

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 49/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03805460.4

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100340298C

[22] 申请日 2003.3.7 [21] 申请号 03805460.4

[30] 优先权

[32] 2002.3.7 [33] JP [31] 109794/2002

[86] 国际申请 PCT/EP2003/002358 2003.3.7

[87] 国际公布 WO2003/074091 英 2003.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.7

[73] 专利权人 富士胶片株式会社

地址 日本神奈川县

共同专利权人 舍林股份公司

[72] 发明人 川上雅之 北口博司 凯·利恰

克里斯廷·佩利茨 江口博明

津田奈津子 相川和广

[56] 参考文献

EP1152008A2 2001.4.10

CN1075951C 2001.12.12

W00212398A1 2002.2.14

审查员 李凤云

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

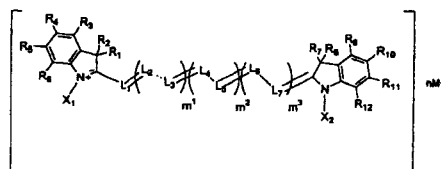
权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图 8 页

[54] 发明名称

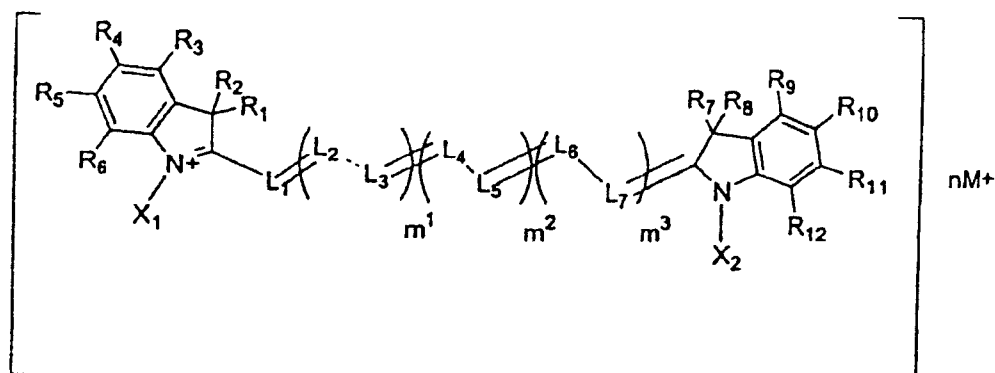
近红外荧光造影剂以及用于荧光成像的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种在活组织中具有优异渗透性并能够特异性地使肿瘤和/或血管造影的近红外荧光造影剂,其包含以下式 [I] 所示化合物或其药物学可接受的盐:其中: R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 相互独立地代表 C_{1-10} 烷基等; R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 相互独立地代表氢原子、 C_{1-6} 烷基、芳基等; X^1 和 X^2 独立地代表 C_{1-15} 烷基或芳基,而且 X^1 和 X^2 总共具有0-4个羧基; m^1 、 m^2 和 m^3 代表0或1; L^1-L^7 独立地代表次甲基; M 代表氢原子、金属或季铵盐;以及 n 代表中和电荷所需要的1-7整数。



1、用于荧光成像的组合物，其包含以下式[I]所示化合物或其药物学可接受的盐以及药物学可接受的载体和赋形剂：



其中：

R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 相互独立地代表取代或未取代的 C_{1-10} 烷基或取代或未取代的芳基，而且 R^1 和 R^2 和/或 R^7 和 R^8 可相互连接在一起形成环；
 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 相互独立地代表氢原子、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、卤原子、氰基、羧基或磺基，而且 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 可相互连接在一起形成环；

m^1 代表0或1；

m^2 代表0或1；

m^3 代表0或1；

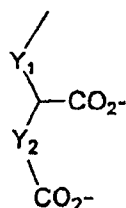
L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 独立地代表取代或未取代的次甲基，条件是：当两个或者更多个次甲基具有取代基时，该取代基可以相互连接在一起形成环；

M代表氢原子、金属或季铵盐；

n代表中和电荷所需要的1-7整数；

X^2 代表取代或未取代的 C_{1-15} 烷基或取代或未取代的芳基；以及

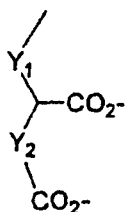
X^1 代表以下式 (i) 所示的基团:



其中 Y_1 和 Y_2 独立地代表取代或未取代的二价连接基团, X^1 和 X^2 总共具有 2—4 个羧基。

2、如权利要求 1 所述的组合物, 其中 m^1 、 m^2 和 m^3 分别是 1。

3、如权利要求 1 所述的组合物, 其中 X^1 和 X^2 独立地代表以下式(i)表示的基团:



其中 Y_1 和 Y_2 独立地代表取代或未取代的二价基团。

4、如权利要求 1 所述的组合物, 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中至少一个是取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂芳基。

5、如权利要求 1 所述的组合物, 其中 Y_1 代表 $-(CH_2)_pCONH-$, 其中 p 代表 1—4 的整数, 而 Y_2 代表 $-(CH_2)-$ 或 $(CH_2)_2-$ 。

6、如权利要求 1—5 之一所述的组合物, 其中所述荧光成像是用于肿瘤成像。

7、如权利要求 1—5 之一所述的组合物，其中所述荧光成像是用于血管造影。

8、如权利要求 1—5 之一所述的组合物在制备用于活体荧光成像的药物中的应用。

9、如权利要求 8 所述的应用，其中所述药物是用于肿瘤成像。

10、如权利要求 8 所述的应用，其中所述药物是用于血管造影。

近红外荧光造影剂以及用于荧光成像的方法

技术领域

本发明涉及近红外荧光造影剂、以及使用所述近红外荧光造影剂进行荧光成像的方法。

背景技术

在治疗疾病时，重要的是在疾病的早期于活体内检测到由所述疾病导致的形态学和功能变化。特别是对于癌症的治疗，事先知道肿瘤的部位和大小对于确定进一步治疗的策略和方案都是极为重要的。目前应用的方法包括通过针刺等进行活组织检查以及成像诊断如 X 射线成像、MRI、超声成像等。活组织检查对于确定性诊断是一种有效的手段，但给待诊断的患者施加了非常大的负担，而且也不适合于跟踪损伤中随时间的变化。X 射线成像和 MRI 不可避免地使进行诊断的患者暴露于辐射或者电磁波。另外，如上所述的常规成像诊断在进行测量和诊断时需要复杂的操作和长的时间。大型仪器也使得难以在手术期间应用这些方法。

已报道的图像诊断方法之一包括荧光成像 (Lipsbn R.L.等人, J. Natl. Cancer Inst., 26,1-11 (1961))。该方法使用作为造影剂的物质，该物质在暴露于特定波长的激发光时发射荧光。该方法包括以下步骤：使身体暴露于身体外侧的激发光，然后检测由体内的荧光造影剂发射出的荧光。

荧光造影剂的例子包括例如卟啉化合物，该化合物累积在肿瘤中并用于光动力学疗法 (PDT)，如血卟啉。其他的例子包括 photophyrin 和 苯并卟啉 (参见 Lipsbn R.L.等人, 同上; Meng T.S.等人, SPIE, 1641, 90-98 (1992), W084/04665 等)。但是，这些化合物具有光毒性，因为它们原本是用于 PDT (PDT 需要此等性质)，并且因此这些化合物作为诊断剂并

不是理想的。

使用已知的荧光染料如荧光素、fluorescamine 和 riboflavin 进行视网膜循环微血管造影是众所周知的 (U.S.4945239)。但是, 这些荧光染料在 400—600 nm 的可见光区域发射的荧光仅能实现低的活组织透射作用, 并且因而几乎不可能检测身体更深部分中的损伤。

包括靛花菁 (indocyanine) 绿 (以下简称为 “ICG”) 的花菁化合物可用于检测肝脏功能和心输出, 有报道称还可用作荧光造影剂 (Haglund M.M.等人, Neurosurgery, 35, 930 (1994), Li, X.等人, SPIE, 2389, 789-797 (1995))。花菁化合物在近红外光区域 (700—1300 nm) 具有吸收。

近红外光具有透过活组织的高度透射性质, 而且可由约 10cm 的头骨中穿过, 并由于这些原因, 最近在临床医药领域中已开始关注所述光。例如, 在临床领域中已注意到作为新技术的光学 CT 技术 (使用介质的光透射作用的 CT 技术), 因为近红外光可透过活体, 并且使用该区域范围内的光可检测体内的氧浓度和循环。

花菁化合物在近红外区域发射荧光, 该区域中的光如上所述在活组织中具有优异的渗透性, 并且因此有人提议将其用作荧光造影剂。近些年来已开发出各种花菁化合物, 而且已被用作荧光造影剂 (W096/17628、WP97/13490 等)。但是, 现在仍未得到具有令人满意的区别损伤和正常组织的能力的药剂, 即、对于待成像部位具有令人满意的选择性的药剂。

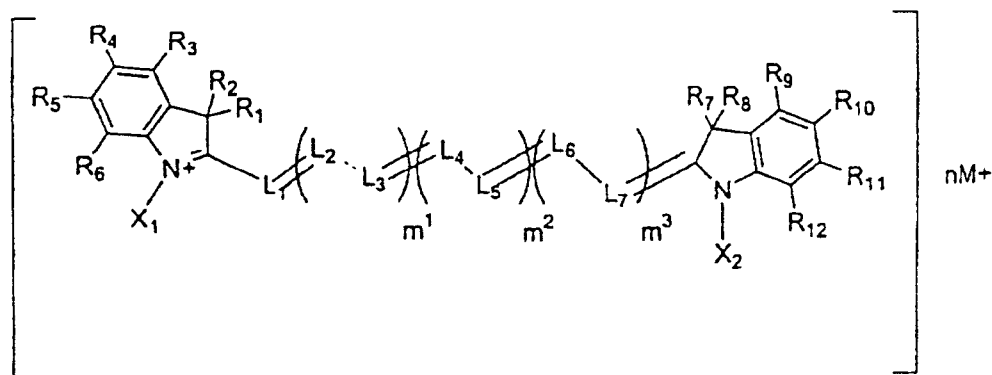
发明内容

本发明的目的是提供在近红外区域中发射荧光的荧光造影剂, 在活组织中具有优异的渗透性, 而且能够使肿瘤和/或血管特异性地成像。本发明的另一个目的是提供一种使用所述近红外荧光造影剂进行荧光成像的方法。

本发明的发明人为实现上述目的进行了各种研究。其结果发现, 在花菁染料中引入羧酸或芳基, 由此成功地得到具有高度肿瘤选择性的荧

光造影剂。他们还成功地确立了使用所述造影剂进行荧光成像的方法。
本发明就是基于上述这些发现而完成的。

因此, 本发明提供包含以下式[I]所示化合物或其药理学可接受的盐的近红外荧光造影剂:



其中:

R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 相互独立地代表取代或未取代的 C_{1-10} 烷基或取代或未取代的芳基, 而且 R^1 和 R^2 和/或 R^7 和 R^8 可相互连接在一起形成环;
 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 相互独立地代表氢原子、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、卤原子、氰基、羧基或磺基, 而且 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 可相互连接在一起形成环;

X^1 和 X^2 独立地代表取代或未取代的 C_{1-15} 烷基或取代或未取代的芳基, 而且 X^1 和 X^2 总共具有 0—4 个羧基, 条件是: 当羧基的数目为 0 或 1 时, X^1 和 X^2 中的每一个都是 C_{1-5} 羧基烷基或磺基烷基, 而且 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中至少一个代表取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂芳基;

m^1 代表 0 或 1;

m^2 代表 0 或 1;

m^3 代表 0 或 1;

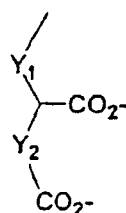
L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 独立地代表取代或未取代的次甲基, 条件

是：当两个或者更多个次甲基具有取代基时，这些取代基可以相互连接在一起形成环，而且当 X^1 和 X^2 每一个都具有一个羧基时， X^1 和 X^2 都是羧基取代的烃基，且 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 所代表的至少一个次甲基是取代的次甲基，以及 R^4 和 R^{10} 代表磺基；

M 代表氢原子、金属或季铵盐；以及

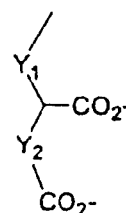
n 代表中和电荷所需要的 1—7 整数。

根据本发明的优选实施方案， m^1 、 m^2 和 m^3 都同时是 1，而 X^1 是以下式 (i) 表示的基团：



其中 Y_1 和 Y_2 独立地代表取代或未取代的二价连接基团。

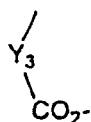
根据本发明更优选的实施方案， X^1 和 X^2 独立地代表以下式(i)表示的基团：



其中 Y_1 和 Y_2 独立地代表取代或未取代的二价键。

根据进一步优选的实施方案， R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中至少一个是取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂芳基。根据更进一步的优选实施方案， R^4 、 R^5 、 R^{10} 和 R^{11} 中至少一个是取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂芳基；而且 X^1 和 X^2 每一个都独立地是 C_{1-5} 羧基烷基或磺基烷基。

根据本发明另一个优选的实施方案， X^1 和 X^2 独立地代表以下式的基团：



其中 Y^3 代表 C_{1-10} 烃基, 而且 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 所代表的至少一个次甲基是取代的次甲基, 以及 R^4 和 R^{10} 代表磺基。

优选地, 分子中的磺基数量为 2 或更少。

根据进一步优选的实施方案, Y_1 代表 $-(CH_2)_pCONH-$, 其中 p 代表 1—4 的整数, 而 Y_2 代表 $-(CH_2)-$ 或 $(CH_2)_2-$ 。

上述近红外荧光造影剂可优选用于肿瘤成像和血管造影。

在另一个方面, 本发明提供进行荧光成像的方法, 其包括以下步骤: 在活体内引入上述近红外荧光造影剂, 使所述活体暴露在激发光下, 然后检测由造影剂发射的近红外荧光。

附图说明

图 1 是显示在给药本发明的化合物 2 后给定时间处的荧光成像结果的图。

图 2 是显示在给药作为参比化合物的 ICG 后给定时间处的荧光成像结果的图。

图 3 是显示在给药作为参比化合物的化合物 A 后给定时间处的荧光成像结果的图。

图 4 是测试实施例 2 中进行荧光成像的试验构成的示意图。在该图中, SHG 代表第二谐波产生, THG 代表第三谐波产生, 而 OPO 代表光学参数振荡器。

图 5 是显示在给药本发明的化合物 5 后给定时间处的荧光成像结果的图。

图 6 是显示在给药本发明的化合物 7 后给定时间处的荧光成像结果的图。

图 7 是显示在给药本发明的化合物 10 后给定时间处的荧光成像结果

的图。

图 8 是显示在给药作为参比化合物的化合物 B 后给定时间处的荧光成像结果的图。

具体实施方式

R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 代表的 C_{1-10} 烷基可以是线性、支链、环状或者它们的组合（烷基以及包含烷基的官能团中的烷基部分具有说明书中所述的含义，除非另有说明）。作为未取代烷基，例如可以使用甲基、乙基、丙基、丁基和己基。取代烷基上的取代基的数量、种类或位置没有具体的限定。作为取代烷基，例如可以使用磺基烷基、羧基烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、氨基烷基、卤代烷基、氰基烷基、芳基取代的烷基、杂芳基取代的烷基等。

R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 代表的芳基可以是单环或稠合环，例如可以使用 C_{6-14} 芳基，优选 C_{6-10} 芳基（芳基以及包含芳基的官能团中的芳基部分具有说明书中所述的含义，除非另有说明）。作为芳基，可优选使用苯基或萘基，更优选的是苯基。作为取代芳基，可以使用磺基苯基、羟基苯基、氨基苯基。

