

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 49/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/61194</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02697</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. März 2000 (28.03.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 17 713.9 9. April 1999 (09.04.99) DE</p> <p>(71) Anmelder: INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder: LICHA, Kai; Bornimer Strasse 17a, D-14612 Falkensee (DE). BECKER, Andreas; Lindenring 19a, D-16761 Henningsdorf (DE). SEMMLER, Wolfhard; Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Im Neuen- heimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). WIEDEN- MANN, Bertram; Kommandantenstrasse 96a, D-12205 Berlin (DE). HESSENIUS, Carsten; Hermannstrasse 198, D-12049 Berlin (DE). VOLKMER-ENGERT, Rudolf; Dubliner Strasse 8, D-13349 Berlin (DE). SCHNEI- DER-MERGENER, Jens; Hohenzollerndamm 7, D-10717 Berlin (DE). BHARGAVA, Sarah; Lichtenrader Strasse 32, D-12049 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: SHORT-CHAIN PEPTIDE DYE CONJUGATES USED AS CONTRAST AGENTS FOR OPTICAL DIAGNOSTICS</p> <p>(54) Bezeichnung: KURZKETTIGE PEPTID-FARBSTOFFKONJUGATE ALS KONTRASTMITTEL FÜR DIE OPTISCHE DIAGNOS- TIK</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to compounds which are used for diagnosing tumors comprised of conjugates of dyes having short-chain peptides that are derived from the vasoactive intestinal peptide, from somatostatin or from neurotensin. The invention also relates to the use of these compounds as optical diagnostic agents and to diagnostic products containing these compounds.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Verbindungen zur Tumordiagnostik, bestehend aus Konjugaten von Farbstoffen mit kurzkettigen Peptiden, die vom vasoaktiven intestinalen Peptid, vom Somatostatin oder vom Neurotensin abgeleitet sind, die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika, und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5 **Kurzkettige Peptid-Farbstoffkonjugate als Kontrastmittel
für die optische Diagnostik**

Die Erfindung betrifft Verbindungen zur Tumordiagnostik,
bestehend aus Konjugaten von Farbstoffen mit kurzkettigen
Peptiden, die vom vasoaktiven intestinalen Peptid, vom
10 Somatostatin oder vom Neurotensin abgeleitet sind, die
Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika,
und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

Krankheitsbedingte Veränderungen spiegeln sich auf zellu-
15 lärer Ebene oft in einer gegenüber dem Normalzustand ver-
änderten Rezeptorverteilung oder -expression wieder. Die-
se Unterschiede können sowohl quantitativer Art (z. B.
Menge der Transferrin-Rezeptoren auf proliferierenden
Zellen) oder aber auch qualitativer Art sein (z. B. Ex-
20 pression von Vascular endothelial growth factors, VEGF).
Bisher werden Ansätze zur Abbildung einer pathologischen
Rezeptorexpression oder -verteilung wegen der notwendigen
Sensitivität des Detektionsverfahrens hauptsächlich in
der Radiodiagnostik verfolgt.

25 Heptahelikale Rezeptoren sind Zielmoleküle von vielen
pharmakologischen Wirkstoffen (z. B. β -Blocker, H₂-Säure-
Blocker, Antihistaminika). Neben therapeutischen Ansätzen
werden hauptsächlich radioaktiv markierte agonistische
30 Liganden dieser Rezeptoren diagnostisch für die sog. Re-
zeptorszintigraphie zur In-vivo-Detektion und Lokalisati-
on von Tumoren eingesetzt. Hierbei wird der Mechanismus
der rezeptorvermittelten Endozytose, z. B. durch den So-
matostatinrezeptor, der auf neuroendokrinen Tumoren ver-
35 mehrt exprimiert ist, ausgenutzt. Klinisch zugelassen für

die szintigraphische Routinediagnostik ist das Somatostatinanalogon ^{111}In -DTPA-pentetreotid (Octreoscan[®]);

Literatur: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37, 1079-82, 1990, J. Nucl. Med. 32, 1184-9, 1991,; J. Nucl. Med. 33, 652-8, 1992; Digestion 3, 54-9, 1994, J. Clin. Invest. 5 93, 1321-5, 1994, Metabolism 45, 21-3, 1996.

Ein anderer Ansatz besteht in der Nutzung von radioaktiv markiertem VIP und VIP-Analoga, welche an den VIP- 10 Rezeptor binden. Der VIP-Rezeptor wird von einem breiten Spektrum von Tumoren vermehrt exprimiert (u. a. Adenokarzinome).

WO 96/30055 beschreibt radiodiagnostische und radiotherapeutische Reagenzien, speziell VIP-rezeptorbindende Peptide, die radioaktiv markiert sind und für die Radiodia- 15 gnostik und -therapie eingesetzt werden können. Mit besonderem Vorteil beschrieben sind VIP-rezeptorbindende, mit Tc-99m markierbare Peptide für die Szintigraphie.

Weitere Literatur: Cancer Research 54, 690-700, 1994; Endocrinology 136, 2662-80, 1994, J. Nucl. Med. 40, 353- 20 361, 1999.

Alle beschriebenen diagnostischen Ansätze, die auf dem Somatostatinrezeptor und VIP-Rezeptor basieren, sind radiodiagnostische Ansätze (Szintigraphie mit ^{123}I , ^{125}I , ^{111}In oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Peptiden). 25

Literatur: EP 588754, US 5650134; US 5620675; US 5225180; WO 96/23527; J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37, 1083-87, 1990; Lancet 242-4, 1989, J. Nucl. Med. 39, 1913-17, 30 1998.

Bisher sind jedoch keine fluoreszenzmarkierten Peptide bekannt, die mit Farbstoffen konjugiert sind, die eine In-vivo-Fluoreszenzdetektion von Tumoren ermöglichen 35 (Photochem. Photobiol. 68, 603-632, 1998).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die eine sensitive Diagnose von Tumoren durch Detektion von Fluoreszenzstrahlung unter Ausnutzung einer rezeptorspezifischen Bindung der Verbindungen an das Zielgewebe ermöglichen. Hierbei sollen spezielle Farbstoffmoleküle, die an Biomoleküle gekoppelt sind, ein hochsensitiv detektierbares Fluoreszenzsignal liefern.

Die Aufgabe wird durch die Bereitstellung von Verbindungen, die Fluoreszenzfarbstoffe enthalten, welche kovalent an kurzkettige Peptide gekoppelt sind, gelöst. Diese Konjugate besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu heptahelikalen Rezeptoren, speziell dem Somatostatinrezeptor, dem VIP-Rezeptor (Vasoaktives intestinales Peptid) und dem Neurotensinrezeptor, und werden ggf. durch rezeptorvermittelte Endozytose intrazellulär aufgenommen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind daher geeignet für die technisch einfache, unschädliche optische Diagnostik von Tumorzellen und Tumorgeweben, die Somatostatinrezeptoren VIP-Rezeptoren oder Neurotensinrezeptoren im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht exprimieren. Insbesondere geeignet sind die Verbindungen für die Fluoreszenzdiagnostik und mit besonderem Vorteil für die fluoreszenzendoskopische Diagnostik in Hohlorganen, wie dem Ösophagus, der Zervix, des Kolons und der Bronchien von verschiedenen Tumortypen, wie z. B. Adenokarzinomen, neuroendokrinen Tumoren oder duktalem pankreatischen Tumoren.

Besonders bevorzugte Farbstoffe zeichnen sich dadurch aus, daß sie bestimmte photophysikalische und chemische Anforderungen erfüllen. Aus photophysikalischer Sicht müssen die Farbstoffe hohe Absorptionskoeffizienten und hohe Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen, um ein effektives Signal auch bei geringsten Gewebekonzentrationen zu erzeugen. Die Absorptionsmaxima müssen frei wählbar einem

weiten spektralen Bereich überdecken. So ist für die Detektion in tieferen Gewebeschichten (mehrere Zentimeter unter der Oberfläche) der Spektralbereich zwischen 600 und 900 nm essentiell, während für oberflächliche Detektion Absorptionswellenlängen von 400 bis 600 nm ausreichen. Aus chemischer Sicht müssen die Farbstoffe eine hohe Photostabilität besitzen und keine Zersetzungserscheinungen (Photobleaching) während der Anregung aufweisen. Die Farbstoffe müssen als Synthesebaustein in der festphasensynthetischen Herstellung der Peptide einsetzbar sein, und somit unter den gängigen Synthesebedingungen stabil sein, damit eine einfache, günstige Produktion strukturell definierter Farbstoff-Peptid-Konjugate mit festem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Farbstoff und Peptid gewährleistet ist. Die Anforderungen werden am besten von Polymethinfarbstoffen, insbesondere Cyanin-, Merocyanin-, Oxonol- und Squariliumfarbstoffen erfüllt.

Gegenstand der Erfindung sind daher

20

Peptid-Polymethinfarbstoff-Konjugate der allgemeinen Formel (I)



25

worin

X für eine α , β oder γ -Aminosäure mit D oder L-Konfiguration und

30

m für eine Zahl von 5 bis 30 steht, wobei die resultierende Aminosäuresequenz $(X)_m$ geradkettiger Natur oder über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen oder Homocysteinen oder amidisch zwischen N- und C-Terminus cyclisiert sein kann und für die Aminosäuresequenz des vasoaktiven

35

intestinalen Peptids (VIP), des Somatostatins oder des Neurotensins, oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des VIP, des Somatostatins oder des Neurotensins steht,

5

A¹ für ein Wasserstoffatom, einen Acetylrest oder einen Alkylrest mit bis zu 10 C-Atomen, der gegebenenfalls mit 1 bis 3 Carboxygruppen und/oder 1 bis 6 Hydroxygruppen substituiert sein kann, oder einen Poly(oxyethylen)rest mit 2 bis 30 -CH₂CH₂O-Einheiten oder ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, steht,

10

15

A² für eine Hydroxygruppe, eine Aminogruppe oder ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, steht

20

unter der Bedingung, daß mindestens einer der Reste A¹ oder A² ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, darstellt,

25

wobei für den Fall, daß A¹ und/oder A² ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, darstellen, A¹ an die N-terminale Aminogruppe und A² an eine Aminogruppe der Aminosäure Lysin oder an eine Hydroxygruppe der Aminosäure Serin in beliebiger Position innerhalb der Aminosäuresequenz (X)_m geknüpft ist,

30

35

und deren physiologisch verträgliche Salze.

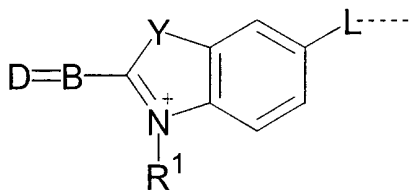
Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga der genannten Peptide stehen u. a. für verkürzte Aminosäuresequenzen, Austausch einzelner oder sämtlicher Aminosäuren gegen die entsprechenden D-Aminosäuren, Austausch einzelner Aminosäuren gegen andere Aminosäuren, invertierte Sequenzen und Kombinationen der genannten Merkmale.

Die Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga der genannten Peptide können auch nicht natürliche Aminosäuren, wie z.B. Naphthalanin, Cyclohexylalanin, Norleucin, Norvalin, α -Aminoadipinsäure, α -Aminobuttersäure, β -Alanin, β -Cyclohexylalanin, Ornithin, Sarcosin oder δ -Hydroxylysin, enthalten.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Verbindungen der allg. Formel I, welche sich dadurch auszeichnen, daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht. Diese Farbstoffe gehören der Klasse der Polymethinfarbstoffe an und besitzen die oben beschriebenen Vorteile.

Weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I zeichnen sich dadurch aus,

daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Cyanin- bzw. Squariliumfarbstoff der allgemeinen Formel II



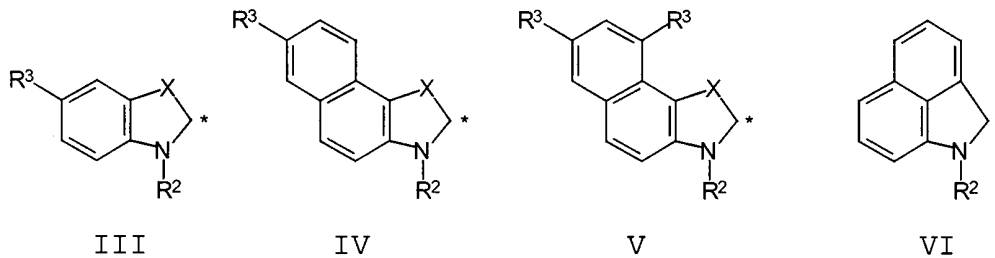
II

30

worin

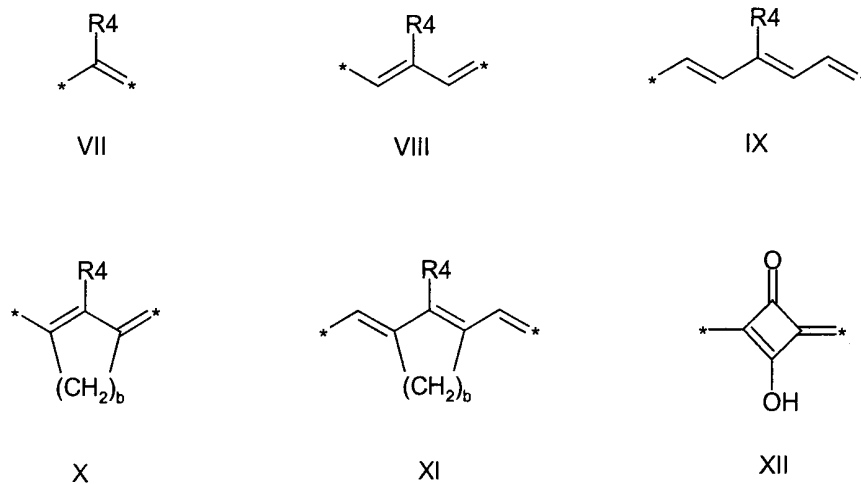
D für ein Fragment entsprechend den allgemeinen Formeln III bis VI, wobei die mit einem Stern gekennzeichnete Position die Verknüpfung mit B bedeutet, steht,

5



B für ein Fragment entsprechend den allgemeinen Formeln VII bis XII

10



15

R^1 und R^2 für E^1 , R^3 für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest $-COE^1$, $-CONE^1E^2$, $-NHCOE^1$, $-NHCONHE^1$, $-NE^1E^2$, $-OE^1$, $-OSO_3E^1$, $-SO_3E^1$, $-SO_2NHE^1$, $-E^1$,

20

wobei E^1 und E^2 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine C_1 - C_4 -Sulfoalkylkette, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C_1 - C_{50} -Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegebenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C_5 - C_6 - oder bityklische C_{10} -Einheiten formen

können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, stehen,

5

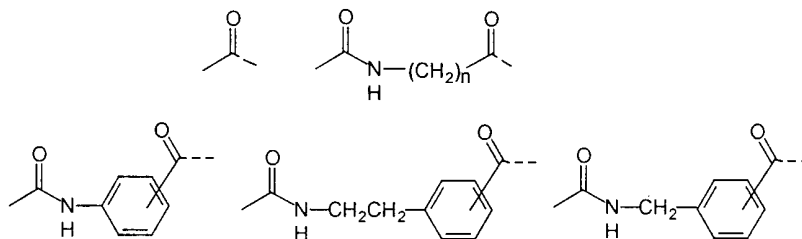
R⁴ für ein Wasserstoffatom, für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine verzweigte oder geradkettige C₁-C₁₀-Alkylkette, steht,

10

b eine Zahl 2 oder 3 bedeutet,
 X und Y unabhängig voneinander O, S, Se, -CH=CH- oder C(CH₃)₂ bedeuten,

15

L für eine Gruppe entsprechend nachstehender Formeln



20

worin n eine Zahl von 1 bis 10 bedeutet, steht.
 (Bei den obengenannten Formeln stellt die im Molekülteil links gezeichnete durchgezogene Linie die Verknüpfung zum Farbstoffgrundgerüst und die unterbrochene Linie im Molekülteil rechts die Verknüpfung zum Peptid dar.)

25

Aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe sind die Cyaninfarbstoffe, z. B. die auf der Indolstruktur basierenden Indocarbo-, Indodicarbo- und Indotricarbcyanine besonders vorteilhaft. Diese Strukturen zeichnen sich durch eine hohe chemische und photochemische Stabilität aus. Durch

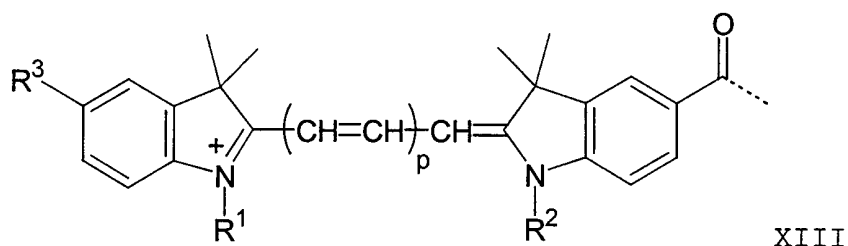
30

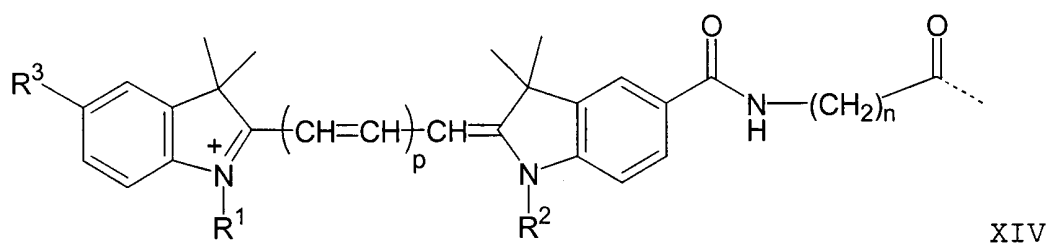
günstige Synthese sind Derivate erhältlich, die beliebig zwischen 400 und 1000 nm absorbieren und fluoreszieren, durch Substitution mit geeigneten Linkern und funktionellen Gruppen, vorzugsweise Carboxylgruppen, an Peptide gekoppelt werden können und eine hohe Wasserlöslichkeit, vorzugsweise durch Sulfonatgruppen, besitzen. Im Gegensatz zu literaturbekannten Cyaninfarbstoffen besitzen die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen nur eine reaktive Gruppe, die eine stöchiometrisch definierte Kopplung an das Peptid im Zuge der Harzsynthese des Konjugates ermöglicht.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zeichnen sich daher dadurch aus,

- daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen Indotricarbocyaninfarbstoff steht,
- daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XIII oder XIV

25





worin

p für 1, 2 oder 3,

5 n für eine Zahl von 1, 2, 3, 4 oder 10 steht,

R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl-, 2-Sulfoethyl-, 3-Methyl-3-sulfopropyl-, Methyl-, Ethyl- oder Propylrest stehen, und

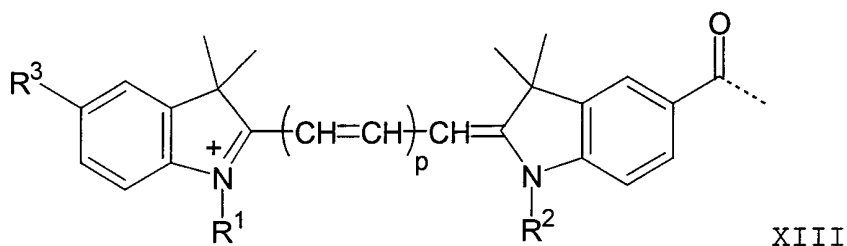
10 R³ für Wasserstoff, ein Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,

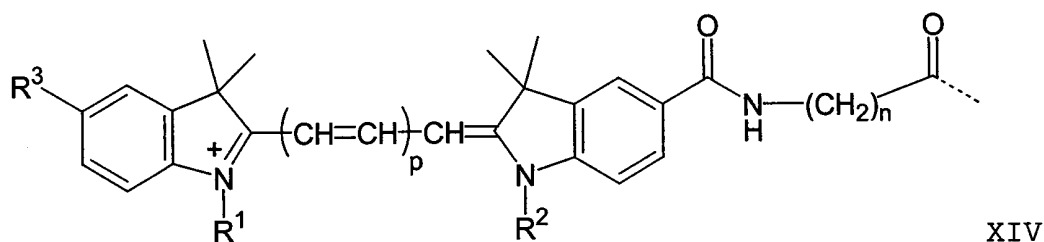
wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder für einen Methyl-, Ethyl- oder einen C₃-C₆-Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, oder für einen Poly(oxyethylen)glykolrest mit 2 bis 30 -CH₂CH₂O-Einheiten stehen,

20 steht,

- daß das Farbstoffmolekül A¹ und/oder A² für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XIII oder XIV

25





worin

5

p für 1, 2 oder 3,

n für 1, 2 oder 4,

R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl- oder 3-Sulfopropylrest,

10

R³ für Wasserstoff oder für einen Rest -COE¹ oder -CONHE¹,

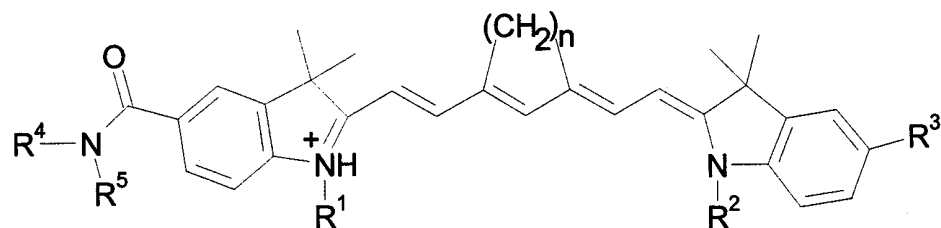
wobei E¹ ein Wasserstoffatom oder ein Methyl-, Ethyl- oder ein C₃-C₆-Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, bedeutet,

