

## 2. 創製

### 2-1 Gd-DTPA を基本骨格とする新規 MRI 造影剤の合成および評価

#### 2-1-1 概要

##### 2-1-1-1 背景

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance ; NMR) は 1946 年 Bloch と Purcell によって発見され、当初は分子構造や、拡散現象、および血流測定などの研究のため非画像的に用いられていた<sup>1,2)</sup>。しかし、1971 年に Damadian がラットの腫瘍におけるプロトンの緩和時間が正常組織におけるプロトンのそれと比較して長いことを報告したことから、核磁気共鳴による画像化が本格的に始まった<sup>1,2)</sup>。次いで 1973 年に Lauterbur が傾斜磁場を用いたパルス NMR 技術とフーリエ変換法に基づく画像編成法を用いて物体の断層像が得られることを示した<sup>1,2)</sup>。1970 年代後半には、高速コンピューターシステムの発達に支えられて生体内の画像化が可能となり、核磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) として発展を遂げ、1980 年代になって臨床医学の各分野で急速に普及してきた<sup>1,2)</sup>。

##### 2-1-1-2 原理

MRI における技術は原子核が磁場により検出されうる磁気モーメントを有するという原理の発見に基づいている<sup>1-3)</sup>。磁場中に核を置くと核自体は磁場の方向と同方向、あるいは逆方向のいずれかに磁気モーメントを整列させる 2 つの様式で配列する。磁場と同方向に整列する核 (いわゆる  $\beta$  スピン核) は磁場と同方向に整列する核 (いわゆる  $\alpha$  スピン核) よりも高エネルギーである。 $\alpha$  スピン核と  $\beta$  スピン核との間のエネルギー差は印加した磁場の強度に直接比例する。このエネルギー差を測定するために核を電磁波に曝す。低エネルギー  $\alpha$  スピン核は電磁波を吸収し、磁場と逆方向にフリップ (flip) して高エネルギー  $\beta$  スピンとなる。共鳴周波数として知られている吸収波は、 $(\beta - \alpha)$  エネルギー差に対応する周波数 ( $\Delta E = h\nu$ ) を示す。あるいは、高エネルギー  $\beta$  スピン核または非整列核は、電磁波の放出を伴って低エネルギー  $\alpha$  スピン状態に緩和し得る。任意の核に対する共鳴周波数および緩和速度 (MRI では緩和速度 ( $1/T_1$ ) について測定する。ここで  $T_1$  は非整列核が緩和するのに要する時間である。) の両方とも、核を取り巻く磁気環境に依存する。例えば、堅固に固定化された (または局在化した) 電子軌道内の核は外部磁場から遮断され、そしてその結果としてより弱い固定化された電子軌道内の核と比較してより小さい  $\alpha$  スピンと  $\beta$  スピン核間のエネルギー差 ( $\Delta E = \beta' - \alpha'$ ) を有する。さらに他の常磁性核の近傍に位置する核はこのような緩和機構が得られない核よりも速く緩和し、かつ高い緩和速度を有する<sup>2,3)</sup>。

診断的 MRI における情報源として最も一般的に使用されるのは水のプロトンにおける核磁気共鳴緩和速度の差である。水は生体内の軟組織中に偏在して見出される。水の水素原子は解離平衡により常磁性核 (プロトン) を有し、この常磁性核は共鳴周波数に曝されて緩和速度測定されると、それらの身体的微細環境に関して直線的な情報を提供する<sup>2,3)</sup>。次いで、この情報はコンピューター技術により処理されて詳細な解剖学的画像が得られる。これらの画像を検査することにより、存在する疾病または異常細

胞、外傷および骨折、あるいは他の機能不全の存在が示される。驚くべきことではないが、腎臓等の特定の組織における MR 画像化は他のものよりも困難である。これは低いコントラストを生じる任意の数の因子に起因し、その結果得られる MR 画像の解像度が不完全であるためである<sup>4)</sup>。

### 2-1-1-3 MRI の現状と問題点

近年の臨床画像診断の進歩は著しく、X 線 CT (Computed Tomography; コンピューター断層撮影)、超音波画像診断、MRI (磁気共鳴画像) 診断、シンチグラフィ等、実に様々な画像診断法が全身のほぼ全ての分野に用いられている。さらに、それらの画像診断法に適した各種造影剤が開発され、それらの有用性が報告されている<sup>3)</sup>。

その中でも、特に体の断層画像を撮影するのに用いられている手法として X 線 CT と MRI の二種類が挙げられる。以下に、これら二種類の違いについて記述した。

1. 最も大きな違いとして X 線 CT は X 線を用いて画像を得るため、放射線による被曝の危険性がある。しかし、MRI は磁石による強い磁場とラジオ波の帯域に属する電磁波を用いて画像を得るため、心臓ペースメーカー装着者、脳動脈瘤クリップのような体内に強磁性体を有する人以外に危険性はない。
2. X 線 CT は体軸に垂直な断面の画像を得ることを得意とする。それに対し、MRI は縦、横、斜め等任意の方向からの断面の画像を自由に得ることができる。また、MRI は骨や空気による影響を受けないため、頭蓋骨に囲まれた脳や脊髄等の画像でさえも得ることができる。
3. MRI は造影剤を用いなくても主な血管の画像を得ること (MRA; Magnetic Resonance Angiography) が可能である。
4. MRI は一般的に X 線 CT に比べて機器が高価であり、検査にも時間がかかることが欠点である。

このような理由から、現在では MRI は臨床医学における最も有用な診断手段の一つにまでなった。

### 2-1-1-4 MRI 造影剤

MRI は上記の原理のために造影剤を用いなくても主な血管の画像を得ることが出来るが、特定の組織では低いコントラストのため MR 画像を得ることが困難であるといった問題を解決するために造影剤を用いている。典型的には、造影剤はその近傍の水におけるプロトンの緩和速度を変化させうる常磁性金属イオンを含む。金属含有 MRI 造影剤を患者に投与すると、造影剤は患者の代謝および排泄経路に依存して種々の器官により化学的あるいは物理的に吸収 (反応または吸着) される。吸収されると造影剤は、それが残留する器官または組織中の水におけるプロトンの緩和速度を変化させる。したがって、その器官または組織の MR 画像はより低濃度の常磁性試薬を含むかまたは全く含まない隣接組織に比較して増強された造影を達成する。このように、造影剤の多くは常磁性体による MR 信号への強い影響<sup>5,6)</sup>を利用したものである。

MRI は体内に存在する水のプロトンの緩和速度を測定しコンピューター処理することで画像化を行っている。そのため、造影剤により増強された水のプロトンの緩和時



間を測定し緩和特性を調べることは、造影剤としての性能を知る重要なパラメータとなる。また、緩和時間に関して言えば MRI 造影剤として  $T_1$  強調型造影剤および  $T_2$  強調型造影剤の 2 種類が知られている。それぞれの造影剤は水のプロトンの縦緩和時間 ( $T_1$ ) あるいは横緩和時間 ( $T_2$ ) を短縮させる効果を持っている<sup>7-9)</sup>。ランタノイド系金属であるガドリニウム (Gd) は、従来プロトンの縦緩和時間 ( $T_1$ ) の強い短縮効果を持つ造影剤であり、MRI 画像上では造影剤の存在部位の輝度が上昇し白く光る<sup>9)</sup>。緩和率に寄与する因子として、Gd 錯体に結合した水分子の数、水分子とバルク溶液との交換速度、7 個の対電子の緩和時間、および溶液中での造影剤の回転相関時間が挙げられる<sup>10)</sup>。Gd によるプロトン緩和時間の短縮は、その対電子および隣接する水におけるプロトンの間の双極子相互作用によって仲介され、Gd の磁気双極子の作用は、これらのプロトンからのその距離の関数として、緩和時間を非常に急速に低下する<sup>10)</sup>。これらの理由から Gd イオンの緩和促進効果を他の常磁性金属イオンのそれらと比べると、2 倍近い大きさを持つことがわかっている (Fig. 2-1-01)<sup>8)</sup>。

