

• 专题论著 •



许晓平, 2004年6月毕业于中国科学技术大学, 获应用化学学士学位; 2012年6月于中国科学院上海应用物理研究所获无机化学博士学位。现为复旦大学附属肿瘤医院核医学科药师、助理研究员, 从事肿瘤靶向放射性药物方面的研究。研究领域主要涉及抗肿瘤多肽放射性药物, 以及基于纳米颗粒的肿瘤靶向放射性分子影像探针的合成、标记和应用。已在国内外核心期刊发表论文13篇, 其中第一作者4篇, 并申请专利5项。

## 前列腺特异性膜抗原小分子抑制剂显像研究

许晓平<sup>1,3,4</sup>, 张建平<sup>1,3,4</sup>, 何思敏<sup>1,3,4</sup>, 罗建民<sup>1,3,4</sup>, 鲍晓<sup>1,3,4</sup>, 王小方<sup>2,3,4</sup>,  
郭小毛<sup>2,3,4</sup>, 章英剑<sup>1,3,4</sup>

1. 复旦大学附属肿瘤医院核医学科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院放疗科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
3. 复旦大学生物医学影像研究中心, 上海 200032;
4. 上海分子影像探针工程技术中心(筹), 上海 200032

**【摘要】** 目的: 前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 是前列腺癌诊疗的一个有效靶点。本研究组成功构建了一种新型<sup>99m</sup>Tc标记PSMA抑制剂<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A, 本研究主要探讨该分子影像探针在前列腺癌模型中的靶向能力, 并将其与目前临床常用PET显像剂<sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖 (<sup>18</sup>F-FDG)、<sup>11</sup>C-胆碱进行比较。方法: 利用小动物SPECT/CT显像, 在PC-3和LNCaP肿瘤模型中研究<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A的靶向能力; 同时在LNCaP肿瘤模型中评估<sup>18</sup>F-FDG和<sup>11</sup>C-胆碱小动物PET/CT显像效果。结果: <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A血液清除迅速, 主要通过肾代谢, 肠道有少量放射性摄取, 其余主要器官无明显放射性摄取。PSMA不表达的PC-3模型肿瘤没有放射性摄取, PSMA高表达的LNCaP模型肿瘤高度放射性浓聚, 肿瘤/肌肉比值达20.4; 经2-PMPA阻断后, LNCaP肿瘤的放射性摄取大幅度降低。LNCaP模型的<sup>18</sup>F-FDG和<sup>11</sup>C-胆碱的肿瘤/肌肉比值分别仅为2.1和2.6, 远远低于<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A。结论: <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A体内清除快, 肿瘤摄取高, 是一个理想的靶向PSMA的分子影像探针, 对PSMA阳性肿瘤的显像优于<sup>18</sup>F-FDG和<sup>11</sup>C-胆碱。

**【关键词】** 前列腺特异性膜抗原; 小分子抑制剂; <sup>99m</sup>Tc; 小动物SPECT/CT

中图分类号: R445.5 文献标志码: A 文章编号: 1008-617X(2015)03-0173-06

**The imaging study of a small-molecular inhibitor targeting prostate specific membrane antigen** XU Xiaoping<sup>1,3,4</sup>, ZHANG Jianping<sup>1,3,4</sup>, HE Simin<sup>1,3,4</sup>, LUO Jianmin<sup>1,3,4</sup>, BAO Xiao<sup>1,3,4</sup>, WANG Xiaofang<sup>2,3,4</sup>, GUO Xiaomao<sup>2,3,4</sup>, ZHANG Yingjian<sup>1,3,4</sup> (1. Department of Nuclear Medicine, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Radiotherapy, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Center for Biomedical Imaging, Fudan University, Shanghai 200032, China; 4. Shanghai Engineering Research Center for Molecular Imaging Probes, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHANG Yingjian E-mail: yjzhang111@aliyun.com

**【Abstract】 Objective:** Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a well-established target for diagnosis and therapy

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No: 21401025); 上海分子影像探针工程技术研究中心项目 (No: 14DZ2251400)。

