

文章编号:0253-9950(2009)03-0152-05

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ 核心标记的邻二氮杂菲类化合物的理化性质和生物分布

杨 洋, 韩美娇, 王科志, 朱 霖*

教育部放射性药物重点实验室, 北京师范大学 化学学院, 北京 100875

摘要: 确定化合物可以通过血脑屏障进入脑中并迅速从脑中清除, 是判断药物能否作为阿尔茨海默病显像剂的首要条件。为发展 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的阿尔茨海默病早期显像诊断药物, 在前期研究与 DNA 分子结合的荧光探针钌金属配合物的基础上, 设计合成了 2 个邻二氮杂菲类配体 2-(9-蒽基)-1 氢-咪唑[4, 5-f][1, 10]邻菲咯啉(2-(9-anthryl)-1H-imidazo[4, 5-f][1, 10]phenanthroline, aip) 和 2-(9-蒽基)-1 乙基-咪唑[4, 5-f][1, 10]邻菲咯啉(2-(9-anthryl)-1ethyl-imidazo[4, 5-f][1, 10]phenanthroline, aeip), 并与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ 进行标记。采用 R-HPLC、纸电泳等方法研究标记产物的理化性质。正常小鼠体内生物分布研究表明, 2 种化合物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aip 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aeip 均有一定的脑初始摄取, 注射后 2 min, 前者为 $(1.028 \pm 0.096)\% \text{ID/g}$; 后者为 $(1.191 \pm 0.197)\% \text{ID/g}$, 因此标记物具有进一步研究的价值。

关键词: 阿尔茨海默病; 羰基钨; 邻二氮杂菲; 脑摄取

中图分类号: R817 **文献标志码:** A

Preparation and Evaluation of New $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+$ -Labelled Phenanthroline Complexes

YANG Yang, HAN Mei-jiao, WANG Ke-zhi, ZHU Lin*

Key Laboratory of Radiopharmaceuticals, Ministry of Education,
College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: The chief requirement to determine if pharmaceuticals may be AD-tracer is that complexes can pass through BBB to enter the brain and have rapid clean from the brain. To develop early diagnose radiopharmaceuticals for Alzheimer's disease, new phenanthroline complexes 2-(9-anthryl)-1H-imidazo[4, 5-f][1, 10]phenanthroline (aip) and 2-(9-anthryl)-1ethyl-imidazo[4, 5-f][1, 10]phenanthroline (aeip) based on the early research of Ru complexes banding to DNA used for fluorescence method were synthesized and labelled by $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -tricarbonyl core. Radiochemical purities of complexes $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aip and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aeip were found to be more than 95% as proved by radio-HPLC. Paper electrophoresis show that these complexes are neutral. Biodistribution of these complexes in mice shows the higher early uptakes in brain (2 min, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aip: $(1.028 \pm 0.096)\% \text{ID/g}$; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ -aeip: $(1.191 \pm 0.197)\% \text{ID/g}$).

Key words: Alzheimer's disease; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$; phenanthroline; uptakes in brain

收稿日期: 2008-02-24; 修订日期: 2008-10-08

基金项目: 国家“973”项目(2006CB500705); 国家自然科学基金资助项目(20371008, 90401007)

作者简介: 杨 洋(1982—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 放射性药物专业

* 通讯联系人: 朱 霖, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 放射性药物专业, E-mail: zhulin@bnu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆症,是由于大脑细胞退化而导致思维能力逐渐丧失的一种疾病。其病理特征是脑组织中出现大量的老年斑(SP)和神经原纤维缠结(NFT)。SP由 β -淀粉样蛋白(A β)构成,A β 作为其有效的生物化学标志物,研制与A β 有亲和力的放射性显像剂,可对AD进行早期诊断^[1]。

到目前为止,尸检仍是诊断AD的唯一可靠标准。它是利用硫磺素-T、刚果红等染料对病人脑组织中的老年斑进行染色,在显微镜下观测,根据其数量多少来诊断^[2]。虽然还没有一个可靠的用于AD早期诊断的方法,但已发现一些化合物与A β 有较高亲和力,例如FDDNP,IBOX,TZDM,6-OH-BTA-1,SB-13,IMPY等^[3-5]。 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的可与A β 斑块有特异性结合的SPECT显像剂报道很少,目前研究较成功的是以 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的联苯类化合物,其脑初始摄取相对较高(2 min: 1.18% ID/g),清除较快,且在转基因老鼠AD脑切片中的放射性自显影中可清楚发现,它与老年斑有明显的结合^[6]。

