

# $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的制备与初步评价

温 凯<sup>1,2</sup>, 胡 骥<sup>1,2</sup>, 邓雪松<sup>2</sup>, 赵海龙<sup>2</sup>, 罗田伟<sup>2</sup>,  
郭飞虎<sup>2</sup>, 于菁菁<sup>2</sup>, 崔海平<sup>1,2,\*</sup>

1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413; 2. 原子高科股份有限公司, 北京 102413

**摘要:** 前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)作为理想靶点, $^{68}\text{Ga}$ 标记的 PSMA 小分子抑制剂可用于前列腺癌诊断、分期和疗效评价。为研发一种新型、具有较好理化性能的 $^{68}\text{Ga}$ 标记的 PSMA 小分子化合物,以 1-萘基丙氨酸、4-胺甲基环己甲酸和苯丙氨酸组成的链式氨基酸为侧链,设计了新型的 PSMA 小分子抑制剂 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA,并对其标记方法和体外理化性质进行了研究。采用固相合成法制备前体化合物,经确证结构后,进行 $^{68}\text{Ga}$ 标记。分别对温度、pH、前体化合物投入量等标记条件进行了实验,并测定了放射性标记物的稳定性和脂水分配系数。标记条件为 pH=3.0~4.5、90.0~95.0 °C、前体化合物质量浓度不低于 20 mg/L,在优化的标记条件下,标记率可达 95%以上。纯化后的标记物在磷酸缓冲液体系下和小牛血清蛋白体系下 2 h 的体外稳定性较好。脂水分配系数为 $-1.36 \pm 0.01 (n=3)$ ,与 PSMA-617 相比,该化合物的亲脂性稍高。标记化合物的体内分布显示:血液清除较快,以肾脏代谢为主,在非靶器官摄取较低。

**关键词:** 前列腺癌; $^{68}\text{Ga}$ ;PSMA

**中图分类号:** TL923;R817.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2019)06-0585-08

**doi:** 10.7538/hhx.2019.YX.2019009

## Preparation and Preliminary Evaluation of $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA

WEN Kai<sup>1,2</sup>, HU Ji<sup>1,2</sup>, DENG Xue-song<sup>2</sup>, ZHAO Hai-long<sup>2</sup>, LUO Tian-wei<sup>2</sup>,  
GUO Fei-hu<sup>2</sup>, YU Jing-jing<sup>2</sup>, CUI Hai-ping<sup>1,2,\*</sup>

1. China Institute of Atom Energy, P. O. Box 275(78), Beijing 102413, China;

2. HTA Co., Ltd., P. O. Box 275(78), Beijing 102413, China

**Abstract:** Prostate specific membrane antigen(PSMA) as a specific target antigen for prostate cancer has become an ideal target. The use of PSMA labeled with  $^{68}\text{Ga}$  has become a hot topic in prostate cancer diagnosis, staging and efficacy evaluation. To develop a new  $^{68}\text{Ga}$  labeled PSMA compound with better physical and chemical properties, a novel PSMA small molecule inhibitor  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA was designed, with 1-naphthylalanine, tranexamic acid and phenylalanine as the side chain. And its labeling method, physical and chemical properties and preliminary evaluation were carried out.  $^{68}\text{Ga}$  was labeled to the PSMA com-

收稿日期:2019-01-22;修订日期:2019-07-25

作者简介:温 凯(1987—),男,山西榆次人,博士研究生,工程师,放射性同位素技术专业,E-mail: wenkai@circ.com.cn

\* 通信联系人:崔海平(1963—),男,山西侯马人,博士生导师,正高级工程师,核技术应用专业,E-mail: cuihaiping@circ.com.cn

网络出版时间:2019-11-07;网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2045.TL.20191106.1435.004.html

pound directly, and the labeling conditions such as temperature, pH and precursor compound input amount were tested, respectively. The stability and octanol-water partition coefficient were determined, and the *in vitro* distribution of normal mice was determined. The labeling conditions should be controlled at pH = 3.0-4.5, the labeling temperature was selected at 90.0-95.0 °C, and the precursor compound concentration was not lower than 20 mg/L. In optimal labeling conditions, the labeling yield achieves to over 95%. The purified labeled compound shows good *in vitro* stability, and radiochemical purity is stable in the PBS system and the serum protein system for 2 hours. The octanol-water partition coefficient is  $-1.36 \pm 0.01 (n=3)$ , which is a little higher than PSMA-617. The distribution in normal mice show that the compound clears fast in blood, mainly by kidney metabolism, lower uptake shows in non-target organs. The compound shows good properties, which is expected to be used for the diagnosis of prostate for PET, and provide a basis for developing prostate cancer therapeutic targeted molecules probe for the future.