另外， R^1 和 R^2 、 R^7 和 R^8 代表的可以相互连接在一起形成环。所形成的环的例子包括例如环戊基环、环己基环等。 R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 优选是甲基或乙基，更优选是甲基。

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 相互独立地代表氢原子、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、卤原子、氰基、羧基或磺基，而且选自于 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的两个相邻基团以及选自于 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的两个相邻基团可独立地相互连接在一起形成环。所形成的环可以是饱和或不饱和的，而且可以是烃环或杂环。例如， R^3 和 R^4 、 R^4 和 R^5 、 R^5 和 R^6 、 R^9 和 R^{10} 、 R^{10} 和 R^{11} 、或者 R^{11} 和 R^{12} 可相互连接在一起形成苯环或芳香杂环如吡啶环。优选的

例子包括 R^3 和 R^4 或 R^9 和 R^{10} 相互连接在一起而形成的苯环。

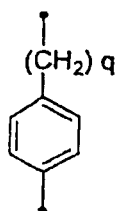
作为 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 所表示的芳基，例如可以使用苯基或萘基。作为杂芳基，例如可以使用噻吩基、苯并噻吩基、呋喃基、苯并呋喃基、吡咯基、咪唑基或喹啉基。在芳基和杂芳基上可存在 1—4 个任选的取代基。取代基的位置没有特殊的限制，而且当存在 2 个或者更多个取代基时，它们可相同或不同。对于此等取代基，可以使用例如羟基，卤原子如氟、氯、溴和碘原子； C_{1-6} 烷基如甲基、乙基、*n*-丙基、异丙基、*n*-丁基、仲丁基、叔丁基； C_{1-6} 卤代烷基如三氟甲基； C_{1-6} 烷氧基如甲氧基、乙氧基、*n*-丙氧基、异丙氧基、*n*-丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基； C_{1-6} 亚烷基二氧基如亚甲二氧基、亚乙二氧基；羧基； C_{1-6} 烷氧基羰基；未取代的氨基； C_{1-6} 烷基取代的氨基如甲基氨基、二甲氨基、乙基氨基；磺基；或氰基等。

X^1 和 X^2 相互独立地代表取代或未取代的 C_{1-15} 烷基或取代或未取代的芳基，而且 X^1 和 X^2 在 X^1 和 X^2 中总共具有 1—4 个羧基。作为 X^1 和 X^2 代表的未取代的烷基，例如可以使用甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、2-甲基丙基或 1,1-二甲基丙基。烷基可以是线性、支链、环状或者它们的组合，优选直链或支链烷基。

作为 X^1 和 X^2 代表的取代烷基，例如可以使用磺基烷基（如 2-磺基乙基、3-磺基丙基、3-甲基-3-磺基丙基、4-磺基丁基等）、羧基烷基（如 1-羧基甲基、2-羧基乙基、3-羧基丙基、4-羧基丁基等）、羟基烷基、烷氧基烷基、氨基烷基、卤代烷基、氰基烷基、杂芳基取代的烷基、芳基或杂芳基。这些基团中的烷基部分与以上所定义的未取代烷基具有相同的定义。作为 R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 代表的取代或未取代的芳基，可以使用苯基、磺基苯基、羟基苯基或氨基苯基。

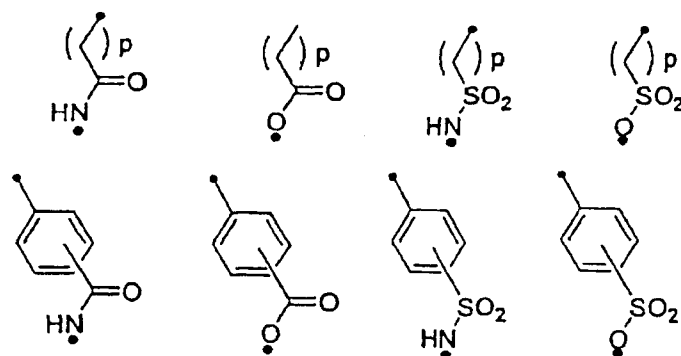
当 X^1 和 X^2 中的羧基数量为 0 或 1 时，可以使用 C_{1-5} 羧基烷基或磺基烷基作为 X^1 和 X^2 。

作为 Y_1 和 Y_2 代表的二价连接基团, 例如可以使用取代或未取代的 C_{1-6} 亚烷基如亚甲基、亚乙基、亚正丁基、甲基亚丙基或亚苯基。作为其他的例子, 可以使用以下式表示的连接基团:

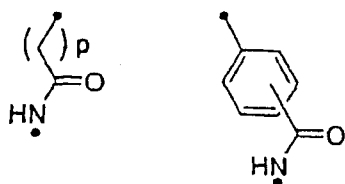


其中 q 代表 1—4 的整数, 符号 “ $\cdot$ ” 代表连接位置。这些烃基可以具有取代基, 而且可包含一个或者多个杂原子。例如, 它们可包含醚键、硫醚键、二硫键、酰胺键、酯键、磺酰胺键或者磺基酯键。

作为 Y_1 和 Y_2 代表的二价连接基团, 例如还可以使用以下式代表的键:



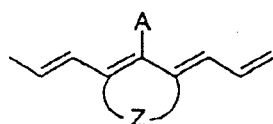
其中 p 代表 1—4 的整数, 符号 “ $\cdot$ ” 代表连接位置。 Y_1 的优选例子包括以下式代表的连接基团:



其中 p 代表 1—4 的整数。 Y_1 最优选的是 $-(CH_2)_p\text{-CO-NH-}$ (其中 p 代表 1—4 的整数)。 Y_2 的优选例子包括亚甲基或亚乙基。

L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 独立地代表取代或未取代的次甲基，其中 m^1 、 m^2 和 m^3 独立地代表0或1。优选的是， m^1 、 m^2 和 m^3 各同时为1。次甲基上的取代基的例子包括取代或未取代的烷基、卤原子、取代或未取代的芳基或低级烷氧基等。取代芳基的具体例子包括4-氯苯基等。低级烷氧基优选为 C_{1-6} 烷氧基，其可以是直链或支链的。具体的例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基等，并且优选甲氧基或乙氧基。作为次甲基的取代基，优选使用甲基或苯基。

当选自于 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 中的次甲基是取代的时，则次甲基上的取代基可相互连接在一起形成环。优选地，次甲基上的取代基可连接形成包含三个连续的选自于 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 中的次甲基的环。作为其中次甲基上的取代基连接形成包含三个连续的选自于 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 中的次甲基的环的例子，包括例如其中形成4,4-二甲基环己烯以包含环 L^3 、 L^4 和 L^5 的化合物。其中由选自于 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 和 L^7 的次甲基形成共扼次甲基链的部分结构的特别优选例子包括以下通式(a)表示的基团：



其中Z代表形成5或6元环所必需的非金属原子基团，而A代表氢原子或单价基团。

Z所代表的用于形成5—10元环所必需的非金属原子基团的例子包括例如碳原子、氮原子、氧原子、氢原子、硫原子、卤原子（氟原子、氯原子、溴原子、碘原子）等。通式(a)所代表的部分结构中的5或6元环的例子包括例如环戊烯环、环己烯环和4,4-二甲基己烯环，其中优选环戊烯环或环己烯环。

A所代表的单价基团的例子包括例如取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的低级烷氧基、

取代或未取代的氨基、取代或未取代的烷基羰基氧基（如乙酰氧基）、取代或未取代的烷硫基、取代或未取代的芳硫基、氰基、硝基、卤原子等。

A 所代表的芳烷基的具体例子包括苄基、2-苯基乙基、3-苯基丙基等。芳烷基上的取代基的例子包括例如磺基、羧基、羟基、取代或未取代的烷基、烷氧基、卤原子等。A 所代表的取代氨基的具体例子包括例如烷基氨基（如甲基氨基、乙基氨基等）、二烷基氨基（如二甲基氨基、二乙基氨基等）、苯基氨基、二苯基氨基、甲基苯基氨基、环氨基（如吗啉基、咪唑烷基、乙氧基羰基 piperadino 基等）。如果取代的氨基具有额外的取代基，则可以使用磺基、羧基等作为该取代基。A 所代表的芳硫基的具体例子包括苯硫基、萘硫基等，而芳硫基的取代基的例子包括磺基、羧基等。

A 所代表的单价基团的例子包括苯基氨基、二苯基氨基、乙氧基羰基哌嗪基、芳硫基等。

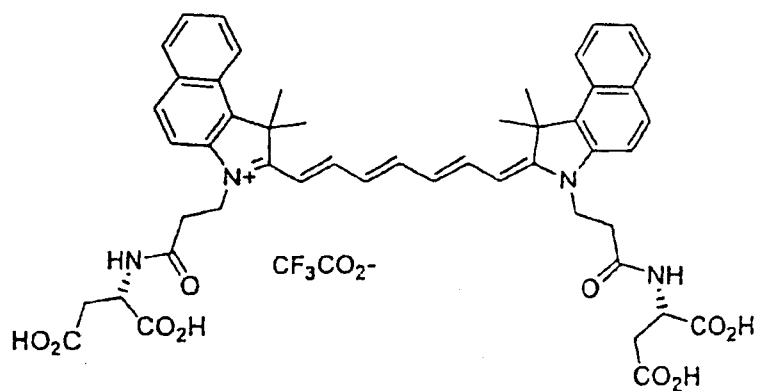
Y 代表形成 5—10 元杂环、优选 5—6 元杂环（该杂环可以是稠合环）所必需的非金属原子。Y 所形成的 5—10 元杂环的例子包括以下环：噻唑环（如噻唑、4-甲基噻唑等）、苯并噻唑环（如苯并噻唑、4-氯苯并噻唑等）、萘并噻唑环（如萘并[2,1-d]-噻唑、萘并[1,2-d]噻唑等）、噻唑啉环（如噻唑啉、4-甲基噻唑啉等）、噁唑环（如噁唑、4-硝基噁唑等）、苯并噁唑（如苯并噁唑、4-氯苯并噁唑等）、萘并噁唑（如萘并[2,1-d]噁唑、萘并[1,2-d]噁唑等）、硒唑环（如硒唑、4-苯基硒唑等）、苯并硒唑环（如苯并硒唑、4-氯苯并硒唑）、萘并硒唑环（如萘并[2,1-d]硒唑、萘并[1,2-d]硒唑等）、3,3-二烷基假吲哚环（如 3,3-二硝基假吲哚、3,3-二乙基假吲哚、3,3-二甲基-5-硝基假吲哚等）、咪唑环（如 1-烷基咪唑、1-烷基-4-苯基咪唑等）、吡啶环（如 2-吡啶、5-甲基-2-吡啶等）、喹啉环（如 2-喹啉、3-甲基-2-喹啉等）、咪唑并[4,5-b]喹喔啉环（如 1,3-二乙基咪唑并[4,5-b]喹喔啉等）等。Y 所形成的 5—10 元杂环的优选例子包括 3,3-二烷基假吲哚环。

M 代表氢原子、金属、季铵盐或药物学上可接受的其他盐。“药物学上可接受的盐”可以用通式[I]所示的化合物形成的任意的无毒性盐。其例子包括例如碱金属盐如钠盐、钾盐等；碱土金属盐如镁盐、钙盐等；有机铵盐如铵盐、三乙基铵盐、三丁基铵盐、吡啶鎓盐等；氨基酸的盐如赖氨酸盐、精氨酸盐等。特别优选的是对活体具有较低毒性的钠盐。

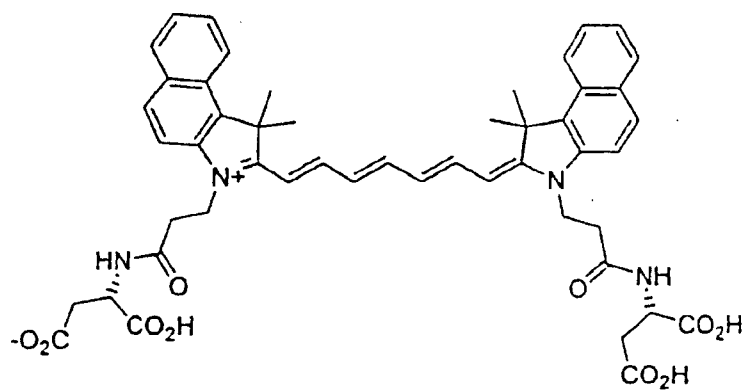
根据取代基的类型，本发明的化合物可具有 1 个或者多个不对称碳原子。硫原子可作为不对称中心。基于一个或者多个不对称碳原子的光学纯形式的旋光异构体、上述旋光异构体的任意混合物、外消旋体、基于两个或者更多个不对称碳原子的非对映异构体、上述非对映异构体的任意混合物等，都落在本发明的范围之内。

