

文章编号 : 0253-9950(2005)01-0052-05

$^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 的制备及其生物分布

张剑英¹, 朱霖^{1*}, 刘 锰¹, 王 京¹, 杨 志²

1. 北京师范大学 化学系, 放射性药物教育部重点实验室, 北京 100875;

2. 北京大学 临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院, 北京市肿瘤防治研究所 核医学科, 北京 100036

摘要:以丁二酰二酰肼(SDH)为 N^{3-} 离子供给体, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为还原剂, 室温下制备 $[\text{}^{99}\text{Tc}^m\text{N}]^{2+}$ 中间体, 并于 100 °C 水浴中与 HL91 配体进行交换反应, 制得 $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 配合物, 标记率大于 90%; 室温下放置 6 h, $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 标记率仍大于 90%; 其脂水分配系数 $\lg P$ 为 -1.026 ± 0.019 , 水溶性较 $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ ($\lg P$ 为 -0.859 ± 0.009) 强; 正常小鼠体内生物分布显示, $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 在血液、肝脏中的清除较 $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ 快; 由于 $^{99}\text{Tc}^m\text{N}$ 核的引入, 使得 $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 配合物在乏氧选择性和生物体内代谢方面不同于 $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$, 前者在荷瘤小鼠体内没有明显的肿瘤摄取。

关键词: $^{99}\text{Tc}^m\text{N}$; HL91; 生物分布; 乏氧显像剂

中图分类号: R981.2; TQ463.7 **文献标识码:** A

$[\text{}^{99}\text{Tc}^m\text{N}]^{2+}$ 中间体可以在不同种类还原剂和较宽 pH 范围下方便地形成, 并通过配体交换反应生成多种新的含 $^{99}\text{Tc}^m\text{N}$ 核的配合物^[1-3]。

在 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的乏氧组织显像剂研究中, $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ 是目前较为成功的一种, 实验证实其具有很高的乏氧选择性, 且不含传统的硝基咪唑靶向基团, 国内外正在进行临床乏氧显像研究^[4], 但是其乏氧显像机理还不清楚。在放射性 Cu 标记的乏氧组织显像剂中, $^{62}\text{Cu-ATSM}$ 的显像机理研究认为, 其乏氧选择性可能与 Cu 配合物的氧化还原性密切相关^[5]。本文在 $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ 研究的基础上^[6,7], 设计制备 $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$, 以研究 $^{99}\text{Tc}^m\text{N}$ 核的引入对标记 HL91 配合物性质变化, 及对正常小鼠体内的生物分布和荷瘤小鼠的显像影响。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

2-甲基-2-丁烯, 分析纯, 美国 Sigma 公司产品; 1,4-丁二胺, 化学纯, 北京化工厂产品; 亚硝酸异戊酯, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, 北京化工厂产品; 丁二酰二酰肼(SDH), 1,2-丙二胺四乙酸(PD-TA), 分析纯, 美国 Aldrich 公司产品; $\text{Na}^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4$

注射液, 北京森科医药有限公司提供; 聚酰胺薄膜, 浙江黄岩四青材料厂。

1.2 仪器

FH-408 自动定标器, FT-603 阱型 闪烁探头, 北京核仪器厂; FJ-391 同位素活度计, 中国计量科学研究院; 奥豪斯 AdventurerTM 电子天平, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 HL91 的合成以及 HL91 药盒的制备

按参考文献[7]的方法合成 HL91 配体: 于亚硝酸异戊酯和 2-甲基-2-丁烯混合液中滴加浓盐酸, 反应 0.5 h 后, 过滤, 用乙醇洗涤沉淀, 得 3-氯-3-甲基-2-亚硝丁烷。3-氯-3-甲基-2-亚硝丁烷再与 1,4-丁二胺反应, 在甲醇中重结晶, 得产品 HL91。

经称量、溶解、无菌过滤、分装、冷冻干燥, 制得冻干品药盒, 其主要成分为 1 mg HL91, 20 μg 酒石酸亚锡。

1.3.2 $^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ 和 $^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 的制备及标记率的测定

$^{99}\text{Tc}^m\text{-HL91}$ 的制备: 将 1~2 mL 新淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4$ 注射液 (1 110 MBq) 注入 HL91 冻干品药盒中, 室温下振摇, 使内容物全部溶解后, 放置 10 min, 进行标记率的测定。

