

· 新型放射性治疗药物 ·

^{177}Lu 标记 HER2 亲和体的制备及性能研究

国洪霞¹ 潘栋辉² 宿晨² 徐宇平² 王立振²
严骏杰² 王辛宇² 陈重阳² 杨慧¹ 杨敏^{1,2}

¹内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 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: 杨敏, Email: yangmin@jsinm.org

【摘要】 目的 制备一种 ^{177}Lu 标记的人表皮生长因子受体 2(HER2)亲和体 ^{177}Lu -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-马来酰亚胺(Mal)-半胱氨酸(Cys)-ZHER_{2,342}(简称 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2),探讨其标记工艺及抗肿瘤性能。方法 考察 2 种缓冲液体系(乙酸钠缓冲液体系和抗坏血酸钠缓冲液体系),比较 pH 值、前体质量与反应温度对 ^{177}Lu 标记 NOTA-MZHER2 的影响,获取最佳标记条件。采用快速薄层色谱(ITLC)测定标记产物放化纯,观察其在 PBS 和血浆中的稳定性。取人源性卵巢癌细胞 SKOV-3 进行细胞内化和细胞毒性实验,评价 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 的细胞摄取和杀伤效果。取 SKOV-3 荷瘤鼠($n=3$)注射 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 后进行 microSPECT/CT 显像。另取荷瘤鼠 40 只,分为尾静脉注射探针 22.2 MBq(静注 22.2 MBq)组、对照组(尾静脉注射 PBS)、低剂量组(瘤体注射探针 3.7 MBq)和高剂量组(瘤体注射探针 7.4 MBq),每组 10 只,注射探针后监测肿瘤体积和荷瘤鼠体质量,评估标记产物的抗肿瘤效应和毒性。采用重复测量方差分析(Bonferroni 法)比较数据间的差异。结果 乙酸钠缓冲液体系下,pH=4、前体质量 50 μg 、70~80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,为最优标记条件。在此条件下,标记产物 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 的标记率为(99.3 \pm 0.4)%,放化纯>99%;在 PBS 和血浆中放置 12 d 后,放化纯分别为(95.0 \pm 1.5)%和(95.0 \pm 2.1)%。细胞实验结果显示, ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 的细胞内化占总摄取的(29.02 \pm 3.50)%,在标记产物放射性浓度为 6×10^{-3} Bq/L 时,SKOV-3 细胞的存活率为(48 \pm 6)%。SPECT 显像示,注射 18.5 MBq ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 后 96 h,该药仍在肿瘤部位浓聚。静注 22.2 MBq 组、高剂量组、低剂量组与对照组比较,荷瘤鼠的相对肿瘤体积(RTV)差异有统计学意义($F=21.75, P<0.001$);高剂量组注射后 20 d,荷瘤鼠 RTV 为(140 \pm 7)%,相对体质量为(80 \pm 9)%,与对照组相比,具有明显的抗肿瘤效果(均 $P<0.001$)。结论 成功制备 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2,工艺简单高效,该药具有较好的抗肿瘤效果。

【关键词】 卵巢肿瘤;基因,erbB-2;同位素标记;镱;肿瘤细胞,培养的;放射性核素显像;小鼠,裸

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20192005, BK20231141);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY21591)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20240129-00041

Preparation and properties of ^{177}Lu -labeled HER2 affibody

Guo Hongxia¹, Pan Donghui², Su Chen², Xu Yuping², Wang Lizhen², Yan Junjie², Wang Xinyu², Chen Chongyang², Yang Hui¹, Yang Min^{1,2}

¹College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; ²NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

Corresponding author: Yang Min, Email: yangmin@jsinm.org

【Abstract】 **Objective** To prepare a ^{177}Lu labeled human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) affibody ^{177}Lu -1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA)-maleimide (Mal)-cysteine (Cys)-ZHER_{2,342} (^{177}Lu -NOTA-MZHER2 for short), and investigate its labeling process and anti-tumor properties. **Methods** Two kinds of buffer systems (sodium acetate buffer system and sodium ascorbate buffer system) were investigated. The effects of pH value, precursor mass and reaction temperature on ^{177}Lu labeling NOTA-MZHER2 were compared to obtain optimal labeling conditions. The radiochemical purity of labeled product was determined by instant thin-layer chromatography (ITLC), and its stabilities in PBS and plasma were observed. Human ovarian cancer cell line SKOV-3 was selected for cell internalization and cytotoxicity test to evaluate cell uptake and killing effect of ^{177}Lu -NOTA-MZHER2. SKOV-3 tumor-bearing mice ($n=3$) were injected with ^{177}Lu -NOTA-MZHER2, and microSPECT/CT imaging was performed. Another 40 tumor-bearing mice were divided into 22.2 MBq group (tail vein injection with probe of 22.2 MBq), control

