

文章编号:0253-9950(2006)01-0038-05

双功能偶联剂 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯的优化合成及其碘标记

刘秀青, 汪勇先, 刘振锋, 尹端沚

中国科学院 上海应用物理研究所 放射性药物研究中心, 上海 201800

摘要:为了改善碘标记生物分子在体内的脱碘问题,在无水无氧条件下合成了碘标记前体 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯(SPC),并优化了合成条件,产率达到 45%,并用核磁共振、质谱法进行了表征。在此基础上,合成了 5-碘-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯(SIPC)。对标记前体 SPC 的 ^{125}I 标记条件进行了摸索,最终标记率达到 80%以上,经高效液相色谱(HPLC)分离后,放化纯度达到 97%。标记后的 ^{125}I -SIPC 在 4 °C 保存 24 h,放化纯度仍在 92%以上,稳定性良好。

关键词: 碘; 间接标记; 标记前体; SPC; ^{125}I -SIPC

中图分类号: R817.9 **文献标识码:** A

Synthesis of *N*-Succinimidyl-5-(Tributylstannyl)-3-Pyridinecarboxylate(SPC) and Its Iodination

LIU Xiu-qing, WANG Yong-xian, LIU Zhen-feng, YIN Duan-zhi

Shanghai Institute of Applied Physics, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: In order to alleviate the *in vivo* deiodination of radioiodine-labeled biomolecules, a novel precursor, *N*-succinimidyl-5-(tributylstannyl)-3-pyridinecarboxylate(SPC), is synthesized in an oxygen- and water-free argon atmosphere. After optimization of the synthetic experimental conditions the SPC yield reaches 45%. The product is characterized by ^1H NMR and MS. *N*-succinimidyl-5-iodo-3-pyridinecarboxylate(SIPC) is also synthesized as a standard reference material. ^{125}I labeled SPC is prepared with a labeling rate better than 80% and radiochemical purity higher than 97% after HPLC purification. The radiochemical purity remains over 92% after 24 h storage at 4 °C.

Key words: iodine; indirect labeling; precursor; SPC; ^{125}I -SIPC

放射性碘标记技术在分子生物学及分子免疫学中占有重要的地位,它已广泛运用于医学及临床检验中。目前,碘标记技术面临的主要问题是标记后的蛋白质在体内的迅速脱碘问题^[1,2]。为此,人们不断地改善碘标记方法。Zalutsky^[3,4]等

合成了一种标记前体 *N*-琥珀酰亚胺-3-碘苯甲酸酯(SIB),利用 SIB 间接标记单克隆抗体(MAbs)。王丽华^[5]合成了 SIB,并用它间接碘标记了血管活性肠肽(VIP)。另外人们也尝试了很多类似的前体^[6,7]。其结果表明,利用这些前体

收稿日期:2005-05-23; 修订日期:2005-10-28

作者简介:刘秀青(1979—),女,河北沧县人,硕士研究生,无机化学专业。

间接标记的 MAbs 在动物体内甲状腺部位聚集剂量降低了 2 个量级, 大大改善了脱碘问题。

为了得到一种更好的标记 MAbs 的酰化试剂, Garg^[8] 等人合成了用于标记蛋白质的试剂 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯 (SPC), 用于合成前体 SIPC。SIPC 与 SIB 相比有两个优点: (1) 采用 SIPC 标记可形成碘烟酸 (INA) 加合物, 脱碘反应主要是碘代苯环如 3-碘酪氨酸、5-碘酪氨酸等的代谢过程, 而碘代杂环化合物很难被相关的酶识别; (2) 利用 SIPC 标记的 MAbs 在体内形成代谢产物碘烟酸 (INA) 及其氨基酸加合物, 与 SIB 的代谢产物碘苯甲酸及其氨基酸加合物相比亲脂性较差, 可迅速从正常组织中清除, 从而提高了肿瘤与正常组织的相对剂量比。Garg^[8] 等比较了用不同前体标记的蛋白质的肿瘤靶向情况, 选择 SIB 标记的 MAbs 81C6 为基准, 评价了 SIPC 标记方法的潜在优势。唐军^[9] 等合成了用于放射性碘 (碘) 标记蛋白质的 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯 (SPC), 并对其进行了表征。本文拟对 SPC 的合成条件进行优化, 并对 SPC 碘标记条件进行系统摸索。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

