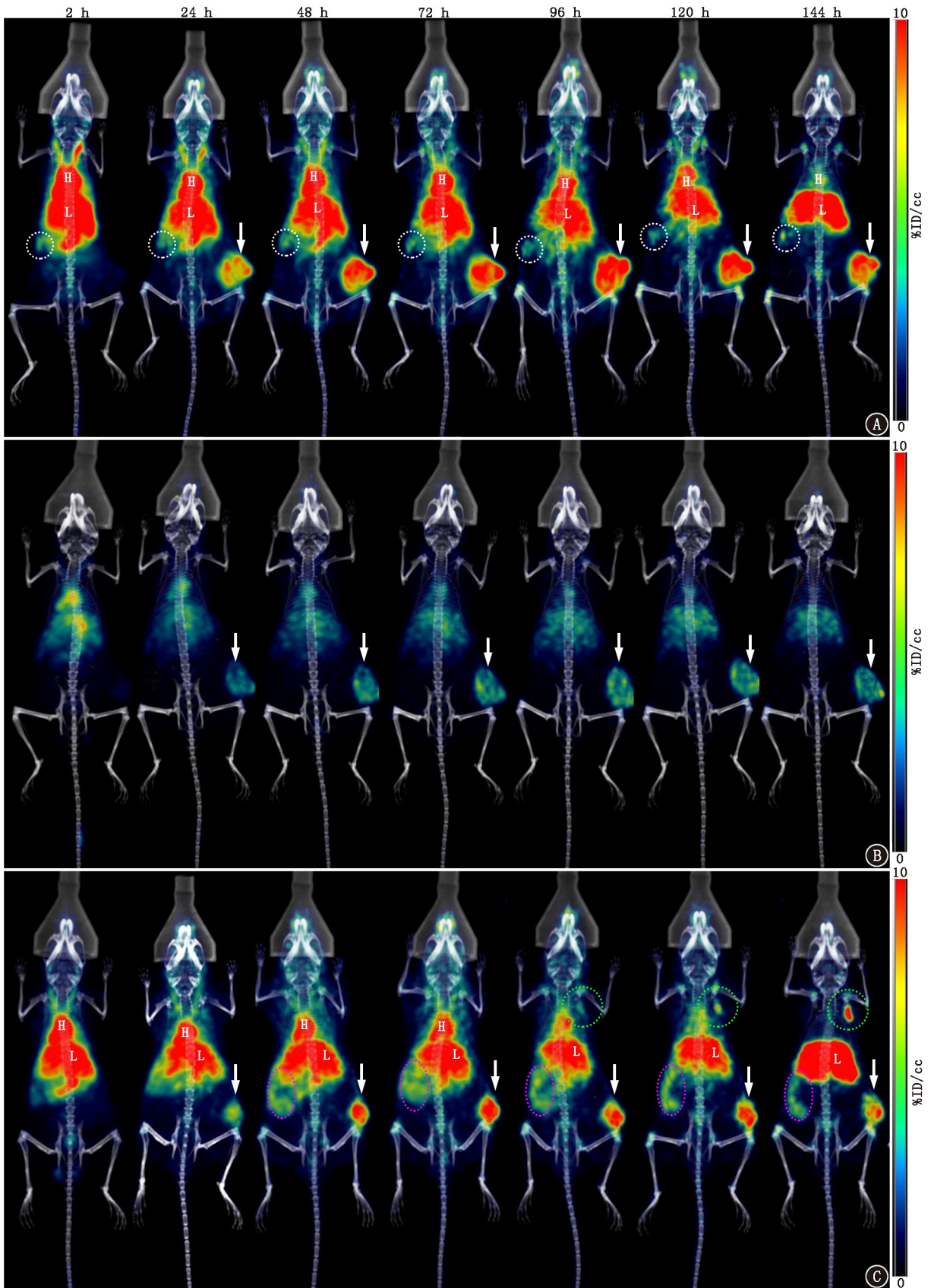


图 1 荷瘤小鼠尾静脉注射<sup>89</sup>Zr-去铁胺(DFO)-G4C2后各时间点的 microPET/CT 显像图(箭头示肿瘤;白色虚线圆圈及紫色虚线圆圈示脾脏;绿色虚线圆圈示转移淋巴结;H为心脏血池;L为肝脏)。1A.实验组 CT26 荷瘤小鼠;1B.阻断组 CT26 荷瘤小鼠;1C. 4T1 荷瘤小鼠。可见实验组 CT26 荷瘤小鼠肿瘤组织具有明显摄取,阻断组肿瘤组织摄取明显减低,4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织摄取明显,另右腋下见一摄取浓聚灶,考虑为转移淋巴结。%ID/cc 为每立方厘米组织百分注射剂量率

