

文章编号:0253-9950(2008)02-0075-05

3-氨基-1-羟丙基-1,1-二膦酸盐的 ^{131}I 标记化合物的合成及其初步动物实验

林如山¹, 蒲满飞², 杨远友^{1,*}, 刘宁¹, 廖家莉¹, 金建南¹

1. 四川大学 原子核科学技术研究所 辐射物理及技术教育部重点实验室, 四川 成都 610064;

2. 中国工程物理研究院 核物理与放射化学研究所, 四川 绵阳 621900

摘要:合成了 3-氨基-1-羟丙基-1,1-二膦酸二钠水合物(ABP)配体,并以 5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯(SPC)为双功能偶联剂,进行了 ^{131}I 标记的研究。其标记率大于 64%,放化纯度大于 99%。室温下,标记产物放置 72 h 后,放化纯度仍大于 98.8%。初步动物实验结果表明,标记产物 ^{131}I -SIPC-ABP 对小鼠骨骼具有明显的亲和力,具有较高的体内外稳定性。

关键词:ABP; 骨肿瘤; SPC; ^{131}I ; 生物分布

中图分类号:R817.9 **文献标志码:**A

Preparation and Biodistribution of ^{131}I Labeled 3-Amino-1-Hydroxypropylidene-1,1-Bisphosphonate

LIN Ru-shan¹, PU Man-fei², YANG Yuan-you^{1,*},
LIU Ning¹, LIAO Jia-li¹, JIN Jian-nan¹

1. Key Laboratory of Radiation Physics and Technology, Ministry of Education,

Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering and Physics, Mianyang 621900, China

Abstract: 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate (ABP) was synthesized and labeled with ^{131}I using *N*-succinimidyl-5-(tri-butylstannyl)-3-pyridinecarboxylate (SPC) as a bi-functional linker. ^{131}I could be coupled to ABP via a ^{131}I -SIPC intermediate with a labeling yield of more than 64%, and a radiochemical purity of more than 99% after HPLC purification. After 72 h at room temperature, the radiochemical purity was still more than 98.8%, implying that the ^{131}I -SIPC-ABP is stable *in vitro*. Biodistribution experiments in mice show that ^{131}I -SIPC-ABP has high affinity to bone and high stability *in vivo* as well as *in vitro*.

Key words: ABP; bone tumor; SPC; ^{131}I ; biodistribution

骨转移癌是恶性肿瘤十分常见的并发症,研究发现 25%~85% 的癌症患者的尸检有骨转移,其中前列腺癌、乳腺癌和肺部癌症的骨转移率可

达 80% 以上^[1-3]。目前临床上治疗骨肿瘤和骨转移癌一般采取外科手术、化学药物治疗、激素治疗、外放射治疗及放射性核素治疗等方法。在这

收稿日期:2007-06-05;修订日期:2007-09-30

基金项目:辐射物理及技术教育部重点实验室开放基金资助项目(K2005-05)

作者简介:林如山(1981—),男,福建长汀人,硕士研究生,无机化学专业

* 通讯联系人:杨远友, y5537331@sina.com; Tel, 028-85412613; Fax, 028-85410252

些方法中,除放射性核素治疗外,其它疗法的大多数患者都存在复发的可能^[4]。因此,核素治疗骨肿瘤和骨转移癌的研究与应用日益受到重视。其中,以对骨骼体系具有高亲和性的胺基膦酸类化合物为载体,络合¹⁵³Sm和^{186/188}Re等 β 核素进行骨肿瘤的核素靶向治疗的研究最为普遍^[5-7],而用²¹¹At等 α 核素进行骨肿瘤和骨转移癌治疗的研究却鲜有报道。²¹¹At($T_{1/2}=7.2$ h)衰变发射 α 射线,其 α 粒子平均能量为6.8 MeV,在软组织中的射程为6~8个细胞范围(55~88 μ m)。就放射治疗而言,它是除硼中子俘获治疗外仅有的高传能线密度体系^[8-10]。但²¹¹At需用加速器制备,考虑到At和I属同族元素,化学性质相似,因此在研究²¹¹At的标记方法及生物学行为时,往往先以放射性碘代替砷进行摸索^[11-12]。本工作拟在合成3-氨基-1-羟丙基-1,1-二膦酸二钠水合物(ABP)配体的基础上,以5-(三正丁基锡)-3-吡啶甲-N-琥珀酰亚胺酯(SPC)为双功能偶联剂进行¹³¹I的标记研究,并对标记物在小鼠体内的分布和代谢行为进行初步考察,以期为下一步²¹¹At标记胺基膦酸类化合物及其用于骨肿瘤治疗的研究奠定基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