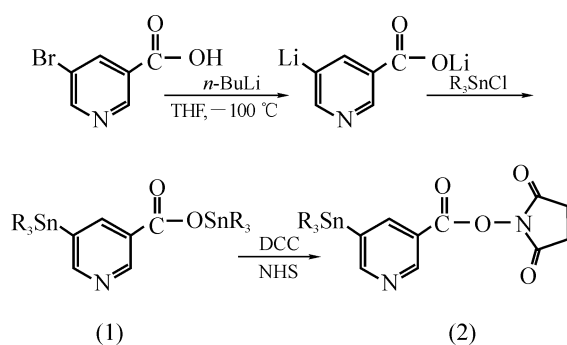
5-溴烟酸, 纯度 98%, 美国 Sigma 公司生产; 三正丁基氯化锡, 纯度 97%, 二环己基碳二亚胺 (DCC)、纯度 99%, 均为瑞士 Fluka 公司生产; 正丁基锂, 2.5 mol/L, 比利时 Acros 公司生产; 柱色谱硅胶, 0.056~0.074 mm, 上海谊恒工贸有限公司精良精细化工厂生产; SiGF₂₅₄ 硅胶层析板, 山东烟台芝罘市黄务硅胶开发试验厂生产; *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 纯度 ≥ 97%, 美国 Sigma 公司生产; 氯代琥珀酰亚胺 (NCS), 纯度 ≥ 98%, 日本东京化成工业株式会社生产; 二苯甲酮, 化学纯, 中国双香助剂厂生产; 四氢呋喃 (THF)、钠、乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产; Na¹²⁵I (13.36 GBq/mL), 核纯度 > 99.95%, 中国核动力设计研究院第一研究所生产。

高效液相色谱 (HPLC), 配有 Waters510 泵、Waters486 可调紫外检测器、Waters 自动梯度系统、PC-800 分析软件, 放射性检测器主要包括 FDG-101 γ 射线流式探头, μ PorasilTM 半制备柱

Sep-Pak Silica (10 μm, φ7.8 mm × 300 mm), 均为美国 Waters 公司生产; 计数率仪, 中国科学院上海应用物理研究所日环仪器厂生产; HP 积分仪, 中国惠普有限公司生产; DPX-300 型核磁共振检测仪, 德国 Bruker 公司生产; API-2000 LC-MS-MS 质谱仪, 美国 Applied Biosystems 公司生产; 数字熔点仪 (WRS-1A), 上海晶科物理光学仪器厂生产; AR-2000 放射性薄层色谱扫描仪, 美国 Bioscan 公司生产。

1.2 SPC 的合成

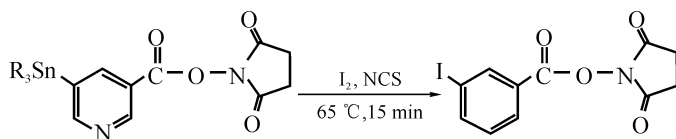
合成路线^[8] 如下:



1.2.1 5-(三正丁基锡)-3-三正丁基锡吡啶甲酸酯 (化合物 1) 的合成 称取 2.02 g (10 mmol) 的 5-溴烟酸于 100 mL 反应瓶中, 反复抽真空, 通氩气, 在氩气保护下, 加入 50 mL 无水四氢呋喃 (THF) 溶解, 用液氮-乙醚浴冷却至约 -100 °C; 磁力搅拌下滴加 10 mL 2.5 mol/L *n*-BuLi 的 THF 溶液, 在 30 min 内加完, 继续反应 30 min, 然后加入 8 mL (约 25 mmol) (*n*-Bu)₃SnCl, 移去低温浴, 室温下继续搅拌反应 4 h 后, 往反应混合物中加入 200 mL 乙酸乙酯。依次用 100 mL 水、30 mL NaHCO₃ (50 mg/mL)、30 mL 水洗涤 2 次; 有机相用无水 MgSO₄ 干燥、过滤、减压蒸馏, 得到油状物 5.58 g。对其进行 HPLC 分析 (分析条件为: μ PorasilTM 半制备柱 Sep-Pak Silica (10 μm, φ7.8 mm × 300 mm); 流动相为乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸体积比为 30 : 70 : 2 的混合液; 流速为 1 mL/min; 检测波长为 250 nm), 并通过硅胶柱色谱分离 (洗脱液为体积比为 20 : 80 的乙酸乙酯与正己烷的混合溶液)。

1.2.2 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯 (SPC) (化合物 2) 的合成 将上述油状物转移至 100 mL 反应瓶中, 依次加入 50 mL 的 THF, 1.65 g DCC 和 0.92 g NHS, 室温下反应 8 h, 除去白色沉淀, 减压浓缩得到黄色油状物, 将

所得产物经硅胶柱色谱分离(洗脱液为体积比为 35 : 65 的乙酸乙酯和正己烷的混合溶液), HPLC 分析(条件同 1. 2. 1), 收集相应产物, 减压蒸馏, 真空干燥, 得到白色油状物, 计算产率。



取 250 mg SPC 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 然后加入 67.7 mg 的 NCS 及 250 mg 的碘素 I_2 , 在 55~60 °C 下反应 15 min, 然后冷却至室温, 有机相先后用 $Na_2S_2O_5$ 和 H_2O 洗涤, 再用无水 Na_2SO_4 干燥, HPLC 分析(条件同 1. 2. 1), 旋转

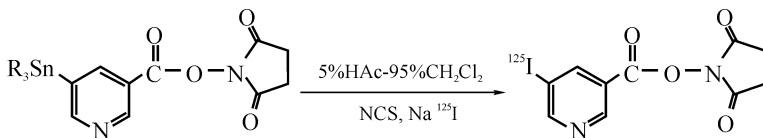
1. 3 5-碘-3-吡啶甲酸-N-琥珀酰亚胺酯 (SIPC) 的合成

合成路线如下:

蒸发至 5 mL, 经硅胶柱色谱分离, 收集相应产物, 用 CH_2Cl_2 -正己烷重结晶得到白色固体。测其熔点, 并计算产率。

1. 4 ^{125}I -SIPC 的合成

合成路线如下:



在指形管中加入 $(1 \sim 8) \times 3.7 \times 10^6$ Bq 的 $Na^{125}I$, 用 5% HAc-95% CH_2Cl_2 调节 pH 至 5.5 左右; 加入 5 μL NCS 及 5 μL SPC, 调节反应时间及反应温度, 加入 $Na_2S_2O_5$ 水溶液终止反应。用乙酸乙酯-正己烷 (35 : 65) 作展开剂, TLC 测其标记率的变化。

1. 5 ^{125}I -SIPC 的稳定性

将标记后的 ^{125}I -SIPC, 经 HPLC 分离(条件同 1. 2. 1)后测其放化纯度, 并在 4 °C 保存 24 h 测放化纯度, 检验其稳定性。

2 结果和讨论

2. 1 SPC 的合成

合成的化合物(2)产率为 45%, 1H NMR 分析结果($CDCl_3$, δ)为: 0.8~1.5(m, 27H, $3 \times n-C_4H_9$), 2.90(s, 4H, $COCH_2CH_2CO$), 8.36(s, 1H, C-4H), 8.79(s, 1H, C-6H), 9.15(s, 1H, C-2H)。MS 分析结果(EI^+ , m/z)为: 510.2, 511(M^+ , 0), 454($M^+ - 57$, 100), 397($M^+ - 114$, 44.16), 226($M^+ - 285$, 70.73)。

