

肽类树状大分子磁共振成像探针的合成与功能化*

余汶川⁺ 罗奎⁺ 何斌 艾华 顾忠伟^{**}

(四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心 成都 610064)

摘要 通过优化设计,合成了高产率的 DTPA 和 DOTA 配体.通过液相发散法制得第三代肽类树状大分子,其外围氨基分别用两种不同保护基团保护,且两种保护基团的个数比精确控制为 18:6,通过选择性脱去保护基团,其中一种氨基与 DTPA、DOTA 偶联,或与丁二酸酐反应,并与金属离子钆螯合,制得 G3-48Gd-DTPA-6COOH, G3-48Gd-DOTA-6COOH 两种肽类树枝状磁共振成像(MRI)分子探针.所合成化合物的结构通过¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-TOF-MS 表征.水相弛豫研究表明,2种肽类树状大分子 MRI 分子探针在水相中表现出了优良的弛豫效能,最高达 12.53 L·mmol⁻¹·s⁻¹,是临床试剂 Gd-DTPA 的 3 倍.

关键词 肽类树枝状大分子, 钆螯合物, 分子探针, 弛豫效能

肽类树枝状大分子是近年来发展起来的一类新型生物医用高分子材料,除了具有普通树枝状大分子特征,如规整性、高度支化、表面呈现高密度功能团、尺度为纳米级、通过可控制备可得到单一分子量等,同时还具有类似蛋白一样的球状结构、生物相容性好、水溶性、耐蛋白酶水解、可生物降解等优异性能^[1].肽类树枝状分子以独特的结构特点,为其在生物医学中的应用奠定了基础,在分子生物模拟、免疫诊断试剂、药物及基因载体、磁共振成像(MRI)分子探针等方面显示了潜在的用途,并越来越显示出诱人的发展前景而引人注目.

目前,用于临床的 Gd³⁺ 类顺磁性 MRI 分子探针由于分子量低,能快速扩散到细胞外基质,致使在血液循环中停留时间短,要求相对高的注射剂量和注射频率.为克服低分子量 MRI 分子探针的上述不足,最好的方法就是将多个造影单元连接到同一分子骨架上,从而得到高分子 MRI 分子探针. Wiener 等^[2,3] 首次在聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状大分子外围通过共价键结合 DTPA,并用这类化合物与 Gd³⁺ 螯合用于磁共振成像研究,发现随着 PAMAM 树枝状大分子的分子量增加,其血液半衰期也增长,但伴随代数的增加,材料毒性加大.肽类树枝状大分子具有一般树枝状分子的普遍特性,它相对于线型多肽具有更好的水溶性、更强的耐水解酶能力和对细胞更小的毒性^[4],其

分子外围众多的结合位点可以连接更多功能性基团,因此肽类树枝状大分子在作为 MRI 分子探针具有很广阔的应用前景^[5].目前报道的主要为单功能化的肽类树状大分子 MRI 分子探针.多功能化的肽类树状大分子 MRI 分子探针具有优良的弛豫效能、良好的生物相容性等特点.但如何设计、制备多功能化肽类树状大分子 MRI 分子探针,并精确、有效调控各功能基团比例,是目前制备多功能化肽类树状大分子 MRI 分子探针面临的难题^[6,7].

DTPA^[8] 和 DOTA 的 Gd³⁺ 络合物,均可作为 MRI 分子探针,并已在临床上得到广泛使用.但由于市售 DTPA 或 DOTA 配体的羧基都没有被保护起来,不能高效选择性地偶联到其它有机分子上.研究同时表明,尽管 DOTA 和 DTPA 的 Gd³⁺ 的络合物均可作为 MRI 分子探针,但二者仍表现出不同的性质,如 Gd-DOTA 具有形成的络合物更加稳定、金属离子解离的半衰期较长、渗透压低等特点^[9].据此,本文优化设计合成路线,制备了一类新型 DTPA 配体和 DOTA 配体,这些配体的外围有唯一的羧基可与树状大分子的氨基酰氨化,而其它被保护的羧基不受影响.合成了新型肽类树状大分子,其外围的氨基通过不同的保护基团保护起来,并达到二者比例精确可控.通过选择性脱保护,将 DTPA 或 DOTA 配体分别偶联到肽类树枝状大分子外围,再进一步选择性脱保护,将氨基

* 2010-01-25 收稿,2010-04-01 修稿;国家自然科学基金(基金号 50633020)和国家重点基础研究发展规划(973 计划,项目号 2005CB623903)资助项目;+ 作者对本文有同等贡献; ** 通讯联系人, E-mail: zwg@scu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10027

与丁二酸酐反应,并与金属离子螯合,制得具有良好水溶性、外围含不同官能团的肽类树状大分子 MRI 分子探针. 合成的肽类树状大分子 MRI 分子探针和临床试剂 Gd-DTPA 进行了水相弛豫对照实验,结果表明,肽类树状大分子 MRI 分子探针表现出了良好的水相弛豫效能.

