

FAP α 靶向标记化合物¹³¹I-FAPI-03 的合成及初步 体内外实验研究

马欢^{1,2}, 廖家莉², 杨远友², 刘宁², 李飞泽²

(1. 四川省医学科学院 四川省人民医院(电子科技大学附属医院)核医学科, 成都 610072;

2. 四川大学 原子核科学技术研究所, 辐射物理及技术教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 本研究以 4-喹啉基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷为骨架, 对连接基团进行碳链延长及羟基修饰成功合成 FAPI 衍生物 ATE-FAPI-03; 通过亲电取代反应实现其¹³¹I 标记, 并对标记化合物¹³¹I-FAPI-03 的脂水分配比、体外稳定性等进行分析; 开展细胞结合、内吞、流出等实验以评价¹³¹I-FAPI-03 的体外动力学特征; 并考察了¹³¹I-FAPI-03 在荷胶质瘤小鼠体内的分布情况。结果表明:¹³¹I-FAPI-03 为亲脂性小分子, 并具有良好的体外稳定性; 与 FAP α 阳性细胞 U87MG 孵育 10 min 时的结合率为(22.00 \pm 0.35)%, 且随着孵育时间的延长结合率有明显的上升趋势, 而与 FAP α 阴性细胞 MCF-7 的结合率始终处于较低水平; 通过竞争结合实验测得¹³¹I-FAPI-03 的 IC₅₀ 值为 45.5 nM, 表明其对 FAP α 具有较高的亲和力; 大部分与 U87MG 细胞结合的¹³¹I-FAPI-03 可被细胞内吞, 但其在细胞中的滞留能力偏低。¹³¹I-FAPI-03 在荷胶质瘤小鼠体内具有快速的肿瘤靶向能力: 经尾静脉注射 5 min 后, 肿瘤组织对¹³¹I-FAPI-03 的放射性摄取值为(14.90 \pm 3.21)% ID/g, 注射 2 h 后, 肿瘤/肌肉的放射性摄取比值达到(43.7 \pm 16.7)。上述结果为新型 FAP α 靶向药物的研发提供了重要的参考。

关键词: FAP α ; ¹³¹I; FAPI; 胶质瘤

中图分类号: TL92+3

文献标志码: A

文章编号: 1000-7512(2024)02-0097-09

doi: 10.7538/tws.2024.37.02.0097

Synthesis and Preliminary Evaluation of FAP α Targeted Tracer ¹³¹I-FAPI-03

MA Huan^{1,2}, LIAO Jiali², YANG Yuanyou², LIU Ning², LI Feize²

(1. Department of Nuclear Medicine, Sichuan Provincial People's Hospital,
University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, China;

2. Key Laboratory of Radiation Physics and Technology of the Ministry of Education,
Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Using N-(4-quinolinoyl)-Gly-(2-cyanopyrrolidine) as scaffold, we prolonged the linker with serine to obtain a FAPI derivative ATE-FAPI-03, which was subsequently labeled with ¹³¹I by electrophilic substitution. Then the in vitro stability, Log P value, binding affinity, targeting properties and biodistribution behavior of ¹³¹I-FAPI-03 was evaluated. Results show that ¹³¹I-FAPI-03 was lipophilic and stable in vitro, capable of specifically binding to FAP α -positive U87MG cells

收稿日期: 2023-12-04; 修回日期: 2024-01-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2023SCU12132); 四川省医学科学院 四川省人民医院青年人才基金(2022QN32)

通信作者: 李飞泽

fast with a major proportion trapped intracellularly. After 10 min of incubation, ^{131}I -FAP1-03 showed a specific binding rate of $(22.00 \pm 0.35)\%$, and the binding rate increased with the incubation time, to a peak of $(37.5 \pm 0.83)\%$ at 180 min. However, the FAP α -negative MCF-7 cells exhibited very low uptake of ^{131}I -FAP1-03 at any time point. The IC_{50} measured by the competition assay indicated significant binding property of ^{131}I -FAP1-03. Biodistribution studies revealed that ^{131}I -FAP1-03 could rapidly accumulate in tumor sites with an uptake of $(14.90 \pm 3.21)\%$ ID/g at 5 min post injection. At 2 h post injection, ^{131}I -FAP1-03 displayed the highest tumor-to-muscle ratio of 43.7 ± 16.7 . All above results provided important reference for the development of novel FAP α -targeting tracers.

Key words: FAP α ; ^{131}I ; FAPI; glioma

肿瘤相关成纤维细胞(CAF)作为肿瘤微环境的主要组成部分,积极参与细胞外基质结构的重塑、肿瘤侵袭与转移、免疫抑制和耐药生成过程^[1-3]。成纤维细胞活化蛋白 α (FAP α)是丝氨酸蛋白酶家族的一类II型整合膜蛋白,也是二肽基肽酶IV家族的一员,在CAF中高度表达,被认为是CAF最具代表性的标志物之一^[4-5]。FAP α 作为肿瘤基质中最有前景的靶点之一,已成为核医学肿瘤诊疗一体化研究领域的热点。以 ^{68}Ga -FAP1-04/46为代表的 ^{68}Ga 标记FAP α 靶向小分子抑制剂(^{68}Ga -FAPIs)在临床前及临床研究中展现了快速肾代谢、低背景和肿瘤特异性高摄取等特征。与 ^{18}F -FDG相比, ^{68}Ga -FAPIs在脑、头颈、胃肠道、肝脏等多种高或可变生理糖代谢器官的肿瘤诊断中表现出优异的图像对比度,进而对此类病灶的检测,尤其是对远端转移灶的检测具有更高的灵敏度,可为肿瘤分期及治疗方案规划提供重要参考^[6-12]。

尽管 ^{68}Ga -FAPIs被认为是很有前景的肿瘤示踪剂,可以帮助确定特定肿瘤组织的定位与代谢特征,在指导活检、辅助放疗靶组织轮廓规划和术后疾病进展监测方面均有重要的应用价值;然而,已报道的FAPI配体的生物半衰期普遍较短,仅数小时的肿瘤滞留时间使其与 $^{177}\text{Lu}/^{225}\text{Ac}$ 等核素搭配使用时不能充分利用治疗核素的辐射剂量,降低了相关药物在靶向治疗方面的应用价值。为此,研究者在FAPI衍生物的结构设计及生物学方面开展了大量研究,包括二聚、异二聚、多聚和白蛋白结合剂修饰等,一定程度上改善了相关药物的肿瘤摄取和滞留能力^[13-17]。但相对于上述治疗核素的物理半衰期,FAPI衍生物的性能还有进一步的提升空间。除了先导化合物的结构优化,引入新

的标记基因实现诊疗核素与靶向载体的高效搭配,对推动FAP α 靶向肿瘤诊疗一体化进程同样具有重要意义。

开发 ^{131}I 标记FAPI示踪剂可为FAPIs化合物在肿瘤诊疗中的应用提供新的思路。首先,适合于SPECT显像的 ^{131}I 较 ^{68}Ga 更易获取,其相对更长的物理半衰期也有利于前期基础研究的开展。其次,SPECT显像比PET显像费用更为低廉,更容易实现规模化推广。最后,适宜于肿瘤靶向治疗的 α 核素 ^{211}At ($T_{1/2} = 7.21\text{ h}$)与 ^{131}I 具有相似的化学性质,且物理半衰期与FAPI配体的生物半衰期较为匹配。开展 ^{131}I 标记FAPI实验,能够为来源匮乏的 ^{211}At 相关研究提供重要参考。此外,连接子是标记药物的关键组成部分,关乎着最终药物的靶向能力、体内稳定以及代谢途径。据文献报道,碳链作为连接子可以增加化合物的亲脂性^[18],从而有望延长药物的代谢时间,而连接子的羟基修饰可以优化示踪剂的药代动力学性质及亲和性^[19]。因此,通过羟基衍生及碳链延长对连接子进行修饰,具有优化标记药物对FAP α 的亲合力以及在肿瘤组织的滞留能力的可能性。综上所述,本研究以主流FAPI结构的核心4-喹啉基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷骨架为基础,通过连接子碳链延长、羟基修饰合成适合于 ^{131}I 标记的FAPI衍生物ATE-FAP1-03,随后通过亲电取代反应实现 ^{131}I 的放射性标记,在对标记化合物 ^{131}I -FAP1-03的脂水分配比、稳定性等进行分析后,开展了细胞结合、内吞、流出等实验以评价 ^{131}I -FAP1-03的体外靶向性以及动力学特征,并通过体内分布实验进一步考察了 ^{131}I -FAP1-03在荷瘤小鼠体内的靶向性。通过上述实验的开展考察修饰后的标记药物其体内性能,

为进一步的²¹¹At标记 FAPI 药物的研究奠定坚实基础,同时也为 FAPI 药物的结构优化提供参考。

1 实验材料

1.1 试剂与仪器

6-羟基喹啉-4-羧酸:上海毕得医药科技股份有限公司;1-溴-4-氯丁烷:上海迈瑞尔化学技术有限公司;N-Boc-哌嗪、N-碘代琥珀酰亚胺(NIS):上海麦克林生化科技有限公司;胎牛血清:浙江天杭生物科技股份有限公司;高糖培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS):美国 Hyclone 公司;L-抗坏血酸钠:上海安耐吉化学有限公司;生理盐水:四川科伦药业股份有限公司;¹³¹I-NaI:中国工程物理研究院。

核磁共振谱仪(400 MHz):德国 Bruker(布鲁克)公司;液相色谱-质谱联用仪:安捷伦科技有限公司;万分之一天平:德国 Sartorius 公司;

放射性活度计:美国 CAPINTEC 公司;井型 NaI(Tl)闪烁体探测器、定标器:北京中核仪器厂。

1.2 细胞与动物

人脑星型胶质母细胞瘤细胞 U87MG、人乳腺癌细胞 MCF-7:美国 ATCC 公司。培养条件均为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 °C 恒温 and 5% CO₂ 的培养箱中培养。

Balb/c 裸鼠(SPF 级):5 周龄,雌性,成都达硕实验动物有限公司。所有操作均严格遵守动物福利及动物伦理规范。

2 实验方法

2.1 标记前体 ATE-FAPI-03 的合成

参考 Haberkorn 团队报道的方法合成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈(H-Gly-Pro-CN)及部分中间体^[20],双功能偶联剂 p-Me-ATE 的合成步骤参考本课题组前期的报道^[21],标记前体 ATE-FAPI-03 的合成路线示于图 1。

