

# 肿瘤 c - Met 靶向分子成像探针的研发、制备与应用进展

燕 吉 韩兆国 孙夕林

**摘要** 肝细胞生长因子受体 (cellular - mesenchymal to epithelial transition factor, c - Met) 在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用, c - Met 的表达水平和活化状态与肿瘤治疗及临床预后密切相关, 因此对 c - Met 表达的评估显得十分重要。分子成像可以实时和在体监测 c - Met 分子水平的异常改变。近年来伴随着新型 c - Met 靶向分子成像探针的不断研发并投入临床前及临床研究, 肿瘤 c - Met 分子成像研究已取得了显著进展。每种分子探针都有其不同的来源、结构、合成方案以及各异的性能, 而这些又是影响分子成像研究结果的关键所在。本文将重点从前体来源、探针设计及修饰原理、探针合成方法、理化性质表征以及性能评估等方面对 c - Met 分子探针进行系统阐述, 以期有利于 c - Met 分子探针的研发, 进而促进肿瘤 c - Met 分子成像研究的发展。

**关键词** 肝细胞生长因子受体 分子成像 探针合成

**中图分类号** R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.040

近年来, 肿瘤的发生率和病死率逐年上升, 而目前常规检查方法包括血清学、病理学、常规影像学等, 均存在很多缺点, 如血清学检查的特异性不足, 诊断不明确; 病理活检多只适用于位置表浅的病灶; 常规影像学多在病灶出现明显形态学变化时方有一定价值, 无法进行早期诊断。

分子成像运用影像学手段体现活体状态下分子水平变化, 支持定性定量研究, 其特异性强, 可以对肿瘤分子类型进行准确判别; 分子成像探针可直达病灶, 在出现形态学变化之前, 实现对肿瘤的早期诊断。迄今为止, 美国食品和药物管理局已批准一系列低分子抑制剂, 用于各类受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 的靶向诊疗, 而 c - Met 作为一类重要的 RTK, 在调节肿瘤细胞的生物学特性方面扮演重要角色, 针对 c - Met 的靶向治疗受到越来越多的关注<sup>[1]</sup>。目前的研究热点在于开发可以无创在体定量检测 c - Met 水平的成像方案, 而其关键又在新型 c - Met 分子探针的开发。本文主要目的是综述报道的 c - Met 分子成像研究在探针设计、构建及应用等

方面的特点及研究进展。

## 一、c - Met 通路

1. c - Met 正常通路: c - Met 是原癌基因 c - Met 的编码产物, 有酪氨酸激酶活性, 其内源性配体为肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)。据报道, 肿瘤的发展和转移与 HGF 及 c - Met 表达的增加高度相关。c - Met 基因由 Cooper 等<sup>[2]</sup>研究发现, 位于染色体 7q21 ~ q31。c - Met 与 HGF 结合后, 其在酪氨酸 1234 和 1235 处发生同型二聚化和磷酸化, 随后在 1349 和 1356 处发生<sup>[3,4]</sup>。磷酸化后, 这些酪氨酸招募 GRB2、PI<sub>3</sub>K、PLC $\gamma$  等一系列信号分子, 进而调节细胞增殖、运动性、细胞周期<sup>[3,5]</sup>。

2. c - Met 异常通路与肿瘤发生: c - Met 通路在人体处于正常状态时, 可受到精准调控而保持稳定。然而, 调控出现异常时往往伴随着肿瘤的发生以及信号通路高度活化。肿瘤中的 c - Met 通路的异常激活, 相关机制包括配体依赖性自分泌、旁分泌机制及配体非依赖性机制<sup>[6]</sup>。c - Met 的异常激活引起细胞的增殖、侵袭, 细胞凋亡的抑制以及血管生成<sup>[7]</sup>。在包括胃癌、乳腺癌、肺癌等诸多癌症中, c - Met 的突变、扩增或过表达经常发生, 并且 c - Met 的过表达还与肿瘤转移高度相关<sup>[8,9]</sup>。

## 二、c - Met 检测方法

c - Met 的传统检测方法有直接测序法、实时荧光定量 (quantitative real - time PCR, RTFQ - PCR)、

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2015CB931800); 国家自然科学基金资助项目 (81471724, 81101088, 81130028); 黑龙江省自然科学基金委员会留学归国科学基金资助项目 (LC2013C26)

