

## 博莱霉素 A<sub>5</sub> 衍生物<sup>99m</sup>Tc-BLAIDA 的合成和小鼠肿瘤定位

胡玉麟\* 谢毓元\* 陶正琴\*\* 陈振家\*\* 张建时\*\* 丁光生\*\*

(中国科学院上海药物研究所合成室\*、药理室\*\*, 上海 200031)

叶德华 王韵 马寄晓 (上海市第六人民医院同位素室, 上海 200040)

**提要** 以钴-博莱霉素 A<sub>5</sub> 为载体与活性螯合剂氮-(4-溴乙酰氨基乙酰替苯胺基)亚氨二乙酸缩合, 得双功能化合物 BLAIDA 用<sup>99m</sup>Tc 标记后, 在 4 种不同的带瘤小鼠中显示<sup>99m</sup>Tc-BLAIDA 对肉瘤 180 的亲合作用最佳, 在 iv 后 12 h 肿瘤与脏器的放射性强度比最高。

**关键词** 肿瘤定位剂; <sup>99m</sup>Tc; 博莱霉素 A<sub>5</sub>; 肉瘤 180; 脑瘤 22; 小鼠肝癌; Lewis 肺癌

博莱霉素(bleomycin)与多种金属离子形成稳定的螯合物, 有良好的肿瘤亲和性<sup>(1)</sup>。其中, 钴-博莱霉素(Co-BLM)在体内、外均十分稳定<sup>(2)</sup>, 其肿瘤亲和性比博莱霉素明显提高<sup>(3)</sup>, 可作为肿瘤定位剂的载体。钴-博莱霉素-EDTA(BLEDTA)<sup>111</sup>In螯合物的肿瘤扫描阳性率优于<sup>111</sup>In-BLM 而与<sup>57</sup>Co-BLM 相当<sup>(4)</sup>。

我们合成了活性螯合剂氮-(4-溴乙酰氨基乙酰替苯胺基)亚氨二乙酸(AIDA)与钴-博莱霉素-A<sub>5</sub>(Co-BLM-A<sub>5</sub>)缩合, 得双功能化合物 Co-BLM-A<sub>5</sub>-AIDA(BLAIDA)。用<sup>99m</sup>Tc 标记得<sup>99m</sup>Tc-BLAIDA。在 4 种带瘤小白鼠中测定了肿瘤及各脏器的分布。

### 化 学

**氮-(4-硝基乙酰替苯胺)亚氨二乙酸** 我们对 Burns 等<sup>(5)</sup>方法作了改进。1.91 g 氮三乙酸、20 ml 吡啶及 1.1 ml 醋酐混和, 在 50°C 搅拌 30 min, 继在 25°C 搅拌 2 h 加 1.38 g 对硝基苯胺, 在 70-80°C 搅拌 4 h。减压除去吡啶后加水稀释到原体积。加 6 N HCl 至 pH 1, 析出固体, 滤集固体并用水洗。固体溶于 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液中, 过滤, 滤液加 6 N HCl

至 pH 1, 滤集淡黄色固体, 用水洗后干燥得 1.98 g(收率 63.7%)。熔点 212-4°C(分解)。

元素分析: C 46.09%, H 4.25%, N 13.48%; (计算值: C 46.31%, H 4.21%, N 13.50%)。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) δ 3.59 (S, 4H, CH<sub>2</sub>COO); 3.80 (S, 2H, COCH<sub>2</sub>); 7.6 (m, 2H, ArH); 8.08 (m, 2H, ArH) ppm。

### 氮-(4-氨基乙酰替苯胺基)亚氨二乙酸

取上述硝基化合物 933 mg 溶于 30 ml 当量之 KHCO<sub>3</sub> 水溶液中。在 300 mg 10% Pd/C 催化下常压氢化 2 h。过滤, 滤液加 6 N HCl 至 pH 3.5-4。减压浓缩, 析出白色针状结晶。结晶用水洗后干燥得 630 mg, (收率 74.7%)。熔点 168°C(分解)。

元素分析: C 51.18%, H 5.43%, N 15.07% (计算值: C 51.24%, H 5.23%, N 14.94%)

<sup>1</sup>H NMR (TFA) δ 4.39 (S, 4H, CH<sub>2</sub>COO); 4.49 (S, 2H, COCH<sub>2</sub>); 7.3-7.56 (m, 4H, ArH); 8.24-9.0 (broad, 3H, +NH<sub>3</sub>Ar); 9.20 (S, 1H, NHCO) ppm

