

文章编号:0253-9950(2011)04-0245-07

细胞凋亡显像剂 $[^{18}\text{F}]$ FEDPA的合成和标记

郭新艳¹, 王红亮¹, 金燕锋¹, 刘英华¹, 唐刚华^{2,*}, 姜申德^{1,*}

1. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072;

2. 中山大学附属第一医院 核医学科 PET-CT 中心, 广东 广州 510080

摘要:为制备新型细胞凋亡显像剂 $[^{18}\text{F}]$ FEDPA, 合成了前体(2-(2-[2-(3,5-二-N,N-二(2-甲基吡啶)氨基-苯氧基)乙氧基]-乙氧基)乙基)-胺, 总收率5%(以化合物4计)。后经过 ^{18}F 标记合成 $[^{18}\text{F}]$ FEDPA, 标记率(8.9±0.3)%(经校正, n=2), HPLC检测其放射化学纯度为77%。

关键词: ^{18}F -标记; 细胞凋亡; $[^{18}\text{F}]$ FEDPA; 合成

中图分类号: TL923 文献标志码: A

Synthesis and Radiolabelling of $[^{18}\text{F}]$ FEDPA as an Imaging Agent for Apoptosis

GUO Xin-yan¹, WANG Hong-liang¹, JIN Yan-feng¹, LIU Ying-hua¹,
TANG Gang-hua^{2,*}, JIANG Shen-de^{1,*}

1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. PET-CT Center of Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital
of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Synthesis and fluoro-radiolabelling of apoptosis imaging agent $[^{18}\text{F}]$ FEDPA were reported. The labeling precursor 2-{2-[2-(3,5-bis(2,2'-dipicolylaminomethyl)-phenoxy)ethoxy]-ethoxy}ethyl amine was prepared with the total yield of 5% (based on compound 4). ^{18}F -labeling of the precursor gave $[^{18}\text{F}]$ FEDPA. The radiochemical yield is (8.9±0.3)% (n=2, decay corrected) and radiochemical purity is 77% determined by HPLC.

Key words: ^{18}F -labeling; apoptosis; $[^{18}\text{F}]$ FEDPA; synthesis

正电子发射断层成像(PET)是研究正电子类放射性显像剂(^{18}F , ^{11}C , ^{15}O 和 ^{13}N 等核素标记的显像剂)在生物体内代谢分布的一种功能性显

像技术,近年来在医学研究、临床诊断及新药研发等方面都有广泛应用^[1]。细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,在保证多细胞生物的细胞分

收稿日期:2010-09-02;修订日期:2010-12-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30970856);国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2008AA02Z430)

作者简介:郭新艳(1985—),女,山东烟台人,硕士研究生,药物化学专业

*通信联系人:唐刚华,男,教授,博士生导师,主要从事放射性药物与分子影像学研究,E-mail:gtang0224@yahoo.com.cn

姜申德,男,教授,博士生导师,主要从事有机合成研究,E-mail:jianggroup@tju.edu.cn

化、器官发育中起着重要的作用。细胞凋亡与许多疾病诸如肿瘤、阿尔茨海默病、帕金森病等有着重要的联系^[2]。磷脂酰丝氨酸(PS)存在于正常细胞的细胞膜内部,细胞发生凋亡的早期,PS就会外翻到细胞膜的外层,蛋白质 Annexin V 可以特异性地与 PS 结合^[3-4]。目前细胞凋亡的检测主要是将显像基团引入到 Annexin V 中,如 Annexin V-FITC,通过荧光基团检测细胞凋亡情况^[5];而⁹⁹Tc^m-Annexin V 是一类研究较为透彻、应用较广的放射性活体细胞凋亡显像剂,已进入

临床试验阶段,应用于疾病细胞凋亡检测以及恶性肿瘤放化疗的疗效评价等^[6]。但是,Annexin V 有一定的缺点:Annexin V 是一种蛋白质,相对分子质量较大(3.6×10^4),易降解,体内结合速率和血液清除较慢^[7]。

近期,Smith 小组设计出可以与 PS 特异性结合的具有二吡啶甲基胺(DPA)基团的荧光大分子化合物,PSS-480(图 1)。锌络合的二吡啶甲基胺与 PS 产生特异性结合后,通过荧光显微镜可进行体外细胞凋亡检测^[8]。

