

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

Gd-DTPA の末端に糖を 4 分子導入した Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の一つである Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8) に関して、過去の合成方法では合成段階が 8 段階、トータル収率が 42% であった。それに対して、今回合成プロセス改善を行った方法では、合成段階が 4 段階、トータル収率が 86% といずれも改善された。また、Gd-DTPA の末端に糖を 2 分子導入した Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の一つである Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH) (26) に関して、過去の合成方法では合成段階が 8 段階、トータル収率が 29% であった。それに対して、今回合成プロセス改善を行った方法では、合成段階が 4 段階、トータル収率が 91% といずれも改善された。今回 Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar と Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar のプロセスの改善に成功した。

さらに、新しい合成方法で得た Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar, Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の造影剤としての評価を行った。現在臨床の主力として使用されている Gd-DTPA のような非特異性造影剤は、血管内投与後、速やかに血管外に漏出し、間質へと移行する。したがって、血中濃度は速やかに低下するのが特徴であり、静脈注射後 15 分後にはほぼ完全に血管内の信号と背景の臓器、間質の信号は同等となってしまう。しかし、合成した Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8), Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH) (26), Gd-DTPA-EDA-D1-2Man(OH) (28) は静脈注射後 1 時間後においても大血管と肝臓の信号が確認でき、造影剤の血管貯留性および肝臓への特異的なターゲット効果を示した。

Gd-DTPA-糖錯体の Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar と Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の糖の数による緩和率、MR イメージングの違いは、糖の数が少ない Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の方が比較的良い結果を示した。これは、親水性の高い Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の方が造影効果が優れていると考察される。また、Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の方が分子量が小さいため、造影剤の投与量も少なく済むという点においても優れているといえる。

また、異なった種類の糖を外殻に配置した Gd-DTPA-糖錯体を調整し、糖の種類の違いによる臓器選択性の違いを期待したが、臓器選択性の違いは見られなかった。しかし、糖の種類によって緩和率、MR イメージングの違いが見られた。この違いにおいても糖の種類によって親水性の違いがみられ、親水性の高いものが比較的よい造影効果を示した。造影剤の親水性は生体内へ投与後、造影剤に配位している水分子と外部の水分子との交換速度に大きく影響されると考えられる。そのため造影剤の親水性は造

影効果に影響されることが考察された。

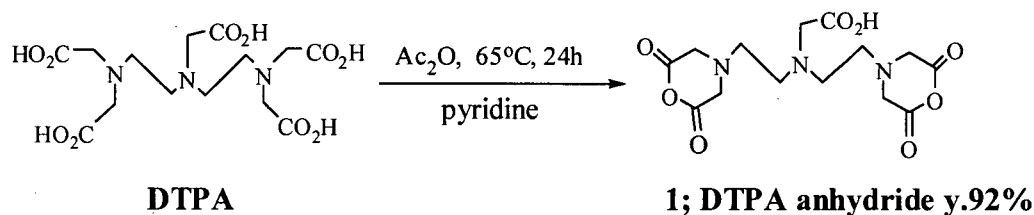
さらに、血清中での T1 緩和速度測定を行うことで、Gd-DTPA-糖錯体が生体内に投与後、血液中のたんぱく質との結合していることが示唆された。そのため MR イメージングにおいて Gd-DTPA-糖錯体は投与後、腎臓からの排泄が遅く、血管貯留性が向上したと考察した。

2-2-2 結果と考察

本研究では末端(Terminal)部、及びコア(Core)部に分割し後に結合させるコンバージョン法により DTPA-糖化合物の合成を行った。またそれぞれの DTPA-糖化合物とガドリニウムイオンとのキレーションにも成功し、新規な臓器および血管ターゲティング MRI 造影剤の合成に成功した。以下にそれぞれの項目について結果と考察について述べる。

2-2-2-1 Core 部の合成

DTPA を反応させる際に、まず DTPA を脱水させることにより反応点の 4 個のカルボキシル基を活性化させて二無水物とし、反応点でないカルボキシル基を相対的に不活性化するために **DTPA-二無水物 1** を合成する方法をとった。**DTPA-二無水物 1** は DTPA をピリジン中、65°C で無水酢酸と反応させることで得ることができ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(1)** を収率 92% で合成した(Scheme 2-2-01)。



Scheme 2-2-01

DTPA-無二水物(1) の ^{13}C -NMR スペクトルを(Fig. 2-2-02)に掲げる。Fig. 2-2-02 では 55.3 ppm に現れていた DTPA のカルボン酸の α 位のメチレン炭素ピークが減少し、そのピークより少し高磁場の 52.5 ppm に対応する無水物由来のメチレン炭素のピークが現れた。また IR より、DTPA が環を形成し、環状酸無水物体となっていることを支持する 1820cm^{-1} にピークが出ていたことから、さらに市販品との熱分析 Fig. 2-2-03 の比較を行ったところ、市販品と同じピーク曲線を得られたことにより **DTPA-二無水物(1)** の構造の同定を行った。

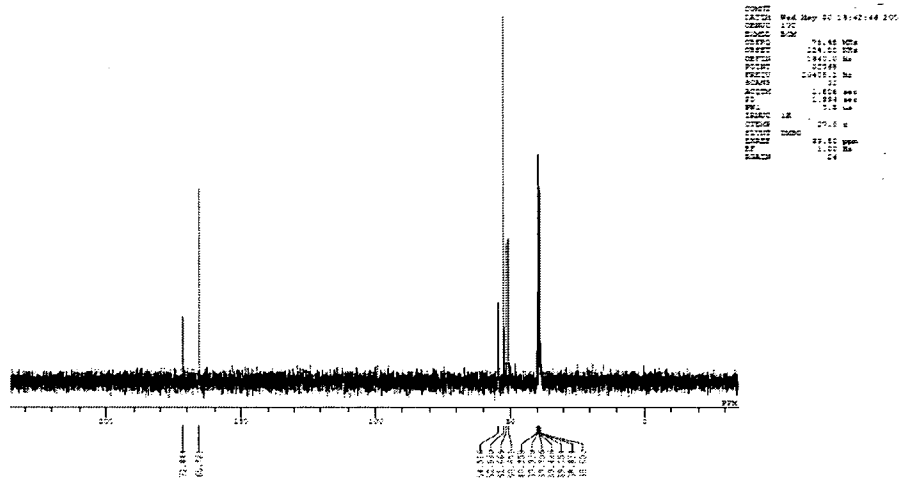


Fig. 2-2-02

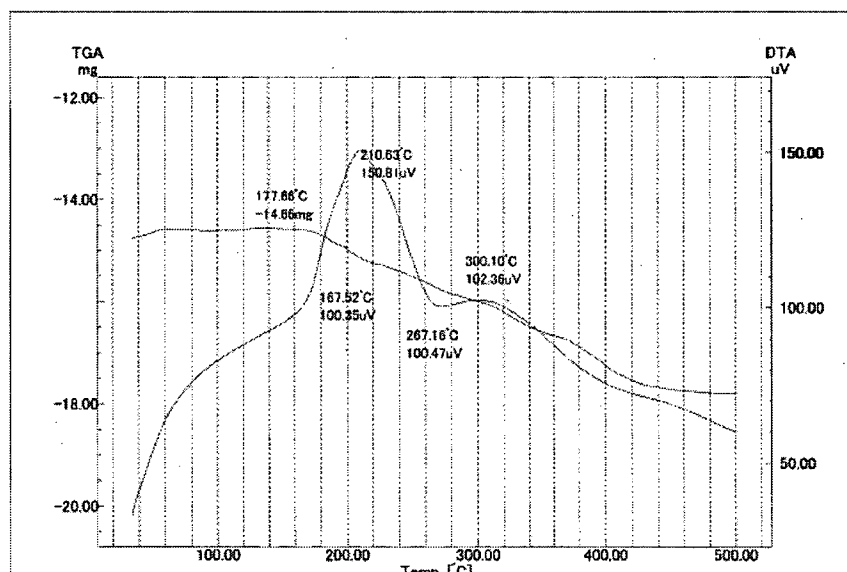


Fig. 2-2-03

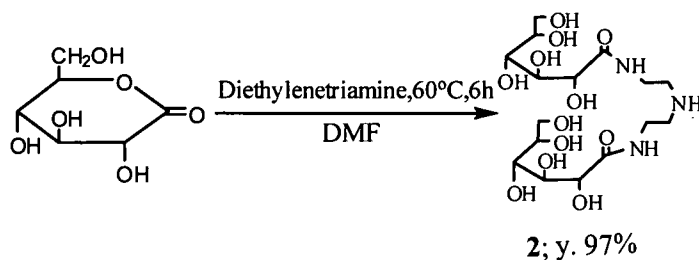
2-2-2-2 Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

