

[¹⁸F]-苯丙氟硼酸的制备工艺改进 及初步临床应用

周 明¹, 李玉来¹, 杨能安¹, 李 建¹, 陈小娟², 胡 硕¹

(1. 中南大学湘雅医院 PET 中心, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省肿瘤医院 药学部, 湖南 长沙 410013)

摘要:为优化新型显像剂 [¹⁸F]-苯丙氟硼酸的放射标记工艺及初步临床应用, 本研究以苯丙氟硼酸为底物, 采用同位素交换方法直接标记, 实验组以 pH=2 的 NaCl 溶液为 ¹⁸F⁻ 的淋洗液, 以 Sep-Park Light Al₂O₃ 柱为纯化柱; 对照组以 K_{2.2.2}/K₂CO₃ 溶液为淋洗液, 以 Sep-Park Light C₁₈ 柱为纯化柱。产物质控完成后用胶质瘤细胞系 U87 MG 进行特异性细胞摄取实验, 并对健康志愿者进行 PET/CT 显像。结果表明: 实验组产率和纯化纯度分别是 (10.26 ± 0.42)% 和大于 99%, 对照组产率和纯化纯度分别为 (4.16 ± 0.26)% 和大于 99%, 对照组产品溶液 K_{2.2.2} 残留量大于 50 mg/L。细胞摄取实验中实验组计数率为 (9.6 ± 1.5)/min⁻¹, 阻断组计数率为 (7.5 ± 1.1)/min⁻¹, 游离 ¹⁸F 对照组计数率为 (4.4 ± 0.9)/min⁻¹。健康志愿者 PET 显像结果提示, 该显像剂在体内血液中清除很快, 主要通过肾脏排泄, 脑等其他脏器均无明显摄取。结果显示, 改良 [¹⁸F]-苯丙氟硼酸的标记方法不仅产率明显高于传统标记方法, 质控检测项目以及检测结果也具有一定的优越性。此外, 较好的细胞摄取率和体内分布也提示该显像剂有可能成为诊断脑胶质瘤等肿瘤疾病的良好显像剂。

关键词: 苯丙氟硼酸; ¹⁸F 放射性标记; PET/CT; 胶质瘤

中图分类号: TL92+3; R817.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2020)03-0167-06

doi: 10.7538/tws.2018.youxian.099

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Modified Synthesis and Clinical Trial of [¹⁸F]-Phe-BF₃

ZHOU Ming¹, LI Yulai¹, YANG Neng'an¹, LI Jian¹,
CHEN Xiaojuan², HU Shuo¹

(1. PET Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

2. Department of Pharmacy, Hunan Cancer Hospital, Changsha 410013, China)

Abstract: To improve the technology of fluorine-18 labelling of (1-ammonio-2-phenylethyl)trifluoroborate (Phe-BF₃). Phe-BF₃ was labelled by isotope exchange. Experimental groups used sodium chloride aqueous solution (pH=2) to elute fluorine-18 and the product solution was collected when the reaction system passed through an alumina cartridge; Control groups used K_{2.2.2}/K₂CO₃ solution to elute fluorine-18 and the product was concentrated by a C₁₈ cartridge first. Then, the product was eluted by 2 mL ethyl alcohol. After quality control, we used U87 glioma cells to study the specific

binding experiment and then we performed PET imaging on healthy volunteers. The radiochemical yield of experimental groups was 10.6%, 9.78% and 10.4% and that of control groups were 3.86%, 4.28% and 4.33%. The radiochemical purity was more than 99% and the concentration of $K_{2.2.2}$ was more than 50 mg/L in control group. In the cell experiment, experimental group cell counting rate was $(9.6 \pm 1.5)/\text{min}^{-1}$, block group was $(7.5 \pm 1.1)/\text{min}^{-1}$ and control group was $(4.4 \pm 0.9)/\text{min}^{-1}$. What's more, PET imaging results indicated the imaging agent mainly cleared by the kidneys and had no adverse effects in volunteers. The radiochemical yield and safety of experimental groups was obviously better. The results of cell uptake and PET imaging implied that ^{18}F -Phe- BF_3 has the potential to be a good imaging agent for tumor diseases such as glioma.