SPC 须在水无氧条件下进行合成, 反应物及反应介质要严格除水, 体系也要反复抽真空通氩气, 本实验前两步反应中 $n-BuLi$ 与 $(n-Bu)_3SnCl$ 的用量加大到理论量的 1.2 倍, 并将第一步反应的时间延长到 1 h, 发现最终得到中间产

物产率增大到 45%(文献[8]值为 40%)。对中间产物进行了 HPLC 分析并示于图 1。从图 1 看出, 副产物较文献[9]报道的少。TLC 分析结果表明, 乙酸乙酯与正己烷的体积比为 20 : 80, 30 : 70, 35 : 65 时, 中间产物与其他杂质比较明显的分离开, 但仍有拖尾现象存在。图 1 中曲线可粗略分为四部分, 处于原点的为反应物, 由副产物形成的两部分处于中间产物的两侧, 其 R_f 近似值列入表 1。由于中间产物利用硅胶柱色谱进行分离难以得到纯的产品。通过 HPLC 用半制备柱分离得到纯的中间产物, 但所得中间产物的量很少。

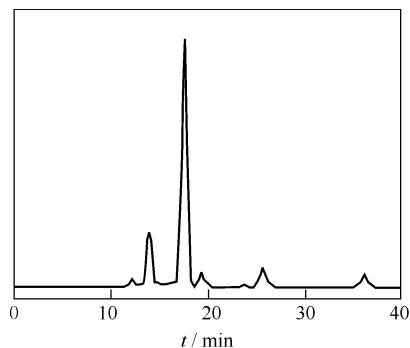


图 1 中间产物的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of middle product

表 1 中间产物的 TLC 分析

Table 1 TLC analysis of intermediates

V ₁ (CH ₃ CO ₂ C ₂ H ₅) : V ₂ (CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃)	Rf	
	中间产物 (Intermediates)	副产物 (By-products)
0 : 100	0. 1	0. 1
10 : 90	0. 58	0. 3, 0. 6
20 : 80	0. 9	0. 3, 1
30 : 70	0. 92	0. 4, 1
35 : 65	0. 96	0. 4, 1
50 : 50	0. 99	0. 5, 1

实验发现,在进行第二步反应时,若中间产物直接投入,不加分离,并将 DCC 与 NHS 的量增加约 20%,对 SPC 的产率并无明显影响。反应过程中用 TLC 对新生成的物质进行了跟踪,发现在 Rf=0. 66 处有一新点,跟踪过程中用定量毛细管取样点板,发现反应生成物颜色加深,说明其浓度逐渐增大,在反应 8 h 后变化不再明显,所以条件调整为室温下反应 8 h。产物经过硅胶柱色谱分离得到纯品 SPC。SPC 的 HPLC 分析示于图 2。从图 2 看出,SPC 分析保留时间为 26. 70 min。

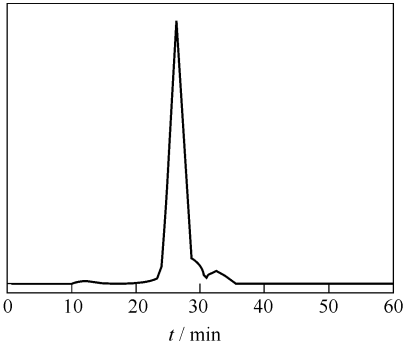


图 2 SPC 的 HPLC 分析图

Fig. 2 HPLC analysis of SPC

2.2 SIPC 的合成

合成的化合物 SIPC 熔点为 169~171 ℃(文献值^[8] 175 ℃),产率为 85%,¹H NMR 分析结果(CDCl₃, δ)为: 2. 9(s, 4H, -COCH₂CH₂CO-), 8. 7(s, 1H, C-4H), 9. 1(s, 1H, C-6H), 9. 26(s, 1H, C-2H)。MS 分析结果(EI⁺, m/z)为: 346. 08, 347(M⁺ + 1, 100), 250(M⁺ - 96, 7. 4), 232(M⁺ - 114, 60)。

合成非放射性的 SIPC 以作为放射性的¹²⁵I-SIPC 的参考标准,便于对其进行鉴定和质量控

制。SIPC 的合成温度为 60 ℃左右,由于 CH₂Cl₂ 的沸点低,易挥发,在高温下体系易暴沸,反应须在敞口容器中进行,并不断向其中滴加 CH₂Cl₂,防止蒸干。最终产物 Rf=0. 48,前方有一杂质 Rf=0. 61。SIPC 的 HPLC 分析示于图 3。从图 3 看出,SIPC 分析保留时间为 32. 97 min。

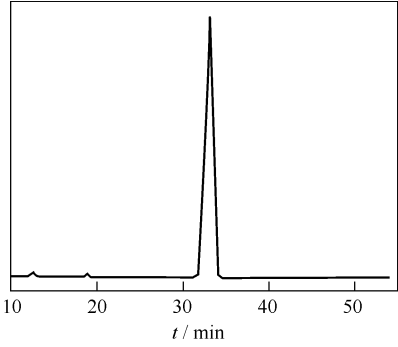


图 3 SIPC 的 HPLC 分析图

Fig. 3 HPLC analysis of SIPC

2.3 ¹²⁵I-SIPC 的制备

反应温度、反应时间对¹²⁵I-SIPC 制备的影响示于图 4, 5。从图 4 可以看出,与 N-琥珀酰亚胺 3-三正丁基锡苯甲酸酯(ATE)不同,SPC 碘标记在室温下并不能达到高的标记率,在 65 ℃左右时,标记率可达到最高。这可能是由于吡啶环的亲核性差,另外在 pH=5~5. 5 时,杂原子的质子化使得吡啶环的活性降低,不利于亲电反应。从图 5 可看出,在高温下(t=65 ℃),碘化反应时间大于 5 min 时,¹²⁵I-SIPC 的产率降低。原因是其水解产生了 5-溴烟酸,当氧化剂(NCS)的量增大时,标记率并无明显变化,说明其用量对标记率影响不大。但根据文献^[8]报道,NCS 用量增大或加热时间过长,会产生副产物 5-氯-3-吡啶甲酸-N-琥珀酰亚胺酯。从图 5 看出,当反应时间延长至 15 min 时,标记率降低到 70 %左右。而在 SIPC 的合成中反应时间为 15 min,以便使 SPC 与 I₂ 反应更充分,但产物需进一步分离才能得到纯的 SIPC。

¹²⁵I-SIPC 的制备在 65 ℃, pH=5~5. 5 的 CH₂Cl₂ 介质中反应 5 min,产物经 TLC 分析(图 6)测得的标记率 Y 可达到 80. 7%。从图 6 看出,¹²⁵I-SIPC 的 Rf 值为 0. 48,与非放射性的 SIPC 相同,原点处的峰可能是游离碘及 5-(¹²⁵I) 碘烟酸。

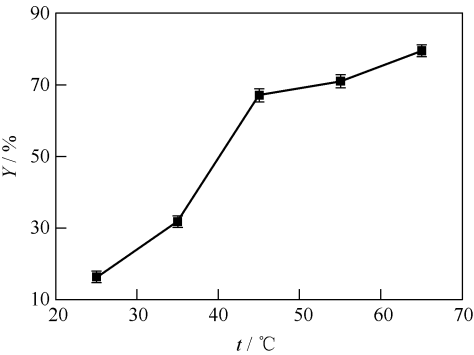


图 4 反应温度对标记率的影响

Fig. 4 Influence of reaction temperature on labeling rate

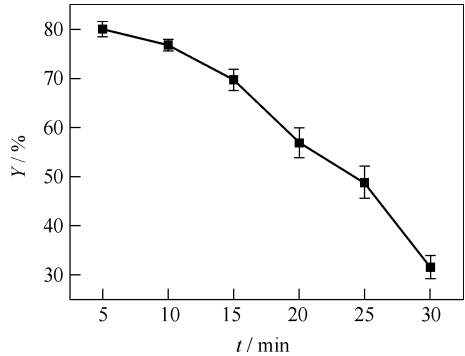


图 5 标记率受反应时间的影响

Fig. 5 Influence of reaction time on labeling rate
 $t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$