group (tail vein injection with PBS), low-dose group (tumor injection with probe of 3.7 MBq) and high-dose group (tumor injection with probe of 7.4 MBq). Tumor volume and mass of tumor-bearing mice were monitored after injection, and the anti-tumor effect and toxicity of probe were evaluated. Repeated measurement analysis of variance (Bonferroni method) was used to analyze the data. **Results** The optimal labeling condition was 70–80 °C for 30 min in the system of sodium acetate buffer solution with pH=4 and precursor mass of 50 µg. Under these conditions, the labeling rate of ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 was (99.3±0.4)% and radiochemical purity was >99%. After 12 d in PBS and plasma, the radiochemical purities were (95.0±1.5)% and (95.0±2.1)%. Results of cell experiment showed that the internalization of ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 accounted for (29.02±3.50)% of the total uptake, and the survival rate of SKOV-3 cells was (48±6)% with the probe concentration of 6×10^{-3} Bq/L. SPECT imaging showed that ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 was still concentrated at the tumor site 96 h after injection with a dose of 18.5 MBq. Relative tumor volume (RTV) of tumor-bearing mice in 22.2 MBq group, high-dose group and low-dose group was significantly different from that in control group ($F=21.75$, $P<0.001$). Twenty days after injection, RTV and relative body mass of the tumor-bearing mice in high-dose group were (140±7)% and (80±9)%, respectively. Compared with control group, high-dose group had obvious anti-tumor effect (both $P<0.001$). **Conclusion** ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 is successfully prepared, which is simple and efficient, and the probe has good anti-tumor effect.

【Key words】 Ovarian neoplasms; Genes, erbB-2; Isotope labeling; Lutetium; Tumor cells, cultured; Radionuclide imaging; Mice, nude

Fund program: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20192005, BK20231141); Scientific Research Projects of Colleges and Universities in Inner Mongolia Autonomous Region (NJZY21591) DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240129-00041

人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的过表达与多种肿瘤的发生及侵袭性紧密相关^[1]。HER2 阳性肿瘤的诊断和治疗方式的选择尤为重要。亲和体 (affibody) 具有高受体亲和性、血液清除速度快、无免疫原性等优点,是 HER2 靶向药物的理想选择^[2]。本课题组先前对亲和体 ZHER_{2,342} 修饰,得到标记前体 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, NOTA)-马来酰亚胺 (maleimide, Mal)-半胱氨酸 (cysteine, Cys)-ZHER_{2,342} (简称 NOTA-MZHER2),经 ^{18}F 、 ^{68}Ga 等正电子核素标记,制得系列靶向 HER2 的 PET 诊断探针^[3-4],具有优异的临床显像效果^[5-6]。

核医学诊疗一体化能实现可视化诊断和精准治疗^[7]。目前, ^{68}Ga - ^{177}Lu 是常用的诊疗一体化核素,已被广泛用于神经内分泌肿瘤^[8-9]和前列腺肿瘤^[10]的诊治,效果良好。基于 ^{68}Ga -NOTA-MZHER2 对 HER2 的高亲和力及优异的体内药代动力学性能,本研究选用治疗性核素 ^{177}Lu 对 NOTA-MZHER2 进行标记,制备 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2,探究并优化其标记工艺,在体内外评估标记产物治疗效果,为 HER2 诊疗一体化探针的开发和应用积累经验。

材料与方法

一、实验仪器与材料

1. 主要仪器。高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC; 1525 型), 紫外检测器 (2487 型), Sep-Pak C18 柱 (4.6 mm×250 mm) (Waters

公司,美国);放射性检测器 (PerkinElmer 公司,美国);放射性核素活度仪 (CRC-55tR, 北京派特生物技术有限公司);小动物麻醉机 (SAR-830/Emission P 型, CWE 公司,美国);microSPECT/CT 仪 (Albira Si SPECT/CT, Bruker 公司,德国);快速薄层色谱 (instant thin-layer chromatography, ITLC) 扫描仪 (MINI-SCAN, BioScan 公司,美国)。

2. 主要试剂。 $^{177}\text{LuCl}_3$ (中国同辐股份有限公司);NOTA-Cys-MZHER2 (上海楚肽生物技术有限公司,纯度>95%);病理染色试剂 (无锡市江原实业技贸有限公司);异氟烷 (上海雅培制药有限公司);其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司);ITLC-SG 色谱纸 (SGI0001, 安捷伦科技有限公司,美国)。

3. 实验细胞与动物。人源性卵巢癌细胞 SKOV-3 购自中国科学院细胞库;雌性 BALB/c 裸鼠 50 只,4~6 周龄,体质量 (20±2) g,购于常州卡文斯实验动物有限公司;在无特殊病原体级环境中饲养,动物实验经江苏省原子医学研究所伦理委员会批准 (JSINM-2023-097)。实验动物许可批件号:JSINM-0025;实验动物使用许可证号:SYXK (苏)2019-0025。

二、实验方法

1. ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 的标记工艺优化。考察 2 种缓冲液体系。(1) 采用乙酸钠缓冲液体系^[11-12],将 $^{177}\text{LuCl}_3$ 原液以 0.05 mol/L HCl 稀释,用 0.1 mol/L 的乙酸钠缓冲液调节溶液 pH 值 (2.5、4.0、5.5、7.0),加入不同质量 (10、20、50、100 和 200 µg) 的前体,于不同反应温度 (25、60、70、80、90 和 100 °C) 下搅拌反应 30 min。(2) 采用抗坏血酸钠缓冲液体

系^[13],调整抗坏血酸钠缓冲液比例与前体质量(50、100和150 μg),混合后加入¹⁷⁷LuCl₃,分别在70和80℃下反应30 min。标记流程见图1。

2. ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2的质量控制及稳定性。(1)采用ITLC法计算标记率和放化纯。¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2在ITLC-SG色谱纸距边缘1 cm处点样,0.1 mol/L柠檬酸钠溶液作为展开剂,通过ITLC扫描仪检测。 $R_f = [\text{样品位置}(\text{min}) - \text{起始位置}(0.1 \text{ min})] / \text{总距离}(0.9 \text{ min})$ ^[14]。(2)稳定性研究。将新鲜制备的20 μl ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2(185 MBq/L)分别置于30 μl PBS及30 μl稀释的人血浆中,37℃温育1~12 d,每天通过ITLC监测放化纯。

3. 细胞培养及细胞毒性实验。取HER2阳性SKOV-3细胞于37℃、体积分数5% CO₂的恒温培养箱中进行培养。将细胞铺于96孔板,温育过夜,按照每孔0、1.5、3.0、6.0、12.0、24.0×10⁻³ Bq/L的放射性浓度加入探针,温育12 h,通过细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)测定细胞存活率。

4. 细胞内化实验。采用酸洗法进行细胞内化实验^[15]。将SKOV-3细胞铺于6孔板,温育过夜,弃上清,按照37 kBq/孔加入探针,温育0、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h。温育结束后,用0.5 ml PBS清洗1次,加入预冷的0.5 ml pH=2的尿素溶液(含4 mol/L尿素和0.2 mol/L甘氨酸),静置5 min,收集上清液,测量放射性计数,作为细胞膜放射性计数A_膜。室温下加入0.5 ml NaOH溶液,静置3 min,测定放射性计数,作为细胞膜内放射性计数A_内。分别计算细胞膜和细胞内放射性摄取率(即内化率)。膜表面摄取率 $U_{\text{膜}} = A_{\text{膜}} / (A_{\text{膜}} + A_{\text{内}}) \times 100\%$;内化率 $U_{\text{内}} = A_{\text{内}} / (A_{\text{膜}} + A_{\text{内}}) \times 100\%$ 。

5. 构建移植瘤模型。常规培养SKOV-3细胞,经对数生长期后,进行细胞消化,使用PBS重悬为细胞悬液。将细胞皮下接种于雌性裸鼠($n=50$)左前肢腋下(每只小鼠 1.3×10^6 个细胞/100 μl),正常饲养,定期用游标卡尺测量肿瘤体积($V=0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$),待接种部位瘤块大小为100~300 mm³时,用于后续实验。

6. 荷瘤鼠microSPECT/CT显像。荷瘤鼠($n=3$)尾静脉注射(静注)18.5 MBq ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2后2、6、24、96 h行平面显像(静注18.5 MBq组);荷瘤鼠($n=3$)瘤体注射3.7 MBq ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2后第6、14天行microSPECT/CT显像(瘤注3.7 MBq组)。显像参数:高能准直器,视野80 mm,扫描时间60 s;CT:电压45 kV,电流0.4 mA;采用有序子集最大期望值迭代法(2次迭代)重建SPECT图像,滤波反投影法重建CT,采用PMOD软件(德国Brucker公司)对图像进行处理。

7. 荷瘤鼠治疗。将20只荷瘤鼠采用简单随机分组的方法分为2组,每组10只,分别静注22.2 MBq ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2(静注22.2 MBq组)和等体积(100 μl)PBS(对照组);另取20只荷瘤鼠,采用简单随机分组的方法分为低剂量组和高剂量组2组,每组10只,分别瘤体注射¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2 3.7和7.4 MBq,注射后每天测量荷瘤鼠的体质量和肿瘤体积,并计算相对体质量(relative body mass, RBM; $\text{RBM} = \text{第}x\text{天的荷瘤鼠体质量} / \text{第}0\text{天的荷瘤鼠体质量}$)和相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV; $\text{RTV} = \text{TV}_x / \text{TV}_0$,其中TV_x对应第x天的肿瘤体积,TV₀对应第0天的体积)^[11],与对照组对比评估治疗效果。

8. 病理学检查。注射后10 d,采用异氟烷麻醉处死治疗组别的荷瘤鼠(每组3只),采集主要器官(心、肝、脾、肺、肾)和肿瘤,于4℃体积分数37%甲醛溶液中固定48 h,脱水,石蜡包埋,制成5 μm切片用于HE染色^[15]和细胞增殖核抗原Ki-67免疫组织化学分析。

9. 统计学处理。采用GraphPad Prism 8软件分析数据。符合正态分布的定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用重复测量方差分析,组间两两比较采用Bonferroni法;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. ¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2标记工艺优化。在乙

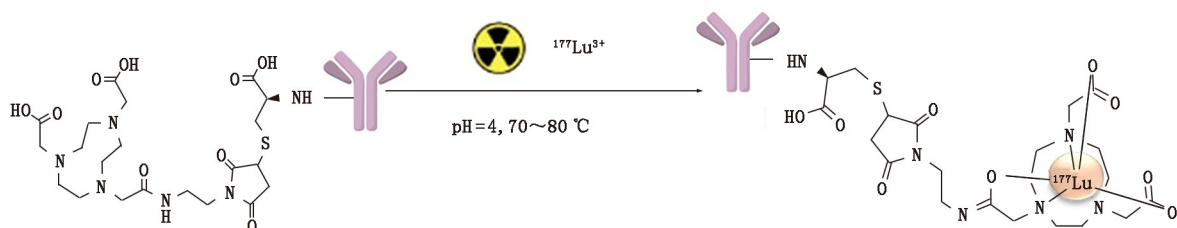


图1 ¹⁷⁷Lu-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-马来酰亚胺(Mal)-半胱氨酸(Cys)-ZHER_{2,342}(MZHER2)的标记流程图