**表 1**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 注射后不同时间在 CT26 荷瘤小鼠体内的生物分布 (%ID/g;  $\bar{x}\pm s$ )

器官或组织	阻断组		实验组	
	72 h	144 h	72 h	144 h
肿瘤	7.43±0.46	5.58±1.67	9.12±1.50	12.98±0.25
心脏	3.20±1.35	1.97±0.46	2.99±0.16	2.03±0.42
肝	8.79±3.97	10.76±2.81	8.69±1.78	17.30±1.29
脾	5.39±2.42	4.86±1.21	6.37±1.48	13.10±1.24
肺	5.74±2.18	6.33±1.89	7.46±4.53	4.55±0.18
肾	7.90±2.29	4.83±0.89	6.10±0.62	5.05±0.74
胃	1.42±0.79	1.10±0.36	1.65±0.23	1.18±0.28
肠道	1.52±0.46	1.66±0.82	2.10±1.08	1.56±0.34
骨骼	4.39±1.17	4.94±1.00	3.02±0.83	3.60±1.14
肌肉	1.37±0.66	0.59±0.20	0.96±0.06	0.61±0.08
脑	0.39±0.14	0.22±0.07	0.35±0.12	0.21±0.04
关节	6.69±1.46	8.90±1.05	4.91±0.83	6.94±1.10

注:每个时间点小鼠数为 6 只;%ID/g 为每克组织百分注射剂量率,DFO 为去铁胺

**表 2**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 注射后不同时间在 4T1 荷瘤小鼠体内的生物分布 (%ID/g;  $\bar{x}\pm s$ )

器官或组织	72 h	144 h
肿瘤	8.97±0.79	13.07±1.96
心脏	2.80±0.68	1.79±0.69
肝	8.98±2.54	18.55±5.19
脾	7.24±0.98	11.59±2.55
肺	6.55±0.96	4.67±1.32
肾	5.69±0.68	5.20±1.17
胃	2.11±0.39	1.53±0.28
肠道	2.91±0.16	1.73±0.57
骨骼	3.43±0.58	4.61±0.77
肌肉	1.03±0.36	0.84±0.10
脑	0.40±0.12	0.22±0.10
关节	4.94±1.08	8.65±2.11

注:每个时间点小鼠数为 6 只

## 讨 论

免疫疗法已经在临床治疗癌症方面取得显著成功<sup>[7-9]</sup>,其中最引人关注的是免疫检查点 PD-1/PD-1 配体(PD-1 ligand, PD-L1)抑制剂,其通过与 PD-1 或者 PD-L1 结合,阻断 PD-1/PD-L1 通路,从而恢复 T 细胞的识别和杀伤能力,有效防止肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[10-11]</sup>。抗 PD-1 抗体免疫疗法在一些患者中显示出持久的缓解率,但临床数据显示只有小部分患者有效<sup>[12]</sup>。目前仅靠单次局部活检作为评估免疫检查点抑制剂的疗效无法满足临床需要,因此迫切需要开发一种全面、动态监测 PD-1 表达水平的非侵入性诊断技术。单抗的靶向特异性与 PET 显像的高灵敏性结合,能够从分子水平上观察肿瘤的病理演变过程,有望实现无创、动态和全面评估 PD-1 表达情况<sup>[13-15]</sup>。

本研究成功构建靶向 PD-1 的免疫 PET 显像分子探针 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2,其合成及标记方法简便易操作,标记率高,具有良好的体内外稳定性。micro-PET/CT 显像结果显示,注射 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 后 24 h 可观察到肿瘤组织明显摄取显像剂,随时间延长瘤体显影逐渐清晰;同时观察到显像早期瘤体边缘部位摄取相对较高,随时间延长瘤体中心相对较多,这可能由于 G4C2 是全长抗体,相对分子质量大于  $150\times 10^3$ ,限制了抗体渗透进入肿瘤内部的速度。肝脏在注射后 2 h 观察到较高显像剂摄取,随时间延长摄取逐渐增高,这符合经肝脏代谢的药代动力学。脾脏显像剂摄取较肝脏低,随时间延长稍有增高。四肢关节部位见轻度显像剂摄取,随时间延长稍有所增高,这可能由于 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在体内少量脱锆,游离 $^{89}\text{Zr}$ 对磷酸盐的高亲和力造成关节部位浓聚。预先注射过量未标记抗体 G4C2 进行阻断的显像结果示,过量的未标记抗体明显阻断肿瘤组织摄取 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2,致肿瘤显像欠清晰,各时间点肿瘤摄取值均低于实验组,脾脏未见明显显影,表明脾脏被成功阻断。 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在 CT26 荷瘤小鼠体内生物分布与显像结果基本吻合,144 h 实验组肿瘤和脾脏摄取值约为阻断组的 2 倍,2 组数据差异具有统计学意义( $t$  值:7.60、8.26,均  $P<0.01$ )。

本实验进一步观察 $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在乳腺癌 4T1 荷瘤小鼠中的显像效果及体内分布特性。microPET/CT 显像结果与 CT26 荷瘤小鼠相似,肿瘤组织在注射后 24 h 显影,随时间延长显影清晰。另外,在 96 h 显影观察到小鼠右侧腋下见一显像剂浓聚影,随时间延长逐渐清晰,显像完成后解剖,考虑为转移淋巴结,这从侧面表明该分子探针可以特异性靶向 PD-1,不仅能监测肿瘤原发灶,还可以发现转移灶。

