

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

新型生物醫學肝膽磁振造影分子顯影劑

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2623-7-009-002-NU

執行期間：93年01月01日至93年12月31日

執行單位：國立交通大學生物科技研究所

計畫主持人：張正

計畫參與人員：林志誠

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 4 月 1 日

新型生物醫學肝膽磁振造影分子顯影劑

The New Classes of Biomedical Liver-Specific Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents

(NSC93-2623-7009-002-NU)

張正*

*國立交通大學生物科技系

一、緣起與目的

含高順磁性金屬「Gd (III)」的金屬螯合物，目前已經很有效率的被使用在臨床醫療上，用來加強 MRI (核磁共振造影) 的顯影，因此能增進診斷的正確性。自從 1988 年第一個 MRI 試劑 (NMG)₂ 「Gd (DTPA)」被核准使用，時至今日已有超過兩千萬的病人受惠。此類多酸基胺化合物 (如線性之 DTPA 及大環之 DO3A 等之衍生物) 皆能與 Gd (III) 形成穩定的螯合物，所以適合作為 MRI 之顯影劑。

磁振造影劑為含不成對電子的順磁性物質，可藉著減低 spin-lattice (T1) 和/或 (T2) 弛緩時間的數值以加速水的質子在磁性環境中遲緩，由此可以使病變組織之間的訊號差異變大從而取得核磁造影。依對水質子弛緩影響不同，磁振造影可分為兩大類：(1) 同時影響 T1 及 T2 之低分子量順磁性金屬螯合物以及 (2) 主要影響 T2 之超順磁性物質如氧化鐵之類。此兩類磁振造影劑作用之方式有相當大差異。就低分子量金屬螯合物及相鄰水分子之相對運動有關，正向促進 (即訊號強度增加) 及負向促進 (及訊號強度減少) 均可被觀察到。然而超順磁性物質會引發局部磁場變化而減少有效 T2，在此狀況下只會觀察到負向促進。

早期的 MRI 造影劑發展皆是很簡單的 Gd 螯合物，其目的只是顯影並無法針對各種不同的特定組織使用。如今造影劑的發展，將是藉由改變化合物結構而促進水的質子很容易 relax 或者藉由所結合的生物分子而加強顯影。

近期 MRI 顯影劑發展是製造出具有特別的 binding site 的分子在活體中而能 target 到特定器官顯影對比劑，此構想是利用試劑與生物體分子間所產生的非共價結合力而能結合至特定器官。

Ms-325 是此類型化合物的代表， $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ 的衍生物，Lauffer 等多人從事這方面開發⁽¹⁾⁽²⁾，其結構如下

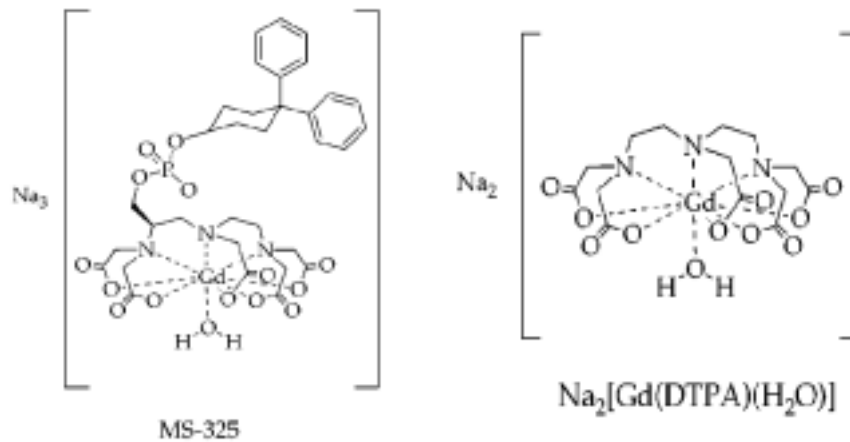


Figure 2. Ms-325 與 $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ 結構

在主結構 DTPA 的骨架上的碳接有 lipophilic diphenylcyclohexyl group 具有親脂性可與血漿蛋白 (HSA) 形成強的非共價化合物，這種情形具有三個目的：

Targets 這個試劑到 blood pool 使動靜脈顯影加強而具選擇性。與 protein 鍵結後便成錯合物，因此翻轉變慢而提供 5-10 倍加強顯影。此種結合也增加了活體中動物的生命期，而有具較多的時間顯影多倍體

Gd-EBO-DTPA 是一個利用與 Ms-325 相似原理所設計出的螯合物其配位子結構如右

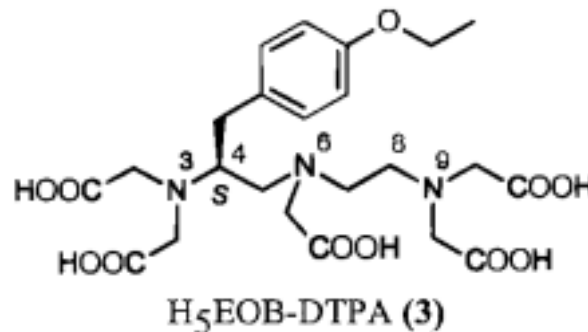


Figure 3. H5EOB-DTPA 結構

Schmitt-Willich⁽³⁾ 等人在 DTPA 骨架上另外接出之 ethoxybenzyl group 也是個 lipophilic group，因此藥劑能被正常肝細胞吸收，而不被腫瘤組織吸收，因此能測出肝癌，此試劑目前已進入臨床第四階段研究。

當然在這些報導中除了強調其爲了特殊用途所做的設計外也同時測試其安全性及顯影效率。一般而言螯合物之安全考量上包括錯合物在溶液中形成之安全性及選擇性、良好的溶解度、低動力變化性，以及低滲透壓性。

爲了更了解此類錯合物的穩定性，進一步了解其結構及反應機構是必要的。配位子的預結構化（preorganization）是一種自由配位子被認爲與金屬離子錯合時爲了增加錯合離子的穩定度在構形上所需求的趨勢⁽⁴⁾。已有許多蛋白質配位子的預結構化被發現，例如，第一個預結構化的是 siderophore alcaligin（一種微生物的鐵運輸劑），它具有大環結構並與鐵形成穩定錯合物⁽⁵⁾。另一個例子是具有反-環己烯二胺骨架的螯合劑如 CDTA（反-環己烯二胺四酸）及其相似物傾向於比 EDTA 形成更穩定的錯合物，而這些生成物已被優先使用於顯影及放射線治療上⁽⁶⁾。

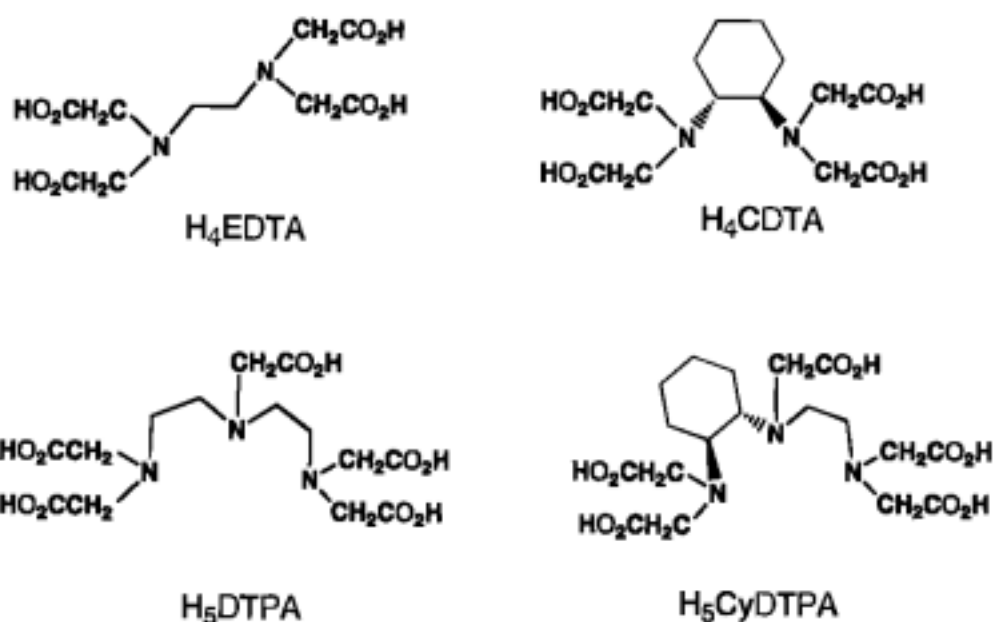


Figure4.CDTA 等化合物結構

在尋找穩定安全具效率的顯影劑及人造 DNA/RNA 切割劑上，Ln³⁺ 與大環多胺基多酸基配位子如 DOTA、HPDO3A 等之錯合物，其穩定度與動力鈍性隨金屬電荷密度增加而增加並且通常大於線性配位子如 DTPA 已被論證出來。⁽⁷⁾

另一方面鑷系金屬與 14 環相似結構配位子 TETA 所形成錯合物有相當不同的配位性質。

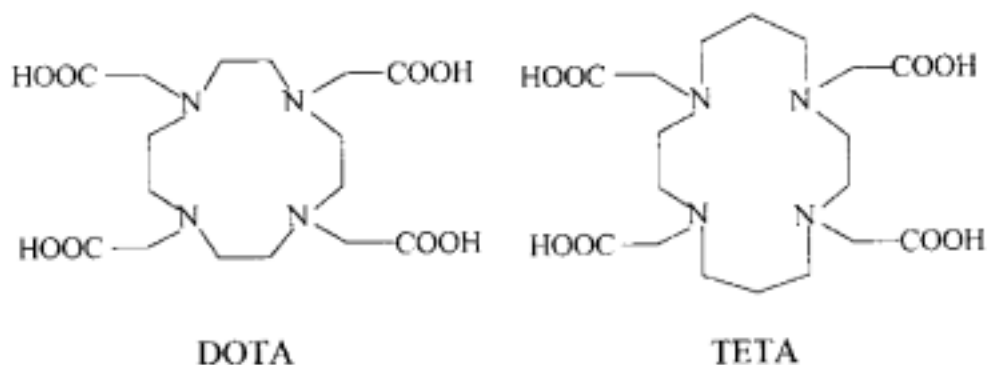


Figure 5. Structural formulas of DOTA and TETA.

例如 Gd(TETA)-穩定常數, $\log K_f = 14.7$ ⁽⁸⁾ 比 Gd(DOTA)-, $\log K_f = 25.3$ ⁽⁹⁾ 低了 10 個級數, 而在動力學上 Ln(DOTA)- 和 Ln(TETA)-⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ 的形成與解離比線性配位子 EDTA 和 DTPA⁽¹²⁾ 還要慢。無論如何, 酸催化解離速率 Ce(TETA)⁻ 比 Ce(DOTA)⁻ 快許多。尤其是 Ce(TETA)⁻ 和 Ce(DOTA)⁻ 的單質子解離速率的差值主要是因為 ΔH^\ddagger ⁽¹³⁾ 的差。

Gd(III) and Y(III) 與 DOTA and HPDO3A 所形成 complexes 的晶體結構顯示出具九配位, 金屬離子與配位子形成 8 配位 (4 個氮與 4 個氧原子) 而另一配位則由水所佔有。⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ DOTA 在自由配位子與錯合物中結構是相似的例如四個酸基相對於四個氮所形成的平面是 syn 的結構。這顯示出為了與金屬錯合只有限制 DOTA 配位子重組是必須的亦即 DOTA 有預結構。另一方面相似配位子 TETA 其相鄰的兩對酸基則具反式結構。⁽¹⁶⁾ 而在金屬錯合物上 TETA 配位子的構造則大大重組以致於四個酸基是 syn 結構。⁽¹⁷⁾ DOTA 和 TETA 的鑷系錯合物在順磁與反磁 NMR 研究上皆顯示在水溶液中具有非常剛性結構⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾, 而電腦模擬計算也指出在固態中有相同發現⁽²¹⁾。

我們可以這樣假設, 有預結構的配位子如 DOTA 比其他無預結構的配位子如 TETA 會形成較穩定的鑷系錯合物雖然 Ln(DOTA)- 的研究已有許多的文獻發表, 然而 Ln(TETA) 的文獻卻很少, 尤其是 Ln(TETA) 的形成動力學尚未被發表。因此本人曾就 DOTA 與 TETA 之錯合物做過相關之研究⁽²²⁾。H₆DOTA²⁺ and H₂DOTA²⁺ 經計算後四個酸根都朝同一個方向, 和之前發表的 free DOTA 的結果一致。而 H₄TETA 經計算後則是成 anti 的方向(fig6), 2 個酸基朝上 2 個酸基朝下, 且會形成分子內氫鍵, 此結構和 H₄TETA.2H₂O 的晶體結構有少許的不同

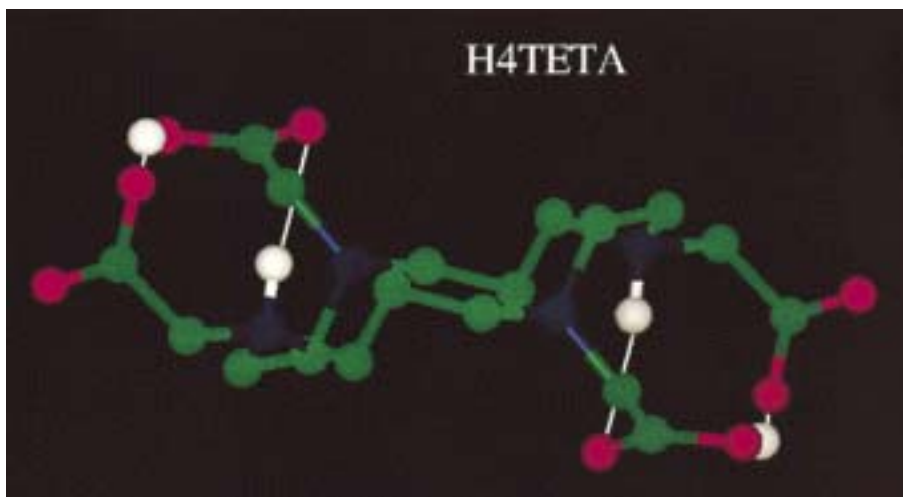


Figure6. Molecular mechanics calculated structure of H4TETA. The structure takes an anti configuration with two intramolecular H-bonds.