Key words: Phe- BF_3 ; fluorine radio labelling; PET/CT; glioma

氨基酸是肿瘤增殖过程的必需营养物质,利用放射性核素标记氨基酸类似物作为显像剂,对肿瘤进行特异性显像是近些年的研究热点^[1-4]。由于氨基酸结构的特殊性,用 ^{11}C 或 ^{18}F 直接标记产率低、稳定性差^[5],而 Al^{18}F 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等都会对原有分子结构有较大改变,容易导致标记分子的靶向性降低、毒性变大^[6]。氟硼酸结构是一种与 α -氨基酸结构极其类似的结构,研究表明,用氟硼酸结构取代 α -氨基酸结构后化合物的药代行为与原来氨基酸非常相似,因此可以用氟硼酸类化合物代替氨基酸类化合物进行放射性标记用于肿瘤的显像研究^[7-9]。

目前 ^{18}F 标记氟硼酸类显像剂主要采用氨基聚醚碳酸钾溶液进行淋洗,通过固相萃取纯化,产率较低,终末产品需要检查氨基聚醚和乙腈等有害物质的残留^[9]。本研究拟对现有的标记工艺进行部分优化,以获得更加安全、高效的放射性 ^{18}F 标记氟硼酸类显像剂,并研究其在 U87 MG 细胞中的摄取情况,及在健康受试者体内分布情况,为下一步的临床应用奠定基础。

1 设备与材料

1.1 设备

PET/CT:美国 GE Discover Elite;回旋加速器:美国 GE Qilin;氟多功能药物合成模块:派特(北京)科技;Radio-TLC 仪:美国 Bioscan 公司;CRC-25R 型活度计:美国 Capintec 公司;Radio-HPLC 仪、分析型 C18 柱(5 μm , 4.6 mm \times

250 mm);美国 Agilent 公司; γ 放射免疫分析仪:北京核海高技术有限公司。

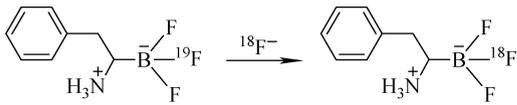
1.2 材料

标记前体苯丙氟硼酸由陈小元教授和刘志博教授惠赠;氨基聚醚(kryptofix2.2.2, $K_{2.2.2}$)/ K_2CO_3 溶液:派特(北京)科技;Sep-Park Light Al_2O_3 柱、Sep-Park Light C_{18} 柱:美国 Waters 公司;Millex.GS 无菌过滤器(0.22 μm):美国 Millipore 公司;色谱纯乙腈:上海凌峰化学试剂有限公司; ^{18}O - H_2O :江苏华益;U87 MG 细胞:中南大学细胞实验中心。

2 实验方法

2.1 对照组苯丙氟硼酸常规标记方法

1) 采用 GE 公司 Qilin 医用质子回旋加速器进行 $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ 反应生成 $^{18}\text{F}^-$,加速器束流为 50 μA ,轰击时间为 20 min;2) 将步骤 $^{18}\text{F}^-$ 经管道传输至 Sep-Park Light QMA 上并被 QMA 捕获;3) 反应管中加入 0.2 mL 浓度为 500 mmol/L 的苯丙氟硼酸乙醇溶液和 0.2 mL pH 为 2.5 的哌嗪-盐酸缓冲液;4) 用 $K_{2.2.2}/\text{K}_2\text{CO}_3$ 的混合溶液 0.5 mL $^{18}\text{F}^-$ 淋洗至安瓿瓶中,并取 100 μL 加入到反应瓶中;5) 80 $^\circ\text{C}$ 条件下苯丙氟硼酸溶液与 $^{18}\text{F}^-$ 进行核素交换反应(如图 1);6) 20 min 后反应体系加入去离子水 5 mL 进行淬灭反应;7) 淬灭反应后的体系直接过 Sep-Park Light C_{18} 柱纯化,并用 10 mL 水清洗 C_{18} 柱;8) 用 50% 的乙醇溶液 5 mL 淋洗 C_{18} 柱即得 [^{18}F]-苯丙氟硼酸溶液([^{18}F]-Phe- BF_3)。