本发明化合物的具体例子见以下所示。但是，本发明的范围不仅限于以下化合物。

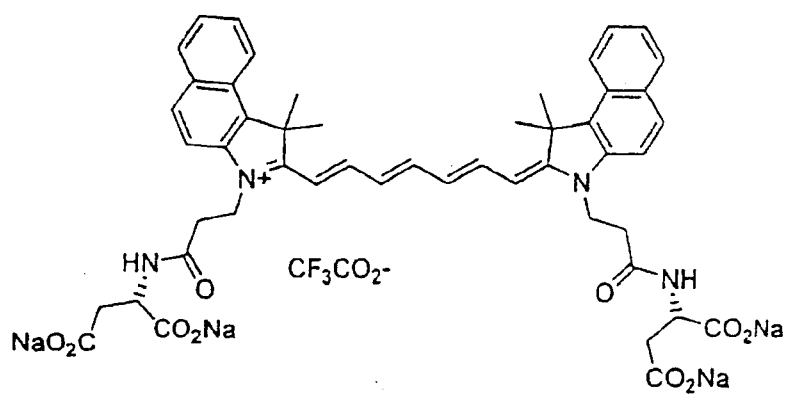
化合物 1



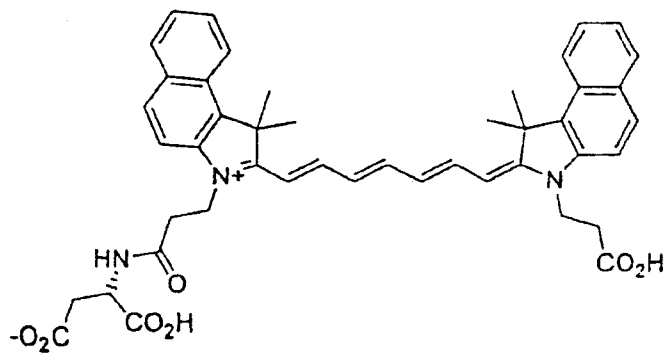
化合物 2



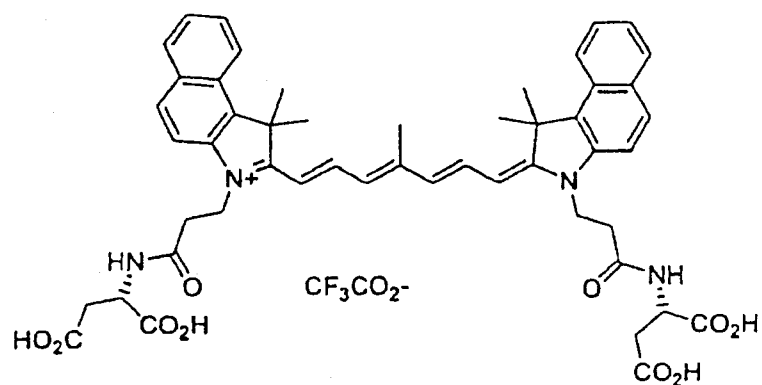
化合物 3



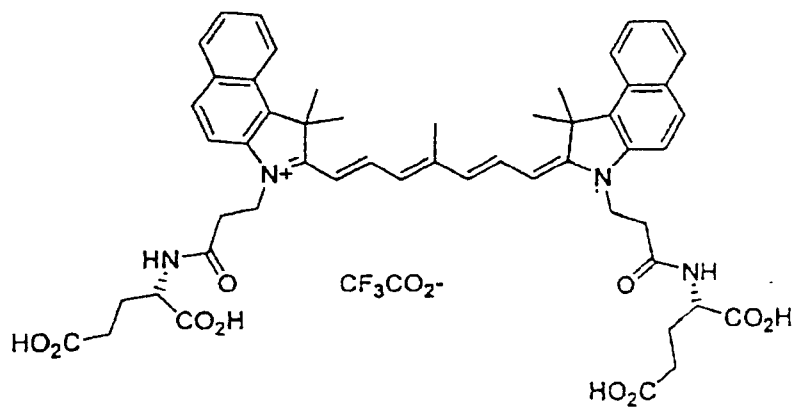
化合物 4



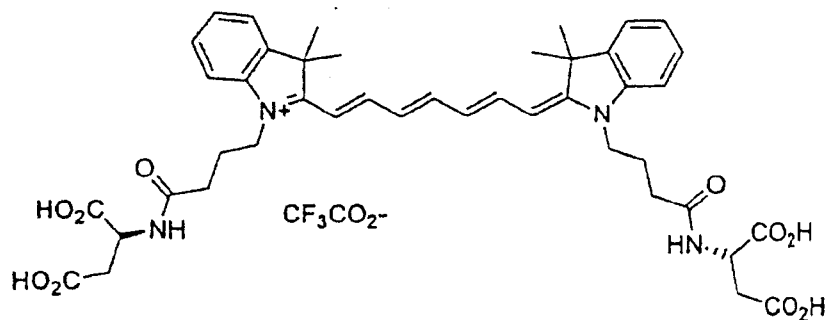
化合物 5



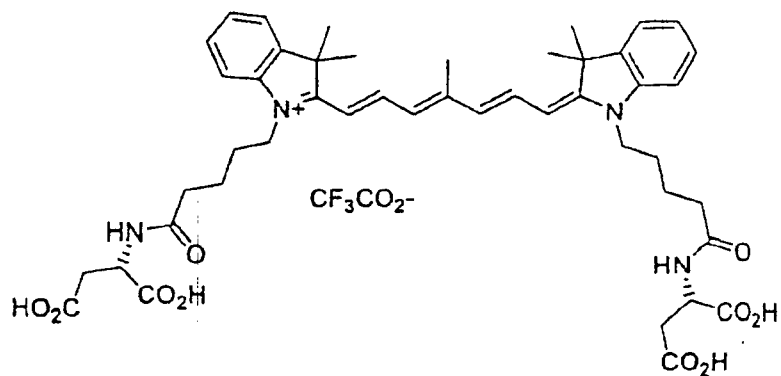
化合物 6



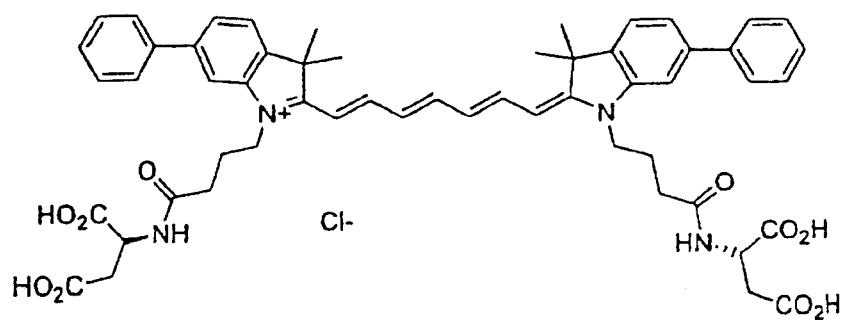
化合物 7



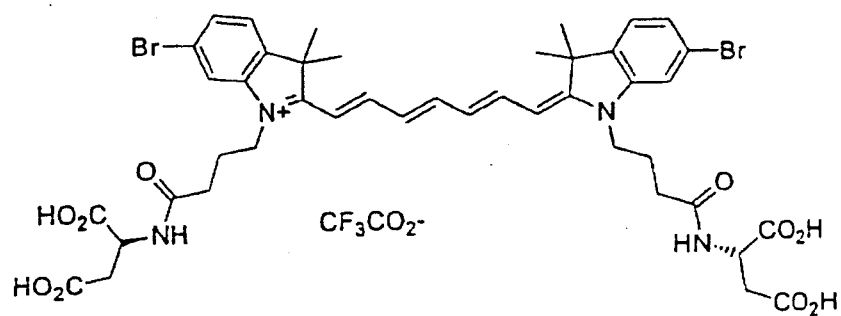
化合物 8



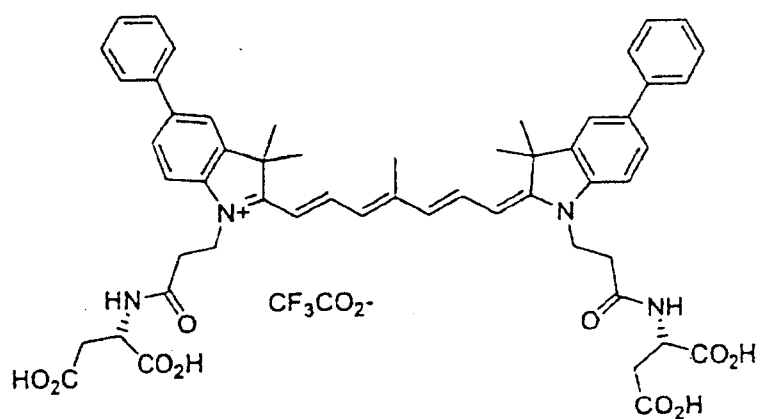
化合物 9



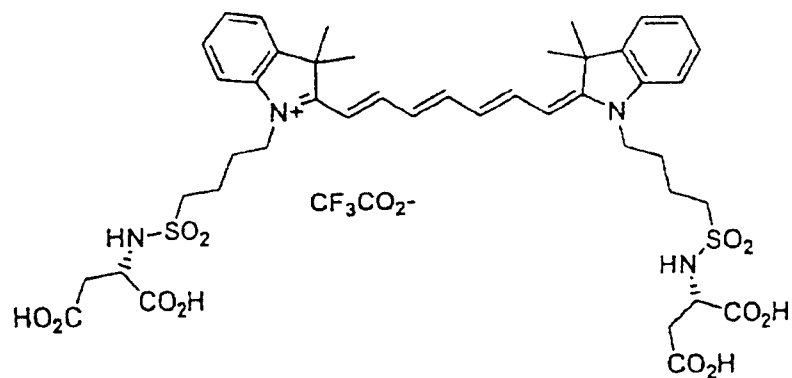
化合物 10



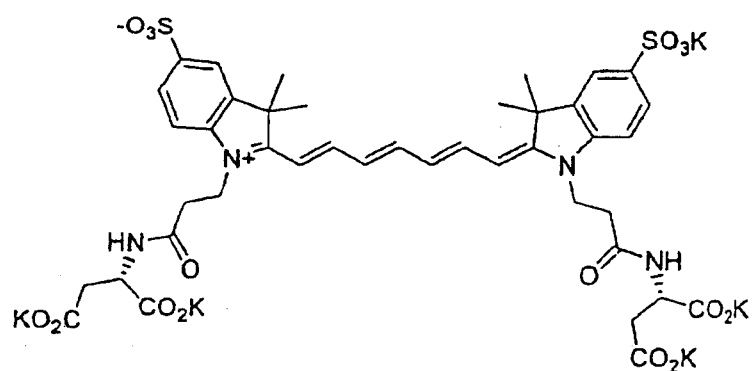
化合物 11



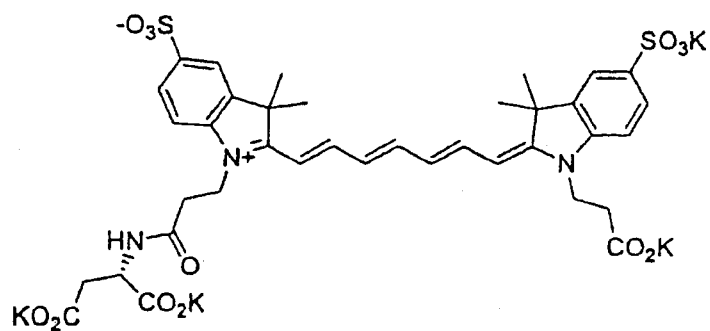
化合物 12



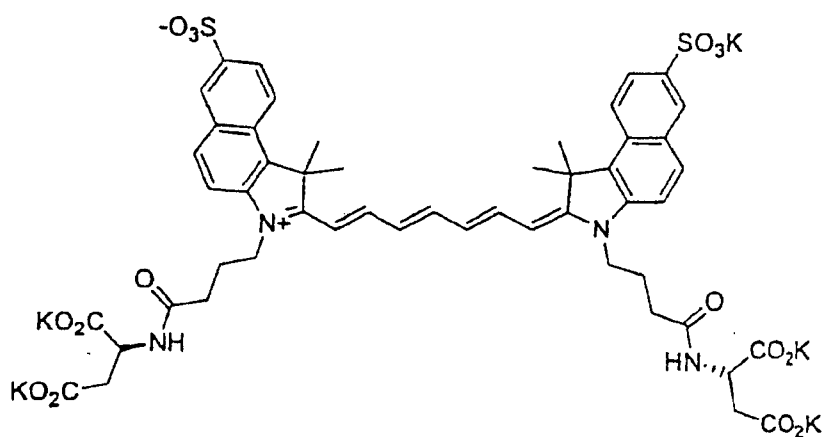
化合物 13



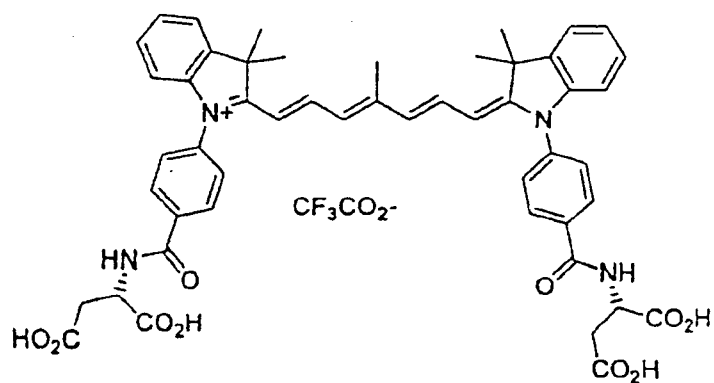
化合物 14



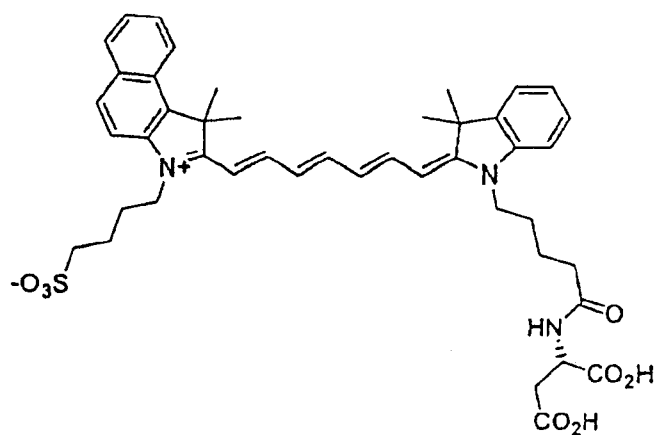
化合物 15



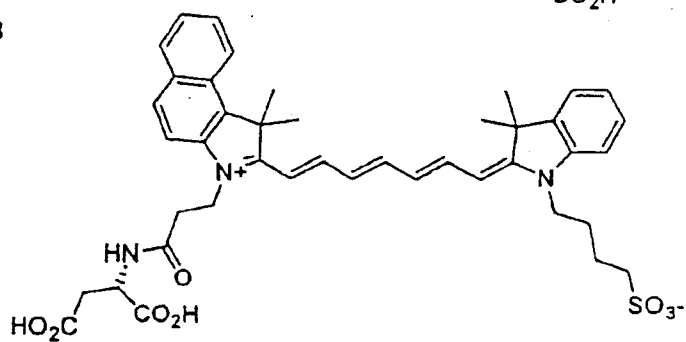
化合物 16



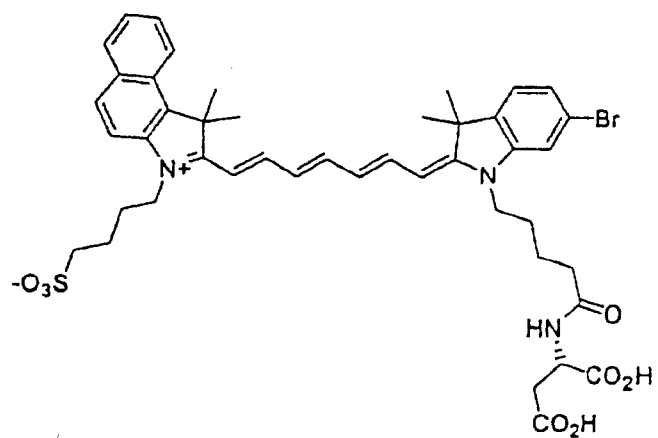
化合物 17



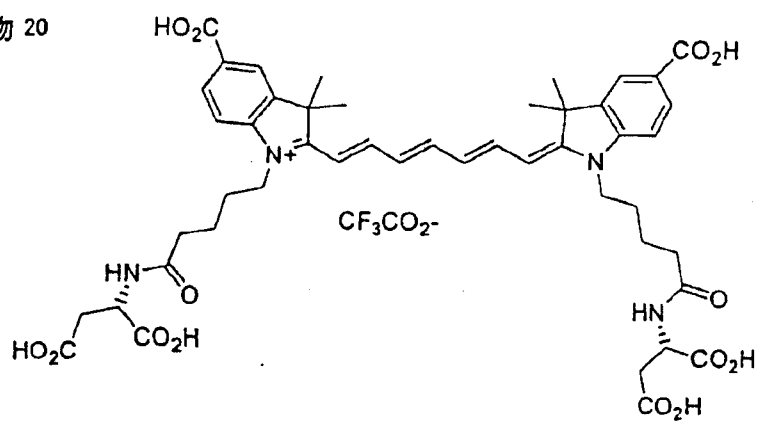
化合物 18



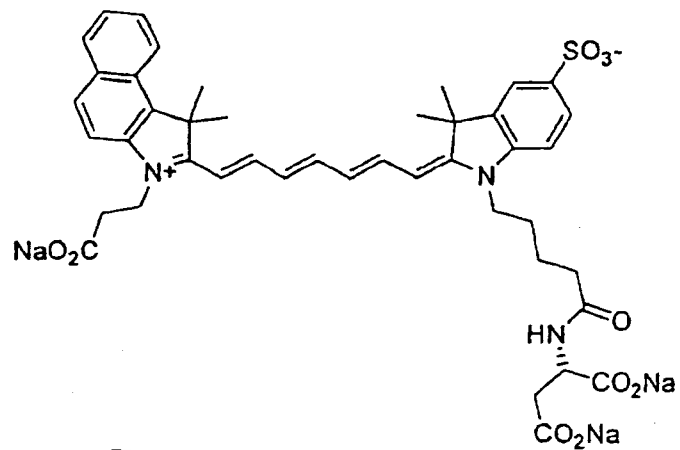
化合物 19



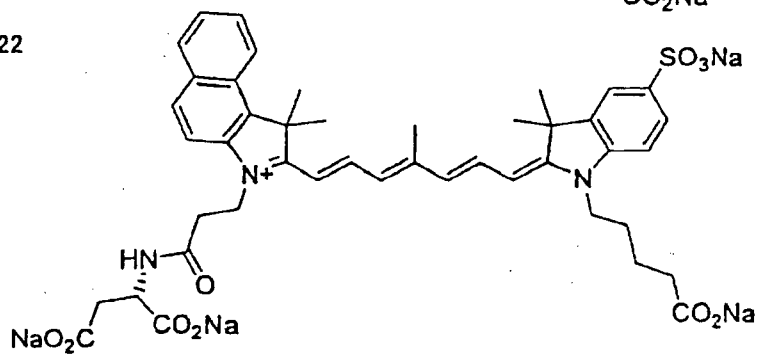
化合物 20



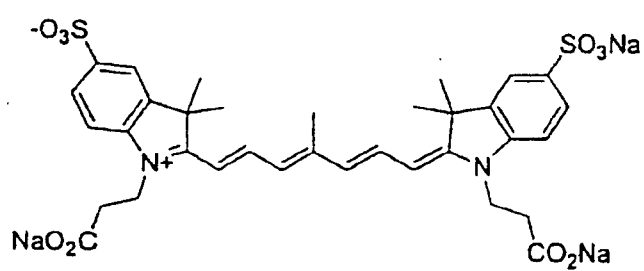
化合物 21



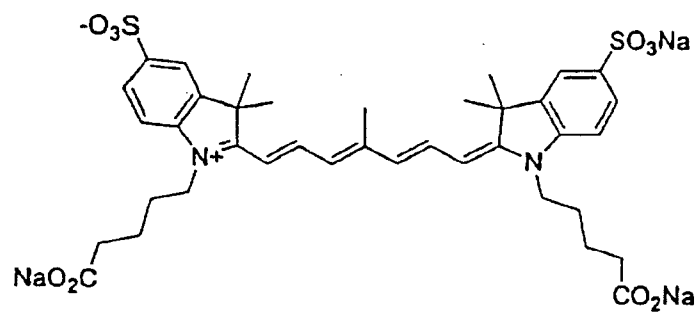
化合物 22



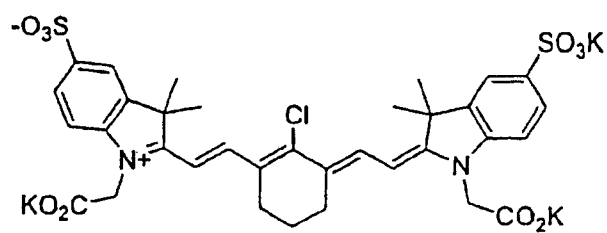
化合物 23



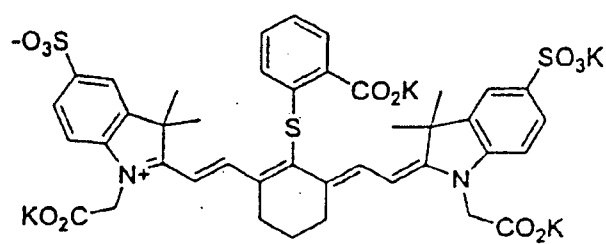
化合物 24



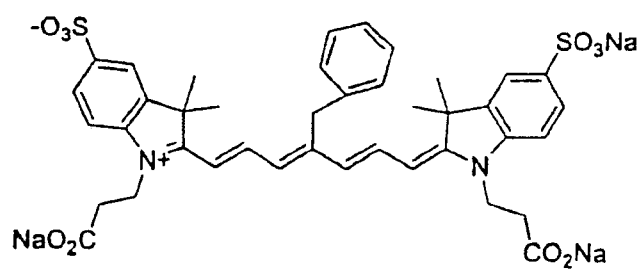
化合物 25



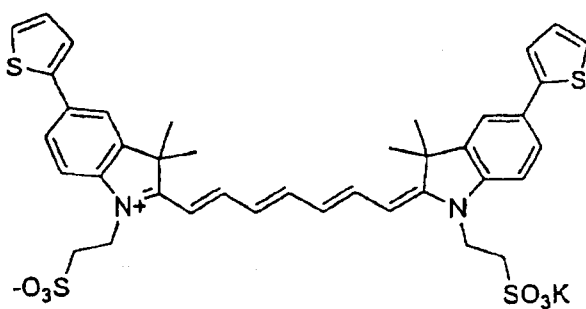
化合物 26



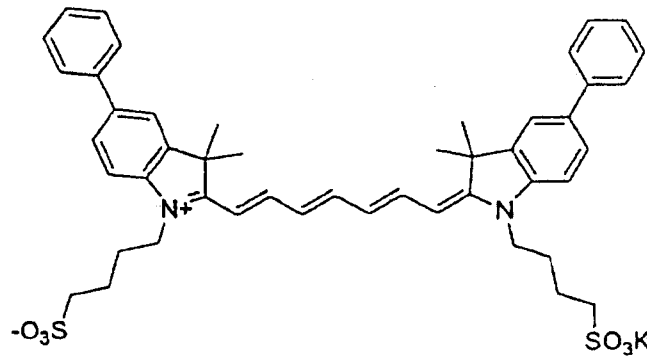
化合物 27



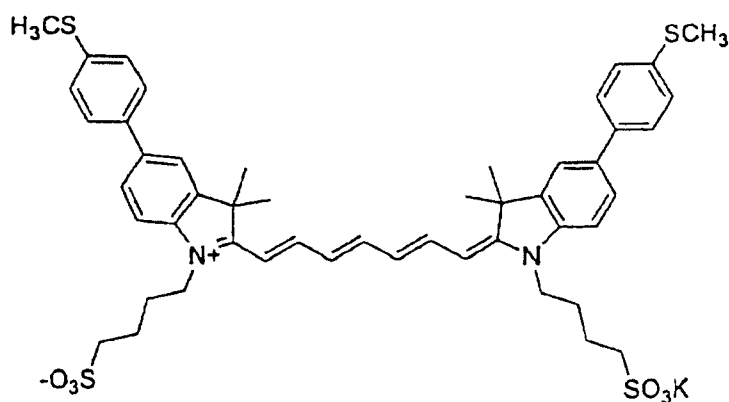
化合物 32



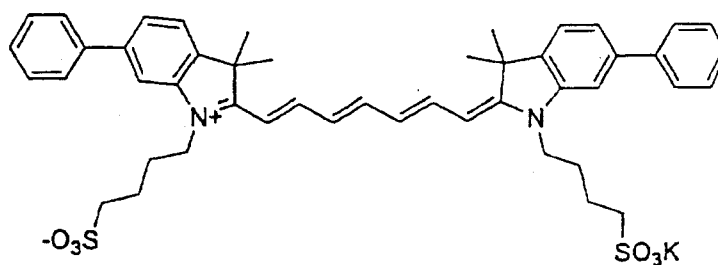
化合物 33



化合物 34



化合物 35



式[I]或[II]所示的花菁染料可根据花菁染料化合物的已知制备方法
来合成，例如以下文献中公开的方法：the Cyanines and Related

Compounds, F.M.Hamer, John Wiley and Sons, New York, 1964, Cytometry, 11, 416-430 (1990), Cytometry, 12, 723-730 (1990), Bioconjugate Chem, 4, 105-111 (1993), Anal.Biochem., 217, 197-204 (1994), Tetrahedron, 45, 4845-4866 (1989), EP-A-0591820A1, EP-A-0580145A1 等。或者, 它们可由市售的花菁染料化合物通过已知方法进行半合成。更具体而言, 它们可通过使二芳基化合物与杂环季盐反应来合成。

制备式[I]或[II]所示的花菁染料化合物的方法没有具体的限制, 而且这些化合物可通过各种合成途径进行合成。本发明之典型化合物的具体制备方法公开在本发明说明书的实施例中。因此, 本领域技术人员可通过实施例中描述的方法, 并且在必要时对这些方法增加合适的变化或改进, 适当地选择起始物和试剂, 制得在上述通式范围内的花菁染料化合物。在制备时, 可以单独或者组合使用选自于缩合、加成、氧化、还原等各种反应的反应。这些反应在文献中都有详细的解释。例如, 可以适当地使用在“Jikken Kagaku Kouza”(由 Maruzen, Ltd.出版, 在第一至第四版中包括每一单独的卷都是可得的)中描述为单元合成操作的各种方法和原料化合物。另外, 本发明化合物的合成具体描述在 PCT/JP01/06689 的说明书中, 该文献的公开内容在此并入作为参考。