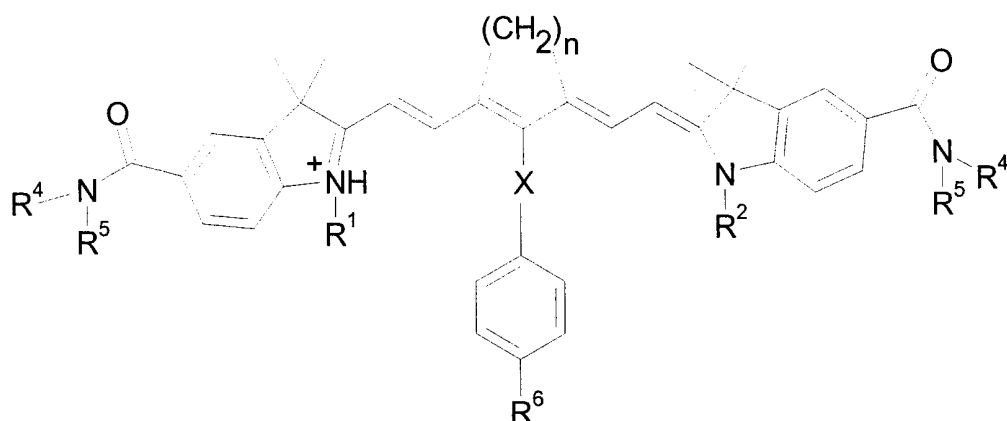
15

steht,

- daß das Farbstoffmolekül A¹ und/oder A² für einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XV oder XVI steht:

20

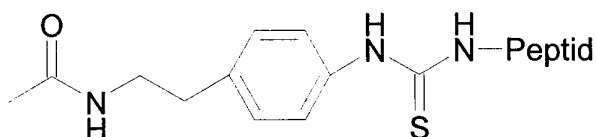




XVI

worin

- 5 n für 2 oder 3 steht,
 R^1 und R^2 unabhängig voneinander einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,
 R^3 für einen Rest $-\text{CONH-Peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CONH-Peptid}$,
 $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH-CS-NH-Peptid}$ oder $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO-CH}_2-$
 10 Peptid mit $m = 1$ bis 10 und $n = 2$ oder 3 steht,
 oder eine folgende Gruppe darstellt:



- 15 R^4 und R^5 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom,
 einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest wie
 z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-
 Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-
 Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-
 20 Pentahydroxyhexyl stehen,

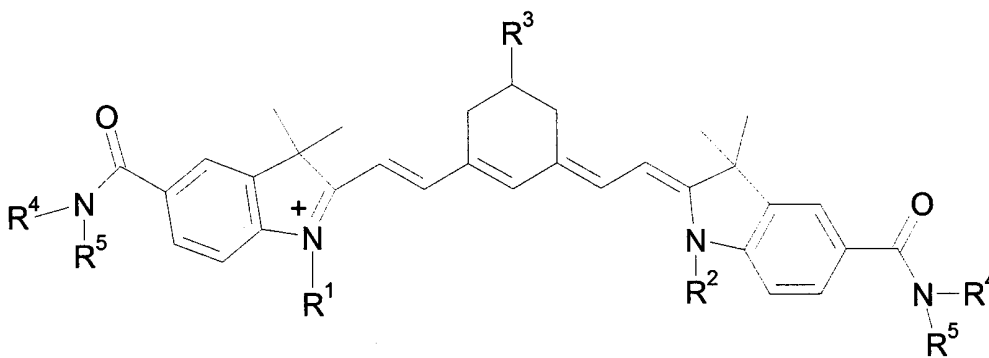
R^6 für eine der folgenden Gruppen steht:

- $-(\text{CH}_2)_m-\text{CONH-Peptid}$ mit $m = 0$ bis 2,

- $(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CS-NH-Peptid}$ mit $m = 0$ bis 2 ,

und X für ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom steht;

- 5 - daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XVII steht:



10

XVII

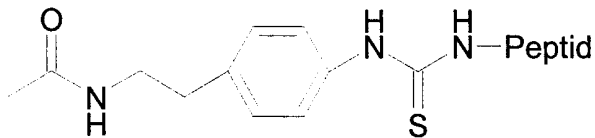
15

worin

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl- oder 3-Sulfopropylrest darstellen,

20

R^3 für einen Rest $-\text{CONH-Peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m\text{-CONH-Peptid}$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-CS-NH-Peptid}$ oder $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n\text{-NHCO-CH}_2\text{-Peptid}$ mit $m = 1$ bis 10 und $n = 2$ oder 3 steht, oder eine folgende Gruppe darstellt:



und R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest
5 wie z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl stehen.

10

Die Verwendung von farbstoffmarkierten Antikörpern zur Tumordetektion ist literaturbekannt (J. Cell. Pharmacol.
15 3, 141-145, 1992; Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63, 1995; Cancer Research 54, 2643-9, 1994, Biotechnol. Prog. 13, 649-658, 1997).

Im Gegensatz dazu enthalten die erfindungsgemäßen Verbindungen als Biomoleküle niedermolekulare Peptide und Peptidderivate, die die Vorteile von Antikörpern, wie eine
20 hohe Bindung an Zielstrukturen, aufweisen, ohne daß das diagnostische Potential durch eine ungünstige Pharmakokinetik (lange Bluthalbwertszeiten, allergene Nebeneffekte (Immunogenität)) eingeschränkt ist.

25

Biologische und pharmakologische Anforderungen an Peptidsequenzen sind dementsprechend eine ausreichende Plasmastabilität bei schneller Anreicherung im Zielgewebe und
gleichzeitiger schneller Eliminierung aus dem Restkörper, vorzugsweise über den renalen Ausscheidungsweg.
30

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Peptidsequenzen, die mindestens 5 Aminosäuren der C-terminalen Seite der VIP-Sequenz enthalten, und an welche ein Farbstoff für die Fluoreszenzdiagnostik gekoppelt ist, eine dem nativen VIP vergleichbare Aufnahme in Tumorzellen besitzen. Darüber hinaus wurde gefunden, daß durch den Einbau mindestens einer D-Aminosäure, oder den Austausch durch mindestens eine D-Aminosäure, die Plasmastabilität beträchtlich erhöht werden konnte. Am Beispiel eines vollständigen Austausches aller L- gegen D-Aminosäuren in einem VIP-bindenden Farbstoff-Peptidkonjugat konnte gezeigt werden, daß die Bindungseigenschaften und die Zellaufnahme unverändert ist.

Weitere besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I zeichnen sich dadurch aus,

- daß $(X)_m$ für die Aminosäuresequenz des nativen, natürlich vorkommenden, humanen vasoaktiven intestinalen Peptides entsprechend

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides, bestehend aus 5 bis 30 Aminosäuren, steht,

- daß $(X)_m$ für die Aminosäuresequenz des Somatostatins entsprechend

AGCKNFFWKTFTSC

oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Somatostatins, bestehend aus 5 bis 20 Aminosäu-

ren,
steht,

- 5 - daß (X)_m für die Aminosäuresequenz des Neurotensins
entsprechend

Pyroglutaminsäure-LYENKPRRPYIL

10 oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analo-
ga des Neurotensins, bestehend aus 5 bis 20 Aminosäu-
ren,
steht,

- 15 - daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga
des vasoaktiven intestinalen Peptides (VIP) die folgen-
den Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:

	RLRKQMAVKKYLNSILN	RLRKQMAVKKYLNSIL	RLRKQMAVKKYLNSI
	LRKQMAVKKYLNSILN	LRKQMAVKKYLNSIL	LRKQMAVKKYLNSI
20	RKQMAVKKYLNSILN	RKQMAVKKYLNSIL	RKQMAVKKYLNSI
	KQMAVKKYLNSILN	KQMAVKKYLNSIL	KQMAVKKYLNSI
	QMAVKKYLNSILN	QMAVKKYLNSIL	QMAVKKYLNSI
	MAVKKYLNSILN	MAVKKYLNSIL	MAVKKYLNSI
	AVKKYLNSILN	AVKKYLNSIL	AVKKYLNSI
25			
	RLRKQMAVKKYLNS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
	LRKQMAVKKYLNS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
	RKQMAVKKYLNS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
	KQMAVKKYLNS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
30	QMAVKKYLNS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
	MAVKKYLNS	MAVKKYLN	MAVKKYL
	AVKKYLNS	AVKKYLN	AVKKYL,

- 35 - daß als Analoga des VIP folgende Sequenzen ausgewählt
sind:

FSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN

ISDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
LSDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HFDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HHDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
5 HIDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HLDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HMDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HQDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HTDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
10 HVDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HWDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HYDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSAAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSEAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
15 HSFVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSHAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSIAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSLAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSMVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
20 HSWAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDFVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDGVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDMVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDQVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
25 HSDSVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDWVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDYVAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAIF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
30 HSDALF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAMF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDATF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAYF'DDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
35 HSDAVKTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFVDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN

HSDAVFWDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNW TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRRRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRWRKQMAVK KYLNSILN
5 HSDAVFTDNY TRLRFQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRLQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRMQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRRQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKAMAVK KYLNSILN
10 HSDAVFTDNY TRLRKFMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKIMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKKMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKLMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKMMAVK KYLNSILN
15 HSDAVFTDNY TRLRKRMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKVMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKWMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKYMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQFAVK KYLNSILN
20 HSDAVFTDNY TRLRKQIAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQKAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQLAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQQAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQRAVK KYLNSILN
25 HSDAVFTDNY TRLRKQWAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMFVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMIVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMKVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMLVK KYLNSILN
30 HSDAVFTDNY TRLRKQMMVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMQVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMRVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMVVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMWVK KYLNSILN
35 HSDAVFTDNY TRLRKQMYVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAAK KYLNSILN

HSDAVFTDNY TRLRKQMAIK KYLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMALK KYLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVR KYLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK RYLNSILN
 5 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK WYLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KFLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KWLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLASILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLFSILN
 10 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLISILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLMSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLVSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLWSILN
 15 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNNILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNRILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNWILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNYILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 20 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 25 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN

- daß als Analogon des VIP eine Verbindung gemäß folgen-
 30 der Formel ausgewählt ist:

$HSDAVFTX^1X^2Y X^3RLRKQMAVK KYLNSILN$, worin X^1 , X^2 und X^3
 jede beliebige Aminosäure darstellen können,

- daß 2 bis m Aminosäuren unabhängig voneinander gegen
 35 ihre jeweilige D-Aminosäure oder gegen andere L- oder

D-Aminosäuren ausgetauscht sein können, wobei m die oben angegebene Bedeutung hat,

- 5 - daß mindestens eine der Aminosäuren $(X)_m$ unabhängig voneinander gegen andere, nicht natürliche Aminosäuren oder Aminosäurederivate ausgetauscht sein kann,
- 10 - daß mindestens eine der Aminosäuren $(X)_m$ unabhängig voneinander gegen andere, nicht natürliche Aminosäuren oder Aminosäurederivate, wie z. B. Naphthalanin, Cyclohexylalanin, Norleucin, Norvalin, α -Aminoadipinsäure, α -Aminobuttersäure, β -Alanin, β -Cyclohexylalanin, Ornithin, Sarcosin oder δ -Hydroxylysin, ausgetauscht sein kann,
- 15 - daß als Analogon des VIP eine Verbindung gemäß folgender Formel ausgewählt ist:
 $X^1SDAVX^2TDNX^3TRLRKQMAVK KX^4LNSILN$, worin X^1 , X^2 , X^3 und X^4 nicht natürliche Aminosäuren oder Aminosäurederivate, wie z. B. Naphthalanin, Cyclohexylalanin, Norleucin, Norvalin, α -Aminoadipinsäure, α -Aminobuttersäure, β -Alanin, β -Cyclohexylalanin, Ornithin, Sarcosin oder δ -Hydroxylysin, darstellen können,
- 20 - daß sämtliche Aminosäuren $(X)_m$ gegen ihre jeweilige D-Aminosäure ausgetauscht sind,
- 25 - daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides retrosynthetische Aminosäuresequenzen ausgewählt sind,
- 30 - daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides retrosynthetische Aminosäuresequenzen, bei denen 2 bis m Aminosäuren gegen die jeweilige D-Aminosäure ausgetauscht sind, aus-
- 35

gewählt sind, wobei m die oben angegebene Bedeutung hat,

- 5 - daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:

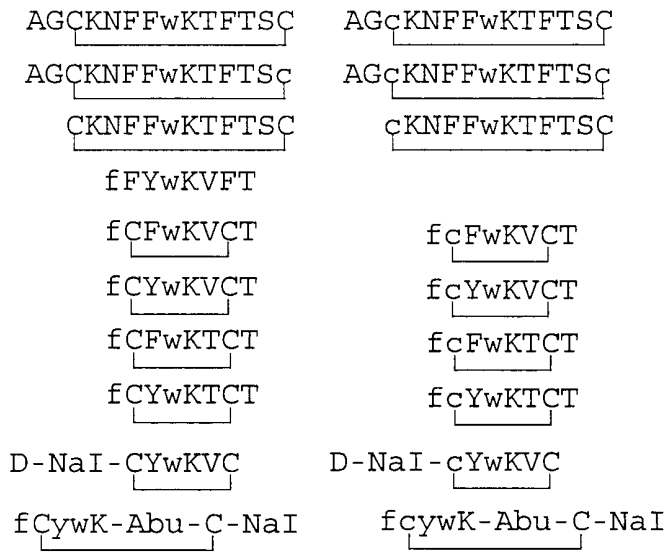
	rlrkq mavkkylnsiln	rlrkq mavkkylnsil	rlrkq mavkkylnsi
	lrkq mavkkylnsiln	lrkq mavkkylnsil	lrkq mavkkylnsi
10	rkq mavkkylnsiln	rkq mavkkylnsil	rkq mavkkylnsi
	kq mavkkylnsiln	kq mavkkylnsil	kq mavkkylnsi
	q mavkkylnsiln	q mavkkylnsil	q mavkkylnsi
	mavkkylnsiln	mavkkylnsil	mavkkylnsi
	avkkylnsiln	avkkylnsil	avkkylnsi

15

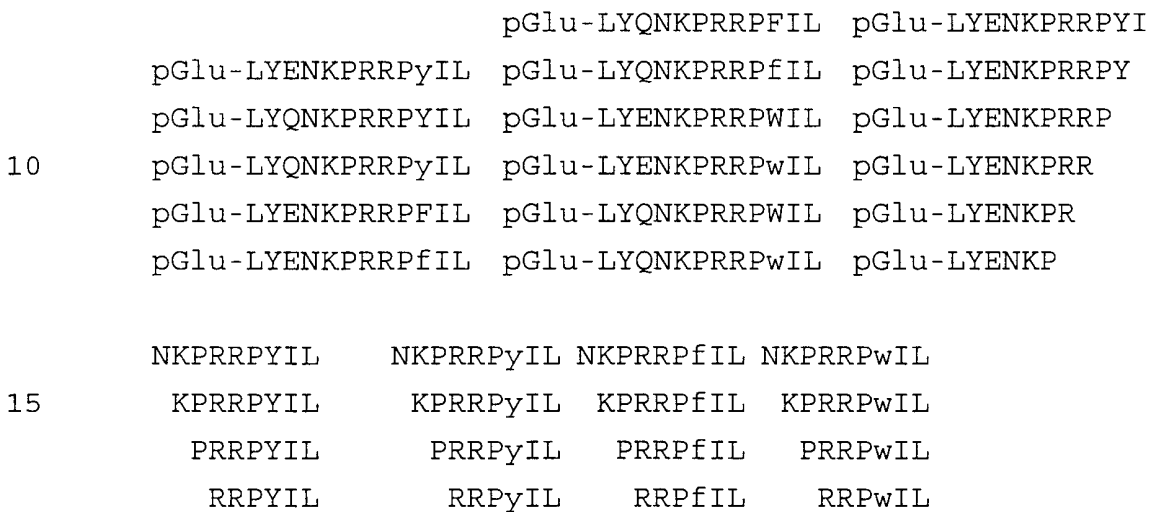
	RLRKQMAvKKyLNSILN	RLRKQMAvKKyLNSIL	RLRKQMAvKKyLNSI
	LRKQMAvKKyLNSILN	LRKQMAvKKyLNSIL	LRKQMAvKKyLNSI
	RKQMAvKKyLNSILN	RKQMAvKKyLNSIL	RKQMAvKKyLNSI
	KQMAvKKyLNSILN	KQMAvKKyLNSIL	KQMAvKKyLNSI
20	QMAvKKyLNSILN	QMAvKKyLNSIL	QMAvKKyLNSI
	MAvKKyLNSILN	MAvKKyLNSIL	MAvKKyLNSI
	AvKKyLNSILN	AvKKyLNSIL	AvKKyLNSI

25

- daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Somatostatins folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:



- daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Neurotensins folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:



20 Die Terminologie der allg. Formel I beinhaltet die übliche Schreibweise von Aminosäuresequenzen. Der N-Terminus ist stets links und der C-Terminus rechts (unsubstituiert entsprechend H-(X)_m-OH oder, im Fall eines Amids, H-(X)_m-NH₂). Die verwendeten Einbuchstaben-Abkürzungen der Aminosäuren können nachgelesen werden in M. Bodanszky, Pep-

25

tide chemistry - A practical textbook, 2nd edition,
Springer-Verlag Heidelberg 1993, S. 3. Großbuchstaben be-
deuten Aminosäuren mit L-Konfiguration (natürliche Ami-
nosäuren), Kleinbuchstaben bedeuten D-Aminosäuren, Disul-
fidbrücken (cyclische Peptide) sind durch Verbindungstri-
che zwischen den entsprechenden Buchstaben (C = Cystein
oder Homocystein) gekennzeichnet. Mit retrosynthetisch
bezeichnet man Sequenzen, bei denen in der Synthese die
Reihenfolge der Aminosäuren im Vergleich zu einer gegebene-
nen nativen

Sequenz invertiert ist, d. h. man beginnt die Synthese
mit der ursprünglich N-terminalen Aminosäure und erzeugt
die Sequenz bis zur ursprünglich C-terminalen Aminosäure.

Die Analoga des VIP wurden mittels Substitutionsanalyse
ermittelt (siehe Beispiel 43). Besonders bevorzugte Ana-
loga des VIP sind die folgenden Verbindungen:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 3)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 4)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 5)

5 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 6)

10 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 7)

15 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 8).

Die erfindungsgemäßen Substanzen haben verschiedene Vor-
teile gegenüber radioaktiv markierten Substanzen. Fluor-
eszenzfarbstoffe können beliebig oft zur Fluoreszenzemis-
sion angeregt werden. Es liegt kein kontinuierliches Si-
gnal vor, das einem Zerfall mit entsprechender Halbwerts-
zeit zu Grunde liegt. Dementsprechend ist der Zeitpunkt
der Diagnose beliebig wählbar und beliebig oft wiederhol-
bar und nicht durch die Halbwertszeit eines Isotops limi-
tiert. Der Patient ist keiner ionisierenden Strahlung
ausgesetzt, die verwendete Lichtstrahlung ist in den ver-
wendeten Dosen unschädlich. Die optische Detektionstech-
nik erlaubt die hochsensitive Detektion weniger Photonen
und ist daher bezüglich der Sensitivität mit der Radio-
diagnostik vergleichbar.

Ein Verfahren zur Diagnostik mittels Nahinfrarotstrahlung
(NIR-Strahlung) unter Verwendung von Farbstoffbiomolekül-
konjugaten wurde beschrieben (WO 96/17628). Als besonders
vorteilhaft erwies sich im Falle der vorliegenden Erfin-
dung, daß die Peptidkonjugate in günstiger Ausbeute und

hoher Reinheit durch das Verfahren der automatisierten Festphasensynthese darstellbar sind. Überraschenderweise wurde gefunden, daß verschiedene Carboxylgruppentragende Indocyaninverbindungen als Aminosäureanaloge eingesetzt und sowohl N-terminal als auch an eine Aminogruppe des Lysins an der Festphase (Harz) gekoppelt werden können. Nach Abspaltung vom Harz und chromatographischer Reinigung wurden die Farbstoff-Peptid-Konjugate in Reinheiten > 95% erhalten. Ein neues Kopplungsverfahren erlaubt die Kopplung von Halogenacetyl-Farbstoffen an die Aminosäure Cystein oder Homocystein, die eine beliebige Aminosäure der nativen VIP-Sequenz ersetzen kann.

Das wesentliche Problem bei Nutzung von Licht zur Fluoreszenzanregung ist die begrenzte Eindringtiefe des Lichtes, die im VIS im Submillimeterbereich liegt, im NIR jedoch Zentimeter betragen kann. Hinsichtlich der Eindringtiefe unproblematisch sind Detektionsverfahren in oberflächlichen Gewebeerkrankungen, sowie weichen Geweben. Erfindungsgegenstand sind daher mammographische Verfahren, endoskopische Verfahren und intraoperative Verfahren, bei denen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen erkrankte Gewebereiche durch Detektion der Fluoreszenz oder der nicht absorbierten Strahlung diagnostiziert werden. Besonderer Erfindungsgegenstand ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in endoskopischen Verfahren, z. B. die Koloskopie, Bronchoskopie, Oesophagialendoskopie, bei denen oberflächennahe Gewebeveränderungen diagnostiziert werden. Die Verwendung von Weißlicht mit direkter visueller Beurteilung ist in der endoskopischen Diagnostik weit verbreitet. Die erfindungsgemäßen Verbindungen tragen durch die Erzeugung eines gewebespezifischen Signals zu einer entscheidenden Verbesserung des Verfahrens bei, insbesondere bei der Diagnostik frühzeitiger, visuell nicht erfaßbarer Gewebeveränderungen (z. B. Dysplasien des Kolons).

