

脑功能显像剂 $^{99}\text{Tc}^m$ -Memantine 的初步研究

张建康¹, 周杏琴¹, 颜成龙², 徐希杰¹, 曹国宪¹

(1. 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 用 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 N-[2-(N-(2-巯基乙基)氨基甲酰甲基)-N-(2-巯基乙基)-3,5-二甲基金刚烷胺基乙酰胺(N_2S_2 -Memantine), 生成了 $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine。采用纸层析对此标记物进行质控并检测其体外稳定性。结果显示, 湿法的标记率 $>90\%$, 药盒化标记的标记物经乙酸乙酯萃取纯化后, 放化纯度 $>95\%$, 体外稳定性良好, 有望成为一种新的脑功能显像剂。

关键词: $^{99}\text{Tc}^m$ 标记; 美金刚胺; 脑受体; 显像剂

中图分类号: TQ463; R817 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2008)04-0215-05

Preliminary Study of $^{99}\text{Tc}^m$ -Memantine as an Brain Functional Imaging Agent

ZHANG Jian-kang¹, ZHOU Xing-qin¹, YAN Cheng-long², XU Xi-jie¹, CAO Guo-xian¹

(1. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: N_2S_2 -Memantine was labeled with $^{99}\text{Tc}^m$ using stannous fluoride as reducing agent, and the labeling conditions of $^{99}\text{Tc}^m$ -Memantine were optimized, and lyophilized kit of $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine was also developed. The labeling efficiency was more than 90% by TLC and the kit radiochemical purity which was after extraction with ethyl acetate, was more than 95%. The stability was good in room temperature. $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine would be a potential brain imaging agent which would need more research work.

Key words: $^{99}\text{Tc}^m$ labeling; memantine; brain receptor; imaging agent

NMDA (N-methyl-D-Aspartic Acid, N-甲基-D-天门冬氨酸)受体是兴奋性氨基酸特异性受体之一, 它是一个由离子通道偶联的大分子复合物, 具有谷氨酸、甘氨酸、多胺类、通道阻断剂、 Mg^{2+} 、 H^+ 、 Zn^{2+} 等多种配体的结合位点。NMDA受体广泛参与机体的生理和病理活动, 在神

经保护、神经退行性病变、长时程增强、记忆和认知等脑部病理生理过程中起着重要的作用^[1]。许多神经系统疾病包括痴呆、精神分裂、帕金森疾病等都与脑内 NMDA 受体异常有关^[2-4]。研究和开发新的放射性分子探针, 使用 SPECT 探测仪器进行脑受体分子活体断层显像, 获取脑受

收稿日期: 2008-07-11; 修回日期: 2008-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770602), 江苏省卫生厅重大项目(K200512)

作者简介: 张建康(1979~), 男(汉族), 江苏阜宁人, 研究实习员(硕士), 主要从事放射药物研发

通信作者: 周杏琴, 女, 研究员, 电话: 0510-85514482-3532, E-mail: xingqin118@126.com

体分布、密度和功能等方面的信息,观察脑内微量受体的存在及变化,是目前国际医学领域研究的前沿^[5]。目前,国外用于标记不同类型的 NMDA 受体拮抗剂的常用核素为¹⁸F、¹¹C、¹²³I^[6-10],但⁹⁹Tc^m标记的 NMDA 受体显像剂国内外尚无报道。由于⁹⁹Tc^m方便易得,具有优良的核素性质及⁹⁹Tc^m-Trodat-1 脑显像剂成功研发^[11-12],使得⁹⁹Tc^m标记 CNS(Central Nervous System, 中枢神经系统)受体显像剂的研究一直是放射性药物研究的热点之一。本工作拟以临床用药 NMDA 受体拮抗剂美金刚胺(Memantine)为原料,经过两步反应,通过 N₂S₂ 螯合基团偶联进行⁹⁹Tc^m标记,为将来进行体内外生物学特性研究提供基础数据。

1 实验材料

1.1 主要试剂

美金刚胺:自制^[13];S-对甲氧基苄基巯乙基胺:自制^[12];三氟乙酸、氯乙酰氯、氟化亚锡:分

析纯,百灵威公司产品;三乙胺:分析纯,无锡市佳妮化工有限公司;苯甲醚、醋酸汞:化学纯,上海化学试剂公司;EDTA:分析纯,国药集团化学试剂公司;葡庚糖酸钠盐:自制;医用⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m发生器:原子高科股份有限公司。聚酰胺薄膜:台州市路桥四甲基生化塑料厂。