**氮-(4-溴乙酰氨基乙酰替苯胺基)亚氨二乙酸(AIDA)** 上述胺基化合物 562 mg 溶于 400 mg KHCO<sub>3</sub> 之 4 ml 水溶液中, 在 15°C 搅拌下滴加 0.20 ml 溴乙酰溴, 析出粘稠固体。加入 3 ml 水, 再搅拌 2 h, 滤集固体, 用水洗、0.01 N HCl 洗, 水洗, 干燥得 540 mg(收率 67%), 熔点 184-6°C(分解)。

元素分析: C 42.08%, H 4.21%, N 10.63% (计算值: C 41.88%, H 4.00%, N 10.44%).

$^1\text{H NMR}$  (TFA)  $\delta$  3.75 (S, 2H,  $\text{BrCH}_2\text{-CO}$ ); 4.25 (S, 4H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 4.36 (S, 2H,  $\text{COCH}_2$ ); 7.0-7.2 (m, 4H, ArH); 8.54 (S, 1H, ArNHCO); 8.78 (S, 1H, CONHAr) ppm.

### 钴-博莱霉素- $\text{A}_5$ -AIDA (BLAIDA) 的合成

博莱霉素- $\text{A}_5$  (华北制药厂提供) 230 mg 溶于 40 ml 水中, 加 0.1 N NaOH 到 pH 6.5. 在 28°C 搅拌下加入 0.1 M  $\text{CoCl}_2$  水溶液 1.6 ml 后再调到 pH 6.5, 继续搅拌 30 min. 减压浓缩到 2 ml. 通过 Sephadex G-25 柱 (1×26 cm), 收集排阻部分, 再减压浓缩到 3 ml. 加 3 ml 吡啶. 在 28°C 搅拌下加 60.3 mg AIDA 后继续搅拌 2 h. 减压除去吡啶, 加水到 2 ml. 滤液通过 Sephadex G-25 柱 (1×26 cm), 收集排阻部分. 用硅胶 G TLC (10%  $\text{NH}_4\text{OAc}$ : MeOH 1:1) 检定, 证明无原料 AIDA 的斑点 ( $R_F$  0.80). 冷冻干燥得 240 mg.

BLAIDA 在硅胶 G 的 TLC 中的  $R_F$  值为 0.35 (10%  $\text{NH}_4\text{OAc}$ : MeOH 1:1) 其 UV  $\lambda_{\text{max}}$  258 nm 及 292 nm 分别为分子中乙酰氨基苯基及双噻唑环发色团的吸收. BLAIDA 与  $\text{Co-BLM-A}_5$  的  $^1\text{H NMR}$  芳香区域谱见图 1. BLAIDA 在 7.38 ppm 左右出现的新的芳香质子信号, 为所引入之对取代苯环质子的共振信号. 从 IR 谱可看到 BLAIDA 在  $2500\text{ cm}^{-1}$  -  $3300\text{ cm}^{-1}$  区域有典型的 COOH 基的 Fermi 共振所产生的吸收带 (图 2). 综合上述结果可知 BLAIDA 含有乙酰苯胺亚氨二乙酸螯合基部分.

**$^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记 BLAIDA** 8 mg BLAIDA 溶于 0.2 ml 无菌水中, 加 0.1 ml  $\text{SnCl}_2$  (2 mg  $\text{SnCl}_2$  溶于 1 ml 0.02 N HCl). 注入 1-2 ml 无菌的  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  淋洗液 (放射性强度 1-2 mCi/ml) 后, 剧烈搅动. 用无菌水稀释到 6 ml. 通过  $0.20\ \mu\text{m}$  微孔滤膜, 得 pH 5-5.5 的淡黄色澄清溶液.

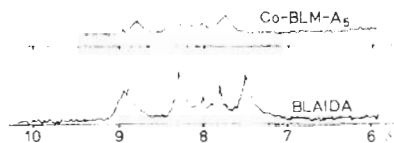


Fig 1. The  $^1\text{H NMR}$  spectra of  $\text{Co-BLM-A}_5$  and BLAIDA

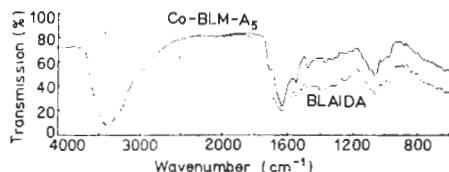


Fig 2. The IR spectra of  $\text{Co-BLM-A}_5$  and BLAIDA

**标记率测定** 用新华 3 号层析滤纸进行上行层析. 展开剂为 0.9% NaCl ( $^{99\text{m}}\text{Tc-BLAIDA}$   $R_F$  0-0.1;  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$   $R_F$  0.6-0.7) 和正丁醇:吡啶:醋酸:水 (15:10:3:12) ( $^{99\text{m}}\text{Tc-BLAIDA}$   $R_F$  0.9;  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$   $R_F$  0.9) 平均标记率 94%.

