用于肿瘤显像的 ^{99m}Tc 标记葡萄糖衍生物的合成与生物评价

李一林, 张旭冉, 张俊波*

北京师范大学化学学院, 放射性药物教育部重点实验室, 北京 100875

*通讯作者, E-mail: zhjunbo@bnu.edu.cn

收稿日期: 2021-12-29; 接受日期: 2022-02-09; 网络版发表日期: 2022-02-17

国家自然科学基金(编号: 21771023, 22076013)和北京市科技重大专项(编号: Z181100002218033)资助项目

摘要 研制性能良好、制备简便且价格低廉的新型肿瘤SPECT显像剂是国际放射性药物领域的重点前沿课题。 ^{99m}Tc 是临床应用最多的SPECT核素。为了研制新型 ^{99m}Tc 标记的肿瘤放射性药物, 本研究合成了一种含异腈的葡萄糖衍生物(CN6DG), 并将其用 ^{99m}Tc 标记得到放射化学纯度大于95%的 ^{99m}Tc -CN6DG配合物。该配合物为水溶性物质($\log D$ 为 -2.52 ± 0.33)且具有良好的体内外稳定性。体外细胞摄取实验结果表明其进入肿瘤细胞与葡萄糖转运体相关。其在S180荷瘤小鼠中注射2 h后肿瘤摄取值为 0.75 ± 0.12 %ID/g, 肿瘤/肌肉和肿瘤/血液的比值分别为4.41, 18.75。在A549荷瘤小鼠中注射2 h后肿瘤摄取值为 2.62 ± 0.23 %ID/g, 优于 ^{99m}Tc -CN5DG (1.48 ± 0.23 %ID/g), 肿瘤/血液比值 (52.4 vs. 49.33)和肿瘤/肌肉比值 (6.89 vs. 24.67)具有和 ^{99m}Tc -CN5DG同样优良的结果。在S180和A549荷瘤鼠的SPECT/CT显像结果显示其在这两种肿瘤中均有明显的浓聚, 有望发展成为新型肿瘤显像剂。

关键词 肿瘤, 葡萄糖, ^{99m}Tc , 异腈, SPECT

1 引言

癌症严重威胁着人类的生命, 已成为21世纪导致人类死亡的重要因素之一。癌症的早发现、早治疗成为迫切需要解决的问题^[1]。

核医学显像是一种非侵入性的分子显像技术, 能从分子水平上反映人体组织的生理、病理、生化代谢改变, 具有快速、简便、无创、特异性强、灵敏度高等特点, 越来越受到人们的关注。核医学显像技术主要包括正电子发射计算机断层扫描技术(PET)和单光子发射计算机断层扫描技术(SPECT)。其中用于

SPECT的 ^{99m}Tc 具有半衰期适宜 (6.02 h)、能量适宜 (140 keV)、制备方便 (^{99}Mo - ^{99m}Tc 发生器)等优点, 同时 ^{99m}Tc 标记药物可通过药盒化制备, 而且 SPECT仪器数量多且诊断费用低廉, 因此 ^{99m}Tc 标记药物在临床上具有巨大的市场应用前景^[2]。

由于肿瘤细胞内糖酵解增加, 相比正常细胞会摄取更多的葡萄糖^[3], 因此可以将葡萄糖衍生物作为靶向分子, 将其与放射性核素相连接后, 从而在体内能够显示病灶所在位置。目前临床用于肿瘤诊断的显像剂为 ^{18}F -氟代脱氧葡萄糖(简称为 ^{18}F -FDG), 但 ^{18}F 需要加速器制备且PET显像价格昂贵, 另外存在假阳性等

引用格式: Li Y, Zhang X, Zhang J. Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc -labeled glucose derivative for tumor imaging. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 963–971, doi: 10.1360/SSC-2021-0264

不足^[4-7]。就^{99m}Tc标记的葡萄糖类肿瘤显像剂的研究而言, 目前大多数尚处于实验室研究阶段, 尚无批准上市的该类肿瘤显像剂^[5-16]。其中研究较为成熟的^{99m}Tc-ethylenedicycysteine-deoxyglucose (简称^{99m}Tc-ECDG)进入三期临床研究阶段, 且肿瘤摄取值和肿瘤/血液比值有待提高^[17,18]。我们前期报道了^{99m}Tc-CN5DG是较为成功的肿瘤显像剂, 然而其在肿瘤中的摄取值仍低于¹⁸F-FDG^[19,20], 还有待改进。

