

文章编号:0253-9950(2011)03-0188-05

A β 斑块显像剂:¹¹C-PIB 的合成及标记

张锦明¹,王武尚²,张晓军¹,郭 喆¹,田嘉禾¹

1. 中国人民解放军总医院 核医学科,北京 100853;

2. 西北核技术研究所,陕西 西安 710024

摘要: ¹¹C 标记 2-(4'-N-¹¹C-甲胺基苯)-6-羟基苯并噻唑(6-OH-BTA-1)是目前较理想的 A β 斑块显像剂,本研究合成了 6-OH-BTA-1 的前体:6-羟基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑,并用 ¹¹C 标记。在常温下,无需保护羟基条件下,标记效率为 52.6%(校正, n=35),产品放射化学纯度大于 99%,比活度为 18.0 TBq/mmol。80 °C 加热 2 min,有副反应发生。采用弱酸性流动相,半制备 HPLC 分离后产品的放射化学纯度达 99%。

关键词: A β 斑块显像剂;阿尔茨海默病(AD);¹¹C-PIB

中图分类号: R817.4 **文献标志码:** A

Synthesis and Carbon Labeling of ¹¹C-PIB for A β -Amyloid Imaging

ZHANG Jin-ming¹, WANG Wu-shang², ZHANG Xiao-jun¹, GUO Zhe¹, TIAN Jia-he¹

1. Department of Nuclear Medicine, The PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Northwest Institute of Nuclear Technology, Xi'an 710024, China

Abstract: Assessing the deposition of A β -amyloid in the living brain is important for diagnosis and treatment of Alzheimer's disease (AD). 2-(4'-N-¹¹C-methyl-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole(¹¹C-PIB) was used as a ideal labeled probe imaging A β -amyloid for AD. The precursor of ¹¹C-PIB, 2-(4'-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole, was synthesized. ¹¹C-PIB was labeled with ¹¹C-CH₃-Triflate (Trifluoromethanesulfonate) under unprotect 6-hydroxyl precursor at room temperature. The labeling yield, radiochemistry purity and specific activity are 52.6%(corrected, n=35), 99% and 18.0 TBq/mmol respectively. The by-reaction occurs when the reaction is heated 80 °C for 2 min. The radiochemistry purity can be improved to 99% by semi-HPLC weak acid mobile phase.

Key words: A β -amyloid imaging agent; AD; ¹¹C-PIB

阿尔茨海默病(Alzheimer's, AD)病理学特征包括神经元丧失、神经元纤维缠结(NFT)、老年斑(A β 斑块)和神经元内颗粒空泡变性。病理学检测 A β 斑块的染色剂有:刚果红(Congo red, CR)、硫磺素-T(thioflavin-T)、硫磺素-S、金黄胺

G(chrysamine G, CG)和 X-34 等,这些试剂在体外与 A β 有很高的亲和能力。如果用放射性核素标记上述试剂或类似物,并能有效突破血脑屏障(BBB)进入大脑,就可以采用 SPECT 或 PET 技术,进行 AD 患者脑内老年斑分布及定

收稿日期:2010-06-04;修订日期:2010-12-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670586);核能开发科技资助项目(2009-1228)

作者简介:张锦明(1965—),男,江苏南通人,博士,研究员,核医学专业

量的在体、可视化检测,可以提高 AD 的早期诊断率和鉴别准确率,而且可以对 AD 病人分期、针对 A β 为靶点的治疗和药物的研究等提供有效的评价方法。文献报道了多种在体显示 AD 患者脑内 A β 淀粉样蛋白沉积显像剂,如 ^{18}F 标记的甲氧萘普酸(FDDNP)类^[1]、 ^{123}I 标记 IM-PY、 ^{11}C 标记的苯二烯^[2-3] 和 ^{18}F -AV45^[4] 等。其中 2-(4'-N- ^{11}C -甲胺基苯)-6-羟基苯并噻唑(^{11}C -CH $_3$ -6-OH-BTA-1, 习惯称 ^{11}C -PIB) 是一类较理想的 A β 显像剂,其脂溶性适中,lg $P=1.2$,与 A β 1-40 聚集物有很高的亲和常数($K_i=4.3\text{ nmol/L}$),在正常小鼠脑内清除很快,2 min/30 min 脑摄取比达到 12^[5]。本工作拟在文献基础上合成前体 6-OH-BTA-0,并研究不同制备和分离条件对 ^{11}C -PIB 标记率及纯化纯度的影响。

