

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

放射醣質藥物之生物研究  
**Biological study of radiogalactosic drugs**

計畫編號：1002001INER089

受委託機關(構)：國立陽明大學

計畫主持人：王信二、劉仁賢、陳傳霖

核研所聯絡人員：陳振宗、林武智

聯絡電話：02-28267215

E-mail address：[hewang@ym.edu.tw](mailto:hewang@ym.edu.tw)

報告日期：2011.11.28

Chuan-Lin Chen<sup>a</sup>, Wen-Yi Chang<sup>a</sup>, Hao-Wen Kao<sup>a</sup>, Jenn-Tzong Chen<sup>b</sup>,  
Wuu-Jyh Lin<sup>b</sup>, Ren-Shyan Liu<sup>c, d</sup>, Shyh-Jen Wang<sup>e</sup> and Hsin-ElI Wang<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biomedical Imaging and Radiological Sciences, National  
Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

<sup>b</sup>Institute of Nuclear Energy Research, Department of isotope application,  
Taoyuan, Taiwan

<sup>c</sup>Department of Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

<sup>d</sup>National PET/Cyclotron Center, Veterans General Hospital, Taipei,  
Taiwan

<sup>e</sup>Department of Nuclear Medicine, Taipei Veterans General Hospital,  
Taipei, Taiwan

## 目 錄

中文摘要 .....	1
ABSTRACT .....	2
壹、計畫緣起與目的 .....	3
貳、研究方法與過程 .....	6
一、合成鎔-99M 單、雙半乳衍生物前趨物 .....	6
二、合成鎔-99M 標誌單、雙半乳糖衍生物 .....	11
三、動物模式 .....	12
四、生物分布 .....	13
五、MICROSPECT 造影 .....	13
參、主要發現與結論 .....	15
肆、參考文獻 .....	19

## 中文摘要

衛生署統計 1986 年至今，慢性肝病、肝硬化居國人十大死因第六位。肝硬化始於肝纖維化，肝纖維化造成亞醣蛋白受體減少，逐漸嚴重後演變為肝硬化，因此肝纖維化之早期診斷有助於預防肝臟疾病。本研究成功建立經多步驟合成單、雙半乳糖衍生物(總合成產率分別為 14.3% 及 7.3%)，並標幟鎔-99m 成為核醫造影劑  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  與  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  (放射化學純度 >98%)，於正常及肝纖維化小鼠進行 microSPECT 造像及生物分布研究，評估其做為亞醣蛋白受體定量探針之潛力。結果顯示，靜脈注  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  與  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ，5 分鐘後肝組織有顯著的放射活性積聚，並經由肝膽及泌尿系統快速排除，且雙半乳糖衍生物之代謝較單半乳糖衍生物快速。

## **Abstract**

The annual report issued by National Health Administration reveals that the chronic liver diseases and cirrhosis ranks sixth in the cancer casualties since 1986. A syndrome of liver fibrosis appeared in the beginning, resulted in decreasing of asialoglycoprotein receptor, becoming worse and worse, and finally the liver cirrhosis is developed. Early detection of liver fibrosis will certainly benefit the prevention of the liver diseases. In this study, the monomer and dimer galactose derivatives ( $^{99m}\text{Tc-MGal}$  and  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ) were successfully prepared via a multi-step synthesis (total synthesis yield of precursor were 14.3% and 7.3%, respectively; the radiochemical purities were >98%). Dynamic microSPECT imaging and biodistribution of  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  and  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  after injection in mouse model indicated significant radioactivity retention in the liver and then rapidly excreted via hepatobiliary system and renal clearance. The differences in the metabolism of  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  and  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  in the liver are significant ( $p < 0.05$ ).