1 实验部分

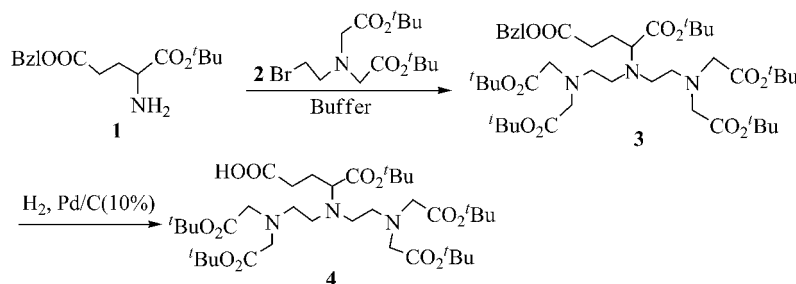
1.1 试剂及仪器

N-乙基二异丙胺 (DIPEA),三氟乙酸 (TFA), 丁二酸酐,爱斯特(成都)有限公司,分析纯;苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU),1-羟基-苯并三氮唑 (HOBt),Boc-L-Lys (Boc)-OH, Boc-L-Lys (Cbz)-OH,吉尔生化(上海)有限公司,分析纯;三(2-氨基-乙基)胺, Pd/C (10%), GdCl₃·6H₂O (99.9999%),Sigma-Aldrich.

高分辨超导核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司 Bruker AV II-400 MHz, Bruker AV II-600 MHz);液相色谱质谱联用仪(美国 ABI 公司, API3000 LC-MS/MS);质谱仪(美国 Waters 公司, Q-TOF Premier);感耦等离子体原子发射光谱仪(美国热电公司,IRIS Advantage).

1.2 DTPA 的合成

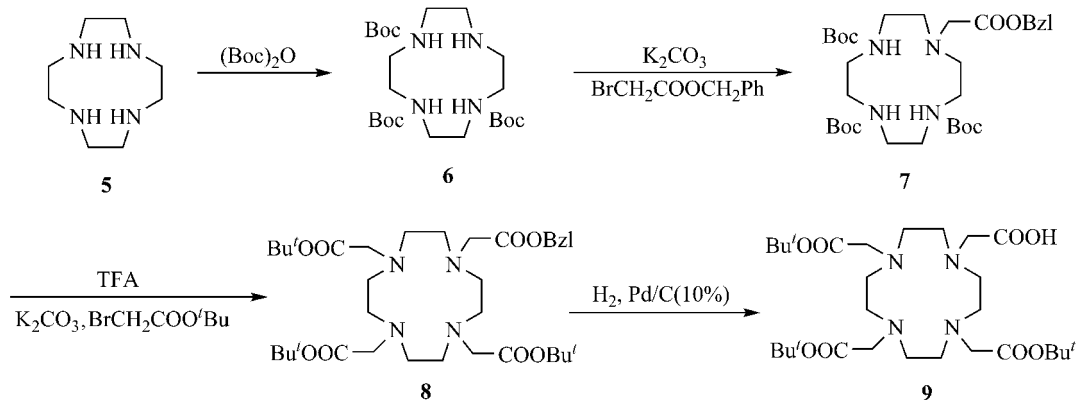
将 2.0 mmol 化合物 1^[10]溶于 100 mL 乙腈中,加入 250 mL 磷酸盐缓冲溶液 (1 mol/L),滴加 50 mL 含 5.0 mmol 化合物 2^[10]的乙腈溶液,室温搅拌 24 h (其反应见示意式 1). 反应完毕后,分液,无机相用乙酸乙酯萃取 (150 × 3),合并有机相,无水 Na₂SO₄干燥过夜,减压蒸除溶剂,残余物用硅胶柱层析分离 (洗脱剂 *V*_{正己烷}/*V*_{乙酸乙酯} = 4:1 ~ 3:1) 得无色油状物 3,产率 40.6%. ESI-MS: *m/z* 836.1 ([M + H]⁺), 858.2 ([M + Na]⁺).



Scheme 1 Reaction scheme for synthesis of DTPA

化合物 3 (3.0 g, 4 mmol) 置于中压釜中,加入 20 mL 甲醇和 1.8 g Pd/C (10%),通入氢气 (0.4 MPa),室温搅拌 24 h 后,过滤,减压蒸除溶剂,真空干燥 24 h 得无色油状物 4. 产率 100%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 1.40 (s, 45H), 1.98 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 2.80

(m, 8H), 3.45 (s, 8H), 3.80 (m, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ) 24.1, 27.8, 28.1, 31.2, 40.5, 53.1, 55.6, 63.4, 80.3, 81.4, 170.6, 171.5, 175.2; ESI-MS: *m/z* 746.3 ([M + H]⁺), 768.0 ([M + Na]⁺).



Scheme 2 Reaction scheme for synthesis of DOTA

1.3 DOTA 的合成

N_2 保护下,将 9.2 g (53.4 mmol) 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷 5 溶于 250 mL 无水氯仿溶液中,加入 20 mL 三乙胺冰浴下,滴加含有 31.44 g (144.2 mmol) $(Boc)_2O$ 的氯仿溶液 250 mL,室温搅拌过夜,减压蒸除溶剂,残余物用硅胶 H 柱层析分离(洗脱剂 $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}(60\sim90^\circ\text{C}) = 1:2$)得无色固体 6,产率 87.6% (其反应见示意式 2)。

N_2 保护下,4,7,10-三(叔丁氧羰基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷 6^[11] (2.3 g, 4.9 mmol) 溶于 50 mL 无水乙腈中,加入无水 K_2CO_3 (0.69 g, 5.0 mmol). 冰浴下搅拌 5 min 后,滴加入含有溴乙酸苄酯 (1.15 g, 5.0 mmol) 的乙腈溶液 (25 mL). 缓慢升温至 60°C 搅拌 12 h,过滤,减压蒸除溶剂,残余物用硅胶柱层析分离(硅胶 H, 洗脱剂 $V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}} = 15:1$)得无色油状物 7,产率 84.3%. ESI-MS: m/z 643.42 ($[M + Na]^+$).

