



· 论 著 ·

新型HER2靶向环肽PET探针的计算机设计及其用于乳腺癌的成像评价

郭旭¹, 高晓敏², 姚莹^{1, 3}

1. 南京医科大学附属无锡妇幼保健院药学部, 江苏 无锡 214002;

2. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122;

3. 无锡市妇幼保健院药学部, 江苏 无锡 214002

[摘要] 目的: 设计一种靶向人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的放射性核素标记肽类示踪剂 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9, 利用正电子发射断层成像 (positron emission tomography, PET) 技术, 旨在实现体内HER2表达的灵敏、特异性检测, 为改善乳腺癌的早期诊断与预后评估提供新手段。方法: 通过计算机辅助设计、分子动力学模拟和表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 检测, 我们设计了HER2靶向肽WC8, 并进一步引入Lys (赖氨酸), 使WC8成环得到Cyclo-WK9。然后偶联螯合剂DOTA, 进行⁶⁸Ga标记。首先对 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的放射化学纯度 (radiochemical purity, RCP)、脂水分配系数 (log P) 和稳定性进行了评估。该示踪剂对HER2的靶向特异性通过体外细胞摄取测定和体内PET成像以及阻断研究进行了检验。此外, 还在体外和体内观察了示踪剂在监测化学物质诱导的HER2表达动态变化方面的灵敏度。为了明确 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9对HER2的特异性, 还进行了生物分布、放射自显影和Western Blot印迹研究。结果: 设计合成的 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9具有高稳定性 (RCP > 90%) 和对HER2的高亲和力。体外细胞摄取试验表明, 示踪剂 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9能与HER2⁺乳腺癌细胞SK-BR-3特异性结合, 2 h时摄取值为 (1.32 ± 0.03) %AD/10⁵细胞, 然而HER2⁻乳腺癌细胞MDA-MB-231的2 h时摄取仅为 (0.14 ± 0.02) %AD/10⁵细胞。MicroPET显示, SK-BR-3异种移植瘤在注射后15 min对 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的最大摄取量 [(4.1 ± 0.81) %ID/g] 明显高于MDA-MB-231异种移植瘤 [(1.41 ± 0.52) %ID/g], 前者在注射后60 min的肿瘤-肌肉摄取比 (3.82 ± 0.36) 明显高于后者 (1.45 ± 0.29)。用非放射性前体DOTA-Cyclo-WK9预处理的MDA-MB-231异种移植瘤对 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的摄取很少 [注射后10 min为 (1.25 ± 0.30) %ID/g]。结论: 本研究成功地设计合成了一条HER2靶向的环肽DOTA-Cyclo-WK9, 其螯合⁶⁸Ga时, 在监测HER2表达的动态变化方面显示出显著的特异性和敏感性。

[关键词] 乳腺癌; 人表皮生长因子受体2; 正电子发射断层成像; 放射性靶向肽; 环肽; 动态监测

中图分类号: R737.9; R445.6 文献标志码: A

DOI: 10.19732/j.cnki.2096-6210.2025.06.011

基金项目: 江苏省药学会奥赛康医院药学科科研项目 (A202406)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: JSINM-2024-175。

知情同意: 有。

引用本文: 郭旭, 高晓敏, 姚莹. 新型HER2靶向环肽PET探针的计算机设计及其用于乳腺癌的成像评价 [J]. 肿瘤影像学, 2025, 34(6): 643-654。

Funding: Jiangsu Pharmaceutical Association - Aosaikang Hospital Pharmaceutical Research Project (A202406).

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: JSINM-2024-175.

Informed consent: available.

Cite this article: GUO X, GAO X M, YAO Y. Computer-aided design of a novel HER2-targeted cyclic peptide PET probe and its evaluation for noninvasive imaging of breast cancer [J]. Oncoradiology, 2025, 34(6): 643-654.

Computer-aided design of a novel HER2-targeted cyclic peptide PET probe and its evaluation for noninvasive imaging of breast cancer GUO Xu¹, GAO Xiaomin², YAO Ying^{1,3} (1. Department of Pharmacy, Wuxi Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China; 2. Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China; 3. Department of Pharmacy, Wuxi Maternal and Child Health Care Hospital, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: YAO Ying E-mail: 9862023375@jiangnan.edu.cn

[Abstract] Objective: This study designed a radiometal-labeled peptide tracer, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9, targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Utilizing positron emission tomography (PET) imaging, the research aims to achieve sensitive and specific detection of HER2 expression *in vivo*, thereby providing a novel approach to improve early diagnosis and prognosis assessment for breast cancer. **Methods:** Through computer-aided design, molecular dynamics simulation and surface plasmon resonance (SPR) detection, we designed the HER2-targeting peptide WC8 and further introduced Lys to cyclize WC8 to obtain Cyclo-WK9. Then, the chelator DOTA was coupled, and labeled with ⁶⁸Ga. First, the radiochemical purity (RCP), lipophilicity (log *P*) and stability of [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 were evaluated. The targeting specificity of the tracer to HER2 was verified through *in vitro* cell uptake assays, *in vivo* PET imaging and blocking studies. In addition, the sensitivity of the tracer in monitoring the dynamic changes of HER2 expression induced by chemicals was studied *in vitro* and *in vivo*. To investigate the specificity of [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 for HER2, biodistribution, autoradiography and Western Blot studies were also conducted. **Results:** The designed and synthesized [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 had high stability (RCP>90%) and high affinity for HER2. *In vitro* cell uptake experiments showed that the tracer [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 could specifically bind to HER2⁺ tumor cells SK-BR-3, with an uptake value of (1.32 ± 0.03) %AD/10⁵ cells at 2 h, while the uptake of HER2⁻ tumor cells MDA-MB-231 at 2 h was only (0.14 ± 0.02) %AD/10⁵ cells. MicroPET imaging showed that the maximum uptake of [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 in SK-BR-3 xenografts [(4.14 ± 0.81)%ID/g] was significantly higher than that in MDA-MB-231 xenografts [(1.41 ± 0.52)%ID/g] at 15 min after injection, and the tumor-to-muscle uptake ratio of the former (3.82 ± 0.36) was significantly higher than that of the latter (1.45 ± 0.29) at 60 min after injection. The xenografts of MDA-MB-231 pretreated with the non-radioactive precursor DOTA-Cyclo-WK9 showed very little uptake of [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 [(1.25 ± 0.30)% ID/g] at 10 min post-injection). **Conclusion:** This study successfully designed and synthesized a HER2-targeted cyclic peptide DOTA-Cyclo-WK9, which demonstrated significant specificity and sensitivity in monitoring the dynamic changes of HER2 expression when chelated with ⁶⁸Ga. **[Key words]** Breast cancer; Human epidermal growth factor receptor 2; Positron emission tomography; Radiolabeled targeting peptide; Cyclic peptide; Dynamic monitoring