1) 末端(Terminal)部の合成

本研究では末端部の合成は、まずジエチレントリアミンとグルコノラク톤を出発物質として行った^{6),7)}。また、過去に報告されている合成の段階においては、遊離のヒドロキシル基をパーアセチル保護する合成方法をとっているが、その方法では合成が多段階にわたる、収率の低下といった問題点がある。そこで、今回パーアセチル保護を経由しない合成法を行った。末端部の合成は1ステップ高収率で進み、収率は97%であった。また、同様の方法にて、出発物質をガラクトース、マンノース由来のラクトン体として、異なる種類の糖による末端部を合成した。それぞれの糖に対する末端部の全収率は85%、49%であった。

・ ジグリコシルアミン(2)の合成

DMF 中室温でジエチレントリアミン 1 当量に対して D-(+)-グルコノ-1,5-ラク톤を 2 当量反応させることによって、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ジグリコシルアミン(2)を収率 97%で得た (Scheme. 2-2-02)。この場合には反応が進行すると、生成物 2 は DMF 中から結晶として析出するので精製が容易であった。



Scheme 2-2-02

化合物 1 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し (Fig. 2-2-04)、さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルで糖の 4 種類のメチン炭素と 1 種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-05)。

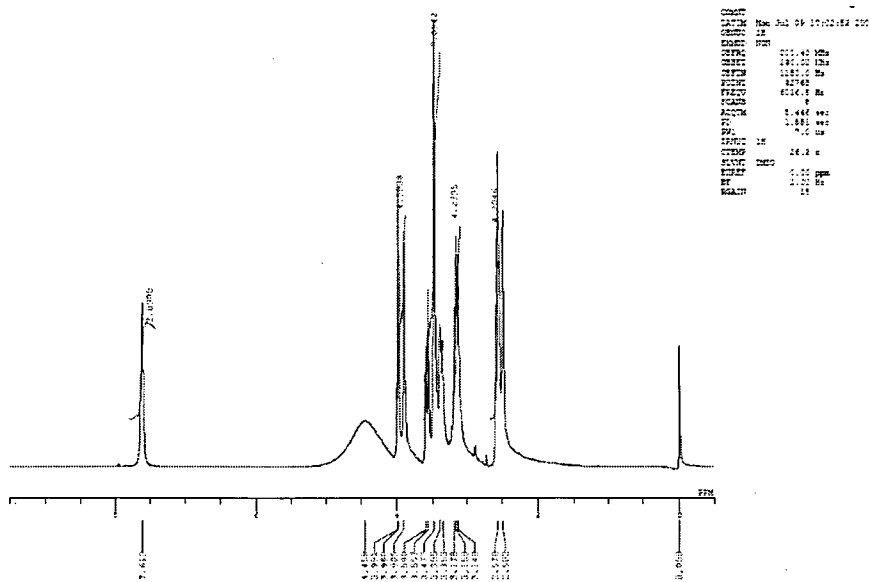


Fig. 2-2-04

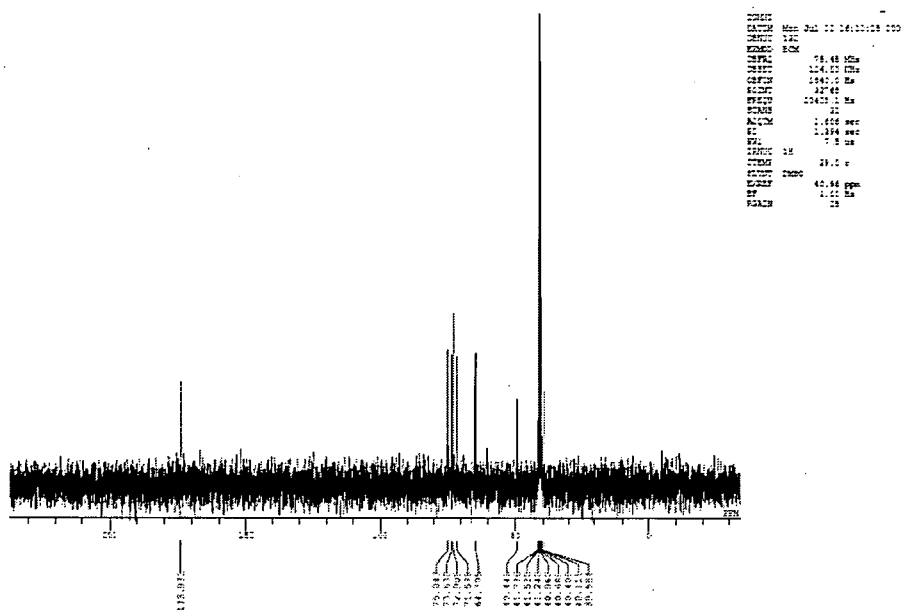
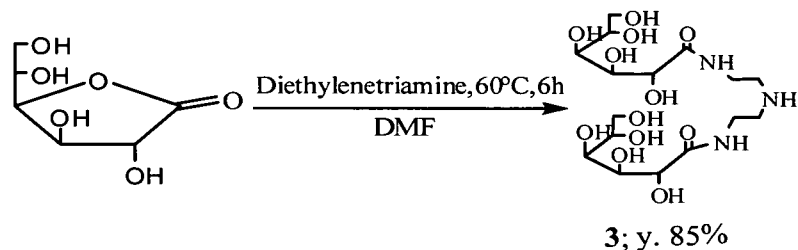


Fig. 2-2-05

・ジガラクトシルアミン(3)の合成

2-2-2-21) で記した方法と同様の方法にて、ガラクトースで誘導した末端部を合成することができた。

DMF 中室温でジエチレントリアミン1当量に対して D-(-)-ガラクトノ-1,4-ラク톤を2当量反応させることによって、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ジガラクトシルアミン(3)を収率87%で得た(Scheme 2-2-03)。この場合にも反応が進行すると、生成物3はDMF中から結晶として析出するので精製が容易であった。



Scheme 2-2-03

化合物3の構造は¹H-NMRスペクトルでアミドプロトンの存在を確認し(Fig. 2-2-06)、さらに¹³C-NMRスペクトルで糖の4種類のメチン炭素と1種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した(Fig. 2-2-07)。