例如, 如果上述定义的官能团可在反应步骤中发生变化或者它们在制备中不适合进行反应步骤, 则有时可通过使用有机合成化学领域中常规使用的各种方法来有效地进行所希望的步骤, 例如用于官能团的保护或者脱保护的方法, 或者进行各种处理, 如氧化、还原、水解等。在上述步骤中的合成中间体化合物以及目标化合物可通过有机合成化学中使用的常规纯制方法进行分离和纯制, 例如过滤、萃取、洗涤、干燥、浓缩、重结晶、以及各种色谱法等。合成的中间产物可无需分离即用于接下来的步骤中。

作为本发明的近红外荧光造影剂的活性成分, 通式[I]或[II]所示的化合物或其盐可单独使用或者组合使用。更具体而言, 活性成分可以在溶

剂中的悬浮液或者溶液的形式包含在造影剂中，所述溶剂例如是注射用蒸馏水、生理盐水、Ringer 溶液等。如果需要，也可配制加入诸如药理学可接受的载体、赋形剂等的添加剂。这些添加剂的例子包括诸如药理学可接受的电解质溶液、缓冲液、去污剂的物质、以及用于调节渗透压的物质、用于提高稳定性或溶解度的物质如环糊精、脂质体等。可以使用本领域中通常可以得到的任意添加剂。在用作临床使用的药物时，本发明的近红外荧光造影剂优选通过无菌工艺进行合成。

本发明的造影剂可通过注射、喷雾或者局部施用如血管内给药（静脉、动脉）、口服给药、腹膜内给药、经皮给药、皮下给药、囊内给药、或支气管内给药等途径进行给药。优选地，该造影剂可以水溶液、乳液或者混悬液的形式给药于血管内。

本发明近红外荧光造影剂的剂量没有具体的限制，只要该剂量能够使待诊断的部位被检测出来。根据待使用的发射近红外荧光的化合物的类型、待给药的患者年龄、体重和目标器官等，该剂量可增加或者减少。通常情况下，以化合物的重量表示的剂量可以是 0.1—100 mg/kg 体重，优选为 0.5—20 mg/kg 体重。

本发明的造影剂也可适当地用于人以外的各种动物中。给药剂型、给药途径以及剂量等，可根据目标动物的体重和条件进行适当地选择。

以上式[I]和[II]所示的本发明化合物具有高度累积在肿瘤组织中的性质。利用该性质，本发明还提供能够特异性地使肿瘤组织成像的荧光造影剂。另外，该类的本发明化合物可长期地保留在血管中，并且本发明的荧光造影剂因此还可用于血管造影。

本发明之用于荧光成像的方法的特征在于使用本发明的近红外荧光造影剂。本领域的普通技术人员可根据已知的方法实施该成像方法，而且根据待给药的近红外荧光造影剂的种类以及待给药的患者，可适当地确定各个参数，如激发波长和待检测的荧光波长，以达到最佳的成像和评估。从给药本发明的近红外荧光造影剂到开始根据本发明的荧光成像

的时间间隔,可根据待使用的近红外荧光造影剂的种类以及待给药的患者而变化。例如当给药包含式[I]或式[II]的化合物的造影剂进行肿瘤成像使,时间间隔可以是在给药后约10分钟—24小时。如果时间间隔太短,每个部位中发出的荧光仍然过强,而且目标部位不能与其他部位区别出来。如果时间间隔太长,造影剂有可能被从身体中排泄掉。当希望对血管进行成像时,可在给药后立即或者在给药后约30分钟内检测式[I]或式[II]的化合物。

例如,可按照以下步骤进行荧光成像。将本发明的近红外荧光造影剂给药于待诊断的患者,使用产生激发光的装置,使所述患者暴露于所述激发光。接着,使用荧光检测器检测由所述近红外荧光造影剂发出并由所述激发光产生的荧光。激发波长可根据所用近红外荧光造影剂的类型进行变化,而且没有限制,只要所述化合物在近红外区域中有效地发射出荧光。优选使用具有优异生物渗透性的近红外光。待检测的近红外荧光的波长也根据所用造影剂来变化。通常情况下,可以使用波长为600—1000 nm、优选700—850 nm的激发光,并检测波长为700—1000 nm、优选750—900 nm的近红外荧光。作为产生激发光的装置,可使用常规激发光源,如各种激光(如离子激光、染料激光和半导体激光)、卤素光源、氙光源等。如果需要,可使用各种滤光器以得到最佳的激发波长。在检测荧光时,可使用各种滤光器用于选择由近红外荧光造影剂产生的荧光。

检测到的荧光作为荧光信息进行数据处理,以构建待记录的荧光图像。形成荧光图像的方法的例子包括例如包含以下步骤的方法:宽范围地照射目标组织,用CCD照相机检测荧光,然后对得到的荧光信息进行图像处理;使用光学CT装置的方法;使用内窥镜的方法;或者使用眼底照相机的方法,等等。

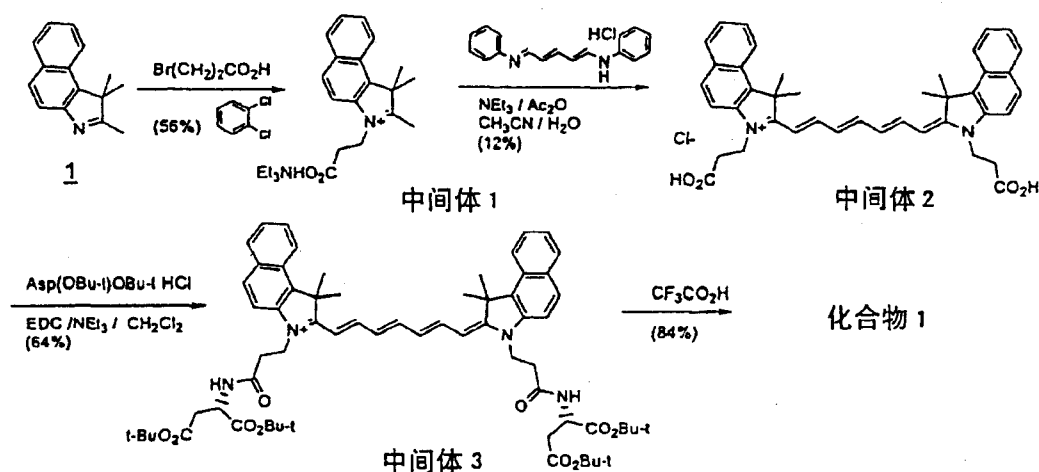
根据本发明的荧光成像方法,在不破坏活体的情况下可观察到系统疾病、肿瘤、血管等。

实施例

以下将参考合成实施例和测试实施例对本发明进行更为详细的说明。但是，本发明的范围绝不仅限于以下实施例。在这些实施例中，化合物的序列号相应于在以上化学结构中所列的化合物的编号。

实施例 1：化合物 1、化合物 2 和化合物 3 的合成

化合物 1 的合成路线见以下所示。



中间体 1 的合成

加热起始物 1 (20.9 g, 0.1 mol)、2-溴丙酸 (23.0 g, 0.15 mol)、和 *o*-二氯苯 (20 ml)，并在 140℃ 下搅拌 2 小时。反应完成后，在反应混合物中添加丙酮 (200 ml)，并冷却至室温，然后过滤所得的晶体，得到中间体 1 (20.3 g，产率：56%)。

中间体 2 的合成

将如上得到的中间体 1 (10.0 g, 28 mmol) 和 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯盐酸盐 (3.9 g, 14 mmol) 溶解在乙腈 (70 ml) 和水 (11 ml) 中，所得溶液中加入三乙胺 (8.4 g, 91 mmol) 和醋酸酐 (8.5 g, 91 mmol)，

该混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物滴加至 0.1 N 盐酸 (900 ml) 中, 并过滤沉淀出的结晶。该结晶通过柱色谱进行纯制 (洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇=95: 5-90: 10), 得到中间体 2 (2.1 g, 产率: 12%)。

中间体 3 的合成

将如上得到的中间体 2 (21.0 g, 1.5 mmol)、L-天冬氨酸-二叔丁基酯单水合物 (1.3 g, 4.5 mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (40 mg, 0.3 mmol) 溶解在二氯甲烷 (50 ml) 中, 并在冰上冷却该溶液。在所得溶液中添加 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) (700 mg, 4 mmol) 和三乙胺 (340 mg, 3 mmol), 并在 4°C 下搅拌过夜。在反应混合物中添加二氯甲烷 (200 ml) 和 1N 盐酸 (200 ml), 萃取二氯甲烷层, 并用饱和氯化钠溶液 (200 ml) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥。减压蒸发溶剂, 并通过柱色谱进行纯制 (洗脱剂: 乙酸乙酯: 甲醇=95: 5-80: 20), 得到中间体 3 (1.1 g, 产率: 64%)。

化合物 1、化合物 2 和化合物 3 的合成

将中间体 3 (500 mg, 0.5 mmol) 溶解在三氟乙酸 (5 ml) 中, 在 4°C 下反应过夜, 然后减压蒸发三氟乙酸。过滤收集晶体, 然后用水和乙酸乙酯洗涤, 得到化合物 1 (390 mg, 产率: 90%)。

使用 Sephadex (LH-20, Pharmacia) 通过柱色谱 (洗脱剂: 甲醇) 对化合物 1 进行纯制, 得到化合物 2。

将化合物 1 放在离子交换树脂柱 CR 11 (Mitsubishi Chemical, Co., Ltd.) 上, 得到化合物 3。

化合物 1

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ δ 1.98 (s, 12H), 2.70 (d, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.80 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.60 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.80

(H₂O), 6.40 (d, J=13.2 Hz, 2H), 6.63 (dd, J=13.2, 13.2 Hz, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.66 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d, J=7.2 Hz, 2H)

化合物 2

¹H-NMR(CD₃OD) δ 1.99 (s, 12H), 2.72 (d, J=7.2 Hz, 4H), 2.80 (t, J=7.2 Hz, 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t, J=7.2 Hz, 4H), 4.60 (t, J=7.2 Hz, 2H), 4.80 (H₂O), 6.38 (d, J=13.2 Hz, 2H), 6.61 (dd, J=13.2, 13.2 Hz, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 5H), 7.96-8.07 (m, 6H), 8.21 (d, J=7.2 Hz, 2H)

化合物 3

¹H-NMR(CD₃OD) δ 1.98 (s, 12H), 2.56-2.65 (m, 4H), 2.75-2.85 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.45-4.50 (m, 4H), 4.80 (H₂O), 6.20 (d, J=13.2 Hz, 2H), 6.65 (dd, J=13.2, 13.2 Hz, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.70 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d, J=7.2 Hz, 2H)

实施例 2: 化合物 5 的合成

按照类似于化合物 1 的方法由中间体 1 和 1,7-二氮杂-5-甲基-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单水合物合成化合物 5。

¹H-NMR(CD₃OD) δ 2.00 (s, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.73 (d, J=7.2 Hz, 4H), 2.82 (t, J=7.2 Hz, 4H), 3.31 (MeOH), 4.50 (t, J=7.2 Hz, 4H), 4.69 (t, J=7.2 Hz, 2H), 4.88 (H₂O), 6.41 (d, J=13.2 Hz, 2H), 6.65 (d, J=13.2 Hz, 2H), 7.43-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

实施例 3: 化合物 6 的合成

按照类似于化合物 1 的方法由中间体 1 和 1,7-二氮杂-5-甲基-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单水合物合成化合物 6, 不同之处在于: 使用 L-谷氨酸-二叔丁基酯单水合物替代 L-天冬氨酸-二叔丁基酯单水合物。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ 1.80-2.15 (m, 4H), 2.01 (s, 12H), 2.28 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.82 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.31 (MeOH), 4.40-4.50 (m, 2H), 4.51 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.88 (H_2O), 6.42 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 7.42-7.50 (m, 2H), 7.57-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

实施例 4: 化合物 7 的合成

按照类似于化合物 1 的方法由 2,3,3-三甲基假吲哚合成化合物 7。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ 1.70 (s, 12H), 2.05-2.13 (m, 4H), 2.55 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.78-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.10 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.89 (H_2O), 6.45 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 6.50 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 7.29-7.50 (m, 8H), 7.92 (dd, $J=13.2, 13.2$ Hz, 2H)

实施例 5: 化合物 8 的合成

按照类似于化合物 1 的方法由 2,3,3-三甲基假吲哚合成化合物 8, 不同之处在于: 使用 1,7-二氮杂-5-甲基-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单盐酸盐替代 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单水合物。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ 1.70 (s, 12H), 1.72-1.90 (m, 8H), 2.35-2.39 (m, 7H), 2.73-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.66 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.89 (H_2O), 6.33 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 7.18-7.50 (m, 8H), 8.05 (dd, $J=13.2, 13.2$ Hz, 2H)

实施例 6: 化合物 9 的合成

按照类似于化合物 1 的方法由 6-苯基-2,3,3-三甲基假吲哚 (按照美国专利 6,004, 536 中描述的方法合成的) 合成化合物 9。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ 1.75 (s, 12H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.45-2.55 (m, 4H), 2.75-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.20 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.80 (H_2O),

6.38 (J=13.2 Hz, 2H), 6.62 (J=13.2 Hz, 2H), 7.43-7.70 (m, 17H), 7.95 (dd, J=13.2, 13.2 Hz, 2H)

实施例 7: 化合物 10 的合成

由 6-溴-2,3,3-三甲基-假吲哚按照类似于化合物 1 的方法合成化合物 10。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ δ 1.68 (s, 12H), 2.00-2.15 (m, 4H), 2.40-2.55 (m, 4H), 2.77-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t, J=7.2 Hz, 4H), 4.82 (m, 2H), 6.38 (J=13.2 Hz, 2H), 6.65 (J=13.2 Hz, 2H), 7.30-7.40 (m, 4H), 7.50-7.72 (m, 3H), 7.90-8.02 (m, 2H)

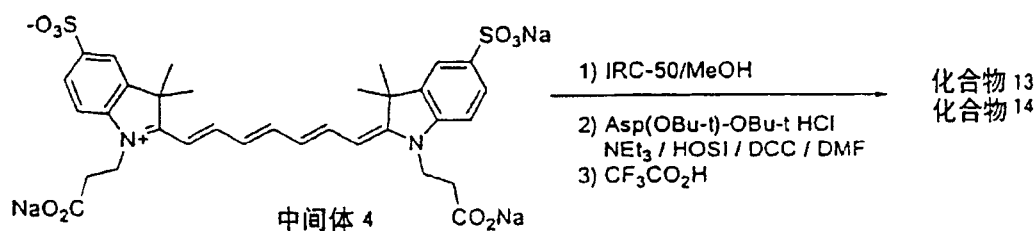
实施例 8: 化合物 11 的合成

由 5-苯基-2,3,3-三甲基-假吲哚按照类似于化合物 1 的方法合成化合物 11。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ δ 1.78 (s, 12H), 2.39 (s, 3H), 2.70-2.84 (m, 8H), 3.30 (MeOH), 4.30-4.46 (m, 4H), 4.60-4.68 (m, 2H), 6.39 (J=13.2 Hz, 2H), 6.66 (J=13.2 Hz, 2H), 7.30-7.48 (m, 9H), 7.56-7.72 (m, 3H), 8.05 (J=13.2 Hz, 13.2 Hz)

实施例 9: 化合物 13 和化合物 14 的合成

化合物 13 和化合物 14 的合成路线如下所示。



将通过使 5-磺基-2,3,3-三甲基假吲哚（根据日本尚未审查的专利申

请公开(Hei) 2-233658 中描述的方法制备的) 和 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单盐酸盐在甲醇中于三乙胺和醋酸酐存在下反应而制得的中间体化合物 (375 mg) 溶解在 5 ml 的甲醇中, 然后施放在填充有离子交换树脂 IRC-50 的柱 (Organo, 洗脱剂: 甲醇) 中。蒸发溶剂, 得到质子形式的羧酸。将所得产物溶解在 3 ml 的二甲基甲酰胺中, 并在该溶液中添加 338 mg (1.2 mmol) 的天冬氨酸二丁基酯盐酸盐、24 mg (0.2 mmol) 的二甲基氨基吡啶、以及 121 mg (1.2 mmol) 的三乙胺, 然后在冰浴上冷却该混合物。向该混合物中添加 230 mg (2 mmol) 的羟基琥珀酰亚胺 (HOSI) 和 288 mg (1.4 mmol) 的 N, N-二环己基-碳二亚胺 (DCC), 所得混合物搅拌过夜。向反应混合物中添加 200 ml 的乙酸乙酯/己烷 (1: 1) 混合溶剂, 过滤收集沉淀出的晶体。该晶体通过柱色谱进行纯制 (洗脱剂: 二氯甲烷: 甲醇 = 10: 1—2: 1), 得到二酰胺化合物 (135 mg) 和单酰胺化合物 (94 mg)。

将所得的二酰胺化合物 (120 mg) 和单酰胺化合物 (60 mg) 分别溶解在 2 ml 的三氟乙酸中, 然后在室温下搅拌混合物 1 小时。反应混合物溶解在水/甲醇 (1/1 (v/v)) 中, 然后使用 Sephadex (LH-20, Pharmacia, 洗脱剂: 甲醇) 通过柱色谱进行纯制。将所得晶体溶解在少量的甲醇中, 并在该溶液中添加乙酸钾在甲醇中的饱和溶液。过滤收集沉淀出的晶体, 得到化合物 13 (35 mg, 产率 7%) 和化合物 14 (15 mg, 产率 5%)。

化合物 13

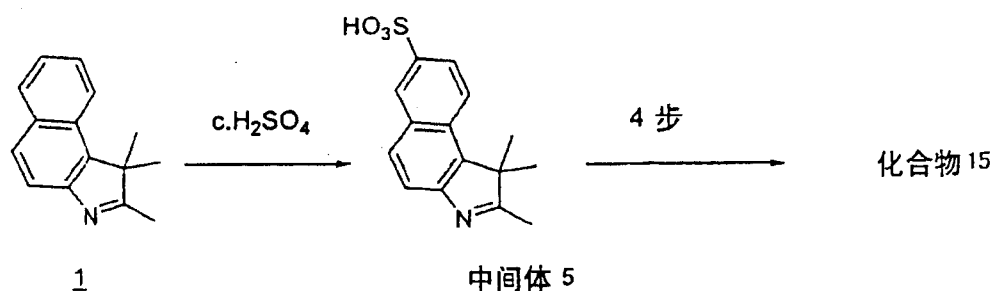
$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 1.73 (s, 12H), 2.50-2.65 (m, 4H), 2.68-2.73 (m, 4H), 4.28-4.38 (m, 4H), 4.39-4.50 (m, 2H), 4.90 (D_2O), 6.47 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 6.74 (t, $J=13.2$ Hz, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.60 (t, $J=13.2$ Hz, 1H), 7.80-8.05 (m, 6H)

化合物 14

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 1.65 (s, 6H), 1.70 (s, 6H), 2.40 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.70 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.18-4.30 (m, 4H), 4.90 (D_2O), 6.18 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 6.48-6.62 (m, 2H), 7.20 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J=13.2$ Hz, 1H), 7.68-7.95 (m, 6H)

实施例 10: 化合物 15 的合成

化合物 15 的合成路线如下所示。



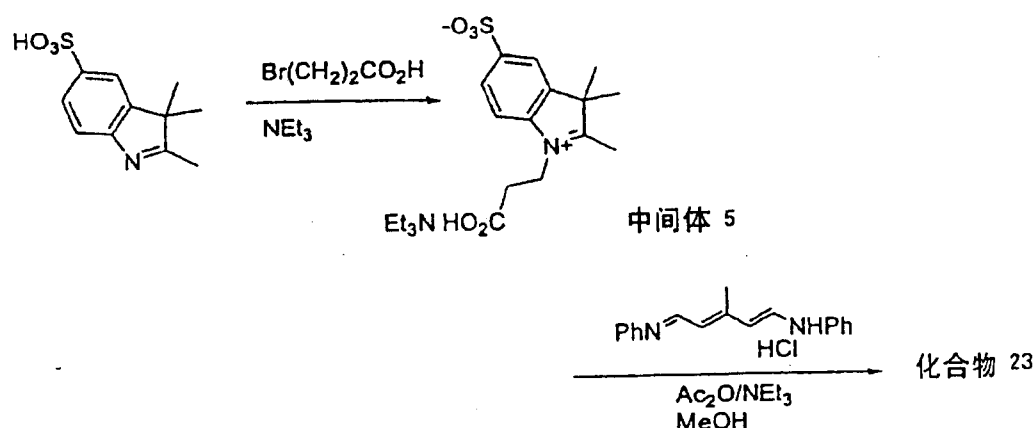
将起始物(41.8 g, 0.2 mol) 溶解在浓硫酸 (156 ml, 2.9 mol)中, 并在 140°C 下反应 1 小时, 然后将该混合物冷却至 80°C 。将所得的溶液添加在冰水 (300 ml) 中后, 小心地将氢氧化钠 (96.6 g, 2.4 mol)在水(100 ml)中的溶液添加至上述混合物中。过滤收集沉淀出的晶体, 并用水 (120 ml) 洗涤。所得的粗晶体中添加水(300 ml) 和甲醇 (100 ml), 混合物在搅拌下回流 30 分钟, 然后冷却至室温。过滤收集所得的晶体, 并用水(100 ml) 和甲醇 (120 ml) 洗涤, 得到中间体 5 (37.9 g, 产率: 66%)。

按照类似于化合物 13 的方法由中间体 5 制得化合物 15。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ δ 2.00 (s, 12H), 2.72 (d, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.82 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.30 (MeOH), 4.58 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.70 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.86 (H_2O), 6.42 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 6.62 (dd, $J=13.2, 13.2$ Hz, 2H), 7.62-7.70 (m, 3H), 7.95-8.12 (m, 6H), 8.28 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.42 (s, 2H)

实施例 11: 化合物 23 的合成

化合物 23 的合成路线如下所示。



中间体 6 的合成

加热 5-磺基-2,3,3-三甲基假吡啶（根据日本尚未审查的专利申请公开(Hei) 2-233658 中描述的方法制备的）(24.0 g, 0.1 mol)、2-溴丙酸 (23.0 g, 0.15 mol) 和三乙胺 (10.1 g, 0.1 mol)，并在 160℃ 下搅拌 6 小时。反应完全后，向反应混合物中添加甲醇 (200 ml)，冷却至室温，然后过滤收集所得的晶体，得到中间体 6 (6.0 g, 产率：19.3%)。

