

PET 显像剂¹⁸F-FLT 的合成条件优化

郭先伟¹, 黄丽蓉², 虞善友¹, 陆 铨¹, 王 燕¹, 颜成龙¹,
李新平¹, 黄洪波³, 杨 敏³

(1. 无锡江原安迪科分子核医学研究发展有限公司, 江苏 无锡 214063;

2. 无锡市人民医院, 江苏 无锡 214000;

3. 江苏省原子医学研究所 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063)

摘要: 以 MTR-Nos-Boc-LT(3-N-Boc-5-DMTr-3-Nos-2-脱氧-β-D-胸腺嘧啶核苷)为前体, 利用季铵盐为相转移催化剂, 采用质子溶剂, 摸索更优的¹⁸F-FLT 合成方法。并就合成的¹⁸F-FLT 进行肿瘤鼠的 MicroPET 扫描。研究结果显示, 季铵盐可以取代 K_{2.2.2}/K₂CO₃ 体系, 将 QMA 柱上的¹⁸F 洗脱, 并且是很好的相转移催化剂, 氟化反应中加入质子溶剂, ¹⁸F-FLT 的放化纯度大于 95%, 不矫正合成效率为 50%。

关键词: ¹⁸F-FLT; PET 显像剂; 条件优化

中图分类号: R817 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7512(2011)增刊-0076-04

Synthesis Technology Optimization on PET Imaging Agent ¹⁸F-FLT

GUO Xian-wei¹, HUANG Li-rong², YU Shan-you¹, LU Cheng¹,
WANG Yan¹, YAN Cheng-long¹, LI Xin-ping¹, HUANG Hong-bo³, YANG Min³

(1. Wuxi Molecular Imaging CRO Co., Ltd, Wuxi 214063, China;

2. The people's Hospital of Wuxi, Wuxi 214000, China;

3. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Wuxi 214063, China)

Abstract: 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine (¹⁸F-FLT) was synthesised with MTR-Nos-Boc-LT as precursor, uaternary ammonium salt as phase transfer catalyst, and buffer solution as neutralization solution. MicroPET imaging of A549 tumor in nude mice bearing tumor xenografts was performed by ¹⁸F-FLT. The results showed that uaternary ammonium salt is a good phase transfer catalyst, and can replace K_{2.2.2}/K₂CO₃ and elute ¹⁸F completely from QMA. The radiochemical purity was over 95% and the yield at EOS(end of synthesis) was 50%(uncorrected).

Key words: ¹⁸F-FLT; MicroPET; PET imaging agent; optimization

¹⁸F-FLT 是一种胸腺嘧啶类似物, 能够和胸腺嘧啶一样进入细胞内, 并被细胞质内的人胸苷

激酶-1(Thymidine Kinase-1, TK-1)磷酸化, 但由于 3'端氟原子的置换, 其磷酸化后的代谢产

收稿日期: 2011-10-11; 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101077, 81171399); 卫生部核医学重点实验室开放课题资助项目(KF200982, KF201112)

作者简介: 郭先伟(1986—), 男, 安徽人, 硕士研究生, 放射性药物化学专业

通信作者: 杨敏, 研究员, E-mail: ymzfk@yahoo.com.hk

物不能进一步参与 DNA 的合成,也不能通过细胞膜返回到组织液而滞留在细胞内。肿瘤细胞在增殖的过程中,DNA 的合成需要 TK-1 上调,以加快核苷类底物的合成与利用,因而处于 S 期的细胞 TK-1 活性增强,¹⁸F-FLT PET 可通过反映 TK-1 的活性而间接反映肿瘤细胞的增殖状况,有助于对肿瘤进行良恶性鉴别、疗效评估和预后判断,是具有应用前景的 PET 显像剂^[3,4]。

¹⁸F-FLT 的合成需要前体,目前常用的主要有以下 5 种: 3-N-Boc-5'-O-dimethoxytrityl-3'-O-nosyl-thymidine (3-N-Boc-5-DMTr-3-Nos-2-脱氧-β-D-胸腺嘧啶核苷, MTR-Nos-Boc-LT)、DMTr-lysothymidine、DMTr-Nosyl-lysothymidine、Anhydrothymidine-FLT-precursor、5'-O-Benzoyl-2,3'-anhydrothymidine。其中合成效率最高的是第一种 MTR-Nos-Boc-LT。现有的制备方法合成路线示于图 1。

现有合成¹⁸F-FLT 的条件存在明显不足:1) 合成效率普遍较低,为了提高合成效率,需要的前体用量很大(多在 30~40 mg),且反应慢,而¹⁸F-FLT 的前体价格较高,增加前体用量就增加了合成成本;2) 反应中需加入毒性很高的 K_{2.2.2},

为了去除 K_{2.2.2},现有技术均采用 HPLC 纯化方法,操作繁琐且耗时,而由于¹⁸F⁻的半衰期约为 110 min,延长反应时间会降低合成效率;(3) 采用制备型 HPLC 分离时,有较多的放射性损失在柱上,降低了合成效率,工作量大,不宜推广^[5,6]。

SANG^[7]等利用 Ps-HCO₃ 柱和季铵盐 TBAHCO₃ 进行¹⁸F⁻的捕获和洗脱,加入质子溶剂,研究发现,产品放化产率为 40.8%~60.2% (矫正),用 HPLC 纯化,总合成时间约 70.5 min,放化纯度大于 98%。Tang^[8]等利用色谱柱代替 HPLC 进行¹⁸F-FLT 的纯化,产品放化纯度大于 97%,放化产率为 16%~22% (非矫正)。Nandy 等^[9]利用 Ps-HCO₃ 柱和季铵盐 TBAHCO₃ 进行¹⁸F⁻的捕获和洗脱,以 DMTr-Thy 为前体,并用柱代替 HPLC 进行纯化,¹⁸F-FLT 产品放化产率为 8.48% (非矫正),放化纯度大于 95%。本研究拟用季铵盐 (TEABC) 取代 K_{2.2.2}/K₂CO₃ 体系,并加入质子溶剂 (叔丁醇) 以提高反应效率,摸索高效简捷的¹⁸F-FLT 的合成条件。

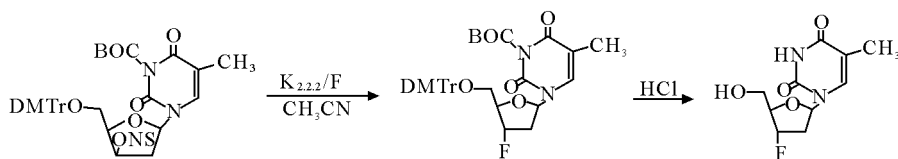


图 1 ¹⁸F-FLT 的合成路线

1 实验材料

1.1 主要仪器与装置

HM-7 医用回旋加速器:日本住友公司; PET-MF-2V-IT-I 型氟多功能合成模块:北京派特生物技术有限公司;高效液相色谱仪:配 1525 Binary 型高效液相泵和 2487 型双波长紫外吸收检测器:美国 Waters 公司产品;放射性检测仪:Perkin Elmer 公司产品;Mini-SCAN 薄板扫描仪:BIOSCAN INC 公司产品;MicroPET:Inveon SIEMENS 公司产品,分辨率为 1.4 mm; SEL-1 型层流架:江苏省苏州市吴县实验动物设施设备厂生产;Lunaire Model BI 0620 M 细胞培养箱:美国 Thero Forma 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

3-N-Boc-5-DMTr-3-Nos-2-脱氧-β-D-胸腺嘧啶核苷:江苏省原子医学研究所应用研究

部提供;无水乙腈:百灵威产品;QMA 柱、Dowex50 柱、C-18 柱:Waters 产品;季铵盐 TE-ABC、叔丁醇:Sigma-Aldrich。其他试剂均为国产分析纯。

非小细胞肺癌细胞株 A549:中国科学院上海细胞研究所提供,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液 (含青霉素 100 mg/L、链霉素 100 mg/L) 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中维持培养。

1.3 实验动物

Balb/c 裸鼠:10 只,体重 18~20 g,4~5 周龄:上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号码 SCXK (沪) 2007-0005,按 SPF 级标准饲养于江苏省原子医学研究所实验动物中心层流架内。

2 实验方法

2.1 ^{18}F -FLT 的制备

设计的合成 ^{18}F -FLT的新路线示于图2。

使用PET-MF-2V-IT-I型氟多功能合成模块制备 ^{18}F -FLT,合成方法如下。

1)由 $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ 反应生成无载体 F^- ,富集在阴离子交换柱(QMA)上;2)0.3 mL水、0.3 mL乙腈、20 μL 季铵盐 TEABC 的混合溶液将 $^{18}\text{F}^-$ 淋洗到反应管中;3)将反应管中的溶液在116 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干,除水干燥;4)向反应管中加入2 mL无水乙腈,在116 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干,

再次除水干燥;5)将20 mg前体 MTR-Nos-Boc-FLT 溶解在2 mL叔丁醇和0.2 mL乙腈中,并将其加入反应管中,在密闭条件下120 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min;6)用氮气吹干反应溶剂,冷却后加入3 mL浓度为1 mol/L的盐酸和0.3 mL乙腈,密闭条件下加热至85 $^{\circ}\text{C}$,反应5 min;7)冷却后,向反应管中加入2.7 mL浓度为1 mol/L的氢氧化钠和2 mL浓度为2 mol/L的乙酸钠缓冲溶液;8)将反应管中溶液依次经Dowex50柱,C-18柱处理,再用5 mL注射用水洗柱,洗脱液经过无菌滤膜后获最终无色透明的产品。

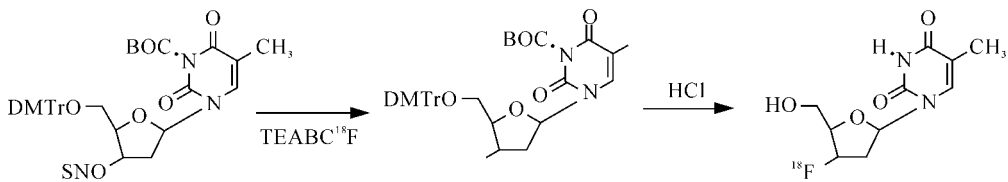


图2 ^{18}F -FLT新合成路线

2.2 ^{18}F -FLT 放化纯度测定

高效液相色谱分析条件:分析柱为汉邦 Li-chrospher C18(150 mm \times 4.6 mm,5 μm),流动相为 $V(\text{乙醇}):V(\text{水})=1:9$,流速0.8 mL/min,流动相用放射性检测仪检测。

薄板扫描分析条件:95%的乙腈溶液,硅胶板,毛细管点样。

2.3 肿瘤鼠的 MicroPET 显像

2.3.1 肿瘤模型鼠的制作 取指数生长期的A549细胞,经消化后,用无血清培养液调整细胞浓度为 $1\times 10^7/\text{mL}$ 。无菌条件下,每只裸鼠右前肢皮下注射200 μL 细胞悬液(含 2×10^6 个细胞)。裸鼠继续饲养于层流架内,接种后5~6周,瘤体直径7~10 mm进行实验。

2.3.2 肿瘤鼠的 MicroPET 显像 取A549肿瘤模型鼠,尾静脉注射0.2 mL(3.7 MBq) ^{18}F -FLT,异氟烷麻醉,平躺在microPET床上,四肢用胶带固定,注射60 min后,扫描采集,图像重

建采用OSEM-3D法。

3 结果与讨论

3.1 ^{18}F -FLT 的放化纯度

^{18}F -FLT的HPLC分析图示于图3。由图2B可见, ^{18}F -FLT的保留时间为8.0 min,与图2A的保留时间基本一致,证明产物即为 ^{18}F -FLT。 ^{18}F -FLT的放化纯度大于95%,放化产率为50%。TLC分析示于图4。由图4可知, ^{18}F -FLT的 R_f 为0.8。

3.2 肿瘤鼠的 MicroPET 显像

肿瘤模型鼠的MicroPET显像图示于图5。由图5可见,肿瘤鼠右侧前肢的肿瘤有明显的放射性浓聚,心、腹腔和膀胱内也有放射性浓聚,尤其是膀胱。初步显像结果显示,用本方法制备的 ^{18}F -FLT进行MicroPET,肿瘤清晰显像,注射本显像剂的小鼠未出现异常变化。

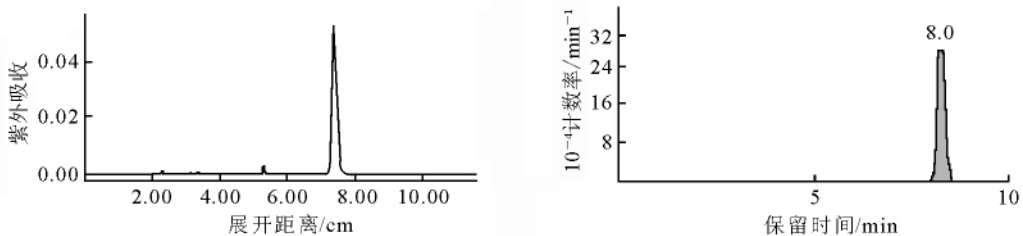
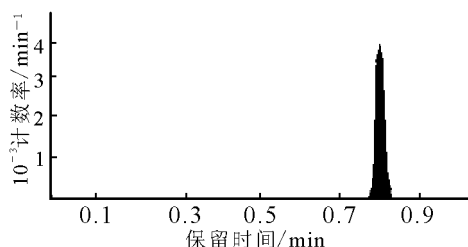


图3 ^{18}F -FLT的HPLC分析图

A—— ^{19}F -FLT; B—— ^{18}F -FLT

图 4 ¹⁸F-FLT 的 TLC 分析图图 5 ¹⁸F-FLT 的 MicroPET 扫描图片

3.3 讨论

本研究用季铵盐 (TEABC) 代替 $K_2.2.2/K_2CO_3$, 仍采用常用的 QMA 柱进行 $^{18}F^-$ 的捕获, 用惰性质子溶剂 (叔丁醇) 溶解前体进行氟化反应, 制备中间体的反应是在密闭条件下进行的, 盐酸水解完之后利用强碱和缓冲溶液进行中和。通过实验, 可以发现仅需要很微量的季铵盐 (20 μL) 就可以将 $^{18}F^-$ 洗脱, 同时还能起到很好的相转移催化作用, 而用惰性质子溶剂确实提高了氟化反应效率, 用小柱纯化产品可缩短时间, 总合成时间约为 30 min。最后合成效率达 50% (非校正), 放化纯度大于 95%。肿瘤鼠的 MicroPET 发现, 本方法的 ^{18}F -FLT 在肿瘤部位具有特异性浓聚。

4 结论

和其它 ^{18}F -FLT 合成工艺相比, 本合成工艺的放化产率较高, 时间较短。以 MTR-Nos-Boc-FLT 为前体, 采用 TEABC 和 QMA 柱取代常用的其它季铵盐反应体系, 如 TABHCO₃ 和 Ps-HCO₃ 柱, 盐酸水解完之后利用强碱和缓冲溶液进行中和。用本方法制备的 ^{18}F -FLT 对 A549 肿瘤模型鼠进行 MicroPET 显像, 肿瘤部位显像清晰, 小鼠注射本显像剂后无异常变化。

本合成工艺适用于现有的 ^{18}F -FLT 的自动化合成系统, 相对于现有合成工艺, 本方法是一

种高产率、简捷和安全的 ^{18}F -FLT 合成方法。目前正在对其中可能所含试剂包括叔丁醇、季铵盐等进行进一步的质量控制研究。

致谢: 感谢江苏省原子医学研究所应用研究部在标记前体中提供的帮助; 感谢江苏省原子医学研究所 Micro PET 室黄洪波在 Micro PET 扫描实验中提供的帮助; 感谢江苏省原子医学研究所徐宇平、潘栋辉、王立振在动物模型构建及数据分析方面提供的帮助。

参考文献:

- [1] Burns HD, Hamill TG, Eng WS, et al. Positron emission tomography neuroreceptor imaging as a tool in drug discovery, research and development [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3(4): 388-394.
- [2] 柳曦, 周乃康, 张锦明, 等. ^{18}F -FLT 在肺癌模型小鼠体内的生物分布及 PET 显像研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(10): 960-962.
- [3] 陆春雄, 王正武, 蒋泉福, 等. ^{18}F -FLT 的制备及其 MicroPET 显像 [J]. *同位素*, 2008, 21(3): 145-149.
- [4] Lukas BB, Albert JHS, David CPC, et al. [^{18}F] FLT-PET in oncology: current status and opportunities [J]. *Europ J Nucl Med Mol Imag*, 2004, 31(12): 1 659-1 672.
- [5] Sang Ju Lee, Seung Jun Oh, Dae Yoon Chi, et al. Comparison of synthesis yields of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine by nucleophilic fluorination in various alcohol solvents [J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2008, 51: 80-82.
- [6] 张锦明, 田嘉禾. 制备 ^{18}F -FLT 的方法: 中国, 200710193785.9 [P]. 2011-03-02.
- [7] Sang Ju Lee, Seung Jun Oh, Dae Yoon Chi, et al. Simple and highly efficient synthesis of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine using nucleophilic fluorination catalyzed by protic solvent [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34: 1 406-1 409.
- [8] Tang Ganghua, Tang Xiaolan, Wen Fuhua, et al. A facile and rapid automated synthesis of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine [J]. *Applied Radiation and Isotopes*, 2010, 68: 1 734-1 739.
- [9] Nandy SK, Rajan MGR. Fully automated and simplified radiosynthesis of [^{18}F]-3'-deoxy-3'-fluorothymidine using anhydro precursor and single neutral alumina column purification [J]. *J Radioanal Nucl Chem*, 2010, 283: 741-748.