

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

肿瘤靶向肽 PET 探针的开发研究

李业森

工作完成日期 2015.10

报告提交日期 2015.10

厦门大学

年 月

肿瘤靶向肽 PET 探针的开发研究

Development of Radiolabeled tumor-specific targeting peptides for
PET Imaging

博 士 后 姓 名 李业森

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称

研究工作起始时间 2013 年 11 月

研究工作期满时间 2015 年 10 月

厦 门 大 学

年 月

厦门大学博士后研究工作报告 著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要

多肽具有优良的药动学特性和生物学活性，因此在 PET 分子影像领域，多肽类分子影像探针展现出广阔的应用前景和优势。本课题利用 AIF 螯合法标记多肽，开发出一系列 PET 探针，并对相应探针进行体外及体内生物学评价。本课题具体研究内容可分为四部分。

第一部分，肝癌是最常见也是最致命的癌症之一，对于肝癌转移复发目前尚无行之有效的诊断、治疗方法。本研究通过固相法合成 NOTA-G-TMTP1，并利用 ^{18}F 标记制得 PET 探针 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ 。 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ 标记产率为 $(25 \pm 6)\%$ ($n=5$)，放化纯大于 95%，放射性比活度大于 $11.1 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ，脂水分配系数为 -3.17 ± 0.02 。 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ 注射到荷瘤裸鼠中 30 min 后，在 SMCC-7721 和 HCCLM3 高转移潜能肿瘤模型中，肿瘤/肌肉摄取比值大于 4，而在 HepG2 和 HCC97L 低转移潜能肿瘤模型中，肿瘤/肌肉摄取比值小于 2。通过过量的 G-TMTP1 对 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ 的抑制，结果 SMCC-7721 和 HCCLM3 肿瘤对 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ 摄取降低了 61.9% 和 57.6%，证明其具有良好的特异性。本研究成功开发出 PET 探针 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-G-TMTP1}$ ，它可以特异性的靶向高转移性肝癌，具有潜在的临床应用价值。

第二部分，肺癌在癌症中发病率最高，目前已成为全世界造成癌症死亡的主要原因，EGFR 作为重要的肿瘤治疗靶点，目前虽然有靶向 EGFR 的治疗药物，但是却没有可以准确、全面预测这些药物疗效的临床评价指标。本研究通过固相合成 NOTA-D4，并利用 ^{18}F 标记制得 PET 探针 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-D4}$ 。 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-D4}$ 标记产率为 $23 \pm 5\%$ ($n=5$)，放化纯大于 95%，放射性比活度大于 $10.7 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ，脂水分配系数为 -0.98 ± 0.01 。通过 A549 肺癌细胞系分别建立了皮下瘤模型和原位肺癌模型，并对其进行了 microPET/CT 显像研究发现，在尾静脉注射 40 min 后，肿瘤部位对 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-D4}$ 的摄取值可以达到 $1.4\% \text{ ID/g}$ ，肿瘤/肌肉比值可以达到 9.2，利用过量的 D4 对 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-D4}$ 抑制发现 A549 皮下瘤对 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-D4}$ 的摄取降低了 53.5%，证明其具有良好的特异性。通过对 A549 原位肺癌模型鼠的 microPET/CT 显像研究发现，随着肿瘤接种时间的增加，肿瘤的摄取值越来越高（从 $0.7\% \text{ ID/g}$ ，到 $2.2\% \text{ ID/g}$ ），肿瘤/肝脏摄取比值从第十天的 0.36，增加到第二十五天的 1.98。本研究成功开发出 PET 探针

[¹⁸F]AIF-NOTA-D4, 它可以特异性的靶向 EGFR, 具有潜在的临床应用价值。

第三部分, ¹⁸F-FDG PET 显像已广泛应用于肿瘤的诊断、治疗方案选择和疗效评价, 但其在临床应用中还存在一些不足, 例如特异性不高, 存在炎症假阳性等。RGD 可特异性的靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$, ¹⁸F-Alfatiade 为 RGD 的二聚体, 对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的选择性高, 特异性好。本研究主要探讨 ¹⁸F-Alfatiade 对肿瘤的诊断作用, 旨在提供临床前药效学资料。¹⁸F-Alfatiade 在肿瘤中的摄取在 10 min 左右达到最高值, 在 40 min 左右时 T/NT 比值最高, 可以对 $\alpha_v\beta_3$ 表达可以进行半定量的反映。我们发现 ¹⁸F-Alfatiade 用于 A549 原位肺癌诊断时, 肿瘤部位与心脏摄取的比值约为 4.5, 远远大于 ¹⁸F-FDG 组, 有更好的靶与非靶比, 更有利于原位肺癌的诊断。生物分布实验与 microPET/CT 显像结果相吻合, 进一步验证了 microPET/CT 显像结果。

