

Fig.2-5-09 The MS spectrum of DTPA-L-Leucine

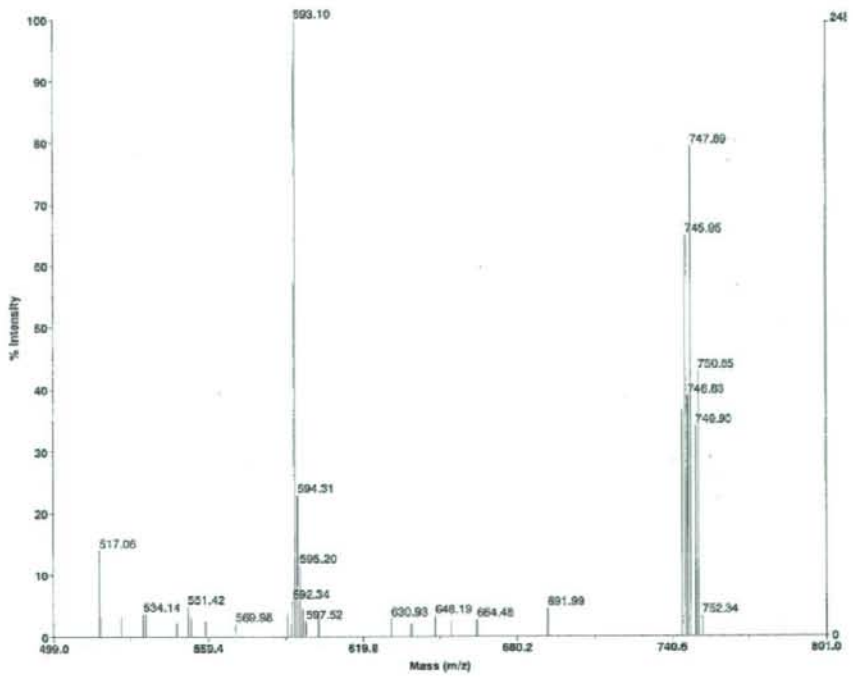


Fig.2-5-10 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Valine

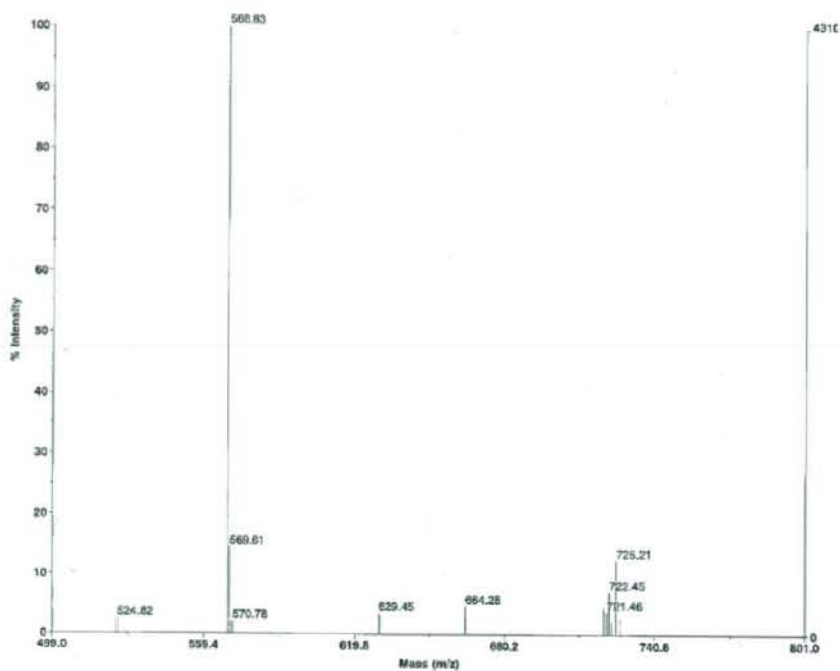


Fig.2-5-11 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Serine

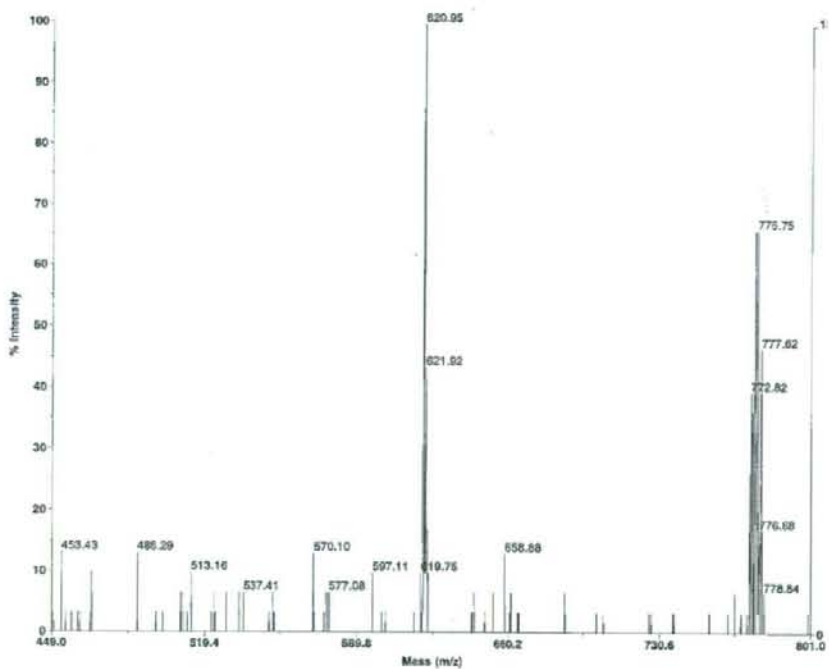


Fig.2-5-12 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Leucine

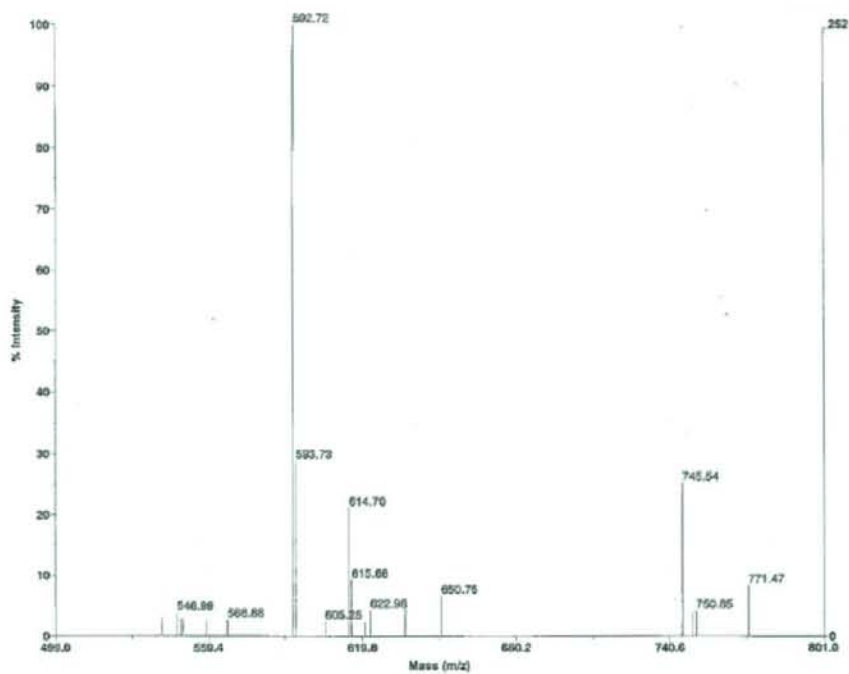


Fig.2-5-13 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Valine (Free Gd be removed)