N_2 保护下,化合物 7 (1.1 g, 1.8 mmol) 溶于 8 mL 无水 CH_2Cl_2 中,冰浴下,加入 8 mL TFA. 室温搅拌 0.5 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物. 真空干燥 3 h 后溶于 30 mL 无水乙腈中, N_2 保护下,加入无水 K_2CO_3 (0.69 g, 5.0 mmol), 溴乙酸叔丁酯 (1.17 g, 6.0 mmol). 升温至 60°C 搅拌 24 h,过滤,减压蒸除溶剂,残余物用硅胶柱层析分离(硅胶 H, 洗脱剂 $V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}} = 10:1$)得无色油状物 8,产率 84.3%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$, δ) 1.33, 1.34, 1.35 (s, 27H), 1.85 ~ 3.74 (br 24H), 5.17 (s, 2H), 7.24 (m, 5H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$, δ) 172.13, 168.75, 164.10, 135.52, 128.79, 128.55, 128.12, 81.48, 81.32, 66.24, 56.21, 55.51, 54.29, 53.31, 51.55, 48.41, 46.90, 27.88, 27.56; ESI-TOF-MS: m/z 685.45 ($[M + Na]^+$).

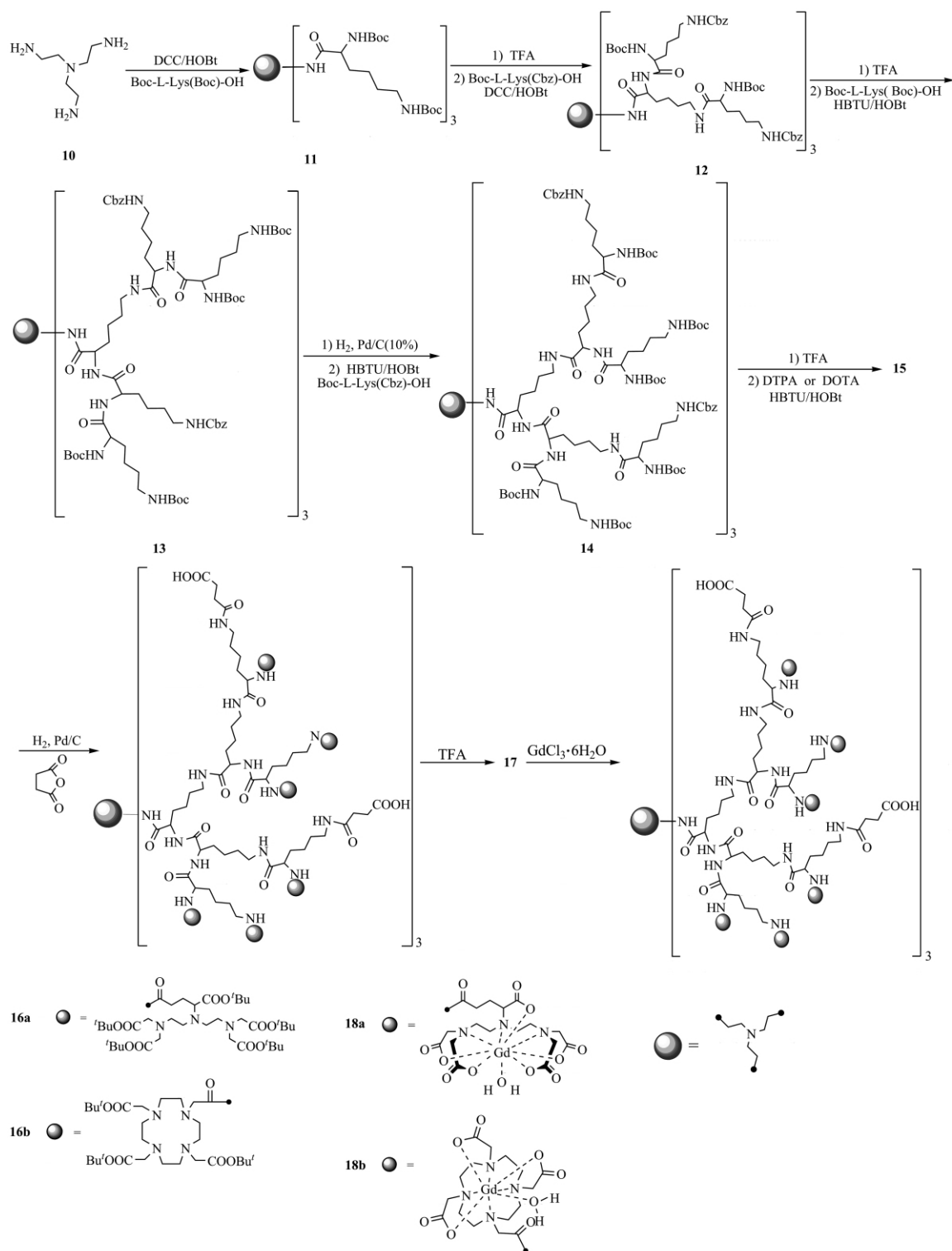
化合物 9 制备方法同化合物 4. 产率 99.3%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$, δ) 1.33, 1.34, 1.35 (s, 27H), 1.85 ~ 3.73 (br 24H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$, δ) 172.1, 168.8, 164.6, 81.70, 81.61, 56.11, 55.48, 54.30, 53.3, 51.61, 50.42, 48.91, 27.85, 27.81; ESI-MS: m/z 573.9 ($[M + H]^+$); ESI-TOF-MS: m/z 595.24 ($[M + Na]^+$).

