

文章编号:0253-9950(2009)01-0052-05

肿瘤增殖显像剂¹⁸F-FLT 的合成和标记

陆春雄^{1, 2}, 王正武^{1, 3, *}, 蒋泉福², 吴春英²

1. 江南大学 化学与材料工程学院, 无锡 214122;

2. 江苏省原子医学研究所, 卫生部核医学重点实验室, 无锡 214063;

3. 上海交通大学 农业与生物学院 食品科学与工程系, 上海 200240

摘要:为制备肿瘤增殖显像剂 3'-脱氧-3'-氟胸腺嘧啶脱氧核苷(3'-deoxy-3'-fluorothymidine, ¹⁸F-FLT), 合成了标记前体 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基-β-1)-苏戊呋喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(N-BOC-FLT)并进行了标记。标记前体和各步合成中间体均经红外、核磁共振和质谱确证;于 120 °C 进行亲核氟化反应, 标记率为(35.2±5.8)% (经校正, n=2), 用 TLC 和 HPLC 检测其放化纯度(RCP)大于 95%, 可满足临床研究的要求。

关键词: ¹⁸F-标记; ¹⁸F-FLT; 合成

中图分类号:O628; R817 文献标志码:A

Synthesis and Fluoro-Radiolabelling of Proliferation Imaging Agent ¹⁸F-FLT

LU Chun-xiong^{1, 2}, WANG Zheng-wu^{1, 3, *}, JIANG Quan-fu², WU Chun-ying²

1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Wuxi 214063, China; 3. Department of Food Science and Technology, School of Agriculture and Biology,

Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Synthesis and fluoro-radiolabeling of proliferation imaging agent 3'-deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine(¹⁸F-FLT) were reported. The chemical structure of the labeling precursor N-BOC-FLT and all its intermediates were verified by IR, MS and ¹H NMR. Nucleophilic fluorination was proceeded at 120 °C. Radiochemical yield is (35.2±5.8)% (n=2, decay corrected) and final radiochemical purity is above 95% determined by TLC and HPLC. Thereby it can be used preclinically.

Key words: ¹⁸F labeling; ¹⁸F-FLT; synthesis

目前临床常用的肿瘤 PET 药物是 ¹⁸F 标记的脱氧葡萄糖(FDG), 其机理是肿瘤细胞摄取糖比正常细胞高, 葡萄糖在肿瘤细胞内的有氧氧化和无氧酵解也比正常细胞快。通过两者在糖的摄取

与代谢方面的不同, 因摄入细胞内的 FDG 在己糖激酶和 1, 6-二磷酸葡萄糖异构酶的作用下, 滞留在细胞内, 从而使组织显像, 所以用 PET 来进行肿瘤鉴别诊断。但 FDG 在炎症灶也有较强的集

收稿日期:2007-11-22; 修订日期:2008-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20676051, 20573048); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2008111, BK2008112); 江苏省卫生厅资助项目(H200624)

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

* 通讯联系人

聚,在肿瘤组织以外也有非特异集积,同时也不是所有的肿瘤细胞对 FDG 都有高摄取,所以假阳性和非特异性是 FDG 肿瘤 PET 的主要问题。因而研制新的针对肿瘤其他生化代谢的 PET 药物一直是正电子药物的研究重点。

3'-脱氧-3'-氟胸腺嘧啶脱氧核苷(3'-deoxy-3'-fluorothymidine, ¹⁸F-FLT)是一种显示细胞增殖状态的胸腺嘧啶类显像剂,它在胸腺嘧啶激酶的作用下被磷酸化,其产物不参与 DNA 合成,只能聚集在细胞内。当肿瘤组织急剧增生时,大量的 DNA 合成,需要胸腺嘧啶激酶的上调和活性增加,因而肿瘤细胞内有大量 FLT 聚集,因此¹⁸F-FLT 可以使肿瘤组织成像。而对于炎症病灶和结核病灶来讲,尽管糖代谢增强,摄取率都表现为较高水平,但细胞增生并不活跃,因此¹⁸F-FLT 显像可以很容易地进行鉴别诊断^[1-2]。

对于¹⁸F-FLT,国外研究较多,国内也有几家 PET 中心对¹⁸F-FLT 的标记进行了研究^[3],但国内对于¹⁸F-FLT 的标记前体的合成未见报道。本研究拟对国外文献^[4-6]的合成条件进行改进,以满足临床研究的要求。

1 试剂与仪器

β-胸苷,新乡拓新生化科技有限公司,纯度大于 99%; 4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTrCl), 上海南翔试剂厂,纯度大于 97%; 甲磺酰氯(MsCl), 4-硝基苯磺酰氯(NsCl), 叔丁氧基甲酸酐(t-butyloxycarbonyl anhydride, (BOC)₂O), 氨基聚醚(Kry2. 2. 2)均购于百灵威公司;其他试剂为国产分析纯。

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 PACKARD-COBRA 公司; PET-MF-2V-IT-I 型氟多功能合成模块,北京派特生物技术有限公司; 薄层扫描仪,美国 BIOSCAN 公司; 1525 Binary 高效液相分析色谱仪,美国 Waters 公司; 紫外检测仪(2487 型双波长紫外吸收检测器),美国 Waters 公司; 流动相放射性检测仪,美国 Perkin Elmer 公司; Yanadimoto 熔点仪,日本株式会社,温度未校正。

2 实验方法

2.1 ¹⁸F-FLT 标记前体的合成路线

¹⁸F-FLT 标记前体的合成路线^[4-5]示于图 1。

2.2 实验步骤

2.2.1 5'-O-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基)胸腺嘧啶脱氧核苷(1)的合成 取 1.5 g β-胸苷和 10 g 无水碳酸钾加入到 250 mL 丙酮中,在氮气保护下搅拌约 10 min。滴加 2.54 g 4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTrCl)溶于 50 mL 丙酮溶液,滴毕,过滤,滤液浓缩后过硅胶柱,用体积比 3:1 的乙酸乙酯-正己烷为洗脱剂,得 1.3 g 淡黄色泡沫状固体,产率为 38.6%,熔点 110~115 °C。

2.2.2 5'-O-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基)d-苏式呋喃糖胸腺嘧啶脱氧核苷(2)的合成 取 0.5 g 化合物 1,溶于 15 mL 干燥四氢呋喃中,于 0 °C 加入 0.4 mL 三乙胺,缓慢滴加 0.11 mL 甲磺酰氯(MsCl)的 10 mL 干燥四氢呋喃溶液,有沉淀生成。搅拌反应 1.5 h。加入 10 mL 乙醇和 10 mL

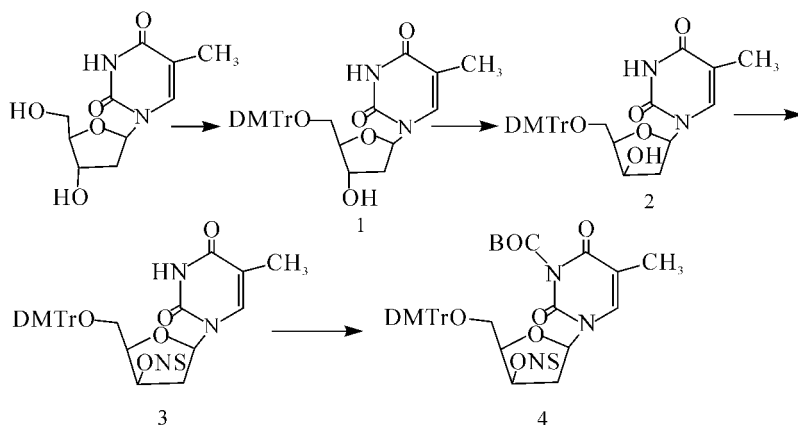


图 1 ¹⁸F-FLT 标记前体的合成路线

Fig. 1 Scheme for synthesis of precursor of ¹⁸F-FLT

1 mol/L NaOH 溶液, 加热回流 4 h。再加入 9.25 mL 10 mol/L NaOH 溶液, 回流 1.5 h。反应完全后, 减压除去四氢呋喃和乙醇, 所得产物溶于水后用二氯甲烷萃取 2 次。将有机相蒸干后得到淡黄色固体 0.45 g, 产率 90%, 熔点 120~124 °C。

2.2.3 [5'-O-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基-β-1)-苏戊咪喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(3)的合成 取 0.9 g 化合物 2, 溶于 20 mL CH₂Cl₂, 加入 0.25 g 4-N, N-二甲基胺基吡啶(DMAP), 于 0 °C 滴加 0.74 g 4-硝基苯磺酰氯的 10 mL CH₂Cl₂, 加入 1 mL 三乙胺, 有白色沉淀生成, 继续反应, 沉淀消失, 反应 5 h 后, 倒入冰水中, 分出有机层, 水洗, 干燥, 过硅胶柱(体积比 3:1 的乙酸乙酯-正己烷为展开剂), 得黄色泡沫状固体 0.7 g, 产率 58.3%, 熔点 110~115 °C。

2.2.4 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基-β-1)-苏戊咪喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(4, N-BOC-FLT)的合成 取 0.5 g 化合物 3, 溶于 20 mL 四氢呋喃中, 加入 0.27 g 叔丁氧基甲酸酐, 于室温搅拌 80 min, 加入 0.4 g DMAP, 继续室温搅拌 4 h, 反应液浓缩后, 用乙酸乙酯稀释, 然后分别用

水、稀乙酸和 NaHCO₃ 溶液洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥。浓缩过柱(展开剂为乙酸乙酯-正己烷, 体积比为 1:2), 得黄色固体 0.4 g, 产率 70.4%, 熔点 108~115 °C。

2.3 N-BOC-FLT 的 ¹⁸F⁻ 标记

用氟多功能合成模块(图 2)进行 ¹⁸F⁻ 标记, 具体标记操作如下:

- (1) 将购买来的 ¹⁸F⁻ 注射到 QMA 柱上;
- (2) 用 1 号瓶中的 1 mL 溶液(2 mg K₂CO₃ 加 12 mg Kry2. 2.2 溶于 0.3 mL 水和 0.7 mL 乙腈的混合溶液)将 ¹⁸F⁻ 淋洗到反应管中;
- (3) 将反应管中的溶液于 120 °C 氮气吹干;
- (4) 反应管中加入 2 号瓶中 1 mL 干燥乙腈, 于 120 °C 氮气吹干;
- (5) 反应管中加入 3 号瓶中 30 mg N-BOC-FLT 和 1 mL 干燥乙腈, 于 120 °C 反应 5 min;
- (6) 通氮气到反应管, 吹干乙腈, 加入 4 号瓶中 0.3 mL 1 mol/L HCl, 于 120 °C 反应 5 min;
- (7) 反应管中加入 5 号瓶中 2 mL 2 mol/L 乙酸钠溶液中和;
- (8) 启动 HPLC 纯化, Alltima C18 柱(250 mm×10.0 mm, 10 μm); 流动相为乙醇-水, 体积比为 1:9; 流速 5 mL/min。

亲核反应式示于图 3。

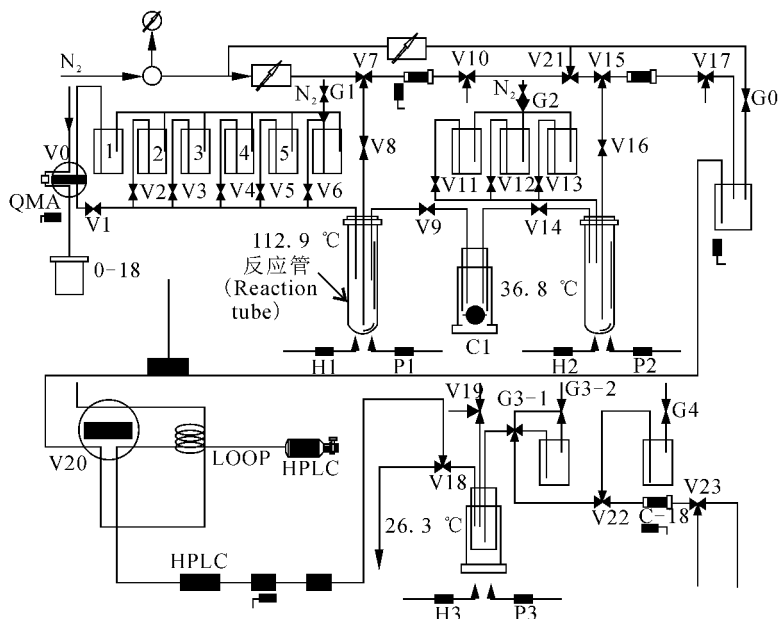
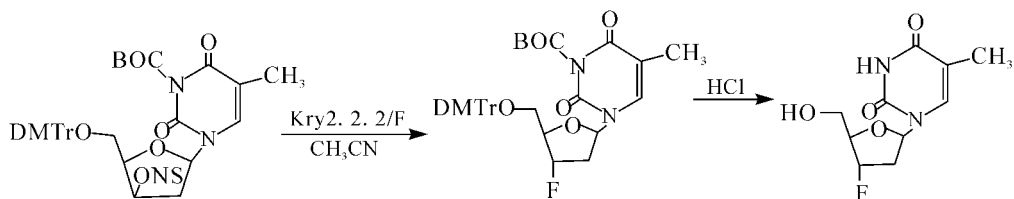


图 2 合成模块的路线图

Fig. 2 Scheme of disposable cassette

V0~V23——阀门(Valves), H1~H3——加热阀(Heating valves), G0~G4——气体阀门(Gas valves),

P1~P3——降温阀(Cooling valves), C1——真空泵(Vacuum pump)

图 3 N-BOC-FLT 的¹⁸F⁻标记Fig. 3 Scheme for synthesis of ¹⁸F-FLT

2.4 放化纯度测定

2.4.1 TLC 测定 将产品¹⁸F-FLT 点样于硅胶板上,以体积比为 9:1 的 CH₂Cl₂-CH₃OH 为展开剂展开,晾干后,放在薄层扫描仪上扫描。

2.4.2 HPLC 测定 汉邦 Lichrospher C18 柱 (150 mm×4.65 mm, 5 μm), 流动相为乙醇-水, 体积比为 1:9;流速 0.8 mL/min, 流动相放射性检测仪检测。

3 结果和讨论

(1) 本文合成的标记前体 N-BOC-FLT 是目前国际上流行的¹⁸F-FLT 的标记前体, N-BOC-FLT 以及各步中间产物的结构均经红外、质谱和核磁共振确证,总收率 14.3%。

其中化合物 1: MS(*m/z*): 567(M+Na); IR (cm⁻¹): 3 413, 3 183, 2 960, 2 835, 1 690, 1 607, 1 509, 1 466; ¹H NMR(CDCl₃, δ): 8.28 (s, 1H), 7.60~7.20(m, 10H), 6.84(m, 4H), 6.40(m, 1H), 4.58(s, 1H), 4.05(s, 1H), 3.80(s, 6H), 3.50~3.36(m, 2H), 2.46~2.30(m, 2H), 2.05(s, 1H), 1.60~1.58(d, 3H)。

化合物 2: MS(*m/z*): 567(M+Na); IR (cm⁻¹): 3 413, 3 183, 2 960, 2 835, 1 690, 1 607, 1 509, 1 466; ¹H NMR(CDCl₃, δ): 8.78 (s, 1H), 7.76~7.20(m, 10H), 6.82(d, 4H), 6.20(m, 1H), 4.44(s, 1H), 4.00(m, 1H), 3.80(s, 6H), 3.64~3.50(m, 2H), 3.06(s, 1H), 2.08~2.02(m, 1H), 1.80~1.78(m, 4H)。

化合物 3: MS(*m/z*): 752(M+Na); IR (cm⁻¹): 3 458, 3 184, 3 046, 2 963, 2 837, 1 692, 1 608, 1 534, 1 509, 1 466, 1 350; ¹H NMR(CDCl₃, δ): 8.25~7.85(m, 4H), 7.40~7.18(m, 11H), 6.89~6.80(m, 4H), 6.21(m, 1H), 5.22(m, 1H), 4.20~4.10(m, 1H), 3.80(s, 6H), 3.60~3.52(m, 1H), 3.28~3.22(m, 1H), 2.82~2.72(m, 1H), 2.52~2.48(m, 1H), 1.80~1.78(s, 3H)。

化合物 4: MS(*m/z*): 852(M+Na); ¹H

NMR(CDCl₃, δ): 8.26~8.24(m, 1H), 7.87~7.84(m, 1H), 7.38~7.34(m, 2H), 7.30~7.20(m, 11H), 6.82~6.80(m, 4H), 6.18(m, 1H), 4.19(m, 1H), 3.80(s, 6H), 3.58~3.52(m, 1H), 3.28~3.20(m, 1H), 2.78~2.68(m, 1H), 2.48~2.41(m, 1H), 1.78~1.76(s, 3H), 1.62~1.60(s, 9H)。

合成化合物 1 时,文献[4-5]均在吡啶溶液中反应生成,而本工作在吡啶溶液(新购或蒸馏处理)中多次反应均无法得到化合物 1,将反应改为在丙酮体系中进行,得到化合物 1。但反应过程中,4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTrCl)的滴加速度不能太快,否则反应产率降低。

合成化合物 3 时,文献[4]是在吡啶溶液中室温反应 6 d,收率为 61.7%,文献[5]也是在吡啶溶液中,加三氟甲基磺酸银作催化剂先于 0℃反应 50 min,再于室温反应 40 min,收率为 70%。本工作曾按上述反应条件进行反应,但均不能得到产品,TLC 检测反应没有进行,所以本工作改用二氯甲烷作溶剂,4-*N,N*-二甲基氨基吡啶作催化剂,反应 5 h,收率为 58.3%。本工作也曾试过以吡啶作溶剂,4-*N,N*-二甲基氨基吡啶作催化剂,反应 1 d,TLC 检测反应没有进行。

在合成 N-BOC-FLT 及各步中间产物时发现,产物均为无色透明状粘稠物,需加入少量有机溶剂在真空泵抽干下,起泡成白色或淡黄色泡沫状固体。

与文献相比,2 次反应条件的改变都与吡啶作溶剂有关,文献中能在吡啶溶液里反应得到产品,而本工作却无法在吡啶溶液里进行反应,这需要进一步进行研究。

(2) TLC 检测,产品¹⁸F-FLT 的 *R_f*≈0.8~0.9, ¹⁸F⁻ 的 *R_f*=0.0。放化纯度大于 95%(图 4)。同时,TLC 检测发现,当反应液通过中性氧化铝 Sep-Pak 柱,可将¹⁸F⁻ 大部分吸附在柱上,使接下来使用半制备型 HPLC 柱纯化更加方便。使用 HPLC 柱纯化时,¹⁸F⁻ 的 *t_R*≈3.0 min, ¹⁸F-FLT 的 *t_R*=9.3 min,纯化得¹⁸F-FLT。

(3) HPLC 检测,取产品 ^{18}F -FLT 10 μL (3.7 MBq/L)进样, ^{18}F -FLT 的 $t_{\text{R}} \approx 10.0$ min, $^{18}\text{F}^-$ 的 $t_{\text{R}} \approx 2.0$ min,放化纯度大于 95%,以 1.295 GBq 产品计算,投 30 mg N-BOC-FLT(0.35 mol),则比活度大于 3.7×10^{10} Bq/mmol(图 5)。

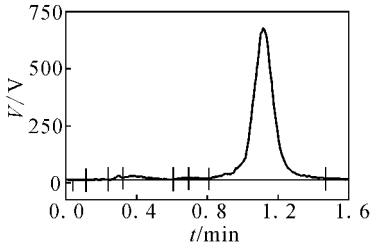


图 4 ^{18}F -FLT 的 TLC 层析图

Fig. 4 TLC chromatogram of ^{18}F -FLT

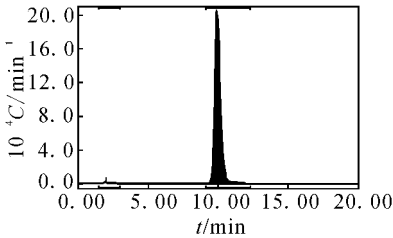


图 5 HPLC 分析图

Fig. 5 HPLC chromatogram of ^{18}F -FLT

(4) 文献[4-6]中,使用不同的标记前体进行 ^{18}F -FLT的 ^{18}F 标记,得到的结果是 N-BOC-FLT 作为标记前体得到的标记产率最高。但不同的文献^[4-6]使用标记前体的量和标记温度有所不同。

