

出國報告（出國類別：實習）

赴美國國家衛生研究院分子影像及奈米醫學實驗室實習核醫藥物標誌及分析技術研究

服務機關：核能研究所

姓名職稱：于鴻文 副工程師

派赴國家：美國

出國期間：101年10月12日~101年11月10日

報告日期：101年12月7日

摘要

本次國外公差之目的地為到美國國家衛生研究院(National Institute of Health, NIH)的分子影像及奈米醫學實驗室(Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, LOMIN)，進行核醫藥物標誌及分析技術研究。本次出國實習主要目的是學習F-18-FBEM prosthetic group的合成。F-18-FBEM為F-18 radiolabeling中所使用的prosthetic group，能夠在室溫下用來標誌有sulfhydryl group的化合物(如peptides 或 proteins)。在之前LOMIN/NIH已發展出F-18-FBEM的合成技術，之後又發展出F-18-FBEM的自動化合成技術。由於F-18-FBEM的自動化合成仍然需要大約兩個小時的時間且產率偏低，因此LOMIN/NIH目前正在對F-18-FBEM進行精進研發，希望能夠縮短合成時間及提昇產率，有助於將來應用於臨床研究。

另一方面，本次實習也有機會了解血管新生造影劑RDG相關之最新發展。LOMIN/NIH近年來已經發展出許多radiolabeled RDG衍生物造影劑，包括monomer、dimer、tetramer等多種RDG衍生物；另外還有接上不同的chelator (DOTA、DTPA、NOTA等)及同位素 (F-18、Cu-64、Ga-68、Tc-99m、In-111等)；使用不同prosthetic group ($[^{18}\text{F}]$ FSB、 $[^{18}\text{F}]$ NPFP、 $[^{18}\text{F}]$ FSMB、 $[^{18}\text{F}]$ NPE等)合成F-18標誌的RDG衍生物。由他們所發展的 $[^{18}\text{F}]$ AIF-NOTA-RDG₂現在正在進行人體臨床試驗，目前已經有一些良好的成效，預期未來很有機會上市及進行藥品登記。本次出國實習收穫豐碩，期盼能增進本所新藥研發能力，並對本所未來研究發展有所助益。本次出國實習期程自101年10月12日至101年11月10日，共計30天。

目 次

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	2
三、心 得	3
四、建 議 事 項	17

一、目的

放射性標記胜肽及蛋白質在現今醫學，尤其是癌症診療中的應用不斷增加，顯示這類藥物也正扮演著越來越重要的角色。本次國外公差之目的地為到美國國家衛生研究院(National Institute of Health, NIH)的分子影像及奈米醫學實驗室(Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, LOMIN)，進行核醫藥物標記及分析技術研究，該實驗室主持人為 Dr. Xiaoyuan Chen (陳小元教授)。陳小元教授為傑出的分子影像專家，發表相關文獻非常豐碩。LOMIN 在分子影像領域中有卓越的表現及成績，尤其在放射性標記胜肽的研究中，常有突破性的發現。

本次出國實習主要目的為（一）學習 F-18-FBEM 的合成、（二）了解血管新生造影劑 RDG 相關之最新發展，（三）洽談未來研究方向及合作等相關事宜。F-18-FBEM 為 F-18 radiolabeling 中所使用的 prosthetic group，能夠在室溫下用來標記帶有 sulfhydryl group 的化合物(如 peptides 或 proteins)，且並不會破壞其結構。RDG 為血管新生的生物標記胜肽，標記上放射性同位素能夠作為腫瘤血管新生及療效評估造影劑。陳小元教授在 RDG 衍生物造影劑已有相當豐富的經驗。RDG 衍生物造影劑在未來臨床應用上也是一個十分有潛力藥物。

二、過 程

本次出國實習行程，於民國101年10月12日出發，經美國洛杉磯轉機抵達達拉斯，再由達拉斯抵達華盛頓，於10月15日抵達美國貝賽斯達國家衛生研究院，正式開始實習課程。民國101年11月08日結束實習，於11月10日返抵台灣。出國實習行程表如下：

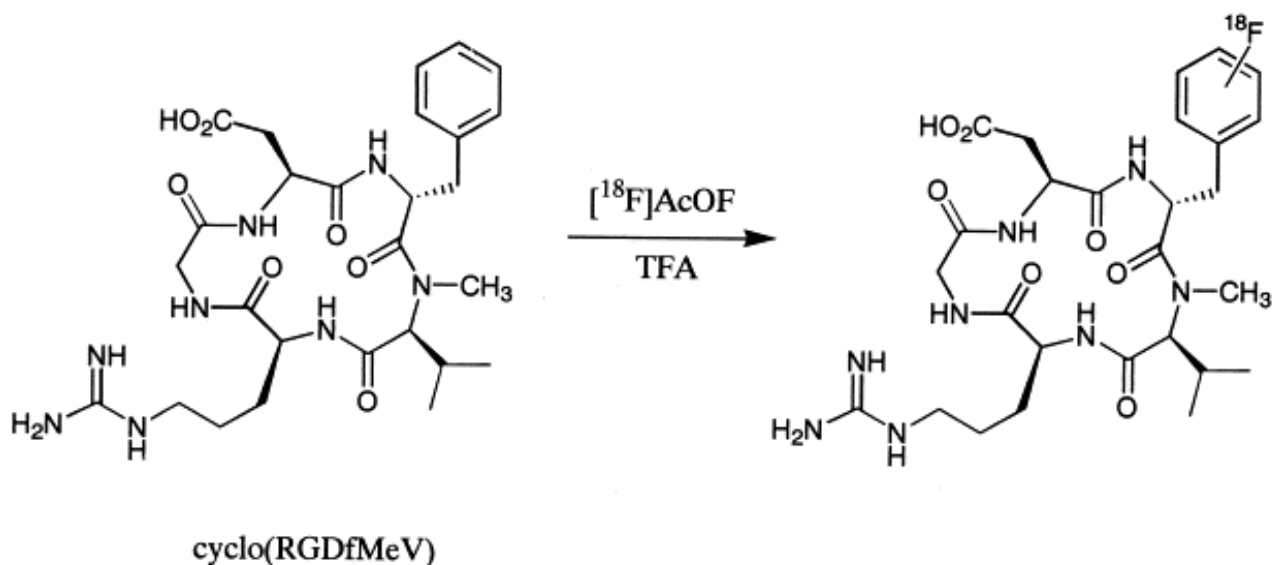
姓名	于鴻文		出國期間	自101年10月12日 至 101年11月10日 共計30天			
出國事由	赴美國國家衛生研究院分子-影像及奈米醫學實驗室進行核醫藥物標誌及分析技術研究實習						
行 程			公差地點		工 作 內 容		
月	日	星期	地 點		國名	地 名	
			出 發	抵 達			
10	12	五	台北	洛杉磯	美國	貝賽斯達	去程
10	13	六	洛杉磯 達拉斯	達拉斯 華盛頓	美國	貝賽斯達	去程
10- 10	14- 26	日- 五	貝賽斯達	貝賽斯達	美國	貝賽斯達	核醫藥物標誌及分析技術研究實習
10- 11	27- 07	六- 三	貝賽斯達	貝賽斯達	美國	貝賽斯達	核醫藥物標誌及分析技術研究實習
11	08	四	華盛頓	洛杉磯	美國	貝賽斯達	回程
11	09- 10	四- 六	洛杉磯	台北	中華 民國	台北	回程

三、心得

F-18-FBEM prosthetic group 放射合成與分析研究

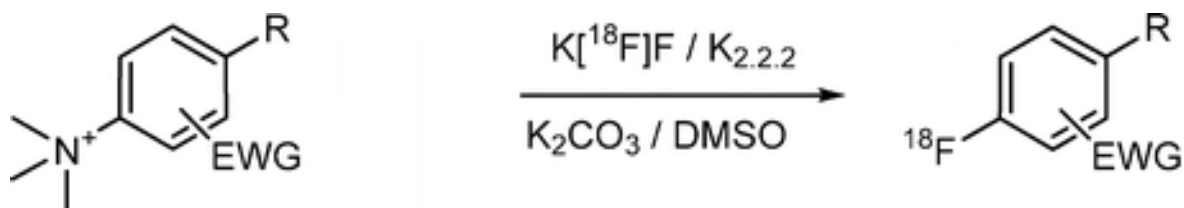
放射性標誌胜肽及蛋白質在現今醫學，尤其是癌症診療中的應用不斷增加，顯示這類藥物也正扮演著越來越重要的角色。能夠應用於正子放射斷層掃描(Positron Emission Tomography, PET)的放射性同位素包括有 F-18、Cu-64、Br-76、Ga-68、I-124 及其他幾種金屬類放射性同位素。而目前在醫療單位應用的最廣泛及普及的 PET 放射性同位素是 F-18，這是由於它有適當的物理半衰期(109 分鐘)的特性。

胜肽能夠利用親電子(electrophilic)、親核(nucleophilic)或直接氟化(flourination)的方法來進行放射性氟化標誌(radiofluorination)。例如 Ogawa 等人利用 $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ 對 RDG 衍生物 cyclo(RGDfMeV) 進行 direct electrophilic radiofluorination (圖一)。此方法的好處是簡單快速、不會改變胜肽本身的結構和生物化學特性。



圖一、Radiosynthetic scheme of $[^{18}\text{F}]$ fluorinated cyclo(RGDfMeV) by direct fluorination with $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ (Ogawa, M., et al., 2003. Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha(v)\beta(3)$ integrin related tumor imaging. Nucl. Med. Biol. 30, 1 - 9)。

另外，Becaud 等人利用帶有三甲基铵(trimethylammonium, TMA) 離去基 (leaving group) 及拉電子基 (electron-withdrawing groups, EWGs) 的苯環 (aromatic ring) 進行 direct nucleophilic radiofluorination (圖二)。此方法的好處是 one-step synthesis、能夠在較溫和的化學條約下反應、並且有不錯的產率。



1a: EWG = 3-F, R = 4-COCH₃; **2a:** EWG = 2-F, R = 4-COCH₃;
3a: EWG = 2-CN, R = 4-COCH₃; **4a:** EWG = 2-CF₃, R = 4-COCH₃;
5a: EWG = 2-CN, R = 4-SO₂N(CH₃)CH₂COOCH₃

圖二、General Radiosynthetic Pathway to TMA-Based Model Compounds (Becaud, J., et al., 2009. Direct one-step¹⁸F-labeling of peptides via nucleophilic aromatic substitution. *Bioconjug. Chem.* 20, 2254 – 2261)。

但由於這些放射氟化反應都需要在較激烈的化學條件(如大於 100°C)中進行，大部分的胜肽及蛋白質都無法承受這些嚴苛的條件而產生降解及變質的現象。因此利用 F-18 標誌的輔基(prosthetic group)來進行胜肽及蛋白質的放射性氟化標誌反應已經成為主要的標誌方法，這些 F-18 標誌的 prosthetic group 都能夠與胜肽及蛋白質上 lysine residues 的 amine group 或 cysteine residues 的 sulfhydryl group 進行反應。

在這些 F-18 標誌的 prosthetic group 中，F-18 標誌的 maleimide 是其中一個能夠對 cysteine residues 的 sulfhydryl group 進行反應的 prosthetic group。直到目前為止，已經有多篇文獻報告研究這類的 prosthetic group。N-[2-(4-[¹⁸F]fluorobenzamido)ethyl]maleimide ([¹⁸F]FBEM) 是其中一個在近年來較

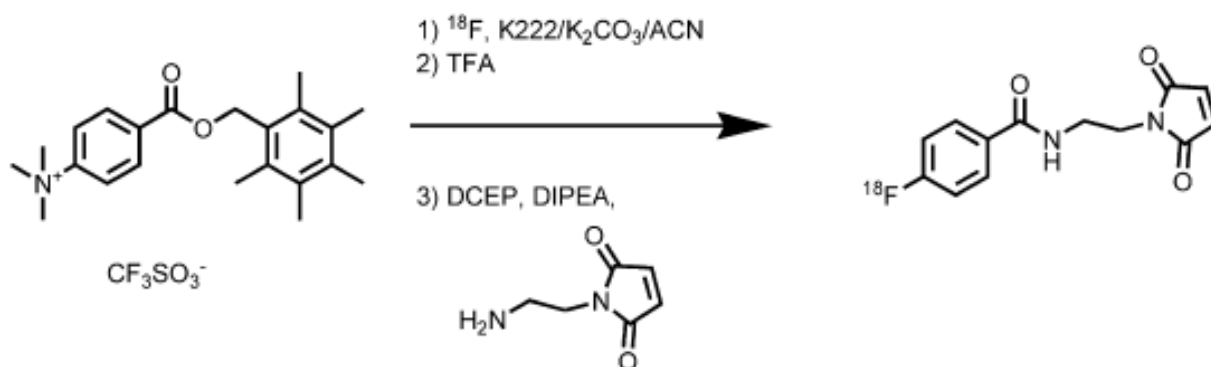
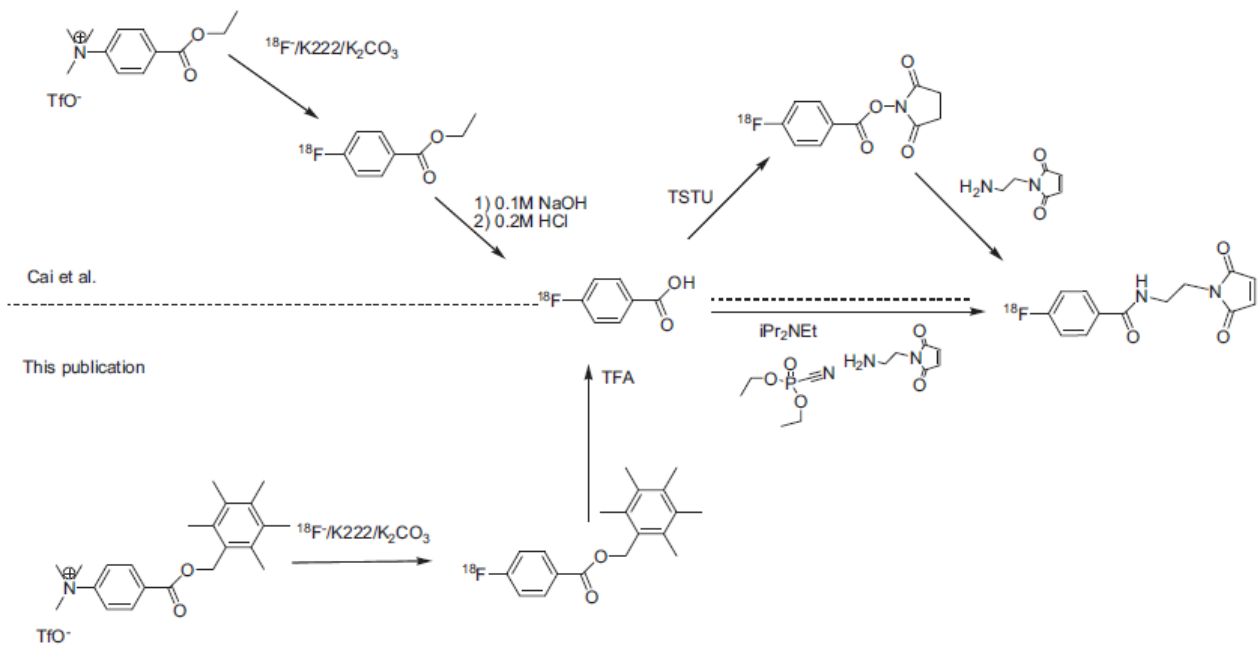


Fig. 1. Synthesis of *N*-[2-(4- ^{18}F fluorobenzamide)ethyl]maleimide (^{18}F FBEM) (4).

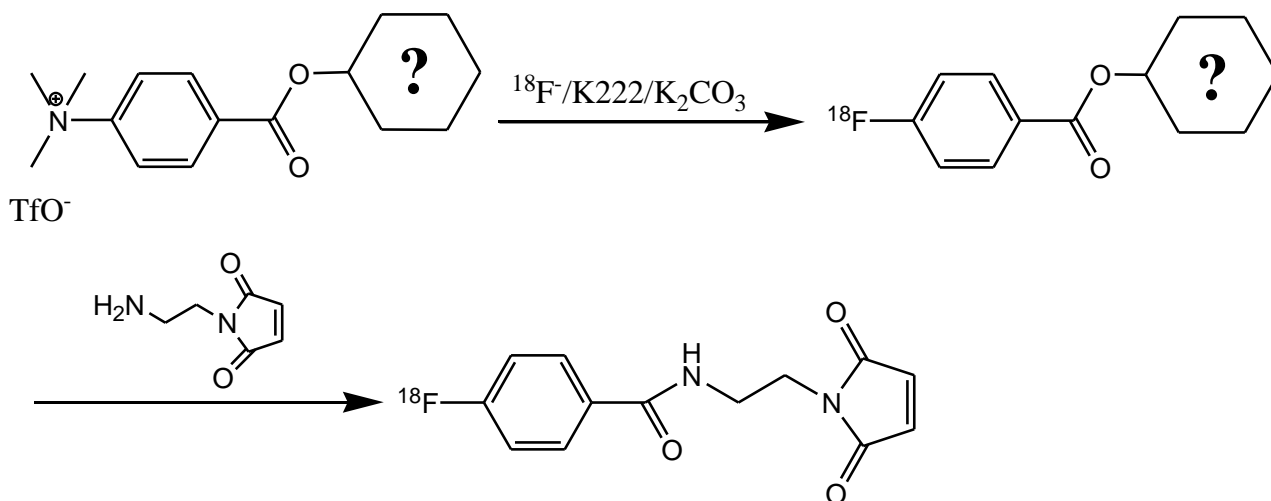
圖四、Synthesis of *N*-[2-(4- ^{18}F fluorobenzamide)ethyl]maleimide (^{18}F FBEM) (Kiesewetter, D.O., Kramer-Marek, G., Ma, Y., Capala, J., 2008. Radiolabeling of HER2-specific affibody (R) molecule with F-18. *J. Fluorine Chem.* 129, 799 – 806).

到了 2011 年 Kiesewetter 等人利用自動化方法合成 ^{18}F FBEM (圖五)。此自動化合成功能使用了包括三個放射化學步驟及兩個反應瓶。在第一個反應瓶中，進行了 pentamethyl-benzyl 4-(N,N,N-trimethylammonium)benzoate trifluoromethanesulfonate 上 trimethylammonium 的 ^{18}F Fluoride 取代反應；而在第二個反應瓶中，進行了 benzoic acid 的 pentamethylbenzyl 保護基的酸解反應，以及 ^{18}F fluorobenzoicacid 與 *N*-(2-aminoethyl)maleimide 的結合反應，然後 ^{18}F FBEM 利用 high performance liquid chromatography (HPLC) 純化出來，最後再與具有 free sulfhydryl group 的 peptides 結合。此 ^{18}F FBEM 的合成方法需要較少的化學合成步驟，有較高的產率 ($17 \pm 6\%$ uncorrected) 及需求較短的合成時間 (約 115 分鐘)。



圖五、Scheme of the chemical transformations during the radiochemical synthesis of [^{18}F]FBEM. The steps above the dashed line indicate the procedure of Cai et al. (2006), while those below the line are the steps of the procedure described in this manuscript (Kiesewetter DO, Jacobson O, Lang L, Chen X. 2011. Automated radiochemical synthesis of [^{18}F]FBEM: a thiol reactive synthon for radiofluorination of peptides and proteins. *Appl Radiat Isot.* 69, 410 - 414).

在本次到美國國家衛生研究院分子-影像及奈米醫學實驗室進行核醫藥物標誌及分析技術研究的實習中，該實驗室正在進行[^{18}F]FBEM 合成方法的再精進 (圖六)。此合成方法希望能夠只使用二個放射化學步驟及一個 HPLC 純化步驟來合成出[^{18}F]FBEM，預期此合成方法能夠提昇放射化學產率及減少整個合成步驟的時間。在第一個反應中，進行了 tetrafluoro-benzyl 4-(N,N,N-trimethylammonium)benzoate trifluoromethanesulfonate (OTf-Py-TFP) 上 trimethylammonium 的[^{18}F]Fluoride 取代反應，生成[^{18}F]fluoronicotinic acid 2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester；而在第二個反應中，進行了 tetrafluorobenzyl 4-[^{18}F]fluorobenzoate 上 tetrafluorobenzyl 保護基的水解反應，以及與 N-(2-aminoethyl)maleimide 的結合反應生成[^{18}F]FBEM，然後[^{18}F]FBEM 利用 HPLC 純化出來，最後再與具有 free sulfhydryl group 的 peptides 或 protein 結合。



圖六、Scheme of the radiochemical synthesis of $[^{18}\text{F}]$ FBEM using OTf-1 as precursor.

在本次實習中，此 $[^{18}\text{F}]$ FBEM 的精進合成方法，有使用自動化合成系統（圖七 — 圖九）及人工合成（圖十 — 圖十一）兩種方法進行。原則上是先使用人工合成方法，以低放射活性（每次約 1 - 2 mCi）進行條件測試，優點是時間短，彈性大，一天能夠進行 4 - 6 次反應，可以快速測試各種條件組合。而使用自動化合成盒，優點是可以使用高放射活性（50 - 100 mCi），以及模擬實際反應情況，但合成過程長，一天只能進行 1 - 2 次反應。在進行自動化合成中，自動合成盒是使用 GE TRACERlab FX_{FN}，首先將 ^{18}F 以 PS-HCO₃ cartridge 捕捉，然後用 acetonitrile (ACN) 沖洗至反應瓶，加熱至 95°C，並通氮氣，乾燥後冷卻至 50°C，加入新的 precursor (OTf-1) 反應於 43°C，反應完成之後再加入 N-(2-aminoethyl)maleimide trifluoro acetate salt 及 diisopropyl ethyl amine (DIPEA)，反應 15 分鐘後加入 ACN，將反應混合物通過 alumina cartridge，將濾液通過半製備級 (semi-preparative) HPLC 並收集產物至裝有 H₂O 的瓶子，將液體通過兩個連接的 Sep-pak cartridge，再用 10 mL H₂O 沖洗，最後使用 3 mL 5% EtOH/DCM 將產物洗出，並取樣用分析級 (analytical) radio- HPLC 進行放射化學純度分析。



圖七、自動化合成系統之防護屏蔽及控制電腦。



圖八、GE TRACERlab FX_{FN} 自動合成盒。



圖九、 ^{18}F FBEM 自動化合成系統之 radio-HPLC 純化系統。



圖十、進行 ^{18}F FBEM 人工合成時使用之抽風櫃及防護屏蔽。

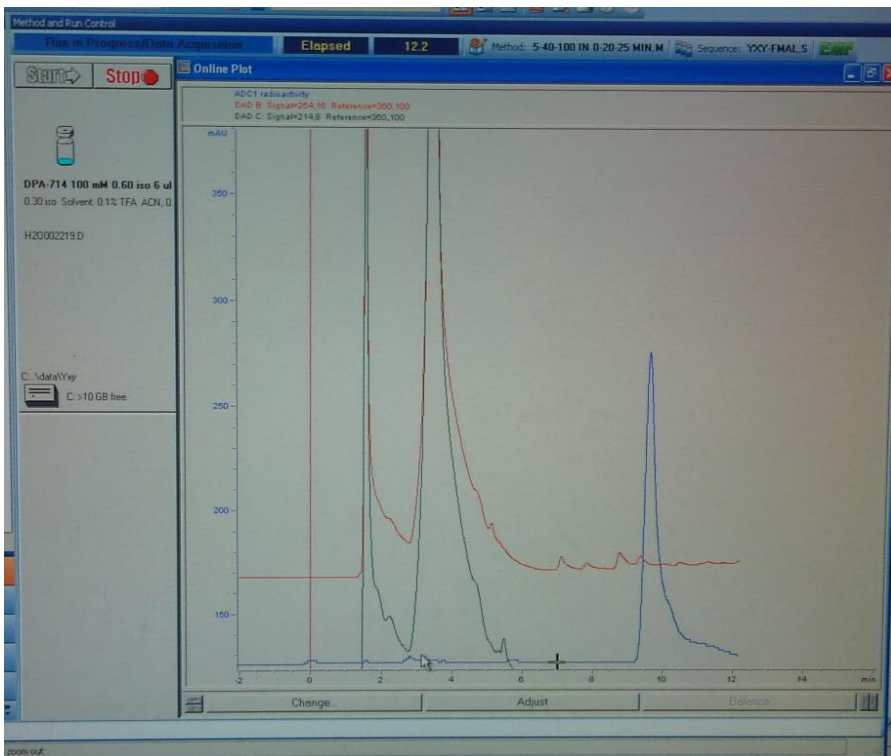


圖十一、進行 ^{18}F FBEM 人工合成時使用之加熱設備及儀器。

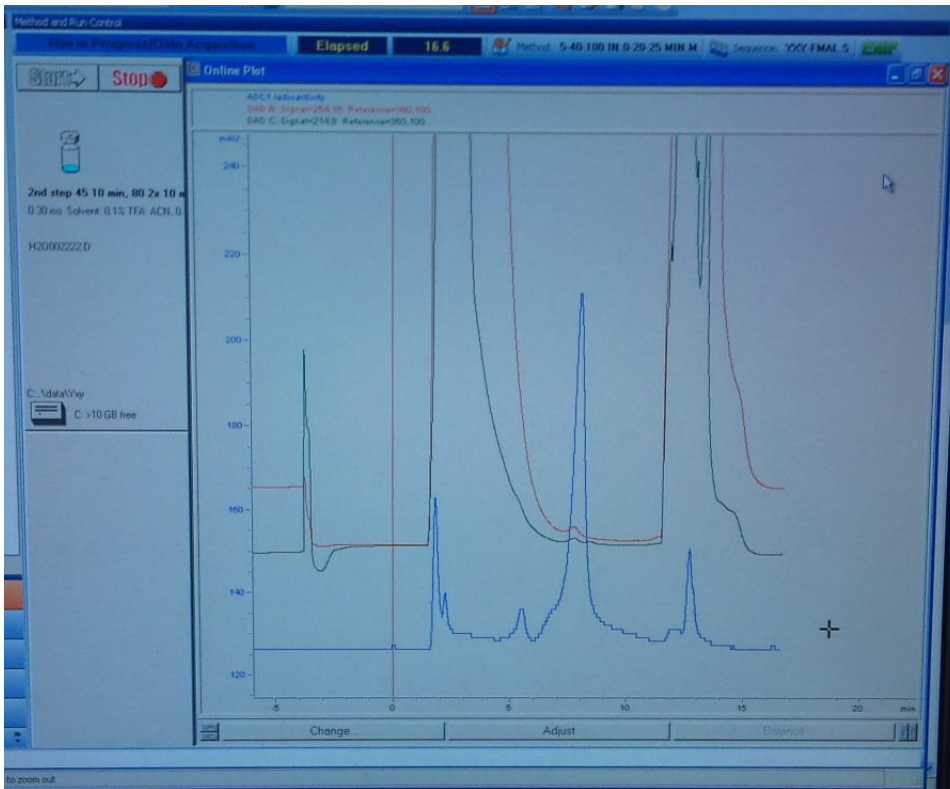
在進行人工合成 ^{18}F FBEM 中，每次使用少量放射活性，約 1 mCi 來進行實驗。人工合成 ^{18}F FBEM 的主要步驟為：(1) 利用 ACN 及氫氣使 ^{18}F 乾燥，共三次；(2) 加入已溶於溶劑之 OTf-1，反應於 40°C 10 分鐘；(3) 使用分析級 radio-HPLC 分析放射化學純度及計算產率(圖十二 — 圖十三)；(4) 加入已溶於溶劑之 N-(2-aminoethyl)maleimide 及 base；(5) 反應於不同溫度及時間；(6) 使用分析級 radio-HPLC 分析放射化學純度及計算產率(圖十四)。在本次實習期間，LOMIN 實驗室有進行使用不同條件的 ^{18}F FBEM 人工合成測試，主要是改變第二個化學步驟的溶劑 (ACN、DMF、DMSO、THF 等)、base (DMAP、pyridine、2,4,6-collidine 等)、反應溫度和時間。在 ^{18}F FBEM 的合成中，第一個化學步驟已經有良好的產率 (70% ~ 80%) 及穩定的結果；而在第二個化學步驟，經過多次不同條件測試後，產率已經能夠達到 60% ~ 70%，所以整個 ^{18}F FBEM 合成的產率約有 40% ~ 60% (uncorrected)，而 LOMIN 則目前仍然繼續進行 ^{18}F FBEM 合成的精進測試。



圖十二、分析級 radio-HPLC (Agilent)。



圖十三、第一個化學步驟之分析級 radio-HPLC (Agilent) 分析結果，圖中藍色線為 radio-detector，紅色及綠色線為 UV detector，solvent 使用 isocratic 40% ACN，retention time = 8 min 的 peak 為第一步之產物。



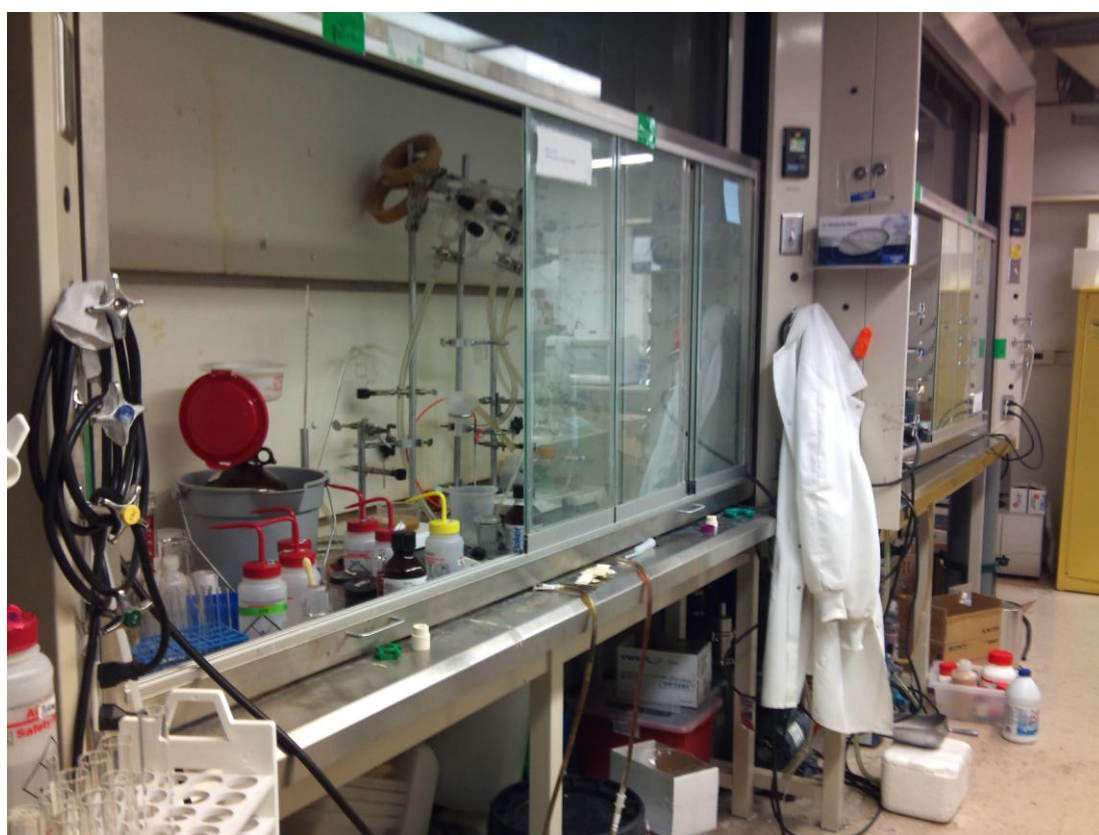
圖十四、第二個化學步驟之分析級 radio-HPLC (Agilent) 分析結果，圖中藍色線為 radio-detector，紅色及綠色線為 UV detector，solvent 使用 isocratic 15% ACN，retention time = 2 min、8 min、13 min 的 peak 分別為 hydrolysis 產生的副產物、 $[^{18}\text{F}]$ FBEM、第一步之產物。



圖十五、美國 NIH 正門及接待中心，也是每天要換通行證的地方。



圖十六、美國 NIH 內的 clinical center，本次實習的有機及放化實驗室就位於此建築內。



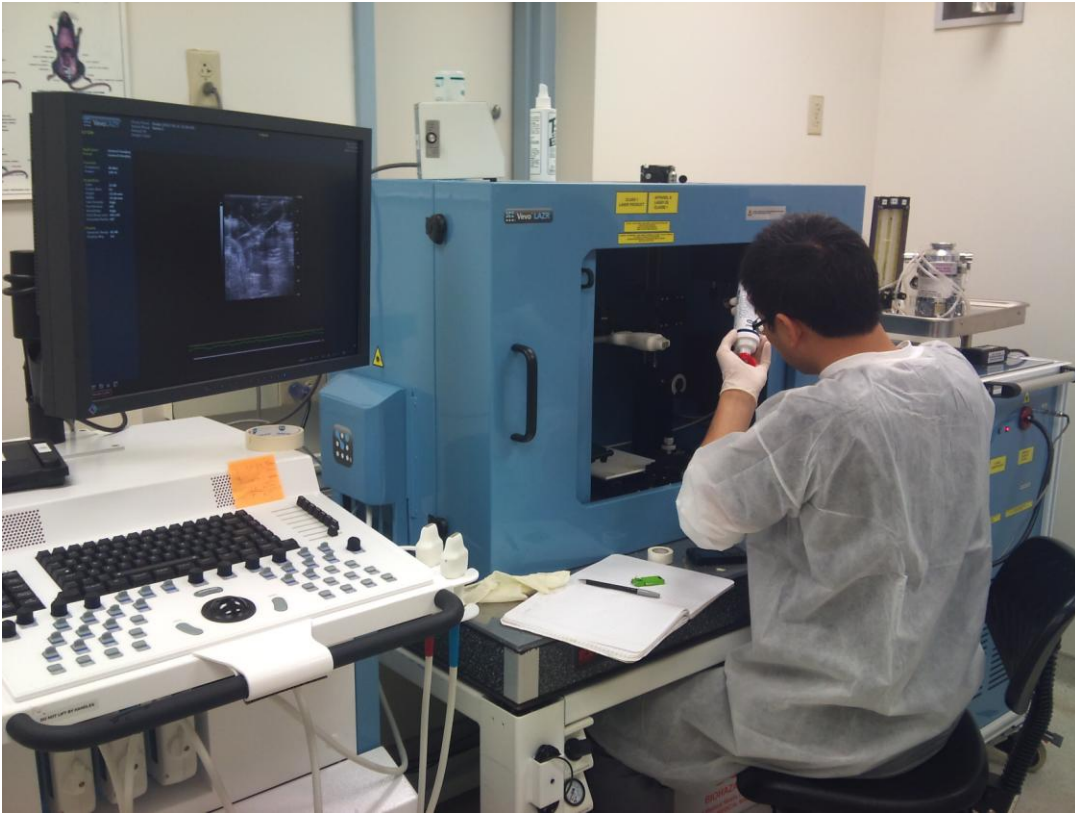
圖十七、本次實習的有機實驗室內的情形。



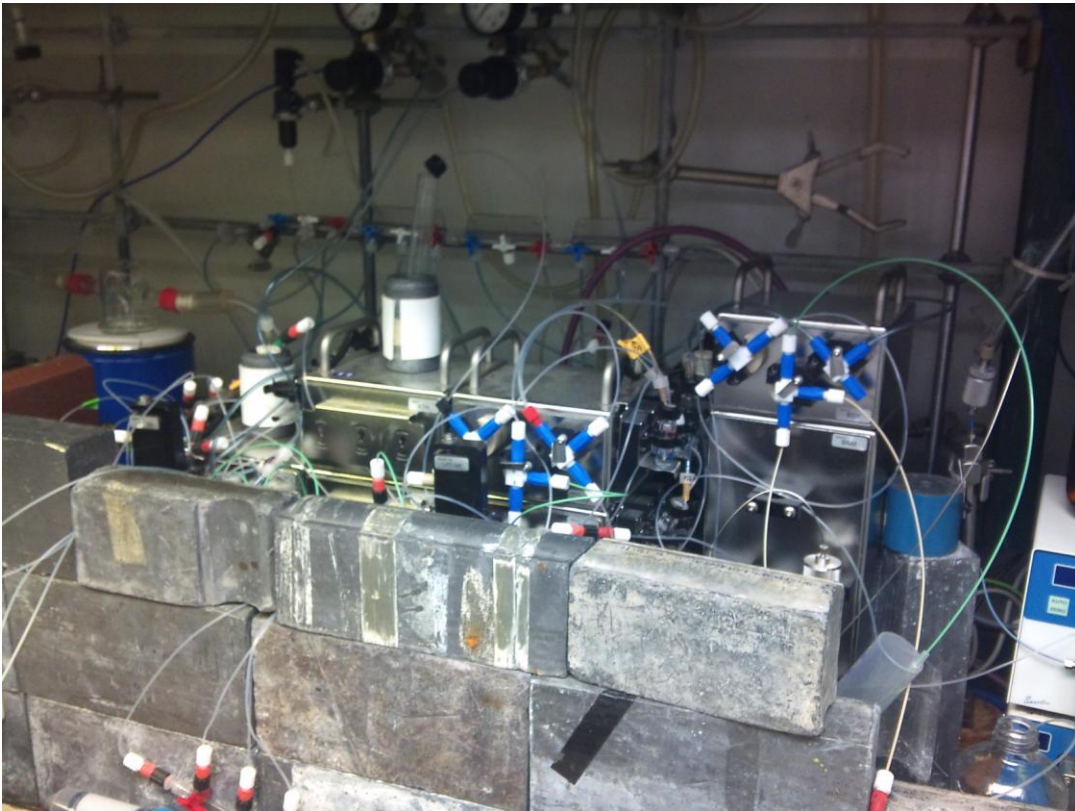
圖十八、美國 NIH 的 microCT 電腦繼層造影系統。



圖十九、美國 NIH 的 microMRI 磁振造影系統。



圖二十、美國 NIH 的 Visualsonics Vevo LAZR photoacoustic imaging system (光聲造影系統)。



圖二十一、美國 LOMIN/NIH 放化實驗室的 Eckert & Ziegler Eurotope GMBH Modular-Lab 自動合成系統。

四、建議事項

(一) 發展 F-18 prosthetic group 技術

對於 PET 核醫藥物，目前為止主要使用的射源仍然以 F-18 為主，因此 F-18 標誌技術對於 PET 核醫藥物的研發十分重要。大部分傳統 F-18 標誌小分子的標誌過程常常需要使用到高溫，而大部分胜肽及蛋白質都無法承受這種嚴苛的條件。放射性標誌胜肽及蛋白質在現今醫學，尤其是癌症診療中的應用不斷增加，顯示這類藥物也正扮演著越來越重要的角色。因此發展低溫 F-18 標誌方法能夠提升核研所的胜肽及蛋白質類的 PET 核醫藥物的研發能量。

(二) 發展 AIF-NOTA 技術

另外，藥物合成時間也是影響 PET 核醫藥物發展很重要的因素。大部分傳統 F-18 標誌藥物合成都需要一個小時以上，這對於臨床使用上也是一大障礙。近年來 AIF-NOTA PET 核醫藥物的發展越來越迅速，例如由 NIH 研發的 AIF-NOTA-RGD₂，目前已經於中國大陸進行人體臨床試驗。AIF-NOTA 的好優點是 ¹⁸F 能夠在水溶液狀態下進行標誌反應，免除要乾燥 ¹⁸F 的時間，藥物能夠製造成 labeling kit，就像 Tc-99m 的核醫藥物一樣。因此發展 AIF-NOTA 的技術對於推廣 F-18 核醫藥物至臨床是一個非常有潛力的方法。

(三) 從銷售同位素開始，逐步拓展中國大陸市場

另一方面，LOMIN/NIH 實驗室主持人陳小元教授表示廈門大學將成立分子影像暨轉化醫學研究中心，將來對於放射性同位素需求會大幅上升。而由於目前中國大陸並無自產 I-123、In-111 等放射性同位素供應學術研究單位使用，因為陳教授表示核研所自產多種放射性同位素，如能透過適當的管道銷往中國大陸，無論是對核研所的銷售市場推廣，或兩岸學術研究交流，都有十分正面及有幫助的影響。中國大陸市場很大且很有潛力，這是核研所很好的契機進入中國大陸市場，可以首先從放射性同位素開始，再逐步將藥物推廣出去，這對於將來台灣的核醫藥物發展與產銷都是很重要的效益。