Es wurde gefunden, daß sich nach Versprühen der erfindungsgemäßen farbstoffgekoppelten Verbindungen im Darm von Ratten mit chemisch induzierten Dysplasien und Kolonkarzinomen, anschließendem Spülen und der Durchführung einer endoskopischen Fluoreszenzdiagnostik (Anregung 740 nm, Detektion oberhalb 760 nm) Gewebebereiche erhöhter Fluoreszenz im Kolon nachweisen ließen.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur endoskopischen Fluoreszenzdiagnostik, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Dabei wird dem Gewebe eine oder mehrere der Substanzen, vorzugsweise intravenös, oder topisch durch Versprühen zugeführt und Licht aus dem entsprechenden Spektralbereich zur elektronischen Anregung des verwendeten Farbstoffes eingestrahlt. Die reflektierte oder die vom Farbstoff emittierte Fluoreszenzstrahlung wird registriert. Bevorzugt sind die Methoden, bei denen das Gewebe großflächig bestrahlt und die Fluoreszenzstrahlung örtlich aufgelöst durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera dargestellt wird oder die abzubildenden Gewebereale mit einem Lichtleiter abgerastert und die erhaltenen Signale rechnerisch in ein synthetisches Bild umgesetzt werden. Dabei kann die Fluoreszenz spektral und/oder phasenselektiv sowie stationär und/oder zeitaufgelöst detektiert und ausgewertet werden. Die erhaltenen Fluoreszenzbilder können simultan mit Weißlichtbildern erzeugt werden und zur Datenauswertung in einer Abbildung übereinander dargestellt werden.

Die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt in Anlehnung an literaturbekannte Methoden. Die Peptide werden festphasensynthetisch an Polymerharzen hergestellt. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt.

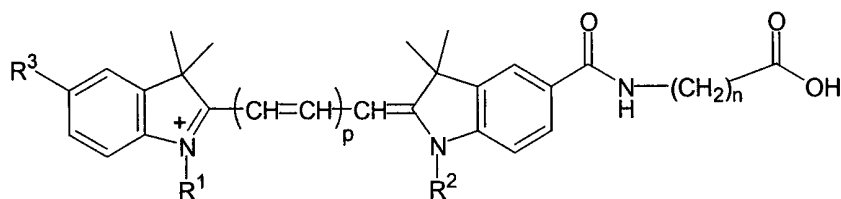
Literatur: Peptide chemistry - A practical textbook (M. Bodanszky), 2nd edition, Springer-Verlag Heidelberg 1993; Anti-Cancer Drug Design 12, 145-167, 1997; J. Am. Chem. Soc. 117, 11821-2, 1995.

5

Die Farbstoffe werden separat hergestellt und dann im Zuge der festphasensynthetischen Darstellung der Peptide an diese gekoppelt und die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Abspaltung vom Harz und Reinigung als hochreine Verbindungen erhalten. Bevorzugt sind solche Farbstoffe, die Carboxylgruppen enthalten, welche nach Aktivierung mittels gängiger Reagenzien mit Aminogruppen des Peptides, insbesondere der ϵ -Aminogruppe des Lysins oder der N-terminalen Peptidaminogruppe, gekoppelt werden. Weiterhin bevorzugt sind Farbstoffe mit Halogenalkyl- oder Halogenacetylresten, die an Thiolgruppen des Peptides, insbesondere der Aminosäure Cystein oder Homocystein, gekoppelt werden.

Literatur zur Synthese von Polymethinfarbstoffen: Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993; Bioconjugate Chem. 7, 356-62, 1996; Bioconjugate Chem. 8, 751-56, 1997; Cytometry 10, 11-19, 1989 und 11, 418-30, 1990; J. Heterocycl. Chem. 33, 1871-6, 1996; J. Org. Chem. 60, 2391-5, 1995; Dyes and Pigments 17, 19-27, 1991, Dyes and Pigments 21, 227-34, 1993; J. Fluoresc. 3, 153-155, 1993; Anal. Biochem. 217, 197-204, 1994; US 4981977; US 5688966; US 5808044; WO 97/42976; WO 97/42978; WO 98/22146; WO 98/26077; EP 0800831.

Besonders geeignet für eine Kopplung an Peptide an fester Phase sind Farbstoffe, die genau eine Carboxylgruppe enthalten, mit besonderem Vorteil Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XVIII



XVIII

worin

5 p für 1, 2 oder 3,

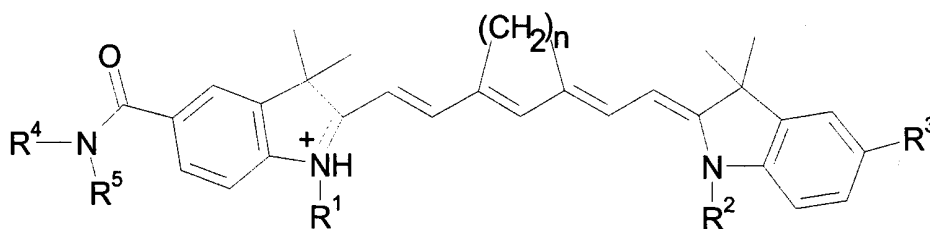
n für 1, 2, 3, 4 oder 10 steht,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-,
3-Sulfopropyl-, 2-Sulfoethyl-, 3-Methyl-3-sulfopropyl-,
Methyl-, Ethyl- oder Propylrest stehen, und

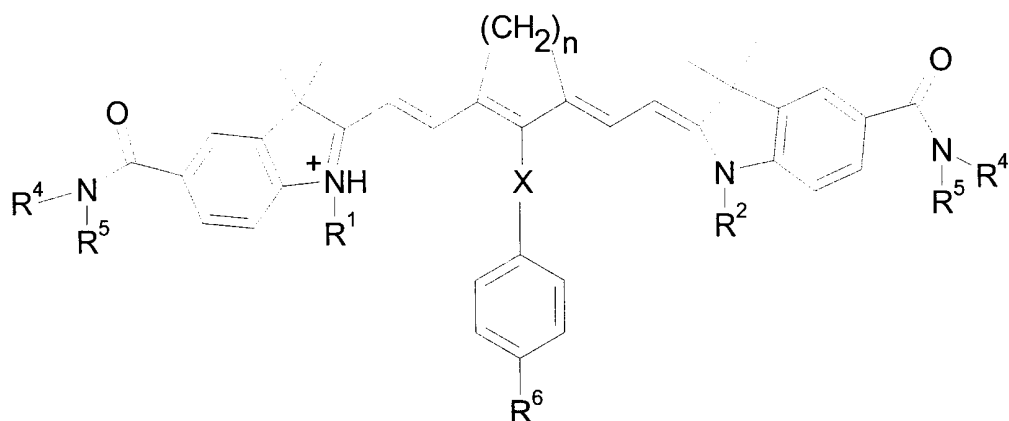
10 R^3 für Wasserstoff oder für einen Rest $-COE^1$, $-CONE^1E^2$,
 $-NHCOE^1$, $-NHCONHE^1$, $-NE^1E^2$, $-OE^1$, $-OSO_3E^1$, $-SO_3E^1$,
 $-SO_2NHE^1$,

wobei E^1 und E^2 unabhängig voneinander für ein Wasser-
stoffatom oder für einen Methyl-, Ethyl- oder einen C_3 -
15 C_6 -Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen und/oder
von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit
0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, stehen,
steht,

20 oder Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XIX oder XX



XIX



XX

worin

5 n für 2 oder 3 steht,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,

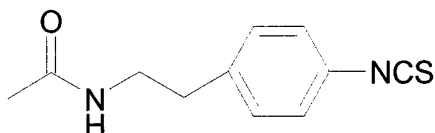
R^3 für eine -COOH-Gruppe oder einen der folgenden Reste steht:

10

-CONH-(CH₂)_n-COOH mit n = 2 oder 3,

-CONH-(CH₂)_n-NCS mit n = 2 oder 3,

-CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ mit n = 2 oder 3 und X¹ = Cl, Br, I



15

R^4 und R^5 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest wie z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-

20 Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-

Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl stehen,

R^6 für eine der folgenden Gruppen steht:

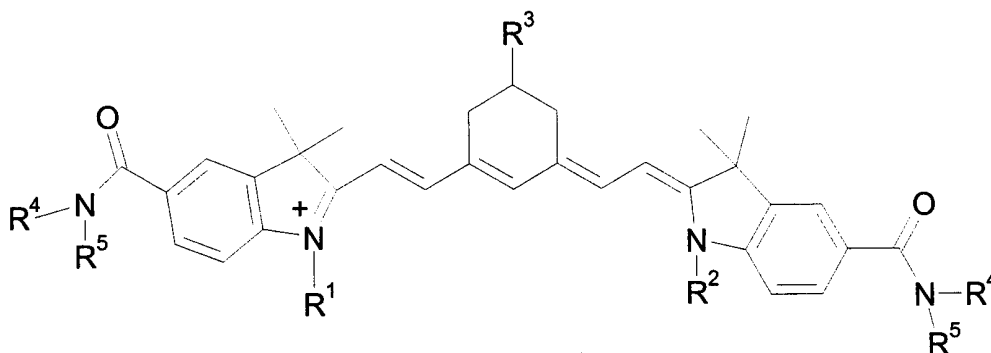
-(CH₂)_m-COOH mit m = 0 bis 2,

-(CH₂)_m-NCS mit m = 0 bis 2,

und X für ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom steht;

5

oder Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XXI



10

XXI

15

worin

R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-,
3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,

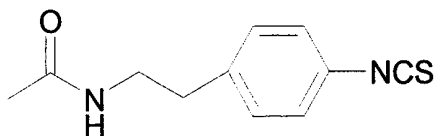
R³ für eine -COOH-Gruppe oder einen der folgenden Reste
steht:

20

-CONH-(CH₂)_n-COOH mit n = 2 oder 3,

-CONH-(CH₂)_n-NCS mit n = 2 oder 3,

-CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ mit n = 2 oder 3 und X¹ = Cl, Br, I



25

und R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest wie z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl stehen.

10

Der Vorteil nur einer aktivierbaren Gruppe, wie z.B. einer Carboxylgruppe, oder einer bereits aktivierten Gruppe, wie z.B. einem Isothiocyanat, einer Halogenalkylgruppe oder einer Halogenacetylgruppe, besteht darin, daß eine chemisch einheitliche Kopplung erfolgen kann. Die Halogenacetylgruppe hat den besonderen Vorteil, daß eine chemisch einheitliche Kopplung an die Mercaptogruppe des Cysteins oder Homocysteins erfolgt. Diese Kopplung kann in Lösung an das ungebundene und von Schutzgruppen befreite Peptid erfolgen. Durch die aktivierten Gruppen ist eine Kopplung an Peptide möglich, ohne daß Nebenreaktionen auftreten. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit weisen die Peptid-Farbstoffkonjugate am Farbstoff eine erhöhte Anzahl von Hydroxygruppen auf. Durch die Position des Linkers am Indolsystem des Farbstoffes kann zusätzlich eine ausreichende Hydrophilie durch Sulfonatgruppen enthaltende Reste an den Stickstoffatomen des Indolsystems erzeugt werden. Dadurch kann eine strukturell einheitliche Kopplungsreaktion mit den Peptiden (siehe Beispiele 4 bis 38 und 44 bis 49) durchgeführt werden.

15

20

25

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebereiche, welches sich dadurch auszeichnet, daß es mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel I zusammen

35

mit den üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.

Folgende Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiele 1 bis 3: Synthese der Indocyaninfarbstoffe 1-3 zur festphasensynthetischen Kopplung an Aminogruppen (N-terminal oder ϵ -Lysin) der Peptide

Die Synthese erfolgt generell ausgehend von 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin und 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenin (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-510, 1992).

Beispiel 1: Synthese von 1,1'-Bis(4-sulfobutyl)indocyanin-5-carbonsäure, Natriumsalz (1)

0,8 g (4,0 mmol) N,N-Diphenylformamidin werden in 15 ml Essigsäureanhydrid vorgelegt und bei Raumtemp. portionsweise mit 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenin versetzt, 30 min bei 120 °C gerührt und dann mit einem Wasserbad auf Raumtemp. abgekühlt. Anschließend werden 1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin, 1,2 g (14,6 mmol) wasserfreies Natriumacetat, 15 ml Essigsäureanhydrid und 6 ml Essigsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h auf 120 °C erhitzt, die tiefrote Lösung abgekühlt und mit 100 ml Ether versetzt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert. Es erfolgt eine chromatographische Reinigung an RP-Kieselgel EUROPREP 60-30 C18, 60A, 20-45 m (Eluens: Wasser/MeOH, Stufengradient von 0 % auf 70 % MeOH). Die produktenthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit und anschließend lyophilisiert, Ausbeute: 1,5 g (58 %), rotes Lyophilisat.

Beispiel 2:

Synthese von 1,1'-Bis(4-sulfobutyl)indodicarbocyanin-5-carbonsäure, Natriumsalz (2)

1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin und 1,0 g (3,9 mmol) Malonaldehyd-bisphenylimin-hydrochlorid werden in 15 ml Essigsäureanhydrid 30 min bei 120 °C gerührt und dann mit einem Wasserbad auf Raumtemp. abgekühlt. Anschließend werden nacheinander 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenin, 1,2 g (14,6 mmol) wasserfreies Natriumacetat, 15 ml Essigsäureanhydrid und 6 ml Essigsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h auf 120 °C erhitzt, die nun blaue Lösung abgekühlt und mit 100 ml Ether versetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben, Ausbeute: 1,8 g (66 %), blaues Lyophilisat.

Beispiel 3:

Synthese von 1,1'-Bis(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure, Natriumsalz (3)

1,2 g (4,1 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin und 1,1 g (3,9 mmol) Glutaconaldehyd-dianilhydrochlorid werden in 15 ml Essigsäureanhydrid 30 min bei 120 °C gerührt und dann mit einem Wasserbad auf Raumtemp. abgekühlt. Anschließend werden 1,4 g (4,2 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenin, 1,2 g (14,6 mmol) wasserfreies Natriumacetat, 15 ml Essigsäureanhydrid und 6 ml Essigsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h auf 120 °C erhitzt, die nun blaue Lösung abgekühlt und mit 100 ml Ether versetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben, Ausbeute: 1,8 g (60 %), blaues Lyophilisat.

Die Strukturen der Verbindungen aus Beispiel 1-3 sind in Fig. 1 dargestellt.

Beispiele 4 bis 6: Synthese der Indocyaninfarbstoffe 4-6 aus 1-3 zur festphasensynthetischen Kopplung an Aminogruppen (N-terminal oder ϵ -Lysin) der Peptide

5

Die Synthese erfolgt durch Amidierung der Farbstoffe 1-3 mit β -Alanin-t-butylester und saurer Spaltung der t-Butylestergruppe.

10 Eine Lösung von 0,5 mmol des Farbstoffes 1-3 und 0,1 g (1,0 mmol) Triethylamin in 20 ml Dimethylformamid wird bei 0 °C mit 0,5 mmol TBTU in 10 ml Dimethylformamid ver-
setzt und 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine
15 Lösung von 0,11 g (0,6 mmol) β -Alanin-t-butylester-
hydrochlorid und 0,6 mmol Triethylamin in 5 ml Dimethyl-
formamid zugetropft und das Reaktionsgemisch 2 h bei
Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Diethylether
wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert, in 20 ml
Dichlormethan gelöst, mit 10 ml Trifluoressigsäure ver-
20 setzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wird im
Vakuum eingeengt und der Rückstand wie in Beispiel 1 be-
schrieben chromatographisch gereinigt und lyophilisiert;
Ausbeuten: 0,21 g (58%) **4**, 0,29 g (76%) **5**, 0,28 g (72%)
6.

25

Beispiele 7 bis 9: Synthese der Indocyaninfarbstoffe 7-9 aus 1-3 zur festphasensynthetischen Kopplung an Aminogruppen (N-terminal oder ϵ -Lysin) der Peptide

30

Die Darstellung erfolgt analog der Beispiele 4-6 unter Verwendung von 0,1 g (0,6 mmol) Glycin-t-butylester-
hydrochlorid, Ausbeuten: 0,25 g (68%) **4**, 0,30 g (80%) **5**,
0,32 g (83%) **6**.

35

Beispiele 10 bis 12: Synthese der Indocyaninfarbstoffe 10-12 aus 1-3 zur festphasensynthetischen Kopplung an Peptide durch Kopplung an Thiolgruppen von Cystein.

5 Die Synthese erfolgt durch Amidierung der Farbstoffe 1-3 mit 3-Aminopropanol und anschließender Überführung der Alkoholgruppe in ein Bromid.

10 Eine Lösung von 0,5 mmol des Farbstoffes 1-3 und 0,1 g (1,0 mmol) Triethylamin in 20 ml Dimethylformamid wird bei 0 °C mit 0,5 mmol TBTU in 10 ml Dimethylformamid versetzt und 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 850 mg (1,2 mmol) 3-Aminopropanol und 1,2 mmol Triethylamin in 5 ml Dimethylformamid zugetropft und das
15 Reaktionsgemisch 6 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Diethylether wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert und wie in Beispiel 1 beschrieben chromatographisch gereinigt und lyophilisiert.

Die Umsetzung zu den Bromiden 10-12 erfolgt durch Rühren
20 von 0,3 mmol der Zwischenprodukte mit 55 mg (0,5 mmol) N-Bromsuccinimid und 130 mg (0,5 mmol) Triphenylphosphin in einem Gemisch von 4 ml Dichlormethan und 4 ml Dimethylformamid für 48 h bei 4 °C. Durch Zugabe von 3 ml Ether werden die Produkte ausgefällt, abfiltriert und als
25 Rohprodukte in der Peptidkopplung eingesetzt.

Beispiele 14-16 und 18-27: Harzsynthese von Peptidkonjugaten aus VIP-rezeptorbindenden Peptiden und den Farbstoffen 1-9 und 13.
30

a) *Festphasenpeptidsynthese*: An 50 µmol TentaGel-Sram-Harz (Rapp Polymere, Tübingen) werden die Peptide nach der Fmoc-Strategie analog dem Standard-Fmoc-Maschinen-
35 Protokoll (Pept. Res., 36 (1990) 225) unter Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris-

pyrrolidionophosphonium hexafluorophosphat) und N-Methylmorpholin synthetisiert. Die folgenden Seitenschutzgruppen wurden benutzt: Trityl für Cys, His, Asn und Gln; t-Butyl für Asp, Glu, Ser und Thr; t-butylloxycarbonyl für Lys und Trp und Pentamethylchroman-sulfonyl für Arg.

Die Kopplung an die ϵ -Aminogruppe eines Lysins (Beispiel 24) wird durch orthogonale Schutzgruppentechnik erzielt. Als Lysinbaustein wird Fmoc-Lys(Dde)-OH eingesetzt und das Peptid wie oben beschrieben synthetisiert. Nach Acetylierung des N-Terminus erfolgt die Spaltung der Dde-Schutzgruppen selektiv durch 3% Hydrazinhydrat.

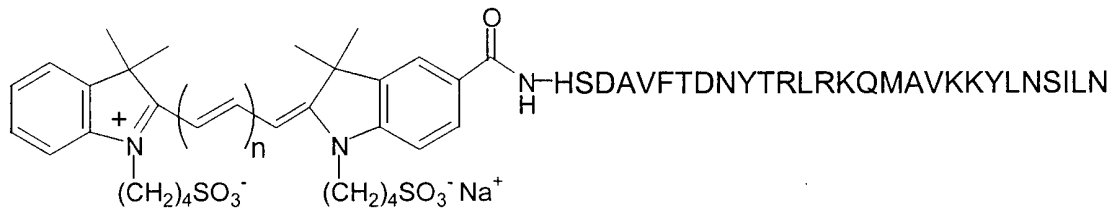
b) *Farbstoffkopplung*: An die noch festphasengebundenen Peptide werden die Farbstoffe N-terminal bzw. an Lysin gebunden. Hierzu werden 75 μmol des jeweiligen Farbstoffes **1-9 und 13** (1,5 eq) in 600 μl Dimethylformamid gelöst und mit 83 μmol TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat) sowie 150 μmol N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 2 min wird dieses Reaktionsgemisch auf das jeweilige peptidtragende Harz gegeben und über Nacht reagieren lassen. Anschließend wird das Harz 5x mit Dimethylformamid und 3x mit Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet.

c) *Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate*: Je 1,5 ml einer Mischung bestehend aus 750 mg Phenol, 250 μl Ethandithiol, 500 μl Thioanisol und 500 μl Wasser in 10 ml Trifluoressigsäure werden auf das peptidkonjugattragende Harz gegeben und für vier Stunden einwirken lassen. Die Farbstoff-Peptid-Konjugate werden mit kaltem t-Butylmethylether gefällt, 6x mit kaltem Diethylether gewaschen, in 5%iger Essigsäure gelöst und gefriergetrocknet. Reinheitsanalyse und Reinigung der Konjugate erfolgt mittels RP-HPLC an einer Vydac-C18-Säule (Gradient: Wasser+0,05% TFA /Acetonitril, 5% auf 60% Acetonitril in 20 min, Detektion: 214 und 750 nm).

