



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105008402 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201480009911. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 21

*C08B 37/08*(2006. 01)

*A61B 5/00*(2006. 01)

(30) 优先权数据

2013-033633 2013. 02. 22 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/054990 2014. 02. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/129674 EN 2014. 08. 28

(71) 申请人 佳能株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 三木康嗣 井上达广 小林靖人

中野克哉 大江浩一 山内文生

矢野哲哉 南昌人

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 石宝忠

权利要求书7页 说明书38页 附图23页

(54) 发明名称

近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括其的光学成像用造影剂

(57) 摘要

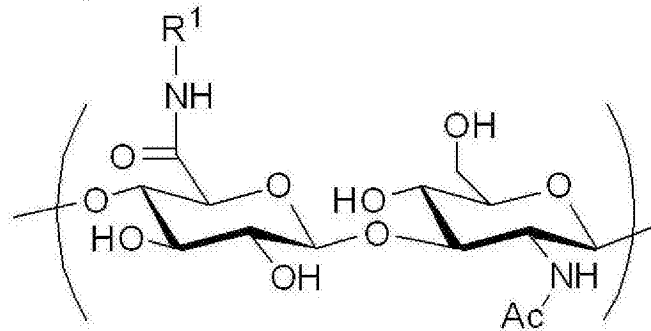
本发明提供具有高 ICG 含量的化合物,其在肿瘤中具有高积累性并且具有大强度的从肿瘤中发出的光声信号,即使给药后经过一段时间。具体地,本发明提供使聚乙二醇和 ICG 衍生物与其结合的透明质酸衍生物。

1. 化合物,包括由各自由下述通式 (1) 表示的单元形成的聚合物,其中:

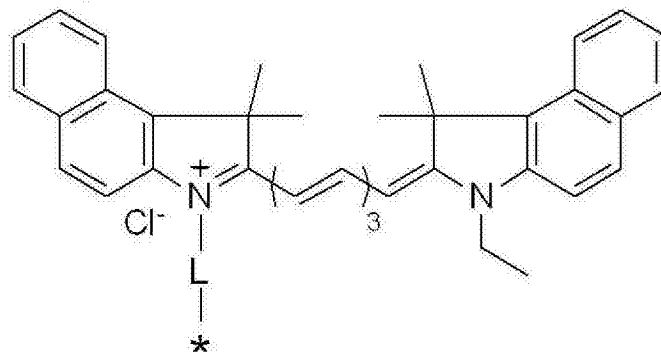
R<sup>1</sup>在通式 (1) 中的单元与单元之间彼此独立;和

该聚合物含有至少一个具有下述通式 (2) 和下述通式 (25) 中的一者作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元和至少一个具有下述通式 (3) 作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元:

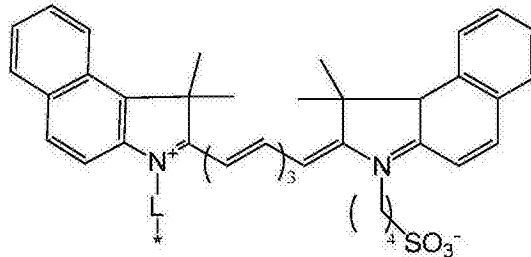
通式 (1)



通式 (2)



通式 (25)



通式 (3)



条件是:通式 (2)、通式 (3) 和通式 (25) 中,L 表示单元与单元之间彼此独立的连接基,和 \* 表示与通式 (1) 中 N 的结合位置;和通式 (3) 中,R<sup>2</sup>表示 H、OH、OMe、NH<sub>2</sub>和 COOH 的任一个,和 k 表示 20-200 的整数。

2. 根据权利要求 1 的化合物,其中聚合物中的各自具有通式 (2) 和通式 (25) 中的一者作为 R<sup>1</sup>的单元数用 x 表示并且聚合物中的全部单元数用 N 表示时,x 和 N 满足由下式 (1) 表示的关系:

$$0.13 < x/N \leq 0.78 \quad \text{式 (1)}。$$

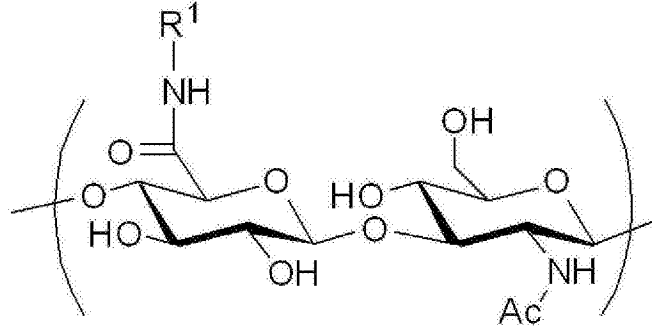
3. 化合物,包括由各自由下述通式 (1) 表示的单元形成的聚合物,其中:

R<sup>1</sup>在通式(1)中的单元与单元之间彼此独立；

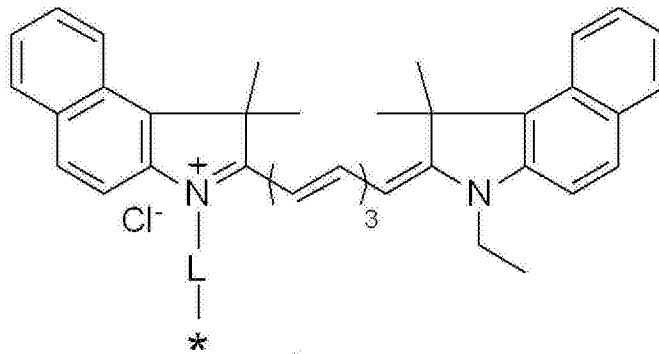
R<sup>1</sup>选自由下述通式(2)-(5)、下述通式(25)和下述通式(29)组成的组；和

该聚合物含有至少一个具有通式(2)和通式(25)中的一者作为R<sup>1</sup>的单元和至少一个具有通式(3)作为R<sup>1</sup>的单元：

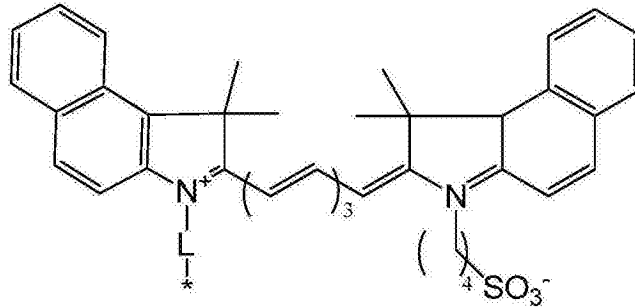
通式(1)



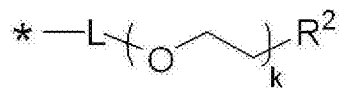
通式(2)



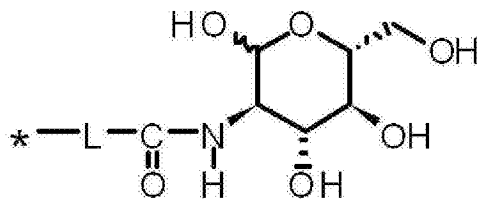
通式(25)



通式(3)



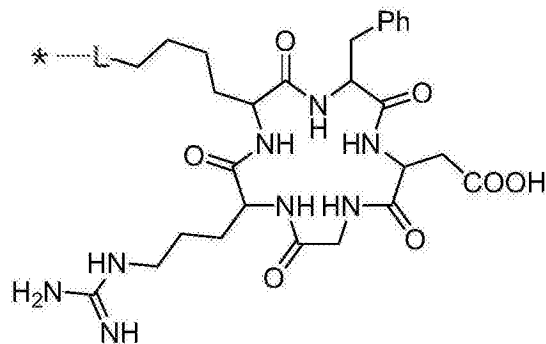
通式(4)



通式(5)

\* -L-R<sup>3</sup>

通式 (29)



条件是：通式 (2)–(5)、通式 (25) 和通式 (29) 中，L 表示单元与单元之间彼此独立的连接基，和 \* 表示与通式 (1) 中 N 的结合位置；和通式 (3) 中，R<sup>2</sup> 表示 H、OH、OMe、NH<sub>2</sub> 和 COOH 的任一个，和 k 表示 20–200 的整数；和通式 (5) 中，R<sup>3</sup> 表示 N<sub>3</sub>、H、CH<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、SH 和 COOH 的任一个。

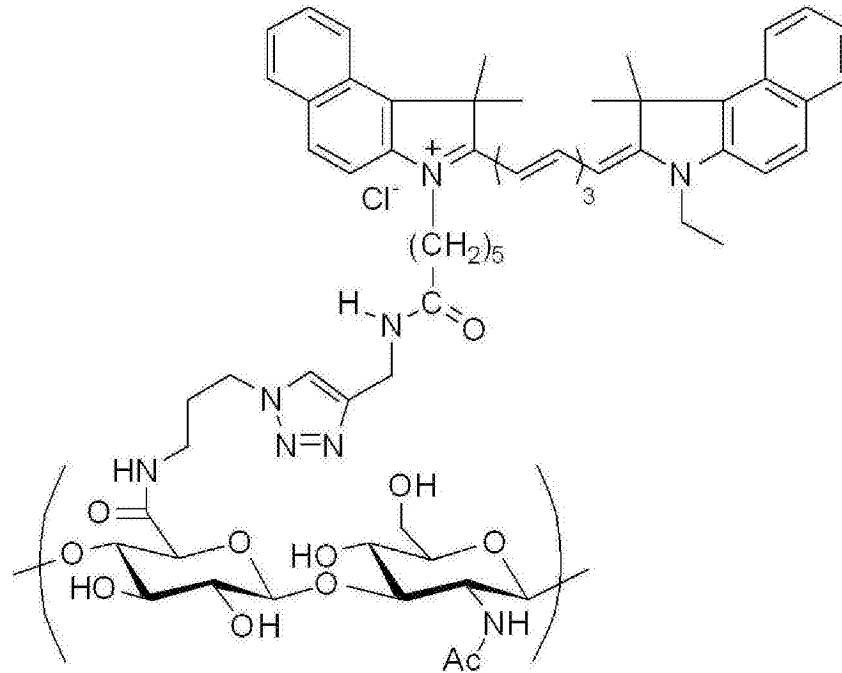
4. 根据权利要求 3 的化合物，其中聚合物中的各自具有通式 (2) 和通式 (25) 中的一者作为 R<sup>1</sup> 的单元数用 x 表示，聚合物中的各自具有通式 (3) 作为 R<sup>1</sup> 的单元数用 y 表示，并且聚合物中的各自具有通式 (4) 和通式 (29) 中的一者作为 R<sup>1</sup> 的单元数用 z 表示时，x、y 和 z 满足由下式 (2) 表示的关系：

$$0.13 < x / (x + y + z) \leq 0.78 \quad \text{式 (2)}。$$

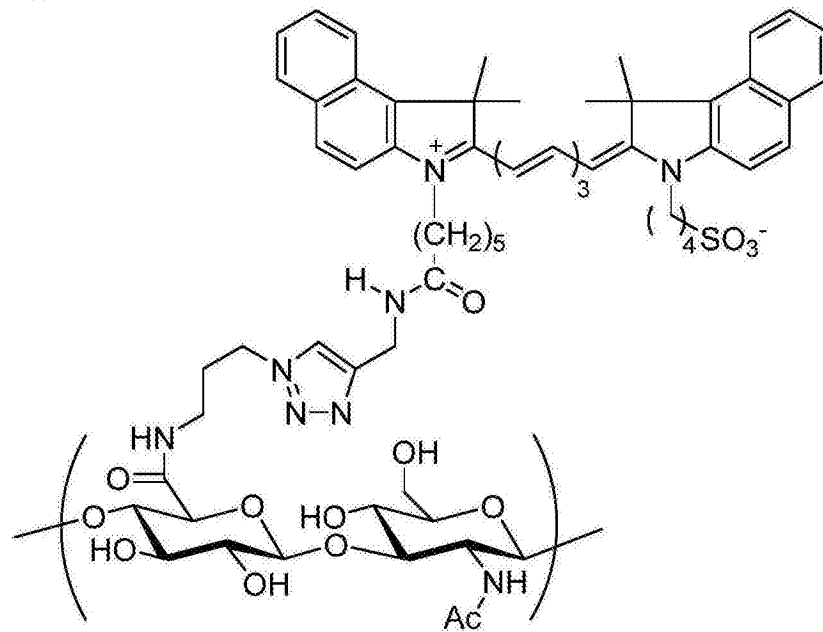
5. 根据权利要求 3 或 4 的化合物，其中该聚合物含有至少一个具有通式 (4) 和通式 (29) 中的一者作为 R<sup>1</sup> 的单元。

6. 化合物，包括由各自由下述通式 (6)–(9)、下述通式 (28) 和下述通式 (30) 的任一个表示的单元形成的聚合物，其中该聚合物含有至少一个由通式 (6) 和通式 (28) 中的一者表示的单元和至少一个由通式 (7) 表示的单元，

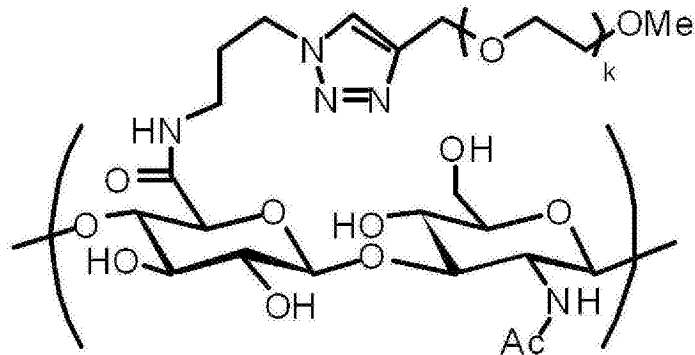
通式(6)



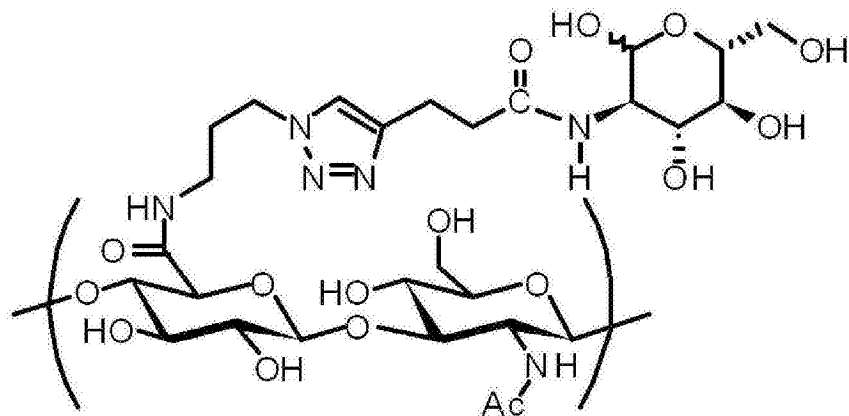
通式(28)



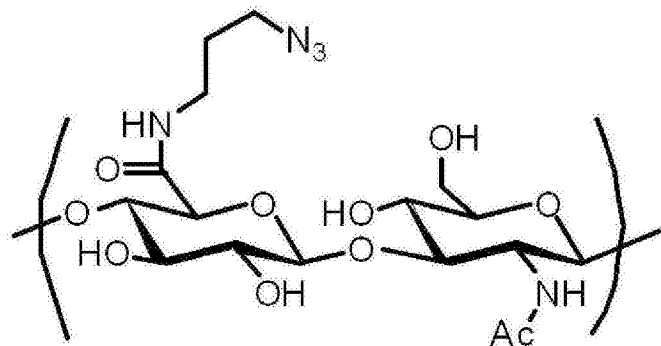
通式 (7)



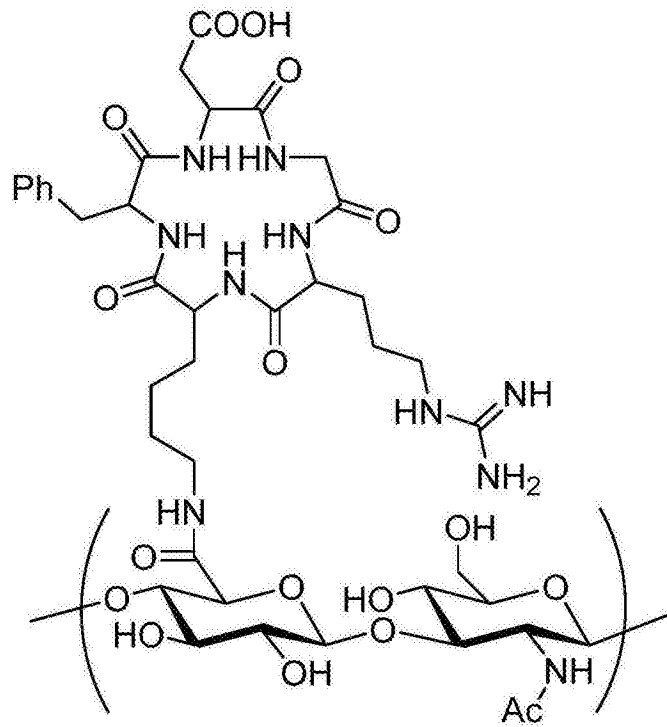
通式 (8)



通式 (9)



通式 (30)



7. 根据权利要求6的化合物,其中该聚合物中各自由通式(6)和通式(28)中的一者表示的单元数用 $x$ 表示,该聚合物中各自由通式(7)表示的单元数用 $y$ 表示,并且该聚合物中各自由通式(8)、(9)和(30)中的一者表示的单元数用 $z$ 表示时, $x$ 、 $y$ 和 $z$ 满足由下式(2)表示的关系:

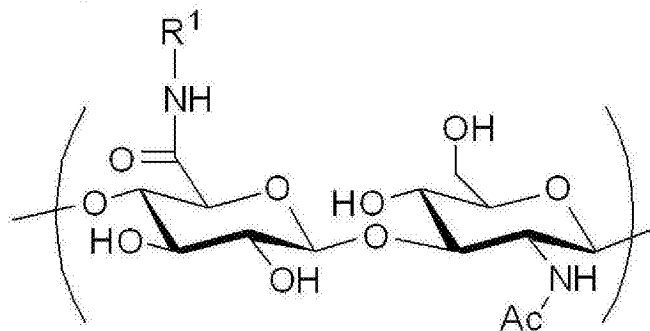
$$0.13 < x/(x+y+z) \leq 0.78 \quad \text{式(2)}。$$

8. 化合物,包括由各自由通式(1)表示的单元形成的聚合物作为主链,其中:

$R^1$ 在单元与单元之间彼此独立;和

该化合物结合有 ICG 类似物和两亲性分子中的一者作为  $R^1$ :

### 通式(1)



条件是:各自具有 ICG 类似物作为  $R^1$  的单元数用  $x$  表示并且该聚合物中的全部单元数用  $N$  表示时,  $x$  和  $N$  满足由下式(1)表示的关系:

$$0.13 < x/N \leq 0.78 \quad \text{式(1)}。$$

9. 颗粒,包括根据权利要求1-8的任一项的化合物。

10. 光声成像用造影剂,包括:

根据权利要求1-8的任一项的化合物;和

分散介质。

11. 根据权利要求 9 的颗粒,其中该颗粒具有 10nm-180nm 的平均颗粒直径。
12. 光声成像用造影剂,包括:  
根据权利要求 9 的颗粒 ;和  
该颗粒的分散介质。
13. 透明质酸衍生物的制备方法,包括在两亲性分子的存在下使 ICG 衍生物与透明质酸彼此反应。
14. 根据权利要求 13 的透明质酸衍生物的制备方法,其中该两亲性分子包括聚乙二醇。

## 近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括其的光学成像用造影剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括该透明质酸衍生物的光学成像用造影剂。

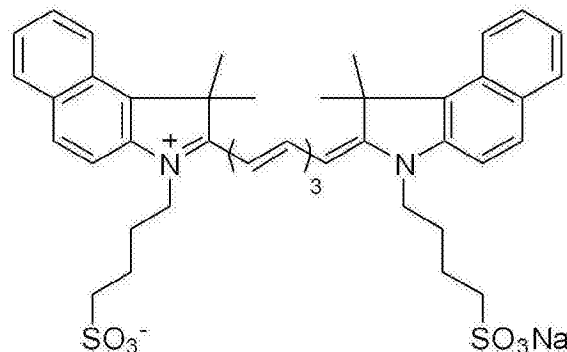
### 背景技术

[0002] 作为一种用于将活体的内部的信息可视化的装置,已知光声断层照相(以下有时简称为“PAT”)装置。包括使用该 PAT 装置的测定中,对用光照射待测定的物体时由在待测定的物体中吸收光的物质(光吸收剂)发出的光声信号的强度和产生信号的时间点进行测定,由此能够得到其中对待测定的物体中的物质分布进行操作的图像。

[0003] 只要光吸收剂在活体中吸收光以发出声波,能够将任何光吸收剂用作光吸收剂。例如,人体中血管或恶性肿瘤能够用作光吸收剂。此外,能够将分子例如吲哚花青绿(以下有时简称为“ICG”)给药于物体以用作造影剂。ICG 能够适合用作 PAT 装置中的造影剂,原因在于对人体给药时 ICG 具有小的影响,而且吸收对活体具有高透过性的近红外波长区域中的光。应指出地是,本文中使用的术语“ICG”是指由下述结构表示的化合物。

[0004] 通式(10)

[0005]



[0006] 应指出地是,抗衡离子可不是  $\text{Na}^+$  并且能够使用任意的抗衡离子例如  $\text{H}^+$  或  $\text{K}^+$ 。

[0007] 此外,由于该化合物吸收近红外光以发出近红外荧光,因此 ICG 已用于荧光成像。换言之,将 ICG 给药于待测定的物体,一段时间后,测定从外部用光照射该物体时由待测定的物体中吸收光的 ICG 发出的荧光信号,由此能够将待测定的物体中的 ICG 分布成像。例如,能够使前哨淋巴结可视化。

[0008] 但是,已知 ICG 在血液中的半衰期为约几分钟,这是极短的。

[0009] 鉴于上述内容,非专利文献 1 报道了如下实例,其中通过使上述的 ICG 的亲水性衍生物(ICG-OSu)与作为天然多糖的具有 40,000 的分子量的透明质酸结合以形成各自具有 188nm 的平均颗粒直径的纳米颗粒来进行淋巴结或肿瘤的荧光体内成像。该报道显示与 ICG 单独相比,该衍生物在血液中长期残留并且在淋巴结或肿瘤中积累。

[0010] 专利文献 1 报道了如下实例,其中通过使作为亲水性近红外色素的 IR783 与透明

质酸结合来进行淋巴结的荧光体内成像。

[0011] 专利文献 2 报道了已使荧光素共价结合的透明质酸衍生物,并且该衍生物已用于测定葡糖胺多糖降解酶的活性的方法。

[0012] 非专利文献 2 报道了通过使聚乙二醇(以下有时简称为“PEG”)与具有 2,500,000 的分子量的疏水化透明质酸结合而得到的透明质酸衍生物的纳米颗粒。此外,该文献报道了其中使 PEG 和亲水性近红外色素 Cy5.5 结合的疏水化透明质酸衍生物的纳米颗粒、通过使近红外色素与上述纳米颗粒共价结合而得到的纳米颗粒,并且报道了荧光体内成像的实例。

[0013] 引用列表

[0014] 专利文献

[0015] PTL 1 :US 专利申请公开 2008/0056999A

[0016] PTL 2 :日本专利申请公开 No. 2006-25625

[0017] PTL 3 :日本专利申请公开 No. 2009-155486

[0018] 非专利文献

[0019] NPL 1 :H. Mok,等,Chem. Commun.,48,第 8628-8630 页(2012)

[0020] NPL 2 :K. Y. Choi,等,Biomaterials,32,第 1880-1889 页(2011)

[0021] NPL 3 :T. Hirata,等,Bioorg. Med. Chem.,6,第 2179 页(1998)

[0022] NPL 4 :F. Palumbo,等,Carbohydrate Polym. 66,第 379 页(2006)

[0023] NPL 5 :M. H. Oudshoorn,等,Polymer,48,第 1915 页(2007)

[0024] NPL 6 :B. Carboni,等,M. J. Org. Chem.,58,第 3736 页(1993)

[0025] NPL 7 :K. Miki,等,Biomaterials,31,第 934 页(2010)

[0026] NPL 8 :M. Breidenbach,等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,107,第 3988 页(2010)

[0027] NPL 9 :G. Huerta-Angeles,等,Carbohydrate Polym.,84,第 1293 页(2011)

[0028] NPL 10 :G. Testa,等,Int. J. Pharm.,378,第 86 页(2009)

## 发明内容

[0029] 技术问题

[0030] 为了可以将该化合物以高灵敏性用作光学成像用造影剂,需要化合物的 ICG 含量高。化合物的 ICG 含量低时,被转运到目标组织的 ICG 的量减少并且造影灵敏性变得不足。结果,产生对将大量的含有 ICG 的化合物给药的需要。已需要具有高 ICG 含量的含有 ICG 的化合物以致病人不会承担过重的负担。此外,已希望含有 ICG 的化合物具有适度的在血液中的保持性并且能够高效率地达到目标组织例如肿瘤。

[0031] 非专利文献 1 中公开的含有亲水性 ICG 衍生物的化合物的 ICG 含量低达约 10%。此外,专利文献 1 中公开的含有亲水性 IR783 的透明质酸衍生物中导入的色素的比例未知并且未对该衍生物进行任何使用聚乙二醇的改性以使该衍生物在活体中稳定。专利文献 2 中公开的已结合有荧光素的透明质酸衍生物的情况下,由于荧光素不是近红外色素,因此难以高效地检测活体中存在的透明质酸衍生物。此外,相对于具有 40,000 的分子量的透明质酸,装载 20 当量的色素。因此,即使反应以 100%进行,色素含量也至多为 20%。

