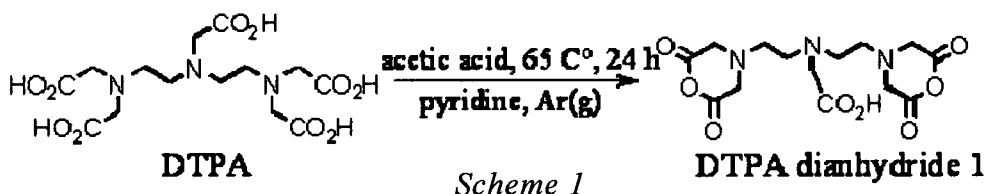


functionalized medical materials, medicines, imaging agents, etc., which help the early stage recognition and then make the early stage medical therapy effectively, are the most desired social needs to be achieved.

In our laboratory novel MRI contrast agents, Gd-DTPA-D1-Sugar (DEN-OH) derivated from Gd-DTPA, were prepared [1, 2]. DEN-OH makes clearer images of blood vessels than currently used contrast agent, Gd-DTPA, and may be a potential contrast agent for MRA (MRA: Magnetic Resonance Angiography). And moreover DEN-OH could make MR images of tumor cells of liver, whose images with Gd-DTPA could not be made. DEN-OH takes a longer time to be eliminated from blood vessel. Therefore, DEN-OH provide a novel blood pool property, however, it takes over 24 hours to be excluded from body. Here, we designed molecular models, which may afford clearer MR images and be excluded after appropriate passage of time, and synthesized new MRI contrast agents with lower molecular weight.

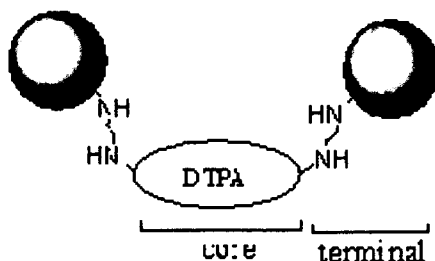
Results and Discussion:

DTPA dianhydride 1 was synthesized from DTPA (Scheme 2) as the core [3].



Convergent methods

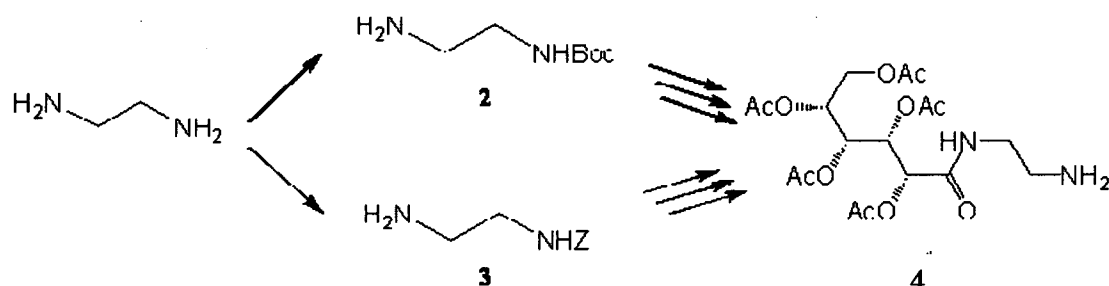
Convergent methods were applied for the preparation of dendrimer structure of target molecules. The terminal and core parts (Scheme 1), separately, were prepared first, and then the parts were combined to construct the dendrimers for Gd(III) ligands.



Synthesis of Terminal

As the beginning of the research, D-(+)-glucono-1,5-lactone was used for providing the recognition site of organs or tissues at the dendrimer outer shell. To prepare terminal part, gluconolactone was converted into ethylenediamine derivative 4 (glucose derivative) by protection of the hydroxyl groups of the sugar moiety by acetate formation (Scheme 3). The ^1H NMR spectrum of 4

supported the terminal structure. By an alternative synthetic pathway ethylenediamine derivative **4** was prepared from ethylenediamine protected by a Boc or a Z group (Scheme 3).



Scheme 3

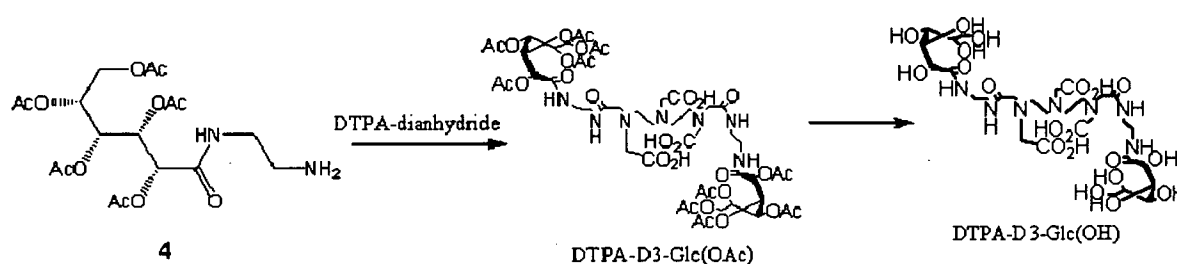
Overall yields of ethylenediamine derivative **4** were summarized in Table 1. Method of Boc protection contains a difficult step of deprotection, and then Z protection route was selected hereafter.

Protection	Intermediate Yield (%)			Total Yield(%)
	Protection of Boc or Z	Protection of Acetyl (Ac)	Deprotection of Boc or Z	
Boc	64	66	9	3.8
Z	98	91	72	64

Table 1. Total yield of **4** and yield of synthetic intermediates for each approach.

Synthesis of Ligands

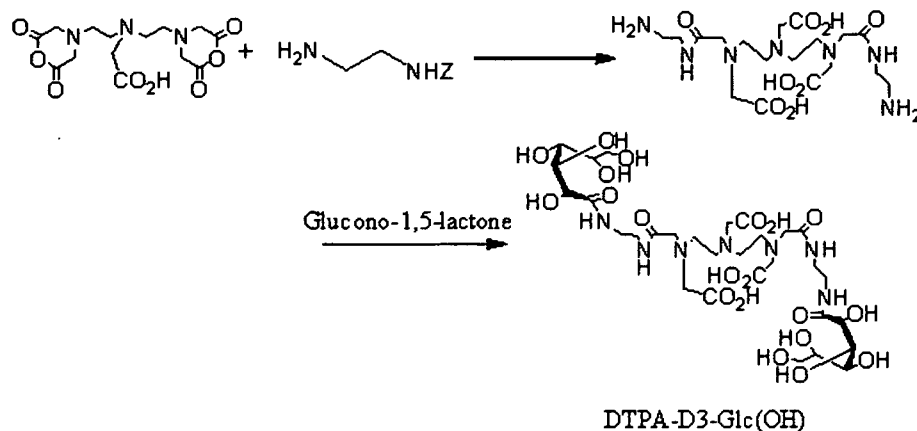
DTPA-D3-Glc(OH) was synthesized by convergent method. The reaction of DTPA-dianhydride **1** with terminal **4** gave DTPA-D3-Glc(OAc), whose final hydrolysis of acetyl protected group under basic condition offered DTPA-D3-Glc(OH). The total yields of DTPA-D3-Glc(OH) from **1** was 51% (Scheme 4).



Scheme 4: Convergent method

Divergent method

Divergent method was applied for the preparation of the dendrimer structure of the target molecules. The process constructs a dendrimer skeleton from center to branch. Then the first reaction for the present target molecule started from core part (DTPA dianhydride), and the successive condensation reactions with spacers and sugars, afforded DTPA-D3-Glc(OH) in a total yield of 15% (scheme 5).



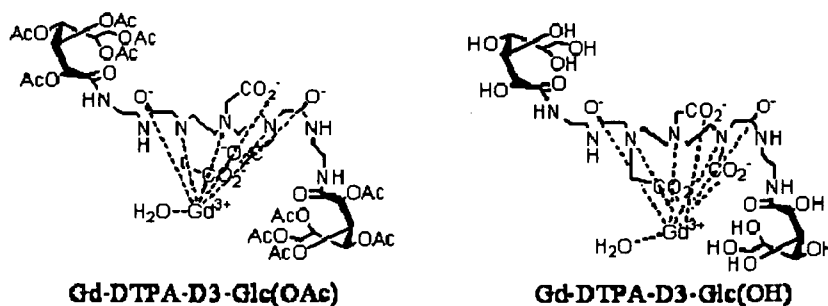
Scheme 5: Divergent Method

Comparison of Convergent Method with Divergent Method

To compare convergent method with divergent method, divergent method was carried out as shown in Scheme 5 to afford DTPA-D3-Glc(OH) in 15% yield. Convergent method (Scheme 4) for preparation of Gd-DTPA-Glc(OH) follows longer synthetic steps including protection by acetyl (Ac) and Z groups and the deprotection process, nevertheless, the convergent method gave better results in the total yield of 51% than the divergent method (total yield of 15%) for the preparation of DTPA-D3-Glc(OH) for the new ligand of Gd(III).

Preparation of Novel Contrast Agents Gd-DTPA-D3-Sugar

DTPA-D3-Sugar was prepared for Gd(III) ligands, which complex formation with $\text{GdCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, produced novel contrast agents as shown in Scheme 6.



Scheme 6: Novel Contrast Agents Gd-DTPA-D3-Sugar

Experimental Section:

Benzyl Formate Protection Method

Benzy-2-aminoethylcarbamate

To ethylenediamine (4.7 ml, 70 mmol) was slowly added the solution of Z-chloride (0.2 ml, 1.4 mmol) in 20 mL THF, for 1 h and then the solvent was evaporated, to afford residue, to which deionized water was added and crystallized. The crystal was filtered and the crystal was resolved with toluene (15 ml × 3 times), whose solution was washed with brine (15 ml × 3 times), dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated to give a colorless crystal **3** (0.268 g, 1.38 mmol, yield 98 %).

Introduction of a Sugar Residue into Protected Ethylenediamine

To D-(+)-Glucono-1, 5-lactone (0.248 g, 1.46 mmol) in 15 ml of DMF was added **3** and the mixture was stirred for 1 day at room temperature. The mixture was added into Et₃N (3 ml) and Ac₂O (0.96 ml, 7.3 mmol) at 0 °C, and then the solution was stirred for 2 days at room temperature. After the completion of the reaction, extraction of the product from the reaction mixture with 30 mL ethyl acetate followed by neutralization with aqueous sodium hydrogencarbonate (15 mL × 3 times), being dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated gave colorless crystal **4** (0.42 g, 0.93 mmol, yield 64 %).

Acknowledgment:

Financial supports by Shizuoka Prefectural Government, Ministry of Health, Labor and Welfare, and Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology as well as collaborated companies and Shizuoka University are deeply acknowledged.

References:

- [1] Yu, G., Yamashita, M., Aoshima, K., Kobayashi, M., Kato, T., Kamikage, N., Takahashi, M., Takayanagi, H., Oshikawa, T., Laurent, S., Burtea, C., Elst L. V., Muller R. N., Takehara, Y., Sakahara, H.: *Heterocyclic Commun.*, **2007**, 13(2-3), 101-108.
- [2] Yamashita, M., Ito, S., Yu, G., Fujie, M., Niimi, T., Sakata, Y., Ogawa, K., Ozaki, N., Kasthuraiah, M., Ogawa, T., Otake, Y., Asai, K., Aoki S., Hara, Y., Aoshima, K., Kobayashi, M., Kamikage, N., Takahashi, K., Takayanagi, H., Oshikawa, T., Kiyofuji, K., Takehara, Y., Sakahara, H., Urano, T., Nakamura, S., Laurent S., Burtea, Elst L. V., Muller R. N.: *Proceedings of 5rd Inter-Academia* **2006**, 291-298.
- [3] Gerald, C. F. G. C., Urbano, A. M., Alpoim, M. C., Sherry, A. D., Kuan, K. T., Rajagopalan, R., Maton, F., Muller, R. N.: *Magnetic Resonance Imaging.*, **1995**, (13), 3, 401.

「Reserch on Novel Sugar Dendric MRI Contrast Agents for Cancer and Phospha Sugar Anti-cancer Materials」 山下 光司

Reserch on Novel Sugar Dendric MRI Contrast Agents for Cancer and Phospha Sugar Anti-cancer Materials

Mitsuji Yamashita¹, Michio Fujie^{1,2}, Junko Yamashita¹, Keisuke Ogawa¹, Kengo Aoshima¹, Nobuhisa Ozaki¹, Takashi Aoki¹, Yasuo Takehara², Harumi Sakahara² and Satoki Nakamura²

¹ Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8011, Japan; ² Faculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, 431-3192, Japan

(1) Novel Sugar Dendric MRI Contrast Agents

Introduction

The currently most commonly used MRI contrast agent, Gd-DTPA (Gadolinium(III)-Diethylene Triamine-Pentaacetic Acid Complex) has difficulty to make clear images of blood vessels and cancers. To improve the MRI contrast agent is important R & D theme for innovation on medical sciences.
 In the present research, the novel dendritic MRI contrast agents having the Gd complex in the core part and having sugars on the outer shell part (DEN-OH), which recognizes molecules in the blood vessels, have been developed to make clearer images of blood vessels and cancers under lower Gd concentration.

Method

Synthesis

Core + Terminal → DEN-OH

Qualification

1. MRI
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

2. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

3. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

4. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

5. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

6. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

7. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

8. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

9. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

10. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

11. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

12. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

13. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

14. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

15. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

16. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

17. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

18. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

19. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

20. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

21. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

22. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

23. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

24. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

25. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

26. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

27. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

28. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

29. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

30. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

31. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

32. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

33. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

34. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

35. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

36. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

37. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

38. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

39. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

40. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

41. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

42. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

43. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

44. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

45. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

46. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

47. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

48. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

49. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

50. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

51. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

52. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

53. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

54. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

55. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

56. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

57. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

58. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

59. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

60. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

61. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

62. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

63. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

64. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

65. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

66. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

67. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

68. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

69. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

70. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

71. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

72. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

73. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

74. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

75. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

76. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

77. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

78. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

79. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

80. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

81. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

82. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

83. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

84. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

85. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

86. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

87. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

88. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

89. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

90. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

91. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

92. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

93. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

94. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

95. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

96. ¹⁵N-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

97. ³¹P-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

98. ¹⁹F-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

99. ¹³C-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

100. ¹H-MRS
 - Tumor enhancement
 - Normal vessel contrast

Results

Time Course Changes of Contrast Enhancement on Tumor (in-vivo MRI)

Time Course Changes of CNR (Lesion basis)

Summary

- The novel Gd-DTPA-Sugar dendrimer (DEN-OH) revealed the capability of contrast for hepatocellular carcinoma (HCC) in spin-echo, and then showed clearer MRI images for blood vessels and liver tumors.
- HCC with DEN-OH made visible clear images to the eye for 2 hours.
- The CNR in DEN-OH is over five times higher than that in Gd-DTPA after 30 minutes.
- DEN-OH (DTPA-DT Glu (OH) Dendrimer) has a character which remains in the blood vessel for long time enough, and then possibility to be a blood pool MRI contrast agent.
- The present MRI contrast agent, DEN-OH, has a potential for innovation in MRA (Angiography) and imaging tumors of blood rich organs (e.g., liver).

(2) Phospha Sugar Anti-cancer Materials

Introduction

Chemotherapy by molecular targeting agents reduces side reaction, nevertheless, it is impossible not to afford any damages on the healthy cells by the current therapeutical method. (Chemotherapy with larger doses anti-cancer agents as well as by radio isotope therapy affords damages on healthy cells.)
 For innovation in chemotherapy, novel phospha sugar derivatives are prepared and characterized to be active, selective, specific, and wide spectral anti-cancer agents.

Method

Synthesis

Structure

Evaluation (MTT (in vitro))

Results

-Evaluation of Bioactivity for Phospha Sugars by MTT Method (Leukemia)

-Bioactivity Evaluation by MTT Method for Dibromides

Summary

- Dibromides were active towards solid cancer, e.g., stomach cancer, etc. Top photo shows control with DMSO, 48 h, which shows that the cancer cell are actively splitting. Bottom photo shows 200 μM of dibromides, 48 h, which clearly shows that most of the cancer cells were killed by the agent.
- Tribromides were elucidated to be more active than the bromides, and they are active enough.
- MTT in vitro method for leukemia showed quite positive activity (high activity, wide spectrum, and NR for health cell). The detailed in vitro and in vivo bioassay results as well as the mechanism will be presented separately.
- Results of cell cycle analysis by flow cytometer showed typical apoptosis pattern.

Conclusion: The present research may provide highly potential MRI contrast agents and chemotherapy agents for eradicating cancer and innovating in medical sciences.

2-4 第37回複素環化学討論会

「エポキシあるいはブロモ基を有する含リン複素環化合物

あるいはリン糖誘導体の合成と生理活性」 山下 光司

(^a静岡大院創造・^b静岡大院理・^c静岡大院工・^d浜松医大医) ○山下光司 ^a・藤江三千男 ^{b,d}・新美大志 ^b・マッダリ カスツライアー^a・浅井一秀 ^c・陶山拓也 ^c・山下純子 ^a・伊藤 悟 ^b・中村悟己 ^d

Synthesis and Bio-activity of Phosphorus Atom Containing Heterocycles or Phospha Sugars Having Epoxy or Bromo Groups

(^aGraduate School of Science and Technology, Shizuoka University; ^bGraduate School of Science and Engineering, Shizuoka University; ^cGraduate School of Engineering, Shizuoka University; ^dFaculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine) Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Taishi Niimi, Maddali Kasthuraiah, Hidekazu Asai, Takuya Suyama, Junko Yamashita, Satoru Ito, Satoki Nakamura

Phospholenes, which have a phosphorus atom in the heterocycles, were converted into phospholanes or phospha sugars being provided with epoxy or bromo groups by novel chemical procedures. The prepared phospholanes or phospha sugars was qualified by MTT method to find quite efficient anti-cancer activity for leukemia cell with a wide spectra, high activity, and specificity as well as for solid cancer cells, etc.