第四部分, 5-羟色胺 (5-HT) 受体的表达情况与抑郁、焦虑等多种疾病息息相关, [¹⁸F]MPPF 是 5HT_{1A} 的拮抗剂, 可定量测定 5HT_{1A} 在人脑中的分布及检测 5-HT 的变化。我们成功实现了对 [¹⁸F]MPPF 的自动化合成, 合成时间约为 70min, 放射化学产率为 13.2±5.9% (未经衰减校正, n=5), 放射化学纯度大于 98%, 比活度高于 2×10¹¹Bq/μmol。对大鼠脑部进行显像发现, 中缝核摄取 SUVmax 值为 2.15±0.21, 左右颞叶皮层 SUVmax 值分别为 1.67±0.18、1.71±0.23, 与 5-HT_{1A} 受体在大鼠脑中的解剖学分布一致, 证明其可以特异性的靶向 5HT_{1A} 受体, 我们的合成方法可以直接将 [¹⁸F]MPPF 转换到临床应用。

总之, 本研究开发出一系列 PET 探针, 初步的体外及体内生物学评价证明其具有潜在的临床应用前景。

关键词: 多肽, PET, 肝癌, 肺癌, EGFR, ¹⁸F-Alfatiade, MPPF

Abstract

Due to their favorable pharmacokinetics and biological activities, small peptides labeled with positron emitting radionuclides have shown great potential in PET imaging. In this study, a series of ^{18}F -labeled peptides were synthesized and radiolabeled with ^{18}F using NOTA-AIF chelation method. The biological activities of these tracers were evaluated in vitro and in vivo. The thesis consists of four major sections.

I. Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and aggressive cancers worldwide, there was no efficient approaches for diagnosis and treatment of HCC metastases or postsurgical recurrence. ^{18}F AIF-NOTA-G-TMTP1 was synthesized and radiolabeled with ^{18}F using NOTA-AIF chelation method. The total synthesis time was about 20 min with radiochemical yield of $25\pm 6\%$. The specific activity was about 11.1-14.8 GBq/ μmol . The log P value of ^{18}F AIF-NOTA-G-TMTP1 was -3.166 ± 0.022 . ^{18}F AIF-NOTA-G-TMTP1 accumulated in SMCC-7721 and HCCLM3 tumors (high metastatic potential) in vivo to give tumor/muscle (T/M) ratios above 4 as measured by PET at 30 min post-injection (p.i.), meanwhile the tumor/muscle (T/M) ratios of HepG2 and HCC97L tumors which exhibited low metastatic potential were below 2. In addition, Uptake of the tracer in the tumor at 40 min p.i. could be inhibited 61.9% and 57.6% by unlabeled G-TMTP1 in SMCC-7721 and HCCLM3 tumor bearing nude mice respectively. ^{18}F AIF-NOTA-G-TMTP1 may specifically target high metastatic or/and aggressive hepatocellular carcinoma with low liver uptake and should be further evaluated clinically.

II. Lung cancer is one of the most common cancers in the world. There were several Drugs that target EGFR used to treat non-small cell lung cancer (NSCLC), however, there was no objective method to accurately and reliably predict the sensitivity of patients to anti-EGFR treatments. ^{18}F AIF-NOTA-D4 was synthesized and radiolabeled with ^{18}F using NOTA-AIF chelation method. The total synthesis time was about 30 min with radiochemical yield of $23\pm 4\%$. The specific activity was above

10.7 GBq/ μ mol. The log P value of [^{18}F]AIF-NOTA-D4 was -0.98 ± 0.01 . The tumor-targeting characteristics of [^{18}F]AIF-NOTA-D4 was assessed in A549 xenografts and A549 orthotopic lung cancer model. [^{18}F]AIF-NOTA-D4 accumulated in A549 xenografts in vivo to give tumor/muscle (T/M) ratios of 9.2 as measured by PET at 40 min post-injection (p.i.). Uptake of the tracer in the tumor at 40 min p.i. could be inhibited 53.5% by unlabeled D4 in A549 tumor bearing nude mice. In addition, there was a dramatic increase in tumor uptake of [^{18}F]AIF-NOTA-D4 as the A549 orthotopic tumor growth, the tumor/liver (T/L) ratios increased from 0.36 to 1.98 in 15 days. Overall, [^{18}F]AIF-NOTA-D4 could specifically target EGFR and should be further evaluated clinically.

