



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R445.5

U D C 616-006

密 级 公开

# 博士学位论文

**NGR 短肽介导肿瘤分子探针的靶向多模态  
显像及核素治疗研究**

---

马温惠

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 科学学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 影像医学与核医学

研 究 方 向 肿瘤分子影像

指 导 教 师 汪 静 教授 (主任医师)

培 养 单 位 西京医院核医学科

二〇一五年五月

# 独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_

# 保护知识产权明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：\_\_\_\_\_ 导师签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_

# 目 录

缩略语表 .....	1
中文摘要 .....	4
ABSTRACT .....	7
前 言 .....	10
文献回顾 .....	12
1、血管发生在肿瘤生长中的作用 .....	12
2、内皮细胞在血管发生中的作用 .....	15
3、血管内皮生长抑制因子 .....	16
4、核素标记分子探针的研究现状 .....	17
5、NGR 多肽相关靶向探针 .....	22
6、分子影像概况 .....	23
正 文 .....	27
第一部分 $^{64}\text{Cu}$ 标记 NGR 单体、二聚体的小动物 PET 显像研究 .....	27
1 材料与仪器 .....	27
2 方法 .....	27
3 结果 .....	33
4 讨论 .....	37
第二部分 NGR-VEGI 融合蛋白靶向肿瘤血管的光学成像研究 .....	41
1 材料与仪器 .....	41
2 方法 .....	41
3 结果 .....	44
4 讨论 .....	46
第三部分 $^{188}\text{Re}$ 标记 NGR-VEGI 的核素显像和治疗研究 .....	49

1 材料与仪器 .....	49
2 方法 .....	49
3 结果 .....	51
4 讨论 .....	54
小 结 .....	71
参考文献 .....	72
个人简历和研究成果 .....	93
致 谢 .....	96

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
NGR	Asparagine-Glycine-Arginine (Asn-Gly-Arg)	天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸
RGD	Arginine-Glycine-Aspartic Acid (Arg-Gly-Asp)	精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
APN	Aminopeptidase N	氨肽酶 N
Gly <sub>3</sub>	glycine-glycine-glycine	甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基
PBS	Phosphate Buffered Solution	磷酸盐缓冲液
TFA	Trifluoroacetic Acid	三氟乙酸
DMF	Dimethylformamide	二甲基甲酰胺
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine	N,N-二异丙基乙胺
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F- fluorodeoxyglucose	氟-[ <sup>18</sup> F]脱氧葡萄糖
<sup>64</sup> Cu	Copper-64	铜-64
<sup>188</sup> Re	Rhenium-188	铼-188
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子
VEGI	Vascular Endothelial Growth Inhibitor	血管内皮细胞生长抑制因子
PET	Positron Emission Tomography	正电子发射断层成像
CT	Computered Tomography	计算机断层成像
MRI	Magnetic Resonance Imaging	核磁共振成像

缩略词	英文全称	中文全称
OI	Optical Imaging	光学成像
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography	单光子计算机断层成像
% ID/g	percentage injected dose per gram of tissue	每克组织注射剂量率
NIRF	Near-infrared fluorescence	近红外荧光
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
IFN	Interferon	干扰素
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
SUV	Standard Uptake Value	标准摄取值
T/NT	Target/Non-Target	靶/非靶比值
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,4,7,10-四乙酸
DTPA	Diethylenetetraaminepentaacetic acid	二乙基三胺五乙酸
Cyclen	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane	1,4,7,10-四氮杂环十二烷
Cyclam	1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane	1,4,8,11-四氮杂环十四烷
Bridged-cyclam	1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane	1,4,8,11-四氮双环[6.6.2]十六烷
Et-cyclam	1,4-ethano-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane	1,4-亚乙基-1,4,8,11-四氮杂环十四烷
Cyclam-dione	1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-3,9-dione	1,4,8,11-四氮杂环十四烷 -3,9-二酮
TETA	1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid	1,4,8,11-四氮杂环十二烷 -1,4,8,11-四乙酸

---

缩略词	英文全称	中文全称
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tri(acetic acid)	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,4,7-三乙酸
DO2A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-di(acetic acid)	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,7-二乙酸
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra(methanephosphonic acid)	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,4,7,10-四甲基磷酸
DO3P	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tri(methanephosphonic acid)	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,4,7-三甲基磷酸
DO2P	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-di(methanephosphonic acid)	1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,7-二甲基磷酸
NHS	Hydroxysuccinimide	羟基琥珀酰亚胺

# NGR 短肽介导肿瘤分子探针的靶向多模态显像及核素治疗研究

博士研究生：马温惠

导 师：汪 静 教授

辅 导 教 师：Kai Chen 副教授

第四军医大学第一附属医院核医学科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（30970846，81230033，81227901）

国家重点基础研究发展计划（2011CB707704）

## 中文摘要

### 目的：

病理性血管生成对肿瘤的生长、侵袭和转移至关重要。含天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸序列的分子探针可以特异性结合新生血管和多种肿瘤细胞表面高表达的 CD13 受体（氨肽酶 N）。本研究拟设计合成 NGR 肽单体和二聚体，通过  $^{64}\text{Cu}$  标记进行 PET 肿瘤显像，筛选肿瘤分子显像新探针，探索肿瘤显像新方法；结合 NGR 的肿瘤靶向性与肿瘤新生血管生长抑制因子（VEGI），制备新型 NGR-VEGI 融合蛋白，通过光学染料和核素标记，进行近红外荧光光学成像和靶向肿瘤血管系统的核素显像和治疗。本研究基于 NGR 合成了多个肿瘤靶向特异性的新型探针，将为无创性早期检测肿瘤血管生物过程和有效监测抗肿瘤血管治疗提供了新的方向和方法。

### 方法：

通过蛋白印记分析和细胞免疫荧光染色实验鉴定 CD13 受体表达阳性和阴性的细胞系，建立 CD13 受体表达阳性的肿瘤动物模型，利用  $^{64}\text{Cu}$  标记的 NGR 肽单体和二聚体进行 CD13 受体的小动物 PET 在体显像。含 NGR 核心序列的 NGR 单体

(NGR1) 和二聚体 (NGR2) 与 DOTA 进行螯合后在乙酸铵缓冲盐中分别进行  $^{64}\text{Cu}$  标记。标记后评估  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的体外稳定性、细胞摄取和细胞外流, 肿瘤模型动物经尾静脉注射  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 后进行生物学分布及小动物 PET 显像。制备 Cy5.5 标记的 NGR-VEGI 蛋白并测定其体内外生物学功能, 通过静脉注射于 CD13 受体表达阳性的荷瘤裸鼠模型上利用近红外荧光 (NIRF, Near-infrared fluorescence) 成像进行光学显像和量化分析。最后, 使用预锡化法进行 NGR-VEGI 的  $^{188}\text{Re}$  标记, 探针进行体内外分析后在 CD13 受体表达阳性的荷瘤裸鼠模型上进行 SPECT 显像和核素治疗实验。

## 结果:

CD13 受体高表达于人纤维腺瘤 HT-1080 细胞, 在人结肠腺癌 HT-29 细胞中表达为阴性。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 与 HT-1080 细胞的亲和力高于  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1, 是  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 的 2 倍。小动物 PET 显像结果提示  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 相比, 在 HT-1080 肿瘤中摄取高且清除慢, 而  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 CD13 受体表达阴性的 HT-29 肿瘤中均摄取低且清除快。此外,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 是通过 CD13 受体介导与肿瘤进行特异性结合的, 注射阻断剂量的 NGR 环肽 [c(CNGRC)] 后发现肿瘤放射性摄取明显下降。体外生物学分布实验结果与小动物 PET 显像结果一致, 表明了探针体内结合的特异性。Cy5.5 标记的 NGR-VEGI 能特异性结合 HT-1080 肿瘤, 表现出快速的 HT-1080 肿瘤靶向性, 注射后 8 小时即达到最高肿瘤/肌肉比值。探针与过量未标记 NGR-VEGI (20 mg/kg) 共注射后, 肿瘤的特异性摄取明显下降, 表明探针具有体内靶向特异性。体外 NIRF 成像进一步证实了体内成像的结果, 在注射后 8 小时未封闭组显示出优异的肿瘤/肌肉比值 ( $18.93 \pm 2.88$ ), 封闭组该比值显著降低 ( $4.92 \pm 0.75$ )。 $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的 SPECT 成像结果显示, HT-1080 荷瘤裸鼠有良好的肿瘤/本底比值。通过共注射  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 和未放射性标记的 NGR-VEGI 蛋白, 肿瘤对  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的摄取明显降低。生物分布实验结果与 SPECT 显像结果一致, 注射  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 后 24 小时仍具有良好的肿瘤/肌肉比值 ( $4.98 \pm 0.25$ )。核素治疗实验结果提示  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI (18.5 MBq) 治疗组具有最好的抑瘤效果。

## 结论:

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 CD13 受体表达强阳性的 HT-1080 荷瘤裸鼠中均显示出较高的肿瘤摄取和滞留, 是肿瘤特异性的 PET 显像探针。与单体相比, 二聚体显示出更高的肿瘤摄取值和更长的留存时间,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 有望成为肿瘤 PET 显像的新型核素标记探针。Cy5.5-NGR-VEGI 为 CD13 受体高表达肿瘤提供了简便快捷、灵敏性高的靶向特异性成像方法。Cy5.5-NGR-VEGI 作为一种新型的诊断治疗类探针, 有望提高肿瘤治疗效果。 $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 有潜力作为治疗诊断剂进行 CD13 受体靶向肿瘤的成像和治疗。以上 NGR 基序介导的靶向性分子影像探针均为肿瘤的诊断和治疗提供了新的方向和方法。

**关键词:** NGR 多肽; CD13 受体; 多聚体空间效应; 小动物 PET 显像; NIRF 成像; 肿瘤血管新生; 核素治疗; 血管内皮细胞生长抑制因子

# Studies on NGR-containing molecular probes for tumor targeted multimodal imaging and radionuclide therapy

Candidate for doctor: Wenhui Ma

Supervisor: Jing Wang

Tutor: Kai Chen

Department of Nuclear Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University,  
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China

(30970846, 81230033, 81227901)

National Program on Key Basic Research Project (2011CB707704)

## Abstract

### Objective:

Pathological angiogenesis is crucial in tumor growth, invasion and metastasis. The NGR (asparagine-glycine-arginine)-containing peptides can specifically bind to CD13 (Aminopeptidase N) receptor which is overexpressed in angiogenic blood vessels and various tumor cells. In this study, monomeric and dimeric NGR peptides were synthesized and labeled with  $^{64}\text{Cu}$ . Tumor-bearing mice were employed to investigate the difference of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled monomeric and dimeric NGR peptides in biodistribution and tumor imaging. A novel NGR-VEGI fusion protein was produced and labeled with fluorescent dyes Cy5.5 and therapeutic radionuclide Re-188. The NGR-VEGI protein labeled with fluorescent dyes was used for near-infrared fluorescence (NIRF) optical imaging. The NGR-VEGI protein labeled with Re-188 was evaluated for tumor vasculature targeted imaging and therapy. Based on the NGR mediated tumor targeted specificity, these novel probes offer a noninvasive method for early detection of tumor angiogenesis and efficient monitoring of tumor response to anti-angiogenesis therapy.

**Methods:**

Western blot analysis and immunofluorescence staining were performed to identify CD13-positive and CD13-negative cell lines.  $^{64}\text{Cu}$ -labeled monomeric and dimeric NGR peptides were employed for microPET imaging of CD13 receptor expression in vivo. NGR-containing peptides were conjugated with 1, 4, 7, 10-tetraazadodecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA) and labeled with  $^{64}\text{Cu}$  in ammonium acetate buffer. The resulting monomeric ( $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1) and dimeric ( $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2) peptides were then subjected to in vitro stability, cell uptake and efflux, small animal microPET, and biodistribution studies. The NGR-VEGI protein was labeled with a Cy5.5 fluorophore to afford Cy5.5-NGR-VEGI probe. Using the NIRF imaging technique, we visualized and quantified the specific delivery of Cy5.5-NGR-VEGI protein to subcutaneous HT-1080 fibrosarcoma tumors in mouse xenografts. Finally NGR-VEGI fusion protein was prepared and labeled with  $^{188}\text{Re}$  for radioimaging and radiotherapy in mice bearing HT-1080 xenografts.

**Results:**

Western blot analysis and immunofluorescence staining results showed that CD13 receptor was highly expressed on HT-1080 colon and negative expression on HT-29 cells. The binding affinity of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 to HT-1080 cells was measured to be within nanomolar range and about 2-fold higher than that of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1. For small animal microPET studies,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 displayed more favorable in vivo performance in terms of higher tumor uptake and slower tumor washout in CD13-positive HT-1080 tumor xenografts as compared to  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1. As expected, significantly lower tumor uptake and poorer tumor/normal organ contrast were observed for both  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 and  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 in CD13-negative HT-29 tumor xenografts in comparison with those in the HT-1080 tumor xenografts. The CD13-specific tumor activity accumulation of both  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 and  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 was further demonstrated by significant reduction of tumor uptake in HT-1080 tumor xenografts with a co-injected blocking dose of cyclic NGR peptide [c(CNGRC)]. The biodistribution results were consistent with the quantitative analysis of microPET imaging. The Cy5.5-NGR-VEGI probe exhibited rapid HT-1080 tumor targeting, and highest

tumor-to-background contrast at 8 h post-injection (pi). Tumor specificity of Cy5.5-NGR-VEGI was confirmed by effective blocking of tumor uptake in the presence of unlabeled NGR-VEGI (20 mg/kg). Ex vivo NIRF imaging further confirmed in vivo imaging findings, demonstrating that Cy5.5-NGR-VEGI displayed an excellent tumor-to-muscle ratio ( $18.93 \pm 2.88$ ) at 8 h pi for the non-blocking group and significantly reduced ratio ( $4.92 \pm 0.75$ ) for the blocking group. SPECT imaging results revealed that  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI exhibits good tumor-to-background contrast in CD13-positive HT-1080 tumor xenografts. The CD13 specificity of  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI was further verified by significant reduction of tumor uptake in HT-1080 tumor xenografts with coinjection of the non-radiolabeled NGR-VEGI protein. The biodistribution results demonstrated good tumor-to-muscle ratio ( $4.98 \pm 0.25$ ) of  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI at 24 h, which is consistent with the results from SPECT imaging. For radiotherapy, 18.5 MBq of  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI showed excellent tumor inhibition effect in HT-1080 tumor xenografts with no observable biological toxicity.

#### **Conclusion:**

Both  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 and  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 have good and specific tumor uptake in CD13-positive HT-1080 tumor xenografts.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 showed higher tumor uptake and better tumor retention than  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1, presumably due to bivalency effect and increase in apparent molecular size.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 is a promising PET probe for noninvasive detection of CD13 receptor expressed tumor. Cy5.5-NGR-VEGI provided highly sensitive and target-specific imaging of CD13 positive expressed tumors. As a novel theranostic protein, Cy5.5-NGR-VEGI has the potential to improve cancer treatment by targeting tumor vasculature.  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI has the potential as a theranostic agent for CD13-targeted tumor imaging and therapy. These NGR-containing molecular probes could provide a new direction and method for tumor diagnosis and therapy.

**Keywords:** NGR peptide; CD13 receptor; bivalency effect; microPET imaging; NIRF imaging; tumor angiogenesis; radionuclide therapy; vascular endothelial growth inhibitor

## 前 言

近年来由于恶性肿瘤发病率的逐年增加，严重危害人民的健康和生命，肿瘤的早期诊断与个体化治疗成为了国内外学者研究的热点<sup>[1,2]</sup>。虽然多数肿瘤诊断明确，但由于发现病变较晚、难以手术切除或者需要进行化疗为主的治疗，常规化疗药物因为没有靶向性，在杀灭肿瘤的同时容易造成对正常组织、细胞的杀伤，导致副作用明显，因此必须发展以靶向性治疗为主的个性化治疗，期望在减少副作用的同时提高疗效<sup>[3,4]</sup>。此外由于部分肿瘤活检困难，常规影像学得到的诊断结果并不明确，使得发展靶向性影像诊断势在必行。靶向性诊疗则是利用对肿瘤细胞具有高选择性的物质作为载体，将兼具显像和治疗作用的药物带到靶组织从而提高了诊断的敏感度和特异性，同时减少了对正常组织和细胞的损伤。

众多周知，分子识别几乎发生在细胞间与细胞内生化过程的每一步，是分子间选择性相互作用的基础<sup>[5,6]</sup>。例如，抗原与抗体识别后结合发生作用，配体与受体之间、酶与底物之间、核酸分子与蛋白质之间发生相互作用等等。利用放射性核素或者光学染料标记抗体、配体和反义基因等分子，就可以与相应的抗原、受体和基因等结合实现显影，这种技术有助于在分子水平上认识和诊断疾病，并为在分子水平上治疗这些分子疾病提供基础，而这些是目前其他研究方法所不能显现的<sup>[2,6,7]</sup>。肿瘤组织的特异性标志包括与细胞信号传递有关的受体、激酶及其他蛋白等，而目前临床直接应用的靶向药物仍然存在体内靶向性较低、治疗效果不明显的问题。新型分子显像仪器可同时用于进行功能和形态学显像，对具有肿瘤靶向性的物质（多肽、小分子物质、蛋白质等）进行放射性核素标记后就能用于放射性核素显像，标记具有抑瘤作用的药物还可进行相关药代动力和放射剂量学研究，对治疗过程进行实时监测和疗效评价。此外，治疗性核素还能协同靶向性物质发挥协同杀伤肿瘤组织的作用，从而明显提高治疗效果。

随着分子影像学的发展，人们对肿瘤的诊疗研究也已经深入到分子水平，肿瘤放射受体靶向性显像和治疗作为当今肿瘤核医学研究的热点之一就是寻找肿瘤组织高特异性的结合位点<sup>[8]</sup>。众所周知，肿瘤新生血管生成是肿瘤生长、侵袭和转移的关

键环节<sup>[9]</sup>，因此理所当然成为了抗肿瘤靶点的研究热点。噬菌体随机多肽库技术筛选到的核心序列天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸（Asparagine-Glycine-Arginine, NGR）能特异性识别肿瘤新生血管内皮细胞高表达的 CD13 受体/APN（即氨肽酶 N）<sup>[10,11]</sup>。此外，研究表明 APN/CD13 作为一种跨膜蛋白酶与胞外基质降解、细胞迁移、血管生成和肿瘤侵袭均密切相关<sup>[12]</sup>，而许多肿瘤细胞、周细胞以及成纤维细胞和平滑肌细胞在某些阶段也会表达 CD13 受体<sup>[13]</sup>，因此 CD13 受体是肿瘤靶向性分子的理想研究靶点之一。

根据 NGR 能与肿瘤新生血管及肿瘤细胞高表达 CD13 受体特异性结合的特点，本项研究探索性设计和改造了 NGR 基序相关的多种肿瘤靶向性探针并进行了体内外评估。第一部分实验使用谷氨酸作为连接体合成了二聚体化的 NGR 多肽，NGR 多肽二聚体分别结合市售大环螯合剂 1, 4, 7, 10- tetraazadodecane-N, N', N'', N'''-四乙酸（DOTA）并进行 Cu-64 标记，同时制备 <sup>64</sup>Cu 标记的 NGR 单体作为对照，比较了二者的体外稳定性、亲脂性、亲和性以及细胞摄入和排出的区别。<sup>64</sup>Cu 成功标记 NGR 多肽后进行了 CD13 受体表达阳性 HT-1080 纤维肉瘤荷瘤裸鼠的小动物 PET 显像。同时 <sup>64</sup>Cu 标记 NGR 单体和二聚体与 CD13 受体的体内结合特异性进一步在 CD13 受体表达阴性的 HT-29 结肠癌荷瘤裸鼠模型中进行了评价。在第二和第三部分实验中设计、制备了原核表达融合蛋白 NGR-VEGI，鉴定 NGR-VEGI 蛋白的体外功能后分别进行荧光染料 Cy5.5 和放射性核素 Re-188 的标记，评价 Cy5.5-NGR-VEGI 和 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 的体内外肿瘤靶向作用及其在荷瘤小鼠模型上的药物动力学。使用 NIRF 和 SPECT 成像技术，对标记物在 CD13 受体表达阳性肿瘤模型中的体内特异性分布和治疗作用进行了可视化显像和量化评估。

## 文献回顾

肿瘤发病率的持续增高让新型分子探针的开发和在个体化诊疗中的应用成为近年来的研究热点<sup>[2, 6, 7]</sup>。人类肿瘤的发生、发展是一个多步骤的复杂生物学过程，而新生血管生成在肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥了极其重要的作用<sup>[9]</sup>，更好的了解这一生物学过程有利于从中寻找特异性靶标进行分子水平的诊断和治疗。对病患的早期发现和靶向治疗能够显著减少癌症患者的负担，然而目前临床直接应用的靶向药物仍然存在体内靶向性较低、治疗效果不明显的问题。新型分子显像仪器可同时进行功能和形态学显像，核医学诊疗在临床医学领域的应用具有许多优势。对具有抑瘤效应的靶向性物质进行放射性核素标记，就既能用于进行放射性核素显像，又能进行治疗过程中的实时监测和评价疗效，治疗性核素还能协同靶向物质发挥协同杀伤肿瘤细胞的作用，从而明显提高治疗效果。通过噬菌体随机多肽库技术筛选到的核心序列天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸（Asparagine-Glycine-Arginine, NGR）能特异性识别肿瘤细胞及肿瘤新生血管内皮细胞高水平表达的 CD13 受体<sup>[10, 11]</sup>，因此本文对 CD13 受体作为肿瘤分子靶向性研究的一个理想靶点在肿瘤分子影像领域中的应用进行了探讨。

### 1、血管发生在肿瘤生长中的作用

人类肿瘤的形成是一个包含六种标志性生物学行为的多步骤发展过程<sup>[14]</sup>，了解这六种标志，即持续增殖、逃避生长抑制因子作用、抗凋亡、无限增殖性、诱导新生血管生成和发生侵袭转移（见图 1a），可以帮助我们更好的理解肿瘤类疾病的复杂性。这些标志的基本特点就是基因组的不稳定性导致了遗传的多样性并加快了肿瘤细胞的生长，发生炎症反应从而促使多个标志性行为发生。过去十年的研究让肿瘤的基本标志又增加了两个，即已知晓的能量代谢改变和免疫逃逸（见图 1b）。肿瘤不仅仅是一群可以无限增殖的癌细胞，而是多种细胞参与相互作用的复杂组织。除了癌细胞，肿瘤表现出复杂性的另一个方面在于肿瘤拥有改变周围正常细胞和组织的能力，因此研究人员提出了“肿瘤微环境”的概念，让人们认识到了了解肿瘤生物学行为可以为人类癌症的治疗提供崭新的方法和途径<sup>[15]</sup>。

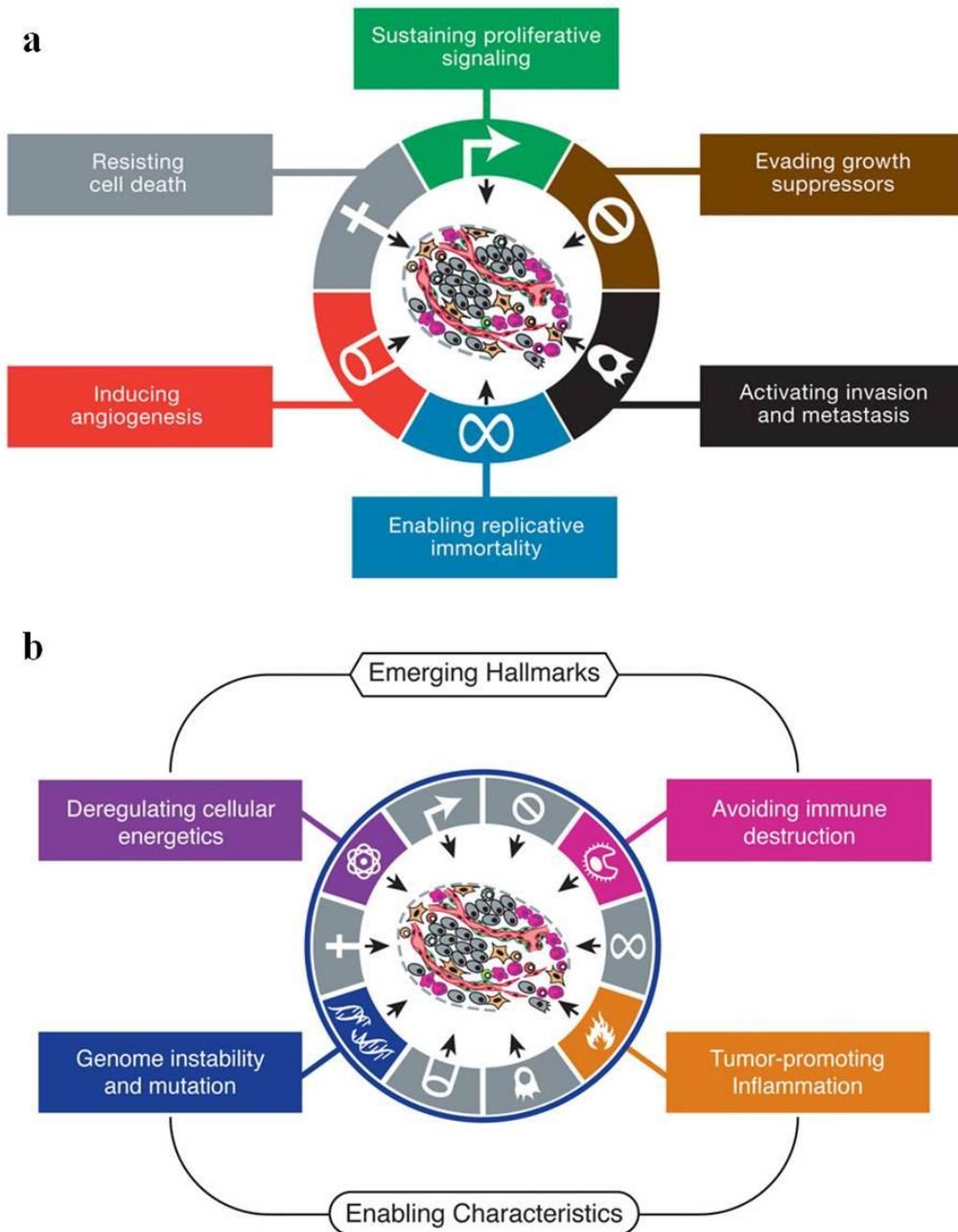


图 1. 肿瘤标志性生物学行为<sup>[14, 15]</sup>

肿瘤与正常组织一样需要营养和氧气以及排泄代谢废物和二氧化碳的能力，肿瘤相关的新生血管系统在肿瘤生长的过程中相伴产生，从而解决了相应的需求。胚胎发育期间血管发生涉及新内皮细胞的生成及其形成管状结构和从现有血管萌发出新血管（血管生成）的过程，在此之后，正常脉管基本上处于静止状态。成年人在一些生理过程譬如伤口愈合和女性生殖系统代谢时，血管发生将出现短暂激活，与此相反的是肿瘤进展中“血管生成开关”几乎总是处于激活状态并保持开放，导致正

常处于静态的脉管不断萌发出新生血管，从而支持并维持了肿瘤的不断生长<sup>[16]</sup>。研究表明血管生成开关由诱发或抑制血管生成的因素协同控制<sup>[17, 18]</sup>。有些血管生成调节剂是信号蛋白，可以结合后刺激或者抑制内皮细胞表面表达的受体，比如众所周知血管生成诱导剂和抑制剂的代表分别是血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 和血小板反应蛋白-1 (TSP-1)。

VEGF-A 基因编码配体参与胚胎期和出生后新生血管的形成和排布，而成人无论是生理条件还是病理情况下血管内皮细胞的内环境均很稳定。VEGF 信号通过三个受体酪氨酸激酶 (VEGFR-1~3) 进行多水平调节，反映出该调节过程的复杂性。因此，VEGF 基因表达可通过缺氧和癌基因信号刺激进行表达上调<sup>[19-21]</sup>。此外，血管内皮生长因子配体可以被隔离在细胞外基质中作为贮备体，受细胞外基质降解蛋白酶 (例如 MMP-9) 激活并释放<sup>[22]</sup>。另外其它促血管生成信号在维持肿瘤血管生成时其表达被长期上调，如成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族成员<sup>[17]</sup>。TSP-1 作为血管生成开关中的关键平衡因子，也能结合内皮细胞表达的跨膜受体引发抑制信号，从而抵消促血管生成刺激物的作用<sup>[23]</sup>。通过长期激发血管生成和促血管生成信号的不平衡升高，导致肿瘤内产生的血管通常是异常的，肿瘤新生血管的标志表现为早熟毛细血管发芽、血管过度分支、血管腔扭曲扩大、血流不稳定、微出血、内皮细胞增殖和凋亡水平异常等<sup>[24, 25]</sup>。研究发现动物模型和人类血管新生在肿瘤发生早期就已经出现，癌前非侵入性病变例如原位癌的组织学分析也证实了血管生成的存在<sup>[16, 26]</sup>。通常认为只有血管生成对于宏观肿瘤的快速生长很重要，然而研究表明，血管生成也发生在微小肿瘤的癌前阶段，这一发现进一步巩固了血管生成作为癌症重要标志的地位。

一旦血管发生被激活，肿瘤组织就会形成形态各异的新生血管走行。某些肿瘤包括高危险度的胰腺导管腺癌就属于低度血管化肿瘤，间质大多处于无血管状态，甚至可能会具有抗血管生成作用<sup>[27]</sup>。许多其它肿瘤包括人类肾脏和胰腺神经内分泌癌的血管生成明显，因此肿瘤组织血管很密集<sup>[28, 29]</sup>。总的来说，这些观察结果表明肿瘤发生发展过程中新血管的形成是由肿瘤细胞和周围微环境共同参与的复杂生物过程<sup>[17, 18]</sup>。值得注意的是即使最终的调控结果还是一种常见的感应信号 (例如血管内皮生长因子)，仍然存在多种可变的调控机制。某些肿瘤中，肿瘤细胞占主导地位的癌基因 (如 Ras 和 Myc 基因) 可上调血管生成因子的表达。而其他肿瘤这些诱导

信号则通常由免疫炎症细胞间接产生。癌基因直接诱导的血管生成也促进了增生信号的传递，表明不同肿瘤因子的功能可由相同的转化剂进行共同调节。

内源性血管生成抑制剂是肿瘤血管生成的天然屏障。上世纪 90 年代的研究发现，TSP-1 以及纤溶酶（血管抑素）和 18 型胶原（内皮抑素）的片段都可以充当血管生成的内源性抑制剂<sup>[23, 30-33]</sup>。过去十年中又发现了其他一些内源性抑制剂的类似物，大多数是蛋白质，并且其中许多是来自结构蛋白本身而不是血管生成调节剂<sup>[30, 32, 33]</sup>。在正常小鼠和人类的循环系统中均检测出了多种内源性血管生成抑制剂，研究发现去除小鼠生殖细胞几个编码内源性血管生成抑制剂的基因并无不良生理影响，而原位和植入肿瘤的生长速度较正常小鼠明显增快<sup>[30, 33]</sup>。反之，通过基因上调内源性抑制剂的表达水平（例如通过高表达转基因小鼠或异种移植肿瘤）则不利于肿瘤的生长<sup>[30, 33]</sup>。有趣的是，伤口愈合和脂肪沉积会通过升高或者降低相关基因的表达发生延迟和加速<sup>[34, 35]</sup>。这些数据表明内源性血管生成抑制剂可以在正常情况下调节组织重塑和伤口愈合过程中暂时性的血管生成，也可以作为早期肿瘤的固有屏障或者经早期肿瘤诱导产生持久性的血管增生。

## 2、内皮细胞在血管发生中的作用

很多肿瘤内细胞的异质性是在其基质中发现的，而内皮细胞发育、分化和形成动静脉及毛细血管的机制在 2000 年已经被人们所了解。因此可以激活静态内皮细胞这个“血管生成开关”的概念进入了细胞生物学并用于构建新血管。在过去十年中，内皮细胞表达信号转导受体（例如 Notch、Neuropilin、Robo 和 Eph-A/B）相关的信号通路网络已知与熟知的 VEGF、血管生成素和 FGF 信号密切相关<sup>[9, 36-38]</sup>。这些新型信号通路功能化描述了发育及肿瘤相关的血管生成，并且展示出内皮细胞表型的复杂调控机制。其他研究发现了肿瘤相关血管内皮细胞的表达基因，并且鉴定出正常细胞和肿瘤内皮细胞表面标志物独特的基因表达谱<sup>[24, 39, 40]</sup>。在信号传递、转录、血管编码的差异可能对理解正常内皮细胞转化成肿瘤相关内皮细胞非常重要。反之，了解这些差异后就可以探索性开发选择性靶向肿瘤相关内皮细胞的新疗法。

