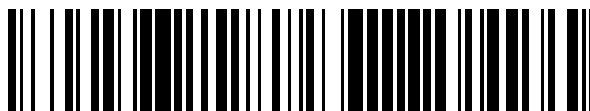


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 697**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011** **PCT/JP2011/000489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011** **WO11093098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011** **E 11736813 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2530093**

54 Título: **Compuesto de indocianina, método de síntesis del mismo, método de purificación del mismo, composición diagnóstica utilizando el compuesto de indocianina y dispositivo para medición in vivo de la cinética y dispositivo para la circulación de visualización usando la composición diagnóstica**

30 Prioridad:

10.06.2010 JP 2010132923
28.01.2010 JP 2010017255

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2019

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION MIE
UNIVERSITY (50.0%)
1577, Kurimamachiya-cho,
Tsu-shi, Mie 514-8507, JP y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
NAGOYA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TERANISHI, KATSUNORI;
HIRATA, HITOSHI y
ARAI, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 708 697 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

Compuesto de indocianina, método de síntesis del mismo, método de purificación del mismo, composición diagnóstica utilizando el compuesto de indocianina y dispositivo para medición *in vivo* de la cinética y dispositivo para la circulación de visualización usando la composición diagnóstica

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto de indocianina como se define en las reivindicaciones, que es un pigmento verde útil para tecnologías de diagnóstico médico, tecnologías quirúrgicas médicas, tecnologías de análisis y medición científica, tecnologías de impresión, tecnologías de escritura, tecnologías de recubrimiento, tecnologías de colorantes y tecnologías de tinción y tiene una propiedad capaz de emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano, un método de síntesis y un método de purificación de los mismos, y una composición de diagnóstico. Más particularmente, la presente invención se relaciona con un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de cadena de azúcar cíclica que es un pigmento verde y tiene una propiedad capaz de emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano, un método de síntesis y un método de purificación del mismo, y una composición de diagnóstico que usa el compuesto de indocianina.

Antecedentes de la invención

Hasta ahora se han sintetizado compuestos de indocianina que son pigmentos verdes y emiten fluorescencia en el infrarrojo cercano, y tienen varias aplicaciones, como pigmentos para teñir utilizados en cirugías del cuerpo vítreo del ojo, pigmentos usados en medicamentos para probar las funciones hepáticas, pigmentos usados en medicamentos para probar las funciones circulatorias, pigmentos utilizados para operaciones quirúrgicas y compuestos fluorescentes en el infrarrojo cercano utilizados para operaciones quirúrgicas en campos médicos; tinción de proteínas o azúcares y compuestos para la generación de fluorescencia en campos científicos; y pigmentos para tecnologías de impresión. De estos compuestos de indocianina, un compuesto que se llama verde de indocianina (en lo sucesivo denominado "ICG") se ha utilizado durante casi 50 años como medicamento para probar las funciones hepáticas o las funciones circulatorias. El ICG se ha utilizado recientemente para operaciones médicas o diagnósticos médicos, utilizando su propiedad de alta permeabilidad a la luz de un tejido biológico, mediante la administración tópica de ICG a un cuerpo tal como un vaso sanguíneo, un vaso linfático, un cerebro, un ojo, un estómago, una mama y un esófago, piel u otro sitio y observando la fluorescencia infrarroja cercana de ICG, que aún es una prueba, como la aplicación de ICG que no sean los medicamentos para evaluar las funciones hepáticas o la función circulatoria (Documento no Patente 1).

Documentos técnicos del arte anterior

Documento no Patente

Documento no Patente 1: "All of ICG fluorescence Navigation Surgery", supervised and edited by Mitsuo Kusano, Intermedica Co., Ltd, (publicada en noviembre de 2008).

Documento no Patente 2: URL (https://www.daiichisankyo.co.jp/med/contents/di/dg2/pi/pdf/pi_dg2_0909.pdf) de la página principal de Internet en la que se adjunta un documento adjunto a "(marca registrada) Diagnogreen for injection 25mg*" (Daiichi Sankyo Company, Limited).

Documento no Patente 3: R. C. Benson, H. A. Kues, Phys. Med. Biol., 23, 159-163 (1978).

Documento no Patente 4: S. Yoneyama, T. Saito, Y. Komatsu, I. Koyama, K. Takahashi, J. Duvoll-Young, IOVS, 37, 1286-1290 (1998).

Documento no Patente 5: Y. Ye, W. P. Li, C. J. Anderson, J. Kao, G. V. Nikiforovich, S. Achilefu, J. Am. Chem. Soc., 125, 7766-7767 (2003).

Documento no Patente 6: K. Teranishi and S. Tanabe, ITELetters on Batteries, New Technologies & Medicine, 1, 53-60 (2000).

Documento no Patente 7: MICHAEL O'SHAUGHNESSY et al: 1994 Wiley-Liss, Inc MICROSURGERY 15: 40 S 412 1994.

Documento no Patente 8: RALPH J. P. M et al: 1997 Wiley-Liss, Inc. MICROSURGERY 17: 402-408 1996.

Documentos de Patente

El documento WO9849176 (A1) se refiere a reactivos de marcación fluorescentes glicoconjugados solubles en agua que comprenden un colorante fluorescente, uno o más residuos de azúcar o carbohidratos que imparten solubilidad en agua, y un grupo reactivo que permite la unión covalente del reactivo a un sustrato.

El documento WO2007025768 (A1) se refiere a nanopartículas que tienen actividad ópticamente fluorescente, más específicamente una matriz de nanopartículas que comprende un coagregado de al menos un polielectrolito cargado y al menos un agente activo con carga opuesta, en donde el agente activo es un agente fluorescente ópticamente hidrófilo.

Resumen de la invención

Problemas para resolver mediante la invención

Un cromóforo verde (una estructura química necesaria para exhibir verde) y un fluoróforo en el infrarrojo cercano (una estructura química necesaria para exhibir fluorescencia en el infrarrojo cercano) de ICG, son, sin embargo, hidrófobos y, por lo tanto, los grupos sulfonilo están unidos al extremo de la cadena lateral para hacerlos solubles en agua. Esto genera muchos problemas descritos a continuación para el ICG convencional.

Cuando se usa la preparación de ICG en aplicaciones médicas, generalmente se agrega agua destilada a 25 mg de ICG en una cantidad de aproximadamente 5 mL a 10 mL, y el ICG se disuelve por agitación por vibración. Si el ICG no está completamente disuelto, a veces puede ocurrir vómito, náusea, fiebre o un síntoma similar a un choque (Documento no Patente 2). Además, es imposible disolverlo inicialmente en otra solución acuosa como solución salina fisiológica debido a la insolubilización (Documento no Patente 2).

El ICG es soluble en agua porque los grupos sulfonilo están unidos al mismo, como se describió anteriormente, pero tiene una actividad superficial debido a su estructura química en la que hay muchos grupos hidrocarburo hidrófobos, y por lo tanto tiene una propiedad de adsorción a los lípidos. Cuando se administra a un tejido biológico, como un vaso sanguíneo o un órgano, en consecuencia, se adhiere al sitio inyectado, se filtra por error o fluye hacia atrás, por lo que a veces se puede adherir a un tejido biológico no deseado. El ICG que se adhiere al tejido biológico no puede eliminarse fácilmente del tejido biológico limpiándolo o succionando, lo que da lugar a una posibilidad en la que haya interferencia en una operación quirúrgica o un diagnóstico médico.

El ICG tiene una propiedad de ensamblar moléculas en una solución acuosa. El ICG, por lo tanto, tiene una intensidad de fluorescencia baja en una solución acuosa, aunque la propiedad es uno de los factores principales (Documentos No Patente 3 y 4).

Además, el ICG se torna insolubilizado a medida que el tiempo avanza después de que se disuelve en agua y, por lo tanto, es difícil almacenarlo en el estado de una solución acuosa a largo plazo. Además, a baja temperatura, su conservación por congelación promueve la insolubilización.

La preparación de ICG incluye 5% o menos de Nal, y tiene un defecto en donde puede causar hipersensibilidad al yodo (Documento no Patente 2).

Cuando se inyecta ICG por vía intravenosa, se acumula rápidamente en el hígado y se excreta a través del hígado y, por lo tanto, la generación de imágenes de fluorescencia de otro órgano como riñón, uréter, vejiga, uretra, corazón o pulmón es difícil.

Además, cuando se inyecta ICG por vía intravenosa, se transfiere con la sangre y se transfiere un poco a los tejidos periféricos, y, por consiguiente, es difícil observar la transferencia a un tejido intersticial.

El objetivo de la presente invención es resolver los problemas del ICG convencional descrito anteriormente; en otras palabras, el objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto de indocianina novedoso que sea un pigmento verde y presente fluorescencia en el infrarrojo cercano, caracterizado por una alta solubilidad en agua o solución salina fisiológica, extracción fácil de un tejido biológico, una asociación baja de molécula en una solución acuosa, una intensidad de fluorescencia en el infrarrojo cercano alta en una solución acuosa y una generación de imágenes de fluorescencia de un órgano distinto al hígado, como riñón, uréter, vejiga, uretra, corazón o pulmón. La presente invención proporciona además un método de síntesis química y un método de purificación del nuevo compuesto de indocianina que tiene las características descritas anteriormente. Proporcionar una composición de

diagnóstico que incluya el nuevo compuesto de indocianina también es un problema para resolver mediante la invención.

Medios para resolver el problema

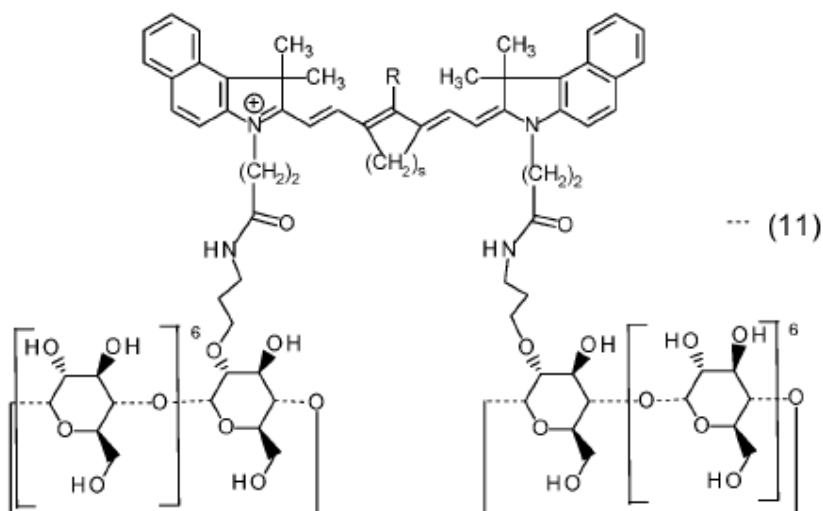
Los presentes inventores han repetido estudios minuciosos para resolver los problemas descritos anteriormente; como resultado, han encontrado un compuesto que exhibe fluorescencia en el infrarrojo cercano, que se puede usar en una operación quirúrgica o diagnóstico médico que utiliza la propiedad de exhibir fluorescencia en el infrarrojo cercano, y han resuelto los problemas del ICG descritos anteriormente.

Los presentes inventores han encontrado una nueva indocianina como se define en las reivindicaciones, que es un pigmento verde caracterizado por una alta solubilidad en agua o solución salina fisiológica, fácil eliminación de un tejido biológico, una baja asociación de moléculas en una solución acuosa, una alta Intensidad de fluorescencia en el infrarrojo cercano en una solución acuosa y exposición de fluorescencia en el infrarrojo cercano; y han completado la presente invención. Además, han encontrado un método de síntesis química y un método de purificación del nuevo compuesto de indocianina, y han completado la presente invención. Además, han proporcionado una composición de diagnóstico que incluye el nuevo compuesto de indocianina. Además, han proporcionado un método para obtener imágenes de fluorescencia de un órgano distinto al hígado, incluso en administración intravenosa, utilizando la composición de diagnóstico. Además, han proporcionado un método para evaluar la biocinética del nuevo compuesto de indocianina, en relación con un equilibrio horizontal en un cuerpo vivo y un dispositivo para medir la biocinética, y un método y un dispositivo para visualizar la circulación de la sangre, el fluido linfático, la orina u otro fluido en un cuerpo vivo.

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier asunto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Un primer compuesto de indocianina novedoso de la presente invención es un compuesto en donde una ciclodextrina de cadena de azúcar cíclica está unida covalentemente a un cromóforo verde (una estructura química necesaria para exhibir cerca fluorescencia infrarroja) del ICG. Además, un segundo nuevo compuesto de indocianina de la invención es un nuevo compuesto de indocianina que se caracteriza porque una unidad estructural naftilo que es una unidad estructural hidrófoba de una estructura de indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina para cubrir una unidad estructural naftilo que es una unidad estructural hidrófoba con un grupo de glucosa hidrófila, hidratando de este modo tridimensionalmente muchas regiones de la estructura de la molécula de indocianina. El ICG se caracteriza por tener una propiedad tipo tensioactivo en la que tiene tanto unidades estructurales hidrófobas como propiedades hidrófilas causadas por grupos sulfonilo; mientras que, el compuesto de la invención se caracteriza por no tener propiedades de tipo tensioactivo porque las unidades estructurales hidrófobas en su molécula están cubiertas con las ciclodextrinas. Más detalladamente, las presentes invenciones son:

<1> Un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la siguiente fórmula química 11 o un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina en el cual al menos una parte de un grupo naftilo de una indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina, representada por la siguiente fórmula química 12:

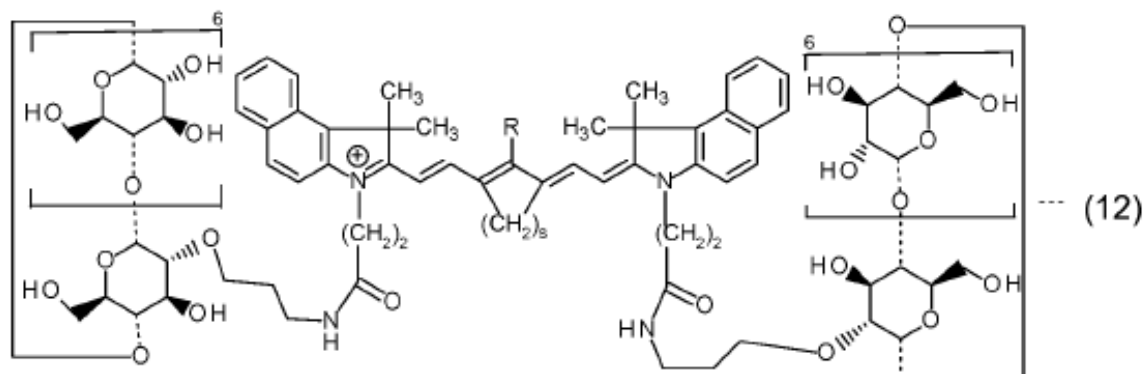
[Fórmula Química 11]



en donde s es un número entero de 0 o más y 4 o menos; y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo formilo, un grupo sulfonilo, un grupo ácido sulfónico, un grupo alquilocarbonilo, un grupo arilocarbonilo, un grupo alquilcarbonilo, un grupo arilcarbonilo o un anillo heterocíclico;

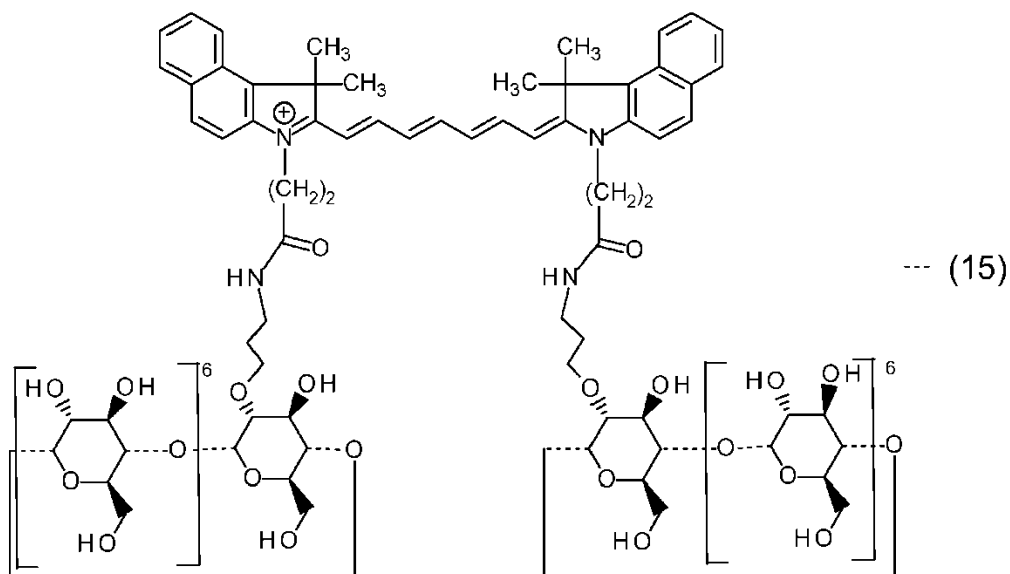
5

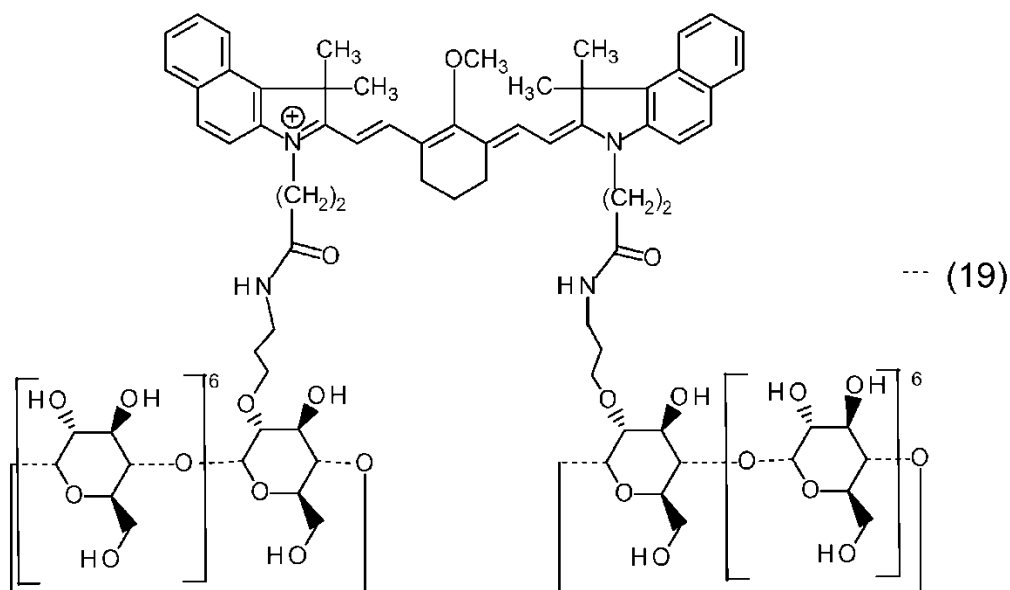
[Fórmula Química 12]