INOVA-400 MHz核磁共振仪,美国Varian公司产品;API3000质谱,美国ABI公司产品;334系列HPLC色谱仪,配170型放射性探测器,美国Beckman公司产品;BS210S电子天平,精度0.1 mg,德国Sartorius公司产品;FH-603阱型闪烁探头,FH463A自动定标器,北京核仪器厂产品;7530型分光光度计,上海分析仪器厂产品;TYR-3熔点仪,天津大学精密仪器厂产品;RE-52C旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产品。

β -丙氨酸,纯度为98%,四(三苯基磷)钯($\text{Pd}(\text{Ph})_4$),纯度为99%,均为美国Alfa Aesar公司产品;5-溴烟酸,纯度为98%,六丁基二锡,纯度为95%,柱色谱硅胶(0.040~0.075 mm),TLC硅胶板(20 cm $\times$ 20 cm),均为美国Aldrich公司产品;*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS),纯度大于98%,氯代琥珀酰亚胺(NCS),纯度大于98%,二环己基碳二亚胺(DCC),纯度为99%,均为瑞典Acros公司产品;Sep-Pak硅胶小柱,美国Waters公司;凝胶Sephadex G₂₅,美国Pharmacia公司; Na^{131}I (18.5 MBq/L, 0.1 mol/L NaOH溶液),

成都中核高通同位素股份有限公司;1,4-二氧六环(无水1,4-二氧六环经10%浓盐酸回流、氢氧化钠干燥后,加入钠丝蒸馏得到),四氢呋喃(THF,无水THF经钠/二苯甲酮蒸馏并立即使用),分析纯,均为成都市科龙化工试剂厂产品;实验所用其它试剂均为国产分析纯试剂,除特别说明外均直接使用;实验用3次蒸馏水由本实验室制备。

昆明系小白鼠,一级,(20 $\pm$ 5) g,雌雄各半,四川大学华西医学动物实验中心。

1.2 ABP的制备与SPC的合成

1.2.1 配体ABP的制备 ABP的制备参照文献^[13-14],其合成路线示于图1。产物的¹H NMR和MS数据均与文献相符。

1.2.2 双功能偶联剂SPC的合成 双功能偶联剂SPC的合成参考文献^[15],其合成路线示于图2。产物的¹H NMR和MS数据均与文献一致。

1.3 ABP的¹³¹I标记

¹³¹I-SIPC-ABP的标记路线示于图3。在微型反应管中加入5 μ L(74 MBq) Na^{131}I ,在 N_2 气流中吹干后加入4 μ L冰醋酸、5 μ L 13 g/L NCS的 CH_2Cl_2 溶液和50 μ L 50 g/L SPC的 CH_2Cl_2 溶液,在(65 $\pm$ 1) $^\circ\text{C}$ 下反应5 min后,室温下再继续反应15 min。标记物¹³¹I-SIPC用Sep-Pak硅胶柱(100%正己烷预饱和)进行分离:分别以30 mL正己烷和25 mL $V(\text{EtOAc}):V(\text{正己烷})=8:92$ 的溶液淋洗,再用8 mL $V(\text{EtOAc}):V(\text{正己烷})=1:1$ 的溶液淋洗,将最后所得淋洗液用 N_2 吹至近干(作TLC分析,展开剂为 $V(\text{EtOAc}):V(\text{正己烷})=1:1$),备用。

在上述 N_2 吹至近干的试管中加入100 μ L 30 g/L ABP(0.1 mol/L 硼酸缓冲溶液(BBS), pH=9.0),间或经旋涡震荡器震荡,室温下反应15 min后,反应混合物经HPLC分离,用170型放射性探测器检测鉴定分离组分的放射性,用TLC分析计算标记率和标记产物的放化纯度。HPLC分析条件为:反相柱ULTRAS-PHERETM-ODS(5 μ m, ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm),流动相为含10 mmol/L四叔丁基氢氧化铵(TBAH)的磷酸缓冲溶液(PBS, 0.2 mol/L, pH=9.0)和乙醇的混合溶液,体积比为4:1,流速为1 mL/min,紫外检测波长为254 nm, $t=20$ $^\circ\text{C}$ 。¹³¹I-SIPC-ABP的TLC条件:展开剂为 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (体积比4:1)溶液, ¹³¹I-SIPC-ABP的 $R_f=0$, ¹³¹I-SIPC的 $R_f\approx 0.95$ 。

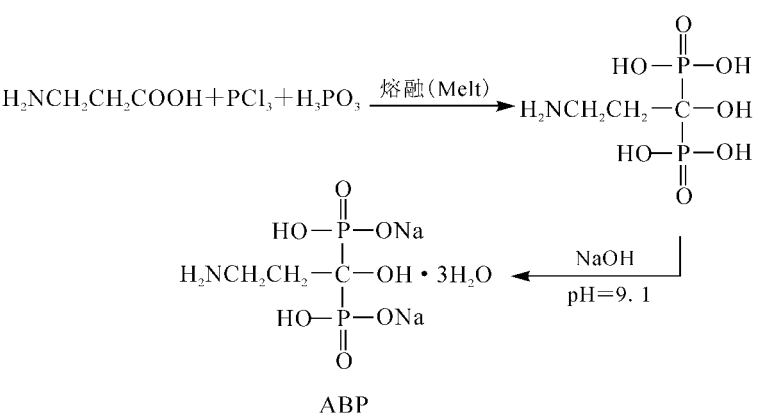


图 1 ABP 的合成

Fig. 1 Synthesis of ABP

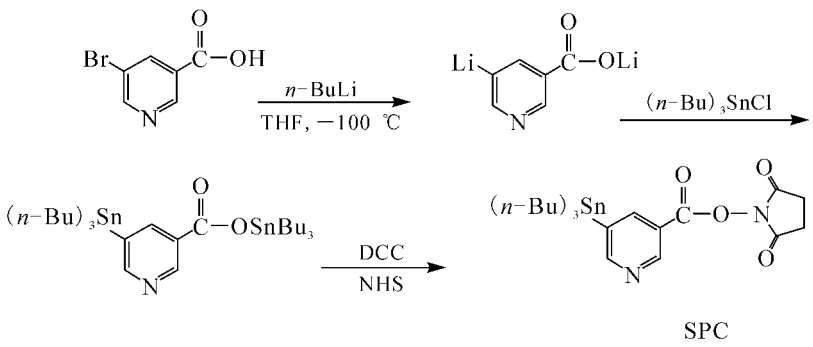


图 2 SPC 的合成

Fig. 2 Synthesis of SPC

标记物¹³¹I-SIPC-ABP 在注入小鼠前,需用 0.1 mol/L pH=7.6 的磷酸缓冲溶液作淋洗液,经 Sephadex G₂₅ 柱分离。

1.4 ¹³¹I-SIPC-ABP 的体外稳定性

把经 Sephadex G₂₅ 柱分离的¹³¹I-SIPC-ABP 在室温下放置 72 h,分别于不同时间取样,以 CHCl₃-CH₃OH(体积比为 4∶1)混合溶液为展开剂作 TLC 测定,得到¹³¹I-SIPC-ABP 的放化纯度。

1.5 ¹³¹I-SIPC-ABP 的初步动物实验

将 16 只小鼠(雌雄各半)随机分为 4 组,每只小鼠经腹腔注射 0.1 mL 约 60 kBq 标记物¹³¹I-SIPC-ABP,注射后分别于 0.5, 2, 6, 24 h 处死小鼠。取血、心脏、肝、脾、肾、肺、胃、小肠、肌肉、腿骨、甲状腺(含颈部)等组织器官,称重并测其放射性计数,计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g)(甲状腺的摄取率以%ID 表示)。

2 结果和讨论

2.1 以 SPC 为偶联剂¹³¹I 标记 ABP

将¹³¹I 标记的中间体¹³¹I-SIPC 与 ABP 进行偶联,经 HPLC 分离纯化,收集保留时间为 13.0 min 的馏分,得到最终产物¹³¹I-SIPC-ABP。¹³¹I-SIPC 和¹³¹I-SIPC-ABP 的 HPLC 分离淋洗曲线示于图 4。由图 4 可知,¹³¹I 标记的中间体¹³¹I-SIPC 分别在保留时间为 6.0 min 和 28.0 min 处出现放射性峰;而¹³¹I 标记的目标产物¹³¹I-SIPC-ABP 除在以上 2 处出现峰外,在 13.0 min 处出现 1 个新的强峰,且 28.0 min 处的峰强度明显减弱。保留时间为 13.0 min 和 28.0 min 处的峰分别属于标记产物¹³¹I-SIPC-ABP 和标记中间体¹³¹I-SIPC;保留时间为 6.0 min 处出现的弱峰归属尚不明确,有可能为¹³¹I-SIPC 水解脱掉琥珀酰亚胺基后的碘标记物。

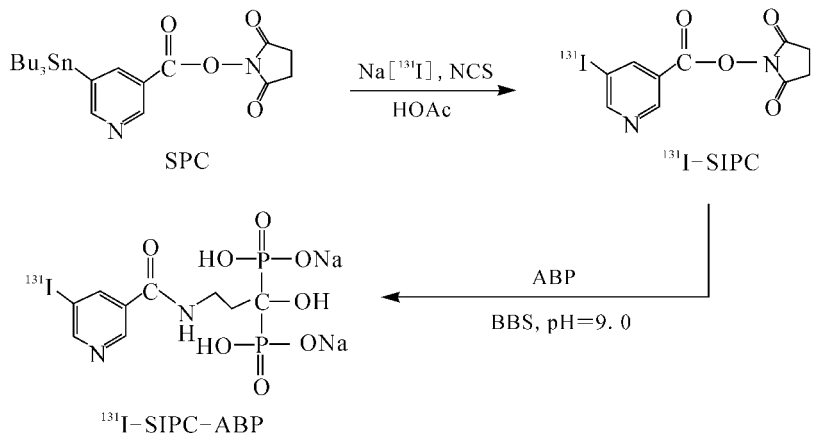


图 3 ¹³¹I-SIPC-ABP 的合成路线
Fig. 3 Synthesis of ¹³¹I-SIPC-ABP

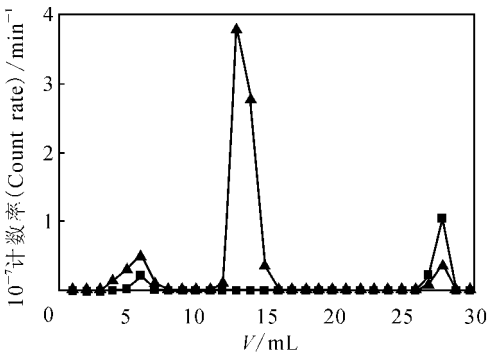


图 4 ¹³¹I-SIPC 和 ¹³¹I-SIPC-ABP 的 HPLC 分离淋洗曲线
Fig. 4 Elution curve of ¹³¹I-SIPC and ¹³¹I-SIPC-ABP purified by HPLC
▲——¹³¹I-SIPC-ABP, ■——¹³¹I-SIPC