## 药 理

取体重 18-22 g 的  $\delta$  小鼠, 于右腋窝皮下分别接种肉瘤 180、肝癌、脑瘤-22 瘤块. 另用体重 18-20 g 的 C57BL  $\delta$  小鼠, 于右腋窝皮下接种 Lewis 肺癌瘤块. 10-14 d 后挑选肿瘤外表无坏死的小鼠, iv  $^{99\text{m}}\text{Tc-BLAIDA}$  或  $^{99\text{m}}\text{Tc-AIDA}$  0.2 ml (约 40  $\mu\text{Ci}$ ), 含 BLAIDA 0.3 mg 或 AIDA 0.08 mg. 不同时间后收集眶静脉血 0.1 ml, 取脑、心、肺、肝、脾、肾、股骨、大腿肉及肿瘤. 用 FT-603 的 3 英寸井式  $\gamma$  闪烁计数器测定放射性强度. 换算出 cpm/g 脏器, 并以肿瘤组织与其他脏器组织作比较, 计算出肿瘤与脏器的比值.

**$^{99\text{m}}\text{Tc-BLAIDA}$  对小鼠 4 种移植肿瘤的亲 和 作 用** 用皮下移植肉瘤的小鼠 30 只, 移植脑瘤、肝癌和肺癌的小鼠各 15 只. 各分 3 组; iv  $^{99\text{m}}\text{Tc-BLAIDA}$  后, 分别于 3, 7, 12 h 取脏器测放射性强度, 求得肿瘤与各脏器的放射性

Table 1. Tumor/organ radioactivities ratio after iv  $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA in tumor-bearing mice. Upper row is mean, lower row is SD

Tumor	Time after iv	Mice	Tumor Blood	Tumor Brain	Tumor Lung	Tumor Heart	Tumor Spleen	Tumor Kidney	Tumor Muscle	Tumor Bone	Tumor Liver
Sarcoma 180	1 h	5	0.6	12.0	0.6	1.5	1.3	0.17	3.8	1.6	0.36
			0.1	5.1	0.4	0.2	0.4	0.10	0.5	0.3	0.24
	3 h	10	1.5	17.7	1.6	3.5	3.0	0.31	7.1	3.5	0.81
			0.4	4.8	0.5	0.9	1.2	0.25	2.8	1.0	0.32
	5 h	10	2.4	24.6	2.0	4.4	3.7	0.25	9.6	4.4	0.96
			0.4	9.2	0.3	0.9	1.2	0.10	2.6	1.6	0.45
	7 h	10	3.4	31.6	2.8	6.8	5.6	0.67	12.3	6.7	1.64
			1.1	12.1	0.8	2.4	1.7	0.24	4.1	2.0	0.32
	9 h	10	5.0	39.0	3.0	7.8	6.4	0.83	14.8	8.5	1.84
			1.8	16.4	0.8	2.2	2.1	0.42	5.9	2.9	0.64
12 h	10	7.3	55.2	4.0	11.2	8.4	1.16	27.9	12.0	2.18	
		3.3	18.7	1.1	4.8	2.8	0.37	13.0	4.9	0.76	
24 h	8	7.2	39.8	3.1	12.6	7.0	0.55	14.8	14.9	2.06	
		4.3	34.2	1.2	8.8	6.9	0.18	11.0	16.9	0.57	
Brain tumor-22	3 h	5	1.1	16.3	1.16	2.55	1.7	0.17	5.0	2.7	0.70
			0.3	2.1	0.10	0.21	0.7	0.04	1.8	0.4	0.19
	7 h	5	2.9	24.7	1.7	4.0	1.5	0.24	8.4	3.1	0.77
			0.5	4.1	0.4	0.9	0.7	0.03	1.9	0.4	0.19
	12 h	5	4.5	20.1	4.0	5.9	1.3	0.32	11.4	5.3	0.94
			1.9	5.7	3.8	2.1	1.0	0.15	4.3	1.9	0.33
Murine hepatoma	3 h	5	0.8	13.2	0.93	1.8	1.7	0.21	4.8	2.2	0.76
			0.1	1.6	0.16	0.4	0.8	0.04	2.2	0.5	0.10
	7 h	5	1.4	20.5	1.5	3.0	3.6	0.30	7.8	3.6	1.00
			0.3	2.8	0.3	0.6	0.7	0.04	1.6	0.9	0.23
	12 h	5	2.4	24.8	1.6	5.5	4.9	0.27	11.2	5.4	1.34
			1.5	8.6	0.4	2.0	1.8	0.05	4.1	1.9	0.57
Lewis lung carcinoma	3 h	5	0.9	18.9	1.02	2.2	2.17	0.14	7.2	2.8	0.56
			0.2	4.9	0.20	0.4	0.08	0.02	1.7	0.6	0.13
	7 h	5	1.7	28.6	1.4	3.2	2.8	0.27	8.0	3.6	0.71
			0.6	10.3	0.3	0.7	0.8	0.10	2.4	1.3	0.21
	12 h	5	1.7	24.1	1.0	3.3	2.6	0.30	8.4	4.1	0.67
			0.3	7.1	0.3	0.8	0.5	0.12	1.3	0.8	0.29

比值.从表1可见4种肿瘤摄取放射性均较多.其中以肉瘤最多,给药后除3,7h的肾脏外,其他脏器的放射性强度都比肿瘤少;肿瘤与各脏器的放射性比值均>1.表明 $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA与肉瘤有较好的亲和作用.带脑瘤的小鼠除肾和肝放射性含量较多外,其余脏器的放射性含量比肿瘤组织少;12h后肿瘤与血的比值为4.5;肿瘤与肌肉的比值为11.4;肿瘤与脑的比值为20.1.带肝癌的小鼠除肾脏放射性摄取量较多外,肿瘤中的摄取量高于其他脏器. $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA与肺癌的亲和力虽不如前3种瘤,但肿瘤中的含量仍比血液高1.7倍,比肌肉高8倍以上.

**$^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA在带肉瘤180小鼠中的分布** 用移植肉瘤180的小鼠63只,分成7组,iv $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA后1,3,5,7,9,12,24h取脏器测放射性强度.从表1可见各脏器摄取放射性量的多少依次为肾、肝、肺、血、脾、心骨、肌肉和脑.放射性在肿瘤中有浓集,表示 $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA与肉瘤180有亲和力.这种作用在1h不明显,3h以后逐渐增高.12h最为显著,肿瘤与血、肌肉和脑的比值分别为7.3,27.9和55.2.

**$^{99m}\text{Tc}$ -AIDA在带肉瘤180小鼠中的分布** 将带瘤小鼠20只分成4组,iv $^{99m}\text{Tc}$ -AIDA后0.5,3,7,12h测定各组织中的放射性强度,

Table 2. Tumor/organ radioactivities ratio after iv  $^{99m}\text{Tc}$ -AIDA in mice bearing sarcoma-180. Upper row is mean, lower row is SD.

Time after iv	0.5 h	3 h	7 h	12 h
Tumor	0.23	0.50	1.12	1.28
Blood	0.04	0.06	0.52	0.14
Tumor	7.7	11.6	23.7	21.2
Brain	2.9	3.4	12.5	3.9
Tumor	0.44	0.73	1.16	1.38
Lung	0.09	0.01	0.59	0.17
Tumor	0.62	1.01	2.32	2.10
Heart	0.14	0.06	1.37	0.34
Tumor	0.34	0.23	0.27	0.37
Spleen	0.11	0.08	0.11	0.11
Tumor	0.17	0.19	0.32	0.36
Kidney	0.03	0.02	0.17	0.07
Tumor	1.8	2.8	5.2	5.8
Muscle	0.4	0.4	3.5	0.7
Tumor	0.28	0.21	0.28	0.20
Bone	0.08	0.05	0.19	0.03
Tumor	0.17	0.11	0.14	0.19
Liver	0.03	0.02	0.06	0.04

结果见表2。肾、肝、骨、脾中放射性含量都比肿瘤多；给药后0.5及3h血、肺、心中含量也高于肿瘤；7,12h虽低于肿瘤，但比值仅为1-2；肌肉含量比肿瘤低，比值为5左右。