含リン複素環化合物であるホスホレン類を新規な方法により化学的に変換して、エポキシあるいはブロモ基を導入したホスホラン類あるいはリン糖の調製を行った。得られた新規な含リン複素環化合物を MTT 法等によりヒトの白血病培養細胞等に対する有効性を *in vitro* 評価した。その結果、本研究により化学合成した複素環化合物は、白血病等のがん化した細胞あるいは固形がん等に (1) 広いスペクトル、(2) 高い活性、(3) 特異的、に作用する新しい抗がん剤として有望な生理活性を示すことが明らかとなった。

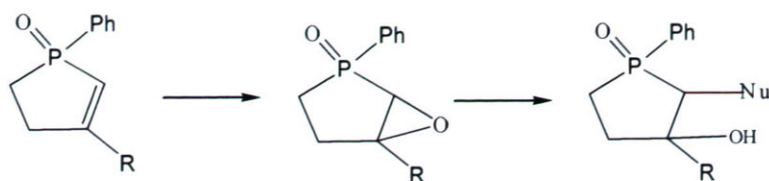
(1) はじめに

糖のヘミアセタール環内の酸素原子を炭素あるいはヘテロ原子に置き換えた擬似糖類 (例えば、カルバ糖、アザ糖、チア糖) は自然界に存在し、それらの化学合成や生理活性についても知られている。擬似糖類の中でも、リン原子を含むリン糖類は、現在まで自然界での存在は報告されておらず、化学合成やその生理活性も余り良く知られていない。しかし、ホスホマイシン等の炭素-リン結合を持つ化合物の生理活性あるいはアザ糖やチア糖等の化学合成および生理活性と同様に、リン糖も化学合成のみでなく生理活性等に関しても興味を持たれている。

演者らは、既にホスホレン類を出発物質とした短経路のリン糖合成に成功し^{1,3)}、更にリン糖類似体のグリコシド誘導体の合成についても報告した^{4,5)}。ここでは、リン原子を環内に含む不飽和複素環化合物の2-ホスホレン類の化学修飾によるエポキシ誘導体、ブロモ誘導体、およびリン糖 N-グリコシド誘導体の合成や立体特異性・立体選択性、あるいはそれらの生理活性について検討した結果を報告する。

(2) 2-ホスホレン類の2,3-エポキシドの合成およびエポキシドの求核置換反応

1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドのクロロホルム-水混合溶液に臭素を作用させると、ジアステレオマーの *threo* 型および *erythro* 型の2-ブロモ-3-ヒドロキシ-1-フェニルホスホレン 1-オキシドを得た。これらのブロモヒドリル誘導体から対応するエポキシドがそれぞれのジアステレオマーとして得られた。

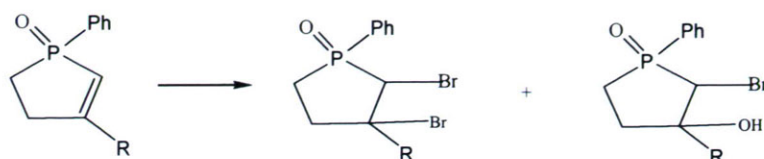


過酸化水素による酸化反応によっても、ジアステレオマー混合物として、エポキシド誘導体が得られた。しかし、1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド

ドを過酸化ナトリウムで酸化すると、2,3-位の C=C 不飽和結合のエポキシ化反応が選択的に進行して、立体特異的に *erythro* 型のエポキシド誘導体を高収率で得た^{6,7)}。更に、エポキシドに対する求核置換反応により、リン糖グリコシド類似体を調製した。

(3) 2-ホスホレン類からプロモホスホラン類の合成

1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドに非水溶媒中、触媒存在下臭素付加を行うと、ジプロモホスホラン誘導体が得られた。



(4) MTT法による生理活性の評価

得られたエポキシ及びプロモホスホラン誘導体等を用いてヒトの白血病細胞 K562 及び U937 を用い、MTT法により *in vitro* 評価を行った。

ジプロモ誘導体の結果を例示する (Fig. 1)。MTT法による評価結果から、これらの化合物は、白血病細胞に対して、(1) 高い活性を持つ、(2) スペクトルが広い、(3) がん化細胞に特異的作用し健常細胞に対しては作用しない、等の優れた生理活性を示した。

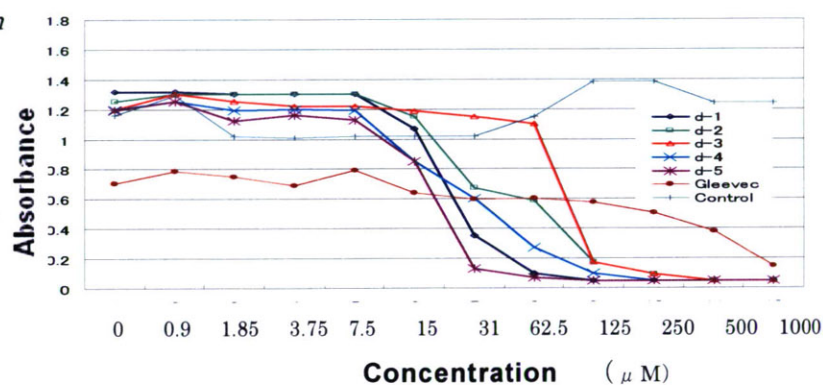


Fig. 1. MTT result (U937).

(4) 結語

新規な方法で調製したエポキシやプロモ基等を有する含リン不飽和複素環化合物のホスホラン誘導体あるいはリン糖誘導体は、抗がん剤等として有効な生理活性を示した。

(5) 文献

- 1) M. Yamashita, M. Uchimura, A. Iida, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 569 (1988).
- 2) M. Yamashita, A. Yabui, T. Oshikawa, T. Hanaya, and H. Yamamoto, *Heterocycles*, **38**, 1449 (1994).
- 3) M. Yamashita, A. Yabui, K. Suzuki, Y. Kato, M. Uchimura, A. Iida, H. Mizuno, K. Ikai, T. Oshikawa, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Carbohydr. Chem.*, **16**, 499 (1997).
- 4) M. Yamashita, A. Iida, K. Ikai, T. Oshikawa, T. Hanaya, and H. Yamamoto, *Chem. Lett.*, 407 (1992).
- 5) M. Yamashita, K. Suzuki, Y. Kato, A. Iida, P. M. Reddy, and T. Oshikawa, *J. Carbohydr. Chem.*, **18**, 915 (1999).
- 6) M. Yamashita, V. K. Reddy, L. N. Rao, B. Haritha, M. Maeda, K. Suzuki, H. Totsuka, M. Takahashi, and T. Oshikawa, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2339 (2003).
- 7) H. Totsuka, M. Maeda, V. K. Reddy, M. Takahashi, and M. Yamashita, *Heterocyclic Commun.*, **10**, 295 (2004).

2-5 第 38 回中部化学関係学 協会支部連合秋季大会 ・「Gd-DTPAを糖で化学修飾した新規MRI造影剤の合成及び評価」 青木 峻

(静岡大院工・静岡大院創造*・静岡大院理工**・静岡大工***・浜松医大医****)
○青木 峻・山下 光司*・於 剛**・小川 圭介**・尾崎 伸久・杉山 雅紀***
・水野 紗耶香***・阪原 鳴海****・竹原 康雄****

MRIはNMRを基本原理とし、生体内の水素原子プロトンの磁氣的挙動を利用し組織断面を画像化する臨床画像診断の一つである。近年の疾病の増加に伴いMRIによる検査の重要性が高まっている。しかし、現在最も広く用いられているMRI造影剤であるGd-DTPAは緩和率が低く、また血管貯留性及び組織特異性を有していないため血管及び特定の臓器の造影が困難である等の問題点がある。

そこで、当研究室では糖が有する組織への認識機能を利用したドラッグデリバリーシステムに着目し、血管貯留性及び組織特異性の発現を期待してGd-DTPAを糖により化学修飾したGd-DTPA糖化合物(Figure 1)の合成を行った。合成した化合物の評価としてはラットを用いた動物実験による画像化及び緩和率測定を行った。その結果、得られた画像(Figure 2)はGd-DTPAに比べて鮮明であり緩和率も高い値を示し、特に血管、肝臓、腎臓の造影が優れていることが示唆された。

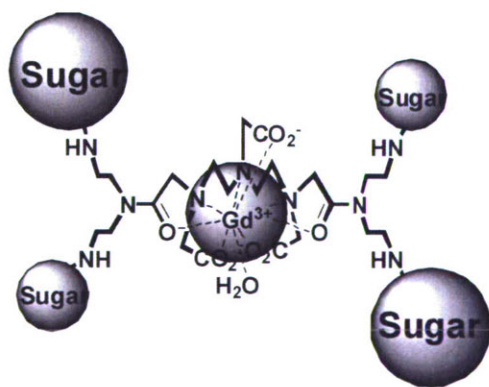


Figure 1. Gd-DTPA 糖化合物

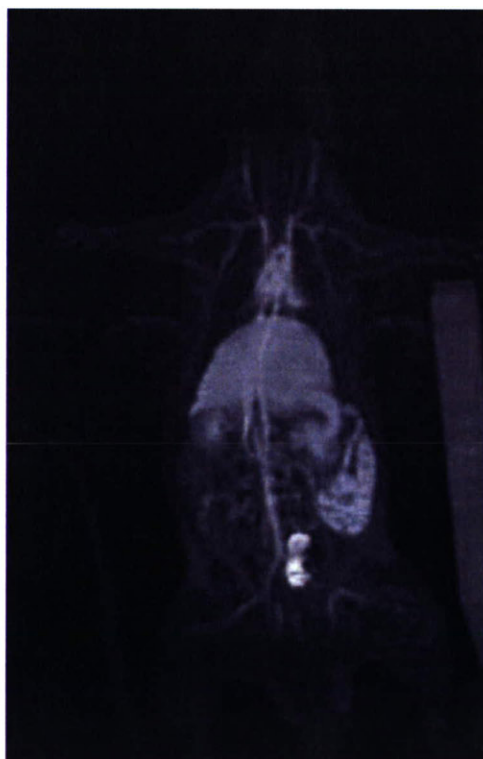


Figure 2. MR 画像

2-6 ナノバイオテクノロジー連携群の成果報告会

・「がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズシュガーポルデンリマー型新規 MRI 造影剤の開発研究」 山下 光司

Introduction:

MRIは、放射線等を使わずに体内可視化技術である。MRIを一種有効な診断技術とするために、現在用いられている血管外漏出型のGd-DTPA(ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸)の欠点を克服し、高感度で、選択性・特異性を備え、鮮明な画像を容易に安全に撮出できる血管内貯留型の優れたMRI造影剤の開発が必要である。

本開発研究では、(I) Gd-DTPAの分子サイズを大きくすること、(II) 体内分子を認識する部位を備えた分子設計、(III) 感度が高く安全なMRI造影剤の開発、等のコンセプトを基本組織として、Gd-DTPAをコアとし外殻部に糖鎖をもつデンリマー型のMRI造影剤の開発研究を行う。

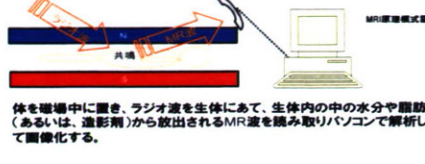
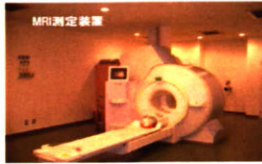
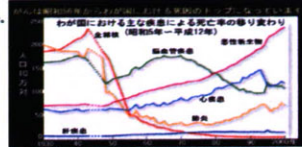


Fig. 1. 実際の医療現場で使われているMRI装置(左上)と測定原理(中央上)および癌の現状(右上)

Yamashita Lab. (Bio-Medical Material Lab. Team MRI)



現在、我が国では、がんや循環器系疾患による死亡率が高い。がんは、死因1位の病気であり、今後もがんによる死亡率は上昇することが予想されている。それ故、がんおよび循環器系疾患の早期発見・早期治療が最大の課題となっている。

Molecular design: 分子設計

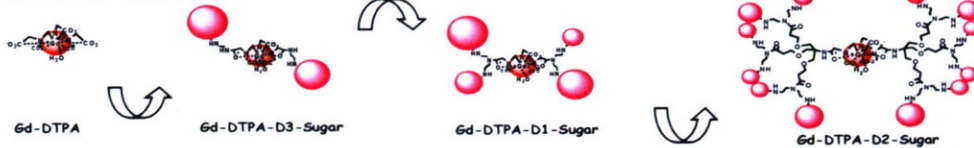
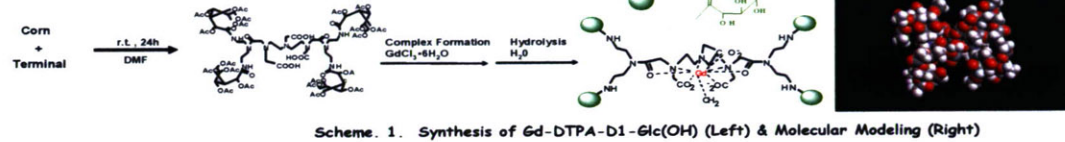


Fig. 2. Gd-DTPAを基本構造として分子のコアとし、外殻部に分子認識・組織認識部位として糖鎖を化学結合で配置したデンリマー型分子を設計した。

Experimental 1: 造影剤の化学合成



Scheme 1. Synthesis of Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (Left) & Molecular Modeling (Right)

Experimental 2: In vitro 評価試験



Photo 1. ICP-AE プラズマ発光分光光度計
ICPは、当該のGd錯体の評価用サンプルに含まれるGd元素の正確な定量が可能である。また、極微量のサンプル量でも様々な元素の定量分析が可能であるため、錯体生成定数の測定等の応用的な利用方法も可能である。



Photo 2. Minispec 緩和率測定装置
Minispecにより、造影剤として不可欠な緩和率などの物理的・化学的な性質を測定できる。
例: T1緩和時間より、r1緩和率、Gdのモル濃度、Gdの安全性の評価、温度によるr1変化 etc
T2緩和時間より、r2緩和率、Gdに配位した水の交換速度 etc
緩和時間を温度やサンプルの濃度を変化させて測定することでMRI造影剤のin vitro評価ができる。それ故、動物実験によるin vivo評価前に調整した新規な造影剤の描出能力を予測し、造影剤としての機能を評価することが可能となった。また、構造-活性相関を求めることにより、構造の最適化が可能となる。

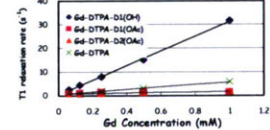
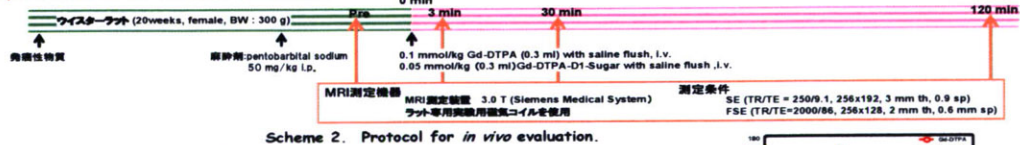


Fig. 3. Relaxation rate vs. Gd Conc.

Experimental 3: In vivo 評価 (動物実験)



Results: 血管造影、肝細胞がん造影等の比較

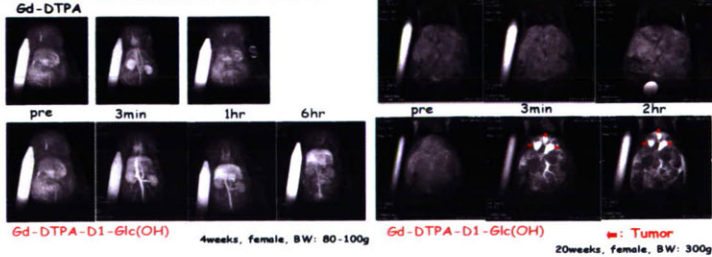


Fig. 4. 富血性肝細胞癌を造影した結果

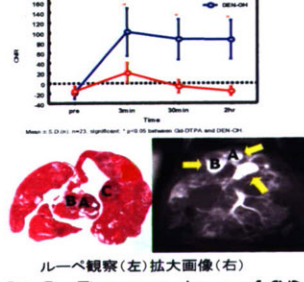


Fig. 5. Time course changes of CNR (Top) and tumors imaged by a magnifier (Bottom Left) and MRI (Bottom Right).

Summary:

- ・開発中のGd-DTPA-D1-Glc(OH)は、現在最も一般的に使われているMRI造影剤(Gd-DTPA)に比べ、非常に高感度で鮮明な画像を動物実験によるin vivo評価において与えた。
- ・Gd-DTPAでは、通常、造影剤投与後5分程度しかなかった造影時間を、飛躍的に長く出来た(ImagingのWindowを拡大した)。
- ・開発中の造影剤は、血管を鮮明に造影できるので、MRA (Magnetic Resonance Angiography)が可能である。
- ・開発中の造影剤は、血管を長時間造影しており血管貯留型の造影剤(Blood Pool Contrast Agent)と言える。
- ・開発中の造影剤は、血管の他にも血液に富んだ臓器や組織を鮮明に造影している。
- ・開発中の造影剤は、血管だけでなく、富血性肝細胞癌を鮮明に画像化でき、がんの早期発見を可能にする造影剤の開発の可能性を強く示唆している。

2-7 C-P化合物研究会

「がんを早期発見・早期治療するMRI 造影剤およびC-P 結合を持つリン糖・複素環化合物の開発と*in vitro*および*in vivo*評価」 山下 光司

(静岡大学大学院) ○山下光司、○浅井一秀、伊藤 悟、山下純子、陶山拓也、小川圭介、尾崎伸久、青木 峻、於 剛、Valluru Krishna Reddy
(浜松医科大学) 藤江三千男、中村悟己、竹原康雄、阪原晴海

(要旨)

がんを早期発見・早期治療するための医療技術のイノベーションを目指した医療材料の開発研究を行っている。Gd-DTPA をコアとし糖類を外殻に結合した新規な dendrimer 型の MRI 造影剤の調製を行い、*in vitro* および *in vivo* 評価を行った。本研究により、ラットの肝臓がんを鮮明に画像化できる造影剤を創製した。また、リン原子を環内に含む糖誘導体のリン糖あるいは複素環化合物のホスホラン誘導体を 2-ホスホレン類を原料として化学合成した。更に、これらのリン糖および含リン複素環化合物の生理活性を *in vitro* 評価したところ、分子標的抗がん剤である Gleevec と類似の作用機序を持つ抗がん作用を見出した。

(がんを早期発見する技術開発)

がんは死因の第 1 位の病気であり、がんを早期発見・早期治療することは現在最も重要な課題の一つである。

MRI は NMR を基本とした画像診断装置であり、明瞭な画像を得るために MRI 造影剤として Gd-DTPA (ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸) が実用化されている。この血管外漏出型の MRI 造影剤の外殻に糖を結合した血管内貯留型のシュガーボール dendrimer 型 Gd-DTPA-Dn-Sugar の新規な造影剤を化学合成し、*in vitro* 評価および *in vivo* 評価を行った。Gd-DTPA-D4-Glc(OH) を用いてラットにより *in vivo* 評価を行ったところ、肝臓がんの鮮明な画像を得ることに成功した。

(がんを薬剤により治療する技術開発)

糖のヘミアセタール環骨格内の酸素残基を他の原子を含む残基で置き換えた擬似糖 (例えば、炭素で置換したカルバ糖や窒素で置換したアザ糖、硫黄で置換したアザ糖等) は天然にその存在が確認されている。これらの擬似糖類については、その合成化学および生化学的研究が多数おこなわれており、擬似糖類には生理活性を示す化合物が多数報告されている。また C-P 結合を有する有機リン化合物にも生理活性 (例えば、ホスホマイシン (抗生物質)、ピアラホス (除草剤)) がある。これらの知見から、糖のヘミアセタール環内酸素残基をリン残基で置き換えたリン糖の研究に関しては合成化学の見地のみでなく生化学の見地からも興味深く、当該の研究成果に対する期待が高い。しかしながら、他の擬似糖類とは異なり、現時点では、リン糖においてはその存在が天然においては未確認であり、他の擬似糖と比べ生理活性等の報告があまりない。

従来の擬似糖類の合成方法としては、糖を出発物質とした化学合成が典型的な方法である。しかし、リン糖類の化学合成においては、従来の合成方法と異なる化学合成ルートを検討する意義が大きいと判断され、当研究室では含リン複素環化合物の2-ホスホレン類を出発物質として、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応を用いてリン糖誘導体あるいは含リン複素環化合物の合成を行った。また、これらの誘導体の *in vitro* 評価を行った。評価には、白血病の培養細胞に対して、比色分析の一つである MTT 法を用いた。

(研究成果)

(1) Gd-DTPA-Dn-Sugar の合成および造影剤としての評価

現在用いられている MRI 造影剤 Gd-DTPA (Fig. 1) の分子サイズを大きくし、生体内分子を認識する機能性分子を導入することにより、血管内生体機能関連物質や臓器を認識し、血管内貯留性を高める分子を設計して、Gd-DTPA をコア部とし外殻部に様々な糖を 1 個～10 数個結合したシュガーボールデンドリマー型のガドリニウム錯体を調製する事に成功した。調製した Gd-DTPA-糖誘導体を *in vitro* 及びラットを用いた *in vivo* により造影効果の評価を行ったところ、この Gd-DTPA-Dn-Sugar の基本構造の MRI 造影剤は、Gd-DTPA と比較して、造影の至適時間の延長効果や臓器選択性があることを確認した。また、この MRI 造影剤により、血管造影、更に、がん組織の造影に成功した (Fig. 2)。

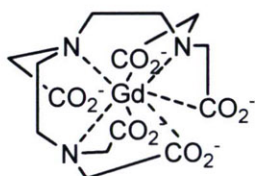


Fig. 1. Gd-DTPA.

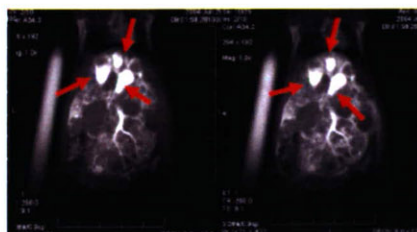
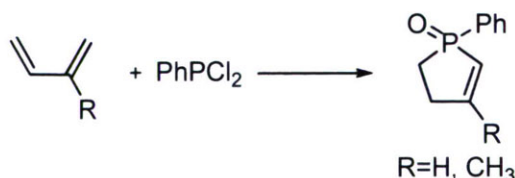


Fig. 2. MR imaging for tumors by Gd-DTPA-D4-Glc contrast agent.

(2) リン糖および 2-ホスホレン誘導体の合成

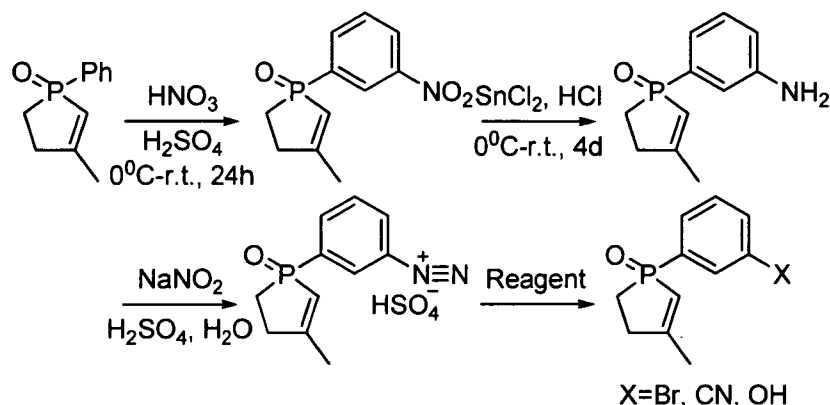
従来のリン糖合成は、主に糖を出発物質とする合成であった。この方法は多段階であるため、当研究室ではジエン類とジクロロフェニルホスフィン (フェニル亜ホスホン酸ジクロリド) との McCormack 反応により 2-ホスホレン類の合成を行い (Scheme 1)、従来法とは異なった新しいリン糖誘導体、あるいはホスホラン誘導体の合成の原料とした。



Scheme 1. Synthesis of 2-phospholenes.

(3) 2-ホスホレン類の1-位（環内リンの位置）のフェニル基の置換反応

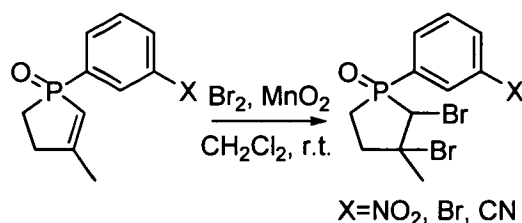
P=O 結合が、O 原子の大きな電気陰性度の故に強い電子求引基であるため 1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドでは、リン上のフェニル基の置換は選択的に *m*-位に起こる。そこで、このホスホレン誘導体のフェニル基のニトロ化反応により *m*-位にニトロ基を導入した。また、ニトロ基を還元しアミノ基とし、更に、Sandmeyer 反応によってブロモ基、シアノ基、ヒドロキシル基の導入を行った (Scheme 2)。



Scheme 2. Synthesis of 1-(Substituted Phenyl)-2-phospholenes.

(4) 2-ホスホレン類の2,3-位（環内オレフィン）のジブロモ化反応

2-ホスホレン類の2,3-位の複素環内オレフィンに対し二酸化マンガンをも触媒とし、臭素と反応させジブロモ化を行った。また、1-(置換フェニル)-2-ホスホレン誘導体の2,3-位の環内 C=C 不飽和結合について臭素の付加反応によるジブロモ化を行った (Scheme 3)。



Scheme 3. Synthesis of 2,3-dibromo-1-(Substituted Phenyl)-2-phospholanes.

(5) 生理活性評価

ホスホレンを出発物質とした新規なリン糖誘導体合成あるいはホスホラン誘導体合成、更には、当研究室において従来化学合成した様々な誘導体に対する生理活性の評価を、MTT 法を用いて行った。*in vitro* 評価用の細胞としては、白血病細胞 K562 および U937 を用いた。MTT 法による生理活性評価結果を図に示す (Fig. 3)。

図 (Fig. 3) では、いくつかのリン糖あるいはホスホラン誘導体が、白血病細胞に対して強い活性があることを示す。

また、2,3-ジブロモホスホラン誘導体は、Fig. 3 より更に強い活性を示した (Fig. 4)。

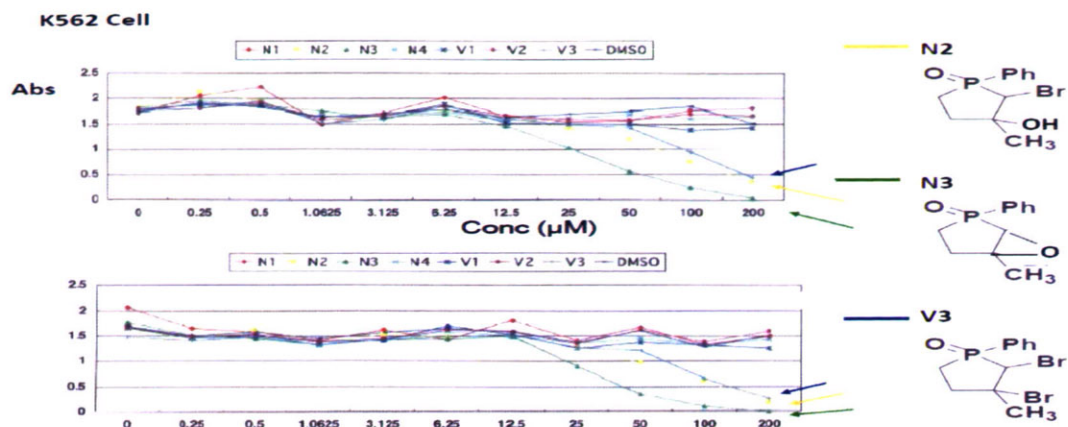


Fig. 3. MTT *in vitro* evaluation of phospho sugars and phospholanes for leukemia cells.

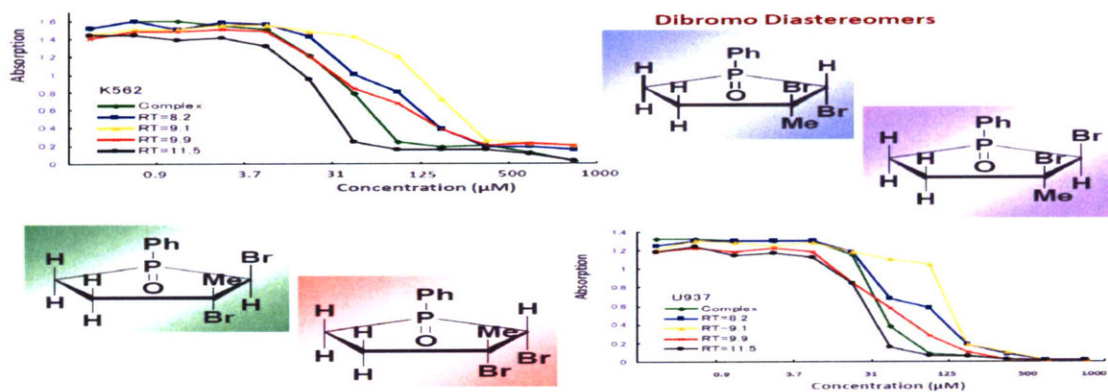


Fig. 4. MTT *in vitro* evaluation of phospho sugars and phospholanes for leukemia cells.

数種の白血病細胞等を用いたリン糖あるいはホスホラン誘導体に対する MTT 法による *in vitro* 評価の結果によれば、これらの化合物は、1) がん細胞に対する強い活性、2) がん細胞に対する高い特異性と選択性、3) がん細胞に対する広いスペクトル、を示すことが示された。

また、これら抗がん剤としての生理活性を示した化合物に対してフローサイトメーターによる解析を行ったところ、細胞のプログラム死であるアポトーシスによる作用機序を確認した。

(結語)

がんの早期発見・早期治療を行うための医療技術のイノベーションを目指した医療材料の開発研究を行い、新規な MRI 造影剤およびリン糖抗がん剤において一定の研究成果を得た。

2-8 第34回有機典型元素化学討論会

- ・「がんの早期発見・早期治療を目指す医療材料－エポキシあるいはプロモ基を有する含リン複素環化合物あるいはリン糖誘導体の合成と生理活性」

山下 光司

(静岡大院創造・浜松医大医・静岡大院理工・静岡大院工)

○山下光司、藤江三千男、新美大志、浅井一秀、陶山拓也、
山下純子、伊藤 悟、中村悟己

がんは死因の第1位の病気であり、がんを早期発見・早期治療することは現在最も重要な課題の一つである。

MRIはNMRを基本とした画像診断装置であり、明瞭な画像を得るためにMRI造影剤としてGd-DTPA(ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸)が実用化されている。この血管外漏出型の造影剤の外殻に糖を結合した血管内貯留型のシュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-Dn-Sugarの新規な造影剤を合成し、*in vivo*評価によりがんの画像を得ることに成功した。

糖のヘミアセタール環内酸素原子をリン原子で置き換えた糖(リン糖)は擬似糖類の一種であり、窒素原子あるいは硫黄原子で置換したアザ糖あるいはチア糖の様に生理活性が期待される。本研究では、古典的な擬似糖合成法である糖を出発物質とする合成法とは異なって、リン原子を含む不飽和複素環化合物の2-ホスホレン類を出発物質とするリン糖誘導体の合成を行った。2-ホスホレン誘導体をエポキシ化あるいはプロモ化することにより幾つかのリン糖誘導体あるいはホスホラン誘導体を化学合成し、それらの化合物の抗がん剤としての活性についてMTT法により*in vitro*評価した。

Gd-DTPA・シュガーボールデンドリマー・ホスホレン・リン糖・エポキシ化・
プロモ化・MTT法・抗がん剤

[序]

MRIはNMRを基本とし、生体内の水や脂肪のプロトンの磁気的挙動を画像化する撮影技術であり、現在の医療にとって欠くことのできない画像診断装置となっている。しかし、MRI装置だけでは診断しにくい臓器や疾患があり、MRI画像をより鮮明に映し出すための造影剤が開発されてきた。現在、MRI造影剤として実用化されている化合物に、Gd-DTPA (Figure 1)がある。しかし、この造影剤は血管外漏出型であり、投与後短時間で血管壁を通過して組織内に一様に分布してしまうため、血管や臓器特異性を有しておらず、血管や特定の臓器の詳細な情報を得ることが難しい。そこで、当研究室では、現在MRI造影剤として実用化されているGd-DTPAのGd-DTPA錯体をコア部とし、末端部に糖が導入されたデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体の合成およびこれらの造影剤の*in vitro*評価や*in vivo*評価を行った。

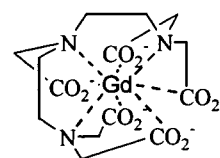


Figure 1. Gd(DTPA)
(DTPA=diethylenetriamine-
pentaacetic acid)

糖のヘミアセタール環内の酸素原子をメチレン基やヘテロ原子（窒素やイオウ、等）で置き換えたカルバ糖、アザ（アミン）糖やチア（チオ）糖等の擬似糖は、天然にも存在し、様々な誘導体が合成され、生理活性の面でも重要な化合物である。一方、通常の糖のヘミアセタール環内の酸素原子をリン原子に置き換えた糖も擬似糖類であるが、天然には存在が知られていない。リン糖も他の擬似糖と同様に化学合成のみでなく生理活性等に関しても興味を持たれているものの、それらの誘導体の合成およびその生理活性については、あまり多くの研究がされていない。また、リン糖は従来法では糖を出発原料として化学合成されているが、その合成経路が長いことや収率が低いため合成例は少ない。演者らは既に、リン原子を含む複素環化合物であるホスホレン類を出発物質とした短経路のリン糖合成に成功した¹⁻³⁾。ここでは、2-ホスホレン類のプロモヒドリン化を経由したエポキシ化、あるいは2-ホスホレン類の過酸化物による直接エポキシ化、臭素の付加によるプロモ化によるリン糖誘導体の新規な合成を検討した。また、これらのリン糖あるいはホスホラン誘導体の生理活性評価を MTT 法により行い、抗がん剤としての生理活性を見出したので報告する。

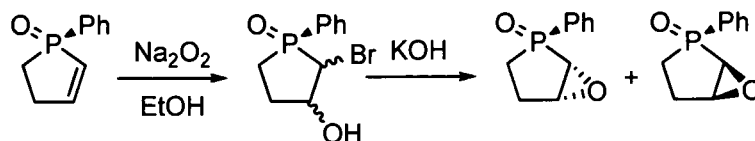
[結果及び考察]

(1) Gd-DTPA-Dn-Sugar の合成および造影剤としての評価

現在用いられている MRI 造影剤 Gd-DTPA の分子を大きくし、生体内分子を認識する機能性物質を導入することにより、血管内物質や臓器を認識し、血管貯留性を高める分子を設計して、Gd-DTPA をコア部とし外殻部に様々な糖を 1 個～10 数個結合したシュガーボールデンドリマー型の錯体を調製する事に成功した。調製した Gd-DTPA-糖誘導体を *in vitro* 及びラットを用いた *in vivo* により造影効果の評価を行ったところ、Gd-DTPA と比較して、造影時間の延長、血管造影、臓器選択性を確認し、さらにがん組織の造影に成功した。

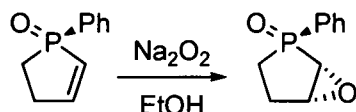
(2) 2-ホスホレン類の 2,3-エポキシ化反応

1-フェニル-3-メチル-2-ホスホレン 1-オキシドのクロロホルム-水の混合溶液に臭素を作用させると、2-ブロモ-3-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド（プロモヒドリン誘導体）が位置異性体やジアステレオ異性体の混合物として得られた。また、これらのプロモヒドリン誘導体から対応するエポキシド誘導体が、*threo* 型および *erythro* 型のジアステレオマー混合物として得られた (Scheme 1)。1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドの過酸化水素-塩基による酸化反応においても同様にエポキシドの異性体混合物が得られた。



Scheme 1

1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドを過酸化ナトリウムで酸化すると、報告されているアリル位の酸化反応ではなく、複素環内二重結合のエポキシ化反応が立体特異的かつ立体選択的に進行し、*erythro* 型のエポキシドのみが高収率で得られた (Scheme 2) ⁴⁻⁶⁾。



Scheme 2

(3) 2,3-ジブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシドの合成

3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシドのジクロロメタン溶液中、二酸化マンガンをも触媒とし臭素を付加させたところ、2,3-ジブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシドを得た (Scheme 3)。



Scheme 3

(4) 生理活性

含リン複素環化合物である幾つかのリン糖誘導体あるいはホスホラン誘導体の生理活性を、白血病培養細胞を用いて MTT 法により抗がん剤として評価した。これらの含リン複素環化合物は、抗がん剤として高い活性と広いスペクトルを示し、しかもがん化細胞に特異的・選択的に有効に作用する新しい抗がん剤としての生理活性を有することを確認した。

[結語]

糖を導入した Gd-DTPA 誘導体において臓器選択造影効果を得た。

含リン不飽和複素環化合物の 2-ホスホレン誘導体を出発物質として、がんに対する生理活性を持つリン糖類似体のアンヒドロ糖 (エポキシド) およびリン糖ブromo誘導体の合成に成功した。

[文献]

- 1) M. Yamashita, M. Uchimura, A. Iida, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 569 (1988).
- 2) M. Yamashita, A. Yabui, T. Oshikawa, T. Hanaya, and H. Yamamoto, *Heterocycles*, **38**, 1449 (1994).
- 3) M. Yamashita, A. Yabui, K. Suzuki, Y. Kato, M. Uchimura, A. Iida, H. Mizuno, K. Ikai, T. Oshikawa, L. Parkanayi, and J. Clardy, *J. Carbohydr. Chem.*, **16**, 499 (1997).
- 4) M. Yamashita, K. Suzuki, Y. Kato, A. Iida, P. M. Reddy, and T. Oshikawa, *J. Carbohydr. Chem.*, **18**, 915 (1999).
- 5) M. Yamashita, V. K. Reddy, L. N. Rao, B. Haritha, M. Maeda, K. Suzuki, H. Totsuka, M. Takahashi, and T. Oshikawa, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2339 (2003).
- 6) H. Totsuka, M. Maeda, V. K. Reddy, M. Takahashi, and M. Yamashita, *Heterocyclic Commun.*, **10**, 295 (2004).

Medical Materials for Finding and Curing Cancers at Their Early Stages: Syntheses and Biological Evaluations of Phosphorus Heterocycles or Phospha Sugars Having an Epoxy or a Bromo Group on the Ring

Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Taishi Niimi, Kazuhide Asai,
Takuya Suyama, Junko Yamashita, Satoru Ito, and Satoki Nakamura
Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan
Faculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan
Graduate School of Engineering, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan
Faculty of Engineering, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan
e-mail: tcmiyama@ipc.shizuoka.ac.jp

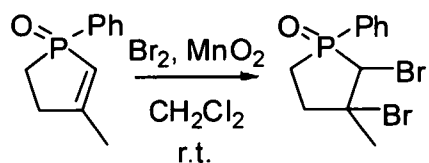
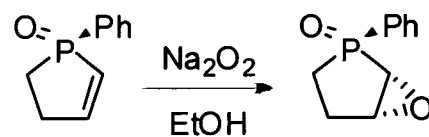
Gd-DTPA, Sugar ball dendrimers, Phospholanes, Phospha sugars, Epoxidation, Bromination, Biological Activity, Anti-cancer

Cancer is one of the most dangerous disease which causes the largest number of human die. Therefore, it is required to find and to cure the cancer patients at their early stage of the disease.

Gd-DTPA complex is currently one of the most widely used materials for MRI contrast agent, however, the agent has a poor potential for imaging specific organs and blood vessels as well as tumors because of the property of penetrating blood vessels. To improve the poor property of Gd-DTPA, DTPA-Sugar dendritic ligands with several sugars, i.e., with four and twelve sugars, at the outer shell were prepared and their Gd complexes, Gd-DTPA-Dn-Sugars which had Gd-DTPA as the core, were prepared. The *in vivo* MR imaging of blood vessel by Gd-DTPA-Dn-Sugar dendrimers were successful and the MRI contrast agent described tumors quite clearly.

Sugar derivatives, whose oxygen atom in the hemiacetal ring is replaced by a carbon, nitrogen, or sulphur atom, are called as *carba*, *aza*, or *thia* sugars, respectively, which are categorized as pseudo sugars. The characterization of pseudo sugars of naturally occurring products and chemically prepared products are well investigated and many of them found in the nature and synthesized chemically are known to be biologically active sugars. On the other hand, phospha sugars which have a phosphorus atom in the hemiacetal ring of the sugar are not yet found in the nature. The synthesis and the characterization of them are not yet so well studied.

Previous methodologies used for the preparation of phospha sugars started entirely from sugar materials, however, the process was tedious and the yield was low. We are challenging to develop novel synthetic routes starting from phosphorus heterocyclic compounds, mainly 2- or 3-phospholene derivatives. From the 1-phenyl-2-phospholene derivative phosphorus heterocycles of 3-bromo-2-hydroxy-, 2,3-epoxy-, and 2,3-dibromo-1-phenylphospholane derivatives or phospha sugars were prepared. The *in vitro* bioassay for these compounds by MTT method revealed that the compound have very important biological activities, especially such as anti-cancer activity, in manners of i) high activity, ii) wide spectra, and iii) high specificity and selectivity for tumour cells.



2-9 ナノメディシン研究推進事業発表会

「がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズシュガーボールデンドリマー型新規 MRI 造影剤の開発研究」 山下 光司

49 がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズシュガーボールデンドリマー型新規MRI造影剤の開発研究
(H19-ナノ-般-015)

**厚生労働省科学研究費補助金
平成19年度医療機器開発推進研究事業
ナノメディシン研究 研究成果発表会**
(③疾患の超早期診断・治療システム開発に関する研究(19080301))

平成20年2月27日(水) 18:20~18:30

於 財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館 国際会議場
東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター内
静岡大学 創造科学技術大学院院 研究部 ナノマテリアル部門
バイオメディカルマテリアル研究室
(プロジェクト 研究主任) 山下光司

電話/ファクス 053-478-1144; メール tomyama@ipc.shizuoka.ac.jp
キーワード: MRI造影剤、化学、糖質、リン糖、複素環化合物、白血病、固形がん、抗がん剤、医薬薬、生体適合性医用材料、超親水性

研究組織

研究者名	分担する研究項目	所属及び現在の専門	職名
山下 光司	研究の統括・新規MRI造影剤の開発・総合評価	静岡大学創造科学技術大学院院・医 用材料工学 (静岡大学)	教授
飯塚 晴希	新規MRI造影剤のin vivo評価 と構造活性相関	京都医科大学薬学部・放射線医学(京都医科大学)	教授
竹原 康雄	Gd造影剤の構造評価とin vitro 評価	京都医科大学薬学部センター・構造部 新(京都医科大学)	准教授
藤江三千男	新規MRI造影剤の構造評価 及びマーケティングアドバイ ス	京都医科大学薬学部センター・新薬材料課 新(京都医科大学)	技術職員
橋本 俊英	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
V. K. Roddy	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
於 剛	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
B. Siva	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
Kumar	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
A. Uma	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
Ravi Sankar	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
R. N. Mani	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教
山下光司	新規MRI造影剤の開発	京都大学 外環人間研究 所(京都大学)	助教

医療ニーズの内容変化

悪性腫瘍(癌)、
心疾患
の死亡増加

Quality Of Life
向上の流れ

(超)早期発見
早期治療

低侵襲治療の
拡大

画像診断装置、内視鏡、超音波診断装置
(MRI, Super Hydrophilic Materials,
Anti-cancer Chemicals)

より小さな機器開発
(Catheter, Endoscope,
Embolism)

医工連携の必要性増大

Needs & Seeds

- 死因のトップのがん(3人に1人)を克服することは非常に大切な研究課題である。
- 医療のNeeds(がん撲滅) & 医用材料のSeeds(医用材料開発)
- 医療技術のイノベーション患者のQOL改善

- 早期発見を支える技術
新規なMRI造影剤 (問題点) 血管造影・がん組織造影・特定腫瘍造影
- 医療器具の材料に関する技術
生体適合性材料、塞栓材料(問題点) 抗血栓性・抗菌性・潤滑性・柔軟性
- QOLを改善する治療法を支える技術
超親水性医用材料 (問題点) 内視鏡・腹腔鏡の曇り止め
- リン糖・複素環化合物の新規な抗がん剤
新規なリン糖誘導体・新規な複素環化合物 (問題点) 副作用・効果

がん組織や血管を画像化するMRI造影剤の開発

MRI装置と造影剤の例と造影剤 (MRI装置)

造影剤--ガドリニウム 製剤
Gd Complex
(毒性低減 Ligands + Gd-H₂O
(9 配座錯体)

Gd(DTPA)
(DTPA=diethylenetriamine-pentaacetic acid)

現状(従来)のMRI造影剤

非特異的、血管外漏出性(血管貯留性に乏しい)

望ましいMRI造影剤

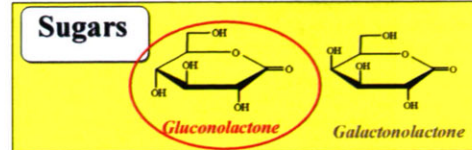
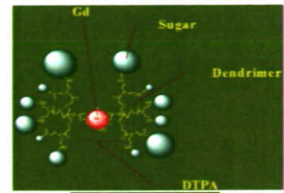
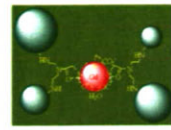
- 造影効果が高いこと。造影効果は緩和現象によって決定。少量でもMR画像上で大きな造影効果。投与量はmmolのオーダー。
- 安全であること。副作用が少なく、組織結合性などが無い化合物で、速やかに排泄される。保存期間中に物性変化しない。
- 使いやすいこと。ガドリニウム製剤は静脈内投与するために粘稠度の低い注射しやすい剤形。

血管造影剤の背景

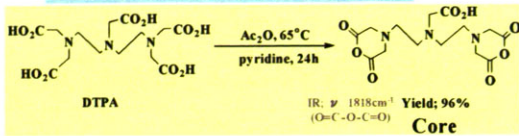
MR Angiography (MRA)/がんのMR描出

- 現在MR造影剤の主力(Gd-DTPA)は、血管外漏出性
- 投与後早期に(1分間以内に)撮影を行わないと良好なMRAが得られない
- 血管内に留まる造影剤を使用すればMRAの画質が向上至適撮像タイミングの範囲を広げることが可能
- がん等病変部の超早期発見/高感度のMRI造影剤

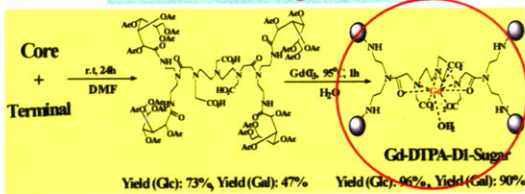
シュガーボールドンドリマータイプのDTPA-GdコアMRI造影剤



《Core (DTPA二無水物)部の調製》

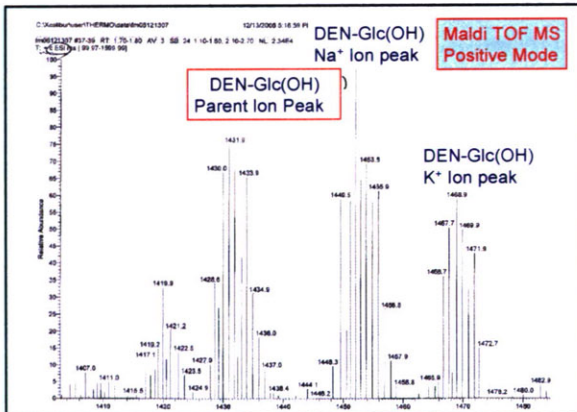
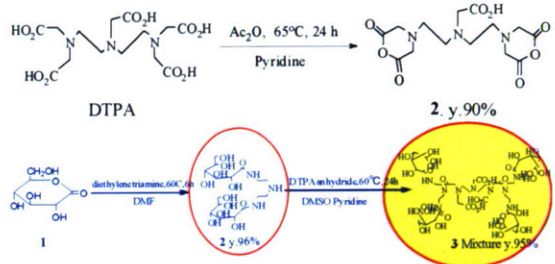


《Gd-DTPA-D1-Sugarの調製》



合成経路の開発

(Protection Free) for DTPA-D1-Sugar(OH)



複合電子顕微鏡

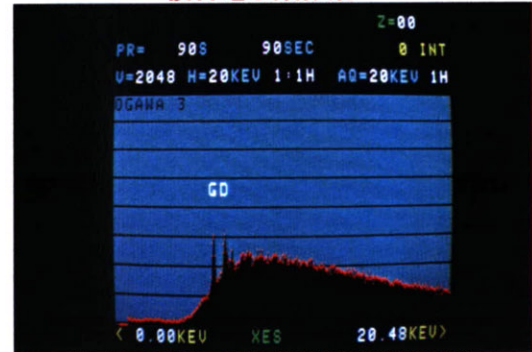
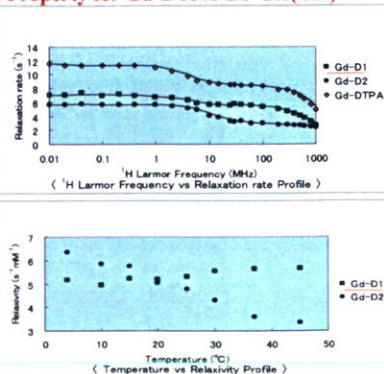
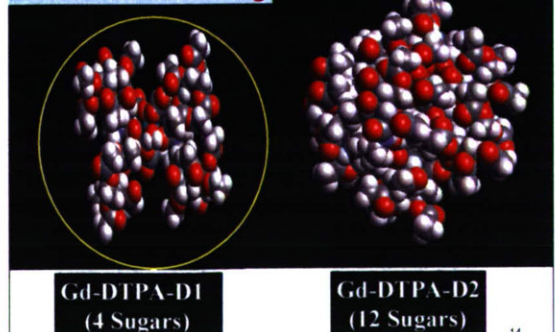


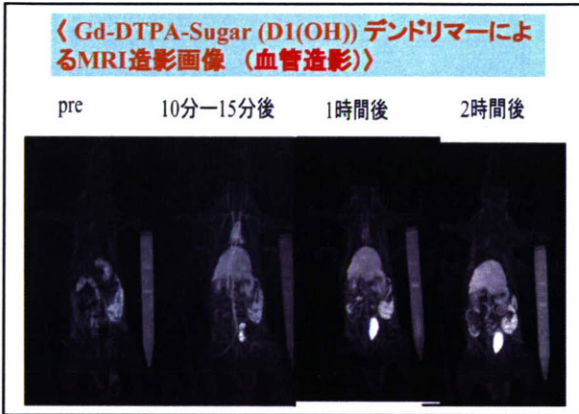
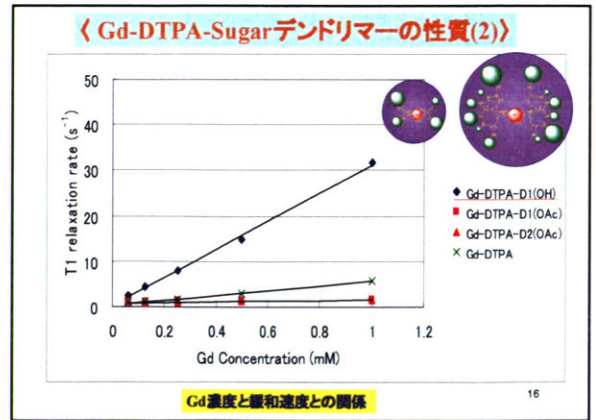
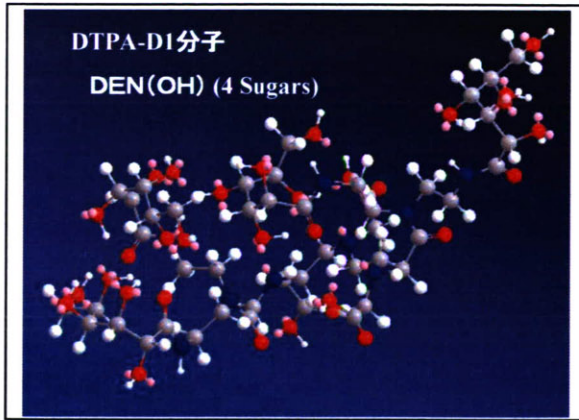
Fig. Elemental analysis of Gd-DTPA-D1-Glu(OH)

Physical Property for Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

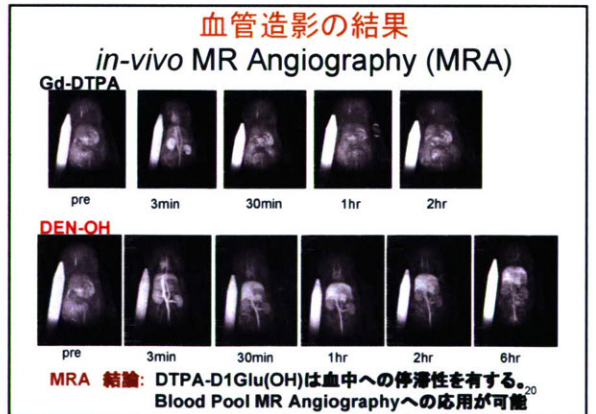
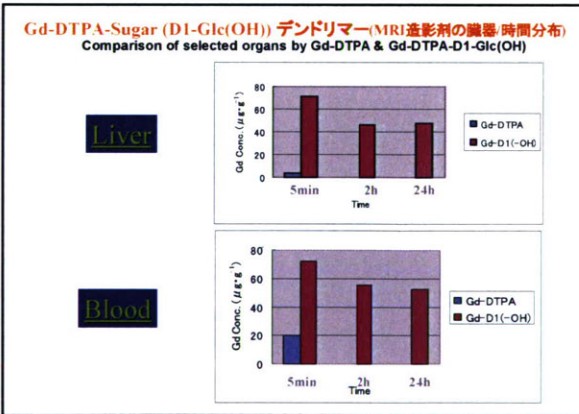


Molecular Modeling





- 方法: In-vivo MRI
- Animals
 - 3 Wistar rats
 - 20w, female, BW 300g
 - 麻酔
 - ソムノベンチル 50 mg/Kg i.p.
 - 造影剤
 - 0.05 mmol/kg (0.3ml) dendrimers DTPA-D1Glu(OH) with saline flush
 - 0.1 mmol/kg Gd-DTPA (0.3ml) with saline flush
 - 投与
 - Tail vein cannulation with 25G butterfly needle
 - MR装置
 - Magnetom Allegra 3.0T
 - Home made surface coil
 - PulseSequences
 - 3D VIBE, 3DFISP, FSE (T2WI), SE (T1WI)



- 肝細胞癌画像化技術の背景
- 肝細胞癌は肝臓の悪性腫瘍中最も高頻度に遭遇する病変であり、早期発見、早期治療が予後の改善に寄与するため、画像診断の役割は大きい
 - 富血性肝細胞癌の診断はこれまで、非特異的な血管外漏出性造影剤による造影動脈相(静脈投与後30秒以内)を狙った撮影によるものであり、高磁場の高速MR装置が必要であった
 - 投与後数時間にわたり血管内にとどまる傾向のある dendrimers DTPA-D1Glu(OH)により、MR検査で、動脈相に特定しなくても、通常のspin-echo法で肝細胞癌の検出ができるようになる可能性がある(imaging windowを広げることができる)