酸钠缓冲液体系下,标记率受 pH 值、前体质量和温度的影响。结果显示,pH=4 时标记率最高(>99%)并稳定;前体质量为 50~200 μg 时,标记率>95%,50 μg 时即达(99.3 \pm 0.4)%;70 $^{\circ}\text{C}$ 时标记率最高,随后保持稳定。因此,最优条件为:pH=4、前体 50 μg 、70~80 $^{\circ}\text{C}$ 、反应 30 min,此时放化纯>99%,标记率(99.3 \pm 0.4)%。在抗坏血酸钠缓冲液体系下,不同反应温度的标记率均<90%,最高仅为(86.0 \pm 0.5)%。相比之下,乙酸钠缓冲液体系标记率更高。

2. ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 的质量控制及稳定性。游离 ^{177}Lu 的 R_f 为 0.980,标记后的探针 R_f 为 0.065,接近原点,探针标记率>99%。在 PBS 和血浆中放置 12 d,放化纯分别为(95.0 \pm 1.5)%、(95.0 \pm 2.1)%,表明探针具有良好的体外稳定性。

3. 细胞毒性实验与内化实验。当 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 放射性浓度为 6.0×10^{-3} Bq/L 时,SKOV-3 细胞存活率为(48 \pm 6)% (图 2A),表明探针对 SKOV-3 细胞具有较强的杀伤效应。SKOV-3 细胞对探针的摄取在注射后 0.5 h 达平台期,每 10^6 个细胞的摄取百分比(percentage absorbed dose, %AD)为 7.41 ± 0.17 (图 2B),注射后 0.5~6.0 h 细胞内化占总摄取的(29.02 \pm 3.50)%,注射后 6.0 h 时该探针细胞内化占总摄取的(35.00 \pm 1.50)%。

4. 荷瘤鼠显像结果。静注 18.5 MBq 组注射 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 后 96 h 的平面显像中,仍可见探针在肿瘤和肾脏浓聚(图 3A);瘤注 3.7 MBq 组注射后第 6、14 天,SPECT/CT 显像示探针聚集在肿瘤区域,未观察到明显的扩散或溢出(图 3B),表明其具有较强的靶向性。

5. 荷瘤鼠的治疗。静注 22.2 MBq 组注射 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 后 10 d,RTV 为(134 \pm 21)%,与对照组差异有统计学意义[(322 \pm 121)%; $t=3.46, P=$

0.003];两者肿瘤体积分别增长了(34 \pm 21)%和(222 \pm 121)%。静注 22.2 MBq 组荷瘤鼠于第 10 天开始自然死亡,16 d 时 RBM 为(76.0 \pm 9.1)%,减轻了约 20%,相较于对照组 RBM 下降明显[(97.0 \pm 3.1)%; $t=4.75, P<0.001$;图 4]。

静注 22.2 MBq 组、高剂量组、低剂量组与对照组比较,荷瘤鼠的 RTV 差异有统计学意义($F=21.75, P<0.001$)。注射 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 后 15 d,低剂量组 RTV 为(149 \pm 19)%,增长了(49 \pm 19)%,高剂量组 RTV 为(92 \pm 10)%,对照组 RTV 为(409 \pm 31)%,增长了(309 \pm 31)% ($F=32.98, P<0.001$);其中高剂量组 RTV 小于对照组($P<0.001$),亦小于低剂量组($P<0.001$);低剂量组 RTV 亦小于对照组($P<0.001$)。注射后 20 d,低剂量组 RTV 为(308 \pm 33)%,增长了(208 \pm 34)%,高剂量组 RTV 为(140 \pm 7)%,增长了(40 \pm 7)%,对照组 RTV 为(595 \pm 42)% ($F=28.41, P<0.001$);高剂量组 RTV 小于对照组($P<0.001$)。注射后 20 d,低剂量组 RBM 为(92 \pm 4)%,高剂量组 RBM 为(80 \pm 9)%,对照组 RBM 为(82 \pm 12)% ($F=34.28, P<0.001$);高剂量组 RBM 与对照组的差异有统计学意义($P<0.001$)。注射高剂量组 23 d 时 RBM 为(85 \pm 1)%。上述表明,低剂量组在前期(15 d 内)抑制了肿瘤增长,而高剂量组在 23 d 内抑制肿瘤增长,延长了荷瘤鼠的生存时间(图 4)。

6. 病理学检查(图 5)。HE 染色示,静注探针后 10 d,荷瘤鼠肾损伤明显,肾小管组织异常病变(图 5A);高剂量组注射后 12 d,肝组织轻度损伤(图 5C),而心、脾、肺、肾等主要器官未见明显异常;与对照组比,经 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 治疗后荷瘤鼠肿瘤细胞增殖明显减少(图 5B)。

