

A β 斑块显像剂苯并噻唑衍生物的¹¹C 标记

张锦明^{1,2}, 田嘉禾¹, 郭 喆¹, 王武尚^{2,3}, 刘伯里²

(1. 解放军总医院 核医学科, 北京 100853; 2. 北京师范大学 化学系, 北京 100875;
3. 西北核技术研究所, 陕西 西安 710024)

摘要: 合成苯并噻唑(BTA)的前体——对胺基苯并噻唑(APBT),并用改良法¹¹C-CH₃I 标记 APBT,制得¹¹C-BTA-1;观察了¹¹C-BTA-1 在正常小鼠体内的生物分布,以考察该标记物作为 A β 斑块显像剂的可能性。结果显示,标记方法改良后,¹¹C-BTA-1 的标记率提高到 58%;正常小鼠的摄取¹¹C-BTA-1 较高,2 min 全脑摄取为 3.81 \pm 0.34%ID;非特异区清除快,2 min 和 30 min 时的脑摄取比为 10。以上结果提示,¹¹C-BTA-1 有望用于诊断早老性痴呆的 A β 斑块显像剂。

关键词: 阿尔茨海默病(AD);¹¹C 标记 ; β -淀粉样蛋白;苯并噻唑

中图分类号: TL92.3; R817-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7512(2008)02-0105-05

¹¹C Labeled Thioflavin T Derivative for A β -Amyloid Imaging

ZHANG Jin-ming^{1,2}, TIAN Jia-he¹, GUO Zhe¹, WANG Wu-shang^{2,3}, LIU Bo-li²

(1. *Department Nuclear Medicine, the PLA General Hospital, Beijing 100853, China;*
2. *Department Chemistry, the Normal University, Beijing 100875, China;*
3. *Northwest Institute of Nuclear Technology, Xi'an 710024, China*)

Abstract: 2-(4-aminophenyl) benzothiazole (BTA) was synthesized. The ¹¹C labeled BTA was performed by improved-methods with ¹¹C-methyl iodide. The labeled yield was measured with column-methods. The results showed that the column-methods for labeled yields was simple and efficient. The improved-methods led to labelling yield of 58% (n=10) when ¹¹C-CH₃I reacted with BTA. Intravenous injection of ¹¹C-BTA-1 in control mice resulted in high brain uptake. The brain uptake was 3.81 \pm 0.34%ID at 2 min. The uptake ratio of 2 min with 30 min was 10. ¹¹C-BTA-1 was a promising β -amyloid agent for Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's diseases(AD); ¹¹C labelling; β -amyloid;benzothiazole

早老性痴呆,又称阿尔茨海默病性痴呆(Alzheimer's Disease, AD),是中枢神经退行性疾病,主要症状为进行性记忆力和认知力减退、言语障碍、精神运动异常等,严重影响老年人的

生活质量,目前尚无有效治疗方法。AD 最显著的神经组织病理特征是神经细胞之间大量的老年斑和神经细胞内存在的神经细胞纤维缠结^[1-2]。老年斑主要由 β -淀粉样蛋白(β -amy-

loid, A β) 结成, 是 AD 相关性重要分子标志物^[3], 也是临床尸检或活检诊断 AD 的金标准。病理学检测 A β 的染色剂有刚果红(Congo Red, CR)、硫磺素-T (Thioflavin-T)、硫磺素-S、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, 对 AD 患者脑内老年斑分布准确定位并实现在体定量检测, 从而提高 AD 的早期诊断率和鉴别准确率, 并可以为 AD 病人分期、针对 A β 为靶点的治疗方案(如减少 A β 前体蛋白生成、抑制 A β 的生成和集聚、清除生成的 A β 等)和药物的研究等提供有效的评价方法。