III. With ^{18}F -FDG, PET/CT is rapidly becoming the key investigative tool for the diagnosis, staging, and monitoring treatment of cancers, however, there are inherent limitations of ^{18}F -FDG PET that can result in false-negative and false-positive findings. RGD peptides are well-known to bind preferentially to the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin, ^{18}F -Alfatiade a novel dimeric RGD peptide could specific target $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin. The goal of this study is to evaluate the tumor-targeting characteristics of ^{18}F -Alfatiade and provide pharmacodynamics and pharmacokinetics materials for clinical trials. The tumor uptake of ^{18}F -Alfatiade reached a peak at 10 min, and T/NT ratios reached a peak at 40 min. The tumor/heart ratio was 4.5 using ^{18}F -Alfatiade for detection of A549 orthotopic tumor which was much higher than FDG. These results lead to an easy approach for the diagnosis of lung cancer. Biodistribution data largely corroborated the microPET/CT imaging studies.

IV. 5-HT has been implicated in mechanisms of anxiety and depression for many years, [^{18}F]MPPF is a selective serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptor antagonist and may be used to measure changes in the functional levels of serotonin (5-HT). [^{18}F]MPPF was synthesized automatically with a radiochemical yield of $13.2\pm 5.9\%$ in 70 min. The specific activity was above 2×10^{11} Bq/ μ mol, and the radiochemical purity was above 95%. The in vivo distributions of [^{18}F]MPPF was evaluated in the rat brain. The highest uptakes of radioactivity were observed in the raphe nuclei (SUV_{max} 2.15

± 0.21) and cingulate cortex (SUV_{max} 1.67 ± 0.18 、 1.71 ± 0.23), which closely matched the 5-HT(1A) receptors rich areas in rat brain. These results indicate that [18F]MPPF could be a useful candidate for noninvasive PET imaging of 5-HT(1A) receptors in the living human brain.

Overall, a series of 18F-labeled peptides have been developed, the encouraging preliminary data of this study indicate that further clinical evaluation of those tracers is warranted.

Keywords: peptides, PET, hepatocellular carcinoma, lung cancer, EGFR, ^{18}F -Alfatiade, MPPF

目录

目 次

第一章 引言.....	1
1.2 分子影像学概述.....	1
1.2.1 分子影像学概念.....	1
1.2.2 分子影像技术.....	2
1.2 PET 分子影像探针.....	9
1.2.1 PET 正电子核素.....	9
1.2.2 多肽类 PET 分子影像探针.....	11
第二章 特异性靶向高转移肝癌 PET 探针的构建.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 实验仪器与试剂.....	15
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 G-TMTP1 的合成.....	16
2.3.2 NOTA-G-TMTP1 的合成.....	17
2.3.3 AIF-NOTA-G-TMTP1 的合成.....	17
2.3.4 [¹⁸ F]AIF-NOTA-G-TMTP1 的标记.....	17
2.3.5 脂水分配系数.....	18
2.3.6 体外稳定性.....	18
2.3.7 实验细胞.....	18
2.3.8 microPET/CT 显像.....	19
2.3.9 生物分布.....	19
2.4 实验结果与讨论.....	20
2.4.1 G-TMTP1 的合成.....	20
2.4.2 NOTA-G-TMTP1 的合成.....	20
2.4.3 AIF-NOTA-G-TMTP1 的合成.....	21
2.4.4 [¹⁸ F]AIF-NOTA-G-TMTP1 的标记.....	22
2.4.5 脂水分配系数.....	23
2.4.6 体外稳定性.....	24
2.4.7 细胞实验.....	24
2.4.6 microPET/CT 显像.....	27
2.4.7 生物分布.....	31
2.4.8 讨论.....	33
2.5 小结.....	35
第三章 肿瘤表皮生长因子受体 PET 探针的构建.....	36
3.1 引言.....	36
3.2 实验仪器与试剂.....	37
3.3 实验方法.....	39
3.3.1 D4 的合成.....	39
3.3.2 NOTA-D4 的合成.....	39
3.3.3 [¹⁸ F]AIF-NOTA-D4 的标记.....	39

