

文章编号:0253-9950(2008)03-0162-05

$A\beta$ 斑块显像剂 $3'-^{131}\text{I}$ -PIB 的合成与生物分布

陆春雄^{1, 2}, 蒋泉福¹, 吴春英¹, 王颂佩¹, 唐 婕¹, 刘春仪¹, 王正武^{2, 3}

1. 江苏省原子医学研究所 卫生部核医学重点实验室, 无锡 214063;

2. 江南大学 化学与材料工程学院, 无锡 214122;

3. 上海交通大学, 上海 200030

摘要:为了找到适合单光子计算机发射断层(SPECT)的脑内 β 淀粉样蛋白($A\beta$)斑块的显像剂,合成了2-(3'-三正丁基锡-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑,并采用双氧水标记法进行了 ^{131}I 标记,得到了2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑($3'-^{131}\text{I}$ -PIB),放化纯大于95%。对文献中原料与条件作了相应的改进,提高了合成的回收率。正常小鼠体内分布实验表明, $3'-^{131}\text{I}$ -PIB在2 min和60 min时,小鼠脑摄取分别为 $(2.45 \pm 0.43)\% \text{ID/g}$ 和 $(0.19 \pm 0.02)\% \text{ID/g}$ 。说明 $3'-^{131}\text{I}$ -PIB在小鼠脑中初摄取高,清除很快。如果改用合适的核素标记, $3'-\text{I}$ -PIB将是一个有研究前景的 $A\beta$ 斑块显像剂。

关键词: β -淀粉样蛋白斑块; $3'-^{131}\text{I}$ -PIB;合成

中图分类号:R817.4 **文献标志码:**A

Synthesis and Radioiodinelabeling of β -Amyloid Plaques Imaging Agent $3'-^{131}\text{I}$ -PIB

LU Chun-xiong^{1, 2}, JIANG Quan-fu¹, WU Chun-ying¹, WANG Song-pe¹,
TANG Jie¹, LIU Chun-yi¹, WANG Zheng-wu^{2, 3}

1. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine,
Ministry of Health, Wuxi 214063, China;

2. School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

Abstract: The synthesis and biodistribution of β -amyloid plaques imaging agent 2-(3'-iodo-4'-methylaminophenyl)-6-hydroxy-benzothiazole($3'-^{131}\text{I}$ -PIB) were reported. The chemical structure of the labeling precursor 2-(3'-tributylstannyl-4'-methylaminophenyl)-6-hydroxy-benzothiazole and all its intermediates were verified by ^1H NMR and MS. The radioiodinated compound was prepared using iododestannylation reaction by hydrogen peroxide. Final radiochemical purity is above 95% determined by TLC. The *in vivo* biodistribution of $3'-^{131}\text{I}$ -PIB in normal mice shows excellent brain uptake and washout, indicating this benzothiazole (BTA) derivative has potential for *in vivo* imaging amyloid deposits.

Key words: β -amyloid plaques; $3'-^{131}\text{I}$ -PIB; synthesis

收稿日期:2007-10-29;修订日期:2008-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470496);江苏省自然科学基金资助项目(BK2004423)

作者简介:陆春雄(1975—),男,江苏无锡人,助理研究员,药物化学专业

老年性痴呆(senile dementia),亦称阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD),是一种以临床和病理为特征的进行性退行性神经系统疾病。随着人口老龄化,其患病率也明显增高。AD 病因是多源性的,常有临床变异,在出现症状前尚无检出或生前作出确定诊断的生物学标示物,对 AD 的确诊只能根据尸检脑组织^[1]。随着遗传学和分子生物学的进步,目前已经公认,神经元细胞以外 β 淀粉样蛋白(amyloid β , A β)为主要蛋白组成的老年斑(senile plaques, SP, 也称淀粉样斑块)和脑细胞内高度磷酸化的微管相关蛋白(tau)构成的神经纤维缠结(neuro fibrillary tangles, NFT)是 AD 的两大组织病理特征^[2]。目前对 AD 的治疗研究主要集中在预防和阻止 A β 的形成,或逆转 A β ,如 β 和 γ 分泌酶抑制剂、A β 疫苗、铜-锌螯合剂等等^[3-4],AD 患者脑内 A β 斑块已经成为 AD 病研究的特异靶,因此对 AD 患者脑内 A β 斑块进行活体显像的研究不仅有助于 AD 病的诊断,而且将促进对 AD 治疗药物的评价。