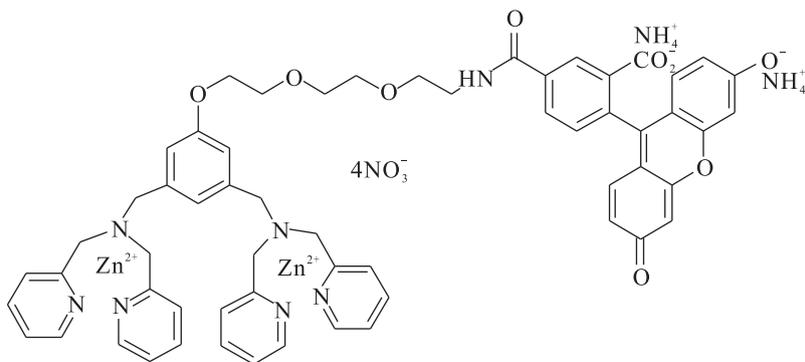


图 1 PSS-480 结构

Fig. 1 Structure of PSS-480

为了研究用于体内细胞凋亡检测的 PET 显像剂,本工作采用锌络合的二吡啶甲基胺类化合物为框架结构,设计核素¹⁸F 标记的新型细胞凋亡显像剂^[18F]FEDPA,并报道^[18F]FEDPA 的放射合成及其前体的有机合成。

1 仪器与试剂

Reichert-Thermovar 熔点仪,奥地利 Reichert 公司;N-1001 型旋转蒸发仪,上海爱朗仪器公司;Bruker Avance III 400 MHz 核磁仪,德国 Bruker 公司;Merck 60F254 硅胶板,德国 Merck 公司;Kugelrohr GKR-50 高温蒸馏仪,瑞士Buchi 公司;硅胶,粒径 0.037~0.056 mm,烟台化学工业研究所;Cyclone 10/5 型回旋加速器,比利时 IBA 公司;PET-MF-2V-IT-I 型氟-18 多功能合成模块,北京派特生物有限公司;CRC-15R 放射性活度计,美国 CAPINTEC 公司;1200 Series 高效液相色谱仪(HPLC),美国 Agilent 公司;流动相放射性检测器,B-FC-3200 高能 PMT 检测器,美国华盛顿 BIOSCAN 公司。所用试剂均为分析纯或化学纯。

2 实验方法

2.1 ^[18F]FEDPA 前体的合成路线

^[18F]FEDPA 的逆合成路线示于图 2。其中前体 1 经多步有机反应合成,其合成路线示于图 3—5。

2.2 实验步骤

2.2.1 二甲基吡啶胺(化合物 3)的合成^[9] 2-氨基吡啶(15 g, 144 mmol), 1.2 g Pd/C(Pd 的质量分数为 5%), 加入乙醇水溶液(V(乙醇):V(水)=6:1)。用氢气置换高压釜内空气 6 次,然后加压至 2×10^6 Pa,控温 25 °C,搅拌反应 5 h,反应完毕。过滤除去 Pd/C,减压蒸去溶剂,得到黄色油状液体 15.17 g。Kugelrohr 高温蒸馏仪纯化,真空度 150 mm 汞柱,除去 170 °C 馏分,收集 270 °C 馏分,得到 8.83 g 化合物 3,为金黄色透明液体,收率 30%。

2.2.2 (2-[2-(2-叠氮基)乙氧基]乙氧基)-乙醇(化合物 5)的合成^[10] 三缩乙二醇(10.5 g, 70 mmol)溶于 150 mL 干燥的四氢呋喃,加入三乙胺(15 mL, 50 mmol),将体系冷却至 0 °C,滴入

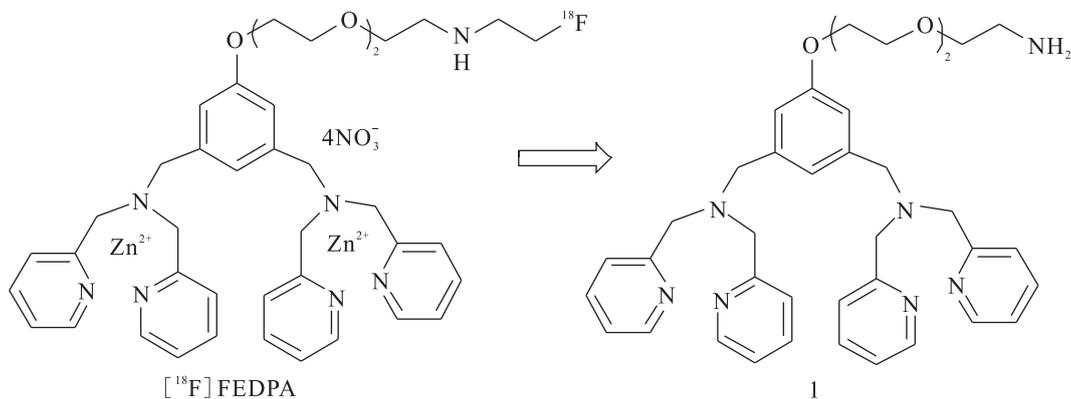


图 2 目标化合物的逆合成分析

Fig. 2 Retrosynthetic analysis of target compounds

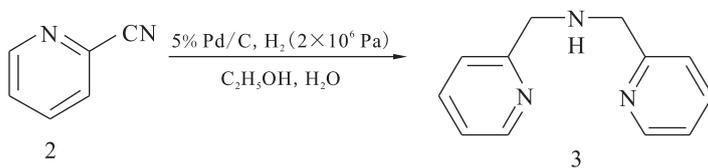


图 3 化合物 3 的合成

Fig. 3 Synthesis of compound 3

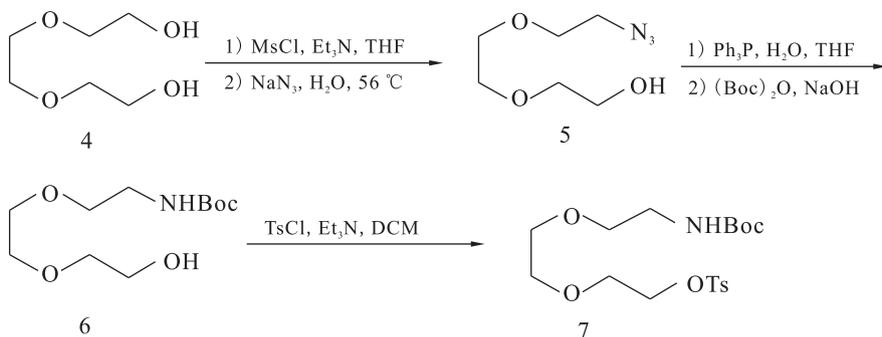


图 4 化合物 7 的合成

Fig. 4 Synthesis of compound 7

甲磺酰氯(3.87 mL, 25 mmol), 室温搅拌 1 h。将反应液蒸干, 加入蒸馏水 30 mL, 乙酸乙酯萃取(30 mL \times 3), 无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到浅黄色油状液体 4.25 g。加入 30 mL 乙醇中, 将叠氮化钠(3.25 g, 50 mmol)溶于 10 mL 蒸馏水, 滴加到反应溶液中, 体系加热到 50 $^{\circ}\text{C}$, 反应 7 h。加入 100 mL 蒸馏水, 80 mL 乙酸乙酯, 搅拌分液。乙酸乙酯萃取(100 mL \times 4), 合并有机层, 无水硫酸钠干燥、浓缩, 硅胶柱层析分离(V(石油醚): V(乙酸乙酯)=1:9), 得到 1.69 g 化合物 5, 收率 38%。

2.2.3 2-[2-(2-(叔丁氧酰胺基)乙氧基)乙氧基]乙醇(化合物 6)的合成 化合物 5(1.69 g,

9.65 mmol)溶于 50 mL 四氢呋喃中, 加入三苯基磷(2.53 g, 9.65 mmol), 液封, 室温反应 30 min, 加入 10 mL 蒸馏水, 室温搅拌反应 15 h。加盐酸水溶液调 pH=3, 加入 30 mL 乙酸乙酯, 分离水层, 有机层用蒸馏水(30 mL \times 3)萃取, 将水层合并, 氢氧化钠调 pH=13。加入(Boc) $_2$ O(3.16 g, 14.47 mmol), 室温反应 30 min, 乙酸乙酯萃取(70 mL \times 3), 收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 旋干得到 3.80 g 化合物 6 粗品。

2.2.4 2-(2-(2-(叔丁氧酰胺基)乙氧基)乙氧基)对甲磺酸乙酯(化合物 7)的合成 化合物 6 粗品(3.37 g, 13.5 mmol)溶于 20 mL 干燥的二氯甲烷