作者单位: 150028 哈尔滨医科大学分子影像研究中心、哈尔滨医科大学附属第四医院 TOF - PET/CT/MR 中心

通讯作者: 孙夕林, 教授, 博士生导师, 电子信箱: sunxilin@aliyun.com

荧光原位杂交法 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC)<sup>[10]</sup>。直接测序法主要检测 c-Met 突变,然而部分肿瘤患者如非小细胞肺癌患者 c-Met 突变的发生率较低,因此其对于筛查 c-Met 靶向治疗获益人群的指导意义有限;RTFQ-PCR 和 FISH 主要检测 c-Met 扩增,但存在阳性率低等问题;IHC 主要检测 c-Met 过表达,敏感度高,但特异性差<sup>[11]</sup>。c-Met 靶向分子成像可以无创、精确地检测到肿瘤位置、靶点活化程度等异质性信息,它高效、无害且可重复性强,而 c-Met 靶向分子探针的研发又是 c-Met 分子成像研究开展的关键和基础,其较传统检测方法有以下明显优势:①探针前体可直接放射性标记,具有清晰的结构,可精确确定药代动力学信息及安全性信息等;②可提供更准确的定量信息;③探针易于修饰,适应成像需求<sup>[12]</sup>。

### 三、c-Met 分子成像探针

c-Met 靶向分子探针的结构设计、定点修饰等是制备稳定、安全、高效探针的先决条件,探针的基本结构由靶向基团、连接部分和示踪部分组成,通过连接物经特定方法将靶向基团与放射性同位素、顺磁性物质或光声造影剂进行连接,靶向基团是探针最重要的结构,包括特异性的抗体、蛋白、多肽及高亲和力低分子化合物等。下文将依据靶向基团分类分别阐述不同类别 c-Met 分子探针的构建、优化及应用情况。

1. 蛋白及抗体类:以 HGF 和各种不同抗 c-Met 单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 作为靶向基团构建 c-Met 探针,是目前应用于靶向 c-Met 分子成像研究最广泛的一类探针,其结合原理为抗原-抗体结合、受体-配体结合或者酶-底物结合等。鉴于抗 c-Met 抗体具有高特异性、高亲和力、修饰承受度大等优势,此类探针在 c-Met 分子成像研究中得到广泛应用。Perk 等<sup>[13]</sup>以 DN-30 作为靶向基团,进行<sup>89</sup>Zr 标记后用于 c-Met 靶向成像研究, DN-30 是一种来源于鼠免疫球蛋白 G2a 的抗 c-Met 单克隆抗体。探针合成方法简述如下:将去铁胺琥珀酰化,再与 DN30 的赖氨酸残基偶联后,将 pH 值调至 7.0,用<sup>89</sup>Zr 标记。在 PD10 柱上纯化后得到终产物<sup>89</sup>Zr-N-sucDf-DN30。连接介质先与抗体偶联,然后在偶联物上标记放射性核素,采用这种方法的优点是放射性利用率较高。该制备方法不需特殊条件,原料易得。但步骤较多,相对耗时,且标记产率较低。在靶向性验证过程中,c-Met 阳性实验组摄取探针明显

高于阴性组,但在肝脏和脾脏有大量摄取,背景信号太高,致使图像整体对比度稍低。Jagoda 等<sup>[14]</sup>使用了改进后的合成方法,不同的是换用了 c-Met 靶向治疗性单臂单克隆抗体奥那妥珠单抗 (onartuzumab),它是具有纳摩尔级别亲和力的 c-Met 选择性人源化单臂单克隆抗体,在小鼠肿瘤模型中证实对肿瘤生长有抑制作用且具备临床转化潜力<sup>[15]</sup>。探针<sup>89</sup>Zr-Df-onartuzumab 的标记产率 >90%。

相比于 DN30 (部分激动剂),onartuzumab 亲和力和靶向特异性更强,生物抑制效应更为完整。体外和体内多项实验验证了其良好的靶向性、安全性和稳定性。Li 等<sup>[16]</sup>提出,无论是 DN30 还是 onartuzumab,都具有完整的可结晶段 (fragment crystalline, Fc),需 3~7 天方能从体内循环中清除。为克服这一缺点,该研究者对单克隆抗体的结构加以修饰,选用单链可变片段,将其中的 H2 片段重组,在保证探针靶向性的基础上明显降低了探针的分子量。在连接介质方面,区别于传统的去铁草酰胺 (desferrioxamine, DFO),Li 等将 DFO 同马来酰亚胺相螯合,形成新的连接介质马来酰亚胺化去铁草酰胺 (maleimide-DFO),这种改进使核素-连接介质-抗体联结体更加稳定,不易分解。该合成标记产率为 49%,放射化学纯度为 95%。该新型探针与传统探针比较肿瘤摄取水平略低,但所得到的图像的对比如得到很大提高,得益于探针分子量的降低以加快了其在体内的循环代谢。另外,前文描述的基于 DN-30 和 onartuzumab 的探针,结合抗体均为单价片段,该研究者证实单价片段不能抑制 c-Met 阳性细胞生长,说明需二价结合,该基于二价抗体片段的探针可将 c-Met 锁定为禁止下游信号转导的构象以实现高效结合。

HGF 是 c-Met 的唯一的内源性配体,依据受体-配体结合原理将其改造为靶向探针,可特异性结合 c-Met 靶点。曾有研究者直接将 HGF 作为分子显像剂,研究病变的血流动力学改变,实现了 c-Met 活化状态的检测,但未修饰的 HGF 将难以避免相关的生物学效应及其潜在危害。Luo 等<sup>[17]</sup>将 HGF 加以修饰,使其用于放射性核素标记的成像研究。该研究者选用重组人 HGF (recombinant human hepatocyte growth factor, rh-HGF),将其与连接介质 p-SCNBn-NOTA 缀合,pH 值调至 9.0,常温下反应 1h。放射性标记过程比较简单,只需将<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> 溶在乙酸钠缓冲液 (pH 值为 6.5) 中,加入到前体物质中,常温即可标记。再经 PD10 柱纯化后制得。该探针的合成方法

简单,条件温和,前体具有一定的临床药用基础,更易于转化。合成过程中使用了NOTA,一种大环类双功能联接剂,以其作为连接介质可以提高探针稳定性,这是由于配体的刚性架构束缚了缀合位点与放射性核素。*rh-HGF*分子量显著小于传统单克隆抗体,因此,该探针的消除速率比传统单克隆抗体类探针更高。脂蛋白是一类低分子量蛋白质,其天然特性使其具备优良的生物相容性,是作为靶向分子探针的理想材料。

Anticalin是一种基于人脂蛋白支架的新型生物治疗药物,能够与抗原特异性结合,分子量比单克隆抗体小约8倍。*von Scheltinga*等<sup>[18]</sup>设计出一种靶向*c-Met*的anticalin,称为PRs-110,采用<sup>89</sup>Zr标记,标记方法简述如下:将<sup>89</sup>Zr-草酸盐溶液用Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节至pH值为4.0~4.5,两者在室温反应3min,用过量的羟乙基哌嗪乙磺酸(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES, pH值为7.2)使溶液的pH值达到6.8~7.2,加入PRs-110并温育60min,得到终产物<sup>89</sup>Zr-PRs-110。该探针HPLC分析结果表明,前体与放射性核素结合紧密,探针稳定性较强。脂蛋白类探针是今后靶向*c-Met*靶向成像探针研发的一个新的潜在热点。但此类探针的脂溶性较高,聚集于肝胆系统,对图像对比度造成一定影响。

近年来,蛋白及抗体类*c-Met*分子探针的开发已取得较大进步,但也存在以下问题:①体内清除缓慢,这与探针靶向基团的分子量过大有关,在保证靶向性能的前提下尽量降低靶向基团的分子量将是未来发展的关键;②难以避免的免疫原性及相关生物学效应将带来潜在的安全问题;③背景噪声高,这与探针常积聚于肝胆系统有关。对探针进行修饰,调整其水溶性,可在一定程度上克服此类问题。

2. 多肽类:多肽是氨基酸以肽键形式连接在一起形成的生物高分子,*c-Met*特异性多肽以剂量依赖的方式与HGF竞争结合,具有改造为高效*c-Met*分子探针的潜力。多肽分子量较小,靶点结合效率较高,且易于结构修饰,具有低毒、低免疫原性等优点。然而,有些以多肽结构为基础的分子探针在实际合成和应用过程中涉及到特殊试剂的使用,在一定程度上降低了探针安全性,限制了其临床转化。基于以上方面,下文将分类探究多肽类*c-Met*探针的性能特点及在合成应用过程中面临的挑战。从多肽库中使用细胞因子受体筛选出的细胞因子模拟肽,具有活性强、分子量小等优点,主要包括直链肽类和环肽类。

Kim等<sup>[19]</sup>从噬菌体多肽库中筛选出*c-Met*抗原表位模拟肽NH<sub>2</sub>-Lys1-Ser2-Leu3-Ser4-Arg5-His6-Asp7-His8-Ile9-His10-His11-His12-Ac,将其命名为cMBP,即*c-Met* binding peptide。并证实该多肽可与*c-Met*特异性结合,通过一定的结构改造将其与甘氨酸(G)或氨基辛酸(AOC)连接,用于<sup>125</sup>I标记(<sup>125</sup>I-cMBP-G和<sup>125</sup>I-cMBP-AOC)的*c-Met*分子成像研究。前体制备及探针合成方法如下:在碱性条件下除去芴甲氧羰基(flourene methoxycarbonyl, Fmoc)保护基团后,多肽被分离出来,随后连接G和AOC,生产出前体cMBP-GGG和cMBP-AOC,采用氯胺T碘标法,加入氯胺T和Na<sup>125</sup>I后加入亚硫酸钠终止反应。放射化学纯度为90%~95%。亲和力测定实验证实,经G或AOC修饰后的多肽探针与*c-Met*之间的亲和力较修饰前明显提高。<sup>125</sup>I-cMBP-GGG在肿瘤摄取方面优于<sup>125</sup>I-cMBP-AOC,这说明连接部分含有3个甘氨酸可以提高探针的亲和力,其原理是提高了探针的脂溶性及滞留能力。该研究者又将基于cMBP的探针研究拓展至光学成像领域,将cMBP-GGG和cMBP-AOC分别同花菁染料5.5(cyanine dyes 5.5, Cy5.5)共轭连接,制备出靶向*c-Met*光学成像探针<sup>[20]</sup>。Cy5.5是一种近红外光染料,已广泛应用于光学分子成像研究,仅需亚纳摩尔级别便足以满足实验需求。该光学探针的合成方法简述如下: Cy5.5马来酰胺化后,与cMBP-GGG或cMBP-AOC混合,暗室室温孵育6h。该探针可通过实时光学成像显示*c-Met*的表达量。

Li等<sup>[21]</sup>使用<sup>18</sup>F标记,基于多肽Met-pep1(YLFSVHWPLKA),合成新型分子探针<sup>18</sup>F-FP-Met-pep1。该研究者创新性地使用<sup>18</sup>F的丙酸盐与多肽相连接,保证了多肽与放射性核素连接的稳定性。经二异丙基乙胺(diisopropylethylamine, DIPEA)及二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)等物质处理后,由乙醇洗脱制得。放射标记率在55%以上,纯度为97%。探针在肿瘤摄取能力强,可通过尿路迅速排出。虽然以上探针都取得了符合预期的结果,但直链肽类探针存在以下缺点:直链肽在生物体内酶的作用下易被降解,影响探针的稳定性;另外,直链肽的构象柔性符合受体的构象要求方面稍有不足,导致其受体选择性方面不如环状多肽。相对于直链肽,环肽具有较强的生物活性,其环状结构决定其稳定性及抗酶解能力均强于直链肽,生物利用度也远高于直链肽。

Burggraaf等<sup>[22]</sup>将一种商品化的*c-Met*特异性

环肽 AH-111972 与连接肽 GGGK 连接后,以 Cy5 衍生活光染料(Cy5.7)修饰,构建了一种新型光学 c-Met 靶向探针 GE-137,并将此探针用于荧光内窥镜成像,与病理切片比较,结果一致性良好,实现了临床转化。体外遗传毒性和光毒性研究结果证实,该探针安全性较高。Arulappu 等<sup>[23]</sup>选用 GE-137 的靶向多肽结构,将其进行<sup>18</sup>F 标记,制备了新型 c-Met 靶向分子探针。标记采用两步法,第一步:从经辐照的靶水中回收<sup>18</sup>F 的氟化物,然后洗脱到环烯烃共聚物反应容器中,在 120℃ <sup>14</sup>N<sub>2</sub> 气流下干燥。随后与甲磺酸盐反应产生<sup>18</sup>F-氟苯甲醛。第二步:将肽前体溶解于苯胺盐酸盐的水溶液中并加入到<sup>18</sup>F-氟苯甲醛中,通过<sup>18</sup>F 亲核取代反应实现放射性标记,得到粗产品,经 C18 固相萃取柱纯化后制得终产品<sup>18</sup>F-AH113804。总合成时间为 49min,放射化学纯度 > 90%。此探针亲和力高,且药代动力学特性良好。成像对比度高、背景噪声低。靶向 c-Met 多肽类探针在安全性、可修饰性、合成工艺优化等方面均优于蛋白及抗体类,这与其生物相容性高、筛选方式及修饰优化等因素有关。

