

IR (KBr, cm^{-1}): 1728 (O=C-O-C=O), 1658 (O=C-O-C=O), 1388 (C=O-OH),
1226 (C=O-OH)

(4) ジグリコシルアミン(T1-OH)の合成

ジエチレントリアミン(2.04g, 19.8mmol)をDMF(50ml)に溶かし、室温で攪拌しながら D-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン(7.05g, 39.6mmol)を少しずつ加えた。6時間室温で攪拌した後冷保存し、析出した結晶をろ過し、乾燥させて無色結晶のジグリコシルアミン **3**(8.77g, 19.0mmol)を収率96%で得た。

MALDI-TOF-MS(+), 460, $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6),

δ (ppm) : 2.50–2.70 (m, 4H; $\text{NHCH}_2 \times 2$)

; 3.00–4.00 (m, 16H; $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{CH} \times 8$ (sugar hydrogens), $\text{O}=\text{CNHCH}_2 \times 2$)

; 4.34 (bs, 10H; $\text{OH} \times 10$)

; 7.62 (t, 2H, $J_{\text{HNCH}}=5.46\text{Hz}$; $\text{O}=\text{CNH} \times 2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6);

δ (ppm) : 38.0 (NHCH_2)

; 47.9 ($\text{O}=\text{CNHCH}_2$)

; 63.2 (CH_2 (sugar carbons))

; 70.0, 71.4, 72.1, 73.5 (CH (sugar carbons))

; 172.4 ($\text{O}=\text{CNH}$)

IR (KBr); ν (cm^{-1}) = 3382 (OH, NH), 1650, 1544 ($\text{O}=\text{CNH}$)

m.p; 134°C–136°C

(5) T1-Boc-OAcの合成

ジグリコシルアミン **3**(4.23g, 9.21mmol)をDMF(20ml)に溶解させ、その溶液に二炭酸ジ-*t*-ブチル(2.01g, 9.21mmol)DMF溶液(10ml)を氷水浴中で滴下した。その後、室温で1日間攪拌した。反応終了後、トリエチルアミン(10ml)を加え、さらに無水酢酸(9.40g, 92.1mmol)を氷水浴中で加え室温で2日間攪拌した。反応終了後、水(20ml)を入れ攪拌し、さらに酢酸エチル(50ml)と飽和炭酸水素ナトリウム(1g)を加え抽出した。水相を酢酸エチル(30ml)で再度抽出し、飽和食塩水(50ml)で3回洗浄した。最後に無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過してから減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開液クロロホルム:メタノール=20:1)で単離精製することによりアセチル化された無色結晶のT1-Boc-OAc(7.67g, 7.83mmol)を収率85%で得た。

MALDI-TOF-MS(+), 1002 $[M+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3);

δ (ppm): 1.47 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)

; 2.00, 2.05, 2.06, 2.08, 2.11 (s \times 5, 30H; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O} \times 10$)

; 3.37 (bs, 8H; $\text{O}=\text{CNHCH}_2 \times 2$, $\text{O}=\text{CNCH}_2 \times 2$)

; 4.10, 4.34 (dd×2, 4H, $J_{\text{HCl}}=12.3\text{Hz}$, $J_{\text{HCH}}=5.46\text{Hz}$, 3.76Hz ; $\text{CH}_2\times 2$ (sugar hydrogens))
; 5.04–5.62 (m, 8H; $\text{CH}\times 8$ (sugar hydrogens))

※ アミドプロトンのピークはブロード化してしまったため、観測されなかった。

^{13}C -NMR (CDCl_3),

δ (ppm): 20.3, 20.5, 20.6 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)

; 28.2 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$)

; 39.5, 47.4 ($\text{O}=\text{CNHCH}_2$, $\text{O}=\text{CNCH}_2$)

; 61.5 (CH_2 (sugar carbons))

; 68.7, 68.9, 69.3, 71.3 ($\text{CH}\times 4$ (sugar carbons))

; 80.8 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$)

; 156.8 ($(\text{CH}_3)_3\text{COC}=\text{O}$)

; 166.7, 169.3, 169.7, 170.5 ($\text{O}=\text{CNH}$, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)

Rf= 0.57 (CHCl_3 : $\text{MeOH}=10 : 1$)

IR (KBr)= ν (cm^{-1}) = 1755 ($\text{O}=\text{CO}$), 1683, 1538 ($\text{O}=\text{CNH}$), 1683 ($\text{O}=\text{CN}$)

(6) T1-Boc-OAc の脱 Boc 化反応 (T1-OAc 7 の合成)

T1-Boc-OAc (8.42g, 8.59mmol) をジクロロメタン (5ml) に溶かし、溶液を攪拌しながらトリフルオロ酢酸 (7ml, 94.2mmol) を室温で少しずつ加え、その後、室温で1時間30分攪拌した。反応終了後、減圧下で溶媒を除去してから残渣を酢酸エチル (100ml) に溶かし、その溶液を飽和炭酸水素ナトリウム (50ml) で洗浄し、次に水 (50ml) で洗浄した。最後に無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過した後、減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒クロロホルム:メタノール=15:1) で単離精製することで無色結晶の T1-OAc 7 (6.58g, 7.47mmol) を収率 87% で得た。

MALDI-TOF-MS (+) 880, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H -NMR (CDCl_3);

δ (ppm): 1.29 (s, 1H; NH)

; 2.06, 2.09, 2.12, 2.16, 2.18 (s×5, 30H; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}\times 10$)

; 3.20 (m, 4H; $\text{NHCH}_2\times 2$)

; 3.40–3.76 (m, 4H; $\text{O}=\text{CNHCH}_2\times 2$)

; 4.11–4.39 (dd×2, 4H, $J_{\text{HCl}}=12.4\text{Hz}$, $J_{\text{HCH}}=5.37\text{Hz}$, 3.00Hz ; $\text{CH}_2\times 2$ (sugar hydrogens))

; 5.11–5.70 (m, 8H; $\text{CH}\times 8$ (sugar hydrogens))

; 8.22 (m, 2H; $\text{O}=\text{CNH}\times 2$)

^{13}C -NMR (CDCl_3);

δ (ppm): 20.7, 20.8, 20.9, 21.4 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}\times 10$)

; 36.3 (NHCH_2)

; 47.7 ($\text{O}=\text{CNHCH}_2$)

; 61.7 (CH_2 (sugar carbons))

; 68.6, 69.3, 69.5, 71.9 (CH (sugar carbons))

; 167.5, 170.0, 170.3, 170.7 ($\text{O}=\text{CNH}$, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)

Rf= 0.28 (CHCl₃ : MeOH=10 : 1)

IR (KBr)= ν (cm⁻¹)=3376 (NH), 1752 (O=CO), 1680, 1541 (O=CNH)

(7) モノグルコシルアミン T3 11 の合成

アルゴンガス雰囲気下、室温で DMF (10ml) に溶解させた D-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン (1.00g, 5.61mmol) をエチレンジアミン (11.2ml, 168mmol) に 12 時間かけて徐々に滴下した。滴下後、更に 6 時間反応させた。反応終了後、減圧下溶媒を留去しオイル状の残渣にジクロロメタン (10ml) を加えて 1 日攪拌し、目的物を析出させ減圧濾過により溶媒を除き、乾燥させ目的物の T3 (1.43g, 1.19mmol) を収率 89% で得た。

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3363 (OH, NH), 1643, 1550 (O=CNH), 1103 (NH₂)

MALDI-TOF-MS(+): 239, [M+H]⁺.

¹H-NMR (DMSO-d₆):

δ (ppm): 2.49–2.61 (t, 2H; NH₂CH₂)
; 3.05–3.18 (m, 2H; O=CNHCH₂)
; 3.35–3.60 (m, 4H; CH×4 (sugar hydrogens))
; 3.90–4.00 (d×d, 2H; CH₂ (sugar hydrogens))
; 7.63 (t, 1H; O=CNH×1)

¹³CNMR (DMSO-d₆):

δ (ppm): 41.4 (CH₂-NH₂)
; 44.3 (O=CNHCH₂)
; 63.3 (CH₂-OH)
; 70.1, 71.4, 72.1, 73.6 (CH×4 (sugar carbons))
; 172.6 (O=CNH)

(8) DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH) 7 の合成

アルゴン雰囲気下、DTPA-MA (0.20mg, 0.53mmol) とジグルコシルアミン T3 (0.24mg, 0.52mmol) を DMSO (5ml) に溶解させ、ピリジン (1ml) を加え 25°C、1 日反応させる。反応後、溶媒を減圧下大まかに留去し、残渣を攪拌しながら徐々にエタノールを加えることで目的物を析出させ減圧濾過により溶媒を除き乾燥させることで DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH) を定量的に得た (この段階では不純物として DTPA を含んでいる。)

MALDI-TOF-MS(+): 835, [M+H]⁺.

* 精製ができていないため NMR での解析ができなかった。

(9) DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc) 8 の合成

アルゴン雰囲気下、DTPA-MA (0.51mg, 1.36mmol) とグルコシドアミン (1.07mg, 1.21mmol) を 50°C、1 日反応させ、反応終了後減圧下溶媒を留去し、残渣にメタノールを加えて出てきた結晶をろ過することで除いた。次にろ液から溶媒を減圧下留去することで、DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc) (1.17g, 0.94mmol) を収率 77% で得た。

MALDI-TOF-MS(+): 1254, [M]⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) ;

δ (ppm): 2.05-2.17 (m, 30H; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O} \times 10$)

; 3.14- 3.69 (br-t, 26H; $\text{O}=\text{CNHCH}_2 \times 2$, $\text{O}=\text{CNCH}_2 \times 2$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N} \times 2$, $\text{NCH}_2\text{C}=\text{O} \times 5$)

; 4.15-4.36 (m, 4H, $\text{CH}_2 \times 2$ (sugar hydrogens))

; 5.12-5.72 (m, 8H; $\text{CH} \times 8$ (sugar hydrogens))

※ アミドプロトンのピークはブロード化してしまったため、観測されなかった。

(10) DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) 12の合成

アルゴンガス雰囲気下、DTPA-MA (1.00g, 2.67mmol) と T37 (0.50g, 2.09mmol) を HOBt (0.43g, 2.08mmol)、DCCI (0.29g, 2.15mmol) を触媒として用いて DMF (10ml) 中 60°C で 1 日攪拌することで反応を行った。反応終了後、結晶を減圧濾過することで取り除き、ろ液から減圧下溶媒を留去し、残渣をエタノールで洗浄することで DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) (0.64g, 1.05mmol) を収率 50% で得た。

MALDI-TOF-MS (+) 614, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) :

δ (ppm): 2.89-3.47 (m, 22H; $\text{O}=\text{CNHCH}_2 \times 2$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N} \times 2$, $\text{NCH}_2\text{C}=\text{O} \times 5$)

; 3.56-3.66 (m, 4H; $\text{CH} \times 4$ (sugar hydrogens))

; 3.92-4.02 (m, 2H; CH_2 (sugar hydrogens))

※ アミドプロトンのピークはブロード化したため、正確なプロトン比を示さなかった。

(11) Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH) 9の合成

DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH)7 (0.150g, 0.0676mmol) を水 3ml とピリジン 1ml の混合溶媒に溶解させ、そこに 1ml の水に溶解した塩化ガドリニウム六水和物 (0.025g, 0.0676mmol) を滴下し 70°C で 4 時間攪拌した。反応終了後減圧下で溶媒を除去し、残渣をメタノールで過熱しながら洗浄することで白色粉末の Gd-DTPA デンドリマー Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH) (0.149g, 0.0649mmol) を収率 96% で得た。

MALDI-TOF-MS (+) 988, $[\text{M}]^+$.

ESI-Q-MS (-) 988, $[\text{M}]^-$.

(12) Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc) 10の合成

DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc)8 (0.150g, 0.0676mmol) を水 3ml とピリジン 1ml の混合溶媒に溶解させ、そこに 1ml の水に溶解した塩化ガドリニウム六水和物 (0.025g, 0.0676mmol) を滴下し 70°C で 4 時間攪拌した。反応終了後減圧下で溶媒を除去し、残渣をメタノールで過熱しながら洗浄することで白色粉末の Gd-DTPA デンドリマー Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc)

(0.149g, 0.0649mmol) を収率 1.8% で得た。

MALDI-TOF-MS (+) 1409, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(13) Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) 13の合成

DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) 12 (0.2g, 0.489mmol) を水 5ml とピリジン 0.15ml の混合溶媒に溶解させ、そこに 1ml の水に溶解した塩化ガドリニウム六水和物 (0.133g, 0.538mmol) を滴下し 70℃ で 4 時間攪拌した。反応終了後減圧下で溶媒を除去し、残渣をメタノールで加熱しながら洗浄することで白色粉末の Gd-DTPA デンドリマー Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) (0.25g, 0.0326mmol) を収率 67% で得た。

ESI-Q-MS(-)766, [M]⁻.

2-3-2-5 機器測定 (in vitro)

緩和率測定機に備え付けの恒温装置で、機械の測定部位を 37℃ に保ち、測定し測定された緩和時間を参考に、各種パラメーターを適正值に直し、各サンプル三回測定し平均値を出した。測定された緩和時間を計算式に導入し緩和率を計算した。濃度未知のサンプルに関しては、concn. 硝酸をサンプル水溶液に対して等量または 7 等量加え一晩放置した溶液の緩和時間を測定し、モル濃度計算の換算式に代入することでサンプルのモル濃度を求めた。

参考文献

- 1) M Takahashi, Y Hara, K Aoshima, H Kurihara, T Oshikawa and M Yamashita, *Tetrahydron Letters*, **41**, 8485-8488 (2000).
- 2) K. Muramatsu, Y. Takehara, H. Sakahara, M. Yamashita, T. Nishikawa, N. Sadato, *ISMRM2005*, 講演ポスター
- 3) M. Yamashita, S. Laurent, L. V. Elst, and R. N. Muller, *ISMRM2004*, 講演ポスター
- 4) David A. Jaeger, Mary F. Peacock, D. Scott Bohle, *Langmuir* **2003**, *19*, 4859-4862
- 5) 小林一清, 周曉華, 住友宏, 高分子論文集, **48**, 253 (1991).
- 6) Z. Zhang, K. Fukunaga, and Y. Sugimura, *Carbohydrate Research*, **290**, 225- (1996).
- 7) 小川圭介, 静岡大学修士論文 (2007)
- 8) 泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典, “ペプチド合成の基礎と実験”, 丸善出版, PP. 26-28 (1985).

2-4

Utilization of Dendritic Framework as a Multivalent Ligand: Synthesis of a functionalized asymmetric gadolinium (III) carrier with glycoside cluster moiety

2-4-1 Introduction

Molecular imaging requires molecular probes able to interact with specific targets and characteristic of the imaging technique. For magnetic resonance imaging (MRI) the presence of a paramagnetic or supermagnetic center is required.