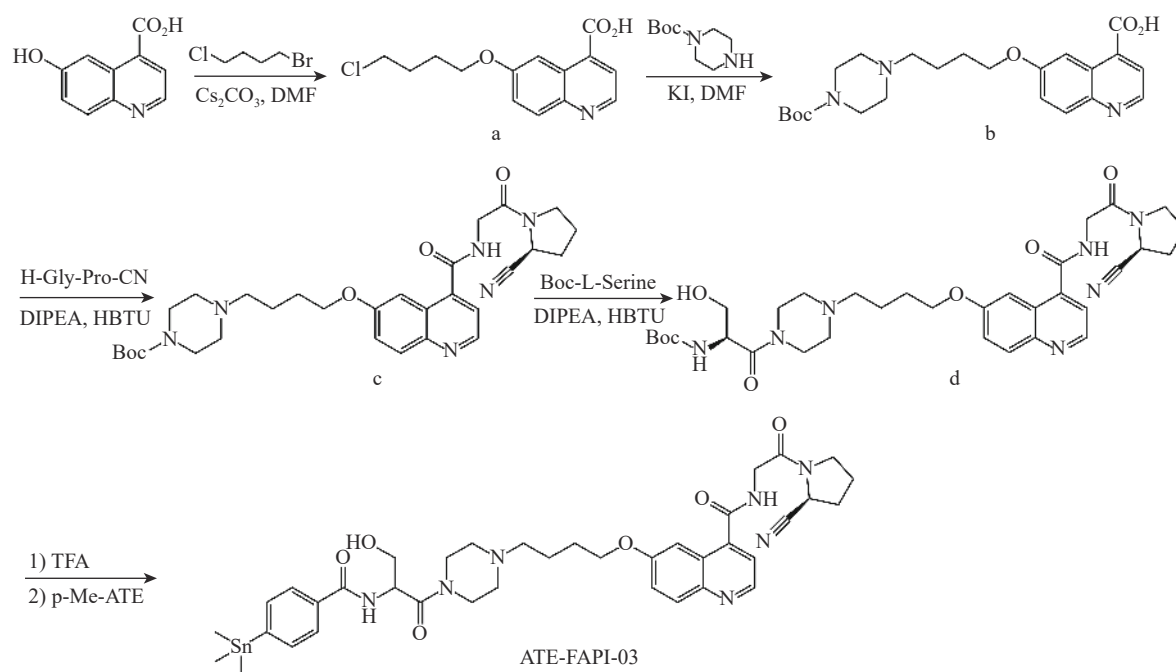


图 1 ATE-FAPI-03 的合成路线

Fig.1 Synthetic scheme of ATE-FAPI-03

2.1.1 化合物 a 的合成 称取 300 mg 6-羟基喹啉-4-羧酸、1 g 碳酸铯和 0.65 mL 1-溴-4-氯丁烷溶于 12 mL DMF 中,60 °C 搅拌过夜。冷却至室温后,加入少量水和乙腈稀释反应液,再加入 2 mL 6 mol/L 氢氧化钠溶液,室温搅拌 1.5 h 以

促使酯完全水解后,用二氯甲烷洗涤水相 3 次,加入浓 HCl 调节 pH 至酸性,析出固体。所得固体用水洗至中性,真空干燥后得化合物 a。

2.1.2 化合物 b 的合成 称取 230 mg 化合物 a、840 mg N-Boc-哌嗪和 780 mg 碘化钾溶于 15 mL

DMF中, 60 °C 搅拌过夜, 减压蒸馏后用硅胶柱纯化, 得到化合物 b。

2.1.3 化合物 c 的合成 称取 150 mg 化合物 b、70 mg HOBt、165 mg HBTU 和 150 μ L DIPEA 溶于 5 mL DMF 中, 室温搅拌 15 min 后再加入含有 162 mg H-Gly-Pro-CN 和 200 μ L DIPEA 的 DMF 溶液, 继续搅拌过夜, 减压蒸馏后用硅胶柱纯化, 得化合物 c。

2.1.4 化合物 d 的合成 取 150 mg 化合物 c 溶于 10 mL 甲醇, 再加 500 μ L 三氟乙酸进行脱 Boc 处理, 反应完全后旋干复溶于 DMF 中。称取 60 mg Boc-丝氨酸、60 mg HOBt、132 mg HBTU 和 90 μ L-DIPEA 溶于 3 mL DMF, 室温搅拌 15 min 后再加到上述脱 Boc 后的混合液中, 室温搅拌过夜, 减压蒸馏后用硅胶柱纯化, 得化合物 d。

2.1.5 标记前体 ATE-FAPI-03 的合成 称取 120 mg 化合物 d 溶于 5 mL 甲醇, 再加 350 μ L 三氟乙酸进行脱 Boc 处理, 反应完全后旋干复溶于 3 mL DMF 中, 再加入 63 μ L DIPEA 和 150 mg p-Me-ATE, 室温下搅拌 2 h, 减压蒸馏后用硅胶柱纯化, 得标记前体 ATE-FAPI-03, 产物经 $^1\text{H-NMR}$ 和质谱表征。

2.2 $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 的合成、脂水分配比及体外稳定性分析

在离心管中依次加入 2.22 MBq $^{131}\text{I-NaI}$ 、2 μ L HAc、2.5 μ L 0.4 mg/mL 的 NIS 溶液和不同质量 (1、2、4 和 8 μ g) 的 ATE-FAPI-03 溶液, 室温下反应 10、20 或 30 min 后再加入 2.5 μ L 0.8 mg/mL 的抗坏血酸钠溶液终止反应。通过薄层层析色谱 (TLC) 分析标记率, 以硅胶条为载体, 展开条件为 $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{甲醇}) = 8 : 1$, 标记物的 R_f 值约为 0.5~0.6。在最佳标记条件下放大反应, 标记混合物经硅胶小柱分离纯化, 先用小极性二氯甲烷: 甲醇进行洗脱, 除杂后再加大洗脱液极性, 收集含目标产物的组份, 用氮气吹干, 然后再复溶于生理盐水中。

在离心管中加入 740 kBq $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 、3 mL PBS 和 3 mL 正辛醇, 剧烈震荡后再 13000 r/min 离心 5 min, 从水相和有机相中各取 100 μ L 液体, 用 γ 计数器测量放射性计数 (设置三个平行样品), 计算脂水分配比 ($\text{Log } P$) : $\text{Log } P = \text{Log}(\text{正辛醇计数}/\text{PBS 计数})$ 。

将 1.5 MBq $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 与等体积的生理盐水或胎牛血清混匀, 37 °C 孵育, 分别在 0、24 和

48 h 取样, 通过 TLC 对放化纯度进行分析 (设置三个平行样品)。

2.3 $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 的体外细胞实验

2.3.1 细胞结合 U87MG (FAP α 阳性) 和 MCF-7 (FAP α 阴性) 细胞以 1×10^6 /孔的密度分别铺在 6 孔板中, 待其完全贴壁后再往各孔中分别加入 1.5 kBq $^{131}\text{I-FAPI-03}$, 37 °C 孵育不同时间 (10、30、60、120、180 和 240 min), 收集上清液, 细胞用 PBS 洗两遍, 洗涤液合并至上清液中。再用氢氧化钠裂解液裂解孔板中的细胞, 孔板用 PBS 洗两遍, 收集洗涤液合并至细胞裂解液中 (设置三个复孔)。用 γ 计数器对上清液和细胞裂解液进行计数, 计算两种细胞对 $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 的摄取率。摄取率 (%) = $\frac{\text{裂解液计数}}{\text{裂解液计数} + \text{上清液计数}} \times 100\%$ 。

2.3.2 细胞内吞 U87MG 细胞以 1×10^6 /孔的密度铺在 6 孔板中, 待其完全贴壁后再往各孔中分别加入 1.5 kBq $^{131}\text{I-FAPI-03}$, 37 °C 孵育不同时间 (10、30、60、120、180 和 240 min) 后弃去上清液, 细胞用 PBS 洗两遍。向各孔中加入 1 mL Gly-HCl 缓冲液, 室温下孵育 10 min 后收集上清液再用 PBS 洗两遍细胞, 合并洗涤液至上清液中。然后用氢氧化钠裂解液裂解孔板中的细胞, 再用 PBS 洗两遍孔板, 收集并合并至细胞裂解液中 (设置三个复孔)。用 γ 计数器对上清液和细胞裂解液进行计数, 计算 $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 进入 U87MG 细胞内的比例。内吞比例 (%) = $\frac{\text{裂解液计数}}{\text{裂解液计数} + \text{上清液计数}} \times 100\%$ 。

2.3.3 细胞流出 U87MG 细胞以 1×10^6 /孔的密度铺在 6 孔板中, 待其完全贴壁后再加入 1.5 kBq $^{131}\text{I-FAPI-03}$, 37 °C 孵育 2 h 后弃去上清液, 用 PBS 洗两遍细胞。再向孔板里加 1 mL DMEM 培养基, 37 °C 孵育不同时间 (10、30、60、120、180 和 240 min) 后收集上清液并用 PBS 洗涤细胞两遍, 合并洗涤液至上清液中。然后用氢氧化钠裂解液裂解孔板中的细胞, 用 PBS 洗两遍, 收集洗涤液合并至细胞裂解液中 (设置三个复孔)。用 γ 计数器测量上清液和细胞裂解液的计数, 计算 $^{131}\text{I-FAPI-03}$ 从 U87MG 细胞中的流出比例。流出比例 (%) = $\frac{\text{上清液计数}}{\text{裂解液计数} + \text{上清液计数}} \times 100\%$ 。

2.3.4 竞争结合 U87MG 细胞以 1×10^6 /孔的密度铺在 6 孔板中, 待其完全贴壁后再同时加入

1.5 kBq ^{131}I -FAPI-03 和不同浓度($10^{-5}\sim 10^{-11}$ mol/L)的非放射性对照品 I-FAPI-03, 摇晃均匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 收集上清液, 细胞用 PBS 洗两遍, 洗涤液合并至上清液中。再用氢氧化钠裂解液裂解孔板中的细胞, 孔板用 PBS 洗两遍, 收集洗涤液并合并至细胞裂解液中(设置三个复孔)。用 γ 计数器对上清液和细胞裂解液进行计数, 计算 U87MG 细胞对 ^{131}I -FAPI-03 的摄取率, 用 Graphpad Prism 软件对 IC_{50} 值进行拟合。

2.4 ^{131}I -FAPI-03 在荷胶质瘤裸鼠体内的分布

将对数生长期的 U87MG 细胞消化处理, 用 PBS 重悬至 5×10^7 个/mL 的密度, 100 μL 每只接种于 5 周龄的裸鼠右侧腋下, 待肿瘤体积约 500 mm^3 时, 将 16 只荷瘤裸鼠随机分成 4 组, 每组 4 只, 尾静脉注射 100 μL 0.6 MBq 经生理盐水稀释后的 ^{131}I -FAPI-03, 分别于注射后 5 min、2、6 和 12 h 处死, 取其心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、肌肉、甲状腺、肿瘤、血和脑, 称重, 并用 γ 计数器测量各个器官的放射性计数, 计算各个器官对 ^{131}I -FAPI-03 的摄取百分比。放射性摄

取百分比($\% \text{ID/g}$) = [组织的放射性计数 / (注射的放射性计数 \times 组织的质量)] $\times 100\%$ 。

3 结果与分析

3.1 标记前体 ATE-FAPI-03 的合成

通过一系列有机反应在 4-喹啉基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷骨架上对连接基团进行碳链延长与羟基修饰, 成功得到 67 mg 标记前体 ATE-FAPI-03, 其 $^1\text{H-NMR}$ 和质谱示于图 2, 纯度 $>95\%$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.80(d, 1H), 8.04(d, 1H), 7.75(m, 2H), 7.69(d, 1H), 7.54(m, 4H), 7.40(dd, 1H), 7.30(t, 1H), 5.12(m, 1H), 4.79(m, 1H), 4.34(m, 2H), 4.17(m, 2H), 3.88(m, 1H), 3.81(m, 1H), 3.71(m, 5H), 3.55(m, 2H), 2.67-2.47(m, 6H), 2.38-2.22(m, 4H), 1.88(m, 2H), 1.77(m, 2H), 0.31(m, 9H); MS: $m/z = 842.3$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 。