3. 低分子类:目前关于 c-Met 靶向分子成像的低分子类探针研究较少,且主要来源于低分子类 c-Met 酪氨酸激酶抑制剂。此类物质常具有较高的水溶性,多经肾脏排泄。因其分子量小、结合力强、消除速率高以及毒性小等优势而被广泛应用于探针研发。靶向 c-Met 低分子抑制剂 SU11274,可在 c-Met 胞内部分的 ATP 特定位点结合,Wiest 等<sup>[24]</sup>通过实验证实其在胞内迅速聚集,阻断 c-Met 磷酸化。Wu 等<sup>[25]</sup>将其进行结构优化,构建了<sup>11</sup>C 标记的 c-Met 靶向探针。由于使用<sup>11</sup>C 标记,而<sup>11</sup>C 的半衰期较短( $t_{1/2} = 20\text{min}$ ),不适合进行多步复杂的标记,该研究者遂采用直接甲基化法,并未增加连接介质,这点区别于其他 c-Met 靶向分子探针的构建。虽无连接介质,探针并未出现脱标情况,说明此法可行。该探针标记产率为 90%~95%,放射化学纯度 > 98%。成像结果显示,探针在腹部的摄取明显低于抗体及多肽类探针。

低分子抑制剂 JNJ38877605、ARQ-197 等均在实验中证实有抗肿瘤增殖的作用<sup>[26,27]</sup>,它们的结构具备修饰潜力,可尝试连接放射性核素,进行 PET 成像研究。研发低分子类探针在制备流程中应注意以下问题:在提高水溶性的过程中不能过多降低脂溶性,否则将影响跨膜递送;人工合成后的低分子物质

不可忽视安全性评估;修饰时不可破坏原结构等。

#### 四、展 望

c-Met 靶向分子成像研究对肿瘤 c-Met 异常表达水平的精准定量意义重大,而探针的研发是成像研究的关键点和重点,直接影响着该领域的研究进展。近年来,c-Met 分子探针在合成方法上不断创新,筛选途径和修饰手段持续多样化,合成步骤不断简约化。通过“先标记再偶联”的方法,可以提高探针的放射性利用率;通过选用生物相容性强的片段,可以提高探针稳定性。通过在尾端修饰 3 个甘氨酸,可以提高探针亲和力。并且在保证不脱标的情况下尽量缩短时间,从而降低半衰期过短的不良影响。目前,合成方法研究较成熟的是靶向 c-Met 抗体类探针,高效的靶向性保证了探针的稳定性和准确性。而低分子探针在药代动力学、诊疗一体化及临床转换等方面均优于蛋白、抗体及多肽类,因此它将是 c-Met 靶向成像研究的重点和方向,但其合成方法复杂,需在合成和优化结构方面深入研究。相信蛋白组学和基因组学的不断进展,以及 c-Met 靶向探针制备方法的不断改进,将极大促进 c-Met 分子探针开发和 c-Met 分子成像研究及其在临床转化及应用方面的进展。

#### 参考文献

- 1 Gao HF, Li AN, Yang JJ, *et al.* Soluble c-Met levels correlated with tissue c-Met protein expression in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2017, 18(1): 85-91
- 2 Cooper CS, Park M, Blair DG, *et al.* Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line[J]. *Nature*, 1984, 311: 29-33
- 3 Han Z, Wu Y, Wang K, *et al.* Analysis of progress and challenges for various patterns of c-MET-targeted molecular imaging: a systematic review[J]. *EJNMMI Res*, 2017, 7(1): 41
- 4 Ozasa H, Oguri T, Maeno K, *et al.* Significance of c-MET overexpression in cytotoxic anticancer drug-resistant small-cell lung cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(8): 1032-1039
- 5 Marano L, Chiari R, Fabozzi A, *et al.* c-Met targeting in advanced gastric cancer: an open challenge[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(1): 30-36
- 6 Ahn SY, Kim J, Kim MA, *et al.* Increased HGF expression induces resistance to c-MET tyrosine kinase inhibitors in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 1127-1138
- 7 Erlmeier F, Ivanyi P, Hartmann A, *et al.* c-Met in chromophobe renal cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(2): 15
- 8 Miranda O, Farooqui M, Siegfried JM. Status of agents targeting the HGF/c-met axis in lung cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9): 331-340

(转第 183 页)