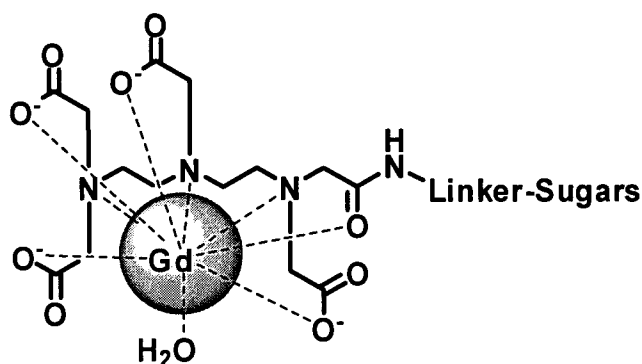


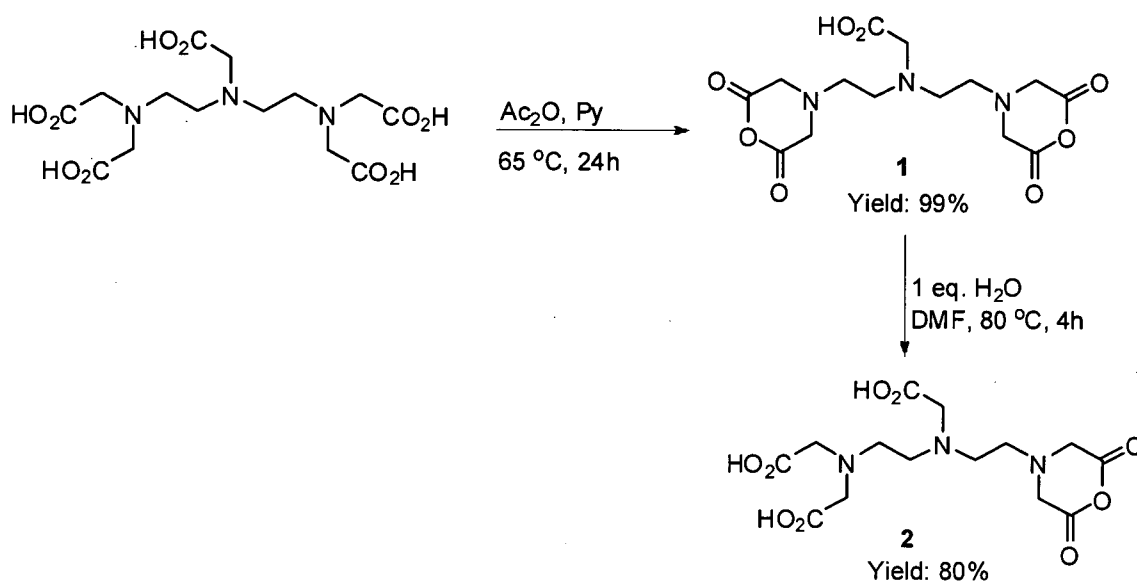
Fig. 2-4-01. Target molecule K6

(特許の関係で K6 の構造については開示できない。)

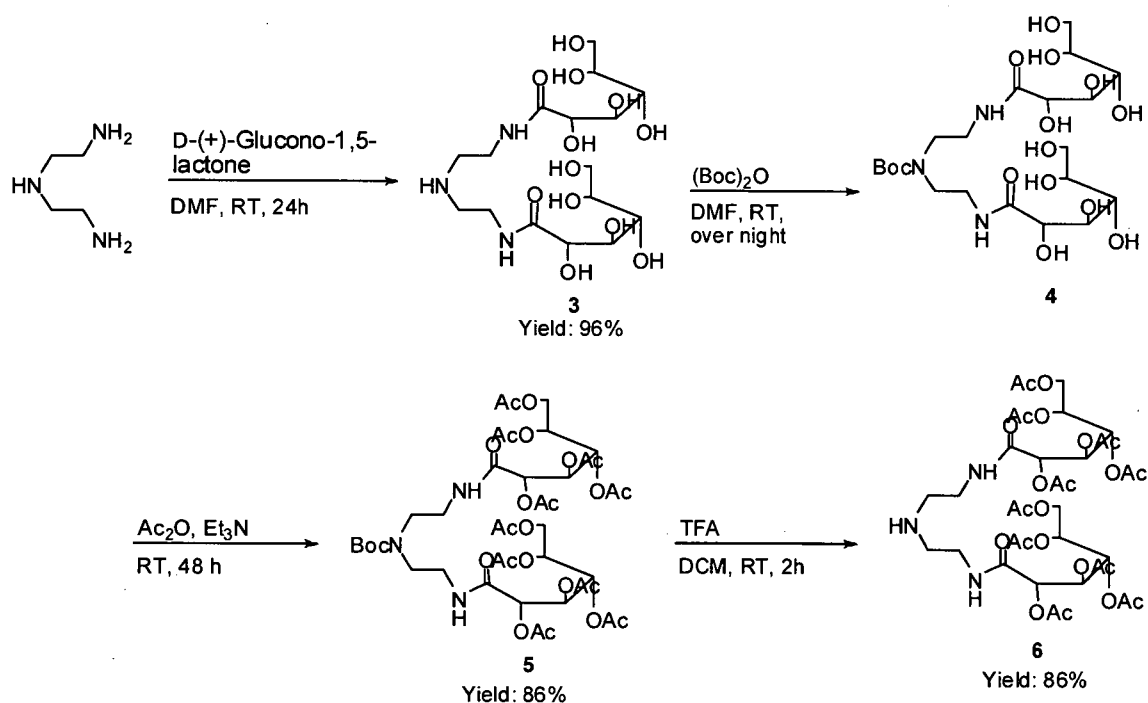
Several hyperbranched polymers have been described in the last decade and their expanded applications have considerably enhanced their own significance.^{1,2} To explore the use of spherically dendritic macromolecules as drug carriers, it has attracted a great deal of interest because of the feasibility for new drug delivery systems.³ Accordingly, some groups have described intriguing examples of new contrast media for the preclinical studies of magnetic resonance imaging (MRI), where dendritic frameworks were applied as a paramagnetic metal support.^{4,5} Lanthanide metals such as Gd(III) shorten the relaxation time and presuppose a possibility of achieving higher sensitivities for the MRI examinations.⁶ Hitherto, much effort has been devoted to create new candidates in this field, and most of them immobilize the metals in the exterior surfaces under chelation.⁷⁻⁹ On designing more instructive contrast agents, we explored an alternative approach to a tunable candidate for the metal carrier by utilization of the dendritic framework as a ligand for lanthanide metals. These ligands are composed of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)¹⁰ and glycodendrimers, which may immobilize gadolinium ion at the focal points by eight coordination sites, allowing one water molecule to chelate and encapsulates the metal ions inside the glycoside clusters. Along with the 'glycoside cluster effect', the carbohydrate aggregation may offer a potential advantage for site-specific delivery of the contrast agents at a molecular level since carbohydrates play significant roles in recognition processes on

cell surfaces. In this publication, we disclose a new type of dendritic macromolecule, which works as a functionalized ligand coordinating gadolinium(III) ion at the centers of their frameworks under complexation.

2-4-2 Results and Discussion

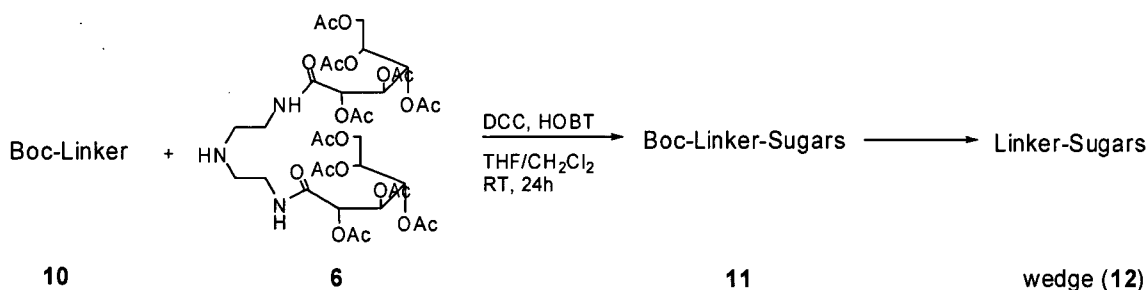


Scheme 2-4-01. Synthesis of DTPA mono-anhydride 2.



Scheme 2-4-02. Synthesis of Terminal 6.

cleavage of the Boc group by trifluoroacetic acid (TFA) gave the amine **6** in 86% yield, and structurally confirmed by NMR spectra (Fig. 2-2-02). The building block **8** was readily accessible by the reported methods,¹¹ and its amino group was then protected as the *tert*-butyl carbamate (Boc group) to give **9**. Subsequent hydrolysis of ester groups in basic conditions led to the linker unit Boc-Linker (**10**) in 67% total yield over four steps in Scheme 2-4-03.