正电子发射断层成像技术(PET)和单光子计算机发射断层(SPECT)配合放射性核素标记的示踪剂,可以非创伤性地进行活体内 A β 显像,这些示踪剂主要都是在与 A β 斑块具有很高亲和力的一些染料的基础上发展而来,如对刚果红(congo red, CR)、硫磺素 T(thioflavin T)和硫磺素 S(thioflavin S)以及吖啶橙(acridine orange)等进行结构改造而得到的¹¹C 标记的 2-(4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑(6-OH-BTA-1)(又称为匹兹堡化合物,PIB)和¹⁸F 标记的 2-(1-(6-[(2-氟乙基)甲基氨基]-2-萘基)亚乙基)丙二腈(FDDNP)等,已成功地用于临床^[5-6]。

2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑(6-OH-BTA-1-3'-I)是¹¹C 标记的 6-OH-BTA-1(匹兹堡化合物)的 3'位被碘取代的衍生物,其与 A β 也有很高的亲和性^[7]。6-OH-BTA-1 是适合 PET 的显像剂,而用碘标记的 6-OH-BTA-1-3'-I 是适合 SPECT 的显像剂。同样,6-OH-BTA-1-3'-I 也可用¹¹C 标记,适合做 PET 显像剂。

文献^[7]对 6-OH-BTA-1-3'-I 的合成标记进行了报道,其标记前体为 2-(4'-甲氨基苯基)-6-甲磺酰酯基苯并噻唑,经氯胺 T 法标记放射性碘,再经 NaOH 水解脱去保护基得到放射性碘标记的 6-OH-BTA-1-3'-I。但用氯胺 T 法进行标记,再经 NaOH 水解,使得反应时间延长,标记率

降低。

本工作拟对文献^[7]报道的合成条件进行改进,以提高反应收率。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑,吴县市东吴染料厂,纯度 99%;对硝基苯甲酰氯,金坛市兰陵化工有限公司,纯度 99.5%;氯化亚锡,纯度大于 98%,上海试四赫维化工有限公司;双三丁基锡,纯度 97%,钼化四三苯膦(Pd(Ph₃P)₄),纯度 99%,均为百灵威产品;Na¹³¹I,成都中核高通同位素股份有限公司;ICR 小鼠,扬州大学农学院,动物许可证书 SCXK(苏)2007-0001;其他试剂均为国产分析纯。