乳腺癌已成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的主要原因^[1]。人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2),一种跨膜酪氨酸激酶受体蛋白,是乳腺癌中关键的预后和预测性生物标志物^[2]。针对HER2的单克隆抗体(如曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)、抗体-药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC,如T-DM1、DS-8201)以及酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI,如拉帕替尼、吡咯替尼)已在HER2阳性乳腺癌患者中显示出显著的临床疗效^[3-5]。

HER2靶向药物的治疗效果与HER2表达水平密切相关,因为治疗后HER2表达可能下

调^[6]。与此相反,对于非HER2高表达的患者,这些疗法不仅临床获益有限,还可能带来潜在风险。鉴于HER2在乳腺癌中的核心作用及其靶向治疗日益重要的临床意义,建立非侵入性检测、监测和定量分析乳腺癌中HER2表达的方法至关重要。

在临床实践中,HER2⁺乳腺癌的诊断主要依赖于免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、显色原位杂交(chromogenic *in situ* hybridization, CISH/SISH)等技术,其中FISH检测为HER2⁺乳腺癌诊断的金标准,尽管传统HER2检测方法(IHC和FISH)的核心优势在于技术成熟、成本可控、结果可重

复性强，且已通过大量临床研究验证其与治疗反应的关联性。但仍存在一些缺陷：组织依赖性，需足够的肿瘤组织样本，采用细针穿刺活检时可能因样本量不足导致结果不可靠^[7]；无法动态监测，仅反映取样时的HER2状态，无法实时监测治疗过程中HER2表达的变化（如靶向治疗耐药后HER2丢失）；无法识别HER2低表达状态，传统方法仅区分“阳性”和“阴性”，但近年来研究^[8-9]显示“HER2低表达”（IHC 1+或2+/FISH阴性）患者也可能对新型ADC敏感，而传统检测无法精准分类此类患者。

因此，我们尝试设计了一种可以特异性地识别并靶向HER2的多肽探针，用于诊断以及动态监测HER2的变化。

1 材料和方法

1.1 HER2靶向肽序列的设计

基于从RCSB PDB数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取的曲妥珠单抗-HER2复合物的晶体结构 (PDB ID: 1N8Z)^[10]，依据该复合物胞外域的晶体结构，识别出曲妥珠单抗上位于HER2蛋白5 Å半径范围内的氨基酸残基，这些残基被认为是结合相互作用的关键位点。随后将这些残基连接，推导出关键肽序列，命名为WA8。利用FoldX软件，将Lead-pep序列中的每个关键氨基酸位点系统地突变为其他天然氨基酸，并计算相应的突变能量^[11-12]。将能量值低于-0.5 kcal/mol的突变归类为潜在增强抗体-HER2结合亲和力的突变。选择Gly101、Asp102和Ala108作为关键氨基酸位点进行三重饱和突变。通过组合任意3个有益突变构建突变组合，并根据预测的结合性能排序，对前5位的突变组合进行进一步分析。其中，性能最优的突变组合被确定为有前景的HER2靶向肽候选物，命名为WC8。

使用Autodock Vina^[13-14]软件预测WC8的结合亲和力，并采用分子力学/广义波恩表面积 (MM/GBSA^[15-16])方法计算其结合自由能 (ΔG_{bind})。此外，在高性能工作站上，使用GROMACS 2022.6软件包进行分子动力学模拟

(molecular dynamics simulation, MD)^[16-17]，以分析WA8、WC8及Cyclo-WK9与HER2之间的相互作用。

1.2 前体DOTA-Cyclo-WK9的合成

前体DOTA-WC8由上海强耀生物科技有限公司定制合成，化学纯度为98.9%。HPLC分析方法采用梯度洗脱程序。以含0.1%三氟乙酸的水溶液为水相，含0.1%三氟乙酸的乙腈为油相，流速恒定为1.0 mL/min。洗脱程序设定如下：0 min时，水相与油相比比例为95:5；随后在17 min内线性变化至10:90并保持3 min；最后在20 min内快速复位至初始比例95:5，并保持平衡以备下次进样。计算值（分子式： $C_{67}H_{88}N_{16}O_{18}S$ ）： $[(M+2H)/2]^+$ 为719.3， $[(M+3H)/3]^+$ 为479.9。实测ESI-MS m/z 为719.3和480.0。

1.3 放射性标记与质量控制

使用0.05 mol/L HCl从⁶⁸Ge-⁶⁸Ga发生器 (ITG GmbH, 德国) 洗脱得到含⁶⁸Ga³⁺的溶液 (1.0 mL)，测定同位素活度。随后加入预制的醋酸钠溶液 (250 μL, 0.25 mol/L) 将溶液pH调节至4.0~5.0，然后与20 μg DOTA-DOTA-Cyclo-WK9在80 °C下温育10 min。所得混合物使用C18 Sep-Pak固相萃取柱 (WAT020515, Waters) 进行纯化，以乙醇 (0.3 mL) 作为洗脱液。溶液在氮气流下浓缩以除去过量乙醇，最终体积小于50 μL。取少量最终溶液进行放射性高效液相色谱 (radio-HPLC) 分析，剩余部分用生理盐水稀释用于后续体内外实验。使用 γ 计数器测定 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的脂水分系数 ($\log P$)。

1.4 细胞与动物模型

人乳腺癌细胞系SK-BR-3 (HER2阳性) 和MDA-MB-231 (HER2阴性) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞使用高糖DMEM培养基培养，培养基中添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素-两性霉素B溶液。细胞置于37 °C、CO₂体积分数为5%的湿润培养箱中培养。

雌性BALB/c裸小鼠 (4~5周龄) 购自常州卡文斯实验动物有限公司 (中国)，随机分为两组。通过在小鼠右前肢腋下皮下接种SK-BR-3或

MDA-MB-231细胞(5×10^6 个细胞悬浮于50 μ L生理盐水和50 μ L基质胶中),建立移植瘤模型。待肿瘤体积达到200~300 mm³时,认为适用于后续体内生物学评价。

在SK-BR-3移植瘤实验中,小鼠随机分为3组:空白对照组($n=3$)、阻断组($n=3$)和吡咯替尼处理组($n=3$)。阻断组在进行后续操作前30 min,通过尾静脉注射过量250倍摩尔浓度的未标记DOTA-WC8肽进行预处理。吡咯替尼处理组通过灌胃给予吡咯替尼(20 mg/kg),隔天1次,共4次。吡咯替尼是一种选择性HER2抑制剂,用于下调HER2蛋白表达。在整个实验期间,每隔48 h系统监测并记录SK-BR-3移植瘤小鼠的体重和肿瘤体积。

1.5 体外特异性实验

为评估放射性示踪剂的特异性,在SK-BR-3和MDA-MB-231乳腺癌细胞中检测了[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8(37 kBq)的细胞摄取。

细胞摄取实验:将SK-BR-3和MDA-MB-231细胞以 2×10^6 个细胞/孔的密度接种于24孔板中,培养过夜。用PBS洗涤3次后,细胞在37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数5%条件下与37 kBq [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8温育15、30、60和120 min。进行细胞阻断研究时,在24孔板中加入过量未标记DOTA-WC8(1 μ mol/L),预处理10 min,然后与[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8共温育指定时间。温育结束后,用冰PBS洗涤细胞,并用1.5 mL 0.2 mol/L NaOH消化2 min。将裂解液转移至 γ 计数管中,使用 γ 计数器测量放射性活度。细胞摄取结果表示为经衰减校正后每管辐射剂量相对于 10^5 个细胞的百分比(%AD/ 10^5 细胞)。

细胞结合实验:将SK-BR-3细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于24孔板中,培养过夜。PBS洗涤后,细胞在不同浓度未标记DOTA-WC8肽存在下,与37 kBq [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8温育。温育2 h后,用冷PBS洗涤细胞,加入0.2 mol/L NaOH消化2 min。将裂解液转移至 γ 计数管中,使用 γ 计数器定量放射性活度。

1.6 体内microPET

将SK-BR-3细胞(6×10^6 个)皮下接种于每

只雌性BALB/c裸小鼠的右侧肋腹部。通常在接种后2周,待肿瘤体积达到约250 mm³时开始实验。成像时,向SK-BR-3移植瘤小鼠尾静脉注射100 μ L [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8(3.7 MBq)。注射后立即进行动态PET,数据采集持续60 min(每组 $n=3$)。进行阻断实验时,将过量的未标记DOTA-WC8与放射性标记的[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8共同注射入SK-BR-3瘤小鼠体内,随后进行60 min动态PET。所有PET图像均采用先前建立的方法进行定量分析。

动物实验符合伦理学规范,并经江苏省原子医学研究所动物研究委员会批准(JSINM-2024-166, JSINM-2024-151)。

1.7 体内生物分布分析

对荷SK-BR-3和MDA-MB-231移植瘤小鼠静脉注射约0.74 MBq放射性标记化合物[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8。在注射后60 min处死小鼠,采集血液、肿瘤组织及主要器官并称量。使用 γ 计数器定量收集样本中的放射性活度。结果经标准化处理,以每克组织注射剂量百分比(%ID/g)表示。

1.8 监测靶向治疗诱导的HER2表达变化

体外研究:首先,通过Western blot分析、免疫荧光染色(10 μ mol/L吡咯替尼)和[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8(37 kBq)细胞摄取实验,评估了SK-BR-3癌细胞中HER2表达对不同浓度吡咯替尼(0、5、7.5和10 μ mol/L)响应的调节情况。

体内研究:随后,使用[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8(3.7 MBq)进行PET,评估了经吡咯替尼(20 mg/kg,处理8 d)治疗的SK-BR-3移植瘤小鼠体内HER2表达的调节情况。在PET成像过程中,基于感兴趣区(region of interest, ROI)分析,定量示踪剂在肿瘤和肌肉组织中的摄取量以及肿瘤/肌肉摄取比值。PET后,对肿瘤和肌肉组织进行放射自显影分析,以进一步研究示踪剂在组织中的特异性分布。此外,采用Western blot和免疫荧光染色进一步检测吡咯替尼治疗后SK-BR-3移植瘤中HER2的表达水平。为评估吡咯替尼的潜在不良反应,对取自SK-BR-3移植瘤小鼠

的肿瘤组织和主要的正常器官进行HE染色。

1.9 统计学处理

采用Graphpad Prism 8.0对计量数据进行正态性和方差齐性检验，对于符合正态分布的数据，采用独立样本 t 检验；对于非正态分布的连续变量，使用Mann-Whitney U 检验。所有实验均独立重复操作3次，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用Student t 检验和单因素方差分析（ANOVA）评估差异的显著性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多肽探针Cyclo-WK9的计算机辅助设计

曲妥珠单抗（trastuzumab）通过特异性结合HER2蛋白的IV结构域，诱导其内吞并发挥治疗效应。受此机制启发，我们基于曲妥珠单抗与HER2蛋白相互作用的氨基酸残基，设计了靶向肽段。为获得具有更高亲和力与生物活性的HER2靶向肽，我们依据人源HER2-赫赛汀Fab复合物胞外结构域的晶体结构（PDB:1N8Z），通过计算筛选出曲妥珠单抗中距离HER2蛋白5 Å范围内的关键残基，这些氨基酸残基对于结合起着重要的作用。将这些残基串联后获得先导肽pep1与pep2，命名为RR9和WA8，通过Autodock Vina进行分子对接以预测其亲和力（表1）。

表1 先导肽的序列

Tab.1 The sequence of the lead peptide

名称	序列	亲和力/ (kcal·mol ⁻¹)
RR9	RIYPTNGYTR	-7.8
WA8	WGGDGFYA	-8.8

鉴于WA8展现出更高的亲和力，我们选择WA8为后续研究设计的对象，通过丙氨酸扫描突变，系统鉴定出肽段中削弱结合的氨基酸位点。基于此结果，对这些位点进行三点突变。突变结果显示，当Asp102→Arg，Gly101→Tyr和Ala106→Cys三点突变时，结合能提升至-6.76 kcal/mol，可显著增强与HER2蛋白的相互作用（表2）。

将突变结果代入WA8的氨基酸序列中，获得了突变后的多肽WC8（WGYRGFYC）。

表2 三点突变的结果

Tab.2 The results of triple mutation

序号	三点突变	突变能/ (kcal·mol ⁻¹)
1	B:Gly101>Tyr, B:Asp102>Arg, B:Ala108>Cys	-6.76
2	B:GLY101>Phe, B:Asp102>Arg, B:Ala108>Cys	-6.55
3	B:Gly101>Arg, B:Asp102>Arg, B:Ala108>Cys	-6.54
4	B:Gly101>Arg, B:Asp102>Ile, B:Ala108>Gln	-6.54
5	B:Gly101>Arg, B:Asp102>Lys, B:Ala108>Gly	-6.08

2.2 线性肽WC8的环化设计

考虑到后续环化设计，我们在WC8的C端引入了一个Lys，利用Lys的侧链NH₂构建了 α -氨基环化和 ϵ -氨基环化两种模型。使用Autodock Vina预测两者的亲和力，并预测脂水分配系数， α -氨基环化的脂水分配系数是-2.57， ϵ -氨基环化的脂水分配系数预测结果是-1.24。考虑到放射性靶向肽肝摄取过高会导致肝脏毒性，我们选择了更为亲水的 α -氨基环化，命名为Cyclo-WK9（Cyclo-WGYRGFYRK），从而降低肝脏代谢的占比，提高肾脏代谢的比例。