长期以来周细胞被称为支持细胞，紧密结合在正常组织脉管系统内皮细胞的外周，为内皮细胞提供物理和生理支持。与此相反，肿瘤脉管系统则缺乏周细胞等的支持。然而，最近几年进行的微观研究已经揭示周细胞与大多数肿瘤的新生脉管系

统具有相关性<sup>[41, 42]</sup>。研究表明周细胞包裹对于维持肿瘤新血管系统的功能性非常重要，起源于骨髓的一种细胞类型在病理性血管生成中起了关键作用<sup>[43-46]</sup>。这些细胞包括先天免疫系统，特别是巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞和髓系祖细胞等，能渗入癌前病变和进展期肿瘤组织并聚集在这些病变的边缘，肿瘤周围的炎症细胞则有助于促使先前处于静止状态的组织发生持续性的血管生成，并且在肿瘤生长过程中一直存在，使脉管系统避免受到靶向内皮细胞信号药物的作用<sup>[47]</sup>。此外，研究人员还观察到多种类型骨髓来源的血管祖细胞有时会迁移到肿瘤性病变，嵌入到新脉管系统中成为周细胞或血管内皮细胞<sup>[48-50]</sup>。

循环系统中与内皮细胞密切相关的就是淋巴管<sup>[51]</sup>。对于淋巴管与肿瘤的相互作用，特别是在肿瘤生长过程中的支持作用，我们一直知之甚少。事实上由于实体肿瘤内的高压力，导致瘤内淋巴管通常闭塞无功能，然而与此相反的是，肿瘤周围以及癌细胞侵入临近正常组织旁往往存在有功能且密度较高的淋巴管，这些淋巴管可能是一些癌症进行转移、播散的引流管道。

### 3、血管内皮生长抑制因子

血管生成，即活体组织在已存在微血管床上芽生出新毛细血管形成血管系统的过程<sup>[52]</sup>。成年人生理性血管生成仅发生在女性生殖系统或在伤口愈合时<sup>[53]</sup>。与此相反，病理性血管发生通常与许多疾病相关，包括炎症、血管性视网膜病、类风湿关节炎和癌症<sup>[16, 54-57]</sup>。过去几十年中，多种抗血管生成剂被开发并且用于靶向肿瘤新生血管的治疗<sup>[32, 58]</sup>，其中血管内皮细胞生长抑制剂（VEGI）是研究的热点之一<sup>[59, 60]</sup>。VEGI 作为肿瘤坏死因子超家族（TNFSF15）中的一员，能有效抑制内皮细胞的增殖和新生血管发生，从而抑制肿瘤的生长、浸润和转移<sup>[61]</sup>。有研究表明，重组人 VEGI-174 能显著抑制肿瘤细胞体外生长以及在荷瘤动物模型中肿瘤血管的生成<sup>[62, 63]</sup>。另外 VEGI 能抑制上皮细胞和多种肿瘤细胞的生长，包括人上皮癌、人组织细胞淋巴瘤 U-937、人乳腺癌 MCF-7、鼠结肠癌细胞 MC-38 和人粒细胞淋巴瘤 ML-1a<sup>[64-66]</sup>。VEGI 能影响膀胱癌细胞和前列腺癌细胞的运动和粘附性进一步证明了其对肿瘤细胞的抑制作用<sup>[60, 67]</sup>。Parr 等<sup>[66]</sup>在一项临床研究发现 VEGI 水平降低的乳腺癌患者中拥有高 VEGI 水平者具有较高的肿瘤局部复发率，生存时期也更短。由于 VEGI 可以通过抑制新生血管形成发挥作用，所以 VEGI 被认为是最有前途的抗癌药之一，

大量合成重组 VEGI 也成为了临床研究转化的必需条件<sup>[59]</sup>。

尽管重组 VEGI 因为具有抗血管生成功能可用于癌症治疗，但是大多数新型 VEGI 类似物的肿瘤特异性较低，从而导致了副作用的发生<sup>[59]</sup>。CD13 受体即氨肽酶 N (APN)，是一种锌依赖性膜结合氨肽酶，已被确定为诱导血管生成信号的关键调节因子<sup>[68-71]</sup>。前期研究结果表明，含有天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸 (NGR) 序列的多肽可以特异性结合高表达的 CD13 受体，一些研究还表明，抗癌药如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素 (IFN) 和多柔比星 (DOX) 等通过螯合 NGR 多肽基序后可以增加药物的靶向性<sup>[10, 13, 72-74]</sup>、用于肿瘤的成像与治疗<sup>[75, 76]</sup>。因此，我们认为综合 VEGI 与 CD13 受体靶向序列 NGR 多肽的方法能有效提高 VEGI 的肿瘤特异性，并且能为靶向性肿瘤血管治疗提供一种新型的生物制剂。

#### 4、核素标记分子探针的研究现状

正电子放射性核素标记的小分子探针是目前放射性靶向诊断的研究热点之一，许多正电子发射放射性核素已经成功应用于进行 PET 放射性示踪剂的研究和临床试验。这些常用放射性核素包括  $^{11}\text{C}$  ( $E_{\text{max}} = 970 \text{ keV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 20.4 \text{ min}$ )、 $^{13}\text{N}$  ( $E_{\text{max}} = 1.30 \text{ MeV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 9.97 \text{ min}$ )、 $^{15}\text{O}$  ( $E_{\text{max}} = 1.73 \text{ MeV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 2.04 \text{ min}$ )、 $^{18}\text{F}$  ( $E_{\text{max}} = 635 \text{ keV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 109.8 \text{ min}$ )、 $^{64}\text{Cu}$  ( $E_{\text{max}} = 657 \text{ keV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 12.7 \text{ 小时}$ )、 $^{68}\text{Ga}$  ( $E_{\text{max}} = 1.90 \text{ MeV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 68.1 \text{ min}$ )、 $^{82}\text{Rb}$  ( $E_{\text{max}} = 3.36 \text{ MeV}$ , 半衰期  $t_{1/2} = 1.27 \text{ min}$ ) 和  $^{124}\text{I}$  ( $E_{\text{max}} = 2.13 \text{ MeV}; 1.53 \text{ MeV}; 808 \text{ keV}$ ,  $t_{1/2} = 4.2 \text{ 天}$ )<sup>[77, 78]</sup>。

$^{11}\text{C}$  是一个极具吸引力的正电子核素，可用于进行靶向生物分子标记，但是  $^{11}\text{C}$  的半衰期非常短 (仅 20.4 min)，多步合成方法并不适合其放射性标记，因此大多数情况下  $^{11}\text{C}$  适用于在学术研究和药物开发中进行分子标记。与具有短半衰期的放射性核素相比，小型生物学回旋加速器或发生器可以高效制备几个具有更长半衰期的非常规金属放射性核素。例如， $^{68}\text{Ga}$  和  $^{82}\text{Rb}$  发生器就能为临床提供制备放射性示踪剂所需的实用性核素。然而一些金属放射性核素具有较为复杂的衰变过程，例如衰变伴随着低比例的  $\beta^+$  射线发射 ( $^{86}\text{Y}$ , 33%;  $^{68}\text{Ga}$ , 57%)、高能量  $\beta^+$  射线 ( $^{86}\text{Y}$ , 1.3 MeV;  $^{68}\text{Ga}$ , 4.2 MeV) 和  $\gamma$  射线，这些都会导致患者辐射剂量的大量增加。由于氟-18 相对理想的化学特性和核性能，越来越多的  $^{18}\text{F}$  标记示踪剂开始进入临床应用。 $^{18}\text{F}$  的

半衰期足够长, 109.8 min 的时间允许放化实验室耗时进行多步骤放射性合成, 将标记产物的成像时间延长至合成后几小时。此外,  $^{18}\text{F}$  具有较低的  $\beta^+$  能量 (0.64 MeV), 保证了正电子在组织中较短的线性范围, 导致 PET 图像拥有高达 1 mm 的空间分辨率, 降低了患者的辐射剂量<sup>[77, 78]</sup>。

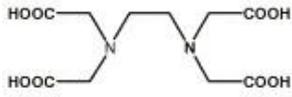
正电子放射性核素  $^{64}\text{Cu}$  ( $E_{\max} \beta^+ = 0.655 \text{ MeV}$ ,  $E_{\max} \beta^- = 0.573 \text{ MeV}$ ,  $E_{\max} \gamma = 0.511 \text{ MeV}$ ) 具有较长的半衰期和适于 PET 成像的衰变特性<sup>[79-82]</sup>。二价铜进行放射性金属标记展现出许多的优势, 具有不同半衰期和物理特性的放射性铜可进行生物标记后用于 PET 显像或者 SPECT 显像 (见表 1), 其中正二价铜的氧化状态可与许多配体紧密结合从而合成一系列稳定的化合物。基于  $^{64}\text{Cu}$  放射性药剂进行靶向 PET 成像的临床可行性, 有必要采用双功能螯合剂从而能够快速形成稳定的铜 (II) 络合物, 常见  $^{64/67}\text{Cu}^{2+}$  螯合物的合成条件见表 2。快速进行生物活性分子如抗体的  $^{64}\text{Cu}$  放射性标记对于制备具有生物活性铜标记复合物进行医学应用是必须的<sup>[7, 81, 83]</sup>。放射性  $^{64}\text{Cu}$  标记配合物在体内必须是稳定的, 减少螯合体脱离或者与其他金属结合蛋白质或生物学上重要的金属结合。铜 (II) 具有较小的离子半径 (73 ppm) 并且对氮氧供电子原子具有高亲和性。各种无环和大环聚氨基羧酸螯合物包括 DTPA (二乙三胺五乙酸)、NOTA (1, 4, 7-三氮杂环壬烷-1, 4, 7-三乙酸)、DOTA (1, 4, 7, 10-四氮杂四乙酸) 和 TETA (2-[1, 4, 8, 11-四氮杂四乙酸) 等都可用于进行  $^{64}\text{Cu}$  标记并进行 PET 成像<sup>[79-81]</sup>, 常见  $^{64/67}\text{Cu}^{2+}$  放射标记可选择母体衍生物见图 2。

表 1 各种铜的放射性同位素的物理性能和潜在应用<sup>[84]</sup>

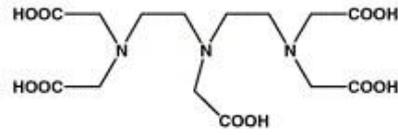
同核素	半衰期	显像 (射线类型, 能量*, 吸收)	治疗 (能量*, 组织内射程)	应用
$^{60}\text{Cu}$	20 min	PET ( $\beta^+$ , 873 keV, 93%)		标记小分子物质, 进行不同生理条件下的重复实验
$^{61}\text{Cu}$	3.3 h	PET ( $\beta^+$ , 527 keV, 62%)		标记小分子物质
$^{62}\text{Cu}$	9.74 min	PET ( $\beta^+$ , 1315 keV, 98%)		进行不同生理条件下的重复实验
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	PET ( $\beta^+$ , 278 keV, 19%)	$\beta^-$ : 190 keV, 0.95 mm	标记小分子物质、多肽和抗体
$^{66}\text{Cu}$	5.4 min		$\beta^-$ : 1109 keV, 5.6 mm	标记治疗性小分子物质
$^{67}\text{Cu}$	62 h	SPECT (91 keV, 7%; 93 keV, 16%; 185 keV, 48%)	$\beta^-$ : 121 keV, 0.61 mm	标记多肽和抗体

\*指大多数非穿透性辐射的平均能量

OPEN-CHAIN POLYAMINOCARBOXYLATES

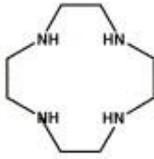


edta

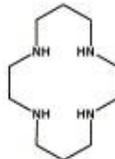


dtpa

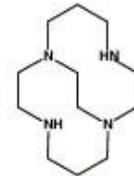
AZA MACROCYCLES



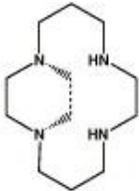
cyclen



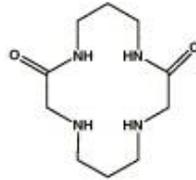
cyclam



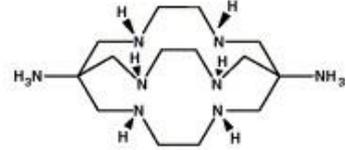
bridged-cyclam



et-cyclam

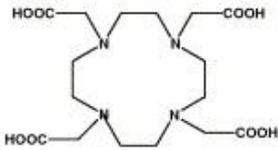


cyclamdione

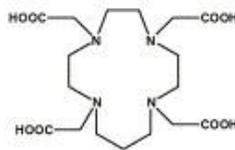


diamsar

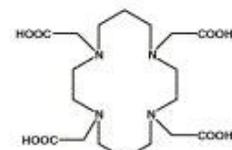
POLYAMINOCARBOXYLIC MACROCYCLES



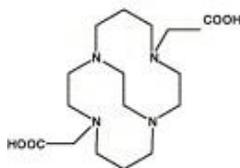
dota



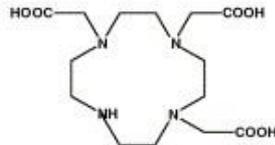
trita



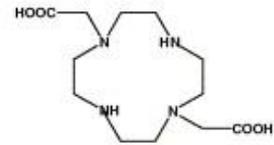
teta



bridged-cyclam-2a

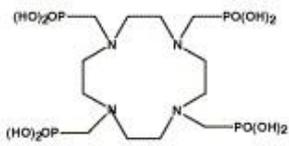


do3a

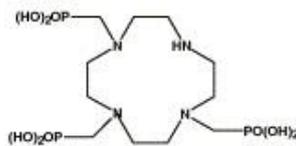


do2a

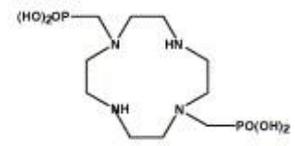
POLYAMINOPHOSPHONATE MACROCYCLES



dotp



do3p



do2p

图 2.  $^{64/67}\text{Cu}^{2+}$  放射标记可选择链接的母体衍生物化学结构图<sup>[81]</sup>

表 2  $^{64/67}\text{Cu}^{2+}$  与相应配体 (L) 的络合条件<sup>[81, 85-87]</sup>

配体	[L](M)/摩尔比例 L:M	pH 值	温度 (°C)	时间 (min)	$^{64/67}\text{Cu}^{2+}$ 比例 (log K 增加)
TETA	$2 \times 10^{-5}$ /过量 L	5.5	20-25	30	≈100
DOTA	$3 \times 10^{-5}$ /过量 L	5.5	20-25	45	95
DO3A	$1.5 \times 10^{-6}$ /过量 L	5.5	20-25	30	≈85
Cyclen	$2 \times 10^{-5}$ /过量 L	5.5	20-25	10	98
DOTP	$(2-5) \times 10^{-3}$ /过量 L	6.5	20-25	120	96.9
DO2A	$1 \times 10^{-5}$ /过量 L	5.5	20-25	60	100
DO3P	$(2-5) \times 10^{-3}$ /过量 L	6.5	20-25	120	96.6
Et-cyclam	$5 \times 10^{-6}$ /过量 L	6.4	20-25	20	90
Bridged-cyclam	$1 \times 10^{-2}$ /100:1	基础 EtOH	75	60	99
Cyclam	$2 \times 10^{-5}$ /过量 L	5.5	20-25	10	97
Bridged-cyclam-2a	$1 \times 10^{-2}$ /载体 Cu(II) 100: 1 和 1:1	基础 EtOH	75	60	>95
	$1 \times 10^{-2}$ /100:1	基础 EtOH	75	60	76
	$1 \times 10^{-2}$ /1:1	基础 EtOH	75	60	23
DO2P	$(2-5) \times 10^{-5}$ /过量 L	6.5	90	240	97.8
Sarar	$1 \times 10^{-6}$ /1:1	4-9	20-25	<2	>99.95

近年来研发了多种不同功能的正电子放射性核素标记探针，如反映灌注功能的  $^{15}\text{O-H}_2\text{O}$ 、反映葡萄糖代谢的  $^{18}\text{F-FDG}$ 、反映骨代谢的  $^{18}\text{F-氟化钠}$ 、反映胆碱代谢的  $^{18}\text{F-胆碱}$ 、反映 DNA 合成的  $^{18}\text{F-FLT}$ 、指示脂质合成的  $^{11}\text{C-AcOH}$ 、反映氨基酸转运和蛋白合成的  $^{18}\text{F-FET}$ 、 $^{11}\text{C-蛋氨酸}$  和  $^{18}\text{F-多巴胺}$ 、与生长抑素受体结合的  $^{68}\text{Ga-DOTA-TOC}$ 、反映肿瘤血管生成的  $^{68}\text{Ga-RGD}$ 、进行乏氧显像研究的  $^{18}\text{F-FAZA}$  和  $^{18}\text{F-MISO}$ 、用于凋亡显像的  $^{124}\text{I-Annexin V}$  以及基因表达显像的  $^{18}\text{F-FHBG}$  (鸟嘌呤) 等<sup>[77, 88-96]</sup>，但大多数正电子核素标记探针的靶向性和特异性仍存在一定的问題。

抗体可以和肿瘤细胞表面过度表达的抗原高度特异性结合，通过介导细胞凋亡、阻碍配体—受体作用或者阻碍对肿瘤表型至关重要蛋白质的表达而发挥肿瘤抑制作用。经过放射性核素标记后的抗体可以明显增强单克隆抗体治疗肿瘤的效果，因为抗体与抗原特异性结合的同时，放射性核素会对肿瘤细胞及其周围组织产生短距离的杀伤作用，因此最终治疗效果往往取决于放射性核素发射射线的能量和辐射范围。相比之下，未标记抗体对肿瘤的杀伤作用则非常有限<sup>[97]</sup>。与前列腺特异性膜抗原

PSMA 结合的  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA 可用于前列腺癌的诊断、放射性核素标记的替伊莫单抗 Zevalin、抗-CD20 单克隆抗体和托西莫单抗 Bexxar 也已经取得了一定的肿瘤治疗效果<sup>[98, 99]</sup>。但核素标记的抗体治疗仍存在异种抗体的免疫遗传性、循环抗原庇护、肿瘤表面抗原异源性、肿瘤内效应细胞数量限制、肿瘤血管通路紊乱和肿瘤微环境免疫抑制等阻碍，使得抗体靶向肿瘤治疗的有效性仍需进一步提高。在这些分子中，单克隆抗体（mAbs）由于其对同源抗原的特异性一直被认为是最具有靶向诊断和治疗潜力的候选者。然而，单克隆抗体的显像效果由于其较大的分子量（~150 kDa）而有所限制，导致了抗体较长的血液循环时间（数天至数周不等）和肿瘤最佳摄取时间的延长（通常数天），抗体工程技术已经在不损害其亲和力和特异性的同时明显改善抗体的药物动力学<sup>[100, 101]</sup>。因此，众多的抗体片段和变体例如 Fab 段、F(ab')<sub>2</sub> 段、单链 Fv (scFv)、双抗体和微型抗体（分子量为 25~100 kDa）陆续经生物工程合成<sup>[100-102]</sup>。此外，几个非传统蛋白支架如结构域抗体、亲和体和纳米抗体的相关研究也已有报道<sup>[100-102]</sup>。近年来，被称为“纳米抗体”的单结构域抗原结合片段进行生物工程改造后可应用于分子成像。小分子物质（~15 kDa）和纳米抗体的互补性决定区（CDR）这种优良的结构特点非常利于进入分子成像应用，如靶向定位快、血液清除快、溶解度高、稳定性好、可克隆、易于结合空腔和低免疫原性等。应用纳米抗体为基础合成的探针使用若干成像技术如放射性核素成像、光学显像和超声等，已被用于各种疾病靶标的可视化研究。迄今报告的相关临床前数据是相当有希望的，因此以纳米抗体为基础分子成像剂将在各种疾病诊疗中发挥重要的作用<sup>[103]</sup>。

几种具有调节功能的多肽受体在某些人类癌症中的过度表达，使得放射性核素标记其配体后与受体靶向结合进行局部治疗成为可能。譬如诊断性核素  $^{111}\text{In}$  或  $^{68}\text{Ga}$  标记生长抑素类似物 TOC 和 TATE 后可以用于肿瘤显像，治疗性核素  $^{90}\text{Y}$  或  $^{177}\text{Lu}$  标记生长抑素类似物后可用于生长抑素受体（SSTR）表达阳性肿瘤的靶向治疗。放射性核素标记多肽及其类似物后也可用于进行显像和治疗，如蛙皮素、神经降压素、胆囊收缩素、胃泌素、胰高血糖素样肽-1（GLP-1）、受体激动剂 Exendin-4、RGD 和 P 物质等，均已成为目前肿瘤分子显像和多肽受体介导治疗的临床前研究热点<sup>[104-107]</sup>。然而，已知可识别的靶向特异性肽是微不足道的，噬菌体展示库筛选技术为寻找与固定靶分子亲和性高的多肽提供了有力支持<sup>[108, 109]</sup>。

## 5、NGR 多肽相关靶向探针

新生血管形成是肿瘤发生、发展的基本过程<sup>[110, 111]</sup>。多项研究表明肿瘤新生血管形成是由生长因子、粘附分子和细胞受体介导控制发生的一个多步骤过程<sup>[112-114]</sup>。肿瘤血管归巢序列 CNGRCVSGCAGRC 通过体内筛选的噬菌体展示肽库技术经人乳腺癌肿瘤筛选脱颖而出<sup>[115]</sup>，该序列的肿瘤归巢性可通过共注射 CNGRC 肽被抑制，这表明共注射的环状短肽是功能性的肿瘤靶向肽。此外通过体内外肿瘤血管归巢噬菌体库还筛选出了多种含 NGR 基序的多肽，均可作为能与肿瘤血管特异性结合的配体，包括线性 NGR 肽如 NGRAHA 和 GNGRGR，环状 NGR 肽如 CNGRC 和 CVLNGRMEC 等<sup>[116, 117]</sup>。直到 2000 年，NGR 多肽的靶分子才被确定为 CD13 受体<sup>[110]</sup>。此后，一系列含 NGR 基序的衍生物开始用于 CD13 受体靶向肿瘤分子显像和治疗<sup>[73, 118-123]</sup>。

CD13 受体也称作氨肽酶 N (APN)，是一种锌依赖性膜外结合肽酶，已被确定为血管新生过程中的关键调节分子<sup>[121]</sup>。迄今为止，CD13 受体已被确定是恶性骨髓细胞的一种表面标记<sup>[124]</sup>，研究表明 CD13 受体在前列腺癌、肺癌和卵巢癌中的高表达与肿瘤进展程度密切相关<sup>[125-127]</sup>。由于 CD13 受体在肿瘤血管生成中发挥了至关重要的作用，对 CD13 受体进行无创性分子成像将使早期监测 CD13 受体靶向的肿瘤血管成为可能，从而有效提高肿瘤的早期诊断率，还可以个体化监控抗肿瘤血管靶向治疗的效果。

虽然大多数基于 NGR 序列的探针可通过结合 CD13 受体靶向肿瘤，但是 NGR 探针肿瘤特异性摄取较低及其体内药代动力学特点均限制了该类探针在体内成像和治疗中的应用<sup>[119, 120]</sup>。为了改善和增强分子探针的体内靶向特异性，现在常用的方法包括：(1) 改变探针的空间结构，如将 RGD 线样结构改变成环状结构可以明显提高靶向性<sup>[128]</sup>；(2) 将探针重复排列或构建成二聚体及多聚体，例如合成的 RGD 二聚体具有两个重复的环状 RGD 单元，由于配体的二价效应显著增强了 RGD 与整合素  $\alpha v \beta 3$  受体的结合亲和力<sup>[129-131]</sup>；(3) 增加新的作用靶点，如连接 RGD 和蛙皮素形成异源二聚体<sup>[132, 133]</sup>。为了增强探针的结合亲和力，获得更高的受体靶向性肿瘤摄取，配体多聚化已被证明是增强探针成像聚集和化疗效果的有效方法<sup>[78, 134-140]</sup>。由于 CD13 受体类似于整合素  $\alpha v \beta 3$  受体，是位于肿瘤新生血管内皮细胞和肿瘤细胞表面的靶分子，多聚体化的 NGR 多肽理论上也能增加探针在靶器官的局部浓度，表现为

肿瘤摄取值更高且保留时间延长。因此，设计并合成二聚体化的 NGR 多肽含有两个重复的环状 NGR 单元，将有效提高受体-配体的结合亲和力，同时由于二聚体分子量较单体大，从而能有效延长探针的体内循环时间，最终增加靶分子在肿瘤的摄取率和留存时间。

## 6、分子影像概况

分子影像在生物医学领域的主要应用主要分为显像和治疗两个方面。诊断性显像方式通常包括核素成像（正电子发射断层扫描 PET 或单光子发射计算机断层显像 SPECT）、计算机断层扫描（CT）、光学成像（OI）、核磁共振成像（MRI）和超声（US）。表 3 展示出了目前在临床和生物医学领域中所应用显像方式的特性，可见每种显像方式都有其独特优点和固有缺点，因此导致了实际应用受限，如空间/深度分辨率和灵敏度较差会导致很难准确获得疾病部位的可靠信息。

表 3 生物医学领域各种显像方式的优缺点比较

显像方式	优点	缺点
CT 成像	空间分辨率高、组织穿透性强	辐射危害、图像无法定量分析
SPECT 显像	灵敏度高、穿透性强	辐射危害、空间分辨率低
PET 显像	灵敏度高、穿透性强、可进行全身扫描	成本较高、辐射危害
光学显像	灵敏度高、非侵入性功能学检查	组织穿透性差、图像无法定量分析
超声显像	可进行实时检查、成本低廉	分析时检查者依赖程度高、分辨率低
MRI 显像	空间分辨率高、组织穿透性高	敏感度较低、显像时间长、成本高

近年来，新兴的单光子发射计算机断层成像术（SPECT）和正电子发射断层扫描（PET）为疾病的生化代谢提供了无创性可定量的成像方法<sup>[141]</sup>。与传统影像学检查方法相比，核素显像技术需要向体内注射可检测剂量内的单光子或正电子分子探针，从而获得检测信号进行 SPECT 或 PET 显像<sup>[78, 142]</sup>，结合了诊断级多层 CT 的复合成像设备 SPECT/CT 和 PET/CT 系统，可以更精确定位病变的位置、性质和程度，为疾病的诊治提供了有效的参考。现在研究应用的分子探针包括小分子物质、多肽、蛋白质、纳米粒子和抗体及其片段等均可作为显像探针的有效载体<sup>[78, 143]</sup>。其中低分子量的小肽段拥有许多优点，包括良好的药物代谢动力学和体内组织分布特性、低

毒性、低免疫原性、良好的渗透性、便于进行化学修饰和放射性标记等<sup>[143]</sup>，让以多肽为核心分子探针的制备和开发成为了分子影像领域的研究热点。

作为核医学成像技术很好的补充方式，光学成像具有无电离辐射、无放射性物质、相对经济、高敏感度和结果直观等多种优势<sup>[144]</sup>。近红外荧光光学成像为在分子水平进行活体疾病研究提供了一种直观、简洁、无创的途径<sup>[145-147]</sup>。最新进展表明 NIRF 光学成像在诸多重要生物靶分子例如细胞表面受体<sup>[144, 145, 148-151]</sup>、胞内酶<sup>[146, 147, 152]</sup>和抗原<sup>[153]</sup>等的定量评估中均具有巨大的应用前景。NIRF 光学成像将帮助我们更好地理解生物学、疾病早期检测、疗效监测、筛选和开发新药物等多领域的研究<sup>[123, 144, 154]</sup>，例如贝伐单抗，即靶向 VEGF 的人源化单克隆抗体，成功整合 AlexaFluor750 形成了贝伐单抗-AlexaFluor750 探针<sup>[155]</sup>，光学成像显示贝伐单抗-AlexaFluor750 探针可以用于 VEGF 表达阳性 HT-29 结肠癌的非侵入性在体成像。本研究涉及的 Cy5.5 菁染料是性能优良的荧光标记染料，摩尔吸光系数在荧光染料中是最高的，而且方便进行结构修饰和快速标记，已经成为基因芯片的首选荧光标记物。此外菁染料 Cy5、Cy5.5 和 Cy7 的吸收在近红外区背景非常低，是荧光强度最高、最稳定的长波长染料，特别适于代替放射性元素进行活体小动物 NIRF 成像。

大多数分子探针均采用 SPECT 或 PET 作为成像设备，其他显像设备如光学和超声成像应用相对较少，然而任何单模态成像获得的信息都是不完整的，因此多种分子成像技术组合后产生的协同优势能够提供更全面的优势<sup>[156]</sup>。例如，PET 和 MRI 的结合既能为软组织提供高对比度图像，又能将 PET 的功能学信息加入诊断结果，从而有利于提高诊断准确性和及时调整治疗计划。结合光学和磁共振探针的双模态分子成像剂可以在术中应用，光学成像可用于显示手术边缘，MRI 则能确保完全切除所有癌灶。然而直接连接多模态探针与多肽或者抗体是极具有挑战性的，因为探针前体可进行连接的位点是有限的，而且这种连接会干扰探针与其受体结合的能力。纳米载体拥有的巨大表面积为多功能探针提供了更多的结合位点，从而可以用于进行多模态显像<sup>[157]</sup>。随着此类探针不断发展的进一步推动，以多肽和小抗体为基础的多模态成像方法将渐渐被推向临床并占有一席之地。因此，能改善目前使用诊断性显像仪器缺点形成的组合式成像模态（例如 PET / CT）获得了广泛关注。第一台融合机器 PET / CT 仪经 Townsend's 于 1998 年开发、2001 年投入商业化运作开始，由此开始，大量的分子探针经研发并开始进入临床应用。携带两个或两个以上的多模

态成像探针可以克服单个成像模态的限制，并为诊断提供更具体的信息<sup>[158]</sup>。设计多模态显像探针时需要考虑尽量减少显像模态优点的重叠和结合适当的优势互补，以求最大限度地发挥各种显像的协同优势。例如，PET 图像能为疾病提供高灵敏度的功能学信息，MRI 或 CT 能提供高分辨率的解剖学图像，因此这两种成像模态的组合就能同时实现图像的高灵敏度和高分辨率，为疾病提供更详细的解剖和生物学信息。研究者设计合成可进行三种模态成像的分子探针，即结合放射性金属螯合物（如  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA）、光学以及 MRI 显像信号的探针，就可以同时用于 PET / 光学 / MRI 的三模态成像<sup>[159]</sup>。

成像技术与治疗药物结合就能用于标记靶标位点、获得生物学信息、研究纳米材料或药物的活体生物分布和检测治疗研究<sup>[160-162]</sup>。某些类型的纳米材料同时具有成像诊断和治疗的属性。例如，Zhou 等<sup>[163]</sup>设计合成了一类新型无螯合剂的  $^{64}\text{Cu}$  /  $\text{CuS}$  纳米颗粒，既可用于小动物 PET / CT 成像也可用于光热消融治疗。纳米结构基体包裹 MRI 造影剂和抗癌药是另一种策略，可以允许分子探针同时用于诊断和靶向化疗<sup>[164]</sup>。此外，两个或三个成像探针也可以被掺入到含有药物的纳米颗粒并监控药物输送、药物释放和治疗效果。因此，不同纳米材料的组合使用是未来进行多模成像、诊断和治疗的基础和平台<sup>[165-168]</sup>。

