

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102336908 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 01

(21) 申请号 201010230680. 8

(22) 申请日 2010. 07. 20

(71) 申请人 中国科学院上海应用物理研究所
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路 2019 号

(72) 发明人 沈玉梅 许晓平 张元庆 朱华
王旭东

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002
代理人 薛琦 朱水平


(51) Int. Cl.
C08G 69/48 (2006. 01)
A61K 51/06 (2006. 01)
A61K 103/10 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 22 页 附图 3 页

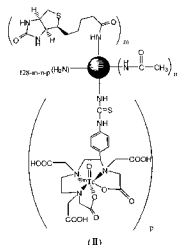
(54) 发明名称

一种 ^{99m}Tc 配合物、其制备方法、中间体及其应用

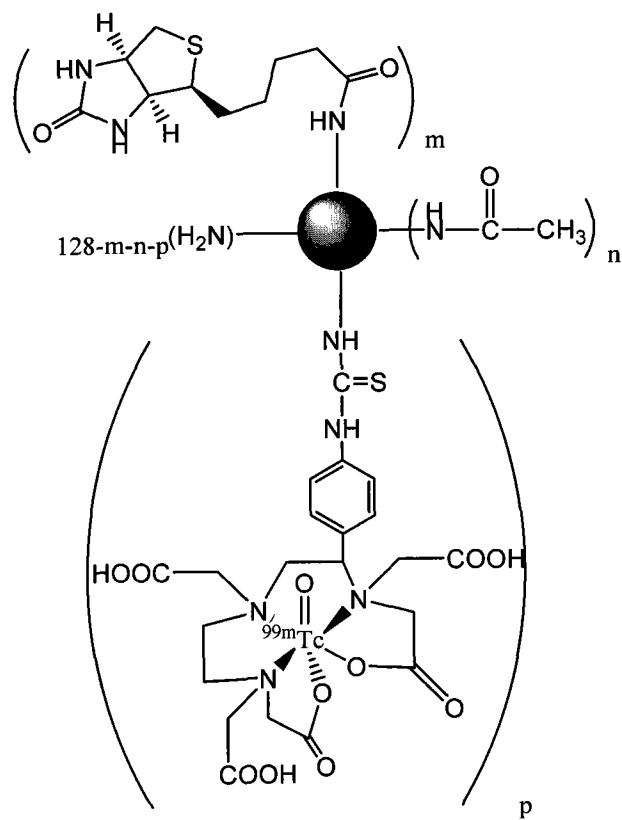
(57) 摘要

本发明公开了一种如式 II 所示的 ^{99m}Tc 配合物;其中 $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$;球状结构  表示聚酰胺-胺树状大分子中除 128 个 $-\text{NH}_2$ 以外的结构。本发明还公开了其制备方法、中间体及其应用。本发明的 ^{99m}Tc 配合物具有优良的肿瘤靶向性,水溶性和稳定性,是一种具有较好


代谢能力的 SPECT 显影剂。



1. 一种如式 II 所示的 ^{99m}Tc 配合物；



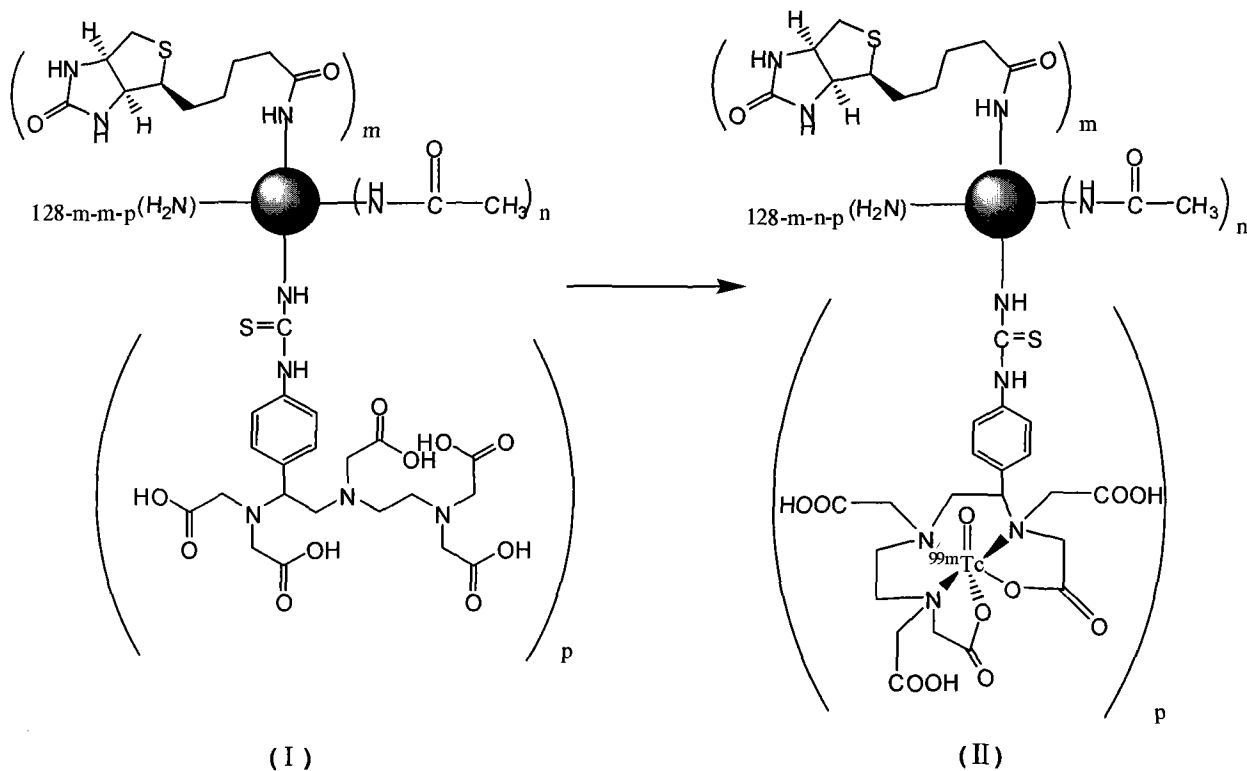
(II)

其中, $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$; 球状结构  表示聚酰胺-胺树状大分子中除 128 个 $-\text{NH}_2$ 以外的结构。

2. 如权利要求 1 所述的 ^{99m}Tc 配合物, 其特征在于: 所述的 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$, $p = 8 \sim 10$ 。

3. 如权利要求 2 所述的 ^{99m}Tc 配合物, 其特征在于: 所述的 $m = 9$, $n = 81$, $p = 10$ 。

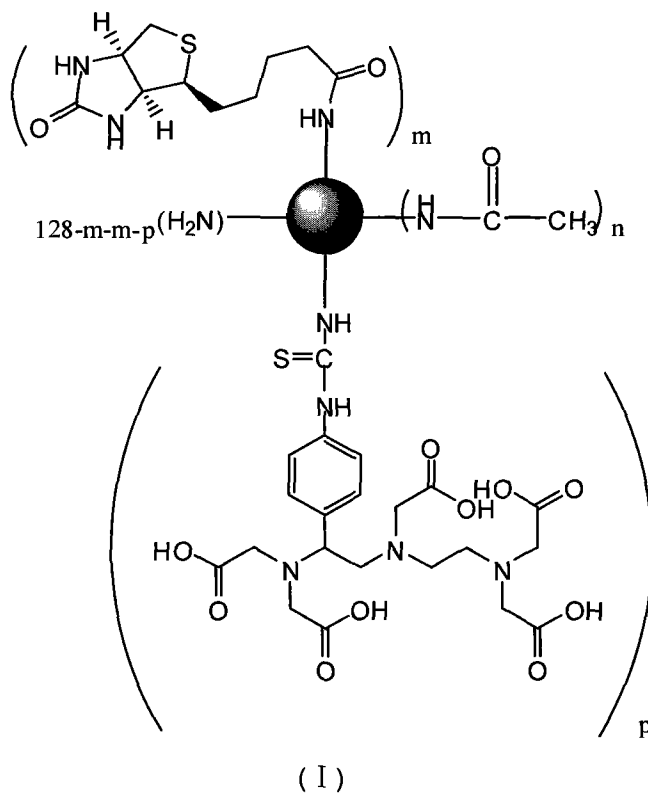
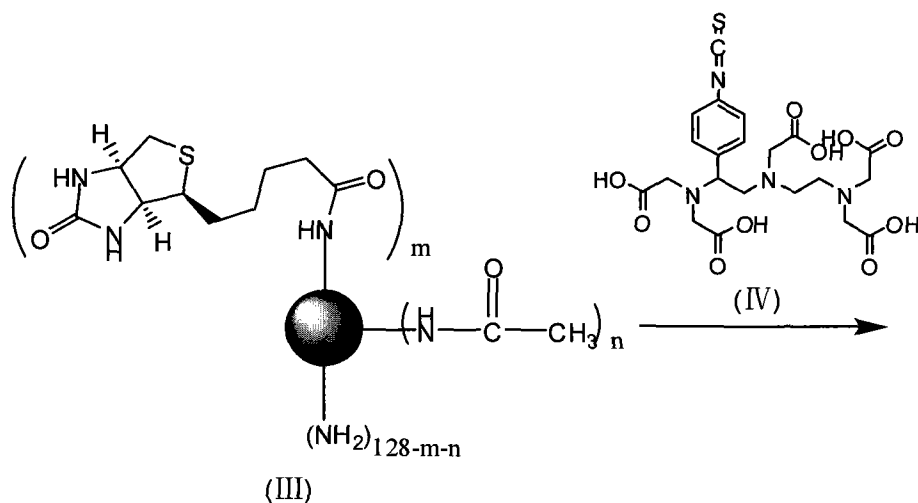
4. 如权利要求 1 ~ 3 任一项所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于包含下列步骤: 盐酸水溶液中, 在 SnCl_2 的作用下, 将化合物 I 和 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐和 / 或碱土金属盐进行标记反应, 即可;



其中, m 、 n 、 p 和球状结构 如权利要求 1 ~ 3 任一项所述。

5. 如权利要求 4 所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于: 所述的盐酸水溶液的浓度为 $0.05 \sim 0.15\text{M}$; 盐酸与化合物 I 的摩尔比为 $0.1 : 1 \sim 20 : 1$; 所述的 SnCl_2 的用量为化合物 I 摩尔量的 $3 \sim 20$ 倍; 所述的 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐为 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$; $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐和 / 或碱土金属盐的放射性活度与化合物 I 摩尔量之间的比例为 $1\text{mCi} : 10^{-6}\text{mmol} \sim 1\text{mCi} : 1\text{mmol}$; 所述的反应温度为 $60 \sim 100^\circ\text{C}$; 所述的反应时间以检测反应完全为止。

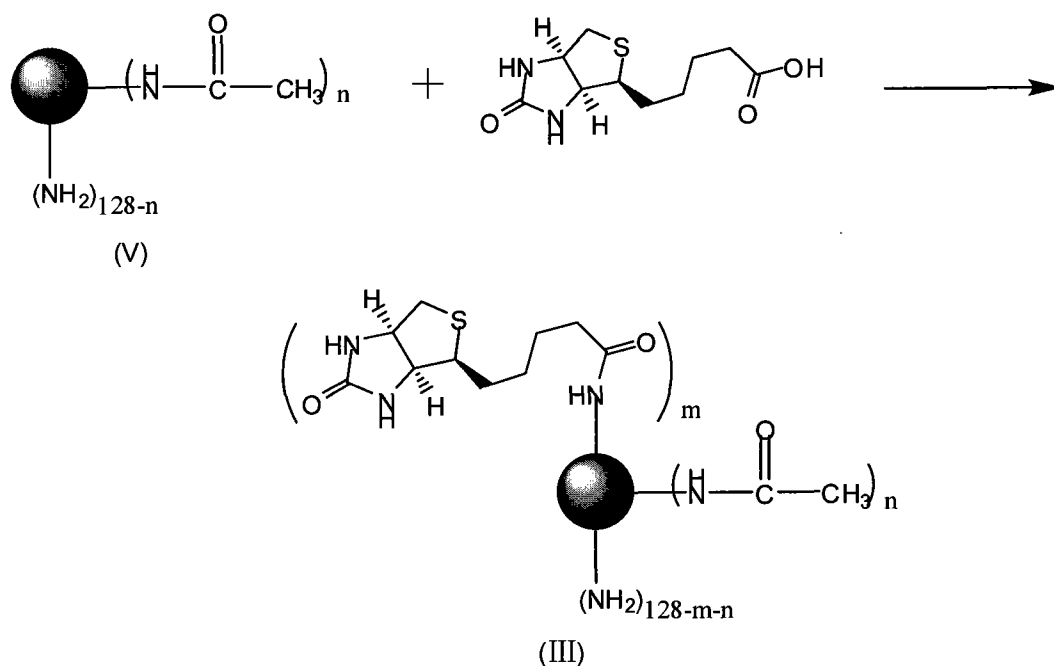
6. 如权利要求 4 所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于: 所述的化合物 I 由下列方法制得: 水中, 在碱的作用下, 化合物 III 和化合物 IV 进行氨基与异硫氰基的反应, 即可;



其中, m 、 n 、 p 和球状结构  如权利要求 1 ~ 3 任一项所述。

7. 如权利要求 6 所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于: 所述的化合物 IV 的用量为化合物 III 摩尔量的 5 ~ 40 倍; 所述的碱为无机强碱; 碱的用量为控制反应溶液的 pH 范围为 8 ~ 10 的量; 所述的反应温度为 30 ~ 50°C; 所述的反应时间以检测反应完全为止。

8. 如权利要求 6 所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于: 所述的化合物 III 由下列方法制得: 将化合物 V 和生物素进行氨基和羧基的缩合反应, 即可;



其中, m 、 n 、 p 和球状结构 如权利要求 1 ~ 3 任一项所述。

9. 如权利要求 8 所述的配合物 II 的制备方法, 其特征在于: 所述的氨基和羧基的缩合反应的步骤如下: 溶剂中, 在缩合剂的作用下, 将化合物 V 和生物素进行氨基和羧基的缩合反应, 即可; 其中, 所述的溶剂为 N,N -二甲基甲酰胺和 / 或二甲亚砜; 所述的缩合剂为 N -乙基- N' -(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐和 / 或二环己基碳二亚胺; 缩合剂的用量为化合物 V 摩尔量的 10 ~ 100 倍; 所述的生物素的用量为化合物 V 摩尔量的 5 ~ 100 倍; 所述的反应的温度为 10 ~ 40°C; 所述的反应时间以检测反应完全为止。

10. 一种如式 I 所示的制备 ^{99m}Tc 配合物 II 的中间体化合物;

一种 ^{99m}Tc 配合物、其制备方法、中间体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种放射性金属配合物、其制备方法、中间体及其应用,具体的涉及一种 ^{99m}Tc 配合物、其制备方法、中间体及其应用。

