

的な研究開発

- (2) 天然には存在しない新しい糖骨格を持つ擬似糖により新しいタイプの医薬あるいは農薬を開発する萌芽的な研究
- (3) 大きな分子量を持つ樹木状分子である dendrimer の末端に臓器や細胞を認識する糖質を持った新しい MRI 造影剤や抗がん剤や血管の塞栓剤等、特定の部位に作用する臓器・組織選択機能等を備えた医療を支える材料の研究開発
- (4) (1)～(3)に関連して新しい展開が図られた課題である糖質、バイオ関連材料、医療、光産業、生命科学、衣料、等の基礎的ないしは応用的研究開発

また、これらの研究費の支援を受けて、研究推進に寄与して頂いた多くの研究者、大学院学生や研究室の構成員の方々に感謝する。更に、研究分担者として、当該研究を平成19年度も、更に今後も研究を推進して頂ける諸先生方やそれらの研究室に所属されている方々に深謝したい。

1-8 平成19年度の研究組織に実質的に参加した特記すべき研究者

平成19年度の研究組織に明記されていないが実質的に研究に参加した特記すべき研究者は次の方々である。

- ・ 静岡大学の学内協力者

木村元彦 教授
田中康隆 准教授
戸田三津夫 准教授
小川圭介 研究員

- ・ 厚生労働科研究費による研究者

Bitragunta Siva Kumar 博士

- ・ 医療機器センターの流動研究員

Valluru Krishna Reddy 博士 (2-4の執筆担当)
Arigala Uma Ravi Sankar 博士

- ・ 医療機器センターの外国人研究者

Robert N. Muller 教授

- ・ 静岡大学イノベーション共同研究センター

於剛 博士

- ・ 静岡大学外の共同研究者

David F. Wiemer 教授 (the University of Iowa, U.S.A.)
Jeffrey D. Neighbors 博士 (the University of Iowa, U.S.A.)
Sophie Laurent 博士 (the University of Mons-Hainaut, Belgium)

これらの研究協力者の成果は、本総括研究報告書には一部のみ記載しているが、次年度の報告書には全て掲載できると思われる。御芳名を記して感謝したい。

本章の引用文献

- 1) Yu, Gang; Yamashita, Mitsuji; Aoshima, Kengo; Kobayashi, Masatsugu; Kato, Tatsunori; Kamikage, Nao; Takahashi, Masaki; Takayanagi, Hisao; Oshikawa, Tatsuo; Laurent, Sofie; Burtea, Carmen; Vander Elst, L.; Muller, Robert N.; Takehara, Yasuo; Sakahara, Harumi. **Studies on preparation and characterization of novel MRI contrast agents for targeting organs and blood vessels.** Heterocyclic Communications (2007), 13(2-3), 101-108.
- 2) Yamashita, Mitsuji; Takahashi, Masaki; Sakahara, Harumi; Takehara, Yasuo; Yu, Gang; Kato, Tatsunori; Kamikage, Nao. **Gadolinium-DTPA derivative complexes as contrast medium specific to hypervascular tumors.** PCT Int. Appl. (2006), 31pp.
- 3) Mardor, Yael; Rahav, Ofer; Zauberman, Yacov; Lidar, Zvi; Ocherashvilli, Aharon; Daniels, Dianne; Roth, Yiftach; Maier, Stephan E.; Orenstein, Arie; Ram, Zvi. **Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and magnetic resonance image monitoring.** Cancer Research (2005), 65(15), 6858-6863.
- 4) Burtea, Carmen; Laurent, Sophie; Colet, Jean-Marie; Vander Elst, Luce; Muller, Robert N. **Development of new glucosylated derivatives of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance angiography.** Investigative Radiology (2003), 38(6), 320-333.
- 5) Fu, Yan-Jun; Zhuo, Ren-Xi. **Studies on hepatocyte-targeting magnetic resonance imaging macromolecular contrast media.** Chemical Research in Chinese Universities (1997), 13(4), 336-343.
- 6) Burtea Carmen; Laurent Sophie; Colet Jean-Marie; Vander Elst Luce; Muller Robert N **Development of new glucosylated derivatives of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic for magnetic resonance angiography.** Investigative radiology (2003), 38(6), 320-33.
- 7) Takahashi, Masaki; Hara, Yusuke; Aoshima, Kengo; Kurihara, Hideo; Oshikawa, Tatsuo; Yamashita, Mitsuji. **Utilization of dendritic framework as a multivalent ligand: a functionalized gadolinium(III) carrier with glycoside cluster periphery.** Tetrahedron Letters (2000), 41(44), 8485-8488.
- 8) 三浦紀生、山下光司、尾崎伸久、阪原晴海、竹原康雄、藤江三千男「ガドリニウム化合物及びMRI造影剤」出願番号 2008-038115 出願日 平成20年2月20日
- 9) 三浦紀生、山下光司、小川圭介、阪原晴海、竹原康雄、藤江三千男「ガドリニウム錯体の製造方法」出願番号: 2008-038116 出願日 平成20年2月20日
- 10) 山下光司、高橋雅樹、阪原晴海、竹原康雄、於剛、加藤辰徳、上陰那央、押川達夫、青島堅吾「ジエチレントリアミン五酢酸誘導体、ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸誘導体の錯体及びMRI造影剤並びに富血性腫瘍特異性造影剤」国際出願番号 PCT/JP2006/304409 国際出願日 平成18年3月7日 国際公開番号 WO 2006/095745 A1 国際公開日 平成18年9月14日
- 11) 山下光司、高橋雅樹、阪原晴海、竹原康雄、押川達夫、青島堅吾 「富血性腫瘍得意性造影剤」 出願番号 特願 2005-062340 出願日 平成17年3月7日

- 12) 山下光司, 高橋雅樹, 阪原晴海, 竹原康雄, 押川達夫, 青島堅吾 「新規なデンドリマーおよび造影剤」 出願番号 特願 2003-99222 出願日 平成 15 年 4 月 2 日
公開番号 特開 2004-307356 公開日 平成 16 年 11 月 4 日
- 13) M. Yamashita, T. Niimi, M. Fujie, V. Krishna Reddy, H. Totsuka, B. Haritha, M. Kasthuraiah Reddy, S. Nakamura, K. Asai, T. Suyama, G. Yu, M. Takahashi, and T. Oshikawa, "Highly stereoselective and stereospecific epoxidation of 2-phospholenes and N-glycosides of phospho sugars and their bioassays", 17th International Conference on Phosphorus Chemistry, 43, Apr. 15-19, 2007, Xiamen, China.
- 14) M. Yamashita, T. Iimi, M. Kasthuraiah, T. Suyama, K. Asai, M. Fujie, S. Nakamura, and T. Oshikawa, "Preparation of 2,3-bromides and 2,3-epoxides of phospholanes as analogues of phospho sugars and their important biological activities", 21st International Congress for Heterocyclic Chemistry, 40, Jul. 15-20, 2007, Sydney, Australia.
- 15) M. Yamashita, T. Niimi, M. Fujie, V. Krishna Reddy, H. Totsuka, B. Haritha, M. Kasthuraiah, S. Nakamura, K. Asai, T. Suyama, and T. Oshikawa, "Highly stereoselective and stereospecific epoxidation of 2-phospholenes to prepare bioactive phospho sugars and their N-Glycosides", 14th European Carbohydrate Symposium, 332, Sept. 2-7, 2007, Luebeck, Germany.
- 16) ○K. Ogawa, N. Ozaki, M. Fujie, M. Yamashita, G. Yu, K. Aoshima, M. Kobayashi, T. Kato, N. Kamikage, T. Aoki, H. Takayanagi, T. Oshikawa, Y. Takehara, H. Sakahara, S. Laurent, C. Burtea, L. Vander Elst, Robert N. Muller, "Studies on novel contrast agents for specific organs, blood vessels, and tumors", 14th European Carbohydrate Symposium, 159, Sept. 2-7, 2007, Luebeck, Germany.
- 17) ○ N. Ozaki, M. Yamashita, G. Yu, S. Ito, M. Fujie, K. Ogawa, T. Aoki, S. Mizuno, M. Sugiyama, K. Aoshima, M. Kobayashi, N. Kamikage, Y. Takehara, H. Sakahara, "Synthesis and evaluation of novel Gd-DTPA-Sugar compounds as MRI contrast agents", 5th Inter-academia 2007, Sept. 26-27, Hamamatsu, Japan.
- 18) H. Kashihira, Y. Kosaka, H. Nakagomi, S. Abe, and M. Yamashita, "Preparation and evaluation of super-hydrophilic coating materials bearing phosphate groups", 5th Inter-academia 2007, Sept. 26-27, Hamamatsu, Japan.
- 19) Y. Otake, M. Yamashita, S. Ito, K. Kiyofuji, H. Mikami, T. Ogawa, M. Tsurumaki, and M. Fukumoto, "Biocompatible medical materials: Preparation of lubricative medical materials modified by PVP (Poly-Vinyl Pyrrolidone)", 5th Inter-academia 2007, Sept. 26-27, Hamamatsu, Japan.
- 20) ○M. Yamashita, M. Fujie, J. Yamashita, K. Ogawa, K. Aoshima, N. Ozaki, T. Aoki, Y. Takehara, H. Sakahara, and S. Nakamura, "Research on Novel Sugar Dendritic MRI Contrast Agents for Cancer and Phospho Sugar Anti-cancer Material", 4th Tumor Progression & Therapeutic Resistance Conference, Oct. 4-5, 2007, in Philadelphia, PA. U.S.A.