图1 [¹⁸F]-苯丙氟硼酸合成路线图Fig. 1 Synthetic route of [¹⁸F]-Phe-BF₃

2.2 实验组苯丙氟硼酸标记方法

1) ¹⁸F⁻生产与捕获方式与实验组相同,反应管中加入0.2 mL浓度为500 mmol/L的苯丙氟硼酸乙醇溶液;2)用pH=2的盐酸氯化钠溶液0.5 mL将¹⁸F⁻淋洗至安瓿瓶中,并取100 μL加入到反应瓶中;3)80 °C条件下苯丙氟硼酸溶液与¹⁸F⁻进行同位素交换反应;4)20 min后反应体系加入5 mL去离子水进行淬灭反应;5)淬灭反应后的体系直接过Sep-Park Light Al₂O₃柱纯化得产品溶液,比活度为(6.11±0.25) MBq/μmol。

2.3 [¹⁸F]-苯丙氟硼酸质量控制

对产品溶液的理化性质、放化纯度、细菌、内毒性等质控指标进行测定(参考2015版药典)。对比放射性产物[¹⁸F]-苯丙氟硼酸与反应原料[¹⁹F]-苯丙氟硼酸(标准品)HPLC保留时间,确定放射性产物纯度的流动相为0~2 min,5%乙腈;2~10 min,20%乙腈;10~15 min,100%乙腈。

2.4 细胞摄取实验

为了确定显像剂[¹⁸F]-苯丙氟硼酸是否与肿瘤细胞有靶向性,选用U87 MG人胶质瘤细胞,分为三组,其中实验组为[¹⁸F]Phe-BF₃,阻断组为[¹⁸F]-Phe-BF₃+Phe-BF₃,游离¹⁸F⁻为对照组。实验组细胞经PBS清洗三次,加入显像剂[¹⁸F]-Phe-BF₃ 2.96 MBq,孵育1 h,再用PBS清洗三次后加0.5 mL 1 mol/L NaOH,最后收集细胞液测γ计数;阻断组细胞经PBS清洗三次,加入Phe-BF₃(500 mg/L),孵育0.5 h后,加显像剂2.96 MBq,再孵育1 h,然后PBS清洗三次后,加0.5 mL 1 mol/L NaOH,收集细胞液测γ计数;对照组加游离¹⁸F⁻ 2.96 MBq,孵育1 h, PBS清洗三次后加0.5 mL 1 mol/L NaOH,最后收集细胞液测γ计数。各组保持最终体积一致。

2.5 PET 显像

2.5.1 受试人群 共招募志愿者3人,其中男

性1人,女性2人,年龄在56~60岁,中位年龄57岁,3人体检无器质性疾病。该项目已通过医院伦理委员会批准(201601007),检查前告知受检者并签署知情同意书。

2.5.2 显像方法 受检者仰卧于PET/CT检查床,静脉注射[¹⁸F]-苯丙氟硼酸4.44 MBq/kg后,分别于5、15、30、45、60、75、90 min,分别进行PET/CT静态扫描,先进行CT扫描,扫描范围及顺序为脑部-盆腔,然后立即进行PET采集,采集范围同CT,采集顺序为盆腔-脑部,共8个床位,每个床位15.7 cm,每个床位间重叠3.7 cm,PET采集方法采用3D-TOF序列,CT扫描管电压为120 kV、自动mAs、螺距为0.984:1、矩阵512×512,PET矩阵256×256,CT及PET层厚均为3.75 mm。

2.5.3 图像重建和数据处理 PET图像重建均用有序子集最大期望值迭代(OSEM)法,得到三维图像及横断、冠状、矢状断层图像。将PET和CT图像传到GE AW 4.6后处理工作站,进行帧对帧图像对位融合,在健康志愿者脑、肺、心脏、肝脏、脾脏、胰腺、肾实质、膀胱、肌肉及骨髓等处分别勾画感兴趣区(ROI)的放射性摄取,取ROI区内放射性计数平均值即平均标准摄取值(SUV),所有ROI测量3次取平均值,计算SUV,根据公式SUV=病灶的放射性浓度(kBq/mL)/注射剂量(MBq)/体重(kg),由AW 4.6后处理工作站完成。

3 实验结果

3.1 质量控制

1)理化性质:各三批产品均为无色透明溶液,pH均为6到7之间。2)K_{2.2.2}残留:对照组产品溶液中K_{2.2.2}均大于50 mg/L。3)细菌内毒素:参考2015版药典进行细菌、内毒素检测,结果表明,细菌和内毒素均未检出。4)放化纯度:实验组产品溶液利用HPLC检测纯度,实验结果表明产品化合物放化纯度大于99%,无明显杂质峰(如图2)。

3.2 放化产率对比

实验组和对照组各实验三次,结果对照组产率为(4.16±0.26)%,实验组产率为(10.26±0.42)%(P=0.000 03),差异具有统计学意义,如表1所示。

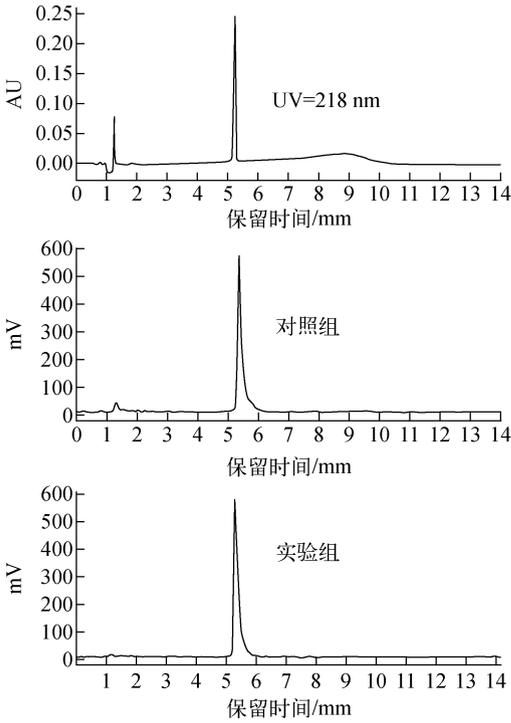


图2 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸产品
溶液纯化纯度 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of $[^{18}\text{F}]$ -Phe- BF_3

表1 $[^{18}\text{F}]$ 苯丙氟硼酸产率比较

Table 1 The yield comparison of $[^{18}\text{F}]$ -Phe- BF_3

	$^{18}\text{F}^-$ /mCi	$[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸/mCi	产率
对照组	168.2	7.2	4.28%
	173.1	7.5	4.33%
	168.2	6.5	3.86%
实验组	152.8	16.2	10.6%
	161.5	15.8	9.78%
	168.3	17.5	10.4%

注:对照组和实验组差异显著, $P < 0.01$

3.3 细胞摄取实验

孵育 1 h 后, U87 MG 人胶质瘤细胞系 $[^{18}\text{F}]$ -Phe- BF_3 计数率为: 实验组 $(9.6 \pm 1.5) / \text{min}^{-1}$, 阻断组 $(7.5 \pm 1.1) / \text{min}^{-1}$, 游离 ^{18}F 对照组 $(4.4 \pm 0.9) / \text{min}^{-1}$ 。计算摄取值, 实验组与阻断组 ($P = 0.007$)、实验组与游离 ^{18}F 对照组 ($P = 0.008$) 的差异均具有显著统计学意义(图 3)。

3.4 PET 显像

3 名健康志愿者均成功完成显像。注射显

像剂后随访至 24 h(10 个半衰期), 志愿者均未出现任何不良反应。受试者注射显像剂 5、10、15、30、60、90 min 后显像, 可见 5 min 时显像剂在心、肝、脾、胰腺、骨髓等脏器浓聚, 随着时间延长, 在心脏、肝脏、脾脏、胰腺、肾实质及骨髓中摄取随时间逐渐减低, 至 30 min 后接近本底(图 4)。而 $[^{18}\text{F}]$ 苯丙氟硼酸在不同相人体脑组织及肺组织中放射性摄取均很低(图 5), 表明该显像剂在正常脑组织中本底低, 有利于显示高摄取的病灶, 同时该显像剂主要通过泌尿系统排泄, 在肾盂、输尿管及膀胱中呈高摄取。

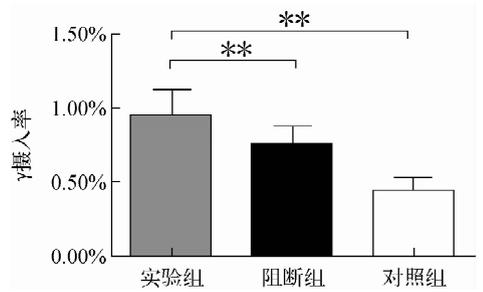


图3 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸细胞摄取实验

Fig. 3 $[^{18}\text{F}]$ -Phe- BF_3 uptake by U87 MG cells

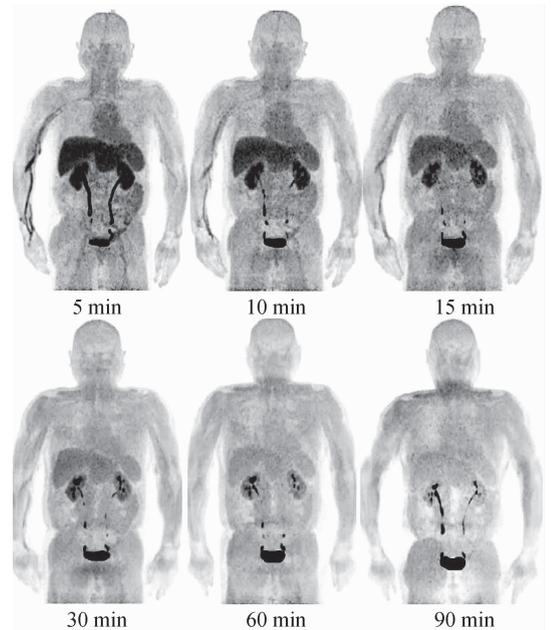
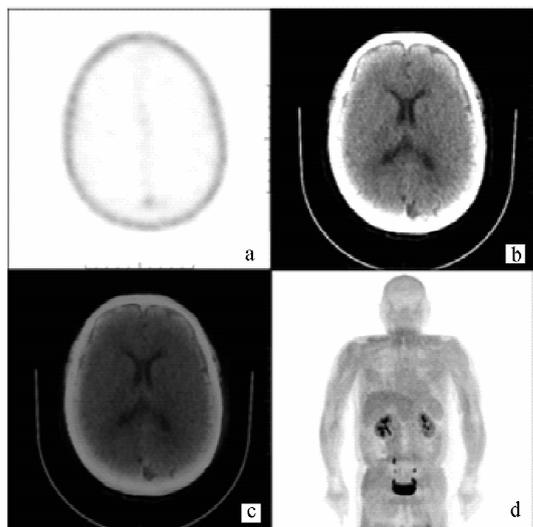


图4 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸在人体动态 PET 显像图

Fig. 4 The PET dynamic imaging
of $[^{18}\text{F}]$ -Phe- BF_3 in human



a——PET image;b——CT image;c——PET/CT image;
d——PET/CT whole-body image

图5 脑部PET/CT断层及融合图像

a——PET image;b——CT image;c——PET/CT image;
d——PET/CT whole-body image

Fig. 5 PET/CT brain tomography (CT) and fusion image

4 讨论

本研究首次尝试在 $[^{19}\text{F}]$ 氟硼酸标记过程中,用盐酸氯化钠溶液洗脱 $^{18}\text{F}^-$,既避免了为保证反应浓度对反应 $^{18}\text{F}^-$ 的浓缩,也避免了将 $^{18}\text{F}^-$ 传输至浓缩管再转至反应管过程中的损失;同时,采用盐酸氯化钠溶液作为淋洗 $^{18}\text{F}^-$ 溶液,不仅可以很好的实现对 $^{18}\text{F}^-$ 的淋洗,还保证反应过程中的酸性要求。此外,盐酸氯化钠溶液作为 $^{18}\text{F}^-$ 淋洗液,相比氨基聚醚碳酸钾溶液明显具有更高的安全性,反应体系也无需额外纯化步骤,经简单的直接稀释过柱即可直接用于人体,安全系数高,而且产品无需检查氨基聚醚和乙腈等有机物的残留。

细胞摄取实验结果中,加 $[^{19}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸作为抑制剂的实验组与单纯的 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸实验组相比细胞摄取计数差别不是很大,原因有可能是 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸产品溶液中的 $[^{19}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸含量高,因为核素交换反应一般产率都不高,而且反应前体与产品因为结构一样也很难纯化分离,产品 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸中含有的部分 $[^{19}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸已经对细胞摄取产生了较强的抑制作用,再额外

加入 $[^{19}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸作为抑制剂效果可能不太明显。

通过健康志愿者 ^{18}F -苯丙氟硼酸PET/CT连续显像发现,该显像剂在正常脑组织中所有采集时像中放射性摄取均很低,表明该显像在正常脑组织中本底很低,而通过细胞摄取实验发现U87 MG人胶质瘤细胞能特异性摄取 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸,因此可以预见胶质瘤将呈高的放射性摄取,而这将为临床胶质瘤诊断提供有力的影像学支持。同时, $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸在肺组织中分布较少,而在心脏、肝脏、脾脏、胰腺、肾实质及骨髓中摄取随时间逐步减低,至30 min后基本接近本底,说明注射显像剂后30 min即可以开始显像。 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸主要通过泌尿系统排泄,因此检查结束后大量饮水可以让显像剂尽快排出体外,减少人体所受辐射。人体动态显像提示,该显像剂能够较快的进行代谢分布,并且全身实质脏器摄取较低,主要通过泌尿系统排泄,提示 $[^{18}\text{F}]$ -苯丙氟硼酸未来用于临床显像时背景干扰小,很可能作为一种有效的新型显像剂用于临床研究。

参考文献:

- [1] Liu B, Du H, Rutkowski R, et al. LAAT-1 is the lysosomal lysine/argininetransporter that maintains amino acid homeostasis[J]. Science, 2012, 337(6092): 351-354.
- [2] Geier E G, Schlessinger A, Fan H, et al. Structurebased ligand discovery for the large-neutral amino acid transporter 1, LAT-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(14): 5 480-5 485.
- [3] Yelshanskaya M V, Li M, Sobolevsky A I. Structure of an agonist-bound ionotropic glutamate receptor[J]. Science, 2014, 345(6 200): 1 070-1 074.
- [4] Bhutia Y D, Babu E, Ramachandran S, et al. Amino acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs[J]. Cancer Res, 2015, 75(9): 1 782-1 788.
- [5] Meconathy J, Goodman M. Non-natural amino acids for tumor imaging using positron emission tomography and single photon emission computed tomography[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008,

- 27(4): 555-573.
- [6] Perrin D M. [^{18}F]-Organotrifluoroborates as radioprosthetic groups for PET imaging: from design principles to preclinical applications[J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49 (7): 1 333-1 343.
- [7] Liu Zhibo, Pourghiasian M, Radtke M A, et al. An organotrifluoroborate for broadly applicable one-step ^{18}F -labeling[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 11 876-11 880.
- [8] Liu Zhibo, Chao Daniel, Li Ying, et al. From minutes to years: predicting organotrifluoroborate solvolysis rates[J]. *Chemistry*, 2015, 21 (10): 3 924-3 928.
- [9] Liu Zhibo, Chen Haojun, Chen Kai, et al. Boramino acid as a marker for amino acid transporters[J]. *Sci Adv*, 2015, 1(8): 1-7.
- [10] 张现忠,李化,黄路梅,等. 一种放射性标记的肿瘤显像剂、其制备方法和应用:中国,201610307569.1 [P]. 2016-09-28.