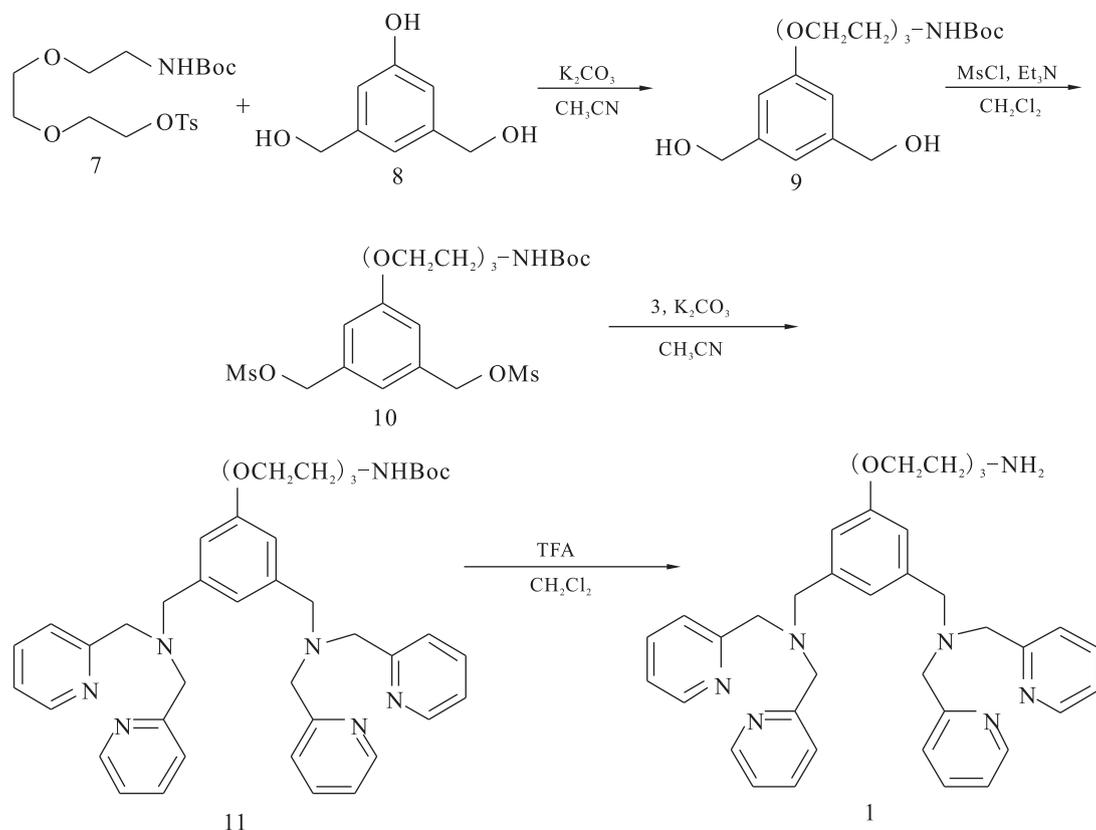


图 5 前体 1 的合成

Fig. 5 Synthesis of compound 1

中,冰浴冷却后加入三乙胺(2.34 mL, 16.2 mmol),接着滴入对甲苯磺酰氯(3.08 g, 16.2 mmol),滴加完毕后,室温反应过夜。将反应液旋干,加入蒸馏水,乙酸乙酯(20 mL \times 3)萃取,合并有机相。无水硫酸钠干燥,旋干溶剂,得黄色透明油状物,硅胶柱层析分离(V(石油醚):V(乙酸乙酯)=1:2)得到化合物 7 纯品 3.50 g,收率 83%。

2.2.5 (2-{2-[2-(3,5-二羟甲基-苯氧基)-乙氧基]-乙氧基}乙基)-氨基甲酸叔丁酯(化合物 9)的合成 将化合物 7(2.3 g, 7.34 mmol)、3,5-二羟甲基苯酚(1.13 g, 7.34 mmol)、无水碳酸钾(3.04 g, 22.02 mmol)、20 mL 乙腈加入到烧瓶中,加热回流反应 11 h。将反应体系中的乙腈蒸干,加入 20 mL 蒸馏水,氢氧化钠调 pH=13,乙酸乙酯萃取(20 mL \times 3)。合并有机层,无水硫酸钠干燥、浓缩,硅胶柱层析分离(V(石油醚):V(乙酸乙酯)=1:8),得到化合物 9 黄色油状液体 1.32 g,收率 47%。

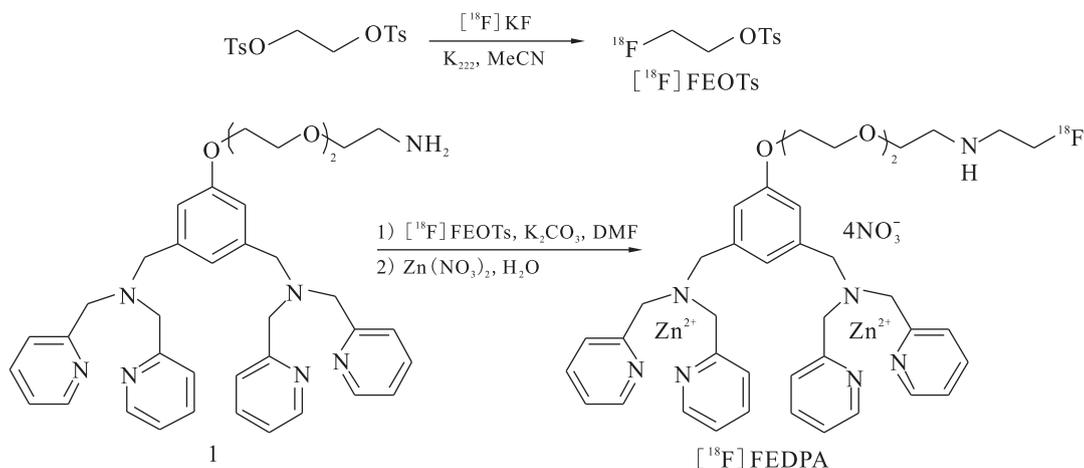
2.2.6 (2-{2-[2-(3,5-二甲磺酰氧基甲基-苯氧基)-乙氧基]-乙氧基}乙基)-氨基甲酸叔丁酯(化

合物 10)的合成 化合物 9(1.32 g, 3.42 mmol)溶于 10 mL 干燥的二氯甲烷中,冰浴冷却至 0 $^{\circ}C$,加入三乙胺(2.08 g, 20.54 mmol),滴入甲磺酰氯(2.35 g, 20.54 mmol),室温反应 1 h。减压蒸出溶剂,加入 20 mL 蒸馏水,二氯甲烷萃取(20 mL \times 3),合并有机相,无水硫酸钠干燥后,浓缩,柱层析(V(石油醚):V(乙酸乙酯)=1:2),得到化合物 10 无色液体 1.23 g,收率 66%。

2.2.7 (2-{2-[2-(3,5-二-N,N-二(2-甲基吡啶)氨基-苯氧基)乙氧基]-乙氧基}乙基)-氨基甲酸叔丁酯(化合物 11)的合成^[11] 将化合物 10(1.15 g, 2.12 mmol)溶于 25 mL 乙腈中,加入无水碳酸钾(1.17 g, 8.46 mmol)、二甲基吡啶胺(1.06 g, 5.3 mmol),氩气保护,室温反应过夜。先将乙腈蒸出,加入蒸馏水 15 mL,乙酸乙酯萃取(20 mL \times 3),合并有机相。无水硫酸钠干燥,蒸干溶剂,得到化合物 11 棕黄色油状液体 1.71 g。

2.2.8 (2-{2-[2-(3,5-二-N,N-二(2-甲基吡啶)氨基-苯氧基)乙氧基]-乙氧基}乙基)-胺(前体 1)的合成 将化合物 11 粗品 1.71 g,加入 10 mL 二氯甲烷充分溶解,冰浴冷却,滴加三氟乙酸的二

氯甲烷溶液($\varphi=50\%$)10 mL,室温反应4 h。减压蒸出溶剂,加入饱和碳酸钠溶液调 $\text{pH}=10$,二氯甲烷萃取(20 mL \times 4),合并有机相。干燥、浓缩,得到棕红色油状液体,硅胶柱层析分离($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{氨的甲醇溶液})=5:1$,氨的甲醇溶液浓度为4.11 mol/L),得到纯品0.69 g,两步反应收率50%。

图6 $[^{18}\text{F}]\text{FEDPA}$ 的合成Fig. 6 Synthesis of $[^{18}\text{F}]\text{FEDPA}$

用氟多功能合成模块(图7)进行 ^{18}F 标记,具体标记操作如下:

(1) $^{18}\text{F}^-$ 由Cyclone 10/5通过 $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ 反应生产;

(2) $^{18}\text{F}^-$ 被QMA捕获后,用瓶a中的1.5 mL K_2CO_3 和 K_{222} 混合液(30 mg/1 mL水溶液-130 mg/10 mL K_{222} 乙腈溶液)将其洗脱,进入反应管I中;

(3)在116 $^\circ\text{C}$ 加热反应管6 min,蒸发溶剂;冷却后加入瓶b中的乙腈,116 $^\circ\text{C}$ 蒸干溶剂,干燥反应管至无液体残留,然后冷却;

(4)瓶c中加入二对甲苯磺酸乙二醇酯(8 mg)的乙腈(1 mL)溶液,100 $^\circ\text{C}$ 下密闭反应6 min,浓缩反应溶液后,冷却反应管;

(5)瓶d中的乙醚(5 mL)加入到反应管I;

(6)将反应液通过V7与V10之间相连的Sep Pak SiO_2 小柱,液体进入反应管II中(装有碳酸钾8 mg),并在90 $^\circ\text{C}$ 下将乙醚蒸除;

(7)重复(5)和(6)中的操作;

(8)瓶g中加入前体化合物1(5 mg)的DMF溶液至反应管II,135 $^\circ\text{C}$ 下密闭反应30 min,反应

2.3 $[^{18}\text{F}]\text{FEDPA}$ 的制备

在合成 $[^{18}\text{F}]\text{FEOTs}$ 时,采用文献[12]中的方法,二对甲苯磺酸乙二醇酯和 $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ 在100 $^\circ\text{C}$ 下反应6 min。经Sep Pak SiO_2 小柱分离纯化后,得到放射纯度大于95%的 $[^{18}\text{F}]\text{FEOTs}$,然后与前体1反应。 $[^{18}\text{F}]\text{FEDPA}$ 的合成路线示于图6。

结束后冷却反应管;

(9)瓶h中加入15 mL水,将反应液通过V15和V17之间的Sep Pak Al_2O_3 和Sep Pak C18小柱后进入废液,并用氮气吹干小柱。

(10)加入瓶i中的1 mL无水乙醇到反应管II,经Sep Pak Al_2O_3 和Sep Pak C18后,加入0.1 mol/L硝酸锌乙醇溶液2.31 μL ,密闭反应10 min后,70 $^\circ\text{C}$ 下浓缩溶液,至溶液完全蒸干,加入生理盐水配置溶液,过无菌滤膜后接入产品瓶中。

3 结果与讨论

3.1 $[^{18}\text{F}]\text{FEDPA}$ 前体的合成

Hanshaw等^[8]的合成路线是以3,5-二羟甲基苯酚为起始原料,经过缩合、溴代、胺化、脱保护基等反应制备前体1。本工作分3部分合成了前体1:2-氨基吡啶经过催化氢化制备二甲基吡啶胺(化合物3),收率30%;三乙二醇为起始原料,经酯化、叠氮化、还原、Boc保护和取代反应制备化合物7;最后以化合物3、7、8,经过四步反应完成了前体1的合成,并采用氨的甲醇溶液作为洗脱剂,得到目标前体1的纯品,收率5%(以化

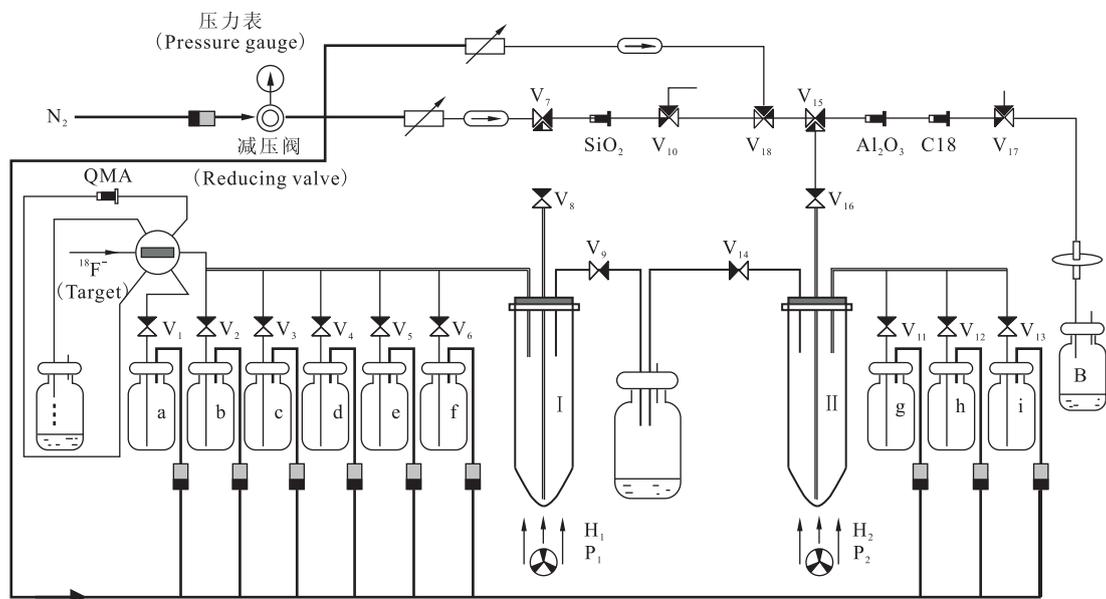


图 7 合成模块的路线图

Fig. 7 Scheme of disposable cassette

V_1-V_{18} ——阀门(Valves), H_1, H_2 ——加热阀(Heating valves), P_1, P_2 ——降温阀(Cooling valves),
I、II——反应管(Reaction tube), a-i——试剂瓶(Reagent bottle), B——产品瓶(Product bottle)

合物 4 计)。在合成化合物 7 时,采用甲磺酰酯基替代原路线中的溴作为离去基团,提高了收率。

3.2 产物的鉴定分析

化合物 1: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :
8.51(d, 4H, $J = 4.2$ Hz), 7.56~7.85(m, 8H),
7.11~7.14(m, 4H), 7.07(s, 1H), 6.89(s, 2H),
4.08~4.15(m, 2H), 3.86~3.89(m, 2H), 3.80
(s, 8H), 3.70~3.74(m, 2H), 3.64(s, 4H), 3.53

(t, 2H, $J = 5.2$ Hz), 2.87(t, 2H, $J = 5.2$ Hz),
2.08(s, 2H)。

产品用 HPLC 分析(Alltima C18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 结果示于图 8。由图 8 可以看出, ^{18}F FEDPA 的保留时间为 11.9 min, 标准品 ^{19}F FEDPA 的保留时间为 11.6 min。放射化学纯度为 77% (乙腈/0.1 mol/L 甲酸铵水溶液: 30/70, 流速为 1 mL/min, 254 nm UV 检测)。

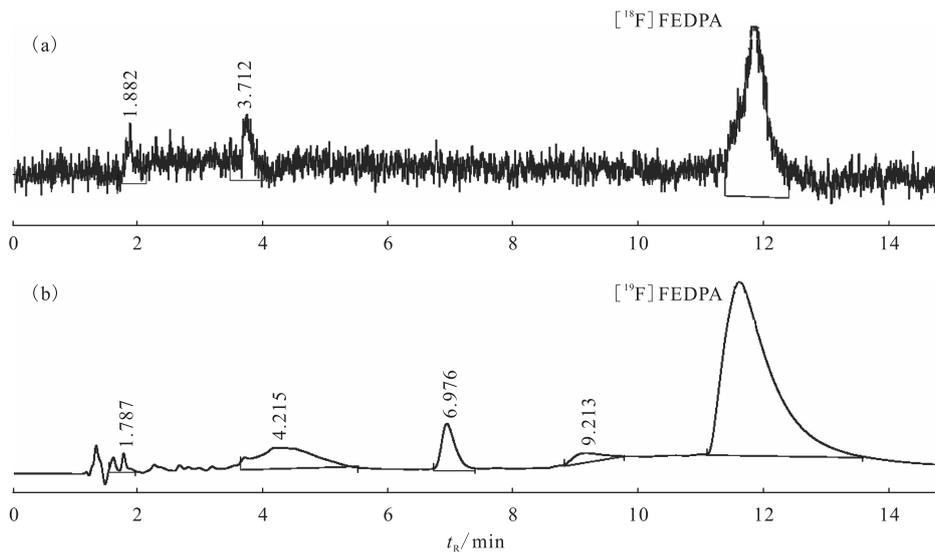
图 8 ^{18}F FEDPA 的放射性 HPLC 图谱(a)和 FEDPA 紫外 HPLC 图谱(b)

Fig. 8 Radioactive(a) and UV(b) chromatogram of the prepared FEDPA

^{18}F FEOTs 在碱性条件下进行烷基化反应时,发生部分水解,致使采用 Sep Pak C18 小柱分离的方法纯化后的产物中仍带有部分水解产物,造成目标产物的放射化学纯度较低。

3.3 氟化标记反应条件的选择

在进行前体 1 的 ^{18}F 氟乙基化反应时,作者尝试了很多反应条件,得到产物 ^{18}F FEDPA 的标记率都很低(表 1)。

表 1 不同条件下合成 ^{18}F FEDPA 的标记率

Table 1 Radiochemical yield of ^{18}F FEDPA at different conditions

溶剂 (Solvent)	碱 (Base)	合成时间 (Reaction time)/ min	衰变校正后收率 (Decay corrected yield)/%
MeCN	K_2CO_3	120	$3.2 \pm 0.6 (n=3)$
DMSO	0.1 g/mL NaOH(aq)	100	$2.0 \pm 0.1 (n=2)$
DMF	K_2CO_3	105	$8.9 \pm 0.3 (n=2)$

最后选定以 DMF 为溶剂,以 K_2CO_3 为碱在 $135\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 30 min,得到 ^{18}F FEDPA,标记率 $(8.9 \pm 0.3)\% (n=2)$ 。分析造成 ^{18}F FEDPA 放射收率低的主要原因是:(1) ^{18}F FEOTs 的化学纯度较低;(2) 前体 1 的烷基化效率较低,且合成时间长,造成目标产物的标记率偏低,有待进一步优化。

4 结 论

^{18}F FEDPA 是自行设计的一种检测细胞凋亡的二甲基吡啶胺类 PET 显像剂。本研究对前体 1 的全合成路线进行了改进,并以化合物 1 作为前体进行了 ^{18}F 标记制备 ^{18}F FEDPA,合成时间是 105 min,标记率 $(8.9 \pm 0.3)\%$ (经校正, $n=2$),HPLC 检测放射化学纯度为 77%。

参考文献:

[1] 王世真. 分子核医学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:366-367.
[2] 张建海,郝俊虎,王俊东,等. 细胞凋亡的生理意义

及其检测技术[J]. 中国动物检疫,2004,21:43-45.

- [3] Liemann S, Huber R C. Three-Dimensional Structure of Annexins[J]. Cell Mol Life Sci, 1997, 53: 516-521.
[4] Gerke V, Moss S E. Annexins: From Structure to Function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 331-371.
[5] Zhang G H, Gurtu V, Kain S R, et al. Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin V[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 525-531.
[6] Mochizuki T, Kuge Y, Zhao S J, et al. Detection of Apoptotic Tumor Response *in Vivo* After a Single Dose of Chemotherapy With Tc-99m-Annexin V[J]. J Nucl Med, 2003, 44(1): 92-97.
[7] Kamp D, Sieberg T, Haest C W M. Inhibition and Stimulation of Phospholipid Scrambling Activity. Consequences for Lipid Asymmetry, Echinocytosis, and Microvesiculation of Erythrocytes[J]. Biochem, 2001, 40(31): 9 438-9 446.
[8] Hanshaw R G, Smith B D. New Reagents for Phosphatidylserine Recognition and Detection of Apoptosis[J]. Bioorg Medic Chem, 2005, 13(17): 5 035-5 042.
[9] Sigel H, Hofstetter F, Martin B G, et al. General Considerations of Transphosphorylations: Mechanism of the Metal Ion Facilitated Dephosphorylation of Nucleoside 5'-Triphosphates Including Promotion of ATP Dephosphorylation by Addition of Adenosine 5'-Monophosphate[J]. J Am Chem Soc, 1984, 106(25):7 935-7 946.
[10] Jeong S W, O'Brien D F. Synthesis of a Polymerizable Metal-Ion-Chelating Lipid for Fluid Bilayers[J]. J Org Chem, 2001, 66: 4 799-4 802.
[11] Lakshmi C, Hanshaw R G, Smith B D. Fluorophore-Linked Zinc(II) Dipicolylamine Coordination Complexes as Sensors for Phosphatidylserine-Containing Membranes[J]. Tetrahedron, 2004, 60(49): 11 307-11 315.
[12] Tang G H, Wang M F, Tang X L, et al. Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry Estimation of O-(2- ^{18}F fluoroethyl)-L-Tyrosine as Oncologic PET Tracer[J]. Appl Radiat Isot, 2003, 58: 219-225.