

PD-L1 靶向单域抗体的定点标记及生物学评价

陈银飞 陈盼盼 朱诗宇 梁蓓蓓 谢敏浩 林建国 邱玲

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:邱玲, Email: qiuling@jsinm.org

【摘要】 目的 设计合成⁶⁸Ga-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(CDV)-Nb109,探讨其用于检测不同肿瘤中程序性细胞死亡蛋白配体 1(PD-L1)表达水平的潜力。方法 采用基因工程技术将 CDV 引入单域抗体 Nb109 序列的尾部,通过马来酰亚胺-半胱氨酸定点偶联策略,将马来酰亚胺-DOTA 与 CDV-Nb109(物质的量比 1:1)反应制备前体 DOTA-CDV-Nb109,随后进行⁶⁸Ga 标记并用 PD-10 脱盐柱纯化。建立人黑色素瘤 A375、人源性 PD-L1 转染的 A375-hPD-L1 及人胶质瘤 U87 荷瘤裸鼠模型,通过稳定性分析、细胞摄取和 microPET 显像评价⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 的诊断价值。采用单因素方差分析和最小显著差异 *t* 检验分析数据。结果 ⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 放射化学产率为(69.79±4.69)%,放化纯大于 97%,摩尔活度为(12.85±1.51) GBq/μmol。⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 与 A375-hPD-L1 细胞具有较强的亲和力,解离常数(*K_d*)为(66.43±17.89) nmol/L。⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 细胞[(3.17±0.15)百分加入放射性剂量(%AD)]、U87 细胞[(2.08±0.03) %AD]中的摄取明显高于 A375 细胞[(1.21±0.14) %AD;*F*=82.87, *t* 值:15.23, 9.98, *P* 值:<0.001, 0.003]。⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 [(5.21±0.35) 每毫升百分注射剂量率(%ID/ml)]和 U87 [(3.44±0.69) %ID/ml] 荷瘤裸鼠肿瘤中的摄取显著高于 A375 荷瘤裸鼠[(2.17±0.36) %ID/ml; *F*=249.72, *t* 值:35.70, 3.43, 均 *P*<0.001]。结论 成功制得定点标记的 PET 探针⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109,可无创、动态监测不同肿瘤中 PD-L1 表达水平的变化,在 PD-L1 免疫检查点阻断治疗潜在受益患者筛选方面具有应用潜力。

【关键词】 程序性细胞死亡受体 1;单域抗体;同位素标记;镓放射性同位素;肿瘤细胞,培养的;正电子发射断层显像术;小鼠,裸

基金项目:无锡市科技发展资金项目(Y20212013)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220509-00151

Site-specific labelling and biological evaluation of PD-L1 targeted single-domain antibody

Chen Yinfei, Chen Panpan, Zhu Shiyu, Liang Beibei, Xie Minhao, Lin Jianguo, Qiu Ling

NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

Corresponding author: Qiu Ling, Email: qiuling@jsinm.org

【Abstract】 Objective To synthesize a novel site-specifically labelled probe ⁶⁸Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-Cys-Asp-Val (CDV)-Nb109 and explore its potential for detection of the programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression level in different tumors. **Methods** Firstly, CDV was inserted into the tail of the sequence of Nb109 by genetic engineering. Then the precursor DOTA-CDV-Nb109 was prepared by mixing the maleimide-DOTA and the single-domain antibody CDV-Nb109 (amount of substance ratio 1:1) via the maleimide-cysteine site-specific coupling strategy. Subsequently, the DOTA-CDV-Nb109 was labeled with ⁶⁸Ga and purified by PD-10 column. Human melanoma A375, human PD-L1 transfected melanoma A375-hPD-L1 and human glioma U87 tumor-bearing mice models were established, and the diagnostic value of ⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 was evaluated by stability assay, cellular uptake, and microPET imaging. One-way analysis of variance and the least significant difference *t* test were used to analyze the data. **Results** The probe ⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 was obtained with the radiochemical yield of (69.79±4.69)%, radiochemical purity more than 97%, and molar activity of (12.85±1.51) GBq/μmol. ⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 had strong binding affinity for A375-hPD-L1 with the dissociation constant (*K_d*) of (66.43±17.89) nmol/L. The uptake of ⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 in A375-hPD-L1 and U87 cells were (3.17±0.15) percentage of the added radioactivity dose (%AD) and (2.08±

0.03) %AD respectively, which were significantly higher than that in A375 cells ((1.21±0.14) %AD; $F=82.87$, t values: 15.23, 9.98, P values: <0.001, 0.003). The tumor uptake of the probe in A375-hPD-L1 ((5.21±0.35) percentage of injected dose per ml (%ID/ml)) and U87 tumor-bearing mice ((3.44±0.69) %ID/ml) were significantly higher than that in A375 tumor-bearing mice ((2.17±0.36) %ID/ml; $F=249.72$, t values: 35.70, 3.43, both $P<0.001$). **Conclusion** The site-specifically labelled probe ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109, which can non-invasively and dynamically monitor the change of PD-L1 expression level in different tumors and help screen patients who can benefit from PD-L1 immune checkpoint blocking therapy, is successfully synthesized with high radiochemical purity.