目前, 已有多在体显示 A β -淀粉样蛋白的显像剂研制成功, 如¹⁸F 标记的 FDDNP^[4-5], ¹²⁵I 标记的 TZDM、IMPY、苯并咪喃^[6-8], ¹¹C 标记的硫磺素-T、苯二烯^[9-10], ⁹⁹Tc^m 标记的联苯^[11]等。这些化合物各自存在一些缺陷, 如¹⁸F-FDDNP 正常脑内清除慢, ⁹⁹Tc^m 标记的联苯的脑摄取较低。其中¹¹C 标记的硫磺素-T: 甲胺基苯并噻唑(¹¹C)methylaminophenyl benzothiazole, [¹¹C]-BTA-1)是一类较理想的 A β 显像剂, 其脂溶性适中, lgP=2.7, 与 A β 1~40 聚集物有很高的亲和常数, K_i=11 nm, 在正常小鼠脑内清除很快, 但¹¹C-CH₃I 标记 BTA 类化合物时, 标记率很低, 仅为 5%^[12]。本工作拟对对胺基苯并噻唑的合成和标记进行研究, 改进¹¹C-CH₃I 标记方法, 以提高合成效率。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

对硝基苯酰氯、邻硝基硫酚、57% 氢碘酸: Adrich 公司产品; 1 mol/L 氯化锂铝 THF 溶液: ABX 公司产品; 苯: 北京长海化工厂产品; 无

水乙醇、氯化亚锡、NaOH: 北京化学试剂公司; DMSO: 北京亚太精细化工厂产品。以上化学试剂均为分析纯。

Sep-Pak C-18 柱: Waters 公司; RDS111 回旋加速器: 美国 CTI 公司; 调温型电热套: 河北黄骅新兴电器厂; X-4 数显显微熔点测定仪: 北京泰克仪器有限公司(未校正); Shz-3 型循环水真空泵: 河南巩义英峪仪器厂; Avance 500 MHz 核磁共振仪: Bruker 公司; 自动化碳-11 碘代甲烷模块: 自制^[13]。高效液相色谱仪: Waters 公司, 2487 紫外分光光度计, 515 泵, 分析柱为反相 Nova-Park C-18 柱(ϕ 3.9 mm \times 150 mm); Flow-Count 放射性检测器: Bio-Scan 公司。

1.2 实验动物

NH 小鼠: 4 周龄, 20 \pm 2 g, 雌性, 解放军总医院动物室提供。

2 实验方法

2.1 对胺基苯并噻唑的合成及标记

参考文献^[12]合成对胺基苯并噻唑, 合成线路示于图 1。

2.1.1 对硝基苯并噻唑的合成 2 g 邻氨基硫酚中加 60 mL 新制备的无水苯, 分批加入 3 g 的对硝基苯酰氯, 反应溶液颜色变黄, 再加反应溶液变得很稠。再加对硝基苯酰氯, 溶液慢慢变稀, 室温静置过夜。加水稀释, 过滤, 干燥。得对硝基苯并噻唑。合成产物进行¹HNMR 分析。

2.1.2 对胺基苯并噻唑的合成 取 1 g 对硝基苯并噻唑, 溶于 60 mL 无水乙醇中。在氮气氛围下加入 2.0 g SnCl₂·2H₂O, 回流 4 h。直接用 5 mol/L NaOH 调节 pH>11。用 50 mL 的乙酸乙酯萃取 2 次, 蒸发有机相, 粗产品用硅胶柱纯化, 流动相为 V(乙酸乙酯): V(正己烷)=6:4。合成产物进行¹HNMR 分析。

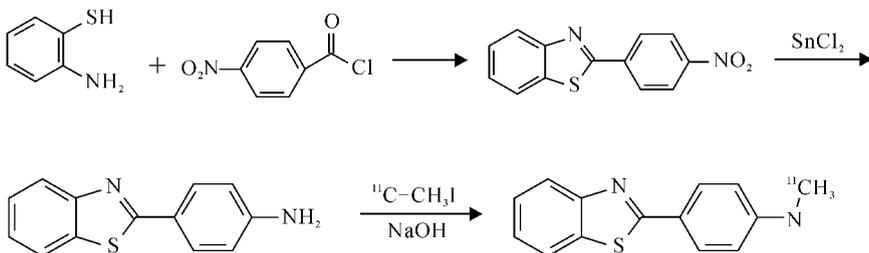


图 1 对胺基苯并噻唑的合成及标记线路图

2.1.3 对胺基苯并噻唑的¹¹C 标记 加热法^[12]: 取 2 mg 对胺基苯并噻唑, 溶于 0.4 mL DMSO 中, 加入 12 μ L 5 mol/L NaOH 溶液。通入¹¹C-CH₃I, 密封, 在 85 $^{\circ}$ C 下加热 2 min。冷却后测产物甲胺基苯并噻唑(¹¹C-BTA-1) 标记率。

¹¹C-Triflate 甲烷法^[14]: 将¹¹C-CH₃I 在线转换成¹¹C-Triflate 甲烷^[15], -10 $^{\circ}$ C 下通入到含 2 mg 对胺基苯并噻唑的丙酮溶液中, 85 $^{\circ}$ C 下加热 2 min, 测标记率。

改良法: 在文献^[12]的基础上进行改进, 在含 2 mg 对胺基苯并噻唑的 0.2 mL DMSO 中加入 12 μ L 5 mol/L NaOH, 2 min 后将混合液加入到 0.2 mL 含¹¹C-CH₃I 的 DMSO 溶液中, 常温放置 2 min 后测标记率。

2.2 标记率和放化纯度的检测

采用 Sep-Pak C-18 柱法测定标记率。向冷却的反应瓶中加入 10 mL 水后, 将反应瓶中的反应液通过用乙醇激活的 Sep-Pak C-18 柱, 产品吸附在 C18 柱上。用 10 mL 12.5 mmol/L 的 NaOH 溶液洗柱, 再用 10 mL 水洗柱。测定 C18 柱上和废水中的放射性活度, 计算标记率。产品用无水乙醇洗脱, 用制备型 HPLC 进一步分离纯化, 用于动物分布实验。分离柱为 Alltech 的 C18 柱, 紫外波长为 254 nm, 流动相为 0.1 mol/L pH=4.0 的 V(甲酸铵): V(乙腈) = 710: 290, 流速为 8 mL/min。

HPLC 测定放化纯度: 流动相为 0.1 mol/L pH=4.0 的 V(甲酸铵): V(乙腈) = 710: 290, 流速 1 mL/min, 波长 254 nm。

2.3 ¹¹C-BTA-1 的生物学评价

12 只 NH 小鼠随机分成 3 组, 每组 4 只, 尾静脉注射经生理盐水稀释的¹¹C-BTA-1, 每只 0.2 mL(约 5.6 MBq)。注射后于 2、10、30 min 处死, 取血液、全脑、心、肝、脾、肺、肾称重并分别测量其放射性计数, 计算每克组织的放射性摄取(%ID/g)。

3 结果与讨论

3.1 对硝基苯并噻唑的合成及分析鉴定

由 2.1.1 得到固体产品 2.5 g, 产率为 50%, 熔点为 256~257 $^{\circ}$ C。¹H NMR(DMSO, δ): 7.55~7.57(2H), 7.60~7.61(2H), 8.15~8.16(2H), 8.24~8.25(2H), 与所设计的结构相符。

3.2 对胺基苯并噻唑的合成及分析鉴定

由 2.1.2 得到产品 0.92 g, 产率为 92%, 熔点为 148~150 $^{\circ}$ C。¹H NMR(DMSO, δ): 4.13(2H), 6.6~6.7(2H), 7.34(H), 7.47(H), 7.71~7.72(2H), 7.89(H), 8.0(H), 与所设计的结构相符。

在合成对硝基苯并噻唑时, 用水代替乙酸乙酯萃取, 使产品直接沉淀, 产率较文献低, 但该方法方便、所得对硝基苯并噻唑纯度高。对硝基苯并噻唑在酸性条件下还原成胺基, 文献^[12]采用先除乙醇, 再用乙酸乙酯溶解, NaOH 调 pH 的方法。本工作发现在乙酸乙酯中加入 NaOH 后产生大量的沉淀, 有机相与水相很难分开, 导致萃取失败。因此采用直接用 5 mol/L NaOH 调整反应液 pH>11, 再加入乙酸乙酯的方法, 这样较容易分开有机相和水相, 以便于下一步的萃取。

3.3 柱层法测¹¹C-BTA-1 标记率及放化纯度

¹¹C-BTA-1 的 HPLC 谱示于图 2。由图 2a 可见, 未标记的放射性物质保留时间为 4 min, ¹¹C-BTA-1 保留时间为 12.5 min, 较容易将标记物与杂质分开。Sep-Pak C18 柱层法分离标记物和杂质, 计算¹¹C-BTA-1 的标记率为 58%。无水乙醇淋洗 C18 柱, 测定产品放化纯度 > 98%。废液中没有测到¹¹C-BTA-1 的漏穿, 说明柱层法测量¹¹C-BTA-1 的标记率结果可靠。