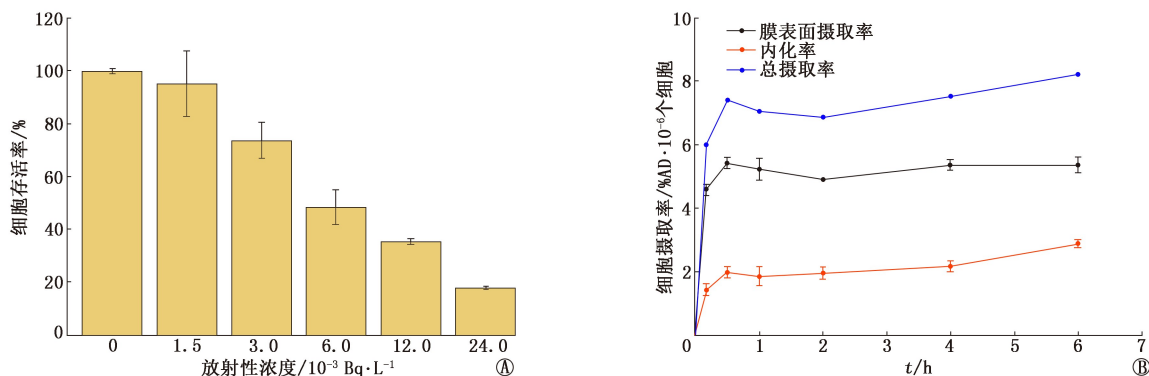


图 2 SKOV-3 细胞注射 ^{177}Lu -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (NOTA)-马来酰亚胺 (Mal)-半胱氨酸 (Cys)-ZHER $_{2,342}$ (MZHER2) 后的细胞存活率 (A) 和细胞摄取率情况 (B)。%AD· 10^6 个细胞即每 10^6 个细胞的摄取百分比

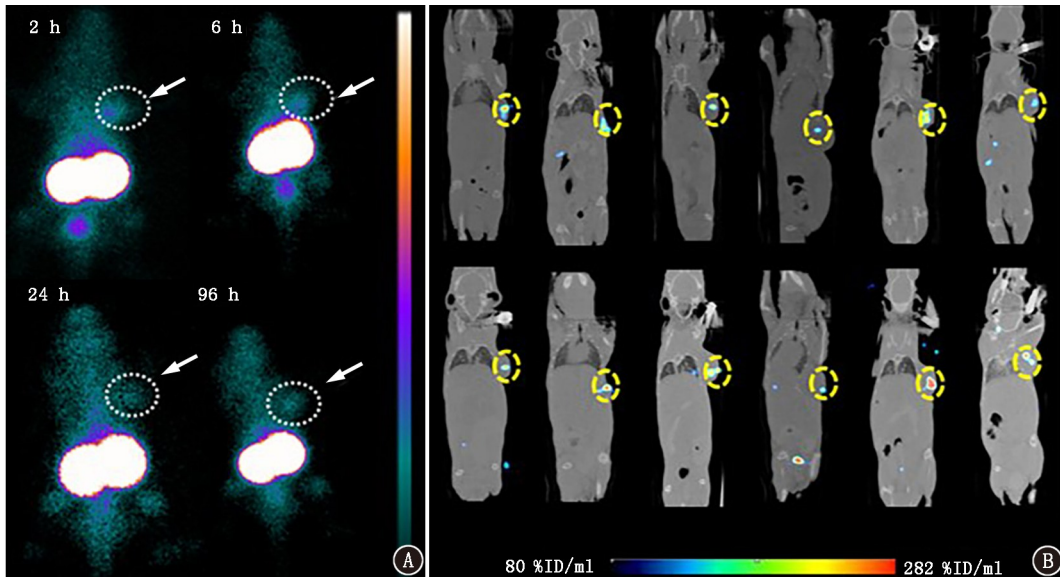


图3 荷瘤鼠尾静脉注射(静注)不同剂量¹⁷⁷Lu-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-马来酰亚胺(Mal)-半胱氨酸(Cys)-ZHER₂:342(MZHER2)后的影像学检查图。A.静注18.5 MBq后的平面显像图,可见肿瘤和肾脏区域探针聚集(箭头及椭圆示肿瘤);B.瘤体注射3.7 MBq后6 d(上排)和14 d(下排)的SPECT/CT显像图,可见肿瘤区域探针聚集(椭圆示肿瘤);%ID为百分注射剂量率