作为科学研究迅速发展的领域之一，分子成像已成为癌症研究、临床试验和医疗实践中不可或缺的工具<sup>[2, 169-172]</sup>。分子成像可以在细胞和分子水平上进行在体非侵入性生物过程的检测，从而能更好地了解和治疗各种疾病。过去的十年中，癌症相关的分子成像已经在临床前和临床研究领域中取得了显著的进步，分子影像技术可以将分子显像剂上的诊断性核素替换成适用于内照射的放射性核素，从而实现相应分子水平的靶向核素治疗，如放射免疫治疗、受体介导靶向治疗和反义放射性核素治疗等<sup>[2, 77]</sup>。分子影像学技术的魅力主要表现在检测的非侵入性、可视化、表征和测量疾病发生发展中分子细胞水平的变化<sup>[173, 174]</sup>，包括核素成像和荧光光学成像在内的分子影像技术让现代分子医学革命成为了可能，新一代多模态肿瘤分子探针的出现使癌症的早期诊断、治疗预评估、个体化给药和长期疗效监测成为可能<sup>[1]</sup>。抗癌制剂通过适当螯合显像分子即可用作治疗诊断学，从而克服不同试剂生物分布和选择性不同导致的显像和治疗不同步。因此，诊断治疗试剂可以同时用于诊断性显像、研究患病组织动力学和长期的药效监测，最终达到优化治疗计划的作用。总体而言，

分子探针的临床前研究推动、鼓励了分子成像更广泛的应用和发展，最终需要放射化学、分子生物学、生物医学、影像学、临床医学及其监管机构进行跨学科的共同努力，来实现个性化医学的终极目标<sup>[103]</sup>。

# 正 文

## 第一部分 $^{64}\text{Cu}$ 标记 NGR 单体、二聚体的小动物

### PET 显像研究

#### 1 材料与仪器

所有化学品（试剂级）购自供应商，无需进一步纯化即可使用。NGR 肽 [GGGCNGRC，半胱氨酸构成二硫键 Cys: Cys = 4 - 8] 和 Boc 保护 Gly3 肽购自美国 CS 生物公司。DOTA-NHS 酯购自美国 Macrocyclics 公司。 $^{64}\text{Cu}$ - $\text{CuCl}_2$  购自美国华盛顿大学。实验用水取自 Milli-Q 超纯水系统（Millipore 公司，美国），生物耦合与放射性标记前通过 Chelex 100 树脂纯化。Finnigan LTQ 质谱仪配备电喷雾电离源（Thermo Scientific，美国）。四甲基偶氮唑蓝 MTT（Amresco 公司，美国），HEPES（N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulfonic Acid，羟乙基哌嗪乙磺酸）购自美国 Sigma 公司。

#### 2 方法

##### 2.1 HPLC 方法

分析和半制备型反相 HPLC 设备含两个 Waters 515 HPLC 泵，一个 Waters 2487 紫外吸收检测器和一个 Ludlum 模型（2200 放射性检测器），操作软件是 Waters Empower 2。DOTA 螯合 NGR 肽的纯化在 Phenomenex Luna C18 反相柱（5  $\mu\text{m}$ ，250  $\times$  10 mm）完成，半制备 HPLC 流速 4 mL/min，流动相起始溶剂为 95% 的 A 液（含 0.1% TFA 的水溶液）和 5% B 液（含 0.1% TFA 的乙腈），终止溶剂为 40% A 液和 60% B 液，保留时间为 27.5 min。UV 吸光度监测波长为 214 nm 和 254 nm。分析型 HPLC

和  $^{64}\text{Cu}$  标记纯化在 Phenomenex Luna C18 反相分析柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4.6 mm) 上进行。流速为 1 mL/min, 流动相起始溶剂为 100% 的 A 液 (含 0.1% TFA 的水溶液), 到 50% A 液和 50% B 液, 保留时间为 22.5 min。

## 2.2 制备 DOTA-NGR 单体

NGR 肽 (GGGCNGRC, 半胱氨酸构成二硫键 Cys: Cys = 4 - 8, 3.0 mg, 4.16  $\mu\text{mol}$ ) 溶解在 0.5 mL 含有 DOTA-NHS 酯 (3.8 mg, 5.0  $\mu\text{mol}$ ) 和 DIPEA (25  $\mu\text{L}$ ) 的 DMF 混合。40 $^{\circ}\text{C}$  超声处理 2 小时后, 将反应物骤冷, 加入 50  $\mu\text{L}$  5% 乙酸 (HOAc)。将混合物溶于水中并通过分析型 HPLC 纯化。收集含有 DOTA-NGR1 肽 (保留时间  $t_R=15.5$  min) 的液体并冷冻干燥, 得到蓬松的白色粉末 (3.9 mg, 产率 85%)。ESI-MS:  $m/z$   $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_{16}\text{O}_{17}\text{S}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  计算值为 1107.42, 实测值为 1107.90。

## 2.3 Boc 保护 NGR 二聚体的合成

Boc 保护谷氨酸活化的 Boc-E (OSU) 酯。NGR 肽 (GGGCNGRC, 半胱氨酸构成二硫键 Cys: Cys = 4 - 8, 10.0 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) 溶于硼酸钠缓冲液 (10mM, pH 值 8.5) 溶液中, Boc-E (OSU) 2 (2.05 mg, 4.6  $\mu\text{mol}$ ) 溶于无水 DMSO (25  $\mu\text{L}$ ), 二者进行混合反应后将混合物在室温下震荡 2 小时, 产物通过半制备型 HPLC ( $t_R = 13.2$  min) 进行纯化收集和冷冻干燥, 得到蓬松的白色粉末 (5.1 mg, 产率 67%)。ESI-MS:  $m/z$   $\text{C}_{58}\text{H}_{93}\text{N}_{25}\text{O}_{24}\text{S}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  计算值为 1652.57, 实测值为 1652.65。

## 2.4 制备 NGR 二聚体

Boc 保护 NGR2 肽 (5.0 mg, 3  $\mu\text{mol}$ ) 溶解在 0.5 mL 三氟乙酸: 三异丙基硅烷: 水 (95: 2.5: 2.5) 溶液中。将混合物在搅拌室温下震荡 1 小时后进行旋蒸, 残余物重新溶解在 0.5 mL 水中并通过半制备 HPLC 进行纯化。收集 NGR 二聚体肽 ( $t_R = 10.3$  min), 并冷冻干燥, 得到蓬松白色粉末 (4.1 mg, 产率 88%)。ESI-MS:  $m/z$   $\text{C}_{53}\text{H}_{85}\text{N}_{25}\text{O}_{22}\text{S}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  计算值是 1552.52, 实测值是 1552.59。

## 2.5 合成 Boc 保护的 Gly<sub>3</sub>-NGR 二聚体

Boc 保护 Gly<sub>3</sub> 肽 [BocNH-Gly<sub>3</sub>-OH] (0.7 mg, 2.42  $\mu\text{mol}$ ) 在含有 HATU (0.92 mg, 2.42  $\mu\text{mol}$ ) 和 HOAT (0.33 mg, 2.42  $\mu\text{mol}$ ) 的 200  $\mu\text{L}$  DMF 中激活 30 min。向混合物中加入 200  $\mu\text{L}$  DMF 溶解后的 NGR 二聚体肽 (2.5 mg, 1.6  $\mu\text{mol}$ )。将混合物用

DIPEA 调节其至 pH 值为 8.5, 室温下超声 2 小时。粗制肽通过半制备型 HPLC 纯化, 收集含有所需产物的峰 ( $t_R = 14.0 \text{ min}$ ) 并冷冻干燥, 得到蓬松白色粉末 (2.1 mg, 产率 72%)。ESI-MS:  $m/z$   $C_{64}H_{102}N_{28}O_{27}S_4 [M + H]^+$  计算值是 1823.64, 实测值是 1823.90。

## 2.6 合成 Gly<sub>3</sub>-NGR 二聚体

Boc 保护 Gly<sub>3</sub>-NGR2 肽 (2.0 mg, 1.1  $\mu\text{mol}$ ) 溶解在 0.25 mL TFA: 三异丙基硅烷: 水 (95: 2.5: 2.5) 溶液中。将混合物在室温下搅拌 1 小时, 蒸发溶剂后, 残余物再溶解在 0.5 mL 水中用于半制备型 HPLC 纯化。含有 Gly<sub>3</sub>-NGR2 肽的峰被收集 ( $t_R = 10.9 \text{ min}$ ) 和冷冻干燥, 得到蓬松白色粉末 (1.6 mg, 产率 85%)。ESI-MS:  $m/z$   $C_{59}H_{94}N_{28}O_{25}S_4 [M + H]^+$  计算值为 1723.58, 实测值为 1723.80。

## 2.7 合成 DOTA-NGR2

Gly<sub>3</sub>-NGR2 肽 (1.5 mg, 0.87  $\mu\text{mol}$ ) 溶解在 0.5 mL DMF 中的 DOTA-NHS 酯 (1.07mg, 1.04  $\mu\text{mol}$ ) 和 DIPEA (20  $\mu\text{L}$ ) 混合。40°C 超声处理 2 小时, 将反应物骤冷, 加入 50  $\mu\text{L}$  5% 醋酸 (HOAc)。真空除去溶剂后将所得残余物溶于水中, 并通过分析型 HPLC 纯化。收集含 DOTA-NGR2 肽峰 ( $t_R=16.6 \text{ min}$ ) 并冻干, 得到蓬松白色粉末 (1.56 mg, 产率 85%)。ESI-MS:  $m/z$   $C_{75}H_{120}N_{32}O_{32}S_4 [M + 2H]^{2+}$  计算值为 1057.38, 实测值为 1057.70。

## 2.8 <sup>64</sup>Cu 标记 NGR 多肽及纯化

37~111 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> 加入 0.1 N HCl 中, 与 300  $\mu\text{l}$  乙酸铵缓冲液 (0.4 M, pH = 5.5) 混合并在室温下放置 15 min。将 [<sup>64</sup>Cu]Cu(OAc)<sub>2</sub> 溶液 (37~111 MBq) 加入到溶于乙酸铵溶液 (0.4 M, pH = 5.5) 的 DOTA-NGR1 或 DOTA-NGR2 肽中 (5  $\mu\text{g}$  肽/mCi)。反应混合物 40°C 下共浴 30 min 后通过分析型 HPLC 纯化, 收集含有 <sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR1 或 <sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR2 肽的放射性峰。收集产物并通过旋转蒸发浓缩, 然后将产物重新溶解在 500~800  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔过滤器过滤后吸入无菌小瓶备用。

## 2.9 分配系数测定

油水分配系数表示为 Log  $P$  值。<sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR1 和 <sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR2 肽的 Log

$P$  值通过测定其在 1-辛醇和 PBS 中的放射性分布确定。取约 185 KBq  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 溶于 2  $\mu\text{L}$  PBS 中 (pH 值 7.4), 分别加入到含 0.5 mL 1-辛醇和 0.5 mL PBS (pH 值 7.4) 的小瓶中, 震荡 10 min, 12500 rpm 离心 5 min, 以确保完全分离。分层液体分别各取 200  $\mu\text{L}$  移到试管中, 并用  $\gamma$  计数器 (Perkin-Elmer Packard Cobra, 美国) 测定放射活性。实验重复三次, 最终结果取平均值。

## 2.10 体外稳定性测定

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的体外稳定性在 PBS 和小鼠血清中进行检测。3.7 MBq  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 加入 0.5 mL 的 PBS 中, 然后分别加入 PBS (室温) 或小鼠血清 (37 $^{\circ}\text{C}$ ), 300 rpm 轻微振荡混匀。对于 PBS 组, 在不同时间点 (1、6 和 24 小时) 将溶液的等分试样直接取出后在相同的条件下使用反相 HPLC 测定测量其放射化学纯度。对小鼠血清组, 在不同时间点 (1、6 和 24 小时) 取等分溶液加入 TFA, 可溶部分用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤澄清, 将溶液的等分试样在相同的条件下使用反相 HPLC 测定其放射化学纯度。

## 2.11 细胞培养

HT-1080 人纤维肉瘤细胞和 HT-29 人结肠腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心, 分别培养于含 10% 胎牛血清 (Life Technologies, 美国) 的 DMEM 和 RPMI-1640 培养基中, 培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  浓度 5%。

## 2.12 蛋白免疫印迹实验

HT-1080 细胞和 HT-29 细胞分别培养于 75  $\text{cm}^2$  培养瓶中, 加入裂解缓冲液 (碧云天, 中国) 和蛋白酶抑制剂 (Roche, 加拿大), 离心除去细胞碎片 (10000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min), Bradford 蛋白测定试剂盒 (碧云天, 中国) 测定蛋白质浓度。将含有 40  $\mu\text{g}$  蛋白的细胞提取物样品加入浓缩胶为 5%、分离胶为 8% 的 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-聚丙烯酰胺凝胶) 进行电泳, 分离后转移到聚偏氟乙烯滤膜上 (Life Technologies, 美国)。抗 CD13 抗体检测使用 1:100 一抗 (Santa Cruz, 美国) 和 1:400 过氧化物酶标记的二抗 (Life Technologies, 美国)。转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 小时后加入 H-300 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 漂洗 30 min 后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 2 小时后显影。在膜上的抗原-抗体复合物用 ECL 蛋

白质印迹检测系统 (Thermo Scientific, 美国) 与 ChemiDOC XRS+ (Bio-Rad, 美国) 进行观测。采用  $\beta$ -肌动蛋白作为内参对照。

### 2.13 细胞免疫荧光染色

取对数期生长的 HT-1080 或 HT-29 细胞以质量分数 0.25% 胰酶消化后制备单层细胞爬片, 以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种到 24 孔板中培养过夜。4% 多聚甲醛固定细胞 10 min 后, 晾干。预热 PBS 洗涤 3 次 (5 min/次)。然后将细胞与 3% BSA 温育 30 min 以阻断非特异性结合, 接着与抗 CD13 抗体 (Santa Cruz, 美国) 温育, 4°C 过夜, 抗体用含 1% BSA 的 PBS (pH 值 7.4) 稀释至 1:50。第二天, PBS 洗涤细胞 3 次 (5 min/次), 与二抗 (山羊抗兔 IgG 异硫氰酸酯 (FITC) 偶联的抗体, 1:400, Life Technologies, Grand Island, 纽约, 美国) 避光温育 45 min, PBS 洗涤 3 次 (5 min/次) 后, DAPI 复染细胞核。使用 IX71 荧光显微镜进行显像观察 (Olympus, 日本)。

### 2.14 细胞结合试验

HT-1080 细胞 ( $1 \times 10^6$  个/孔) 均匀接种在 12 孔培养板, 培养过夜。将细胞用冰冷的结合缓冲液 (25 mM HEPES 和 1% BSA) 洗涤两次, 每次 2 min。然后将细胞与  $^{99m}\text{Tc}$  标记线性 NGR 肽 (YGGCNGRC) 温育, 与不同浓度的 DOTA-NGR1 或 DOTA-NGR2 共孵育 1 小时。然后使用冰冷的结合缓冲液洗涤 3 次 (5 min/次), 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 细胞的放射性计数用  $\gamma$  计数器测定, 使用 Graph-Pad Prism 5.0 软件 (Graph-Pad, 美国) 进行非线性回归分析数据, 拟合出两种肽的 50% 抑制浓度 (IC<sub>50</sub> 值)。实验重复三遍。

### 2.15 细胞摄取和流出研究

HT-1080 或 HT-29 细胞以  $2.5 \times 10^5$  细胞/孔的密度于接种到 48 孔板中, 培养过夜后。肿瘤细胞与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 肽 (370 KBq/孔) 在 37°C 下温育 15、30、60 和 120 min。每个时间点用冰冷 PBS 洗涤肿瘤细胞 3 次 (5 min/次), 并用 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA (Life Technologies, 美国) 收集细胞, 期间用光学显微镜观察以确保细胞完全脱离。细胞悬浮液被收集并用  $\gamma$  计数器 (Perkin-Elmer Packard Cobra, 美国) 进行放射性计数。细胞摄取的结果按照加入总放射性衰变校正后的百分比计算, 每个浓度 3 个复孔, 实验重复 2 次。对于流出实验, 48 孔板中 HT-1080 和 HT-29 细胞分别加入  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 肽 (370 KBq/

孔), 在 37°C 温育 2 小时使其内化。然后将细胞用冰 PBS 洗涤 2 次 (5 min/次), 用 PBS 孵育细胞 15、30、60 和 120 min。每个时间点用 PBS 洗涤 3 次 (5 min/次) 后用胰蛋白酶消化收集细胞, 细胞悬浮液被收集并在  $\gamma$  计数器进行测定。细胞流出结果按照加入总放射性衰变校正后的百分比计算, 每个浓度 3 个复孔, 实验重复 2 次。

## 2.16 动物模型

所有动物研究根据南加州大学实验动物管理和使用委员会批准协议执行。雌性无胸腺裸鼠 (大约 4~6 周龄, 体重 20~25 g) 购自 Harlan Laboratories 公司 (Livermore, 美国)。HT-1080 人纤维肉瘤细胞和 HT-29 人结肠腺癌细胞通过在雌性无胸腺裸小鼠前肢皮下注射肿瘤细胞构建右上肢荷瘤模型, 约  $5 \times 10^6$  个 HT-1080 细胞悬浮于 50  $\mu$ l 无血清培养基和 50  $\mu$ l BD 基质胶 (Biosciences 公司, 美国) 形成肿瘤移植模型。肿瘤生长约 3~4 周, 游标卡尺测量肿瘤的直径, 肿瘤直径达到 0.8~1.0 cm 时可用于后续的体内外研究。

## 2.17 小动物 PET 成像和封闭实验

小动物 PET 扫描和显像分析使用啮齿动物扫描仪 (小动物 PET R4 扫描仪, 西门子) 进行。2% 异氟烷麻醉下, 每只小鼠静脉注射约 7.4 MBq  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 肽, 分别于注射后 1、2 和 4 小时进行 5 min 静态扫描, 注射 24 小时后进行 10 min 静态扫描。采集图像进行二维有序子集最大期望值 (OSEM) 算法重构。通过勾画衰减校正后的全身冠状图像上肿瘤、正常组织和主要器官的感兴趣区, 获得肿瘤、肌肉、肝脏和肾脏在多层感兴趣区的平均放射性浓度, 然后转换为 %ID/g。对于封闭实验组, 7.4 MBq  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 与 20 mg/kg NGR 肽 [c(CNGRC)] 共注射 4 小时后进行 5 min 静态扫描采集图像。

## 2.18 生物分布实验

HT-1080 或 HT-29 的荷瘤裸鼠 (每组 5 只), 分别经尾静脉注射 7.4 MBq  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2。注射后 24 h 处死小鼠并进行解剖分离, 收集血液、肿瘤、主要器官和组织并称重, 随后使用  $\gamma$  计数器 (Perkin-Elmer Packard Cobra, 美国) 测定组织的放射活性, 计算每克组织的百分注射剂量率 (%ID/g)。

## 2.19 统计学分析

定量数据表示为平均值  $\pm$  标准差，使用单向方差分析 (ANOVA) 和 Student's *t* 检验进行统计学分析， $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的制备

DOTA-NGR1 可通过一步法合成，产率高达 85% (图 1a)。DOTA-NGR2 肽的合成方案示于图 1b。最初，NGR2 肽通过活性酯法耦合 BocGlu(OSU)-OSu 与单体 NGR 肽 [GGGCNGRC，半胱氨酸形成二硫键 Cys: Cys = 4 - 8]，随后用 TFA 脱保护。Boc 保护的 Gly3 肽被激活后螯合 NGR2 肽。用 TFA 除去 Boc 基团后，所得到的肽螯合 DOTA-NHS 酯从而得到了 DOTA-NGR2 肽。这个合成需要五个步骤，总产率约 31%。经过衰减校正后， $^{64}\text{Cu}$  标记后 ( $n = 6/\text{组}$ ) 提示  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 放射化学纯度均  $> 99\%$ 。 $^{64}\text{Cu}$  标记的 DOTA-NGR1 或 DOTA-NGR2 多肽通过 HPLC 进行分析和纯化，可见  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 的 HPLC 保留时间为 15.58 min，而相同 HPLC 条件下  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的保留时间为 16.67 min (图 2)，而且在高效液相色谱分析中观察到  $^{64}\text{Cu}$  标记探针的保留时间和未标记的化合物之间没有显著差异。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的比活度大约为 37 MBq/nmol， $^{64}\text{Cu}$  标记的探针制备好后可以立即进行使用。

### 3.2 分配系数及体外稳定性

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的辛醇/水分配系数 ( $\log P$  值) 分别为  $-2.35 \pm 0.03$  和  $-2.54 \pm 0.07$ ，提示 NGR 单体和二聚体都是亲水性的。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在室温 PBS (pH 值 7.4) 和 37°C 小鼠血清中的体外稳定性在不同的时间点 (1、6 和 24 小时) 进行了检测。如图 3 所示，室温下孵育 24 h 后 PBS 中  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 的放射化学纯度大于 97.6%， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 则大于 97.2%；37°C 与小鼠血清共浴 24 小时后， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 的放射化学纯度大于 94.5%， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 大于 94.0%。上述结果提示  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 PBS 和小鼠血清中均显示出良好的体外稳定性。

### 3.3 蛋白免疫印记和细胞免疫荧光染色实验

在 HT-1080 细胞和 HT-29 细胞中 CD13 受体表达的蛋白免疫印迹结果见图 4a。HT-1080 细胞在 150 kDa 处可见提示 CD13 受体高表达的清晰条带，HT-29 细胞则未见条带，这表明 CD13 受体在 HT-1080 细胞中为过度表达。此外，细胞免疫荧光实验显示 HT-1080 细胞膜呈现强烈的绿色荧光信号，而 HT-29 细胞未见绿色荧光信号（图 4b），进一步证实 HT-1080 细胞是 CD13 受体阳性表达，HT-29 细胞是 CD13 受体阴性表达。

### 3.4 细胞结合实验分析

蛋白免疫印迹实验和细胞免疫荧光染色实验结果均表明人纤维肉瘤 HT-1080 细胞 CD13/APN 受体为高表达。因此，我们使用 HT-1080 细胞测量 DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 与 CD13 受体结合的亲和力。细胞竞争结合试验可见  $^{99m}\text{Tc}$  标记的线性 NGR 肽被用作 CD13 特异性的放射性配体。DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 的  $\text{IC}_{50}$  值代表其竞争取代  $^{99m}\text{Tc}$  标记的线性 NGR 肽结合到 HT-1080 细胞的 50% 所需的浓度，最终确定单体和二聚体的  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $1.27 \pm 0.25 \text{ nM}$  和  $0.62 \pm 0.29 \text{ nM}$ （图 5）。基于细胞的结合测定法表明，NGR 二聚体与 CD13 受体的亲和力约为 NGR 单体的 2 倍。

### 3.5 细胞摄取和流出试验

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的细胞摄取和流出实验在 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 细胞和 CD13 受体表达阴性的 HT-29 细胞进行了检测。肿瘤细胞与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 肽（370 KBq/孔）在  $37^\circ\text{C}$  下温育 15、30、60 和 120 min，每个时间点用冰冷的 PBS 洗涤肿瘤细胞后收集细胞进行  $\gamma$  计数。细胞摄取研究表明， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 均能有效结合 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 细胞，但是基本不与 CD13 受体表达阴性的 HT-29 细胞结合。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 在与 HT-1080 细胞温育 1 小时后，摄取率为  $0.78 \pm 0.04\%$ ，2 小时摄取率达到最大值  $1.00 \pm 0.08\%$ （图 6a 实线所示）。

细胞流出实验表明， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 与 HT-1080 细胞结合良好，与 PBS 共浴 2 小时后流出率只有约 0.4%（总输入放射性的从 1.00% 至 0.62%，图 6a 实线所示）。然而在 CD13 受体表达阴性细胞 HT-29 中， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 的 2 小时细胞摄取率

仅为  $0.27 \pm 0.06\%$  (图 6a 虚线所示), 其摄取和流出均保持在低水平。对于二聚体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2, HT-1080 细胞 2 小时摄取率为  $1.42 \pm 0.20\%$  (图 6b 左侧实线所示), 为单体摄取率的 1.4 倍。细胞流出研究结果表明,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 与 HT-1080 细胞结合牢固, 2 小时流出率约  $0.70\%$  ( $1.42\%$  到  $0.72\%$ ) (图 6b 实线所示)。与  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 类似,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 HT-29 细胞 2 小时的摄取率和流出率均保持在低水平, 分别为  $0.44 \pm 0.07\%$  和  $0.23 \pm 0.04\%$  (图 6b 虚线所示)。

### 3.6 $^{64}\text{Cu}$ 标记 DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 的小动物 PET 肿瘤显像

$^{64}\text{Cu}$  标记 DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 在 HT-1080 肿瘤 ( $n = 5/\text{组}$ ) 和 HT-29 肿瘤 ( $n = 5/\text{组}$ ) 的靶向显像使用多个时间点静态 PET 扫描 (1、2、4 和 24 小时) 获得。在注射  $^{64}\text{Cu}$  标记的 DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 探针后 1 小时, CD13 受体表达阳性 HT-1080 肿瘤模型可见肿瘤有明显摄取, 与对侧正常组织形成鲜明对比。而在 CD13 受体表达阴性 HT-29 肿瘤模型中仅可见肿瘤有微量摄取。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 注射后 4 小时经衰减校正的显像结果见图 7。实验数据提示注射探针后早期, 两种肿瘤模型均可见到主要摄取器官为肝脏和肾脏。肿瘤和主要组织器官的摄取通过在冠状位 PET 显像图上勾画感兴趣区获得。注射  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 后的时间-活度曲线显示了 HT-1080 肿瘤、肝脏、肾脏和肌肉的代谢变化 (图 8a 和图 8b)。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 组 HT-1080 肿瘤的摄取在注射后 1、2、4 和 24 小时分别为  $3.33 \pm 0.10$ 、 $3.09 \pm 0.20$ 、 $2.32 \pm 0.17$  和  $1.79 \pm 0.27\% \text{ID/g}$ 。放射性随着时间逐步从肝脏和肾脏迅速排出体外。肝脏摄取在注射后 1、2、4 和 24 小时分别为  $8.11 \pm 0.56$ 、 $7.65 \pm 0.76$ 、 $6.39 \pm 0.41$  和  $3.90 \pm 0.45\% \text{ID/g}$ , 肾脏摄取分别是  $8.80 \pm 0.51$ 、 $7.29 \pm 0.24$ 、 $4.61 \pm 0.47$  和  $0.72 \pm 0.21\% \text{ID/g}$ 。放射性探针在其他大多数器官 (除小肠) 的聚集处于非常低的水平。HT-1080 肿瘤的摄取在注射  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 后 1、2、4 和 24 小时分别是  $6.53 \pm 0.20$ 、 $6.09 \pm 0.18$ 、 $5.22 \pm 0.17$  和  $3.60 \pm 0.23\% \text{ID/g}$ 。相同的时间点二聚体探针在 HT-1080 肿瘤的摄取约为单体的 2 倍, 而  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在正常组织的聚集则类似于  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1, 主要表现在较早时间点 (注射后 1、2 和 4 小时) 时肝脏和肾脏摄取较高, 除了小肠外其余正常组织的摄取较低。二聚体的体内代谢特点类似单体, 均随着时间通过肝胆系统和泌尿系统排出体外。因为 HT-1080 肿瘤对  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的摄取在所有测量的

时间点均比  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  高，可见二聚体  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  较单体  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  具有更好的药代动力学特征。HT-1080 肿瘤及主要器官对  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  和  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  在注射后 4 小时的摄取结果见表 1。对于  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$ ，HT-1080 肿瘤摄取与肌肉、肝脏和肾脏吸收比分别为  $3.91 \pm 0.19$ 、 $0.35 \pm 0.21$  和  $0.52 \pm 0.27$ 。对于  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  相应的值分别为  $7.57 \pm 0.15$ 、 $0.81 \pm 0.24$  和  $1.06 \pm 0.32$ 。在 CD13 受体表达阴性的 HT-29 肿瘤模型中， $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  和  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  注射后 4 小时可见肿瘤微量摄取，正常器官和组织摄取值（肝、肾和肌肉）则类似于 HT-1080 荷瘤裸鼠模型（见表 1）。

表 1 HT-1080 和 HT-29 荷瘤裸鼠注射  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  和  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  后 4 小时经衰减校正后的生物分布实验结果<sup>a</sup>

组织	HT-1080 未封闭组		HT-1080 封闭组		HT-29 未封闭组	
	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$	$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$
组织百分注射剂量率/克 (%ID/g)						
肿瘤 (T)	$2.32 \pm 0.17$	$5.22 \pm 0.19$	$0.61 \pm 0.11$	$0.58 \pm 0.12$	$0.49 \pm 0.15$	$0.65 \pm 0.21$
肌肉 (M)	$0.59 \pm 0.06$	$0.69 \pm 0.08$	$0.49 \pm 0.09$	$0.65 \pm 0.10$	$0.43 \pm 0.11$	$0.40 \pm 0.12$
肝脏 (L)	$6.39 \pm 0.41$	$6.49 \pm 0.39$	$5.94 \pm 0.33$	$5.25 \pm 0.23$	$5.54 \pm 0.32$	$4.95 \pm 0.45$
肾脏 (K)	$4.61 \pm 0.47$	$5.01 \pm 0.42$	$4.25 \pm 0.38$	$4.57 \pm 0.40$	$3.95 \pm 0.48$	$5.24 \pm 0.39$
肿瘤/正常组织摄取比值						
T/M	$3.91 \pm 0.19$	$7.57 \pm 0.15$	$1.25 \pm 0.16$	$0.91 \pm 0.12$	$1.15 \pm 0.18$	$1.62 \pm 0.20$
T/L	$0.35 \pm 0.21$	$0.81 \pm 0.24$	$0.11 \pm 0.08$	$0.13 \pm 0.06$	$0.09 \pm 0.07$	$0.14 \pm 0.08$
T/K	$0.52 \pm 0.27$	$1.06 \pm 0.32$	$0.15 \pm 0.09$	$0.14 \pm 0.07$	$0.13 \pm 0.12$	$0.12 \pm 0.10$

<sup>a</sup>结果表示为平均数 ± 标准差 (n = 5/组)

### 3.7 封闭实验

$^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  和  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  的靶向特异性由共注射环状 NGR 肽 (20 mg 每千克小鼠体重) 进行封闭实验进一步得到了验证。 $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  或  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  共注射环状 NGR 肽 4 小时后经衰减校正后的冠状位图像见图 7。HT-1080 的肿瘤对于  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  的摄取在注射过量未标记 NGR 肽后显著降低，注射后 4 小时数据（见表 1）显示由  $2.32 \pm 0.17\% \text{ID/g}$  降到  $0.61 \pm 0.11\% \text{ID/g}$  ( $P < 0.01$ )。未标记 NGR 肽也轻微降低了肝脏和肾脏的放射性摄取，而肌肉对于  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  的摄取在封闭组和未封闭组间变化较小。 $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  相比

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 在肿瘤摄取特异性上相似, 4 小时肿瘤摄取数据 (见表 1) 显示由  $5.22 \pm 0.19\% \text{ID/g}$  降到  $0.58 \pm 0.12\% \text{ID/g}$  ( $P < 0.01$ )。综上所述的这些数据证实, 这两种  $^{64}\text{Cu}$  标记的 NGR 肽均是 CD13 受体特异性的 PET 探针。

### 3.8 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的体内生物分布

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的体外生物分布研究分别在 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 和 CD13 受体表达阴性的 HT-29 荷瘤小鼠模型上进行。如图 9 所示, 注射后 24 小时的生物分布结果提示组织放射性分布百分比 ( $\% \text{ID/g}$ ) 与小动物 PET 显像的定量分析结果是一致的。HT-1080 肿瘤对  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 的摄取分别是  $2.35 \pm 0.17$  和  $3.61 \pm 0.39\% \text{ID/g}$ , 而 HT-29 肿瘤摄取明显较低, 分别是  $0.38 \pm 0.09\% \text{ID/g}$  ( $P < 0.01$ ) 和  $0.61 \pm 0.09\% \text{ID/g}$  ( $P < 0.01$ )。此外, 这两种探针在注射 24 小时后主要组织和器官 (除了肝脏以外) 的摄取水平均极低。HT-1080 肿瘤组, 肝脏对单体和二聚体的摄取值分别为  $4.14 \pm 0.26\% \text{ID/g}$  和  $4.30 \pm 0.36\% \text{ID/g}$ , HT-29 肿瘤组则分别为  $3.64 \pm 0.23\% \text{ID/g}$  和  $3.98 \pm 0.26\% \text{ID/g}$ 。