2.3 分子动力学模拟评估WA8、WC8、Cyclo-WK9与HER2亲和力

我们通过GROMACS 2022.6进行分子动力学模拟，结果如图1所示，在分子动力学模拟过程中，Cyclo-WK9/HER2复合物的均方根偏差显著低于WA/HER2、WC8/HER2，并且具有更高的稳定性，其回旋半径（RMSF）也显著低于WA/HER2、WC8/HER2。同时，Cyclo-WK9/HER2在模拟过程中与HER2蛋白之间的氢键数量稳定在5左右，显著高于WA/HER2、WC8/HER2之间1和2的氢键数。以上结果表明，与先导肽WA8、线性肽WC8相比，Cyclo-WK9具有更好的HER2靶向性和结合稳定性。因此，我们合成了DOTA-Cyclo-WK9，并对其与HER2的亲和力进行了表面等离子体共振（surface plasmon resonance, SPR）鉴定，其结合平衡常数 K_D 值为91.91 nmol/L，达到nmol/L级别，可以用于后续的影像学研究。

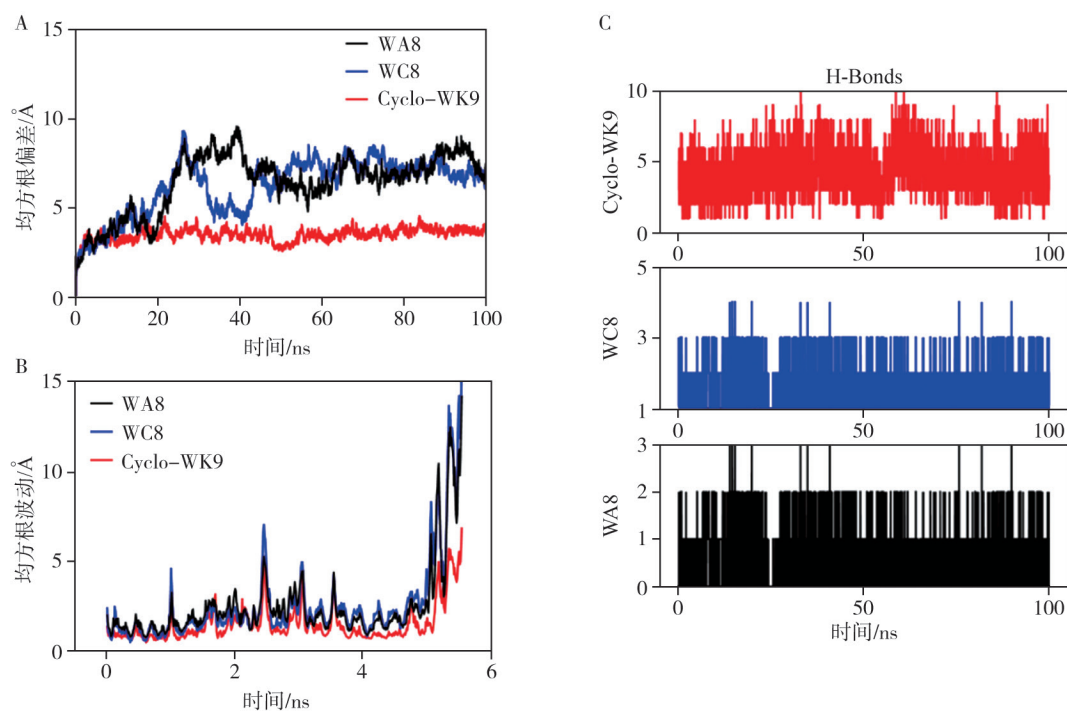


图1 多肽WA8、WC8、Cyclo-WK9的分子动力学模拟结果

Fig.1 Molecular dynamics simulation results of peptides WA8, WC8, and Cyclo-WK9

A: 分子动力学模拟过程中复合物均方根偏差 (RMSD) 随时间的变化; B: 基于分子动力学模拟轨迹计算的均方根波动 (RMSF); C: 分子动力学模拟过程中, 短肽与蛋白的氢键数目变化。

2.4 DOTA-Cyclo-WK9的 ^{68}Ga 标记和质量控制

放射性示踪剂 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9按照图2中概述的程序合成。使用放射性HPLC系统监测 ^{68}Ga 的放射性标记效率。如图3A所示, [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的放射化学纯度超过97%。在PBS和FBS中进行的稳定性试验表明, [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在37 °C温育120 min后的放射化学纯度仍高于95% (图2B、

C)。此外, [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在注射后30 min和60 min收集的体内血液中保持稳定 (图3D)。这些结果表明, [^{68}Ga] GaDOTA-WC8在体内血液中具有很高的稳定性, 并且在活体系统中具有一定的生物应用潜力。同时, 测 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的脂-水分配系数 ($\log P$) 为 -2.31 ± 0.16 , 表明具有明显的亲水性。

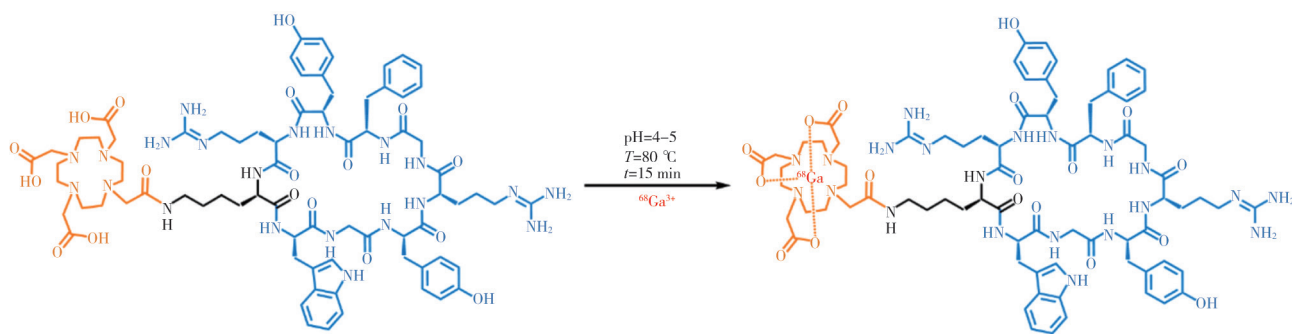


图2 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9的合成路线示意图

Fig.2 Schematic diagram of the synthesis route for [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9

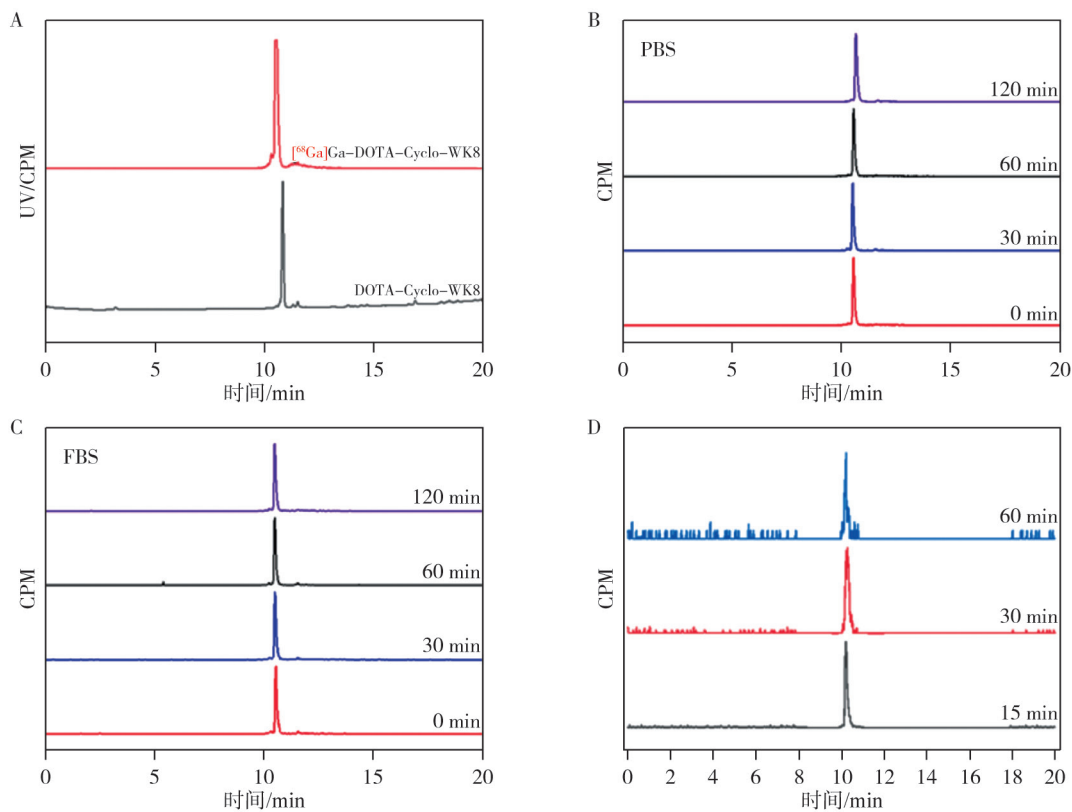


图3 高效液相色谱评估 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的体内外稳定性

Fig.3 *In vitro* and *in vivo* stability evaluation of $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9 by high-performance liquid chromatography

A: $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9, DOTA-Cyclo-WK9共注射。B: $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9在PBS中的稳定性。C: $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9在FBS中的稳定性。D: $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9在小鼠血清中的稳定性。

2.5 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的体外特异性测定

为了评价不同乳腺癌细胞系中HER2的相对表达水平,选择表现出不同HER2表达水平的SK-BR-3和MDA-MB-231乳腺癌细胞进行细胞摄取实验。蛋白质印迹分析(图4A)和免疫荧光染色(图4B)证实SK-BR-3细胞中的HER2表达水平显著高于MDA-MB-231细胞。

$[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的摄取在120 min内逐渐增加,在120 min时在SK-BR-3细胞中达到 $(2.15 \pm 0.11) \% \text{AD}/10^5$ 细胞的最大摄取,这显著高于在MDA-MB-231细胞中观察到的摄取 $[(0.84 \pm 0.05) \% \text{AD}/10^5$ 细胞,图5A)。此外,通过在暴露于 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9之前将SKBR3细胞与前体DOTA-Cyclo-WK9预温育来进行阻断实验。 γ 计数器分析证明阻断组中 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的摄取显著降低,

证实了示踪剂对HER2的特异性。为了进一步评估放射性示踪剂的体外结合亲和力,进行细胞竞争测定(图5B)。随着前体DOTA-WC8浓度的增加,示踪剂与HER2的结合逐渐受到抑制,50%抑制浓度(IC_{50})值计算为42.21 nmol/L。

2.6 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9在正常小鼠体内的药代动力学

在正常小鼠体内评价了 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的药代动力学曲线,发现浓度-时间曲线符合二室模型(图6)。由于 $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9的亲水性,示踪剂表现出快速分布和清除,分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)为2.898 min,消除半衰期($t_{1/2\beta}$)为23.477 min。这些结果表明, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Cyclo-WK9被靶肿瘤组织快速吸收,而剩余的放射性示踪剂从血流中有效清除,导致在注射后早期时间点即可达到最佳的肿瘤/背景比。

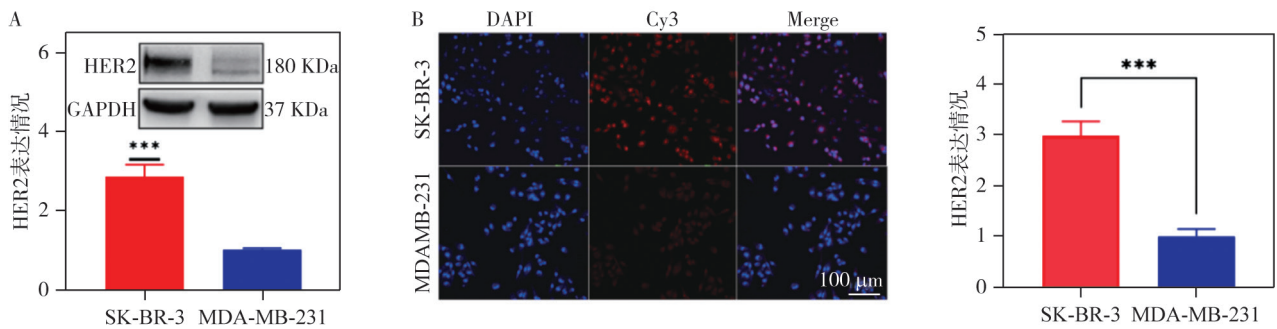
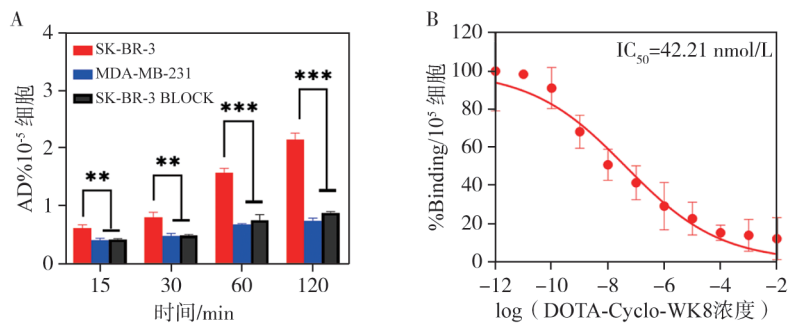


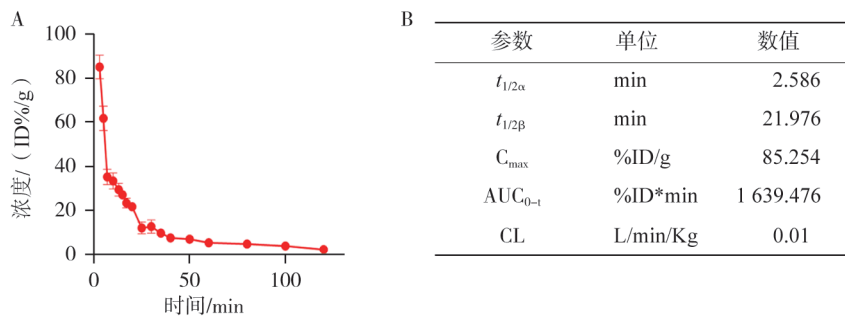
图4 SK-BR-3、MDA-MB-231细胞系的HER2表达水平检测

Fig.4 Detection of HER2 expression levels in SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell lines

A: 检测SK-BR-3细胞和MDA-MB-231细胞HER2表达的Western Blot实验 (***: $P < 0.001$)。B: 检测SK-BR-3细胞和MDA-MB-231细胞HER2表达的免疫荧光实验 (***: $P < 0.001$)。

图5 示踪剂 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 在体外实验中的评估Fig.5 Evaluation of the tracer $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ in *in vitro* experiments

A: 在SK-BR-3、MDA-MB-231细胞中 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 的摄取水平和阻断实验。B: SK-BR-3细胞中 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 竞争性结合实验。

图6 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 在正常小鼠体内的药代动力学Fig.6 Pharmacokinetics of $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ in normal mice

2.7 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 在荷瘤小鼠中的microPET

进行动态microPET以评价 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 对HER2的体内特异性。图7A的结果显示, $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 在SK-BR-3异种移植瘤中有明显的蓄积,而在MDA-MB-231肿瘤中几乎没有示踪剂蓄积。 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 的定量分析表明,

该探针主要通过肾途径快速清除,在肝脏中有少量积累,背景活性最小(图7B)。在SK-BR-3移植瘤小鼠中, $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-DOTA-Cyclo-WK9}$ 的肿瘤摄取在注射后20 min达到 $(4.34 \pm 0.71) \% \text{ID/g}$ 的最大值,并且在注射后60 min保持在3.00 %ID/g以上(图4C)。相比之下,MDA-MB-231移植瘤小鼠在肿瘤部位未表现出显著的示踪剂积累,最大肿瘤摄取仅为 $(1.45 \pm 0.53) \% \text{ID/g}$ 。

[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在体内的特异性通过肿瘤-肌球摄取比率分析进一步证实。SK-BR-3异种移植瘤中的肿瘤-肌肉摄取比随时间增加，在注射后50 min达到峰值4.70 ± 0.82，而在整个成像期间MDA-MB-231异种移植瘤中保持约1.2（图7C）。此外，通过阻断试验验证了 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WC8对HER2的体内特异性。如图7A所示，用

DOTA-WC8预处理可显著降低SK-BR-3异种移植瘤中的肿瘤摄取，其中最大肿瘤摄取在注射后20 min降低至 (1.85 ± 0.62) %ID/g（图4C）。SK-BR-3阻断性异种移植瘤也表现出较低的肿瘤-肌肉摄取比，在注射后60 min最大值为1.85 ± 0.83（图7C）。这些发现进一步证实了 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在体内对HER2具有结合特异性。

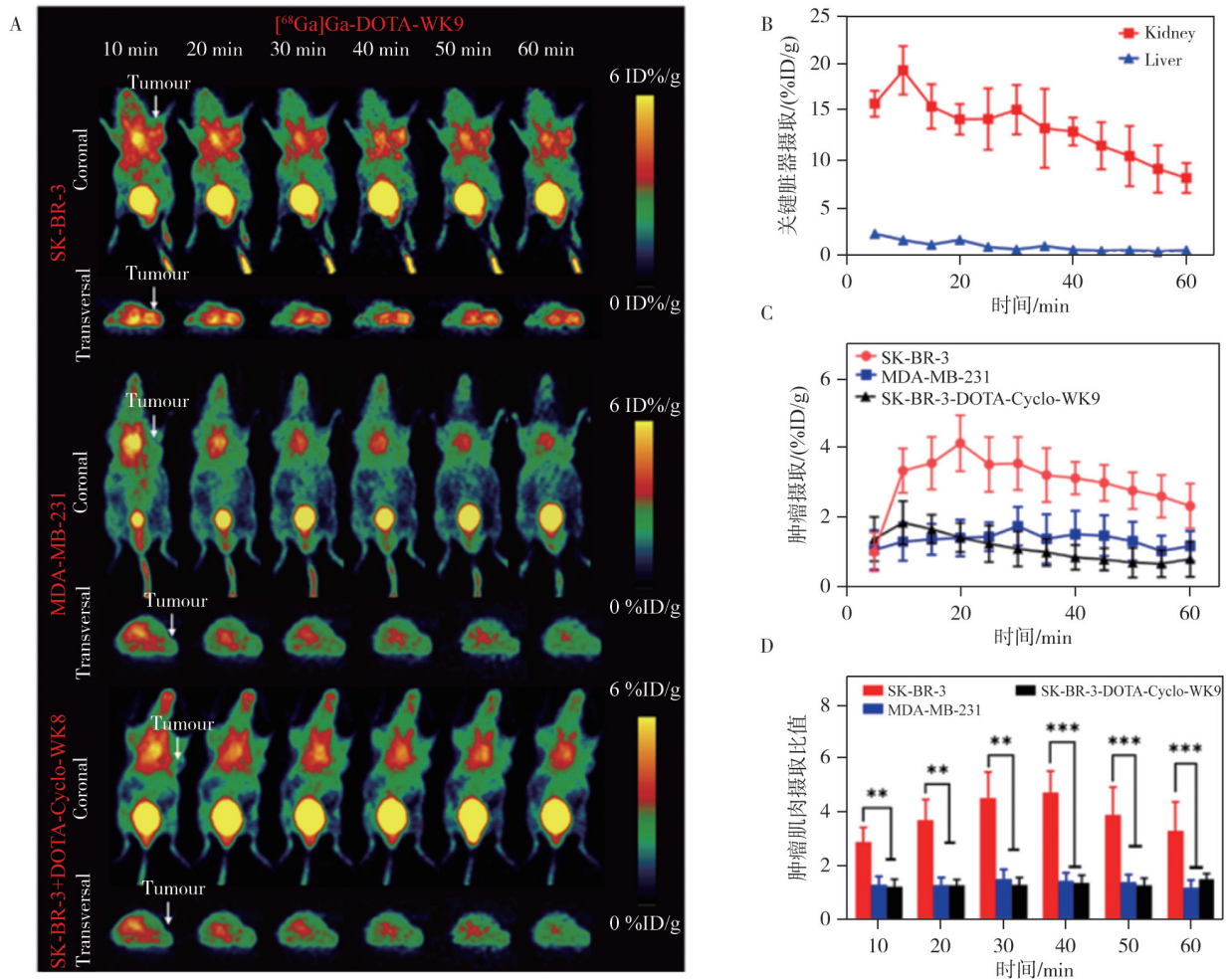


图7 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9 microPET体内动态成像

Fig.7 In vivo dynamic microPET imaging of [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9

A: [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9分别在SK-BR-3、MDA-MB-231异种移植瘤模型以及阻断实验中的microPET显像。B: [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在荷瘤小鼠肝肾中的摄取值。C: [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在各种瘤的摄取值。D: [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在各异种移植模型的肿瘤/肌肉比值 (***)：P<0.001)。

2.8 监测靶向治疗诱导后的HER2表达

为了评估 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在监测HER2表达动态变化中的灵敏度，选择在我们先前的研究^[18]中已经证明可下调HER2表达的吡咯替尼与SK-BR-3细胞一起温育。如图8A、B所示，在吡咯替尼处理后，SK-BR-3的活性以及细胞中的HER2表达以剂量依赖性方式下调，这

通过免疫荧光染色得到进一步证实（图8C）。随后，通过细胞摄取测定评估 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9对由吡咯替尼诱导的HER2表达变化的灵敏度。如图8C所示，与未处理的SK-BR-3细胞相比，用10 μmol/L吡咯替尼处理的SK-BR-3细胞中 [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-WK9的细胞摄取显著降低。

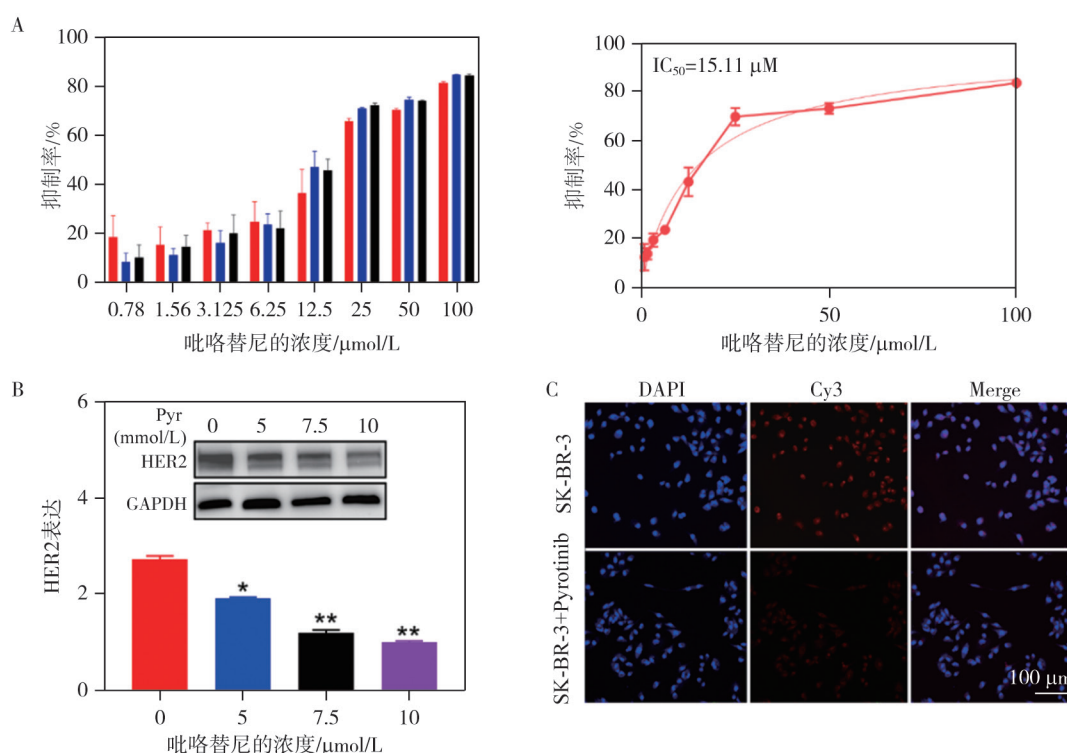


图8 吡咯替尼的抗肿瘤活性评估

Fig.8 Evaluation of the antitumor activity of pyrotinib

A: MTT实验评估吡咯替尼对于SK-BR-3细胞生长的抑制能力。B: Western Blot实验评估吡咯替尼干预后, HER2表达变化 (***, $P < 0.001$); C: 免疫荧光实验评估吡咯替尼干预后, HER2表达变化。

为了研究 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9在体内监测HER2表达变化的能力, 我们构建了SK-BR-3的异种移植瘤模型, 在4轮吡咯替尼处理后, 在将 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9注射到携带SK-BR-3肿瘤的小鼠中的60 min内进行动态microPET。如图9A所示, 与PBS处理的肿瘤相比, 吡咯替尼处理的肿瘤表现出显著更低

的 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9积累。定量分析显示吡咯替尼治疗小鼠的最大肿瘤摄取下降至 $(2.38 \pm 0.71) \% \text{ID/g}$ (图9B), 肿瘤与肌肉摄取比下降至 2.00 ± 1.10 (图9B)。这些结果表明, 吡咯替尼治疗下调了HER2表达, 并且 [^{68}Ga] Ga-DOTA-Cyclo-WK9可以灵敏地检测这些变化。

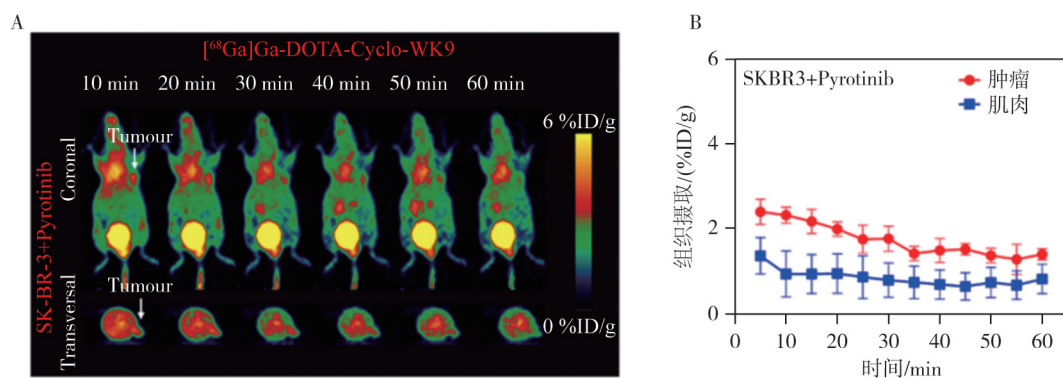


图9 吡咯替尼治疗后SK-BR-3异种移植瘤模型microPET动态显像

Fig.9 Dynamic microPET imaging of SK-BR-3 xenograft models after pyrotinib treatment

