

以 ^{18}F -FDG 为辅基的 ^{18}F -氟标记方法研究进展

丁 晖, 李 阳, 李 淼*

西安交通大学 第一附属医院 医学影像科, 陕西 西安 710061

摘要:在核医学分子影像领域用于正电子示踪剂的 ^{18}F -氟标记方法中,基于含 ^{18}F -氟中间体分子(即辅基)的方法其反应条件温和、化学选择性好,产物易纯化,是进行 ^{18}F -氟标记的经典策略之一。 $2\text{-}^{18}\text{F}$ -氟代-2-脱氧-D-葡萄糖($2\text{-}^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose, ^{18}F -FDG)是目前临床最常用的正电子示踪剂,其分子结构简单、亲水性强、易获得,是用于间接 ^{18}F -氟标记的理想辅基。通过比较其方法学参数,并分析标记产物性能可知,以 ^{18}F -FDG 为辅基的间接 ^{18}F -氟标记方法有酶法、成脎法、巯基连接法、“点击化学”法等,在小分子、肽、酶和纳米粒的 ^{18}F -氟标记研究中均有报道。此外,微流控芯片等新技术在上述方法中也有应用。与 ^{18}F -FDG 连接可方便地同时实现被标记分子糖基化和 ^{18}F -氟标记,显著改善标记产物的体内分布和消除特性,虽存在反应步骤多、被标记分子需修饰等局限,但以 ^{18}F -FDG 为辅基进行 ^{18}F -氟标记仍是一种具有较高可行性和应用价值的间接 ^{18}F -氟标记策略。

关键词: ^{18}F -氟代脱氧葡萄糖;辅基;间接标记; ^{18}F -氟标记;方法学

中图分类号: R811.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2017)03-0193-15

doi: 10.7538/hhx.2017.39.03.0193

Methodological Progress of ^{18}F -Fluoro-Labeling Employing ^{18}F -FDG as Prosthetic Group

DING Hui, LI Yang, LI Miao*

Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: In the field of nuclear medicine molecular imaging, ^{18}F -fluoro-labeling methods based on intermediate molecule containing ^{18}F -fluoro (i. e. prosthetic groups) has mild reaction condition, fine chemo-selectivity and simple purification for product. Therefore, the indirect ^{18}F -fluoro-labeling via prosthetic group is a classical strategy in the development of tracers for positron emission tomography(PET). $2\text{-}^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG), which has simple scaffold, high hydrophilicity and easy accessibility, is the most popular tracer in PET practice and ideal prosthetic molecule for ^{18}F -fluoro-labeling. In this paper, we review related methodological progress in literatures. The methodological parameters and product properties in these reports are compared and analyzed. Overall, several ^{18}F -fluoro-labeling solutions employing ^{18}F -FDG have emerged, including enzymic method,

收稿日期:2016-05-03;修订日期:2016-09-05

基金项目:西安交通大学第一附属医院科研基金青年创新项目(2014YK8)

作者简介:丁 晖(1970—),男,山东曹县人,主管技师,研究方向为医学影像技术,E-mail: 2330996003@qq.com

* 通信联系人:李 淼(1983—),男,陕西安康人,博士,助理研究员,研究方向为分子影像与分子探针,E-mail: 43086906@qq.com

oxime formation, sulfhydryl ligation and click-chemistry. They were tried in the ^{18}F -fluoro-labeling of small molecules, peptides, enzymes and nanoparticles. New technology such as microfluidic reactor was applied in some solutions aforementioned. Glycosylation and ^{18}F -fluoro-labeling of precursor molecule can be achieved synchronically by the conjugation with ^{18}F -FDG. Consequently, the *in vivo* bio-kinetics of labeling product are significantly improved. Although the ^{18}F -fluoro-labeling employing ^{18}F -FDG needs multi-step reaction and especial modification in precursor, it is generally a feasible and valuable indirect labeling strategy.

Key words: ^{18}F -FDG; prosthetic group; indirect labeling; ^{18}F -fluoro-labeling; methodology

正电子发射断层成像 (positron emission tomography, PET) 是通过探测注入体内的正电子类放射性核素标记示踪剂发射的 γ 射线信号表征其分布, 间接获知代谢功能、受体分布、基因表达等生理病理信息的先进分子影像技术。PET 的进步主要依靠正电子核素标记示踪剂 (以下简称“示踪剂”) 的发展^[1]。通过引入辅基可修饰示踪剂分子结构, 改变其体内分布和消除特性^[2-3]。糖基化是最常用的修饰策略之一, 其优势在于: (1) 增加水溶性, 增加肾消除比例, 减少消化系统生理性摄取; (2) 减少内皮网状系统清除, 延长靶组织滞留时间; (3) 加快血液清除, 缩短注射到成像的时间间隔。存在的问题是: (1) 糖基极性大, 可能改变被标记分子的极性分布, 并影响其透过血脑屏障的能力; (2) 糖基空间位阻大, 可能影响标记产物对靶标的亲和力^[4]。

$2\text{-}^{18}\text{F}$ -氟代-2-脱氧-D-葡萄糖 ($2\text{-}^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose, ^{18}F -FDG) 是目前占主导地位的示踪剂^[5], 其分子结构类似单糖, 以 ^{18}F -FDG 为辅基进行 ^{18}F -氟标记可获得类似糖基化修饰的效果。1999 年以来已有众多基于 ^{18}F -FDG 制备 ^{18}F -氟标记示踪剂的研究报道^[6-7]。笔者^[8]也曾尝试采用该策略, 对氨基端存在 6-胍基烟酰基修饰的肽进行了 ^{18}F -氟标记研究, 该方法简便, 反应迅速, 所得胍类产物的标记率接近 35%。6-胍基烟酰基是常用于 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -锝标记的辅基, 早已实现商品化, 故该法具有一定的临床转化潜力。本工作拟按各方法首次报道时间为序归纳相关进展, 以期协助后续研究选择适当的反应类型。

1 酶法

Prante 等^[9]首次报道的以 ^{18}F -FDG 为辅基的 ^{18}F -氟标记研究即采用该法。为了规避酶促反

应的可逆性影响放射化学产率 (radio-chemical yield, RCY), Prante 等以 ^{18}F -FDG-1-磷酸为底物对三磷酸尿苷 (uridine triphosphate, UTP) 进行酶促 ^{18}F -氟标记, 制得 ^{18}F -FDG-二磷酸尿苷 (^{18}F -F-1, 图 1)。UTP 浓度在 0.65 mmol/L 时 RCY 达到最高, 且酶浓度升高可加快反应。

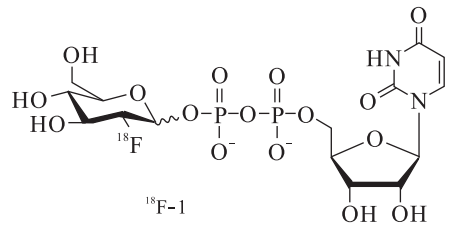


图 1 ^{18}F -氟代二磷酸尿苷结构式
Fig. 1 Structural formula of ^{18}F -fluoro-uridine diphosphate

Bormans 等^[10]采用 ^{18}F -FDG 对二磷酸尿苷-半乳糖进行酶促标记, 制备 $2'\text{-}^{18}\text{F}$ -氟代脱氧乳糖 (^{18}F -2) (图 2)。该反应速率慢且 RCY 低。在野生小鼠和高表达 LacZ 基因的 Rosa-26 型小鼠体内 ^{18}F -2 的血液清除快, 但未见组织摄取, 说明 ^{18}F -2 不能跨细胞膜转运, 不适用于体内成像。

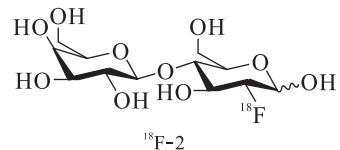


图 2 以 ^{18}F -FDG 为辅基制备的 ^{18}F -氟代乳糖结构式
Fig. 2 Structural formula

of ^{18}F -fluoro-galactose labeled via ^{18}F -FDG

Phenix 等^[11]用 ^{18}F -FDG 衍生物标记重组酸

性 β -葡萄糖脑苷酯酶(GCase),用于表征 Gaucher 病模型鼠体内 GCase 分布和代谢动力学的研究。该反应较快,但标记产物 ^{18}F -GCase(^{18}F -3)(图 3)的纯化过程冗长。 ^{18}F -3 在小鼠体内巨噬细胞富集器官(如肝、脾)中浓聚,主要通过肾和肝胆代谢。脑中无摄取说明未解离出 ^{18}F -FDG。该方法有潜力发展成为酶替代型示踪剂的通用制备方法。

