

细胞凋亡显像剂 ^{18}F -ML-10 前体合成 及放射性标记

桂媛¹, 徐志宏¹, 张晓军², 李云刚², 刘健², 张锦明^{2,*}

1. 华益科技有限公司, 江苏常熟 215522; 2. 中国人民解放军总医院核医学科, 北京 100853

摘要: ^{18}F -2-(5-氟-戊基)-2-甲基丙二酸(^{18}F -ML-10)是一个有潜力的细胞凋亡显像剂。以5-溴-1-戊醇为原料, 合成了前体:5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯, 采用国产MF-2V-IT-1模块, 经亲核取代及碱水解, 合成了 ^{18}F -ML-10; 粗产品经HPLC纯化及固相萃取, 得到 ^{18}F -ML-10注射液。 ^{18}F -ML-10的合成效率为 $(25.3 \pm 4.7)\%$ ($n=16$, 不校正), 产品的放射化学纯度大于99%, 比活度为740 PBq/mol, K2.2.2含量低于10 mg/L, 有机溶剂乙腈残留量为 $(0.015 \pm 0.01)\%$ (质量分数), 无菌、无热原符合要求, 产品满足临床研究需求。

关键词: ^{18}F ; 放射性合成; 放射药物; 细胞凋亡; PET

中图分类号: R817 文献标志码: A 文章编号: 0253-9950(2016)03-0188-05

doi: 10.7538/hhx.2016.38.03.0188

Synthesis Precursor of Apoptosis Imaging Agent ^{18}F -ML-10 and Its Radiolabeling With ^{18}F

GUI Yuan¹, XU Zhi-hong¹, ZHANG Xiao-jun², LI Yun-gang², LIU Jian², ZHANG Jin-ming^{2,*}

1. Huayi Science & Technology Co. Ltd., Changshu 215522, China;

2. Department Nuclear Medicine, The PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract: ^{18}F -2-(5-fluoro-pentyl)-2-methyl malonic acid(^{18}F -ML-10) is one of the competitive candidate for apoptosis imaging with PET. ML-10 as reference and its OTs derivative (diethyl 2-methyl-2-(5-(tosyloxy)pentyl) malonate) as precursor for labeling with fluorine-18 were prepared. ^{18}F -ML-10 was synthesized via nucleophilic substitution and base hydrolysis. The ^{18}F -ML-10 injection was got by semi-HPLC and solid-extraction-preparation via home MF-2V-IT-1 module. The synthesis yield of ^{18}F -ML-10 is $(25.3 \pm 4.7)\%$ ($n=16$, no corrected decay), and the specific activity is 740 PBq/mol. The radiochemical purity is over 99%. The residuary acetonitrile in the injection is $(0.015 \pm 0.01)\%$ (w). The K2.2.2 mass concentration in the injection is low than 10 mg/L. The injection is free of bacteria and pyrogen. It can be used for clinical research.

Key words: ^{18}F ; radiosynthesis; radiopharmaceuticals; apoptosis; PET

收稿日期: 2015-04-21; 修订日期: 2015-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371593)

作者简介: 桂媛(1981—), 女, 江西九江永修人, 博士, 高级工程师, 从事有机合成工作

* 通信联系人: 张锦明(1965—), 男, 江苏南通人, 博士, 研究员, 从事核医学工作, E-mail: zhangjm301@163.com

肿瘤细胞凋亡显像是早期评价肿瘤放化疗疗效的方法之一,影像学评价细胞凋亡的方法很多,但特异性方法较少。第一个特异性肿瘤细胞凋亡显像剂是 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的 Annexin V,临床研究表明:肿瘤摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 与其凋亡正相关^[1-2]。 ^{18}F -ML-10 (2-(5-fluoro-pentyl)-2-methylmalonic acid)是近年来第一个应用于临床研究的凋亡显像的正电子药物,用于脑胶质瘤放疗后疗效早期评价,临床初步验证:胶质瘤经放疗后24 h,肿瘤摄取 ^{18}F -ML-10 与治疗8周的核磁共振成像(MR)图像改变正相关,说明 ^{18}F -ML-10 是一个有潜在临床价值的细胞凋亡显像剂^[3-5]。Sobrio等^[6]报导了以丙二酸二叔丁基酯为起始原料,合成 ^{18}F -ML-10的前体:5-对甲苯磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二叔丁基酯;该前体的保护基团为叔丁基酯,脱保护需用强酸。Dewkar等^[7]报导了以2-甲基丙二酸二乙酯为起始原料,合成了另一个前体:5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯,该前体的保护基团为乙酯,较容易脱保护。本研究在文献^[6-7]的基础上改变原料,合成较容易脱保护的前体:5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯,采用国产氟多功能模块合成 ^{18}F -ML-10,并进行质量控制,以便将 ^{18}F -ML-10 应用于临床研究。

1 试剂和仪器

甲苯磺酸吡啶盐、5-溴-1-戊醇、碘化钾(KI)、对甲苯磺酸吡啶盐、3,4-二氢吡喃、甲基丙二酸

二乙酯、氢氧化钠、二甲基甲酰胺(DMF)、对甲苯磺酰氯,均为分析纯,购自阿拉丁试剂;K2.2.2-氧-18水(丰度大于97%),江苏华益科技有限公司;SEP-PAK QMA,美国 Waters 公司;无水乙腈,美国 Aldrich 公司。

Agilent 6120 型质谱仪,美国安捷伦公司;Bruker 300M 核磁共振仪,美国布鲁克公司;SGWX-4 熔点仪,上海精密仪器厂;Sumitomo HM-20S 回旋加速器,日本住友公司;MF-2V-IT-1 型氟多功能合成仪,派特(北京)科技有限公司;高效 HPLC 分析仪,美国 Waters 公司,配有 515 泵、2487 紫外分析仪、BioScan 流动放射性检测器;GC7890 型气相色谱,上海天美公司。上海三爱思精密试纸(pH=5.5~9.0)。

2 实验方法

^{18}F -ML-10 前体及 ML-10 标准品合成路线示于图 1。

2.1 5-溴-1-戊-1-二氢吡喃醚(1)的合成

氮气保护下,在 500 mL 三颈瓶中加入 4 g 对甲苯磺酸吡啶盐(PPTS, 16 mmol)、13.36 g 5-溴-1-戊醇(80 mmol)和 200 mL 二氯甲烷,滴加 10.08 g 3,4-二氢吡喃(120 mmol)的 200 mL 二氯甲烷的溶液。滴完后,室温下反应过夜。停止反应,用水洗涤,有机相用无水硫酸镁干燥,过滤得粗品 $m = 25\text{ g}$,粗品过 300~400 目的硅胶柱分离(V(乙酸乙酯):V(正己烷)从 5:1 到 2:1 梯度洗脱)。

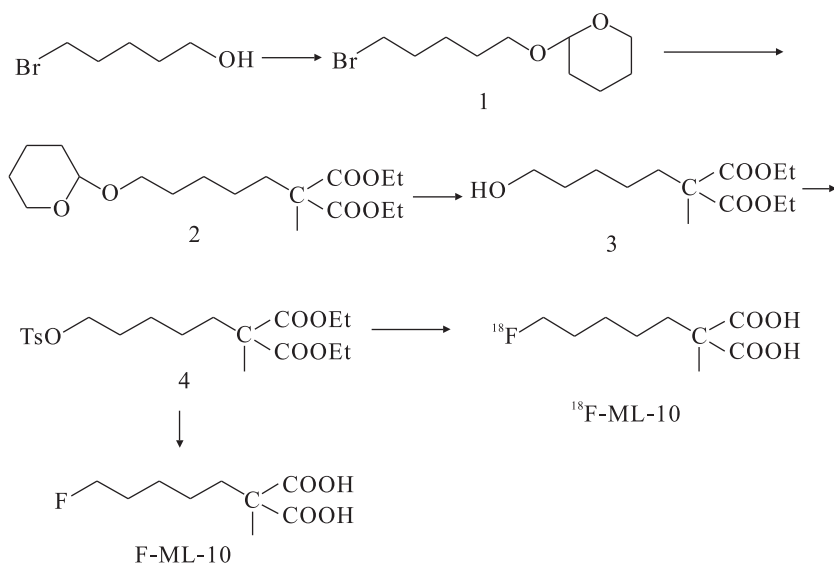


图 1 ^{18}F -ML-10 前体及 ML-10 标准品合成路线

Fig. 1 Reaction scheme for precursor of ^{18}F -ML-10 and ML-10 reference standards

2.2 5-二氢吡喃醚-戊基-2-甲基丙二酸二乙酯(2)的合成

装置氮气保护,加入 7 g 甲基丙二酸二乙酯(40 mmol),50 mL 无水 DMF,冷至 0 °C,分批加入 1.5 g 氢氧化钠(质量分数 80%,48 mmol),加完后在 0 °C 反应 0.5 h;0 °C 下,加入 0.6 g KI(3.6 mmol),后滴加 10 g 物质 1(40 mmol)的 50 mL 无水 DMF 的溶液,加完后升至 50 °C 反应过夜。加入饱和氯化铵溶液,调节 pH 值至中性,加入乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,干燥,产品 2 可直接进行下一步反应。

2.3 5-戊醇-2-甲基丙二酸二乙酯(3)的合成

500 mL 单颈瓶中依次加入 13.7 g 物质 2、1.6 g PPTS(6.4 mmol)、180 mL 乙醇,在 55 °C 下回流反应 2 h。停止反应,旋干溶剂,柱分离可得产品(柱分离洗脱剂 V(乙酸乙酯):V(正己烷)=2:1)。

2.4 5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯(4)的合成

装置氮气保护,依次加入 10 g 物质 3、5.76 g 三乙胺(57 mmol)和 100 mL 二氯甲烷,冷至 0 °C,滴加 10.86 g 对甲苯磺酰氯(57 mmol)溶于 100 mL 二氯甲烷的溶液,约 1 h 滴完,滴完后室温下反应过夜。停止反应,反应液用饱和食盐水洗涤后,有机相用无水硫酸镁干燥,过滤,旋干得粗品,粗品柱分离可得产品(柱分离洗脱剂 V(乙酸乙酯):V(正己烷)=4:1),产物为无色透明液体,纯度大于 98%。

2.5 2-(5-氟-戊基)-2-甲基丙二酸(标准品)的合成

装置氮气保护,250 mL 三颈瓶中依次加入 5 g 物质 4、100 mL 乙腈和 3.9 g 无水四丁基氟化铵(TBAF,15 mmol),回流反应 2 h。停止反应,减压旋去溶剂,加入约 100 mL 二氯甲烷然后用 2×30 mL 水洗涤。有机相干燥,过滤,旋干得粗品。粗品过柱分离可得纯品 5-氟-2-甲基丙二酸二乙酯(ML-6)(柱分离洗脱剂 V(乙酸乙酯):V(正己烷)=10:1)。

100 mL 反应瓶中依次加入 0.5 g ML-6(1.9 mmol)、0.76 g 氢氧化钠(19 mmol)和 20 mL 乙醇回流反应约 2 h,停止反应,用盐酸调节 pH 值至强酸性,过滤,滤饼用少量乙醇洗涤,滤液旋干,残渣加约 10 mL 乙酸乙酯,过滤掉不溶性的无机盐,滤液再次旋干得粗品,粗品用正己烷和乙酸乙酯重结晶可得产品。

2.6 ¹⁸F-ML-10 的自动化合成

由 Sumitomo HM-20S 回旋加速器 20 MeV 质子轰击丰度为 98% 的氧-18 水,经 ¹⁸O(p,n)¹⁸F 反应生成 ¹⁸F 离子,将 ¹⁸F 离子传到 QMA 柱,以下由 MF-2V-IT-1 型氟多功能合成器自动化合成。依序将安装在合成器的液体加入,加入 1 号瓶液体(1 mL 的乙腈水溶液,含 15 mg K₂.2.2 和 3 mg K₂CO₃),将 ¹⁸F(40~60 GBq)从 QMA 柱上淋洗入反应管,加热反应管并通入 110 mL/min 的氮气,将反应管中溶液蒸发至干;加 2 号瓶内液体(2 mL 乙腈),重复以上步骤,将反应管中溶液蒸发至干;加入 3 号瓶液体(1 mL 乙腈溶解 10 mg 的 5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯),83 °C 加热反应管 5 min;加入 4 号瓶液体(0.6 mL 2 mol/L NaOH)115 °C 加热反应管水解 10 min,加入 5 号瓶液体(4 mL 1 mol/L HCl)中和,最后加入 6 号瓶液体(2 mL 含 1% 三氟乙酸(TFA)的 20%(体积分数,下同)乙腈)。最终约 4 mL 的反应液自动移到半制备 HPLC 上分离,半制备分离柱为:Grace Attach C-18 柱(250 mm×10 mm),流动相为含 1% TFA 的 20% 乙腈,流速为 12 mL/min。收集 9~10 min 的放射性峰,经合成器上固相萃取系统,将含 20% 乙腈的溶液转化成含 8% 乙醇的注射液。

2.7 ¹⁸F-ML-10 的质量控制

¹⁸F-ML-10 应为无色透明的溶液,用精密 pH 试纸测其 pH 应在 6.0~7.0。

取 10 μL 的 ¹⁸F-ML-10 注射液,于美国 Waters 公司的高效 HPLC 分析仪上分析,HPLC 分析柱为反相 C-18 柱(Nova ParK C-18,150 mm×3.9 mm),流动相为含 1% TFA 的 20% 乙腈,流速为 1 mL/min。氟离子的 $t_R = 1.9$ min, ¹⁸F-ML-10 的 $t_R = 5.8$ min,产品的放化纯应大于 95%。产品与 ML-10 标准品共注射进样(1 g/L),紫外波长为 254 nm, ¹⁸F-ML-10 放射性峰应与 ML-10 的紫外吸收峰一致。

取衰变后的 ¹⁸F-ML-10 注射液与等体积的标准 K₂.2.2(100 mg/L)溶液混合,取 3 μL 点样于经氯铂酸和碘化钾染色的 TLC 硅胶板上得到 A 点,同时另取 3 μL 标准 K₂.2.2(50 mg/L)、标准 K₂.2.2(10 mg/L)溶液点样硅胶板上得到 B 点、C 点,取 3 μL 衰变后的 ¹⁸F-ML-10 注射液点样于硅胶板上得到 D 点。硅胶板上的 A 点和 B 点的深蓝色斑块应一致,同时 D 点的蓝色斑块应小于

B点^[8]。

取已完全衰变的 5 μL ¹⁸F-ML-10 注射液,按文献^[8]方法测残留乙腈的含量,乙腈含量应不高于 0.04%(质量分数)。

按中国药典 2015 年版二部附录 XI E 和 H 检查注射液的内毒素和无菌性,应符合要求。

3 结果与讨论

3.1 ML-10 标准品和前体合成与表征

本研究以 5-溴-1-戊醇为原料,最终合成了 ML-10 标准品和前体。

其中化合物 1: 纯品 $m = 13.7 \text{ g}$, 合成产率 68%; LC-MS $[M + 1]^+ = 251 (100\%)$, 253 (97%); ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.55 \sim 4.60(\text{m}, 1\text{H})$, $3.81 \sim 3.92(\text{m}, 1\text{H})$, $3.69 \sim 3.80(\text{dt}, 1\text{H}, J = 6.4 \text{ Hz}, 9.7 \text{ Hz})$, $3.46 \sim 3.55(\text{m}, 1\text{H})$, $3.35 \sim 3.45(\text{dt}, 1\text{H}, J = 6.4 \text{ Hz}, 9.7 \text{ Hz})$, $3.39 \sim 3.45(\text{t}, 2\text{H}, J = 6.8 \text{ Hz})$, $1.86 \sim 1.97(\text{m}, 2\text{H})$, $1.46 \sim 1.85(\text{m}, 10\text{H})$ 。化合物 2: 粗产品 $m = 2.3 \text{ g}$, 产率 72.8%, LC-MS: $[M + 1]^+ = 345$, 由于直接用于下步反应,没有做核磁鉴定。化合物 3: $m = 6.4 \text{ g}$, 化合物 2 和 3 两步总产率 61.5%; LC-MS: $[M + 1]^+ = 261$; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.12 \sim 4.23(\text{q}, 4\text{H}, J = 7.3 \text{ Hz})$, $3.56 \sim 3.69(\text{t}, 2\text{H}, J = 6.1 \text{ Hz})$, $1.76 \sim 1.92(\text{m}, 2\text{H})$, $1.46 \sim 1.65(\text{m}, 3\text{H})$, $1.32 \sim 1.46(\text{m}, 2\text{H})$, $1.40(\text{s}, 3\text{H})$, $1.17 \sim 1.31(\text{m}, 2\text{H})$, $1.21 \sim 1.27(\text{t}, 6\text{H}, J = 7.3 \text{ Hz})$ 。化合物 4: $m = 12.4 \text{ g}$, 合成收率 78.9%; LC-MS: $[M + 1]^+ = 339$; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.12 \sim 4.26(\text{m}, 6\text{H})$, $3.00(\text{s}, 3\text{H})$, $1.81 \sim 1.90(\text{m}, 2\text{H})$, $1.69 \sim 1.80(\text{m}, 2\text{H})$, $1.36 \sim 1.49(\text{m}, 2\text{H})$, $1.40(\text{s}, 3\text{H})$, $1.20 \sim 1.35(\text{m}, 2\text{H})$, $1.20 \sim 1.28(\text{t}, 6\text{H})$ 。化合物 5: $m = 250 \text{ mg}$, 合成收率 47%; LC-MS: $[M + 1]^+ = 415$; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74 \sim 7.82(\text{d}, 2\text{H}, J = 8.3 \text{ Hz})$, $7.29 \sim 7.39(\text{d}, 2\text{H}, J = 8.3 \text{ Hz})$, $4.11 \sim 4.21(\text{q}, 4\text{H}, J = 7.1 \text{ Hz})$, $3.96 \sim 4.04(\text{t}, 2\text{H}, J = 6.3 \text{ Hz})$, $2.45(\text{s}, 3\text{H})$, $1.74 \sim 1.84(\text{m}, 2\text{H})$, $1.61 \sim 1.70(\text{m}, 2\text{H})$, $1.36(\text{s}, 3\text{H})$, $1.19 \sim 1.27(\text{t}, 6\text{H}, J = 7.1 \text{ Hz})$, $1.12 \sim 1.38(\text{m}, 4\text{H})$ 。化合物 6: LC-MS: $[M + 1]^+ = 207$; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.31 \sim 4.56(\text{dt}, 2\text{H}, J = 6.0, 47.4 \text{ Hz})$, $1.86 \sim 1.98(\text{m}, 2\text{H})$, $1.61 \sim 1.82(\text{m}, 2\text{H})$, $1.50(\text{s}, 3\text{H})$, $1.29 \sim 1.55(\text{m}, 4\text{H})$ 。

Sobrio 等^[6]采用丙二酸二叔丁基酯与 5-溴戊苄醚反应,再经甲基化后,在钨碳催化下还原苄醚生成 5-羟基-戊基-2-甲基丙二酸二叔丁基酯,合成步骤多,所用催化剂价格贵^[6]。Dewkar 等^[7]采用 2-甲基丙二酸二乙酯与 1,5-二溴戊烷直接反应,生成 5-溴-戊基-2-甲基丙二酸二乙酯,经甲基磺酸银将其转化成 5-羟基-戊基-2-甲基丙二酸二乙酯,同样使用了贵金属试剂。本研究综合了二种方面的特点,用 3,4-二氢吡喃替代苄基保护,用 PPTS 可以较容易脱保护,降低了合成成本。本研究从原料到前体共 4 步,合成总收率为 33.4%,高于文献^[6]的 28%。

3.2 ¹⁸F-ML-10 的自动化合成结果

采用 MF-2V-IT-1 型多功能模块,单个反应管即能全自动合成 ¹⁸F-ML-10,并完成半制备 HPLC 的分离和 HPLC 流动相的溶剂转换得到注射液。图 2 为半制备 HPLC 的放射性色谱图,仅见二个峰,一个是未反应的氟离子峰,另一个即为产品 ¹⁸F-ML-10 的峰,说明本反应较单一,没有其它副反应。从氟离子到产品 ¹⁸F-ML-10 花费时间 40 min,合成效率为 $(25.3 \pm 4.7)\%$ ($n = 16$, 未衰减校正),衰减校正后的合成效率为 32.6%,该效率低于文献^[6]的 39.8%。但文献^[6]为小剂量合成,起始 ¹⁸F 量为 35~70 MBq,低于本研究 ¹⁸F 量三个数量级,本研究的产品活度为 10~15 GBq,满足临床使用要求。

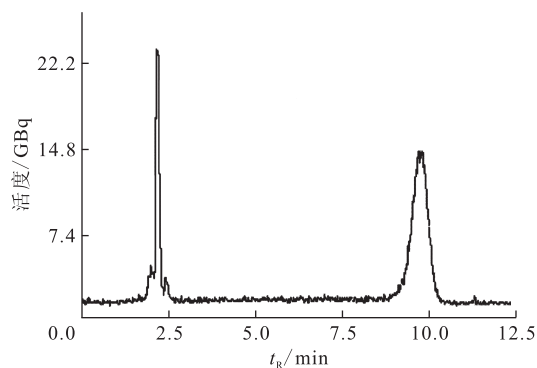


图 2 半制备 HPLC 的 ¹⁸F-ML-10 放射性色谱图
Fig. 2 Semipreparative radioactive HPLC traces for ¹⁸F-ML-10

3.3 ¹⁸F-ML-10 的质量控制结果

经溶剂转换后的含 $w = 8\%$ 乙醇的 ¹⁸F-ML-10 注射液为无色透明的液体,溶液 pH = 6.5。

产品的活度为 10~15 GBq,活度浓度为 1.0~

1.5 TBq/L。

完全衰变后的 ^{18}F -ML-10 注射液点样于硅胶板上得到 D 点没有斑点形成,基本无色、无色环,低于标准 K2.2.2(10 mg/L)溶液的色斑 C 点。符合我国关于 ^{18}F -FDG 注射液中 K2.2.2 含量低于 50 mg/L 的要求^[9]。

经分析型 HPLC 分析表明,在 HPLC 柱上仅一个放射性主峰,该峰的保留时间与 ML-10 标准品的紫外吸收峰保留时间一致(图 3), ^{18}F -ML-10 的放射化学纯度大于 99%,比活度为 740 PBq/mol。

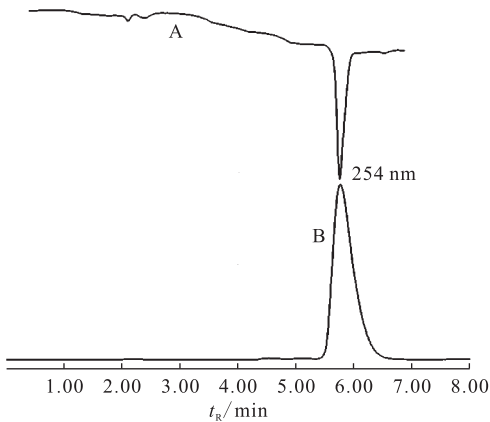


图 3 ^{18}F -ML-10 的分析型 HPLC 放射性(B)和 ML-10 标准品的紫外色谱图(A)

Fig. 3 ^{18}F -ML-10 radioactivity(B) and ML-10 UV traces(A)

经 GC 分析表明,有机溶剂乙腈的残留为 $(0.015 \pm 0.01)\%$ (质量分数)。

注射液的内毒素和无菌性,符合要求。

4 结 论

本研究以 5-溴-1-戊醇为原料,合成了前体 5-甲基磺酰基戊基-2-甲基丙二酸二乙酯和标准品 F-ML-10,用 3,4-二氢吡喃替代苄基保护,用 PPTS 可以较容易脱保护,降低了合成成本。同时采用国产氟多功能模块,自动合成了 ^{18}F -ML-10,合成效率为 $(25.3 \pm 4.7)\%$, ^{18}F -ML-10 放射化学纯度大于 99%,K2.2.2 含量低于 10 mg/L,

乙腈含量低于 0.04%(质量分数),产品满足临床研究的需求。

参考文献:

- [1] Kuge Y, Zhao S, Takei T, et al. Molecular imaging of apoptosis with radio-labeled Annexin A5 focused on the evaluation of tumor response to chemotherapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9(9): 1003-1011.
- [2] Hoebbers F J, Kartachova M, de Bois J, et al. $^{99}\text{Tc}^m$ Hynic-rh-Annexin V scintigraphy for *in vivo* imaging of apoptosis in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(3): 509-518.
- [3] Hoglund J, Shirvan A, Antoni G, et al. ^{18}F -ML-10, a PET tracer for apoptosis: first human study[J]. *J Nucl Med*, 2011, 52: 720-725.
- [4] Allen A M, Ben-Ami M, Reshef A, et al. Assessment of response of brain metastases to radiotherapy by PET imaging of apoptosis with ^{18}F -ML-10[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2012, 39: 1400-1408.
- [5] Oborski M J, Laymon C M, Lieberman F S, et al. First use of ^{18}F -labeled ML-10 PET to assess apoptosis change in a newly diagnosed glioblastoma multiforme patient before and early after therapy[J]. *Brain and Behavior*, 2014, 4(2): 312-315.
- [6] Sobrio F, Médoc M, Martial L, et al. Automated radiosynthesis of [^{18}F] ML-10, a PET radiotracer dedicated to apoptosis imaging, on a TRACER Lab FX-FN module[J]. *Mol Imaging Biol*, 2013, 15: 12-18.
- [7] Dewkar G K, Sundaresan G, Lamichhane N, et al. Microfluidic radiosynthesis and biodistribution of [^{18}F] 2-(5-fluoro-pentyl)-2-methyl malonic acid[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2013, 56: 289-294.
- [8] 李云钢, 张晓军, 刘健, 等. 气相色谱法测量正电子放射性药物中有机溶剂残留及原因分析[J]. *同位素*, 2013, 26(3): 152-157.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1559-1660.