1.4 肽类树枝状大分子 (dendrimer) MRI 分子探针的制备

N_2 保护下, $Boc\text{-L-Lys}(Boc)\text{-OH}$ (2.18 g, 6.3 mmol) 溶于 20 mL 无水 CH_2Cl_2 中,加入 DCC (1.3 g, 6.3 mmol), HOBT (0.85 g, 6.3 mmol), DIPEA (1.63 g, 12.6 mmol) 和三(2-氨基-乙基)胺 (0.22 g, 1.5 mmol). 室温搅拌 24 h 后,过滤固体,固体用 10 mL CH_2Cl_2 洗涤,减压蒸除溶剂,得无色油状物,硅胶柱层析分离(硅胶 H, 洗脱剂 $V_{\text{二氯甲烷}}/V_{\text{甲醇}} = 10:1$), CH_2Cl_2 重结晶得无色固体 11,产率 87.5%. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $CDCl_3$, δ) 1.18 ~ 1.60 (m, 15H), 2.46 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 3.80 ~ 4.01 (m, 1H), 6.76 (s, 2H), 7.60 (s, 1H). ESI-MS: m/z 1131.76 ($[M + H]^+$), 1153.78 ($[M + Na]^+$) (其反应式见示意式 3)。

N_2 保护下,化合物 11 (565.7 mg, 0.5 mmol) 溶于 5 mL 无水 CH_2Cl_2 中,冰浴下,加入 5 mL TFA. 室温搅拌 0.5 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物. 真空干燥 4 h 后溶于 10 mL 无水 DMF 中,加入 $Boc\text{-L-Lys}(Cbz)\text{-OH}$ (1.22 g, 3.2 mmol), DCC (660.2 mg, 3.2 mmol), HOBT (432.3 mg, 3.2 mmol) 和 DIPEA (580 mg, 4.5 mmol). 室温搅拌 36 h 后,过滤固体,固体用 20 mL CH_2Cl_2 洗涤,减压蒸除有机相,得无色油状物,用硅胶柱层析分离(硅胶 H, 洗脱剂 $V_{\text{氯仿}}/V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{乙醇}} = 6:2:1$)得无色固体 12,产率 84.2%. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, δ) 1.18 ~ 1.69 (m, 36H), 2.46 (m, 2H), 2.96 (m, 6H), 3.09 (m, 2H), 3.86 (m, 2H), 4.21 (m, 1H), 5.01 (s, 4H), 6.69 (s, 1H), 6.90 (s, 2H), 7.25 (m, 10H), 7.60 (s, 4H). ESI-TOF-MS: m/z 2705.57 ($[M + H]^+$), 2727.56 ($[M + Na]^+$).

N_2 保护下,化合物 12 (0.54 g, 0.2 mmol) 溶于 7 mL 无水 CH_2Cl_2 中,冰浴下,加入 7 mL TFA. 室温搅拌 0.5 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物. 真空干燥 4 h 后溶于 15 mL 无水 DMF 中,加入 $Boc\text{-L-Lys}(Boc)\text{-OH}$ (0.48 g, 14 mmol), HBTU (0.53 g, 1.4 mmol), HOBT (0.19 g, 1.4 mmol) 和 DIPEA (0.23 g, 1.8 mmol). 室温搅拌 48 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物,用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 CH_3OH)得无色固体 13,产率 76.1%. $^1\text{H-NMR}$



Scheme 3 Reaction scheme for synthesis of peptide dendrimers G3-18Gd-DTPA-6COOH and G3-18Gd-DOTA-6COOH

(600 MHz, DMSO, δ) 1.20 ~ 1.73 (m, 66H), 2.44 (s, 2H), 2.94 ~ 3.10 (m, 12H), 3.88 (m, 4H), 4.22 (m, 1H), 5.09 (s, 4H), 6.67 (s, 1H), 6.88 (s, 4H), 7.22 (m, 10H), 7.46 (s, 6H). ESI-TOF-MS: m/z 4097.49 ($[M +$

$Na]^+$).

N_2 保护下, 化合物 13 (587.3 mg, 0.15 mmol) 置于中压反应釜中, 加入 20 mL 甲醇 800 mg Pd/C (10%), 通入氢气 (50 Psi), 室温搅拌 24 h 后, 过滤, 减压蒸除溶剂, 真空干燥 24 h 得白固体, 产率 99.1%. 上述所得固体 (318.8 mg, 20

μmol)溶于 10 mL 无水 DMF 中,加入 Boc-L-Lys (Cbz)-OH (49.5 mg, 0.13 mmol), HBTU (49.3 mg, 0.13 mmol), HOBT (17.6 mg, 0.13 mmol) 和 DIPEA (25.8 mg, 0.2 mmol). 室温搅拌 24 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物,用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 CH_3OH)得无色固体 14,产率 78.8%. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, δ) 1.20 ~ 1.73 (m, 96H), 2.40 (s, 2H), 2.85 ~ 3.09 (m, 16H), 3.80 (s, 4H), 4.18 (s, 3H), 5.09 (s, 4H), 6.70 (s, 5H), 6.89 (s, 2H), 7.21 (m, 1H), 7.38 (m, 10H), 7.80 (s, 7H). ESI-TOF-MS: m/z 2734.67 ($[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^{2+}$), 2745.17 ($[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$).

N_2 保护下,化合物 14 (54.4 mg, 10 μmol)溶于 7 mL 无水 CH_2Cl_2 ,冰浴下,加入 7 mL TFA,室温搅拌 2 h 后,减压蒸除溶剂,得无色油状物.真空干燥 6 h 后溶于 10 mL 无水 DMF 中,加入 DTPA (141.6 mg, 0.19 mmol), HBTU (72 mg, 0.19 mmol), HOBT (25.7 mg, 0.19 mmol) 和 (132.3 mg, 0.25 mmol) DIPEA. 室温搅拌 72 h,减压蒸除溶剂,用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 CH_3OH)得无色固体 15a,产率 62.1%. 化合物 15b 制备同化合物 15a,产率 56.3%.