**Key words:** prostate cancer;  $^{68}\text{Ga}$ ; PSMA

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤,截至2018年,全球范围内每年新增病例42.75万人<sup>[1]</sup>,每年因患前列腺癌的死亡人数达到36.18万人,是男性癌症中发病率第二、死亡率第五高的癌症<sup>[2-4]</sup>。早期前列腺癌的治疗效果较好,多数患者可达到治愈的目的<sup>[5-6]</sup>。前列腺癌早期缺乏特异性临床表现,许多患者首次确诊时已经发生转移而失去最佳治疗时机,导致无法治愈。因此,寻找有效地诊断方法和指标使前列腺癌得以早期诊断是提高治愈率和生存率的关键。目前,传统的影像学检查的局限性会降低前列腺癌早期诊断的准确率<sup>[5-6]</sup>。为了更好地诊断原发病灶、检测转移灶,正电子发射断层/计算机断层扫描(PET/CT)已广泛应用于临床。

前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)是由前列腺上皮细胞分泌的一种100 kD的II型跨膜糖蛋白,表达于正常前列腺和恶变前列腺上皮细胞,其表达量与前列腺癌恶性程度呈正相关。谷氨酸-脲及其类似物Glu-Urea-R是靶向PSMA的小分子抑制剂,尤其是谷氨酸-脲-赖氨酸的小分子抑制剂,能高效、特异地与PSMA结合。Glu-Urea-R生物学活性稳定、体内循环半衰期短、组织渗透性好,在前列腺癌分子影像学诊断方面具有更好的应用价值<sup>[7-10]</sup>。使用正电子核素 $^{68}\text{Ga}$ 标记PSMA小分子抑制剂已成为国际研究的热点。

2012年,Eder等<sup>[11]</sup>设计合成了 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11( $^{68}\text{Ga}$ -HBED-CC(Ahx)-PSMA),血液和器官清除较快,显示出良好的生物分布特性。Weineisen等<sup>[12]</sup>制备了以1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,

7,10-四乙酸(DOTA)为配体的 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-I&T(Sub-KuE),可以利用 $^{68}\text{Ga}$ 标记用来PET显像诊断,同时可以用 $^{177}\text{Lu}$ 进行标记,用于核素治疗,实现诊疗一体化。Benesová等<sup>[13]</sup>设计研制了 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-617,改变了PSMA和螯合剂之间的脂肪烃链,PET显像结果显示出较高的肿瘤背景比,而且可以直接使用 $^{177}\text{Lu}$ 标记,用于前列腺癌的靶向治疗。有研究表明<sup>[14]</sup>,侧链增加苯丙氨酸,可以适当提高亲脂性,并提高与血浆蛋白的结合,延长肿瘤持续积累的时间。有研究对 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11与传统前列腺癌PET诊断试剂 $^{18}\text{F}$ -choline进行了比较<sup>[14-18]</sup>。 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA与 $^{18}\text{F}$ -choline相比,显示出更高的灵敏度、特异性和阳性检出率。临床结果发现,以PSMA小分子量的标记物为显像剂,对于前列腺癌的诊断和后续治疗具有重要指导作用<sup>[19-20]</sup>,已经成为国内外研究的热点。但PSMA-11不能同时用于放射性诊断与治疗,PSMA-617受专利保护。

为了研发一种新型的具有较好理化性能的 $^{68}\text{Ga}$ 标记的PSMA小分子化合物,可用于前列腺癌的诊断与治疗,基于 $^{68}\text{Ga}$ 标记PSMA小分子抑制剂的研究,以1-萘基丙氨酸、4-胺甲基环己甲酸、苯丙氨酸(Ala(Nap)-Cyh-Phe,以下简称ANCP)组成的链式氨基酸为侧链,设计新型的PSMA小分子抑制剂 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA。

## 1 实验方法

### 1.1 实验材料和仪器

$^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$ 发生器(740 MBq),德国ITM公

司;盐酸(Trace metal)、醋酸(Metal basis)、醋酸钠(Metal basis),加拿大 Alfa Aesar 公司;4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(纯度 98%),美国 Sigma Aldrich 公司;无水乙醇(分析纯)、乙醇(分析纯,纯度 95%),国药化学试剂有限公司;乙腈,色谱纯,德国 Merck;超纯水,德国 Millipore 纯水仪制备;Sep-Pak C-18 柱,美国 Waters 公司;昆明小鼠,6~8 周,23~25 g。

CRC-55TW 活度计,美国 Capintec 公司;2470 全自动伽马计数器,美国 Perkin Elmer 公司;VORTEX3 螺旋振荡器,德国 IKA 公司;JHX-100 恒温加热器,上海净信实业发展有限公司;雷磁 PHS-3E pH 计,上海仪电科学仪器股份

有限公司;ML303 电子天平,精度 0.1 mg,德国 Mettler Toledo 公司;LC-20AT 高效液相色谱仪、BPD-20A HPLC 紫外检测器、CTO-10AS HPLC 柱温箱,日本岛津公司;Bioscan 色谱仪伽马计数器,德国 Eckert & Ziegler 公司;Iertsil ODS-SP C18 RP-HPLC 色谱柱( $\phi$ 4.6 mm  $\times$  250 mm),日本岛津公司;Avance 400M 核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;3200Q TRAP 质谱仪,美国 AB SCIEX 公司。

