

文章编号 : 0253-9950(2004)03-0175-04

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记趋化肽类似物的制备

岳井银¹, 王 芹¹, 冯学民², 韩佩珍¹, 穆传杰¹

1. 中国医学科学院 中国协和医科大学 放射医学研究所, 天津 300192;

2. 天津市第一中心医院 核医学部, 天津 300192

摘要: 利用固相法合成趋化肽类似物 fMLFK, 并采用双功能螯合剂 (HYNIC) 技术合成了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的趋化肽类似物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HYNIC-fMLFK, 测定了标记物的标记率和放化纯度, 考察了配合物的稳定性。结果表明, 合成 fMLFK 的产率大于 80%, 纯度大于 97%; 质谱法测得的相对分子质量与理论值相符; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记后, 配合物的放化纯度大于 95%, 在 24 h 内放化纯度无明显降低。

关键词: 多肽; 固相合成; 双功能螯合剂 (HYNIC) 技术; 显像剂

中图分类号: R817.4 **文献标识码:** A

随着核医学研究的深入, 出现了各种类型的炎症显像剂, 包括无机化合物、免疫球蛋白、脂质体、小分子多肽以及标记的白细胞等。目前, 炎症显像剂研究的热点集中在对白细胞表面表达的抗原或受体的研究, 利用这些抗原或受体的标记配体作为示踪剂可以达到显像的目的。趋化肽 (formyl-Met-Leu-Phe, fMLF) 是原核生物产生的一种趋化因子, 白细胞表面存在其高亲和力受体, 可以通过受体-配体结合引发白细胞的趋化作用^[1]。文献[2]表明, 采用手工固相方法合成的趋化肽类似物 (fMLFK) 具有与 fMLF 相同或更高的白细胞受体亲和力。通过化学反应合成双功能螯合剂 (HYNIC) 后^[3], fMLFK 大多采用 HYNIC 技术进行 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记, 标记反应体系中的辅助配体可以是三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tricine)^[4]、甘露醇^[5]和葡庚糖酸^[6]。文献[6]研究表明, 标记体系采用 Tricine 作为辅助配体时, 得到的标记物在动物实验中可以获得更高的信噪比 (T/NT 值)。本实验室在先前的研究中已采用多肽合成仪合成了 fMLFK, 并经 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记后成功地用于动物体炎症病灶的体内显像^[7]。本研究在此基础上对多肽固相合成方法进行优化, 提高 fMLFK 的产率及纯度, 简化双功能螯合剂的合成步骤, 同时优化标记条件, 提高标记物的稳定

性。

1 实验部分

1.1 试剂

Bio-Gel P2 柱, 美国 Bio-Rad 公司产品; 6-氯烟酸, 二碳酸二叔丁酯 ((tBuOCO)₂O), 二异丙基乙胺, 三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tricine) 均为美国 Aldrich 公司产品; N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ), 美国 ACT 公司产品; N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 上海伯奥生物科技有限公司进口分装; 环己基碳二亚胺 (DCC), 中国医药集团上海化学试剂公司进口分装; 乙腈, 色谱纯, 协和试剂公司产品; 高锝酸钠淋洗液 ($\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$), 天津市第一中心医院核医学部提供; 树脂切割剂, 军事医学科学院提供; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

ABI 433A 多肽合成仪, 美国 PE 公司产品 (合成试剂为 PE 公司原装配套试剂); 冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司产品; R200D 型精密分析天平, 德国 Sartorius 公司产品; HPLC, 美国 Beckman 公司产品; ZAB-HB 质谱仪, 英国 VG 公司产品; VARIO EL 元素分析仪, 德国 Elementar 公司产品; ACP200 核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司产品; UV-3000 紫外分光光度计, 日本岛津公司产

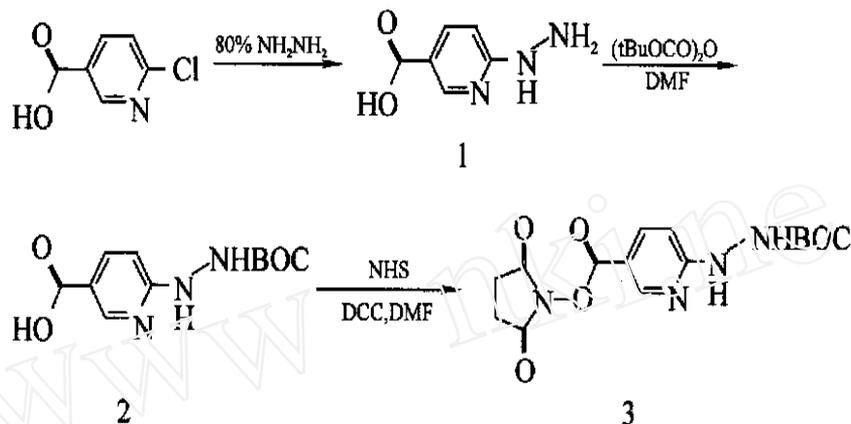
收稿日期: 2003-07-21; 修订日期: 2003-12-08

基金项目: 卫生部科学研究基金资助项目 (98-1-042)

