(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3612343号
(P3612343)
(45)発行日　平成17年1月19日(2005.1.19)　(24)登録日　平成16年10月29日(2004.10.29)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C07D 487/22	C07D 487/22	
A61K 31/555	A61K 31/555	
A61K 38/00	A61K 39/395	C
A61K 38/22	A61K 49/00	A
A61K 39/395	A61P 35/00	

請求項の数 13　(全 28 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平5-226328
(22)出願日　平成5年7月26日(1993.7.26)
(65)公開番号　特開平7-33772
(43)公開日　平成7年2月3日(1995.2.3)
審査請求日　平成12年6月1日(2000.6.1)
(31)優先権主張番号　102645
(32)優先日　平成4年7月26日(1992.7.26)
(33)優先権主張国　イスラエル(IL)

(73)特許権者　591015175
イエダ　リサーチ　アンド　デベロツプメント　カンパニー　リミテツド
イスラエル国レホボト　ピー　オー　ボツクス　９５
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100090804
弁理士　歌門　章二
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロロフィルとバクテリオクロロフィルの誘導体、それらの製造法及びそれら誘導体を含んで成る製剤組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
一般式
Ｘ－ＣＯ－Ｙ－Ａ－Ｒ
の化合物であって、
Ｘ－ＣＯ－は、天然のクロロフィル（Ｃｈｌ）、天然のバクテリオクロロフィル（Ｂｃｈｌ）、並びに中心Ｍｇ原子が異なった二価の金属原子で置換されている天然のＣｈｌ及び天然のＢｃｈｌからなる群から選択される化合物のＣ１７－プロピオニル残基であり；
ＹはＯ、Ｓ又はＮＨであり；
Ａは、共有結合であるか、又は、直鎖状若しくは分子鎖状の、飽和若しくは不飽和の、ＯＨ、NH_2、ＣＯＯＨ及び$CONH_2$からなる群から選択される１以上の官能基により置換されている、若しくは置換されていない、５～２０個の炭素原子を有する炭化水素鎖であって、ＯＨ、ＣＯＯＨ及びNH_2からなる群から選択される末端官能基を含有する炭化水素鎖であって、又はこのような炭化水素鎖はその鎖中に、Ｏ、Ｓ及びＮＨからなる群から選択される１以上のヘテロ原子若しくはフェニル環を含有していてもよい；及び
Ｒは、
（ｉ）ＯＨ若しくはＳＨ基を含有しているアミノ酸、又はその誘導体であって、エステル、及び保護基がカルボベンゾキシ、トリチル及びｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルであるＮ－保護誘導体からなる群から選択される誘導体であり、前記の場合に、Ａが共有結合であるときはＹはＯ若しくはＳである；

（ｉｉ）ＯＨ若しくはＳＨ基を含有しているペプチド、又はその誘導体であって、エステル、及び保護基がカルボベンゾキシ、トリチル及びｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルであるＮ－保護誘導体からなる群から選択される誘導体であり、前記の場合に、Ａが共有結合であるときはＹはＯ若しくはＳである；及び
（ｉｉｉ）ペプチドホルモン、又は細胞特異性配位子である蛋白質、
からなる群から選択される化合物の残基である、
上記化合物。
【請求項２】
Ｘ－ＣＯ－は、中心Ｍｇ原子が、Ｖ、Ｚｎ、Ｃｕ、Ｃｏ、Ｎｉ及びＳｎからなる群から選択される二価の金属原子で置換されているＣｈｌ又はＢｃｈｌのＣ１７－プロピオニル残基であり；
Ｙは Ｏであり；
Ａは共有結合であり；及び
Ｒは、ＯＨ基を含有しているアミノ酸又はペプチド、又はその誘導体であって、エステル、及び保護基がカルボベンゾキシ、トリチル若しくはｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルであるＮ－保護誘導体からなる群から選択される誘導体である、
請求項１記載の化合物。
【請求項３】
化合物が、
Ｌ－セリルメチルエステルクロロフィリドａ、
Ｌ－セリルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ、
Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステルクロロフィリドａ、
Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ、
カルボベゾキシセリルセリルメチルエステルクロロフィリドａ、
カルボベゾキシセリルセリルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ、
Ｌ－セリルメチルエステルフェオフォルビドａ－Ｚｎ、
Ｌ－セリルメチルエステルフェオフォルビドａ－Ｃｕ、
Ｎ－トリチル－Ｌ－セリンメチルエステルクロロフィリドａ、
チロシルエチルエステルクロロフィリドａ、
チロシルエチルエステルバクテリオクロロフィリドａ、
である請求項２記載の化合物。
【請求項４】
Ｒがペプチドホルモンの残基である請求項１記載の化合物。
【請求項５】
化合物が、クロロフィル又はバクテリオクロロフィルとα－メラノサイト刺激ホルモンとの結合体である請求項４記載の化合物。
【請求項６】
Ｒが、細胞特異性配位子である蛋白質の残基である請求項１記載の化合物。
【請求項７】
蛋白質が腫瘍特異性抗体である請求項６記載の化合物。
【請求項８】
化合物が、クロロフィル又はバクテリオクロロフィルと免疫グロブリンＧとの結合体である請求項６記載の化合物。
【請求項９】
天然のＣｈｌ又はＢｃｈｌをクロロフィラーゼの存在下で適当なＲ－ＯＨ化合物とエステル交換することを含む、ＹがＯであり、Ａが共有結合である請求項１記載の化合物の製造方法。
【請求項１０】
Ｃｈｌｉｄｅ誘導体又はＢｃｈｌｉｄｅ誘導体をジシクロヘキシル－カルボジイミド（Ｄ

ＣＣ）と４－ジメチルアミノピリジンとの存在下又はＮ－ヒドロキシスクシンイミドとＤＣＣとの存在下で、適当なＲ－ＯＨ化合物、Ｒ－ＳＨ化合物又はＲ－NH_2化合物と触媒縮合させることを含む、Ａが共有結合である請求項１記載の化合物の製造方法。

【請求項１１】

有効成分として請求項１記載の化合物を含む、腫瘍の光力学療法のための製剤組成物。

【請求項１２】

有効成分として請求項１記載の化合物を含む、腫瘍の診断のための製剤組成物。

【請求項１３】

有効成分として請求項１記載の化合物を含む、正常又は悪性の細胞及び培養中の微生物の光破壊のための製剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

【０００１】

本発明はクロロフィル（Ｃｈｌ）とバクテリオクロロフィル（Ｂｃｈｌ）の新規な誘導体、それらの製造法、並びに光力学療法及び蛍光検出、監視技術におけるそれら誘導体の応用に関する。

【０００２】

【従来の技術】

過去２０年間に癌の治療に対する光増感剤の利用に関心が高まって来た。光力学療法（ＰＤＴ）として知られるこの技術において、前以て適用された発色団の現場光増感で１重項状態酸素（ｓｉｎｇｌｅｔ　ｏｘｙｇｅｎ）、酸素ラジカル及び超酸化物即ち過酸化物が生成され、それらが悪性細胞を中毒する［ドーハーティー（Ｄｏｕｇｈｅｒｔｙ）、１９８７年］。この技術は非毒性薬剤と危険のない光増感化照射とを併用するもので、一般的に用いられる化学療法又は放射線療法に比較して選択性が高く、しかも破壊性は同程度である可能性があり、従って治療を受けている患者の生活の質を高めることが期待される。

【０００３】

ＰＤＴに用いられる光増感剤は１重項状態酸素の生成に対しては高い量子収率を、また悪性の組織に対しては高い親和性と選択性を有していることが必要である。ポルフィリン類は励起３重項状態の生成に対して比較的高い量子収率を有し、この状態とポルフィリン類の１重項基底状態とのエネルギー差はそれらポルフィリンをしてその基底状態（３重項）酸素をその１重項状態に励起する良好なエネルギー供与体となす。ヘマトポルフィリン（ＨＰ）（図１）及びヘマトポルフィリン誘導体（ＨＰＤ）は腫瘍組織の中に蓄積する傾向があることがある時期に知られることとなった。しかして、ＨＰとＨＰＤ混台物がＰＤＴに対する好ましい化合物となった。

【０００４】

光力学療法剤として商業的に用いられているＨＰＤ混合物のフォトフリン（Ｐｈｏｔｏｆｒｉｎ）ＩＩ［カナダ国、ＢＣ、バンクーバー（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ）のクォード　ロジック　テクノロジーズ社（Ｑｕａｒｄａ　Ｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）］は４００ｎｍ［所謂ソレットバンド（Ｓｏｒｅｔ　ｂａｎｄ）］あたりに高い吸光係数値を有するが、可視域（５００～６３０ｎｍ；所謂Ｑバンド）の吸光係数値がそれよりはるかに小さいエーテル結合ＨＰオリゴマーを高い割合で含有するものである。残念ながら、ＵＶ－可視光の動物組織による著しい減衰のために、ＨＰＤによる現場光増感量子収率は非常に低い。従って、腫瘍の効率的治療には強い照射と大量のＨＰＤが必要とされる。適用されるＨＰＤの量が増加すると、それにつれてＨＰＤが正常な組織に蓄積する機会とその蓄積に伴って生ずる非悪性部位を損傷する危険が著しく増大する。ＨＰＤ関連同族体の更に他の不利点は人体からの除去が遅いことである。ＨＰＤ治療を受けている患者は何週間も皮膚の光毒性を受けるのである。

【０００５】

動物組織によるＵＶ－ＶＩＳ光の強い減衰とＨＰＤの悪性部位に対する限られた特異性は６５０ｎｍを越える光を吸収し、悪性部位における保持率が高い新しい光療法剤を研究し

、合成する動機となった［マックロバート（ＭｃＲｏｂｅｒｔ）等、１９８９年］。
【０００６】
悪性組織における保持率と同組織に対する特異性を高めるために、特定の化学的基がポルフィリン構造のピロール残基に結合された種々のポルフィリン誘導体について試験が行われた。これら化合物のＨＰＤに対する吸収の赤色シフトはポルフィリンのπ－電子系における変化によって達成される。
【０００７】
このアプローチに続いて、ＰＤＴ剤としてＣｈｌとＢｃｈｌの誘導体を使用することに関心が高まった［クレーマー（Ｋｒｅｉｍｅｒ）－バーンバウム（Ｂｉｒｎｂａｕｍ）、１９８９年；スパイク（Ｓｐｉｋｅ）及びボーマー（Ｂｏｍｍｅｒ）１９９１年］。Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類はそれぞれジ－及びテトラーヒドロポルフィリン誘導体であって、それら誘導体はクロロフィルａ（Ｃｈｌａ）については図２に、またバクテリオクロロフィルａ（Ｂｃｈｌａ）については図３に示されるように、４ピロール及び互いにかつＭｇ原子に結合した１個のイソ環式環より成る。ただし、ＭはＭｇを表し、基ＲはＢｃｈｌａにおいてはフィチル又はゲラニルゲラニルであり、Ｃｈｌａにおいてはフィチルである。Ｂｃｈｌａ分子は２個以上のβ－炭素（ピロール環の外周炭素）が還元されている点でＣｈｌａ分子と異なる。Ｃｈｌ類とＢｃｈｌ類の多様性はその大環状化合物における置換基が色々であること、又は１７－プロピオン酸残基をエステル化しているアルコール残基が色々であることの結果である。天然産のＢｃｈｌａにおいては、アルコール残基はフィチル又はゲラニルゲラニルであり、一方例えばＢｃｈｌｂにおいては、それはゲラニルゲラニルである。クロロフィル及びバクテリオクロロフィルに由来する酸はそれぞれクロロフィリド（Ｃｈｌｉｄｅ）及びバクテリオクロロフィリド（Ｂｃｈｌｉｄｅ）と称される。Ｃｈｌａ及びＢｃｈｌａに由来する遊離酸はそれぞれＣｈｌｉｄｅａ及びＢｃｈｌｉｄｅａと表示される。中心の金属原子を欠くＣｈｌ及びＢｃｈｌ由来化合物はそれぞれフェオフィチン（Ｐｈｅｏ）及びバクテリオフェオフィチン（Ｂｐｈｅｏ）と称される。Ｃｈｌａ及びＢｃｈｌａに由来するフェオフィチンはそれぞれＰｈｅｏａ及びＢｐｈｅｏａと表示される。フェオフィチン及びバクテリオフェオフィチンに由来する遊離酸はそれぞれフェオフォルビド及びバクテリオフェオフォルビドと称される。
【０００８】
Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類は太陽エネルギーを吸収し、生物学的光合成において電子の移動を開始させる。モノマー形態におけるそれらの最低エネルギー転移（所謂、Q_y転移）は６７０～８００ｎｍに見いだされるが、それら転移は集合形態では１０００ｎｍまでシフトされ得る。これらの転移状態は極めて高い吸光係数を有する。Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類の励起１重項状態からそれらの最低３重項状態までのシステム間クロッシング（ｉｎｔｅｒ－ｓｙｓｔｅｍ　ｃｒｏｓｓｉｎｇ）の可能性はかなり高く（３０～５０％）、このことが高収率の励起酸素分子を保証している。事実、Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類による酸素の光増感化の重要性はそれらＣｈｌ類及びＢｃｈｌ類が光合成バクテリア及び同植物における重要な分解過程に係わり、従って光合成有機体が全て１重項状態酸素又は酸素ラジカルに対して種々の保護機構を有すると言う事実によって強調される。Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類は本来動物によって消費される天然の化合物であるから、それらの生体内分解はＨＰ又はＨＰＤに比較して非常に速い［レウェリン（Ｌｌｅｗｅｌｌｙｎ）等、１９９０年］。このことは患者が長期の照射に付されることを少なくすると言う重要な利点となる。
【０００９】
【発明が解決しようとする課題】
しかし、ＰＤＴに天然のＣｈｌ又はＢｃｈｌ抽出物を使用する場合には幾つかの問題がある。即ち、第一に、それら抽出物は強度に疎水性であるのでそれらの悪性部位への送出がむずかしい。第二に、それらは普通の送出条件下、即ち酸素の存在下、室温及び普通の光条件下で非常に不安定である。第三に、それらはそれらを特定的に悪性組織の標的とする部分を持たない。これらの制限のために、これら光合成顔料のＰＤＴにおける増感剤としての可能性は現在のところは実現困難である。従って、これらの困難を克服し、かつＰＤ

Ｔにおいて成功裏に使用することができるＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体を合成することが極めて望ましいことである。本発明の目的はそのような誘導体を提供することである。

【００１０】

【課題を解決するための手段】

Ｃｈｌ及びＢｃｈｌの側鎖基は色々な環境に対するそれら分子の総体的親和性を決定する。

【００１１】

Ｃｈｌ構造又はＢｃｈｌ構造のＣ１７－プロピオン酸側鎖基におけるエステル基を変成することによって治療及び診断において光増感剤として使用するための新規なＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体を製造することが可能であることが本発明によりここに見いだされた。

【００１２】

本発明は従って一般式（Ｉ）

【化２】

Ｘ－ＣＯ－Ｙ－Ａ－Ｒ　　（Ｉ）

【００１３】

で表される新規なＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体に関する。ただし、上記式（Ｉ）において、Ｘ－ＣＯ－はＣ１７－プロピオニルＣｈｌ又は同Ｂｃｈｌを表し；ＹはＯ、Ｓ又はＮＨであり；Ａは共有結合であるか、又は２～２０個の炭素原子を有する、置換され及び／又は官能基、ヘテロ原子及び／又は炭素環式－若しくは複素環式－部分で遮断されていてもよい、直鎖又は分枝鎖の、飽和又は不飽和の炭化水素鎖であり；そしてＲはアミノ酸、ペプチド若しくは蛋白質の残基又はそれらの誘導体である。

【００１４】

ここで、“Ｃｈｌ残基又はＢｃｈｌ残基”なる用語は共に天然又は合成の誘導体であるＣｈｌ又はＢｃｈｌの任意の誘導体を意味し、これには中心のＭｇ原子が除かれ又は他の二価の金属、例えばＺｎ、Ｖ、Ｃｕ、Ｃｏ、Ｎｉ又はＳｎで置換された化合物が包含される。本発明によれば、Ｂｃｈｌ誘導体が好ましい。

【００１５】

１つの好ましい態様において、ＹはＯであり、Ｘ－ＣＯ－はＣｈｌ又はＢｃｈｌの残基であって、それぞれ図２及び３に示される。

【００１６】

炭化水素鎖Ａは５～２０個の炭素原子を有するのが好ましい。それは飽和又は不飽和であってもよいし、ヘテロ原子、例えばＯ、Ｎ及び／又はＳで遮断されていてもよいし、及び／又はモノ－又はポリ－炭素環式又は複素環式部分、及び／又は官能基、例えばＯＨ、NH_2、$CONH_2$、ＣＯＯＨ等で置換又は遮断されていてもよい。例えば、Ａは、例えばモノサッカリド若しくはオリゴサッカリドの、トリグリセリド若しくは他の脂質部分の、ポリ炭素環式環、例えばコレステロールのようなステロイドの、又は複素環式化合物、例えばウラシル及び２，５－ジオキソ－３、６－ジヒドロキシメチルピペラジンの残基であるか又はそのような残基を含んでいることができ、そしてウラシルＡは官能基、例えばエステル、アミド、エーテル等を介してＲに結合されている。

【００１７】

基Ｒはアミノ酸又はその誘導体、例えばセリン、チロシン及びリシン並びにそれらの誘導体、例えばＬ－セリン又はチロシンのメチルエステルから、又はペプチド、例えばセリルセリンメチルエステル、メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）から、或いは蛋白質から誘導されたものであることができる。

【００１８】

特に、本発明により予定されているものはＣｈｌ及びＢｃｈｌと色々なアミノ酸との結合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、これらＣｈｌ／Ｂｃｈｌアミノ酸結合体（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）とホルモン、成長因子若しくはそれらの誘導体又は腫瘍特異性抗体或いは他の細胞

特異性配位子との更なる結合であり、かくして適当な部位指向（ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ）光増感剤（ＳＰＤ）が得られる。本発明で用いられるペプチドホルモンの１例はメラノサイト中の受容体に特定的に結合し、従って光増感性部分を黒色腫の腫瘍の標的となし得るメラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）（メラノトロピン類）、例えばα－，β－又はγ－ＭＳＨの１つである。

【００１９】

本発明は更に式（Ｉ）で表される化合物の製造法を含む。

【００２０】

本発明はまた式（Ｉ）の化合物を含んで成る診断及び光力学療法のための組成物、並びに癌患者を式（Ｉ）の化合物で治療し、続いて局所照射することから成る癌患者の光力学的治療法も包含する。

【００２１】

発明の詳細な説明

本発明はＣｈｌ及びＢｃｈｌとアミノ酸、ペプチド及びポリペプチドとの結合体を提供するものである。特に重要なものは、（ａ）Ｃｈｌ及びＢｃｈｌと色々なアミノ酸及びそれらの誘導体との結合、（ｂ）Ｃｈｌ－及びＢｃｈｌ－アミノ酸結合体とホルモン、例えばα－メラノトロピン、又は（ｃ）腫瘍特異性抗体との更なる結合及び（ｄ）３重項状態の収率を改善する金属によるＣｈｌ結合体中及びＢｃｈｌ結合体中の中心Ｍｇの置換によって得られる結合体である。

【００２２】

１つの好ましい態様において、Ａは共有結合であり、ＹはＯであり、残基ＲはＣｈｌ又はＢｃｈｌのＣ１７－プロピオン酸基にエステル結合を介して直接結合している。。これらの化合物は次の２つの方法の内の１つで製造することができる。

【００２３】

（１）植物の葉緑体からアセトンで抽出され、アセトン粉末として貯蔵された酵素であるクロロフィラーゼ（Ｃｈｌａｓｅ）による図４に示される新規な酵素エステル交換法。このエステル化反応はクロロフィラーゼアセトン粉末を洗浄剤を含有する緩衝溶液中で第一アルコールＲ－ＯＨ、例えばＬ－セリンメチルエステルと共に３７℃において１時間インキュベートし、得られた懸濁液にＢｃｈｌ誘導体又はＣｈｌ誘導体、例えばＢｃｈｌａ又はＣｈｌａを加え、３７℃において更にインキュベートすることによって行われる。固体のアセトン粉末の除去後、目的のエステルを反応混合物から抽出し、精製する。

【００２４】

（２）Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）とジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）又はジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）とＤＣＣを用いてＣｈｌｉｄｅ又はＢｃｈｌｉｄｅのカルボキシル基を活性化する、Ｃｈｌｉｄｅ誘導体又はＢｃｈｌｉｄｅ誘導体、例えばＣｈｌｉｄｅａ又はＢｃｈｌｉｄｅａと化合物Ｒ－ＯＨ、例えばＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅとの新規な触媒縮合法（図５）。それぞれＭｇを含まないＣｈｌｉｄｅａ及びＢｃｈｌｉｄｅａの同族体であるフェオフォルビド及びバクテリオフェオフォルビドをエチレングリコールとの縮合に先立って活性化する後者の方法を用いることができる［ワシーレフスキー（Ｗａｓｉｅｌｅｓｋｉ）、１９８０年］。

【００２５】

セリン又はその誘導体、例えばＬ－セリンメチルエステル塩酸塩、Ｎ－トリチル－Ｌ－セリンメチルエステル、カルボベンゾキシ－セリル－Ｌ－セリンメチルエステルを用いて上記の方法により数種のエステルを製造した。これらの誘導体はそれら自体本発明の応用において使用することができるか、又は他の適当な分子をＣｈｌ又はＢｃｈｌなる大環状化合物に結合する橋として役立てることができる。

【００２６】

エステルが所望とされ、かつ目的のペプチド又は蛋白質がヒドロキシル含有アミノ酸残基を含んでいない場合、Ｃｈｌ又はＢｃｈｌのエステル交換反応で、又は対応する遊離酸（Ｃｈｌｉｄｅ又はＢｃｈｌｉｄｅ）のエステル化反応でまずそのＣｈｌ又はＢｃｈｌなる

大環状化合物をセリン若しくは他の任意のヒドロキシル含有アミノ酸に、又はその誘導体と結合させることができ、次いでこのアミノ酸残基を介してその大環状化合物にペプチド又は蛋白質を結合させる。

【００２７】

ＹがＳであり、Ａが共有結合である式（Ｉ）の結合体はＣｈｌ誘導体又はＢｃｈｌ誘導体とクロロフィラーゼ及び化合物Ｒ－ＳＨ、例えばシスティン又はその誘導体或いはシスティン含有ペプチド若しくは同蛋白質との酵素エステル交換反応か、又はＤＣＣ及びＤＭＡＰの存在下におけるＣｈｌｉｄｅ誘導体又はＢｃｈｌｉｄｅ誘導体と化合物Ｒ－ＳＨとの触媒縮合反応で得ることができる。

【００２８】

ＹがＮＨであり、Ａが共有結合である式（Ｉ）の結合体はＤＣＣ及びＤＭＡＰの存在下における、又はＮＨＳ及びＤＣＣによるＣｈｌｉｄｅ誘導体又はＢｃｈｌｉｄｅ誘導体と化合物$Ｒ－ＮＨ_2$、例えばアミン、又はペプチド若しくは蛋白質のアミノ末端基との触媒縮合反応で得ることができる。

【００２９】

Ｃｈｌｉｄｅ誘導体又はＢｃｈｌｉｄｅ誘導体をヒドロキシル基、メルカプト基及び／又はアミノ基を含有するアミノ酸部分を含むペプチド又は蛋白質と反応させる場合、結合がＯ原子若しくはＳ原子又はＮＨ基を介しているかどうかは必ずしも明確ではないが、そのような結合体は全てそれらの構造の同定には無関係に本発明に包含される。

【００３０】

金属置換Ｃｈｌ誘導体及び同Ｂｃｈｌ誘導体の製造のために、Ｍｇはこの顔料のアミノ酸又は細胞特異性配位子に対する結合に先立って置換される。Ｃｈｌ及びその誘導体の中心ＭｇのＣｕ、Ｎｉ、Ｚｎ、Ｖ、Ｃｏ、その他の二価金属による置換は標準的な方法で、例えば対応するフェオフィチンを無水エタノール中、外囲温度において目的金属の塩、例えば酢酸Ｚｎ又は酢酸Ｃｕにより処理することによって行われる［ハンブライト（Ｈａｍｂｒｉｇｈｔ）、１９７５年；ヒンニネン（Ｈｙｎｎｉｎｅｎ、１９９１年）］。Ｂｃｈｌ及びその誘導体の場合は、中心Ｍｇは氷酢酸中、アルゴン下、昇温の下での酢酸Ｚｎ又は同Ｃｕによる処理を含む同様の方法でＺｎ又はＣｕにより置換することができる［フィーダー（Ｆｉｅｄｏｒ）等、１９９３年）］。

【００３１】

Ａが定義された通りの炭化水素鎖である場合、その炭化水素鎖は末端官能基を含有し、その末端官能基を介してＲ残基に結合されている。例えば、Ａのカルボキシル末端基とアミノ酸のヒドロキシル基との反応か、又はＡのヒドロキシル末端基とアミノ酸のカルボキシル基との反応によりエステル基が形成され；Ａのカルボキシル末端基とアミノ酸のアミノ基との反応か、又はＡのアミノ末端基とアミノ酸のカルボキシル基との反応によりアミド基が形成される、等々。

【００３２】

これらの新規なエステルはそれぞれのＣｈｌ類及びＢｃｈｌ類と同じ光学的吸収特性と光物理的特性を有する。従って、これら新規なＣｈｌエステル及びＢｃｈｌエステルは、それが処理済み組織内に存在するに至ると、効率的な光力学療法剤となると期待される。

【００３３】

蛋白質、例えばホルモン、成長因子又はそれらの誘導体、及び抗体の、並びに細胞の栄養分、例えばチロシンのＣｈｌ部分又はＢｃｈｌ部分に対する結合は腫瘍及び処理された部位におけるそれらの保持率を高めることを意味する。赤色シフトが増加すると、自然の系の遍在を保ちつつより大きな侵入深さが可能となる。他の金属によるＭｇの置換はＣｈｌ部分又はＢｃｈｌ部分及び励起３重項状態に対する当該部分のシステム間クロッシングの本来の代謝安定性を最適化することを意味し、これはまた新しい診断法の可能性を開く。

【００３４】

腫瘍特異性抗体は腫瘍即ち処理された部位に対してＣｈｌ部分及びＢｃｈｌ部分を専ら攻撃目標とし、一方またホルモン及び細胞の栄養分はトランスフォーメーションを起こさな

なかった正常な片方によって吸収されるだろう。しかし、ホルモン又は細胞栄養分に対する標的として選択された細胞、例えばメラノサイトは正常条件下では他の細胞内に分散され、また悪性細胞へのトランスフォーメーションを起こした場合はそれらが集まって固体の腫瘍となる。その結果、細胞がより高度に分散され、腫瘍部位におけるＰＤＴ効果の増幅を保証するようになっている場合に、悪性組織中の光増感剤の濃度は正常組織中のその濃度に比較して劇的に高まると期待される。これは正常組織の損傷閾値より低い光量の有効使用を可能ならしめ、かくして空間的に十分に画成された照射の必要が少なくなる。加えて、非常に強い蛍光を有すると、その部位指向Ｃｈｌ又は同Ｂｃｈｌは腫瘍部位、その他の標的に蛍光ラベルを付けるのに使用することができる。

【００３５】

黒色腫の腫瘍は幾つかの理由、即ち（ａ）初期段階（非転移性）では、悪性黒色腫、その他の皮膚腫瘍はＰＤＴに非常に受け入れられ易いこと；（ｂ）これまで、緑色光を使用する光力学療法のみならず、通常の化学療法及び放射線療法も黒色腫の治療に失敗して来たこと；（ｃ）しかし、光増感化部分を標的として腫瘍部位に送り得る幾つかの黒色腫特異性配位子が存在すること；及び（ｄ）長い波長の励起可能なＣｈｌ部分及びＢｃｈｌ部分の使用は、メラニンの吸収に起因してスクリーンされる従来の光増感剤の欠点を克服すると期待されることから本発明の新規なＣｈｌ及びＢｃｈｌ光増感剤による治療に適している。

【００３６】

黒色腫の腫瘍はメラノサイトの発癌トランスフォーメーション（ＵＶ－誘発の変異誘発を含む）から発達する。正常なメラノサイトはヒトの正常皮膚細胞の母集団の数パーセントを占め、通常は各々が３０～４０個のケラチノサイトと１個のランゲルハンス細胞とで包囲されている表皮と真皮との間の底部細胞層に見いだされる。黒色腫の腫瘍細胞は黒色の不溶性ユーメラニン類（ポリ－５，６－インドールキノン類）を含有している可能性があるので、ＰＤＴは黒色腫の腫瘍による特に困難な挑戦に直面する。ここで、不溶性ユーメラニン類は５４０ｎｍ付近に広い吸収バンドを有し、従って、６５０ｎｍより短い波長の放射線に対してはいかなる光増感剤とも競合する。加えて、メラニン分子は形成されている酸素ラジカルを消滅させる可能性があり、それによって生体細胞の小器官の中毒が防がれる。従って、一般に使用されるＨＰＤによるメラニン性黒色腫のＰＤＴは余り有望ではない。しかし、励起されたＣｈｌ類とＢｃｈｌ類及びそれらの合成誘導体が６５０ｎｍより長い波長に最大の光学的吸収を有すると、それら化合物はメラニンによって遮られることはないだろう。更に、黒色腫の腫瘍細胞（即ち、トランスフォーメーションを起こしたメラノサイト）はメラニンの合成に際して相当量のチロシンを消費し、メラノトロピン類［下垂体のα－，β－及びγ－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）］及び数種の公知の抗体に対して高い親和性を有する。従って、それら腫瘍細胞は、その結合が細胞受容体による配位子の認識に強い影響を及ぼさない限り、Ｃｈｌ及びＢｃｈｌのチロシン－、メラノコルチン－又は抗体－結合体に対する良好な標的とることができる。メラノサイトの濃度は黒色腫の部位において（正常な皮膚組織に比較して）ほとんど４０倍も増加するから、光力学的効果は劇的に高まると期待される。

【００３７】

本発明はかくして本発明のＣｈｌ誘導体又はＢｃｈｌ誘導体を含んで成る、脳、卵巣及び胸の腫瘍、皮膚、肺、食道及び膀胱の癌、その他のホルモン感受性腫瘍を含めて数タイプの癌の光力学的治療のための製剤組成物を提供する。

【００３８】

１つの態様において、本発明は悪性黒色腫の光力学的治療に関する。本発明化合物の光力学的効果は腫瘍及び細胞培養物の中の黒色腫細胞に対してモニターされる。この目的に使用することができる誘導体の例はＣｈｌ又はＢｃｈｌとα－メラノトロピンとの結合体であって、そのα－メラノトロピンはセリン、チロシン又はリジンの残基を介するか、又はアミノ末端基を介してＣｈｌ顔料部分又はＢｃｈｌ顔料部分に結合されている。

【００３９】

本発明の製剤組成物はＰＤＴにおいて用いられる標準的な方法で患者に投与される。投与されるべき化合物の量及び投与ルートは患者の腫瘍、疾患の段階、年令及び健康状態に従って決められるが、ＨＰＤ約２０～４０ｍｇ／ｋｇ体重と言うフォトフィリンＩＩの現在使用されている用量よりははるかに少ない。好ましい投与ルートは、常用の製剤上許容できるキャリアー及び添加剤を含む本発明の活性化合物の水溶液の静脈注射か、又はその水溶液の固体腫瘍への直接注射と、適当な局所用組成物による皮膚腫瘍の局所的治療である。

【００４０】

本発明は更に固体の腫瘍癌に苦しんでいる患者に本発明によるＣｈｌ誘導体又はＢｃｈｌ誘導体を含んで成る製剤組成物を投与し、次いで腫瘍部位に６７０～７８０ｎｍの強い光源を照射することから成る癌の光力学的治療法に関する。

【００４１】

かくして、本発明のＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体について、部位指向光力学療法（ＳＤＰ）による良性又は悪性の細胞又は組織の光破壊に対するもののような幾つかの適用例が予想される。本発明による結合体は腫瘍組織に集まる細胞にトランスフォーメーション時に結合体のＣｈｌ分子又はＢｃｈｌ分子を運ぶが、正常組織（例えば、黒色腫中のメラノサイト）の中では互いによく分離されている。その結果、腫瘍中の光増感剤の光力学的効果は正常組織におけるその効果よりも数桁大きい。従って、腫瘍を破壊し得る照明閾値は正常組織を破壊し得ないレベルまで低下されると期待される。このような状況下で、その光毒効果は非特異性の照射下でも腫瘍部位に制限される。この適用は通常の外科には受け入れられ難い腫瘍にとって特に重要なものである。

【００４２】

バイフォトン法（ｂｉｐｈｏｔｏｎｉｃ　ｐｒｏｃｅｓｓ）を用いる光力学療法［ロイポルド（Ｌｅｕｐｏｌｄ）及びフレヤー（Ｆｒｅｙｅｒ）、１９９２年］が近ＩＲに対する増感化範囲を広げるもう１つの方法である。Ｃｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体の高いシステム間クロッシング率及びそれらの長い最大吸収波長はそれら誘導体をしてこのＰＤＴモードの非常に良好な候補にする。

【００４３】

本発明の結合体はまた正常な又は悪性の動物細胞のみならず、培養中のある種の細胞又は感染性剤の選択的な光破壊を可能にするＳＤＰにより又はＳＤＰによらずに、培養中の微生物の光破壊；特定のポリペプチド、例えばホルモン又は他の受容体配位子に対する、細胞－又は組織－特異性抗体に対する、又は他の配位子、例えばレクチンに対するＣｈｌ－及びＢｃｈ１－セリン結合体の結合によって、選択された細胞に対してポルフィリン部分を標的とすること；実験室用途、診断用途又は工業用途における分析の目的のための蛍光ラベリング／標識付け；及び実験室用途、診断用途又は工業用途に対する動物細胞若しくは微生物又は粒子の蛍光ラベリングに対しても有用である。それらはそれらの優れた吸光係数とより高い蛍光収率に起因して、現在用いられている蛍光標識、例えばフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）又はフィコエリスリンの内の幾つかを置き換え得る。

【００４４】

診断の目的には、本発明のＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体は標準的な方法で、例えば^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎ、^{201}Ｔｌ、^{99}ｍＴｃにより放射性ラベリングすることができ、この放射性診断剤は患者に、好ましくはｉ．ｖ．注射で投与される。若干の期間の経過後、癌の位置は標準的な方法で画像にして示すことができる。

【００４５】

部位指向増感剤を使用するＰＤＴの期待される利点は副作用と増感剤の適用用量の劇的な減少である。ＰＤＴに対してこれら提案されたＣｈｌ結合体及びＢｃｈｌ結合体を使用する幾つかの特定の利点は次の通りである：

【００４６】

（１）これらの化合物はヒト／動物組織による光学的吸収／減衰が著しく減少する（モノマー形では６６０～８３０ｎｍ、２量体以上のアグレゲート（ａｇｇｒｅｇａｔｅ）では

１０００ｎｍまで）波長で最大の光学的吸収を有する。光散乱の減少と共に、これはより大きな侵入深さ又は強度がより弱く、値段がより安い光源の使用を可能にするだろう。

【００４７】

（２）可視光及び近－１Ｒにおけるそれらの吸光係数がＰＤＴに現在使用されているポルフィリンの吸光係数より約１０倍大きい。

【００４８】

（３）中心Ｍｇ原子の他の金属による置換は、光増感剤の３重項状態の収率がより高いことに起因して、１重項状態酸素の生成収率を向上させることができ、かつそれら化合物を著しく安定化する。

【００４９】

（４）それらは標的細胞の認識について高い特異性を示す。従って、増感剤は細胞の壊死に対してより低い用量で十分である。加えて、Ｃｈｌ結合体及びＢｃｈｌ結合体は現在使用されている多くの発蛍光団より優れた光化学的性質を示し、従って他の用途においても実用可能であろう。

【００５０】

（５）ある種特定のＣｈｌ誘導体は体からの清掃率が高いことを示す幾つかの報文がある［スパイクス（Ｓｐｉｋｅｓ）及びボーマー（Ｂｏｍｍｅｒ）、１９９１年］。

【００５１】

（６）通常、照射はレーザー源、例えば６３０ｎｍで放射するように調整されたＡｒ－排気式（Ａｒ－ｐｕｍｐｅｄ）染料レーザー又は６２８ｎｍで放射する金－蒸気レーザー（パルス式レーザー）を用いて行われる。この装置は高価であるので、ＰＤＴの適用はより大きな医療センターに限られる。本発明による赤吸収性又は近－ＩＲ吸収性の光増感剤の使用はキセノンフラッシュランプ、ハロゲンランプ、ダイオードレーザー又は太陽直射線等のより一般的かつ低コストの手段に道を開く。

【００５２】

（７）放射線ラベル付き又は活性ラベル付きＣｈｌ誘導体及び同Ｂｃｈｌ誘導体は診断及び治療の両目的に同時に使用することができる。

【００５３】

【実施例】

ここで、本発明を次の非限定実施例によって説明する。

【００５４】

実施例１：クロロフィルａの製造

クロロフィルａをスピルリナ　ガルティーリ（Ｓｐｉｒｕｌｌｉｎａ　Ｇａｌｔｉｅｒｉ）から次の通り精製した。即ち、凍結乾燥細胞（２～３ｇ）を粉砕して粉末となし、アセトン（１０ｍｌ）で3回抽出し、その抽出物を濾過し、捨てた。褐－緑色の残分をメタノールと共に粉砕することによって再抽出した。濾過後、淡灰色の固体を捨て、その抽出物から溶媒を真空下で蒸発させた。緑色の残分をアセトンに再溶解し、５℃においてジエチルアミノエチルセファローズ［ファーマシア　ファイン　ケミカルス社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｆｉｎｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、ＤＥＡＥ－セファローズＣＬ－６Ｂ］のカラム（直径１．５ｃｍ、長さ６ｃｍ）でクロマトグラフにかけて精製した。そのカラムをアセトンで洗浄して黄色物質（カロテノイド類）ををを除去し、次いでメタノール／アセトン（１：３ｖ／ｖ）で洗浄してＣｈｌａの暗青色溶液を溶離した。クロマトグラフィーによる分離に要した総時間は１０～１２分であった。得られたＣｈｌａを残留カロテノイド類、その他の不純物、例えばフェオフィチン又は塩素についてＴＬＣと分光測光法でチェックし、そして必要によって再度クロマトグラフにかけた。次に、メタノール／アセトンを蒸発させ、そして固体のＣｈｌａを真空下で完全に乾燥させた。全ての操作はうす暗い明かりの中又は暗所で行い、そして分解を最少限に抑えるために可能な限り速やかに終わらせた。分析等級の溶媒をそれ以上精製することなく使用した。

【００５５】

実施例２：クロロフィラーゼの製造

メリア アゼダラフ Ｌ．チャイナ ツリー（Ｍｅｌｉａ ａｚｅｄａｒａｃｈ Ｌ・Ｃｈｉｎａ ｔｒｅｅ）の葉の葉緑体からクロロフィラーゼ（Ｃｈｌａｓｅ）アセトン粉末を調製した。即ち、新鮮な葉（５０ｇ）をブレンダー中で冷アセトン（－２０℃）３５０ｍＬと共に粉砕した。その均質化物をゲージを通して濾過し、その濾液を５℃において１晩放置して葉緑体を沈降させた。アセトンを濾過により除去し、残った粉末を９５％アセトンで数回、そして最後に１００％アセトンで洗浄すると、クロロフィラーゼアセトン粉末が得られ、これを真空下で乾燥した。この粉末は－２０℃で少なくとも数カ月間は貯蔵して置くことができる。

【００５６】

実施例３：セリン誘導体の製造

次のセリン誘導体をＣｈｌａ／Ｂｃｈｌａのエステル交換反応に使用した：

【００５７】

（ａ）Ｌ－セリンメチルエステル塩酸塩（Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ・ＨＣｌ）はシグマ ケミカル社（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）から購入した。

【００５８】

（ｂ）カルボベンゾキシセリルセリンメチルエステル（Ｚ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ）：この新規な誘導体の合成はニコレーデス（ＮｉＣｏｌａｉｄｅｓ）等がＪ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１１、７４－７９、１９６８に記載する方法を用いて行った。即ち、カルボベンゾキシセリン（Ｚ－Ｓｅｒ）６．４５ｇ（０．０２７モル）のＤＭＦ５０ｍＬ中冷（５℃）溶液にｐ－ニトロフェノール３．９ｇ（０．０２８モル）とＤＣＣ５．８ｇ（０．０２８モル）を加えた。その混合物を５℃に５時間保ち、そして濾過した。その濾液にセリンメチルエステル塩酸塩４．２ｇとＥｔ$_3$Ｎ２．７ｇ（０．０２７モル）とから調製したＤＭＦ５０ｍＬ中の濾過済み溶液を加えた。この反応混合物を２５℃で１８時間放置し、次いで蒸発させて少容量となした。その残分をＥｔＯＡｃ１００ｍＬに吸収させ、得られた溶液をＨ$_2$Ｏ、５％Ｎａ$_2$ＣＯ$_3$溶液及び希ＨＣｌで洗浄し、これを乾燥し、そして約３０ｍＬになるまで蒸発させた。石油エーテルを加え、得られた固体を取り出し、ＥｔＯＡｃ－ＭｅＯＨ－Ｅｔ$_2$Ｏから再結晶化してＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅを得た。ｍｐ１９０～１９２℃。

【００５９】

（ｃ）カルボベンゾキシセリン（Ｚ－Ｓｅｒ）：上記（ｂ）の合成で使用したこの誘導体の合成はムーア（Ｍｏｏｒｅ）等がＪＡＣＳ、７６、２８８４－２８８７、１９５４に記載した方法を用いて行った。即ち、ＮａＯＨの冷（５℃）溶液（２１２ｍＬ、２Ｎ）にＬ－セリン４４．３ｇ（０．４２モル）を加えてｐＨ９．８を得た。１０～１５分間隔でベンジルクロロホルメートを一部ずつ（４～５ｇ）を加え、そしてＮａＯＨの１Ｎ溶液を用いてｐＨ９．８に調整した。この添加はベンジルクロロホルメート８０ｇ（０．４６モル）を加え終わるまで続けられた。そのｐＨを次に１０℃で０．５時間維持した。その塩基性溶液をジエチルエーテル１５０ｍＬで、次いで１００ｍＬで抽出し、そしてその水溶液にＥｔＯＡｃ１Ｌを加えた。この溶液を濃ＨＣｌ・３０～３５ｍＬを加えることによってｐＨ３まで酸性化し、そしてその水性層をＥｔＯＡｃ２５０ｍＬで、次いでＥｔＯＡｃ１５０ｍＬで抽出した。このＥｔＯＡｃ溶液をＭｇＳＯ$_4$上で乾燥し、そしてＺ－Ｓｅｒが沈殿するまで真空下で濃縮した。ＥｔＯＡｃから再結晶化すると純粋な生成物が得られた。ｍｐ１１７－１１９℃、総収量７９ｇ（７８％）。

【００６０】

（ｄ）Ｎ－トリチル－Ｌ－セリンメチルエステル（Ｔｒｉ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ）：この誘導体の合成はグットマン（Ｇｕｔｔｍａｎｎ）がＨｅｌｖ．Ｃｈｅｍ．、４５、２６２２、１９６２に記載した方法を用いて行った。即ち、Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ１５．５ｇ（０．１モル）のクロロホルム１５０ｍＬ中の冷（０℃）溶液にＥｔ$_3$Ｎ３１ｍＬとトリフェニルメタン２６．７ｇ（０．１１モル）を加えた。この溶液を０℃に３時間保ち、次いで水で洗浄し、そしてＮａ$_2$ＳＯ$_4$上で乾燥した。その溶媒を真空下で蒸発させ、その固体残分をベンゼン－石油エーテル混合物（１：１）中で再結晶化させることによって純粋な生成

物２８ｇ（７７％）を得た。

【００６１】

実施例４：ＣｈｌａとＬ－セリンメチルエステルとの酵素エステル交換反応によるＬ－セリルメチルエステルクロロフィリドａ（Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ）の製造

【００６２】

４．１　Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの製造

実施例２のクロロフィラーゼアセトン粉末２００ｍｇをＴＸ－１００［トリトン（Ｔｒｉｔｏｎ）Ｘ－１００、シグマ　ケミカル社］０．７％、Ｌ－セリンメチルエステル塩酸塩（シグマ社）４００ｍｇ及びアスコルビン酸［メルク社（Ｍｅｒｃｋ）］，７０ｍｇを含有するｐＨ７．６の０．５Ｍ燐酸ナトリウム緩衝液６ｍＬに懸濁させた。この懸濁液を５分間均質化し、そして室温で１時間撹拌した。得られた懸濁液を固体のＣｈｌａ５ｍｇと共に更に均質化し、そしてＡｒで飽和させた。この混合物を密封し、そして撹拌しながら完全な暗所で３６℃において７時間インキュベートした。反応の進行を溶離液としてｎ－ヘキサン：アセトン（６：４）か又は１－ブタノールを用いてシリカゲル（メルク社）によるＴＬＣでモニターした。Ｃｈｌａ、Ｃｈｌｉｄｅａ及び標題化合物Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅに対応する３つのバンドが観察された。

【００６３】

４．２　Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの精製

上記の反応混合物をＮａＣｌ・２ｇ及びアスコルビン酸ナトリウム（シグマ社）１００ｍｇを含有する水２０ｍＬに加え、低真空下で濾過した。青－緑色の残分をアセトンで洗浄し、再び濾過した。それらの濾液を合わせ、ＮａＣｌを飽和させ、そして分液漏斗中でジエチルエーテルと一緒に振盪した。そのエーテル性層を集め、固体ＮａＣｌ上に約１０時間保持し、次いで乾燥窒素流中で蒸発させ、そして得られた顔料の青－緑色残分を真空下で乾燥した。この残分をアセトンに溶解し、そしてアセトンで平衡にせしめられた５℃のＣＭ－セファローズＣＬ－６Ｂカラムに供した。このカラムをフェオフィチン類の褐色バンドが現れ、カラム頂部に青－緑色バンドとして残るＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体のバンドから分離されるまでアセトンで洗浄した。そのフェオフォルビドを溶離するのに５％メタノール／アセトン及び８％メタノール／アセトンをそれぞれ使用した。次に、Ｃｈｌｉｄｅａを溶離し、最後にＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体を２５％メタノール／アセトンで溶離した。この最後の青－緑色画分を集め、分別に１－ブタノールを使用してシリカゲルによるＴＬＣで純度のチェックを行い、乾固するまでN_2をフラッシュし、次いで真空下で乾燥し、そして貯蔵のためにＡｒ下、暗所で－２０℃において密封した。収率７５％。

【００６４】

４．３　Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体の構造

Ｃｈｌａ、Ｃｈｌｉｄｅａ及びＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体の光学的吸収スペクトルとＦＴＩＲスペクトルをそれぞれ図６及び８に示す。各化合物（反応混合物内）はシリカゲルＴＬＣ上に個別スポットとして分離した。出発Ｃｈｌｉｄｅａに比較してＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体（ＩＶ）のCD_3OD中の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（化学シフトは表１に示す）はセリン部分のメチル基に相当する３．５７ｐｐｍ及びエステル結合の再発現を示している５．３１－５．３７ｐｐｍに新しい信号を有している。化合物は全て完全な大環状化合物のパターンを示しているが、Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体（ＩＶ）及びＣｈｌｉｄｅａにはフィチルのバンドがない。

【００６５】

図８に示される通り、Ｃｈｌａ（ａ）とＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体（ｃ）とのＦＴＩＲスペクトル（１７２８cm^{-1}にエステルバンドを有する）は似ているが、Ｃｈｌｉｄｅａ（ｂ）とは相当に異なる。

【００６６】

実施例５：ＣｈｌａとＺ－Ser_2－ＯＭｅ及びＴｒｉ－Ｓｅｒ－ＯＭｅとの酵素エステル交換反応

Ｃｈｌａとセリン誘導体であるＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ及びＴｒｉ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ［上記実施例３の化合物（ｂ）及び（ｄ）］とのエステル交換反応を上記実施例４におけるようにして行った。ＴＬＣは、Ｃｈｌａ－セリン誘導体の結合体は収率３５％であることを、また加水分解精製物は存在しないことを示す。

【００６７】

実施例６：ＢｃｈｌａとＬ－セリンメチルエステルとの酵素エステル交換反応によるＬ－セリルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ（Ｂｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ）の製造

ＢｃｈｌａとＬ－セリンメチルエステルとのエステル交換反応を実施例４に記載されるようにして行い、Ｂｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅを製造した。収率３５％。この結合体の純度をＴＬＣでチェックした。ＢｃｈｌａとＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体の光学的吸収スペクトルとＦＴＩＲスペクトルをそれぞれ図６及び９に示す。（化学シフトは表１に示す（化合物ＶＩＩ）。）

【００６８】

【表１】

表１

Ｃｈｌｉｄｅａ、Ｂｃｈｌｉｄｅａ及びそれらの誘導体のＣＤ$_3$ＯＤ中^{1}Ｈ化学シフト（高－場信号のみ）、ｐｐｍ

プロトン	Chlidea	Bchlidea	IV	V	VIII	IX	I	II	III
C-10	9.16s	8.60s	9.6s	9.65s	8.80s	8.80s	-	-	-
C-5	9.48s	8.25s	9.5s	9.33s	8.42s	9.45s	-	-	-
C-20	8.34s	8.18s	8.55s	8.45s	8.25s	8.34s	-	-	-
“ｴｽﾃﾙ結合”	-	-	5.33m	5.10m	5.33m	-	-	-	-
“ｱﾐﾉ酸残基”	-	-	-	7.35m	7.35m	6.7-7.0q	7.35m	-	6.7-7.0q
C-13^2	6.46s	6.15s	6.40s	6.70s	6.80s	6.80s	-	-	-

【００６９】

★Ｂｃｈｌｉｄｅａのカルボキシル基とＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅとの間の図５による“エステル結合”

【００７０】

Ｉ　Ｚ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ　－　カルボベゾキシセリル－セリンメチルエステル

ＩＩ　Ｌ－セリン　－　Ｌ－セリンメチルエステル

ＩＩＩ　Ｎ－ｔＢＯＣ－Ｔｙｒ－ＯＭｅ　－　Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシンメチルエステル

ＩＶ　Ｌ－セリルメチルエステルクロロフィリドａ

Ｖ　カルボベゾキシセリル－セリルメチルエステルクロロフィリドａ

ＶＩＩＩ　カルボベゾキシセリル－セリルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ

ＩＸ　Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ

【００７１】

実施例７：ＣｈｌｉｄｅａとＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅとの触媒エステル化反応によるカルボベゾキシセリルセリルメチルエステルクロロフィリドａの製造

乾燥Ｃｈｌｉｄｅａ（３ｍｇ）、ＤＣＣ（５．１ｍｇ）、ＤＭＡＰ（１．２ｍｇ）及びＺ

－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ（５倍過剰）を乾燥ジクロロメタン１ｍＬに溶解し、Ａｒ下で密封し、そして室温、暗所で３６時間撹拌した。標題化合物（Ｖ）を分取シリカゲルＴＬＣプレートで単離し、次いでＤＥＡＥ－セファローズカラムで精製した。最終生成物のＮＭＲスペクトルを表１に示す。収率１８％。

【００７２】

実施例８：ＣｈｌｉｄｅａとＮ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステル（Ｎ－ｔＢＯＣ－Ｔｙｒ－ＯＭｅ）との触媒エステル化反応によるＮ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステルクロロフィリドａの製造乾燥Ｃｈｌｉｄｅａ（３．４ｍｇ）、ＤＣＣ（５８ｍｇ）、ＤＭＡＰ（１．３８ｍｇ）及びＮ－ｔＢＯＣ一Ｔｙｒ－ＯＭｅ（シグマ社）（１５倍過剰）を乾燥ジクロロメタン１ｍＬに溶解し、Ａｒ下で密封し、そして室温、暗所で４０時間撹拌した。生成物を分取シリカゲルＴＬＣプレートで単離し、そしてＤＥＡＥ－セファローズカラムで更に精製した。収率２５％。

【００７３】

実施例９：ＢｃｈｌｉｄｅａとＺ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ及びＮ－ｔＢＯＣ－Ｔｙｒ－ＯＭｅとの触媒エステル化反応によるＢｃｈｌａ－セリン結合体及びＢｃｈｌａ－チロシン結合体の製造

Ｂｃｈｌｉｄｅａと上記化合物の各々とのエステル化反応（縮合）をそれぞれＣｈｌｉｄｅａについて実施例７～８で述べたようにして行った。表１はＮ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルチロシルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ（Ｂｃｈｌａ－Ｎ－ｔＢＯＣ－Ｔｙｒ－ＯＭｅ：化合物ＩＸ）及びカルボベゾキシセリルセリルメチルエステルバクテリオクロロフィリドａ（Ｂｃｈｌａ－Ｚ－Ｓｅｒ$_2$－ＯＭｅ：化合物ＶＩＩＩ）のＮＭＲシフトを示す。

【００７４】

実施例１０：Ｃｈｌ類及びＢｃｈｌ類中の中心ＭｇのＺｎ及びＣｕによる置換

Ｚｎ又はＣｕのＣｈｌｉｄｅａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅへの挿入は室温において非常に緩和な条件下で容易に起こる。

【００７５】

Ｌ－セリルメチルエステルフェオフォルビドａ（Ｐｈｅｏ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ：化合物Ｘ）を氷酢酸との反応におけるＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅのデメタレーションで得た。Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの少部分を数滴の酢酸に溶解し、１０～１５秒後にその酸をN_2下で蒸発させた。Ｐｈｅｏ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの褐色がかった残分を酢酸Ｚｎ（又は酢酸Ｃｕ^{11}）のエタノール中０．１Ｍ溶液２ｍＬに溶解し、それを撹拌しながらＡｒ雰囲気下、室温において暗所に２０分間保持した。この大環状化合物の配位状態における変化には可視範囲における吸収スペクトルの変化が伴われ、その反応の進行は分光分析で追跡することができた。生成物の可視吸収スペクトルを図７に示す。これらの条件下では、メタレーション反応はほとんど定量的で、Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅのＺｎ誘導体及びＣｕ誘導体が得られた。

【００７６】

実施例１１：Ｃｈｌｉｄｅａ、Ｂｃｈｌｉｄｅａ並びにＣｈｌａ－セリン結合体及びＢｃｈｌａ－セリン結合体の培養中の黒色腫細胞に対する吸収

（ａ）試験管内検定

Ｃｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体の黒色腫細胞に対する親和性のモニターは次のようにして行った。マウスのＭ２Ｒ黒色腫細胞［ガースト（Ｇｅｒｓｔ）等、１９８６年］を$CO_2$８％の吸湿された雰囲気中、３７℃においてウマの血清１０％を含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２中で単層として培養した（合流率１００％まで）。４８時間後、細胞を色々な濃度（１～１００μＭ）のＣｈｌｉｄｅａ、Ｂｃｈｌｉｄｅａ、Ｃｈｌａ－セリン結合体、Ｂｃｈｌａ－セリン結合体並びにＨＰＤ（フォトフィリンＩＩ）で3時間処理した。Ｃｈｌ誘導体又はＢｃｈｌ誘導体の細胞に対する吸収の程度を調べるために、培地を吸い出し、その細胞を燐酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）で３回洗浄し、そしてそれら顔料をアセトンで抽出した。その溶液中のＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体の濃度を、それらの光学的吸収と蛍

光をアセトン中の既知顔料濃度のそれらと比較することによって求めた。

【００７７】

ウマの血清の存在下における３時間のインキュベーションに続いてＭ２Ｒ細胞に吸収されたＣｈｌｉｄｅａとＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ及び対応するＢｃｈｌａ誘導体の分子数を図１０及び１１に示す。それらの図から分かるように、Ｃｈｌｉｄｅａ及びＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅはＭ２Ｒ黒色腫細胞にフォトフィリンＩＩ（ＨＰＤ）より良好に吸収される。Ｂｃｈｌｉｄｅａ及びＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅは黒色腫細胞にそれぞれ同程度及びフォトフィリンＩＩより約５倍少なく吸収される。吸収された分子数は培地中のそれらの初期濃度に直線的に依存し、そして顔料吸収はインキュベーションの最初の時間中に平衡に達する（表２）。血清の不存在下では、Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅはＣｈｌａより約１５倍良好に吸収される（データーは示さず）。

【００７８】

【表２】

表２

Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ

（２．７×１０$^{-5}$Ｍ）の細胞吸収時間依存性

時間、ｈ	Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ分子／細胞
１．０	２．７×１０^{7}
１．５	１．３×１０^{8}
２．０	１．３×１０^{8}

【００７９】

（ｂ）生体内検定

１０％エタノール／ＰＢＳに溶解したＣｈｌ又はＢｃｈｌを複数のマウスに腹腔内（ｉ．ｐ．）注射する。対照群として、複数の注射しないマウスと賦形剤を注射したマウスを使用する。動物組織の一部分又は完全な器官（例えば、脾臓、肝臓、脳等）を切り裂き、アセトン中で均質化し、次いで遠心分離する。その上層液が顔料を含有する。上層液中の顔料濃度は蛍光分光分析法で測定する。

【００８０】

実施例１２：培養液中の黒色腫細胞に対するＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体の毒性

Ｃｈｌｉｄｅａ及びＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ結合体の培養中の黒色腫細胞に対する光力学的効果を次のようにして試験した。即ち、単層（合流率１００％まで）としてのＭ２Ｒマウス黒色腫細胞を顔料のＣｈｌａ、Ｃｈｌｉｄｅａ及びＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅで３０分間処理した。続いて、培養物にその上から６７０ｎｍ、５ｍＷのＧａＡｓダイオードレーザー（光源Ａ）、５０００μアインシュタイン／ｃｍ^{2}、１５０Ｗのキセノンランプ（光源Ｂ）又は１５００μアインシュタイン、９０Ｗのハロゲンランプ（光源Ｃ）を１０分間照射した。対照群は未処理細胞、暗所に保たれた顔料処理細胞及び照射未処理細胞を包含していた。照射３時間後に細胞形態の照射による変化を位相差鏡検法で調べた。

【００８１】

完全な／生きている細胞には入れず、損傷を受けた細胞の核に選択的に蓄積するプロピジウムアイオダイド［２，７－ジアミノ－９－フェニル－１０－（ジエチルアミノプロピル）－フェナントリジニウムアイオダイド　ｍｅｔｈ－アイオダイド］（ＰＩＤ）で単層の光力学的に処理された領域中の死んだ細胞を染色し、そのアイオダイドの赤色蛍光をモニ

ターすることによってそれら死んだ細胞を評価することにより種々のＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体の細胞溶解活性の評価を行った。染色された培養物中の蛍光性の核の測定は蛍光鏡検法で行った［イェー（Ｙｅｈ）、１９８１年］。結果を図１４及び１５に示す。しかし、処理細胞の培養物を顕微鏡検査することに基づくこの方法は、非常に多数の細胞培養物に適用されるＰＤＴ薬剤の細胞溶解活性の系統的な定量的スクーリングと評価に対して最も適したものと言うわけではない。

【００８２】

別法として、光力学的毒性を［^{3}Ｈ］チミジンの配合によって調べた。この場合、ＰＤＴに続いて行われる［^{3}Ｈ］チミジンの配合率の変更は次のようにして行った。即ち、細胞培養物（１０％胎児性ウシ血清中で成長せしめられた、合流率約４０～５０％の細胞４～５×１０^{4}個／ウエル）にチミジン［メチル－^{3}Ｈ］１μＣｉ／ｍＬを３７℃で２時間律動的に送った。次に、培養物を冷燐酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）で２回洗浄し、７．５％氷冷トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）で４℃において３０分間処理し、そしてエタノールで２回洗浄した。次に、１ＭのＮａＯＨ０．３ｍＬに細胞を３７℃において１５分間溶解させた。各１００μＬの試料を１ＮのＨＣｌ・１００μＬと０．１Ｍイミダゾール４ｍＬで中和し、そしてキシレンシンチレーター／ルマックス（Ｌｕｍａｘ）の２０：８（容量／容量）混合物中で細胞を数えた。図１２Ａで説明される実験において、Ｍ２Ｒ細胞をＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅでその濃度を次第に高めながら６０分間処理し、続いて光源Ｂを照射した。図１２Ａから分かるように、光力学的損傷は細胞の２４時間後における［^{3}Ｈ］チミジン配合能の用量依存性低下で表される。効果は完全に光依存性であって、それは暗所対照例及び未処理照明対照例では認められなかった。同様の結果がＦＳ１１ヒト表皮線維芽細胞（図１２Ｂ）及びヒトＴ４７Ｄ胸癌細胞（図１２Ｃ）により得られた（光源Ｂを使用）。結果は３重反復測定の平均±ＳＤとして与えられる。

【００８３】

ＰＤＴの効果をまたクローン原性検定によって測定した。即ち、上記のように（図１２Ａ）色々な濃度のＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅによる細胞の処理及び照射工程が完了して２４時間後に、培養物をトリプシン化し、そして成育可能細胞の数をトリパンブルー排除法で求めた。適切な希釈を行い、そして６－ウエルのコースタープレート（Ｃｏｓｔａｒ　ｐｌａｔｅｓ）に細胞２５０個／ウエルを接種した。培養１１～１２日後、培地を吸い出し、そのコロニーを固定し、メタノール中クリスタルバイオレットで染色し、そしてコロニー数（細胞４０個／コロニー以上）を解剖顕微鏡下で数えた。図１３に見ることができるように、光力学的処理は生存細胞の数をＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅに関して用量依存性様式で減少させたが、暗所対照又は未処理照明対照ではその減少はなかった。図１２Ａと図１３との結果を比較すると、それは２つの形態間に良好な相関関係があることを示している。結果は３重反復測定の平均±ＳＤとして与えられる。

【００８４】

細胞溶解を推論するために用いることができる他の方法に、（１）［^{3}Ｈ］アデニン負荷に続く処理細胞の細胞溶解活性の測定、（２）^{51}Ｃｒ負荷による細胞溶解活性の測定及び（３）ビデオ－マイクロ画像形成技術による壊死領域の検出がある。ＰＩＤの使用は損傷をうけた細胞のみによる蛍光染料の選択的摂取に基づくが、方法１及び２は予備インキュベーション工程の際の放射性トレーサーの摂取に基づくもので、薬剤は第二工程で放射能の放出を誘発する。後者の２つの方法は十分な反復試験物中の数十乃至数百の試料の詳細な滴定に必要とされる多重検定（ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ａｓｓａｙｓ）に適している。

【００８５】

図１４は４×１０$^{-6}$ＭのＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅと共に３０分間インキュベートした黒色腫細胞の単層上の２つの領域を示す。領域Ａ（図１４、左）に照射を行い（光源Ａ）、一方領域Ｂは暗所に保つ。照射細胞（領域Ａ）は著しく減少しているようであり、皿との接触を失っているように思われ、そしてそれらの細胞膜は分解され、不規則となっているようである。同じ培養物（図１４、右）をＰＩＤ蛍光鏡検法で調べると、それは細胞の損傷が光力学的に処理された領域に限られ、形態変化と細胞死との間には１：１の相

関関係があることを示し、一方生きている細胞の核はＰＩＤから何んらの蛍光も示さなかった（図１４の領域ＡとＢ、即ち左右を比較されたい）。倍率がより高い照射域のへりは蛍光性の核を有する照射されたＰＩＤ処理細胞を示し、それらに隣接して正常な形態を持つ未照射対照細胞と未染色細胞が存在する（図１５）。同等に照射された対照の未処理細胞には損傷は確認できなかった（図１６）。同様の形態変化が4×10^{-6}ＭのＣｈｌｉｄｅａと共にインキュベートされた黒色腫細胞の１０分照射後に認められた（図示されず）。

【００８６】

実施例１３：Ｃｈｌ結合体及びＢｃｈｌ結合体による複数のマウスの処理

（ａ）腫瘍の移植：Ｍ２Ｒ細胞を通常通りに単層として保持する。細胞をゴムポリスマンの助けを借りて掻き取り、標準食塩水に懸濁させる。細胞1×10^{6}個／０．１ｍＬを雄のＣ５７Ｂ１又はＣＤ１ヌードマウスの側腹部又はバッチに皮下注射する。約３～５週間で腫瘍は目で見えるようになる。これらの腫瘍は固体の局限された構造のものとして成長し、移植７～８週間後に約１０ｇの質量に達することができる。同様の方法をマウスＭ２Ｒか、又はヒト（ＦＯ／１、ＭＲＩ／Ｈ／２２１、ＨＳ６９５Ｔメラニン欠乏黒色腫又はＳＫ／ＭＥＬ／２８）の黒色腫腫瘍が移植されているヌードマウスに使用する。

【００８７】

（ｂ）注射と照射：複数のマウスに１０％エタノール－ＰＢＳ溶液中のＣｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体、即ちＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ及びＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ２０ｍｇ／ｋｇをｉ．ｐ．注射した。５時間後、その腫瘍に１時間照射した。複数の対照マウスには（ｉ）上記エタノール－ＰＢＳ溶液を注射し、そして１時間照射し；（ｉｉ）上記Ｃｈｌ誘導体及びＢｃｈｌ誘導体を注射し、そして暗所に保った。

【００８８】

（ｃ）照射２４時間後、それらマウスを頚部脱臼により殺した。必要な通り、腫瘍の配向を組織染色の助けを借りて維持し、そして腫瘍を標準的な組織学的切片形成経路により更に処理した。

【００８９】

（ｄ）照射なしでの、正常ハウジング（ｎｏｒｍａｌ　ｈｏｕｓｉｎｇ）条件下における複数のＣ５７Ｂ１マウス中のＣｈｌ－セリン結合体及びＢｃｈｌ－セリン結合体、即ちＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ及びＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの毒性を１０％エタノール／ＰＢＳに溶解した上記化合物の注射によって評価した。複数の対照マウスには上記ビヒクルのみを注射した。注射量４０ｍｇ／ｋｇ体重まではそれらマウスの挙動に顕著な影響はなく、マウスは最長で１４日間状態よく生存していた。この薬剤用量はしかして使用用量としてずば抜けて高いもので、従って処理のLD_{50}対EC_{50}（治療指数の限界）はこれを更に決定しなければならない。

【００９０】

（ｅ）病巣照射（５ｍＷのＧａ／Ａｓダイオードレーザー、６７０ｎｍ）に起因する複数のＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ処理ヌードマウスにおける皮膚細胞毒性を試験した。即ち、１０％エタノール／ＰＢＳ中のＣｈｌ／Ｂｃｈｌ－結合体（２０ｍｇ／ｋｇ）を複数のヌードマウスに注射（ｉ．ｖ．）し、２４時間後にそれらマウスの皮膚に４時間照射した。複数の対照マウスに（ｉ）上記エタノール－ＰＢＳ溶液を注射し、暗所に保つ；（ｉｉ）対照マウスをＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ処理せずに４時間照射（光源Ａ）した。照射２４時間後、それらマウスを頚部脱臼により殺した。必要な通り、照射域の配向を組織染色の助けを借りて維持し、そして皮膚試料を標準的な組織学的方法により更に処理した。実験動物における皮膚の照射は照射部位に損傷をもたらし、真皮、表皮及び皮下脂肪層（ＳＦ）を通して組織の壊死がもたらされることが見いだされた（図１５）。壊死領域直下の区域の白血球（ＬＵ）が浸潤されていることで、明白な免疫応答があったことが示された。壊死領域に隣接する非照射皮膚は正常のようである。対照群には皮膚刺激の徴候は認められなかった（データーは示されず）。

【００９１】

（ｆ）Ｂｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅによるＭ２Ｒ黒色腫の腫瘍の光力学的処理：１：１エタノール：食塩水０．０５ｍＬ中のＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ５０～１５０μｇをＣＤ１ヌードマウスに前以て移植した直径５～６ｍｍの腫瘍の中に及びその周囲に麻酔［ネムブタール（Ｎｅｍｂｕｔａｌ）６．０ｍｇ／ｋｇ］下で注射した。注射は皮膚に注射針を腫瘍から１０～１５ｍｍ挿通することにより行い、その薬剤の腫瘍自体への送出は腫瘍上方の皮膚及び腫瘍の外面はそのまま残るようにその内面から行った。次に、麻酔がかけられたマウスをベットに入れ、そして腫瘍部位に強度１９０００μアインシュタイン／ｃｍ^{2}のハロゲン白色光を６０分間照射した。照射部位の直径は９ｍｍで、腫瘍領域をカバーするだけであった。腫瘍の構造及び寸法の変化の追跡を磁気共鳴画像形成法（ＭＲＩ）を用いて数週間にわたり行った。処理前後の腫瘍形状の違いを図１８に示す。肩甲骨に近い上部胸郭に移植された腫瘍は処理前の図１８Ａに高ＭＲＩ信号による明るい構造（Ｔ）としてはっきり認めることができるが、８４時間後には本質的に除去されていた。２週間後に小さな再発があった（図１８Ｂ）。２回目の処理（Ｂｃｈｌ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの照明）は３週間後も再発をもたらさなかった（図１８Ｃ）。

【００９２】

（ｇ）色々な組織及び器官の中の、並びに処理されたヌードマウスとブラック（ｂｌａｃｋ）マウスの腫瘍の中のＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの保持性を評価した。即ち、１０％エタノール／ＰＢＳ中Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅをＣ５７Ｂ１雄ヌードマウス、ＣＤ１雄ヌードマウス及びＣＤ１雌ヌードマウスにｉ．ｐ．注射した（２０ｍｇ／ｋｇ、５～１０匹のマウスの平均）。組織試料（脂肪、筋肉、皮膚、血液）、完全器官（脾臓、肝臓、脳、肺臓、心臓等）及び腫瘍を取り出し、アセトン中で均質化し、次いで遠心分離した。上層液中の顔料濃度を蛍光鏡検法で測定した。図１９にＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの腫瘍中並びに色々な組織及び器官中の１２時間後の分布を示す。

【００９３】

実施例１４：チロシルエチルエステルクロロフィリド及び同バクテリオクロロフィリドの製造

【００９４】

（ａ）Ｃｈｌｄｅａ又はＢｃｈｌｉｄｅａのＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）による活性化

真空乾燥したＣｈｌｄｅａ又はＢｃｈｌｉｄｅａ（５ｍｇ）と乾燥ＮＨＳ（９．６ｍｇ）との混合物及びＤＣＣ（５ｍｇ）をアルミナ上で乾燥したテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）２ｍＬに溶解した。この反応混台物をＡｒ下で密封し、室温で４８時間撹拌し、次いで更に４８時間５℃に保った。各工程は暗所で行った。反応完結後、その溶媒をN_2下で蒸発させ、緑色の残分をアセトンに再溶解し、そして小さいＣＭ－セファローズカラム（ファーマシア社；０．５×５．０ｃｍ）に供し、アセトン中で平衡させた。そのカラムをアセトン１５～２０ｍＬで洗浄し、そして活性化されたＣｈｌｉｄｅ（ＮＨＳ－Ｃｈｌｄｅａ又はＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａ）をアセトン中３～５％のメタノールで溶離した。溶離されたＮＨＳ－Ｃｈｌｄｅａ又はＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａを同様にして更に精製した。収量：２．９５～４．１５ｍｇ（５０～８０％）。

【００９５】

（ｂ）ＮＨＳ－Ｃｈｌｄｅａ及びＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａのチロシンエチルエステル（Ｔｒｙ－ＯＥｔ）に対する触媒結合

上記工程（ａ）の精製されたＮＨＳ－Ｃｈｌｄｅａ又はＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａ（２ｍｇ）を乾燥ＴＨＦ１ｍＬに溶解し、その溶液にチロシンエチルエステル（シグマ社）５ｍｇを加えた。この反応混合物をＡｒ下で密封し、室温で４８時間撹拌し、次いで暗所中、５℃に４８時間保った。この反応混合物の組成をヴィダック（Ｖｙｄａｃ）Ｃ－１８ＨＰＬＣカラム［米国、ＩＩＩ州、ディアフィールド（Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ）のオールテクアソシエーツ社（ＡｌｌｔｅｃｈＡｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．）を用いて分析した。分離条件は次の通りであった：カラム－２５０ｍｍ×４．６ｍｍ；充填－ヴィダック２１８ＴＰ、粒径１０μ、孔寸法３００Å；移動相－アセトニトリル／水（７：３）；流量－

１ｍＬ／分。Ｃｈｌｄｅａ－Ｔｒｙ－ＯＥｔ結合体又はＢｃｈｌｉｄｅａ－Ｔｒｙ－ＯＥｔ結合体は保持時間９．５分で溶離された。反応生成物をＣＭ－セファローズを用いて実施例４におけるようにして精製した。

【００９６】

実施例１５：Ｃｈｌａ－及びＢｃｈｌａ－α－ＭＳＨ結合体の製造

α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）は次式を有する：

【化３】

Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｓｅｒ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｈｉｓ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－Ｔｒｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－NH_2

【００９７】

Ａｒ下でポリエチレン製試験管に入れられ、トリエチルアミン（ＴＥＡ）０．０７ｍｇを含有する、アセトニトリルと水との８：２混合物中α－ＭＳＨ１ｍｇの撹拌された溶液１ｍＬに少容量（約０．２ｍＬ）のアセトニトリル中のＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅａ（実施例１４ａで製造）２．１５ｍｇを加え、短時間超音波処理した。Ａｒ下で密封したこの反応混合物を暗所、室温において６６時間撹拌した。反応の途中において、反応混合物から反応の開始から０、３、１９、４５及び６６時間後に１５μＬづつを採取し、ＨＰＬＣ分析にかけた。

【００９８】

反応混合物の各既知少量（１５μＬ）をN_2下で乾燥し、ＴＦＡ０．１％を含有する水中にアセトニトリルを２０％（％は全てｖ／ｖ）含む混合物５０～１００μＬに再溶解した。この溶液をＣ－１８ＨＰＬＣ力ラムに注入した。集められた画分は次の保持時間を有していた：２４分－未反応α－ＭＳＨ；３６分－Ｃｈｌａ－α－ＭＳＨ結合体；７６分－Ｃｈｌｉｄｅａ。分離条件は次の通りであった：カラム－２５０ｍｍ×４．６ｍｍ；充填－ヴィダック２１８ＴＰ、粒径１０μ、孔寸法３００Å；移動層Ａ－水中ＴＦＡ０．１％；移動層Ｂ－アセトニトリル中ＴＦＡ０．１％；勾配－０分から５分までＢ２０％、次いで１０分にわたりＢ２０～５５％、そして２５分にわたりＢ５５～８０％、その後Ｂ８０％で洗浄；流量－１ｍＬ／分。

【００９９】

Ｂｃｈｌａ－α－ＭＳＨ結合体を同様にして製造した。ただし、Ｂｃｈｌｉｄｅａを出発物質として用いた。精製後、ペプチドとＢｃｈｌａとのスペクトルの特徴を有する画分を集めた。

【０１００】

Ｃｈｌａ－α－ＭＳＨ結合体の生物学的活性をマウスのＭ２Ｒ細胞培養物中において環式ＡＭＰ（ｃＡＭＰ）を刺激するその能力をα－ＭＳＨの効力のある同族体である［Nle^4，Ｄ－Phe^7］α－ＭＳＨに比較して測定することによって評価した。ｃＡＭＰの蓄積はガースト等（１９８６年）が記載するようにして行った。図２０に示されるように、Ｃｈｌａ－α－ＭＳＨ結台体は上記α－ＭＳＨ同族体の活性と比較して同じ効力を保持している。

【０１０１】

実施例１６：Ｃｈｌａ－及びＢｃｈｌａ－蛋白質結合体の製造

N_2下でポリエチレン製試験管に入れられ、トリエチルアミン（ＴＥＡ）０．１ｍｇを含有する、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ガンマー免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）及びピーナッツ凝集素から選択される蛋白質数ミリグラムの緩衝ＰＢＳ（燐酸塩緩衝剤０．１Ｍ、ｐＨ７．６）中の撹拌されている溶液１ｍＬに実施例１４ａで製造した過剰のＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅａ又はＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａを幾つかの１０μＬ部づつの濃縮アセトン溶液として３０分にわたり添加し、続いて短時間超音波処理した。

【０１０２】

各場合の試薬の量は次の通りであった：

【０１０３】

－ＢＳＡ２．５ｍｇ－ＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅ０．０４５ｍｇ

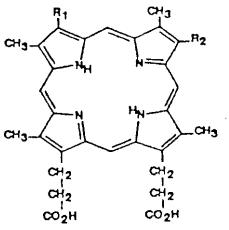
－１ｇＧ３ｍｇ－ＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅ０．０４１ｍｇ
－ＰＮＡ１ｍｇ－ＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅ０．０７０ｍｇ
【０１０４】
Ａｒ下で密封した反応混合物を暗所、室温において２４時間撹拌した。
【０１０５】
Ｃｈｌａ－又はＢｃｈｌａ－蛋白質結合体をバイオーゲル（Ｂｉｏ－Ｇｅｌ）Ｐ－１０［米国、Ｃａ州のハーキュレス社（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ）、バイオーラド（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）］のミニーカラム（０．５ｃｍ×５ｃｍ）で精製した。カラムはＰＢＳ中で予備膨潤された上記ゲルから次のようにして調製した：ＰＢＳ中での平衡後、カラムをＰＢＳ中のＢＳＡ（１～２ｍｇ）溶液数ミリリットルで洗浄し、そしてＢＳＡの過剰分をＰＢＳで溶離した。反応混合物の少量の試料（５０～６０μＬ）をカラムに装填し、ＰＢＳで溶離した。未反応のＮＨＳ－Ｃｈｌｉｄｅａ又はＮＨＳ－Ｂｃｈｌｉｄｅａは頂部に保持され、そしてカラムに沿って移動した結合体の緑色バンドを採集した。
【０１０６】
Ｃｈｌａ－及びＢｃｈｌａ－蛋白質結合体は水溶液中に超遠心分離すると採集することができる緑色の沈澱を形成する。これらの沈澱は洗浄剤、例えば１％のトリトン－Ｘ１００と共に超音波処理することによって再溶解させることができる。これらの結合体はＣｈｌａ（又はＢｃｈｌａ）と蛋白質の両者のスペクトルの特徴を示す。それらはＵＶ範囲で光を強く吸収し、かつモノマーとしての及びアグレゲートとしてのＣｈｌａ又はＢｃｈｌａのバンドを示す（データーは示さず）。
【０１０７】
文献
ドーハーティー，Ｔ．Ｊ．、Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｔｏｂｉｏｌ．、１９８７、４５：８７９－８８９。
【０１０８】
フィーダー，Ｌ．等、ＦＥＢＳに提出、１９９３。
【０１０９】
ガースト，Ｊ．Ｅ．等、Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．、１９８６、４６：１３７－１４７。
【０１１０】
ハンブライト，Ｐ、１９７５、“Ｐｏｒｐｈｒｉｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔａｌｌｏｐｏｒｐｈｒｉｎｓ”、スミス，Ｋ．Ｍ．（Ｓｍｉｔｈ，Ｋ．Ｍ．）編、エルセビア社（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ）、２３３－２７８。
【０１１１】
ヒンニネン，Ｐ．Ａ．、１９９１、“Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｌｌｓ”、シーアー，Ｈ．（Ｓｃｈｅｅｒ，Ｈ）編、ＣＲＣプレス社（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ）、１４５－２１０。
【０１１２】
クレーマーバーンバウム，Ｍ．，１９８９、Ｓｅｍｉｎａｒｓ ｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ．、２６：１５７－１７３。
【０１１３】
ロイポルド，Ｄ及びフレヤー，Ｗ．、Ｊ．Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．、Ｂ：Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９９２、３１１－３１４。
【０１１４】
レウェリン，Ｃ．Ａ．等、Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．、１９９０、５２：１０４３－１０４７。
【０１１５】
マックロバート，Ａ．Ｊ．等、１９８９、ＣＩＢＡ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ １４６、“Ｐｈｏｔｏｓｅｎｓｉｔｉｚｉｎｇ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ：Ｔｈｅｉｒ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｕｓｅ”、ジョン ワイレー アンド サンズ社（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ）、４－１２

。
【０１１６】
モーサー，Ｊ．Ｋ．等、１９９２、ｉｎ Ａｂｓｔｒ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｃｏｎｆ．ＰＤＴ ＆ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｌａｓｅｒ Ａｐｐｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｍｉｌａｎ）。
【０１１７】
スパイクス，Ｊ．Ｄ．及びボーマー，Ｊ．Ｃ．、１９９１、“Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｌｌ”、シーアー，Ｈ．編、ＣＲＣプレス社、１１８１－１２０４。
【０１１８】
ワシーレフスキー，Ｍ．Ｒ．、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔ、１９７７、１６：１３７３－１３７６。
【０１１９】
ワシーレフスキー，Ｍ．Ｒ．等、１９８０、Ｊ．Ｏｒｅｇ．Ｃｈｅｍ．、４５：１９６９。
【０１２０】
イェー，Ｃ．－Ｊ．Ｇ．等、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１９８１、４３：２６９－２７５。
【図面の簡単な説明】
【図１】図１はR_1＝R_2＝－ＣＨＯＨ－CH_3であるヘマトポルフィリン、即ちＨＰの構造を示す。
【図２】図２はＣｈｌａ（Ｍ＝Ｍｇ、Ｒ＝フィチル）、Ｃｈｌｉｄｅａ（Ｍ＝Ｍｇ、Ｒ＝Ｈ）及びＰｈｅｏａ（Ｍ＝２Ｈ、Ｒ＝フィチル）の構造を示す。
【図３】図３はＢｃｈｌａ（Ｍ＝Ｍｇ、Ｒ＝フィチル）、Ｂｃｈｌｉｄｅａ（（Ｍ＝Ｍｇ、Ｒ＝Ｈ）及びＢｐｈｅｏａ（Ｍ＝２Ｈ、Ｒ＝フィチル）の構造を示す。
【図４】図４はＣｈｌａとＬ－セリンメチルエステル（Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ）とのクロロフィラーゼ（Ｃｈｌａｓｅ）の存在下における酵素エステル交換反応の反応式を示す。
【図５】図５はＢｃｈｌｉｄｅａとカルボベンゾキシセリルセリンメチルエステル（Ｚ－Ser_2－ＯＭｅ；式中、Ｚはカルボベンゾキシである）との触媒エステル化反応の反応式を示す。
【図６】図６ａはＣｈｌａの１００％アセトン中での光学的吸収スペクトルを示す。
図６ｂはＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの１００％アセトン中での光学的吸収スペクトルを示す。
図６ｃはＢｃｈｌａの１００％アセトン中での光学的吸収スペクトルを示す。
図６ｄはＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの１００％アセトン中での光学的吸収スペクトルを示す。
【図７】図７ａはＰｈｅｏａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの１００％エタノール中での光学的吸収スペクトルを示す。
図７ｂはＺｎ－Ｐｈｅｏａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの１００％エタノール中での光学的吸収スペクトルを示す。
図７ｃはＣｕ－Ｐｈｅｏａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの１００％エタノール中での光学的吸収スペクトルを示す。
【図８】図８ａは固体のＣｈｌａのフーリエ転移赤外（ＦＴＩＲ）スペクトルを示す。
図８ｂはＣｈｌｉｄｅａのフーリエ転移赤外（ＦＴＩＲ）スペクトルを示す。
図８ｃはＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅのフーリエ転移赤外（ＦＴＩＲ）スペクトルを示す。
【図９】図９ａは固体のＢｃｈｌａのＦＴＩＲスペクトルを示す。
図９ｂはＢｃｈｌｉｄｅａのＦＴＩＲスペクトルを示す。
図９ＣはＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅのＦＴＩＲスペクトルを示す。
【図１０】図１０はＣｈｌｉｄｅａ（黒塗りの三角）、Ｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ（黒塗りの円）及びＨＰＤ（黒塗りの四角）の培養中のＭ２Ｒ黒色腫細胞に対する吸収のインキュベーション培地中顔料濃度に対する依存性を示す。

【図１１】図１１はＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ（黒塗りの円）及びＢｃｈｌｉｄｅａ（黒塗りの三角）の培養中のＭ２Ｒ黒色腫細胞に対する吸収のインキュベーション培地中顔料濃度の関数としての依存性を示す。
【図１２】図１２ＡはＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅにより後続照射あり（明）及び後続光照射なし（暗）で処理したときの、マウスのＭ２Ｒ黒色腫細胞への［^{3}Ｈ］チミジンの配合に対するＰＤＴの効果を示す。
図１２ＢはＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅにより後続照射あり（明）及び後続光照射なし（暗）で処理したときの、ＦＳ－１１ヒト包皮線維芽細胞への［^{3}Ｈ］チミジンの配合に対するＰＤＴの効果を示す。
図１２ＣはＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅにより後続照射あり（明）及び後続光照射なし（暗）で処理したときの、ヒトのＴ４７Ｄ胸癌細胞への［^{3}Ｈ］チミジンの配合に対するＰＤＴの効果を示す。
【図１３】図１３はＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅにより後続照射あり（明）及び後続光照射なし（暗）で処理したときのＭ２Ｒマウス黒色腫細胞の増殖のクローニング効率に対するＰＤＴの効果を示す。
【図１４】ａは生物の形態を示す写真であり、４×１０$^{-6}$ＭのＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅと共に１時間インキュベートされ、そして６７０ｎｍのレーザー（５ｍＷ）で１０分間照射されたＭ２Ｒ細胞の単層の位相差顕微鏡写真（左）を示す。
ｂは生物の形態を示す写真であり、４×１０$^{-6}$ＭのＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅと共に１時間インキュベートされ、そして６７０ｎｍのレーザー（５ｍＷ）で１０分間照射されたＭ２Ｒ細胞の単層の蛍光顕微鏡写真（右）を示す。　照射３時間後、細胞をプロビジウムアイオダイド（ＰＩＤ）で処理し、それらのＰＩＤ蛍光を測定した。レーザービームで照射された円形領域（Ａ）は損傷を受けた細胞と死んだ細胞が分離された区域を示す。暗所に保たれた照射域（Ｂ）の周囲の領域中の細胞は正常な形態を有する（左）。同一単層の蛍光顕微鏡写真（右）において、領域（Ａ）中に残っている損傷を受けた細胞はＰＩＤのラベルが付けられ、一方領域（Ｂ）中の細胞は未染色のままで、従って無損傷として数えられる。
【図１５】生物の形態を示す写真であり、図１４に記載されたように処理されたＭ２Ｒ細胞の単層の位相差／蛍光顕微鏡写真を示す。ＰＩＤラベルが付けられた核（Ｎｕ）を隣接対照細胞（Ｃ）の一番近くの損傷細胞に見ることができる照射領域の境界が示される。対照細胞（Ｃ）は照射されず、従ってそれら対照細胞は正常な形態と未染色の核を有する。
【図１６】生物の形態を示す写真であり、増感剤なしで１０分間照射されたＭ２Ｒ細胞の単層の位相差顕微鏡写真を示す。細胞形状に変化は認められない。細胞にはＰＩＤ染色によるラベル付けは行われなかった（図示されず）。
【図１７】図１７は光力学的に処理されたヌードマウス（Ａ：ｍａｇ×３０；Ｂ：ｍａｇ×７０）の皮膚の断面を示す。即ち、ヌードマウスをＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅ（２０ｍｇ／Ｋｇ）で処理し、２４時間後に４時間照射した。２４時間の追加時間の後、マウスを殺した。その皮膚を切り離し、そして直ちにブアン固定液に固定した。照射された皮膚組織のパラフィン切片を変成トリクローム（ヘマトキシリン／エオシン／明緑色、ホスホロモリブデン酸）で染色し、照射領域の配向を実験中一定に保った。壊死領域（ＮＣ）の中央を通って切片を取った。照射を受けなかった正常な皮膚は壊死領域（Ａ）の両側に認められる。壊死は真皮及び表皮を貫通し、典型的には脂肪の小滴が詰まっている皮下の脂肪層に達している。壊死領域直下の白血球（ＬＵ）の浸潤も認められる。
【図１８】図１８ＡはＣＤ１ヌードマウスに移植された、Ｂｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅで処理する前のＭ２Ｒ黒色腫の腫瘍（Ｔ）の磁気共鳴画像（ＭＲＩ）を示す。
図１８ＢはＣＤ１ヌードマウスに移植されたＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅで処理された、Ｍ２Ｒ黒色腫の腫瘍（Ｔ）の最初の処理から２週間後の磁気共鳴画像（ＭＲＩ）を示す。
図１８ＣはＣＤ１ヌードマウスに移植されたＢｃｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅで処理された、Ｍ２Ｒ黒色腫の腫瘍（Ｔ）の２回目の処理から２週間後の磁気共鳴画像（ＭＲＩ）を

示す。
（Ｂ）では若干の再発が認められるが、（Ｃ）では再発はない。
【図１９】図１９はＣＤ１ヌードマウスの幾つかの器官におけるＣｈｌａ－Ｌ－Ｓｅｒ－ＯＭｅの処理１２時間後の分布を示す。
【図２０】図２０はマウスのＭ２Ｒ黒色腫細胞の培養に際してＣｈｌａ－α－ＭＳＨ（黒塗りの円）により誘発された、及びα－ＭＳＨ同族体（白抜きの円）で誘発されたｃＡＭＰの形成を示す。Ｃｈｌａ－α－ＭＳＨの濃度はＣｈｌ部分の可能性のある最低吸光係数で測定される。

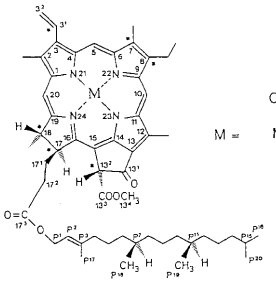
【図１】



ヘマトポルフィリン（Hp）

$R_1=R_2=CH(OH)CH_3$

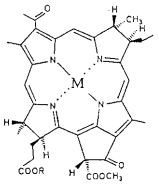
【図２】



	Chla	Chlidea	Pheoa
M =	Mg	Mg	2H

a)クロロフィルaの構造とIUPACの数字表示系

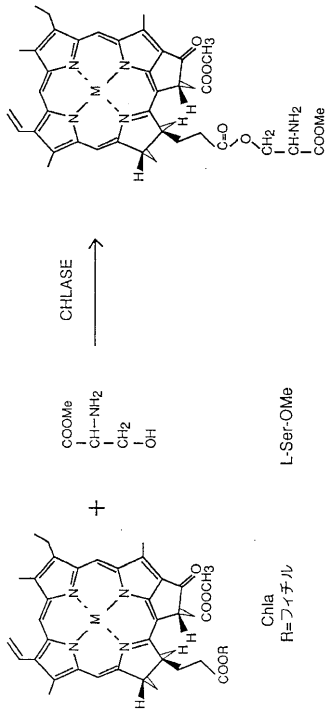
【図３】



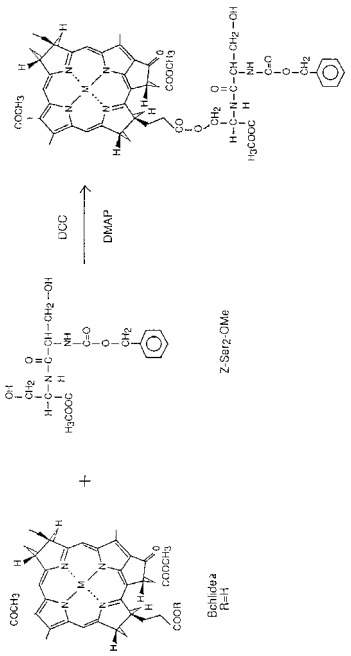
	Bchla	Bchlidea	Bpheoa
M =	Mg	Mg	2H
R =	フィチル	H	フィチル

b)バクテリオクロロフィルaの構造

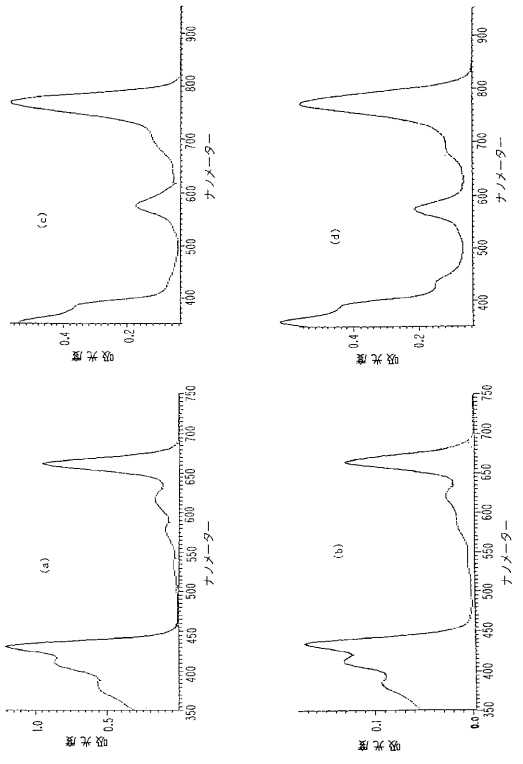
【図４】


CHLASE
COOMe
CH-NH2
CH2
OH
L-Ser-OMe
Chla
R=フィチル
COOCH3
COOR

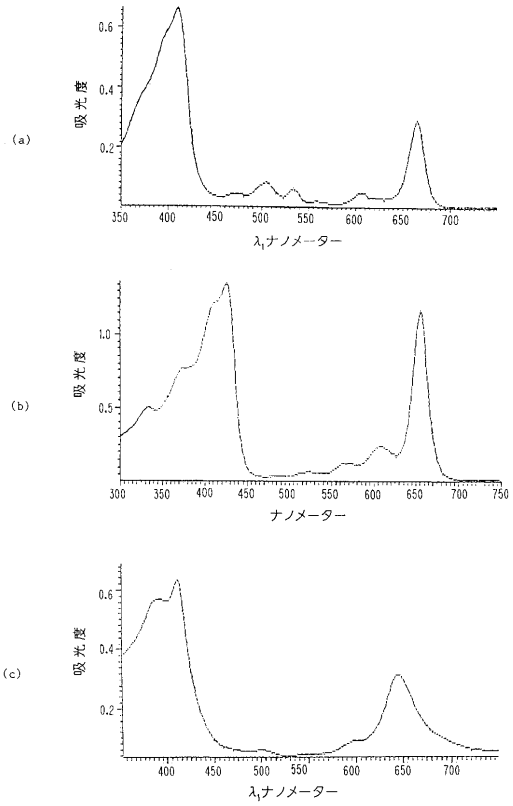
【図５】


DCC
DMAP
Z-Ser2-OMe
Bchlide a
R=H

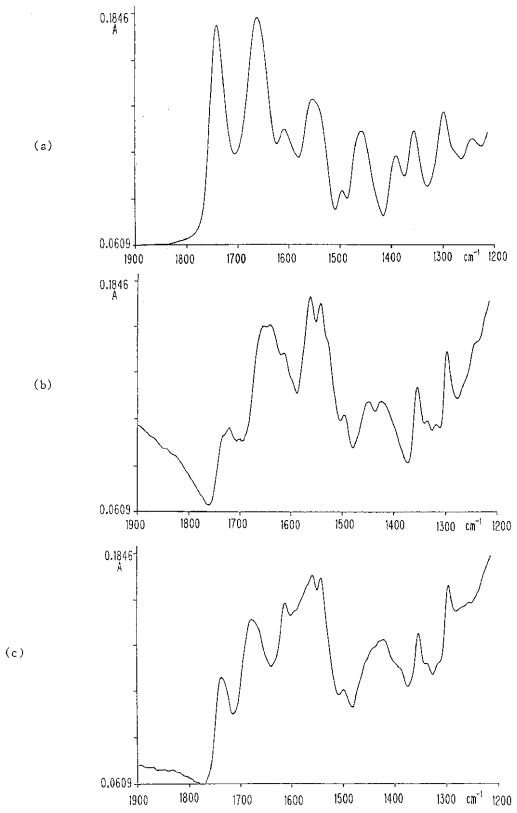
【図６】


(a)
(b)
(c)
(d)
吸光度
ナノメーター

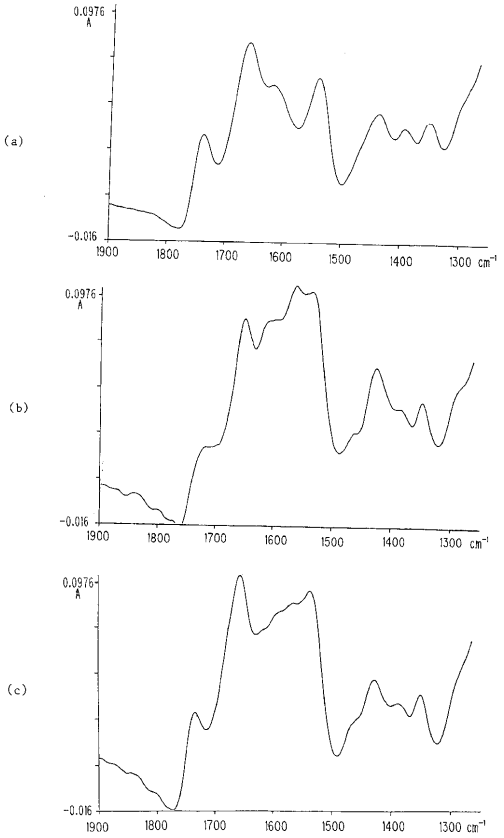
【図７】


(a)
(b)
(c)
吸光度
λ1ナノメーター
ナノメーター

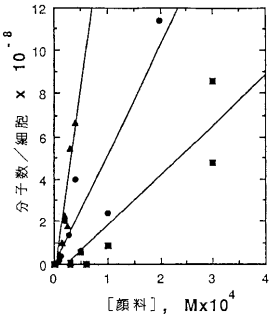
【図８】



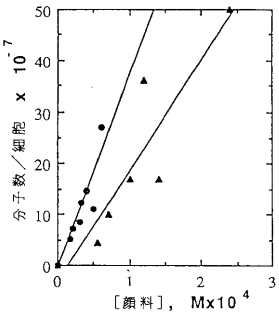
【図９】



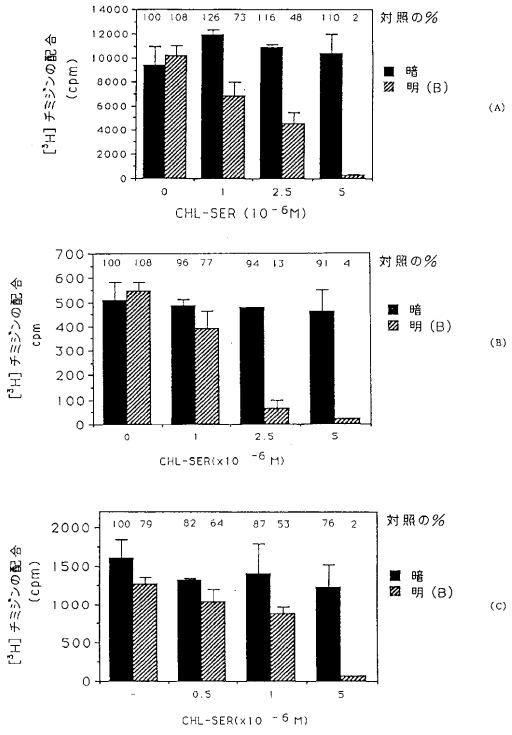
【図１０】



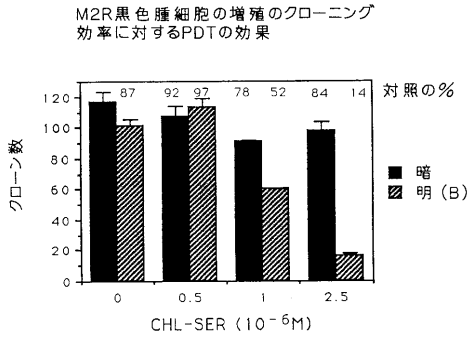
【図１１】



【図１２】

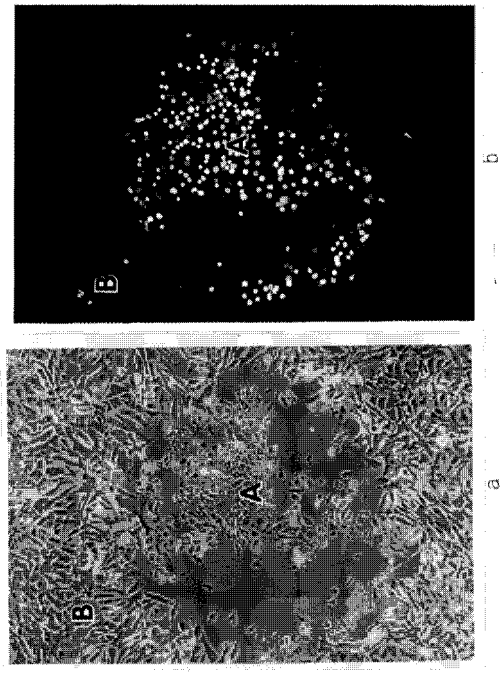


【図１３】



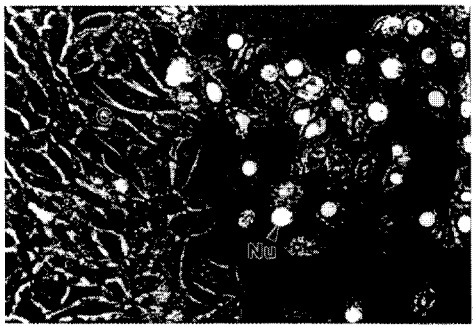
【図１４】

図面代用写真



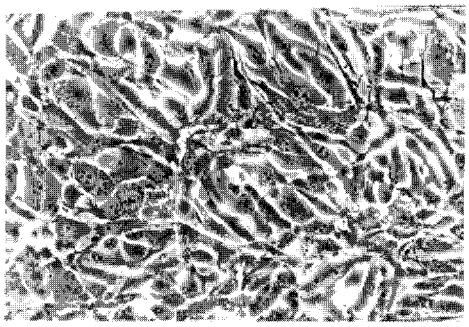
【図１５】

図面代用写真



【図１６】

図面代用写真

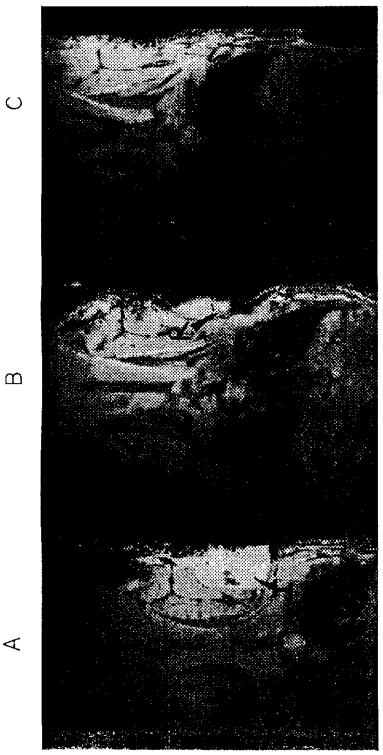


【図１７】



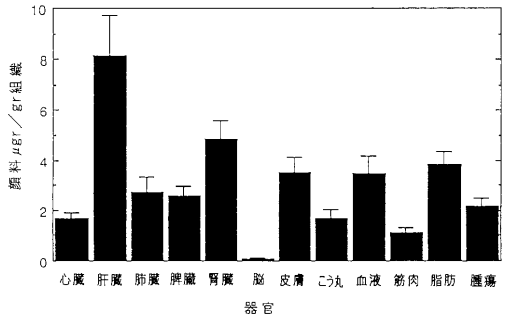
複　　写

【図１８】

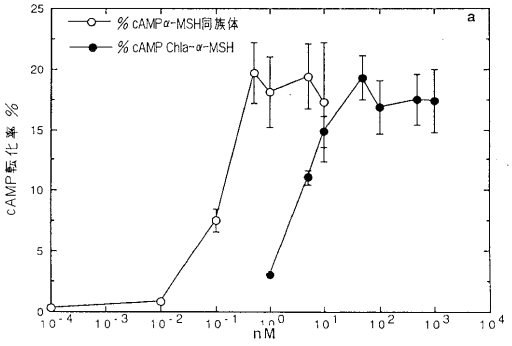


複　　写

【図１９】



【図２０】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	
Ａ６１Ｋ 49/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１２１
Ａ６１Ｐ 35/00	Ｃ０７Ｋ 5/023	
Ａ６１Ｐ 43/00	Ｃ０７Ｋ 14/795	
Ｃ０７Ｋ 5/023	Ｃ０７Ｋ 16/00	
Ｃ０７Ｋ 14/795	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｔ
Ｃ０７Ｋ 16/00	Ｇ０１Ｎ 33/574	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ａ６１Ｋ 37/02	
Ｇ０１Ｎ 33/574	Ａ６１Ｋ 37/24	
// Ａ６１Ｎ 5/06	Ａ６１Ｎ 5/06	Ｅ

(72)発明者 アビグドア シェルツ
イスラエル国レホボト，ネベ アミット １，トル ハビブ ４
(72)発明者 ヨラム サロモン
イスラエル国レホボト，ゴードン ストリート ４３ビー
(72)発明者 レスゼック フィードアー
ポーランド国シェスジン，ゴーナ ストリート ２９エイ／９

審査官 星野 紹英

(56)参考文献 特開平０１－２５０３８１（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－５０１０６３（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－１３８２８０（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２３９２８６（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－００７２７９（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－１９６５８６（ＪＰ，Ａ）
特開昭５７－１８５２２０（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－００５９２４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－００５９８５（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－０８３１８６（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１２９１６３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９０／０１２５７３（WO，Ａ１）
国際公開第８９／００１６３０（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C07D487/22
A61K 31/555
A61K 38/00
A61K 38/22
A61K 39/395
A61K 49/00
CA(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)