化合物 15a (134 mg, 8 μmol)置于反应釜中,加入 10 mL 甲醇 40 mg Pd/C (10%),通入氢气(50 Psi),室温搅拌 24 h 后,过滤,减压蒸除溶剂,真空干燥 24 h 得白粉末固体,产率 98.6%. N_2 保护下,上述所得固体 (111.6 mg, 约 7 μmol)溶于 6 mL 无水 CHCl_3 中,加入丁二酸酐 (478.2 mg, 45 μmol)和 50 μL DIPEA,室温搅拌过夜.减压蒸除溶剂,残余物用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 CH_3OH)得无色固体 16a,产率 77.4%. 化合物 16b 制备同化合物 16a,产率 80.3%.

N_2 保护下,化合物 16a (132.3 mg, 约 8 μmol)溶于 3 mL 无水 CH_2Cl_2 中,冰浴下,加入 3 mL TFA,室温搅拌 24 h 后,减压蒸除溶剂,得黄色油状物,真空干燥 1 h 后,加入 25 mL 无水乙醚后析出固体,过滤,得白色粉末.粗产物真空干燥 24 h 后用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 H_2O),冷冻干燥得无色固体 17a,产率 69.1%.

化合物 17b 的制备同 17a,产率 74.1%.

化合物 17a (46 mg, 约 4 μmol)溶于 5 mL 二次蒸馏水中,冰浴下,滴加 2 mL $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (14.9 mg, 40 μmol)的水溶液,用 1 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 $\text{pH} = 5 \sim 6$. 室温搅拌 24 h 后,透析(1 L $\times$ 5),浓缩溶液,粗产物进一步用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离(洗脱剂为 H_2O),冷冻干燥得无色固体 18a (G3-18Gd-DTPA-6COOH),产率 65.3%. 化合物 18b (G3-18Gd-DOTA-6COOH)的制备方法同化合物 18a,产率 69.8%.

1.5 水相弛豫实验

上述制备的 G3-18Gd-DTPA-6COOH, G3-18Gd-DOTA-6COOH 肽类树状大分子 MRI 分子探针和临床试剂 Gd-DTPA 配成水溶液,每种 MRI 分子探针配成 8 个梯度, Gd^{3+} 浓度分别为 0.5, 0.4, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10 mmol/L. 各取 1.5 mL 置于 EP 管中,按照 Gd^{3+} 浓度梯度有序地排列在样品板上.将样品板整体置于 GE 1.5 T 磁共振扫描仪进行扫描,收集数据并处理得到相应的水相弛豫率值(r_1).

2 结果与讨论

2.1 DTPA 的合成

DTPA 4 偶联到树状分子后,经脱保护,具有 5 个可与金属离子配位的羧基和 3 个氮原子,所生成的络合物更为稳定.配体 4 具有唯一羧基,其可通过酰胺化与树状分子偶联,而其它被保护起来的羧基不受影响,旨在简化后续合成的程序,便于分离提纯.在碱性条件下,化合物 1 与 2 发生取代反应后,合成了化合物 3.文献 [12] 采用 NaOH 溶液作碱,我们采用了 NaOH 溶液和磷酸盐缓冲溶液两种溶液作碱.比较发现,用磷酸盐缓冲溶液这一温和体系更有利于反应的进行,反应后处理容易,反应产率相对文献报道有了较大的提高(文献产率 31%,本文 40.6%).化合物 3 中的苄酯基团在中压反应釜中经 Pd/C 加氢还原成羧基,产率都很高,为定量反应(文献产率 56%,本文 100%). $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 ESI-MS 测试结果与文献吻合.

2.2 DOTA 的合成

相对于 DTPA 与 Gd^{3+} 形成开链配合物,DOTA 9 各羧基脱保护后,与 Gd^{3+} 络合形成窝穴化合物,DOTA 形成 8 个五元环面,8 个配位键,空间张力小,形成的络合物更加稳定.此外, Gd-

DOTA 具有金属离子解离的半衰期较长,渗透压低等特点.文献 [13] 报道,大环多胺与溴乙酸叔丁酯以摩尔量比 1:3 反应,环上的 3 个叔胺基团与溴乙酸叔丁酯进行取代反应,另一胺基进而与溴乙酸苄酯反应.但由于该反应活性高,反应条件很难控制,所得反应后体系复杂,分离困难,产率低.我们采用滴加的方法,大环多胺(化合物 5)先与 $(\text{Boc})_2\text{O}$ 反应,生成三保护的大环衍生物,其唯一的胺基可与溴乙酸苄酯反应生成化合物 7,两步反应的总产率在 70% 以上,每步反应后处理均采用硅胶柱层析的方法,产物不会吸附在硅胶上.化合物 7 脱保护后直接与溴乙酸叔丁酯反应合成化合物 8,反应彻底,反应后处理简单,经 Pd/C 加氢还原后得到化合物 9.利用 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, ESI-MS 和 ESI-TOF-MS 测试方法对化合物结构进行表征.化合物 9 的理论分子量为 572.38, ESI-MS 测试结果 m/z 573.9 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); ESI-TOF-MS 测试结果图 1 所示. m/z 595.24 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 测试结果与理论计算值相符.

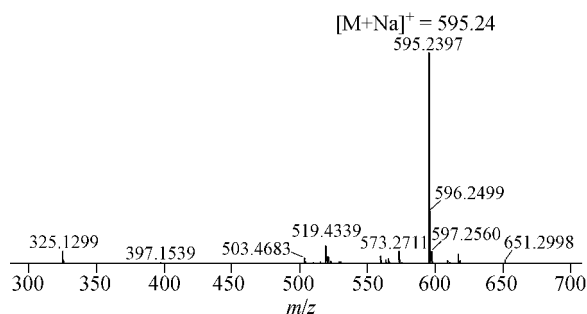


Fig. 1 ESI-TOF-MS spectrum of compound 9

2.3 G3-48Boc-6Cbz 肽类树枝状大分子合成

三(2-氨基-乙基)胺、Boc-L-Lys(Boc)-OH 与 DCC/HOBt 缩合剂一锅法合成化合物 11, 该反应无空间位阻, 反应进行彻底, 三(2-氨基-乙基)胺的 3 个臂完全与 Boc-L-Lys(Boc)-OH 反应. 化合物 11 经 TFA 的二氯甲烷溶液脱保护后, 再与 Boc-L-Lys(Cbz)-OH、DCC/HOBt 缩合剂一锅法合成第二代肽类树枝状大分子 12, 其外围的 12 个氨基分别被 6 个 Boc 基团和 6 个 Cbz 基团保护. 利用 $^1\text{H-NMR}$ 和 ESI-TOF-MS 测试方法对化合物 12 进行表征, 其理论分子量为 2704.55, 测试结果 ESI-TOF-MS: m/z 2705.57 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 2727.56 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

化合物 12 选择性脱保护后与 Boc 保护的赖氨酸缩合, 并在 Pd/C 加氢还原的条件下生成化

合物的外围含有 6 个伯胺基团, 而其它的 12 个氨基被 Boc 基团保护, 再与 Boc-L-Lys(Cbz)-OH 缩合后合成关键肽类树枝状大分子 14, 其外 18 个 Boc 保护氨基, 6 个 Cbz 保护氨基. 化合物 14 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图(图 2)上标明了各特征峰的位置, 其在氘代 DMSO 中的溶解性很好, 各特征峰位置的归属很好, 如 $\delta = 7.3 \sim 7.4$ 之间出现芳香环上的氢质子特征峰, $\delta = 5.09$ 为 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CO}-$ 的特征单峰, $\delta = 2.45$ 位移处出现归属于 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ 的质子信号特征峰, $\delta = 3.8 \sim 4.3$ 位移之间出现了赖氨酸结构单元上的 α 位氢质子信号的多重特征峰, $\delta = 2.8 \sim 3.3$ 位移之间赖氨酸结构单元上的 ε 位和 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NCO}-$ 的氢质子信号的多重特征峰, Boc 基团上的甲基氢质子信号峰为锐利的单峰, 在 $\delta = 1.28$ 位移处出现, 由于该聚集体由多个赖氨酸单体组成, 每个单体的每一个特征氢质子峰的位移相似, 导致其在谱图上的位移值为多个特征峰重合在一起, 表现为宽峰. 如 $\delta = 1.1 \sim 1.8$ 位移之间为一宽峰, 为赖氨酸的 β 氢、 γ 氢、 δ 氢以及 Boc 保护基的氢质子信号峰. $^1\text{H-NMR}$ 谱图同时显示各特征峰的峰面积的比值与理论计算值吻合的很好, 如 peak Ph: peak PhCH_2CO : peak α : peak ε : peak β = 10: 4: 7: 16: 2.

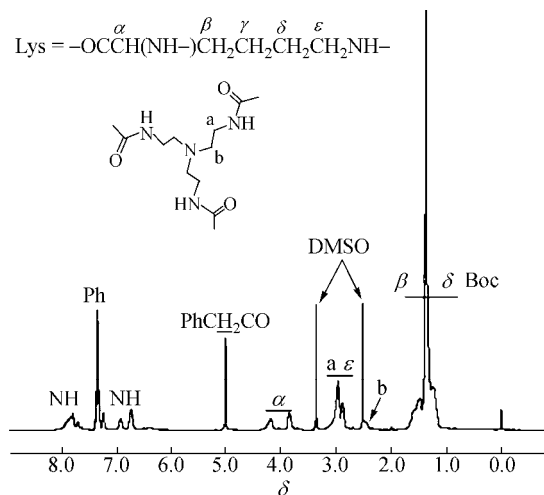


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 14 in DMSO

化合物 14 进一步用质谱表征, 化合物 14 的理论分子量是 5444.32, 其 ESI-TOF-MS 质谱图(图 3)显示, 每组 3 个峰的差值基本相等, 如 $2745.6685 - 2745.1660 = 0.5025$, 同时, $2745.1660 - 2744.6812 = 0.4842$, 两式差值约等于 0.5, 整数 1 除以 0.5 等于 2^[14], 故 2745.1660

的质谱峰为所测试物质的双电荷分子离子峰 $[M + 2Na]^{2+}$, 测试值为 5490.33, 同理可得, 峰值为 2734.6719 的质谱峰为所测试物质的双电荷分子离子峰 $[M + H + Na]^{2+}$, 测试值为 5469.34. 以上测试结果与化合物 14 的理论分子量吻合得很好, 进一步表明该化合物正确.