作者简介: 岳井银 (1972-), 男, 天津人, 助理研究员, 硕士, 影像医学与核医学专业。

品; FT-646 型微机放免测量仪, 北京核仪器厂产品。

1.3 实验方法



(1) 化合物 1 (6-胍基吡啶-3-羧酸) 的合成。称取 6-氯烟酸 4.0 g, 加入 18 mL 80% 水合肼, 在 100 °C 油浴中加热 4 h 后, 将混合物冷却至室温, 浓缩得白色沉淀, 溶于极少量水中, 用浓盐酸调 pH 值为 5.5, 生成沉淀, 过滤, 用 95% 乙醇、乙醚洗涤, 真空干燥得黄色固体, 称重 3.2 g, 产率 80%。熔点: 287 ~ 288 °C, MS (m/z): 154 (MW153)。

(2) 化合物 2 (6-BOC-胍基吡啶-3-羧酸) 的合成。将 1.4 g 化合物 1 溶于 10 mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 加入 1.2 mL 三乙胺, 混匀, 加入 2.13 g $(t\text{BuOCO})_2\text{O}$ 。反应混合物在室温下搅拌 17 h, 减压蒸馏得棕色固体, 溶于少量乙酸乙酯, 硅胶 (粒径为 50 ~ 75 μm) 柱层析纯化, 得产物 2.03 g, 产率 82%。MS ($M+H$): 254 (MW 253)。

(3) 化合物 3 (琥珀酰亚氨基-6-BOC-胍基吡啶-3-羧酸) 的合成。将 1.45 g 化合物 2 和 0.66 g NHS 溶于 15 mL DMF 中, 1.18 g DCC 溶于 5 mL DMF 中, 混合两种溶液, 于室温搅拌 17 h, 过滤, 滤液浓缩得棕色固体, 溶于极少量乙酸乙酯, 硅胶 (粒径为 50 ~ 75 μm) 柱层析纯化, 得黄色固体 1.1 g, 产率 60%。熔点: 168 ~ 171 °C, MS ($M+H$): 351 (MW 350)。元素分析 (以 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_4$ 计): 计算值, C, 51.43%; H, 5.18%; N, 16.00%; 实测值, C, 51.51%; H, 5.15%; N, 15.95%。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.53 (s, 9H), 3.01 (s, 4H), 7.24 (d, 5-H), 8.23 (dd, 4-H), 8.72 (d, 2-H)。

1.3.2 趋化肽类似物 formyl-Met-Leu-Phe-Lys (fMLFK) 的合成

(1) 四肽-树脂的合成 (Met-Leu-Phe-Lys

1.3.1 双功能整合剂的合成 双功能整合剂 (HYNIC) 的合成路线如下, 其中化合物 2, 3 的合成必须在无水条件下进行。

resin)。在 ABI 433A 多肽合成仪主控电脑上运行 SynthAssistTM 软件, 编辑多肽序列 Met-Leu-Phe, 选择 Lys 预挂的 Pre-loaded HPM resin, 所需氨基酸的 α -氨基由 Fmoc 基团保护, 设定合成方法为 FastMoc 0.1 monPrevPK, 运行仪器合成四肽-树脂。

(2) 四肽-树脂的甲酰化^[8]。将 1 mmol 四肽-树脂干燥后装入试管中, 加入 8.7 mL 甲酸, 室温搅拌 17 h 后真空蒸发, 剩余物溶于 8.7 mL 无水 DMF, 加入 0.445 g (1.80 mmol) EEDQ, 室温搅拌 20 h。慢速滤纸过滤, 用无水甲醇充分洗涤, 空气干燥。

(3) 趋化肽类似物-树脂的切割。将趋化肽类似物-树脂置于冰浴中冷却, 逐滴加入预冷的切割剂, 室温下继续搅拌 1.5 h。慢速滤纸过滤, 用少量三氟乙酸 (TFA) 洗涤树脂和容器, 合并滤液, 加入 30 mL 预冷的乙醚, 出现白色沉淀, 在 2000 r/min 下离心 10 min, 除去上清液。加入 8 ~ 9 mL 预冷乙醚, 充分洗涤多肽沉淀, 离心, 洗涤 2 ~ 4 次, 除去切割剂, 真空干燥后得趋化肽类似物粗产物。