从AD诊断药物的相关报道可以发现,与A β 斑块具有特异性结合的分子设计原则是:(1)这些探针应包含简单的二苯乙烯结构;(2)一个苯环上含有给电子基团如p-Me₂N-,MeO-或HO-等;(3)另一苯环具有较大的可修饰性,可用于放射性核素的标记,而不影响其亲和力^[1];(4)标记产物要有适当的脂溶性^[7],在脑中的初始摄取高,且清除较快;(5)原料价格适中。为探索新的A β 斑块显像剂的先导化合物,本工作拟在前期研究新核心标记药物 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_2(\text{NO})^{2+}$ 的基础上^[8],合成配体2-(9-蒽基)-1H-咪唑[4,5-f][1,10]邻菲咯啉(2-(9-anthryl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline, aip)和2-(9-蒽基)-1乙基-咪唑[4,5-f][1,10]邻菲咯啉(2-(9-anthryl)-1ethyl-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline, aeip),并分别通过 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3^+$ 核心进行标记,用R-HPLC、纸电泳等方法研究标记产物的理化性质以及生物分布,探索此类配合物是否可以作为AD显像药物。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

260-50型红外光谱仪,日本Hitachi公司;Advance 500 MHz超导核磁共振仪,瑞士Bruker

公司;Trace质谱仪,美国Finigan公司;HPLC,日本岛津公司;Vario EL元素分析仪,德国Elementar公司。

蒽-9-甲醛(anthracene-9-carbaldehyde),1,10-邻菲咯啉-5,6-二酮(1,10-phenanthroline-5,6-dione),NaH,美国Sigma公司产品;其它试剂为北京化学试剂公司产品。

1.2 实验条件

HPLC分析系统:色谱柱为C-18反向柱,洗脱梯度:溶液A是含0.1%TFA的水;溶液B是含0.1%TFA的乙腈。方法是:0—20 min,100%A—100%B;20—25 min,100%B;流速0.9 mL/min。

1.3 配体的合成

配体aip和aeip的合成路线示于图1。配体aip的合成参照文献^[9],aeip的合成是把aip乙基化。

1.4 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3^+$ 的放射性标记

1.4.1 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ 中间体的制备 按文献^[10]方法,将20 mg硼氢化钠,4 mg碳酸钠,15 mg酒石酸钾钠装入一个西林瓶中,密封后通入CO气体30 min,将瓶中空气排净,压好铝盖备用。用注射器向制备好的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3$ 中间体药盒中加入新淋洗的高锝酸钠溶液(1 mL,约27 MBq)。100℃水浴反应10 min,冷却至室温,用0.1 mol/L HCl调节pH=7,备用。

1.4.2 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3^+$ -aip/aeip的制备 分别配制pH=1的aip/aeip(1 mmol/L)溶液,移取0.5 mL配体溶液分别放入2个西林瓶中,再分别加入0.1 mL上述制备的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ 中间体溶液,再用0.1 mol/L NaOH溶液调节溶液的pH=7,室温下放置30 min。

1.4.3 标记率的测定 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ 中间体和 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3^+$ -aip/aeip配合物的标记率测定均采用HPLC分析方法。

1.4.4 配合物电荷的测定 将纯化纯大于95%的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{CO})_3^+$ -aip/aeip配合物溶液点样于新华一号滤纸,置于0.06 mol/L磷酸盐(PBS)缓冲溶液(pH=7.4)中展开。电泳电压为150 V,电场强度为20 V/cm,展开时间为4 h。测定各标记化合物的放射性分布,分别计算移向正极、负极及滞留原点组分的相对百分比(表1)。

