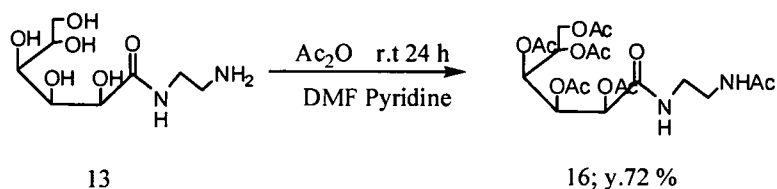


・ **モノマンノシルアミン(13)のアセチル化**

アルゴン雰囲気下、DMF中、室温でモノマンノシルアミン(13) 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16を収率72%で得た(Scheme 2-2-14)。



Scheme 2-2-14

化合物16の構造は¹H-NMRスペクトルによって2.21~1.99 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5.53~5.13 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. 2-2-28)。さらに¹³C-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. 2-2-29)。

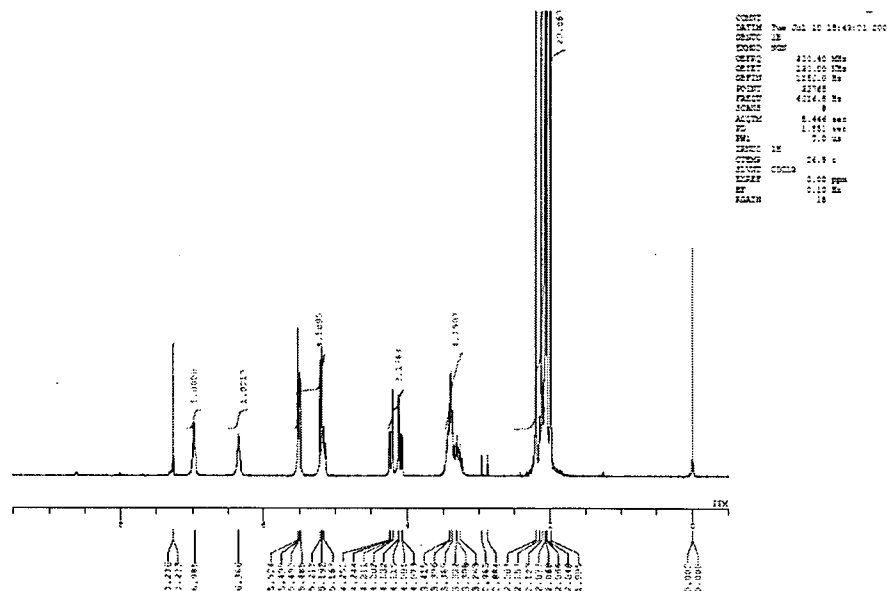


Fig. 2-2-28

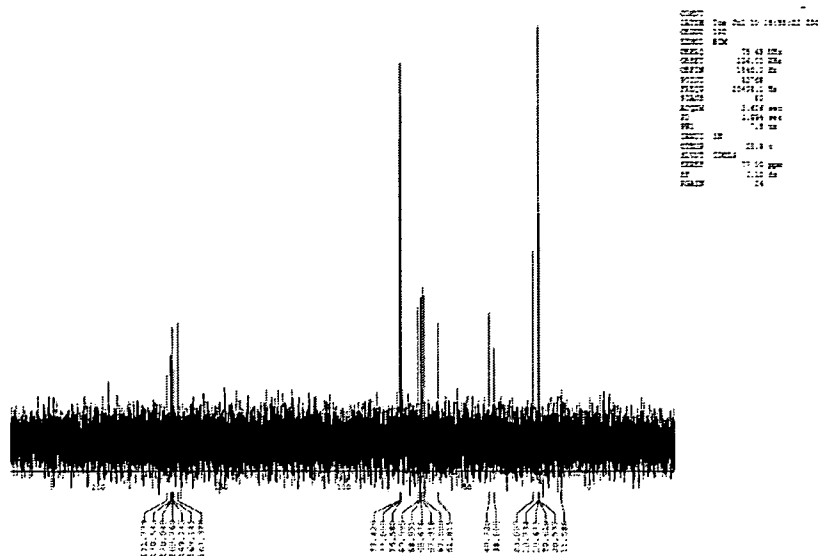
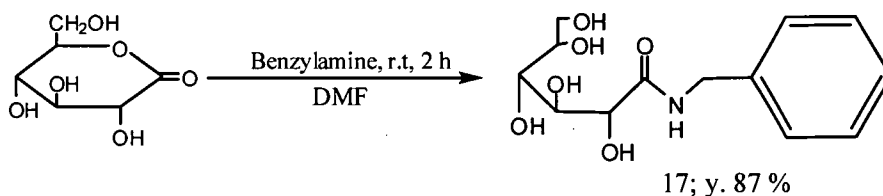


Fig. 2-2-29

・ グルコシルベンジルアミド(17)の合成

アルゴン雰囲気下、DMF 中、室温で D-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン 1 当量とベンジルアミン 1 当量とを加え攪拌することによって、化合物 17 を収率 87 % で得た (Scheme 2-2-15)。



Scheme 2-2-15

化合物 17 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 3.58~3.40 ppm に出現する糖由来のメチンピークのプロトン数と 7.30~7.22 ppm に出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した (Fig. 2-2-30)。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでフェニル基由来の sp^2 炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-31)。

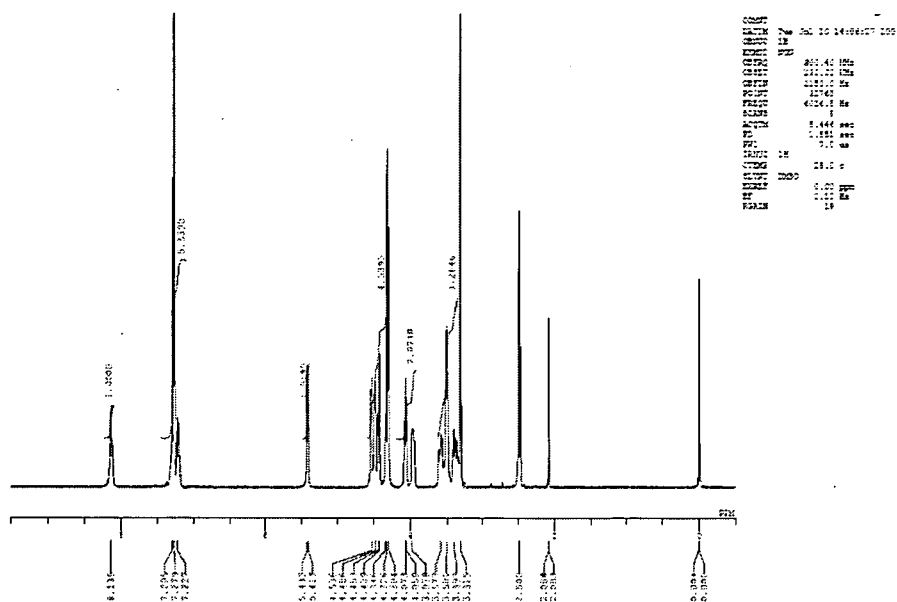


Fig. 2-2-30

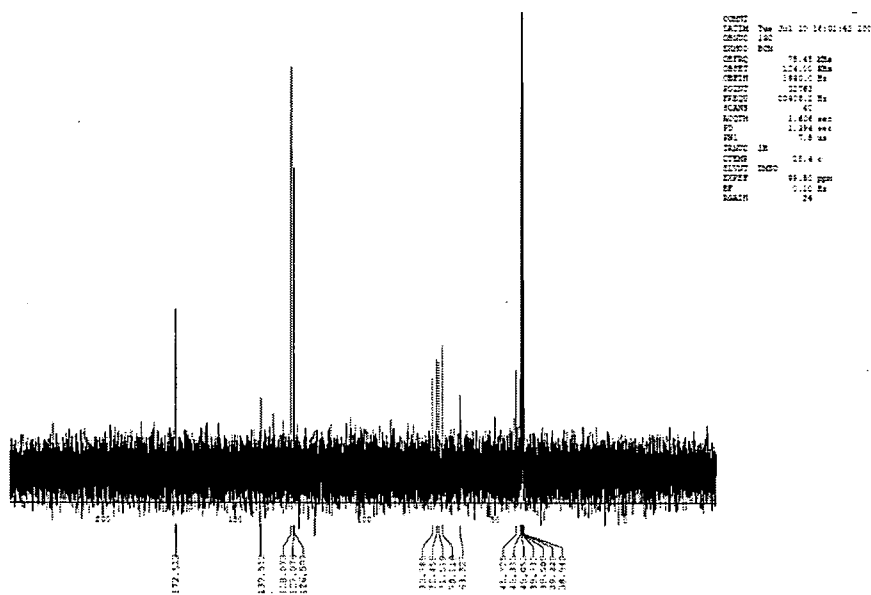
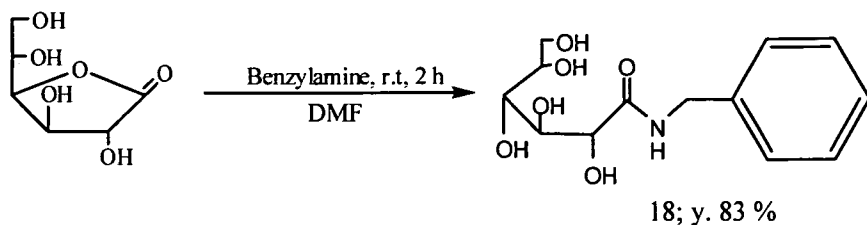