(4) 趋化肽类似物的纯化。趋化肽类似物粗产品加少量水溶解后, 经高效液相色谱分离纯化。色谱条件: 反相 C18 柱, 梯度洗脱, 流动相 A 为 0.1% TFA 纯水溶液, 流动相 B 为含 0.1% TFA 的乙腈, 洗脱梯度为流动相 B 的比例在 40 min 内由 30% 增加到 50%, 检测波长 220 nm, 流速 1.00 mL/min。收集趋化肽类似物所在的洗脱峰, 旋转蒸馏除去有机溶剂, 经冷冻干燥得到纯化后的趋化肽类似物, HPLC 及质谱鉴定。

1.3.3 ⁹⁹Tc^m 标记趋化肽类似物 (1) 趋化肽类似物与双功能螯合剂的连接 (fMLFK-HYNIC)。将 93 mg 趋化肽类似物溶于 1 mL DMF 和 30 μL 二异丙基乙胺中, 77 mg 双功能螯合剂溶于 0.5 mL DMF, 合并以上两种溶液, 室温搅拌 2 h。往反应混合物中加入适量石油醚, 除去上清液, 油层中加入适量 H₂O, 有沉淀生成, 过滤, 沉淀经 5% NaHCO₃, H₂O 和乙酸乙酯洗涤后, 溶于 5 mL TFA (内含 0.1 mL 对-甲酚), 20 °C 下搅拌 15 min, 除去胍基上的 BOC 保护基。溶液经旋转蒸馏除去 TFA, 加入乙醚, 过滤, 得 fMLFK-HYNIC。双功能螯合剂中的 BOC 保护基可以起到封闭胍基的作用, 使连接反应的产物单一, 不需要进一步纯化。紫外分析显示, 最大吸收峰为 268 nm 和 315 nm, 与文献[10]相符。元素分析 (以 C₃₃H₄₉O₇N₈S 计): 计算值, C, 56.47%; H, 7.04%; N, 15.97%。实测值, C, 56.49%; H, 7.07%; N, 15.94%。

(2) 趋化肽类似物的⁹⁹Tc^m 标记 (⁹⁹Tc^m-HYNIC-fMLFK)。往 50 μL 160 mg/mL 的 Tricine 水溶液中, 顺序加入 20 μL 不同浓度 fMLFK-HYNIC (溶于 DMSO) 溶液、200 μL Na⁹⁹Tc^mO₄ (296 ~ 444 MBq), 44 μL 乙醇及 6 μL 1 mg/mL SnCl₂ (溶于 0.1 mol/L HCl), 反应体系混匀后, 室温下放置 0.5 ~ 1 h, 测定标记率。选择 pH 值不同的 0.025 mol/L 磷酸缓冲液作为洗脱液, 标记物经过 Bio-Gel P2 柱纯化, 分步收集, 确定洗脱峰位置, 测定放化纯度。标记率及放化纯度的测定采用薄层层析法, 硅胶 G 层析板作为支持物, 生理盐水展开, 每个时间点测定 5 次。对照系统采用 Whatman No. 1 层析纸作为支持物, 体积比为 9:1 的丙酮-水混合溶液展开。

2 结果和讨论

2.1 趋化肽类似物 fMLFK 的合成

本文采用固相法合成多肽, 不仅简化了过量反应试剂和反应副产物同产物分离的操作, 还可通过使用过量的反应试剂, 使缩合反应更趋完全, 从而获得更高的产率, 并且 ABI 433A 多肽合成仪自动化程度高, 合成过程完全由电脑控制, 合成过程有完整的记录。实验还在文献[8]的基础上对四肽-树脂的甲酰化方法进行了修改, 文献[8]报道液相合成过程中甲酰化反应的产率为 93%。6 次合成实验结果显示, 粗产物通过 HPLC 分离

纯化后, fMLFK 的最终产率为 (81.9 ± 1.4)% , 优于文献[7]的实验结果。fMLFK 产品经分析型反相 HPLC 测定, 保留时间与标准品相同, 纯度为 (97.7 ± 0.9)% , MS(M + H) : 567 (MW566) , 与计算值相符。

2.2 趋化肽类似物的浓度对标记率的影响

肽的质量浓度对标记率的影响见图 1。由图 1 可知, 肽的质量浓度对标记反应的影响较大, 随 fMLFK-HYNIC 质量浓度的增大, 标记率呈上升趋势, 之后逐渐趋于平衡。当肽的质量浓度在 30 μg/mL 以上时, 标记率即可达 90% , 实验中选用 40 μg/mL。

