



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105008402 B

(45)授权公告日 2018.09.18

(21)申请号 201480009911.9

(22)申请日 2014.02.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105008402 A

(43)申请公布日 2015.10.28

(30)优先权数据
2013-033633 2013.02.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/054990 2014.02.21

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/129674 EN 2014.08.28

(73)专利权人 佳能株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 三木康嗣 井上达广 小林靖人
中野克哉 大江浩一 山内文生
矢野哲哉 南昌人

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 石宝忠

(51)Int.Cl.
C08B 37/08(2006.01)
A61B 5/00(2006.01)

审查员 刘璐

权利要求书6页 说明书35页 附图22页

(54)发明名称

近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括
其的光学成像用造影剂

(57)摘要

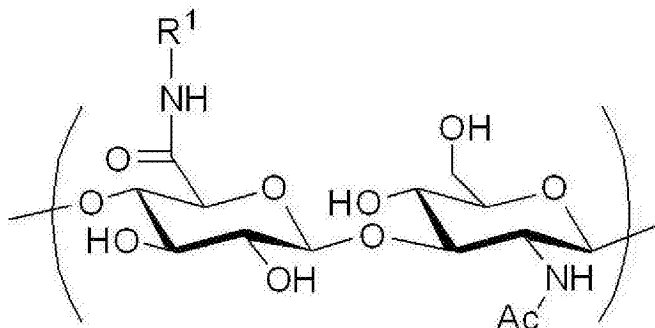
本发明提供具有高ICG含量的化合物,其在
肿瘤中具有高积累性并且具有大强度的从肿瘤
中发出的光声信号,即使给药后经过一段时间。
具体地,本发明提供使聚乙二醇和ICG衍生物与
其结合的透明质酸衍生物。

1. 聚合物,其由各自由下述通式(1)表示的单元形成,其中:

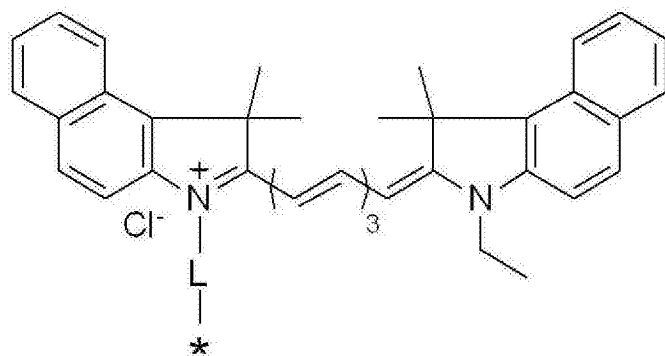
R^1 在通式(1)中的单元与单元之间彼此独立;和

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

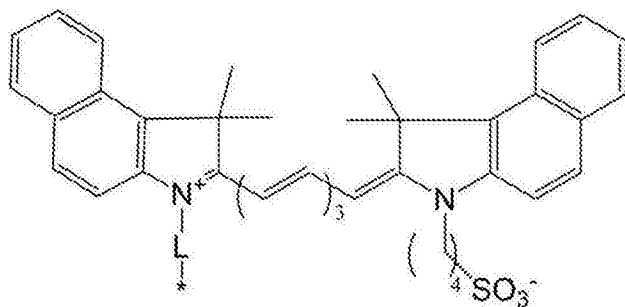
通式(1)



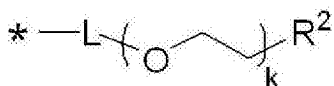
通式(2)



通式(25)



通式(3)



条件是:通式(2)、通式(3)和通式(25)中,L表示单元与单元之间彼此独立的连接基,和*表示与通式(1)中N的结合位置;和通式(3)中, R^2 表示H、OH、OMe、 NH_2 和COOH的任一个,和k表示20-200的整数,

其中聚合物中的各自具有通式(2)和通式(25)中的一者作为 R^1 的单元数用x表示并且聚合物中的全部单元数用N表示时,x和N满足由下式(1)表示的关系:

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

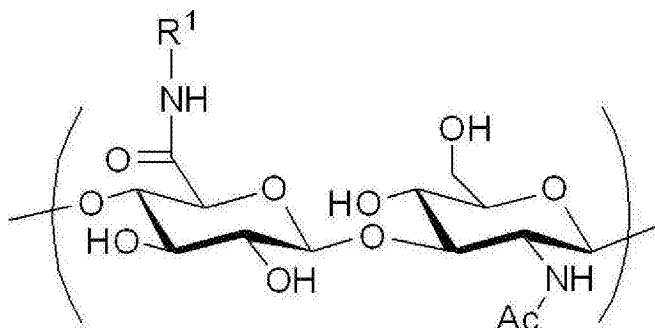
2. 聚合物,其由各自由下述通式(1)表示的单元形成,其中:

R¹在通式(1)中的单元与单元之间彼此独立；

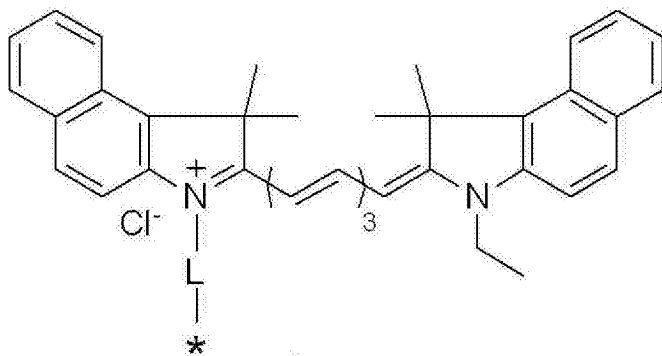
R¹选自由下述通式(2)–(5)、下述通式(25)和下述通式(29)组成的组；和

该聚合物含有至少一个具有通式(2)和通式(25)中的一者作为R¹的单元和至少一个具有通式(3)作为R¹的单元：

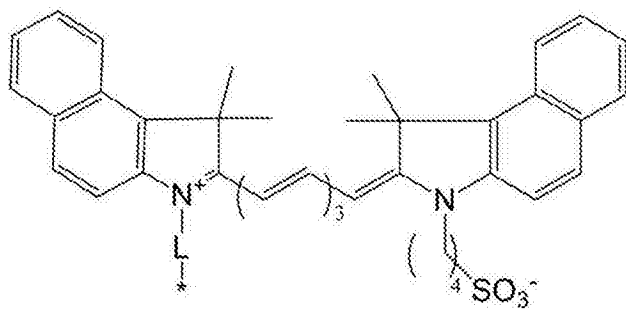
通式(1)



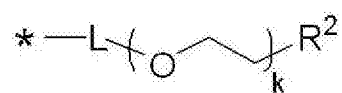
通式(2)



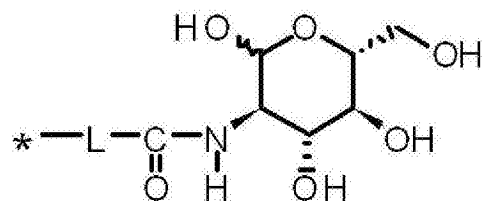
通式(25)



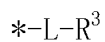
通式(3)



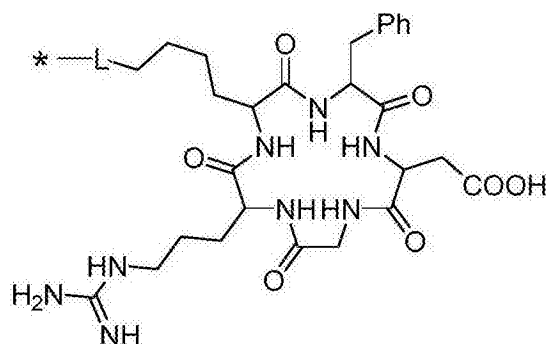
通式(4)



通式(5)



通式 (29)



条件是:通式(2) - (5)、通式(25)和通式(29)中,L表示单元与单元之间彼此独立的连接基,和*表示与通式(1)中N的结合位置;和通式(3)中, R^2 表示H、OH、OMe、NH₂和COOH的任一个,和k表示20-200的整数;和通式(5)中, R^3 表示N₃、H、CH₃、NH₂、SH和COOH的任一个,

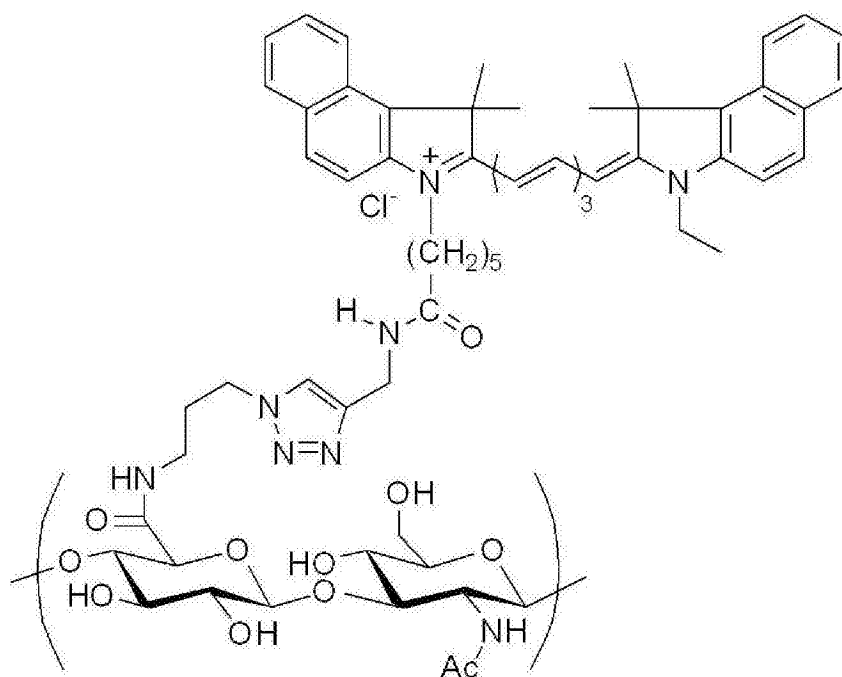
其中聚合物中的各自具有通式(2)和通式(25)中的一者作为R¹的单元数用x表示,聚合物中的各自具有通式(3)作为R¹的单元数用y表示,并且聚合物中的各自具有通式(4)和通式(29)中的一者作为R¹的单元数用z表示时,x、y和z满足由下式(2)表示的关系:

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

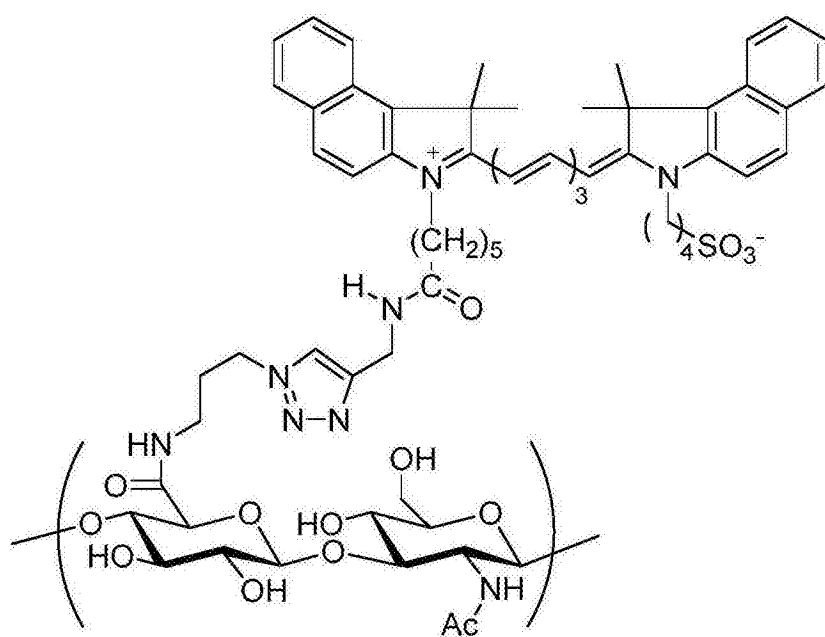
3. 根据权利要求2的聚合物,其中该聚合物含有至少一个具有通式(4)和通式(29)中的一者作为R¹的单元。

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

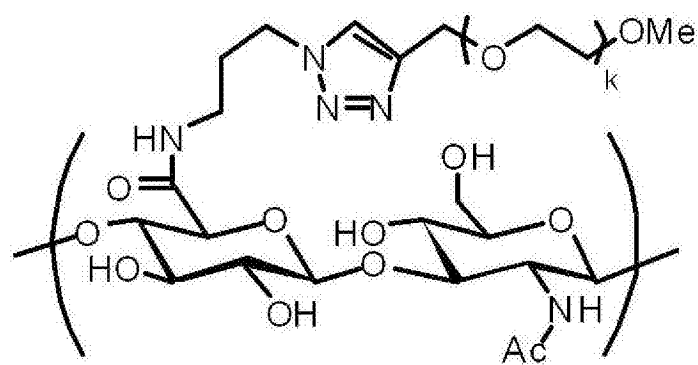
通式 (6)



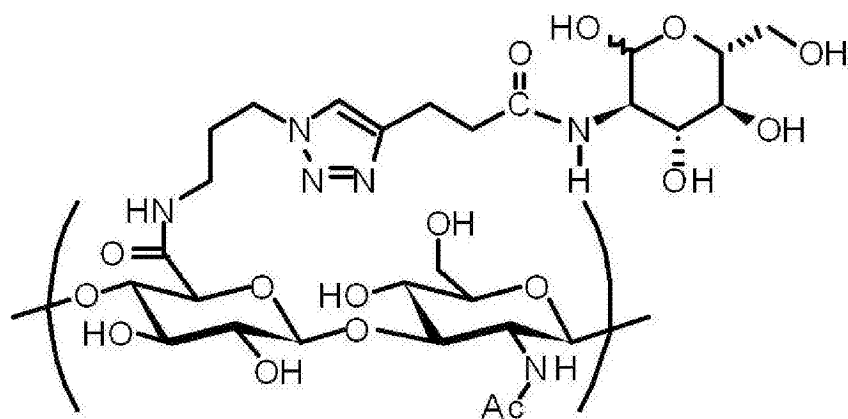
通式 (28)



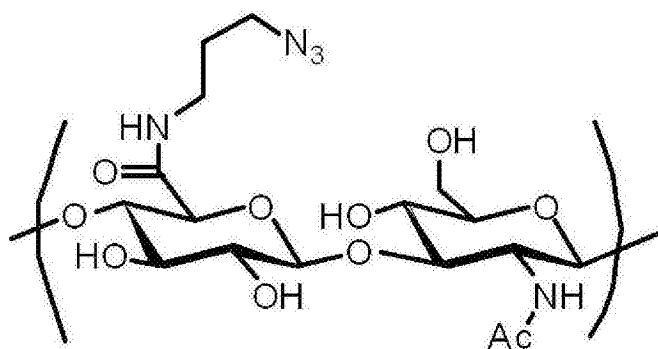
通式 (7)



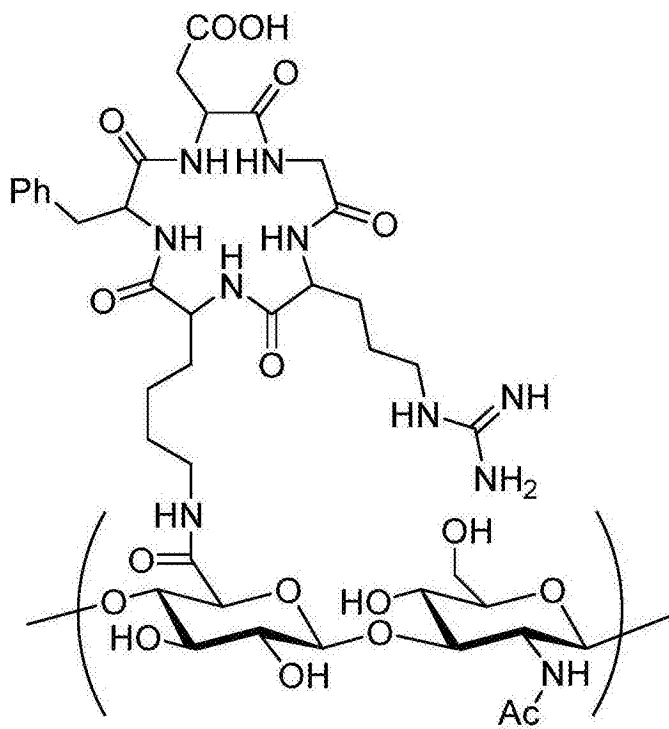
通式 (8)



通式 (9)



通式 (30)



5. 根据权利要求4的聚合物, 其中该聚合物中各自由通式 (6) 和通式 (28) 中的一者表示的单元数用 x 表示, 该聚合物中各自由通式 (7) 表示的单元数用 y 表示, 并且该聚合物中各自由通式 (8)、(9) 和 (30) 中的一者表示的单元数用 z 表示时, x 、 y 和 z 满足由下式 (2) 表示的关系:

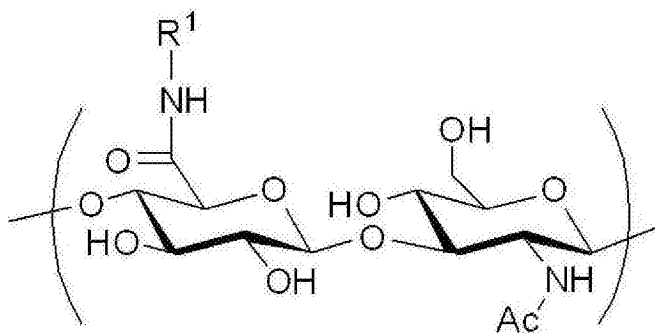
$$0.13 < x / (x + y + z) \leq 0.78 \quad \text{式 (2)}。$$

6. 聚合物, 包括由各自由通式 (1) 表示的单元形成的主链、吲哚花青绿衍生物和两亲性分子, 其中:

R^1 在单元与单元之间彼此独立; 和

该聚合物包含通式 (1) 中的 R^1 是吲哚花青绿衍生物的单元和通式 (1) 中的 R^1 是两亲性分子的单元这两者:

通式 (1)



条件是：各自具有卟啉花青绿衍生物作为 R^1 的单元数用 x 表示并且该聚合物中的全部单元数用 N 表示时， x 和 N 满足由下式(1)表示的关系：

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

7. 颗粒，包括根据权利要求1的聚合物。

8. 根据权利要求7的颗粒，其中该颗粒具有10nm-180nm的平均颗粒直径。

9. 光声成像用造影剂，包括：

根据权利要求1的聚合物；和
分散介质。

10. 光声成像用造影剂，包括：

根据权利要求7的颗粒；和
该颗粒的分散介质。

近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括其的光学成像用造影剂

技术领域

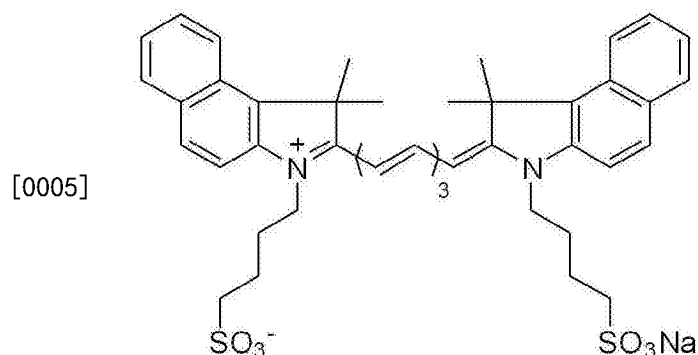
[0001] 本发明涉及近红外色素结合的透明质酸衍生物和包括该透明质酸衍生物的光学成像用造影剂。

背景技术

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

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

[0004] 通式(10)