## 壹、計畫緣起與目的

根據衛生署 99 年死因統計報告指出，慢性肝病及肝硬化位居國人十大死亡原因中第八位，而肝癌則常居國內十大癌症死亡原因的第一或第二位，因此肝臟的健康對於國人生命保障有其迫切的重要性。肝硬化的形成通常經由肝臟慢性發炎或損傷造成肝臟不斷經歷重複性的修復工作，而開始形成肝纖維化，並隨纖維化越趨嚴重，最後演變為肝硬化，因此肝硬化為嚴重的肝纖維化表現，一旦自肝臟纖維化轉為肝硬化則成為不可逆病程(1, 2)。感染 B 型或 C 型肝炎之患者，或患有糖尿病、過分飲酒、過胖或長期服用藥物的人士，都為罹患肝硬化之高危險群(3)，若病情惡化，更可引致肝癌和肝衰竭，因此早期發現肝纖維化病灶，對於肝臟疾病的預防有極為重要的意義。

活體組織切片檢驗方式至今仍為評估肝臟疾病診斷之標準，然此種檢驗方式具侵入式，並無法排除組織採樣錯誤之風險，因此開發非侵入式之診斷方法為現今各領域之研究團隊積極發展目標。在分子影像的發展中，正子斷層造影(PET)及單光子射出電腦斷層掃描(SPECT)為功能性診斷之利器(4, 5)，且近年來硬體設備的開發融合斷層掃描(CT)或核磁共振(MRI)之影像，增進PET或SPECT於解剖位置上的解析度，因此開發PET或SPECT探針頗具

非侵入式評估肝臟疾病程度之潛力(6, 7)。

過去研究發現，肝細胞表面上具有多量的亞醣蛋白受體 (asialoglycoprotein receptor, ASGP-R) 分佈，雖然其生理功能尚未被完畢闡述說明，研究顯示在血液中 ASGP 濃度與肝細胞上的 ASGP 受體數量可能與血液中的醣蛋白代謝機制有關，且此受體在肝細胞表面分佈之多寡也反映血液中醣蛋白的含量，並與肝功能具相關性，ASGP 受體的減少亦反映病人肝纖維化之程度嚴重(8)。自 1980 年代核醫學診斷已開發出以白蛋白(albumin)做為基礎修飾半乳糖或半乳糖醯氨等片段的單光子放射造影探針  $^{99m}\text{Tc}$ -diethylenetriaminepentaacetic acid galactosyl neoglycoalbumin ( $^{99m}\text{Tc}$ -NGA) (9-11) 與  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled diethylenetriaminepentaacetic acid-galactosyl-human serum albumin ( $^{99m}\text{Tc}$ -GSA) (12)，利用半乳糖或半乳糖醯氨等片段能特異性結合於肝細胞表現亞醣蛋白受體 (ASGP-R) 之特性，再經內吞作用代謝，這類探針在肝臟的最大移除速率可反映肝臟中亞醣蛋白受體的總量及表現，進而能評估肝臟功能。雖然部分文獻指出在老鼠模式或人體試驗中可偵測到 GSA 或 NGA 與 ASGP-R 的結合程度與肝硬化有相關性(12)，且在對於肝臟移植手術成功與否之評估可提供具診斷價值之訊息(13)，但在施予  $^{99m}\text{Tc}$ -NGA 或  $^{99m}\text{Tc}$ -GSA 前先給予 NGA 或 GSA 前處理之

動物模式實驗中顯示，一旦大多數亞醣蛋白受體被NGA或GSA占據，具結合能力之受體數量降低(似肝纖維化之徵狀)，將造成<sup>99m</sup>Tc-NGA或<sup>99m</sup>Tc-GSA較長時間循環於血液系統，且albumin製劑體內穩定度佳，結果反而會造成肝臟影像模糊，並因血液之活性積聚干擾定量計算。

本計劃開發合成鎔-99m標幟單、雙半乳糖衍生物，並標幟鎔-99m成為核醫造影劑<sup>99m</sup>Tc-MGal和<sup>99m</sup>Tc-DGal，具血清高穩定度且於活體內可快速達到藥物動力學平衡，藉由半乳糖與肝細胞亞醣蛋白受體的高親和性結合，其他正常組織的非特異性積聚可於短時間內經由泌尿系統清除，得到較低背景的核醫影像。再以化學藥物(dimethylnitrosamine, DMN)誘發建立小鼠纖維化動物模式，經由非侵入式造影及影像定量分析，有效且準確的評估正常及纖維化肝臟的差異，可提供國內研究肝臟疾病治療之新藥開發評估之平台。



## 貳、研究方法與過程

### 一、合成鎔-99m 單、雙半乳衍生物前趨物

#### (一) 合成 *S*-(Trityl)cysteamine (1)

取 cysteamine hydrochloride (4 g, 0.05 mole) 溶於 dichloromethane 和 dimethylformamide (1:1, 200 mL) 混合液中，加入 trityl chloride (14.5 g, 0.052 mole)，於室溫攪拌 2 h，待反應完成以真空系統抽乾，粗產物溶於 dichloromethane (500 mL) 以過飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (250 mL) 萃取、過濾並抽乾，再經 flash chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 9:1) 純化得 15.28 g，產率 92%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38-7.13 (m, 15H, Tr), 2.62 (t, 2H, S-CH<sub>2</sub>), 2.34 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N)

#### (二) 合成化合物(2)

取一圓底燒瓶 A 將 bromoacetyl chloride (1.17 mL, 14.08 mmol) 溶於 dichloromethane (20 mL) 中，另取一圓底燒瓶 B 將 compound 1 (4.5 g, 14.08 mmol) 溶於含 triethylamine (3 mL, 12.5 mmol) 之 dichloromethane (45 mL) 中，於 0°C 將圓底燒瓶 B 之溶液加入圓底燒瓶 A 中反應 15 min 回溫至室溫再反應 15 min，反應完成加入 80 mL 的水終止反應，依序將有機層以 1 N 之 HCl、水、過飽和

NaHCO<sub>3</sub> 水溶液及過飽和食鹽水萃取，將有機層除水、過濾並抽乾，粗產物經 flash chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 9:1) 純化可得化合物 5.5g，產率 90%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 7.42-7.18 (m, 15H, Tr), 3.9 (s, 2H), 3.10 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.41 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>)

### (三) 合成化合物(3)

將化合物 **1** (4.5g, 10.08 mmole) 溶於 acetonitrile (200 mL) 後依序加入 methyl 3-bromopropionate (2309 mg, 10.08 mmole)、KHCO<sub>3</sub> (680 mg) 和 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (680 mg)，於 80°C 反應 12 h，待反應完成將反應液降至室溫並過濾抽乾，粗產物經 flash chromatography (ethyl acetate/hexane, 1:10) 純化可得化合物 **3** (2.82 g，產率 60%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) d 7.92 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz, Ph), 7.38-7.15 (m, 17H, Ph), 3.87 (s, 3H, OMe), 3.59 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 2.36 (s, 4H, CH<sub>2</sub>)

### (四) 合成化合物(4)

將化合物 **3** (1.55 g, 3.314 mmole) 溶於 acetonitrile (30 mL) 後依序加入化合物 **2** (1.5 eq, 2.18 g)、KHCO<sub>3</sub> (220 mg) 和 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (220 mg)，於 80°C 反應 12 h，待反應完成將反應液降至室溫並過濾抽乾，粗產物經 chromatography (ethyl acetate/hexane, 1:2) 純化可得化合物

**4** (2.1 g, 產率 76%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) δ 7.84 (d, 2H, *J* = 8 Hz, Ph), 7.41-7.15 (m, 32H, Ph), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.49 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 2.91 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C=O), 2.42-2.26 (m, 6H, CH<sub>2</sub>)

#### (五) 合成化合物**5**

將化合物 **4** (3 g, 3.6 mmole) 溶於 methanol (30 mL)、水(20 mL)和 tetrahydrofuran (30 mL) 中加入 lithium hydroxide (180 mg, 7.5 mmole) 於室溫反應 6 h 移除有機層，將水層以 10% HCl 酸化至 pH 4 後再以 ethyl acetate 萃取、除水、過濾並抽乾可得化合物 **5** (2.23 g, 產率 75%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) δ 7.86 (d, 2H, *J* = 8 Hz, Ph), 7.38-7.15 (m, 32H, Ph), 3.49 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 2.90 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C=O), 2.41-2.26 (m, 6H, CH<sub>2</sub>)

#### (六) 合成化合物**6**

將化合物 **5** (1115.9 mg, 1.372 mmole)、HOBt (205 mg, 1.1eq)、DIPEA (0.7 mL, 3eq) 和已建立單糖前驅物 6-amino-1-hexyl-galactopyranoside (460 mg, 1.647 mmole) 溶於 dimethylformamide (8.5 mL)，於 0°C 反應 15 min 後加入 EDC (289.5 mg, 1.1eq)，室溫下反應 18 h 後抽乾，以 flash chromatography (dichloromethane

/methanol, 10:1)純化可得化合物 **6** (500 mg, 產率 34%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) δ 7.68 (d, 2H, Ph), 7.36-7.14 (m, 32H, Ph), 4.19 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.87 (m, 1H, H-1a), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.72 (m, 2H, H-6'), 3.54-3.42 (m, 6H, H-1b, Ph-CH<sub>2</sub>, H-2', H-3', H-4'), 2.90 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>C=O), 2.43-2.25 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.63-1.38 (m, 8H, H-2, H-3, H-4, H-5)

#### (七) 合成化合物(**7a**)

化合物 **7** (360 mg, 0.34 mmol)溶於 methanol (23 mL)與 tetrahydrofuran (3.3 mL)之混和液中，依序加入 tin(II) chloride (1.1eq, 147 mg 溶於 1mL 之 0.1 M HCl)、sodium perrhenate (200 mg 溶於 1 mL H<sub>2</sub>O)，於 66 °C 反應 24 h 後經 celite 過濾並抽乾，粗產物以 reverse-phase silica gel column (methanol/H<sub>2</sub>O = 1:4 → methanol/H<sub>2</sub>O = 2:3)純化可得化合物 **7a** (50 mg, 產率 20%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-DMSO) δ 8.54 (br, 1H, NH), 7.91-7.77 (m, 4H, Ph), 5.31 (d, 1H, H-14a), 5.08 (d, 1H, H-17a), 4.76 (d, 1H, H-17b), 4.66, 4.57 (s, 1H, OH), 4.42 (m, 2H, H-6), 4.33 (s, 1H, OH), 4.02 (m, 3H, H-1', H-1a, H-16a), 3.86 (m, 1H, H-19a), 3.70 (m, 2H, H-5', H-14b), 3.6-3.14 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-1b, H-16b, H-15a, H-20), 3.03-2.87 (m, 4H, H-6', H-19b, H-15b), 1.51~1.32 (m, 8H,

H-2, H-3, H-4, H-5)

(八) 合成化合物(8)

此步驟與合成化合物 6 相仿，惟反應完成後將反應液抽乾，以 ethyl acetate 溶解並依序以 2N HCl、過飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液及過飽和食鹽水萃取、除水、過濾並抽乾則可得產物 9 (978.4 mg, 產率 82%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) d 7.7 (d, 2H, *J* = 4.4 Hz, Ph), 7.37-7.15 (m, 32H, Ph), 4.64 (m, 1H, H-a), 3.71, 3.60 (s, 6H, OMe), 3.49 (s, 2H, Ph-CH<sup>2</sup>), 2.92-2.84 (m, 4H, mama), 2.48-2.06 (m, 10H, glu-CH<sub>2</sub>, mama)

(九) 合成化合物(9)

此步驟與合成化合物 5 相仿，化合物 9 產率為 71% (688.9 mg)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) d 7.73 (d, 2H, *J* = 8 Hz, Ph), 7.39-7.15 (m, 32H, Ph), 4.63 (dd, 1H, H-a), 3.52 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 2.98-2.81 (m, 4H, mama), 2.47-2.05 (m, 10H, glu-CH<sub>2</sub>, mama)

(十) 合成化合物(10)

此步驟與合成化合物 6 相仿，惟反應時間延長為 30 h，以 flash chromatography (dichloromethane /methanol, 10:1) 純化可得化合物 10 (232.9 mg, 產率 30%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) d 7.81 (d,

2H, Ph), 7.48-7.15 (m, 32H, Ph), 4.5 (dt, 1H, glu-Ha), 4.2 (d, 2H, H-1', 7'), 3.89-3.82 (m, 4H, H-1a, 17a, 5', 11'), 3.73 (d, 4H, H-6', 12'), 3.55-3.45 (m, 8H, H-1b, 17b, 2', 3', 4', 8', 9', 10'), 3.32 (s, 2H, H-25), 3.22-3.11 (dt, 4H, H-6, 12), 2.93-2.90 (t, 2H, H-30), 2.85 (s, 2H, H-28), 2.44-2.08 (m, 10H, H-8, 9, 26, 27, 31), 1.68-1.25 (m, 16H, H-2, 3, 4, 5, 13, 14, 15, 16)

#### (十一) 合成化合物(**11a**)

此步驟與合成化合物 **7a** 相仿，粗產物以 reverse-phase silica gel column (methanol/H<sub>2</sub>O = 1:1 → methanol/H<sub>2</sub>O = 3:1) 純化可得化合物 **11a** (90 mg, 產率 50%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*-MeOH) δ 8.03-7.77 (m, 4H, Ph), 5.41 (d, 1H, *J* = 16 Hz, H-24a), 5.21 (d, 1H, *J* = 14 Hz, H-27a), 4.85 (m, 1H, H-27b), 4.58-4.48 (m, 3H, H-6a, H-12a, H-a), 4.20-4.17 (m, 2H, H-1', H-7'), 4.04-4.02 (m, 1H, H-29a), 3.91-3.69 (m, 7H, H-5', H-11', H-25a, H-24b, H-26a, H-1a, H-17a), 3.55-3.43 (m, 9H, H-2', H-3', H-4', H-8', H-9', H-10', H-1b, H-17b, H-26b), 3.23-2.90 (m, 10H, H-6', H-12', H-6b, H-12b, H-25b, H-29b, H-30a, H-30b), 2.39-2.09 (m, 4H, H-8, H-9), 1.65-1.28 (m, 16H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-13, H-14, H-15, H-16)

#### 二、合成鎔-99m 標誌單、雙半乳糖衍生物(**7b**、**11b**)

鎔-99m 放射化學標誌方式如 scheme 1 所示。將標誌前驅物 **6** (1 mg) 和 **10** (2 mg) 以 200  $\mu$ L 三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA) 除去保護基，減壓抽乾後加入酒石酸鉀鈉(potassium sodium tartrate tetrahydrate, 50  $\mu$ L, 0.14 M) 及 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 50  $\mu$ L, 0.1 M) 做為弱結合配位子，與經氯化亞錫( $\text{SnCl}_2$ ) 還原產生之還原態鎔-99m 反應得到  $^{99\text{m}}\text{Tc-MGal}$  和  $^{99\text{m}}\text{Tc-DGal}$ 。以高壓液相管柱層析(high-performance liquid chromatography, HPLC) 純化，RP-C18 管柱(Hibar Purospher STAR, RP-18e, 250  $\times$  10 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Germany)，採線性梯度程式沖提(gradient elution)，0 分鐘：90% 0.1% TFA buffer + 10% 0.1% TFA in acetonitrile，25 分鐘：10% 0.1% TFA buffer + 90% 0.1% TFA in acetonitrile，30 分鐘：10% 0.1% TFA buffer + 90% 0.1% TFA in acetonitrile，流速 3 mL/min。純化前後以放射薄層(Silica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S aluminium sheets) 分析放射化學純度，移動相為 100% 生理食鹽水或甲醇。

### 三、動物模式

經由注射二甲基亞硝胺(dimethylnitrosamine, DMN) 誘發肝纖維化動物模式。由國家動物中心購得十二隻 C57BL6 (B6) 小鼠(公，6~8 周)，隨機將實驗動物分為兩組，一組六隻。實驗組於每周連續

三天經腹腔注射劑量為 10 mg/kg 之二甲基亞硝酸胺(DMN, 以 0.9%之生理食鹽水稀釋至濃度為 10 mg/mL), 共給藥四週; 控制組則施予等體積之生理食鹽水。誘發肝纖維化期間, 實驗動物飼養於可自由取得食物及水之飼養盒。

#### 四、 生物分布

使用重約 25 g C57BL6 小鼠, 隨機分為四組, 其中二組經四周共 12 劑二甲基亞硝酸胺(DMN)注射誘發肝纖維化, 另二組為正常小鼠, 各三個時間點 (n = 5), 分別經尾靜脈注射  $^{99m}\text{Tc}$ -MGal 及  $^{99m}\text{Tc}$ -DGal, 第一組: 正常小鼠施予  $^{99m}\text{Tc}$ -MGal (MN group); 第二組: 正常小鼠施予  $^{99m}\text{Tc}$ -DGal (DN group); 第三組: 纖維化小鼠施予  $^{99m}\text{Tc}$ -MGal (MF group); 第四組: 纖維化小鼠施予  $^{99m}\text{Tc}$ -DGal (DF group)。注射後 5、30 及 120 分鐘後斷頸犧牲小鼠, 採集各器官包含血液、心臟、肺臟、胃、小腸、大腸、脾臟、胰臟、肌肉、骨骼、腎臟、肝臟、膽汁、尿液及糞便, 並以  $\gamma$ -counter 測量放射性, 結果以 %ID/g (percent injection dose per gram) 表示。

#### 五、 MicroSPECT 造影

將約 14.8 MBq (400  $\mu\text{Ci}$ )之鎝-99m 標幟單、雙半乳糖衍生物經尾靜脈注射入正常和二甲基亞硝酸胺(DMN)誘發肝纖維化小鼠



(C57BL6，公，8周，使用1% isoflurane/O<sub>2</sub> 麻醉)，隨即進行實驗動物之微單光子放射斷層掃描造影(FLEX Triumph™ preclinical PET/CT scanner)。

### 參、主要發現與結論

鎔-99m 標幟半乳糖衍生物  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  和  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  之放射化學純度大於 98 %，HPLC 分析滯留時間分別為 16.50 及 14.45 分鐘，放射化學產率經衰減校正後分別為 35 % 及 32%，總合成時間約 3 小時。

$^{99m}\text{Tc-MGal}$  與  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  於正常及纖維化小鼠生物分布試驗分別顯示，經尾靜脈注射鎔-99m 標誌單、雙半乳糖衍生物  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  和  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ，二者快速地經由與肝臟之亞醣蛋白受體結合攝取，5 分鐘後肝臟已有大量活性積聚(分別為  $41.34 \pm 3.48$  %ID/g 及  $20.18 \pm 2.38$  %ID/g)，細胞內吞後經由膽汁排入十二指腸，代謝後主要經由尿液排出體外；單半乳糖衍生物( $^{99m}\text{Tc-MGal}$ )於不同時間點的肝臟/血液比值(liver-to-blood ratio, L/B)皆顯著高於雙半乳糖衍生物( $^{99m}\text{Tc-DGal}$ )。膽汁與十二指腸的放射活性累積可代表肝臟代謝速率，其結果顯示無論是注射  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  或  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ，膽汁的總放射活性積聚均隨時間而增加( $^{99m}\text{Tc-MGal}$ ：5 分鐘  $0.72 \pm 0.37$  %ID、30 分鐘  $1.91 \pm 0.80$  %ID、120 分鐘  $2.74 \pm 1.41$  %ID； $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ：5 分鐘  $1.56 \pm 0.23$  %ID、30 分鐘  $4.65 \pm 1.44$  %ID、120 分鐘  $5.32 \pm 1.34$  %ID)，且於不同時間點之  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  活性累積皆顯著低於  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  (5 分鐘  $p < 0.05$ 、30 分鐘  $p < 0.01$ 、120 分鐘  $p$