Scheme 2-4-04. Synthesis of wedge 12.

(特許の関係で Boc-Linker、Boc-Linker-Sugars、

Linker-Sugars (7-9) の構造については開示できない。)

Condensation of compounds **10** and **6** in the presence of DCC and HOBT gave *N*-protected wedge Boc-Linker-Sugars (62% yield), and subsequent removal of the Boc group by TFA cleavage led to another amine, Linker-Sugars, Wedge in 60% yield. With these glycoside branch in hand, the dendrimer Ligand **K6** (**13**) was quantitatively produced by their nucleophilic addition with DTPA mono anhydride (Scheme 2-4-05). The formations of dendritic structures were assigned by their spectroscopic data. In the ¹H-NMR spectra, the intense acetyl and glycoside peaks appeared in the regions of δ 2.0–2.3, δ 4.1–4.4, and δ 5.0–5.7 ppm, while the characteristic protons of the metal chelating portions showed broad absorption around δ 3.5 ppm as observed for other DTPA analogs. Like previous works on Gd(III)–DTPA complexes, dendritic ligands should leave the three carboxylate arms free to coordinate to Gd(III) ion. HPLC analyses showed that the formations of well-stabilized complex **K6** (Scheme 2-4-06) was readily realized by heating mixtures of the ligands and GdCl₃·6H₂O in aqueous media at 95°C. Remarkably, these complexes showed good solubility in aqueous solutions, although the acetylated glycosides might reinforce their own hydrophobic features. Besides, these acetyl groups could be cleaved by additional sodium hydroxide with good yield. Finally, the synthesis of new dendritic macromolecules and their utilization as functionalized ligands was achieved. Along with our synthetic strategy, a multigram synthesis responsible for practical use as radiopharmaceuticals can be administered. The chelates with higher-molecular weight compounds are indispensable for prevention of their diffusion from the intravascular space during MRI examinations.

Accordingly, these dendrimer-gadolinium(III) chelates may develop many criteria for superior contrast agents after certain structural modifications have been made.

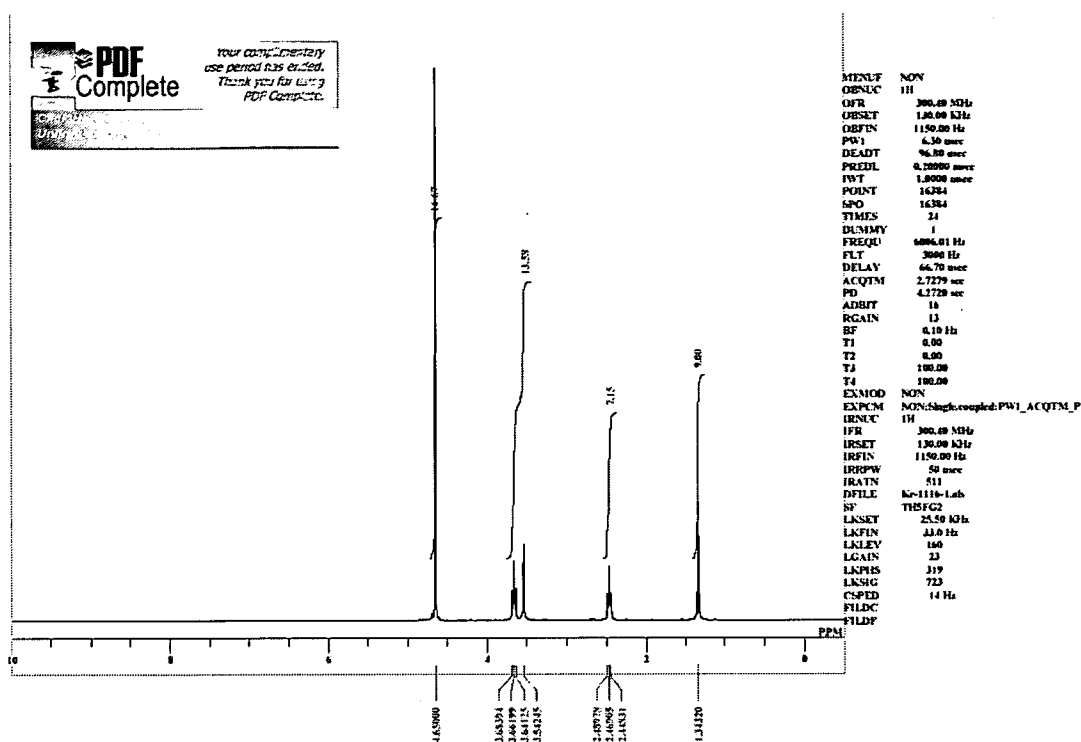
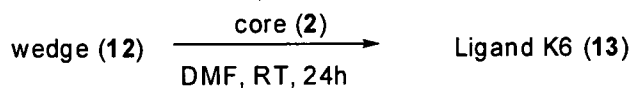


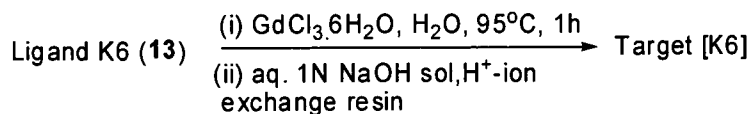
Fig. 2-4-03. ¹H-NMR of compound 10.

Following the intensive and deep investigations on a wide variety of carbohydrate-modified dendrimers, and the structural skeleton of new MRI contrast agents, the feasibility of their metal complexes as new potential candidates for MRI contrast media are now in progress. These results will be published in future elsewhere.



Scheme 2-4-05. Synthesis of compound 13.

(特許の関係で core, Ligand K6 の構造については開示できない。)



Scheme 2-4-06. Synthesis of Target compound.

(特許の関係で Target (K6) の構造については開示できない。)

2 – 4 – 3 Experimental

Preparation of DTPA mono-anhydride (2) To a solution of diethylenetriaminepentaacetic acid di-anhydride **1** (0.9 g, 2.5 mmol) in anhydrous DMF (4.0 mL) stirred under argon atmosphere at 80 °C, was added H₂O (45 µL) dropwise over 40-50 min. Thereafter, the reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 hours, during which **2** was precipitated, and then it was cooled to room temperature, filtered and dried to give pure compound **2** (0.75 g, 80%).

K6 To a solution of Ligand K6 (0.26 g, 0.078 mmol) in ion-exchange water (4.0 mL) stirred at room temperature, was added GdCl₃·6H₂O (29 mg, 0.078 mmol). Thereafter, the reaction mixture was stirred at 95 °C for one hour, and then it was cooled to room temperature. The mixture was washed with ether (10 mL) and dried to give K6(OAc), 0.26 g (95%). This Compound was further dissolved in ion-exchange water (5 mL) and 4 mL of aq.1N NaOH solution, and stirred at room temperature for 1-2 hours. And then DOWEX 50W-X8 ion exchange resin (H form 100-200, 1.2 g) was added. After the completion of reaction, the resin was filtered off, the filtrate was evaporated to give K6 as yellow crystal, 0.16 g (96%). IR (KBr): 3355 (OH), 1589 (O=CNH, O=CN) cm⁻¹.

