

文章

用于肿瘤PET成像的新型trop2靶向肽示踪剂的计算机设计和临床前评估

方静^{1,2*}, 薛燕^{1,2}, 赵媛^{1,2}, 王玲^{1,2}, 黄志宏^{1,2}, 王爽^{1,2}, 朱雪^{1,2*} & 王珂^{1,2*}¹国家卫生健康委核医学重点实验室, 江苏省分子核医学重点实验室, 江苏省核医学研究所, 无锡214063²南京医科大学药学院放射性药物教研室, 南京211166

*通讯作者(email: fangjing@jsinm.org; zhuxue@jsinm.org; wangke@jsinm.org)

2025年4月11日收到; 2025年6月20日接收; 2025年10月10日在线发表

滋养细胞表面抗原2 (Trophoblast cell surface antigen 2, Trop2)被广泛认为是一种临床意义重大的泛癌生物标志物, 在多种肿瘤中表达, 显著影响肿瘤的生长、侵袭和转移。在这项研究中, 我们开发了基于肽的Trop2靶向放射性示踪剂^{[68Ga]Ga-NOTA-GL10}, 通过正电子发射断层扫描(PET)成像准确检测Trop2的表达水平。以T2-2肽为基础, 通过计算方法合理设计Trop2靶向肽GL10, 并与NOTA螯合物1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N', N'-三乙酸偶联, 合成对Trop2具有纳米级亲和力($K_D=12.9$ nM)的前体NOTA-GL10。通过常规方法实现了^{[68Ga]Ga-NOTA-GL10}的放射合成, 具有高的放射化学产率(RCY)、良好的稳定性和良好的药代动力学。动态PET显像显示, trop2阳性的BxPC-3异种移植物的肿瘤摄取((5.03±0.49)%ID/mL)和瘤肌比(4.44±0.30)明显高于trop2阴性的bpc-1异种移植物的(1.41±0.13)%ID/mL, 1.23±0.27)。此外, 探针ICG-GL10的近红外(NIR)荧光成像进一步证实了GL10特异性靶向trop2阳性肿瘤的能力。基于肽的Trop2靶向放射性示踪剂^{[68Ga]Ga-NOTA-GL10}在检测Trop2表达方面具有较高的特异性和敏感性, 揭示了基于Trop2的无创成像在癌症诊断中的潜力。

关键词: Trop2, PET成像, 多肽, 计算方法, 肿瘤诊断

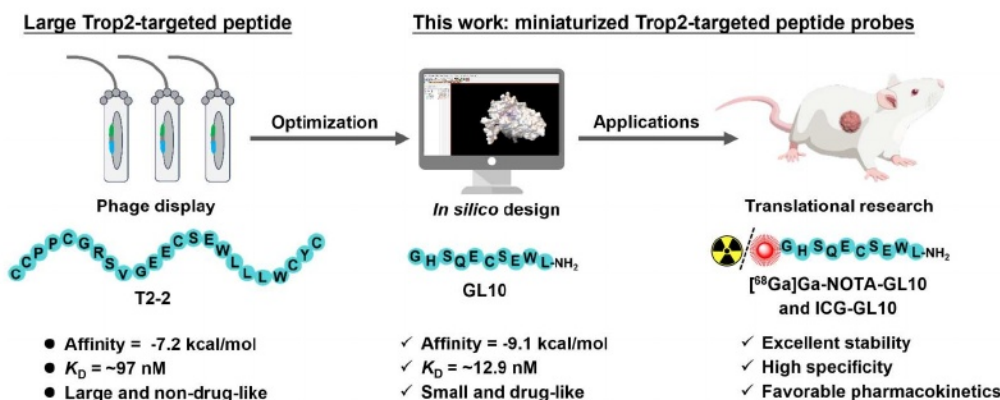
1 简介

滋养细胞表面抗原2 (Trop2)已被公认为临床重要的肿瘤相关抗原, 在临床肿瘤学中具有重要的诊断和治疗意义[1-3]。Trop2在多种人类恶性肿瘤中表现出显著的过表达, 包括非小细胞肺癌(NSCLC)[4]、三阴性乳腺癌(TNBC)[5]、胃癌[6]和胰腺导管腺癌[7]。在临床上, 与传统的肿瘤标志物相比, Trop2作为一种强大的预后生物标志物, 具有更广泛的泛癌表达谱。重要的是, Trop2过表达与不良临床结果密切相关, 主要是通过其对细胞增殖、侵袭潜力和转移性传播的调节[8-10]。鉴于Trop2在肿瘤发生中的关键作用以及trop2靶向治疗的临床相关性日益增加, 无创表征、监测和定量实体肿瘤中Trop2表达的工具是相当重要的。

正电子发射断层扫描(PET)成像已成为实体肿瘤中Trop2表达定量评估不可或缺的非侵入性成像方式。迄今为止, 几种放射性标记的Trop2抗体, 如¹¹¹In-tf12-rdc018[11], ⁸⁹Zr-DFO-AF650[12], ⁶⁴Cu-NOTA-Trodely [13] (NOTA = 1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N', N'-三乙酸)和⁶⁴Cu/¹⁷⁷Lu-NOTA-hIMB1636[14], 已被用于成像各种肿瘤模型中的Trop2表达。虽然这些探针已经表现出令人满意的靶向特异性和有利的肿瘤-背景比, 但它们的临床翻译受到

复杂的放射性合成、纯化需求、严格的制备要求和有限的可扩展性的阻碍[15-18]。此外, 基于抗体的放射性示踪剂由于药代动力学性质差, 往往需要使用半衰期较长的放射性核素进行数天的PET成像, 这使得及时评估肿瘤Trop2表达和放射性核素在非靶器官的过度积累变得复杂。相反, 较小的多肽表现出优越的药代动力学特性, 包括快速的靶标结合、增强的肿瘤通透性和主要的肾脏清除[19-26]。然而, 尽管有这些优势, 迄今为止还没有针对Trop2的肽基PET示踪剂的报道。因此, 迫切需要开发一种具有良好药代动力学、纳米摩尔亲和力、高特异性的肽放射性示踪剂, 以快速准确地检测Trop2在实体肿瘤中的表达水平。