通信作者: 章英剑 E-mail: yjzhang111@aliyun.com

of prostate cancer (PCa). We have synthesized an amino-functionalized PSMA inhibitor (Glu-Urea-A) and labeled technetium-99m via HYNIC. The *in vivo* target capacity of the new probe was evaluated in animal model and compared with  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) and  $^{11}\text{C}$ -choline which were mostly used in clinic. **Methods:** The new probe was studied in severe combined immunodeficiency (SCID) mice bearing PC-3 and LNCaP tumor xenografts on small animal SPECT/CT. The comparative analysis of  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{11}\text{C}$ -choline imagings was done in LNCaP tumor xenografts on small animal PET/CT. The tumor to muscle ratio was obtained by the analysis software accompanying with small animal SPECT/CT and PET/CT respectively. **Results:** The imaging results showed that the metabolism of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A was very fast. Kidney was the primary excretory organ and little radioactive uptake was found in intestines. There was no significant uptake in other organs. PC-3 tumor did not have any radioactive uptake. LNCaP tumor had very high radioactive uptake, and the tumor to muscle ratio was 20.4. The blocking experiment showed that the tumor uptake reduced significantly. The tumor to muscle ratio obtained from PET/CT imaging were only 2.1 and 2.6 for  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{11}\text{C}$ -choline respectively, which were much lower than  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A. **Conclusion:** The probe  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A with fast metabolism and high tumor uptake was a promising molecular imaging probe targeting PSMA. It is superior to  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{11}\text{C}$ -choline in prostate cancer imaging.

**【Key words】** Prostate-specific membrane antigen; Small-molecular inhibitor;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ; Small animal SPECT/CT

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是威胁男性健康最常见的肿瘤之一。近年来,其在我国的发病率明显上升,已成为所有恶性肿瘤中发病率增速最快的病种,大城市更成为“重灾区”。2012年中国肿瘤登记年报显示,上海市20年间前列腺癌发病率增长10余倍,已跃居男性恶性肿瘤第5位。

前列腺癌的早期诊断有赖于局部多点穿刺,核医学 $^{18}\text{F}$ -脱氧葡萄糖( $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose,  $^{18}\text{F}$ -FDG)、 $^{11}\text{C}$ -胆碱和 $^{11}\text{C}$ -乙酸PET/CT显像均存在灵敏度低的缺点,尤其对复发的前列腺癌<sup>[1-3]</sup>;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP SPECT/CT骨显像特异性欠佳、对脊柱部位的转移灶不够灵敏。因此,临床上迫切需要寻找更好的分子影像探针。

前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)也被称为I型叶酸水解酶或II型谷氨酸羧肽酶,几乎在所有的前列腺癌细胞表面过度表达,且在低分化、转移性和雄激素非依赖型前列腺癌细胞中的表达进一步增加,而在肾脏、肠道、脑等正常组织中的表达水平要低1 000倍以上<sup>[4-6]</sup>。因此,PSMA对于前列腺癌的诊断和治疗是一个极具有吸引力的靶点,其中靶向PSMA的小分子抑制剂能快速从血液中清除,已成为分子影像探针的首选<sup>[7-10]</sup>。本科在谷氨酸-脲核心的基础上,引入双功能螯合剂6-胍基烟酸(HYNIC),合成了一种可用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的新型PSMA小分子抑制剂类似物HYNIC-Glu-Urea-A。本研究报道其在前列腺癌模型中的靶向能力及与目前临床常用PET显像剂 $^{18}\text{F}$ -FDG、 $^{11}\text{C}$ -胆碱的比较。

## 1 资料和方法

### 1.1 试剂和材料

HYNIC-Glu-Urea-A为自制产品,方法、质量分析另文报道。乙二胺-*N,N'*-二乙酸(ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid, EDDA)购自日本TCI公司,Tricine购自上海百灵威化学技术有限公司,SnCl<sub>2</sub>购自美国SIGMA-ALDRICH公司,HCl、NaOH购自国药集团化学试剂有限公司(上海),RPMI 1640培养基和10%胎牛血清购自美国GIBCO公司,双抗(青霉素-链霉素)和0.25%胰酶购自法国BIOWEST公司,Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>淋洗液购自上海原子科兴药业有限公司。 $^{18}\text{F}$ -FDG和 $^{11}\text{C}$ -胆碱为自制产品。

