

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 535041

(P2003 - 535041A)

(43)公表日 平成15年11月25日(2003.11.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 0 7 D405/14		C 0 7 D405/14	4 C 0 5 7
A 6 1 B 1/00	300	A 6 1 B 1/00	300 D 4 C 0 6 1
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 41/00	4 C 0 6 3
41/00		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00		C 0 7 H 15/26	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全 67数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 552801(P2001 - 552801)
(86)(22)出願日	平成13年1月17日(2001.1.17)
(85)翻訳文提出日	平成14年7月17日(2002.7.17)
(86)国際出願番号	PCT/US01/01471
(87)国際公開番号	W001/052746
(87)国際公開日	平成13年7月26日(2001.7.26)
(31)優先権主張番号	09/484,321
(32)優先日	平成12年1月18日(2000.1.18)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	09/757,733
(32)優先日	平成13年1月9日(2001.1.9)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	マリンクロッド・インコーポレイテッド M A L L I N C K R O D T I N C . アメリカ合衆国、63134 ミズーリ州、セン トルイス、マクドネル ブールバード675、 ピー・オー・ボックス 5840
(72)発明者	サミュエル・アイ・アチレフ アメリカ合衆国630443ミズーリ州セント・ル イス、サン・セビリヤ・コート3424番
(72)発明者	ラガバン・ラジャゴパラン アメリカ合衆国63043ミズーリ州メリーラン ド・ハイツ、ピンソン・コート13031番
(74)代理人	弁理士 青山 葵 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 広用途の親水性染料

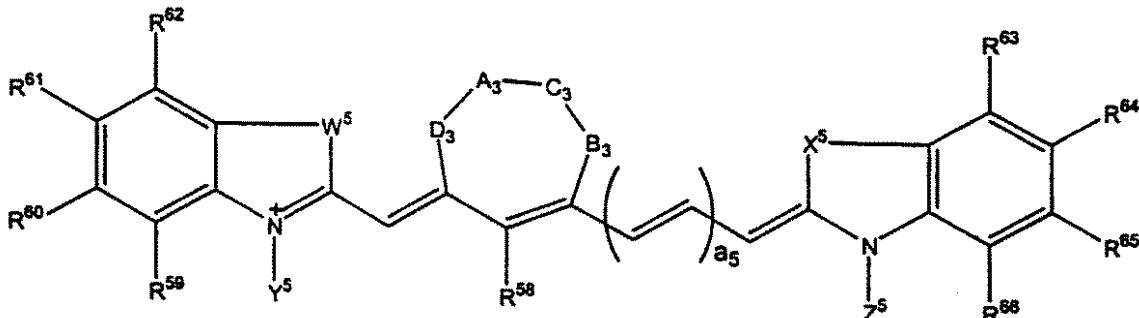
(57)【要約】

診断用イメージングおよび治療に有用な染料 - ペプチドコンジュゲートを開示する。該染料 - ペプチドコンジュゲートには、多様なビス - およびテトラキス (カルボン酸) 同族体を有する数種のシアニン染料が含まれる。該化合物は、生物活性ペプチド、炭水化物、ホルモン、薬剤、または他の生物活性物質とコンジュゲートし得る。化合物のサイズが小さいため、分子量が大きいイメージング剤と比べて腫瘍細胞への送達がより有利になる。多様な染料が、350 - 1300 nm の範囲に渡って有用であり、正確な範囲は特定の染料に応じて決まっている。ジメチルスルホキシドの使用は、化合物の蛍光の維持を補助する。本発明の分子は、診断用イメージングおよび治療に、腫瘍および他の異常の検出のための内視鏡的応用で、局所的治療に、腫瘍の光音響的イメージング、検出および治療に、並びに腫瘍の音蛍光イメージング、検出および治療に、有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式

【化 1】



$N(R^3) - (CH_2)_a - CONH - Dm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - N(R^3) - (CH_2)_a - NHCO - Dm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - N(R^3) - CH_2 - (CH_2OCH_2)_d - CONH - Dm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - N(R^3) - CH_2 - (CH_2OCH_2)_d - NHCO - Dm$ 、 $- (CH_2)_a - NR^3R^4$ および $- CH_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2NR^3R^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 は単または二重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 は、独立して $- O -$ 、 $- S -$ 、 $- Se -$ 、 $- P -$ 、 $- CR^1R^2$ 、 $- CR^1$ 、アルキル、 NR^3 および $- C = O$ から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 は、一緒になって6～12員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい6～12員複素環状環を形成し得、 a_5 は0～5の範囲で変化し、 $R^1 \sim R^4$ および $R^{5\sim 8} \sim R^{6\sim 6}$ は、独立して水素、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_5 - C_{20}$ アリール、 $C_1 - C_{10}$ アルコキシリル、 $C_1 - C_{10}$ ポリアルコキシリル、 $C_1 - C_{20}$ ポリヒドロキシリル、 $C_5 - C_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $C_1 - C_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $- CH_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2 - OH$ 、 $- (CH_2)_a - CO_2H$ 、 $- (CH_2)_a - CONH - Bm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - CONH - Bm$ 、 $- (CH_2)_a - NHCO - Bm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - NHCO - Bm$ 、 $- (CH_2)_a - OH$ および $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CO_2H$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は、独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は独立して1～20の範囲で変化し、 b および d は独立して1～100の範囲で変化する】

で示される化合物。

【請求項2】 W^5 および X^5 が、独立して $- C(CH_3)_2$ 、 $- C((CH_2)_aOH)CH_3$ 、 $- C((CH_2)_aOH)_2$ 、 $- C((CH_2)_aCO_2H)CH_3$ 、 $- C((CH_2)_aCO_2H)_2$ 、 $- C((CH_2)_aNH_2)CH_3$ 、 $C((CH_2)_a$

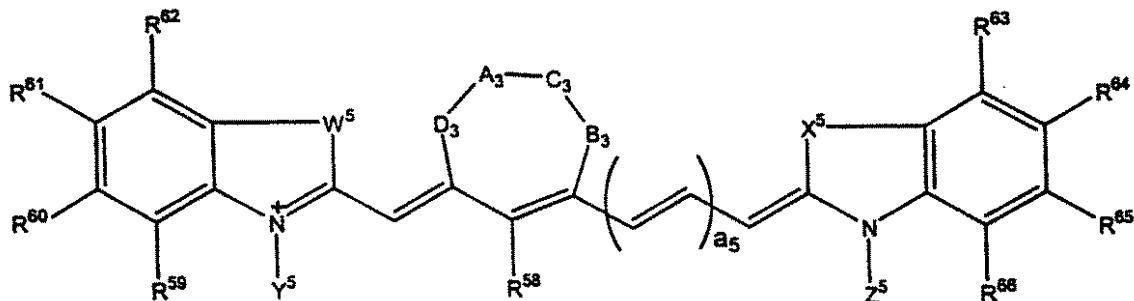
$\text{NH}_2)_2$ 、 $\text{C}((\text{CH}_2)_a \text{NR}^3 \text{R}^4)_2$ 、 $-\text{NR}^3$ 、および $-\text{S}-$ から成る群
 から選ばれ、 Y^5 が、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH-Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OC})$
 $\text{H}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHC(O)-Bm}$ 、 $-\text{CH}_2$
 $- (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHC(O)-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3 \text{R}^4$ お
 よび $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2\text{NR}^3 \text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 Z
 5 が、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH-Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2$
 $- \text{CONH-Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHC(O)-Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH})$
 $_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHC(O)-Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3 \text{R}^4$ および $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2\text{NR}^3 \text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 が単または二
 重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 が、独立して $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 NR^3 、 $(\text{CH}_2)_a - \text{CR}^1 \text{R}^2$ 、および $-\text{CR}^1$ から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、
 C_3 および D_3 が、一緒になって6～10-員炭素環状環または所望により1
 個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてよい6～10-
 員複素環状環を形成し得、 a_3 が0～3の範囲で変化し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および R^5
 $^8 \sim \text{R}^{66}$ が、独立して水素、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{12}$ アリール、
 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルコキシル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ ポリヒドロキシアルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_1$
 $_2$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アミノアルキル、モノまたはオリゴサ
 ッカリド、2～30個のアミノ酸単位を有するペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OC})$
 $\text{H}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH-}$
 Bm 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a$
 $- \text{NHC(O)-Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHC(O)-Bm}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群
 から選ばれ、 Bm および Dm が、独立して2～30個のアミノ酸単位を含む生物
 活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレ
 ーント剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコーソ源性剤から成る群から選
 択され、 a および c が、独立して1～10の範囲で変化し、 b および d が独立し
 て1～30の範囲で変化する、請求項1記載の化合物。

【請求項3】 W^5 および X^5 が各々 $\text{C}((\text{CH}_2)\text{OH})_2$ であり、 Y^5 が $-(\text{CH}_2)_2 - \text{CONH-Bm}$ であり、 Z^5 が $-(\text{CH}_2)_2 - \text{CONH-Dm}$ であ

り、A₃が単結合であり、A₃、B₃、C₃およびD₃が一緒になって6員炭素環状環を形成し、a₅が1であり、R^{5,8}がガラクトースであり、R^{5,9}～R⁶⁶が各々水素であり、Bmがオクトレオテートであり、Dmがボンベシン(7-14)である、請求項2記載の化合物。

【請求項4】 診断または治療処置の遂行方法であって、式

【化 2】



$\text{H}_2)_c - \text{NHCO - Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OC})\text{H}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHCO - Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Dm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 は単または二重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 は、独立して $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{P}-$ 、 $-\text{CR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{CR}^1$ 、アルキル、 NR^3 および $-\text{C=O}$ から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 は、一緒になって $6 - \sim 12$ -員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい $6 - \sim 12$ -員複素環状環を形成し得、 a_5 は $0 \sim 5$ の範囲で変化し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および $\text{R}^{5,8} \sim \text{R}^{6,6}$ は、独立して水素、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ アリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ ポリアルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシリル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHC O - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は、独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して $1 \sim 20$ の範囲で変化し、 b および d は独立して $1 \sim 100$ の範囲で変化する]で示される化合物の治療有効量、および組成物を形成するための医薬的に許容し得る担体または賦形剤を個体に投与し、光線を用いて化合物を活性化

させ、そして診断または治療処置を遂行することを含む方法。

【請求項5】 W^5 および X^5 が、独立して - $C(CH_3)_2$ 、 - $C((CH_2)_aOH)CH_3$ 、 - $C((CH_2)_aOH)_2$ 、 - $C((CH_2)_aCO_2H)CH_3$ 、 - $C((CH_2)_aCO_2H)_2$ 、 - $C((CH_2)_aNH_2)CH_3$ 、 $C((CH_2)_aNH_2)_2$ 、 $C((CH_2)_aN R^3 R^4)_2$ 、 - $N R^3$ 、および - S - から成る群から選ばれ、 Y^5 が、 - $(CH_2)_aCONH-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OC$
 $H_2)_b-CH_2-CONH-Bm$ 、 - $(CH_2)_aNHC-O-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHC-O-Bm$ 、 - $(CH_2)_aN R^3 R^4$ および - $CH_2(CH_2OCCH_2)_b-CH_2NR^3R^4$ から成る群から選ばれ、 Z^5 が、 - $(CH_2)_aCONH-Dm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2$
 $-CONH-Dm$ 、 - $(CH_2)_aNHC-O-Dm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHC-O-Dm$ 、 - $(CH_2)_aN R^3 R^4$ および - $CH_2(CH_2OCH_2)_b-CH_2NR^3R^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 が単または二重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 が、独立して - $O-$ 、 - $S-$ 、 $N R^3$ 、 $(CH_2)_aCR^1R^2$ 、および - CR^1 から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 が、一緒にになって 6 - ~ 10 - 員炭素環状環または所望により 1 個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい 6 - ~ 10 - 員複素環状環を形成し得、 a_5 が 0 ~ 3 の範囲で変化し、 $R^1 \sim R^4$ および R^5
 $\sim R^{6\sim 6}$ が、独立して水素、 C_1-C_{10} アルキル、 C_5-C_{12} アリール、 C_1-C_{10} アルコキシル、 C_1-C_{10} ポリヒドロキシアルキル、 C_5-C_1 ポリヒドロキシアリール、 C_1-C_{10} アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2 ~ 30 個のアミノ酸単位を有するペプチド、 - $CH_2(CH_2OC$
 $H_2)_b-CH_2-OH$ 、 - $(CH_2)_aCO_2H$ 、 - $(CH_2)_aCONH-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-CONH-Bm$ 、 - $(CH_2)_aNHC-O-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHC-O-Bm$ 、 - $(CH_2)_a-OH$ および - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CO_2H$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm が、独立して 2 ~ 30 個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選

択され、 a および c が、独立して1～10の範囲で変化し、 b および d が独立して1～30の範囲で変化する化合物の治療有効量を個体に投与することを含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】 W^5 および X^5 が各々 $C((CH_2)OH)_2$ であり、 Y^5 が $-CH_2CONH-Bm$ であり、 Z^5 が $-CH_2CONH-Dm$ であり、 A_3 が単結合であり、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 が一緒にあって6員炭素環状環を形成し、 a_5 が1であり、 R^{58} がガラクトースであり、 $R^{59} \sim R^6$ が各々水素であり、 Bm がオクトレオテートであり、 Dm がボンベシン(7-14)である化合物の治療有効量を個体に投与することを含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】 上記処置に350～1300nm領域の波長の光線が使用される、請求項4記載の方法。

【請求項8】 診断的処置が光学断層撮影法である、請求項4記載の方法。

【請求項9】 診断的処置が蛍光内視鏡検査法である、請求項4記載の方法

。

【請求項10】 さらに蛍光、吸光度または光散乱により(その場合350～1300nm領域の波長の光線が使用される)、上記化合物の血液クリアランスプロフィールをモニターすることを含む、請求項4記載の方法。

【請求項11】 上記処置がさらに造影および治療の段階を含み、上記造影および治療が、吸收、光散乱、光音響および音蛍光技術から成る群から選択される、請求項4記載の方法。

【請求項12】 上記処置がアテローム硬化斑および血餅の診断用である、請求項4記載の方法。

【請求項13】 上記処置が限局性治療の実施を含む、請求項4記載の方法

。

【請求項14】 上記治療処置がレーザー光学治療を含む、請求項4記載の方法。

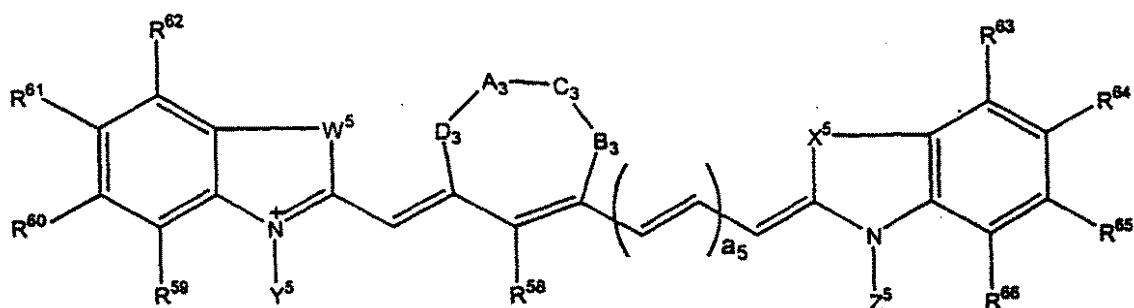
【請求項15】 治療的処置が、微小転移巣を検出するためのレーザー支援誘導手術を含む、請求項4記載の方法。

【請求項 16】 さらにインビボまたはインビトロ蛍光クエンチングを阻止するため組成物に対し 1 ~ 50 パーセント濃度で生物適合性有機溶媒を加えることを含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 17】 1～50パーセントのジメチルスルホキシドを含む媒質に上記化合物を溶かす、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】 式

(化3)



$\text{H}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_b - \text{CONH - Dm}$ 、 $(\text{CH}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_c - \text{NHCO - Dm}$ 、 $- (\text{CH}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Dm}$ 、 $- (\text{CH}_2)_a - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHCO - Dm}$ 、 $- \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Dm}$ 、 $- \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Dm}$ 、 $- \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{CONH - Dm}$ 、 $- \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{NHCO - Dm}$ 、 $- (\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3\text{R}^4$ および $- \text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 は単または二重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 は、独立して $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{P}-$ 、 $-\text{CR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{CR}^1$ 、アルキル、 NR^3 および $-\text{C=O}$ から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 は、一緒になって $6 - \sim 12$ - 員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい $6 - \sim 12$ - 員複素環状環を形成し得、 a_5 は $0 \sim 5$ の範囲で変化し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および $\text{R}^{5,8} \sim \text{R}^{6,6}$ は、独立して水素、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ アリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ ポリアルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシリル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHC(O - Bm)}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は、独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して $1 \sim 20$ の範囲で変化し、 b および d は独立して $1 \sim 100$ の範囲で変化する]で示されるシアニン染料バイオコンジュゲートおよび医薬的に許容し

得る担体または賦形剤を含む組成物。

【請求項19】 W^5 および X^5 が、独立して - $C(CH_3)_2$ 、 - $C((CH_2)_aOH)CH_3$ 、 - $C((CH_2)_aOH)_2$ 、 - $C((CH_2)_aCO_2H)CH_3$ 、 - $C((CH_2)_aCO_2H)_2$ 、 - $C((CH_2)_aNH_2)CH_3$ 、 $C((CH_2)_aNH_2)_2$ 、 $C((CH_2)_aN R^3 R^4)_2$ 、 - $N R^3$ 、および - S - から成る群から選ばれ、 Y^5 が、 - $(CH_2)_aCONH-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-CO NH-Bm$ 、 - $(CH_2)_a-NHCO-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHCO-Bm$ 、 - $(CH_2)_a-N R^3 R^4$ および - $CH_2(CH_2OCH_2)_b-CH_2N R^3 R^4$ から成る群から選ばれ、 Z^5 が、 - $(CH_2)_aCONH-Dm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-CO NH-Dm$ 、 - $(CH_2)_a-NHCO-Dm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHCO-Dm$ 、 - $(CH_2)_a-N R^3 R^4$ および - $CH_2(CH_2OCH_2)_b-CH_2N R^3 R^4$ から成る群から選ばれ、 A_3 が単または二重結合であり、 B_3 、 C_3 および D_3 が、独立して - O - 、 - S - 、 $N R^3$ 、 $(CH_2)_a-CR^1 R^2$ 、および - CR^1 から成る群から選ばれ、 A_3 、 B_3 、 C_3 および D_3 が、一緒にになって 6 - ~ 10 - 員炭素環状環または所望により 1 個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい 6 - ~ 10 - 員複素環状環を形成し得、 a_5 が 0 ~ 3 の範囲で変化し、 $R^1 \sim R^4$ および $R^{5,8} \sim R^{6,6}$ が、独立して水素、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_5 - C_{12}$ アリール、 $C_1 - C_{10}$ アルコキシリル、 $C_1 - C_{10}$ ポリヒドロキシアルキル、 $C_5 - C_{12}$ ポリヒドロキシアリール、 $C_1 - C_{10}$ アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2 ~ 30 個のアミノ酸単位を有するペプチド、 - $CH_2(CH_2OCH_2)_b-CH_2-OH$ 、 - $(CH_2)_a-CO_2H$ 、 - $(CH_2)_a-CO NH-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-CO NH-Bm$ 、 - $(CH_2)_a-NHCO-Bm$ 、 - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CH_2-NHCO-Bm$ 、 - $(CH_2)_a-OH$ および - $CH_2-(CH_2OCH_2)_b-CO_2H$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm が、独立して 2 ~ 30 個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から

選択され、aおよびcが、独立して1～10の範囲で変化し、bおよびdが独立して1～30の範囲で変化する、請求項18記載の組成物。

【請求項20】 W⁵およびX⁵が各々C((CH₂)OH)₂であり、Y⁵が-(CH₂)₂-CONH-Bmであり、Z⁵が-(CH₂)₂-CONH-Dmであり、A₃が単結合であり、A₃、B₃、C₃およびD₃が一緒になって6員炭素環状環を形成し、a₅が1であり、R⁵⁸がガラクトースであり、R⁵⁹～R⁶⁶が各々水素であり、Bmがオクトレオテートであり、Dmがポンベシン(7-14)である、請求項19記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

この出願は、2000年1月18日付け出願番号第09/484321号の一部継続出願である。

【0002】**(発明の分野)**

この発明は、概して診断および治療用、特に腫瘍の視覚化および検出用の生物活性分子とのシアニン染料バイオコンジュゲートの組成物に関するものである。

【0003】**(発明の背景)**

電磁スペクトルの可視および近赤外線領域における光を吸収および放射する幾つかの染料は、生物適合性があり、モル吸光率が高く、および／または蛍光量子収量が高い故に最近様々な生物医学的適用例に使用されている。造影剤としての染料に関連した光学モダリティーの高い感度は核医学の場合と相応しており、電離放射線の望ましくない作用を伴うことなく器官および組織の視覚化が可能となる。

【0004】

近赤外線(NIR)領域における吸収および放射が強いシアニン染料は、生物組織がこの領域では光学的に透過性であるため特に有用である(B.C.Wilson, Optical properties of tissues(「組織の光学特性」)、Encyclopedia of Human Biology、1991、5、587-597)。例えば、NIR領域で吸収および放射するインドシアニングリーンは、心拍出量、肝機能および肝臓血流量をモニターするのに使用されており(Y.L.Heら、Measurement of blood volume using indocyanine green measured with pulse-spectrometry: Its reproducibility and reliability(「パルス分光法で測定される インドシアニングリーンを用いた血液量の測定：その再現性および信頼性」)、Critical Care Medicine、1998、26(8)、1446-1451、J.Caesarら、The use of Indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function(「肝臓血流量測定および肝機能検査におけるインドシアニングリーンの使用」

)、Clin.Sci. 1961、21、43-57)、そしてその官能性誘導体は、診断目的用に生体分子をコンジュゲートするのに使用されている(R.B.Mujumdarら、Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters(「シアニン染料標識試薬：スルホインドシアニンスクシニミジルエステル類」)、Bioconjugate Chemistry、1993、4(2)、105-111、米国特許第5453505号、WO98/48846、WO98/22146、WO96/17628、WO98/48838)。

【0005】

シアニン染料誘導体の使用における主たる欠点は、肝臓によるこれらの染料の急速なクリアランスにより生じる肝胆汁性毒性に関する可能性である(G.R.Cherrickら、Indocyanine green: Observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction(「インドシアニングリーン：その物理特性、血漿崩壊および肝臓抽出に関する観察」)、J.Clinical Investigation、1960、39、592-600)。これは、溶解状態のシアニン染料が凝集体を形成する傾向があり、それらが肝臓のクッパー細胞により吸収され得ることに関連している。

【0006】

この問題を回避する様々な試みはこれまでのところあまり有効ではなかった。典型的には、親水性ペプチド、ポリエチレングリコールまたはオリゴサッカリドコンジュゲートが使用されたが、これらは長期循環性産物を生じるため、結局は肝臓により依然としてクリアランスされる。現行のシアニンおよびインドシアニン染料系に伴なう別の大きな問題点は、これらの染料の吸収および放射特性における大きな変化を誘発する能力の範囲にそれらが限界を示すことである。様々なヘテロ原子および環状部分をこれらの染料のポリエン鎖に組込む試みはこれまでに為されているが(L.Strekowskiら、Substitution reactions of a nucleophilic group in hetamethine cyanine dyes(「ヘタメチンシアニン染料における離核基の置換反応」)、J.Org.Chem.、1992、57、4578-4580、N.NaranjanおよびG.Patonay、A new method for the synthesis of heptamethine cyanine dyes: Synthesis of new near infrared fluorescent labels(「ヘプタメ

チンシアニン染料の新規合成方法：新規近赤外線蛍光標識の合成」)、J.Org.Chem., 1995, 60, 2391 - 2395、米国特許第5732104号、同5672333号および同5709845号)、生成した染料系は、特に光音響的診断適用が非常に敏感である830 nmを越える、吸収および放射最大値に大した差異は示さない。それらはまた、肝臓吸収を促進する突起した疎水性コアを有する。さらに、ほとんどのシアニン染料は、生物医学適用に有用である、スターバーストデンドリマーの形成能を有していない。

【0007】

腫瘍検出目的の場合、多くの慣用的染料は、正常および異常の両組織に対する傷害効果が高いためインビトロ適用例には有用である。他の染料は、特定器官または組織に関する特異性を欠くため、体の特異領域に染料を送達させるためには生物活性担体、例えばタンパク質、ペプチド、炭水化物などに結合されなければならない。近赤外線染料および染料-生体分子コンジュゲートの用途に関する幾つかの試験が既に発表されている(G.PatonayおよびM.D.Antoine、Near-Infrared Fluorogenic Labels: New Approach to an Old Problem(「近赤外線蛍光原標識：古い問題への新規取組み方法」)、Analytical Chemistry, 1991, 63 : 321A - 327Aおよびそれらの参考文献:M.Brinkley、A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Cross-Linking Reagents(「染料、ハプテンおよび架橋試薬によるタンパク質コンジュゲートの製造方法の簡単な概観」)、Perspectives in Bioconjugate Chemistry 1993, 59 - 70頁、C.Meares(編)、ACSパブリケーション、ワシントンDC、J.Slavik、Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, 1994、CRCプレス、インコーポレイテッド、米国特許第5453505号、WO98/48846、WO98/22146、WO96/17628、WO98/48838)。

【0008】

特に興味深いのは、送達ビークルとしての抗体または他の大型タンパク質担体、例えばトランスフェリンによる腫瘍細胞のターゲッティングである(A.Beckerら、“Transferrin Mediated Tumor Delivery of Contrast Media for Optical

“Imaging and Magnetic Resonance Imaging”(「光学的画像法および磁気共鳴画像法用造影剤のトランスフェリン仲介腫瘍送達」)、生物医学的光学集会、1月23-29日、1999年、サンホセ、カリフォルニア)。上記方法は、核医学適用において広範に使用されている。染料の分子体積は担体よりかなり小さいため、その主たる利点は担体の組織特異性の保持である。しかしながら、この方法は、腫瘍細胞への高分子量バイオコンジュゲートの拡散が極めて望ましくないという点で幾つかの深刻な限界を有しており、さらに固形腫瘍では正味正の圧力が加わることにより複雑になる(R.K.Jain、Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors(「固形腫瘍における薬剤送達に対する障害」)、Scientific American 1994、271:58-65)。さらに、一般に多くの染料および特にシアニン染料は、水性媒質中で凝集体を形成することにより蛍光クエンチングを誘導する傾向がある。

【0009】

従って、溶液における染料凝集を阻止し得、デンドリマーを形成しやすくさせ、800nmを越えて吸収または放射し得、望ましい光学物理特性を有し、組織特異的ターゲッティング能力が賦与されている染料が要望される。

【0010】

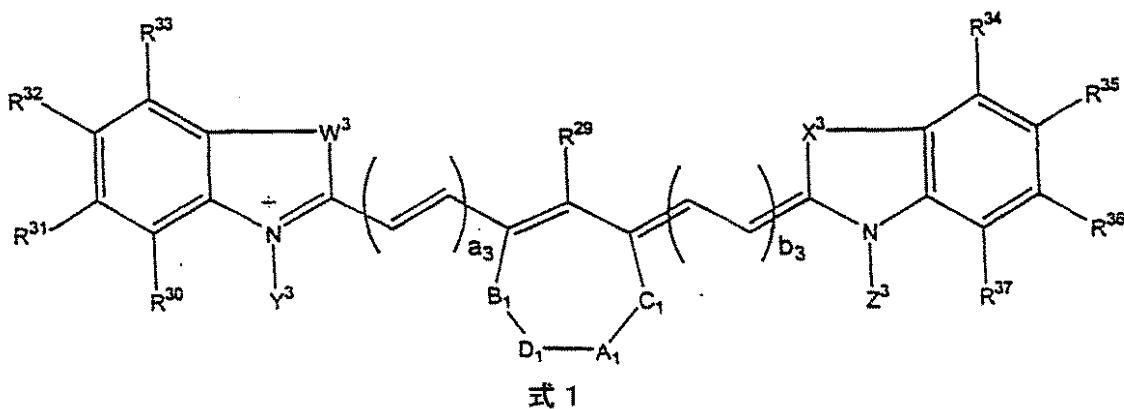
(発明の要約)

本発明は、腫瘍検出を促進するための低分子量生体分子 染料コンジュゲートの組成物、および前記組成物の製造方法に関するものである。本発明組成物は、染料分子の蛍光効率を保ち、溶液中では凝集せず、スターバストデンドリマーを形成し、近赤外線領域(800nmを越える)での光線を吸収または放射し得、そして組織特異的とされ得る。

【0011】

一態様において、本発明組成物は、一般式1

【化4】

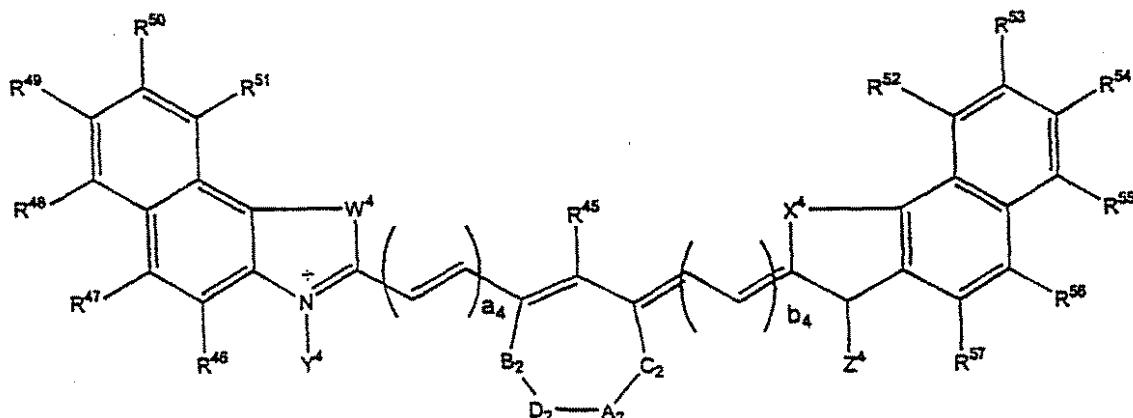


$\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{CONH - Dm}$ 、
 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2\text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_1 は単または二重結合であり、 B_1 、 C_1 および D_1 は、同一または異なり得、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{P}-$ 、 $-\text{CR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{CR}^1$ 、アルキル、 NR^3 および $-\text{C=O}$ から成る群から選ばれ、 A_1 、 B_1 、 C_1 および D_1 は、一緒になって $6 \sim 12$ - 員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい $6 \sim 12$ - 員複素環状環を形成し得、 a_3 および b_3 は独立して0 ~ 5であり、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および $\text{R}^{29} \sim \text{R}^{37}$ は、独立して水素、 C_1 - C_{10} アルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ アリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ ポリアルコキシアルキル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{O H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は、独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して1 ~ 20であり、並びに b および d は独立して1 ~ 100である】
 で示されるシアニン染料を含む。

【0012】

第二態様において、本発明組成物は、一般式2

【化5】



式2

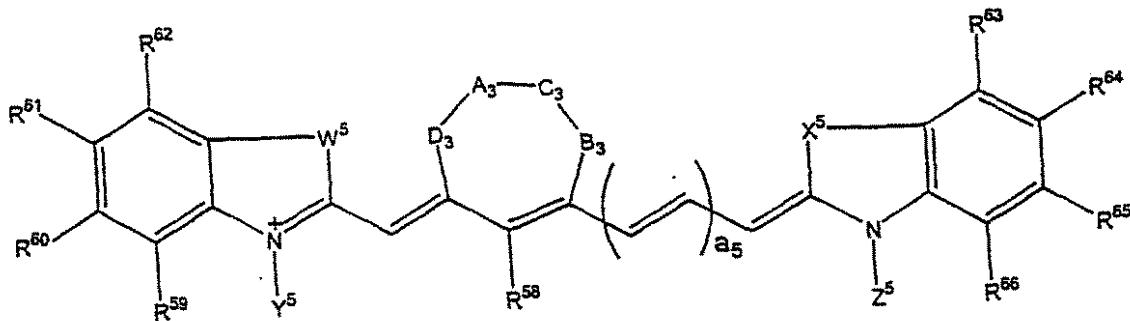
[式中、W⁴およびX⁴は、同一または異なり得、-CR¹R²、-O-、-N
R³、-S-および-S eから成る群から選ばれ、Y⁴は、-(CH₂)_a-CO
NH-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(C
H₂)_a-NHCO-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO
-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-(CH₂)_b-CONH-Bm、(CH₂)_a-
N(R³)-(CH₂)_c-NHCO-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH₂-
(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH
₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO-Bm、-CH₂-(CH₂OCH
)_b-CH₂-N(R³)-(CH₂)_a-CONH-Bm、-CH₂-(CH₂O
CH₂)_b-CH₂-N(R³)-(CH₂)_a-NHCO-Bm、-CH₂-(C
H₂OCH₂)_b-CH₂-N(R³)-CH₂-(CH₂OCH₂)_d-CONH-
Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-N(R³)-CH₂-(CH₂O
CH₂)_d-NHCO-Bm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂
OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、Z⁴は、-(CH₂)_a-
CONH-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、
(CH₂)_a-NHCO-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NH
CO-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-(CH₂)_b-CONH-Dm、(CH₂)_a-
N(R³)-(CH₂)_c-NHCO-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH₂
(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-C
H₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO-Dm、-CH₂-(CH₂OCH

$\text{H}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Dm}$ 、
 $\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{CONH}$
 $- \text{Dm}$ 、
 $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2$
 $\text{OCH}_2)_d - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2\text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_2 は単または二重結合であり、 B_2 、 C_2 および D_2 は、同一または異なり得、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{P}-$ 、 $-\text{CR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{CR}^1$ 、アルキル、 NR^3 および $-\text{C=O}$ から成る群から選ばれ、 A_2 、 B_2 、 C_2 および D_2 は、一緒になって $6 \sim 12$ - 員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい $6 \sim 12$ - 員複素環状環を形成し得、 a_4 および b_4 は独立して $0 \sim 5$ であり、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および $\text{R}^{45} \sim \text{R}^{57}$ は、独立して水素、 C_1 - C_{10} アルキル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ アリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ ポリアルコキシリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシリル、 $\text{C}_5 - \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{O}$ H 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ および $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は、独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して $1 \sim 20$ であり、並びに b および d は独立して $1 \sim 100$ である】
 で示されるシアニン染料を含む。

【0013】

第三の態様において、本発明組成物は、一般式3

【化6】



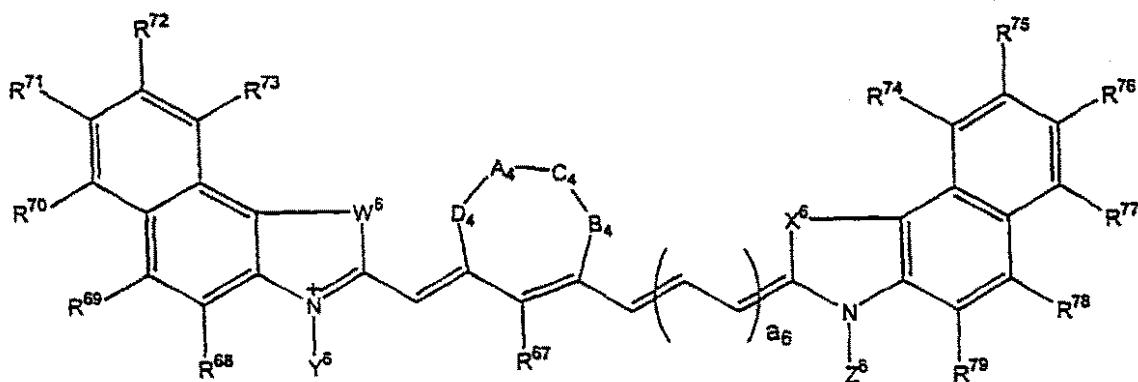
式3

$\text{H}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{CONH}$
 - Dm、 - CH₂ - (CH₂OCH₂)_b - CH₂ - N(R³) - CH₂ - (CH₂
 OCH₂)_d - NHCO - Dm、 - (CH₂)_a - NR³R⁴および - CH₂(CH
₂OCH₂)_b - CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、 A₃ は単または二重
 結合であり、 B₃、 C₃ および D₃ は、 同一または異なり得、 - O - 、 - S - 、
 - Se - 、 - P - 、 - CR¹R² 、 - CR¹ 、 アルキル、 NR³ および - C = O
 から成る群から選ばれ、 A₃、 B₃、 C₃ および D₁ は、 一緒になって 6 - ~ 1
 2 - 員炭素環状環または所望により 1 個またはそれ以上の酸素、 窒素または硫黄
 原子を含んでいてもよい 6 - ~ 12 - 員複素環状環を形成し得、 a₅ は独立して
 0 ~ 5 であり、 R¹ ~ R⁴ および R⁵ ~ R⁶ は、 独立して水素、 C₁ - C₁₀ ア
 ルキル、 C₅ - C₂₀ アリール、 C₁ - C₁₀ アルコキシリル、 C₁ - C₁₀ ポリ
 アルコキシアルキル、 C₁ - C₂₀ ポリヒドロキシアルキル、 C₅ - C₂₀ ポリ
 ヒドロキシアリール、 C₁ - C₁₀ アミノアルキル、 シアノ、 ニトロ、 ハロゲン
 、 サッカリド、 ペプチド、 - CH₂(CH₂OCH₂)_b - CH₂ - OH、 - (C
 H₂)_a - CO₂H、 - (CH₂)_a - CONH - Bm、 - CH₂ - (CH₂OCH
₂)_b - CH₂ - CONH - Bm、 - (CH₂)_a - NHCO - Bm、 - CH₂ - (CH₂OCH₂)_b - CH₂ - NHCO - Bm、 - (CH₂)_a - OH および - C
 H₂ - (CH₂OCH₂)_b - CO₂H から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は
 、 独立して生物活性ペプチド、 タンパク質、 細胞、 抗体、 抗体フラグメント、 サ
 ッカリド、 グリコペプチド、 ペプチド擬似物質、 薬剤、 薬剤ミミック、 ホルモン
 、 金属キレート剤、 放射性または非放射性金属錯体、 およびエコー源性剤から成
 る群から選択され、 a および c は、 独立して 1 ~ 20 であり、 並びに b および d
 は独立して 1 ~ 100 である]
 で示されるシアニン染料を含む。

【0014】

第四の態様において、本発明組成物は、一般式 4

【化7】



式4

[式中、W⁶およびX⁶は、同一または異なり得、-CR¹R²、-O-、-N
R³、-S-および-Seから成る群から選ばれ、Y⁶は、-(CH₂)_a-CO
NH-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(C
H₂)_a-NHCO-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO
-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-(CH₂)_b-CONH-Bm、(CH₂)_a-
N(R³)-(CH₂)_c-NHCO-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH₂-
(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH
₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO-Bm、-CH₂-(CH₂OCH
)_b-CH₂-N(R³)-(CH₂)_a-CONH-Bm、-CH₂-(CH₂)_b-
N(R³)-(CH₂)_a-NHCO-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_d-CONH-
Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-N(R³)-CH₂-
(CH₂OCH₂)_d-CONH-Bm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂
OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、Z⁶は、-(CH₂)_a-
CONH-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、
(CH₂)_a-NHCO-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NH
CO-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-(CH₂)_b-CONH-Dm、(CH₂)_a-
N(R³)-(CH₂)_c-NHCO-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-CH₂-
(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、-(CH₂)_a-N(R³)-C
H₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHCO-Dm、-CH₂-(CH₂OCH
)_b-CH₂-CONH-Dm、-(CH₂)_a-CONH-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-N(R³)-(CH₂)_a-CONH-Dm、

$\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - (\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{CONH - Dm}$ 、
 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^3) - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_d - \text{NHCO - Dm}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2\text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、 A_4 は単または二重結合であり、 B_4 、 C_4 および D_4 は、同一または異なり得、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{P}-$ 、 $-\text{CR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{CR}^1$ 、アルキル、 NR^3 および $-\text{C=O}$ から成る群から選ばれ、 A_4 、 B_4 、 C_4 および D_4 は、一緒になって $6 \sim 12$ - 員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい $6 \sim 12$ - 員複素環状環を形成し得、 a_6 は独立して0~5であり、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ および $\text{R}^{67} \sim \text{R}^{79}$ は、独立して水素、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{20}$ アリール、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルコキシリル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ ポリアルコキシリル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシリル、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{20}$ ポリヒドロキシアリール、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アミノアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、サッカリド、ペプチド、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CO}_2\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{CONH - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{CONH - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CH}_2 - \text{NHCO - Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a - \text{OH}$ または $-\text{CH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b - \text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、 Bm および Dm は独立して生物活性ペプチド、タンパク質、細胞、抗体、抗体フラグメント、サッカリド、グリコペプチド、ペプチド擬似物質、薬剤、薬剤ミミック、ホルモン、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して1~20であり、並びに b および d は独立して1~100である]で示されるシアニン染料を含む。

【0015】

下記の図面、詳細な説明および実施例を考えに入れると、本発明はさらに正しく認識されるはずである。

【0016】

(図面の簡単な説明)

この特許の書類は、少なくとも一通のカラー図面を含む。カラー図面(複数も可)を伴なうこの特許のコピーは、特許庁に請求し、必要な料金を払えば提供される。

【0017】

図1は、ビスカルボン酸シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【0018】

図2は、テトラカルボン酸シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【0019】

図3は、ポリヒドロキシカルボン酸染料の合成に関する反応経路を示す。

【0020】

図4は、非凝集性シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【0021】

図5は、長波長吸収性染料の合成に関する反応経路を示す。

【0022】

図6は、シアニン染料バイオコンジュゲートの合成に関する反応経路を示す。

【0023】

図7A-Fは、様々な腫瘍をもつラットへのインドシアニングリーン(IGC)注射の2分および30分後における画像を表す。

【0024】

図8A-Bは、膵臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットにおけるIGC(図8A)およびサイテート1(図8B)の取込みの比較を示す。

【0025】

図9A-Bは、サイテート1注射後45分(図9A)および27時間(図9B)における膵臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットの画像を示す。

【0026】

図10は、サイテート1による注射の約24時間後における膵臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットから摘出された個々の器官の画像である。

【0027】

図11は、注射後22時間のAR42-J腫瘍担持ラットにおけるポンベシネートの画像である。

【0028】

図12は、正常ラットの血液からのサイテート1のクリアランスプロフィールである。

【0029】

図13は、脾臓腫瘍担持ラットの血液からのサイテート1のクリアランスプロフィールである。

【0030】

図14は、正常ラットの血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールである。

【0031】

図15は、脾臓腫瘍担持ラットの血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールである。

【0032】

図16は、正常ラットの血液からのサイテート4のクリアランスプロフィールである。

【0033】

(発明の詳細な説明)

式1～4で示される染料を含む本発明の新規組成物は、現在文献に報告されているものを凌ぐ顕著な利点を呈する。これらの本発明染料は、分子内および分子間の規則正しい疎水性相互作用を阻止することにより溶液中での凝集を阻止するスターバーストデンドリマーを形成し、生物活性分子を形成し易くするため染料発色団の近位に多重結合部位を有する。堅固で伸長した発色団バックボーンの存在により、それらの蛍光量子収量が高められ、それらの最大吸収が800nm以上に伸ばされる。これらの染料への生体分子のコンジュゲーションは、容易に達成できるものである。

【0034】

本発明のバイオコンジュゲートはまた、互いに極めて近接している1～10個

の受容体ターゲッティング基を組込むことによりシアニンおよびインドシアニン染料構造の対称的性質を利用してあり、その結果協同効果により受容体結合が大いに促進され得る。従って、1個またはそれ以上のターゲッティングドメインを含む幾つかのシアニン染料が製造され、生物活性についてインビポで試験されている。

【0035】

式1～4で示される本発明の染料-バイオコンジュゲートは、様々な生物医学的適用に有用である。これらには、臓器の断層撮影法、臓器機能のモニター、冠動脈造影、蛍光内視鏡検査、検出、イメージング(画像化)および腫瘍の治療、レーザー支援誘導手術、光音響的方法および音蛍光方法があるが、これらに限定されるわけではない。

【0036】

前述の生物医学適用の幾つかを達成する実施態様を下記に示す。本発明の新規染料は、当業界で公知の方法に従い製造され、図1～5で説明されている。

【0037】

図1は、ビス-カルボン酸シアニン染料に関する合成図を示しており、図式中、 $A = CH_2$ または CH_2OCH_2 、 $R = COOH$ 、 $R' = COOH$ 、 $NHFe^{+}$
 OC ； CO_2t-Bu 、 SO_3 、 $R_1 = R_2 = H$ (式1)または R_1 、 R_2 =縮合フェニル(式2)。

【0038】

図2は、テトラカルボン酸シアニン染料に関する合成図を示しており、図式中、 $A = CH_2$ または CH_2OCH_2 、 $R_1 = R_2 = H$ (式1)または R_1 、 R_2 =縮合フェニル(式2)。

【0039】

図3は、ポリヒドロキシカルボン酸シアニン染料に関する合成図を示している。

【0040】

図4は、非凝集性シアニン染料に関する合成図を示している。

【0041】

図5は、長波長吸収性の「調整可能」なシアニン染料に関する合成図を示している。

【0042】

一様において、本発明バイオコンジュゲートは、式1 [ただし、W³およびX³は、同一または異なり得、-C(CH₃)₂、-C((CH₂)_aOH)CH₃、-C((CH₂)_aOH)₂、-C((CH₂)_aCO₂H)CH₃、-C((CH₂)_aCO₂H)₂、-C((CH₂)_aNH₂)CH₃、C((CH₂)_aNH₂)₂、C((CH₂)_aNR³R⁴)₂、-NR³、および-S-から成る群から選ばれ、Y³は、-(CH₂)_a-CONH-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(CH₂)_a-NHC(O)-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHC(O)-Bm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、Z³は、-(CH₂)_a-CONH-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、-(CH₂)_a-NHC(O)-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHC(O)-Dm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、A₁は単または二重結合であり、B₁、C₁およびD₁は、独立して-O-、-S-、NR³、(CH₂)_a-CR¹R²、および-CR¹から成る群から選ばれ、A₁、B₁、C₁およびD₁は、一緒になって6-~10-員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい6-~10-員複素環状環を形成し得、a₃およびb₃は独立して0~3であり、R¹~R⁴およびR²⁹~R³⁷は、独立して水素、C₁-C₁₀アルキル、C₅-C₁₂アリール、C₁-C₁₀アルコキシル、C₁-C₁₀ポリヒドロキシアルキル、C₅-C₁₂ポリヒドロキシアリール、C₁-C₁₀アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2~30個のアミノ酸単位を有するペプチド、-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂-OH、-(CH₂)_a-CO₂H、-(CH₂)_a-CONH-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(CH₂)_a-NHC(O)-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHC(O)-Bm、-(CH₂)_a-OHおよび-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CO₂Hから成る群から選ばれ、B

mおよびDmは、独立して2～30個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、aおよびcは、独立して1～10であり、並びにbおよびdは独立して1～30である]を有する。

【0043】

第二の態様において、本発明バイオコンジュゲートは、一般式2 [ただし、W⁴およびX⁴は、同一または異なり得、-C(CH₃)₂、-C((CH₂)_aOH)CH₃、-C((CH₂)_aOH)₂、-C((CH₂)_aCO₂H)CH₃、-C((CH₂)_aCO₂H)₂、-C((CH₂)_aNH₂)CH₃、C((CH₂)_aNH₂)₂、C((CH₂)_aNR³R⁴)₂、-NR³、および-S-から成る群から選ばれ、Y⁴は、-(CH₂)_a-CONH-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Bm、-(CH₂)_a-NHC(O)-Bm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHC(O)-Bm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、Z⁴は、-(CH₂)_a-CONH-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-CONH-Dm、-(CH₂)_a-NHC(O)-Dm、-CH₂-(CH₂OCH₂)_b-CH₂-NHC(O)-Dm、-(CH₂)_a-NR³R⁴および-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂NR³R⁴から成る群から選ばれ、A₂は単または二重結合であり、B₂、C₂およびD₂は、独立して-O-、-S-、NR³、(CH₂)_a-CR¹R²、および-CR¹から成る群から選ばれ、A₂、B₂、C₂およびD₂は、一緒になって6～10-員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい6～10-員複素環状環を形成し得、a₄およびb₄は独立して0～3であり、R¹～R⁴およびR⁴～R⁵は、独立して水素、C₁-C₁₀アルキル、C₅-C₁₂アリール、C₁-C₁₀アルコキシル、C₁-C₁₀ポリヒドロキシアルキル、C₅-C₁₂ポリヒドロキシアリール、C₁-C₁₀アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2～30個のアミノ酸単位を有するペプチド、-CH₂(CH₂OCH₂)_b-CH₂-OH、-(CH₂)_a-CO₂H、-(CH₂)_a-CONH-B

m、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{CONH-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-$
 NHC O-Bm 、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{NHCO-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{OH}$ および $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ から成る群から選ばれ、BmおよびDmは、独立して2~30個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、aおよびcは、独立して1~10であり、並びにbおよびdは独立して1~30である]を有する。

【0044】

第三の態様において、本発明バイオコンジュゲートは、一般式3 [ただし、W⁵およびX⁵は、同一または異なり得、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{CO}_2\text{H})_2$ 、 $-\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{NH}_2)\text{CH}_3$ 、 $\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{NH}_2)_2$ 、 $\text{C}((\text{CH}_2)_a\text{NR}^3\text{R}^4)_2$ 、 $-\text{NR}^3$ 、および-S-から成る群から選ばれ、Y⁵は、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{CONH-Bm}$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{CONH-Bm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{NHCO-Bm}$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2\text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、Z⁵は、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{CONH-Dm}$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{CONH-Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{NHCO-Dm}$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{NHCO-Dm}$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-\text{NR}^3\text{R}^4$ および $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_b-\text{CH}_2\text{NR}^3\text{R}^4$ から成る群から選ばれ、A₃は単または二重結合であり、B₃、C₃およびD₃は、独立して-O-、-S-、NR³、(CH₂)_a-CR¹R²、および-CR¹から成る群から選ばれ、A₃、B₃、C₃およびD₃は、一緒にになって6~-10~-員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい6~-10~-員複素環状環を形成し得、a₅は0~3であり、R¹~R⁴およびR^{5~8}~R^{6~6}は、独立して水素、C₁-C₁₀アルキル、C₅-C₁₂アリール、C₁-C₁₀アルコキシル、C₁-C₁₀ポリヒドロキシアルキル、C₅-C₁₂ポリヒドロキシアリ

ール、 $C_1 - C_{10}$ アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2~30個のアミノ酸単位を有するペプチド、 $-CH_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2 - OH$ 、 $-CH_2_a - CO_2H$ 、 $-CH_2_a - CONH - Bm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - CONH - Bm$ 、 $-CH_2_a - NHCO - Bm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - NHCO - Bm$ 、 $-CH_2_a - OH$ および $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CO_2H$ から成る群から選ばれ、BmおよびDmは、独立して2~30個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、aおよびcは、独立して1~10であり、並びにbおよびdが独立して1~30である]を有する。

【0045】

第四の態様において、本発明バイオコンジュゲートは、一般式4 [ただし、W⁶およびX⁶は、同一または異なり得、 $-C(CH_3)_2$ 、 $-C((CH_2)_aOH)$ CH_3 、 $-C((CH_2)_aOH)_2$ 、 $-C((CH_2)_aCO_2H)CH_3$ 、 $-C((CH_2)_aCO_2H)_2$ 、 $-C((CH_2)_aNH_2)CH_3$ 、 $-C((CH_2)_aNH_2)_2$ 、 $C((CH_2)_aNR^3R^4)_2$ 、 $-NR^3$ 、および-S-から成る群から選ばれ、Y⁶は、 $-CH_2_a - CONH - Bm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - CONH - Bm$ 、 $-CH_2_a - NHCO - Bm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - NHCO - Bm$ 、 $-CH_2_a - NR^3R^4$ および-C $H_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2NR^3R^4$ から成る群から選ばれ、Z⁶は、 $-CH_2_a - CONH - Dm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - CONH - Dm$ 、 $-CH_2_a - NHCO - Dm$ 、 $-CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - NHCO - Dm$ 、 $-CH_2_a - NR^3R^4$ および-C $H_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2NR^3R^4$ から成る群から選ばれ、A₄は単または二重結合であり、B₄、C₄およびD₄は、独立して-O-、-S-、NR³、(CH₂)_a-CR¹R²、および-CR¹から成る群から選ばれ、A₄、B₄、C₄およびD₄は、一緒にになって6-~10-員炭素環状環または所望により1個またはそれ以上の酸素、窒素または硫黄原子を含んでいてもよい6-~10-員複素環

状環を形成し得、 a_6 は0～3であり、 $R^1 \sim R^4$ および $R^{67} \sim R^{79}$ は、独立して水素、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_5 - C_{12}$ アリール、 $C_1 - C_{10}$ アルコキシル、 $C_1 - C_{10}$ ポリヒドロキシアルキル、 $C_5 - C_{12}$ ポリヒドロキシアリール、 $C_1 - C_{10}$ アミノアルキル、モノまたはオリゴサッカリド、2～30個のアミノ酸単位を有するペプチド、 $-CH_2(CH_2OCH_2)_b - CH_2 - OH$ 、 $- (CH_2)_a - CO_2H$ 、 $- (CH_2)_a - CONH - Bm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - CONH - Bm$ 、 $- (CH_2)_a - NHCO - Bm$ 、 $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CH_2 - NHCO - Bm$ 、 $- (CH_2)_a - OH$ および $- CH_2 - (CH_2OCH_2)_b - CO_2H$ から成る群から選ばれ、BmおよびDmは、独立して2～30個のアミノ酸単位を含む生物活性ペプチド、抗体、モノまたはオリゴサッカリド、グリコペプチド、金属キレート剤、放射性または非放射性金属錯体、およびエコー源性剤から成る群から選択され、 a および c は、独立して1～10であり、並びに b および d は独立して1～30である]を有する。

【0046】

この発明はまた、固相または液中合成方法により本発明染料をペプチドまたは生体分子にコンジュゲートする方法に関するものである。図6は、固体支持体における自動ペプチド合成法を用いて、図1～5のシアニン染料を組込むバイオコンジュゲートの合成図を示すもので、式中、 $A = CH_2$ または CH_2OCH_2 、 $R_1 = R_2 = H$ （式1）または R_1 、 $R_2 =$ 縮合フェニル（式2）、 $AA =$ アミノ酸、 $R = CONH$ ペプチド、 $R' = R$ （ビスコンジュゲート）または $COOH$ （モノコンジュゲート）、 $P =$ 固体支持体、 $P' =$ 存在または不存在は R' の定義により異なる。

【0047】

この発明はまた、蛍光クエンチングの阻止方法に関するものである。シアニン染料は一般に水性媒質中で凝集体を形成し、蛍光クエンチングを誘導することが知られている。染料中における疎水性コアの存在が蛍光クエンチングを誘発する場合、生物適合性有機溶媒、例えば1～50%ジメチルスルホキシド（DMSO）を加えると、凝集が阻止されることにより蛍光が回復し、インビボ臓器視覚化

が可能となった。

【0048】

本発明染料 - 生体分子コンジュゲートは、腫瘍または他の異常の検出および処置を目的とした光学断層撮影法、内視鏡検査、光音響的および音蛍光的適用法に使用される。

【0049】

染料 生体分子コンジュゲートはまた、限局性治療にも使用される。これは、ポルフィリンまたは他のレーザー光学治療剤をバイオコンジュゲートに結合させ、適当な波長の光線を照射して薬剤を活性化し、そして異常を検出および / または処置することにより行われ得る。

【0050】

本発明コンジュゲートはまた、腹腔鏡検査時の例えばソマトスタチンサブタイプ2 (SST-2) 陽性腫瘍の極微小転移検出用レーザー支援誘導手術、およびアテローム性硬化斑および血餅の診断を目的とした、コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルをモニターすることによる、腫瘍および他の異常の存在検出に使用され得る。

【0051】

本発明組成物は、経腸および非経口投与用診断および治療組成物に製剤化され得る。これらの組成物は、意図された投与型に適した慣用的医薬用担体および賦形剤と一緒に有効量の染料を含む。例えば、非経口製剤は、有利には滅菌水溶液または懸濁液中に本発明薬剤を含む。非経口組成物は、直接注射されるかまたは大量の全身投与用非経口組成物と混合され得る。上記溶液はまた、医薬的に許容し得る緩衝液を含み得、所望により電解質、例えば塩化ナトリウムを含んでいてもよい。

【0052】

当業界で熟知されている通り、経腸投与用製剤は広範に変化し得る。一般に、上記製剤は液体であり、水溶液または懸濁液中に有効量の本発明薬剤を含む。上記経腸組成物は、所望により緩衝液、界面活性剤、搖変剤などを含み得る。経口投与用組成物はまた、香味料およびそれらの感覚刺激性の質を高める他の成分を

含み得る。

【0053】

診断組成物は、所望の増強を達成するのに有効な量で投与される。上記用量は、使用される特定染料、画像化される臓器または組織、使用されている画像化設備などにより広範に変化し得る。本発明の診断組成物は、常法で使用される。組成物は、患者、典型的には温血動物に全身的または画像化すべき臓器または組織へ局所的に投与され得、次いで患者をイメージング法にかける。

【0054】

本発明組成物および方法は、多様な光学物理および化学特性を有する新規シアニンおよびインドシアニン染料の合成および用途にとって重要な方法を表す。この組合せはまた、小分子ターゲッティング基を用いて光学的方法により腫瘍を画像化するための重要な方法を表す。下記実施例で本発明についてさらに詳述するが、それらは説明として示されたもので、いかなる意味でも本発明の範囲を制限する意図はないものとする。

【0055】

(実施例)

実施例1

ビス(エチルカルボキシメチル)インドシアニン染料の合成(図1、R₁、R₂ = 縮合フェニル、A = C H₂、n = 1 および R = R' = C O₂ H)

1,2-ジクロロベンゼン(40mL)中1,1,2-トリメチル-[1H]-ベンゾ[e]インドール(9.1g、43.58ミリモル)および3-プロモプロピオン酸(10.0g、65.37ミリモル)から成る混合物を12時間110度加熱した。溶液を室温に冷却し、得られた赤色残留物を濾過し、アセトニトリル：ジエチルエーテル(1:1)混合物で洗浄した。得られた固体を真空乾燥すると、10g(64%)の明褐色粉末が得られた。この固体の一部(6.0g、16.56ミリモル)、グルタコンアルデヒドジアニルモノ塩酸塩(2.36g、8.28ミリモル)および酢酸ナトリウムトリ水和物(2.93g、21.53ミリモル)をエタノール(150mL)中で90分間還流させた。溶媒を濃縮後、40mLの2N HCl水溶液を残留物に加えた。混合物を遠心分離し、上清を

傾瀉した。上清がほぼ無色になるまでこの手順を反復した。約 5 mL の水 : アセトニトリル (3 : 2) 混合物を固体残留物に加え、凍結乾燥すると、2 g の濃緑色フレークが得られた。化合物の純度は、¹H - NMR および液体クロマトグラフィー - 質量分光学的方法 (LC - MS) により確立された。

【0056】

実施例 2

ビス(ペンチルカルボキシメチル)インドシアニン染料の合成 (図 1、R₁、R₂ = 縮合フェニル、A = CH₂、n = 4 および R = R' = CO₂H)

1,2-ジクロロベンゼン (250 mL) 中 1,1,2-トリメチル-[1H]-ベンゾ[e]インドール (20 g、95.6 ミリモル) および 6-プロモヘキサン酸 (28.1 g、144.1 ミリモル) から成る混合物を 12 時間 110°で加熱した。緑色溶液を室温に冷却し、形成された褐色固体沈澱物を濾過により集めた。1,2-ジクロロベンゼンおよびジエチルエーテルで固体を洗浄後、得られた褐色粉末 (24 g、64%) を室温で真空乾燥した。この固体の一部 (4.0 g、9.8 ミリモル)、グルタコンアルデヒドジアニルモノ塩酸塩 (1.4 g、5 ミリモル) および酢酸ナトリウムトリ水和物 (1.8 g、12.9 ミリモル) をエタノール (80 mL) 中で 1 時間還流させた。溶媒を濃縮後、20 mL の 2 N HCl 水溶液を残留物に加えた。混合物を遠心分離し、上清を傾瀉した。上清がほぼ無色になるまでこの手順を反復した。約 5 mL の水 : アセトニトリル (3 : 2) 混合物を固体残留物に加え、凍結乾燥すると、約 2 g の濃緑色フレークが得られた。化合物の純度は、¹H - NMR および LC - MS により確立された。

【0057】

実施例 3

ビスエチルカルボキシメチルインドシアニン染料の合成 (図 1、R₁、R₂ = H、A = CH₂、n = 1 および R = R' = CO₂H)

この化合物は実施例 1 と同じ要領で製造されたが、ただし出発材料として 1,1,2-トリメチルインドールを使用した。

【0058】

実施例 4

ビス(エチルカルボキシメチル)インドシアニン染料の合成(図1、 R_1 、 R_2
=縮合フェニル、 $A = C H_2$ 、 $n = 1$ および $R = R' = C O_2 H$)

この化合物は実施例1と同じ要領で製造されたが、ただし、プロモプロピオン酸の代わりに - プロモヘキサオキシエチレングリコールプロピオリル酸を使用し、反応は1,2-ジメトキシプロパン中で行なわれた。

【0059】

実施例5

ビスエチルカルボキシメチルインドシアニン染料の合成(図2、 R_1 、 R_2 =
縮合フェニル、 $A = C H_2$ 、および $n = 0$)

50m1のジメチルホルムアミドおよびベンジルプロモアセテート(16.0g、70ミリモル)の溶液を、100m1の三頸フラスコ中で攪拌した。固体重炭酸カリウム(7.8g、78ミリモル)を加えた。フラスコをアルゴンによりパージングし、氷浴で0℃に冷却した。攪拌混合物にエタノールアミン(1.9g、31ミリモル)および4m1のジメチルホルムアミドの溶液を5分間かけて滴下した。滴下完了後、混合物を0℃で1時間攪拌した。氷浴を除去し、混合物を室温で一夜攪拌した。反応混合物を100m1のメチレンクロリドおよび100m1の飽和重炭酸ナトリウム溶液間に分配した。層を分離し、メチレンクロリド層を100m1の飽和重炭酸ナトリウム溶液で再洗浄した。水層を合わせ、25m1のメチレンクロリドで2回抽出した。メチレンクロリド層を合わせ、100m1の食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。メチレンクロリドを約35℃で吸引装置により減圧除去し、そして残存しているジメチルホルムアミドを約45℃で真空除去した。粗物質を真空ラインで一夜室温で放置した。

【0060】

次いで、粗物質を100m1のメチレンクロリドに室温で溶かした。トリフェニルホスフィン(8.91g、34ミリモル)を加え、攪拌しながら溶かした。アルゴンでのパージングを開始し、混合物を氷浴で0℃に冷却した。N-プロモスクシンイミド(6.05g、34ミリモル)を2分間にわたって分割して加えた。混合物を0℃で1.5時間攪拌した。メチレンクロリドを真空除去すると、紫色油状物が得られた。この油状物を一定して手動攪拌しながら200m1のエ

ーテルで磨碎した。この期間中、油状物は非常に粘稠性になった。エーテル溶液を傾瀉し、油状物を100mlのエーテルで磨碎した。エーテル溶液を傾瀉し、油状物を再び100ml分量のエーテルで磨碎した。エーテルを傾瀉し、エーテル溶液を合わせ、約2時間放置することにより、トリフェニルホスフィンオキシドを結晶化させた。エーテル溶液を結晶から傾瀉し、固体を100mlのエーテルで洗浄した。体積が約25mlとなるまで合わせたエーテル抽出物の体積を真空により低減化した。これを0°で一夜放置した。エーテル(10ml)を冷混合物に加え、混合して固体を懸濁させた。混合物を45gのシリカゲルのカラムで濾過し、エーテルで溶離し、そして75mlフラクションを集めた。薄層クロマトグラフィーにより測定された、生成物を含むフラクションをプールし、エーテルを真空除去した。この結果、粗生成物10.1gが得られた。この物質を、9:1ヘキサン:エーテルに変えながら、ヘキサンによるシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーにかけた。生成物含有フラクションをプールし、溶媒を真空除去した。この結果、7.4g(57%収率)の純粋生成物が得られた。

【0061】

10%パラジウム炭素(1g)および150mlのメタノール中ベンジルエステル(10g)の溶液から成る混合物を2時間25psiで水素化分解した。混合物をセライトで濾過し、残留物をメタノールで洗浄した。溶媒を濃縮すると、定量的収率で粘稠性油状物が得られた。

【0062】

プロミドと1,1,2-トリメチル-[1H]-ベンゾ[e]インドールとの反応を実施例1と同じ要領で実施した。

【0063】

実施例6

ビス(エチルカルボキシメチルジヒドロキシル)インドシアニン染料(図3)ヒドロキシ-インドール化合物は、公知方法(P.L.Southwickら、「蛍光性バイオラベル用中間体としての(2,3,3-トリメチル-3-H-インドール-5-イル)酢酸誘導体の一ポットフィッシャー合成」(One pot Fischer synthesis of (2,3,3-trimethyl-3-H-indol-5-yl)-acetic acid derivatives as intermed

iates for fluorescent biolabels)、Org.Prep.Proced.Int.Briefs、1988、20(3)、279-284)により容易に製造される。室温で30分間および還流温度で1分間酢酸(50mL)中p-カルボキシメチルフェニルヒドラジン塩酸塩(30ミリモル、1当量)および1,1-ビス(ヒドロキシメチル)プロパン(45ミリモル、1.5当量)の反応により、固体残留物として(3,3-ジヒドロキシメチル-2-メチル-3-H-インドール-5-イル)酢酸が得られる。実施例5記載の要領で製造された3-プロモプロピル-N,N-ビス(カルボキシメチル)アミンと中間体インドールとの反応および後続のインドール中間体とグルタコンアルデヒドジアニルモノ塩酸塩(実施例1参照)との反応により、目的生成物が得られる。

【0064】

実施例7

ビス(プロピルカルボキシメチル)インドシアニン染料の合成(図4)

文献に記載(G.A.ReynoldsおよびK.H.Drexhage、「赤外線で吸収する安定したヘプタメチンピリリウム染料」(Stable heptamethine pyrylium dyes that absorb in the infrared)、J.Org.Chem.1977、42(5)、885-888)の要領で中間体2-クロロ-1-ホルミル-3-ヒドロキシメチレンシクロヘキサンを製造した。等量(各々40mL)のジメチルホルムアミド(DMF)およびジクロロメタンを混合し、溶液をアセトン-ドライアイス浴中で-10℃に冷却した。アルゴン雰囲気下、ジクロロメタン中オキシ塩化リン(40mL)を冷DMF溶液に滴下した後、10gのシクロヘキサンを加えた。生成した溶液を室温に温まるまで放置し、6時間還流させた。室温に冷却後、混合物を氷冷水中に注ぎ、12時間4℃で貯蔵した。濾過後、黄色粉末約8gが得られた。インドール中間体と環状ジアルデヒドの縮合は、実施例1記載の要領で実施される。さらにビスイソプロピリデンアセタール保護モノサッカリドによる染料の官能化は、文献に記載された方法により達成された(J.H.Flanaganら、時間経過順識別法を用いたDNA配列決定適用における塩基 招集(コーリング)用近赤外線重原子修飾蛍光染料(Near infrared heavy-atom-modified fluorescent dyes for base-calling in DNA-sequencing application using temporal discrimination

)、Anal.Chem.、1998、70(13)、2676-2684)。

【0065】

実施例8

ビス(エチルカルボキシメチル)インドシアニン染料の合成(図5)

これらの染料は、実施例7記載の要領で製造される。これらの染料は赤外線領域で吸収する。図5に示された典型的な実例は、1036nmでの予測吸収最大値を有する。

【0066】

実施例9

ペプチドの合成

下記方法は、オクトレオテートの合成を目的とする。オクトレオテートのアミノ酸配列は、D - Phe - Cys' - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Cys' - Thr(配列番号1)(ただし、Cys'は2個のシステインアミノ酸間における分子内ジスルフィド結合の存在を示す)である。この発明の他のペプチドは、場合によっては軽微な修飾を伴ない得る類似方法により製造された。

【0067】

オクタペプチドは、アプライド・バイオシステムズ(432AモデルのSYN ERYペプチド・シンセサイザー)から市販されているペプチド合成装置を用いた自動フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)固相ペプチド合成法により製造された。最初のペプチドカートリッジは、25マイクロモル割合でFmoc - Thrによる前荷重ワン樹脂を含んでいた。後続のカートリッジは、次のアミノ酸:Cys(Acm)、Thr(t-Bu)、Lys(Boc)、Trp(Boc)およびTyr(t-Bu)に関する側鎖保護基を伴うFmoc保護アミノ酸を含んでいた。アミノ酸カートリッジをペプチド合成装置に置き、C-末端からN-末端位置へ生成物を合成させた。カップリング反応は、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)/N-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)の存在下において75マイクロモルの保護アミノ酸により実施された。ジメチルホルムアミド中20%ピペリジンによりFmoc保護基を除去した。合成

完了後、チオール基をトリフルオロ酢酸タリウムにより閉環し、6時間トリフルオロ酢酸(85%)：水(5%)：フェノール(5%)：チオアニソール(5%)を含む開裂混合物により固体支持体から生成物を開裂した。ペプチドをt-ブチルメチルエーテルにより沈澱させ、水：アセトニトリル(2:3)混合物により凍結乾燥した。ペプチドをHPLCにより精製し、LC/MSにより分析した。

【0068】

オクトレオチド、D-Phe-Cys'-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys'-Thr-OH(配列番号2)(ただし、Cys'は2個のシステインアミノ酸間における分子内ジスルフィド結合の存在を示す)は、同じ手順により製造された。

【0069】

ボンベシン類似体は同じ手順により製造されたが、トリフルオロ酢酸タリウムによる閉環は必要とされなかった。側鎖脱保護および樹脂からの開裂は、各々50μLのエタンジチオール、チオアニソールおよび水、および850μLのトリフルオロ酢酸により実施された。2種の類似体が製造された：Gly-Ser-Gly-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂(配列番号3)およびGly-Asp-Gly-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂(配列番号4)。

【0070】

コレシストキニンオクタペプチド類似体は、閉環段階を伴わずにオクトレオテートの場合と同じ要領で製造された。3種の類似体が製造された：Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂(配列番号5)、Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂(配列番号6)、およびD-Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂(配列番号7)(ただし、Nleはノルロイシンである)。

【0071】

ニューロテンシン類似体、D-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-T

y r - I l e - L e u (配列番号8)は、閉環段階を伴わずにオクトレオテートと同様にして製造された。

【0072】

実施例10

ペプチド-染料コンジュゲートの合成(図6)

下記方法は、オクトレオテート-シアニン染料コンジュゲートの合成に関するものであるが、他のペプチド-染料コンジュゲートの合成にも類似方法が使用される。

【0073】

オクトレオテートは実施例9記載の要領で製造されたが、ペプチドは固体支持体から開裂されず、PheのN-末端Fmoc基は保持されていた。チオール基はトリフルオロ酢酸タリウムにより閉環され、Pheを脱保護することにより遊離アミンが脱離された。ビスエチルカルボキシメチルインドシアニン染料(53mg、75マイクロモル)が、DMSO(375μL)中HBTU/HOBtの0.2モル溶液、およびDMSO(375μL)中ジイソプロピルエチルアミンの0.2モル溶液から成る活性化試薬に加えられた。約30分で活性化は完了し、樹脂結合ペプチド(25マイクロモル)を染料に加えた。室温で3時間カップリング反応を実施した。混合物を濾過し、固体残留物をDMF、アセトニトリルおよびTHFで洗浄した。緑色残留物を乾燥後、ペプチドが樹脂から開裂され、8.5%トリフルオロ酢酸、2.5%水、2.5%チオアニソールおよび2.5%フェノールの混合物により側鎖保護基が除去された。樹脂を濾過し、冷t-ブチルメチルエーテル(MTBE)を用いて染料-ペプチドコンジュゲートを沈澱させ、これをアセトニトリル:水(2:3)混合物に溶かし、凍結乾燥した。生成物をHPLCにより精製すると、モノオクトレオテート-ビスエチルカルボキシメチルインドシアニン染料(サイテート1、80%)およびビスオクトレオテート-ビスエチルカルボキシメチルインドシアニン染料(サイテート2、20%)が得られた。モノオクトレオテートコンジュゲートは、反応時間を2時間に減らすことによりビスコンジュゲートに対しほぼ独占的(>95%)に得られる。しかしながら、これはまた、不完全反応を誘発するため、非染料コンジュゲートペプ

チドによる受容体の飽和を回避するためには染料コンジュゲートから遊離オクトレオテートを注意深く分離しなければならない。

【0074】

オクトレオテート - ビスベンチルカルボキシメチルインドシアニン染料は、若干の修正を加えながらも上記と同じ要領で製造された。ビスベンチルカルボキシメチルインドシアニン染料(60mg、75マイクロモル)が、DMSO(400μL)中HBTU/HOBtの0.2モル溶液、およびDMSO(400μL)中ジイソプロピルエチルアミンの0.2モル溶液から成る活性化試薬に加えられた。約30分で活性化は完了し、樹脂結合ペプチド(25マイクロモル)を染料に加えた。室温で3時間反応を実施した。混合物を濾過し、固体残留物をDMF、アセトニトリルおよびTHFで洗浄した。緑色残留物を乾燥後、ペプチドが樹脂から開裂され、85%トリフルオロ酢酸、2.5%水、2.5%チオアニソールおよび2.5%フェノールの混合物により側鎖保護基が除去された。樹脂を濾過し、冷t-ブチルメチルエーテル(MTB E)を用いて染料 - ペプチドコンジュゲートを沈澱させ、これをアセトニトリル : 水(2:3)混合物に溶かし、凍結乾燥した。生成物をHPLCにより精製すると、オクトレオテート-1,1,2-トリメチル-[1H]-ベンゾ[e]インドールプロピオン酸コンジュゲート(10%)、モノオクトレオテート - ビスベンチルカルボキシメチルインドシアニン染料(サイテート3、60%)およびビスオクトレオテート - ビスベンチルカルボキシメチルインドシアニン染料(サイテート4、30%)が得られた。

【0075】

実施例11

ジメチルスルホキシド(DMSO)中におけるペプチド - 染料コンジュゲートの製剤

染料 - ペプチドコンジュゲートは、水中では可溶性に乏しく、可溶化剤または共溶媒の添加を必要とする。1 - 20%水性エタノールをコンジュゲートに加えると、インビトロ蛍光強度が部分的にクエンチングされ、インビボでは完全に蛍光はクエンチングされた(コンジュゲートは電荷結合素子(CCD)カメラにより検出されなかった)。1 - 50%DMSOを加えることにより、インビトロ

およびインビボでのコンジュゲートの蛍光強度は再確立または増強された。染料の蛍光は1週間にわたって強いままであった。DMSO製剤は、この発明用に使用された実験動物にとって認容性良好であった。

【0076】

実施例12

インドシアニングリーン(IGC)による膵管腺癌(DSL6A)のイメージング

非侵襲性インビボ蛍光イメージング装置を用いて、動物モデルにおいて腫瘍検出用に開発された造影剤の効率を評価した。名目波長780nmおよび名目電力40mWのレーザーマックス・インコーポレイテッドのレーザーダイオードを使用した。検出装置は、ローデンストック10mmF2レンズ(ストック#542.032.002.20)を装着したプリンストン・インスツルメントRE/C CD-1317-K/2型CCDカメラであった。造影剤から放射された蛍光のみが画像化されるように、830nm干渉レンズ(CVIレーザー・コーポレーション、部品#F10-830-4-2)をCCDインプットレンズの正面に固定した。典型的な例では、動物の画像を造影剤の注射前に撮った。それに続いてこの画像を注射後画像から差し引いた(ピクセル単位で)。しかしながら、一旦動物が試料領域から除かれ、注射の数時間後に撮られる画像用に後の時点で戻されると、バックグラウンドサブトラクションは決して為されなかった。

【0077】

固体(ドナー)移植片からの材料を導入することによりDSL6A腫瘍を雄マウスラットの左脇腹領域に誘導すると、腫瘍は約14日で触診可能となった。筋肉内注射により0.8mL/kgでキシラジン:ケタミン:アセプロマジン、1.5:1.5:0.5により動物に麻酔をかけた。腫瘍領域(左脇腹)の毛を剃って、腫瘍および周囲表面領域を露出させた。コックの栓およびヘパリン化食塩水を含む注射器2本を備えた21ゲージ蝶形物をラットの後方尾部静脈へ設置した。蝶形装置によるIGC投与前に静脈の開通性をチェックした。各動物に水中IGCの0.42mg/mL溶液500μLを与えた。

【0078】

図7A-Bは、ICG(5.4 μm)の0.5mL水溶液のボーラス注射後2分(図7A)および30分(図7B)時点での腫瘍画像である。テトラカルボン酸シアニン染料は、図2(ただし、 $A = CH_2$ または CH_2OCH_2 、 $R_1 = R_2 = H$ (式1)または $R_1, R_2 =$ 縮合フェニル(式2))に示された要領で合成された。

【0079】

図面は、指示された時点で測定された蛍光強度の偽色彩画像であり、画像は腫瘍および周囲小領域に制約されている。示されている通り、腫瘍における染料強度はICG注射後30分で顕著に減少した。

【0080】

実施例13

インドシアニングリーン(ICG)による前立腺癌(R3327-H)のイメージング

使用されたイメージング装置および方法は実施例12の場合と同様である。前立腺腫瘍(ダニングR3327-H)を、固体移植片から雄の若年コペンハーゲンラットの左脇腹領域に誘導した。これらの腫瘍は非常にゆっくりと増大し、触診できる塊は移植の4-5ヶ月後に存在した。図7C-Dは、注射の2分後(図7C)および30分後(図7D)に画像化された前立腺癌腫(R3327-H)誘導ラットの画像である。

【0081】

図面は、指示された時点で測定された蛍光強度の偽色彩画像であり、画像は腫瘍および周囲小領域に制約されている。示されている通り、腫瘍における染料強度はICG注射後30分で顕著に減少した。

【0082】

実施例14

インドシアニングリーン(ICG)によるラット臍臓小葉癌(CA20948)のイメージング

使用されるイメージング装置および方法は実施例12の場合と同様である。固体移植片技術により左脇腹領域にSST-2受容体を発現するラット臍臓小葉癌

(C A 2 0 9 4 8) を誘導したところ、触診可能な塊は移植の9日後に検出された。注射の2および3分後に得られた画像は図7 E - Fに示されている。図7 E - Fは、注射の2分後(図7 E)および30分後(図7 F)に画像化されたS S T - 2受容体を発現する臍臓小葉癌(C A 2 0 9 4 8)が誘導されたラットの画像である。

【0083】

図面は、指示された時点での測定された蛍光強度の偽色彩画像であり、画像は腫瘍および周囲小領域に制約された。示されている通り、腫瘍における染料強度は I C G 注射後30分で顕著に減少し、ほとんど存在していなかった。

【0084】

実施例15

サイテート1によるラット臍臓小葉癌(C A 2 0 9 4 8)のイメージング
使用されたイメージング装置および方法は実施例12の場合と同様であるが、
ただし各動物には水中25%ジメチルスルホキシドのサイテート1溶液の1.0
mg / mL溶液500μlを与えた。

【0085】

固体移植技術により左脇腹領域にS S T - 2受容体を発現するラット臍臓小葉癌(C A 2 0 9 4 8)を誘導したところ、触診できる塊は移植の24日後に検出された。画像は注射後の様々な時点で得られた。腫瘍への取込みは2分で見られたが、最大となったのは約5分後であった。

【0086】

図8 A - Bは、C A 2 0 9 4 8セルライン誘導ラットにおける45分時点でのI C Gおよびサイテート1の取込み比較を示す。45分までにI C Gはほぼ一掃されたが(図8 A)、サイテート1はまだ強い状態である(図8 B)。この染料蛍光は注射後数時間の間腫瘍において強い状態のままであった。

【0087】

実施例16

インドシアニングリーンによるイメージングと比較したサイテート1によるラット臍臓小葉癌(C A 2 0 9 4 8)のイメージング

インドシアニングリーン (ICG) を用い、CCD カメラ装置を用いて 3 種の異なるセルラインを光学的に画像化した。セルラインのうちの 2 種、DSL6/A (臍臓) およびダニング R3327H (前立腺) は、時間経過に伴い腫瘍への緩慢な薬剤の灌流を示し、各々について妥当な画像が得られた。第三のライン、CA20948 (臍臓) は、注射の僅か 30 分後には存在しない軽微ではあるが一時的な灌流を示した。これは、他の 2 腫瘍ラインと比べてこのラインには ICG の非特異的局在性の無いことを示していたことから、この型の腫瘍に関する異なる血管構造が示唆された (図 7A - F 参照)。最初の 2 腫瘍ライン (DSL6/A および R3327H) は、同じくソマトスタチン (SST-2) 受容体に富む CA20948 ほど高度に血管化されてはいない。従って、この腫瘍モデルにおける染料の検出および保持は、受容体依存的特異性の優れた指標である。

【0088】

オクトレオテートは、ソマトスタチン (SST-2) 受容体をターゲッティングすることが知られているため、シアノ - オクトレオテート (サイテート 1 およびサイテート 2) が製造された。サイテート 1 は、CA20948 ルイスラットモデルで評価された。CCD カメラ装置を用いると、この染料の強い局在性が注射の 90 分後に腫瘍で観察された (図 9A)。注射後 19 時間の時点で、動物を再び画像化した (図 9B)。腫瘍視覚化は容易に観察されたことから、この腫瘍ラインに存在する SST-2 受容体に関するこの薬剤の特異性を示していた。対照として、器官を再度画像化し (図 10A)、画像を注射されていないラットの同じ組織のもの (図 10B) と比較した。

【0089】

個々の臓器を除去し、画像化した。物質の高い取込みが臍臓、腎傍および腫瘍組織において観察され、心臓、筋肉、脾臓および肝臓はそれよりかなり低い取込みを示した (図 11)。これらのデータは、同じモデル系における放射性標識オクトレオテートと完全な相関関係を示す (M. de Jongら、Cancer Res. 1998、58、437-441)。

【0090】

実施例 17

ペプチド染料コンジュゲートの血液クリアランスプロフィールのモニター
染料発色団の励起に適当な波長のレーザーを、光ファイバー束の一端に向か、
他端をラットの耳から数ミリメートルのところに配置した。第2の光ファイバー
束もまた、同じ耳付近に配置することにより、放射された蛍光を検出し、他端を
データ収集用オプティックス（光学機器）およびエレクトロニクス（電子機器）
へ指向させた。収集オプティックストレインにおける干渉フィルター（IF）を
用いて、染料発色団にとって適当な波長の放射された蛍光を選択した。

【0091】

スプラーグ ドーリーまたはフィッシャー 344 ラットをこれらの試験で使用
した。体重 1 kg 当たり 1.35 g の用量で腹腔内注射によるウレタン投与によ
り動物に麻酔をかけた。動物が所望の麻酔段階に達した後、12" 管を備えた 2
1 ゲージ蝶形物を各動物の側面尾部静脈に設置し、ヘパリン化食塩水で洗い流し
た。動物を加熱パッドに置き、全試験中常に暖かく保った。左耳たぶをガラス製
顕微鏡スライドに貼付することにより動きおよび振動を低減化した。

【0092】

光ファイバーから送達された入射レーザー光線を貼付された耳に集中させた。
次いで、データ収集を開始し、そして試験薬剤投与前に蛍光のバックグラウンド
読み取り値を得た。サイトート 1 または 2 の場合、ペプチド - 染料コンジュゲート
を、側面尾部静脈におけるボーラス注射により、典型的には 0.5 ~ 2.0 mL を
動物に投与した。この手順を正常および腫瘍担持ラットにおいて幾つかのペプチ
ドコンジュゲートにより反復した。正常および腫瘍担持動物におけるペプチド染
料コンジュゲートの血液クリアランスをモニターする方法としての代表的プロフ
ィールは図 12 ~ 16 に示されている。一区画モデル用の標準シグマプロットソ
フトウェアプログラムを用いてデータを分析した。

【0093】

サイトート 1 または 2 で処理したラットでは、蛍光シグナルは、ピーク値まで
急速に増加した。次いで、シグナルは、血流から一掃されたコンジュゲートとし
ての時間の関数として減少した。図 12 は、780 nm で励起後に 830 nm で
モニターされた正常ラット血液からのサイトート 1 のクリアランスプロフィール

を示す。図13は、同じく780nmで励起後に830nmでモニターされた膵臓腫瘍(CA20948)担持ラット血液からのサイテート1のクリアランスプロフィールを示す。

【0094】

図14は、正常ラット血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールを示し、図15は、780nmで励起後に830nmでモニターされた膵臓腫瘍(CA20948)担持ラット血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールを示す。

【0095】

図16は、780nmで励起後に830nmでモニターされた正常ラット血液からのサイテート4のクリアランスプロフィールを示す。

【0096】

本明細書に示され、記載されている本発明の具体例は、当技術分野に習熟した本発明者らの実施態様に過ぎず、何らかの意味で限定しているわけではないものと理解すべきである。従って、本発明の精神および請求の範囲から逸脱することなく、それらの実施態様に対し様々な変化、修飾または改変を加えるかまたはそれらの手段に訴えることもあり得る。引用された参考文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ビスカルボン酸シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【図2】 テトラカルボン酸シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【図3】 ポリヒドロキシカルボン酸染料の合成に関する反応経路を示す。

【図4】 非凝集性シアニン染料の合成に関する反応経路を示す。

【図5】 長波長吸収性染料の合成に関する反応経路を示す。

【図6】 シアニン染料バイオコンジュゲートの合成に関する反応経路を示す。

【図7】 様々な腫瘍をもつラットへのインドシアニングリーン(IGC)注射の2分および30分後における画像を表す。

【図8】 膵臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットにおけるIGC(

図8A)およびサイテート1(図8B)の取込みの比較を示す。

【図9】 サイテート1注射後45分(図9A)および27時間(図9B)における脾臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットの画像を示す。

【図10】 サイテート1による注射の約24時間後における脾臓小葉癌(CA20948)に罹ったラットから摘出された個々の器官の画像である。

【図11】 注射後22時間のAR42-J腫瘍担持ラットにおけるポンベシネットの画像である。

【図12】 正常ラットの血液からのサイテート1のクリアランスプロフィールである。

【図13】 脾臓腫瘍担持ラットの血液からのサイテート1のクリアランスプロフィールである。

【図14】 正常ラットの血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールである。

【図15】 脾臓腫瘍担持ラットの血液からのサイテート2のクリアランスプロフィールである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Achilefu, Samuel
Rajagopalan, Raghavan
Dorshow, Richard B
Bugaj, Joseph E.

<120> NEW HYDROPHILIC CYANINE DYES

<130> DNA STRING

<140> 09/484,319
<141> 2000-01-18

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Octreotide

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> This is D-phenylalanine

<220>
<221> DISULFID
<222> (2)..(7)

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> This is D-tryptophan

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> This C-terminal residue ends with a hydroxyl

<400> 1
Phe Cys Tyr Trp Lys Thr Cys Thr
1 5

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SITE
<222> (11)
<223> This C-terminal amino acid ends with an NH₂

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
BOMBESIN.

<400> 2
Gly Ser Gly Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SITE
<222> (11)
<223> THIS C-TERMINAL AMINO ACID ENDS WITH AN NH2.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
BOMBESIN.

<400> 3
Gly Asp Gly Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> THIS C-TERMINAL RESIDUE ENDS WITH NH2.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
CHOLECYSTOKININ

<400> 4
Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Nle

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> THIS C-TERMINAL ENDS WITH NH2.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
CHOLECYSTOKININ

<400> 5
Asp Tyr Xaa Gly Trp Xaa Asp Phe
1 5

```

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Nle

<220>
<221> SITE
<222> (8)
<223> THIS C-TERMINAL RESIDUE ENDS WITH NH2

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
      CHOLECYSTOKININ

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> THIS IS D-ASPARTIC ACID

<400> 6
Asp Tyr Xaa Gly Trp Xaa Asp Phe
    1           5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> THIS IS D-LYSINE.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:ANALOG OF
      NEUROTENSIN

<400> 7
Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
    1           5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Octreotide

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> This is D-phenylalanine

<220>
<221> DISULFID
<222> (2)..(7)

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> This is D-tryptophan

<400> 8
Phe Cys Tyr Trp Lys Thr Cys Thr
    1           5

```

【図1】

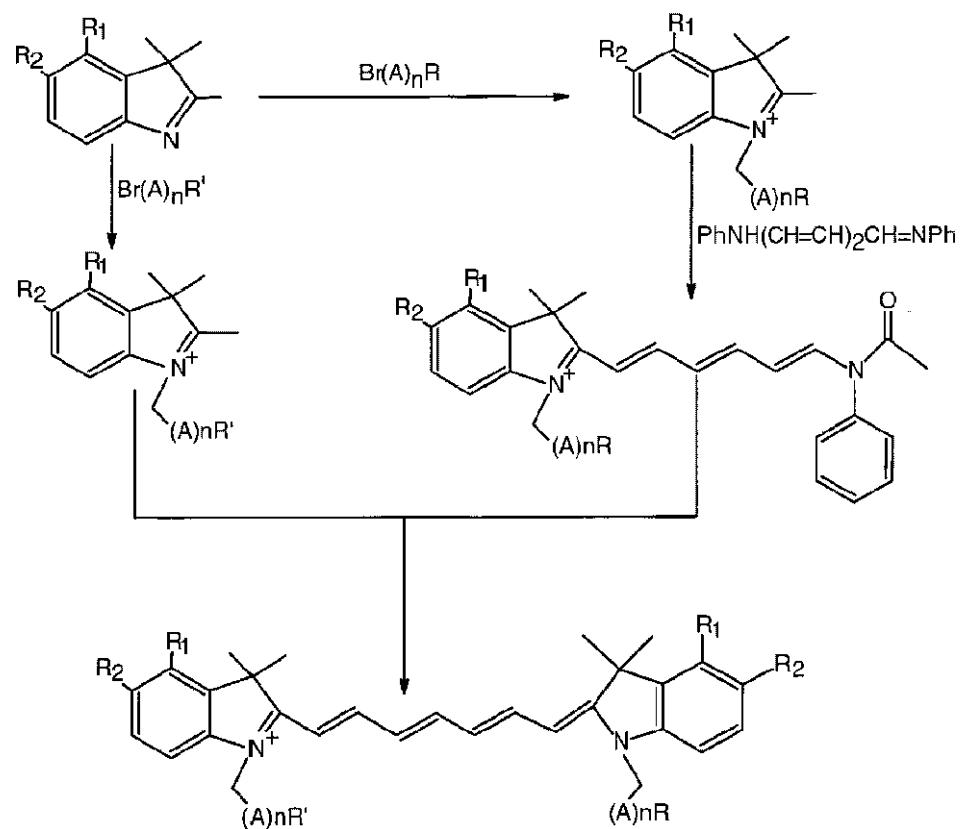


FIG. 1

【図2】

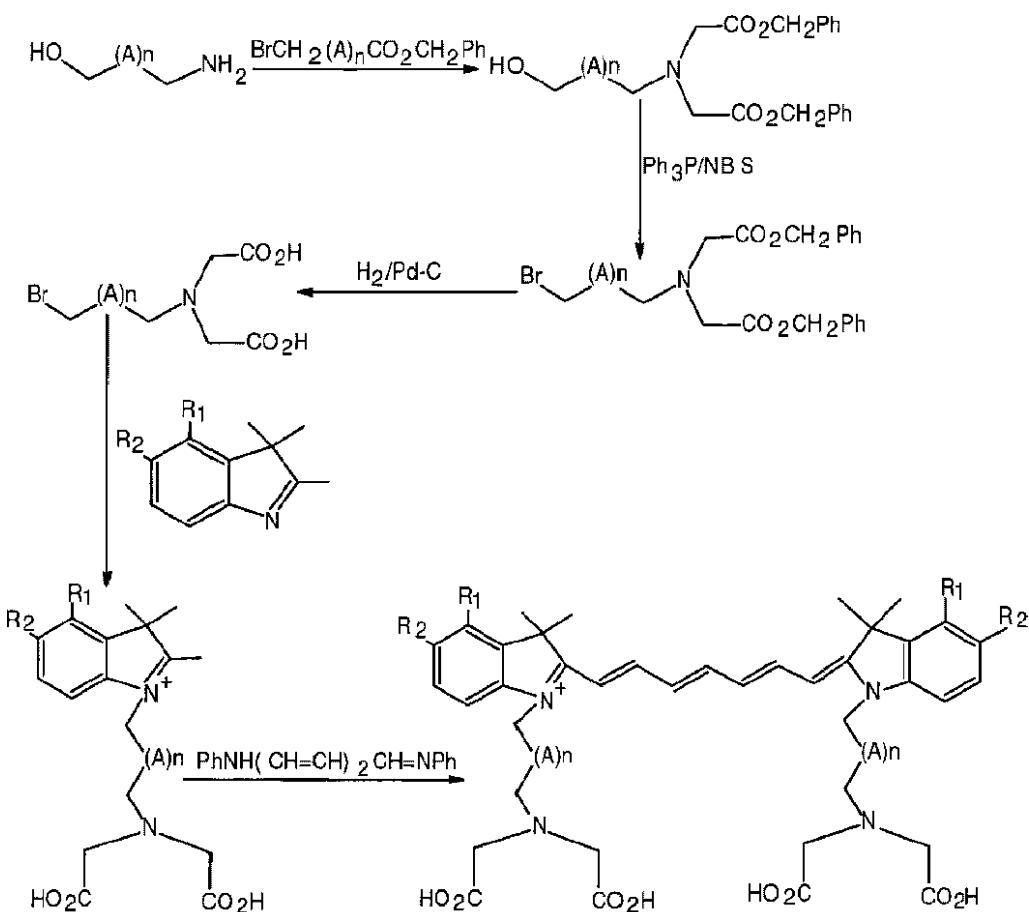


FIG. 2

【図3】

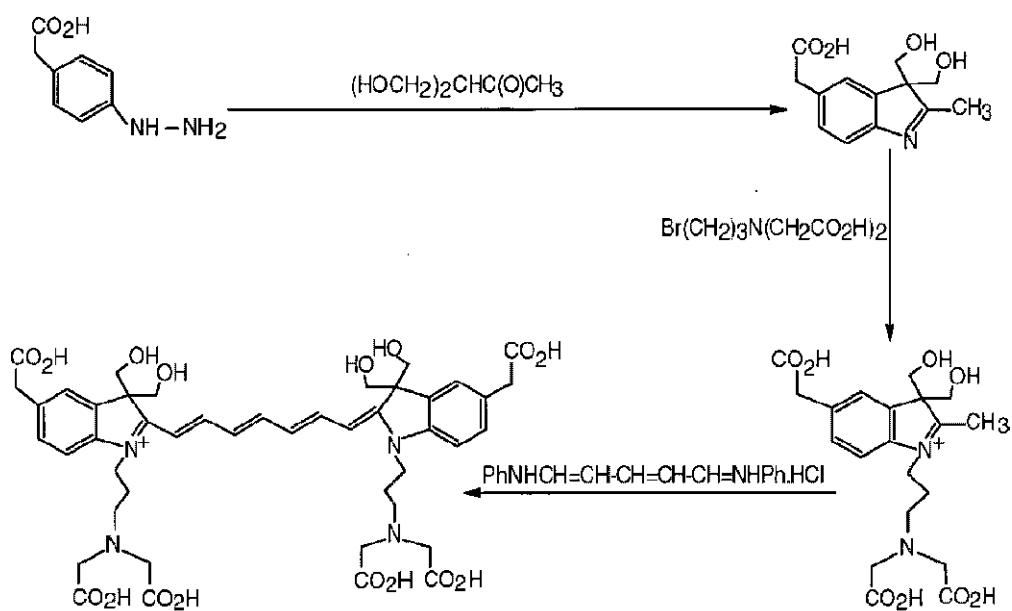


FIG. 3

【図4】

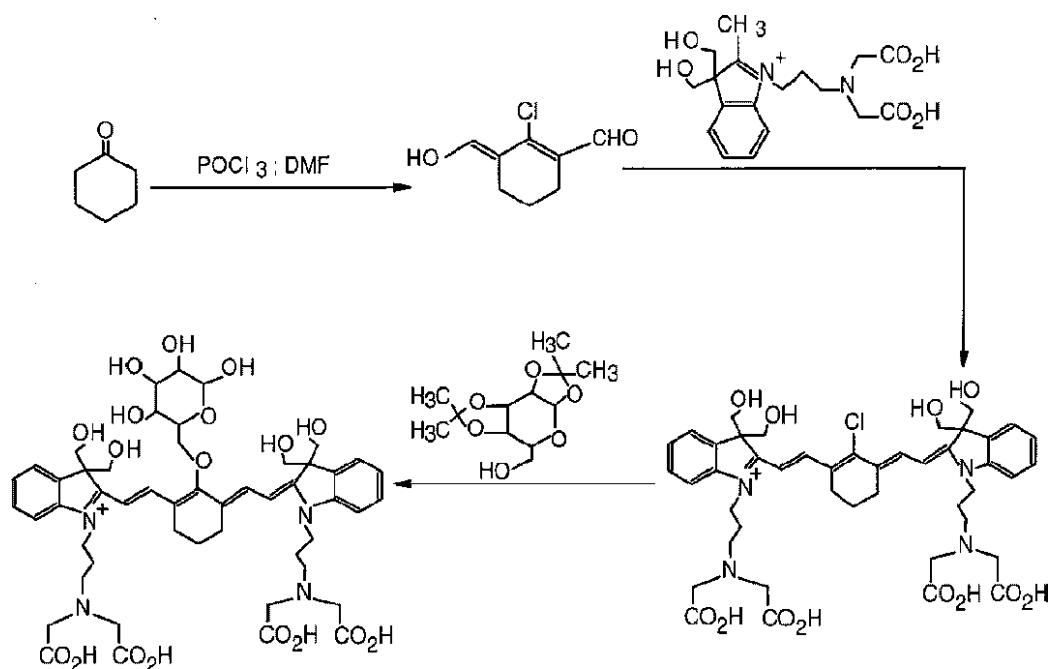


FIG. 4

【図5】

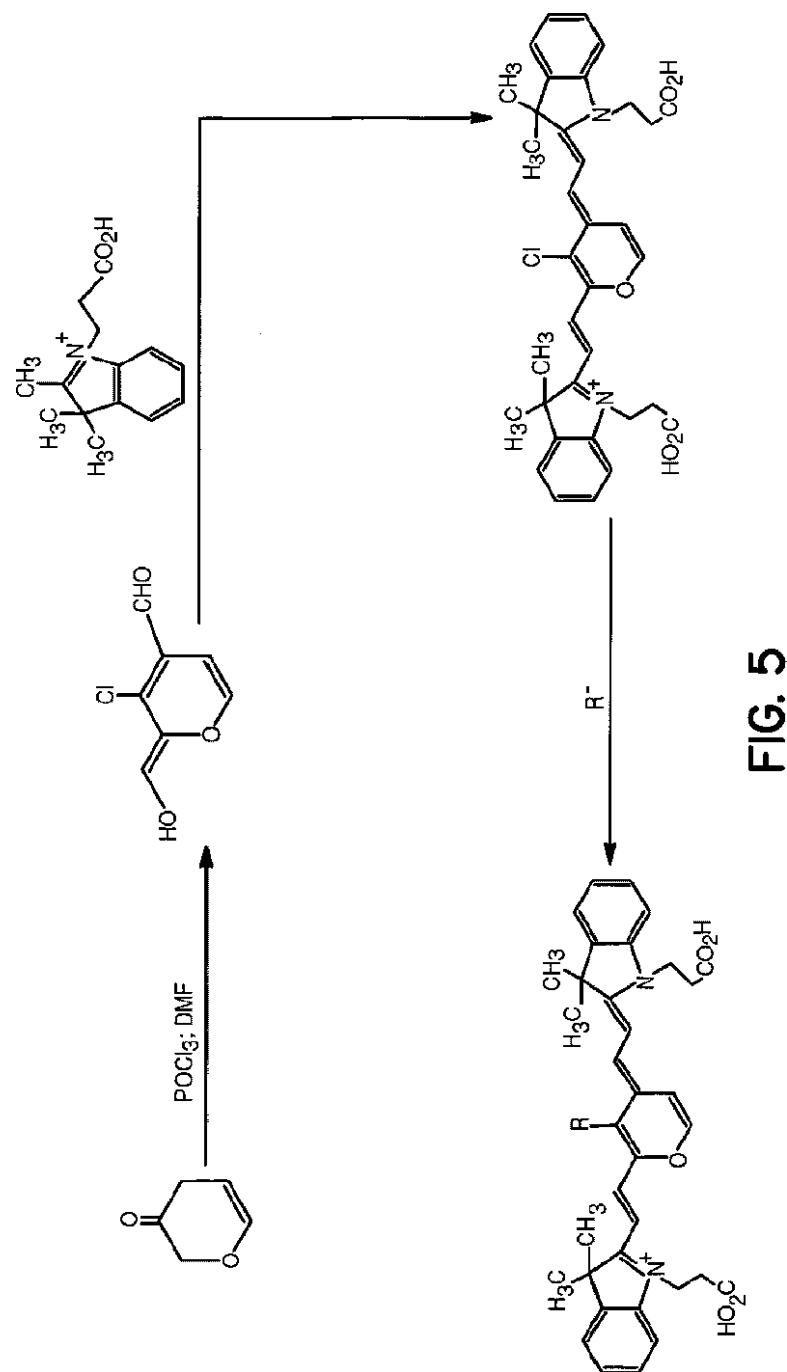


FIG. 5

【図6】

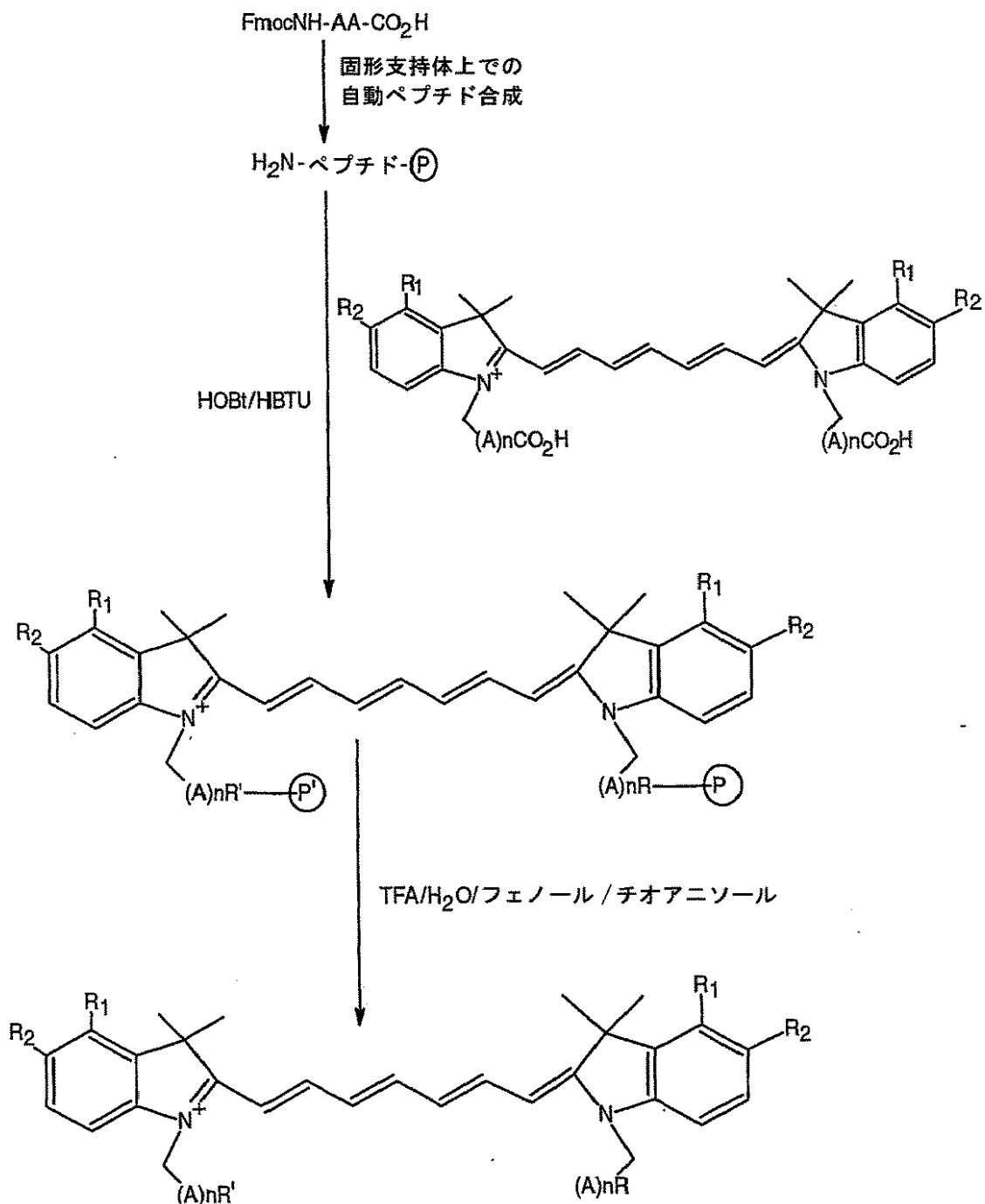


FIG. 6

【図7】

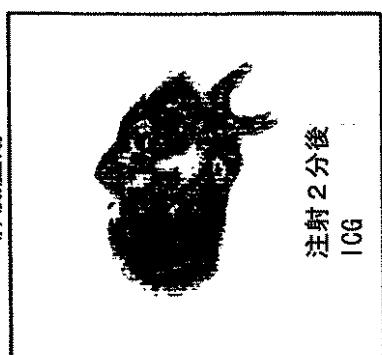
CA20948
脾臓腫瘍癌

FIG. 7E

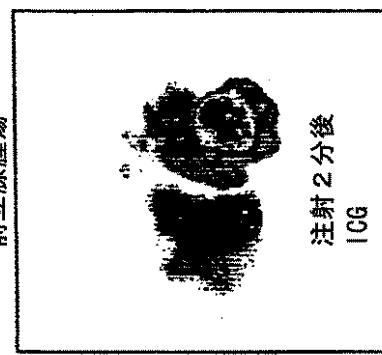
DUNNING R3327H
前立腺腫瘍癌

FIG. 7C

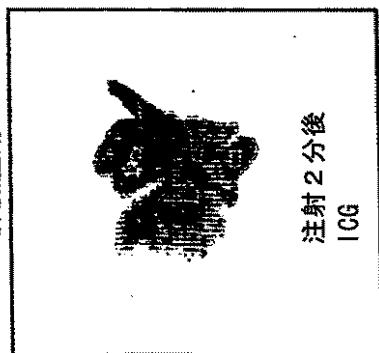
DSL6/A
脾臓腫瘍癌

FIG. 7A

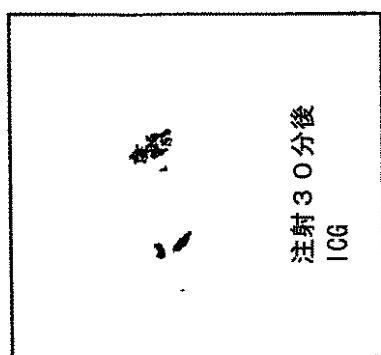
注射 30 分後
ICG

FIG. 7F

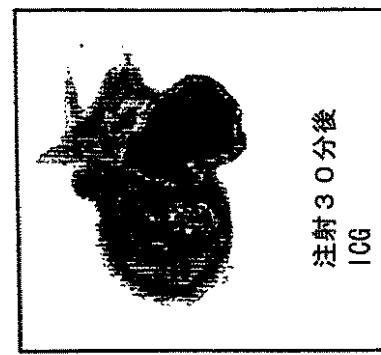
注射 30 分後
ICG

FIG. 7D

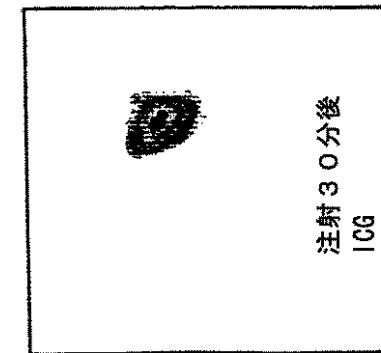
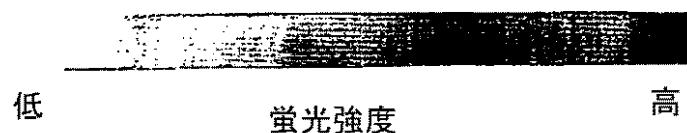
注射 30 分後
ICG

FIG. 7B

【図8】



45分の時点—I C G



FIG. 8A

45分の時点—サイト1



FIG. 8B

【図9】

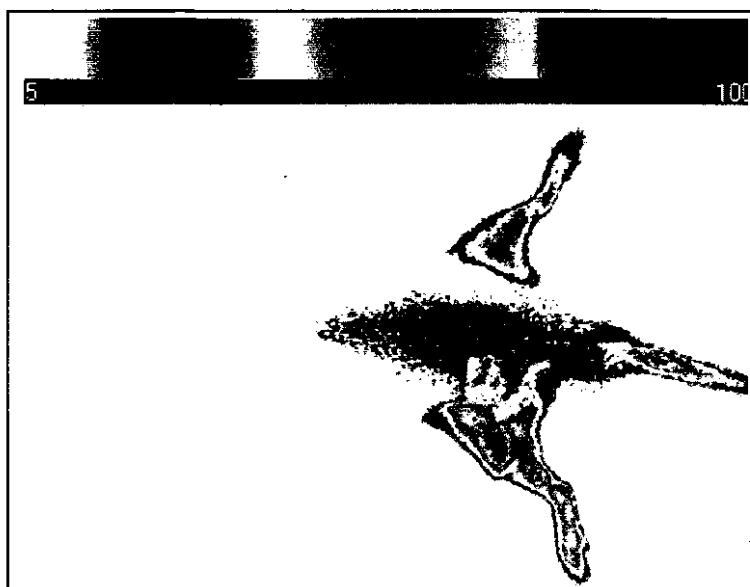


FIG. 9A



FIG. 9B

【図10】

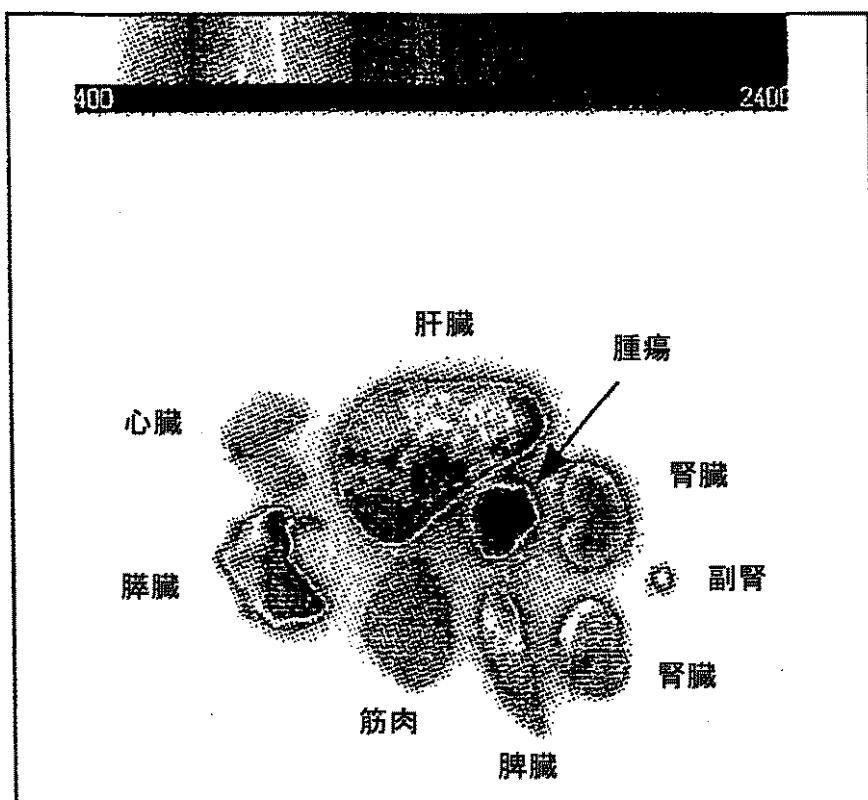


FIG. 10

【図11】

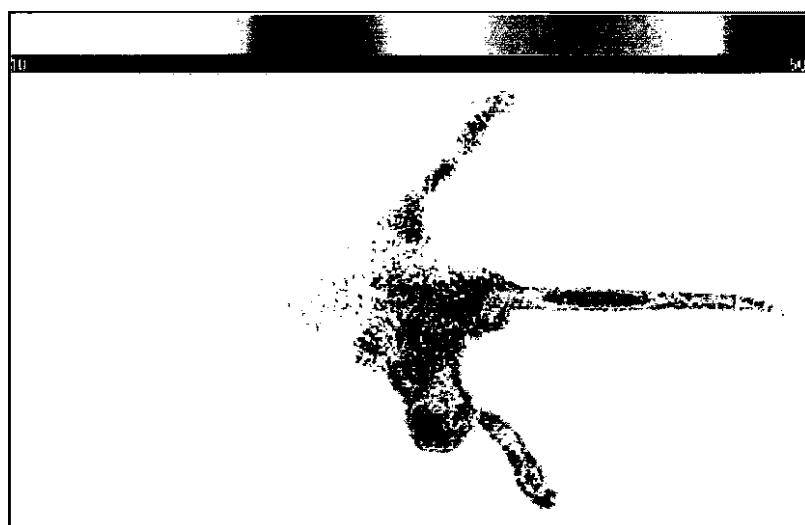


FIG. 11

【図12】

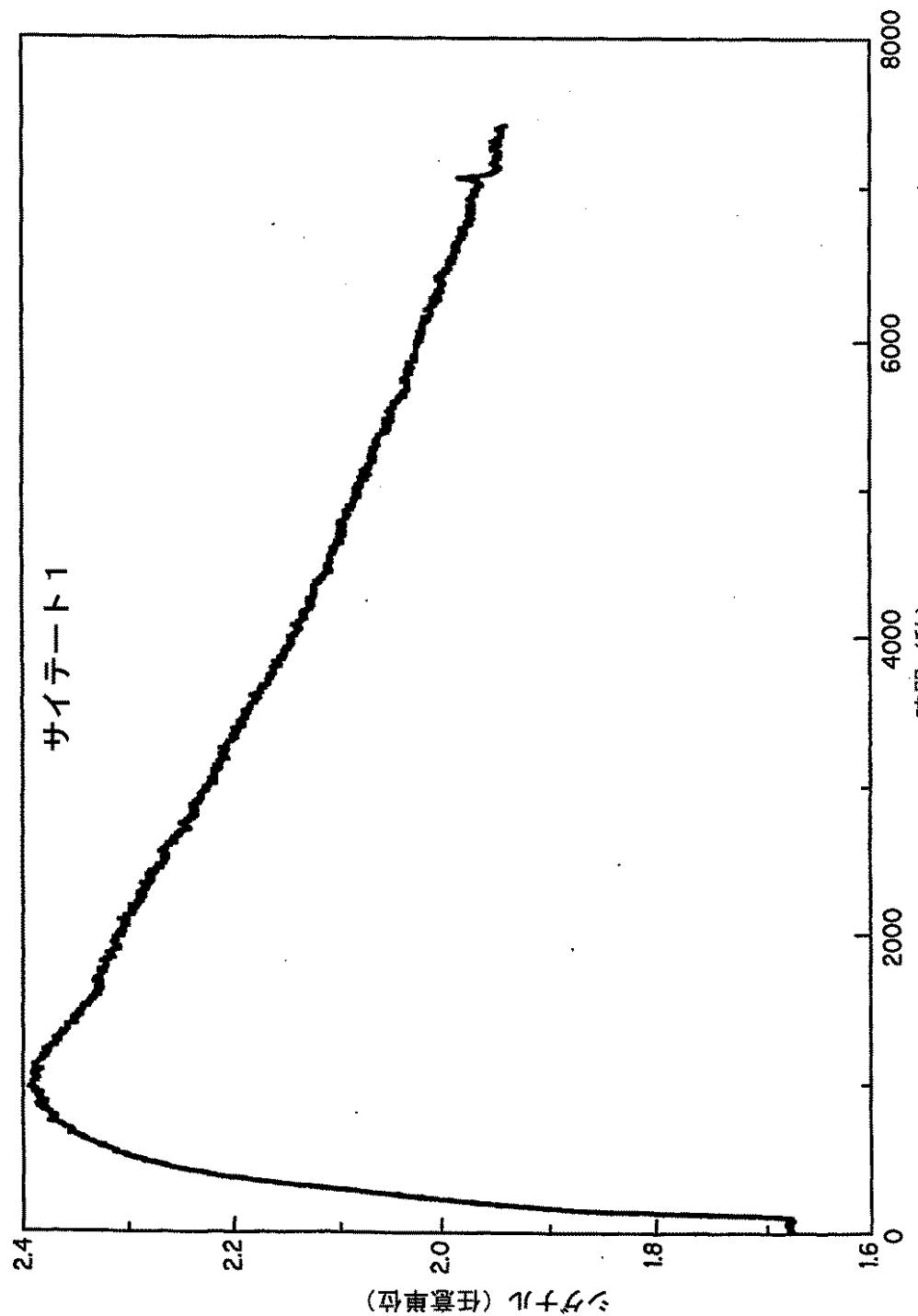


FIG. 12

【図13】

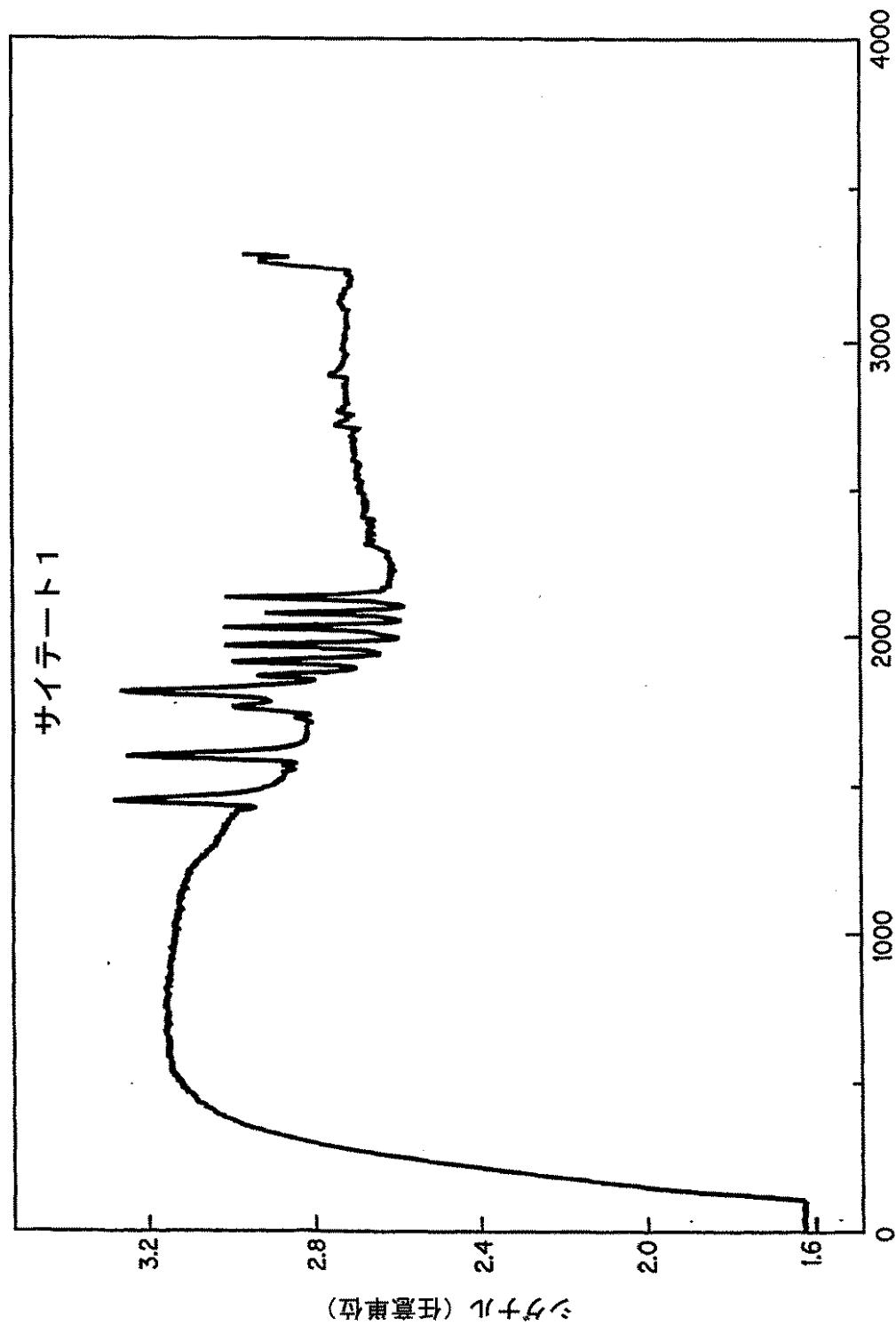


FIG. 13

【図14】

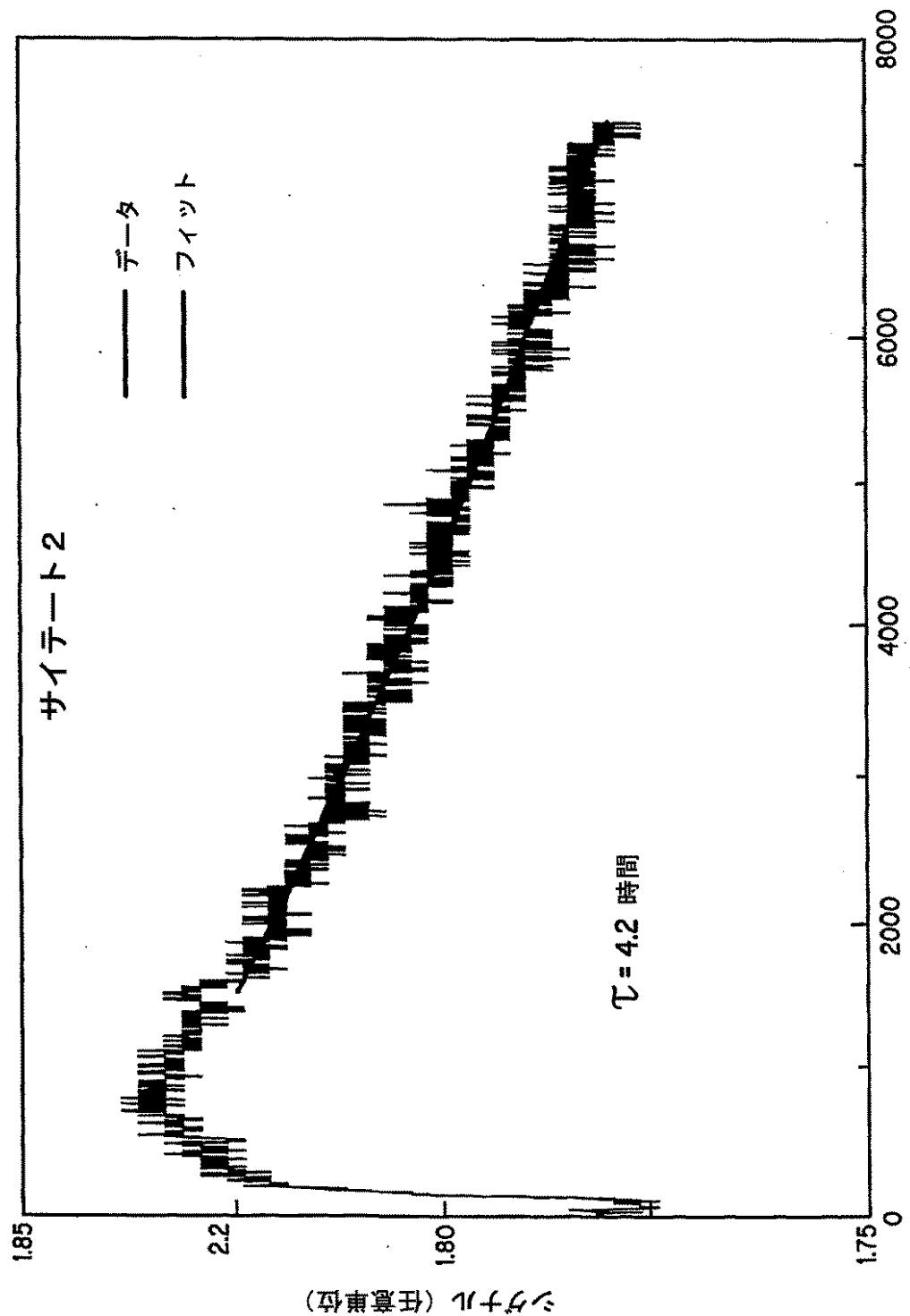


FIG. 14

【図15】

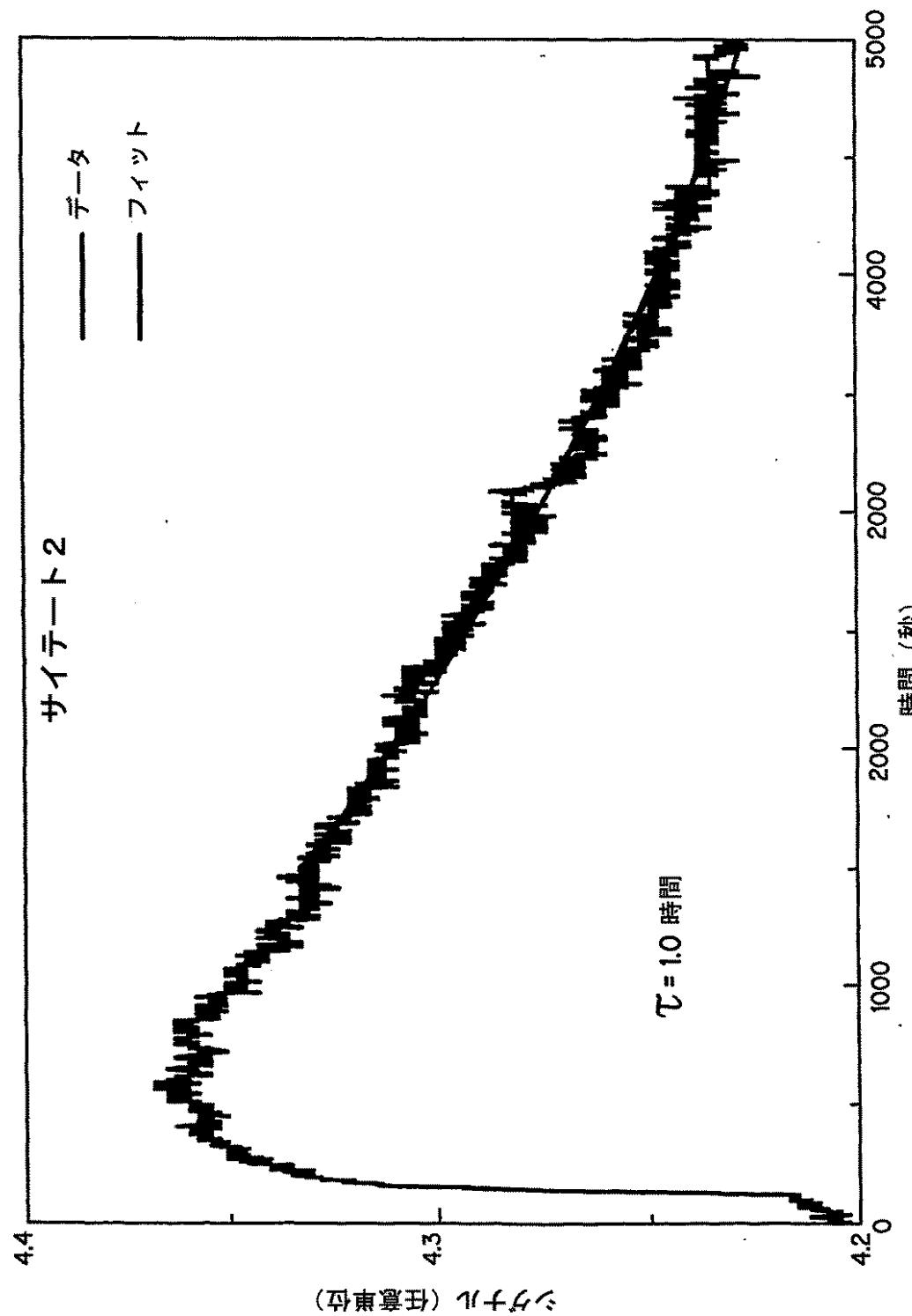


FIG. 15

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/01471
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A 61B 10/00 US CL : 424/9.6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/1.11, 1.65, 9.1, 9.6		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,E	US 6,183,726 B1 (ACHILEFU et al) 06 February 2001, see entire document, especially, columns 19-22, claims 1-16.	1-20
Y	BERGMARK W.R. Dramatic Fluorescence Effects for Coumarin Laser Dyes Coincluded with Organic Solvents in Cyclodextrins. Journal of Physical Chemistry, 1990, Vol. 94, No. 12, pages 5020-5022, especially, page 5021, Tables II and III.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other events "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 08 MARCH 2001		Date of mailing of the international search report 03 APR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 308-3230		Authorized officer  J.D. Jones Telephone No. (703) 308-1235

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド(参考)
C 0 7 H 15/26		C 0 9 B 23/00	Z N A L 4 H 0 5 6
C 0 9 B 23/00	Z N A	C 0 9 K 11/06	
C 0 9 K 11/06		C 0 7 K 7/06	
// C 0 7 K 7/06		A 6 1 K 37/02	
(81)指定国	E P(A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A(B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P(G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A(A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	リチャード・ビー・ドーシー アメリカ合衆国63146ミズーリ州セント ルイス、ニーハウス・レイン11977番		
(72)発明者	ジョゼフ・イー・ブガジュ アメリカ合衆国63303ミズーリ州セント チャールズ、ケッタリング・ドライブ2916 番		
F ターム(参考)	4C057 BB02 DD02 JJ27 4C061 AA24 BB01 CC00 DD01 HH51 WW17 4C063 AA03 BB03 CC78 DD06 EE01 EE10 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA09 BA17 BA23 BA32 BA38 CA59 DA27 NA14 ZB262 4H045 AA10 AA20 BA14 BA15 BA16 BA70 EA50 FA34 4H056 CA01 CA02 CA05 CB01 CB06 CC02 CC08 CE03 CE06 DD03		

专利名称(译)	广泛使用的亲水染料		
公开(公告)号	JP2003535041A	公开(公告)日	2003-11-25
申请号	JP2001552801	申请日	2001-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	马林克罗特公司		
申请(专利权)人(译)	马连杆有限公司		
[标]发明人	サミュエルアイアチレフ ラガバンラジヤゴパラン リチャードビードーショー ジョゼフィーブガジュ		
发明人	サミュエル・アイ・アチレフ ラガバン・ラジヤゴパラン リチャード・ビー・ドーショー ジョゼフ・イー・ブガジュ		
IPC分类号	C07H15/26 A61B1/00 A61K38/00 A61K41/00 A61K49/00 A61P35/00 C07D405/14 C07K7/06 C09B23/00 C09K11/06		
CPC分类号	A61K49/0032 A61K41/0033 A61K41/0057 A61K49/0056		
FI分类号	C07D405/14 A61B1/00.300.D A61K41/00 A61P35/00 C07H15/26 C09B23/00.ZNA.L C09K11/06 C07K7/06 A61K37/02		
F-TERM分类号	4C057/BB02 4C057/DD02 4C057/JJ27 4C061/AA24 4C061/BB01 4C061/CC00 4C061/DD01 4C061/HH51 4C061/WW17 4C063/AA03 4C063/BB03 4C063/CC78 4C063/DD06 4C063/EE01 4C063/EE10 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA09 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/BA32 4C084/BA38 4C084/CA59 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA70 4H045/EA50 4H045/FA34 4H056/CA01 4H056/CA02 4H056/CA05 4H056/CB01 4H056/CB06 4H056/CC02 4H056/CC08 4H056/CE03 4H056/CE06 4H056/DD03		
优先权	09/484321 2000-01-18 US 09/757733 2001-01-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了可用于诊断成像和治疗的染料-肽缀合物。染料-肽共轭物包括具有各种双-和四-(羧酸)同系物的几种花青染料。该化合物可以与生物活性肽，碳水化合物，激素，药物或其他生物活性剂缀合。与较高分子量的成像剂相比，化合物的小尺寸使其更有利递送至肿瘤细胞。在350-1300 nm范围内可以使用多种染料，确切的范围取决于特定的染料。二甲基亚砜的使用有助于维持化合物的荧光。本发明的分子可用于诊断成像和治疗，内窥镜应用中以检测肿瘤和其他异常，局部治疗，肿瘤的光声成像，检测和治疗以及肿瘤中。对于声荧光成像，检测和治疗有用。