## 1.2 前体化合物的合成

合成路线示于图 1。称量取代度(指每克树脂含官能团的摩尔数(mmol))为 0.3 mmol/g 的

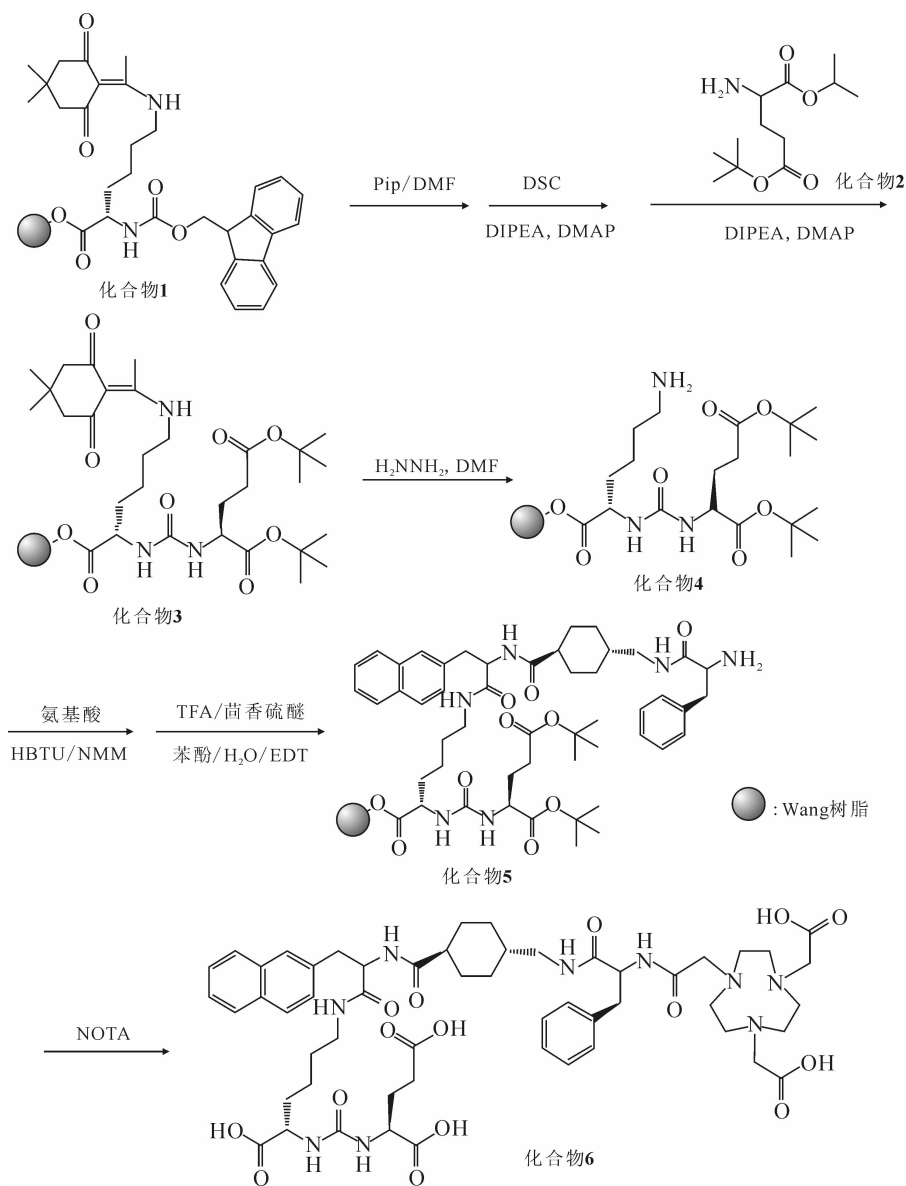


图 1 PSMA-ANCP-NOTA 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of PSMA-ANCP-NOTA

Fmoc-Lys(Dde)-Wang Resin(化合物 1) 3 g, 加入反应器中, 再加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF), 浸泡 30 min; 之后抽干 DMF, 加入质量浓度为 20% 的 DMF 溶液(体积是哌啶(Pip)的 3 倍), 充氮气保护, 用以脱除苄氧羰基(Fmoc)保护基团, 反应 30 min。抽干 Pip/DMF, DMF 洗涤 5 次, 茚三酮检测显示深蓝色。按摩尔比投入反应物:  $n(\text{化合物 1}) : n(N,N'$ -琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)) :  $n(N,N$ -二异丙基乙胺(DIPEA)) :  $n(4$ -二甲氨基吡啶(DMAP)) = 1 : 6 : 12 : 1, 加入适量 DMF, 在氮气保护下, 反应 1 h。将 H-Glu(OtBu)-OtBu · HCl(化合物 2) 加入反应器, 并加入适量 DMF, 在氮气保护下, 反应 1 h, 获得化合物 3。