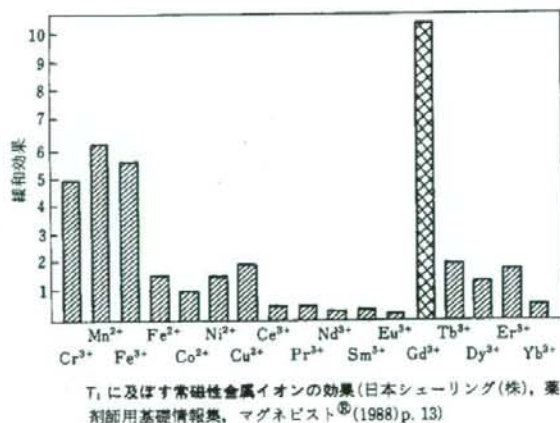


Fig. 2-1-01  $T_1$  に及ぼす常磁性金属イオンの効果

しかし、Gd を含めた大部分の常磁性金属は急性毒性を有しているため、常磁性金属の無機塩は造影剤としては備えるべき機能が不十分であり、毒性のために使用できない。この問題の解決方法は有機キレートリガンドを使用することである<sup>11)</sup>。金属との錯体形成により、有機キレートリガンドは遊離の毒性金属の放出を防止し、かつ非毒性常磁性担体として作用することによりプロトン緩和を増強する。有効であるためには MRI 造影剤 (常磁性金属-リガンド錯体) はいくつかの条件を満足しなければならない<sup>11)</sup>。低い毒性のためには、それらは毒性金属の放出が妨げられるように安定であり、かつ高い錯体生成定数を有しなければならない。実施面の観点からは、それらは患者への投与を容易にするに十分な水に可溶性でなければならない。そして、クリアーな MR 画像を得るためには、それらは溶液中の水におけるプロトンの緩和速度を効果的に増強し得なければならない。効率は一般的に緩和性について測定され、これは mM (mmolar ; mmol/dm<sup>3</sup>) の単位で測定した常磁性錯体の濃度当りにおける緩和速度

の増加として定義される。

最近では特定の組織、臓器を標的にするために様々な常磁性金属-リガンド錯体が設計され、合成されている<sup>12)</sup>。中でも米食品医薬品局(FDA)に認可された Gd-DTPA (Magnevist) は最も早期に発見された MRI 造影剤であり、高い錯生成定数 ( $10^{22.1}$ ) を持つ安定した錯体を形成し、生体に対する安全性の高い錯体であることから、現在 MRI 造影剤として最も広く使用されている<sup>13)</sup>。Gd-DTPA やその環状化合物 Gd-DOTA の誘導体の合成、そしてそれら化合物の MRI 造影剤としての有用性を報告する論文も数多くある<sup>4,14-19)</sup>。それらの構造と誘導体については代表例を以下に示す (Fig. 2-1-02)。



Fig. 2-1-02 既存 MRI 造影剤の構造

しかし、これらの造影剤には臓器特異性がなく、また低分子であり血管透過性が高いため、投与された後、体内に均一に分布し希釈されてしまう。そのため体内のスクリーニングの目的には適しているが狭心症や心筋梗塞のような虚血性心疾患への適応において、虚血部のみを画像化する場合のように特定の臓器または組織を画像化する鑑別診断の目的には適していない。やむを得ずそのような診断を行なう場合は多量の Gd-DTPA を使用することになる。また Gd-DTPA は静脈内に投与することで用いられるが、血漿から尿中への排出が速いので、毒性は低いが、生体中で一部解離して Gd が放出される可能性がある。実際授乳中被験者で母乳中に Gd が検出されたという報告もある<sup>11)</sup>。また、従来の MRI 用造影剤では、生体内で異物として認識され、細網内皮系 (Reticuloendothelial System ; RES) による貪食作用を受け、十分な標的指向性が得られなかった。そのためコントラストに優れ、且つ正常組織等の造影が必要のない部位では造影せず腫瘍や特定臓器のみで造影させることを可能とするような高機能 MRI 造影剤が求められている<sup>20-25)</sup>。そこで昨今では標的部位および臓器に速達させるための手段として、モノクロナール抗体、ペプチド類、多糖類およびリポソームなどを用いた MRI 造影剤が開発されている。しかし、これら既存の MRI 造影剤は比較的高濃度に局在化する必要があり、実用的な標的指向性造影剤は未だ存在していないのが現状である。

#### 2-1-1-5 糖による組織選択性について

細胞や組織にトラブルが生じると、その周囲の毛細血管は白血球等の免疫細胞を呼び込むために、血管内皮細胞間隙をを広げる。それと同時に、血管内でレクチンという糖鎖認識タンパク質を作り、血管の内側に突き出す。免疫細胞は、このレクチンに捕らえられ、隙間の周辺を転がり、毛細血管の隙間に入り込み、患部に到達する、これを利用し、ドラッグデリバリーシステム (DDS) では免疫細胞が有している糖鎖を



模倣したものをリポソーム等に修飾し、薬を包み込むことで目的とする疾患に効率的に取り込ませる研究が行われている<sup>26)</sup>。

ところが単純な単糖や二糖、および一部を化学変換した糖鎖であっても、糖鎖構造に応じた特徴的なターゲット信号を認識する機能が発現されることが明らかにされてきた。例えば、肝臓の表面にはアシアロ糖タンパク質レセプターが存在し<sup>27)</sup>、これは糖タンパク質の特異的な糖鎖を認識する<sup>28-30)</sup>。グルコース<sup>31)</sup>をはじめ、ガラクトース<sup>32,33)</sup>、マンノース<sup>34,35)</sup>、またラクトース<sup>36)</sup>等といった肝臓に対する糖について糖鎖認識に関する研究がなされている。

### 2-1-1-6 本研究の目的

疾病の増加に伴い MR 技術の進歩、装置の普及が進められており、MRI による検査の重要性がますます高まっている。このことから、高機能 MRI 造影剤の開発が重要であると考えられる。そこで、当研究室では糖の組織認識機能とデンドリマーの構造に着目し、Gd-DTPA をコア部とし糖を末端部にしたデンドリマー構造の新規 MRI 造影剤である Gd-DTPA-糖錯体の合成を行っている (Fig. 2-1-03)。

当研究室では糖をグルコースとし DTPA とのスペーサーをジエチレントリアミンとした Gd-DTPA-糖錯体である Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH), Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) が既に合成されている<sup>37,38)</sup>。基本骨格をそのままとし末端部を伸ばすためにスペーサーを炭素数の多いヘキサメチレントリアミンとした Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) が合成されており Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH), Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) に比べて緩和率が向上したと報告されている<sup>39)</sup>。また、当研究室では末端部を糖ではなくアミノ酸とした Gd-DTPA-アミノ酸錯体が合成されている (Fig. 2-1-04)<sup>40)</sup>。しかしながら、これらの Gd 錯体は新規 MRI 造影剤としてのポテンシャルを有しているにも関わらずそれぞれの比較がなされていなかった。

そこで、本研究では Gd-DTPA 糖錯体および Gd-DTPA アミノ酸錯体の造影剤としての性能評価を行なうと共にそれぞれの分子構造の違いが MRI 造影剤としての性能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

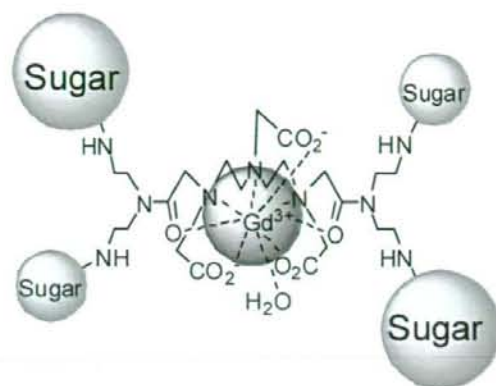


Fig. 2-1-03 Gd-DTPA 糖錯体の分子モデル

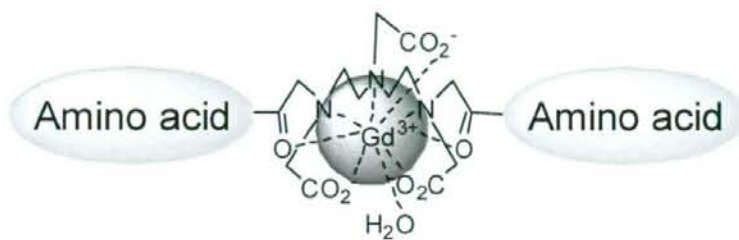


Fig. 2-1-04 Gd-DTPA アミノ酸錯体の分子モデル

## 2-1-2 結果と考察

デンドリマー分子は、末端 (Terminal) 部、コア (Core) 部に分割したデンドリマー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ョン法を用いて合成した。また、コア部である DTPA に対して糖やアミノ酸等からなる末端部を反応させることで合成したリガンドへのガドリニウムのキレーションにも成功し、優れた撮像能力を有する新規 MRI 造影剤である Gd-DTPA 糖錯体および Gd-DTPA アミノ酸錯体の合成を達成した。

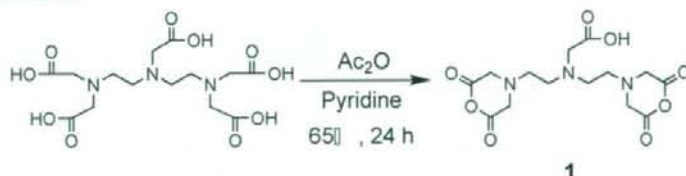
以下にそれぞれの項目の詳細について述べる。

### 2-1-2-1 コア (Core) 部の合成

コア部は DTPA であるが、他のカルボン酸誘導体に比べて反応性が劣る、5 個のカルボキシル基を有しているため反応点が限定できない等の問題点があった。

このことから、コア部はアミノ基との反応性の向上および反応点を限定するため、DTPA の脱水反応を行ない 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 個を環状酸無水物とし、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 1



Scheme 2-1-01 DTPA dianhydride 1

DTPA dianhydride 1 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<sup>41)</sup>。本研究でも、この合成方法と同様の方法で DTPA dianhydride 1 を粗収率 98% 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。

以下に化合物 1 の IR スペクトル (Fig. 2-1-05)、<sup>13</sup>C-NMR スペクトル (Fig. 2-1-06) のデータを示す。

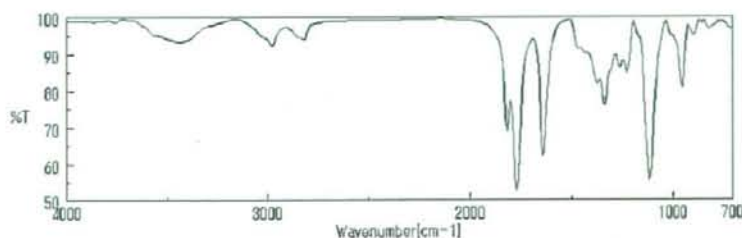


Fig. 2-1-05 化合物 1 の IR スペクトル

7/4名, C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\  
 MITSUHI YAMASITAI\MY DOCUMENT  
 735青木M11実験\DTPA DIANHYDRIDE  
 EQ007.11.20\_DTPA DIANHYDRIDE.A  
 LS  
 試料ファイル名  
 測定日時 Tue Nov 20 18:43:01 2007  
 土曜  
 測定核種  $^{13}\text{C}$   
 測定モード BCDM  
 測定周波数(MHz) 75.45 MHz  
 測定周波数Offset 124.0 kHz  
 測定周波数Fine 1840.0 Hz  
 1-ポイント数 32768  
 検出範囲 20356.23 Hz  
 検出器周波数 32  
 ID取得時間 1.6097 s  
 90度時間 1.39 s  
 1-スキャン 4.7  $\mu\text{s}$   
 recycle時間 11  
 プログラム ALICE

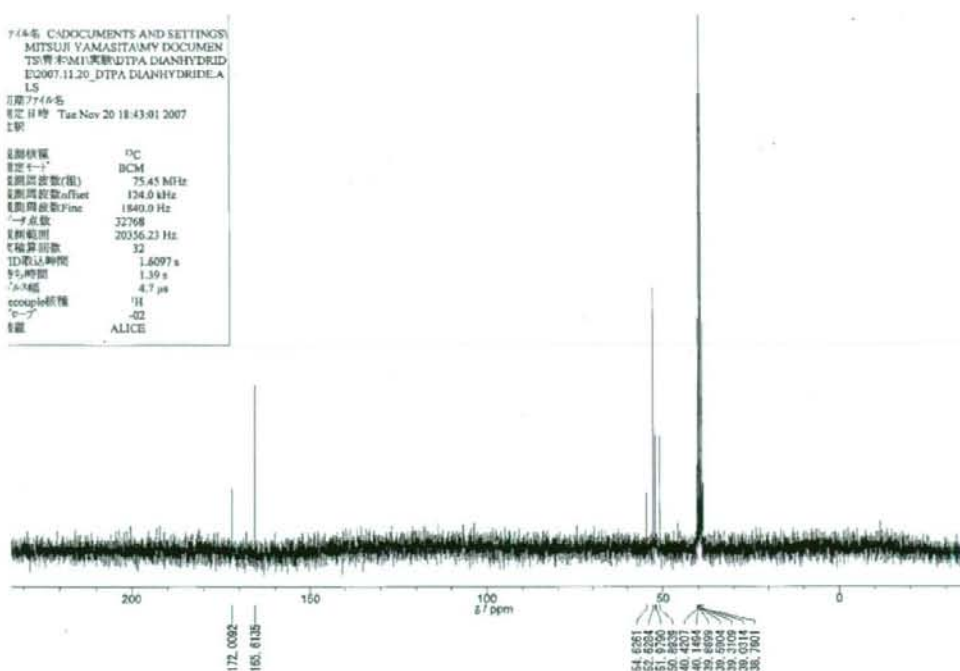


Fig. 2-1-06 化合物 1 の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル

Fig. 5 の IR スペクトルより  $1820, 1774 \text{ cm}^{-1}$  に C=O 伸縮による吸収と  $1118, 949 \text{ cm}^{-1}$  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、 $1643 \text{ cm}^{-1}$  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。Fig. 6 の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルより  $165.6 \text{ ppm}$  に無水環のカルボニル炭素由来のピークを確認した。以上から化合物 1 の構造を同定した。

## 2-1-2-2 末端 (Terminal) 部の合成

末端部は糖とスペーサーから構成され、糖とスペーサーおよび DTPA とスペーサーを共にアミド結合により結合させるため、スペーサーはトリアミンを用いた<sup>42, 43)</sup>。また、反応点を限定するために、糖はラクトン化したものとした<sup>42, 43)</sup>。過去、目的に応じた末端部の合成方法が報告されている<sup>38, 39, 44)</sup>。以下にそれぞれの合成方法の詳細について述べる。

### 2-1-2-2-1 t-ブトキシカルボニル保護を用いた末端 (Terminal) 部の合成

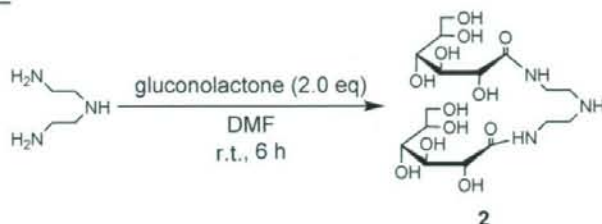
デンドリマー合成の段階において末端部を構成する糖のヒドロキシル基による反応の複雑化を抑制するため、ヒドロキシル基を全てパーアセチル保護した。また、この反応において末端部を構成するスペーサーであるジエチレントリアミンの第 2 級アミンもパーアセチル保護されてしまい、コア部との反応点として働かなくなってしまうよう、アセチル化の前段階としてアミノ基を t-ブトキシカルボニル (Boc) により



保護した。

合成経路は、糖とジエチレントリアミンとの求核反応、アミノ基の Boc 基による保護、糖のヒドロキシル基のアセチル化、Boc 基の脱保護の順とした。以下に各反応の詳細について述べる。