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

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

[0008] 但是,已知ICG在血液中的半衰期为约几分钟,这是极短的。

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

[0010] 专利文献1报道了如下实例,其中通过使作为亲水性近红外色素的IR783与透明质酸结合来进行淋巴结的荧光体内成像。

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

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

[0013] 引用列表

[0014] 专利文献

[0015] PTL 1:US专利申请公开2008/0056999A

[0016] PTL 2:日本专利申请公开No.2006-25625

[0017] PTL 3:日本专利申请公开No.2009-155486

[0018] 非专利文献

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

发明内容

[0029] 技术问题

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

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

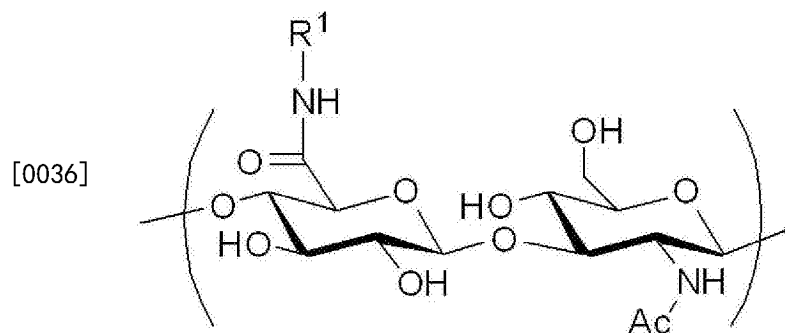
[0032] 此外,非专利文献2中公开的透明质酸衍生物的纳米颗粒已用聚乙二醇进行了改性,但导入色素的比例未知并且该文献没有公开任何有关其最佳值的内容。上述现有技术没有公开以高含量将近红外色素,例如ICG衍生物导入透明质酸的方法和分子设计以及用

于改善其在血液中的保持性和肿瘤积累性的分子设计。

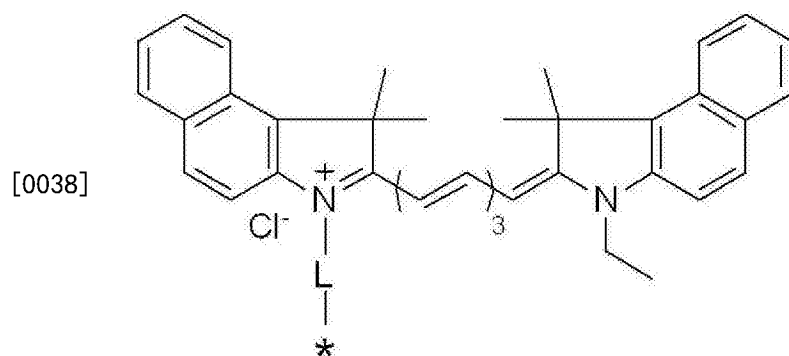
[0033] 问题的解决方案

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

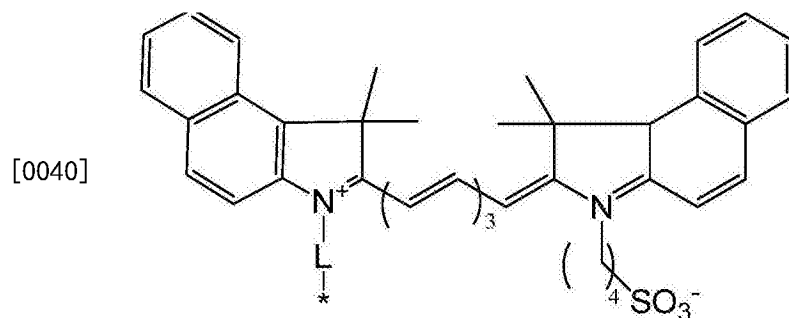
[0035] 通式(1)



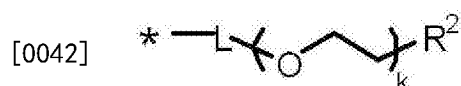
[0037] 通式(2)



[0039] 通式(25)



[0041] 通式(3)



[0043] 条件是:通式(2)、通式(3)和通式(25)中,L表示在单元与单元之间彼此独立的连接基,和*表示与通式(1)中的N的结合位置;和通式(3)中, R^2 表示H、OH、OMe、 NH_2 和COOH的任一个,和k表示20-200的整数。

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

附图说明

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

[0046] 图2表示透明质酸四丁基铵盐HA-NBu₄的合成路线。

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

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

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

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

[0051] 图7是表示相对于其对小鼠的注射剂量、色素的残留率的坐标图。

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

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

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

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

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

[0057] 图13表示衍生物1a的¹H-NMR图。

[0058] 图14表示衍生物2a (GA) 的¹H-NMR图。

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

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

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

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

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

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

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

谱。

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

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

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

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

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

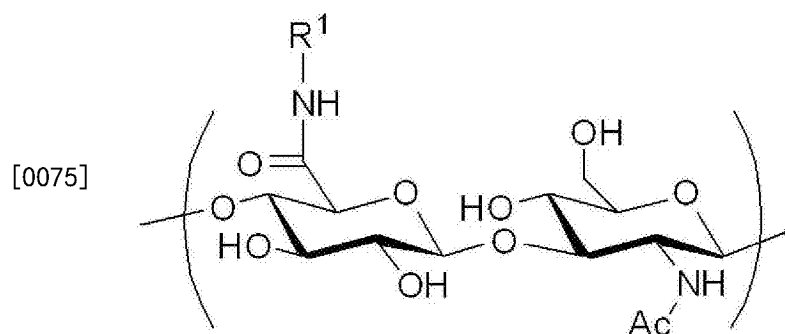
[0071] 图27表示具有ICG、PEG和RGD的透明质酸衍生物7 (通式 (31)) 的合成路线。

具体实施方式

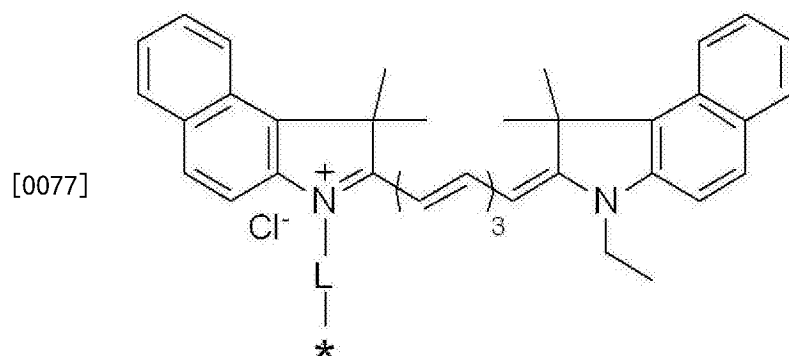
[0072] 对本发明的实施方案进行说明。根据本实施方案的化合物具有下述结构,其中使ICG衍生物与具有PEG的透明质酸结合,并且通过连接分子使PEG和ICG衍生物各自与透明质酸的骨架的葡萄糖醛酸单元中存在的羧基结合。

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

[0074] 通式 (1)

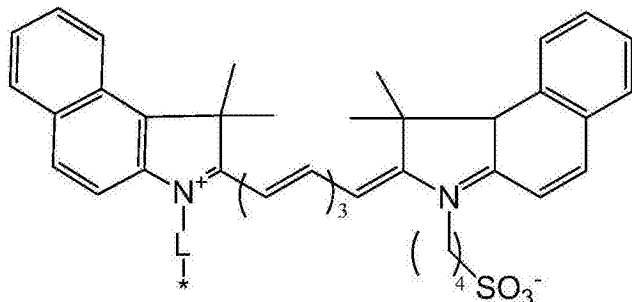


[0076] 通式 (2)

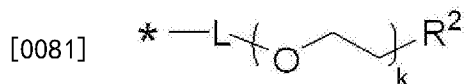


[0078] 通式 (25)

[0079]



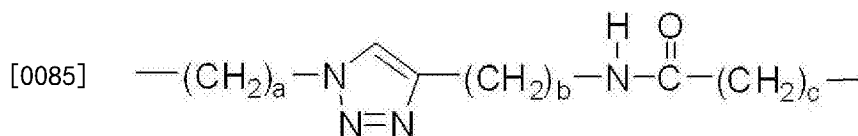
[0080] 通式 (3)



[0082] 条件是：通式 (2)、通式 (3) 和通式 (25) 中，L 表示在单元与单元之间彼此独立的连接基，和 * 表示与通式 (1) 中的 N 的结合位置；和通式 (3) 中， R^2 表示 H、OH、OMe、 NH_2 和 COOH 的任一个，和 k 表示 20-200 的整数。

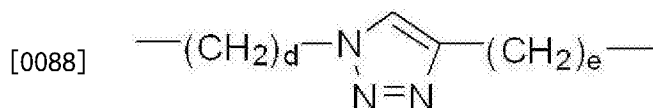
[0083] 此外，通式 (2)、(3) 和 (25) 中的连接基 L 可彼此相同或不同。连接基 L 的实例包括可被取代的具有 1-10 个碳原子的直链或支化烷基、和由下述通式 (22) - (24) 表示的结构。烷基的取代基为例具有 1-3 个碳原子的烷基、卤素原子、或氨基。

[0084] 通式 (22)



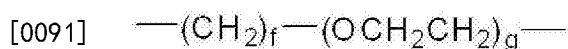
[0086] 通式 (22) 中，a、b 和 c 各自独立地表示 1-10 的整数。

[0087] 通式 (23)



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

[0090] 通式 (24)



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

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

[0094] $0.13 < x/N \leq 0.78$ 式 (i)

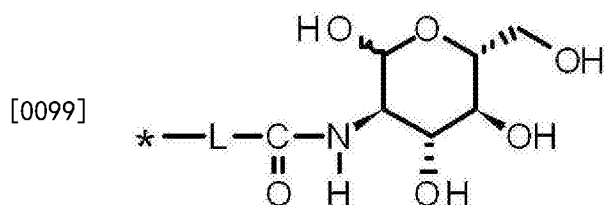
[0095] 此外，各自具有通式 (3) 作为 R^1 的单元数用 y 表示并且聚合物中的全部单元数用 N 表示时，y 和 N 优选地满足由下式 (iii) 表示的关系。

[0096] $0.22 < y/N \leq 0.99$ 式 (iii)

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

或 (25) 作为 R^1 的单元, 和至少一个具有通式 (3) 作为 R^1 的单元:

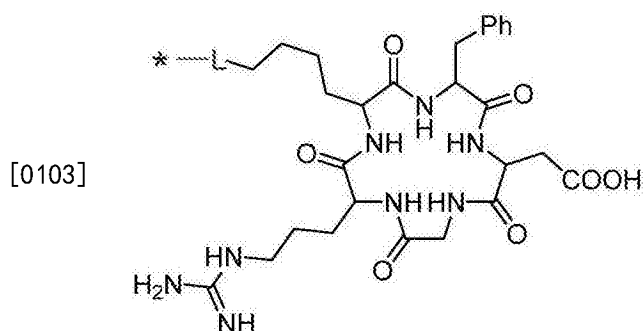
[0098] 通式 (4)



[0100] 通式 (5)

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

[0102] 通式 (29)



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

[0105] 进而, 根据本实施方案的透明质酸衍生物中, 各自具有通式 (2) 或 (25) 作为 R^1 的单元数用 x 表示, 各自具有通式 (3) 作为 R^1 的单元数用 y 表示, 并且各自具有通式 (4) 或 (29) 作为 R^1 的单元数用 z 表示时, x、y 和 z 优选地满足由下式 (ii) 表示的关系。

[0106] $0.13 < x / (x + y + z) \leq 0.78$ 式 (ii)

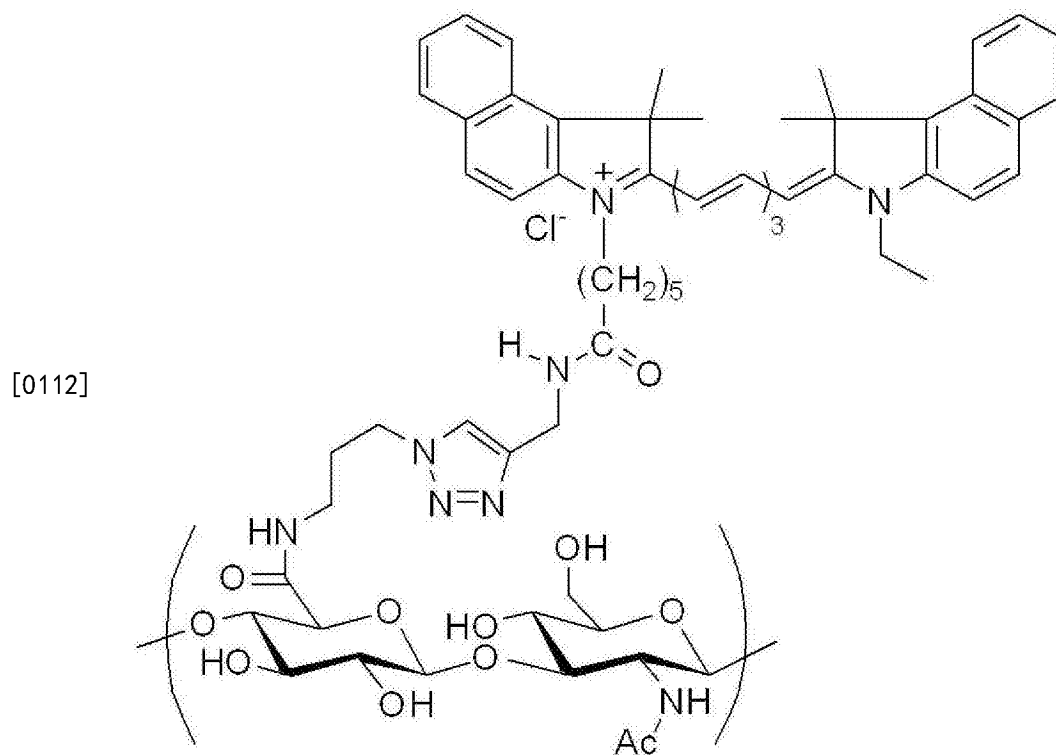
[0107] 此外, x、y 和 z 优选地满足由下式 (iii) 表示的关系。

[0108] $0.22 < y / (x + y + z) \leq 0.99$ 式 (iii)

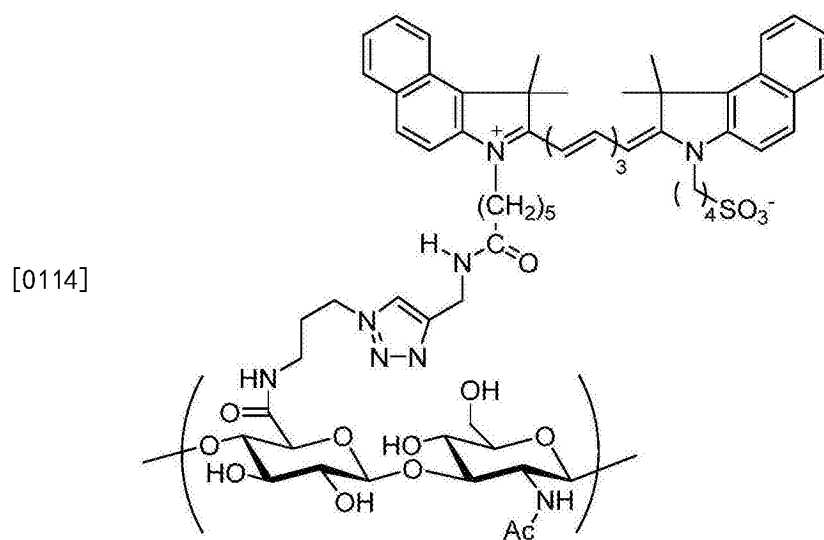
[0109] 此外, 根据本实施方案的透明质酸衍生物优选地含有至少一个具有通式 (4) 或 (29) 作为 R^1 的单元。

[0110] 根据本发明的又一实施方案, 提供透明质酸衍生物, 包括由各自由通式 (6) - (9)、(28) 和 (30) 的任一个表示的单元形成的聚合物, 其中该聚合物含有至少一个由通式 (6) 或 (28) 表示的单元和至少一个由通式 (7) 表示的单元。

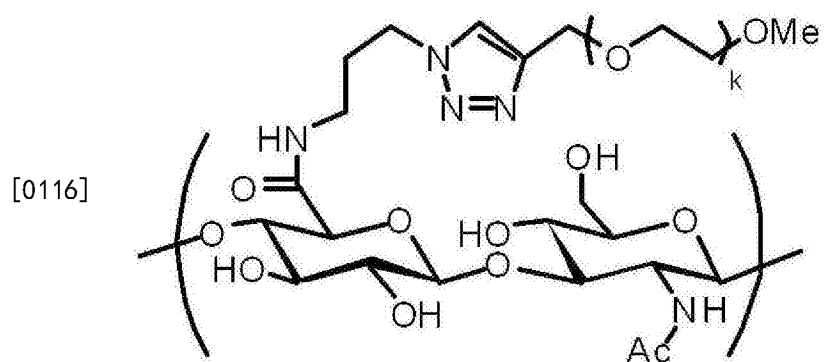
[0111] 通式 (6)



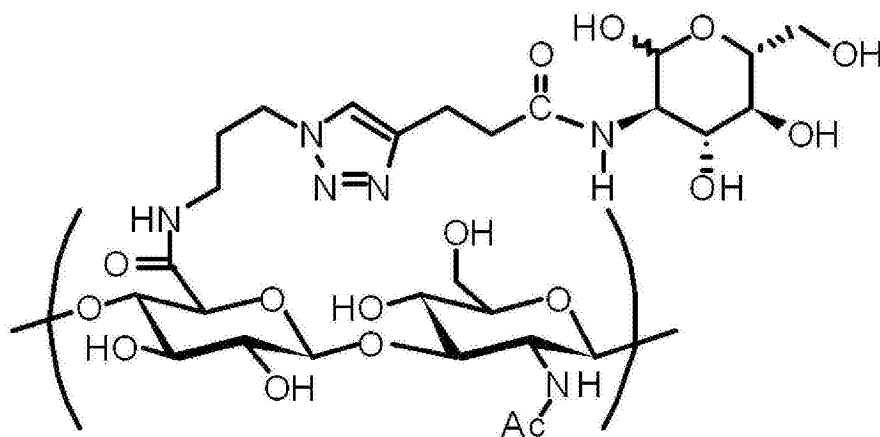
[0113] 通式(28)



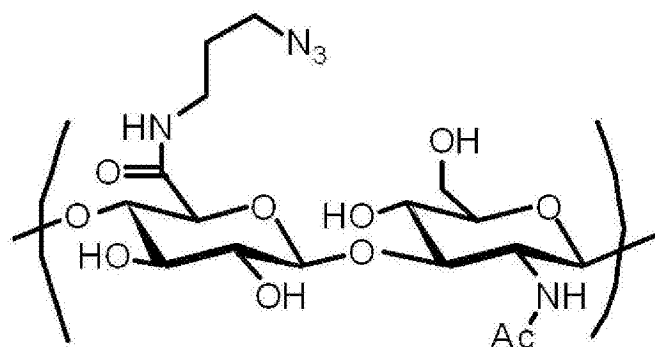
[0115] 通式(7)



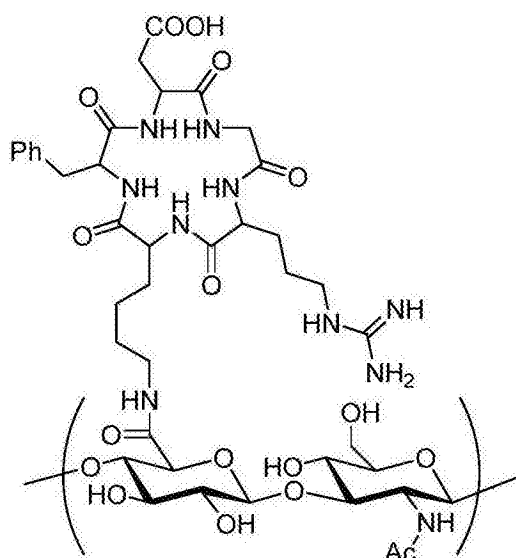
[0117] 通式 (8)



[0118] 通式 (9)



[0119] 通式 (30)



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

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

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

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

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

[0125] 应指出地是, 各自具有 ICG 类似物作为 R^1 的单元数用 x 表示并且聚合物中的全部单

元数用N表示时,x和N满足由下式(1)表示的关系。

[0126] $0.13 < x/N \leq 0.78$ 式(1)