将化合物 3 用切割液 E 液(纯 TFA、茴香硫醚、水、苯酚、1,2-乙二硫醇(EDT))切割反应 1 h, 使用茚三酮检测法确定是否完全连接, 若未完全连接, 重新投料直至完全连接。完全连接后, 加入 2%(质量浓度)的 DMF 溶液(体积是水合肼的 3 倍), 反应 30 min, 脱去 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)乙基(Dde)保护基团保护, DMF 洗涤 5 次, 获得化合物 4。

按照多肽固相合成法依次连接 1-萘基丙氨酸、4-胺甲基环己甲酸、苯丙氨酸, 按照摩尔比 1 : 3 : 2.85 : 6 的比例加入侧链所需的氨基酸、化合物 4、苯并三氮唑-*N,N,N'*-四甲基异脲六氟磷酸盐(HBTU)、*N*-甲基吗啡啉(NMM), 加入适量 DMF, 反应 1 h。将合成产物转移至切割管中, 加入 E 液, 振荡切割反应 1 h。将切割液收集至离心管中, 加入 6 倍体积冰乙醚, 低速离心机沉淀; 将沉淀的粗品用乙醚洗三遍, 得到化合物 5 的粗产物。

在化合物 5 的基础上, 加入 3 当量的螯合剂 NOTA, 加入适量 DMF, 反应 1 h; 将合成产物转移至切割管中, 加入 E 液, 振荡切割反应 1 h。将切割液收集至离心管中, 加入 6 倍体积冰乙醚, 低速离心机沉淀。将沉淀的粗品用乙醚洗三遍, 通过半制备色谱柱纯化得到化合物 6。

### 1.3 $^{68}\text{Ga}$ 的放射性标记

**1.3.1**  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的标记 将反应器温度设定在 95 °C, 取出冷冻的 NOTA-ANCP-PSMA 冻干制剂, 用超纯水配制成 5 g/L 溶液, 取 4.0  $\mu\text{L}$  置于 1.5 mL EP 反应管中, 向反应管中加入 65  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L 醋酸钠溶液。用 3.5 mL 0.05 mol/L HCl 溶液淋洗  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  发生器。取

1.0 mL 淋洗的  $^{68}\text{Ga}$  溶液( $c(\text{HCl}) = 0.05 \text{ mol/L}$ ) (约 111~185 MBq) 加入反应管, 并置于 95.0 °C 的恒温加热器中, 200 r/min 下反应 15 min。将反应后的溶液取出并用活度计测量总活度, 并测定 pH 值。将溶液注入到活化的 Sep-Pak C18 柱中, 以 3.0 mL 纯水冲洗 C18 柱, 以清洗杂质; 在 C18 柱上安装 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 以 1.0 mL 95%(质量分数)的乙醇溶液淋洗, 收集淋洗液到无菌真空瓶中。用于动物实验时, 将 95% 乙醇淋洗的组分置于恒温加热器上, 以氮气吹干, 用生理盐水复溶, 得到目标标记物  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA。

### 1.3.2 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的质量控制

观察产品外观是否为无色澄明溶液, 使用液相色谱测定最终产品的保留时间和放射化学纯度, 使用精密 pH 试纸测定 pH 值。液相分析方法: 溶剂 A 为 0.1%(质量分数)三氟乙酸(TFA)/ $\text{H}_2\text{O}$ , 溶剂 B 为 0.1%(质量分数)TFA/乙腈, 流速 1 mL/min, 紫外检测器波长 220 nm。梯度洗脱程序为 0→10 min, 20%→55% 溶剂 B; 10→13 min, 55% 溶剂 B; 13→15 min, 55%→20% 溶剂 B; 15→18 min, 结束。在此体系中, 多肽的保留时间约为 11 min, 游离的  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  的保留时间均为 2~3 min。可以保证反应产物与游离放射性离子的分离。

**1.3.3** 反应体系 pH 的影响 分别取 5 g/L NOTA-ANCP-PSMA 的水溶液 4.0  $\mu\text{L}$ , 加入 1.5 mL EP 管, 之后分别加入 20、40、55、65  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L 醋酸钠溶液, 并使用精密 pH 试纸测其 pH 值; 取 1.0 mL 淋洗的  $^{68}\text{Ga}$  溶液(0.05 mol/L HCl) 加入反应管中, 置于 95.0 °C 的恒温加热器中, 200 r/min 振荡 20 min。分别取上清液 5.0~15.0  $\mu\text{L}$ , 用 HPLC 检测其标记率。

**1.3.4** 反应温度的影响 分别取 5 g/L NOTA-ANCP-PSMA 的水溶液 4.0  $\mu\text{L}$ , 加入 1.5 mL EP 管, 之后加入 65  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L 醋酸钠溶液, 取 1.0 mL  $^{68}\text{Ga}$  溶液(0.05 mol/L HCl) 加入反应管中, 分别置于 50.0、65.0、80.0、95.0 °C 的恒温加热器中, 200 r/min 振荡 20 min。分别取上清液 5.0~15.0  $\mu\text{L}$ , 用 HPLC 检测其标记率。