背景技术

[0002] 单光子发射计算机断层成像术 (Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) 是一种使用 γ 射线的核医学计算机断层成像技术。SPECT 利用传统核医造影剂 (radiotracer) 及安格式 γ 照相机以一定的角度环绕病人的标的器官,得到一系列的平面影像,再以电脑影像重组技术得到另一系列的影像,从而获得 Transaxial, Sagittal, Coronal 的立体影像。

[0003] SPECT 的基本成像原理:一般核医核种由发生器产生,例如 ^{99m}Tc 、 I-131 、 I-125 。此类型的核种多属于中子过多型。在产生过程中,用中子撞击母靶,使它得到过剩的中子,而变得不稳定,经过 β -衰变,原子核剩余较多的能量,回到基态之后,多余的光子以单一方向产生。 γ 照相机探头的每个灵敏点探测沿一条投影线 (Ray) 进来的 γ 光子,其测量值代表人体在该投影线上的放射性之和。在同一条直线上的灵敏点可探测人体一个断层上的放射性药物,它们的输出称作该断层的一维投影 (Projection)。图中各条投影线都垂直于探测器并互相平行,故称之为平行束,探测器的法线与 X 轴的交角 θ 称为观测角 (View)。 γ 照相机是二维探测器,安装了平行孔准直器后,可以同时获取多个断层的平行束投影,这就是平片。平片不能反应出投影线上各点的前后关系。要想知道人体在纵深方向上的结构,就需要从不同角度进行观测。可以证明,知道了某个断层在所有观测角的一维投影,就能计算出该断层的图像。从投影求解断层图像的过程称作重建 (Reconstruction)。它类似于传统的 γ 照相机的平面成像技术,但能提供三维图像。

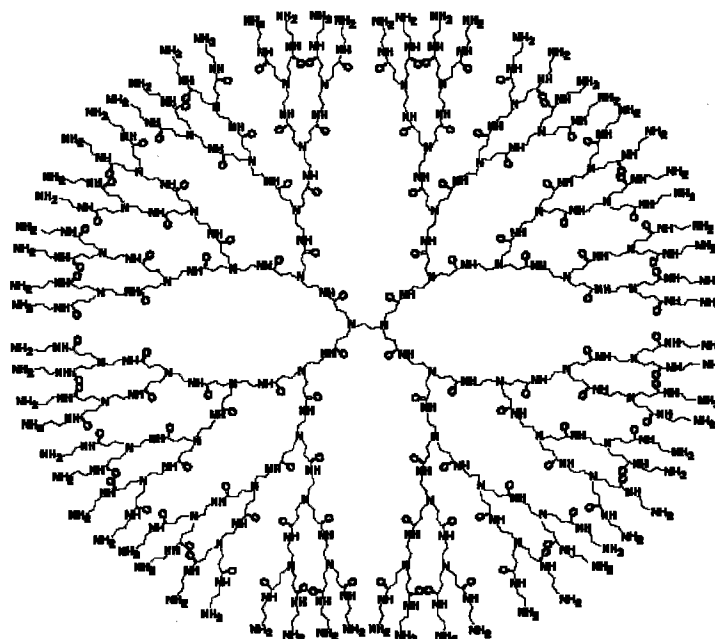
[0004] ^{99m}Tc 的半衰期为 6 小时,长短较适合医学显像。 ^{99m}Tc 为纯 γ 射线,无 β 辐射,故对人体造成的伤害很低。光子产生率达到 86%,能量为 140KeV,适于显像,便于临床上估算吸收剂量和进行药代动力学研究。

[0005] 由于 ^{99m}Tc 具有放射性,对正常组织有一定伤害,因此,为了提高 ^{99m}Tc 的生物利用率,同时减少对机体的放射性损伤,需要将含 ^{99m}Tc 的 SPECT 显影剂选择性浓集在肿瘤组织。

[0006] 生物素是一种维生素 (维生素 H)。它是生物生长过程中必不可少的营养物质之一。由于癌细胞的快速繁殖需要大量的养分,因此生物素在癌变组织中的含量远远高于正常组织,即生物素对癌细胞具有一定的特异性。然而,生物素极差的水溶性限制了它在生物体中的应用。目前,大量的研究工作都集中在利用各种类型的载体改善生物素的水溶性和生物相容性方面。

[0007] 树状大分子 (dendrimer) 是近年来国外开发的一类新型功能高分子,其分子在结构上具有高度的几何对称性,同时还具有精确的分子结构、大量的官能团、分子内存在空腔及分子链增长具有可控性等特点,这些独特的性质引起相关领域的普遍关注。聚酰胺-胺树状大分子结构如下:

[0008]




[0009] 树状大分子的超大分子量,使其具有EPR效应(enhanced permeation and retention effect),能被动靶向到血管壁比较疏松的肿瘤部位;同时树状大分子表面的活性基团可以连接主动靶向分子,达到主动靶向的效果。因此树状大分子是一种优良的药物载体。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是:为了克服现有的 $\text{Fac}-[{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 对二乙烯三胺五乙酸类双功能整合剂的标记率低的缺陷,提供了一种 ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ 配合物、其制备方法、中间体及其应用。本发明的 ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ 配合物具有优良的肿瘤靶向性、水溶性和稳定性,是一种具有较好代谢能力的 SPECT 显影剂。

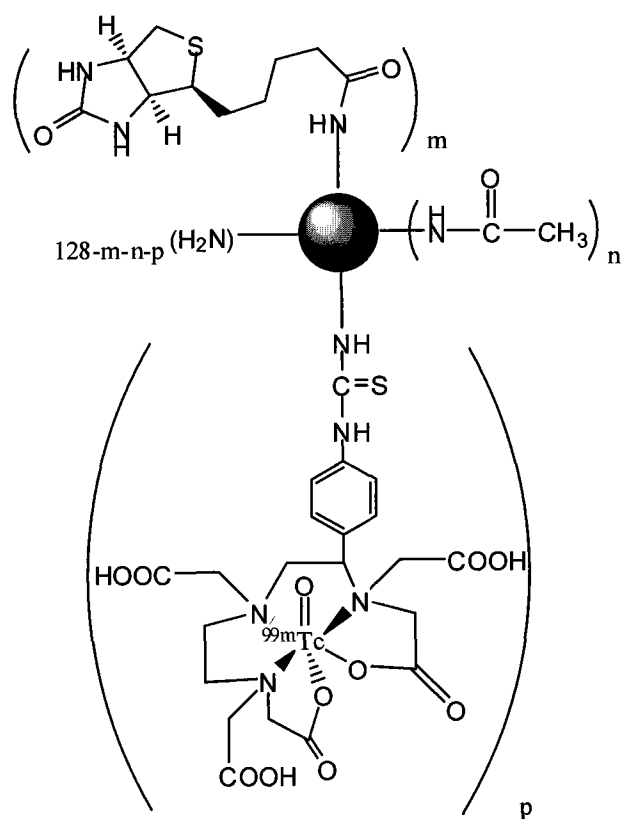
[0011] 发明人经过深入研究发现,为克服生物素水溶性差的缺陷,而尽量保证生物素的药代动力学不受影响,可以选择聚酰胺-胺类树状大分子作为载药平台搭载生物素分子以及双功能整合剂;而为了减小聚酰胺-胺类树状大分子的毒性,发明人首先利用乙酸酐(Ac_2O)乙酰化树状大分子表面的部分氨基。然后通过树状大分子表面的氨基引入生物素分子,以实现显像试剂的肿瘤靶向,最后再连接上双功能整合剂,得到标记前体化合物 I。

[0012] 传统的 $\text{Fac}-[{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 对二乙烯三胺五乙酸类双功能整合剂的标记率很低,实验证明一般低于 10%。而本发明的发明人发现了将 $\text{Na}{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 还原的同时对二乙烯三胺五乙酸类双功能整合剂标记的一步法,即利用 SnCl_2 还原 ${}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$,同时与化合物 I 配位。此法标记率可达到 93%。

[0013] 本发明涉及聚酰胺-胺树状大分子的衍生物以及该衍生物的制备方法,而聚酰胺-胺树状大分子结构复杂,因此将其部分结构用省略的画法来代替,即 128 个氨基以外的结构用球状结构  来表示。

[0014] 因此本发明涉及一种如式 II 所示的 ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ 配合物;

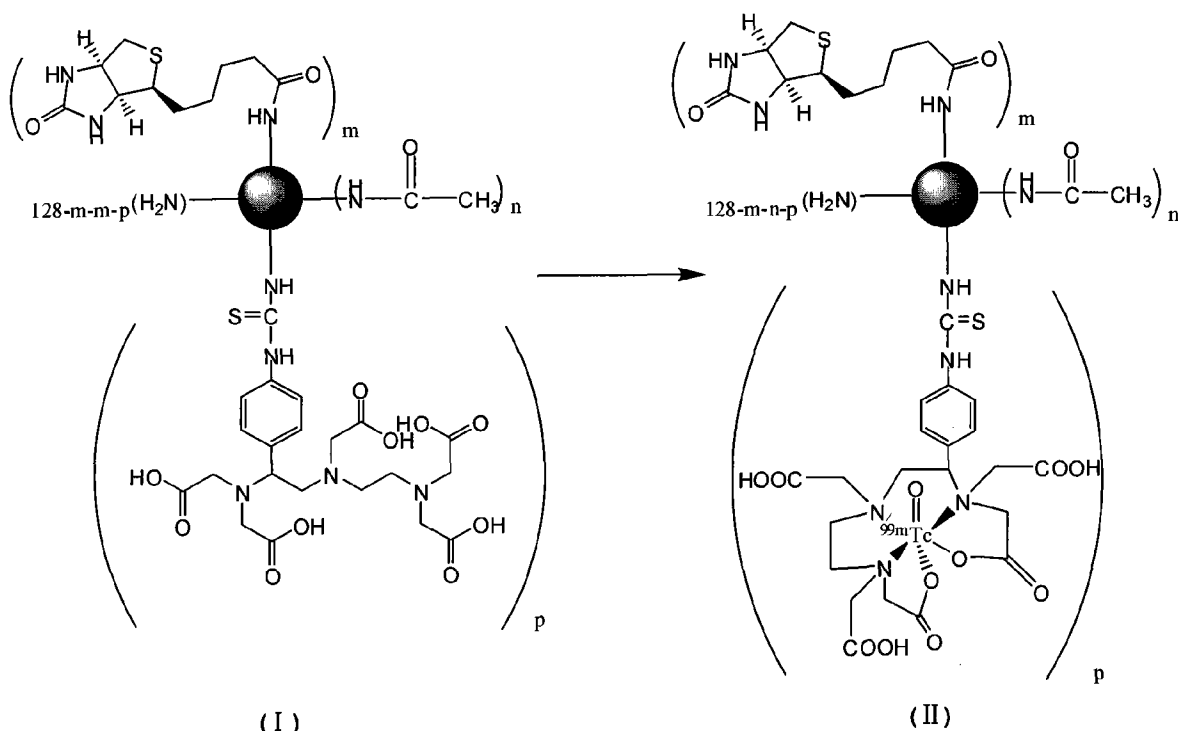
[0015]



[0016] 其中 $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$, 优选 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$, $p = 9 \sim 11$, 最佳的, $m = 9$, $n = 81$, $p = 10$ 。化合物 II 可简写为 PAMAM-Ac-Bt-DTPA- ^{99m}Tc 。

[0017] 本发明进一步涉及上述配合物 II 的制备方法, 其包含下列步骤: 盐酸水溶液中, 在 SnCl_2 的作用下, 将化合物 I 和 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐和 / 或碱土金属盐进行标记反应, 即可;

[0018]

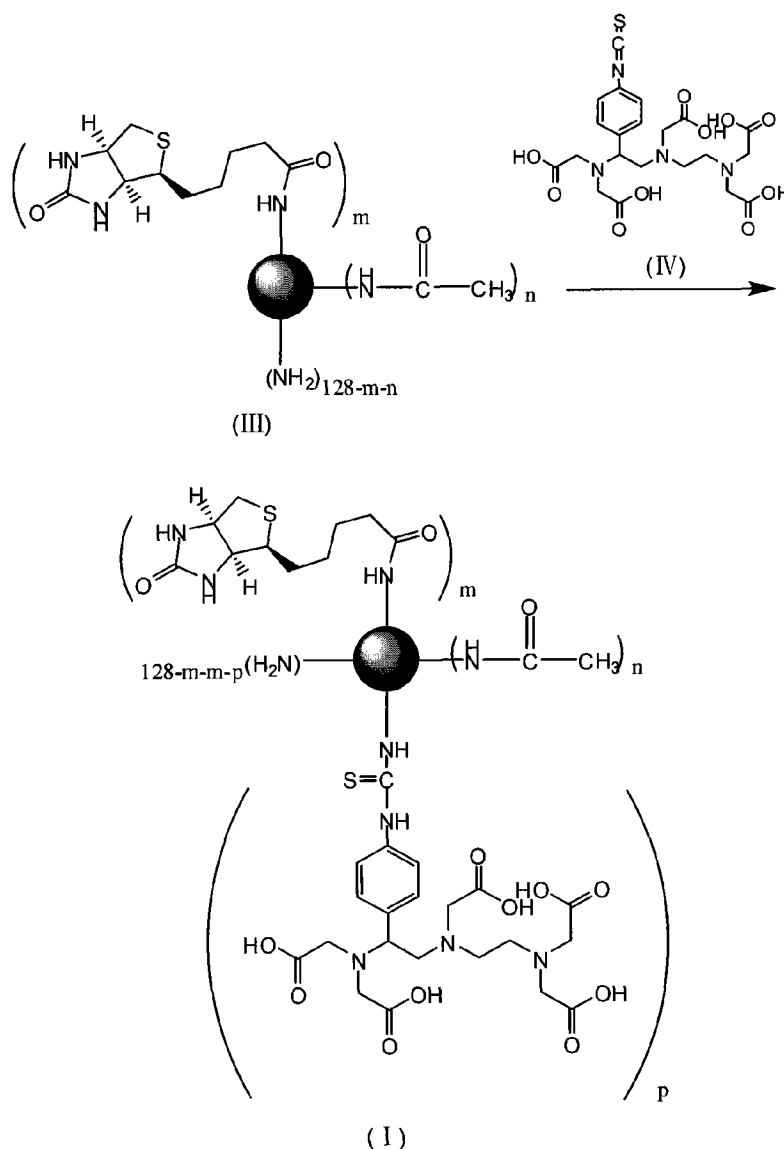


[0019] 其中, $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$, 优选 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$, $p = 9 \sim 11$, 最佳的, $m = 9$, $n = 81$, $p = 10$ 。