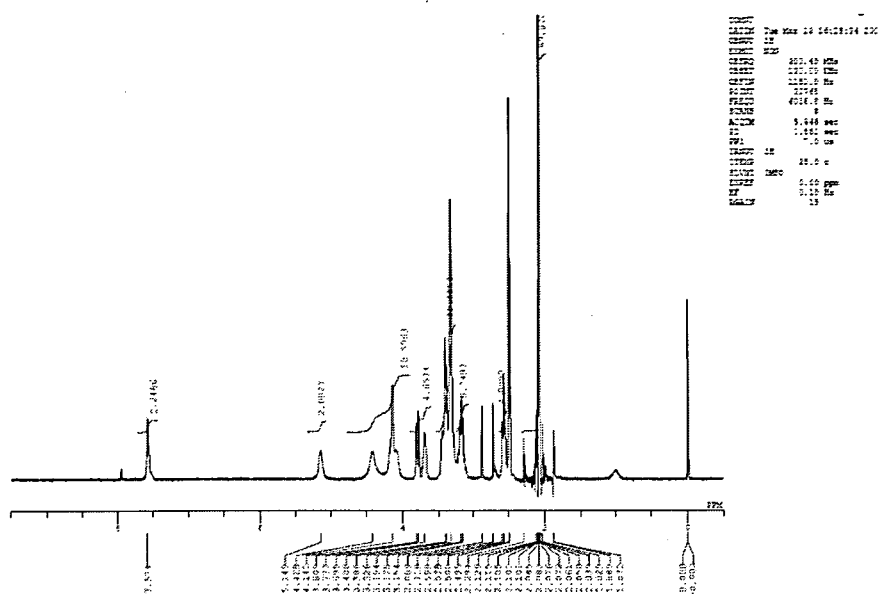


Fig. 2-2-06

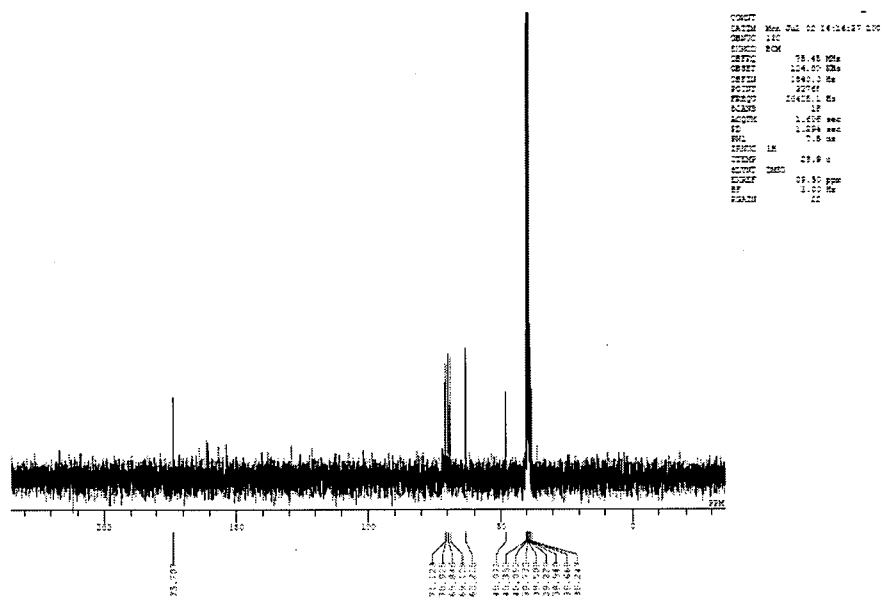
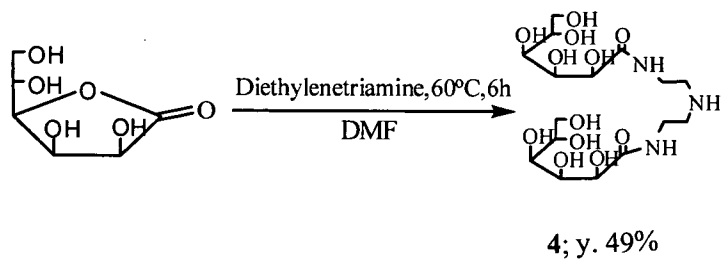


Fig. 2-2-07

・ ジマンノシルアミン(4)の合成

2-2-2-21) で記した方法と同様の方法にて、マンノースで誘導した末端部を合成することができた。

DMF 中室温でジエチレントリアミン1当量に対してD-(-)-マンノノ-1,4-ラクトン を2当量反応させることによって、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ジマンノシルアミン(4)を定量的に得た(Scheme 2-2-04)。この場合にも反応が進行すると、生成物4はDMF中から結晶として析出するので精製が容易であった。



Scheme 2-2-04

化合物 4 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し (Fig. 2-2-08)、さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルで糖の 4 種類のメチン炭素と 1 種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-09)。

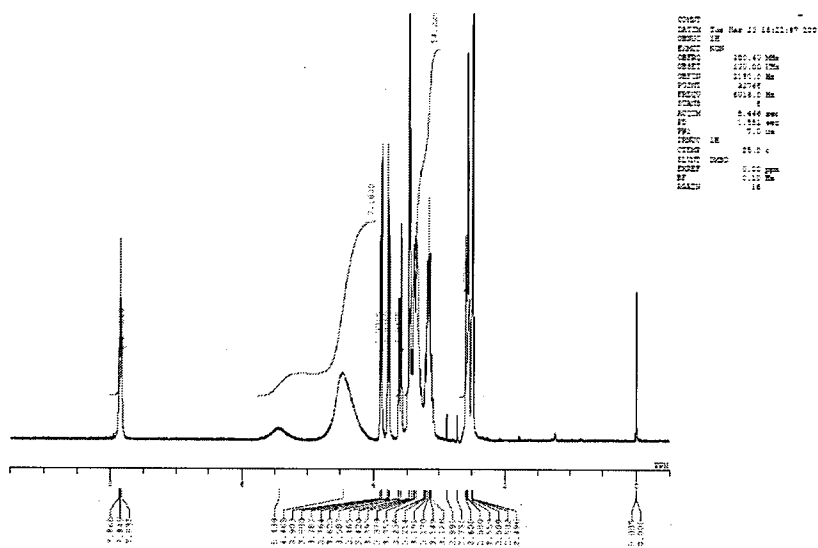


Fig. 2-2-08

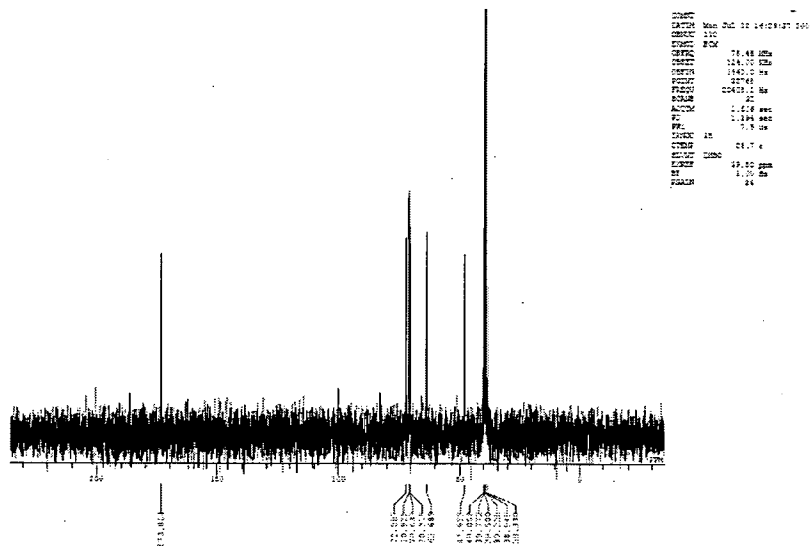


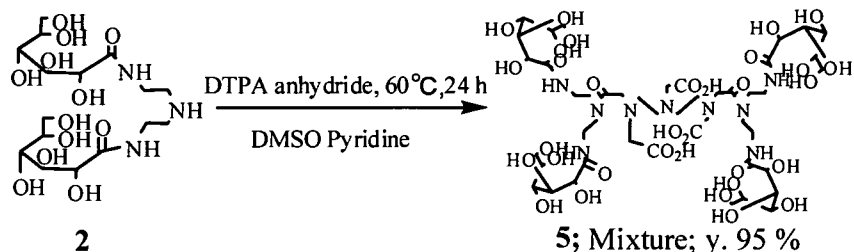
Fig. 2-2-09

2) DTPA-DETA-D2-4Sugar の合成

・ DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (5) の合成

合成した 1.2 当量の DTPA-二無水物 (1) と 2 当量の化合物 2 を DMSO 中、ピリジンを触媒とし 60 °C で反応させることで、DTPA-糖化合物 (DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)) (5) と DTPA の混合物を収率 95%* で合成した。(Scheme 2-2-05)。

*ここでの収率は、DTPA-糖化合物 (DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)) (5) が 1 当量に対して DTPA が 0.2 当量存在しているとし、その重量パーセントの収率とした。



Scheme 2-2-05

化合物 5 の構造は、¹H-NMR スペクトルでアミドプロトンの存在を確認したこと、3.70~2.50ppm に出現するピークは DTPA 存在のため DTPA およびエチレンジアミン由来の N 隣接メチレンピークの比率が増大したこと (Fig. 2-2-10)、また、MALDI-TOF-MS における DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (5) の分子イオンピーク 1274 ($[M-H]^-$) と DTPA の分子イオンピークである 392 ($[M-H]^-$) も同時確認されたこと (Fig. 2-2-11) 等により決定した。