1.2 主要仪器

Yanagimoto 型熔点仪:日本 YANACO 公司;冻干机,FTS-MD 480D1 型低温浴槽:日本岛津公司;Packard Cobra 型自动 γ 计数器:美国 Victoreen 公司;Varian MAT2.2 质谱分析仪:美国 Varian 公司。

2 实验方法

2.1 N₂S₂-Memantine 的制备

标记前体 N-[2-(N-(2-巯基乙基)氨基甲酰甲基)-N-(2-巯基乙基)-3,5-二甲基金刚烷胺基乙酰胺(N₂S₂-Memantine)的合成路线示于图 1^[14]。

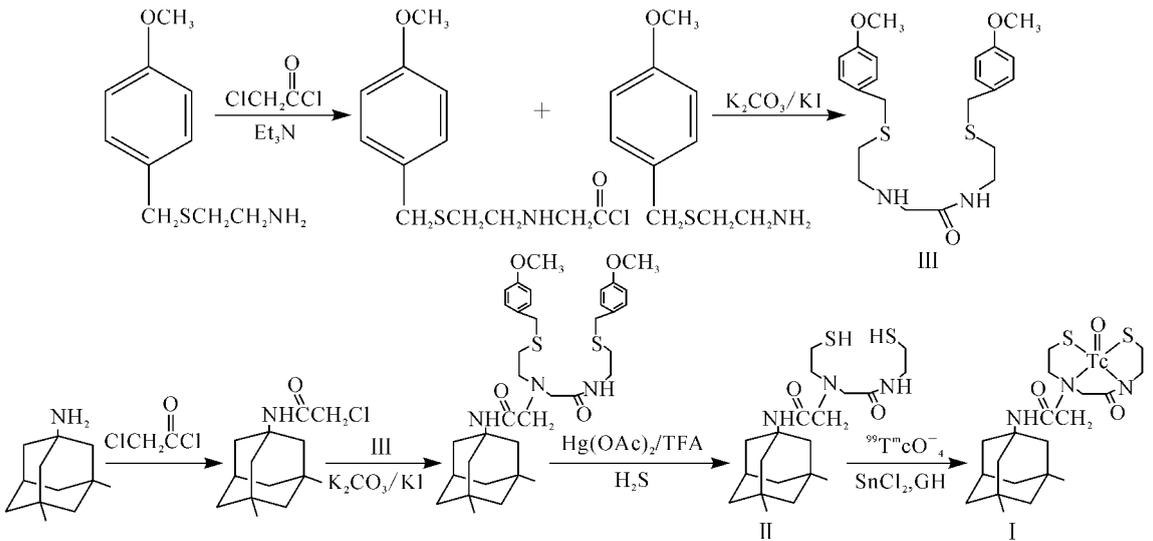


图 1 N₂S₂-Memantine 的合成及标记路线图

I ——⁹⁹Tc^m(V)-Memantine; II ——N₂S₂-Memantine; III ——二硫乙胺

2.2 N₂S₂-Memantine⁹⁹Tc^m 标记

2.2.1 N₂S₂-Memantine 的⁹⁹Tc^m 标记^[15]

在西林瓶中加入 0.5 mL 0.2 mol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲液,50 μ L 1 g/L N₂S₂-Memantine 的乙醇溶液,20 μ L 1 g/L SnF₂ 盐酸溶液(0.1 mol/L)、5 mg GH(葡庚糖酸钠)、0.5 mg EDTA(乙二胺四乙酸),充分摇匀,加入由医

用⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m发生器淋洗的⁹⁹Tc^mO₄⁻洗脱液 0.1 mL(约 37 MBq),100 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min,即得⁹⁹Tc^m(V)-Memantine。纸层析法测定其标记率。分别考察改变 pH, N₂S₂-Memantine、SnF₂、GH、EDTA 的用量以及反应时间对标记率的影响,以确定最佳标记条件。

2.2.2 N_2S_2 -Memantine 冻干药盒的制备

称取适量 N_2S_2 -Memantine、GH 和 EDTA, 用磷酸盐缓冲液溶解, 再加入适量 SnF_2 的盐酸溶液, 摇匀后, 加入充氮双蒸水稀释至预定体积。无菌过滤后按 1.0 mL/瓶分装于 10 mL 西林瓶中, 冷冻干燥后充氮密封, 备用。

2.2.3 $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine 的药盒化制备

取上述冻干药盒, 加入新鲜 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 洗脱液 0.1~0.3 mL (约 37 MBq), 置于沸水浴上煮沸 30 min, 冷却, 即得 $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine。