Die Strukturen der synthetisierten Farbstoff-Peptid-Konjugate sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

Farbstoffkonjugate mit VIP-Rezeptor-bindenden Peptiden I

Beispiel 14 bis 16: Konjugate von Farbstoff **1-3** mit VIP(1-28)

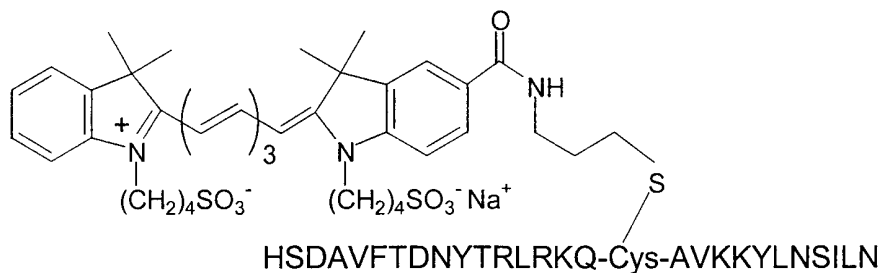


n = 1: Indocarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **14**

n = 2: Indodicarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **15**

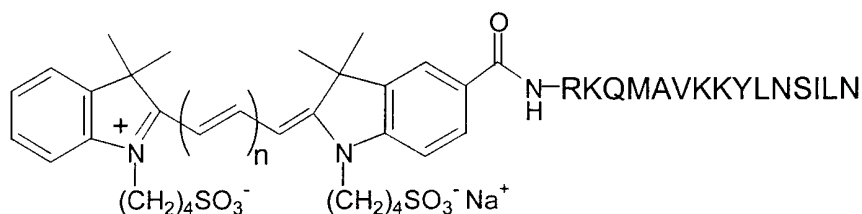
n = 3: Indotricarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **16**

Beispiel 17: Konjugat von Farbstoff **12** mit Cys¹⁷-VIP(1-28)



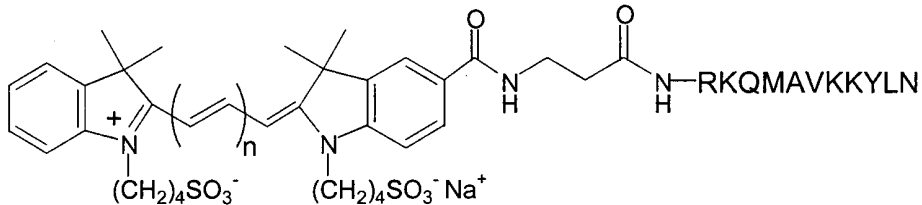
Indotricarbocyanin-Cys¹⁷-VIP(1-28)-Konjugat **17**

Beispiel 18 bis 20: Konjugate von Farbstoff **1-3** mit VIP(14-28)



- n = 1: Indocarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat **18**
 n = 2: Indodicarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat **19**
 n = 3: Indotricarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat **20**

Beispiel 21 bis 23: Konjugate von Farbstoff **4-6** mit VIP(14-24)



- n = 1: Indocarbocyanin-β-Alanin-VIP(14-24)-Konjugat **21**
 n = 2: Indodicarbocyanin-β-Alanin-VIP(14-24)-Konjugat **22**
 n = 3: Indotricarbocyanin-β-Alanin-VIP(14-24)-Konjugat **23**

Beispiel 17: Harzsynthese von Peptidkonjugaten bestehend aus VIP-rezeptorbindenden Peptiden und den Farbstoffen 10-12.

5

Um die Bromtragenden Farbstoffe **10-12** chemoselektiv über eine Thioetherbindung an die Peptide zu binden, muß in das Peptid ein Cystein oder Homocystein mit orthogonaler Schutzgruppe eingebaut werden. Die Festphasenpeptidsynthese wird wie für die Beispiele 14-16/18-27 beschrieben durchgeführt und der Baustein Fmoc-cys(Mmt)-OH eingesetzt. Die Monomethoxytritylgruppe (Mmt) ist unter Erhalt der übrigen Seitenschutzgruppen durch 1% TFA/5% Triisobutylsilan in Dichlormethan abspaltbar. Hierzu wird das Harz 3 mal mit je 1ml obiger Lösung für 10 min inkubiert. Nach Waschen des Harzes mit Dichlormethan (3x), DMF (5x) und Ethanol (3x) wird das Harz für 2 min mit einer 20%igen Cäsiumcarbonatlösung (1 ml) inkubiert und anschließend mit Wasser (2x), Ethanol (2x) und DMF (2x) gewaschen. Anschließend werden 75 µmol des jeweiligen Farbstoffes **10-12** (1,5 eq) in 600 µl Dimethylformamid gelöst

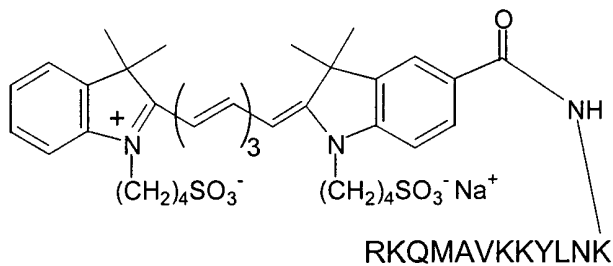
10
15
20

und auf das jeweilige Harz gegeben und der Vorgang nach 30 min wiederholt. Anschließend wird das Harz fünf mal mit Dimethylformamid (5x) und mit Dichlormethan (2x) gewaschen. Nach Trocknung des Harzes an Luft erfolgt die
5 Schutzgruppenabspaltung und Ablösung vom Träger wie oben beschrieben.

10 Die Strukturen von weiteren synthetisierten Farbstoff-Peptid-Konjugaten sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

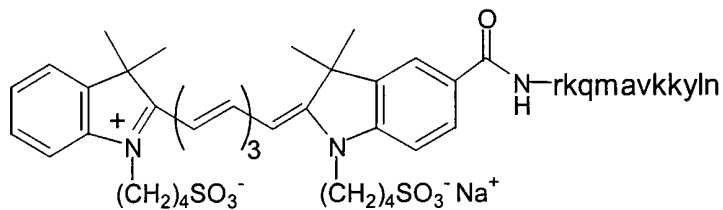
Farbstoffkonjugate mit VIP-Rezeptor-bindenden Peptiden II

Beispiel 24: Konjugat von Farbstoff **6** mit Lys²⁵-VIP(14-25)



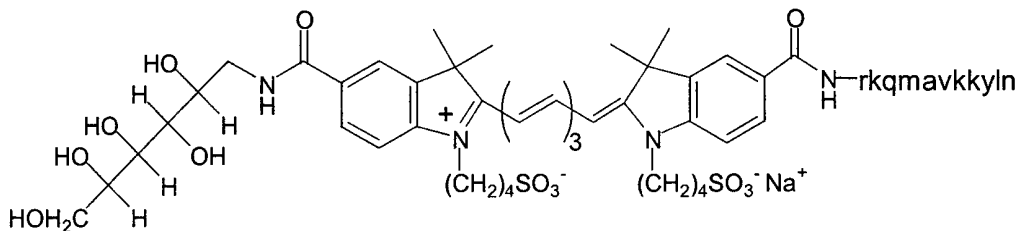
(ϵ -Amino-Indotricarbocyanin) -Lys²⁵-VIP(14-25) -Konjugat **24**

Beispiel 25: Konjugat von Farbstoff **3** mit D-VIP(14-24)



Indotricarbocyanin-D-VIP(14-24) -Konjugat **25**

Beispiel 26: Konjugat von Farbstoff **13** mit D-VIP(14-24)



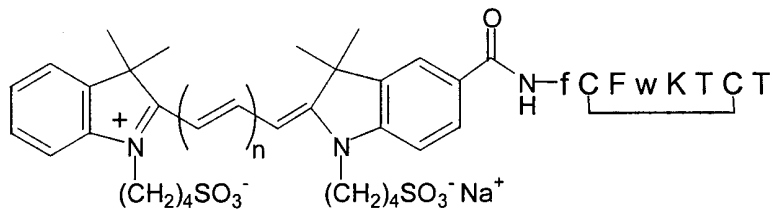
Indotricarbocyanin-5-carbonsäureglucamid-D-VIP(14-24) -
Konjugat **26**

Beispiel 27: Konjugat von Farbstoff **13** mit retro-D-

Die Strukturen der synthetisierten Farbstoff-Peptid-Konjugate sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

Farbstoffkonjugate mit Somatostatinrezeptor- bindenden Peptiden

Beispiel 28 bis 30: Konjugat von Farbstoff **1-3**
mit Pentetretotid

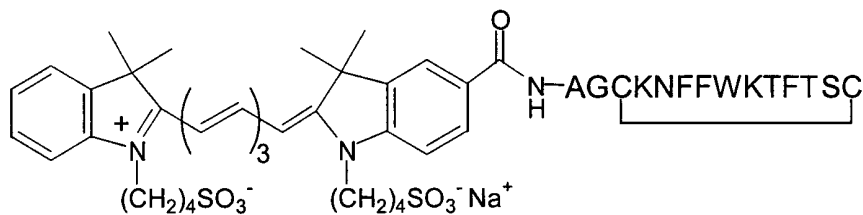


n = 1: Indocarbocyanin-pentetretotid **28**

n = 2: Indodicarbocyanin-pentetretotid **29**

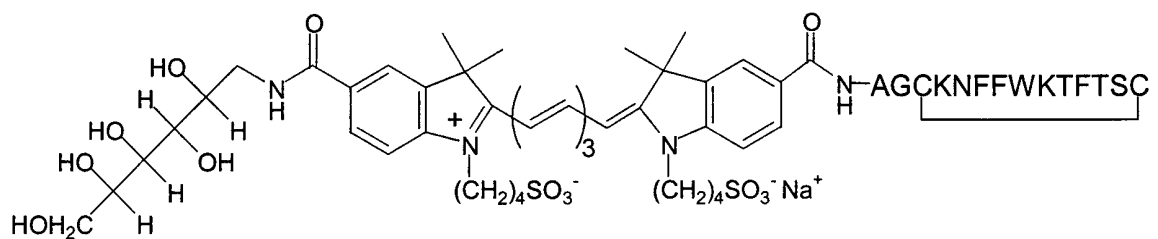
n = 3: Indotricarbocyanin-pentetretotid **30**

Beispiel 31: Konjugat von Farbstoff **3** mit So-
matostatin-14



Indotricarbocyanin-Somatostatin-14-Konjugat **31**

Beispiel 32: Konjugat von Farbstoff **13** mit So-
matostatin-14



Indotricarbocyanin-5-carbonsäureglucamid-Somatostatin-14-
Konjugat **32**

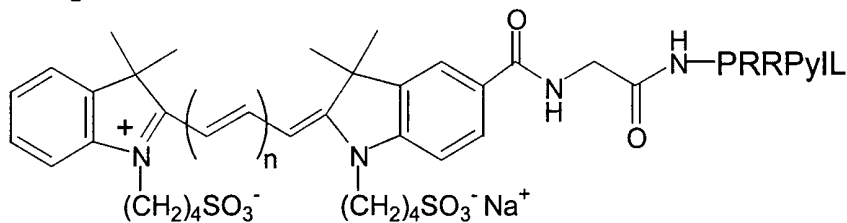
Beispiele 33 bis 38: Synthese von Peptidkonjugaten aus Neurotensin-Peptiden und dem Farbstoff 3.

Die Synthese der Substanzen erfolgt analog den für die Beispiele 14-27 beschriebenen, allgemeinen Protokollen.

Die Strukturen der synthetisierten Farbstoff-Peptidkonjugate sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

Farbstoffkonjugate mit Neurotensinrezeptorbindenden Peptiden

Beispiel 33 bis 35: Konjugat von Farbstoff 7-9 mit D-Tyr¹¹-Neurotensin(7-13)

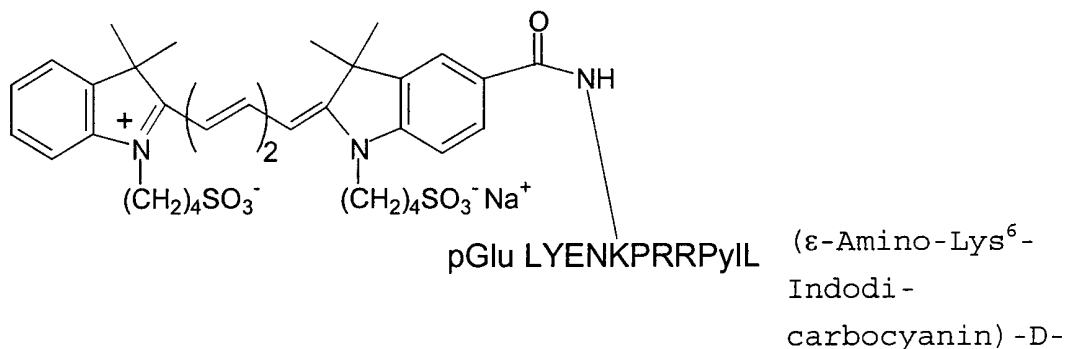


n = 1: Indocarbocyanin-D-Tyr¹¹-Neurotensin(7-13)-Konjugat
33

n = 2: Indodicarbocyanin-D-Tyr¹¹-Neurotensin(7-13)-Konjugat
34

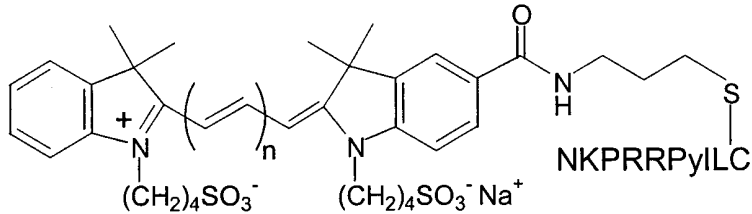
n = 3: Indotricarbocyanin-D-Tyr¹¹-Neurotensin(7-13)-
Konjugat 35

Beispiel 36: Konjugat von Farbstoff 2 mit D-Tyr¹¹-Neurotensin



Tyr¹¹-Neurotensin-
Konjugat 36

Beispiel 37 bi 38: Konjugat von Farbstoff 10-11
mit D-Tyr¹¹-Neuro-tensin(5-13)-Cys



n = 1: Indocarbocyanin-D-Tyr¹¹-Neurotensin(5-13)-Cys-
Konjugat 37

n = 2: Indodicarbocyanin-D-Tyr¹¹-Neurotensin(5-13)-Cys-
Konjugat 38

5 **Beispiel 39: Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften
der synthetisierten Farbstoff-Peptidkonjugate**

Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten wurden in
PBS und in Rinderplasma bestimmt (Perkin Elmer Lambda 2).
10 Fluoreszenzemissionsspektren wurden in PBS durch Anregung
auf der kurzwelligen Seite (ca. 40 nm vom Absorptionsma-
ximum) erhalten (SPEX Fluorolog, R928 PMT).

Die Absorptions- und Fluoreszenzdaten sind in Fig. 4 zu-
15 sammengefaßt. In Fig. 5 sind typische Absorptions- und
Fluoreszenzemissionsspektren beispielhaft gezeigt.

20 **Beispiel 40: Bestimmung der Zellaufnahme mittels Fluores-
zenzmikroskopie**

Die Bindung und Aufnahme der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in vitro an humanen Tumorzellen untersucht, die Rezeptoren für vasoaktives intestinales Peptid und/oder Somatostatin und/oder Neurotensin exprimieren.

5 Dazu wurden 5×10^5 Tumorzellen in 1,5 ml Medium inkubiert, welches die Testsubstanz enthielt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der Substanzen (10 nM-10 μ M) eingesetzt und die Inkubationsdauer variiert (1 min-24 h). Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und mikroskopische Präparate hergestellt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 135-Fluoreszenzmikroskop, das mit einem Cy 7- (Exciter HQ 710/70nm, Emitter 810/90nm, Beamsplitter 750nm LP), Cy5- (Exciter 575-625 nm, Emitter 660-710nm BP, Beamsplitter 645nm) und Cy3-Filtersatz (Exciter 546/12nm, Emitter 590nm LP, Beamsplitter 580nm) ausgestattet war.

10 Von allen Präparaten wurden Weißlicht- und Fluoreszenzbilder mit einer CCD-Kamera (Visitron RTE/CCD-576) aufgenommen und digital gespeichert.

20 Ausgewählte Ergebnisse sind im folgenden beschrieben:

Es wurden mikroskopische Weisslicht- und Fluoreszenzaufnahmen (Cy7-Filtersatz) von HT29-Zellen nach 30 min Inkubation mit 10 μ M Indotricarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **16** erstellt. Im Fluoreszenzbild wurde ein weitgehend homogen über die Zelle verteilte Fluoreszenz detektiert. Zusätzlich wurden Areale erhöhter Signale sichtbar, die mit vesikulären Kompartimenten assoziiert sein können. Die Zellen im Fluoreszenzbild korrelieren in ihrer räumlichen Ausdehnung mit dem Weisslichtbild.

10

Mit folgenden Verbindungen wurden Weisslicht- und Fluoreszenzaufnahmen (Cy7-Filtersatz) in analoger Durchführung erhalten:

Indotricarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat **20**, 10 μ M, HT29-Zellen. Homogen über die Zelle verteilte Fluoreszenz, gute Korrelation mit dem Weisslichtbild.

Indotricarbocyanin-retro-D-VIP(24-14) **25**, 10 μ M, HT29-Zellen. Homogen über die Zelle verteilte Fluoreszenz, gute Korrelation mit dem Weisslichtbild.

Indotricarbocyanin-pentetreotid-Konjugat **30**, 10 μ M, RIN38-VIP1-Zellen. Fluoreszenzareale mit vesikulärem Muster im Membranbereich der Zelle, gute Korrelation mit dem Weisslichtbild.

Des weiteren wurden Fluoreszenzaufnahmen in analoger Durchführung mit den folgenden Verbindungen erhalten: (-Amino-Indotricarbocyanin)-Lys²⁵-VIP(14-25)-Konjugat **24**, 10 μ M, RIN38-VIP1-Zellen, Cy7-Filtersatz. Das Fluoreszenzbild zeigt eine homogene, intrazelluläre zellkernnahe Fluoreszenz.

30

Indodicarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **15**, 10 μ M, RIN38-VIP1-Zellen, Cy5-Filtersatz. Das Fluoreszenzbild zeigt intrazelluläre Fluoreszenzareale mit vesikulärem Muster im Membranbereich der Zelle.

Indocarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **14**, 10 μM , RIN38-VIP1-Zellen, Cy3-Filtersatz. Das Fluoreszenzbild zeigt intrazelluläre Fluoreszenzareale mit vesikulärem Muster im Membranbereich der Zelle.

5

Beispiel 41: Untersuchung der Tumoranreicherung mittels In-vivo-Fluoreszenzbildgebung an tumortragenden Mäusen

10 Die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in vivo nach Injektion in tumortragende Nacktmäuse untersucht. Dazu wurden 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ bis 2 $\mu\text{mol/kg}$ der Substanz intravenös appliziert und die Anreicherung in der Tumorregion in einem Zeitraum von 0 bis 48
15 Stunden beobachtet. Die Fluoreszenz der Substanzen wurde durch Bestrahlung der Tiere mit Nahinfrarot-Licht der Wellenlänge 640 nm (Indodicarbocyanine) bzw. 740 nm (Indotricarbocyanine), das mit einem Nd:YAG Laser erzeugt wurde, angeregt. Die Fluoreszenzstrahlung wurde bei einer
20 Wellenlänge von >700nm bzw. > 800 nm durch eine intensivierte CCD-Kamera detektiert und die Fluoreszenzbilder digital gespeichert.

Ausgewählte Ergebnisse sind im folgenden beschrieben:

25

Von einer tumortragenden Nacktmaus (HT29-Tumor in der rechten Hinterflanke) wurden Ganzkörper-Fluoreszenzbilder vor und 1 h nach Applikation von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ Indotricarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat **20** aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität vor Applikation ist vernachlässigbar (geringe Autofluoreszenz). 1 h nach Applikation resultiert ein ca. 2-fach erhöhtes Signal im Tumor relativ zur kontralateralen Flanke bei ansonsten homogen über den Restkörper verteilten Fluoreszenzemission.

35

Von einer tumortragenden Nacktmaus (RIN38-SSTR2-Tumor in der rechten Hinterflanke) wurden Ganzkörper-Fluoreszenzbilder vor und 1 h nach Applikation von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ Indotricarbocyanin-pentetreotid-Konjugat **30** aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität vor Applikation ist vernachlässigbar (geringe Autofluoreszenz). 1 h nach Applikation resultiert ein ca. 3-fach erhöhtes Signal im Tumor relativ zur kontralateralen Flanke bei ansonsten homogen über den Restkörper verteilten Fluoreszenzemission.

Von einer tumortragenden Nacktmaus (HT29-Tumor in der rechten Hinterflanke) wurden Ganzkörper-Fluoreszenzbilder vor und 1 h nach Applikation von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ (ϵ -Amino-Indotricarbocyanin)-Lys²⁵-VIP(14-25)-Konjugat **24** aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität vor Applikation ist vernachlässigbar (geringe Autofluoreszenz). 1 h nach Applikation resultiert ein ca. 1,5-fach erhöhtes Signal im Tumor relativ zur kontralateralen Flanke. Zusätzlich wurde ein erhöhtes Fluoreszenzsignal in den Nieren detektiert.

Von einer tumortragenden Nacktmaus (HT29-Tumor in der rechten Hinterflanke) wurden Ganzkörper-Fluoreszenzbilder vor und 5 min nach Applikation von 0,2 $\mu\text{mol/kg}$ Indodicarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat **15** aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität vor Applikation ist vernachlässigbar (geringe Autofluoreszenz). 1 h nach Applikation resultiert ein ca. 1,4-fach erhöhtes Signal im Tumor relativ zur kontralateralen Flanke. Zusätzlich wurde ein erhöhtes Fluoreszenzsignal in den Nieren detektiert.

**Beispiel 42: Untersuchung der Stabilität von Farbstoff-
Peptidkonjugaten in Rinderplasma**

Die chemische Stabilität der erfindungsgemäßen Verbindungen in Plasma wurde in vitro in Abhängigkeit von der Zeit mittels HPLC untersucht. Dazu wurden 1 mM Lösungen der Peptide in PBS in Rinderblutplasma (Fa. Graeber, gefroren, zur Heparinanalyse) unter Erhalt einer Konzentration von 30 µM pipettiert und die Lösungen bei 37 °C inkubiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5; 1; 2; 4; 6; 24 h) erfolgte die Aufarbeitung der Proben, indem 1 ml der Plasmalösung mit 1 ml MeOH versetzt wird und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert werden.

Die Analyse des Überstandes erfolgte mittels HPLC durch Bestimmung des Gehaltes bei 750 nm bezogen auf den Gehalt nach 1 min Inkubation bei 0 °C (Kontrolle).

HPLC: Beckmann, Diodenarraydetektor TIDAS (Fa. J&M) 350-1000 nm;

Säule: Chromasil 5µ, 250mm x 4,5mm

Laufmittel: A: 90% H₂O(+0.5%TFA)/10% MeOH

B: 10% H₂O(+0.5%TFA)/90% MeOH

Gradient: 10% B auf 100% B innerhalb von 20 min

25

Die Beispiele sind in Fig. 6 zusammengefaßt.

**Beispiel 43: Substitutionsanalyse von VIP mittels
Spotsynthese**

30

1. Synthese von Peptiden auf Cellulose

Die Synthese von Peptiden auf Zellulose (Spotsynthese) wurde 1988 erstmals von R. Frank und R. Döring veröf-

35

fentlicht und 1992 detailliert von R. Frank¹ beschrieben. Hier wurde die in der AG Schneider-Mergener etablierte Methode² angewendet.

5 Die Zellulosemembran wurde chemisch modifiziert, um geeignete Ankerfunktionen für die nachfolgende Peptidsynthese anzubringen. Dabei wurde auf eine aminofunktionale Zellulose-Membran (CAPE-Membran)³ eine Mercaptofunktion⁴ eingeführt. An diese Mercaptofunktion konnte
10 die erste Aminosäure in Form eines Brompropylesters gekoppelt werden. Anschließend wurden alle Aminosäuren des Peptids sukzessive nach der Fmoc-Strategie aufgebaut. Am Ende wurde der Indodicarboyaninfarbstoff N-terminal an das Peptid gebunden und anschließend alle Seitenschutzgruppen abgespalten.
15

Um die Peptide auf Rezeptorbindung untersuchen zu können, mußten die Peptide von der Zellulose abgespalten werden. Dafür wurde eine Methode entwickelt, bei der es erstmalig gelungen ist, Peptide mit authentischen C-Terminus von
20 der Zellulose abzuspalten.

1a. Modifikation der Zellulose-Membran

- 25
- Eine 20 x 30 cm große Zellulose-Membran (Whatman 50) wurde für 2 min. mit Methanol/1.2 % Perchloroessigsäure inkubiert und anschließend getrocknet.
 - Nach dreistündiger Inkubation mit 10%Epibromhydrin in Dioxan/1,2 % Perchloroessigsäure wurde für 30 min.
30 mit Methanol abreagiert und danach zweimal mit Methanol gewaschen.
 - Anschließend wurde 3 x mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen und über Nacht mit 50 % 1,3-Diaminopropan (v/v) in DMF inkubiert. Danach wurde wie folgt gewaschen:
35 3 x DMF, 2 x Ethanol, 2 x Aqua dest., 2 x Et-

hanol, 15 min. mit 5 M Natriummethanolat, 3 x Methanol, 4 x Aqua dest., 3 x Ethanol, 1 x Diethylether

5 1b. Definition der Spots

- Für die Spotdefinition wurde 1.3 μ l 0.6 M Fmoc- β -Alanin-Opfp-Lösung mit dem Auto-Spot Robot 222 XL (Abimed, Langenfeld) bei einer Reaktionszeit von 15
10 min. auf bestimmte Punkte der Zellulose-Membran doppelt aufpipettiert.
- Die Membran wurde 2 min. mit 2 % Acetanhydridlösung und 30 min. mit 20 % Acetanhydrid/10 % Diisopropylethylamin acetyliert.
- 15 • Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die Membran 3 x mit DMF gewaschen, 2 x 10 min. mit 20 % Piperidin-Lösung inkubiert, 5 x mit DMF und 1 x mit Ethanol gewaschen. Die freien Aminogruppen konnten mit Bromphenolyblau sichtbar gemacht werden. Nach
20 wiederholtem Waschen mit Ethanol wurde die Membran getrocknet.

25 1c. Kopplung der Mmt-Mercaptopropionsäure und des Brompropylesters

- Es wurde 0.6 M Mercaptopropionsäure bei einer Reaktionszeit von 15 min. doppelt auf die definierten Spots pipettiert. Anschließend wurde 3 x mit DMF und
30 3 x mit Dichlormethan (DCM) gewaschen.
- Die Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe erfolgte mit Inkubation für 2 min. mit 10 % Dichloressigsäure/0.5% Trifluoressigsäure und 3 x 5 min. mit 10 % Dichloressigsäure/0,5 % trifluoressigsäure/5 % Triisobutylsilan. Folgende Waschschr
35 1x DCM, 2 x Ethanol, 1 x Aqua dest., 1-2 min. mit 10

% Cäsiumcarbonat, 1 x Aqua dest., 2 x Ethanol, 1 x Diethylether

- Die jeweiligen Fmoc-brompropyl-aminosäureester wurden 3 x bei einer Konzentration von 0.6 M und Reaktionszeit von 15 min. gekoppelt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde wie bei 1b durchgeführt.

1d. Kopplung der Aminosäuren

- Die Peptide wurden durch wiederholtes Aufpipettieren von 0.6 M Aminosäurelösungen in N-Methylpyrrolidon auf die Spots und anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen aufgebaut.

15

1e. Kopplung des Indodicarbocyaninfarbstoffes

- Es wurde eine 0.3 M Lösung des Indodicarbocyaninfarbstoffes mit 0.3 M TBTU und 0.6 M Diisopropylethylamin aktiviert und 4 x bei einer Reaktionszeit von 15 min. auf die Spots aufpipettiert.

20

1f. Abspaltung der Seitenschutzgruppen

- Die Abspaltung der Seitenschutzgruppen erfolgte durch nacheinanderfolgende Behandlung der Membran mit 90 % Trifluoressigsäure/3 % Triisobutylsilan/2 % Aqua dest./1 % Phenol für 30 min. und mit 50 % Trifluoressigsäure/3 % Triisobutylsilan/2 % Aqua dest./1 % Phenol für 2,5 h. Anschließend wurde 4 x mit Dichlormethan, 3 x mit DMF und 1 x mit Ethanol gewaschen.

30

35

2. Abspaltung der Peptide von der Zellulose-Membran

- 5 • Die Spots wurden ausgestanzt und mit Methanol gewaschen. Für die Abspaltung wurde 30 min. mit 70 mM Natriummethanolat in Methanol inkubiert. Der pH konnte durch Zugabe von 37%iger Salzsäure korrigiert werden. Anschließend wurden die Peptide in einer Speed-Vac getrocknet.
- 10 • Nach dem Trocknen wurden die Peptide in Aqua dest. aufgenommen und mittels Reversed-Phase-HPLC und MALDI-TOF analysiert.

15

3. Zellassay und Durchflußzytometrie

- 20 • Die Konzentration der VIP-Derivate wurde photometrisch über den Farbstoff ermittelt. In dem Zellassay wurden die Peptide mit einer Endkonzentration von 150 nM eingesetzt. Dabei wurden 1×10^5 RIN38 (VAPC1)-Zellen mit den VIP-Derivaten für eine Stunde bei 37° C in Bindungspuffer (50 mM Tris/HCL, pH 7,5 , 5 nM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 % BSA) inkubiert.
- 25 • Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und 5 min. bei 377 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Cellfix resuspendiert am FACS-Calibur (Becton Dickinson) mit
30 FL4-Optik gemessen.

4. Auswertung

- 35 • Die Fluoreszenzintensitäten der in der Durchflußzytometrie gemessenen nativen, natürlich vorkommenden, hu-

manen VIP-Peptide wurde 100 % gesetzt. Die Standardabweichung von 28 nativen VIP-peptiden betrug 11%. Die weiteren VIP-Derivate wurden diesen 100 % angeglichen.

5

Fig. 7 zeigt relative Fluoreszenzintensitäten von RIN38 VPAC1-Zellen nach Inkubation in Gegenwart von 150 nM der farbstoffmarkierten Peptide für 1 h bei 37 °C. Angaben in Prozent bezogen auf das native Peptid der jeweiligen Reihe.

10

Literatur zur Spotsynthese:

1. Frank, R. (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232
2. Kramer, A., Schneider-Mergener, J. (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods in Molecular Biology* 87, 25-39
3. Volkmer-Engert, R., Hoffmann, B., Schneider-Mergener, J. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 1029-1032
4. Licha, K., Bhargava, S., Rheinländer, C., Becker, A., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R. (in press) Highly parallel Nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett.*

30

Beispiel 44

- a) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl) aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H) indolenin

35

0,9 g (2,6 mmol) 5-Carboxy-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-
Trimethyl(3H)indolenin (Anal. Biochem. 217,197, 1994)
werden in 30 ml absolutem N,N-Dimethylformamid und 3 ml
5 Pyridin vorgelegt und mit 1,35 g (5,3 mmol) Disuccinimi-
dylcarbonat versetzt. Nach drei Stunden addiert man 0,965
g (10,6 mmol) 2,3-Dihydroxypropylamin. Man rührt über
Nacht bei Raumtemperatur, dampft den Ansatz zur Trockne
ein und rührt den Rückstand mit Diethylether aus. Der
10 Feststoff wird abgesaugt und zur Reinigung an RP-Material
chromatographiert.
Ausbeute: 0,82 g (76 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):
15 ber.: C 55,32 H 6,84 N 6,79 S 7,77 O 23,27
gef.: C 55,39 H 6,95 N 6,57 S 7,58

b) 4-[2-[4-Chlor-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-
20 3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-
3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-
(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-
dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

25 Eine Lösung von 360 mg (1 mmol) N-[5-Anilino-3-chlor-2,4-
(propan-1,3-diyl)-2,4-pentadien-1-yliden]anilinium-
chlorid, 825 mg (2 mmol) 5-N-(2,3-
Dihydroxypropyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-
trimethyl(3H)indolenin (Beispiel 44a) und 330 mg (4 mmol)
30 wasserfreies Natriumacetat in 30 ml Ethanol werden für
zwei Stunden unter Argon am Rückfluß gekocht. Anschlie-
ßend destilliert man das Ethanol ab und reinigt den Rück-
stand chromatographisch.
Ausbeute: 0,58 g (59 % d. Th.)

35 Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 56,17 H 6,15 Cl 3,60 N 6,79 S 7,77 O 23,27 Na 2,34
gef.: C 55,99 H 6,30 Cl 3,41 N 6,87 S 7,64 Na 2,17

5

c) 4-[2-[4-(4-(2-Carboxyethyl)phenoxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz, N-Hydroxysuccinimidester

225 mg (1,4 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure werden in 10 ml trockenem N,N-Dimethylformamid unter Schutzgas gelöst und mit 65 mg (2,7 mmol) Natriumhydrid (60%-ig in Öl) versetzt. Nach 30 Minuten addiert man 138 mg (0,14 mmol) 4-[2-[4-Chlor-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz (Beispiel 44b) und rührt für weitere 30 Minuten. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit Trockeneis gequench und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird über eine präparative HPLC gereinigt. Zur Herstellung des Aktivesters löst man 14 mg (120 μ mol) N-Hydroxysuccinimid und 2 mg (2,4 μ mol) der Carbonsäure in 200 μ l N,N-Dimethylformamid. Nach zehn Minuten setzt man 24 mg (120 μ mol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Der Aktivester wird ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

35 Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogon

HSDAVFWDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN an der Festphase synthetisiert. Der Farbstoff 4-[2-[4-(4-(2-Carboxyethyl)-phenyloxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz wird nach Beispiel 14-16 und 18-27 b (Farbstoffkopplung) an das Peptid gekoppelt und nach Beispiel 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat isoliert und gereinigt.

d) 4-[2-[4-(4-(2-Isothiocyanatoethyl)phenyloxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

20

Zu einer Suspension von 28 mg (0,6 mmol) Natriumhydrid (60%-ig in Öl) in 4 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid addiert man bei 0°C 116 mg (0,6 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylisothiocyanat in 2 ml N,N-Dimethylformamid. Nach 30 Minuten wird die so hergestellte Lösung zu 138 mg (0,14 mmol) 4-[2-[4-Chlor-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz (Beispiel 44b) gegeben. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur und quencht anschließend mit Trockeneis. Man dampft am Rotationsverdampfer zur Trockne ein und reinigt den Rückstand per präparativer HPLC.

Ausbeute: 85 mg (54 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 58,65	H 6,09	N 6,22	S 8,54	O 18,47	Na 2,04
gef.:	C 58,53	H 6,17	N 6,11	S 8,63		Na 1,83

5

Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogon HSDAVFTDNY TRLRFQMAVK KYLNSILN an der Festphase synthetisiert. Der Farbstoff 4-[2-[4-(4-(2-Isothiocyanatoethyl)-phenyloxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]-butansulfonat, Natriumsalz wird an das Peptid N-terminal gekoppelt und nach Beispiel 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat isoliert und gereinigt.

In analoger Weise können weitere symmetrische hydrophile Farbstoffe aus folgenden Bausteinen aufgebaut werden:

Hydrophile Indolenin-Derivate mit Hydroxyalkylsubstituenten: (hergestellt nach Beispiel 44a)

25 a) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-N-methylaminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

b) 5-N-(Hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

30

c) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-N-(hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

35 d) 5-N,N-(bis-Hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

e) 5-N-(2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

5 f) 5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-N-methylaminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

Beispiel 45

10

a) 5-N-(2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

15 0,6 g (1,8 mmol) 5-Carboxy-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-Trimethyl(3H)indolenin (Anal. Biochem. 217,197, 1994) werden in 20 ml absolutem N,N-Dimethylformamid und 2 ml Pyridin vorgelegt und mit 0,95 g (3,6 mmol) Disuccinimidylcarbonat versetzt. Nach zwei Stunden addiert man 1,4
20 ml (10 mmol) Triethylamin und 322 mg (1,8 mmol) Glucamin. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur, dampft den Ansatz zur Trockne ein und rührt den Rückstand mit Diethylether aus. Der Feststoff wird abgesaugt und zur Reinigung an RP-Material chromatographiert.

25 Ausbeute: 0,67 g (74 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 52,58 H 6,82 N 5,57 S 6,38 O 28,65

gef.: C 52,47 H 6,91 N 5,39 S 6,44

30

b) 4-[2-[4-Chlor-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-[N-

35

(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl]
(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

Eine Lösung von 180 mg (0,5 mmol) N-[5-Anilino-3-chlor-
5 2,4-(propan-1,3-diyl)-2,4-pentadien-1-yliden]anilinium-
chlorid, 503 mg (1 mmol) 5-N-(2,3,4,5,6-
Pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-
trimethyl(3H)indolenin (Beispiel 45a) und 165 mg (2 mmol)
wasserfreies Natriumacetat in 10 ml Ethanol werden für
10 zwei Stunden unter Argon am Rückfluß gekocht. Anschlie-
ßend destilliert man das Ethanol ab und reinigt den Rück-
stand chromatographisch.

Ausbeute: 0,31 g (53 % d. Th.)

15 Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 54,05	H 6,33	Cl 3,01	N 4,76	S 5,44	O 24,45	Na 1,95
gef.:	C 53,89	H 6,20	Cl 2,87	N 4,83	S 5,29		Na 1,72

20 c) 4-[2-[4-(4-Isothiocyanatothiophenyloxy)-7-[5-N-
(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-3,3-
dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-
(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-
5-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhe-
25 xyl)aminocarbonyl](3H)indolio]butansulfonat, Natrium-
salz

54 mg (0,4 mmol) 4-Aminothiophenol werden in 10 ml abso-
30 lutem N,N-Dimethylformamid unter Argonatmosphäre gelöst
und bei Raumtemperatur mit 165 mg (0,14 mmol) 4-[2-[4-
Chlor-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-
3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-
(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-
35 [N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhe-

xyl)aminocarbonyl] (3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz
 (Beispiel 45b) versetzt. Nach 10 Minuten wird die Reakti-
 onsmischung mit Trockeneis gequencht und 210 mg (1 mmol)
 Thiocarbonyldiimidazol addiert. Nach 45 Minuten wird der
 5 Farbstoff mit Diethylether gefällt und der Feststoff per
 Zentrifugation isoliert. Zur Reinigung kann an RP-
 Material chromatographiert werden.

Ausbeute: 78 mg (43 % d. Th.)

10 Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 55,07	H 6,01	N 5,35	S 9,80	O 22,01	Na 1,76
gef.:	C 54,89	H 6,20	N 5,24	S 9,58		Na 1,54

Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a
 15 (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogen
 HSWAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN an der Festphase syntheti-
 siert. Der Farbstoff 4-[2-[4-(4-Isothiocyanatothio-
 henyloxy)-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-
 aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-
 20 yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-
 dimethyl-5-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhe-
 xyl)aminocarbonyl] (3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz
 wird an das Peptid N-terminal gekoppelt und nach Beispiel
 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung
 25 der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat iso-
 liert und gereinigt.

In analoger Weise können weitere symmetrische hydrophile
 30 Farbstoffe aus folgenden Bausteinen aufgebaut werden:

Hydrophile Indolenin-Derivate mit Hydroxyalkylsubstituen-
 ten: (hergestellt nach Beispiel 44a)

35 a) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-N-methylaminocarbonyl-1-(4-
 sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl (3H)indolenin

- b) 5-N-(Hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-
2,3,3-trimethyl(3H)indolenin
- 5 c) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-N-(hydroxyethyl)-
aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-
trimethyl(3H)indolenin
- 10 d) 5-N,N-(bis-Hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-
sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin
- e) 5-N-(2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl)-aminocarbonyl-1-(4-
sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin
- 15 f) 5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-N-methylaminocarbonyl-
1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

Beispiel 46

20

7-[5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-carboxy(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

25

Eine Lösung von 2,35 g (5,71 mmol) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin (Beispiel 44a) und 1,57 g (5,5 mmol) Glutaconaldehyddianilid-hydrochlorid in 25 ml Essigsäureanhydrid werden 30 Minuten bei 120°C gerührt. Anschließend addiert man 2,4 g (7,1 mmol) 5-Carboxy-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin, 1,71 g Natriumacetat, 22 ml Essigsäureanhydrid und 8,6 ml Essigsäure. Man läßt die Reaktionsmischung eine Stunde bei 120°C rühren, kühlt auf Raumtemperatur ab und fällt das Produkt

30

35

mit Diethylether. Das Rohprodukt wird über RP-Material chromatographiert.

Ausbeute: 1,9 g (40 % d. Th.)

5 Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 54,47	H 6,03	N 5,03	S 7,67	O 21,05	Na 2,75
gef.:	C 54,26	H 6,12	N 5,00	S 7,49		Na 2,48

10 Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogen HSDAVFTDNY TRLRKKMAVK KYLNSILN an der Festphase synthetisiert. Der Farbstoff 7-[5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-1,3,5-heptatrien-1-yl]-
 15 3,3-dimethyl-5-carboxy(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz wird nach Beispiel 14-16 und 18-27 b (Farbstoffkoppelung) N-terminal an das Peptid gekoppelt und nach Beispiel 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat
 20 isoliert und mittels HPLC gereinigt.