<0.05)；於十二指腸則觀察到施予  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  5 分鐘後，其放射活性積聚顯著高於注射  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  者，由上述結果可推論雙半乳糖衍生物較單半乳糖衍生物有較佳之亞醣蛋白受體 (ASGP-R) 結合效果，與文獻報導雙半乳糖之親和力( $10^{-6}$  M)較單半乳糖( $10^{-3}$  M)為佳相符。

比較  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  於正常小鼠及纖維化小鼠之生物分佈，於藥物注射 5 和 30 分鐘後，纖維化小鼠於血液中的放射性積聚(分別為  $6.01 \pm 2.25$  %ID/g 與  $1.35 \pm 0.32$  %ID/g)皆顯著性高於( $p < 0.01$ )正常小鼠(分別為  $2.67 \pm 0.62$  %ID/g 與  $0.77 \pm 0.06$  %ID/g)；藥物注射 5 和 30 分鐘後肝臟特異性積聚(肝臟/血液比值，去除血液之背景值之影響)於正常小鼠顯著性高於纖維化小鼠(5 分鐘： $16.06 \pm 3.43$  與  $9.21 \pm 5.31$ ， $p < 0.05$ ；30 分鐘： $17.47 \pm 1.37$  與  $10.70 \pm 1.84$ ， $p < 0.01$ )，這些結果顯示，由於肝臟纖維化造成肝細胞上的 ASGP-R 總表現量下降，放射性藥物在肝臟的特異性積聚降低，未被受體結合之放射性示蹤劑滯留於循環系統，等待 ASGP-R 循環後再次攝取或經由排泄系統清除。

$^{99m}\text{Tc-DGal}$  於正常小鼠及纖維化小鼠之生物分佈則顯示相似於  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  之特性，包含相較於正常小鼠纖維化小鼠有較高的活性保持於血液中，肝臟特異性積聚於正常小鼠顯著性高於纖維化小

鼠，此外，藥物注射 5 和 30 分鐘後可觀察到於正常小鼠十二指腸之活性積聚(分別為 131.9 %ID/g 與 12.42 %ID/g)顯著性高於(5 和 30 分鐘分別為  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ )纖維化小鼠(分別為 32.73 %ID/g 與 8.32 %ID/g)，推測是因為正常小鼠的肝臟代謝速率較快，放射性示蹤劑經肝臟之亞糖蛋白受體結合攝取，於肝細胞中代謝後儲存於膽汁，再分泌至十二指腸所造成結果；注射後 120 分鐘正常小鼠十二指腸之活性積聚(0.50 %ID/g)低於肝纖維化小鼠(1.49 %ID/g)，應是由於正常小鼠之放射性示蹤劑大部分已代謝排出，而纖維化小鼠則因肝臟代謝速率較慢，於 120 分鐘時仍有相對較高之放射活性殘留。

1999 年 Nobumitsu 等作者於 Journal of Nuclear Medicine 所發表之文獻指出，於肝硬化病人注射以 albumin 作為基礎修飾糖基之放射性探針( $^{99m}\text{Tc-GSA}$ )，所得到之 receptor index (注射藥物 15 分鐘後圈選肝臟之 ROI 除以心臟所得之 ROI)顯著低於正常受試者。本研究開發的  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  與  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ，以肝臟/血液比值(L/B ratio)做為肝臟特異性積聚參數，亦得到肝硬化小鼠之 L/B ratio 顯著低於正常小鼠的結果。此外， $^{99m}\text{Tc-MGal}$  與  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  相較於 albumin-based  $^{99m}\text{Tc-GSA}$ ，可於活體內快速達藥物動力學平衡，快速由泌尿系統排除，僅給予受試者較低的輻射劑量，是較  $^{99m}\text{Tc-GSA}$  為佳之肝功能診斷核醫藥物探針。

於正常及肝纖維化小鼠施打鎔-99m 標幟半乳糖衍生物後的 microSPECT 動態造影，顯示注射單半乳糖衍生物  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  後藥物隨著血流分布全身，15 分鐘內影像即清楚顯示正常及纖維化之小鼠肝臟活性積聚有顯著差異；藥物注射後短時間內腸胃道積聚活性快速增加，顯示此藥物於活體內之動力學(pharmacokinetics)甚為快速，且放射性代謝物最後主要經由腎臟進入尿液排出體外；相較於  $^{99m}\text{Tc-MGal}$ ，雙半乳糖衍生物  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  於正常及誘發肝纖維化小鼠體內的藥物動力學更為快速，30 分鐘後放射活性大多積聚於膽囊、腸胃道，且已有相當數量排入尿液，肝臟之放射活性積聚已大幅降低。

本研究成功建立鎔-99m 標幟單、雙半乳糖衍生物  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  及  $^{99m}\text{Tc-DGal}$ ，並評估此二探針於活體內之分布，於正常小鼠及肝纖維化小鼠之生物分布實驗及 microSPECT/CT 造影，結果顯示  $^{99m}\text{Tc-MGal}$  及  $^{99m}\text{Tc-DGal}$  於活體內之代謝速率有顯著差異，經由非侵入式造影及圈 ROI 進行影像定量分析，可評估正常及纖維化肝臟的差異，提供國內研究肝臟疾病治療之新藥開發評估之平台。

#### 肆、参考文献

1. Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology*. Dec 30 2008;254(3):120-129.
2. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
3. Ferrell L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. *Mod Pathol*. Jun 2000;13(6):679-704.
4. Herholz K, Coope D, Jackson A. Metabolic and molecular imaging in neuro-oncology. *Lancet Neurol*. Aug 2007;6(8):711-724.
5. Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. Feb 2003;2(2):123-131.
6. Bybel B, Brunken RC, Shah SN, Wu G, Turbiner E, Neumann DR. PET and PET/CT imaging: what clinicians need to know. *Cleve Clin J Med*. Dec 2006;73(12):1075-1087.
7. Franc BL, Acton PD, Mari C, Hasegawa BH. Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *J Nucl Med*. Oct 2008;49(10):1651-1663.
8. Sawamura T, Kawasato S, Shiozaki Y, Sameshima Y, Nakada H,

- Tashiro Y. Decrease of a hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins with accumulation of serum asialoglycoproteins in galactosamine-treated rats. *Gastroenterology*. Sep 1981;81(3):527-533.
9. Stadalnik RC, Vera DR. The evolution of (99m)Tc-NGA as a clinically useful receptor-binding radiopharmaceutical. *Nucl Med Biol*. Jul 2001;28(5):499-503.
  10. Virgolini I, Muller C, Angelberger P, Hobart J, Bergmann H, Sinzinger H. Functional liver imaging with 99Tcm-galactosyl-neoglycoalbumin (NGA) in alcoholic liver cirrhosis and liver fibrosis. *Nucl Med Commun*. Jun 1991;12(6):507-517.
  11. Yang W, Mou T, Zhang X, Wang X. Synthesis and biological evaluation of (99m)Tc-DMP-NGA as a novel hepatic asialoglycoprotein receptor imaging agent. *Appl Radiat Isot*. Jan;68(1):105-109.
  12. Sasaki N, Shiomi S, Iwata Y, et al. Clinical usefulness of scintigraphy with 99mTc-galactosyl-human serum albumin for prognosis of cirrhosis of the liver. *J Nucl Med*. Oct

1999;40(10):1652-1656.

- 13.** Woodle ES, Vera DR, Stadalnik RC, Ward RE. Tc-NGA imaging in liver transplantation: preclinical studies. *Surgery*. Jul 1987;102(1):55-62.