## 4 讨论

正电子发射断层扫描 (PET) 是一种用于反映放射性标记探针给药后生理过程的活体成像技术<sup>[78, 175]</sup>。 $^{18}\text{F}$  氟代脱氧葡萄糖 ( $^{18}\text{F}$ -FDG) 是肿瘤学成像领域使用最广泛的 PET 探针。氟元素属于卤素, 放射性核素中适合医用的只有一种  $^{18}\text{F}$ , 半衰期 110 min, 通过  $\beta^+$  和 EC 衰变放出信号 (649 keV, 97%) 可以用于 PET 成像。 $^{18}\text{F}$  可以通过反应堆或者加速器产生, 化学性质活泼, 可以直接与碳氢化合物作用形成有机氟化物。 $^{18}\text{F}$ FDG-PET 可用于肿瘤的诊断、恶性程度和预后, 进行全身显像能够简易地探测肿瘤在全身的转移情况, 对疾病的分期和治疗决策有更重要的价值<sup>[176, 177]</sup>。 $^{18}\text{F}$ -FDG 作为一种广谱肿瘤功能性检查方法, 优点是实用性强, 然而一些良性增殖性病变也会有不同程度的显影, 常常存在需要鉴别假阴性和假阳性, 因此并不是一个肿瘤特异靶向性的 PET 探针。所以在过去的几十年里, 研究者们针对癌症可替代  $^{18}\text{F}$ -FDG 的特异性探针进行了广泛探索<sup>[110, 143]</sup>。

血管生成是肿瘤发生发展的基本过程, 研究表明 CD13 受体在肿瘤血管生成中发挥了关键的作用<sup>[16, 18]</sup>。CD13 是一种多功能的膜结合金属蛋白酶, 可以调节多种激素、细胞因子、蛋白质降解、抗原提呈、细胞增殖、细胞迁移和新生血管的生成。

CD13 在正常血管内皮细胞没有或很少表达, 在新生血管中却表达上调。除了肿瘤血管内皮细胞, 还有许多细胞包括肿瘤细胞、周细胞、成纤维细胞以及平滑肌细胞的某些阶段等也会表达较低水平的 CD13 受体。CD13 作为细胞表面标记物高表达于许多肿瘤细胞上<sup>[178]</sup>, 而含有 NGR 序列的多肽已被确定为 CD13 受体的特异性配体<sup>[10]</sup>。因此, 含 NGR 序列的衍生物靶向 CD13 受体的活体研究尤其引人注目, 据文献报道, 多种化合物和粒子包括细胞毒性药物、细胞因子、抗血管生成的化合物、病毒颗粒、荧光化合物、造影剂、DNA 复合物和其他生物反应调节剂<sup>[11, 13]</sup>, 可以人工结合加入 NGR 基序以增加新生血管的靶向性, NGR-TNF 也已进入 II 期临床试验研究。无创性检测 CD13 受体表达水平具有极大的临床应用价值, 能够基于受体的表达与否即表达密度筛选合适的患者进行相关治疗, 也更易准确评估靶向 CD13 受体治疗的疗效。

PET 放射性核素除了两种常规的  $^{18}\text{F}$  和  $^{11}\text{C}$ , 一些非常规的金属放射性核素, 如  $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$  和  $^{89}\text{Zr}$  也已经被用作制备 PET 探针<sup>[179]</sup>。这些金属正电子同位素通常具有较长的半衰期, 使得对同一对象进行几小时到几天时间的放射性药物动力学评估成为可能。在这些金属的放射性核素中,  $^{64}\text{Cu}$ ( $t_{1/2} = 12.7$  小时,  $\beta^+$  655 keV, 17.8%) 因为其良好的衰减时间、低  $\beta^+$  能量和商用可获得性得到了众多研究者的青睐<sup>[180-182]</sup>。 $^{64}\text{Cu}$  与生物分子螯合过程将通过配位化学从而被对应的螯合剂被捕获, 可用于  $^{64}\text{Cu}$  标记的 PET 探针已经被众多文献所报道<sup>[180, 183, 184]</sup>。

因此, 本部分实验成功合成了单体和二聚体的 NGR 肽并进行了放射性  $^{64}\text{Cu}$  标记(图 1 和 2)。对单体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和二聚体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 分别进行了体内外评估和 CD13 受体的小动物 PET 成像。体外实验表明  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在室温 PBS 和 37°C 小鼠血清中放置 24 小时后依然很稳定,  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 与小鼠血清在 37°C (图 3) 温育 24 小时后放射化学纯度仍超过 94%。为了选择合适的靶向 CD13 受体的肿瘤细胞系, 我们用蛋白质印迹实验和细胞免疫荧光染色验证了人纤维肉瘤 HT-1080 细胞和人结肠腺癌 HT-29 细胞的 CD13 受体表达水平, 了解到 HT-1080 细胞为 CD13 受体高度阳性表达, HT-29 细胞为 CD13 受体阴性表达(图 4)。随后, 使用 HT-1080 细胞竞争结合分析结果表明单体和二聚体 NGR 肽与 CD13 受体的结合亲和力分别为  $1.27 \pm 0.25$  nM 和  $0.62 \pm 0.29$  nM (图 5), 即 NGR 二聚物与 CD13 亲和力约为单体 NGR 肽的 2 倍。细

胞摄取实验结果进一步表明这两种探针均能结合 CD13 阳性的 HT-1080 细胞，但基本不与 CD13 表达阴性的 HT-29 细胞结合（图 6）。经过 2 小时温育后， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 HT-1080 细胞的总摄取率比  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 高，而两者在 CD13 阴性表达的 HT-29 细胞中摄取率明显低于 HT-1080 细胞。此外，无论是单体还是二聚体在 HT-1080 细胞中均表现出良好的细胞存留。细胞流出实验证实 2 小时后只有约 0.40% 的  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 外流和 0.70% 的  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 外流。这些体外结果在动物模型的体内实验中进行了进一步评估。

通过尾静脉给荷瘤小鼠注射  $^{64}\text{Cu}$  标记的 DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 后进行小动物 PET 显像发现，HT-1080 肿瘤组织经过半定量分析表现出较高的肿瘤/本底比值。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 摄取较高的器官和组织主要是肿瘤、肝脏、肾脏和小肠，而大多数其他器官中的放射性摄取是非常低的。时间-放射性活度变化曲线分析发现  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 均是逐步通过肝脏和肾脏清除和排泄的。在所有测量时间点， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在 HT-1080 肿瘤的摄取均高于  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1，这可能归因于 NGR 多肽二聚体与 CD13 受体有较高的亲和力。此外  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 较大的分子量可能增加了探针的血液循环时间，从而延长了探针在肿瘤的留存时间。总体而言，二聚体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 较单体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 显示出更高的靶本比值和更好的药代动力学特征（图 7、8 和表 1）。HT-29 肿瘤组和 HT-1080 肿瘤组经过共注射过量未标记 NGR 肽和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 或  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2，PET 图像分析可见肿瘤均呈微量摄取（表 1），表明  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 是 CD13 受体特异性的 PET 显像剂，离体生物分布研究结果进一步支持了小动物在体 PET 显像结果。

双功能螯合剂是分子中具有强螯合力的基团，又能与生物大分子、单克隆抗体等蛋白形成共价键连接。目标生物分子接上双功能螯合剂后既能与放射性金属形成牢固结合，同时又由于螯合剂分子的分隔产生的距离避免了位阻作用，从而保证了其原本的生物活性，在这部分研究中我们选择了 DOTA 作为螯合剂用于合成  $^{64}\text{Cu}$  标记的 NGR 肽，在保证铜标记快速、顺利进行的同时保持了 NGR 肽与 CD13 受体的特异性识别和结合活性，并且对合成的 PET 探针进行了 CD13 受体的活体成像验证。对于  $^{64}\text{Cu}$  标记，DOTA 已被报道为一种常用的双功能螯合剂，一系列  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 连接的肽探针已被广泛开发并用于肿瘤成像<sup>[185-187]</sup>。然而，肝脏高摄取和相对较长的代

谢时间是  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 探针急需解决的问题之一，究其原因可能是  $^{64}\text{Cu}$  与 DOTA 螯合剂在体内的缓慢解离导致的， $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 螯合物的不稳定会导致脱离的金属积累在非靶组织和器官中（如肝脏）<sup>[188]</sup>。在这项研究中，PET 显像和生物分布研究均证实  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 在小鼠肝脏有积聚和留存。 $^{64}\text{Cu}$  标记较好的螯合体系如 TETA (1, 4, 8, 1-四氮杂-N, N', N'', N'''-四乙酸)、跨桥 Cyclam 配体 (1, 4, 8, 11-四氮杂环十四烷) 以及 sarcophagine (3, 6, 10, 13, 16, 19-hexaazabicyclo [6.6.6]二十烷) 均可以提高金属螯合物的稳定性并表现出更好的药代动力学特征<sup>[186, 189, 190]</sup>。另外，进一步改进  $^{64}\text{Cu}$  标记 NGR 肽的药代动力学需要选择一个合适的连接体，从而使其拥有合适的长度、亲水性、柔韧性以及电荷<sup>[134, 191, 192]</sup>。此外，进一步研究人体正常器官和组织(如肝肾)CD13 受体的表达水平也是保证含 NGR 序列 PET 探针能更好进行临床成像应用的基础。

## 第二部分 NGR-VEGI 融合蛋白靶向肿瘤血管的 光学成像研究

### 1 材料与仪器

所有的化学物质（试剂级）购自商业供应商，无需进一步纯化即可使用。单体 NGR 肽[CNGRC, 半胱氨酸构成二硫键 Cys: Cys = 1 - 5]购自美国 CS 生物公司。Cy5.5 单官能性 NHS 酯(Cy5.5-NHS)和 PD-10 柱购自美国 GE 公司。实验用水取自 Milli-Q 超纯水系统（Millipore 公司，美国），生物耦合与放射性标记前通过 Chelex 100 树脂纯化。

### 2 方法

#### 2.1 NGR-VEGI 融合蛋白的合成

NGR-VEGI 表达质粒 pET28a-NGR-VEGI 按照文献描述方法构建<sup>[193]</sup>。简言之，NGR-VEGI 的 cDNA 编码区（人 VEGI 基因 N 端融合 CNGRCVGCAGRC），通过含有 VEGI cDNA 序列的质粒 PCR 获得，引物如下：5'-ACC ATA TGG TAT ACA CGT TGC CG-3'（5'端引物）；5'-GTC TCG AGT TAG AGC AGA AAC GC-3'（3'端引物）。引物序列设计包含 NdeI 和 XhoI 限制性内切位点可经 PCR 克隆到原核表达载体 pET28a 中（Novagen 公司，德国）。NGR-VEGI 蛋白纯化由中国百奥迈科生物技术有限公司按照标准方法进行，即 Origami B (DE3)菌株经诱导表达后进行亲和层析纯化。含菌培养液经 0.5 mM IPTG 诱导 4 小时后，10000 g × 10 min 离心收集沉淀，以 10 mg/mL（湿重）的浓度溶解在裂解缓冲液（100 mM 磷酸二氢钠，10 mM 的 Tris-盐酸，8 M 尿素，pH 8.0）中并进行超声破碎，接着裂解物离心 10000 g × 30 min 去除细胞碎片沉淀。上清液 Ni-NTA 树脂（EMD Millipor，美国）用酸性洗脱条件（pH 值 4.0）进行纯化。收集目标洗脱液后进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝 R-250 染色。目标蛋白用去离子水稀释后透析、离心、分离并收集，最终产物冻干后保存在-80℃冰

箱中 (Labconco, 美国)。

## 2.2 Cy5.5 荧光标记 NGR-VEGI

NGR-VEGI (0.5 mg, 0.024  $\mu\text{mL}$ ) 溶解在 150  $\mu\text{l}$  硼酸钠缓冲液 (0.02 M, pH 值 8.5), 与溶解于 5  $\mu\text{L}$  DMSO 中的 Cy5.5-NHS (0.027 mg, 0.024  $\mu\text{mL}$ ) 进行混合。混合物在室温下避光震荡 2 小时后用 PD-10 柱进行纯化, 收集淡蓝色终产物 Cy5.5-NGR-VEGI, 避光冻干后储存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  条件下备用 (0.45 mg, 收率: 86%)。

## 2.3 细胞培养

人纤维肉瘤细胞 (HT-1080) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自美国典型培养物保藏中心。DMEM 培养基 (美国南加州大学细胞培养中心) 含 10% FBS、青霉素和链霉素 (100 IU/mL), 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。

## 2.4 流式细胞检测蛋白功能

HUVEC 细胞于实验前 24 小时接种于 6 孔板, 密度  $2.0 \times 10^5$  个/孔。然后分别加入 NGR 多肽 (20 nM)、VEGI 蛋白 (20 nM) 和纯化的 NGR-VEGI 蛋白 (20 nM) 共同温育 12 小时。PBS 液洗涤 3 次后, 细胞用 500  $\mu\text{L}$  含 FITC-膜联蛋白 V (FITC-Annexin-V) 和碘化丙啶 (PI) (碧云天公司, 中国) 的结合液重悬浮, 避光温育 15 min, 随后使用通过流式细胞仪分析结果 (FACS Calibur 流式细胞仪, 美国)。

## 2.5 测定吸收和发射光谱

Cy5.5-NGR-VEGI 蛋白的吸收光谱通过 Cary 14 紫外-可见光分光光度计 (美国) 进行测定, 扫描频谱是 550~800 nm, 增量为 1 nm。Cy5.5-NGR-VEGI 的荧光发射光谱使用 RF-5301Pc 荧光分光光度计 (岛津公司, 日本) 进行测定, 扫描频谱为 550~800 nm, 增量为 1 nm。激发光波长为 650 nm。

## 2.6 Cy5.5-NGR-VEGI 体外荧光成像

HT-1080 细胞于实验前 24 小时以  $5 \times 10^4$ /孔的密度接种于 4 孔培养腔室玻片系统 (VWR 公司, 美国)。预热无血清 DMEM 培养基洗涤细胞 3 min 后, 加入 4% 多聚甲醛固定 10 min, 然后用无血清的 DMEM 培养基洗涤 3 次, 3 min/次。HT-1080 细胞与含 2  $\mu\text{M}$  Cy5.5-NGR-VEGI 的 200  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$  下避光温育 30 min, 随后 PBS 洗涤 3 次, 5 min/次。封闭组中, HT-1080 细胞与含 Cy5.5-NGR-VEGI

蛋白 (2  $\mu\text{M}$ ) 和未标记 NGR 多肽 (2 mM) 的 200  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 温育。然后加入含 DAPI (4', 6-二脒-2-苯基吡啶) 的固定液, 盖上盖玻片, 避光风干并封片后在 LSM 510 共聚焦激光扫描显微镜下进行观察 (Zeiss, 德国)。

## 2.7 动物模型

所有动物研究根据南加州大学实验动物管理和使用委员会批准协议执行。雌性无胸腺裸鼠 (4~6 周龄, 体重为 20~25 g) 购自 Harlan Laboratories 公司 (Livermore, 美国)。通过皮下注射 HT-1080 细胞悬浮液构建右上肢荷瘤模型, 约  $5 \times 10^6$  个 HT-1080 细胞悬浮于 50  $\mu\text{l}$  无血清培养基和 50  $\mu\text{l}$  BD 基质胶 (Biosciences 公司, 美国)。游标卡尺测量肿瘤的长短径, 肿瘤直径达到 0.8~1.0 cm 时用于后续研究。

## 2.8 体内外 NIRF 成像

活体荧光成像使用 IVIS 成像系统 200 系列进行, 并使用 IVIS 活体成像软件 4.4 (PerkinElmer 公司, 美国) 进行分析。Cy5.5 滤波器用于采集荧光信号。实验中所有的图像均使用相同的参数设置 (灯电压、过滤器、f/stop、视野、小区化设置)。荧光图像对比使用单位为 P/S/cm<sup>2</sup>/sr。非封闭组小鼠 (n = 6/组) 经静脉注射 1.5 nmol Cy5.5-NGR-VEGI, 注射后分别于各个时间点进行光学成像。封闭组小鼠 (n = 6/组) 经静脉同时注射 Cy5.5 NGR-VEGI (1.5 nmol) 和未标记 NGR-VEGI 蛋白 (20 mg/kg)。所有 NIRF 图像的曝光时间均为 1s (f/stop=4)。显像过程中动物持续吸入 2% 异氟醚进行麻醉。非封闭组小鼠 (n = 3/组) 和封闭组小鼠 (n = 3/组) 分别于注射 8 小时后处死, 解剖分离肿瘤和主要组织、器官并进行离体荧光成像, 肿瘤和器官的荧光强度勾画感兴趣区后进行确定, 每个样本的荧光强度均使用软件勾画后获得的平均值进行描述。

## 2.9 统计学分析

所有数据均表示为平均值  $\pm$  标准差, 比较使用单向方差分析 (ANOVA) 和 Student's t 检验进行统计分析,  $P < 0.05$  具有统计学意义。使用 IVIS 活体成像软件 4.4 分别勾画感兴趣区后肿瘤与本底对比度即右上肢肿瘤 (T) 区域的荧光强度和周围正常组织 (N) 荧光强度的比值, T 除以 N 即可得到肿瘤与正常组织的对比度。

### 3 结果

#### 3.1 NGR-VEGI 蛋白合成和鉴定

NGR-VEGI 融合蛋白通过 Origami B (DE3) 宿主菌成功制备 (图 11 所示), SDS-PAGE 结果提示 NGR-VEGI 蛋白未经 IPTG 诱导不能表达, 0.5 mM IPTG (异丙  $\beta$ -D-1-硫代半乳糖苷) 37°C 诱导 4 小时后 NGR-VEGI 蛋白出现高表达。NGR-VEGI 融合蛋白共计 186 个氨基酸, 分子量约 21 kDa, 亲和层析后可得到高纯度的目标蛋白 NGR-VEGI。

#### 3.2 流式细胞术检测 NGR-VEGI 蛋白诱导细胞凋亡

HUVEC 细胞于实验前 24 小时接种于 6 孔板并分别加入 NGR 多肽 (20 nM)、VEGI 蛋白 (20 nM) 和纯化的 NGR-VEGI 蛋白 (20 nM) 共同温育 12 小时。预热 PBS 液洗涤细胞后加入 FITC-膜联蛋白 V 和碘化丙啶结合液避光温育 15 min。随后使用流式细胞仪 FITC-Annexin V/PI 双标记染色法检测 NGR-VEGI 蛋白对 HUVEC 细胞的生长抑制作用, 结果见图 12。对照组、NGR 肽、VEGI 和 NGR-VEGI 分别处理 HUVEC 细胞后, 凋亡率显示为 FITC-Annexin V 阳性的细胞比例。NGR-VEGI 蛋白诱导凋亡率为 24.21%, 明显高于空白组 (1.13%) 和 NGR 组 (2.91%), 较 VEGI 蛋白作用略大 (22.54 %), 表明经 IPTG 诱导表达产生的 NGR-VEGI 融合蛋白还保有 VEGI 蛋白的功能。

#### 3.3 荧光分光光度计测定 Cy5.5-NGR-VEGI 的吸收波长和发射波长。

Cy5.5-NGR-VEGI 的荧光吸收波长和荧光发射波长见图 13, 可见最大吸收波长和荧光发射波长分别是 673 nm 和 693 nm。

#### 3.4 Cy5.5-NGR-VEGI 的细胞结合特异性

HT-1080 细胞与含 2  $\mu$ M Cy5.5-NGR-VEGI 的 200  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养基在 37°C 下避光温育 30 min, 随后用 PBS 进行洗涤, 封闭实验组 HT-1080 细胞与含 Cy5.5-NGR-VEGI 蛋白 (2  $\mu$ M) 和未标记 NGR 多肽 (2 mM) 的 200  $\mu$ l 无血清 DMEM 温育。最后加入含 DAPI(4', 6-二脒-2-苯基吡啶)的固定染色液, 确定 Cy5.5-NGR-VEGI 与 CD13 受体的结合特异性和亚细胞定位。Cy5.5-NGR-VEGI 与 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 细胞在激光共聚焦显微镜下进行观察结果见图 14。HT-1080 细胞表面可

以观测到明显的红色荧光，细胞质内也可见到一些红色荧光信号。此外，HT-1080 细胞与 Cy5.5-NGR-VEGI 以及大量未标记 NGR-VEGI 共同温育后红色荧光明显降低消失，提示 Cy5.5-NGR-VEGI 与 HT-1080 细胞 CD13 受体的结合是特异性的。

### 3.5 肿瘤特异性 Cy5.5-NGR-VEGI 探针的小动物在体荧光成像

为了确定 Cy5.5-NGR-VEGI 的体内肿瘤特异性，HT-1080 荷瘤裸鼠模型经尾静脉注射 1.5 nmol Cy5.5-NGR-VEGI 后进行了近红外荧光成像（图 15a 所示）。非封闭组小鼠（n = 6/组）经静脉注射 1.5 nmol Cy5.5-NGR-VEGI，注射后分别于各个时间点进行光学成像，所有 NIRF 图像的曝光时间均为 1s（f/stop=4）。注射后 4 小时图像显示，HT-1080 肿瘤与正常组织具有良好的对比度，T/NT 值在注射后 8 小时达到最高。HT-1080 肿瘤和肌肉的荧光强度随时间变化见图 15b。HT-1080 肿瘤摄取在注射后 6 小时达到最高值，随后逐步缓慢下降，同时探针与正常组织的结合速度快、解离速度也快。注射后 24 小时光学成像结果提示肌肉对 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取值整体明显低于 HT-1080 肿瘤的摄取值。

Cy5.5-NGR-VEGI 与 CD13 受体体内结合的特异性经封闭实验进行了验证，即封闭组荷瘤裸鼠经静脉同时注射 1.5 nmol 的 Cy5.5-NGR-VEGI 和未标记的 NGR-VEGI（20 mg/kg），而未封闭组只注射相同剂量的 Cy5.5-NGR-VEGI。结果显示在注射后各个时间点，未标记 NGR-VEGI 明显降低了肿瘤对标记探针 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取。ROI 勾画分析得到了靶本比值，注射 8 小时后肿瘤/肌肉比值由  $14.98 \pm 2.48$  降低到  $3.51 \pm 0.85$  ( $P < 0.05$ )。HT-1080 荷瘤裸鼠注射 Cy5.5-NGR-VEGI 后 8 小时的光学成像见图 16。

### 3.6 Cy5.5-NGR-VEGI 的体外成像

体外成像结果与体内成像结果一致，非封闭组小鼠（n = 3/组）和封闭组小鼠（n = 3/组）于注射 8 小时后处死，解剖分离肿瘤和主要组织、器官并进行离体荧光成像，肿瘤和器官的荧光强度经勾画感兴趣区后进行确定，每个样本的荧光强度均使用软件勾画后获得的平均值进行描述。体外成像结果提示非封闭组 Cy5.5-NGR-VEGI 主要由 HT-1080 肿瘤摄取（图 17 所示）。除了肿瘤，Cy5.5-NGR-VEGI 在肝脏的摄取值最高。封闭实验组共注射 Cy5.5-NGR-VEGI（1.5 nmol）和过量 NGR-VEGI（20 mg/kg），HT-1080 荷瘤裸鼠对 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取整体下降，封闭组肿瘤的荧

光强度与未封闭组比较明显下降 ( $P < 0.05$ ), 提示了 Cy5.5-NGR-VEGI 的体内靶向特异性。体外成像结果定量分析显示未封闭组和封闭组肿瘤和主要器官组织在注射 Cy5.5-NGR-VEGI (1.5 nmol) 8 小时后肿瘤/肌肉比值分别是  $18.93 \pm 2.88$  和  $4.92 \pm 0.75$  ( $P < 0.05$ )。此外, 未封闭组肿瘤/肝脏和肿瘤/肾脏比值分别是  $0.86 \pm 0.12$  和  $2.58 \pm 0.34$ , 而封闭组则是  $0.29 \pm 0.35$  和  $0.86 \pm 0.55$ 。

## 4 讨论

众所周知, VEGI 具有抑制新生血管内皮细胞从而抑制肿瘤生长的功能。对于内皮细胞, VEGI 一般通过两种生物学方式来发挥作用<sup>[194]</sup>, 一是使早期 G1 期细胞停滞于 G0 / G1 期, 二是促进增殖细胞的程序性死亡。VEGI 通过激活 C-Jun N 末端激酶诱导内皮细胞的凋亡则是上述作用可能的内在机制<sup>[64]</sup>。VEGI 的剪接同型体已被发现, 即 VEGI-174、VEGI-251 和 VEGI-192<sup>[63, 195]</sup>。它们在 C-末端拥有相同的 151 个残基, 却具有不同的 N 末端区域。VEGI 能通过新生血管形成, 是最有前途的抗癌制剂之一, 但是天然 VEGI 数量有限从而阻止了其临床转化, 目前开发重组 VEGI 及其类似物是解决临床前及临床研究需要的有效替代方式。Chen 等<sup>[196]</sup>发现合成的 rhVEGI-192 具有较高产率且其抗血管生成活性可能与 rhVEGI-192 能形成聚合物结构有关。此外, 异位表达的 VEGI-251 也能诱导肿瘤血管内皮细胞的凋亡、降低微血管密度, 从而拥有抑制肿瘤生长的作用<sup>[197-199]</sup>。

分子成像, 尤其是正电子发射断层扫描 (PET) 对各种疾病的诊断和疗效评价越来越重要, 因此应用也越来越普遍。与此同时, 各类可以在人体内进行特异性累积且具有可视化靶向性的仿 PET 示踪剂需求也开始不断增长。除了开发可单独用于 PET 显像的试剂外, 近来研究趋势倾向于合成可同时进行 PET 和光学成像 (OI) 的双功能成像探针, 从而结合了各自的成像优点, 既拥有通过 PET 核素发射  $\gamma$  射线的高组织穿透性, 为临床提供优质的 PET 图像, 同时允许定量成像从而进行肿瘤识别, 全身可视化检测还能获得转移病灶信息。光学成像与 PET 显像相反, 光子还具有通量大、显像便捷的优点, 其有限的组织穿透性让外科医生能在术中明确肿瘤边缘显影并区别周边播散淋巴结, 同时还可以避免不必要的辐射剂量。因此, 具备结合肿瘤疾病成像和治疗功能的 PET 和 OI 双功能探针也是研究的一个新热点<sup>[200]</sup>。虽然 OI 中因为荧光探针发出的光具有有限的组织穿透性, 限制了全身体内成像的适用性,

但是利用表面成像良好的空间分辨率和灵敏度使得术中成像引导手术成为了一个有价值的尝试<sup>[201-203]</sup>，特别是针对乳腺癌、前列腺癌以及恶性黑色素瘤这些肿瘤，预后很大程度上取决于患者是否存在淋巴结转移<sup>[204-206]</sup>。

新型诊治生物材料就需要通过同时输送诊断显像剂和治疗药物推动生物医药领域走向个性化医疗。在以前的研究中，研究者们已经开发了多种含 NGR 肽序的成像探针，均可特异性结合具有血管生成调节作用的 CD13 受体<sup>[121, 122, 207, 208]</sup>。本研究融合蛋白 NGR-VEGI 结合了 NGR 和 VEGI 的生物学活性，进行荧光标记后得到了诊治一体化的新型光学探针。SDS-PAGE 蛋白电泳结果显示经 0.5 mM IPTG 诱导后 NGR-VEGI 融合蛋白出现高表达，经亲和层析纯化后得知其分子量约 21 kDa。NGR-VEGI 蛋白的生物学功能依靠 HUVEC 细胞生长抑制的流式细胞术分析进行测定。同浓度 NGR-VEGI 作用后 HUVEC 细胞凋亡率明显高于对照组和 NGR 肽组。以上结果表明，NGR-VEGI 融合蛋白仍保留了 VEGI 的生物学活性。Cy5.5 染料作为广泛使用的市售近红外检测染料，被用作本部分研究的生物标记。标记后纯化得到的 Cy5.5-NGR-VEGI 在近红外区显示出的最大吸收波长为 673 nm，发射波长为 693 nm（图 13 所示）。对 Cy5.5-NGR-VEGI 进行体外鉴定，激光共焦显微镜结果表明 Cy5.5-NGR-VEGI 具有 CD13 受体靶向特异性（图 14 所示），此外激光共焦显微镜镜下在 HT-1080 细胞胞内也发现了 Cy5.5-NGR-VEGI，一种可能的解释是蛋白进行荧光染料标记后增加了探针的亲脂性从而促进了配体的内化，但是 Cy5.5-NGR-VEGI 的细胞内化机制仍需进一步研究。

Cy5.5-NGR-VEGI 的肿瘤靶向性在 HT-1080 纤维肉瘤荷瘤裸鼠模型上进行了评估。体内光学成像的研究表明（图 15 所示），静脉注射 Cy5.5-NGR-VEGI 8 小时后非封闭组显示出优异的肿瘤/本底比值，肿瘤摄取高且保留时间长，Cy5.5-NGR-VEGI 在肿瘤的代谢明显低于其余组织，致使注射后 8 小时~20 小时肿瘤/正常组织比值较高，肿瘤显示良好。封闭实验提示通过共注射 Cy5.5-NGR-VEGI 和过量未标记的 NGR-VEGI 蛋白（20 mg/kg），8 小时后肿瘤的摄取显著减少（ $P < 0.05$ ），体内实验结果证明 Cy5.5-NGR-VEGI 是 CD13 受体特异性探针（图 16 所示）。体外 NIRF 成像结果进一步验证了体内结果，封闭组 HT-1080 肿瘤对 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取明显低于非封闭组（ $P < 0.05$ ），再次表明 Cy5.5-NGR-VEGI 的靶向特异性。体外成像定量分析显示注射 8 小时后肿瘤/肌肉比值高达  $18.93 \pm 2.88$ 。

体外 NIRF 图像可见除了 HT-1080 肿瘤具有高摄取, 肝脏对 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取也较高, 这表明 Cy5.5-NGR-VEGI 的主要代谢途径是肝脏代谢。为了进一步优化 NGR-VEGI 蛋白的药代动力学, 减少肝脏摄取, 适当引入亲水性元素改善 NGR-VEGI 蛋白的体内生物分布是一种可行的途径<sup>[75]</sup>。例如, Mario 等对 VEGF 衍生环肽(环状 VEGI)进行化学修饰, 将其与亲水性连接体结合, 研究结果证明该化学修饰方法增强了 VEGI 衍生环肽的生物学活性。此外, 配体多聚化已被证明是增加配体与其生物靶点结合亲和力的有效方式, 同时能有效降低配体的非特异性结合。例如, 有研究表明含有重复环状 RGD 单元的多聚体化 RGD 肽显著增强了 RGD 配体与整合素  $\alpha v\beta 3$  受体的亲和力<sup>[129-131]</sup>。前期实验也证明 NGR 二聚体与 CD13 受体的结合亲和性较 NGR 单体高<sup>[207, 208]</sup>。采用多价效应的策略提高了靶点的局部配体浓度, 增加了配体-受体结合速率的同时降低了其解离速度。在今后的工作中可以将 NGR 多聚体引入 NGR-VEGI 融合蛋白结构中从而进一步提高探针的靶向特异性。基于本研究已证实的结果, 未来的研究计划还包括设计合成含 NGR-VEGI 的纳米粒子, 保证探针具有更大的表面积与体积比<sup>[209]</sup>, 从而为发展靶向肿瘤血管的生物材料提供契机。

## 第三部分 $^{188}\text{Re}$ 标记 NGR-VEGI 的核素显像和 治疗研究

### 1 材料与仪器

所有商品用化学品（试剂级）购自公司，无需进一步纯化即可使用。 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 由 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ 发生器（ITM Isotopen Technologien München AG，德国）按标准淋洗流程获得。实验用水经 Milli-Q 超纯水系统（Millipore 公司，美国）纯化，生物耦合与放射性标记前通过 Chelex 100 树脂纯化。放射性-TLC 使用硅胶被覆塑料片，流动相分别为 100% 丙酮和水相混合液（ $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{氨水}}=2:5:1$ ），层析结果在 Bioscan 微型扫描仪（美国）中进行检测并通过 Allchhrom Plus 软件进行分析。

### 2 方法

#### 2.1 NGR-VEGI 的表达和纯化

NGR-VEGI 蛋白的表达和纯化如前所述<sup>[210]</sup>。简言之，NGR-VEGI 表达质粒 pET28a-NGR-VEGI 使用 BL21 (DE3) pLysS 或 Origami B (DE3) (Transgen) 在大肠杆菌宿主合成，细菌培养液为 Luria-Bertani，使用 IPTG 进行蛋白诱导表达。NGR-VEGI 的表达和纯化根据标准方法由百奥迈科生物技术有限公司（中国）合成。

#### 2.2 NGR-VEGI 蛋白的 $^{188}\text{Re}$ 标记

$^{188}\text{Re}$  标记 NGR-VEGI 蛋白方法依照文献所述，略有改动<sup>[37, 39]</sup>。简而言之，冻干获得的融合蛋白以 5 mg/mL 的浓度溶解在双蒸水中，取 10  $\mu\text{g}$  NGR-VEGI 加入含有 20 mg/mL 抗坏血酸（Sigma-Aldrich，美国）的乙酸钠缓冲液中（200  $\mu\text{L}$ ，0.01 M，pH 值 5.2），然后添加新鲜的锡溶液（10 mg/mL  $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，20 mmol/L HCl）。反应混合物在 45 $^\circ\text{C}$  温育 90 min。专用盐水从  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  标记发生器洗脱出新鲜  $^{188}\text{ReO}_4^-$  溶液（ $\sim 37$  MBq）后加入到该混合物中，室温下温育 30 min。 $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的放

放射性标记产率和放射化学纯度是由放射性-TLC 确定，所需产物重新溶解于磷酸盐缓冲盐水（PBS）中以备使用。

### 2.3 $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 体外稳定性检测

$^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的体外稳定性在 PBS 和小鼠血清中进行测定，将标记好的  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI ( $\sim 3.7$  MBq) 吸移到 0.5 mL PBS 或小鼠血清在 37°C 下分别温育 3、12 和 24 小时，在每个时间点取每个溶液的等分试样，使用放射性-TLC 测定其放射化学纯度。

### 2.4 流式细胞术测定细胞凋亡

HT-1080 细胞培养条件同前。实验前 24 小时以  $2.0 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 6 孔板。然后将细胞分别与 NGR(5 nM)、VEGI(5 nM)、NGR-VEGI(5 nM) 和  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI (3.7 mCi,  $\sim 0.05$  nM) 共孵育 12 小时，然后预热 PBS 洗涤 3 次，将细胞与碧云天细胞凋亡检测结合缓冲液（含膜联蛋白和碘化丙啶）避光条件下 4°C 共浴 15 min，FACS Calibur 流式细胞仪（Becton-Dickinson, 美国）检测 FITC-Annexin V/PI 双标记染色法检测 NGR-VEGI 蛋白对 HT-1080 细胞的生长抑制作用，细胞的染色百分比并进行数据分析，凋亡率显示为 FITC-Annexin V 阳性的细胞比例。

### 2.5 动物模型

所有动物研究根据南加州大学实验动物管理和使用委员会批准协议执行。雌性无胸腺裸鼠（4~6 周龄，体重为 20~25 g）购自 Harlan Laboratories 公司（Livermore, 美国）。通过皮下注射 HT-1080 细胞悬浮液构建右上肢荷瘤模型，约  $5 \times 10^6$  个 HT-1080 细胞悬浮于 50  $\mu\text{l}$  无血清培养基和 50  $\mu\text{l}$  BD 基质胶（Biosciences 公司，美国）。游标卡尺测量肿瘤的长短径，当肿瘤直径达到 0.8~1.0 cm（接种后 2~3 周）后，荷瘤裸鼠模型被用于 SPECT 成像和生物分布研究中。肿瘤体积达到  $\sim 50$  mm<sup>3</sup> 时用于进行放射性核素治疗实验。

### 2.6 SPECT 显像

动物仰卧位在配备有针孔准直器的单头  $\gamma$  相机 MPR（GE 公司，美国）进行图像采集。HT-1080 荷瘤裸鼠经戊巴比妥钠 45.0 mg/kg 腹膜内注射麻醉后经尾静脉注射  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI ( $\sim 11.1$  MBq)，分别于注射后 1、4、12 和 24 小时获得静态图

像。参数设置：矩阵  $128 \times 128$ ，Zoom 值 1.67，采集计数 200 k。采集所得数据通过 Xeleris 软件（GE 公司，美国）进行分析。封闭组 HT-1080 荷瘤小鼠（ $n = 4/\text{组}$ ）通过尾静脉共注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ （11.1 MBq）和 20 mg/kg 未标记 NGR-VEGI 后在相同条件下进行图像采集和数据分析。

## 2.7 生物分布研究

HT-1080 荷瘤小鼠（ $n = 4/\text{组}$ ）注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ （ $\sim 11.1 \text{ mCi}$ ）24 小时后将动物处死并分离肿瘤和主要组织、器官。称重后使用  $\gamma$  计数器（Perkin-Elmer Packard Cobra，美国）测量各自的放射计数，根据注射剂量和时间分别进行衰减校正后获得每克组织的百分注射剂量率（%ID/g）。

## 2.8 放射性核素治疗研究

HT-1080 荷瘤小鼠肿瘤体积达到  $\sim 50 \text{ mm}^3$  后分成 4 组（ $n = 5/\text{组}$ ）。第 1 组单次静脉注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ （18.5 MBq），第 2 组两次静脉注射 NGR-VEGI（10 mg/kg/次/3 天），第 3 组两次静脉注射 NGR 肽（10 mg/kg/次/3 天），第 4 组是对照组，单次静脉注射 200  $\mu\text{L}$  生理盐水。隔两天测定肿瘤大小（mm），利用以下公式计算肿瘤体积，肿瘤体积 = 长度  $\times$  宽度<sup>2</sup>/2（ $\text{mm}^3$ ），并检测小鼠体重变化（g）。为了进一步确定治疗对正常器官是否有明显毒性作用，在观察小鼠体重变化的同时，对放疗组和对照组荷瘤裸鼠的主要器官进行苏木精-伊红染色（H&E）后进行比较。

## 2.9 统计分析

定量数据表示为平均值  $\pm$  标准差，使用 SPSS 16.0 软件（SPSS 公司，美国）进行统计分析，数据比较使用单向方差分析（ANOVA）和 Student's *t* 检验， $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 合成和体外稳定性测定

$^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  可于 2 小时内完成标记合成，放射性标记率  $> 90\%$ （衰变校正后）， $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的比活度为 37~55.5 MBq/nmol。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  体外稳定性在室温下 PBS（pH 7.4）和 37 $^{\circ}\text{C}$  小鼠血清中进行测定，不同时间点（3、12 和 24 小时）稳定性由放射性-TLC 测定，结果见图 18。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  在 PBS 和小鼠血

清中表现出优异的稳定性，孵育 24 小时后在 PBS 和小鼠血清中的  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  标记率仍  $> 85\%$ ，提示  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  体外稳定性良好。

### 3.2 流式细胞术检测细胞凋亡率

流式细胞术分析用 FITC-膜联蛋白 V / PI 染色的方法测定， $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  对 HT-1080 细胞的生长抑制作用与其他组进行比较。对照组、NGR (5 nM)、VEGI (5 nM)、NGR-VEGI (5 nM) 和  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  (3.7 MBq,  $\sim 0.05$  nM) 处理 HT-1080 细胞 12 小时后，凋亡细胞表示为 FITC-膜联蛋白 V 阳性，如图 19。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  (坏死率 95.20%，凋亡率 3.51%) 对细胞杀伤作用明显高于对照组 (坏死率 0.43%，凋亡率 0.94%)、NGR (坏死率 0.29%，凋亡率 2.81%)、VEGI (坏死率 0.32%，凋亡率 4.94%) 和 NGR-VEGI (坏死率 0.48%，凋亡率 6.27%)。表明  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  对 HT-1080 肿瘤细胞能有效诱导凋亡并进行杀伤，而且与其他实验组相比， $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  中靶分子化学量最小，却表现出对 HT-1080 肿瘤细胞最高的杀伤率和诱导凋亡作用。

### 3.3 SPECT 显像

HT-1080 荷瘤裸鼠经戊巴比妥钠 45.0 mg/kg 腹腔内注射麻醉后经尾静脉注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  ( $\sim 11.1$  MBq)，分别于注射后 1、4、12 和 24 小时呈俯卧位在配备有针孔准直器的单头  $\gamma$  相机 MPR (GE 公司，美国) 上进行静态图像采集。可见注射后每个时间点 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 肿瘤与对侧正常组织均具有较高的对比度，图像中右上肢处 HT-1080 肿瘤清晰可见。衰减校正后的荷瘤裸鼠全身 SPECT 图像见图 20，可见除了 HT-1080 肿瘤外， $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  主要在小鼠的肝脏和肾脏有较高摄取，表明  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  主要是通过肝胆系统和泌尿系统代谢出体外的。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  与 HT-1080 肿瘤 CD13 受体的体内特异性通过共注射过量未标记 NGR-VEGI (20 mg/kg) 进行封闭实验后检测。HT-1080 荷瘤裸鼠全身静态 SPECT 显像进行衰减校正后可见 (图 20)，封闭组 HT-1080 肿瘤对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的摄取与非封闭组相比显著降低，未标记 NGR-VEGI 成功阻碍了肿瘤对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的摄取，进一步证实了  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  在体内也是 CD13 受体特异性探针。此外，SPECT 图像可见未封闭组和封闭组荷瘤裸鼠主要器官和组织对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的摄取并未发生明显变化，而荷瘤裸鼠肝脏和肾脏相对高的摄取则提示

$^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  主要是通过肝胆系统和泌尿系统排泄的。

### 3.4 生物分布研究

HT-1080 荷瘤小鼠 ( $n = 4/\text{组}$ ) 经尾静脉注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  ( $\sim 11.1 \text{ mCi}$ ) 24 小时后被处死并分离肿瘤和主要组织、器官。称重后使用  $\gamma$  计数器测量各自的放射性计数, 根据注射剂量和注射时间进行衰减校正后即可获得各自的每克组织百分注射剂量率 ( $\% \text{ID/g}$ )。图 21a 所示, 体外生物分布数据与体内 SPECT 显像结果一致, 可见注射后 24 小时, HT-1080 肿瘤对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的摄取可达  $1.66 \pm 0.32\% \text{ID/g}$ , 封闭组的肿瘤摄取值显著降低为  $0.41 \pm 0.29\% \text{ID/g}$  ( $P < 0.01$ )。总体来说, 注射 24 小时后除了肝脏和肾脏 (摄取均  $> 1.5\% \text{ID/g}$ ),  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  在大多数器官摄取都相对较低。未封闭组肝脏和肾脏的摄取值分别为  $1.51 \pm 0.46$  和  $2.72 \pm 0.48\% \text{ID/g}$ , 与之对应, 封闭组的相应值则分别为  $1.31 \pm 0.29$  和  $2.52 \pm 0.46\% \text{ID/g}$ 。基于生物分布实验结果, 计算未封闭组和封闭组肿瘤与正常器官的摄取对比值, 结果见图 21b, 注射 24 小时后未封闭组肿瘤与肌肉、肾脏和肝脏的摄取比值分别为  $4.98 \pm 0.25$ 、 $0.61 \pm 0.38$  和  $1.09 \pm 0.31$ , 而未封闭组相应值分别为  $1.42 \pm 0.22$ 、 $0.16 \pm 0.35$  和  $0.31 \pm 0.27$ 。可见 HT-1080 肿瘤对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的摄取是特异性的, 可通过共注射过量未标记 NGR-VEGI 蛋白得到抑制, 同时未封闭组肾脏和肝脏相对较高的摄取值提示 HT-1080 荷瘤裸鼠对  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的排泄主要是通过肝胆系统和泌尿系统进行的, 从而进一步印证了 SPECT 的显像结果。

### 3.5 核素治疗研究

HT-1080 荷瘤裸鼠肿瘤体积达到  $\sim 50 \text{ mm}^3$  后分成 4 组 ( $n = 5/\text{组}$ )。对照组、NGR 治疗组、NGR-VEGI 及  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  的体内肿瘤治疗实验结果如图 22a 所示, 对照组、NGR 治疗组和 NGR-VEGI 治疗组肿瘤体积自治疗开始后就持续增大, 治疗后 21 天时肿瘤平均体积已经超过  $1500 \text{ mm}^3$ , 而  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  治疗组 ( $18.5 \text{ MBq}$ ) 与其他组相比肿瘤抑制效果明显, 治疗开始后肿瘤体积呈缓慢增长,  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  对肿瘤的生长抑制作用在治疗后第 6 天明显强于对照组 ( $P < 0.05$ )。

总体来看, 治疗后 18 天之内  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  治疗组 HT-1080 肿瘤的生长基本被抑制 (图 22b), 同时该组荷瘤裸鼠体重也没有明显减轻 ( $P > 0.05$ ), 表明该剂量  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  用于 HT-1080 肿瘤的放射性核素治疗研究是安全、有效的。此外, 治疗后 HT-1080 荷瘤裸鼠主要器官 (心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和胃) 解剖分离后进行 H&E 染色 (图 23) 证实, 与对照组相比,  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  治疗组中主要

器官的组织切片均正常，未见明显凋亡或坏死的组织和细胞，验证了本实验中放射性核素治疗的相对安全性。

## 4 讨论

含显像信号和治疗功能的药物可同时进行诊断和治疗，为近年来倡导的个性化医疗提供了创新性条件和方案<sup>[209, 210]</sup>。本课题组之前的研究中已经成功开发了几种含有 NGR 多肽基序的分子成像探针<sup>[122, 207, 208, 211]</sup>，并且证实这些探针均能与血管生成关键调节因子 CD13 受体进行特异性结合，并成功对肿瘤进行核素或者光学显像。这部分研究创新性开发了集诊断和治疗为一体的分子探针 NGR-VEGI，保证 NGR 肽肿瘤靶向性的同时保留了 VEGI 抑制血管生成的生物学特性<sup>[210]</sup>。我们使用预锡化法对放射性核素  $^{188}\text{Re}$  标记了融合蛋白 NGR-VEGI，成功获得  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 后进行了 HT-1080 荷瘤裸鼠的 SPECT 成像和 CD13 受体介导的肿瘤放射性核素治疗，从而有效评估了  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的体内外探针靶向性和肿瘤诊治效果。

$^{188}\text{Re}$  属于元素周期表 VIIB 族元素，具有优良的核物理性能，可由市售  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  发生器直接淋洗获得<sup>[212, 213]</sup>，使用方便、无载体、比活度高且母体半衰期长 ( $t_{1/2} = 69.4$  d)。 $^{188}\text{Re}$  主要发射能量为 2.12 Mev 的  $\beta$  射线（最大射程 10 mm，适用于内放射治疗），因此是目前公认非常理想的治疗型核素。除此之外， $^{188}\text{Re}$  还可同时发射 155 keV 的  $\gamma$  射线（约占 15%，适用于显像），因此具有显像和治疗的双重功效。 $^{188}\text{Re}$  与其他放射性同位素相比拥有许多可进入临床广泛使用的优点。首先， $^{188}\text{Re}$  可通过购买钨/铼发生器制备，是一种廉价、方便的来源方式。合适的物理半衰期适宜开展核素治疗，相比于其他半衰期较长的放射性同位素（ $^{153}\text{Sm}$ ： $t_{1/2} = 1.95$  d， $^{89}\text{Tc}$ ： $t_{1/2} = 53$  d）降低了生物毒性风险。而且  $^{188}\text{Re}$  的化学性质类似于铼，因此可借鉴铼的标记方法和实验条件，简单且易于操作。另外，由于  $^{188}\text{Re}$  的化学反应大多是氧化还原，重新将  $^{188}\text{Re}$  还原为阴离子  $\text{ReO}_4^-$  可使其在重要器官分泌加快，减少了对重要器官的辐射。与铼-89 和钐-153 相比， $^{188}\text{Re}$  的穿透深度明显加大， $\gamma$  照相机检测可以检测其发射的  $\gamma$  辐射能，因此在进行核素治疗的同时也可进行核素显像，真正实现诊疗一体化。因为  $^{188}\text{Re}$  与  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  衰变发出的能量类似，所以  $^{188}\text{Re}$  标试剂的成像实验、生物分布实验和吸收辐射剂量研究也不需要增加额外屏蔽。由此可见，本实验采用的  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 也可在治疗实体瘤的同时进行显像，通过实时监测靶区浓聚来计算

辐射剂量。

本研究中 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的放射性合成可以在2小时之内来完成且具有较高的标记率(>90%)和优良的比活度(37~55.5 MBq/nmol)。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的体外稳定性研究表明在PBS和小鼠血清中共浴24小时后 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 标记率仍>85%(图18所示),提示 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的体外稳定性良好。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的生物学功能使用流式细胞术对HT-1080细胞的生长抑制率进行了测定。 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的放射作用和NGR-VEGI的化学作用进一步在体外内实验中进行验证(图19所示)。结果提示与对照组、NGR、VEGI和NGR-VEGI相比, $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 对HT-1080肿瘤细胞的生长抑制作用最强、细胞死亡率也最高。尽管 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ (0.05 nM)中NGR-VEGI的化学量显著低于其他组(5 nM), $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 产生的细胞抑制作用却明显强于其他组,可见 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的肿瘤细胞生长抑制作用主要是依赖于 $^{188}\text{Re}$ 产生的核素治疗效果而不是生物治疗效果。

$^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的体内靶向性和生物分布实验在皮下移植HT-1080纤维肉瘤荷瘤裸鼠上进行了评估。SPECT显像研究结果表明非封闭组在 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 注射后各个时间点(1、4、12和24小时)均表现出优异的靶本比值(图20所示)。封闭实验则通过共注射 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 和过量未标记NGR-VEGI(20 mg/kg)进行显像和治疗,进一步验证了 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的体内靶向性。封闭组HT-1080肿瘤对 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的摄取较未封闭组显著降低( $P < 0.05$ ),这表明 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 是CD13受体特异性探针。生物分布实验进一步证实了体内的显像结果,显示注射 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 探针24小时后 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的摄取主要集中在HT-1080肿瘤(图21A),且封闭组肿瘤对 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的摄取明显低于未封闭组( $P < 0.05$ )。这一结果进一步证明了 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 在体内具有CD13受体结合特异性。

基于生物分布实验的定量分析, $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 在注射后24小时肿瘤-肌肉摄取比值为 $4.98 \pm 0.25$ (图21B)。SPECT显像结果显示除了HT-1080肿瘤摄取较高外,肝脏对 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的摄取也较高,提示体内 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 部分是通过肝胆途径代谢的。下一步研究可以为NGR-VEGI针对性引入亲水单元如聚乙二醇等,从而进一步优化 $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$ 的亲水性和药物动力学<sup>[195]</sup>。此外,我们还可以将多聚化的NGR基序与NGR-VEGI序列结合形成融合蛋白,通过多聚效应进一步增强

融合蛋白的靶向特异性<sup>[207, 214]</sup>。

<sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 的体内治疗效果与 NGR、NGR-VEGI 和盐水对照组进行了对比实验。众所周知，VEGI 抑制内皮细胞生长是通过诱导增殖细胞凋亡或阻滞正常细胞周期发挥作用的<sup>[194]</sup>。虽然重组 VEGI 可应用于癌症治疗，但是大多数 VEGI 及其类似物仍具有低肿瘤特异性和不良副作用多的缺陷<sup>[59]</sup>。本项研究中我们设计并制备了新型融合蛋白 NGR-VEGI，通过引入肿瘤血管靶向性 NGR 肽序从而提高了 VEGI 的肿瘤特异性。对 NGR 肽进行放射性标记（<sup>64</sup>Cu 或 <sup>99m</sup>Tc）后进行 PET 和 SPECT 肿瘤显像<sup>[207, 208]</sup>的结果表明，放射性标记 NGR 肽可用于 CD13 受体表达阳性肿瘤的无创性检测。然而，由于放射性标记 NGR 肽的整体分子量较小（通常 < 2 kDa），肿瘤局部保留时间较短且清除较快（< 24 小时的肿瘤保留），通常不适用于治疗研究。新型 NGR-VEGI 蛋白分子量较单纯多肽明显增大（~21 kDa），约为常用 NGR 肽的 10~20 倍，进行放射性标记后在保留肿瘤靶向性的同时明显延长了探针在肿瘤的保留时间，螯合具有治疗性核素后更适用于进行核素治疗研究。

本研究核素治疗结果数据表明，单次剂量 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI（18.5 MBq）的抑瘤作用相比于其它组均较高（图 22A）。<sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 治疗组与 NGR-VEGI 治疗组相比，生物剂量较低却显示出了更高的抑瘤作用，可见 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 的肿瘤生长抑制效果主要是归因于 <sup>188</sup>Re 的核素治疗作用，而且流式细胞术检测到的体外细胞生产抑制实验数据也支持体内结果。此外，由于实验中 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 治疗组 VEGI 的化学量较低以及治疗组实验动物数量的限制，VEGI 对肿瘤在体生长的协同抑制作用在本研究中不得而知，需要进一步大量制备 NGR-VEGI 和 VEGI 后进行对比研究。<sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 治疗组肿瘤的生长抑制效果约能达到治疗后 18 天，此后 HT-1080 肿瘤生长加快可能是由于放射性核素 <sup>188</sup>Re 相对较短的物理半衰期导致治疗效果丧失而导致的。因此在未来的治疗研究中，可以将 <sup>188</sup>Re 改变为具有更长半衰期的治疗性核素，如 <sup>177</sup>Lu（ $t_{1/2} = 6.7$  天）和 <sup>90</sup>Y（ $t_{1/2} = 2.7$  天），从而保证肿瘤细胞及局部周围组织获得足够的辐射剂量<sup>[215, 216]</sup>。此外，放疗组 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 在抑制 HT-1080 肿瘤生长（图 22B）的同时并没有出现荷瘤裸鼠死亡率和体重的明显变化，间接表明本研究使用单剂量 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI（18.5 MBq）进行治疗是安全有效的，重要器官和组织的 H&E 染色实验均正常也印证了其相对安全性（图 23）。另外下一步研究应该检测 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI 的最大耐受剂量并观察高剂量或者类似剂量（18.5 MBq）

$^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 的多次给药是否有效增强肿瘤的治疗效果,也可以进行长半衰期核素标记 NGR-VEGI 后继续研究体内外性质和药代动力学分布。总之,NGR-VEGI 蛋白结合了 NGR 的肿瘤靶向作用和 VEGI 的生物学作用,进行具备诊断和治疗作用的单光子核素  $^{188}\text{Re}$  标记对于肿瘤的靶向性诊疗研究是一项有益的尝试,为新型肿瘤分子探针的设计合成提供了新的思路和方向。

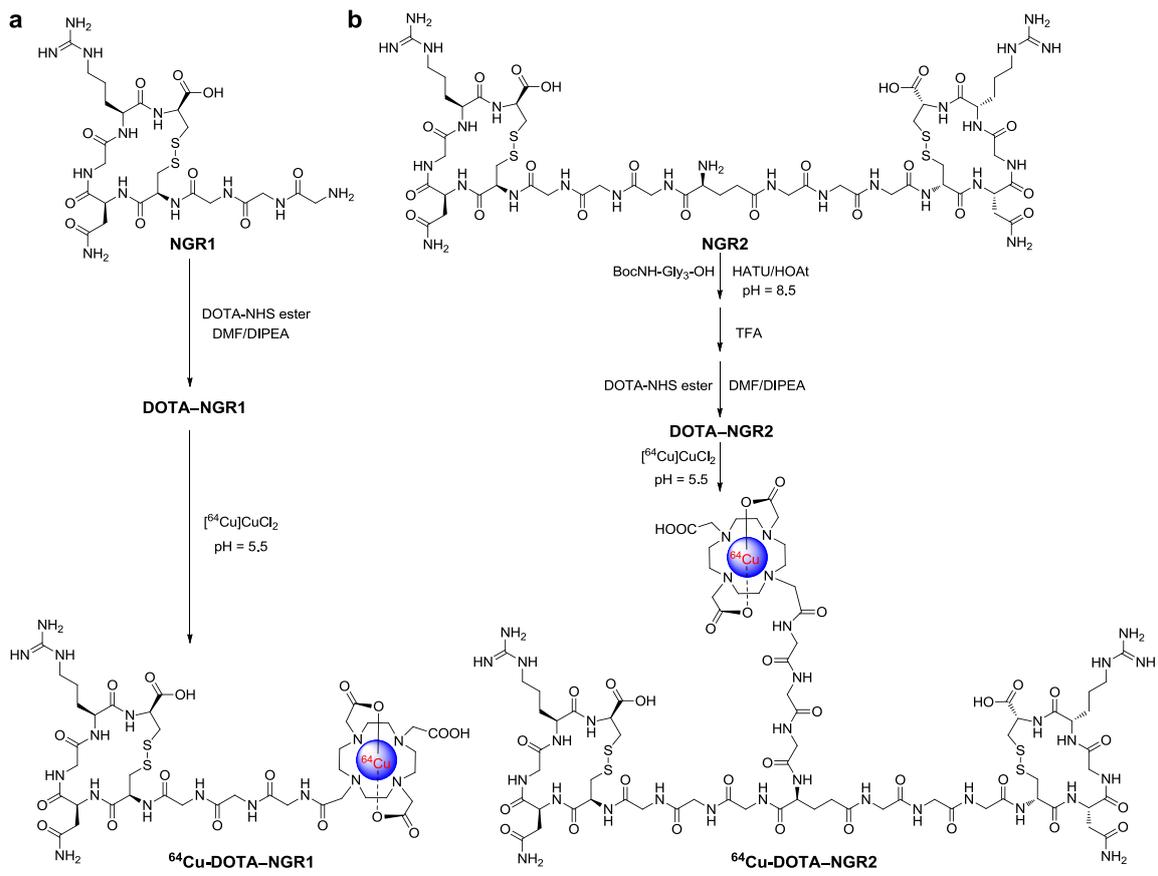


图 1.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 (a)和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 (b)的制备示意图

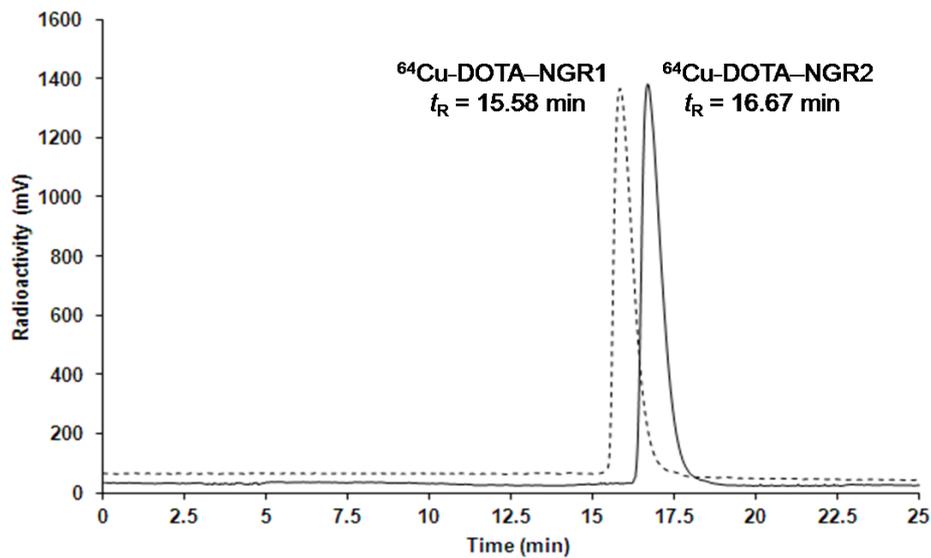


图 2. 放射性-HPLC 检测  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2。HPLC 采用相同方法得到 Cu-64 标记的 NGR 单体 ( $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1) 保留时间为 15.58 min (虚线所示), Cu-64 标记 NGR 二聚体 ( $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2) 保留时间为 16.67 min (实线所示)。

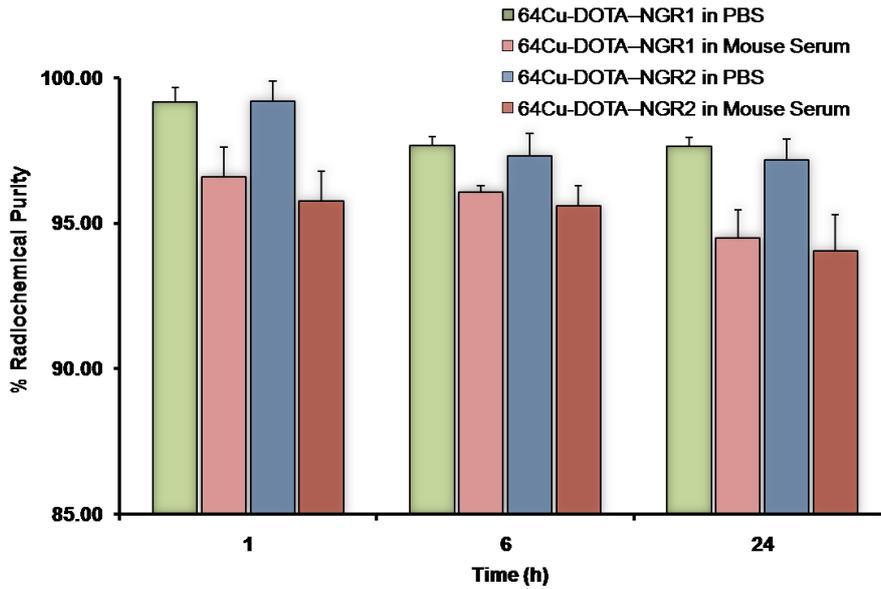


图 3. <sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR1 和 <sup>64</sup>Cu-DOTA-NGR2 在室温 PBS (pH 值 = 7.4) 和小鼠血清中 (37℃) 中放置 1、6、24 小时后稳定性良好

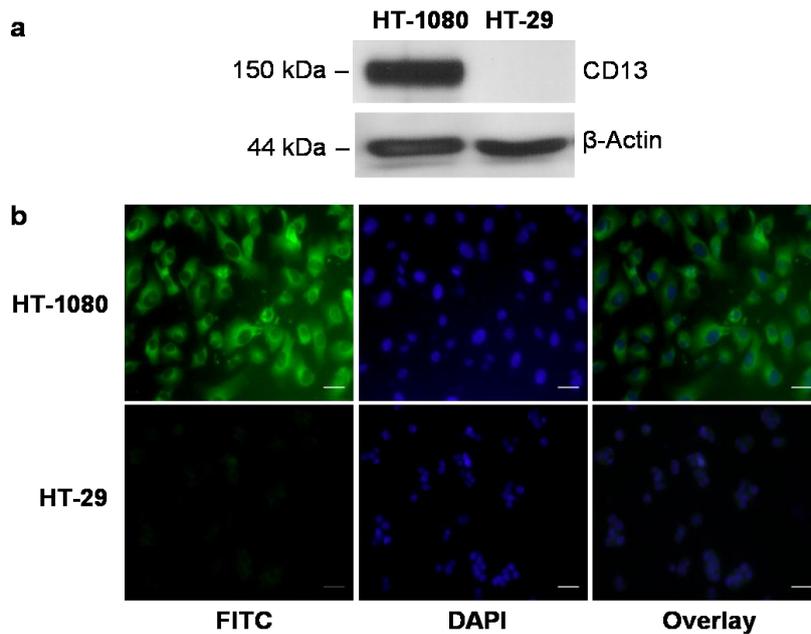


图 4. **a** 蛋白免疫印记实验检测 HT-1080 细胞和 HT-29 细胞的 CD13 受体表达水平 (~150 kDa), β-肌动蛋白为内参对照。 **b** 细胞免疫荧光染色实验检测 HT-1080 细胞和 HT-29 细胞的 CD13 受体表达水平, 其中 FITC-羊抗兔 IgG 为绿色荧光, 显示 CD13 受体表达情况, DAPI 蓝色荧光表示细胞核 (放大倍数: ×20, 比例尺 = 20 μm)。蛋白免疫印记实验和细胞免疫荧光染色实验结果均显示, CD13 受体在 HT-1080 细胞中为高表达, 在 HT-29 细胞中为低表达。

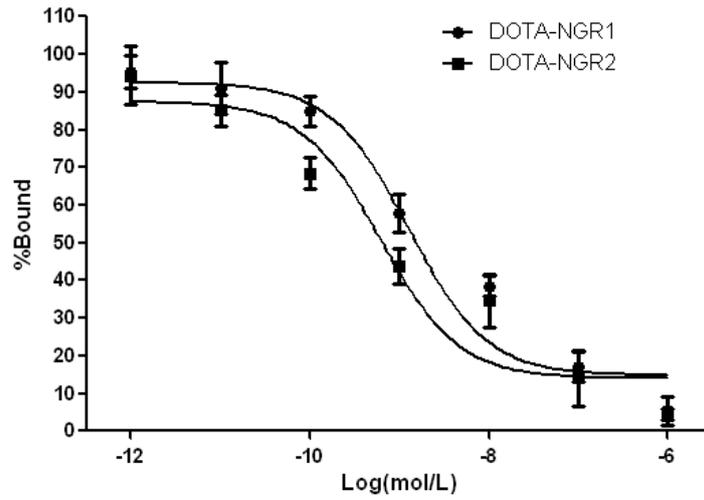


图 5. DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 与 HT-1080 细胞的体外竞争抑制试验，DOTA-NGR1 和 DOTA-NGR2 的  $IC_{50}$  值分别是  $1.27 \pm 0.25$  nM 和  $0.62 \pm 0.29$  nM。

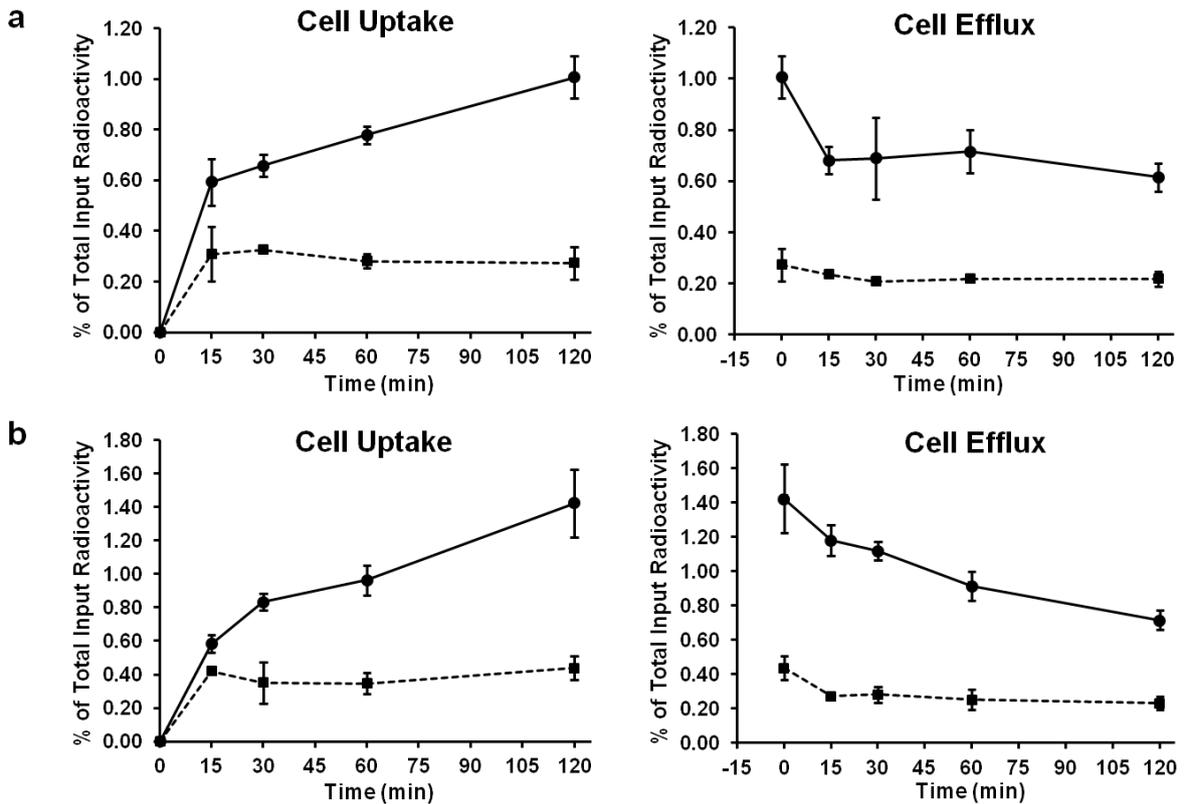


图 6. 细胞摄取（左）和外流实验（右）：**a**  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 ( $n = 3$ /组，平均数 $\pm$ 标准差)，**b**  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 ( $n = 3$ /组，平均数 $\pm$ 标准差)，其中 HT-1080 细胞为实线，HT-29 细胞为虚线。

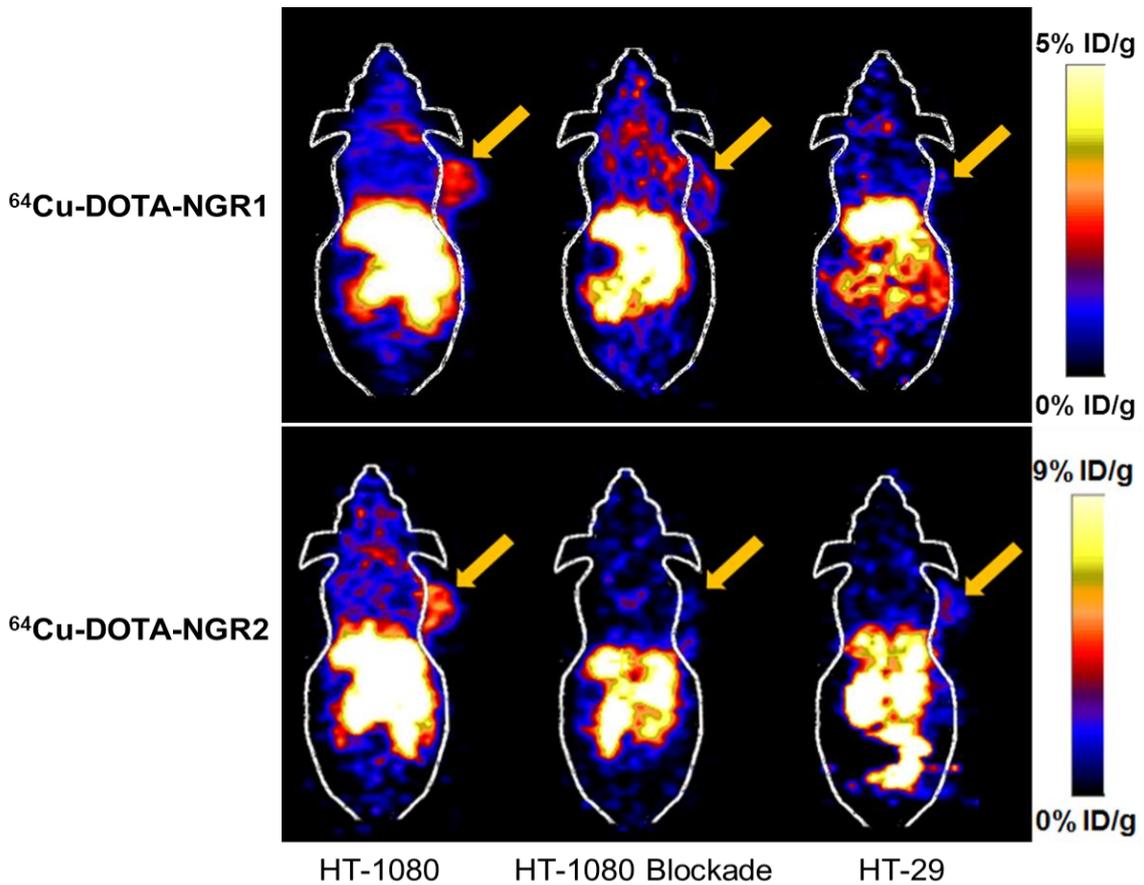


图 7. HT-1080 和 HT-29 荷瘤裸鼠注射  $7.4 \text{ MBq } ^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  或  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  后的小动物 PET 显像图 ( $n = 5/\text{组}$ ), 封闭实验组即 HT-1080 荷瘤裸鼠共注射  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR1}$  或  $^{64}\text{Cu-DOTA-NGR2}$  以及  $20 \text{ mg/kg NGR}$  多肽[c(CNGRC)]。本图展示了注射后 4 小时的小动物 PET 显像图, 黄色箭头所示为右上肢肿瘤。

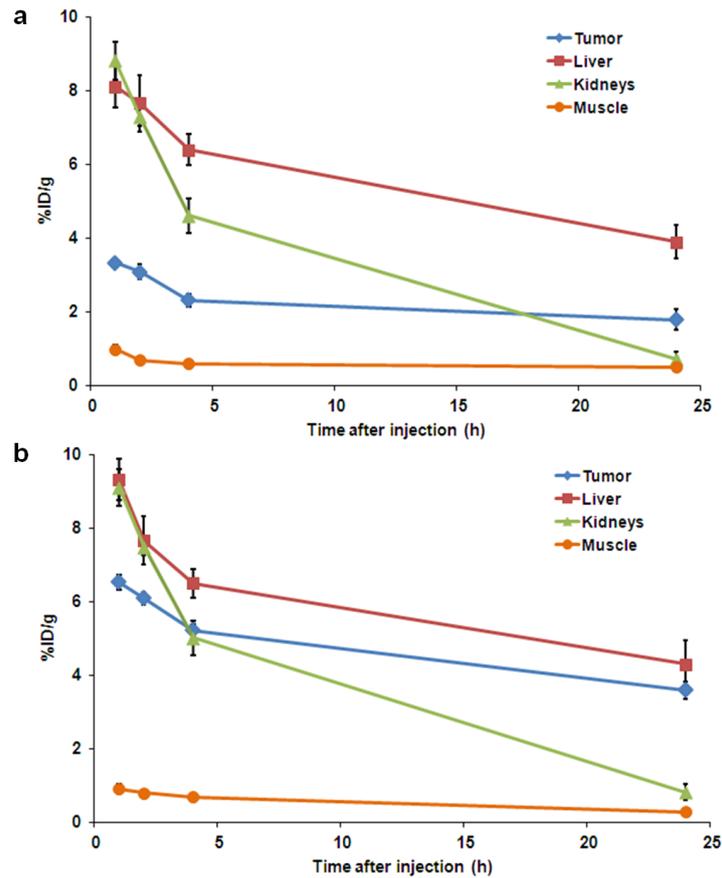


图8. HT-1080 荷瘤裸鼠经尾静脉注射  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 (a)和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 (b) 后依据小动物 PET 成像结果勾画 ROI 后得到的时间-放射性曲线, 结果表示为%ID/g 士标准差 (n = 5/组)。

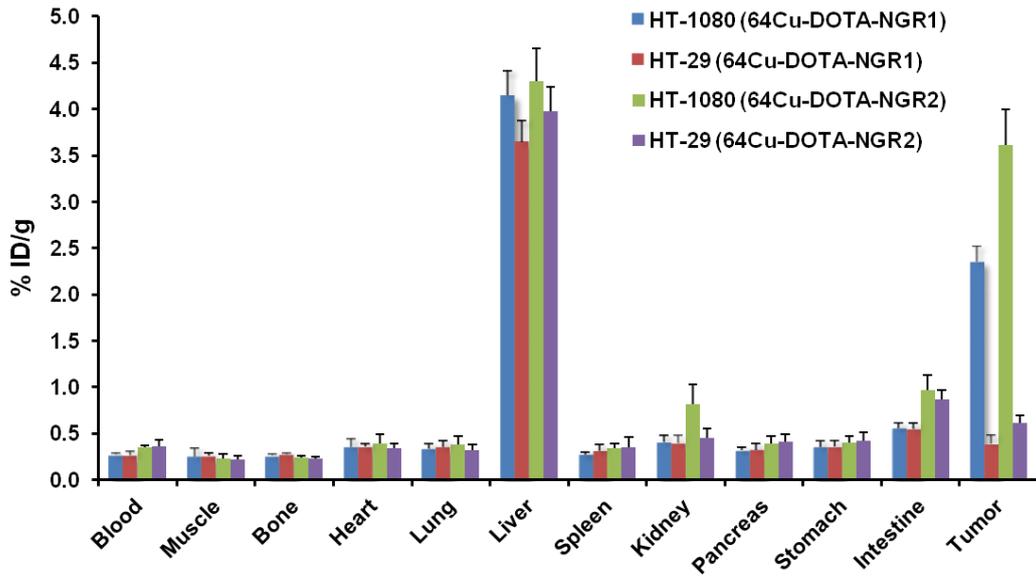


图9. HT-1080 和 HT-29 荷瘤裸鼠经  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 尾静脉注射 24 小时后生物分布试验结果 (n = 5/组, 平均数士标准差)

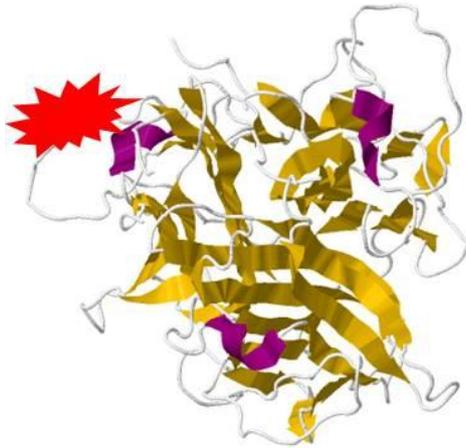


图 10. Cy5.5-NGR-VEGI 结构示意图

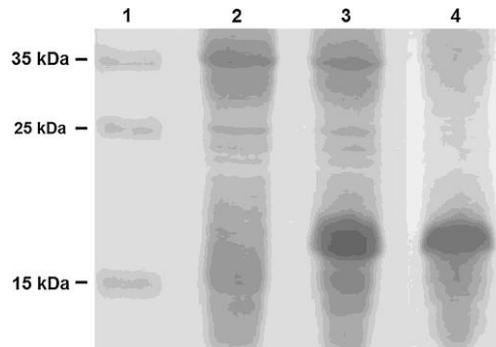


图 11. NGR-VEGI 蛋白表达 SDS-PAGE 分析, 显示经 IPTG 诱导后 NGR-VEGI 出现高表达, 1~4 道分别为蛋白标准品、无 IPTG 诱导组、IPTG 诱导表达组和纯化后 NGR-VEGI 蛋白 (~21 kDa)。

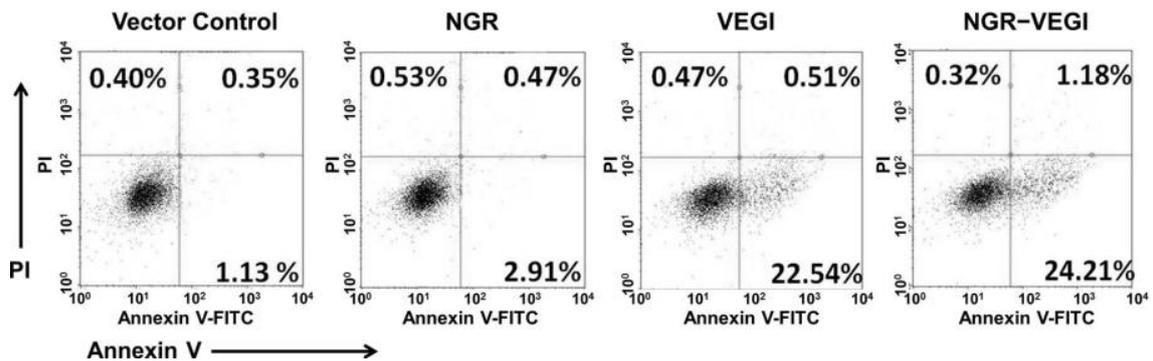


图 12. 流式细胞仪凋亡分析空载体、NGR 多肽 (20 nM)、VEGI 蛋白 (20 nM) 和纯化 NGR-VEGI 蛋白 (20 nM) 对 HUVEC 细胞的生长抑制作用。FITC-Annexin V/PI 双标阴性指示细胞存活, FITC-Annexin V 阳性提示细胞凋亡, FITC-Annexin V/PI 双标阳性提示细胞死亡。

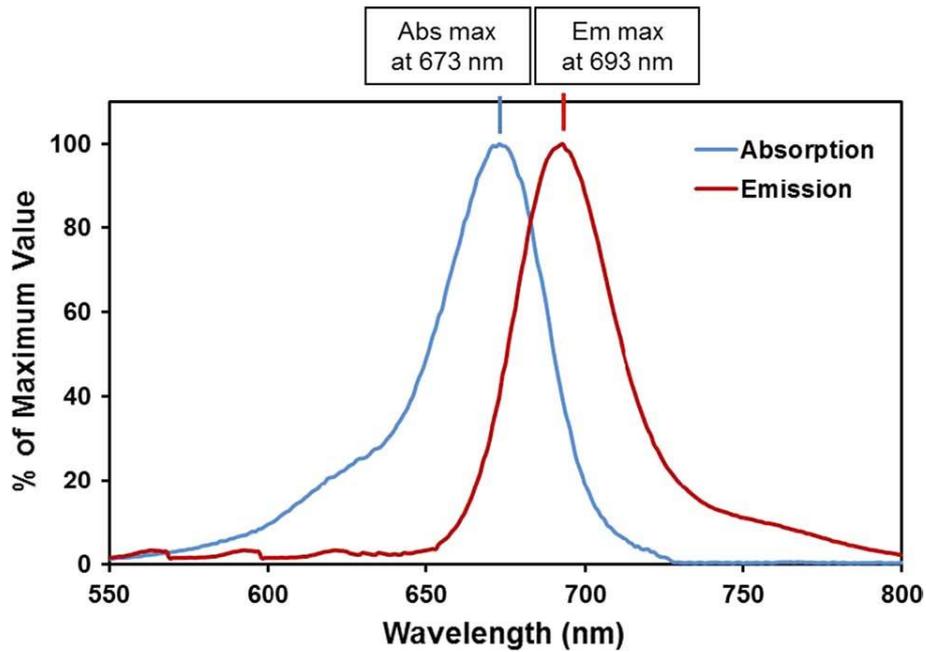


图 13. Cy5.5-NGR-VEGI 的荧光吸收和发射光谱

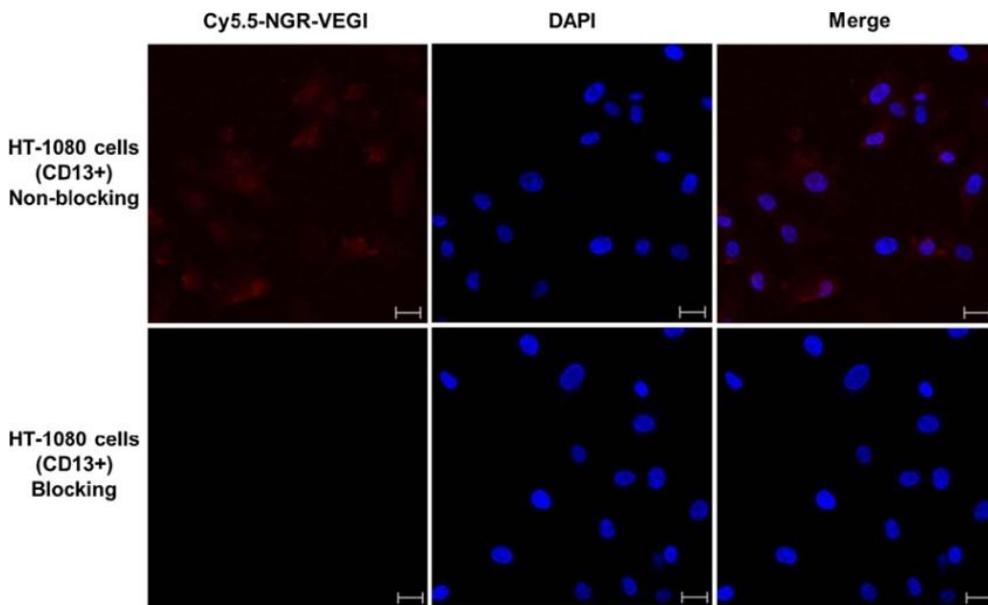


图 14. 激光共聚焦显微镜观察 Cy5.5-NGR-VEGI 与 CD13 受体表达阳性 HT-1080 细胞的特异性结合情况(放大倍数:  $\times 100$ , 比例尺 =  $20 \mu\text{m}$ )。上排: Cy5.5-NGR-VEGI ( $2 \mu\text{M}$ ) 与 HT-1080 细胞共孵育; 下排(封闭组): Cy5.5-NGR-VEGI ( $2 \mu\text{M}$ ) 与 HT-1080 细胞共孵育, 额外加入了未标记 NGR-VEGI ( $2 \text{mM}$ )。

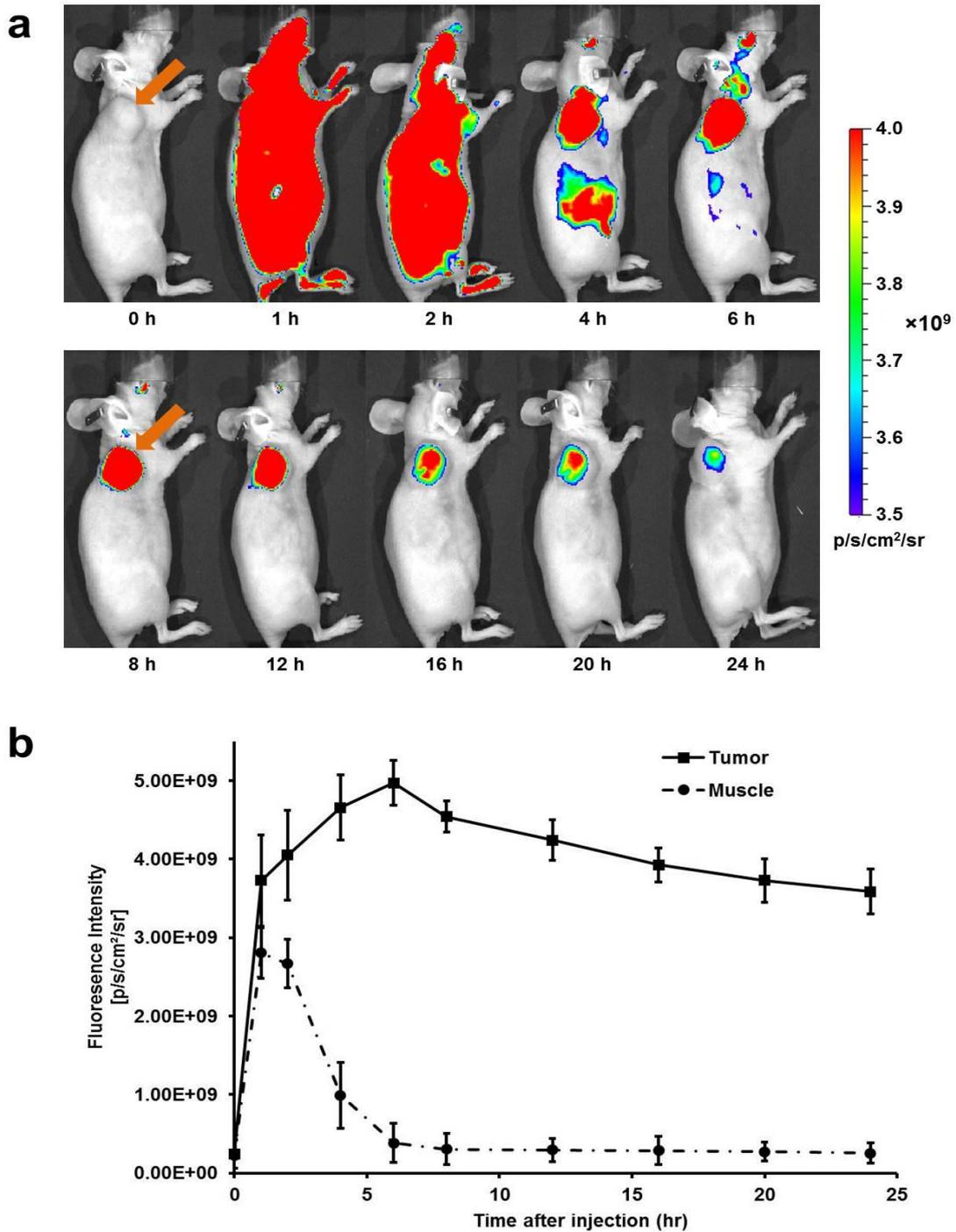


图 15. **a** HT-1080 荷瘤裸鼠经尾静脉注射 Cy5.5-NGR-VEGI (1.5 nmol) 后 0~24 小时的光学成像图 (n = 6/组), 可见注射后至 24 小时肿瘤依然清晰可见, 橙色箭头所指为右上肢肿瘤。**b** Cy5.5-NGR-VEGI 体内靶向性的定量和变化趋势, 可见注射后每个时间点 HT-1080 肿瘤对 Cy5.5-NGR-VEGI 的摄取均高于肌肉 (n = 6/组, 平均数±标准差)。

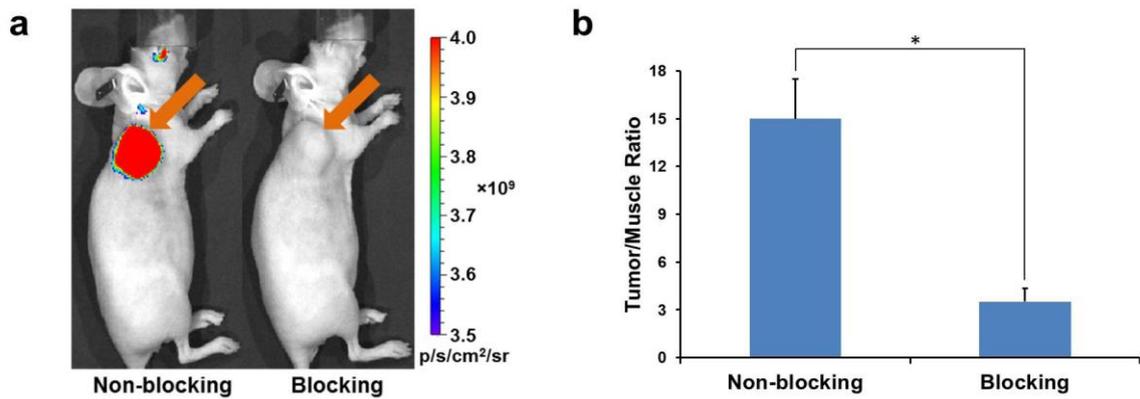


图 16. a HT-1080 荷瘤裸鼠注射 Cy5.5-NGR-VEGI (1.5 nmol) 8 小时后光学成像图，肿瘤位于右上肢清晰可见。封闭组共注射 Cy5.5-NGR-VEGI (1.5 nmol) 和过量未标记 NGR-VEGI (20 mg/kg)，未见肿瘤摄取。橙色箭头所示为肿瘤。b 感兴趣区勾画 (ROI) 测量肿瘤/肌肉的荧光强度比值 (n = 6/组，平均值 ± 标准差)

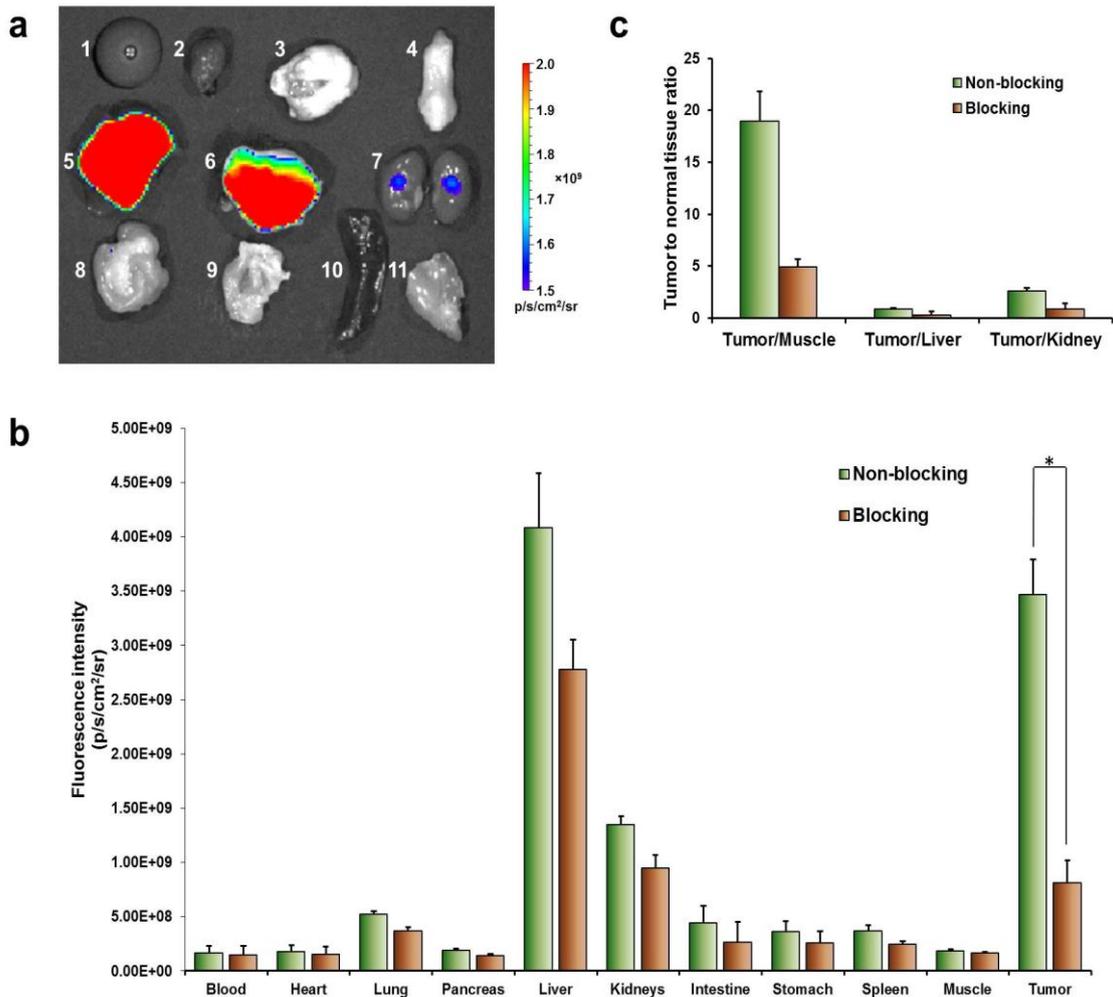


图 17. a HT-1080 荷瘤裸鼠注射 Cy5.5-NGR-VEGI (1.5 nmol) 8 小时后肿瘤和主要器官的体外光学成像图: 1 血液 2 心脏 3 肺脏 4 胰腺 5 肝脏 6 肿瘤 7 肾脏 8 小肠 9 胃 10 脾脏 11 肌肉。 b 未封闭组和封闭组分别进行 ROI 勾画后分析肿瘤和主要组织器官体外光学显像的荧光强度 (n = 3/组, 平均数±标准差), 封闭组额外共注射 NGR-VEGI (20 mg/kg) c 基于 ROI 技术分析肿瘤与正常组织荧光强度比值 (n = 3/组, 平均数±标准差)。

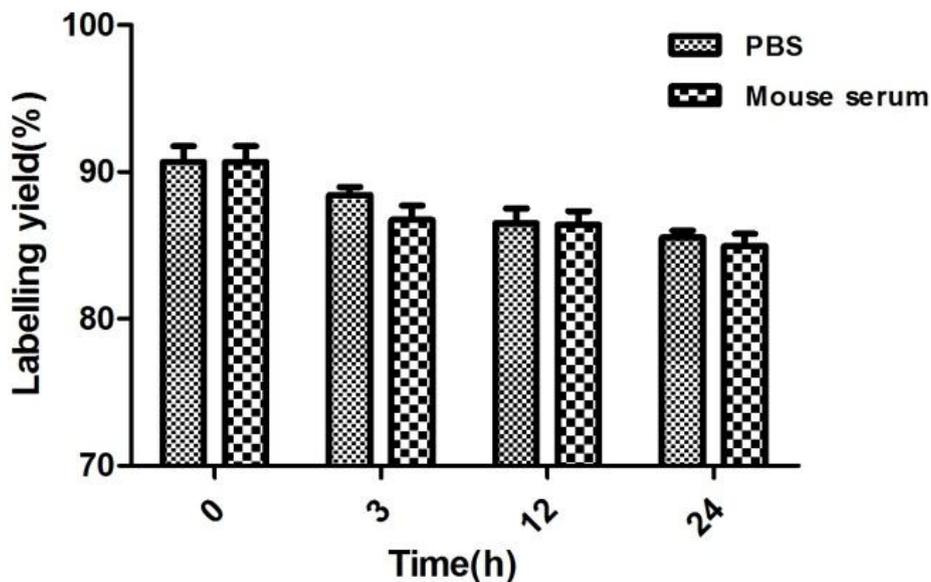


图 18.  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 在 PBS (pH 值 = 7.4) 和小鼠血清 (37°C) 中放置 3、12、24 小时后的稳定性

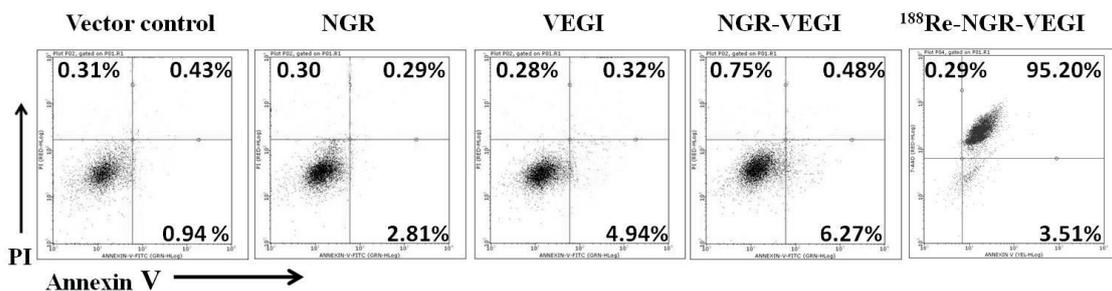


图 19. 流式细胞术分析  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI (3.7 MBq, ~0.05 nM)、对照组、NGR 多肽 (5 nM)、VEGI 蛋白 (5 nM) 和纯化 NGR-VEGI 蛋白 (5 nM) 对 HT-1080 细胞的生长抑制作用。Annexin V-FITC/PI 双标阴性表示细胞存活, Annexin V-FITC 染色阳性表示细胞凋亡, Annexin V-FITC/PI 双标阳性表示细胞死亡。

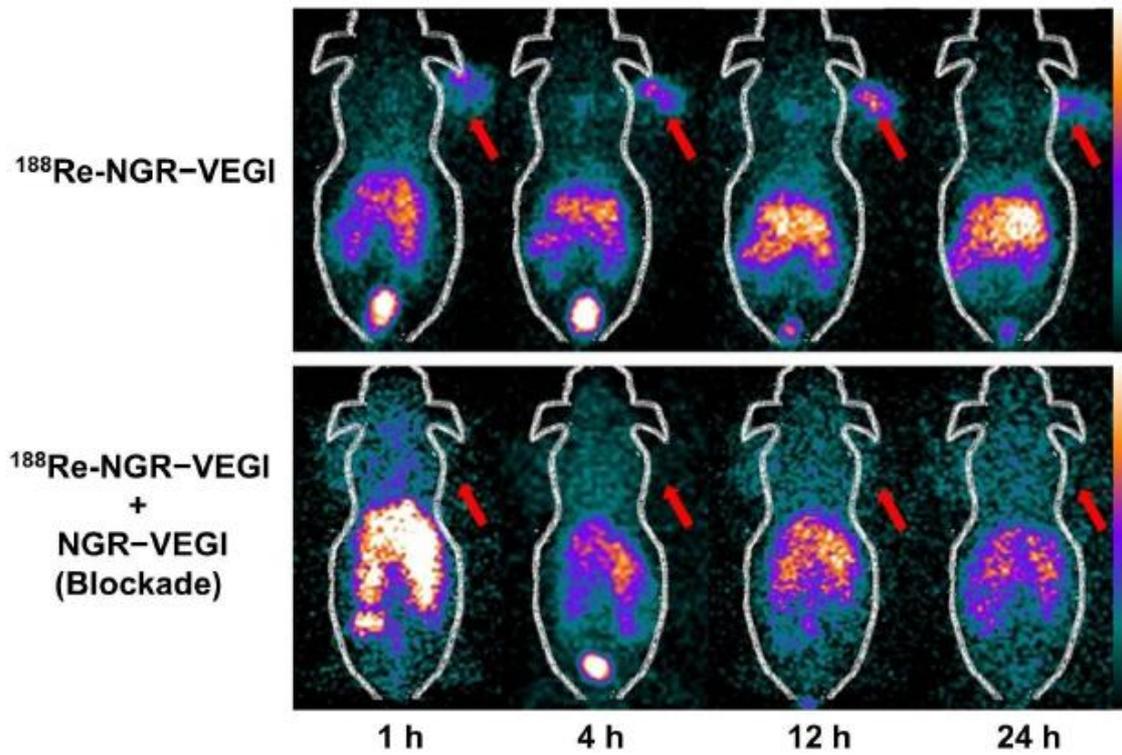


图 20. 注射  $^{188}\text{Re-NGR-VEGI}$  (11.1 MBq) 1、4、12、24 小时后 HT-1080 荷瘤裸鼠的全身 SPECT 显像, 封闭组荷瘤裸鼠额外共注射未标记 NGR-VEGI (20 mg/kg), 红色箭头所示为肿瘤, n = 4/组。

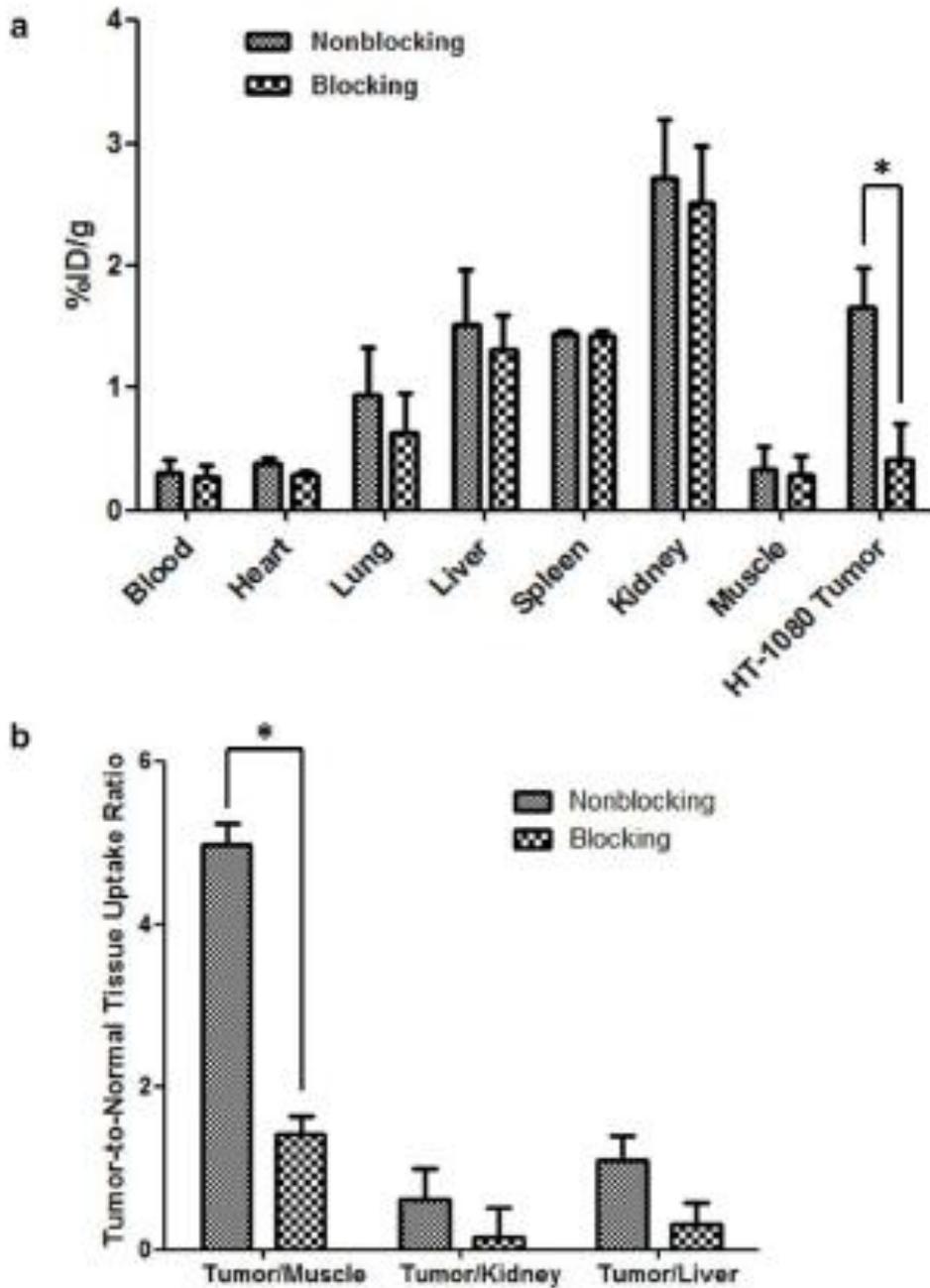


图 21. **a** HT-1080 荷瘤裸鼠经尾静脉注射  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI (11.1 MBq) 后 24 小时生物分布结果, 封闭组荷瘤裸鼠额外共注射过量未标记 NGR-VEGI (20 mg/kg) ( $n = 4$ /组, 平均数 $\pm$ 标准差)。**b** HT-1080 荷瘤裸鼠注射  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI (11.1 MBq) 后 24 小时肿瘤与正常组织摄取比值 ( $n = 4$ /组, 平均数 $\pm$ 标准差)。

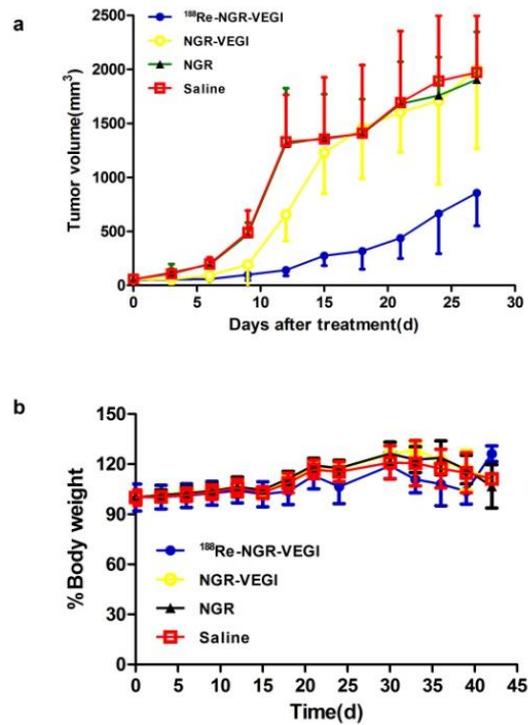


图 22. a 分别经 <sup>188</sup>Re-NGR-VEGI、NGR-VEGI 蛋白、NGR 多肽和生理盐水治疗后 HT-1080 瘤体体积 (mm<sup>3</sup>) 变化 (n = 5/组, 平均数 ± 标准差)。 b HT-1080 荷瘤裸鼠经治疗后裸鼠体重变化百分率 (%) (n = 5/组, 平均数 ± 标准差)。

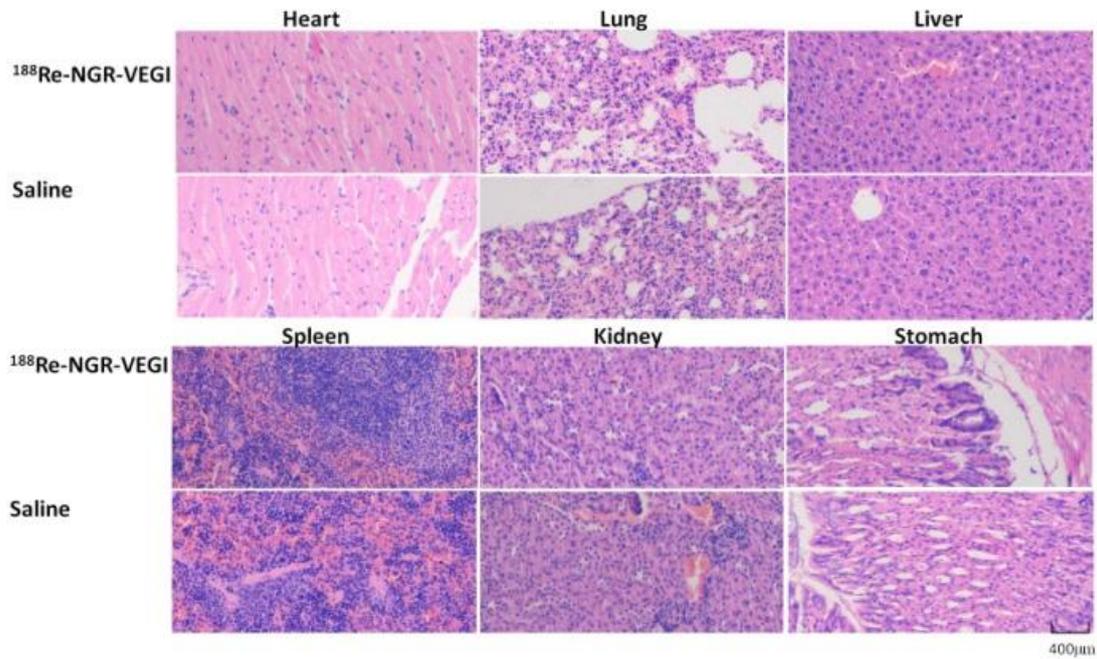


图 23. HT-1080 荷瘤裸鼠 <sup>188</sup>Re-NGE-VEGI 治疗组 (18.5 MBq 单剂量) 和对照组主要组织器官 H&E 染色结果对照 (放大倍数: ×100, 比例尺 = 400 μm)。

## 小 结

1、成功合成单体和二聚体 NGR 肽并标记了放射性核素  $^{64}\text{Cu}$ ，构建荷瘤裸鼠模型并进行了 CD13 受体的小动物 PET 成像。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1 和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 均能成功的显示肿瘤，相比于单体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR1，二聚体  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NGR2 对 CD13 受体表达阳性的 HT-1080 肿瘤具有更好的亲和力和特异性，能更清晰的显示肿瘤。同时本研究中使用的  $^{64}\text{Cu}$  标记肽螯合物也可以用于标记其他放射性金属，进行 CD13 受体靶向肿瘤的核素成像和治疗。

2、新型 NGR-VEGI 融合蛋白作为一种兼具诊断和治疗功能的分子探针，结合了 NGR 多肽和 VEGI 蛋白的优势，提高了探针靶向肿瘤血管的功能。

3、近红外荧光光学成像显示 Cy5.5 标记 NGR-VEGI 后能成功进行肿瘤模型 CD13 受体的可视化定量和分析，具有靶向肿瘤新生血管从而改善癌症治疗效果的应用前景。

4、 $^{188}\text{Re}$  标记新型 NGR-VEGI 融合蛋白后既能对肿瘤进行 CD13 受体特异性的 SPECT 显像，探索性核素治疗发现其能有效抑制肿瘤的生长。因此，新型  $^{188}\text{Re}$ -NGR-VEGI 具有进行 CD13 受体靶向性肿瘤成像和核素治疗的潜力，为新型肿瘤分子探针的设计、合成提供了新的思路和方向。

## 参考文献

- [1] KH Jung, KH Lee: **Molecular imaging in the era of personalized medicine.** *J Pathol Transl Med* 2015, **49**:5-12.
- [2] I Velikyan: **Molecular imaging and radiotherapy: theranostics for personalized patient management.** *Theranostics* 2012, **2**:424-6.
- [3] H Zhang, M Tian, I Carrio, AC Civelek, Y Fujibayashi: **Molecular image-guided theranostic and personalized medicine 2014.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:258612.
- [4] G Lippi, M Plebani: **Personalized medicine: moving from simple theory to daily practice.** *Clin Chem Lab Med* 2015.
- [5] D Marasco, PL Scognamiglio: **Identification of Inhibitors of Biological Interactions Involving Intrinsically Disordered Proteins.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**:7394-7412.
- [6] F Kraeber-Bodere, C Rousseau, C Bodet-Milin, E Frampas, A Faivre-Chauvet, A Rauscher, RM Sharkey, DM Goldenberg, JF Chatal, J Barbet: **A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy.** *Front Pharmacol* 2015, **6**:54.
- [7] DN Pandya, N Bhatt, AV Dale, JY Kim, H Lee, YS Ha, JE Lee, GI An, J Yoo: **New bifunctional chelator for <sup>64</sup>Cu-immuno-positron emission tomography.** *Bioconjug Chem* 2013, **24**:1356-66.
- [8] C Xu, H Zhang: **Somatostatin Receptor Based Imaging and Radionuclide Therapy.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:917968.
- [9] P Carmeliet, RK Jain: **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature* 2000, **407**:249-57.
- [10] R Pasqualini, E Koivunen, R Kain, J Lahdenranta, M Sakamoto, A Stryhn, RA Ashmun, LH Shapiro, W Arap, E Ruoslahti: **Aminopeptidase N is a receptor for**

- tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis.** *Cancer Res* 2000, **60**:722-7.
- [11] F Curnis, G Arrigoni, A Sacchi, L Fischetti, W Arap, R Pasqualini, A Corti: **Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells.** *Cancer Res* 2002, **62**:867-74.
- [12] SV Bhagwat, J Lahdenranta, R Giordano, W Arap, R Pasqualini, LH Shapiro: **CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation.** *Blood* 2001, **97**:652-9.
- [13] N Petrovic, W Schacke, JR Gahagan, CA O'Connor, B Winnicka, RE Conway, P Mina-Osorio, LH Shapiro: **CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation.** *Blood* 2007, **110**:142-50.
- [14] D Hanahan, RA Weinberg: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
- [15] D Hanahan, RA Weinberg: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**:646-74.
- [16] D Hanahan, J Folkman: **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell* 1996, **86**:353-64.
- [17] V Baeriswyl, G Christofori: **The angiogenic switch in carcinogenesis.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:329-37.
- [18] G Bergers, LE Benjamin: **Tumorigenesis and the angiogenic switch.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:401-10.
- [19] P Carmeliet: **VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer.** *Oncology* 2005, **69 Suppl 3**:4-10.
- [20] F Mac Gabhann, AS Popel: **Systems biology of vascular endothelial growth factors.** *Microcirculation* 2008, **15**:715-38.
- [21] N Ferrara: **Vascular endothelial growth factor.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:789-91.
- [22] K Kessenbrock, V Plaks, Z Werb: **Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.** *Cell* 2010, **141**:52-67.
- [23] S Kazerounian, KO Yee, J Lawler: **Thrombospondins in cancer.** *Cell Mol Life Sci*

- 2008, **65**:700-12.
- [24] JA Nagy, SH Chang, SC Shih, AM Dvorak, HF Dvorak: **Heterogeneity of the tumor vasculature**. *Semin Thromb Hemost* 2010, **36**:321-31.
- [25] P Baluk, H Hashizume, DM McDonald: **Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer**. *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**:102-11.
- [26] M Raica, AM Cimpean, D Ribatti: **Angiogenesis in pre-malignant conditions**. *Eur J Cancer* 2009, **45**:1924-34.
- [27] KP Olive, MA Jacobetz, CJ Davidson, A Gopinathan, D McIntyre, D Honess, B Madhu, MA Goldgraben, ME Caldwell, D Allard, et al: **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer**. *Science* 2009, **324**:1457-61.
- [28] YK Zee, JP O'Connor, GJ Parker, A Jackson, AR Clamp, MB Taylor, NW Clarke, GC Jayson: **Imaging angiogenesis of genitourinary tumors**. *Nat Rev Urol* 2010, **7**:69-82.
- [29] HE Turner, AL Harris, S Melmed, JA Wass: **Angiogenesis in endocrine tumors**. *Endocr Rev* 2003, **24**:600-32.
- [30] D Ribatti: **Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review**. *Leuk Res* 2009, **33**:638-44.
- [31] J Folkman: **Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis**. *Semin Oncol* 2002, **29**:15-8.
- [32] J Folkman: **Angiogenesis**. *Annu Rev Med* 2006, **57**:1-18.
- [33] P Nyberg, L Xie, R Kalluri: **Endogenous inhibitors of angiogenesis**. *Cancer Res* 2005, **65**:3967-79.
- [34] Y Cao: **Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases**. *Nat Rev Drug Discov* 2010, **9**:107-15.
- [35] L Seppinen, R Sormunen, Y Soini, H Elamaa, R Heljasvaara, T Pihlajaniemi: **Lack of collagen XVIII accelerates cutaneous wound healing, while overexpression of its endostatin domain leads to delayed healing**. *Matrix Biol* 2008, **27**:535-46.
- [36] EB Pasquale: **Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and**

- beyond.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:165-80.
- [37] Z Ahmed, R Bicknell: **Angiogenic signalling pathways.** *Methods Mol Biol* 2009, **467**:3-24.
- [38] E Dejana, F Orsenigo, C Molendini, P Baluk, DM McDonald: **Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees.** *Cell Tissue Res* 2009, **335**:17-25.
- [39] E Ruoslahti: **Specialization of tumour vasculature.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:83-90.
- [40] E Ruoslahti, SN Bhatia, MJ Sailor: **Targeting of drugs and nanoparticles to tumors.** *J Cell Biol* 2010, **188**:759-68.
- [41] A Raza, MJ Franklin, AZ Dudek: **Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis.** *Am J Hematol* 2010, **85**:593-8.
- [42] G Bergers, S Song: **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** *Neuro Oncol* 2005, **7**:452-64.
- [43] BZ Qian, JW Pollard: **Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.** *Cell* 2010, **141**:39-51.
- [44] A Zumsteg, G Christofori: **Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis.** *Curr Opin Oncol* 2009, **21**:60-70.
- [45] C Murdoch, M Muthana, SB Coffelt, CE Lewis: **The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:618-31.
- [46] M De Palma, C Murdoch, MA Venneri, L Naldini, CE Lewis: **Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications.** *Trends Immunol* 2007, **28**:519-24.
- [47] N Ferrara: **Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, **21**:21-6.
- [48] A Patenaude, J Parker, A Karsan: **Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization.** *Microvasc Res* 2010, **79**:217-23.
- [49] JC Kovacic, M Boehm: **Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology.** *Stem*

- Cell Res* 2009, **2**:2-15.
- [50] C Lamagna, G Bergers: **The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors.** *J Leukoc Biol* 2006, **80**:677-81.
- [51] T Tammela, K Alitalo: **Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise.** *Cell* 2010, **140**:460-76.
- [52] M Goncalves, K Estieu-Gionnet, T Berthelot, G Lain, M Bayle, X Canron, N Betz, A Bikfalvi, G Deleris: **Design, synthesis, and evaluation of original carriers for targeting vascular endothelial growth factor receptor interactions.** *Pharm Res* 2005, **22**:1411-21.
- [53] W Risau: **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature* 1997, **386**:671-4.
- [54] LM Coussens, Z Werb: **Inflammation and cancer.** *Nature* 2002, **420**:860-7.
- [55] F Balkwill, KA Charles, A Mantovani: **Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease.** *Cancer Cell* 2005, **7**:211-7.
- [56] P Carmeliet: **Angiogenesis in life, disease and medicine.** *Nature* 2005, **438**:932-6.
- [57] C Lopez-Otin, LM Matrisian: **Emerging roles of proteases in tumour suppression.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:800-8.
- [58] J Folkman: **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *N Engl J Med* 1971, **285**:1182-6.
- [59] L Duan, G Yang, R Zhang, L Feng, C Xu: **Advancement in the research on vascular endothelial growth inhibitor (VEGI).** *Target Oncol* 2012, **7**:87-90.
- [60] N Zhang, AJ Sanders, L Ye, HG Kynaston, WG Jiang: **Vascular endothelial growth inhibitor, expression in human prostate cancer tissue and the impact on adhesion and migration of prostate cancer cells in vitro.** *Int J Oncol* 2009, **35**:1473-80.
- [61] N Zhang, AJ Sanders, L Ye, WG Jiang: **Vascular endothelial growth inhibitor in human cancer (Review).** *Int J Mol Med* 2009, **24**:3-8.
- [62] Y Zhai, J Yu, L Iruela-Arispe, WQ Huang, Z Wang, AJ Hayes, J Lu, G Jiang, L Rojas, ME Lippman, et al: **Inhibition of angiogenesis and breast cancer**

- xenograft tumor growth by VEGI, a novel cytokine of the TNF superfamily.** *Int J Cancer* 1999, **82**:131-6.
- [63] Y Zhai, J Ni, GW Jiang, J Lu, L Xing, C Lincoln, KC Carter, F Janat, D Kozak, S Xu, et al: **VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo.** *FASEB J* 1999, **13**:181-9.
- [64] V Haridas, A Shrivastava, J Su, GL Yu, J Ni, D Liu, SF Chen, Y Ni, SM Ruben, R Gentz, et al: **VEGI, a new member of the TNF family activates nuclear factor-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and modulates cell growth.** *Oncogene* 1999, **18**:6496-504.
- [65] Q Xiao, CY Hsu, H Chen, X Ma, J Xu, JM Lee: **Characterization of cis-regulatory elements of the vascular endothelial growth inhibitor gene promoter.** *Biochem J* 2005, **388**:913-20.
- [66] C Parr, CH Gan, G Watkins, WG Jiang: **Reduced vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) expression is associated with poor prognosis in breast cancer patients.** *Angiogenesis* 2006, **9**:73-81.
- [67] N Zhang, AJ Sanders, L Ye, HG Kynaston, WG Jiang: **Expression of vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) in human urothelial cancer of the bladder and its effects on the adhesion and migration of bladder cancer cells in vitro.** *Anticancer Res* 2010, **30**:87-95.
- [68] M Dunne, J Zheng, J Rosenblat, DA Jaffray, C Allen: **APN/CD13-targeting as a strategy to alter the tumor accumulation of liposomes.** *J Control Release* 2011, **154**:298-305.
- [69] J Dreischaluck, C Schwoppe, T Spieker, T Kessler, K Tiemann, R Liersch, C Schliemann, M Kreuter, A Kolkmeier, H Hintelmann, et al: **Vascular infarction by subcutaneous application of tissue factor targeted to tumor vessels with NGR-peptides: activity and toxicity profile.** *Int J Oncol* 2010, **37**:1389-97.
- [70] D Majhen, J Gabrilovac, M Eloit, J Richardson, A Ambriovic-Ristov: **Disulfide bond formation in NGR fiber-modified adenovirus is essential for retargeting**

- to aminopeptidase N.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **348**:278-87.
- [71] Y Yokoyama, S Ramakrishnan: **Addition of an aminopeptidase N-binding sequence to human endostatin improves inhibition of ovarian carcinoma growth.** *Cancer* 2005, **104**:321-31.
- [72] Z Zhang, H Harada, K Tanabe, H Hatta, M Hiraoka, S Nishimoto: **Aminopeptidase N/CD13 targeting fluorescent probes: synthesis and application to tumor cell imaging.** *Peptides* 2005, **26**:2182-7.
- [73] A von Wallbrunn, J Waldeck, C Holtke, M Zuhlsdorf, R Mesters, W Heindel, M Schafers, C Bremer: **In vivo optical imaging of CD13/APN-expression in tumor xenografts.** *J Biomed Opt* 2008, **13**:011007.
- [74] M Westphal, S Yla-Herttuala, J Martin, P Warnke, P Menei, D Eckland, J Kinley, R Kay, Z Ram: **Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2013, **14**:823-33.
- [75] K Chen, X Chen: **Design and development of molecular imaging probes.** *Curr Top Med Chem* 2010, **10**:1227-36.
- [76] SS Kelkar, TM Reineke: **Theranostics: combining imaging and therapy.** *Bioconjug Chem* 2011, **22**:1879-903.
- [77] L Jiang, Y Tu, H Shi, Z Cheng: **PET probes beyond (18)F-FDG.** *J Biomed Res* 2014, **28**:435-46.
- [78] K Chen, X Chen: **Positron emission tomography imaging of cancer biology: current status and future prospects.** *Semin Oncol* 2011, **38**:70-86.
- [79] TJ Wadas, EH Wong, GR Weisman, CJ Anderson: **Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease.** *Chem Rev* 2010, **110**:2858-902.
- [80] TJ Wadas, EH Wong, GR Weisman, CJ Anderson: **Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals.** *Curr Pharm Des* 2007, **13**:3-16.
- [81] SV Smith: **Molecular imaging with copper-64.** *J Inorg Biochem* 2004,

- 98:1874-901.
- [82] HS Chong, Y Chen, CS Kang, X Sun, N Wu: **Novel (64)Cu-radiolabeled bile acid conjugates for targeted PET imaging.** *Bioorg Med Chem Lett* 2015, **25**:1082-5.
- [83] Z Cai, CJ Anderson: **Chelators for copper radionuclides in positron emission tomography radiopharmaceuticals.** *J Labelled Comp Radiopharm* 2014, **57**:224-30.
- [84] J Fichna, A Janecka: **Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging.** *Bioconjug Chem* 2003, **14**:3-17.
- [85] TM Jones-Wilson, KA Deal, CJ Anderson, DW McCarthy, Z Kovacs, RJ Motekaitis, AD Sherry, AE Martell, MJ Welch: **The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes.** *Nucl Med Biol* 1998, **25**:523-30.
- [86] X Sun, M Wuest, GR Weisman, EH Wong, DP Reed, CA Boswell, R Motekaitis, AE Martell, MJ Welch, CJ Anderson: **Radiolabeling and in vivo behavior of copper-64-labeled cross-bridged cyclam ligands.** *J Med Chem* 2002, **45**:469-77.
- [87] RJ Motekaitis, BE Rogers, DE Reichert, AE Martell, MJ Welch: **Stability and Structure of Activated Macrocycles. Ligands with Biological Applications.** *Inorg Chem* 1996, **35**:3821-3827.
- [88] P Brust, W Deuther-Conrad, G Becker, M Patt, CK Donat, S Stittsworth, S Fischer, A Hiller, B Wenzel, S Dukic-Stefanovic, et al: **Distinctive In Vivo Kinetics of the New Sigma1 Receptor Ligands (R)-(+)- and (S)-(-)-18F-Fluspidine in Porcine Brain.** *J Nucl Med* 2014.
- [89] DB Buxton: **Noninvasive measurement of mouse myocardial glucose uptake with 18F-FDG.** *J Nucl Med* 2014, **55**:866.
- [90] AM Chacko, C Li, M Nayak, JL Mikitsh, J Hu, C Hou, L Grasso, NC Nicolaidis, VR Muzykantov, CR Divgi, et al: **Development of 124I immuno-PET targeting tumor vascular TEM1/endothelialin.** *J Nucl Med* 2014, **55**:500-7.
- [91] A Colasanti, Q Guo, N Muhlert, P Giannetti, M Onega, RD Newbould, O Ciccarelli, S Rison, C Thomas, R Nicholas, et al: **In Vivo Assessment of Brain**

- White Matter Inflammation in Multiple Sclerosis with 18F-PBR111 PET.** *J Nucl Med* 2014, **55**:1112-1118.
- [92] T Ebenhan, JR Zeevaart, JD Venter, T Govender, GH Kruger, NV Jarvis, MM Sathekge: **Preclinical evaluation of 68Ga-labeled 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid-ubiquitin as a radioligand for PET infection imaging.** *J Nucl Med* 2014, **55**:308-14.
- [93] JD Gallezot, MQ Zheng, K Lim, SF Lin, D Labaree, D Matuskey, Y Huang, YS Ding, RE Carson, RT Malison: **Parametric Imaging and Test-Retest Variability of 11C-(+)-PHNO Binding to D2/D3 Dopamine Receptors in Humans on the High-Resolution Research Tomograph PET Scanner.** *J Nucl Med* 2014, **55**:960-966.
- [94] G Giovacchini, M Picchio, R Garcia-Parra, A Briganti, F Abdollah, L Gianolli, C Schindler, F Montorsi, C Messa, F Fazio: **11C-choline PET/CT predicts prostate cancer-specific survival in patients with biochemical failure during androgen-deprivation therapy.** *J Nucl Med* 2014, **55**:233-41.
- [95] CL Ho, S Chen, YL Leung, T Cheng, KN Wong, SK Cheung, R Liang, CS Chim: **11C-acetate PET/CT for metabolic characterization of multiple myeloma: a comparative study with 18F-FDG PET/CT.** *J Nucl Med* 2014, **55**:749-52.
- [96] P Caroli, C Nanni, D Rubello, A Alavi, S Fanti: **Non-FDG PET in the practice of oncology.** *Indian J Cancer* 2010, **47**:120-5.
- [97] TE Witzig, LI Gordon, F Cabanillas, MS Czuczman, C Emmanouilides, R Joyce, BL Pohlman, NL Bartlett, GA Wiseman, N Padre, et al: **Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma.** *J Clin Oncol* 2002, **20**:2453-63.
- [98] DE Milenic, MW Brechbiel: **Targeting of radio-isotopes for cancer therapy.** *Cancer Biol Ther* 2004, **3**:361-70.
- [99] MR Chamarthy, SC Williams, RM Moadel: **Radioimmunotherapy of**

- non-Hodgkin's lymphoma: from the 'magic bullets' to 'radioactive magic bullets'**. *Yale J Biol Med* 2011, **84**:391-407.
- [100] T Olafsen, AM Wu: **Antibody vectors for imaging**. *Semin Nucl Med* 2010, **40**:167-81.
- [101] S Kaur, G Venktaraman, M Jain, S Senapati, PK Garg, SK Batra: **Recent trends in antibody-based oncologic imaging**. *Cancer Lett* 2012, **315**:97-111.
- [102] P Holliger, PJ Hudson: **Engineered antibody fragments and the rise of single domains**. *Nat Biotechnol* 2005, **23**:1126-36.
- [103] R Chakravarty, S Goel, W Cai: **Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging?** *Theranostics* 2014, **4**:386-98.
- [104] M Schottelius, HJ Wester: **Molecular imaging targeting peptide receptors**. *Methods* 2009, **48**:161-77.
- [105] JC Reubi, HR Maecke: **Peptide-based probes for cancer imaging**. *J Nucl Med* 2008, **49**:1735-8.
- [106] MM Graham, Y Menda: **Radiopeptide imaging and therapy in the United States**. *J Nucl Med* 2011, **52 Suppl 2**:56S-63S.
- [107] MF Tweedle: **Peptide-targeted diagnostics and radiotherapeutics**. *Acc Chem Res* 2009, **42**:958-68.
- [108] J Cai, Z Liu, F Wang, F Li: **Phage display applications for molecular imaging**. *Curr Pharm Biotechnol* 2010, **11**:603-9.
- [109] SL Deutscher: **Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer**. *Chem Rev* 2010, **110**:3196-211.
- [110] J Folkman: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease**. *Nat Med* 1995, **1**:27-31.
- [111] W Cai, SS Gambhir, X Chen: **Chapter 7. Molecular imaging of tumor vasculature**. *Methods Enzymol* 2008, **445**:141-76.
- [112] GD Yancopoulos, S Davis, NW Gale, JS Rudge, SJ Wiegand, J Holash: **Vascular-specific growth factors and blood vessel formation**. *Nature* 2000, **407**:242-8.

