

新型⁶⁴Cu 丙酮醛双缩氨基硫脲类 配体药物的研究

刘 锰

(首都医科大学化学教研室, 北京 100054)

刘正浩

(北京师范大学化学系, 北京 100875)

合成了 3 种新型丙酮醛双缩氨基硫脲类配体。用比活度约为 370 GBq/g ⁶⁴Cu 作指示剂, 探讨了标记配合物的反应条件, 并用 3 个 ⁶⁴Cu-丙酮醛双缩氨基硫脲类配合物进行了动物实验。体内分布结果表明: ⁶⁴Cu-PTSP 具有较高的脑摄取和较好的滞留, 脑/血摄取率比值较高, 且随时间的延长而增加。

关键词 丙酮醛双缩氨基硫脲类配体 脑摄取 生物分布

中图分类号 R · 817

在 Pastakia 等^[1,2]合成 ⁶⁴Cu-3-乙氧基-2-氧丁醛双缩氨基硫脲之后, Green 等^[3]合成了 ⁶⁴Cu-丙酮醛双 N⁴-甲基缩氨基硫脲 (⁶⁴Cu-PTSM)。 ⁶⁴Cu-PTSM 的动物分布结果表明, 它的心肌、脑摄取高, 血清除快。 ⁶²Cu-PTSM 可作为脑、心肌灌注正电子放射层析 X 射线射影法 (PET) 的放射性药物。为了研制出新的 ⁶²Cu-双缩氨基硫脲类配合物的 PET 药物, 受脑内酯酶的启发, Matsumoto 等^[4]制备了两个含酯结构的双缩氨基硫脲类配体。 Arano 和 Magata^[5]等合成了两个含双缩氨基硫脲结构的脂肪酸类似物。这些结构都是对 PTSM 结构的修饰, 但作为心肌、脑的放射性药物, 这些配体的 ⁶²Cu 配合物, 其生物分布结果均不如 ⁶²Cu-PTSM。本文利用 ⁶⁴Cu 作标记物对 PTSM 氨基硫脲上的甲基进行改造, 以期得到新的 ⁶²Cu 丙酮醛双缩氨基硫脲类 PET 放射性药物。

1 实验部分

1.1 配体的合成与鉴定

1.1.1 中间体氨基硫脲 RNHCNHNH_2 的合成 S
0.1 mol RNH₂ [R 分别为—CH₂CH₃, —CH₂CH₂CH₃, —(CH₂)₃CH₃] 或其水溶液和 0.28 mol 的 25% 氨水混合均匀, 在 10~15 搅

收稿日期: 1997-08-05 收到修改稿日期: 1997-12-08

刘 锰: 男, 29 岁, 放射化学专业, 硕士, 助教

拌条件下,滴加 0.12 mol CS₂, 室温下回流 1 h, 然后在 25~ 30 条件下搅拌 1.5 h, 再加入 0.11 mol NH₂—NH₂, 回流下升温至 90 并持续 3 h。自然冷却至室温即有固体出现, 数小时后析出大量结晶, 抽滤, 用蒸馏水洗数次, 得白色结晶。

1.1.2 丙酮醛双缩氨基硫脲类配体的合成 0.01 mol 氨基硫脲在搅拌下溶于 50 g/L 醋酸水溶液中, 控温在 50~ 60 , 30 min 内缓慢滴加 0.81 g 400 g/L 丙酮醛水溶液, 并不停地搅拌。室温放置数小时, 然后冷冻 2 d 出现大量晶体, 抽滤, 产品用大量甲醛结晶。所得配体的结构见图 1。

1.1.3 鉴定 产品用熔点测定、红外光谱分析和元素分析等方法进行鉴定。实验数据分别列入表 1。

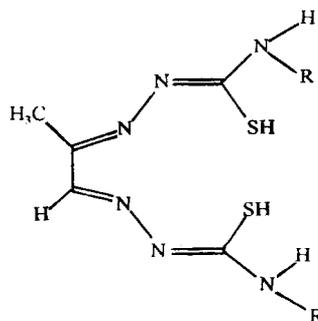


图 1 配体结构

Fig 1 Structural formula of ligand

表 1 配体的熔点、性状、产率、元素分析及红外光谱图的指认

Table 1 Analytical data on ligand

| R | 名称缩写 (Name) | 状态 (Aspect) | 熔点(Melting point)/ | 产率 (Yield) % | 元素分析(Element analyses) | | | 红外光谱(IR) | | |
|---|----------------|--|-----------------------|-----------------|------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | w (C) / % | w (H) / % | w (N) / % | α -H | α -N | α -S |
| - CH ₂ CH ₃ | PTSE | 淡黄色针状晶体 (Light yellow needle crystal) | 225.5~ 227 | 97.2 | 39.22(39.41) | 6.53(6.56) | 30.26(30.65) | 3376 | 1541 | 1098 |
| - (CH ₂) ₂ CH ₃ | PTSP | 黄色针状晶体 (Yellow needle crystal) | 219~ 219.5 | 84.5 | 43.69(43.71) | 7.31(7.28) | 27.82(27.81) | 3333 | 1542 | 1195 |
| - (CH ₂) ₃ CH ₃ | PTSB | 黄色粒状晶体 (Yellow grain crystal) | 190~ 190.5 | 80.81 | 47.32(47.27) | 8.32(7.88) | 24.58(24.45) | 3363 | 1538 | 1195 |

注: 括号内为理论值(Data in brackets are calculated values)

1.2 ⁶⁴Cu 标记配体

1.2.1 ⁶⁴Cu 指示剂 20 mg Cu 经 ⁶³Cu(n, γ)⁶⁴Cu 核反应, ⁶³Cu 的反应截面 $\sigma = 4.5 \text{ ycm}^2$, 在中子注量率 $\Phi = 3 \times 10^{13} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$ 的反应堆中照射 48 h, 冷却, 到实验室溶靶标记时, 放射性比活度为 370 GBq/g。小心地将铜片放入一个青霉素小瓶中, 加入 0.2 mL 浓 HNO₃, 在微热条件下, 铜片约 3 min 溶解完毕。用空气赶走绝大部分多余的 HNO₃ 和水, 得到湿润的蓝色 Cu(NO₃)₂ 固体, 冷却, 加入 1.0 mL 蒸馏水即得 ⁶⁴Cu²⁺ 指示剂溶液。在此指示剂中稳定 Cu 为 0.317 mmol, 而放射性 ⁶⁴Cu 为 0.838 mmol, 尽管已接近饱和照射, 但 ⁶⁴Cu 的比活度仍然很低, 载体铜占了绝大部分。

1.2.2 标记 首先将 5 mg 配体加入 5 mL 乙醇中, 加数滴二甲亚砜助溶, 配制成配体的乙醇溶液备用。由于指示剂中载体铜的量太大, 为提高 ⁶⁴Cu 的标记率, 必须尽量增加标记反应体系

中的配体量。但因这些配体在水中的溶解度很小, 即使加入较多量的乙醇助溶, 配体的浓度仍然很低。配体与载体的合适摩尔比为 1 : 2。

2 结果和讨论

2.1 pH 值对标记率的影响

取 6 个青霉素小瓶, 各加入 0.2 mL 乙醇溶液(约含配体 0.7 μmol), 再加适量乙醇, 加入 1 mL 蒸馏水及适量⁶⁴Cu²⁺ 示踪液(含载体 Cu²⁺ 和⁶⁴Cu²⁺ 共 1.4 μmol), 分别迅速用 0.1 mol/L HCl 和 3.0 mol/L NaAc 溶液调 pH 至 2, 3, 4, 5, 6, 7, 在室温(16.5 °C)下反应 3~5 min, 加入等体积的二氯甲烷, 振荡, 静置, 用阱型 γ 探测器分别测量有机相和水相的放射性计数率, 计算标记率。实验结果示于图 2。由图 2 可知: 标记率随 pH 值升高而增大。在 pH = 4~6 时, 标记率达到 50%。因此, 提高 pH 值, 有利于标记反应进行。但 pH = 7 时, 标记反应体系出现混浊。因此, 只要标记液 pH 值不小于 4, ⁶⁴Cu²⁺ 就很容易和配体配合。

采取类似的方法, 在 pH = 5~6 时, 观察标记反应时间、温度对标记率的影响。结果表明: 10~70 min 标记反应 3 min 以上, 标记率均在 50% 左右。

综上所述, 示踪剂中绝大部分是稳定 Cu, 若用⁶²Zn-⁶²Cu 发生器生产的无载体的⁶²Cu, 则 3.7 GBq ⁶²Cu (5.1 pmol) 标记 0.01 mg (33 nmol) 配体, 由于配体量远大于⁶²Cu 的量, 则⁶²Cu-丙酮醛双缩氨基硫脲配合物的标记率理论上可达 99% 以上。

2.2 分配系数的测定

⁶⁴Cu 标记配体的脂溶性是脑摄取的一个重要参数。待标记反应达平衡后, 用二氯甲烷萃取⁶⁴Cu 标记配体, 蒸去二氯甲烷, 按原标记体系中水、乙醇、二甲亚砜的比例与 pH 值, 配制成⁶⁴Cu 标记配体的配合物溶液。取 0.1 mL 溶液加到含 4.0 mL 正辛醇和 4.0 mL 蒸馏水的小玻璃瓶中振荡 15 min, 静置 40 min 后, 分别取有机相和水相测量放射性计数率, 计算分配系数。结果列入表 2。从表 2 看出, ⁶⁴Cu-PTSE 和⁶⁴Cu-PTSP 均具有较好的脂溶性。

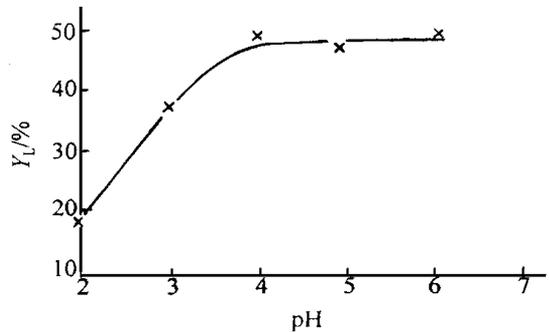


图 2 标记率-pH 关系曲线

Fig 2 The relation between labelling yield and pH

表 2 配合物的分配系数

Table 2 The distribution coefficients of complexes

| 配合物 (Complexes) | D | lgD |
|-----------------------|-------|------|
| ⁶⁴ Cu-PTSE | 15.80 | 1.20 |
| ⁶⁴ Cu-PTSP | 16.12 | 1.21 |

2.3 ⁶⁴Cu 标记配体配合物的生物分布

待标记反应平衡后, 用二氯甲烷萃取⁶⁴Cu 标记配体的配合物, 蒸去二氯甲烷, 用含少量助

溶剂的乙醇水溶液溶解备用。取 18~ 22 g 昆明种小白鼠, 每只尾静脉注射 0.1 mL 配合物溶液 (放射性活度为 0.74 MBq), 每一时相 4 只, 分别于注射后 5、10、20 min 断头处死。取其血、心、脑、肝、肺、肾、肌肉等组织, 称重并测量放射性计数率, 计算每克组织摄取注入量的百分数 ($\% \cdot g^{-1}$)。 ^{64}Cu -PTSE 在正常小鼠体内的生物分布和脏器/血摄取比值列入表 3。由表 3 可知: ^{64}Cu -PTSE 在小鼠脑内有一定的摄取和滞留, 且随时间延长脑/血摄取比值增大。心肌内有一定摄取, 肝、肺摄取高。

表 3 ^{64}Cu -PTSE 在正常小鼠体内的生物分布及脏器/血比值
Table 3 Biodistribution and tissue/blood ratios of ^{64}Cu -PTSE in mice $\% \cdot g^{-1}$

| | t/min | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 5 | 10 | 20 |
| 血(Blood) | 6.00 ± 0.41 | 3.26 ± 0.63 | 2.06 ± 0.07 |
| 心(Heart) | 15.40 ± 1.50 | 9.06 ± 1.55 | 8.57 ± 0.34 |
| 脑(Brain) | 7.9 ± 0.36 | 4.9 ± 0.63 | 4.30 ± 0.49 |
| 肝(Liver) | 24.12 ± 0.20 | 17.63 ± 0.24 | 19.59 ± 0.23 |
| 肺(Lungs) | 52.81 ± 0.14 | 58.06 ± 0.13 | 41.26 ± 0.16 |
| 肾(Kidney) | 11.25 ± 0.30 | 7.45 ± 0.37 | 7.81 ± 0.36 |
| 肌肉(Muscle) | 3.45 ± 0.54 | 2.14 ± 0.41 | 1.44 ± 0.83 |
| 心/血(Heart/Blood) | 2.57 | 2.78 | 4.16 |
| 脑/血(Brain/Blood) | 1.32 | 1.50 | 2.09 |
| 肝/血(Liver/Blood) | 4.02 | 5.41 | 9.51 |
| 肺/血(Lungs/Blood) | 8.80 | 17.81 | 20.03 |
| 肾/血(Kidney/Blood) | 1.88 | 2.29 | 3.79 |
| 肌肉/血(Muscle/Blood) | 0.58 | 0.66 | 0.70 |

注: 脏器/血比值即每克脏器中放射性计数率/每克血中放射性计数率(Tissue/Blood ratios: Counts of tissue per gram/Counts of blood per gram)

表 4 ^{64}Cu -PTSP 在正常小鼠体内的生物分布及脏器/血摄取比值
Table 4 Biodistribution and tissue/blood ratios of ^{64}Cu -PTSP in mice $\% \cdot g^{-1}$

| | t/min | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 5 | 10 | 20 |
| 血(Blood) | 2.25 ± 0.15 | 2.35 ± 0.15 | 2.05 ± 0.07 |
| 心(Heart) | 5.99 ± 0.96 | 8.48 ± 0.58 | 7.82 ± 0.61 |
| 脑(Brain) | 4.26 ± 0.32 | 5.0 ± 0.56 | 5.31 ± 0.23 |
| 肝(Liver) | 24.76 ± 4.90 | 33.50 ± 6.50 | 38.79 ± 0.62 |
| 肺(Lungs) | 42.61 ± 0.16 | 39.56 ± 0.16 | 22.82 ± 3.82 |
| 肾(Kidney) | 6.75 ± 0.33 | 6.66 ± 0.71 | 8.10 ± 0.86 |
| 肌肉(Muscle) | 2.11 ± 0.25 | 2.08 ± 0.38 | 1.37 ± 0.30 |
| 心/血(Heart/Blood) | 2.66 | 3.61 | 3.81 |
| 脑/血(Brain/Blood) | 1.89 | 2.13 | 2.59 |
| 肝/血(Liver/Blood) | 11.00 | 14.26 | 18.92 |
| 肺/血(Lungs/Blood) | 18.94 | 16.83 | 11.13 |
| 肾/血(Kidney/Blood) | 3.00 | 2.83 | 3.95 |
| 肌肉/血(Muscle/Blood) | 0.94 | 0.89 | 0.64 |

⁶⁴Cu-PTSP 在正常小鼠体内的生物分布和脏器/血摄取比值列入表 4。由表 4 可知: ⁶⁴Cu-PTSP 在小鼠脑内有一定的摄取和滞留, 且随时间延长摄取值增加, 脑/血摄取比值随时间延长也增大。心肌内有一定摄取, 肝、肺摄取较多。

表 5 ⁶⁴Cu-PTSB 在正常小鼠体内的生物分布及脏器/血摄取比值
Table 5 Biodistribution and tissue/blood ratios of ⁶⁴Cu-PTSB in mice % · g⁻¹

| | t/min | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 5 | 10 | 20 |
| 血(B bod) | 2.22 ± 0.67 | 2.07 ± 0.70 | 2.48 ± 0.09 |
| 心(Heart) | 6.77 ± 0.46 | 5.42 ± 0.43 | 6.55 ± 0.49 |
| 脑(Brain) | 4.10 ± 0.24 | 2.96 ± 0.58 | 3.49 ± 0.46 |
| 肝(Liver) | 45.10 ± 3.97 | 30.52 ± 7.90 | 66.87 ± 2.85 |
| 肺(Lungs) | 35.45 ± 4.40 | 41.81 ± 9.60 | 40.08 ± 5.21 |
| 肾(Kidney) | 6.89 ± 0.38 | 5.26 ± 0.44 | 8.62 ± 1.05 |
| 肌肉(Muscle) | 2.16 ± 0.68 | 2.08 ± 0.69 | 2.32 ± 0.13 |
| 心/血(Heart/B bod) | 3.05 | 2.62 | 2.64 |
| 脑/血(Brain/B bod) | 1.85 | 1.43 | 1.41 |
| 肝/血(Liver/B bod) | 20.32 | 14.74 | 26.96 |
| 肺/血(Lungs/B bod) | 15.97 | 20.20 | 16.16 |
| 肾/血(Kidney/B bod) | 3.10 | 2.54 | 3.48 |
| 肌肉/血(Muscle/B bod) | 0.97 | 1.00 | 0.94 |

⁶⁴Cu-PTSB 在正常小鼠体内的生物分布和脏器/血摄取率比值列入表 5。由表 5 可知, ⁶⁴Cu-PTSB 在正常小鼠脑内有一定的摄取和滞留, 在心肌内有一定摄取, 肝、肺摄取率较大。

⁶⁴Cu-PTSE、⁶⁴Cu-PTSP、⁶⁴Cu-PTSB 在小鼠体内脑/血摄取率比值与时间的关系曲线示于图 3。由图 3 可知, ⁶⁴Cu-PTSP 和 ⁶⁴Cu-PTSE 的摄取比值随时间延长而增大, 且 ⁶⁴Cu-PTSP 的脑血摄取比值相对较大。

⁶⁴Cu-PTSB 的脑/血摄取率比值变化规律与 ⁶⁴Cu-PTSP 和 ⁶⁴Cu-PTSE 的不同, ⁶⁴Cu-PTSB 的脂溶性应更强, 但脑/血摄取率比值随时间延长而减小, 这可能是由于碳链增长导致空间位阻加大, 使脑内多肽上的巯基不易进攻, 将其脂溶性增加的优势抵消所致。

3 结 论

室温下, 丙酮醛双缩氨基硫脲类配体和 Cu²⁺ 的标记反应在 3 min 内可达到平衡, 可见它们有很强的结合能力, 生成的配合物为零电

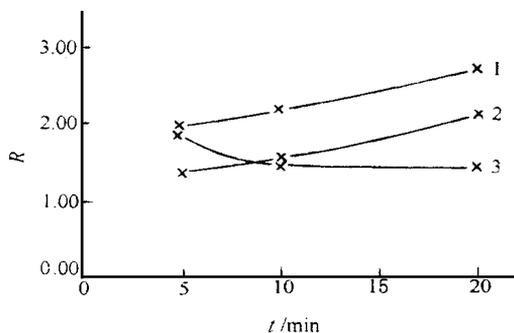


图 3 ⁶⁴Cu-PTSP, ⁶⁴Cu-PTSE, ⁶⁴Cu-PTSB 在小鼠体内的脑/血摄取率比值(R)与时间关系

Fig 3 Relation between time and brain/blood ratios(R) of ⁶⁴Cu-PTSP, ⁶⁴Cu-PTSE and ⁶⁴Cu-PTSB in mice
1——⁶⁴Cu-PTSP, 2——⁶⁴Cu-PTSE,
3——⁶⁴Cu-PTSB

荷。当配体与载体 Cu 摩尔比为 1 : 2 时, 其标记率可达 50%。由此可推断, 用无载体的⁶²Cu 标记, 其标记率将达 99% 以上。

⁶⁴Cu-PTSE, ⁶⁴Cu-PTSP, ⁶⁴Cu-PTSB 都具有一定的脑摄取和滞留, 表明这三个配合物都可以穿透小鼠的血脑屏障进入脑内。尤其是⁶⁴Cu-PTSP 的脑/血摄取比值随时间的延长而增大, ⁶²Cu-PTSP 是否有可能成为一个新的放射性药物并应用于脑显像, 还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Pastakia B, Lieberman LM, Gatley SJ, et al Tissue Distribution of Copper-Labeled 3-Ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(Thiosemicarbazone) (Cu-64 KTS) in Mice and Rats Concise Communication J Nucl Med, 1980, 21: 67~ 70
- 2 Hosotani T, Yokoyama A, Arano Y, et al In the Procurement of a Neutral and Compact Monomeric Complex of Dithiosemicarbazone(DTS) Derivative Tc-99m. Int J Nucl Med Biol, 1986, 12(6): 431~ 437
- 3 Green MA, Klippenstein DL, Tennison JR. Copper-Bis(thiosemicarbazone) Complexes as Potential Tracers for Evaluation of Cerebral and Myocardial Blood Flow With PET. J Nucl Med, 1988, 29(9): 1549~ 1557
- 4 Matsumoto K, Fujibayashi Y, Arano Y, et al Cu-62-Labeled Bifunctional Radiopharmaceuticals With Metabolizable Ester Groups Nucl Med Biol, 1992, 19(1): 33~ 38
- 5 Arano Y, Magata Y, Horiuchi K, et al Design, Synthesis and Cu-64 Labeling of Fatty Acid Analogs Containing Dithiosemicarbazone Chelate Int J Radiat Isot, 1989, 40(9): 745~ 749

INVESTIGATION OF SOME NOVEL LIGANDS OF PYRUVALDEHYDE BIS(THIOSEMICARBAZONE) AS PET RADIOPHARMACEUTICALS

Liu Meng

(Department of Chemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054)

Liu Zhenghao

(Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875)

ABSTRACT

Three novel ligands of pyruvaldehyde bis(thiosemicarbazone) have been synthesized. These ligands are labeled with ⁶⁴Cu. The factors that affect labeling yield are also investigated. The biodistributions of three ⁶⁴Cu ligand complexes in mice are determined. The higher brain uptake with a prolonged retention time is found in case of ⁶⁴Cu-PTSP. The results suggested that ⁶²Cu-PTSP may be used as a PET tracer for cerebral perfusion and it needs more research.

Key words Pyruvaldehyde-bis(thiosemicarbazone) ligand Brain uptake
Biodistribution