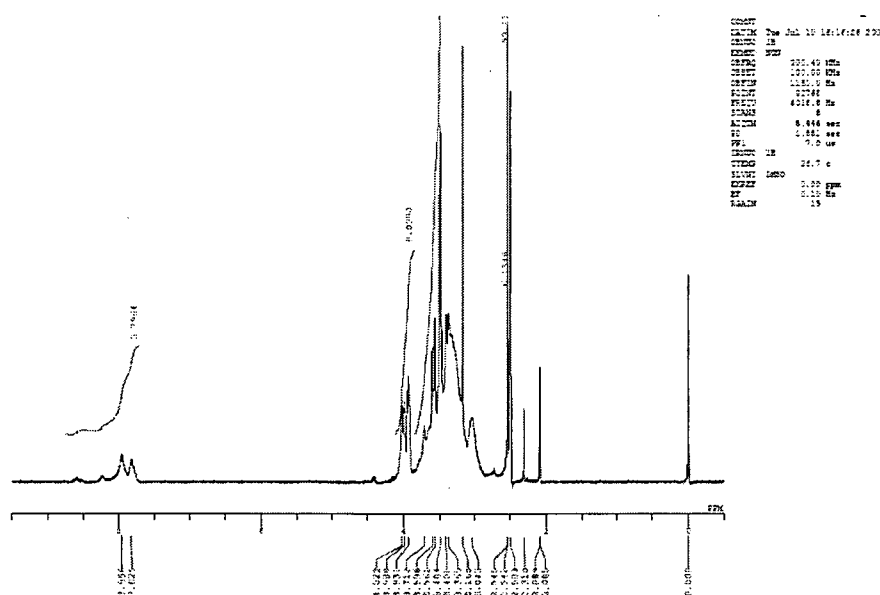


Fig. 2-2-10

化合物 7 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し、3.79~2.50 ppm に出現するピークは DTPA 存在のため DTPA およびエチレンジアミン由来の N 隣接メチレンピークの比率が増大したこと (Fig. 2-2-14)、また、MALDI-TOF-MS における DTPA-DETA-D2-4Man(OH) (7) の分子イオンピーク 1274 ($[M-H]^-$) と DTPA の分子イオンピークである 392 ($[M-H]^-$) も同時確認されたこと (Fig. 2-2-15) 等により決定した。

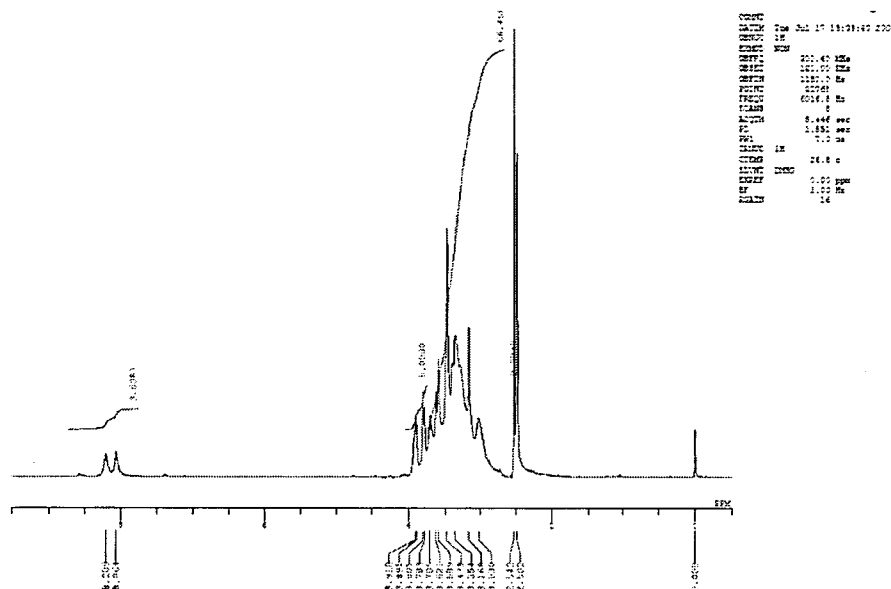


Fig. 2-2-14

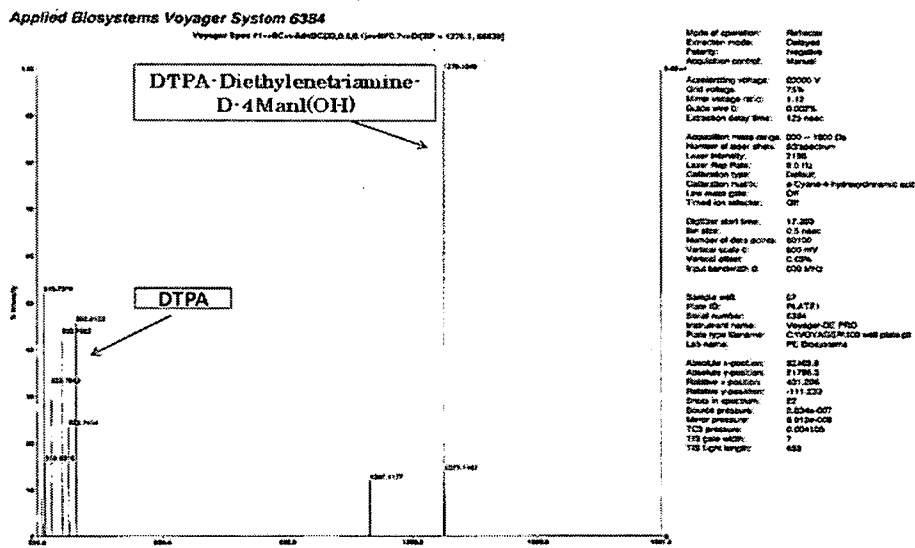
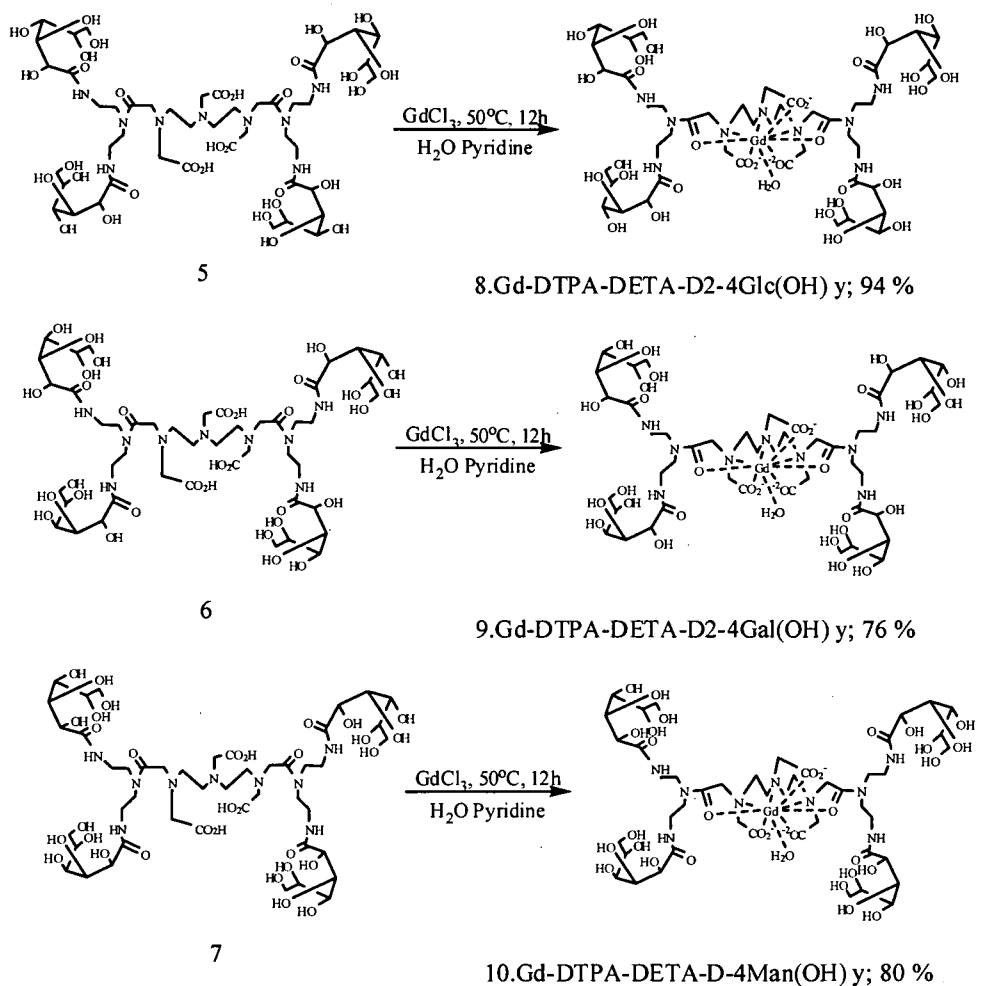