### DETA-2Glc(OH) **2**



Scheme 2-1-02 DETA-2Glc(OH) **2**

DMF 中、ジエチレントリアミンと D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンとの求核反応により DETA-2Glc(OH) **2** を粗収率 91% で合成した。この反応は D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンのカルボニル炭素と求核試薬であるジエチレントリアミンによる求核アシル置換反応であり、ジエチレントリアミンに対して D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンを 2 当量反応させることで、ジエチレントリアミンの第一級アミンに対して選択的に糖が導入された。また、生成物 **2** は DMF に溶解せず生成と同時に結晶となり析出してくるため、これを反応進行の目安とした。

通常の dendrimer 合成において、末端部とコア部の中間に位置するブランチ (Branch) 部を合成する途中の段階では基質の片方の反応部位を保護することによって反応点を制御していく方法が主流である<sup>45,46</sup>。しかし、ジエチレントリアミンの第一級アミンに対する選択的アミド化反応は不必要な反応点における保護・脱保護の過程を省略することが出来るため、一般的な dendrimer 合成において非常に利用価値の高い反応である。

以下に化合物 **2** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (Fig. 2-1-07)、MS スペクトル (Fig. 2-1-08)、IR スペクトル (Fig. 2-1-09) のデータを示す。

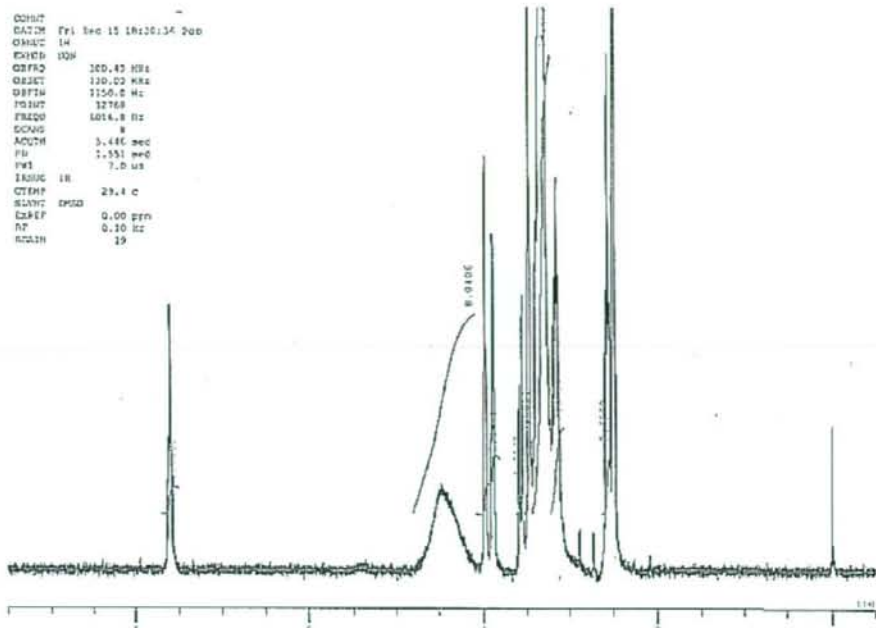
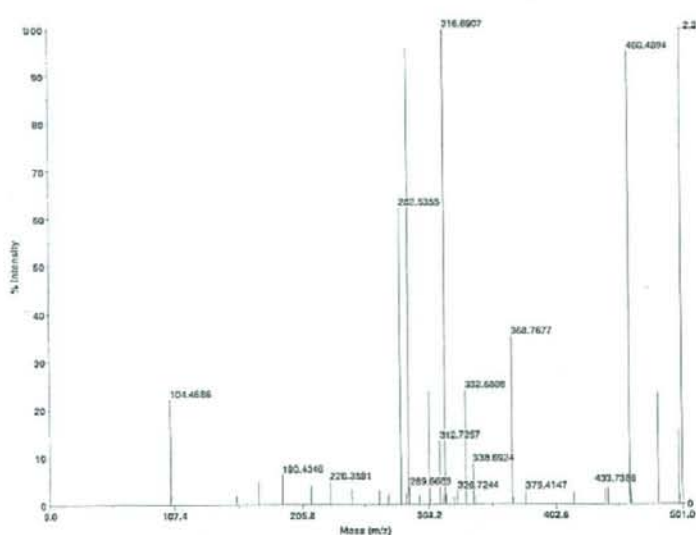


Fig. 2-1-07 化合物 2 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6304

Voyager Spec #1 $\Rightarrow$ BC $\Rightarrow$ AdvBC(32,0.5,0.1) $\Rightarrow$ NF0.7 $\Rightarrow$ D[BP = 316.7, 22041]



Made of operator: Reflector  
 Excretion mode: Delayed  
 Polarity: Positive  
 Acquisition control: Manual  
 Accelerating voltage: 25000 V  
 Grid voltage: 75%  
 Mirror voltage ratio: 1.32  
 Guide wire C: 0.002%  
 Extraction delay time: 125 msec  
 Acquisition mass range: 10 - 500 Da  
 Number of laser shots: 50 (per scan)  
 Laser intensity: 1019  
 Laser Rep Rate: 3.0 Hz  
 Calibration type: Default  
 Calibration matrix:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyiminoacetic acid  
 Low mass gate: Off  
 Trapped ion selector: Off  
 Digitizer scan time: 3.273  
 Bin size: 0.5 m/z  
 Number of data points: 30311  
 Vertical scale D: 500 mV  
 Vertical offset: 0.65%  
 Input bandwidth D: 500 kHz  
 Sample well: 32  
 Plate ID: FLAT18  
 Serial number: 4384  
 Instrument name: Voyager-DE PRO  
 Plate type filename: C:\VOYAGER\100-well plate.plt  
 Lab name: PE Biosystems  
 Absolute x-position: 7544.32  
 Absolute y-position: 31696.4  
 Relative x-position: 277.92  
 Relative y-position: -169.864  
 Shear in spectrum: 50  
 Source pressure: 3.55e-007  
 Mirror pressure: 6.918e-008  
 TIC pressure: 6.9015e-003  
 TIS gate width: 7  
 TIS light length: 688

Fig. 2-1-08 化合物 2 の MS スペクトル

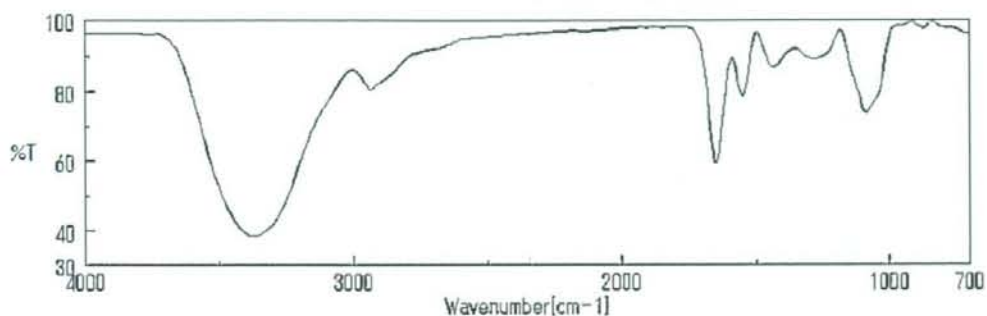
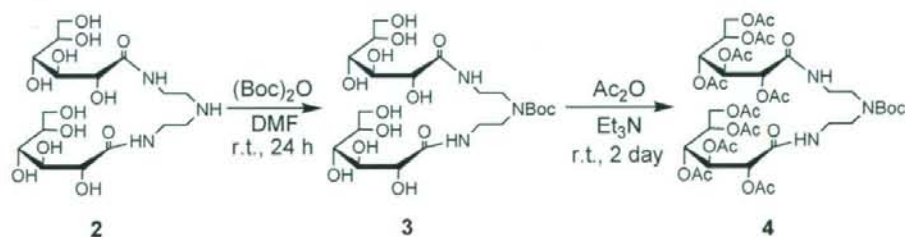


Fig. 2-1-09 化合物 2 の IR スペクトル

Fig. 2-1-07 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより 4.43 ppm にヒドロキシル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチンおよびメチレンのプロトン数を比較した。Fig. 2-1-08 の MS スペクトルより  $460.49 [\text{M}+\text{H}]^+$  のピークを確認した。Fig. 2-1-09 の IR スペクトルより  $3371 \text{ cm}^{-1}$  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、 $1651 \text{ cm}^{-1}$  に C=O 伸縮による吸収と  $1543 \text{ cm}^{-1}$  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。

#### DETA-2Glc(OAc)-Boc 4



Scheme 2-1-03 DETA-2Glc(OAc)-Boc 4

DMF 中、DETA-2Glc(OH) 2 と二炭酸ジ-*t*-ブチル ((Boc) $_2$ O) を反応させた後、トリエチルアミンを触媒として加え、さらに無水酢酸と反応させることで DETA-2Glc(OAc)-Boc 3 を収率 85% で合成した。一段階目の反応は化合物 2 の第二級アミンと二炭酸ジ-*t*-ブチルとの求核アシル置換反応によるアミド化反応であり、二段階目の反応は化合物 2 のヒドロキシル基と無水酢酸との求核アシル置換反応によるアセチル化反応である。これまでの研究において化合物 3 の単離精製を行わずに反応を進めても目的化合物 4 が高収率で得られる事がわかっているため、目的化合物 4 まで合成した後でシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl $_3$  : methanol = 15 : 1) による単離精製を行なった。

以下に化合物 4 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Fig. 2-1-10) のデータを示す。



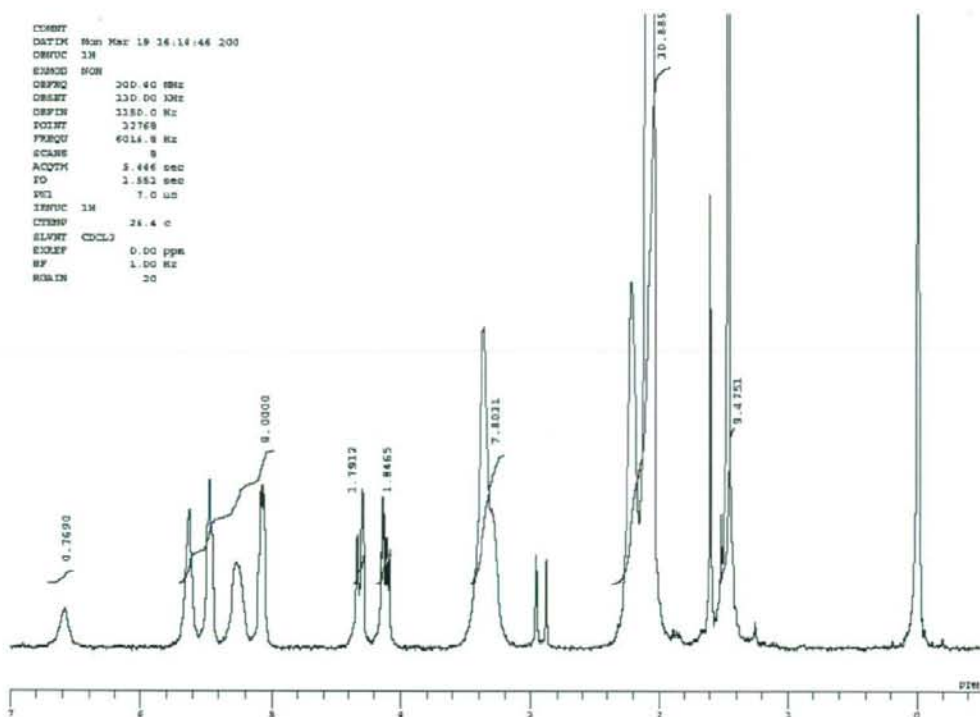
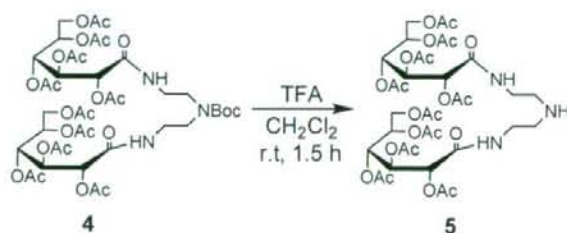


Fig. 2-1-10 化合物 4 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

Fig. 2-1-10 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより 1.47 ppm に Boc 基の t-Bu 由来のピークを、2.05-2.21 ppm にアセチ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およびメチレンのプロトン数を比較することで、化合物 4 の構造を同定した。

### DETA-2Glc(OAc) 5



Scheme 2-1-04 DETA-2Glc(OAc) 5

ジクロロメタン中、トリフルオロ酢酸を用いて DETA-2Glc(OAc)-Boc 4 の Boc 基の脱保護を行ない DETA-2Glc(OAc) 5 を収率 68% で合成した。Boc 基の脱保護は酸性条件下、短時間で行われることが知られており<sup>47)</sup>、この反応では化合物 4 のアセチル基が外れない程度の強さの有機酸であるトリフルオロ酢酸を用いることで Boc 基のみを

選択的に脱離させた。化合物 **5** はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : methanol = 15 : 1) による単離精製を行なった。

以下に化合物 **5** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (Fig. 2-1-11)、MS スペクトル (Fig. 2-1-12) のデータを示す。

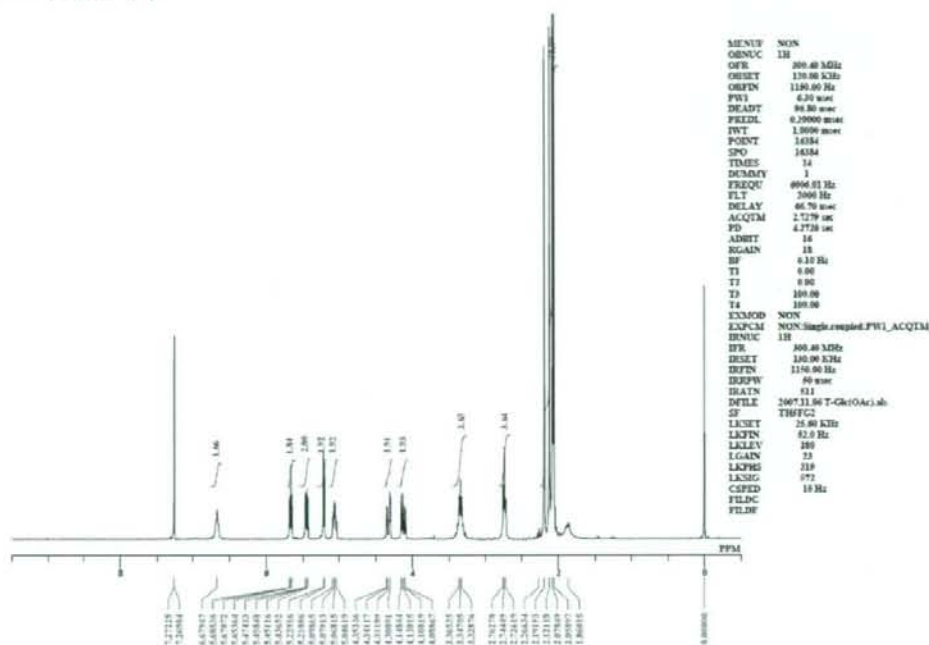


Fig. 2-1-11 化合物 **5** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1 → AdvBC(32.0,5,0.1) → NFO.7 → DI(BP = 890.8, #2042)

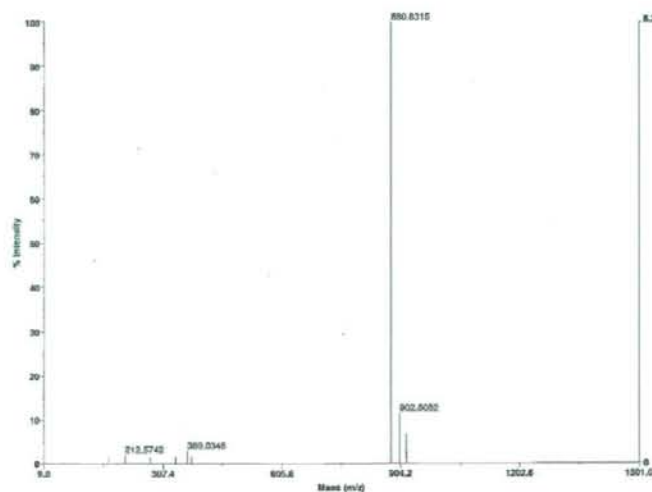


Fig. 2-1-12 化合物 **5** の MS スペクトル

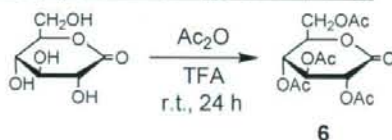
Fig. 2-1-11 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより Boc 基の t-Bu 由来のピークが消滅していることから Boc 基は脱保護されたと考えられる。また、2.06-2.22 ppm にアセチル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチンおよびメチレンのプロトン数を比較した。Fig. 2-1-12 の MS スペクトルより 880.04  $[\text{M}+\text{H}]^+$  のピークを確認した。以上から化合物 5 の構造を同定した。

### 2-1-2-2-2 糖のアセチル化による末端 (Terminal) 部の合成

t-ブトキシカルボニル基を用いて末端部を合成する方法ではアミノ基の保護および脱保護を含むため、反応が多段階におよびまた繁雑であった。そこで、この 2 段階の反応を省略することを考えた。そのために、まず糖のヒドロキシル基を全てパーアセチル保護し、次にアセチル化した糖誘導体とジエチレントリアミンとを反応させ末端部を合成した。この反応はジエチレントリアミンの第一級アミンに対する選択的アミド化反応と同じく、不必要な反応点における保護・脱保護の過程を省略することが出来るため一般的なデンドリマー合成において非常に利用価値の高い反応である。また、合成した末端部は既存のものとは異なり、糖が有する 5 個のヒドロキシル基のうち 4 個がアセチル化され、1 個のみヒドロキシル基のまま残った構造となっている。

合成経路は、糖のヒドロキシル基のアセチル化、糖誘導体とジエチレントリアミンとの反応の順とした。以下に各反応の詳細について述べる。

#### 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D(+)-グルコノ-1,5-ラクトン 6



Scheme 2-1-05 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D(+)-グルコノ-1,5-ラクトン 6

2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D(+)-グルコノ-1,5-ラクトン 6 は D(+)-グルコノ-1,5-ラクTONをトリフルオロ酢酸触媒下、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<sup>48)</sup>。本研究でも、この合成方法と同様の方法で化合物 6 を収率 83% で合成した。しかし、参考文献<sup>47)</sup>においてこの化合物の精製は行われていなかったため、本研究ではシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$  : methanol = 20 : 1) による単離精製を行なった。この反応は、D(+)-グルコノ-1,5-ラクTONのヒドロキシル基と無水酢酸との求核アシル置換反応によるヒドロキシル基のアセチル化反応である。この反応において、D(+)-グルコノ-1,5-ラクTONは無水酢酸に溶解しないが生成物は溶解するため、反応溶液の濁りがなくなることを反応進行の目安とした。

以下に化合物 6 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Fig. 2-1-13)、IR スペクトル (Fig. 2-1-14) のデータを示す。



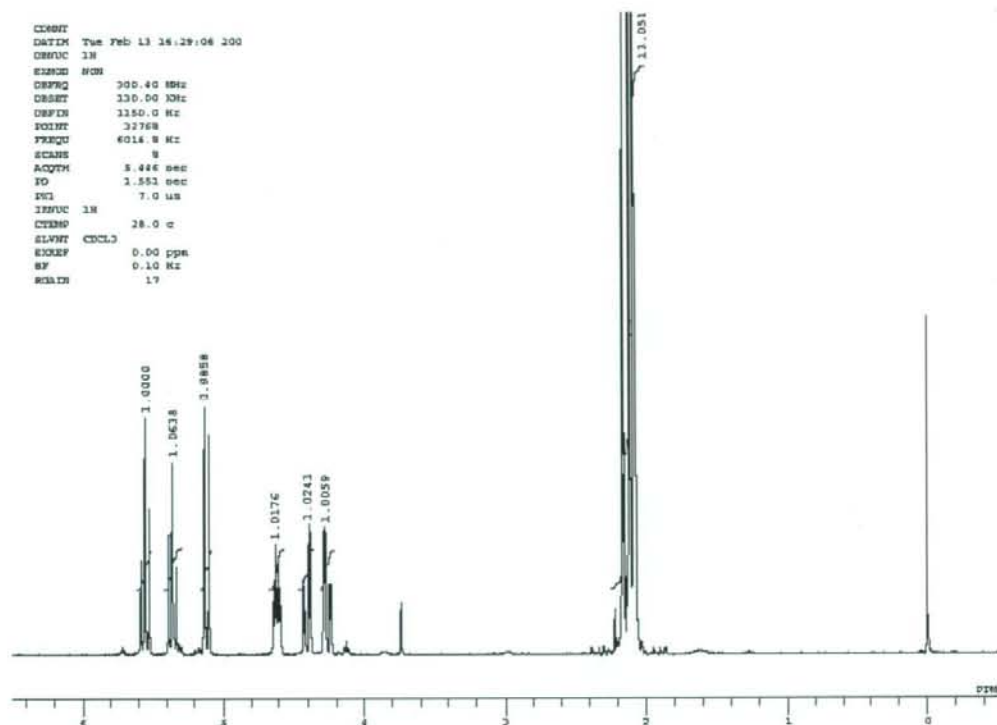


Fig. 2-1-13 化合物 6 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

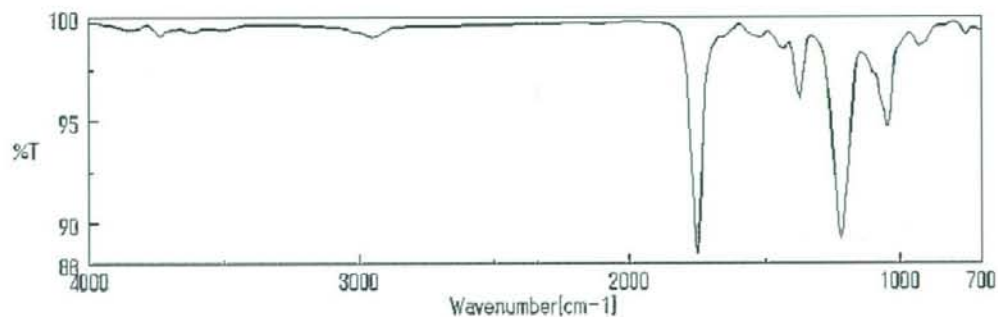
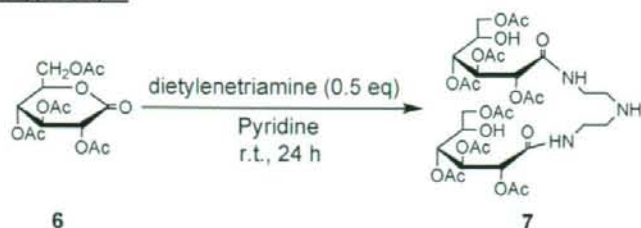


Fig. 2-1-14 化合物 6 の IR スペクトル

Fig. 2-1-13 の  $^1\text{H-NMR}$  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およびメチレンのプロトン数を比較した。Fig. 2-1-14 の IR スペクトルより  $1751\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{C=O}$  伸縮による吸収と  $1218\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{C-O}$  伸縮による吸収を示すことからエステル存在を確認した。また、 $\text{O-H}$  伸縮による吸収を示していないことからヒドロキシル基はすべてアセチル化されたと考えられる。以上から化合物 6 の構造を同定した。

DETA-2Glc(4OAc)(1OH) **7**



Scheme 2-1-06 DETA-2Glc(4OAc)(1OH)

ピリジン中、ジエチレントリアミンと 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D(+)-グルコノ-1,5-ラクトン **6** との求核反応により化合物 **7** を粗収率 90%で合成した。この反応は化合物 **6** 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化合物 **6** を 2 当量反応させることで、ジエチレントリアミンの第一級アミンに対して選択的に糖が導入された。合成した末端部は既存のものとは異なり、糖が有する 5 個のヒドロキシル基のうち 4 個がアセチル化され、1 個のみヒドロキシル基のまま残った構造となっており、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、 dendrimer 分子まで誘導し、そこで再結晶による単離精製を行なうこととした。

以下に化合物 **7** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (Fig. 2-1-15)、MS スペクトル (Fig. 2-1-16)、IR スペクトル (Fig. 2-1-17) のデータを示す。

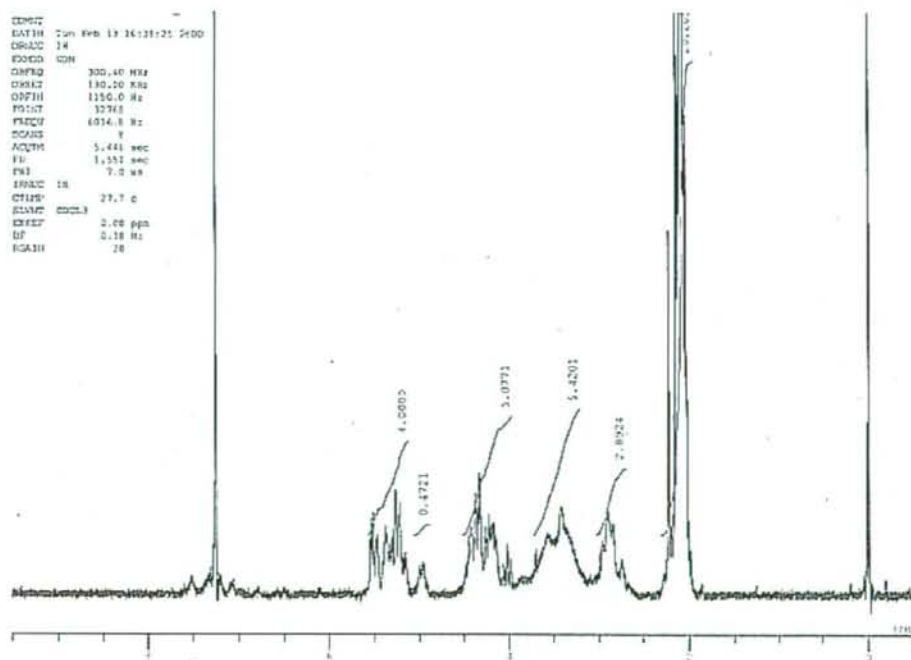
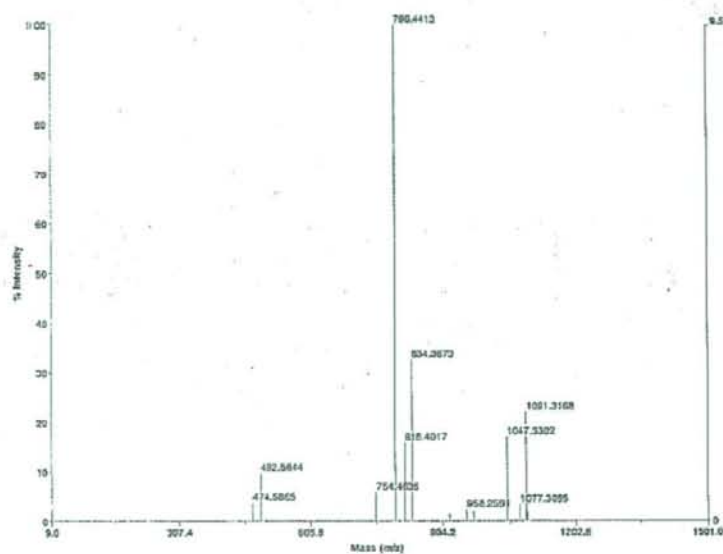


Fig. 2-1-15 化合物 **7** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Voyager Spec #1 =&gt; BC =&gt; AdvBC(32,0.5,0.1) =&gt; NP0.7 =&gt; D[BP = 796.4, 94802]



Mode of operation:	Reflector
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Positive
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	20000 V
4kV Grid voltage:	15%
Mixer voltage ratio:	1.12
Guide wire ID:	8.002%
Extraction delay time:	125 nsec
Acquisition mass range:	10 - 1500 Da
Number of laser shots:	3000000
Laser intensity:	1545
Laser Rep Rate:	2.0 Hz
Collision type:	None
Collision matrix:	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate:	Off
Time lock solution:	Off
Digitizer start time:	3.272
SP #10:	0.5 nsec
Number of data points:	70965
Vertical scale @:	500 mV
Vertical offset:	0.65%
Input bandwidth @:	500 MHz
Sample well:	27
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	6384
Instrument name:	Voyager-DE F/RC
File type filename:	C:\MSYASER\101 well plate.pr
Lab name:	PE Biosystems
Absolute x-position:	34187.8
Absolute y-position:	34934.4
Relative x-position:	2130.44
Relative y-position:	-209.14
Mass in spectrum:	59
Source pressure:	1.085e-007
Mirror pressure:	5.033e-008
TIC acquisition:	3.001
TIC gate width:	7
TIC signal length:	668

Fig. 2-1-16 化合物 7 の NMS スペクトル

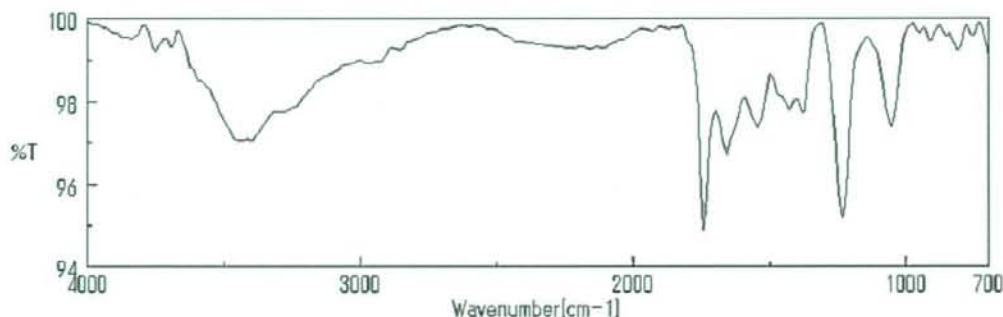


Fig. 2-1-17 化合物 7 の IR スペクトル

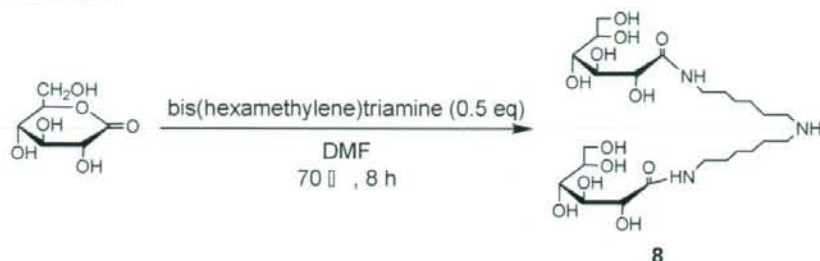
Fig. 2-1-15 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより 2.07-2.23 ppm にアセチル基由来のピークを、2.74-3.70 ppm にヒドロキシル基由来のピークをそれぞれ確認し、それらのプロトン数とメチンおよびメチレンのプロトン数を比較した。ここで、ヒドロキシル基由来のピークは  $\text{D}_2\text{O}$  置換することで確認した。Fig. 2-1-16 の MS スペクトルより 796.44  $[\text{M}+\text{H}]^+$  のピークを確認した。Fig. 2-1-17 の IR スペクトルより  $3463\text{ cm}^{-1}$  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、 $1743\text{ cm}^{-1}$  に C=O 伸縮による吸収と  $1234\text{ cm}^{-1}$  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、 $1658\text{ cm}^{-1}$  に C=O 伸縮による吸収と  $1542\text{ cm}^{-1}$  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 7 の構造を同定した。



### 2-1-2-2-3 炭素数の多いスペーサーを用いた末端 (Terminal) 部の合成

糖とコア部である DTPA との距離の増加が緩和率や組織特異性などへ及ぼす影響を検討するため、ジエチレントリアミンに比べて炭素数の多いヘキサメチレントリアミンをスペーサーとして用いた末端部を合成した。以下に反応の詳細について述べる。

#### HMTA-2Glc(OH) **8**



Scheme 2-1-07 HMTA-2Glc(OH) **8**

DMF 中、70°C でヘキサメチレントリアミンと D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンとの求核反応により HMTA-2Glc(OH) **8** を粗収率 75% で合成した。この反応は D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンのカルボニル炭素と求核試薬であるヘキサメチレントリアミンによる求核アシル置換反応であり、ヘキサメチレントリアミンに対して D(+)-グルコノ-1,5-ラクトンを 2 当量反応させることで、ヘキサメチレントリアミンの第一級アミンに対して選択的に糖が導入された。また、生成物 **8** は DMF に溶解せず生成と同時に結晶となり析出してくるため、これを反応進行の目安とした。

以下に化合物 **8** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (Fig. 2-1-18)、MS スペクトル (Fig. 2-1-19) のデータを示す。

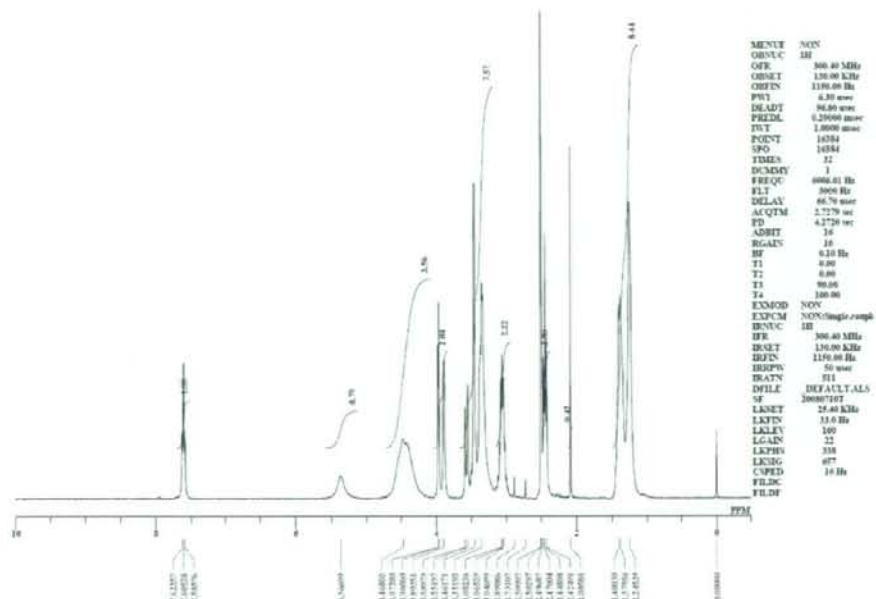


Fig. 2-1-18 化合物 8 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>BC=>AdvBC(32,0.5,0.1)>NF0.7=>D[BP = 573.1, 124841]

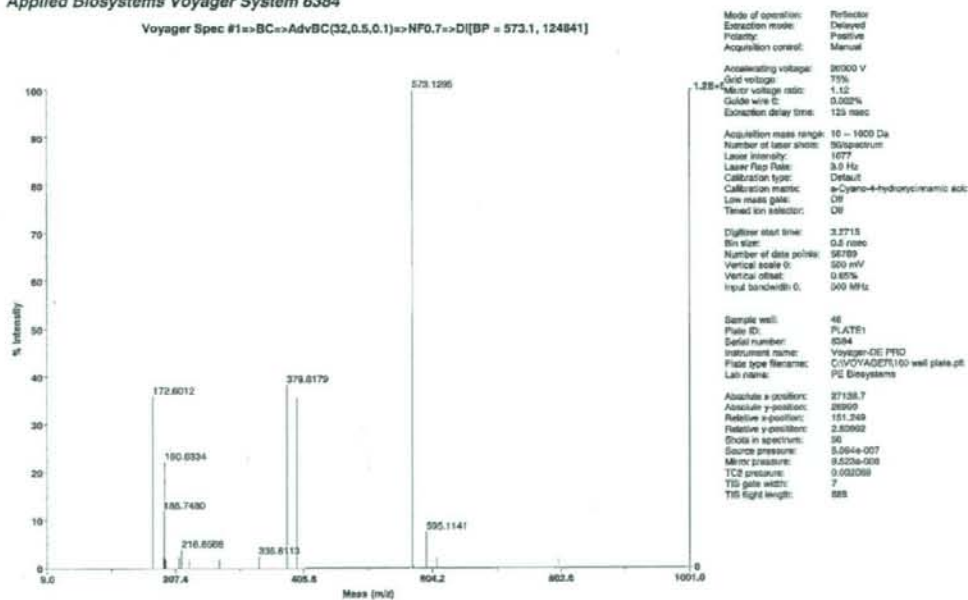


Fig. 2-1-19 化合物 8 の MS スペクトル

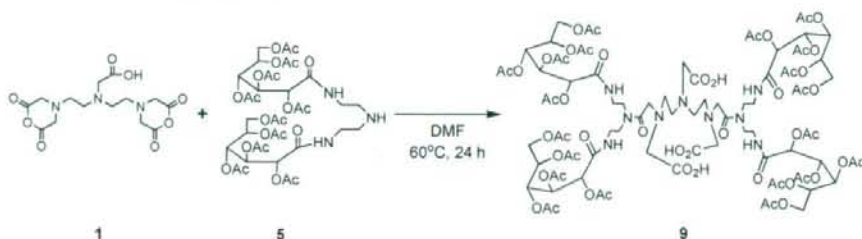
Fig. 2-1-18 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルより 4.47-5.37 ppm にヒドロキシル基由来のピークを確認し、そのプロトン数とメチンおよびメチレンのプロトン数を比較した。Fig.

2-4-19のMSスペクトルより573.12 [M+H]<sup>+</sup>のピークを確認した。以上から化合物 **8** の構造を同定した。

### 2-1-2-3 リガンド (Ligand) の合成

2-1-2-1において合成したコア部の DTPA dianhydride **1** に対して2-1-2-2において合成した末端部を2当量反応させることでリガンドの合成を行なった。また、末端部として糖以外にアミノ酸を用いたリガンドの合成方法が報告されている<sup>40)</sup>。末端部を構成するスペーサーは主にトリアミンを用いていたが、分子の回転を抑制するために芳香環をスペーサーにすることを考えた。本研究では糖との結合は行っていないが Gd 錯体まで誘導しその性能を他の Gd 錯体と比較することとした。以下に各反応の詳細について述べる。

#### DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) **9**



Scheme 2-1-08 DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) **9**

DMF 中、40°C で DTPA dianhydride **1** に対して DETA-2Glc(OAc) **5** を2当量反応させることで DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) **9** を収率 84% で合成した。化合物 **9** は再結晶 (イソプロパノール) による単離精製を行なった。

以下に化合物 **9** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (Fig. 2-1-20)、MS スペクトル (Fig. 2-1-21)、IR スペクトル (Fig. 2-1-22) のデータを示す。

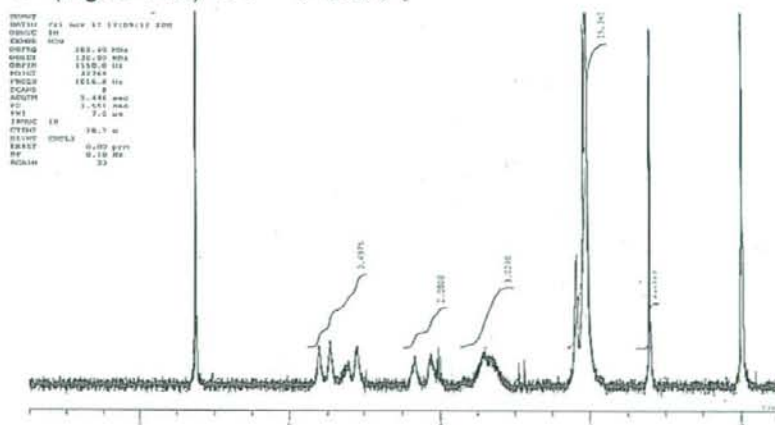


Fig. 2-1-20 化合物 **9** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル