

文章编号:0253-9950(2012)03-0157-09

# n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA 的制备和初步生物学评价

郭飞虎<sup>1,2</sup>, 陈玉清<sup>2</sup>, 刘 婷<sup>3</sup>, 陈宝军<sup>2</sup>, 梁积新<sup>2</sup>,  
徐 琪<sup>4</sup>, 邱 芊<sup>4</sup>, 陈大明<sup>2</sup>, 杜 进<sup>1,5,\*</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;  
3. 环境保护部 核与辐射安全中心 政策法规研究所, 北京 100082;  
4. 杭州中肽生化有限公司, 浙江 杭州 310018; 5. 中国同辐股份有限公司, 北京 100045

**摘要:** 肿瘤细胞组织上常有一些生长抑素受体的过度表达, 奥曲肽及其衍生物与生长抑素受体(SSTR)能够高特异性地结合, 因此, 应用<sup>18</sup>F 标记的奥曲肽及其衍生物作为肿瘤示踪剂, 可对生长抑素受体阳性肿瘤进行诊断和疗效评价。为开发一种能够高效快速合成的<sup>18</sup>F 标记奥曲肽衍生物, 用 Al<sup>18</sup>F 复合物和偶联了双功能螯合剂 NOTA 的糖基化奥曲肽衍生物 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 通过螯合反应制备了 n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA, 放化反应合成时间为 25~30 min, 标记率为 69%, 最终产品经 HLB 柱纯化后放化纯大于 95%。标记物在体外稳定, 水溶性高(lg P=-4.20±0.09(n=3))。正常鼠体内分布实验显示: 标记物通过肾代谢; 在肝中摄取很低, 在生长抑素受体高表达的胰腺中有高摄取, 血液和肌肉本底低。骨中的摄取低, 说明标记物在体内无脱<sup>18</sup>F 或 Al<sup>18</sup>F 的现象。本工作为进一步研究 Al<sup>18</sup>F 复合物标记的奥曲肽衍生物作为生长抑素受体阳性肿瘤显像剂提供了实验依据。

**关键词:** 生长抑素(SST); 奥曲肽; Al<sup>18</sup>F 复合物; 正电子发射计算机断层显像(PET)

**中图分类号:** R817.4 **文献标志码:** A

## Preparation and Preliminary Biological Evaluation of n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA

GUO Fei-hu<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-qing<sup>2</sup>, LIU Ting<sup>3</sup>, CHEN Bao-jun<sup>2</sup>, LIANG Ji-xin<sup>2</sup>,  
XU Qi<sup>4</sup>, QIU Qian<sup>4</sup>, CHEN Da-ming<sup>2</sup>, DU Jin<sup>1,5,\*</sup>

1. Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2. Beijing Atom High Tech Co., Ltd., P. O. Box 275(99), Beijing 102413, China;

3. Policy & Regulations Research Institute, Nuclear and Radiation Safety Center, Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China, Beijing 100082, China; 4. Chinese Peptide Company, Hangzhou 310018, China;

5. China Isotope & Radiation Corporation, Beijing 100045, China

**Abstract:** Octreotide and their derivatives can specifically bind with somatostatin receptor (SSTR) which is usually over-expressed on many tumor cells. So <sup>18</sup>F labeled octreotide and their derivatives can be used for the diagnosis and evaluation of therapeutic efficacy of SSTR

收稿日期:2012-02-26; 修订日期:2012-03-22

作者简介:郭飞虎(1981—),男,甘肃会宁人,博士研究生,助理研究员,核技术应用专业

\* 通信联系人:杜 进,男,博士,研究员, E-mail:dujin@china-isotope.com

positive tumors. In order to explore a novel PET probe for diagnosis of SSTR positive tumors, the n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA was radio-synthesized fast and efficiently using the chelation reaction of n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA with  $Al^{18}F$  moiety. n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA was a glycosylated octreotide derivative combined with 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid(NOTA). The labeling efficiency of n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA is 69% and the total synthesis time is 25-30 min. The radiochemical purity is over 95% after HLB column purification. The stability *in vitro* is excellent, and the hydrophilicity is high( $\lg P = -4.20 \pm 0.09 (n=3)$ ). Biodistribution studies in normal mice at 2 h after injection show that the uptake of n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA in kidney is high ( $(13.83 \pm 3.52)\%ID/g (n=5)$ ) and the uptake in liver and bone is low. The uptake in somatostatin pancreas receptor express is high, and the background of blood and muscle is low. These preliminary results provide some experimental basis for further study of  $Al^{18}F$  complex labeled octreotide and their analogues as tumor probes for the diagnosis of SSTR-positive tumors.

**Key words:** somatostatin(SST); octreotide; aluminum fluoride complex( $Al^{18}F$ ); positron emission computed tomography(PET)

生长抑素(somatostatin, SST)是一种含有 14 或 28 个氨基酸的天然多肽类激素,广泛分布于人体中枢内分泌系统和许多脑外组织,对垂体、胰腺和胃肠组织的各种分泌过程有抑制作用,通过与存在于细胞组织上的受体特异性结合发挥作用<sup>[1]</sup>。由于生长抑素在体内的生物半衰期非常短(约 3 min),从而限制了它在临床的应用<sup>[2]</sup>。奥曲肽是一种人工合成的生长抑素类似物,含有 8 个氨基酸,其性质与 SST 相似,与  $SSTR_2$ 、 $SSTR_5$  亚型保持高亲和力,但其结构中引入了 D-型氨基酸,增强了抗酶降解的能力,体内半衰期约为 2 h<sup>[3]</sup>。研究发现在奥曲肽的结构中引入糖基,可优化其体内代谢动力学特性,降低小分子多肽的亲脂性和肝胆代谢程度,增加肾脏排泄<sup>[4-7]</sup>。而肿瘤细胞组织上常有一些生长抑素受体(SSTR)的过表达。因此,可用放射性核素标记奥曲肽及其衍生物对 SSTR 阳性肿瘤进行诊断和治疗<sup>[8-9]</sup>。

早在 20 世纪 80 年代晚期,人们已经对生长抑素受体显像进行了深入研究<sup>[4]</sup>。在放射性核素标记的生长抑素类似物中, $^{111}In$ -DTPA-Octreotide 作为世界上第一个获美国 FDA 批准的多肽类放射性药物,已在临床上广泛用于生长抑素受体阳性肿瘤的诊断<sup>[10]</sup>, $^{123}I$ -Tyr<sup>3</sup>-octreotide 已经用作临床研究<sup>[11]</sup>, $^{99}Tc^m$ -depreotide 也已被批准用于肺癌的评估<sup>[4]</sup>。与 SPECT 相比,PET 显像有更好的优越性,如更高的灵敏度和空间分辨率,能够对生物分布和代谢过程进行定量研究,所以对正电子核素标

记的生长抑素类似物的研究也越来越多。 $^{18}F$  半衰期为 109.6 min,和奥曲肽的体内生物半衰期相匹配, $\beta^+$  能量较低(0.635 MeV),是一个临床应用最广泛、核素性质非常理想的正电子核素。 $^{18}F$  标记的糖基化奥曲肽衍生物 $[^{18}F]$ FP-Gluc-TOCA 已经用作临床研究,显像效率明显优于 $[^{111}In]$ DTPA-octreotide。但是由于其放化合成过程繁琐,合成时间长,放化产率低(衰变校正后仅为 25%~35%),这在很大程度上影响临床使用<sup>[4-5]</sup>。

McBride 等<sup>[12-13]</sup> 研究了一种通过  $Al^{18}F$  复合物和偶联 1,4,7-三氮环壬烷-1,4,7-三乙酸(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid,NOTA) 或其衍生物的多肽通过螯合反应制备 $^{18}F$  标记正电子药物的方法,方法新颖,合成过程简单,尤其是在标记过程中免去了通常采用的需要严格控制无水条件的亲核取代反应。稳定性试验研究表明, $[Al^{18}F]$ NOTA 在体内外都非常稳定,适合用作临床研究。D'Souza<sup>[14]</sup> 和 Shetty 等<sup>[15]</sup> 用 X 射线晶体衍射对 $[Al^{19}F]$ NOTA 的空间结构进行了分析,结果显示其空间结构为扭曲的八面体,铝原子在八面体中心。

2010 年 Laverman 等<sup>[16]</sup> 通过该法制备了 $[Al^{18}F]$ NOTA-octreotide。它的小动物 PET/CT 显像显示,肿瘤的轮廓清晰可见,在骨中的摄取很低。该法目前也有用作 $^{18}F$  标记蛋白<sup>[17]</sup>、RGD<sup>[18-19]</sup> 及其它多肽<sup>[14-15,20-22]</sup> 研究的报道。

本工作拟在上述研究的基础上以 Fmoc 保护



**1.2.2** n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的合成 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的合成路线示于图 2。在多肽反应器中加入 260 mg Fmoc-Thr(tBu)-树脂(1)和 20% 哌啶,常温下反应 30 min 脱去 Fmoc,用 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤 3 次,然后加入 174 mg Fmoc-Cys(Trt)-OH、864 mg HBTU、532  $\mu\text{L}$  NMM 在 DMF 中反应 50 min,茚三酮检测为阴性,过滤洗涤得到 Fmoc-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Resin,重复上述操作依次加入相应的氨基酸:120 mg Fmoc-Thr(tBu)-OH、140 mg Fmoc-Lys(Boc)-OH、168 mg Fmoc-DTrp(Boc)-OH、69 mg Fmoc-Tyr(tBu)-OH、174 mg Fmoc-Cys(Trt)-OH、116 mg Fmoc-DPhe-OH、74 mg n-Gluc-Lys(Fmoc)-OH,最终得到 n-Gluc-Lys(Fmoc)-Dphe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-树脂(2)。加入 20% 哌啶常温下反应 30 min 脱去 Fmoc,用 DMF 洗涤 3 次,然后加入 42 mg Bis-t-Bu-NOTA、16  $\mu\text{L}$  DIC、864 mg HOBt、532  $\mu\text{L}$  NMM 在 DMF 中反应 8 h,用 DMF 洗涤后干燥得到树脂 n-Gluc-Lys(Bis-t-Bu-NOTA)-DPhe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-树脂(3),然后在三氟乙酸中酸解 2 次,每次 2 h,过滤,滤液用乙醚沉淀后离心,并用乙醚洗涤 2 次得到粗品:n-Gluc-Lys(NOTA)-DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(4)。粗品用乙腈和水溶解,用  $\text{I}_2$  氧化后用高效液相(HPLC)纯化,冻干后得到 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA,最后用质谱定性分析,用 HPLC 定量分析。

**1.2.3** n-Gluc-Lys( $[\text{Al}^{19}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的制备 向 1.5 mL EP 管中加入 30  $\mu\text{L}$  2 mmol/L  $\text{AlCl}_3$  的 0.1 mol/L pH=4.0 的醋酸钠缓冲液,

10  $\mu\text{L}$  65 mmol/L KF 的 0.1 mol/L pH=4.0 醋酸钠缓冲液,20  $\mu\text{L}$  2.0 g/L 的 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的去离子水溶液。混合物摇匀后在 105  $^\circ\text{C}$  反应 20 min,冷却至常温,用 HPLC 纯化后用质谱进行定性分析。

**1.2.4** n-Gluc-Lys( $[\text{Al}^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的制备 n-Gluc-Lys( $[\text{Al}^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的合成路线示于图 3。

#### (1) $^{18}\text{F}^-$ 生理盐水溶液的制备

在回旋加速器上用核反应  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  制得  $^{18}\text{F}^-$ ,然后富集在 Sep-Park light QMA 柱上(QMA 柱分别用 10 mL 0.5 mol/L pH=8.4 NaOAc 溶液和 10 mL 去离子水淋洗),用 5 mL 去离子水淋洗以除去吸附在 QMA 柱上的金属杂质离子,用 0.2~1 mL 生理盐水洗脱得到生理盐水溶液。

#### (2) $\text{AlCl}_3$ 用量对标记率的影响

向 5 个 1.5 mL EP 管中分别加入 10  $\mu\text{L}$  2.0 g/L n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的去离子水溶液,10  $\mu\text{L}$  10 g/L 抗坏血酸的 0.122 mol/L 邻苯二甲酸氢钾(KHP)溶液,100  $\mu\text{L}$  37~74 MBq  $^{18}\text{F}^-$  的生理盐水溶液,用 0.1 mol/L 的稀盐酸调节 pH 至 4.0,再依次加入 3  $\mu\text{L}$  0.5、1、2、3、4 mmol/L  $\text{AlCl}_3$  的去离子水溶液。混合物摇匀后在 105  $^\circ\text{C}$  反应 20 min,冷却至常温,用 1 mL 去离子水稀释,取其中 20  $\mu\text{L}$  用 HPLC 测定其标记率。

#### (3) pH 值对标记率的影响

向 5 个 1.5 mL EP 管中分别加入 3  $\mu\text{L}$  1 mmol/L  $\text{AlCl}_3$  的去离子水溶液,10  $\mu\text{L}$  2.0 g/L n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的去离子水溶液,10  $\mu\text{L}$  10 g/L 抗坏血酸的 0.122 mol/L KHP 溶液,100  $\mu\text{L}$  37~74 MBq  $^{18}\text{F}^-$  的生理盐水溶液,用

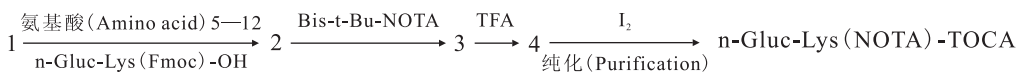


图 2 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的合成路线

Fig. 2 Synthesis of n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA

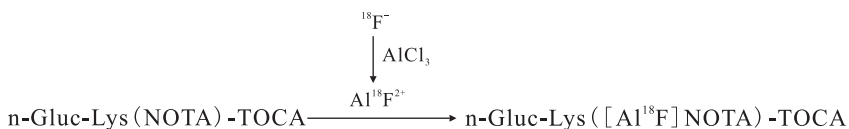


图 3 n-Gluc-Lys( $[\text{Al}^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的合成路线

Fig. 3 Synthesis of n-Gluc-Lys( $[\text{Al}^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA

1 mol/L 或 0.1 mol/L 的稀 HCl 将 pH 调至 3.00、3.50、3.83、4.00、4.32 和 4.88。混合物摇匀后在 105 °C 反应 20 min, 冷却至常温。用 1 mL 去离子水稀释, 取其中 20  $\mu$ L 用 HPLC 测定其标记率。

#### (4) 不同缓冲体系对标记率的影响

取 3 个反应管分别编号①②③, ①号管中加入 3.0  $\mu$ L 1 mmol/L  $AlCl_3$  pH=4 的 0.1 mol/L 醋酸钠溶液, 10.0  $\mu$ L 2.0 g/L n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA 的 0.5 mol/L 醋酸钠溶液, 10  $\mu$ L 10 g/L 抗坏血酸的 0.122 mol/L KHP 溶液, 100  $\mu$ L 37~74 MBq  $^{18}F^-$  的生理盐水溶液, 用 1.0 mol/L 的稀盐酸调节 pH 至 4.0; ②号管加入 3.0  $\mu$ L 1 mmol/L  $AlCl_3$  去离子水溶液, 10.0  $\mu$ L 2.0 g/L n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA 的去离子水溶液, 10  $\mu$ L 10 g/L 抗坏血酸的 0.122 mol/L KHP 溶液, 100  $\mu$ L 37~74 MBq  $^{18}F^-$  的生理盐水溶液, 用 0.1 mol/L 的稀盐酸调节 pH 至 4.0; ③号管加入 3.0  $\mu$ L 0.5 mol/L  $AlCl_3$  pH=4 的 0.1 mol/L 醋酸钠溶液, 10.0  $\mu$ L 2.0 g/L n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA pH=4 的 0.5 mol/L 的醋酸钠溶液, 100  $\mu$ L 约 37 MBq pH=4 的  $[^{18}F]F^-$  的醋酸钾溶液。分别摇匀后在 105 °C 反应 20 min, 冷却至常温, 用 1 mL 去离子水稀释, 取其中 20  $\mu$ L 用 HPLC 测定其标记率。

#### (5) 乙醇对标记率的影响

向反应管中加入 10  $\mu$ L 2.0 g/L n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA 的去离子水溶液, 3  $\mu$ L 1 mmol/L  $AlCl_3$  的去离子水溶液, 10  $\mu$ L 10 g/L 抗坏血酸的 0.122 mol/L KHP 溶液, 100  $\mu$ L 37~74 MBq  $^{18}F^-$  的生理盐水溶液, 用 0.1 mol/L 的稀盐酸调节 pH 至 4.0, 最后分别加入 100、500  $\mu$ L 乙醇。摇匀后在 105 °C 反应 20 min, 冷却至常温。用 1 mL 去离子水稀释, 取其中 20  $\mu$ L 用 HPLC 测定其标记率。

#### (6) 产品纯化和质量控制

将以上反应液缓慢注入事先活化过的 HLB 柱, 再用 2 mL 蒸馏水淋洗除去水溶性杂质, 吹干后用 500  $\mu$ L 75% (体积比, 下同) 的乙醇淋洗, 淋洗液用生理盐水稀释至乙醇含量小于 10%, 用 HPLC 测定其保留时间和放射纯, 观察其外观性状是否为无色澄清透明液体, 用精密 pH 试纸测定其 pH 值。

**1.2.5 脂水分配系数的测定** 取 5  $\mu$ L 约 24 000  $s^{-1}$  的 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA 的生理盐

水溶液分别加入 3 个含有 0.5 mL 正辛醇和 0.5 mL 磷酸缓冲液 (PBS) 的 1.5 mL EP 管中, 密封后在室温下涡旋 2 min, 3 500 r/min 条件下离心 5 min。用移液器依次取出有机相和水相各 200  $\mu$ L 置于  $\gamma$  计数管中, 用  $\gamma$  计数器测定计数。由公式  $lg P = lg(\text{有机相计数}/\text{水相计数})$  计算标记物的平均  $lg P$  值。

**1.2.6 体外稳定性研究** 取 20  $\mu$ L 约 3.7 MBq 的 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA 生理盐水溶液, 分别置于 3 个 1 mL 磷酸缓冲液 (pH = 7.24, 0.02 mol/L) 和小牛血清中, 置于 37 °C 下, 孵育 30、60、120 min 后, 用 HPLC 测定其放射化学纯度, 观察其体外稳定性。

**1.2.7 正常小鼠体内分布** 取 15 只正常小鼠, 分为 3 组, 每组 5 只, 经尾静脉注射 100  $\mu$ L 约 550 kBq 的 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA 注射液, 分别于注射后 30、60、120 min 时处死, 取心、肝、脾、胰腺、肺、肾、胃、肠、肌肉、骨头、血、甲状腺等相应器官置于事先称量好的计数管底部, 称重, 测量计数。测量计数经衰变校正后计算每克组织百分注射剂量率 (%ID/g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的鉴定

该化合物是在奥曲肽衍生物 TOCA 的基础上通过三功能连接体 Lys 偶联了链状葡萄糖基和 NOTA。合成方法是先将葡萄糖基和 NOTA 引入肽链, 再从树脂上酸解后氧化关环, 最终制备了 18 mg n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA, 收率为 11%。通过质谱分析可知  $m/z$  为 814.2  $[(M+2H)/2]$ , 与计算值相符 ( $C_{73}H_{107}N_{15}O_{23}S_2$ ,  $M_{\text{计算}} = 1626.9$ ), 通过 HPLC 分析可知其纯度大于 95.0%, 保留时间为 11.876 min, 结果示于图 4(a)。该方法避免了用市场现有的奥曲肽连接糖基和 NOTA 时副反应多、收率过低甚至得不到最终产品的问题<sup>[23]</sup>。

### 2.2 n-Gluc-Lys( $[Al^{19}F]$ NOTA)-TOCA 的分析

用 HPLC 纯化后的化合物通过质谱分析可知  $m/z$  为 836.6  $[(M+2H)/2]$ , 与计算值相符 ( $C_{73}H_{107}Al^{19}FN_{15}O_{23}S_2$ ,  $M_{\text{计算}} = 1671.7$ )。HPLC 分析图谱示于图 4(b), 保留时间为 11.697 min。

### 2.3 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]$ NOTA)-TOCA 的合成

(1)  $^{18}F^-$  的生理盐水溶液

$^{18}F^-$  通常是吸附在 QMA 柱上后用碳酸氢钾

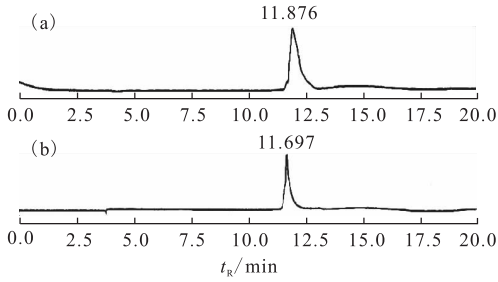


图 4 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA(a)和  
n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA(b)HPLC 分析图谱  
Fig. 4 HPLC chromatography of  
n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA(a) and  
n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA(b)

等碱性溶液淋洗,由于本实验中 pH 是影响标记率的关键因素,需要用冰醋酸调节 pH 至 4.0,这会导致实验过程相对繁琐,带来较大误差。该法先将<sup>18</sup>F<sup>-</sup>富集在用 10 mL 0.5 mol/L pH=8.4 NaOAc 溶液和 10 mL 去离子水活化过的 QMA 柱上,再用生理盐水洗脱,结果显示 0.2 mL 生理盐水能洗脱约 80% 的<sup>18</sup>F<sup>-</sup>。

### (2) AlCl<sub>3</sub> 的用量

AlCl<sub>3</sub> 用量对标记率的影响结果示于图 5。由图 5 可知,当加入 AlCl<sub>3</sub> 的浓度为 1 mmol/L,反应体系中 AlCl<sub>3</sub> 的浓度为 48 μmol/L (n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 和 AlCl<sub>3</sub> 的物质的量之比为 4.1 : 1) 时,标记率达最大值 69%。可能的原因是:AlCl<sub>3</sub> 的加入量不足时,Al<sup>18</sup>F 的浓度过低,标记率降低;当 AlCl<sub>3</sub> 过量时,因为 Al<sup>3+</sup> 与 NOTA 能形成稳定络合物<sup>[24-25]</sup>,所以主要是 Al<sup>3+</sup> 与 Al<sup>18</sup>F 竞争螯合,导致标记率降低。

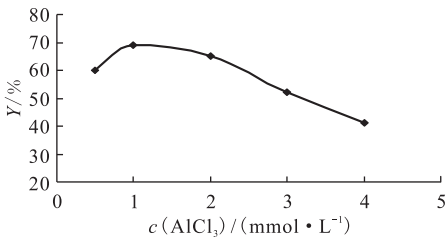


图 5 AlCl<sub>3</sub> 浓度对标记率(Y)的影响  
Fig. 5 Effect of  $c(\text{AlCl}_3)$  on labeling efficiency

### (3) 反应体系的 pH 值

其它条件保持不变的情况下,pH 值对标记率的影响结果示于图 6。由图 6 可知:pH 值是影响标记率的关键因素,pH=4.00 时标记率达最

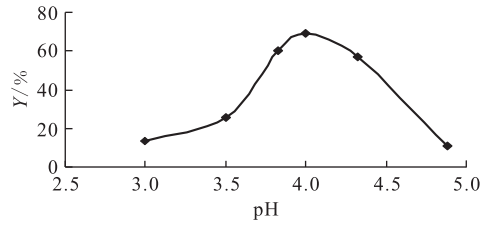


图 6 pH 值对标记率(Y)的影响  
Fig. 6 Effect of pH on labeling efficiency

大值 69%,这是因为 pH < 4 时,<sup>18</sup>F<sup>-</sup> 质子化为 HF,pH 值越小,<sup>18</sup>F<sup>-</sup> 质子化程度越高,反应体系中游离的<sup>18</sup>F<sup>-</sup> 浓度越低,标记率越低;当 pH > 5 时,Al<sup>3+</sup> 开始水解,溶液中游离 Al<sup>3+</sup> 的浓度减小,pH 值越大,其水解程度越大,体系中 Al<sup>3+</sup> 的浓度越小,标记率越低。由文献[26]计算可知,当 pH=4.00 时,AlF<sup>2+</sup> 的条件形成常数 lg K 达最大值 6.04。这和本实验结果相符。

### (4) 不同缓冲体系的选择

其它条件保持不变的情况下,比较了 KHP 和醋酸钠混合缓冲体系、KHP 缓冲体系、醋酸钠缓冲体系对标记率的影响。缓冲体系①(9.76 mmol/L KHP 和 42.4 mmol/L 醋酸钠)的标记率为 64%;缓冲体系②(9.76 mmol/L KHP)的标记率为 69%;缓冲体系③(42.4 mmol/L 醋酸钠)的标记率为 61%。结果表明,不同缓冲体系对标记率有一定影响,其原因可能为醋酸体系的 pH 受温度的影响较大,并且加热时醋酸会有一定程度的挥发,KHP 体系 pH 受温度影响较小(温度由 5 °C 升至 60 °C 时 pH 仅由 4.00 升为 4.09),而 pH 值是影响标记率大小的关键因素,因此,KHP 缓冲体系②的标记率为最高值 69%。

### (5) 加入乙醇的体积

其它条件保持不变的情况下,分别向反应体系中加入 100 μL 和 500 μL 乙醇时标记率分别为 55% 和 13%,加入乙醇反而使标记率降低,这可能是因为加入乙醇降低了离子强度的同时,反应物的浓度也明显降低。虽然降低离子强度能够提高标记率,但是反应物的浓度也是影响标记率高低的主要因素。

总之,用 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 和 Al<sup>18</sup>F 复合物通过螯合反应快速方便的制备了 n-Gluc-Lys([Al<sup>18</sup>F]NOTA)-TOCA,合成时间为 25 ~ 30 min,合成时间短,有利于标记物今后的临床应用。最佳标记条件为:10 μL 2.0 g/L n-Gluc-Lys

(NOTA)-TOCA 的去离子水溶液,  $3 \mu\text{L}$   $1 \text{ mmol/L}$   $\text{AlCl}_3$  的去离子水溶液,  $10 \mu\text{L}$   $10 \text{ g/L}$  抗坏血酸的  $0.122 \text{ mol/L}$  KHP 溶液和  $100 \mu\text{L}$   $37\sim 74 \text{ MBq } ^{18}\text{F}^-$  的生理盐水溶液混合后, 用  $0.1 \text{ mol/L}$  的稀盐酸调节 pH 至 4.0。混合物摇匀后在  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  反应 20 min。即在 pH=4.0 的 KHP 缓冲体系中,  $^{18}\text{F}^-$  的活度为  $37\sim 74 \text{ MBq}$ , 反应体系中多肽浓度为  $196.6 \mu\text{mol/L}$ , 多肽和  $\text{AlCl}_3$  的物质的量之比为 4.1:1 时, 标记率达最大值 69%。据文献[18]报道, NOTA-Octreotide 的浓度为  $765 \mu\text{mol/L}$  时的最佳标记率为 50%, 和文献值相比, 在减少多肽用量和降低多肽浓度的条件下, 标记率提高 19%。这可能和 n-Gluc-Lys(NOTA)-TOCA 的结构有关, 该化合物是用赖氨酸残基 Lys 将 NOTA 和 TOCA 偶联, Lys 侧链较长, 减小了空间位阻, 这些因素可能在一定程度上影响其标记率。

#### (6) 产品纯化和分析

标记物经 HLB 柱纯化后用 HPLC 进行分析, 放化纯大于 95%, 保留时间为 12.12 min, 比 n-Gluc-Lys( $[Al^{19}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的保留时间滞后约 0.42 min, 如图 7, 这是因为放射性检测器连接在紫外检测器之后。标记物生理盐水溶液的外观性状为无色澄清透明液体, 用精密 pH 试纸测得 pH=5~6。

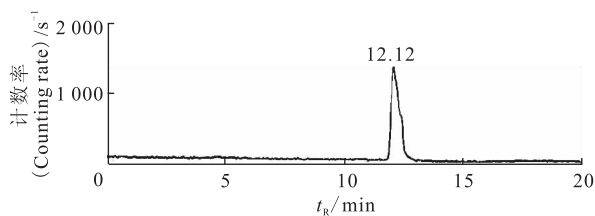


图 7 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA HPLC 分析图谱

Fig. 7 HPLC chromatography of n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA

#### 2.4 脂水分配系数

为了研究 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 的水溶性, 测得其在正辛醇和 PBS 中的脂水分配系数  $\lg P = -4.20 \pm 0.09$  ( $n=3$ ), 说明该化合物水溶性高, 利于肾脏代谢, 能够降低肝胆中的摄取。文献[16]报道  $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA-octreotide 的  $\lg P = -2.44 \pm 0.12$ 。说明该化合物 C 末端的羧基和糖基化作用增加了标记物的水溶性, 这

和预期的结果一致。

#### 2.5 体外稳定性

n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 在磷酸缓冲液(PBS)(pH=7.24,  $0.02 \text{ mol/L}$ )和小牛血清(BS)中  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下孵育 30、60、120 min 后放化纯没有显著变化, 均大于 95%, 表明标记物体外稳定。120 min 的 HPLC 分析图谱示于图 8。

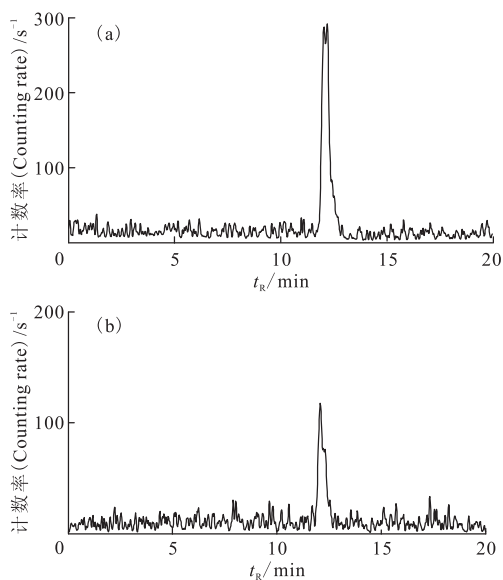


图 8 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 体外稳定性分析图谱

Fig. 8 Stability of n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA *in vitro*  
(a)——PBS, (b)——BS  
 $t=120 \text{ min}$ ,  $\theta=37 \text{ }^\circ\text{C}$

#### 2.6 正常鼠体内分布实验

n-Gluc-Lys( $[Al^{18}\text{F}]$ NOTA)-TOCA 在正常鼠体内分布数据列入表 1。由表 1 可知: 标记物注入体内 30、60、120 min 时, 肾脏的放射性摄取值均为最高, 说明标记物主要通过肾脏代谢; 在血液中的摄取低、清除快; 30、60、120 min 时肝脏中的摄取很低, 分别为  $(0.34 \pm 0.04)$ 、 $(0.23 \pm 0.04)$ 、 $(0.08 \pm 0.01) \% \text{ID/g}$ , 说明标记物不是通过肝胆代谢, 这和最初的设计目标一致; 120 min 时, 骨中的放射性摄取仅为  $(0.46 \pm 0.13) \% \text{ID/g}$ , 进一步证明了标记物在体内不易脱  $[^{18}\text{F}]$  氟和  $\text{Al}^{18}\text{F}$ , 这和体外稳定性结果一致; 标记物在 SSTR 有表达的胰腺中有摄取, 表明其与生长抑素受体有亲和力。总之, 从正常鼠体内分布结果可以推断, 在后续显像研究中, 显像本底较低, 有

表 1 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]NOTA$ )-TOCA 的正常鼠体内分布  
Table 1 Biodistribution of n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]NOTA$ )-TOCA in normal mice

组织 (Tissues)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage injected dose per gram)/(%ID · g <sup>-1</sup> )		
	30 min	60 min	120 min
心 (Heart)	0.46 ± 0.10	0.24 ± 0.07	0.05 ± 0.01
肝 (Liver)	0.34 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.08 ± 0.01
脾 (Spleen)	0.36 ± 0.06	0.22 ± 0.06	0.09 ± 0.03
肺 (Lung)	1.57 ± 0.27	1.11 ± 0.26	0.53 ± 0.08
肾 (Kidney)	16.27 ± 3.06	14.97 ± 3.08	13.83 ± 3.52
胰腺 (Pancreas)	1.49 ± 0.08	1.48 ± 0.17	1.20 ± 0.11
胃 (Stomach)	1.02 ± 0.35	0.47 ± 0.09	0.43 ± 0.27
小肠 (Intestine)	0.67 ± 0.12	0.44 ± 0.06	0.18 ± 0.05
肌肉 (Muscle)	0.43 ± 0.26	0.20 ± 0.08	0.04 ± 0.01
骨 (Bone)	0.65 ± 0.20	0.48 ± 0.22	0.46 ± 0.13
血液 (Blood)	0.97 ± 0.36	0.34 ± 0.25	0.11 ± 0.10
甲状腺 (Thyroid)	0.60 ± 0.21	0.53 ± 0.12	0.37 ± 0.11

注 (Note):  $n=5$

利于获取良好的 PET 显像。荷瘤裸鼠体内分布实验和 PET 显像研究正在进行。

### 3 结 论

用  $Al^{18}F$  复合物和 n-Gluc-Lys (NOTA)-TOCA 通过螯合反应制备了 n-Gluc-Lys( $[Al^{18}F]NOTA$ )-TOCA。标记物水溶性高、体外稳定、体内外无脱 $[^{18}F]$ 氟和  $Al^{18}F$  现象,主要通过肾脏代谢,与生长抑素受体有亲和力。血液本底低,在肝脏、肌肉、骨等其它正常组织中的摄取低。本工作为进一步研究  $Al^{18}F$  复合物标记的奥曲肽衍生物作为生长抑素受体阳性肿瘤显像剂提供了实验依据。

**致谢:**感谢赵贵植研究员、邓雪松、岳文强、温凯、石翠燕、江晓、刘强、葛彪、殷胤、李雯等人在本文完成过程中给予的帮助,感谢原子高科医学三部提供 $^{18}F$ 离子。

### 参考文献:

- [1] Reichlin S. Somatostatin[J]. N Engl J Med, 1983 (309): 1 495-1 563.
- [2] 王丽华,汪勇先,尹端沚. 生长抑素及其类似物的标记技术的发展[J]. 核技术, 2003, 26: 537-544.
- [3] Bardfeid P A, Chervu L R, Myrty D Rk. The Organ Distribution of  $^{131}I$ -Tyrosyl Somatostatin[J]. Br J Radiol, 1976(49): 381-382.
- [4] Wester H J, Schottelius M, Scheidhauer K, et al. PET Imaging of Somatostatin Receptors: Design, Synthesis and Preclinical Evaluation of a Novel  $^{18}F$ -Labelled, Carbohydrated Analogue of Octreotide[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003, 30: 117-122.
- [5] Günther M, Thorsten P, Alexander S, et al. Gluc-Lys ( $[^{18}F]FP$ )-TOCA PET in Patients With SSTR-Positive Tumors: Biodistribution and Diagnostic Evaluation Compared With  $[^{111}In]DTPA$ -Octreotide[J]. J Nucl Med, 2006, 47: 566-573.
- [6] Schottelius M, Poethko T, Herz M, et al. First  $^{18}F$ -Labeled Tracer Suitable for Routine Clinical Imaging of SST Receptor-Expressing Tumors Using Positron Emission Tomography [J]. Clin Cancer Res, 2004(10): 3 593-3 606.
- [7] Carmen W, Beatrice W, Andrea A, et al. One-Step  $^{18}F$ -Labeling of Carbohydrate-Conjugated Octreotate-Derivatives Containing a Silicon-Fluoride-Acceptor (SiFA): *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation as Tumor Imaging Agents for Positron Emission Tomography(PET)[J]. Bioconjugate Chem, 2010, 21 (12): 2 289-2 296.
- [8] Hofland L J, Lamberts S W, van Hagen P M, et al. Crucial Role for Somatostatin Receptor Sub-

