

MS: 1039.

### 2-12-4-3 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 GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (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.

### 2-12-4-4 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 N<sub>2</sub> 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, NaHCO<sub>3</sub> (sat), H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O (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 GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 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. Geraldès, 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. Telsner, 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).

### **3. 合成物質の評価と候補物質の絞込み**

### 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

山下 光司

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

本サブチャプターでは、(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。この絞り込まれた候補化合物を基盤として、今後の研究開発の第 2～第 3 ステージへと展開される。

##### 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 <sup>1</sup>H-NMR あるいは <sup>13</sup>C-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 年度及び平成 20 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、平成 20 年度には、(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、構造の開示を平成 20 年度の報告書では控えた。

平成 21 年度に於いては、次の DTPA 誘導体を配位子として合成し、それらの Gd-DTPA 誘導体を調製した（新規な配位子については Table 3-1-05 参照）。

Table 3-1-05 配位子：平成 21 年度の新規な各種タイプデンドリマー合成

DTPA-DETA-D2-4Pht	DTPA-BHMTA-D2-4Pht
DTPA-BHMTA-D2-2Glc(OH)2NH <sub>2</sub>	DTPA-BHMTA-D2-2Glc(OH)2Pht
DTPA-BPTA-4Glc(OH)	DTPA-BHMTA-D2-4Glc(OH)
DTPA-BPTA-D2-4Glc(OH)	DTPA-DBPA-D2-4Pht(4OH)
DTPA-DETA-D2-4NH <sub>2</sub>	DTPA-D2-2DL-Thy
DTPA-D2-2L-Trypt	DTPA-D2-2Asp
DTPA-D2-2NHS	DTPA-BHMTA-D-(1,14)-2Glc(OH)
DTPA-D2-2Kyn	DTPA-BHMTA-D2-4Glc(15OH)(50Ac)
DTPA-BHMTA-D2-4Glc(13OH)(70Ac)	DTPA-BHMTA-D2-4Glc(11OH)(90Ac)
DTPA-BHMTA-D2-4Glc(10OH)(100Ac)	DTPA-BHMTA-D2-4Glc(6OH)(140Ac)
DTPA-XylDA-D2-2Glc(OH)	DTPA-D2-BDA(NH <sub>2</sub> )
DTPA-Sper-D2-2Glc(OH)	DTPA-D2-2ABThiaz
DTPA-2L-Trypt	DTPA-Sper-AsD1-2Glc(OH)
DTPA-D2-2BAEAmine	DTPA-BHMTA-D2-2Glc(OH)2HBA1d
DTPA-DETA-D2-2HBA1d	Gd-DTPA-Sper-AsD1-2Glc(OH)

### 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. 3-1-03 参照)。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、<sup>1</sup>H-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体（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。

加水分解触媒の塩基として水酸化ナトリウム (NaOH) を用いた場合は、糖の水酸基の保護基の酢酸エステルの加水分解と糖とリンカーとのアミド結合の加水分解が進行することが確認できた。ナトリウムメトキシド (NaOMe) を触媒として用いるとアミド結合の加水分解は遅く、酢酸エステルの加水分解もコントロールできる事が分かった。酢酸エステルの NaOMe 触媒下での加水分解では、反応条件を制御することにより水酸基 (OH) と酢酸エステル基 (OAc アセテート基) の比率を制御出来た。その加水分解成績体の OH:OAc を 15:5~6:14 に変化させて r1 値を測定したところ、両者の基の比率の中央値付近で極大を得た。しかし、これらの加水分解成績体の r1 値は 10 [s<sup>-1</sup>・mM<sup>-1</sup>] であり、DEN-OH の r1 値 (約 30 [s<sup>-1</sup>・mM<sup>-1</sup>]) には及ばなかった。(Fig. 3-1-01 及び 2-2-4 章参照)

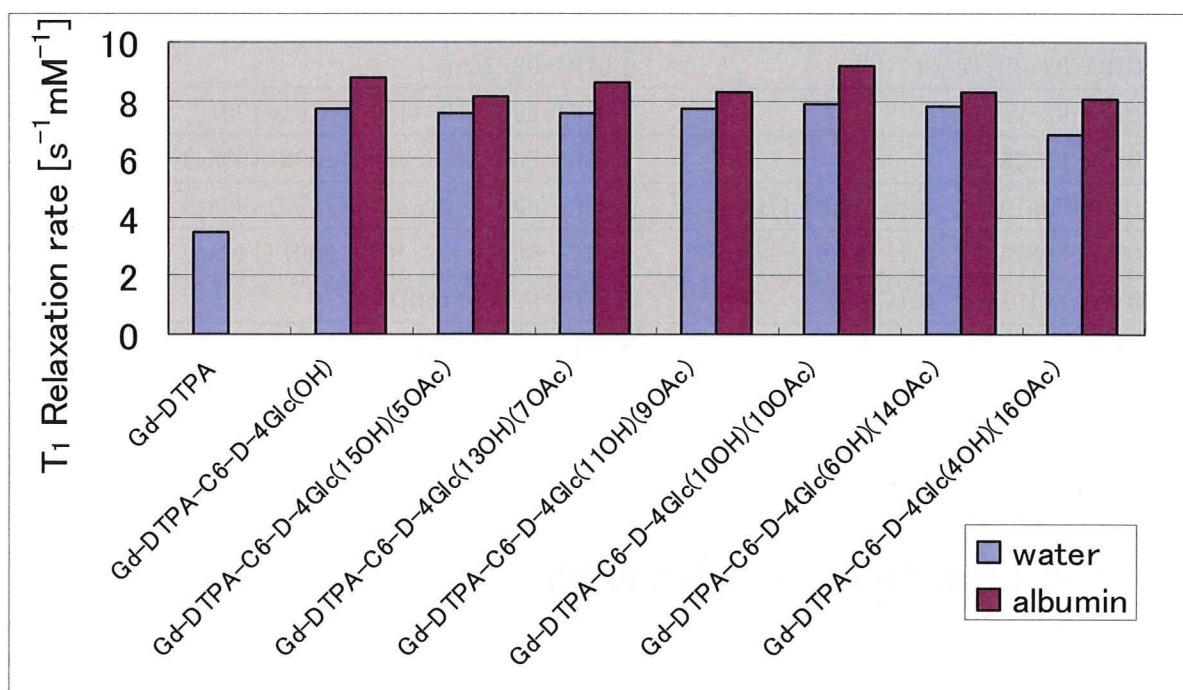


Fig. 3-1-01 r1 values of Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(nOH)(mOAc).

この結果から、DEN-OH は単純な加水分解成績体ではなく、糖及びアミド結合が加水分解して生成したアミノ基等の機能性残基が生体内成分 (特に、血液成分) を認識して、r1 値を増強していることが示唆される。

それ故、DEN-OH を生成する加水分解行程で生成する機能性残基、あるいは、生体内分子認識機能が高い残基を外殻に備えた配位子を非加水分解経路により化学合成する経路を研究した。(この加水分解経路の反応条件、生成物、r1 値等の詳細はサブチャプター2-4 を参照されたい。)

平成 19 年度～平成 21 年度の 3 年間の当該項目の研究成果としては、DEN-OH が最良の in vitro 及び in vivo 評価を与えた。DEN-OH を復刻する加水分解条件の詳細な検討、



DEN-OH の真の錯体の構造（立体構造を含めて）の検討等の研究の余地は今後に残ったが、DEN-OH は非常に優れた MRI 造影剤である。安全性試験結果に於いても問題が無く、今後は実用化に向けて当該研究のステージ 2～ステージ 3 へと進めて実用化・商品化を図る造影剤の第 1 位の候補である。

### 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 章の各論で述べる様に、構造解析の重要なデータは、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、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 造影剤の構造が支持された。

### 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<sup>®</sup>100 Resin を加え 6 時間攪拌した。その後、Xylenol orange 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化しなくなるまで Chelex<sup>®</sup>100 Resin による Gd(III) イオンの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 [ $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ ]

$T_1$ ; 縦緩和時間 [ms]

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

$[Gd^{3+}]$ ; Gd 濃度 [mM]

### 3-1-5 様々な Gd 錯体の評価 (Gd-DTPA をコアに持つシュガーボール dendリマー等の糖錯体及び非糖錯体)

#### (1) 非加水分解タイプの Gd-DTPA 誘導体の *in vitro* 評価・絞込み

3-1 及び 3-2 に示した様々な Gd-DTPA 錯体誘導体について、MRI 造影剤としての *in vitro* 及び *in vivo* 評価を行った。評価の結果は、それぞれの錯体の創製 (第 2 章) の各論に於いて記述されている。

ここでは、創製された数種の Gd-DTPA 錯体誘導体を比較できるデータを収集し、その結果を議論する。先ず、20 種類余の Gd-DTPA 錯体誘導体の *in vitro* 評価結果を Fig. 3-1-02 に示す。この図から、新規な方法により調製した Gd-DTPA-D2-Glc(OH) (小川サンプル) ( $r_1 =$  約 10 [ $1/s \cdot mM$ ]) はマグネビスト ( $r_1 =$  約 3.5 [ $1/s \cdot mM$ ]) の約 3 倍

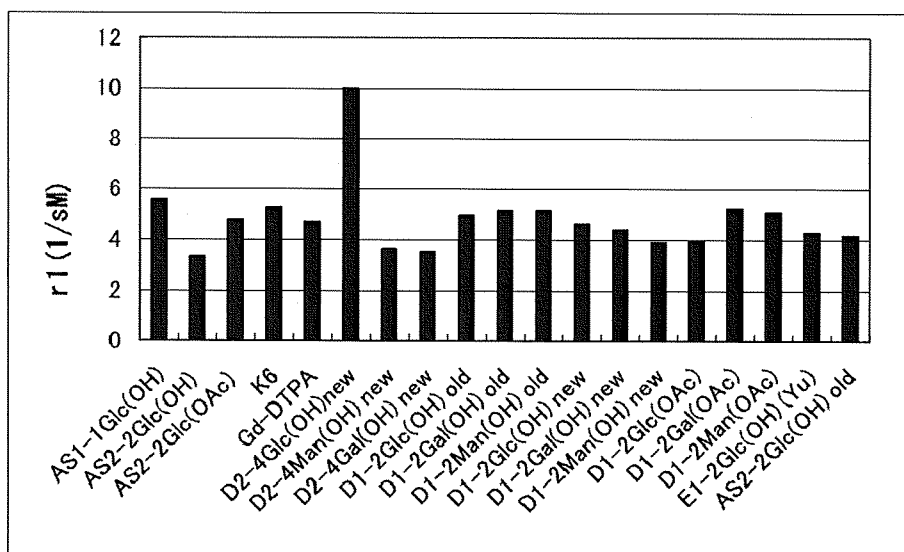


Fig. 3-1-02  $r_1$  values for various Gd-DTPA complex derivatives obtained by *in vitro* evaluation.

の緩和率を示すことが分かる。尚、この Gd-DTPA 錯体誘導体 (A サンプル) は、安全性試験をパスしている。

更に、Gd-DTPA、Gd-DTPA-D1-C2-Glc(OH) および新規な Gd-DTPA 錯体誘導体 W、X、Y、Z (構造は特許の関係で非開示) を比較すると、X、Y、Z は更に優れた緩和率 ( $r_1 =$  約 10~13[1/sM]) を示すことが判明した (Fig. 3-1-03)。

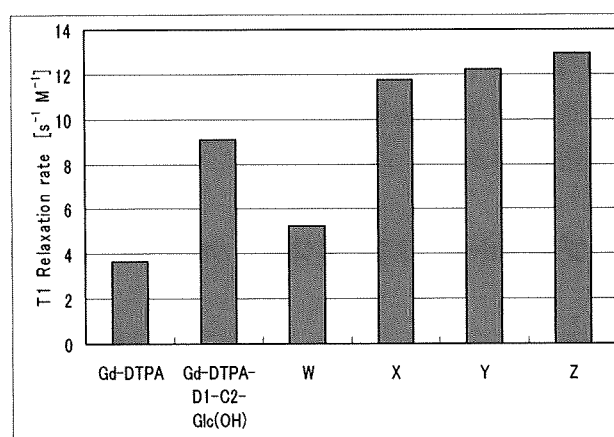


Fig. 3-1-03  $r_1$  values for various Gd-DTPA complex derivatives obtained by *in vitro* evaluation.

平成 21 年度は、加水分解ルートにより DEN-OH を開発した事に対する詳細な検討を行うと並行して非加水分解ルートにより DEN-OH と同等以上の造影剤の開発を目指した研究を行った。分子設計ソフト Molecular Operating Biology (MOE) による Docking Simulation を使って、入手可能な化合物の中でアルブミン等の生体機能性物質との相互作用の大きな化合物を探索した。MOE 筆筒区の結果から候補化合物を数点に絞り、数点に絞った候補化合物を DTPA に導入した配位子を調製し、更に Gd 錯体を誘導した。Thyronine の場合は、 $r_1$  値が水中の場合とアルブミンの場合とでは後者の媒体中で前者の媒体中の  $r_1$  値の 2 倍上の MRI シグナル増強効果が期待される新しい知見が得られた。また、抗体等との反応性に富む NHS (N-hydroxysuccinic imide) を配位子の DTPA に導入した。Kynurenine の場合は、水中に於いてもアルブミン中に於いても高い  $r_1$  値を得た。これらの配位子は、スペーサーを経ることなく直接にコア部の Gd-DTPA と MOE の結果から高い効果が期待される機能性残基を直接に結合させた分子であるが、スペーサーを仲介するあるいは、糖との複合化を行えば、更に大きな  $r_1$  値が期待できる。

リンカー部分のメチレン鎖を長くする効果、芳香族基をターミナルあるいはリンカー一部に導入する効果、ターミナル部として糖とその他の機能性残基と複合化する効果、等を探究した。*p*-Xylylenediamine をリンカーとしたグルコース誘導体を配位子として調製した Gd-DTPA 錯体は  $r_1$  値が約 20 [ $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ ] と大きな値であった。また、Gd-DTPA-BHMTA-D2-4Glc(OH) の  $r_1$  値約 20 [ $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ ] であった。これらの新規な MRI 造影剤の調製と評価については、対応する夫々の章(2 章のサブチャプター: 2-1~2-12)を参照願いたい。

これらの結果から、DEN-OH 以外にも、優れた分子設計により、Gd-DTPA の約 20 倍の造影効果が期待される Gd-DTPA 錯体として *p*-Xylylenediamine をリンカーとしたグルコース誘導体を配位子として調製した Gd-DTPA 錯体 (Gd-DTPA-Xy1DA-D-2G1c(OH)) は  $r_1$  値が約  $20 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$  と大きな値であった。また、Gd-DTPA-BHMTA-D2-4G1c(OH) の  $r_1$  値も約  $20 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$  と大きく、これらの Gd-DTPA 錯体誘導体が非加水分ルートで開発された MRI 造影剤として今後の研究を推進する際の第 1 位の候補となる。第 2 位の候補としては、 $r_1$  値が  $15 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$  程度の数種の Gd-DTPA 錯体誘導体が候補となる。これらの Gd-DTPA 錯体誘導体は  $r_1$  値が Gd-DTPA 錯体自身の  $3.5 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$  の 10 倍には及ばないものの十分な造影効果があるので、今後の第 2 ステージ～第 3 ステージに繋がる研究のターゲット化合物あるいはリーディング化合物となることが期待される。

## (2) 加水分解タイプの Gd-DTPA 誘導体の *in vitro* 評価および *in vivo* 評価・絞込み

特筆すべき加水分解タイプのカテゴリーに属する (i) 鎖式、(ii) 対称型あるいは非対称型、(iii) 糖誘導体、(iv) 加水分解経路の Gd-DTPA 糖誘導体 DEN-OH の *in vitro* 評価および *in vivo* 評価結果を以下に示す。

*In vitro* 評価では、Fig. 3-1-04 に示す様に、DEN-OH は Gd-DTPA の約 10 倍の  $r_1$  の計測値を示した。

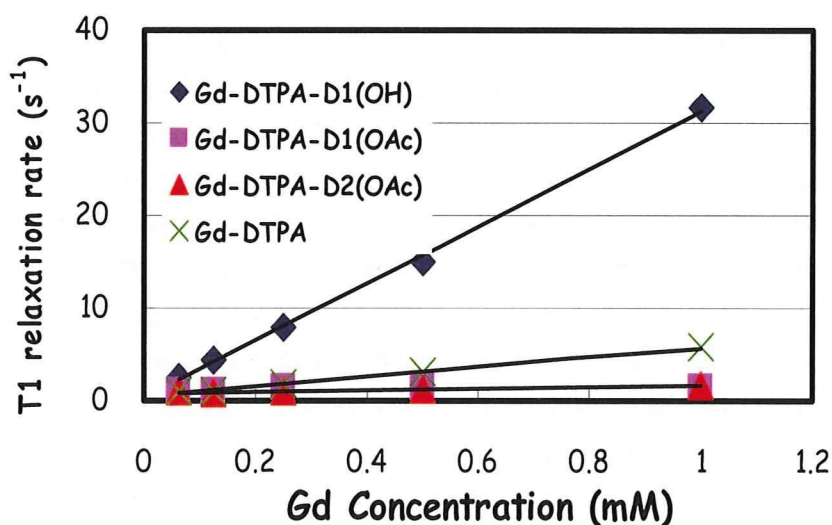


Fig. 3-1-04 Relaxation rate vs. [Gd] concn.

また、DEN-OH は血管貯留性に優れていることが示された (Fig. 3-1-05)。DEN-OH は血管貯留性に優れている故に血管造影 (Magnetic Resonance Angiography: MRA) に於いても広い Imaging Window を示した (Fig. 3-1-06)。この結果は、血管造影に於いては、Single dose で十分に良好な MRA 画像が得られることを示している。

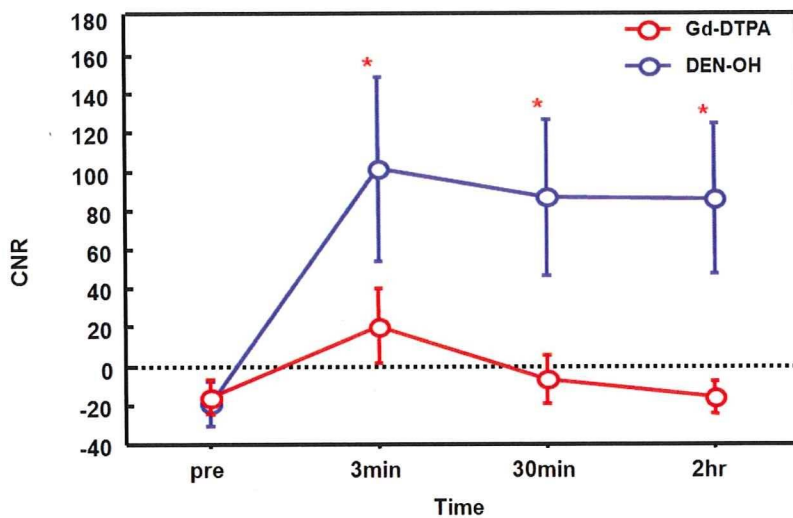


Fig. 3-1-05 Time course changes of CNR (Lesion basis) for DEN-OH compared with Gd-DTPA.

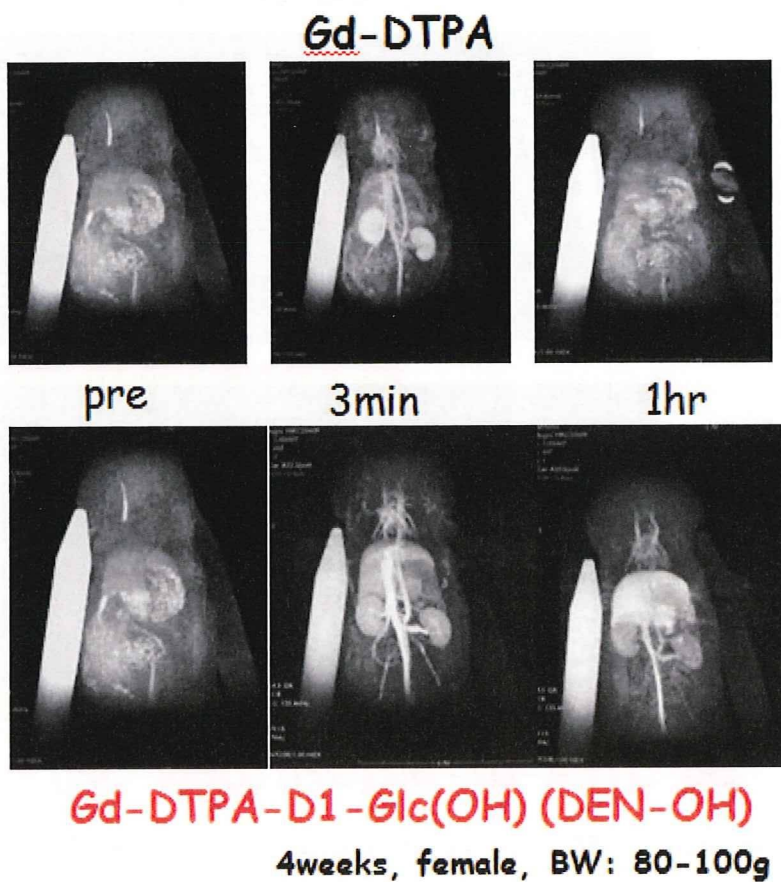


Fig. 3-1-06 MRI for blood vessel of rat.

DEN-OH を使って、ラットの肝細胞がんのMRIによる描出を行った。そのプロトコールを Fig. 3-1-07 に示す。また、肝細胞がんのMRI画像を Fig. 3-1-08 に示す。

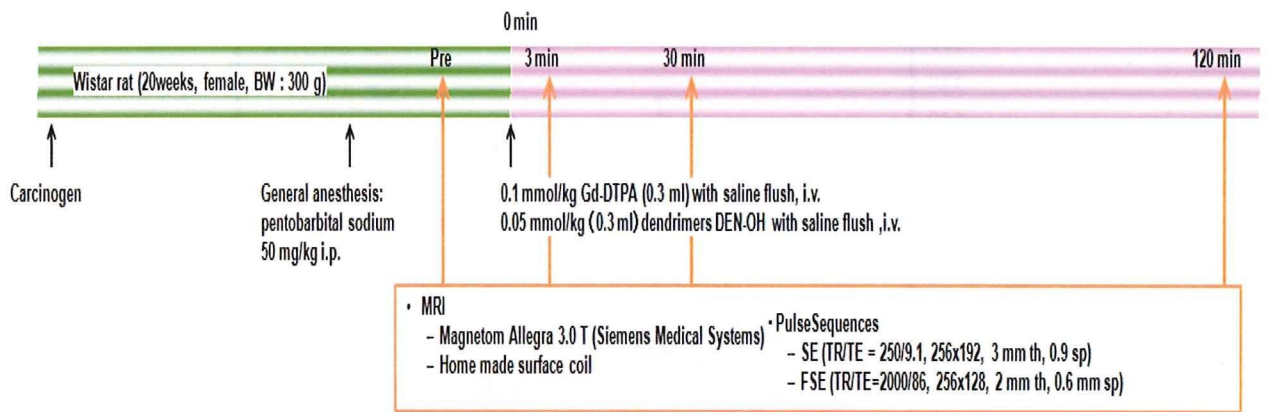


Fig. 3-1-07 Protocol for *in vivo* evaluation experiment of rat with MRI contrast agent DEN-OH.

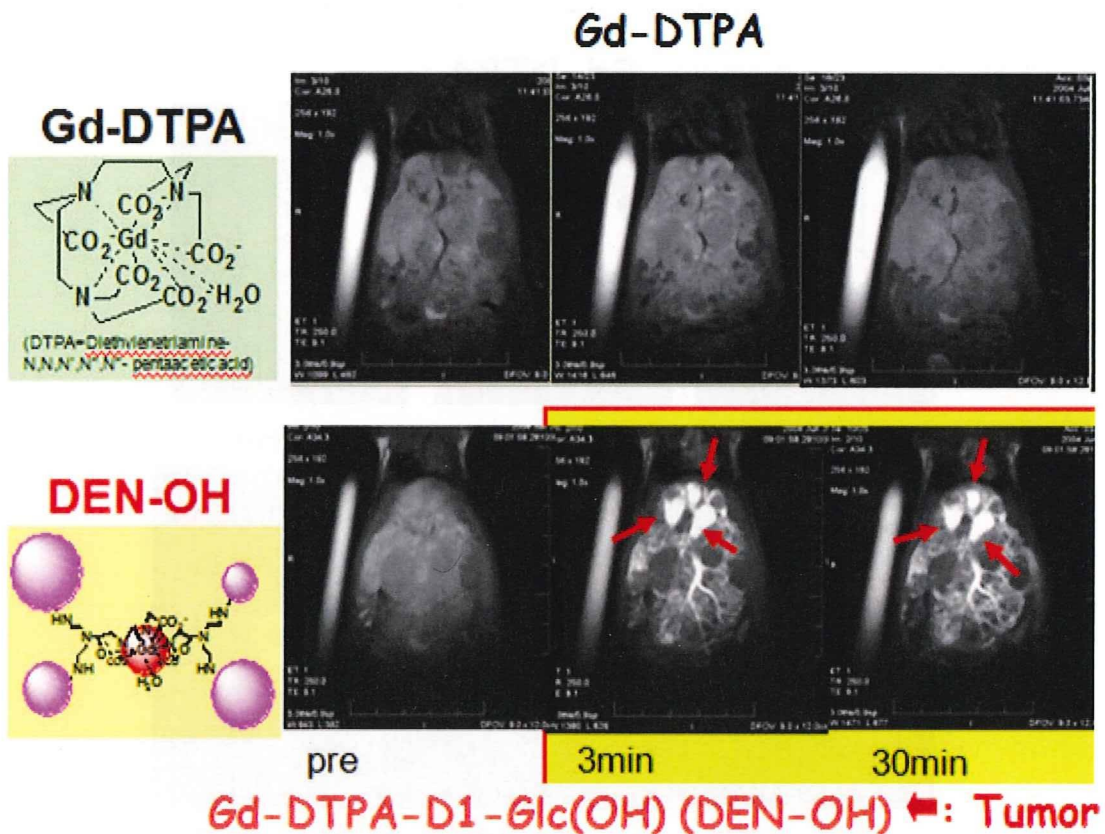


Fig. 3-1-08 MRI for liver tumour of a rat with DEN-OH.

DEN-OH を用いた血管造影、がん造影の他の利用例として、腹腔内出血の描出の例を Fig. 3-1-09 に示す。

患者の QOL 改善の為の医療技術として、内視鏡や腹腔鏡による観察の他、内視鏡や腹腔鏡による手技あるいは処置が従来技術としての外科的手術に代わって、しばしば

行われている。このような手技あるいは処置の際に、内視鏡等の狭い視野故に、手技後の出血を見過ごす危険性がある。このような手技の際に、術後に腹腔内出血を容易に描出できることは非常に大切な技術である。



### ラットの腹腔内出血 のMR画像

Fig. 3-1-09 MRI for “Intraabdominal Hemorrhage” of a rat with DEN-OH.

Fig. 3-1-09 の腹腔内出血の MRI 画像は、QOL を改善する医療技術としての腹腔鏡による手技の安全性を高めるサポート技術として当該の造影剤は非常に価値が高いことを示している。

## 3-2 ガドリニウム錯体の蛍光分析

田中 康隆

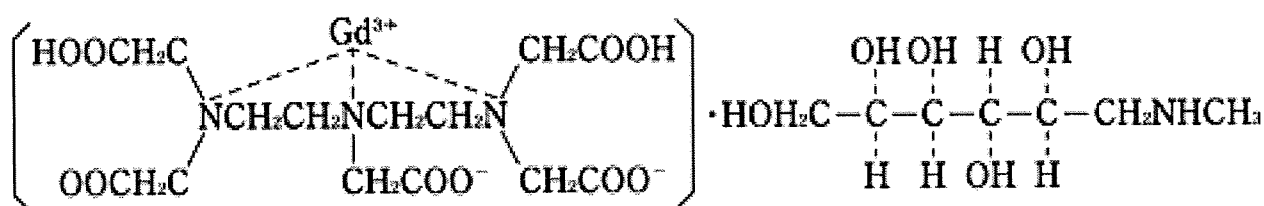
本研究プロジェクトでは多数の新規ガドリニウム錯体の合成と評価を行う。このため高効率で高感度な試料中のガドリニウムの定性および定量分析が必要となる。定量分析によるガドリニウム錯体の純度検定は、*in vivo*での投与量に直接結びつく事から必須な過程である。本プロジェクトではICP（誘導結合プラズマ）発光分析装置を導入し、ppm から ppb オーダーでのガドリニウムの定性および定量を行っている。このICP発光分析に加え、さらに簡便に短時間に数多くのガドリニウムの分析を行うため、希土類が有する蛍光特性に着目し蛍光分光分析の可能性を調査した。蛍光分析は非破壊分析であり、試料を溶液とするだけで簡便に定性および定量が可能な分析方法である。ここでは最初にガドリニウム錯体が実際に蛍光で定量分析が行えるかどうかの検討を行った。昨年度の検討で以下の事が判明した。

1. 希土類元素の中で発光しない「非蛍光グループ」に分類される  $Gd^{3+}$  であるが、 $GdCl_3$  を用いた発光実験で、さらに発光しにくいとされる水媒体中でも強く蛍光を発する事が判明した。これは解説書や教科書の記述と全く異なる実験結果である。
2. 希土類発光の特徴である大きなストークスシフト (Stokes shift) を示した。励起波長 272 nm で約 622 nm に発光極大を有する蛍光を与える。ストークスシフトは実に 350 nm である。希土類蛍光錯体では一般的に配位子が励起光により励起され、エネルギー移動ののち希土類金属イオンの励起状態から基底状態への遷移に伴って発光するため、ストークスシフトが非常に大きく 250 nm 以上であるのが普通である。しかし昨年度の実験では配位子を持たない  $GdCl_3$  においても、このような大きなストークスシフトが観測され、これは初めての例である。通常有機蛍光色素の励起スペクトルと発光スペクトルは一部重なっており、通常鏡面对称のような関係にある。そのため励起極大波長と発光極大波長の差 (ストークスシフト) は数十 nm で、励起-発光スペクトル間には大きな重なりがあるのが一般的である。このため、希土類は有機蛍光色素に見られるような濃度消光 (自己消光) をほとんど受けず、さらに蛍光測定をする際に励起光に由来する散乱光 (レイリー散乱、ラマン散乱) の影響を受けにくいという利点がある事から定量の指標として適している。
3. これも希土類発光の特徴であるが、 $Gd^{3+}$  の発光ピークは極めてシャープであった。昨年度観測した  $GdCl_3$  の水溶液の 622 nm の蛍光の半値幅は 3 nm 以下であった。通常希土類の発光ピークの半値幅が約 10-20 nm である。例えば、約 615 nm におけるユウロピウムの蛍光スペクトルは非常にシャープであり、蛍光放射のエネルギーがほとんど  $615 \pm 10$  nm の波長範囲に集中している。 $Gd^{3+}$  の発光ピークはさらにこれよりシャープである事が分かった。このようなシャープなピークを持つことは、蛍光量子収率が低くても特定波長での発光強度はブロードな発光スペクトルを持つ有機蛍光色素に比べて大きくなり、より検出しやすいという利点になる。

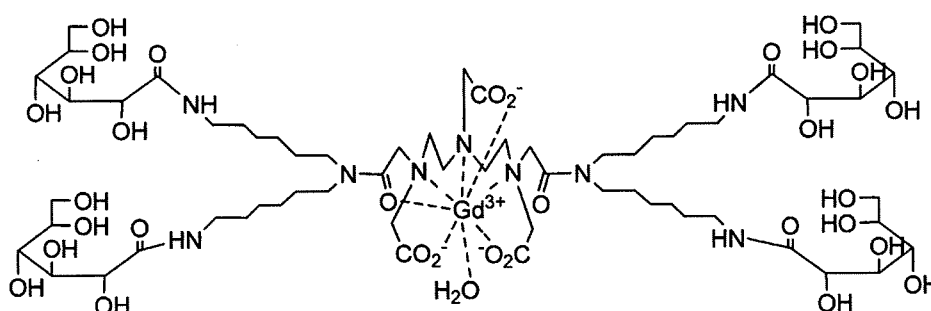


4. 蛍光発光であるので当然であるが、広い濃度範囲でガドリニウムイオンイオンの濃度と蛍光強度が、Lambert Beer の式に従い比例関係にあることから定量性が証明された。定量性が確認された濃度範囲は、 $1 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{M}$  である。

以上の結果を受けて本年度は配位子を有する  $\text{Gd}^{3+}$  錯体でも蛍光が観測でき、定量分析に蛍光分析を応用できるかどうかを検討した。用いた  $\text{Gd}^{3+}$  錯体は市販のマグネビスト (1) (ガドペンテト酸メグルミン (Meglumine Gadopentetate)) と本プロジェクトで合成した  $\text{Gd}^{3+}$  錯体 (2) ( $\text{Gd(III)-DTPA-HMTA-D2-4Glu(OH)}$ ) である。化学構造式を以下に示した。



マグネビスト (1) (ガドペンテト酸メグルミン (Meglumine Gadopentetate))



$\text{Gd(III)-DTPA-HMTA-D2-4Glu(OH)}$  (2)

### 3-2-1 $\text{Gd(III)}$ 錯体 (1, 2) の吸収スペクトルおよび励起スペクトル

#### (1) $\text{Gd(III)}$ 錯体 (1, 2) の吸収スペクトル

1 mmol/l のマグネビスト (1) 水溶液を調整し吸収スペクトルを測定した。同様に濃度未知の 2 の水溶液を調整し吸収スペクトルを測定した。結果を Fig. 3-2-01 に示す。 $\text{GdCl}_3$  の水溶液は約 275 nm に吸収極大が存在する。1 の水溶液に関しては希薄なため図から判別するのは困難だが倍率を上げることで約 275 nm のほぼ同じ波長に吸収極大を確認した。一方 2 は 256 nm 付近に吸収極大が観測される。これは 2 が有する糖置換基に由来する吸収と考えられる。吸収スペクトルから  $\text{Gd}^{3+}$  錯体 1 および 2 の配位子は紫外-可視領域に強い吸収帯を持っていない事が分かる。これは 1 と 2 の配位子には強い発色団は含まれない事から、ある程度予測できる結果である。

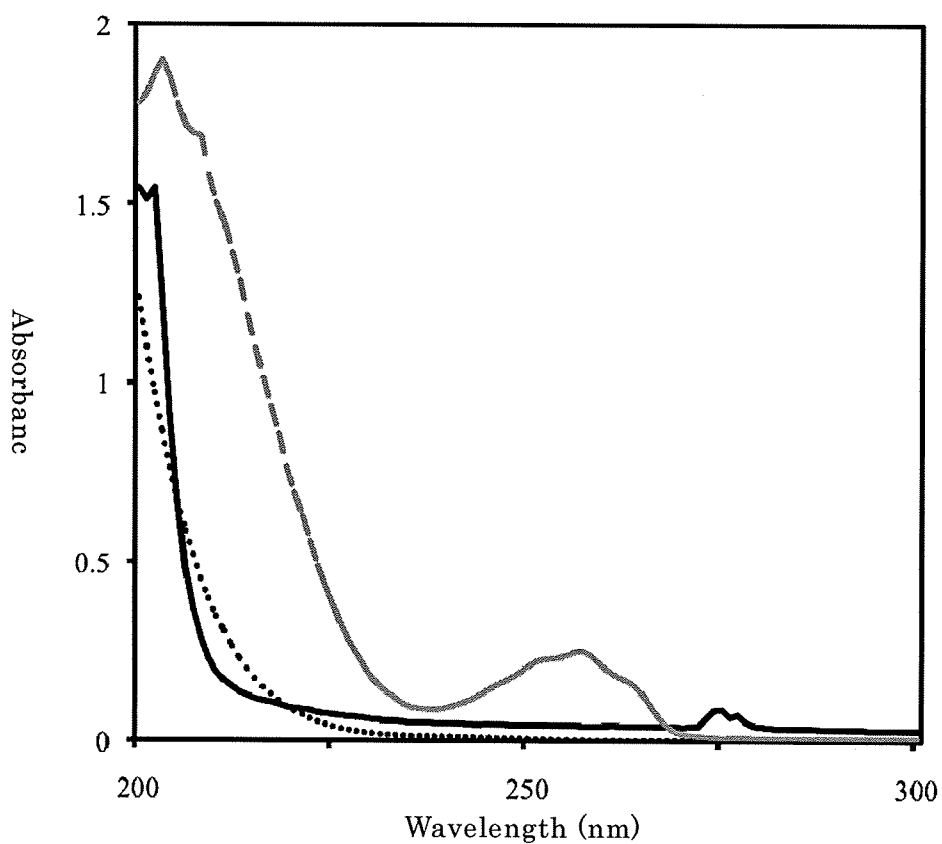


Fig. 3-2-01 水中での吸収スペクトル.  $GdCl_3$ …実線, 1…点線, 2…破線.

(2)  $Gd(III)$ 錯体 (1, 2) の励起スペクトル

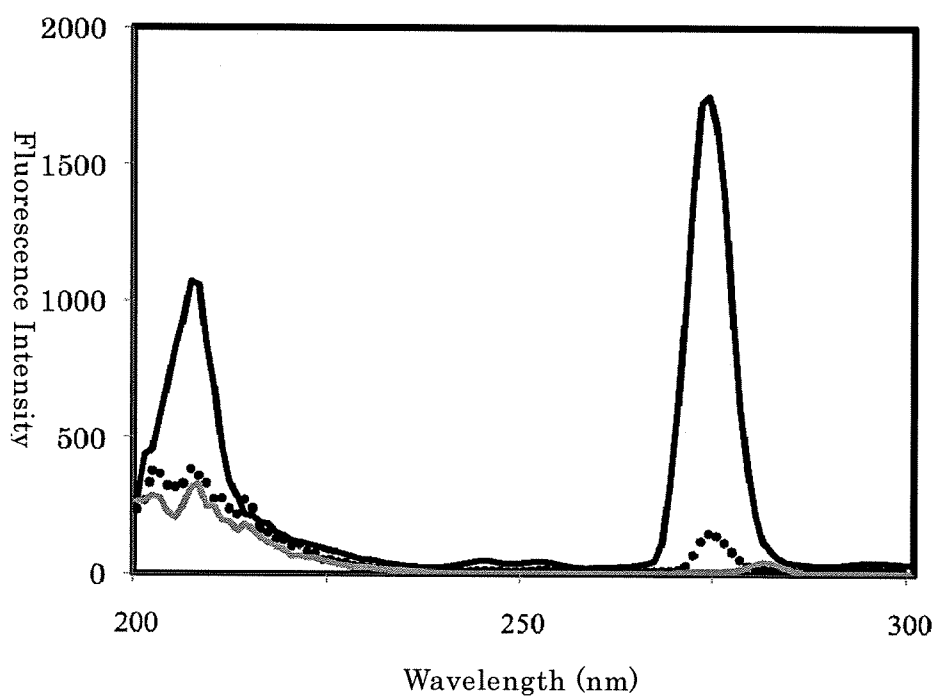


Fig. 3-2-02 水中での蛍光励起スペクトル.  $GdCl_3$ …実線, 1…点線, 2…灰色

1 mmol/l のマグネビスト (1) 水溶液を調整し、622 nm に対する蛍光励起スペクトルを測定した。同様に濃度未知の 2 の水溶液を調整し蛍光励起スペクトルを測定した。結果を Fig. 3-2-02 に示す。1 は  $\text{GdCl}_3$  の水溶液の蛍光励起スペクトルと同様に、約 275 nm の励起光を照射した時に 622 nm の光が一番強く放出される事が分かった。この事は一般的な希土類錯体の発光過程である、(1) 配位子の光吸収による励起一重項状態 ( $S_1$ ) への遷移 → (2) 励起三重項状態 ( $T_1$ ) への項間交差 → (3) 配位子の励起三重項状態 ( $T_1$ ) から希土類イオンへの励起状態 ( $^5D$ ) にエネルギー移動 → (4) イオンの励起状態から基底状態 ( $^7F$ ) に戻る時に蛍光発光、という過程を経るのではなく、希土類イオンが直接光励起され励起状態 ( $^5D$ ) をとり基底状態 ( $^7F$ ) に戻る際の蛍光発光と考えられる。一方 2 では約 280 nm の励起光を照射した時に 622 nm の光が一番強く放出される事が分かった。吸収スペクトルでは吸収極大が、 $\text{GdCl}_3 \rightarrow 2$  と変化する事で短波長シフト (275 → 256 nm) したが、蛍光励起スペクトルは長波長シフト (273 → 281 nm) が観測された。一般的には吸収スペクトルと蛍光励起スペクトルはほぼ一致するが、これは 2 の配位子が有する糖置換基の吸収は Gd イオンの励起には関わっていない事を示唆している。これらの結果から、1 と 2 の配位子は光励起過程に関与していないと考えられ、今回の  $\text{Gd}^{3+}$  錯体系は配位子の有無にかかわらず、同様の操作で定量分析が行える可能性を示唆している。

### 3-2-2 Gd(III)錯体 (1, 2) の蛍光スペクトル

#### (1) Gd(III)錯体 (1, 2) の蛍光スペクトル

1 mmol/l のマグネビスト (1) 水溶液を調整し、272 nm の光で励起し蛍光スペクトルを測定した。同様に濃度未知の 2 の水溶液を調整し蛍光スペクトルを測定した。結果を Fig. 3-2-03 に示す。

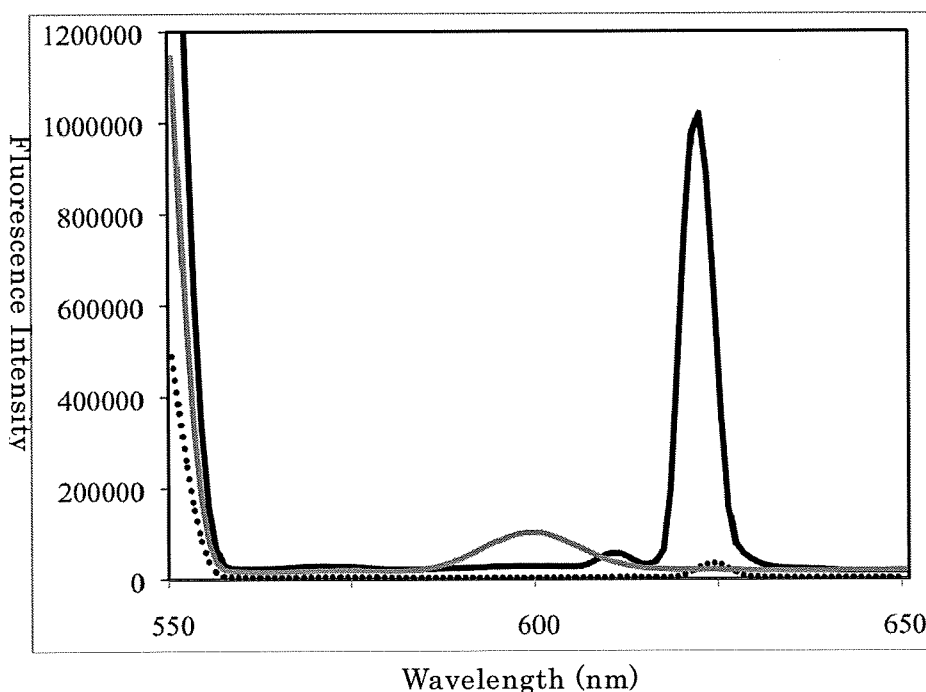


Fig. 3-2-03 水中での蛍光スペクトル.  $\text{GdCl}_3$ …実線, 1…点線, 2…灰色線.

Fig. 3-2-03 から、 $\text{GdCl}_3$  と **1** はほぼ同じ波長 (622 nm) で蛍光発光するのに対して、**2** ではこれより短波長で蛍光発光している事が明らかとなった。これも配位子の構造の違いに影響を受けていると考えられるが、光励起過程に配位子の励起は含まれていないと考えられる。以上の結果より配位子の有無にかかわらず、Gd イオンは 270 nm 付近の波長の光で直接励起され励起状態 ( $^5\text{D}$ ) をとり、蛍光を発しながら基底状態 ( $^7\text{F}$ ) に戻ると結論できる。つまり、配位子の有無に関係なく蛍光による定量分析が可能である事を明らかにした。先述したが Gd イオンは「蛍光は殆どない。水中では特に蛍光は観測されない。」とされているにもかかわらず定量の指標となる蛍光を観測し、一般的な希土類イオンの光励起過程とは異なり、Gd イオンを直接光励起できる事も明らかにした。