[0020] 其中, 所述的反应方法和条件均可为本领域此类标记反应的常规方法和条件, 本发明优选下述条件: 所述的盐酸水溶液与化合物 I 的体积质量比较佳的为 $10 \sim 200\text{ml/g}$; 所述的盐酸水溶液的浓度较佳的为 $0.05 \sim 0.15\text{M}$; 盐酸与化合物 I 的摩尔比较佳的为 $0.1 : 1 \sim 20 : 1$, 更佳的为 $5 : 1 \sim 10 : 1$; 所述的 SnCl_2 的用量可以在很大的范围内选择, 用量越多效果越好, 较佳的为化合物 I 摩尔量的 $3 \sim 20$ 倍, 更佳的为 $5 \sim 10$ 倍; 所述的 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐优选 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$; $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的碱金属盐和 / 或碱土金属盐的放射性活度与化合物 I 的摩尔量之间的比例较佳的为 $1\text{mCi} : 10^{-6}\text{mmol} \sim 1\text{mCi} : 1\text{mmol}$, 更佳的为 $1\text{mCi} : 10^{-4}\text{mmol} \sim 1\text{mCi} : 10^{-2}\text{mmol}$; 所述的反应的温度较佳的为 $60 \sim 100^\circ\text{C}$, 更佳的为 $75 \sim 85^\circ\text{C}$; 所述的反应时间较佳的以检测反应完全为止, 如通过放射性 TLC 检测反应完全为止, 一般为 $0.2 \sim 1$ 小时。

[0021] 本发明中, 所述的化合物 I 可由下列方法制得: 水中, 在碱的作用下, 化合物 III 和化合物 IV (2-对异硫氰苯基-二乙烯三胺五乙酸) 进行氨基与异硫氰基的反应, 即可;

[0022]



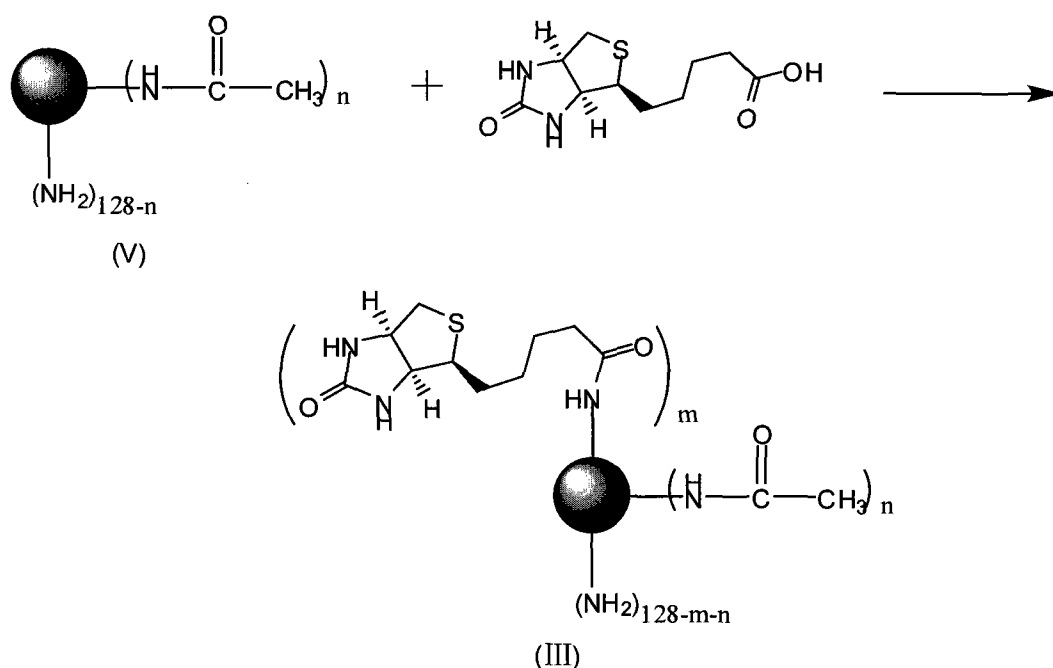
[0023] 其中 $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$, 优选 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$, $p = 9 \sim 11$, 最佳的, $m = 9$, $n = 81$, $p = 10$ 。化合物 I 也可简称为 PAMAM-Ac-Bt-DTPA。

[0024] 其中, 所述的反应方法和条件可为本领域此类反应的常规方法和条件, 本发明特别优选下述条件: 所述的水的用量与化合物 III 的体积质量比较佳的为 $10 \sim 200\text{ml/g}$; 所述的化合物 IV 的用量较佳的为化合物 III 摩尔量的 $5 \sim 40$ 倍, 更佳的为 $10 \sim 20$ 倍; 所述的碱较佳的为无机强碱, 如氢氧化钠, 碱的用量较佳的为控制反应溶液的 pH 范围为 $8 \sim 10$ 的量, 优选 pH 值为 9; 所述的反应温度较佳的为 $30 \sim 50^\circ\text{C}$, 更佳的为 $35 \sim 45^\circ\text{C}$; 所述的反应时间较佳的以检测反应完全为止, 一般为 $24 \sim 72$ 小时。

[0025] 反应完成后, 经过本领域此类反应常规的后处理方法, 如去离子水溶解、过滤和 PBS 溶液透析, 即可制得纯的化合物 I。

[0026] 本发明中, 所述的化合物 III 可由下列方法制得: 将化合物 V 和生物素进行氨基和羧基的缩合反应, 即可;

[0027]



[0028] 其中 $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, 优选 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$; 最佳的, $m = 9$, $n = 81$ 。化合物 III 也可简写为 PAMAM-Ac-Bt。

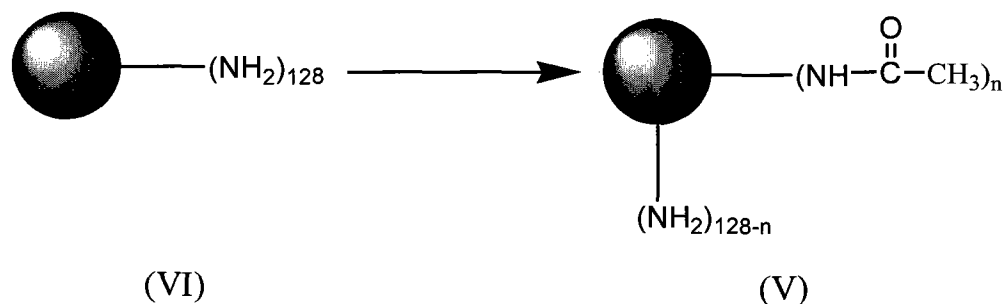
[0029] 其中, 所述的反应方法和条件可为本领域此类缩合反应的常规方法和条件, 优选的方法和条件如下: 溶剂中, 在缩合剂的作用下, 将化合物 V 和生物素进行氨基和羧基的缩合反应, 即可。其中, 所述的溶剂较佳的为 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和 / 或二甲亚砜 (DMSO), 溶剂与化合物 V 的体积质量比较佳的为 $10 \sim 200 \text{ml/g}$; 所述的缩合剂较佳的为 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 和 / 或二环己基碳二亚胺 (DCC), 优选 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl), 缩合剂的用量较佳的为化合物 V 摩尔量的 $10 \sim 100$ 倍, 更佳的为 $30 \sim 50$ 倍; 所述的生物素的用量较佳的为化合物 V 摩尔量的 $5 \sim 100$ 倍, 更佳的为 $10 \sim 20$ 倍; 所述的反应温度较佳的为 $10 \sim 40^\circ\text{C}$, 更佳的为 $20 \sim 30^\circ\text{C}$; 所述的反应时间较佳的以检测反应完全为止, 一般为 $24 \sim 120$ 小时。

[0030] 反应完成后, 经本领域此类反应常规的后处理方法, 如去离子水溶解、过滤和 PBS 溶液透析, 即可制得纯的化合物 III。

[0031] 本发明的制备方法中, 各工艺步骤的优选条件可任意组合, 即得各较佳实例。

[0032] 本发明中, 所述的化合物 V 可由下列方法制得: 将化合物 VI 进行部分氨基的乙酰化反应, 即可;

[0033]

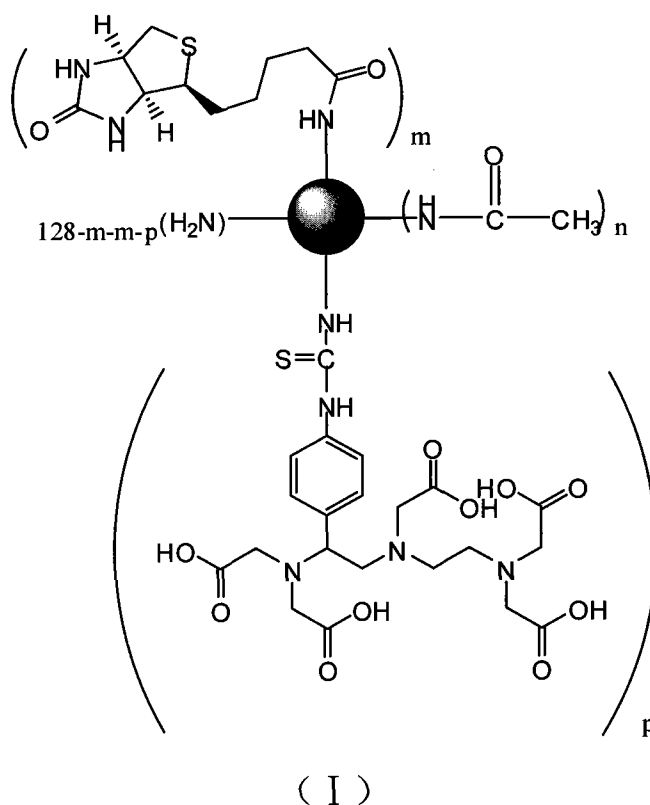


[0034] 其中, $n = 60 \sim 90$, 优选 $n = 80 \sim 82$; 最佳的, $n = 81$ 。

[0035] 其中,所述的反应的方法和条件均可为本领域乙酰化反应的常规方法和条件,具体步骤可参考文献 Istva' n J. Majoros, Acetylation of Poly(amidoamine) Dendrimers, *Macromolecules* 2003, 36, 5526-5529.

[0036] 本发明还涉及一种如式 I 所示的制备 ^{99m}Tc 配合物 II 的中间体化合物,即 ^{99m}Tc 的标记前体化合物,其为聚酰胺-胺类树状大分子衍生物;

[0037]



[0038] 简称为 G5-Ac-Bt-DTPA;其中 $m = 5 \sim 20$, $n = 60 \sim 90$, $p = 5 \sim 20$, 优选 $m = 8 \sim 10$, $n = 80 \sim 82$, $p = 9 \sim 11$;最佳的, $m = 9$, $n = 81$, $p = 10$ 。

[0039] 本发明进一步涉及 ^{99m}Tc 配合物 II 在制备 SPECT 显影剂中的应用。

[0040] 除特殊说明外,本发明涉及的原料和试剂均市售可得。

[0041] 本发明的积极进步效果在于:本发明的 ^{99m}Tc 配合物 II 利用聚酰胺-胺类树状大分子作为药物载体,克服了生物素水溶性不好的缺点,水溶性和稳定性优良,增大了载药量从而加强了显像效果,同时其具有肿瘤靶向性,是一种具有较好代谢能力的 SPECT 显影剂,具有较好的显像前景;且本发明的制备方法步骤简单,可以一步实现 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的还原及其对二乙烯三胺五乙酸类双功能整合剂的标记,标记率高达 93%。

附图说明

[0042] 图 1 为 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的放射性 HPLC 谱图,保留时间 $t = 6.15\text{min}$ 。

[0043] 图 2 为实施例 4 制得的配合物 II 的放射性 HPLC 谱图,保留时间 $t = 11.25\text{min}$ 。

[0044] 图 3 为实施例 8 制得的配合物 II 的放射性 HPLC 谱图,保留时间 $t = 11.30\text{min}$ 。

[0045] 图 4 为实施例 12 制得的配合物 II 的放射性 HPLC 谱图,保留时间 $t = 11.40\text{min}$ 。

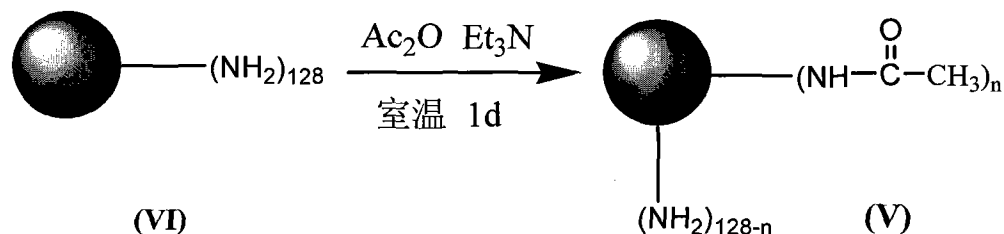
[0046] 图 5 为实施例 4 制得的配合物 II 对肿瘤鼠的 SPECT 成像图。

具体实施方式

[0047] 下面用实施例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。

[0048] 实施例 1: 化合物 V ($n = 81$) 的合成 (五代聚酰胺-胺树状大分子的部分乙酰化)

[0049]