- type 2 in Determining the Uptake of  $[^{111}\text{In}]\text{-DTPA-D-Phe}^1$  octreotide in Somatostatin Receptor-Positive Organs[J]. *J Nucl Med*, 2003, 44 (8): 1 315-1 321.
- [9] 武凤玉. 放射性核素标记奥曲肽肿瘤受体显像研究进展[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2005, 32(10): 760-763.
- [10] Krenning E P, Bakker W H, Kooij P P M, et al. Somatostatin Receptor Scintigraphy With  $\text{In-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide}$  in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison With Iodine-123-Try-3-Octreotide[J]. *J Nucl Med*, 1992, 33: 652-658.
- [11] Krenning E P, Kwekkeboom D J, Bakker W H, et al. Somatostatin Receptor Scintigraphy With  $[^{111}\text{In}]\text{-DTPA-D-phe}^1$  and  $[^{125}\text{I-Tyr}^3]\text{-Octreotide}$ : The Rotterdam Experience With More Than 1 000 Patients[J]. *Eur J Nucl Med*, 1993, 20: 716-731.
- [12] McBride W J, Sharkey R M, Karacay H D S, et al. A Novel Method of  $^{18}\text{F}$  Radiolabeling for PET[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50: 991-998.
- [13] McBride W J, Karacay H D S, Sharkey R M, et al. Improved  $^{18}\text{F}$  Labeling of Peptides With a Fluoride-Aluminum-Chelate Complex [J]. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 1 331-1 340.
- [14] D'Souza C A, McBride W J, Sharkey R M, et al. High-Yielding Aqueous  $^{18}\text{F}$ -Labeling of Peptides via  $\text{Al}^{18}\text{F}$  Chelation[J]. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22: 1 793-1 803.
- [15] Shetty D, Choi S Y, Jeong J M, et al. Stable Aluminium Fluoride Chelates With Triazacyclononane Derivatives Proved by X-Ray Crystallography and  $^{18}\text{F}$ -Labeling Study[J]. *Chem Commun*, 2011, 47: 9 732-9 734.
- [16] Laverman P, McBride W J, Sharkey R M, et al. A Novel Facile Method of Labeling Octreotide With  $^{18}\text{F}$ -Fluorine[J]. *J Nucl Med*, 2010, 51: 454-461.
- [17] McBride W J, D' Souza C A, Sharkey R M, et al. The Radiolabeling of Proteins by the  $[^{18}\text{F}]\text{AlF}$  Method[J]. *Appl Radiat Isot*, 2012, 70: 200-204.
- [18] Liu S L, Liu H G, Jiang H, et al. One-Step Radiosynthesis of  $^{18}\text{F}\text{-AlF-NOTA-RGD}_2$  for Tumor Angiogenesis PET Imaging[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38: 1 732-1 741.
- [19] Lang L X, Li W H, Guo N, et al. Comparison Study of  $[^{18}\text{F}]\text{FAI-NOTA-PRGD}_2$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{FP-PRGD}_2$ , and  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-PRGD}_2$  for PET Imaging of U87MG Tumors in Mice[J]. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22: 2 415-2 422.
- [20] 郭飞虎, 陈玉清, 刘婷, 等.  $\text{Al}^{18}\text{F}$  复合物标记奥曲肽类似物的研究[C]// 第十一届全国放射性药物和标记化合物会议论文集. 广州: 中国核学会同位素分会. 2011.
- [21] 王立振, 杨敏, 徐宇平, 等.  $\text{Al}^{18}\text{F-NOTA-PRGD}_2$  的制备与小动物 PET 显像[C]// 第十一届全国放射性药物和标记化合物会议论文集. 广州: 中国核学会同位素分会. 2011.
- [22] 翟创彦, 王淑侠, 何山震, 等.  $\text{Al}^{18}\text{F}$  络合标记  $\text{NOTA-RGD}$  的体外稳定性研究[C]// 第十一届全国放射性药物和标记化合物会议论文集. 广州: 中国核学会同位素分会. 2011.
- [23] 罗联哲. 生长抑素类似物  $^{99}\text{Tc}^m\text{-EDDA/HYNIC-Lys}^0\text{-TOCA}$  的制备及其糖基化衍生物合成方法研究[D]. 北京: 中国原子能科学研究院, 2006.
- [24] Bossek U, Hanke D, Wieghardt K. Pendent Arm Macrocyclic Complexes: Crystal Structures of  $\text{Al}(\text{TCTA})$  and  $\text{In}(\text{TS-TACN})$  [J]. *Polyhedron*, 1993, 12(1): 1-5.
- [25] Andre J P, Macke H, Kaspar A, et al. *In Vivo* and *in Vitro*  $^{27}\text{Al}$  NMR Studies of Aluminium(III) Chelates of Triazacyclononane Polycarboxylate Ligands[J]. *J Inorg Biochem*, 2002, 88: 1-6.
- [26] 韩秉浩.  $\text{AlF}_n^{3-n}$  各形体在饮用水中的分布[J]. 西北建筑工程学院学报, 1996(4): 31-36.