综上, $^{89}\text{Zr}$ -DFO-G4C2 在 CT26 荷瘤小鼠和 4T1 荷瘤小鼠体内展现出良好的肿瘤靶向性,可以无创、动态、直观地反映肿瘤微环境中 PD-1 表达水平,有望成为一种用于 PD-1 抑制剂免疫治疗监测的分子影像学新技术。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 朱怡蓉:研究实施、数据分析、论文撰写;孔维唯:统计学分析;尤嘉熙、倪凯茹、张兵:研究实施、数据采集;刘增礼、石怡珍:材料支持、技术支持;洪智慧:研究指导、论文修改、经费支持

## 参 考 文 献

- [1] O'Neill RE, Cao X. Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in cancer immunotherapy[J]. Adv Cancer Res, 2019, 143: 145-194.

- DOI:10.1016/bs.acr.2019.03.003.
- [2] Verhoeff SR, van den Heuvel MM, van Herpen C, et al. Programmed cell death-1/ligand-1 PET imaging: a novel tool to optimize immunotherapy? [J]. PET Clin, 2020, 15(1): 35-43. DOI:10.1016/j.cpet.2019.08.008.
- [3] 魏伟军, 黄钢, 刘建军. 免疫 PET/SPECT 显像: 精准医学时代伴随诊断新范式[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2022, 42(2): 65-67. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220106-00004. Wei WJ, Huang G, Liu JJ. ImmunoPET/SPECT: modal companion diagnostics in precision medicine[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 42(2): 65-67. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220106-00004.
- [4] 刘玫汐, 杨子仪, 李拓, 等. 肿瘤免疫环境及肿瘤免疫治疗反应成像(第 2 部分): 新型 PET 药物的应用[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2022, 42(3): 186-192. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211202-00430. Liu MX, Yang ZY, Li T, et al. Imaging the cancer immune environment and its response to pharmacologic intervention, part 2: the role of novel PET agents[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 42(3): 186-192. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20211202-00430.
- [5] Hettich M, Braun F, Bartholomä MD, et al. High-resolution PET imaging with therapeutic antibody-based PD-1/PD-L1 checkpoint tracers[J]. Theranostics, 2016, 6(10): 1629-1640. DOI:10.7150/thno.15253.
- [6] Niemeijer AN, Leung D, Huisman MC, et al. Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4664. DOI:10.1038/s41467-018-07131-y.
- [7] Cha JH, Chan LC, Li CW, et al. Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer[J]. Mol Cell, 2019, 76(3): 359-370. DOI:10.1016/j.molcel.2019.09.030.
- [8] Depil S, Duchateau P, Grupp SA, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(3): 185-199. DOI:10.1038/s41573-019-0051-2.
- [9] Peng M, Mo Y, Wang Y, et al. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 128. DOI:10.1186/s12943-019-1055-6.
- [10] Yi M, Zheng X, Niu M, et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 28. DOI:10.1186/s12943-021-01489-2.
- [11] Wang Q, Xie B, Liu S, et al. What happens to the immune microenvironment after PD-1 inhibitor therapy? [J]. Front Immunol, 2021, 12: 773168. DOI:10.3389/fimmu.2021.773168.
- [12] Dolladille C, Ederhy S, Sassié M, et al. Immune checkpoint inhibitor rechallenge after immune-related adverse events in patients with cancer[J]. JAMA Oncol, 2020, 6(6): 865-871. DOI:10.1001/jamaoncol.2020.0726.
- [13] 孙艳莎, 宋少莉. 核素标记的 PD-1 与 PD-L1 显像剂在肿瘤诊断中的研究进展[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(2): 108-111. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.012. Sun YS, Song SL. Research progress of radionuclide labeled imaging agents targeting PD-1 and PD-L1 in the diagnosis of tumors [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 39(2): 108-111. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.012.
- [14] Menzies AM, Lastoria S. PET imaging for cancer immunotherapy: the immuno-PET[J]. Ann Oncol, 2022, 33(1): 13-14. DOI:10.1016/j.annonc.2021.11.003.
- [15] Wright BD, Lapi SE. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use[J]. J Nucl Med, 2013, 54(8): 1171-1174. DOI:10.2967/jnumed.113.126086.

(收稿日期:2023-10-19)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于参考文献

请按 GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》,采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出,并将序号置于方括号中,排列于文后。同一文献作者不超过 3 人全部著录;超过 3 人只著录前 3 人,后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”“and”等连词。题名后请标注文献类型标志。文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB/T 7714—2015 附录 B《文献类型与文献载体标识代码》。中文期刊用全称;外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑出版的医学索引(Index Medicus)中的格式为准;Index Medicus 未收录者,依次选用文献自身对刊名的缩写、期刊全称。文献 DOI 号著录在该条文献最后,并需列出中文参考文献的英文表述(双语著录)。作者必须将参考文献与其原文核对无误。

本刊编辑部