2. 創製

2-1 Gd-DTPA を糖で化学修飾した新規 MRI 造影剤の合成

概要

現在 MRI 造影剤として実用化されている Gd-DTPA は分子サイズが小さく組織認識部位を有していないため、血管壁透過性が高く体内に均一に分布してしまう。そのため、細かい血管の描出が困難であるだけでなく、特定の臓器や疾患を選択的に描出することができていない。

本研究では糖が有する組織への認識機能に着目し、血管貯留性及び組織特異性の発現を期待して Gd-DTPA を単糖であるグルコースを 4 分子化学修飾した Gd-DTPA-糖化合物の合成を行った (Fig. 2-1-01)。

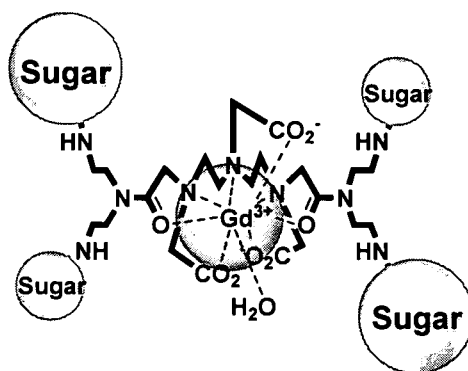


Fig. 2-1-01 Models of Gd-DTPA-Sugar compounds as MRI contrast agents.

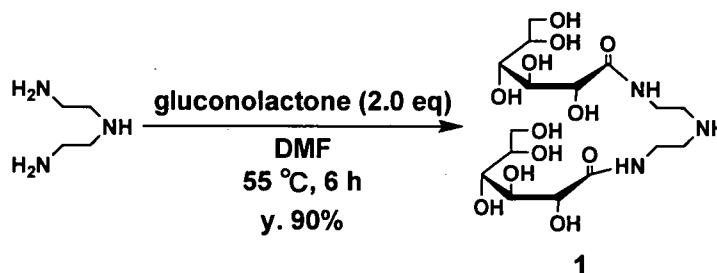
2-1-1 結果と考察

本研究では末端(Terminal)部、コア(Core)部に分割したパーツをそれぞれ合成し、それらを分子表面から分子中央部へと順次結合させていくコンバージェント法により DTPA-糖化合物を合成した。また、合成した DTPA-糖化合物へのガドリニウムのキレーションにも成功し、特定の臓器及び血管のターゲッティングが可能な新規 MRI 造影剤である Gd-DTPA 糖化合物の合成を達成した。以下にそれぞれの項目の詳細について述べる。

2-1-1-1 末端(Terminal)部の合成

末端部は糖とスペーサーから構成され、糖とスペーサー及び DTPA とスペーサーを共にアミド結合により結合させるため、スペーサーはジエチレントリアミンとした。また、反応点を限定するために、糖はラクトン化したものとした。以下にそれぞれの合成方法の詳細について述べる。

・ジグルコシルアミン (1) の合成



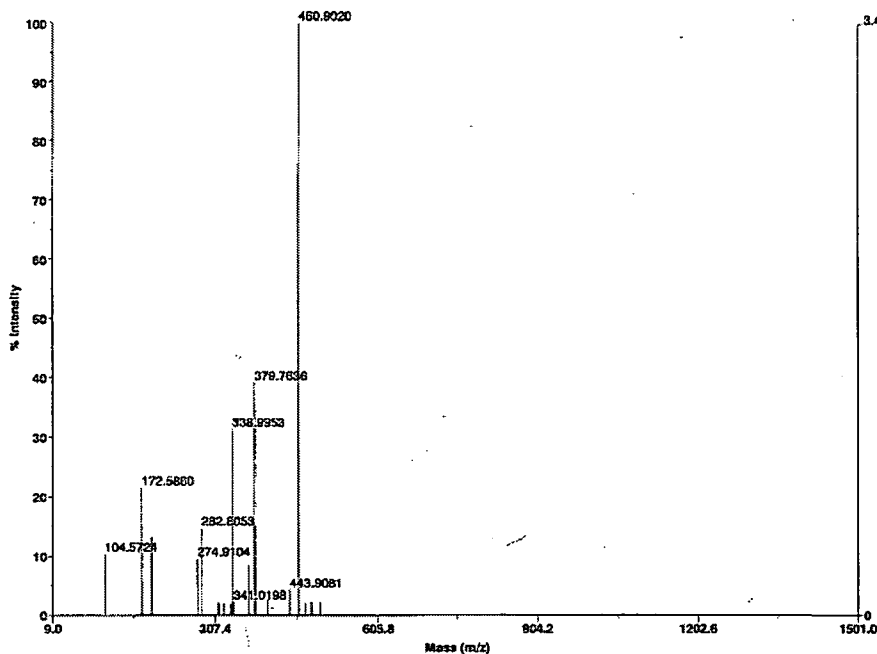
Scheme 2-1-01

DMF 中、ジエチレントリアミンと D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンとの求核反応によりジグリコシルアミン 1 を粗収率 90% で合成した。この反応は D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンのカルボニル炭素と求核試薬であるジエチレントリアミンによる求核アシル置換反応であり、ジエチレントリアミンに対して D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンを 2 当量反応させることで、ジエチレントリアミンの第一級アミンに対して選択的に糖が導入された。また、生成物 1 は DMF に溶解せず生成と同時に結晶となり析出してくるため、これを反応進行の目安とした。

以下に ¹H-NMR スペクトル、MS スペクトル、IR スペクトル、熱分析のデータを示す。

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>Adv8C(32,0.5,0.1)=>NF0.7=>D[BP = 460.9, 34468]



Mode of operation:	Reflector
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Positive
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	20000 V
Grid voltage:	75%
Mirror voltage ratio:	1.12
Guide wire Or:	0.002%
Extraction delay time:	125 reuse
Acquisition mass range:	10 - 1500 Da
Number of laser shots:	50/spectrum
Laser intensity:	1846
Laser Flip Rate:	3.0 Hz
Calibration type:	Default
Calibration matrix:	o-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate:	Off
Timed ion selector:	Off
Digitizer start time:	3.271
Bin size:	0.5 msec
Number of data points:	70581
Vertical scale Or:	500 mV
Vertical offset:	0.65%
Input bandwidth Or:	500 MHz
Sample well:	24
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	6384
Instrument name:	Voyager-DE PRO
Plate type filename:	C:\VOYAGER\100 well plate.plt
Lab name:	PE Bioystems
Absolute x-position:	18779.1
Absolute y-position:	36296.5
Relative x-position:	-48.3551
Relative y-position:	-247.898
Shots in spectrum:	50
Source pressure:	4.232e-007
Mirror pressure:	1.069e-007
TCS pressure:	0.003648
TIS gate width:	7
TIS flight length:	688