## 讨 论

滝田等<sup>(6)</sup>在测定博莱霉素-金属螯合物的结构时指出 BLM-A<sub>2</sub> 螯合金属离子后，就不再发生 Schotten-Baumann 反应。DeRiemer 等<sup>(4)</sup>指出 Co-BLM-B<sub>2</sub> 不被 1-溴乙酰氨基苯基-EDTA 烷基化。据此，我们认为 Co-BLM-A<sub>5</sub> 在碱性条件下被 AIDA 烷基化的最可能的位置只能在“C-端”的伯胺氮上。如图3所示。

$^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA 与  $^{99m}\text{Tc}$ -AIDA 在肿瘤中的不同分布，证实含 Co 的博莱霉素螯合物

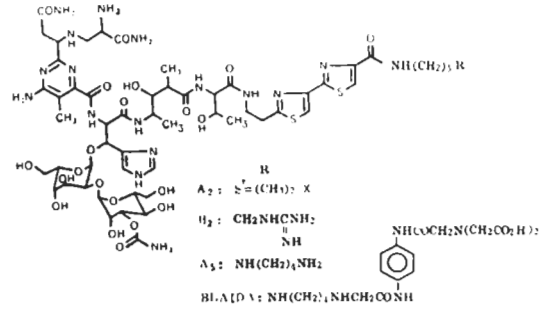


Fig 3. Structural formulae of bleomycins.

有明显的趋肿瘤性，通过与螯合剂相接后用放射性  $^{99m}\text{Tc}$  标记，达到示踪目的，在体内能真正地起到双功能作用。 $^{111}\text{In}$ -BLEDTA 在实验动物及临床上能显示出趋肿瘤性<sup>(4)</sup>；但  $^{111}\text{In}$  必须由加速器产生，国内来源不易。 $^{99m}\text{Tc}$  来自国产的小型同位素发生器（即  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  发生器）。半衰期短，使用方便。因此  $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA 是一良好的、有希望的肿瘤阳性定位剂。该药物已进行无菌、热源、急性毒性等试验，现正推荐临床试用。

致谢 元素分析、IR 和  $^1\text{H}$  NMR 谱由中国科学院上海药物研究所分析室测定。

## 参 考 文 献

- 1 Nouel JP. Radioactive metal-bleomycin complex for the diagnosis of cancer. In: Canter SK, Ichikawa T, Mathe G, Umezawa H, eds. *Fundamental and chemical studies of bleomycin*. 1st ed. Tokyo: University Park Press, 1976: 301-16
- 2 Kono A, Matsushima Y, Kojima M, Maeda J. *Chem Pharm Bull* 1977 Jul; 25 (7):1725
- 3 陈渊卿、顾健人、蒋惠秋、沈德奋、张全德. 上海医学 1980 年 5 月; 3(5): 16
- 4 DeRiemer LH, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. *J Med Chem* 1979 Sep; 22 (9):1019
- 5 Burns HD, Sowa DT, Marzilli LG. *J Pharm Sci* 1978 Oct; 67 (10):1434
- 6 滝田智久. 化学の領域 1979 Sep; 33 (9):695

## BLEOMYCIN A DERIVATIVE, $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA: SYNTHESIS AND DISTRIBUTION IN TUMOR-BEARING MICE

HU Yu-lin\*, XIE Yu-yuan\*, TAO Zheng-qin\*\*, CHEN Zhen-jia\*\*,  
 ZHANG Jian-shi\*\*, DING Guang-sheng\*\* (*Departments of Synthetic Chemistry\* and  
 Pharmacology\*\*, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)  
 YE De-hua, WANG Yun, MA Ji-xiao (*Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200040*)

**ABSTRACT** *N*-(4-bromoacetylaminooacetanilido) iminodiacetic acid (AIDA) was synthesized by condensation of *p*-nitroaniline with nitrilotriacetic acid, catalytic reduction and subsequent acylation with bromoacetyl bromide. AIDA was conjugated with cobalt-bleomycin A<sub>5</sub> to give BLAIDA, which was in turn labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  to yield  $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA.

$^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA was tested on mice bearing sarcoma 180, brain tumor-22, murine hepatoma or Lewis lung car-

cinoma. The radioactivities in tumors were much higher than those in blood and other organs. The tumor/organ ratio was highest in case of sarcoma 180 at 12 h after iv  $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA. Hence  $^{99m}\text{Tc}$ -BLAIDA is a potential tumor localizing agent for clinical diagnosis.

**KEY WORDS** tumor localizing agent;  $^{99m}\text{Tc}$ ; bleomycin A<sub>5</sub>; sarcoma 180; brain tumor-22; murine hepatoma; Lewis lung carcinoma