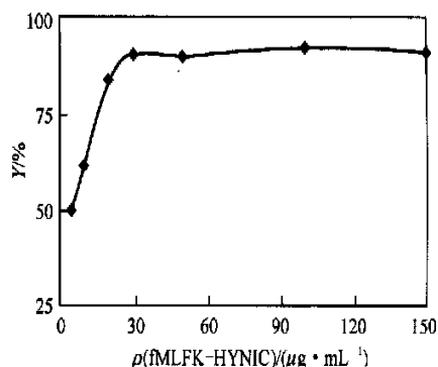


图 1 fMLFK-HYNIC 的质量浓度对标记率的影响

Fig. 1 Effect of fMLFK-HYNIC mass concentrations on labeling yield

2.3 ⁹⁹Tc^m 标记的趋化肽类似物的体外稳定性

不同 pH 值的磷酸缓冲液对纯化后的放射性药物的稳定性有一定影响, 结果示于图 2。由图 2 可以看出, 在 pH = 7.4 的条件下, ⁹⁹Tc^m-HYNIC-fMLFK 在室温放置 24 h, 放化纯度均在 95% 以上, 无明显降低 ($t < 2.31, P > 0.05$)。而在 pH = 8.0 的条件下, ⁹⁹Tc^m-HYNIC-fMLFK 在室温放置 18 和 24 h 后, 放化纯度分别为 94.6% 和 94.3% , 与 pH = 7.4 条件下相比, 放化纯度明显降低 ($t = 2.36$ 和 $t = 2.84, P < 0.05$)。说明在此条件下标记物室温放置超过 18 h 后稳定性降低。因此本实验中标记物的纯化采用 pH = 7.4 的磷酸缓冲液。⁹⁹Tc^m 可以通过不同化合物形式制备放射性标记物, HYNIC 技术用于标记蛋白与多肽已经超过十年了^[3,9], 经该方法标记的⁹⁹Tc^m-趋化肽类似物在实验中表现出了良好的稳定性以及优异的显像特性, 这在其它研究中也得到了证实^[10]。在本研究中, 标记过程在室温下进行, 标记反应连同分

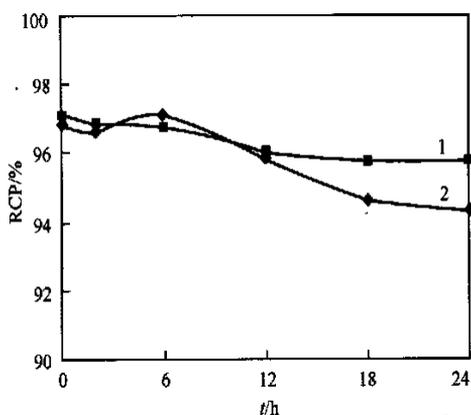


图 2 放射性药物的体外稳定性

Fig. 2 Stability of ^{99m}Tc -HYNIC-fMLFK in vitro

1 — pH = 7.4, 2 — pH = 8.0

离纯化操作可在 2 h 内完成,比较适合肽类这种具有生物学活性药物的标记。

3 结 论

(1) 建立了趋化肽类似物 fMLFK 的合成及纯化方法, fMLFK 的最终产率大于 80%, 纯度大于 97%。

(2) 采用 HYNIC 技术成功制备了 ^{99m}Tc 标记的趋化肽类似物, 对标记条件进行优化, 标记物的放化纯度大于 95%, 且在标记后 24 h 内无明显降低, 具有良好的稳定性。

参考文献:

- [1] Zoghbi S, Thakur M, Gottschalk A. Selective Cell Labeling: A Potential Radioactive Agent for Labeling of Human Neutrophils[J]. J Nucl Med, 1981, 22:32.
- [2] Fischman A J, Pike M C, Kroon D, et al. Imaging Focal Sites of Bacterial Infection in Rats With

Indium-111-labeled Chemotactic Peptide Analogues [J]. J Nucl Med, 1991, 32:481~491.

- [3] Michael J A, Malik J, Caroline Iten K, et al. Technetium-99m-human Polyclonal IgG Radiolabeled Via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats[J]. J Nucl Med, 1990, 31:2 022~2 028.
- [4] Van der Laken C J, Boerman O C, Oyen W J G, et al. Technetium-99m-labeled Chemotactic Peptides Specifically Localize in Acute Infection and Sterile Inflammation [J]. J Nucl Med, 1997, 38:1 310~1 315.
- [5] Babich J W, Fischman A J. Effect of "Co-ligand" on the Biodistribution of ^{99m}Tc -labeled Hydrazino Nicotinic Acid Derivatized Chemotactic Peptides [J]. Nucl Med Biol, 1995, 22:25~30.
- [6] Babich J W, Tompkins R G, Graham W, et al. Localization of Radiolabeled Chemotactic Peptide at Focal Sites of E. Coli Infection in Rabbits: Evidence for a Receptor Specific Mechanism [J]. J Nucl Med, 1997, 38:1 316~1 322.
- [7] 岳银根, 王 芹, 刘国藩, 等. ^{99m}Tc -HYNIC-fMLFK 用于小鼠炎症显像[J]. 中华核医学杂志, 2003, 23(3):179~181.
- [8] Zecchini P G, Paradisi P M, Torrini I, et al. Synthesis and Chemotactic Activity of N-formyl-Met-Leu-Phe Analogues Containing (S)-phenylalaninol Derivatives [J]. Arch Pharm (Weinheim), 1995, 328:673~676.
- [9] Liu S, Edwards D S. ^{99m}Tc -labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals [J]. Chem Rev, 1999, 99:2 235~2 268.
- [10] Fischman A J, Babich J W, Barrow S A, et al. Detection of Acute Bacterial Infection Within Soft Tissue Injuries Using a ^{99m}Tc -chemotactic Peptide [J]. J Trauma, 1995, 38(2):223~227.

Preparation of ^{99m}Tc Labeled Chemotactic Peptide Analogue

YUE Jing-yin¹, WANG Qin¹, FENG Xue-min², HAN Pei-zhen¹, MU Chuan-jie¹

1. Institute of Radiation Medicine, CAMS and PUMC, Tianjin 300192, China;

2. Department of Nuclear Medicine, the First Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China

Abstract: The chemotactic peptide analogue fMLFK, synthesized with solid phase method, is labeled

(下转第 192 页, Continued on page 192)

(5) Na_2CO_3 的洗涤不能恢复辐照后萃取剂的萃取性能。

参考文献:

- [1] 陈文浚,祝霖,丁颂东,等. 二酰胺结构对其萃取 Am()和 Eu()性能的影响[J]. 高等学校化学学报,1998,19(11):1724~1726.
- [2] 叶国安,何建玉,罗方祥,等. 酰胺类对 Am()和 Eu()的萃取行为研究. 萃取热力学和萃合物光谱研究[J]. 核化学与放射化学,2000,22(3):136~143.
- [3] 张荣锁,陈文浚,黄忠良,等. 酰胺化合物对 U(), Eu(), Sr()和 Fe()的萃取[J]. 核化学与放射化学,2001,23(2):87~91.
- [4] Renato Chiarizia, E Philip Horwitz. Hydrolytic and Radiolytic Degradation of Octyl(phenyl)-N,N-diisobutylcarbamoylmethylphosphine Oxide and Related Compounds[J]. Sol Extr Ion Exch,1986,4(4):677~723.

Study on the Hydrolytic and Radiolytic Stabilities of N,N,N',N'-tetra-butyl-3-oxa-pentanediamide

ZHANG Xiao-lan^{1,2}, YANG Yan-qin², WU Ming-hong²,
BAO Bo-rong^{1,2}, YE Guo-an³, ZHANG Xian-ye³

1. Shanghai Institute of Apply Physics Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China;
2. School of Environment and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China;
3. Radiochemistry Department, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China

Abstract: N,N,N',N'-tetra-butyl-3-oxa-pentanediamide (TBOPDA) presents excellent extraction abilities for actinides elements. The effects of hydrolysis and radiation on extraction behavior of U() with TBOPDA have been investigated. It indicates that TBOPDA has better hydrolysis stability. At 50 °C, when the acidity is 1 mol/L HNO_3 , the effects of hydrolysis on distribution ratio are unchanged, when the acidity is 5 mol/L, the changes of distribution ratio are about 37%. At the same time, it also has high radiolysis stability. When absorbed dose reached 1 MGy, $D(U)$ declined remarkably. The addition of diluents resulted in a decline of radiolytic stability.

Key words: hydrolysis; radiolysis; TBOPDA; extraction; U

(上接第 178 页, Continued from page 178)

with ^{99m}Tc by HYNIC technique. The results indicate that the synthesis yield of fMLFK is over 80% and the purity is over 97%. After labeled with ^{99m}Tc , the radiochemical purity of ^{99m}Tc -HYNIC-fMLFK is over 95%. There is no significant decrease of the radiochemical purity in 24 h after the radiopharmaceutical is purified.

Key words: peptide; solid phase synthesis; HYNIC technique; image agent