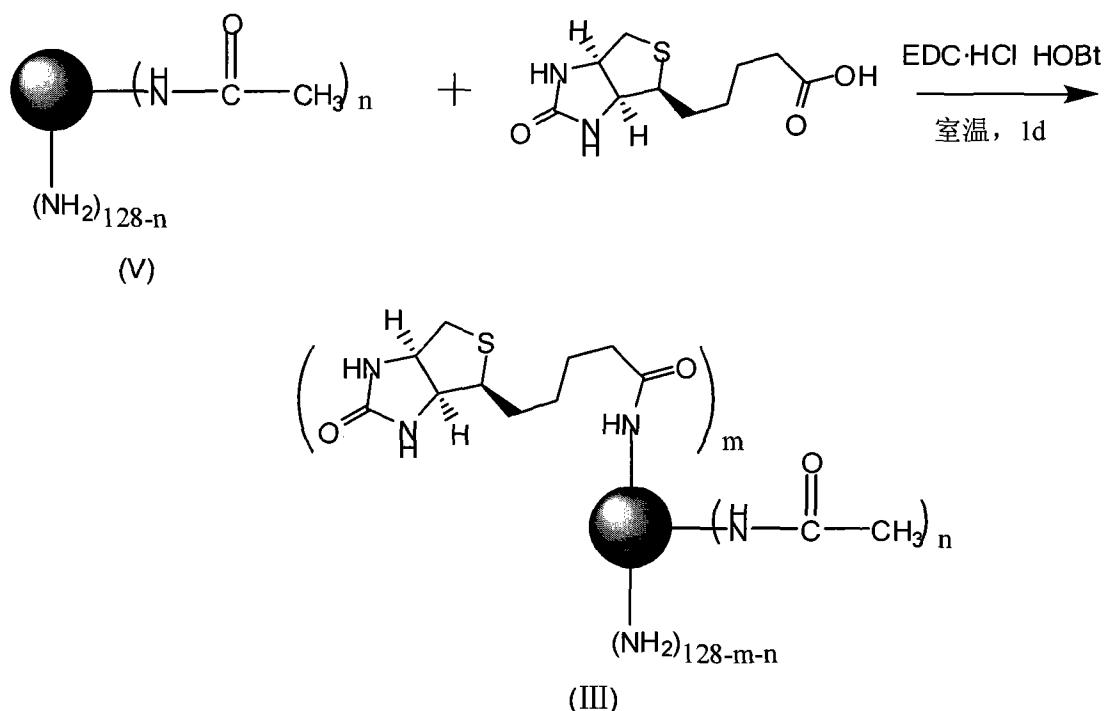
[0050] 根据文献 (Istvan J. Majoros, Acetylation of Poly(amidoamine) Dendrimers, *Macromolecules* 2003, 36, 5526-5529) 乙酰化树状大分子, 具体步骤如下: 100mg 的五代聚酰胺-胺树状大分子 (化合物 VI, G5 PAMAM, 分子量 28824, 储存在甲醇中, wt : 5%) (约为 $3.47 \times 10^{-6} \text{ mol}$)、24.9 μl 的醋酸酐 (Ac_2O) (约为 $2.43 \times 10^{-4} \text{ mol}$) 和 43.4 μl 的三乙胺 (Et_3N) (约为 $3.04 \times 10^{-4} \text{ mol}$) 混合, 氮气保护室温下 (25°C) 搅拌反应 24h, 得到无色透明液体。旋干溶剂, 用去离子水溶解产物, 用水相针式过滤器 (规格 $25\text{mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤, 滤液在 PBS 溶液中透析 (PBS 配方: NaCl 8.0g、 KCl 0.2g、 Na_2HPO_4 1.44g、 KH_2PO_4 0.27g 溶于 1000ml 去离子水中, 测定 $\text{pH} = 7.31$)。透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 94.7%。

[0051] 其鉴定数据如下:

[0052] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (244H, s), 2.33 (504H, br)

[0053] 实施例 2: 化合物 III ($m = 9, n = 81$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0054]



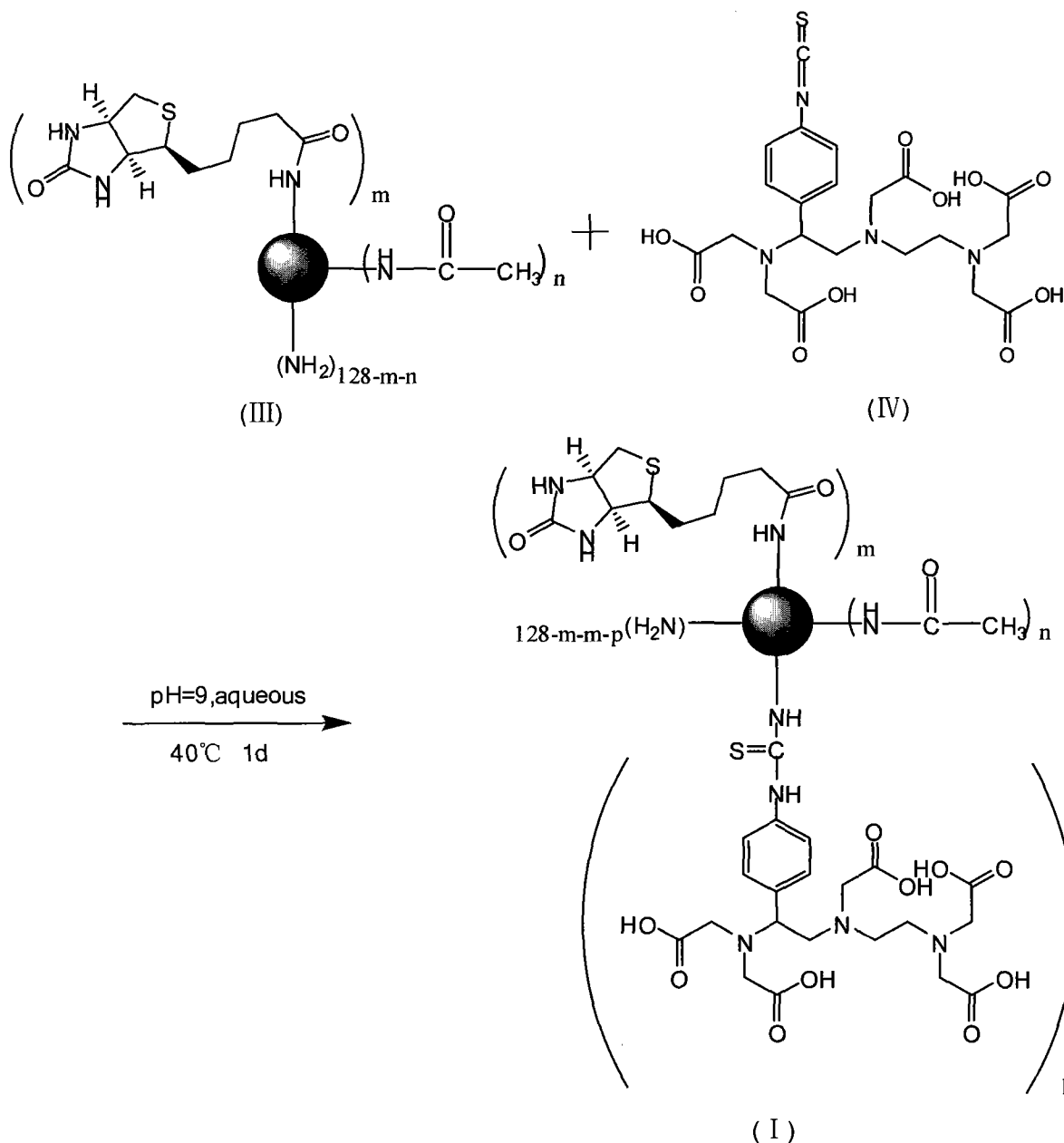
[0055] 30mg 生物素 ($1.24 \times 10^{-4} \text{mol}$)、48mg EDC·HCl ($2.48 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 36mg HOBt ($2.48 \times 10^{-4} \text{mol}$) 溶解在 2ml DMSO 中, 室温下反应 1h, 然后加入 5ml 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac, $3.1 \times 10^{-6} \text{mol}$) 的 DMSO 溶液, 室温下反应 1d, 去离子水稀释, 过滤除去未反应的生物素, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 90.3%。

[0056] 其鉴定数据如下:

[0057] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (244H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (9H, s), 4.62 (10H, s)

[0058] 实施例 3: 化合物 I ($m = 9, n = 81, p = 10$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA 的合成)

[0059]



[0060] 在含 $3 \times 10^{-6} \text{mol}$ G5-Ac-Bt 的水溶液中 (浓度 0.6mM), 加入 $6 \times 10^{-5} \text{mol}$ 化合物 IV, 用 1M NaOH 溶液调节 $\text{pH} = 9$, 40°C 下反应 24h, 去离子稀释, 水相针式过滤器 (规格

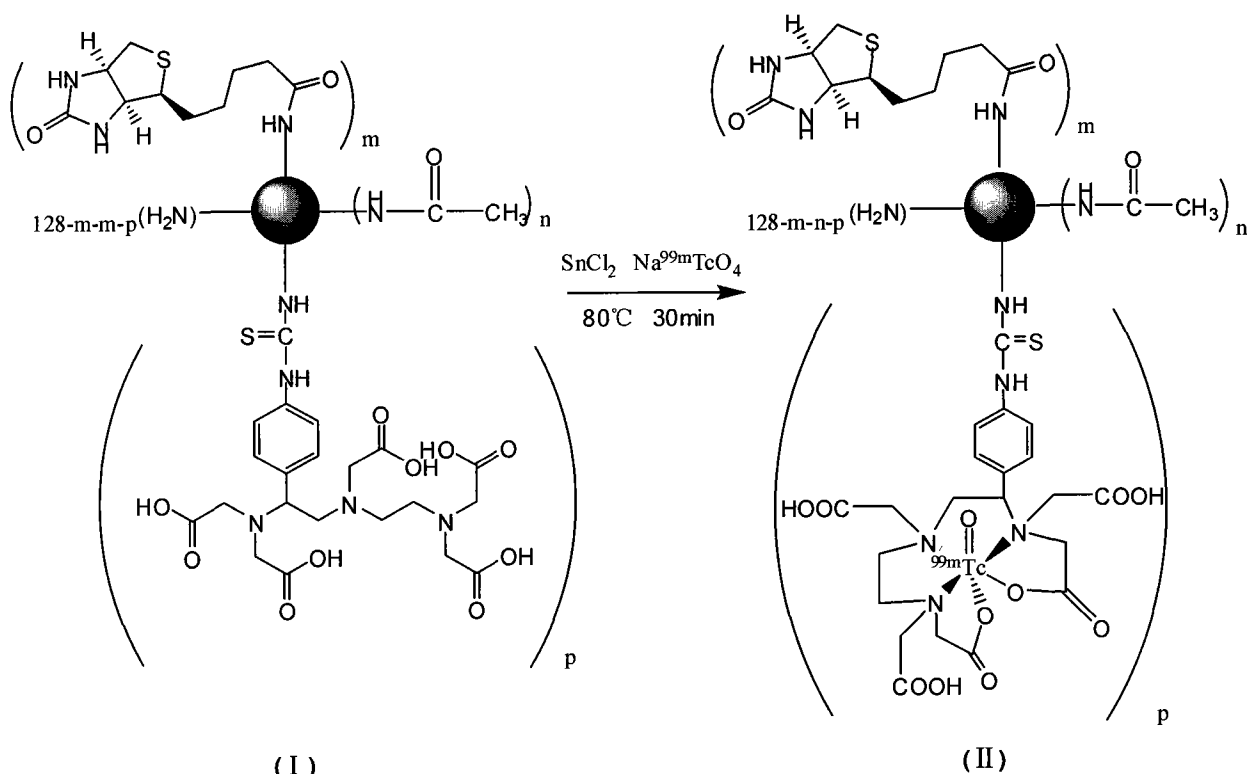
25mm×0.20 μm) 过滤, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 92.7%。

[0061] 核磁数据如下:

[0062] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (244H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (9H, s), 4.62 (10H, s), 6.84 (18H, m), 7.11 (21H, m)

[0063] 实施例 4: 化合物 II ($m = 9, n = 81, p = 10$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的合成)

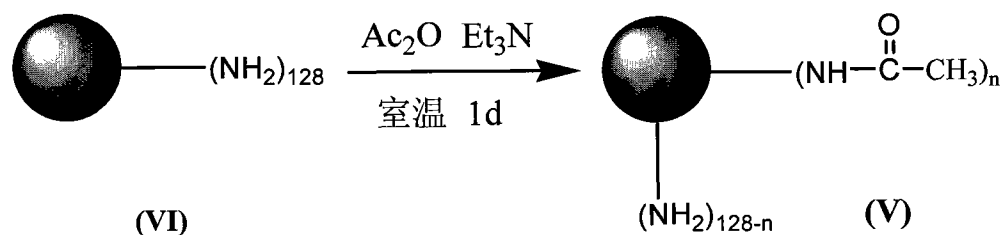
[0064]



[0065] 将化合物 I (50mg, 1.2×10^{-6} mol) 溶解在 5ml 的 SnCl_2 (SnCl_2 浓度 5.27×10^{-3} M) 盐酸溶液 (盐酸浓度: 0.1M) 中, 然后加入 1mCi $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 水溶液, 在 80°C 的水浴中反应 30min, 得到标记产物。标记率约为 93%, 用放射性 HPLC 鉴定, 结果见附图 2, 保留时间 $t = 11.25\text{min}$ 。

[0066] 实施例 5: 化合物 V ($n = 90$) 的合成 (五代聚酰胺-胺树状大分子的部分乙酰化)

[0067]



[0068] 根据文献 (Istvan J. Majoros, Acetylation of Poly(amidoamine) Dendrimers, *Macromolecules* 2003, 36, 5526-5529) 乙酰化树状大分子, 具体步骤如下: 100mg 的五代聚酰胺-胺树状大分子 (化合物 VI, G5 PAMAM, 分子量 28824, 储存在甲醇中,

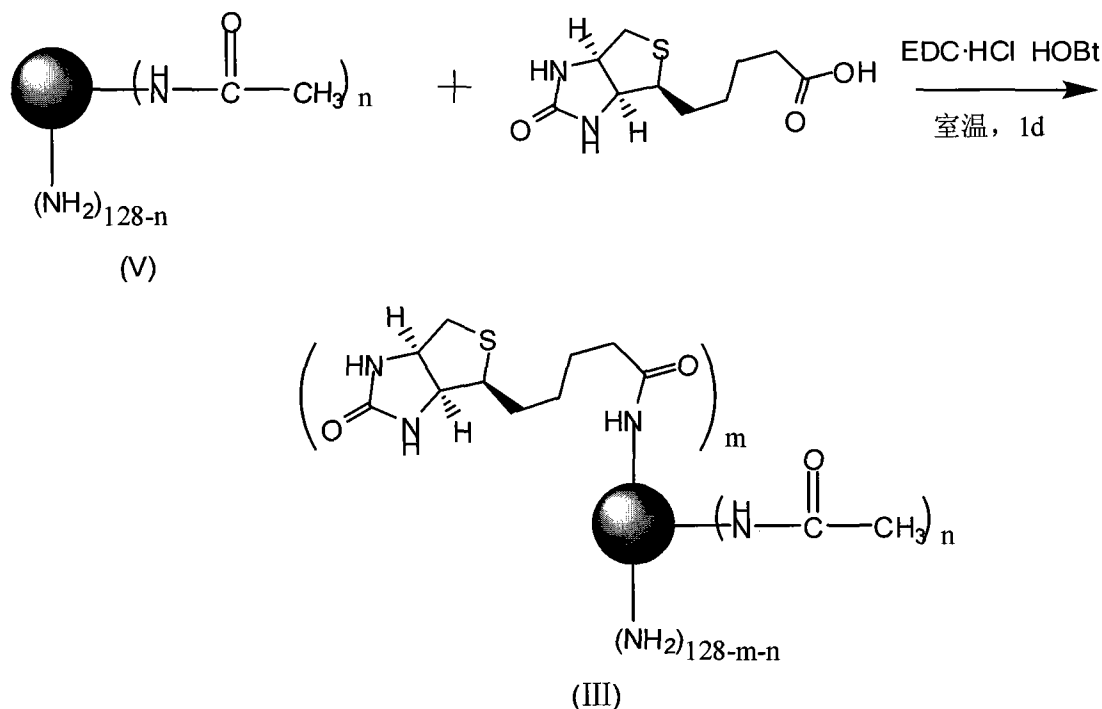
wt :5%) (约为 $3.47 \times 10^{-6} \text{mol}$)、 $28 \mu\text{l}$ 的醋酸酐 (Ac_2O) (约为 $2.73 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 $48.8 \mu\text{l}$ 的三乙胺 (Et_3N) (约为 $3.42 \times 10^{-4} \text{mol}$) 混合, 氮气保护室温下 (25°C) 搅拌反应 24h, 得到无色透明液体。旋干溶剂, 用去离子水溶解产物, 用水相针式过滤器 (规格 $25\text{mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤, 滤液在 PBS 溶液中透析 (PBS 配方: NaCl 8.0g、 KCl 0.2g、 Na_2HPO_4 1.44g、 KH_2PO_4 0.27g 溶于 1000ml 去离子水中, 测定 $\text{pH} = 7.31$)。透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 95%。