Fig. 2-1-02 化合物 1 の MS スペクトル

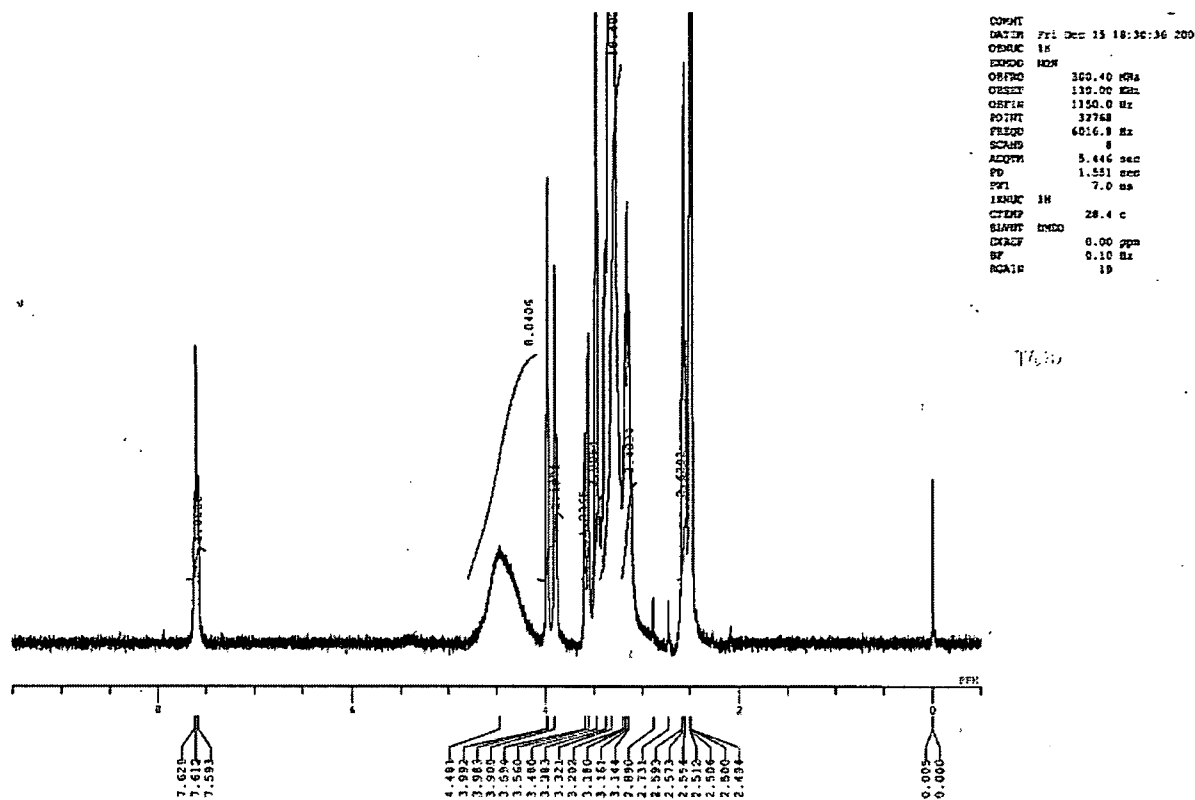


Fig. 2-1-03 化合物 1 の ¹H-NMR スペクトル

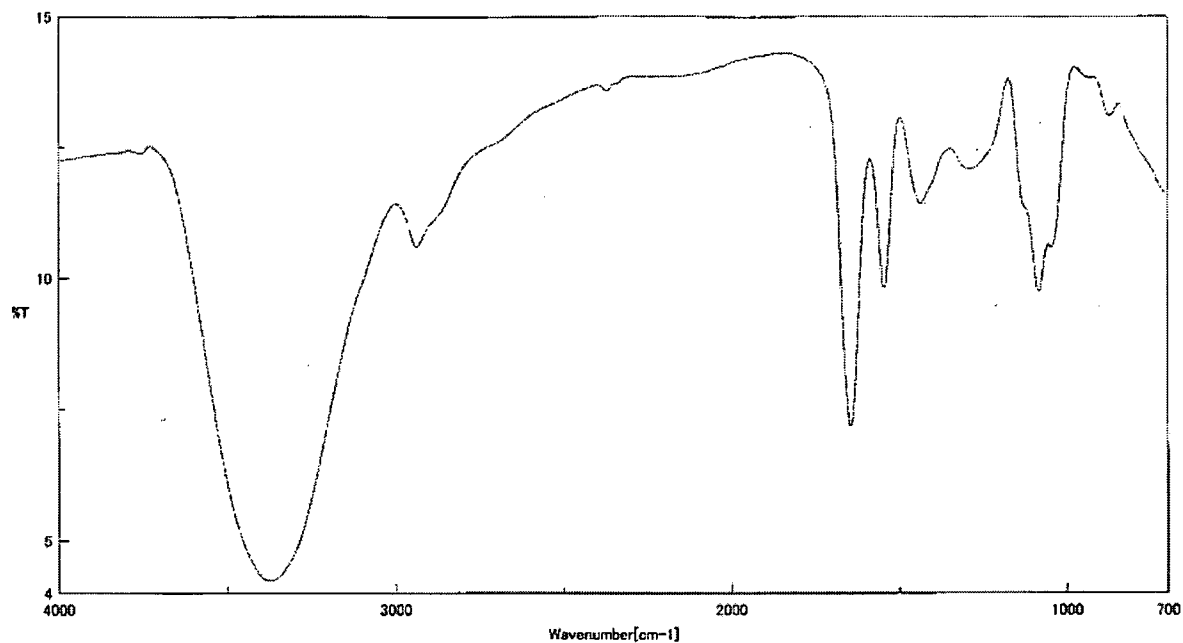


Fig. 2-1-04 化合物 1 の IR スペクトル

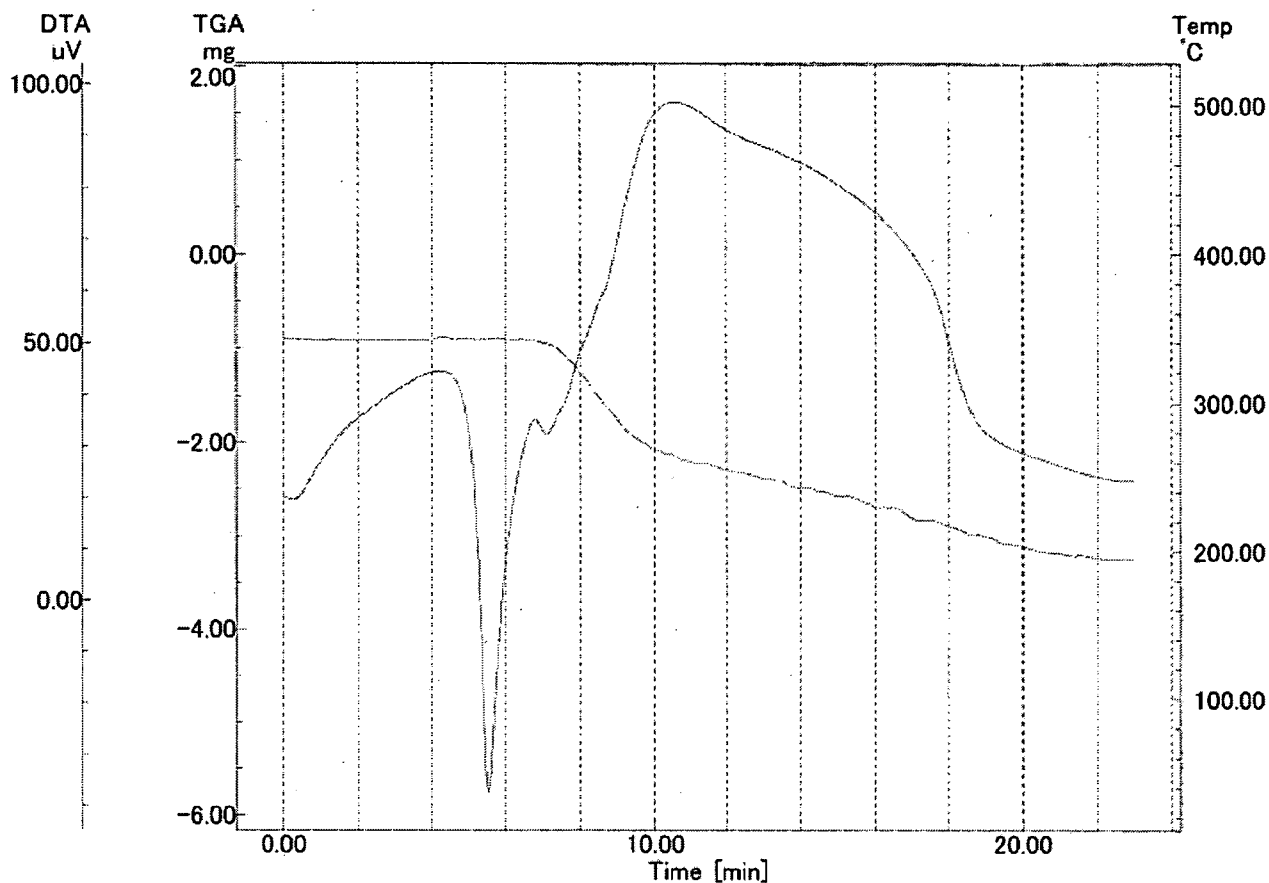
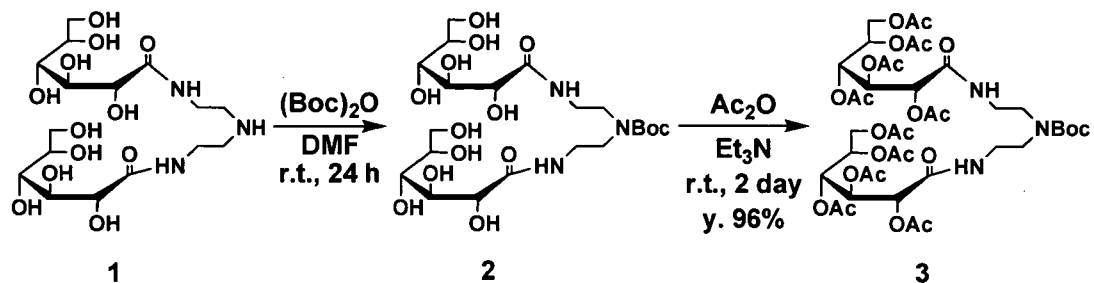


Fig. 2-1-05 化合物 1 の熱分析

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルより 2.09-2.22 ppm にアセチル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチン及びメチレンのプロトン数を比較した。IR スペクトルより 1751 cm^{-1} に C=O 伸縮による吸収と 1218 cm^{-1} に C-O 伸縮による吸収を示すことからエステルの存在を確認した。また、 O-H 伸縮による吸収を示していないことからヒドロキシル基はすべてアセチル化されたと考えられる。以上から化合物 1 の構造を同定した。

・ diethylenetriamine-2Glc (OAc)-Boc (3) の合成



Scheme 2-1-02

DMF 中、ジグリコシルアミン **1** と二炭酸ジ-*t*-ブチルを反応させた後、トリエチルアミンを触媒として加え、さらに無水酢酸と反応させることで化合物 **3** を収率 96% で合成した。一段階目の反応は **1** の第二級アミンと二炭酸ジ-*t*-ブチルとの求核アシル置換反応によるアミド化反応であり、二段階目の反応は **1** のヒドロキシル基と無水酢酸との求核アシル置換反応によるアセチル化反応である。これまでの研究において化合物 **2** の単離精製を行わずに反応を進めても目的化合物 **3** が高収率で得られる事がわかっているため、目的化合物 **3** まで合成した後でシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : methanol = 10 : 1) による単離精製を行った。

以下に ¹H-NMR スペクトルのデータを示す。

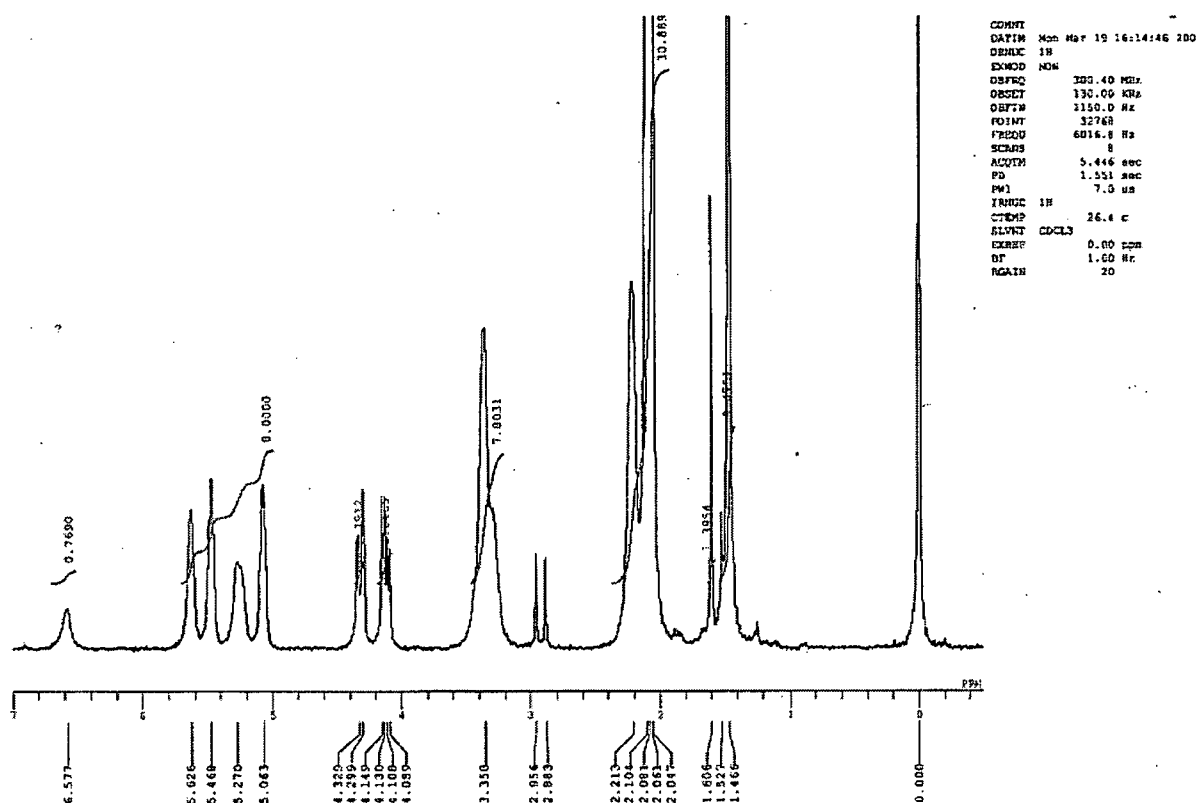
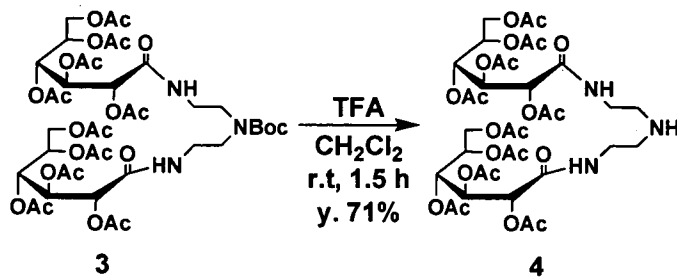