Fig. 2-2-15

3) Gd 錯体の合成

Gd-DTPA のガドリニウム源として塩化ガドリニウム(III)を利用した合成方法が報告されている。ここでもその方法を適用した。ピリジンを加えた水中で Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar (5-7) と DTPA の混合物と 1.1 当量の塩化ガドリニウム(III)を 40°C で反応させ、

Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar 8-10 をそれぞれ収率 94%, 76%, 80% で得た。反応終了後メタノールでリフラックス 3 回の洗浄を行うことにより、未反応の塩化ガドリニウム(III)とピリジン塩、さらに Gd-DTPA を洗うことができるためこの段階で精製が可能であった。DTPA-糖化合物 5-7 の合成において生成物の **DTPA-DETA-D2-4Sugar** の他に存在する DTPA は溶媒に対する溶解度が互いに似ているために化合物 5-7 の単離生成はできなかったが、ガドリニウムを配位させることにより、Gd-DTPA のメタノールへの溶解度が上がり、**Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar** 8-10 はメタノールに対して溶解度が低いので、よって、この Gd による錯体形成の段階で、メタノールで洗浄という操作によって化合物 8-10 の単離精製が可能になったためである。



Scheme 2-2-08

化合物 8-10 は、MALDI-TOF-MS によるスペクトルで **Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar** 8-10 の分子イオンピーク 1430 [$M-H_2O$]⁻分子量付近に Gd (^{152}Gd (151.919803), 0.8052%; ^{154}Gd (153.920876), 8.7762%; ^{155}Gd (154.922629), 59.5813%; ^{156}Gd (155.922130), 82.4074%; ^{157}Gd (156.923967), 63.0032%; ^{158}Gd (157.924111), 100.0000%; ^{160}Gd (159.927061), 88.0032%) の配位による同位体ピークを確認することができた (Fig. 2-2-16)。また、複合 TEM によるスペクトルにおいて、いずれも Gd 原子のピークが確認、また C1 原子のピークがないことから、急性毒性を持つ塩化ガドリニウムの存在が