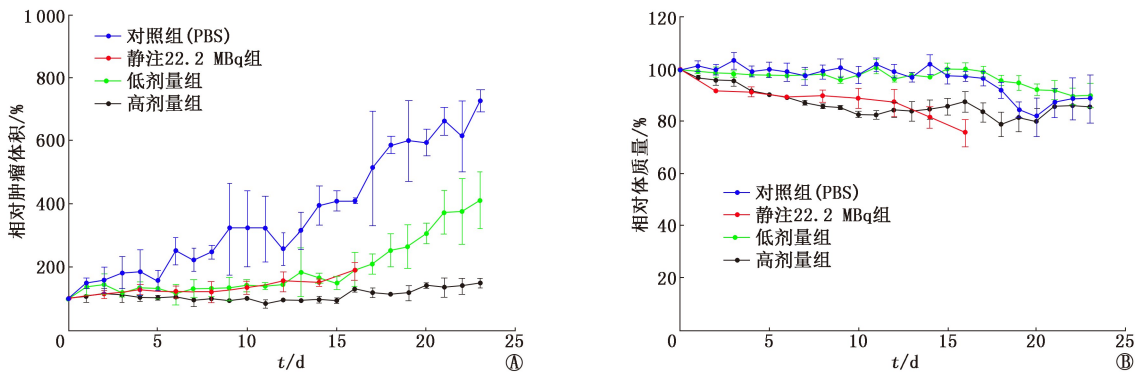


图4 不同组别荷瘤鼠注射¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2后不同时间的相对肿瘤体积(A)及相对体质量变化曲线(B)。因静注22.2 MBq组荷瘤鼠在第16天时体质量减轻了20%,需实施安乐死,故观察时间较短,未观察更多时长;高、低剂量组分别瘤体注射探针7.4和3.7 MBq

讨论

¹⁷⁷Lu 是常用的治疗性核素,具有合适的半衰期(6.7 d),可用于 SPECT/CT 显像。相比于其他的治疗核素,¹⁷⁷Lu 已实现国产化^[16-17],成本较低,易获取。本研究采用诊断探针标记前体 NOTA-MZHER2 为载体,用治疗性核素¹⁷⁷Lu 对 NOTA-MZHER2 进行标记,以期实现诊疗一体化。

本研究首先对¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2 的标记工艺进行了优化,在乙酸钠缓冲液体系下,pH 值为 4,前体质量 50 μg,标记温度 70~80 °C,反应 30 min 时,标记产率最高,为(99.3±0.4)%,与文献报道¹⁷⁷Lu 标记的 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)类前体及¹⁷⁷Lu-ABY-027 产率相

当^[13]。经 ITLC 检测,其放化纯均>99%,且在 PBS 和血浆中 12 d 内可保持稳定。在抗坏血酸钠缓冲液体系下,¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2 的标记率最高为(86.0±0.5)%,低于 DOTA-酪氨酸 3-奥曲肽(Tyr3-octreotide, TOC)、DOTA-前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)等前体的标记率(>99%)^[18],提示¹⁷⁷Lu 标记可能受整合剂、前体性质等因素的影响,但还需进一步研究加以验证。细胞实验结果显示,6 h 时该探针细胞内化占总摄取的(35.00±1.50)%,与¹⁷⁷Lu-DOTA-ZHER₂:342-3 的 SKOV-3 细胞内化[(38±2)%]相当^[19]。

本研究进一步考察了¹⁷⁷Lu-NOTA-MZHER2 的抗肿瘤作用。体外细胞实验表明,探针对 SKOV-3 细胞具有较强的杀伤能力。本研究设立了多个实验组,分别采用尾静脉注射与瘤体注射2种给药方式