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

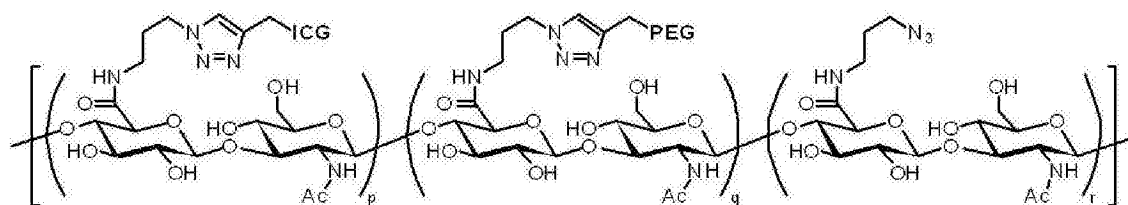
[0128] 根据本发明的实施方案的颗粒可以是这样的颗粒形状以致多个根据本发明的实施方案的化合物的分子聚集,并且色素部分(ICG衍生物)主要位于颗粒的内部且PEG部分主要位于颗粒的外部。

[0129] 以下通过具体例对有关本发明的实施方案的细节进行说明。

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

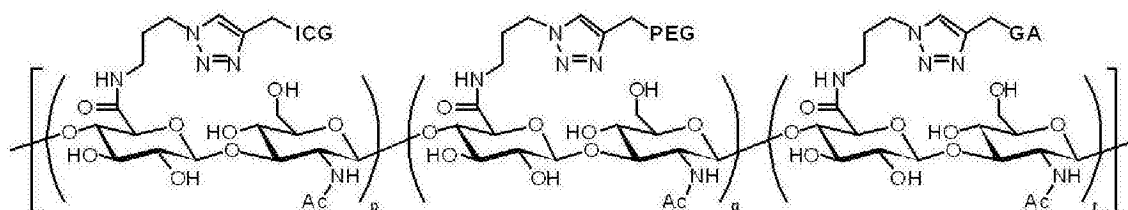
[0131] 通式(11)

[0132]



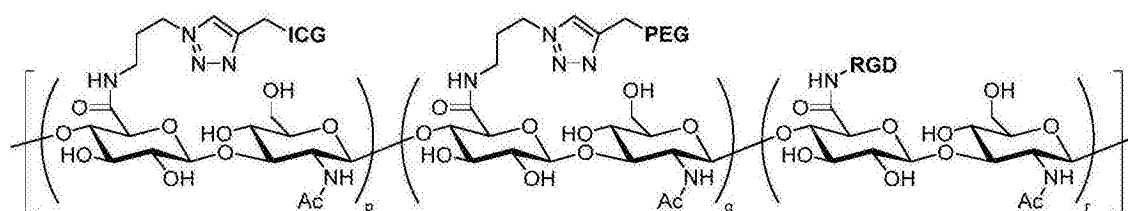
[0133] 通式(12)

[0134]



[0135] 通式(31)

[0136]



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

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

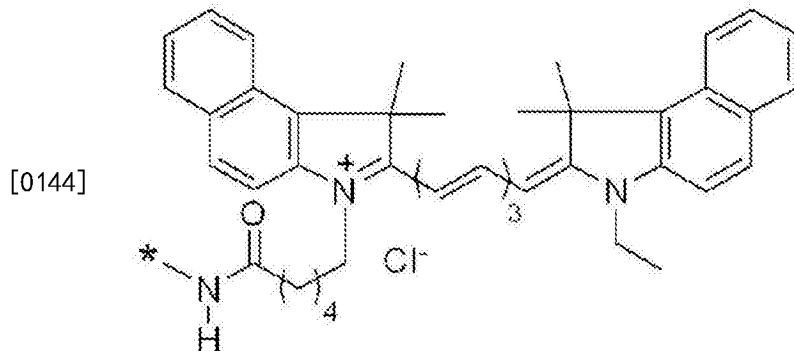
[0139] 即,将x、y和z的合计设为100时式(ii)中的x、y和z的值为p、q和r。

[0140] 通式(12)中,GA是下述通式(15)。

[0141] 通式(31)中,RGD是下述通式(32)。

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

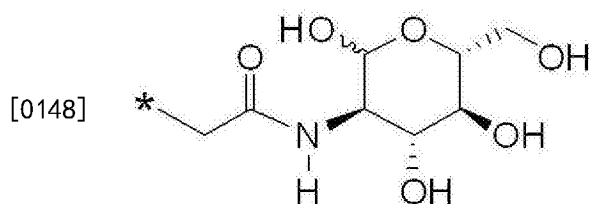
[0143] 通式(13)



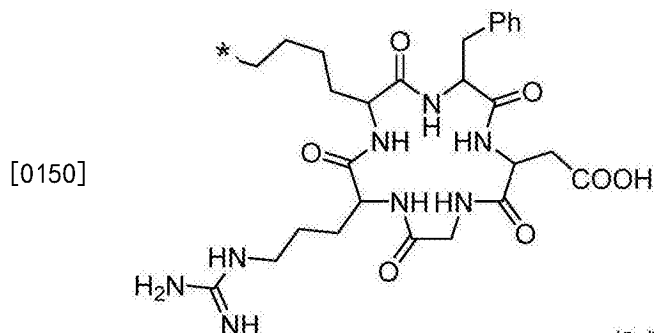
[0145] 通式(14)



[0147] 通式(15)



[0149] 通式(32)



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

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

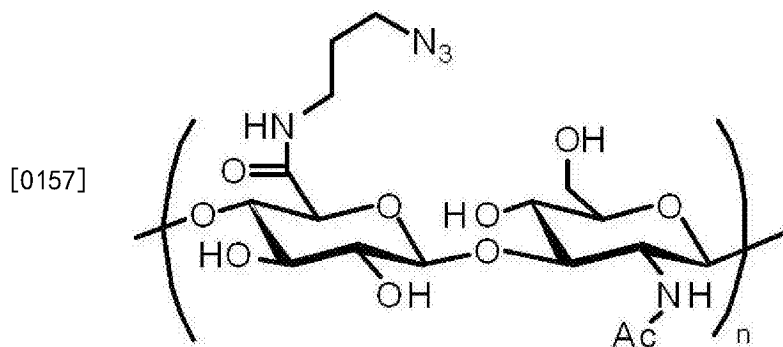
[0153] (透明质酸)

[0154] 根据本实施方案的化合物使用透明质酸作为其骨架。能够采用具有各种分子量的透明质酸,并且分子量优选落入2,500-110,000、特别地5,000-25,000的范围内。50,000以

上的分子量导致高粘度或者在溶剂中的溶解度的减小,因此适合使用通过使透明质酸的分子量减小而得到的具有这样的分子量的透明质酸。从其合成的再现性的观点出发,特别适合使用具有5,000-8,000的分子量的透明质酸。

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

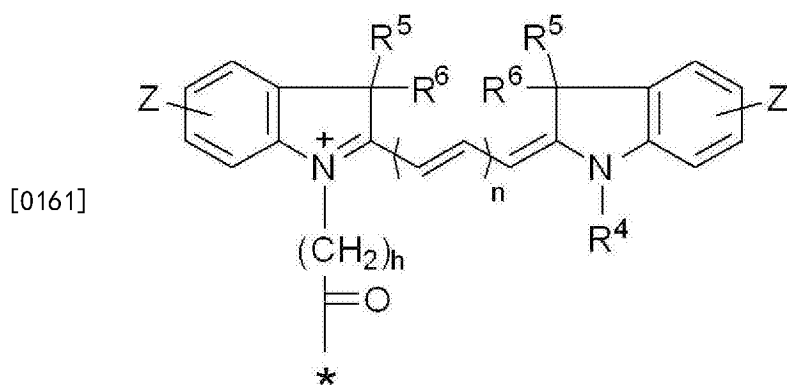
[0156] 通式(16)



[0158] (ICG衍生物)

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

[0160] 通式(17)

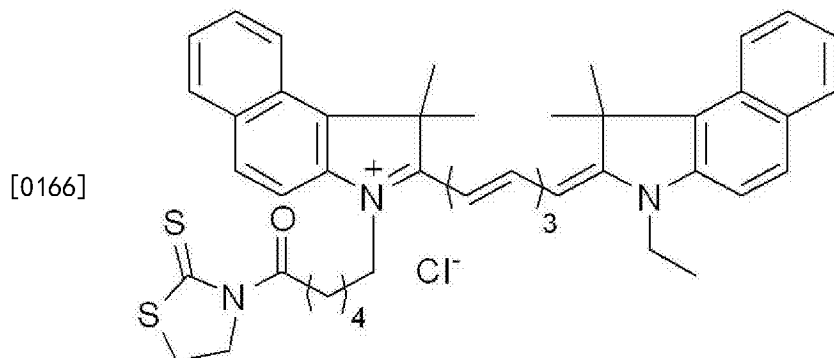


[0162] 通式(17)中,Z表示氢原子或磺基,或者与和Z键合的吡啶环一起形成由苯并[e]吡啶环、苯并[f]吡啶环或苯并[g]吡啶环形成的环状芳族环,并且该环状芳族环的氢原子可被具有1-10个碳原子的烷基、具有1-10个碳原子的烷氧基或磺基取代。尽管对通式(17)中的*结合的结构并无特别限制,但其实例为在由下述通式(18)或下述通式(19)表示的结构的相同位置与氮结合的结构。

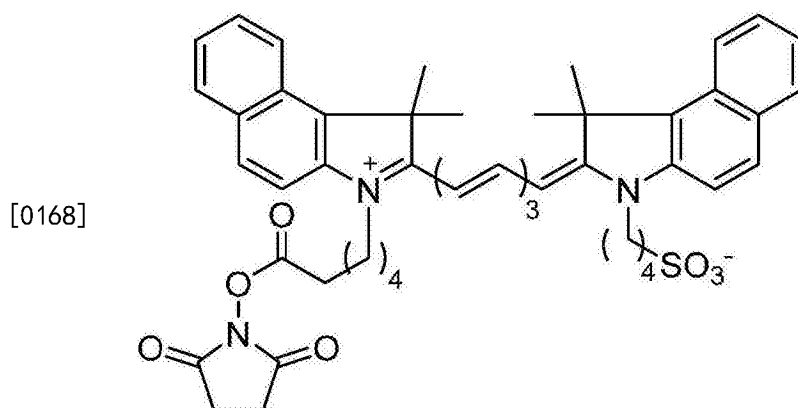
[0163] 通式(17)中, R^4 表示具有1-10个碳原子的烷基和 $-(CH_2)_i-SO_3^-$ (i表示1-10的整数的任一个)的任一个。 R^4 表示烷基时,可含有卤素离子或有机酸离子作为抗衡离子。 R^5 和 R^6 各自独立地表示氢原子、具有1-10个碳原子的烷基、具有1-10个碳原子的烷氧基、 $-(CH_2)_i-SO_3^-$ (i表示1-10的整数的任一个)和 $-(CH_2)_i-SO_3X$ (i表示1-10的整数的任一个,并且X表示钠、钾、铵、三乙基铵、赖氨酸和精氨酸的任一个)的任一个。通式(13)中,h表示1-10的整数的任一个。通式(17)中,n表示3。

[0164] 通式(17)的优选例包括由下述通式(18)表示的ICG衍生物(ICG-ATT)和由下述通式(26)表示的ICG衍生物(ICG-S-OSu)。

[0165] 通式(18)

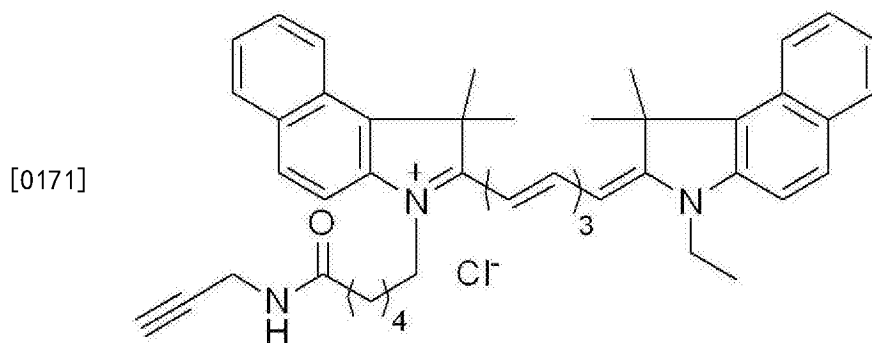


[0167] 通式(26)



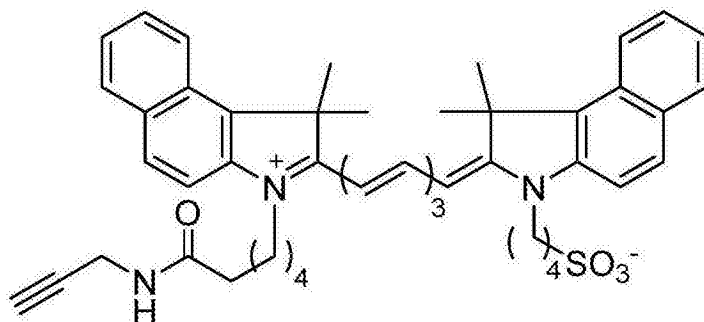
[0169] 具有炔烃的ICG衍生物能够用于ICG衍生物与具有叠氮基的透明质酸的结合。例如,能够使用由下式(19)或下式(27)表示的化合物。

[0170] 通式(19)



[0172] 通式(27)

[0173]

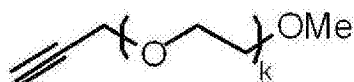


[0174] (PEG)

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

[0176] 通式(20)

[0177]



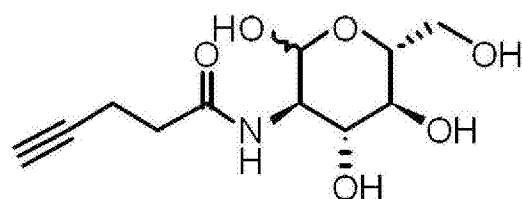
[0178] (靶分子)

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

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

[0181] 通式(21)

[0182]



[0183] (化合物的制备方法)

[0184] 本实施方案中的化合物能够通过采用已知的偶合反应使PEG和ICG衍生物与透明质酸衍生物的官能团结合而制备。例如,能够通过采用click反应使PEG和ICG衍生物与透明

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

[0185] (光学成像用造影剂)

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

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

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

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

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

[0191] (光声成像方法)

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

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

[0194] (b) 检测从该试样中存在的化合物产生的声波的步骤。

[0195] 此外,检测根据本实施方案的化合物的方法可包括如下步骤:由例如步骤(b)中得到的声波的波长、相位和时间信息重建空间光声信号强度分布。应指出地是,基于步骤(b)中得到的光声信号的波长、相位和时间信息,能够进行三维图像重建。由图像重建获得的数

据可采用任何形式,只要能够由该数据掌握光声信号的强度分布的位置信息。例如,该形式可以是使得光声信号强度被表示在三维空间上,或者可以是使得光声信号强度被表示在二维平面上。或者,能够采用下述:采用不同的成像方法获得关于相同的被观察对象的信息,然后获得这些各件信息与光声信号的强度分布之间的位置对应。

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

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

[0198] 只要光源能够用具有选自600nm-1,300nm的范围的至少一种波长的激光脉冲光照射试样,对步骤(b)中用光照射试样的光源并无限制。作为用激光脉冲光照射试样的装置,可给出例如钛蓝宝石激光器(LT-2211-PC,由LOTIS TII制造)、OP0激光器(LT-22140PO,由LOTIS TII制造)和变石激光器。

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

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

[0201] (透明质酸衍生物的制备方法)

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

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

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

[0205] (实施例1:含有近红外色素的透明质酸衍生物的合成)

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

[0207] 通过基于下述方法的分子量降低而得到具有5K、8K、25K和50K的分子量的HA-Na。将5.2克(13mmol)的HA-Na溶解于纯水(150mL)中。将6.6N的HCl水溶液(15ml)添加到该溶液中,然后在70℃下搅拌该混合物。预定的时间段后,用10%NaOH水溶液中和该混合物,然后通过蒸发将溶剂除去。将得到的白色固体溶解在水中,然后用具有1K的分子量截止的透析膜(Spectra/Por 6,由Spectrum Laboratories, Inc.制造)对该溶液进行透析24小时。随后,将产物冷冻干燥以提供2.9g(55%)的作为白色固体的HA-Na。通过对HA-Na进行酸处理分别历时6小时、4小时、3小时和2小时的反应时间,从而得到具有5K、8K、25K和50K的分子量

的HA-Na。

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

[0209] (实施例1(1)：发近红外光的化合物ICG-炔烃的合成)

[0210] 图1B表示发近红外光的化合物ICG-炔烃的合成路线。细节如下所述。将0.10克(0.32mmol)的已知的吲哚花青绿衍生物ICG-ATT(非专利文献3)装入50-ml单颈圆底烧瓶中，然后溶解于2ml的乙腈中。在0℃下将炔丙胺(25μL, 0.39mmol)添加到该溶液中，然后将该混合物搅拌2小时。将10毫升的0.1N盐酸添加到该溶液中，然后用CH₂Cl₂萃取水层。用饱和盐水溶液对有机层进行洗涤，然后用硫酸镁干燥。通过在减压下蒸发将溶剂除去，然后通过离心沉降(CH₂Cl₂/Et₂O)将得到的深绿色固体纯化。用小量的醋酸乙酯对该深绿色固体进行洗涤，然后在减压下干燥。然后，作为深绿色固体得到82mg(82%)的ICG-炔烃。通过¹H-NMR和FAB-MS进行其鉴别。结果如下：¹H-NMR(400MHz, CDCl₃, 25℃, TMS) δ/ppm; 1.47(t, J=6.9Hz, 3H), 1.57-1.70(m, 2H), 1.78-1.86(m, 2H), 1.86-1.96(m, 2H), 1.96(s, 6H), 2.00(s, 6H), 2.15(t, J=2.4Hz, 1H), 2.42(t, J=7.3Hz, 2H), 4.04(dd, J=2.4, 5.4Hz, 2H), 4.10-4.28(m, 4H), 6.11-6.20(m, 1H), 6.40-6.58(m, 1H), 6.62-6.76(m, 1H), 6.85-6.96(m, 1H), 7.04-7.13(m, 1H), 7.31(d, J=8.8Hz, 2H), 7.39(d, J=8.8Hz, 1H), 7.43-7.49(m, 2H), 7.56-7.63(m, 2H), 7.88-7.97(m, 6H), 8.06-8.14(m, 2H); FAB-HRMS m/e 660.3964[M]⁺。应指出地是，近红外区中ICG-炔烃的光吸收光谱如图1C中所示(溶剂：氯仿(1.0×10⁻⁶M))。该化合物在802nm具有吸收最大值。该化合物具有1.8×10⁵(M⁻¹cm⁻¹)的摩尔吸光系数。

[0211] (实施例1(2)：透明质酸四丁基铵盐HA-NBu₄的合成)

[0212] 高分子量HA-Na在有机溶剂中具有低溶解度，因此将其转化为对应的铵盐以进行各种转化反应(非专利文献4和非专利文献5)。本发明中使用的低分子量透明质酸钠盐HA-Na在有机溶剂中也几乎不溶，因此同样地将HA-Na转化为铵盐，然后用于缩合反应。以下对透明质酸四丁基铵盐HA-NBu₄的合成概要进行说明(图2)。将0.80克的低分子量透明质酸钠盐HA-Na(MW(HA-Na)=8K, 2.0mmol, 以最小单元计)装入100-ml单颈圆底烧瓶中，然后溶解于5ml水中。将用四丁基氢氧化铵进行了阳离子交换的阳离子交换树脂DOWEX(1.9g, 对应于4.0mmol)添加到该溶液中，然后在室温下将该混合物搅拌一夜。用玻璃过滤器已将DOWEX除去后，将滤液冷冻干燥以提供1.1g(85%)的作为白色固体的透明质酸四丁基铵盐HA-NBu₄。通过¹H-NMR(¹H-NMR(400MHz, D₂O, 25℃) δ/ppm; 0.81-0.85(br m, 12H), 1.22-1.27(br m, 8H), 1.53-1.54(br m, 8H), 1.88(s, 3H), 3.06-3.10(br m, 8H), 3.31-3.92(m, 10H), 4.45(br s, 2H))进行其鉴别。

