

·研究简报·

端氨基聚(醚-氨酯-酰胺)配体及磁共振成像造影剂研究^{*}

宋春梅^{1**} 薛海丽¹ 李建奇² 余亦华² 彭 敏² 钱 旻³ 杜 冰³ 谢美然¹ 陈 群²

(华东师范大学¹ 化学系² 物理系³ 生物系³ 上海 200062)

摘 要 设计合成了一种端氨基聚(醚-氨酯)PEU-((CH₂)₆NH₂)₂(Ⅱ),以Ⅱ为原料制备端氨基聚(醚-氨酯-酰胺)PEU/DTPA 共聚物造影剂配体(Ⅲ). Ⅲ的特点为(1)大分子配体的端基为-(CH₂)₆-NH₂,柔性间隔基较长,可克服较大的空间位阻,与靶向性物质(如靶向多肽、蛋白质)反应;(2)原料Ⅱ为采用聚氨酯反应制备,亲水亲油链段长短、种类可控性好,实验条件简单;(3)端氨基可以在温和条件下与多肽等反应. 大分子配体Ⅲ与Gd³⁺络合制备了相应的Gd³⁺配合物(Ⅳ),研究了Ⅳ的弛豫性能,磁共振成像(MRI)结果表明,合成的造影剂Ⅳ纵向弛豫速率(R₁)与医用造影剂钆喷酸葡胺Gd-DTPA相比提高了38.40%,在裸鼠肝脏内信号增强率在0.1、6、12、24 h 分别是Gd-DTPA 最大信号增强的1.5、3、1.8和1.3倍,在体内的半衰期明显延长. 用IR、NMR、GPC、官能团滴定、ICP等方法表征产物.

关键词 端氨基聚(醚-氨酯-酰胺), 磁共振成像造影剂, 载体, 弛豫速率

分子成像是世界上最热的研究领域^[1,2],美国5年前NIH(National Institutes of Health)设立了专门的生物医药成像研究所,用专项基金支持该领域研究. MRI 磁共振技术跟踪监控基因转导过程属于近年来新领域,评价新的癌症药物的靶向性及疗效. 临床常用的造影剂Gd-DTPA是与钆配位最稳定的小分子离子型造影剂,体内渗透压较高,在体内存留时间较短,易经肾脏代谢后迅速排除. 近年来的研究主要是对二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)类修饰,制备各种造影剂. 研究方向为(1)非离子化;(2)靶向性;(3)大分子化. 大分子化可制备血池造影剂、延长半衰期. Zhuo等^[3]最早作了大量卓有成效的工作,合成了一系列的聚酯、聚酰胺以及聚酯-聚酰胺共聚物Gd³⁺造影剂等;Weissleder等^[4]在聚赖氨酸(PLL)侧链氨基上连接DOTA配体. Sander等^[5]将Gd-DTPA共价偶联到聚丙烯亚胺树形高分子表面得到Gd³⁺造影剂,每种方法各有优缺点.

但是通过较短的实验路线,设计合成可以在水中室温条件下与靶向多肽、蛋白质偶联的胺基的大分子配体较少,端基为-(CH₂)₆-NH₂的造影剂鲜见报道. 本文的工作是要设计一种可以在

温和条件下与多肽等反应的大分子造影剂,为满足要求,大分子造影剂要具有可反应官能团、半衰期长、造影效果增强,降低对动物及人体的毒害性. 聚乙二醇(PEG)又称聚氧乙烯醚(PEO)是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的载体,有良好的亲水性和生物、血液相容性,无免疫原性^[6,7],常用来修饰蛋白质、多肽、酶等生化药物和生物医用材料^[8,9]. Gd³⁺自旋增强效果最好,DTPA螯合效果最好,但商用PEG价格昂贵,品种有限,氨基端为-OCH₂CH₂NH₂,柔性间隔基短,不利于与有较大空间位阻、官能团为侧基的其它功能基反应. 多肽、蛋白质、酶等具有庞大空间位阻,蛋白质大分子为球状等立体结构,其可反应官能团往往蜷曲在球体内部或表面,且侧基较短,这时端基为-OCH₂CH₂NH₂的PEG只能对部分蛋白质有修饰性,不能克服空间位阻深入到蛋白质内部反应. 本文制备含氨基端基的聚(醚-氨酯)Ⅱ,柔性间隔基CH₂多,能克服空间位阻,可偶联的生物活性物质种类更多. 并且用本方法合成的PEG,具有亲水亲油链段长短、种类可控性好,能满足不同器官亲和性要求,实验条件简单,无易燃易爆性,有利于应用. 进一步制备了端氨基聚(醚-氨酯-酰胺)Ⅲ和