3.2 ^{131}I -FAPI-03 的合成、脂水分配比与体外稳定性

前体用量和反应时间对 ^{131}I -FAPI-03 标记率的影响如图 3a 所示。对于固定活度的 ^{131}I

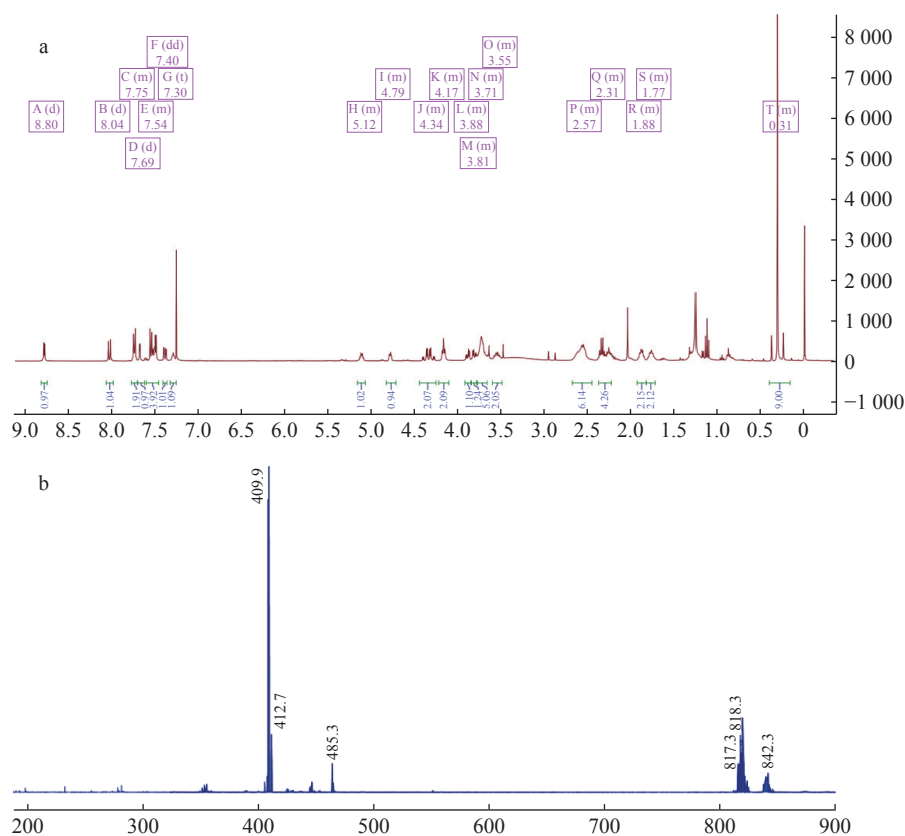


图 2 ATE-FAPI-03 的 $^1\text{H-NMR}$ (a) 和质谱(b)图

Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ (a) and MS (b) spectra of ATE-FAPI-03

(2.22 MBq), 前体用量从 1 μg 增加到 8 μg 时标记率有明显的上升, 而反应时间从 10 min 延长到 30 min 对标记率几乎没有提升作用, 说明 10 min 已经足够该亲电取代反应完全进行。当前

体用量为 8 μg , 反应时间为 10 min 时, ^{131}I -FAPI-03 的标记率为 $(86.4 \pm 2.37)\%$, 选择在该标记条件下放大反应, 标记混合物经硅胶小柱纯化使 ^{131}I -FAPI-03 的纯化纯度大于 95% 后再用于后续实验。

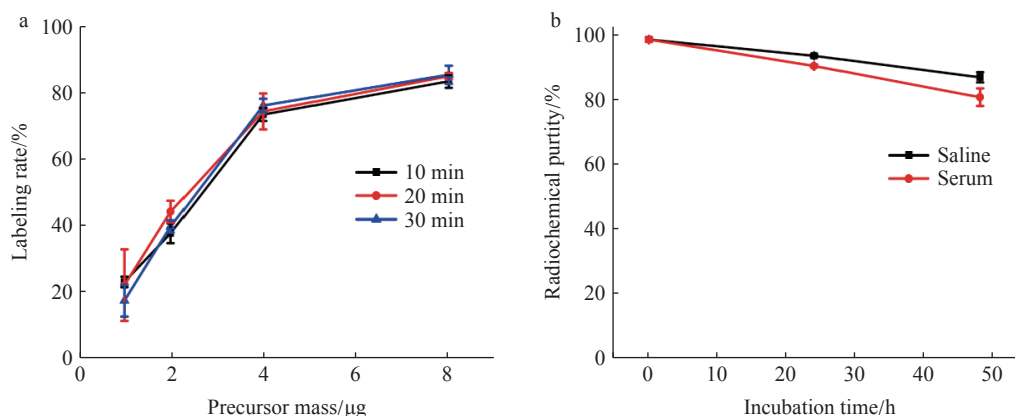


图 3 不同前体用量及反应时间下 ^{131}I -FAPI-03 的标记率分析(a)及(b) ^{131}I -FAPI-03 的体外稳定性分析
Fig.3 Labeling rate analysis of ^{131}I -FAPI-03 by TLC at different amounts of precursor for 10, 20, and 30 minutes (a) and stability assessment of ^{131}I -FAPI-03 in saline and serum (b)

Log P 通常用来反映化合物的亲脂性。经过测定, ^{131}I -FAPI-03 的 Log P 为 2.04 ± 0.02 , 与之前报道的 ^{131}I -FAPI-02 的亲脂性相近^[21], 表明经碳链延长及羟基修饰后的 ^{131}I -FAPI-03 亲脂性有略微的增加。

放射性卤素标记物在体内均存在一定程度的脱标现象, 因此 ^{131}I -FAPI-03 的良好稳定性是后续研究开展的基础, 如图 3b 所示, ^{131}I -FAPI-03 在生理盐水和血清中孵育 24 h 后的纯化纯度分别为 $(93.2 \pm 0.55)\%$ 和 $(90.1 \pm 0.44)\%$, 说明其具有较好的体外稳定性, 且在生理盐水中的稳定性要优于血清中的稳定性。

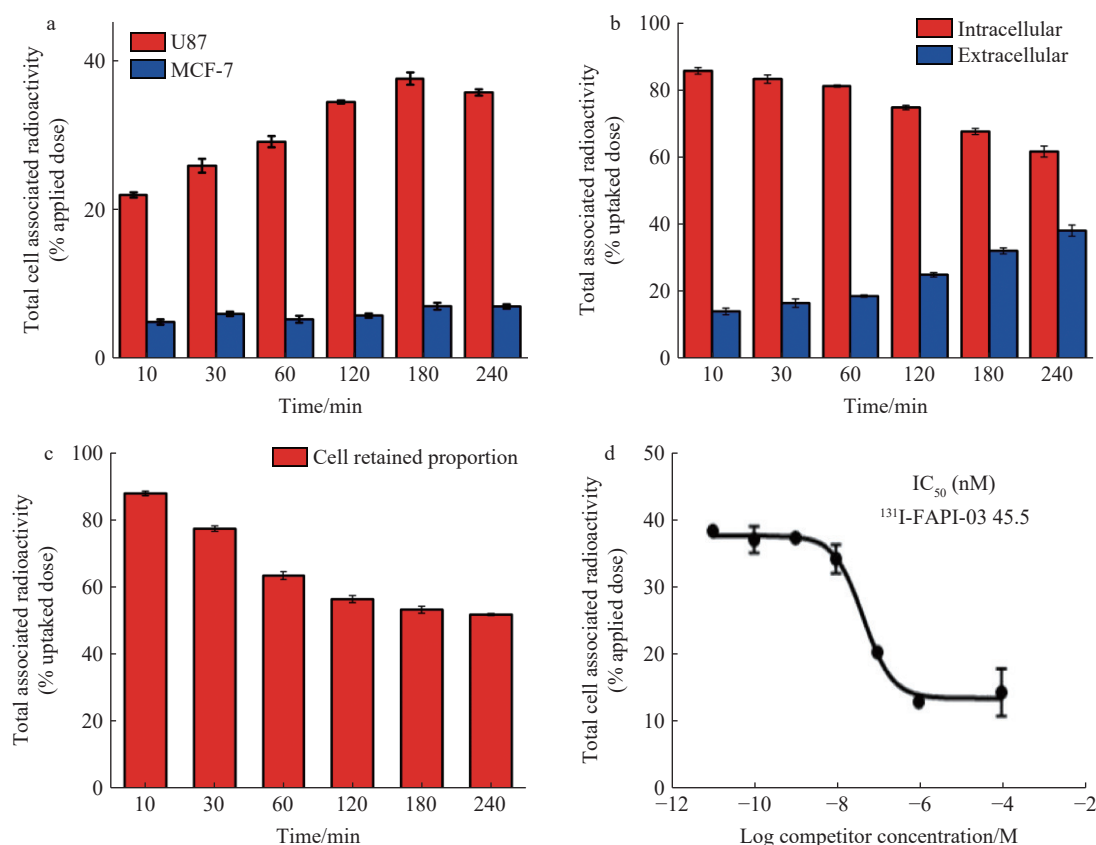
3.3 ^{131}I -FAPI-03 的体外细胞实验

通过对比 ^{131}I -FAPI-03 与 FAP α 阳性细胞 U87MG 及 FAP α 阴性细胞 MCF-7 的结合差异来分析该标记药物对 FAP α 的特异性。如图 4a 所示, ^{131}I -FAPI-03 能快速地与 U87MG 细胞结合, 且结合率明显高于 MCF-7 细胞。孵育 10 min 时, ^{131}I -FAPI-03 与 U87MG 及 MCF-7 细胞的结合率分别为 $(22.00 \pm 0.35)\%$ 和 $(4.99 \pm 0.36)\%$ 。 ^{131}I -FAPI-03 与 U87MG 细胞的结合率随着孵育时间的延长有明显的上升趋势, 而与 MCF-7 细胞的结合率始终处于较低水平; 孵育 180 min 时, 其与 U87MG 及 MCF-7 细胞的结合率分别为 $(37.5 \pm 0.83)\%$ 和 $(7.09 \pm 0.47)\%$ 。然而随着孵

育时间的进一步延长, U87MG 细胞对 ^{131}I -FAPI-03 的摄取率略微下降: 当孵育时间达 240 min 时, ^{131}I -FAPI-03 与 U87MG 细胞的结合率为 $(35.70 \pm 0.42)\%$, 这可能是标记药物在胞内发生少部分酶解引起的^[20]。

如图 4b 所示, ^{131}I -FAPI-03 与 U87MG 细胞结合后, 可以快速地进入细胞内, 且被细胞内吞的比例要明显高于与细胞膜结合的比例。孵育 10 min 后, 与 U87MG 细胞结合的 ^{131}I -FAPI-03 有 $(85.80 \pm 0.98)\%$ 进入细胞内。但随着孵育时间的延长, 滞留在胞内的 ^{131}I -FAPI-03 比例略微下降, 而对应的与细胞膜结合的 ^{131}I -FAPI-03 则呈现出一定的上升趋势。孵育 10 min 后与细胞膜结合的 ^{131}I -FAPI-03 占 U87MG 细胞摄取值的 $(14.20 \pm 0.98)\%$, 当孵育时间延长至 240 min, 该比例上升至 $(38.20 \pm 1.64)\%$ 。

当 U87MG 细胞与 ^{131}I -FAPI-03 孵育 2 h 后将含标记药物的培养基更换为完全培养基, 通过测量上清液中的放射性计数分析 ^{131}I -FAPI-03 从细胞中流出的情况。如图 4c 所示, 更换培养基 10、30、60、120、180 和 240 min 后, 仍与 U87MG 细胞结合的 ^{131}I -FAPI-03 分别占初始结合率的 $(87.9 \pm 0.70)\%$ 、 $(77.4 \pm 0.84)\%$ 、 $(63.4 \pm 1.16)\%$ 、 $(56.4 \pm 1.07)\%$ 、 $(53.2 \pm 1.04)\%$ 和 $(51.8 \pm 0.34)\%$, 表明 ^{131}I -FAPI-03 会逐渐地从 U87MG 细胞中流



a—¹³¹I-FAPI-03 与 FAP α 阳性细胞 U87MG 及 FAP α 阴性细胞 MCF-7 的结合率分析; b—¹³¹I-FAPI-03 与 U87MG 细胞孵育不同时间时的细胞内吞及胞膜结合分析; c—¹³¹I-FAPI-03 与 U87MG 细胞结合 2 h 后从细胞中流出的分析; d—¹³¹I-FAPI-03 的竞争结合分析

图 4 ¹³¹I-FAPI-03 与 U87MG 细胞的结合、内吞、流出及 IC₅₀ 分析

Fig.4 Cellular uptake, internalization, efflux kinetics and competitive binding of ¹³¹I-FAPI-03 in U87MG cells

出,随着时间的推移,流出的速率逐渐变慢。

IC₅₀ 是表征化合物对靶标亲和力的常用指标,通过在培养基中加入不同浓度的非放射性对照品 (I-FAPI-03),与 ¹³¹I-FAPI-03 竞争结合 U87MG 细胞来测定 ¹³¹I-FAPI-03 的 IC₅₀ 值。如图 4d 所示,随着 I-FAPI-03 浓度的增加,U87MG 细胞对 ¹³¹I-FAPI-03 的摄取能力逐渐降低,根据 Graphpad Prism 软件的拟合结果,¹³¹I-FAPI-03 的 IC₅₀ 值为 45.5 nM,说明 ¹³¹I-FAPI-03 与 FAP α 阳性的 U87MG 细胞有较高的亲和力。

3.4 ¹³¹I-FAPI-03 在荷胶质瘤裸鼠体内的分布

¹³¹I-FAPI-03 在荷瘤鼠体内的分布情况示于图 5a。注射 5 min 后,肿瘤组织的放射性摄取值为 (14.9 ± 3.21)% ID/g,说明 ¹³¹I-FAPI-03 经尾静脉注射后可以快速到达肿瘤组织,与体外细胞结合实验的结果一致,该标记药物在荷瘤鼠体内也具有快速且良好的 FAP α 特异性靶向

能力。注射 2、6 及 12 h 后,肿瘤组织对 ¹³¹I-FAPI-03 的放射性摄取分别为 (1.90 ± 0.97)% ID/g、(0.08 ± 0.02)% ID/g 和 (0.06 ± 0.01)% ID/g,皆较 5 min 时有明显下降,表明其在肿瘤组织的滞留能力偏低,且其在体内比从体外细胞中流出的速度更快,这可能是由于体内肿瘤组织的微环境构成更为复杂。¹³¹I-FAPI-03 在鼠体内主要通过肝、肾代谢,且代谢速度极快:注射 5 min 后,小鼠肝肾的放射性摄取值分别为 (57.9 ± 10.9)% ID/g 和 (32.8 ± 14.2)% ID/g,注射 6 h 后小鼠体内各器官的放射性值均维持在较低水平。¹³¹I-FAPI-03 较 ⁶⁸Ga-FAPi 有更高的肝脏摄取,这主要是因为其为亲脂性的小分子。此外,在鼠的甲状腺组织也检测到稍高的放射性摄取值,表明 ¹³¹I-FAPI-03 在鼠体内存在一定的脱碘现象。肿瘤/血、肿瘤/肌肉、肿瘤/肝脏、肿瘤/肾脏的摄取比值如图 5b 所示。注射 5 min

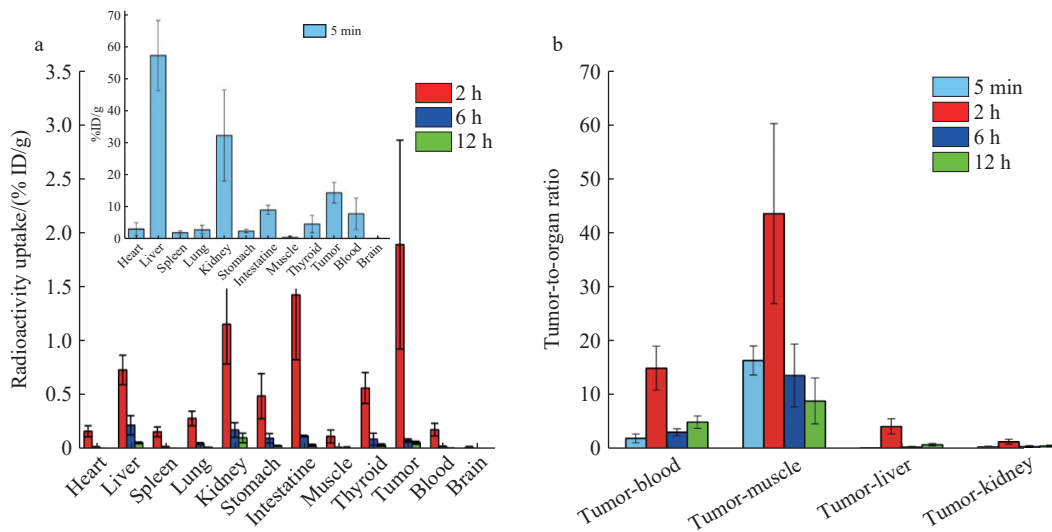


图5 ^{131}I -FAPI-03 在荷 U87MG 胶质瘤裸鼠体内的分布情况 ($n=4$) (a) 及肿瘤与器官对 ^{131}I -FAPI-03 的摄取比值 ($n=4$) (b)

Fig.5 Biodistribution study of ^{131}I -FAPI-03 in U87MG-bearing mice ($n=4$) (a) and Tumor-to-organ ratios of radioactivity at 5 min, 2, 6 and 12 h after intravenous injection of ^{131}I -FAPI-03 ($n=4$) (b)

后,上述放射性摄取比分别为 (2.03 ± 0.82) 、 (16.4 ± 2.69) 、 (0.26 ± 0.01) 和 (0.48 ± 0.11) ; 注射 2 h 后,肿瘤/器官比值达到最高,分别为 (15.0 ± 4.09) 、 (43.7 ± 16.7) 、 (4.24 ± 1.40) 和 (1.41 ± 0.43) 。