Fig. 2-2-31

・ ガラコシルベンジルアミド(18)の合成

アルゴン雰囲気下、DMF中、室温でD(-)-ガラクトノ-1,4-ラクトン1当量とベンジルアミン1当量とを加え攪拌することによって、化合物18を収率83%で得た(Scheme 2-2-16)。



Scheme 2-2-16

化合物 18 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 3.50~3.40 ppm に出現する糖由来のメチンピークのプロトン数と 7.30~7.2-2 ppm に出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した (Fig. 2-2-32)。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでフェニル基由来の sp^2 炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-33)。

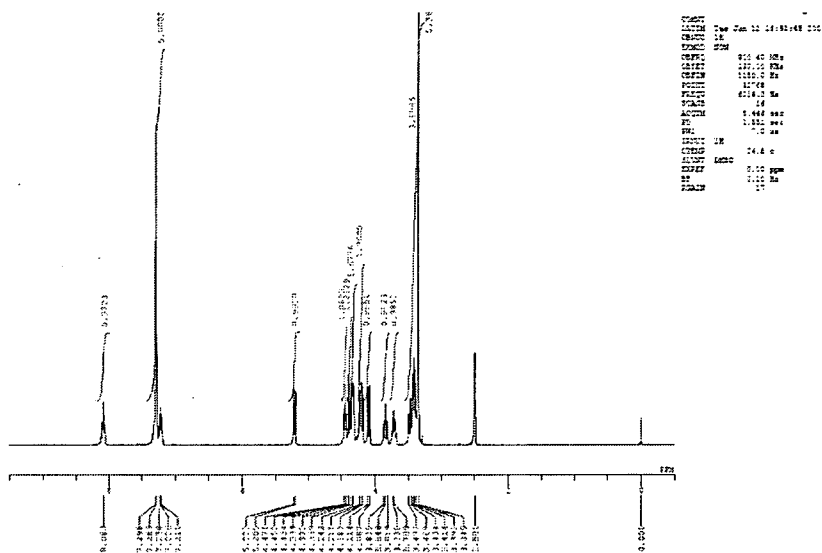


Fig. 2-2-32

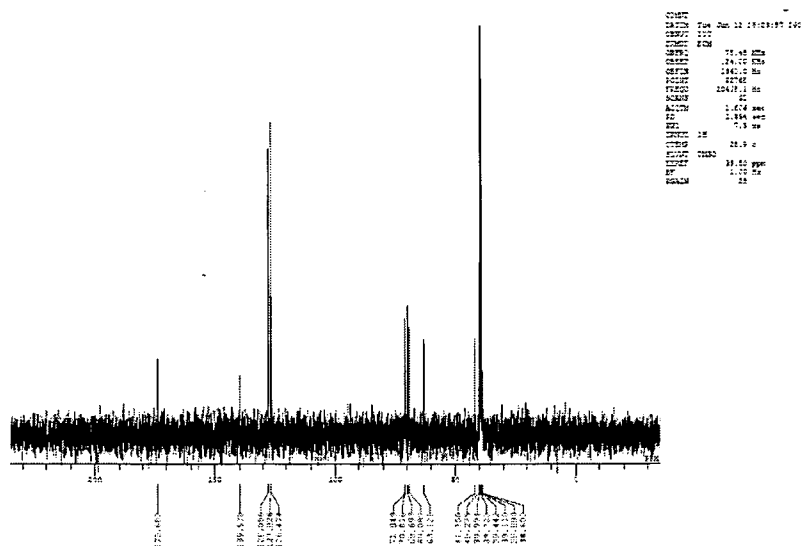
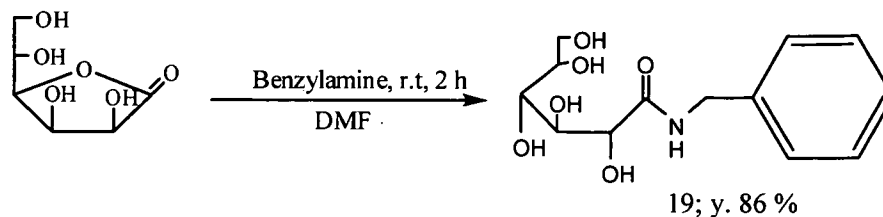


Fig. 2-2-33

・ マンノシルベンジルアミド(19)の合成

アルゴン雰囲気下、DMF中、室温でD-(-)-ガラクトノ-1,4-ラクトン1当量とベンジルアミン1当量とを加え攪拌することによって、化合物19を収率86%で得た(Scheme 2-2-17)。



Scheme 2-2-17

化合物19の構造は¹H-NMRスペクトルによって3.60~3.40 ppmに出現する糖由来のメチンピークのプロトン数と7.30~7.22 ppmに出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した(Fig. 2-2-34)。さらに¹³C-NMRスペクトルでフェニル基由来のsp²炭素の存在を確認することにより同定した(Fig. 2-2-35)。

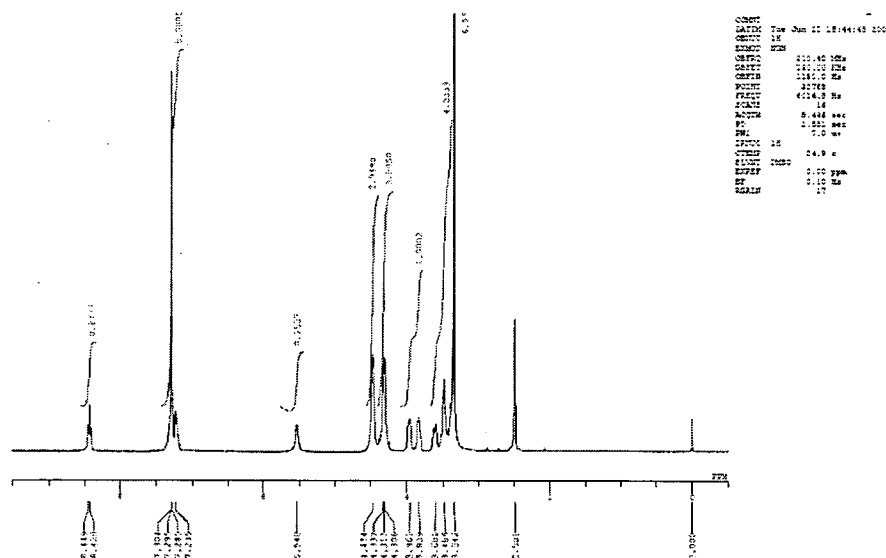


Fig. 2-2-34

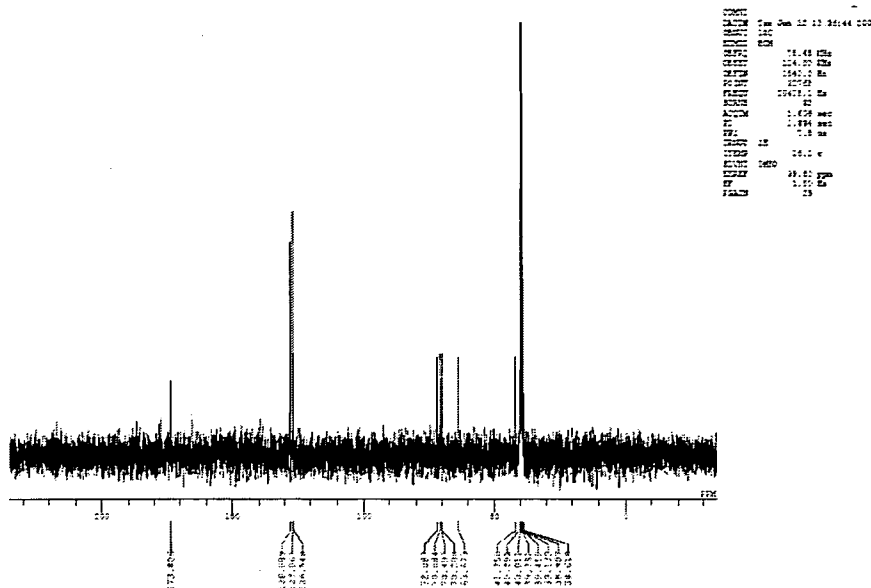
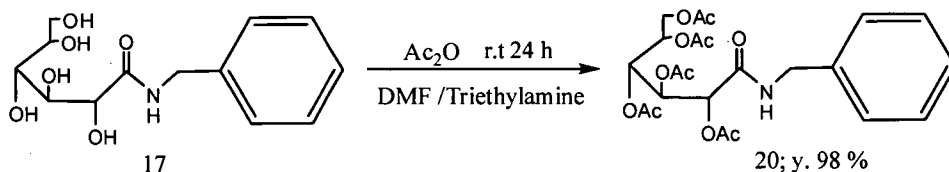


