

文章编号: 0253-9950(2003)01-0037-03

^{18}F 标记甘氨酸-苯丙氨酸盐的研究

李俊玲, 汪勇先, 张秀利, 周 伟, 田海滨, 尹端 让

中国科学院 上海原子核研究所, 上海 201800

摘要: 利用间接标记法对甘氨酸-苯丙氨酸乙酸盐 (HGP) 进行了 ^{18}F 标记。研究了 pH、反应时间、HGP 浓度及催化剂 1-羟基苯并三唑 (HOB T) 用量等对标记率的影响。实验结果表明, 在 pH = 9.2, HGP 的质量浓度为 1 mg/mL, 室温反应 5 min 时, 标记率可达 90 %。

关键词: ^{18}F ; HGP; HOB T; 标记率

中图分类号: O623.73 **文献标识码:** A

在过去的三十多年中, 显像试剂已从大分子蛋白、单克隆抗体及片段发展到受体特异的多肽^[1~4]。经放射性核素标记的多肽是目前最具前景的显像剂和治疗药物之一。由于多肽的分子较小, 在放射性标记后, 显像时可得到较高靶-背景比和较快的血液清除速度。因此, 短寿命的正电子核素可以用来标记生物活性多肽分子, 并进行正电子发射断层显像 (PET) 诊断疾病。在大量发射正电子的核素中, ^{11}C 与 ^{18}F 是多肽标记中的较佳选择, 而 ^{18}F 因具有较长半衰期 (110 min), 将成为许多受体显像研究 (特别在生物结合过程较慢的情况下) 中的优选正电子核素^[5]。

在生物分子的 ^{18}F 标记过程中, 标记前体的选择非常重要, 选择标准主要有三个: 一是对生物分子的活性损伤小; 二是与生物分子结合力强, 体内稳定性好; 三是易于合成。在文献 [6~11] 的基础上, 实验选择 ^{18}F -SFMB 为 ^{18}F 标记前体。因为多数生物活性多肽价格昂贵, 本文选用结构简单、易于合成、价格便宜、无活性的二肽甘氨酸-苯丙氨酸盐 (HGP), 作为模型化合物进行 ^{18}F 标记。

^{18}F 酰化试剂与多肽分子的结合位点一般有两个: 一是多肽分子中赖氨酸的 ϵ -氨基; 二是多肽

分子的末端氨基。通过控制 pH 可控制不同结合位点的产物比例, 但一般情况下存在两者的竞争平衡。因此本文研究几个因素对 ^{18}F -SFMB 与 HGP 氨基端结合的影响, 以期对生物活性的多肽的 ^{18}F 标记提供有价值的参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甘氨酸-苯丙氨酸盐 (HGP), 中国科学院上海细胞所提供; 1-羟基苯并三唑 (HOB T), Belgium ACORS 公司产品; Sep-pak 硅胶柱, Waters 公司生产; 新华 1# 硅胶纸, 青岛海洋化工厂分厂生产。

$^{18}\text{F}^-$ 由 Cyclo 30 型回旋加速器产生, 靶材料为 $^{18}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ (^{18}O 丰度 > 95 %); γ 计数器, 中国科学院上海原子核研究所生产。

1.2 实验方法

1.2.1 ^{18}F -SFMB 的制备和检测 按文献 [9] 方法合成标记中间体 N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F (氟甲基) 苯甲酸酯 (^{18}F -SFMB)。所得产物 ^{18}F -SFMB 的放化产率达 50 % 左右, 用新华 1# 硅胶纸进行检测, 展开剂为 V (氯仿) : V (甲醇) = 7 : 5, 产物的放化纯度 RCP > 99 %, 所得结果与文献 [9] 一致。

收稿日期: 2002-04-28; 修订日期: 2002-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10075073); 中国科学院创新工程重大资助项目 (KJ CXF-SW-08)

作者简介: 李俊玲 (1974—), 女, 山东莱芜人, 博士, 无机化学专业。

1.2.2 ^{18}F -SFMB-HGP 的制备 上述含 ^{18}F -SFMB 的甲醇淋洗液经氮气吹干后,加入 50 μL 无水乙腈、20 μL 一定浓度的二肽硼砂溶液,室温反应一定时间后,产品经 Sep-pak 硅胶柱分离。步骤如下:用适量二氯甲烷平衡 Sep-pak 硅胶柱后,将上述料液通过柱子,然后用 4~6 mL 体积比为 1:1 的氯仿-甲醇淋洗,再用 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}):V(10\% \text{ 乙酸}) = 5:5:0.5$ 的淋洗液将标记产品淋洗下来。经 TLC ($V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}) = 3:1$) 检测,产率约为 90%,放化纯度大于 99%。

2 结果和讨论

2.1 pH 值和反应时间对标记率的影响

pH 值与标记率的关系示于图 1。由图 1 可见,随 pH 升高,标记率先升后降,pH 约 9.2 左右时,标记率最高,之后 pH 再增大,标记率急剧下降。这可能是因为 HGP 以乙酸盐的形式存在,其 α -氨基在 pH=9 左右时能充分游离出来,使得标记反应充分进行;但 pH 过大,将加剧 ^{18}F -SFMB 的水解,不利于反应。不同 pH 值下,反应时间与标记率的关系示于图 2。由图 2 可知,反应时间对标记率影响不大,反应基本在 5 min 内达到平衡。

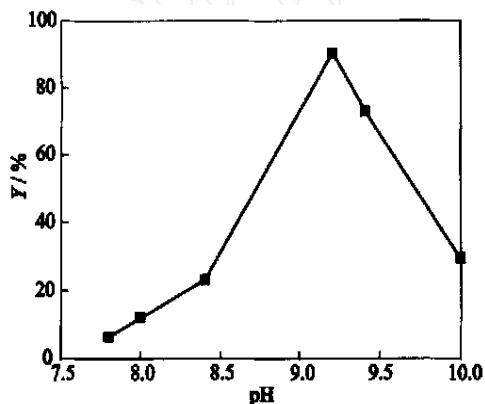


图 1 pH 对标记率的影响

Fig. 1 Effect of pH on labeling yield
 $\rho(\text{HGP}) = 1 \text{ mg/mL}$, $t = 5 \text{ min}$

2.2 HOB T 浓度对标记率的影响

不同浓度的 HOB T 与标记率的关系示于图 3。由图 3 可知,HOB T 浓度变化对标记率基本无影响。Wester 等^[12,13]在对某些二肽如苯丙氨酸-甘氨酸等进行 ^{18}F 氟丙酰化的研究时发现,仅通过控制 pH 值不能实现对多肽 α -氨基的标记,但

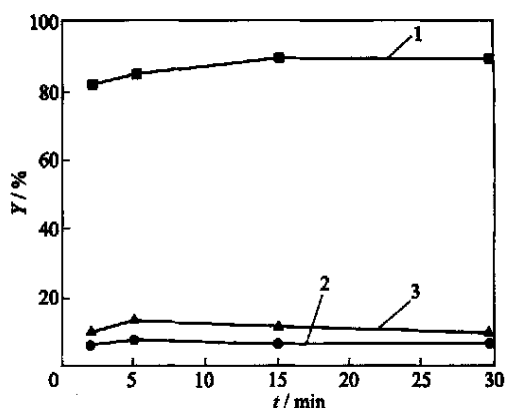


图 2 不同 pH 下时间对标记率的影响

Fig. 2 Effect of time on labeling yield
 at different pH

$\rho(\text{HGP}) = 1 \text{ mg/mL}$,

1 — pH = 9.2, 2 — pH = 8.4, 3 — pH = 7.8

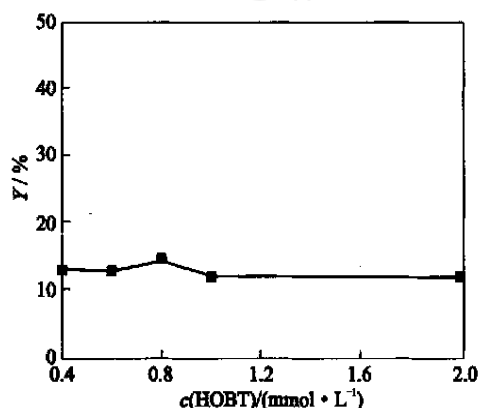


图 3 HOB T 浓度对标记率的影响

Fig. 3 Effect of HOB T concentrations
 on labeling yield

$\rho(\text{HGP}) = 1 \text{ mg/mL}$, $t = 5 \text{ min}$, $\text{pH} = 8.4$

加入适量的催化剂 HOB T 却能极大地提高标记率。这是由于所用的 ^{18}F 氟丙酰化试剂与 HOB T 相结合的共同作用下,使得多肽与蛋白质利于进行标记。而本实验所用的酰化试剂 ^{18}F -SFMB 与 ^{18}F 氟丙酰化试剂结构及其性质差异很大,这可能是导致 HOB T 的加入对反应影响不大的主要原因。

2.3 HGP 浓度对标记反应的影响

HGP 浓度对标记率的影响示于图 4。由图 4 可知,HGP 浓度对标记反应影响较大,随浓度的增大,标记率呈上升趋势,之后逐渐趋于平衡。

利用亲核取代法很难对多肽直接进行 ^{18}F 标

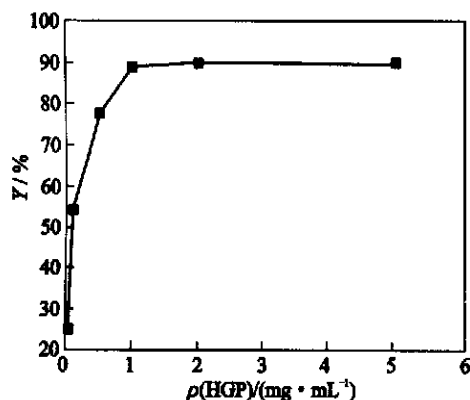


图 4 二肽浓度对标记率的影响

Fig. 4 Effect of HGP concentrations
on labeling yield
pH = 9.2, $t = 5 \text{ min}$

记,只能利用合适的辅基进行间接标记。为保证间接氟标记的顺利进行,所用辅基和被标记的多肽必须满足一定的要求,如辅基的高反应活性、被标记多肽的氨基组分的高碱性和低立体阻碍等。本文所用辅基 ^{18}F -SFMB 已被证明具有较强的反应活性^[9],所用二肽 HGP 含有一苯丙氨酸基团,因而具备一定的亲脂性,使得应用 ^{18}F -SFMB 进行标记成为可能。

3 结 论

本文通过对 ^{18}F -SFMB 与 HGP 标记反应几个影响因素的优化选择,得出了最佳的标记条件,标记率可达 90%,为其它多肽的 ^{18}F 标记提供参考。

参考文献:

- [1] CORSTENS FHM, Van der Meer JWM. Chemotactic Peptides: New Location for Imaging of Infection[J]. J Nucl Med, 1991, 31: 491 ~ 494.
- [2] GOLDENBERG D M. Cancer Imaging and Therapy With Radiolabeled Antibodies. In Immunobiology of Proteins and Peptides[M]. Vol 6. New York: Plenum Press, 1992. Vol. 6. 145 ~ 157.
- [3] GOODWIN D A. Pharmacokinetics and Antibodies[J]. J Nucl Med, 1987, 28: 1 358 ~ 1 362.
- [4] MILLER L. Synthetic Peptides Come of Age[J]. J Nucl Med, 1993, 34: 15 ~ 30.
- [5] BLOK D, FEITSMA RIJ, VERMEIJ P, et al. Peptide Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine[J]. Eur J Nucl Med, 1999, 26: 1 511 ~ 1 519.
- [6] WESTER H J, HAMACHER K, STÖCKLIN G. A Comparative Study of n. c. a. Fluorine-18 Labeling of Protein Via Acylation and Photochemical Conjugation[J]. Nucl Med Biol, 1996, 23: 365 ~ 372.
- [7] VADYANATHAN G, ZALUSTKY M R. Improved Synthesis of N-Succinimidyl 4- ^{18}F Fluorobenzoate and Its Application to The Labeling of a Monoclonal Antibody Fragment[J]. Bioconjugate Chem, 1994, 5: 352 ~ 356.
- [8] VADYANATHAN G, ZALUSTKY M R. Fluorine-18 Labeled Chemotactic Peptides: a Potential Approach for The PET Imaging of Bacterial Infection[J]. Nucl Med Biol, 1995, 22: 759 ~ 764.
- [9] 李俊玲, 张秀利, 田海滨, 等. N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F (氟甲基) 苯甲酸酯的合成[J]. 核化学与放射化学, 2002, 24(3): 157 ~ 160.
- [10] LANG L X, ECKELMAN W C. One Step Synthesis of ^{18}F Labeled [^{18}F]-N-Succinimidyl 4-(fluoromethyl) Benzoate for Protein Labeling[J]. Int J Appl Radiat Isot, 1994, 45: 1 155 ~ 1 163.
- [11] LANG L X, ECKELMAN W C. Labeling Proteins at High Specific Activity Using N-succinimidyl 4- ^{18}F (fluoromethyl) Benzoate[J]. Int J Appl Radiat Isot, 1997, 48: 169 ~ 173.
- [12] WESTER H J, GUHLKE S, STÖCKLIN G. Regioselective [^{18}F]Fluoropropionylation of Peptides and Proteins in Aqueous Solution[J]. J Labelled Compd Radiopharm, 1994, 35: 297 ~ 299.
- [13] GUHLKE S, WESTER H J, BRUNS C, et al. (2- ^{18}F Fluoropropionyl- (D) Phe¹)-Octreotide, a Potential Radiopharmaceutical for Quantitative Somatostatin Receptor Imaging With PET: Synthesis, Radiolabeling, *in vitro* Validation and Biodistribution in Mice[J]. Nucl Med Biol, 1994, 21: 819 ~ 825.

(下转第 44 页, Continued on page 44)

- FDG and ^{18}F -FET Uptake in Experimental Soft Tissue Infection [J]. Eur J Nucl Med, 2002, 29:648~654.
- [5] 朴日阳,崔瑞雪,杜宜奎,等. O-(2- ^{18}F -氟代乙基)-L-酪氨酸的合成及初步动物实验[J]. 中华核医学杂志, 2000, 20(6):272~273.
- [6] 党永红,王世真,马定远. O-(2- ^{18}F -氟代乙基)-L-酪氨酸的合成及临床前实验研究[A]. 第八届全国放射性药物与标记化合物学术会议论文摘要汇编[C]. 厦门, 2001, 72.
- [7] 唐刚华,王明芳,唐小兰,等. O-(2- ^{18}F -氟代乙基)-L-酪氨酸的合成及其动物实验研究[J]. 亚洲核医学杂志, 2002, 2(2):90~92.
- [8] 唐刚华,王明芳,吴湖炳,等. ^{18}F FDG的制备及在小鼠体内分布研究[J]. 核技术, 2001, 24(5):417~420.
- [9] TOORONGIAN S A, MULHOLLAND G K, JEWETT D M, et al. Routine Production of 2-deoxy-2-[^{18}F] fluoro-*D*-glucose by Direct Nucleophilic Exchange on a Quaternary 4-aminopyridinium Resin[J]. Nucl Med Biol, 1990, 17:273~279.
- [10] HAMACHER K, COENEN H H, STOCKLIN G. Efficient Stereospecific Synthesis of no-Carrier-Added 2-[^{18}F] fluoro-2-deoxy-*D*-glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution [J]. J Nucl Med, 1986, 27(2):235~238.
- [11] SOLAR S L, SCHUMAKER R R. Selective O-alkylation of Tyrosine [J]. J Org Chem, 1966, 31:1996~1997.

FULLY AUTOMATED SYNTHESIS OF O-(2- ^{18}F -FLUOROETHYL)-L-TYROSINE

TANG Gang-Hua, WANG Ming-Fang, TANG Xiao-lan, LUO Lei, GAN Man-Quan

Nan Fang PET Centre, Nan Fang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: ^{18}F is produced via nuclear reaction $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ at PET trace Cyclotron. O-(2- ^{18}F -fluoroethyl)-L-tyrosine (^{18}F -FET) is synthesized by a two-step reaction at FDG MicroLab Synthesis. Nucleophilic fluorination reaction of ^{18}F -fluoride with 1,2-di(4-methylphenylsulfonyloxy) ethane on column give 2- ^{18}F -1-(4-methylphenylsulfonyloxy) ethane, and ^{18}F -fluoroalkylation of L-tyrosine di-sodium salt with 2- ^{18}F -1-(4-methylsulfonyloxy) ethane formed ^{18}F -FET. The overall radiochemical yield with no decay correction is more than 4%, the whole synthesis time is about 52 min, and the radiochemical purity is above 95%. The synthetic ^{18}F -FET can be suitable for clinical study with PET imaging.

Key words: FDG MicroLab Synthesis; O-(2- ^{18}F -fluoroethyl)-L-tyrosine; fully automated synthesis

(上接第 39 页, Continued from page 39)

STUDY OF LABELING ACETATE GLY-PHE WITH ^{18}F

LI Jun-ling, WANG Yong-xian, ZHANG Xi-li, ZHOU Wei, TIAN Hai-bin, YIN Duan-zhi

Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: Acetate Gly-Phe (HGP) is indirectly labeled with ^{18}F . The effects of pH, reaction time, HGP concentration and the amount of catalyst HOB T on labeling yields are studied. The optimum conditions are pH = 9.2, HGP concentration is 1 mg/mL, reaction time is 5 min at room temperature, under which the labeling yield is obtained to be 90%.

Key words: ^{18}F ; HGP; HOB T; labeling yield