^{*} 2008-08-11 收稿,2008-09-28 修稿;国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2004AA302080)和国家自然科学基金项目(基金号 20474017)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: cmsong@chem. ecnu. edu. cn

液,室温搅拌反应 24 h,用透析袋透析 72 h,每隔 8 h换透析液一次,把透析内液蒸干后,再用无水乙醇重结晶,真空干燥后得白色粉末状产物Ⅳ,简称为 PEU-Gd-DTPA.

5 测试仪器及方法

使用 Nicolet Nexus 670 FT-IR 红外仪进行红外光谱测定,均为 KBr 压片;Bruker DRX 500 MHz核磁共振波谱仪进行核磁共振测定,四甲基硅烷(TMS)为内标,溶剂为氘代二甲亚砜 DMSO-*d*₆ 或氘代氯仿 CDCl₃;由 SGW X-4 显微熔点仪测定熔点;按基滴定法测定分子量;凝胶渗透色谱(GPC)采用 Waters 1525 型凝胶渗透色谱仪,流动相为 DMF,官能团滴定采用胺基测定^[11];异氰酸酯测定参照 HG/T 2409-92,DTPA 含量测定^[12].

6 合成的大分子钆配合物造影剂(Ⅳ)的研究

6.1 钆含量测定 用电感耦合等离子体 ICP (radio frequency inductively coupled plasma)发射光谱分析方法测定.机器型号 IRIS Intrepid 11 XSP Thermo Elemental.用浓硝酸硝化使样品分解,在容量瓶中稀释定容.

6.2 弛豫时间测定 将合成的造影剂Ⅳ和商品造影剂(Gd-DTPA)配成钆含量在 10~40 mg/L 之间的一系列水溶液,环境温度为 23℃,0.3T 永磁开放磁共振成像仪上,测得纯水质子和配合物溶液中水质子的弛豫时间.测量序列,IR-FID(TI: 10、30、50、100、200、500、700、1000、1500、2000 和 3000 ms).

6.3 器官增强效果比较 用合成造影剂Ⅳ和商品造影剂(Gd-DTPA)配成相同浓度的水溶液,

且注射量相同,观察正常裸鼠体内器官造影增强效果.样品浓度 5 mmol/L, 500 μL;GE Twin Speed 1.5T MRI 注射方法,团注;成像方法优化,7.6 cm 表面线圈接收,线圈空间敏感性校正;取 10 只裸鼠,分成两组,每只裸鼠多时间段观察.

7 共聚物的表征

7.1 端氨基聚(醚-氨酯)表征 产物Ⅱ的 IR 谱图见图 1 中曲线 c,其中氨酯键(—NHCOO—)中的 C=O 伸缩振动特征峰为 1716 cm⁻¹,脲键(—NHCONH—)中的 C=O 伸缩振动特征峰为 1650 cm⁻¹,N—H 弯曲振动特征峰为 1559 cm⁻¹,而原料 PEG(见图 1 中曲线 b)则无上述特征峰. 3304~3128 cm⁻¹ 为 NH₂ 中—N—H, —NH—COO—, —NHCONH—及分子间氢键.产物Ⅱ的 ¹H-NMR(CDCl₃)谱图及归属见图 2. δ=4.50~6.00 (a, b, c),4.16(d, e),3.45~3.75(f, g),3.09(h),2.86(i),2.59(j),1.83(k, l),1.63(m, n),1.28~1.50(o, p),1.13(q),0.83~1.00^[13,14] (r, s, t).

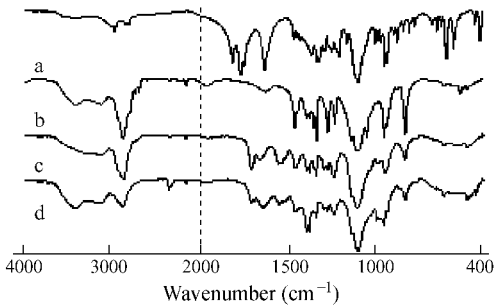


Fig. 1 The IR spectra of (I), PEG, (II) and (III)
Curve a (I); Curve b PEG; Curve c (II); Curve d (III)

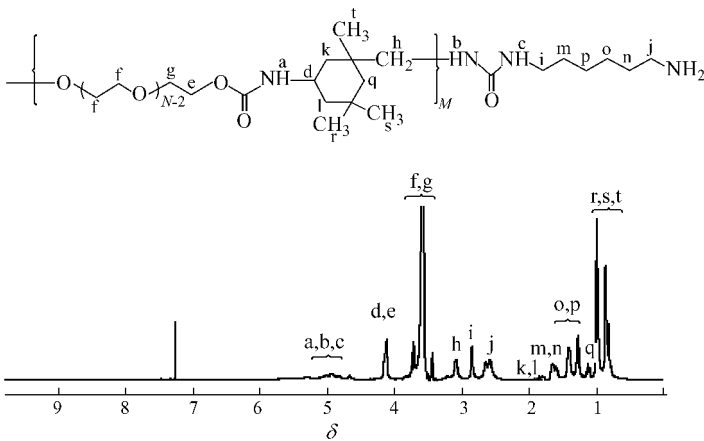
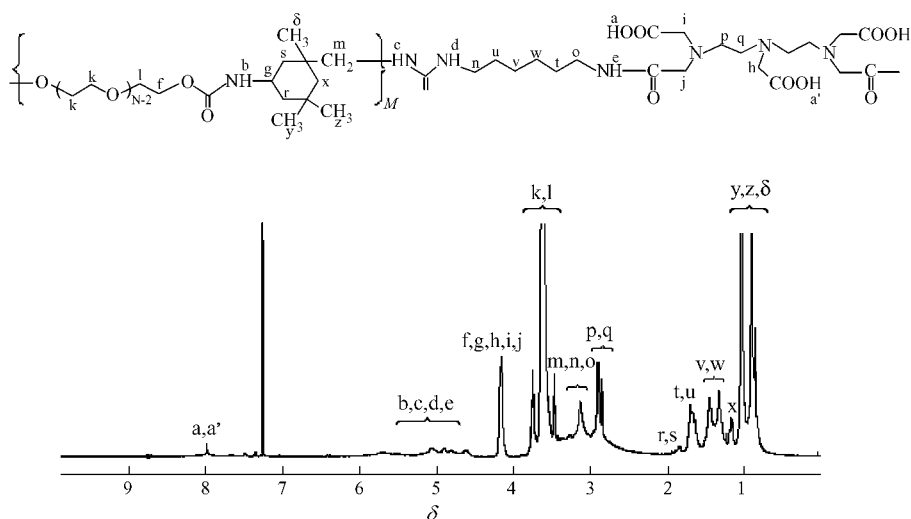


Fig. 2 The ¹H-NMR spectrum of (II)

Fig. 3 The ^1H -NMR spectrum of (III)

7.2 端氨基聚(醚-氨酯-酰胺)配体 III 表征

产物 III 的 IR 谱图(见图 1 中曲线 d),与 II 的 IR 谱图比较,发生了以下明显的变化.在 III 的 IR 谱中,在 1650 cm^{-1} 处出现了酰胺键峰,以肩峰的形式存在于 1653 cm^{-1} 脲键峰位处.而且氨酯键和脲键的相对峰强发生了很大的变化,在 II 的 IR 谱图中 1716 cm^{-1} 处的氨酯键特征峰强度远远大于 1650 cm^{-1} 处脲键特征峰强度,而由于 II 与 DTPAA 开环形成的酰胺键在 1650 cm^{-1} 处与脲键峰重叠,所以造成产物 III 在 1716 cm^{-1} 处的氨酯键特征峰强度远远小于 1653 cm^{-1} 处脲键和酰胺键的特征峰强度,而且 III 在 $3431 \sim 3131\text{ cm}^{-1}$ 中由于 COOH 中 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动,强度增加; 1399 cm^{-1} 和 1385 cm^{-1} 处由于 COOH 二聚体的 OH 的弯曲振动和 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动的耦合,峰的相对强度也增强了很多,在 $2886, 1463, 1360, 1343, 1303, 1280$ 和 1243 cm^{-1} 处峰强均减弱.与 DTPAA 的 IR 谱图(见图 1 中曲线 a)比较,其中在 1821 和 1775 cm^{-1} [3] 处的酸酐特征峰消失. ^1H -NMR (CDCl_3) 谱图与聚合物中对应氢质子的归属见图 3. $\delta = 8.00$ (a, a'), $4.50 \sim 6.00$ (b, c, d, e), 4.16 (f, g, h, i, j), $3.47 \sim 3.75$ (k, l), 3.14 (m, n, o), $2.90 \sim 2.92$ (p, q), 1.83 (r, s), 1.70 (t, u), $1.33 \sim 1.45$ (v, w), 1.17 (x), $0.86 \sim 1.04$ (y, z, δ).

对产物 III 进行氨基官能团滴定,得到胺基 (NH_2) 含量为 0.0964 mmol/g 样品,求出 III 平均分子量为 2.1×10^4 ,滴定得 DTPA 含量为 0.0804 mmol/g 样品. GPC 方法测得数均分子量为 $2.1 \times$

10^4 ,分子量分布指数 d 为 1.5.

8 造影剂 IV 与 Gd-DTPA 性能比较

8.1 弛豫率比较 好的 MRI 造影剂,应当具有较高的弛豫速率 (R_1),可获得清晰的成像效果.顺磁性金属离子配合物能减小组织中水质子的弛豫时间,从而增加磁共振信号的对比度.它对水质子弛豫时间的减小程度可用弛豫速率来表示.体外测试弛豫速率,公式如下

$$1/T_{\text{obsd}} = 1/T_{\text{ld}} + R_1 [\text{M}]$$

[M] 为配合物溶液中钆的浓度,测纯水质子的弛豫时间 T_{ld} 和配合物溶液中水质子的弛豫时间 T_{obsd} ,计算配合物的纵向弛豫速率 R_1 . ICP 测得造影剂钆配合物 IV 的钆含量为 $0.88\text{ wt}\%$, R_1 为 $8.21(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,临床应用的 Gd-DTPA 的 R_1 为 $5.93(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,IV 的 R_1 提高了 38.40% ,IV 的造影效果好.

8.2 器官造影增强效果比较 用合成的造影剂钆配合物 IV 和商品造影剂 (Gd-DTPA) 配成相同浓度的水溶液,且注射量相同,取 10 只裸鼠,分成两组,多时间段 (0.1、6、12 和 24 h) 观察每只裸鼠体内器官造影增强效果,取平均值(见图 4). Gd-DTPA 的最大信号增强在 0.1 h 时刻. IV 在 0.1 h、12 h 肝脏内信号增强率分别是 Gd-DTPA 最大信号增强的 1.5 倍和 1.8 倍,在 6 h 信号增强是 Gd-DTPA 最大信号增强的 3 倍. Gd-DTPA 在肝脏 6 h 后无增强,而 IV 在肝脏 24 h 信号增强是 Gd-DTPA 最大信号增强的 1.3 倍,IV 在肝脏的半衰期明显延长.

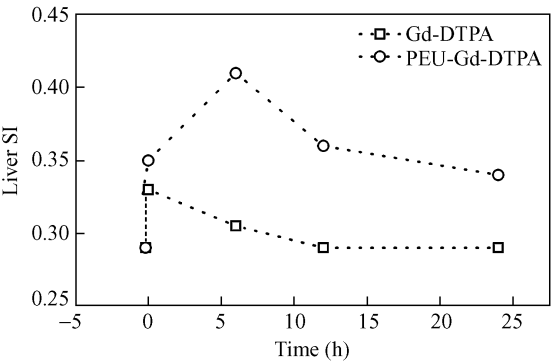


Fig. 4 The imaging effect of (IV) and Gd-DTPA in liver

9 结论

(1) 用简便的方法合成了新型的 PEU-((CH₂)₆NH₂)₂ II 和端氨基聚(醚-氨酯-酰胺)共聚物配体 III。(2) 合成了端氨基聚(醚-氨酯-酰胺) Gd³⁺ 造影剂 IV, IV 的纵向弛豫速率 R₁ 与 Gd-DTPA 相比提高了 38.40%, 且在 0.1、6、12、24 h 肝脏内信号增强率分别是 Gd-DTPA 最大信号增强的 1.5、3、1.8 和 1.3 倍, 半衰期明显延长。

REFERENCES

1 Downing G. Science, 2005, 310(18): 1132 ~ 1134

2 Service R F. Science, 2004, 305(10): 1559

3 Luo Yi(罗毅), Zhuo Renxi(卓仁禧), Fan Changlie(范昌烈). Chemical Journal of Chinese University(高等学校化学学报), 1995, 16(9): 1476 ~ 1479

4 Weissleder R, Bogdanov A, Tung C H, Weinmann H J. Bioconjug Chem, 2001, 12(2): 213 ~ 219

5 Langereis S, Lussanet Q G, Genderen M H P V, Meijer E W, Beets-Tan R G H, Griffioen A W, Engelshoven J M A V, Backes Walter H. NMR Biomed, 2006, 19(1): 133 ~ 141

6 Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54: 459 ~ 476

7 Bailon P, Palleroni A, Schaffer C A, Spence C L, Fung W J, Porter J E, Ehrlich G K, Pan W, Xu Z X, Modi M W, Farid A, Berthold W, Graves M. Bioconjug Chem, 2001, 12(2): 195 ~ 202

8 Caliceti P, Veronese F M. Adv Drug Deliv Revi, 2003, 55: 1261 ~ 1277

9 Veronese F M. Biomaterials, 2001, 22: 405 ~ 417

10 Eckelman W C, Karesh S M. J Pharm Sci, 1975, 64: 704 ~ 709

11 Zhang Zhixian(张志贤), Zhang Ruigao(张瑞稿). Analysis of Organic Groups(有机官能团定量分析). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1990. 300 ~ 307

12 Wang M, Cheng T H, Liu G C, Shen R S. J Chem Soc, Dalton Trans, 1997, (5): 833 ~ 837

13 Wang Leimin(汪雷敏), Pan Tieying(潘铁英), Shi Xinmei(史新梅), Zhou Lifang(周丽芳), Wang Xiang(吴翔), Dang Xiaorong(党晓荣), Yuan Qiaolong(袁养龙), Wang Dening(王得宁). Chinese J of Magenetic Resonance(波谱学杂志), 2005, 22(1): 79 ~ 84

14 Song Chunmei(宋春梅), Xue Haili(薛海丽), Zhuang Xiaolu(庄小璐), Huang Yi(黄奕). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2006, (5): 660 ~ 665

STUDIES ON AMINO GROUP TERMINATED POLY(ETHER-URETHANE-AMIDE) LIGAND AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENT

SONG Chunmei¹, XUE Haili¹, LI Jianqi², YU Yihua², PENG Min², CHEN Qun²,

QIAN Min³, XIE Meiran¹, DU Bing³

(¹ Chemistry Department, ² Physics Department, ³ Biology Department, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract To develop and characterize a new class of potential blood pool magnetic resonance (MR) contrast agents which could be used as cancer target gene delivery carrier, novel gadolinium amino group terminated poly(ether-urethane-amide)/diethylenetriamine pentaacetic acid (PEU-Gd-DTPA) polymeric chelate (IV) was synthesized. The amino group terminated poly(ether-urethane-amide)/diethylenetriamine pentaacetic acid (PEU/DTPA) copolymer ligand (III) could be designed and obtained from the reaction of diethylenetriamine pentaacetic acid dianhydride (DTPAA, I) with amino group terminated PEU (PEU-((CH₂)₆NH₂)₂) (II), which was prepared in high yield by the reaction of polyethylene glycol (PEG) with isophorone diisocyanate (IPDI) and then with hexamethylene diamine. Ligand III was then coordinated with Gd³⁺ ion to give the macromolecular contrast agent IV in water at room temperature. The structure analysis and characterization of DTPAA, II, III were studied by IR, NMR, GPC, and functional group titration methods. Gadolinium content of the polymeric chelate IV was 0.88 wt%, which was determined by radio frequency inductively coupled plasma (ICP) spectra. *In vitro* relaxivity (*R*₁) studies of IV showed a 38.40% increase in *R*₁ relaxivity compared with gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid dimeglumine (Gd-DTPA) injection. The *R*₁ values for Gd-DTPA and IV were 5.93 and 8.21 (mmol/L)⁻¹ · s⁻¹, respectively. *In vivo* distribution of Gd-DTPA and IV was studied at magnetic resonance imaging (MRI) before injection, 0.1, 6, 12 and 24 h after injection, with assessment of liver signal intensity (SI) in 10 nude mice. The liver signal enhancement rates of IV at 0.1, 6, 12 and 24 h are 1.5, 3, 1.8 and 1.3 times, respectively, compared with the largest signal intensity 0.33 of Gd-DTPA observed at 0.1 h. The half-life of IV in liver was as longer as 24 h, while no signal enhancement was observed after 6 hours injection of Gd-DTPA. IV had also a longer circulation life.

Keywords Amino group terminated PEU/DTPA copolymer, MRI contrast agents, Carrier, Relaxivity