

肝组织特异性非离子型高分子磁共振造影剂的制备及性能评价*

舒 婕¹ 李建齐¹ 徐 敏¹ 罗淑芳² 刘顺英² 余家会^{2**} 丛 蓉³ 杜 冰³

(¹ 华东师范大学物理系 上海市功能磁共振成像重点实验室 上海 200062)

(² 华东师范大学新药创制先进技术研究院 上海 200062) (³ 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘 要 L-酪氨酸甲酯与 DTPA 双 *N*-羟基琥珀酰亚胺活性酯(SuO-DTPA-OSu)反应,合成了含 L-酪氨酸甲酯残基的 DTPA 单 *N*-羟基琥珀酰亚胺活性酯(SuO-DTPA-Tyr).以 EDC/NHS 为媒介,通过一步反应将不同量的乳糖酸偶联到 α,β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺]上,然后将含有苯环的结构 SuO-DTPA-Tyr 与联有 D-半乳糖的 α,β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺]反应,合成了 3 种含糖量不同的大分子配体,并制备了其 Gd(III) 螯合物.结果表明,EDC/NHS 方法操作简便,产率高且易于提纯,而 SuO-DTPA-Tyr 上 L-酪氨酸甲酯残基的引入,不仅实现了高分子造影剂的非离子化,同时 L-酪氨酸甲酯残基上的苯环结构也可以方便核磁氢谱的指认.大分子配体的细胞毒性随含糖量降低而增加,但均小于同浓度聚(L-赖氨酸)的毒性.大分子螯合物的细胞毒性与商用小分子造影剂的细胞毒性相当,但其弛豫率明显高于小分子造影剂的弛豫率.大分子螯合物在小鼠肝部有比商用小分子造影剂(钆喷酸葡胺)更好的成像增强效果及更长的停留时间,且在注射前后 6 h,含 D-半乳糖残基的大分子螯合物比不含 D-半乳糖残基的大分子螯合物在小鼠肝部的代谢速率慢,并呈现出更清晰的造影效果.

关键词 聚(L-天冬氨酸)衍生物,大分子-钆螯合物,乳糖酸,磁共振成像

20 世纪 80 年代,钆金属螯合物首次被提出可作为磁共振成像(MRI)造影剂^[1,2],至今世界上已有 7 种商业化造影剂投入了临床使用^[3,4],它们按性质、结构和功能上的不同,可分为离子型和非离子型造影剂、线型和环状造影剂或组织特异性和非特异性造影剂^[4].这些造影剂都是较低分子量的钆金属配合物,毒性低^[1],稳定性好^[5].特别是非离子型造影剂,其具有较小的摩尔渗透压,安全性高,在中枢神经系统成像及血管造影中,可使用较普通诊断量更高的剂量^[4].

近年来,高分子磁共振造影剂在相关研究领域逐渐受到重视^[6],其分子量较高,体内循环时间长,用于血池造影的前景较好,同时由于分子链段运动性能较差,故有比小分子造影剂更高的弛豫效率^[7],这样即便使用很少的剂量也可达到正常成像的需求^[8],既节省了药物,也降低了造影剂给生物体内所带来的风险,但由于代谢较慢,会在体内造成一定的负面作用^[3,9],高分子磁共振造影剂迟迟不能用于临床.

本文以 α,β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺]为主链^[10-13],二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)为配体

合成了一系列非离子型高分子磁共振造影剂.同时在主链上偶联了对肝细胞有识别功能的 D-半乳糖^[14,15](图 1),希望在提高弛豫率的同时实现造影剂的组织特异性^[4],从而适当调控高分子造影剂在体内的代谢速率,使造影的效果在体内肝部维持一段时间后再尽快地代谢到体外,这样既满足了成像时间上的需要,也可减少造影剂在体内累积所带来的副作用.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乳糖酸(Lactobionic acid)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、二亚乙基三胺五乙酸双酸酐(DTPAA)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、L-酪氨酸甲酯盐酸盐(L-TyOMe·HCl)、六水合三氯化钆为 Aldrich 产品,*N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC,上海吉尔生化有限公司),钆喷酸葡胺(Dimeglumine Gadopentetate,北京北陆药业股份有限公司),氘水(四川火炬试剂厂),三乙胺(分别用 KOH、茚三酮回流蒸出),*N,N*-二甲基甲酰胺(0.4 nm 分子

* 2007-04-16 收稿,2007-08-23 修稿;上海市纳米专项(项目号 0652nm009,05nm05012,0452nm028,0452nm084)及国家自然科学基金(基金号 20504010)资助项目;** 通讯联系人,E-mail: yujh109@yahoo.com.cn

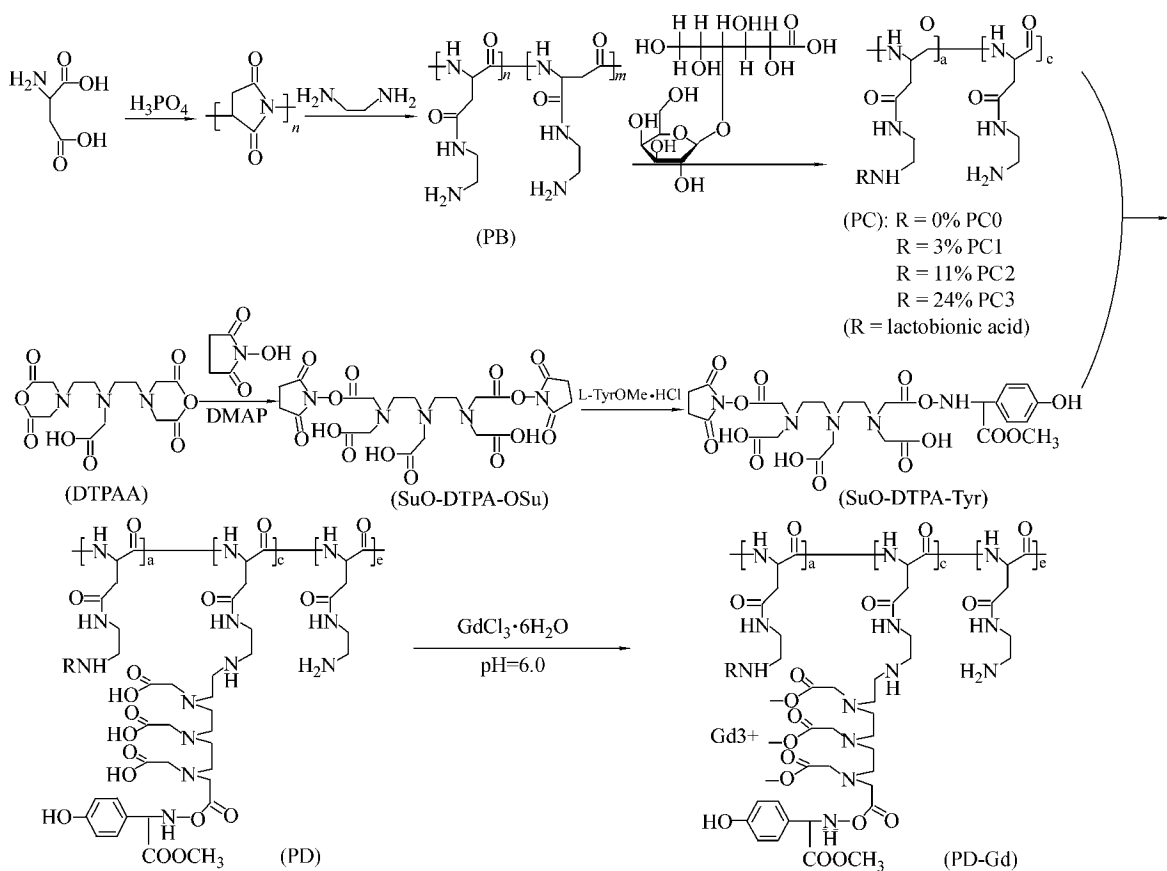


Fig. 1 Synthesis of α, β -poly(L-aspartic acid) derivatives-Gd complexes

筛干燥, 减压蒸出), 戊巴比妥钠(国产)、ICR 小白鼠(上海斯莱克公司生产, 生产许可证号 SCXK (沪) 2003-0003), RPMI1640 培养基(含 10% FBS (小牛血清, GIBCO, USA), 100 units/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素), 噻唑蓝(MTT, 上海华美生物工程公司), 浓硝酸、浓盐酸、乙醚、乙醇、甲醇、L-天冬氨酸、乙二胺、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等为市售分析纯试剂。

酶标仪(Bio-Tek, 美国);核磁共振波谱仪(BRUKER AVANCE 500, 德国布鲁克公司);傅利叶变换红外光谱仪(Nicolet Nexus 670, 美国热电-尼高力公司);电感耦合等离子体原子发射光谱仪(IRIS intrepid II XSP, 美国热电公司);磁共振成像仪(0.3T, 中国卡勒福公司);磁共振成像仪(1.5T, 美国 GE 公司);凝胶色谱仪(Serirs200, 美国珀金埃尔默);冷冻干燥机(FD 20099D000, 美国珀金埃尔默);元素分析仪(VARIOEL3, 德国 ELEMENTAR 公司);紫外-可见分光光度计(Cary100, 美国 Varian 公司)。

1.2 大分子载体的合成

1.2.1 α, β -聚(L-天冬酰胺)(PA)的合成

β -聚(L-天冬酰胺)(PA)的合成与表征参照文献[9]的方法, 并用 DCC 缩合处理, 粘均分子量 M_η 为 7.5×10^4 (25 $^\circ$ C, DMF, $[\eta] = 1.48 \times 10^{-2} \times M_\eta^{0.64}$)。