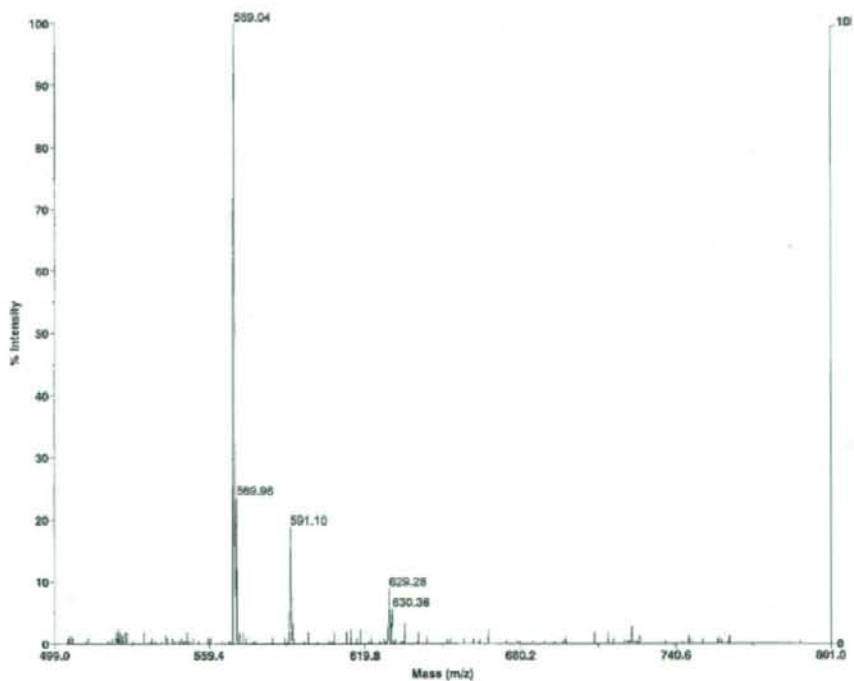


Fig.2-5-14 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Serine (Free Gd be removed)

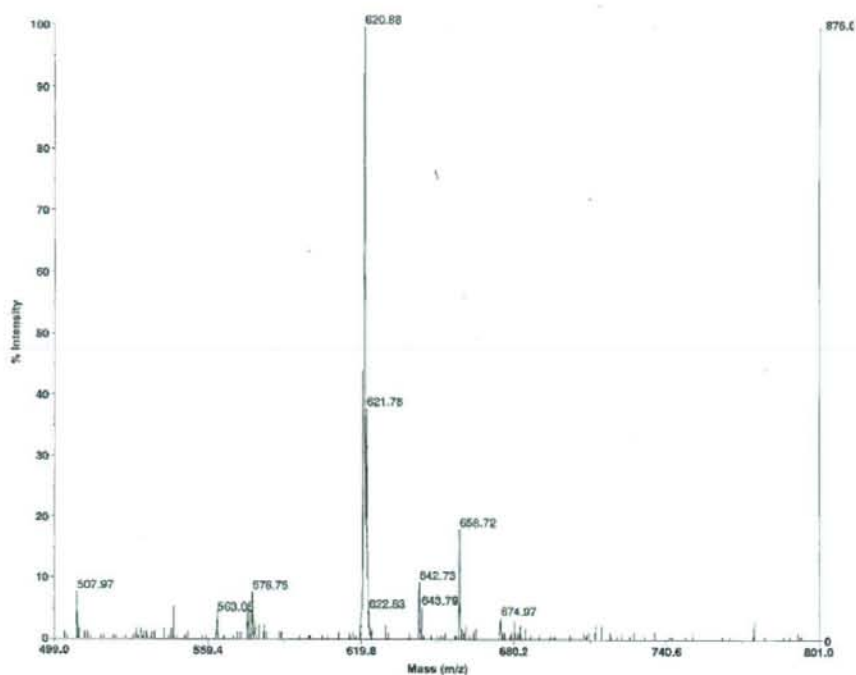
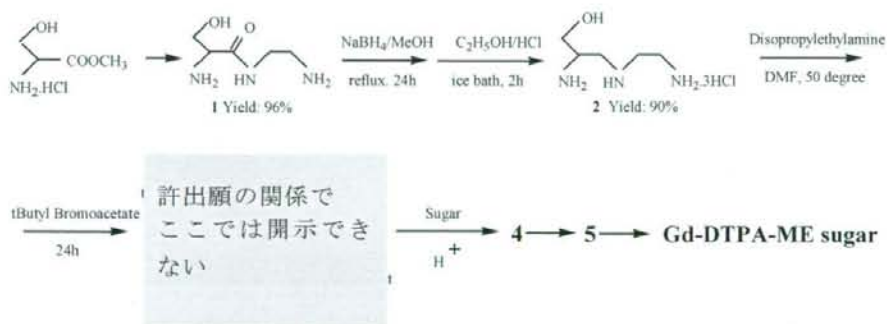


Fig.2-5-15 The MS spectrum of Gd-DTPA-L-Leucine (Free Gd be removed)

2-5-2-3 Synthesis of Gd-DTPA-ME sugar

According to some references,^{4,5} we have prepared a novel ligand for MRI contrast agent to improve the stability of Gd-DTPA derivative. The Scheme2-5-03 is the preparation route to Gd-DTPA-ME sugar.



Scheme 2-5-03 The preparation route to Gd-DTPA-ME sugar

The Complex 1, Complex2 and Complex3 were synthesized according to previously reported procedures.^{4,5} Complex 3 react with sugar for 24 h at 60°C to obtain complex 4. Concentrated HCl was added and the solution was stirred overnight at room temperature to get complex 5. At last, complex 5 react with GdCl₃.6H₂O at 60°C for 24 h to obtain Gd-DTPA-ME (exact structure of complex 4~6 can not be disclosed).

The structure of complexes can be identified by MS and $^1\text{H-NMR}$. The MS and $^1\text{H-NMR}$ spectra of complexes were shown in Fig.2-5-16~Fig.2-5-21.

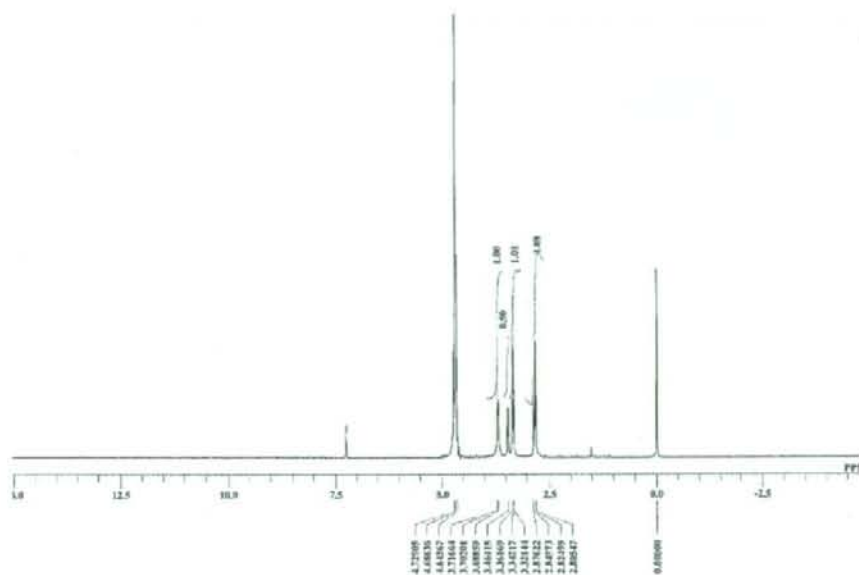


Fig.2-5-16 The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Complex 1

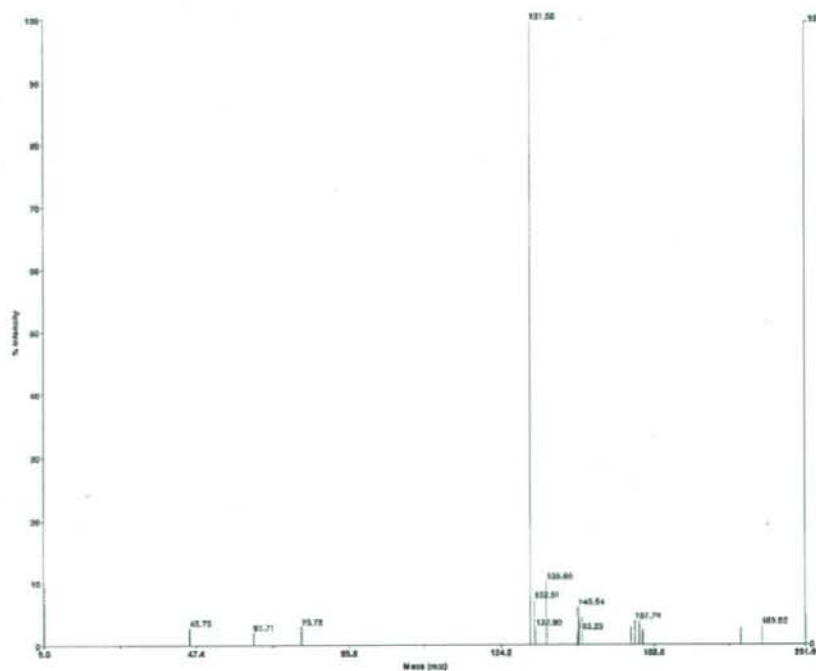


Fig.2-5-17 The MS spectrum of Complex 2

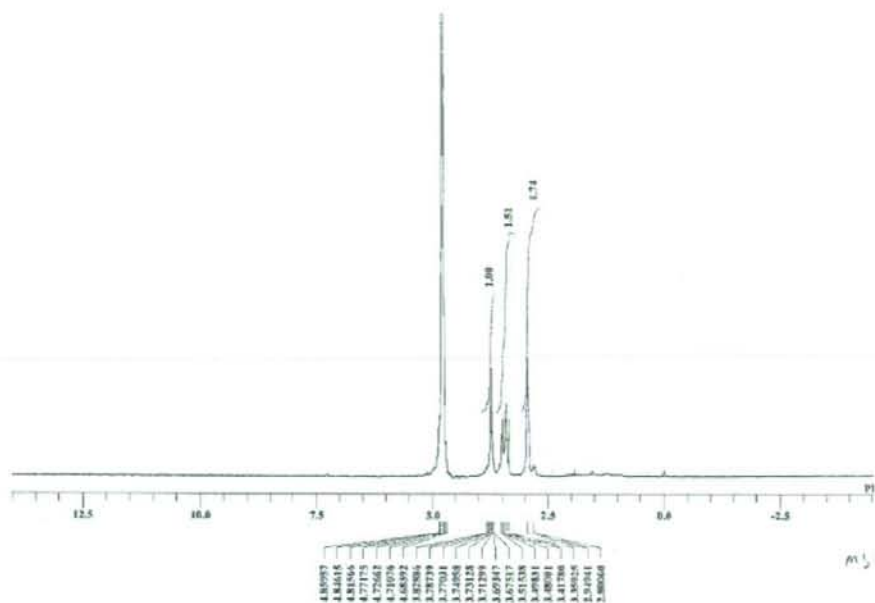


Fig.2-5-18 The ¹H-NMR spectrum of Complex 2

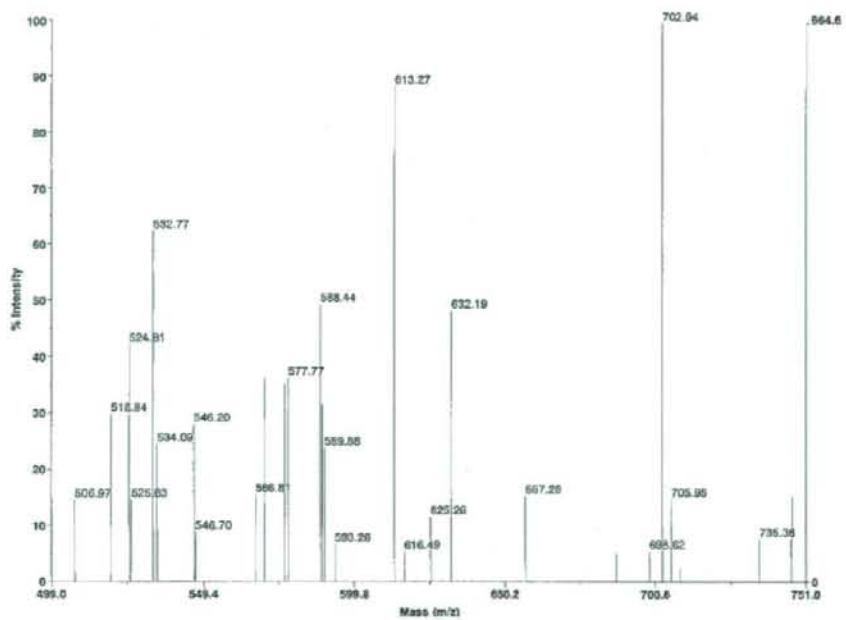


Fig.2-5-19 The MS spectrum of Complex 3

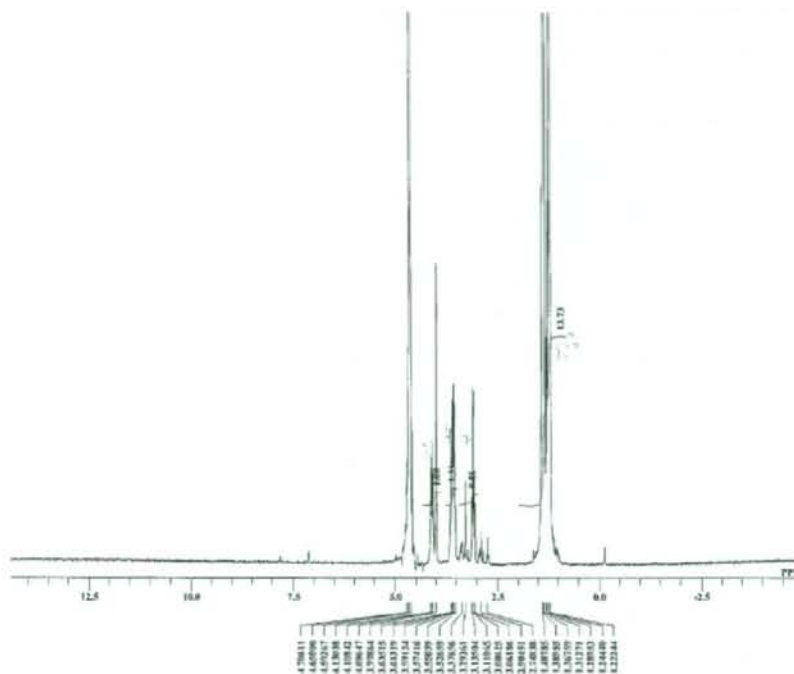


Fig.2-5-20 The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Complex 3

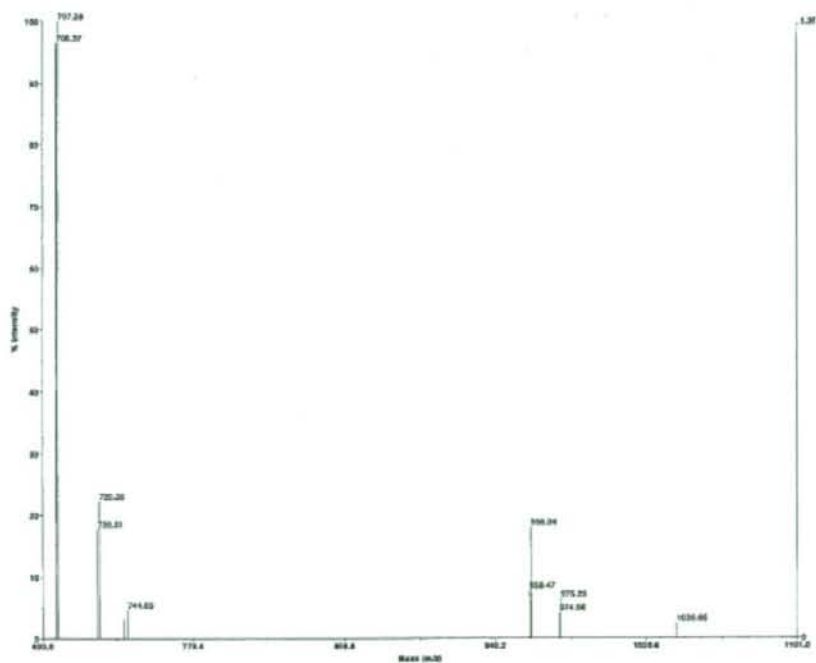


Fig.2-5-21 The MS spectrum of Complex 4

2-5-2-4 Physical property of Gd-DTPA-bis(amido sugar)

The MR image intensity in $^1\text{H-NMR}$ signal of water protons linked with Gd(III) is dependent on nuclear relaxation times.⁶ They have a good correlation to the relaxation rate of the protons. The parameters of relaxation times for Gd-DTPA-bis(amido sugar) was examined. The relaxivity vs. temperature profile is shown in Fig.2-5-22.

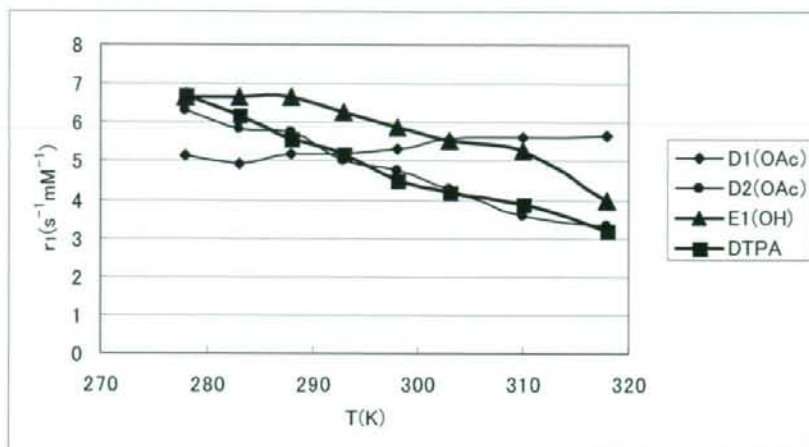


Fig2-5-22 Relaxivity of the Gd- DTPA-bis(amido sugar) vs. temperature profile.

These results show that relaxivity of Gd-DTPA-bis(amido sugar) decreased as temperature risen, that is same with the change of relaxivity of Gd-DTPA. However, at 310K, we can find the relaxivity of Gd-DTPA-bis(amido sugar) is higher than Gd-DTPA which indicate Gd-DTPA-bis(amido sugar) may better than Gd-DTPA as MRI contrast agents.

2-5-3 Conclusions

We have successfully synthesized a new gadolinium conjugated compound by a simple two-step reaction. This complex can be obtained by using DTPA-bis(amido sugar) as the ligand, and using gadolinium(III) as the paramagnetic centers. From the relaxivity of Gd-DTPA-bis(amido sugar), we think these paramagnetic polymetallic species has a potential as MRI contrast agents.

Also, we have prepared a series of Gd-DTPA amino acids. However, the stability of Gd derivatives is low, which limit the application.

To modify DTPA, a novel contrast agent also has been prepared. The feasibility of this metal complex as new potential candidates for MRI contrast agent is now in progress. The results will be published in future elsewhere. According to the chemical structure of Gd-DTPA-ME sugar, we hope this complex has a potential as MRI contrast agents.

2-5-4 Experimental

D-(+)-Glucono-1,5 lactone, DMF, DTPA, amino acids, serine methyl ester, 3-amino-1-propanol and another material were obtained from Wako Pure Chemical Industries, LTD. The DTPA-bis(anhydride) was synthesized according to previously reported procedures.⁷ ¹H-NMR spectra were collected on JEOL EX300 (300MHz). IR spectra were measured on a FTIR-spectrometer, using reflection on silicon. Elemental analysis was performed on a FLASH EA1112. The MS measurement was performed on a VOYAGER-DE Porimerix.

2-5-4-1 Synthesis of DTPA-bis(amido sugar)

To a solution of DTPA anhydride 0.2500g (0.700mmol) in dry DMF (10mL), 3-amino-1-propanol 0.1051g (1.400mmol) was dropped into solution at room temperature. After 3 h of stirring, the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in dry DMF (10mL) containing 1mL of ether saturated with hydrogen chloride, and the D-(+)-Glucono-1,5 lactone 0.2469g (1.39mmol) was added and the reaction mixture was heated at 60 °C for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the compound was washed with ethanol and ether and dried in vacuum 3 h. The residues were the product as a yellow crystal: yield, 0.5512 g (0.624 mmol), 95%.

IR (reflection on silicon): $\nu(\text{cm}^{-1})=3320$ (O-H), 1735 (O=C), 1648, 1543 (N-C), 1203, 1089(C-O-C)

¹H-NMR (300MHz, D₂O),

$\delta(\text{ppm})$: = 1.79 (t, 4H; CH₂-CH₂×2)

= 3.32~3.41 (m, 12H; CH₂-N×6)

= 3.64 (s, 2H; CH₂-COOH)

= 3.73 (s, 4H; CH₂-COOH×2)

= 3.77 (s, 4H, CH₂-CO-NH×2)

= 3.87 (d, 4H, CH(OH)-OH)

= 3.92 (t, 4H; CH₂-O×2)

= 4.37 (t, 6H, CH(OH)-CH×6)

= 4.65 (d, 2H, CH(OH)-CO-O×2)

MS: 863

2-5-4-2 Synthesis of Gd-DTPA-bis(amido sugar)

DTPA-bis(amido sugar) (0.5562 g, 0.644 mmol) was dissolved in pyridine (10 mL), and the solution of GdCl₃·6H₂O (0.2549g, 0.137mmol) in water (1 mL) was added. After 24 h of stirring at 65 °C, the solvent was removed and the crude product was then refluxed in ethanol for 1 h. After cooling to room temperature, the complex was filtered off and dried in vacuum at room temperature. The product was a light yellow solid, yield: 0.6423g (0.618mmol), 96%. Elem. Anal. Calcd.: (found): C₃₃H₅₇N₅O₂₂·H₂O: C, 36.34 (34.19), H, 5.78 (5.62), N, 6.69 (6.62).

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})=3361$ (νOH), 1664 (O=C), 1538 (N-C=O), 1226 (C-N).

2-5-4-3 Synthesis of Gd-DTPA amino acids

The DTPA was dissolved in dry DMF (10mL) containing 1ml of ether saturated with hydrogen chloride, and the L-Valine, L-Serine and L-Leucine were added, respectively, and the reaction mixture was heated at 60 °C for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the compound was washed with ethanol and ether and dried in vacuum 3 h. The residue was dissolved in pyridine (10 mL), and the solution of GdCl₃.6H₂O (0.2549g, 0.137mmol) in water (1 mL) was added. After 24 h of stirring at 65 °C, the solvent was removed and the crude product was purified.

2-5-4-4 Synthesis of Gd-DTPA-ME sugar

Serine methyl ester hydrochloride (1.00 g) was dissolved in 10 mL ethylenediamine and stirred at room temperature for 16h. To remove solvent by evaporation at reduced pressure. To purify residue, serine ethylenediamine amide can be obtain (Complex 1). The crude amide was dissolved in 15 mL THF. Borane.THF was added at ice bath and stirred for 3 h and then refluxed under Ar for 16h. The excess borane was quenched by carefully addition of 50 mL methanol at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residual oil was diluted in 20 mL of dry ethanol. Concentrated HCl (5 mL) was added slowly at ice bath and stirred for 2 h. 2-hydroxymethyldiethylenetriamine trihydrochloride (Complex 2) precipitated and was collected by filtration and dried in reduced pressure. To a solution of 2-hydroxymethyldiethylenetriamine trihydrochloride (1.00 g) and diisopropylethylamine (7 mL) in 10 mL of dry DMF at room temperature under N₂ was added t-butyl bromoacetate (5 mL) and stirred for 48 h at 55 °C. Solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc and extracted with water, NaHCO₃ (sat), H₂O and NaCl (sat). The residue was purified by column chromatography to obtain the pure 1-hydroxymethyl-DTPA-penta-t-butyl ester (Complex 3). Complex 3 (1.00 g) react with an equimolar amount of sugar in DMF at 60 °C for 24 h. The solvent was removed by reduced pressure. The residue was purified to obtain pure complex 4. Concentrated HCl (5 mL) and ether (10 mL) were added and the solution was stirred overnight at room temperature. The solvents were evaporated off and the residue was triturated with H₂O (20 mL). The resulting precipitate was filtered and washed with water and ether. The solid product was dried under pump at room temperature for 4 h to give the pure product (Complex 5). Complex 5 was dissolved in pyridine (10 mL), and the solution of GdCl₃.6H₂O in water (1 mL) was added. After 24 h of stirring at 65 °C, the solvent was removed and the crude product was purified to obtain Gd-DTPA-ME (exact structure of complex 4~6 can not be disclosed). This step is now in progress.

References:

1. Merbach, A. E.; Toth, E. *The Chemistry of Contrast Agent in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK, 2001.
2. Gang Yu, Mitsuji Yamashita, Kengo Aoshima, Masatsugu Kobayashi, Tatsunori Kato, Nao Kamikage, Masaki Takahashi, Hisao Takayanagi, Tatsuo Oshikawa, Sofie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, Robert N. Muller, Yasuo Takehara, and Harumi Sakahara, "Studies on Preparation and Characterization of Novel MRI Contrast Agents for Targeting Organs and Blood Vessels", *Heterocyclic Communications*, Vol13, Nos. 2-3, 2007, Pages 101-108.
3. G. Yu, M. Yamashita, K. Aoshima, M. Takahashi, T. Oshikawa, H. Takayanagi, S. Laurent, C. Burtea, L. Vander Elst and R.N. Muller, "A Glycosylated Complex of Gadolinium, a New Potential Contrast Agent for MR Angiography?", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 17, Issue 8, 15 April 2007, Pages 2246-2249.
4. PCT/US96/00164
5. *MAGMA* (2004) 16: 235-245
6. Lammers, H.; Maton, F.; Pubanz, D.; Laren, M. W.; Bekkum, H.; Merbach, A. E.; Muller, R. N.; Peters, J. A.: *Inorg. Chem.*, **36**, 2527 (1997).
7. C. F. G. C. Geraldes, A. M. Urbano, M. C. Alpoim, A. D. Sherry, K. T. Kuan, *Magnetic Resonance Imaging*, 3 (13) (1995) 401.
8. W.Krause (Ed), *Contrast Agents I, Magnetic Resonance Imaging*, Springer-Verlag, Berlin, 2002.
9. Tatjana N. Parac-Vogt, Kristof Kimpe, Koen Binnemans, *Journal of Alloys and Compounds*, 2004, **374**, 325;
10. Claude B. Sirlin, David R. Vera, Jacqueline A. Corbeil, Marlon B. Caballero, Richard B. Buxton, and Robert F. Mattrey, *Acad Radiol*, 2004, **11**, 1361;
11. Sophie Laurent, Francois Botteman, Luce Vander Elst, and Robert N. Muller, *Eur. J. Inorg. Chem*, 2004, 463;
12. Tatjana N. Parac-Vogt, Kristof Kimpe, Koen Binnemans, *Journal of Alloys and Compounds*, 2004, **374**, 325;
13. Kazunori Takahashi, Hiroyuki Nakamura, Shozo Furumoto, Kazuyoshi Yamamoto, Hiroshi Fukuda, Akira Matsumura, and Yoshinori Yamamoto, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, **13**, 735;
14. Masato Ito, Hiroyuki Ogino, Hidekazu Oshima, Norio Shiraki, Yuta Shibamoto, Harumasa Kasai, Mitsuhiro Mase, Yasutaka Kawamura, and Tosiaki Miyati, *Magnetic Resonance Imaging*, 2006, **5**, 625;
15. R.B. Lauffer, *Chem. Rev*, 1987, **87**, 901;
16. J.A. Peters, *Inorg. Chem*, 1988, **27**, 4686;
17. C.A. Chang, H.G. Brittain, J. Telser, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem*, 1990, **29**, 4468;
18. K. Micskei, L. Helm, E. Brucher, A.E. Merbach, *Inorg. Chem*, 1993, **32**, 3844;
19. P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, *Chem. Rev*, 1999, **99**, 2293;

20. W.Krause (Ed), Contrast Agents I, Magnetic Resonance Imaging, Springer-Verlag, Berlin, 2002.
21. C. F. G. C. Geraldes, A. M. Urbano, M. C. Alpoim, A. D. Sherry, K. T. Kuan, *Magnetic Resonance Imaging*, 3 (13) (1995) 401.
22. Lammers, H.: Maton, F.: Pubanz, D.: Laren, M. W.: Bekkum, H.: Merbach, A. E.: Muller, R. N.: Peters, J. A.: *Inorg. Chem.*, **36**, 2527 (1997).

2-6 ガドリニウム錯体の製造

2-6-1 合成上の問題点

MRI 造影剤としてのガドリニウム錯体の合成研究には、「ガドリニウム錯体合成」と「常磁性金属ゆえに NMR 分析ができない」という、相反する要素が障害となる。すなわち、ガドリニウムイオンを配位子に取り込ませ、錯体とする過程をどの段階に持ってくるかは、最終生成物の合成をすすめる上で極めて重要である。しかし、一方で、一旦ガドリニウムイオンを取り込ませ錯体を合成すると、MRI 造影剤として有効であるということ、これは裏を返せば、つまり NMR 分析が事実上不可能であることを意味する。しかも、ガドリニウム錯体は一般に非常に安定度定数が大きいため、ガドリニウムイオンを気軽に出し入れすることはできない。これは、ガドリニウムの毒性を封じ込める意味では重要なのだが、合成上はありがたくない。

有機物の構造決定は、現在の洗練された有機合成においてもますます極めて重要で、あらゆる段階で構造と純度を確認して用心深くステップを重ねていく。しかも、有機物の構造決定には NMR 分析によるところが非常に大きな比重を占めている。したがって、ある段階から NMR が使用できないということは、合成に携わるものにとって、飛行機のレーダーが機能を停止するようなものである。ガドリニウムを入れた途端、妨害電波やチャフによりレーダーが攪乱されたようになる。実際に合成に携わっている者にとって、これはパニックに等しく、自らの進むべき進路を見失う。それ以後は、大昔に有機合成のための分析手段の主流であった元素分析、赤外吸収スペクトル吸収分析、あるいは、質量分析、発光分析などに頼らざるを得ない。この考え方に立てば、ガドリニウムイオンの導入が後の段階になるほど合成上はやりやすいことになる。

本プロジェクトでは、青島、青木により Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)が合成されているが、その造影剤としての性能は異なる。また、小川により別途合成がなされており、こちらの方が構造はより確実性が高いが、造影剤としての性能はさらに劣るといふ結果が出ている。すべての段階で NMR 分析可能な一般的合成であれば、ということが起こっていてどう対処すれば良いか、容易に判明するが、すでに述べたように本研究の合成ではガドリニウムイオンを導入した段階以降では NMR が使用できないためサンプルの合成再現性が完全には達成されていない状況にある。ここでは、その解決法について考察する。

2-6-2 実際の合成

青島、青木による Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)合成は、周辺部をアセチル化してコア部と反応させ、塩化ガドリニウムを反応させることにより錯体 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)とし、アセチル基を水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解により脱離させて生成物を得ている。青島（オリジナル）は、錯体合成の際に酸化ガドリニウムを使用しているが、青木（再現実験）の場合には、塩化物を用い塩化水素が発生したためか、加水分解ステップ以前に生成物の一部 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)となってしまうている。加水分解の条件検討とともに、使用するガドリニウム試薬の検討も必要であるかもしれない。また、青木サンプルが MALDI-TOF-MS において positive モードで 146

2 ([M+H]⁺) を示したのに対して、青島サンプル (オリジナル) は、青木サンプルにパターンがよく似ているものの、1462 ([M+H]⁺) ピークはなく、1747、1255 にピークを示した。1255 のピークは、加水分解されて AcO が HO になり、しかも糖の部分が一つ外れた質量に相当する。

一方、小川は、青島、青木がアセチル保護した段階を省き、コア部と未保護の周辺部を反応させて DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) を直接合成している。こちらは、MALDI-TOF-MS にて negative モードで 1274 ([M-H]⁻) が検出されている。

このように、本研究では、精密な構造決定の困難によって支障をきたしている面がある。

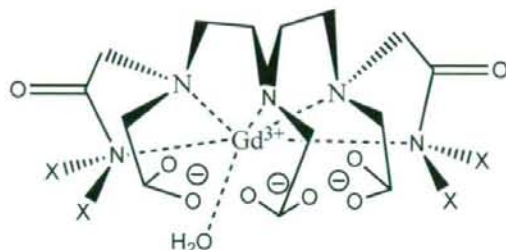


Fig. 2-6-01

2-6-3 打開策

現在のところ、ぜひ検討しなければならない要件は以下の通りである。

1. 合成途中段階での構造決定を可能にする。

(1) Gd をできるだけあとの段階で導入する合成ルートを計画する。

NMR 分析に際して、Gd の存在が障害となるため、合成ルートの最終段階に近いところまで、配位子のみの合成とすることにより、構造の確認が可能となり合成の精度と再現性が確保できる。

(2) Gd 以外の、NMR 測定不能とならない希土類元素の利用を検討する。

(保護基として活用することも考慮しながら、最終的には Gd 錯体とする)

たとえば Eu などの比較的 NMR 分析に障害とならない希土類元素を用いて合成を行い、錯体構造を保持しつつ NMR 分析も可能な合成ルートを確保する。

錯体の安定度定数が適当なものを選択すればあとの段階で Gd への置換も考えてみたい。

2. 条件の強弱と加水分解の進み具合に不可解な点があるので検討する。

青島サンプルと青木サンプルでは同様のルートにより合成を行ったが、性能が異なるというのは、アセトキシエステルの加水分解に鍵があると思われる。したがって、加水分解条件を詳細に検討することが必要になる。また、別途合成し構造がより確かな小川サンプルとも性質が異なるため、当初の目的の構造とは違うものであると想定したほうがよい。

3. 錯体合成段階についても、酸化物がよいのか塩化物でよいのか、再検討する。
青島サンプルのいくつかは、試薬に酸化ガドリニウムを用い錯体を得ている。一方、青木サンプルは基本的には塩化ガドリニウムを用いている。塩化ガドリニウムを用いると系内に塩化水素が発生して、これが通常の、あるいは錯体構造に特異的な加水分解をしているかもしれない。このことを考慮して、錯体化試薬の検討とその際の条件の検討を行う必要がある。
4. 光学異性体の存在も含めて、構造未確定の成分の構造決定を試みる。
合成の些細な条件変化などにより、微量成分の構造や構成が変化している可能性がある。有効な成分が微量成分であれば、それは卓越した性能を有していることが期待されるため、混合物から、HPLC、電気泳動、その他の方法により分画を行い、性能と構造の評価を行う必要がある。
5. Mass、IR 以外に、蛍光分析をぜひ取り入れる。
元素としての Gd の特性を生かすために蛍光分析を取り入れる。
6. 青島サンプルがペースト状で、再現物が結晶だったという点の解明。
これは、現象を再現しないと如何ともしがたいが、性状の違いは極めて重要である場合があるので、細心の注意を払う必要がある。

いずれにしても、現在までの状況では、当初描いていた構造のものが最良の性能をもたらしたわけではないようだ。しかし、マイナー成分にして高い性能を発揮したのであれば、その純度を上げた場合には、今までの造影剤の中でのチャンピオンデータを、10 倍を超えて上回るかもしれない。

ほかの方法として、当初の再現を試みて、とにかくある程度の性能が出た複数の成分が存在するサンプルから有効なものを取り出す努力も必要かもしれない。

3. 合成物質の評価と候補物質の絞り込み

3. 合成物質の評価と候補物質の絞り込み

3-1 配位子および Gd 錯体の合成・評価・絞り込み

第1章の緒言で記した様に、当該のMRI造影剤の創製の戦略は次のカテゴリーに分類される。

- (i) 鎖式あるいは環式
- (ii) 対称型あるいは非対称型
- (iii) 糖誘導体あるいは非糖誘導体
- (iv) 加水分解経路あるいは非加水分解経路

本サブチャプターは、(iv)加水分解経路あるいは非加水分解経路に分けて、合成したGd錯体の造影剤の合成、評価および絞り込みについて報告する。

3-1-1 非加水分解経路による配位子の創製と Gd 錯体の調製

非加水分解経路による配位子の調製方法は、合成経路が短く、合成した配位子の構造も¹H-NMRあるいは¹³C-NMR等核磁気共鳴装置を含めて様々なスペクトルを測定できるので、合成化学的には大変優れた合成経路である。

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の合成は、平成19年度の報告書に記載した。基本的には、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の合成方法は、①糖の種類、②リンカーの種類、③対称あるいは非対称の配位子についても、糖やリンカーの種類を変更し、合成経路や基質や試薬あるいはそれらのモル比を変化させることにより、一般的に様々な配位子合成に応用できる優れた合成方法である。

この合成方法を応用して、(i)鎖式、(ii)対称型あるいは非対称型、(iv)非加水分解経路により、配位子あるいはGd錯体としては、糖(シュガーボールデンドリマー)タイプ(上記カテゴリー(iii)の糖誘導体)の以下を合成した。

Table 3-1-01 配位子：(iii)糖誘導体タイプデンドリマー合成

DTPA-DETA-D2-4Glc(4OAc)(10H)	DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)
DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	DTPA-HTMA-Glc(OAc)
DTPA-HMTA-Glc(OAc)	DTPA-D/TA-D2-4Glc(OH)
DTPA-D/TA-D2-4Glc(OAc)	DTPA-D/TA-D1-2Glc(OH)
DTPA-D/TA-D1-2Glc(OAc)	DTPA-X-D1-2Glc(OH)
DTPA-X-D1-2Glc(OAc)	DTPA-B-D1-2Glc(OH)
DTPA-ME-sugar	DTPA-DETA-D2-4Gal(OH)
DTPA-DETA-D2-4Man(OH)	DTPA-EDA-D1-2Glc(OH)
DTPA-EDA-D1-2Gal(OH)	DTPA-EDA-D1-2Man(OH)
DTPA-DETA-AS2-2Glc(OH)	DTPA-DETA-AS2-2Glc(OAc)
DTPA-AS2-1Glc(OH)	DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH)
DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH)	DTPA-E1-Glc(OH)

また、非糖（ノンシュガー）タイプ（上記カテゴリー(iii)の非糖誘導体）の以下を合成をした。

Table 3-1-02 配位子：(iii)非糖誘導体タイプデンドリマー

DTPA-Phenylalanine (DTPA-Phe)	DTPA-Glycine (DTPA-Gly)
DTPA-Aspartic acid (DTPA-Asp)	DTPA-AP (DTPA-AP)
DTPA-L-Valine (DTPA-Val)	DTPA-L-Serine (DTPA-Ser)
DTPA-L-Leucine (DTPA-Leu)	DTPA-1
4-B (DTPA-B)	

更に、それぞれの配位子と $GdCl_3$ (塩化ガドリニウム) の錯体形成を行った。Gd 錯体は、糖（シュガーボールデンドリマー）タイプ（上記カテゴリー(iii)の糖誘導体）の以下を合成した。

Table 3-1-03 Gd 錯体：(iii)糖誘導体タイプデンドリマー

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OAc)	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OAc)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (4OAc) (10H)	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OH)	Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc (OH)
Gd-DTPA-Phenylalanine (Gd-DTPA-Phe)	Gd-DTPA-HTMA-Glc (OAc)
Gd-DTPA-HMTA-Glc (OAc)	Gd-DTPA-D/TA-D2-4Glc (OH)
Gd-DTPA-D/TA-D2-4Glc (OAc)	Gd-DTPA-D/TA-D1-2Glc (OH)
Gd-DTPA-D/TA-D1-2Glc (OAc)	Gd-DTPA-X-D1-2Glc (OH)
Gd-DTPA-X-D1-2Glc (OAc)	Gd-DTPA-B-D1-2Glc (OH)
Gd-DTPA-ME-sugar	Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Man (OH)	Gd-DTPA-EDA-D1-2Sugar
Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc (OH)	Gd-DTPA-EDA-D1-2Gal (OH)
Gd-DTPA-EDA-D1-2Man (OH)	Gd-DTPA-DETA-AS2-2Sugar
Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc (OH)	Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc (OAc)
Gd-DTPA-EDA-AS1-1Sugar	Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc (OH)
Gd-DTPA-E1-Glc (OH)	A4
K6	K6

また、非糖（ノンシュガー）タイプ（上記カテゴリー(iii)の非糖誘導体）の以下を合成した。

Table 3-1-04 Gd 錯体：(iii)非糖誘導体タイプデンドリマー

(Gd-DTPA-Phe)	Gd-DTPA-Glycine (Gd-DTPA-Gly)
Gd-DTPA-Aspartic acid (Gd-DTPA-Asp)	Gd-DTPA-2-AP (Gd-DTPA-AP)
Gd-DTPA-L-Valine (Gd-DTPA-Val)	Gd-DTPA-L-Serine (Gd-DTPA-Ser)
Gd-DTPA-L-Leucine (Gd-DTPA-Leu)	Gd-DTPA-1
4-B (Gd-DTPA-B)	

これらの配位子あるいは Gd 錯体は、その合成あるいは評価を各論にて示し、あるいは特許の関係で、構造の開示を本報告書では控える。

3-1-2 加水分解経路による Gd 錯体の調製

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)の加水分解により Gd 錯体である DEN-OH を調製した。DEN-OH は、MRI 造影剤としての *in vitro* 評価あるいは *in vivo* 評価において非常に高い物理定数あるいは造影効果を示した (Fig. 3-1-01)。それ故、当該の Gd 錯体の再現性、構造解析、造影効果の作用機序、等の解明の研究を行った。

DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)は、¹H-NMR、IR、MS データ等により、明確にその構造が示唆された。また、その Gd 錯体は、Gd の持つ常磁性の性質により測定できないが、MALDI-TOF-MS では、Gd の同位体のピークを含めて、非常に明瞭なスペクトルを与える。また、濃度調整した DEN-OH の Gd イオンの濃度は、ICP により測定できる。

加水分解条件は、様々な要因を考慮して、実験者、塩基の種類・濃度、反応時間、反応温度、等を変化させて行った。詳細な条件は特許の関係で開示できないが、再現性よく DEN-OH を調製することがなかなか容易でないことを体験した。加水分解条件を振ることによる加水分解生成物 DEN-OH の *in vitro* 評価結果は、第 4 章のサブチャプター 4-1 に示す。

また、この結果から、DEN-OH を加水分解で調製する経路の他に、化学合成による調整の方法、分子設計ソフト Molecular Operating Biology (MOE) による Docking Simulation の結果を使って Molecular Design 等の新規な研究手法に依る Gd-DTPA-糖錯体誘導体の分子設計あるいは Gd-DTPA 以外の Gd-糖錯体誘導体の分子設計を行っている。それらの結果については、特許の関係で別途に報告する。

厚生労働科研の 3 年計画のプロジェクト研究成果としては、2 年度目までには、構造及び造影剤としての評価において、最終的な結論を絞り込む段階の一手手前の段階である。

最終年度にむけて、次の課題を明確にした。①DEN-OH の構造と評価の確定、②DEN-OH の別途合成と評価、③DEN-OH を凌ぐ MRI 造影剤の開発と評価、④前臨床前試験結果の完全な収集を行う。①～④により、当該開発研究による成果を次のプロジェクトに引き継ぎ、臨床試験、実用化研究を経て、当該開発研究成果の製品化を行う。

3-1-3 新規な配位子および新規な Gd 錯体の構造

新規な配位子の構造解析については、第 2 章の各論で述べた様に、構造解析の重要なデータは、¹H-NMR、¹³C-NMR、IR、MALDI-TOF-MS、等の機器分析により得られた。また、新規な配位子を持つ Gd 錯体については、IR、MALDI-TOF-MS、複合電子顕微鏡、ICP、等の機器分析を行い、それぞれの錯体の構造あるいは純度に関するデータを得た。これらの機器分析により、開発した MRI 造影剤の構造は支持された。

3-1-4 Gd 錯体の精製およびキャラクタリゼーション

(1) 錯体を形成していないガドリニウム (Free Gd(III)) の除去

錯体を形成していないガドリニウムが緩和時間の測定に影響を及ぼさないよう合成した全ての Gd 錯体はその水溶液の pH を 7.0 に調整後、Chelex[®]100 Resin を加え 6 時間攪拌した。その後、呈色試験により錯体を形成していないガドリニウムの有無を確認した。

呈色試験の手順としてはまずサンプルチューブに微量の Gd 錯体を入れ、続けて pH を 5.0 に調整した酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を加えピリジンを一滴滴下した。溶液を均一にした後、キシレノールオレンジを加えた。溶液の色が赤褐色のまま変化していない場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していないことを示している。溶液の色が青紫色に変化した場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していることを示しているので呈色試験で色が変わらなくなるまで Chelex[®]100 Resin による除去を繰り返し行なった。

(2) Gd 錯体の縦緩和時間 (T_1) の測定

合成した Gd 錯体を超純水に溶解させ、卓上核磁気共鳴装置 Minispec (TD-NMR) により錯体に含まれる水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) を測定した。緩和時間は温度依存性が大きく温度が上昇するほど長くなることが知られている。また、造影剤は体内に投与されることを考慮に入れ水溶液の温度を 37 °C に固定して測定を行なった。測定誤差が極小になるよう一つの Gd 錯体につき 5 回の測定を行ない得られた値の平均を縦緩和時間 (T_1) とした。

(3) Gd 濃度の測定

緩和時間は造影剤の Gd 濃度に依存しているため、ICP 発光分光分析装置を用いて緩和時間の測定に使用した水溶液の Gd 濃度を測定した。また、各水溶液の Gd 濃度を測定する際に基準となる検量線は 3 つの濃度に調整した Gd 水溶液を用いて作成した。

(4) Gd 錯体の縦緩和率 (r_1) の測定

Gd 錯体に含まれる水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) を測定した。緩和率 (r_1) は、造影剤としての性能を示す重要なパラメータとなるので、緩和時間 T_1 および造影剤の Gd 濃度で示される次の式 (1) により縦緩和率 (r_1) を求めた。

$$r_1 = \frac{\frac{1}{T_1} \times 1000 - r_1^{H_2O}}{[Gd^{3+}]} \quad (1)$$

r_1 ; 縦緩和率 [$s^{-1}mM^{-1}$]

T_1 ; 縦緩和時間 [ms]

$r_1^{H_2O}$; 水の縦緩和率 [$s^{-1}mM^{-1}$]

$[Gd^{3+}]$; Gd 濃度 [mM]