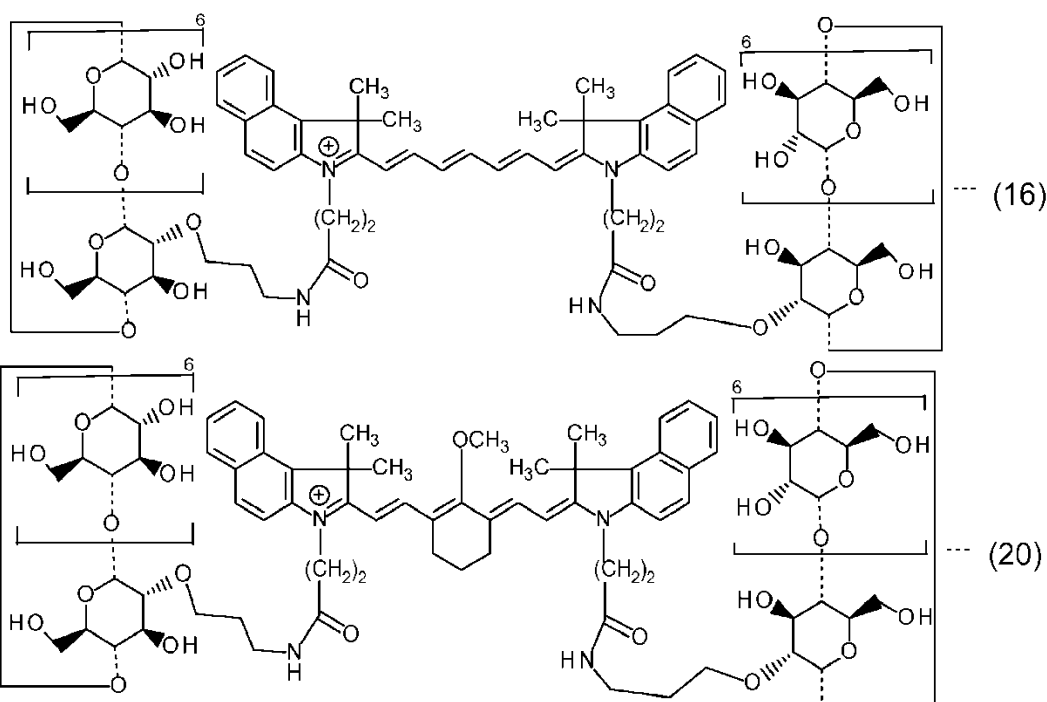
10 en donde s es un número entero de 0 o más y 4 o menos; y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo formilo, un grupo sulfonilo, un grupo ácido sulfónico, un grupo alquilocarbonilo, un grupo arilocarbonilo, un grupo alquilcarbonilo, un grupo arilcarbonilo o un anillo heterocíclico.

15 <2> El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina según el ítem <1>, que es un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la siguiente fórmula química 15 o 19:





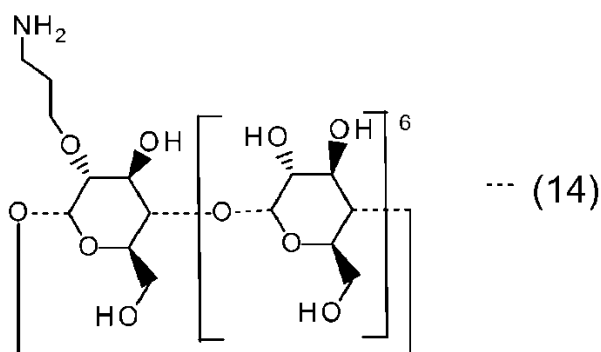
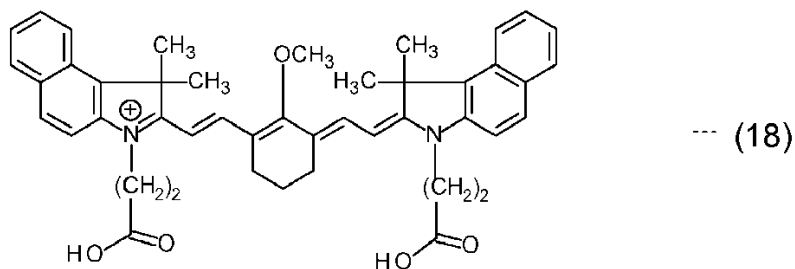
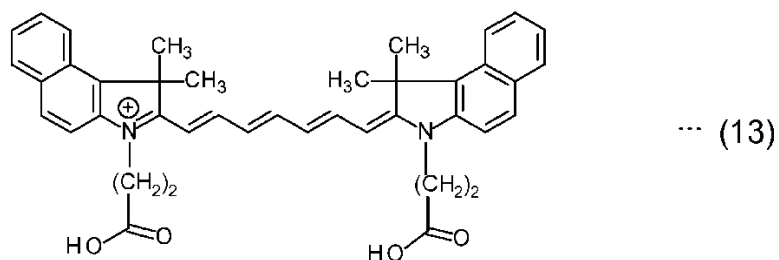
o que es un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina en el cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina, representada por la siguiente fórmula química 16 o 20:



<3> El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina según el ítem <2>, que está representado por la fórmula química 19 o 20.

<4> El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina según el ítem <2>, que está representado por la fórmula química 15 o 16.

<5> Un método de síntesis química del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la fórmula química 15 o 19 de acuerdo con el ítem <2>, que incluye: (1) una etapa de mezclar un compuesto de ácido indocianincarboxílico representado por la siguiente fórmula 13 o 18 con una aminociclodextrina representada por la siguiente fórmula 14 en un medio, y (2) una etapa de una reacción de deshidratación-condensación de la mezcla mediante la adición de un agente de deshidratación-condensación al mismo:



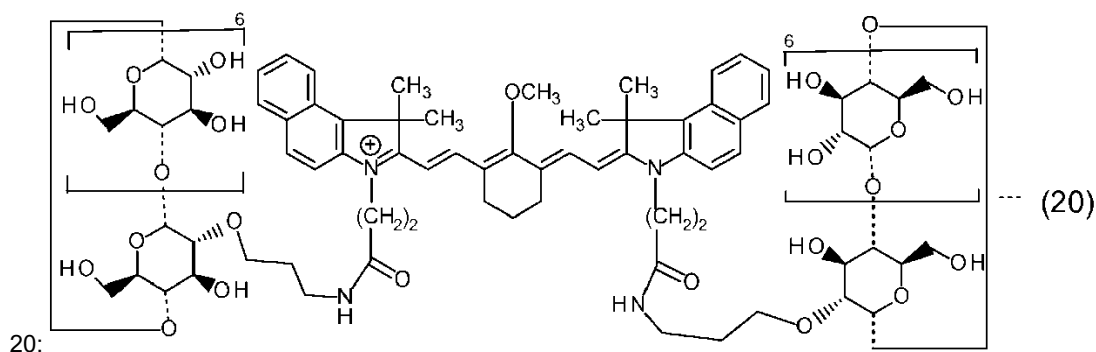
<6> Un método de síntesis química del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la fórmula química 16 o 20 según el ítem <2>, que incluye un paso para someter el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la fórmula química 15 o 19 a una reacción de inclusión en agua.

<7> Un método de purificación del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con uno cualquiera de los puntos <1> a <4>, que incluye una etapa de purificación del compuesto mediante una cromatografía en columna eluyendo con un medio que incluye HCl.

<8> Una composición de diagnóstico que es una solución acuosa que incluye el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con uno cualquiera de los ítems <1> a <4>, y se usa infundiéndolo en un cuerpo.

<9> La composición de diagnóstico según el ítem <8>, que no incluye sustancialmente yodo.

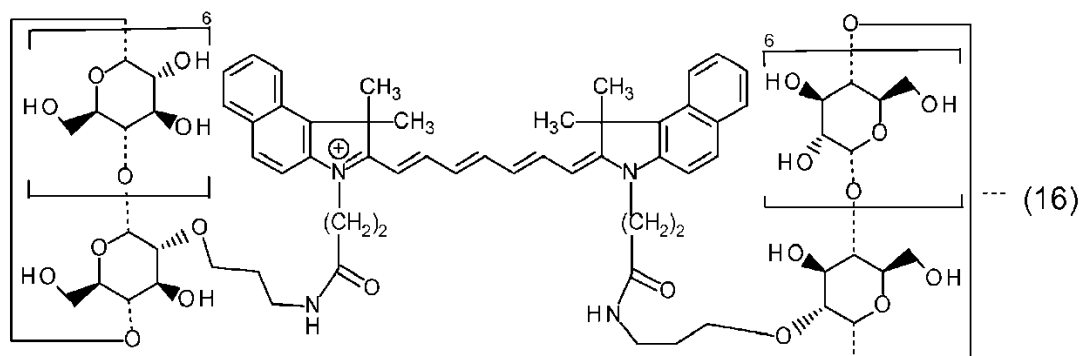
<10> Una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química



en la cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina, y preferiblemente una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 20, que tiene un valor ESI-MS m/z $[M]^+$ correspondiente a una fórmula molecular $C_{135}H_{197}N_4O_{73}$, o

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 20, purificada por el método de purificación de acuerdo con el ítem <7>.

<11> Una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16:



en la cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina, y preferiblemente una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16, que tiene un valor ESI-MS m/z $[M]^+$ correspondiente a una fórmula molecular $C_{131}H_{191}N_4O_{72}$, o

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16, purificada por el método de purificación de acuerdo con el ítem <7>.

<12> Una composición que comprende la indocianina unida a ciclodextrina sólida de acuerdo con uno cualquiera de los ítems <10> y <11>.

<13>. Una composición de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los ítems <8> y <9>

para uso en operaciones médicas o diagnósticos médicos, en los cuales se observa la fluorescencia en el infrarrojo cercano emitida por la administración de la composición de diagnóstico a un cuerpo, o,

para uso en operaciones médicas o diagnóstico médico, en el cual se observa la fluorescencia en el infrarrojo cercano emitida por la administración de la composición de diagnóstico en al menos uno de un vaso sanguíneo, vaso linfático, cerebro, ojo, estómago, mama, esófago, piel, riñón, uréter, vejiga, uretra, pulmón y corazón, o,

para uso en operaciones médicas o diagnósticos médicos, en donde las operaciones médicas o diagnósticos médicos brindan al menos una imagen visual, evaluación de la circulación cerebral, imágenes durante la cirugía cerebral, identificación de un ganglio linfático centinela, evaluación de linfedema, colangiografía intraoperatoria, marcado del tumor, imágenes de la arteria coronaria y una imagen de un vaso sanguíneo abdominal.

<14> La composición diagnóstica según el ítem <13>, en donde la composición diagnóstica se usa para la visualización de una circulación de sangre, líquido linfático, líquido de tejido intersticial u orina.

<15> La composición diagnóstica según el ítem <13>, en donde la composición diagnóstica se usa para imágenes de fluorescencia de riñón, uréter, vejiga o uretra.

Efecto de la invención

Se puede proporcionar un compuesto a partir del compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención que es un pigmento verde y exhibe fluorescencia en el infrarrojo cercano caracterizado porque una solubilidad en agua o solución salina fisiológica es más alta que la de ICG, se puede eliminar fácilmente desde un tejido biológico, una asociación de moléculas es baja en una solución acuosa, una intensidad de fluorescencia en el infrarrojo cercano es alta en una solución acuosa, se pueden realizar imágenes de fluorescencia de otros órganos además del hígado, y no incluye yodo. Además, el método de síntesis del compuesto de indocianina unido a

ciclodextrina de la presente invención puede proporcionar una síntesis útil del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina. Además, el método de purificación del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención puede proporcionar una purificación útil del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina. Además, el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención muestra una solubilidad suficiente incluso si no incluye yodo, y, en consecuencia, puede proporcionar una composición de diagnóstico que no incluya yodo, el cual conduce a la hipersensibilidad al yodo. Esta composición de diagnóstico muestra un comportamiento biológico diferente de una composición de diagnóstico que incluye ICG convencional solo, y por lo tanto puede proporcionar varios dispositivos útiles que utilizan las propiedades.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de las pruebas de adsorción de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 para la piel humana. Muestra un estado inmediatamente después de la aplicación de una solución acuosa 1 mM (0.03 mL) que incluye ICG o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 en un brazo (fotografía de la izquierda), un estado inmediatamente después de lavarlo con agua 5 minutos más tarde (fotografía del medio) y un estado inmediatamente después de frotarlo y lavarlo con agua (fotografía de la derecha), donde un punto en el lado derecho es un marcador con un bolígrafo rojo.

La Figura 2 muestra los resultados de las pruebas de adsorción de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 en una fibra de celulosa. Muestra un estado inmediatamente después de la aplicación de una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 a un hisopo de algodón (una fotografía superior), y un estado inmediatamente después de 5 segundos de lavado con agua corriente después de 3 minutos (una fotografía inferior).

La Figura 3 muestra los resultados de las pruebas de adsorción de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 para un modelo de carne de un cuerpo vivo. Muestra un estado inmediatamente después de la aplicación de una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o el compuesto representado por la fórmula química 20 a una parte de depresión con un diámetro de 5 mm de una carne de lomo de cerdo (fotografía de la izquierda), y un estado inmediatamente después de 10 segundos de lavado con agua corriente después de 3 minutos (fotografía de la derecha).

La Figura 4 muestra los resultados de las pruebas de adsorción de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 a un modelo de proteína de un cuerpo vivo. Muestra un estado inmediatamente después de la aplicación de una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 a una parte de depresión con un diámetro de 5 mm de una carne de pechuga de pollo (fotografía de la izquierda) y un estado inmediatamente después de 10 segundos de lavado con agua corriente después de 3 minutos (fotografía de la derecha).

La Figura 5 muestra los resultados de las pruebas de adsorción de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 en una fibra química hidrófoba. Muestra un estado inmediatamente después de la aplicación de una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 a una máscara de polipropileno (fotografía de la izquierda), y un estado inmediatamente después de un segundo lavado con agua corriente después de 20 minutos (fotografía de la derecha).

La Figura 6 muestra los resultados de las pruebas de asociación de moléculas de ICG y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20. El gráfico a la izquierda muestra los resultados de ICG, y el gráfico de la derecha muestra los resultados del compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración de la intensidad de fluorescencia en la sangre venosa humana de ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20, y el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16.

La Figura 8 es una vista que muestra un estado de observación cuando ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20, o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 se administra a una rata.

La Figura 9 muestra vistas que muestran los estados de fluorescencia en una cavidad abdominal cuando el ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20, o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 se administra a una rata.

5 La Figura 10 muestra las vistas obtenidas administrando una solución acuosa 0.1 mM (0.075 mL) que incluye el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 a una vena caudada de una rata Wistar macho (14 semanas de edad, 300 g), y tomando una imagen del mismo utilizando un sistema de observación infrarrojo cercano PDE fabricado por Hamamatsu Photonics K.K. La de la izquierda es una imagen monocromática a través de luz visible, y a la derecha es una imagen de fluorescencia.

10 La Figura 11 muestra las vistas obtenidas al administrar una solución acuosa 0.1 mM (0.075 mL) que incluye el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 a una vena caudada de una rata Wistar macho (14 semanas de edad, 300 g), y tomar una imagen de la misma utilizando un endoscopio fluorescente en el infrarrojo cercano. La izquierda es una imagen monocroma a través de la luz visible, y la derecha es una imagen de fluorescencia.

15 La Figura 12 muestra vistas de los estados de fluorescencia en una región dorsal del pie cuando se administra ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 se administra a una rata.