$^{99}\text{Tc}^m\text{N-HL91}$ 的制备: 分别称取 5 mg SDH,

收稿日期: 2004-03-09; 修订日期: 2004-06-30

作者简介: 张剑英(1979-), 女, 河北易县人, 硕士研究生, 放射性药物化学专业。

* * 通讯联系人

5 mg PDTA 于 10 mL 西林瓶中,以磷酸盐缓冲液溶解后加入 100 μg SnCl₂ · 2H₂O (1 mg/mL, 0.1 mol/L HCl) 和 1 mL 新淋洗的 Na⁹⁹Tc^mO₄, 摇匀后室温放置 30 min, 制得 [⁹⁹Tc^m N]²⁺ 中间体^[8]。调节中间体的 pH 值为 9~10, 然后加入 1 mL 的 HL91 (3 mg/mL), 充分摇匀, 沸水浴中反应 1 h, 进行标记率的测定。

⁹⁹Tc^m-HL91 的纸层析测定: 新华一号试纸为支持体, 甲醇作展开剂时, ⁹⁹Tc^mO₄ 的 R_f = 0.9~1.0, 还原水解 Tc 的 R_f = 0~0.1, ⁹⁹Tc^m-HL91 的 R_f = 0.9~1.0; 硅胶纸为支持体, 生理盐水为展开剂时, ⁹⁹Tc^mO₄ 的 R_f = 0.9~1.0, 还原水解 Tc 的 R_f = 0~0.1, ⁹⁹Tc^m-HL91 的 R_f = 0~0.1。

[⁹⁹Tc^m N]²⁺ 和 ⁹⁹Tc^mN-HL91 的层析测定: 新华一号滤纸为支持体, 丙酮为展开剂时, ⁹⁹Tc^mO₄ 的 R_f = 0.9~1.0, 还原水解 Tc 的 R_f = 0~0.1, [⁹⁹Tc^m N]²⁺ 的 R_f = 0~0.1; 聚酰胺薄膜为支持体, 生理盐水为展开剂时, ⁹⁹Tc^mO₄ 的 R_f = 0.9~1.0, 还原水解 Tc 的 R_f = 0~0.1, [⁹⁹Tc^m N]²⁺ 的 R_f = 0.8~1.0, ⁹⁹Tc^mN-HL91 的 R_f = 0.3~0.5。

1.3.3 各因素对⁹⁹Tc^mN-HL91 标记的影响 将制得的 [⁹⁹Tc^m N]²⁺ 中间体在不同 pH 值下, 加入 HL91 配体, 在不同温度下反应, 测定 ⁹⁹Tc^mN-HL91 的标记率, 研究 pH 值, 反应温度, 反应时间及 HL91 配体量对标记率的影响。

1.3.4 ⁹⁹Tc^m-HL91 及 ⁹⁹Tc^mN-HL91 配合物的脂水分配系数 (lg P) 的测定 10 mL 离心管中加入 1.0 mL 浓度为 0.025 mol/mL 的 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 然后加入 1.0 mL 正辛醇和 0.01 mL 的 ⁹⁹Tc^m-HL91 (或 ⁹⁹Tc^mN-HL91), 振摇离心管 15 min, 充分摇匀后, 离心 5 min。分别取 0.1 mL 有机相和水相, 测定两相的放射性计数, 计算 ⁹⁹Tc^m-HL91 及 ⁹⁹Tc^mN-HL91 的脂水分配系数。

1.3.5 ⁹⁹Tc^mN-HL91 体外稳定性的研究 将 ⁹⁹Tc^mN-HL91 (约 185 MBq) 室温下放置 1~6 h, 测定标记率的变化, 确定 ⁹⁹Tc^mN-HL91 的体外稳定性。

1.3.6 ⁹⁹Tc^m-HL91 和 ⁹⁹Tc^mN-HL91 在正常小鼠体内的分布 取 ICR 小鼠, 体重为 (20 ± 2) g, 3 只为一组。尾静脉注入 0.1 mL (1.11 MBq) 的 ⁹⁹Tc^m-HL91 (或 ⁹⁹Tc^mN-HL91), 于不同时间断头处死, 取脏器称重, 测量放射性计数, 计算各脏器的摄取量。

1.3.7 ⁹⁹Tc^m-HL91 和 ⁹⁹Tc^mN-HL91 在荷 GLC82 肺癌肿瘤裸鼠体内的肿瘤显像 将 0.1 mL (约 1.11 MBq) 标记率大于 90% 的标记物经尾静脉注射到荷 GLC82 肺癌肿瘤小鼠体内, 注射后于不同时间在 SOPHA 公司的 ECT 下采用针孔准直器进行采集, 采集矩阵为 256 × 256, 采集总计数为 500 K 左右。观察两种药物在肿瘤和全身分布情况。

2 结果和讨论

2.1 影响⁹⁹Tc^mN-HL91 标记率的因素

2.1.1 pH 值的影响 pH 值对标记率的影响示于图 1。由图 1 可知, 随着反应的 pH 值由 5 升至 10, ⁹⁹Tc^mN-HL91 的标记率增高, 但是当 pH 值大于 10 时, HL91 配体易出现沉淀。因此选择标记的最佳 pH 值范围为 9~10。

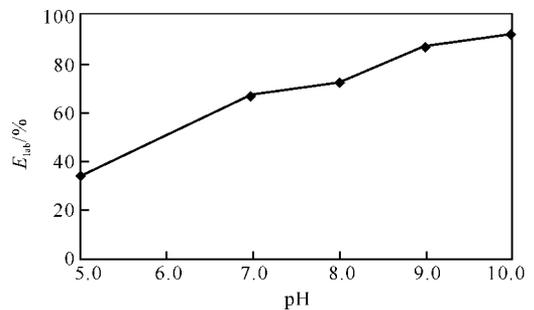


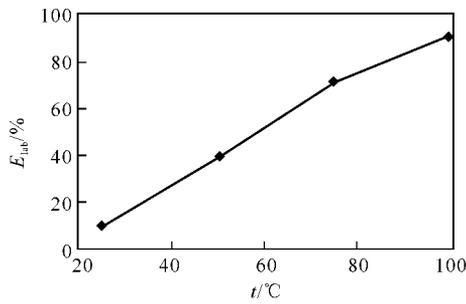
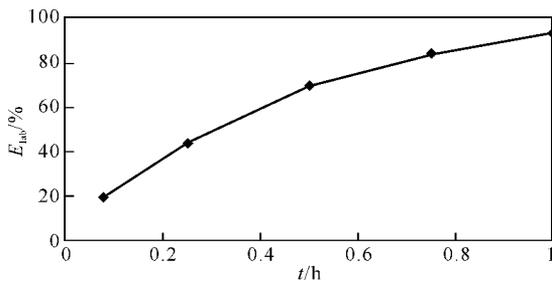
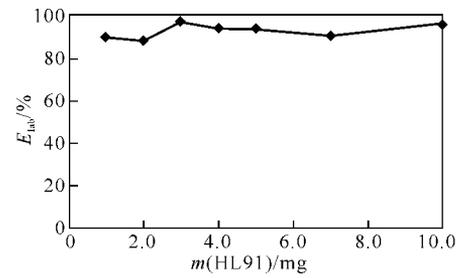
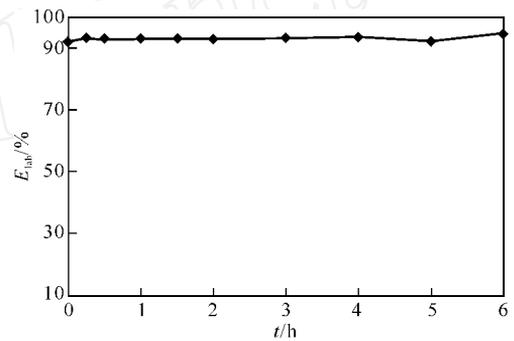
图 1 pH 值对⁹⁹Tc^mN-HL91 标记率的影响

Fig. 1 Effect of pH on labeling efficiency of ⁹⁹Tc^mN-HL91

2.1.2 反应温度的影响 调节 [⁹⁹Tc^m N]²⁺ 中间体 pH 值为 9, 分别在 25, 50, 75, 100 °C 下反应 1 h, 温度对标记率的影响示于图 2。由图 2 可见, 在室温时, ⁹⁹Tc^mN-HL91 的标记率很低, 随着反应温度的上升, 标记率逐渐升高。选择最佳反应温度为 100 °C。

2.1.3 反应时间的影响 反应时间对标记率的影响示于图 3。由图 3 可知, 随着反应时间的延长, 配合物的标记率升高, 因此, 选择交换的反应时间为 1 h。

2.1.4 HL91 配体量的影响 HL91 为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 和 10.0 mg 时, 配体量对标记率的影响示于图 4。由图 4 可以看出, 配体量由 1.0 mg 增至 3.0 mg 时, 标记率随之升高,

图 2 反应温度对⁹⁹Tc^mN- HL91 标记率的影响Fig. 2 Effect of temperature on labeling efficiency of ⁹⁹Tc^mN- HL91图 3 反应时间对⁹⁹Tc^mN- HL91 标记率的影响Fig. 3 Effect of exchange time on labeling efficiency of ⁹⁹Tc^mN- HL91图 4 HL91 配体量对⁹⁹Tc^mN- HL91 标记率的影响Fig. 4 Effect of HL91 on labeling efficiency of ⁹⁹Tc^mN- HL91图 5 ⁹⁹Tc^mN- HL91 的稳定性Fig. 5 Stability of ⁹⁹Tc^mN- HL91

当配体量大于 3.0 mg 时,标记率保持在 90% 以上。随着 HL91 配体量增加(大于 5.0 mg), HL91 容易出现沉淀。故选择 HL91 配体量为 3.0 mg。

2.2 ⁹⁹Tc^mN- HL91 的稳定性

⁹⁹Tc^mN- HL91 在室温下的标记率变化示于图 5。由图 5 可以看出,⁹⁹Tc^mN- HL91 的体外稳定性较好。室温下放置 6 h,⁹⁹Tc^mN- HL91 的标记率没有明显变化。

2.3 ⁹⁹Tc^m- HL91 和⁹⁹Tc^mN- HL91 的脂水分配系数

pH = 7.4 时⁹⁹Tc^m- HL91 的脂水分配系数(lg P)为 - 0.859 ± 0.009,⁹⁹Tc^mN- HL91 的脂水分配系数(lg P)为 - 1.026 ± 0.019。表明⁹⁹Tc^mN- HL91 的亲水性较⁹⁹Tc^m- HL91 强。

2.4 ⁹⁹Tc^m- HL91 及⁹⁹Tc^mN- HL91 在正常小鼠体内分布

⁹⁹Tc^m- HL91 和⁹⁹Tc^mN- HL91 在正常小鼠体内分布实验结果列入表 1 和表 2。

表 1 ⁹⁹Tc^m- HL91 在小鼠体内的生物分布Table 1 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m- HL91 in mice

组织 (Tissues)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	2 min	15 min	30 min	60 min	120 min
血(Blood)	6.08 ± 0.62	2.83 ± 0.46	1.59 ± 0.27	1.12 ± 0.30	0.83 ± 0.32
心(Heart)	6.52 ± 0.74	2.81 ± 0.31	1.13 ± 0.11	0.91 ± 0.39	0.37 ± 0.07
肝(Liver)	4.72 ± 0.44	11.34 ± 0.93	10.38 ± 1.35	13.96 ± 0.86	12.02 ± 1.19
脾(Spleen)	3.00 ± 0.68	2.57 ± 0.38	1.60 ± 0.21	1.40 ± 0.32	1.00 ± 0.12
肺(Lung)	6.13 ± 0.57	3.13 ± 0.34	1.82 ± 0.09	1.35 ± 0.40	0.84 ± 0.17
肾(Kidney)	11.22 ± 0.51	5.66 ± 0.63	3.45 ± 0.40	3.34 ± 0.55	2.45 ± 0.51
脑(Brain)	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.10	0.32 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.16 ± 0.01
肠(Intestines)	3.20 ± 0.50	5.11 ± 0.66	3.17 ± 0.50	1.59 ± 0.58	1.96 ± 0.15