就目前 FAPI 结构优化研究而言,大幅度提升此类示踪剂的肿瘤滞留时间是极具挑战的一项工作,而使用半衰期较短的放射性核素对 FAPI 进行标记从而提升 FAPI 药物的治疗效果相对更容易实现。 ^{211}At 7.21 h 的物理半衰期与 FAPI 配体的生物半衰期较为匹配,且该 α 核素具有较高的传能线密度值,可以在肿瘤组织产生高剂量的辐射沉积。虽然 FAPI 靶向基质中的肿瘤相关成纤维细胞,但此类细胞在肿瘤侵袭与转移、免疫抑制和耐药生成过程中扮演重要角色,肿瘤基质中 FAP α 的过度表达与多种肿瘤的恶性程度、侵袭特征和不良预后明显相关,靶向此类细胞也能抑制肿瘤的进展^[1-3, 22-23]。另外, α 核素的射程虽短,但肿瘤相关成纤维细胞是肿瘤基质的主要组成部分,理论上讲,肿瘤细胞也在 α 粒子的辐照范围内,且除了直接辐照效应,细胞因子传递及细胞间通讯介导的旁观者效应和免疫细胞激活介导的系统效应也能在一定程度上抑制肿瘤进展。因此, ^{131}I -FAPI-03 在荷胶质瘤小鼠体内的快速靶向及代谢特征支持用短半衰期的 α 核素 ^{211}At 标记相关前体开展治疗实验研究。

4 结论

本研究以 4-喹啉基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷为骨架,通过连接子碳链延长、羟基修饰合成了新型 FAPI 衍生物 ATE-FAPI-03; 经 ^{131}I 标记、纯化后获得的 ^{131}I -FAPI-03 为亲脂性的小分子,体外稳定性良好。 ^{131}I -FAPI-03 可以快速地与 FAP α 阳性的 U87MG 细胞特异性结合并进入胞内,其在荷胶质瘤小鼠体内也可以快速地被肿瘤组织摄取,展现了较好的肿瘤靶向性。

参考文献:

- [1] Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: Back to the basics[J]. *Oncogene*, 2018, 37: 4343-4357.
- [2] Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16: 582-598.
- [3] Glentis A, Oertle P, Mariani P, et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 924.
- [4] Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, et al. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers[J]. *International Journal of Cancer*, 2020, 146(4): 895-905.
- [5] Hamson E J, Keane F M, Tholen S, et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy[J].

- Proteomics Clinical Applications*, 2014, 8(5-6): 454-463.
- [6] Giesel F L, Kratochwil C, Lindner T, et al. ⁶⁸Ga-FAPI PET/CT: Biodistribution and preliminary dosimetry estimate of 2 DOTA-containing FAP-targeting agents in patients with various cancers[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2019, 60(3): 386-392.
- [7] Chen H, Pang Y, Wu J, et al. Comparison of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-FAPI-04 and [¹⁸F]FDG PET/CT for the diagnosis of primary and metastatic lesions in patients with various types of cancer[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2020, 47(8): 1820-1832.
- [8] Pang Y, Zhao L, Luo Z, et al. Comparison of ⁶⁸Ga-FAPI and ¹⁸F-FDG uptake in gastric, duodenal, and colorectal cancers[J]. *Radiology*, 2021, 298(2): 393-402.
- [9] Jiang D, Chen X, You Z, et al. Comparison of [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-04 and [¹⁸F]FDG for the detection of primary and metastatic lesions in patients with gastric cancer: A bicentric retrospective study[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2022, 49(2): 732-742.
- [10] Qin C, Shao F, Gai Y, et al. ⁶⁸Ga-DOTA-FAPI-04 PET/MR in the evaluation of gastric carcinomas: Comparison with ¹⁸F-FDG PET/CT[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2022, 63(1): 81-88.
- [11] Shi X, Xing H, Yang X, et al. Comparison of PET imaging of activated fibroblasts and ¹⁸F-FDG for diagnosis of primary hepatic tumours: A prospective pilot study[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2021, 48(5): 1593-1603.
- [12] Guo W, Pang Y, Yao L, et al. Imaging fibroblast activation protein in liver cancer: a single-center post hoc retrospective analysis to compare [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-04 PET/CT versus MRI and [¹⁸F]FDG PET/CT[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2021, 48(5): 1604-1617.
- [13] Pang Y, Zhao L, Fang J, et al. Development of FAPI tetramers to improve tumor uptake and efficacy of FAPI radioligand therapy[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2023, 64(9): 1449-1455.
- [14] Zhao L, Niu B, Fang J, et al. Synthesis, preclinical evaluation, and a pilot clinical PET imaging study of ⁶⁸Ga-labeled FAPI dimer[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2022, 63(6): 862-868.
- [15] Ballal S, Yadav M P, Moon E S, et al. Novel fibroblast activation protein inhibitor-based targeted theranostics for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer patients: a pilot study[J]. *Thyroid*, 2021: 65-77.
- [16] Galbiati A, Zana A, Bocci M, et al. A dimeric FAP-targeting small-molecule radioconjugate with high and prolonged tumor uptake[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2022, 63(12): 1852-1858.
- [17] Yan Q, Zhong J, Liu Y, et al. Synthesis and preclinical evaluation of a heterodimeric radioligand targeting fibroblast activation protein and integrin- $\alpha_v\beta_3$ [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 251: 115279.
- [18] Abouzayed A, Yim C B, Mitran B, et al. Synthesis and preclinical evaluation of radio-iodinated GRPR/PSMA bispecific heterodimers for the theranostics application in prostate cancer[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(7): 358.
- [19] 李钰莹, 周凯翔, 崔孟超. ¹⁸F 标记的羟基修饰的噻啉类衍生物用于脑内 NFTs 的检测[C]//第十一届全国化学生物学学术会议论文摘要(第二卷). 北京: 中国化学会, 2019: 50.
- [20] Loktev A, Lindner T, Mier W, et al. A tumor-imaging method targeting cancer-associated fibroblasts[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2018, 59(9): 1423-1429.
- [21] Ma H, Li F, Shen G, et al. Synthesis and preliminary evaluation of ¹³¹I-labeled FAPI tracers for cancer theranostics[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(11): 4179-4187.
- [22] Ostermann E, Garin-Chesa P, Heider K H, et al. Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(14): 4584-4592.
- [23] Kim M G, Shon Y, Kim J, et al. Selective activation of anticancer chemotherapy by Suzuki J, Tsuboi M, Ishii G. Cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2017, 109(1): djw186.