1 试剂和仪器

2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑、对硝基苯甲醛,纯度均大于 98%,美国 Alfa Aesar 公司;柱层析硅胶,青岛海洋化工集团公司;1 mol/L LiAlH $_4$ /THF 和 PIB 标准品,德国 ABX 公司;57% HI,美

国 Sigma 公司;其它试剂均为国产分析纯。

Necolet-170SX 傅立叶红外仪,美国 Necolet 公司;Avance 500 MHz 核磁共振仪,美国 Bruker 公司;TrisGC2000 质谱仪,美国 Finnigan 公司;Perkin-Elmer 240-C 型元素分析仪,美国 PE 公司;XT4 显微熔点测定仪,北京泰克仪器有限公司,温度未校正。Sumitomo HM-20S 回旋加速器,日本驻友公司;C-11 碘代甲烷合成器和多功能碳-氟一体机,北京派特生物技术有限公司;高效 HPLC 分析仪,美国 Waters 公司,配 515 泵、2487 紫外检测器、BioScan 流动放射性检测器。

2 实验方法

2.1 6-羟基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑的合成

以 2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑为起始原料,根据文献[6-7]合成了中间体 5-甲氧基-2-氨基苯硫酚。然后依照文献[8]合成 6-甲氧基-2-(4'-硝基苯基)苯并噻唑,将硝基还原成氨基,得 6-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑(6-MeO-BTA-0),再去甲基化后得到目标化合物。合成路线示于图 1。

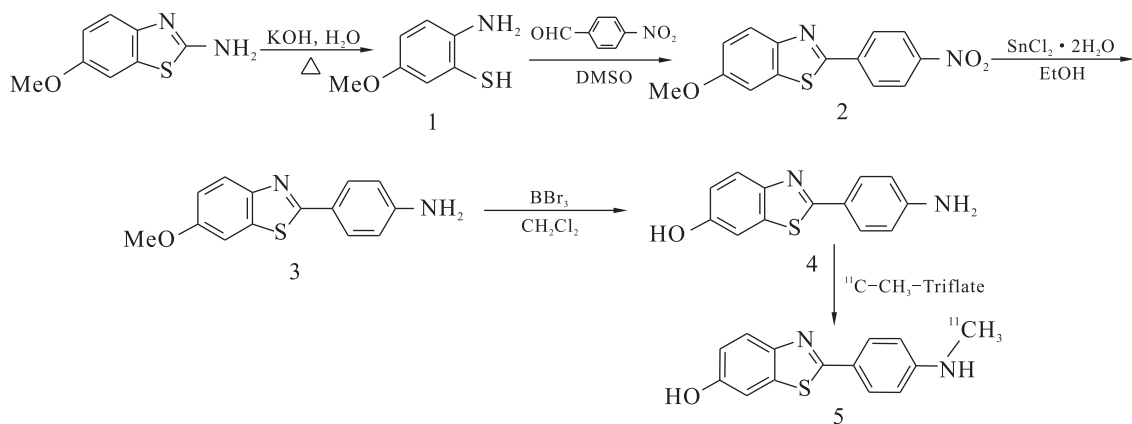


图 1 6-OH-BTA-0 的合成线路图及其 ^{11}C 标记

Fig. 1 Scheme for synthesis of 6-OH-BTA-0 and its ^{11}C -labeling to produce ^{11}C -PIB

2.1.1 5-甲氧基-2-氨基苯硫酚(1)的合成 反应瓶中加入 2.7 g(15.0 mmol)2-氨基-6-甲氧基苯并噻唑、16.2 g KOH、32 mL 水,加热回流 12 h。反应液冷却至室温,加入 15 mL 水,过滤除去不溶物。搅拌下向滤液中加入 36% 乙酸至微酸性,置于冰箱冷却。抽滤,水洗沉淀(10 mL \times 3)。50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥,得黄色粗产物 5-甲氧基-2-氨基苯硫酚