化合物 23 的合成

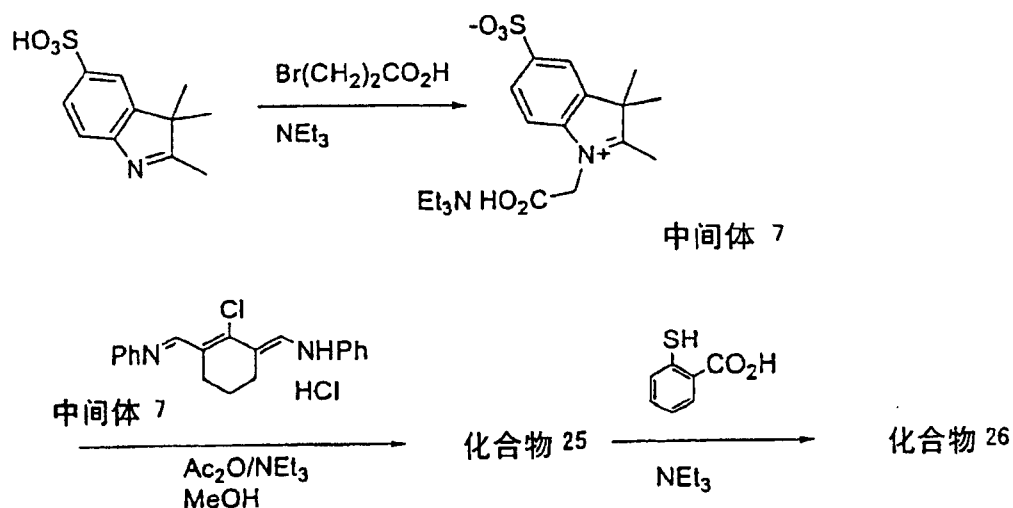
将如上得到的中间体 1 (3.1 g, 10 mmol) 和 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-4-甲基-1,3,5-庚三烯单盐酸盐 (日本尚未审查的专利申请公开(Hei) 8-295658) (1.5 g, 5 mmol) 溶解在甲醇 (20 ml) 中, 并向所得的溶液中添加三乙胺 (2.5 g, 25 mmol) 和醋酸酐 (4.6 g, 45 mmol), 然后在室温下搅拌混合物 3 小时。向反应混合物中添加醋酸钠 (3.3 g, 33 mmol), 然后在室温下搅拌 30 分钟。过滤收集所得的晶体, 并用甲醇 (20 ml) 洗涤, 得到化合物 23 (2.0 g, 产率: 50.0%)。

¹H-NMR(CD₃OD) δ (ppm) 1.60 (s, 12H), 2.30 (s, 3H), 2.60 (t, 4H, J=7.2 Hz), 4.20 (t, 4H, J=7.2 Hz), 6.25 (d, 2H, J=14.5 Hz), 6.55 (dd, 2H, 14.5,

14.5 Hz), 7.25 (d, 2H, J=7.0 Hz), 7.70-7.80 (m, 4H), 8.00 (dd, 2H, J=14.5, 14.5 Hz)

实施例 12: 化合物 25 和化合物 26 的合成

化合物 25 和化合物 26 的合成路线如下所示。



中间体 7 的合成

由 5-磺基-2,3,3-三甲基假吲哚和溴乙酸按照类似于中间体 6 的方法合成中间体 7 (16.6 g)。

化合物 25 的合成

由中间体 7 和中间体 8 (根据 Zh. Org. Khim., 13, pp. 1189-1192, 1977 中描述的方法制得的) 按照类似于化合物 23 的方法合成化合物 25 (15.0 g)。

MS (FAB-, 甘油) $m/z = 844$

化合物 26 的合成

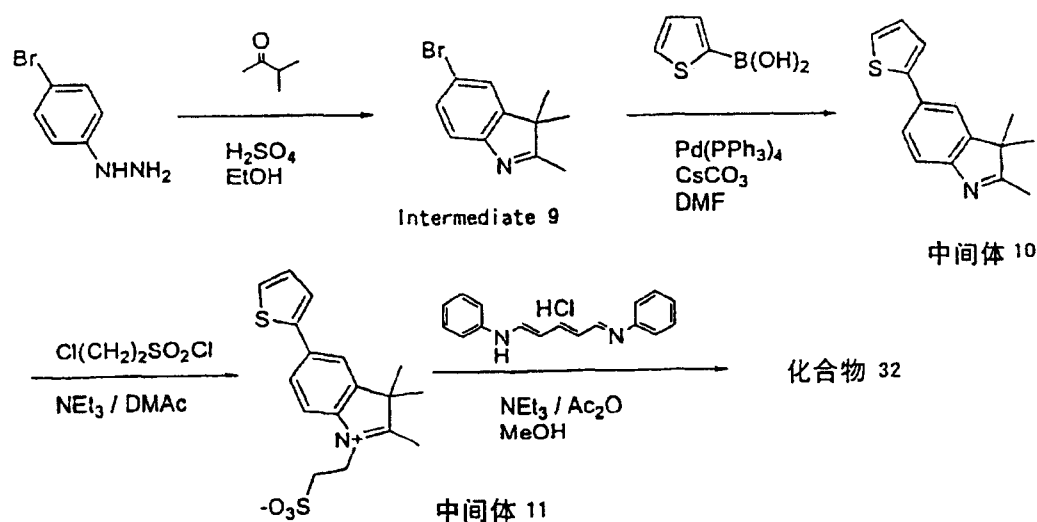
将化合物 25 (4.2 g, 5 mmol) 和三乙胺 (1.0 g) 添加至水 (20 ml) 中, 向

所得的溶液中添加 *o*-巯基苯甲酸 (0.93 g, 6 mmol), 然后在室温下搅拌 1 小时。所得的混合物中添加醋酸钾, 然后添加乙醇 (20 ml), 过滤所得的晶体, 得到化合物 26 (1.3 g, 产率: 27%)。

MS (FAB-, 甘油) $m/z = 962$

实施例 13: 化合物 32 的合成

化合物 32 的合成路线如下所示。



中间体 9 的合成

将 4-溴苯肼单盐酸盐 (73.8 g, 0.33 mmol) 和 3-甲基-2-丁酮 (33.2 g, 0.40 mmol) 溶解在乙醇 (450 ml) 中, 向所得的溶液中添加浓硫酸 (7.5 ml), 然后在搅拌下回流 8 小时。将混合物冷却至室温后, 将溶液减压浓缩至 100 ml。向残留物中添加水 (400 ml) 和乙酸乙酯 (400 ml), 然后用氢氧化钠溶液将含水层的 pH 调节至 7—8。所得的溶液用乙酸乙酯萃取, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 然后在无水硫酸钠上干燥。所得的残留物通过硅胶柱色谱进行纯制 (洗脱剂: 己烷: 乙酸乙酯 = 5: 1—1: 1), 得到棕色液体状的中间体 9 (58.6 g, 产率 76%)。

中间体 10 的合成

将中间体 9 (4.76 g, 20 mmol) 和噻吩硼酸 (3.84 g, 30 mmol) 添加至二甲基酰胺 (50 ml) 中, 向所得的溶液中添加四苯基磷钨 (1.16 g, 9 mmol) 和氯化铯 (13.3 g, 40 mmol), 然后在氮气氛围下加热并在 100℃ 下搅拌 4 小时。添加水 (200 ml) 后, 用乙酸乙酯 (200 ml) 萃取混合物, 并用饱和氯化钠溶液洗涤, 有机层在无水硫酸钠上干燥, 然后进行减压蒸发。残留物通过硅胶柱色谱进行纯制 (洗脱剂: 己烷: 乙酸乙酯 = 2: 1-1: 1), 得到棕色固体状的中间体 10 (2.8 g, 产率: 58%)。

中间体 11 的合成

将中间体 10 (1.40 g, 6 mmol) 和三乙胺 (0.59 g, 6 mmol) 添加至二甲基甲酰胺 (3 ml) 中, 并在冰冷却下向该混合物中滴加 2-氯乙烷亚硫酸酐 (1.42 g, 9 mmol)。继续在室温下搅拌 30 分钟后, 向溶液中添加氢氧化钠 (0.23 g, 6 mmol) 在水 (2 ml) 中的溶液, 然后进一步在室温下搅拌 1 小时。向该混合物中添加乙酸乙酯, 倾析掉上层。干燥残留物, 得到中间体 11。该中间体 11 未经纯制即用于下一步反应中。

化合物 32 的合成

将如上得到的中间体 11 和 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单盐酸盐溶解在甲醇 (5 ml) 中, 向所得的溶液中添加三乙胺 (160 mg, 2 mmol) 和无水乙酸 (230 mg, 2 mmol), 然后在室温下搅拌混合物 7 小时。向该混合物中添加乙酸乙酯 (20 ml), 过滤收集沉淀出的晶体, 并用乙酸乙酯 (10 ml) 洗涤。将该晶体溶解在甲醇 (10 ml) 中, 并向该溶液中添加饱和醋酸钾在甲醇 (10 ml) 中的饱和溶液。过滤收集沉淀出的晶体, 并用甲醇 (5 ml) 洗涤。晶体通过 Sephadex LH-20 (洗脱剂: 甲醇) 进行纯制, 得到化合物 32 (15 mg, 产率: 2%, 由中间体 2 计算)。

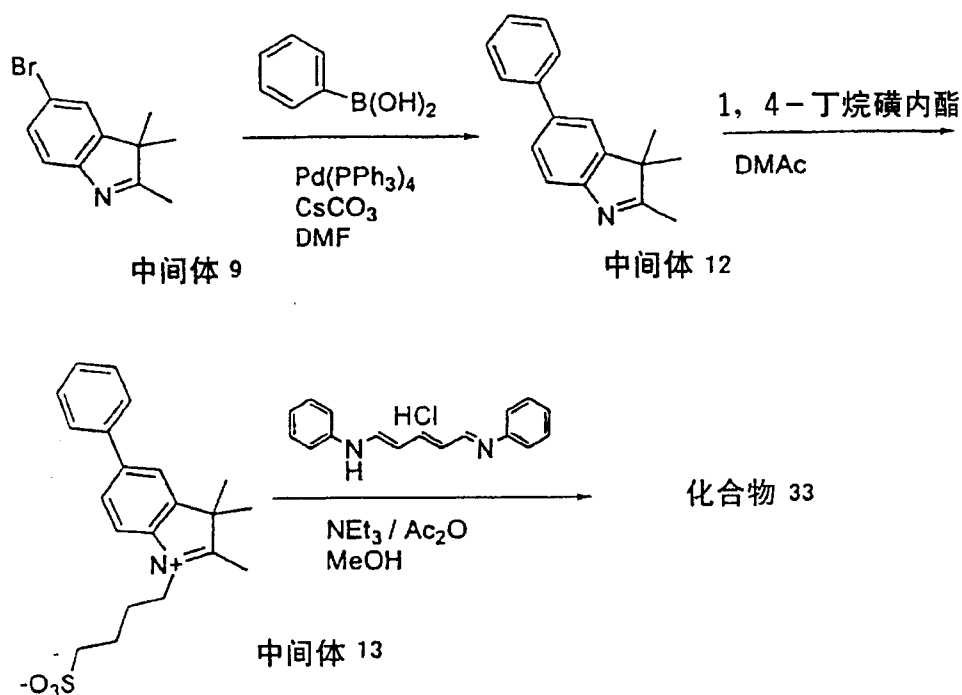
$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ (ppm) 1.75 (s, 12H), 3.25 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 4.50 (t,

4H, $J=7.2$ Hz), 6.40 (d, 2H, $J=14.5$ Hz), 6.63 (dd, 2H, 14.5, 14.5 Hz), 7.07-7.12 (m, 2H), 7.33-7.45 (m, 6H), 7.53-7.75 (m, 5H), 7.96 (dd, 2H, $J=14.5$, 14.5 Hz)

MS (FAB-, 甘油) $m/z = 760$

实施例 14: 化合物 33 的合成

化合物 33 的合成路线如下所示。



中间 体 12 的合成

由中间 体 9 和二羟基苯基硼烷按照类似于中间 体 10 的方法合成中间 体 12 (3.6 g, 产率: 77%)。

中间 体 13 的合成

将中间 体 12 (1.40 g, 6 mmol) 和 1,4-丁烷磺内酯 (1.22 g, 9 mmol) 溶解在二甲基乙酰胺 (2 ml) 中, 并在 135°C 下搅拌该溶液 5 小时。向该溶

液中添加乙酸乙酯 (20 ml), 然后冷却至室温。过滤收集沉淀出的晶体, 然后用乙酸乙酯洗涤, 得到中间体 13 (10 ml) (1.84 g, 产率: 84%)。

化合物 33 的合成

将中间体 13 (1110 mg, 3 mmol) 和 1,7-二氮杂-1,7-二苯基-1,3,5-庚三烯单盐酸盐 (285 mg, 1 mmol) 溶解在甲醇 (5 ml) 中, 向所得的溶液中添加三乙胺 (480 mg, 5 mmol) 和无水乙酸 (670 mg, 7 mmol), 然后在室温下搅拌 7 小时。将乙酸乙酯 (10 ml) 添加至反应混合物中, 过滤收集沉淀出的晶体, 然后用乙酸乙酯 (10 ml) 洗涤。将晶体溶解在甲醇 (5 ml) 中, 并添加醋酸钾在甲醇 (10 ml) 中的饱和溶液, 过滤沉淀出的晶体, 并用 5 ml 洗涤。该晶体用 Sephadex LH-20 (稀释剂: 甲醇) 纯制, 得到化合物 33 (250 mg, 产率: 30%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ (ppm) 1.80 (s, 12H), 1.95-2.05 (m, 8H), 2.90 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 4.20 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 6.38 (d, 2H, $J=14.5$ Hz), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5 Hz), 7.30-7.48 (m, 8H), 7.60-7.74 (m, 9H), 7.93 (dd, 2H, $J=14.5$, 14.5 Hz)

MS (FAB-, 硝基苄基醇) $m/z = 803$

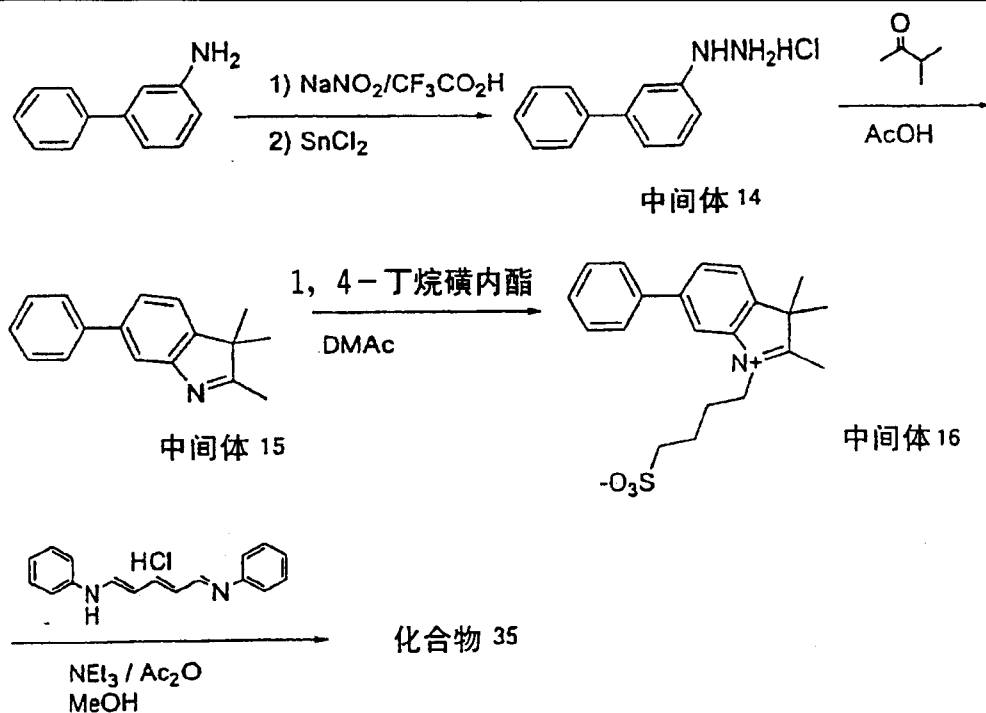
实施例 15: 化合物 34 的合成

由中间体 9 和 4-甲基巯基苯基硼酸按照类似于化合物 33 的方法合成化合物 34 (15 mg)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}) \delta$ (ppm) 1.68 (s, 12H), 1.95-2.10 (m, 8H), 2.50 (s, 6H), 3.00 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 4.10 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 6.30 (d, 2H, $J=14.5$ Hz), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5 Hz), 7.20-7.70 (m, 19H)

实施例 16: 化合物 35 的合成

化合物 35 的合成路线如下所示。



中间体 14 的合成

将 25.0 g 的 3-氨基联苯 (0.15 mol) 添加至 100 ml 的三氟乙酸中, 然后将该混合物冷却至 0°C 的内部温度。向该混合物中滴加 10.2 g 亚硝酸钠 (0.15 mol) 在 100 ml 水中的溶液, 同时将反应混合物的温度保持在低于 5°C。滴加完成后, 在相同的温度下搅拌混合物 15 分钟, 然后向混合物中添加 100 g 氯化锡 (0.54 mol) 在 50 ml 浓盐酸中的溶液, 同时将反应混合物的温度保持在低于 10°C。滴加完成后, 添加 250 ml 的水, 过滤收集沉淀出的晶体, 并用 200 ml 的二氯甲烷洗涤。干燥所得的中间体 14, 而且没有进行纯制即用于中间体 15 的合成中。

中间体 15 的合成

将如上得到的中间体 14 (全部量) 和 12.9 g 的 3-甲基-2-丁酮 (0.15 mol) 添加至 140 ml 的乙酸中, 该混合物在搅拌下加热 2.5 小时。将混合物冷却至室温后, 过滤除去沉淀出的晶体, 并减压浓缩滤液至 1/4 体

积。残留物中添加 300 ml 的水和 300 ml 的乙酸乙酯，用 celite 过滤除去不溶性的沉淀物。用乙酸乙酯 (300 ml, 200 ml $\times$ 2) 萃取滤液，而萃取液用饱和碳酸氢钠溶液和饱和盐水洗涤，然后在硫酸钠上干燥，并减压蒸发除去溶剂。残留物通过硅胶色谱纯制（洗脱剂：己烷：乙酸乙酯=3:1-2:1）。所得的晶体用 50 ml 的己烷进行重结晶，得到中间体 15 (1.3 g, 产率：4%)。

化合物 35 的合成

由中间体 15 按照类似于中间体 13 和化合物 33 的方法合成化合物 35 (65 mg)。

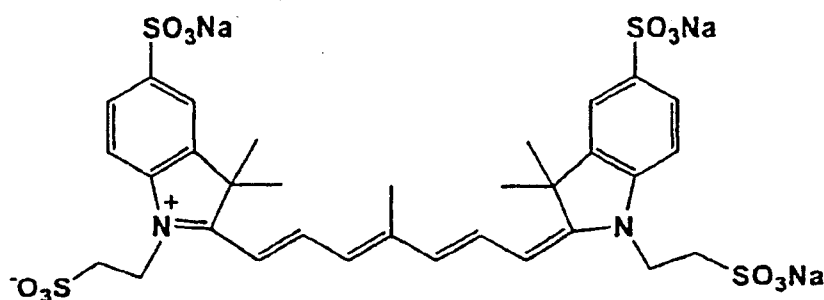
MS (FAB-, 甘油) m/z = 842.804

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ (ppm) 1.70 (s, 12H), 1.90-2.00 (m, 8H), 2.90 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 4.10 (t, 4H, $J=7.2$ Hz), 6.22 (d, 2H, $J=14.5$ Hz), 6.55 (dd, 2H, 14.5, 14.5 Hz), 7.30-7.60 (m, 17H), 7.77 (dd, 2H, $J=14.5$, 14.5 Hz)

测试实施例 1：荧光成像测试

将小鼠结肠癌（结肠 26 癌）的肿瘤组织切片皮下移植到 BALB/c 无毛小鼠（5 周龄，Clea Japan, Inc.）的左胸部。10 天后，当肿瘤生长至约 8 mm 时，将小鼠用于试验中。作为荧光激发光源，使用钛蓝宝石激光。使用环型光导器（Sumita Optical Glass Co.），其中照射的分散度在 10% 以内，由此使测试小鼠均匀地暴露在激光的光中。调节照射功率输出，使得该功率在接近小鼠的皮肤表面时约为 $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。在各化合物的最大激发波长时激发出荧光，然后检测小鼠中发射的荧光并通过带有 CCD 照相机（C4880, Hamamatsu Photonics K.K.）的短波截止滤光器（IR84, IR86, IR88, Fuji Photo Film CO., LTD.）进行照像。截止滤光器的选择应适合于化合物的激发波长。暴露时间的调节取决于各化合物的荧光强度。作为测试化合物的化合物 2 (0.5 mg/ml) 溶解在生理盐水或磷酸盐缓冲

液 (pH7.4) 中, 然后通过尾静脉以 5.0 mg/Kg 的剂量给药于小鼠。在给药测试化合物后的给定时间处, 用乙醚麻醉小鼠, 并对小鼠整个身体的荧光图像进行照像。为进行对比, 分别给药 ICG (5 mg/kg, i.v.) 和以下化合物 (化合物 A), 然后按照与以上相同的方法进行成像。结果示于图 1—3 中。

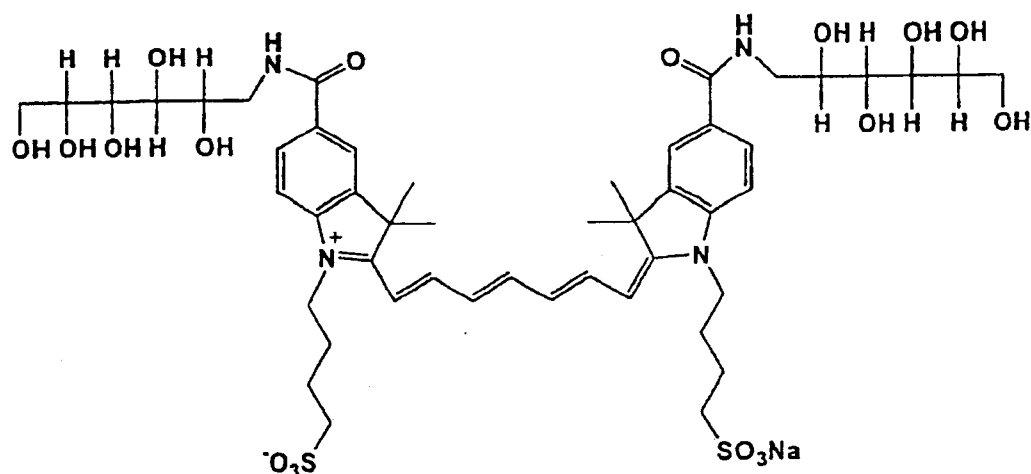


与参比化合物相比, 化合物 2 在给药后的更短时间内给出了清晰的肿瘤图像。在给药参比化合物 1 小时内, 肿瘤的位置不清晰。在给药后 10—30 分钟时, 化合物 2 成功地给出了肿瘤的清晰图像, 而且显示可高效地作为荧光造影剂 (图 1)。

测试实施例 2: 荧光成像测试

按照与测试实施例 1 相同的方式准备携带肿瘤的小鼠, 而且照射条件与测试实施例 1 中描述的相同。

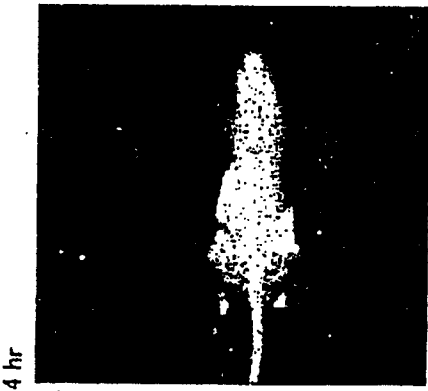
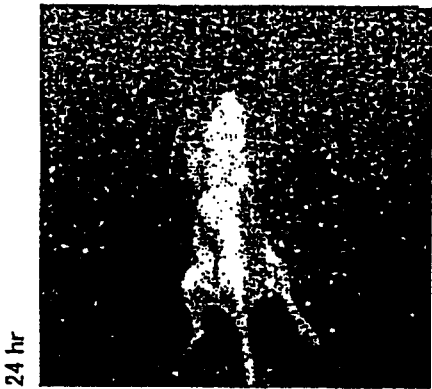
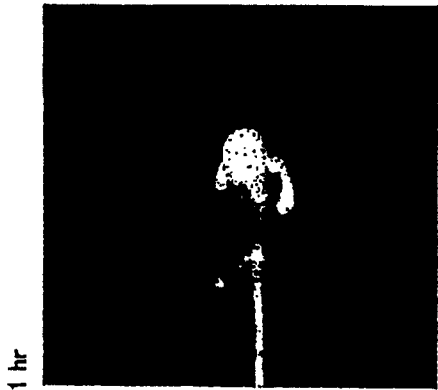
使用化合物 5、化合物 7、和化合物 10 作为测试化合物。将各测试化合物 (0.5 mg/ml) 溶解在生理盐水或磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中, 然后通过尾静脉以 5.0 mg/Kg 的剂量给药于小鼠。为进行对比, 向小鼠给药以下化合物 (化合物 B, 5 mg/kg, i.v.)。



使用可调谐的、脉冲固体激光系统产生光，该激光系统由通过 Nd:Yag 激光 (Coherent Inc.) 的第三谐波驱动的光学参数振荡器 (OPO) 组成。选择 $\lambda_{ex}=740\text{ nm}$ 的激发波长并用光导纤维导向至携带肿瘤的无毛小鼠。使用滤光器组合 (Corion) 以及增强型 CCD 照相机 (Roper Scientific.) 在给药染料后的不同时间处对染料特异性的荧光发射进行成像 (图 4)。在给药之前以及通过侧尾静脉以 5 mg/kg 的标准剂量静脉给药染料后的 1 分钟、10 分钟、30 分钟、60 分钟、2 小时、4 小时、24 小时进行荧光成像。在头一个 60 分钟内，用加热垫将动物的身体温度保持在 38°C 。在无毛小鼠肿瘤模型中对比各化合物的荧光成像性质。结果示于图 5—8 中。与参比化合物 (化合物 B) 相比，化合物 5、化合物 7 和化合物 10 在给药后的更短时间内给出了清晰的肿瘤图像。在给药参比化合物 1 小时内，肿瘤的位置不清晰 (图 8)。在给药后 10—30 分钟时，本发明的化合物成功地给出了肿瘤的清晰图像 (图 5—7)，而且显示可高效地作为荧光造影剂。

产业上的利用性

本发明的近红外荧光造影剂可通过激发光发射出近红外荧光。该近红外荧光在生物组织的渗透性方面是优异的，并且该造影剂因此能够检测活体更深部分中的损伤。



1
图

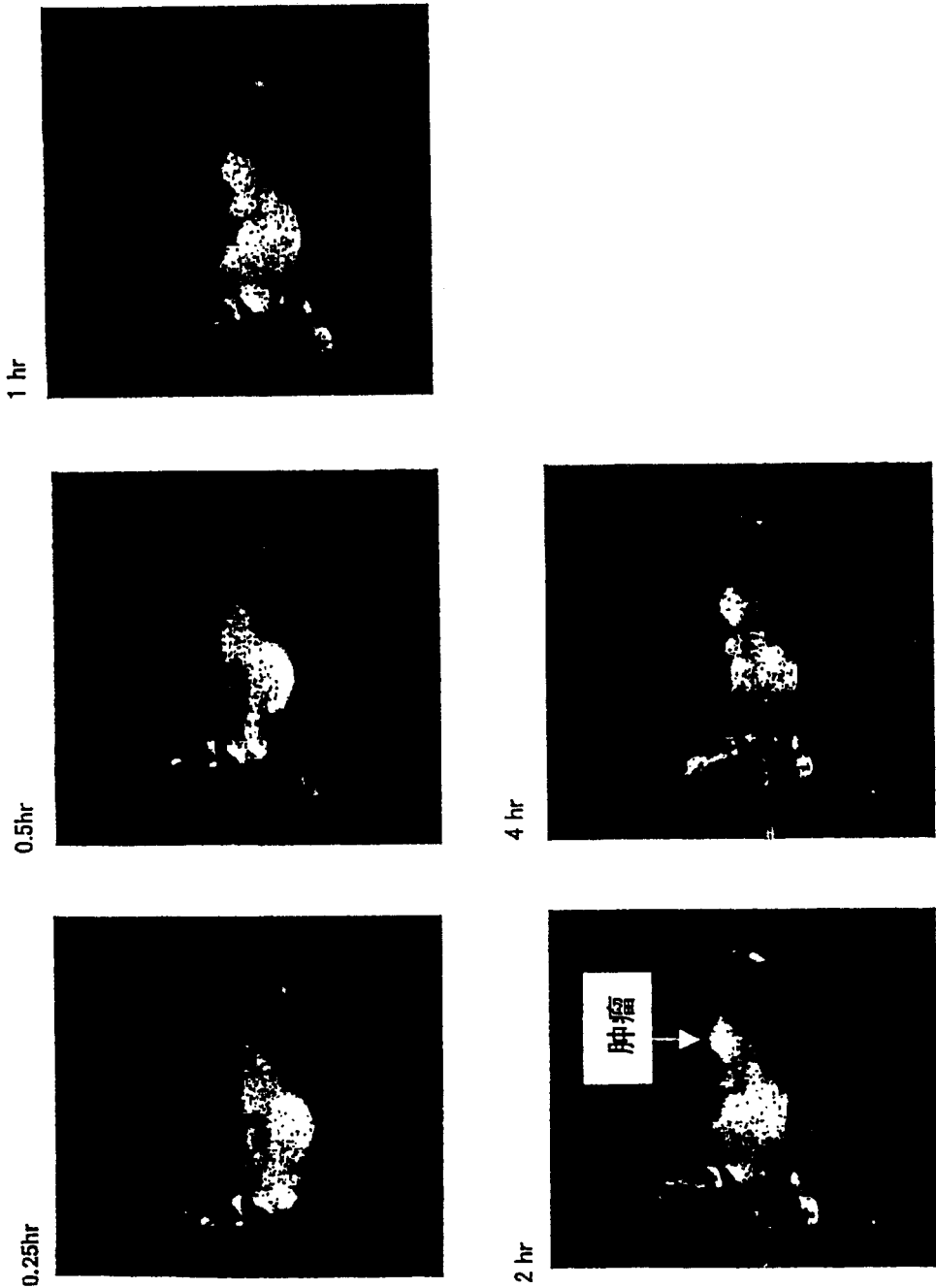
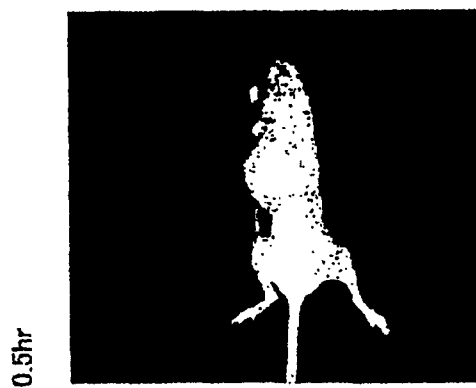
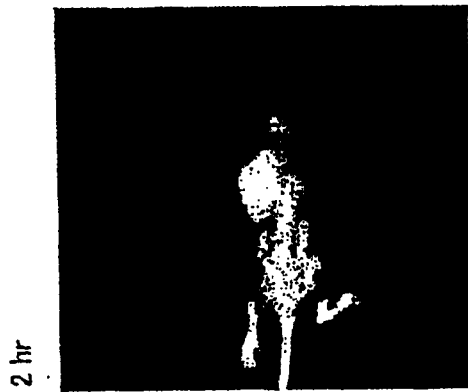