3.4 ¹¹C-BTA-1 标记方法的改良

3 种标记方法的标记率列于表 1。实验表明, 影响标记率的因素除常规的 pH、标记时间、前体用量等外, 还有加入 NaOH 后的间隔时间。采用常规通气方法, 需在通入¹¹C-CH₃I 前将 NaOH 加入到前体中, 间隔一般超过 10 min。采用改良法, 即前体中加入 NaOH 2~3 min 后将之反向加到¹¹C-CH₃I 中, 标记率明显提高, 提高的原因即为缩短了加入碱的间隔时间; 并且无需加热, 标记率可达 58%, 实验结果重复性也很好。

BTA 化合物的标记为芳香胺上的 N-C 甲基化, 需在碱性条件下进行。如果采用加热法, 标记率仅为 10%~30%, 而且每次实验结果波动较大, 但该标记率高于 Mathis 最初的实验结果(5%)^[12]。为了提高标记率, Solbach C 等^[14]在丙酮溶液中用¹¹C-Triflate-CH₃ 标记 BTA, 结果表明, 此方法可明显提高标记率, 达到 50% 以上。本次实验参照文献^[14]进行, 得到标记率为 51%。

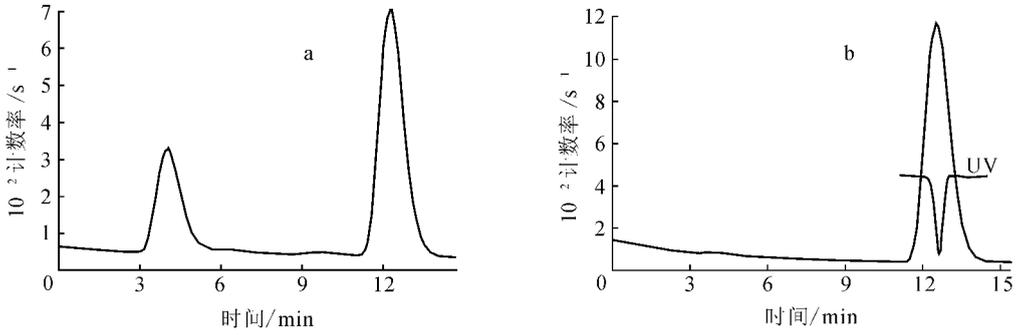
图 2 ^{11}C -BTA-1 的 HPLC 谱a— ^{11}C -BTA-1 标记物直接经 HPLC 分析的放射性图谱；b—Sep-Pak C-18 柱吸附,乙醇洗脱下的 ^{11}C -BTA-1 放射性图谱

表 1 3 种标记方法的标记率

标记方法	标记率/%	<i>n</i>
加热法	10~30	6
^{11}C -Triflate 甲烷法	51	3
改良法	58	10

3.4 ^{11}C -BTA-1 在正常 NH 小鼠体内的分布

小鼠尾静脉注射标记物后不同时间处死,主要器官的放射性摄取列于表 2。由表 2 可以看出,放射性主要分布在肝内,清除很快;药物经泌尿系统排出;在血液中清除较慢,到 30 min 时,仍有 5.47%ID/g;靶器官脑摄取高,2 min 时全脑有 3.81%ID,到 30 min 时全脑仅为 0.42%ID,而且脑内清除很快,2 min 与 30 min 时摄取比为 10,该值与 Mathis CA 等^[12]所测的脑 2 min 与 30 min 时的摄取比为 10 相一致。这表明 ^{11}C -BTA-1 适用于 AD 的显像,有进一步研究的价值。

表 2 ^{11}C -BTA-1 在正常小鼠体内的分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组织	不同时间的放射性摄取 / (%ID · g ⁻¹)		
	2 min	10 min	30 min
血液	24.04 ± 2.38	25.22 ± 5.57	5.47 ± 3.32
心	19.91 ± 17.91	11.08 ± 1.68	2.69 ± 0.95
肝	32.04 ± 2.63	20.86 ± 1.73	4.31 ± 1.22
脾	14.27 ± 1.78	8.17 ± 1.42	1.80 ± 0.63
肺	32.76 ± 2.54	21.15 ± 5.02	5.40 ± 3.10
肾	48.13 ± 3.12	57.61 ± 4.93	14.11 ± 3.68
脑	11.36 ± 1.24	4.88 ± 0.73	1.13 ± 0.38
全脑	3.81 ± 0.34	1.70 ± 0.26	0.42 ± 0.12