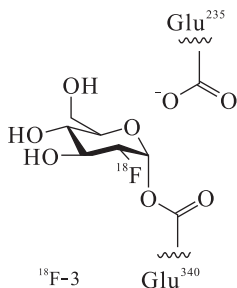
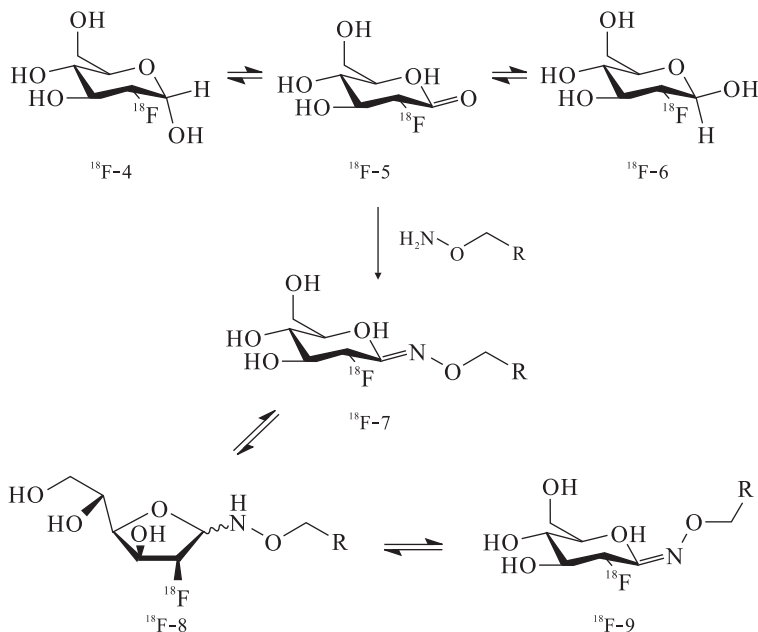


图 3 ^{18}F -氟标记酸性 β -葡萄糖脑苷酯酶结构式
Fig. 3 Structural formula
of ^{18}F -fluoro-acid β -glucocerebrosidase

总之,酶法主要利用 ^{18}F -FDG 与葡萄糖结构相似而可被酶选择性识别的特性,反应条件温和,可保证标记底物和位点的高度选择性,但也限制了被标记分子的种类。酶法 RCY 较低,耗时很长,产物难纯化,尚不适用于临床成像。

2 成脎法

成脎法是利用醛/酮羰基与氨基基在酸性水相体系($\text{pH}=4\sim 7$)中可选择性反应形成脎的原理。虽然该条件下 ^{18}F -FDG 可开环暴露醛基(^{18}F -5),但也易使生物大分子变性。因 $\text{C}=\text{N}$ 双键取代基空间位阻的差异会存在 E/Z 两种构型的产物(^{18}F -7、 ^{18}F -9)。因水相溶液中吡喃单糖(包括 ^{18}F -FDG)存在 α/β 异头物(^{18}F -4、 ^{18}F -6)变旋现象,故 ^{18}F -7 和 ^{18}F -9 也处于以呋喃糖(^{18}F -8)为中间体的互相转化平衡中,在高温($80\sim 120\text{ }^\circ\text{C}$)和酸性($\text{pH}=1.5\sim 2.5$)条件下转化迅速,可认为是同一物质而无需分离(图 4)。



R: 被标记分子

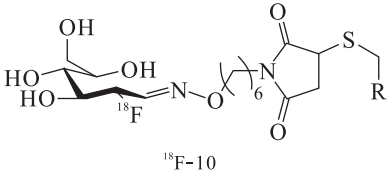
图 4 成脎法 ^{18}F -氟标记的原理示意图

Fig. 4 Schematic diagram of oxime formation in the ^{18}F -fluoro-labeling via ^{18}F -FDG

文献[12]首次报道了以 ^{18}F -FDG 为起点采用成脎法进行 ^{18}F -氟标记的研究,即通过顺丁烯二酰亚胺基己基脎连接 ^{18}F -FDG 后再与肽或蛋白质的半胱氨酸残基连接成 ^{18}F -10(图 5)。采用谷胱甘肽验证方法后 Wuest 等[13]进行了膜联蛋白 A5 的 ^{18}F -氟标记研究。该法对膜联蛋白 A5 浓度要

求低($2.25\text{ }\mu\text{mol/L}$),RCY 高,但 ^{18}F -10 纯化过程复杂。

采用 ^{18}F -FDG 直接对氨基修饰肽进行标记的方法由 Namavari 等[14]和 Hultsch 等[15]分别报道。Namavari 等[14]用 ^{18}F -FDG 分别直接标记氨基乙酰基修饰的线性和环状精氨酸-甘氨酸-天冬

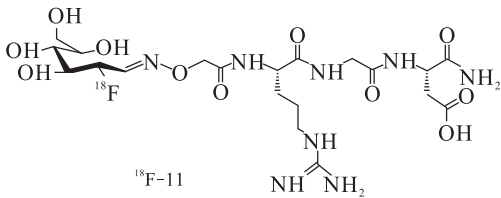


$^{18}\text{F-10}$
R=膜联蛋白 A5

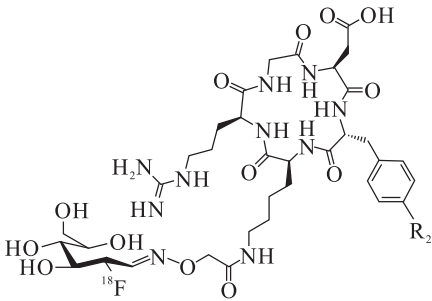
图 5 以 $^{18}\text{F-FDG}$ -顺丁烯二酰亚胺己基肟为中间体制备的 ^{18}F -标记膜联蛋白 A5 结构式

Fig. 5 Structural formula of ^{18}F -fluoro-annexin A5 labeled via $^{18}\text{F-FDG}$ -maleimidehexyloxime

氨酸短肽 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) (图 6)。 $^{18}\text{F-FDG-RGD}$ 环肽 ($^{18}\text{F-12}$) 的 $\text{IC}_{50} = 0.67 \mu\text{mol/L}$, 说明 ^{18}F -氟标记未影响其活性。标记产物 ($^{18}\text{F-11}$ 、 $^{18}\text{F-12}$) 分别注入 U87MG 荷瘤鼠后 120 min, 肿瘤摄取显著低于心脏和肾; $^{18}\text{F-11}$ 的肿瘤/血摄取比高, 肿瘤/肝摄取比低; $^{18}\text{F-18}$ 的肿瘤/肌肉和肿瘤/肝摄取比高, 说明 $^{18}\text{F-11}$ 和 $^{18}\text{F-12}$ 非特异性生理摄取过高, 不适用于成像。Hultsch 等^[15] 采用临床 $^{18}\text{F-FDG}$ 标记氨基修饰 RGD 环肽的研究中以叔丁氧羰基 (Boc) 保护氨基以减少副反应, Boc 基可自行热解离 (图 6)。采用小体积 $^{18}\text{F-FDG}$ 与高浓度肽反应, 在肽过量时 RCY 较高, 原因可能是原料 $^{18}\text{F-FDG}$ 所含葡萄糖干扰标记反应。用高效液相色谱法 (high per-



$^{18}\text{F-11}$



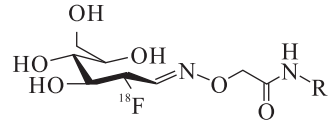
$^{18}\text{F-12}$: $\text{R}_2 = \text{OH}$
 $^{18}\text{F-13}$: $\text{R}_2 = \text{H}$

图 6 以 $^{18}\text{F-FDG}$ 为辅基标记 RGD 线肽/环肽的反应路线图

Fig. 6 Structural formulas of ^{18}F -fluoro-cyclo/linear RGD peptide labeled via $^{18}\text{F-FDG}$

formance liquid chromatography, HPLC) 分离葡萄糖后标记效果显著改善。 $^{18}\text{F-13}$ 注入 M21 荷瘤鼠 120 min 后, 肿瘤/血摄取比高, 成像性能尚可。

Wuest 等^[16] 还采用 $^{18}\text{F-FDG}$ 标记了氨基乙酰基修饰神经降压肽 (8—13) 片段 (NT_{8-13}) 单体、二聚体、四聚体 (图 7)。其中单体标记产物 ($^{18}\text{F-14}$) 的 RCY 最高 (80%), NT_{8-13} 聚合程度越高 RCY 越低, 原因可能是多聚体中氨基含量相对低。 NT_{8-13} 浓度越低 RCY 越低。Wuest 等^[16] 认为 $^{18}\text{F-FDG}$ 开环醛 α 位 ^{18}F -氟取代基可能增加羰基活性, 使 $^{18}\text{F-FDG}$ 比葡萄糖更容易与氨基基反应。



$^{18}\text{F-14}$: $\text{R} = \text{---Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH}$

$^{18}\text{F-15}$: $\text{R} = \begin{matrix} \text{---Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \\ | \\ \text{Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \end{matrix}$

$^{18}\text{F-16}$: $\text{R} = \begin{matrix} \text{---Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \\ | \\ \text{Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \\ | \\ \text{Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \\ | \\ \text{Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH} \end{matrix}$

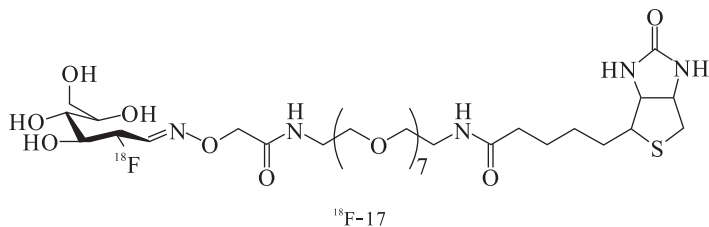
图 7 以 $^{18}\text{F-FDG}$ 为辅基对神经降压肽 (8—13) 片段衍生物

单体/二聚体/四聚体进行 ^{18}F -氟标记的产物结构式

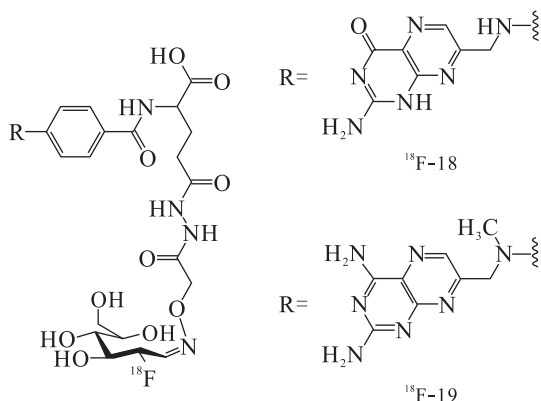
Fig. 7 Structural formulas of $^{18}\text{F-FDG}$ -labeled monomeric, dimeric, and tetrameric neurotensin(8-13) derivatives

Simpson 等^[17] 采用 $^{18}\text{F-FDG}$ 标记氨基乙酰基和聚乙二醇基修饰的生物素衍生物的研究表明, RCY 很高, 但标记产物 ($^{18}\text{F-17}$) (图 8) 比活度较低, 且降低前体浓度会影响 RCY。使用制得后衰变 4 h 的 $^{18}\text{F-FDG}$, RCY 仍能达到近 100%。 $^{18}\text{F-17}$ 在体外对亲和素的结合率可达 85%, 非特异性结合率不足 10%。

Jammaz 等^[18] 采用 $^{18}\text{F-FDG}$ 标记了氨基乙酰基修饰叶酸/甲氨蝶呤, 标记率高, 标记产物 $^{18}\text{F-FDG}$ -叶酸 ($^{18}\text{F-18}$) 和 $^{18}\text{F-FDG}$ -甲氨蝶呤 ($^{18}\text{F-19}$) (图 9) 的比活度和稳定性高。 $^{18}\text{F-18}$ 和 $^{18}\text{F-19}$ 对高表达叶酸受体的 KB 细胞的亲和力优于 ^{18}F -氟苯基或 ^{18}F -氟吡啶基标记叶酸, 与天然叶酸相当。在正常鼠的血液和组织清除快。KB 荷

图 8 以¹⁸F-FDG 为辅基对生物素衍生物进行¹⁸F-氟标记的产物结构式Fig. 8 Structural formula of ¹⁸F-FDG-labeled biotin derivatives

瘤鼠体内分布研究显示,其血液清除快,肿瘤摄取值高,¹⁸F-18 或¹⁸F-19 与叶酸共注射后肿瘤和肾的摄取显著降低,其中¹⁸F-19 显示出较优越的成像性能。

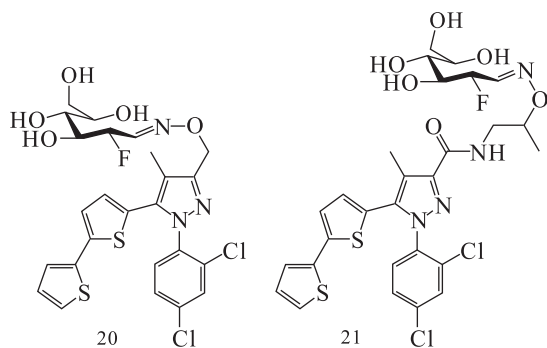
图 9 以¹⁸F-FDG 为辅基对碳酰肼基叶酸/甲氨蝶呤进行¹⁸F-氟标记的产物结构式Fig. 9 Structural formulas of ¹⁸F-FDG-labeled carbonylhydrazide-folate/methotrexate derivatives

Frau 等^[19]报道了¹⁹F-FDG 标记氨基基修饰吡唑类化合物 NESS125A 用于大麻素(cannabinoid, CB)受体显像的研究。相比 NESS125A,两种化合物(化合物 20、21,图 10)对 CB1 和 CB2 受体的亲和力及对 CB1 受体的选择性都显著减弱,说明在吡唑基 3-位的亲水性基团取代会影响 NESS125A 的活性,故未进行¹⁸F-氟标记研究。

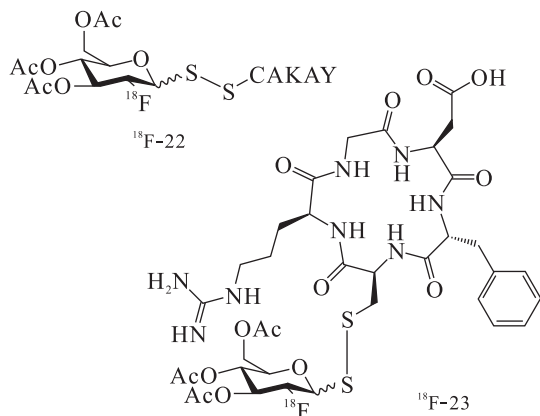
总之,成脞反应条件相对温和,RCY 高,但被标记分子浓度低会影响 RCY。以氨基基修饰被标记分子可保证标记位点选择性。以 Boc 基封闭游离氨基可提高标记率。临床用¹⁸F-FDG 因含有大量葡萄糖会干扰标记反应,使用前应采用 HPLC 纯化。

3 巯基连接法

Prante 等^[20]首次以¹⁸F-FDG 为辅基采用硫

图 10 以¹⁹F-FDG 为辅基对 NESS125A 衍生物进行¹⁹F-氟标记的产物结构式Fig. 10 Structural formulas of ¹⁹F-FDG-labeled NESS125A derivatives

基连接法进行¹⁸F-氟标记的研究。该法将 α -苯磺酸三乙酰基¹⁸F-FDG 硫酯与含半胱氨酸残基的 CAKAY 肽或 RGDfC 环肽连接得到标记产物(¹⁸F-22、¹⁸F-23,图 11)。总体上讲反应条件温和,但步骤冗长影响了 RCY。在生化和细胞水平,¹⁸F-23 与 RGDfC 环肽相比,半胱氨酸残基糖基化未显著影响对 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的亲和力。

图 11 ¹⁸F-氟标记 CAKAY 肽/RGDfC 环肽结构式Fig. 11 Structural formulas of ¹⁸F-fluoro-CAKAY peptide/cyclo-RGDfC peptide derivatives

Boutureira 等^[21]首次从¹⁸F-FDG 开始对蛋白质进行位点选择性¹⁸F-氟标记的研究。反应将 1-硫代-¹⁸F-FDG 与含半胱氨酸或脱氢丙氨酸残基的枯草杆菌丝氨酸蛋白酶(SBL-S156C 或 SBL-S156Dha)连接,分别得到二硫键和硫醚键连接的标记产物(¹⁸F-24、¹⁸F-25,图 12),反应条件温和,RCY 较高。

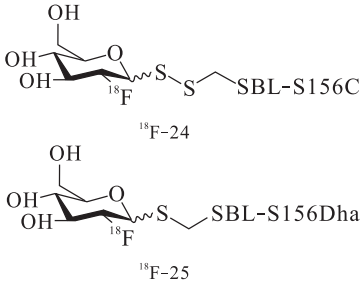


图 12 ¹⁸F-氟标记枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 SBL-S156 结构式

Fig. 12 Structural formulas of ¹⁸F-fluoro-serine protease subtilisin from *Bacillus lentus*(SBL) S156

Unak 等^[22]从四乙酰基三氟甲磺酰甘露糖开始对金纳米粒进行¹⁸F-氟标记的研究。反应的 RCY 和标记产物(¹⁸F-26)稳定性均较高。¹⁸F-26 对异粘蛋白高表达的 MCF-7 细胞有较高亲和力和较低毒性。该法的缺点是制备步骤多(图 13),另外原料 NaCNBH₃ 毒性强,对产物纯化的要求高。

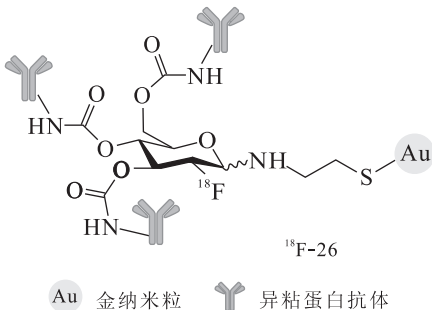


图 13 以¹⁸F-FDG 为辅基对制备的

¹⁸F-氟标记异粘蛋白抗体修饰金纳米粒结构式

Fig. 13 Structural formula of ¹⁸F-fluoro-metadherin antibody modified gold nanoparticle labeled via ¹⁸F-FDG

Ozkaya 等^[23]从四乙酰基三氟甲磺酰甘露糖开始对磁性氧化铁纳米粒进行¹⁸F-氟标记的研究。方法与前述金纳米粒相似,最后一步反应连接纳米粒的产率高(图 14),但总体 RCY 仍较低。

标记产物(¹⁸F-27)对 MCF-7 细胞有高亲和力和低毒性。

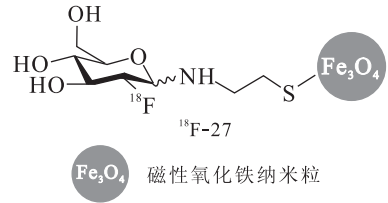


图 14 ¹⁸F-氟标记磁性氧化铁纳米粒结构式

Fig. 14 Structural formula of ¹⁸F-fluoro-magnetic iron oxide nanoparticle labeled

总之,巯基连接法需要被标记分子含有暴露的巯基或含有半胱氨酸残基,该法的优势在于具有优异的位点选择性,反应条件相对温和,更适用于生物大分子的¹⁸F-氟标记。但因反应步骤多,反应时间偏长,总体 RCY 值受到一定影响。该法一般选用二硫键和硫醚键连接¹⁸F-FDG 辅基,虽然这两种键比酯键更难酶解,但其标记产物的体内稳定性仍有待提高。尚未见该法用于体内成像研究的报道。

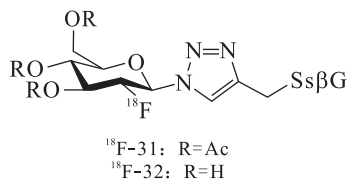
4 “点击化学”法

“点击化学”策略由 Sharpless 等^[24]提出,其条件温和、化学选择性好、操作简便。其中 Cu(I)催化-叠氮基-炔基环化加成反应(copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC)是最常用的反应类型之一^[25]。CuAAC 已广泛应用到正电子核素标记研究中^[26-27]。

Maschauer 等^[28]首次以¹⁸F-FDG 为辅基通过 CuAAC 进行¹⁸F-氟标记的研究。先制得¹⁸F-FDG-叠氮化物,再与丙炔基甘氨酸连接制得¹⁸F-28。该法缺点是反应步骤太多(图 15)。Maschauer 等^[29]还尝试用类似方法对丙炔基甘氨酸残基修饰的 NT₈₋₁₃衍生物和 RGD 环肽进行¹⁸F-氟标记,标记反应快,标记产物(¹⁸F-29、¹⁸F-30)的纯度和比活度高。¹⁸F-29 对 NT 受体有高亲和力($K_d = 8.5 \text{ nmol/L}$)和选择性。¹⁸F-29 注入 HT29 荷瘤鼠 65 min 后,肿瘤/血的放射性摄取比达 3.5;¹⁸F-30 注入 U87MG 荷瘤鼠体内 30 min 后,肿瘤/血和肿瘤/肌肉的放射性摄取比分别为 2.3 和 4.4。¹⁸F-29 和¹⁸F-30 均显示出良好成像性能。

Boutureira 等^[30]分别采用四乙酰基-¹⁸F-FDG-叠氮化物和¹⁸F-FDG-叠氮化物对含丙炔基

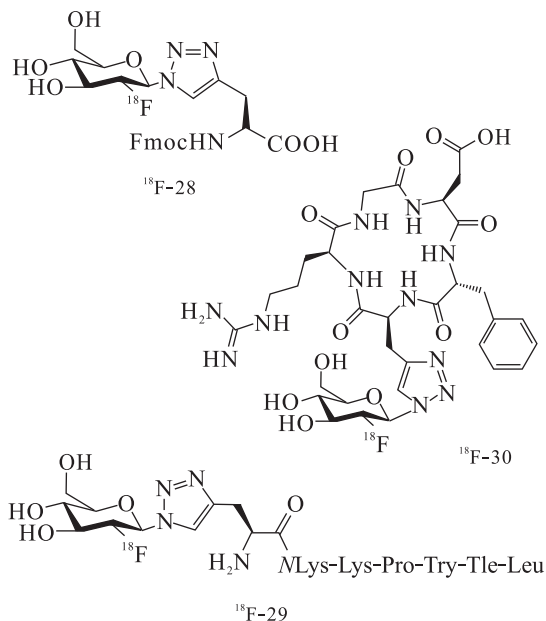
甘氨酸残基的磷酸丙糖异构酶(SsβG)进行¹⁸F-氟标记(图 16),二者都存在标记率低、反应时间长的问题,原因可能是通过基因重组和细菌表达制备的 SsβG 浓度低。采用四乙酰基-¹⁸F-FDG-叠氮化物的总体 RCY 较低,反应时间较长。



SsβG:磷酸丙糖异构酶

图 16 ¹⁸F-氟标记磷酸丙糖异构酶结构式

Fig. 16 Structural formulas of ¹⁸F-fluoro-triosephosphate isomerase barrel protein



Fmoc: 苄氧羰基;NLys: N-(4-氨基)甘氨酸残基;
Tle: 叔亮氨酸残基

图 15 ¹⁸F-氟标记甘氨酸、神经降压肽(8—13)片段和 RGD 环肽衍生物结构式

Fig. 15 Structural formulas of ¹⁸F-fluoro-glycine/neurotensin(8-13)/cyclo RDGfPra peptide derivatives

Fischer 等^[31]采用¹⁸F-FDG-叠氮化物对丙炔基甘氨酸修饰叶酸进行¹⁸F-氟标记的研究。标记产物¹⁸F-33(图 17)显示出良好的体外和体内稳定性。¹⁸F-33 注入 KB 荷瘤鼠体内 90 min 后,肿瘤/血液放射性摄取比高于 36,显示出优异的成像性能。消化系统的非特异性高摄取怀疑与肝细胞的受体介导内吞有关。为增加¹⁸F-33 的血液滞留时间,Fischer 等^[32]还在¹⁸F-33 的基础上添加了血清白蛋白结合基团制得¹⁸F-34(图 17)。¹⁸F-34 的总体 RCY 比¹⁸F-33 略低,但结合叶酸受体的选择性未受影响。在 KB 荷瘤鼠体内,¹⁸F-34 比¹⁸F-33 的血液清除慢造成本底偏高,但注射后 1 h ¹⁸F-34 的肿瘤摄取和肿瘤/肾放射性摄取比更高。

Hugenberg 等^[33]采用点击化学法对异羟肟酸类基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)抑制剂 CGS27023A 和 CGS25966 进行

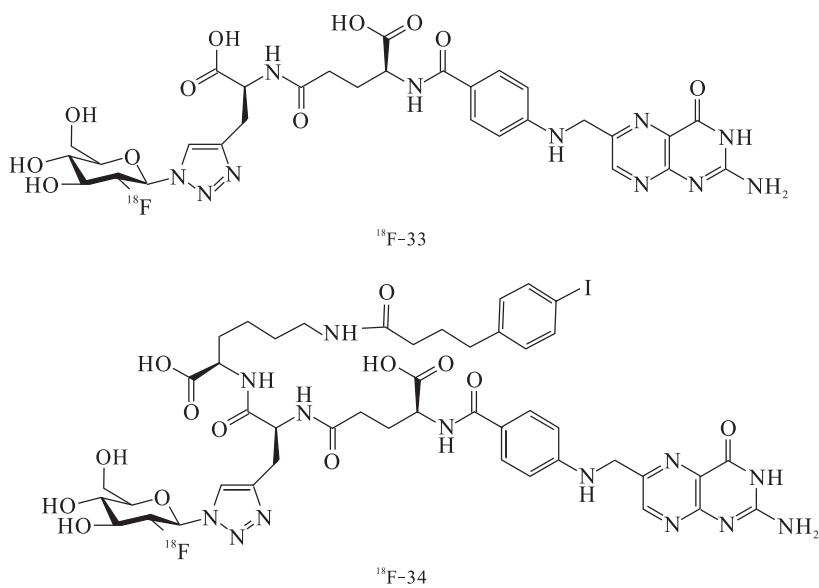


图 17 ¹⁸F-氟标记叶酸及其衍生物结构式

Fig. 17 Structural formulas of ¹⁸F-fluoro-folic acid and its derivatives

了多种辅基的 ^{19}F -氟标记。CGS 25966 的两种 ^{19}F -FDG 标记产物 35 和 36(图 18)对 MMP-2、8、9、13 均有良好亲和力(IC_{50} 值为 $0.2\sim 0.6\text{ nmol/L}$), 由于标记产物 35、36 并非所有 ^{19}F -氟标记产物中 IC_{50} 和 $\lg D_{7.4}$ 值最佳的产物, 故 Hegenberg 等选择了其他产物进行 ^{18}F -氟标记研究。

Held 等^[34]合成了一种可选择性结合神经降

压肽 2 型受体 (neurotensin receptor subtype-2, NTS2) 的含 *N*-homo-酪氨酸的 NT_{8-13} 衍生物, 并在其 N 端连接丙炔基甘氨酸后进行 ^{19}F -FDG 标记。标记产物 37(图 19)对 NTS2 的选择性和亲和力相比被标记分子显著下降, 说明该法制备 NTS2 示踪剂不可行, 故未进行 ^{18}F -氟标记研究。

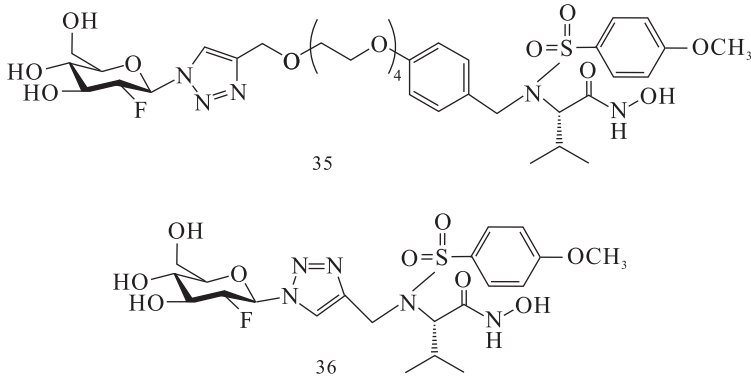
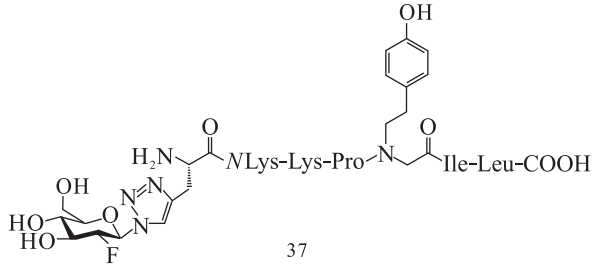


图 18 ^{19}F -氟标记 CGS 27023A 和 CGS 25966 结构式

Fig. 18 Structural formulas of ^{19}F -CGS 27023A and ^{19}F -CGS 25966



NLys: *N*-(4-氨基)甘氨酸残基

图 19 ^{19}F -氟标记神经降压肽(8-13)片段衍生物结构式

Fig. 19 Structural formula of ^{19}F -neurotensin (8-13) derivatives

Banerjee 等^[35]尝试对 *N*-芳基哌嗪三唑类化合物进行了多种衍生化和 ^{19}F -氟标记, 并测定了标记产物对多巴胺受体和 5-羟色胺受体各亚型的亲和力。其中两种 ^{19}F -FDG 标记产物 38 和 39(图 20)的亲水性相对于标记前有不同程度增加, 但对多巴胺 D4 受体的亲和力仅相当于被标记分子的 $1/200$ 和 $1/10$, 故未进行 ^{18}F -氟标记研究。

Maschauer 等^[36]采用 ^{18}F -FDG-叠氮化物对丙炔基聚乙二醇修饰的内皮素 A 型受体 (endothelin receptor A, ET_AR) 选择性配体 PD156707 进行了 ^{18}F 标记。标记产物 ^{18}F -40(图 21)对 ET_AR

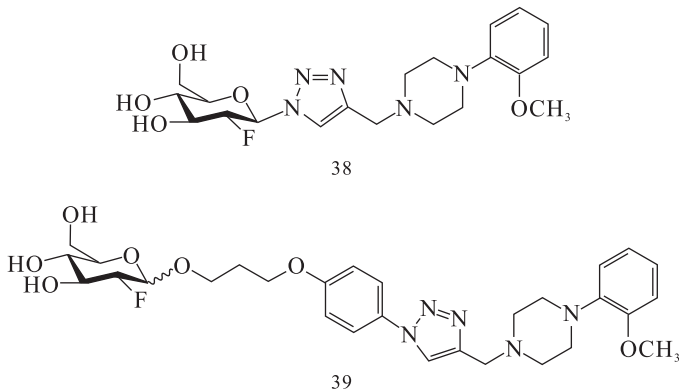


图 20 ^{19}F -氟标记 *N*-芳基哌嗪三唑类衍生物结构式

Fig. 20 Structural formulas of ^{19}F -*N*-arylpiperazine triazole derivatives

亲和力比 ET_BR 高 266 倍,但相比 PD156707 对 ET_AR 的选择性仍有所降低。为 K1 移植瘤裸鼠注射¹⁸F-40 后血液清除快,60 min 肿瘤摄取值为 0.62% ID/g,肝、肾摄取低,胆囊和肠生理性摄取高,说明¹⁸F-FDG 标记虽然增加了亲水性(lg D = -0.4),但¹⁸F-40 仍主要从肝胆清除。

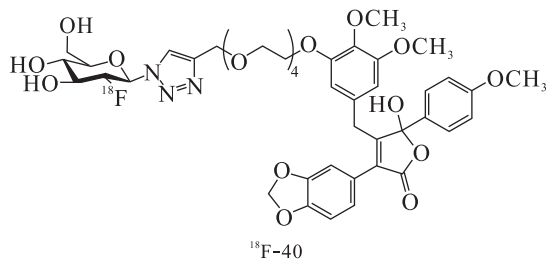


图 21 ¹⁸F-氟标记 PD156707 衍生物结构式
Fig. 21 Structural formula of ¹⁸F-PD156707 derivatives

Lang 等^[37]采用¹⁸F-FDG-叠氮化物对二芳基吡唑类 NTS-1 抑制剂 SR142948A 进行了¹⁸F-氟标记。标记产物¹⁸F-41(图 22)的水溶性好(lg D_{7.4} = -0.24),难以透过血脑屏障,对 NTS-1 的亲和力高(K_i = 1 nmol/L)。¹⁸F-41 注入 HT29 荷瘤鼠体内后血液和肝清除快,注射 60 min 后肿瘤摄取值为 0.74% ID/g,肿瘤/血液的放射性摄取比为 4.4。相对于其他已报道的 NTS-1 示踪剂¹⁸F-41 的肿瘤摄取值偏低,但肾清除快。

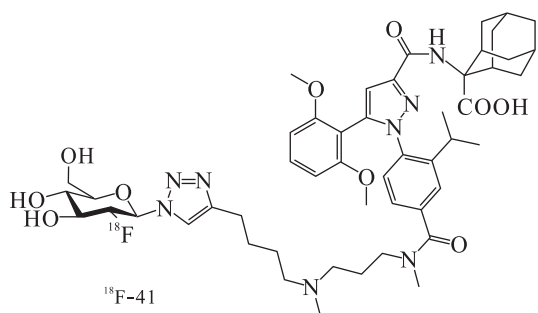


图 22 ¹⁸F-氟标记 SR142948A 结构式
Fig. 22 Structural formula of ¹⁸F-SR142948A

Pisaneschi 等^[38]采用¹⁸F-FDG-叠氮化物对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)氰基喹啉类配体进行了¹⁸F-氟标记。标记产物¹⁸F-42(图 23)的亲水性高。分别用高表达/低表达 EGFR 的 A431/MCF7 细胞进行体外结合测定的结果显示,¹⁸F-42 对 EGFR 有高亲和力

和选择性,但¹⁸F-42 的体内分布研究未见报道。

总之,CuAAC 并非严格意义上从¹⁸F-FDG 开始的¹⁸F-氟标记。另外,叠氮基前体制备过程复杂,需要 4 步反应和 HPLC 纯化^[28],被标记分子还需进行炔基修饰。然而,由于 CuAAC 在反应条件、位点选择性、产率、反应速率、操作便捷性方面具备其他方法难以比拟的优势,目前仍是¹⁸F-氟标记方法研究中最热门的反应类型之一,尤其是丙炔基甘氨酸等非天然氨基酸掺入方法发展成熟后,CuAAC 尤其在生物大分子¹⁸F-氟标记中的应用越来越受到重视。

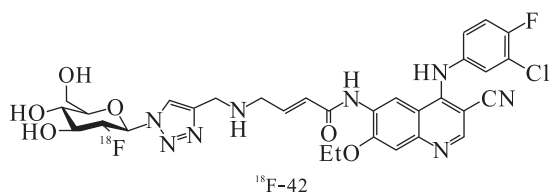


图 23 ¹⁸F-氟标记氰基喹啉类化合物结构式
Fig. 23 Structural formula of ¹⁸F-cyanoquinoline

5 其他方法

Patt 等^[39]借鉴乏氧示踪剂¹⁸F-FAZA 的分子结构,从四乙酰基-¹⁸F-FDG 开始制备¹⁸F-FDG 与 2-硝基咪唑的连接产物¹⁸F-43(图 24)。在体外,肿瘤细胞对¹⁸F-43 的摄取低(0.1%~0.2%)。¹⁸F-43 注入 Walker 256 荷瘤大鼠体内 60 min 后肿瘤摄取值与除肾以外的组织相比无显著差异,故¹⁸F-43 不适用于体内成像,原因尚不明。

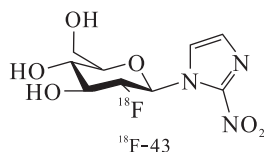


图 24 ¹⁸F-氟标记 2-硝基咪唑结构式
Fig. 24 Structural formula of ¹⁸F-fluoro-2-nitroimidazole

Maschauer 等^[40]从四乙酰基-¹⁸F-FDG 开始采用三氟化硼(BF₃)催化对丝氨酸和苏氨酸进行侧链羟基¹⁸F-氟标记(¹⁸F-44、¹⁸F-45,图 25)。另外 Maschauer 等^[41]还从标记率的角度对四乙酰基-¹⁸F-FDG 连接丝氨酸/苏氨酸的两种方法进行了讨论。BF₃ 法适用于 N-苄氧羰基(Fmoc)丝

氨酸,而氢溴酸-三氟甲磺酸银法适用于 *N*-Fmoc-C-氧苄基苏氨酸。该研究为氨基酸和肽的侧链糖基化¹⁸F-氟标记提供了方法学基础。

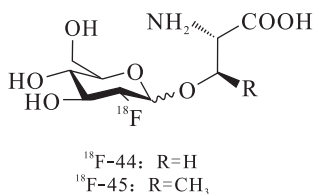


图 25 ¹⁸F-氟标记丝氨酸/苏氨酸结构式

Fig. 25 Structural formulas
of ¹⁸F-fluoro-serine/threonine

6 微流控芯片的应用

Bouvet 等^[42]将微流控芯片技术应用于以¹⁸F-FDG 为辅基对肽进行¹⁸F-氟标记的研究,分别验证了顺丁烯二酰亚胺基己基脒法(图 5)和乙酰基脒法(图 6)。结果显示,采用微流控芯片技术可显著减少反应时间和前体肽用量,并显著提高 RCY。其短时、高温反应的条件更适用于热不稳定性分子的¹⁸F-氟标记。

7 问题与对策

以¹⁸F-FDG 为辅基进行¹⁸F-氟标记的优势在于:(1) ¹⁸F-FDG 成本低,易获取,相比传统间接¹⁸F-氟标记法采用的辅基(如 *N*-丁二酰亚胺基-4-¹⁸F-氟苯甲酸酯、4-¹⁸F-氟苯甲醛等),其标记位点选择性高、合成路线简单、RCY 高;(2) 以¹⁸F-FDG 为辅基的¹⁸F-氟标记反应可在水相进行,反应体系简单。该策略的不足之处是:(1) 临床用¹⁸F-FDG 所含葡萄糖会干扰标记反应,投料前需纯化;(2) 其应用可能受限于特定类型的前体,或被标记分子需先进行特定修饰(氨基、炔基及 Boc 基等)。

此外,前述各类方法均有技术难点:(1) 酶法的难点在于酶易失活,操作不便,反应的重现性较差,需要精细地控制酶的保存、反应和产物纯化条件;(2) 成脒法的难点在于反应需偏酸性环境和加热,故对生物大分子进行标记时反应条件需小心控制;有学者开发了以 5-¹⁸F-氟代-5-脱氧核糖(5-¹⁸F-fluoro-5-deoxyribose, ¹⁸F-FDR)代替¹⁸F-FDG 为辅基进行¹⁸F-氟标记的方法,采用¹⁸F-FDR

在室温和 pH=6.0 时即可获得高 RCY;此外采用苯胺类化合物催化也可显著加快反应^[7,43];(3) 巯基连接法的难点在于被标记分子上的暴露巯基不稳定易氧化,因此反应体系需惰性气体保护和偏碱性环境;(4) CuAAC 的难点在于 2-三氟甲磺酰四乙酰基叠氮前体尚未商品化,故有研究采用 6-三氟甲磺酰基叠氮予以替代;制备四乙酰基-¹⁸F-FDG-叠氮化物时,反应体系 pH 值偏高则 2-三氟甲磺酰四乙酰基叠氮前体可能分解,可在洗脱¹⁸F-F⁻的 K₂CO₃ 溶液中加入适量 KH₂PO₄ 调整 pH 值;另外炔基修饰的被标记分子浓度(应大于 33 μmol/L,生物大分子有时难以达到)会影响标记率^[28];CuAAC 需要 Cu⁺ 催化,引入有毒的重金属离子为产物纯化和质量控制带来不便,故有学者发展了非铜催化环化加成以及其他生物正交反应类型,体现出良好的前景。

目前尚无任何一种前述反应类型适用于所有被标记分子,前述各类方法各有优势(方法学参数对比见表 1)。例如以¹⁸F-FDG 为辅基对 RGD 环肽进行¹⁸F-氟标记分别有成脒法、巯基连接法和“点击化学”法的研究报道,“点击化学”法制备总耗时最短(70 min),成脒法 RCY 最高(可达 93%),巯基连接法反应条件最温和,需根据实际条件和需求选择。尤其是成脒法和“点击化学”法仍不断有新的改进见诸报道,哪种方法更具有临床应用价值尚无定论。

药物质量控制是标记方法开发需考虑的重要因素。理想的标记方法应尽可能少的引入毒性原料(如 NaCNBH₃、重金属、有机溶剂等),产物与原料、副产物易分离,纯化过程简便快速。前述方法中仅个别涉及毒性原料,多数方法反应步骤多,体系较复杂,故大多采用 HPLC 结合固相萃取法进行终产物纯化,可有效克服副产物对标记产物结合靶标的干扰,但缺点是分离时间太长会影响产物比活度。

总而言之,以¹⁸F-FDG 为辅基进行¹⁸F-氟标记是一种可行的间接标记策略。随着步骤更简单、条件温和的新反应类型被开发应用、新型靶向分子的发现和合成设备的进步,以¹⁸F-FDG 为辅基的间接¹⁸F-氟标记法还将继续发展并逐步向临床应用靠近。如何继续提高标记率,减少反应步骤、反应时间和前体用量将是未来研究关注的重点方向。

表1 以¹⁸F-FDG为辅基进行间接¹⁸F-氟标记研究的方法对比
Table 1 Comparison between various ¹⁸F-fluoro-labeling solutions employing ¹⁸F-FDG as prosthetic group

方法类型	被标记分子	标记产物靶标	反应步骤总数	18F-氟标记反应		18F-氟标记产物			制备总耗时/min	参考文献		
				温度/℃	时间/min	各步骤溶剂体系	各步产率或总产率/%	各步骤产物纯化方法			比活度/(GBq·μmol ⁻¹)	纯化程度/%
酶法	二磷酸尿苷半乳糖	糖基转移酶β-半乳糖苷酶	2	40	60	Tris-HCl (pH=8)	60	SPE	N/A	90	110	[9]
				37	180	50 mmol/L HEPES (pH=7.5)	3.4	SPE	N/A	N/A	N/A	[10]
成肽法	酸性β-葡萄糖苷酶	甘露糖受体	2	37	10	r(0.93 mmol/L NaHCO ₃ /EtOH)=1/1;	80	SPE, HPLC;	2	>97	150	[11]
				37	45	20 mmol/L PB (pH=5.5)	N/A	SEC, 超滤				
成肽法	膜联蛋白A5	凋亡	2	100	15	r(EtOH/S) = 4/1;	45~69	SPE, HPLC;	2~4	>95	105	[13]
				rt	30	r(EtOH/Tris-HCl) = 1/4 (pH=7.4)	43~58 (衰变校正, 从 ¹⁸ F-FDG-MHO 计)	SEC				
成肽法	RGD 肽/环肽	α ₃ 整合素	1	100	30	r(EtOH/S) = 4/21 (TFA 0.4% (体积比))	27.5/41	HPLC	N/A	N/A	N/A	[14]
				120	20	r(DMSO/3 mmol/L HCl) = 1/9 (pH=2.5)	56~93	HPLC	N/A	N/A	70~80	[15]
成肽法	神经降压肽单体/二聚体/四聚体	神经降压肽受体	1	80	30	r(MeOH/H ₂ O)=2/1	63~80/15~88/5~8	HPLC	N/A	N/A	70	[16]
				85	90	r(MeOH/PBS/GHAc)=2/2/1	≈100	未纯化	10 ⁻⁶	N/A	N/A	[17]
成肽法	叶氨酸/甲氨蝶呤	叶氨酸受体	1	60	10~15	HAc-NaAc (pH=4.5)	80(从 ¹⁸ F-FDG 计)	SPE	9.3	98	20	[18]
				rt	45	EtOH;	55	SPE;	N/A	N/A	130	[20]
成肽法	丝氨酸蛋白酶	N/A	2	70	20	r(MeCN/DMF)=4/1;	33	HPLC, SPE;				
				rt	15	r(50 mmol/L Tris-HCl (pH=7.7)/MeCN)=3/1	13(衰变校正, 从 ¹⁸ F-F 计)	HPLC, SPE				
成肽法	丝氨酸蛋白酶	N/A	2	100	45	Diox;	55~60	N/A	N/A	N/A	90	[21]
				37	45	r(50 mmol/L PB(pH=8.0)/MeCN) = 9/1 或 PB						

续表 1

方法类型	被标记分子	标记产物 靶标	反应步骤 总数	18F-氟标记反应		18F-氟标记产物		制备 总耗时/ min	参考 文献		
				温度/ ℃	时间/ min	各步产率或 总产率/%	各步骤产物 纯化方法			比活度/(GBq· μmol ⁻¹)	纯化/ 放化 纯度/%
点击 化学法	叶酸	叶酸受体	4	Anh MeCN;	5;	5~25(衰变校正)	SPE;	90	>95	180	[31]
				r(60 mmol/L NaOH/EtOH) =9/1; EtOH	5;		N/A;				
	叶酸衍生物	叶酸受体	4	Anh MeCN;	5;	1~2(衰变校正)	HPLC	20~50	>95	180	[32]
				r(60 mmol/L NaOH/EtOH) =9/1;	5;		SPE;				
	PD156707	内皮素 A型受体	3	DMF	15		HPLC			70	[36]
				Anh MeCN;	2;	20~25	HPLC,SPE;	41~138	>99		
	SR142948A	神经降压肽 I型受体	3	r(60 mmol/L NaOH/EtOH) =9/1;	5;	(未衰变校正,从 ¹⁸ F-F-计)	N/A;				
				r(CH ₂ O/EtOH)=7/5	15		HPLC,SPE				
	氰基咪唑类 化合物	表皮生长 因子受体	3	Anh MeCN;	2;	20(未衰变校正)	HPLC,SPE;	35~74	>99	70	[37]
				60 mmol/L NaOH;	5;		N/A;				
其他	2-硝基咪唑	乏氧 肿瘤组织	3	r(CH ₂ O/THF)=29/40	10		HPLC,SPE				
				Anh MeCN;	5;	8.6	HPLC,SPE;	7.3	>99	90	[38]
	丝氨酸/ 苏氨酸	N/A	3	60 mmol/L NaOH;	10;	(未衰变校正,从 ¹⁸ F-F-计)	N/A;				
				r(PB/H ₂ O/MeCN)=4/5/5	5		HPLC,SPE				
	2-硝基咪唑	乏氧 肿瘤组织	3	Anh MeCN;	60;	80;	SPE,HPLC;	N/A	N/A	N/A	[39]
				Anh MeOH	2	N/A	HPLC				
	丝氨酸/ 苏氨酸	N/A	3	Anh MeCN;	5;	25/12	HPLC,SPE;	N/A	N/A	90	[40]
				Anh MeOH	20		SPE				

注: r=V/V; Anh, 无水; Diox, 二氧己环; DMF, N,N-二甲基甲酰胺; EtOH, 乙醇; GHAc, 冰醋酸; HAc-NaAc, 醋酸-醋酸钠缓冲液; HEPES, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液; HPLC, 高效液相色谱法; MeCN, 乙腈; MeOH, 甲醇; N/A, 原文未提及; PB, 磷酸盐缓冲液; PBS, 磷酸盐缓冲生理盐水; rt, 室温; S, 生理盐水; SEC, 体积排阻色谱法; SPE, 固相萃取法; TBA, 叔丁醇; TFA, 三氟乙酸; THF, 四氢呋喃; Tris-HCl, 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液

参考文献:

- [1] Jiang L, Tu Y, Shi H, et al. PET probes beyond ^{18}F -FDG[J]. J Biomed Res, 2014, 28(6): 435-446.
- [2] Ermert J. ^{18}F -labelled intermediates for radiosynthesis by modular build-up reactions: newer developments[J]. Bio Med Res Int, 2014, 2014: 812973.
- [3] Richter S, Wuest M, Bergman C N, et al. Rerouting the metabolic pathway of ^{18}F -labeled peptides; the influence of prosthetic groups[J]. Bioconjugate Chem, 2015, 26(2): 201-212.
- [4] Wangler C, Waser B, Alke 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): 2289-2296.
- [5] Hamacher K, Coenen H H, Stocklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2- ^{18}F -fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopoly-ether supported nucleophilic substitution[J]. J Nucl Med, 1986, 27(2): 235-238.
- [6] Prante O, Hamacher K, Coenen H H. Chemoenzymatic n. c. a. synthesis of the coenzyme uridine diphospho-2-deoxy-2- ^{18}F fluoro- β -D-glucose[J]. J Labelled Compd Rad, 1999, 42(2): S111-S112.
- [7] Maschauer S, Prante O. Sweetening pharmaceutical radiochemistry by ^{18}F -fluoroglycosylation: a short review[J]. Bio Med Res Int, 2014, 2014: 214748.
- [8] 李森, 李宏利, 郭佑民, 等. ^{18}F -FDG 直接标记 GKL VFFGK 寡肽的方法探讨[J]. 功能与分子医学影像学(电子版), 2014, 3(4): 528-532.
- [9] Prante O, Hamacher K, Coenen H H. Chemoenzymatic n. c. a. synthesis of the coenzyme UDP-2-deoxy-2- ^{18}F fluoro- α -D-glucopyranose as substrate of glycosyltransferases[J]. J Labelled Compd Rad, 2007, 50(1): 55-63.
- [10] Bormans G, Verbruggen A. Enzymatic synthesis and biodistribution in mice of β -O-D-galactopyranosyl-(1,4')-2'- ^{18}F fluoro-2'-deoxy-D-glucopyranose (2'- ^{18}F fluorodeoxy lactose)[J]. J Labelled Compd Rad, 2001, 44(6): 417-423.
- [11] Phenix C P, Rempel B P, Colobong K, et al. Imaging of enzyme replacement therapy using PET[J]. P Natl Acad Sci USA, 2010, 107(24): 10842-10847.
- [12] Berndt M, Pietzsch J, Bergmann R, et al. A novel role for ^{18}F FDG: synthesis and application of a ^{18}F FDG-based prosthetic group for peptide and protein labeling[J]. J Nucl Med, 2006, 47(Suppl 1): 29.
- [13] Wuest F, Berndt M, Bergmann R, et al. Synthesis and application of ^{18}F FDG-maleimidehexyloxime (^{18}F FDG-MHO): a ^{18}F FDG-based prosthetic group for the chemoselective ^{18}F -labeling of peptides and proteins[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(6): 1202-1210.
- [14] Namavari M, Cheng Z, Zhang R, et al. A novel method for direct site-specific radiolabeling of peptides using ^{18}F FDG [J]. Bioconjugate Chem, 2009, 20(3): 432-436.
- [15] Hultsch C, Schottelius M, Auernheimer J, et al. (18)F-Fluoroglycosylation of peptides, exemplified on cyclo(RGDfK) [J]. Eur J Nucl Med Mol I, 2009, 36(9): 1469-1474.
- [16] Wuest F, Hultsch C, Berndt M, et al. Direct labeling of peptides with 2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-d-glucose (^{18}F FDG) [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(18): 5426-5428.
- [17] Simpson M, Trembleau L, Cheyne R W, et al. One-pot production of ^{18}F -biotin by conjugation with ^{18}F -FDG for pre-targeted imaging: synthesis and radio-labelling of a PEGylated precursor[J]. Appl Radiat Isot, 2011, 69(2): 418-422.
- [18] Jammaz I A, Al-Otaibi B, Amer S, et al. Novel synthesis and preclinical evaluation of folic acid derivatives labeled with (18)F-[FDG] for PET imaging of folate receptor-positive tumors [J]. Nucl Med Biol, 2012, 39(6): 864-870.
- [19] Frau S, Dall'Angelo S, Baillie G L, et al. Pyrazole-type cannabinoid ligands conjugated with fluoro-deoxy-carbohydrates as potential PET-imaging agents: synthesis and CB1/CB2 receptor affinity evaluation[J]. J Fluorine Chem, 2013, 152(SI): 166-172.
- [20] Prante O, Einsiedel J, Haubner R, et al. 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2- ^{18}F fluorogluco-pyranosyl phenylthiosulfonate; a thiol-reactive agent for the chemoselective ^{18}F -glycosylation of peptides[J]. Bioconjugate Chem, 2007, 18(1): 254-262.
- [21] Boutureira O, Bernardes G J, D'Hooge F, et al. Direct radiolabelling of proteins at cysteine using ^{18}F -fluorosugars[J]. Chem Commun, 2011, 47(36): 10010-10012.
- [22] Unak G, Ozkaya F, Medine E I, et al. Gold nanoparticle probes: design and *in vitro* applications in

- cancer cell culture[J]. Colloid Surface B, 2012, 90: 217-226.
- [23] Ozkaya F, Unak P, Medine E I, et al. ¹⁸F-FDG conjugated magnetic nanoparticle probes: synthesis and *in vitro* investigations on MCF-7 breast cancer cells[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2013, 295(3): 1789-1796.
- [24] Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions[J]. Angew Chem Int Edit, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [25] Rostovtsev V V, Green L G, Fokin V V, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes[J]. Angew Chem Int Edit, 2002, 41(14): 2596-2599.
- [26] Pretze M, Pietzsch D, Mamat C. Recent trends in bioorthogonal click-radiolabeling reactions using fluorine-18[J]. Molecules, 2013, 18(7): 8618-8665.
- [27] Leila M, Lachlan C, Rudi A D, et al. Application of click chemistry for PET[J]. Curr Org Chem, 2013, 17(19): 2108-2118.
- [28] Maschauer S, Prante O. A series of 2-O-trifluoromethylsulfonyl-D-mannopyranosides as precursors for concomitant ¹⁸F-labeling and glycosylation by click chemistry[J]. Carbohydr Res, 2009, 344(6): 753-761.
- [29] Maschauer S, Einsiedel J, Haubner R, et al. Labeling and glycosylation of peptides using click chemistry: a general approach to (18)F-glycopeptides as effective imaging probes for positron emission tomography[J]. Angew Chem Int Edit, 2010, 49(5): 976-979.
- [30] Boutureira O, D'Hooge F, Fernandez-Gonzalez M, et al. Fluoroglycoproteins: ready chemical site-selective incorporation of fluorosugars into proteins[J]. Chem Commun, 2010, 46(43): 8142-8144.
- [31] Fischer C R, Muller C, Reber J, et al. [¹⁸F]fluorodeoxy-glucose folate: a novel PET radiotracer with improved *in vivo* properties for folate receptor targeting[J]. Bioconjugate Chem, 2012, 23(4): 805-813.
- [32] Fischer C R, Groehn V, Reber J, et al. Improved PET imaging of tumors in mice using a novel ¹⁸F-folate conjugate with an albumin-binding entity[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(6): 649-654.
- [33] Hugenberg V, Breyholz H J, Riemann B, et al. A new class of highly potent matrix metalloproteinase inhibitors based on triazole-substituted hydroxamates: (radio)synthesis and *in vitro* and first *in vivo* evaluation[J]. J Med Chem, 2012, 55(10): 4714-4727.
- [34] Held C, Plomer M, Hubner H, et al. Development of a metabolically stable neurotensin receptor 2 (NTS2) ligand[J]. Chem Med Chem, 2013, 8(1): 75-81.
- [35] Banerjee A, Maschauer S, Hubner H, et al. Click chemistry based synthesis of dopamine D4 selective receptor ligands for the selection of potential PET tracers[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(22): 6079-6082.
- [36] Maschauer S, Michel K, Tripal P, et al. Synthesis and *in vivo* evaluation of an (18)F-labeled glycoconjugate of PD156707 for imaging ETA receptor expression in thyroid carcinoma by positron emission tomography[J]. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 3(5): 425-436.
- [37] Lang C, Maschauer S, Hubner H, et al. Synthesis and evaluation of a (18)F-labeled diarylpyrazole glycoconjugate for the imaging of NTS1-positive tumors[J]. J Med Chem, 2013, 56(22): 9361-9365.
- [38] Pisaneschi F, Slade R L, Iddon L, et al. Synthesis of a new fluorine-18 glycosylated "click" cyanoquinoline for the imaging of epidermal growth factor receptor[J]. J Labelled Compd Rad, 2014, 57(2): 92-96.
- [39] Patt M, Sorger D, Scheunemann M, et al. Adduct of 2-[¹⁸F]FDG and 2-nitroimidazole as a putative radiotracer for the detection of hypoxia with PET: synthesis, *in vitro*- and *in vivo*-characterization[J]. Appl Radiat Isot, 2002, 57(5): 705-712.
- [40] Maschauer S, Pischetsrieder M, Kuwert T, et al. Utility of 1, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-glucopyranoside for no-carrier-added ¹⁸F-glycosylation of amino acids [J]. J Labelled Compd Rad, 2005, 48(10): 701-719.
- [41] Maschauer S, Kuwert T, Prante O. ¹⁸F-glycosylation using Koenigs - Knorr conditions: a comparative study[J]. J Labelled Compd Rad, 2006, 49(2): 101-108.
- [42] Bouvet V R, Wuest F. Application of [¹⁸F]FDG in radiolabeling reactions using microfluidic technology[J]. Lab Chip, 2013, 13(22): 4290-4294.
- [43] Rashidian M, Keliher E J, Dougan M, et al. Use of ¹⁸F-2-fluorodeoxyglucose to label antibody fragments for immuno-positron emission tomography of pancreatic cancer[J]. ACS Cent Sci, 2015, 1(3): 142-147.