References and Notes

1. M. Fischer and F. Vögtle. *Angew. Chem., Int. Ed.* **38** (1999), 884–905.
2. R. Newkome, E. He and C.N. Moorefield. *Chem. Rev.* **99** (1999), 1689–1746.
3. L. Balogh and D.A. Tomalia. *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998), 7355–7356.
4. E.C. Wiener, M.W. Brechbiel, H. Brothers, R.L. Magin, O.A. Gansow, D.A. Tomalia and P.C. Lauterbur. *Magn. Reson. Med.* **31** (1994), 1–8.
5. H.C. Schwickert, T.P.L. Roberts, A. Mühler, M. Stiskal, F. Demsar and R.C. Brasch. *Eur. J. Radiol.* **20** (1995), 144–150.
6. S. Aime, M. Botta, L. Frullano, S.G. Crich, G.B. Giovenzana, R. Pagliarin, G. Palmisano and M. Sisti. *Chem. Eur. J.* **5** (1999), 1253–1260.
7. W.-H. Li, S.E. Fraser and T.J. Meade. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999), 1413–1414.
8. G.A. Lemieux, K.J. Yarema, C.L. Jacobs and C.R. Bertozzi. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999), 4278–4279.
9. Y.H. Jang, M. Blanco, S. Dasgupta, D.A. Keire, J.E. Shively and W.A. Goddard, III. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999), pp. 6142–6151.
10. M.S. Konings, W.C. Dow, D.B. Love, K.N. Raymond, S.C. Quay and S.M. Rocklage. *Inorg. Chem.* **29** (1990), 1488–1491.
11. C. Sun, P. Wirsching and K. D. Janda, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 1761-1768.

2-5 糖の末端基を調整した新規 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。

当研究室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 を糖で化学修飾した Gd-DTPA-糖化合物の合成を行っている (Fig. 2-5-01)。既に当研究室では糖を 4 分子導入した Gd-DTPA-DETA-D2-4Sugar が合成されており¹⁾、中でも糖をグルコースとした Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc(OH) は肝臓・腎臓・血管に高い臓器選択性を有し²⁾、さらに肝細胞がんの描出が可能であると報告されており、疾病の早期発見のためにも有用であると考えられる²⁾。また、グルコースのヒドロキシル基がすべてアセチル化された Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc(OAc) は腎臓・肺に高い臓器選択性を有していると報告されている³⁾。

本研究ではグルコースのヒドロキシル基とアセチル基の数を調整することにより、異なったあるいは双方の臓器選択性を発現することを期待し、目的とする化合物の合成及び評価を行った。

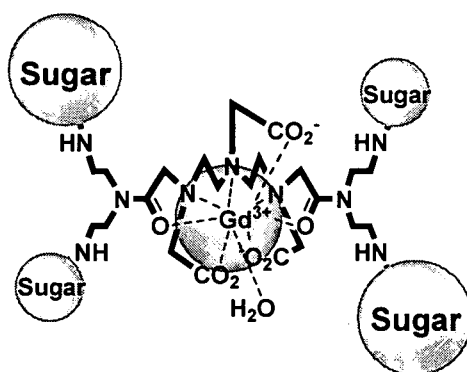


Fig. 2-5-01 Models of Gd-DTPA-Sugar compounds as MRI contrast agents.

2-5-1 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へ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。

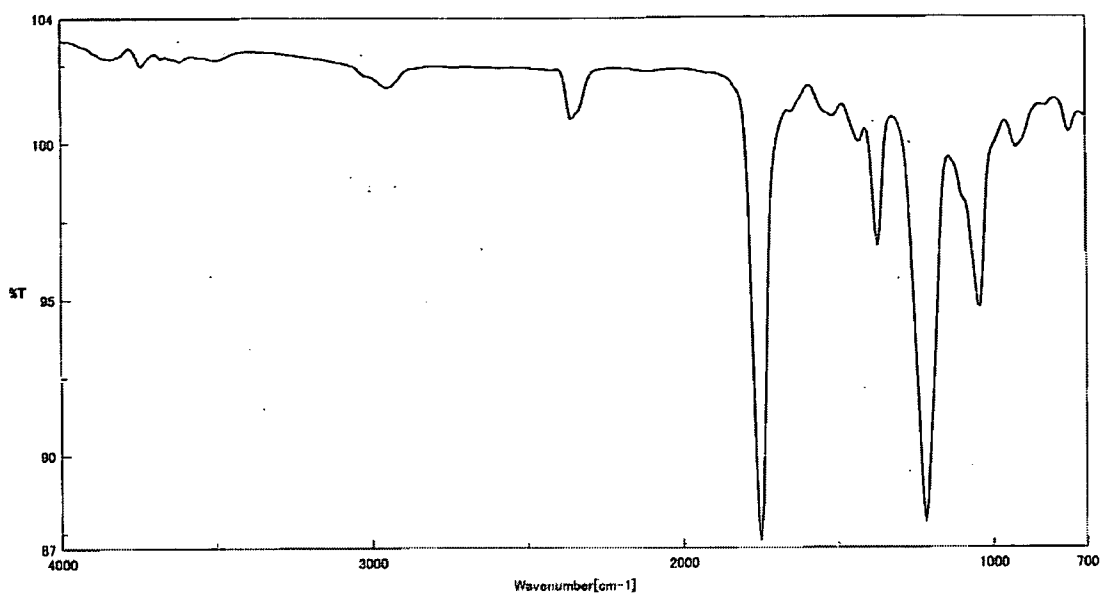


Fig. 2-5-03 化合物 1 の IR スペクトル

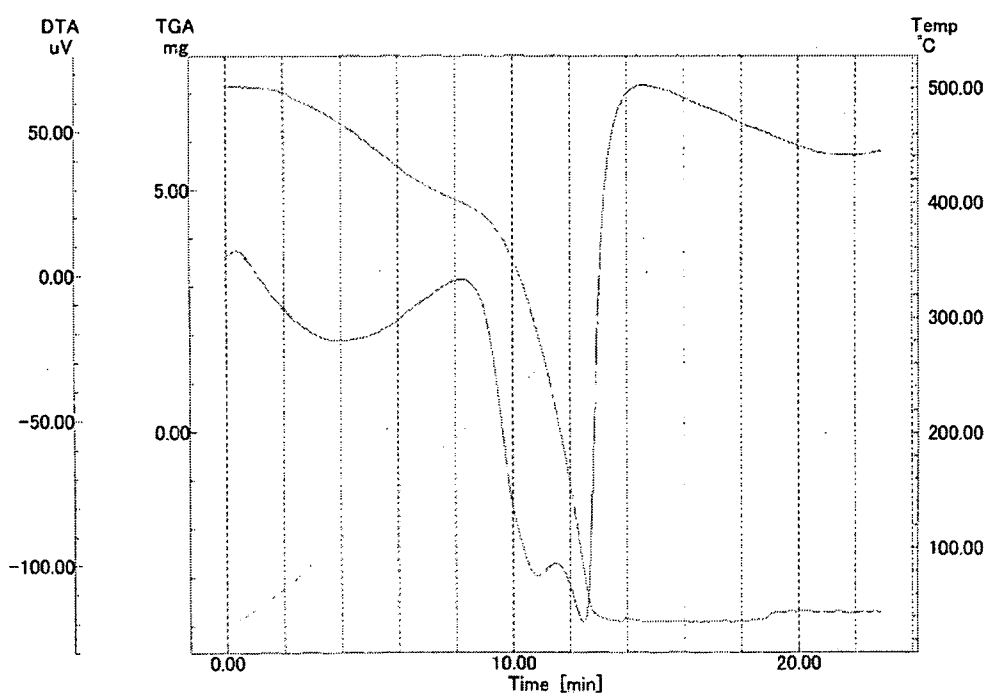
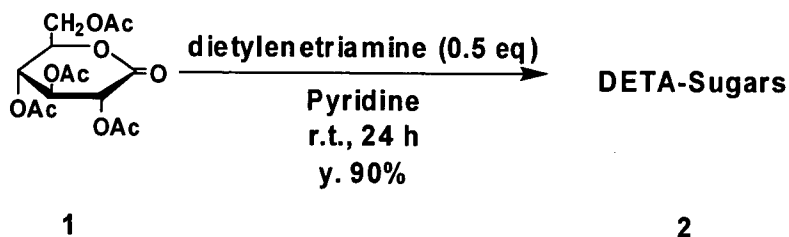


Fig. 2-5-04 化合物 1 の熱分析

$^1\text{H-NMR}$ 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 1751cm^{-1} に $\text{C}=\text{O}$ 伸縮による吸収と 1218 cm^{-1} に $\text{C}-\text{O}$ 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、 $\text{O}-\text{H}$ 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。

・ DETA-Sugars (2) の合成



Scheme 2-5-02

(特許の関係で DETA-Sugars の構造については開示できない。)

ピリジン中、ジエチレントリアミンと化合物 1 との求核反応により化合物 2 を粗収率 90%で合成した。この反応は化合物 1 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糖が導入された。合成した DETA-Sugars(2) 末端部は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着してしまうためこれによる単離精製が出来なかった。そのため、デンドリマー分子まで誘導した後、再結晶による単離精製を行うこととした。

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。

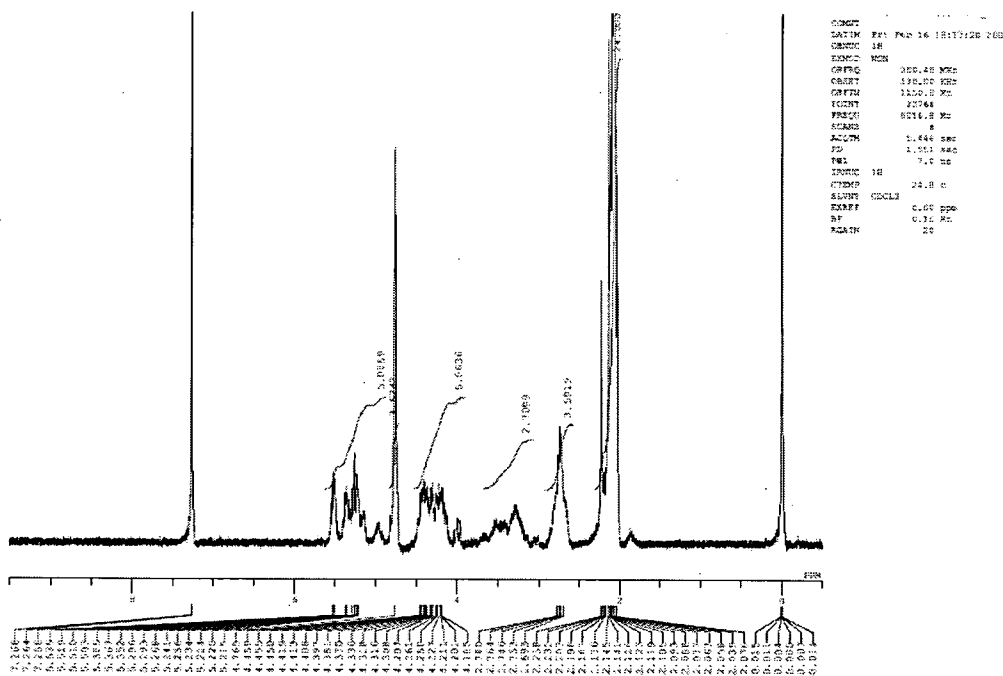
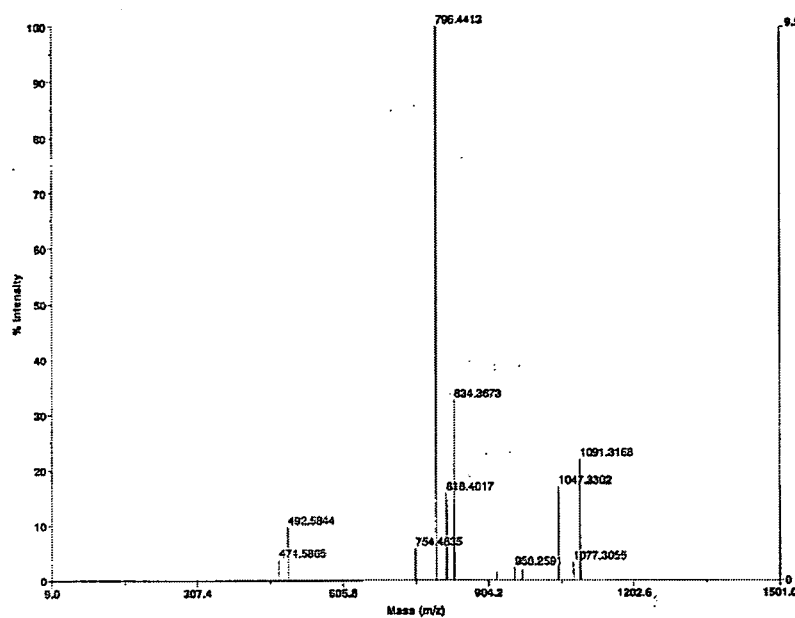


Fig. 2-5-05 化合物 2 の ¹H-NMR スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1 => BC => AdvBC(32,0.5,0.1) => NF0.7 => DI[BP = 786.4, 94802]



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 C: 0.002%
 Extraction delay time: 125 nsec

Acquisition mass range: 10 - 1500 Da
 Number of laser shots: 900 spectrum
 Laser intensity: 1848
 Laser Rep Rate: 3.0 Hz
 Calibration type: Default
 Calibration matrix: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
 Low mass gate: Off
 TMS ion selector: Off

Digitizer start time: 3.872
 Bin size: 0.5 nsec
 Number of data points: 7682
 Vertical scale C: 500 mV
 Vertical offset: 0.85%
 Input bandwidth C: 500 MHz

Sample well: 27
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 6384
 Instrument name: Voyager-DE PRO
 Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plates.pl
 Lab name: PE Bicyclama

Absolute x-position: 34187.9
 Absolute y-position: 34838.4
 Relative x-position: 2130.44
 Relative y-position: -2208.14
 Shots in spectrum: 90
 Source pressure: 2.053e-007
 Mirror pressure: 5.633e-008
 TCO pressure: 0.001
 TIS gate width: 7
 TIS light length: 663

Fig. 2-5-06 化合物 2 の MS スペクトル

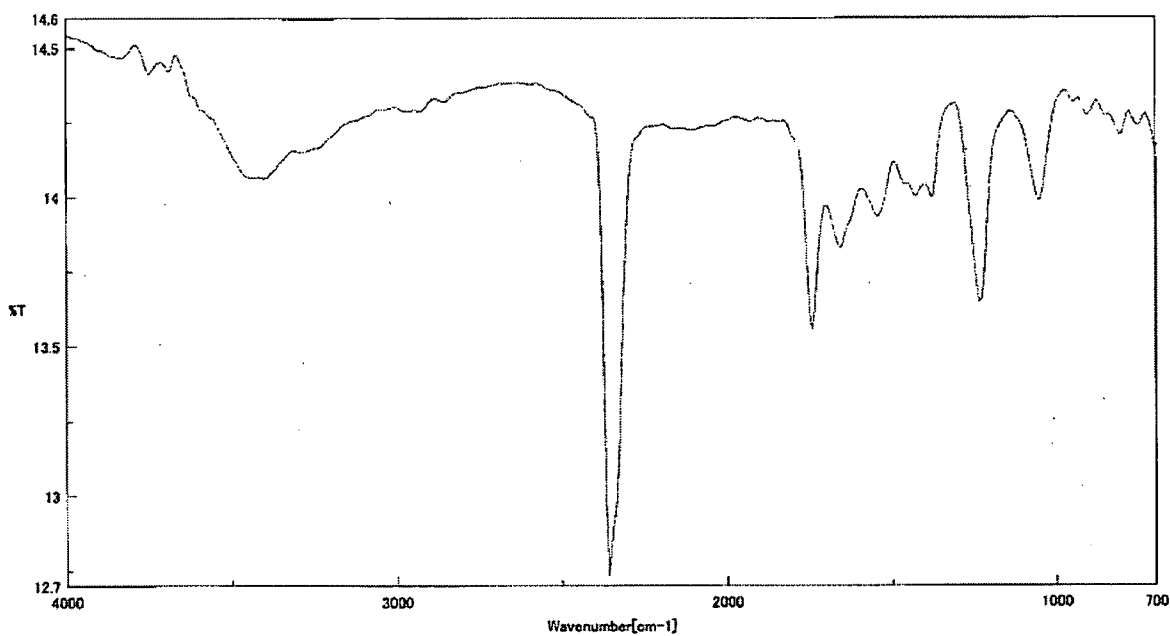


Fig. 2-5-07 化合物 2 の IR スペクトル

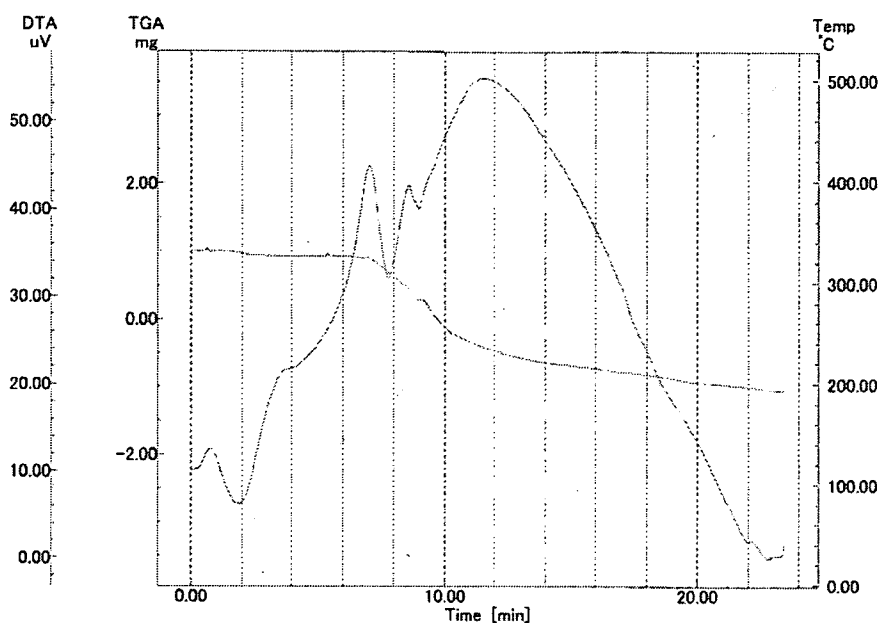


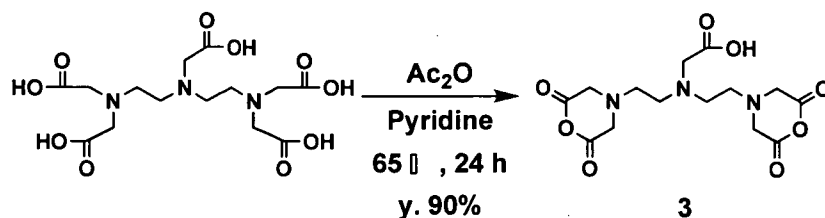
Fig. 2-5-08 化合物 2 の熱分析

$^1\text{H-NMR}$ 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 D_2O 置換することで確認した。MS スペクトルより 796.44 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 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。

2-5-1-2 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 (3) の合成



Scheme 2-5-03

DTPA 二無水物 **3** 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 **3** 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。

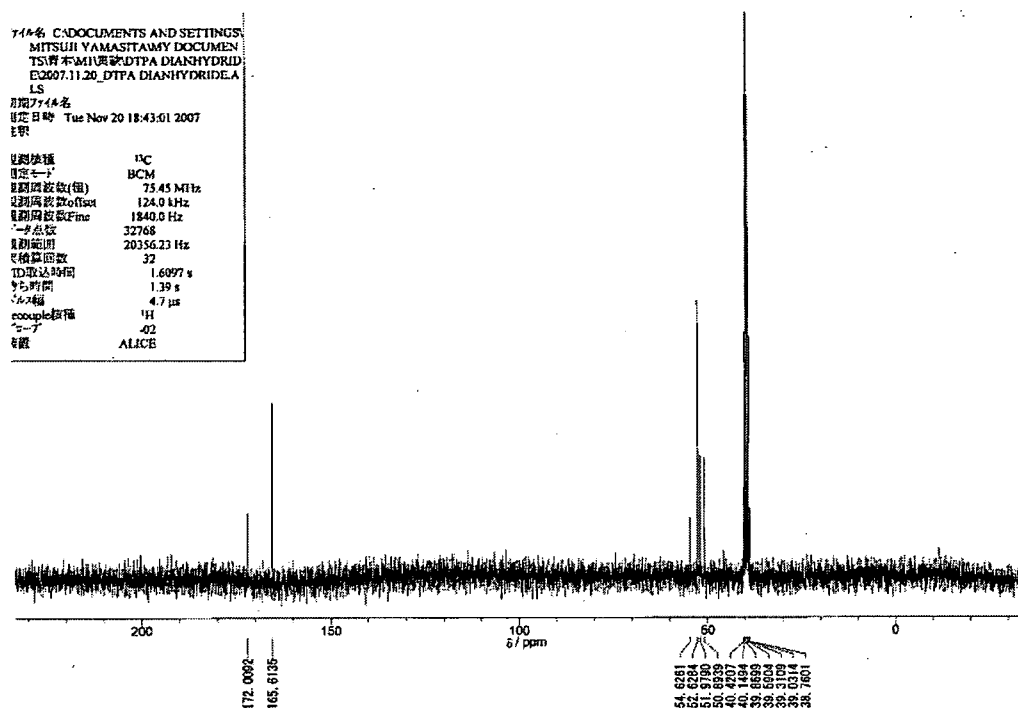


Fig. 2-5-09 化合物 **3** の ^{13}C -NMR スペクトル

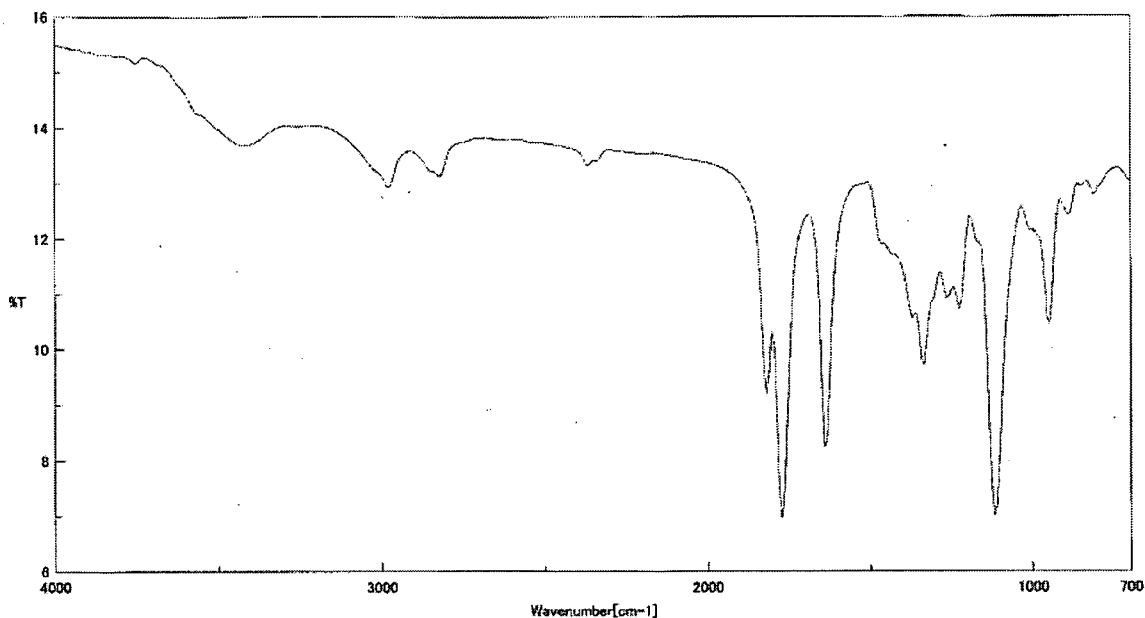


Fig. 2-5-10 化合物 **3** の IR スペクトル

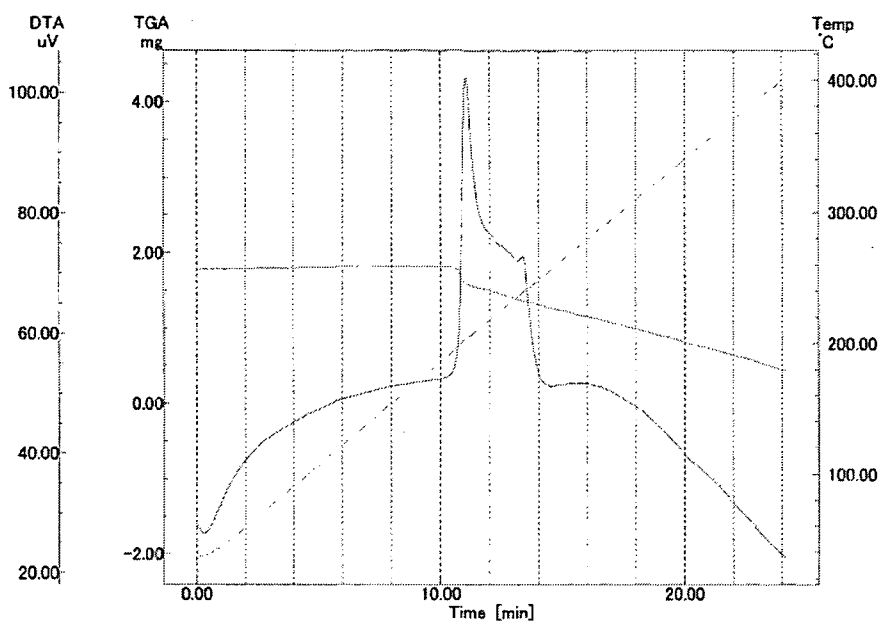
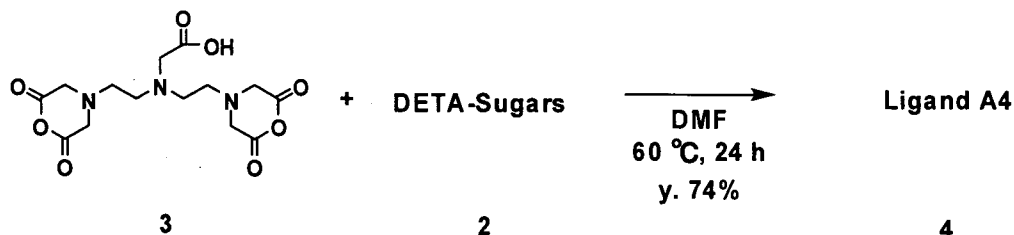


Fig. 2-5-11 化合物 3 の熱分析

^{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。

2-5-1-3 Ligand A4 の合成

・Ligand A4 (4) の合成



Scheme 2-5-04

(特許の関係で Ligand A4 の構造については開示できない。)

DMF 中、コア部である DTPA dianhydride 3 に対して末端部である化合物 2 を反応させることで Ligand A4 4 を収率 74% 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、熱分析のデータを示す。

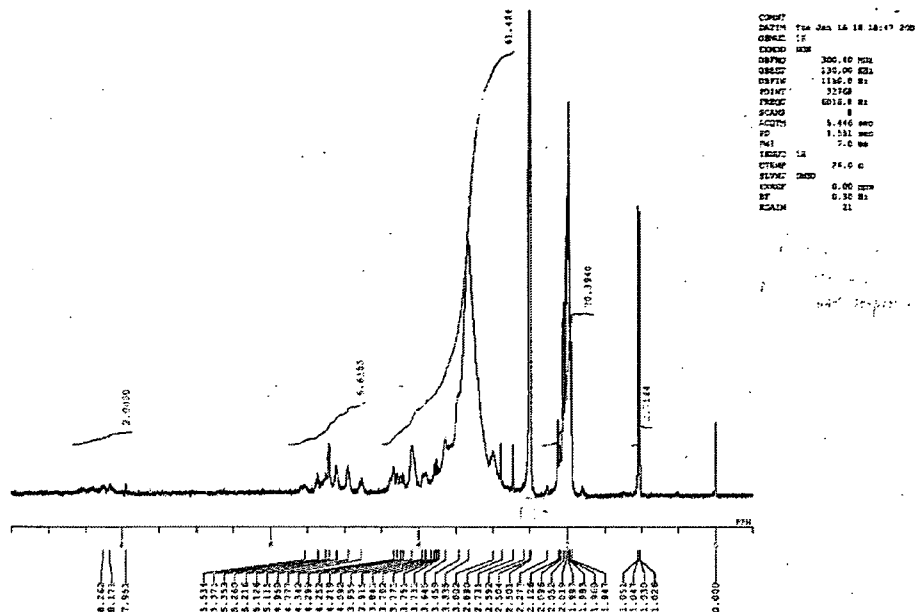
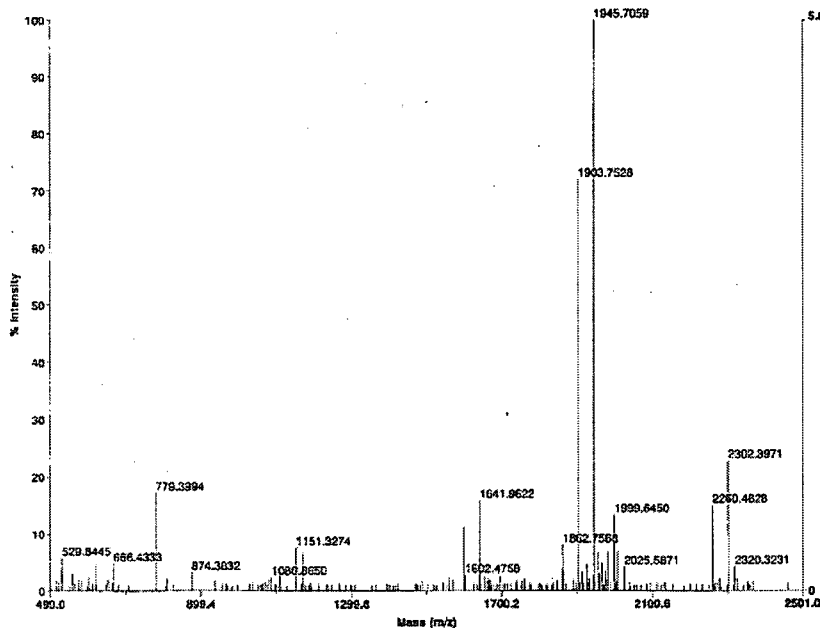


Fig. 2-5-12 化合物 4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>BC=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.7=>DI[BP = 1945.7, 50005]



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

Accelerating voltage: 20000 V
 5.0E+04 Grid voltage: 75%
 Mirror voltage ratio: 1.12
 Guide wire C: 0.002%
 Extraction delay time: 125 msec

Acquisition mass range: 500 - 2500 Da
 Number of laser shots: 50/spectrum
 Laser intensity: 2186
 Laser Rep Rate: 3.0 Hz
 Calibration type: Default
 Calibration name: 4-Cyano-4-Hydroxycinnamic acid
 Low mass gate: 500 Da
 Timed ion selector: Off

Digitizer start time: 22.4285
 Bin size: 0.5 msec
 Number of data points: 25172
 Vertical scale C: 500 mV
 Vertical offset: 0.63%
 Input bandwidth C: 500 MHz

Sample well: 63
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 6334
 Instrument name: Voyager DE PRO
 Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well (plate).pt
 Lab name: PE Biosystems

Absolute x-position: 10287.2
 Absolute y-position: 17922.6
 Relative x-position: -1450.25
 Relative y-position: 1095.14
 Shots in spectrum: 50
 Source pressure: 2.205e-007
 Mirror pressure: 5.355e-008
 TCE pressure: 0.001019
 TIS gate width: 7
 TIS light length: 688

Fig. 2-5-13 化合物 4 の MS スペクトル