经 TLC 鉴定,¹³¹I-SIPC-ABP 的 $R_f=0$,¹³¹I-SIPC 的 $R_f\approx 0.95$ 。而在相同条件下单独将 Na[¹³¹I]做 TLC 分析,发现游离¹³¹I 的 $R_f\approx 0.5\sim 0.6$,说明¹³¹I-SIPC-ABP 的标记是成功的。标记率为 64%,放化纯度大于 99%。

2.2 标记物¹³¹I-SIPC-ABP 的体外稳定性

以 0.1 mol/L pH=7.6 的磷酸缓冲溶液作淋洗液,室温下放置时¹³¹I-SIPC-ABP 的放化纯度变化结果列入表 1,由表 1 可知,其放化纯度无明显变化,标记产物在体外具有较高的稳定性。

2.3 标记物¹³¹I-SIPC-ABP 的初步动物实验

¹³¹I-SIPC-ABP 在 小鼠体内的分布数据列入表 2。由表 2 可知,注射后 0.5, 2, 6, 24 h, ¹³¹I-SIPC-ABP 均显示出较高的骨骼摄取,其放射性摄取大大高于胃、肺、脾、甲状腺等软组织,分别达到 (14.75 ± 1.82) , (15.02 ± 3.38) , (19.99 ± 0.17) , $(12.94\pm 0.50)\%$ ID/g ($n=4$),在 6 h 达到最高值;肾脏中的放射性摄取也较高,说明标记物主要通过肾脏代谢;但在 24 h 后, ¹³¹I-SIPC-ABP 在肾脏的放射性摄取处于较低水平,远低于骨骼;甲状腺放射性摄取较低,即使在 24 h 也只有 0.05% 左右,说明标记物在体内也是比较稳定的。

综上,标记产物在 小鼠体内的分布情况表明, ¹³¹I-SIPC-ABP 在 小鼠体内有较高的稳定性,且对骨骼体系具有良好的亲和性。

表 1 室温放置时¹³¹I-SIPC-ABP 的放化纯度
Table 1 Radiochemical purity of ¹³¹I-SIPC-ABP at room temperature

t/h	RCP/%
2	99.24
24	99.01
48	98.96
72	98.84

表 2 ¹³¹I-SIPC-ABP 在小鼠体内的分布

Table 2 Biodistribution of ¹³¹I-SIPC-ABP in mice

组织 (Tissues)	每克组织百分注射剂量率(Percentage of the injected dose per gram of tissue mass)/(%ID · g ⁻¹)			
	0.5 h	2 h	6 h	24 h
血液(Blood)	0.46±0.11	0.14±0.06	0.07±0.01	0.02±0.01
心脏(Heart)	0.25±0.04	0.22±0.16	0.11±0.05	0.30±0.01
肝脏(Liver)	0.50±0.07	0.55±0.11	0.39±0.10	0.30±0.01
脾脏(Spleen)	0.30±0.07	0.27±0.06	0.28±0.05	0.14±0.02
肾脏(Kidney)	3.88±0.86	2.92±0.28	2.13±0.32	0.39±0.06
肺(Lung)	0.49±0.06	0.26±0.05	0.19±0.03	0.10±0.01
胃(Stomach)	0.72±0.16	0.60±0.08	0.82±0.49	0.06±0.01
肠(Intestine)	0.13±0.14	0.22±0.10	0.14±0.02	0.07±0.02
肌肉(Muscle)	1.15±0.34	0.66±0.41	0.69±0.75	0.44±0.35
骨骼(Bone)	14.75±1.82	15.02±3.38	19.99±0.17	12.94±0.50
甲状腺(Thyroid) ¹⁾	0.08±0.03	0.05±0.01	0.02±0.01	0.05±0.03