- [113] LM Ellis, W Liu, SA Ahmad, F Fan, YD Jung, RM Shaheen, N Reinmuth: **Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy.** *Semin Oncol* 2001, **28**:94-104.
- [114] M Kuwano, J Fukushi, M Okamoto, A Nishie, H Goto, T Ishibashi, M Ono: **Angiogenesis factors.** *Intern Med* 2001, **40**:565-72.
- [115] W Arap, R Pasqualini, E Ruoslahti: **Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model.** *Science* 1998, **279**:377-80.
- [116] E Koivunen, DA Gay, E Ruoslahti: **Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library.** *J Biol Chem* 1993, **268**:20205-10.
- [117] E Koivunen, B Wang, E Ruoslahti: **Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library.** *J Cell Biol* 1994, **124**:373-80.
- [118] AH Negussie, JL Miller, G Reddy, SK Drake, BJ Wood, MR Dreher: **Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR peptide targeted thermally sensitive liposome.** *J Control Release* 2010, **143**:265-73.
- [119] RE Wang, Y Niu, H Wu, Y Hu, J Cai: **Development of NGR-based anti-cancer agents for targeted therapeutics and imaging.** *Anticancer Agents Med Chem* 2012, **12**:76-86.
- [120] RE Wang, Y Niu, H Wu, MN Amin, J Cai: **Development of NGR peptide-based agents for tumor imaging.** *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2011, **1**:36-46.
- [121] J Zhang, X Lu, N Wan, Z Hua, Z Wang, H Huang, M Yang, F Wang: **(68)Ga-DOTA-NGR as a novel molecular probe for APN-positive tumor imaging using MicroPET.** *Nucl Med Biol* 2014, **41**:268-75.
- [122] Y Shao, W Liang, F Kang, W Yang, X Ma, G Li, S Zong, K Chen, J Wang: **A direct comparison of tumor angiogenesis with Ga-labeled NGR and RGD peptides in HT-1080 tumor xenografts using microPET imaging.** *Amino Acids* 2014.
- [123] G Li, Y Xing, J Wang, PS Conti, K Chen: **Near-infrared fluorescence imaging of CD13 receptor expression using a novel Cy5.5-labeled dimeric NGR peptide.**

- Amino Acids* 2014, **46**:1547-56.
- [124] K Razak, AC Newland: **Induction of CD13 expression on fresh myeloid leukaemia: correlation of CD13 expression with aminopeptidase-N activity.** *Leuk Res* 1992, **16**:625-30.
- [125] M Terauchi, H Kajiyama, K Shibata, K Ino, A Nawa, S Mizutani, F Kikkawa: **Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells.** *BMC Cancer* 2007, **7**:140.
- [126] J Teranishi, H Ishiguro, K Hoshino, K Noguchi, Y Kubota, H Uemura: **Evaluation of role of angiotensin III and aminopeptidases in prostate cancer cells.** *Prostate* 2008, **68**:1666-73.
- [127] S Ito, R Miyahara, R Takahashi, S Nagai, K Takenaka, H Wada, F Tanaka: **Stromal aminopeptidase N expression: correlation with angiogenesis in non-small-cell lung cancer.** *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2009, **57**:591-8.
- [128] S Liu, WY Hsieh, Y Jiang, YS Kim, SG Sreerama, X Chen, B Jia, F Wang: **Evaluation of a (99m)Tc-labeled cyclic RGD tetramer for noninvasive imaging integrin alpha(v)beta3-positive breast cancer.** *Bioconjug Chem* 2007, **18**:438-46.
- [129] X Chen, M Tohme, R Park, Y Hou, JR Bading, PS Conti: **Micro-PET imaging of alphavbeta3-integrin expression with 18F-labeled dimeric RGD peptide.** *Mol Imaging* 2004, **3**:96-104.
- [130] I Dijkgraaf, CB Yim, GM Franssen, RC Schuit, G Luurtsema, S Liu, WJ Oyen, OC Boerman: **PET imaging of alphavbeta(3) integrin expression in tumours with (6)(8)Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, **38**:128-37.
- [131] O Jacobson, L Zhu, Y Ma, ID Weiss, X Sun, G Niu, DO Kiesewetter, X Chen: **Rapid and simple one-step F-18 labeling of peptides.** *Bioconjug Chem* 2011, **22**:422-8.
- [132] ZB Li, Z Wu, K Chen, EK Ryu, X Chen: **18F-labeled BBN-RGD heterodimer for prostate cancer imaging.** *J Nucl Med* 2008, **49**:453-61.

- [133] Z Liu, Y Yan, FT Chin, F Wang, X Chen: **Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using  $^{18}\text{F}$ -labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer  $^{18}\text{F}$ -FB-PEG3-Glu-RGD-BBN.** *J Med Chem* 2009, **52**:425-32.
- [134] J Shi, YS Kim, S Zhai, Z Liu, X Chen, S Liu: **Improving tumor uptake and pharmacokinetics of  $(^{64}\text{Cu})$ -labeled cyclic RGD peptide dimers with Gly(3) and PEG(4) linkers.** *Bioconjug Chem* 2009, **20**:750-9.
- [135] Z Liu, G Niu, J Shi, S Liu, F Wang, X Chen:  **$(^{68}\text{Ga})$ -labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$  PET imaging.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009, **36**:947-57.
- [136] Z Liu, S Liu, F Wang, X Chen: **Noninvasive imaging of tumor integrin expression using  $(^{18}\text{F})$ -labeled RGD dimer peptide with PEG (4) linkers.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009, **36**:1296-307.
- [137] Z Wu, ZB Li, W Cai, L He, FT Chin, F Li, X Chen:  **$^{18}\text{F}$ -labeled mini-PEG spaced RGD dimer ( $^{18}\text{F}$ -FPRGD2): synthesis and microPET imaging of  $\alpha\text{v}\beta_3$  integrin expression.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007, **34**:1823-31.
- [138] S Liu: **Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$  targeted radiotracers for tumor imaging.** *Mol Pharm* 2006, **3**:472-87.
- [139] R Haubner, AJ Beer, H Wang, X Chen: **Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **37 Suppl 1**:S86-103.
- [140] Y Wu, X Zhang, Z Xiong, Z Cheng, DR Fisher, S Liu, SS Gambhir, X Chen: **microPET imaging of glioma integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$  expression using  $(^{64}\text{Cu})$ -labeled tetrameric RGD peptide.** *J Nucl Med* 2005, **46**:1707-18.
- [141] TF Massoud, SS Gambhir: **Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light.** *Genes Dev* 2003, **17**:545-80.
- [142] SM Ametamey, M Honer, PA Schubiger: **Molecular imaging with PET.** *Chem Rev* 2008, **108**:1501-16.

- [143] K Chen, PS Conti: **Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging.** *Adv Drug Deliv Rev* 2010, **62**:1005-22.
- [144] K Chen, LP Yap, R Park, X Hui, K Wu, D Fan, X Chen, PS Conti: **A Cy5.5-labeled phage-displayed peptide probe for near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature in living mice.** *Amino Acids* 2012, **42**:1329-37.
- [145] H Kobayashi, M Ogawa, R Alford, PL Choyke, Y Urano: **New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging.** *Chem Rev* 2010, **110**:2620-40.
- [146] CH Tung: **Fluorescent peptide probes for in vivo diagnostic imaging.** *Biopolymers* 2004, **76**:391-403.
- [147] R Weissleder, U Mahmood: **Molecular imaging.** *Radiology* 2001, **219**:316-33.
- [148] A Aloufy, Y Latzer: **[Diet or health--the linkage between vegetarianism and anorexia nervosa].** *Harefuah* 2006, **145**:526-31, 549.
- [149] Z Cheng, Y Wu, Z Xiong, SS Gambhir, X Chen: **Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin alphavbeta3 expression in living mice.** *Bioconjug Chem* 2005, **16**:1433-41.
- [150] S Achilefu, HN Jimenez, RB Dorshow, JE Bugaj, EG Webb, RR Wilhelm, R Rajagopalan, J Johler, JL Erion: **Synthesis, in vitro receptor binding, and in vivo evaluation of fluorescein and carbocyanine peptide-based optical contrast agents.** *J Med Chem* 2002, **45**:2003-15.
- [151] S Achilefu, RB Dorshow, JE Bugaj, R Rajagopalan: **Novel receptor-targeted fluorescent contrast agents for in vivo tumor imaging.** *Invest Radiol* 2000, **35**:479-85.
- [152] U Mahmood, R Weissleder: **Near-infrared optical imaging of proteases in cancer.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:489-96.
- [153] A Moore, Z Medarova, A Potthast, G Dai: **In vivo targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe.** *Cancer Res* 2004, **64**:1821-7.
- [154] W Zhang, H Xiong, D Callaghan, H Liu, A Jones, K Pei, D Fatehi, E Brunette, D

- Stanimirovic: **Blood-brain barrier transport of amyloid beta peptides in efflux pump knock-out animals evaluated by in vivo optical imaging.** *Fluids Barriers CNS* 2013, **10**:13.
- [155] B Paudyal, P Paudyal, D Shah, H Tominaga, Y Tsushima, K Endo: **Detection of vascular endothelial growth factor in colon cancer xenografts using bevacizumab based near infrared fluorophore conjugate.** *J Biomed Sci* 2014, **21**:35.
- [156] LE Jennings, NJ Long: **'Two is better than one'--probes for dual-modality molecular imaging.** *Chem Commun (Camb)* 2009:3511-24.
- [157] F Chen, PA Ellison, CM Lewis, H Hong, Y Zhang, S Shi, R Hernandez, ME Meyerand, TE Barnhart, W Cai: **Chelator-free synthesis of a dual-modality PET/MRI agent.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2013, **52**:13319-23.
- [158] A Louie: **Multimodality imaging probes: design and challenges.** *Chem Rev* 2010, **110**:3146-95.
- [159] J Xie, K Chen, J Huang, S Lee, J Wang, J Gao, X Li, X Chen: **PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles.** *Biomaterials* 2010, **31**:3016-22.
- [160] M Akcan, MR Stroud, SJ Hansen, RJ Clark, NL Daly, DJ Craik, JM Olson: **Chemical re-engineering of chlorotoxin improves bioconjugation properties for tumor imaging and targeted therapy.** *J Med Chem* 2011, **54**:782-7.
- [161] K Liu, X Liu, Q Zeng, Y Zhang, L Tu, T Liu, X Kong, Y Wang, F Cao, SA Lambrechts, et al: **Covalently assembled NIR nanoplatform for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cells.** *ACS Nano* 2012, **6**:4054-62.
- [162] C Zhu, L Liu, Q Yang, F Lv, S Wang: **Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy.** *Chem Rev* 2012, **112**:4687-735.
- [163] M Zhou, R Zhang, M Huang, W Lu, S Song, MP Melancon, M Tian, D Liang, C Li: **A chelator-free multifunctional [64Cu]CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/CT imaging and photothermal ablation therapy.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**:15351-8.

- [164] J Liao, T Qi, B Chu, J Peng, F Luo, Z Qian: **Multifunctional nanostructured materials for multimodal cancer imaging and therapy.** *J Nanosci Nanotechnol* 2014, **14**:175-89.
- [165] TL Doane, C Burda: **The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy.** *Chem Soc Rev* 2012, **41**:2885-911.
- [166] MS Bhojani, M Van Dort, A Rehemtulla, BD Ross: **Targeted imaging and therapy of brain cancer using theranostic nanoparticles.** *Mol Pharm* 2010, **7**:1921-9.
- [167] KT Yong, I Roy, MT Swihart, PN Prasad: **Multifunctional Nanoparticles as Biocompatible Targeted Probes for Human Cancer Diagnosis and Therapy.** *J Mater Chem* 2009, **19**:4655-4672.
- [168] PS Low, WA Henne, DD Doorneweerd: **Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases.** *Acc Chem Res* 2008, **41**:120-9.
- [169] PJ Cassidy, GK Radda: **Molecular imaging perspectives.** *J R Soc Interface* 2005, **2**:133-44.
- [170] SS Gambhir: **Molecular imaging of cancer with positron emission tomography.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:683-93.
- [171] HR Herschman: **Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions.** *Science* 2003, **302**:605-8.
- [172] RP Baum, HR Kulkarni: **THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience.** *Theranostics* 2012, **2**:437-47.
- [173] SR Burks, EA Legenzov, EW Martin, C Li, W Lu, JP Kao: **Co-Encapsulating the Fusogenic Peptide INF7 and Molecular Imaging Probes in Liposomes Increases Intracellular Signal and Probe Retention.** *PLoS One* 2015, **10**:e0120982.
- [174] W Zeng, X Wang, P Xu, G Liu, HS Eden, X Chen: **Molecular Imaging of Apoptosis: From Micro to Macro.** *Theranostics* 2015, **5**:559-582.

- [175] ME Phelps: **Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:9226-33.
- [176] I Kayani, AM Groves: **<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose PET/CT in cancer imaging.** *Clin Med* 2006, **6**:240-4.
- [177] DJ Yang, EE Kim, T Inoue: **Targeted molecular imaging in oncology.** *Ann Nucl Med* 2006, **20**:1-11.
- [178] L Guzman-Rojas, R Rangel, A Salameh, JK Edwards, E Dondossola, YG Kim, A Saghatelian, RJ Giordano, MG Kolonin, FI Staquicini, et al: **Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:1637-42.
- [179] BM Zeglis, JS Lewis: **A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography.** *Dalton Trans* 2011, **40**:6168-95.
- [180] M Shokeen, CJ Anderson: **Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (PET).** *Acc Chem Res* 2009, **42**:832-41.
- [181] MT Ma, PS Donnelly: **Peptide targeted copper-64 radiopharmaceuticals.** *Curr Top Med Chem* 2011, **11**:500-20.
- [182] G Hao, AN Singh, OK Oz, X Sun: **Recent advances in copper radiopharmaceuticals.** *Curr Radiopharm* 2011, **4**:109-21.
- [183] X Sun, CJ Anderson: **Production and applications of copper-64 radiopharmaceuticals.** *Methods Enzymol* 2004, **386**:237-61.
- [184] CJ Anderson, R Ferdani: **Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research.** *Cancer Biother Radiopharm* 2009, **24**:379-93.
- [185] X Chen, S Liu, Y Hou, M Tohme, R Park, JR Bading, PS Conti: **MicroPET imaging of breast cancer alphav-integrin expression with <sup>64</sup>Cu-labeled dimeric RGD peptides.** *Mol Imaging Biol* 2004, **6**:350-9.

- [186] W Cai, Y Wu, K Chen, Q Cao, DA Tice, X Chen: **In vitro and in vivo characterization of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled Abegrin, a humanized monoclonal antibody against integrin alpha v beta 3.** *Cancer Res* 2006, **66**:9673-81.
- [187] ZB Li, W Cai, Q Cao, K Chen, Z Wu, L He, X Chen: **( $^{64}\text{Cu}$ )-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor alpha(v)beta(3) integrin expression.** *J Nucl Med* 2007, **48**:1162-71.
- [188] CA Boswell, X Sun, W Niu, GR Weisman, EH Wong, AL Rheingold, CJ Anderson: **Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes.** *J Med Chem* 2004, **47**:1465-74.
- [189] H Cai, Z Li, CW Huang, AH Shahinian, H Wang, R Park, PS Conti: **Evaluation of copper-64 labeled AmBaSar conjugated cyclic RGD peptide for improved microPET imaging of integrin alphavbeta3 expression.** *Bioconjug Chem* 2010, **21**:1417-24.
- [190] H Cai, Z Li, CW Huang, R Park, AH Shahinian, PS Conti: **An improved synthesis and biological evaluation of a new cage-like bifunctional chelator, 4-((8-amino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]icosane-1-ylamino)methyl)benzoic acid, for  $^{64}\text{Cu}$  radiopharmaceuticals.** *Nucl Med Biol* 2010, **37**:57-65.
- [191] X Chen: **Multimodality imaging of tumor integrin alphavbeta3 expression.** *Mini Rev Med Chem* 2006, **6**:227-34.
- [192] R Haubner, HJ Wester, WA Weber, C Mang, SI Ziegler, SL Goodman, R Senekowitsch-Schmidtke, H Kessler, M Schwaiger: **Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography.** *Cancer Res* 2001, **61**:1781-5.
- [193] FW Studier: **Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.** *Protein Expr Purif* 2005, **41**:207-34.
- [194] J Yu, S Tian, L Metheny-Barlow, LJ Chew, AJ Hayes, H Pan, GL Yu, LY Li: **Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor.** *Circ Res* 2001, **89**:1161-7.
- [195] W Hou, D Medynski, S Wu, X Lin, LY Li: **VEGI-192, a new isoform of**

- TNFSF15, specifically eliminates tumor vascular endothelial cells and suppresses tumor growth.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:5595-602.
- [196] X Chen, J Wu, H Liu, Z He, M Gu, N Wang, J Ma, J Hu, L Xia, H He, et al: **Approaches to efficient production of recombinant angiogenesis inhibitor rhVEGI-192 and characterization of its structure and antiangiogenic function.** *Protein Sci* 2010, **19**:449-57.
- [197] LJ Chew, H Pan, J Yu, S Tian, WQ Huang, JY Zhang, S Pang, LY Li: **A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor.** *FASEB J* 2002, **16**:742-4.
- [198] TS Migone, J Zhang, X Luo, L Zhuang, C Chen, B Hu, JS Hong, JW Perry, SF Chen, JX Zhou, et al: **TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator.** *Immunity* 2002, **16**:479-92.
- [199] G Bamias, C Martin, 3rd, M Marini, S Hoang, M Mishina, WG Ross, MA Sachedina, CM Friel, J Mize, SJ Bickston, et al: **Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease.** *J Immunol* 2003, **171**:4868-74.
- [200] U Seibold, B Wangler, R Schirmacher, C Wangler: **Bimodal imaging probes for combined PET and OI: recent developments and future directions for hybrid agent development.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:153741.
- [201] J Cheon, JH Lee: **Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology.** *Acc Chem Res* 2008, **41**:1630-40.
- [202] T Buckle, PT Chin, FW van Leeuwen: **(Non-targeted) radioactive/fluorescent nanoparticles and their potential in combined pre- and intraoperative imaging during sentinel lymph node resection.** *Nanotechnology* 2010, **21**:482001.
- [203] M Nahrendorf, E Keliher, B Marinelli, P Waterman, PF Feruglio, L Fexon, M Pivovarov, FK Swirski, MJ Pittet, C Vinegoni, et al: **Hybrid PET-optical imaging using targeted probes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:7910-5.
- [204] EJ Rutgers: **Sentinel node biopsy: interpretation and management of patients**

- with immunohistochemistry-positive sentinel nodes and those with micrometastases. *J Clin Oncol* 2008, 26:698-702.**
- [205] CM Balch, SJ Soong, JE Gershenwald, JF Thompson, DS Reintgen, N Cascinelli, M Urist, KM McMasters, MI Ross, JM Kirkwood, et al: **Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001, 19:3622-34.**
- [206] L Vermeeren, RA Valdes Olmos, W Meinhardt, A Bex, HG van der Poel, WV Vogel, F Sivo, CA Hoefnagel, S Horenblas: **Value of SPECT/CT for detection and anatomic localization of sentinel lymph nodes before laparoscopic sentinel node lymphadenectomy in prostate carcinoma. *J Nucl Med* 2009, 50:865-70.**
- [207] K Chen, W Ma, G Li, J Wang, W Yang, LP Yap, LD Hughes, R Park, PS Conti: **Synthesis and evaluation of <sup>64</sup>Cu-labeled monomeric and dimeric NGR peptides for MicroPET imaging of CD13 receptor expression. *Mol Pharm* 2013, 10:417-27.**
- [208] W Ma, F Kang, Z Wang, W Yang, G Li, X Ma, K Chen, Y Zhang, J Wang: **(<sup>99m</sup>Tc)-labeled monomeric and dimeric NGR peptides for SPECT imaging of CD13 receptor in tumor-bearing mice. *Amino Acids* 2013, 44:1337-45.**
- [209] Y Xing, J Zhao, PS Conti, K Chen: **Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. *Theranostics* 2014, 4:290-306.**
- [210] W Ma, G Li, J Wang, W Yang, Y Zhang, PS Conti, K Chen: **In vivo NIRF imaging-guided delivery of a novel NGR-VEGI fusion protein for targeting tumor vasculature. *Amino Acids* 2014, 46:2721-32.**
- [211] Y Shao, W Liang, F Kang, W Yang, X Ma, G Li, S Zong, K Chen, J Wang: **<sup>68</sup>Ga-labeled cyclic NGR peptide for microPET imaging of CD13 receptor expression. *Molecules* 2014, 19:11600-12.**
- [212] FF Knapp, Jr.: **Rhenium-188--a generator-derived radioisotope for cancer therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 1998, 13:337-49.**
- [213] S Gohlke, AL Beets, K Oetjen, S Mirzadeh, HJ Biersack, FF Knapp, Jr.: **Simple**

- new method for effective concentration of  $^{188}\text{Re}$  solutions from alumina-based  $^{188}\text{W}$ - $^{188}\text{Re}$  generator.** *J Nucl Med* 2000, **41**:1271-8.
- [214] Z Liu, M Pourghiasian, F Benard, J Pan, KS Lin, DM Perrin: **Preclinical Evaluation of a High-Affinity  $^{18}\text{F}$ -Trifluoroborate Octreotate Derivative for Somatostatin Receptor Imaging.** *J Nucl Med* 2014.
- [215] M Argyrou, A Valassi, M Andreou, M Lyra: **Rhenium-188 production in hospitals, by w-188/re-188 generator, for easy use in radionuclide therapy.** *Int J Mol Imaging* 2013, **2013**:290750.
- [216] K Liepe, JJ Zaknun, A Padhy, E Barrenechea, V Soroa, S Shrikant, P Asavatanabodee, MJ Jeong, M Dondi: **Radiosynovectomy using yttrium-90, phosphorus-32 or rhenium-188 radiocolloids versus corticoid instillation for rheumatoid arthritis of the knee.** *Ann Nucl Med* 2011, **25**:317-23.

# 个人简历和研究成果

## 1、个人简历

马温惠，女，汉族，党员，1986年9月出生，籍贯甘肃定西。2009年6月毕业于第四军医大学临床口腔医学系临床医学专业，获医学学士学位；2012年6月毕业于第四军医大学第一附属医院影像医学与核医学专业，获医学硕士学位；2012年9月至今就读于第四军医大学第一附属医院影像医学与核医学专业，博士研究生，导师为汪静教授，辅导老师为美国南加州大学分子影像中心 Kai Chen 副教授。

研究工作简历：就读期间的研究课题为“NGR 短肽介导肿瘤分子探针的靶向多模态显像及核素治疗研究”，为国家自然科学基金“ $^{188}\text{Re}$  标记 NGR-VEGI（肿瘤血管靶向的血管内皮生长抑制因子）治疗实体肿瘤的实验研究（30970846）”、“核素-切伦科夫多模态显像关键技术研究（81230033）”、国家自然科学基金重大仪器研制专项“小动物光学多模融合分子影像成像设备（81227901）”和国家重点基础研究发展计划“多模态分子影像关键科学问题研究(2011CB707704)”的资助子课题。博士研究生期间获得国家建设高水平大学公派研究生项目资助赴美国南加州大学分子影像中心进行 NGR 多肽相关的肿瘤分子影像研究。

## 2、在读期间主要研究成果

- [1] **Wenhui Ma**, Jia Jia, Shengjun Wang, Wei Bai, Jingwei Yi, Ming Bai, Zhiyong Quan, Zhanxin Yin, Daiming Fan, Jing Wang, Guohong Han. The Prognostic Value of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT for Hepatocellular Carcinoma Treated with Transarterial Chemoembolization (TACE). *Theranostics*. 2014, 4(7):736-44. (IF=7.827)
- [2] **Wenhui Ma**, Fei Kang, Zhe Wang, Guiyu Li, Weidong Yang, Xiaowei Ma, Guoquan Li, Yingqi Zhang, Kai Chen, Jing Wang.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Monomeric and Dimeric NGR Peptides for SPECT Imaging of CD13 Receptor in Tumor-bearing Mice. *Amino Acids*. 2013, 44(5):1337-45. (IF=3.914)

- [3] **Wenhui Ma**, Guoquan Li, Jing Wang, Peter S. Conti, Kai Chen. NIRF imaging guided delivery of a novel NGR-VEGI fusion protein by targeting tumor vasculature. *Amino Acids*. 2014, 46(12):2721-32. (IF=3.914)
- [4] **Wenhui Ma**, Zhe Wang, Weidong Yang, Xiaowei Ma, Fei Kang, and Jing Wang. Biodistribution and SPECT Imaging Study of <sup>99m</sup>Tc Labeling NGR Peptide in Nude Mice Bearing Human HepG2 Hepatoma. *Biomed Res Int*. 2014:618096. doi: 10.1155/2014/618096. Epub 2014 May 19. (IF=2.880)
- [5] **Wenhui Ma**, Jing Wang and Weidong Yang. <sup>99m</sup>Tc-labeled monomeric and dimeric NGR peptides for SPECT imaging of CD13 receptor. SNM 2012 Annual Meeting, June 9-13th 2012, Miami, Florida, USA. *J Nucl Med*. 2012, 53 (Supplement 1):1675 (壁报交流)
- [6] **Wenhui Ma**, Guoquan Li, Jing Wang, Peter S Conti and Kai Chen. Near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature in living mice using a Cy5.5-labeled NGR-VEGI probe. SNMMI 2014 Annual Meeting, June 7-11th 2014, St. Louis, Missouri, USA. *J Nucl Med*. 2014, 55 (Supplement 1):113 (大会报告)
- [7] Zhe Wang, **Wenhui Ma(共同第一作者)**, Jing Wang, Jinglan Deng, Menghui Yuan, Min Zhao, Jia L, Weidong Yang, Rui Zhang, Weiwei Qin, Chu D, Guoquan Li. Imaging and therapy of hSSTR2-transfected tumors using radiolabeled somatostatin analogs. *Tumor Biol*. 2013, 34(4):2451-57. (IF=2.840)
- [8] **Wenhui Ma**, Jing Wang, Weidong Yang, Guoquan Li and Shengjun Wang. Was [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Complete Response After Chemoradiotherapy Defined As Standardized Uptake Valuemax-1 hour $\geq$ 3 Complete? *Journal of Clinical Oncology*. 2011, 29 (9): e248. (Correspondence, IF=18.372)
- [9] **马温惠**, 汪静, 杨卫东, 李桂玉, 马晓伟, 王喆. <sup>99m</sup>Tc 标记 NGR 在人肝癌荷瘤小鼠体内的分布及 SPECT 显像. *同位素*. 2012, 25(1):62-66.
- [10] **马温惠**, 汪静. 新生血管靶向基序 NGR 的研究进展. *细胞分子和免疫学杂志*. 2012, 3(28): 318-20.
- [11] **马温惠**, 杨卫东, 汪静, 李国权, 王喆. <sup>131</sup>I-间位碘代苯胍 SPECT/CT 显像诊断肾上腺皮髓质增生 1 例. *中国医学影像学杂志*. 2012, 3: 234-35.

- [12] 马温惠, 杨卫东, 李桂玉, 汪静. 生长抑素受体介导的放射性核素治疗. 现代生物医学进展. 2012, 12(25): 4956-60.
- [13] 马温惠, 汪静, 杨卫东, 王喆, 李桂玉.  $^{131}\text{I}$ -NGR 制备及人 CD13 受体表达细胞株的体外筛选. 中华核医学杂志. 2012, 12(32): 447-51.
- [14] 汪静、杨卫东、马温惠等. NGR-VEGI 融合蛋白及其编码基因与表达纯化方法, 专利申请号: 201310093142.2, 目前状态: 获得授权.

## 致 谢

时光荏苒，回望过去，六年来在科室的学习经历却仿佛昨日，值此博士研究生毕业论文完成之时，我满怀感恩之情谨向一直关心、支持我的老师、同学、家人和朋友表达自己最诚挚的谢意！感激第四军医大学多年来对我的培养，更是深深感激与核医学科这场难得的缘分！

由衷感激尊敬的导师汪静教授多年来对我的精心教导，让我能够顺利的完成相关课题的研究工作！导师渊博的专业知识、严谨的治学态度、精益求精的工作作风和严于律己、宽以待人的崇高风范对学生影响深远，是我日后学习、工作和生活的楷模！感谢杨卫东副教授在本课题进行中为学生提供的诸多帮助和耐心指导，使得研究能够顺利进行！感谢邓敬兰教授对我们晚辈一如既往的殷切关怀！他们一丝不苟、精益求精的风范令我终生受益，我取得的每一点进步都凝聚着恩师们的心血和期望！

非常感谢国家留学基金委建设高水平大学公派研究生项目的资助，让我有机会能在博士研究生学习期间赴美深造！感谢美国南加州大学分子影像中心 Peter S. Conti 教授和 Kai Chen 副教授循循善诱的教导，他们不拘一格的研究思路给予了我无尽的启迪！感谢 Ryan Park 实验师、Tautis Skorka 技师、Li-pengYap 博士、朱义州博士、黄蕤博士和邢岩博士对我研究课题的慷慨帮助和大力支持！

课题进行过程中受到第四军医大学药学系生物制药学教研室张英起教授和薛晓畅副教授给予的鼎力支持！还要由衷感谢第四军医大学第一附属医院核医学科李国权博士、王喆博士、邵亚辉博士、康飞博士、赵明玄博士、张明如硕士、马晓伟硕士、王胜军、易婧薇和李桂玉老师在实验进行中给予的帮助！感谢黎倩、曾瑾、宗书、刘大亮、王云雅、全志永以及科室其他老师们为我提供的大力支持！

本论文的完成建立在数位专业学者辛勤的研究基础上，由衷感谢这篇论文所涉及各位学者研究成果对我的帮助和启发！

再次感谢我的家人、同学和朋友给予我的关怀、帮助、支持、包容和理解！