

文章编号: 0253-9950(2002)03-0157-04

N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F (氟甲基)苯甲酸酯的合成

李俊玲, 张秀利, 田海滨, 周 伟, 林英武, 尹端让, 汪勇先

中国科学院 上海原子核研究所, 上海 201800

摘要: 合成了 ^{18}F 标记蛋白常用中间体 N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F (氟甲基)苯甲酸酯(^{18}F -SFMB), 用操作简单的 Sep-Pak 硅胶柱代替了繁琐耗时的 HPLC 分离。探讨了反应溶剂、温度、K/222 与 K_2CO_3 的摩尔比及反应时间等诸因素对 ^{18}F -SFMB 放化合成的影响。得出较佳标记条件: 以无水乙腈为溶剂, K/222 与 K_2CO_3 摩尔比为 1,80 下反应 5 min, 标记率为 57%, 比文献值提高了 3 倍以上。对 IgG 进行了标记, 在室温下反应 15 min, 标记率可达 88%。

关键词: 放化合成; N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F (氟甲基)苯甲酸酯(^{18}F -SFMB); IgG
中图分类号: Q503 **文献标识码:** A

近几年, 由于正电子断层显像(PET)诊断技术的迅速发展, ^{18}F 标记方法也取得了很大进展, 特别是亲核取代法已成为当前 ^{18}F 标记蛋白质和多肽过程中最常用的方法。在该过程中, 辅基的选择决定着反应的成败。选择标准有: 一是对生物分子的活性损伤小; 二是与生物分子结合力强, 体内稳定性好; 三是易于合成^[1], 特别是对于短寿命的 ^{18}F 而言, 其标记前体的合成和反应时间应尽可能地短。文献[2]比较了 3 种氟标中间体 4-叠氮苯甲酰基- ^{18}F 氟化物(^{18}F -APF), 4-硝基苯-2- ^{18}F 氟丙酰酯(^{18}F -NPFP)及 N-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F 氟苯甲酸酯(^{18}F -SFB)的放化合成及对几种蛋白的标记。发现后两种物质虽然合成步骤较 ^{18}F -APF 复杂, 但它们与蛋白的结合率却远高于 ^{18}F -APF; 另外, ^{18}F -NPFP 与蛋白结合的稳定性低于 ^{18}F -SFB。基于以上结果可认为, ^{18}F -SFB 是一种标记蛋白, 特别是标记抗体的较佳酰化试剂^[2~7]。但合成 ^{18}F -SFB 需经干燥、HPLC 分离等三步放化步骤。Lang 等^[8]利用一步放化反应, 合成了结构类似于 ^{18}F -SFB 的 N-琥珀酰亚胺-4-

[^{18}F](氟甲基)苯甲酸酯(^{18}F -SFMB), 且在 15 min 内与蛋白的反应标记率达 50%~70%^[9,10]。但是 ^{18}F -SFMB 的放化产额仅为 ^{18}F -SFB 的三分之一。

本文在文献[8]的基础上, 企图合成高放化产率的 ^{18}F -SFMB, 并提高对 IgG 的标记率。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

丙酮经 3A 分子筛干燥 24 h 以上, 二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、氧化银、氟化钾、碳酸钾均为分析纯。无水乙腈、无水 DMSO、对硝基苯磺酰氯、对溴甲基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、N,N'-二环己基碳酰亚胺、K/222 (Kryptofix 222) 均为 ACROS 产品, Sephadex 凝胶为 Pharmacia 进口分装。

ZF-2 型三用紫外灯, 上海安亭电子仪器厂产品; γ 计数器, 上海原子核研究所日环厂产品; Sep-Pak 硅胶柱为美国 Waters 公司产品; 蠕动泵, 浙江象山定山仪器厂产品。

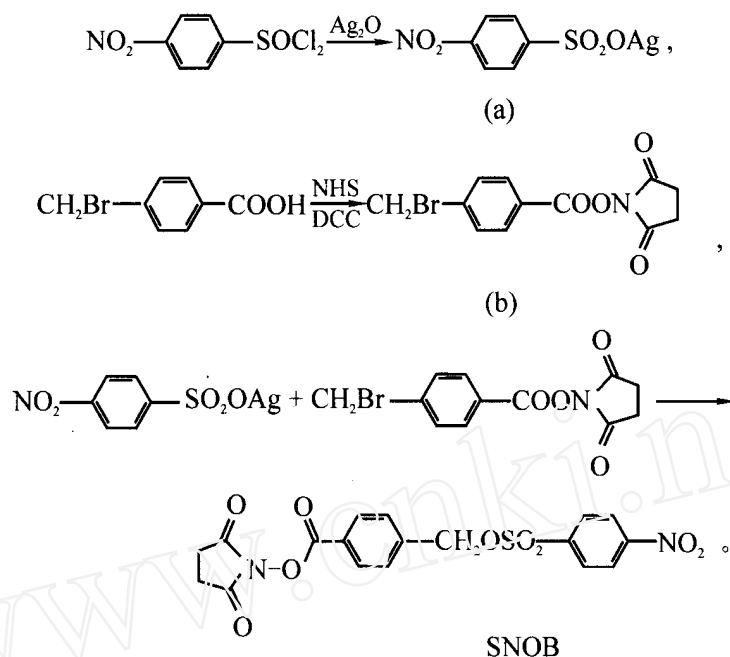
收稿日期: 2002-01-14; 修订日期: 2002-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10075073), 中国科学院创新工程前沿资助项目(90200154)

作者简介: 李俊玲(1974—), 女, 山东莱芜人, 博士研究生, 无机化学专业。

1.2 N-琥珀酰亚胺-4-[(4-硝基苯磺酰)氧甲基]苯甲酸酯(SNOB)的合成

合成路线如下:



(1) 将对硝基苯磺酰氯、 Ag_2O 与适量 CH_3CN 混合, 室温避光反应 2 d。反应结束后, 过滤掉剩余 Ag_2O , 蒸发溶剂, 得到的黄色固体为对硝基苯磺酸银(a)。

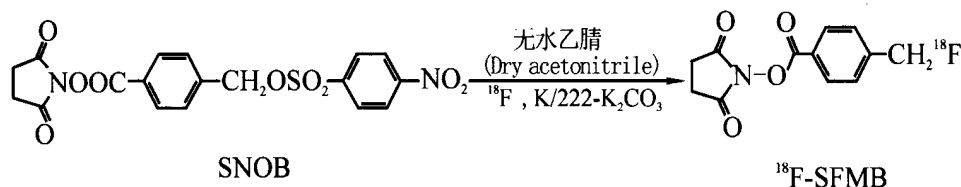
(2) 将对溴甲基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)与二氯甲烷混合, 回流 1 h。过滤除去杂质, 将母液蒸干, 经乙酸乙酯与正己烷重结晶, 得 N-羟基琥珀酰亚胺-4-(溴甲基)苯甲酸酯(b)。

(3) 将化合物(a), (b), 乙腈与少量碘化钠混

合, 室温避光反应 2 d。过滤除去杂质, 用乙酸乙酯萃取, 除去剩余对硝基苯磺酸银, 然后蒸掉溶剂, 经二氯甲烷与正己烷重结晶, 得白色固体 SNOB。产率为 75%~85%, 熔点 $80\sim 83^\circ\text{C}$ 。 ^1H NMR 分析结果为 (CDCl_3 , δ): 2.91(s, 4H, CH_2), 5.52(s, 2H, CH_2), 7.93~8.25(d, 8H, arom)。IR (KBr) 分析结果为 (σ/cm^{-1}): 1795, 1769($\text{C}=\text{O}$), 1600(arom), 1354, 1532(NO_2)。

1.3 ^{18}F -SFMB 的放化合成

合成路线如下:



在回旋加速器上通过 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ 核反应, 应用小体积 (1.5 mL) $^{18}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ (95%) 靶, 用 16.5 MeV, 25 μA 的质子束流连续轰击靶 60 min, 得到约 $3.7 \times 10^{10} \text{ Bq } ^{18}\text{F}^-$ 。

首先合成 SFMB。 ^1H NMR 分析结果为 (CDCl_3 , δ): 2.91(s, 4H), 5.25(s, 2H), 7.25(m, 4H)。经 TLC 检测, 流动相为 $V(\text{CHCl}_3)$ $V(\text{CH}_3\text{OH}) = 2:1$, $R_f = 0.8\sim 0.9$ 。化学纯度

RCP > 99% (HPLC 检测, Vydac C18 柱, 粒径为 $10\mu\text{m}$, $\phi 2.5\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, 流动相为 $V(\text{乙腈})$ $V(\text{水}) = 70:30$, $t_R = 13\text{ min}$)。

将 $(18.5\sim 37) \times 10^7 \text{ Bq } ^{18}\text{F}^-$ (50 μL , 23 mg/mL 的 K_2CO_3) 加入到含 1 mg K/222, 0.2 mL 无水乙腈的反应瓶中, 在 $105\sim 110^\circ\text{C}$ 下氮气吹干, 再加入等体积无水乙腈, 重复操作至少两次。冷却, 加入 1 mg SNOB、0.2 mL 无水乙腈, 80°C 下密闭反应 5

min。反应液吹干、冷却,加入 1 mL 二氯甲烷重新溶解,转移至一小型 Sep-Pak 硅胶柱(经二氯甲烷饱和),先用 5 mL 二氯甲烷淋洗,再用 2 mL 甲醇淋洗 ^{18}F -SFMB。经 TLC 检测, ^{18}F -SFMB 的放化纯度 RCP > 97 %。

1.4 IgG 的标记与分离

^{18}F -SFMB-甲醇淋洗液经氮气吹干,冷却至室温,加入 15 μL 乙腈,10 μL IgG-PB 缓冲液(0.5 mol/L, pH = 8.5),室温放置 15 min。将标记物移入 Sephadex G25 柱内(ϕ 1 cm $\times$ 25 cm),继续用 PB 缓冲液淋洗,流速为 1.5 mL/min,以放射性探测器检测。 ^{18}F -SFMB-IgG 的 t_R 为 3.60 min。用 HP 3392A 积分仪对结果进行处理得到标记率。

2 结果和讨论

2.1 SNOB 的合成

据文献[8]报道,将对硝基苯磺酸银(a)和 N-羟基琥珀酰亚胺-4-(溴甲基)苯甲酸酯(b)及适量乙腈混合,室温避光反应 2 d,即可得到较高产率的 SNOB。但在本实验中发现,反应 2 d 基本未发现有 SNOB 生成,而在反应溶液中加入少量碘化钠,却大大促进了反应的进程。这可能是因为在亲核取代反应中, Br^- 与 I^- 相比,为不易离去基团,从而导致脱 AgBr 较脱 AgI 难。

2.2 ^{18}F -SFMB 的放化合成及标记条件的选择

2.2.1 反应温度和溶剂对标记率的影响 反应温度与反应溶剂对标记率的影响结果示于图 1。从图 1 可见,温度升高,标记率呈上升趋势,但升至回流温度(80 $^{\circ}\text{C}$)后,再升高温度,标记率基本不再变化。从图 1 还可看出,不同溶剂对标记率的影响较大。相同温度下,乙腈为溶剂时,标记率较之丙酮和 DMSO 的高。这可能是因为丙酮与无水 DMSO 的极性较大,导致 SNOB 在其中的溶解度偏低的缘故;另外,丙酮在较低的回流温度下阻碍了反应温度的升高,不利于反应的进行。

2.2.2 K/222 与碳酸钾的摩尔比及反应时间对标记率的影响 以无水乙腈为溶剂,K/222 与碳酸钾摩尔比(r)及反应时间对标记率的影响结果示于图 2。从图 2 看出,不同的 K/222 与碳酸钾摩尔比影响反应,过多碳酸钾不利于反应。实验发现,摩尔比大于 1 时,可保证反应充分进行,即足够的 K/222 能保证反应的顺利进行。另外,由反应时间对反应的影响曲线可见,反应基本在

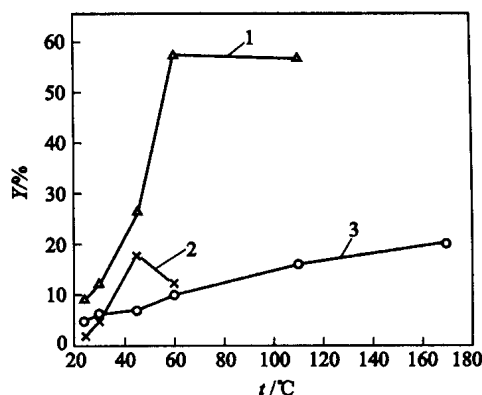


图 1 温度和溶剂对标记率的影响

Fig. 1 Effect of temperatures and solvents on labeling yields

$n(\text{K}/222) : n(\text{K}_2\text{CO}_3) = 1 : 1, t = 5 \text{ min}$

1——无水乙腈(Dry acetonitrile), 2——无水丙酮(Dry acetone), 3——无水 DMSO(Dry DMSO)

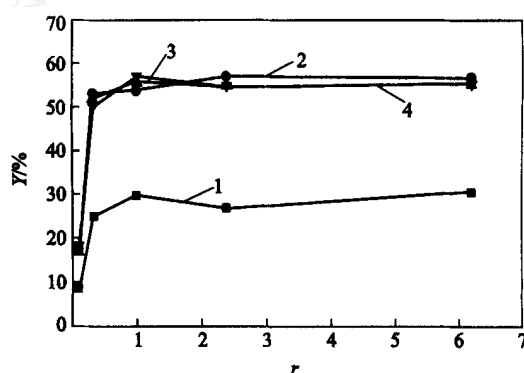


图 2 K/222 与 K_2CO_3 摩尔比和反应时间对标记率的影响

Fig. 2 Effect of mole ratios of K/222 to K_2CO_3 and reaction time on labeling yields

$t = 80^{\circ}\text{C}$;

t: —1 min, 2—5 min, 3—15 min, 4—30 min

5 min 内完成,再延长反应时间意义不大。本实验选择 K/222 与 K_2CO_3 的摩尔比为 1,反应时间为 5 min 时,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下的标记率达 57 %。

本文利用 Sep-Pak 硅胶柱代替了繁琐耗时的 HPLC,实现了产物的分离,在保证 ^{18}F -SFMB 高放化纯度与化学纯度的同时,大大缩短了合成时间(约 20 min),这对短寿命的 ^{18}F 而言意义重大。 ^{18}F -SFMB 对 IgG 的标记反应,反应条件温和,操作简便易行,反应时间短,标记率可达 88 %。

3 结论

以无水乙腈为溶剂,K/222 与碳酸钾摩尔比保

持在 1:1, 80 °C 下反应 5 min, 标记率可达 57 % 以上; ^{18}F -SFMB 对 IgG 的标记反应, 在 pH=8.5, 室温下进行 15 min, 可得 88 % 的高标记率, 用 Sephadex G-25 柱实现了产物的分离, 放化纯度大于 95 %。从 ^{18}F -SFMB 的合成到 IgG 的标记、分离全过程耗时不到 1 h。 ^{18}F -SFMB 和 ^{18}F -SFMB-IgG 在 2 h 以内, 稳定性良好。

参考文献:

- [1] GUHLKE S, WESTER H J, BRUNS C, et al. (2- ^{18}F) Fluoropropionyl-(D) phe¹-octreotide, a Potential Radiopharmaceutical for Quantitative Somatostatin Receptor Imaging With PET: Synthesis, Radiolabeling, *in vitro* Validation and Biodistribution in Mice [J]. Nucl Med Biol, 1994, 21(6): 819~825.
- [2] WESTER H J, HAMACHER K, STOCKLIN G. A Comparative Study of n. c. a. Fluorine-18 Labeling of Protein Via Acylation and Photochemical Conjugation [J]. Nucl Med Biol, 1996, 23: 365~372.
- [3] VAIDYANATHAN G, ZALUTSKY M R. Improved Synthesis of N-Succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate and its Application to the Labeling of a Monoclonal Antibody Fragment [J]. Bioconjugate Chem, 1994, 5: 352~356.
- [4] VAIDYANATHAN G, ZALUTSKY M R. Fluorine-18 Labeled Chemotactic Peptides: a Potential Approach for the PET Imaging of Bacterial Infection [J]. Nucl Med Biol, 1995, 22: 759~764.
- [5] GUHLKE S, COENEN H H, STOCKLIN G. Fluorocyclization Agents Based on Small n. c. a. [^{18}F] Fluorocarboxylic Acids [J]. Int J Appl Radiat Isot, 1994, 45: 715~727.
- [6] FREDRIKSSON A, JOHNSTROM P, ELANDER S S, et al. Labeling of Human C-peptide by Conjugation With N-succinimidyl-4- ^{18}F Fluorobenzoate [J]. J Labeled Compd Radiopharm, 2001, 44: 509~519.
- [7] VAIDYANATHAN G, BIGNER D D, ZALUTSKY M R. Fluorine-18-labeled Monoclonal Antibody Fragments: a Potential Approach for Combining Radioimmunoscintigraphy and Positron Emission Tomography [J]. J Nucl Med, 1992, 33: 1535~1541.
- [8] LANG L X, ECKELMAN W C. One-step of ^{18}F Labeled [^{18}F] N-succinimidyl 4- (fluoromethyl) benzoate for Protein Labeling [J]. Int J Appl Radiat Isot, 1994, 45(12): 1155~1163.
- [9] LANG L X, ECKELMAN W C. Labeling Proteins at High Specific Activity Using N-succinimidyl 4- ^{18}F (fluoromethyl) Benzoate [J]. Int J Appl Radiat Isot, 1997, 48(2): 169~173.
- [10] CARRASQUILLO J A, LANG L X, HERSCOVITCH P, et al. Aminosyn . Effectively Blocks Renal Uptake of ^{18}F -labeled anti-tac disulfide-stabilized Fv [J]. Cancer Res, 1998, 58: 2612~2617.

SYNTHESIS OF N-SUCCINIMIDYL-4- ^{18}F (FLUOROMETHYL) BENZOATE

LI Jun-ling, ZHANG Xiu-li, TIAN Hai-bin,
ZHOU Wei, LIN Ying-wu, YIN Duan-zhi, WANG Yong-xian

Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: N-succinimidyl-4- ^{18}F (fluoromethyl) benzoate (^{18}F -SFMB) of labeling proteins has been synthesized. Laborious and time-consuming HPLC is substituted by simple Sep-pak silica during the process of isolation. Many factors affecting the radiochemical synthesis of ^{18}F -SFMB including reaction solvents, temperature, the mole ratio of K/222 to K_2CO_3 and reaction time are studied. The better labeling conditions are as follows: dry acetonitrile as solvent, the mole ratio of K/222 to K_2CO_3 is 1:1, reaction time is 5 min at 80 °C. The radiochemical yield is about 57 % (EOS) which is about 3 times higher than the published data. IgG is indirectly labeled by ^{18}F -SFMB and the labeled yield are about 88 % at room temperature.

Key words: radiochemical synthesis; N-succinimidyl-4- ^{18}F (fluoromethyl) benzoate (^{18}F -SFMB); IgG