注(Notes):n=4;

1) 单位为 %ID(The unit is %ID)

3 结 论

合成了标记配体 ABP 和偶联剂 SPC,并以 SPC 为偶联剂进行了 ABP 的¹³¹I 标记,在此基础上,探索了标记物¹³¹I-SIPC-ABP 在小鼠体内的分布情况,评估了¹³¹I-SIPC-ABP 的体内、外稳定性。结果表明,¹³¹I-SIPC-ABP 的标记率达 64% 以上,其放化纯度大于 99%。初步动物实验结果显示,标记物¹³¹I-SIPC-ABP 对小鼠骨骼具有明显的亲和性,且标记物具有较高的体内外稳定性。上述结果为进一步开展 α 核素²¹¹At 标记胺基膦酸类化合物及其骨肿瘤治疗的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Nielsen O S, Munro A J, Tannock I F. Bone Metastases: Pathophysiology and Management Policy [J]. J Clin Oncol, 1991, 9: 509-524.

[2] Garret R. Bone Destruction in Cancer [J]. Semin Oncol, 1993, 72: 3 433-3 435.

[3] 张无则,徐光炜.肿瘤学[M].天津:科学技术出版社,1996; 2 575.

[4] Kanis J A. Bone and Cancer: Pathophysiology and Treatment of Metastases[J]. Bone, 1995, 17(Suppl): 101s-105s.

[5] 蒋树斌,罗顺忠,胡 疏,等.⁹⁹Tc^m- HEDTMP 的制备及其生物分布 [J]. 同位素, 2002, 15 (3): 154-156.

[6] Luo S Z, Pu M F, Qiao J, et al. Preparation of Bone Tumor Therapeutic Radiopharmaceuticals ¹⁵³Sm-EDTMP[J]. Nucl Sci Tech, 1995, 16 (3):

146-149.

[7] 罗顺忠,蒲满飞,谯 健,等.骨肿瘤治疗药物的研究 I. ¹⁵³Sm-EDTMP 的生物性质评价[J].核化学与放射化学,1994, 16(2): 99-101.

[8] Weinreich R. Molecular Radiotherapy With ²¹¹At [C] // Amaldi U, Larsson B, Lemoigne Y. Advance in Hadrontherapy. Amsterdam: Elsevier Science, 1997: 359-382.

[9] Zalutsky M R, Bigner D D. Radioimmunotherapy With α-Particle-Emitting Radioconjugates[J]. Acta Oncol, 1996, 35: 373-379.

[10] 唐 军,刘 宁,金建南,等.²¹¹At 标记放射治疗药物进展[J].核技术,2002, 25(11): 973-979.

[11] Zalutsky M R, Narula A S. A Method for the Radiohalogenation of Proteins Resulting in Decrease Thyroid Uptake of Radioiodine[J]. Appl Radiat Isot, 1987, 38(12): 1 051-1 055.

[12] Zalutsky M R, Narula A S. Astatination of Proteins Using an N-Succinimidyl Tri-Butylstannyl-Benzoate Intermediate [J]. Appl Radiat Isot, 1988, 39(13): 227-232.

[13] 梁高林,胡名扬,王博诚.帕米膦酸二钠的合成[J].中国现代应用药学杂志,1999, 16(2): 37-38.

[14] 胡名扬,王博诚,梁高林,等.4-氨基-1-羟丁基-1,1-二膦酸单钠盐的合成与表征[J].化学试剂,1998, 20(2): 104-105.

[15] Yang Y Y, Liu N, Zan L B. Radioiodination of Insulin Using N-Succinimidyl 5-(Tributylstannyl)-3-Pyridine-Carboxylate(SPC) as a Bi-Functional Linker: Synthesis and Biodistribution in Mice[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2006, 268(2): 205-210.