20 La Figura 13 es una gráfica que muestra cambios con el tiempo en la intensidad de fluorescencia en una región dorsal del pie cuando ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20, o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 se administra a una rata.

25 La Figura 14 es una gráfica que muestra cambios con el tiempo en la intensidad de fluorescencia en una región dorsal del pie cuando ICG, el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20, o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16 se administra a una rata.

30 La Figura 15 es una ilustración que muestra un procedimiento para observar directamente un vaso sanguíneo de una rata.

35 La Figura 16 es una vista que muestra un área (colgajo de piel de cremáster) observada directamente en un vaso sanguíneo de una rata.

La Figura 17 es una vista que muestra los estados de fluorescencia de un vaso sanguíneo de una rata a la que se administra ICG y tejidos a su alrededor.

40 La Figura 18 es una vista que muestra los estados de fluorescencia de un vaso sanguíneo de una rata a la que se administra el compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 y los tejidos a su alrededor.

45 La Figura 19 es un gráfico que muestra los volúmenes de un pie izquierdo de una rata medidos inmediatamente después de la administración (postinyección) y una semana después de la administración (1 semana después) en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual la administración no se realiza (normal) en grupos de experimentos que utilizan TK1, en donde el eje vertical muestra el volumen (mL).

50 La Figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de las pruebas de Von Frey de un pie izquierdo de una rata medidos inmediatamente después de la administración (postinyección) y una semana después de la administración (1 semana después) en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual la administración no se realiza (normal) en grupos de experimentos que usan TK1, en donde el eje vertical muestra una carga (g) cuando se obtiene una respuesta.

55 La Figura 21 es un gráfico que muestra los cambios en la luminancia de la superficie del pie izquierdo después de inyectar TK1 inmediatamente después de la inyección de carragenina en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual no se realiza la administración (normal), donde el eje vertical muestra una luminancia (unidad arbitraria) y el eje horizontal muestra un tiempo (segundo).

60 La Figura 22 es una gráfica que muestra los cambios en la luminancia de la superficie del pie izquierdo después de inyectar TK1 una semana después de la inyección de carragenina en un grupo en el cual se realiza la administración

de carragenina (edema) y un grupo en el cual no se realiza la administración (normal), donde el eje vertical muestra una luminancia (unidad arbitraria) y el eje horizontal muestra un tiempo (segundo).

La Figura 23 es una gráfica que muestra los volúmenes de un pie izquierdo de una rata medidos inmediatamente después de la administración (después de la inyección) y una semana después de la administración (1 semana después) en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual la administración no se realiza (normal) en grupos de experimentos que usan ICG, en donde el eje vertical muestra un volumen (mL).

La Figura 24 es una gráfica que muestra los resultados de las pruebas de Von Frey de un pie izquierdo de una rata medidos inmediatamente después de la administración (post inyección) y una semana después de la administración (1 semana después) en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual la administración no se realiza (normal) en grupos de experimentos que usan ICG, en donde el eje vertical muestra una carga (g) cuando se obtiene una respuesta.

La Figura 25 es una gráfica que muestra los cambios en la luminancia de la superficie del pie izquierdo después de inyectar ICG inmediatamente después de la inyección de carragenina en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual no se realiza la administración (normal), donde el eje vertical muestra una luminancia (unidad arbitraria) y el eje horizontal muestra un tiempo (segundo).

La Figura 26 es un gráfico que muestra los cambios en la luminancia de la superficie del pie izquierdo después de inyectar ICG una semana después de la inyección de carragenina en un grupo en el cual se realiza la administración de carragenina (edema) y un grupo en el cual no se realiza la administración (normal), donde el eje vertical muestra una luminancia (unidad arbitraria) y el eje horizontal muestra un tiempo (segundo).

Modo de realización de la invención

La composición de diagnóstico de la presente invención se puede usar en el diagnóstico incluso si el yodo no se incluye empleando el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención descrito a continuación como un pigmento. La composición de diagnóstico puede sustituirse por una composición de diagnóstico que incluye un verde de indocianina que se ha utilizado hasta ahora. La aplicación del mismo puede incluir, por ejemplo, fármacos de prueba de función hepática, fármacos de prueba de función circulatoria, y similares. Además, la composición se puede aplicar a operaciones médicas y diagnósticos médicos en los cuales se observa fluorescencia en el infrarrojo cercano emitida por su administración a un cuerpo tal como vaso sanguíneo, vaso linfático, cerebro, ojo, estómago, seno, esófago, piel, riñón, uréter, vejiga, uretra, pulmón, corazón u otra porción. Se considera que el pigmento incluido en la composición de diagnóstico de la invención tiene una baja propiedad de unión a un cuerpo vivo, y puede marcar una unidad estructural necesaria durante un largo tiempo. La composición de diagnóstico puede incluir una sal como agente isotonzante y otros aditivos si es necesario. Se puede emplear una forma en la que los ingredientes se disuelven arbitrariamente, además de una forma que se prepara previamente en el estado de una solución acuosa. Esta composición de diagnóstico puede administrarse por inyección, infusión, aplicación o administración oral.

Esta composición de diagnóstico puede usarse preferiblemente cuando se visualiza una circulación de una solución acuosa tal como sangre, fluido linfático, fluido de tejido intersticial u orina. La visualización de la circulación de la sangre se puede utilizar, por ejemplo, en una determinación de necrosis mediante la evaluación de una circulación periférica, una evaluación del compromiso del tejido después de una revascularización o una operación de trasplante, un diagnóstico de insuficiencia de la circulación sanguínea o similares. Además, es aplicable a una imagen del ojo, una evaluación de una circulación cerebral, una imagen durante una operación en una operación quirúrgica del cerebro, una identificación de un ganglio linfático centinela en un cáncer (un cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel y similares), una evaluación de linfedema, una colangiografía intraoperatoria, una marca de tumor, una imagen coronaria, una imagen de un vaso sanguíneo abdominal (arteria hepática, aorta abdominal, flujo sanguíneo del tracto digestivo, y similares), en estos archivos, la visualización se ha realizado hasta ahora. La composición también permite una imagen de fluorescencia de un riñón y un sistema excretor como el riñón, el uréter, la vejiga o la uretra.

<1. Compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión y síntesis del mismo>

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión de la presente invención incluye la fórmula química 11, y un método de síntesis del mismo puede realizarse haciendo reaccionar un compuesto de indocianina con un compuesto de ciclodextrina en una solución.

Dado que el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión de la presente invención se forma uniendo covalentemente el compuesto de indocianina al compuesto de ciclodextrina a través de un enlace amida, puede usarse un método de síntesis del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión, puede realizarse mediante una reacción de deshidratación-condensación del compuesto de ácido indocianincarboxílico con el compuesto de aminociclodextrina en una solución.

<2. Compuesto de indocianina unida a ciclodextrina tipo inclusión >

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención es un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la fórmula química 12 en donde una indocianina está unida covalentemente a una ciclodextrina de cadena de azúcar cíclica, que se caracteriza porque al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluido en una cavidad de la ciclodextrina.

Para incluir al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina en la cavidad de la ciclodextrina, la presente invención utiliza un espaciador y la indocianina está unida covalentemente a la ciclodextrina de cadena de azúcar cíclica a través del espaciador. En este momento, al controlar la longitud del espaciador, es posible controlar el grado de inclusión del grupo naftilo de la indocianina en la cavidad de la ciclodextrina.

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina que se caracteriza porque la indocianina se une covalentemente a la ciclodextrina de cadena de azúcar cíclica a través del espaciador, y el grupo naftilo de la indocianina se incluye en la cavidad de la ciclodextrina, en consecuencia, es un compuesto de la fórmula química 12.

<3. Síntesis del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina tipo inclusión >

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina tipo inclusión de la presente invención es un compuesto como se describió anteriormente, y el método de síntesis del mismo puede realizarse disolviendo el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina tipo inclusión, que se sintetiza como se indicó anteriormente y se utiliza como un precursor de síntesis, en una solución acuosa. La solución acuosa puede incluir cualquier material siempre que no impida la inclusión, y el contenido de agua no esté particularmente limitado. La temperatura adecuada en la inclusión es de -20°C a 100°C, preferiblemente de 0°C a 50°C. El tiempo requerido para la inclusión es de aproximadamente un mes inmediatamente después de la adición a la solución acuosa. Como se describió anteriormente, está claro que la reacción de inclusión puede tomar varios formatos dependiendo de la propiedad del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión, la temperatura de la reacción de inclusión, la composición o la concentración de la solución acuosa, y similares.

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión de la presente invención se puede convertir en el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo inclusión disolviéndolo en un medio que incluye agua. El contenido de agua en el medio no está particularmente limitado, y es deseable que sea del 50% en peso o más porque cuando el contenido es más alto, la inclusión avanza fácilmente en principio. Si hay un compuesto capaz de formar el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo inclusión en un medio distinto de la solución acuosa, no es necesario realizar la inclusión utilizando la solución acuosa.

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo inclusión se puede formar en la etapa de la síntesis del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión, y en tal caso, la reacción de inclusión no se requiere de nuevo.

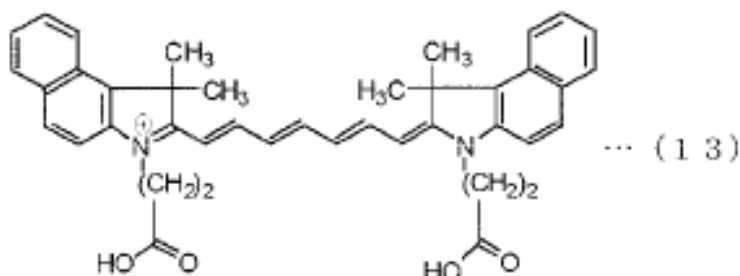
<4. Método de síntesis de indocianina unida a ciclodextrina de tipo no inclusión (Un ejemplo de síntesis)>

Se toma como ejemplo una síntesis del compuesto representado por la fórmula química 11. El compuesto de indocianina representado por la fórmula química 11 se puede obtener, por ejemplo, mezclando el compuesto representado por la fórmula química 13, que se sintetiza en un método descrito en el Documento no Patente 5, el compuesto representado por la fórmula química 14, que se sintetiza en un método descrito en el Documento no Patente 6, un agente de deshidratación-condensación como una carbodiimida soluble en agua (WSC: por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato) o dicitclohexilcarbodiimida (DCC), y un medio tal como piridina, N,N-dimetilformamida o una solución acuosa; y haciendo reaccionar la mezcla a una temperatura de -20°C a 60°C durante 10 minutos a 100 horas. Además, se puede agregar un activador como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) para activar la reacción. La cantidad del agente de deshidratación-condensación es 2 veces o más moles que la del compuesto representado por la fórmula química 13, y la cantidad del medio utilizado no está limitada siempre que los productos de reacción se disuelvan y la reacción de deshidratación-condensación no se vea obstaculizada. El activador no está limitado siempre que active la reacción de deshidratación-condensación, y la

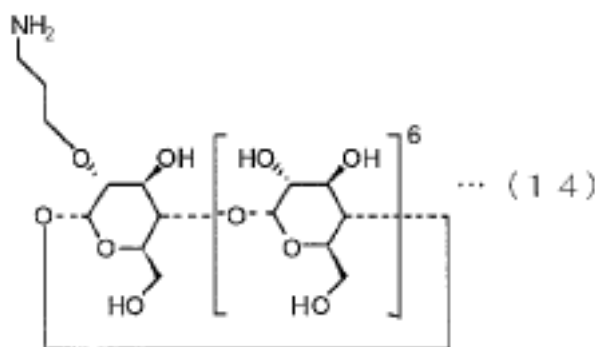
cantidad de adición del mismo no esté limitada mientras la reacción de deshidratación-condensación avance como se espera.

[Fórmula Química 13]

5



[Fórmula Química 14]



10

<5. Método de purificación del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión>

Una mezcla que incluye el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión sintetizado en el método descrito anteriormente se disuelve en una solución acuosa ácida, la solución resultante se aplica a cromatografía en columna de fase reversa, y la elución de la misma se realiza usando, como eluyente, por ejemplo, cualquiera de una solución mixta de agua y metanol que incluye un ácido, una solución mixta de agua y acetonitrilo que incluye un ácido, una solución mixta de agua y etanol que incluye un ácido, y una solución mixta de agua y acetona que incluye un ácido, por lo que el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión puede ser aislado y purificado con una alta pureza. El ácido no está limitado siempre que no descomponga el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión, la elución se puede realizar de manera efectiva y un tratamiento posterior se puede realizar fácilmente después de la elución. Los ejemplos del mismo pueden incluir ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fórmico y similares. Se prefieren ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético y ácido acético, y el ácido clorhídrico es más preferible. La concentración del ácido no está limitada, siempre que no descomponga el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión, la elución se puede realizar de manera efectiva y se puede realizar fácilmente un tratamiento posterior después de la elución. Es preferiblemente de 0.01 mM a 10 mM, más preferiblemente de 0.1 mM a 1 mM. Cuando la concentración se ajusta a este rango, el compuesto deseado no se descompone y se puede eluir rápidamente. El medio se elimina del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no inclusión que se eluye, por lo que se puede obtener en estado sólido. El medio se puede eliminar mediante liofilización.

<6. Método de síntesis (un ejemplo de síntesis) y método de purificación (un ejemplo de purificación) del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina tipo inclusión>

El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de tipo no-inclusión representado por la fórmula química 11 que se ha sintetizado y purificado en los métodos descritos anteriormente es el tipo de no inclusión, por ejemplo, en DMSO, pero se convierte en el compuesto tipo inclusión representado por la fórmula química 12 inmediatamente después de su disolución en agua. Este fenómeno puede ser confirmado por una ^1H RMN.

El compuesto de tipo inclusión, por consiguiente, existe como el compuesto de tipo inclusión en una solución acuosa, y se puede usar como el compuesto de tipo inclusión. Además, cuando se elimina el agua de la solución acuosa que incluye el compuesto de tipo inclusión, es posible obtener el compuesto de tipo inclusión en estado sólido.

<7. Dispositivo para medir la biocinética y dispositivo para visualizar la circulación aplicada al cuerpo vivo en donde se administra la composición de diagnóstico>

- Dispositivo para la medición de la biocinética

El presente dispositivo se completa con base en la característica en la cual el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención, empleado como la composición de diagnóstico de la presente invención (en lo sucesivo, se puede denominar arbitrariamente como el "compuesto de la presente invención"), tiene diferentes biocinéticas, como el grado de transferencia a un tejido intersticial, con respecto a las del ICG.

El compuesto de la presente invención tiene una diferencia con el ICG en la rata metabólica y la velocidad de transferencia desde el sistema circulatorio, como la sangre o el fluido linfático a un tejido intersticial, y la proporción del compuesto de la presente invención que se incorpora al tejido intersticial es relativamente más alta que la del ICG. Cuando se analiza la cinética del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo, por lo tanto, se puede evaluar exactamente un mecanismo del desplazamiento de fluidos corporales en el cuerpo vivo (biocinética). Cuando las condiciones de medición (estado activo de un cuerpo vivo, temperatura ambiente y similares) se hacen lo más estacionarias posible con el uso del presente dispositivo, la biocinética puede medirse con mayor precisión.

Una forma de un desplazamiento anormal de fluido corporal en un cuerpo vivo es la generación de edema. Aquí, según la llamada "hipótesis de Starling", generalmente se considera que un fluido corporal (fluido) en un cuerpo vivo fluye desde una arteria a un tejido intersticial, y luego desde el tejido intersticial a una vena.

Se puede considerar que este desplazamiento de fluido de la arteria a la vena se puede calcular como $(A)-(B)-(C)+(D)$ en donde (A) es un desplazamiento de fluido que fluye hacia el exterior de un sistema circulatorio causado por una diferencia entre la presión arterial y la presión del tejido intersticial, (B) es un desplazamiento de fluido que fluye hacia el interior del sistema circulatorio, causado por una diferencia entre la presión de la vena y la presión del tejido intersticial, (C) es un desplazamiento de fluido que fluye desde un tejido intersticial hacia una arteria causado por una diferencia entre la presión osmótica del fluido del tejido intersticial y la presión osmótica de la sangre arterial, y (D) es un desplazamiento de fluido que fluye desde el tejido intersticial hacia una vena causado por una diferencia entre la presión osmótica del fluido tisular intersticial y la presión osmótica de la sangre venosa.

Cuando la diferencia entre la presión arterial y la presión de la vena se reduce debido a insuficiencia cardíaca, o la presión osmótica del líquido del tejido intersticial disminuye debido a desnutrición, se rompe el equilibrio de los desplazamientos de fluido (A) a (D), dando por lo tanto como resultado la generación de edema. Además, cuando la permeabilidad de un vaso capilar se vuelve anormal (selectividad anormal de la penetración de material) como en la diabetes mellitus, el balance de los desplazamientos de fluido (A) a (D) también se rompe, lo que resulta en la generación de edema. Aquí, ha habido una condición en la que no existe un método simple para evaluar directamente la permeabilidad anormal de un vaso capilar, y por lo tanto, hasta ahora ha sido difícil especificar una causa detallada de la generación de edema, incluso si la generación de edema, que es un fenómeno, puede ser detectada.

Según el hallazgo descrito anteriormente, se puede esperar que la transferencia del compuesto de la presente invención se modifique mediante la reducción de una diferencia entre la presión arterial y la presión de la vena o la reducción de la presión osmótica en una célula, en comparación con un caso en donde se genera edema, cuando la penetración del material se vuelve anormal en la pared de un vaso sanguíneo de un vaso capilar. Cuando se observa la transferencia del compuesto de la presente invención en una cantidad igual o mayor que (o menor que) la correspondiente al desplazamiento del fluido, en consecuencia, se puede determinar la generación de permeabilidad anormal del vaso capilar. Se puede considerar que cuando la permeabilidad del vaso capilar no se vuelve anormal, el cambio de la transferencia del compuesto de la presente invención corresponde a una extensión del desplazamiento del fluido y, por lo tanto, puede distinguirse del caso en donde la pared del vaso sanguíneo se vuelve anormal.

En particular, cuando se emplean dos o más tipos de compuestos de la presente invención que tienen una velocidad de transferencia hacia el tejido intersticial diferente entre sí, y se miden y comparan entre sí las biocinéticas de estos compuestos, el grado de cambio en la permeabilidad del vaso capilar puede ser evaluado; en otras palabras, cuando se emplean dos o más tipos de compuestos de la presente invención que tienen una permeabilidad diferente entre sí

a través de la pared del vaso sanguíneo del vaso capilar, y se miden sus permeabilidades, es posible evaluar más exactamente si la permeabilidad se vuelve anormal o no en la pared del vaso sanguíneo. Esto significa que la causa del cambio en el desplazamiento de fluido puede evaluarse más exactamente empleando dos o más tipos de compuestos de la presente invención que tienen una sensibilidad diferente a la permeabilidad anormal de la pared del vaso sanguíneo entre sí, y midiendo la biocinética de los mismos. Además de la evaluación del desplazamiento de fluido mediante el uso del compuesto de la presente invención, el desplazamiento de fluido se puede medir en un procedimiento habitual.

El dispositivo para medir la biocinética de la presente invención tiene medios de excitación que irradian luz, medios de medición de la intensidad de la fluorescencia, medios de cálculo de la biocinética y otros medios. Los otros medios se seleccionan según la demanda de la ocasión, y un ejemplo de ello es la concentración en un medio de cálculo de cuerpo vivo para calcular una concentración del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina a partir de la intensidad de fluorescencia medida por los medios de medición de intensidad de fluorescencia.

El presente dispositivo es un dispositivo utilizado para medir al menos una parte de un cuerpo vivo en donde se administra la composición de diagnóstico de la presente invención descrita anteriormente. La cantidad de la composición de diagnóstico administrada es una cantidad con la que se puede observar la fluorescencia cuando la luz de excitación es irradiada a la unidad estructural que se va a medir. La cantidad apropiada, en consecuencia, varía dependiendo de la unidad estructural de medición. El tipo de compuesto de la presente invención incluido en la composición de diagnóstico no está particularmente limitado. Los compuestos de la presente invención se pueden usar solos o como una mezcla de dos o más tipos. En el curso de la medición puede administrarse adicionalmente una composición de diagnóstico que tenga la misma o diferente composición.

Los medios de irradiación de luz de excitación son medios para irradiar luz de excitación que tiene una longitud de onda capaz de generar fluorescencia a partir del compuesto de la presente invención incluido en la composición de diagnóstico administrada. La longitud de onda de la luz de excitación irradiada puede restringirse a un rango apropiado. Cuando la longitud de onda se limita a un rango lo más estrecho posible, la fluorescencia puede separarse de la luz de excitación. La longitud de onda se puede restringir seleccionando una fuente de luz capaz de emitir luz que tenga una longitud de onda apropiada, o restringiendo una longitud de onda a través de un filtro.

El modo de irradiación de la luz de excitación no está particularmente limitado siempre que la fluorescencia generada pueda medirse por los medios de medición de intensidad de fluorescencia descritos a continuación. Ejemplo del mismo puede incluir luces de excitación contiguas, luz de excitación pulsátil, luz de excitación cuya intensidad es variable, y similares. Cuando se cambia la intensidad, la intensidad de la luz de excitación se puede modular mediante la irradiación de los impulsos de la luz de excitación en un intervalo predeterminado, y similares. Es deseable modular la intensidad de la luz de excitación empleando la modulación de amplitud de pulso. La luz de excitación se irradia a una unidad estructural para ser irradiada por un sistema óptico apropiado. La unidad estructural que se va a irradiar es una unidad estructural que requiere la medición de la biocinética, por ejemplo, cuando se pretende una evaluación de una unidad estructural en donde se genera un edema, es deseable irradiar directamente la luz de excitación a la unidad estructural donde se genera el edema.

Un intervalo al que se irradia la luz de excitación no está particularmente limitado. El rango de irradiación se determina de acuerdo a la necesidad. Cuando la luz se irradia a un rango estrecho, la biocinética subdividida se puede medir con precisión en el rango estrecho irradiado. Cuando la luz se irradia a un amplio rango, aumenta la cantidad relativa del compuesto de la presente invención que emite la fluorescencia mediante la irradiación de la luz de excitación y, por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia se puede medir con mayor precisión.

Además, es preferible irradiar la luz de excitación por los medios de irradiación de luz de excitación bajo una condición en la que se suprime la influencia de la luz ambiente. Por ejemplo, es preferible irradiar la luz de excitación en un lugar oscuro, o en una condición en la que un área a la que se irradia la luz de excitación se cubre de la luz proveniente desde el exterior.

Los medios de medición de intensidad de fluorescencia son medios para medir una intensidad de la fluorescencia emitida desde una unidad estructural en donde la luz de excitación se irradia mediante los medios de irradiación de luz de excitación. Es preferible medir la luz a partir de la cual se elimina la luz que no sea la fluorescencia (luz ambiente, luz de excitación y similares) a través de un filtro capaz de pasar selectivamente la fluorescencia emitida.

Cuando se emplean medios para irradiar luz de excitación que tiene una intensidad modulada como medios de excitación que irradian luz, un componente que muestra un cambio correspondiente a la modulación puede separarse de la intensidad de luz medida, que puede usarse como la intensidad de fluorescencia. Por ejemplo, cuando la intensidad de la luz de excitación se modula mediante modulación de amplitud de pulso, se desmodula un

componente de la luz que cambia dependiendo de la intensidad del pulso modulado, y se mide su intensidad, separando así la intensidad de fluorescencia. Esto puede reducir la influencia de la luz ambiental en los resultados de medición de la intensidad de fluorescencia.

5 La concentración en un medio de cálculo de cuerpo vivo es un medio para calcular una concentración del compuesto de la presente invención en el cuerpo vivo en base a la intensidad de fluorescencia medida por el medio de medición de intensidad de fluorescencia. La relación entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración del compuesto de la presente invención en el cuerpo vivo puede calcularse en un método apropiado. Por ejemplo, se realiza previamente una curva de calibración, y la concentración del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo
10 puede calcularse basándose en la curva de calibración. También se puede usar el valor absoluto de la intensidad de fluorescencia, ya que es un valor relativo a la concentración del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo. La concentración en un medio de cálculo de cuerpo vivo calcula con el tiempo una concentración del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo.

15 Los medios de cálculo de la biocinética son medios para obtener una rata de tiempo de cambio en la concentración del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo a partir de los datos de las concentraciones en el cuerpo vivo adquiridas con el tiempo por la concentración en un medio de cálculo en un cuerpo vivo. Los medios de cálculo de la biocinética calculan una velocidad de transferencia del compuesto de la presente invención desde el sistema circulatorio al tejido intersticial o desde el tejido intersticial al sistema circulatorio en la parte del cuerpo vivo, a partir
20 de la tasa de cambio del tiempo resultante en la concentración en el cuerpo vivo. La velocidad de transferencia hacia o desde el tejido intersticial también se puede calcular directamente a partir del cambio en la intensidad de fluorescencia obtenida con el tiempo por los medios de medición de intensidad de fluorescencia, sin utilizar las concentraciones en el cuerpo vivo.

25 En este caso, se puede suponer que existe una alta correlación entre la transferencia del compuesto de la presente invención hacia el interior (exterior) del tejido intersticial y el desplazamiento de fluido en el fluido corporal, y por lo tanto un estado de fluido El cambio en una unidad estructural de medición puede evaluarse midiendo las biocinéticas del compuesto de la presente invención. Además, se puede considerar que cuando la pared del vaso sanguíneo se vuelve anormal y la permeabilidad del material no es normal, la cinética del compuesto de la presente invención
30 cambia en un cuerpo vivo. La permeabilidad del vaso sanguíneo, por lo tanto, puede evaluarse mediante la evaluación de la cinética del compuesto de la presente invención.

La rata de tiempo de cambio en la intensidad de fluorescencia (o la concentración en el cuerpo vivo) se puede obtener al diferenciar el cambio con el tiempo en la intensidad de fluorescencia (o la concentración en el cuerpo vivo)
35 con el tiempo, o calculando una intensidad de fluorescencia (una concentración en un cuerpo vivo) por tiempo predeterminado para obtener una diferencia de una intensidad de fluorescencia (o una concentración en un cuerpo vivo) antes del tiempo predeterminado (después del tiempo predeterminado).

Se calcula una velocidad de captación o excreción dentro o fuera del fluido del tejido intersticial del compuesto de la presente invención en una parte del cuerpo vivo, a partir de la rata de tiempo resultante de los cambios en la
40 intensidad de la fluorescencia (o la concentración en el cuerpo vivo). Aquí, la velocidad de captación o excreción dentro o fuera del fluido tisular intersticial se puede obtener como un valor relativo de la intensidad de fluorescencia, y también se puede calcular basándose en la concentración del compuesto de la presente invención en el tejido intersticial y en la cantidad de líquido tisular intersticial, cuando se desea obtenerlo con mayor precisión. Además,
45 cuando se tienen en cuenta la concentración y la cantidad del compuesto de la presente invención en sangre o líquido linfático, se puede realizar un cálculo más preciso. La concentración del compuesto de la presente invención en sangre o similar se puede medir con precisión mediante el muestreo de la sangre.

El método para calcular una concentración en el fluido tisular intersticial se puede ejemplificar mediante los
50 siguientes métodos. Un primer método es un método en donde la concentración del compuesto de la presente invención en el cuerpo vivo calculada se aproxima a la concentración del mismo en el fluido del tejido intersticial en una parte de un cuerpo vivo tal como está. La concentración en el líquido tisular intersticial se puede calcular teniendo en cuenta la cantidad de líquido tisular intersticial como método relevante para el primer método. Un segundo método es un método en donde se mide realmente la concentración del compuesto de la presente
55 invención en sangre, una proporción de la contribución de los materiales en el vaso sanguíneo a un valor medido por los medios de medición de intensidad de fluorescencia, se calcula mediante un método que utiliza otra sustancia estándar que no se transfiere al tejido intersticial (como el ICG), y una concentración en el fluido del tejido intersticial se puede calcular restando la influencia causada por la concentración del compuesto de la presente invención en la sangre realmente medida.

60

La rata de tiempo de cambio en la concentración del compuesto de la presente invención en el fluido del tejido intersticial puede calcularse restando la velocidad de transferencia del tejido intersticial de la velocidad de transferencia al tejido intersticial. Aquí, cuando se supone que la transferencia del compuesto de la presente invención hacia (o fuera de) el tejido intersticial avanza en una velocidad que se correlaciona con la velocidad de desplazamiento del fluido en el fluido corporal y el desplazamiento del fluido alcanza el equilibrio, la velocidad de transferencia al tejido intersticial y la velocidad de transferencia fuera del tejido intersticial pueden considerarse constantes. Por lo tanto, las velocidades de transferencia se pueden calcular a partir del cambio en la concentración del compuesto de la presente invención en la sangre (el cambio causado por el metabolismo, la excreción, la transferencia a los tejidos y similares) y la rata de tiempo de cambio en la concentración en el líquido del tejido intersticial. Incluso si estas velocidades de transferencia varían, las velocidades de transferencia pueden calcularse haciendo un modelo correspondiente al cambio y aplicándolo.

Cuando la velocidad de transferencia calculada está fuera del rango de valores mostrado por una pared de un vaso sanguíneo normal, se puede considerar que la pared del vaso sanguíneo puede volverse anormal. Puede haber un caso en donde se incremente la permeabilidad del compuesto de la presente invención, así como un caso en donde se disminuya como resultado de la anormalidad de la pared del vaso sanguíneo.

Es un hecho bien conocido que el tejido se vuelve agudamente tumescente debido a diversas lesiones tisulares como inflamación aguda, isquemia o trauma, y esta es una reacción tisular muy importante en el entorno médico, independientemente de la región.

Es un ítem relevante para órganos completos, por ejemplo, en una evaluación de la sutura de un intestino durante una operación, una evaluación de un grado de inflamación como la neumonía, una evaluación de compatibilidad en un trasplante de órganos, una evaluación de disfunción cerebral, renal y similares, además del caso en donde la generación de tumescencia se convierte en un problema.

Sin embargo, no hay medios para predecir exactamente una posibilidad o un grado de tumescencia tisular en el momento actual, y solo se predice empíricamente a partir de un grado de lesión tisular. En la mayoría de los casos, en consecuencia, se debe considerar un tratamiento después de que se confirma la generación de tumescencia, lo cual es una gran restricción terapéutica.

Si la posibilidad de tumescencia generada se puede predecir de forma temprana con una alta precisión, un tratamiento para reducir la tumescencia se puede realizar de manera temprana, por lo que la influencia se puede suprimir al mínimo. Por ejemplo, si un grado de edema cerebral, que será causado más adelante, se puede predecir exactamente inmediatamente después del sangrado del cerebro, la influencia puede mantenerse al mínimo al realizar un tratamiento de descompresión o un tratamiento para reducir la permeabilidad de un vaso sanguíneo. De manera similar, si una influencia causada por el estrés por isquemia se puede predecir de antemano, el daño secundario causado por un infarto de miocardio o una lesión de la extremidad se puede mantener al mínimo. Como se indicó anteriormente, una técnica de alta precisión, la predicción cuantitativa de tumescencia, tiene el potencial de proporcionar un impacto considerable en la totalidad de la práctica médica.

La cuantificación de la tumescencia de los tejidos, incluido el edema, hasta la fecha se ha evaluado cualitativamente a partir de su apariencia. La cuantificación se ha intentado, pero solo se puede realizar en condiciones muy limitadas y tiene un defecto en cuanto la evaluación solo se puede realizar después de la generación de la tumescencia.

Para resolver estos problemas, cuando se usa el dispositivo para medir la biocinética de la presente invención, la progresión de la tumescencia se puede predecir calculando una velocidad de desplazamiento del fluido dentro o fuera del tejido intersticial. Como se describe en detalle en los Ejemplos, se sabe que el ICG no se transfiere al tejido intersticial durante la progresión de la tumescencia. Por otro lado, se sabe que el compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención puede transferirse dentro o fuera del tejido intersticial, y la transferencia al tejido intersticial se promueve aún más con el desplazamiento de fluido durante la progresión de la tumescencia. La progresión de la tumescencia, en consecuencia, se puede predecir evaluando la transferencia del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al tejido intersticial.

Como se considera que la velocidad de desplazamiento del fluido dentro o fuera del tejido intersticial ejerce influencia sobre la gran tumescencia que finalmente se forma, la evaluación de la velocidad de transferencia del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención, que es relevante para la velocidad de desplazamiento del fluido, puede conducir a la evaluación de un grado de progresión de tumescencia final. La velocidad de transferencia puede obtenerse calculando una concentración del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina, o puede calcularse utilizando la intensidad de fluorescencia tal como está. La velocidad de transferencia hacia o desde el tejido intersticial se puede calcular como un valor absoluto, por decirlo así, y también

como un valor relativo (por ejemplo, una tasa de cambio en la intensidad de fluorescencia puede adoptarse como un valor relevante para la velocidad de transferencia como es) se calcula y la progresión de la tumescencia se puede predecir de acuerdo con el valor relativo.

El cálculo de la progresión de la tumescencia se realiza de manera deseable en función de una velocidad de transferencia al tejido intersticial en un período normal en donde la tumescencia no avanza. Sin embargo, hay casos en los que la velocidad de transferencia al tejido intersticial no se encuentra en el período normal, y en tales casos, por lo tanto, se selecciona un grupo en el cual la tumescencia no avanza como un grupo de control y la velocidad de transferencia obtenida en ese unidad estructural puede ser utilizada en lugar del mismo. El grado de transferencia del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al tejido intersticial también puede evaluarse evaluando una cantidad de sangre que circula y un grado de metabolismo utilizando ICG que no se transfiere al tejido intersticial.

El grado de transferencia del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al tejido intersticial se mide después de un período de tiempo predeterminado desde la administración de la composición de diagnóstico de la presente invención a un cuerpo vivo. El tiempo predeterminado se refiere al tiempo necesario para la distribución de la composición diagnóstica de la presente invención en sangre. La razón por la que la evaluación se realiza utilizando datos después del curso de tiempo predeterminado es que casi no hay diferencia en el cambio de la intensidad de fluorescencia independientemente de la progresión de la tumescencia, porque la concentración en la sangre se eleva rápidamente sin casi ninguna influencia causada por un grado de progresión de la tumescencia hasta que la composición de diagnóstico se distribuye en la sangre durante el tiempo predeterminado después de la administración de la misma. Una vez que se distribuye en la sangre, la velocidad de transferencia al tejido intersticial cambia según la presencia o ausencia de la progresión de la tumescencia y, por consiguiente, se puede observar un aumento selectivo de la intensidad de fluorescencia en una unidad estructural en donde la transferencia avanza (es decir, una unidad estructural en la que avanza la tumescencia).

Un método concreto para predecir la progresión de la tumescencia puede incluir, por ejemplo, un método en donde se presume un volumen de sangre a partir de un peso corporal o similar, se calculan el tamaño del pico de la intensidad de fluorescencia y el tiempo que alcanza el pico, a partir del volumen de sangre predicho. A partir del tiempo y la intensidad, la intensidad de la fluorescencia se mide en un momento en donde la intensidad cambiará con la generación de edema, y se predice un grado de progresión del edema y un grado de edema que probablemente se generará en el futuro a partir de los resultados obtenidos.

- Dispositivo para visualizar la circulación.

El dispositivo se completa sobre la base del hecho de que el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la invención (en lo sucesivo puede denominarse arbitrariamente como el "compuesto de la presente invención") empleado en la composición de diagnóstico de la invención es diferente de ICG en biocinética tal como un grado de transferencia en un tejido intersticial.

El compuesto de la presente invención se transfiere fácilmente al fluido tisular intersticial y, por lo tanto, es posible visualizar una circulación de sangre o fluido linfático rastreando el comportamiento del compuesto de la presente invención.

El dispositivo para visualizar la circulación de la presente invención tiene medios de excitación que irradian luz, medios de generación de imágenes de fluorescencia, medios de generación de imágenes morfológicas y medios de visualización. El dispositivo es un dispositivo utilizado para medir al menos una parte del cuerpo vivo al que se administra la composición de diagnóstico de la invención descrita anteriormente. La cantidad de la composición de diagnóstico administrada es una cantidad en la que se puede observar la fluorescencia cuando la luz de excitación se irradia a la unidad estructural que se va a medir. La cantidad apropiada, en consecuencia, varía dependiendo de la unidad estructural de medición. El tipo de compuesto de la presente invención incluido en la composición de diagnóstico no está particularmente limitado. Los compuestos de la presente invención se pueden usar solos o como una mezcla de los dos o más tipos. Una composición de diagnóstico que tenga la misma o diferente composición puede administrarse adicionalmente en el curso de la medición.

Los medios de irradiación de luz de excitación son medios para irradiar luz de excitación que tiene una longitud de onda capaz de generar fluorescencia a partir del compuesto de la presente invención incluido en la composición de diagnóstico administrada. La longitud de onda de la luz de excitación irradiada puede restringirse a un rango apropiado. Cuando la longitud de onda se limita a un rango lo más estrecho posible, la fluorescencia puede separarse de la luz de excitación. La longitud de onda se puede restringir seleccionando una fuente de luz capaz de emitir luz que tenga una longitud de onda apropiada, o restringiendo una longitud de onda a través de un filtro.

El modo de irradiación de la luz de excitación no está particularmente limitado siempre que la fluorescencia generada pueda medirse por los medios de generación de imágenes de fluorescencia descritos a continuación. Su ejemplo puede incluir luces de excitación contiguas, luz de excitación pulsátil, luz de excitación cuya intensidad es variable, y similares. Cuando se cambia la intensidad, la intensidad de la luz de excitación se puede modular mediante la irradiación de los impulsos de la luz de excitación en un intervalo predeterminado, y similares. Es deseable modular la intensidad de la luz de excitación empleando la modulación de amplitud de pulso.

La luz de excitación se irradia a una unidad estructural que va a ser irradiada por un sistema óptico apropiado. La unidad estructural que se va a irradiar es una unidad estructural en donde se requiere la visualización de la circulación en un cuerpo vivo, y puede incluir, por ejemplo, una unidad estructural en donde la necrosis del tejido avanza debido a una lesión térmica, congelación, inflamación, herida o infarto, y su periferia. Como la sangre no circula en la unidad estructural en donde el tejido está necrotizado y hay poca ventaja, incluso si esa unidad estructural se deja como está, se piensa su eliminación. En tal caso, es ideal eliminar completamente el área de necrosis entre el área normal y el área de necrosis.

Hasta ahora, la identificación del área de necrosis se ha realizado mediante una angiografía de vasos sanguíneos en la que se administra un agente de contraste, o un método en donde se detecta hipotermia con disminución de la circulación sanguínea. Sin embargo, la angiografía de los vasos sanguíneos tiene un defecto en cuanto no es fácil manejar dispositivos como el dispositivo de irradiación de rayos X, y de acuerdo con el método de evaluación basado en la temperatura corporal, no es fácil obtener una determinación exacta.

El dispositivo de la presente invención se puede usar para una aplicación en la que se realiza una evaluación del área de necrosis y el área normal debido a la presencia o ausencia de circulación de fluido corporal (sangre). Si se puede visualizar una unidad estructural sin circulación, entonces se puede eliminar fácilmente la unidad estructural. Además de la visualización del área de necrosis, es posible evaluar fácilmente la aparición de anomalías en la función circulatoria, ya que la circulación sanguínea se puede observar directamente. Por ejemplo, se puede visualizar una unidad estructural en donde todavía no se produce necrosis, pero se puede reducir la función circulatoria debido a un infarto.

El rango que va a ser irradiado por la luz de excitación se decide de forma que incluya un área que requiere la visualización de la circulación según lo requiera la ocasión.

Además, es preferible irradiar la luz de excitación por los medios de irradiación de luz de excitación bajo una condición en la que se suprime la influencia de la luz ambiente. Por ejemplo, es preferible irradiar la luz de excitación en un lugar oscuro, o en una condición en la que un área a la que se irradia la luz de excitación se cubre de la luz desde el exterior.

Los medios de obtención de imágenes de fluorescencia son medios para adquirir bidimensionalmente una intensidad de fluorescencia emitida por el compuesto de la presente invención que se ha excitado mediante los medios de excitación que irradian luz para obtener datos del estado de distribución del compuesto de la presente invención en un cuerpo vivo es decir, este medio es un medio para adquirir los datos del estado de distribución que muestran la distribución del compuesto de la presente invención en una parte de un cuerpo vivo como datos de imagen bidimensionales.

Puede estar formado, por ejemplo, por una combinación de un sistema óptico apropiado y un dispositivo de captación de imágenes tal como una CCD. La resolución de los datos adquiridos en dos dimensiones se establece en un valor necesario según el propósito. Es preferible medir la intensidad de fluorescencia de la luz a partir de la cual se elimina otra luz distinta de la fluorescencia (luz ambiente, luz de excitación y similares) a través de un filtro capaz de dejar pasar selectivamente la fluorescencia emitida.

Cuando se emplean medios para irradiar luz de excitación que tiene una intensidad modulada como medios de irradiación de luz de excitación, un componente que muestra un cambio correspondiente a la modulación puede separarse de la intensidad de luz medida, que puede usarse como la intensidad de fluorescencia. Por ejemplo, cuando la intensidad de la luz de excitación se modula mediante modulación de amplitud de pulso, se desmodula un componente de la luz que cambia dependiendo de la intensidad del pulso modulado, y se mide su intensidad, separando así la intensidad de fluorescencia. Esto puede reducir la influencia de la luz ambiental en los resultados de medición de la intensidad de fluorescencia.

Los medios de generación de imágenes morfológicas son medios para adquirir bidimensionalmente una intensidad de luz que tiene una longitud de onda diferente a la longitud de onda de la fluorescencia emitida por el compuesto de la presente invención para obtener datos morfológicos de una parte de un cuerpo vivo, es decir, el medio es el medio

de adquirir datos morfológicos que muestran la morfología de la parte del cuerpo vivo como datos de imagen bidimensionales.

Los medios de generación de imágenes morfológicas pueden estar formados por un sistema óptico apropiado y un dispositivo de captación de imágenes, tal como CCD. La resolución de los datos adquiridos en dos dimensiones se establece en un valor necesario según el propósito. En tal caso, se ajusta para que no se detecte la fluorescencia emitida por la luz de excitación (o se reduzca la sensibilidad de detección). Como los medios de imágenes morfológicas, una estructura en la que la mayoría del sistema óptico se usa para estos medios y los medios de imágenes de fluorescencia descritos anteriormente, y la luz que tiene una longitud de onda correspondiente a la fluorescencia se introduce en los medios de imágenes de fluorescencia y las luces que tienen otras longitudes de onda se introducen en los medios de imágenes morfológicas a través de un prisma espectral en una trayectoria óptica antes de que se pueda adoptar la introducción final en el dispositivo de captación de imágenes. El prisma espectral puede controlar adecuadamente la longitud de onda de la luz que se va a separar formando apropiadamente una película dicróica.

Además, se puede usar un dispositivo de generación de imágenes como medio de generación de imágenes de fluorescencia y como medio de generación de imágenes morfológico. La fluorescencia se puede separar matemáticamente de otras luces después de obtener datos de imágenes bidimensionales. Además, los datos del estado de distribución también se pueden obtener como datos de imágenes múltiples de una superficie de una parte de un cuerpo vivo en una dirección de profundidad. Un punto focal en el sistema óptico adoptado en los medios de generación de imágenes de fluorescencia se desplaza en la dirección de profundidad, por lo que se pueden obtener múltiples datos de imágenes bidimensionales en una dirección de profundidad. Además, se adopta un sistema óptico capaz de cambiar la distancia focal como medio de excitación que irradia luz, y el punto focal se desplaza no solo en la superficie de la parte del cuerpo vivo sino también en la dirección de la profundidad, o la luz de excitación ligeramente detenida es irradiada a la parte del cuerpo vivo, por lo que la fluorescencia se puede generar selectivamente no solo en la superficie del cuerpo vivo sino también en el interior en la dirección de la profundidad del cuerpo vivo, y la circulación en esa área puede ser visualizada.

Los medios de visualización son medios para mostrar un estado de distribución del compuesto de la presente invención en una parte de un cuerpo vivo mediante la superposición de los datos de estado de distribución obtenidos por los medios de generación de imágenes de fluorescencia con los datos morfológicos obtenidos por los medios de generación de imágenes morfológicas. Cuando una longitud de onda de fluorescencia no está dentro del rango de luz visible, la longitud de onda de fluorescencia se convierte en una longitud de onda apropiada de luz visible, que se muestra. Es deseable visualizar los datos del estado de distribución en lugar de los datos morfológicos en términos de visualización de la circulación. En particular, un área en la que una cantidad de distribución (es decir, una intensidad de fluorescencia) del compuesto de la presente invención es baja (si es baja o no, se decide de acuerdo con el propósito de visualizar la circulación. Por ejemplo, con el fin de visualizar un área de necrosis, se muestra un área en la cual no se observa la circulación, (es decir, un área en la que no se observa fluorescencia) para que se pueda distinguir de otra área. Por ejemplo, el área se puede mostrar con un color diferente al de otra área, o se puede mostrar con un parpadeo. La superposición de los datos del estado de distribución con los datos morfológicos se puede realizar mediante un programa en un ordenador. Los datos bidimensionales pueden mostrarse utilizando un dispositivo de visualización habitual. Cuando el dispositivo de visualización se coloca entre un cuerpo vivo y un medidor, se puede tratar un cuerpo vivo mientras se observa el dispositivo de visualización.

<8. Definiciones, y similares>

En la presente invención, "grupo alquilo" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 20 átomos de carbono, que puede tener un sustituyente, y ejemplos de los mismos pueden incluir grupos lineales o grupos ramificados que incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo e icosanilo.

En la presente invención, "grupo alcoxilo" puede incluir un grupo alcoxilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, tal como grupos metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, metoxietoxi, metoxipropoxi, etoxietoxi, etoxipropoxi y metoxietoxietoxi.

En la presente invención, "grupo arilo" puede incluir hidrocarburos aromáticos que tienen de 6 a 20 átomos de carbono, tales como fenilo y naftilo.

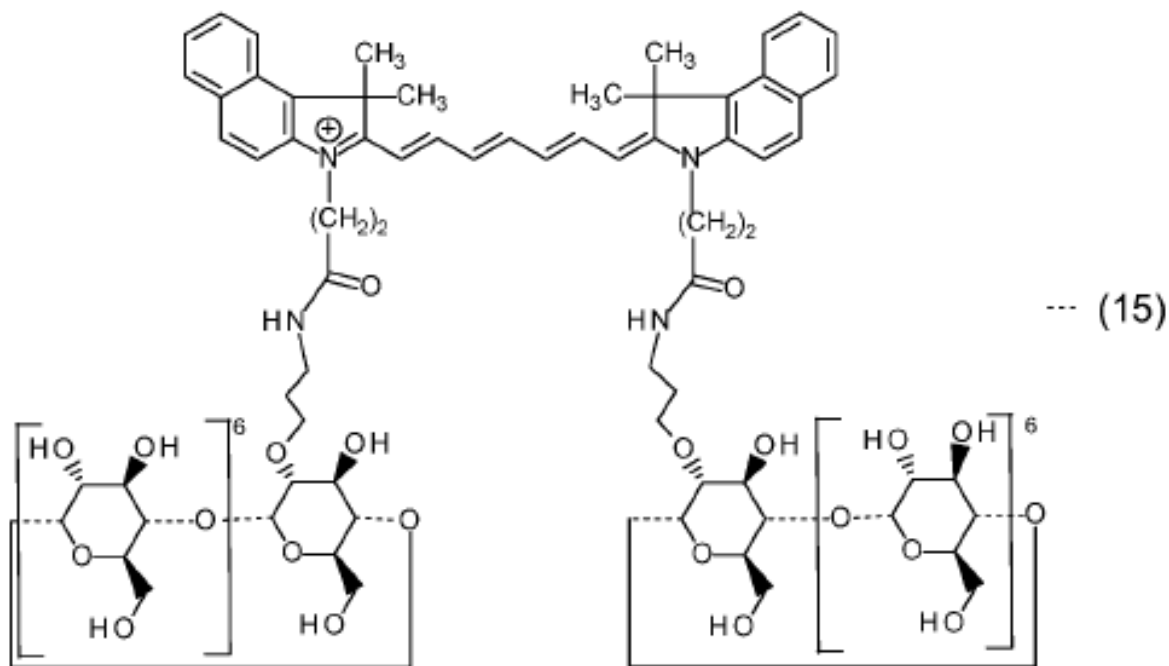
Ejemplo

Las realizaciones preferibles de la presente invención se explicarán específicamente por medio de Ejemplos, pero el alcance técnico de la presente invención no se limita a las realizaciones descritas a continuación, y se pueden llevar a cabo diversas modificaciones de las mismas en el alcance de la presente invención.

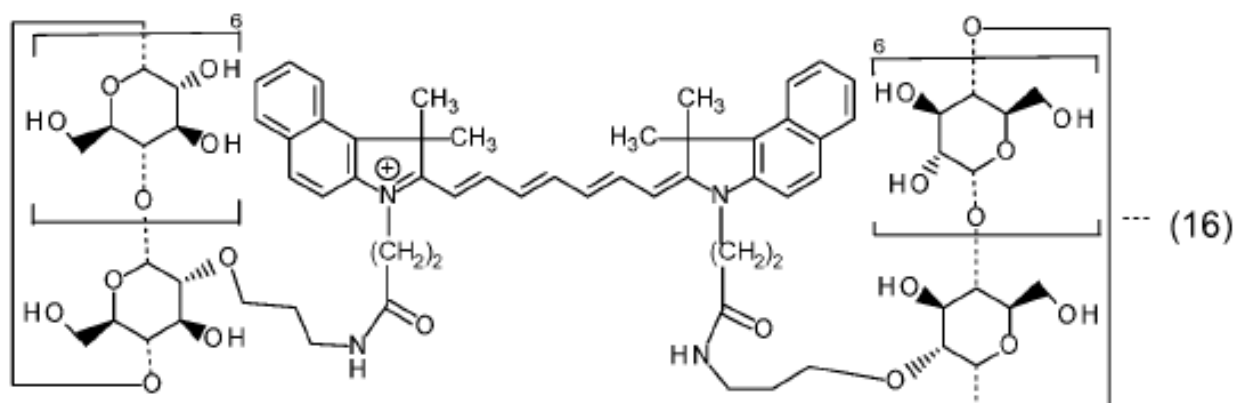
<Prueba 1: Síntesis y purificación de compuestos representados por la fórmula química 15 y la fórmula química 16>

Una mezcla de 0.20 g de compuesto representado por la fórmula química 13, 0.94 g de un compuesto representado por la fórmula química 14, 0.18 g de WSC, 0.12 g de HOBt, 4.0 mL de piridina y 2.0 mL de N,N-dimetilformamida se agitó a 0°C durante 6 horas en un lugar oscuro. A continuación, se añadieron 50 mL de acetona, y se filtró el precipitado a presión reducida. El precipitado se disolvió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1%, y la solución se sometió a cromatografía en columna ODS. Se usó un líquido mixto de agua y metanol que incluía ácido clorhídrico 1 mM, como eluyente, y se eluyó un compuesto representado por la fórmula química 15. El eluato se concentró a presión reducida para obtener 0.65 g de un compuesto verde del tipo inclusión representado por la fórmula química 16, en estado sólido (a la concentración del eluato a presión reducida, el producto se convierte de forma natural en el tipo inclusión, porque el contenido de agua es alto al final de la concentración).

Fórmula Química 15



[Fórmula Química 16]

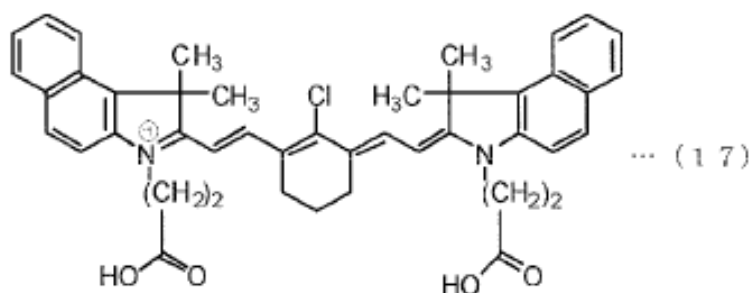


Los datos del análisis mecánico del producto deseado representado por la fórmula química 16 se muestran a continuación. ¹H RMN (500 MHz, D₂O, 26°C, Acetona: 2.10 ppm) 1.43 (2H, m), 1.55 (2H, m), 1.99 (6H, s), 2.09 (6H, s), 2.63 (6H, m), 2.80 (6H, m), 2.92 (2H, m), 3.02 (2H, dd, J=3.7, 9.8 Hz), 3.08 (2H, t, J=9.2 Hz), 3.2-4.1 (m), 4.19 (2H, t, J=9.8 Hz), 4.26 (2H, t, J=9.8 Hz), 4.33 (2H, m), 4.43 (2H, m), 4.71 (2H, d, J=2.4 Hz), 4.81 (4H, d, J=3.7 Hz), 4.91 (2H, d, J=3.7 Hz), 4.99 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.08 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.13 (2H, d, J=3.1 Hz), 6.15 (2H, d, J=13 Hz), 6.52 (2H, t, J=12 Hz), 7.43 (4H, m), 7.57 (1H, d, J=12 Hz), 7.57 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.78 (2H, m), 8.06 (3H, m), 8.15 (2H, d, J=8.5 Hz). ESI-MS m/z calculado para C₁₃₁H₁₉₁N₄O₇₂ 2972, encontrado 2973 [M]⁺.

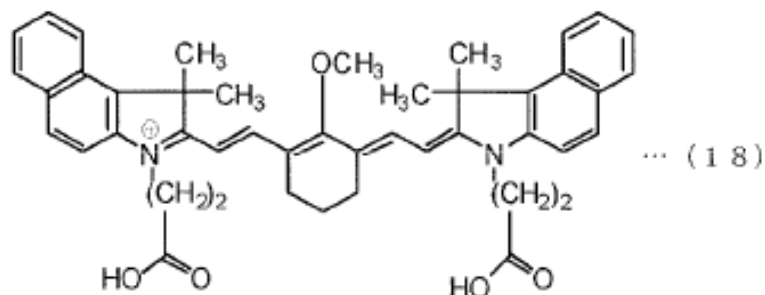
<Prueba 2: Síntesis y purificación de compuestos representados por la fórmula química 19 y la fórmula química 20>

Una mezcla de 0.17 g de un compuesto representado por la fórmula química 17, 5 mL de metanol y 0.30 g de t-BuOK se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, se agregaron 3 mL de ácido clorhídrico 1 M y luego 50 mL de agua. Se filtró un precipitado, se lavó con agua y se secó a presión reducida para obtener 0.17 g de un compuesto representado por la fórmula química 18.

[Fórmula Química 17]



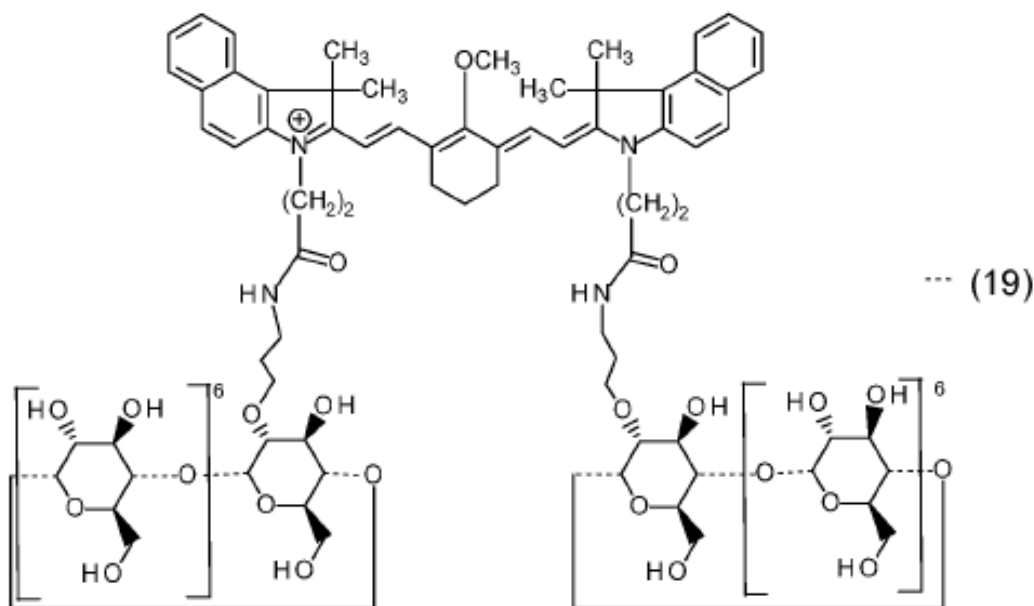
[Fórmula Química 18]



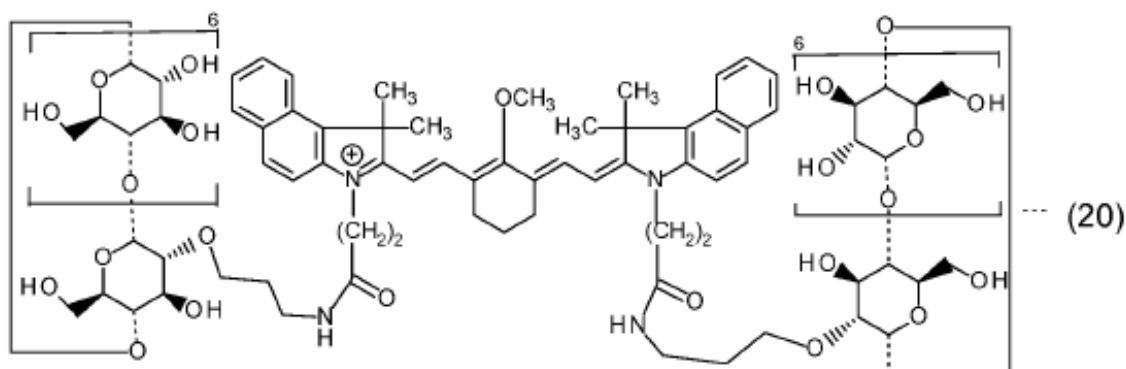
Una mezcla de 0.02 g del compuesto representado por la fórmula química 18, 0.081 g de un compuesto representado por la fórmula química 14, 0.016 g de WSC, 0.011 g de HOBT, 0.3 mL de piridina y 0.2 mL de N,N-

dimetilformamida se agitó a 0°C durante 6 horas en un lugar oscuro. A continuación, se añadieron 5 mL de acetona y se filtró un precipitado a presión reducida. El precipitado se disolvió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1%, y la solución se sometió a una cromatografía en columna ODS. Se usó un líquido mixto de agua y metanol que incluía ácido clorhídrico 1 mM como eluyente, y se eluyó un compuesto representado por la fórmula química 19. El eluato se concentró a presión reducida para obtener 0.045 g de un compuesto verde de tipo inclusión representado por la fórmula química 20 en estado sólido. (En la concentración del eluato a presión reducida, el producto se convierte de forma natural en el tipo inclusión, porque el contenido de agua es alto en el extremo de concentración).

Fórmula Química 19]



[Fórmula Química 20]



Los datos del análisis mecánico del producto deseado representado por la fórmula química 20 se muestran a continuación. ¹H RMN (500 MHz, D₂O, 40°C, Acetona: 2.26 ppm) 1.54 (2H, m), 1.68 (2H, m), 1.98 (2H, m), 2.19 (6H, s), 2.20 (2H, m), 2.30 (6H, s), 2.6-2.85 (10H, m), 2.95 (2H, m), 3.00 (4H, m), 3.08 (2H, t, J=12 Hz), 3.17 (2H, dd, J=3.7, 9.8 Hz), 3.26 (2H, t, J=9.8 Hz), 3.35-4.30 (m), 4.35 (2H, t, J=9.2 Hz), 4.50 (2H, t, J=9.2 Hz), 4.52 (2H, m), 4.63 (2H, m), 4.87 (2H, d, J=3.7 Hz), 4.95 (d, J=3.1 Hz), 4.97 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.08 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.15 (2H, d, J=4.3 Hz), 5.25 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.29 (2H, d, J=3.7 Hz), 6.30 (2H, d, J=14.6 Hz), 7.58 (4H, m), 7.73 (2H, d, J=8.5 Hz), 7.95 (2H, m), 8.25 (2H, m), 8.32 (2H, d, J=14.6 Hz), 8.35 (2H, d, J=8.5 Hz). ESI-MS m/z calculado para C₁₃₅H₁₉₇N₄O₇₃ 3042, encontrado 3042 [M]⁺.

<Prueba 7: Solubilidad del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención>

Se realizaron pruebas de solubilidad de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) en agua o solución salina fisiológica. Fue necesaria una agitación violenta de aproximadamente un minuto para disolver el ICG en polvo de Molecular Probe Inc. en agua o solución salina fisiológica. Por otro lado, la agitación por vibración no fue necesaria para disolver los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular, los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20, y se disolvieron rápidamente.

<Prueba 8: Adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención a la piel humana>

Se realizaron pruebas de adsorción de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina (las fórmulas químicas 16 y 20) de la presente invención a la piel humana. Se colocó una solución acuosa 1 mM (0.03 mL) que incluía ICG o cada uno de los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) en un brazo y se lavó con agua después de 5 minutos, se frotó y luego se lavó con agua. Los resultados fueron que el ICG no se lavó completamente con agua; mientras que, los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20 pudieron lavarse fácilmente. Se demostró que la adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención a la piel humana fue mucho menor que la de ICG (Figura 1).

<Prueba 9: Adsorción del compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención a la fibra de celulosa>

Se realizaron pruebas de adsorción de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) a una fibra de celulosa. Usando un hisopo de algodón (Sanyo Co., Ltd.) como modelo de fibra de celulosa, una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o cada uno de los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se aplicó al modelo y se lavó con agua corriente (agua del grifo, 1 L/minuto) durante 5 segundos después de 3 minutos. Los resultados fueron que el ICG no se lavó completamente con agua; mientras que los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20 pudieron lavarse fácilmente. Se demostró que la adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención a la fibra de celulosa era mucho menor que la de ICG (Figura 2).

<Prueba 10: Adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al modelo de carne del cuerpo vivo>

Se realizaron pruebas de adsorción de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) a un modelo de carne de un cuerpo vivo. Utilizando una carne de lomo de cerdo disponible comercialmente como modelo de carne del cuerpo vivo, se practicó una parte de depresión con un diámetro de 5 mm en la carne de lomo de cerdo y una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o cada una de las ciclodextrinas. Los compuestos de indocianina enlazados de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se aplicaron a la parte de la depresión y se lavaron con agua corriente (agua del grifo, 1 L/minuto) durante 10 segundos después de 3 minutos. Los resultados fueron que el ICG no se lavó completamente con agua; mientras que, los compuestos de indocianina unidos a la ciclodextrina de la presente invención, en particular los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20, pudieron lavarse fácilmente. Se demostró que la adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al modelo de carne del cuerpo vivo fue mucho menor que la de ICG (Figura 3).

<Prueba 11: Adsorción del compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención al modelo de proteína de cuerpo vivo>

Pruebas de adsorción de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) a un modelo de proteína de un cuerpo vivo. Utilizando una carne de pechuga de pollo disponible comercialmente como modelo proteico de cuerpo vivo, se practicó una parte de depresión con un diámetro de 5 mm en la carne de pechuga de pollo y una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o cada una de las ciclodextrinas. Los compuestos de indocianina enlazados de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se aplicaron a la parte de la depresión y se lavaron con agua corriente (agua del grifo, 1 L/minuto) durante 10 segundos después de 3 minutos. Los resultados fueron que el ICG no se lavó completamente con agua; mientras que, los compuestos de indocianina unidos a la ciclodextrina de la presente invención, en particular los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20, pudieron lavarse fácilmente. Se demostró que la

adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención al modelo de proteína de cuerpo vivo era mucho menor que la de ICG (Figura 4).

<Prueba 12: Adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención a fibra química hidrófoba>

Se realizaron pruebas de adsorción de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) a una fibra química hidrófoba. Usando una máscara de polipropileno (Tamagawa-Eizai Co., Ltd.) como modelo de fibra química hidrofóbica, una solución acuosa 1 mM (0.05 mL) que incluye ICG o cada uno de los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se aplicó al modelo y se lavó con agua corriente (agua del grifo, 1 L/minuto) durante un segundo después de dejarlo reposar durante 20 minutos (se dejó reposar durante 20 minutos para eliminar la humedad, porque si la muestra tiene humedad, el compuesto no se adhiere a la máscara). Los resultados fueron que el ICG no se lavó completamente con agua; mientras que, los compuestos de indocianina unidos a la ciclodextrina de la presente invención, en particular los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20, pudieron lavarse fácilmente. Se demostró que la adsorción del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención a la fibra química hidrófoba era mucho menor que la de ICG (Figura 5).

<Prueba 13: Asociación de moléculas de compuesto de indocianina unida a ciclodextrina de la presente Invención en solución acuosa>

Se estudió la asociación de moléculas de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) en una solución acuosa. Cada una de las soluciones acuosas de 0.01 mM, 0.025 mM, 0.05 mM y 0,1 mM que incluyen ICG o el compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención (cada fórmula química 16 y 20) se preparó, se colocó en una celda de cuarzo que tenía una longitud de trayectoria óptica de 1 mm, y se midió el espectro de absorción óptica de 600 nm a 1000 nm a 25°C. Los resultados mostraron que la asociación de moléculas, llamada "agregación H", ocurrió para ICG en este rango de concentración (Fig. 6, gráfico de la izquierda); mientras que la asociación de moléculas, llamada "agregación H", no se produjo para los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular, los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20, en este rango de concentración (Figura 6, gráfica de la derecha).

<Prueba 14: Fluorescencia del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención en solución acuosa>

Se estudió la fluorescencia de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) en una solución acuosa. Una solución acuosa 0.1 μ M que incluye ICG o cada uno de los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se dispuso en una celda de cuarzo cuadrada de 1 cm a 25°C, que se excitó con luz de excitación de 720 nm (paso de banda: 10 nm), y se midió un espectro de fluorescencia (paso de banda: 10 nm). Se calculó una eficiencia de fluorescencia basada en una eficiencia de fluorescencia de ICG, 0.13 (en DMSO, a 25°C). Los resultados fueron que el ICG tuvo una eficiencia cuántica de fluorescencia de 0.021; mientras que los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular, los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20 tuvieron eficiencias cuánticas de fluorescencia de 0.054 y 0.042, respectivamente. Las eficiencias cuánticas de fluorescencia de los mismos fueron respectivamente 2.6 veces y 2 veces más que la de ICG.

<Prueba 15: Fluorescencia del compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención en sangre>

Se estudió la fluorescencia de ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) en sangre. El ICG y los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención (las fórmulas químicas 16 y 20) se disolvieron respectivamente en sangre (humana) en una concentración de 100 μ M. La sangre resultante se colocó en una célula de cuarzo triangular a 25°C, que se excitó con una luz de excitación de 760 nm (paso de banda: 10 nm), y se midió un espectro de fluorescencia superficial (paso de banda: 10 nm). El ICG tenía una intensidad de fluorescencia de 58 (unidad arbitraria) a la longitud de onda de fluorescencia máxima. Los compuestos de indocianina unidos a ciclodextrina de la presente invención, en particular, los compuestos representados por la fórmula química 16 y la fórmula química 20 tenían respectivamente intensidades de fluorescencia de 270 (unidad arbitraria) y 190 (unidad arbitraria), que eran 4.7 veces y 3.3 veces la de ICG. Se podría considerar que esto se debe a que la emisión de luz del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención no se vio obstaculizada en el cuerpo vivo.

<Prueba 16: Comportamiento del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención en un cuerpo vivo>

El comportamiento del compuesto de equilibrio de isomerización (TK1) representado por la fórmula química 19 o 20 o el compuesto de equilibrio de isomerización (TK2) representado por la fórmula química 15 o 16, que eran ejemplos típicos, se evaluó en sangre humana y un cuerpo de rata, que eran cuerpos vivos de interés.

- Comportamiento en fluorescencia en sangre humana

La dependencia de la concentración en la intensidad de fluorescencia de la superficie de ICG, TK1 o TK2 se evaluó en sangre venosa humana en una célula triangular. Específicamente, se colocaron 1.0 mL de sangre venosa humana en una celda de cuarzo triangular, y se agregó ICG, TK1 o TK2 a una concentración determinada. Se irradió luz de excitación de 760 nm (paso de banda: 10 nm) a 25°C y se midió la fluorescencia superficial (paso de banda: 10 nm). Los resultados se muestran en la Figura 7.

Como se desprende de la Figura 7, se encontró que tanto TK1 como TK2 emitían fluorescencia en la sangre venosa humana mediante la irradiación de la luz de excitación.

- Estudio de posibilidad de administración en cuerpo de rata.

Se preparó una solución acuosa que incluía ICG, TK1 o TK2 en una concentración de 1 mM, y se inyectaron 0.1 mL de la solución en la vena femoral expuesta en una rata a la que se había realizado una laparotomía. A continuación, se irradiaron 760 nm de luz de excitación en el abdomen abierto, y se evaluó la presencia o ausencia de fluorescencia.

Como resultado, se observó la fluorescencia de órganos internos en el abdomen abierto. Se observó que TK1 y TK2 estaban altamente acumulados en el riñón (como ya se sabe, el ICG está altamente acumulado en el hígado). No se observaron graves influencias en la rata por la administración, y se confirmó que podían administrarse de forma relativamente segura al cuerpo vivo.

- Observación de distribución en cuerpo de rata.

Después de que una rata macho Wistar (9 semanas de edad, peso corporal de 350 g) se anestesió con éter, se administraron por vía intraperitoneal 0,1 mL de Nembutal usando una aguja 26 G para realizar la anestesia. La base de la cola de la rata se envolvió firmemente con una banda de goma para evitar el flujo de sangre, y la vena caudada se aseguró con una aguja Therflow de 24 G y se aseguró una línea periférica insertando una llave de paso de tres vías y un tubo de extensión. La rata se fijó en un soporte plano en posición supina (Figura 8). Una unidad de cámara PDE fabricada por Hamamatsu Photonics K.K. se fijó a exactamente 16 cm del cuerpo de la rata. Cuando todo el cuerpo fue fotografiado extensamente, la distancia era de 20 cm. El rango de observación fue un rango aproximado mostrado por puntos negros en la Figura 8. A continuación, se administró ICG, TK1 o TK2 en una concentración de 1 mM desde la línea periférica asegurada. La cantidad de administración fue de 0.1 mL. Después de 20 minutos desde la administración, el estado de fluorescencia de la cavidad abdominal que se abrió se muestra en la Figura 9, y el estado de fluorescencia (imágenes a la luminancia máxima) de la región dorsal del pie se muestra en la Figura 12.

La Figura 9 muestra que se acumuló ICG principalmente en el hígado (Figura 9 (a)), y TK1 y TK2 se acumularon principalmente en el riñón (Figura 9 (b) y Figura 9 (C)). La generación de imágenes en el infrarrojo cercano de los órganos internos inmediatamente después de la administración mostró que el riñón, el uréter y la vejiga estaban claramente identificados (Figura 10). Además, también mostró que el endoscopio de infrarrojo cercano puede tomar imágenes del uréter (Figura 11).

Como se desprende de la vista de la imagen 12, el estado en el cual se emitió la fluorescencia de acuerdo con el flujo sanguíneo fue claro en la región dorsal del pie. También se encontró que cuando se administró ICG, TK1 o TK2 como se indicó anteriormente y se observó fluorescencia en un modelo de isquemia de las extremidades inferiores que fue causada por la ligadura de una arteria femoral derecha de una rata, no se observó la fluorescencia en el área de isquemia y, por lo tanto, se encontró que un grado de flujo sanguíneo podía evaluarse en función de la presencia o ausencia de la fluorescencia, aunque no se mostraba en una figura.

Aquí, los cambios con el tiempo en la intensidad de fluorescencia de la región dorsal del pie se muestran en la Figura 13 y en la Figura 14. Además, el tiempo que alcanza el valor máximo de intensidad de fluorescencia (I_{max}), el valor de I_{max} y el tiempo en la cual el valor alcanzó la mitad del valor de I_{max} ($t_{1/2}$) se muestra en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Compuesto	Tiempo para $I_{\max}$	$I_{\max}^*$	$t_{1/2}$
ICG	0.5 min	124	2.3 min
TK-1	10 min	160	40 min
TK-2	15 min	106	55 min

Como se desprende de la Tabla 1, Figura 13 y Figura 14, se encontró que los tiempos necesarios para alcanzar el valor máximo de intensidad de fluorescencia y los tiempos necesarios para reducirlo a la mitad para TK1 y TK2 eran más largos que los de ICG, en otras palabras, podrían emitir la fluorescencia durante mucho tiempo en el cuerpo. Se encontró que, por ejemplo, la intensidad de fluorescencia de ICG se redujo a un valor inicial de la misma en menos de 10 minutos después de la administración; mientras que, TK1 y TK2 mostraron una alta intensidad de fluorescencia incluso después de una hora desde la administración.

• Observación a nivel de vasos sanguíneos

Se administró ICG o TK1 en un estado en el cual un vaso sanguíneo de una rata se expuso directamente y se observó mediante los métodos descritos en los Documentos de Patente No 7 y 8 (Figura 15), y en la Figura 16 se muestra un estado de un colgajo de piel de cremáster después de la exposición. Se administró ICG o TK1 en el estado en el cual se expuso el vaso sanguíneo y se realizó la observación. Como resultado, se observó que el ICG se distribuía de manera desigual en el vaso sanguíneo, en comparación con TK1. Se encontró, por lo tanto, que TK1 se transfirió desde el vaso sanguíneo al fluido del tejido intersticial. Para estudiarlo con mayor precisión, las fotomicrografías del vaso sanguíneo después de la administración se muestran en la Figura 17 (ICG) y en la Figura 18 (TK1). Como se desprende de las Figuras 17 y 18, en comparación con la intensidad de fluorescencia en el vaso sanguíneo y la intensidad de fluorescencia en los tejidos circundantes, apenas se observó fluorescencia en el tejido intersticial para ICG; mientras que se observó fluorescencia en el tejido intersticial para TK1, y el aumento de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo también se observó en el tejido intersticial, aunque no se describe en detalle. Se encontró, por lo tanto, que el ICG apenas se transfiere desde el vaso sanguíneo al fluido del tejido intersticial; mientras que TK1 se transfirió desde el vaso sanguíneo al fluido del tejido intersticial.

• Evaluación de la relación entre el grado de transferencia del compuesto de indocianina unida a ciclodextrina de la presente invención en tejido intersticial y el tamaño del edema formado

(Método de evaluación)

Se seleccionaron ratas (ratas macho, Wister) que tenían 10 semanas de edad y aproximadamente 350 g como animales de prueba ($n = 4$). La rata se anestesió en general con isoflurano y se inyectaron 0.1 mL de λ -carragenina al 0.5% en una almohadilla posterior izquierda con una aguja de 26 G, lo que dio lugar a una rápida generación de edema en el pie. Después de 15 minutos, se midió el volumen del pie izquierdo de la rata utilizando un dispositivo de medición del volumen de la almohadilla de la rata (MK-101 CMP PLETHYSMOMETER fabricado por Muromachi Kikai Co., Ltd.).

A continuación, se suspendió el isoflurano y se confirmó la emergencia de la rata. Después de realizar la prueba de Von Frey, la rata fue anestesiada en general con isoflurano nuevamente. La vena caudada de la rata se aseguró con una aguja Therflow de 24 G, y luego se fijó en un soporte horizontal en posición supina. Se colocó una cámara PDE fabricada por Hamamatsu Photonics K. K. y se fijó a una altura de 16 cm desde el pedis dorsalis de la rata.

Una unidad estructural (ROI) que se iba a medir con la cámara PDE se fijó en una parte central del pedis dorsalis y se apagó la luz. Después de que se inició la medición, se infundieron 0.1 mL de una solución acuosa que incluía 1 mmol de TK1 de una vena caudada y se lavó con 1 mL de solución salina fisiológica durante 5 segundos. Se realizó generación de imágenes continua durante los primeros 5 minutos después de la infusión para medir las luminancias en la ROI. A continuación, se midió la luminancia durante un minuto a intervalos de 5 minutos y la medición se continuó hasta 120 minutos desde la infusión. Una vez finalizada la medición, se suspendió el isoflurano para sacar a la rata de la anestesia y se devolvió a una jaula (experimento de inflamación aguda).

Después de 7 días, se realizó una prueba de Von Frey y luego la rata fue rápidamente anestesiada con isoflurano, y el volumen del pie izquierdo de la rata se midió utilizando el dispositivo de medición del volumen de almohadilla de la rata. La vena caudada de la rata se aseguró con una aguja Therflow de 24 G, y luego se fijó en un soporte horizontal en posición supina. Una cámara PDE fabricada por Hamamatsu Photonics K. K. se fijó a una altura de 16 cm desde

el pedis dorsalis de la rata. Después de establecer la ROI en la parte central del pedis dorsalis y apagar la luz, se inició la medición. Se infundió una solución acuosa que incluía 1 mmol de TK1, 0.1 mL, en una vena caudada, y se lavó con 1 mL de solución salina fisiológica durante 5 segundos. Se realizó una generación de imágenes continua durante los primeros 5 minutos después de la infusión para medir las luminancias en la ROI. A continuación, se midió la luminancia durante un minuto a intervalos de 5 minutos y la medición se continuó hasta 120 minutos desde la infusión. Una vez finalizada la medición, se suspendió el isoflurano para sacar a la rata de la anestesia y se devolvió a la jaula. Un grupo al que no se inyectó λ -carragenina se sometió a la misma prueba.

Los mismos procedimientos anteriores se realizaron para ICG.

(Resultados)

Los resultados se muestran en las Figuras 19 a 26. El volumen del pie izquierdo de la rata en el grupo al que se administró TK1 se muestra en la Figura 19 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es el volumen); los resultados de la prueba de Von Frey se muestran en la Figura 20 (cuanto más bajo es el eje vertical, más alta es la hiperalgesia); el cambio en la luminancia inmediatamente después de la inyección se muestra en la Figura 21 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es la luminancia); y el cambio en la luminancia después de una semana de la inyección de carragenina se muestra en la Figura 23 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es la luminancia). El volumen del pie izquierdo de la rata en el grupo al que se administró ICG se muestra en la Figura 23 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es el volumen); los resultados de la prueba de Von Frey se muestran en la Figura 24 (cuanto más bajo es el eje vertical, más alta es la hiperalgesia); el cambio en la luminancia inmediatamente después de la inyección se muestra en la Figura 25 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es la luminancia); y el cambio en la luminancia después de una semana de la inyección de carragenina se muestra en la Figura 26 (cuanto más alto es el eje vertical, mayor es la luminancia). Los valores en los ejes verticales en todos los gráficos son unidades arbitrarias.

Se observó una gran diferencia entre ICG y TK1 en el patrón de cambio en la luminancia en el ROI. La luminancia se incrementó en poco tiempo después de la administración de ICG, y luego se convirtió rápidamente en disminución y disminuyó a la línea base en aproximadamente 10 minutos. Por otro lado, el TK1 mostró una trayectoria similar a la del ICG en el aumento de la luminancia en el estado inicial después de la administración, pero a continuación, la luminancia se detuvo en un nivel alto, y tardó 6 horas en volver al línea base. A partir de estos resultados, se consideró que el ICG permanecía en el vaso sanguíneo sin fugas al tejido intersticial, y el pasaje en el vaso sanguíneo distribuido en el ROI causó el rápido aumento de la luminancia y la subsiguiente disminución rápida del mismo. Por otra parte, se podría considerar que TK1 reflejó dos fases de una parte en la que se reflejó el paso rápido en el vaso sanguíneo en la primera etapa (en adelante, "fase de vasos sanguíneos") y una fase en la que TK1, que se filtró gradualmente al tejido intersticial a continuación, emitió la fluorescencia (en lo sucesivo denominada "fase del tejido intersticial"). Un tiempo necesario para la transferencia desde la fase del vaso sanguíneo a la fase del tejido intersticial corresponde a un tiempo predeterminado.

En el experimento de inflamación aguda, se observó el notable aumento del volumen del pie de la rata después de la inyección de λ -carragenina en los grupos TK1 e ICG, y el volumen se normalizó al lado del tendón después de una semana (Figuras 19 y 23). En la prueba de Von Frey, se observó una hiperalgesia notable después de la inyección de λ -carragenina en los grupos TK1 e ICG, y la hiperalgesia se normalizó a la del lado del tendón después de una semana (Figuras 20 y 24).

Se observó que en la luminancia del pedis dorsalis, el cambio de luminancia en el grupo TK1 no fue diferente al del grupo de control en la fase de vaso sanguíneo, pero el aumento de luminancia más rápido en el grupo de administración de λ -carragenina fue observado en la fase de tejido intersticial, y se observó que el grupo TK1 mantuvo valores altos durante el tiempo de evaluación (Figura 21). Después de una semana desde la administración de λ -carragenina, en la cual desapareció la inflamación causada por la administración, no se observó una diferencia en el cambio de luminancia entre el lado de administración de carragenina y el lado del tendón en la fase del tejido intersticial (Figura 22). Como se muestra claramente en la gráfica de la Figura 21, el cambio en la luminancia mostró una curva suave en la fase del tejido intersticial, y se encontró que la altura del pico dependía de una tasa de cambio en el aumento de la fase del tejido intersticial; en otras palabras, muestra que un cambio de valores en la fase del tejido intersticial se puede predecir con una alta precisión mediante un análisis de series de tiempo, y muestra motivos importantes para probar nuestra hipótesis de trabajo.

En el grupo de ICG, la diferencia en la luminancia no se observó inmediatamente después de la inyección de λ -carragenina y después de una semana desde la administración (Figura 25 y Figura 26). A partir de este resultado, se descubrió que el ICG, que es altamente hidrofóbico y hasta ahora se ha utilizado clínicamente, no causó la fuga de

la sustancia fluorescente fuera del vaso sanguíneo, incluso si hubo una inflamación aguda severa causada por, por ejemplo, λ -carragenina.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se hizo evidente que cuando la intensidad de fluorescencia de la unidad estructural en la cual se predice la progresión de la tumescencia se mide con el tiempo durante un término correspondiente a la fase del tejido intersticial después de administrar TK1 a un cuerpo vivo, el cambio en la subsiguiente intensidad de fluorescencia se puede predecir, y el cambio en la intensidad de fluorescencia es relevante para la progresión de la tumescencia en esa porción. Por consiguiente, se puede encontrar que se puede usar TK1 en la predicción de tumescencia que no se puede predecir mediante el uso de ICG.

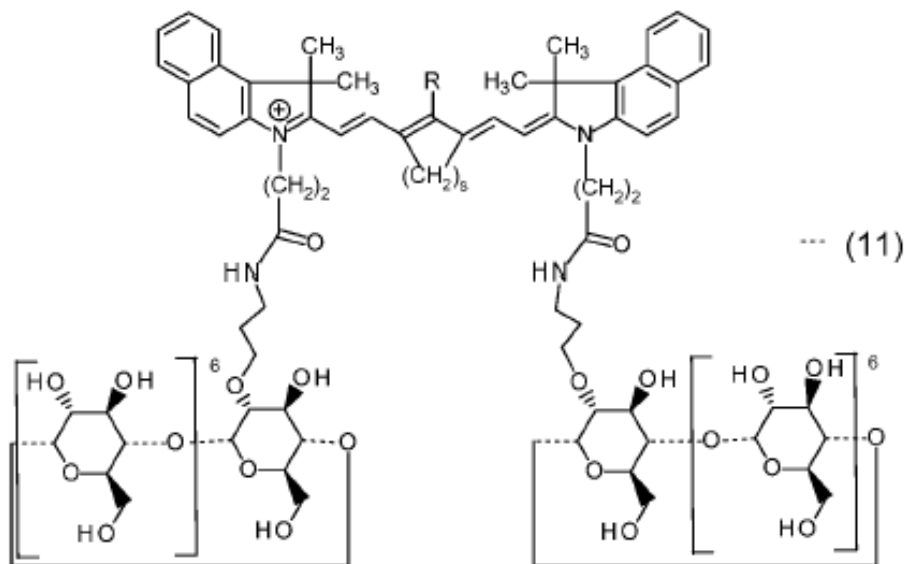
Aplicabilidad industrial

Según el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la fórmula química 11 o la fórmula química 12 de la presente invención, puede proveerse un compuesto que es un pigmento verde y emite fluorescencia en el infrarrojo cercano, que se caracteriza por tener una mayor solubilidad en agua o en solución salina fisiológica, eliminación más fácil de los tejidos biológicos, asociación de moléculas inferiores en una solución acuosa e intensidad de fluorescencia en el infrarrojo cercano más alta en una solución acuosa en comparación con ICG, y sin incluir yodo. También de acuerdo con el método de síntesis del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención, se puede proporcionar una síntesis útil del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina. Además, según el método de purificación del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de la presente invención, se puede proporcionar una purificación útil del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina. Además, el compuesto de indocianina unido a la ciclodextrina de la presente invención puede proporcionar una composición de diagnóstico que no incluya yodo, el cual causa hipersensibilidad al yodo, porque el compuesto muestra una solubilidad suficiente incluso si no se incluye el yodo. La composición de diagnóstico muestra un comportamiento biológico diferente al de una composición de diagnóstico convencional que incluye ICG solo, y por lo tanto, se pueden proporcionar diversos métodos de diagnóstico y dispositivos de diagnóstico útiles utilizando esas propiedades.