Fig. 2-2-35

・ グルコシルベンジルアミド(17)のAc化

アルゴン雰囲気下、DMF中、室温でグルコシルベンジルアミド(17) 1当量と無水酢酸5当量とトリエチルアミ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20を収率75%で得た(Scheme 2-2-18)。



Scheme 2-2-18

化合物20の構造は¹H-NMRスペクトルによって2.20~1.93 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7.33~7.22 ppmに出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した(Fig. 2-2-36)。さらに¹³C-NMRスペクトルでフェニル基由来のsp²炭素と炭素の存在を確認することにより同定した(Fig. 2-2-37)。

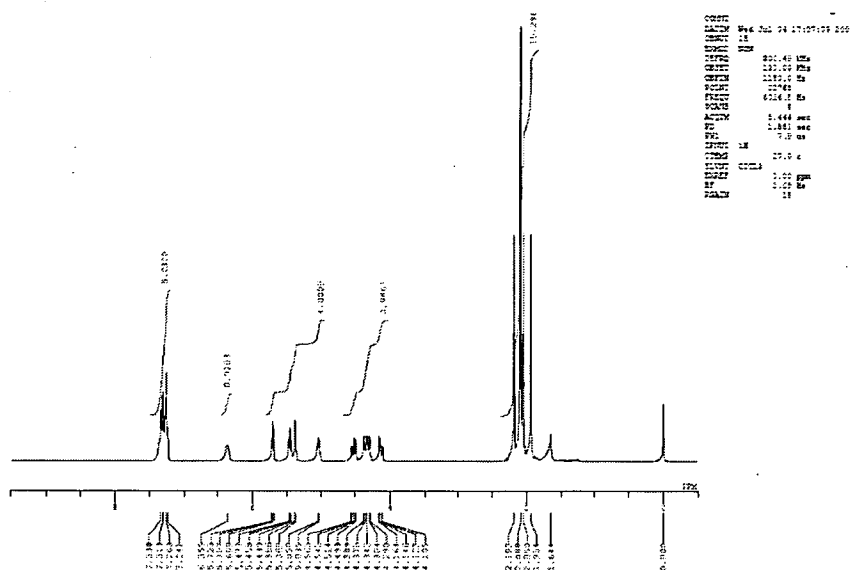


Fig. 2-2-36

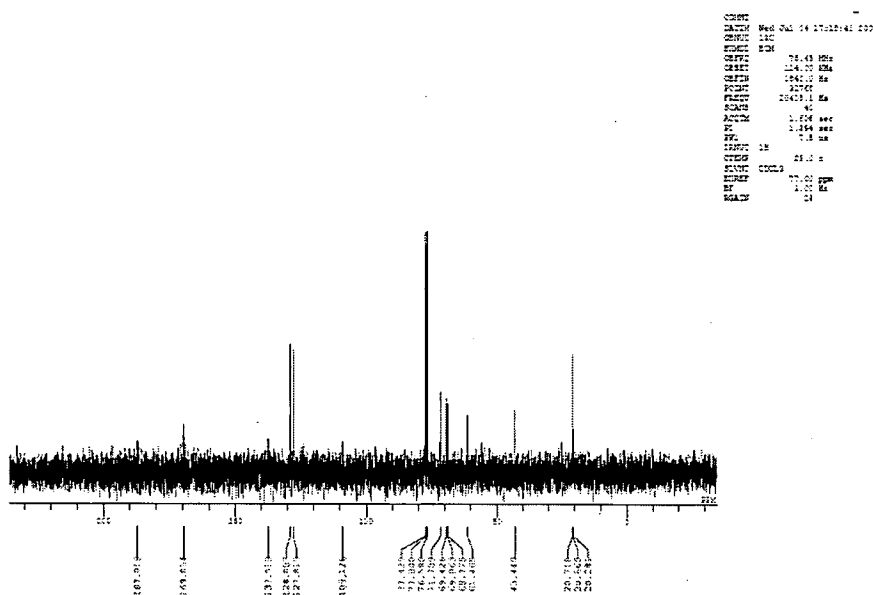
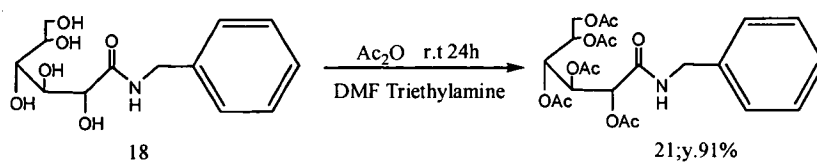


Fig. 2-2-37

・ ガラクトシルベンジルアミド(18)の Ac 化

アルゴン雰囲気下、DMF 中、室温でガラクトシルベンジルアミド 18 1 当量と無水酢酸 5 当量とトリエチルアミ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 21 を収率 91 % で得た (Scheme 2-2-19)。



Scheme 2-2-19

化合物 21 の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 2.29~2.00 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 7.33~7.22 ppm に出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した (Fig. 2-2-38)。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. 2-2-39)。

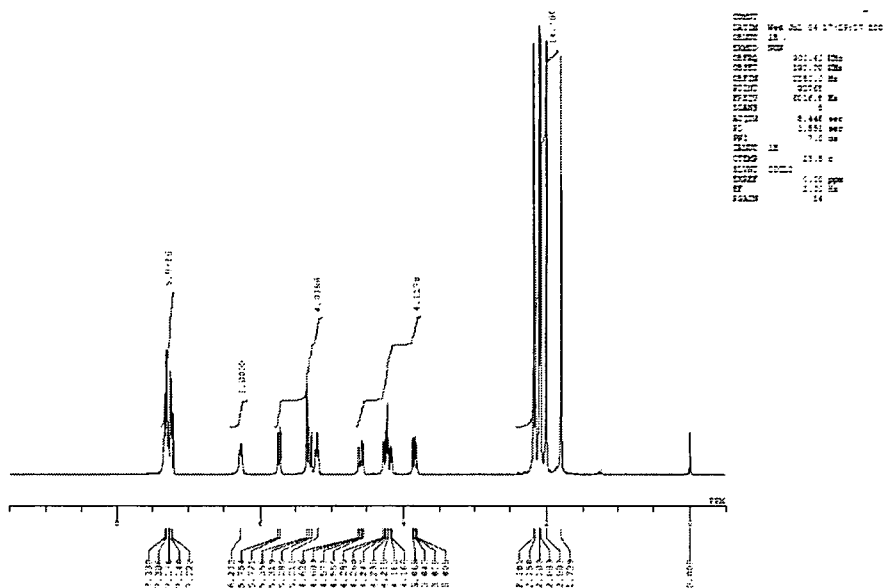


Fig. 2-2-38

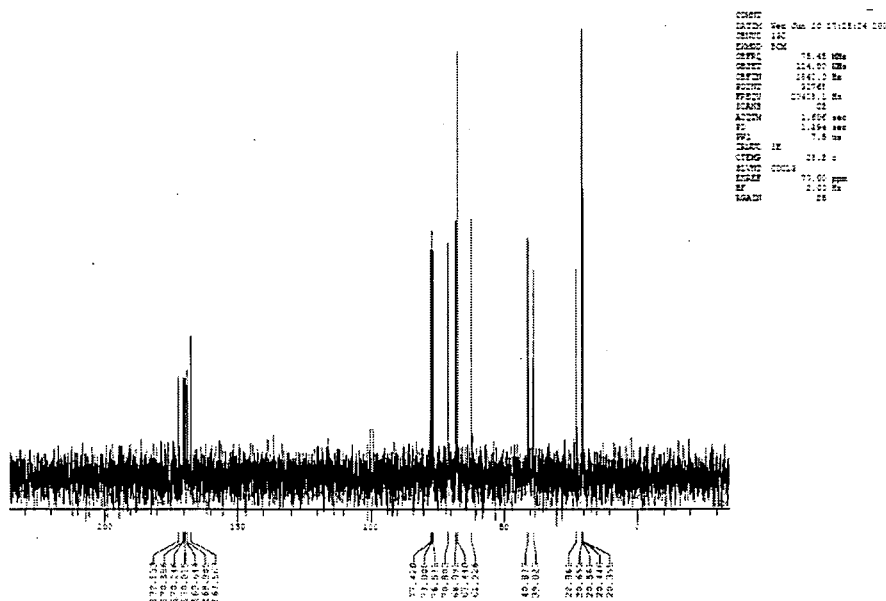
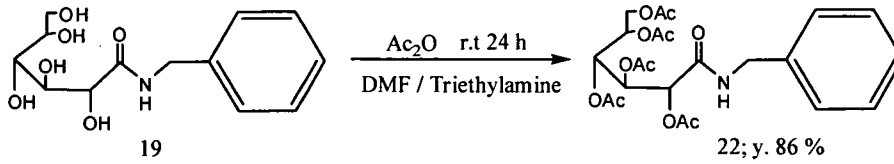