[0213] 用具有2.5K和5K的分子量的HA-Na进行同样的反应以提供它们对应的产物。它们的收率分别为83%和99%。但是，具有25K、50K和110K的分子量的HA-Na均具有差的水溶解度，因此为了可得到它们对应的铵盐，需要增加使用的水量。它们的收率分别为62%、68%和64%。

[0214] (实施例1(3)：具有叠氮基的透明质酸衍生物3的合成)

[0215] 以下对透明质酸衍生物3的合成进行说明,透明质酸衍生物3具有用作用于用近红外色素、PEG、GA等改性的骨架的叠氮基(图3A)。在N₂气氛下,将0.25g的HA-NBu₄(MW(HA-Na)=8K,0.40mmol,以最小单元计)装入50-ml Schlenk烧瓶内,然后溶解于4.0ml的无水DMSO中。将1.7克(3.2mmol)的(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷并磷六氟磷酸盐(PyBOP)和0.43g(3.2mmol)的1-羟基苯并三唑(HOBt)添加到该溶液中。然后,添加0.64g(6.4mmol)的3-叠氮基-1-丙基胺(非专利文献6)并且将该混合物在室温下搅拌20小时。将水添加到该溶液中,用CH₂Cl₂对水层进行洗涤,并且用具有3.5K的分子量截止的透析膜对水层进行透析24小时。随后,将产物冷冻干燥以提供0.13g(70%)的作为白色固体的具有叠氮基的透明质酸衍生物3。通过¹H-NMR(¹H-NMR(400MHz, D₂O, 25°C) δ/ppm; 1.67(s, 2H), 1.87(s, 3H), 3.05-3.80(m, 14H), 4.37(m, 2H))进行其鉴别。图12表示作为非典型实例的衍生物3的NMR图。

[0216] 用具有2.5K、5K、25K、50K和110K的分子量的HA-Na进行同样的反应以提供它们的对应产物。它们的收率分别为85%、66%、99%、99%和99%(羧基的转化率大于99%)。但是,在相同条件下具有2.5K或110K的分子量的HA-NBu₄的反应中,羧基的转化率的再现性差。此外,具有110K的分子量的HA-NBu₄的反应需要使用15ml的DMSO并且与任何其他盐相比其对于缩合反应的反应性低。由这些结果发现,在本发明的含有近红外色素的透明质酸衍生物的合成中,优选5K-50K的分子量。

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

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

[0219]

表 1. 具有叠氮基的透明质酸衍生物 3 的合成

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

^a由 ¹H-NMR 的积分值计算。^b代替 HOBt 而使用 HOBt · H₂O。
^c与项目 7 相同的条件。再现性的确认。

[0220] (比较例1:具有ICG的透明质酸衍生物HA-ICG的合成)

[0221] 以下对作为比较例的只具有ICG的透明质酸衍生物HA-ICG的合成进行说明(图4A)。在N₂气氛下,将41mg的衍生物3(MW(HA-Na)=8K,0.10mmol,以最小单元计,叠氮化效率:~10%)装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。已将14mg(20μmol)的

ICG-炔烃添加到溶液中后,将3.8mg (20 μ mol)的CuI和3.0mg (20 μ mol)的1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)添加到该混合物中,然后将整体在60℃小搅拌一夜。将2毫升的水添加到该溶液中,然后用具有1K的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析24小时。用过滤器(孔直径:0.45 μ m)将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供22mg (51%)的作为淡绿色固体的具有ICG的透明质酸衍生物HA-ICG-a。通过¹H-NMR (¹H-NMR (400MHz, D₂O, 25℃) δ /ppm; 1.60-1.70 (m, 0.23H), 1.89 (brs, 3H), 3.20-3.85 (m, 11H), 4.30-4.50 (m, 2H)) 进行衍生物HA-ICG-a的鉴别。

[0222] 应指出地是,如下确定ICG部分的导入率:测定具有ICG的透明质酸衍生物的DMF-H₂O (1:1) 混合溶液的UV光谱,然后通过使用ICG-炔烃作为标准物质,基于在其最大吸收波长(790nm左右)下的吸光率确定该比率。此外,用基于ICG部分的导入率计算的分子量确定收率。HA-ICG-b具有低的ICG部分的导入率(每分子的导入率为1%),因此没有观察到颗粒形成(在动态光散射(DLS)中几乎没有观察到散射光)。

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

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

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

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

[0227] 通过同时使ICG-炔烃和PEG-炔烃(非专利文献7)与具有叠氮基的透明质酸衍生物3结合,能够各自得到各自具有ICG和PEG的各种透明质酸衍生物1(图4B和表2)。以下对典型的合成例进行说明。在N₂气氛下,将23mg的衍生物3 (MW (HA-Na) = 8K, 50 μ mol, 以最小单元计,叠氮化效率:>99%) 装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。已将8.8mg (13 μ mol)的ICG-炔烃和0.18g (88 μ mol)的PEG-炔烃添加到溶液中后,将2.9mg (15 μ mol)的CuI和2.3mg (15 μ mol)的DBU添加到该混合物中,然后将整体在60℃下搅拌一夜。将2毫升的水添加到该溶液中,然后用具有25K的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水进行透析24小时。用过滤器(孔直径:0.45 μ m)对得到的水溶液进行过滤,然后冷冻干燥以提供48mg (60%)的作为深绿色固体的具有ICG和PEG的透明质酸衍生物1。通过¹H-NMR (¹H-NMR (400MHz, D₂O, 25℃) δ /ppm; 1.80-2.15 (m, 3H), 3.10-3.90 (m, 183H), 4.30-4.50 (m, 2H), 7.93 (br s, 0.96H)) 进行其鉴别。图13表示作为典型实例的衍生物1的¹H-NMR图。

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

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

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

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

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

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

[0234] 冷冻干燥后在固态下贮存一段时间的透明质酸衍生物1显示水溶解性的极度下降。优选在冷冻干燥后制备衍生物1的水溶液。如下能够再次得到具有高水溶解性的透明质酸衍生物:将具有低水溶解性的衍生物1溶解于DMF中;将通过在相同体积的水中使DMF溶液分散而得到的溶液相对于水进行透析;和将产物冷冻干燥。

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

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

[0237]

表 2	透明质酸衍生物 No.	MW (HA-Na)	a/b	收率 (%) ^a	p: q: r ^b	D _{0.15} (nm) ^c	cac (× 10 ⁻¹ g/L)
	1a	8K	0.25/1.75	60	15: 85: 0		157 ± 38 7.9
	1b	8K	0.75/1.25	68	53: 47: 0	26 ± 6 ^d	120 ± 59 ^e 8.4
	1c	8K	1.00/1.00	81	66: 34: 0	27 ± 8 ^e	160 ± 76 ^e 9.2
	1d	8K	1.20/0.80	79	78: 22: 0		
	1e	5K	0.00/2.00	93	0: 100: 0		—
	1f	5K	0.05/1.95	84	1: 99: 0		157 ± 38 13
	1g	5K	0.10/1.90	60	3: 97: 0		206 ± 61 2.2
	1h	5K	0.25/1.75	68	12: 88: 0		275 ± 73 2.3
	1i	5K	0.50/1.50	81	34: 66: 0		209 ± 56 3
	1j	5K	0.20/0.20	70	14: 26: 60		248 ± 72 6.3
	1k	5K	0.20/0.40	78	8: 44: 48		236 ± 84 4
	1l	5K	0.20/0.80	76	12: 77: 11		199 ± 62 2.1
	1m	5K	0.40/0.40	74	25: 39: 36		179 ± 46 5
	1n	25K	0.20/0.80	32	11: 89: 0		29 ± 7 21

^a由基于 ICG 和 PEG 部分的导入率的分子重量计算。
^b由 UV-可见测定中吸光率和 ¹H-NMR 的积分值计算。
^c通过将透明质酸衍生物溶解在水中而制备纳米颗粒。通过动态光散射测定其颗粒直径。
^d两种颗粒在散射强度上基本上彼此相同。
表中所示的符号 “—” 意味着由于低散射光强度而未能进行测定。

[0238]

表 3 透明质酸衍生物的合成收率和再现性

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

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

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

酸衍生物3结合,能够各自得到各自含有ICG、PEG和GA的各种透明质酸衍生物2(图6和表4)。以下对典型的合成例进行说明。在N₂气氛下,将23mg的衍生物3(50μmol,以最小单元计,叠氮化效率:>99%)装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。将14mg(20μmol)的ICG-炔烃、40mg(20μmol)的PEG-炔烃和5.2mg(20μmol)的GA-炔烃已添加到该溶液后,将2.9mg(15μmol)的CuI和2.3mg(15μmol)的DBU添加到该混合物中,然后在60℃下将整体搅拌一夜。将2毫升的水添加到该溶液中,然后用具有25K的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析24小时。用过滤器(孔直径:0.45μm)将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供72mg(87%)的作为深绿色固体的具有ICG、PEG和GA的透明质酸衍生物2。通过¹H-NMR(¹H-NMR(300MHz,D₂O,25℃)δ/ppm;1.75-2.15(m,3H),2.55(br s,0.38H),2.80-3.10(m,0.93H),3.10-4.00(m,102H),4.25-4.50(m,2.4H),7.68(s,0.38H),7.93(br s,0.58H))进行其鉴别。图14表示衍生物2a(GA)的¹H-NMR图。

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

[0242]

表 4

衍生物 No.	MW (HA-Na)	a/b/c	收率 (%) ^a	p: q: r ^b	D _{DLS} (nm) ^c	D _{DLS} (nm) ^d	D _{DLS} (nm) ^e	CAC (×10 ⁻⁴ g/L)
2a (GA)	8K	0.40/0.40/0.40	87	15:47:38	35±9	158±38	190±105	6.9
2b (GA2)	8K	0.50/0.70/0.20	65	13:79:8	24±5 ^f 90±19 ^f	88±21	122±36	4.6
2c (GA4)	8K	0.50/0.30/0.70	67	16:26:58	-	146±38	132±40	11
2e (GA5)	8K	0.80/0.60/0.60	59	41:32:27	155±37	108±37	313±109	8.8
2d (GA3)	5K	0.60/0.80/0.30	52	28:52:20	-	-	155±38	3.6
2f (GA6)	5K	0.80/0.60/0.30	79	45:42:13	-	-	193±46	2.1
2g (GA7)	5K	1.00/0.60/0.40	66	58:23:19	122±31	64±23	162±71	5.2

^a由基于 ICG、PEG 和 GA 部分的导入率的分子量子量计算。

^b由 UV-可见测定中吸光率和 ¹H-NMR 的积分值计算。

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

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

^e如下制备纳米颗粒：将溶解于 CHCl₃ 中的透明质酸衍生物分散在水中；和在减压下通过蒸发将 CHCl₃ 除去。用超声波对得到的水溶液照射 30 分钟后通过动态光散射测定其颗粒直径。

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

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

约35nm的直径的颗粒。以下,将该样品称为“2as (GAs)”。已在DMF中充分分散的衍生物2a (GA) 在水中的分散导致具有约158nm的直径的颗粒的形成。以下,将具有158nm的直径的颗粒称为“2a (GA)”。上述暗示通过形成纳米颗粒的方法能够控制颗粒直径。在透明质酸衍生物2b (GA2) 和2g (GA7) 的每个中,通过包括使用DMF的颗粒形成方法,得到了具有100nm以下的直径的颗粒。尽管存在如透明质酸衍生物2d (GA3) 和2f (GA6) 这样的样品,其中由于低散射强度,在包括使用水或DMF的颗粒形成方法中未能观察到颗粒形成,但包括将透明质酸衍生物的CHCl₃溶液分散于水中、然后通过蒸发将CHCl₃除去的方法可应用于任何样品并且观察到颗粒形成。但是,在任何情形下,形成的颗粒限制在较大的具有120nm以上的颗粒直径的颗粒。由上述结果发现,ICG导入率低下约15%时,通过增加ICG导入率或者增加PEG导入率,得到了具有较小直径的颗粒。

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

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

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

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

[0248] 以下对涉及PEG的导入的实验例进行说明。将PEG-炔烃(3当量)已添加到衍生物3(MW(HA-Na)=8K,叠氮化效率:100%)的水溶液(5ml)后,将抗坏血酸钠(20mol%)和硫酸铜五水合物(40mol%)的DMF溶液(5ml)添加到该混合物中,然后在27℃下将整体搅拌一夜。用具有3.5K的分子量截止的透析膜对于溶液相对于水进行透析24小时。将产物冷冻干燥并且通过用己烷/CHCl₃(7:10)的再沉积进行纯化以提供作为淡棕色固体的具有PEG(58%)的透明质酸衍生物。如上所述,能够导入PEG。

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

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

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

[0251] (实施例2:血液中的保持性的评价)

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

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

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

[0255] (实施例3:通过荧光成像的肿瘤造影能力的评价)

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

效性。

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

[0258] (实施例4:肿瘤积累性的评价)

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

[0260] (实施例5:光声信号的测定)

[0261] 测定上述的实施例1中得到的化合物的光声信号。作为比较例,对ICG的水溶液同样地进行测定。如下进行光声信号的测定:用脉冲激光照射样品的水溶液;用压电元件检测来自样品的光声信号;用高速前置放大器将信号放大;和用数字示波器获得该放大的信号。测定的具体条件如下所述。将钛蓝宝石激光器(由Lotis Ltd.制造)用作光源。将激光波长设定为720nm和790nm,并且对于用于比较的ICG的水溶液,将波长设定为710nm和780nm。这是因为下述原因:样品的水溶液具有两个吸收带,例如,在上述实施例1中得到的各个化合物中,在720nm和790nm处观察到吸收峰。图16A示出典型样品1a、1b、1c和2as(GAs)以及用于比较的ICG的吸收光谱。采用如下条件:能量密度 $12\text{mJ}/\text{cm}^2$,脉冲宽度20纳秒,和10Hz的脉冲重复。将Model V303(由Panametrics-NDT制造)用作超声换能器。采用1MHz的中央带、 $\phi 0.5$ 的元件尺寸、25mm的测定距离(非聚焦)和+30dB的放大率(Ultrasonic Preamplifier Model 5682,由Olympus Corporation制造)的条件。测定容器为由聚苯乙烯制成的试管,并且具有0.1cm的光程长度和约 $200\mu\text{l}$ 的样品体积。将水用作溶剂。将DPO4104(由TEKTRONIX, INC.制造)用作测定装置,并且在下述条件下进行测定:触发器:用光电二极管对光声光的检测;和数据获取:平均128次(128脉冲)。图16B表示在790nm的激光波长下典型样品1a的光声信号(电压)的时间变化光谱。此外,图17表示用它们的吸光率归一化的本发明的化合物和用于比较的ICG的光声信号的强度。本文中使用的术语“用它们的吸光率归一化”意味着用施加的激光的强度(J)和在激光的波长下样品的吸光率去除实际得到的电压值(V)。如由

图17中可以看到那样,本发明的所有化合物能够发出光声信号并且能够提供与用于比较的ICG相当或比其高的光声信号强度。光声信号强度变得高于ICG的可能原因是上述实施例1中得到的本发明的化合物使用疏水性ICG衍生物并且色素自身的热转化效率高于ICG。另一个可能的原因是由于其疏水性,色素的分子强烈地凝聚,或者由下述事实引起的热捕集效应可能具有某种贡献:用透明质酸将色素与作为介质的水屏蔽开。本实施例的结果已确认本发明的化合物作为光声造影剂发挥功能。

[0262] 图18表示透明质酸单元的表现分子量、与透明质酸结合的ICG衍生物数目、整个聚合物的分子量、和在用于本发明的化合物的790nm下透明质酸衍生物的吸光系数。本发明中,能够使大量的ICG衍生物与透明质酸结合,因此能够对透明质酸赋予高光吸收能力。结果,成功地得到能够发出强光声信号的化合物。而且,本发明的透明质酸衍生物能够形成纳米颗粒,因此其作为纳米颗粒的吸光系数变得显著地高。即,该纳米颗粒可含有至少 10^{-1} ,000个透明质酸衍生物分子,因此该纳米颗粒具有比透明质酸衍生物分子高 10^{-1} ,000倍的吸光系数。具体地,该颗粒可具有 10^6 - 10^8 的数量级的吸光系数(假设透明质酸衍生物分子的体积为约11,000nm³,计算该系数时)。

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

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

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

[0266] (实施例6(1):近红外色素ICG-S-炔烃的合成)

[0267] 图21B表示近红外色素ICG-S-炔烃的合成。首先,将0.62g (0.75mmol)的日本专利申请公开No.1997-124599中公开的吲哚花青绿衍生物ICG-S-OSu装入50-ml单颈圆底烧瓶中,然后溶解在2ml的乙腈中。在0℃下将炔丙胺(58μL,0.90mmol)添加到该溶液中,然后将该混合物搅拌2小时。将10毫升的0.1N盐酸添加到该溶液中,然后用CH₂Cl₂萃取水层。用饱和盐水溶液洗涤有机层,然后用硫酸镁干燥。在减压下通过蒸发将溶剂除去,然后通过离心沉降(CH₂Cl₂/Et₂O)对得到的深绿色固体进行纯化。用少量的醋酸乙酯对该深绿色固体进行洗涤,然后在减压下干燥。然后,作为深绿色固体,得到了0.63g (93%)的ICG-S-炔烃。通过¹H-NMR和FAB-MS进行其鉴别。

[0268] 结果如下所述:¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, 25℃, TMS) δ/ppm; 1.51 (t, J=6.4Hz, 2H), 1.71 (t, J=7.3Hz, 2H), 1.86 (t, J=6.4Hz, 2H), 1.91-2.15 (m, 2H), 2.00 (s, 12H), 2.22 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.67 (s, 1H), 2.91 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.40-3.57 (m, 2H), 3.90 (d, J=2.3Hz, 2H), 4.10-4.32 (m, 4H), 6.21-6.36 (m, 1H), 6.36-6.49 (m, 1H), 6.53-6.76 (m, 2H), 7.39-7.51 (m, 2H), 7.54 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.57-7.78 (m, 3H), 7.88-8.13 (m, 6H), 8.13-8.38 (m, 2H); FAB-HRMS m/e 767.3757 [M]⁺。

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

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

[0271] 通过同时使ICG-S-炔烃和PEG-炔烃与具有叠氮基的透明质酸衍生物3结合,能够各自得到各自具有ICG-S和PEG的各种透明质酸衍生物4(图22和表5)。以下对典型的合成例进行说明。在 N_2 气氛下,将23mg的衍生物3($\text{MW}(\text{HA-Na}) = 5\text{K}$, $50 \mu\text{mol}$,以最小单元计,叠氮化效率: $>99\%$)装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。已将38mg ($50 \mu\text{mol}$)的ICG-S-炔烃和0.10g ($50 \mu\text{mol}$)的PEG-炔烃添加到该溶液后,将2.9mg ($15 \mu\text{mol}$)的CuI和2.3mg ($15 \mu\text{mol}$)的DBU添加到该混合物中,然后在 60°C 下将整体搅拌一夜。将2毫升水添加到该溶液中,然后用具有25K的分子量截止的透析膜对于该混合物相对于水进行透析24小时。用过滤器(孔直径: $0.45 \mu\text{m}$)对得到的水溶液进行过滤,然后冷冻干燥以提供83mg (79%)的作为深绿色固体的具有ICG-S和PEG的透明质酸衍生物4b。通过 $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O , 25°C) δ/ppm : 1.80-2.16 (m, 3H), 3.10-4.01 (m, 633H), 4.25-4.60 (m, 1H), 7.93 (br s, 0.98H)) 进行其鉴别。

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

[0273] 透明质酸衍生物4a、4b和4c的cac分别为2.6、3.0和3.9 ($\times 10^{-4} \text{g/L}$)。

[0274] 表5.具有ICG-S和PEG的透明质酸衍生物4的合成

[0275]

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

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

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

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

[0279] (实施例7(1):PEG-5K-炔烃的合成)