参考文献[4-6],本工作标记前体的用量为 30 mg,反应温度为 120 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 5 min,标记率为 $(35.2 \pm 5.8)\%$ (经校正, $n=2$),与文献[5]报道接近。

(5) 氟标记方法主要有亲电和亲核 2 种,本实验采用的是亲核标记法。标记前体 N-BOC-FLT 结构中,对硝基苯磺酰基是与 $^{18}\text{F}^-$ 发生亲核氟代的基团,4,4'-二甲氧基三苯甲基和 t-叔丁氧羰基是保护基,反应必须在非质子溶剂中进行。本标记反应中共沸除水是一关键步骤,本反应既不能有水,也不能蒸得太干,蒸得太干也不利于反应。但文献[7]报道,用离子液体作反应的溶剂进行 ^{18}F -FLT标记,则存在少量的水对反应也没有影响。我们认为这也是 ^{18}F 标记研究的一个方向,可以减少蒸干水的时间,缩短标记时间。

4 结 论

^{18}F -FLT 是一种显示细胞增殖状态的胸腺嘧啶类显像剂。本研究从基本原料 β -胸苷开始合成了标记前体 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基- β -1)-苏戊呋喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(N-BOC-FLT),对合成的条件进行了改进,总收率为 14.3%。用此标记前体进行了 ^{18}F 标记,标记率为 $(35.2 \pm 5.8)\%$ (经校正, $n=2$),说明用此标记前体进行标记,标记简单,标记率高。用 TLC 和 HPLC 检测放化纯度(RCP)大于 95%,可满足临床研究的要求。

参考文献:

- [1] Been L B, Suurmeijer A J H, Cobben D C P, et al. [^{18}F]FLT-PET in Oncology: Current Status and Opportunities[J]. Eur J Nucl Med Mol Imag, 2004, 31(12): 1 659-1 672.
- [2] Reske S N, Deisenhofer S. Is 3'-Deoxy-3'- ^{18}F -Fluorothymidine a Better Marker for Tumour Response Than ^{18}F -Fluorodeoxyglucose?[J]. Eur J Nucl Med Mol Imag, 2006, 33(13): S38-S43.
- [3] 王明芳,罗志福. 肿瘤增殖显像剂 3'-脱氧-3'-F-氟代胸苷[J]. 国外医学·放射医学核医学分册,2005, 29(5): 227-232.
- [4] Martina S J, Eisenbartha J A, Wagner-Utermanna U, et al. A New Precursor for the Radiosynthesis of [^{18}F]FLT[J]. Nucl Med Biol, 2002 (29): 263-273.
- [5] Mikyung Yun, Seung Jun Oh, Hyun-Joon Ha, et al. High Radiochemical Yield Synthesis of 3-Deoxy-3-[^{18}F]Fluorothymidine Using(5'-O-Dimethoxytrityl-2'-Deoxy-3'-O-Nosyl- β -D-Threo Pentofuranosyl)Thymine and Its 3-N-BOC-Protected Analogue as a Labeling Precursor[J]. Nucl Med Biol, 2003 (30): 151-157.
- [6] Seung J O, Christoph M, Dae Y C, et al. Fully Automated Synthesis System of 3-Deoxy-3-[^{18}F]Fluorothymidine[J]. Nucl Med Biol, 2004 (31): 803-809.
- [7] Byung S M, Kyo C L, Gwang I A, et al. Preparation of 3'-Deoxy-3'-[^{18}F]Fluorothymidine ([^{18}F]FLT) in Ionic Liquid, [bmim][OTf][J]. J Label Compd Radiopharm, 2006, 49: 287-293.