In analoger Weise können weitere unsymmetrische hydrophile Farbstoffe aus folgenden Bausteinen aufgebaut werden:

25

Hydrophile Indolenin-Derivate mit Hydroxyalkylsubstituenten: (hergestellt nach Beispiel 44a)

30

a) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-N-methylaminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

b) 5-N-(Hydroxyethyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

c) 5-N- (2,3-Dihydroxypropyl) -N- (hydroxyethyl) -
aminocarbonyl-1- (4-sulfobutyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

5 d) 5-N,N- (bis-Hydroxyethyl) -aminocarbonyl-1- (4-
sulfobutyl) -2,3,3-trimethyl (3H) indolenin

e) 5-N- (2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl) -aminocarbonyl-1- (4-
sulfobutyl) -2,3,3-trimethyl (3H) indolenin

10

f) 5-N- (1,3,4-Trihydroxybut-2-yl) -N-methylaminocarbonyl-
1- (4-sulfobutyl) -2,3,3-trimethyl (3H) indolenin

Indoleninderivate mit Carboxylgruppe:

15

a) 5-Carboxy-1- (4-sulfobutyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

20

b) 5-Carboxymethyl-1- (4-sulfobutyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

c) 5-Carboxy-1- (3-sulfopropyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

25

d) 5-Carboxymethyl-1- (3-sulfopropyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

e) 5-Carboxy-1- (2-sulfoethyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

30

f) 5-Carboxymethyl-1- (2-sulfoethyl) -2,3,3-
trimethyl (3H) indolenin

35

Dianilderivate zur Reaktion mit o. g. Indoleninen unter
Bildung von Mono-, Di- oder Tricarboxyaninen:

- a) Glutaconaldehyddianilid-hydrochlorid
- b) Malonaldehyd-bis-phenylimin-hydrochlorid
- 5 c) N,N-Diphenylformamidin
- d) N- [5-Anilino-2,4- (propan-1,3-diyl) -2,4-pentadien-1-yliden] anilinium-chlorid
- 10 e) N- [5-Anilino-2,4- (ethan-1,2-diyl) -2,4-pentadien-1-yliden] anilinium-chlorid
- f) N- [5-Anilino-3-chlor-2,4- (propan-1,3-diyl) -2,4-pentadien-1-yliden] anilinium-chlorid
- 15 g) N- [5-Anilino-3-chlor-2,4- (ethan-1,2-diyl) -2,4-pentadien-1-yliden] anilinium-chlorid
- 20 **Beispiel 47**
- 7- [5-N- (1,3,4-Trihydroxybut-2-yl) -aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1- (4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden] - 3,5- (2-carboxypropan-1,3-diyl) -1,3,5-heptatrien-1-yl] -3,3-
- 25 dimethyl-5- N- (1,3,4-trihydroxybut-2-yl) -aminocarbonyl (3H) indolio]butansulfonat, Natriumsalz, N-Hydroxysuccinimidester
- 30 a) 4- [2- [4-Chlor-7- [5-N- (1,3,4-trihydroxybut-2-yl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1- (4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden] -3,5- [2- (methoxycarbonyl) propan-1,3-diyl] -1,3,5-heptatrien-1-yl] -3,3-dimethyl-5- [N- (1,3,4-trihydroxybut-2-
- 35 yl) aminocarbonyl] (3H) indolio]butansulfonat, Natriumsalz

Zu einer Lösung von 0,8 g (5 mmol) 4-(Methoxycarbonyl)-cyclohexanon in 5 ml Dichlormethan addiert man 5,5 ml (10 mmol) Phosphoroxychlorid und 6 ml N,N-Dimethylformamid bei 0°C. Anschließend erhitzt man eine Stunde am Rückfluß. Man destilliert das Dichlormethan ab und fügt bei maximal 5°C 4 ml Anilin in 10 ml Methanol hinzu. Man gießt die Reaktionsmischung auf Eis, gibt 5 ml konzentrierte Salzsäure hinzu und läßt das Zwischenprodukt fünf Stunden bei 0°C auskristallisieren. Man saugt die Kristalle ab und setzt diese ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion ein. Dazu löst man die Kristalle in wasserfreiem Ethanol und fügt 4,4 g (10 mmol) 5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-N-methylaminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin (s. Beispiel 45) und 0,8 g wasserfreies Natriumacetat hinzu. Man erhitzt für eine Stunde am Rückfluß, filtriert den Feststoff ab und dampft das Filtrat zur Trockne ein. Der Rückstand wird zur Reinigung chromatographiert.

Ausbeute: 3,25 g (58 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 54,90	H 6,14	Cl 3,18	N 5,02	S 5,75	O 22,94	Na 2,06
gef.:	C 54,76	H 6,03	Cl 2,99	N 4,91	S 5,60		Na 1,83

25

b) 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(2-carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)aminocarbonyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

30

Eine Mischung von 10 mg (0,4 mmol) Natriumhydrid und 80 mg (1,3 mmol) Ethanthiol in 10 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid werden unter Stickstoff 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend versetzt man mit 112

35

mg (0,1 mmol) 4-[2-[4-Chlor-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-[2-(methoxycarbonyl)propan-1,3-diyl]-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)aminocarbonyl] (3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz (Beispiel 47a) in 3 ml N,N-Dimethylformamid. Die Reaktionsmischung wird für zwei Stunden auf 100°C erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit Kohlendioxid gequenchet. Man dampft am Rotationsverdampfer zur Trockne ein und extrahiert den Rückstand mit heißem Ethanol. Man dampft den Extrakt ein und chromatographiert das Rohprodukt.

Ausbeute: 75 mg (67 % d. Th.)

15

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 56,27	H 6,33	N 5,25	S 6,01	O 23,99	Na 2,15
gef.:	C 56,13	H 6,46	N 5,12	S 5,87		Na 1,88

20

c) 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(2-carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl (3H)indolio]butansulfonat-N-Hydroxysuccinimidester, Natriumsalz

25

Zur Herstellung des Aktivesters löst man 14 mg (0,12 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 64 mg (0,06 mmol) der Carbonsäure in 2 ml N,N-Dimethylformamid. Nach 15 Minuten setzt man 25 mg (0,12 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Der Aktivester wird mittels präparativer HPLC gereinigt.

30

Ausbeute: 60 mg (86 % d. Th.)

35

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.:	C 55,71	H 6,06	N 6,02	S 5,51	O 24,73	Na 1,97
gef.:	C 55,59	H 6,21	N 5,93	S 5,37		Na 1,75

Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a
 5 (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogen
 HSDAVFTDNY TRLRKAMAVK KYLNSILN an der Festphase syntheti-
 siert. Der Farbstoff 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-
 aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-
 yliden]-3,5-(2-carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-
 10 1-yl]-3,3-dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)-
 aminocarbonyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz wird
 nach Beispiel 14-16 und 18-27 b (Farbstoffkopplung) an
 das Peptid N-terminal gekoppelt und nach Beispiel 14-16
 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der
 15 Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat isoliert
 und gereinigt.

Beispiel 48

20 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl-3,3-
 dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(2-
 carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-
 dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)-
 25 aminocarbonyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

a) 5-N-(11-Aminoundecyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-
 2,3,3-trimethyl(3H)indolenin

30 340 mg (1 mmol) 5-Carboxy-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-
 trimethyl(3H)indolenin (Anal. Biochem. 217,197, 1994)
 werden in 5 ml absolutem N,N-Dimethylformamid und 1 ml
 Pyridin vorgelegt und mit 0,5 g (2 mmol) Disuccinimi-
 35 dylcarbonat versetzt. Nach drei Stunden addiert man 0,805
 g (4 mmol) 11-Aminoundecansäure. Man rührt über Nacht bei

Raumtemperatur, dampft den Ansatz zur Trockne ein und rührt den Rückstand mit Diethylether aus. Der Feststoff wird abgesaugt und zur Reinigung an RP-Material chromatographiert.

5 Ausbeute: 0,37 g (71 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 62,04 H 8,10 N 5,36 S 6,13 O 18,37

gef.: C 61,88 H 8,23 N 5,17 S 6,02

10

b) 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(2-carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

15

Eine Lösung von 0,35 g (0,67 mmol) 5-N-(11-Aminoundecyl)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)indolenin (Beispiel 48a) und 0,18 g (0,645 mmol) Glutaconaldehyddianil in 3 ml Essigsäureanhydrid werden 20 Minuten bei 110°C gerührt. Anschließend addiert man 344 mg (0,83 mmol) 5-N-(2,3-Dihydroxypropyl)-aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl(3H)-indolenin (Beispiel 44a), 0,2 g Natriumacetat, 3 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml Essigsäure. Man läßt die Reaktionsmischung zwei Stunden bei 110°C rühren, kühlt auf Raumtemperatur ab und fällt das Produkt mit Diethylether. Das Rohprodukt wird über RP-Material chromatographiert.

20

25

30

Ausbeute: 0,41 g (60 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 60,10 H 7,02 N 5,50 S 6,29 O 18,84 Na 2,26

gef.: C 59,96 H 7,14 N 5,33 S 6,15 Na 2,11

35

Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogon HSDAVFTDNY TRLRKQMWVK KYLNSILN an der Festphase synthetisiert. Der Farbstoff 7-[5-N-(1,3,4-Trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl)indolin-2-yliden]-3,5-(2-carboxypropan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-3,3-dimethyl-5-N-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)-aminocarbonyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz wird nach Beispiel 14-16 und 18-27 b (Farbstoffkopplung) an das Peptid N-terminal gekoppelt und nach Beispiel 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat isoliert und gereinigt.

Weitere erfindungsgemäße Farbstoffe können nach Beispiel 44a und b hergestellt werden, in dem man an Stelle von 11-Aminoundecansäure in Beispiel 48a folgende Aminosäuren und die in Beispiel 46 genannten Indoleninderivate mit Hydroxyalkylsubstituenten a)-f) verwendet:

- i. Glycin
- ii. Alanin
- iii. β -Alanin
- iv. 4-Aminobutansäure
- v. 6-Aminohexansäure
- vi. $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ (TH 53, 20, 6977)
- vii. $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{COOH}$ (JOC 63, 5, 1728, 1998)
- viii. $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (Lett. Pept. Sci. 6, 135, 1999)
- ix. $\text{HCl}^* \text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{COOH}$ (MW 3400 g/mol; Shearwater Polymers Inc., USA)

Beispiel 49

4- [2- [4- (4- (N- (4-Aza-6-brom-5-oxohexyl) aminocarbonyl-ethyl) phenyloxy) -7- [5-N- (dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1- (4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden] -3,5- (propan-1,3-diyl) -1,3,5-heptatrien-1-yl] -5-N-
5 (dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl (3H) indolio] butansulfonat, Natriumsalz

a) [3- [N- (tert.-Butoxycarbonyl) amino] propyl] -N'-(bromacetyl) -amid

10

2,5 g (14,4 mmol) [3- [N- (tert.-Butoxycarbonyl) amino] -propyl]amin werden in 15 ml Dioxan gelöst und nach Zugabe von 4,4 ml Triethylamin bei 0°C mit 3,2 g (16 mmol) Bromacetylbromid versetzt. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur und addiert anschließend weitere 320 mg Bromacetylbromid. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt, die Lösung eingeengt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Man wäscht mit Wasser und trocknet die organische Phase über Natriumsulfat.

15

Ausbeute: 3,2 g (75 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 40,69 H 6,49 Br 27,07 N 9,49 O 16,26

25

gef.: C 40,50 H 6,37 Br 26,89 N 9,58

b) [3- [N- (Bromacetyl) amino] propyl]amin, Hydrochlorid

30

3,1 g (10,5 mmol) [3- [N- (tert.-Butoxycarbonyl) amino] propyl] -N'-(bromacetyl) -amid (Beispiel 49a) werden mit 50 mmol 1M Salzsäure in Essigsäureethylester für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man saugt das Produkt ab und wäscht den Feststoff mit Essigsäureethylester nach.

35

Ausbeute: 2,3 g (95 % d. Th.)

Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 25,94 H 5,22 Cl 15,31 Br 34,51 N 12,10 O 6,91
gef.: C 25,76 H 5,41 Cl 15,55 Br 34,34 N 11,97

5

c) 4-[2-[4-(4-(N-(4-Aza-6-brom-5-oxo-hexyl) aminocarbonyl-ethyl) phenoxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz

121 mg (0,1 mmol) 4-[2-[4-(4-(2-Carboxyethyl) phenoxy)-7-[5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz, N-Hydroxysuccinimidester (Beispiel 44c) werden in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst, mit 0,06 ml Triethylamin und 70 mg (0,3 mmol) [3-[N-(Bromacetyl)amino]propyl]amin, Hydrochlorid (Beispiel 49b) versetzt.

Man rührt vier Stunden bei 60°C, kühlt anschließend auf Raumtemperatur ab und fällt das Produkt mit Diethylether. Der Feststoff wird abgesaugt und mit reichlich Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 0,11 mg (80 % d. Th.)

30 Analyse (bezogen auf lösungsmittelfreie Substanz):

ber.: C 56,17 H 6,18 Br 6,13 N 6,44 S 4,92 Na 1,76 O 18,40
gef.: C 55,96 H 6,26 Br 6,01 N 6,27 S 4,81 Na 1,53

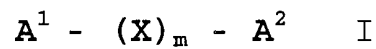
Analog zur Synthese nach Beispiel 14-16 und 18-27 a (Festphasenpeptidsynthese) wird das VIP-Analogon HSDAVFTDNY TRLRKQCAVK KYLNSLLN an der Festphase syntheti-

35

siert. Das Farbstoffbromid 4-[2-[4-(4-(N-(4-Aza-6-brom-5-oxo-hexyl) aminocarbonylethyl) phenyloxy) -7-[5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl-1-(4-sulfonatobutyl) indolin-2-yliden]-3,5-(propan-1,3-diyl)-1,3,5-heptatrien-1-yl]-5-N-(dihydroxypropyl) aminocarbonyl-3,3-dimethyl(3H)indolio]butansulfonat, Natriumsalz wird nach Beispiel 17 an das Peptid N-terminal gekoppelt und nach Beispiel 14-16 und 18-27 c (Schutzgruppenabspaltung und Ablösung der Farbstoff-Peptid-Konjugate) wird dieses Konjugat isoliert und gereinigt.

Patentansprüche

1. Peptid-Polymethinfarbstoff-Konjugate der allgemeinen
5 Formel (I)



worin

10

X für eine α , β oder γ -Aminosäure mit D oder L-Konfiguration und

m für eine Zahl von 5 bis 30 steht,
15 wobei die resultierende Aminosäuresequenz $(X)_m$ geradkettiger Natur oder über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen oder Homocysteinen oder amidisch zwischen N- und C-Terminus cyclisiert sein kann und für die Aminosäuresequenz des vasoaktiven
20 intestinalen Peptids (VIP), des Somatostatins oder des Neurotensins, oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des VIP, des Somatostatins oder des Neurotensins steht,

25 A^1 für ein Wasserstoffatom, einen Acetylrest oder einen Alkylrest mit bis zu 10 C-Atomen, der gegebenenfalls mit 1 bis 3 Carboxygruppen und/oder 1 bis 6 Hydroxygruppen substituiert sein kann, oder einen Poly(oxyethylen)rest mit 2 bis 30 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Einheiten
30 oder ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, steht

35 A^2 für eine Hydroxygruppe, eine Aminogruppe oder ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarb-

stoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, steht

5 unter der Bedingung, daß mindestens einer der Reste A^1 oder A^2 ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, darstellt,

10 wobei für den Fall, daß A^1 und/oder A^2 ein Farbstoffmolekül aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 bis 1200 nm aufweist, darstellen, A^1 an die N-terminale Aminogruppe und A^2 an eine Aminogruppe der Aminosäure Lysin oder an eine Hydroxygruppe der Aminosäure Serin in beliebiger Position
15 innerhalb der Aminosäuresequenz $(X)_m$ geknüpft ist,

und deren physiologisch verträgliche Salze.

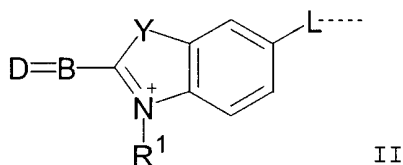
20

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht.

25

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Cyanin- bzw. Squariliumfarbstoff der allgemeinen Formeln II

30

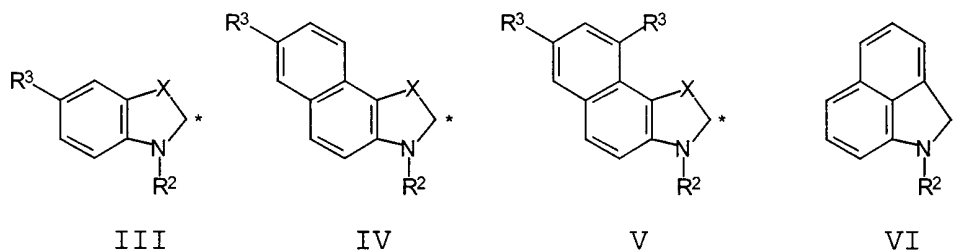


worin

D für ein Fragment entsprechend den allgemeinen For-

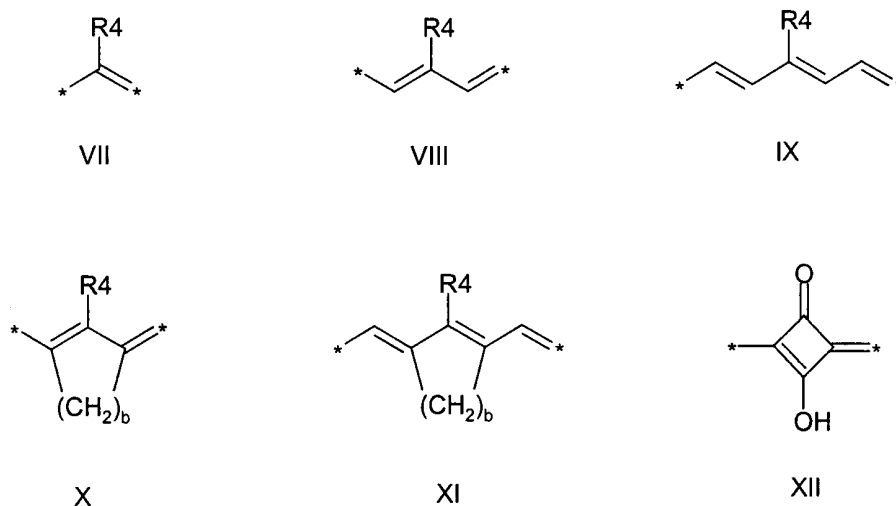
meln III bis VI, wobei die mit einem Stern gekennzeichnete Position die Verknüpfung mit B bedeutet, steht,

5



B für ein Fragment entsprechend den allgemeinen Formeln VII bis XII

10



15

R¹ und R² für E¹, R³ für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹, -E¹,

20

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegebenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-

C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, stehen,

5 R⁴ für ein Wasserstoffatom, ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine verzweigte oder geradkettige C₁-C₁₀-Alkylkette, steht,

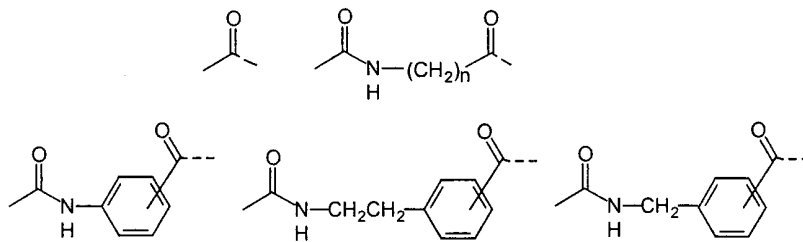
b eine Zahl 2 oder 3 bedeutet,

10

X und Y unabhängig voneinander O, S, Se, -CH=CH- oder C(CH₃)₂ bedeuten,

15

L für eine Gruppe entsprechend nachstehender Formeln



worin

n eine Zahl von 1 bis 10 bedeutet,

20

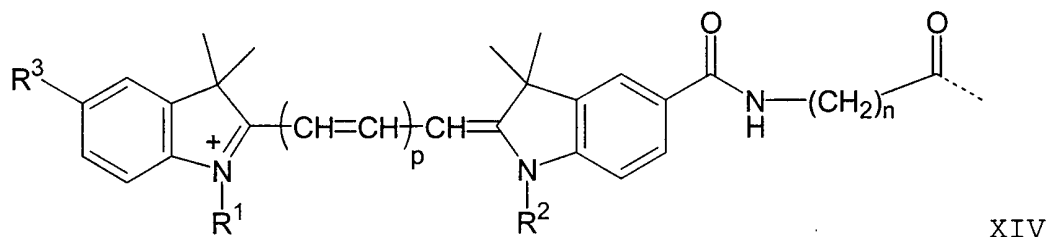
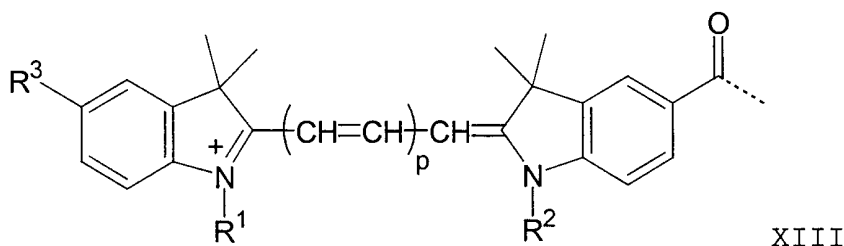
steht.

4. Verbindungen nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A¹ und/oder A² für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen Indotricarbocyaninfarbstoff steht.

25

5. Verbindungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A¹ und/oder A² für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XIII oder XIV

30



5

worin

p für 1, 2 oder 3,

n für 1, 2, 3, 4 oder 10 steht,

R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-

10 Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl-, 2-Sulfoethyl-, 3-Methyl-
3-sulfopropyl-, Methyl-, Ethyl- oder Propylrest stehen, und

R³ für Wasserstoff, ein Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COE¹, -

15 CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -
SO₃E¹, -SO₂NHE¹,

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Was-

serstoffatom oder für einen Methyl-, Ethyl- oder einen C₃-C₆-Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen

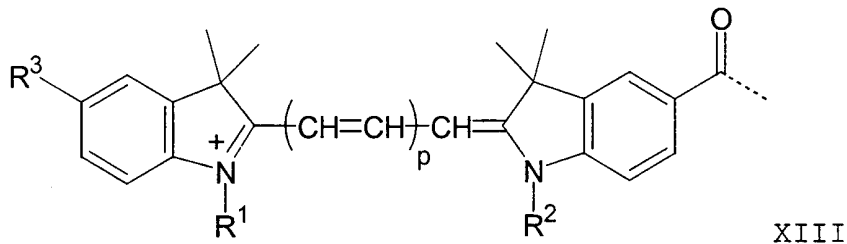
20 und/oder von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, oder für einen Poly(oxyethylen)glykolrest mit 2 bis 30 -CH₂CH₂O-Einheiten stehen,

steht.