2.3 药盒的标记率和放化纯度检测

采用纸层析法测定标记物的标记率和标记物经乙酸乙酯萃取纯化后的放化纯度。将标记物点样于聚酰胺薄膜上, 置于 $V(\text{乙醇}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1.5$ 体系中上行展开, 空气中自然晾干。采用 10 段法进行放射性分布测量。

2.4 $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine 体外稳定性

取 2.3 中乙酸乙酯萃取溶液, 室温下静置, 分别于 0.5、1、2、3、4、5、6、7 h 取样, 采用纸层析法检测标记物的放化纯度。

3 结果和讨论

3.1 N_2S_2 -Memantine 的化学合成

N_2S_2 -Memantine 的质谱分析结果 MS: $\text{MS}(m/z): 414(m^{+1}), 436(m^{+\text{Na}})$ 。结果证明, 合成的标记前体 N_2S_2 -Memantine 的结构即为目标结构。由于 N_2S_2 -Memantine 极易吸湿氧化, 所得固体需立即投入下一步反应, 故未纯化进行核磁表征。 N_2S_2 -Memantine 充氮气保护, 低温冷藏, 以备 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记。

3.2 湿法制备 $^{99}\text{Tc}^m(\text{V})$ -Memantine 的最佳标记条件

以 $V(\text{乙醇}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1.5$ 为纸层析的展开体系, 确定标记溶液中各种可能的组分。各组分 R_f 分别为: $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 0.8~1.0; $^{99}\text{Tc}^m\text{-GH}$ 0~0.3; $^{99}\text{Tc}^m\text{-EDTA}$ 0~0.3; $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 0~0.3; $^{99}\text{Tc}^m$ 胶体 0~0.3。

3.2.1 标记溶液 pH 对标记率的影响

pH 对标记率的影响曲线示于图 2。由图 2 可见, 当 pH 大于 7 时, 标记率明显降低, 这主要是由于亚锡水解。pH 为 4.5~7.0 时标记率 > 90%。

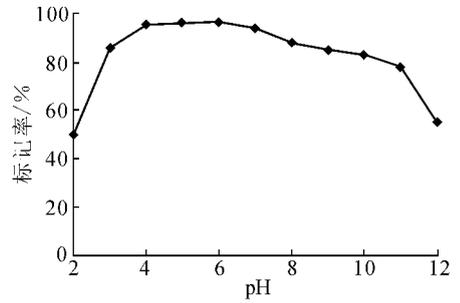


图 2 pH 对标记率的影响

3.2.2 N_2S_2 -Memantine 用量对标记率的影响

N_2S_2 -Memantine 用量对标记率的影响曲线示于图 3。由图 3 可见, 当 N_2S_2 -Memantine 用量较小时, 改变其用量对标记率的影响较大, 用量增加使标记率大幅提高; 用量为 50 μg 时, 标记率 > 90%; 再增加其用量时, 标记率提高不明显, 甚至当用量达到 200 μg 时, 标记率有下降趋势, 可能的原因是配体量过多时会与亚锡络合, 降低了还原效率。

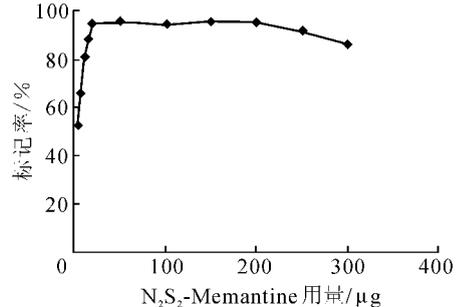


图 3 N_2S_2 -Memantine 用量对标记率的影响

3.2.3 亚锡用量对标记率的影响

亚锡用量对标记率的影响曲线示于图 4。由图 4 可见, 亚锡用量对标记率影响较大, 用量过少、过多都会使标记率降低。理论所需 Sn^{2+} 量很少, 但由于 Sn^{2+} 极易氧化, 亚锡量少, $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 还原不完全, 导致标记率偏低; 当亚锡含量 200~300 μg 时, 标记率降低, 这主要是由于 Sn^{2+} 还原水解 $^{99}\text{Tc}^m$ 产生放射性胶体。

3.2.4 GH 用量对标记率的影响

GH 用量对标记率的影响曲线示于图 5。由图 5 可见, 为了使还原后 V 价 $^{99}\text{Tc}^m$ 保持溶解状态, 不形成不溶性水解产物 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_2$ 、

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 等,加入适量的 GH 弱配体,可以提高标记率。GH 用量为 2~20 mg 时,标记率 >90%。

3.2.5 EDTA 用量对标记率的影响

EDTA 用量对标记率的影响曲线示于图 6。为了阻止亚离子水解,在制备药盒时,加入足够的络合剂 EDTA,使亚锡与络合剂络合,阻止水解反应,从而提高标记率。由图 6 可以看出,EDTA 用量为 0.2~4.0 mg 时,标记率 >95%。