1.2.2 α, β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺](PB)的合成 α, β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺](PB)的合成方法可参照文献[9], 产率 86%, 分子量 M_w 为 8.9×10^4 (GPC, PEG 标定)。

^1H -NMR (500 MHz, D_2O , δ): 4.5 ~ 4.6 (b, 1H, $-\underline{CH}-$), 3.1 ~ 3.2 (b, 2H, $-\underline{NH}-\underline{CH}_2-$), 2.7 ~ 2.6 (b, 2H, $-\underline{CH}_2-$), 2.6 ~ 2.7 (b, 2H, $-\underline{CH}_2-\underline{NH}_2$) ; ^{13}C -NMR (500 MHz, D_2O , δ): 172.0 ($\underline{C}=\underline{O}$), 49.5 ($-\underline{CH}-$), 41.0 ($-\underline{NH}-\underline{CH}_2-$), 38.5 ($-\underline{CH}_2-\underline{NH}_2$), 36.0 ($-\underline{CH}_2-$)。

1.2.3 含 D-半乳糖基团的聚合物(PC3)的合成 将 2.57 g 的 N-羟基琥珀酰亚胺(22.3 mmol)的 20 mL 磷酸缓冲液(pH = 5.7)与 2 g 乳糖酸(5.6 mmol)的 40 mL 磷酸缓冲液混合, 再加入 4.28 g EDCI·HCl 固体(22.3 mmol), -5 $^\circ$ C 搅拌反应 20 min, 加入聚合物 2.92 g PB 的磷酸缓冲液 10 mL,

0℃继续反应 1 h 后,再常温反应 36 h. 产物溶液在 4℃下用截留分子量 3500 的透析袋透析 72 h,将透析液 45℃下减压浓缩至干得黄色玻璃状固体(PC3) 4.38 g,产率为 89%. 定量碳谱测得 D-半乳糖基团摩尔百分含量为 24%. 同法,制得 D-半乳糖基团含量分别为 3%,11% 的聚合物 PC1、PC2. 经核磁谱图检测,与 PB 的核磁氢谱相比,PC3 氢谱 3.5~4.5 处新增许多小宽峰,为半乳糖基团(LA)的信号,其与 PB 的信号有部分重叠;同时,碳谱的归属如下(LC-D-半乳糖基团环状部分). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, D_2O , δ) :PB, 172.0 ($\text{C}=\text{O}$), 50.5 ($-\text{CH}-$), 39.0 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 37.0 ($-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 35.7 ($-\text{CH}_2-$); LA, 160.1 ($\text{C}=\text{O}$), 103.4 (LC, $\text{CH}-\text{O}-\text{C}-\text{O}$), 81.6 ($\text{CH}-\text{O}-\text{C}-\text{O}$), 75.3 (LC, $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$), 62.0 (LC, $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$), 59.7 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), 72.4, 71.5, 71.4, 71.1, 70.3, 68.6 处为其余 6 个 $-\text{CHOH}-$ 的化学位移处.

1.2.4 大分子配体的合成 二亚乙基三胺五乙酸双活性酯(SuO-DTPA-OSu)的合成是称取 8.6 g DTPA 双酸酐, 6.648 g *N*-羧基琥珀酰亚胺及 10 mg DMAP 溶于 100 mL DMF 中室温搅拌反应 24 h. 将产物用 1:1 的乙醇-乙醚混合液沉淀,沉淀用甲醇洗涤,再用乙醚浸泡过夜,抽干,得白色粉末状固体 SuO-DTPA-OSu 9 g,产率为 63.8%.

含 L-酪氨酸甲酯残基的 DTPA 单活性酯(SuO-DTPA-Tyr)的合成是称取 6.3541 g (27.4 mmol) 酪氨酸甲酯盐酸盐溶于 30 mL DMF,加入 4 mL 三乙胺,搅拌反应 20 min,产生大量的白色固体,将溶液过滤,滤液转移到滴液漏斗中,缓慢滴加到 DTPA 双活性酯的 40 mL DMF 溶液中(16.0975 g, 27.4 mmol),冰盐浴下搅拌反应 12 h 后,室温反应 24 h. 产物用 1:1 的乙醇-乙醚混合液沉淀,沉淀用甲醇洗涤,再用乙醚浸泡过夜,抽干,得乳白色粉末状固体 SuO-DTPA-Tyr 15 g. 产率为 85.6%. 产率为 85.6% 元素分析数据, C 48.43/50.7(理论), H 6.53/5.79(理论), N 9.967/10.95(理论).

大分子配体的合成是将 9.3 mmol PC3 的 150 mL 水溶液加入 500 mL 圆底烧瓶中,冰浴冷却 10 min,滴加入 9.8 mmol SuO-DTPA-Tyr 的 52 mL DMF 溶液,冰浴搅拌反应 6 h 后,室温继续反应 24 h. 过滤,滤液在 4℃下用截留分子量 3500 的

透析袋透析 72 h,将透析液于 45℃以下减压浓缩至干燥得黄色玻璃状固体(PD3) 7.7 g,产率 89%.