ないことが示され、ことから構造 Gd 錯体 8-10 を同定した (Fig. 2-2-17)。

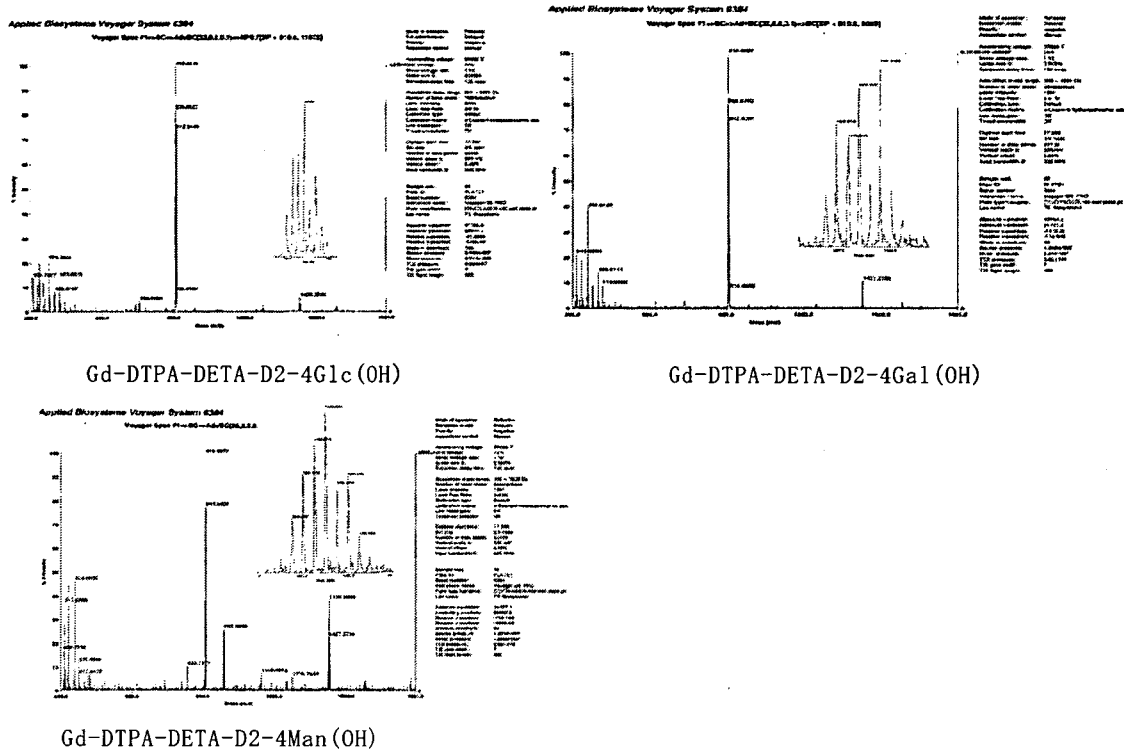


Fig. 2-2-16

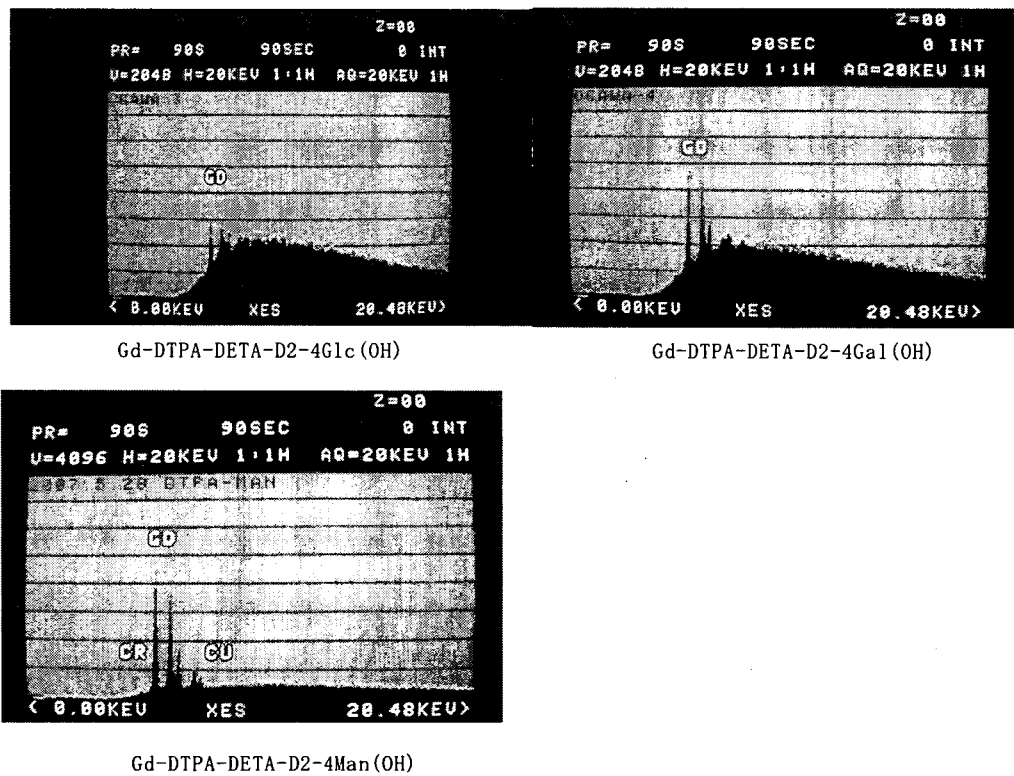


Fig. 2-2-17

2-2-2-3 Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の合成

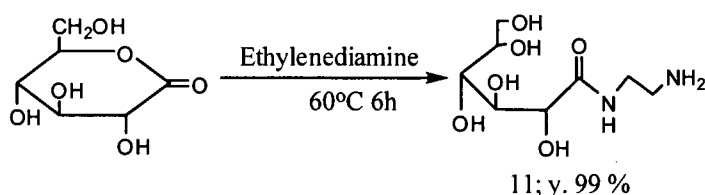
1) 末端(Terminal)部の合成

本研究では、末端部の合成は、まずエチレンジアミンとグルコノラクトンを出発物質として行った。但し、過去に報告されている合成の段階においては、遊離のヒドロキシル基をパーアセチル保護する合成方法をとっているが、その方法では合成が多段階にわたり、収率が低下する問題点があることが判っている。そこで今回パーアセチル保護を経由しない合成法を行った。末端部の合成は1ステップで高収率で進み、全収率は98%であった。また、同様の方法にて、出発物質をガラクトース、マンノース由来のラクトン体として、ガラクトース、マンノースの様に異なる糖による末端部を合成した。それぞれの糖に対する末端部の全収率は96%、100%であった。

・モノグルコシルアミンの(11)合成

エチレンジアミンの2つの第一級アミンのうち1つのアミノ基のみに糖を導入するために、エチレンジアミンと糖を60:1で反応させることで、糖をジアミノに対して1当量だけ反応するにとどめることに成功した。

モノグルコシルジアミン(11)はアルゴン雰囲気下大過剰のエチレンジアミンに対してDMFに溶解したD-(+)-グルコノ-1,5-ラクトンをゆっくりと滴下することにより合成した。未反応のエチレンジアミンと溶媒であるDMFは減圧下で留去することでモノグルコシルアミン(11)を収率98%(Scheme 2-2-09)で得た。



Scheme 2-2-09

化合物11の構造は¹H-NMRスペクトルでアミドプロトンの存在を確認し(Fig. 2-2-18)、さらに¹³C-NMRスペクトルで糖の4種類のメチン炭素と1種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した(Fig. 2-2-19)。

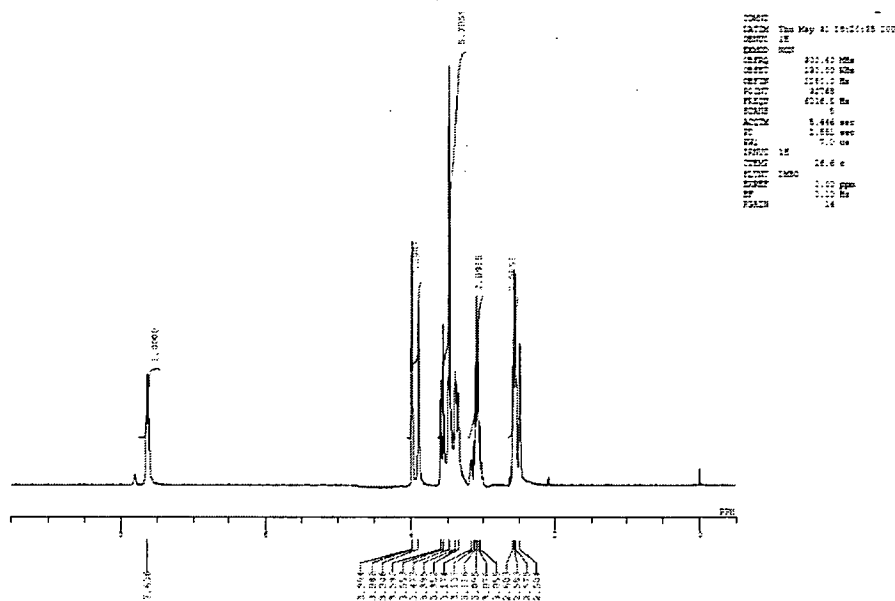


Fig. 2-2-18

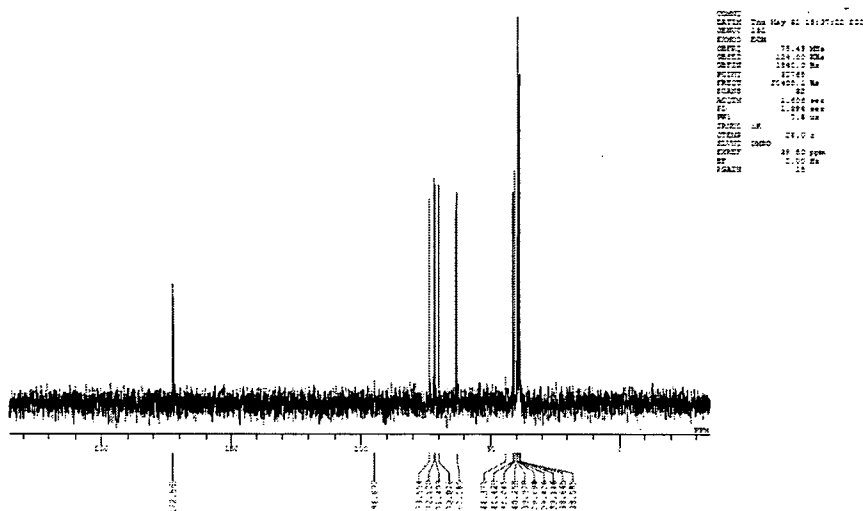
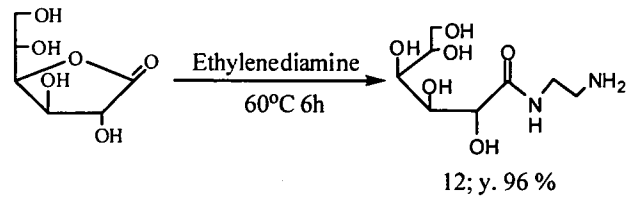


Fig. 2-2-19

・モノガラコシルアミン(12)の合成

エチレンジアミンの2つの第一級アミンのうち1つのアミノ基のみに糖を導入するために、エチレンジアミンと糖を60:1で反応させることで、糖を1当量にとどめることに成功した。

モノガラコシルアミン(12)はアルゴン雰囲気下大過剰のエチレンジアミンに対してDMFに溶解したD-(-)-ガラクトノ-1,4-ラク톤をゆっくりと滴下することにより合成した。未反応のエチレンジアミンと溶媒であるDMFは減圧下で留去することでモノガラコシルアミン(12)を収率96%(Scheme 2-2-10)で得た。



Scheme 2-2-10

化合物 12 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し (Fig. 2-2-20)、さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルで糖の 4 種類のメチン炭素と 1 種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-21)。