[0280] 以下对PEG-5K-炔烃的合成进行说明(图23B)。将10克(2.0mmol)的可商购的mPEG5000装入200-ml两颈圆底烧瓶中,然后在减压下在100℃下干燥一夜。将干燥产物静置以冷却到55℃,然后溶解在80ml的THF中。将4-戊炔酸(0.79g,8.0mmol)已添加到该溶液中后,将0.83g(4.0mmol)的DCC和73mg(0.6mmol)的DMAP添加到该混合物中,然后在55℃下将整体搅拌一夜。将产物静置以冷却到室温后,用玻璃过滤器将不溶固体除去。向滤液中添加过量的二乙醚提供白色固体。用玻璃过滤器将该固体与滤液分离,然后用二乙醚洗涤以提供8.1g(81%)的作为白色固体的PEG-5K-炔烃。通过¹H-NMR进行其鉴别。结果如下:(¹H-NMR(400MHz,CDCl₃,25℃,TMS) δ/ppm;1.97-2.01(m,1H),2.47-2.55(m,2H),2.55-2.64(m,2H),3.40-3.92(m,591H),4.26(t,J=5.0Hz,2H))。

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

[0282] 通过同时使ICG-炔烃和PEG-5K-炔烃与具有叠氮基的透明质酸类似物3结合,能够各自得到各自具有ICG和PEG-5K的各种透明质酸衍生物5(图24A和表6)。以下对典型的合成例进行说明。在氮气氛下,将23mg的衍生物3(MW(HA-Na)=5K,50μmol,以最小单元计,叠氮化效率:>99%)装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。将26mg(38μmol)的ICG-炔烃和0.31g(63μmol)的PEG-5K-炔烃已添加到该溶液中后,将2.9mg(15μmol)的CuI和2.3mg(15μmol)的DBU添加到该混合物中,然后在60℃下将整体搅拌一夜。将2毫升的水添加到该溶液中,然后用具有25K的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水透析24小时。用过滤器(孔直径:0.45μm)将得到的水溶液过滤,然后冷冻干燥以提供0.27g(63%)的作为深绿色固体的具有ICG和PEG-5K的透明质酸衍生物5。通过¹H-NMR(¹H-NMR(400MHz,D₂O,25℃) δ/ppm;1.65-2.10(m,3H),2.54(br s,0.6H),2.82-3.05(m,1.3H),3.15-4.00(m,395H),4.25-4.50(m,2H),7.72(s,0.65H),7.93(br s,0.15H)进行其鉴别。

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

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

[0285] 表6.具有ICG和PEG-5K的透明质酸衍生物5的合成

[0286]

聚合物 No.	a/b	收率(%) ^a	p: q ^b	D _{DLS} (nm) ^c
5a	0.75/1.25	63	28: 72	84 ± 28
5b	1.00/1.00	63	45: 55	84 ± 27

[0287] ^a由基于ICG和PEG-5K部分的导入率的分子量计算。

[0288] ^b由UV-可见测定中吸光率和¹H-NMR的积分值计算。

[0289] ^c将聚合物溶解在水中后通过动态光散射确定。

[0290] (实施例8:具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物6的合成)

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

[0292] 通过同时使ICG-炔烃和PEG-炔烃与具有叠氮基的透明质酸类似物3结合,能够各自得到各自具有ICG和PEG的高分子量透明质酸衍生物6(图24B和表7)。以下对典型的合成例进行说明。在氮气氛下,将23mg的衍生物3(MW(HA-Na)=25K,50μmol,以最小单元计,叠氮化效率:>99%)装入25-ml Schlenk烧瓶中,然后溶解于2ml的无水DMF中。将17mg(25μmol)的ICG-炔烃和0.15g(75μmol)的PEG-炔烃已添加到该溶液中后,将2.9mg(15μmol)的CuI和2.3mg(15μmol)的DBU添加到该混合物中,然后将整体在60℃下搅拌一夜。将2毫升的水添加到该溶液中,然后用具有25K的分子量截止的透析膜对该混合物相对于水进行透析24小时。用过滤器(孔直径:0.45μm)对得到的水溶液进行过滤,然后冷冻干燥以提供42mg(35%)的作为深绿色固体的具有ICG和PEG的透明质酸衍生物6。通过¹H-NMR(¹H-NMR(400MHz,D₂O,25℃)δ/ppm;1.71-2.13(m,3H),3.22-4.00(m,390H),4.30-4.53(m,2H),7.93(br s,0.99H))进行其鉴别。

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

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

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

[0296] 表7.具有近红外色素的高分子量透明质酸衍生物6的合成

[0297]

聚合物 No.	a/b	收率 (%) ^a	p: q ^b	D _{DLIS} (nm)	
6a	0.50/1.50	35	4: 96	26 ± 6 ^{c, d}	150 ± 77 ^{c, d}
6b	0.75/1.25	34	16: 84		111 ± 45 ^e

[0298] ^a由基于ICG和PEG部分的导入率的分子量计算。

[0299] ^b由UV-可见测定中吸光率和¹H-NMR的积分值计算。

[0300] ^c将聚合物溶解在水中后通过动态光散射确定。

[0301] ^d两种颗粒之间的散射强度比为1:2。

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

[0303] (实施例9:通过荧光成像的肿瘤造影能力的评价)

[0304] 采用与上述实施例3相同的方法对上述实施例6-8中得到的化合物评价它们的肿瘤造影能力。关于已将透明质酸衍生物4a、4b、4c、5a、5b和6b给药的小鼠的全身荧光图像,在给药后24小时,用IVIS(商标)Imaging System 200系列(XENOGEN)获得小鼠的亮场图像和荧光图像。注射剂量为50nmol每个小鼠,以色素量计,并且作为100μL的PBS溶液将色素注

入每个小鼠的尾部静脉。图25A示出给药后24小时小鼠的荧光图像。在所有样品中观察到图25A中用白色箭头表示的肿瘤位置处的荧光信号。结果显示本发明的透明质酸衍生物能够对肿瘤造影并且作为肿瘤的光学成像用造影剂显示其有效性。

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

[0306] (实施例10:肿瘤积累性和血液中色素残留率的评价)

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

[0308] (实施例11:光声信号的测定)

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

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

[0311] 如下所述测定从患有癌症的小鼠的肿瘤位置的光声信号的强度。使用可商购的光声成像装置(Nexus 128,由Endra Inc.制造)。将光的波长设定为790nm。在本发明的化合物的给药前和给药后24小时测定来自肿瘤位置的光声信号,然后对每个信号获得三维重组数据。用得到的三维重组数据和软件(GEHC MICROVIEW,GE Healthcare)定作为关注区域(ROI)的整个测定区域(2cm×2cm×2cm)的光声强度。将实施例3中所述的小鼠用作患有癌症的小鼠。将根据本发明的实例的化合物1a、1c、1i、2c、2g、4a和4b和作为对照的生理盐水药。对于注射剂量的每种化合物,将50nmol的ICG给药于小鼠。

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

像。

[0313]

表 8. 化合物的给药前后来自肿瘤位置的光声信号的强度之比

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

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

[0315] 通过将环状RGD肽导入相对于透明质酸衍生物3(表1,项目No.3)未反应的HA的羧基部分,其中已将3-叠氮基-1-丙基胺部分地导入HA,其在实施例1(4)中得到,从而合成具有叠氮基和RGD的透明质酸衍生物,然后进行ICG和PEG与衍生物的结合(图27)。以下对具体实施例进行说明。

[0316] 通过使12mg的在表1的项目No.3的条件下得到的其90%的基团已结合有3-叠氮基-1-丙基胺的透明质酸衍生物(MW(HA-Na)=8K,30 μ mol,以最小单元计)进行实施例1(2)中所述的反应,从而进行阳离子交换。随后,在氮气氛下,将9.7mg的得到的白色固体(20 μ mol,以最小单元计)装入25-mL Schlenk烧瓶中,然后溶解于0.50ml的无水DMSO中。将9.5毫克(18 μ mol)的PyBOP和2.4mg(18 μ mol)的HOBt添加到该溶液中。然后,将11mg(18 μ mol)的环状RGD肽(RGD-NH₂)的1.1ml的DMSO溶液添加到该混合物中,然后在室温下将整体搅拌18小时。将水添加到该溶液中,用CH₂Cl₂洗涤水层,并且用具有3.5K的分子量截止的透析膜对水层进行透析24小时。以两阶段将产物冷冻干燥以提供6.5mg(43%)的作为白色固体的透明质酸衍生物,其中叠氮基的导入效率和RGD的导入效率分别为90%和10%。通过¹H-NMR进行其鉴别。应指出地是,由透明质酸中N-乙酰基(Ac)的3H(1.87ppm)与RGD的苯基丙氨酸中苯基(Ph)的5H(7.05-7.28ppm)之比,计算RGD的导入效率。结果如下:¹H-NMR(400MHz,D₂O,25 $^{\circ}$ C) δ /ppm;1.69(s,1.8H),1.88(s,3H),3.00-3.85(m,14H),4.39(m,2H),7.05-7.28(m,0.50H)。

[0317] 接下来,使ICG-炔烃和PEG-炔烃作用于在与实施例1(5)的那些相同的反应条件下在上述得到的具有叠氮基和RGD的透明质酸衍生物以以53%的收率提供具有ICG、PEG和RGD的透明质酸衍生物7(图27)。ICG、PEG和RGD之间的导入率为17:73:10。通过¹H-NMR(¹H-NMR(400MHz,D₂O,25 $^{\circ}$ C) δ /ppm;1.70-2.15(m,3H),3.10-4.00(m,261H),4.25-4.50(m,2H),7.94(br s,0.89H))进行其鉴别。应指出地是,通过本申请说明书的[0079]中记载的方法确定环化反应的转化率。水中自组装形成的所得化合物具有94 $\pm$ 68nm的颗粒直径和4.0 $\times$ 10⁻⁴g/l的临界凝聚浓度。

[0318] 本发明的有利效果

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

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

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



图2

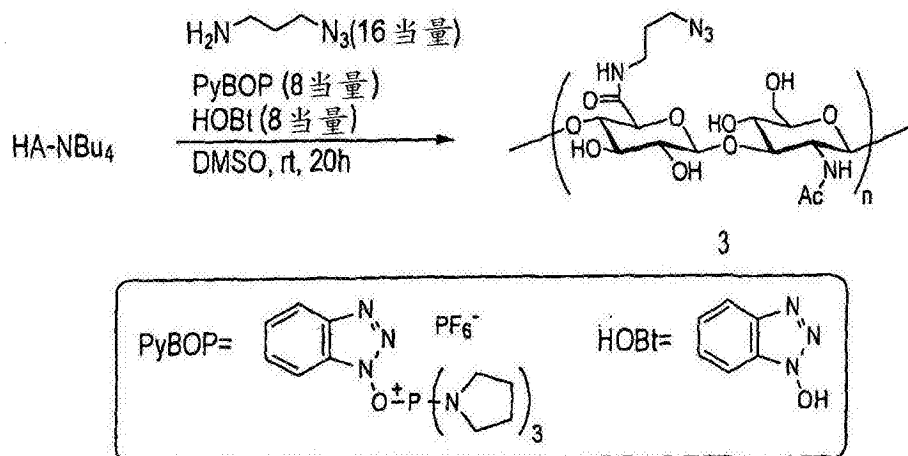


图3A

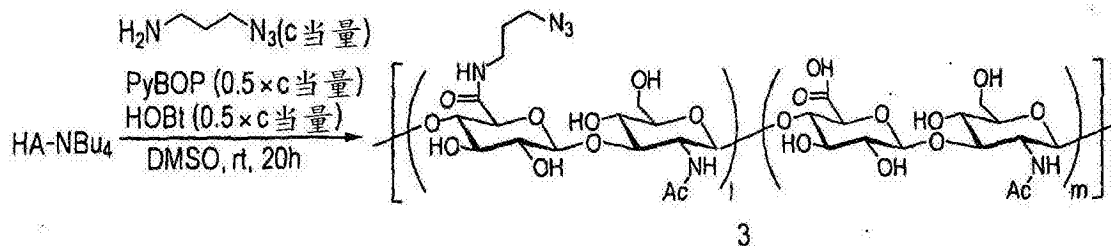


图3B

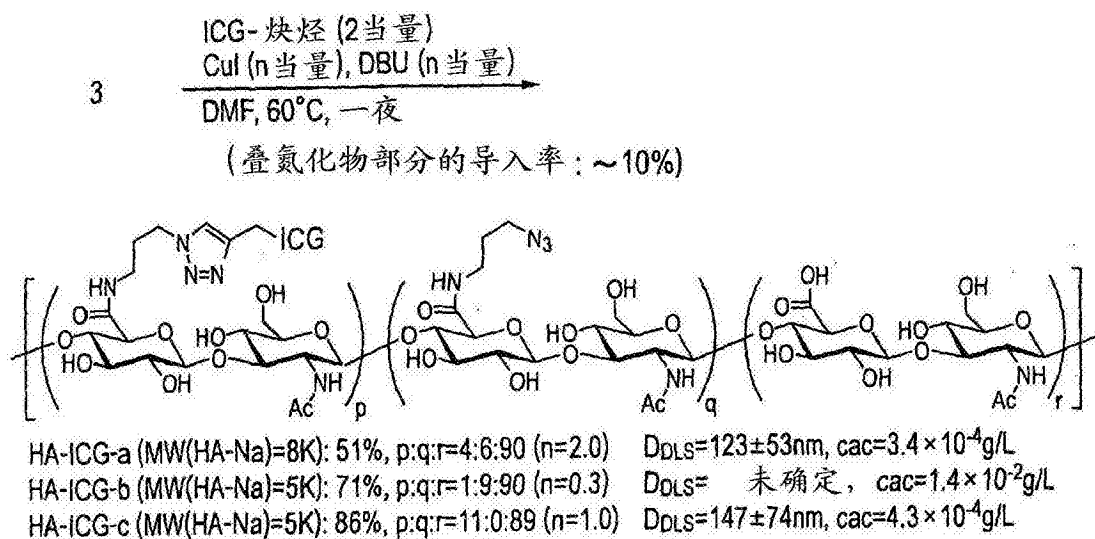


图4A

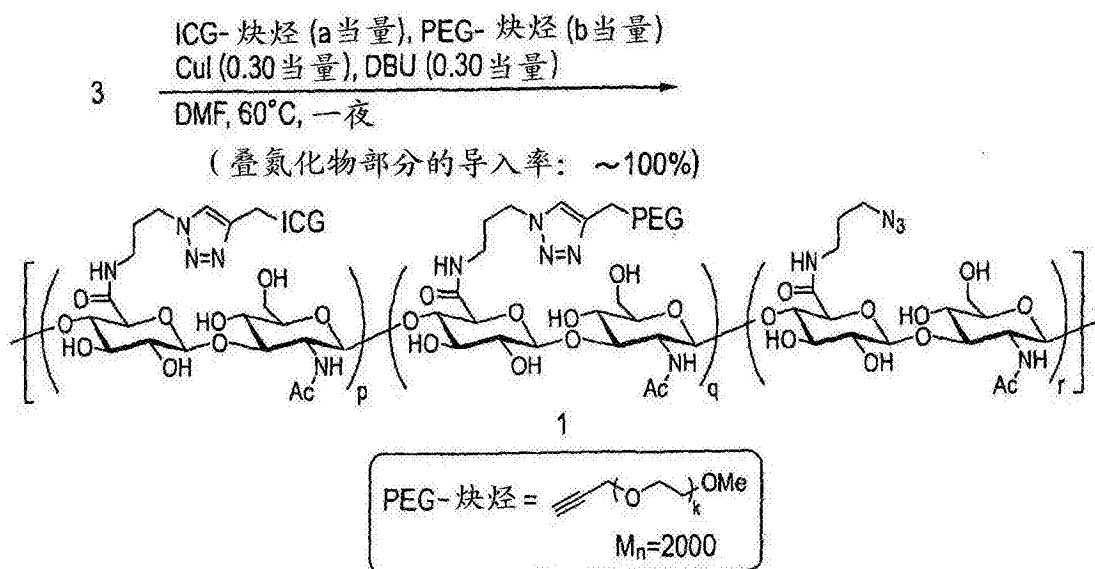


图4B

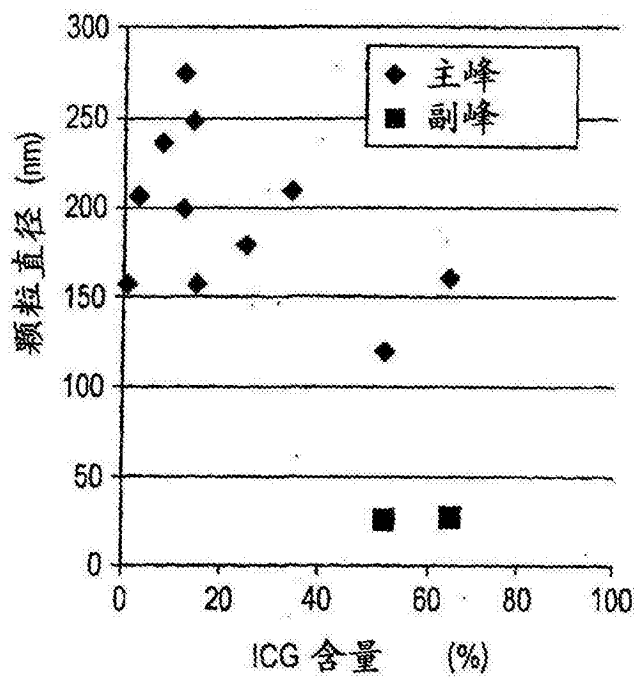


图5A

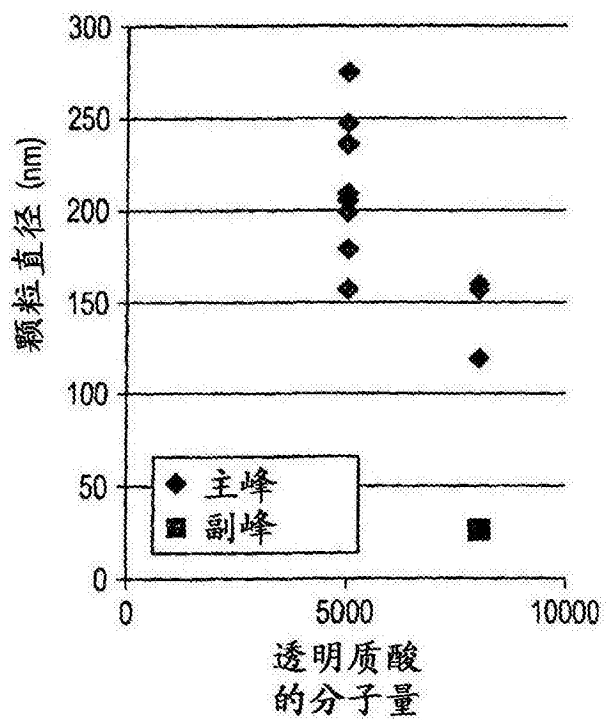


图5B

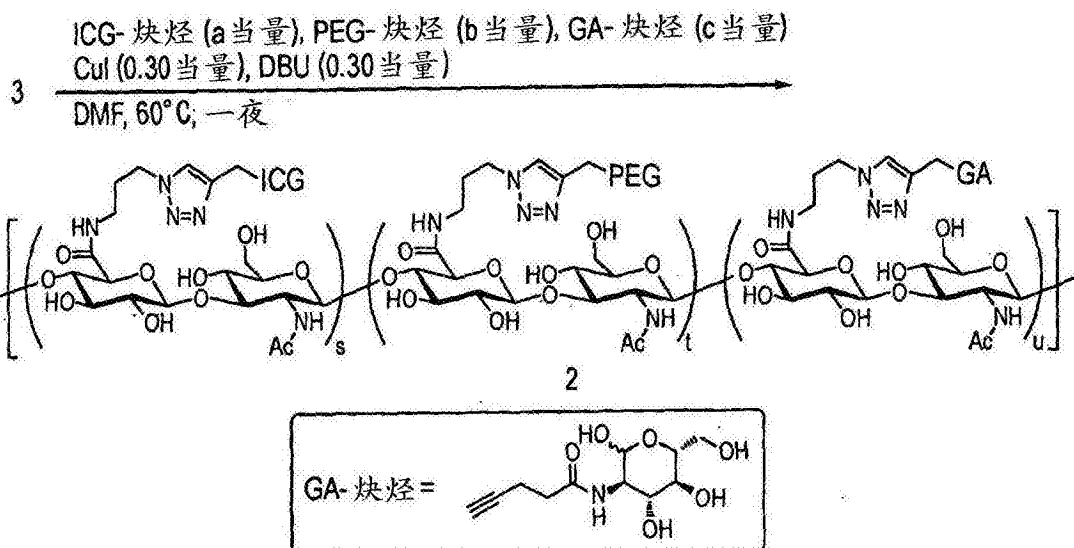


图6

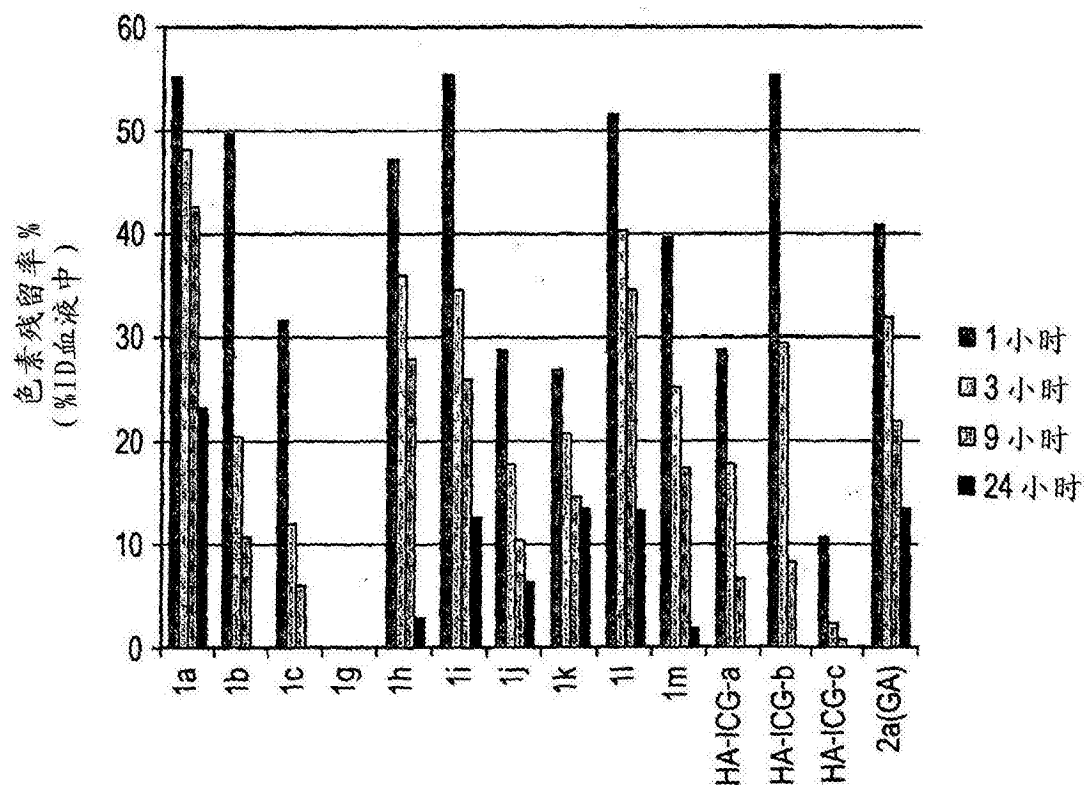


图7

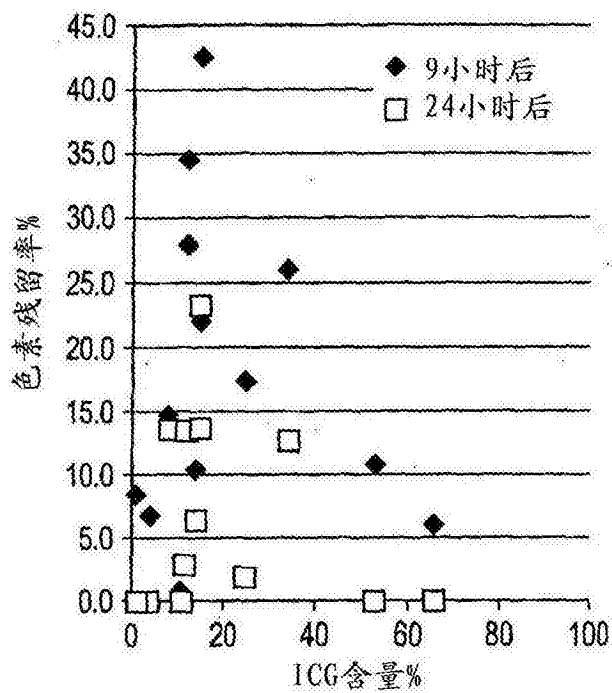


图8A

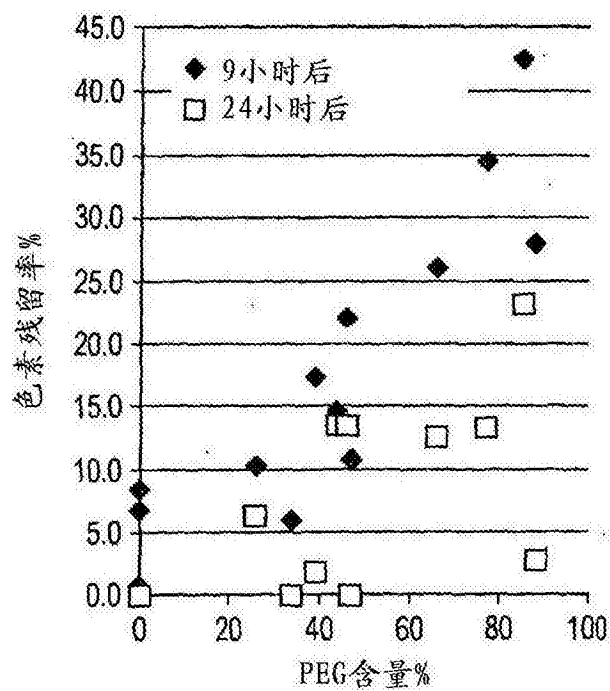


图8B

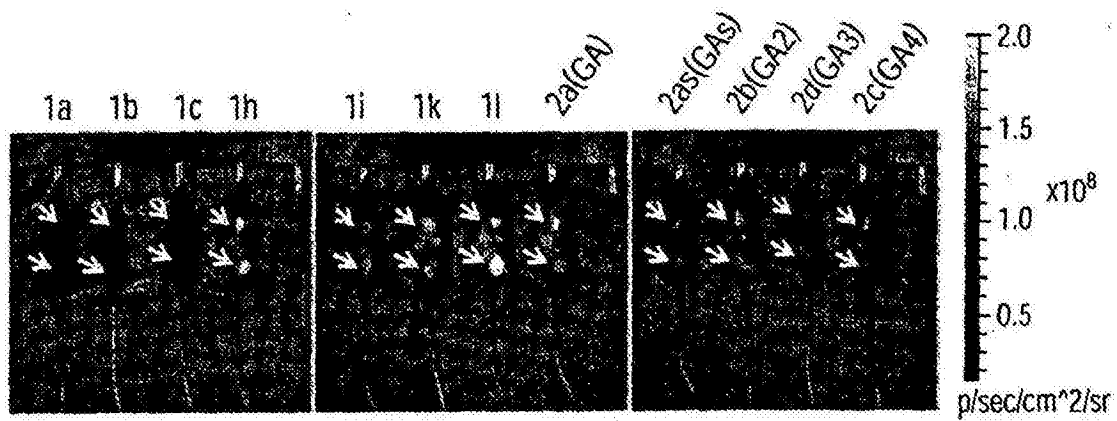


图9

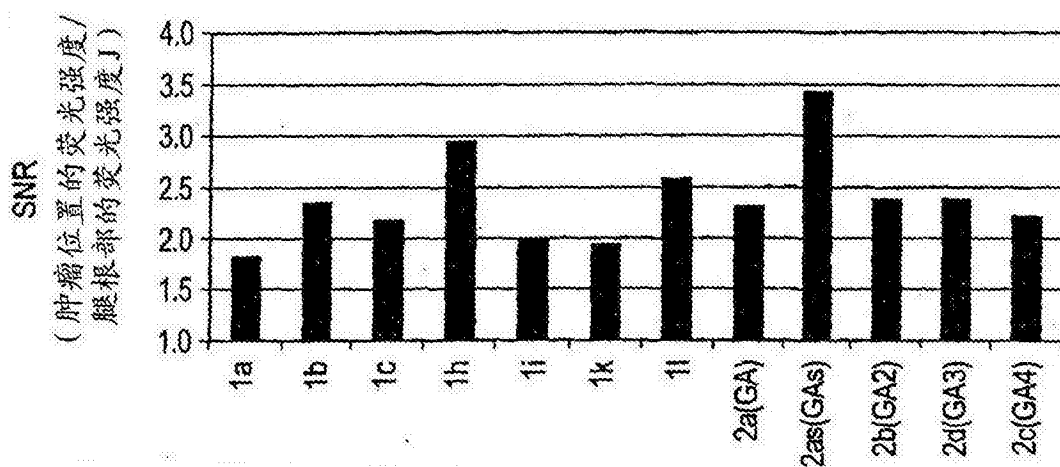


图10A

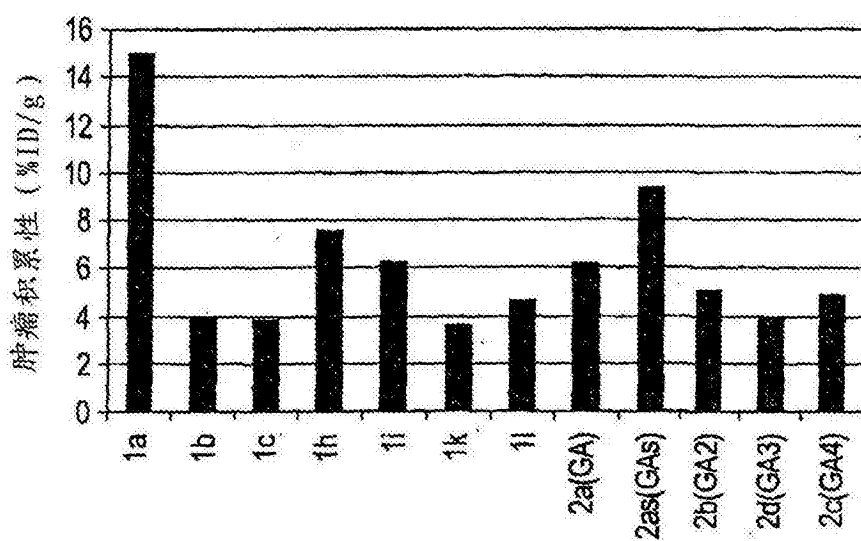