图2



3
图

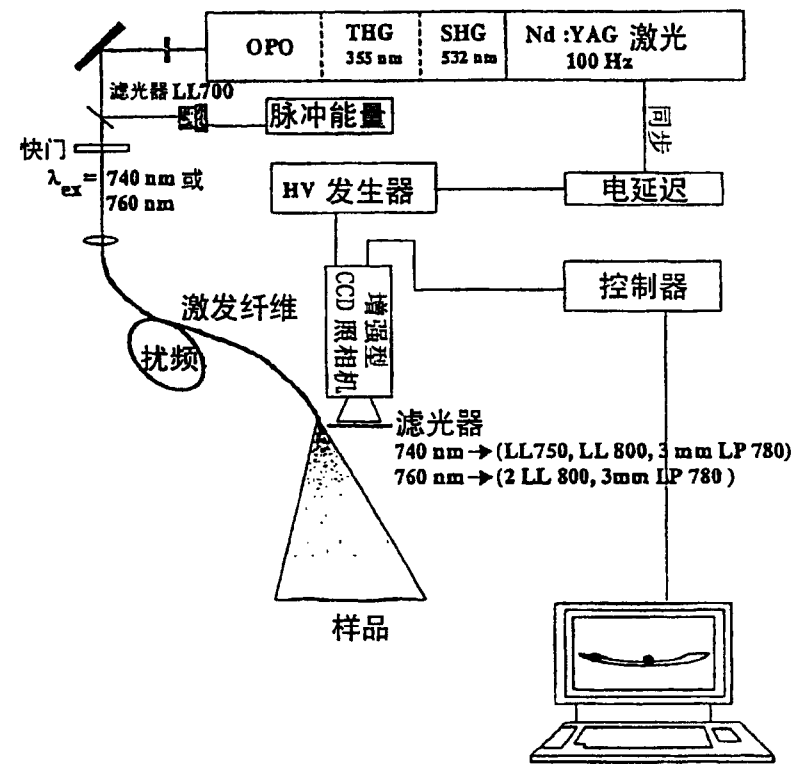


图4

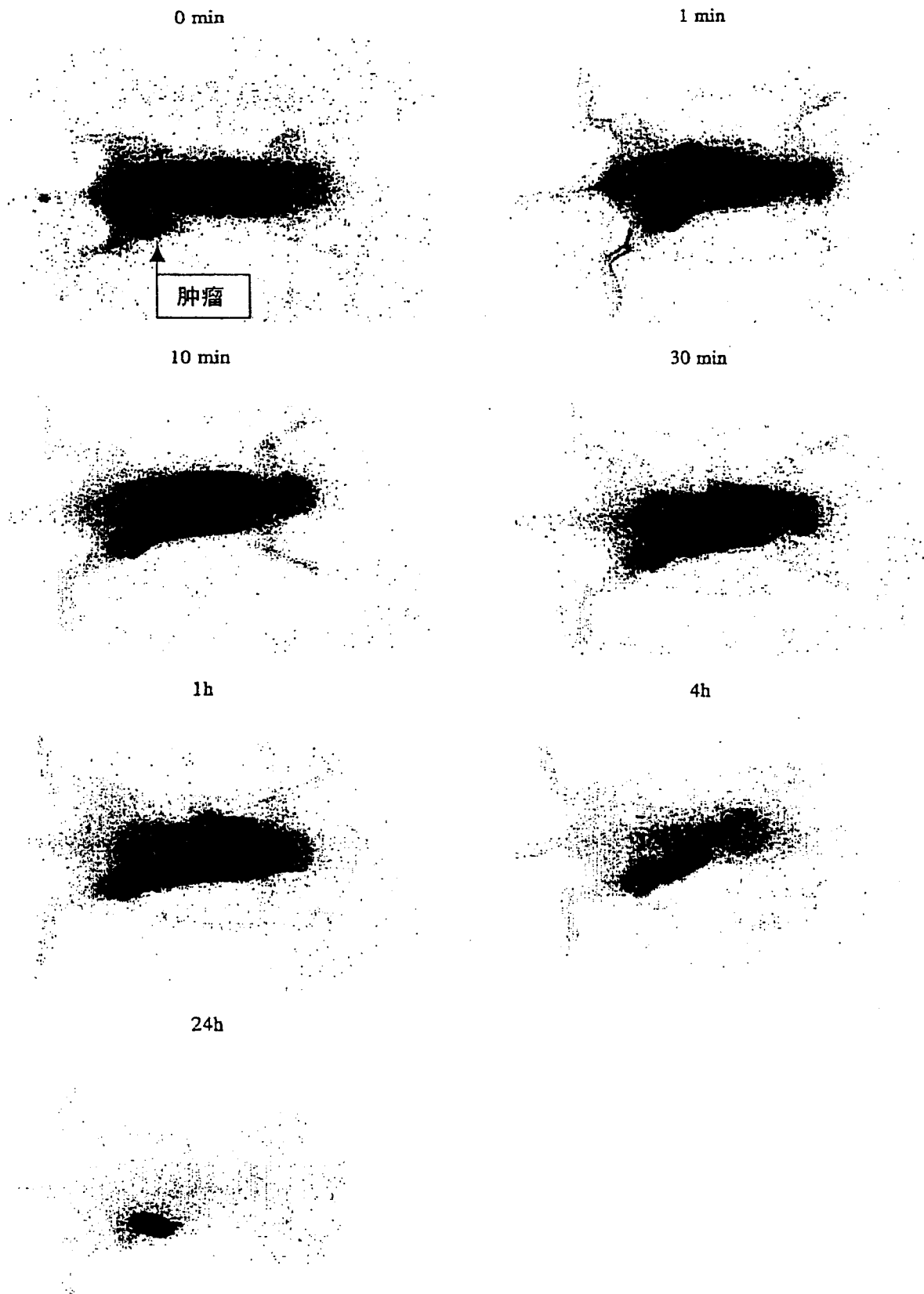


图5

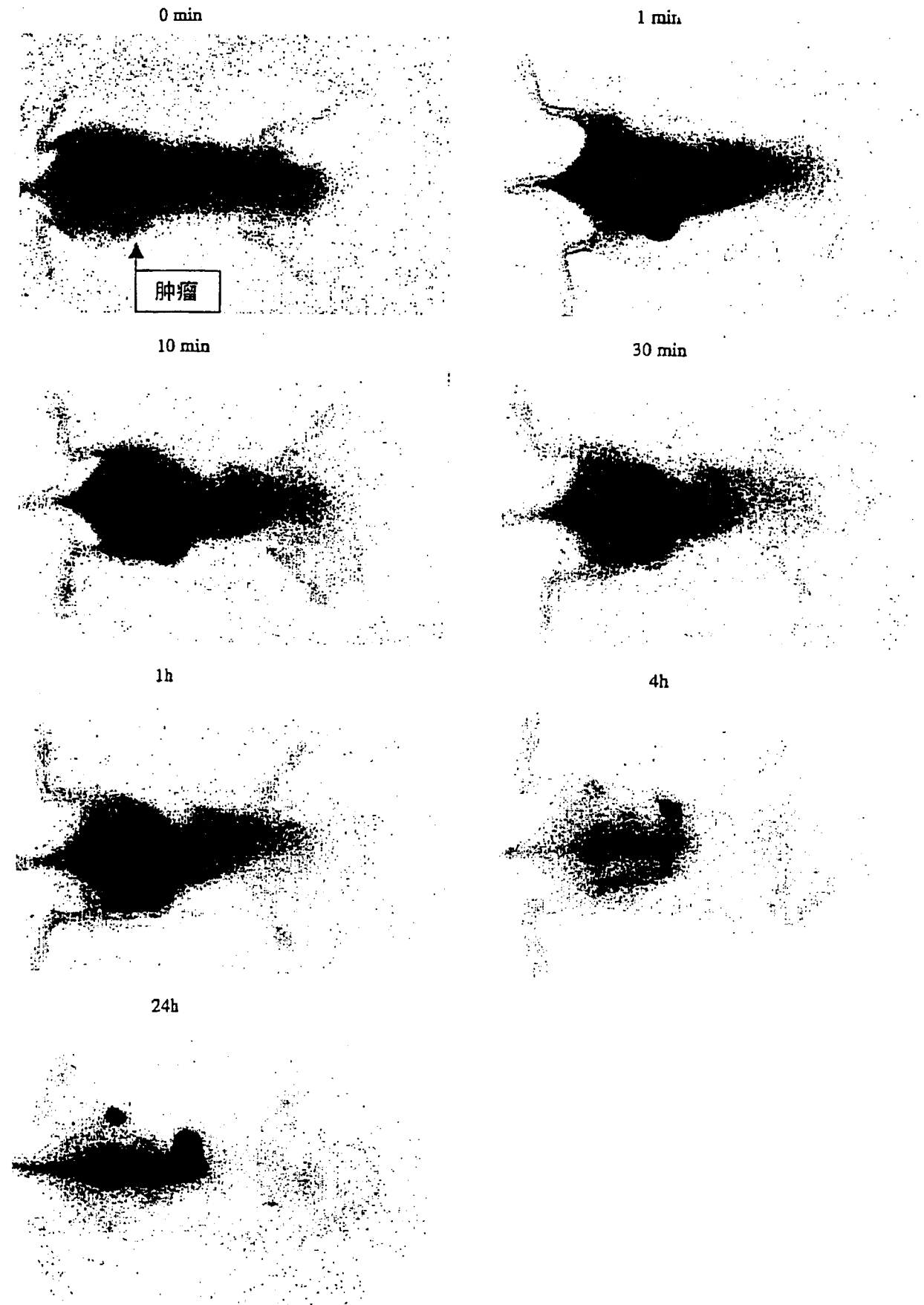


图6

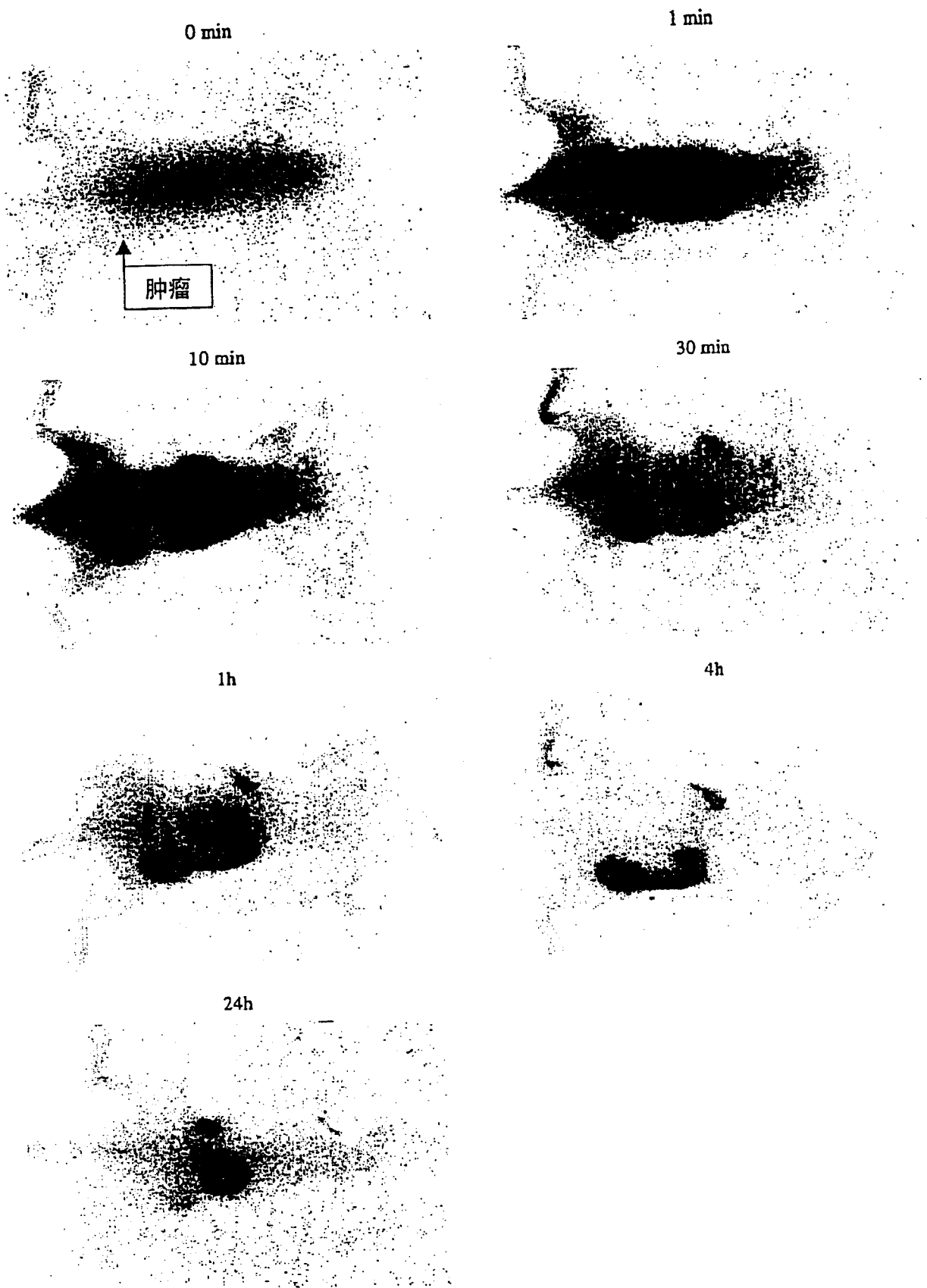
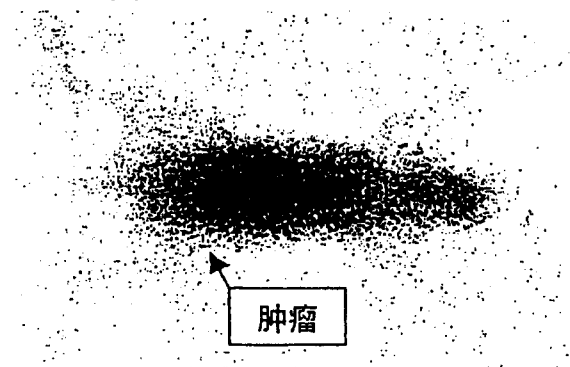


图7

No.:8, 小鼠17, 0 min.,编号10SLi7



No.:8, 小鼠17, 1 min.,编号10SLi12



No.:8, 小鼠17, 10 min.,编号10SLi17



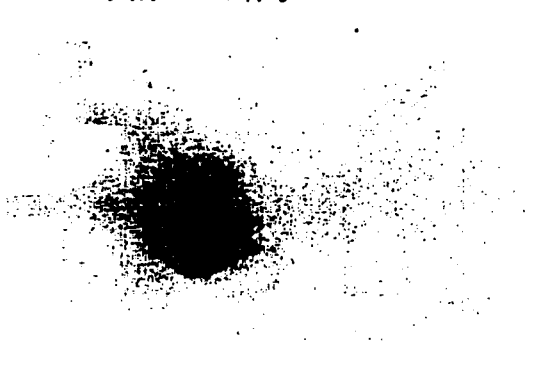
No.:8, 小鼠17, 30 min.,编号10SLi30



No.:8, 小鼠17, 1h,编号10SLi43



No.:8, 小鼠17, 4h,编号10SLi53



No.:8, 小鼠17, 24h,编号11SLi2

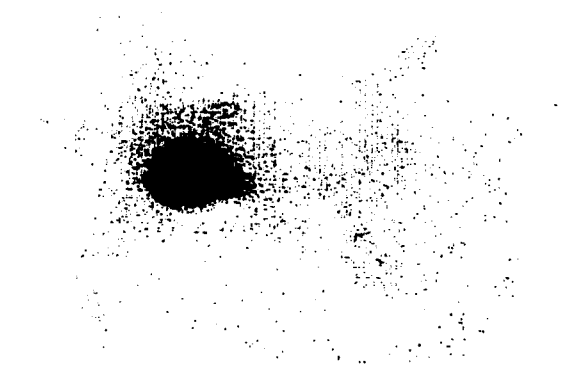


图8