Fig. 2-1-06 化合物 **2** の ¹H-NMR スペクトル

¹H-NMR スペクトルより 2.07-2.23 ppm にアセチル基由来のピークを、2.74-3.70 ppm にヒドロキシル基由来のピークをそれぞれ確認し、それらのプロトン数とメチン及びメチレンのプロトン数を比較した。ここで、ヒドロキシル基由来のピークは D₂O 置換することで確認した。MS スペクトルより 796.44 [M+H]⁺ のピークを確認した。IR スペクトルより 3463 cm⁻¹ に O-H 伸縮による吸収を示すことからヒドロキシル基の存在を、1743 cm⁻¹ に C=O 伸縮による吸収と 1234 cm⁻¹ に C-O 伸縮による吸収を示すことからエステルの存在を、1658 cm⁻¹ に C=O 伸縮による吸収と 1542 cm⁻¹ に N-H 変角による吸収を示すことからアミド基の存在をそれぞれ確認した。以上から化合物 **2** の構造を同定した。

・ diethylenetriamine-2Glc (OAc) (4) の合成



Scheme 2-1-03

ジクロロメタン中、トリフルオロ酢酸を用いて化合物 3 の Boc 基の脱保護を行い化合物 4 を収率 71%で合成した。Boc 基の脱保護は酸性条件下、短時間で行われることが知られており、この反応では化合物 3 のアセチル基が外れない程度の強さの有機酸であるトリフルオロ酢酸を用いることで Boc 基のみを選択的に脱離させた。

以下に ¹H-NMR スペクトル、MS スペクトルのデータを示す。

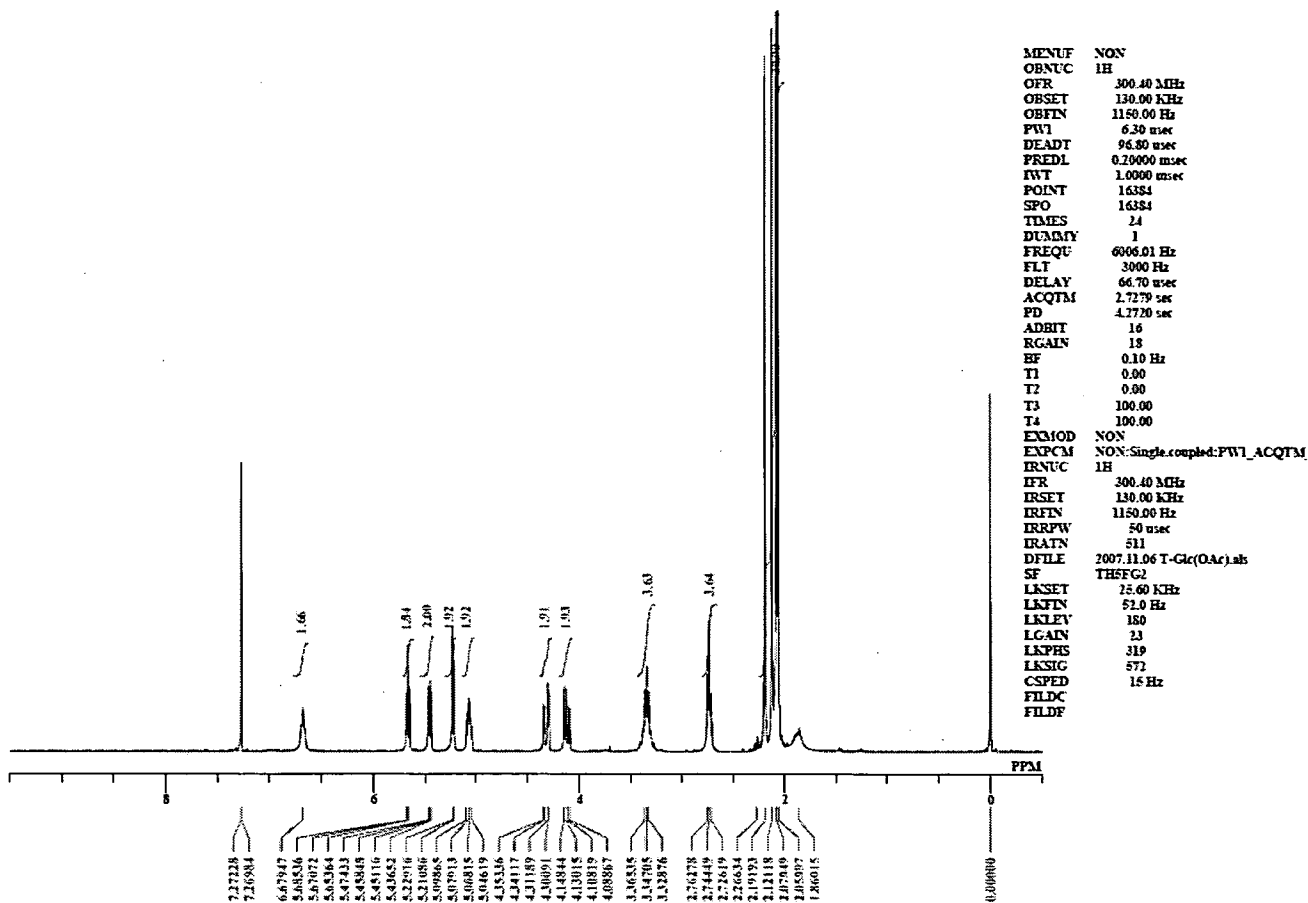
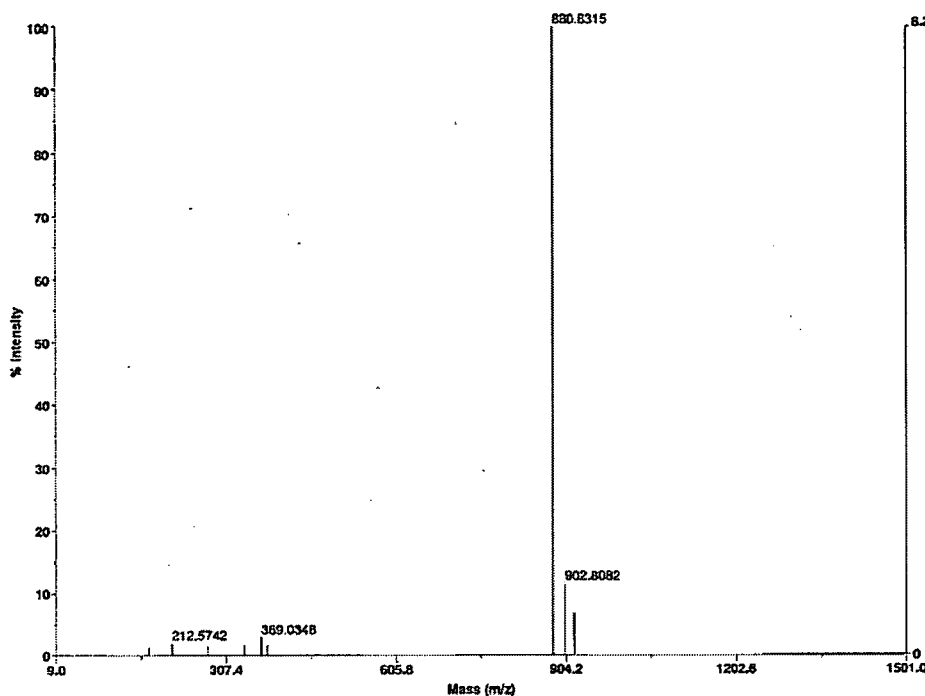


Fig. 2-1-07 化合物 2 の ¹H-NMR スペクトル

Voyager Spec #1=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.7=>DI[BP = 880.8, 82042]