Fig. 2-2-39

・ マンノシルベンジルアミド(19)の Ac 化

アルゴン雰囲気下、DMF 中、室温でマンノシルベンジルアミド(19) 1 当量と無水酢酸 5 当量とトリエチルアミ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 22 を収率 86 % で得た (Scheme 2-2-20)。



Scheme 2-2-20

化合物 **22** の構造は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって 2.23~1.93 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 7.34~7.26 ppm に出現するフェニル基由来の芳香族のプロトン数で確認した (Fig. 2-2-40)。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. 2-2-41)。

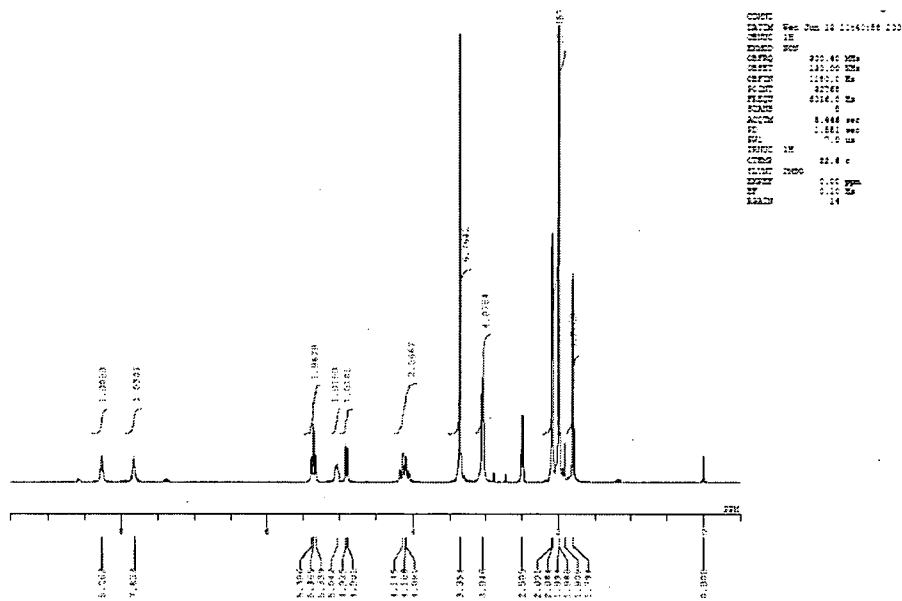


Fig. 2-2-40

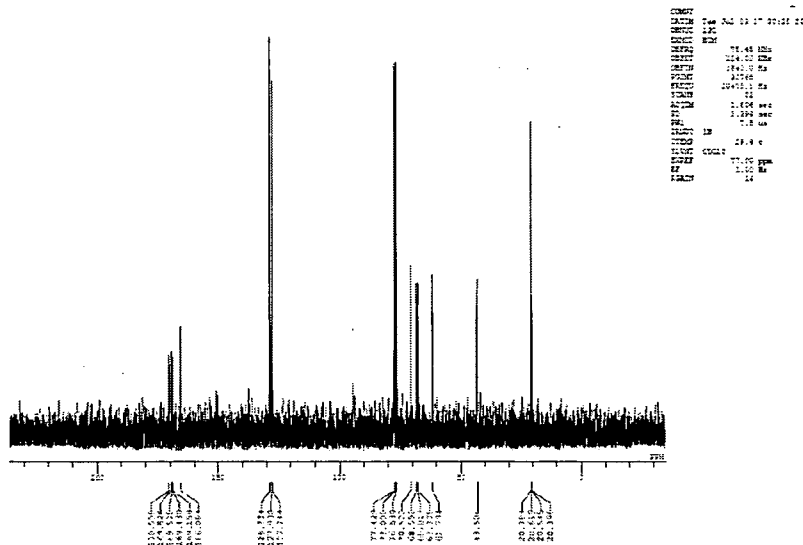
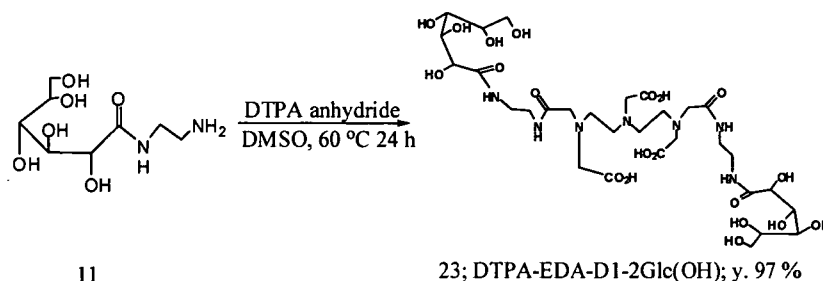


Fig. 2-2-41

3) Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar の合成

・ DTPA-EDA-D1-2Glc(OH) の合成

合成した 1 当量の DTPA-二無水物 (1) と 2 当量のモノグルコシルアミン (11) を DMSO 中 60 °C、24 時間反応させることで、DTPA-糖化合物 (DTPA-EDA-D1-2Glc(OH)) を収率 97 % で合成した (Scheme 2-2-21)。



Scheme 2-2-21

化合物 23 の構造は ¹H-NMR において 4.34~3.54 ppm に出現する糖由来のメチンおよびメチレンピークと、3.50~2.50 ppm に出現する 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プロトン数の比によってコア部に糖が 2 分子導入されているということも示唆された (Fig. 2-2-42)。加えて、MALDI-TOF-MS における分子イオン-1 のピーク 832, [M-H]⁻により化合物 23 の構造が裏付けられた (Fig. 2-2-43)。

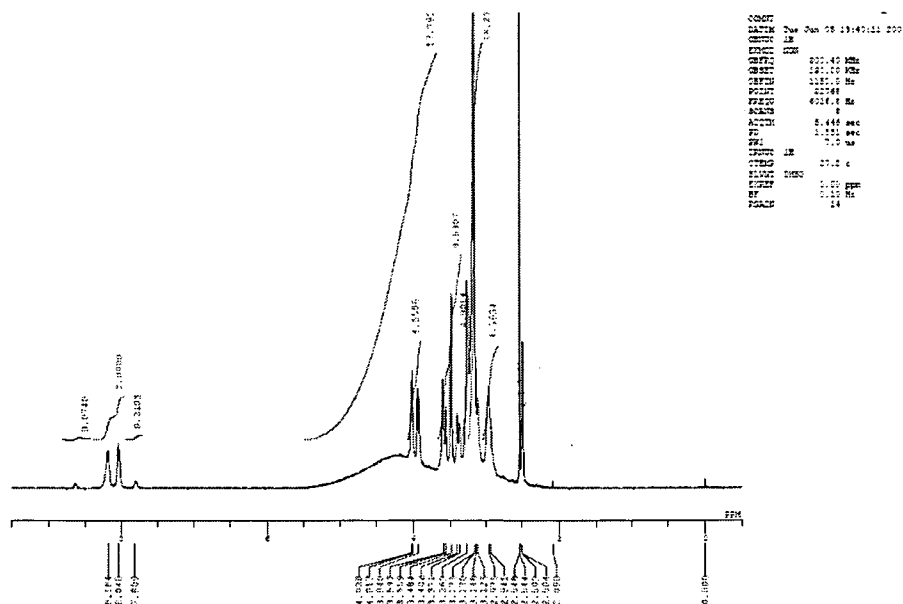
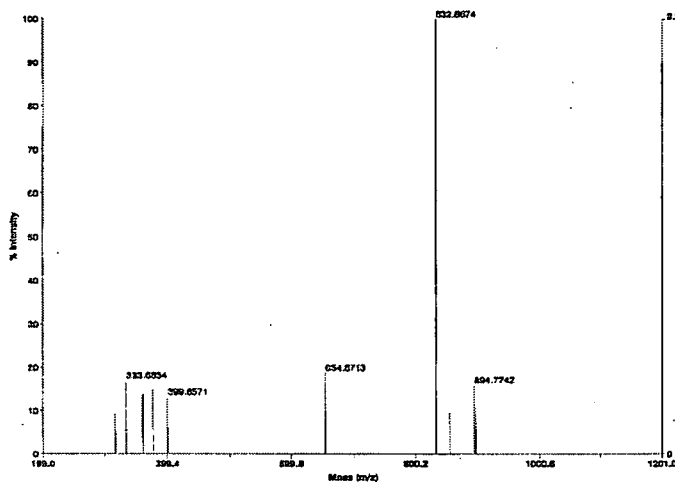