最近, Wu和同事[27]通过噬菌体展示系统鉴定了一种新的trop2靶向肽(T2-2肽, CCPPCGRSVGEECSEWLLLWCYC), 具有低纳微结合亲和力($K_D=97$ nM)。然而, 该肽相对较大的分子质量可能导致肿瘤穿透性低, 稳定性差。本研究基于分子对接和虚氨基酸突变(方案1)的合理设计, 从T2-2中筛选出Trop2高亲和肽GL10(GHSQECSEWL-NH₂), 随后开发了一种基于肽的潜在PET示踪剂^{[68Ga]Ga-NOTA-GL10}, 用于定量Trop2在肿瘤中的表达水平。采用表面等离子体共振(SPR)方法研究了GL10与Trop2的结合亲和力。通过细胞摄取研究、动态PET成像和竞争研究, 研究了^{[68Ga]Ga-NOTA-GL10}对Trop2的特异性



方案1(在线彩色)小型化trop2靶向肽示踪剂 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 设计示意图。小型化trop2靶向肽GL10与大trop2靶向肽T2-2的比较。小肽GL10具有纳米摩尔亲和力和药物样性质。基于肽GL10的trop2靶向放射性示踪剂的开发具有良好的稳定性、高特异性和良好的药代动力学。

结合试验。此外,用吲哚菁绿(ICG)进一步修饰肽GL10,用于trop2靶向的近红外荧光(NIRF)成像,使胰腺癌的非辐射和无创检测成为可能。本研究建立了一种新的基于肽的PET示踪剂,用于无创监测体内Trop2的表达。

2 结果与讨论

2.1 Trop2靶向肽NOTA-GL10的设计

为了筛选Trop2靶向肽,我们从具有一个氨基酸移位窗口的T2-2(残基1-23)序列中生成了一个硅质肽库(P1至P14, 10-mer)(图1a)。根据结合亲和力通过AutoDock Vina模拟选择与人Trop2蛋白(PDB ID 7PEE)结合的候选肽(表S2, 在线支持信息)。其中,预测P8(残基8-17)对人类Trop2蛋白具有相对优越的结合亲和力,并且与亲本T2-2肽占据相同的结合口袋(图1b, c)。

为了提高P8与Trop2的结合亲和力,进行了虚拟氨基酸突变。将P8序列内的每个残基系统地突变为其他天然氨基酸,并计算出相应的突变能量(E_{mut}),以评估每个突变的贡献。表S3总结了增强结合亲和力的有益突变,并选择了四个最有利的 E_{mut} 值(< -3.20 kcal/mol)的关键残基(Ser8、Val9、Gly10和Glu11)进行组合突变。研究表明,残基Ser8、Val9、Gly10和Glu11被G、H、S和Q取代,分别提高了肽与Trop2之间的亲和力(表S4)。此外,H-Leu-NH₂在c端取代Leu17进一步增加了体内抗酶降解和肿瘤摄取的抵抗力。然后,将优化后的肽段(序列:GHSQECSEWL-NH₂,命名为GL10)通过AutoDock Vina模拟[28]与Trop2对接。利用PyMOL分析和可视化所得到的相互作用模式(图1d和表S5)。与T2-2和P8肽相比,GL10对Trop2蛋白具有更高的结合亲和力(图1e)。

为了检验肽的构象稳定性以及肽与Trop2的结合,分别对三种肽(T2-2、P10和GL10)与Trop2结合的复杂结构进行了100 ns动态模拟。从图1f可以看出,

GL10在中后期波动明显小于T2-2和P8,较早达到稳定状态。这可能是由于GL10本身结构更稳定,同时也可以说明Trop2更适应与GL10结合。最后,用MM/GBSA法计算T2-2、P8和GL10对Trop2的结合自由能(ΔG_{bind})。由表S6可知,配合物GL10/Trop2的结合自由能最高,表明GL10(-43.63 ± 3.49 kJ/mol)与Trop2的结合亲和力高于T2-2(-14.85 ± 1.95 kJ/mol)和P8(-22.94 ± 2.36 kJ/mol)。

为了验证理论建模结果并评估GL10的靶向性,我们合成了NOTA-GL10,并使用质谱(MS)和高效液相色谱(HPLC)对其进行了表征(图S1和S2, 在线支持信息)。NOTA-GL10与Trop2的结合亲和力通过表面等离子体共振(SPR)分析进一步评估。如图1g所示,NOTA-GL10对Trop2的亲和力 K_D 为12.9 nM,与之前报道的Trop2靶向抗体的亲和力相当[12-14,29-31]。这种纳米分子范围的结合亲和性非常适合trop2靶向成像应用。这些实验验证证实了计算预测,并证明了GL10作为Trop2靶向肽的潜力。

2.2 NOTA-GL10的放射性标签和质量控制

根据图2a所示的放射性合成途径成功合成了放射性示踪剂 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 。采用放射性高效液相色谱法监测放射性标签效率。 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 的放射化学产率(RCY, 分离产率, 衰变校正)超过95%。此外,每个探针的摩尔活性(A_m)被确定为约27 GBq/ μmol ,纯化后的放射化学纯度(RCP)大于98%(图2b)。为了评估稳定性,将 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 在37°C的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)和胎牛血清(FBS)中孵育。结果表明,在孵育120 min后,放射化学纯度保持在95%以上(图2c, d),表明其在生理条件下具有较高的稳定性。此外, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 在注射后30和60分钟采集的血液样本中表现出稳定性(图S3),表明其具有强大的体内稳定性。这些发现支持 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 在生物系统中的生物学应用潜力。此外, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 的分配系数(LogP)测量为 -2.14 ± 0.23 ,表明明显的亲水性。