1.7 g。

2.1.2 6-甲氧基-2-(4'-硝基苯基)苯并噻唑(2)的合成 反应瓶中加入 5-甲氧基-2-氨基苯硫酚 1.7 g、对硝基苯甲醛 1.7 g(11.2 mmol)和 15 mL DMSO。搅拌,加热至近沸,反应 1 h。冷却至室温,加入 25 mL 水,搅拌,抽滤,水洗沉淀(15 mL \times 3)。沉淀于 110 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥,乙酸乙酯重结晶 1

次,得黄色 6-甲氧基-2-(4'-硝基苯基)苯并噻唑 2.0 g。

2.1.3 6-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑(3)的合成 反应瓶中加入 6-甲氧基-2-(4'-硝基苯基)苯并噻唑 2.0 g(7.1 mmol)、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.0 g(17.7 mmol)和 60 mL 无水乙醇。搅拌下加热回流 5 h。反应液冷却至室温,旋蒸除去无水乙醇,用 200 mL 乙酸乙酯溶解残余物,溶液转入分液漏斗中,用 1 mol/L NaOH 洗涤(150 mL \times 3),水洗至中性。旋蒸除去溶剂,用硅胶柱层析分离($V(\text{正己烷}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 60 : 40$),得淡黄色 6-MeO-BTA-0 1.5 g,总产率 40%,熔点 192~193 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.4 6-羟基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑(4)的合成 反应瓶中加入 6-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑 0.71 g 和 200 mL 二氯甲烷,冰浴冷却,滴加 28.4 mL 1 mol/L BBr_3 的二氯甲烷溶液,升温至室温,搅拌反应过夜,冰浴冷却,加入 100 mL 水,用 1 mol/L NaOH 中和,用 200 mL 乙酸乙酯分 2 次萃取,合并有机相,水洗(50 mL \times 3),无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,用硅胶柱层析分离($V(\text{正己烷}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 50 : 50$),得淡黄色 6-OH-BTA-0 0.6 g,产率 83%。

2.2 碳-11 碘代甲烷的生产及三氟甲基磺酰基(Triflate)的在线转化

用 Sumitomo HM-20S 回旋加速器,40 μA 20 MeV 质子轰击含 1% 氧的天然氮气靶,通过 $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ 核反应生成 $^{11}\text{C}\text{-CO}_2$ 。 [^{11}C]- CH_3I 由单管、液相法由碳-11 碘代甲烷仪自动化合成^[9],即生成的 $^{11}\text{C}\text{-CO}_2$ 由液氮捕获后,由氮气以 30 mL/min 速率载带 0.2 mL 1 mol/L 氢化锂铝/THF 中,然后加热除 THF,加入 0.2 mL 57% 的氢碘酸,生成的 $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$ 由氮气载带,通入 Triflate 转化炉, $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$ 在线转化成 $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{-Triflate}$ ^[10]。

2.3 $^{11}\text{C}\text{-PIB}(5)$ 的标记及纯化

1.0 mg 的 6-OH-BTA-0 前体,用 0.2 mL 丙酮溶解,安装于多功能碳-氟一体机。将上述制备的 $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{-Triflate}$ 通入该溶液,常温下反应。当碳-氟一体机上放射性计数达到最大、不再增加时,80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min 或不加热直接用 2 mL 55% 的乙腈溶液稀释后自动进入半制备的 HPLC 纯化,流动相为 $\varphi = 55\%$ 的乙腈水溶液,流速为 6 mL/min,半制备柱为 Grace Alltima C-18

HPLC 柱(10 mm \times 250 mm),收集 6~7 min 时的放射性峰,再用 60 mL 水混和,混和液过 C-18 柱,用 10 mL 水清洗该柱,最后用 1.0 mL 无水乙醇将产品从 C-2 柱上洗脱,加入 9 mL 水。