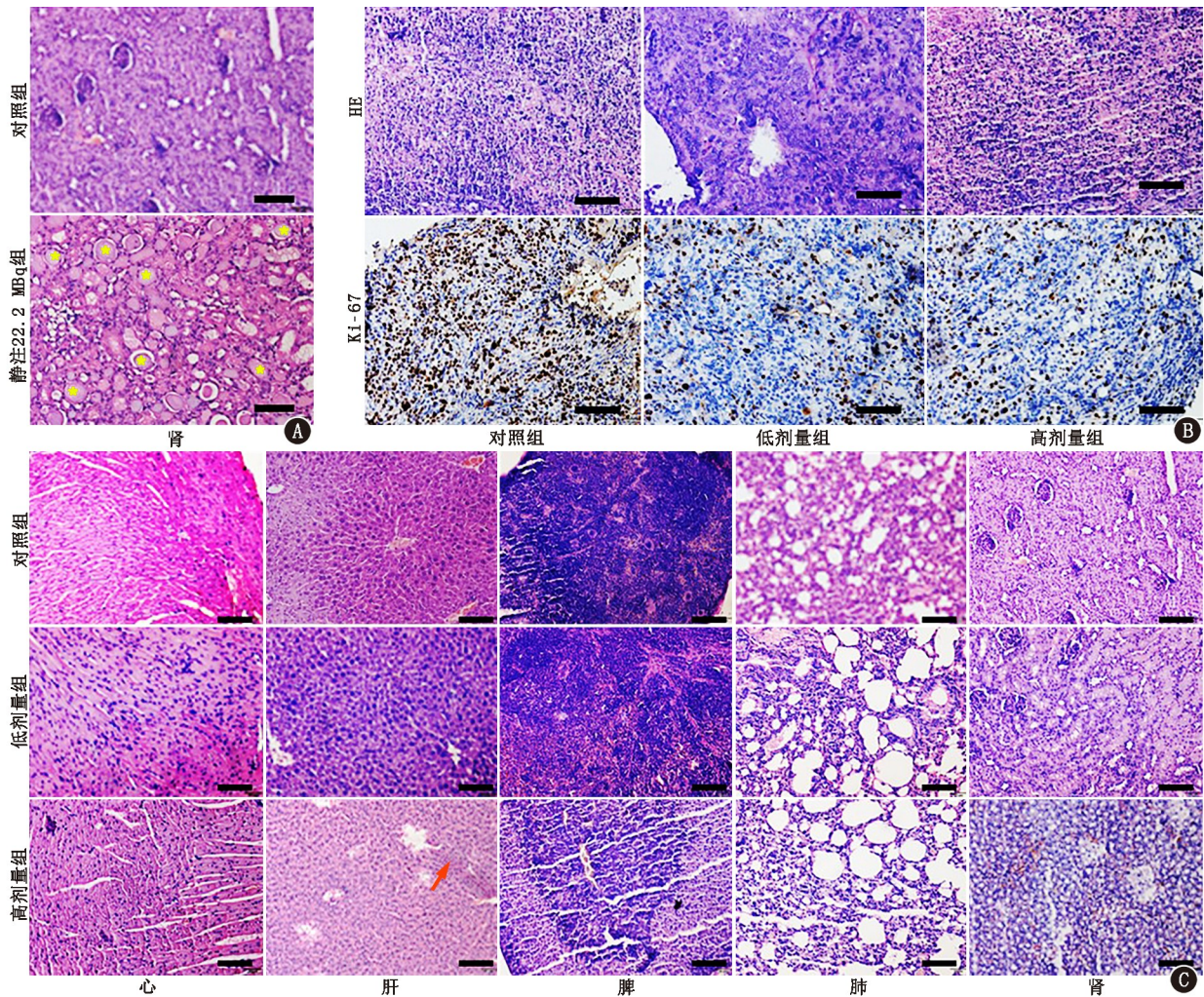


图 5 不同组别荷瘤鼠 HE 染色和细胞增殖核抗原 Ki-67 免疫组织化学分析图[抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法;标尺均为 50 μm]。A.尾静脉注射(静注)22.2 MBq 组[注射 22.2 MBq 的 ^{177}Lu -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-马来酰亚胺(Mal)-半胱氨酸(Cys)-ZHER₂,₃₄₂(MZHER2)]与对照组(PBS)肾组织的 HE 染色示对照组肾组织未见异常,静注 22.2 MBq 组可见肾小管病变(星号示);B. HE 染色和 Ki-67 免疫组织化学分析示高剂量组(瘤体注射探针 7.4 MBq)细胞增殖减少最明显;C.主要器官 HE 染色示高剂量组肝组织上有轻微损伤(箭头示);低剂量组为瘤体注射探针 3.7 MBq

加以对比研究。SPECT 显像可见,探针注射后 96 h 仍在肿瘤部位浓聚,表明 ^{177}Lu 标记未影响 NOTA-MZHER2 的靶向性。在治疗实验中,尾静脉注射 22.2 MBq 后 10 d,荷瘤鼠 RTV 为 $(134 \pm 21)\%$,肿瘤体积增长了 $(34 \pm 21)\%$;对照组 RTV 为 $(322 \pm 121)\%$ ($t = 3.46, P = 0.003$),增长了 $(222 \pm 121)\%$,短期内有效,但 HE 染色示肾损伤明显。瘤体注射低剂量组荷瘤鼠 15 d 的 RTV 为 $(149 \pm 19)\%$,增长了 $(49 \pm 19)\%$,低于对照组的 RTV [$(409 \pm 31)\%$],虽然 15 d 内有一定疗效,但随着核素衰变,疗效也随之下降;高剂量组 15 d 后荷瘤鼠 RTV 为 $(92 \pm 10)\%$,20 d 时 RTV 为 $(140 \pm 7)\%$,在治疗整个阶段的疗效(RTV)都优于低剂量组(均 $P < 0.001$),且 23 d 时 RBM 为 $(85 \pm 1)\%$,无需安乐死,从而延长了荷瘤鼠

的生存期,但由于移植瘤与肝较近,引起了轻微的肝损伤。以上结果表明,简单地通过核素替换将 ^{68}Ga -NOTA-MZHER2 诊断性探针改造为治疗性探针,虽然抑瘤效果明显,但存在不足,需进一步改善来降低肾脏摄取,优化治疗剂量,从而提高安全性^[19]。

综上,本研究成功制备了 ^{177}Lu -NOTA-MZHER2 治疗探针,工艺简单,标记率高,长时间稳定。尽管注射后存在一定程度的肾损伤,但在 HER2 阳性移植瘤模型的诊疗一体化研究方面显示出良好的疗效与靶向性,后续将进一步优化该探针的体内性能,提高安全性。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 国洪霞:研究实施、文章撰写;潘栋辉、徐宇平:研究设计;宿晨:数据分析和解释;王立振:研究支持;严俊杰、王辛宇、陈重阳、杨慧:论文审阅;杨敏:研究指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies—a role beyond breast cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(1): 33-48. DOI:10.1038/s41571-019-0268-3.
- [2] Burley TA, Da Pieve C, Martins CD, et al. Affibody-based PET imaging to guide EGFR-targeted cancer therapy in head and neck squamous cell cancer models[J]. *J Nucl Med*, 2019, 60(3): 353-361. DOI:10.2967/jnumed.118.216069.
- [3] Xu Y, Wang L, Pan D, et al. PET imaging of a ^{68}Ga labeled modified HER2 affibody in breast cancers: from xenografts to patients[J]. *Br J Radiol*, 2019, 92(1104): 20190425. DOI:10.1259/bjr.20190425.
- [4] Xu Y, Bai Z, Huang Q, et al. PET of HER2 expression with a novel ^{18}F labeled affibody[J]. *J Cancer*, 2017, 8(7): 1170-1178. DOI:10.7150/jca.18070.
- [5] Miao H, Sun Y, Jin Y, et al. Application of a novel ^{68}Ga -HER2 affibody PET/CT imaging in breast cancer patients[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 894767. DOI:10.3389/fonc.2022.894767.
- [6] Zhou N, Liu C, Guo X, et al. Impact of ^{68}Ga -NOTA-MAL-MZHER2 PET imaging in advanced gastric cancer patients and therapeutic response monitoring[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48(1): 161-175. DOI:10.1007/s00259-020-04898-5.
- [7] 陈跃.我国诊疗一体化核素及放射性药物临床应用与展望[J]. *协和医学杂志*, 2022, 13(2): 187-191. DOI:10.12290/xhyxzz.2021-0557.
Chen Y. Development and prospect of theranostic medical isotopes and radiopharmaceuticals in China[J]. *Med J Peking Union Med Coll Hosp*, 2022, 13(2): 187-191. DOI:10.12290/xhyxzz.2021-0557.
- [8] Zhang J, Song Q, Cai L, et al. The efficacy of ^{177}Lu -DOTATATE peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in patients with metastatic neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(6): 1533-1543. DOI:10.1007/s00432-020-03181-2.
- [9] Chan DL, Hayes AR, Karfis I, et al. Dual [^{68}Ga] DOTATATE and [^{18}F] FDG PET/CT in patients with metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: a multicentre validation of the NETPET score[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(4): 549-555. DOI:10.1038/s41416-022-02061-5.
- [10] 汪静. $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -PSMA 在前列腺癌靶向诊疗中的作用[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2019, 39(2): 65-66. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.001.
Wang J. Role of $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -PSMA in theranostic of prostate cancer[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 39(2): 65-66. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.001.
- [11] Borgna F, Deberle LM, Busslinger SD, et al. Preclinical investigations to explore the difference between the diastereomers [^{177}Lu] Lu-SibuDAB and [^{177}Lu] Lu-RibuDAB toward prostate cancer therapy[J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(7): 2105-2114. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.1c00994.
- [12] 卜婷,张川,臧士明,等. ^{177}Lu -PSMA-617 治疗转移性前列腺癌的安全性和疗效[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2019, 39(2): 81-85. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.005.
Bu T, Zhang C, Zang SM, et al. Safety and efficacy of ^{177}Lu -PSMA-617 therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 39(2): 81-85. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.005.
- [13] 张朋俊,张露露,卜婷,等. ^{177}Lu 标记的放射性药物制备方法的比较及初步临床应用[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2022, 42(10): 597-601. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210201-00021.
Zhang PJ, Zhang LL, Bu T, et al. Comparison of preparation for ^{177}Lu -labeled radiopharmaceutical and its preliminary clinical application[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2022, 42(10): 597-601. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210201-00021.
- [14] 廖伟,付华霞,李祥玉,等.寡聚苯乙炔修饰 RM26 的 ^{177}Lu 标记和细胞内化研究[J]. *同位素*, 2022, 35(3): 200-208. DOI:10.7538/tws.2022.35.03.0200.
Liao W, Fu HX, Li XY, et al. ^{177}Lu Radiolabeling of RM26 modified with oligo-phenylene-ethynylene and its cellular internalization[J]. *J Isot*, 2022, 35(3): 200-208. DOI:10.7538/tws.2022.35.03.0200.
- [15] Wang H, Yu D, Fang J, et al. Renal-clearable porphyrinic metal-organic framework nanodots for enhanced photodynamic therapy[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(8): 9206-9217. DOI:10.1021/acs.nano.9b03531.
- [16] Chong HS, Chen Y, Kang CS, et al. Pyridine-containing octadentate ligand NE3TA-PY for formation of neutral complex with ^{177}Lu (III) and ^{90}Y (III) for radiopharmaceutical applications; synthesis, DFT calculation, radiolabeling, and *in vitro* complex stability[J]. *J Inorg Biochem*, 2021, 221: 111436. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2021.111436.
- [17] 张心怡,傅文会,徐婷婷,等.国产 ^{177}Lu 标记 PSMA-617 的制备及初步生物学评价[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2021, 41(5): 296-302. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200401-00135.
Zhang XY, Fu WH, Xu TT, et al. Preparation and preliminary biological evaluation of domestic ^{177}Lu -PSMA-617[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 41(5): 296-302. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200401-00135.
- [18] Oroujeni M, Rinne SS, Vorobyeva A, et al. Preclinical evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ZHER2: 41071, a second-generation affibody-based HER2-visualizing imaging probe with a low renal uptake[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2770. DOI:10.3390/ijms22052770.
- [19] Fortin MA, Orlova A, Malmström PU, et al. Labelling chemistry and characterization of [$^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$]-DOTA-ZHER_{2,342-3} affibody molecule, a candidate agent for locoregional treatment of urinary bladder carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19(2): 285-291.
(收稿日期:2024-01-29)