[0069] 其鉴定数据如下:

[0070] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (270H, s), 2.33 (504H, br)

[0071] 实施例 6: 化合物 III ($m = 5, n = 90$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0072]



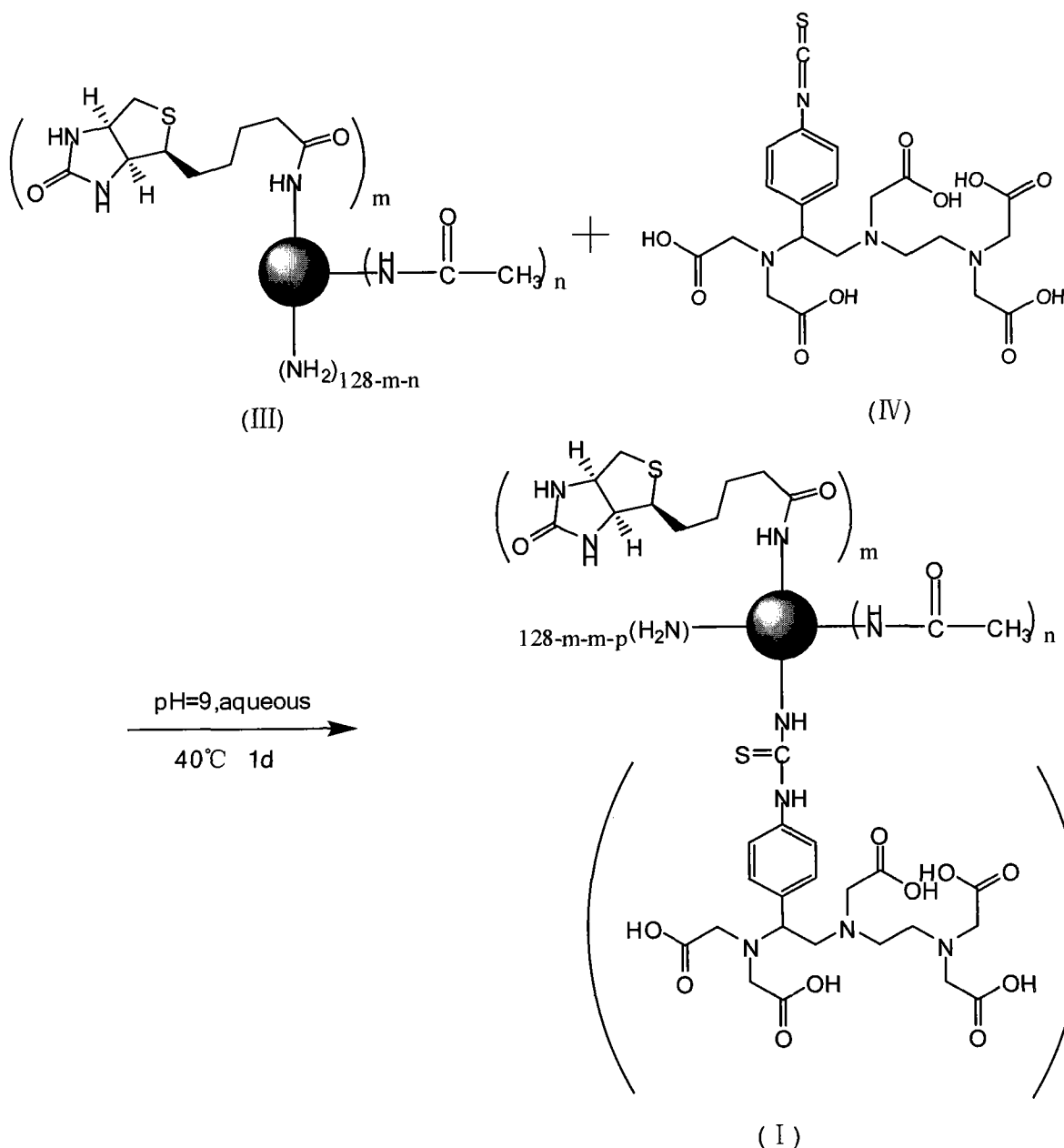
[0073] 15mg 生物素 ($6.2 \times 10^{-5} \text{mol}$)、24mg $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ ($1.24 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 18mg HOBT ($1.24 \times 10^{-4} \text{mol}$) 溶解在 2ml DMSO 中, 室温下反应 1h, 然后加入 5ml 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac , $3.1 \times 10^{-6} \text{mol}$) 的 DMSO 溶液, 室温下反应 1 天, 去离子水稀释, 过滤除去未反应的生物素, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 91%。

[0074] 其鉴定数据如下:

[0075] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (270H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (5H, s), 4.62 (5H, s)

[0076] 实施例 7: 化合物 I ($m = 5, n = 90, p = 5$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA 的合成)

[0077]



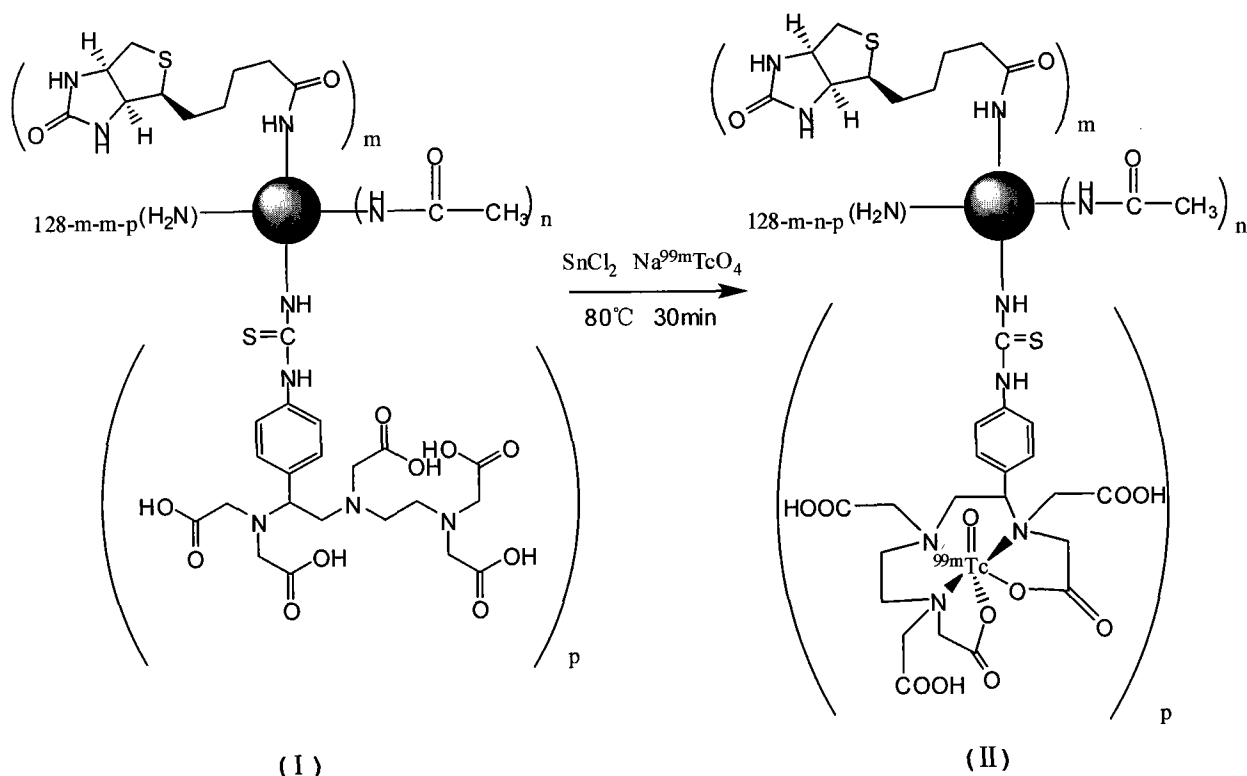
[0078] 在含 $3 \times 10^{-6} \text{ mol}$ G5-Ac-Bt 的水溶液中, 加入 $3 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 化合物 IV, 用 1MNaOH 溶液调节 $\text{pH} = 9$, 40°C 下反应 24h, 去离子稀释, 水相用针式过滤器 (规格 $25\text{mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 93%。

[0079] 核磁数据如下:

[0080] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (270H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (5H, s), 4.62 (5H, s), 6.84 (10H, m), 7.11 (10H, m)

[0081] 实施例 8: 化合物 II ($m = 5$, $n = 90$, $p = 5$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的合成)

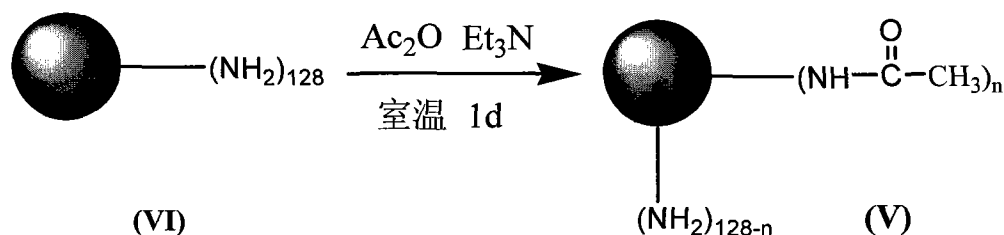
[0082]



[0083] 将化合物 I 1.2×10^{-6} mol 溶解在 3ml 的 SnCl_2 (SnCl_2 浓度 5.27×10^{-3} M) 盐酸溶液 (盐酸浓度: 0.1M) 中, 然后加入 0.5mCi $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液, 在 80°C 的水浴中反应 30min, 得到标记产物。标记率约为 91%, 用放射性 HPLC 鉴定, 结果见附图 3, $t = 11.30\text{min}$ 。

[0084] 实施例 9: 化合物 V ($n = 60$) 的合成 (五代聚酰胺-胺树状大分子的部分乙酰化)

[0085]



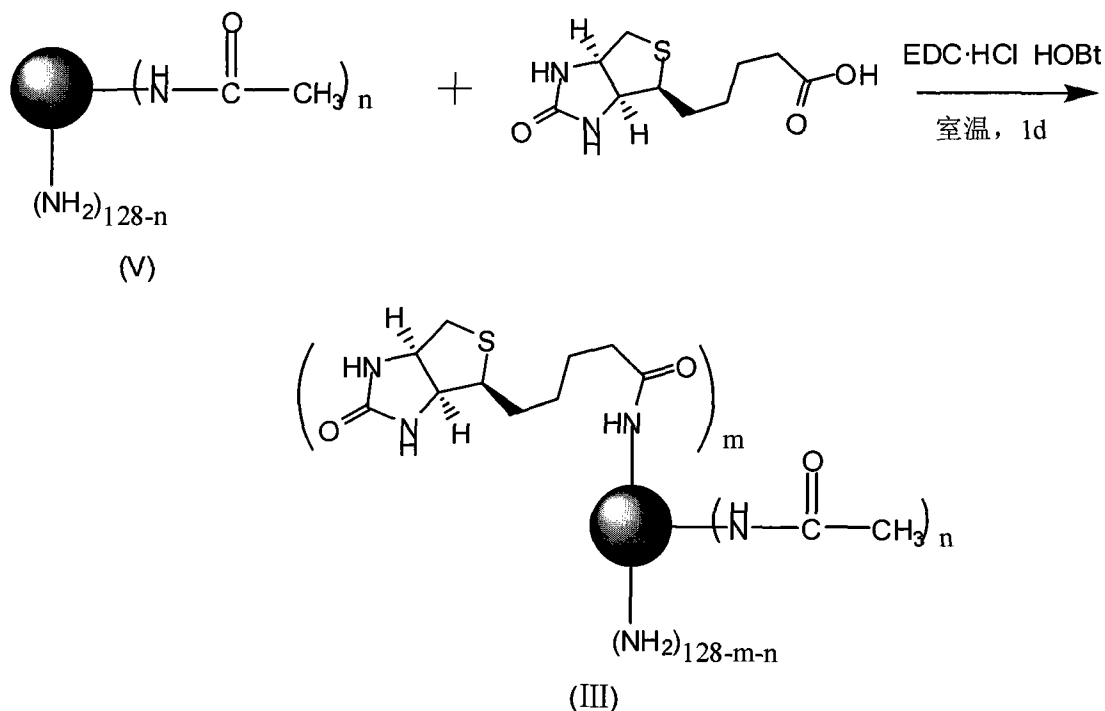
[0086] 根据文献 (Istvan J. Majoros, Acetylation of Poly(amidoamine) Dendrimers, *Macromolecules* 2003, 36, 5526-5529) 乙酰化树状大分子, 具体步骤如下: 100mg 的五代聚酰胺-胺树状大分子 (化合物 VI, G5 PAMAM, 分子量 28824, 储存在甲醇中, wt: 5%) (约为 3.47×10^{-6} mol)、18.7 μl 的醋酸酐 (Ac_2O) (约为 1.82×10^{-4} mol) 和 32.6 μl 的三乙胺 (Et_3N) (约为 2.28×10^{-4} mol) 混合, 氮气保护室温下 (25°C) 搅拌反应 24h, 得到无色透明液体。旋干溶剂, 用去离子水溶解产物, 用水相针式过滤器 (规格 $25\text{mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤, 滤液在 PBS 溶液中透析 (PBS 配方: NaCl 8.0g、 KCl 0.2g、 Na_2HPO_4 1.44g、 KH_2PO_4 0.27g 溶于 1000ml 去离子水中, 测定 $\text{pH} = 7.31$)。透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 91%。

[0087] 其鉴定数据如下:

[0088] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (180H, s), 2.33 (504H, br)

[0089] 实施例 10 : 化合物 III ($m = 20, n = 60$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0090]



