

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

釐金屬錯合物及氧化鐵表面修飾做為分子影像之磁振造影對比劑

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2113-M-009-016-MY3

執行期間：97年8月1日至100年7月31日

執行機構及系所：高雄醫學大學醫藥暨應用化學系

計畫主持人：王雲銘

共同主持人：

計畫參與人員：吳首成、陳俞任、陳彥豪、吳啟明、許光美  
林欣平、蕭淳珊

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

中 華 民 國 101 年 2 月 21 日

## 目 錄

|              |    |
|--------------|----|
| 中文摘要.....    | 1  |
| 英文摘要.....    | 2  |
| 前言.....      | 3  |
| 計畫內容.....    | 4  |
| 研究方法.....    | 15 |
| 結果與討論.....   | 20 |
| 結論與建議.....   | 32 |
| 參考文獻.....    | 33 |
| 計畫結果與自評..... | 35 |

## 中文摘要

近年來磁振造影(MRI)已被發展至應用於人體到細胞及分子的層級。為了完全開發 MRI 技術應用於細胞、分子與功能性影像，能夠標幟活體細胞的目標化、區域化及數量化之新一代 MRI 對比劑與技術是目前最迫切需要的。因此，目前兩種最主要的 MRI 對比劑是研究與發展的方向：小型分子量之釷金屬錯合物及氧化鐵奈米粒子。高度表現於人類腫瘤上新穎的 MMP-7、Legumain 蛋白酶(protease)或  $\alpha_v\beta_3$  受體與腫瘤侵犯及轉移有關，目標化之 MMP-7、Legumain 或 cRGD 之胜肽片段可當作標的，目標化至表現這些蛋白酶或受體類型之腫瘤。本研究之目的為調節不同親脂性之釷金屬錯合物，並將此釷金屬錯合物鍵結上目標化之 MMP-7、Legumain 或 cRGD 蛋白酶表現之腫瘤，找出最佳的脂溶性之釷屬錯合物，胜肽片段能使釷金屬錯合物目標化沈積於 MMP-7 蛋白酶、Legumain 或 cRGD 相關的腫瘤位置。親脂性之釷金屬錯合物能夠安定的沈積於腫瘤細胞膜表面而應用 MRI 上，可用於標幟與追蹤癌細胞。這些釷金屬錯合物能用於以非侵入造影追蹤蛋白酶表現。此釷金屬錯合物之物性、化性探討，包括熱力學穩定度、弛緩率( $r_1$ )、內層水分子數、水分子交換速率、轉動相關時間及與蛋白酶或膜蛋白受體作用之探討是本研究的重點。最後，體外相關實驗與 MR 影像也將被研究探討。在氧化鐵奈米粒子方面，先前研究中有發展出具良好生物相容性的超順磁氧化鐵奈米粒子，其在磁振造影的顯影上具有較高之靈敏度，無毒性又兼具生物可降解性，我們利用先前的經驗作為研究  $T_2$  磁振造影對比劑的一基本平台。本計劃目的為將超順磁氧化鐵奈米粒子表面修飾上具生物相容性之高分子聚合物，再鍵結賀癌平(Herceptin)或其他具目標化之胜肽片段，藉以目標化到腫瘤(乳癌或其他癌症)位置。我們首先合成奈米級之超順磁氧化鐵粒子及研究其物、化性質，包括氧化鐵奈米粒子粒徑大小、穩定性、磁化率、XRD 晶型研究等，並藉由縮短其橫向弛緩時間( $T_2$ )來提高其將來在 MRI 上訊號強度的對比。縱向( $T_1$ )及橫向( $T_2$ )弛緩率則利用 20MHz 弛緩儀在 37°C 下測得。最後利用流式細胞儀及 MR 影像來證明已修飾超順磁氧化鐵奈米粒子之效能。

關鍵詞：磁振造影對比劑、熱力學、動力學、弛緩率、釷金屬錯合物、水交換速率、氧化鐵奈米粒子

## 英文摘要

Recently, MRI has been developed to examine living organisms down to the cellular and molecule level. To exploit the advancement of MRI technique for cellular, molecule and functional imaging, there are increasing needs for developing new MRI contrast agents and techniques for cell and molecule labeling to report the localization, movement, mass, and functions of cells in vivo. Therefore, two major classes of contrast agents are available for MRI such as small molecular weight  $Gd^{3+}$  chelates and iron oxide nanoparticles. The purpose of research is tuning the lipophilicity of  $Gd^{3+}$  complexes and conjugating with peptide substrates of MMP-7, Legumain protease or cRGD. MMP-7, Legumain protease and  $\alpha\beta3$  receptor are greatly related to tumor invasion and metastasis, and are also highly expressed in majority of human tumors, which make them as the very representative cancer proteases and membrane receptor. To find the optimum lipophilicity of  $Gd^{3+}$  complexes that can be stably incorporated into cell membranes may serve as a useful tool for tumor cell labeling and tracking. Ideally, these  $Gd^{3+}$  chelates should label intact cell membranes noninvasively at low concentrations and with fast kinetics, and should remain on labeled cells over a period of time to allow repetitive imaging. The chemical and physical properties of these  $Gd^{3+}$  complexes will be characterized, including thermodynamic stability constant, relaxivity ( $r_1$ ), the number of inner-sphere water and kinetic parameter (water exchange rate and rotational correlation time). Finally, the MR imaging will be conducted as well. On the other hand, in the case of targeting to tumor cell, the surface of iron oxide nanoparticles modified with dextrin or PEG (polyethylene glycol) and then conjugated with herceptin or targeting peptide will be synthesized. The nano-sized superparamagnetic iron oxide (SPIO) particulates selectively shorten the transverse relaxation time ( $T_2$ ) of nearby water protons and generally produce negative enhancement by decreasing signal intensity. The geometry, structural features, and physical properties of magnetite nanoparticles will be characterized. The longitudinal relaxivity ( $r_1$ ) and transverse relaxivity ( $r_2$ ) will be measured by 20 MHz relaxometer at  $37.0 \pm 0.1^\circ C$ . To prove effectiveness of this MR probe, the flow-cytometric analysis and MR imaging will be used.

**Keywords:** Magnetic resonance imaging contrast agent, thermodynamic, kinetic, relaxivity, gadolinium complex, water exchange rate, superparamagnetic iron oxide

## 前言

磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)是近年來在臨床診斷上相當重要之影像工具。它不同於傳統的 X 光攝影(X-ray)、電腦斷層掃描(computer tomography, CT)僅能提供軸狀面影像，對人體不會產生游離輻射，可進一步提供矢狀面和冠狀面的影像，提供三度空間影像，不需侵入體即可獲得人體各種組織之任意截面剖面圖，又有高對比的解像力，是現代醫學不可或缺的影像診斷工具，對醫學的診斷、醫療及後續工作皆十分重要，而其對於軟組織的顯影亦有不錯的診斷，目前已普遍應用於臨床，對於一些疾病的診斷成了必不可少之檢查技術。核磁共振是指原子核在靜止磁場中，受電磁波激發而產生的共振現象，這裡面涉及到磁矩、自旋角動量、晶格弛緩、脈衝及擴散係數等參數，其原理是利用磁場原理。一般而言，人體組織 60~70%的組成是水，7~10%是脂肪，15~20%是蛋白質，所以人體是個充滿水分的有機體，而水分子含有很多氫原子核，MRI 就是利用人體內的氫原子核(proton)，在強磁場受到射頻無線電波(radio frequency)脈衝的激發，產生核磁共振現象，原子核就會釋放吸收的能量，把以電磁形式放出的核磁共振信號接收，藉由電腦二維傅立葉轉換(twodimensional Fourier Transform)運算轉換，再通過電腦的分析組合成影像，以做診斷。然而在早期的臨床使用中，在某些情況下的電腦斷層檢查中，可發現注射對比劑(contrast agent, CA)比未注射對比劑的磁振造影檢查效果更好。所以，磁振造影對比劑的發展乃針對傳統磁振造影的缺點，使 MRI 在臨床應用範圍更趨廣泛。

## 計畫內容

磁振造影(Magnetic Resonance Imaging, MRI)近年來發展相當快速，因為具有非侵入性的診斷特質，故已成為世界各醫學中心必備之診斷工具。而磁振造影術所使用的磁振造影對比劑(Contrast Agent, CA)也正快速的成長中。對比劑可依據質子的弛緩時間種類予以分類，順磁性物質主要是降低質子的自旋-晶格弛緩時間(spin-lattice relaxation time,  $T_1$ )。因此，這一類之對比劑稱之  $T_1$  對比劑<sup>1-4</sup>。 $T_1$  對比劑主要是增強組織之信號強度，以應用於  $T_1$ -weighted 之脈衝列為主。另一類為超順磁氧化鐵主要是降低質子的自旋-自旋弛緩時間(spin-spin relaxation time,  $T_2$ )，進而減少組織之信號強度，主要應用  $T_2$ -weighted 之脈衝序列。一般而言，對比劑必須具備下列之特性：(1)高弛緩率，(2)滯留體內之穩定性高，(3)毒性低，(4)體內分佈達到目標化。對比劑若能累積在特殊之組織或器官，且對周圍其他器官與組織無明顯攝入之現象，則會增加其對病變組織之對比，此即為目標化對比劑之特點。磁振造影劑藉由從信號強度之改變可得到較佳之訊號與雜訊之比率，進而提高對疾病診斷之靈敏度。由研究中得知有以下幾種方法可以使磁振造影對比劑到達目標組織，其一為合成一些具特殊性官能基之  $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  或  $Gd^{3+}$  錯合物，這些錯合物由於具備特殊之官能基，故能在特定之組織或器官累積。其二為利用分子量大於 20 KDa 之順磁性或超順磁性化合物，即巨大分子對比劑(Macromolecular Contrast Media, MMCM)。此類對比劑主要目的係增加其在血池(blood pool)停留時間，而實驗顯示此種對比劑注射至動物體內後、可延長其在血管內之停留時間，因此可做為血管、肝臟、脾臟及腫瘤之造影。其三乃是將氧化鐵奈米粒子或釧系金屬錯合物標幟於特殊單株抗體(monoclonal antibody)或殘基(residue)上，亦可達到目標組織之功能。Peters 等人<sup>5</sup>針對在癌症細胞膜表面具有 Neu5Ac 過度表現的唾液酸(sialic acid)醣類殘基，設計了兩類以 DTPA 為主架構之雙醯胺基配位子  $L^1$  和  $L^2$ ，如 Figure 2 所示，在  $L^1$  和  $L^2$  兩端都修飾上苯硼酸官能基，此類結構具有與唾液酸醣類殘基上氫氧基結合並目標化之功能，且在與其他醣類殘基競爭實驗中證實，其目標化於唾液酸殘基之能力較為顯著。因此可作為一目標化之磁振造影對比劑。

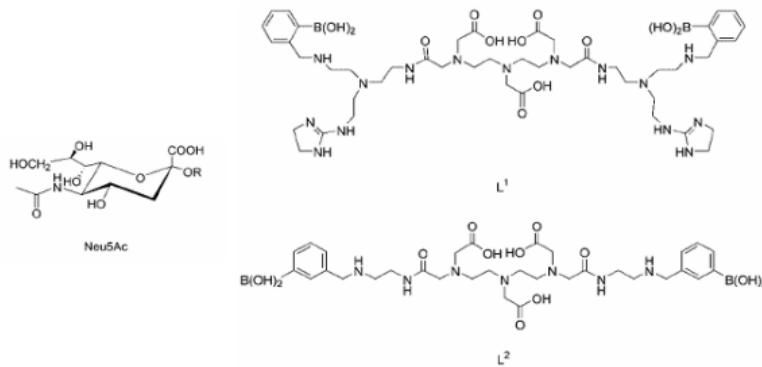


Figure 2. Molecular structures of a Neu5Ac end group in a glycoprotein or glycolipid (R) and the targeting ligands  $L^1$  and  $L^2$ .

Meade 等人<sup>6</sup>在 2005 年針對一在生物體中扮演報告基因(report gene)角色的尿甘酸醛糖醇素 ( $\beta$ -glucuronidase)，合成一具生物活性之對比劑，當此釧金屬錯合物經由尿甘酸醛糖醇素的切割後產生一連串分子自身共價鍵結的斷裂如 Figure 3 所示，而由  $\tau_m$  (分子轉動相關時間)較大的大分子(1)轉變成  $\tau_m$  較小的小分子(2)，在 DOTA 此類型水交換速率慢的磁振造影對比劑中，其分子轉動相關時間會因分子量大小而有所變化，而此釧金屬錯合物經由尿甘酸醛糖醇素切割之前後因分子量由大變小，在遲緩時間( $T_1$ )上前後差異增加了 15%，在影像上具有由亮變暗的性質，而形成了一具有開關(on/off switch)功能之具生物活性磁振造影對比劑。

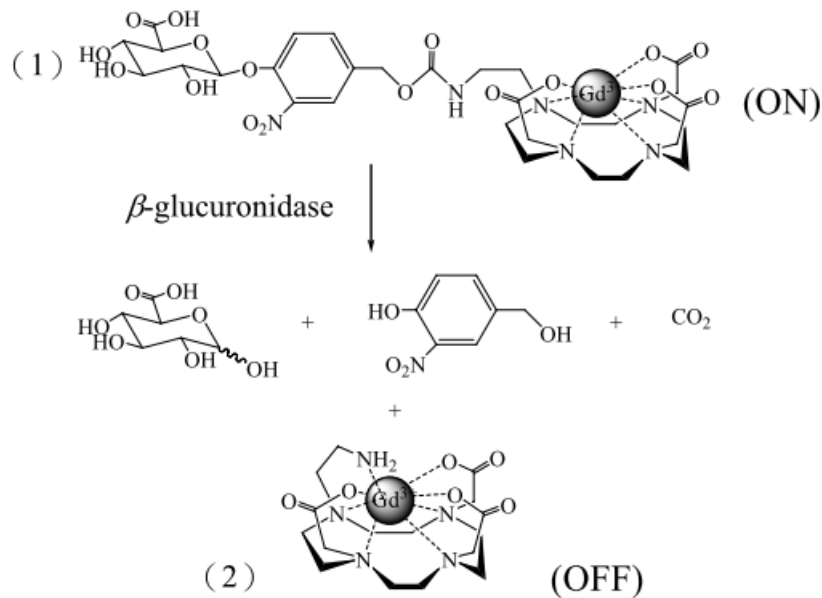


Figure 3. Enzyme-cleavable contrast agent for molecular weight changed.

在 2006 年，Desreux 等人<sup>7</sup>合成出了一具有與過渡金屬元素如 Fe(II)及 Ni(II)進行自我組裝之超分子磁振造影對比劑，以 DO3A 為主架構和 5,6-dihydro-phenanthroline 結合，形成一動力學穩定的釷金屬錯合物，再與過渡金屬元素如 Fe(II)及 Ni(II)進行自我組裝，如 Figure 4 所示，形成一個超分子釷金屬錯合物，由於其分子轉動時間由單體轉變至參聚體時明顯增加，使其參聚體弛緩率( $r_1 = 11.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )明顯提高，而可以用來降低使用之劑量。

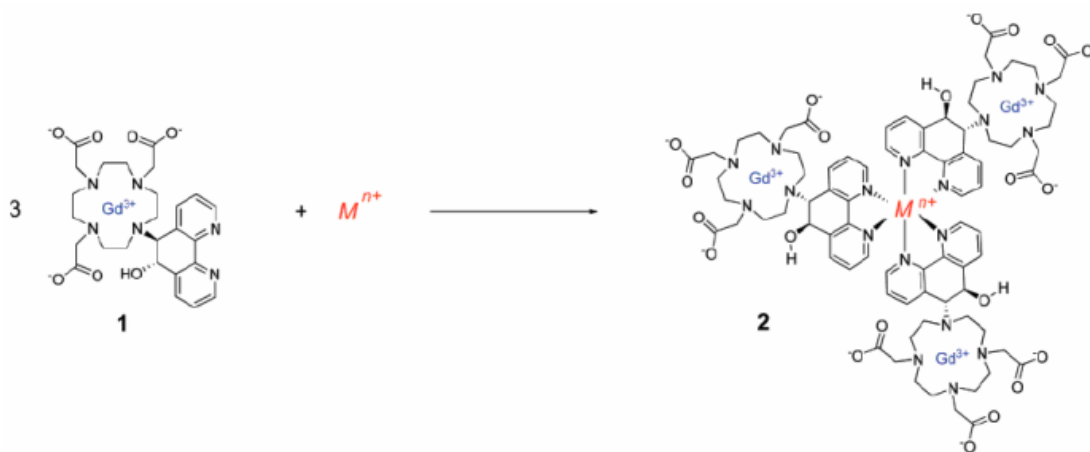


Figure 4. PhenHDO3A 1 and its auto-assembling by transition metal  $M^{n+}$  to form a trimer.

Tóth, É.等人<sup>8</sup>在 2007 年合成大分子錯合物(PAMAM-G4、HB-PEI 和 HB-PG，如 Figure 5 所示，接上  $\text{Gd}^{3+}$  螯合物( $\text{Gd}^{3+}$  接上 DOTA-pBn<sup>4-</sup>、DO3A-MA<sup>3-</sup> 或 mPEG))。而當磁場為 100 MHz 以下時，大分子化合物修飾上  $\text{Gd}(\text{DOTA-pBn})^-$  者，其遲緩率值比修飾上  $\text{Gd}(\text{DO3A-MA})^-$  者高出兩倍。且從實驗結果得知：(1)在  $\text{Gd}^{3+}$  大分子錯合物修飾上 PEG 鏈，並不會影響遲緩率。(2)不規則分枝聚合物(hyperbranch)與枝狀體(dendrimer)有相同的弛緩率。(3)在 MRI 體內實驗中證明，枝狀體修飾上  $[\text{Gd}(\text{DO3A-AEM})(\text{H}_2\text{O})]$  和 PEG 鏈的  $\text{Gd}^{3+}$  大分子錯合物，可適用於血池造影，未來可做成目標化對比劑增加其靈敏度。

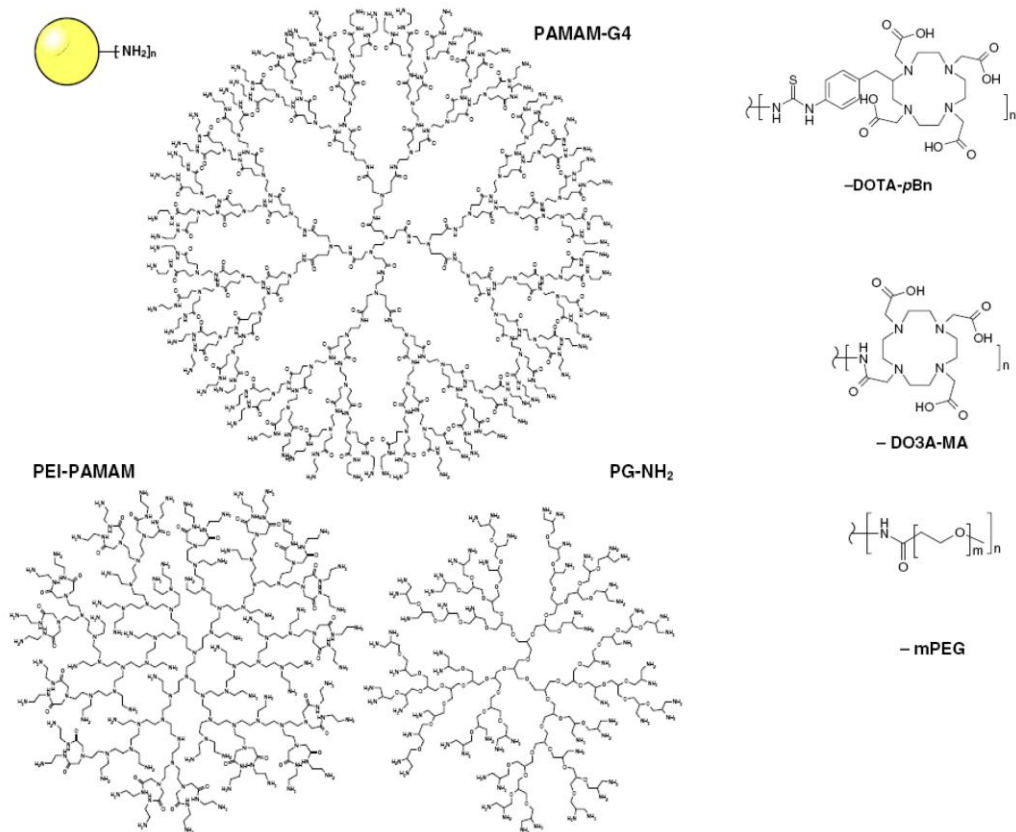


Figure 5. Different dendrimers as macromolecular scaffolds for MRI contrast agents: PAMAM-G4, PEI and PG-NH<sub>2</sub>.

Aime, S.等人

<sup>9</sup> 在 2007 年合成了一具目標化的磁振造影對比劑，其結構是在一條多胜肽鏈上修飾多個磁振造影對比劑 Gd-DTPA 以及具目標化至特定細胞膜上受體的胜肽受質片段 CCK8，其示意圖如 Figure 6 所示。此策略可將大量的磁振造影對比劑投遞到目標分子，有效提昇磁振造影的靈敏度。

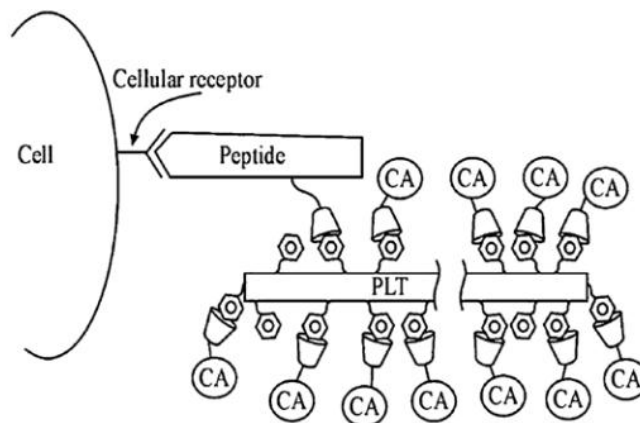


Figure 6. Schematic representation of a self-assembling second-generation MRI contrast agent.

M. G. Finn 等人<sup>10</sup> 利用兩種不同病毒的外殼顆粒 CPMV 及 QB 鍵結上釷金屬錯合物 Gd-DOTA，如 figure 7，實驗顯示每個病毒顆粒可帶有  $223 \pm 20$  及  $153 \pm 15$  個釷金屬錯合物，而病毒顆粒 CPMV 本身亦可攜帶釷金屬。因此在 64MHz 的磁場下，整個病毒顆粒的弛緩率高達  $2850$  及  $1820 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，相當於每個 Gd-DOTA 分子的磁緩率高達  $12.8$  及  $11.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，是目前商業化的磁振造影對比劑 Magnevist 的二至三倍，這樣的策略確實能有效的增高對比劑的靈敏度。



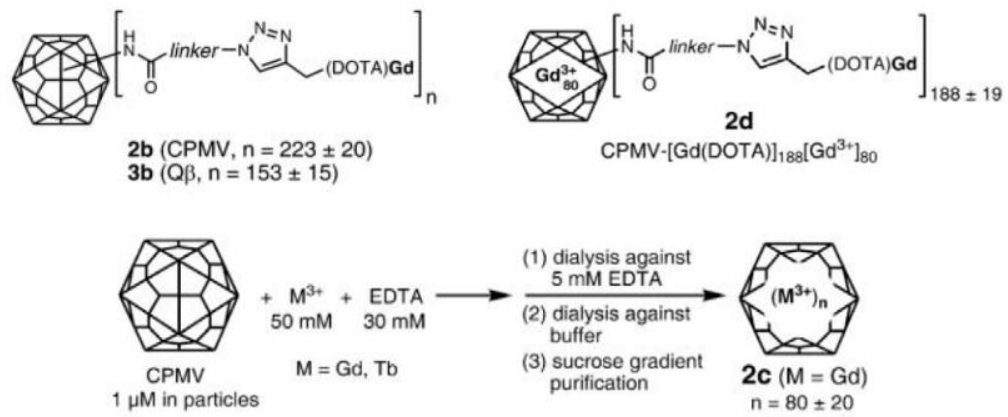


Figure 7. The structural formula of Gd(DOTA)-derivatized virus particles.

V. Alexander 等人<sup>11</sup>以 DO3A 為主架構之四核心釷金屬錯合物, [Gd<sub>4</sub>(4)(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>], 如 Figure 8 所示, 其目的為改善內層水分子質子弛緩率, 研究發現其弛緩率高達  $28.13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (24 MHz,  $35 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5.6), 比 [Gd(DO3A)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] 之弛緩率高出 5.86 倍。其主要原因為內層水分子數  $q$  值 ( $q=8$ ) 與轉動相關時間 ( $\tau_R$ ) 的增加有關。其另一優點, 分別在高 pH 值與低 pH 值中仍具有高的弛緩率 (在 pH 5.6 下,  $r_{1p} = 28.13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pH 5.6 下,  $r_{1p} = 16.52 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )。較特別的, 其  $r_{2p}$  為  $129.97 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (24 MHz,  $35 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5.6), 而  $r_{2p} / r_{1p} = 4.6$ , 因此可能可以成為一個 T<sub>2</sub>-weighted 對比劑。

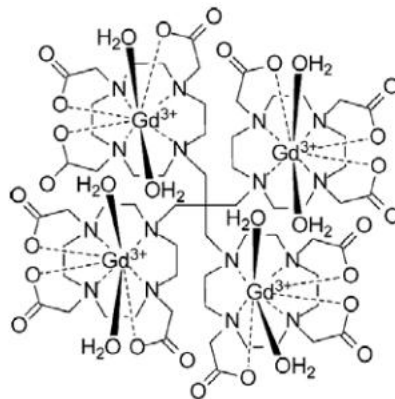


Figure 8. Gd(DO3A) Tetramer [Gd<sub>4</sub>(4)(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>].

Kao 等人<sup>12</sup>利用微胞修飾奈米金屬鐵核後, 用病毒的蛋白質片段在外層進行自組裝 (self-assembly), 如 Figure 9 所示。在研究中提到, 影響蛋白質外殼自組裝效率因素有二: 奈米粒子尺寸大小以及表面電位高低。當使用了不同尺寸 (8.5、10.6 及 20.1 nm) 或不同種類的奈米粒子去進行自組裝效率的比較發現, 自組裝效率與奈米粒子尺寸大小關聯較大, 與表面電位的關係較小。同時利用 XRD 與 SQUID 量測中心粒子 (氧化鐵奈米粒子) 的組態及磁性, 以證明奈米金屬鐵核具有超順磁 (superparamagnetic) 的性質, 可供利用於磁振造影 (MRI)。

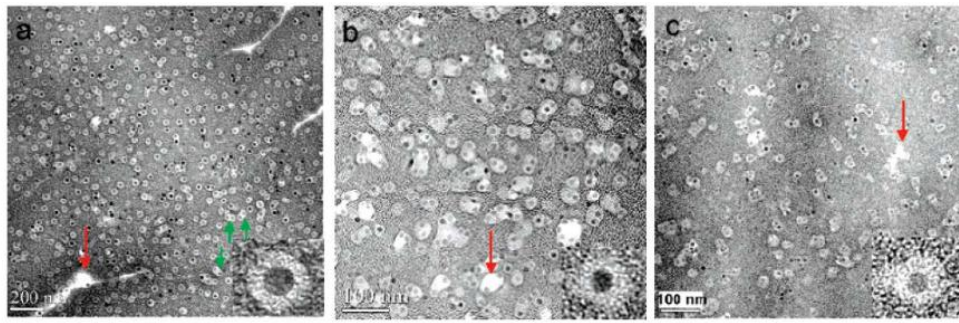


Figure 9. TEM images of VLPs formed by self-assembly of BMV proteins around 20.1 (a), 10.6 (b), and 8.5 (c) nm spherical NPs coated with HOOC-PEG-PL.

Möhwald, H.等人<sup>13</sup>在2006年發表使用不同皆具生物相容性之聚合物在水溶液中製備包覆超順磁氧化鐵奈米粒子使趨於穩定，如 Figure 10 所示。利用生理食鹽水儲藏氧化鐵，可保存六個月。在體內實驗利用磁振造影注入對比劑，十分鐘後就可以在老鼠的肝臟有明顯影像變黑，訊號下降的現象，證實此對比劑與目前臨床使用之對比劑具有相同功效。

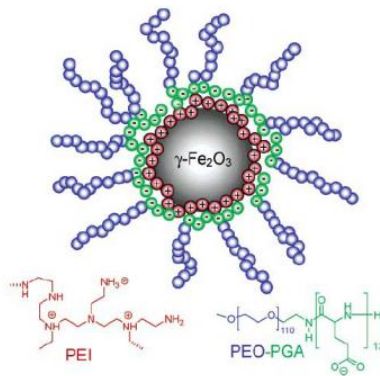


Figure 10. Sketch of polymer coated maghemite nanoparticles and chemical structures of the polymers. The branched poly(ethylene imine) (PEI) was used for the first layer (red), and poly(ethylene oxide)-*b*-poly(glutamic acid) (PEO-PGA) was used for the second layer (blue and green, respectively).

Gao 等人<sup>14</sup>在2006年設計一多功能性之微胞，以超順磁氧化鐵奈米粒子及抗癌藥物，doxorubicin 為微胞中心，包覆具生物相容性的聚合物後再修飾上能標的癌細胞  $\alpha_v\beta_3$  受體的 cRGD，如 Figure 11 所示，經由 enhanced permeability and retention effect，到達目標位置進行藥物釋放，藉由磁振造影達到顯影效果。

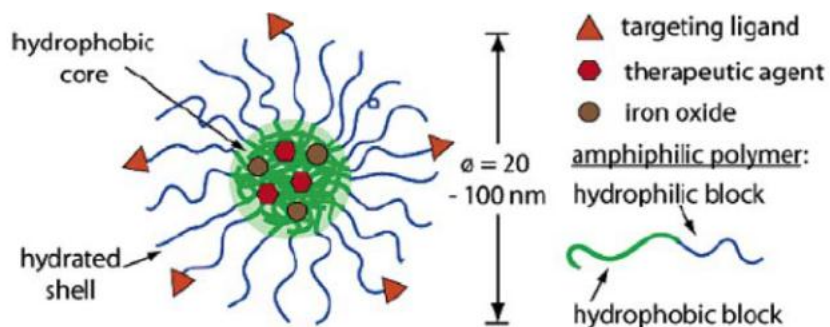


Figure 11. Multifunctional nanomedicine platform for targeted drug delivery.

Syková, E.等人<sup>15</sup>在2007年合成超順磁氧化鐵奈米粒子包覆甘露糖來追蹤幹細胞。由結果顯

示，作者所合成的氧化鐵奈米粒子確實可以追蹤幹細胞，且在弛緩率方面有良好的表現，縱向弛緩率為  $7.31 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、橫向弛緩率為  $140 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。在體外顯影部份可在磁振造影上得到良好的顯影效果。如 Figure 12 所示。

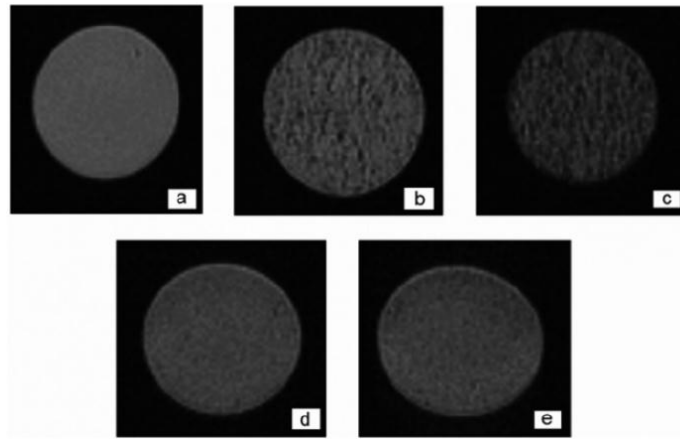


Figure 12.  $T_2$ -weighted MR images of gelatin phantoms containing (a) unlabeled cells, (b) 31 100 or (c) 62 200 cells labeled with D-mannosecoated iron oxide nanoparticles, and, for comparison, (d) 31 100 and (e) 62 200 cells labeled with Endorem.

Protamine 為具小分子量帶有正電的胍肽，另外腺癌細胞會釋放肝素，protamine 會與之形成共價鍵結。R. Weissleder 等人<sup>16</sup>在 2005 年合成 protamine 的對照組胍肽，此胍肽對肝素並不會鍵結，作者將兩條胍肽分別與包覆 dextran 的氧化鐵奈米粒子進行鍵結，並在外層接上螢光物質。隨後利用螢光顯微鏡觀察實驗及對照組細胞對其吞噬現象。由結果圖像發現，如 Figure 13 所示，接有 protamine 的奈米鐵粒子會被實驗組細胞所吞噬，對照組則無反應。

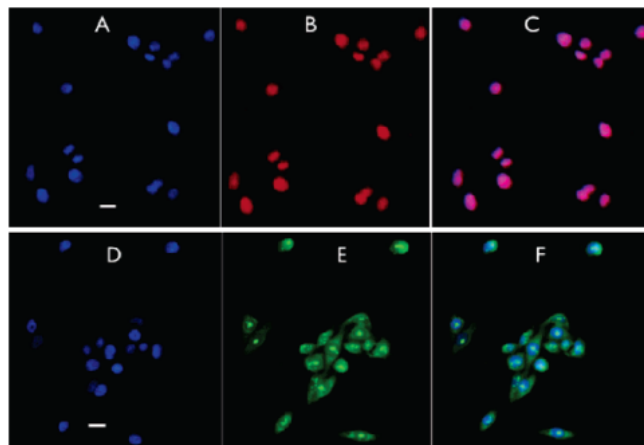


Figure 13. Nuclear localization of protamine or tat peptide. Cells were incubated with Pro(Rh) (A, B, C) or Tat(Fl) (D, E, F) at  $2 \mu\text{M}$  fluorochrome for 4 h. Cells were washed, fixed, and stained with DAPI, a nuclear stain. (A and D) Cell nuclei shown by the DAPI (ultraviolet) channel. (B) Pro(Rh) visualized in rhodamine channel. (C) Overlay of parts A and B. (E) Tat(Fl) visualized in the fluorescein channel. (F) Overlay of parts D and E. Scale marker is  $10 \mu\text{m}$ .

Jon 等人<sup>17</sup>成功合成出熱交聯超順磁氧化鐵奈米粒子(thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles, TCL-SPION)的結構，並研究其物、化性質及應用於磁振造影(MRI)及光學影像(optical imaging)兩種影像系統之腫瘤造影。研究中利用不同於傳統的糊精包覆(dextran-coated)奈米粒子所用的化學交聯，TCL-SPION 利用加熱後就能自然形成的矽氧鍵結，使用簡單的聚合反應將矽烷基、PEG 以及 NHS-terminal 的結構利用自由基反應形成共聚合物 (copolymer)。矽烷基能夠鍵結於氧化鐵奈米粒子表面，為了能夠穩固聚合物外層，在包覆載氧化鐵奈米粒子之後加熱到  $80^\circ\text{C}$ 。未鍵結至氧化鐵表面的矽烷基(Si-O-C)會在彼此間形成強力鍵結(Si-O-Si)，原本如鍊子般纏繞在粒子外層的聚合物就交聯起來成為



網子(net)的穩固結構，如 Figure 14 所示。最後利用 NHS 的官能基接枝上 Cy5.5(organic dye)。中心的氧化鐵奈米粒子具有  $T_2$  效應，可應用於磁振造影，而接枝上 Cy5.5 可利用於光學影像，成為具雙功能性造影能力的  $T_2$  磁振造影對比劑。

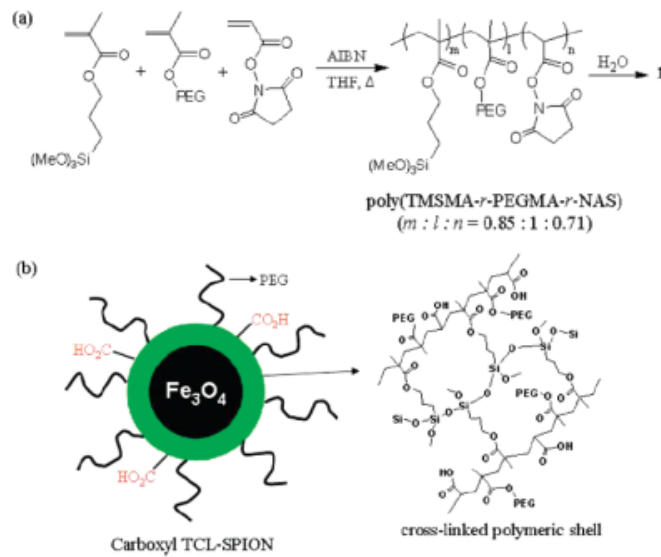


Figure 14. (a) Synthetic scheme for the production of poly(TMSMA-r-PEGMA-r-NAS). (b) Schematic illustration of carboxyl TCL-SPION showing crosslinking between polymer layers after heat treatment.

為了使磁振造影技術能擴展至細胞、分子及功能性層級之造影上，在對於磁振造影對比劑的設計上必須要使其能達到目標化、區域化且可以量化我們所要看到的細胞或分子影像。由本實驗室所發展的 TTDA，在結構上具有快速內層水分子交換速率的特性，且由先前本實驗室的研究結果得知，藉由增加以 TTDA 為基本架構之分子轉動相關時間( $\tau_R$ )，便能有效增加對比劑的弛緩率。依據目前國際期刊研究回顧及本實驗室近期的研究結果顯示，將磁振造影對比劑目標化至特定的蛋白質、腫瘤或組織，不僅可以達到針對特定分子或組織進行造影的目的，更藉由此類磁振造影對比劑鍵結上大分子，增加其弛緩率，進而達到提高磁振造影的對比效果及得到分子影像。先前臨床醫學研究的報告指出，[Gd(DTPA-BMA)]對比劑在使用時由於其雙甲基醯胺基(bismethyl amide)與釷金屬離子鍵結之熱力學穩定度不高，而導致釷金屬離子部分解離，使得腎功能較差之病患在接受磁振造影後，易發生組織纖維化病變，而影響患者生命與健康。所以在第一年的研究計畫中，我們以 TTDA 為基本架構，設計合成出 TTDA 之衍生物 TTDA-NP、TTDA-NAPH 及 NB-CB-TTDA，如 Schemes 1、2 及 3 所示，保留 TTDA 架構具有熱力學高穩定度，不易解離釷金屬離子及因其結構上特性使其具有快速之內層水分子交換速率之特性。TTDA-NP 及 TTDA-NAPH 此二類 TTDA 衍生物是在 TTDA 基本架構的主鏈個別修飾上硝基苯甲基(nitrophenol group)或硝基萘甲基(nitronaphthalene group)，皆是為了保留 TTDA 與釷金屬離子穩定結合的 8 配位主要穩定架構，並利用化學方法將硝基苯甲基或硝基萘甲基氫化成  $-NH_2$  或進一步修飾成  $-N=C=S$ (isothiocyanate)，藉由將此類釷金屬錯合物鍵結上具目標化功能的胜肽受質片段或具特殊目標化之生物標籤，來研究這類型釷金屬錯合物基本物、化特性，了解這些錯合物作為磁振造影對比劑的潛力。而 NB-CB-TTDA 的設計則是在 TTDA 的骨架丙烷鏈中間碳上修飾四元環(cyclobutyl)以增加其結構剛硬性(rigidity)，其目的是為了提高其熱力學穩定性及維持其快速之內層水交換速率。而在其骨架乙烷鏈上修飾硝基苯甲基(nitrophenol group)，並利用化學方法將硝基苯甲基氫化成  $-NH_2$  或進一步修飾成  $-N=C=S$ (isothiocyanate)，將此類釷金屬錯合物鍵結上具目標化功能的胜肽受質片段或具特殊目標化之生物標籤，研究其釷金屬錯合物基本物、化特性及其作為磁振造影對比劑的潛力。本計畫將利用與腫瘤侵犯及轉移相關且高度表現於人類腫瘤的新奇 Legumain 與 MMP 蛋白酶當作標的，設計及合成具 Legumain 與 MMP 蛋白酶表現之前驅對比劑([Gd(TTDA)]<sup>2-</sup> derivative-peptide-poly-lys)(procontrast agents)，我們也將利用此前驅對比劑的物、化性做詳細研究與探討，並對與 Legumain 及 MMP 蛋白酶表現之細胞做進一步研究與探討。此策略的成功將非常便利未來針對蛋白酶相關疾病的診斷、治療選擇與療效評估，已達成最佳化之個人化醫療。Legumain、MMP-7 及 cRGD 等目標化之胜肽皆為較少胺基酸

序列之目標化胜肽，在癌症細胞(乳癌、結腸癌、肺癌及攝護腺癌)細胞膜上有其過度表現之受體。本研究另一目的為調節釷金屬錯合物在蛋白酶酵素表現前後其不同親脂性(tuning lipophilicity)，將此釷金屬錯合物鍵結上 MMP-7 或 Legumain 蛋白酶之胜肽片段，找出最佳的脂溶性之釷金屬錯合物，胜肽片段在被蛋白酶酵素 MMP-7 或 Legumain 切割後能使釷金屬錯合物目標化沈積於 MMP-7 或 Legumain 蛋白酶濃度較高之相關的目標化腫瘤位置。親脂性之釷金屬錯合物能夠安定的沈積於腫瘤細胞膜表面且應用於 MRI 得到分子影像。cRGD 則具目標化至具有表現  $\alpha_v\beta_3$  受體之腫瘤細胞膜表面之功能。藉由研究其初步細胞影像，作為未來應用於 in vivo 研究的參考與依據。在第二年，為了彌補磁振造影對比劑在靈敏度不足的缺點，藉由將單體磁振造影對比劑形成大分子以提高其分子轉動相關時間( $\tau_R$ )，增加磁振造影對比劑之弛緩率，分別設計了如 Scheme 4 將 TTDA 衍生物分別接在具有肝臟目標化功能的矽氧化合物(siloxane)上，作成四聚體及其單體；如 Scheme 5 將 TTDA 衍生物修飾在生物可相容性的聚合物(polyethylene glycol, PEG)上形成多聚體，再經由 pH 值改變調控其微胞形式之釷金屬磁振造影對比劑，藉由探討此類多聚體金屬錯合物之物、化特性，以瞭解其是否具有成為磁振造影對比劑的潛力。在弛緩率之研究方面，本研究亦藉由因其分子變大，來探討此類多聚體釷金屬錯合物之內層水分子存在時間( $\tau_M$ )及其分子轉動相關時間( $\tau_R$ )對縱向弛緩率之間的關係及影響。Scheme 4 的設計是希望藉由本實驗室所開發出之有機配位子 TTDA 具有快速水交換速率的特性，將其與矽氧化合物(siloxane)結合在一起，希望藉由此設計，使其由小分子化合物變成大分子的四聚體釷金屬錯合物。藉由提高其分子轉動相關時間( $\tau_R$ )，研究多聚體形式時釷金屬錯合物縱向弛緩率的變化及其動力學參數的探討；Scheme 5 利用第一年計畫中所合成出之有機配位子 TTDA-NP-NH<sub>2</sub> (3)、TTDA-NAPH-NH<sub>2</sub> (12)或 NB-CB-TTDA-NH<sub>2</sub> (22)與具生物相容性且具水溶性之聚乙二醇，及具脂溶性之碳鏈結合，形成如 Scheme 5 所示之長鏈共聚物(copolymer)。藉由溶液相 pH 值的改變，在生理環境 pH=7.4 時由單體共聚物形成奈米微胞(micelle)，當經由靜脈注射進入動物體內時，隨著血液流動，當遇到偏酸性的腫瘤組織時，奈米微胞崩解形成單體共聚物並沉積於腫瘤組織細胞內，成為不需修飾目標化生物標籤而能達到全面性目標化照影功能。將由化學合成方法合成所需之單體共聚物，並藉由探討其物、化性質，進而研究其在細胞影像之表現。期望能在初步細胞影像表現上可以達到最佳化，除了高解析度外也能達至高靈敏度的表現。除上述以釷金屬錯化物作為磁振造影的 T<sub>1</sub> 對比劑之外，本實驗室在先前研究中有發展出具有良好生物相容性的超順磁氧化鐵奈米粒子(superparamagnetic iron oxide, SPIO)(T<sub>2</sub> 對比劑)，超順磁氧化鐵奈米粒子在磁振造影的顯影上具有較高之靈敏度，無毒性又兼具生物可降解性，我們利用先前的經驗作為研究 T<sub>2</sub> 磁振造影對比劑的一基本平台。在第三年的研究中，設計合成具生物相容性及特殊標的材料修飾之超順磁氧化鐵奈米粒子，探討其物、化特性及調控其粒子大小來研究目標化至細胞影像的結果，並期望開發出 T<sub>2</sub> 磁振造影對比劑，如 Schemes 6、7 所示。乳癌目前居台灣女性癌症發生率第二位，僅次於子宮頸癌，據估計國內每年約有兩千多人罹患乳癌，然而卻有一半以上病人因此而死亡。最近關於乳癌的治療有一突破性的進展，就是利用單株抗體 Herceptin (Trastuzumab)來對抗致癌基因(HER2/neu)高表現型乳癌之藥物。『HER2/neu 基因』可以製造出一種蛋白質稱為「人類上皮生長因子接受器第 2 蛋白」(human epidermal growth factor receptor 2 protein, HER2 protein)，這種蛋白質附著在細胞膜上，可作為一種生長素接受器，它可以接受訊息而加速細胞的生長與分裂。當 HER2 基因的作用被加強時，會產生大量 HER2 受體(receptor)，也就是會有 HER2 過度表現(overexpression)的現象，造成細胞快速生長，如同癌細胞一般。而臨床上在原發性乳癌病人中，會發現約有 25%到 30%其癌細胞有 HER2 過度表現的現象。由這些觀察中可以推測 HER2 過度表現可能是導致此類乳癌發生的原因之一，所以如能找到一種藥物能夠抑制 HER2 的功能，理論上應該能抑制這類癌細胞的生長，Herceptin 就是這樣誕生的。Herceptin 是由 DNA 基因重組技術製成的人化單株抗體(humanized monoclonal antibody)，人化單株抗體的優點是人體對此單株抗體不會發生過敏免疫反應。目前 Herceptin 的作用機轉仍在陸續瞭解中，最主要它可以選擇性地作用在腫瘤細胞 HER2 上，降低 HER2 蛋白的過度表現，進而導致腫瘤細胞增生減少。如 Scheme 6 所示，我們設計將氧化鐵奈米粒子表面修飾 Herceptin(CLIO-EDBE-Herceptin)，此氧化鐵奈米粒子可目標化至乳癌，而達到診斷乳癌及 HER2 受體之 MRI 造影，以及達到早期診斷之目的。此外，如 Scheme 7 所示，我們利用簡單的化學合成方式合成出具有三甲氧基矽烷共聚物單體，再與 SPIO 裸核結合形成 SPIO-mPPDA。與具目標化之胜肽 MMP-7 受質片段上

cysteine 的硫氫鍵結合，形成具目標化之超順磁氧化鐵奈米粒子之  $T_2$  磁振造影對比劑。氧化鐵奈米粒子 SPIO-mPPDA 修飾上具目標化之胜肽 MMP-7 受質，可目標化至過度表現 MMP-7 蛋白酶濃度較高之相關癌症細胞位置，而達到目標化 MRI 造影的目的。藉由研究新型具目標化之超順磁氧化鐵奈米粒子，將探討其物、化特性及調控其粒子大小來研究對弛緩率  $r_2$  之影響以及目標化至細胞影像的結果，期望開發出新穎的  $T_2$  磁振造影對比劑。

# 研究方法

## (1)有機配位子及氧化鐵奈米粒子之合成

### 1. 苯基環丁基三胺基五羧酸化合物有機配位子之合成(Bz-CB TTDA,4) (C-(1-Aminomethyl-cyclobutyl)-methyl amine, 1)之合成方法

將Cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid diamide (5.2 g, 36.6 mmol) 置於真空系統下抽乾 灌入氮氣。冰浴下加入250 ml去水的四氫呋喃與300 ml甲硼烷-四氫呋喃在冰浴下反應1小時。加熱到70 °C反應36小時，之後加入甲醇。反應結束後將溶液抽乾後，加 250 ml乙醇和50 ml 鹽酸 (6 N) 加熱到80 °C迴流12小時抽乾可得黃色油狀物，將此一油狀物以鹽酸將pH值調至2，再以陽離子交換樹脂進行純化。以不同濃度之鹽酸沖提，收集1.0~2.0 N 的鹽酸沖提液，以減壓濃縮抽乾後得產物3.0 g (26.3 mmol) 產率70.9 %。ESI- MS: calcd  $m/z$  114.19, found 114.76  $[M+H]^+$ . Anal. Calcd (Found) for  $C_6H_{14}N_2 \cdot 3HCl$ : C, 32.44 (32.23); H, 7.20 (7.66); N, 12.24 (12.53).  $^1H$  NMR ( $D_2O$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 2.95 (s, 4H,  $NH_2CH_2CCH_2NH_2$ ), 1.87-1.81 (m, 6H,  $-CCH_2CH_2CH_2-$ ).  $^{13}C$  NMR ( $D_2O$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 49.93, 49.81, 36.91, 27.73, 26.28, 14.46.

### 2. (L-phenylalanine methyl ester, 2)之合成方法

在冰浴下，將 6.61 ml 的亞硫酰氯(thionyl chloride,  $SOCl_2$ )加入40 ml 的甲醇中，攪拌30 分鐘。加入10 g 的L-苯胺 (L-phenylalanine) 加熱到70 °C 迴流，反應24 小時。反應結束後將溶液抽乾，用乙醚 (diethyl ether) 再結晶得到白色固體，抽氣過濾得白色固體11.5 g, 產率 88.3 %。ESI-MS: calcd  $m/z$  179.22, found 180.13  $[M+H]^+$ . Anal. Calcd (Found) for  $C_{10}H_{13}NO_2 \cdot HCl$ : C, 55.69 (55.32); H, 6.45 (6.54); N, 6.49 (6.35).  $^1H$  NMR ( $D_2O$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.36-7.20 (m, 5H, Ar), 4.36-4.34 (t, 1H,  $J=6$ ,  $H_2NHCH$ ), 3.75 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.30-3.12 (m, 2H,  $CH_2Ar$ ).  $^{13}C$ -NMR ( $D_2O$ , 100MHz),  $\delta$ (ppm): 170.2, 133.9, 129.5, 129.4, 129.3, 128.3,128.1, 54.2, 53.7, 35.7

### 3. (2-amino-N-((1-(aminomethyl)cyclobutyl)methyl)-3-phenylpropanamide, 3)之合成方法

將3.6 g (31.5 mmol) 的C-(1-Aminomethyl-cyclobutyl)-methyl amine (1) 溶在100 ml 的甲醇中放入500 ml 的三頸瓶，並用三乙基胺將pH 值調到9~10。將5.1 g (28.7 mmol) 的L-phenylalanine methyl ester( 2) 100 ml 的甲醇加入等壓管中。裝置迴流管，加熱到60~70

°C，將等壓管溶液慢慢滴入，反應19 小時。反應結束後以減壓濃縮機抽乾，加入少量的氫水 (NH<sub>4</sub>OH) 使其溶解，再以氯仿 (CHCl<sub>3</sub>) 及水進行萃取，取有機層。以減壓濃縮機抽乾，得淡黃色油狀物2.9 g (11.1 mmol) 產率38.6 %。ESI-MS: calcd *m/z* 261.36, found 262.18 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. Calcd (Found) for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O·HCl: C, 60.94 (60.49); H, 8.43 (8.12); N, 14.53 (14.11). <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz), δ (ppm): 7.29-7.15 (m, 5H, Ar), 3.57 (t, 1H, *J*=3, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-), 3.20-2.95 (m, 2H, -NHCH<sub>2</sub>-), 2.89-2.76 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>Ar), 2.21-2.05 (m, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.69-1.66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.52-1.45 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100MHz), δ (ppm): 176.88, 137.37, 129.38, 128.90, 127.11, 56.60, 45.82, 43.99, 42.36, 40.90, 26.59, 26.51, 14, 27.

#### 4. (4-benzyl-8-cyclobutyl-3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triaza dodecanedioic acid, 4)

##### 之合成方法

取2.4g (9.2mmol) 2-amino-*N*-((1-(aminomethyl)cyclobutyl)methyl)-3-phenylpropanamide (3) 氫氣下以雙頭針加入36.7 ml (濃度為1 M) 甲硼烷-四氫夫喃。加熱到70 °C，反應36 小時，結束後加入甲醇。以減壓濃縮機抽乾，加入50 ml 乙醇和10 ml 鹽酸 (6N) 加熱到80°C，迴流12 小時後抽乾，以氯仿及水進行萃取，取有機層。抽乾後得黃色油狀物1.9 g (7.7 mmol) 取此黃色油狀物溶於氯甲烷中，加入碳酸鉀(8.0 g, 57.8 mmol) 使溶液維持在pH 10 左右後，加入BrCH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>-Bu (6.1 ml, 42.4 mmol) 加熱 迴流48 小時後，過濾抽乾以氯仿及水進行萃取，取氯仿層並將其抽乾，加入鹽酸(100 ml, 3 N) 於室溫下反應24 小時後抽乾，將pH值調至11~12，再以陰離子交換樹脂(200-400進行純化)收集0.8N甲酸沖提液抽乾後可得產物1.4 g(2.7 mmol) 產率為34.8 % ESI-MS: calcd *m/z* 537.56, found 537.84[M+H]<sup>+</sup>. Anal. Calcd (Found) for C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>·3HCl·5H<sub>2</sub>O: C, 40.52 (40.74); H, 6.57 (6.56); N, 5.42 (5.70). <sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O, 400 MHz), δ(ppm): 7.34-7.23(m, 5H, ArH), 3.82-3.60(s, 10H, -CH<sub>2</sub>COOH), 3.58-3.28(m, 6H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-), 3.16(d, 2H, *J*=14, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.71(m, 1H, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-), 1.87(m, 6H, -CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100MHz), δ (ppm): 185.04, 136.48, 129.59, 129.30, 127.52, 62.05, 60.68, 60.27, 58.30, 57.36, 55.36, 54.41, 53.09, 39.39, 33.14, 30.14, 15.86

#### 5. NB-TTDA-BN 之合成

將NB-TTDA 0.72 克(0.862mmole)與0.5 克的resin(0.31mmole)放置於PS3 的反應瓶中，加入10ml 的Dimethyl sulfoxide 及5ml 的*N*-ethyl-diisopropylamine，利用PS3 反應24小時，反應完畢取10 ml 已配置好的切除試劑及去保護基之溶劑，比例為：三氟醋酸(TFA) / 去離子水 / 乙烷二硫化物(EDT) / 三乙基矽(TIS)之體積比例為94.5 / 2.5 / 2.5 / 1 與0.5 g的 resin，充分震盪攪拌1小時30分後，用甲醇及甲苯清洗resin，再將其過濾，收集濾液，並加入三乙胺中和剩餘的三氟醋酸，利用減壓濃縮機反覆抽乾(利用甲苯的高沸點帶走三氟醋酸)，接著在冰浴下，緩慢滴入冰乙醚做沈澱，利用離心機進行離心約5分鐘，轉速調至1500 rpm，即可將固體及液體分開，重複以上步驟利用乙醚清洗3至5次，直到上清液呈無色透明，利用滴管將上清液盡量吸出，加入去離子水，放入冰箱冷凍，之後利用冷凍乾燥(lyophilized)的方法將多餘的乙醚、三氟醋酸、甲苯、三乙胺抽乾，可得紅色粉狀物，抽乾後得到粗產物，再利用HPLC 加以純化。ESI-MS: calcd *m/z* 1623.2, found 1623.8[M+H]<sup>+</sup>

#### 6. 超順磁氧化鐵參雜錳之奈米粒子SPIO (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 之合成方法

將 Fe(acac)<sub>3</sub> (2 mmol, 0.71g)、Mn(acac)<sub>2</sub> (1 mmol, 0.25g)、oleic acid (6 mmol, 1.7g)、oleylamine (6 mmol, 1.6g)、1,2-Hexadecandiol (10 mmol, 2.55g) 和benzyl ether 混合置於高溫爐。緩慢升溫至200°C後持續加熱一小時使其融解並混合均勻，並加熱至300°C，到達指定溫度並持續加熱一小時後降溫至室溫。產物加入丙酮後以8000rpm離心，並利用丙酮清洗移除多餘的界面活性劑離心後之沉澱物即為 SPIO (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)，可溶於 chloroform、hexane等



溶劑保存。反應藉由調整 benzyl ether 的量改變金屬前驅物的濃度，藉以控制粒子粒徑，並以穿透式電子顯微鏡觀察其粒徑及形狀。

## 7. N,N' -APTES-mPEG-N-Boc ethylenediamine (mPEG-NBoc-silane)之合成

APTES-Ac (5 mmol, 1.4 g)、mPEG-Ac(5 mmol, 10.5 g) 與N-Boc ethylenediamine (5mmol 0.8 g) 溶解在 dry dichloromethane (20 ml) 之中加入 TEA (5mmol 0.8 ml) 於 40~45°C 加熱迴流，在氮氣下反應 72 小時即完成反應。反應完成後用 hexane 析出 mPEG-NBoc-silane。Yield: 39.4 % (1.9 mmol, 4.5 g)。<sup>1</sup>H-NMR: {CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz} δ (ppm) = 0.76 (t, 2H, Si-CH<sub>2</sub>-C, J = 4.2 Hz), 1.24 (t, 9H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J = 2.4 Hz), 1.42 (s, 9H, C-CH<sub>3</sub>), 2.48-2.67 (m, 2H, -C-CH<sub>2</sub>-(C=O)-N; 2H, -C-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O), 2.82-2.98 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-(C=O)-O; 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-(C=O)-N; 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-N), 3.20 (t, 2H, -C-CH<sub>2</sub>-NH-(C=O)), 3.27 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.54-3.70 (m, ~190H, -(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), 4.18 (t, 2H, C-CH<sub>2</sub>-O-(C=O), J = 4.2 Hz)。FTIR (KBr): C=O stretching: 1657、1724 cm<sup>-1</sup>, C-O-C bending: 1101 cm<sup>-1</sup>。

## 8. N,N' -APTES-mPEG-N-Boc ethylenediamine (mPEG-NBoc-silane)之水解

為了將 N-Boc 去保護還原成 NH<sub>2</sub>，以 trifluoroacetic acid (TFA) 跟 DCM (TFA/DCM = 1/1 20ml) 加入 N,N' -APTES-mPEG-N-Boc ethylenediamine 進行反應，六小時後即完成水解。最後以乙醚與正己烷 (ethyl ether/hexane = 1/4) 移除 TFA 並析出 mPEG-NH<sub>2</sub>-silane。<sup>1</sup>H-NMR: {CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz} δ (ppm) = 1.09 (t, 2H, Si-CH<sub>2</sub>-C, J = 2.9 Hz), 2.54 (m, 2H, -C-CH<sub>2</sub>-(C=O)-N-; 2H, -C-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-), 2.67 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-(C=O)-N-; 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-NH<sub>2</sub>), 2.86 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-C-(C=O)-O-; 2H, N-C-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.13 (q, 2H, -C-CH<sub>2</sub>-NH-(C=O)), 3.32 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.59-3.70 (m, ~190H, -(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), 4.22 (t, 2H, C-CH<sub>2</sub>-O-(C=O), J = 7.8 Hz), 4.45 (s, 3H, Si-OH)。

## 9. 胜肽 D4 之合成 (Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr)

本研究中利用固相胜肽合成儀 (solid phase peptide synthesizer, PS3)，採用之樹脂為 N 端具有 Fmoc 保護基之 Rink Amide 樹脂，去除 Fmoc 保護基之試劑為 20% piperidine (in DMF)，以 benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP)、1-hydroxybenzotriazole (HOBT) 為偶合試劑，溶於活化試劑 0.4M N-Methyl morpholin (NMM, in DMF)，依序接上 Fmoc-Glu-Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr-OH，每接一個胺基酸後，便取一些樹脂進行 Kaiser test 分析，確定其是否成功接上胺基酸，每當成功合成上一個胺基酸後利用 acetic anhydride (Ac<sub>2</sub>O) 將 resin 樹脂上沒有與胺基酸接上的 N 端進行反應，使未接上的 N 端不再參與反應再接下一個胺基酸，反覆以上步驟直至序列接完為止。再以 20% piperidine 去除末端 Fmoc 保護基，以甲醇反覆清洗樹脂，抽氣過濾後真空乾燥 resin。取 5 mL 混合溶劑 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT = 94.5/2.5/1/2.5) 作為切除 resin 及去保護基的試劑。將切除試劑加入 resin 後，利用振盪器振盪 2 小時。再使用甲醇清洗 resin，將其過濾並收集濾液。濃縮濾液體積剩 5ml 後移至離心管，並且用 ethyl ether 析出胜肽，離心五分鐘後倒掉上清液。重複上述動作 3~5 次後，沉澱物加入去離子水溶解後冷凍乾燥得 D4，以 Mass 測定產物純度及分子量。

## 10. SPIO-mPEG-D4 之合成

SPIO-mPEG-D4 (10mM (Fe: 8.6 mM、Mn: 1.4mM), 2ml)，與 D4 (20 μmol, 17.1 mg) 溶解於 dimethyl sulfoxide (DMSO, 5 ml) 中，加入 PyBOP 及 HOBT 做為偶合試劑反應 overnight。最後用透析膜 (Mn: 1000) 於 4°C 的二次水中純化，即可得 SPIO-mPEG-D4。

## (2) 弛緩率(relaxivity)的研究

配製各種不同pH值的6種不同濃度(1.0~2.0 mM)之釷金屬錯合物溶液。T<sub>1</sub> (spin-lattice relaxation time) 及 T<sub>2</sub> (spin-spin relaxation time) 之測定，係利用 0.47 Tesla (20 MHz) relaxometer，在測定前 90° 及 180° 之脈衝 (pulse) 必須經過校正，再以反轉回覆 (inversion recovery) 脈衝序列測定釷金屬錯合物溶液的T<sub>1</sub>，分別以弛緩時間之倒數(1/T<sub>1</sub>)對濃度作圖，所得之斜率即為弛緩率r<sub>1</sub>。

## (3) 釷金屬錯合物內層水分子之測定

內層水分子交換速率較快的釷金屬錯合物系統，以螢光光譜方法求出其內層水分子之數據。取氯化鎔標準液與有機配位子1:1.05混合，室溫攪拌12hr後，以冷凍乾燥得到鎔金屬錯合物。以D<sub>2</sub>O及H<sub>2</sub>O分別配置 4mM的鎔金屬錯合物，利用螢光光譜儀分別測定鎔金屬錯合物在D<sub>2</sub>O及H<sub>2</sub>O中之發射螢光半生期τ值，將τ值帶入方程式(1)<sup>4-6</sup>。式(1)中A值為鍵結至個別鐳系金屬離子的水分子數(A<sub>Eu</sub> = 1.05 ms<sup>1</sup>, A<sub>Tb</sub> = 4.2 ms<sup>1</sup>)。此公式(1)主要應用於結構上具有OH、NH及CH等官能基之配位子，利用鐳系金屬離子所求得之A值，配合由螢光光譜儀所測得之鐳系金屬錯合物發射螢光半生期τ值，來求得錯合物本身配位之內層水分子數q值。

$$q = A[1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}] \quad A = 1.05 \quad (1)$$

## (4) 內層水分子存在時間(τ<sub>M</sub>)及金屬錯合物之分子轉動相關時間(τ<sub>r</sub>)之研究

利用 400MHz 核磁共振光譜儀，測定釷金屬錯合物的<sup>17</sup>O 弛緩率(1/T<sub>1</sub>, 1/T<sub>2</sub>)和化學位移(ω)及酸水的<sup>17</sup>O弛緩率(1/T<sub>1A</sub>, 1/T<sub>2A</sub>)和化學位移(ω<sub>A</sub>)。此外，再計算出減少的弛緩率及化學位移(1/T<sub>1r</sub>, 1/T<sub>2r</sub>, ω<sub>r</sub>)。接著將這些數值利用公式(2) - (9)做運算<sup>7-9</sup>，同時進行curve fitting逼近實驗數據，即可求得τ<sub>M</sub>、τ<sub>r</sub>等參數。

$$\frac{1}{T_{1r}} = \frac{1}{P_M} \left[ \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1A}} \right] = \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_M} \left[ \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_M} \left( \frac{T_{2M}^{-1} (\tau_M^{-1} + T_{2M}^{-1}) + \Delta\omega_M^2}{(T_{2M}^{-1} + \tau_M^{-1})^2 + \Delta\omega_M^2} \right) \quad (3)$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_M} [\omega - \omega_A] = \frac{\Delta\omega_M}{(1 + T_{2M}^{-1} \tau_M^{-1})^2 + \tau_M^2 \Delta\omega_M^2} + \Delta\omega_{Os} \quad (4)$$

其中 $P_M$  為莫耳分率，而 $\tau_M$  可以以方程式(5)表示之， $\Delta\omega_M$  可以以方程式(6)表示之：

$$\frac{1}{\tau_M} = k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp\left[\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right] \quad (5)$$

$$\Delta\omega_M = \frac{g_L \mu_B S(S+1) A}{3k_B T} \frac{A}{\hbar}; \Delta\omega_{OS} = C_{OS} \Delta\omega_M \quad (6)$$

式中 $\Delta S^\ddagger$ 與 $\Delta H^\ddagger$ 分別為活化熵與活化焓， $g_L$  是 isotropic Landé  $g$  factor ( $g_L = 2.0$  for  $Gd^{3+}$ )， $S$  是電子旋轉量子數(7/2 for  $Gd^{3+}$ )， $B$ 是磁場強度， $k_B$  是 Boltzmann 常數， $\mu_B$  是波爾磁子， $A/\hbar$  是  $Gd^{17}O$  的向量耦合常數

$^{17}O$  縱向弛緩率可由方程式(7)求得：

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{6}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_O^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r_{GdO}^6} \tau_R + \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I+1)} \chi^2 (1 + \eta^{2/3}) \tau_R \quad (7)$$

其中  $\gamma_0$  是核的迴轉磁比 ( $-3.626 \times 10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ )， $r$  是電子與  $^{17}\text{O}$  核的有效距離， $I$  是核旋轉 (5/2 for  $^{17}\text{O}$ )， $\chi$  是四極耦合常數， $\eta$  是不對稱參數

$^{17}\text{O}$  橫向弛緩率可由方程式(8)求得：

$$\frac{1}{T_{2M}} \cong \frac{1}{T_{2sc}} = \frac{S(S+1)}{3} \left( \frac{A}{\hbar} \right)^2 \tau_{sc} \quad (8)$$

由於我們只使用一種磁場來測定  $^{17}\text{O}$ ，因此電子弛緩率 ( $1/T_{1e}$ ) 與溫度呈現指數的相關，如方程式(9)：

$$\frac{1}{T_{1e}^{HF}} = \frac{1}{T_{1e}^{310}} \exp \left[ \frac{E_{T1e}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{310.15} \right) \right] \quad (9)$$

### (5) 釷金屬錯合物與人體血清蛋白(HSA)之結合能力測定

#### E-titration

配製釷金屬錯合物之濃度固定為 0.1 mM (0.6 毫升) 在 50 mM, pH 7.4 之 PBS 緩衝溶液 (Phosphate Buffer Saline) 中，改變人類血清蛋白 (HSA) 之濃度 0~1.4 mM，共配置 10 支樣品，使用 20 MHz Relaxometer，測量其在  $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  下的  $^1\text{H}$  縱向弛緩時間 ( $T_1$ ) 共要做三次以求得標準偏差。

#### M-titration

配製釷金屬錯合物之濃度為 0.1-2.0 mM (0.6 毫升) 在 50 mM, pH 7.4 之 PBS 緩衝溶液中，固定人類血清蛋白 (HSA) 之濃度為 0.6 mM，共配置 10 支樣品，使用 20 MHz Relaxometer，測量其在  $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  下的  $^1\text{H}$  縱向弛緩時間 ( $T_1$ ) 共要做三次以求得標準偏差。

### (6) *In vitro* 影像之研究

針對合成出之釷金屬錯合物之磁振造影對比劑 Gd-NB-TTDA-BN，選擇 positive (PC-3) 及 negative (KB) cell line 進行培養之後，利用磁振造影取得其影像。

### (7) 動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering, DLS) 測定

DLS 的原理是利用使用單一波長的雷射光照射在分散在液相中的懸浮粒子表面，量測在幾個反射角的反射光強度，或者固定在某一角度量測反射光強度的衰變情形，再配合理論分析模式，便可以得到粒子的平均大小及分布。將 SPIO-mPEG、SPIO-mPEG-NH2 與 SPIO-mPEG-D4 水溶液樣品，配製成 1~10 mM 的水溶液 (1 ml) 裝在比色管內，量測粒子的水合直徑。

### (8) 縱向弛緩率 ( $r_1$ ) 及橫向弛緩率 ( $r_2$ ) 之測定

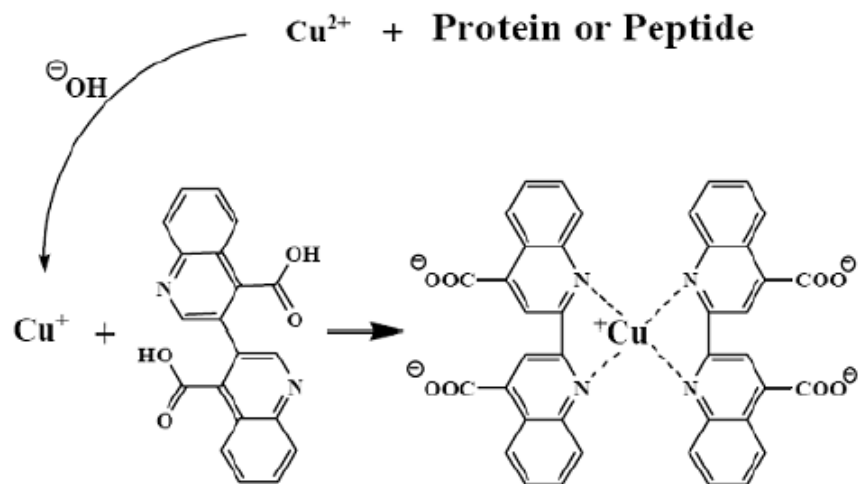
將 SPIO-mPEG、SPIO-mPEG-NH2 與 SPIO-mPEG-D4 水溶液樣品分別配製成五個不同濃度，再利用 20 MHz relaxometer 測量樣品在  $37.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  的縱向弛緩時間 ( $T_1$ ) 及橫向弛緩時間 ( $T_2$ )。

### (9) 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 之測定

配製 0.2~0.5% (W/W) 氧化鐵奈米粒子溶液,並利用毛細管將樣品點染於鍍碳銅網上,待其自然乾燥後以穿透式電子顯微鏡觀察。選取範圍內200~300 個鐵核計算其大小,並且求出其平均粒徑。

### (10) BCA 蛋白質測試

下圖為以 P.K. Smit 等人及 P.E. Tyljanakis 等人研究為基礎的商業化蛋白質測定方法。將 BCA protein assay reagent kit 的 A、B 劑以 50:1 的體積混合,密封後置放 1 分鐘。取 2 ml 到比色管,然後將測定樣品加入,密封後置放 30 分鐘。如果比色管中的樣品有顏色變化,則證實蛋白質或胜肽的存在。



### (11) *In vitro* 影像之研究

測定方式可分為對比劑樣品掃描與體外培養腫瘤細胞添加對比劑掃描。對比劑樣品掃描使用 SPIO-mPEG-D4 作為測定樣品,不同鐵核粒徑的 SPIO-mPEG-D4 (6 nm, 9 nm 及 12 nm) 樣品配製成五個濃度 (400  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  及 25  $\mu\text{M}$ ) 並且填裝入 0.3 ml 的微量離心試管測定之。使用磁振造影的  $T_2$  加權影像 (T2-weighted image) 觀察其粒子尺寸 改變與鐵濃度變化時所產生的訊號改變;操作條件: TE = 5000 ms, TR = 90 ms, coronal 方向, knee coil。體外培養腫瘤細胞添加對比劑掃描使用 SPIO-mPEG-D4 作為測定樣品,取 12 nm 的氧化鐵奈米粒子作為核心並使用四株細胞表面 EGFR 表現量不同的細胞株 (cell line): Negative cell: HEK-293。Positive cell: PC-3, SKBR-3 及 A431。每個細胞株取細胞個數  $10^6$  個分別與 SPIO-mPEG-D4 (1 mM, 1 ml) 混合,在等同體內環境  $37^\circ\text{C}$  培養 1 小時以 PBS 反覆清洗三次,再使用 3.0T 磁振造影掃描儀的  $T_2$  加權影像 (T2-weighted image) 觀察氧化鐵粒子表面接上的小胜肽 D4 與細胞表面 EGFR 表現量不同而產生的訊號改變;操作條件: TE = 5000 ms, TR = 90 ms, coronal 方向, knee coil。

## 結果與討論

### 一、內層水分子數之探討

在表 1 中利用螢光光譜儀測定 $[\text{Eu}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ 和 $[\text{Eu}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 錯合物在  $\text{D}_2\text{O}$  及  $\text{H}_2\text{O}$  中發射螢光存在的半生期  $\tau$  值，利用測得的  $\tau$  值，代入公式 (1) 求出  $[\text{Eu}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  和  $[\text{Eu}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  錯合物之內層水分子數 ( $q$ ) 分別為 1.21<sup>(1)</sup> 及 1.26<sup>(1)</sup>。由螢光光譜儀可證明，CB-TTDA 與 Bz-CB-TTDA 之內層水分子大約皆為 1，因此 CB-TTDA 系列之衍生物之結構與 TTDA 基本架構相同，皆能與釷金屬離子鍵結而產生一個穩定的八配位金屬錯化合物。

表 1.  $[\text{Eu}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  與  $[\text{Eu}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  金屬錯合物之  $q$  值。

| Compounds                             | $q^{(1)}$   |
|---------------------------------------|-------------|
| $[\text{Eu}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ | 1.26 ± 0.02 |
| $[\text{Eu}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$    | 1.21 ± 0.01 |

### 二、弛緩率 (relaxivity, $r_1$ ) 的研究

表 2 表示，釷金屬錯化合物  $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  之縱向弛緩率為 4.29  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ，其值卻略高於主結構  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  之弛緩率 4.12  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、且高於市面上對比劑  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$  以及先前本實驗室發展出之  $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$  結構之弛緩率。顯示在 CB-TTDA 中引進苯基或是對-硝基苯除了提高分子量外，約略可提高其弛緩率，然而其值卻相當接近  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ ，可能會與其有相同之特性，因而弛緩率皆大於  $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$  及  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ 。

表 2.  $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 、 $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ 、 $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$ 、MS-325 與  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$  之弛緩率  $r_1$  在  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ，20 MHz。

| Complex                               | pH        | relaxivity $r_1 / \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ |
|---------------------------------------|-----------|---|
| $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ | 7.4 ± 0.1 | 4.29 ± 0.03                                     |
| $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$    | 7.4 ± 0.1 | 4.12 ± 0.05                                     |
| $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$       | 7.5 ± 0.1 | 3.85 ± 0.03                                     |
| MS-325                                | PBS       | 6.84 ± 0.48                                     |
| $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$       | 7.6 ± 0.1 | 3.89 ± 0.03                                     |

### 三、內層水分子交換速率 ( $k_{ex}$ ) 與分子轉動相關時間 ( $\tau_R$ ) 之研究

由表 3. 中表示， $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  內層水分子交換速率 ( $k_{ex}^{298}$ ) 為  $271 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ，其值近似於  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  ( $232 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ )，較  $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$  ( $146 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) 來得高，且遠比 MS-325 ( $6.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) 及  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$  ( $4.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) 高很多。另外， $^{17}\text{O}$  NMR 實驗結果也顯示， $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  的與分子轉動相關時間 ( $\tau_R$ ) 為 151 ps，略高於  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  (114 ps) 且高於  $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$  (104 ps) 與  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$  (103 ps)，略低於 MS-325 (188 ps) 其原因在於 MS-325 的分子量較大，而使其分子轉動相關時間 ( $\tau_R$ ) 增加。

雖然在小分子時，分子轉動相關時間 ( $\tau_R$ ) 值之大小為主要影響遲緩率 ( $r_1$ ) 之主因，但當小分子的釷金屬錯合物與大分子 (如：人類血清蛋白 (HSA) 或胜肽序列) 鍵結時，其水分子交換速率 ( $k_{ex}^{298}$ ) 越快，會使遲緩率 ( $r_1$ ) 明顯增加。因此，其釷金屬錯合物具有潛力成為適當的對比劑。

表 3. 由 $^{17}\text{O}$  NMR 弛緩時間與化學位移之數據，獲得之釷金屬錯合物動力學參數。

| Parameter  | Bz-CB-TTDA      | CB-TTDA         | TTDA            | MS-325 | DTPA |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|--------|------|
| $k_{ex}^{298}$ ( $10^6 \text{ s}^{-1}$ )                   | $271 \pm 3$     | $232 \pm 4$     | $146 \pm 17$    | 6.1    | 4.1  |
| $\Delta H^\ddagger$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )               | $23.1 \pm 0.1$  | $23.5 \pm 0.4$  | $23.1 \pm 0.5$  | 53.7   | 52.0 |
| $\Delta S^\ddagger$ ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) | $5.9 \pm 0.3$   | $5.8 \pm 1.0$   | $-11.1 \pm 3.1$ | 65     | 56.2 |
| $A/h$ ( $10^6 \text{ rad s}^{-1}$ )                        | $3.5 \pm 0.2$   | $3.7 \pm 0.1$   | $-3.2 \pm 0.3$  | -4.46  | -3.8 |
| $\tau_R^{298}$ (ps)  | $151 \pm 3$     | $112 \pm 2$     | $104 \pm 12$    | 188    | 103  |
| $C_{os}$   | $\underline{0}$ | $\underline{0}$ | $\underline{0}$ | 0.23   | 0.13 |
| $E_R$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )                             | $27.2 \pm 1.1$  | $13.6 \pm 0.8$  | $24.8 \pm 1.5$  | 31.5   | 18   |

#### 四、釷金屬錯合物與HSA鍵結之弛緩率 ( $r_1^b$ ) 研究

CB-TTDA及Bz-CB-TTDA釷金屬錯合物之‘E’與‘M’滴定結果如圖 2與3所示。由圖中可知釷金屬錯合物之縱向弛緩率隨著HSA濃度增加而上升。

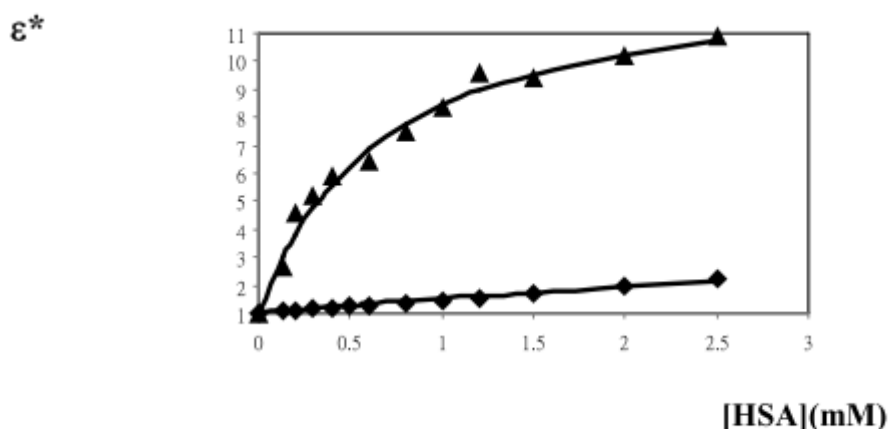


圖 3. E滴定法於 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  ( $\blacktriangle$ ) 或  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  ( $\blacklozenge$ )(0.1 mM) 與HSA (4.5%) 在 20 MHz,  $25.0 \pm 0.1$  °C, 50 mM PBS, pH 7.4.

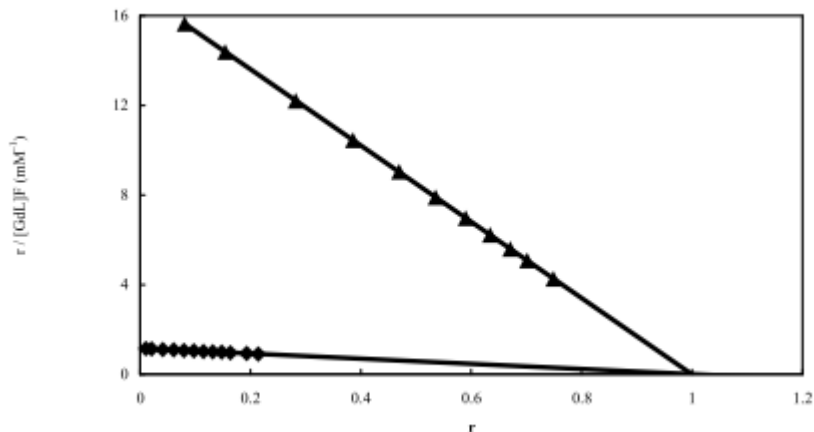


圖 4. 鍵結上HSA 之  $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$  ( $\blacktriangle$ ) 或  $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$  ( $\blacklozenge$ )的Scatchard plots, 在20 MHz,  $25.0 \pm 0.1$  °C, pH 7.4, 0.6 mM [HSA].  $r = [\text{GdL-HSA}]/[\text{HSA}]_T$

表 4. 人類血清蛋白(HSA)之鍵結參數

| Complexes               | $K_A(M^{-1})$             | n | b              | $r_1^F$<br>( $mM^{-1} s^{-1}$ ) | $r_1^b$<br>( $mM^{-1} s^{-1}$ ) |
|-------------------------|---------------------------|---|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $[Gd(Bz-CB-TTDA)]^{2-}$ | $1.7 \pm 0.1 \times 10^3$ | 1 | $13.1 \pm 0.4$ | $5.1 \pm 0.3$                   | $66.7 \pm 2.2$                  |
| $[Gd(CB-TTDA)]^{2-}$    | $1.1 \pm 0.1 \times 10^2$ | 1 | $6.1 \pm 0.2$  | $4.8 \pm 0.1$                   | $29.3 \pm 0.8$                  |
| MS-325                  | $3.0 \pm 0.2 \times 10^4$ | 1 | –              | $6.6 \pm 0.4$                   | $47.0 \pm 4$                    |

此外，鍵結弛緩率( $r_1^b$ )可以經由 b 乘以  $r_1^F$  獲得。 $[Gd(Bz-CB-TTDA)]^{2-}/HSA$  及  $[Gd(CB-TTDA)]^{2-}/HSA$  之  $r_1^b$  值分別為 66.7 及 29.3  $mM^{-1} s^{-1}$ ， $[Gd(Bz-CB-TTDA)]^{2-}$  之  $r_1^b$  值明顯高於  $[Gd(CB-TTDA)]^{2-}$ ，其中一個原因是因為  $[Gd(Bz-CB-TTDA)]^{2-}$  之內層水分子交換速率快，且脂溶性高，易鍵結上人類血清蛋白，故明顯高於  $[Gd(CB-TTDA)]^{2-}$ 。

### 五、*In vitro* 光學影像研究

將 Eu-NB-TTDA-BN 與 GRPR 過度表現之 PC-3 人類前列腺癌細胞，分別在 4 °C 及 37 °C 培養後由螢光顯微鏡可得其光學影像。由結果可得之 Eu-NB-TTDA-BN 在 37 °C 可鍵結至 PC-3 細胞並可被細胞噬入，而可用於追蹤 GRPR 過度表現的癌細胞。

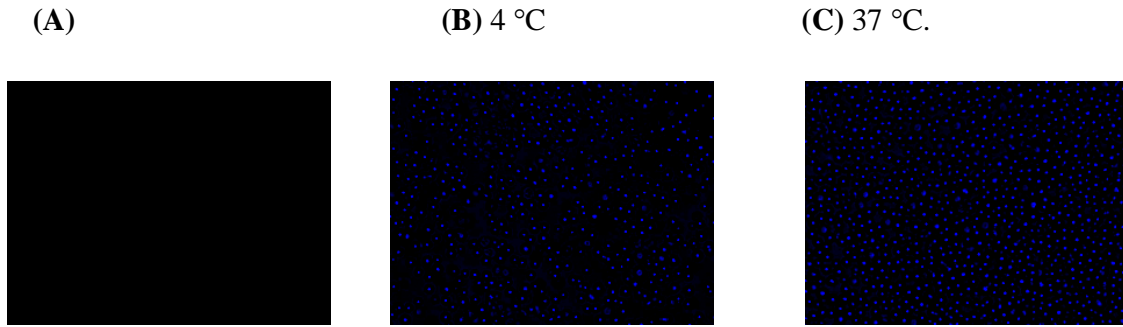


圖5. 將 PC-3 細胞不加入(A)及加入 1mM Eu-NB-TTDA-BN(B, C)，分別培養於 4 °C(B)及 37 °C(C)之光學影像。



## 六、*In vitro* MR 影像研究

圖6為Gd-NB-TTDA-BN在*in vitro*磁振造影之影像圖，由結果可得之GRPR過度表現之PC-3人類前列腺癌細胞，加入Gd- NP-TTDA-BN相較於未加入對比劑之訊號強度增加三倍，相對於臨床使用的對比劑[Gd (DTPA)]<sup>2-</sup>及[Gd (NP-TTDA)]<sup>2-</sup>也明顯的增加了影像的對比，而在競爭實驗中，我們加入四倍量的BN胜肽競爭GRPR，而使影像強度較低，這樣的結果顯示Gd-NB-TTDA-BN可利用BN去鍵結到GRPR而可成為一具有目標化的MRI對比藥劑。

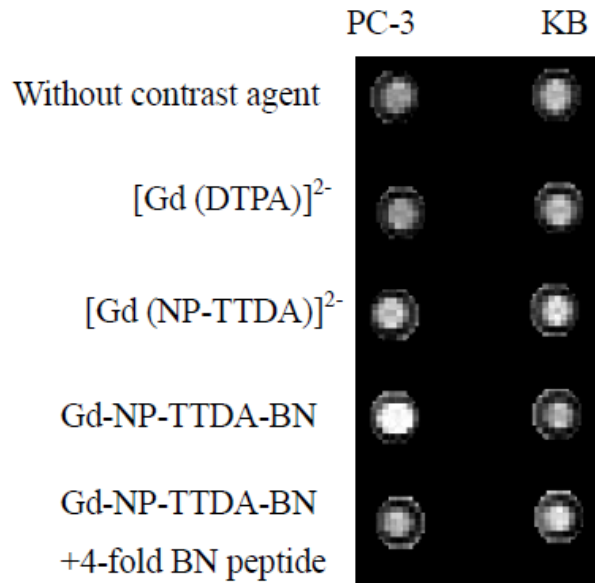


圖6. PC-3 cells(GRPR過度表現)及KB cells(GRPR無過度表現)分別未加入及加入1.0M [Gd (DTPA)]<sup>2-</sup>、[Gd (NP-TTDA)]<sup>2-</sup>、Gd-NP-TTDA-BN、四倍BN胜肽之體外MRI影像。

## 七、CLIO-Herceptin 之物化特性探討

本實驗利用傅立葉轉換紅外線光譜儀(FT-IR)(圖 7)及熱分析儀(TGA)(圖 8) 鑑定所合成之 SPIO、CLIO、CLIO-EDBE 及 CLIO-Herceptin。圖一中，SPIO (a)在 3300cm<sup>-1</sup>有-OH官能基的吸收、在 2800 cm<sup>-1</sup>有低強度的吸收，是-CH<sub>2</sub>-官能基訊號，這兩個吸收峰為 dextran 的吸收訊號。CLIO (b)在 3300 cm<sup>-1</sup>有-OH官能基的吸收。CLIO-EDBE (c)在 3000~3400 cm<sup>-1</sup>有一個寬帶的訊號，為-NH<sub>2</sub>和-OH的混合訊號，且在 2900 cm<sup>-1</sup>有低強度的吸收。這些吸收峰代表氧化鐵奈米粒子表面確實接上 dextran、epichlorohydrin 及 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (EDBE)。將每一步驟的產物抽乾送測熱分析儀，由圖二可以看出在每一步驟產物經過高溫(600°C)燃燒後剩餘產物的百分比，SPIO (60%)、CLIO (56%)、CLIO-EDBE (52%)及 CLIO-Herceptin (39%)，被燃燒的部份為氧化鐵奈米粒子表面的有機物，而核心的氧化鐵奈米粒子則是要 1000°C 以上的高溫才會被燃燒掉，由圖一及圖二結果顯示，本實驗確實成功合成且得到最終產物。

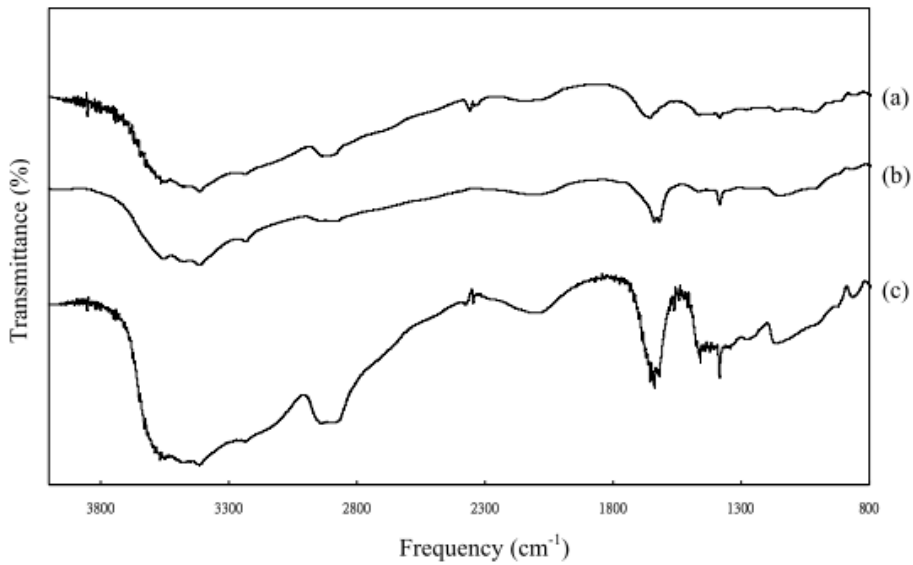


圖 7. 氧化鐵奈米粒子表面修飾上 dextran、epichlorohydrin 及 EDBE 之紅外線光譜圖。  
(a)SPIO，(b)CLIO 及(c)CLIO-EDBE。

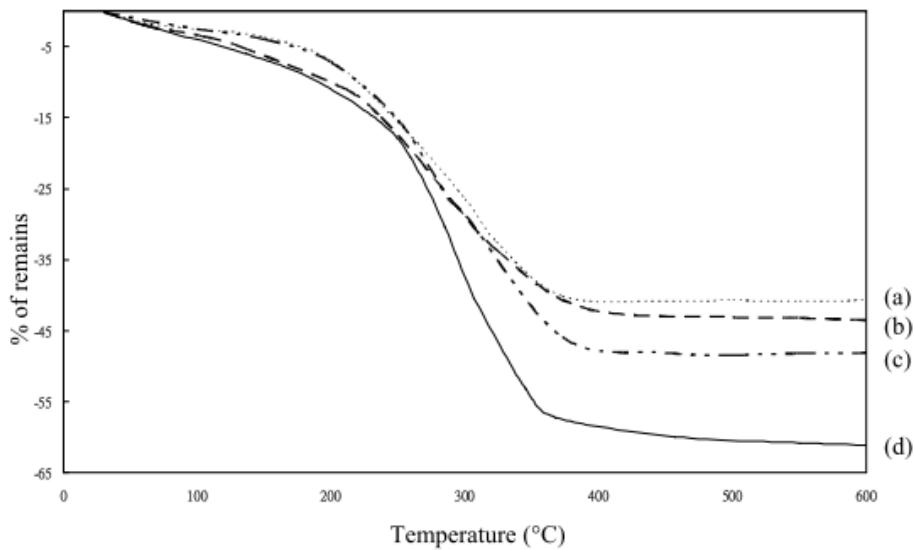


圖 8. 氧化鐵奈米粒子表面修飾上 dextran、epichlorohydrin、EDBE 及 Herceptin 利用熱分析儀分析後之圖譜。(a)SPIO，(b)CLIO，(c)CLIO-EDBE 及(d)CLIO-EDBE-Herceptin。

氧化鐵奈米粒子在尚未包覆具生物相容性之材料時，易因磁性產生聚集形成巨大顆粒而造成沉澱。在包覆良好生物相容性之材料後，每個氧化鐵奈米粒子之外層，形成一層薄膜，此薄膜讓氧化鐵奈米粒子不易產生聚集且增加分散性。由穿透式電子顯微鏡的觀察，即可判斷氧化鐵奈米粒子是否聚集，藉此證明已包覆良好生物相容性之材料可增加其分散性，並量測所合成之氧化鐵奈米粒子之鐵核部份的平均粒徑大小。將合成之 CLIO-Herceptin 利用穿透式電子顯微鏡分析，結果如圖 9 所示，由影像可看出氧化鐵奈米粒子分散良好且無聚集現象，並計算其平均氧化鐵奈米粒子核心直徑為  $3.5 \pm 0.3$  nm。

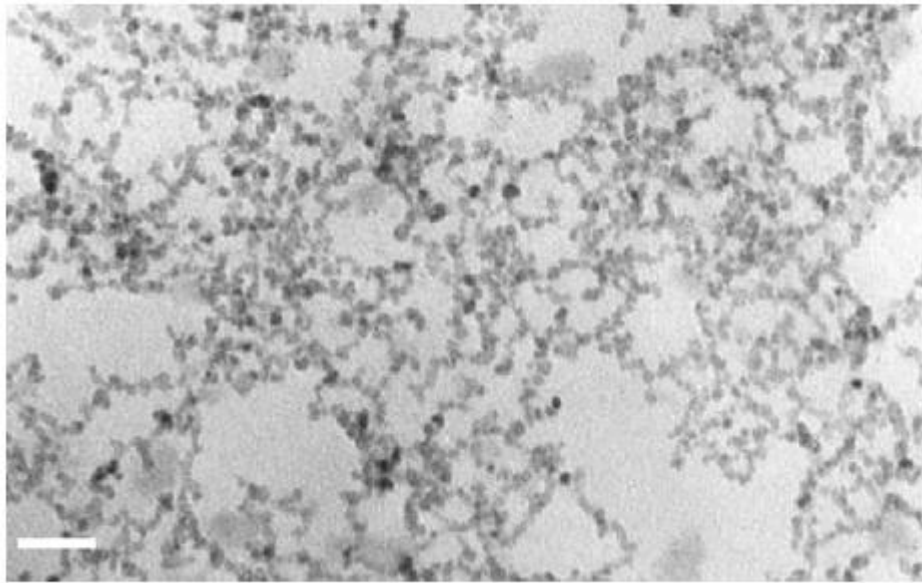


圖 9. CLIO-Herceptin 溶液滴在鍍碳銅網上並利用穿透式電子顯微鏡觀察所得之影像。  
白色 bar 為 20nm。

利用粒徑分析儀測量每一步驟產物之水合直徑，其粒徑分布如圖 10 所示，SPIO、CLIO、CLIO-EDBE 及 CLIO-Herceptin 的平均粒徑分別為  $26.1 \pm 0.2$ 、 $35.2 \pm 1.1$ 、 $41.3 \pm 0.8$  及  $67.2 \pm 1.4$  nm。SPIO 的粒徑略小於目前臨床使用的瑞瑟維斯(Resovist<sup>®</sup>，50~60 nm)，鍵結上 Herceptin 後直徑變大，推測是因為 Herceptin 本身體積較大之緣故。由文獻探討，雖然本實驗所合成的奈米粒子尺寸分布略大於用熱裂解方法合成的超順磁氧化鐵奈米粒子，但由文獻推測本研究中所合成的 CLIO-Herceptin 整體尺寸較小，且有包覆上生物相容性的聚合物，若打入動物體內，可減少被網狀內皮系統(reticuloendothelial system, RES)吞噬的機率，則可提高到達目標腫瘤位置的機率。

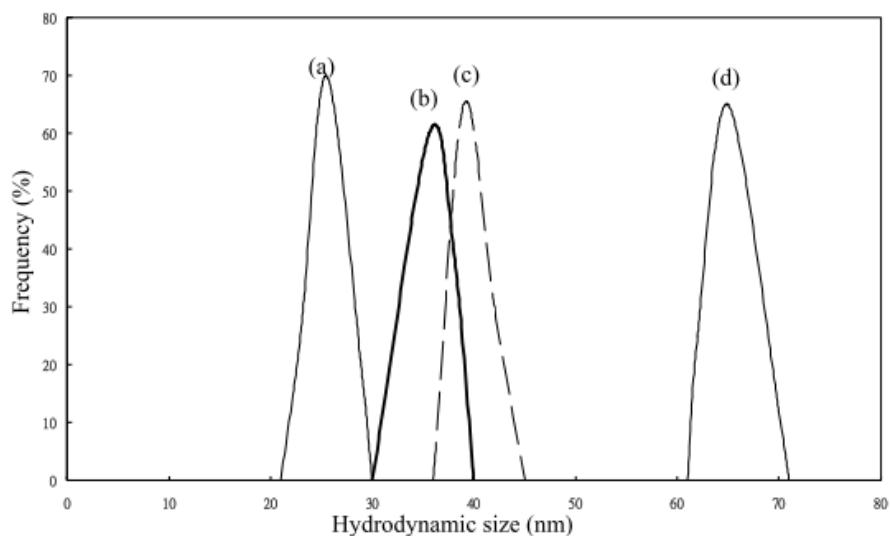


圖 10. 使用粒徑分析儀測量(a)SPIO，(b)CLIO，(c)CLIO-EDBE 及(d)CLIO-Herceptin 之水合粒徑分布。

要作為可運用在磁振造影上的對比劑，必須具有超順磁性，其特性為給予一正向外來磁場即產生相對正向感應磁場，當外來磁場愈大感應磁場也隨之變大直到飽和，反之，若給予負向外來磁場即產生相對負向感應磁場，增強到某一強度亦達到飽和，若外來磁場為零，則感應磁場亦隨之消失，表示無磁滯現象。將整感應磁場與外加磁場的對應關係作圖，即可繪出一組完整、封閉的磁滯曲線。為證明本實驗所合成 CLIO-Herceptin 確實具有超順磁性，將其送測 SQUID，圖 11 為 CLIO-Herceptin 在 298K 下之磁滯曲線，圖中的磁滯曲線在外加磁場消失時，CLIO-Herceptin 的感應磁場也跟著消失，並沒有產生磁滯現象。此曲線證明 CLIO-Herceptin 具超順磁性、無磁滯現象並得飽和磁化率為 80 emu/g，此數值比過去文獻發表，利用二價鐵、三價鐵混合得到氧化鐵奈米粒子且包覆 dextran 的數值略高(30~50emu/g)，但相對於利用熱列解法所得之氧化鐵奈米粒子較低(100emu/g)。由文獻探討得知，較高的飽和磁化率，可在磁振造影上得到較好的對比效果。

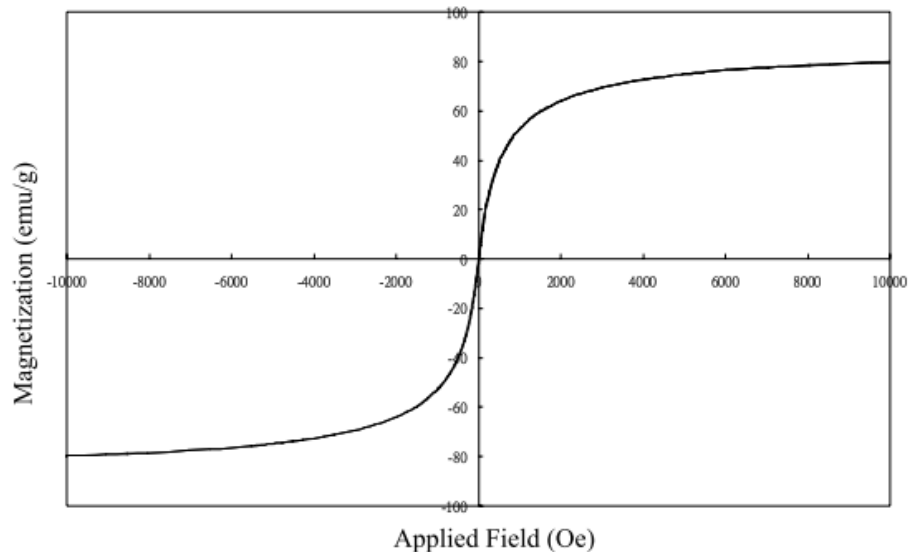


圖 11. 在 298K

下利

用超導量子干涉儀測量 CLIO-Herceptin 的磁化率。  
磁場測量範圍從 10000Oe 到-10000Oe。

為判斷所合成之 CLIO-Herceptin 之穩定度，長時間量測其水合粒徑、弛緩率及觀測在不同 pH 水溶液下分散狀態。圖 12 為長時間量測 SPIO、CLIO、CLIO-EDBE 及 CLIO-Herceptin 之粒徑大小，由結果發現並無明顯團聚造成粒徑變大之現象，初步顯示本實驗中所合成之產物相當穩定。使用 20 MHz relaxometer，在  $37.0 \pm 0.1$  °C 之下，測量 CLIO-Herceptin 的縱向弛緩時間及橫向弛緩時間，求得  $r_1$  為  $21 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  及  $r_2$  為  $144 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ， $r_2 / r_1$  之值為 6.8，長期量測弛緩率，其值並無明顯化，結果如圖 13 所示，表示長時間存放 CLIO-Herceptin 並不會造成聚集而導致弛緩率有所下降。最後亦將 CLIO-Herceptin 分散於不同 pH 值水溶液中，長時間觀察其分散情形，如圖 14 所示，分散於不同 pH 值水溶液中的 CLIO-Herceptin 並無明顯聚集現象，由結果推測，若注射到動物體內不會因為環境 pH 值改變而有聚集，減低被巨噬細胞吞噬的機率。

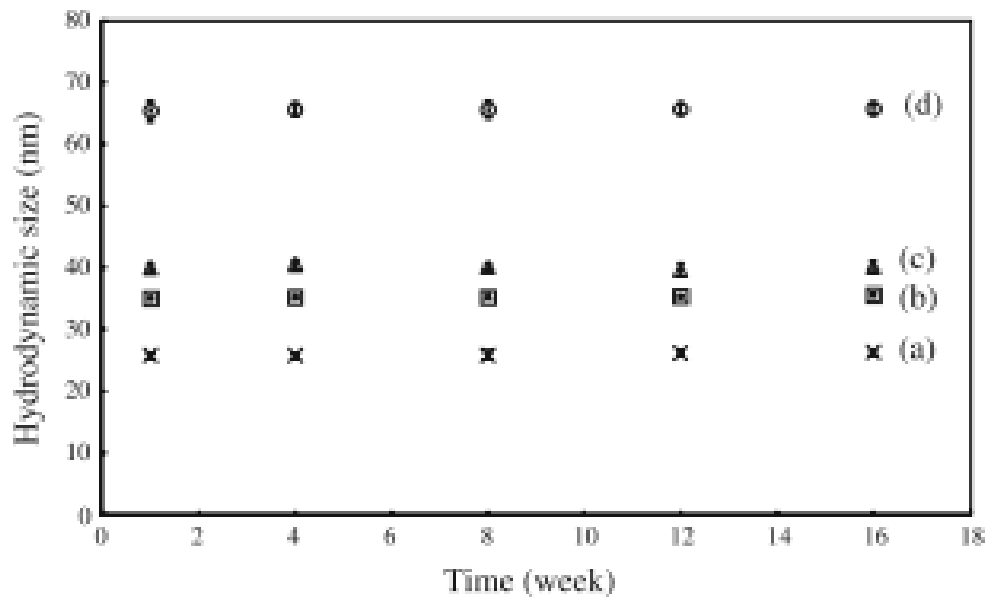


圖 12. 利用粒徑分析儀在不同時間量測(a)SPIO，(b)CLIO，(c)CLIO-EDBE 及(d)CLIO-Herceptin 之水合粒徑分布且觀察其穩定度。

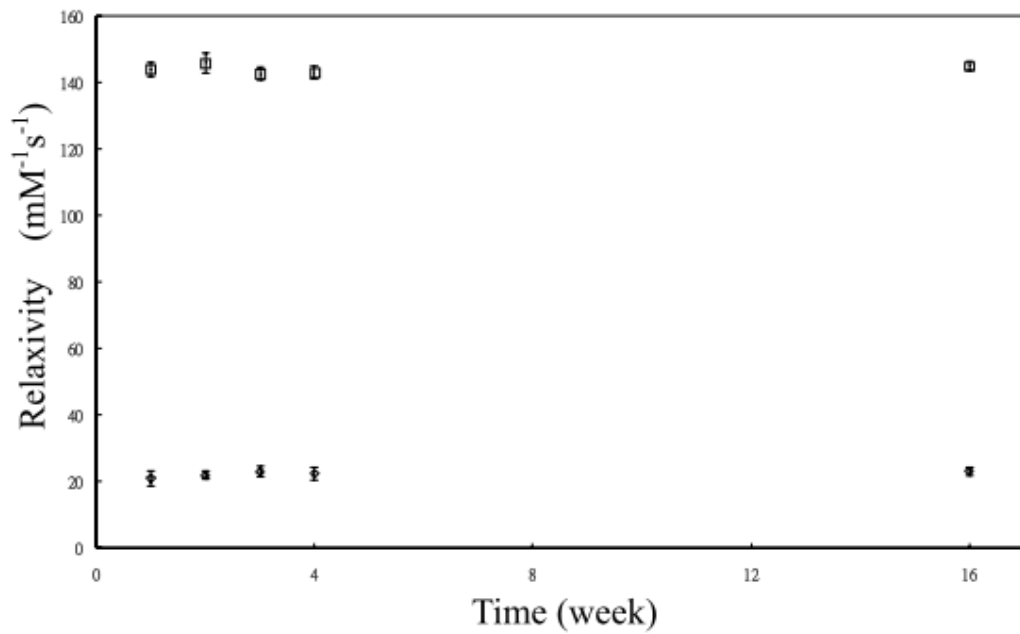


圖 13. 在 37°C 下用 20 MHz relaxometer 在不同時間量測CLIO-Herceptin 之弛緩率並觀察其穩定度。

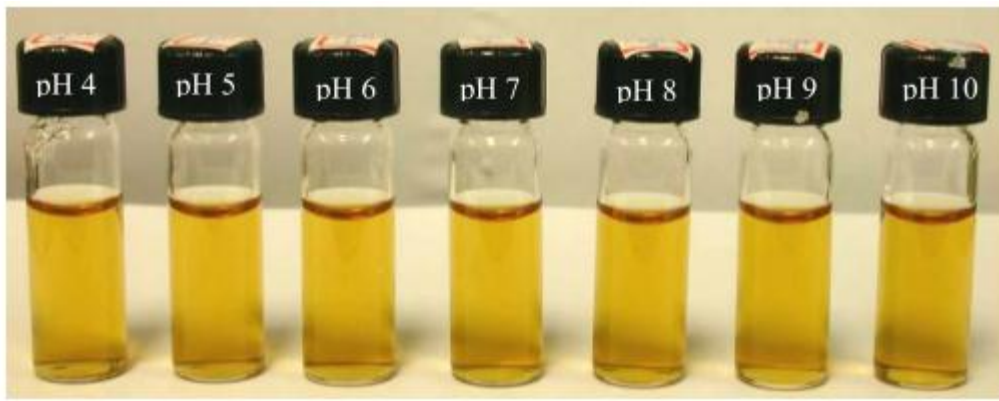


圖 14. 將 CLIO-Herceptin 分散於不同 pH 值水溶液下，並長時間觀察其分散現象。

#### 八、CLIO-Herceptin 之體外實驗

本實驗中，選用具有不同 HER2/neu 表現量之乳癌細胞，BT-474、SKBR-3、MDA-MB-231、MCF-7 及 KB 細胞，進行體外實驗之探討。藉由螢光影像討論 CLIO-Herceptin 對細胞目標化的成效。將細胞培養於六孔盤中，與 CLIO-Herceptin 培養後加入 anti-human-IgG( $\gamma$ -chain)-FITC，再利用螢光顯微鏡觀測。Herceptin 是屬於 IgG1 抗體，anti-human-IgG( $\gamma$ -chain)-FITC 是遇到 IgG1 的抗體時，會標的在 IgG1 抗體的  $\gamma$ -chain 上，再藉由 anti-human-IgG( $\gamma$ -chain)-FITC 上的 FITC，就可以利用倒立螢光顯微鏡偵測 CLIO-Herceptin 是否有標的到細胞膜上的受器。當細胞膜上有 CLIO-Herceptin 鍵結至 HER2/neu 基因受器時，則加入 anti-human-IgG( $\gamma$ -chain)-FITC 即可在螢光顯微鏡上有 FITC 的綠光表現。而為了測試並比對 CLIO-Herceptin 對不同細胞膜上受器的鍵結狀況，在本實驗準備每一種細胞各 2 個樣品，一個加入 CLIO-Herceptin，另一個不加入 CLIO-Herceptin 將其結果互相比對，以了解細胞膜上的受器鍵結的狀況。BT-474 及 SKBR-3 是具有 HER2/neu 基因高度表現細胞，當其遇到 Herceptin 時，Herceptin 會大量鍵結到其細胞膜表面上；MDA-MB-231 及 MCF-7 則為少量表現之細胞，KB 則是不表現 HER2/neu 基因。由圖 15 結果顯示，HER2/neu 基因表現量愈高的細胞其螢光表現愈亮，沒有表現 HER2/neu 基因的細胞則無螢光反應。

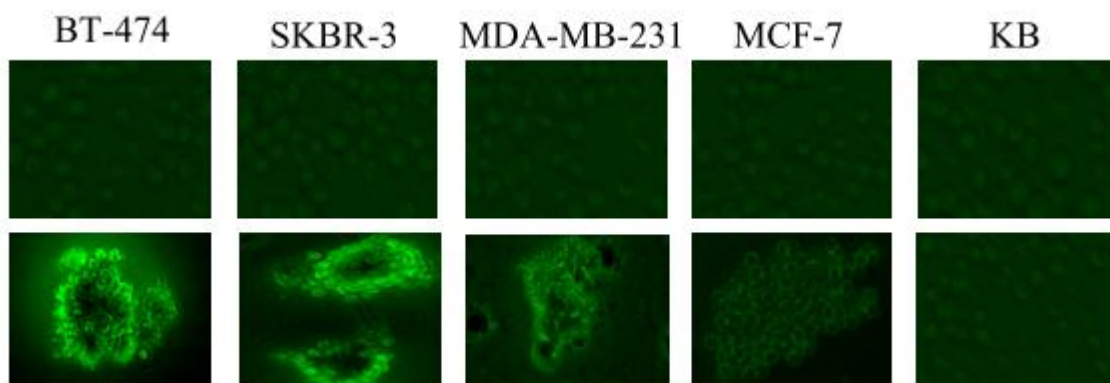


圖 15. 不同 HER2/neu 基因表現量之細胞在 4°C 下與 CLIO-Herceptin 培養後，並以 anti-human-IgG( $\gamma$ -chain)-FITC 追蹤所得螢光影像。

利用不同 HER2/neu 基因表現量之細胞株來測試 CLIO-Herceptin 的細胞毒性，在細胞毒性實驗中選擇三種不同含鐵濃度：1、5、10 mM 對定量細胞( $10^4$ 個細胞)進行測試。由圖 16 細胞毒性實驗結果顯示，當使用含有高濃度鐵的 CLIO-Herceptin(10 mM)與細胞培養，會大量抑

制細胞生長，尤其反應在 HER2/neu 基因較多表現的細胞上，反之在低濃度下，細胞存活率達 90%以上，此結果顯示本研究確實將 Herceptin 鍵結在氧化鐵奈米粒子上，且確實可達到目標化作用，對於大量表現 HER2/neu 基因的乳癌細胞亦會抑制其細胞生長，換算此抑制細胞生長濃度遠大於欲施打至動物體之對比劑濃度，此濃度下並不造成腫瘤或正常組織毒殺作用。

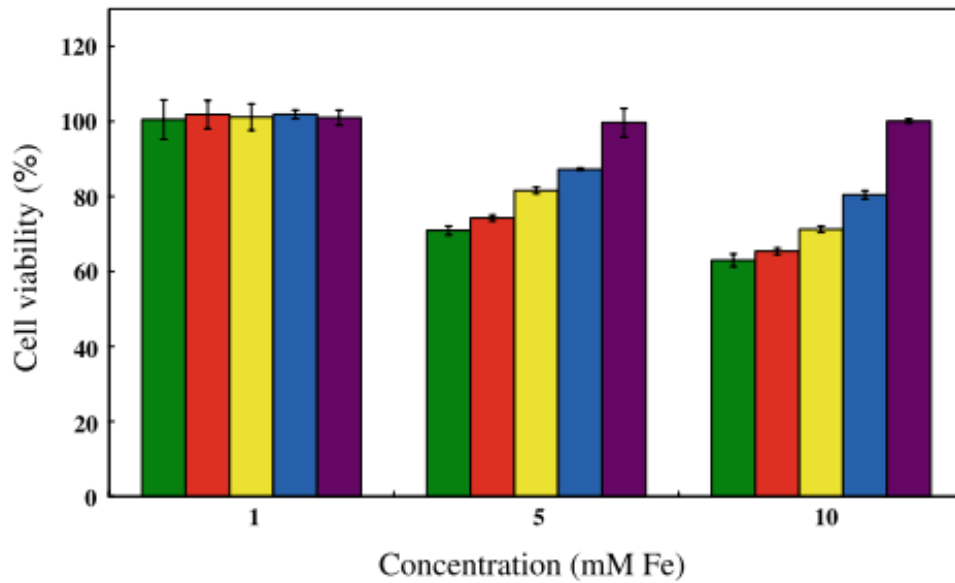


圖 16. 不同 HER2/neu 基因表現量之細胞與不同濃度之 CLIO-Herceptin 培養後，以 MTT 方法檢測細胞存活率。綠色為 BT-474 細胞；紅色為 SKBR-3 細胞；黃色為 MDA-MB-231 細胞；藍色為 MCF-7 細胞；紫色為 KB 細胞。

在體外影像實驗中，選用不同程度 HER2/neu 基因表現的細胞株與 CLIO-Herceptin 進行培養後，使用 3.0 T MRI 進行掃描。圖 17 為體外影像結果。由結果顯示細胞膜外層表現愈多 HER2/neu 基因受器的細胞(BT-474 及 SKBR-3)，其影像明顯變黑、訊號值下降多，相對於較少表現 HER2/neu 基因受器的細胞(MDA-MB-231 及 MCF-7)，其影像較少變化、訊號值下降亦不多。將實驗組細胞(BT-474、SKBR-3、MDA-MB-231 及 MCF-7)加入對比劑的訊號除以未加入對比劑的訊號值，可得細胞影像的 enhancement(%), 分別是  $75.4 \pm 2.4$ ,  $70.9 \pm 1.2$ ,  $40.8 \pm 0.9$  及  $25.3 \pm 1.8$  %，在控制組細胞(KB)加入對比劑前後，enhancement(%)無明顯變化。另外，將磁振造影所得的體外灰階影像利用 Kodak MI 軟體進行套色，色碼圖之紅色代表訊號值較高，往紫色方向代表訊號值逐漸下降，由彩色影像可以看出，細胞在未與 CLIO-Herceptin 培養前皆為黃綠色，與 CLIO-Herceptin 培養後，表現較多 HER2/neu 基因的乳癌細胞(BT-474 及 SKBR-3)變為紫色，而較少表現 HER2/neu 基因的乳癌細胞(MDA-MB-231 及 MCF-7) 則呈現藍色，不表現 HER2/neu 基因的細胞則無顏色變化仍呈現黃綠色。



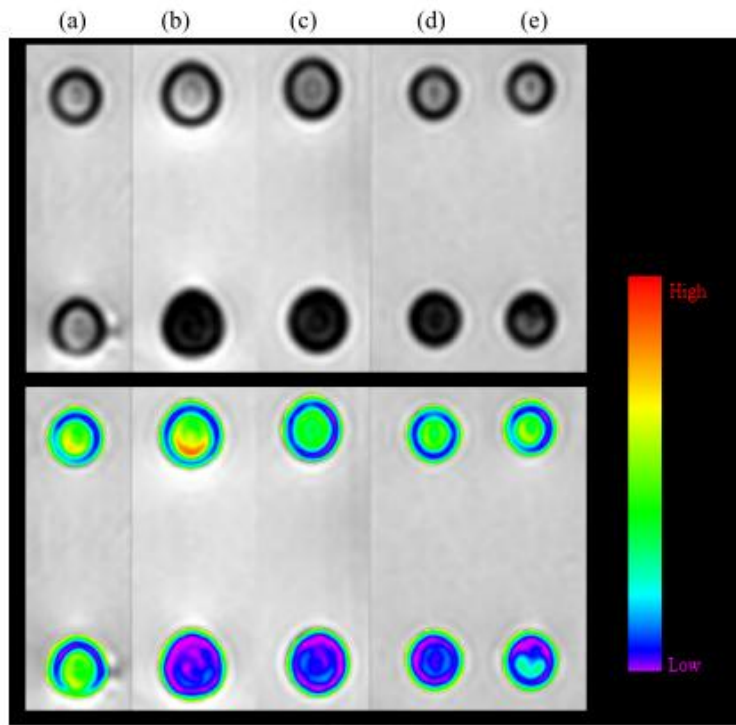


圖 17. 不同 HER2/neu 基因表現量之細胞與 CLIO-Herceptin 在 4°C 下培養後利用 3.0 T MRI 進行造影所得之影像，並且利用光學影像軟體 Kodak MI 將灰階影像套上色譜。色碼圖紅色部分代表訊號值較高，往紫色方向代表訊號值下降。

#### 九、CLIO-Herceptin 之體內實驗

在動物實驗中，選擇無特定病源裸鼠(nude mice)，在其左右後腿上方接種 SKBR-3 及 KB 細胞，待腫瘤長成約 0.5 平方公分後，由尾部靜脈注射 CLIO-Herceptin(其劑量為 20 $\mu$ mol/kg)，再以 3.0 T MRI 進行造影。圖 18 為注射對比劑前後一小時之影像，可由圖像得知在 SKBR-3 腫瘤區塊有明顯變黑現象，SI pre 表示注射對比劑前腫瘤部位的訊號強度，SI p.pre 表示注射對比劑前 phantom 的訊號強度，SI post 表示注射對比劑後腫瘤區塊的訊號強度，SI p.post 表示注射對比劑之後 phantom 的訊號強度。由公式計算可得知，打入對比劑後的腫瘤部位比打入對比劑前下降 45%，由結果顯示，本研究所設計合成目標化的對比劑發揮其功效，具有標的特殊部位之效果。另外，將磁振造影所得的體內灰階影像利用 Kodak MI 軟體進行套色，色碼圖之紅色代表訊號值較高，往紫色方向代表訊號值下降，由彩色影像可以看出，腫瘤在未打入 CLIO-Herceptin 前皆為黃綠色，經由尾部靜脈注射 CLIO-Herceptin 後，SKBR-3 腫瘤呈現藍紫色，代表訊號下降，而無表現 HER2/neu 基因的乳癌腫瘤則無顏色變化仍呈現黃綠色。



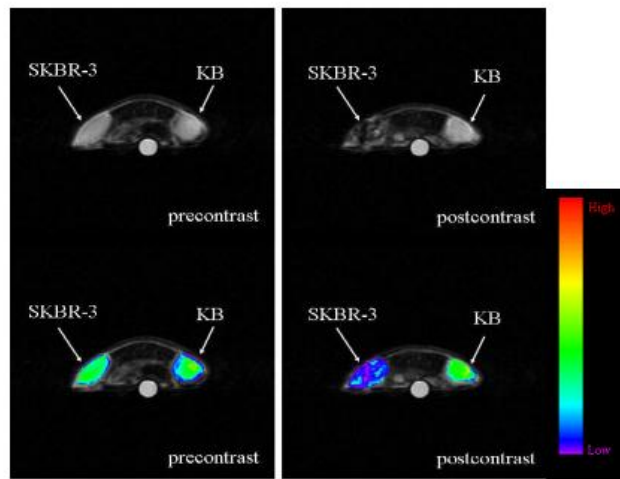


圖 18. 將接種 SKBR-3 及 KB 腫瘤小鼠以尾部靜脈注射 CLIO-Herceptin 一小時後利用 3.0 T MRI 進行造影所得之影像，並且利用光學影像軟體 Kodak MI 將灰階影像套上色譜。色碼圖紅色部分代表訊號值較高，往紫色方向代表訊號值下降。

## 結論與建議

本研究合成了TTDA 衍生物Bz-CB-TTDA，在弛緩率的研究上，將 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 與已商業化之磁振造影對比劑 $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ 、 $[\text{Gd}(\text{TTDA})]^{2-}$ 比較，顯示 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 弛緩率較高，因此 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 具備作為磁振造影對比劑的基本條件。在內層水分子交換速率方面，本文中發現Bz-CB-TTDA 之釷金屬錯合物具有快速之內層水分子交換速率，且脂溶性高，易鍵結上人類血清蛋白，其效果明顯高於 $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ ，可用於做為血池造影 MRI 對比劑。而目標化對比劑Gd-NB-TTDA-BN 可由螢光實驗結果證明會鍵結到胃泌素受體，應用於光學影像上；MRI 的影像說明了Gd-NB-TTDA-BN 能目標化到PC-3 前列腺癌細胞上，使訊號強度增強，說明這將是有潛力的目標化MRI 對比劑。

不同粒徑大小的超順磁氧化鐵奈米粒子，會影響粒子的弛緩率及飽合磁化率。使用高溫熱裂解合成，並將氧化鐵奈米粒子參雜錳得到形狀良好及高弛緩率( $r_2$ ) 之 SPIO ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ )，測量SPIO-mPEG的弛緩率及MRI 影像實驗得知:若使用較大的氧化鐵核 (12 nm) 可以得到的 $r_2$ 值較高。因此，本研究使用12 nm 之SPIO以生物相容性配位子包覆，然後鍵結生物標記 D4 合成SPIO-mPEG-D4，並利用 D4 對於EGFR 良好的親和力，成功將SPIO-mPEG-D4目標化到細胞。最後經由MRI 得到不同EGFR 表現程度的體外細胞影像，達到預期的細胞顯影效果。未來將更進一步使用SPIO-mPEG-D4 於動物模組 (animal model)及體內磁振造影之相關研究，並且以SPIO-mPEG-NH<sub>2</sub> 為技術平台，鍵結上不同的生物標記分子，以發展為各種不同標的物之分子影像對比劑。

## 参考文献

1. Lauffer, R. B.; Grief, W. F.; Stark, D. D.; C. Vincent, A.; Saini, S.; Wedden, V. J.; Brady, T. J., *J. Comput. Assist. Tomogra.* 1985, 9, 431.
2. Rocklage, S. M.; Sheffer, S. D.; Cacheris, W. P.; Quay, S. D., *Inorg. Chem.* 1988, 27, 3530.
3. Vittadin, G.; Felder, E.; Tirone, P.; Lorusso, V. B., *Invest. Radiol.* 1988, 23, 246.
4. Pavone, P.; Patrizio, G.; Buoni, C., *Radiology* 1990, 176, 61.
5. Frullano, L.; Rohovec, J.; Aime, S.; Maschmeyer, T.; Prata, M. M. I.; Lima, J. J. P. d.; Geraldés, C. F.; G. C.; Peters, J. A., *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 5202.
6. Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12847.
7. Paris, J.; Gameiro, C.; Humblet, V.; Mohapatra, P. K.; Jacques, V.; Desreux, J. F., *Inorg. Chem.* 2006, 45, 5092.
8. Jászberényi, Z.; Moriggi, L.; Schmidt, P.; Weidensteiner, C.; Kneuer, R.; Merbach, A. E. H., L.; Tóth, É., *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 406.
9. Barge, A.; Cravotto, G.; Robaldo, B.; Gianolio, E.; Aime, S., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2007, 57, 489.
10. Prasuhn Jr., D. E.; Yeh, R. M.; Obenaus, A.; Manchester, M.; Finn, M. G. *Chem. Commun.*, 2007, 1269.
11. Jebasingh, B.; Alexander, V., *Inorg. Chem.* 2005, 44, 9434.
12. Huang, X.; Dragnea, B.; Bronstein, L. M.; Retrum, J.; Dufort, C.; Tsvetkova, I.; Aniagyei, S.; Stein, B.; Stucky, G.; McKenna, B.; Remmes, N.; Baxter, D.; Kao, C. C., *Nano Lett.* 2007, 7, 2407.
13. Thünemann, A. F.; Kaufner, D. S. L.; Pison, U.; Möhwald, H., *Langmuir* 2006, 22, 2351.
14. Nasongkla, N.; Bey, E.; Ren, J.; Ai, H.; Khemtong, C.; Guthi, J. S.; Chin, S.-F.; Sherry, A. D.; Boothman, D. A.; Gao, J., *Nano Lett.* 2006, 11, 2427.
15. Hork, D.; Babi, M.; Jendelov, P.; Herynek, V.; Trchov, M.; Pientka, Z.; Pollert, E.; Hjek, M.; Sykov, E., *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 635.

16. Reynolds, F.; Weissleder, R.; Josephson, L., *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 1240.

17. Lee, H.; Yu, M. K.; Park, S.; Moon, S.; Min, J. J.; Jeong, Y. Y.; Kang, H.-W.; Jon, S., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 12739.

## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

- 達成目標
- 未達成目標（請說明，以 100 字為限）
- 實驗失敗
  - 因故實驗中斷
  - 其他原因

說明：

已達成預期目標

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

- 論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無
- 專利： 已獲得  申請中  無
- 技轉： 已技轉  洽談中  無
- 其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

本研究進行磁振造影(MRI)對比劑之開發及研究，本研究所開發之 Gd-NB-TTDA-BN 及 Herceptin-nanoparticals 對於生物標靶分子具有顯著的效用。同時，本研究所發表之論文於 J. Biol. Inorg. Chem. 已被引用 41 次。本研究結果顯示所開發之 MRI 對比劑，具有商品化之價值及潛能，如成功商品化將對社會有極大的貢獻。