雄性严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠6只,18~20 g,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,于复旦大学动物实验中心2~3级清洁级动物房饲养;人前列腺癌细胞PC-3(PSMA表达阴性)和LNCaP(PSMA表达阳性)由中国科学院细胞库提供。

### 1.2 实验仪器

小动物SPECT/CT为美国BIOSCAN公司Nano SPECT/CT plus,小动物PET/CT为SIEMENS公司Inveon PET/CT,放射性高效液相色谱仪(Radio-HPLC)为美国安捷伦公司1200系列高效液相色谱仪配德国RAYTEST公司GABI放射性检测器,放射性薄层色谱仪(Radio-TLC)为德国RAYTEST公司miniGITA,医用回旋加速器为德国SIEMENS

公司Eclipse ST,  $^{18}\text{F}$ -FDG合成仪为德国SIEMENS公司 Explora FDG4,  $^{11}\text{C}$ -胆碱合成仪为北京派特公司PET-CS- I (本科改造后)、PET-CS- II。上述仪器均为本科拥有。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记HYNIC-Glu-Urea-A

取10  $\mu\text{g}$  HYNIC-Glu-Urea-A, 加入0.5 mL EDDA溶液(20 mg/mL溶于0.1 mol/L NaOH溶液)与0.5 mL Tricine溶液[40 mg/mL溶于0.2 mol/L pH 6的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)]的混合液中溶解, 再加入25  $\mu\text{L}$   $\text{SnCl}_2$ 溶液(1 mg/mL溶于0.1 mol/L HCl)、30 mCi  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$

溶液, 100  $^\circ\text{C}$ 反应10 min。反应结束后, 反应液经0.22  $\mu\text{m}$ 的Millipore针式过滤器除菌。

#### 1.3.2 质量控制方法

使用Radio-HPLC和Radio-TLC分析 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A的放射化学纯度。其中, 薄层色谱法展开剂为丙酮和50%乙腈水溶液。各组分的比值(Rf)见表1。反相高效液相色谱方法: 色谱柱为安捷伦ZOBRAx 300SB-C18柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm)。流动相为水/0.1%三氟乙酸/乙腈。洗脱条件为0~3 min, 10%乙腈; 3~18 min, 10%~70%乙腈; 18~22 min, 70%~10%乙腈。紫外检测(波长为220 nm)和放射性检测。

表 1  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记可能产物的Rf值

| 放射化学产物                                     | Rf值 | 固定相    | 流动相   |
|--|-----|--------|-------|
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$              | 1   | TLC-SG | 丙酮    |
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$                | 0   |        |       |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -coligand         | 1   |        |       |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A | 0   |        |       |
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$              | 1   | TLC-SG | 50%乙腈 |
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$                | 0   |        |       |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -coligand         | 1   |        |       |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A | 1   |        |       |

#### 1.3.3 肿瘤模型建立

将PC-3和LNCaP细胞传代后接种于50  $\text{cm}^2$ 培养瓶中, 加入RPMI 1640培养基, 在5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$ 培养箱内贴壁生长至融合状态。用0.25%胰酶消化传代扩增至所需用量。在倒置显微镜下进行细胞计数, 至细胞总数为 $5\times 10^7$ 个。收集细胞, 用50% Matrigel基质胶制成密度为 $1\times 10^7/\text{mL}$ 的单细胞悬液。取0.2 mL细胞悬液快速皮下接种于SCID小鼠右上肢, 在复旦大学动物实验中心培养4~6周, 待实体瘤长至7~8 mm时用于显像。

#### 1.3.4 小动物显像实验

PC-3和LNCaP肿瘤模型小鼠各3只, 均尾静脉注射1 mCi/100  $\mu\text{L}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A, 于1、2和4 h时用1.5%异氟烷/氧气麻醉固定后进行SPECT/CT显像。然后利用仪器配置的软件进行图像处理和数据分析, 获取各时间点的全身图像和包括肿瘤在内的各种感兴趣组织的定量数据, 计算靶/非靶比值, 进行定性和半定量分析, 寻找最佳的显像时相。

阻断实验: 每只LNCaP模型小鼠尾静脉注射过量PSMA抑制剂2-PMPA(摩尔当量大于1 000倍, 溶于100  $\mu\text{L}$ 生理盐水)0.5 h后, 再注射

1 mCi/100  $\mu\text{L}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A, 同上显像。

与 $^{18}\text{F}$ -FDG和 $^{11}\text{C}$ -胆碱PET/CT显像比较: 每只LNCaP模型注射量200  $\mu\text{Ci}$ /0.2 mL  $^{18}\text{F}$ -FDG注射后1 h显像,  $^{11}\text{C}$ -胆碱注射后15 min显像。显像方法: 到采集时间点时, 固定方法同上, PET/CT显像后, 利用仪器配置的软件进行图像处理和数据分析, 计算靶/非靶比值, 进行半定量分析。

## 2 结 果

### 2.1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A质量控制

经Radio-HPLC和Radio-TLC测定,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A的标记率和放射化学纯度均大于99%。Radio-HPLC谱图见图1。

### 2.2 小动物显像研究

LNCaP模型小鼠尾静脉注射 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-Urea-A后, 各时间点显像见图2, 可见肿瘤高度摄取, 1、2和4 h时肿瘤/肌肉比值分别为17.3、20.4和18.1。

由图3可见, PSMA阴性PC-3肿瘤未见放射

性摄取，放射性分布类似周围肌肉本底(靶/本比仅为1.2)；而PSMA阳性LNCaP肿瘤则放射性高度浓聚，经PSMA抑制剂2-PMPA阻断后，LNCaP肿瘤的放射性摄取大幅度降低，仅稍稍高

于本底。

如图4所示，LNCaP肿瘤均能摄取<sup>18</sup>F-FDG和<sup>11</sup>C-胆碱，但其肿瘤/肌肉比值分别仅为2.1和2.6。

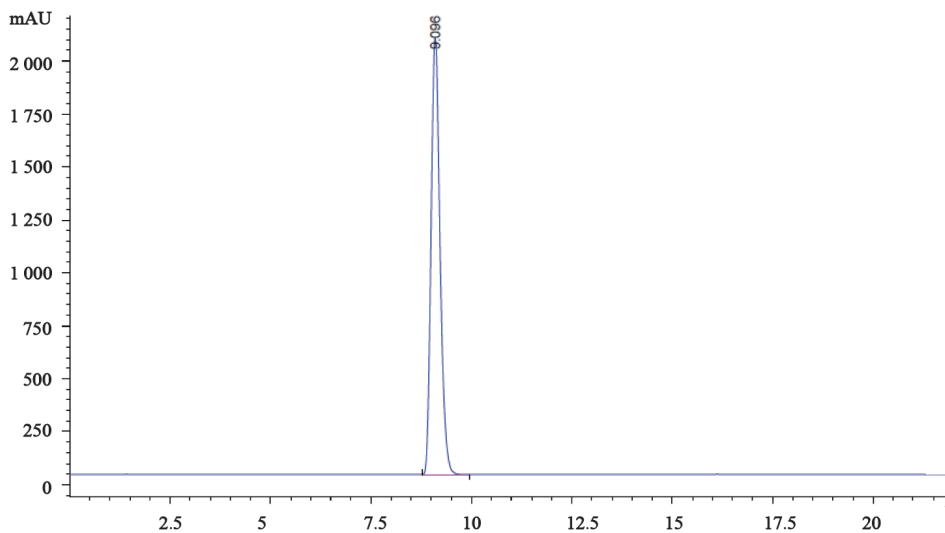


图1 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A的Radio-HPLC谱图

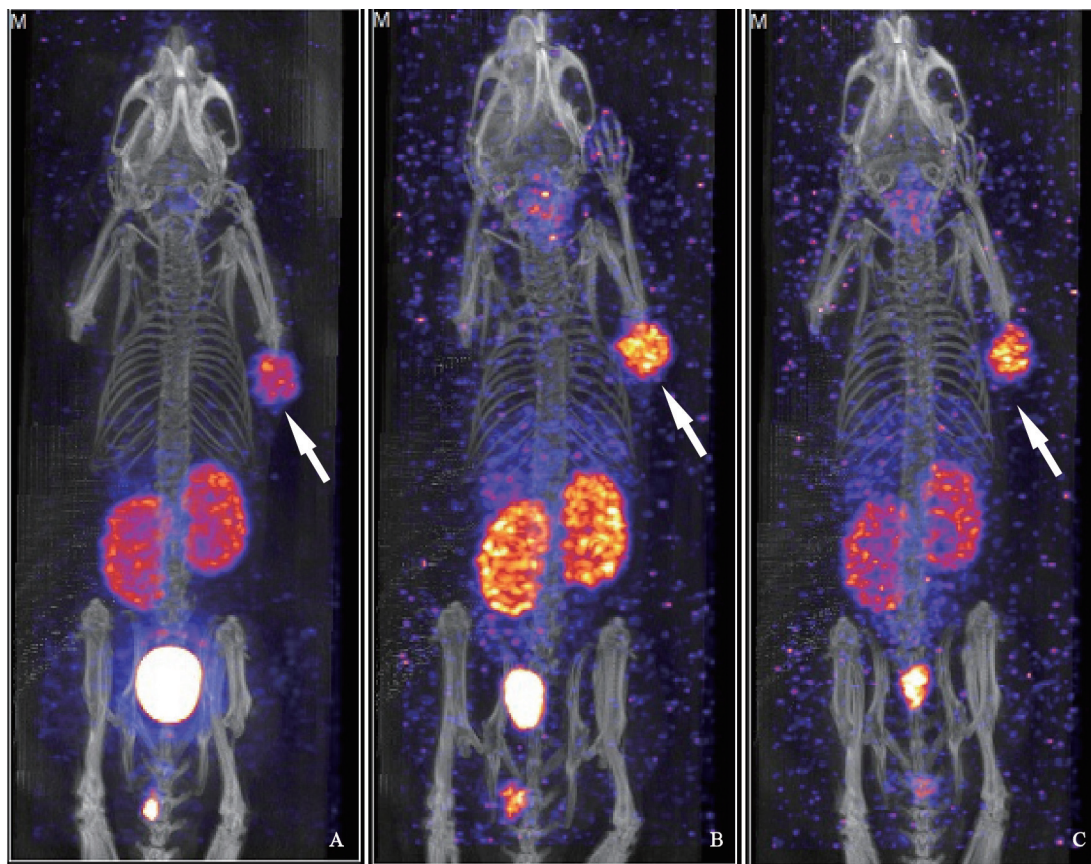


图2 LNCaP模型(PSMA阳性)<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A SPECT/CT显像(箭头示肿瘤位置)

A: 1 h; B: 2 h; C: 4 h

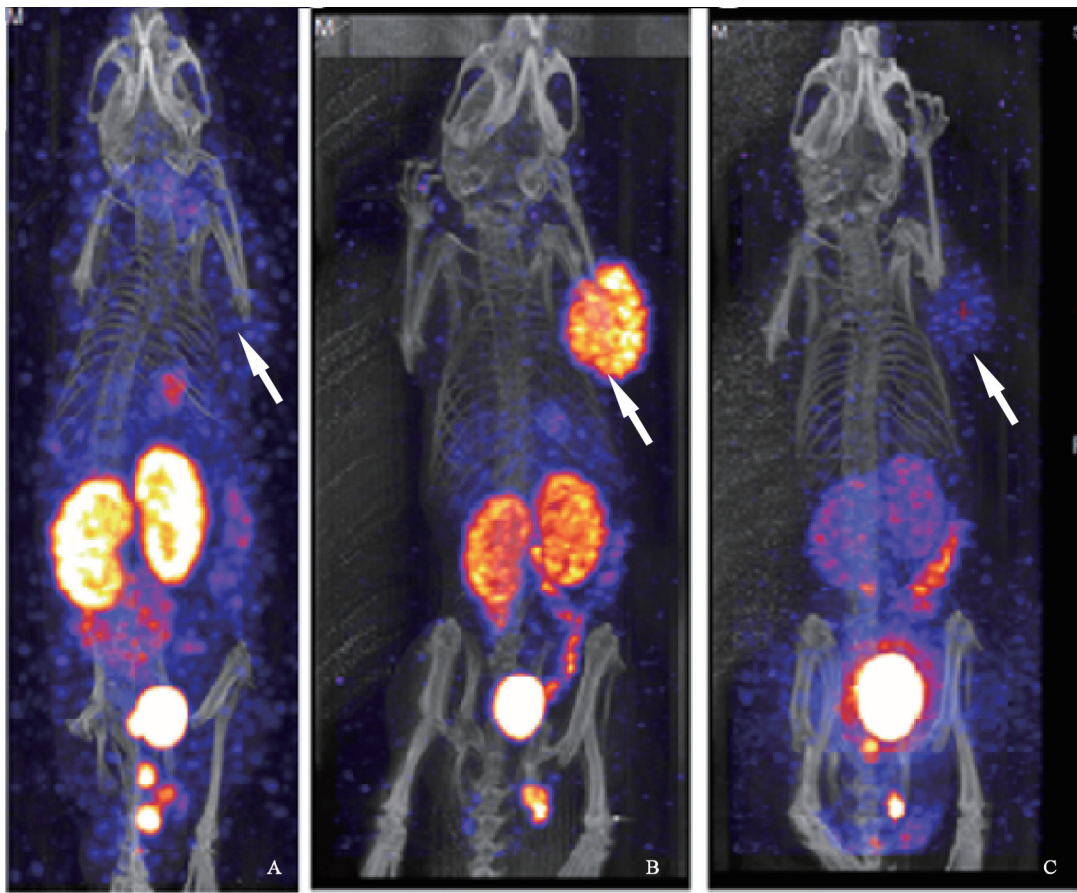


图 3 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A SPECT/CT显像2 h (箭头示肿瘤位置)

A: PC-3; B: LNCaP; C: LNCaP阻断后

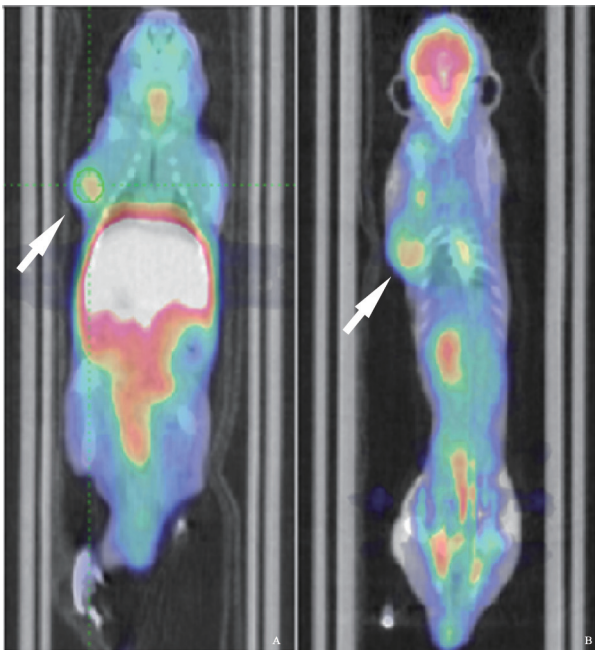


图 4 LNCaP模型PET/CT显像 (箭头示肿瘤位置)

A: <sup>11</sup>C-胆碱; B: <sup>18</sup>F-FDG

### 3 讨 论

前列腺癌大多增殖缓慢且糖代谢率较低，因此目前临床常用的PET显像剂如<sup>18</sup>F-FDG、<sup>11</sup>C-胆碱和<sup>11</sup>C-乙酸盐在前列腺癌诊断效能方面均不太理想<sup>[1-3]</sup>。笔者认为，仅与细胞表面受体类似物结合而与增殖、代谢等无关的配体类分子影像探针在肿瘤定性、定位中可能发挥更强的作用。PSMA正是这样一种在前列腺癌细胞表面过表达的受体类物质<sup>[11-12]</sup>，而与PSMA结合的配体类物质更能有效地被网格蛋白转运到细胞内<sup>[13]</sup>，导致放射性示踪剂在肿瘤细胞内的滞留，从而带来更佳的显像质量。因此，PSMA已成为前列腺癌诊疗的一个有效靶点。

本研究基于谷氨酸-脲核心设计合成了一种新型PSMA小分子抑制剂类似物，在国内首次制备成靶向PSMA的放射性分子影像探针<sup>99m</sup>Tc-

HYNIC-Glu-Urea-A。该探针标记方法简便、放射化学纯度高、图像质量好,适于大范围推广。

本研究中小动物SPECT/CT显像提示,PSMA阳性LNCaP肿瘤模型能高度摄取<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A,心、肺和脾等重要器官放射性摄取很低,肌肉等放射性本底也低,血液清除快,能满足分子影像探针的基本要求。肾和膀胱放射性分布非常高,表明该化合物主要经泌尿系统排泄,与其相对分子质量小且水溶性极高有关。肝及肠道轻度摄取,提示该药物也有少部分经肝-肠循环途径代谢。SPECT/CT半定量分析提示,最佳显像时相为注射后2 h,属临床可接受的时相。

本研究中,PSMA阴性PC-3肿瘤模型<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A靶/本比仅为1.2,PSMA阳性LNCaP模型在提前半小时注射超过标记物摩尔量1 000倍的PSMA抑制剂2-PMPA后,<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A完全被阻断,肿瘤/肌肉比值下降为1.5。由此从两方面证实该分子影像探针高度特异性靶向PSMA。

本研究同一LNCaP模型的<sup>18</sup>F-FDG、<sup>11</sup>C-胆碱小动物PET/CT显像中,肿瘤/肌肉比分别只有2.1和2.6,与临床所见类似。因此,<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A SPECT/CT前列腺癌定性显像可望比PET/CT价廉物美,但能否与<sup>18</sup>F-FDG PET/CT一样评价远处病灶的疗效,尚有待进一步研究。

综上所述,本研究组自制的新型SPECT/CT显像剂<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Glu-Urea-A标记方法简便,放射化学纯度高,能高度特异性靶向PSMA,对PSMA阳性肿瘤的显像效果优于<sup>18</sup>F-FDG和<sup>11</sup>C-胆碱。

## 参考文献

- [1] HAIN S F, MAISEY M N. Positron emission tomography for urological tumours [J]. *BJU Int*, 2003, 92(2): 159-164.
- [2] BOUCHELOUCHE K, TAGAWA S, GOLDSMITH S, et al. PET/CT imaging and radioimmunotherapy of prostate cancer [J]. *Semin Nucl Med*, 2011, 41(1): 29-44.
- [3] HUSARIK D B, MIRALBELL R, DUBS M, et al. Evaluation of [<sup>18</sup>F]-choline PET/CT for staging and restaging of prostate cancer [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(2): 253-263.
- [4] ISRAELI R S, POWELL C T, FAIR W R, et al. Molecular cloning of a complementary DNA encoding prostate specific membrane antigen [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(2): 227-230.
- [5] SILVER D A, PELLICER I, FAIR W R, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(1): 81-85.
- [6] GHOSH A, HESTON W D. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(3): 528-539.
- [7] EDER M, SCHÄFER M, BAUDER-WÜST U, et al. <sup>68</sup>Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea based PSMA inhibitor for PET imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(4): 688-697.
- [8] HILLIER S M, MARESCA K P, LU G, et al. <sup>99m</sup>Tc-labeled small-molecule inhibitors of prostate-specific membrane antigen for molecular imaging of prostate cancer [J]. *J Nucl Med*, 2013, 54(8): 1369-1376.
- [9] VALLABHAJOSULA S, NIKOLOPOULOU A, BABICH J W, et al. <sup>99m</sup>Tc-labeled small-molecule inhibitors of prostate-specific membrane antigen: pharmacokinetics and biodistribution studies in healthy subjects and patients with metastatic prostate cancer [J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(11): 1791-1798.
- [10] MAURER T, WEIRICH G, SCHOTTELIUS M, et al. Prostate-specific membrane antigen-radioguided surgery for metastatic lymph nodes in prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2015, 68(3): 530-534.
- [11] HENRY M D, WEN S, SILVA M D, et al. A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7995-8001.
- [12] ELSASSER-BEILE U, REISCHL G, WIEHR S, et al. PET imaging of prostate cancer xenografts with a highly specific antibody against the prostate-specific membrane antigen [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(4): 606-611.
- [13] GOODMAN O B JR, BARWE S P, RITTER B, et al. Interaction of prostate specific membrane antigen with clathrin and the adaptor protein complex-2 [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1199-1203.

(收稿日期: 2015-08-30)