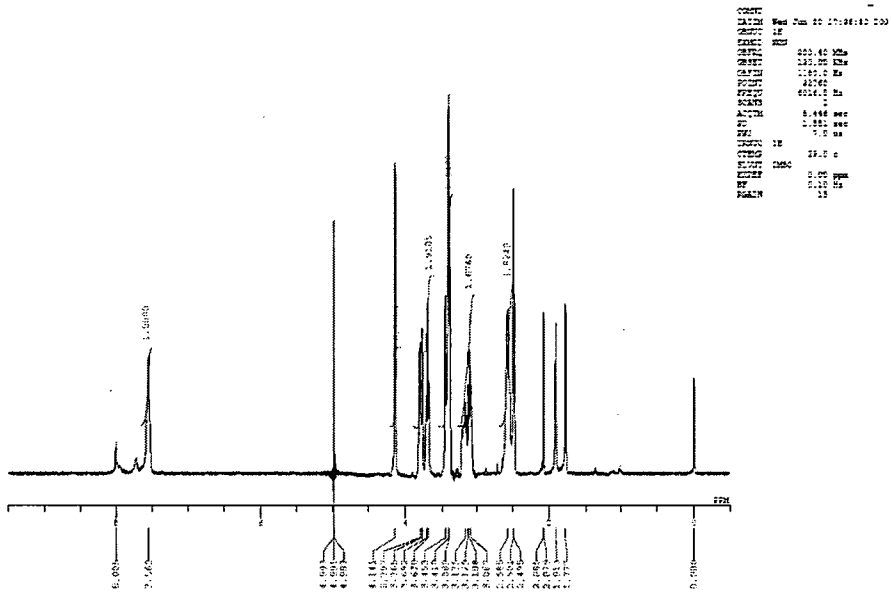


Fig. 2-2-20

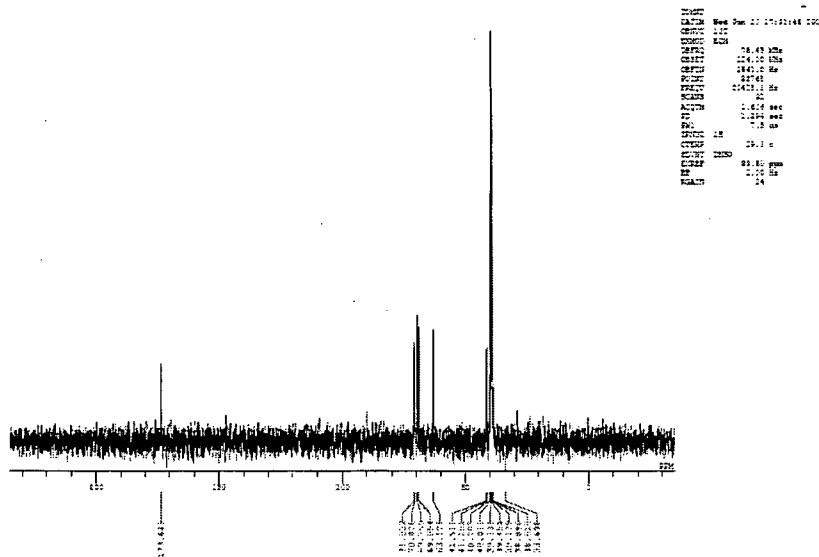
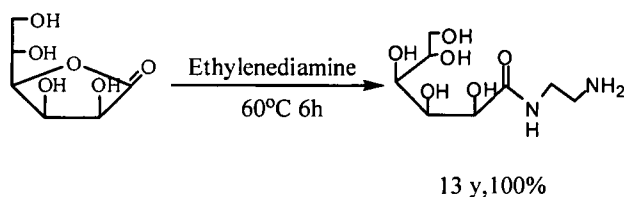


Fig. 2-2-21

・ モノマンノシルアミンの合成 (13)

エチレンジアミンの 2 つの第一級アミンのうち 1 つのアミノ基のみに糖を導入するために、エチレンジアミンと糖を 60:1 で反応させることで、反応する糖を 1 当量にとどめることに成功した。

モノマンノシルアミン(13)はアルゴン雰囲気下大過剰のエチレンジアミンに対して DMF に溶解した D-(-)-マンノノ-1,4-ラク톤をゆっくりと滴下することにより合成した。未反応のエチレンジアミンと溶媒である DMF は減圧下で留去することでモノマンノシルアミン(13)を収率 100 % (Scheme 2-2-11) で得た。



Scheme 2-2-11

化合物 13 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し (Fig. 2-2-22)、さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルで糖の 4 種類のメチン炭素と 1 種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-23)。

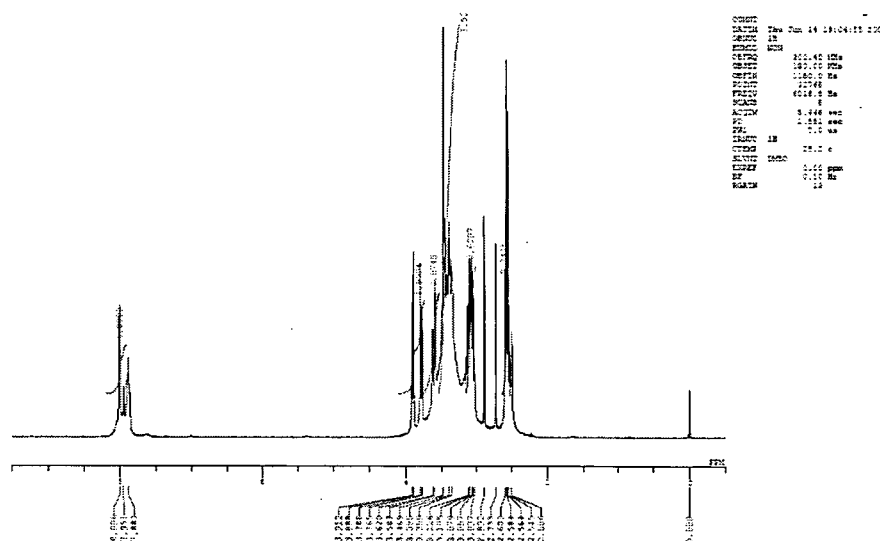


Fig. 2-2-22

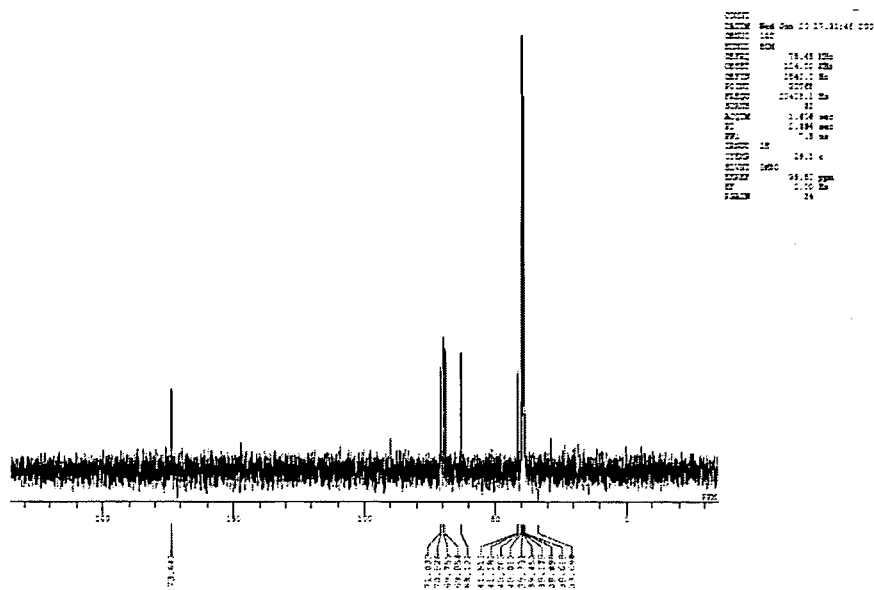


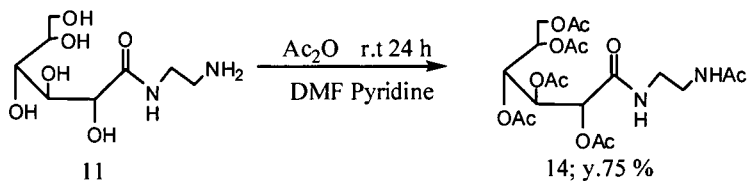
Fig. 2-2-23

2) 末端(Terminal)部の確認

今回合成した化合物 11-13 は非対称形であり $^1\text{H-NMR}$ のヒドロキシル基のプロトンのピークが見られなかった。そこで構造決定のため化合物 11-13 をアセチル化した。さらに、それぞれのラクトンとベンジルアミンとの反応、さらにそのアセチル化を行い化合物 11-13 の構造決定の予備実験とした。

・ モノグルコシルアミン(11)のアセチル化

アルゴン雰囲気下、DMF 中、室温でモノグルコシルアミン(11) 1 当量と無水酢酸 6 当量とピリジンを加え攪拌することによって、アセチル誘導体である化合物(14)を収率 75 %で得た(Scheme 2-2-12)。



Scheme 2-2-12

化合物 14 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 2.23~1.90 ppm に出現するアセチル由来のピークにおけるプロトン数と 5.70~5.00 ppm に出現する糖由来のメチンピークのプロトン数で確認した(Fig. 2-2-24)。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでアセチル由来のメチル炭素とカルボニル炭素の存在を確認することにより同定した(Fig. 2-2-25)。