2.4 $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ 质量控制

采用 HPLC 分析产品的放射纯度,分析柱为 Grace Alltima C-18, 5 μm , 3.9 mm \times 150 mm,流动相为 $\varphi = 50\%$ MeCN 水溶液,流速为 1 mL/min。产品的保留时间为 6.8 min。

将德国 ABX 公司的 PIB 标准品配成不同浓度,HPLC 进相同体积样,测量 6.8 min 处的紫外吸收峰,以紫外吸收峰面积对 PIB 浓度作图得标定直线,从相同体积样品在 6.8 min 处的紫外吸收峰面积计算样品中 $^{12}\text{C}\text{-PIB}$ 的浓度,再根据放射化学浓度,计算产品 $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ 的比活度。

3 结果和讨论

(1) 本研究所合成的前体是未保护羟基的 6-OH-BTA-0,最终产品的红外光谱图: 3 458.4、3 284.8、1 315.5、602.8、1 465.9、1 437.0 cm^{-1} 。 ^1H NMR(500 MHz, acetone- d_6 , δ): 7.796 48~7.813 73(d, $J = 8.63$ Hz, 3H), 7.534 65~7.539 49(d, $J = 2.42$ Hz, 1H), 7.061 85~7.084 52(m, 1H), 6.781 63~6.798 67(d, $J = 8.52$ Hz, 2H), 3.889 71(s, 3H), 2.975 42(s, 2H)。MS(EI) m/z : 256.07(M^+), 257.07($\text{M}^+ + 1$)。元素分析的计算值 C、65.60%, H、4.719%, N、10.93%; 实验值 C、65.72%, H、4.885%, N、10.97%。

合成化合物 1 时,由于中和强碱,生成了大量的乙酸钠,需在第二步中用大量水洗的方法除去。同时化合物 1 不稳定,合成当天将之转化成产品 2。产品 3 还原后,溶液中含有的乙醇对乙酸乙酯的萃取不利,使乙酸乙酯与水成混合相,因此必须采用蒸发法将之除去,以保证乙酸乙酯萃取成功。

(2) 在常温、中性条件下、无需保护羟基, $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{-Triflate}$ 很容易与前体发生反应,标记效率为 52.6%(校正, $n = 35$),而且 100% 是在苯胺上 C-N 甲基化(图 2(a)),半制备 HPLC 的放射性曲线表明, $t_R = 2.5$ min 处为未反应的放射性, 5.8 min 处为标记物,收集该峰,经固相萃取得到最终产品。

前体中通入 $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{-Triflate}$,并在 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min。从图 2(b) 可以发现,加热后的标记率

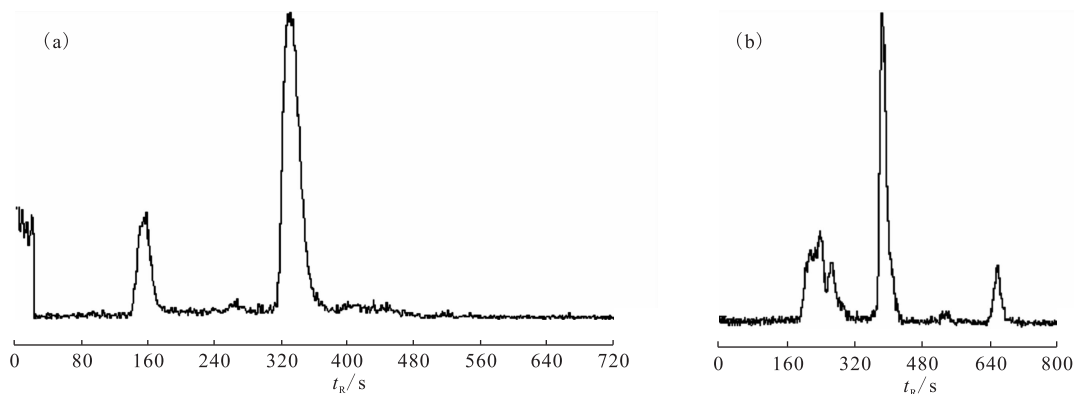


图2 半制备 HPLC 分离的放射性曲线

Fig. 2 Radioactivity profiles of semiprep HPLC with different reaction temperature
(a)——室温(Room temperature), (b)——80 °C 加热 2 min(Heated 80 °C for 2 min)