同法得到 PC1, PB 分别与 SuO-DTPA-Tyr 反应的大分子配体 PD1 及 PD0.

1.3 大分子配体/钆螯合物的制备

称取 0.1407 g (0.18 mmol) PD3 和 0.0831 g (0.22 mmol) $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 10 mL 蒸馏水溶解,用 0.01 mol/L 的稀盐酸调节 pH 值至 6,室温搅拌反应 6 h,过滤,滤液在 4℃以下用截留分子量为 3500 的透析袋透析 72 h,冷冻干燥透析液得大分子/钆螯合物 PD3-Gd,电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP)测定 Gd 重量百分含量为 4.9%.

同法合成 PD1-Gd、PD0-Gd, Gd 重量百分含量分别为 5.8%、11.4%.

1.4 高分子配体的含糖量的测定

1.4.1 定量碳谱测定含糖量 实验以氘水为溶剂,分别将 D1 设为 10 s, 2 s, 进行对比,所得的谱图的各个峰的积分强度基本一致. 可见,由于样品的分子量较高, T1 较短, D1 = 2 s 时磁化矢量已基本弛豫完全,故实验将 D1 (Delay Time) 设为 2 s 时可得到具有定量意义的碳谱.

1.4.2 蒽酮比色法测定含糖量 分别在含 0.01 μg 、0.02 μg 、0.04 μg 、0.06 μg 、0.08 μg 、0.1 μg 的 1 mL 葡萄糖溶液中加入 4 mL 的蒽酮试剂(蒽酮浓度为 2 mg/mL 的浓硫酸溶液),沸水浴加热 7 min,冷至室温测其在 620 nm 的吸收值,绘制工作曲线. 同样方法制备 PC1、PC2 和 PC3 的待测溶液,通过测定读取浓度值.

1.5 PC0、PC1、PC3 及 PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 的体外细胞毒性评价

用噻唑蓝比色法(MTT 法)评价 3 种含不同百分比乳糖酸的聚天冬氨酸衍生物(PC0, $R = 0\%$; PC1, $R = 3\%$; PC3, $R = 24\%$; R-lactobionic acid) 对人黑色素瘤细胞(A375 细胞株)的细胞毒性,以聚(L-赖氨酸)(PLL)作为对照. 用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度,接种于 96 孔培养板,每孔加 100 μL 细胞悬液(2×10^4 个/孔),在 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h,去掉培养液,加入含不同浓度的载体(PC0、PC1、PC3)的新鲜培养基(100 μL /孔),继续培养 48 h,加入 MTT 溶液(5 mg/mL, 20 μL /孔),继续培养 4 h. 测定前吸出培养液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 200

μL , 缓慢振荡 10 min 后, 用酶标仪于波长 570 nm 下测定 OD 值并计算细胞相对存活率, 相对存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%.

同法评价 3 种大分子造影剂 (PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd) 对人黑色素瘤细胞 (A375 细胞株) 的细胞毒性 (以商用造影剂钆喷酸葡胺作为对照).

1.6 大分子造影剂 PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 弛豫率的测定

将大分子造影剂 PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 及商用造影剂钆喷酸葡胺配成 4 种浓度的溶液, 钆离子浓度分别为 0.24 mmol/L, 0.12 mmol/L, 0.06 mmol/L, 0.03 mmol/L 左右. 将稀释好的溶液盛于 1.5 mL 离心管中在 0.3 T 磁共振仪上通过反转恢复法测 4 种造影剂不同浓度溶液的 T_1 值, 通过下列公式, 用作图法求斜率, 从而得弛豫率 r_1 :

$$c_{\text{Gd}} \cdot \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_{1w}} = \frac{1}{T_{1m}}$$

其中 $r_1 = 1/T_1$, T_{1w} 为纯水的弛豫时间, T_{1m} 为不同浓度造影剂实际测量出的弛豫时间.

1.7 ICR 小白鼠肝部磁共振成像实验

磁共振成像实验选取 6 周雄性品系为 ICR 的小白鼠为对象 (约 30 g), 将每种造影剂所用小鼠按测试时间不同分为 5 组, 每组 6 只, 分别在注射造影剂后 10 min 内、3 h、6 h、12 h、24 h 及 1 周进行磁共振成像实验. 实验选用戊巴比妥钠作为小白鼠的麻醉剂, 腹腔注射, 剂量为 50 $\mu\text{g/g}$. 造影剂的钆浓度全部为 0.015 mol/L, 每只小白鼠注射量为 1 mmol/kg, 每只约注射 200 μL .