Mode of operation:	Reflector
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Positive
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	20000 V
Orb voltage:	75%
Mirror voltage ratio:	1.12
Orbit wire ID:	0.023%
Extraction delay time:	125 nsec
Acquisition mass range:	10 - 1500 Da
Number of laser shots:	50/spectrum
Laser intensity:	1848
Laser Rep Rate:	3.0 Hz
Calibration type:	Default
Calibration matrix:	o-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate:	On
Timed ion selector:	Off
Digitizer start time:	3.271
Bin size:	0.5 nsec
Number of data points:	70961
Vertical scale ID:	500 mV
Vertical offset:	0.65%
Input bandwidth ID:	500 MHz
Sample well:	32
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	6384
Instrument name:	Voyager-DE PRO
Plate type filename:	C:\VOYAGER\100 well plate.plt
Lab name:	PE Biosystems
Absolute x-position:	6562.81
Absolute y-position:	32032.8
Relative x-position:	-104.691
Relative y-position:	-34.9473
Shots in spectrum:	50
Source pressure:	7.183e-007
Mirror pressure:	1.132e-007
TC2 pressure:	0.006992
TIS gate width:	7
TIS light length:	688

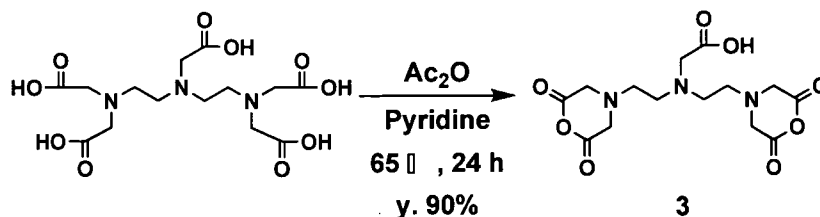
Fig. 2-1-08 化合物 2 の MS スペクトル

¹H-NMR スペクトルより Boc 基由来のピークが消滅していることから Boc 基は脱保護されたと考えられる。また、2.06-2.22 ppm にアセチル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチン及びメチレンのプロトン数を比較した。MS スペクトルより 880.04 [M+H]⁺のピークを確認した。以上から化合物 4 の構造を同定した。

2-1-1-2 コア(Core)部の合成

コア部は DTPA であるが、コア部はアミノ基との反応性の向上及び反応点を限定するため、DTPA の脱水反応を行い DTPA 二無水物へと誘導した。これにより、5 個のカルボキシル基のうち 4 個を環状エステルとし、残り 1 個のカルボキシル基を相対的に不活性基とし、反応点を 2 個に限定した。以下に反応の詳細について述べる。

・ DTPA dianhydride (5) の合成



Scheme 2-1-04

DTPA 二無水物 **5** は DTPA をピリジン触媒下、65°C で無水酢酸と反応させることで得ることが出来ると報告されている⁵⁾。本研究でも、この合成方法と同様の方法で DTPA 二無水物 **5** を粗収率 90% で合成した。この反応は求核アシル置換反応によるカルボキシル基のエステル化反応である。

以下に ^{13}C -NMR スペクトル、IR スペクトル、熱分析のデータを示す。

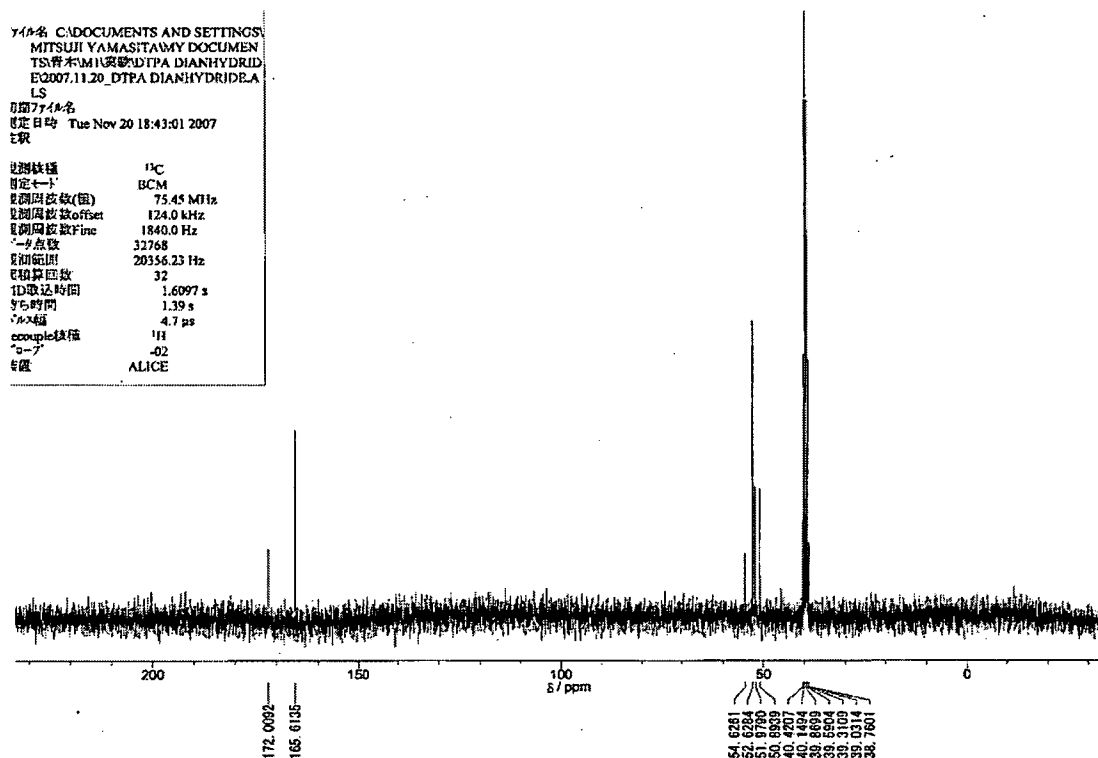


Fig. 2-1-09 化合物 **5** の ^{13}C -NMR スペクトル

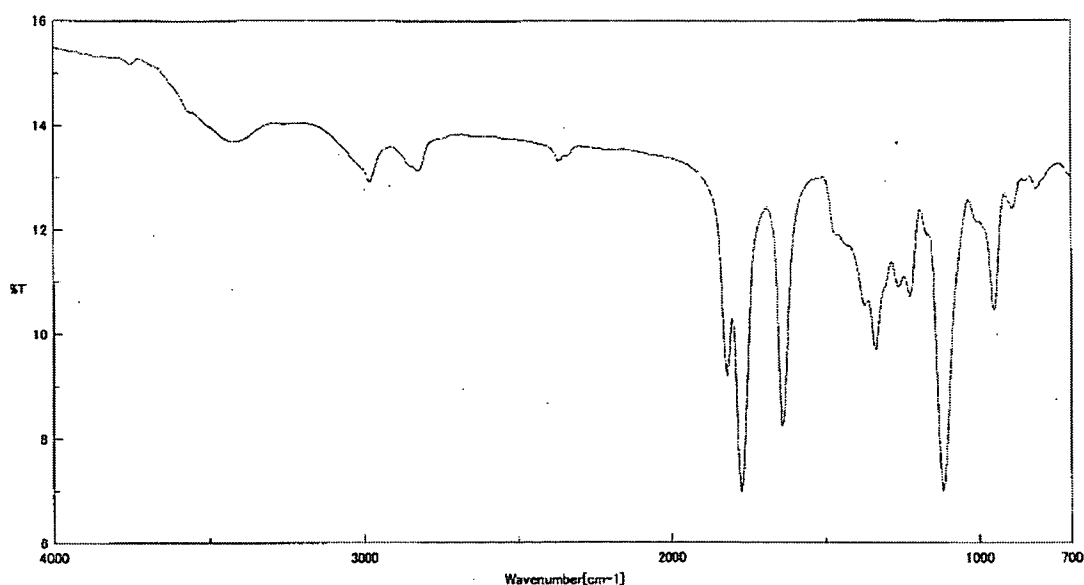


Fig. 2-1-10 化合物 **5** の IR スペクトル

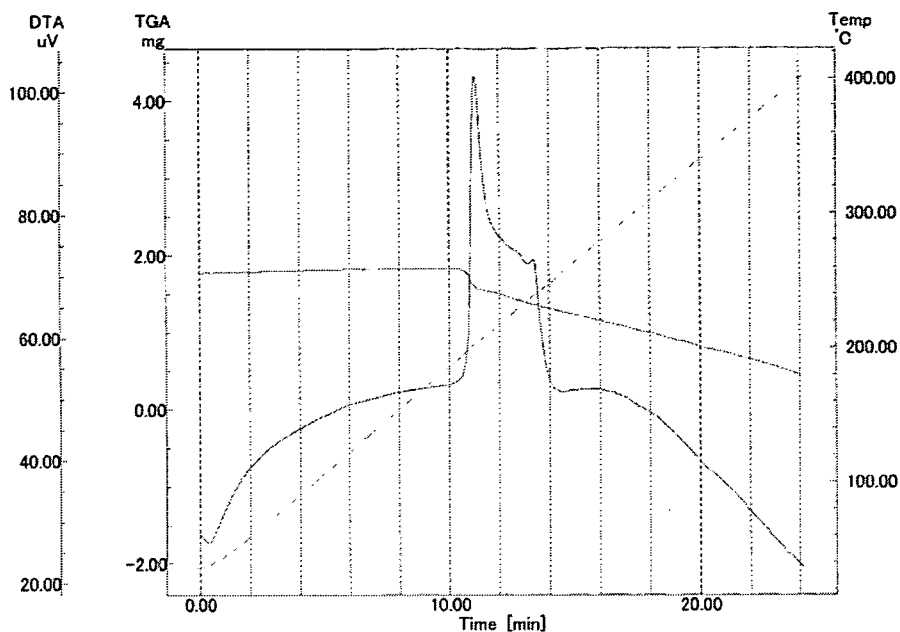
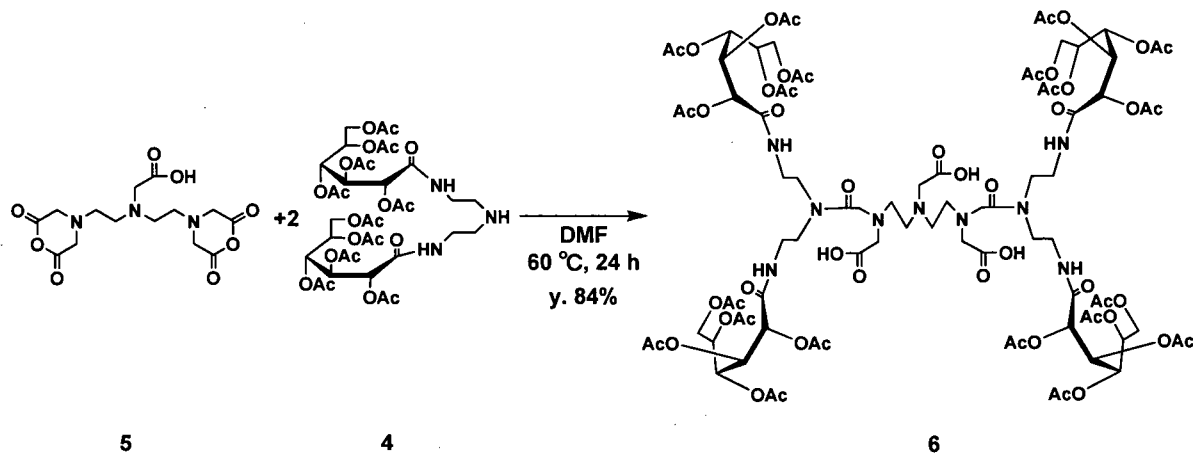


Fig. 2-1-11 化合物 5 の熱分析

^{13}C -NMR スペクトルより DTPA のカルボン酸由来である α メチレン炭素のピークが減少しており、そのピークより少し高磁場の 52.5 ppm にカルボン酸無水物由来である α メチレン炭素のピークが現れたことから無水環化が起こったと考えられる。IR スペクトルより 1820, 1774 cm^{-1} に C=O 伸縮による吸収と 1118, 949 cm^{-1} に C-O 伸縮による吸収を示すことからカルボン酸無水物の存在を、1643 cm^{-1} に C=O 伸縮による吸収を示すことからカルボキシル基の存在をそれぞれ確認した。以上から化合物 3 の構造を同定した。

2-1-1-3 DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

・ DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) (6) の合成



Scheme 2-1-05

DMF 中、コア部である DTPA dianhydride **5** に対して末端部である化合物 **4** を 2 当量反応させることでデンドリマー分子である DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) を収率 84% で合成した。精製は再結晶 (イソプロパノール) により行った。

以下に $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、MS スペクトル、IR スペクトルのデータを示す。

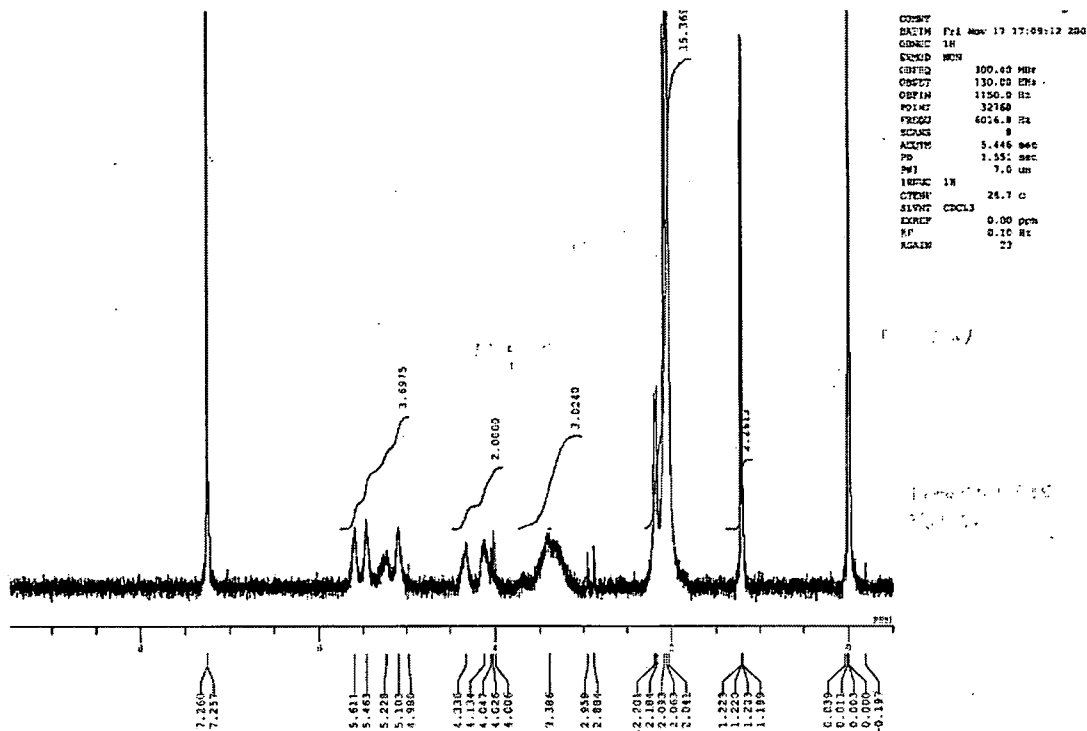


Fig. 2-1-12 化合物 6 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>AdvBC(32,0,5,0.1)>NF0.7>D[BP = 2114.4, 303685]

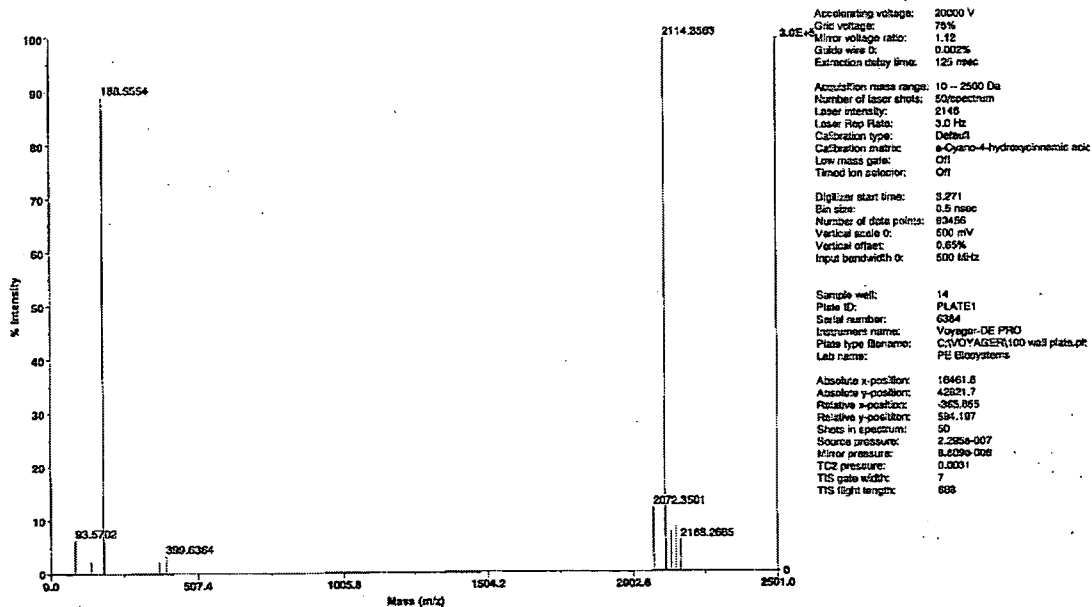


Fig. 2-1-13 化合物 6 の MS スペクトル

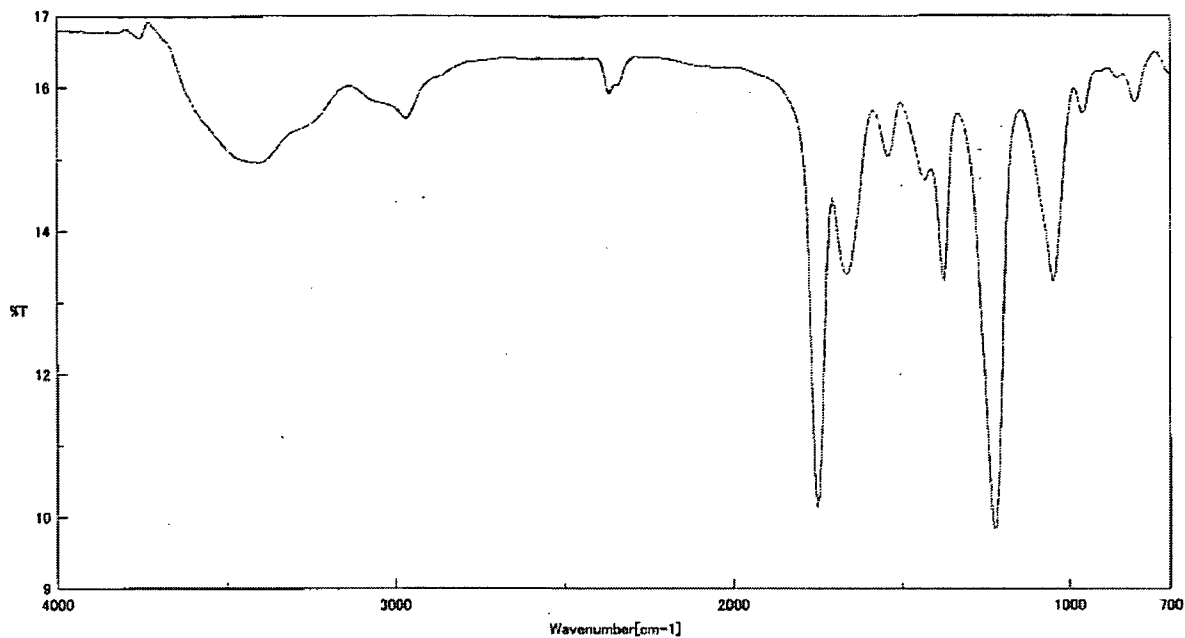


Fig. 2-1-14 化合物 6 IR スペクトル

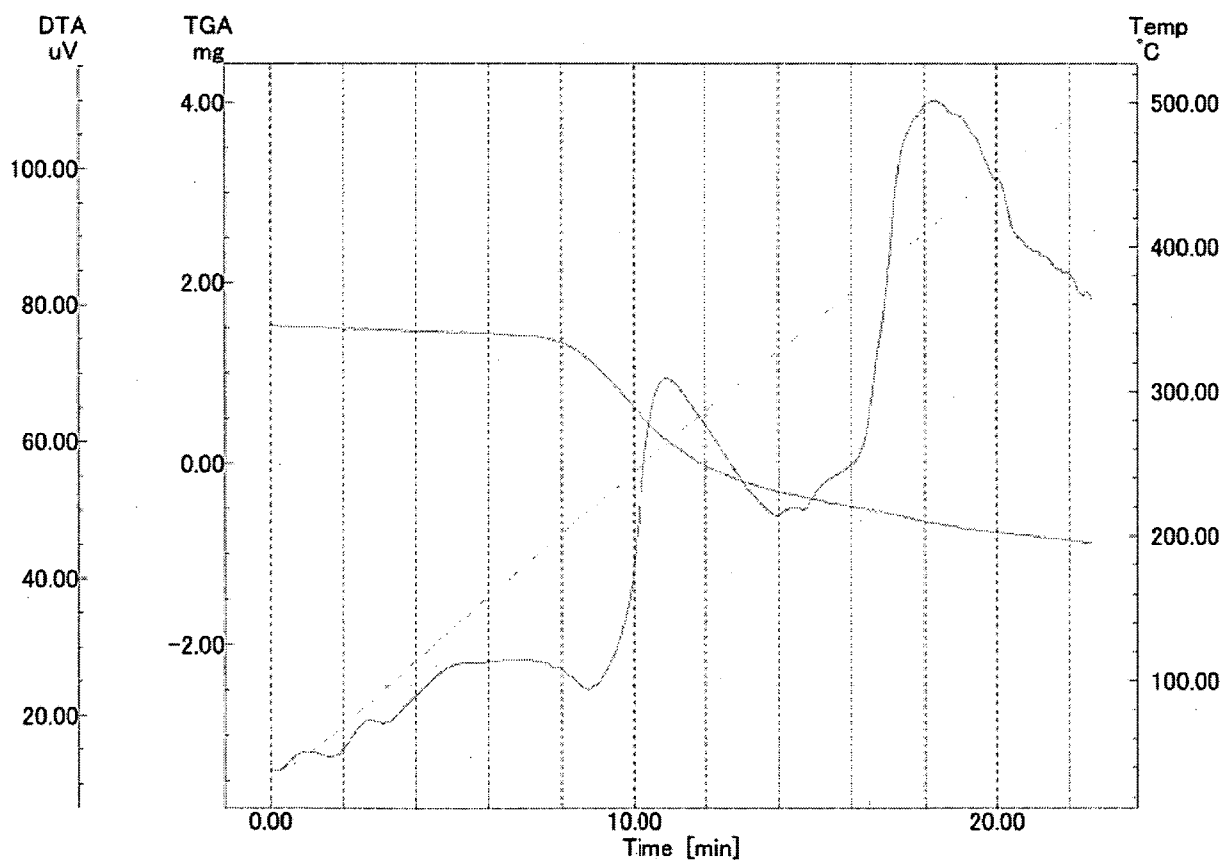
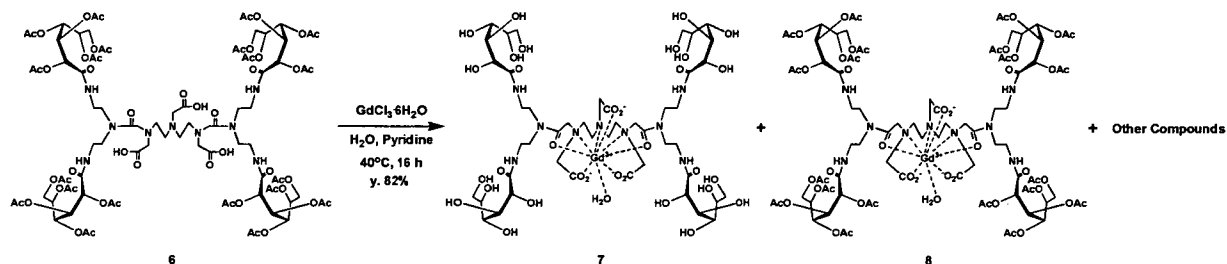


Fig. 2-1-15 化合物 6 の熱分析

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルより 2.05-2.28 ppm にアセチル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチン及びメチレンのプロトン数を比較した。MS スペクトルより 2113.00 $[\text{M}-3\text{H}]^-$ のピークを確認した。IR スペクトルより 1751 cm^{-1} に C=O 伸縮による吸収と 1226 cm^{-1} に C-O 伸縮による吸収を示すことからエステルが存在を、 1666 cm^{-1} に C=O 伸縮による吸収と 1542 cm^{-1} に N-H 変角による吸収を示すことからアミド基の存在をそれぞれ確認した。以上から化合物 **6** の構造を同定した。

2-1-1-4 Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

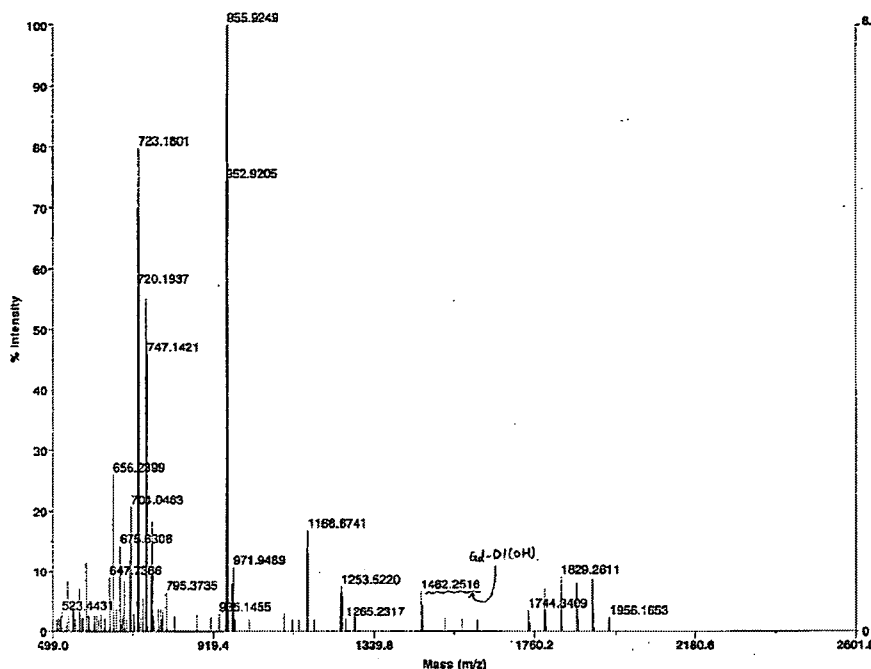
・ Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) (7) の合成



Scheme 2-1-06

Gd-DTPA のガドリニウム源として塩化ガドリニウム (Ⅲ) 六水和物を利用した合成方法が報告されている。本研究でも、この合成方法を適用した。水中、 95°C で化合物 **6** と塩化ガドリニウム (Ⅲ) 六水和物を反応させることで Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) **7** を合成し、続けて化合物 **7** を水酸化ナトリウム存在下で加水分解することによって Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) **8** を得ていた。しかし、この条件で反応させたところ化合物 **7** だけでなく、化合物 **8** やいくらか脱アセチル化された化合物等を含む混合物となってしまった (Fig. 2-1-13)。これは、化合物 **6** と塩化ガドリニウム (Ⅲ) 六水和物が反応することによって、脱離した塩化物イオンによって水溶液が酸性となったためだと考えられる。

以下に MS スペクトルのデータを示す。



Mode of operation: Reflector
 Extraction mode: Delayed
 Polarity: Positive
 Acquisition control: Manual

Accelerating voltage: 20000 V
 Grid voltage: 75%
 Mirror voltage ratio: 1.12
 Guide wire 0: 0.002%
 Extraction delay time: 125 nsec

Acquisition mass range: 800 - 2600 Da
 Number of laser shots: 50/spectrum
 Laser intensity: 2047
 Laser Rep Rate: 3.0 Hz
 Calibration type: Default
 Calibration matrix: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
 Low mass gate: 500 Da
 Timed ion selector: Off

Digitizer start time: 22.4265
 Bin size: 0.5 msec
 Number of data points: 57143
 Vertical scale 0: 500 mV
 Vertical offset: 0.65%
 Input bandwidth 0: 500 MHz

Sample well: 88
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 8384
 Instrument name: Voyager-DE PRO
 Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plate.pt
 Lab name: PE Biosystems

Absolute x-position: 27554.9
 Absolute y-position: 8281.85
 Relative x-position: 887.375
 Relative y-position: -385.546
 Shots in spectrum: 50
 Source pressure: 3.019e-007
 Mirror pressure: 6.058e-008
 TIS pressure: 0.002275
 TIS gate width: 7
 TIS flight length: 688

Fig. 2-1-16 化合物 7 の MS スペクトル

MS スペクトルより化合物 7 に由来する 1462.25 [M+H]⁺のピークを確認した。他にも脱アセチル化された化合物のピークを確認した。

2-1-2 実験項

2-1-2-1 使用試薬及び分析機器

全ての試薬類及び溶媒類は、和光純薬工業株式会社・シグマ アルドリッチ・東京化成工業株式会社・関東化学株式会社からの市販品を使用した。

¹H-NMR (300 MHz)スペクトルは、JEOL JNM-AL300 核磁気共鳴分光計を用いて測定した。このとき、重溶媒としては重クロロホルム (chloroform-*d*)、重水 (D₂O)、重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆) を使用し、内部標準としては TMS を使用した。

ATR-FTIR スペクトルは、JASCO FT/IR-410 赤外分光計を用いて測定した。

融点測定は、島津製作所 DTG-60A50AH 測定器を用いて測定した。

MALDI-TOF-MS による質量分析は、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 99% をマトリックスとし、GL Science 社 Voyager-DE Porimerix を用いて測定した。カラムクロマトグラフィーの固定相は、ワコーゲル C-200 を用いた。