而 TETA 在錯合時 ligand 會 rearrangement, 形成 syn(同向) configuration, 且四個酸基指向同一方向, Eu(TETA)-只有八配位, 因為 14 元環孔穴大, Ln 進入較深所致

中間物 Eu-H2DOTA 已經由 Luminescence 觀察到, 且分子模擬結構預測 Eu ion 會遠離四個氮所形成的平面, 然而在中間物 Eu-H2TETA 則預測 Eu 和兩個酸基在 syn 方向錯合而剩下的配位位置則是由水分子佔據(fig7)

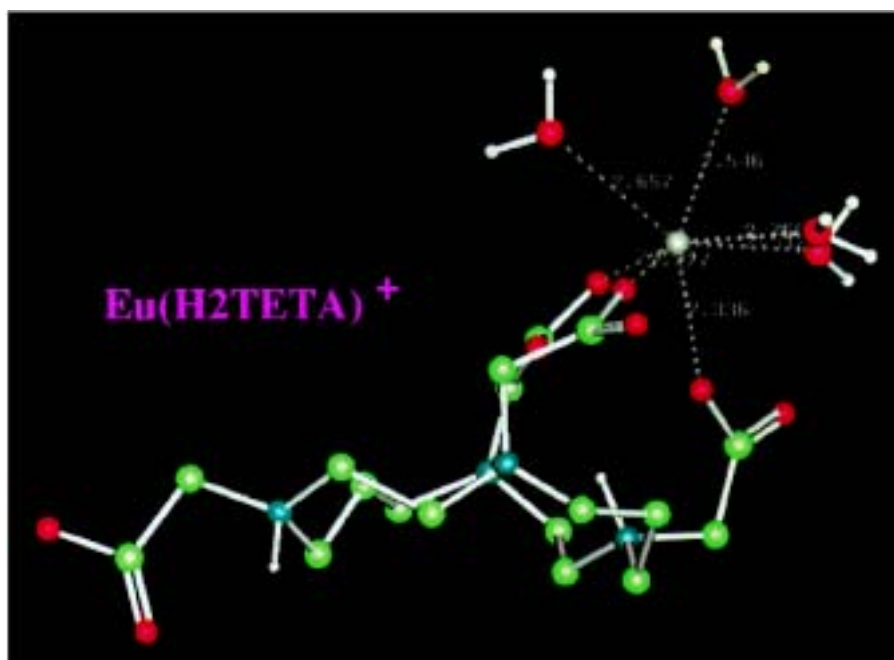
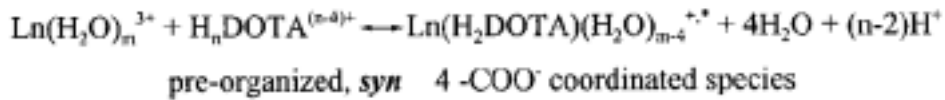


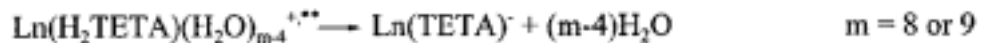
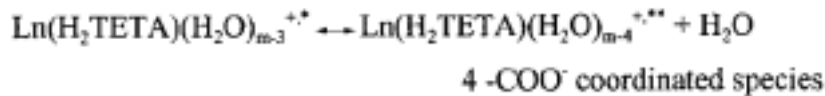
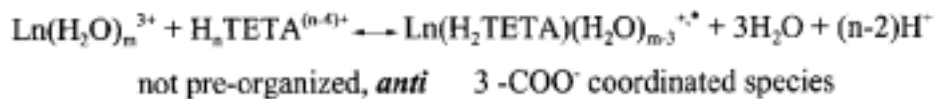
Figure 7. One potential Eu(III)-H2TETA intermediate structure. The Eu(III) ion is coordinated to three carboxylate groups in the syn configuration.

分子模擬 DOTA 的反應機制是和動力學實驗所預測的相同,也已有 paper 發表⁽⁷⁾
⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾,但 TETA 沒有動力學實驗的支持,所以利用 Luminescence 實驗來推測可能的中間物和產物

DOTA :



TETA :



此外，利用分子模擬作結構的判斷可以幫助我們了解所設計的配位子在形成錯合物後，是否可能具有顯影效果。顯影劑的效率與內層水分子的弛緩率有關影響內層弛緩率之因素可以下式表示：

$$R_1 \propto q (\mu_{\text{eff}})^2 \tau / r^6$$

r 為金屬離子至內層水質子的距離，2003 年 Caravan⁽²³⁾ 使用 ENDOR (electron-nuclear double resonance) 光譜測試五個具顯影效果的錯合物 [Gd(H₂O)₈]³⁺, [Gd(DTPA)(H₂O)]²⁻, [Gd(BOPTA)(H₂O)]²⁻, MS-325, 和 [Gd(HP-DO3A)(H₂O)][·]，發現他們的 ENDOR 光譜及 r_{Gd-H} 幾乎相同。r_{Gd-H} = 3.1 爭 0.1 Å 這個結果提供我們一個訊息，若能建立適當的分子模擬計算這些已知物，能夠得到相似的結果的話，將之使用於未知錯合物應可預知其顯影效果。

因此這份研究我們期盼達成以下幾個目的：

1. 了解 Ln (III) 與 aminopolycarboxylate 配位子的熱力學性質 (穩定度選

擇性) 動力學性質 (易變性) 及結構性質

2. 合成 PE3A 及其衍生物

3. 合成 DO2A、NO2A 單體與雙體

4. 決定 Ln 與 PE3A 及其衍生物錯合的可能機制極可能的反應中間體

5. 決定能量中間體及產物結構

6. 決定錯合反應的可能能量

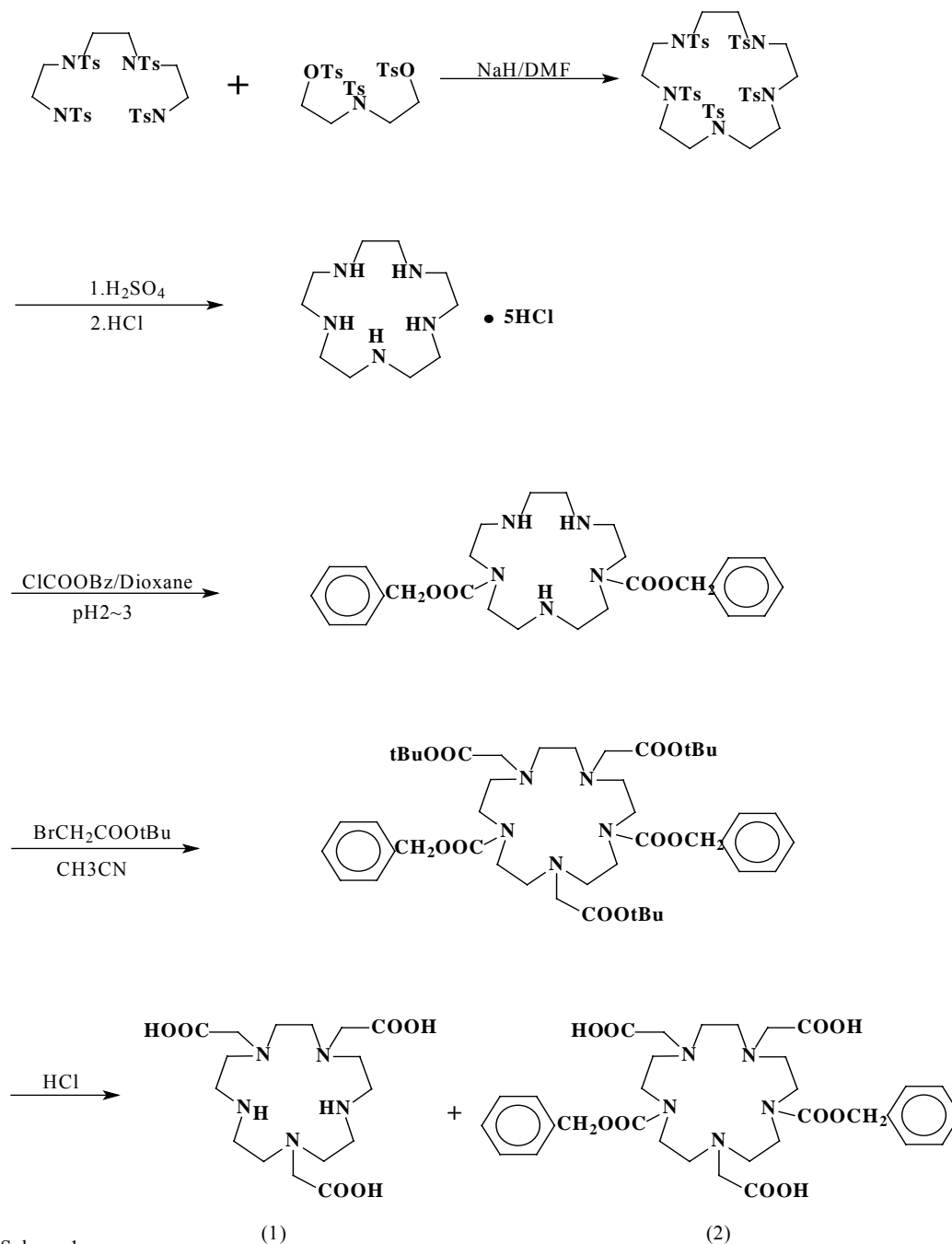
7. 已熱力動力及結構特性來了解分子機制的結果關係

8. 應用於 MRI 對比劑，分子放光探針和 DNA/RNA 切割劑

二、研究方法與過程

有機配位子的合成及結構鑑定：

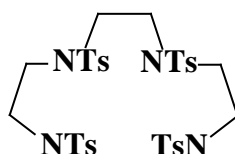
依據所提合成之構想，如 Scheme 1 所示，合成 PE3A (1,4,10,13-tricarboxymethyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclo-pentadecane) 及其衍生物等，再分別利用 IR、NMR、元素分析及 Mass 分析及鑑定其結構。DO2A、NO2A 之單體與雙體的合成則參考文獻方法合成。



Scheme 1

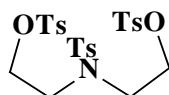
三、主要發現與結論

1. NN'N''N'''-Tetratosyltriethyltetraamine C₆H₁₄N₄Ts₄ 的製備 (MW=763):



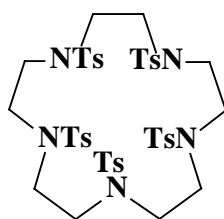
- a. 取 29.24 克 (0.2mol) 之 triethyltetraamine (MW=146.2) 加入 200ml 之 NaOH 溶液中 (含 NaOH 0.8mol)
- b. 再取 0.8mol (152.8g) 之對甲苯硫醯氯 (tosylchloride TsCl) 溶於 600ml EtOH 中
- c. 冰浴下將 a 液於 3~4 小時內逐滴加入 b 液中並強力攪拌，加完後再反應一小時，過濾沉澱物，將沉澱物分散於 400ml 乙醇中，並 reflux 1 小時後過濾之，已熱乙醇沖洗可得白色固體 (產率 60±10%)，固體熔點 214°C，其 ¹H 和 ¹³C-NMR 結果如 figure8，figure9。

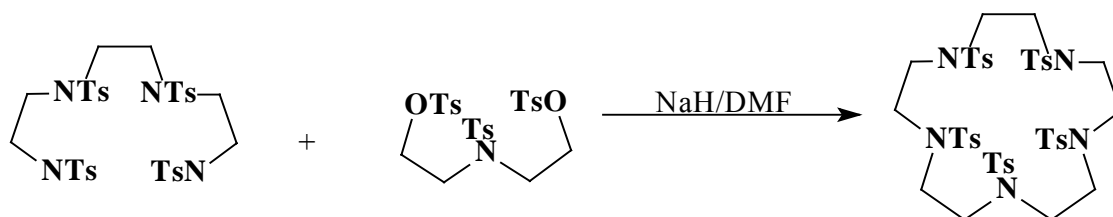
2. NOO'-Tritosyl-diethanolamine C₄H₈NO₂Ts₃ 的製備 (MW=564.6):



- a. 取 20.4 克 (0.2mol) 之 diethanolamine 加入 200ml 之 triethylamine 溶液中
- b. 再取 0.6mol (114.4g) 之對甲苯硫醯氯 (tosylchloride TsCl) 溶於 600ml Et₂O 中
- c. 在開放狀態下將 a 液逐滴加入 b 液中並強力攪拌，加完後再反應一小時，加入水以溶去未反應之物質，過濾白色沉澱物，將沉澱物以少量乙醇中做再結晶，可得白色結晶 (產率約 60%)，固體熔點 98°C。

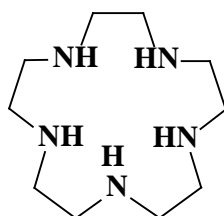
3. 合環：合成 1,4,7,10,13-pentatosyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclo-pentadecane (5N15ane。5Ts) (MW=986)





- 取 $C_6H_{14}N_4Ts_4$ 7.63 克 (0.01mol) 溶於無水的 DMF 100ml 中，再取 3.2 克 NaH (60%) 約 0.08mol 分次於 20 分鐘加入上述溶液中，加完後攪拌 4 小時，N2 下過濾，將濾液 (淡黃色) 加熱至 $110^\circ C$
- 取 5.64 克 $C_4H_8NO_2Ts_3$ 溶於 50ml DMF 中，並將此溶液逐滴加入上述溶液中 (a 液)，反應 4 小時
- 反應後溶液濃縮至約 100ml，再逐滴加入 500ml 之水中產生白色沉澱，抽濾水洗後改溶於 $CHCl_3$ 中，加入 Na_2SO_4 靜置 overnight。
- 過濾後濃縮至約 50ml 產生沉澱，分別以 $CHCl_3$ 、EtOH 洗之，得白色沉澱 (產率 $50\pm 10\%$) $mp=280^\circ C$ ，其 1H 和 ^{13}C -NMR 結果如 figure10, figure11。

4. 水解 (DeTosyl): 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane (5N15ane) 的製備

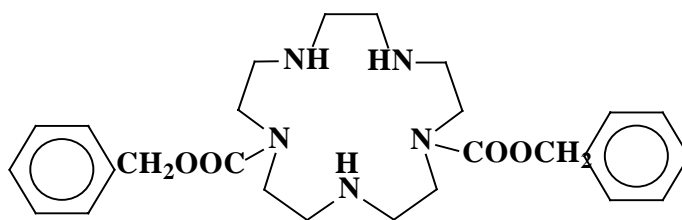


取 5N15ane。5Ts 5 克加入約 20ml H_2SO_4 (96%) 在 $110\sim 120^\circ C$ 下 reflux 72 小時，在冰浴下加入 60ml 乙醇，產生灰色沉澱，用玻璃濾片抽濾後，濾物溶於 150ml 水中，加入 3 大匙活性碳過濾得澄清液，然後加入碳酸鋇產生沉澱 (硫酸鋇) 及氣泡 (CO_2)，過濾後加入 12N HCl 60ml，將溶液濃縮至約 50ml，以乙醇再結晶得晶體 (產率約 70%)，其 1H 和 ^{13}C -NMR 結果如 figure12, figure13。

5. Protection :

1,7-bis (benzylcarboxyl) -1,4,7,10,13- pentaazacyclopentadecane (PE2P) 的

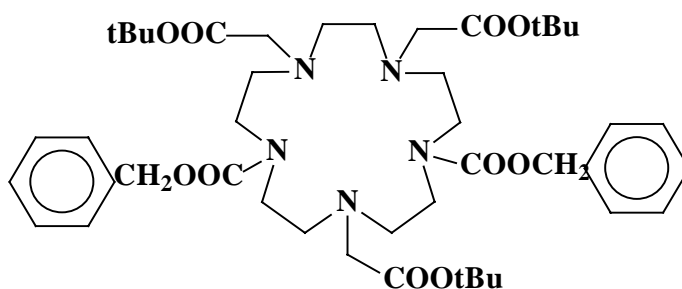
製備



- 將 1.3 克 5N15ane · 5HCl 溶於 6ml 水中並以 2N NaOH 調至 pH=3，加入 5ml Dioxane
- 將 1.328 克 benzyl chloroformate 溶於 5ml Dioxane，控制 pH=2~3（以 2N NaOH 及 6N HCl 控制）以非常慢的速度逐滴加入 a 液中（約 5 小時），過程中需隨時注意 pH=2~3
- 減壓抽去 Dioxane 再加入 25ml 水並濾去沉澱物（5-protect product），
- 抽乾濾液，用 6.45ml NaOH（20%）溶解之，再以 20ml×4 乙醚萃取，再用 5% NaOH 5ml ×3，然後 5ml 水洗，最後之乙醚溶液抽乾即得 2-protect 之稠狀物（產率約 37%），其 ¹H 和 ¹³C-NMR 結果如 figure14，figure15。

6. Alkylation :

1,7-bis (benzylcarboxyl) -4,10,13-tris (t-butylcarboxymethyl) -1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane PE2P3 (t-Bu) 的製備



- 取 0.58 克 PE2P 溶於 CH₃CN 15ml 中再加入 0.5 g diisopropylthylamine (in 5ml CH₃CN) 再加入 0.725g BrCOO (t-Bu) (in 5ml CH₃CN)，40°C 下攪拌 14 小時，然後升溫至 60°C 再攪拌 8 小時
- 抽乾溶液，加入 20ml 乙醚及 10ml 水，取乙醚層再以 H₂O 10ml×2 然後用 5% NaOH 7.5ml 再以 H₂O 10ml×2 分別洗之，然後以 Na₂SO₄ 乾燥，溶液可用 Al₂O₃ 管柱純化，其 ¹H 和 ¹³C-NMR 結果如 figure16，figure17。

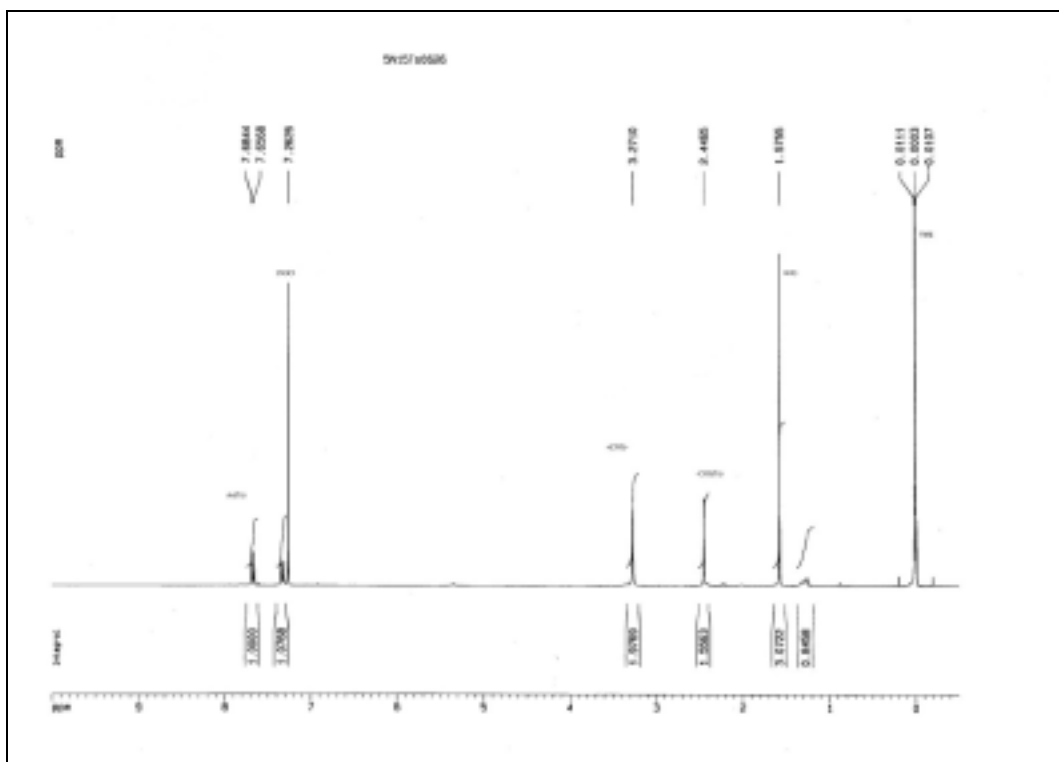


Figure 10 1,4,7,10,13-pentatosyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclo-pentadecane $^1\text{H-NMR}$

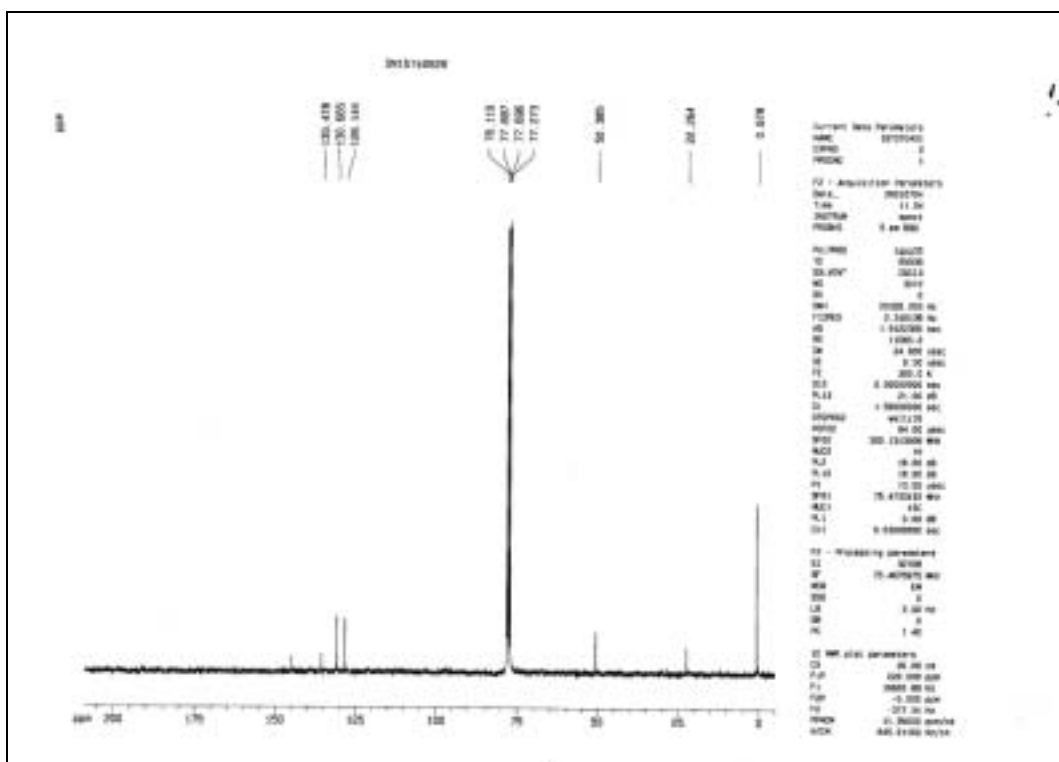


Figure 11 1,4,7,10,13-pentatosyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclo-pentadecane $^{13}\text{C-NMR}$

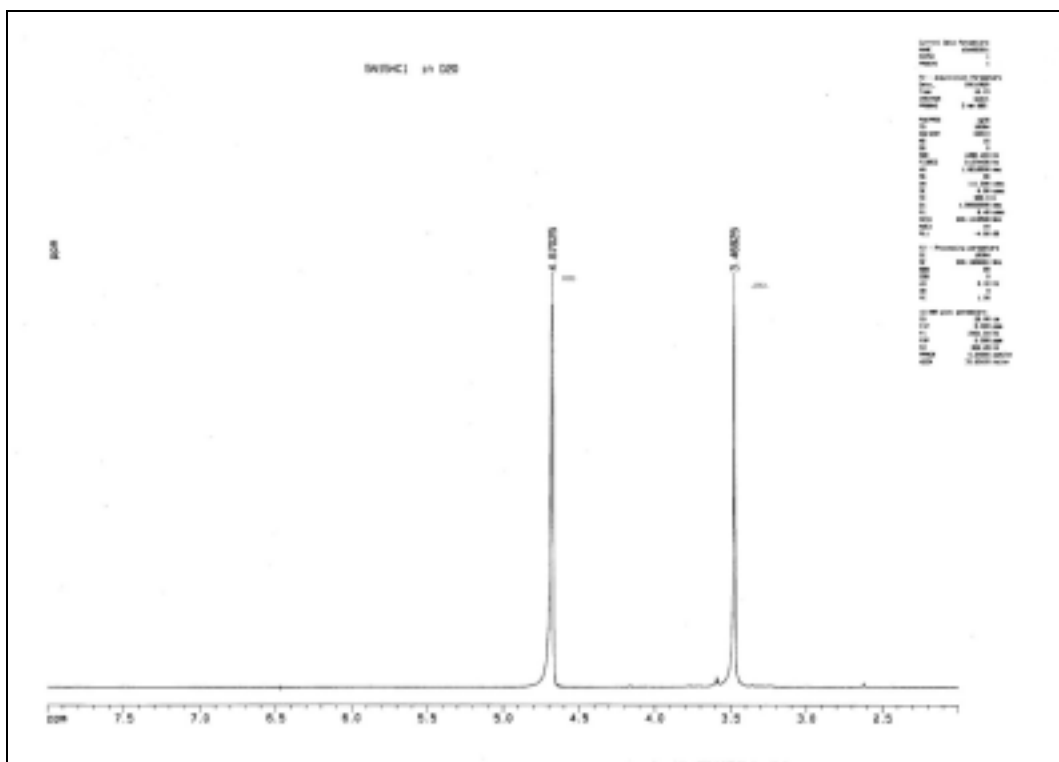


Figure 12 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane $^1\text{H-NMR}$

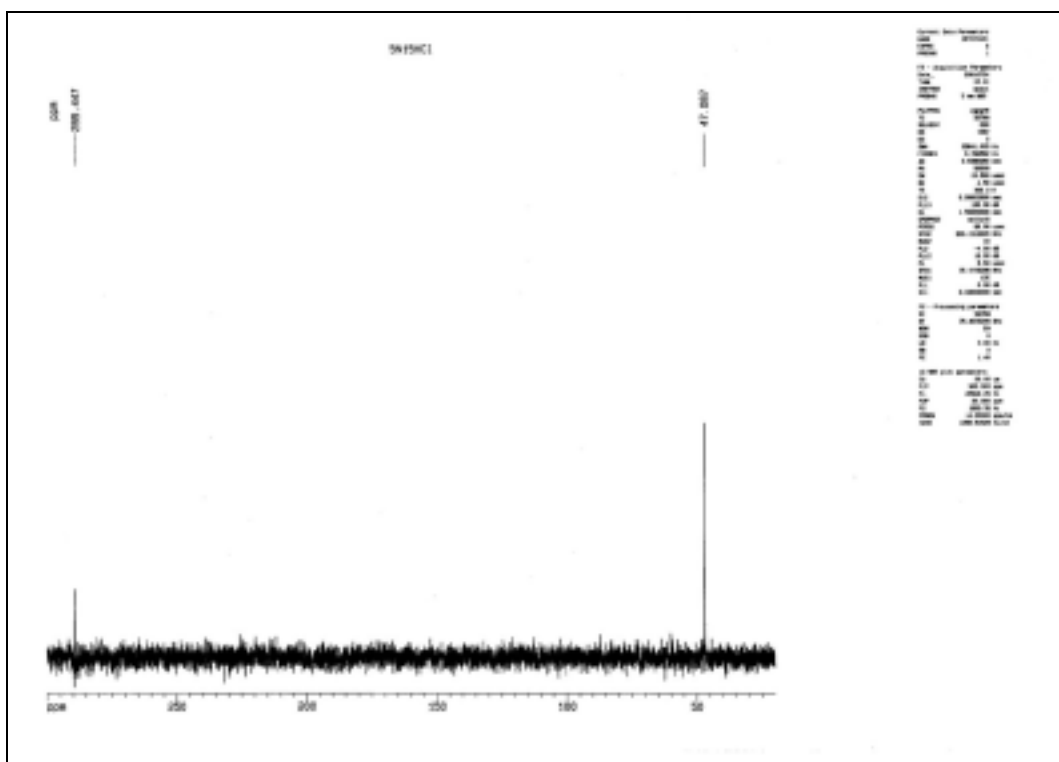


Figure 13 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane $^{13}\text{C-NMR}$

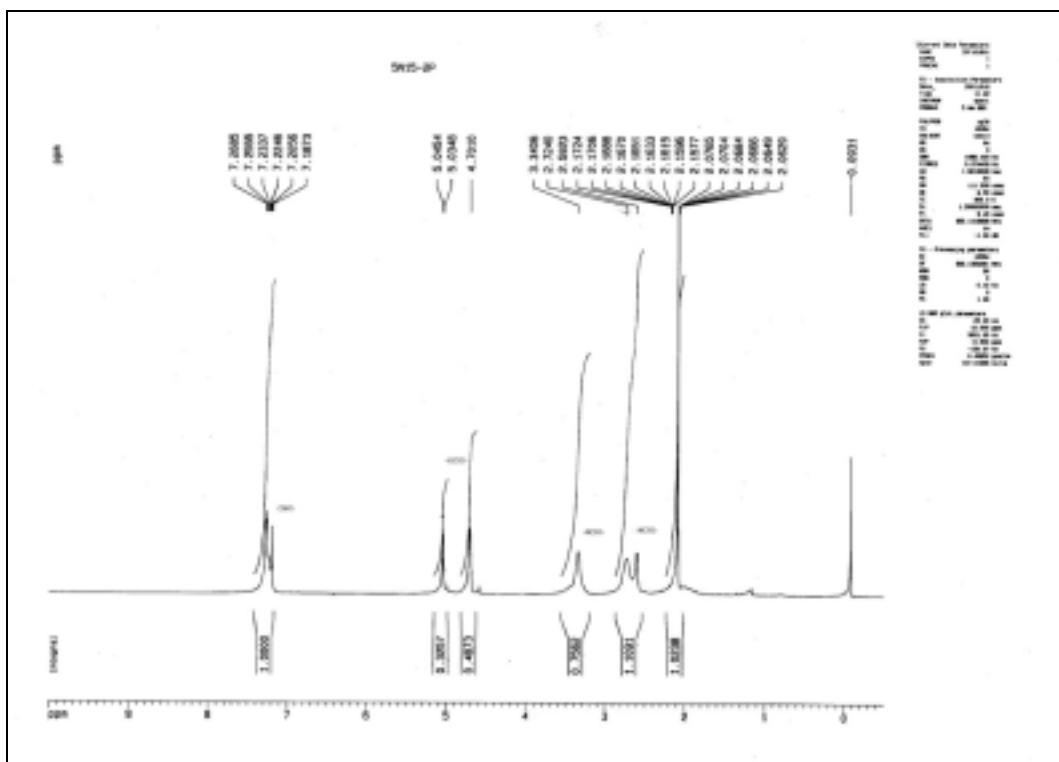


Figure 14 1,7-bis (benzylcarboxyl) -1,4,7,10,13- pentaazacyclopentadecane $^1\text{H-NMR}$

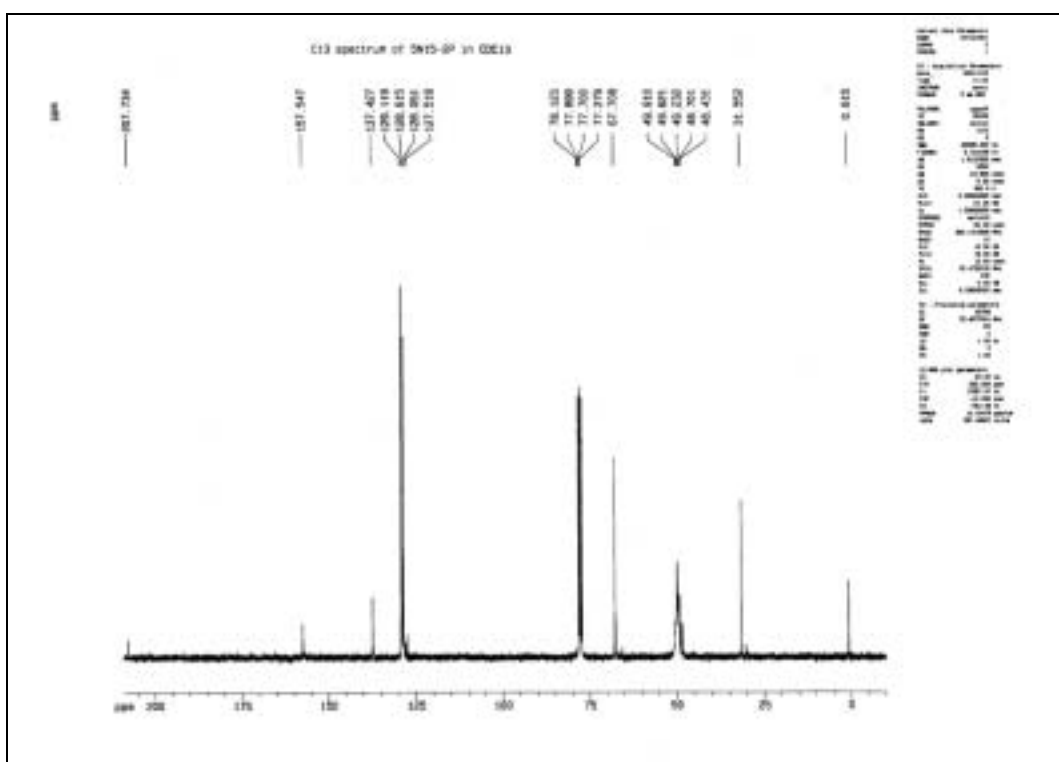


Figure 15 1,7-bis (benzylcarboxyl) -1,4,7,10,13- pentaazacyclopentadecane $^{13}\text{C-NMR}$

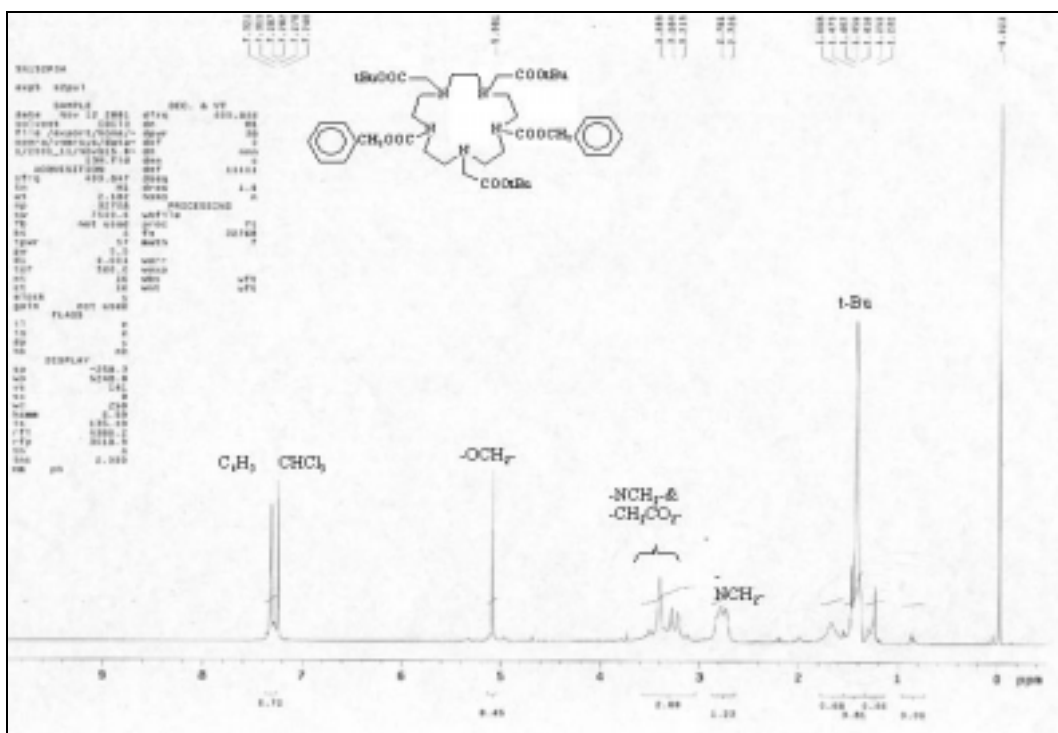


Figure 16 1,7-bis (benzylcarboxyl) -4,10,13-tris (t-butylcarboxymethyl) -1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane¹H-NMR

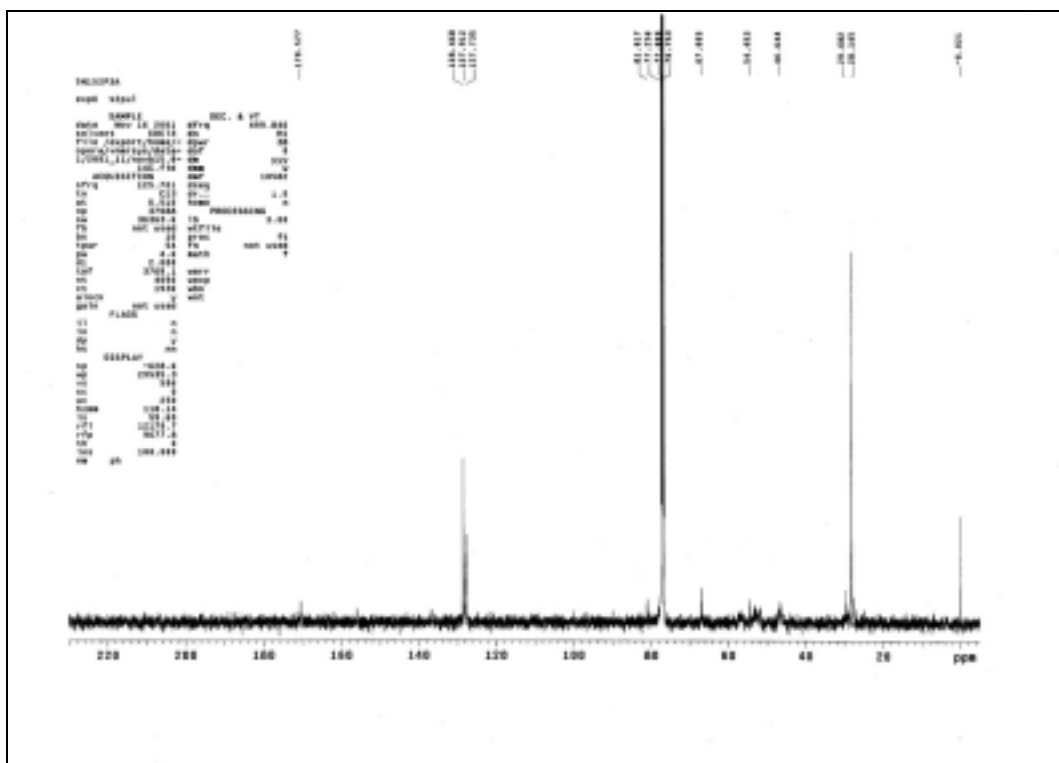


Figure 17 1,7-bis (benzylcarboxyl) -4,10,13-tris (t-butylcarboxymethyl) -1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane¹³C-NMR

7. 原本預期得到的產物 PE3A (1,4,10, -tricarboxymethyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane) 與 PE2P3A(1,7-bis (benzylcarboxyl) -4,10,13-tricarboxymethyl-1,4,7,10,13- pentaazacyclopentadecane)是種新型的大環配位子，在實驗過程中我們發現 PE3A 的合成最後的水解步驟發生了醯化合環現象，以至於未能得到最後得產物，所以我們後續的實驗除了鑑定前一步的產物 PE2P3A(t-Bu)外，找尋新的水解條件以及進一步合成出雙體配位子，並探討比較其熱力學與動力學之性質，都是我們未來的研究重點。

四、參考文獻

1. Peter Caravan , Normand J. Cloutier , Matthew T. Greenfield , Sarah A. McDermid , Stephen U. Dunham , Jeff W. M. Bulte , John C. Amedio , Jr., Richard J. Looby , Ronald M. Supkowski , William DeW. Horrocks , Jr., Thomas J. McMurry , and Randall B. Lauffer , *J.Am.Chem.Soc* ,**2002**, 124 ,3152-3162.
2. P. Caravan , C. Comuzzi,, W. Crooks, T. J. McMurry, G. R. Choppin, and S. R. Woulfe *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2170-2176
3. H. Schmitt-Willich, M. Brehm, Ch. L. J. Ewers, G. Michl, A. Müller-Fahrnow, O. Petrov, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1413-1414
4. . Hancock, R. D.; Martell, A. E. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1875
5. . Hou, Z.; Sunderland, C. J.; Nishio, T.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5148-5149
6. Brechbiel, M. W.; Gansow, O. A.; Pippin, C. G.; Rogers, R. D.; Planalp, R. P. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6343-6348
7. Wu, S. L.; Horrocks, W. D. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3724-3732
8. Kumar, K.; Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Dischino, D. D.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 3567-3575
9. . Kodama, M.; Koike, T.; Mahatma, B.; Kimura, E. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 1270-1273
10. Kumar, K.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 4193-4199
11. Toth, E.; Brucher, E.; Lazar, I.; Toth, I. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4070-4076
12. Nyssen, G. A.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 1814-1820
13. Chang, C. A.; Liu, Y. L. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 1001-1006
14. Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Malley, M. F.; Kumar, K.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F.; Lee, D. W.; Wilson, L. J. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3501-3508.
15. Spirlet, M.-R.; Rebizant, J.; Desreux, J. F.; Loncin, M.-F. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 359-363

16. Maurya, M. R.; Zaluzec, E. J.; Pavkovic, S. F.; Herlinger, A. W. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3657-3662
17. Spirlet, M.-R.; Rebizant, J.; Loncin, M.-F.; Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4278-4283
18. Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 1319-1324
19. Desreux, J. F.; Loncin, M. F. *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 69-74
20. Jacques, V.; Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4048-4053
21. Fossheim, R.; Dahl, S. D. *Acta Chem. Scand.* **1990**, *44*, 698-706
22. C. Allen Chang, Yuh-Liang Liu, Chang-Yuh Chen, and Xiu-Mei Chou *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3448 -3455
23. Peter Caravan, , Andrei V. Astashkin, and Arnold M. Raitsimring *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3972-3974