A: 吡咯替尼治疗后SK-BR-3异种移植瘤模型动态PET图像; B: MicroPET动态显像定量分析。

3 讨 论

HER2高表达与乳腺癌侵袭性及患者的不良预后显著相关^[19-20]，其精准定量对个体化治疗至关重要。尽管拉帕替尼等HER2靶向药物可改善患者预后，但HER2表达的异质性阻碍治疗优化^[21]。本研究通过计算策略设计新型HER2靶向肽Cyclo-WK9，基于曲妥珠单抗互补位（CDR）设计先导肽WA8，经关键氨基酸突变获得WC8，最后环化改造得到环肽Cyclo-WK9。分子对接、MD模拟及结合自由能（ ΔG_{bind} ）计算表明，Cyclo-WK9较之WA8、WC8可与HER2形成更稳定的复合物。SPR证实前体DOTA-WC8具有高亲和力（ $K_D=91.91 \text{ nmol/L}$ ）。

因其体内半衰期较短，选用⁶⁸Ga（ $t_{1/2}=68 \text{ min}$ ）标记DOTA-WC8，构建PET探针^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9。该示踪剂药代动力学良好，肾脏/膀胱高蓄积提示肾排泄主导（亲水性特性）。体外实验显示，^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9在HER2⁺SK-BR-3细胞中特异性摄取，在HER2⁻MDA-MB-231细胞中摄取极低。体内PET成像证实SK-BR-3移植瘤特异性富集，肿瘤轮廓清晰。阻断实验、生物分布、放射自显影及免疫组织化学进一步验证其HER2高特异性。与已报道肽探针^[22]相比，^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9具有更小的分子结构、更强的亲和力及更低的肝摄取。

吡咯替尼、奈拉替尼等作为HER2-TKI可诱导HER2降解^[23]，其治疗过程中伴随着肿瘤组织中HER2水平的下降。本研究利用^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9评估吡咯替尼治疗响应PET成像显示HER2⁺肿瘤HER2表达降低，证实其疗效监测潜力。

^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9呈现中度肿瘤摄取及瘤肌比，可能归因于多肽类药物体内稳定性有限、血浆半衰期短及快速肾清除。未来将通过聚乙二醇化（延长半衰期）、非天然氨基酸取代（增强稳定性）及多聚化（提高亲和力）进行结构优化。

本研究基于曲妥珠单抗-HER2复合物的晶体结构设计了一种新的HER2靶向肽DOTA-Cyclo-WK9。基于这种设计，随后开发了一种潜在的HER2靶向PET示踪剂^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9，以实现HER2表达的准确和非侵入性检测。全面的体外和体内评价表明，^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9表现出高特异性、纳摩尔级别亲和力、有利的药代动力学性质和用于HER2成像的显著潜力。此外，本研究证实^[68Ga]Ga-DOTA-Cyclo-WK9具有灵敏地监测TKI诱导的HER2表达动态变化的能力。这些结果共同表明，DOTA-Cyclo-WK9有望成为一种能精确检测HER2表达的有前途的工具，并且有助于监测HER2阳性乳腺癌的治疗反应。

第一作者：

郭旭（ORCID: 0009-0000-8397-617X），硕士，硕士研究生。

通信作者：

姚荧（ORCID: 0009-0009-6673-8220），硕士，主任药师，E-mail: 9862023375@jiangnan.edu.cn。

作者贡献说明：

郭旭：采集与分析数据，提出、设计论文基本框架，撰写论文；姚荧：提出研究方向，完善文章框架、修订、审核，获得项目支持；高晓敏：参与数据采集及分析。

[参 考 文 献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182.
- [3] SWAIN S M, SHASTRY M, HAMILTON E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(2): 101-126.
- [4] OH D Y, BANG Y J. HER2-targeted therapies – a role beyond breast cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(1): 33-48.
- [5] ARTEAGA C L, SLIWKOWSKI M X, OSBORNE C K, et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 9(1): 16-32.
- [6] SCHLAM I, TARANTINO P, TOLANEY S M. Overcoming resistance to HER2-directed therapies in breast cancer [J]. *Cancers*, 2022, 14(16): 3996.
- [7] TAPIA C, SCHRAML P, SIMON R, et al. HER2 analysis

- in breast cancer: reduced immunoreactivity in FISH non-informative cancer biopsies [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(6): 1551–1557.
- [8] LI C, REN C Y, WEN L Z, et al. Heterogenous and low expression of HER2 in breast cancer overcome by DS-8201a in a heavily treated patient: case report and review of the literature [J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2022, 16: 11795549211072880.
- [9] BHARDWAJ S, JAFFER S. A comparative analysis of the value of HER2 immunohistochemistry scoring in primary and metastatic breast cancer, in the era of HER2 “low” breast cancers [J]. *Clin Breast Cancer*, 2025, 25(4): 354–357.
- [10] CHO H S, MASON K, RAMYAR K X, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab [J]. *Nature*, 2003, 421(6924): 756–760.
- [11] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, et al. The FoldX web server: an online force field [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Web Server issue): W382–W388.
- [12] BENEDIX A, BECKER C M, DE GROOT B L, et al. Predicting free energy changes using structural ensembles [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 3–4.
- [13] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455–461.
- [14] MORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785–2791.
- [15] KOLLMAN P A, MASSOVA I, REYES C, et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models [J]. *Acc Chem Res*, 2000, 33(12): 889–897.
- [16] GENHEDEN S, RYDE U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand–binding affinities [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10(5): 449–461.
- [17] ABRAHAM M J, MURTOLA T, SCHULZ R, et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers [J]. *SoftwareX*, 2015, 1/2: 19–25.
- [18] GAO X M, GUO X, YUAN W B, et al. Pyrotinib induces cell death in HER2–positive breast cancer *via* triggering HSP90–dependent HER2 degradation and ROS/HSF-1–dependent oxidative DNA damage [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2024, 29(6): 777–791.
- [19] HANNA W M, SLODKOWSKA E, LU F I, et al. Comparative analysis of human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer according to 2007 and 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(26): 3039–3045.
- [20] LU J, STEEG P S, PRICE J E, et al. Breast cancer metastasis: challenges and opportunities [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 4951–4953.
- [21] RÍOS-LUCI C, DÍAZ-RODRÍGUEZ E, GANDULLO-SÁNCHEZ L, et al. Adaptive resistance to trastuzumab impairs response to neratinib and lapatinib through deregulation of cell death mechanisms [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 161–169.
- [22] CAO R, LI R D, LAI C Q, et al. Development of a novel HER2–targeted peptide probe for dual–modal imaging of tumors [J]. *J Med Chem*, 2023, 66(11): 7523–7533.
- [23] GUAN X W, MA F, LI Q, et al. Pyrotinib monotherapy or pyrotinib in combination with capecitabine could significantly prolong progression–free survival and overall survival in patients with HER2–positive metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(suppl 16): 1034.

(收稿日期: 2025–06–09 修回日期: 2025–08–25)