2-1-2-2 実験操作

1) 末端(Terminal)部の合成

・ジグルコシルアミンの(1)合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコに D(+)-グルコノ-1,5-ラクトン (7.05 g, 39.6 mmol)、ジエチレントリアミン (2.15 ml, 19.8 mmol) を入れ、60°Cで 6 時間攪拌した。その後、氷水浴中で冷却し、析出した白色固体を減圧ろ過し、さらに減圧下で溶媒を除去することで目的化合物である白色結晶 ジグリコシルアミン **1** (8.19 g, 17.8 mmol) を粗収率 90%で得た。

分子式 : $C_{16}H_{33}N_3O_{12}$; M.W. : 459.45

MALDI-TOF-MS (+) : 460.49 $[M+H]^+$

IR (KBr)

ν (cm^{-1}) : 3371 (O-H), 1651 (C=O of amide), 1543 (N-H of amide)

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz)

δ (ppm) : 2.43-2.62 (m, 4H, $CH_2NH \times 2$), 3.13-3.98 (m, 16H, $CH_2 \times 2$, $CH \times 8$ (sugar hydrogens), $CH_2NHC=O \times 2$), 4.43 (br s, 10H, $OH \times 10$)

・Diethylenetriamine-2Glc(OAc)-Boc (3) の合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコにジグリコシルアミン **1** (3.60 g, 7.84 mmol) を入れ、DMF (20 ml) に溶解させ、攪拌しながら二炭酸ジ-*t*-ブチル (1.88 g, 8.62 mmol)/DMF (10 ml) 溶液をゆっくり滴下した。滴下終了後、室温 24 時間攪拌した。反応終了後トリエチルアミン (10 ml) を加え、氷水浴中で攪拌しながら無水酢酸 (8.1 ml, 86.2 mmol) をゆっくりと滴下し、室温で 2 日間攪拌した。減圧下で溶媒を除去し、酢酸エチルに溶解させ、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 ml)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 ml) の順で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過、濃縮後、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$: methanol = 10 : 1) にて単離精製し、目的化合物である褐色結晶 **3** (7.40 g, 7.55 mmol) を収率 96%で得た。

分子式 : $C_{41}H_{61}N_3O_{24}$; M.W. : 979.93

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz)

δ (ppm) : 1.47 (s, 9H, $(CH_3)_3C$), 2.05, 2.06, 2.08, 2.10, 2.21 (s \times 5, 30H, $CH_3C=O \times 10$), 3.37 (br s, 8H, $CH_2NHC=O \times 2$, $CH_2NC=O \times 2$), 4.09-4.33 (dd, 4H, $J_{HCH} = Hz$, $J_{HCCH} = Hz$, CH_2), 5.08 (m, 2H, CH (sugar hydrogens)), 5.06-5.63 (m, 8H, CH (sugar hydrogens))

・ Diethylenetriamine-2Glc(OAc) (4) の合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコに化合物 3 (8.08 g, 8.24 mmol) を入れ、ジクロロメタン (10 ml) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (7.4 ml, 98.9 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去し、酢酸エチルに溶解させ、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 ml)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 ml) の順で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過、濃縮後、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : methanol = 10 : 1) にて単離精製し、目的化合物である褐色結晶 4 (5.11 g, 5.81 mmol) を収率 71% で得た。

分子式 : C₃₆H₅₃N₃O₂₂ ; M. W. : 879.81

MALDI-TOF-MS (+) : 880.04 [M+H]⁺

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm) : 2.06, 2.08, 2.12, 2.19, 2.22 (s×5, 30H, CH₃C=O×10), 2.84-2.88 (m, 4H, CH₂NH×2), 3.40-3.47 (m, 4H, CH₂NHC=O×2), 4.13-4.32 (dd, 4H, CH₂×2 (sugar hydrogens)), 5.08- 5.66 (m, 8H, CH×8 (sugar hydrogens))

2) コア(Core)部の合成

・ DTPA dianhydride (5) の合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコに DTPA (5.00 g, 12.7 mmol) を入れ、乾燥ピリジン (10 ml) に溶解させ、攪拌しながら無水酢酸 (4.8 ml, 5.08 mmol) を加え、50°C で 24 時間攪拌した。沈殿物を減圧ろ過し、無水酢酸 (10 ml×3)、アセトニトリル (10 ml×3) の順で洗浄した後、真空乾燥することで目的化合物である白色結晶 DTPA dianhydride 5 (4.46 g, 12.4 mmol) を粗収率 90% で得た。

IR (KBr)

ν (cm⁻¹) : 1820 (C=O of carboxylic anhydride), 1774 (C=O of carboxylic anhydride), 1643 (C=O of carboxylic acid anion), 1118 (C-CO-O-CO-C), 949 (C-CO-O-CO-C)

¹³C NMR (DMSO-d₆),

δ (ppm) : 50.9, 51.9 (2×N-CH₂-CH₂), 52.6 (CH₂-O=C-O-C=O), 54.6 (N-CH₂-CO₂H), 165.6 (O=C-O-C=O), 172.0 (O=C-OH)

3) DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

・ DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) (6) の合成

アルゴン雰囲気下、ナスフラスコに DTPA dianhydride **5** (1.04 g, 2.91 mmol) と化合物 **4** (5.11 g, 5.81 mmol) を入れ、DMF (20 ml) に溶解させ、60°C で 24 時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去し、粗生成物を再結晶 (イソプロパノール) にて単離精製し、白色結晶 **6** (5.18 g, 2.45 mmol) を収率 84% で得た。

分子式 : $C_{78}H_{117}N_9O_{48}$; M.W. : 1948.80

MALDI-TOF-MS (-) : 1945.61 [M-3H]⁻

m. p. : 180°C

IR (KBr)

ν (cm⁻¹) : 3440 (O-H), 1743 (C=O of ester), 1658 (C=O of amide), 1542 (N-H of amide), 1226 (C-O of ester)

¹HNMR (CDCl₃)

δ (ppm) : 1.97, 2.00, 2.10, 2.13 (s×4, 48H, CH₃C=O×16), 3.00-3.84 (m, 38H, OH×4, CH₂NC=O×4, CH₂NHC=O×4, CH₂N×4, NCH₂C=O), 3.92-4.34 (m, 12H, CH₂×2, CH×2 (sugar hydrogens)), 4.78- 5.53 (m, 6H, CH×6 (sugar hydrogens))

4) Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

・ Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) (7) の合成

ナスフラスコに DTPA-D1-Glc(OAc) (0.150 g, 0.0676 mmol) と塩化ガドリニウム (Ⅲ) 六水和物 (0.300 g, 0.0811 mmol) を入れ、水 (3 ml) に溶解させ、95°C で 1 時間攪拌した。反応終了後水溶液をエーテル (3 ml×3) で洗浄した。減圧下で溶媒を除去し、白色結晶の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) **7**、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) **8** 及びいくらか脱アセチル化された化合物等を含む混合物を得た。

参考文献

- 1) M. Takahashi, Y. Hara, K. Aoshima, H. Kurihara, T. Oshikawa and M. Yamashita, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 8485-8488.
- 2) K. Muramatsu, Y. Takehara, H. Sakahara, M. Yamashita, T. Nishikawa, N. Sadatah, *ISMRM2005*, フロリダ講演ポスター **2005**.
- 3) M. Yamashita, S. Laurent, L. V. Elst, and R. N. Mullar, *ISMRM2004*, 京都講演ポスター **2004**.
- 4) C. C. Joseph, H. Regeling, B. Zwanenburg and G. J. F. Chittenden, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6910.
- 5) C. F. Geraldies and A. M. Urbano, *J. Magn. Reson.* **1995**, 13, 401-.

2-2 がん組織等を画像化する新規 MRI 造影剤としての Gd-DTPA-糖錯体の合成並びに合成プロセスと造影剤の評価

2-2-1 概要

研究の目的

現在、最も広く使用されている Gd-DTPA は組織認識部位を有しておらず、その分子サイズの小ささ故に血管から滲み出し、細かい血管や、特定の臓器や疾患を選択的に映し出すことができない。

本研究室では、これを改善するために、組織認識部位として Gd-DTPA の末端に糖を 4 分子導入した Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar、糖を 2 分子導入した Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar (Fig. 2-2-01) が既に開発されている¹⁾。Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の造影剤としての能力は、糖末端がヒドロキシル基のもの (OH 型) で血管、腎臓、肝臓に高い臓器特異性を有しており²⁾、糖末端がパーアセチル基のもの (OAc 型) でも腎臓に高い特異性を有しているということが報告されており³⁾、いずれも Gd-DTPA より高い緩和率を示したことから、実用化が期待されている。また、OH 型では、肝細胞がんでの増強効果も確認されており、疾病の早期発見のためにも有用であると考えられる²⁾。しかしながら、それらの組織との強い結合力のために投与後体外に排出されにくいという欠点が新たに生じている²⁾。そこで、Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の長所を引き継ぎ、各組織と適度な結合力を持たせるため、組織認識部位である糖の数を減らし、分子量も小さくした Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の合成報告がされている。しかしながら、造影効果に関しての報告はされていない⁴⁾。この Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar および Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の合成方法は Terminal 部と Core 部を別々に行い後に結合させるコンバージョン法を用いて合成をおこなっている。この合成方法は、Terminal 部を合成させる際に糖のヒドロキシル基をパーアセチル保護する経路をとっている。Terminal 部の合成法は、アミノ基の保護基導入、糖のアセチル化、脱保護を経由する。そして、DTPA-糖化合物 (OAc) の状態にしてから、脱アセチル化を行うことによって最終目的物を得ている。そのため、この方法は最終目的物までの反応段階が多く費用と手間がかかるといった問題がある。

そこで、本研究ではこの Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar および Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の合成プロセスの改善の研究を行い、さらに新しい合成方法で得た Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar および Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の造影剤としての評価を行うことにより、Gd-DTPA-糖錯体の糖の数による造影効果の違い、また、糖の種類の違いによる臓器選択性の違いについて研究を進めた。