3.3.4 脂水分配系数.....	40
3.3.5 体外稳定性.....	40
3.3.6 实验细胞.....	40
3.3.7 microPET/CT 显像.....	40
3.3.8 生物分布.....	41
3.3.9 组织包埋与切片.....	41
3.3.10 HE 染色.....	42
3.3.11 免疫组化.....	42
3.4 实验结果与讨论.....	43
3.4.1 D4 的合成.....	43
3.4.2 NOTA-D4 的合成.....	43
3.4.3 [¹⁸ F]AIF-NOTA-D4 的标记.....	44
3.4.4 脂水分配系数.....	45
3.4.5 体外稳定性.....	45
3.4.6 细胞实验.....	46
3.4.7 microPET/CT 显像.....	47
3.4.8 生物分布.....	49
3.4.9 HE 染色与免疫组化.....	50
3.4.10 讨论.....	52
小结.....	53
第四章 ¹⁸ F-ALFATIDE 药效学研究.....	55
4.1 实验目的.....	55
4.2 实验材料和统计方法.....	55
4.2.1 动物.....	55
4.2.2 细胞.....	56
4.2.3 受试药物.....	56
4.2.4 药品与试剂.....	56
4.2.5 实验仪器.....	56
4.3 ¹⁸ F-Alfatide 的合成方法与结果.....	57
4.3.1 受试药 ¹⁸ F-Alfatide 的合成方法.....	57
4.3.2 实验结果:.....	58
4.4 ¹⁸ F-Alfatide 对荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像研究.....	61
4.4.1 荷瘤裸鼠模型的建立.....	61
4.4.2 ¹⁸ F-Alfatide 与 ¹⁸ F-FDG 对 A549 原位荷瘤裸鼠肿瘤显像研究.....	61
4.4.3 ¹⁸ F-Alfatide 与 ¹⁸ F-FDG 对 A549 皮下荷瘤裸鼠肿瘤显像研究.....	62
4.4.4 ¹⁸ F-Alfatide 对不同生长阶段 A549 荷瘤裸鼠肿瘤显像研究.....	64
4.4.5 ¹⁸ F-Alfatide 与 ¹⁸ F-FDG 对 U87MG 皮下荷瘤裸鼠肿瘤显像研究.....	65
4.4.6 ¹⁸ F-Alfatide 与 ¹⁸ F-FDG 对 MDA-MB-231 原位荷瘤裸鼠肿瘤显像研究.....	66
4.4.7 ¹⁸ F-Alfatide 对不同肿瘤的显像研究.....	67
4.5 不同比活度的 ¹⁸ F-Alfatide 对肿瘤的摄取影响.....	69
4.6 ¹⁸ F-Alfatide 在荷瘤裸鼠中的生物分布研究.....	70
4.7 结论.....	74
第五章 MPPF 的自动化合成.....	75
5.1 引言.....	75

5.1.1 实验材料.....	75
5.1.1.1 试剂.....	75
5.1.1.2 仪器与条件.....	76
5.1.1.3 实验动物.....	76
5.1.2 实验方法.....	76
5.1.2.1 [¹⁸ F]MPPF 的放射性化学合成路线	76
5.1.2.2 自动化合成模块.....	77
5.1.2.3 [¹⁸ F]MPPF 的自动化合成及分离纯化	77
5.1.2.4 质量控制.....	78
5.1.3 结果与讨论.....	78
5.1.4 结语.....	81
参考文献:	81
致谢.....	85
博士生期间发表的学术论文、专著	86
博士后期间发表的学术论文、专著	87
个人简历.....	89
联系地址.....	90

第一章 引言

1.2 分子影像学概述

1.2.1 分子影像学概念

分子影像学可以定义为运用影像学手段显示组织水平、细胞和亚细胞水平的特定分子，反映活体状态下分子水平变化，对其生物学行为在影像方面进行定性和定量研究的科学。它可以在真实、完整的生理环境中直接检测细胞和分子通路，对生物活动的发生、发展过程进行实时成像。

分子影像学通过现代分子生物技术与传统的医学影像技术的结合，实现了在活体内细胞与分子水平上对病变的分子学改变进行观察和分析，既能早期发现疾病，又能够准确为临床诊断提供定位、定量、定性和分期的信息。分子影像学在分子水平上进行的无损伤实时成像，具有传统影像学成像方法所不具有的优点：无创伤、实时、活体、特异、精细（分子水平）显像等独特性质，因此分子影像学已经成为医学影像未来发展的方向[1, 2]。

