

^{18}F -FDOPA 的自动化标记合成与动物实验

赵震宇 张思伟 张朋俊 金志铭 张颖冬 王峰

210006 南京医科大学附属南京医院、南京市第一医院核医学科(赵震宇、张朋俊、王峰),神经内科(张颖冬);215522 常熟,江苏华益科技有限公司药物研发部(张思伟、金志铭)

通信作者:王峰, Email: fengwangcn@njmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.06.007

【摘要】 目的 制备 L - ^{18}F -多巴(^{18}F -FDOPA)并探讨其在小鼠体内生物分布及药代动力学,评价其探测胰岛素瘤的可行性。**方法** 采用亲核反应三步法合成 ^{18}F -FDOPA,测定其标记率、放化纯及体外稳定性。注射后 2、5、15、30、60 和 120 min 分别处死正常小鼠(每时间点 3 只)获得主要脏器的放射性计数,行 microPET 动态观察 ^{18}F -FDOPA 在正常小鼠体内的生物分布。建立胰岛素瘤 INS-1 细胞株荷瘤裸鼠模型,行 microPET 动态扫描;勾画感兴趣区(ROI),获得正常小鼠主要脏器及荷瘤裸鼠肿瘤时间-放射性曲线(TAC)。**结果** ^{18}F -FDOPA 标记合成产率为 $(11.0\pm 0.4)\%$,放化纯为 $(99.3\pm 0.2)\%$,室温放置 120 min 放化纯仍 $>99\%$ 。 ^{18}F -FDOPA 主要经肾脏排泄,血液内清除较快;注射后 20~50 min 胰腺摄取相对稳定,2 个时间点摄取分别为 (5.98 ± 0.71) 和 (4.62 ± 0.47) 每克组织百分注射剂量率($\% \text{ID/g}$)。INS-1 肿瘤早期相(2 min)有显著放射性摄取 $[(11.42\pm 0.70)\% \text{ID/g}]$ 。**结论** ^{18}F -FDOPA 标记合成方法简单、放化纯高、稳定性好;早期显像有利于胰岛素瘤的检出。

【关键词】 左旋多巴;同位素标记;氟放射性同位素;胰岛素瘤;正电子发射断层显像术;小鼠

基金项目:江苏省重点研发专项基金(BE2017612, BL2014014)

Automated radiolabeling and in vivo evaluation of ^{18}F -FDOPA Zhao Zhenyu, Zhang Siwei, Zhang Pengjun, Jin Zhiming, Zhang Yingdong, Wang Feng

Department of Nuclear Medicine, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China (Zhao ZY, Zhang PJ, Wang F); Department of Neurology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China (Zhang YD); Department of Drug Research, Jiangsu Huayi Technology Co. Ltd., Changshu 215522, China (Zhang SW, Jin ZM)

Corresponding author: Wang Feng, Email: fengwangcn@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To synthesize ^{18}F -fluoro- L -3,4-dihydroxyphenylalanine (^{18}F -FDOPA) and evaluate its biodistribution and kinetics in mice, in order to explore its feasibility for insulinoma detection. **Methods** ^{18}F -FDOPA was synthesized by a three-step nucleophilic reaction. Radiolabeling yield, radiochemical purity and stability *in vitro* were analyzed. Normal mice were sacrificed at 2, 5, 15, 30, 60 and 120 min postinjection to measure radioactive counts in main organs. Biodistribution and kinetics were evaluated by dynamic microPET in normal mice. The insulinoma tumor (INS-1) model was established and dynamic microPET was performed immediately after intravenous injection and stopped at 60 min. Region of interest (ROI) was drawn to access time-activity curve (TAC) in main organs and insulinoma. **Results** ^{18}F -FDOPA was prepared with radiochemical yield of $(11.0\pm 0.4)\%$, radiochemical purity of $(99.3\pm 0.2)\%$. The radiochemical purity was still $>99\%$ after being stored for 120 min at room temperature. Predominant uptake of ^{18}F -FDOPA was in the kidneys, and was cleared rapidly in blood. Pancreas showed stable uptake from 20 to 50 min, which was (5.98 ± 0.71) percentage activity of injection dose per gram of tissue ($\% \text{ID/g}$) at 20 min and $(4.62\pm 0.47)\% \text{ID/g}$ at 50 min postinjection, respectively. ^{18}F -FDOPA showed high affinity to tumor tissue of insulinoma $[(11.42\pm 0.70)\% \text{ID/g}]$ at 2 min. **Conclusions** ^{18}F -FDOPA could be easily synthesized in short total reaction time with high radiochemical purity and stability. Early phase imaging of ^{18}F -FDOPA may be helpful for insulinoma detection.

【Key words】 Levodopa; Isotope labeling; Fluorine radioisotopes; Insulinoma; Positron-emission tomography; Mice

Fund program: Key Research and Development Program of Jiangsu Province(BE2017612, BL2014014)

L -6- ^{18}F -多巴(6- ^{18}F fluoro- L -3,4-dihydroxyphenylalanine, ^{18}F -FDOPA)是儿茶酚胺前体左旋多巴

(levodopa, L -DOPA)类似物,其反映的中枢神经系统多巴胺代谢是确定帕金森病中突触前多巴胺能神

神经元变性程度的有效手段^[1],其对神经内分泌肿瘤也有很好的诊断价值^[2]。胰岛素瘤是最常见的功能性胰腺神经内分泌肿瘤,外科手术切除是治愈胰岛素瘤的有效手段^[3],而术前精确定位尤为重要。由于胰岛素瘤较小且可多发,常规影像学检查灵敏度和准确性均受到影响,功能影像检查对明确肿瘤定位有一定的辅助作用。本研究合成¹⁸F-FDOPA 并探讨其在正常小鼠体内的生物分布情况及其探测胰岛素瘤的可行性,现报道如下。

材料与方法

一、实验仪器与材料

1.实验设备。放射性合成模块(Neptis mosaic RS 公司,比利时);Sep-Pak C18 Plus Light 固相萃取柱(Waters 公司,美国);microPET/CT 仪(Inveon, Siemens 公司,德国); γ 放射免疫计数器(PerkinElmer 公司,美国);高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC; LC-20AT, 岛津公司,日本);XBridge BEH C18 OBD 半制备柱(10 mm $\times$ 250 mm, 5.0 μ m)。

2.实验试剂。前体 3-(5-甲酰基-4-苄氧基-2-硝基苯)-2-(氨基甲酸叔丁酯)-*N*-甲基-*N*-苯基丙酰胺{[2-(4-benzyloxy-5-formyl-2-nitro-phenyl)-1-(methyl-phenyl-carbamoyl)-ethyl]-carbamic acid tert-butyl ester, NDOPA} 和¹⁸F⁻由江苏华益科技有限公司提供;氨基聚醚(kryptofix, K222; Sigma 公司,美国);甲醇、乙腈(Merck 公司,美国);其他为国产分析纯(南京布克生物技术有限公司)。

3.细胞株及实验动物。INS-1 胰岛素瘤细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。雄性 ICR 小鼠 21 只,4~6 周龄,体质量(20 $\pm$ 2) g;BALB/c 裸鼠 6 只,4~6 周龄,体质量(20 $\pm$ 2) g;均来自常州卡文斯实验动物有限公司,动物证号分别为 201703198 和 201703940。实验动物均由本院实验动物中心提供。动物实验经南京医科大学伦理委员会批准。

二、实验方法

1.荷瘤裸鼠模型的建立。将 INS-1 胰岛素瘤肿瘤细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 INS-1 专用

培养液,37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱培养,当细胞增殖>80%时传代。收集对数生长期 INS-1 细胞并制成悬液,调整细胞浓度至 5 $\times$ 10⁷/ml,于 BALB/c 裸鼠右前肢腋下注射 INS-1 细胞悬液 0.1 ml/只,无菌饲养,待肿瘤直径至 1.0 cm 时行 microPET 显像。

2. ¹⁸F-FDOPA 的制备。制备过程参照文献[4]加以改进,并引入一次性卡套及试剂盒,即回收氧水至 QMA 柱,将¹⁸F⁻淋洗至反应瓶 1(甲醇 0.64 ml,水 0.16 ml, K222 12 mg, K₂CO₃ 3.5 mg),彻底蒸干后加入前体 NDOPA 溶液[10 mg 溶于 1 ml 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)],130 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 10 ml 水稀释反应液后转移过 C18 柱,将中间体吸附在 C18 柱上,用水冲洗掉反应溶剂和无机盐等,期间将反应瓶 1 用 10 ml 水清洗 2 次并转移过 C18 柱,再将反应瓶 1 用 2 ml 乙腈依次清洗 2 次,并加热烘干,用 2 ml 乙腈将上述中间体洗回反应瓶 1,蒸干上述中间体,加入间氯过氧苯甲酸反应(20 mg *m*-CPBA 溶于 1 ml 乙腈),70 $^{\circ}$ C 反应 5 min,蒸干乙腈,加入氢碘酸水解反应,150 $^{\circ}$ C 反应 15 min,再进制备色谱分离,收集所需产品。合成路线图见图 1。

3. ¹⁸F-FDOPA 的质量控制及稳定性。采用 HPLC 分析放化纯:等度洗脱,流动相:205 mg 乙酸钠+100 mg 抗坏血酸+0.5 ml 醋酸溶于 500 ml 水,流速 1.0 ml/min,紫外检测波长 283 nm,放射性探测器灵敏度 1 mmol/L。将标记产物置于室温下,分别于标记后 30、60 和 120 min 测定其放化纯评估稳定性。

4. ¹⁸F-FDOPA 在正常小鼠体内的生物分布。取健康雄性 ICR 正常小鼠 18 只,采用抽签法将其随机分 6 组(每组 3 只),尾静脉注射¹⁸F-FDOPA 3.7 MBq,分别在注射后 2、5、15、30、60 和 120 min 颈椎脱臼处死,分离脏器并测定放射性摄取值[每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)]。

5. MicroPET 动态显像。取正常小鼠及肿瘤大小均匀的荷瘤裸鼠各 3 只,麻醉后经尾静脉注入 3.7 MBq ¹⁸F-FDOPA 后显像:能峰 350~650 keV,动态连续采集 60 min,数据经衰减校正,获得正常小鼠及荷瘤裸鼠¹⁸F-FDOPA 显像图。勾画正常小鼠主要脏器及荷

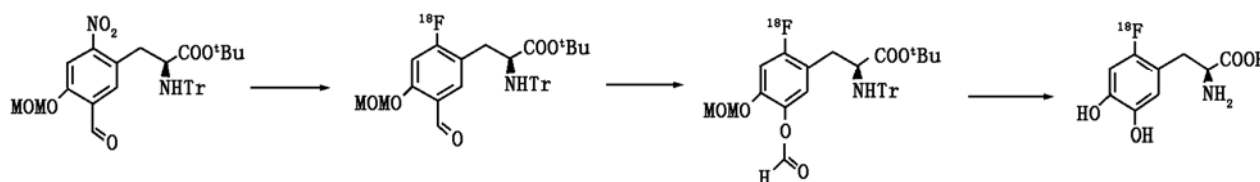


图 1 L-6-¹⁸F-多巴(¹⁸F-FDOPA)合成路线图

瘤裸鼠肿瘤感兴趣区(region of interest, ROI), 获得时间-放射性曲线(time-activity curve, TAC)。以左心室放射性作为全血的放射性, 在 CT 解剖图像上勾画左侧 1/2 心脏的 ROI 获取左心室 TAC。分别选取正常小鼠注射后 55~60 min 的图像数据及荷瘤裸鼠注射后 5、10、15、30 和 60 min 的图像数据进行重建, 得到相应的静态图像。

三、统计学处理

采用 GraphPad Prism 6 软件进行分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1. ^{18}F -FDOPA 的制备结果。 ^{18}F -FDOPA 的总反应时间(含制备纯化)约为 55 min, 产品为无色澄明液体, pH 值约 4.4; 产率为 $(11.0 \pm 0.4)\%$ 。HPLC 结果示, 放射性出峰时间为 10.0 min, 在保留时间内未见游离氟离子吸收峰, 放化纯为 $(99.3 \pm 0.2)\%$; 室温放置 120 min 时放化纯仍 $>99\%$ 。

2. 正常小鼠的体内生物分布。 ^{18}F -FDOPA 在正常小鼠的体内分布见表 1。早期相(2 min) ^{18}F -FDOPA 在血液和肾脏的放射性摄取分别为 (6.58 ± 1.29) 和 $(26.96 \pm 10.24) \% \text{ID/g}$, 延迟相(60 min)放射性摄取减低至 (0.17 ± 0.01) 和 $(1.10 \pm 0.13) \% \text{ID/g}$, 表明 ^{18}F -FDOPA 主要通过肾脏排泄, 血液内清除较快。胰腺对 ^{18}F -FDOPA 有较高的放射性摄取, TAC 示胰腺在注射后 3 min 达最大放射性摄取值, 为 $(9.28 \pm 0.74) \% \text{ID/g}$, 在注射后 20~50 min 放射性摄取变化不大, 20 与 50 min 时分别为 (5.98 ± 0.71) 和 $(4.62 \pm 0.47) \% \text{ID/g}$; 肌肉

等软组织本底较低且清除较快, 提示 ^{18}F -FDOPA 对于胰腺有较好的显像效果。正常小鼠 microPET 显像可见注射后 60 min 胰腺显影(图 2)。

3. 荷瘤裸鼠 microPET 显像(图 3)。 ^{18}F -FDOPA 注射后 5、10 和 15 min, 胰岛素瘤摄取显影。TAC 示肿瘤在注射后 2 min 达最大放射性摄取值, 为 $(11.42 \pm 0.70) \% \text{ID/g}$, 12 min 时降至 $(6.66 \pm 0.50) \% \text{ID/g}$, 表明胰岛素瘤对 ^{18}F -FDOPA 有亲和性。但由于富血供病变清除较快, 推测注射 ^{18}F -FDOPA 后早期(5~15 min)是肿瘤最佳显影窗。

讨 论

^{18}F -FDOPA 的合成有亲电氮化反应和亲核氟化反应 2 种, 后者是目前合成研究的主要方向^[5]。有报道^[6]应用铜盐催化、以芳基硼酸脂类为标记前体, 合成 ^{18}F -DOPA 已实现自动化, 且放化纯 $>98\%$, 但铜盐催化剂具有一定的细胞毒性。本研究以硝基为前体、通过核素置换、自动化模块合成 ^{18}F -FDOPA, 操作简单, 过程简化, 并将总反应时间缩短至 55 min (含制备纯化), 放化纯为 $(99.3 \pm 0.2)\%$; 另外采用一次性卡套、试剂盒式生产, 可有效避免污染和交叉污染, 重复性好。本研究合成的 ^{18}F -FDOPA 的放化产率为 $(11.0 \pm 0.4)\%$, 与文献^[5]报道的合成 ^{18}F -FDOPA 总放化产率有一定差距, 因此仍需进一步改进, 但对 ^{18}F -FDOPA 应用于临床仍有一定的推动作用。

^{18}F -FDOPA 主要经肾脏快速排泄, 心脏、肺、肝脏有一定放射性摄取且清除迅速; 肌肉等软组织本底摄取较低; 胰腺对 ^{18}F -FDOPA 有较高摄取, microPET 示

表 1 L -6- ^{18}F -多巴注射后不同时间在正常小鼠体内的生物分布

器官或组织	注射后不同时间的放射性摄取值($\% \text{ID/g}$; $\bar{x} \pm s$)					
	2 min	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
血	6.58 ± 1.29	1.10 ± 0.14	0.65 ± 0.16	0.37 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.09 ± 0.01
脑	0.73 ± 0.16	0.57 ± 0.07	0.35 ± 0.09	0.20 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.02
心	2.76 ± 0.47	0.75 ± 0.01	0.59 ± 0.08	0.31 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.13 ± 0.02
肝	1.77 ± 0.55	2.15 ± 0.55	1.98 ± 0.51	1.21 ± 0.32	0.51 ± 0.01	0.24 ± 0.09
脾	2.26 ± 0.81	0.98 ± 0.21	0.64 ± 0.10	0.33 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.12 ± 0.03
肺	2.55 ± 0.69	0.89 ± 0.29	0.52 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.40 ± 0.06	0.20 ± 0.12
肾	26.96 ± 10.24	5.41 ± 0.20	3.43 ± 0.14	2.41 ± 0.62	1.10 ± 0.13	0.88 ± 0.12
胃	2.78 ± 0.66	1.42 ± 0.14	0.76 ± 0.02	0.59 ± 0.32	0.28 ± 0.03	0.21 ± 0.05
肠	5.48 ± 0.26	4.63 ± 0.84	3.87 ± 0.82	1.54 ± 0.63	0.68 ± 0.15	0.45 ± 0.03
肌肉	1.51 ± 0.49	1.05 ± 0.10	0.79 ± 0.23	0.56 ± 0.13	0.40 ± 0.03	0.35 ± 0.06
胰腺	9.04 ± 2.92	8.30 ± 2.71	5.18 ± 1.75	4.63 ± 1.33	3.09 ± 0.73	1.26 ± 0.04
脂肪	1.50 ± 0.29	1.36 ± 0.69	1.02 ± 0.38	0.64 ± 0.27	0.52 ± 0.03	0.40 ± 0.25
骨	4.28 ± 0.42	1.62 ± 0.13	1.45 ± 0.04	1.24 ± 0.61	1.10 ± 0.18	0.62 ± 0.29
性腺	1.64 ± 0.33	0.96 ± 0.06	0.64 ± 0.22	0.59 ± 0.15	0.45 ± 0.14	0.24 ± 0.08
肾上腺	12.41 ± 5.04	7.81 ± 3.43	4.20 ± 1.31	3.38 ± 1.26	2.99 ± 0.71	1.48 ± 0.55

注: 每时间点小鼠 3 只; $\% \text{ID/g}$ 为每克组织百分注射剂量率

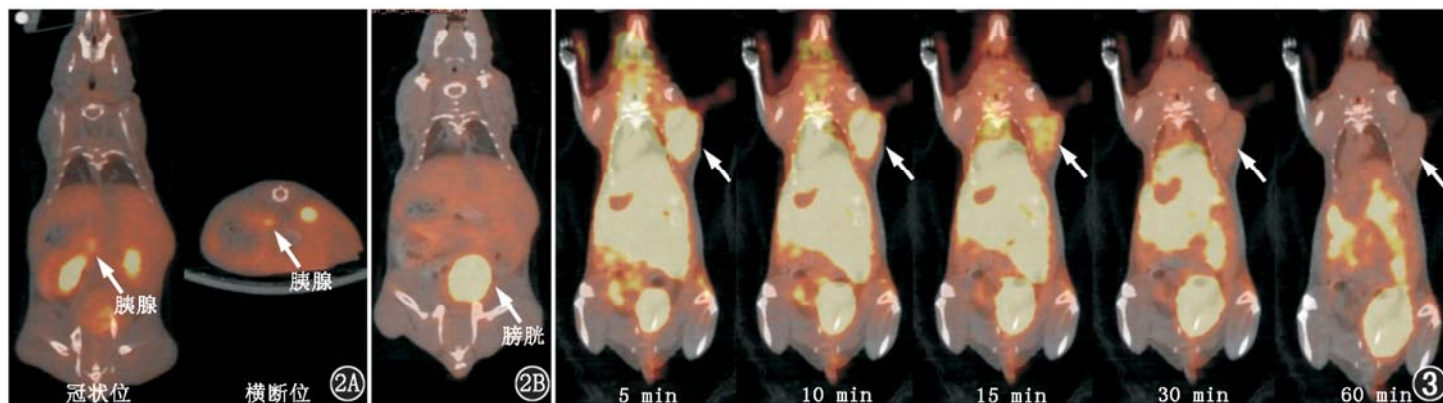


图2 正常小鼠 $L-6-^{18}\text{F}$ -多巴 (^{18}F -FDOPA) 注射后 60 min microPET 显像图。2A.胰腺摄取显影(箭头示);2B.膀胱内放射性尿液滞留(箭头示) 图3 荷胰岛素瘤裸鼠注射 ^{18}F -FDOPA 后不同时间 microPET 显像图。可见胰岛素瘤早期摄取显影(箭头示)

胰腺对比度好。胰岛 β 细胞可选择性摄取 ^{18}F -FDOPA, 并通过多巴胺脱羧酶转化为 ^{18}F -多巴胺^[7], ^{18}F -FDOPA 显像可应用于胰岛 β 细胞增生或高分泌状态引起先天性高胰岛素血症^[8], 并可定量糖尿病胰岛 β 细胞受损, 但由于胰腺摄取异质性较大, 且无法鉴别胰岛细胞和外分泌腺摄取, 需与特异性结合胰岛 β 细胞的分子探针作对比研究。本研究生物分布及胰腺 TAC 示, 胰腺 ^{18}F -FDOPA 摄取值在 20~50 min 变化不大, 表明该时间段胰腺摄取和清除处于平衡阶段; 肝脏、脾脏等主要脏器放射性快速清除, 因此注射后 20~50 min 是 ^{18}F -FDOPA 胰腺理想显像时间窗。

本研究中, ^{18}F -FDOPA 对荷 INS-1 胰岛素瘤有较高的亲和性, 肿瘤可早期显影, 注射后 5~15 min 是理想显像时间窗。手术切除是治疗胰岛素瘤的最佳选择, 术前定位是手术成功关键。常规无创影像检查手段很难发现较小病灶, 且不同病灶间影像征象不同, 影响探测效果^[9]; 胰高血糖素样肽-1 受体显像诊断胰岛素瘤有较高的灵敏度^[10], 但部分恶性胰岛素瘤摄取不高, 存在肾脏摄取较高、影响肾周病灶探查等不足。本研究中, ^{18}F -FDOPA microPET 动态显像可清晰显示胰岛素瘤, 显像剂在肾脏、肝脾等主要脏器快速清除, 有利于对胰岛素瘤探测。

本研究未研究胰岛素瘤 ^{18}F -FDOPA 摄取与芳香族氨基酸脱羧酶的关系, 有待在今后进一步完善。综上, ^{18}F -FDOPA 合成便捷、总反应时间短、放化纯高、稳定性好, 体内动物分布实验结果良好, 在胰岛细胞及胰岛素瘤显像方面具有一定的应用价值。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Sioka C, Fotopoulos A, Kyritsis AP. Recent advances in PET imaging for evaluation of Parkinson's disease[J]. Eur J Nucl Med Mol

Imaging, 2010, 37(8): 1594-1603. DOI: 10.1007/s00259-009-1357-9.

- [2] Balogova S, Talbot JN, Nataf V, et al. ^{18}F -fluorodihydroxyphenylalanine vs other radiopharmaceuticals for imaging neuroendocrine tumours according to their type[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 40(6): 943-966. DOI: 10.1007/s00259-013-2342-x.
- [3] Öberg K. Management of functional neuroendocrine tumors of the pancreas[J]. Gland Surg, 2018, 7(1): 20-27. DOI: 10.21037/gs.2017.10.08.
- [4] Hoepping A, Müller M, Smits R, et al. Precursors and process for the production of ^{18}F -labelled amino acids: EP, 2746250B1[P]. 2017-09-27.
- [5] Libert LC, Franci X, Plenevaux AR, et al. Production at the Curie level of no-carrier-added 6- ^{18}F -fluoro-L-dopa[J]. J Nucl Med, 2013, 54(7): 1154-1161. DOI: 10.2967/jnumed.112.112284.
- [6] Tredwell M, Preshlock SM, Taylor NJ, et al. A general copper-mediated nucleophilic ^{18}F fluorination of arenes[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(30): 7751-7755. DOI: 10.1002/anie.201404436.
- [7] de Lonlay P, Simon-Carre A, Ribeiro MJ, et al. Congenital hyperinsulinism: pancreatic [^{18}F] fluoro-L-dihydroxyphenylalanine (DOPA) positron emission tomography and immunohistochemistry study of DOPA decarboxylase and insulin secretion[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(3): 933-940. DOI: 10.1210/jc.2005-1713.
- [8] Christiansen CD, Petersen H, Nielsen AL, et al. ^{18}F -DOPA PET/CT and ^{68}Ga -DOTANOC PET/CT scans as diagnostic tools in focal congenital hyperinsulinism: a blinded evaluation[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 45(2): 250-261. DOI: 10.1007/s00259-017-3867-1.
- [9] Imperiale A, Sebag F, Vix M, et al. ^{18}F -FDOPA PET/CT imaging of insulinoma revisited[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 42(3): 409-418. DOI: 10.1007/s00259-014-2943-z.
- [10] 罗亚平, 潘青青, 要少波, 等. ^{68}Ga -exendin-4 PET/CT 显像定位诊断胰岛素瘤[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(3): 137-141. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.003.

Luo YP, Pan QQ, Yao SB, et al. ^{68}Ga -exendin-4 PET/CT for the localization of insulinomas[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(3): 137-141. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.003.

(收稿日期: 2018-04-08)