**1.3.5** 反应时间的影响 分别取 5 g/L NOTA-ANCP-PSMA 的水溶液 4.0  $\mu\text{L}$ , 加入 1.5 mL EP 管, 之后加入 65  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L 醋酸钠溶液, 取 1.0 mL 淋洗的  $^{68}\text{Ga}$  溶液(0.05 mol/L HCl) 加入反应管中, 置于 95.0 °C 的恒温加热器中, 200 r/min

振荡。分别在振荡 5、10、15、20 min 取上清液 5.0~15.0 μL,用 HPLC 检测其标记率。

**1.3.6 前体化合物投入量的影响** 分别取 5 g/L NOTA-ANCP-PSMA 的水溶液 0.8、1.5、3.5、4.0、5.0 μL(对应的 PSMA 前体化合物质量分别为 4.0、7.5、17.5、20.0、25.0 μg),加入 1.5 mL EP 管,之后加入 65 μL 1.0 mol/L 醋酸钠溶液,取 1.0 mL 淋洗的<sup>68</sup>Ga溶液(0.05 mol/L HCl)加入反应管,置于 95.0 °C 的恒温加热器中,200 r/min 振荡 20 min。分别取上清液 5.0~15.0 μL,用 HPLC 检测其标记率。

**1.3.7 <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> 活度浓度的影响** 取 5 g/L NOTA-ANCP-PSMA 的水溶液 4.0 μL,加入 1.5 mL EP 管,之后加入 65 μL 1.0 mol/L 醋酸钠溶液,取 1.0 mL <sup>68</sup>Ga溶液(0.05 mol/L HCl)加入反应管,活度浓度分别为 37、111、185 GBq/L,置于 95.0 °C 的恒温加热器中,200 r/min 振荡 20 min。分别取上清液 5.0~15.0 μL,用 HPLC 检测其标记率。

#### 1.4 体外稳定性研究

<sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA 的放射化学稳定性实验在磷酸缓冲液(PBS)和小牛血清(BSA)两种体系中进行。

**PBS 法:**置于 0.5 mL 的磷酸缓冲液(pH = 7.4)中,37.0 °C、孵育 30、60、90、120、150 min 时,使用 HPLC 测定其放射化学纯度,以测定其体外稳定性。

**BSA 法:**置于 0.5 mL 的小牛血清溶液中,在 pH = 7.0、37.0 °C 下孵育。孵育 30、60、90、120、150 min 时,使用 HPLC 测定其放射化学纯度,以测定其体外稳定性。

#### 1.5 脂水分配系数的测量

标记物通过 Sep-Pak C18 分离纯化得到,使用 95%乙醇洗脱。将获得的标记物通过干燥的氮气吹干,使用相同体积(0.5 mL : 0.5 mL)的正辛醇(有机相)和磷酸缓冲溶液(水相,pH = 7.4)将得到的标记物溶于 1.5 mL EP 管(约 3.7 MBq)中。充分振荡 5 min,在离心机中离心分层 5 min,转速为 2 000 r/min。分别取有机相和水相各 100 μL 于 1 mL EP 管中,在井型 γ 探测器中分别测量其放射性计数率,由有机相和水相的放射性计数率的比值来计算脂水分配系数(P):

$$P = \lg(N_o/N_{aq})$$

式中: $N_o$  和  $N_{aq}$  分别为有机相和水相样品的放射

性计数率, $s^{-1}$ 。重复操作 3 次,取平均值为该标记物的脂水分配系数。

#### 1.6 正常鼠的生物分布

取正常小鼠 16 只,4 只一组,取 0.15 mL(约 3.7 MBq) <sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA 通过尾静脉缓慢注射。在 15、30、60、90 min 取血,断颈处死,分别取心脏、肺、肝、脾、肾、胰腺、胃、小肠、大肠、膀胱、骨、肌肉等器官。将各器官进行称重,测定放射性计数,计数通过标准液进行标准校正,经过计算得到每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 前体化合物的质谱表征

最终的化合物是以谷氨酸脲为基础结构,通过固相合成法与多肽侧链、螯合剂连接最终制得的多肽-脲结构化合物。化合物 NOTA-ANCP-PSMA 的质谱图示于图 2。由图 2 可知:542.8 处为(M-2H)<sup>2+</sup> 峰,1 086.3 处为 M-H 峰,其相对分子质量为 1 087,根据质谱确证其结构正确。从化合物的液相色谱结果中得出,纯度大于 95%。

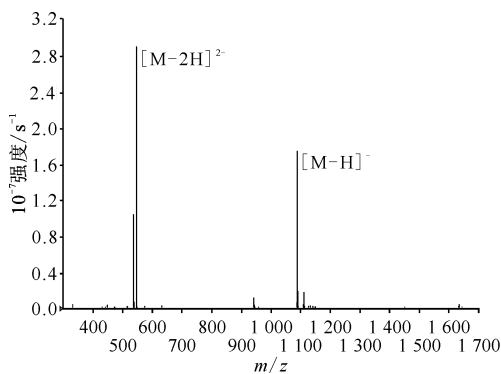


图 2 化合物 NOTA-ANCP-PSMA 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of NOTA-ANCP-PSMA

### 2.2 <sup>68</sup>Ga 的标记条件

**2.2.1 <sup>68</sup>Ga 的标记结果** 前体化合物 NOTA-ANCP-PSMA 的 HPLC 紫外检测图谱示于图 3。由图 3 可知:前体化合物保留时间约为 11.783 min。纯化后<sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA 的 HPLC 放射性检测图谱示于图 4。由图 4 可知:标记后的化合物在放射性检测器中保留时间为 12.138 min 左右,由于放射性检测器在紫外检测器之后,根据流速,同一物质在两个检测器上的保留时间相差 0.3~0.4 min,标记物的保留时间与前体化合物相符。放射化学纯度也可达 95.2%,游离<sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> 峰面

积比为 1.0%，在目标化合物前后为一些多肽杂质形成的杂峰，峰面积比分别为 1.7%、0.9%。

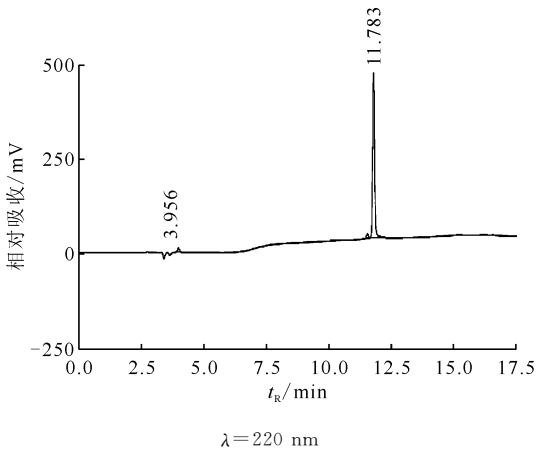


图3 前体化合物 NOTA-ANCP-PSMA 的 HPLC 紫外检测图谱

Fig. 3 HPLC UV chromatogram of NOTA-ANCP-PSMA

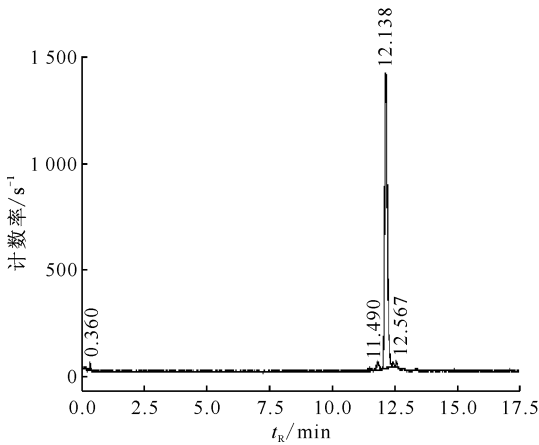


图4 纯化后<sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA 的 HPLC 放射性检测图谱

Fig. 4 HPLC  $\gamma$  detector chromatogram of <sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA

**2.2.2 反应体系 pH 的影响结果** 反应体系的 pH 会对<sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup>产生影响，当 pH 偏高时，会导致<sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup>形成氢氧化物胶体，影响标记率。pH 对标记率的影响示于图 5。由图 5 可知：结果符合理论值。当 pH > 4.5 时，标记率会显著降低，当 pH < 4.5 时，标记率始终高于 95%。但是，考虑到多肽在酸性条件下的稳定性，不宜将 pH 设置为过低的 pH。因此，pH 范围选定为 3.0~4.5。

**2.2.3 反应温度的影响结果** 反应温度会影响标记反应的活性，尤其是金属离子和螯合剂的反应过

程需要一定的温度，保证反应的顺利进行。根据实验结果可以得出：当反应温度在 80.0 °C 以下时，反应 20 min 标记率仅约为 50%，标记率较低；当温度达到 80.0 °C 以上后，反应 20 min 标记率可以达到 90% 以上。<sup>68</sup>Ga 的半衰期仅为 67.7 min，低温时的反应速率相对较慢，影响标记物产量；但温度过高可能会导致多肽失活。为了保证反应的速度，同时保证多肽的活性，温度选定在 90.0~95.0 °C。

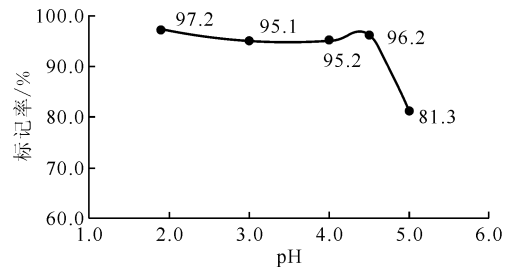


图5 pH 对标记率的影响

Fig. 5 Influence of pH on labeling yield

**2.2.4 反应时间的影响结果** 根据实验结果：在 95.0 °C 下，反应 5 min 时，标记率就可达 91% 以上，随着时间的延长，标记率逐渐提高，至 15 min 左右，即可达到 95% 以上。为了保证标记物的最终活度，尽量缩短反应时间，将标记时间控制在 15 min 左右。

**2.2.5 前体化合物投入量的影响结果** 反应溶液体积固定，前体化合物在反应液中的浓度会对螯合反应起到非常重要的影响，浓度过低会影响产品的标记率，结果示于图 6。由图 6 可知：当前体投入量过低时，标记率一直维持在较低的水平，当前体化合物质量浓度达到 20.0 mg/L 以上时，标记率可高达 95%。因此，前体化合物的质量浓度应大于 20.0 mg/L，将其质量浓度控制在 20.0~25.0 mg/L。

**2.2.6 <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> 活度浓度对标记率的影响结果** 通

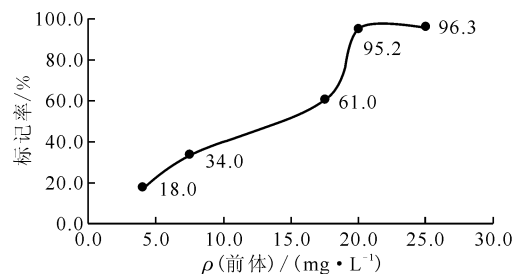


图6 前体化合物质量浓度对标记率的影响

Fig. 6 Influence of precursor mass concentration on labeling yield

过  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  发生器淋洗液获得  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , 其活度浓度最高为 185 GBq/L, 本工作研究了  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  活度浓度分别为 37、111、185 GBq/L 下的标记率。在此体系中, 当  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  活度浓度小于 185 GBq/L 时,  $^{68}\text{Ga}$  标记率均可达 95% 以上, 比活度最高可达 9.25 TBq/g。

### 2.3 稳定性结果

分别对 PBS 体系和小牛血清体系中,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 在 30、60、90、120、150 min 时的稳定性进行测试, 结果列入表 1。由表 1 可知: PBS 体系中,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的放射化学纯度略有降低, 但始终保持在 95% 以上, 说明  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 在 PBS 中的稳定性良好; 对于 BSA 体系, 从 30 min 开始, 放射化学纯度持续略微下降, 至 120 min, 已略低于 95%, 这说明  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 在 BSA

中的稳定性比 PBS 条件下略差, 但在 90 min 仍能维持在 95% 左右。

### 2.4 脂水分配系数结果

对  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的脂水分配系数进行了测试, 根据所测得的数据计算得脂水分配系数为  $-1.36 \pm 0.01$  ( $n=3$ ), 与  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-617 脂水分配系数  $-2.00^{[13]}$  相比, 具有更高的亲脂性, 符合结构设计的预期。

### 2.5 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的正常鼠生物分布

$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的正常鼠生物分布结果列入表 2。由表 2 可知:  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 在 15 min 内血液中放射性摄取达到最高值, 之后血液快速清除, 多个时相时, 血液均未出现较高放射性摄取, 表明该标记物体内稳定, 未分解形成游离  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  进入血液; 该标记物主要通过肾脏代谢, 在 15、30 min 时, 其放射性摄取分别达到  $(127.44 \pm 11.05)$ 、 $(109.04 \pm 8.30)\% \text{ID/g}$ , 在肾脏维持较高摄取水平; 肝脏的放射性摄取较低, 15、30 min 时的放射性摄取仅有  $(3.54 \pm 0.49)$ 、 $(2.14 \pm 0.49)\% \text{ID/g}$ , 远低于肾脏的摄取值, 这表明肾脏的高摄取符合 PSMA 化合物亲水性好的特点, 较 PSMA-617 的肾脏摄取更高; 标记物在心脏、肺、胰腺、胃、小肠、大肠等非靶器官中摄取均较低, 在脾脏有一定的摄取, 肌肉、骨等非靶组织摄取也较低, 在 PET 显像时显示低背景水平。

表 1 两个体系下的放射化学纯度

Table 1 Radiochemistry purity in two systems

测量时间/min	放射化学纯度/%	
	PBS 体系	BSA 体系
30	96.8	96.1
60	96.2	96.0
90	95.9	95.1
120	95.8	94.8
150	95.4	94.3

表 2  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA 的正常鼠生物分布

Table 2 Biodistribution of  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-ANCP-PSMA in normal mice

组织或器官	每克组织百分注射剂量率/ $(\% \text{ID} \cdot \text{g}^{-1})$			
	15 min	30 min	60 min	90 min
血	$9.73 \pm 1.92$	$4.29 \pm 0.47$	$2.89 \pm 1.60$	$1.43 \pm 1.68$
心	$3.65 \pm 0.16$	$2.08 \pm 0.17$	$1.19 \pm 0.21$	$0.69 \pm 0.17$
肺	$5.48 \pm 0.67$	$3.16 \pm 0.49$	$1.78 \pm 0.41$	$0.90 \pm 0.19$
肝	$3.54 \pm 0.49$	$2.14 \pm 0.49$	$1.34 \pm 0.31$	$0.64 \pm 0.32$
脾	$7.82 \pm 2.14$	$7.99 \pm 2.92$	$4.22 \pm 1.73$	$1.67 \pm 0.42$
肾	$127.44 \pm 11.05$	$109.04 \pm 8.30$	$95.26 \pm 8.96$	$64.50 \pm 5.84$
胰	$4.15 \pm 1.02$	$4.38 \pm 2.15$	$2.93 \pm 0.79$	$1.75 \pm 0.98$
胃	$2.24 \pm 0.26$	$1.40 \pm 0.35$	$1.25 \pm 0.48$	$0.60 \pm 0.20$
小肠	$3.50 \pm 0.68$	$2.60 \pm 0.79$	$2.04 \pm 0.31$	$1.31 \pm 0.86$
大肠	$2.24 \pm 0.19$	$1.42 \pm 0.37$	$1.34 \pm 0.49$	$0.52 \pm 0.28$
膀胱	$7.76 \pm 1.40$	$6.10 \pm 1.21$	$5.70 \pm 0.82$	$3.03 \pm 0.74$
骨	$2.83 \pm 0.31$	$1.80 \pm 0.40$	$1.18 \pm 0.18$	$0.64 \pm 0.04$
肌肉	$2.09 \pm 0.32$	$1.13 \pm 0.13$	$0.72 \pm 0.23$	$0.45 \pm 0.15$

注:  $n=4$

### 3 结 论

采用<sup>68</sup>Ga 直接标记 NOTA-ANCP-PSMA, 标记速率快, 体外稳定性好。pH 是影响<sup>68</sup>Ga 标记的关键因素。<sup>68</sup>Ga-NOTA-ANCP-PSMA 显示出更高的亲脂性, 符合结构设计的预期; 标记化合物主要通过肾脏代谢, 血液清除快, 体内稳定性好, 在肝脏、肺、肌肉等非靶器官和组织中摄取低。未来将对该标记物继续开展荷瘤裸鼠的生物分布研究和 PET-CT 显像研究, 为前列腺癌的 PET 靶向诊断提供基础。

#### 参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69: 7-34.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [4] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.
- [5] Maresca P, Hillier M, Femia J, et al. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen(PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer[J]. J Med Chem, 2009, 52(2): 347-357.
- [6] 胡四龙, 许晓平, 章英剑. 以核素标记前列腺特异性膜抗原小分子抑制剂为探针的前列腺癌分子影像研究进展[J]. 肿瘤影像学, 2015, 24(3): 161-167.
- [7] Lindenberg L, Choyke P, Dahut W. Prostate cancer imaging with novel PET tracers[J]. Curr Urol Rep, 2016, 17: 18.
- [8] Zeglis B M, Houghton J L, Evans M J, et al. Underscoring the influence of inorganic chemistry on nuclear imaging with radiometals[J]. Inorg Chem, 2013, 53(4): 1880-1899.
- [9] Fani M, Andre J P, Maecke H R. <sup>68</sup>Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2008, 3(2): 53-63.
- [10] Prata I M. Gallium-68: a new trend in PET radio-pharmacy[J]. Current Radiopharmaceuticals, 2012, 5(2): 142-149.
- [11] Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, et al. <sup>68</sup>Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging[J]. Bioconj Chem, 2012, 23: 688-697.
- [12] Weineisen M, Simecek J, Schottelius M, et al. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer[J]. EJNMMI Research, 2014, 4: 63-78.
- [13] Benesová M, Schäfer M, Ulrike Bauder-Wüst U, et al. Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer[J]. J Nucl Med, 2015, 56: 914-920.
- [14] Wirtz M, Schmidt A, Schottelius M, et al. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity[J]. EJNMMI Research, 2018, 8: 84-95.
- [15] Afshar-Oromieh A, Zechmann M, Malcher A, et al. Comparison of PET imaging with a Ga-68-labelled PSMA ligand and F-18-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer[J]. Eur J Nucl Med Mol, 2014, 41(1): 11-20.
- [16] Mease C, Foss A, Pomper G. PET imaging in prostate cancer: focus on prostate-specific membrane antigen[J]. Curr Top Med Chem, 2013, 13(8): 951-962.
- [17] Banerjee R, Pullambhatla M, Byun Y, et al. Ga-68-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen(PSMA) for imaging prostate cancer[J]. J Med Chem, 2010, 53(14): 5333-5341.
- [18] Herrmann K, Bluemel C, Weineisen M, et al. Biodistribution and radiation dosimetry for a probe targeting prostate-specific membrane antigen for imaging and therapy[J]. J Nucl Med, 2015, 56: 855-861.
- [19] Demirkol O, Acar O, Ucar B, et al. Prostate specific membrane antigen-based imaging in prostate cancer: impact on clinical decision making process[J]. Prostate, 2015, 75(7): 748-757.
- [20] Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, et al. PET imaging with a [<sup>68</sup>Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions[J]. Eur J Nucl Med Mol, 2013, 40(4): 486-495.