

· 综 述 ·

人表皮生长因子受体 2 靶向的亲体和在肿瘤核素显像的研究进展*

康 磊 综述, 王荣福[△] 审校
(北京大学第一医院核医学科, 北京 100034)

关键词: 受体表皮生长因子; 肿瘤; 亲和体; 放射性核素显像

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 08. 023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)08-0782-03

人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 与多种肿瘤的关系密切, 在乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌中具有过度表达, 而且 HER2 过度表达的肿瘤其恶性程度高、侵袭性强和患者预后差。因 HER2 分子在正常组织中的表达非常低甚至检测不到, 这种表达差异的特点使得 HER2 作为一种肿瘤生物标记物已被成功应用于乳腺癌的诊断和治疗中。由于亲和体 (Affibody) 具有相对分子质量小、结合力高、特异性强、靶向浓聚迅速、血液清除快等优点, 因此放射性标记的 HER2 靶向的亲体和 HER2 表达阳性的肿瘤体内显像中具有很好的应用价值。本文就 HER2 特异性的亲和体和肿瘤核素显像的研究进展进行综述。

1 HER2 与肿瘤的关系

HER 家族是一类具有酪氨酸激酶活性的受体蛋白, 包括 HER1、HER2、HER3 及与肿瘤恶性度相关蛋白 HER4。HER1 和 ErbB-1 过度表达常见于预后差的乳腺癌和肺癌^[1]。HER2 蛋白在 20%~30% 的乳腺癌中有过度表达, HER2 表达阳性的肿瘤恶性度高、侵袭性强、转移和复发发生早、患者预后差, 且对他莫昔芬 (tamoxifen) 等抗肿瘤药物具有耐药抵抗效应, 但对蒽环类化疗药 (如阿霉素) 则比较敏感^[2]。HER2 靶向的单克隆抗体如曲妥单抗能够在体内减缓甚至阻止乳腺癌细胞的生长, 在分子水平对乳腺癌进行靶向治疗, 已被应用于临床, 并取得良好效果^[3]。

2 HER2 的检测方法

临床上对肿瘤的 HER2 表达检测一般采用取活检标本进行生化和组织病理学检查的方法, 包括使用实时定量 PCR 测定 HER2 基因的含量, 使用蛋白印迹电泳测定 HER2 蛋白表达量, 或使用免疫组织染色检测病理组织切片的 HER2 蛋白表达。虽然病理活检是评价 HER2 表达的金指标, 但是这种有创性的检查不能作为肿瘤疗效评价的常规检查而多次进行, 活检的局部情况不能反映肿瘤的整体, 缺乏时效性和全面性。有研究发现, 使用免疫组化或者原位杂交方法测定 HER2 的表达会有 20% 的误诊率^[4]。因此对 HER2 的表达检测需要一种无创、动态的体内评价方法。

核医学显像能够对体内的生物指标进行无创、实时的功能评价, 特别是正电子发射断层 (positron emission tomography, PET) 显像具有灵敏度高、空间分辨率好、量化评价的优点, 在临床疾病的诊断中越来越受到关注。核素示踪为病理活检方法弥补了检测方面的缺点, 既可评价肿瘤的原位灶和转移瘤, 又可避免由于活检取材局限而导致的假阴性诊断^[5]。

3 HER2 靶向的亲体和

亲和体是一类基于非免疫蛋白亲和配体的新型支架蛋白, 最初来源于金黄色葡萄球菌蛋白。其大小根据序列不同, 为

4.5~180 kD^[6]。它可以与靶向蛋白特异性的结合, 具有很高的亲和力, 且分子小, 结构简单, 能够通过多肽合成仪来合成和修饰。

HER2 靶向的亲体是通过 HER2 蛋白的细胞外区进行噬菌体展示技术筛选而得到的^[6]。该亲和体与 HER2 具有特异性的结合能力, 其结合位点与曲妥单抗、HER2 的结合表位不同^[7]。第 1 代 HER2 靶向的亲体主要为 Z_{HER2,4}, 其亲和力为 50 nM。但亲和力较低, 需要进一步优化。有研究将 Z_{HER2,4} 的头尾端结合形成二聚体 (Z_{HER2,4})₂, 其亲和力显著提升至 3 nM^[8]。第 2 代亲和体 Z_{HER2,342} 是通过成熟的亲和体序列进行定点变异而筛选得到的, 其相对分子质量约 7 kD, 亲和力指数由 50 nM 提高至 22 pM, 提高了近 2 200 倍^[9]。

4 HER2 亲和体的放射性标记

亲和体与受体的结合类似于单克隆抗体, 但是亲和体具有抗体无法比拟的优点。(1) 一般单克隆抗体的相对分子质量为 150 kD, 而亲和体相对分子质量很小, 甚至不到单克隆抗体的 10%。单克隆抗体分子大于肾脏滤过孔径 (60 kD), 因此无法通过肾脏清除而只能通过肝胆分泌途径清除。但是肝脏的肝胆分泌慢, 导致单克隆抗体的血液清除慢, 显像本底高。(2) 小分子的亲和体可以快速浓聚于靶向部位并且在血液中的清除快, 用于显像剂时获得的图像对比度高, 优于单克隆抗体。(3) 亲和体物理性质非常稳定, 容易制备和储存而且耐高温, 因而应用范围较单克隆抗体更加广泛。

已有许多研究对 HER2 靶向的亲体和进行不同放射性核素的标记, 以评价放射性标记的亲体和 HER2 阳性肿瘤的体内显像和体内治疗的应用价值。用于 HER2 亲和体肿瘤显像的放射性核素有碘 [¹²⁵I]^[8-11]、镓 [⁹⁹Tc^m]^[12-15]、铜 [¹¹¹In]^[7,16-19]、氟 [¹⁸F]^[20-22]、溴 [⁷⁶Br]^[23]、铜 [⁶⁴Cu]^[24] 和镓 [⁶⁸Ga]^[25], 用于治疗的放射性核素有钇 [⁹⁰Y]^[26]、镧 [¹⁷⁷Lu]^[27] 和砷 [²¹¹At]^[28]。

5 HER2 亲和体的肿瘤显像

5.1 放射性¹²⁵I 标记的亲体和 早期使用¹²⁵I (T_{1/2}=60 d, E_γ=35 kV) 标记亲和体 Z_{HER2,4} 的单体和二聚体并测定其体外细胞亲和力, 发现二聚体比单体的结合活性强^[8]。在荷 SK-OV3 卵巢肿瘤 (过度表达 HER2) 裸鼠体内, ¹²⁵I 标记的二聚体主要通过肾脏清除, 且在肿瘤部位具有显著的特异性浓聚, 证明亲和体与肿瘤的结合具有特异性^[10]。有研究对带组氨酸标签的 (Z_{HER2,4})₂ 二聚体分别进行⁹⁹Tc^m 和¹²⁵I 标记, 发现在 SK-OV3 荷裸鼠体内注射后 4 h, 镓标探针在肿瘤的摄取与碘标探针无差异, 但是在肝脏的摄取比碘标探针高^[11]。该二聚体在 C 端与羟苯乙基马来酰亚胺 (4-hydroxyphenyl ethyl maleim-

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2006CB705705); 国家自然科学基金资助项目 (30870729, 81071183/ H1806); “十一五”国家科技支撑计划课题资助项目 (2007BAI05B01)。△ 通讯作者, Tel: (010) 83572594; E-mail: roongfu_wang2003@yahoo.com.cn。

ide, HPEM) 偶联后可被 ^{76}Br 标记。其标记率为 83%, 肿瘤放射性分布为 4.8% IA/g, T/B 为 9^[23]。第 2 代 HER2 亲和体 $Z_{\text{HER2},342}$ 的碘标产物注入荷瘤裸鼠 4 h 后的 T/B 达 38, 远优于第 1 代亲和体 $Z_{\text{HER2},4}$ 的单体和二聚体^[9]。

5.2 放射性 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的亲和体 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ($T_{1/2} = 6 \text{ h}$, $E_{\gamma} = 140 \text{ keV}$) 是单光子成像最常用的放射性核素, 发射能量适中、剂量负荷低、价格低廉并且示踪效果好。相比巯基乙酰三甘氨酸-N-羧基丁二酰亚胺酯(NHS-MAG3)结构, 水溶性的螯合结构可以降低探针在肝胆的摄取^[12]。半胱氨酸-二甘氨酸(CGG)和半胱氨酸-三甘氨酸(CGGG)序列与 MAG3 相似, 可以起到 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记转螯合的作用, 比 MAG3 多一个氨基可以增加标记探针的水溶性^[13]。丝氨酸代替甘氨酸亦可增加探针的水溶性, 由此将 MAG3 结构改造为巯基乙酰基-甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(maGSG)、巯基乙酰基-甘氨酸-右旋丝氨酸-甘氨酸(maG-DS-G) 和巯基乙酰基-三丝氨酸(maSSS)结构, 发现 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记探针的肝胆分泌明显降低, 肾脏的清除率提高, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -maSSS- $Z_{\text{HER2},342}$ 的 SKOV3 肿瘤分布约 11.5% IA/g, T/B 值为 76^[14]。带组氨酸(his)标签的 $Z_{\text{HER2},342}$ 和无 his 的 $Z_{\text{HER2},2395}$ 的 HER2 亲和力分别为 29 pM 和 27 pM, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 的标记率达 90% 以上^[15]。

5.3 放射性 ^{111}In 标记的亲和体 ^{111}In ($T_{1/2} = 2.8 \text{ d}$, $E_{\gamma} = 171, 245 \text{ keV}$) 标记的亲和体需在特异的位点进行螯合结构修饰, 其标记率高, 无需纯化即可应用于体内研究。有研究使用多肽合成法一步合成了 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-N-四乙酸(DOTA)- $Z_{\text{HER2},342}$ -pep2 分子, 具有 65 pM 的亲和力^[7]。除此之外, ^{111}In 还可通过螯合结构苯甲基-二乙烯三胺五乙酸(DTPA)^[16]、CHX-A''-DTPA^[17]、苯甲基-DOTA^[18] 的异硫氰酸基与 $Z_{\text{HER2},342}$ 偶联后进行标记。苯甲基-DTPA- $Z_{\text{HER2},342}$ 的亲和力为 21 pM, 注射后 4 h 在 SKOV3 肿瘤的分布为 12% IA/g 左右, T/B 为 100。相比苯甲基-DTPA, CHX-A''-DTPA 偶联的亲和体的标记稳定性和标记率更高, 在室温反应 30 min 即可达到 95% 的标记率, 放化纯达 12 MBq/nmol, 注射后 4 h 在肿瘤的分布约 10% IA/g, T/B 达 190, 肿瘤显像十分清晰。 ^{111}In -苯甲基-DOTA- $Z_{\text{HER2},342}$ 在 60 度反应 5 min 可达 97% 的标记率, 肿瘤分布为 4.4 ± 1.0% IA/g, T/B 为 23^[23]。马来酰亚胺乙基乙酰胺-DOTA(MMA-DOTA)与亲和体的螯合无需二硫苏糖醇(DTT)的参与, 偶联率达 93%。 ^{111}In 标记产物比活度达 7 GBq/mmol, 无 His 标签的 ^{111}In -MMA-DOTA- $Z_{\text{HER2},2395}$ 比带 His 的探针的肝胆摄取低, 肿瘤浓聚迅速且血液清除快, 注射 1 h 后 T/B 为 18 ± 8, 4 h 后高达 138 ± 8^[19]。

最近有研究构建的 HER2 靶向的亲和体既可由 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记, 也可通过 DOTA 被 ^{111}In 标记^[29]。该研究显示两种标记探针均可与 HER2 受体在体内外结合, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记探针较 ^{111}In 标记探针的肾脏浓聚低 4 倍, 但肿瘤摄取相同 T/B 达 30。丝氨酸-谷氨酸-半胱氨酸-甘氨酸(SECG)结构为多种核素对蛋白标记多种核素如 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 、 ^{111}In 、 ^{68}Ga 、钴 [^{60}Co] 或 ^{90}Y 提供了一个多功能平台。

5.4 正电子检索标记的亲和体 相比单光子显像, PET 显像具有灵敏度高、空间分辨率好、量化评价的优势。HER2 靶向的 PET 显像可以在早期对肿瘤的 HER2 表达和治疗效果进行监测。有研究将对氟苯甲醛与亲和体的氨基进行偶联后被 ^{18}F ($T_{1/2} = 110 \text{ min}$) 标记, 得到 ^{18}F 标记的 $Z_{\text{HER2},477}$ 单体和二聚体, 二者在体外均具有特异性的靶向结合力, 但体内研究发现单体在肿瘤的浓聚较二聚体更高且更快^[20]。 $Z_{\text{HER2},342}$ 通过半胱氨酸与 ^{18}F 标记的氟苯乙基马来酰亚胺 (^{18}F -FBEM) 偶联而被标记。注射后 20 min 肿瘤即有非常高的摄取, 60 min 后

达平台期, 1 h 后其 T/B 为 7.5, 4 h 时 T/B 达 27。预先注射未标记的探针会降低标记探针的肿瘤摄取^[21]。通过 FBEM 偶联所得的 ^{18}F 标记 $Z_{\text{HER2},342}$ 的二聚体在体内外均显示出高度的肿瘤摄取^[22]。

6 展 望

虽然近年来以 HER2 靶向的亲和体肿瘤显像和肿瘤治疗均取得了长足的发展, 但由于小分子探针具有肾脏清除的特性, 因此肾脏部位的放射性摄取较高, 这种非特异的放射性浓聚可能会导致肾脏的潜在毒性, 并限制了 HER2 靶向的放射性治疗的应用。通过对氨基酸序列进行修饰来改变表面电荷、脂溶性、蛋白结合亲和力并使用不同的同位素优化标记方法来降低肾脏摄取, 进一步提高标记探针在肿瘤部位的特异性摄取, 进而使 HER2 靶向的亲和体在肿瘤的阳性显像和治疗方面最终应用于临床。

参考文献:

- [1] Castillo L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, et al. Pharmacological background of EGFR targeting[J]. *Ann Oncol*, 2004, 15(7): 1007-1012.
- [2] Ferretti G, Felici A, Papaldo P, et al. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19(1): 56-62.
- [3] Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6326-6330.
- [4] Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER2 status: which test to use? [J]. *J Pathol*, 2003, 199(4): 411-417.
- [5] Behr TM, Béhé M, Wormann B. Trastuzumab and breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(13): 995-996.
- [6] Landon LA, Deutscher SL. Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(3): 509-517.
- [7] Orlova A, Tolmachev V, Pehrson R, et al. Synthetic Affibody molecules: A novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2 expressing malignant tumors [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 2178-2186.
- [8] Steffen AC, Wikman M, Tolmachev V, et al. In vitro characterization of a bivalent anti-HER2 affibody with potential for radionuclide based diagnostics[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(3): 239-248.
- [9] Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, et al. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4339-4348.
- [10] Steffen AC, Orlova A, Wikman M, et al. Affibody-mediated tumour targeting of HER2 expressing xenografts in mice[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(6): 631-638.
- [11] Orlova A, Nilsson FY, Wikman M, et al. Comparative in vivo evaluation of technetium and iodine labels on an anti-HER2 affibody for single-photon imaging of HER2 expression in tumors[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(3): 512-519.
- [12] Engfeldt T, Orlova A, Tran T, et al. Imaging of HER2-expressing tumours using a synthetic Affibody molecule containing the $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ chelating mercaptoacetyl-glycyl-gly-

- cyl-glycyl(MAG3)sequence[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(5):722-733.
- [13] Tran T, Engfeldt T, Orlova A, et al. In vivo evaluation of cysteine-based chelators for attachment of $^{99}\text{Tc}^m$ to tumor-targeting affibody molecules[J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(2):549-558.
- [14] Engfeldt T, Tran T, Orlova A, et al. $^{99}\text{Tc}^m$ -chelator engineering to improve tumour targeting properties of a HER2-specific Affibody molecule[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(11):1843-1853.
- [15] Ahlgren S, Wällberg H, Tran TA, et al. Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled recombinant affibody molecule, ZHER2: 2395, with C-terminally engineered cysteine[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(5):781-789.
- [16] Tolmachev V, Nilsson FY, Widstrom C, et al. ^{111}In -benzyl-DTPA-Z_{HER2:342}, an affibody-based conjugate for in vivo imaging of HER2 expression in malignant tumors[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(5):846-853.
- [17] Orlova A, Rosik D, Sandstrom M, et al. Evaluation of [(111/114m)In]CHX-A''-DTPA-Z HER2:342, an Affibody ligand conjugate for targeting of HER2-expressing malignant tumors[J]. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 51(4):314-323.
- [18] Orlova A, Tran T, Widstrom CH, et al. Pre-clinical evaluation of [^{111}In]-benzyl-DOTA-Z(HER2:342), a potential agent for imaging of HER2 expression in malignant tumors[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(3):397-404.
- [19] Ahlgren S, Orlova A, Rosik D, et al. Evaluation of maleimide derivative of DOTA for site-specific labeling of recombinant affibody molecules[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(1):235-243.
- [20] Cheng Z, De Jesus OP, Namavari M, et al. Small-animal PET imaging of human epidermal growth factor receptor type 2 expression with sitespecific ^{18}F -labeled protein scaffold molecules[J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(5):804-813.
- [21] Kramer-Marek G, Kiesewetter DO, Martiniova L, et al. **· 综 述 ·**
- [18 F] FBEM-Z (HER2: 342)-Affibody molecule-a new molecular tracer for in vivo monitoring of HER2 expression by positron emission tomography[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(5):1008-1018.
- [22] Namavari M, Padilla De Jesus O, Cheng Z, et al. Direct sitespecific radiolabeling of an Affibody protein with 4- ^{18}F fluorobenzaldehyde via oxime chemistry[J]. *Mol Imaging Biol*, 2008, 10(4):177-181.
- [23] Mume E, Orlova A, Larsson B, et al. Evaluation of ((4-hydroxyphenyl) ethyl) maleimide for site-specific radiobromination of anti-HER2 affibody[J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(6):1547-1555.
- [24] Cheng Z, De Jesus OP, Kramer DJ, et al. ^{64}Cu -labeled Affibody molecules for imaging of HER2 expressing tumors [J]. *Mol Imaging Biol*, 2009, 12(3):316-324.
- [25] Ren G, Zhang R, Liu Z, et al. A 2-helix small protein labeled with ^{68}Ga for PET imaging of HER2 expression [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(9):1492-1499.
- [26] Fortin MA, Orlova A, Malmstrom PU, et al. Labelling chemistry and characterization of [$^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$]-DOTA-Z_{HER2:342-3} Affibody molecule, a candidate agent for locoregional treatment of urinary bladder carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19(2):285-291.
- [27] Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, et al. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a ^{177}Lu -labeled HER2-specific Affibody molecule [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6):2773-2782.
- [28] Steffen AC, Almqvist Y, Chyan MK, et al. Biodistribution of ^{211}At labeled HER-2 binding affibody molecules in mice[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(5):1141-1147.
- [29] Tran TA, Rosik D, Abrahmsén L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of a multifunctional HER2-specific Affibody molecule for molecular imaging[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36(11):1864-1873.

(收稿日期:2010-11-09 修回日期:2010-12-22)

放射性核素示踪心脏干细胞治疗研究应用及进展*

卢霞综述,王荣福[△]审校

(北京大学第一医院核医学科,北京 100034)

关键词: 干细胞;心脏;移植;核素示踪

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)08-0784-04

心血管疾病的治疗虽然取得了进展,但是在世界范围内,其发病率和病死率仍然居高不下。

目前统计学资料表明,在美国和英国由于心脏病造成的死亡率仍然处于第 1 位。因此,寻求和探索心脏病新的诊治方法是当前世界医学研究的热点课题之一。干细胞是具有自我更

新能力、高度增殖和多项分化潜能的细胞群体。干细胞治疗是近年提出的极具发展前景的缺血性心血管疾病的治疗策略。可供移植的干细胞有骨髓干细胞、内皮祖细胞、胚胎干细胞和间充质干细胞等。目前,心脏干细胞移植大部分使用骨髓间充质干细胞。但也有研究者发现心脏本身也有干细胞存在。美

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2006CB705705);北京大学 985 二期基金资助项目(985-2-056);“十一五”国家科技支撑计划课题资助项目(2007BAI05B01)。[△] 通讯作者, Tel:(010)83572594; E-mail:rongfu_wang2003@yahoo.com.cn。