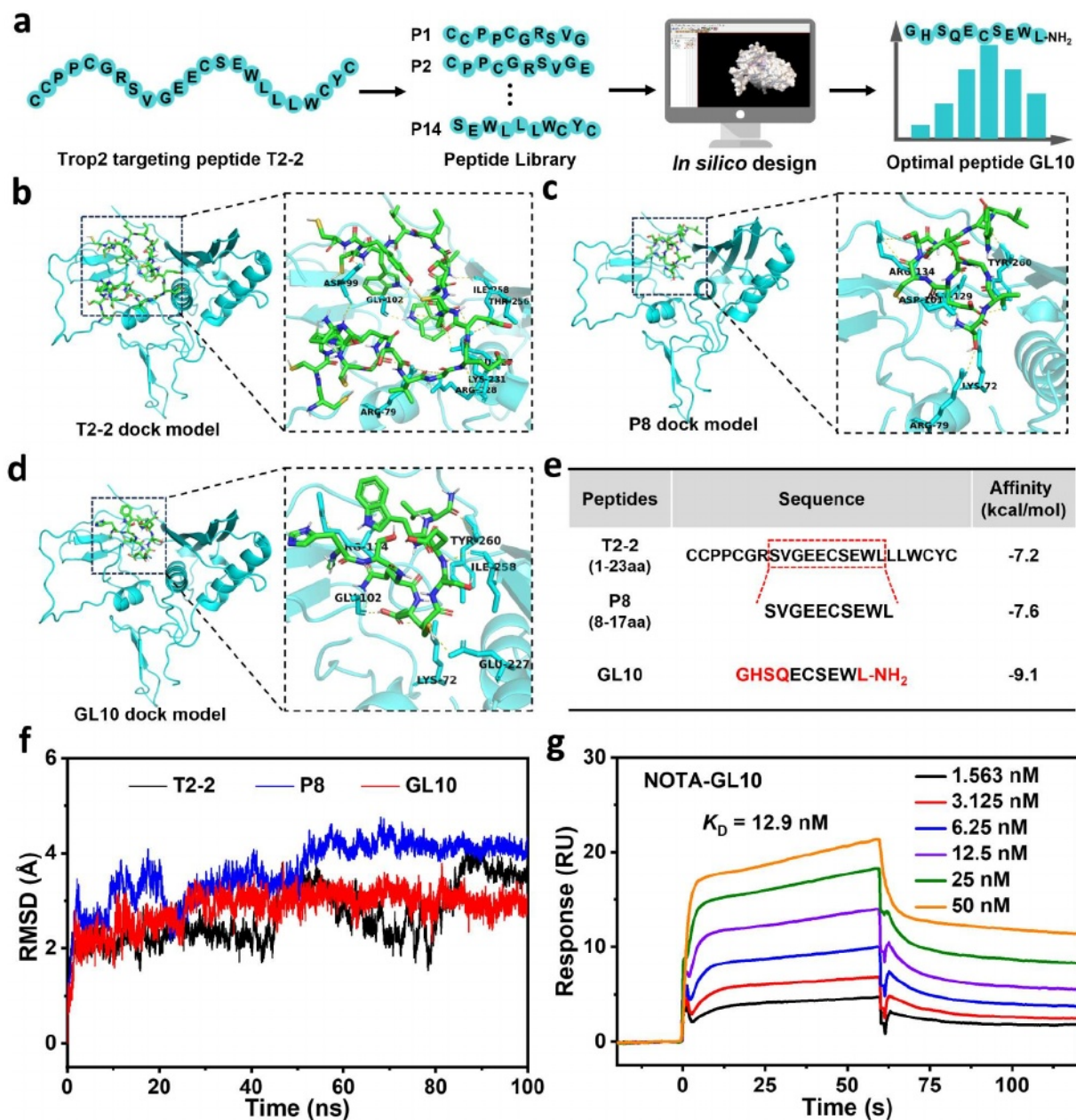


图1(彩色在线)Trop2靶向肽的虚拟筛选和体外验证。(a) Trop2靶向肽设计流程图。计算机设计:分子对接和虚拟氨基酸突变。(b) T2-2与Trop2 (PDB ID: 7PEE)的三维(3D)结合模型。(c) P8与Trop2的三维结合模型。(d) GL10与Trop2的三维结合模型。蓝色卡通中的Trop2, 绿色棒中的T2-2, P8和GL10。(e) T2-2、P8和GL10对Trop2的结合亲和力。3D结合模型和结合亲和力由AutoDock Vina生成。“aa”是氨基酸的简称。(f) T2-2、P8和GL10与Trop2结合的复杂结构的动态模拟。(g)前体NOTA-GL10的SPR和 K_D 。

2.3 细胞摄取和结合试验

为了评估 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10对Trop2的体外特异性, 使用BxPC-3和PANC-1细胞进行细胞摄取测定, 这两个细胞表现出不同的Trop2表达水平。Western blot分析(图3a)和免疫荧光染色(图3b)证实BxPC-3细胞中Trop2的表达明显高于PANC-1细胞。采用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)活力测定法评估 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10在BxPC-3细胞中的剂量依赖性细胞毒性。定量分析表明, 与 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10在0至3.7 MBq的放射性活性范围内孵育24小时, 不会导致细胞活力的统计学显著降低(图S4)。这些发现表明, 放

射性示踪剂具有良好的生物相容性特征, 表明其潜在的肿瘤成像应用适用性。时间依赖性摄取研究显示 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10积累逐渐增加, 在孵育2小时后达到饱和(图3c)。值得注意的是, 在2小时的孵育期后, BxPC-3细胞的放射性示踪剂摄取((4.67±0.17)% AD)明显高于PANC-1细胞((2.06±0.14)% AD)。为了进一步验证trop2特异性结合, 我们进行了竞争性抑制实验。过量NOTA-GL10预处理显著降低BxPC-3细胞的 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10摄取至(2.16±0.05)% AD, 证实受体介导的内化。此外, 在BxPC-3细胞中, ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10对Trop2的半最大抑制浓度(IC₅₀)为8.62 nM(图3d), 显示出高结合亲和力。

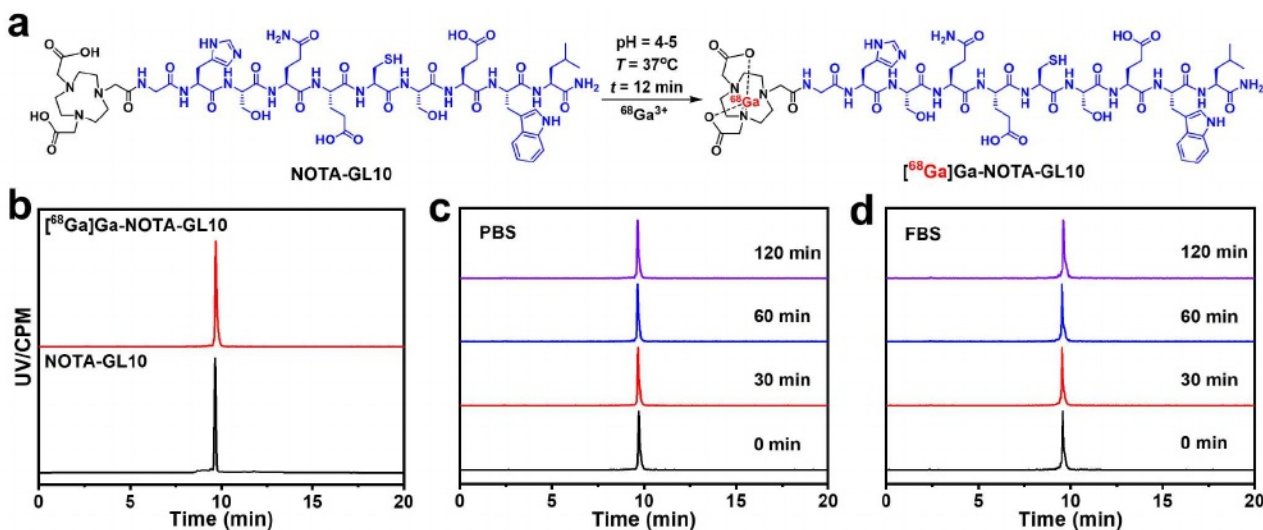


图2(在线颜色)[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的放射性合成和稳定性分析。(a)放射性合成[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10。(b)HPLC和放射性高效液相色谱监测[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10。(c)[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10在PBS中的稳定性测定。(d)[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10在FBS中的稳定性测定。

