

BADTPA 偶联 ^{153}Sm , ^{186}Re 标记平阳霉素

何佳恒, 蒲满飞, 陈琪萍, 魏洪源

中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900

摘要: 通过一步法合成二乙三胺五乙酸环二酸酐(BADTPA)并与平阳霉素(PLM)偶联,于室温制得 DTPA-PLM。在 pH 为 4~6 的沸水中进行 ^{153}Sm 标记,反应 3 min 后制得产额高于 95 %的 ^{153}Sm -DTPA-PLM。采用亚锡还原法进行 ^{186}Re 标记,在 pH 为 3~5 的沸水中反应 30 min 制得产额高于 95 %的 ^{186}Re -DTPA-PLM。两种标记物的稳定性很好,于室温下放置 48 h 后,其放化纯度仍高于 95 %。脂水分分配系数表明, ^{153}Sm -DTPA-PLM 是亲水性的。动物体内分布实验结果表明: ^{153}Sm -DTPA-PLM 的血液清除较快,主要通过肾脏代谢。正常鼠体内行为初试结果表明: ^{186}Re -DTPA-PLM 是一种可望用于肿瘤治疗的新型药物。

关键词: ^{153}Sm ; ^{186}Re ; 平阳霉素; 标记; DTPA

中图分类号: O614.337; O614.713 **文献标识码:** A

平阳霉素(PLM)是一种结构复杂的含硫糖肽类化合物。它是由平阳链霉菌产生的博莱霉素类抗肿瘤抗生素,能抑制癌细胞 DNA 的合成和切断 DNA 链,影响癌细胞代谢功能,促进癌细胞变性、坏死。目前,我国虽已研制出多种放射性核素标记的 BLM 药物,并用作肿瘤显像剂。但它们化学稳定性差,有的核素发射不利于显像的射线,还有一些核素的生物分布还需作进一步的研究,才能用于临床应用^[1~3]。稀土核素 ^{153}Sm 具有较理想的核性质,其 103 keV 的 γ 射线非常适于显像和探测,便于剂量估算。 ^{186}Re (1.07 MeV, 77%; 0.93 MeV, 23%)也是用于诊断和治疗肿瘤的理想核素之一,137 keV 的 γ 射线即使在高剂量时也非常适合一般相机显影^[4]。90 年代初本所首次用 ^{186}Re 直接标记了 PLM,但进一步实验表明, ^{186}Re -PLM 具有不稳定性,限制了它的应用。

BADTPA 偶联 ^{153}Sm , ^{186}Re 标记 PLM 及其在小鼠体内行为研究,尚未见文献报道。本文先引

入整合能力很强的双功能剂 BADTPA 到 PLM 上,然后分别进行 ^{153}Sm , ^{186}Re 标记,试图获得集 ^{153}Sm , ^{186}Re 的辐射治疗和 PLM 化疗于一体的新型肿瘤治疗药物。

1 实验部分

1.1 主要仪器

FJ-2021 型 γ 放射免疫计数器,西安核仪器厂产品;FA1104 电子天平,上海天平仪器厂产品;WFZ-25 型 UV-Vis 光谱仪,天津光学仪器电子厂产品。

1.2 主要试剂

盐酸平阳霉素,针剂,天津太河制药有限公司产品;葡聚糖凝胶 G25,进口分装,上海化学试剂厂; $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$,固体粉末,中国原子能科学研究院提供; ^{186}Re ,金属铼片,光谱纯,中国工程物理研究院二所提供;二乙三胺五乙酸(DTPA),氯化亚锡,分析纯。

收稿日期: 2001-08-24; 修订日期: 2001-10-22

基金项目: 中国工程物理研究院资助项目(990558)

作者简介: 何佳恒(1976—)女,四川广元人,实习研究员,放射化学专业。

2 结果和讨论

2.1 BADTPA 合成

在烧瓶中,分别加入 DTPA、乙酸酐及吡啶,搅拌。冷凝回流后,将奶油状的产品过滤,并分别用乙酸酐及无水乙醚洗涤、纯化,于 45 °C 真空干燥。所得产品熔点为 179 ~ 182 °C。元素分析实测值: N, 11.42 %; C, 46.94 %; H, 5.17 %。理论值为: N, 11.76 %; C, 47.06 %; H, 5.36 %,二者基本相符。从 IR 图谱可以看到酸酐羰基 ($1\,820\text{ cm}^{-1}$ 及 $1\,776\text{ cm}^{-1}$) 存在, $1\,640\text{ cm}^{-1}$ 存在说明中心羰基是离子化的。

2.2 PLM-DTPA 制备

按 $n(\text{PLM}) : n(\text{BADTPA}) = 1 : 20$ 将两种固体粉末充分混匀,加入 0.5 mL 0.3 mol/L 的 NaHCO_3 溶液,将反应体系 pH 值调至 7 ~ 8,于室温下反应 5 min,再调节 pH 至中性,然后将反应液装入 Sephadex G25 凝胶色谱柱,用 0.3 mol/L 的 NaHCO_3 溶液淋洗,收集纯化组分即得 PLM-DTPA,产额可达 80 % 左右。通过紫外光谱知道,PLM 在 290 nm 处有特征吸收峰, DTPA-PLM 在 300 nm 处有特征吸收峰, DTPA 在 200 ~ 400 nm 波长范围内不存在特征吸收峰。在 290 nm 波长下测定吸光度,结果示于图 1。图 1 中第一个峰是偶联物,第二个峰是未偶联的 DTPA。由于 PLM 在分子结构上含有许多杂环结构,所以它出现在第三个峰。

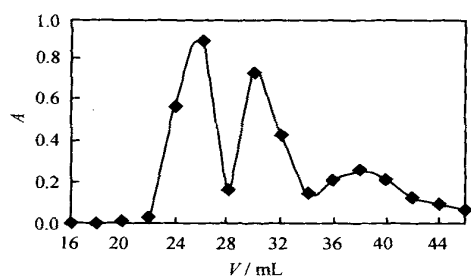


图 1 BADTPA 与 PLM 交联产物于 Sephadex G25 色谱柱上纯化的淋洗曲线

Fig. 1 Elution curve of coupled product of BADTPA and PLM in chromatogram column
 $\lambda = 290\text{ nm}$

2.3 ^{153}Sm 标记 PLM-DTPA 研究

在反应管中加入一定量的 $^{153}\text{SmCl}_3$ 和 PLM-DTPA,调节 pH ≈ 6 ,将反应管加塞封闭置于沸水浴中反应 5 ~ 10 min 后,以 Whatman 1# 为支持体,展开体系为 $V(\text{吡啶}) : V(\text{乙醇}) : V(\text{水}) = 1 : 2 : 4$,用放射性纸层析法分析标记率。游离钐的 $R_f = 0$,配合钐的 $R_f = 0.7 \sim 0.9$ 。结果测得反应的标记率可达 95 % 以上。

2.3.1 温度和 pH 值对标记率的影响 反应温度对 ^{153}Sm -DTPA-PLM 合成的影响结果示于图 2。图 2 表明:沸水浴较室温更有利于在更宽的酸度范围内促使 ^{153}Sm 标记平阳霉素反应完成。pH 值在 6 左右时,在沸水浴中可获得标记率大于 90 % 的标记物。

2.3.2 反应时间对标记率的影响 反应物在沸水浴中分别反应 3, 5, 10, 20, 30 min,然后点样展开,结果示于图 3。由图 3 看出,在 3 min 时,标记率已达 95 % 以上,随着反应时间(30 min 以内)的延长,标记率几乎不变。

2.3.3 ^{153}Sm -DTPA-PLM 的正辛醇-生理盐水分配系数的测定 在 ^{153}Sm -DTPA-PLM 中加入生理盐水缓冲液(pH = 7)至 3 mL,再加入 3 mL 正辛醇,振荡离心,取水相 2 mL 测量计数。有机相中加入 3 mL 缓冲液,振荡离心,取有机相,再加入缓冲液,振荡离心。如此重复不得少于 5 次。最后取有机相 2 mL 测其计数。与缓冲溶液的计数相比,得分配比为 5.3×10^{-3} 。表明该标记物是亲水性的。

2.3.4 体外稳定性 将标记物于室温下放置,于不同时间测定标记率。结果表明:标记物较稳定,在 48 h 后标记率仍在 95 % 以上。

2.3.5 动物体内分布 取 25 只雄性小白鼠,分成 5 批,每批注射相同剂量的标记物。将小鼠于不同时间处死,取不同脏器称量,测量放射性,计算每克组织摄入放射性占总注射剂量的百分数,结果列入表 1。由表 1 看出,标记物血液清除较快,主要通过肾脏代谢,也可能在体内解离。

2.4 ^{186}Re 标记 PLM-DTPA 研究

2.4.1 $\text{NH}_4^{186}\text{ReO}_4$ 的制备 按文献[5]方法将反应堆照射的金属铼片,用少量浓硝酸微热溶解后,再加入少量 25 % 氨水至有白色沉淀形成,再微热蒸干,最后加入蒸馏水稀释,测其放射性比活度。

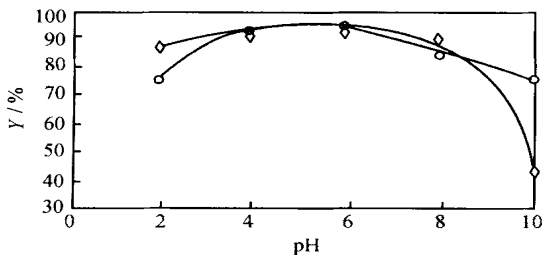


图 2 pH 值和温度对标记率的影响
Fig. 2 Effect of pH and temperature on labeling yield
○ — $t = 16$, $t = 20$ min; — $t = 95$, $t = 3$ min

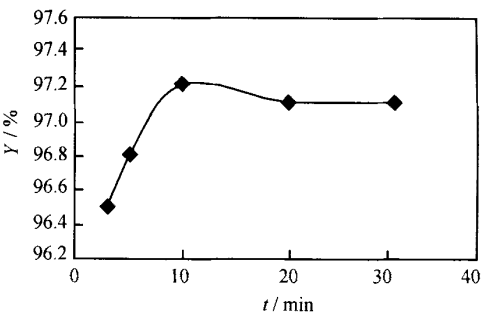


图 3 沸水浴中反应时间对标记率的影响
Fig. 3 Effect of reaction time on labeling yield in boiling-water bath

表 1 小白鼠体内分布实验
Table 1 Distribution of ¹⁵³Sm-DTPA-PLM in normal mice

脏器 (Tissues)	ID/ (% g ⁻¹)				
	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
心脏 (Heart)	1.90 ±0.14	0.80 ±0.19	0.24 ±0.06	0.05 ±0.01	0.04 ±0.02
肝脏 (Liver)	1.30 ±0.13	0.80 ±0.15	0.27 ±0.12	0.14 ±0.05	0.20 ±0.07
肺 (Lung)	4.90 ±0.84	1.80 ±0.23	0.58 ±0.21	0.11 ±0.02	0.08 ±0.04
肾脏 (Kidney)	19.0 ±1.37	6.70 ±1.52	2.10 ±0.17	0.83 ±0.12	0.72 ±0.07
脑 (Brain)	0.23 ±0.07	0.14 ±0.02	0.07 ±0.01	0.049 ±0.01	0.047 ±0.01
骨 (Bone)	1.40 ±0.12	1.20 ±0.13	0.29 ±0.04	0.22 ±0.01	0.21 ±0.04
肌肉 (Muscle)	1.30 ±0.09	0.79 ±0.02	0.19 ±0.06	0.06 ±0.02	0.07 ±0.01
血 (Blood)	5.80 ±0.46	2.00 ±0.14	0.62 ±0.03	0.07 ±0.04	0.04 ±0.01

2.4.2 ¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 的制备 将一定量的 SnCl₂ · 2H₂O, Sn 粒, Glu (葡萄糖酸钠) 和 DTPA-PLM 加入反应器中, 调节 pH 至 3 ~ 5, 通氮气保护, 再加入 NH₄¹⁸⁶ReO₄ 溶液 (pH = 7), 于沸水浴中反应 30 min 后, 用 0.1 mol/L NaOH 或盐酸调节 pH 至 7, 即得咖啡色、澄清的¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 溶液。

2.4.3 不同温度下反应时间对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响 不同温度下反应时间对配合物合成的影响示于图 4。由图 4 看出, 沸水浴加热有利于¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 的快速形成, 室温下

¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 生成速度较慢。在 95 ℃ 时, 随时间增加, 配合物产额可达 95 % (> 30 min 时) 以上; 室温下在 70 min 时产率最高才达 75 % 左右。

2.4.4 还原剂对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响 还原剂用量对合成¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 的影响示于图 5。由图 5 可看出, 随着 Sn() 浓度的增加, 配合物产额增加。Sn() 浓度达到 3.5 mmol/L 时, 配合物产额可达 95 % 以上。加入少量 Sn 粒时, 可减少加入 Sn() 的量并获得更高的配合物产额 (> 95 %), 同时还减少了浑浊絮状物生成。

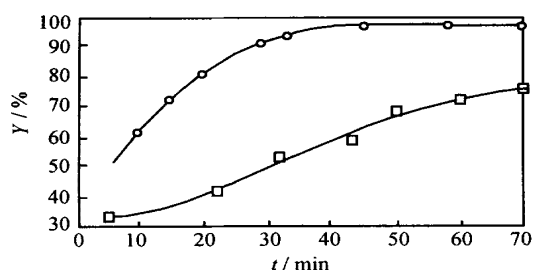


图 4 不同温度下反应时间对配合物产额的影响

Fig. 4 Effect of reaction time and temperature on labeling yield
□—16 , ○—95

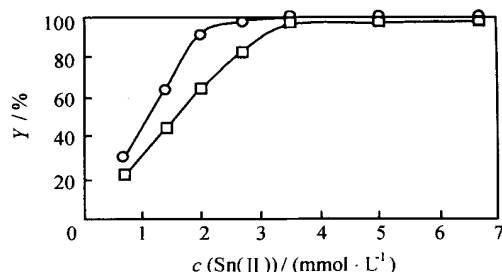
图 5 还原剂用量对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 产额的影响

Fig. 5 Effect of reducing agent dosage on labeling yield
○—Sn() + Sn 粒(Particle), □—Sn()

2.4.5 pH 值对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响

pH 值对配合物合成的影响示于图 6。由图 6 可知,反应体系 pH 值对配合物合成有较显著的影响,在 pH = 3 ~ 5 的范围内可获得产额不低于 95 %的¹⁸⁶Re-DTPA-PLM。

2.4.6 Glu (葡萄糖酸钠) 浓度对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响

Glu 浓度对配合物合成的影响示于图 7。从图 7 可知,随 Glu 浓度增大,配合物产额增加。当 Glu 浓度为 3.5 mmol/L 时,其

产额可达 98 %以上,而未加入 Glu 时,其产额为 92 %。表明 Glu 可促进高价铼的还原,对配合物形成有促进作用。在实验过程中,发现加入 Glu 后,制备液呈透明状,而不加 Glu 时,由于 Sn() 用量较大,致使其水解产生絮状沉淀。所以可认为, Glu 具有改变¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 形成时溶液外观性状的作用,使溶液澄清透明,避免加入大量 Sn() 而形成锡胶体,同时促进了配合物有效形成。

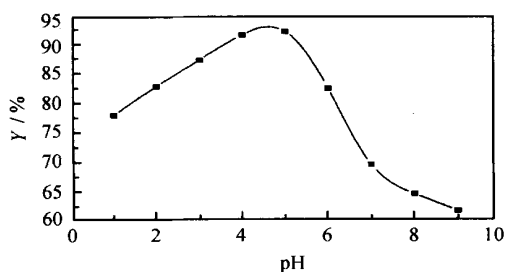
图 6 pH 值对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响

Fig. 6 Effect of pH on labeling yield

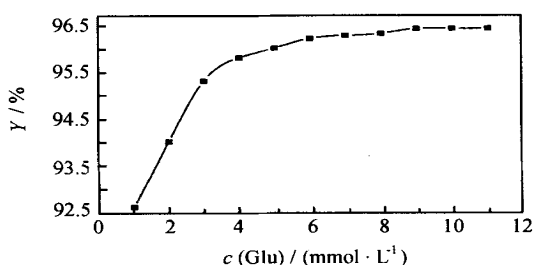
图 7 Glu 浓度对¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 合成的影响

Fig. 7 Effect of Glu concentration on labeling yield

2.4.7 ¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 在正常小鼠体内分布

本实验条件下,¹⁸⁶Re-DTPA-PLM (放化纯度大于 95 %) 在健康小鼠体内的主要器官(肾、肝、肺)代谢结果表明,¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 在肾、肝、肺中具有较高摄取,其中药物浓度分布从大到小依次为:肾、肝、肺,而肌肉中相对含量较少。PLM 自身特性决定了 PLM 由肾排泄,并在肝、肺中都有较大药物浓度^[6]。已经证明,用于肿瘤阳性显像的⁵⁷Co-PLM 具有体内稳定性^[7],表现出 PLM 的特性。比较¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 与⁵⁷Co-PLM 在血液中清除曲线及尿液累积排泄结果,可以看出,

¹⁸⁶Re-DTPA-PLM 具有较好的体内稳定性,有望对 PLM 所能化疗的肿瘤进行双重治疗。

3 结 论

合成了双功能剂 BADTPA。首次用偶联法制得了¹⁵³Sm-DTPA-PLM 和¹⁸⁶Re-DTPA-PLM。系统地研究了反应条件对¹⁵³Sm,¹⁸⁶Re 标记的影响,获得了两种配合物的最佳制备条件,并考察了它们在正常小鼠体内的代谢行为。为这两种可用于肿瘤治疗的新化合物的研制打下了一定基础。

参考文献:

- [1] UMEZAWA H. Natural and Artificial Bleomycins: Chemistry and Anti-tumor Activities[J]. Pure Appl Chem, 1971, 28: 665 ~ 680.
- [2] TORU Mori, KEN Hamamoto, YASU TO Onoyama, et al. Tumor Imaging After Administration of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled Bleomycin[J]. J Nucl Med, 1974, 16: 414 ~ 422.
- [3] 柳惠图,唐 谨,王吉欣,等. ^{57}Co -争光霉素几种不同组分的制备和在肿瘤动物中分布及临床扫描初步结果[J]. 中华肿瘤杂志, 1979, 1(2): 106 ~ 112.
- [4] 贾 兵,王豫庆,金小海. ^{188}Re 标记平阳霉素的制备与分析[A]. 全国放射治疗学术研讨会论文摘要汇编[C]. 1999, 22 ~ 23.
- [5] ECKELMAN W, MEINKEN G, RICHARDS P. Chemical State of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in Biomedical Products[J]. J Nucl Med, 1971, 12: 596 ~ 600.
- [6] 罗顺忠,蒲满飞,谯 健,等. ^{186}Re 标记博莱霉素的研究[J]. 核技术, 1995, 18(4): 231 ~ 234.
- [7] GROVE R B, ECKELMAN W C, REBA R C, et al. Distribution of Labeled Bleomycin in Normal and Tumor-bearing Mice[J]. J Nucl Med, 1974, 14: 917.

LABELING OF PINGYANGMYCIN WITH ^{153}Sm AND ^{186}Re THROUGH THE CONJUGATION OF BADTPA

HE Jia-heng, PU Man-fei, CHEN Qi-ping, WEI Hong-yuan

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

Abstract: Pingyangmycin (PLM) is a homemade antibiotics mixture with bleomycin as its main constituent. ^{153}Sm or ^{186}Re is indirectly labeled to PLM via a conjugating chelator. Diethylenetriamine pentaacetic acid(DTPA) is chosen as the conjugator. The bicyclic anhydride of DTPA(BADTPA) is chosen as the conjugator. The bicyclic anhydride of DTPA(BADTPA) is coupled to PLM at room temperature to form a BADTPA-PLM adduct. ^{153}Sm -BADTPA-PLM is prepared by boiling of aqueous $^{153}\text{SmCl}_3$ and BADTPA solution mixture at pH = 4 ~ 6 for 3 min. ^{186}Re is labeled to BADTPA-PLM by reduction of $^{186}\text{ReO}_4^-$ with $\text{SnCl}_2 + \text{Sn}$ at 95 °C for 30 min in the presence of gluconic acid (pH = 3 ~ 5). The yield in both cases is higher than 95 %. The labeled compounds are stable for 48 h at least at room temperature. Their high hydrophilicity is demonstrated by their low partition coefficients between octanol and water. The biodistribution of these labeled compounds in mice upon time is determined. The results indicate that these labeled compounds are principally excreted through blood-kidney route.

Key words: ^{153}Sm ; ^{186}Re ; pingyangmycin, label DTPA