3.2.6 反应时间对标记率的影响

反应时间对标记率的影响示于图 7。由图 7

可见,反应 5 min,标记率达 88%;30 min 时,标记率 >90%。此后延长标记时间标记率不再有明显变化,因此,选择标记时间为 30 min。

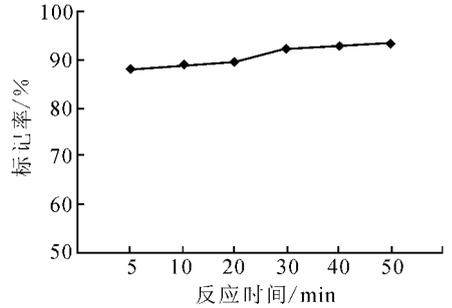


图 7 反应时间对标记率的影响

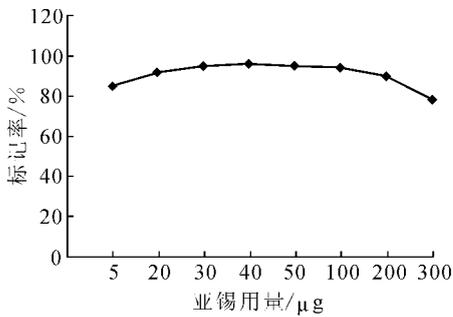


图 4 亚锡用量对标记率的影响

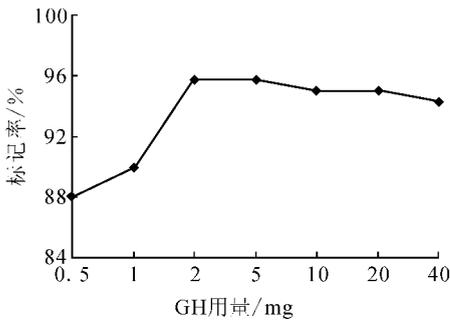


图 5 葡庚糖酸钠用量对标记率的影响

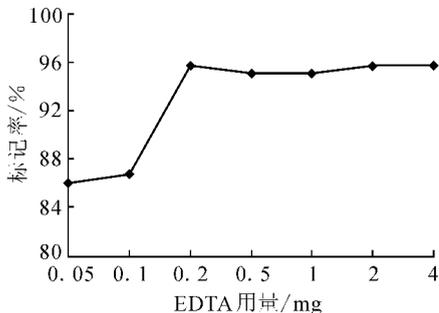


图 6 EDTA 用量对标记率的影响

3.2.7 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液的体积和活度对标记率的影响

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液体积和活度对标记率的影响曲线示于图 8。由图 8 可见, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液的体积为 0.1~3 mL、活度为 37~740 MBq 时,标记率 >95%。

以上结果表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{V})$ -Memantine 的最佳标记条件为: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液的体积 0.1~3 mL,活度 37~740 TBq/L,pH 6.0 磷酸盐缓冲液、50 μg N_2S_2 -Memantine、40 μg SnF_2 、0.5 mg EDTA、5 mg GH、100 °C 水浴中反应 30 min。最佳条件下,标记率 >90%。

3.3 N_2S_2 -Memantine 药盒化

根据湿法最佳标记条件,确定一步法冻干药盒的配方为:50 μg N_2S_2 -Memantine、40 μg SnF_2 、0.5 mg EDTA、5 mg GH 和 pH 5.0~6.0 的磷酸盐缓冲液。

3.4 药盒制备的标记物稳定性实验

纸层析法测得标记物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{V})$ -Memantine 的 R_f 为 0.8~1.0、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-GH}$ 为 0~0.2、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 为 0~0.2、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-EDTA}$ 为 0~0.3、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 胶体为 0~0.2。标记物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{V})$ -Memantine 经乙酸乙酯萃取纯化后室温放置,不同时间取样测定放化纯度,观察标记物的体外稳定性,结果示于图 9。由图 9 可见,标记物在 6 h 内,放化纯度 >95%。说明标记物在室温下体外稳定性较好。

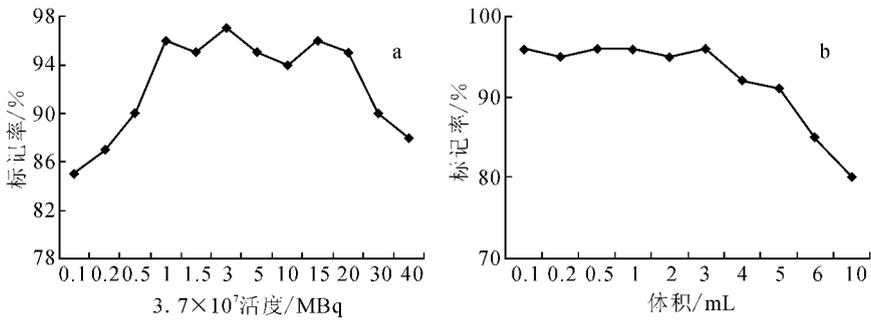


图 8 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液体积和活度对标记率的影响

a——体积对标记率的影响;b——活度对标记率的影响

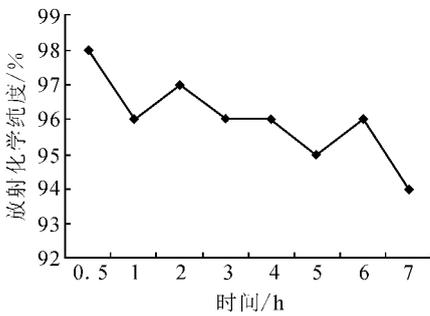


图 9 标记物体外稳定性实验

4 结 论

用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 N_2S_2 -Memantine, 得到 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ (V)-Memantine, 优化湿法标记条件, 标记方法进行了药盒化, 简化了标记方法, 标记率 $>90\%$, 所得标记物体外稳定性好。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ (V)-Memantine 有可能成为一种新的脑功能显像剂。

参考文献:

- [1] WATKINS JC, JANE DE. The Glutamate Story [J]. Br J Pharmacol, 2006, 147 (Suppl 6): 100-108.
- [2] CARROLL RC, ZUKIN RS. NMDA-receptor Trafficking and Targeting: Implications for Synaptic Transmission and Plasticity[J]. Trends Neurosci, 2002, 25(11): 571-577.
- [3] KRYSTAL JH, D'SOUZA DC, PETRAKINS IL, et al. NMDA Agonists and Antagonists as Probes of Glutamatergic Dysfunction and Pharmacotherapies in Neuropsychiatric Disorders [J]. Harvard Rev Psych, 1999, 7(3): 125-143.
- [4] MELDRUM BS. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology [J]. J Nutr, 2000, 130(4S Suppl): 1 007S-1 015S.
- [5] WATERHOUSE RN. Imaging the PCP Site of the NMDA Ion Channel [J]. Nucl Med Biol, 2003, 30 (8): 869-878.

- [6] REYNOLDS IJ, ROTHERMUND K, RAJDEV S, et al. [^{125}I]Thienylphenylcyclidine, a Novel Ligand for the NMDA Receptor [J]. Eur J Pharmacol, 1992, 226(1): 53-58.
- [7] BLIN J, DENIS A, YAMAGUCHI T, et al. PET Studies of [^{18}F]methyl-MK-801, a Potential NMDA Receptor Complex Radioligand [J]. Neurosci Lett, 1991, 121(1-2): 183-186.
- [8] AMETAMEY SM, SAMNICK S, LEENDERS KL, et al. Fluorine-18 Radiolabelling, Biodistribution Studies and Preliminary PET Evaluation of a New Memantine Derivative for Imaging the NMDA Receptor [J]. J Recept Signal Transduct Res, 1999, 19(1-4): 129-141.
- [9] KOIKC M, HONER M, KESSLER LJ, et al. Synthesis Vitro and in Vivo Evaluation of [^{11}C] Methyl-BIII277CL for Imaging the PCP-binding Site of the NMDA Receptor by Pet [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2002, 22(1-4): 123-139.
- [10] ERLANDSSON K, BRESSAN RA, MULLIGAN RS, et al. Kinetic Modelling of [^{123}I]CNS 1261-a Potential SPET Tracer for the NMDA Receptor [J]. Nucl Med Biol, 2003, 30(4): 441-454.
- [11] MEEGALLA SK, PLÖSSL K, KUNG MP, et al. Synthesis and Characterization of Technetium-99m-labeled Tropanes as Dopamine Transporter-imaging Agents [J]. J Med Chem, 1997, 40(1): 9-17.
- [12] 方平, 陈正平, 周翔, 等. 多巴胺转运蛋白显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -TRODAT-1 的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(6): 244-247.
- [13] 周杏琴, 曹国宪, 项景德, 等. 盐酸美金刚胺的合成 [J]. 化工时刊, 2005, (19) 3: 11-12.
- [14] International Atomic Energy Agency. Technical Reports Series No. 426. Development of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Agents for Imaging Central Neural System Receptors [R]. Vienna: IAEA, 2004.