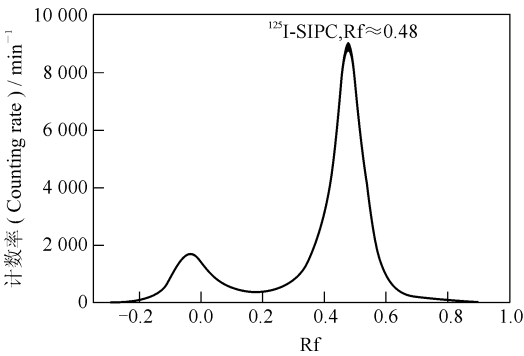


图 6 125I-SIPC 的 TLC 分析

Fig. 6 TLC analysis of 125I-SIPC

2.4 125I-SIPC 的稳定性

对 125I-SIPC 的稳定性检测结果表明,经 HPLC 分离后放化纯度达 97%,4 °C 放置 24 h 后放化纯度仍在 92% 以上,说明其稳定性良好。

3 结 论

在无水无氧条件下合成 SPC,反应中 $n\text{-BuLi}$ 与 $(n\text{-Bu})_3\text{SnCl}$ 的用量加大到理论量的 1.2 倍,并将第一步反应的时间延长到 1 h,不分离中间产物对最终产率没有明显影响,简化了实验步骤。125I-SIPC 的制备在 65 °C, pH=5~5.5 的 CH_2Cl_2 介质中反应 5 min,标记率可达到 80% 以上。

参考文献:

[1] Pimm M V, Perkin A C, Baldwin R W. Differences in Tumor and Normal Tissue Concentrations of Iodine- and Indium-Labeled Monoclonal Antibody II. Biodistribution Studies in Mice With Human Tumor Xenografts[J]. Eur J Nucl Med, 1985,11:300-304.

[2] Koizumi M, Endo K, Watanabe Y, et al. Pharmacokinetics of Internally Labeled Monoclonal Antibodies as a Gold Standard; Comparison of Biodistribution of 75Se-, 111In-, and 125I-Labeled Monoclonal Antibodies in Osteogenic Sarcoma Xenografts in Nude Mice[J]. Cancer Res, 1989,49:1 752-1 757.

[3] Zalusky M R, Narula A S. A Method for the Radiohalogenation of Proteins Resulting in Decreased Thyroid Uptake of Radioiodine[J]. Appl Radiat Isot, 1987,38:1 051-1 055.

[4] Zalusky M R, Narula A S. Radiohalogenation of a Monoclonal Antibody Using a *N*-Succinimidyl-3-(Tri-*n*-Butylstannyl) Benzoate Intermediate [J]. Cancer Res, 1988,48:1 446-1 450.

[5] 王丽华,李俊玲,汪勇先,等. 血管活性肠肽(VIP)的放射性碘间接标记[J]. 中华核医学杂志, 2002, 22 (4):243-246.

[6] Wilbur D S, Hadley S W, Hyalarides M D, et al. Development of a Stable Radioiodinating Reagent to Label Monoclonal Antibodies for Radiotherapy of Cancer[J]. J Nucl Med, 1989,30:216-226.

[7] Khawli L A, Kassis A I. Synthesis of 124I Labeled *N*-Succinimidyl *p*-Iodobenzoate for Use in Radiolabeling Antibodies[J]. Nucl Med Biol, 1989, 16: 727-733.

[8] Garg S, Garg P K, Zalusky M R. *N*-Succinimidyl-5-(Trialkylstannyl)-3-Pyridinecarboxylates: a New Class of Reagents for Protein Radioiodination[J]. Bioconj Chem, 1991,2:50-56.

[9] 唐 军,金建南,刘 宁,等.用于放射性碘(碘)标记蛋白质的偶联剂 SPC 的合成与表征[J]. 原子能科学技术, 2004,25(3):261-265.