Fig. 2-2-42

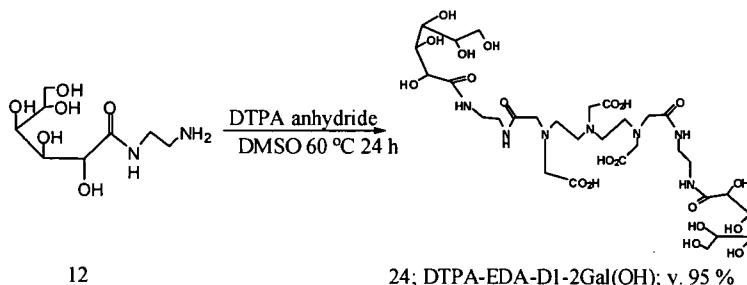


Mode of operation: Reflector
 Scan mode: Delayed
 Polarity: Negative
 Acquisition control: Manual
 Accelerating voltage: 20000 V
 Grid voltage: 75%
 Mirror voltage ratio: 1.12
 Gate wire C: 0.002%
 Extraction delay time: 125 nsec
 Acquisition mass range: 200 - 1200 Da
 Number of laser shots: 100/spectrum
 Laser frequency: 1800
 Laser trip time: 2.5 Hz
 Calibration type: Delayed
 Calibration matrix: *m*-Cyano-4-hydroxycyclohexane snc
 Low mass gate: Off
 Timed ion selection: Off
 Digester start time: 14.222
 Ion size: 0.0 nsec
 Number of data points: 42007
 Vertical scale C: 600 mV
 Vertical offset: 0.00%
 Input bandwidth C: 300 MHz
 Sample well: 50
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 6384
 Instrument name: Voyager-DE PRO
 Plate type identifier: C010YACEN100 well plate.ct
 Lab name: PG Bioscience
 Absolute x-position: 42029.4
 Absolute y-position: 20771
 Relative x-position: -1136.46
 Relative y-position: 100
 Scan pressure: 2.58e-007
 Mirror pressure: 7.25e-009
 TIC pressure: 0.00308
 TIS gate width: 7
 TIS light length: 608

Fig. 2-2-43

・ DTPA-EDA-D1-2Gal(OH) の合成

合成した 1 当量の DTPA-二無水物 (1) と 2 当量のモノガラクトシルアミン (12) を DMSO 中、60 °C、24 時間反応させることで、DTPA-糖化合物 (DTPA-EDA-D1-2Gal(OH)) (24) を収率 95 % で合成した (Scheme 2-2-22)。



Scheme 2-2-22

化合物 24 の構造は $^1\text{H-NMR}$ において 3.80~3.70 ppm に出現する糖由来のメチレンピークと、3.70~2.50 ppm に出現する糖由来のメチンピークと 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プロトン数の比によってコア部に糖が 2 分子導入されているということも示唆された (Fig. 2-2-44)。加えて、MALDI-TOF-MS における分子イオン-1 ピークより 832, $[M-H]^-$ により化合物 24 の構造が裏付けられた (Fig. 2-2-45)。

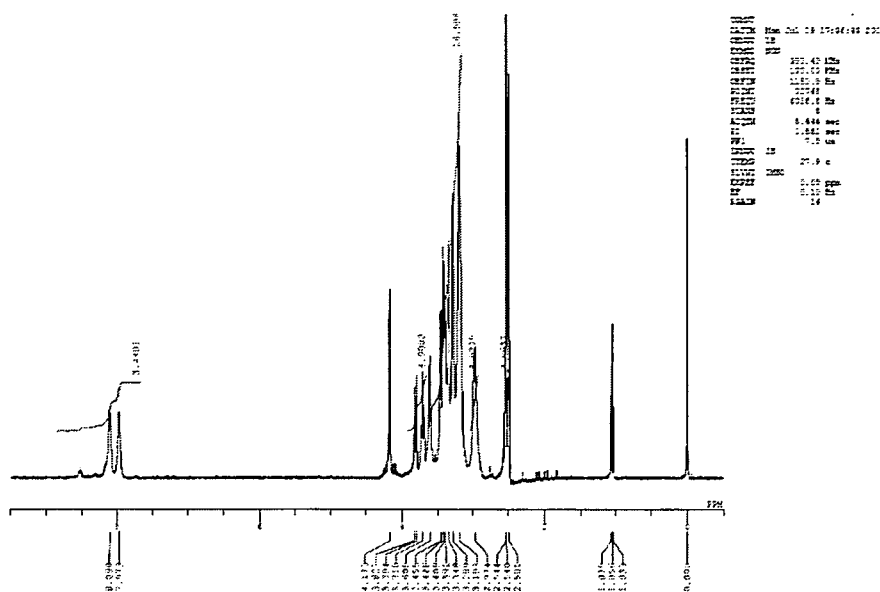
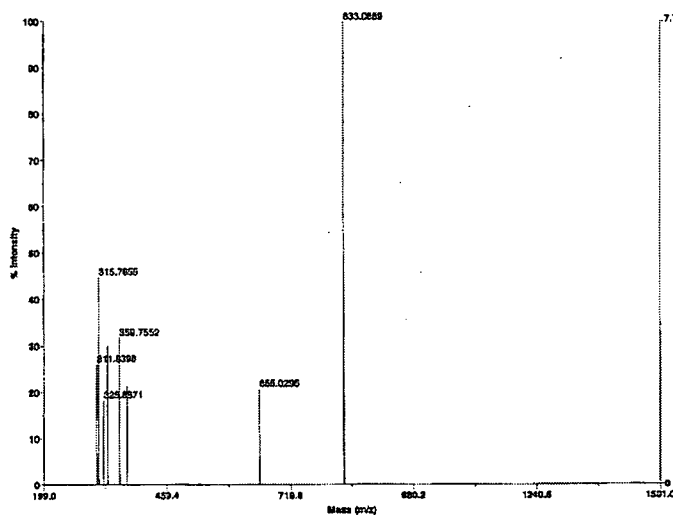


Fig. 2-2-44

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1 => BC => AdvBC(32,0.5,0.1) => NF0.7 => D[BP = 633.1, 76726]

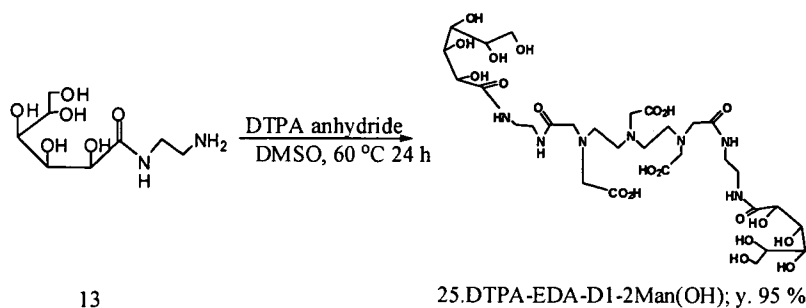


Mode of operation: Reflectron
 Extraction mode: Delayed
 Polarity: Negative
 Acceleration control: Manual
 Accelerating voltage: 20000 V
 7.7E+4 (kV) voltage: 75%
 Mirror voltage ratio: 1.12
 - Gunne wire O
 Extraction delay time: 125 msec
 Acquisition mass range: 200 - 1500 Da
 Number of laser shots: 50 Spectra/scan
 Laser intensity: 2000
 Laser Rep Rate: 3.0 Hz
 Collision type: Dwell
 Collision reagent: o-Diethyl-hydroxybenzoic acid
 Low mass gas: On
 Trapped ion selector: Off
 Digitizer start time: 14.222
 Gun size: 0.5 mm
 Number of data points: 4000
 Vertical scale: 0.50 mV
 Vertical offset: 0.85%
 Input bandwidth: 500 kHz
 Sample well: 50
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 0204
 Instrument name: Voyager-DE PRO
 Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plate.m
 Lab name: PE Biosystems
 Absolute x-position: 87505.5
 Absolute y-position: 11710.6
 Relative x-position: 878
 Relative y-position: -146.856
 Shots in spectrum: 25
 Source pressure: 3.01e-007
 Mirror pressure: 9.016e-008
 TIC pressure: 0.004028
 TSI gate width: 7
 TSI flight length: 658

Fig. 2-2-45

• DTPA-EDA-D1-2Man(OH) (25) の合成

合成した 1 当量の DTPA-二無水物(1)と 2 当量のモノマンノシルアミン(13)を DMSO 中、ピリジンを経触媒とし 60 °C、24 時間反応させることで、DTPA-糖化合物(DTPA-EDA-D1-2Man(OH)) (25)を収率 95 %で合成した(Scheme 2-2-23)。