4 小结

(1) 合成 BTA 前体对胺基苯并噻唑时,经氯化亚锡还原得到胺,可以先直接调 pH > 11,再用乙酸乙酯萃取,这样可以提高萃取的成功率。

(2) 采用 Sep-Pak C18 柱吸附的方法测量 ^{11}C -BTA-1 的标记率,该方法快速,适于如 ^{11}C 短半衰期核素标记条件的研究,并且结果可靠。

(3) 前体的 NaOH 混合液,加入到制备 ^{11}C -CH₃I 的 DMSO 溶液中,以缩短碱加入的时间,标记率可达到 58%。

(4) ^{11}C -BTA-1 能快速入脑,并能很快清除,2 min 和 30 min 时的脑摄取比值达到 10,说明 ^{11}C -BTA-1 是一个很有潜在价值的 AD 诊断显像剂。

参考文献:

- [1] GRAVINA SA, L HO, ECKMAN CB, et al. Amyloid (Protein(Aβ) in Alzheimer's Disease Brain, Biochemical and Immunocytochemical Analysis With Antibodies Specific for Forms Ending at Aβ40 or Aβ42(43)[J]. J Biol Chem, 1995, 270:7 013-7 016.
- [2] SELKOE DJ. The Cell Biology of Beta-amyloid Precursor Protein and Presenilin in Alzheimer Disease[J]. Trends Cell Biol, 1998, 8:447-453.
- [3] 代蓉,殷义涛,高秀云.老年性痴呆中 β 淀粉样肽的研究进展 [J]. 中国临床康复, 2004, 19: 3 858-3 859.
- [4] AGDEPPA ED, KEPE V, PETRIC A, et al. In Vitro Detection of (S)-naproxen and Ibuprofen Binding to Plaques in the Alzheimer's Brain Using the Positron Emission Tomography Molecular Imaging Probe 2-(1-{6-[(2-[¹⁸F]fluoroethyl)(meth-

- yl) amino]-2-naphthyl) ethylidene) Malononitrile [J]. Neuroscience, 2003, 117 : 723-730.
- [5] 贾建军, 郭喆, 汤洪川, 等. 阿尔茨海默病与血管性痴呆的¹⁸F-FDDNP 脑 PET 显像[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2007, 6: 20-22.
- [6] ZHUANG ZP, KUNG MP, HOU C, et al. Radioiodinated Styrybenzenes and Thioflavins as Probes for Amyloid Aggregates[J]. J Med Chem, 2001, 44: 1 905-1 914.
- [7] KUNG MP, HOU C, ZHUANG ZP, et al. IMPY: an Improved Thioflavin-T Derivative for in Vivo Labeling of β -amyloid Plaques [J]. Brain Res, 2002: 202-210.
- [8] ONO M, KUNG MP, HOU C, et al. Benzofuran Derivatives as A β -aggregate-specific Imaging Agents for Alzheimer's Disease[J]. Nucl Med Biol, 2002, 29: 633-642.
- [9] KLUNK WE, WANG YM, HUANG GF, et al. Uncharged Thioflavin-T Derivatives Bind to Amyloid Beta Protein With High Affinity and Readily Enter the Brain [J]. Life Sci, 2001, 69: 1 471-1 484.
- [10] 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.
- [11] ZHUANG ZP, KUNG MP, HOU C, et al. Biphenyls Labeled With Technetium-99m for Imaging β -amyloid Plaques in the Brain [J]. Nucl Med Biol, 2005, 32: 171-184.
- [12] MATHIS CA, BACSKAI BJ, KAJDASZ ST, et al. A Lipophilic Thioflavin-T Derivative for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Amyloid in Brain [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2002, 12: 295-297.
- [13] 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, 24: 243-244.
- [14] SOLBACH C, UEBELE M, REISCHL G, et al. Efficient Radiosynthesis of Carbon-11 Labeled 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.
- [15] 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.