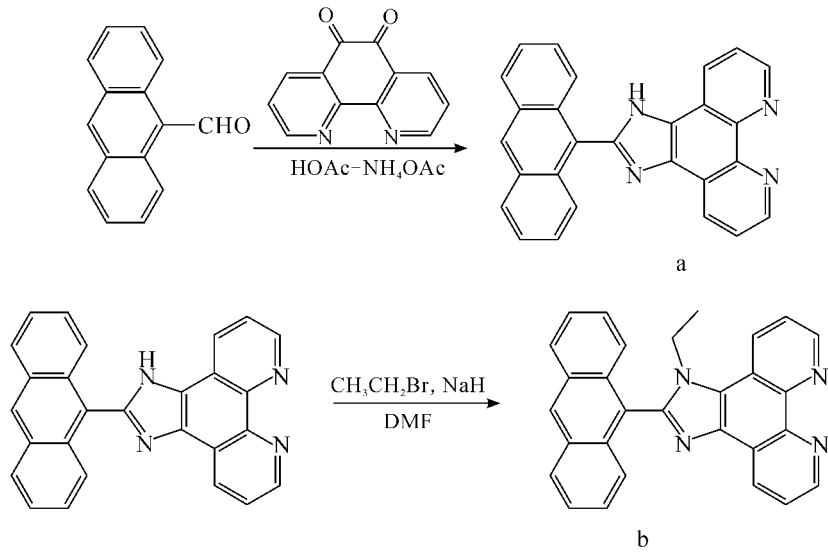


图 1 aip(a)和 aeip(b)的合成
Fig. 1 Synthesis of aip(a) and aeip(b)

表 1 配合物电荷分布

Table 1 Charge distribution of two complexes

配合物 (Complexes)	阴极 (Cathode)	原点 (Origin)	阳极 (Anode)
[⁹⁹ Tc ^m (CO) ₃] ⁺ -aip	2%	97%	1%
[⁹⁹ Tc ^m (CO) ₃] ⁺ -aeip	3%	95%	2%

1.4.5 配合物脂水分配系数的测定 将0.1 mL ⁹⁹Tc^m(CO)₃⁺-L (L = aip, aeip) 溶液加入到含有 2 mL正辛醇与 1.9 mL PBS 缓冲溶液(pH=7.4) 的离心试管中,充分混合后离心分层,分别取等体积的有机相和水相溶液测定其放射性计数,由有机相和水相计数比的对数计算⁹⁹Tc^m(CO)₃⁺-L 的脂水分配系数。

1.4.6 配合物的生物分布研究 取 18~22 g 雌性昆明小鼠 15 只,尾静脉注射 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 溶液 0.1 mL(约 700 MBq/L),分别于注射后 2, 15, 30, 60, 120 min 将其断颈处死,取心、肝、脾、肺、肾、肌肉、骨组织、脑、血液,称重并测定放射性计数,计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g)。

2 结果和讨论

2.1 配体 aip 和 aeip 的有机合成

没有对合成的 aip 进行结构表征,但对形成的配合物[(bpy)₂Ru(aip)](ClO₄)₂·H₂O 进行

了结构表征^[9],证明了 aip 的结构。

aeip 的元素分析结果如下(%): C, 81.41; H, 4.544; N, 12.80。C₂₉H₂₀N₄·0.25H₂O 计算结果(%): C, 81.25; H, 4.817; N, 13.06。¹H NMR(500 Hz, DMSO-d₆): 9.13 (m, 2H); 8.93 (m, 3H); 8.29 (d, 2H); 7.84 (m, 2H); 7.62 (t, 2H); 7.51 (m, 4H); 4.31 (m, 2H); 1.18 (t, 3H)。熔点:238~240 ℃。

2.2 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-L 的标记及理化性质研究

2.2.1 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺中间体的 HPLC 分析 按照文献[8]方法制备的 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺中间体的放化纯大于 99%,而且具有较好的稳定性。

2.2.2 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 配合物的 HPLC 分析 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 配合物的 HPLC 分析结果示于图 2。室温下中性溶液中,配体 aip 和 aeip 易与 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺中间体进行标记,标记率大于 95%。HPLC 图谱: [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 的保留时间分别为 14.20 min和 13.90 min。图 2 中保留时间为 17.2 min和 21.20 min 的峰均为杂质峰。

2.2.3 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 电荷的测定 分别将放化纯大于 95%的 [⁹⁹Tc^m(CO)₃]⁺-aip/aeip 配合物溶液点样于新华一号滤纸,置于 0.06 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中展开。电泳电压为 150 V,电场强度为 20 V/cm,展开时

间为 2 h,测定标记化合物的放射性分布,分别计算移向正极、负极及滞留原点组分的相对百分比。结果证明, $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}/\text{aeip}$ 均为电中性(表 1),这是化合物进脑的前提。推测 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}/\text{aeip}$ 为电中性可能是因为溶液中的氯离子配位 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+$ 核心得到零电荷的 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3(\text{Cl})]-\text{aip}/\text{aeip}$ 配合物。