Scheme 2-2-23

化合物 25 構造は $^1\text{H-NMR}$ において 3.96~3.60 ppm に出現する糖由来のメチレンピークと、3.64~2.50 ppm に出現する糖由来のメチンピークと 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プロトン数の比によってコア部に糖が 2 分子導入されているということも示唆された (Fig. 2-2-46)。加えて、MALDI-TOF-MS における分子イオン-1 ピーク 832, $[M-H]^-$ により化合物 23 の構造が裏付けられた (Fig. 2-2-47)。

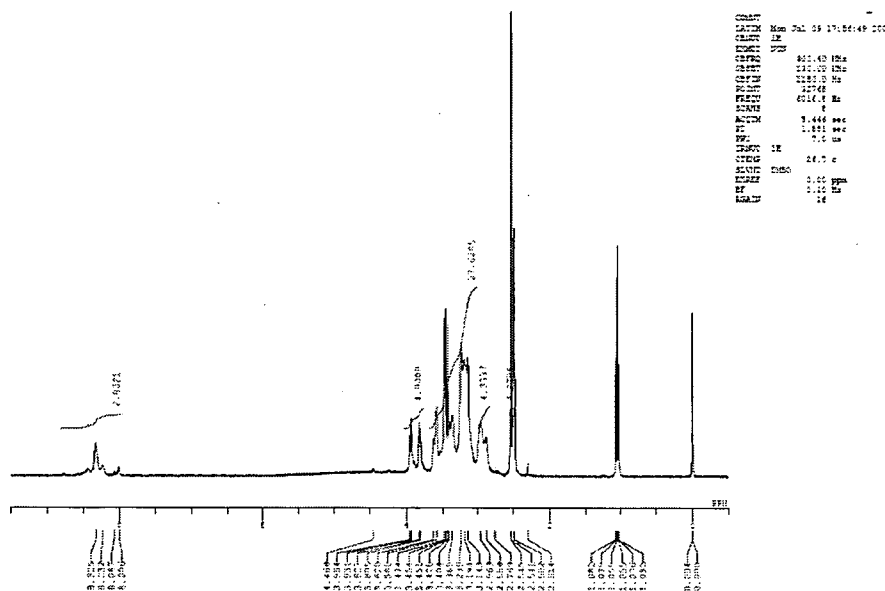
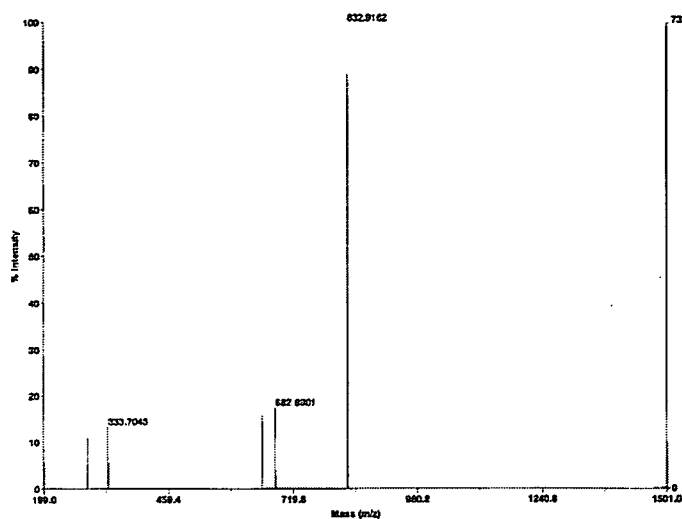


Fig. 2-2-46

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>BC=>AdvGC(32.0.5.0.1)->NFO.7->D(BP = 632.8, 7319)

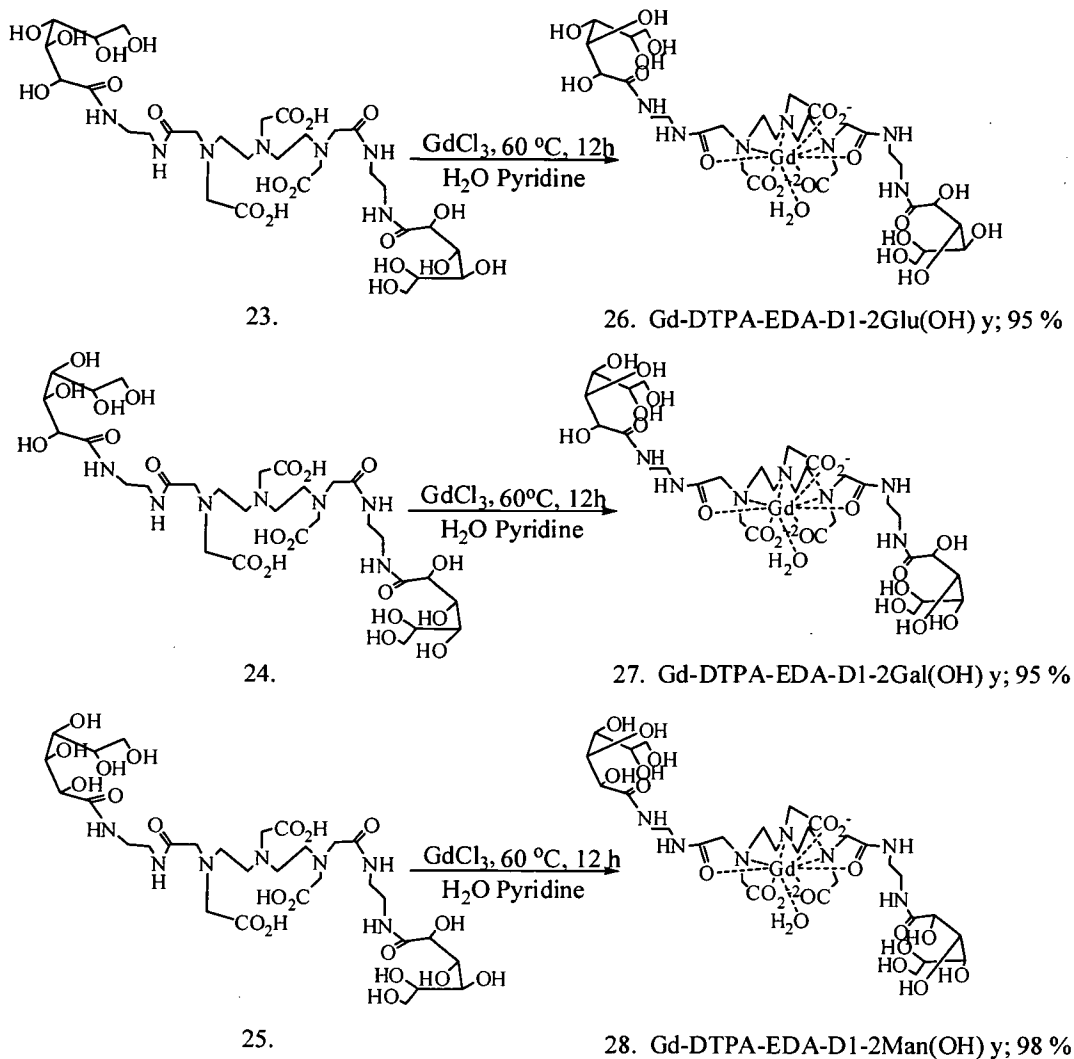


Mode of operation:	Positive
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Negative
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	30000 V
731.9102 voltage:	77%
Minor voltage ratio:	1.12
Quadrupole wire C:	0.02%
Extraction delay time:	125 nsec
Acquisition scan range:	200 - 1500 Da
Number of laser shots:	5000000
Laser intensity:	2500
Laser Fluor Filter:	3.0 Hz
Calibration type:	Default
Calibration reagent:	4-Oxano-4-hydroxynonanoic acid
Low pass gate:	Off
Tuned ion selector:	Off
Digitalizer start time:	14.822
Scan size:	0.5 msec
Number of data points:	43068
Vertical scale G:	800 rev
Vertical offset:	0.0%
Input bandwidth G:	800 MHz
Sample well:	53
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	6384
Instrument name:	Voyager-DE PRO
Plate type Element:	CONTOURAGE Pk100 well plate
Lens name:	FE Resonance
Abundance position:	1271.8.8
Abundance position:	27033.0
Relative position:	455.308
Relative position:	-323.878
Stokes in spectrum:	50
Quadrupole pressure:	3.789e-007
Minor pressure:	1e-007
TOF pressure:	0.004749
TOF gate width:	7
TOF flight length:	688

Fig. 2-2-47

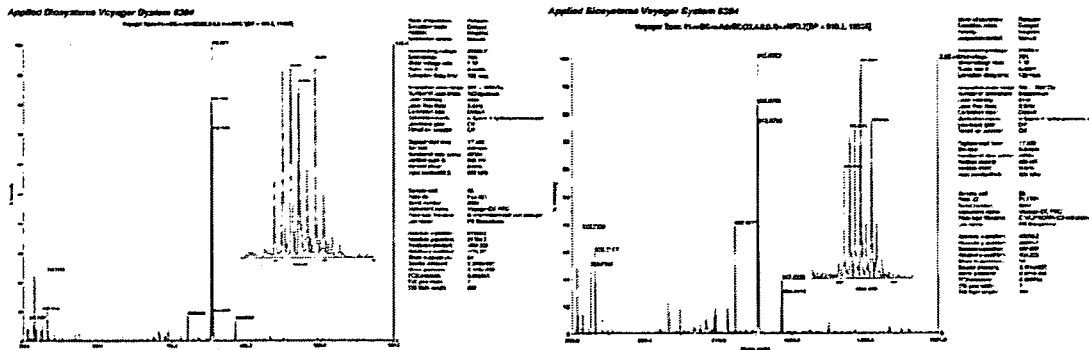
4) Gd 錯体の合成

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-EDA-D1-2Sugar (23-25) 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-EDA-D1-2Sugar (26-27) をそれぞれ収率 98 %, 95 %, 98 % で得た (Scheme 2-2-24)。反応終了後メタノールでリフラックス 3 回洗浄を行うことにより、未反応の塩化ガドリニウム(III)とピリジン塩を溶解除去することができるため精製が簡単であった。



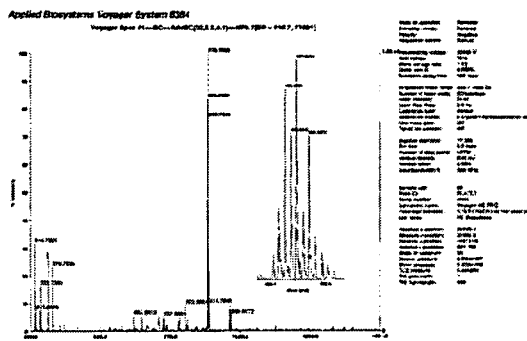
Scheme 2-2-24

化合物 26-28 は、MALDI-TOF-MS によるスペクトルで Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar (26-28) の分子イオンピーク $980[M-H_2O]^-$ 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. 2-2-48)。また、複合 TEM によるスペクトルにおいて、いずれも Gd 原子のピークを確認、また Cl 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を示した。ことから構造を同定した (Fig. 2-2-49)。



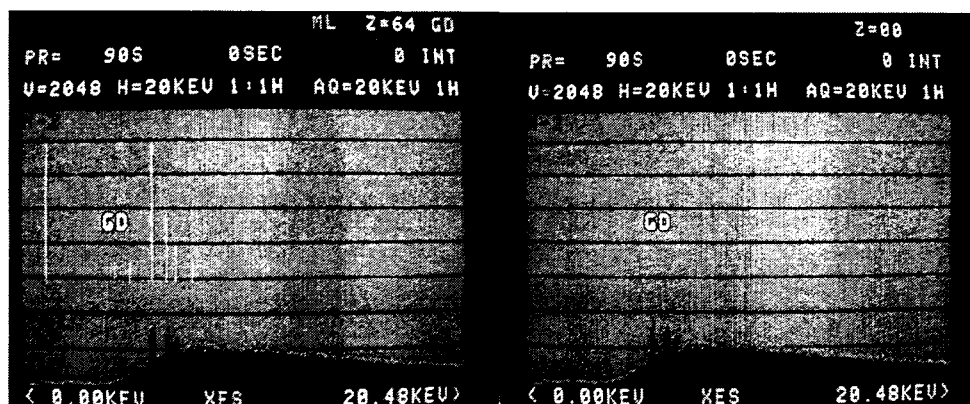
Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH)

Gd-DTPA-EDA-D1-2Gal(OH)



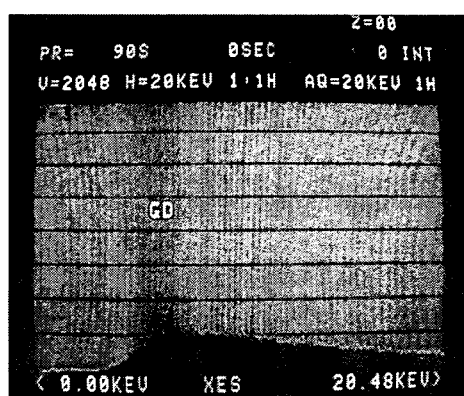
Gd-DTPA-EDA-D1-2Man(OH)

Fig. 2-2-48



Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH)

Gd-DTPA-EDA-D1-2Gal(OH)



Gd-DTPA-EDA-D1-2Man(OH)

Fig. 2-2-49

2-2-4 合成した Gd-DTPA-糖錯体の評価

合成した Gd-DTPA-糖錯体について、T1 緩和速度と MR イメージングについて調べた。

1) T1 緩和速度測定

MRI は、水の水素原子のプロトン緩和率を測定し、画像化している。そこで、造影剤の緩和速度を測定することにより、造影剤の性能を調べることができる。

5 種類の濃度 (1mM、0.5mM、0.25mM、0.125mM、0.0625mM) の Gd-DTPA-糖錯体 ((Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar, Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar) 水溶液 (生理的食塩水に溶解) のサンプルの緩和速度を計測した。また、同様の濃度の Gd-DTPA 水溶液 (マグネビスト、日本シェーリング社製) を使用し、比較をした。その結果、Gd-DTPA-糖錯体は、

0.0625mM から 1mM の濃度勾配において濃度依存性の直線的な T1 短縮を有し、その短縮効果は市販されている Gd-DTPA の約 1.2~3 倍の T1 relaxation-rate を示した (Fig. 2-2-50)。T1 短縮効果が大きいことは造影剤として信号増強効果が強いことを

示しており、有用性の指標となる。

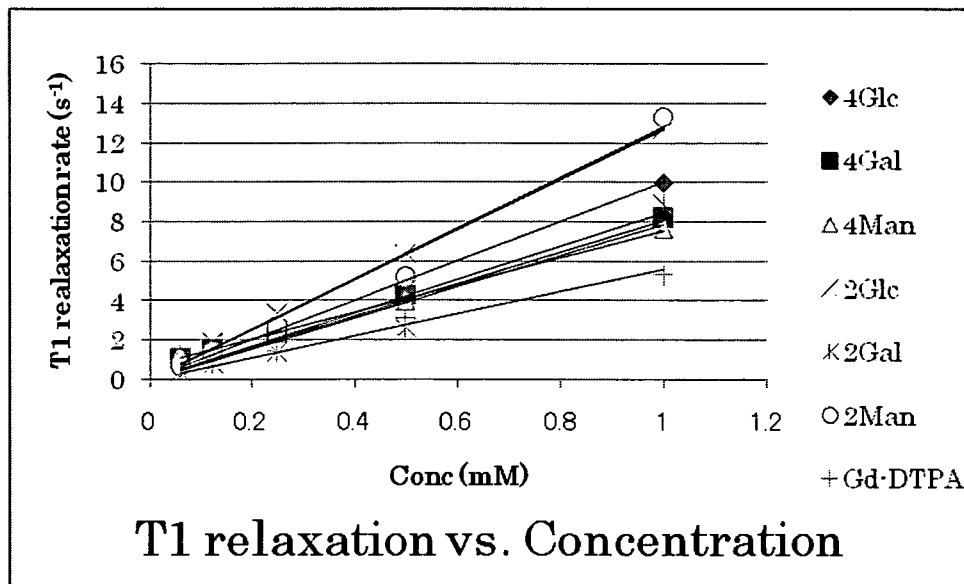


Fig. 2-2-50

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8)、Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH) (26)、Gd-DTPA-EDA-D1-2Man(OH) (28)、が良い T1 短縮を示した。この3種は大気中で潮解性がある。よって、この3種は親水性が高いといえる。緩和速度は Gd 金属と水分子との交換速度を見ているため、親水性が高い造影剤は配位している水分子と外部の水分子との交換速度が速くなる。このことが、良い T1 短縮を示す要因となっていると考えられる。

2) MR イメージング

・ Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar (Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8), Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal(OH) (9), Gd-DTPA-DETA-D2-4Man(OH) (10)) の MR イメージング調整した Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar (Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8), Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal(OH) (9), Gd-DTPA-DETA-D2-4Man(OH) (10)) それぞれの MR イメージングを行なった。3.0T 超伝導磁気共鳴画像撮影装置 Signa 3.0T を使用し、撮像には、ラットを用いた。

まず、造影剤投与前の全身像を撮像、ひきつづき、Gd-DTPA 糖化合物 (D1 Type) を注入し、1 分後、5 分後、1 時間後、2 時間後に撮像を繰り返した (Fig. 2-2-51)。また、比較として Gd-DTPA 水溶液 (マグネビスト、日本シェーリング社製) の撮像も行なった。また、撮像した画像より臓器 (肝臓、腎臓、血管) ごとの信号強度を算出した (Fig. 2-2-52) (Fig. 2-2-53) (Fig. 2-2-54)。

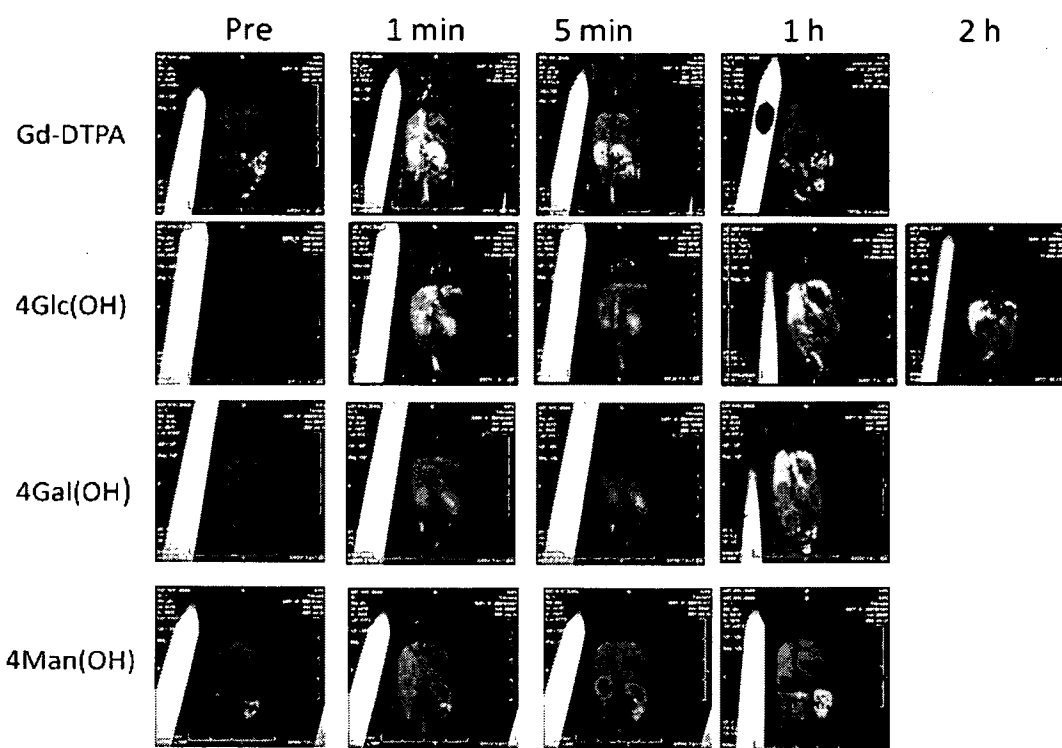


Fig. 2-2-51

Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal(OH) (9)と Gd-DTPA-DETA-D2-4Man(OH) (10)の造影効果は優れた造影効果を示さなかった。

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8)は、Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製)の造影効果よりやや劣るが、静脈注射後1分後から5分後では、大動脈、下大静脈の造影効果が良好であり、肝臓、腎臓の描出も認められた。また1時間後において、Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製)は完全に体外に排出されて造影効果がなくなっているが、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (8)は大動脈、下大静脈の信号増強は低下してくるが、まだ十分な増強効果を残している。肝臓の信号増強や、尿路への排泄をうかがわせる膀胱内の信号増強が認められており、2時間後には心大血管の信号は目立たなくなり、肝臓、尿路、の信号が目立つようになっている。また、造影剤の尿路からの排泄とともに、肝臓から胆汁中への排泄も推測される。

緩和速度測定の結果において、新規導入した造影剤 Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の緩和速度が Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製) よりも高いにもかかわらず、造影効果が Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製) よりも劣る理由として、ラットへの Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar の投与量が Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製) の半分であるためと考察される。

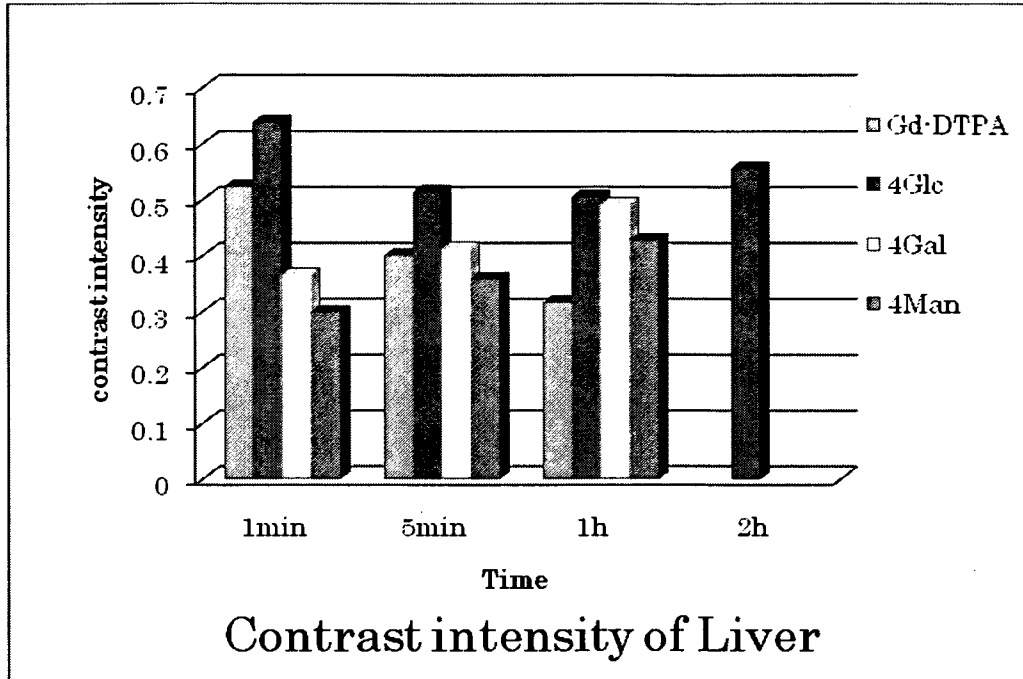


Fig. 2-2-52

肝臓において、Gd-DTPA（マグネビスト、日本シェーリング社製）は投与後徐々に信号強度が弱くなる。一方、Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar は徐々に信号強度が強くなる。これは、Gd-DTPA は徐々に排出されるが、Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar が徐々に肝臓に取り込まれ、肝臓に特異性があることが示唆された。

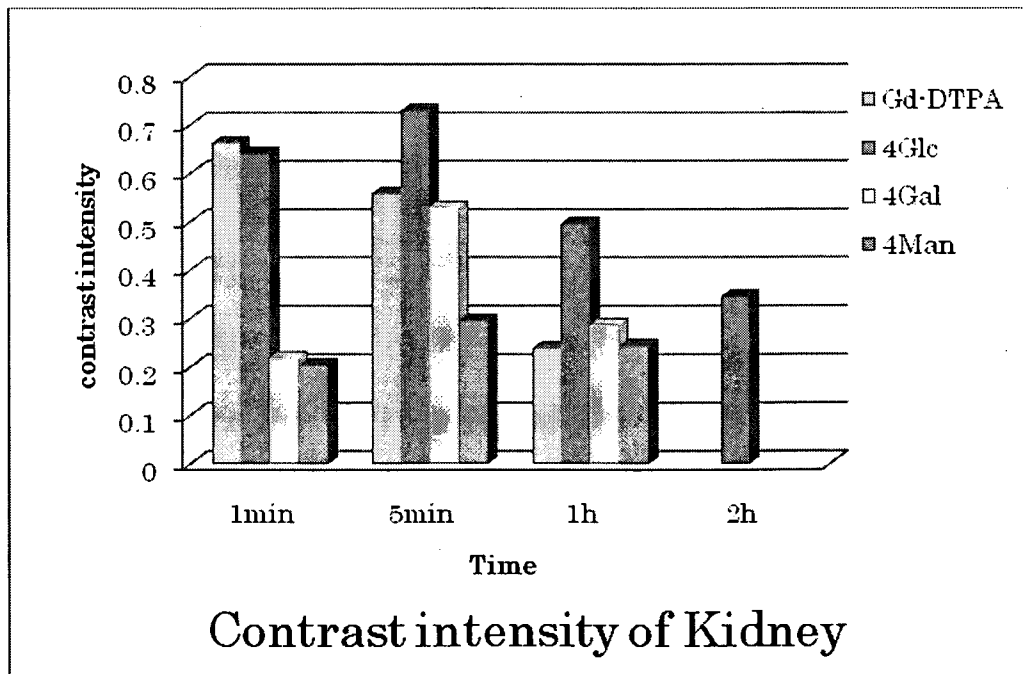


Fig. 2-2-53