2.4 G3-48Gd-DTPA, G3-48Gd-DOTA 的合成

树状大分子 14 经 TFA/DCM 溶液脱保护后, 在碱性条件下, 外围的氨基游离出来, 分别与 DTPA 配体(化合物 4) 或 DOTA 配体(化合物 9) 脱水缩合形成酰胺键后合成化合物 15a, 15b. 化合物 15a, 15b 经 Pd/C 加氢还原后与丁二酸酐反应合成化合物 16a, 16b, 再经过脱保护后与三价金属离

子钆络合, 最终合成外围含 18 个造影功能团和 6 个羧基的肽类树枝状 MRI 分子探针 18a 和 18b. 肽类树状大分子 17a 和 17b 表现出了良好的水溶性. 17b 的 ^1H -NMR 谱图(图 4) 显示, 各特征峰位置的归属很好, 如 peaks α 为赖氨酸结构单元上的 α 位氢质子信号的多重特征峰, peaks b 为 $-OCNCH_2CH_2COO-$ 的氢质子信号峰, $\delta = 1.1 \sim 1.8$ 之间的 3 个宽峰为赖氨酸的 β 位、 γ 位、 δ 位的氢质子信号峰, 其它几个宽峰为赖氨酸结构单元上的 ϵ 位和 DOTA 结构单元的 $-NCH_2-$ 的氢质子特征峰等. 但由于多个亚甲基的氢质子特征峰重叠在一起, 故不能计算出个特征峰的比例. 同样, 17a 的 ^1H -NMR 谱图结果亦如此.

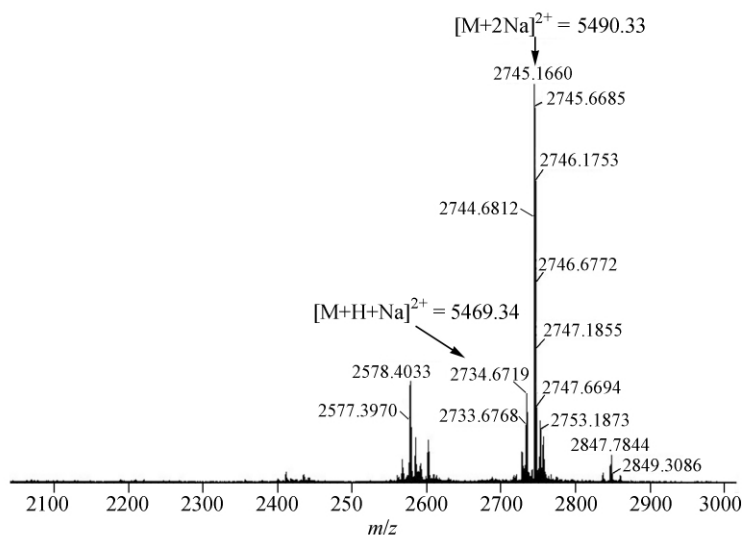


Fig. 3 ESI-TOF-MS spectrum of compound 14

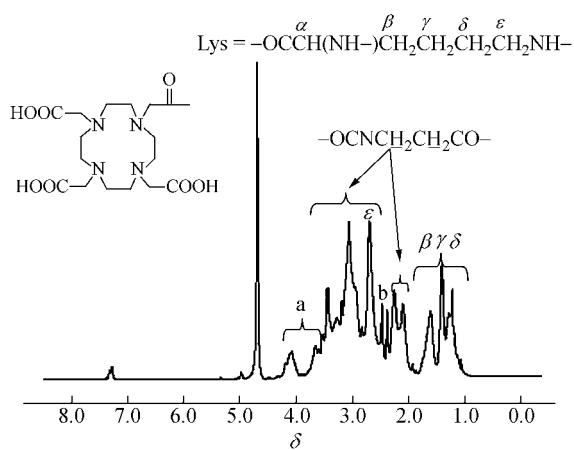


Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of compound 17b in D_2O

由于肽类树状大分子结构复杂, 一般测试手段难以准确表征其结构. 树状大分子 16a 和 16b

分子外围的 DTPA 和 DOTA 部分的叔丁酯在 TFA 作用下全部脱保护, 转化为羧基, 且 17a 和 17b 外围已脱保护的 DTPA 和 DOTA 可完全与金属离子钆螯合. 故我们采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)测定钆的含量, 即可推测 17a 和 17b 外围含 DTPA 和 DOTA 的数目, 以及最终产物 18a 和 18b 外围造影单元数目的多少. 结果显示, 18a 钆含量 (wt%): 19.54% (理论含量 19.89%), 18b 钆含量 (wt%): 21.03% (理论含量 21.49%), 测试值与理论值基本吻合, 故分子

Table 1 Longitudinal (r_1) relaxivities of Gd-DTPA complex and different dendrimers as MRI agents at 1.5 T field

Compound	Sample	r_1 ($L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$)
Comp. 18a	G3-48Gd-DTPA-6COOH	12.53
Comp. 18b	G3-48Gd-DOTA-6COOH	11.78
Gd-DTPA	Gd-DTPA	4.37

探针 18a 和 18b 外围含约 18 个钆螯合物.

2.5 水相弛豫效能

表 1 所示的实验结果显示, 肽类树状大分子 MRI 分子探针均有良好的水质子纵向弛豫性能, 能够有效地加速水质子弛豫率. 根据弛豫时间 T_1 测试值及计算出相应的弛豫率 (r_1), G3-18Gd-DTPA-6COOH 的为 $12.53 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, G3-18Gd-DOTA-6COOH 的为 $11.78 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 而临床试剂 DTPA-Gd 的为 $4.37 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 在相同的条件下, 合成的树状大分子 MRI 分子探针的弛豫率显著的高于临床造影剂 Gd-DTPA 的弛豫率, 提高幅度达到了 300%. 促成肽类树状大分子 MRI 分子探针表现出较高弛豫率的原因有两方面, 一是与树状大分子 MRI 分子探针含有多个中心离子 (钆离子)、分子体积较大、分子在水溶液中旋转变慢、旋转相关时间延长有关, 从而增加与水的交换速率, 增加弛豫率 r_1 ; 二是弛豫性能的提高可能源于树状大分子 MRI 分子探针外围同时含有多个亲水基团, 如羧基等, 这些亲水基团通过氢键作用, 促使螯合物周围能够束集更多的水分子, 从而增强了外层弛豫的贡献. 水相弛豫效能结果显示, 所合成的外围含不同螯合物

(DOTA-Gd 和 DTPA-Gd) 的树状大分子 MRI 分子探针表现出了相似的弛豫效能, 这可能是由于其相应母体结构 (树状大分子), 以及外围含螯合物数目相同等因素有关. 与之相关的细胞毒性、细胞标记、体外成像以及动物体成像等生物学评价正在进行中.

3 结论

通过优化合成路线, 更换反应条件, 合成了含唯一反应活性基团 (羧基) 的 DTPA 配体和 DOTA 配体. 设计合成了以三-(2-氨基-乙基) 胺为核、水溶性氨基酸—赖氨酸为骨架、第三代肽类树状大分子, 其外围的氨基分别用 Boc 保护基和 Cbz 保护基保护起来, 其比例精确可控 (3:1). 树状大分子外围保护氨基通过选择性脱保护后与 DOTA 或 DTPA 偶联并 Gd 螯合, 即得含不同功能团的肽类树状聚体 MRI 分子探针. 为结构可控的多功能肽类树状大分子 MRI 分子探针的制备提供了新的合成思路与方法. 这类新型肽类树状大分子 MRI 分子探针表现出了较高的水相弛豫效能, 具有进一步探索价值和作为 MRI 分子探针的潜力.

REFERENCES

- Crespo L, Sanclimens G, Pons M, Giralte E, Royo M, Albericio F. *Chem Rev*, 2005, 105:1663 ~ 1681
- Wiener E C, Brechbiel M W, Brothers H, Magin R L, Gansow O A, Tomalia D A, Lauterbur P C. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1994, 31:1 ~ 8
- Wiener E C, Auteri F P, Chen J W, Brechbiel M W, Gansow O A. *J Am Chem Soc*, 1996, 118:774 ~ 778
- Huricha B, Kaname K, Kohsaku O, Toshiyuki U. *Macromol Chem Phys*, 2004, 205:684 ~ 691
- Fu Y J, Hans J R, Danute E N, Michael F W, Viktor N, Laure S F, Clemens C, Victor R, David M S, Robert C B. *Biomacromolecules*, 2007, 8:1519 ~ 1529
- Langereis S, Dirksen A, Hackeng T M, Genderena M, Meijer E W. *New J Chem*, 2007, 31:1152 ~ 1160
- Luo K, Liu G, Zhang X W, She W Ch, He B, Nie Y, Li L, Wu Y, Zhang Zh R, Gong Q Y, Gao F B, Song B, Ai H, Gu Z W. *Macromol Biosci*, 2009, 9:1227 ~ 1236
- Song Chunmei (宋春梅), Xue Haili (薛海丽), Li Jianqi (李建奇), Yu Yihua (余亦华), Peng Min (彭敏), Qian Min (钱旻), Du Bing (杜冰), Xie Meiran (谢美然), Chen Qun (陈群). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2009, (3):278 ~ 283
- Mong T K K, Niu A, Chow H F, Wu C, Li L, Chen R. *Chem Eur J*, 2001, 7:686 ~ 699
- Williams M A, Rapoport H. *J Org Chem*, 1993, 58:1151 ~ 1158
- Kimura E, Aoki S, Koike T, Shiro M. *J Am Chem Soc*, 1997, 119:3068 ~ 3076
- Anelli P L, Fedeli F, Gazzotti O, Lattuada L, Lux G, Rebasti F. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10:137 ~ 140
- Mishra A, Pfeuffer J, Mishra R, Engelmann J, Mishra A K, Ugurbil K, Logothetis N K. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17:773 ~ 780
- Chen Yaozu (陈耀祖), Tu Yaping (涂亚平). *Mechanism and Application of Organic Mass Spectra (有机质谱原理及应用)*, 1st ed (第一版). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2004. 191 ~ 228

FUNCTIONAL PEPTIDE DENDRIMERS AS MAGNETIC RESONANCE IMAGING PROBES

SHE Wenchuan, LUO Kui, HE Bin, AI Hua, GU ZHongwei

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract Novel synthetic strategies and methods have been developed for the synthesis of magnetic resonance imaging (MRI) contrasts. DTPA ligand, DOTA ligand and peptide dendrimer-based MRI probes with controllable structure were prepared. The third generation L-lysine dendrimers were synthesized by solution-phase synthesis method and convergent approach, and the primary amine groups on the surface of the dendrimers were protected by different groups. The ratio between Boc group and Cbz groups was 18:6. The peptide dendrimers were selectively deprotected and reacted with DTPA or DOTA derivatives in the presence of succinic anhydride to yield controllable 'peripheral' functional dendrimer-based MRI contrast agents. The new compounds were confirmed by NMR, ESI-TOF MS and so on. The peptide dendrimer-based MRI probes possessing highly controlled structures and single molecular weight were tested at 1.5 T magnetic field in a clinical MRI scanner, and a 3-fold increase in T_1 relaxivity to $12.53 \text{ Gd mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ was noticed comparing to that of the clinical agent Gd-DTPA. The successful approach to synthesize the controllable dendrimer-based agent and the high T_1 relaxivity of the agent opened an opportunity for the design of multifunctional dendritic contrasts for MRI.

Keywords Peptide dendrimers, Gadolinium chelates, Magnetic resonance imaging probes, Relaxivity