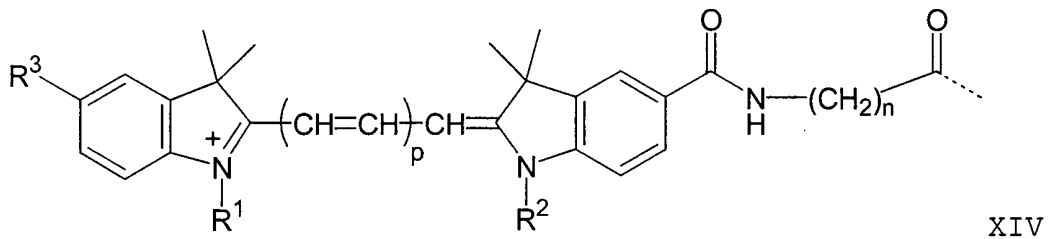
25

6. Verbindungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A¹ und/oder A² für einen Indocarbocyanin-, einen Indodicarbocyanin- oder einen

Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XIII oder XIV



5



worin

p für 1, 2 oder 3,

n für 1, 2 oder 4,

10 R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl- oder 3-Sulfopropylrest,

R^3 für Wasserstoff oder für einen Rest $-\text{COE}^1$ oder $-\text{CONHE}^1$,

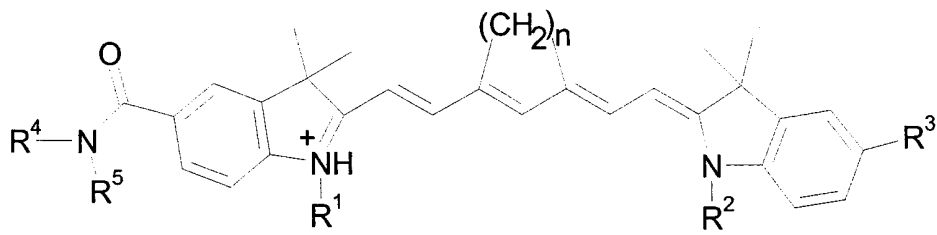
15 wobei E^1 ein Wasserstoffatom oder ein Methyl-, Ethyl- oder ein C_3 - C_6 -Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, bedeutet,

steht.

20

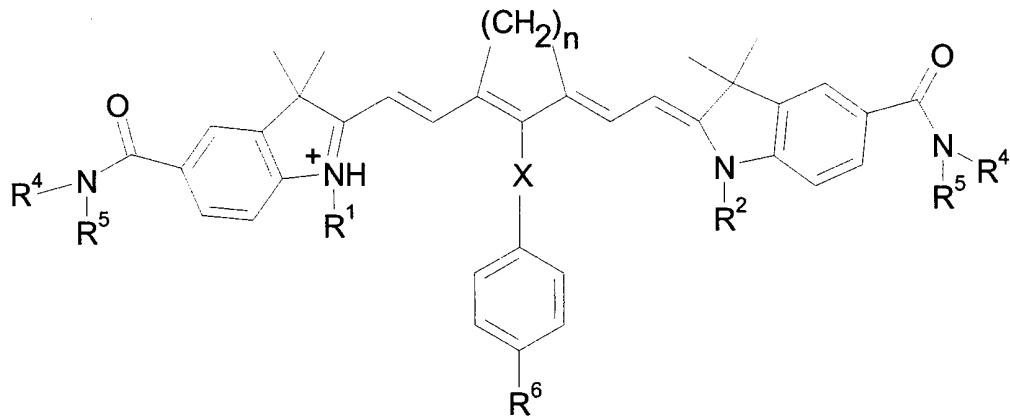
7. Verbindungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XV oder XVI steht:

25



XV

5



XVI

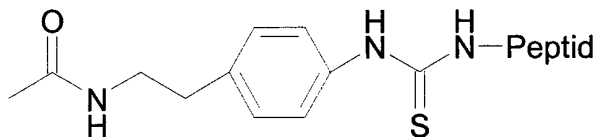
worin

10 n für 2 oder 3 steht,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,

R^3 für einen Rest -CONH-Peptid, -CONH-(CH₂)_m-CONH-Peptid, -CONH-(CH₂)_n-NH-CS-NH-Peptid oder -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-

15 Peptid mit $m = 1$ bis 10 und $n = 2$ oder 3 steht, oder eine folgende Gruppe darstellt:



R^4 und R^5 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest stehen,

5 R^6 für eine der folgenden Gruppen steht:

- $(CH_2)_m$ -CONH-Peptid mit $m = 0$ bis 2,

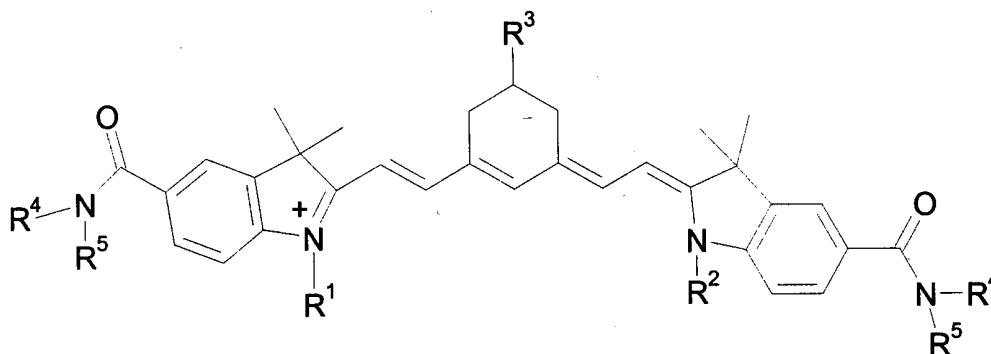
- $(CH_2)_m$ -NH-CS-NH-Peptid mit $m = 0$ bis 2,

und X für ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom steht.

10

8. Verbindungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffmolekül A^1 und/oder A^2 für einen Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel XVII steht:

15



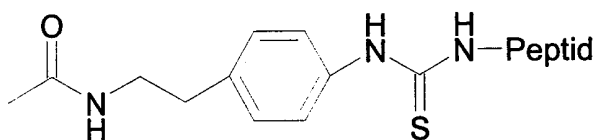
XVIII

worin

20 R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,

R^3 für einen Rest -CONH-Peptid, -NH-CS-NH-Peptid oder -CONH- $(CH_2)_n$ -NHCO- CH_2 -Peptid mit $n = 2$ oder 3 steht oder eine folgende Gruppe darstellt:

25



und R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest stehen.

5

9. Verbindungen gemäß Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydroxylierten Alkylreste für 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl stehen.

10

10. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß (X)_m für die Aminosäuresequenz des nativen vasoaktiven intestinalen Peptides entsprechend

15

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides, bestehend aus 5 bis 30 Aminosäuren, steht.

20

11. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß (X)_m für die Aminosäuresequenz des Somatostatins entsprechend

25

AGCKNFFWKTFTSC

oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Somatostatins, bestehend aus 5 bis 20 Aminosäuren, steht.

30

12. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß (X)_m für die Aminosäuresequenz des Neurotensins entsprechend

Pyroglutaminsäure-LYENKPRRPYIL

oder für Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Neurotensins, bestehend aus 5 bis 20 Aminosäuren,
steht.

5

13. Verbindungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides folgenden Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:

10

RLRKQMAVKKYLNSILN	RLRKQMAVKKYLNSIL	RLRKQMAVKKYLNSI
LRKQMAVKKYLNSILN	LRKQMAVKKYLNSIL	LRKQMAVKKYLNSI
RKQMAVKKYLNSILN	RKQMAVKKYLNSIL	RKQMAVKKYLNSI
KQMAVKKYLNSILN	KQMAVKKYLNSIL	KQMAVKKYLNSI
QMAVKKYLNSILN	QMAVKKYLNSIL	QMAVKKYLNSI
MAVKKYLNSILN	MAVKKYLNSIL	MAVKKYLNSI
AVKKYLNSILN	AVKKYLNSIL	AVKKYLNSI

15

RLRKQMAVKKYLNS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
LRKQMAVKKYLNS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
RKQMAVKKYLNS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
KQMAVKKYLNS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
QMAVKKYLNS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
MAVKKYLNS	MAVKKYLN	MAVKKYL
AVKKYLNS	AVKKYLN	AVKKYL

20

25

14. Verbindungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Analoga des VIP Peptide aus der folgenden Gruppe von Sequenzen ausgewählt sind:

30

FSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
ISDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
LSDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HFDAVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN
HHDVFTDNY	TRLRKQMAVK	KYLNSILN

35

HIDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HLDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HMDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HQDVAFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
5 HTDVAFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HVDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HWDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HYDVAFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSAVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
10 HSEVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSFVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSHVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSIVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSLVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
15 HSMVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSWVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDGVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDMVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
20 HSDQVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDSVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDWVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDYVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
25 HSDAIVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDALFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAMFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDATFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
30 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN
35 HSDAVFTDNY TRRRKQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRWRKQMAVK KYLNSILN

HSDAVFTDNY TRLRFQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRLQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRMQMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRRQMAVK KYLNSILN
5 HSDAVFTDNY TRLRKAMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKFMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKIMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKKMAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKLMVAVK KYLNSILN
10 HSDAVFTDNY TRLRKMMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKRMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKVMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKWMVAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKYMVAVK KYLNSILN
15 HSDAVFTDNY TRLRKQFAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQIAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQKAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQLAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQQAVK KYLNSILN
20 HSDAVFTDNY TRLRKQRAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQWAVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMFVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMIVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMKVK KYLNSILN
25 HSDAVFTDNY TRLRKQMLVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMMVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMQVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMRVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMVVK KYLNSILN
30 HSDAVFTDNY TRLRKQMWVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMYVK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAAK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAIK KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMALK KYLNSILN
35 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVR KYLNSILN
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK RYLNSILN

HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK WYLSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KFLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KWLNSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLASILN
 5 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLFSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLISILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLMSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLVSILN
 10 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLWSILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNNILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNRILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLWILN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNYILN
 15 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSLLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN
 20 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIFN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIIN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIWN
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILW

15. Verbindungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeich-
 25 net, daß als Analogon des VIP eine Verbindung gemäß
 folgender Formel ausgewählt ist:

$$\text{HSDAVFTX}^1\text{X}^2\text{Y X}^3\text{RLRKQMAVK KYLNSILN},$$
 worin X^1 , X^2 und X^3 jede beliebige Aminosäure darstel-
 len können.

30

16. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden
 35 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß 2 bis m Ami-
 nosäuren unabhängig voneinander gegen ihre jeweilige

D-Aminosäure oder gegen andere L- oder D-Aminosäuren ausgetauscht sein können, wobei m die oben angegebene Bedeutung hat.

- 5 17. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Aminosäuren $(X)_m$ unabhängig voneinander gegen andere, nicht natürliche Aminosäuren oder Aminosäurederivate ausgetauscht sein kann.
- 10 18. Verbindungen nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß als nicht natürliche Aminosäuren oder Aminosäurederivate eine der folgenden Verbindungen ausgewählt ist: Naphthalanin, Cyclohexylalanin, Norleucin, Norvalin, α -Aminoadipinsäure, α -Aminobuttersäure, β -Alanin, β -Cyclohexylalanin, Ornithin, Sarcosin oder δ -Hydroxylysin.
- 15 19. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Analogon des VIP eine Verbindung gemäß folgender Formel ausgewählt ist:
- 20 $X^1SDAVX^2TDNX^3$ TRLRKQMAVK $KX^4LNSILN$,
worin X^1 , X^2 , X^3 und X^4 nicht natürliche Aminosäuren
25 oder Aminosäurederivate darstellen.
20. Verbindungen nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht natürlichen Aminosäuren oder Aminosäurederivate aus folgender Gruppe ausgewählt sind:
- 30 Naphthalanin, Cyclohexylalanin, Norleucin, Norvalin, α -Aminoadipinsäure, α -Aminobuttersäure, β -Alanin, β -Cyclohexylalanin, Ornithin, Sarcosin oder δ -Hydroxylysin.
- 35 21. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche Ami-

nosäuren (X)_m gegen ihre jeweilige D-Aminosäure ausgetauscht sind.

22. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides retrosynthetische Aminosäuresequenzen ausgewählt sind.

23. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides retrosynthetische Aminosäuresequenzen, bei denen 2 bis m Aminosäuren gegen die jeweilige D-Aminosäure ausgetauscht sind, ausgewählt sind, wobei m die oben angegebene Bedeutung hat.

24. Verbindungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des vasoaktiven intestinalen Peptides folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:

	rlrkqmavkkylnsiln	rlrkqmavkkylnsil	rlrkqmavkkylnsi
	lrkqmavkkylnsiln	lrkqmavkkylnsil	lrkqmavkkylnsi
25	rkqmavkkylnsiln	rkqmavkkylnsil	rkqmavkkylnsi
	kqmavkkylnsiln	kqmavkkylnsil	kqmavkkylnsi
	qmavkkylnsiln	qmavkkylnsil	qmavkkylnsi
	mavkkylnsiln	mavkkylnsil	mavkkylnsi
	avkkylnsiln	avkkylnsil	avkkylnsi

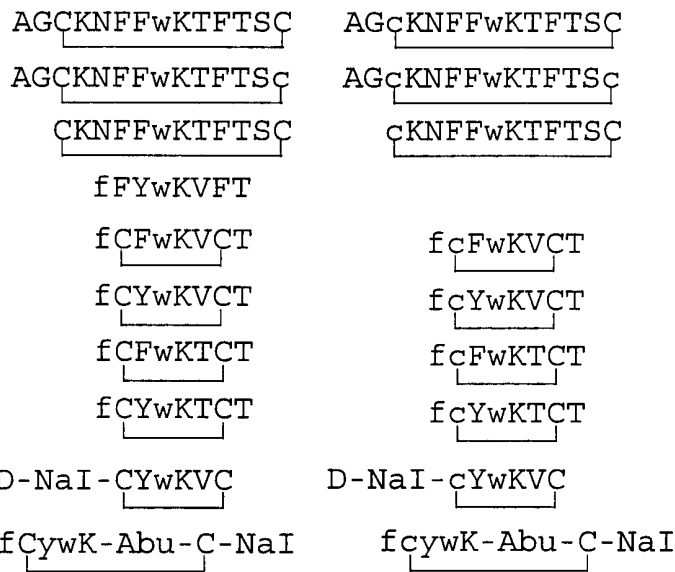
30	RLRKQMAvKKyLNSILN	RLRKQMAvKKyLNSIL	RLRKQMAvKKyLNSI
	LRKQMAvKKyLNSILN	LRKQMAvKKyLNSIL	LRKQMAvKKyLNSI
	RKQMAvKKyLNSILN	RKQMAvKKyLNSIL	RKQMAvKKyLNSI
	KQMAvKKyLNSILN	KQMAvKKyLNSIL	KQMAvKKyLNSI
35	QMAvKKyLNSILN	QMAvKKyLNSIL	QMAvKKyLNSI
	MAvKKyLNSILN	MAvKKyLNSIL	MAvKKyLNSI

AvKKyLNSILN

AvKKyLNSIL

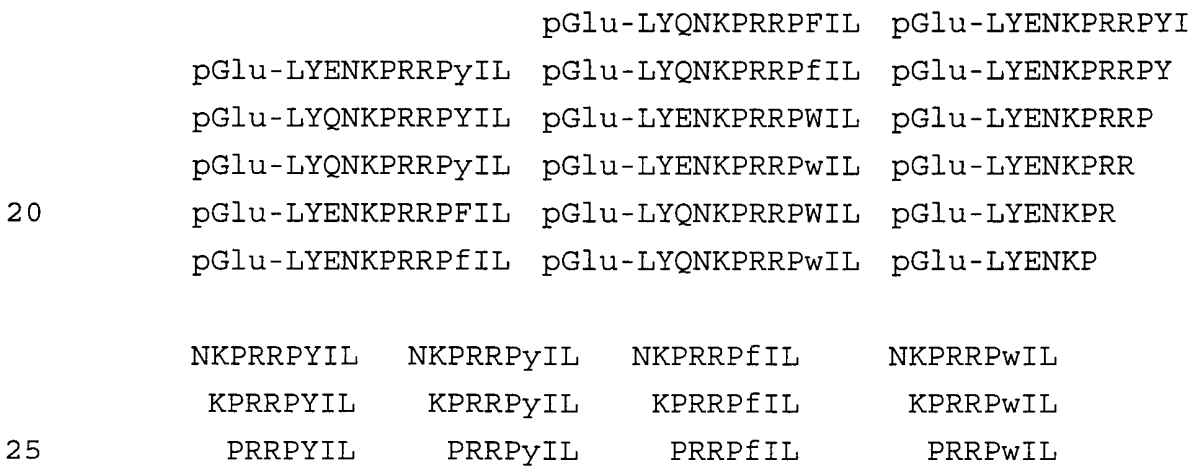
AvKKyLNSI

25. Verbindungen nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Somatostatins folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:



10

26. Verbindungen nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Fragmente, Teilsequenzen, Derivate oder Analoga des Neurotensins folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt sind:



25

RRPYIL

RRPyIL

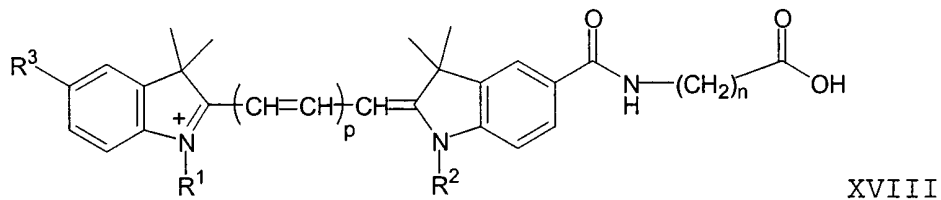
RRPfIL

RRPwIL

27. Verwendung der Verbindungen nach mindestens einem der
5 vorangehenden Ansprüche zur In-vivo-Diagnostik von Tumoren, anderen erkrankten Gewebebereichen oder Adenomen mittels optischer Detektionsverfahren, oder zur In-vivo-Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren, Tumorzellen und/oder entzündlichen Geweben mittels endoskopischer Verfahren im Gastrointestinaltrakt, Oesophagus,
10 Bronchialtrakt, der Blase oder der Zervix, oder zur In-vivo-Fluoreszenzdiagnostik und/oder Absorptionsdiagnostik von Brusttumoren mittels der optischen Mammographie (Transillumination oder optische Tomographie der Brust).
15
28. Verfahren zur endoskopischen In-vivo-Fluoreszenzdiagnostik unter Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
20 dem Patienten die Verbindungen intravenös appliziert werden oder topisch durch Versprühen im Gastrointestinaltrakt, Oesophagus, der Blase, oder durch Inhalation den Bronchien zugeführt wird, im Falle des Versprühens der nicht gebundene, überschüssige Anteil der Verbindung durch Waschen entfernt wird,
25 die endoskopische Untersuchung durch örtliche Anregung mit einer aus dem Spektralbereich von 380 bis 1200 nm ausgewählten Anregungswellenlänge und durch
30 ortsabhängige Detektion der spezifischen, vom Farbstoff emittierten Fluoreszenzstrahlung durchgeführt wird.
- 35 29. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche, dadurch gekennzeichnet, daß

es mindestens eine Verbindung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.

5 30. Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XVIII,



worin

10 p für 1, 2 oder 3,

n für 1, 2, 3, 4 oder 10 steht,

R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl-, 2-Sulfoethyl-, 3-Methyl-3-sulfopropyl-, Methyl-, Ethyl- oder Propylrest stehen, und

15

R³ für Wasserstoff oder für einen Rest -COE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,

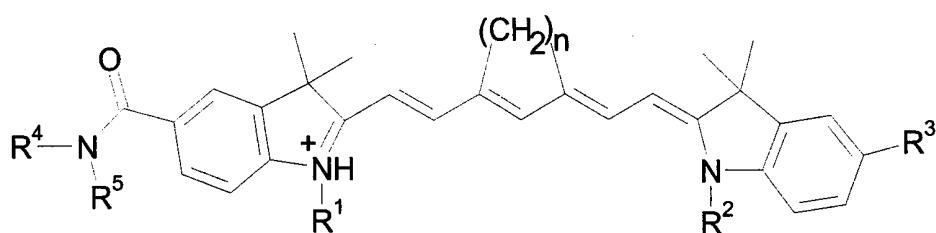
20

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder für einen Methyl-, Ethyl- oder einen C₃-C₆-Alkylrest, der von 0 bis 2 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 1 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist, stehen,

25

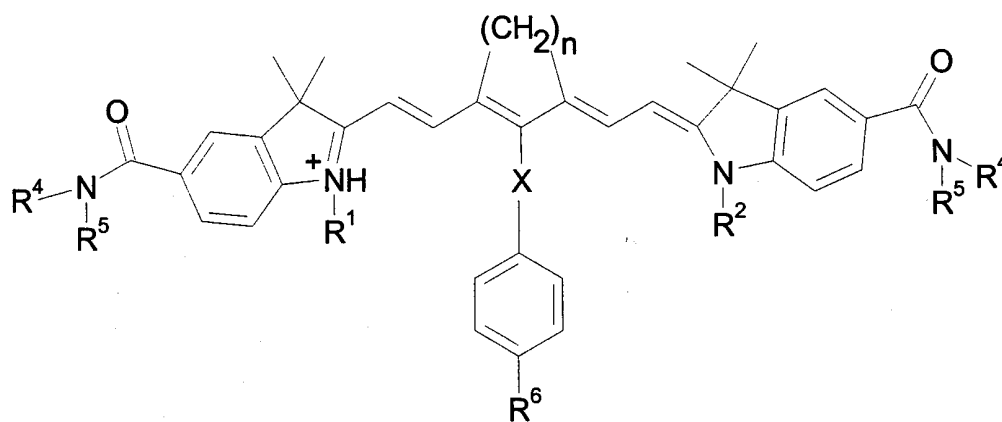
steht.

31. Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XIX oder XX



XIX

5



XX

worin

10 n für 2 oder 3 steht,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander einen 4-Sulfobutyl-, 3-Sulfopropyl- oder 2-Sulfoethylrest darstellen,

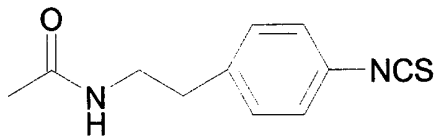
R^3 für eine $-COOH$ -Gruppe oder einen der folgenden Reste steht:

15

-CONH- $(CH_2)_n$ -COOH mit $n = 2$ oder 3 ,

-CONH- $(CH_2)_n$ -NCS mit $n = 2$ oder 3 ,

-CONH- $(CH_2)_n$ -NHCO- CH_2 - X^1 mit $n = 2$ oder 3 und $X^1 = Cl, Br, I$



R^4 und R^5 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom,
 einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest wie
 5 z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-
 Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-
 Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-
 Pentahydroxyhexyl stehen,

10 R^6 für eine der folgenden Gruppen steht:

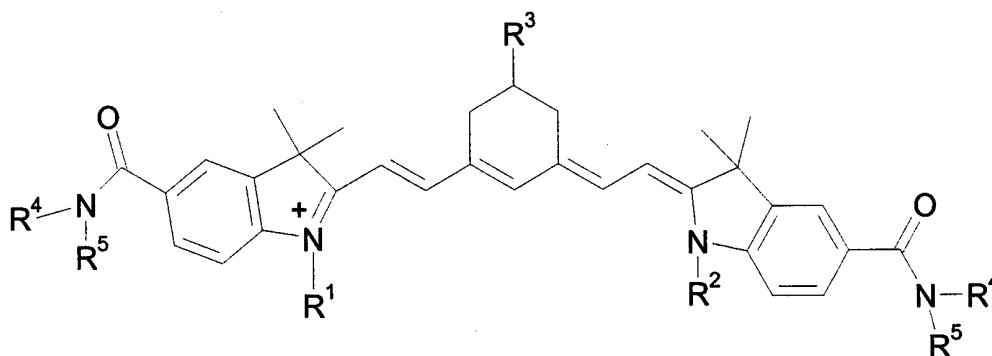
- $(CH_2)_m$ -COOH mit $m = 0$ bis 2,
- $(CH_2)_m$ -NCS mit $m = 0$ bis 2,
- $(CH_2)_m$ -CONH-Peptid mit $m = 0$ bis 2,
- $(CH_2)_m$ -NH-CS-NH-Peptid mit $m = 0$ bis 2,

15

und X für ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom steht.

32. Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel XXI

20



XXI

25

worin

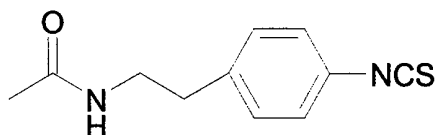
R¹ und R² unabhängig voneinander für einen 4-Sulfobutyl-
oder 3-Sulfopropylrest darstellen,

5 R³ für eine -COOH-Gruppe oder einen der folgenden Reste
steht:

-CONH-(CH₂)_n-COOH mit n = 2 oder 3,

-CONH-(CH₂)_n-NCS mit n = 2 oder 3,

10 -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-X¹ mit n = 2 oder 3 und X¹ = Cl, Br, I



15 und R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffat-
tom, einen Methylrest oder einen hydroxylierten Alkylrest
wie z.B. 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2,3-
Dihydroxypropyl, 1,3-Dihydroxy-2-propyl, 2,3,4-
Trihydroxybutyl, 1,3,4-Trihydroxy-2-butyl, 2,3,4,5,6-
20 Pentahydroxyhexyl stehen.

33. Analoga des VIP, gekennzeichnet durch die folgenden
Sequenzen:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
25 Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
30 (SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 3)

5 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 4)

10 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 5)

15 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 6)

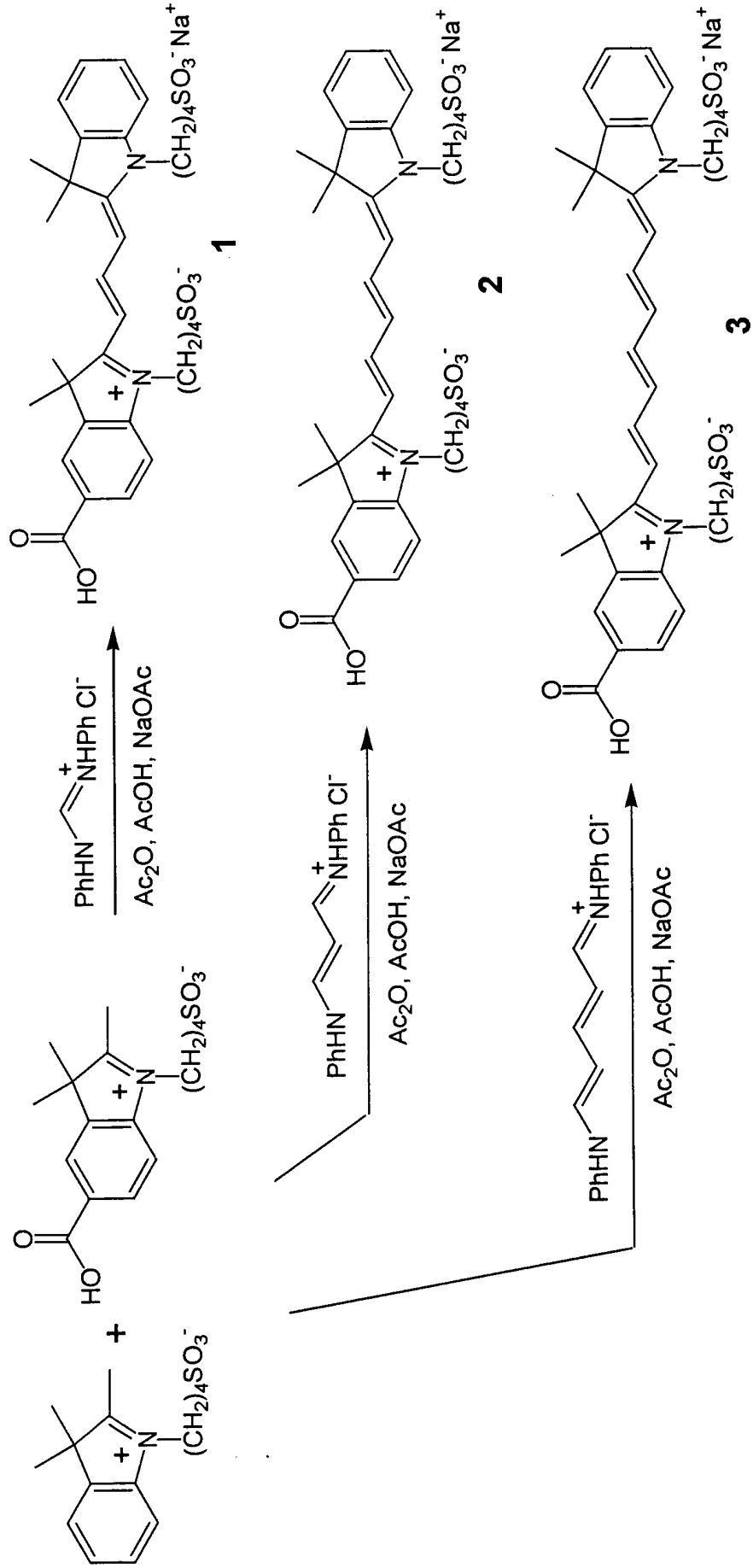
20 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 7)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(SEQ ID NO: 8).

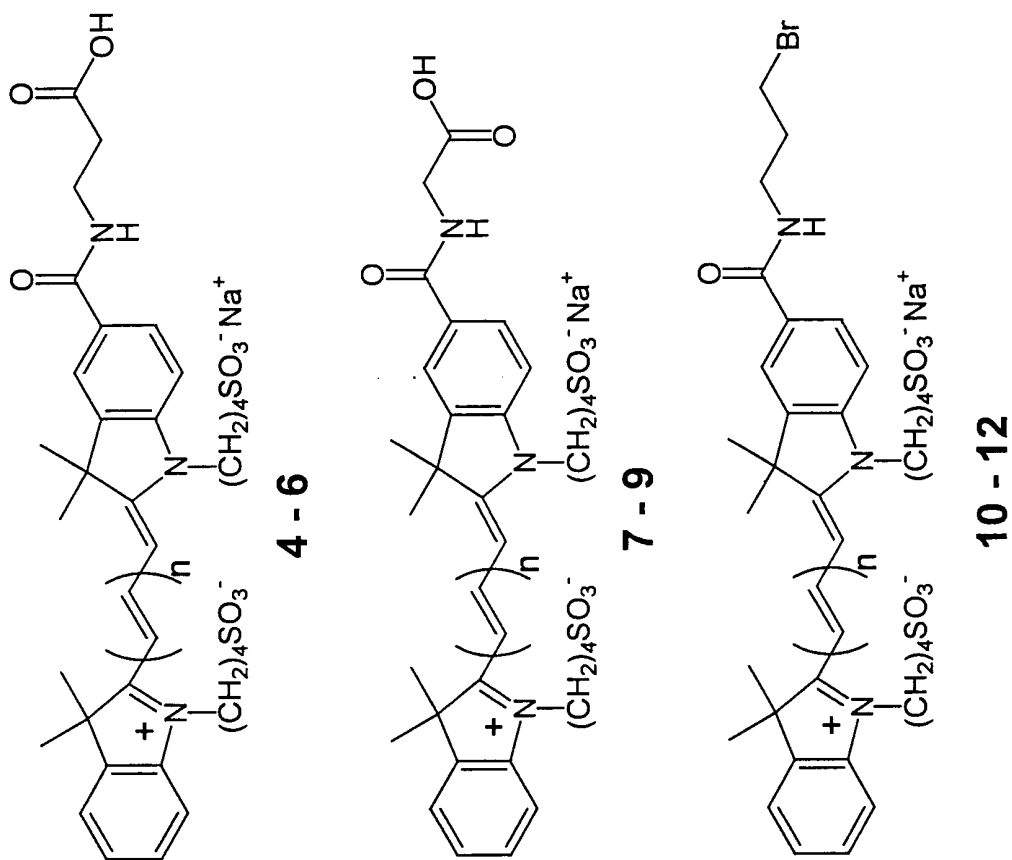
25

30

Figur 1



Figur 2



1 - 3

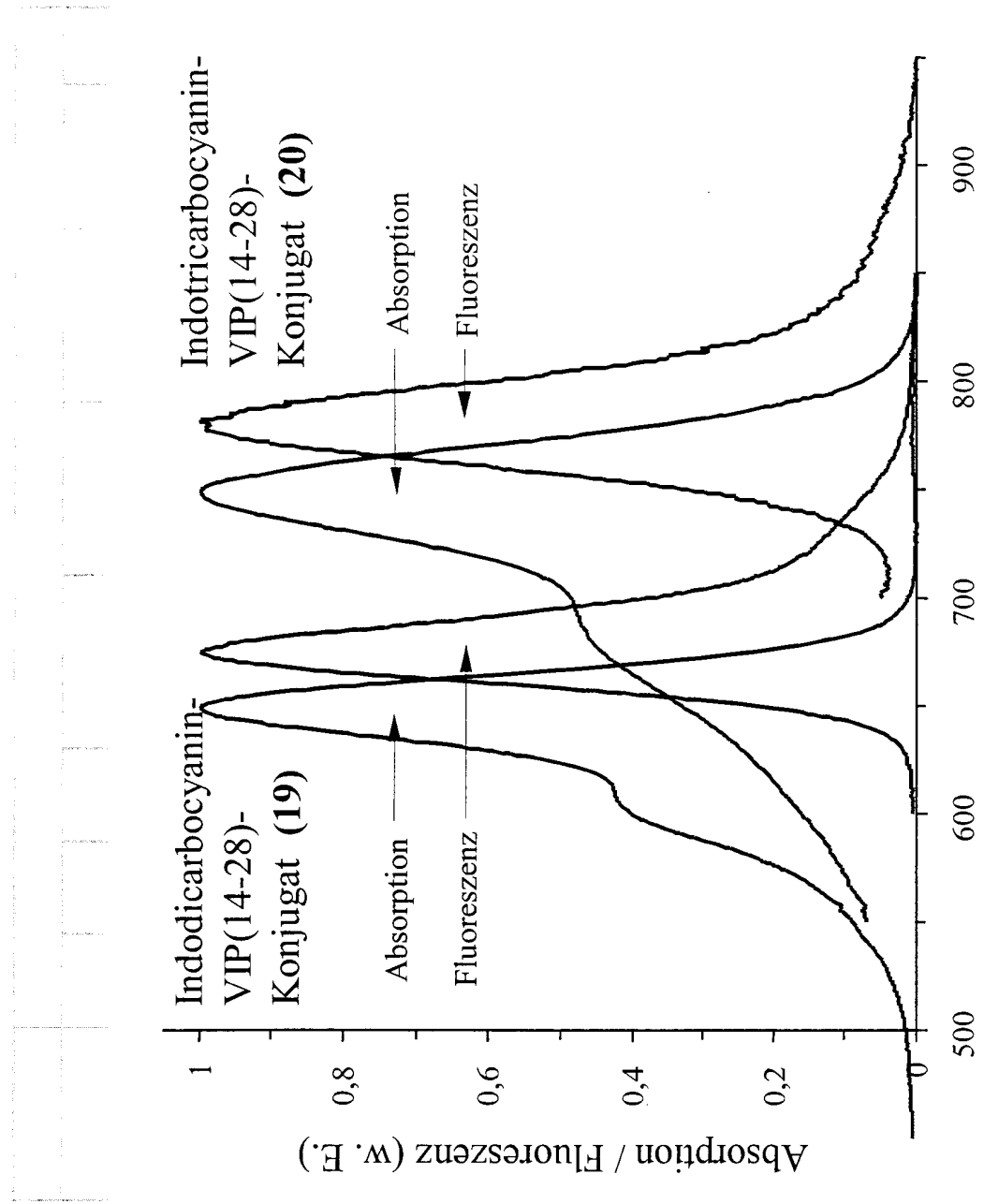
n = 1: **1, 4, 7, 10**
 n = 2: **2, 5, 8, 11**
 n = 3: **3, 6, 9, 12**

Fig. 4

Photophysikalische Eigenschaften der
Farbstoff-Peptidkonjugate 14-38

Lösungsmittel: PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)

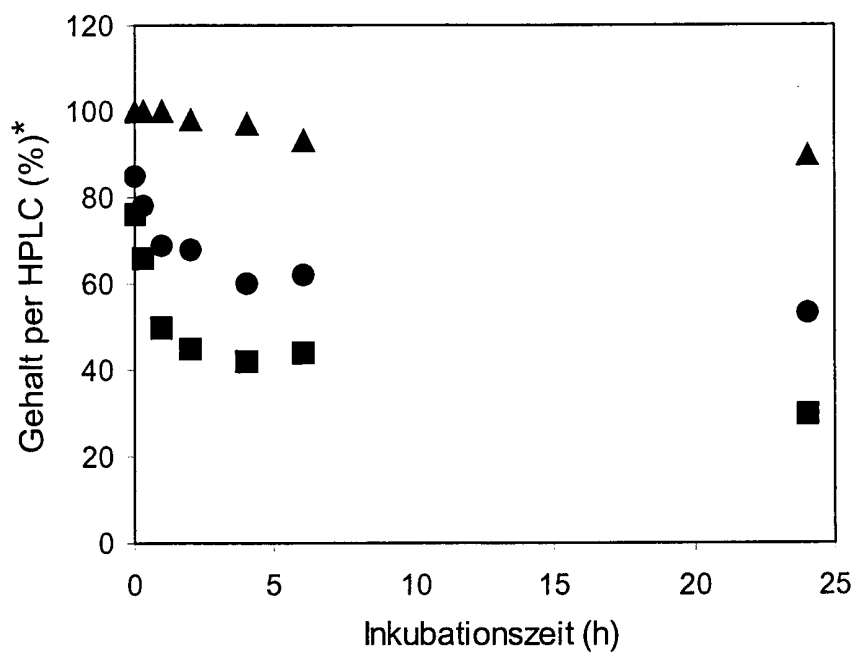
Verbindung #	Absorptionsmax. $\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	Fluoreszenzmax. $\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	Extinktionskoeff. ϵ ($\ell \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
14	556	582	98 000
15	649	675	105 000
16	746	781	125 000
17	749	783	115 000
18	556	580	108 000
19	649	677	110 000
20	746	781	135 000
21	552	580	n. b.
22	648	676	111 000
23	746	781	n. b.
24	746	783	n. b.
25	747	784	121 000
26	748	784	156 000
27	748	784	159 000
28	552	579	102 000
29	648	676	111 000
30	746	781	128 000
31	746	781	n. b.
32	748	782	169 000
33	552	579	101 000
34	648	677	121 000
35	746	780	130 000
36	747	781	109 000
37	554	578	99 000
38	648	676	121 000



Figur 5

Fig. 6

Stabilität von Farbstoffkonjugaten mit VIP-Rezeptorbindenden Peptiden in Rinderplasma



▲ Indotricarbocyanin-D-VIP(14-24)-Konjugat (Beispiel 25)

● Indotricarbocyanin-VIP(14-28)-Konjugat (Beispiel 20)

■ Indotricarbocyanin-VIP(1-28)-Konjugat (Beispiel 16)

* bei 750 nm, bezogen auf Kontrollwert (1 min 0°C)

Fig. 7

	1A	2C	3D	4E	5F	6G	7H	8I	9K	10L	11M	12N	13P	14Q	15R	16S	17T	18V	19W	20Y
1H	46	143	43	33	103	72	100	126	52	156	77	69	45	38	85	65	77	33	25	6
2S	91	93	32	58	167	75	96	184	50	95	131	50	66	235	60	100	152	121	235	121
3D	111	132	100	110	110	75	103	105	66	101	96	69	66	57	84	39	67	89	149	86
4A	100	97	31	33	135	120	62	95	59	75	111	66	36	110	70	130	63	79	172	140
5V	66	81	33	43	100	84	70	107	66	113	105	52	41	70	82	59	114	100	144	95
6F	21	7	18	16	100	22	26	78	105	78	51	4	4	20	28	20	12	9	65	61
7T	53	86	28	29	58	41	73	61	41	69	72	89	36	69	57	70	100	111	94	71
8D	134	178	100	104	231	153	199	223	240	225	208	190	70	250	407	177	219	220	251	184
9N	84	174	45	71	151	125	104	114	102	115	145	100	57	117	153	114	102	89	135	117
10Y	39	81	15	17	88	18	26	40	45	90	63	28	20	27	39	35	26	49	132	100
11T	116	240	33	46	178	106	87	211	216	169	111	146	31	128	246	108	100	112	122	137
12R	49	91	19	25	66	25	42	30	85	60	57	38	15	43	100	38	42	43	80	57
13L	80	113	13	17	86	21	69	84	79	105	80	35	14	49	92	55	45	66	123	87
14R	40	113	9	25	63	26	28	70	87	89	64	23	15	43	100	24	26	49	71	39
15K	70	192	17	33	108	37	57	87	100	104	92	52	15	70	138	49	55	78	81	90
16Q	100	154	19	44	94	39	43	108	106	115	108	69	21	100	150	70	84	120	174	107
17M	78	129	31	54	106	45	73	118	91	111	100	90	18	141	118	70	56	72	126	87
18A	100	137	21	42	133	42	73	92	159	115	122	82	25	104	172	78	60	99	137	95
19V	110	149	12	15	80	26	22	105	28	104	65	19	18	26	49	23	29	100	91	66
20K	69	132	12	29	83	31	42	69	100	78	65	27	12	44	121	35	27	50	88	72
21K	61	104	29	46	70	22	46	31	100	65	66	39	11	65	94	49	46	66	117	97
22Y	19	83	8	10	97	15	21	49	24	33	35	14	14	18	42	17	18	62	115	100
23L	17	43	10	13	42	14	17	70	22	100	29	15	18	20	26	13	14	31	57	28
24N	111	160	35	54	95	26	59	125	76	79	136	100	28	85	80	95	70	141	191	65
25S	75	134	40	37	85	54	61	80	89	63	83	92	24	67	116	100	68	39	145	108
26I	25	46	9	12	70	13	21	100	47	119	58	15	9	24	65	112	40	85	115	122
27L	65	63	23	18	124	76	34	109	36	100	60	34	19	31	31	56	47	71	93	80
28N	69	104	45	59	88	81	55	53	70	72	82	100	17	69	62	60	60	64	108	32
	1A	2C	3D	4E	5F	6G	7H	8I	9K	10L	11M	12N	13P	14Q	15R	16S	17T	18V	19W	20Y

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH
AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
- (B) STREET: Spandauer Damm 130
- (C) CITY: Berlin
- (E) COUNTRY: Germany
- (F) POSTAL CODE (ZIP): D-14050
- (G) TELEPHONE: (030)-30390412
- (H) TELEFAX: (030)-30390499

(ii) TITLE OF INVENTION: Kurzkettige Peptid-Farbstoffkonjugate als Kontrastmittel für die optische Diagnostik

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 8

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER:

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER:
- (B) FILING DATE:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 28 amino acids
- (B) TYPE: peptide
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 28 amino acids
 - (B) TYPE: peptide
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 28 amino acids
 - (B) TYPE: peptide
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 28 amino acids
 - (B) TYPE: peptide
 - (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 amino acids

(B) TYPE: peptide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 amino acids

(B) TYPE: peptide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-

Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(8) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 amino acids

(B) TYPE: peptide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(9) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 amino acids

(B) TYPE: peptide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY:

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE: synthetic

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn