

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 712**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

C07D 493/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2011 PCT/JP2011/050299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11087000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11732870 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2524702**

54 Título: **Diagnóstico para cáncer**

30 Prioridad:

13.01.2010 JP 2010004797

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)
3-1, Hongo 7-chome
Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**URANO YASUTERU;
NAGANO TETSUO y
SAKABE MASAYO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 661 712 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico para cáncer

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer que específicamente emite fluorescencia en un tejido canceroso en un tiempo corto cuando se aplica a una parte en la que se sospecha la presencia de un tejido canceroso.

Antecedentes técnicos

Las técnicas de diagnóstico por la imagen tales como las basadas en PET o IRM se han usado ampliamente como métodos para diagnosticar cáncer en años recientes. Sin embargo, por medio de estas técnicas, es difícil encontrar microcarcinomas no mayores de 1 cm. Además, estas técnicas también tienen problemas de que se requieren instrumentos a escala muy grande para la imagenología, y no son adecuadas como métodos diagnósticos para identificar una lesión cancerosa que va a extirpar un cirujano durante la cirugía, endoscopia o similar.

Se ha descrito recientemente un método de imagenología de cáncer que utiliza una sonda compleja que consiste en una combinación de un anticuerpo contra un cáncer y una sonda fluorescente sensible al pH (Nat. Med., 15, pp.104-109, 2009). Este método tiene un rasgo característico en que es alcanzable la imagenología específica de un tejido canceroso con fluorescencia. Sin embargo, este método tiene problemas de que la sensibilidad del complejo de sonda usado en este método es insuficiente, y que se requiere un tiempo de 1 hora o más antes de que una lesión cancerosa se vuelva detectable después de la administración de la sonda. Por estas razones, el método no se ha usado todavía de forma práctica como un método para el diagnóstico rápido de un tejido canceroso durante cirugía o similar.

Como sondas fluorescentes que utilizan una estructura de xanteno, se han desarrollado sondas fluorescentes para la medida de proteasa que tienen sensibilidad y cuantificabilidad rápida superior, y como una sonda fluorescente que específicamente reacciona con γ -glutamyltransferasa (GGT) para dar fluorescencia intensa en un tiempo corto, también se ha descrito γ -Glu-RhoHM (Masayo Sakabe, "Development of novel fluorescent probes for enzyme activity detection utilizing ring opening for the basis of fluorescence control", Tesis de Master en el Departamento de Postgrado de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Tokio, presentada en la junta de Tesis de Master del 5 de marzo, 2009, el resumen se puede leer en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Tokio). Sin embargo, el uso de esta sonda fluorescente para el diagnóstico del cáncer no se ha descrito todavía.

Además, se ha descrito que el fomento de la expresión de γ -glutamyltransferasa se observa en células cancerosas, y este fomento de expresión se relaciona con resistencia a fármacos (Biochemical Pharmacology, 71, pp:231-238, 2006). Sin embargo, no se ha descrito hasta ahora ningún método diagnóstico para identificar una célula cancerosa o un tejido canceroso con gran precisión detectando γ -glutamyltransferasa.

Referencias del estado de la técnica

45 Documentos de no patente

Documentos de no patente 1: Biochemical Pharmacology, 71, pp:231-238, 2006

Documentos de no patente 2: Nat. Med., 15, pp.104-109, 2009

Documentos de no patente 3: Masayo Sakabe, Tesis de Master en el Departamento de Postgrado de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Tokio, presentación en la junta de tesis de Master del 5 de marzo, 2009, y los resúmenes de las tesis de Master se pueden leer en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Tokio.

Compendio de la invención

55 Objeto que se va a alcanzar por la invención

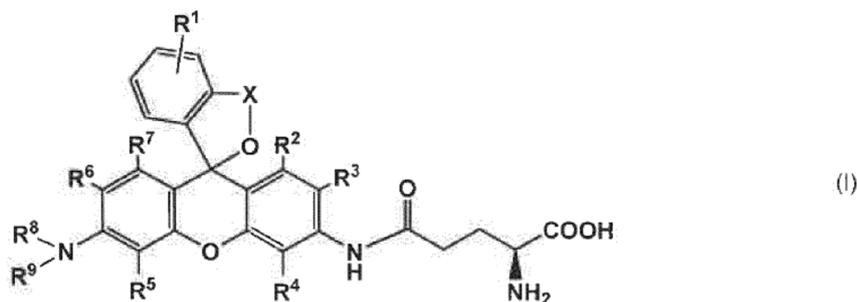
Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer. Más específicamente, el objeto de la presente invención es proporcionar un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer que específicamente emite fluorescencia en un tejido canceroso cuando se aplica a una parte en la que se sospecha la presencia de un tejido canceroso, y también proporcionar un agente para diagnosticar cáncer que pueda alcanzar la identificación rápida de un tejido canceroso en una operación quirúrgica, endoscopia, o similar.

65 Medios para alcanzar el objeto

Los inventores de la presente invención realizaron varias investigaciones para alcanzar el objeto anteriormente mencionado. Como resultado, encontraron que cuando un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I), que actúa como una sonda fluorescente para la medida de γ -glutamyltransferasa, se aplicó a una parte en la que se sospecha la presencia de un tejido canceroso, se emitió específicamente fluorescencia intensa solo desde tejido canceroso, y la intensidad de la fluorescencia alcanzó un nivel suficiente en un tiempo corto, por ejemplo, aproximadamente en varias decenas de segundo a varios minutos, para alcanzar con éxito la identificación extremadamente fácil del tejido canceroso. La presente invención se logró en base a los hallazgos anteriormente mencionados.

Por tanto, la presente invención proporciona un agente para su uso en el diagnóstico "in vivo" de cáncer que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I):

[Fórmula 1]



en donde R¹ representa un átomo de hidrógeno, o de uno a cuatro sustituyentes iguales o diferentes que se unen al anillo de benceno seleccionados de un grupo alquilo de C₁-C₆, un grupo alcoxilo, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo acilo; R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo de C₁-C₆, o un átomo de halógeno; R⁸ y R⁹ independientemente representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo de C₁-C₆; y X representa un grupo alquileo de C₁-C₃, o una sal del mismo como un ingrediente activo.

Según una forma de realización preferida de la invención anteriormente mencionada, se proporciona el agente anteriormente mencionado para uso en el diagnóstico "in vivo" de cáncer que comprende el compuesto anteriormente mencionado o una sal del mismo, en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son átomos de hidrógeno, y X es un grupo metileno.

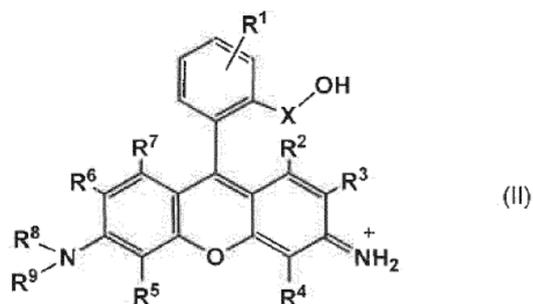
Según otras formas de realización preferidas de la presente invención, se proporciona el agente anteriormente mencionado para uso en el diagnóstico "in vivo" de cáncer que se usa para un tratamiento quirúrgico de un cáncer o un diagnóstico para un cáncer; el agente anteriormente mencionado para uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer, en donde el tratamiento quirúrgico de un cáncer o el diagnóstico de un cáncer es una cirugía abierta tal como craneotomía, toracotomía o laparotomía, una cirugía endoscópica, o endoscopia; y el agente anteriormente mencionado para diagnosticar cáncer que se usa para un diagnóstico rápido durante cirugía.

Desde otro aspecto de la presente invención, se proporciona un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer, que comprende las siguientes etapas:

(1) la etapa de aplicar un compuesto representado por la anteriormente mencionada fórmula general (I) o una sal del mismo a una parte de un cuerpo vivo que contiene un tejido canceroso, y

(2) la etapa de identificar el tejido canceroso en la parte de un cuerpo vivo detectando la fluorescencia emitida por un compuesto representado por la siguiente fórmula general (II):

[Fórmula 2]



en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ y X tienen los mismos significados que los definidos anteriormente) o una sal del mismo que se genera en el tejido canceroso.

5

Efecto de la invención

Al usar el agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer proporcionado por la presente invención, se emite específicamente fluorescencia intensa solo desde un tejido canceroso, y según esto, se hace posible identificar de forma precisa un tejido canceroso. Además, el agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer de la presente invención da fluorescencia extremadamente intensa en un tejido canceroso en un tiempo corto desde aproximadamente varias decenas de segundos hasta varios minutos, el agente tiene un rasgo característico en que se logra una identificación extremadamente rápida de un tejido canceroso durante una operación quirúrgica o un diagnóstico. Además, el agente también tiene un rasgo característico en que el diagnóstico usando el agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer de la presente invención se puede llevar a cabo por medio de una luz visible que es segura para los cuerpos vivos.

10

15

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] Esta figura muestra los cambios de absorción y espectro de fluorescencia del compuesto (2) (γ -Glu-RhoHM) después de la reacción con γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), y la cuantificabilidad de la reacción de γ -Glu-RhoHM.

[Figura 2] Esta figura muestra una imagen obtenida por imagenología usando el compuesto (2) desde fuera del cuerpo.

[Figura 3] Esta figura muestra una imagen intraabdominal después de laparostomía (arriba) e imagen mesentérica después de laparotomía (abajo) obtenidas por imagenología usando el compuesto (2). En cada imagen, se muestra una imagen con luz blanca en el lado izquierdo, y se muestra una imagen de fluorescencia en el lado derecho.

[Figura 4] Esta figura muestra imágenes obtenidas por imagenología viva usando un endoscopio de fluorescencia con el compuesto (2). En cada uno de los resultados obtenidos inmediatamente después de rociar (0 s), y 30 segundos, 60 segundos, 90 segundos y 10 minutos después de rociar, se muestra una imagen con luz blanca en el lado izquierdo, y se muestra una imagen de fluorescencia en el lado derecho. La "imagen con luz blanca" es una imagen obtenida en un modo de endoscopio habitual, no un modo de fluorescencia, para comparación.

35

Modos de llevar a cabo la invención

El grupo alquilo mencionado en esta especificación puede ser un grupo alquilo lineal o ramificado, o puede ser un grupo alquilo que consiste en una combinación de los mismos. El número de carbonos del grupo alquilo está limitado, el número puede ser de 1 a 6, preferiblemente aproximadamente de 1 a 4.

40

Las descripciones anteriores se aplican similarmente a las fracciones alquilo de otros sustituyentes que contienen una fracción alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo).

45

R¹ representa un átomo de hidrógeno, o de uno a cuatro sustituyentes que se unen al anillo de benceno seleccionados de un grupo alquilo de C₁-C₆, un grupo alcoxi de C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo acilo. Cuando hay dos o más sustituyentes en el anillo de benceno, pueden ser iguales o diferentes. Como R¹, se prefiere un átomo de hidrógeno.

50

R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo de C₁-C₆, o un átomo de halógeno. Es preferido que R² y R⁷ sean átomos de hidrógeno. También es preferido que R³, R⁴, R⁵ y R⁶ sean átomos de hidrógeno. Lo más preferido es que todos de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ sean átomos de hidrógeno.

55

R⁸ y R⁹ independientemente representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo de C₁-C₆. Cuando tanto R⁸ como R⁹ representan un grupo alquilo de C₁-C₆, pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se prefiere que tanto R⁸ como R⁹ sean átomos de hidrógeno, o R⁸ es un grupo alquilo de C₁-C₆ y R⁹ es un átomo de hidrógeno, y es más preferido que tanto R⁸ como R⁹ sean átomos de hidrógeno.

X representa un grupo alquileo de C₁-C₃. Los grupos alquileo pueden ser o bien un grupo alquileo lineal o un grupo alquileo ramificado. Por ejemplo, además del grupo metileno (-CH₂-), grupo etileno (-CH₂-CH₂-) y grupo propileno (-CH₂-CH₂-CH₂-), también se pueden usar -CH(CH₃)-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₂CH₃)- como grupos alquileo ramificados. Entre ellos, el grupo metileno y el grupo etileno son preferidos, y el grupo metileno es más preferido.

El compuesto representado por la anteriormente mencionada fórmula general (I) puede existir como una sal. Los ejemplos de la sal incluyen una sal de adición de base, una sal de adición ácida, una sal de aminoácido. Los ejemplos de las sales de adición de base incluyen, por ejemplo, sales metálicas tal como sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, y sales de magnesio; sales de amonio, y sales de amina orgánica tal como sales de trietilamina, sales de piperidina, y sales de morfolina. Los ejemplos de la sal de adición ácida incluyen, por ejemplo, sales de ácido mineral tal como clorhidratos, sulfatos, y nitratos, y sales de ácido orgánico tal como metanosulfonatos, p-toluenosulfonatos, citratos y oxalatos. Los ejemplos de sales de aminoácido incluyen sales de glicina. Sin embargo, las sales de los compuestos de la invención no están limitadas a estos ejemplos.

El compuesto representado por la fórmula general (I) puede tener uno o dos o más carbonos asimétricos dependiendo del tipo de sustituyente, y puede existir estereoisómeros tal como isómeros ópticos o diastereoisómeros. Tales estereoisómeros en formas puras, mezclas arbitrarias de estereoisómeros, racematos, están todos dentro del ámbito de la presente invención.

El compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo puede existir como un hidrato o un solvato, y cualquiera de estas sustancias está dentro del ámbito de la presente invención. El tipo de solvente que forma el solvato no está particularmente limitado. Por ejemplo, se pueden ejemplificar tales solventes como etanol, acetona e isopropanol.

El compuesto representado por la fórmula general (I) se puede preparar fácilmente a partir de, por ejemplo, un compuesto xanteno que tiene grupos amino en las posiciones 3 y 6 y un grupo 2-carboxifenilo o un grupo 2-alcoxicarbonilfenilo en la posición 9 o similar usado como el material de partida, por ejemplo, convirtiendo el grupo 2-carboxifenilo o grupo 2-alcoxicarbonilfenilo en la posición 9 en un grupo hidroxialquilo y después acilando el grupo amino en la posición 3. Como el compuesto 3,6-diaminoxanteno utilizable como material de partida, los ejemplos incluyen, por ejemplo, rodamina 110, rodamina 123, que están todos comercialmente disponibles, pero el compuesto 3,6-diaminoxanteno no está limitado a estos ejemplos, y se puede elegir un compuesto xanteno apropiado dependiendo de la estructura del compuesto objetivo.

Un método de preparación para un compuesto típico entre los compuestos de la presente invención representado por la fórmula general (I) se describe específicamente en los ejemplos mencionados en esta especificación, y según esto, los expertos en la materia pueden preparar fácilmente un compuesto arbitrario entre los compuestos representados por la fórmula general (I), con referencia a las divulgaciones de la presente especificación, y eligiendo apropiadamente materiales de partida, reactivos, condiciones de reacción, según se requiera.

El compuesto representado por la fórmula general (I) por sí es sustancialmente no fluorescente. Mientras que, cuando el grupo γ -glutamilo se hidroliza por la γ -glutamilttransferasa, el compuesto se vuelve rápidamente un tautómero que tiene una estructura de anillo abierto para dar un compuesto fuertemente fluorescente representado por la fórmula general (II). Por tanto, el agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer de la presente invención que comprende el compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo como un ingrediente activo tiene una propiedad que el agente es hidrolizado por γ -glutamilttransferasa expresada específica y fuertemente en un tejido canceroso para dar un compuesto representado por la fórmula general (II) que emite fluorescencia intensa en el tejido canceroso, y aplicando el agente a una parte en que se sospecha la presencia de un tejido canceroso, solo un tejido canceroso viene a emitir específicamente fluorescencia intensa en varias decenas de segundos a varios minutos.

Por ejemplo, cuando el compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo se irradia con una luz de excitación de aproximadamente 440 a 500 nm en una región de pH neutro, el compuesto no emite casi fluorescencia, mientras que el compuesto representado por la fórmula general (II) tiene una propiedad de emitir fluorescencia fuerte en las mismas condiciones (por ejemplo, emisión: 524 nm). Por tanto, cuando se lleva a cabo el diagnóstico usando el agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer de la presente invención, habitualmente se puede irradiar una luz visible de aproximadamente 440 a 500 nm, preferiblemente una luz visible de aproximadamente 445 a 490 nm, más preferiblemente una luz visible de aproximadamente 450 a 480 nm. La longitud de onda de fluorescencia que se va a observar es habitualmente de aproximadamente 510 a 800 nm, y, por ejemplo, es preferible observar fluorescencia de aproximadamente 516 a 556 nm.

En esta especificación, el término “tejido canceroso” significa un tejido arbitrario que contiene una célula cancerosa. El término “tejido” se debe interpretar en su sentido más amplio, incluyendo una parte y el total de órganos, y no se debe interpretar en ningún modo limitante. El agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención tiene una acción de detectar γ -glutamyltransferasa específica y fuertemente expresada en un

tejido canceroso, y según esto, el tejido canceroso es preferiblemente un tejido que expresa mucho γ -glutamyltransferasa. Tal tejido canceroso se explica, por ejemplo, en *Biochemical Pharmacology*, 71, pp:231-238, 2006. Además, en esta especificación, el término “diagnóstico” se debe interpretar en su sentido más amplio, incluyendo confirmar de forma macroscópica o microscópica la presencia de un tejido canceroso en una parte arbitraria de un cuerpo vivo.

El agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención se puede usar, por ejemplo, durante una operación quirúrgica o un diagnóstico. En esta especificación, el término “operación quirúrgica” abarca cirugías arbitrarias aplicadas para terapia contra el cáncer incluyendo cirugías abiertas tal como craneotomía, toracotomía y laparotomía, operaciones de la piel, que están acompañadas por incisión, así como cirugías endoscópicas usando gastroscopio, endoscopia del intestino grueso, laparoscopia, toracoscopio, o similares. El término “diagnóstico” abarca tratamientos diagnósticos usando un endoscopio tal como un gastroscopio y endoscopio del intestino grueso, procedimientos que acompañan a tratamientos diagnósticos tal como escisión y recogida de tejidos, así como tratamientos diagnósticos realizados para tejidos extraídos y recogidos de cuerpos vivos. Estos términos se deben interpretar en sus sentidos más amplios, y no se deben interpretar en ningún modo limitante.

Los cánceres que se pueden diagnosticar con el agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención no están particularmente limitados, y abarcan tumores malignos arbitrarios incluyendo sarcoma. El agente preferiblemente se usa para diagnóstico de un carcinoma sólido. Como una de las formas de realización preferidas, por ejemplo, el agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención se puede aplicar a una parte o el total de un campo de operación quirúrgica realizada macroscópicamente o con un endoscopio por un método apropiado tal como rociado, aplicación o infusión, y después de varias decenas de segundos a varios minutos, la parte aplicada se puede irradiar con una luz de longitud de onda de aproximadamente 500 nm. Cuando un tejido canceroso está incluido en la parte aplicada, el tejido viene a emitir fluorescencia, y por tanto el tejido se identifica como un tejido canceroso, y se extirpa junto con tejidos circundantes. Por ejemplo, en tratamientos quirúrgicos de carcinomas típicos tal como cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, y cáncer pancreático, se puede realizar diagnóstico definido para tejidos de carcinoma que se puede confirmar macroscópicamente, y también se pueden diagnosticar infiltración, metástasis a tejidos linfáticos tal como ganglios linfáticos, así como órganos y tejidos circunferenciales. Por tanto, se vuelve posible realizar diagnóstico rápido durante una cirugía para determinar una región que se va a extirpar.

Como otra forma de realización preferida, por ejemplo, en gastroscopia o endoscopia del intestino grueso, el agente para diagnosticar cáncer de la presente invención se puede aplicar a una parte que se va a ensayar por un método apropiado tal como rociado, aplicación, o infusión, y después de varias decenas de segundos a varios minutos, la parte aplicada se puede irradiar con una luz de longitud de onda de aproximadamente 500 nm, y cuando se detecta un tejido que emite fluorescencia, el tejido se puede identificar como un tejido canceroso. Cuando se identifica un tejido canceroso en endoscopia, la extirpación diagnóstica o terapéutica se puede realizar contra el tejido.

Una concentración para la aplicación del agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención no está particularmente limitada. El agente se puede aplicar preferiblemente a un tejido, en el que se sospecha la presencia de un tejido canceroso, como una solución de una concentración de aproximadamente 1 a 1.000 μ M, y el agente en general se aplica preferiblemente en una condición neutra. El agente se puede usar en un intervalo de, por ejemplo, pH 5,0 a 9,0, preferiblemente de pH 6,0 a 8,0, más preferiblemente de pH 6,8 a 7,6. Aunque el compuesto representado por la anteriormente mencionada fórmula general (I) o una sal del mismo, por sí, se puede usar como el agente para su uso en un método de diagnóstico “in vivo” de cáncer de la presente invención, el compuesto o una sal del mismo se puede usar como una composición mezclando el compuesto o una sal del mismo con aditivos generalmente usados para la preparación de reactivos, si es necesario. Por ejemplo, como aditivos para uso de reactivos en condiciones fisiológicas, se pueden usar tales aditivos como ayudas de disolución, ajustadores de pH, tampones, y agentes isotónicos, y las cantidades de estos aditivos las pueden elegir adecuadamente los expertos en la materia. Tal composición se puede proporcionar como esas en formas apropiadas, por ejemplo, mezclas en polvo, productos liofilizados, gránulos, comprimidos, soluciones, y se pueden disolver en agua para inyección o un tampón apropiado en el momento del uso, y aplicar.

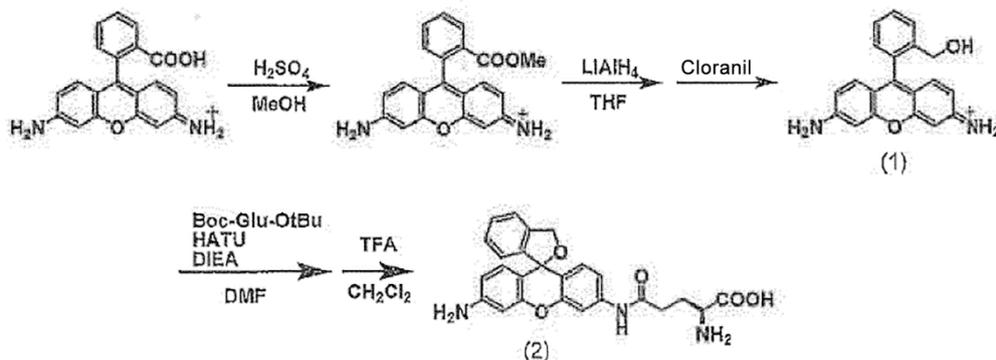
Ejemplos

La presente invención se explicará de forma más específica con referencia a ejemplos. Sin embargo, el ámbito de la presente invención no está limitado por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se preparó el compuesto (2) según el siguiente esquema.

[Fórmula 3]



5

(a) Síntesis del compuesto (1) (RhoHM)

Se disolvió rodamina 110 (285 mg, 0,8 mmol, 1 eq.) en metanol (10 ml), a la solución se añadió ácido sulfúrico, y la mezcla se agitó a 80°C durante 10 horas en una atmósfera de argón. El solvente de reacción se eliminó a presión reducida, y el residuo se lavó con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y agua. El sólido resultante se disolvió en tetrahidrofurano (THF, 10 ml), a la solución se añadió una solución de metóxido de sodio 5 M (en metanol, 400 µl, 0,8 mmol, 1 eq.) a 0°C en una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó durante 10 minutos. A continuación, a la mezcla se añadió hidruro de litio y aluminio (333 mg, 8 mmol, 10 eq.), y la mezcla se agitó durante 3 horas. A la mezcla se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (5 ml), el solvente se eliminó a presión reducida, y el sólido resultante se extrajo con diclorometano y una solución acuosa saturada de ácido tartárico tetrahidrato, sal de potasio y sodio. A la fase orgánica se añadió sulfato de sodio, y se filtró, y después el solvente se eliminó para obtener un sólido. El sólido resultante se disolvió en diclorometano, a la solución se añadió cloranil (196 mg, 1 mmol, 1 eq.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El solvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol = 10:1) para obtener el compuesto objetivo (104 mg, 41%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,64 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 7,56 (t, 1H, J = 7,6 Hz), 7,44 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,17 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 7,03-7,00 (m, 2H), 6,71-6,74 (m, 4H), 4,23 (s, 2H)

¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 161,5, 159,9, 159,6, 141,0, 133,4, 132,2, 131,3, 130,3, 129,5, 128,8, 118,0, 115,0, 98,4, 62,8

HRMS (ESI-F) Calculada para [M+H]⁺, 317,12900, determinada, 317,12862 (-0,38 mmu)

(b) Síntesis del compuesto (2) (γGlu-RhoHM)

El compuesto (1) (0,05 mmol, 1 eq.), HATU (0,11 mmol, 2 eq.) y N,N-diisopropilmetilamina (0,11 mmol, 2 eq.) se disolvieron en dimetilformamida (DMF, 2 ml), y la solución se agitó a 0°C durante 10 minutos en una atmósfera de argón. A continuación, se añadió DMF (0,5 ml) que disolvía Boc-Glu-OtBu (0,05 mmol, 1 eq.) a la solución, y la mezcla se agitó durante 15 horas. El solvente de reacción se eliminó a presión reducida, después el sólido obtenido se disolvió en diclorometano (2 ml) y ácido trifluoroacético (TFA, 2 ml), y la solución se agitó durante 30 minutos. El solvente se eliminó, y el residuo se purificó usando HPLC (eluyente A: H₂O que contenía TFA al 0,1%, eluyente B: CH₃CN (80%) y H₂O (20%) que contenía TFA al 0,1%, A/B = de 80/20 a 0/100 en 40 minutos) para obtener el compuesto objetivo.

Compuesto (2)

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,39 (s, 1H), 7,62-7,61 (m, 2H), 7,50-7,47 (m, 1H), 7,39 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,24 - 7,22 (m, 3H), 6,94 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 6,86 (s, 1H), 4,25 (s, 2H), 3,96 (t, 1H, J = 6,3 Hz), 2,71-2,69 (m, 2H), 2,30-2,27 (m, 2H)

¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 173,4, 171,8, 164,5, 163,1, 160,7, 157,1, 148,7, 141,2, 134,9, 131,9, 131,7, 130,5, 129,8, 129,0, 121,4, 119,4, 118,5, 106,9, 98,5, 63,1, 53,5, 33,4, 26,6

HRMS (ESI+) Calculada para [M-H]⁺, 446,17160, determinada, 446,17195 (+0,36 mmu).

Ejemplo 2

El compuesto (2) (γGlu-RhoHM) formado por unión del residuo acilo derivado del ácido glutámico a un grupo amino del compuesto (1) (RhoHM) se disolvió en un tampón fosfato neutro, y γ-glutamiltanspeptidasa (GGT, riñón equino, SIGMA G9270-100UN) se hizo reaccionar con la solución. Específicamente, 3 µl de una solución 5 µM del

compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO) se disolvieron a una concentración final de 5 μM en 3 ml de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,4), y se añadió GGT (1,1 U) para la reacción enzimática a 37°C. La longitud de onda de excitación fue 501 nm. Como resultado, se produjo un compuesto que tiene una estructura de anillo abierto por hidrólisis del grupo acilo, y subidas notables de absorción e intensidad de fluorescencia se observaron inmediatamente (Fig. 1).

La solución de DMSO del compuesto (5 mM) en un volumen de 3 μl se disolvió en 3 ml de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,4) a una concentración final de 5 μM , y la reacción enzimática se realizó a 37°C. Se representaron los valores de intensidad de fluorescencia observados con cada cantidad de la enzima 9 minutos después de la adición de la enzima. La longitud de onda de excitación fue 501 nm, y la longitud de onda de emisión de fluorescencia fue 524 nm. Como resultado, el compuesto dio aumento lineal de intensidad de fluorescencia de una manera dependiente de la cantidad de GGT añadida (Fig. 1).

Ejemplo 3

Se examinó la especificidad de enzima del compuesto (2). La solución de DMSO (5 mM) en un volumen de 3 μl se disolvió en 3 ml de un tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,4) a una concentración final de 5 μM , y se añadió LAP (0,4 U) a la solución para realizar la reacción enzimática a 37°C. Como resultado, no se observó aumento en la intensidad de fluorescencia después de la reacción del compuesto (2) ($\gamma\text{Glu-RhoHM}$) con LAP. Mientras, el compuesto (2) reaccionó con GGT para dar intensidad de fluorescencia notable (ejemplo 2), y por tanto se consideró que $\gamma\text{Glu-RhoHM}$ específicamente detectaba GGT.

Ejemplo 4: Imagenología de fluorescencia usando un ratón modelo de cáncer

Se conoce la metástasis diseminada del cáncer ovárico al peritoneo como una complicación letal que se produce en general del cáncer ovárico. Tal metástasis al peritoneo empieza a producirse en un estadio relativamente temprano del cáncer ovárico, el tumor invade la membrana coriónica, y cae en la cavidad abdominal, y como resultado, el tumor se metastatiza a los otros órganos en la cavidad abdominal según se dispersan las semillas (metástasis de diseminación). Para reproducir experimentalmente este fenómeno, células SHIN3 de origen de cáncer ovárico se administraron por vía intraperitoneal a ratones atímicos para preparar un modelo de diseminación peritoneal (Neoplasia, 8, pp.607-612, 2006).

Las células SHIN3 derivadas de cáncer ovárico humano se cultivaron a 37°C en el medio RPMI 1640 que contenía SBF al 10%, 100 U/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinina en CO_2 al 5%. Después de que las células alcanzaran subconfluencia, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato), y se eliminaron con tripsina-EDTA de modo que se separaron células individuales. Las células tratadas se centrifugaron (100 x g, 4°C, 3 minutos), y después el sobrenadante se desechó, se añadió PBS helado a las células para resuspenderlas a una densidad celular de 1×10^6 células/300 μl . La suspensión de células preparada se administró inmediatamente por vía intraperitoneal a ratones atímicos de aproximadamente 8 semanas de edad en un volumen de 300 μl (1×10^6 células) por ratón. Los ratones tratados se criaron durante aproximadamente 5 a 10 días. La formación de un gran número de tumores de aproximadamente 0,1 mm a varios milímetros en sitios adyacentes al páncreas y bazo y en el mesenterio se confirmó en general en este periodo.

Una solución del compuesto (2) ($\gamma\text{Glu-RhoHM}$) en PBS (50 μM) en un volumen de 300 μl se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones del modelo de diseminación peritoneal. Se realizó imagenología de fluorescencia irradiando una luz de excitación de 450 a 480 nm desde el exterior del cuerpo del ratón con anestesia 30 minutos después de la administración i.p., y observando la fluorescencia de 516 a 556 nm. Además, después de que se sacrificaran los ratones con gas CO_2 , y se realizara el desangramiento, se realizó la sección abdominal con aparatos de cirugía para animales pequeños para exponer la cavidad abdominal, se irradió una luz de excitación de 445 a 490 nm, y se midió la fluorescencia cada 10 nm desde 520 a 800 nm para obtener imágenes del espectro de fluorescencia.

Como resultado, se observó fluorescencia verde fuerte de una manera específica de sitio de cáncer. Una imagen obtenida por la imagenología realizada desde el exterior de los cuerpos antes de la sección abdominal se muestra en la figura 2 (30 minutos después de la administración del compuesto (2)). En la figura 3, la imagen superior se obtiene por imagenología intraperitoneal realizada después de la sección abdominal (30 minutos después de la administración del compuesto (2)), y la imagen inferior se obtiene por imagenología del mesenterio realizada después de la sección abdominal (30 minutos después de la administración del compuesto (2)). En cada imagen, se muestra una imagen con luz blanca en el lado izquierdo, y se muestra una imagen de fluorescencia en el lado derecho.

Ejemplo 5: Imagenología viva del ratón modelo de cáncer usando endoscopio fluorescente

Se formó un pequeño agujero en la parte abdominal del ratón modelo de la diseminación peritoneal con anestesia de isoflurano, se insertó un endoscopio de fluorescencia en la cavidad abdominal a través de agujero, y 300 μl de una solución del compuesto (2) ($\gamma\text{Glu-RhoHM}$) en PBS (50 μM) se rociaron en estado de neblina desde la punta del

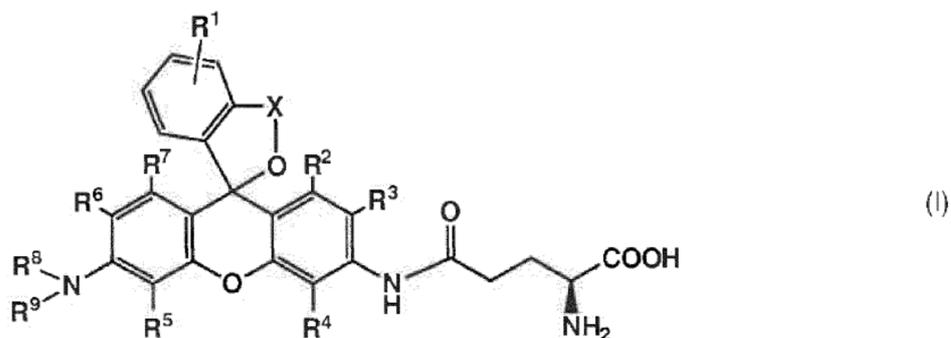
5 endoscopio. A continuación, se irradió una luz de excitación de 450 a 480 nm, y se observó fluorescencia de 516 a
10 556 nm a lo largo del tiempo para obtener películas e imágenes de endoscopio de fluorescencia. Los resultados se
muestran en la figura 4. En cada uno de los resultados obtenidos inmediatamente después del rociado (0 s), y 30
segundos, 60 segundos, 90 segundos y 10 minutos después del rociado, se muestra una imagen con luz blanca en
el lado izquierdo, y se muestra una imagen de fluorescencia en el lado derecho. La "imagen con luz blanca" es una
imagen obtenida en un modo de endoscopio habitual, no un modo de fluorescencia por comparación. Se puede
confirmar que las imágenes del tejido canceroso se hacen más claras en las imágenes de fluorescencia desde
inmediatamente después del rociado hasta 90 segundos después de ello. Además, incluso después de 10 minutos,
se obtuvieron claramente imágenes de los tejidos cancerosos (similarmente, la "imagen con luz blanca" es una
imagen obtenida en un modo de endoscopio habitual por comparación, no un modo de fluorescencia). Como
resultado, se observó que una parte cancerosa se hizo emitir específicamente fluorescencia en varios minutos
usando el agente de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I):

5

[Fórmula 1]



- 10 en donde R¹ representa un átomo de hidrógeno, o de uno a cuatro sustituyentes iguales o diferentes que se unen al anillo de benceno seleccionados de un grupo alquilo de C₁-C₆, un grupo alcoxilo de C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo acilo; R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo de C₁-C₆, o un átomo de halógeno; R⁸ y R⁹ independientemente representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo de C₁-C₆; y X representa un grupo alquileo de C₁-C₃, o una sal del mismo como un ingrediente activo.

15

- 20 2. El agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer según la reivindicación 1, en donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son átomos de hidrógeno, y X es un grupo metileno.
3. El agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" según la reivindicación 1 o 2, que se usa para un tratamiento quirúrgico de un cáncer o un diagnóstico para un cáncer.
4. El agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer según la reivindicación 3, en donde el tratamiento quirúrgico de un cáncer o el diagnóstico para un cáncer es una cirugía abierta, una cirugía endoscópica, o endoscopia.
5. El agente para su uso en un método de diagnóstico "in vivo" de cáncer según la reivindicación 4, que se usa para el diagnóstico rápido durante cirugía.

25

Fig. 1

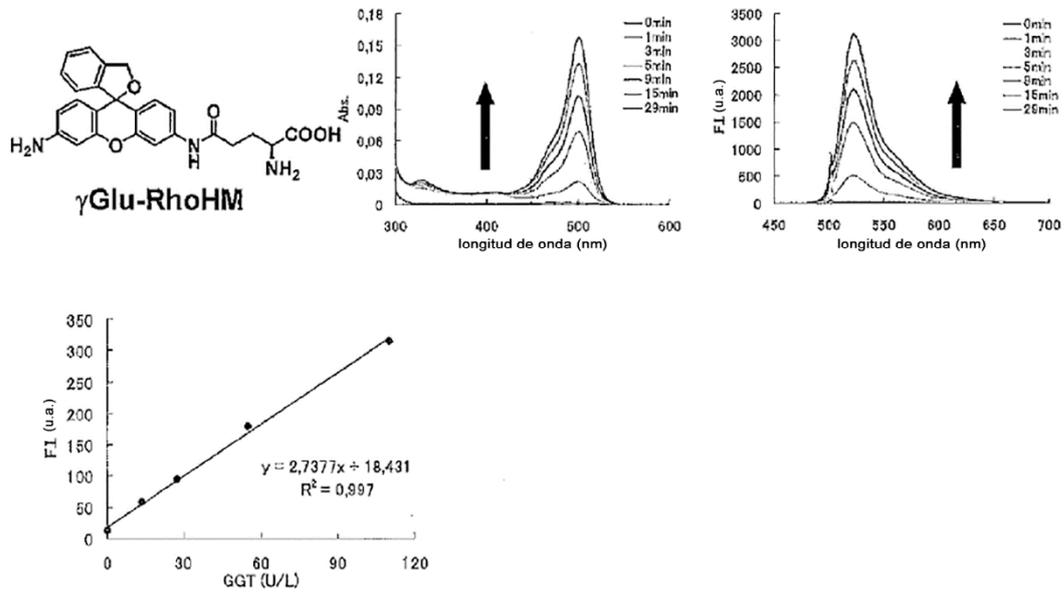


Fig. 2

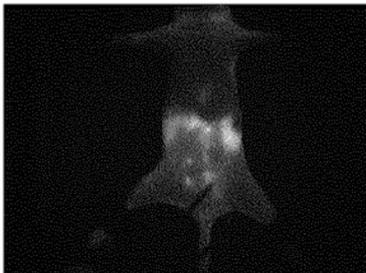


Fig. 3

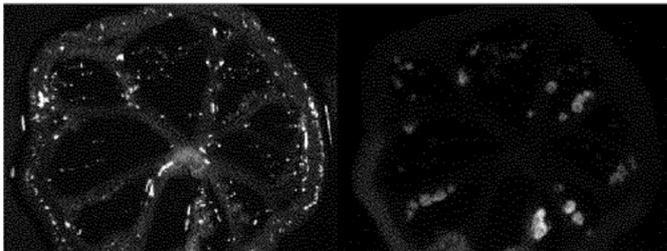
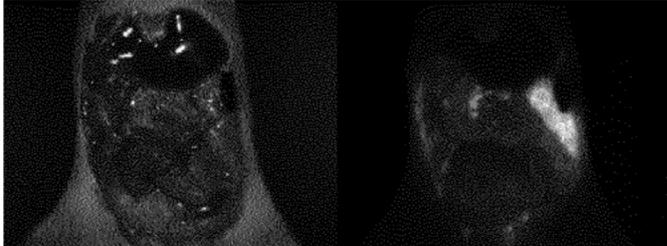


Fig. 4