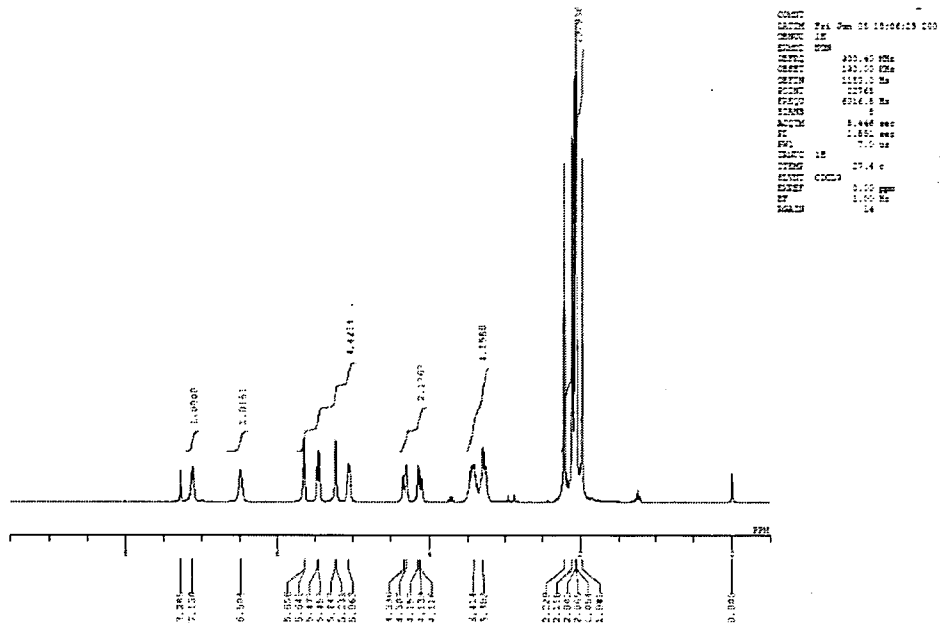


Fig. 2-2-24

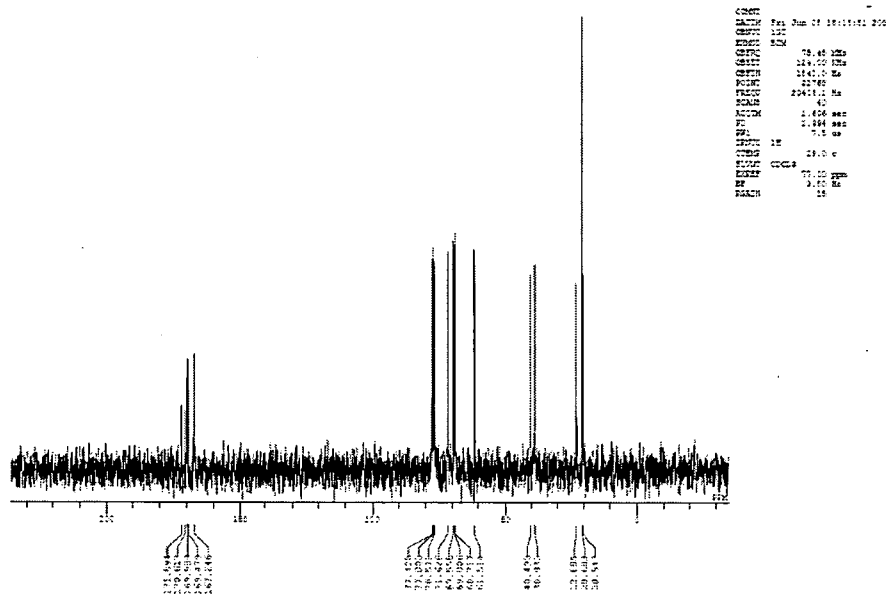
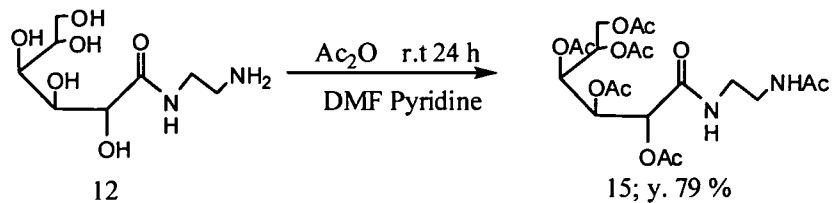


Fig. 2-2-25

・モノガラコシルアミン(12)のアセチル化

アルゴン雰囲気下、DMF中、室温でモノグルコシルアミン(12) 1当量と無水酢酸6当量とピリジンを加え攪拌することによって、アセチル誘導体である化合物15を収率79%で得た(Scheme 2-2-13)。



Scheme 2-2-13

化合物 14 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 2.25~1.97 ppm に出現するアセチル由来のピークにおけるプロトン数と 5.65~5.16 ppm に出現する糖由来のメチンピークのプロトン数で確認した (Fig. 2-2-26)。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでアセチル由来のメチル炭素とカルボニル炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-27)。

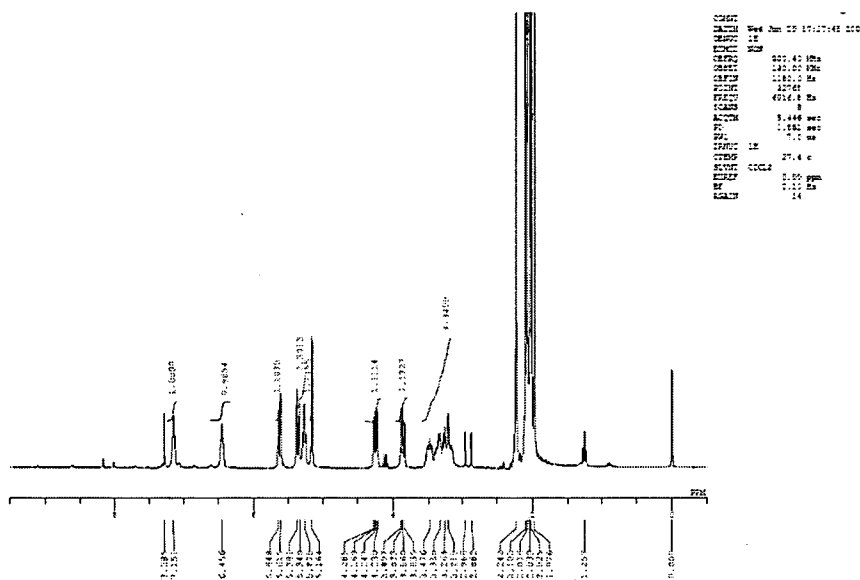


Fig. 2-2-26

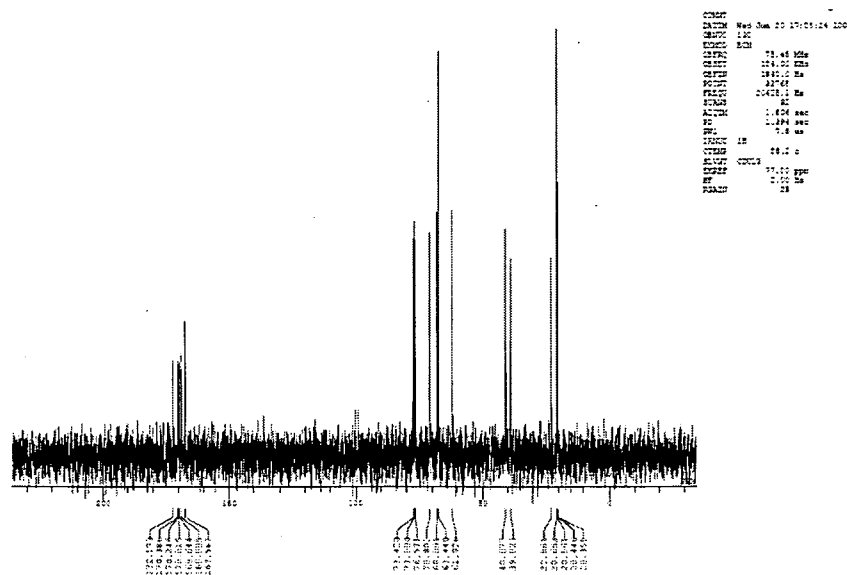


Fig. 2-2-27