注(Note): n = 3

表 2 ⁹⁹Tc^mN- HL91 在小鼠体内的生物分布
Table 2 Biodistribution of ⁹⁹Tc^mN- HL91 in mice

组织 (Tissues)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)				
	2 min	15 min	30 min	60 min	120 min
血(Blood)	6.88 ±0.51	1.45 ±0.03	0.89 ±0.00	0.87 ±0.13	0.52 ±0.06
心(Heart)	2.92 ±0.07	2.74 ±0.08	2.64 ±0.48	1.40 ±0.38	1.16 ±0.21
肝(Liver)	9.69 ±1.00	11.54 ±1.44	9.51 ±1.41	8.38 ±1.48	9.11 ±1.65
脾(Spleen)	2.20 ±0.94	4.31 ±0.19	3.46 ±0.45	2.72 ±0.85	1.95 ±0.19
肺(Lung)	4.79 ±1.30	3.36 ±0.49	3.23 ±0.81	2.15 ±0.56	1.89 ±0.48
肾(Kidney)	17.05 ±1.29	11.27 ±1.64	8.67 ±0.92	7.20 ±2.33	5.45 ±1.39
脑(Brain)	0.22 ±0.06	0.11 ±0.00	0.10 ±0.01	0.11 ±0.02	0.05 ±0.01
肠(Intestines)	1.79 ±0.79	4.01 ±0.40	6.04 ±1.34	3.14 ±0.09	3.59 ±0.93

注(Note): n = 3

从正常小鼠体内分布实验结果看出,注射后 2 min,⁹⁹Tc^m-HL91 的肝摄取率低于⁹⁹Tc^mN- HL91;注射后 15 min,二者的肝摄取率相当,但注射后 30 min,⁹⁹Tc^mN- HL91 的肝脏滞留一直低于⁹⁹Tc^m-HL91。注射后 2 min,⁹⁹Tc^mN- HL91 的血液初始摄取率与⁹⁹Tc^m-HL91 相当,但⁹⁹Tc^mN- HL91 的血液清除略快于⁹⁹Tc^m-HL91。

2.5 荷瘤小鼠的实验结果

注射后 6 h,⁹⁹Tc^m-HL91 及⁹⁹Tc^mN- HL91 在荷 GLC82 肺癌肿瘤裸鼠体内的肿瘤显像结果示于图 6 和图 7。从荷 GLC82 肺癌肿瘤裸鼠体内的显像结果可见,注射⁹⁹Tc^m-HL91 后 6 h,肿瘤显像清晰,但肝本底高,且排泄慢;注射⁹⁹Tc^mN- HL91 后 6 h,放射性主要在胆囊和肠道中,肿瘤不显影。⁹⁹Tc^mN- HL91 代谢途径主要为肝、胆经肠道排泄,肝脏转移较⁹⁹Tc^m-HL91 快,但肿瘤几乎不摄取。

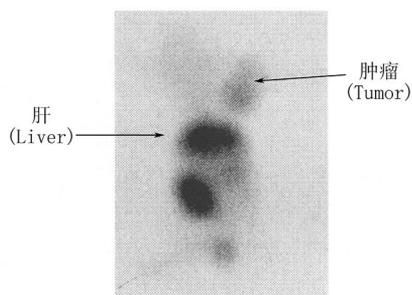


图 6 ⁹⁹Tc^m- HL91 的肿瘤显像

Fig. 6 Tumor imaging of ⁹⁹Tc^m- HL91

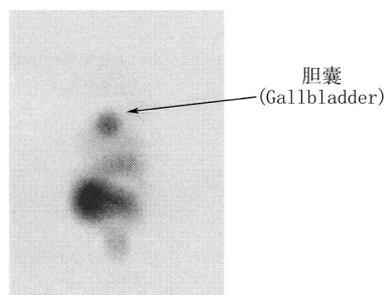


图 7 ⁹⁹Tc^mN- HL91 的肿瘤显像

Fig. 7 Tumor imaging of ⁹⁹Tc^mN- HL91

上述实验结果说明:⁹⁹Tc^m核的引入改变了原⁹⁹TcO₂核与 HL91 形成标记物的乏氧选择性,使得⁹⁹Tc^mN- HL91 在荷瘤小鼠中不具有肿瘤选择性摄取。

3 结 论

在室温下制备了 [⁹⁹Tc^mN]²⁺ 中间体,于 100 水浴下进行 HL91 配体交换反应,制得⁹⁹Tc^mN- HL91 配合物,其标记率大于 90%,体外稳定性较高,脂水分配系数(lg P)为 -1.026 ±0.019,说明其水溶性较⁹⁹Tc^m-HL91 强。正常小鼠体内分布显示,⁹⁹Tc^mN- HL91 的血液、肝清除很快;荷瘤小鼠显像结果显示,与乏氧组织显像剂⁹⁹Tc^m-HL91 不同,⁹⁹Tc^mN- HL91 没有明显的肿瘤摄取。推断可能由于⁹⁹Tc^m-HL91 和⁹⁹Tc^mN- HL91 配合物结构的不同,导致其氧化还原性不同,从而表现出不同的肿瘤摄取结果。

参考文献:

- [1] Bellande E, Comazzi V, Laine J, et al. Synthesis and Biodistribution of Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals With Dithiophosphinate Ligands: a Class of Brain Imaging Agents [J]. Nucl Med Bio, 1995, 22:315 ~ 320.
- [2] Bolzati C, Uccelli L, Boschi A, et al. Synthesis of a Novel Class of Nitrido Tc-99m Radiopharmaceuticals With Phosphino-thiol Ligands Showing Transient Heart Uptake [J]. Nucl Med Bio, 2000, 27:369 ~ 374.
- [3] Nicholso T, Kramer DJ, Davison A, et al. Synthesis and Characterization of a Technetium Nitrido Dimer [J]. Inorg Chim Acta, 2001, 316:110 ~ 112.
- [4] Cook GJ, Houston S, Barrington S F, et al. Technetium-99m-labeled HL91 to Identify Tumor Hypoxia: Correlation With Fluorine-18-FDG [J]. J Nucl Med, 1998, 39:99 ~ 103.
- [5] Jason L J DEARLING, Lewis J S, McCarthy D W, et al. Redox-active Metal Complexes for Imaging Hypoxic Tissues: Structure-activity Relationships in Copper () Bis (thiosemicarbazone) Complexes [J]. Chem Commun, 1998, 8:2 531 ~ 2 532.
- [6] 张剑英,朱霖.⁹⁹Tc^m标记的乏氧组织显像剂[J].中华核医学杂志,2003,23:377 ~ 389.
- [7] 国毓智,张志勇,朱霖,等.乏氧组织显像剂⁹⁹Tc^m-HL91冻干药盒的研制[J].同位素,2003,16:116 ~ 118.
- [8] Zhang J B, Wang X B. Preparation of ⁹⁹Tc^mN(CB-DTC)₂ and Its Biodistribution in Mice [J]. Appl Radiat Isot, 2001, 55:453 ~ 456.

Synthesis and Biodistribution of ⁹⁹Tc^mN-HL91 Complex

ZHANG Jian-ying¹, ZHU Lin¹, LIU Meng¹, WANG Jing¹, YANG Zhi²

1. Department of Chemistry, State Education Ministry Key Laboratory of Radiopharmaceuticals, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;
2. Department of Nuclear Medicine, Beijing University Oncology School, Beijing Cancer Hospital & Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China

Abstract: The complex ⁹⁹Tc^mN-HL91 is synthesized through ligand exchange reaction. The [⁹⁹Tc^mN]²⁺ intermediate is prepared with succinic dihydrazide (SDH) as a donor of nitride nitrogen atom (N³⁻) in the presence of stannous chloride dihydrate a reductant at room temperature. Then HL91 is added to the [⁹⁹Tc^mN]²⁺ intermediate and react at 100 °C. The labeling efficiency of the product is over 90 % measured by thin layer chromatography (TLC). The lg P of ⁹⁹Tc^mN-HL91 (-1.026 ± 0.019) indicates it is a hydrophilic complex. It is stable over 6 h at room temperature. The biodistribution results in mice indicate that it has quick blood and liver cleanness than ⁹⁹Tc-HL91. It differs from ⁹⁹Tc^m-HL91 in the hypoxic selectivity and biologic metabolism. ⁹⁹Tc^mN-HL91 has no significant uptake in hypoxia tumors in tumor-bearing mice.

Key words: ⁹⁹Tc^mN; HL91; biodistribution; hypoxia imaging