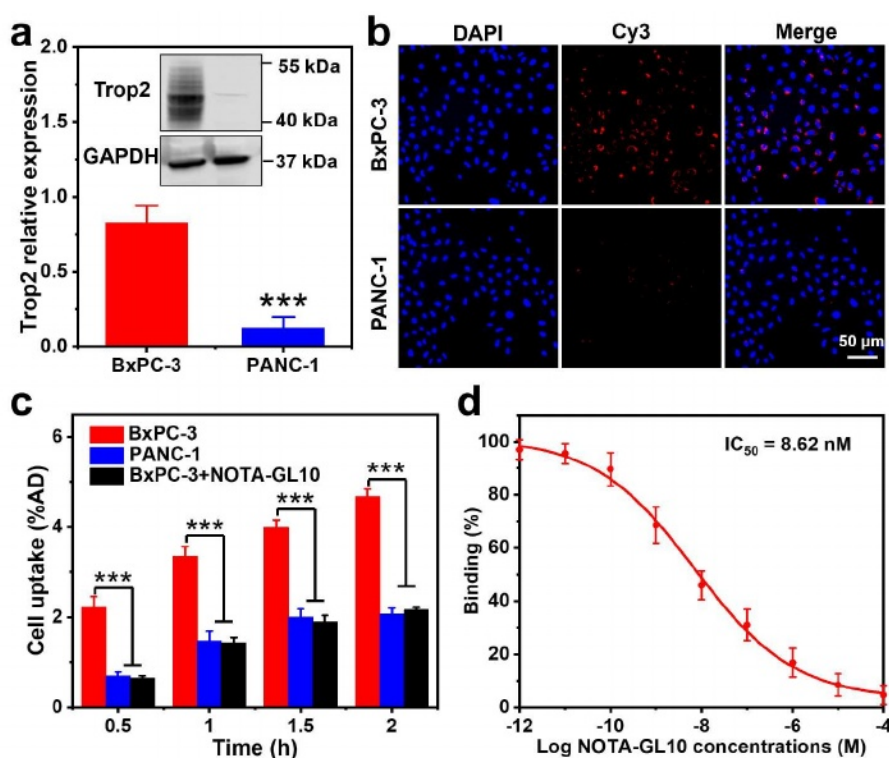


图3 (Color online)[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10体外特异性分析。(a) BxPC-3和PANC-1肿瘤细胞中Trop2表达的Western blot分析。插图:BxPC-3(左)和PANC-1(右)肿瘤细胞中Trop2表达的Western blot图像。(b) BxPC-3和PANC-1肿瘤细胞中Trop2表达的免疫荧光分析。比例尺= 50 μm。(c) BxPC-3和PANC-1肿瘤细胞中[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的细胞摄取。(d) BxPC-3细胞中[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的IC₅₀值。***P < 0.001 (n = 3)。

2.4 [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的药代动力学

在正常小鼠模型中研究了[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的药代动力学特性，其浓度-时间谱显示最适合两室药代动力学模型(图S5)。由于其明显的亲水性，[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10表现出快速的分布药代动力学，其分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)为0.624 min，然后是有有效的全身清除，消除半衰期($t_{1/2\beta}$)为25.422 min。这些药代动力学特征表明该化合物具有双重优势特性。包括

快速外渗和有效渗透到肿瘤组织中，以及从非靶组织中有效清除。因此，[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10实现了最佳的肿瘤与背景比(TBR)，这对于诊断成像应用至关重要。

2.5 荷瘤小鼠中[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的MicroPET成像和生物分布

为了评估[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10在体内监测Trop2表达水平的潜力，在BALB/c荷瘤裸鼠中进行了60分钟的动态PET成像

BxPC-3和PANC-1肿瘤异种移植。所有动物实验均严格遵守江苏省核医学研究所动物护理与使用委员会制定的机构伦理指南(批准号:JSINM-2024-150和JSINM-2024-168)。如图4a所示, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10在BxPC-3肿瘤中的积累量明显高于PANC-1肿瘤。通过感兴趣区域(ROI)分析量化的示踪剂在主要器官中的摄取情况显示, 示踪剂主要在肾脏中积累, 在肝脏中较少, 表明示踪剂主要通过泌尿系统排泄(图4b和图S6)。与 trop2 靶向抗体示踪剂(如⁸⁹Zr-DFO-AF650[12]、⁶⁴Cu-NOTA-Trodelvy[13]和⁸⁹Zr-DFO-SG[30])相比, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10显示肝脏摄取显著减少, 这可能降低与探针相关的肝毒性风险。在BxPC-3荷瘤小鼠中, 放射性示踪剂的摄取在注射后10分钟达到峰值((5.03±0.49)%ID/mL), 并在注射后60分钟保持大量保留((3.77±0.28)%ID/mL)(图4c)。相比之下, PANC-1肿瘤的摄取明显降低, 在10分钟时仅达到(1.41±0.13)%ID/mL。值得注意的是, BxPC-3异种移植物的肿瘤-肌肉比例呈进行性变化

60 min时达到最大值4.44±0.30, 约为PANC-1肿瘤相应比值(1.23±0.28)的2.6倍(图4d)。值得注意的是, 与trop2靶向抗体示踪剂(⁸⁹Zr-DFO-AF650[12]、⁶⁴Cu-NOTA-Trodelvy[13]、⁶⁴Cu/¹⁷⁷Lu-NOTA-hIMB1636[14]和⁸⁹Zr-DFO-SG[30])相比, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10表现出卓越的早期成像造影剂, 为快速肿瘤诊断应用提供了明显的优势。