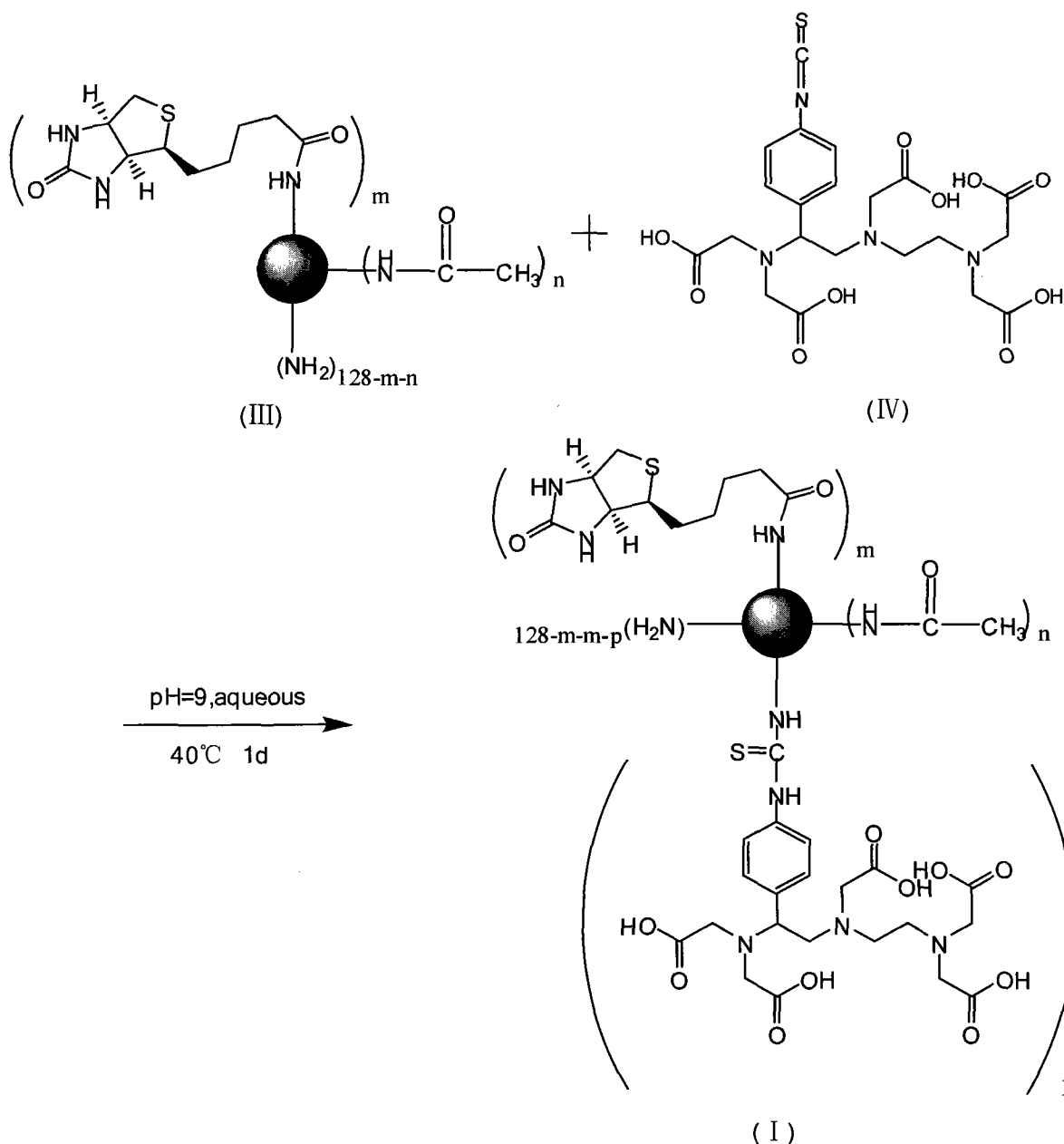
[0091] 75mg 生物素 ($3.1 \times 10^{-4} \text{mol}$)、120mg EDC·HCl ($6.2 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 90mg HOBT ($6.2 \times 10^{-4} \text{mol}$) 溶解在 5ml DMSO 中, 室温下反应 1h, 然后加入 5mL 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac, $3.1 \times 10^{-6} \text{mol}$) 的 DMSO 溶液, 室温下反应 1d, 去离子水稀释, 过滤除去未反应的生物素, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 90%。

[0092] 其鉴定数据如下:

[0093] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (180H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (20H, s), 4.62 (20H, s)

[0094] 实施例 11 : 化合物 I ($m = 20, n = 60, p = 20$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA 的合成)

[0095]



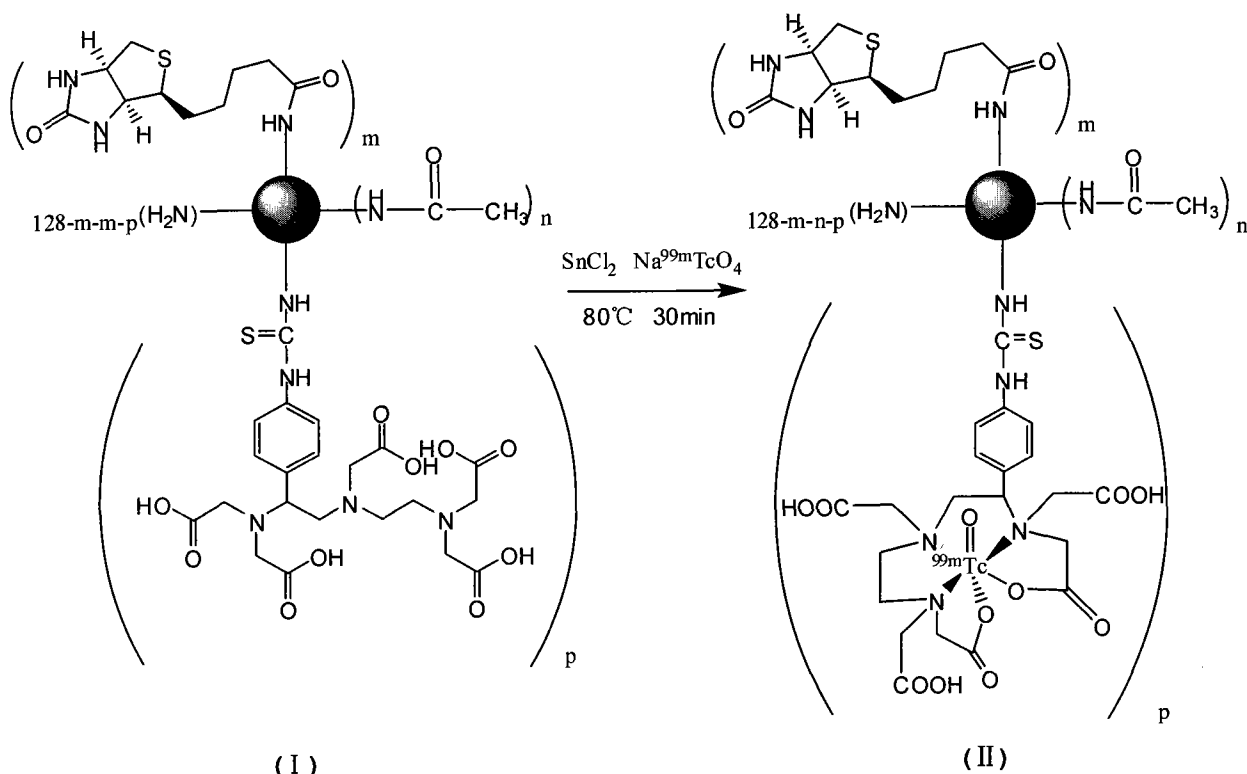
[0096] 在含 $3 \times 10^{-6} \text{ mol}$ G5-Ac-Bt 的水溶液中,加入 $9 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 化合物 IV,用 1 M NaOH 溶液调节 $\text{pH} = 9$, 40°C 下反应 24h,去离子稀释,水相针式过滤器 (规格 $25 \text{ mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤,滤液在 PBS 溶液中透析一天,更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天,每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥,产率约为 94%。

[0097] 核磁数据如下:

[0098] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (180H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (20H, s), 4.62 (20H, s), 6.84 (39H, m), 7.11 (40H, m)

[0099] 实施例 12: 化合物 II ($m = 20$, $n = 60$, $p = 20$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的合成)

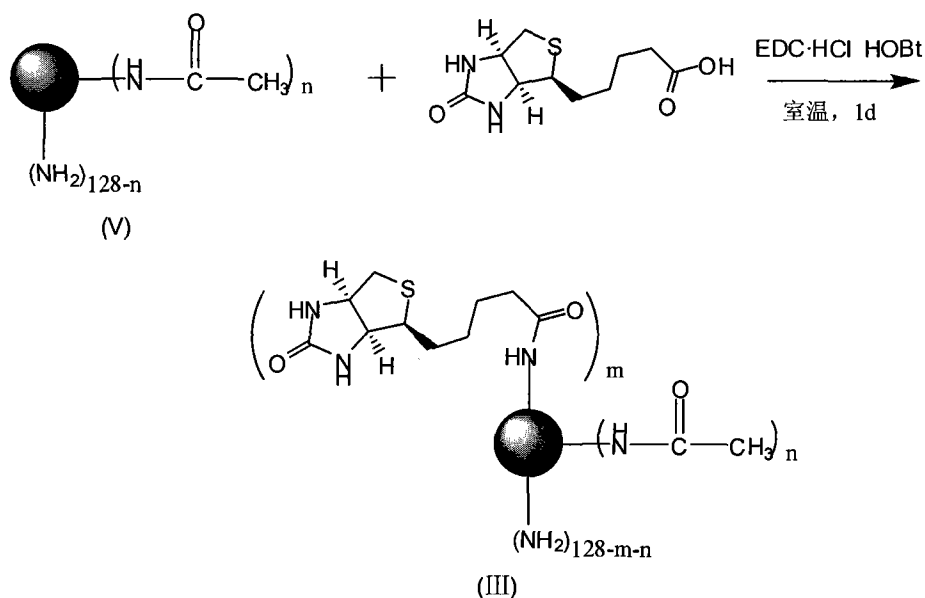
[0100]



[0101] 将化合物 I 1.2×10^{-6} mol 溶解在 5ml 的 SnCl_2 (SnCl_2 浓度 5.27×10^{-3} M) 盐酸溶液 (盐酸浓度: 0.1M) 中, 然后加入 2mCi $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液, 在 80°C 的水浴中反应 30min, 得到标记产物。标记率约为 95%, 用放射性 HPLC 鉴定, 结果见附图 4, $t = 11.40$ min。

[0102] 实施例 13: 化合物 III ($m = 5, n = 90$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0103]



[0104] 15mg 生物素 (6.2×10^{-5} mol)、6mg $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ (3.1×10^{-5} mol) 和 4.5mg HOBt (3.1×10^{-5} mol) 溶解在 2ml DMF 中, 10°C 下反应 1h, 然后加入 5ml 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac, 3.1×10^{-6} mol) 的 DMF 溶液, 10°C 下反应 1 天, 去离子水稀释, 过滤除去未反应的生物素, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥,

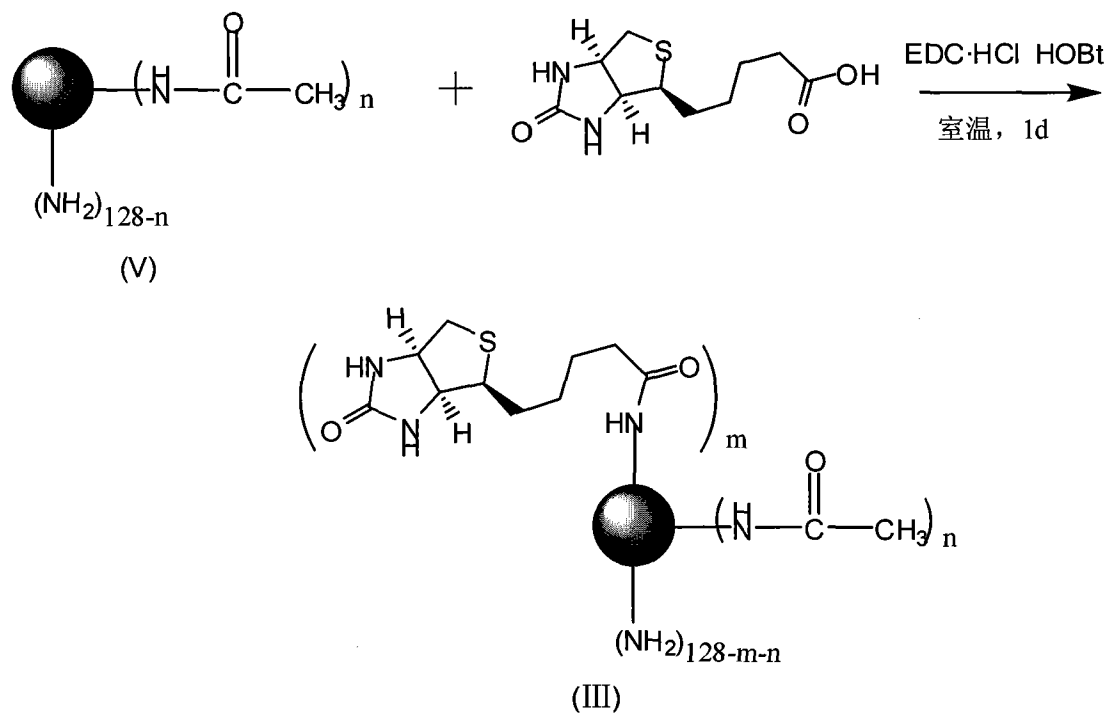
产率约为 90.4%。

[0105] 其鉴定数据如下：

[0106] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.87 (270H, s), 2.33 (504H, br), 4.45 (5H, s), 4.67 (5H, s)

[0107] 实施例 14 : 化合物 III ($m = 5, n = 90$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0108]