考虑到在靶向分子(氨基葡萄糖)与螯合基团(异氰基-NC)之间联接剂(linker)的改变可能会影响^{99m}Tc配合物的生物分布性质, 在^{99m}Tc-CN5DG的基础上, 为了探求肿瘤显像效果好的新型肿瘤显像剂, 本研究尝试将氨基葡萄糖与异氰基之间的linker从(-CH₂)₅改变为(-CH₂)₆。合成配体7-异氰基-N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)庚酰胺, 简称为CN6DG, 并用^{99m}Tc标记制备得到^{99m}Tc-CN6DG (图1), 并评估其作为肿瘤显像剂的潜能。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

所有化学试剂均从商业公司采购, 纯度大于95%, 使用时未进一步纯化。化学合成中使用的溶剂为分析纯级, HPLC中使用的溶剂为色谱纯级。CN6DG药盒

在北京师范大学北京师宏药业有限公司(北京, 中国)生产。核磁共振谱在600 MHz的核磁共振谱仪(JEOL)上获得。质谱在AB SCIEX TripleTOF 5600光谱仪(Concord, Canada)上测量。红外光谱使用AVATAR 360 FT-IR光谱仪测量。^{99m}TcO₄是从⁹⁹Mo-^{99m}Tc发生器(北京智博高科生物技术有限公司, 北京, 中国)中以生理盐水为溶剂新鲜洗脱得到。高效液相色谱(HPLC)实验在Waters 600液相色谱仪上进行, 并配备Water 2489 UV/Visible Detector和Raytest Gabi NaI(Tl)放射性检测器。小动物SPECT/CT成像研究使用Triumph SPECT/CT扫描仪(TriFoil Imaging, California, USA)进行。

2.2 实验方法

2.2.1 化学合成

合成路线如图1所示。

7-甲酰胺基庚酸的合成 称取5.00 g的7-氨基庚酸(简记为AHA), 加入14 mL DMF(*N,N*-二甲基甲酰胺), 搅拌下加入2.30 g甲酸液体, 在150℃油浴中加热, 同时冷凝回流并磁力搅拌反应3 h。用二氯甲烷:甲醇=10:1作为展开剂进行TLC检测, 碘熏法显色, 产物的 $R_f=0.6$, 原料的 $R_f=0.0\sim0.1$ 。反应结束后, 冷却至室温, 在4℃冰箱中过夜放置后, 析出白色固体。抽滤后每次用10 mL乙酸乙酯洗涤, 重复洗涤三次。将洗涤好的产物放入真空干燥箱干燥, 得到白色粉末产物7-甲酰胺基

图1 CN6DG合成路线。(a) 甲酸、*N,N*-二甲基甲酰胺; (b) EDCI、2,3,5,6-四氟苯酚、*N,N*-二甲基甲酰胺; (c) 伯吉斯试剂、二氯甲烷; (d) NaOH、甲醇

Figure 1 Synthesis route of CN6DG. (a) Formic acid, *N,N*-dimethylformamide; (b) EDCI, 2,3,5,6-tetrafluorophenol, *N,N*-dimethylformamide; (c) Burgess reagent, dichloromethane; (d) sodium hydroxide, methanol.

庚酸(2, 简记为FAHA), 质量为3.04 g, 产率为51.03%。

7-甲酰胺基庚酸-2,3,5,6-四氟苯酚的合成 将上一步得到的FAHA投入100 mL烧瓶中, 加入25 mL二氯甲烷, 称取2.65 g 的2,3,5,6-四氟苯酚(2,3,5,6-TFP)溶于10 mL二氯甲烷, 在冰水浴下搅拌加入3.69 g碳二亚胺(EDCI), 继续搅拌5~8 h. 乙酸乙酯做展开剂进行TLC反应检测, 在波长为254 nm紫外下可以看到产物的 $R_f=0.5$. 反应结束后用20 mL 5%的碳酸氢钠溶液洗涤混合物, 再用20 mL纯水洗涤两次, 然后加入无水硫酸钠干燥30 min. 抽滤除掉不溶固体, 旋蒸滤液除去溶剂, 称重, 得到白色固体产物7-甲酰胺基庚酸-2,3,5,6-四氟苯酚(3, 简记为FAH-TFP), 质量为4.36 g, 产率为77.23%。

7-异腈基庚酸-2,3,5,6-四氟苯酚的合成 在100 mL圆底烧瓶里投入上一步反应得到的FAH-TFP, 溶于25 mL CH_2Cl_2 , 称取3.57 g伯吉斯试剂, 溶于20 mL二氯甲烷, 用滴液漏斗滴加后, 室温反应6 h, 用乙酸乙酯作为展开剂进行TLC监测, 在波长为254 nm的紫外灯下可以看到产物的 $R_f=0.8$, 原料 $R_f=0.5$. 反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 加入10 mL二氯甲烷, 再加5 mL石油醚, 用石油醚:乙酸乙酯=10:1进行硅胶柱层析分离. 收集产物, 旋蒸除去溶剂, 称重, 得到淡黄色油状液体产物7-异腈基庚酸-2,3,5,6-四氟苯酚(4, 简记为CN6-TFP), 质量为2.92 g, 产率为70.71%。

CN6DG的合成 称取氢氧化钠0.36 g, 加入25 mL甲醇和1.71 g葡萄糖胺盐酸盐, 室温搅拌约1 h. 将上步反应得到的CN6-TFP溶于15 mL甲醇中, 滴入上述溶液, 继续搅拌, 加氮气保护, 过夜反应. 使用二氯甲烷:甲醇=3:1作为展开剂进行TLC监控, 在254 nm的紫外灯下可以看到原料 $R_f=0$, 产物 $R_f=0.5$. 反应基本完全后抽滤, 除去不溶固体, 将滤液进行旋蒸除去溶剂, 加入50 mL乙腈, 在室温下充分搅拌4 h后抽滤, 洗涤得到固体. 再次洗涤加入50 mL乙腈, 室温下充分搅拌3 h后抽滤, 洗涤得到固体, 真空干燥后得到淡黄色粉末产物7-异腈基-*N*-((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2*H*-吡喃-3-基)庚酰胺 (5, 简记为CN6DG), 质量为2.34 g, 该步骤的产率为93.15%, 总产率为25.96%。

2.2.2 配合物的制备及鉴定

将1 mL高锝酸钠淋洗液加入到CN6DG冻干药盒(含1 mg CN6DG配体, 50 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg柠檬酸

钠, 1 mg *L*-半胱氨酸, 5 mg甘露醇, pH值为6), 100℃下水浴加热20 min. 然后进行TLC和HPLC分析. TLC使用醋酸铵溶液(1 M):甲醇=2:1作为展开剂, 在聚酰胺薄片上展开, 使用锝分析仪进行检测放射性计数测定, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG标记物 R_f 在0.7~1.0之间, 而 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 和水解锝的 R_f 值在0.0~0.1之间. HPLC采用含0.1% TFA(三氟乙酸)的水(A)和含0.1%TFA的乙腈(B), 梯度如表1所示。

2.2.3 体外稳定性实验

根据参考文献报道的方法^[19], 进行体外稳定性实验, 并进行HPLC分析. 对 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG在小鼠血清中的稳定性进行研究: 将100 μL 的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记液, 加入到200 μL 小鼠血清中, 然后置于37℃恒温箱中孵育. 2 h和4 h后分别取出100 μL 的小鼠血清孵育液, 加入200 μL 乙腈, 用5000 rpm的离心机离心3 min除去沉淀的蛋白, 用0.22 μm 的滤膜过滤上清液, 将得到的上清液旋蒸除去乙腈, 最后取20 μL 滤液进行HPLC分析。

2.2.4 脂水分配系数实验

测定方法参考文献^[21], 具体如下: 将等体积的磷酸盐缓冲液(简记为PBS, pH=7.4, 0.025 mol/L)和正辛醇充分混匀后静置过夜饱和. 在离心管中加入750 μL 的磷酸盐缓冲液, 再加入50 μL 配合物的标记液, 再加入800 μL 的正辛醇, 使水相与油相体积比为1:1. 室温涡旋3 min使两相充分混合, 然后使用2100 rpm的离心机离心分层3 min. 从两相中各取100 μL 的分配液, 用锝分析仪进行放射性计数的测定。

该温度下的脂水分配系数(D)可按以下公式计算: $D=(\text{正辛醇相中的放射性计数}/\text{磷酸盐缓冲液相中的放射性计数})$. 脂水分配系数的最终结果用 $\log D$ 来表示,

表 1 直接标记的配合物的HPLC淋洗梯度

Table 1 High-performance liquid chromatography (HPLC) elution gradient of directly labeled complexes

t (min)	A相 (含0.1%TFA的水)	B相 (含0.1%TFA的乙腈)
0.01	90%	10%
2.0	90%	10%
10	10%	90%
18	10%	90%
22	90%	10%
30	/	Stop

平行测定三次取平均值。

2.2.5 细胞摄取实验

用S180细胞进行细胞摄取机制研究。将S180细胞分散于无葡萄糖的DMEM培养基(6×10^6 cells/mL)中, 并加入24孔板中(每孔加入0.5 mL)。设置一组对照组和两组实验组。对照组加入480 kBq的^{99m}Tc-CN6DG, 实验组1加入2 mg的D-葡萄糖和480 kBq的^{99m}Tc-CN6DG, 实验组2加入2 mg的L-葡萄糖和480 kBq的^{99m}Tc-CN6DG。三组分别加入含有S180细胞的小孔($n=6$)中, 在S180细胞中孵育4小时后, 将S180细胞收集在2 mL离心管中, 以8000 rpm的转速离心3 min, 并在1 mL冷PBS(0.025 mol/L, pH=7.4)溶液中洗涤两次。用 γ -计数器检测细胞的放射性计数和添加的总放射性计数。

2.2.6 肿瘤模型鼠构建

S180细胞复苏后在雌性昆明小鼠(18~22 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司)的腹腔中培养, 5~7天后从小鼠的腹部抽取一定量的腹水于离心管中, 离心5 min, 沉淀S180细胞, 转速为1000 rpm。然后去掉上清液, 用1 mL无菌生理盐水洗涤沉淀细胞, 重复洗涤3次。随后将洗涤后的细胞稀释至浓度约为 2×10^7 个/mL。最后抽取0.1 mL细胞稀释液, 用注射器皮下注射在小鼠左前肢腋窝处。将接种肿瘤细胞的小鼠饲养5~7天后, 当肿瘤直径长到0.5~1 cm时, 即可进行后续实验。

从中科院上海细胞库购得A549细胞株, 使用F12-K培养基(1%双抗+10%胎牛血清)在37℃, 5% CO₂条件下培养。经过3代传代培养后, 收集A549细胞进行Balb/c雌性裸小鼠的接种, 每只小鼠皮下注射0.1 mL含 5×10^6 的细胞数于前肢右侧腋下, 待14~21天后肿瘤生长至直径0.5~0.8 cm即可进行后续实验。

2.2.7 生物分布实验

先在S180小鼠模型中通过尾静脉向每组($n=3$)小鼠体内注射0.1 mL含有74 kBq的^{99m}Tc-CN6DG标记物。在注射30、60和120 min后处死, 分离出感兴趣的器官, 称重后测定各脏器的放射性计数。各脏器的摄取值用%ID/g来表示, %ID/g=(脏器的放射性计数/注射到小鼠体内放射性计数的1%)/脏器的质量(g)。同样在A549 ($n=4$)荷瘤小鼠中进行了生物分布实验, 体内注

射120 min后处死, 后续处理同上。

2.2.8 动物显像实验

分别向S180和A549荷瘤小鼠尾静脉注射0.1 mL (1.5 mCi) 的^{99m}Tc-CN6DG标记液。在注射120 min后进行SPECT/CT显像扫描。SPECT参数为140 keV能量峰值, 20%峰宽, 90度旋转, MMP 919准直器, 扫描时间为15 min。CT参数为75 keV, 512 views, 2×2 binding, 扫描时间为5 min。

2.2.9 药代动力学实验

取21只18~22 g正常昆明雌性小鼠, 分成7组($n=3$), 每组尾静脉注射^{99m}Tc-CN6DG标记液(0.1 mL, 74 kBq) 2、10、30、60、90、120和240 min后处死, 收集血液后称取质量并测定放射性计数, 计算出不同时间每只小鼠的血液摄取值(%ID/g), 用DAS3.2.8软件做出药物浓度-时间曲线, 并得到相关药代动力学参数。

2.2.10 异常毒性实验

参考《中国药典》(2020)版四部通则1141^[22]对^{99m}Tc-CN6DG进行异常毒性实验。取CN6DG冻干药盒一支, 加入1 mL高锝酸钠淋洗液, 在100℃下水浴加热20 min。加入生理盐水稀释至5 mL。取5只18~22 g的正常小鼠称重, 每只尾静脉注射0.5 mL标记液。观察注射药品后小鼠的生理反应以及注射2天内的存活情况。

3 结果与讨论

3.1 配合物合成结果

对合成的CN6DG进行核磁共振氢谱(¹H NMR)、核磁共振碳谱(¹³C NMR)、红外光谱(IR)和质谱(MS)的鉴定, 结果如下:

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) 5.08 (d, 1H), 3.79~3.72 (m, 2H), 3.69~3.55 (m, 2H), 3.69~3.37 (m, 4H), 2.23~2.18 (q, 2H), 1.618~1.446 (m, 4H), 1.366~1.282 (m, 2H), 1.272~1.164 (m, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 173.21, 172.77, 155.76, 96.17, 90.79, 77.24, 74.64, 72.58, 71.41, 70.83, 61.53, 57.75, 54.73, 36.09, 35.50, 28.84, 27.97, 26.07, 25.48; IR (KBr) (cm⁻¹): 3358.21 (—OH), 2926.14, 2148.79 (—N≡C), 1655.00, 1635.71 (—C=O); HRMS, m/z calcd. for C₁₄H₂₄—

$\text{N}_2\text{O}_6\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+ 339.1526$; found 339.1532.

用TLC鉴定 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG配合物的放射化学纯度大于95%。用HPLC鉴定 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的保留时间分别为3.58和10.47 min, 放射化学纯度为96.77%, 故无需分离纯化便可进行后续实验。

由于CD6DG和CD5DG有着相似的结构, 推测 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN5DG有着相似的化学结构, 根据文献已报道的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN5DG的结构^[19], 推测 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的结构如下(图2)。

3.2 体外稳定性

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG在生理盐水和血清中稳定性良好(图3), 在生理盐水中放置2和5 h后的放射化学纯度都保持在95%以上, 在血清中放置2和4 h后的放射化学纯度也保持在95%以上, 保留时间均为10.47 min. 与制备后立刻鉴定得到的标准对照组相比, 均无明显差别。

3.3 脂水分配系数

经测定 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的脂水分配系数(log*D*)值为 -2.52 ± 0.33 , 表明 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG具有较好的水溶性。和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN5DG相比, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的配体中氨基葡萄糖与异氰基之间增加了一个碳, 所以 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN5DG具有更强的水溶性(log*D* = -3.57 ± 0.35), 实验结果和理论结果相一致。

图2 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的推测结构
Figure 2 Proposed structure of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG.

3.4 细胞摄取实验

实验结果图4所示, *D*-葡萄糖可以抑制S180细胞对 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的摄取, 而*L*-葡萄糖对S180细胞的摄取没有显著影响。通过以上结果推测, S180细胞对于 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG的摄取可能和*D*-葡萄糖摄取具有类似的机制, 即通过葡萄糖转运体载带进入细胞。

3.5 生物分布实验

如图5a和b, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG配合物在S180荷瘤鼠的肿瘤和肾脏中浓聚较高, 其余组织和器官对该配合物的摄取率较低, 这说明肾脏是主要的排泄器官。从30到120 min, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG在S180荷瘤鼠中具有较高的肿瘤/肌肉及肿瘤/血液比值。由于标记物在血液中清除

图3 体外稳定性实验的高效液相色谱结果 (网络版彩图)
Figure 3 *In vitro* stability by high-performance liquid chromatography (HPLC) (color online).

图4 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG细胞摄取实验, (**P* < 0.05) (网络版彩图)
Figure 4 Cellular uptake of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CN6DG (**P* < 0.05) (color online).

图 5 (a) ^{99m}Tc -CN6DG 在 S180 荷瘤小鼠中第 30、60 和 120 min 的生物分布; (b) ^{99m}Tc -CN6DG 在 S180 荷瘤小鼠中第 30、60 和 120 min 的靶与非靶比值; (c) ^{99m}Tc -CN5DG 和 ^{99m}Tc -CN6DG 在 A549 荷瘤小鼠中第 120 min 的生物分布; (d) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-CN6DG}$ 和 ^{99m}Tc -CN6DG 在 S180 荷瘤小鼠中第 120 min 的生物分布 (网络版彩图)

Figure 5 (a) Biodistribution of ^{99m}Tc -CN6DG in S180 tumor-bearing mice at 30, 60, 120 min post-injection. (b) The tumor-to-background ratios of ^{99m}Tc -CN6DG. (c) Biodistribution of ^{99m}Tc -CN5DG and ^{99m}Tc -CN6DG in A549 tumor-bearing mice at 120 min post-injection. (d) Biodistribution of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-CN6DG}$ and ^{99m}Tc -CN6DG in S180 tumor-bearing mice at 120 min post-injection (color online).

较快, 因此, 标记物在注射 120 min 后具有最高肿瘤/血液比值。在 120 min 时肿瘤摄取值为 0.75 ± 0.12 %ID/g, 肿瘤与肌肉比为 4.41, 肿瘤与血液比值为 18.75。于是选择 120 min 作为最佳显像时间, 标记物在 A549 荷瘤鼠的生物分布实验也选择注射 120 min 后进行。

结合图 5c 可以看出, ^{99m}Tc -CN6DG 在 S180 和 A549 两种肿瘤小鼠的生物分布情况类似, 肿瘤均有较高摄取。同时肾脏摄取均较高, 说明这两种肿瘤模型中该配合物均通过肾脏排泄。对比同系列的 ^{99m}Tc -CN5DG 在 A549 荷瘤小鼠注射 120 min 的生物分布情况, ^{99m}Tc -CN6DG 和 ^{99m}Tc -CN5DG 在肿瘤/血液比 (52.4 vs. 49.33) 和肿瘤/肌肉比 (6.89 vs. 24.67) 方面, 二者均有较好的效果, 而在肿瘤摄取绝对值方面, ^{99m}Tc -CN6DG (2.62

± 0.23 %ID/g) 优于 ^{99m}Tc -CN5DG (1.48 ± 0.23 %ID/g), 这一特性弥补了 ^{99m}Tc -CN5DG 摄取绝对值有待提高的问题^[19]。为何 ^{99m}Tc -CN6DG 相比于 ^{99m}Tc -CN5DG 肿瘤摄取值有了提高? 我们推测可能的原因是 ^{99m}Tc -CN6DG 配体的碳链长度有所增长, 所以增加了配合物的脂溶性, 从而增强了其穿透细胞膜的能力, 更容易被肿瘤细胞摄取。

为了验证配合物中含有糖靶向分子的个数不同对标记物的生物分布影响, 我们还用 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(H}_2\text{O)}_3]^+$ 标记 CN6DG 制备得到 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{CN6DG})_3]^+$ 配合物, 并在 S180 小鼠中进行了静脉注射 120 min 后的生物分布实验对比研究。利用参考文献报道的方法制备了三羰基中间体^[23], 调节 pH 至 7~8, 加入 0.2 mg 配体

后在100℃水浴加热下反应30 min得到配合物, 放化纯度为97.9%. 体外稳定性及脂水分配系数实验方法同 ^{99m}Tc -CN6DG. 结果表明, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{CN6DG})_3]^+$ 的体外稳定性良好, 在生理盐水中4 h和血清中4 h后, 放化纯度>95%, 其脂水分配系数(log*D*)值为 -2.09 ± 0.04 . $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{CN6DG})_3]^+$ 在S180荷瘤小鼠中120 min的生物分布结果表明其在肿瘤摄取值为 0.31 ± 0.00 %ID/g, 低于 ^{99m}Tc -CN6DG(0.75 ± 0.12 %ID/g), 肿瘤/肌肉的比值和肿瘤/血液比分别为1.80和0.99, 均低于 ^{99m}Tc -CN6DG的4.41和18.75. 分析 ^{99m}Tc -CN6DG亲肿瘤效果相对更好的原因可能是其连接的糖分子数量为 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{CN6DG})_3]^+$ 的2倍, 一方面增加了肿瘤靶向性, 另一方面增加了亲水性, 从而降低了背景摄取.

表2中列出了 ^{99m}Tc -CN6DG与其它 ^{99m}Tc 标记葡萄糖类肿瘤显像剂的对比, 可以看出 ^{99m}Tc -CN6DG在肿瘤摄取值方面优于其他几种, 在肿瘤/肌肉和肿瘤/血液比值上也优于 ^{99m}Tc -ECDG和 ^{99m}Tc -DTPA-DG.

3.6 动物显像实验

如图6所示, ^{99m}Tc -CN6DG在S180和A549荷瘤小鼠中注射120 min后均可以清晰地看到肿瘤的位置. 并且除肾脏外, 非靶组织的摄取都非常低, 较低的背景摄取与较高的肿瘤摄取使其具有较好的肿瘤显像效果.

图6 ^{99m}Tc -CN6DG在S180和A549小鼠模型上的SPECT/CT显像 (网络版彩图)

Figure 6 SPECT/CT images with ^{99m}Tc -CN6DG in the mice bearing S180 and A549 tumors (color online).

3.7 药代动力学实验

^{99m}Tc -CN6DG在血液中浓度随时间变化趋势符合双指数函数 $C=0.0202+8.35721e^{-t/18.35101}+9.01188e^{-t/5.36745}$ 模型, *C*为药物浓度, 如图7所示. 主要参数和结果见表3, 结果符合二房室模型, 药物分布半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 为4.034 min, 清除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 为29.85 min. 说明该药物在血液中快速清除.

3.8 异常毒性实验

5只小鼠在注射2天内后存活且生理状态正常.

表2 ^{99m}Tc -CN6DG、 ^{99m}Tc -CN5DG、 ^{99m}Tc -ECDG和 ^{99m}Tc -DTPA-DG的生物分布结果 (%ID/g, Mean $\pm$ SD)

Table 2 Biodistribution of ^{99m}Tc -CN6DG, ^{99m}Tc -CN5DG, ^{99m}Tc -ECDG and ^{99m}Tc -DTPA-DG (%ID/g, Mean $\pm$ SD)

	^{99m}Tc -CN6DG	^{99m}Tc -CN5DG	^{99m}Tc -ECDG	^{99m}Tc -DTPA-DG
肿瘤类型	A549	A549	A549	MCF-7
注射时间	2 h	2 h	2 h	2 h
心	0.48 ± 0.31	0.16 ± 0.03	0.34 ± 0.08	0.29 ± 0.03
肝	0.76 ± 0.23	0.47 ± 0.07	5.81 ± 1.71	2.76 ± 1.05
肺	0.48 ± 0.27	0.11 ± 0.02	0.72 ± 0.21	0.68 ± 0.07
肾	2.97 ± 0.38	1.51 ± 0.03	5.69 ± 1.54	4.45 ± 0.98
脾	0.49 ± 0.20	0.21 ± 0.03	4.21 ± 1.37	5.87 ± 0.06
胃	0.68 ± 0.20	0.18 ± 0.02	0.44 ± 0.14	1.76 ± 0.84
肉	0.38 ± 0.27	0.06 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.42 ± 0.17
肠	0.41 ± 0.28	0.15 ± 0.03	0.42 ± 0.11	1.30 ± 1.07
瘤	2.62 ± 0.23	1.48 ± 0.23	0.42 ± 0.12	2.10 ± 0.02
血	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.98 ± 0.27	0.67 ± 0.18
瘤/肉	6.89	24.67	2.80	3.13
瘤/血	52.4	49.33	0.42	5.01
数据来源	本实验	[23]	[17]	[9]

图 7 ^{99m}Tc-CN6DG在小鼠血液中的浓度-时间曲线
Figure 7 Concentration-time curve of ^{99m}Tc-CN6DG in blood.

^{99m}Tc-CN6DG标记液含有配体1 mg, 所以每只小鼠被给药0.1 mg. 实验中小鼠的平均质量为20 g, 每只小鼠平均注射剂量为0.1 mg/20 g. 若成年病人的体重按照50 kg计算, 每支药盒可以给一个病人使用, 每个病人得到的注射剂量为1.0 mg/50 kg. 则小鼠的给药剂量为成年病人的250倍, 满足临床药物异常毒性实验的要求.

表 3 ^{99m}Tc-CN6DG在健康小鼠中的二房室模型参数

Table 3 Parameters derived from two-compartmental modeling after the administration of ^{99m}Tc-CN6DG in healthy mice

二房室模型参数	单位	数值
$t_{1/2\alpha}$	min	4.034
$t_{1/2\beta}$	min	29.85
V1	L/kg	0.054
CL	L/(min kg)	0.004
AUC(0-t)	μg/(L min)	285.374
AUC(0-∞)	μg/(L min)	317.349
R_AUC(t/∞)	%	89.9
K10	1/min	0.076
K12	1/min	0.066
K21	1/min	0.052

4 结论

本文用药盒法成功制备得到放射化学纯度大于95%的新型^{99m}Tc标记的葡萄糖衍生物^{99m}Tc-CN6DG. 其肿瘤摄取值优于^{99m}Tc-CN5DG. 该配合物在S180和A549肿瘤模型小鼠中均具有良好的亲肿瘤性能, 具有成为新型肿瘤显像剂的潜能, 值得进一步推广和研究.

参考文献

- Chen S, Kong H, Lu X, Li Y, Yin P, Zeng Z, Xu G. *Anal Chem*, 2013, 85: 8326-8333
- Chinese Society of Nuclear Medicine. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 40: 747-749 (in Chinese) [中华医学会核医学分会. 中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40: 747-749]
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Science*, 2009, 324: 1029-1033
- Hicks RJ. *J Nucl Med*, 2009, 50: 31S-42S
- Jaini S, Dadachova E. *Semin Nucl Med*, 2012, 42: 185-189
- Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE. *Radiology*, 2004, 231: 305-332
- Yeung HWD, Grewal RK, Gonen M, Schoder H, Larson SM. *J Nucl Med*, 2003, 44, 11: 1789-1796
- Chen X, Li L, Liu F, Liu B. *BioOrg Medicinal Chem Lett*, 2006, 16: 5503-5506
- Chen Y, Huang ZW, He L, Zheng SL, Li JL, Qin DL. *Appl Radiat Isotopes*, 2006, 64: 342-347
- Zhang J, Ren J, Lin X, Wang X. *BioOrg Medicinal Chem Lett*, 2009, 19: 2752-2754
- Lin X, Jin Z, Ren J, Pang Y, Zhang W, Huo J, Wang X, Zhang J, Zhang Y. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 79: 239-245
- Lin X, Chao X, Zhang J, Jin Z, Zhang Y. *BioOrg Medicinal Chem Lett*, 2014, 24: 3964-3967
- Liu T, Gan Q, Zhang J, Jin Z, Zhang W, Zhang Y. *MedChemComm*, 2016, 7: 1381-1386
- Liu T, Gan Q, Zhang J. *J Radioanal Nucl Chem*, 2016, 310: 1215-1221
- Liu T, Gan Q, Zhang J. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 89: 277-284
- Ding J, Su H, Wang F, Chu T. *BioOrg Medicinal Chem Lett*, 2019, 29: 1791-1798
- Yang DJ, Kim CG, Schechter NR, Azhdarinia A, Yu DF, Oh CS, Bryant JL, Won JJ, Kim EE, Podoloff DA. *Radiology*, 2003, 226: 465-473

- 18 Dai D, Rollo FD, Bryant J, Kim EE. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 2018: 8969714
- 19 Zhang X, Ruan Q, Duan X, Gan Q, Song X, Fang S, Lin X, Du J, Zhang J. *Mol Pharm*, 2018, 15: 3417–3424
- 20 Zhang X, Ruan Q, Jiang Y, Gan Q, Zhang J. *Transl Oncol*, 2021, 14: 100966
- 21 Duan X, Zhang X, Gan Q, Fang S, Ruan Q, Song X, Zhang J. *MedChemComm*, 2018, 9: 705–712
- 22 国家药典委员会. 中国药典. 第四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020
- 23 张旭冉. 新型^{99m}Tc标记的异腈基葡萄糖类衍生物作为肿瘤分子探针的研究. 博士学位论文. 北京: 中国原子能科学研究院, 2019

Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc-labeled glucose derivative for tumor imaging

Yilin Li, Xuran Zhang, Junbo Zhang*

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

*Corresponding author (email: zhjunbo@bnu.edu.cn)

Abstract: The development of novel tumor-imaging agents for single-photon-emission-computed tomography (SPECT) with good performance, simple preparation and low price is a hot topic in the field of radiopharmaceutical research. ^{99m}Tc is the most widely used SPECT nuclide in clinic. In order to develop a novel ^{99m}Tc-labeled tumor radiopharmaceuticals, in this study, a glucose derivative (CN6DG) containing isonitriles was synthesized and it was radiolabeled with ^{99m}Tc to obtain the ^{99m}Tc-CN6DG complex with high radiochemical purity (>95%). The complex is hydrophilic (log*D*=−2.52±0.33) and has good stability *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* cell-uptake assay showed that tumor cells uptake of the complex was related to glucose transporters. In S180 tumor-bearing mice 2 h after injection, the tumor-uptake value was 0.75±0.12 %ID/g and the tumor/muscle, tumor/blood ratios were 4.41 and 18.75, respectively. In A549 tumor-bearing mice after 2 h of post-injection, the tumor-uptake value was 2.62±0.23 %ID/g, which was higher than that of ^{99m}Tc-CN5DG (1.48±0.23 %ID/g). Its tumor/blood (52.4 vs. 49.33) ratios and tumor/muscle ratios (6.89 vs. 24.67) were as good as that of ^{99m}Tc-CN5DG. The SPECT/CT imaging results in S180 and A549 tumor-bearing mice showed that it had significant tumor uptakes, indicating that it is a promising tumor-imaging agent.

Keywords: tumor, glucose, ^{99m}Tc, isonitrile, SPECT

doi: [10.1360/SSC-2021-0264](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0264)