图10B

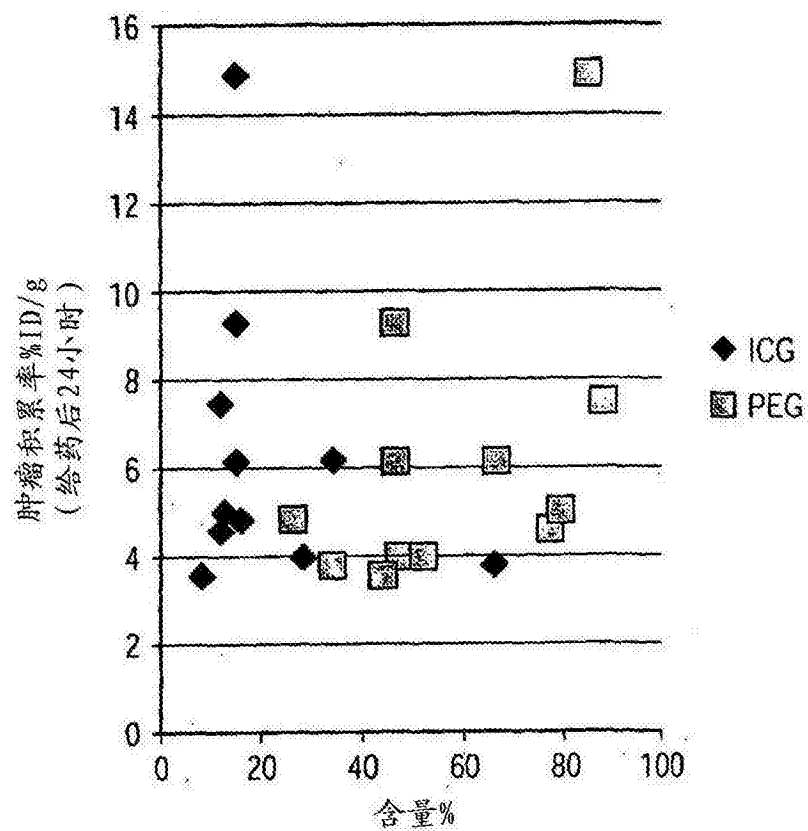


图11

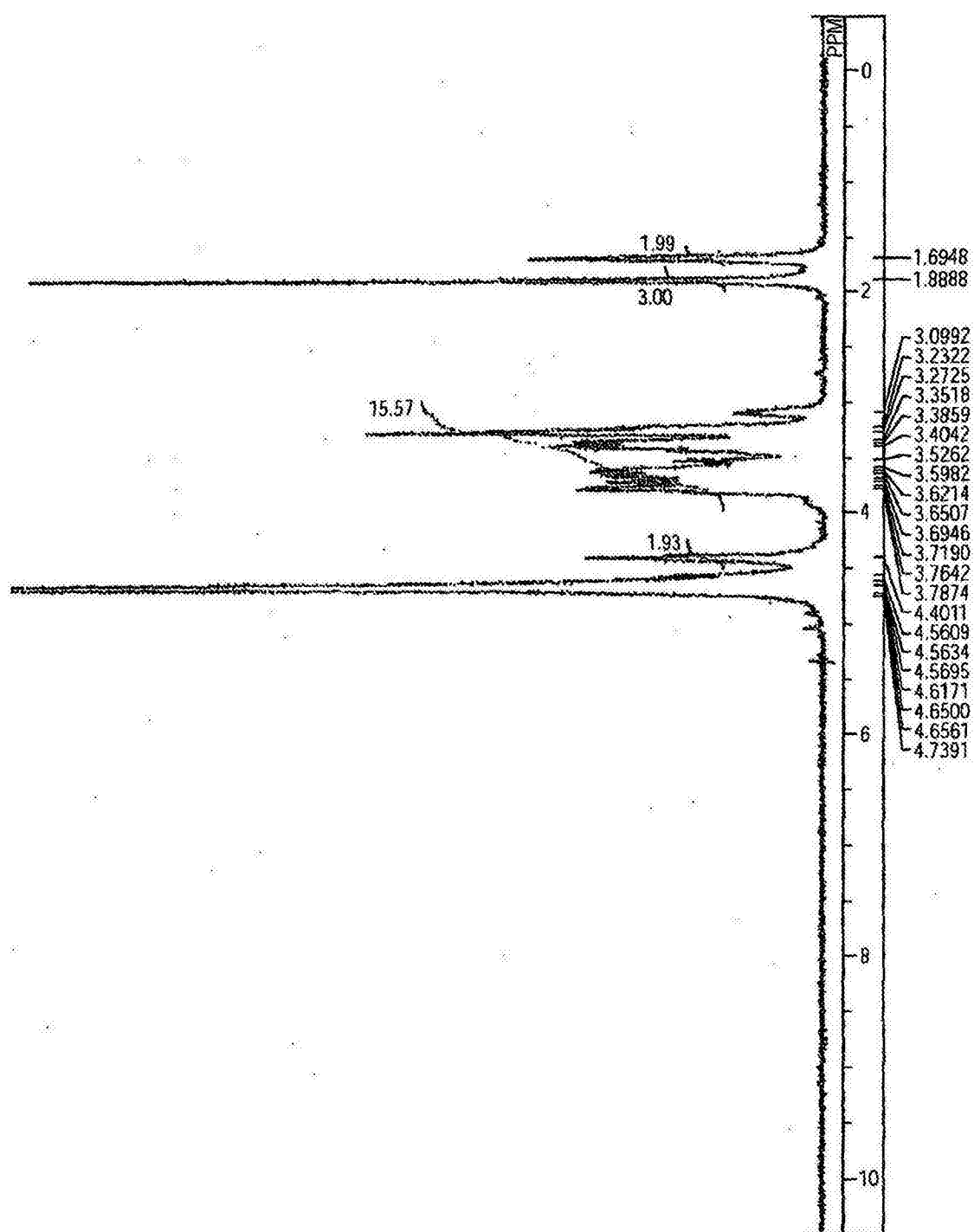


图12

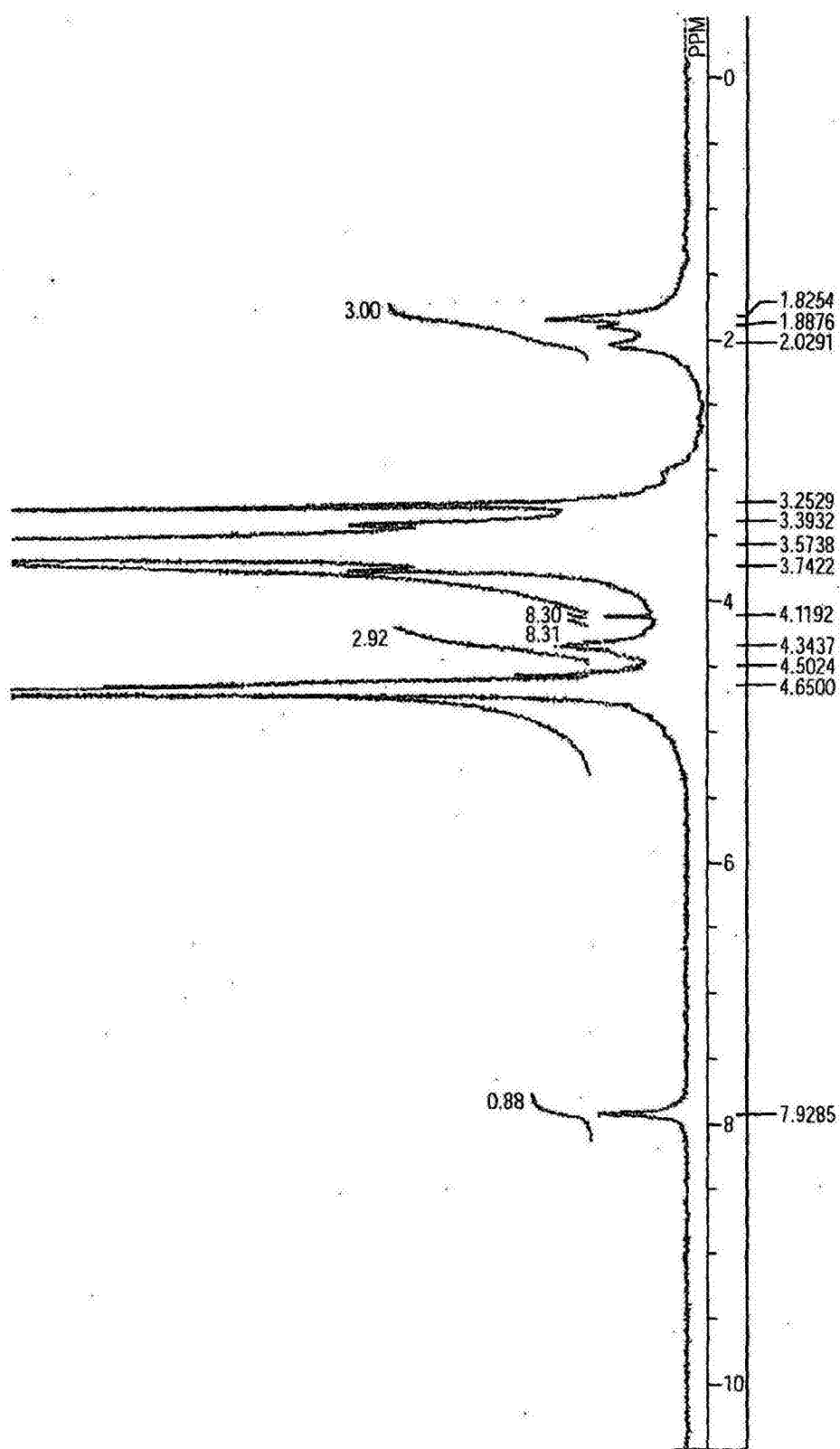


图13

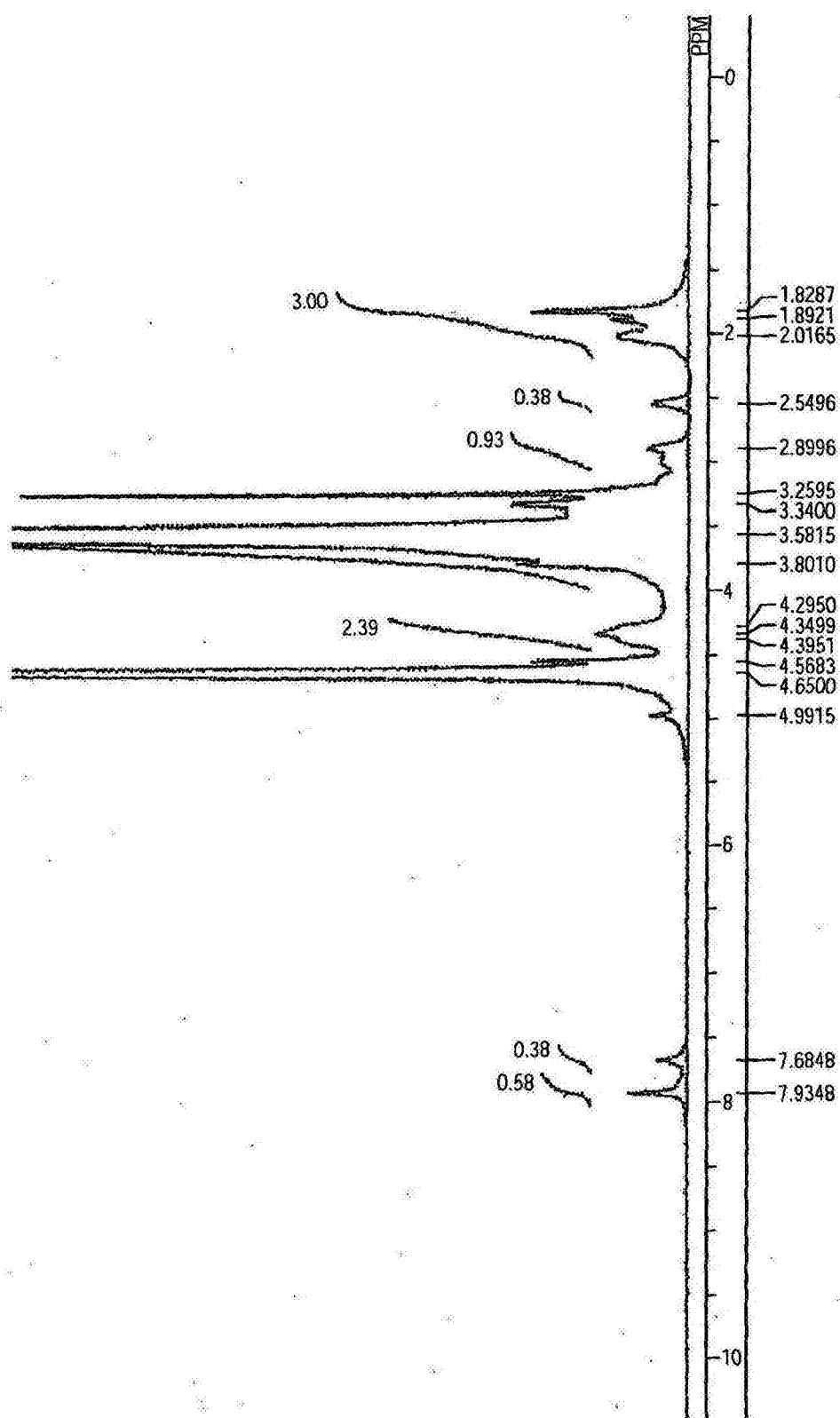


图14

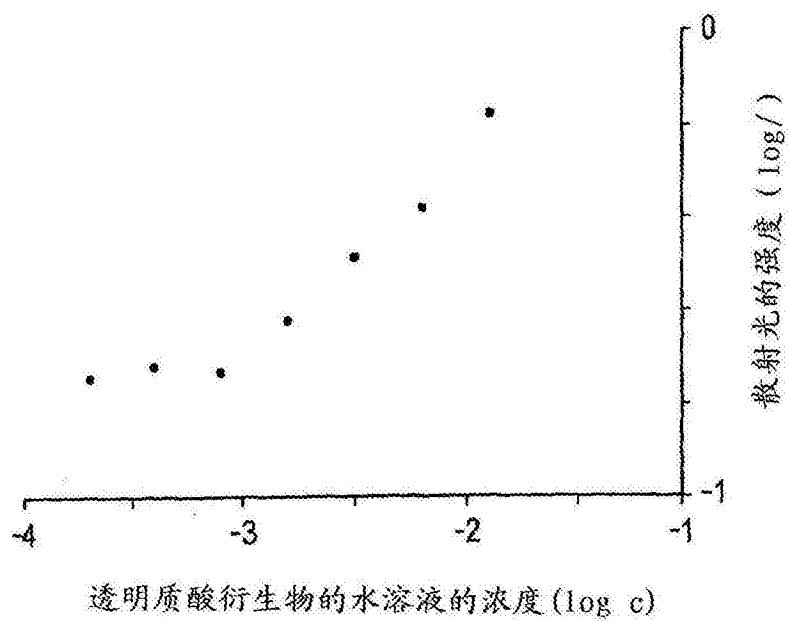


图15

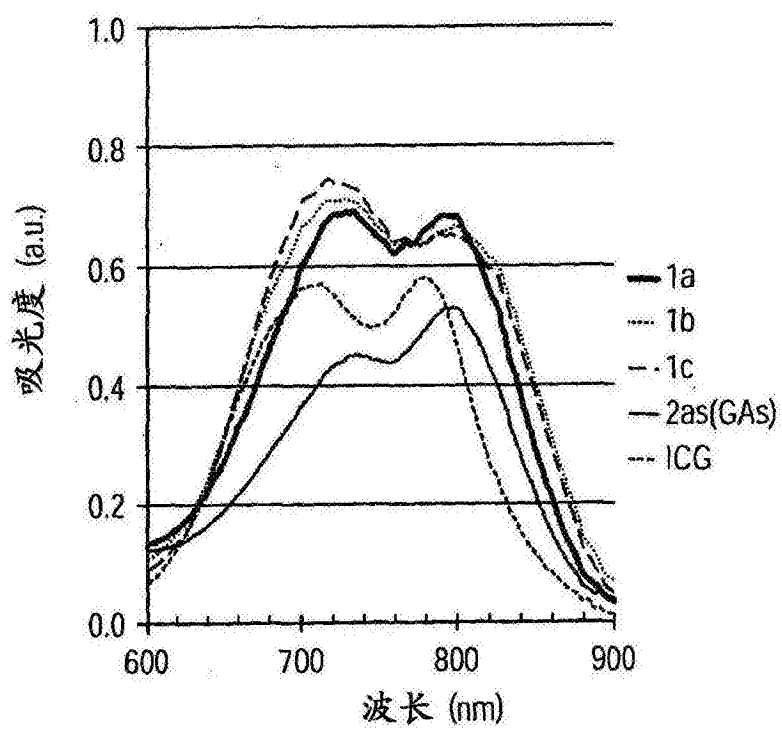


图16A

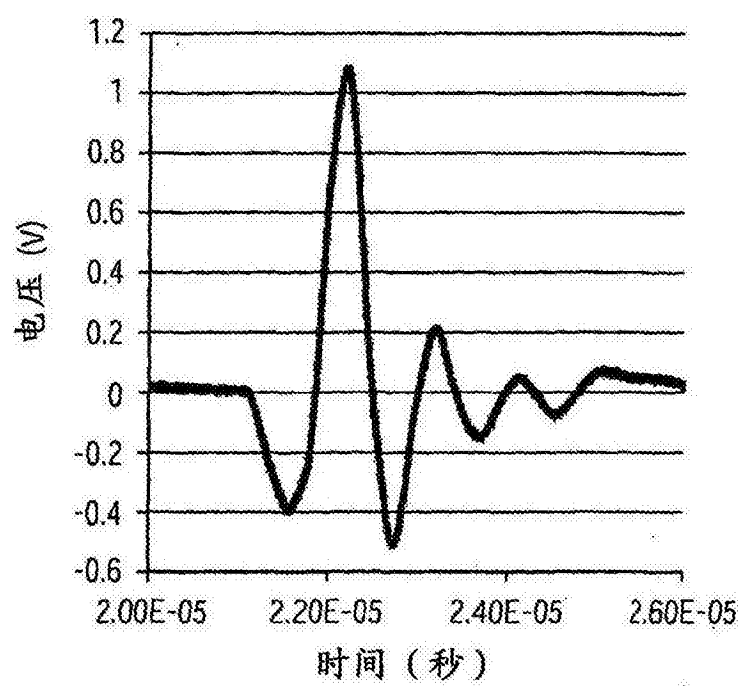


图16B

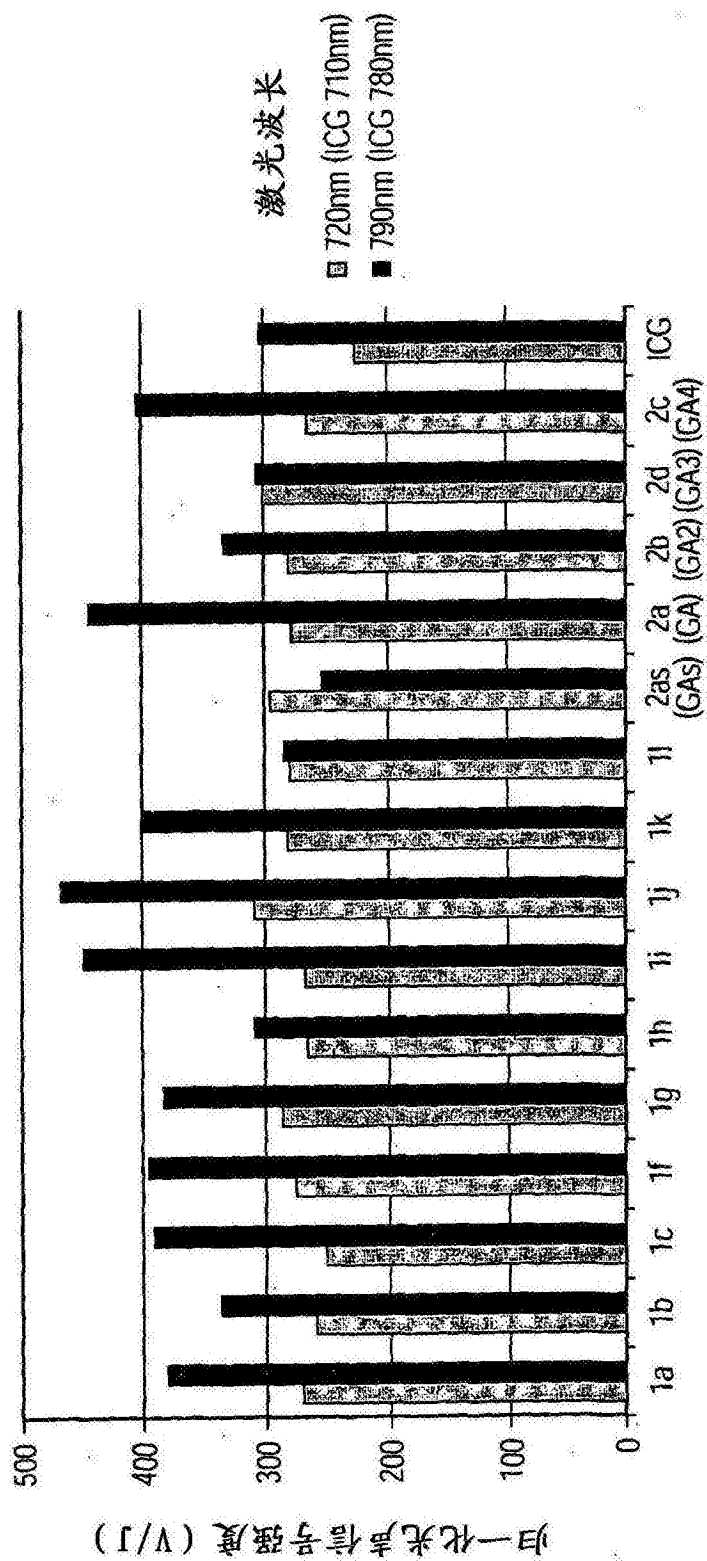


图17

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

图18

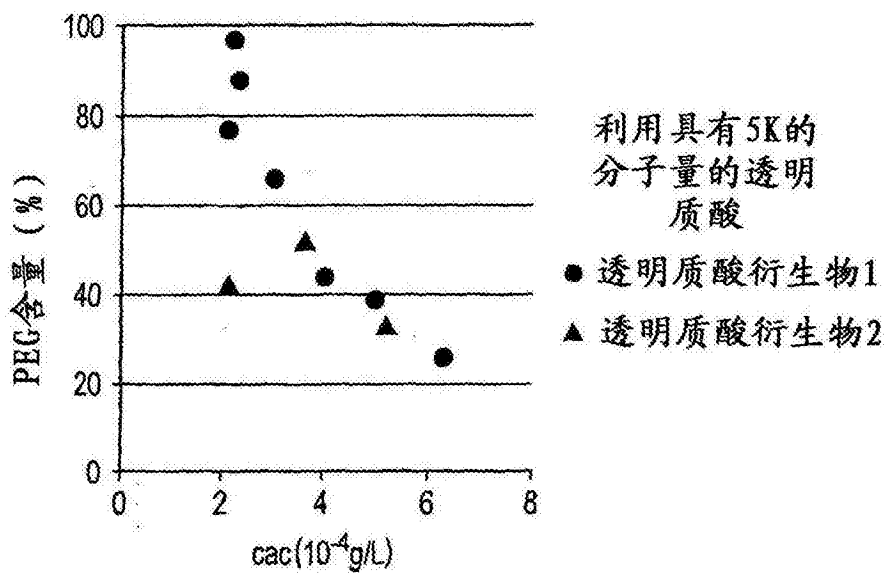


图19A

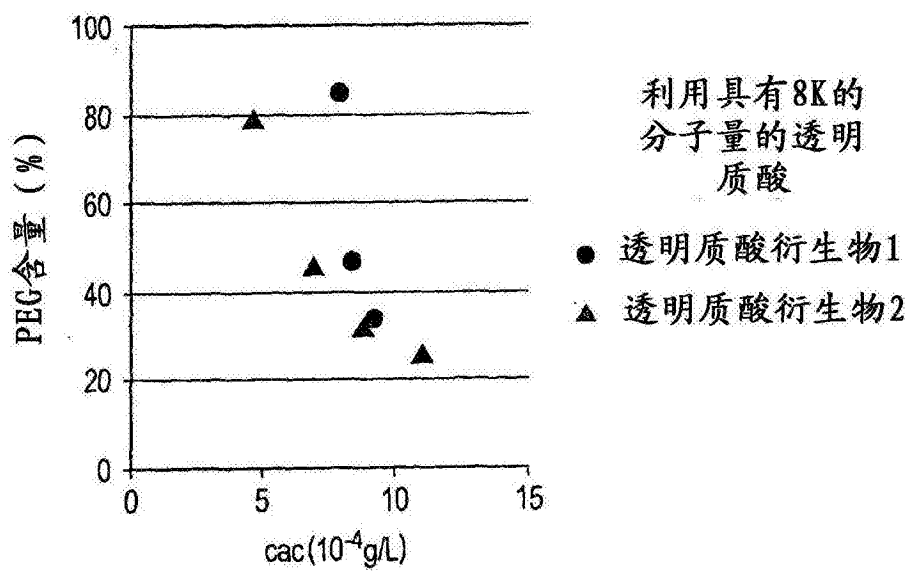


图19B

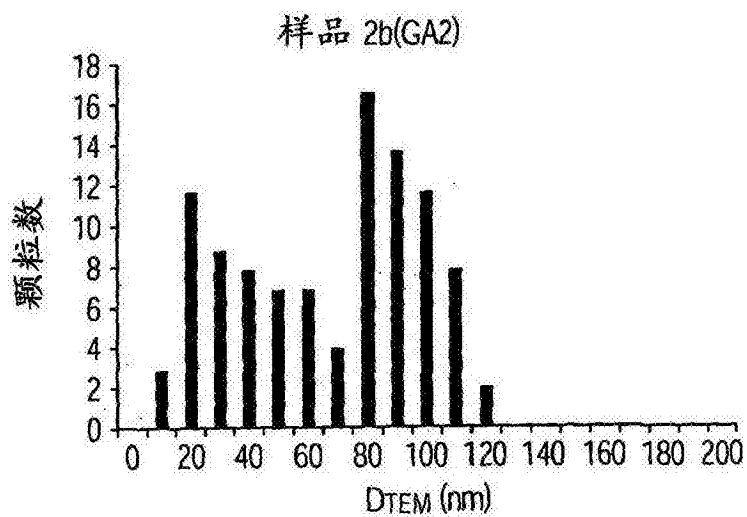


图20A

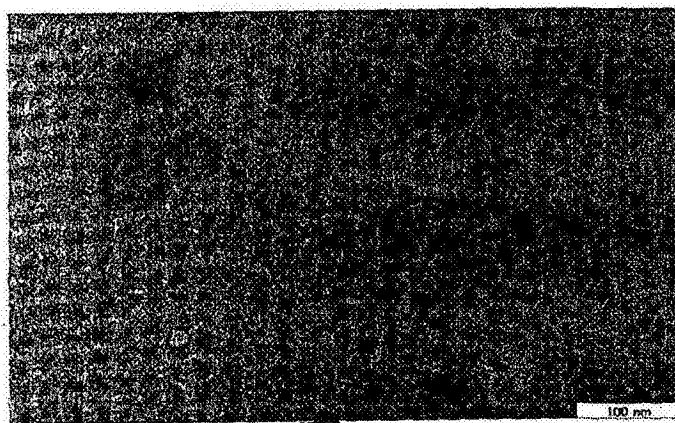


图20B

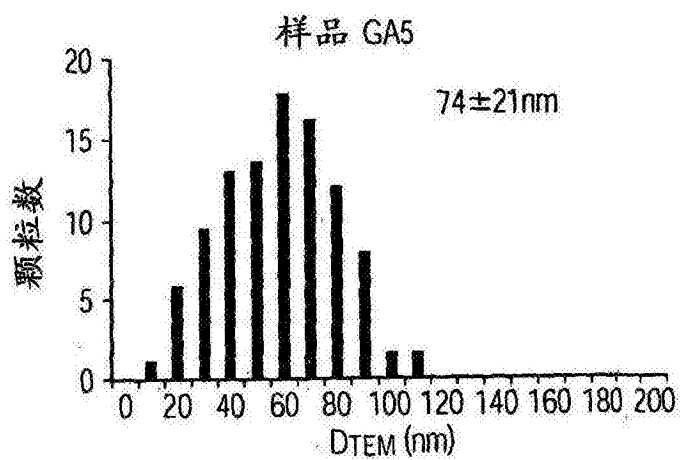


图20C

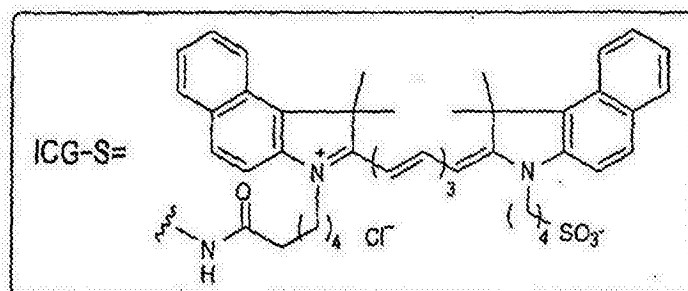
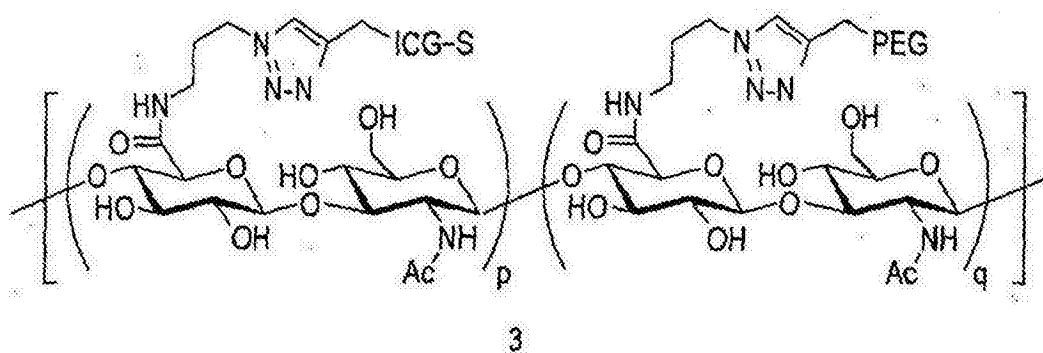


图21A

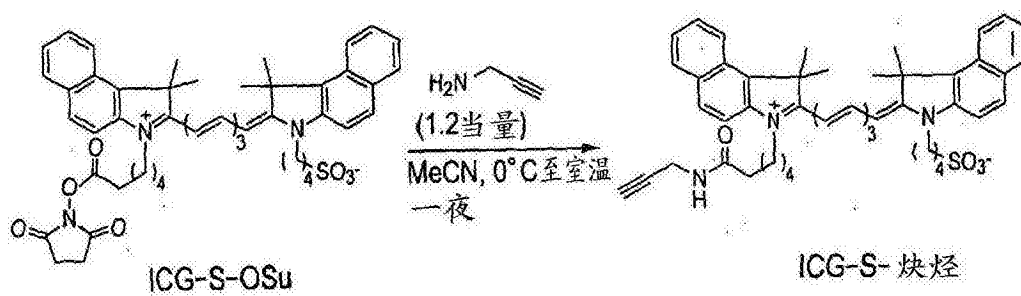


图21B

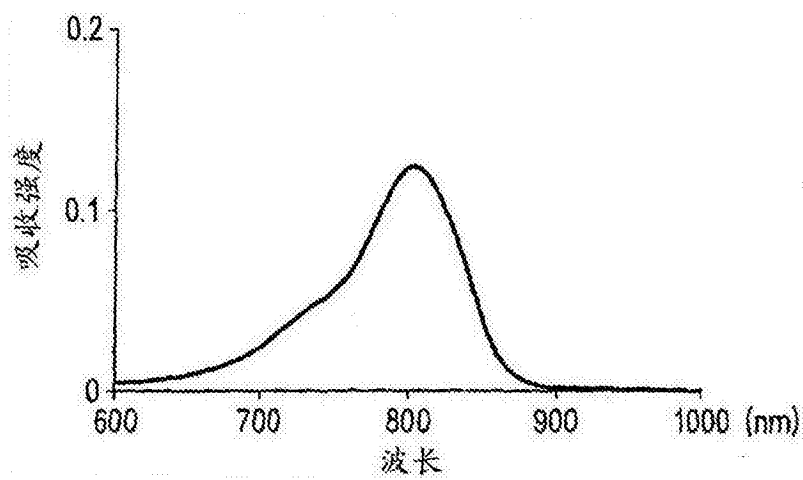


图21C

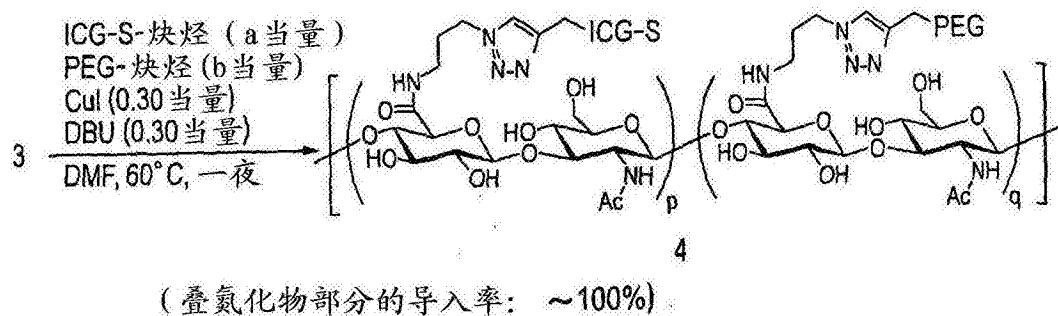


图22

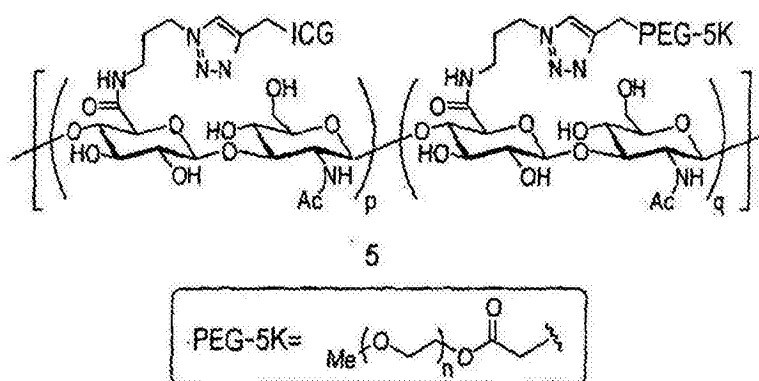


图23A

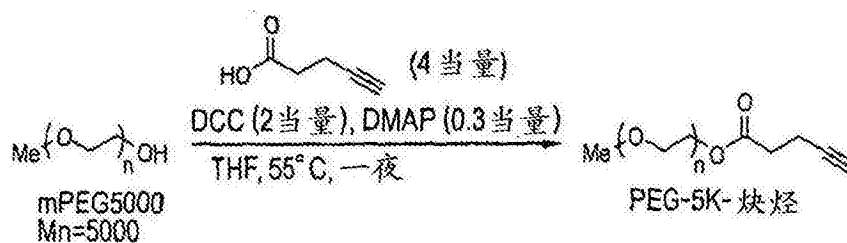


图23B

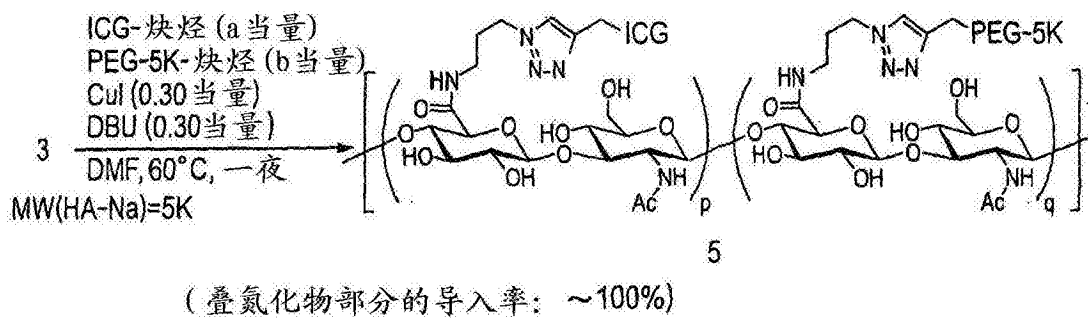
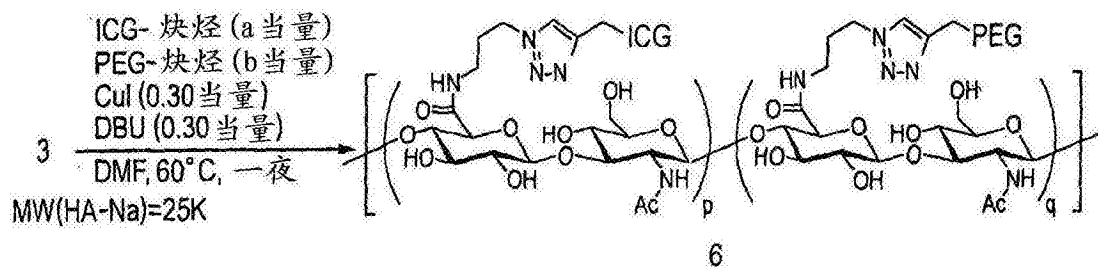


图24A



(叠氮化物部分的导入率: ~100%)

图24B

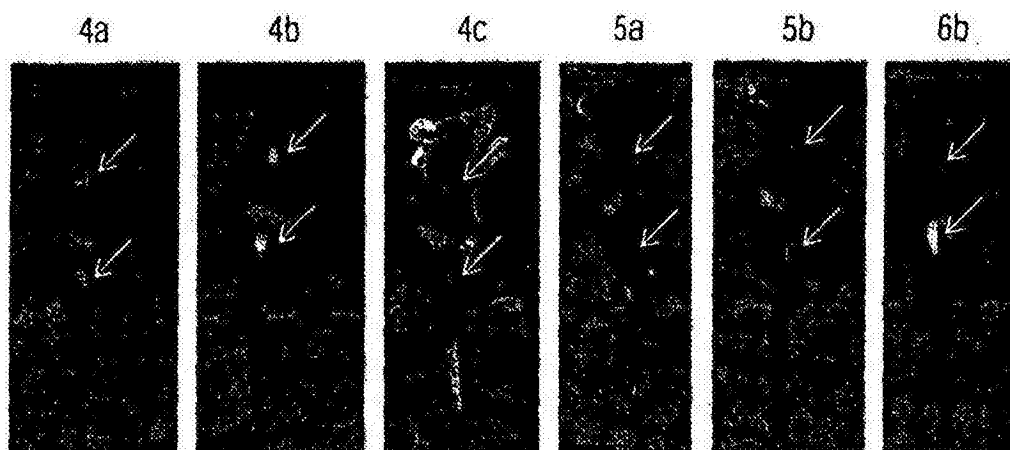


图25A

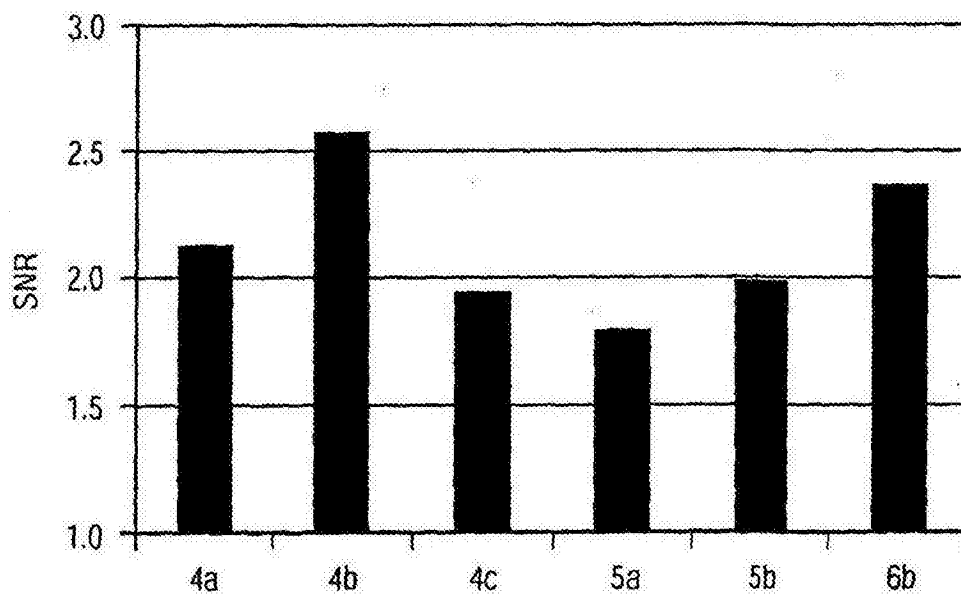


图25B

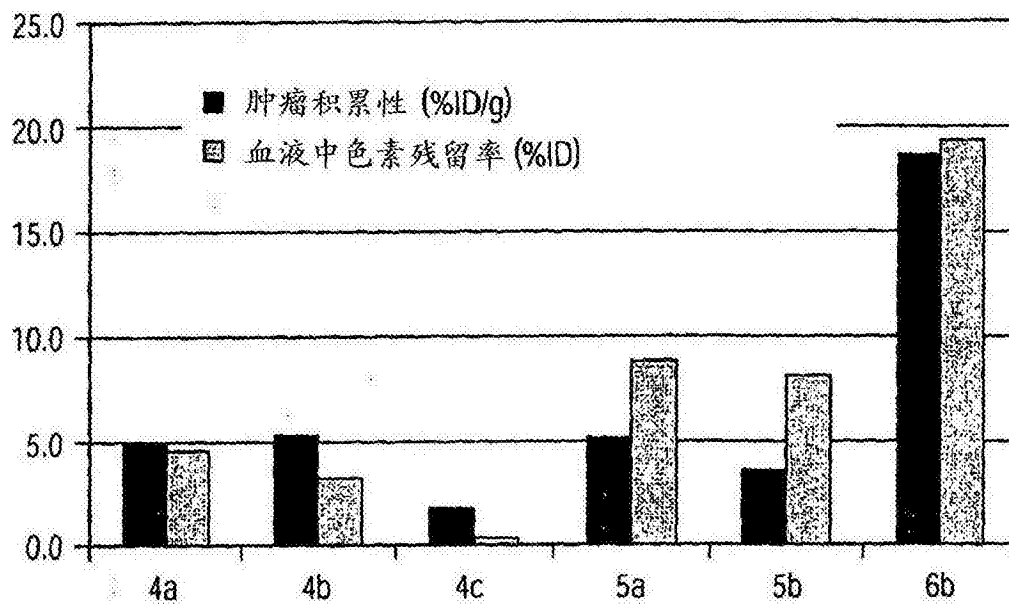


图26A

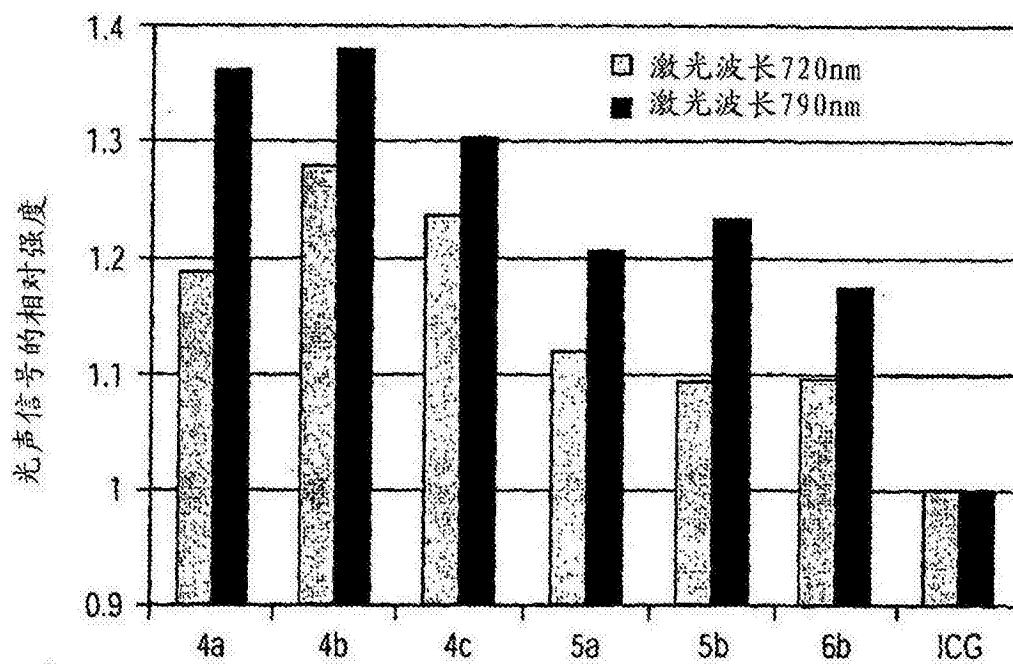


图26B

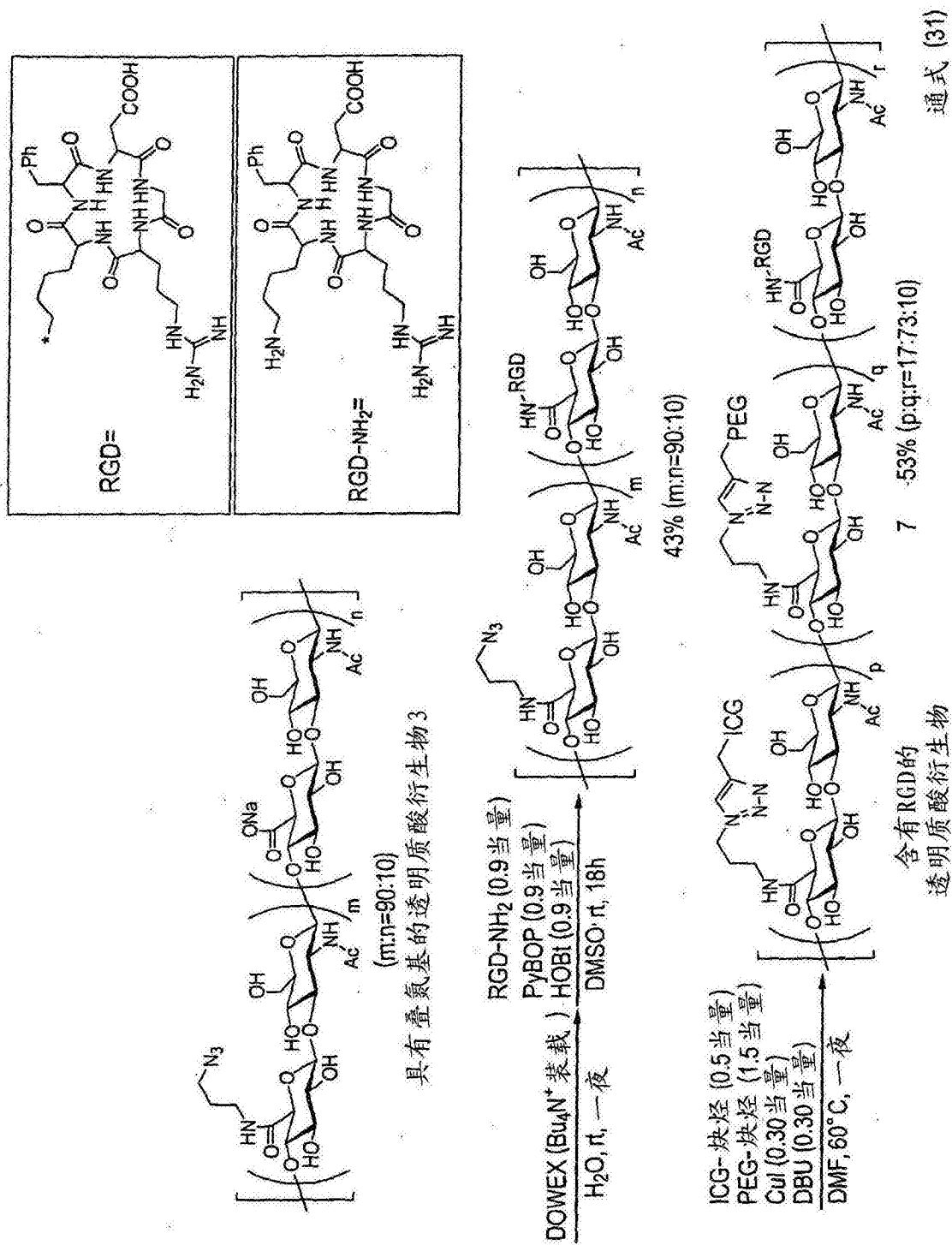


图27