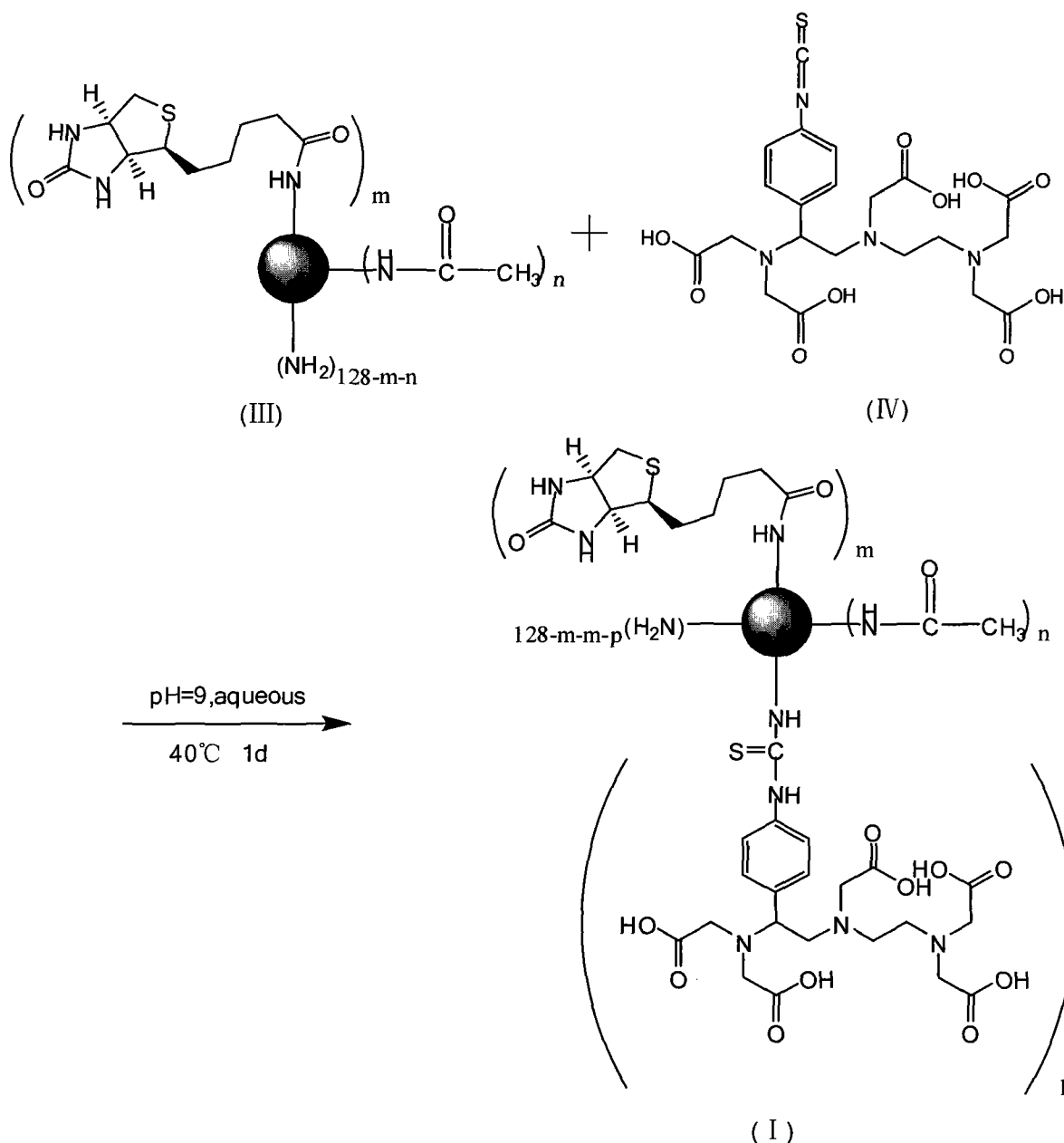
[0109] 15mg 生物素 ($6.2 \times 10^{-5} \text{mol}$)、60mg EDC·HCl ($3.1 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 45mg HOBT ($3.1 \times 10^{-4} \text{mol}$) 溶解在 2ml DMSO 中, 10°C 下反应 1h, 然后加入 5ml 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac, $3.1 \times 10^{-6} \text{mol}$) 的 DMSO 溶液, 10°C 下反应 1 天, 去离子水稀释, 过滤除去未反应的生物素, 滤液在 PBS 溶液中透析一天, 更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天, 每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥, 产率约为 91.1%。

[0110] 其鉴定数据如下：

[0111] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (270H, s), 2.32 (504H, br), 4.45 (5H, s), 4.64 (5H, s)

[0112] 实施例 15 : 化合物 I ($m = 9, n = 81, p = 10$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA 的合成)

[0113]



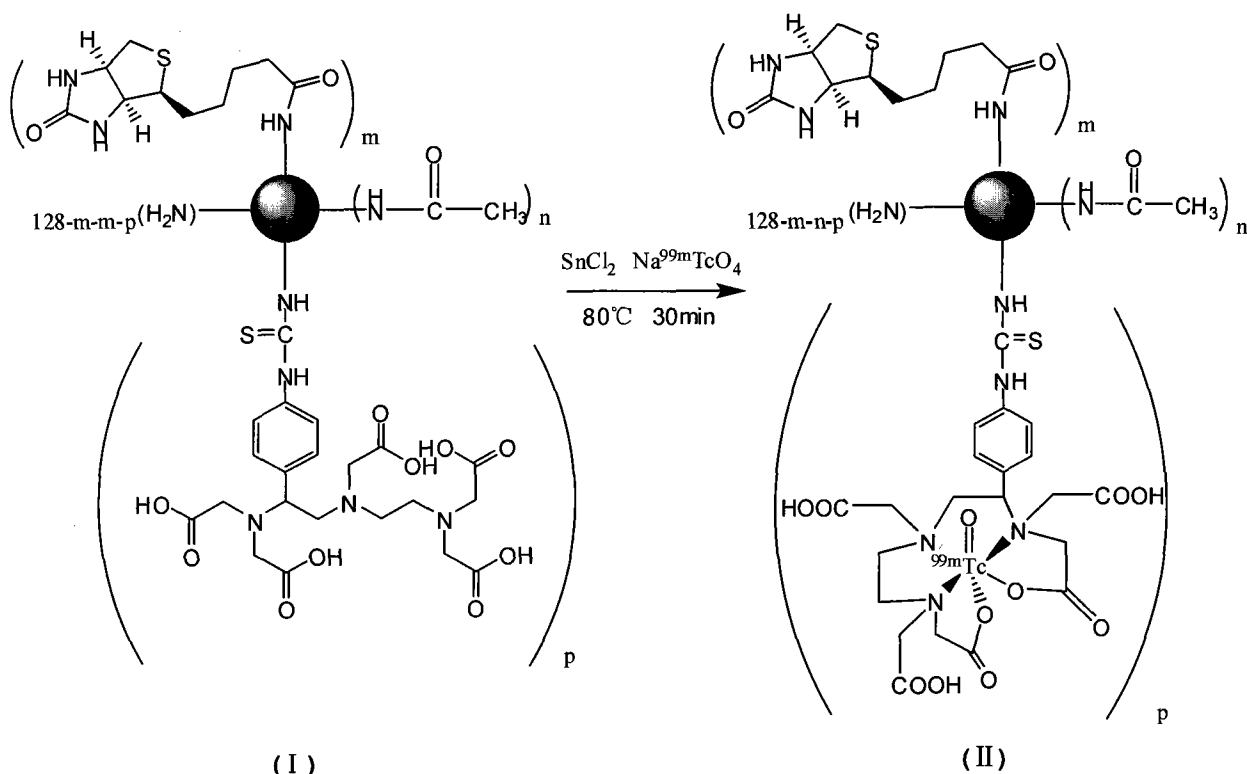
[0114] 在含 $3 \times 10^{-6} \text{ mol}$ G5-Ac-Bt 的水溶液中,加入 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 化合物 IV,用 1M NaOH 溶液调节 $pH = 8$, $30^\circ C$ 下反应 24h,去离子稀释,水相针式过滤器 (规格 $25 \text{ mm} \times 0.20 \mu \text{ m}$) 过滤,滤液在 PBS 溶液中透析一天,更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天,每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥,产率约为 92.4%。

[0115] 核磁数据如下:

[0116] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.88 (244H, s), 2.33 (504H, br), 4.45 (9H, s), 4.62 (10H, s), 6.85 (18H, m), 7.13 (21H, m)

[0117] 实施例 16:化合物 II ($m = 9$, $n = 81$, $p = 10$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA- ^{99m}Tc 的合成)

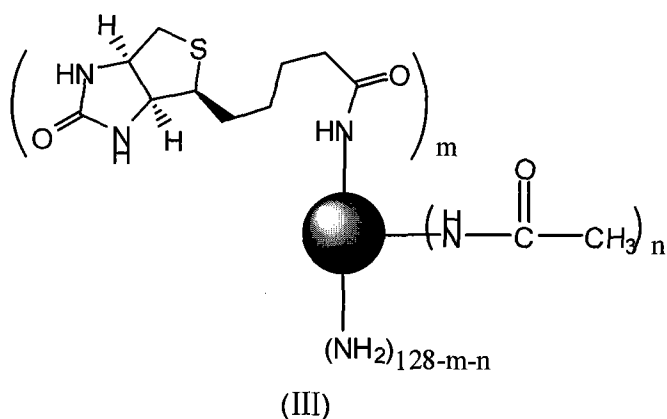
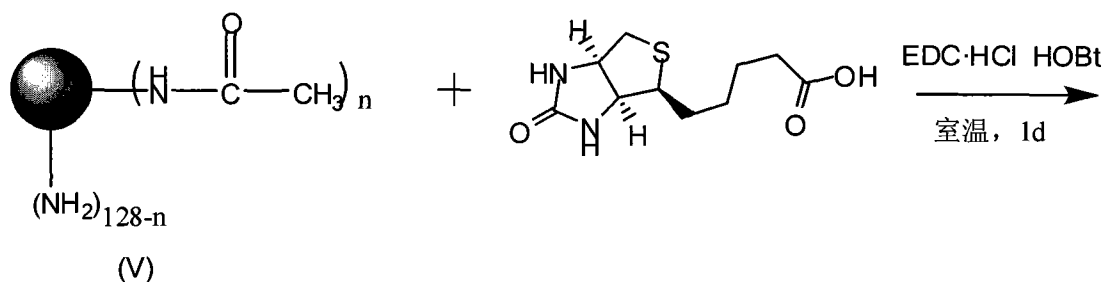
[0118]



[0119] 将化合物 I (50mg, 1.2×10^{-6} mol) 溶解在 3ml 的 SnCl_2 (SnCl_2 浓度 5.27×10^{-3} M) 盐酸溶液 (盐酸浓度: 0.05M) 中, 然后加入 1.2×10^{-3} mCi $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液, 在 60°C 的水浴中反应 30min, 得到标记产物。标记率约为 92%, 用放射性 HPLC 鉴定, 结果同实施例 4。

[0120] 实施例 17: 化合物 III ($m = 20, n = 60$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt 的合成)

[0121]



[0122] 3.6mg 生物素 (1.5×10^{-5} mol)、130mg DCC (6.2×10^{-4} mol) 和 90mg HOBT (6.2×10^{-4} mol) 溶解在 5ml DMSO 中, 40°C 下反应 1h, 然后加入 5ml 溶有 100mg 部分乙酰化的五代聚酰胺-胺树状大分子 (G5-Ac, 3.1×10^{-6} mol) 的 DMSO 溶液, 40°C 下反应 1d, 去

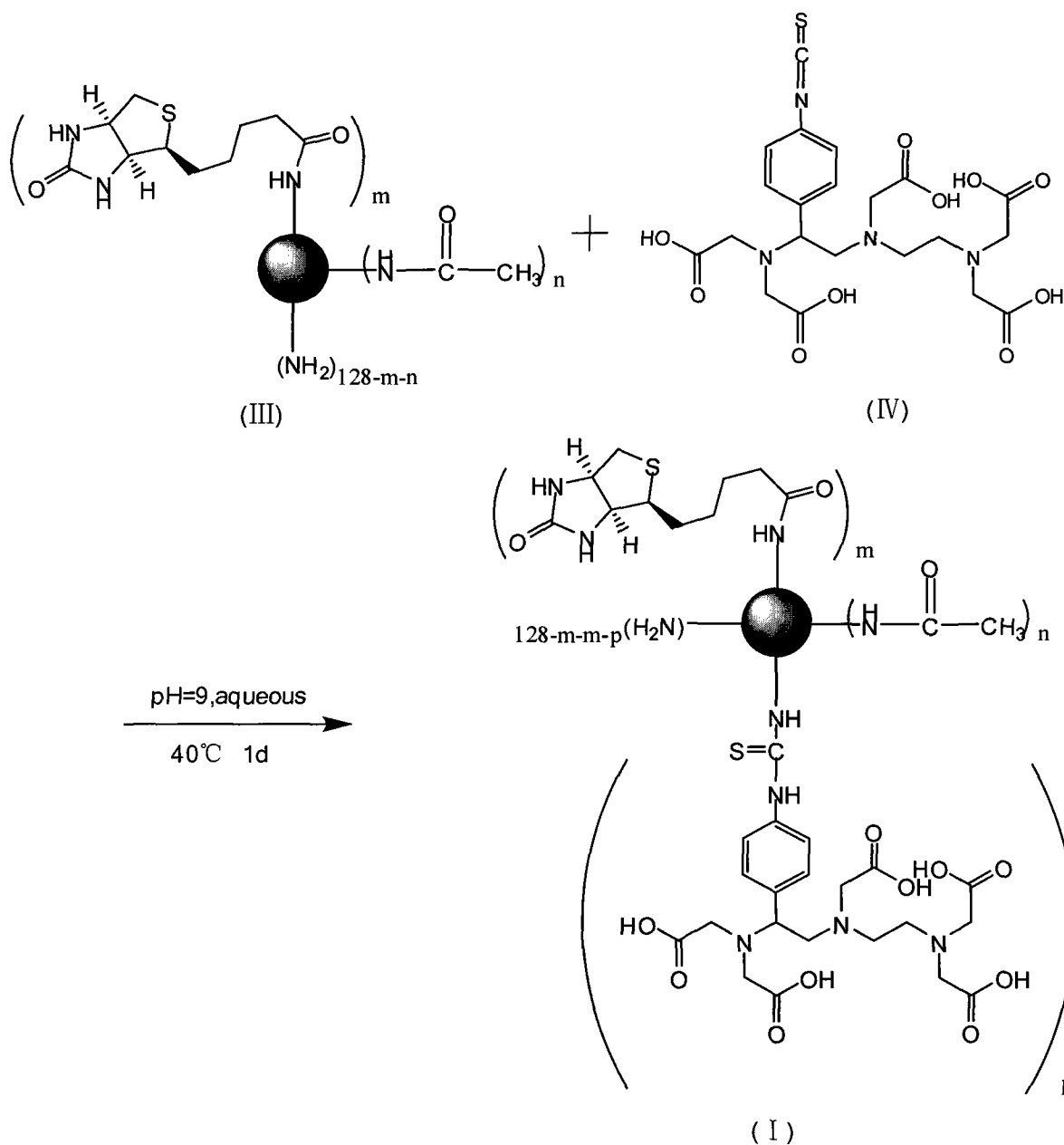
离子水稀释,过滤除去未反应的生物素,滤液在PBS溶液中透析一天,更换三次PBS溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天,每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥,产率约为91.0%。

[0123] 其鉴定数据如下:

[0124] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.87 (180H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (20H, s), 4.61 (20H, s)

[0125] 实施例 18: 化合物 I ($m = 5, n = 90, p = 5$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA 的合成)

[0126]