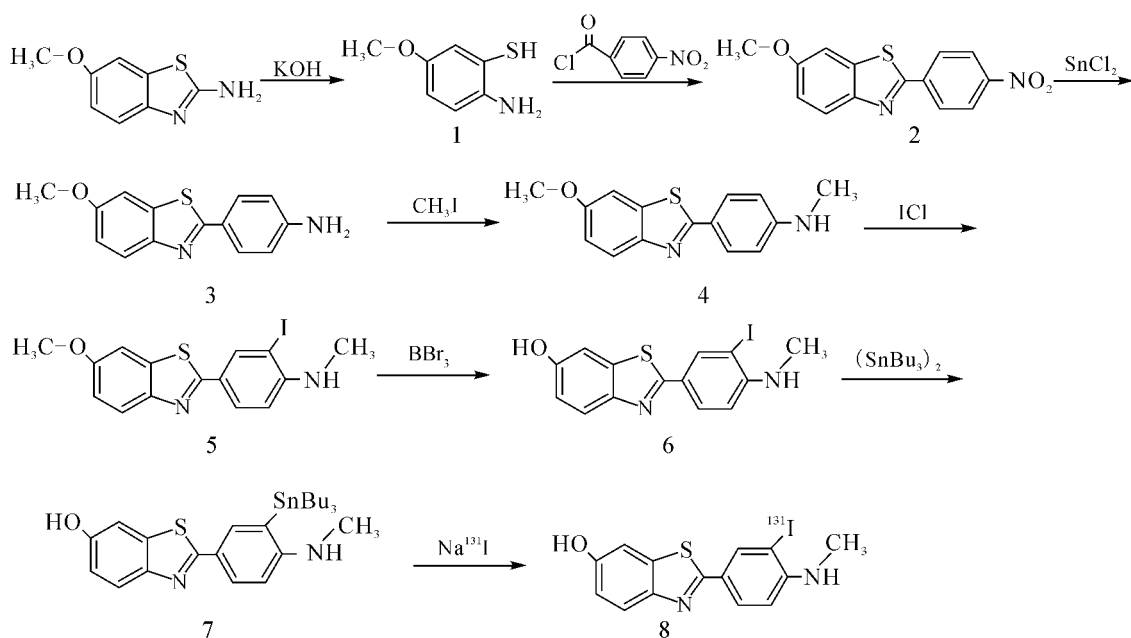
Tensor 27 傅立叶红外分析仪和 AM-400 核磁共振仪,美国 Bruker 公司;ZMD-4000 型质谱分析仪,美国 Waters 公司;C5002 γ -计数器,美国 Packrd-Cobra 公司;Yanadimoto 熔点仪,日本株式会社,温度未校正。

1.2 3'-¹³¹I-PIB 前体的合成

参考文献^[7],合成了 3'-¹³¹I-PIB 前体 6-OH-BTA-1-3'-SnBu₃,并进行了¹³¹I 标记,合成路线示于图 1。

1.2.1 2-(4'-硝基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑(产物 2)的合成 在三颈瓶中加入 2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑 5 g, 50% KOH 30 mL 和 7 mL 乙二醇,氮气保护下搅拌,加热至 145 °C,反应 6 h,冷至室温,继续通氮气,冰水浴下,滴加浓盐酸,调 pH 值至中性,用 50 mL 乙醚萃取 3 次,合并乙醚用无水 Na₂SO₄ 干燥,马上减压除去乙醚,得 5-甲氧基-2-氨基苯硫醇粗品,投入反应,加到含 5 g 对硝基苯甲酰氯的 100 mL 吡啶溶液中,混合,氮气保护,回流 2 h,倒入 1 000 mL 水中,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至中性。有大量黄色固体产生,过滤,固体用吡啶重结晶。

1.2.2 2-(4'-氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑(产物 3)的合成 将 2-(4'-硝基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑 1.0 g,加入到 40 mL 乙醇中,加 2 mL 浓盐酸,冰水浴,氮气保护,加入 4.0 g SnCl₂ · H₂O,搅拌 10 min,升温至 95 °C,回流反应 3 h,除去乙醇,用乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压浓缩。

图 1 3'-¹³¹I-PIB 标记前体的合成及¹³¹I 标记Fig. 1 Scheme for the chemical and radiochemical synthesis of 3'-¹³¹I-PIB

1.2.3 2-(4'-甲氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑(产物 4)的合成 取 2-(4'-氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑(1.0 g, 3.91 mmol), K_2CO_3 (2.0 g) 悬浮于 30 mL DMF 中, 加入 CH_3I (0.67 g, 4.69 mmol), 于 100 °C 反应 6 h, 停止加热, 倒入 300 mL 水中, 有固体析出, 过滤, 过硅胶柱。洗脱剂为石油醚-二氯甲烷-乙酸乙酯, 体积比为 3 : 3 : 1。