没有上升,同时发现在约 11.3 min 处多了一个峰,收集该峰,HPLC 分析表明该峰为 6-¹¹C-甲氧基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑(标准物为合成物质 3),即在 6 位羟基上发生了 C—O 甲基化,该比例约占 10% 左右。

¹¹C-PIB 的标记方法很多,一种方法是采用 ¹¹C-CH₃I,在碱性条件下标记,但此时的前体 6 位羟基需保护,以防止生成甲氧基(6-MeO-BTA-0);然后再脱保护;该方法标记时间长,步骤多,标记率低^[11]。其后采用 6-OH-BTA-0 作前体,采用 ¹¹C-CH₃-Triflate 在无保护条件下甲基化,标记的方法有 LOOP 法、反应管法(溶剂分别是甲乙酮和丙酮)^[11-13],LOOP 法无需加热,反应管法采用 80 °C 加热 1 min 方法,标记效率最高到 44%,未观察到副反应的发生^[14]。但本研究进一步研

究发现,加热时间短(1 min 内),基本观察不到副反应,但延长加热时间后明显有副反应。

(3) 半制备 HPLC 采用流动相为 $\varphi=55\%$ 乙腈水溶液- $\varphi=0.2\%$ 冰乙酸,最终产品 HPLC 分析表明,产品放射化学纯度大于 99%,比活度为 18.0 TBq/mmol(图 3(a))。但半制备 HPLC 流动相为 $\varphi=55\%$ 乙腈水溶液,最终产品的放射化学纯度在 95%~98%(图 3(b)),能明显观察到 2 个小的杂质峰。可见不同 pH 的半制备 HPLC 流动相,最终产品的放射化学纯度有一定区别,弱酸性的流动相有助于将杂质除去。因为反相 C-18 柱的分离条件与 pH 关系很大,弱酸性的流动相提高了半制备反相 C-18 柱的分离能力。

文献上半制备 HPLC 的流动相变化不大,主要是乙腈与水的混合液;为调节 pH,有采用 0.1 mol/L

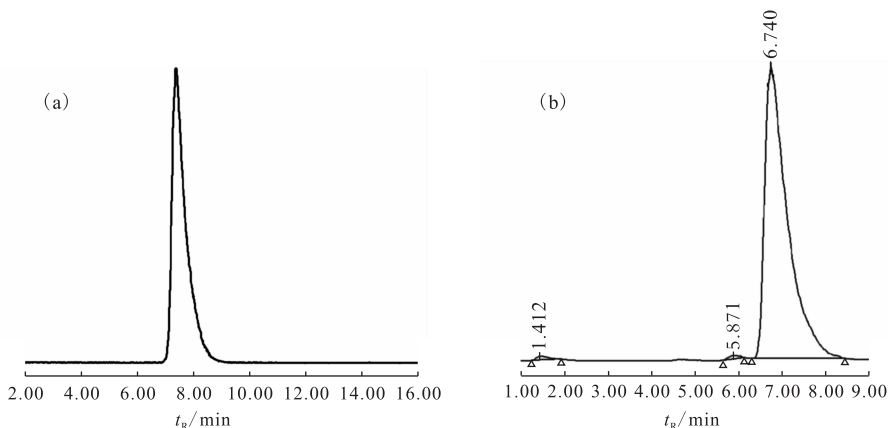
图3 产品¹¹C-PIB 的 HPLC 质控图

Fig. 3 Analytical HPLC profiles of ¹¹C-PIB after semiprep HPLC

(a)——流动相为 $\varphi=55\%$ 乙腈水溶液- $\varphi=0.2\%$ 冰乙酸(55% acetonitrile with 0.2% acetate),
(b)——流动相为 $\varphi=55\%$ 乙腈水溶液(55% acetonitrile)

碳酸氢铵^[11,14],也有采用 0.2% 三乙胺乙酸盐^[13],这些流动相制备的产品放射化学纯度在 95%~98%^[11-13],有时甚至低于 95%,为不合格产品。采用弱酸性半制备流动相,则明显将杂质除去,提高了产品的放射化学纯度。

4 结 论

¹¹C-PIB 是较理想的 A β 斑块显像剂,适于 AD 患者的诊断与疗效评价。本研究合成了未保护羟基的前体:6-羟基-2-(4'-氨基苯基)苯并噻唑,并用¹¹C-CH₃-Triflate 在常温中性条件下标记,标记效率为 52.6%(校正, $n=35$),比活度为 18.0 TBq/mmol。采用弱酸性半制备流动相,产品的放射化学纯度大于 99%。

参考文献:

- [1] Barrio J R, Satyamurthy N, Huang S C, et al. Dissecting Molecular Mechanism in the Living Brain of Dementia Patients[J]. *ACC Chem Res*, 2009, 42: 842-850.
- [2] Kung M P, Zhuang Z P, Hou C, et al. Development and Evaluation of Iodinated Tracers Targeting Amyloid Plaques for SPECT[J]. *J Mol Neurosci*, 2004, 24: 49-53.
- [3] Ono M, Wilson A, Nobrega J, et al. ¹¹C-Labeled Stilbene Derivatives as A β -Aggregate-Specific PET Imaging Agents for Alzheimer's Disease[J]. *Nucl Med Biol*, 2003, 30: 565-571.
- [4] Choi S K, Golding G, Zhuang Z P, et al. Preclinical Properties of ¹⁸F-AV-45: A PET Agent for A β Plaques in the Brain[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50: 1 887-1 894.
- [5] Mathis C A, Klunk W E, Price J C, et al. Imaging Technology for Neurodegenerative Disease: Progress Toward Detection of Specific Pathologies[J]. *Arch Neurol*, 2005, 62: 196-200.
- [6] Mital R L, Jain S K. Synthesis of Some 5-Substituted 2-Aminobenzenethiols and Their Conversion Into Phenothiazines via Smiles Rearrangement [J]. *J Chem Soc (C)*, 1969: 2 148-2 150.
- [7] Lin A J, Kasina S. Synthesis of 3-Substituted 7-(3,3-Dimethyl-1-Triazeno)-10-Methyl-Phenothiazines as Potential Antitumor Agents[J]. *J Heterocyclic Chem*, 1981, 18: 759-761.
- [8] Zhuang Z-P, Kung M-P, Hou C, et al. Radioiodinated Styrylbenzenes and Thioflavins as Probes for Amyloid Aggregates[J]. *J Med Chem*, 2001, 44: 1 905-1 914.
- [9] 张锦明,田嘉禾,王武尚,等.单管法自动化合成¹¹C-碘代甲烷[J].*中华核医学杂志*,2004;243-244.
- [10] 张锦明,田嘉禾,王武尚,等.在线制备¹¹C-Triflate-CH₃[J].*同位素*,2006,19:124-128.
- [11] Wilson A A, Garcia A, Chestakova A, et al. A Rapid One-Step Radiosynthesis of the b-Amyloid Imaging radiotracer N-Methyl-[¹¹C]-2-(4'-Methyl Aminophenyl)-6-Hydroxy Benzothiazole ([¹¹C]-6-OH-BTA-1) [J]. *J Labeled Compd Radiopharm*, 2004, 47: 679-682.
- [12] Cheung M K, Ho C L. A Simple, Versatile, Low-Cost and Remotely Operated Apparatus for [¹¹C]Acetate, [¹¹C]Choline, [¹¹C]Methionine and [¹¹C]PIB Synthesis[J]. *Appl Radiat Isot*, 2009, 67: 581-589.
- [13] Solbach C, Uebele M, Reischl G, et al. Efficient Radiosynthesis of Carbon-11 Labelled Uncharged Thioflavin T Derivatives using [¹¹C] Methyl Triflate for β -Amyloid Imaging in Alzheimer's Disease With PET[J]. *Appl Radiat Isot*, 2005, 62: 591-595.
- [14] 张锦明,郭 喆,田嘉禾,等. A β 斑块显像剂:2-(4'-N-¹¹C-甲基胺苯)-6-羟基苯并噻唑的研究[J].*中华核医学杂志*,2008,28:397-400.