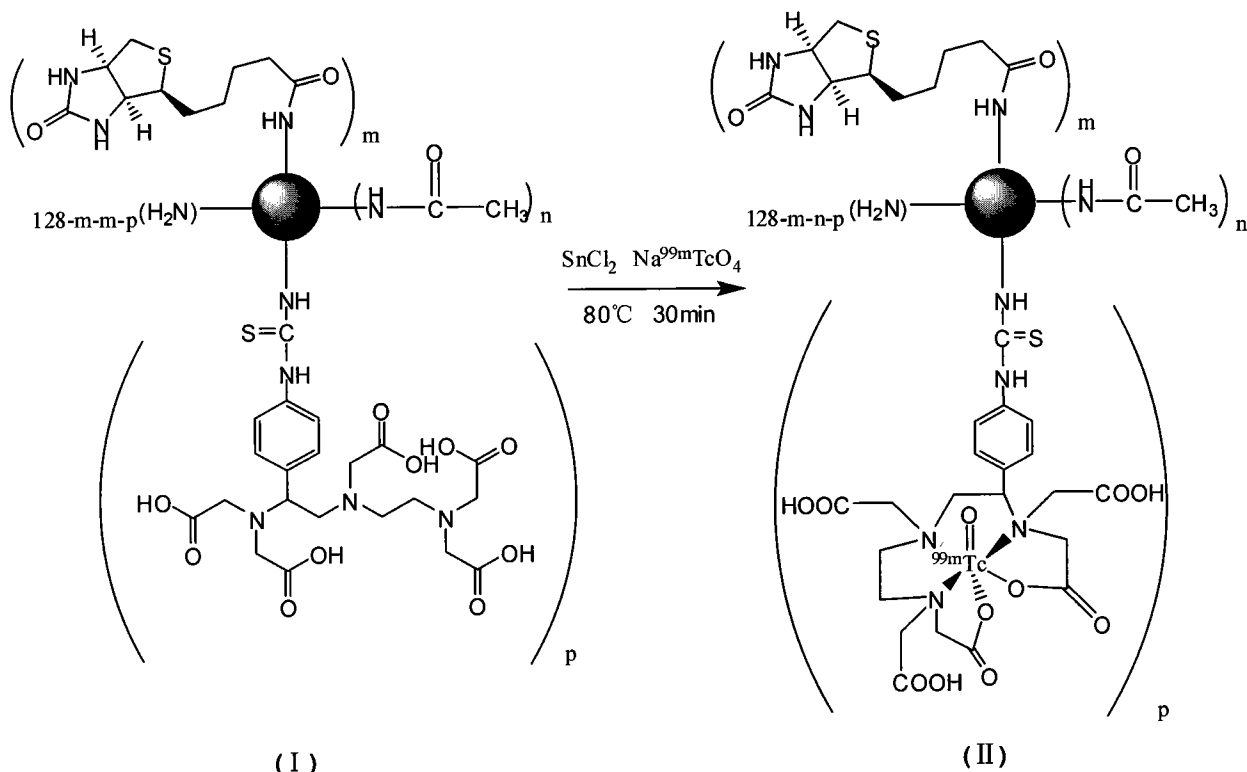
[0127] 在含 $3 \times 10^{-6} \text{ mol}$ G5-Ac-Bt 的水溶液中,加入 $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol}$ 化合物 IV,用 1M NaOH 溶液调节 $\text{pH} = 10$, 50°C 下反应 24h,去离子稀释,水相用针式过滤器 (规格 $25\text{mm} \times 0.20 \mu\text{m}$) 过滤,滤液在 PBS 溶液中透析一天,更换三次 PBS 溶液。将上述产物继续在去离子水中透析两天,每天更换三次水。透析结束将得到的产物冷冻干燥,产率约为 93.1%。

[0128] 核磁数据如下:

[0129] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS, 500MHz), δ 1.87 (270H, s), 2.33 (504H, br), 4.44 (5H, s), 4.61 (5H, s), 6.84 (10H, m), 7.11 (10H, m)

[0130] 实施例 19: 化合物 II ($m = 5, n = 90, p = 5$) 的合成 (PAMAM-Ac-Bt-DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的合成)

[0131]



[0132] 化合物 I $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol}$ 溶解在 0.7ml 的 SnCl_2 (SnCl_2 浓度 $5.27 \times 10^{-3} \text{ M}$) 盐酸溶液 (盐酸浓度: 0.15M) 中, 然后加入 $1.2 \times 10^3 \text{ mCi Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液, 在 100°C 的水浴中反应 30min, 得到标记产物。标记率约为 92%, 用放射性 HPLC 鉴定, 结果同实施例 4。

[0133] HPLC 表征实施例:

[0134] 以上合成的化合物 I 经核磁表征正确, 为确定化合物 II 的正确性, 我们进行了反向高分辨液相色谱的实验来表征其正确性。

[0135] 反向高分辨液相色谱 (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 条件:

[0136] HPLC 柱子: Phenomenex (Torrance, CA) Jupiter C5 silica based HPLC column (250mm_4.6mm, 300 \AA)。

[0137] 淋洗条件: 淋洗剂为水/乙腈。淋洗梯度为从 0min 的 90:10 (水/乙腈) 线性下降到 30min 的 50:50 (水/乙腈)。

[0138] 在上述条件下, 我们得到了放射性 HPLC 图 1、2、3 和 4。

[0139] 效果实施例: 肿瘤鼠的 SPECT 成像实例

[0140] BALB/c 裸鼠, 雄性, 体重 18 ~ 20g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 在上海中医药大学 SPF 级动物实验室饲养。在动物房适应性饲养两天后, 于裸鼠腋下注射人宫颈癌 HeLa 细胞, 注射方式为皮下注射, 注射量为 0.2ml ($1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$)。注射后四周, 肿瘤大小为 $1 \times 1 \text{ cm}$, 进行 SPECT 成像实验。

[0141] 肿瘤鼠通过尾静脉注射注入实施例 4 制得的 PAMAM-Ac-Bt-DTPA-^{99m}Tc, 放射性量为 500 μ Ci。6 小时后的 SPECT 成像图见附图 5。

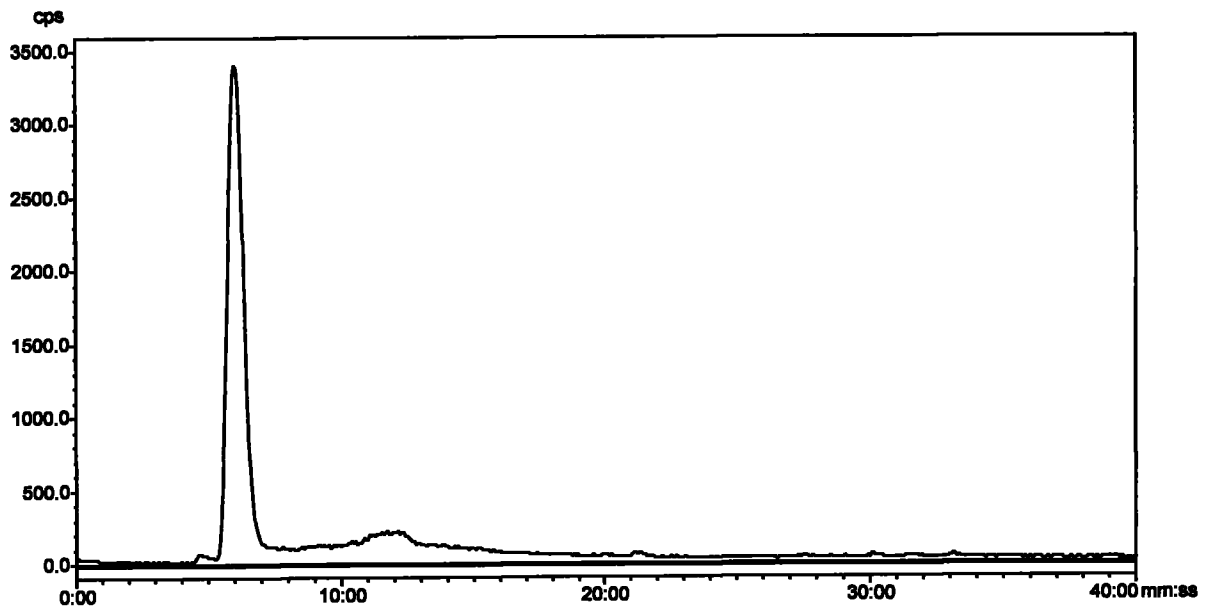


图 1

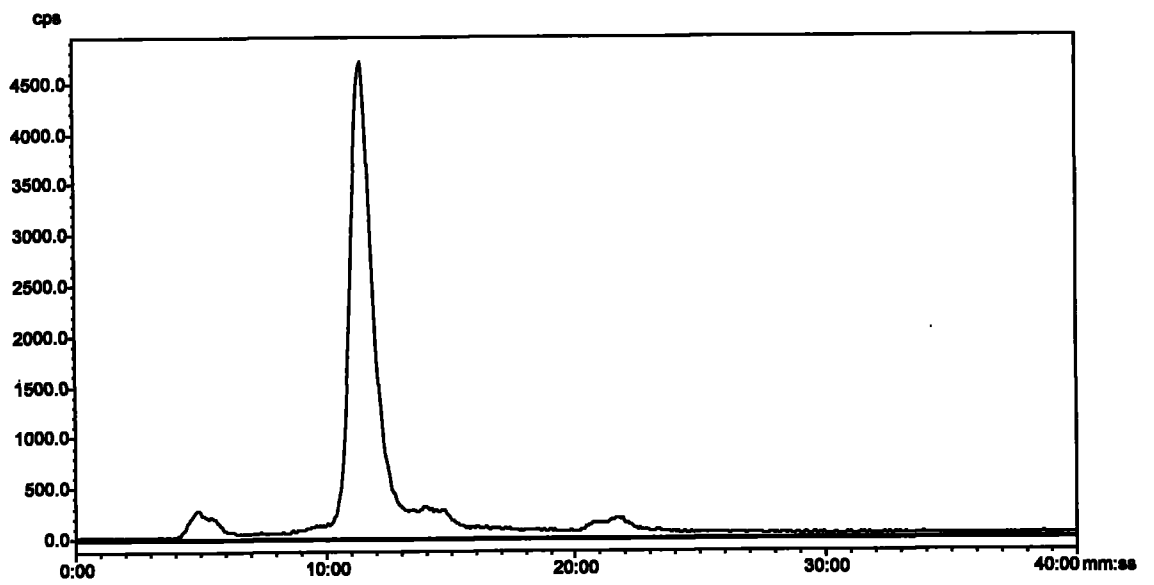


图 2

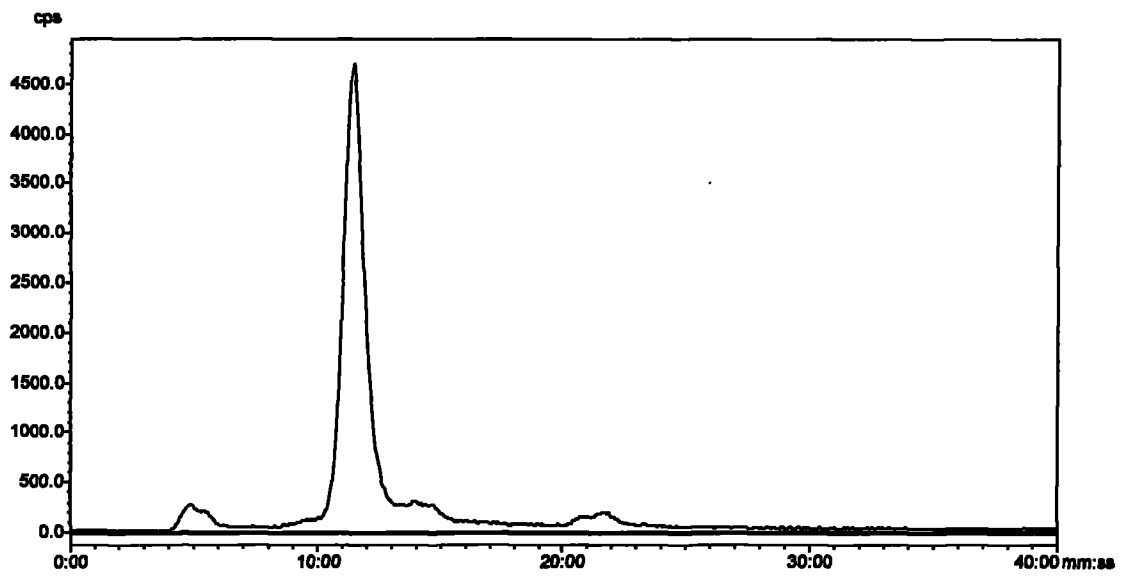


图 3

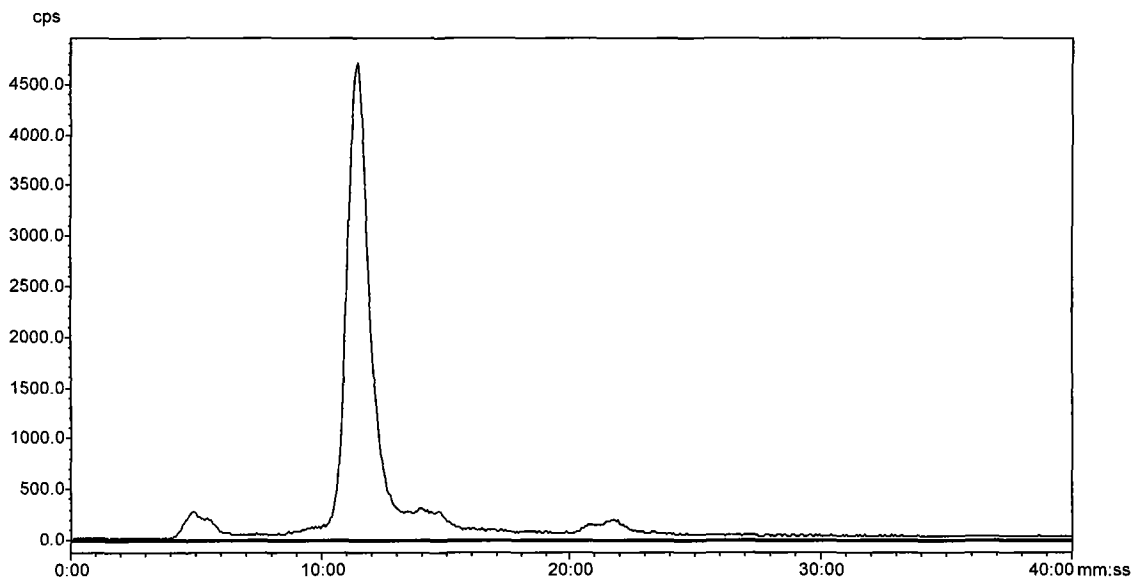


图 4



图 5