1.2.4 2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑(产物 5)的合成 氮气保护下, 向 0.5 g 2-(4'-甲氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑的 30 mL 冰乙酸溶液中加入 ICl (0.4 g, ICl 与产物 4 的摩尔比为 1.3 : 1)。于 50 °C 搅拌反应 10 h, 然后减压除去冰乙酸。残余物溶于 20 mL CH_2Cl_2 中, 并用饱和 $NaHCO_3$ 中和, 水层用 10 mL CH_2Cl_2 萃取 3 次, 合并有机相, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩, 过硅胶柱, 洗脱剂为二氯甲烷。

1.2.5 2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑(产物 6)的合成 氮气保护下, 向 2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-甲氧基苯并噻唑 (0.4 g) 的 CH_2Cl_2 (50 mL) 溶液中, 加入 5 mL 2 mol/L BBr_3 的 CH_2Cl_2 溶液。于室温下搅拌 18 h, 用 5 mL 水终止反应, 然后用饱和 $NaHCO_3$ 溶液中和, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩, 过硅胶柱, 洗脱剂为 CH_2Cl_2 -乙酸乙

酯, 体积比为 5 : 1。

1.2.6 2-(3'-三正丁基锡-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑(产物 7)的合成 氮气保护下, 加入 (0.24 g, 0.63 mmol) 2-(3'-碘-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑, 3 mL 双三丁基锡, 66 mg $Pd(Ph_3P)_4$ 和 20 mL 三乙胺, 混合物在 100 mL 密闭的圆底烧瓶中加热至 80 °C, 反应 24 h, 溶剂减压蒸干, 剩余物硅胶过柱, 展开剂为石油醚-乙酸乙酯, 体积比为 7 : 5。

1.3 3'-¹³¹I-PIB 的¹³¹I 标记

取标记前体 2-(3'-三正丁基锡-4'-甲氨基苯基)-6-羟基苯并噻唑 50 μ g, 溶于 50 μ L 乙醇, 加入 [¹³¹I] NaI (约 37 MBq) 和 100 μ L 1 mol/L HCl , 置于密闭试管中, 再加入 100 μ L H_2O_2 (3%), 在室温下放置 10 min, 加入 150 μ L 饱和 $NaHSO_3$ 溶液中中止反应, 反应液用饱和 $NaHCO_3$ 中和至 pH 值为 7~8 (约用 250 μ L 饱和 $NaHCO_3$ 溶液)。用 1 mL 乙酸乙酯萃取 3 次。用 TLC 检测, 以乙醇-乙醚 (体积比为 1 : 19) 为展开剂。用氮气吹干乙酸乙酯, 待用时用 15% 乙醇的水溶液配成所需溶液。

1.4 3'-¹³¹I-PIB 的脂溶性实验

取 10 μ L (0.74 MBq) 3'-¹³¹I-PIB 注射到正辛醇-磷酸盐缓冲液 (pH=7.0 和 pH=7.4) 的二相系统 (体积比为 3 : 3), 涡旋振荡 3 × 1 min,

4 000 r/min 离心分离 5 min, 分别取 1.0 mL 正辛醇相和 1.0 mL 水相, 在 γ 计数器上测计数, 再取 1.0 mL 正辛醇相注入磷酸盐缓冲液-正辛醇(体积比为 3:2)二相系统中, 如此重复至正辛醇相和水相的放射性比值为—恒值。

1.5 标记物在小鼠体内的生物分布实验

取体重为 18~20 g 的 ICR 小鼠 25 只(15 只雄, 10 只雌), 分成 5 组, 尾静脉注射 0.2 mL 3'-¹³¹I-PIB(7.4×10^5 Bq), 分别于注射后 2, 30, 60, 120, 360 min 断头处死。解剖取出脑、肌肉、心、肝、脾和肺等脏器, 称重后测量放射性计数。每个时相为 5 只小鼠。

2 结果和讨论

2.1 产物的表征

产物 2 为黄色晶体 6 g, 产率 78.02%, Mp 222~223 °C。MS: 287 (M+1)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 8.35(d, 2H), 8.21(d, 2H), 8.01(d, 1H), 7.40(s, 1H), 7.15(d, 1H), 3.93(s, 3H)。

产物 3 为黄绿色固体 0.8 g, 产率 89.4%, Mp 195~198 °C。MS: 257 (M+1)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 7.80(m, 3H), 7.36~7.20(m, 1H), 7.04(m, 1H), 6.76(d, 2H), 3.80~3.40(m, 5H)。

产物 4 为亮黄色固体 0.4 g, 产率为 38%, Mp 166~168 °C。MS: 271 (M+1)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 7.85(m, 3H), 7.34~7.20(m, 1H), 7.04~6.98(m, 1H), 6.65(d, 2H), 4.04(s, 1H), 3.85(s, 3H), 2.90(s, 3H)。

产物 5 为棕色固体 0.44 g, 产率 60%, Mp 168~170 °C。MS: 397 (M+1)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 8.40(s, 1H), 7.85(m, 2H), 7.33(m, 1H), 7.05(m, 1H), 6.60(m, 1H), 4.58(s, 1H), 3.90(s, 3H), 2.96(s, 3H)。

产物 6 为棕色固体 0.35 g, 产率 90.7%, Mp 215~217 °C。MS: 383 (M+1)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 9.12(s, 1H), 8.37(s, 1H), 7.85(m, 1H), 7.75(m, 1H), 7.28(s, 1H), 6.96(m, 1H), 6.55(m, 1H), 4.70(s, 1H), 2.95(s, 3H)。

产物 7 为黄色固体 211 mg, 产率 60%, MS: 569 (M+Na)。¹H NMR (CDCl₃, δ): 9.02(s, 1H), 7.84(d, 1H), 7.76(d, 1H), 7.28(s,

1H), 6.96(d, 1H), 6.62(d, 2H), 4.78(s, 1H), 2.90(s, 3H), 2.80~2.50(m, 27m)。

2.2 3'-¹³¹I-PIB 前体合成的改进

文献[7]合成产物 4 时, 用 2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑水解后与对甲氨基苯甲酸反应制得, 但对甲氨基苯甲酸国内不易购得, 所以本工作改用国内容易购得的对硝基苯甲酰氯与 2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑水解产物反应, 经氯化亚锡还原, 与碘甲烷反应得到产物 4。2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑水解产物 5-甲氧基-2-氨基苯硫醇在空气中很容易失效, 需快速投入下一步反应。

合成产物 5 时, 曾将反应混合物于室温反应 18 h, 收率为 22%, 与文献[7]的 27% 相近, 将反应温度控制在 50 °C, 反应 10 h, 收率为 60%, 有了很大提高。

与文献[7]相比, 本工作所使用的标记前体是产物 7。使用产物 7 进行 ¹³¹I 标记时, 标记条件温和, 操作简单, ¹³¹I⁻ 和 3'-¹³¹I-PIB 的 R_f 值分别为 0.1 和 0.9, 标记率大于 82.3%, 放化纯大于 95%。而文献[7]用的标记前体为 2-(4'-甲氨基苯基)-6-甲磺酰酯基苯并噻唑, 经氯胺 T 法标记放射性碘, 再经 NaOH 水解脱去保护基得到放射性碘标记的 6-OH-BTA-1-3'-I。用氯胺 T 法进行标记, 再经 NaOH 水解, 使得反应时间延长, 标记率(25%)降低。

2.3 3'-¹³¹I-PIB 的脂水分配系数

3'-¹³¹I-PIB 在 pH=7.0 和 pH=7.4 磷酸盐缓冲液中的脂水分配系数(lg P)分别为 1.58 和 1.32。

2.4 3'-¹³¹I-PIB 在小鼠体内的生物分布

理想的 A β 斑块显像剂的基本要求是: 中性的小分子, 适度的脂溶性, 优良的血脑屏障穿透力及正常脑组织区域(无 A β 斑块)不滞留。优良的 A β 斑块显像剂必须在正常脑组织中初始摄取高, 清除快。3'-¹³¹I-PIB 在小鼠体内的生物分布结果列入表 1。由表 1 可以看出, 3'-¹³¹I-PIB 在给药后 2 min, 正常小鼠的脑摄取量高达 2.45% ID/g, 30 min 后, 脑摄取为 0.39% ID/g。文献[7]中用 ¹²⁵I 标记, 未给出小鼠体内分布的详细数据, 仅给出了整脑在 2 min 与 30 min 时摄取的比值为 3, 本工作用 ¹³¹I 标记, 整脑在 2 min 与 30 min 时摄取的比值为 6。说明 3'-¹³¹I-PIB 在正常脑组织中初始摄取高, 清除性能好。如改用 ¹²³I 标记, 3'-I-PIB 将是一个有开发前景的 A β 斑块 SPECT 显像剂。

表 1 3'-¹³¹I-PIB 正常小鼠体内分布

Table 1 Biodistribution of 3'-¹³¹I-PIB in normal mice

脏器 (Tissues)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage of the injected dose per gram of tissue mass) / (%ID · g ⁻¹)				
	2 min	30 min	60 min	120 min	360 min
脑 (Brain)	2.45±0.43	0.39±0.04	0.19±0.02	0.12±0.01	0.06±0.01
肌肉 (Muscle)	1.71±0.44	0.87±0.15	0.57±0.11	0.61±0.12	0.28±0.04
心 (Heart)	7.94±1.18	2.52±0.30	1.64±0.26	1.35±0.23	0.70±0.15
肝 (Liver)	11.10±1.75	6.09±1.06	4.26±1.22	3.71±1.03	2.48±0.91
脾 (Spleen)	4.70±1.67	4.72±0.48	3.20±0.98	2.31±0.59	1.18±0.34
肺 (Lung)	14.74±1.59	4.56±0.62	2.22±0.41	1.76±0.52	2.72±3.01
肾 (Kidney)	8.30±0.99	5.55±0.93	3.13±0.17	1.94±0.36	1.16±0.14
血 (Blood)	8.82±0.93	2.37±0.11	1.68±0.31	1.34±0.09	0.63±0.08

注 (Note): n=5

3 结 论

3'-¹³¹I-PIB 是有适度脂溶性的苯并噻唑类衍生物,本工作合成的目标化合物以及各步中间产物的结构均经核磁共振和质谱确证。标记条件温和,放化纯度高。小鼠体内分布实验结果表明,3'-¹³¹I-PIB 在给药后 2 min,正常小鼠的脑摄取量为 2.45% ID/g, 60 min 后,脑摄取仅为 0.19% ID/g,说明 3'-¹³¹I-PIB 在正常脑组织中初始摄取高,清除性能好。如果改用合适的核素标记,3'-I-PIB 将是一个有研究前景的 Aβ 斑块显像剂。

参考文献:

[1] Petrella J R, Coleman R E, Doraiswamy P M. Neuroimaging and Early Diagnosis of Alzheimer Disease: A Look to the Future[J]. Radiology, 2003, 226: 315-336.

[2] Hardy J A, Higgins G A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis [J]. Science, 1992, 256(5054): 184-185.

[3] Monsonego A, Weiner H L. Immunotherapeutic Approaches to Alzheimer's Disease [J]. Science, 2003, 302: 834-838.

[4] Bowers W J, Federoff H J. Amyloid Immunotherapy-Engendered CNS Inflammation [J]. Neurobiol Aging, 2001, 23: 675-676.

[5] Klunk W E, Engler H, Agneta N. Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease With Pittsburgh Compound-B[J]. Ann Neurol, 2004, 55: 306-319.

[6] Sair H I, Doraiswamy P M, Petrella J R. In Vivo Amyloid Imaging in Alzheimer's Disease [J]. Neuroradiology, 2004, 46: 93-104.

[7] Wang Yanming, Klunk W E, Debnath M L. Development of a PET/SPECT Agent for Amyloid Imaging in Alzheimer's Disease [J]. J Molec Neurosci, 2004, 24: 55-62.