所有扫描均在 GE Signa TwinSpeed 1.5T 磁共振成像仪上完成, 小鼠成像扫描序列采用 SE T1WI, 扫描层面为横断位, 扫描参数为 TR/T₁'E = 400 ms/10 ms; FOV = 6 cm; 层厚/层间隙 = 3 mm/0.5 mm; Matrixs = 128 $\times$ 128, NEX = 4. 图像分别测量肝脏感兴趣区的信号平均强度 SI_{liver} 和油标处的信号平均强度 SI_{Oil} 肝脏的相对信号强度 (图 5a), 由下式计算得到相对信号强度 RI [16]:

$$RI = SI_{\text{liver}}/SI_{\text{Oil}}$$

进一步由下式计算得到肝脏信号增强率:

$$\text{ENH} = (RI - RI_0)/RI_0 \times 100\%$$

式中 RI_0 为 6 只未增强小鼠肝脏的相对信号强度的平均值.

2 结果与讨论

2.1 大分子配体的合成及 D-半乳糖含量测定

分别将乳糖酸及含 L-酪氨酸甲酯残基的 DTPA 单 *N*-羟基琥珀酰亚胺活性酯 (SuO-DTPA-Tyr) 与 α, β -聚[(2-氨基乙基)-L-天冬酰胺] 反应, 合成了 3 种含糖量不同, 水溶性极好的大分子配体. 引入 L-酪氨酸甲酯残基的目的是为了封闭二亚乙基三胺五乙酸配体过量的羧酸基, 赋予造影剂非离子的特性, 以降低其摩尔渗透压和毒性. 此外, 由于 PD3 的分子量较大, 结构较复杂, 且氢谱与碳谱的化学位移都重叠在高场处, 指认存在一定的困难, 而苯环中氢的化学位移在较低场, 故 L-酪氨酸甲酯残基中苯环结构的引入, 方便证实了反应的可行性. 在 PD3 核磁共振氢谱中, $\delta = 6.8(2\text{H}), \delta = 7.1(2\text{H})$ 处有两个峰, 为单活性酯配体苯环上氢的信号.

造影剂中引入乳糖酸残基的目的是因为 D-半乳糖基团对肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体有识别和结合作用, 它可以使造影剂具有肝靶向性.

将 D-半乳糖基团偶联到主链上的合成方法是通过以 EDC/NHS 为媒介的缩合反应实现的, 该方法省去了乳糖酸活性酯的合成步骤, 以 EDC 或 EDC 与 NHS 相组合, 在弱酸环境下与含有羧基的乳糖酸形成不稳定的邻位酰基异尿酯或半稳定的 *N*-羟基琥珀酰亚胺氨基活性酯, 再通过主链上氨基对酯键的进攻而成功实现了 D-半乳糖基团在主链上的偶联. 该方法操作简便, 一步完成, 产率较高, 同时由于反应以水为溶剂, 利用透析的方法提纯方便.

图 2 为聚合物 PC3 的定量碳谱, $\delta = 103.4$ 处为乳糖酸 $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ 的峰, 50.5 为主链上 $-\text{CH}-$ 的峰, 其积分值分别记为 I_1, I_2 , 则 $I_1/(I_2 + I_1)$

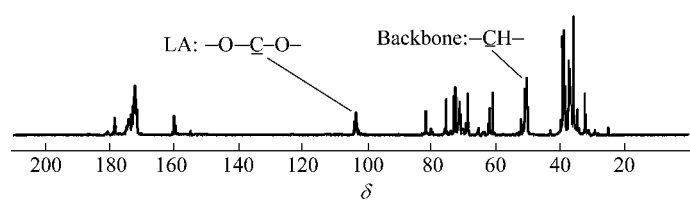


Fig. 2 The quantitative ^{13}C NMR spectrum of PC3

的值为 PC3 载体实际所含的乳糖酸的摩尔百分比(24%),同法计算出 PC1、PC2 的含糖量分别为 3%、11%。同时采用蒽酮比色法测定样品的含糖量 PC1、PC2 和 PC3 的含糖量分别为 3.5%、9.6%和 22.8%,与定量碳谱测定结果基本一致。

2.2 大分子载体(PC0、PC1、PC3)及大分子造影剂(PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd)的体外细胞毒性

图 3(a)为 3 种含不同百分比乳糖酸的聚(L-天冬氨酸)衍生物(PC0、PC1、PC3)及聚(L-赖氨酸)对人黑色素瘤细胞(A375 细胞株)的细胞毒性。3 种大分子载体的细胞毒均小于同浓度的聚(L-赖氨酸)的细胞毒性。对于 PC1 及 PC3 来说,当其浓度大于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞相对存活率依旧维持在 60% 以上,体现了良好的生物相容性。此外,随着载体乳糖含量的增高,载体细胞毒性

逐渐降低,这是由于聚天冬氨酸衍生物是一个聚阳离子,在中性环境下表现出一定的正电性^[17],使其可能会对某些组织产生非特异性的结合,造成细胞毒性的相对增加。而乳糖酸在主链上的偶连,可将链上的部分正电荷屏蔽掉,提高了载体在细胞的投递效率。

图 3(b)为不同浓度大分子造影剂(PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd)及商用小分子造影剂(钆喷酸葡胺)对人黑色素瘤细胞(A375 细胞株)的细胞相对存活率的影响。在浓度小于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时(折合为 Gd 的浓度),在误差范围内大分子造影剂 PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 与商用小分子造影剂的细胞毒性相当。随着浓度的增加,大分子造影剂 PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 的毒性比商用小分子造影剂的毒性略高。

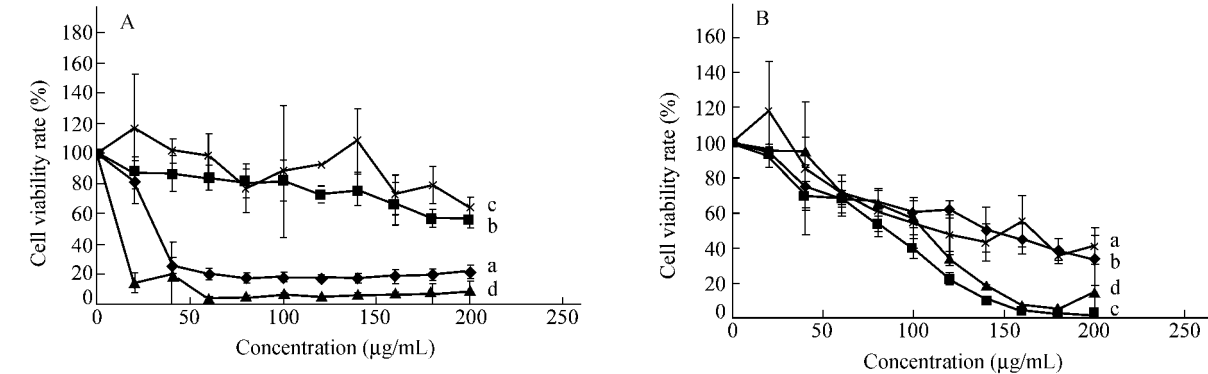


Fig. 3 (A) Cytotoxicity of polymers (a) PC0, (b) PC1, (c) PC3 and (d) polylysine
(B) Cytotoxicity of contrast agents (a) Dimeglumine Gadopentetate, (b) PD0-Gd, (c) PD1-Gd and (d) PD3-Gd

2.3 大分子造影剂(PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd)弛豫率的测定

表 1 列出了 3 种大分子造影剂(PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd)与商用小分子造影剂(钆喷酸葡胺)的弛豫率(r_1)数据。PD0-Gd、PD1-Gd、PD3-Gd 与钆喷酸葡胺的弛豫率相比均有较大的提高,其中 PD0-Gd 的弛豫率最高,比钆喷酸葡胺的弛豫率高约 60%。其主要原因是大分子造影剂的分子活性较低,顺磁性金属离子所产生的局部磁

场更容易对附近的水质子产生影响,缩短其弛豫时间,从而增加了弛豫率。

2.4 大分子造影剂 PD0-Gd、PD3-Gd 对 ICR 小白鼠肝部磁共振成像造影增强性能

图 4 为 3 种造影剂注射 6 h 后,小白鼠肝部磁共振 T1 加权图。由图可见,较空白样本相比(a),商用造影剂在注射 6 h 后(b)信号增强基本消失,而 PD3-Gd(c), PD0-Gd(d)两种造影剂仍保持着较强的肝部信号增强作用。比较(c),(d)两图,带有肝靶向基团的 PD3-Gd 对肝部各个区域的信号增强作用基本一致,肝部的轮廓清晰明朗,同时对皮下脂肪的信号增强作用相对较弱。无肝靶向基团的 PD0-Gd 则有更强的信号增强作用—无论是肝部还是皮下脂肪区,但其对肝部中间区域的增强作用较强,而肝部边缘区域的信号则较为模糊。

Table 1 Relaxation rate r_1 of the contrast agents	
Contrast agents	Relaxivities ($r_1 = 1/T_1$)
PD0-Gd	9.48 mmolL ⁻¹ s ⁻¹
PD1-Gd	8.00 mmolL ⁻¹ s ⁻¹
PD3-Gd	7.77 mmolL ⁻¹ s ⁻¹
DTPA-Gda	5.95 mmolL ⁻¹ s ⁻¹

^a DTPA-Gd : Dimeglumine gadopentetate

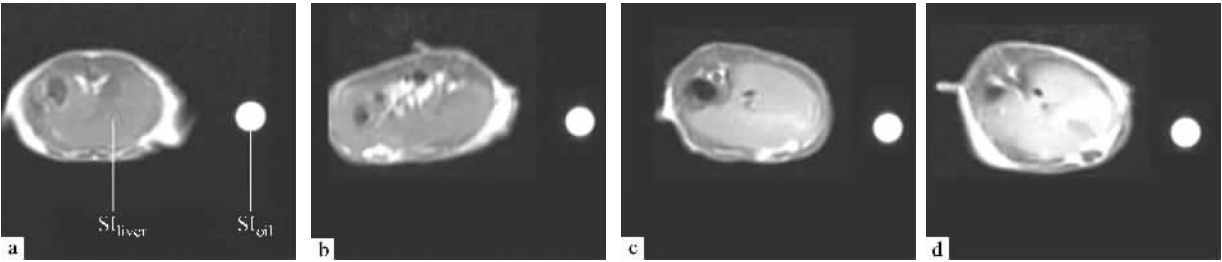


图 4 T1-weighted MR images of the mice without injection of any contrast agent (a), 6 h after injection of DTPA-Gd (b), PD3-Gd (c) and PD0-Gd (d), respectively

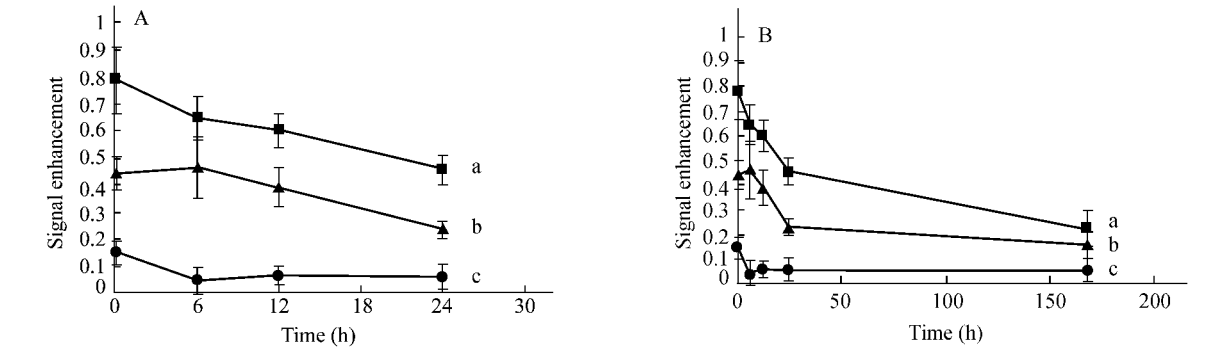


图 5 (A) Signal enhancement of mice livers at 0.1 h, 6 h, 12 h after the injection of different contrast agents ; (B) Signal enhancement of mice livers at 0.1 h, 6 h, 12 h, 24 h and a week after the injection of different contrast agents
a) PD0-Gd ; b) PD3-Gd ; c) DTPA-Gd (dimeglumine gadopentetate)

图 5(a)为钆喷酸葡胺、不含靶向基团的 PD0-Gd 及含肝靶向基团的 PD3-Gd 经小白鼠尾静脉注射后 24 h 内的肝部信号增强变化曲线, (b) 为其注射后一周内的肝部信号增强变化曲线. 小分子造影剂钆喷酸葡胺对小白鼠肝部的信号增强较弱, 在肝部的代谢时间很短(小于 6 h), 而大分子造影剂 PD0-Gd、PD3-Gd 对小白鼠肝部的信号增

强效果远优于小分子造影剂对小白鼠肝部的信号增强效果, 且在肝部的代谢时间较长. 同时, 带有靶向基团的 PD3-Gd 在注射后 6 h 内, 表现稳定, 并没有信号衰减的趋势, 6 h 后才开始减弱. 说明含有 D-半乳糖基团的 PD3-Gd 与小白鼠肝区有一定亲合性, 能在肝部富集, 对肝呈现一定的靶向效果.

REFERENCES

1 Weinmann H,Brasch R,Press W,Wesbey G. Am J Roentgenol 1984,142 619 ~ 624
2 Randalle E L. Chem Rev,1987,87 901 ~ 927
3 Peter C,Jeffrey J E,Thomas J M,Randall B L. Chem Rev,1999,99 2293 ~ 2352
4 Marie F B. Eur J Radiol,2006,60 314 ~ 323
5 Frank G S,Emanuel K. J Magn Reson Imaging,1999,10 477 ~ 484
6 Vladimir P T. Curr Pharm Biotechnol,2000,1 183 ~ 215
7 Yu K C,Hu H B,Liu M L,Yuan H Z,Ye C H,Zhuo R X. Chin J Polym Sci,1999,17(5) 471 ~ 475
8 Claude B S,David R V,Jacqueline A C,Marlon B C,Richard B B,Robert F M. Acad Radiol,2004,11(12) 1361 ~ 1369
9 Franano F N,Edwards W B,Welch M J,Brechbiel M W,Gansow O A,Duncan J R. Magn Reson Imaging,1995,13 201 ~ 214
10 Neri P,Antoni G,Benvenuti F. J Med Chem,1973,16(8) 893 ~ 897
11 Yan Guoping(鄢国平),Zhuo Renxi(卓仁禧),Xu Mianyi(徐勉懿),Li Liyun(李丽云),Tang Yuefeng(唐岳枫). Sci China Ser B(中国科学 B 辑),2001,31(3) 253 ~ 260
12 Yan G P,Liu M L,Li L Y. Bioconjugate Chem,2005,16 967 ~ 971
13 Yan G P,Zhuo R X,Yang Y H,Li L Y,Liu M L,Ye C H. J Bioact Compat Pol,2002,17(2) 139 ~ 151
14 Tae H K,In K P,Jae W N,Yun J C,Chong S C. Biomaterials,2004,25 3783 ~ 3792

- 15 Zhuo Renxi(卓仁禧), Yan Guoping(鄒国平), Fu Yanjun(傅雁军). China patent, 19G16C, CN1316273. 2001-10-10
- 16 Luciani A, Olivier J C, Clement O, Siaube N, Brillet PY, Bessoud B, Gazeau F, Uchegbu IF, Kahn E, Frija G, Cuenod C A. Radiology, 2004, 231 :135 ~ 142
- 17 Leclercq F, Dubertret C, Pitard B, Scherman D, Herscovici J. Bioorg Med Chem Lett, 2000, 10 :1233 ~ 1235

PREPARATION AND EVALUATION OF LIVER SPECIFIC NON-IONIC POLYMERIC CONTRAST AGENT

SHU Jie¹, LI Jianqi¹, XU Min¹, LUO Shufang², LIU Shunying², YU Jiahui², CONG Rong³, DU Bing³

(¹ Key laboratory of Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062)

(² College of New Drug Innovation Research & Development, East China Normal University, Shanghai 200062)

(³ College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract Contrast agents special for liver are always required to have a relatively longer metabolic time and a stable contrast effect in liver tissue. Therefore, D-lactobionic acid residues, which are generally used as liver-targeted groups, were introduced here. Single *N*-hydroxysuccinimide active ester of DTPA (SuO-DTPA-Tyr) was synthesized as the ligand of gadolinium (III) ion, forming the basic structure of non-ionic contrast agent. Three α , β -poly(L-aspartic acid) derivatives (PD0, PD1 and PD3) with different D-lactobionic acid residue contents were synthesized by conjugation of D-lactobionic acid and single *N*-hydroxysuccinimide active ester of DTPA with α , β -poly[(2-aminoethyl)-L-aspartamide], respectively. Polymeric gadolinium (III) complexes (PD0-Gd, PD1-Gd and PD3-Gd) were prepared by the reaction of α , β -poly(L-aspartic acid) derivatives with $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The contents of D-lactobionic residues and gadolinium (III) were determined by quantitative ^{13}C -NMR and ICP, respectively. Properties of these polymeric contrast agents were evaluated here. Cytotoxicity test shows that all the polymer ligands (PC0, PC1 and PC3) have better cell viability rate than that of poly(L-lysine) with corresponding concentrations. The value of cell viability rate rises with the increase of D-lactobionic acid residue content. The reason is the D-lactobionic acid residues mostly shield the positive charge of backbone, which blocks the delivery of carrier to the cells. Compared with the commercial contrast agents, polymer complexes have the same level of cytotoxicity. However, their relaxivities (7.77, 8.00 and 9.48 $\text{mmolL}^{-1}\text{s}^{-1}$ for PD0-Gd, PD1-Gd and PD3-Gd, respectively) are obviously higher than that of commercial contrast agents (5.95 $\text{mmolL}^{-1}\text{s}^{-1}$ for dimeglnmine gadopentetate). That is because the mobility of polymer molecules is lower than that of small molecules, which leads to an increase of relaxivities. Experiments *in vivo* were carried out on ICR mice, which were divided into 3 groups for 3 different contrast agents (PD0-Gd, PD3-Gd and Dimeglnmine Gadopentetate for commercial used). Mice for each contrast agent were also divided into 5 groups (6 mice each) for testing in different time after injections. As the result shows, polymeric complex with liver targeted groups gives a better result than that of complex without liver targeted groups. All of the polymeric complexes give much better image contrast effects and longer circular time than that of commercial contrast agent in mice livers. During the first 6 h after being injected, polymeric complexes with D-lactobionic residues have much lower metabolism rate than those without D-lactobionic residues and gives the clearest liver image among all those contrast agents, even though the signal is not the strongest one which mostly depends on the relaxivities. Besides that, mice liver with liver-targeted complexes show a stable and clear image statistically. After 6 h, metabolism rate of liver targeted polymer complex increases and has almost same metabolism rate as that of commercial contrast agent. Those results illustrate that the introduction of D-lactobionic acid residues can moderately prolong the metabolic time in liver and stabilize the liver signal enhanced by contrast agents.

Keywords Poly(L-aspartic acid) derivatives, Polymer-gadolinium complexes, Lactobionic acid, MRI