通过竞争性受体阻断实验进一步验证[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10对Trop2的体内靶向特异性。定量分析显示, 在BxPC-3荷瘤小鼠中, 预给药NOTA-GL10导致放射性示踪剂积累显著减少, 注射后10分钟, 最大肿瘤摄取从(5.03±0.49)%ID/mL降至(1.86±0.43)%ID/mL(图4a, b)。阻断BxPC-3异种移植物的肿瘤-肌肉摄取比明显衰减, 注射后60分钟仅为1.49±0.46, 而未阻断组为4.44±0.30(图4d)。同时, 在尾静脉给药⁶⁸Ga³⁺溶液后, 对[⁶⁸Ga]进行动态PET成像。如图所示

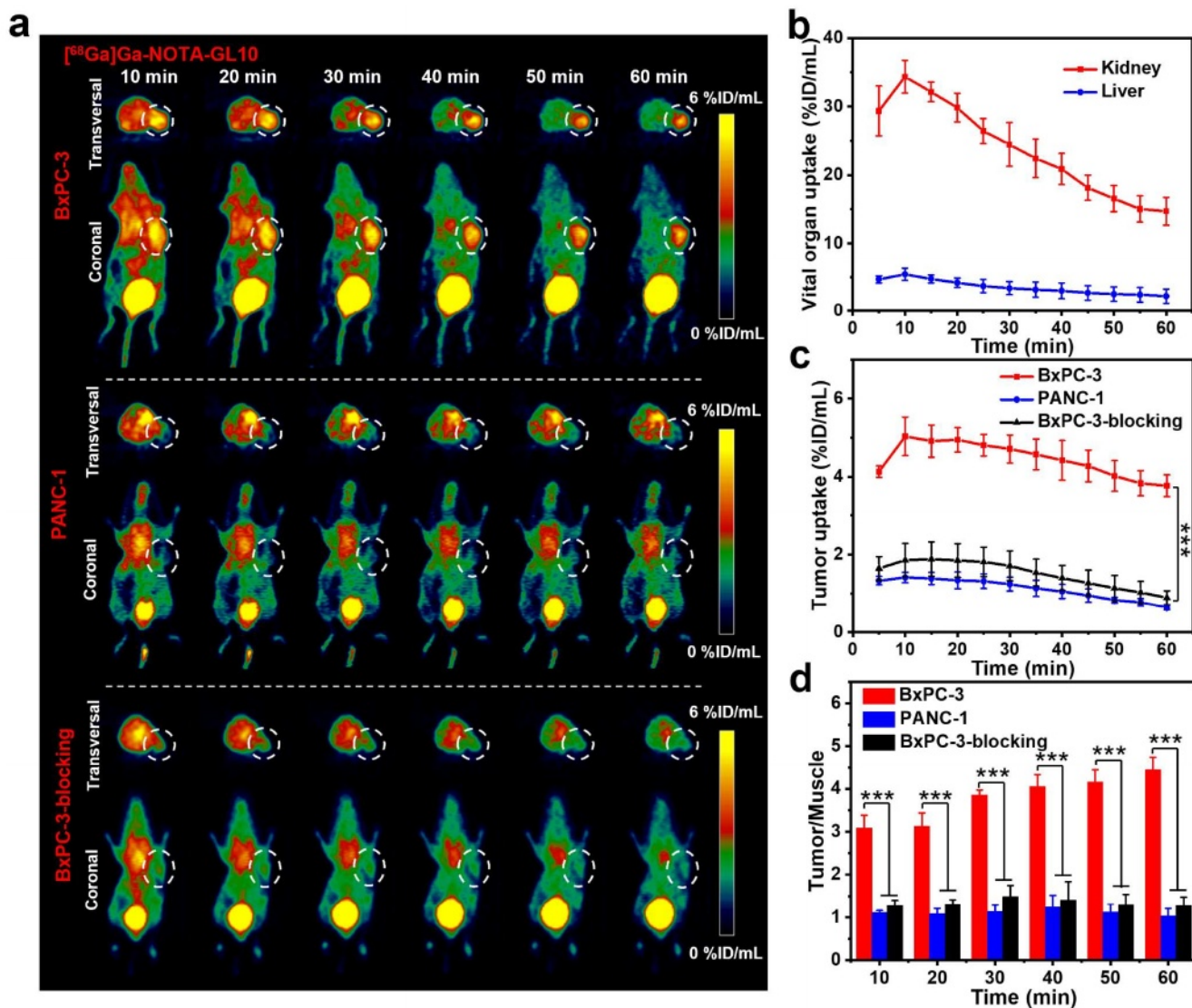


图4(在线彩色)[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10在不同荷瘤小鼠中的MicroPET成像。(a)注射[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10后不同时间BxPC-3、PANC-1和BxPC-3阻断异种移植物的MicroPET图像。白色虚线圆圈表示肿瘤位置。(b) BxPC-3异种移植体肾脏和肝脏摄取[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10时间-活性曲线。(c) BxPC-3、PANC-1和BxPC-3阻断异种移植体中肿瘤摄取[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的时间-活性曲线。(d)注射后代表性时间点BxPC-3、PANC-1和BxPC-3阻断异种移植体中[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-GL10的肿瘤-肌肉摄取比(T/M)。***P < 0.001 (n = 3)。

S7, BxPC-3异种植物在肿瘤部位显示可忽略的示踪剂积累, 以及低肿瘤-肌肉摄取比。这些结果进一步证实了 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10在体内与Trop2的结合特异性。

为了证实体内的发现, 我们进行了全面的离体分析, 包括生物分布研究、放射自显影、免疫印迹、定量放射自显像分析显示, 与PANC-1肿瘤($(1.24 \pm 0.15) \times 10^4 \text{DLU}/\text{mm}^2$)和肌肉组织($(0.98 \pm 0.18) \times 10^4 \text{DLU}/\text{mm}^2$)相比, BxPC-3肿瘤($(3.34 \pm 0.22) \times 10^4 \text{DLU}/\text{mm}^2$)中的放射性示踪剂积累明显更高, 这与它们的Trop2差异表达谱一致(图5a)。注射后60分钟的生物分布研究显示主要是肾脏聚集(肾脏摄取: $(16.14 \pm 3.12)\% \text{ID}/\text{g}$), 其他器官摄取最少(肺: $(2.55 \pm 0.28)\% \text{ID}/\text{g}$;脾脏: $(1.45 \pm 0.26)\% \text{ID}/\text{g}$;肝脏: $(3.09 \pm 0.19)\% \text{ID}/\text{g}$; $(1.01 \pm 0.14)\% \text{ID}/\text{g}$)在BxPC-3异种植物中, 证实尿排泄是主要的消除途径(图5b)。值得注意的是, BxPC-3肿瘤摄取($(4.08 \pm 0.42)\% \text{ID}/\text{g}$)明显超过PANC-1肿瘤($(1.04 \pm 0.30)\% \text{ID}/\text{g}$), 表明该示踪剂能够根据Trop2表达水平区分肿瘤。PET ROI分析与肿瘤和重要器官(肝、肾和肌肉)的离体生物分布结果之间的Pearson相关系数确定为0.994, 表明这两种定量评估方法之间具有良好的一致性(图S8)。此外, Western blot分析显示, Trop2在BxPC-3肿瘤组织中的表达水平比PANC-1肿瘤组织中的表达水平高出约7倍(图5c)。此外, 免疫荧光染色再次显示BxPC-3肿瘤组织中的红色荧光信号明显强于PANC-1肿瘤组织(图5d)。总的来说, 这些离体结果为 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10对表达trop2的肿瘤的高特异性提供了令人信服的证据。

人信服的证据。

2.6 体内NIR荧光成像

NIR荧光成像由于其快速图像采集能力和实时生成高灵敏度图像的能力, 在临床转化, 特别是术中肿瘤可视化和引导切除方面具有重要的潜力[32 - 37]。为了进一步验证GL10靶向Trop2的特异性, 我们合成了一种NIR荧光探针ICG-GL10, 并使用质谱和HPLC对其进行了表征(图S9和S10)。首先评价探针ICG-GL10在PBS缓冲液(pH 7.4)中的稳定性。探针水溶液室温放置72 h, HPLC分析, 结合紫外-可见(UV-Vis)吸收和荧光(FL)光谱。结果表明, 探针ICG-GL10在整个观察期内保持较高的化学纯度(图S11)、稳定的NIR吸收(图S12a)和一致的发射光谱(图S12b), 具有良好的体外稳定性。然后, 将BxPC-3和PANC-1细胞分别与 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的ICG-SG探针体外培养5 h。图S13显示BxPC-3细胞比PANC-1细胞显示出明显更亮的红色荧光。

对皮下注射ICG-GL10和ICG的BxPC-3和PANC-1荷瘤BALB/c小鼠进行NIR荧光成像。图6a显示, trop2阳性的BxPC-3皮下肿瘤比PANC-1肿瘤发出的荧光明显更亮。定量分析显示(图6b), TBR随着时间的增加逐渐增强, 在注射后6 h达到最大值。在注射ICG-GL10的trop2阴性PANC-1肿瘤模型中, TBR在4 h达到峰值, 在肿瘤部位检测到微弱的荧光信号(图6c)。然而, 这两种皮下注射ICG的疗效有很大差异

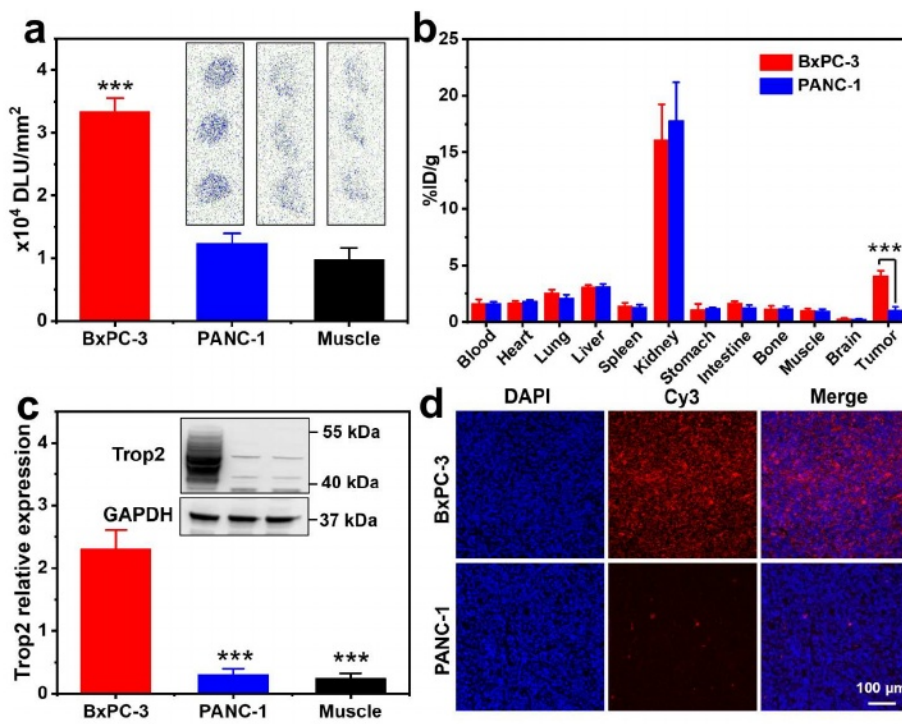


图5(在线颜色)Trop2在不同荷瘤小鼠体内的表达分析。(a)注射 ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10后60分钟BxPC-3和PANC-1荷瘤小鼠的肿瘤和肌肉放射自显影。插图:BxPC-3肿瘤(左)、PANC-1肿瘤(中)和肌肉(右)的放射自显影图像。(b)注射后60min, ^{68}Ga]Ga-NOTA-GL10在BxPC-3和PANC-1荷瘤小鼠体内的生物分布。(c) Western blot分析Trop2在BxPC-3肿瘤、PANC-1肿瘤和肌肉中的表达。插图:Trop2在BxPC-3肿瘤(左)、PANC-1肿瘤(中)和肌肉(右)中表达的Western blot图像。(d) BxPC-3和PANC-1肿瘤中Trop2表达的免疫荧光染色。比例尺=100 μm 。*** $P < 0.001$ ($n = 3$)。

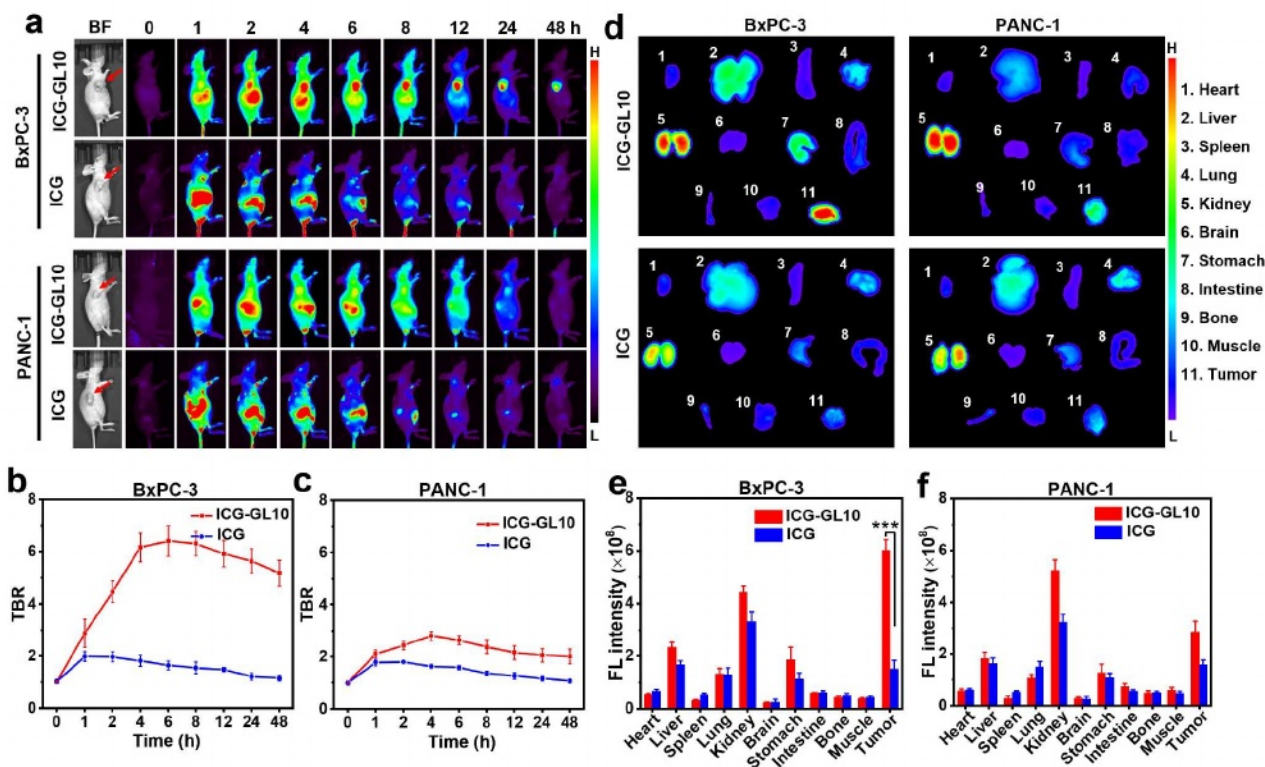


图6(在线彩色)皮下肿瘤的活体实时FL成像及ICG-GL10和ICG探针的生物分布。(a)注射探针后的体内FL成像。红色箭头表示肿瘤部位。BF:亮场。(b) BxPC-3肿瘤的FL强度量化。(c) PANC-1肿瘤的FL强度量化。(d)肿瘤和正常器官的离体FL成像。(e) BxPC-3肿瘤及主要器官的荧光定量强度。(f) PANC-1肿瘤及主要器官的定量荧光强度。*** $P < 0.001$ ($n = 3$)。

肿瘤模型。ICG的强信号主要集中在小鼠的肝脏、肾脏和肠道，肿瘤部位仅发出微弱的荧光信号，48h后几乎完全清除(图6a)。定量分析显示ICG TBR值较低，这与ICG肿瘤摄取低、背景信号高有关(图6b、c)。

为了进一步表征ICG-GL10和ICG的生物分布特征，小鼠在注射后12 h安乐死，切除肿瘤和主要器官进行离体荧光成像和平均荧光强度(MFI)量化(图6d、f)。在BxPC-3异种移植模型中，与非靶器官相比，ICG-GL10在肿瘤组织中的积累明显更高。相反，在PANC-1模型中，探针主要定位于肾脏，在肿瘤和其他组织中观察到最小的滞留。在两种皮下肿瘤模型中，ICG体外成像显示肝脏、肾脏等非肿瘤部位荧光信号明显，荧光信号强于肿瘤部位。ICG-GL10在BxPC-3中的荧光信号明显强于ICG。综上所述，NIR荧光探针ICG-GL10对trop2过表达的肿瘤表现出良好的靶向性，表明其作为肿瘤诊断显像剂的潜力。

基于这些实验结果，我们在注射探针ICG-GL10 12小时后进行了nif引导下的皮下肿瘤手术切除。在两个BxPC-3皮下肿瘤模型中，导航图像清晰地描绘了肿瘤边缘(图S14a)。在初始切除后，残余的NIRF信号持续存在于手术视野中，促使在实时图像引导下进一步切除荧光组织。与邻近的正常组织相比，切除的肿瘤组织表现出明显更强的荧光信号。此外，组织病理学分析证实了所有切除组织

的恶性性质，无论是在原发性和继发性切除阶段(图S14b)。这些结果最终证明了GL10肽靶向trop2的特异性，强调了其在癌症治疗应用中的巨大潜力。

3 结论

本研究通过砷分子对接和虚氨基酸突变设计了一种高特异性的Trop2靶向肽GL10，并开发了首个基于肽的Trop2靶向示踪剂 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ ，用于Trop2的PET成像。该放射性示踪剂在体外和体内均表现出纳米摩尔结合亲和力、高靶标特异性和良好的药代动力学特征。细胞摄取法和动态PET成像均显示 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GL10}$ 检测Trop2表达的特异性和敏感性，ICG-GL10的NIR荧光成像进一步证实了这一点。该研究为肿瘤靶向肽的开发提供了一个有希望的策略，并为开发靶向Trop2的治疗药物提供了一个新的分子支架。

利益冲突

作者声明不存在利益冲突。

致谢

国家自然科学基金项目(22407052)、江苏省自然科学基金项目(BK20240300)、江苏省卫生健康委科研项目(MQ2024007, H2023150, K2024007)、无锡市科技发展基金项目(K20241060)资助。无锡市卫生健康委员会重大项目(Z202303)、无锡市科学技术协会重大项目(TJXD-2024-102)、江苏省科教能力提升项目(ZDXYS202211)。

配套信息

支持信息可在<http://chem.scichina.com>和<http://link.springer.com/journal/11426>上获得。支持材料按提交方式发布, 未经排版和编辑。科学准确性和内容的责任完全由作者负责。

参考文献

- Zaman S, Jaidid H, Denson AC, Gray JE. *Oncotargets Ther*, 2019, Volume 12: 1781–1790
- Nelson BE, Meric-Bernstam F. *Annu Rev Med*, 2024, 75: 31–48
- Corti C, Boscolo Bielo L, Schianca AC, Salimbeni BT, Criscitello C, Curigliano G. *Breast*, 2023, 69: 312–322
- Shimizu T, Sands J, Yoh K, Spira A, Garon EB, Kitazono S, Johnson ML, Meric-Bernstam F, Tolcher AW, Yamamoto N, Greenberg J, Kawasaki Y, Zebger-Gong H, Kobayashi F, Phillips P, Lisberg AE, Heist RS. *J Clin Oncol*, 2023, 41: 4678–4687
- Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, Brufsky A, Sardesai SD, Kalinsky K, Zelnak AB, Weaver R, Traina T, Dalenc F, Aftimos P, Lynce F, Diab S, Cortés J, O’Shaughnessy J, Diéras V, Ferrario C, Schmid P, Carey LA, Gianni L, Piccart MJ, Loibl S, Goldenberg DM, Hong Q, Olivo MS, Itri LM, Rugo HS. *N Engl J Med*, 2021, 384: 1529–1541
- Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, Gastl G, Zitt M, Müller HM, Margreiter R, Ofner D, Fong D. *J Clin Pathol*, 2009, 62: 152–158
- Nishimura T, Mitsunaga M, Sawada R, Saruta M, Kobayashi H, Matsumoto N, Kanke T, Yanai H, Nakamura K. *Cancer Med*, 2019, 8: 7781–7792
- Goldenberg DM, Stein R, Sharkey RM. *Oncotarget*, 2018, 9: 28989–29006
- Shvartsur A, Bonavida B. *Genes Cancer*, 2015, 6: 84–105
- Liu X, Ma L, Li J, Sun L, Yang Y, Liu T, Xing D, Yan S, Zhang M. *Theranostics*, 2024, 14: 3674–3692
- Lütje S, Rijpkema M, Goldenberg DM, van Rij CM, Sharkey RM, McBride WJ, Franssen GM, Frielink C, Helfrich W, Oyen WJG, Boerman OC. *Cancer Res*, 2014, 74: 6216–6223
- Chen W, Li M, Younis MH, Barnhart TE, Jiang D, Sun T, Lang JM, Engle JW, Zhou M, Cai W. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2022, 49: 861–870
- Huang W, Wang T, Chao F, Yang Q, Mixdorf JC, Li L, Engle JW, Fan Y, Kang L, Cai W. *Mol Pharm*, 2025, 22: 2266–2275
- Li C, Liu J, Yang X, Yang Q, Huang W, Zhang M, Zhou D, Wang R, Gong J, Miao Q, Kang L, Yang J. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2022, 50: 168–183
- Liu Y, Huang W, Saladin RJ, Hsu JC, Cai W, Kang L. *Mol Pharm*, 2024, 21: 5909–5928
- Sharma R, Suman SK, Mukherjee A. *Curr Med Chem*, 2022, 29: 5979–6005
- Moek KL, Giesen D, Kok IC, de Groot DJA, Jalving M, Fehrmann RSN, Lub-de Hooge MN, Brouwers AH, de Vries EGE. *J Nucl Med*, 2017, 58: 83S–90S
- Wei W, Jiang D, Evangelista L, Cai W. *Mol Pharm*, 2022, 19: 3453–3455
- Sharma K, Sharma KK, Sharma A, Jain R. *Drug Discov Today*, 2023, 28: 103464
- Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 48
- Cui H, Chen X. *Adv Drug Deliver Rev*, 2017, 110–111: 1–2
- Wang L, Zhu X, Fang J, Huang Z, Xue Y, Wang S, Wang K. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2025, 52: 1223–1224
- Liu J, Sun X, Zhuang J, Liu Z, Xu C, Wu D, Wu C. *Sci China Chem*, 2025, 68: 1434–1444
- Chen L, Lyu Y, Zhang X, Zheng L, Li Q, Ding D, Chen F, Liu Y, Li W, Zhang Y, Huang Q, Wang Z, Xie T, Zhang Q, Sima Y, Li K, Xu S, Ren T, Xiong M, Wu Y, Song J, Yuan L, Yang H, Zhang XB, Tan W. *Sci China Chem*, 2023, 66: 1336–1383
- Guo X, Xu C, Zhu X, Wang X, Hao Y, Wang X, Yao Y, Fang J, Wang K. *J Med Chem*, 2025, 68: 10461–10472
- Guo Y, Lv Z, Zhang Y, Zhao Z, Fan Y, Chen Y, Li M, Ren X, Feng Y, Han Z, Wen H, Fan G, Yang R, Shi H. *Sci China Chem*, 2025, 68: 1456–1467
- Li J, Liu H, Xiao S, Fan S, Cheng X, Wu C. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 28264–28275
- Trott O, Olson AJ. *J Comput Chem*, 2010, 31: 455–461
- Sun Y, Hao Z, Gao H, Yang G, Pan B, Zhu M, Wan Y, Shi J, Huo L, Chen H, Wang F. *J Nucl Med*, 2025, 66: 543–551
- Chen W, Zhang Y, Zhang L, Luo X, Yang X, Zhu Y, Wang G, Huang W, Zhang D, Zeng Y, Li R, Guo C, Wang J, Wu Z, Liu N, Zhang G. *Sci Transl Med*, 2024, 16: eado2461
- Huang W, Zhang Y, Cao M, Wu Y, Jiao F, Chu Z, Zhou X, Li L, Xu D, Pan X, Guan Y, Huang G, Liu J, Xie F, Wei W. *EMBO Mol Med*, 2024, 16: 1143–1161
- Fang J, Zhao Y, Wang A, Zhang Y, Cui C, Ye S, Mao Q, Feng Y, Li J, Xu C, Shi H. *Anal Chem*, 2022, 94: 5149–5158
- Fang J, Feng Y, Zhang Y, Wang A, Li J, Cui C, Guo Y, Zhu J, Lv Z, Zhao Z, Xu C, Shi H. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 23061–23072
- Fang J, Liu Q, Liu Y, Li K, Qiu L, Xi H, Cai S, Zou P, Lin J. *Anal Chem*, 2024, 96: 1707–1716
- Wang X, Ding Q, Groleau RR, Wu L, Mao Y, Che F, Kotova O, Scanlan EM, Lewis SE, Li P, Tang B, James TD, Gunnlaugsson T. *Chem Rev*, 2024, 124: 7106–7164
- Wheeler TT, Cao P, Ghouri MD, Ji T, Nie G, Zhao Y. *Sci China Chem*, 2022, 65: 1498–1514
- Xu X, Ma Y, Cao H, Xu L, Chen H, Liu S, Sun W, Song G, Zhang XB. *Sci China Chem*, 2025, 68: 2138–2145