【Key words】 Programmed cell death 1 receptor; Single-domain antibodies; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Tumor cells, cultured; Positron-emission tomography; Mice, nude

Fund program: Science and Technology Development Foundation of Wuxi (Y20212013)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220509-00151

程序性细胞死亡蛋白配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 免疫检查点阻断治疗已在多种恶性肿瘤治疗中显示出良好的疗效, 但仅有部分患者从中受益, 其整体反应率为 10%~40%^[1]。肿瘤部位 PD-L1 表达阳性的患者进行免疫检查点阻断治疗的客观缓解率显著提升, 患者的存活时间明显延长^[2]。由于肿瘤的异质性及 PD-L1 表达的动态变化等特性, 临床常用的免疫组织化学无法准确检测 PD-L1 在病灶中的表达情况^[3]。PET 具有高灵敏度、高特异性的特点, ^{68}Ga -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)-Nb109 能够实时、无创定量检测肿瘤中 PD-L1 表达, 可在极短时间内获得高靶本比的显像结果^[4-5]。但 S-2-[(4-异硫氰基苯基)甲基]-NOTA [S-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-NOTA, p-SCN-Bn-NOTA] 与单域抗体 Nb109 偶联时, 由于 Nb109 的骨架区有 3 个赖氨酸残基, 制备过程中无法控制螯合剂与抗体偶联的位置、数量, 故所得的放射性探针前体为单域抗体分子结合的单、双 NOTA 混合物。本研究拟在 Nb109 序列尾部引入半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (Cys-Asp-Val, CDV), 利用半胱氨酸裸露的巯基与马来酰亚胺-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) 按物质的量比 1:1 反应, 随后进行 ^{68}Ga 标记, 得到定点标记的探针 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109, 并探讨其用于检测不同肿瘤中 PD-L1 表达水平的能力, 有望为筛选抗 PD-L1 疗法受益患者提供更为精准的手段。

材料与方法

一、实验仪器与材料

1. 主要仪器。 $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ 发生器 (IGG-100, 德国 Eckert & Ziegler AG 公司), 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (1525 型, 美国 Waters 公司), 放射性薄层色谱扫描 (thin-layer

chromatography, TLC) 仪 (Mini-Scan, 美国 Bioscan 公司), 多探头全自动 γ 计数器 (1470 Wizard, 美国 Perkins Elmer 公司), microPET 仪 (Inveon Dedicate, 德国 Siemens 公司)。

2. 主要试剂。马来酰亚胺-DOTA 购于西安齐岳生物科技有限公司; 三(2-羧基乙基) 膦盐酸盐 [tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP]、乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙酸铵购于上海阿拉丁试剂有限公司; 浓 HCl、乙酸钠、柠檬酸均购于中国国药集团有限公司; 小鼠血清购于南京森贝伽生物科技有限公司; 所有细胞培养相关试剂均购于以色列 Biological Industries 公司和上海碧云天生物技术有限公司; 异氟烷购于深圳瑞沃德生命科技有限公司。

3. 细胞株和实验动物。已有研究成功验证了人黑色素瘤 A375 细胞为 PD-L1 阴性细胞, 人源性 PD-L1 转染的 A375-hPD-L1 细胞为 PD-L1 高表达细胞, 人胶质瘤 U87 细胞为内源性 PD-L1 高表达的细胞^[5-6]。因此, 选择这些细胞进行后续实验, 其中 A375 和 A375-hPD-L1 细胞由苏州智核生物医药科技有限公司提供, U87 细胞购于中国科学院细胞库。雌性 BALB/c 裸鼠 24 只, 4~5 周龄, 体质量约 20 g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 无特殊病原体环境中饲养 [实验动物使用许可证号: SYXK(苏) 2019-0025]。本实验方案由江苏省原子医学研究所动物管理与伦理委员会批准 (2020046)。

二、实验方法

1. DOTA-CDV-Nb109 的制备及质量控制。通过基因工程将 CDV 对应的 DNA 片段引入到 Nb109 的 DNA 片段尾部。将新获得的 DNA 片段重新克隆到合适的哺乳动物表达载体 pcDNA4 中, 参照文献 [5] 进行扩增纯化得到定点修饰的蛋白 CDV-Nb109。将 CDV-Nb109 与 TCEP 以物质的量比 1:2 混合, 于 37 °C 还原 2 h。随后 4 °C 下 12 000 r/min

(离心半径 10 cm) 离心 15 min, 离心 2 次, 除去 TCEP, 并换液为含有 2 mmol/L EDTA 的乙酸铵 (0.2 mol/L) 溶液。将蛋白质分别与马来酰亚胺-DOTA 以物质的量比 1:2 混合, 于 37 °C 偶联 2 h。随后通过超滤技术进行脱盐纯化, 纯化后的 DOTA-CDV-Nb109 在纯水中收集, -80 °C 保存, 通过 HPLC 和高分辨质谱对前体进行质量控制。

2. ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 的制备 (图 1)、质量控制及稳定性。使用 0.05 mol/L HCl (4 ml) 从 $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ 发生器中洗脱获得 ^{68}Ga , 取放射性活度较高的核心段 (1.4 ml) 进行后续实验。淋洗液加入 0.25 mol/L 乙酸钠溶液 (约 380 μl) 至 pH = 4.0, 加入标记前体 DOTA-CDV-Nb109 (50 μg), 80 °C 反应 15 min。反应结束后, 以生理盐水为洗脱液用 PD-10 脱盐柱进行纯化。随后取 3 μl 反应产物滴至滤纸 (宽度为 1 cm) 下端 1 cm 处, 置于展开体系 (10 mmol 柠檬酸水溶液) 中, 待产物展开至距下端 10 cm 处时取出晾干, 进行放射性 TLC 分析。将探针 (200 μl , 37 GBq/L) 溶于 200 μl PBS 或小鼠血清中, 放置在 37 °C 下温育 120 min, 采用放射性 TLC 进行放化纯分析。

3. 解离常数 (K_d) 的测定。将 A375-hPD-L1 细胞接种于 12 孔板 (3×10^5 个细胞/孔), 培养过夜。为了进行饱和结合分析, 将细胞与浓度递增 (0 ~ 125 nmol/L) 的 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 单独 (总结合) 或与额外 100 倍的 DOTA-CDV-Nb109 (非特异性结合) 在 37 °C 温育 1 h, 然后用 500 μl 冷 PBS 清洗细胞 2 次, 将细胞收集后使用 γ 计数器测量放射性。通过总结合与非特异性结合曲线相减拟合得到特异性结合曲线。

4. 竞争抑制实验。将 A375-hPD-L1 细胞接种于 12 孔板 (3×10^5 个细胞/孔), 培养过夜。依次加入 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 (3.7×10^4 Bq)、DOTA-CDV-Nb109 (浓度为 $10^{-3} \sim 10^3$ nmol/L), 在 37 °C 温育 1 h; 然后用 500 μl 冷 PBS 清洗细胞 2 次, 将细胞收集后用 γ 计数器测量放射性。以 DOTA-CDV-Nb109 浓度为

横坐标绘制竞争抑制曲线。

5. 细胞摄取实验。将 A375、A375-hPD-L1 和 U87 细胞分别以 1×10^6 个细胞/200 μl 新鲜无血清培养基的浓度转移到试管中, 随后加入含探针 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 (3.7×10^4 Bq) 的新鲜无血清培养基 (100 μl)。阻断组使用 500 倍的 DOTA-CDV-Nb109 预处理 30 min, 然后在 37 °C 分别温育 15、30、60 和 120 min。去除培养基后用 500 μl 冷 PBS 洗涤 2 次, 收集细胞后用 γ 计数器测量放射性, 计算细胞百分加入放射性剂量 (percentage of the added radioactivity dose, %AD; %AD = 样本放射性计数/标记化合物的空白参比放射性计数 $\times 100\%$)。

6. 荷瘤裸鼠模型的建立。(1) microPET 显像 (均 $n = 7$): 将 5×10^6 个 A375 和 A375-hPD-L1 细胞分别接种于同 1 只裸鼠的左、右上肢腋窝皮下; 将 5×10^6 个 U87 细胞接种于裸鼠右上肢腋窝皮下。(2) 生物分布研究 (均 $n = 5$): 将 5×10^6 个 A375 或 A375-hPD-L1 细胞接种于裸鼠的右上肢腋窝皮下。监测肿瘤体积 ($V = \pi/6 \times L \times W \times H$; 其中 L 代表肿瘤长径、 W 代表与长径垂直的横径、 H 代表肿瘤高度), 待长至 150 ~ 250 mm^3 时即可用于实验。

7. MicroPET 显像。荷瘤裸鼠尾静脉注射 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 (5×10^6 Bq) 后, 采用体积分数 2% 异氟烷麻醉, 通过 1 h 动态扫描和 10 min 静态扫描获得全身 PET 显像。利用三维有序子集最大期望值迭代法重构图像, 勾画 ROI 来估算放射性探针在肿瘤病灶和肌肉的摄取值, 并以每毫升百分注射剂量率 (percentage of injected dose per ml, %ID/ml) 表示 [$\% \text{ID/ml} = \text{ROI}$ 残留的放射性浓度 (Bq/ml) / 注射的总放射性活度 (Bq) $\times 100\%$]。

8. 体内生物分布研究。A375-hPD-L1 和 A375 荷瘤裸鼠 (均 $n = 5$) 分别称体质量, 尾静脉注射 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 (5×10^6 Bq)。探针注射后 1 h, 将裸鼠处死后取出相应器官 (心脏、肺、肝、脾、肾、胃、

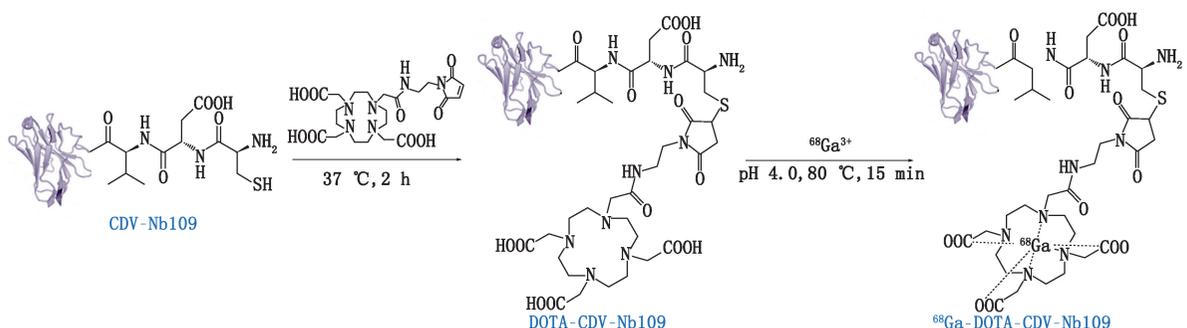


图 1 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (CDV)-Nb109 的合成路线

肠、骨骼、肌肉)和肿瘤组织,洗涤、称质量并测量放射性计数,计算每克组织百分注射剂量率(percentage of injected dose per gram of tissue, %ID/g)。

9. 统计学处理。使用 IBM SPSS 17.0 软件进行统计学分析,使用 Origin 2018 进行数据和图像处理。 K_d 通过 GraphPad Prism 5 进行拟合计算得出。符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差异 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 前体及探针的制备和质量控制。HPLC 分析显示,前体纯度为 95.09%;高分辨质谱显示,前体相对分子质量为 14 455.79,验证其结构正确,为单个抗体分子与单个 DOTA 偶联的均一结构的产物。放射性 TLC 分析显示, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 放射化学产率为 $(69.79 \pm 4.69)\%$;经 PD-10 脱盐柱纯化后,其放化纯大于 97%,摩尔活度为 (12.85 ± 1.51) GBq/ μmol ,整个标记纯化可在 20 min 内完成;其在 PBS 和小鼠血清中温育 120 min 后的放化纯分别为 95% 和 93%。

2. K_d 的测定及竞争抑制实验。如图 2A 所示, K_d 为 (66.43 ± 17.89) nmol/L,表明 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 与 A375-hPD-L1 细胞具有较强的亲和力。随着反应体系中 DOTA-CDV-Nb109 的浓度逐渐增加, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 结合率逐渐降低,DOTA-CDV-Nb109 的半抑制浓度为 (25.43 ± 2.85) nmol/L (图 2B),表明 DOTA-CDV-Nb109 能够有效阻断 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 与 A375-hPD-L1 细胞的结合。

3. 细胞摄取实验。如图 2C 所示,温育 30 min 后, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 U87、A375 和 A375-hPD-L1 细胞中的摄取值达到平衡,分别为 (2.08 ± 0.03) 、 (1.21 ± 0.14) 和 (3.17 ± 0.15) %AD,探针在

A375-hPD-L1 细胞、U87 细胞中的摄取明显高于 A375 细胞 ($F = 82.87$, t 值: 15.23、9.98, P 值: < 0.001 、 0.003)。与 A375-hPD-L1 和 U87 细胞相比, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 A375 细胞中在所有时间点均表现为低摄取。经 500 倍的前体预处理 30 min 后, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 细胞中的最大细胞摄取下降至 (1.57 ± 0.09) %AD,与 A375 细胞的差异无统计学意义 ($t = 1.49$, $P = 0.135$)。以上结果表明, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 具有动态定量不同肿瘤细胞中 PD-L1 表达水平的潜力。

4. MicroPET 显像结果。注射后 15 min, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 PD-L1 高表达的 A375-hPD-L1 模型中快速、高摄取,肿瘤内的显像剂摄取可持续 1 h 以上;相反,阴性的 A375 模型在整个显像过程中未观察到明显的显像剂浓聚(图 3A);此外,探针在内源性 PD-L1 高表达的 U87 荷瘤裸鼠体内不同时间点均有良好的肿瘤摄取(图 3B)。ROI 分析显示, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 肿瘤中的最大摄取为 (5.21 ± 0.35) %ID/ml,显著高于 A375 肿瘤 [(2.17 ± 0.36) %ID/ml] 和肌肉 [(1.93 ± 0.19) %ID/ml; $F = 675.13$, t 值: 35.70、43.58, 均 $P < 0.001$; 图 3C];探针注射后 10 min,在 U87 肿瘤中达到最大摄取 [(3.44 ± 0.69) %ID/ml],显著高于 A375 肿瘤 [(2.17 ± 0.36) %ID/ml] 和肌肉 [(1.69 ± 0.34) %ID/ml; $F = 35.96$, t 值: 3.43、6.29, 均 $P < 0.001$],随后逐渐降低,60 min 时肿瘤摄取值降低至 (1.81 ± 0.46) %ID/ml (图 3D);探针在 A375-hPD-L1 和 U87 荷瘤裸鼠肿瘤中的摄取显著高于 A375 荷瘤裸鼠 ($F = 249.72$, t 值: 35.70、3.43, 均 $P < 0.001$)。探针能够迅速识别 PD-L1 阳性组织并从非靶组织中快速清除,在 A375-hPD-L1 荷瘤裸鼠中显示出良好的靶本比,注射后 10 min 的肿瘤/肌肉摄取比 (tumor-to-muscle

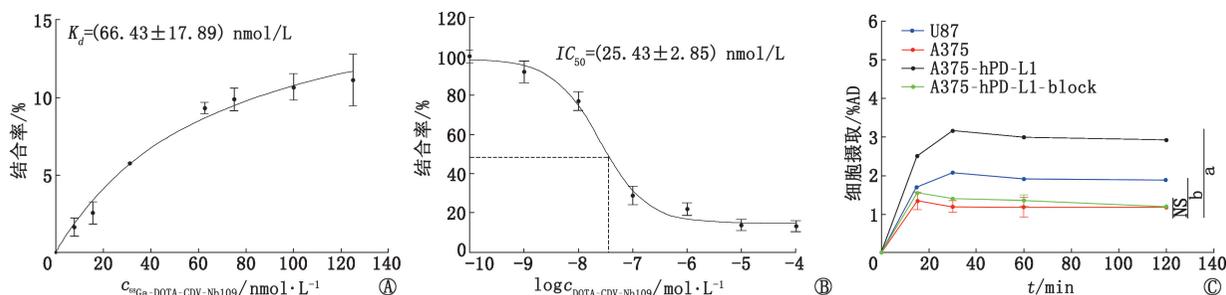


图 2 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (CDV)-Nb109 对程序性细胞死亡蛋白配体 1 (PD-L1) 特异性的体外研究。A. ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 的结合亲和力实验结果; B. ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 的竞争抑制实验结果; C. ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在不同细胞中不同时间点的细胞摄取实验结果。U87 为人类胶质瘤细胞、A375 为人黑色素瘤细胞、A375-hPD-L1 为人源性 PD-L1 转染的 A375 细胞、A375-hPD-L1-block 为经 500 倍 DOTA-CDV-Nb109 预处理后的 A375-hPD-L1 细胞; %AD 为百分加入放射性剂量, IC_{50} 为半抑制浓度, K_d 为解离常数; NS 为差异无统计学意义, $^a P < 0.001$, $^b P < 0.01$

uptake ratio, T/M) 值为 2.90, 并逐渐增加, 最大 T/M 值可达 6.90; 而在 A375 荷瘤裸鼠中的 T/M 值均较低, 且在整个显像过程无显著变化; 探针在 U87 荷瘤裸鼠体内的 T/M 值相对稳定, 注射后 30 min 达到最高值约为 2.74 (图 3E)。此外, 所有 PET 图像均清晰显示探针在肾脏和膀胱有较高的摄取, 提示探针主要通过肾脏和膀胱代谢。

5. 体内生物分布 (表 1)。探针注射后 1 h, A375-hPD-L1 和 A375 荷瘤裸鼠肾脏均显示较高的显像剂浓聚, 表明⁶⁸Ga-DOTA-CDV-Nb109 主要从泌尿系统排出。A375-hPD-L1 和 A375 荷瘤裸鼠的心脏、肺和肝中的显像剂聚集相对较高。注射后 1 h, 探针在 A375-hPD-L1 肿瘤中的摄取值为 $(3.35 \pm 0.16) \%ID/g$, 显著高于 A375 肿瘤 $[(1.22 \pm 0.14) \%ID/g; t = 11.58, P < 0.001]$, 与 PET 显像结果相一致。

讨 论

近年来, 免疫治疗在癌症治疗中表现出了显著的疗效, PD-L1 表达对免疫治疗的预测价值引起了广泛关注^[7-8]。由于免疫组织化学的有创性以及肿瘤的异质性, 其结果只能代表小部分范围内 PD-L1 的表达水平, 不能有效反映整个肿瘤组织和转移病灶的情况^[3]。此外, 在肿瘤的发生发展中, PD-L1 的表达是一个复杂的动态过程, 因此有必要发展能够全面、实时、精确检测 PD-L1 表达水平的显像技术。

目前, 已有多个放射性核素标记的抗 PD-L1 单克隆抗体 (简称单抗) 被报道, 这些单抗与 PD-L1 具有较强的结合亲和力, 并成功应用于肺癌等多种肿瘤中 PD-L1 表达的动态监测^[9-10]。然而, 由于单抗对肿瘤的穿透能力较弱, 需要用长半衰期的放射性

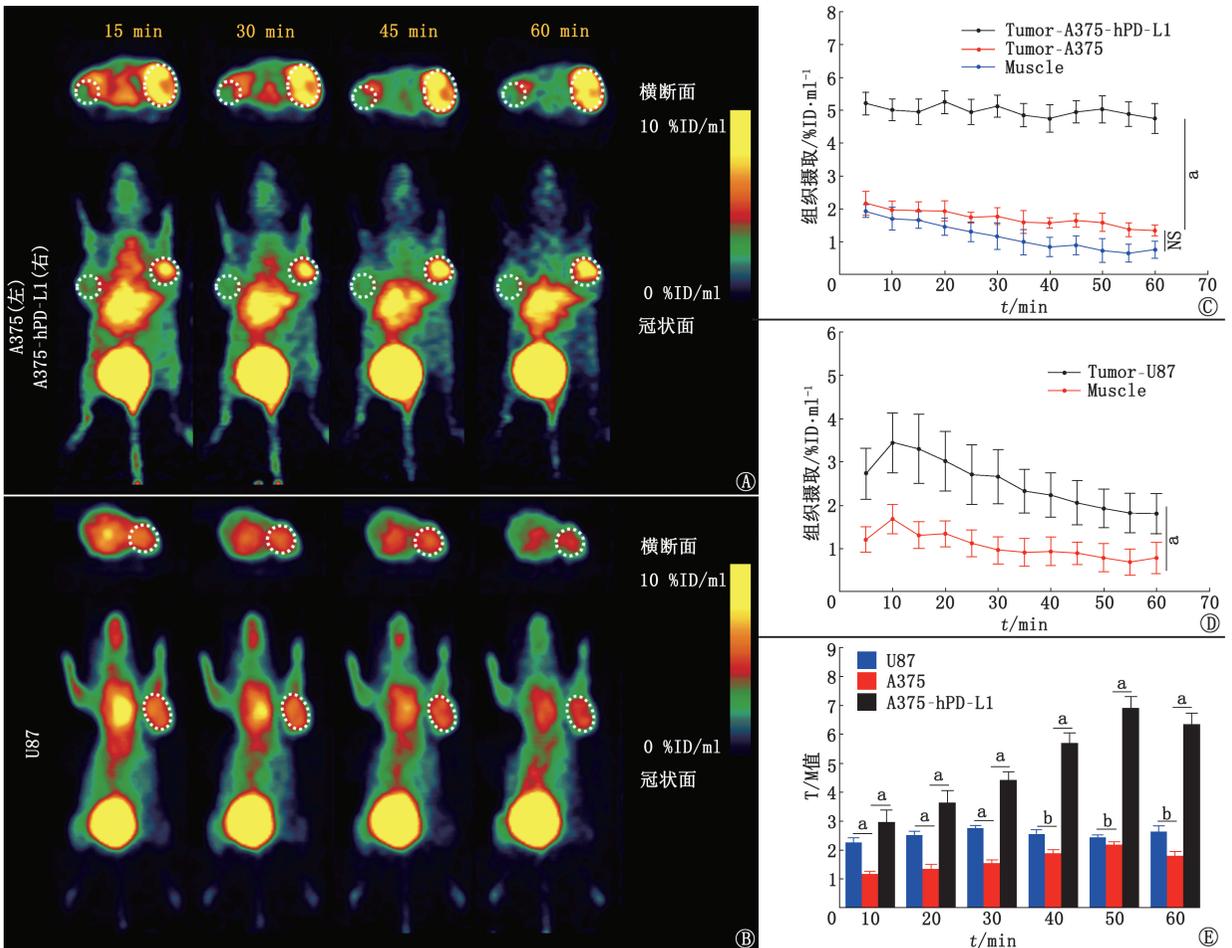


图3 人黑色素瘤细胞 A375 (左) 和人源性程序性细胞死亡蛋白配体 1 (PD-L1) 转染的 A375-hPD-L1 细胞 (右) 双侧荷瘤裸鼠及人胶质瘤细胞 U87 荷瘤裸鼠尾静脉注射⁶⁸Ga-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (CDV)-Nb109 (5×10^6 Bq) 后各时间点的 microPET 显像图 (圆圈示肿瘤) 及肿瘤 (Tumor) 与肌肉 (Muscle) 摄取结果。A. A375 (左) 和 A375-hPD-L1 (右) 双侧荷瘤裸鼠的 microPET 显像图; B. U87 荷瘤裸鼠的 microPET 显像图; C. A375 (左) 和 A375-hPD-L1 (右) 双侧荷瘤裸鼠各时间点肿瘤与肌肉的摄取值; D. U87 荷瘤裸鼠各时间点肿瘤与肌肉的摄取值; E. A375-hPD-L1、A375 以及 U87 荷瘤裸鼠各时间点肿瘤/肌肉摄取比 (T/M) 值。%ID/ml 为每毫升百分注射剂量率; NS 为差异无统计学意义, ^a $P < 0.001$, ^b < 0.01

表 1 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 和 A375 荷瘤裸鼠中注射后 1 h 的生物分布 (%ID/g; $\bar{x}\pm s$)

器官	A375 模型	A375-hPD-L1 模型
心脏	1.49±0.25	1.55±0.16
肺	1.80±0.07	1.52±0.15
肝	1.53±0.09	1.67±0.33
脾	0.56±0.20	0.53±0.25
肾	44.22±1.23	42.07±4.52
胃	1.39±0.11	1.17±0.08
肠	0.79±0.04	0.73±0.14
骨骼	1.06±0.12	1.15±0.07
肌肉	0.46±0.07	0.38±0.03
肿瘤	1.21±0.14	3.35±0.16

注:每组小鼠 5 只;%ID/g 为每克组织百分注射剂量率,CDV 为半胱氨酸-天冬氨酸-缬氨酸,DOTA 为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸,PD-L1 为程序性细胞死亡蛋白配体 1

核素进行标记;注射后需要较长时间才能获得高对比度的图像,且长期辐射照射可能在一定程度上对患者的正常组织器官造成损害。因此,有必要开发能够从非靶器官和血液中快速清除的 PD-L1 靶向探针,实现 PD-L1 表达的动态监测^[11-12]。

基于马来酰亚胺-半胱氨酸(maleimide-cysteine, Mal-Cys)可进行非金属催化迈克尔加成反应,具有反应快速、条件温和的特性,且蛋白质中巯基的修饰易于引入,使得精准合成单一分子量的放射性标记前体成为可能。Mal-Cys 定点标记策略既不会影响蛋白质良好的生物相容性,又可保持单域抗体与 PD-L1 的高亲和力,最大限度地减少免疫反应性的损失^[13-14]。因此,本研究成功利用 Mal-Cys 策略制得均一结构的标记前体 DOTA-CDV-Nb109,经 ^{68}Ga 一步标记得到定点标记的探针 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109,标记步骤简单、放化纯高、具有良好的稳定性。 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 的 K_d 为(66.43±17.89) nmol/L,表明探针与 A375-hPD-L1 细胞具有较强的亲和力。探针与细胞温育 30 min 后,细胞摄取均达到峰值,探针在 PD-L1 阳性表达的 A375-hPD-L1 细胞和 U87 细胞中摄取明显高于 PD-L1 阴性表达的 A375 细胞。MircoPET 显像与细胞摄取一致,探针能够迅速识别 PD-L1 阳性表达的 A375-hPD-L1 及 U87 肿瘤,而在 PD-L1 阴性表达的 A375 肿瘤中未观察到明显的显像剂浓聚。因而,定点标记的探针 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 能够无创对活体内 PD-L1 表达水平进行量化。

与之前报道的随机标记探针 ^{68}Ga -NOTA-Nb109 相比, ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 同样具有较高的放化纯以及良好的体外稳定性。定点标记的探针 ^{68}Ga -DOTA-

CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 和 U87 肿瘤中的最大摄取值为(5.21±0.35)和(3.44±0.69) %ID/ml,与 ^{68}Ga -NOTA-Nb109[(5.32±0.47)和(2.84±0.32) %ID/ml]相似,但其在心脏以及腹部摄取明显增高,信噪比降低。与 ^{68}Ga -NOTA-Nb109(11.03 和 9.12)相比^[5-6], ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在 A375-hPD-L1 和 U87 肿瘤中的最大 T/M 值明显降低(6.90 和 2.74),这可能是由于 80 °C 加热标记反应会对蛋白质的活性造成一定的影响,从而导致蛋白质靶向能力有一定程度的降低。另一方面,因 Ga^{3+} 离子半径较小,可能会降低 ^{68}Ga -DOTA 配合物的体内稳定性,从而造成 PET 显像背景值的增加。

本研究存在一些不足:(1)需要筛选出更多内源性 PD-L1 表达的肿瘤模型,定点标记的 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在其他内源性 PD-L1 表达的肿瘤模型中的有效性有待进一步研究;(2) ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 在人源性模型鼠中的显像效果以及剂量优化还有待进一步探讨。

综上,定点标记的探针 ^{68}Ga -DOTA-CDV-Nb109 具有较强的 PD-L1 靶向特异性,可无创、动态检测不同肿瘤中 PD-L1 的表达水平,为抗 PD-L1 疗法受益患者的筛选提供了更为精确的手段。此外,标记长半衰期的诊疗一体化核素(如 ^{177}Lu)值得进一步研究,其在开发定点标记的诊疗一体化的放射性药物方面具有巨大的应用潜力。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈银飞:研究实施、论文撰写、统计分析;陈盼盼:数据分析;宋诗宇、梁蓓蓓:研究实施、采集数据;谢敏浩、林建国、邱玲:统计分析、研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Garon EB, Hellmann MD, Rizvi NA, et al. Five-year overall survival for patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with pembrolizumab: results from the phase I KEYNOTE-001 study[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(28): 2518-2527. DOI:10.1200/JCO.19.00934.
- [2] Nimmagadda S. Quantifying PD-L1 expression to monitor immune checkpoint therapy: opportunities and challenges [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3173. DOI:10.3390/cancers12113173.
- [3] Tibaldi C, Lunghi A, Baldini E. Use of programmed cell death protein ligand 1 assay to predict the outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors [J]. World J Clin Oncol, 2017, 8(4): 320-328. DOI:10.5306/wjco.v8.i4.320.
- [4] 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.
- [5] Lv G, Sun X, Qiu L, et al. PET imaging of tumor PD-L1 expression with a highly specific nonblocking single-domain antibody[J]. J Nucl Med, 2020, 61(1): 117-122. DOI:10.2967/jnumed.119.226712.
- [6] Liu Q, Jiang L, Li K, et al. Immuno-PET imaging of ⁶⁸Ga-labeled nanobody Nb109 for dynamic monitoring the PD-L1 expression in cancers[J]. Cancer Immunol Immunother, 2021, 70(6): 1721-1733. DOI:10.1007/s00262-020-02818-y.
- [7] Shi T, Ma Y, Yu L, et al. Cancer immunotherapy: a focus on the regulation of immune checkpoints[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1389. DOI:10.3390/ijms19051389.
- [8] Yi M, Jiao D, Xu H, et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 129. DOI:10.1186/s12943-018-0864-3.
- [9] Jagoda EM, Vasalatiy O, Basuli F, et al. Immuno-PET imaging of the programmed cell death-1 ligand (PD-L1) using a zirconium-89 labeled therapeutic antibody, avelumab[J]. Mol Imaging, 2019, 18: 1536012119829986. DOI:10.1177/1536012119829986.
- [10] Truillet C, Oh H, Yeo SP, et al. Imaging PD-L1 expression with immunoPET[J]. Bioconj Chem, 2018, 29(1): 96-103. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00631.
- [11] Broos K, Lecocq Q, Raes G, et al. Noninvasive imaging of the PD-1: PD-L1 immune checkpoint: embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy[J]. Theranostics, 2018, 8(13): 3559-3570. DOI:10.7150/thno.24762.
- [12] 谢丽叶,付杰军,卢奕,等. PD1/PD-L1 激活促进癌症发生、发展和转移的研究进展[J].肿瘤防治研究, 2017, 44(6): 423-427. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087.
- Xie LY, Fu JJ, Lu Y, et al. Novel findings on activation of PD1/PD-L1 that contributes to cancer development and metastasis[J]. Cancer Res Prev Treat, 2017, 44(6): 423-427. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087.
- [13] Chigoho DM, Lecocq Q, Awad RM, et al. Site-specific radiolabeling of a human PD-L1 nanobody via maleimide-cysteine chemistry[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(6): 550. DOI:10.3390/ph14060550.
- [14] Yang E, Liu Q, Huang G, et al. Engineering nanobodies for next-generation molecular imaging[J]. Drug Discov Today, 2022, 27(6): 1622-1638. DOI:10.1016/j.drudis.2022.03.013.

(收稿日期:2022-05-09)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会系列杂志论文作者署名规范

为尊重作者的署名权,弘扬科学道德和学术诚信精神,中华医学会系列杂志论文作者署名应遵守以下规范。

一、作者署名

中华医学会系列杂志论文作者姓名在题名下按序排列,排序应在投稿前由全体作者共同讨论确定,投稿后不应再作改动,确需改动时必须出示单位证明以及所有作者亲笔签名的署名无异议书面证明。

作者应同时具备以下 4 项条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析与解释者;(2)撰写论文或对其学术内容的重要方面进行关键修改者;(3)对最终要发表的论文版本进行全面的审阅和把关者;(4)同意对论文的所有方面负责,保证对涉及研究工作的任何部分的准确性和科研诚信的问题进行恰当的调查,并及时解决者。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。

二、通信作者

每篇论文均需确定一位能对该论文全面负责的通信作者。通信作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第一作者为通信作者。集体署名的论文应对该论文负责的关键人物列为通信作者。规范的多中心或多学科临床随机对照研究,如主要责任者确实超过一位的,可酌情增加通信作者。无论包含几位作者,均需标注通信作者,并注明其 Email 地址。

三、同等贡献作者

不建议著录同等贡献作者,需确定论文的主要责任者。确需著录同等贡献作者时,可在作者单位项后另起一行著录“××和××对本文有同等贡献”,英文为“×× and ×× are contributed equally to the article”。英文摘要中如同等贡献者为第一作者且属不同单位,均需著录其单位。同一单位同一科室作者不宜著录同等贡献。作者申请著录同等贡献时需提供全部作者的贡献声明,期刊编辑委员会进行核查,必要时可将作者贡献声明刊登在论文结尾处。

中华医学会杂志社