2.2.4 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}/\text{aeip}$ 的脂水分配系数的测定 分别取等体积的有机相和水相溶液测定放射性计数,计算 pH=7.4 时 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{L}$ 的脂水分配系数(lg P),结果为: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aip}$ 的 lg P=−0.503; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aeip}$ 的 lg P=−0.171。

2.3 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}/\text{aeip}$ 的小鼠体内生物分布

$[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}$ 和 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aeip}$ 在小鼠体内的生物分布实验结果分别列入表 2 和

表 3。这些结果表明,2 个标记化合物在小鼠脑中有一定的初始摄取,2 h 内在脑中的清除较快,在其它组织中有相似的摄取和清除。配合物 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aeip}$ 在脑中的初始摄取(2 min, $(1.191\pm0.197)\% \text{ID/g}$)稍大于 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}$ (2 min, $(1.028\pm0.096)\% \text{ID/g}$),可能是因为前者比后者多一个乙基,使配合物脂溶性增大,进脑量略有提高。2 种化合物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aip}$ 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aeip}$ 与文献[6]报道的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{V})\text{O}$ 核心标记化合物(2 min, $1.18\% \text{ID/g}$)相比有相当的初始脑摄取(2 min, $(1.028\pm0.096)\% \text{ID/g}$ ($^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aip}$)和 $(1.191\pm0.197)\% \text{ID/g}$ ($^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+-\text{aeip}$)),这表明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ 核心标记的 aip 和 aeip 可以通过 BBB,且 120 min 内在脑组织中的清除也较快,但在血液、肝脏、肾、骨、肺等组织中的清除较慢,且代谢途径尚不清楚。

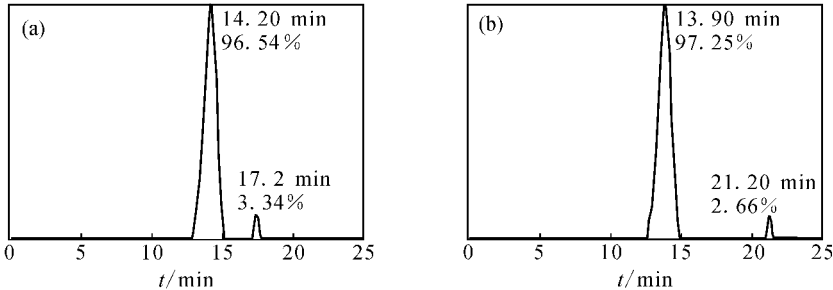


图 2 配合物 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}(\text{a})/\text{aeip}(\text{b})$ 的 HPLC 分析
Fig.2 HPLC analysis of $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}(\text{a})/\text{aeip}(\text{b})$ complexes

表 2 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}$ 在小鼠体内的分布
Table 2 Biodistribution of $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+-\text{aip}$ 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)				
	2 min	15 min	30 min	60 min	120 min
脑(Brain)	1.028±0.096	0.650±0.048	0.687±0.038	0.614±0.050	0.497±0.157
血(Blood)	18.148±1.142	15.303±1.609	14.312±1.520	11.842±0.567	10.253±1.138
心(Heart)	8.651±0.815	5.534±0.393	5.506±0.097	3.990±1.136	2.871±0.320
肝(Liver)	15.510±3.147	18.755±0.695	18.074±1.642	18.537±0.405	15.055±1.666
脾(Spleen)	6.600±0.763	5.645±0.606	6.339±0.420	7.860±1.520	5.936±1.675
肺(Lung)	21.909±2.489	15.290±2.150	15.881±1.583	12.955±0.965	11.019±1.156
肾(Kidney)	28.155±1.539	26.962±1.281	23.515±1.456	21.929±2.175	18.544±2.326
肌肉(Muscle)	3.176±0.470	2.133±0.382	2.638±0.304	2.445±0.430	1.758±0.508
骨组织(Bone)	5.815±0.824	4.233±1.487	4.847±0.646	3.867±0.593	4.266±0.585

注(Note): n=3

表 3 $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+ \text{-aeip}$ 在小鼠体内的分布
Table 3 Biodistribution of $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+ \text{-aeip}$ 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)				
	2 min	15 min	30 min	60 min	120 min
脑 (Brain)	1.191±0.197	0.588±0.084	0.691±0.134	0.472±0.016	0.470±0.143
血 (Blood)	16.033±2.639	11.202±1.125	11.619±0.920	8.532±0.131	8.821±1.293
心 (Heart)	6.582±0.284	4.666±0.342	5.220±1.215	3.844±0.147	4.805±0.384
肝 (Liver)	16.816±1.753	21.058±1.466	21.640±1.129	18.571±2.122	22.203±0.530
脾 (Spleen)	13.959±1.503	17.272±3.257	12.831±3.165	10.818±0.617	10.681±1.378
肺 (Lung)	26.518±1.434	18.913±1.813	16.288±3.066	13.595±1.010	12.844±3.061
肾 (Kidney)	19.733±1.932	18.373±4.908	18.254±4.281	15.929±1.288	16.876±1.204
肌肉 (Muscle)	2.702±0.249	2.413±0.766	2.165±0.605	1.701±0.181	2.457±0.434
骨组织 (Bone)	5.247±0.772	4.060±0.266	3.487±0.668	2.827±0.599	3.775±0.703

注 (Note): $n=3$

3 结 论

本工作合成了 2 个邻二氮杂菲类配体, 化学合成方便, 通过 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ 核心进行标记, 标记产率较高 (大于 95%)。研究了 $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+ \text{-aeip}$ 和 $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3]^+ \text{-aeip}$ 在小鼠体内的生物分布, 正常小鼠脑内的摄取和代谢情况表明, 本研究作为发展 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3^+$ 核心标记的 AD 早期诊断药物提供了新的设计思路。 $\text{Re}(\text{CO})_3^+ \text{-aip}$ 和 $\text{Re}(\text{CO})_3^+ \text{-aeip}$ 配合物的制备、结构确定以及和 $\text{A}\beta$ 斑块结合的评价正在进行中。

参考文献:

[1] 王武尚, 张锦明, 刘伯里. AD 脑 $\text{A}\beta$ 放射性显像剂的研究进展[J]. 同位素, 2004, 17(4): 232-240.

[2] Wengenack T M, Curran G L, Poduslo J F. Targeting Alzheimer's Amyloid Plaques *in Vivo*[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(8): 868-872.

[3] Hiroshi Shimadzu, Takahiro Suemoto, Masako Suzuki, et al. A Novel Probe for Imaging Amyloid- β : Synthesis of F-18 Labelled BF-108, an Acridine Orange Analog [J]. J Label Compd Radiopharm, 2003, 46: 765-772.

[4] Lee Chi-Wan, Kung Mei-Ping, Hou Catherine, et al. Dimethylamino-Fluorenes: Ligands for Detecting β -Amyloid Plaques in the Brain[J]. Nucl Med

Biol, 2003, 30: 573-580.

[5] Masahiro O, Haratake M, Nakayama M, et al. Synthesis and Biological Evaluation of (E)-3-Styrylpyridine Derivatives as Amyloid Imaging Agents for Alzheimer's Disease[J]. Nucl Med Biol, 2005, 32: 329-335.

[6] Zhuang Zhi-Ping, Kung Mei-Ping, Hou Catherine, et al. Biphenyls Labeled With Technetium 99m for Imaging β -Amyloid Plaques in the Brain[J]. Nucl Med Biol, 2005, 32: 171-184.

[7] Zhang Wei, Oya Shunichi, Kung Mei-Ping, et al. F-18 Polyethyleneglycol Stilbenes as PET Imaging Agents Targeting $\text{A}\beta$ Aggregates in the Brain[J]. Nucl Med Biol, 2005, 32: 799-809.

[8] Yang Y, Zhang J X, Wang J J, et al. Two Novel Procedures of Preparation for $[\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{NO})]^{2+}$ Labeled by EHIDA and Its Biodistribution[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2007, 273(1): 31-36.

[9] Han Mei-Jiao, Gao Li-Hua, Wang Ke-Zhi. Ruthenium(II) Complex of 2-(9-Anthryl)-1H-Imidazo [4, 5-F][1, 10]Phenanthroline: Synthesis, Spectrophotometric pH Titrations and DNA Interaction[J]. New J Chem, 2006, 30: 208-214.

[10] 张小波, 朱 霖, 赵学颖, 等. $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记的新双功能联接剂的研究[J]. 核化学与放射化学, 2004, 26(1): 11-18.