[0032] 此外,非专利文献 2 中公开的透明质酸衍生物的纳米颗粒已用聚乙二醇进行了改

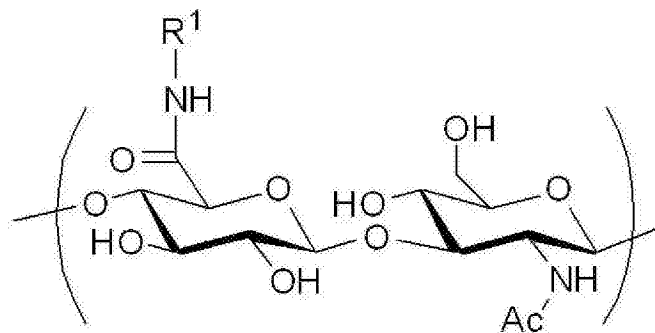
性,但导入色素的比例未知并且该文献没有公开任何有关其最佳值的内容。上述现有技术没有公开以高含量将近红外色素,例如 ICG 衍生物导入透明质酸的方法和分子设计以及用于改善其在血液中的保持性和肿瘤积累性的分子设计。

[0033] 问题的解决方案

[0034] 本发明提供透明质酸衍生物,包括由各自由下述通式 (1) 表示的单元形成的聚合物,其中:R<sup>1</sup>在通式 (1) 中的单元与单元之间彼此独立;和该聚合物含有至少一个具有下述通式 (2) 和下述通式 (25) 中的一者作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元,和/或至少一个具有下述通式 (3) 作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元:

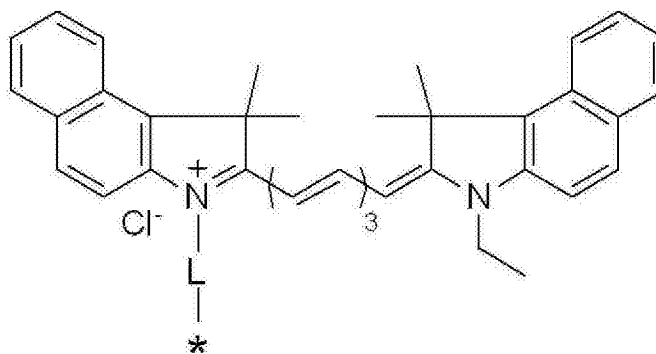
[0035] 通式 (1)

[0036]



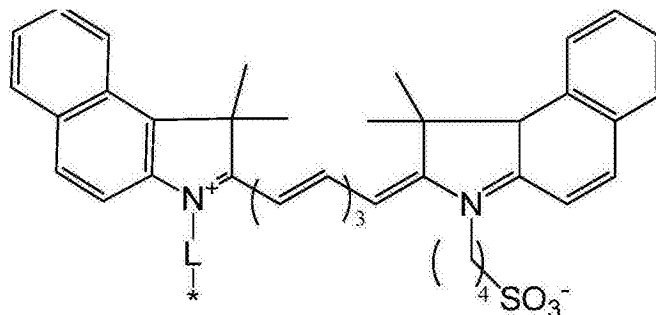
[0037] 通式 (2)

[0038]



[0039] 通式 (25)

[0040]



[0041] 通式 (3)

[0042]



[0043] 条件是：通式 (2)、通式 (3) 和通式 (25) 中，L 表示在单元与单元之间彼此独立的连接基，和 \* 表示与通式 (1) 中的 N 的结合位置；和通式 (3) 中，R<sup>2</sup> 表示 H、OH、OMe、NH<sub>2</sub> 和 COOH 的任一个，和 k 表示 20-200 的整数。

[0044] 由以下参照附图对例示实施方案的说明，本发明进一步的特征将变得清楚。

#### 附图说明

[0045] 图 1A 表示含有近红外色素的透明质酸衍生物的结构式，图 1B 表示发近红外光的化合物 ICG- 炔烃的合成路线，和图 1C 表示 ICG- 炔烃的 UV- 可见 - 近红外吸收光谱。

[0046] 图 2 表示透明质酸四丁基铵盐 HA-NBu<sub>4</sub> 的合成路线。

[0047] 图 3A 表示具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 的合成路线和图 3B 表示将具有叠氮基的胺导入透明质酸的路线。

[0048] 图 4A 表示只具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG 的合成路线，和图 4B 表示具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 1 的合成路线。

[0049] 图 5A 是表示颗粒直径与 ICG 含量之间的关系的关系的坐标图，和图 5B 是表示颗粒直径与透明质酸的分子量之间的关系的关系的坐标图。

[0050] 图 6 表示具有 ICG、PEG 和 GA 的透明质酸衍生物 2 的合成路线。

[0051] 图 7 是表示相对于其对小鼠的注射剂量、色素的残留率的坐标图。

[0052] 图 8A 是表示给药后 9 小时和 24 小时每个样品的 ICG 含量与血液中的色素残留率之间的关系的关系的坐标图，和图 8B 是表示给药后 9 小时和 24 小时每个样品的 PEG 含量与血液中的色素残留率之间的关系的关系的坐标图。

[0053] 图 9 表示透明质酸衍生物 1a、1b、1c、1h、1i、1k、1l、2a(GA)、2as(GAs)、2b(GA2)、2d(GA3) 和 2c(GA4) 的给药后 24 小时小鼠的荧光图像。

[0054] 图 10A 是表示给药后 24 小时小鼠肿瘤图像的 SNR 的坐标图和图 10B 是表示肿瘤积累性的坐标图。

[0055] 图 11 是表示每个样品的 PEG 含量和 ICG 含量与肿瘤积累性之间的关系的关系的坐标图。

[0056] 图 12 表示衍生物 3 (羧基的转化率大于 99%) 的 <sup>1</sup>H-NMR 图。

[0057] 图 13 表示衍生物 1a 的 <sup>1</sup>H-NMR 图。

[0058] 图 14 表示衍生物 2a(GA) 的 <sup>1</sup>H-NMR 图。

[0059] 图 15 表示透明质酸衍生物 1a 的水溶液的浓度与散射光的强度之间的关系。

[0060] 图 16A 表示衍生物 1a、1b、1c 和 2as(GAs) 和用于比较的 ICG 的吸收光谱和图 16B 表示在 790nm 的激光波长下衍生物 1a 的光声信号 (电压) 的时间变化谱。

[0061] 图 17 是表示用它们的吸光度归一化的本发明的化合物和用于比较的 ICG 的光声信号的强度的坐标图。

[0062] 图 18 表示本发明的化合物的透明质酸单元的表现分子量、与透明质酸结合的 ICG 衍生物数目、整个聚合物的分子量和 790nm 下透明质酸衍生物的吸收系数的汇总。

[0063] 图 19A 表示通过使用具有 5K 的分子量的透明质酸合成的透明质酸衍生物 1 和 2 的每个中的 cac 与 PEG 含量之间的关系，和图 19B 表示通过使用具有 8K 的分子量的透明质

酸合成的透明质酸衍生物 1 和 2 的每个中的 cac 与 PEG 含量之间的关系。

[0064] 图 20A 表示基于 TEM 观察的透明质酸衍生物 2b(GA2) 的颗粒直径分布,图 20B 表示透明质酸衍生物 2b(GA2) 的 TEM 观察图像,和图 20C 表示基于 TEM 观察的透明质酸衍生物 2e(GA5) 的颗粒直径分布。

[0065] 图 21A 表示含有具有磺酰基的近红外色素的透明质酸衍生物 4 的结构式,图 21B 表示近红外色素 ICG-S- 炔烃的合成路线,和图 21C 表示 ICG-S- 炔烃的 UV- 可见 - 近红外吸收光谱。

[0066] 图 22 表示具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4 的合成路线。

[0067] 图 23A 表示具有 PEG-5K 的含有近红外色素的透明质酸衍生物 5 的结构式和图 23B 表示 PEG-5K- 炔烃的合成路线。

[0068] 图 24A 表示具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物 5 的合成路线,和图 24B 表示具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物 6 的合成路线。

[0069] 图 25A 表示给药后 24 小时已将透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 给药于其的小鼠的荧光图像和图 25B 是表示给药后 24 小时已将透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 给药于其的小鼠的小鼠肿瘤图像的 SNR 的坐标图。

[0070] 图 26A 是表示透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 的血液中色素残留率与肿瘤积累性的坐标图,和图 26B 是表示透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 的光声信号的相对强度的坐标图。

[0071] 图 27 表示具有 ICG、PEG 和 RGD 的透明质酸衍生物 7(通式 (31)) 的合成路线。

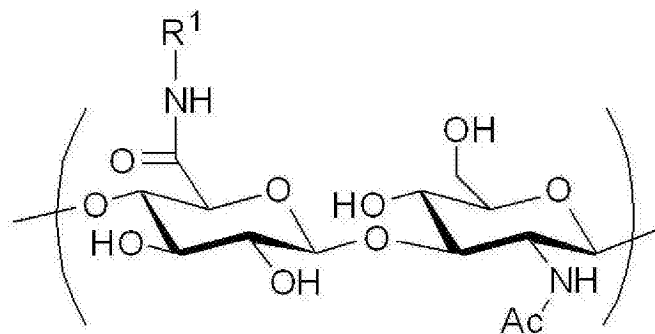
## 具体实施方式

[0072] 对本发明的实施方案进行说明。根据本实施方案的化合物具有下述结构,其中使 ICG 衍生物与具有 PEG 的透明质酸结合,并且通过连接分子使 PEG 和 ICG 衍生物各自与透明质酸的骨架的葡糖醛酸单元中存在的羧基结合。

[0073] 根据本发明的一个实施方案,提供透明质酸衍生物,包括由各自由下述通式 (1) 的表示的单元形成的聚合物,其中:R<sup>1</sup>在通式 (1) 中的单元与单元之间彼此独立;和该聚合物含有至少一个具有下述通式 (2) 或下述通式 (25) 作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元,和至少一个具有下述通式 (3) 作为通式 (1) 中的 R<sup>1</sup>的单元:

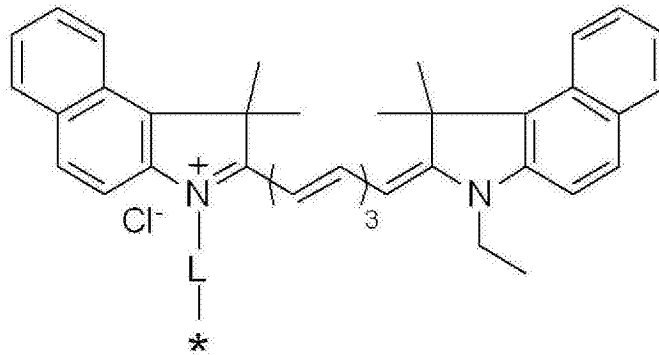
[0074] 通式 (1)

[0075]



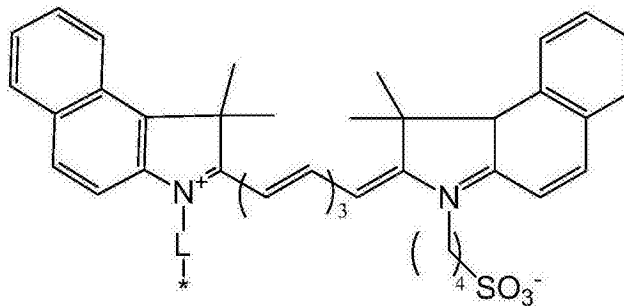
[0076] 通式 (2)

[0077]



[0078] 通式 (25)

[0079]



[0080] 通式 (3)

[0081]

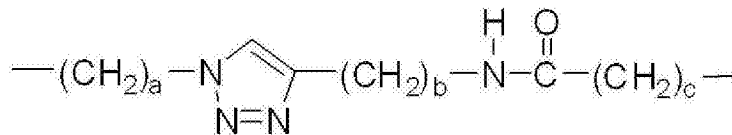


[0082] 条件是：通式 (2)、通式 (3) 和通式 (25) 中，L 表示在单元与单元之间彼此独立的连接基，和 \* 表示与通式 (1) 中的 N 的结合位置；和通式 (3) 中，R<sup>2</sup> 表示 H、OH、OMe、NH<sub>2</sub> 和 COOH 的任一个，和 k 表示 20-200 的整数。

[0083] 此外，通式 (2)、(3) 和 (25) 中的连接基 L 可彼此相同或不同。连接基 L 的实例包括可被取代的具有 1-10 个碳原子的直链或支化烷基、和由下述通式 (22)-(24) 表示的结构。烷基的取代基为例如具有 1-3 个碳原子的烷基、卤素原子、或氨基。

[0084] 通式 (22)

[0085]



[0086] 通式 (22) 中，a、b 和 c 各自独立地表示 1-10 的整数。

[0087] 通式 (23)

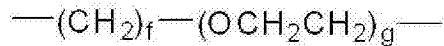
[0088]



[0089] 通式 (23) 中，d 和 e 各自独立地表示 1-10 的整数。

[0090] 通式 (24)

[0091]



[0092] 通式 (24) 中,  $f$  和  $g$  各自独立地表示 1-10 的整数。

[0093] 各自具有通式 (2) 或 (25) 作为  $R^1$  的单元数用  $x$  表示并且聚合物中的全部单元数用  $N$  表示时,  $x$  和  $N$  优选地满足由下式 (i) 表示的关系。

[0094]  $0.13 < x/N \leq 0.78$  式 (i)

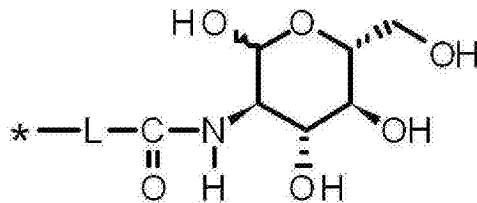
[0095] 此外, 各自具有通式 (3) 作为  $R^1$  的单元数用  $y$  表示并且聚合物中的全部单元数用  $N$  表示时,  $y$  和  $N$  优选地满足由下式 (iii) 表示的关系。

[0096]  $0.22 < y/N \leq 0.99$  式 (iii)

[0097] 根据本发明的另一实施方案, 提供透明质酸衍生物, 包括由各自由通式 (1) 表示的单元形成的聚合物, 其中:  $R^1$  在通式 (1) 中的单元与单元之间彼此独立;  $R^1$  选自由通式 (2)、(3) 和 (25) 以及下述通式 (4)、(5) 和 (29) 组成的组; 和该聚合物含有至少一个具有通式 (2) 或 (25) 作为  $R^1$  的单元, 和至少一个具有通式 (3) 作为  $R^1$  的单元:

[0098] 通式 (4)

[0099]

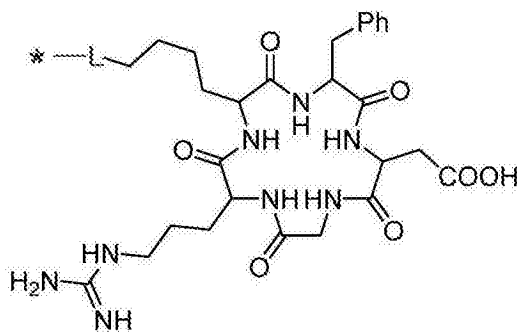


[0100] 通式 (5)

[0101]  $* -L-R^3$

[0102] 通式 (29)

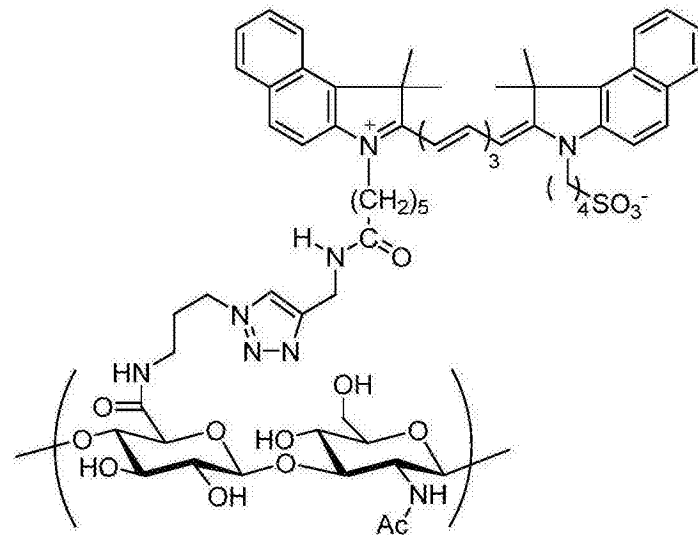
[0103]



[0104] 条件是: 通式 (2)-(5)、(25) 和 (29) 中,  $L$  表示单元与单元之间彼此独立的连接基, 和  $*$  表示与通式 (1) 中  $N$  的结合位置; 和通式 (3) 中,  $R^2$  表示  $H$ 、 $OH$ 、 $OMe$ 、 $NH_2$  和  $COOH$  的任一个, 和  $k$  表示 20-200 的整数; 和通式 (5) 中,  $R^3$  表示  $N_3$ 、 $H$ 、 $CH_3$ 、 $NH_2$ 、 $SH$  和  $COOH$  的任一个。通式 (2)-(5)、(25) 和 (29) 中的连接基  $L$  可以彼此相同或不同。连接基  $L$  的实例包括可被取代的具有 1-10 个碳原子的直链或支化烷基、和由通式 (22)-(24) 表示的结构。烷基的取代基为例如具有 1-3 个碳原子的烷基、卤素原子、或氨基。

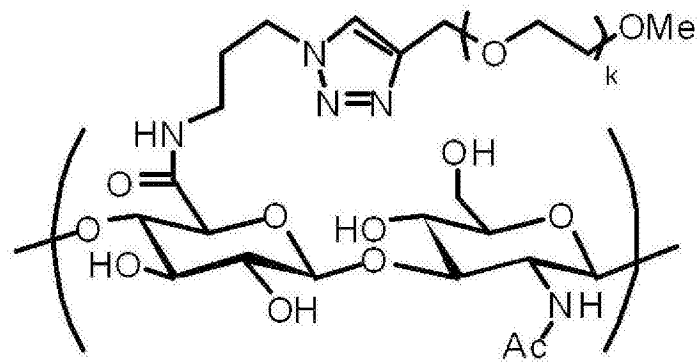
[0105] 进而, 根据本实施方案的透明质酸衍生物中, 各自具有通式 (2) 或 (25) 作为  $R^1$  的



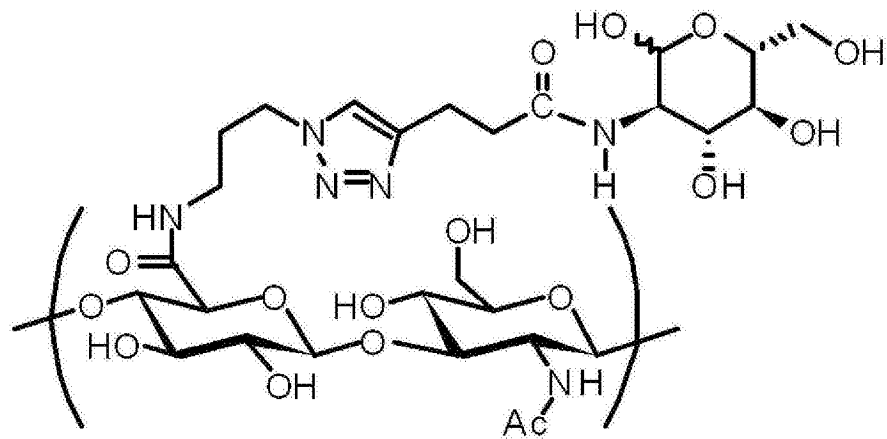


[0115] 通式 (7)

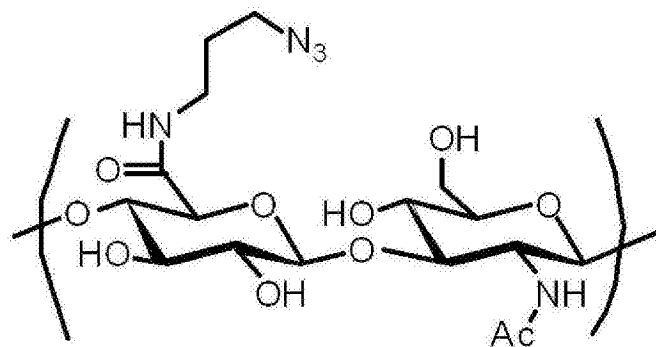
[0116]



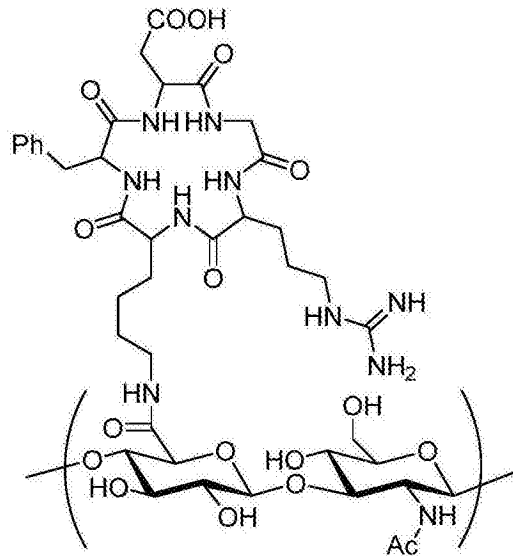
[0117] 通式 (8)



[0118] 通式 (9)



[0119] 通式 (30)



[0120] 此外, 聚合物中各自由通式 (6) 或 (28) 表示的单元数用  $x$  表示, 聚合物中各自由通式 (7) 表示的单元数用  $y$  表示, 并且聚合物中各自由通式 (8)、(9) 或 (30) 表示的单元数用  $z$  表示时,  $x$ 、 $y$  和  $z$  优选地满足由下式 (ii) 表示的关系。

[0121]  $0.13 < x / (x + y + z) \leq 0.78$  式 (ii)

[0122] 此外,  $x$ 、 $y$  和  $z$  优选地满足由下式 (iii) 表示的关系。

[0123]  $0.22 < y / (x + y + z) \leq 0.99$  式 (iii)

[0124] 根据本发明的又一实施方案, 提供透明质酸衍生物, 包括由各自由通式 (1) 表示的单元形成的聚合物作为主链, 其中:  $R^1$  在单元与单元之间彼此独立; 和该透明质酸衍生物结合有 ICG 类似物或两亲性分子作为  $R^1$ 。

[0125] 应指出地是, 各自具有 ICG 类似物作为  $R^1$  的单元数用  $x$  表示并且聚合物中的全部单元数用  $N$  表示时,  $x$  和  $N$  满足由下式 (1) 表示的关系。

[0126]  $0.13 < x / N \leq 0.78$  式 (1)

[0127] 本发明的实施方案包括: 颗粒, 其包括本发明的化合物; 光学成像用造影剂, 其包括本发明的化合物和分散介质; 和光造影剂, 其包括该颗粒和分散介质。尽管对颗粒的大小并无特别限制, 但其平均颗粒直径优选为 10nm-180nm, 更优选为 10nm-100nm。

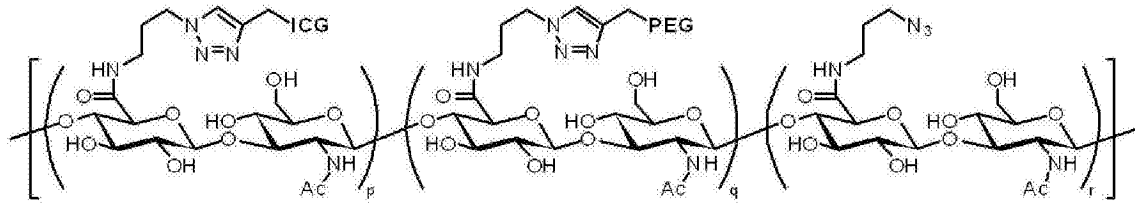
[0128] 根据本发明的实施方案的颗粒可以是这样的颗粒形状以致多个根据本发明的实施方案的化合物的分子聚集, 并且色素部分 (ICG 衍生物) 主要位于颗粒的内部且 PEG 部分主要位于颗粒的外部。

[0129] 以下通过具体例对有关本发明的实施方案的细节进行说明。

[0130] 作为本发明的实施方案的透明质酸衍生物的实例, 能够给出由通式 (11) 或 (12) 表示的化合物。

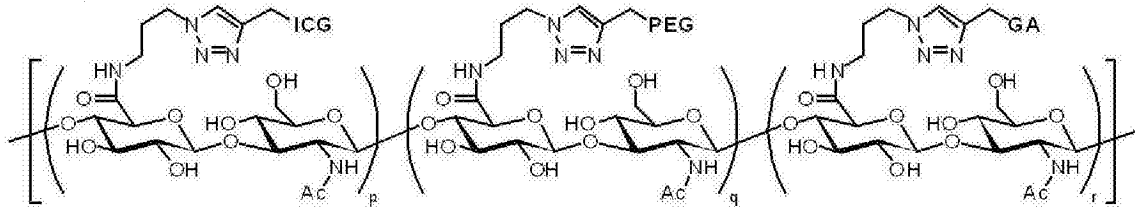
[0131] 通式 (11)

[0132]



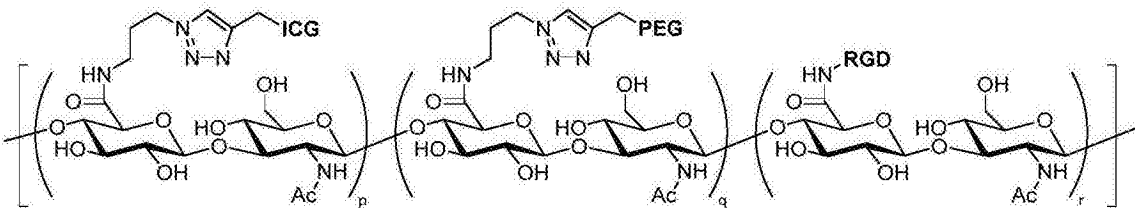
[0133] 通式 (12)

[0134]



[0135] 通式 (31)

[0136]



[0137] 通式 (11)、(12) 和 (31) 中, ICG、PEG 和 RGD 分别具有由下述通式 (13)、下述通式 (14) 和下述通式 (32) 表示的结构。式 (14) 中,  $k$  表示 20-200 的整数。

[0138] 式 (11) 中,  $p$  表示具有 ICG 的透明质酸单元的分率并且是大于 0 且小于 100 的值,  $q$  表示具有 PEG 的透明质酸单元的分率并且是大于 0 且小于 100 的值, 和  $r$  表示具有叠氮基的透明质酸单元的分率并且是 0 或者大于 0 且小于 100 的值。  $p$ 、 $q$  和  $r$  的合计为 100。

[0139] 即将  $x$ 、 $y$  和  $z$  的合计设为 100 时式 (ii) 中的  $x$ 、 $y$  和  $z$  的值为  $p$ 、 $q$  和  $r$ 。

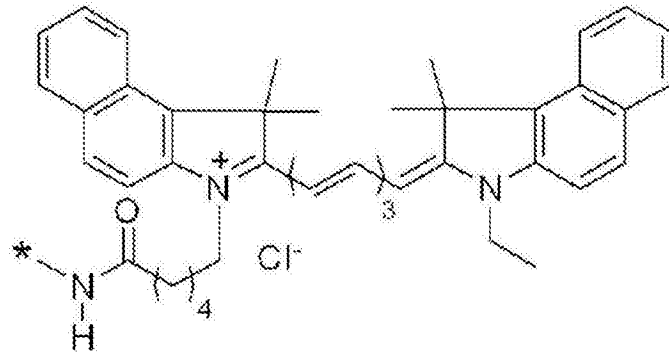
[0140] 通式 (12) 中, GA 是下述通式 (15)。

[0141] 通式 (31) 中, RGD 是下述通式 (32)。

[0142] 通式 (12) 中,  $p$  表示具有 ICG 的透明质酸单元的分率,  $q$  表示具有 PEG 的透明质酸单元的分率, 和  $r$  表示具有葡糖胺 (以下有时简称为“GA”) 基或者精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD)-肽 (RGD-肽) 的透明质酸单元的分率,  $p$ 、 $q$  和  $r$  各自为大于 0 且小于 100 的值, 并且  $p$ 、 $q$  和  $r$  的合计为 100。

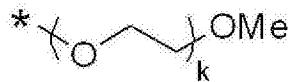
[0143] 通式 (13)

[0144]



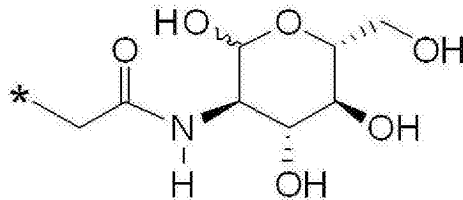
[0145] 通式 (14)

[0146]



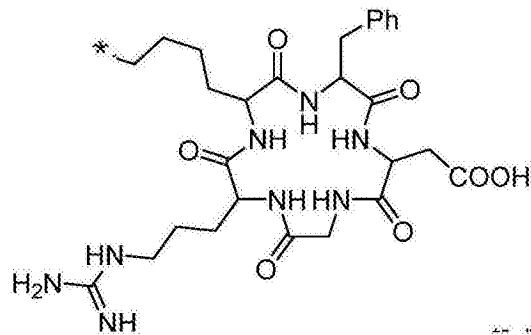
[0147] 通式 (15)

[0148]



[0149] 通式 (32)

[0150]



[0151] 根据本实施方案的化合物中,通式 (11)、(12) 和 (31) 的每个中的  $p$  优选为 3-78 的值,更优选为 10-40,特别优选为大于 13。

[0152] 根据本实施方案的化合物中,式 (11)、(12) 和 (31) 的每个中的  $q$  为 0-97,更优选为 20-90。如实施例所述,观察到下述倾向:随着 PEG 含量增加,在血液中的保持性改善。即,通过控制 ICG 含量和 PEG 含量,能够得到具有任意的在血液中的保持性的根据本发明的透明质酸衍生物。

[0153] (透明质酸)

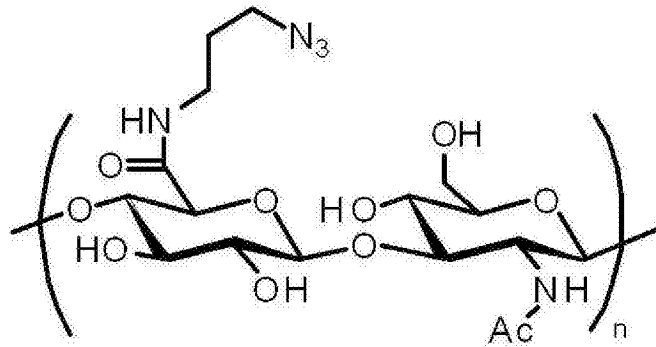
[0154] 根据本实施方案的化合物使用透明质酸作为其骨架。能够采用具有各种分子量的透明质酸,并且分子量优选落入 2,500-110,000、特别地 5,000-25,000 的范围内。50,000 以上的分子量导致高粘度或者在溶剂中的溶解度的减小,因此适合使用通过使透明质酸的分子量减小而得到的具有这样的分子量的透明质酸。从其合成的再现性的观点出发,特别

适合使用具有 5,000-8,000 的分子量的透明质酸。

[0155] 本发明中,为了可导入 ICG 或 PEG,对透明质酸进行改性。通过使具有叠氮基的连接分子与透明质酸的包括羧基的葡糖醛酸部分结合,能够得到由下述通式 (16) 表示的具有叠氮基的透明质酸衍生物。

[0156] 通式 (16)

[0157]

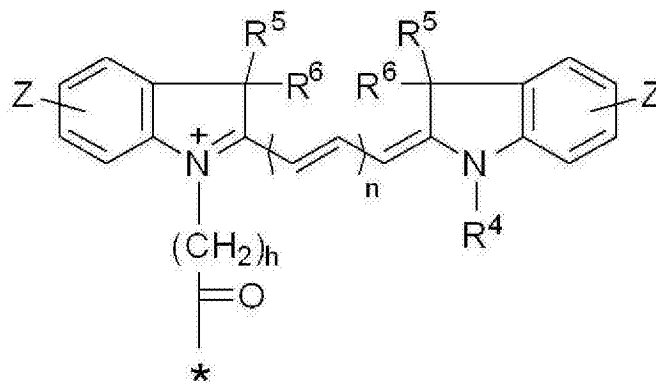


[0158] (ICG 衍生物)

[0159] 根据本实施方案的化合物中,使 ICG 衍生物与透明质酸结合。说明书中,作为近红外色素的 ICG 衍生物是指三羰花青系化合物。本实施方案中,三羰花青系化合物的结构由例如通式 (17) 表示。

[0160] 通式 (17)

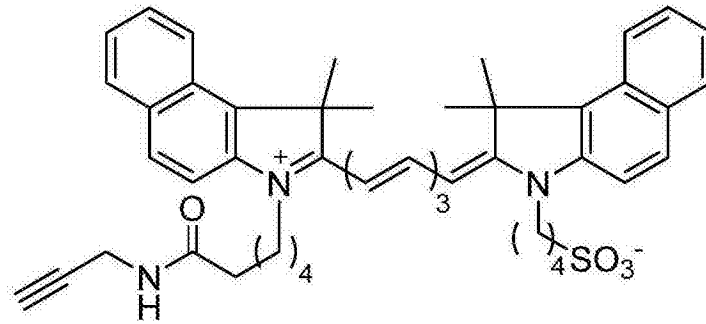
[0161]



[0162] 通式 (17) 中,Z 表示氢原子或磺基,或者与和 Z 键合的咪唑环一起形成由苯并 [e] 咪唑环、苯并 [f] 咪唑环或苯并 [g] 咪唑环形成的环状芳族环,并且该环状芳族环的氢原子可被具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 1-10 个碳原子的烷氧基或磺基取代。尽管对通式 (17) 中的 \* 结合的结构并无特别限制,但其实例为在由下述通式 (18) 或下述通式 (19) 表示的结构的位置与氮结合的结构。

[0163] 通式 (17) 中, $R^4$  表示具有 1-10 个碳原子的烷基和  $-(CH_2)_i-SO_3$  ( $i$  表示 1-10 的整数的任一个) 的任一个。 $R^4$  表示烷基时,可含有卤素离子或有机酸离子作为抗衡离子。 $R^5$  和  $R^6$  各自独立地表示氢原子、具有 1-10 个碳原子的烷基、具有 1-10 个碳原子的烷氧基、 $-(CH_2)_i-SO_3$  ( $i$  表示 1-10 的整数的任一个) 和  $-(CH_2)_i-SO_3X$  ( $i$  表示 1-10 的整数的任一个,并且 X 表示钠、钾、铵、三乙基铵、赖氨酸和精氨酸的任一个) 的任一个。通式 (13) 中, $h$  表示 1-10 的整数的任一个。通式 (17) 中, $n$  表示 3。



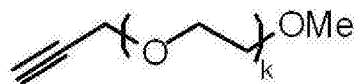


[0174] (PEG)

[0175] 根据本实施方案的化合物中,使 PEG 与透明质酸结合。用于制备根据本实施方案的化合物的 PEG 是水溶性聚合物并且显示效果例如蛋白质的血清半衰期的增加或免疫原性的降低。本实施方案中,具有炔烃的 PEG 衍生物能够用于 PEG 与具有叠氮基的透明质酸衍生物的结合。例如,能够使用由下述通式 (20) 表示的化合物。尽管通式 (20) 中的 k 表示 PEG 的重复单元数并且并无特别限制,但能够使用其 k 落入 20-1,000 的范围内的化合物。k 特别优选为约 50-125。换言之,优选具有约 1,000-40,000、特别是 2,000-5,000 的范围内的分子量的 PEG。

[0176] 通式 (20)

[0177]



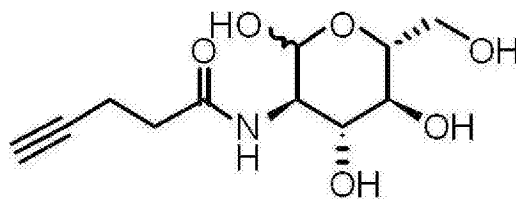
[0178] (靶分子)

[0179] 此外,根据本实施方案的化合物可含有特异地结合于目标位置的靶分子。本实施方案中的靶分子例如特异地结合于目标位置例如肿瘤的物质或者特异地结合于在目标位置周围存在的物质的物质,并且能够任意地选自例如生物分子和化学物质例如药物。其具体实例包括抗体、抗体片段、酶、生物活性肽、糖肽、糖链、脂质、核酸和分子识别化合物。能够单独使用这些物质的一种,或者能够将其两种以上组合使用。已化学结合有靶分子的根据本实施方案的化合物的使用能够进行目标位置的具体检测以及目标物质的动力学、定位、药效、代谢等的跟踪。

[0180] 本实施方案中,具有炔烃的靶分子能够用于使该靶分子与具有叠氮基的透明质酸衍生物的结合。例如,能够使用由下述通式 (21) 表示的葡糖胺衍生物。该葡糖胺衍生物具有对葡糖胺的转运蛋白或葡萄糖的转运蛋白的亲合性并且能够将靶向表达任何这样的转运蛋白的细胞的能力赋予根据本发明的化合物。

[0181] 通式 (21)

[0182]



[0183] (化合物的制备方法)

[0184] 本实施方案中的化合物能够通过采用已知的偶合反应使 PEG 和 ICG 衍生物与透明质酸衍生物的官能团结合而制备。例如,能够通过采用 click 反应使 PEG 和 ICG 衍生物与透明质酸衍生物的叠氮基结合来制备该化合物。具体地,使炔化的 ICG 衍生物和炔化的 PEG 衍生物与已预先用其对透明质酸进行了改性的叠氮基进行 click 反应。为了可增加 ICG 含量,优选同时对炔化的 ICG 衍生物和炔化的 PEG 衍生物进行该反应。除了炔化的 ICG 衍生物和炔化的 PEG 衍生物以外,对炔化的靶分子进行该反应时,能够得到已使 ICG 和 PEG 与其结合并且已使靶分子与其结合的透明质酸衍生物。采用已知的纯化方法例如透析法、超滤法或者尺寸排除色谱法对已结合有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物进行洗涤和纯化。可通过各种交联剂使 ICG 衍生物、PEG 和靶分子与透明质酸结合。例如,通过 PEG 分子能够使靶分子与透明质酸结合。

[0185] (光学成像用造影剂)

[0186] 根据本实施方案的光学成像用造影剂包括根据本实施方案的化合物和分散介质。此外,除了根据本实施方案的化合物以外,根据需要,根据本实施方案的光学成像用造影剂可包括药学上可接受的添加剂例如血管扩张剂。

[0187] 分散介质是用于将根据本实施方案的化合物分散的液体物质,其实例包括生理盐水、用于注射的蒸馏水、磷酸盐缓冲的生理盐水和葡萄糖水溶液。根据本实施方案的光学成像用造影剂中,可预先将根据本实施方案的化合物分散在分散介质中,或者可采用下述方式:使根据本实施方案的颗粒和分散介质成为试剂盒,然后在活体给药之前将该颗粒分散在该分散介质中而使用。

[0188] 本实施方案中的光学成像意味着通过用光照射而成像。即,用光照射时,根据本实施方案的光学成像用造影剂发出声波、荧光等。通过检测该发出的声波能够进行光声成像并且通过检测该发出的荧光能够进行荧光成像。应指出地是,光声成像是包含光声断层照相的概念。将根据本实施方案的光学成像用造影剂用于荧光成像时,该造影剂可称为荧光成像用造影剂,将造影剂用于光声成像时,该造影剂可称为光声成像用造影剂。

[0189] 将根据本实施方案的光学成像用造影剂给药于活体时,通过利用 EPR 效应,与在活体的正常位置中相比,该造影剂能够以较大量在肿瘤位置积累。结果,将根据本实施方案的光学成像用造影剂已给药于活体后用光照射活体并且检测来自该活体的声波时,与从正常位置发出的声波相比,能够使从肿瘤位置发出的声波变大。

[0190] 此外,根据本实施方案的光学成像用造影剂能够用于血管、淋巴管、淋巴结等的造影。此外,该造影剂特别优选用于前哨淋巴结用造影剂。这是因为下述原因:与 ICG 单独相比,该造影剂的尺寸大,因此该造影剂更容易在前哨淋巴结中积累并且预期积累性的改善。

[0191] (光声成像方法)

[0192] 对采用光声成像装置对已给药于活体的根据本实施方案的化合物进行检测的方法进行说明。检测根据本实施方案的化合物的方法包括下述步骤 (a) 和 (b)。应指出地是,根据本实施方案的光声成像方法可包括下述步骤以外的步骤:

[0193] (a) 用 600nm-1, 300nm 的波长区域中的光照射试样的步骤,已将根据本实施方案的化合物给药于该试样;和

[0194] (b) 检测从该试样中存在的化合物产生的声波的步骤。

[0195] 此外,检测根据本实施方案的化合物的方法可包括如下步骤:由例如步骤 (b) 中

得到的声波的波长、相位和时间信息重建空间光声信号强度分布。应指出地是,基于步骤(b)中得到的光声信号的波长、相位和时间信息,能够进行三维图像重建。由图像重建获得的数据可采用任何形式,只要能够由该数据掌握光声信号的强度分布的位置信息。例如,该形式可以是使得光声信号强度被表示在三维空间上,或者可以是使得光声信号强度被表示在两维平面上。或者,能够采用下述:采用不同的成像方法获得关于相同的被观察对象的信息,然后获得这些各件信息与光声信号的强度分布之间的位置对应。

[0196] 步骤(a)中,能够使用采用方法例如口服或注射已将根据本实施方案的化合物给药的试样。

[0197] 此外,步骤(b)中,对产生用于照射试样的光的装置和用于检测从根据本实施方案的化合物发出的光声信号的装置并无特别限制。

[0198] 只要光源能够用具有选自 600nm-1,300nm 的范围的至少一种波长的激光脉冲光照射试样,对步骤(b)中用光照射试样的光源并无限制。作为用激光脉冲光照射试样的装置,可给出例如钛蓝宝石激光器(LT-2211-PC,由 LOTIS TII 制造)、OPO 激光器(LT-22140PO,由 LOTIS TII 制造)和变石激光器。

[0199] 对用于检测声波的装置并无特别限制并且各种装置均能够使用。例如,能够使用可商购的光声成像装置(由 Endra Inc. 制造的 Nexus128)进行检测。

[0200] 包括使用根据本实施方案的化合物的成像方法能够通过步骤(a)和(b)将目标位置例如肿瘤、淋巴结或血管造影。

[0201] (透明质酸衍生物的制备方法)

[0202] 本实施方案中透明质酸衍生物的制备方法的特征在于,在两亲性分子的存在下使 ICG 衍生物与透明质酸彼此反应。该两亲性分子优选为聚乙二醇。

[0203] 使 ICG 类似物与透明质酸结合时,两亲性分子的存在抑制透明质酸的凝聚。结果,使大量的 ICG 衍生物与透明质酸结合。

[0204] 为了可进一步对本发明的特征进行阐述,以下通过实施例对本发明进行说明。但是,本发明并不受实施例限制。应指出地是,根据常规表示法,一些情况下从说明书和附图中表示的化学结构式中将碳原子和氢原子省略。

[0205] (实施例 1:含有近红外色素的透明质酸衍生物的合成)

[0206] 根据下述合成路线(图 1A)合成透明质酸衍生物 1 和 2。将六种具有不同分子量的低分子量透明质酸钠盐(HA-Na)用作起始材料(分子量 MW(HA-Na) = 2.5K、5K、8K、25K、50K 和 110K)。应指出地是,将由 Kikkoman Biochemifa Company 制造的 Micro Hyaluronic Acid FCH 和由 Kikkoman Biochemifa Company 制造的 Hyaluronic Acid FCH 用作具有 2.5K 和 110K 的分子量的 HA-Na。此外,将通过采用已知的方法(专利文献 3)而使分子量降低的 Hyaluronic Acid FCH(具有 110K 的分子量)用作其他起始材料的每一个,即,具有 5K、8K、25K 和 50K 的分子量的 HA-Na。

[0207] 通过基于下述方法的分子量降低而得到具有 5K、8K、25K 和 50K 的分子量的 HA-Na。将 5.2 克(13mmol)的 HA-Na 溶解于纯水(150mL)中。将 6.6N 的 HCl 水溶液(15ml)添加到该溶液中,然后在 70°C 下搅拌该混合物。预定的时间段后,用 10% NaOH 水溶液中和该混合物,然后通过蒸发将溶剂除去。将得到的白色固体溶解在水中,然后用具有 1K 的分子量截止的透析膜(Spectra/Por 6,由 Spectrum Laboratories, Inc. 制造)对该溶液进行透

析 24 小时。随后,将产物冷冻干燥以提供 2.9g(55%) 的作为白色固体的 HA-Na。通过对 HA-Na 进行酸处理分别历时 6 小时、4 小时、3 小时和 2 小时的反应时间,从而得到具有 5K、8K、25K 和 50K 的分子量的 HA-Na。

[0208] 通过尺寸排除色谱确定透明质酸的分子量。测定条件如下所述:洗脱液:0.2M 的 NaCl 水溶液,流速:0.5ml/min,柱:Shodex SB-803HQ(由 Showa Denko K.K. 制造),标准物质:支链淀粉(STD-P 系列,由 Showa Denko K.K. 制造)。应指出地是,从 Kikkoman Biochemifa Company 购买的低分子量透明质酸(FCH-SU,分子量:110K)和 Micro Hyaluronic Acid FCH(分子量:2.5K)在这些条件下各自显示对应的数均分子量。

[0209] (实施例 1(1):发近红外光的化合物 ICG-炔烃的合成)

[0210] 图 1B 表示发近红外光的化合物 ICG-炔烃的合成路线。细节如下所述。将 0.10 克(0.32mmol)的已知的吡啶花青绿衍生物 ICG-ATT(非专利文献 3)装入 50-ml 单颈圆底烧瓶中,然后溶解于 2ml 的乙腈中。在 0°C 下将炔丙胺(25  $\mu$ L, 0.39mmol)添加到该溶液中,然后将该混合物搅拌 2 小时。将 10 毫升的 0.1N 盐酸添加到该溶液中,然后用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取水层。用饱和盐水溶液对有机层进行洗涤,然后用硫酸镁干燥。通过在减压下蒸发将溶剂除去,然后通过离心沉降( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ )将得到的深绿色固体纯化。用小量的醋酸乙酯对该深绿色固体进行洗涤,然后在减压下干燥。然后,作为深绿色固体得到 82mg(82%)的 ICG-炔烃。通过  $^1\text{H-NMR}$  和 FAB-MS 进行其鉴别。结果如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C, TMS)  $\delta$ /ppm; 1.47(t, J = 6.9Hz, 3H), 1.57-1.70(m, 2H), 1.78-1.86(m, 2H), 1.86-1.96(m, 2H), 1.96(s, 6H), 2.00(s, 6H), 2.15(t, J = 2.4Hz, 1H), 2.42(t, J = 7.3Hz, 2H), 4.04(dd, J = 2.4, 5.4Hz, 2H), 4.10-4.28(m, 4H), 6.11-6.20(m, 1H), 6.40-6.58(m, 1H), 6.62-6.76(m, 1H), 6.85-6.96(m, 1H), 7.04-7.13(m, 1H), 7.31(d, J = 8.8Hz, 2H), 7.39(d, J = 8.8Hz, 1H), 7.43-7.49(m, 2H), 7.56-7.63(m, 2H), 7.88-7.97(m, 6H), 8.06-8.14(m, 2H); FAB-HRMS  $m/e$  660.3964[M]<sup>+</sup>。应指出地是,近红外区中 ICG-炔烃的光吸收光谱如图 1C 中所示(溶剂:氯仿( $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ ))。该化合物在 802nm 具有吸收最大值。该化合物具有  $1.8 \times 10^5 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$  的摩尔吸光系数。

[0211] (实施例 1(2):透明质酸四丁基铵盐 HA-NBu<sub>4</sub>的合成)

[0212] 高分子量 HA-Na 在有机溶剂中具有低溶解度,因此将其转化为对应的铵盐以进行各种转化反应(非专利文献 4 和非专利文献 5)。本发明中使用的低分子量透明质酸钠盐 HA-Na 在有机溶剂中也几乎不溶,因此同样地将 HA-Na 转化为铵盐,然后用于缩合反应。以下对透明质酸四丁基铵盐 HA-NBu<sub>4</sub>的合成概要进行说明(图 2)。将 0.80 克的低分子量透明质酸钠盐 HA-Na(MW(HA-Na) = 8K, 2.0mmol, 以最小单元计)装入 100-ml 单颈圆底烧瓶中,然后溶解于 5ml 水中。将用四丁基氢氧化铵进行了阳离子交换的阳离子交换树脂 DOWEX(1.9g, 对应于 4.0mmol)添加到该溶液中,然后在室温下将该混合物搅拌一夜。用玻璃过滤器已将 DOWEX 除去后,将滤液冷冻干燥以提供 1.1g(85%)的作为白色固体的透明质酸四丁基铵盐 HA-NBu<sub>4</sub>。通过  $^1\text{H-NMR}$ ( $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25°C)  $\delta$ /ppm; 0.81-0.85(br m, 12H), 1.22-1.27(br m, 8H), 1.53-1.54(br m, 8H), 1.88(s, 3H), 3.06-3.10(br m, 8H), 3.31-3.92(m, 10H), 4.45(br s, 2H))进行其鉴别。

[0213] 用具有 2.5K 和 5K 的分子量的 HA-Na 进行同样的反应以提供它们对应的产物。它们的收率分别为 83%和 99%。但是,具有 25K、50K 和 110K 的分子量的 HA-Na 均具有差的水

溶解度,因此为了可得到它们对应的铵盐,需要增加使用的水量。它们的收率分别为 62%、68%和 64%。

[0214] (实施例 1(3):具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 的合成)

[0215] 以下对透明质酸衍生物 3 的合成进行说明,透明质酸衍生物 3 具有用作用于用近红外色素、PEG、GA 等改性的骨架的叠氮基(图 3A)。在 N<sub>2</sub>气氛下,将 0.25g 的 HA-NBu<sub>4</sub>(MW(HA-Na) = 8K,0.40mmol,以最小单元计)装入 50-ml Schlenk 烧瓶内,然后溶解于 4.0ml 的无水 DMSO 中。将 1.7 克(3.2mmol)的(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷并磷六氟磷酸盐(PyBOP)和 0.43g(3.2mmol)的 1-羟基苯并三唑(HOBt)添加到该溶液中。然后,添加 0.64g(6.4mmol)的 3-叠氮基-1-丙基胺(非专利文献 6)并且将该混合物在室温下搅拌 20 小时。将水添加到该溶液中,用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>对水层进行洗涤,并且用具有 3.5K 的分子量截止的透析膜对水层进行透析 24 小时。随后,将产物冷冻干燥以提供 0.13g(70%)的作为白色固体的具有叠氮基的透明质酸衍生物 3。通过 <sup>1</sup>H-NMR(<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C) δ / ppm ;1.67(s, 2H), 1.87(s, 3H), 3.05-3.80(m, 14H), 4.37(m, 2H)) 进行其鉴别。图 12 表示作为非典型实例的衍生物 3 的 NMR 图。

[0216] 用具有 2.5K、5K、25K、50K 和 110K 的分子量的 HA-Na 进行同样的反应以提供它们的对应产物。它们的收率分别为 85%、66%、99%、99%和 99%(羧基的转化率大于 99%)。但是,在相同条件下具有 2.5K 或 110K 的分子量的 HA-NBu<sub>4</sub>的反应中,羧基的转化率的再现性差。此外,具有 110K 的分子量的 HA-NBu<sub>4</sub>的反应需要使用 15ml 的 DMSO 并且与任何其他盐相比其对于缩合反应的反应性低。由这些结果发现,在本发明的含有近红外色素的透明质酸衍生物的合成中,优选 5K-50K 的分子量。

[0217] (实施例 1(4):将具有叠氮基的胺导入透明质酸中的比例的控制)

[0218] 如实施例 1(3)中所述,通过将使用的 3-叠氮基-1-丙基胺和缩合剂的当量数分别设定为 16 当量和 8 当量,能够以基本上完全的方式将透明质酸中的羧基转化。同时,通过减少使用的 3-叠氮基-1-丙基胺和缩合剂的当量数,能够调节 3-叠氮基-1-丙基胺的导入效率(图 3B 和表 1)。应指出地是,图 3B 中的括号表示将 3-叠氮基-1-丙基胺无规地导入。由透明质酸中 N-乙酰基的 3H(1.87ppm)与导入的 3-叠氮基-1-丙基胺的 2-位的 2H(1.67ppm)之比计算 3-叠氮基-1-丙基胺的导入效率。此外,用基于通过 <sup>1</sup>H-NMR 确定的导入效率计算的分子量确定收率。

[0219]

表 1. 具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 的合成

项目 No.	当量数	收率 (%)	1: m <sup>a</sup>	项目 No.	当量数	收率 (%)	1: m <sup>a</sup>
1	12	50	>99: <1	7	1.5	47	66: 34
2	8	56	97: 3	8 <sup>e</sup>	1.5	49	65: 35
3	6	52	90: 10	9	1.25	52	53: 47
4 <sup>b</sup>	6	64	93: 7	10	1	58	42: 58
5	4	65	79: 21	11	0.75	59	20: 80
6	2	50	75: 25	12	0.5	55	16: 84

<sup>a</sup>由 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。<sup>b</sup>代替 HOBt 而使用 HOBt · H<sub>2</sub>O。

<sup>c</sup>与项目 7 相同的条件。再现性的确认。

[0220] (比较例 1: 具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG 的合成)

[0221] 以下对作为比较例的只具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG 的合成进行说明(图 4A)。在 N<sub>2</sub>气氛下, 将 41mg 的衍生物 3(MW(HA-Na) = 8K, 0.10mmol, 以最小单元计, 叠氮化效率: ~10%) 装入 25-ml Schlenk 烧瓶中, 然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。已将

14mg (20  $\mu$  mol) 的 ICG-炔烃添加到溶液中后,将 3.8mg (20  $\mu$  mol) 的 CuI 和 3.0mg (20  $\mu$  mol) 的 1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU) 添加到该混合物中,然后将整体在 60 $^{\circ}$ C 小搅拌一夜。将 2 毫升的水添加到该溶液中,然后用具有 1K 的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析 24 小时。用过滤器 (孔直径:0.45  $\mu$  m) 将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供 22mg (51%) 的作为淡绿色固体的具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG-a。通过  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 $^{\circ}$ C)  $\delta$  /ppm ;1.60-1.70 (m, 0.23H), 1.89 (brs, 3H), 3.20-3.85 (m, 11H), 4.30-4.50 (m, 2H)) 进行衍生物 HA-ICG-a 的鉴别。

[0222] 应指出地是,如下确定 ICG 部分的导入率:测定具有 ICG 的透明质酸衍生物的 DMF- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) 混合溶液的 UV 光谱,然后通过使用 ICG-炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长 (790nm 左右) 下的吸光率确定该比率。此外,用基于 ICG 部分的导入率计算的分子量确定收率。HA-ICG-b 具有低的 ICG 部分的导入率 (每分子的导入率为 1%), 因此没有观察到颗粒形成 (在动态光散射 (DLS) 中几乎没有观察到散射光)。

[0223] 将铜化合物和 DBU 的量各自设定为 1 当量以下时,几乎没有导入 ICG 部分。此外,反应的再现性差并且在许多情况下没有导入 ICG 部分。尽管通过使用具有 5K 的分子量的衍生物 3,同样的反应进行,但同样地反应的再现性差。

[0224] 使用由 Otsuka Electronics Co.,Ltd. 制造的 FPAR-1000 进行通过 DLS 由透明质酸衍生物自组装形成的颗粒直径的测定。将该样品溶解于 Milli-Q 水中并且在测定前用 PVDF 过滤器 (孔直径:0.45  $\mu$  m) 过滤该溶液 (样品浓度:1-2g/L)。在 25 $^{\circ}$ C 下进行 3 分钟在 90 $^{\circ}$  的散射角下的散射光测定。通过进行三次测定来确认再现性。用由 Otsuka Electronics Co.,Ltd. 制造的 SLS-6000 进行静态光散射 (SLS) 的由透明质酸衍生物自组装形成的临界凝聚浓度 (cac) 的确定。将该样品溶解于 Milli-Q 水中并且在测定前用 PVDF 过滤器 (孔直径:0.45  $\mu$  m) 过滤该溶液。在 25 $^{\circ}$ C 下进行 3 分钟具有不同浓度的透明质酸衍生物的各个水溶液在 90 $^{\circ}$  的散射角下的散射光测定。通过每个测定进行三次来确认再现性。图 15 表示 SLS 测定的典型结果。

[0225] 通过 DLS 测定的透明质酸衍生物的颗粒直径为约 120-150nm。未能测定具有低的 ICG 导入率的 HA-ICG-b 的颗粒直径。HA-ICG-a 和 HA-ICG-c 的 cac 值极小,因此发现衍生物即使在稀释的环境中也形成稳定的颗粒。

[0226] (实施例 1(5):具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 1 的合成)

[0227] 通过同时使 ICG-炔烃和 PEG-炔烃 (非专利文献 7) 与具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 结合,能够各自得到各自具有 ICG 和 PEG 的各种透明质酸衍生物 1 (图 4B 和表 2)。以下对典型的合成例进行说明。在  $\text{N}_2$  气氛下,将 23mg 的衍生物 3 ( $\text{MW}(\text{HA-Na}) = 8\text{K}$ , 50  $\mu$  mol, 以最小单元计,叠氮化效率:>99%) 装入 25-ml Schlenk 烧瓶中,然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。已将 8.8mg (13  $\mu$  mol) 的 ICG-炔烃和 0.18g (88  $\mu$  mol) 的 PEG-炔烃添加到溶液中后,将 2.9mg (15  $\mu$  mol) 的 CuI 和 2.3mg (15  $\mu$  mol) 的 DBU 添加到该混合物中,然后将整体在 60 $^{\circ}$ C 下搅拌一夜。将 2 毫升的水添加到该溶液中,然后用具有 25K 的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水进行透析 24 小时。用过滤器 (孔直径:0.45  $\mu$  m) 对得到的水溶液进行过滤,然后冷冻干燥以提供 48mg (60%) 的作为深绿色固体的具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 1。通过  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 $^{\circ}$ C)  $\delta$  /ppm ;1.80-2.15 (m, 3H), 3.10-3.90 (m, 183H), 4.30-4.50 (m, 2H), 7.93 (br s, 0.96H)) 进行其鉴别。图 13 表示作为典型实例的衍生物 1 的

<sup>1</sup>H-NMR 图。

[0228] 应指出地是,基于通过 <sup>1</sup>H-NMR 在 3-叠氮基-1-丙基胺的 2-位的 2H(1.67ppm) 的减少率,计算环化反应的转化率。如下确定 ICG 部分的导入率:测定具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物的 DMF 溶液的 UV 光谱,然后通过使用 ICG-炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长(790nm 左右)下的吸光率确定该比率。由叠氮基的转化率和 ICG 部分的导入率计算 PEG 部分的导入率。此外,用基于 ICG 和 PEG 部分的导入率计算的分子量确定收率。

[0229] 如表 2 中所示,得到了具有高 ICG 导入率的透明质酸衍生物。另一方面,如上述的比较例 1(具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG 的合成)中所述,尝试了在不使用 PEG-炔烃的情况下通过使 ICG-炔烃与具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 结合来合成只具有 ICG 的透明质酸衍生物,但难以合成具有高 ICG 导入率的透明质酸衍生物并且导入率限制在至多约 10%。换言之,发现:将 PEG 导入透明质酸中对于获得具有高 ICG 导入率的透明质酸衍生物是必要的;而且同时使 ICG-炔烃和 PEG-炔烃与 3 反应是重要的。此外,该衍生物具有约 100-200nm 的通过 DLS 测定的颗粒直径并且发现满足作为基于 EPR 效应的肿瘤-targeting agent 的条件。

[0230] 应指出地是,具有 53%、66%和 78%的 ICG 导入率的透明质酸衍生物 1b、1c 和 1d 几乎不溶于水。通过将它们的 DMF 溶液在水中分散,能够形成衍生物 1b 和 1c 的颗粒。但是,即使采用相同的方法制备衍生物 1d 时,水不溶性固体沉淀,因此难以将整个样品均匀地溶解。将不溶性固体除去后的水溶液中的聚合物对应于 66%的收率(57%的 ICG 含量),因此推测具有高 ICG 含量的透明质酸衍生物变为水不溶性并且沉淀。同时,在具有 0%的 ICG 导入率,即,只用 PEG 改性的透明质酸衍生物的情况下未能观察到水中颗粒形成,但在具有 1%的 ICG 导入率的透明质酸衍生物 1f 的情况下能够观察到具有 157nm 的直径的颗粒的形成。鉴于上述内容,能够说用 ICG 和 PEG 改性的透明质酸衍生物在水中形成纳米颗粒所需的 ICG 导入率为约 1%-65%。

[0231] 发现具有 5K 的分子量的衍生物的 cac 完全小于具有 8K 的分子量的衍生物的 cac,因此前者的衍生物更容易地形成稳定的颗粒。也发现具有较大 PEG 导入率的透明质酸衍生物形成了更稳定的颗粒。

[0232] 用由 JEOL Ltd. 制造的透射电子显微镜(TEM)JEM-1400 观察颗粒形状。如下制备样品:将透明质酸衍生物 1 的水溶液(1mg/ml)安置在由 Nisshin EM Corporation 制造的粘附有火棉胶膜的筛网(200 目)上;并且将该溶液空气干燥。通过 TEM 模式在 120kV 的加速电压下观察该样品。如下得到颗粒直径分布:每个样品观察 100 个以上的颗粒图像;并且基于它们的颗粒直径计算平均颗粒直径和标准偏差。基于透射电子显微镜观察的透明质酸衍生物 1a、1h 和 1n 的平均颗粒直径 ± 标准偏差分别为 41 ± 18nm、117 ± 28nm 和 26 ± 10nm。

[0233] 图 5A 表示颗粒直径与 ICG 含量之间的关系(来自表 2 的数据)。由图 5A 发现,随着 ICG 含量增加,颗粒直径倾向于减小。这可能由下述引起:由 ICG 含量增加所提高的疏水性导致的水中的缔合能力的改善或者缔合的形状例如胶束或囊泡的改变。由结果发现,增加 ICG 含量不仅有助于造影剂的灵敏度的改善而且有助于颗粒尺寸的减小,如后述的实施例中所述,这对于体内良好动力学的显现重要。

[0234] 冷冻干燥后在固态下贮存一段时间的透明质酸衍生物 1 显示水溶解性的极度下降。优选在冷冻干燥后制备衍生物 1 的水溶液。如下能够再次得到具有高水溶解性的透明

质酸衍生物：将具有低水溶解性的衍生物 1 溶解于 DMF 中；将通过在相同体积的水中使 DMF 溶液分散而得到的溶液相对于水进行透析；并将产物冷冻干燥。

[0235] 如表 2 中所示，用具有 5K 的分子量的衍生物 3 进行同样的反应，由此能够得到对应的产物。但是，在相同条件下涉及具有 25K 的分子量的衍生物 3 的反应显示低收率和低再现性，尽管在一些情况（透明质酸衍生物 1n）下反应进行得良好。此外，涉及具有 50K 的分子量的衍生物 3 的反应几乎没有进行。

[0236] 表 3 汇总了基于比较例 1 和实施例 1(5) 的结果的透明质酸衍生物的收率和再现性。由表 3 可以看到，为了能够采用合成法高效率地合成具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物，使用的透明质酸的分子量优选为约 5K-25K，更优选为 5K-8K。图 5B 表示透明质酸的分子量与颗粒直径之间的关系，并且由图中发现，与 5K 的分子量相比，8K 的分子量倾向于导致较小的颗粒直径。

[0237]

表 2

透明质酸衍生物 No.	MW (HA-Na)	a/b	收率 (%) <sup>a</sup>	p:q:r <sup>b</sup>	D <sub>DLS</sub> (nm) <sup>c</sup>	cac ( $\times 10^{-4}$ g/L)
1a	8K	0.25/1.75	60	15:85:0	157 ± 38	7.9
1b	8K	0.75/1.25	68	53:47:0	120 ± 59 <sup>d</sup>	8.4
1c	8K	1.00/1.00	81	66:34:0	160 ± 76 <sup>d</sup>	9.2
1d	8K	1.20/0.80	79	78:22:0	-	-
1e	5K	0.00/2.00	93	0:100:0	157 ± 38	13
1f	5K	0.05/1.95	84	1:99:0	206 ± 61	2.2
1g	5K	0.10/1.90	60	3:97:0	275 ± 73	2.3
1h	5K	0.25/1.75	68	12:88:0	209 ± 56	3
1i	5K	0.50/1.50	81	34:66:0	248 ± 72	6.3
1j	5K	0.20/0.20	70	14:26:60	236 ± 84	4
1k	5K	0.20/0.40	78	8:44:48	199 ± 62	2.1
1l	5K	0.20/0.80	76	12:77:11	179 ± 46	5
1m	5K	0.40/0.40	74	25:39:36	29 ± 7	21
1n	25K	0.20/0.80	32	11:89:0	-	-

<sup>a</sup>由基于 ICG 和 PEG 部分的导入率的分子量计算。

<sup>b</sup>由 UV-可见测定中吸光率和 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。

<sup>c</sup>通过将透明质酸衍生物溶解在水中而制备纳米颗粒。通过动态光散射测定其颗粒直径。

<sup>d</sup>两种颗粒在散射强度上基本上彼此相同。

表中所示的符号“-”意味着由于低散射光强度而未能进行测定。

表 3 透明质酸衍生物的合成收率和再现性

透明质酸 (起始材 料)	透明质酸四丁基 铵盐	具有叠氮基的透明质酸 衍生物		比较例: 含有 ICG 的透明质酸衍生 物的合成(由具有叠氮基 的透明质酸衍生物合成)		本发明的化合物 含有 ICG 和 PEG 的透明质酸 衍生物(由具有叠氮基的透 明质酸衍生物合成)	
		收率 %	再现性	收率 %	再现性	收率 %	再现性
分子量	收率 %	收率 %	再现性	收率 %	再现性	收率 %	再现性
2.5K	83	85	低	未考察	未考察	未考察	未考察
5K	99	66	高	78.5	高	72.4	高
8K	85	70	高	51	低	69.7	高
25K	62	99	高		未考察	32	低
50K	68	99	高		未考察	0(未反应)	-
110K	64	99	低		未考察	未考察	未考察

[0239] (实施例 1(6):含有 ICG、PEG 和 GA 的透明质酸衍生物 2 的合成)

[0240] 通过同时使 ICG-炔烃、PEG-炔烃和 GA-炔烃(非专利文献 8)与具有叠氮基的透

明质酸衍生物 3 结合,能够各自得到各自含有 ICG、PEG 和 GA 的各种透明质酸衍生物 2(图 6 和表 4)。以下对典型的合成例进行说明。在  $N_2$  气氛下,将 23mg 的衍生物 3 ( $50 \mu\text{mol}$ , 以最小单元计,叠氮化效率: $>99\%$ ) 装入 25-ml Schlenk 烧瓶中,然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。将 14mg ( $20 \mu\text{mol}$ ) 的 ICG-炔烃、40mg ( $20 \mu\text{mol}$ ) 的 PEG-炔烃和 5.2mg ( $20 \mu\text{mol}$ ) 的 GA-炔烃已添加到该溶液中后,将 2.9mg ( $15 \mu\text{mol}$ ) 的 CuI 和 2.3mg ( $15 \mu\text{mol}$ ) 的 DBU 添加到该混合物中,然后在  $60^\circ\text{C}$  下将整体搅拌一夜。将 2 毫升的水添加到该溶液中,然后用具有 25K 的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析 24 小时。用过滤器(孔直径: $0.45 \mu\text{m}$ ) 将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供 72mg ( $87\%$ ) 的作为深绿色固体的具有 ICG、PEG 和 GA 的透明质酸衍生物 2。通过  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $D_2O$ ,  $25^\circ\text{C}$ )  $\delta$  /ppm ; 1.75-2.15 (m, 3H), 2.55 (br s, 0.38H), 2.80-3.10 (m, 0.93H), 3.10-4.00 (m, 102H), 4.25-4.50 (m, 2.4H), 7.68 (s, 0.38H), 7.93 (br s, 0.58H)) 进行其鉴别。图 14 表示衍生物 2a (GA) 的  $^1\text{H-NMR}$  图。

[0241] 应指出地是,基于通过  $^1\text{H-NMR}$  在 3-叠氮基-1-丙基胺的 2-位的 2H (1.67ppm) 的减少率,计算环化反应的转化率。观察到已结合有 GA 的三唑环的质子的化学位移 (7.68ppm) 不同于具有 ICG 或 PEG 的三唑环的质子的化学位移 (7.93ppm)。通过利用上述内容,基于转化为具有 GA 的三唑环的叠氮基与反应的叠氮基之比和叠氮基的转化率计算 GA 部分的导入率。如下确定 ICG 部分的导入率:测定具有 ICG、PEG 和 GA 的透明质酸衍生物的 DMF 溶液的 UV 光谱,然后通过使用 ICG-炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长 (790nm 左右) 下的吸光率确定该比率。由叠氮基的转化率以及 GA 和 ICG 部分的导入率计算 PEG 部分的导入率。此外,用基于 ICG、PEG 和 GA 部分的导入率计算的分子量确定收率。

[0242]

表 4

衍生物 No.	MW (HA-Na)	a/b/c	收率 (%) <sup>a</sup>	p:q:r <sup>b</sup>	D <sub>0.15</sub> (nm) <sup>c</sup>	D <sub>0.15</sub> (nm) <sup>d</sup>	D <sub>0.15</sub> (nm) <sup>e</sup>	cac (×10 <sup>-3</sup> g/L)
2a (GA)	8K	0.40/0.40/0.40	87	15:47:38	35±9	158±38	190±105	6.9
2b (GA2)	8K	0.50/0.70/0.20	65	13:79:8	24±5 <sup>f</sup>	88±21	122±36	4.6
2c (GA4)	8K	0.50/0.30/0.70	67	16:26:58	-	146±38	132±40	11
2e (GA5)	8K	0.80/0.60/0.60	59	41:32:27	155±37	108±37	313±109	8.8
2d (GA3)	5K	0.60/0.80/0.30	52	28:52:20	-	-	155±38	3.6
2f (GA6)	5K	0.80/0.60/0.30	79	45:42:13	-	-	193±46	2.1
2g (GA7)	5K	1.00/0.60/0.40	66	58:23:19	122±31	64±23	162±71	5.2

<sup>a</sup>由基于 ICG、PEG 和 GA 部分的导入率的分子量子量计算。

<sup>b</sup>由 UV-可见测定中吸光率和 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。

<sup>c</sup>通过将透明质酸衍生物溶解在水中而制备纳米颗粒。通过动态光散射测定其颗粒直径。

<sup>d</sup>如下制备纳米颗粒：将透明质酸衍生物溶解于 DMF 中；将该溶液与相同量的水混合；和通过透析将 DMF 除去。通过动态光散射测定其颗粒直径。

<sup>e</sup>如下制备纳米颗粒：将溶解于 CHCl<sub>3</sub> 中的透明质酸衍生物分散在水中；和在减压下通过蒸发将 CHCl<sub>3</sub> 除去。用超声波对得到的水溶液照射 30 分钟后通过动态光散射测定其颗粒直径。

<sup>f</sup>两种颗粒在散射强度上基本上彼此相同。表中所示的符号“-”意味着由于低散射光强度而未能进行测定。

[0243] 由表 4 发现，各自具有 ICG、PEG 和 GA 的许多透明质酸衍生物与具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物相比，形成了较小的颗粒。透明质酸衍生物 2a (GA) 在水中的溶解能够提供

具有约 35nm 的直径的颗粒。以下,将该样品称为“2as (GAs)”。已在 DMF 中充分分散的衍生物 2a (GA) 在水中的分散导致具有约 158nm 的直径的颗粒的形成。以下,将具有 158nm 的直径的颗粒称为“2a (GA)”。上述暗示通过形成纳米颗粒的方法能够控制颗粒直径。在透明质酸衍生物 2b (GA2) 和 2g (GA7) 的每个中,通过包括使用 DMF 的颗粒形成方法,得到了具有 100nm 以下的直径的颗粒。尽管存在如透明质酸衍生物 2d (GA3) 和 2f (GA6) 这样的样品,其中由于低散射强度,在包括使用水或 DMF 的颗粒形成方法中未能观察到颗粒形成,但包括将透明质酸衍生物的  $\text{CHCl}_3$  溶液分散于水中、然后通过蒸发将  $\text{CHCl}_3$  除去的方法可应用于任何样品并且观察到颗粒形成。但是,在任何情形下,形成的颗粒限制在较大的具有 120nm 以上的颗粒直径的颗粒。由上述结果发现,ICG 导入率低达约 15% 时,通过增加 ICG 导入率或者增加 PEG 导入率,得到了具有较小直径的颗粒。

[0244] 图 19A 和图 19B 表示通过使用具有 5K 和 8K 的分子量的透明质酸作为起始材料合成的透明质酸衍生物中 PEG 含量与 cac 值之间的关系(来自表 2 和表 4 的数据)。由每个结果发现,随着 PEG 含量增加,cac 倾向于减小。

[0245] 用由 JEOL Ltd. 制造的透射电子显微镜 JEM-1400 观察颗粒形状。如下制备样品:将透明质酸衍生物 2 的水溶液 (1mg/ml) 安置在由 Nisshin EM Corporation 制造的粘附有火棉胶膜的筛网 (200 目) 上;并且将该溶液空气干燥。通过 TEM 模式在 120kV 的加速电压下观察该样品。如下得到颗粒直径分布:每个样品观察 100 个以上的颗粒图像;并且基于它们的颗粒直径计算平均颗粒直径和标准偏差。如图 20A 和图 20B 中所示,在衍生物 2b (GA2) 中得到了两种颗粒直径分布,即,大分布和小分布,其与包括使用通过在水中溶解而制备的样品的 DLS 测定的结果一致。另一方面,在任何其他样品中,得到了一种颗粒直径分布,如图 20C 所代表。基于透射电子显微镜观察的透明质酸衍生物 2a (GA)、2b (GA2)、2c (GA4)、2d (GA3)、2e (GA5)、2f (GA6) 和 2g (GA7) 的平均颗粒直径  $\pm$  标准偏差分别为  $28 \pm 23\text{nm}$ 、 $24 \pm 12\text{nm}$  和  $85 \pm 15\text{nm}$  (双峰)、 $75 \pm 22\text{nm}$ 、 $64 \pm 19\text{nm}$ 、 $74 \pm 21\text{nm}$ 、 $35 \pm 8\text{nm}$  和  $66 \pm 24\text{nm}$ 。

[0246] (比较例 2:在水中具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 1 的合成)

[0247] 已报道了通过采用将硫酸铜和抗坏血酸钠组合的水中的催化剂体系,具有叠氮基的透明质酸与具有末端炔烃的衍生物之间的环化反应进行(非专利文献 9 和非专利文献 10)。鉴于上述内容,尝试在将硫酸铜和抗坏血酸钠组合的催化剂条件下使 ICG-炔烃和 PEG-炔烃与具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 反应。

[0248] 以下对涉及 PEG 的导入的实验例进行说明。将 PEG-炔烃 (3 当量) 已添加到衍生物 3 ( $\text{MW}(\text{HA}-\text{Na}) = 8\text{K}$ , 叠氮化效率:100%) 的水溶液 (5ml) 后,将抗坏血酸钠 (20mol%) 和硫酸铜五水合物 (40mol%) 的 DMF 溶液 (5ml) 添加到该混合物中,然后在 27°C 下将整体搅拌一夜。用具有 3.5K 的分子量截止的透析膜对于溶液相对于水进行透析 24 小时。将产物冷冻干燥并且通过用己烷/ $\text{CHCl}_3$  (7:10) 的再沉积进行纯化以提供作为淡棕色固体的具有 PEG (58%) 的透明质酸衍生物。如上所述,能够导入 PEG。

[0249] 另一方面,ICG-炔烃没有进行反应。以下对实验例进行说明。将 PEG-炔烃 (1.5 当量)、ICG-炔烃 (1.5 当量) 以及抗坏血酸钠 (20mol%) 和硫酸铜五水合物 (40mol%) 的 DMF 溶液 (3ml) 添加到衍生物 3 ( $\text{MW}(\text{HA}-\text{Na}) = 8\text{K}$ , 叠氮化效率:100%) 的水溶液 (3ml) 中,然后在 27°C 下将该混合物搅拌一夜。用具有 3.5K 的分子量截止的透析膜对该溶液相对于水进行透析 24 小时。用过滤器 (孔直径:0.45  $\mu\text{m}$ ) 对得到的水溶液进行过滤,然后冷

冻干燥以提供作为淡棕色固体的透明质酸衍生物。尽管将 PEG 导入到透明质酸衍生物 3 中 83% 的叠氮基,但残余的 17% 未反应并且没有导入 ICG。

[0250] 总之,在水中具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 1 的合成中,观察到 PEG 的导入,但没有导入 ICG。这可能是由 ICG-炔烃的低水溶解性引起的。换言之,通过常规已知的水下合成法难以合成本发明的具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物,而且目前为止尚未报道根据本发明的包括使用 CuI/DMF 的新型合成法,并且已示出其有效性。如上所述,包括使用 CuI/DMF 的合成法不仅能够将 ICG 衍生物导入透明质酸而且能够同时高效率、定量地将 ICG 衍生物和 PEG 导入其中。

[0251] (实施例 2:血液中的保持性的评价)

[0252] 为了对上述制备的各个化合物评价其血液中的保持性,将各个化合物对雌性远系繁殖的 BALB/c Slc-nu/nu 小鼠(7-9 周龄,Japan SLC, Inc.)的尾部静脉给药,然后测定各个时间的血液中的色素残留率。在给药后 1、3、9 和 24 小时,从小鼠的尾部静脉收集血液,然后在 96-well 塑料板中以 2:9:9 将该血液、1% Triton 和 DMF 混合。通过用 IVIS(商标) Imaging System 200 系列(由 XENOGEN 制造)测定 96-well 塑料板中的血液溶液的荧光强度,从而测定血液中的色素残留率。图 7 示出各个时间的相对于注射剂量的色素残留率(%注射剂量:简称为“% ID”)。由于未能得到充分的荧光强度,因此未能对衍生物 1g 进行评价。由色素残留率的测定揭示,由于即使经过 24 小时后样品仍残留在血液中,因此衍生物 1a、1h-1m 和 2a(GA)各自的血液中的保持性优异。另一方面,由于经过 24 小时后所有样品在血液中都不残留,因此发现各自不含 PEG 且只具有 ICG 的透明质酸衍生物 HA-ICG-a、HA-ICG-b 和 HA-ICG-c(比较例样品)各自具有低的血液中的保持性。结果已表明,具有 ICG 的透明质酸衍生物中,PEG 的引入对于 ICG 含量的增加和血液中的保持性的改善是必要的并且能够通过 PEG 含量控制血液中的保持性。

[0253] 图 8A 表示给药后 9 小时和 24 小时各个样品的 ICG 含量与血液中的色素残留率之间的关系。发现在 10-40% 的 ICG 含量范围内,血液中的残留率增加。

[0254] 图 8B 表示给药后 9 小时和 24 小时各个样品的 PEG 含量与血液中的色素残留率之间的关系。发现随着 PEG 含量增加,血液中的残留率增加。

[0255] (实施例 3:通过荧光成像的肿瘤造影能力的评价)

[0256] 对上述实施例 1 中得到的化合物评价它们的肿瘤造影能力。为了对肿瘤造影能力进行评价,进行了已将透明质酸衍生物给药的带有癌症的小鼠的荧光成像。荧光成像实验中,使用了雌性远系繁殖的 BALB/c Slc-nu/nu 小鼠(购买时为 6 周龄)(Japan SLC, Inc.)。使小鼠带有癌症前 1 周期间,在随意可得到饮食和饮用水的环境下在 Kyoto University, Faculty of Medicine(Kyoto Prefecture, Japan)的动物设备中用正常的饮食和床使小鼠栖息。成像实验前约 1 周,将  $1 \times 10^6$  结肠 26 小鼠结肠癌细胞(RIKEN)皮下注射到小鼠的肩部和股骨中。注射剂量为 0.25nmol 每个小鼠,以色素量计,并且作为 100  $\mu$ L 的 PBS 溶液将色素注入每个小鼠的尾部静脉。关于已将透明质酸衍生物 1a、1b、1c、1h、1i、1k、1l、2a(GA)、2as(GAs)、2b(GA2)、2d(GA3) 和 2c(GA4) 给药的小鼠的全身荧光图像,在给药后 24 小时,用 IVIS(商标) Imaging System 200 系列(XENOGEN)获得小鼠的亮场图像和荧光图像。图 9 示出给药后 24 小时小鼠的荧光图像。观察到图 9 中用白色箭头表示的肿瘤位置处的荧光信号。结果显示本发明的透明质酸衍生物能够对肿瘤造影并且作为肿瘤的光学成像用造影

剂显示其有效性。

[0257] 图 10A 中,由图 9 中所示的荧光成像数据得到肿瘤位置(测定区域:0.5×0.5cm)的荧光强度与腿根部(作为正常位置选择,测定区域:0.5×0.5cm)的荧光强度之比,然后作为信噪比(SNR)转化为数值。即,SNR 为显示各个化合物的肿瘤可视力的参数并且随着 SNR 增大,该化合物作为肿瘤的光学成像用造影剂变得更有效。由图 10A 发现,所有化合物的 SNR 为 1.5 以上,并且具有小颗粒尺寸的衍生物 2a(GAs) 具有最高的 SNR。

[0258] (实施例 4:肿瘤积累性的评价)

[0259] 通过确定实施例 3 中进行的肿瘤造影实验的小鼠的肿瘤中色素的量,对透明质酸衍生物 1a、1b、1c、1h、1i、1k、1l、2a(GA)、2as(GAs)、2b(GA2)、2d(GA3) 和 2c(GA4) 评价它们的肿瘤积累性。肿瘤积累性表示为相对于每 1g 肿瘤的总注射剂量的向肿瘤的迁移率(% ID/g)。首先,在给药后用二氧化碳对小鼠施以安乐死 24 小时,然后进行肿瘤的外科切除。将肿瘤转移到塑料管中,然后以比肿瘤的重量大 1.25 倍的量将 1% Triton-X100 水溶液添加到其中,然后用塑料杵粉碎。接下来,以比肿瘤组织的重量大 20.25 倍的量将二甲基甲酰胺(DMF)添加到其中。通过用 IVIS(商标)Imaging System 200 系列(XENOGEN)测定在塑料管中贮存的状态下的肿瘤粉碎溶液的荧光强度来确定肿瘤中色素的量。图 10B 示出结果。在已将根据本发明的透明质酸衍生物给药的肿瘤中检测到色素,因此确认了在肿瘤中积累。肿瘤积累性在 4% -14% 的范围内并且衍生物 1a 显示最高的肿瘤积累性,即,14.8% ID/g。图 11 示出肿瘤积累性与各个样品的 ICG 含量和 PEG 含量之间的关系。观察到下述倾向:随着 PEG 含量增加,肿瘤积累性改善。同时,观察到下述倾向:在约 15% 的 ICG 含量下肿瘤积累性改善。即使将 ICG 含量设定为 20% 以上时,也没有观察到肿瘤积累性的降低。该结果表明,该衍生物是具有高 ICG 含量的同时能够保持肿瘤中的积累性,换言之,提高灵敏性的化合物。

[0260] (实施例 5:光声信号的测定)

[0261] 测定上述的实施例 1 中得到的化合物的光声信号。作为比较例,对 ICG 的水溶液同样地进行测定。如下进行光声信号的测定:用脉冲激光照射样品的水溶液;用压电元件检测来自样品的光声信号;用高速前置放大器将信号放大;和用数字示波器获得该放大的信号。测定的具体条件如下所述。将钛蓝宝石激光器(由 Lotis Ltd. 制造)用作光源。将激光波长设定为 720nm 和 790nm,并且对于用于比较的 ICG 的水溶液,将波长设定为 710nm 和 780nm。这是因为下述原因:样品的水溶液具有两个吸收带,例如,在上述实施例 1 中得到的各个化合物中,在 720nm 和 790nm 处观察到吸收峰。图 16A 示出典型样品 1a、1b、1c 和 2as(GAs) 以及用于比较的 ICG 的吸收光谱。采用如下条件:能量密度 12mJ/cm<sup>2</sup>,脉冲宽度 20 纳秒,和 10Hz 的脉冲重复。将 Model V303(由 Panametrics-NDT 制造)用作超声换能器。采用 1MHz 的中央带、Φ0.5 的元件尺寸、25mm 的测定距离(非聚焦)和 +30dB 的放大率(Ultrasonic Preamplifier Model 5682,由 Olympus Corporation 制造)的条件。测定容器为由聚苯乙烯制成的试管,并且具有 0.1cm 的光程长度和约 200 μl 的样品体积。将水用作溶剂。将 DPO4104(由 TEKTRONIX, INC. 制造)用作测定装置,并且在下述条件下进行测定:触发器:用光电二极管对光声光的检测;和数据获取:平均 128 次(128 脉冲)。图 16B 表示在 790nm 的激光波长下典型样品 1a 的光声信号(电压)的时间变化光谱。此外,图 17 表示用它们的吸光率归一化的本发明的化合物和用于比较的 ICG 的光声信号的强度。

本文中使用的术语“用它们的吸光率归一化”意味着用施加的激光的强度(J)和在激光的波长下样品的吸光率去除实际得到的电压值(V)。如由图 17 中可以看到那样,本发明的所有化合物能够发出光声信号并且能够提供与用于比较的 ICG 相当或比其高的光声信号强度。光声信号强度变得高于 ICG 的可能的原因是上述实施例 1 中得到的本发明的化合物使用疏水性 ICG 衍生物并且色素自身的热转化效率高于 ICG。另一个可能的原因是由于其疏水性,色素的分子强烈地凝聚,或者由下述事实引起的热捕集效应可能具有某种贡献:用透明质酸将色素与作为介质的水屏蔽开。本实施例的结果已确认本发明的化合物作为光声造影剂发挥功能。

[0262] 图 18 表示透明质酸单元的表现分子量、与透明质酸结合的 ICG 衍生物的数量、整个聚合物的分子量、和在用于本发明的化合物的 790nm 下透明质酸衍生物的吸光系数。本发明中,能够使大量的 ICG 衍生物与透明质酸结合,因此能够对透明质酸赋予高光吸收能力。结果,成功地得到能够发出强光声信号的化合物。而且,本发明的透明质酸衍生物能够形成纳米颗粒,因此其作为纳米颗粒的吸光系数变得显著地高。即,该纳米颗粒可含有至少  $10^{-1}$ , 000 个透明质酸衍生物分子,因此该纳米颗粒具有比透明质酸衍生物分子高  $10^{-1}$ , 000 倍的吸光系数。具体地,该颗粒可具有  $10^6$ - $10^8$  的数量级的吸光系数(假设透明质酸衍生物分子的体积为约  $11,000\text{nm}^3$ , 计算该系数时)。

[0263] 如由本实施例可以看到那样,本发明人首次发现通过同时使 ICG 衍生物和 PEG 与透明质酸结合,能够使透明质酸衍生物的 ICG 含量增加,并且已成功地开发出具有高 ICG 含量的透明质酸衍生物。尽管非专利文献 1 中公开的含有亲水性 ICG 衍生物的透明质酸的 ICG 含量低达约 12%,但能够使本发明的透明质酸衍生物的 ICG 含量高于 13%。同时,含量的最大值为 78%。因此,本发明的透明质酸衍生物的 ICG 含量优选在大于 13%且小于等于 78%的范围内。

[0264] (实施例 6:具有磺酰基的含有近红外色素的透明质酸衍生物 4 的合成)

[0265] 除了使用了具有磺酰基的近红外色素 ICG-S-炔烃以外,根据与实施例 1 相同的合成路线合成了具有磺酰基的含有近红外色素的透明质酸衍生物 4。图 21A 表示该衍生物的结构式。将具有 5K 的分子量的 HA-Na 用作起始材料。

[0266] (实施例 6(1):近红外色素 ICG-S-炔烃的合成)

[0267] 图 21B 表示近红外色素 ICG-S-炔烃的合成。首先,将 0.62g(0.75mmol)的日本专利申请公开 No. 1997-124599 中公开的吡啶花青绿衍生物 ICG-S-OSu 装入 50-ml 单颈圆底烧瓶中,然后溶解在 2ml 的乙腈中。在 0℃下将炔丙胺(58  $\mu\text{L}$ , 0.90mmol)添加到该溶液中,然后将该混合物搅拌 2 小时。将 10 毫升的 0.1N 盐酸添加到该溶液中,然后用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取水层。用饱和盐水溶液洗涤有机层,然后用硫酸镁干燥。在减压下通过蒸发将溶剂除去,然后通过离心沉降( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ )对得到的深绿色固体进行纯化。用少量的醋酸乙酯对该深绿色固体进行洗涤,然后在减压下干燥。然后,作为深绿色固体,得到了 0.63g(93%)的 ICG-S-炔烃。通过  $^1\text{H-NMR}$  和 FAB-MS 进行其鉴别。

[0268] 结果如下所述: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, TMS)  $\delta$  /ppm ;1.51(t, J = 6.4Hz, 2H), 1.71(t, J = 7.3Hz, 2H), 1.86(t, J = 6.4Hz, 2H), 1.91-2.15(m, 2H), 2.00(s, 12H), 2.22(t, J = 7.2Hz, 2H), 2.67(s, 1H), 2.91(t, J = 6.0Hz, 2H), 3.40-3.57(m, 2H), 3.90(d, J = 2.3Hz, 2H), 4.10-4.32(m, 4H), 6.21-6.36(m, 1H), 6.36-6.49(m, 1H), 6.53-6.76(m, 2H)

), 7.39-7.51 (m, 2H), 7.54 (d, J = 8.7Hz, 1H), 7.57-7.78 (m, 3H), 7.88-8.13 (m, 6H), 8.13-8.38 (m, 2H); FAB-HRMS m/e 767.3757 [M]<sup>+</sup>.

[0269] 近红外区中 ICG-S-炔烃的光吸收光谱如图 21C 中所示 (氯仿中, 色素浓度:  $1.0 \times 10^{-6}$  M)。该化合物在 804nm 处具有吸收最大值。该化合物在最大吸收波长处具有  $1.2 \times 10^5$  (M<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>) 的摩尔吸光系数。

[0270] (实施例 6(2): 具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4 的合成)

[0271] 通过同时使 ICG-S-炔烃和 PEG-炔烃与具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 结合, 能够各自得到各自具有 ICG-S 和 PEG 的各种透明质酸衍生物 4 (图 22 和表 5)。以下对典型的合成例进行说明。在 N<sub>2</sub> 气氛下, 将 23mg 的衍生物 3 (MW(HA-Na) = 5K, 50 μmol, 以最小单元计, 叠氮化效率: >99%) 装入 25-ml Schlenk 烧瓶中, 然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。已将 38mg (50 μmol) 的 ICG-S-炔烃和 0.10g (50 μmol) 的 PEG-炔烃添加到该溶液后, 将 2.9mg (15 μmol) 的 CuI 和 2.3mg (15 μmol) 的 DBU 添加到该混合物中, 然后在 60°C 下将整体搅拌一夜。将 2 毫升水添加到该溶液中, 然后用具有 25K 的分子量截止的透析膜对于该混合物相对于水进行透析 24 小时。用过滤器 (孔直径: 0.45 μm) 对得到的水溶液进行过滤, 然后冷冻干燥以提供 83mg (79%) 的作为深绿色固体的具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4b。通过 <sup>1</sup>H-NMR (<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C) δ /ppm; 1.80-2.16 (m, 3H), 3.10-4.01 (m, 633H), 4.25-4.60 (m, 1H), 7.93 (br s, 0.98H)) 进行其鉴别。

[0272] 应指出地是, 基于通过 <sup>1</sup>H-NMR 在 3-叠氮基-1-丙基胺的 2-位的 2H (1.67ppm) 的减少率, 计算环化反应的转化率。如下确定 ICG 部分的导入率: 测定具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物的 DMF 溶液的 UV 光谱, 然后通过使用 ICG-S-炔烃作为标准物质, 基于在其最大吸收波长 (790nm 左右) 下的吸光率确定该比率。由叠氮基的转化率和 ICG-S 部分的导入率计算 PEG 部分的导入率。此外, 用基于 ICG-S 和 PEG 部分的导入率计算的分子量确定收率。

[0273] 透明质酸衍生物 4a、4b 和 4c 的 cac 分别为 2.6、3.0 和 3.9 (× 10<sup>4</sup> g/L)。

[0274] 表 5. 具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4 的合成

[0275]

聚合物 No.	a/b	收 率 (%) <sup>a</sup>	p: q <sup>b</sup>	D <sub>DLIS</sub> (nm)
4a	0.75/1.25	84	24:76	83 ± 25 <sup>c</sup>
4b	1.00/1.00	79	30:70	130 ± 31 <sup>c</sup>
4c	1.25/0.75	54	54:46	14 ± 3 <sup>d,e</sup> 92 ± 36 <sup>d,e</sup>

[0276] <sup>a</sup>由基于 ICG-S 和 PEG 部分的导入率的分子量计算。<sup>b</sup>由 UV-可见测定中的吸光率和 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。<sup>c</sup>将聚合物溶解于水中后通过动态光散射确定。<sup>d</sup>将聚合物溶解于 DMF 中; 将该溶液与相同量的水混合; 并且通过透析将 DMF 除去后通过动态光散射确定。<sup>e</sup>两种颗粒之间的散射强度比为 1:4。

[0277] (实施例 7: 具有分子量为 5K 的 PEG 的含有近红外色素的透明质酸衍生物 5 的合成)

[0278] 除了将 PEG-5K-炔烃用作具有 5K 的分子量的 PEG 的衍生物以外,根据与实施例 1(5) 相同的路线合成具有分子量为 5K 的 PEG 的透明质酸衍生物 5(图 23A)。将具有 5K 的分子量的 HA-Na 用作起始材料。

[0279] (实施例 7(1):PEG-5K-炔烃的合成)

[0280] 以下对 PEG-5K-炔烃的合成进行说明(图 23B)。将 10 克(2.0mmol)的可商购的 mPEG5000 装入 200-ml 两颈圆底烧瓶中,然后在减压下在 100°C 下干燥一夜。将干燥产物静置以冷却到 55°C,然后溶解在 80ml 的 THF 中。将 4-戊炔酸(0.79g,8.0mmol)已添加到该溶液中后,将 0.83g(4.0mmol)的 DCC 和 73mg(0.6mmol)的 DMAP 添加到该混合物中,然后在 55°C 下将整体搅拌一夜。将产物静置以冷却到室温后,用玻璃过滤器将不溶固体除去。向滤液中添加过量的二乙醚提供白色固体。用玻璃过滤器将该固体与滤液分离,然后用二乙醚洗涤以提供 8.1g(81%)的作为白色固体的 PEG-5K-炔烃。通过 <sup>1</sup>H-NMR 进行其鉴别。结果如下:(<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS) δ /ppm ;1.97-2.01(m, 1H), 2.47-2.55(m, 2H), 2.55-2.64(m, 2H), 3.40-3.92(m, 591H), 4.26(t, J = 5.0Hz, 2H))。

[0281] (实施例 7(2):具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物 5 的合成)

[0282] 通过同时使 ICG-炔烃和 PEG-5K-炔烃与具有叠氮基的透明质酸类似物 3 结合,能够各自得到各自具有 ICG 和 PEG-5K 的各种透明质酸衍生物 5(图 24A 和表 6)。以下对典型的合成例进行说明。在氮气氛下,将 23mg 的衍生物 3(MW(HA-Na) = 5K, 50 μmol, 以最小单元计,叠氮化效率:>99%)装入 25-ml Schlenk 烧瓶中,然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。将 26mg(38 μmol)的 ICG-炔烃和 0.31g(63 μmol)的 PEG-5K-炔烃已添加到该溶液中后,将 2.9mg(15 μmol)的 CuI 和 2.3mg(15 μmol)的 DBU 添加到该混合物中,然后在 60°C 下将整体搅拌一夜。将 2 毫升的水添加到该溶液中,然后用具有 25K 的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析 24 小时。用过滤器(孔直径:0.45 μm)将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供 0.27g(63%)的作为深绿色固体的具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物 5。通过 <sup>1</sup>H-NMR(<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C) δ /ppm ;1.65-2.10(m, 3H), 2.54(br s, 0.6H), 2.82-3.05(m, 1.3H), 3.15-4.00(m, 395H), 4.25-4.50(m, 2H), 7.72(s, 0.65H), 7.93(br s, 0.15H)进行其鉴别。

[0283] 应指出地是,基于通过 <sup>1</sup>H-NMR 在 3-叠氮基-1-丙基胺的 2-位的 2H(1.67ppm)的减少率,计算环化反应的转化率。如下确定 ICG 部分的导入率:测定具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物的 DMF 溶液的 UV 光谱,然后通过使用 ICG-S-炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长(790nm 左右)下的吸光率确定该比率。观察到已结合有 PEG-5K 的三唑环的质子的化学位移(7.72ppm)不同于具有 ICG 的三唑环的质子的化学位移(7.93ppm)。尽管能够由叠氮基的转化率和 ICG 部分的导入率计算 PEG 部分的导入率,但通过利用上述内容,基于转化为具有 PEG-5K 的三唑环的叠氮基与反应的叠氮基之比和叠氮基的转化率也能够计算该比率。此外,用基于 ICG 和 PEG-5K 部分的导入率计算的分子量确定收率。

[0284] 透明质酸衍生物 5a 和 5b 的 cac 分别为 2.1 和 3.8(×10<sup>4</sup>g/L)。

[0285] 表 6. 具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物 5 的合成

[0286]

聚合物 No.	a/b	收率 (%) <sup>a</sup>	p: q <sup>b</sup>	D <sub>DLS</sub> (nm) <sup>c</sup>
5a	0.75/1.25	63	28:72	84 ± 28
5b	1.00/1.00	63	45:55	84 ± 27

[0287] <sup>a</sup>由基于 ICG 和 PEG-5K 部分的导入率的分子量计算。

[0288] <sup>b</sup>由 UV- 可见测定中吸光率和 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。

[0289] <sup>c</sup>将聚合物溶解在水中后通过动态光散射确定。

[0290] ( 实施例 8 :具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物 6 的合成 )

[0291] 除了将具有 25K 的分子量的 HA-Na 用作起始材料以外,根据与实施例 1 相同的合成路线合成具有近红外色素的透明质酸衍生物 6。

[0292] 通过同时使 ICG- 炔烃和 PEG- 炔烃与具有叠氮基的透明质酸类似物 3 结合,能够各自得到各自具有 ICG 和 PEG 的高分子量透明质酸衍生物 6( 图 24B 和表 7)。以下对典型的合成例进行说明。在氮气氛下,将 23mg 的衍生物 3(MW(HA-Na) = 25K, 50 μmol, 以最小单元计,叠氮化效率: >99%) 装入 25-ml Schlenk 烧瓶中,然后溶解于 2ml 的无水 DMF 中。将 17mg(25 μmol) 的 ICG- 炔烃和 0.15g(75 μmol) 的 PEG- 炔烃已添加到该溶液中后,将 2.9mg(15 μmol) 的 CuI 和 2.3mg(15 μmol) 的 DBU 添加到该混合物中,然后将整体在 60℃ 下搅拌一夜。将 2 毫升的水添加到该溶液中,然后用具有 25K 的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水进行透析 24 小时。用过滤器(孔直径:0.45 μm)对得到的水溶液进行过滤,然后冷冻干燥以提供 42mg(35%) 的作为深绿色固体的具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物 6。通过 <sup>1</sup>H-NMR(<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O, 25℃) δ /ppm ;1.71-2.13(m, 3H), 3.22-4.00(m, 390H), 4.30-4.53(m, 2H), 7.93(br s, 0.99H)) 进行其鉴别。

[0293] 该反应的再现性差。此外,相对于使用的 ICG 的量的低导入量是特征所在。

[0294] 应指出地是,基于通过 <sup>1</sup>H-NMR 在 3- 叠氮基 -1- 丙基胺的 2- 位的 2H(1.67ppm) 的减少率,计算环化反应的转化率。如下确定 ICG 部分的导入率:测定具有 ICG 和 PEG 的透明质酸衍生物的 DMF 溶液的 UV 光谱,然后通过使用 ICG- 炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长(790nm 左右)下的吸光率确定该比率。由叠氮基的转化率和 ICG 部分的导入率计算 PEG 部分的导入率。此外,用基于 ICG 和 PEG 部分的导入率计算的分子量确定收率。

[0295] 透明质酸衍生物 6a 和 6b 的 cac 分别为 14 和 18(×10<sup>4</sup>g/L)。

[0296] 表 7. 具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物 6 的合成

[0297]

聚合物 No.	a/b	收率 (%) <sup>a</sup>	p: q <sup>b</sup>	D <sub>DLS</sub> (nm)
6a	0.50/1.50	35	4:96	26 ± 6 <sup>a, d</sup> 150 ± 77 <sup>a, d</sup>
6b	0.75/1.25	34	16:84	111 ± 45 <sup>a</sup>

[0298] <sup>a</sup>由基于 ICG 和 PEG 部分的导入率的分子量计算。

[0299] <sup>b</sup>由 UV- 可见测定中吸光率和 <sup>1</sup>H-NMR 的积分值计算。

[0300] <sup>c</sup>将聚合物溶解在水中后通过动态光散射确定。

[0301] <sup>d</sup>两种颗粒之间的散射强度比为 1:2。

[0302] 将聚合物溶解于 DMF 中 ;将该溶液与相同量的水混合 ;和通过透析将 DMF 除去后通过光散射确定。

[0303] ( 实施例 9 :通过荧光成像的肿瘤造影能力的评价 )

[0304] 采用与上述实施例 3 相同的方法对上述实施例 6-8 中得到的化合物评价它们的肿瘤造影能力。关于已将透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 给药的小鼠的全身荧光图像,在给药后 24 小时,用 IVIS( 商标 ) Imaging System 200 系列 (XENOGEN) 获得小鼠的亮场图像和荧光图像。注射剂量为 50nmol 每个小鼠,以色素量计,并且作为 100  $\mu$  L 的 PBS 溶液将色素注入每个小鼠的尾部静脉。图 25A 示出给药后 24 小时小鼠的荧光图像。在所有样品中观察到图 25A 中用白色箭头表示的肿瘤位置处的荧光信号。结果显示本发明的透明质酸衍生物能够对肿瘤造影并且作为肿瘤的光学成像用造影剂显示其有效性。

[0305] 图 25B 中,由图 25A 中所示的荧光成像数据得到肿瘤位置 ( 测定区域 : 0.5 $\times$ 0.5cm ) 的荧光强度与腿根部 ( 作为正常位置选择,测定区域 :0.5 $\times$ 0.5cm ) 的荧光强度之比,然后作为信噪比 (SNR) 转化为数值。即,SNR 为显示各个化合物的肿瘤可视力的参数并且随着 SNR 增大,该化合物作为肿瘤的光学成像用造影剂变得更有效。由图 25B 显示,所有化合物的 SNR 为 1.5 以上,并且由于它们特别高的 SNR,因此衍生物 4b 和 6b 是具有优异的肿瘤造影能力的化合物。

[0306] ( 实施例 10 :肿瘤积累性和血液中色素残留率的评价 )

[0307] 通过确定实施例 9 中进行的肿瘤造影实验的小鼠的肿瘤中色素的量和其血液中色素的量来对透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 评价它们的肿瘤积累性和血液中色素残留率。采用与实施例 4 相同的方法评价肿瘤积累性。采用与实施例 2 相同的方法评价血液中色素残留率。图 26A 示出结果。在已经将根据本发明的透明质酸衍生物给药的小鼠的肿瘤中检测到色素,因此确认了在肿瘤中积累。肿瘤积累性在 1.7% -18.5% 的范围内并且衍生物 6b 显示最高的肿瘤积累性,即,18.5% ID/g。尽管其在血液中的色素残留率低的事实,但由于其肿瘤积累性较高,因此发现具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4 是具有高肿瘤选择性的化合物。观察到下述倾向 :随着 ICG 含量增加,肿瘤积累性降低。在具有 ICG 和 PEG-5K 的透明质酸衍生物 5 中,与具有 2K 的 PEG 分子量的化合物 ( 例如衍生物 1i ) 相比,肿瘤积累性降低,而血液中色素残留率增加。具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物 6 的肿瘤积累性和血液中浓度高。可能由于其在血液中极高的保持性,肿瘤积累性改善。

[0308] ( 实施例 11 :光声信号的测定 )

[0309] 以与实施例 5 中相同的方式测定透明质酸衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 的光声信号。作为比较例,同样地对 ICG 的水溶液进行测定。图 26B 表示相对于 ICG 的光声信号强度的本发明的化合物的光声信号强度。由图 26B 可以看到,衍生物 4a、4b、4c、5a、5b 和 6b 能够发出光声信号并且能够提供比 ICG 高的光声信号强度。具体地,具有 ICG-S 和 PEG 的透明质酸衍生物 4 与 ICG 相比,显示光声信号强度增加 1.3-1.4 倍。信号强度增加的可能的机理是例如,色素自身的热转换效率高于 ICG,或者色素的分子强烈地聚集并且将色素与作为介质的水屏蔽,因此捕集热。本实施例的结果已确认本发明的化合物作为光声造影剂发挥功能。

[0310] ( 实施例 12 :从患有癌症的小鼠的肿瘤位置的光声信号的强度测定 )

[0311] 如下所述测定从患有癌症的小鼠的肿瘤位置的光声信号的强度。使用可商购的光

声成像装置 (Nexus 128, 由 Endra Inc. 制造)。将光的波长设定为 790nm。在本发明的化合物的给药前和给药后 24 小时测定来自肿瘤位置的光声信号, 然后对每个信号获得三维重组数据。用得到的三维重组数据和软件 (GEHC MICROVIEW, GE Healthcare) 定作为关注区域 (ROI) 的整个测定区域 (2cm×2cm×2cm) 的光声强度。将实施例 3 中所述的小鼠用作患有癌症的小鼠。将根据本发明的实例的化合物 1a、1c、1i、2c、2g、4a 和 4b 和作为对照的生理盐水药。对于注射剂量的每种化合物, 将 50nmol 的 ICG 给药于小鼠。

[0312] 表 8 表示给药前和给药后 24 小时来自肿瘤位置的光声信号之比在全部化合物中, 发现与参照相比, 给药后光声信号增大。结果已明本发明的化合物能够进行肿瘤的光声成像。

[0313]

表 8. 化合物的给药前后来自肿瘤位置的光声信号的强度之比

化合物	光声信号的强度之比(给药后/给药前)					平均值的标准偏差
	实验 1	实验 2	实验 3	三次实验的平均值	平均值的标准偏差	
1a	3.9	4.2	3.4	3.8	0.4	
1c	4.7	6.6	10.9	7.4	3.2	
1i	3.5	6.6	7.1	5.7	1.9	
2c	4.1	3.6	3.5	3.8	0.3	
2g	2.5	8.2	2.8	4.5	3.2	
4a	1.0	2.3	3.2	2.2	1.1	
4b	5.2	1.1	1.2	2.5	2.4	
参照(生理盐水)	0.7	无	无	0.7	不能计算	

[0314] (实施例 13:具有 ICG、PEG 和 RGD 的透明质酸衍生物 7 的合成)

[0315] 通过将环状 RGD 肽导入相对于透明质酸衍生物 3(表 1,项目 No. 3) 未反应的 HA 的

羧基部分,其中已将 3-叠氮基-1-丙基胺部分地导入 HA,其在实施例 1(4)中得到,从而合成具有叠氮基和 RGD 的透明质酸衍生物,然后进行 ICG 和 PEG 与衍生物的结合(图 27)。以下对具体实施例进行说明。

[0316] 通过使 12mg 的在表 1 的项目 No. 3 的条件下得到的其 90%的基团已结合有 3-叠氮基-1-丙基胺的透明质酸衍生物(MW(HA-Na) = 8K, 30  $\mu$ mol,以最小单元计)进行实施例 1(2)中所述的反应,从而进行阳离子交换。随后,在氮气氛下,将 9.7mg 的得到的白色固体(20  $\mu$ mol,以最小单元计)装入 25-mL Schlenk 烧瓶中,然后溶解于 0.50ml 的无水 DMSO 中。将 9.5 毫克(18  $\mu$ mol)的 PyBOP 和 2.4mg(18  $\mu$ mol)的 HOBt 添加到该溶液中。然后,将 11mg(18  $\mu$ mol)的环状 RGD 肽(RGD-NH<sub>2</sub>)的 1.1ml 的 DMSO 溶液添加到该混合物中,然后在室温下将整体搅拌 18 小时。将水添加到该溶液中,用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>洗涤水层,并且用具有 3.5K 的分子量截止的透析膜对水层进行透析 24 小时。以两阶段将产物冷冻干燥以提供 6.5mg(43%)的作为白色固体的透明质酸衍生物,其中叠氮基的导入效率和 RGD 的导入效率分别为 90%和 10%。通过 <sup>1</sup>H-NMR 进行其鉴别。应指出地是,由透明质酸中 N-乙酰基(Ac)的 3H(1.87ppm)与 RGD 的苯基丙氨酸中苯基(Ph)的 5H(7.05-7.28ppm)之比,计算 RGD 的导入效率。结果如下:<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C)  $\delta$ /ppm; 1.69(s, 1.8H), 1.88(s, 3H), 3.00-3.85(m, 14H), 4.39(m, 2H), 7.05-7.28(m, 0.50H)。

[0317] 接下来,使 ICG-炔烃和 PEG-炔烃作用于在与实施例 1(5)的那些相同的反应条件下在上述得到的具有叠氮基和 RGD 的透明质酸衍生物以 53%的收率提供具有 ICG、PEG 和 RGD 的透明质酸衍生物 7(图 27)。ICG、PEG 和 RGD 之间的导入率为 17:73:10。通过 <sup>1</sup>H-NMR(<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C)  $\delta$ /ppm; 1.70-2.15(m, 3H), 3.10-4.00(m, 261H), 4.25-4.50(m, 2H), 7.94(br s, 0.89H))进行其鉴别。应指出地是,通过本申请说明书的[0079]中记载的方法确定环化反应的转化率。水中自组装形成的所得化合物具有 94 $\pm$ 68nm 的颗粒直径和 4.0 $\times$ 10<sup>4</sup>g/l 的临界凝聚浓度。

[0318] 本发明的有利效果

[0319] 本发明人首次发现,通过同时使 ICG 衍生物和 PEG 与透明质酸结合,能够增加透明质酸衍生物的 ICG 含量,并且成功地开发了具有高 ICG 含量的透明质酸衍生物。如单独地将 ICG 对活体给药的情形相比,根据本发明的透明质酸衍生物具有高的血液中的保持性或者高的肿瘤中的积累性,并且从血液或肿瘤中发出的光声信号的强度大。此外,由于高 ICG 含量,因此单位透明质酸的光声信号的强度大。

[0320] 尽管已参照例示实施方案对本发明进行了说明,但应理解本发明并不限于所公开的例示实施方案。下述权利要求的范围应给予最宽泛的解释以包括所有这样的变形以及等同的结构和功能。

[0321] 本申请要求于 2013 年 2 月 22 日提交的日本专利申请 No. 2013-033633 的权益,由此通过引用将其全文并入本文。



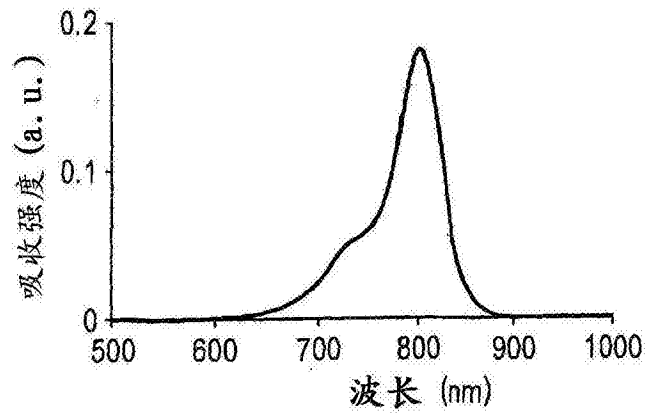


图 1C

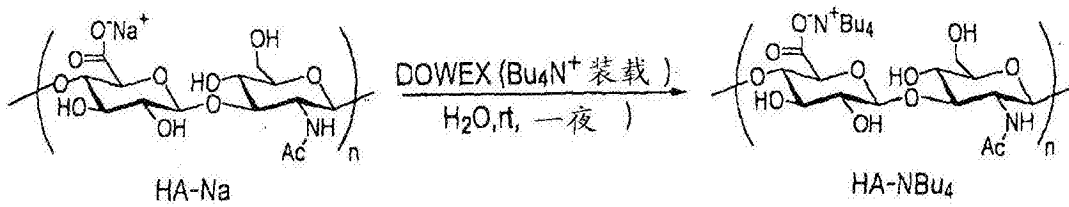


图 2

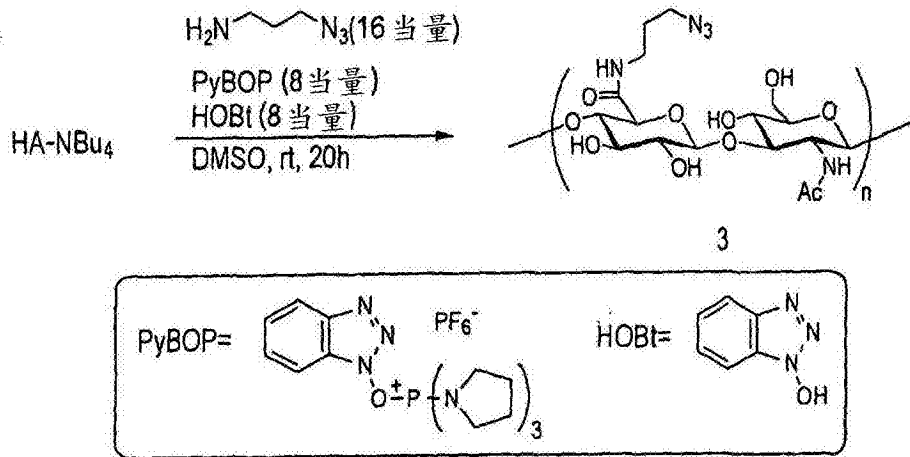


图 3A



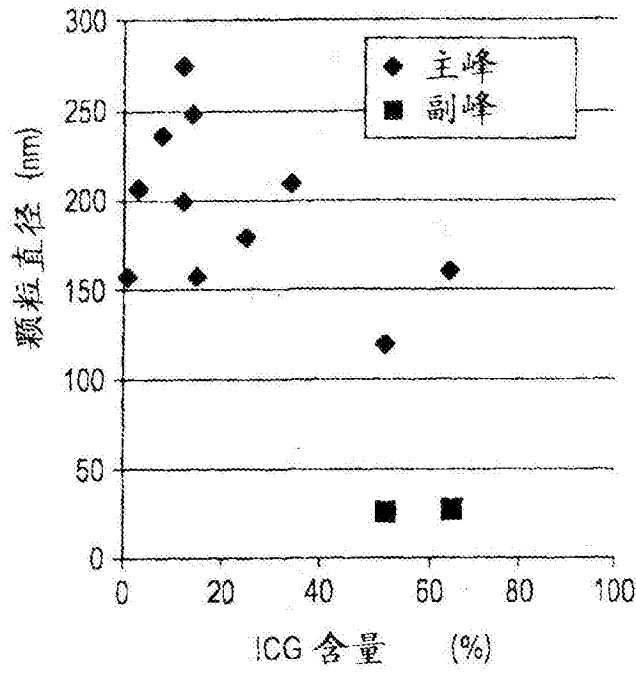


图 5A

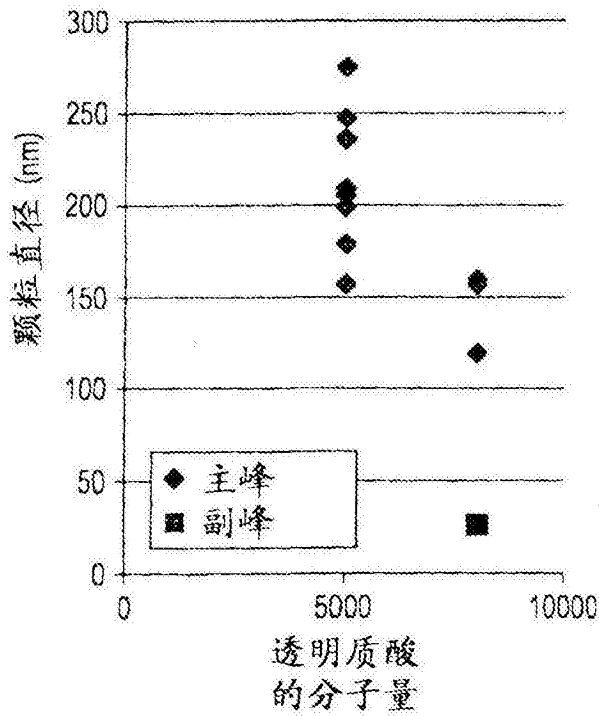


图 5B

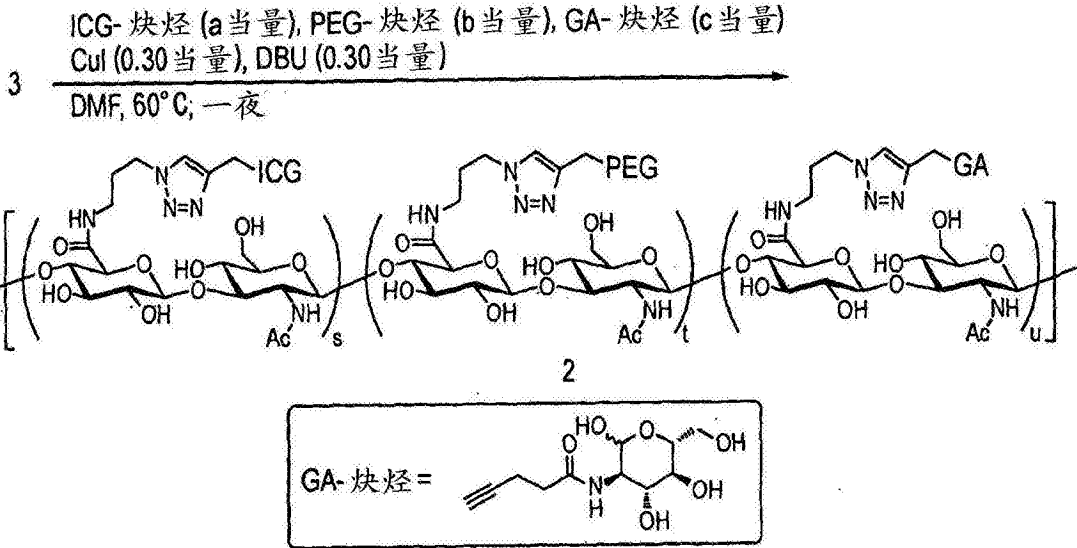


图 6

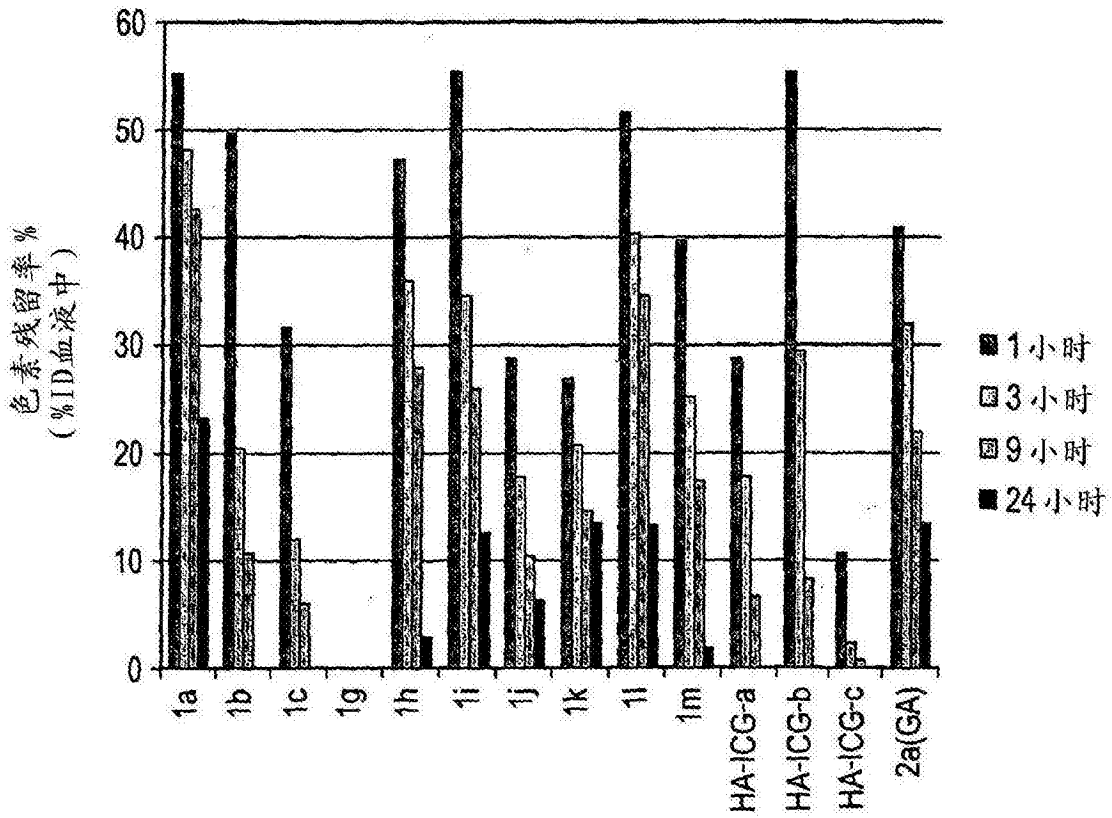


图 7

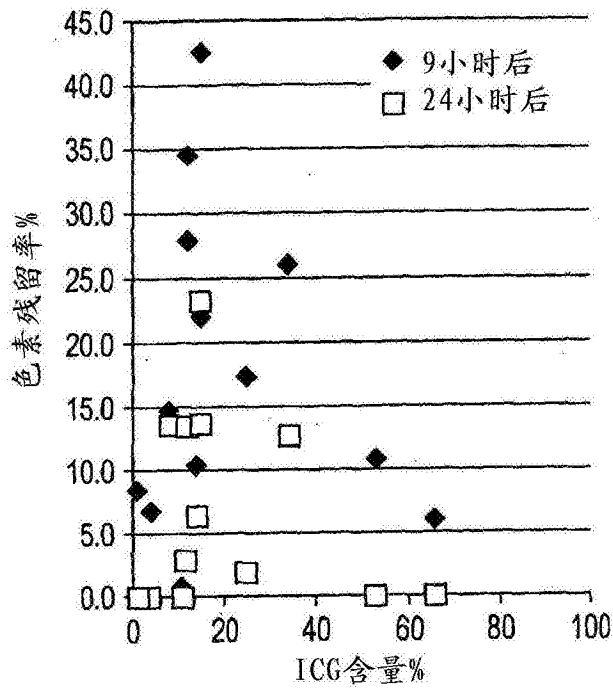


图 8A

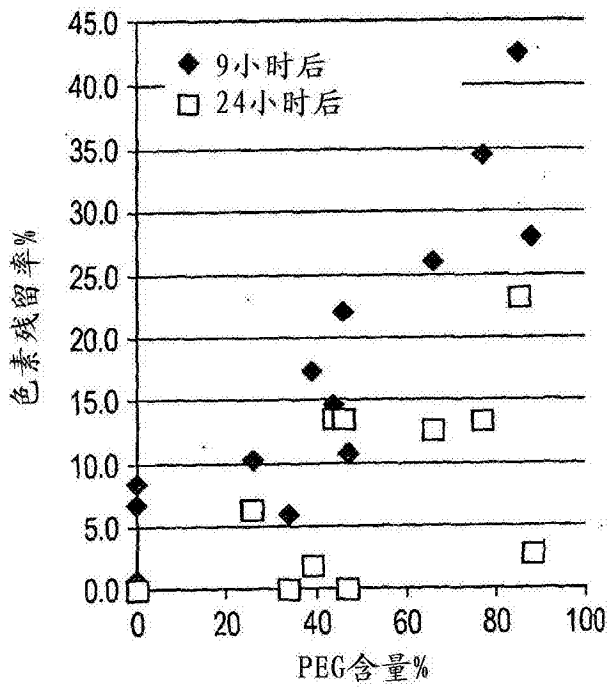


图 8B

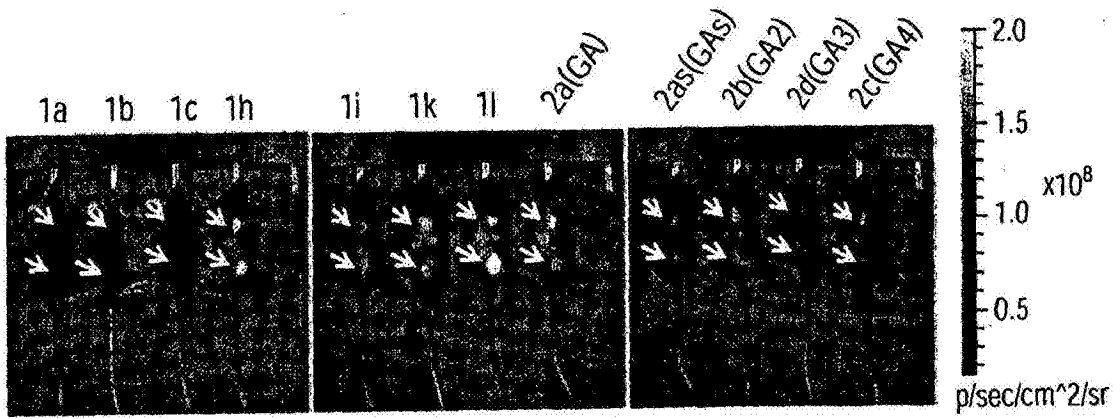


图 9

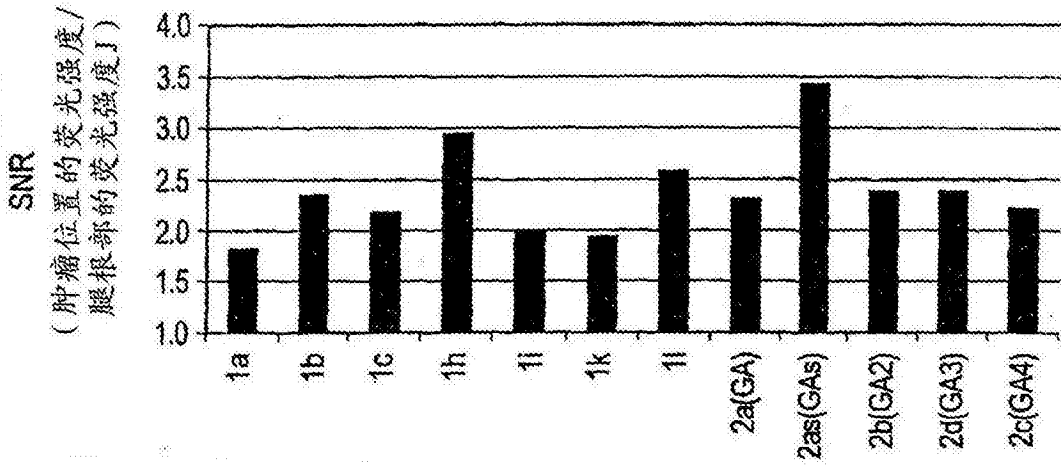


图 10A

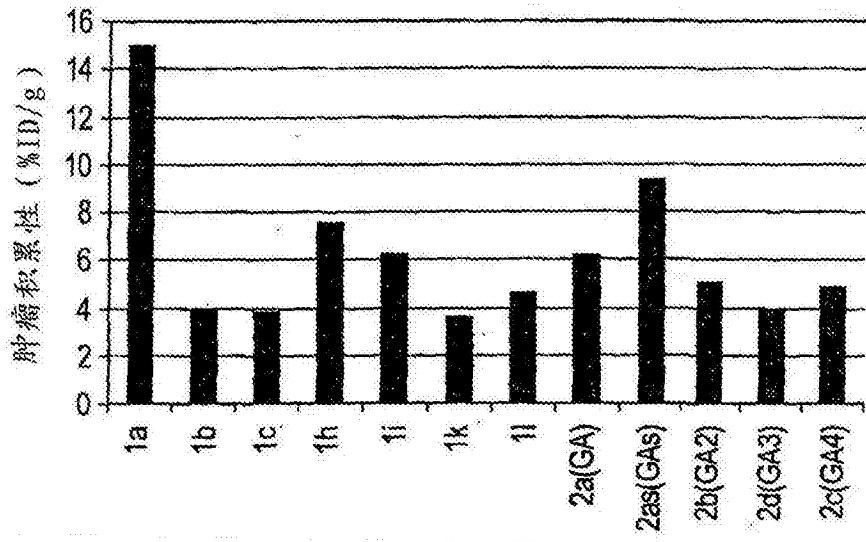


图 10B

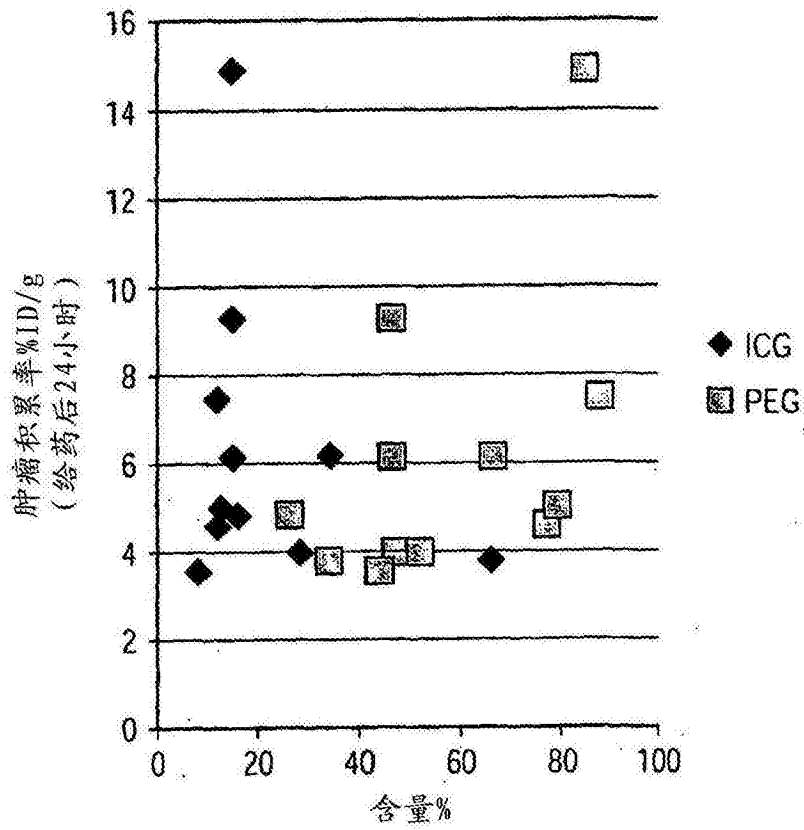


图 11

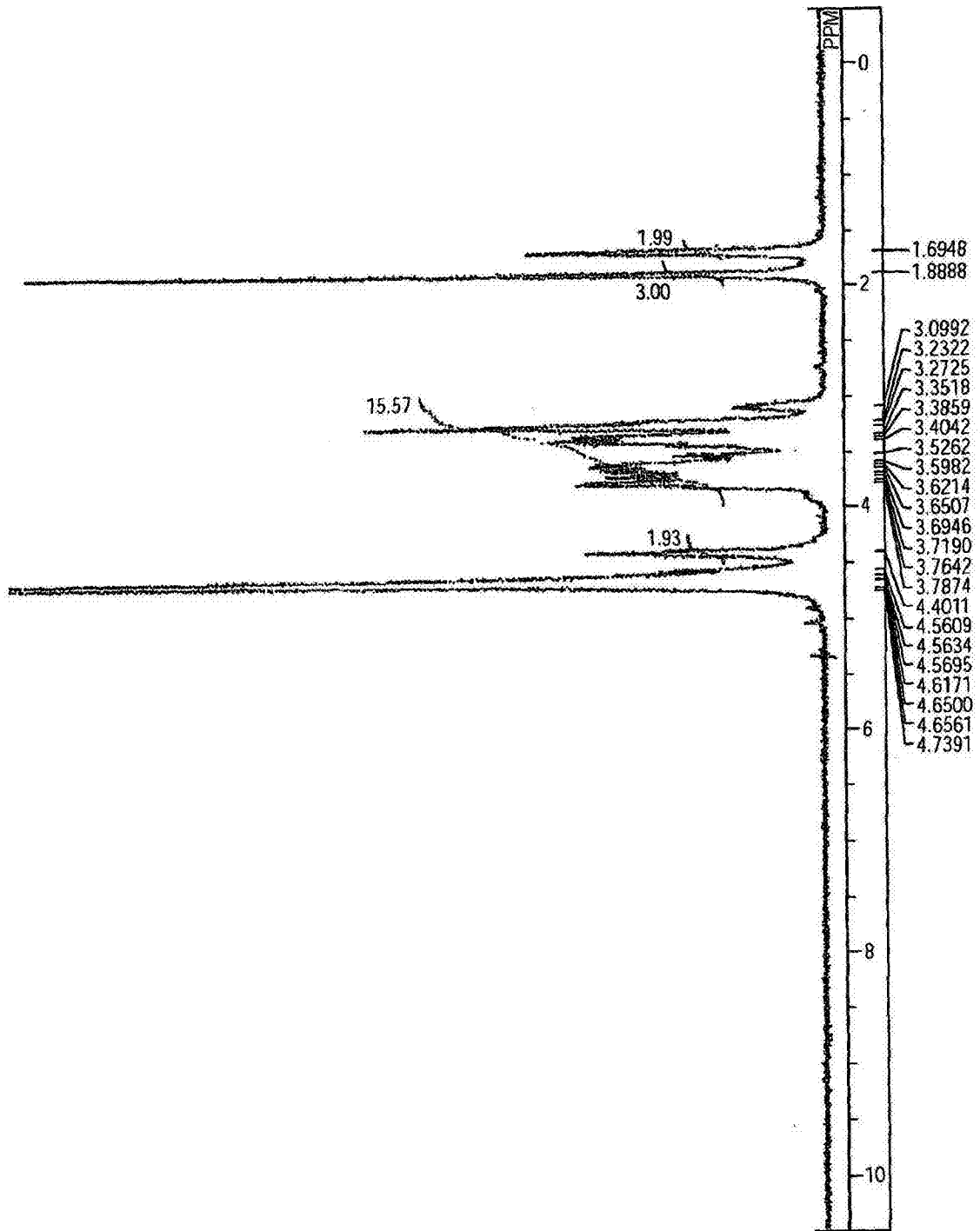


图 12

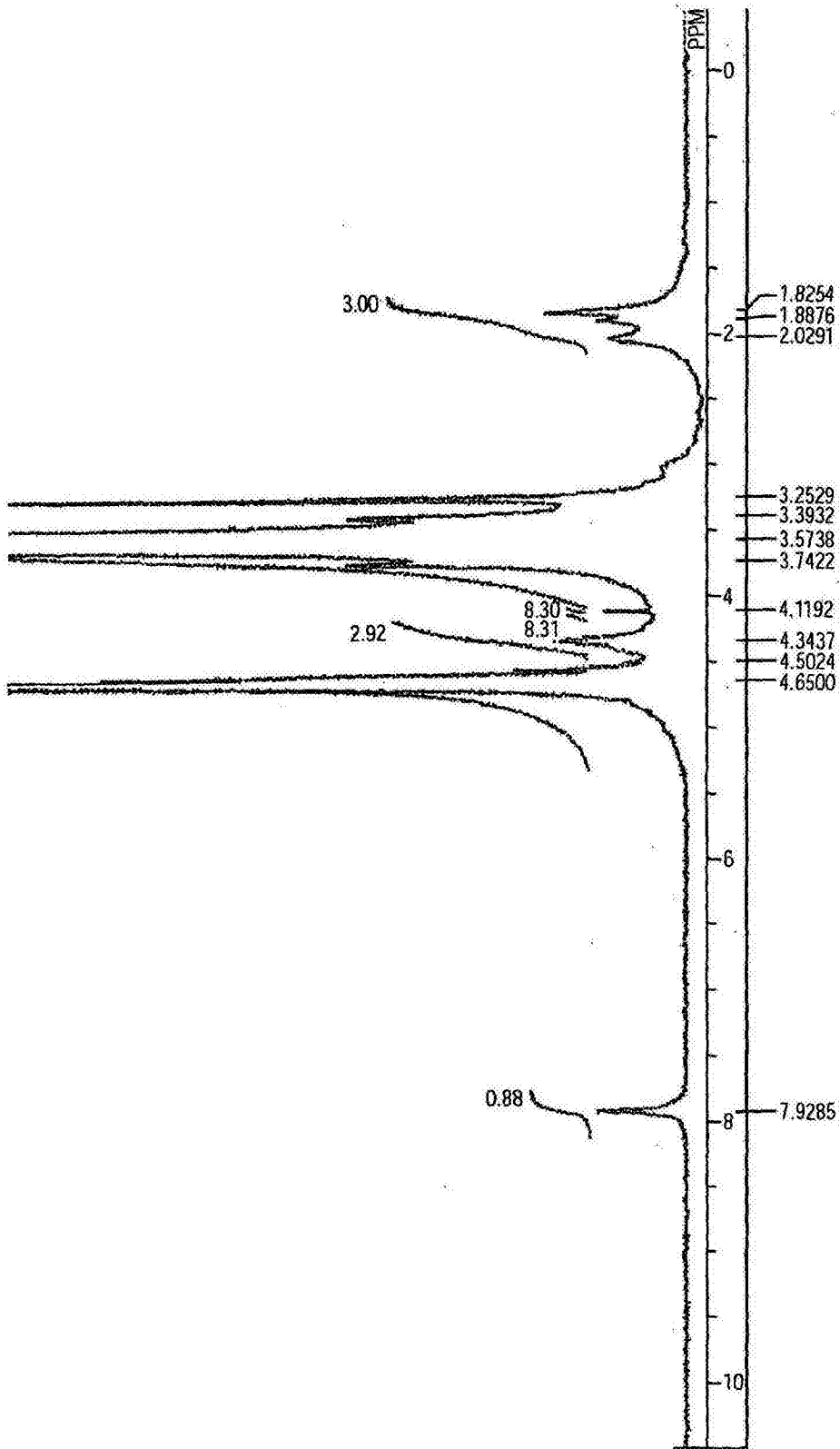


图 13

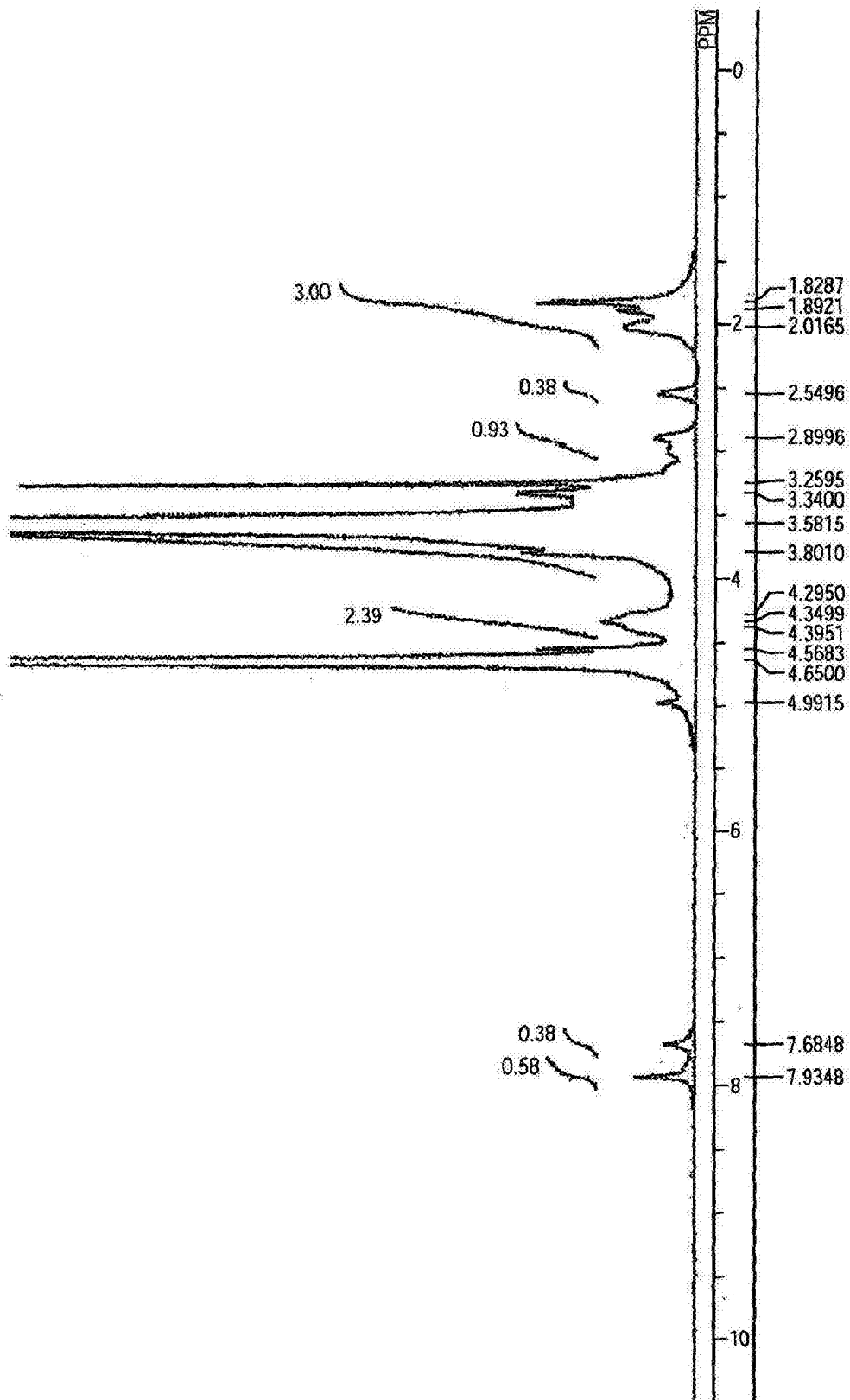


图 14

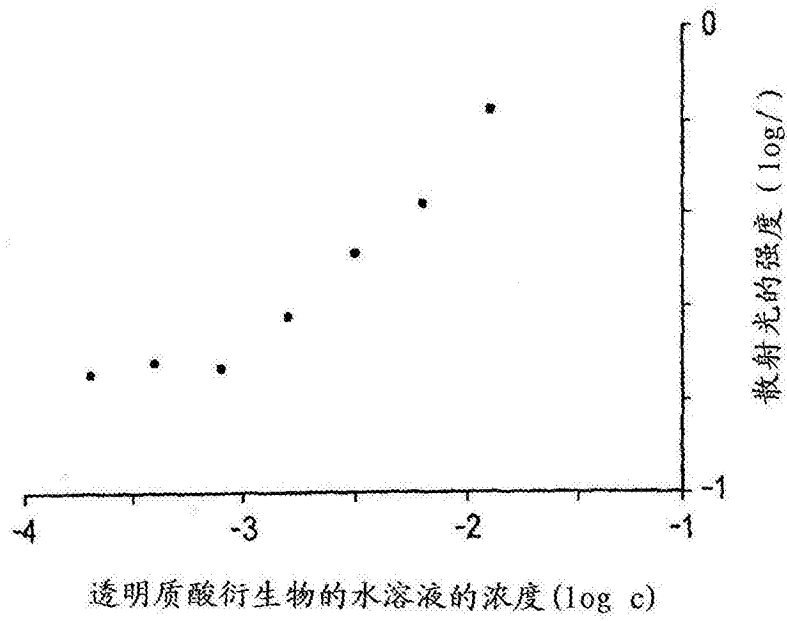


图 15

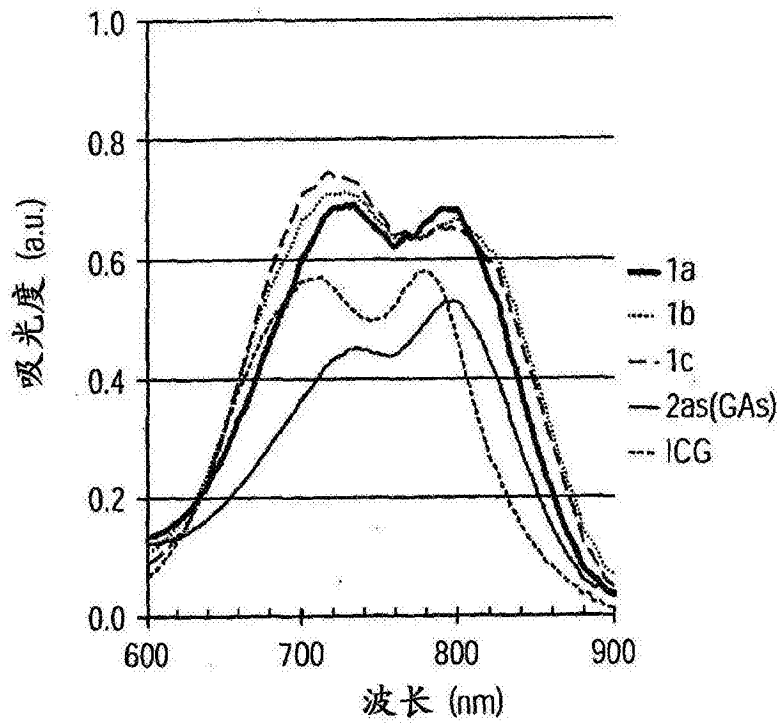


图 16A

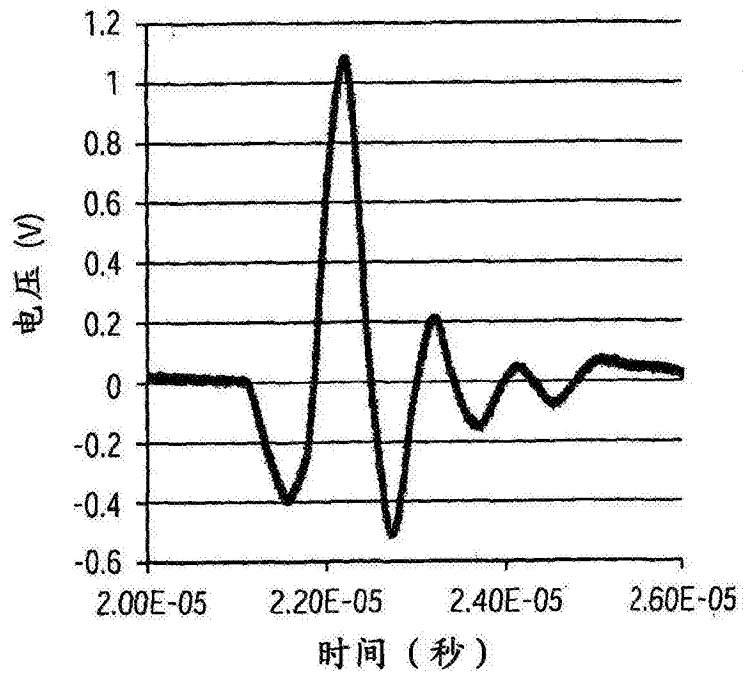


图 16B

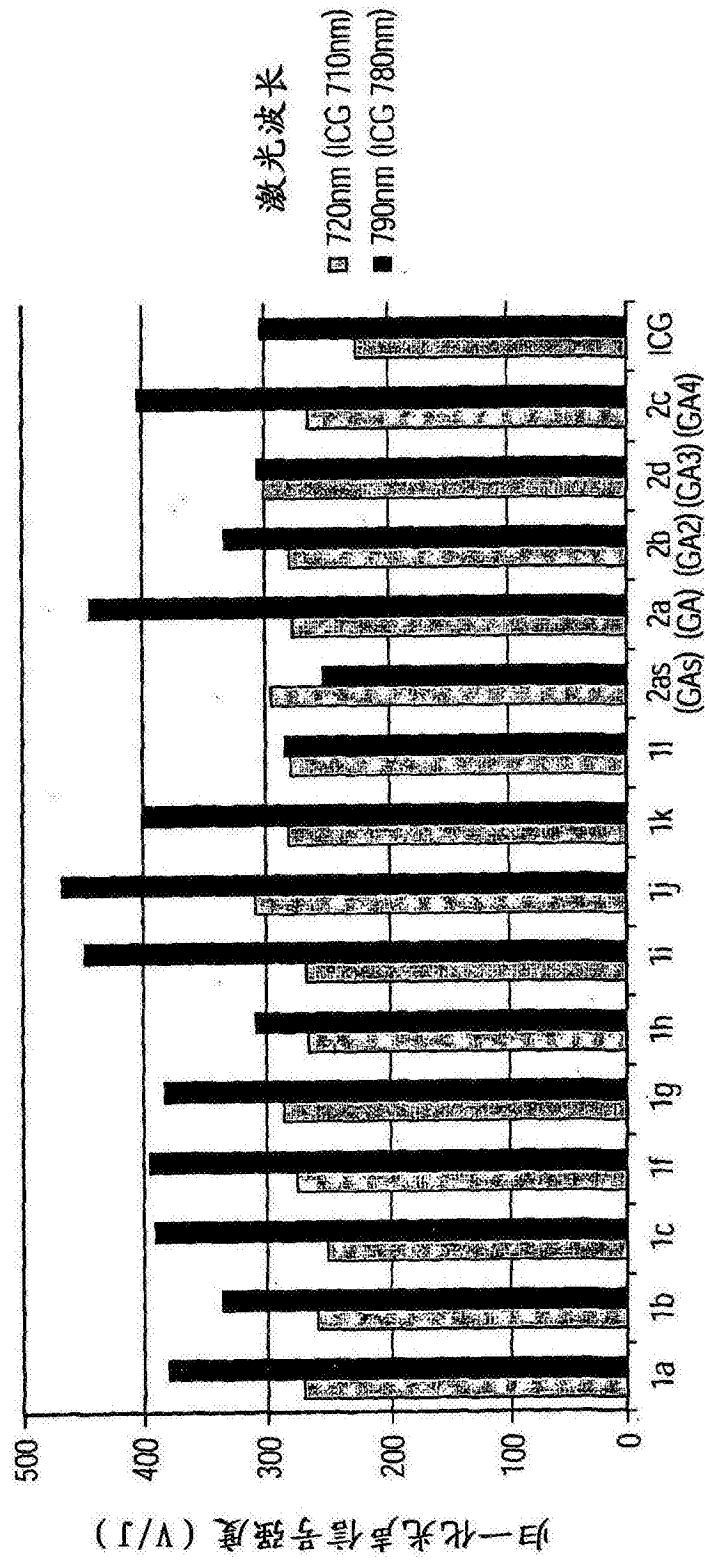


图 17

	透明质酸 单元的 表观 分子量	与透明质 酸结合的 ICG的数目	整个聚合物 的分子量	在790nm下透明质酸 衍生物的吸光系数 (/M·cm)
1a	2.3E+03	3.0	4.5E+04	5.4E+05
1b	1.8E+03	10.6	3.5E+04	1.9E+06
1c	1.6E+03	13.2	3.2E+04	2.4E+06
1f	4.7E+02	0.1	5.8E+03	2.3E+04
1g	2.4E+03	0.4	3.0E+04	6.8E+04
1h	2.3E+03	1.5	2.9E+04	2.7E+05
1i	2.0E+03	4.3	2.5E+04	7.7E+05
1j	1.1E+03	1.8	1.3E+04	3.2E+05
1k	1.4E+03	1.0	1.7E+04	1.8E+05
1l	2.1E+03	1.5	2.6E+04	2.7E+05
1m	1.4E+03	3.1	1.8E+04	5.6E+05
1n	2.3E+03	6.9	1.4E+05	1.2E+06
2a (GA)	1.8E+03	3.0	3.5E+04	5.4E+05
2as (GAs)	1.8E+03	3.0	3.5E+04	5.4E+05
2b (GA2)	2.2E+03	2.6	4.4E+04	4.7E+05
2d (GA3)	1.8E+03	3.5	2.3E+04	6.3E+05
2c (GA4)	1.5E+03	3.2	3.0E+04	5.8E+05
2e (GA5)	1.6E+03	8.2	3.2E+04	1.5E+06
2f (GA6)	1.7E+03	5.6	2.1E+04	1.0E+06
2g (GA7)	1.7E+03	7.3	2.1E+04	1.3E+06

图 18

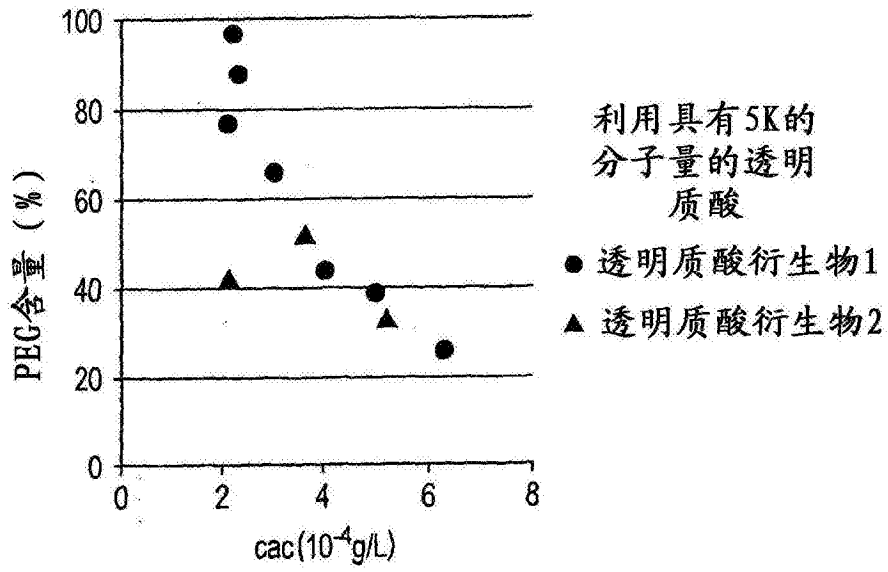


图 19A

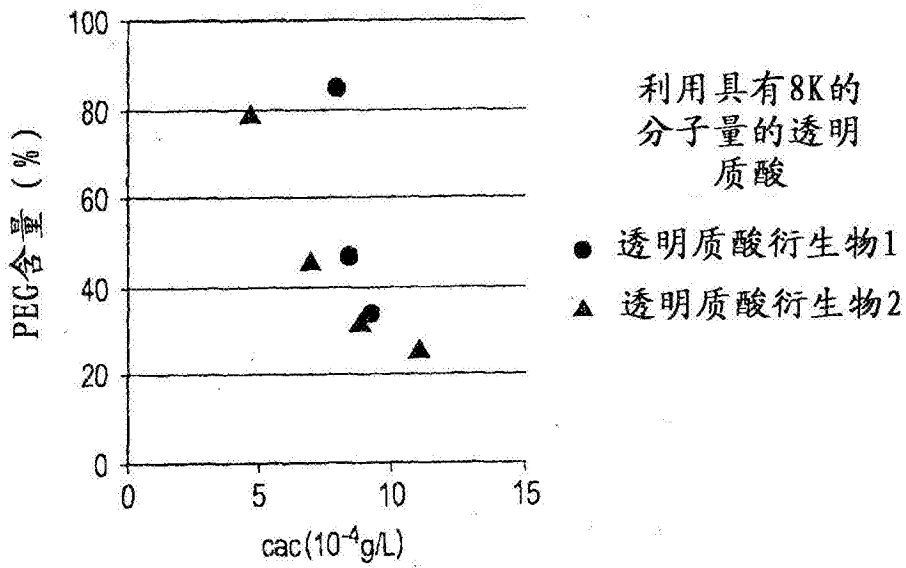


图 19B

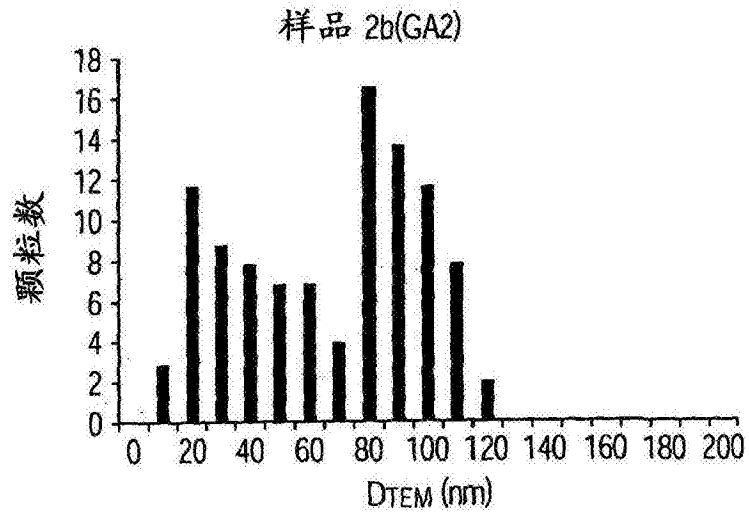


图 20A

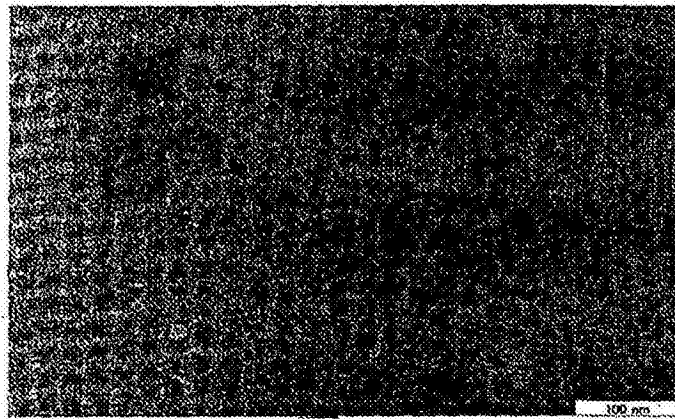


图 20B

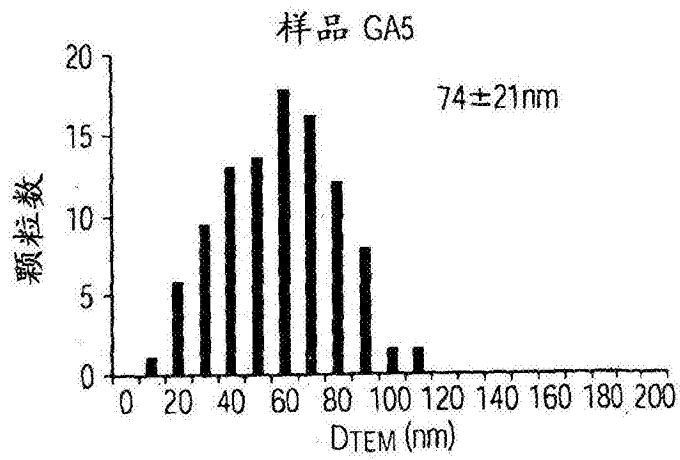


图 20C

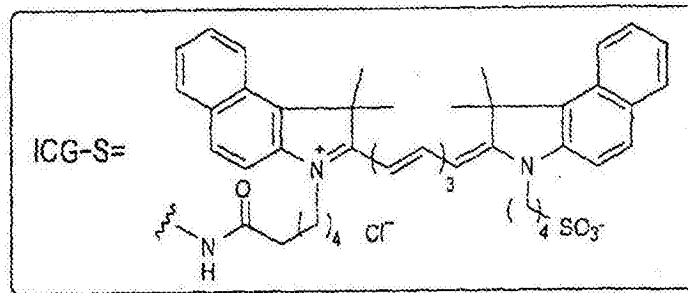
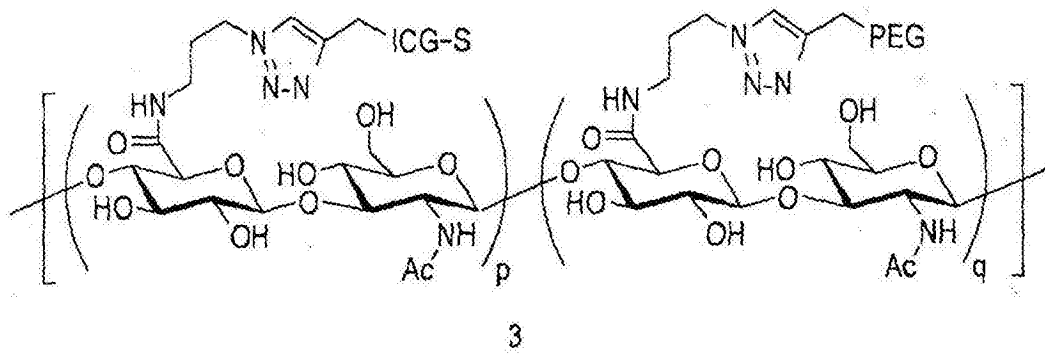


图 21A

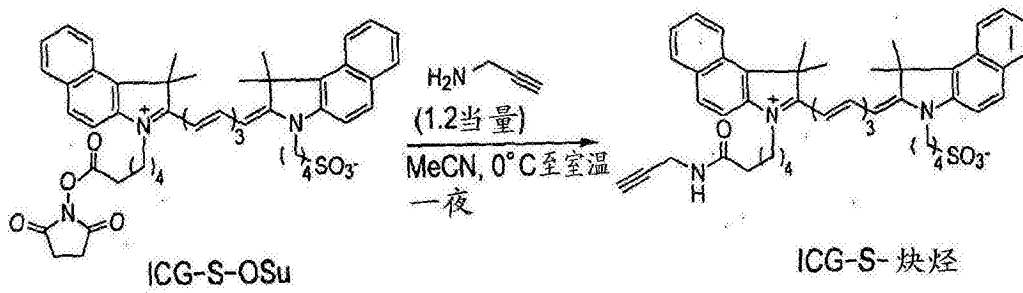


图 21B

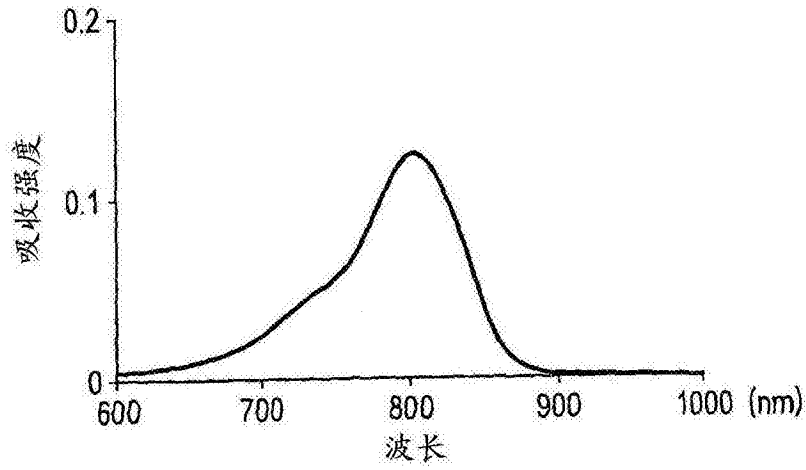
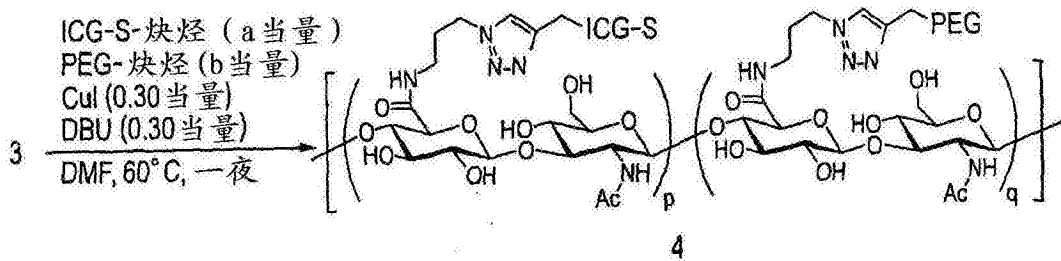


图 21C



(叠氮化物部分的导入率: ~100%)

图 22

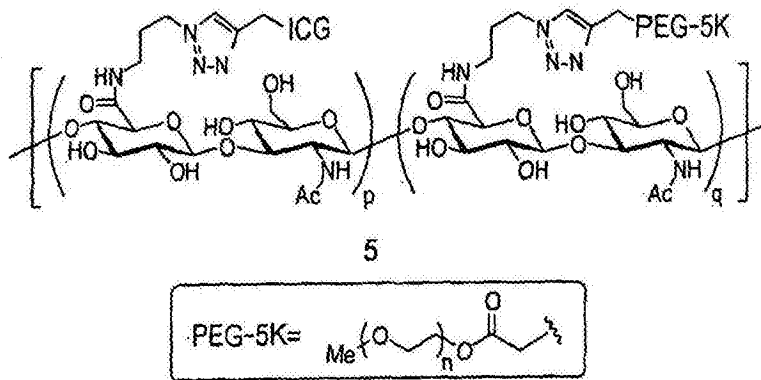


图 23A

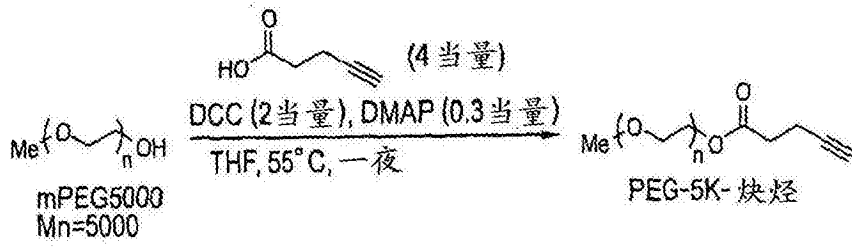


图 23B

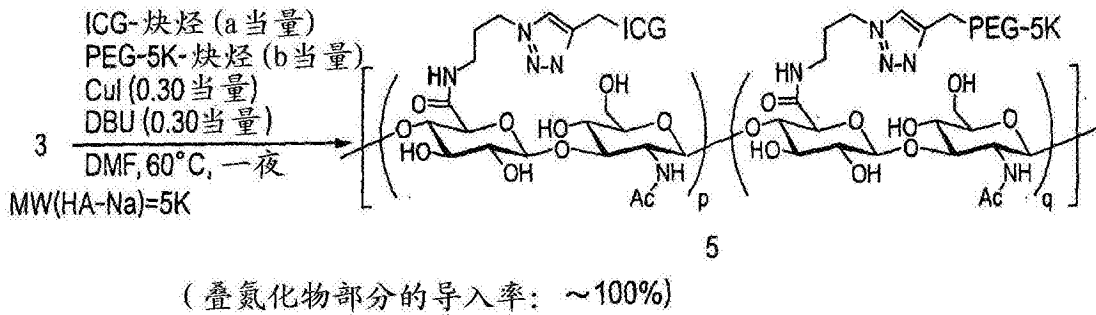


图 24A

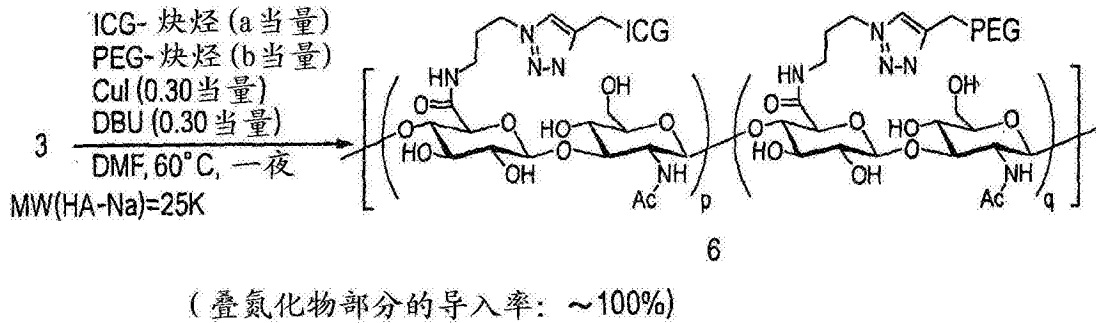


图 24B

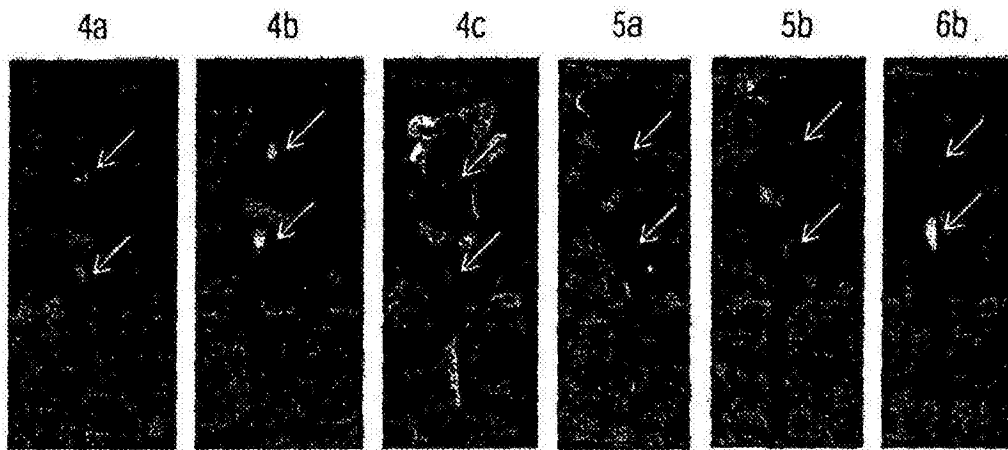


图 25A

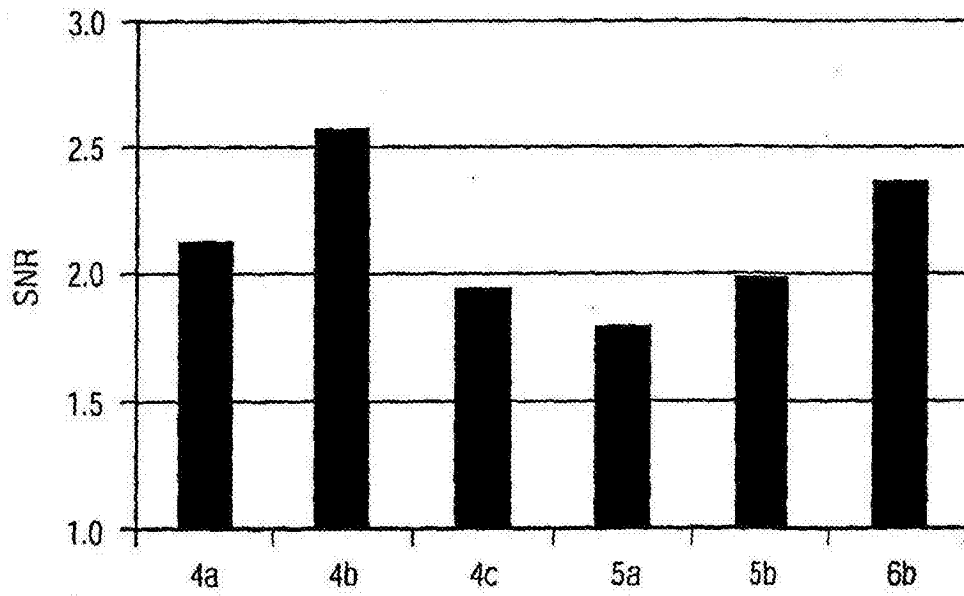


图 25B

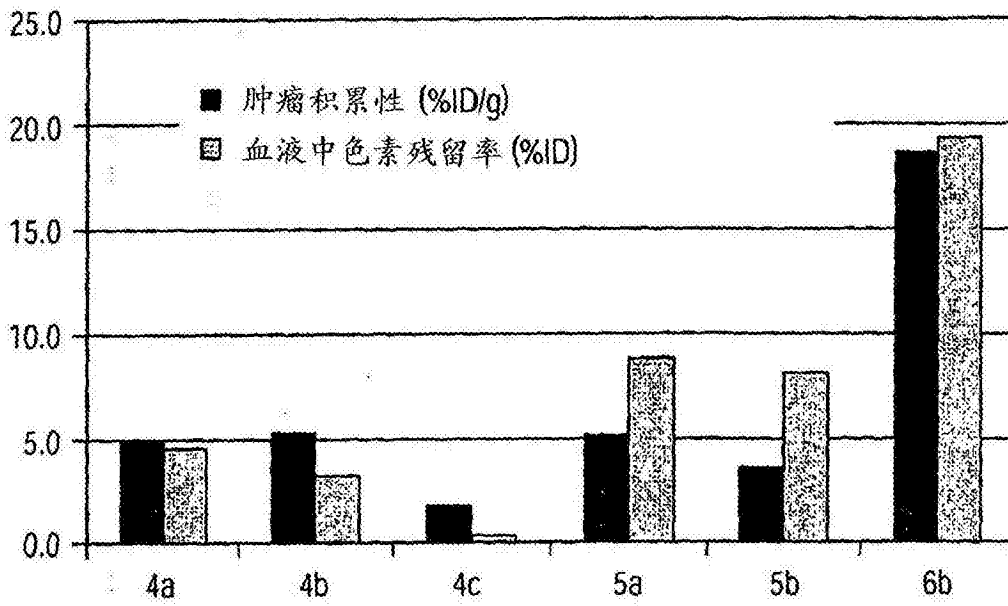


图 26A

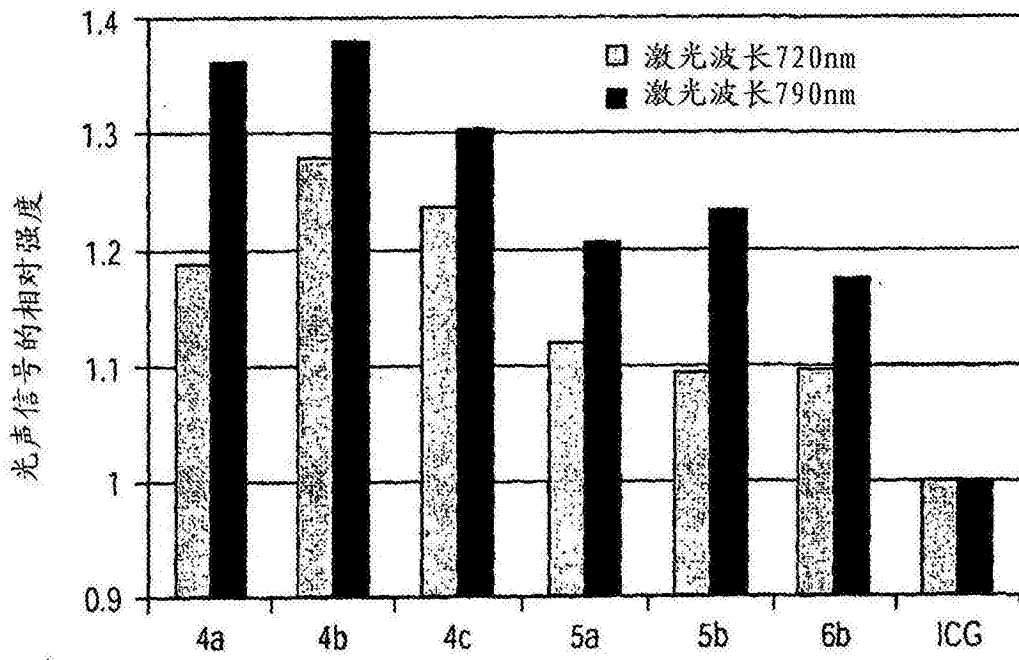


图 26B



专利名称(译)	近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括其的光学成像用造影剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN105008402A</a>	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201480009911.9	申请日	2014-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
[标]发明人	三木康嗣 井上达广 小林靖人 中野克哉 大江浩一 山内文生 矢野哲哉 南昌人		
发明人	三木康嗣 井上达广 小林靖人 中野克哉 大江浩一 山内文生 矢野哲哉 南昌人		
IPC分类号	C08B37/08 A61B5/00		
CPC分类号	C08B37/0072 A61K49/221 A61K47/50 A61K47/51 A61K47/55 A61K47/56 A61K47/61 A61K49/0034 A61K49/0054		
代理人(译)	石宝忠		
优先权	2013033633 2013-02-22 JP		
其他公开文献	CN105008402B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供具有高ICG含量的化合物，其在肿瘤中具有高积累性并且具有大强度的从肿瘤中发出的光声信号，即使给药后经过一段时间。具体地，本发明提供使聚乙二醇和ICG衍生物与其结合的透明质酸衍生物。