与常规的医学影像技术不同，分子影像学主要探查疾病症状之前分子水平的异常，即从生化水平认识疾病，阐明病变组织生物过程的变化，为疾病的研究和提早诊断提供有力的证据。而非像传统影像学那样，仅仅描述疾病发生后的形态学变化[3, 4]。

分子影像技术有三个要素：分子探针，信号放大，高灵敏探测。在这三大要素中，分子探针最为重要，它是实现信号放大和高灵敏探测的首要前体。通常情况下，实现分子显像需要从外界输入一种分子（分子探针），分子探针可以与细胞内的另一种分子（靶分子）特异性的结合，从而使靶分子显像。分子探针必须满足三个条件，第一，分子探针必须具有良好的生物兼容性，而且在生物体内能够参与正常的生理过程；第二，分子探针必须能够有效的到达靶器官；第三，分子探针必须具有高的特异性[5]。

分子影像学发源于放射药理学，在 20 世纪初逐渐发展起来，于 1999 年由 Weissleder 首次提出，它可以在不干扰生物体内器官功能的情况下，对细胞水平

的分子过程进行显像。分子影像学的潜在价值在于可以用于诊断各种疾病，例如癌症，神经疾病以及心血管疾病等；当然，它也可以通过优化药物治疗的临床前实验和临床实验来改善药物的疗效^[6]。

1.2.2 分子影像技术

分子影像学技术常用的探测方法有核探测方法、核磁共振方法、光学探测方法等，这些方法在探测灵敏度、空间分辨率、时间分辨率等性能方面各有优缺点，目前最为常用的分子影像学技术有：核医学成像技术，尤以PET的分子显像研究最受关注^[7]；MRI技术，包括普通的MRI和MR波普成像都已经成功应用于分子影像学的研究领域；光学成像技术上种类繁多，但以生物发光和荧光成像技术的研究为主；超声成像技术和CT成像技术也逐渐在分子影像领域有所应用，图1.1所示几种典型的影像仪器及其成像的例子[6, 7]:

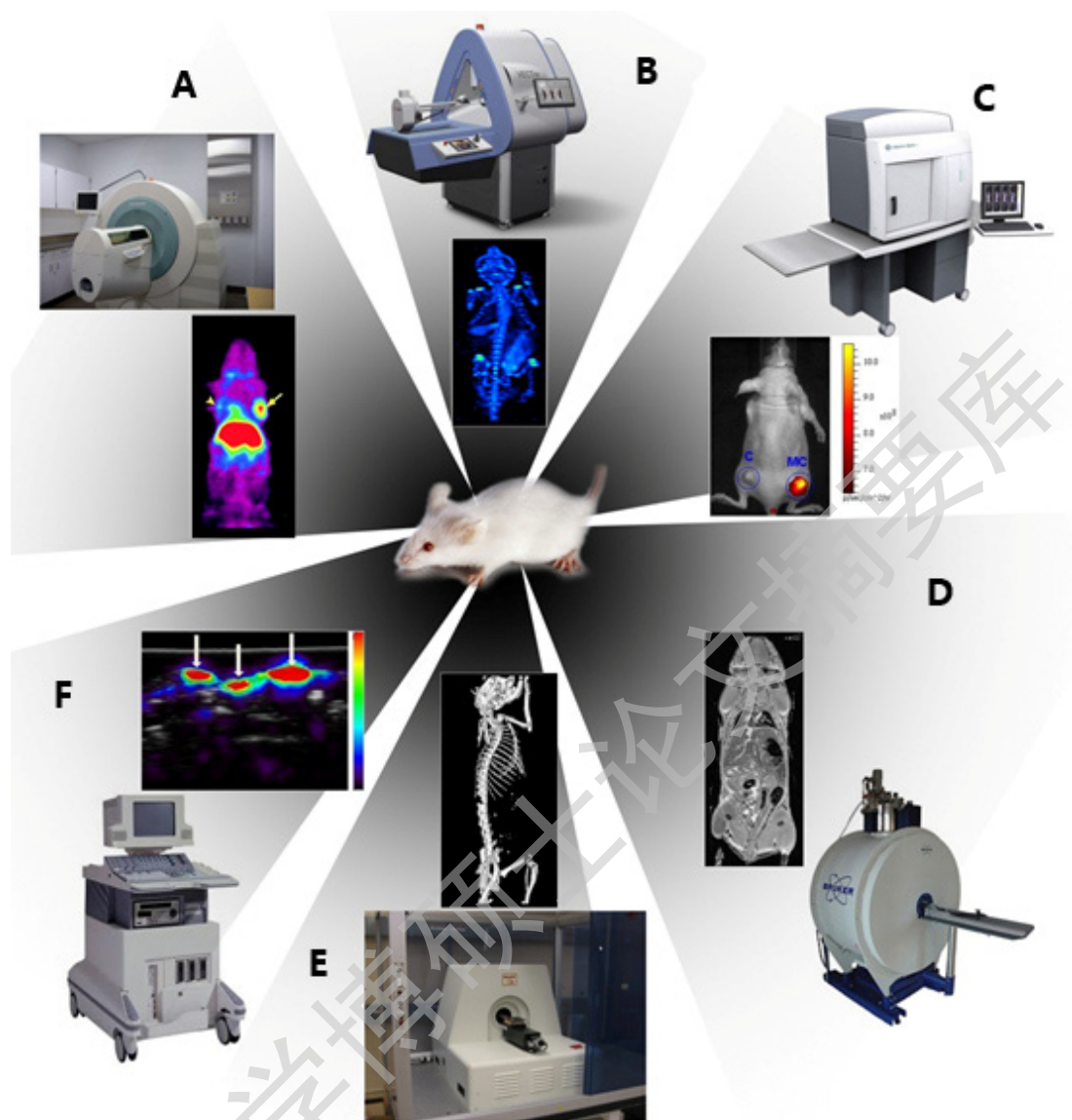


图1.1 A图所示为PET以及利用 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 所进行的小鼠肿瘤显像;B图所示为SPECT以及利用Tc-99m所进行的小鼠骨骼显像;C图所示为小动物光学分子成像系统以及利用Cy5所标记的探针进行裸鼠的荧光显像; D图所示为MRI以及小鼠核磁扫描显像图; E图所示为Micro-CT以及小鼠骨干CT骨骼显像渲染图;F图所示为超声仪器以及小鼠超声造影。

各种分子影像技术的特点汇总如表 1.1 所示[8]:

表 1.1 各种分子影像技术的特点

成像设备	成像原理	空间分辨率 ^a	纵深	时间分辨率 ^b	灵敏度 ^c	探针用量
PET	高能 γ 射线	1-2 mm	不限	10 s-mins	10^{-11} - 10^{-12} mol/L	纳克

SPECT	低能 γ 射线	1-2 mm	不限	mins	10^{-10} - 10^{-11}	纳克 mol/L
光学成像	可见光或 近红外	2-5 mm	1-2 cm	sec- mins	10^{-9} - 10^{-17}	毫克-微克 mol/L
MRI	电磁波	25-100 μ m	不限	mins-hrs	10^{-3} - 10^{-5}	毫克-微克 mol/L
CT	X 射线	50-200 μ m	不限	mins	未定	无
超声	高频声波	50-500 μ m	mm-cm	sec-mins	未定	毫克-微克

续表 1.1

成像设备	人体应用情况	对生物体的干扰	主要应用领域	优点	缺点
PET	可以	无干扰	代谢, 报告基因, 酶, 受体, 靶标	高灵敏度, 无纵深限制, 可定量	成本高, 空间分辨率相对较低, 辐射损伤
SPECT	可以	无干扰	报告基因, 受体	可用分子探针多, 可同时成像, 可定量	空间分辨率低, 辐射损伤
光学成像	有限	探针用量大时会产生干扰	报告基因, 细胞迁移	高灵敏度, 快速, 方便, 成本低, 相对高通量	空间分辨率低, 限于表层应用
MRI	可以	探针用量大时会产生干扰	形态学, 报告基因, 受体	极高的空间分辨率, 结合形态学和功能性成像	灵敏度低, 费时, 探针用量大
CT	可以	探针用量大时会产生干扰	形态学	骨骼、肿瘤成像, 解剖学成像	应用范围小, 软组织分辨率低, 辐射损伤
超声	可以	无干扰	形态学	实时成像, 成本低	空间分辨率低, 主要限于形态学应用

^a 空间分辨率是指影像上能够识别的两个独立被测物之间的最小距离, 它是衡量图片质量的物理量。^b 时间分辨率是指在从成像过程开始起, 纪录最终的可分辨的图

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.