REIVINDICACIONES

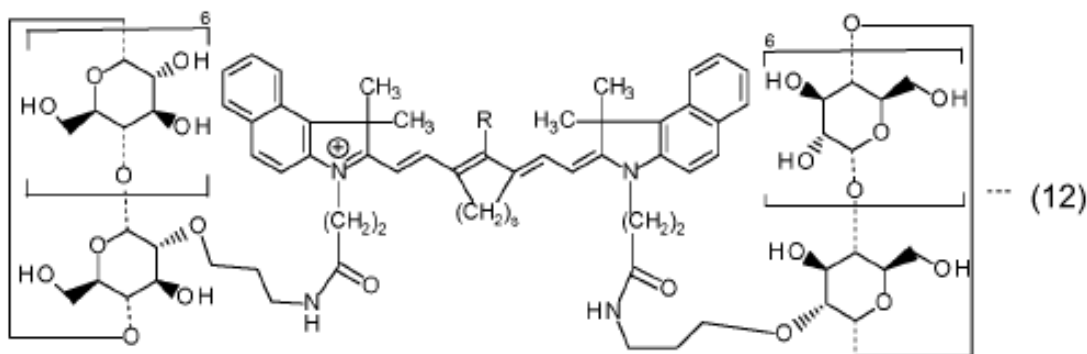
1. Un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la siguiente fórmula química 11 o un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina en el cual al menos una parte de un grupo naftilo de una indocianina está incluido en una cavidad de una ciclodextrina, representada por la siguiente fórmula química 12:

[Fórmula Química 11]



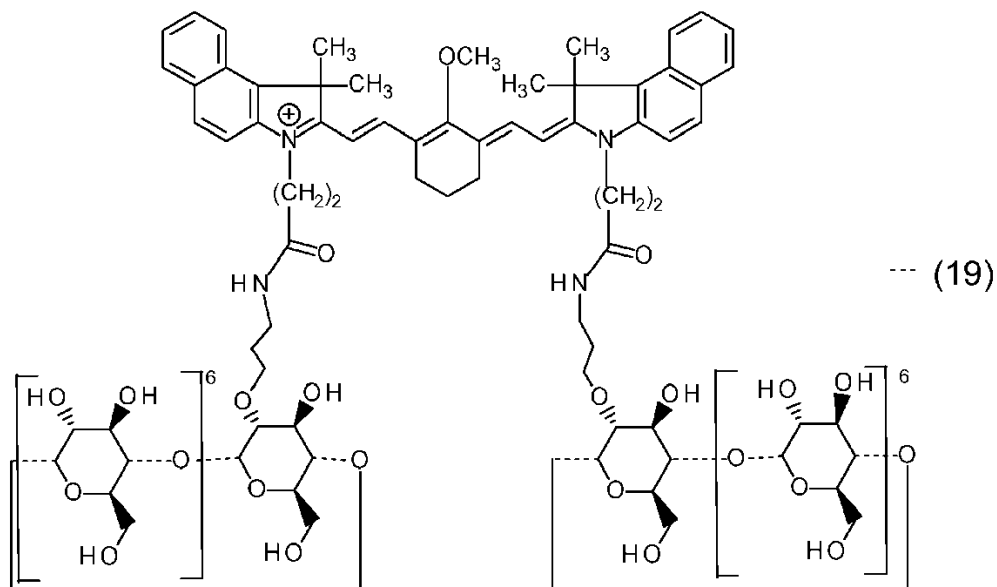
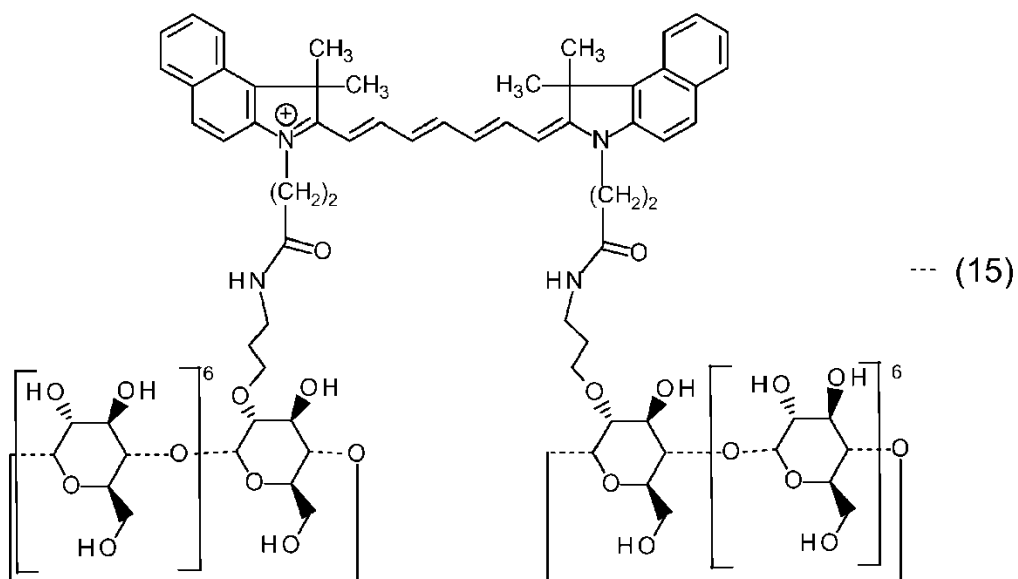
en donde s es un número entero de 0 o más y 4 o menos; y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo formilo, un grupo sulfonilo, un grupo ácido sulfónico, un grupo alquiloxycarbonilo, un grupo ariloxycarbonilo, un grupo alquilcarbonilo, un grupo arilcarbonilo o un anillo heterocíclico;

[Fórmula Química 12]

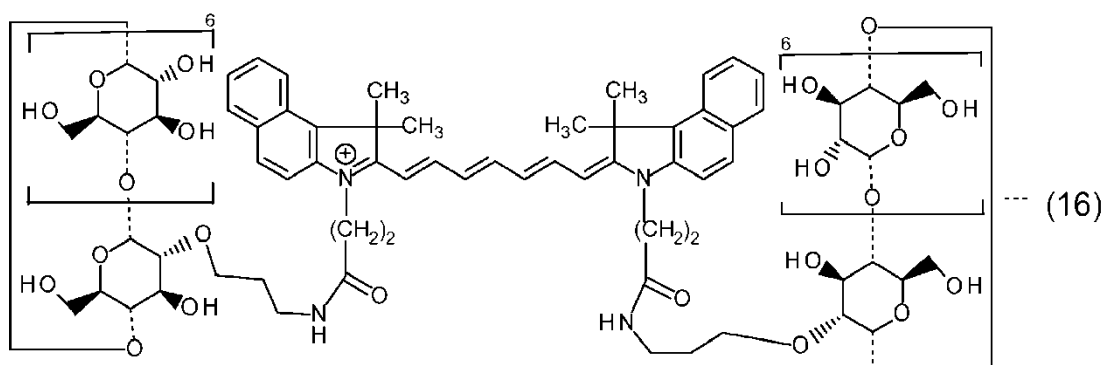


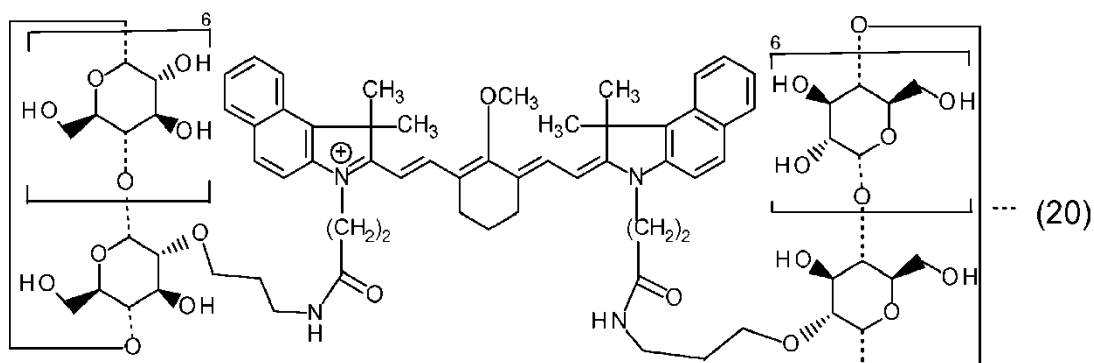
en donde s es un número entero de 0 o más y 4 o menos; y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo formilo, un grupo sulfonilo, un grupo ácido sulfónico, un grupo alquiloxycarbonilo, un grupo ariloxycarbonilo, un grupo alquilcarbonilo, un grupo arilcarbonilo o un anillo heterocíclico.

2. El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina representado por la siguiente fórmula química 15 o 19:



- 5 o que es un compuesto de indocianina unido a ciclodextrina en el cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluida en una cavidad de una ciclodextrina, representada por la siguiente fórmula química 16 o 20:





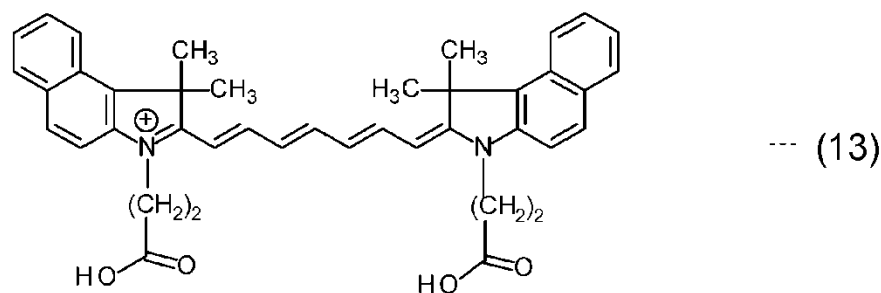
3. El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 2, que está representado por la fórmula química 19 o 20.

5

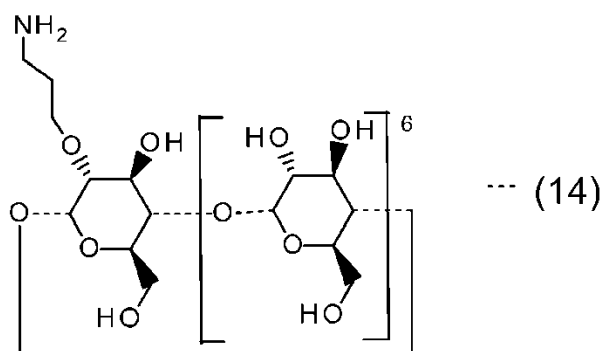
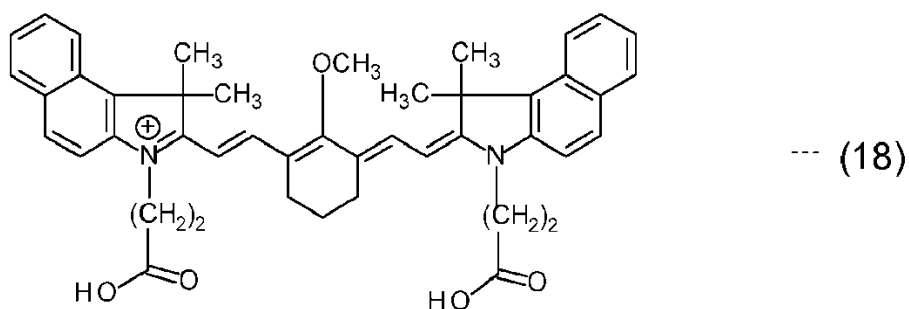
4. El compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 2, que está representado por la fórmula química 15 o 16.

5. Un método de síntesis química del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la fórmula química 15 o 19 de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende: (1) una etapa de mezclar un compuesto de ácido indocianincarboxílico representado por la siguiente fórmula 13 o 18 con una aminociclodextrina representada por la siguiente fórmula 14 en un medio, y (2) una etapa de una reacción de condensación-deshidratación de la mezcla mediante la adición de un agente de condensación-deshidratación al mismo:

10



15



20

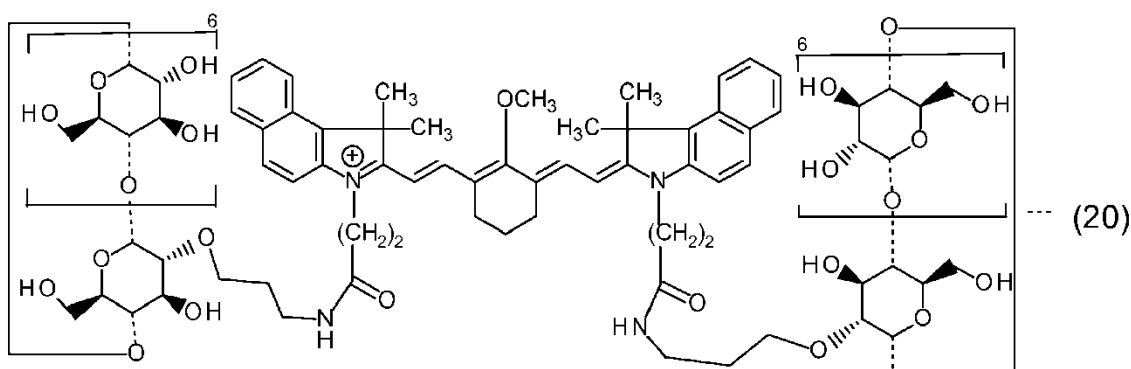
6. Un método de síntesis química del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la fórmula química 16 o 20 de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una etapa de someter el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con la fórmula química 15 o 19 a una reacción de inclusión en agua.

7. Un método de purificación del compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una etapa de purificación del compuesto mediante cromatografía en columna eluyendo con un medio que incluye HCl.

8. Una composición de diagnóstico el cual es una solución acuosa que comprende el compuesto de indocianina unido a ciclodextrina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y se usa infundiéndolo en un cuerpo.

9. La composición de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 8, que no incluye sustancialmente yodo.

10. Una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 20:

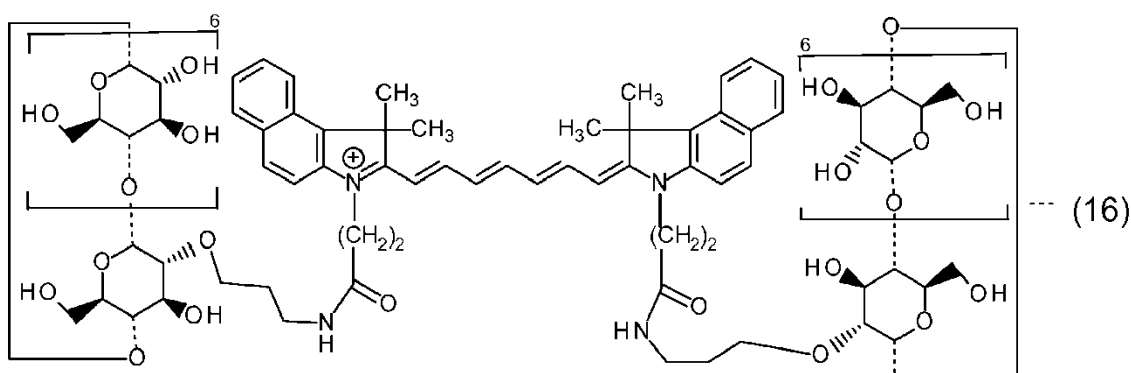


en la cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluida en una cavidad de una ciclodextrina, y preferiblemente

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 20, que tiene un valor ESI-MS m/z $[M]^+$ correspondiente a una fórmula molecular $C_{135}H_{197}N_4O_{73}$, o

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 20, purificada por el método de purificación de acuerdo con la reivindicación 7.

11. Una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16:



en la cual al menos una parte del grupo naftilo de la indocianina está incluida en una cavidad de una ciclodextrina, y preferiblemente

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16, que tiene un valor ESI-MS m/z $[M]^+$ correspondiente a una fórmula molecular $C_{131}H_{191}N_4O_{72}$, o

una indocianina sólida unida a ciclodextrina representada por la fórmula química 16, purificada por el método de purificación de acuerdo con la reivindicación 7.

5 12. Una composición que comprende la indocianina unida a ciclodextrina sólida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.

13. Una composición de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9

10 para uso en operaciones médicas o diagnósticos médicos, en los cuales se observa la fluorescencia en el infrarrojo cercano emitida por la administración de la composición de diagnóstico a un cuerpo, o,

15 para uso en operaciones médicas o diagnóstico médico, en la cual se observa la fluorescencia en el infrarrojo cercano emitida por la administración de la composición de diagnóstico en al menos uno de vaso sanguíneo, vaso linfático, cerebro, ojo, estómago, mama, esófago, piel, riñón, uréter, vejiga, uretra, pulmón y corazón, o

20 para uso en operaciones médicas o diagnósticos médicos, en donde las operaciones médicas o diagnósticos médicos proveen al menos una imagen visual, evaluación de la circulación cerebral, generación de imágenes durante cirugía cerebral, identificación de un ganglio linfático centinela, evaluación de linfedema, colangiografía intraoperatoria, marcación tumoral, imágenes de la arteria coronaria y una imagen de vaso sanguíneo abdominal.

14. La composición de diagnóstico para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la composición de diagnóstico se usa para la visualización de una circulación de sangre, fluido linfático, fluido de tejido intersticial u orina.

25 15. La composición de diagnóstico para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la composición de diagnóstico se usa para la generación de imágenes de fluorescencia de riñón, uréter, vejiga o uretra.

Fig.1



Fig.2

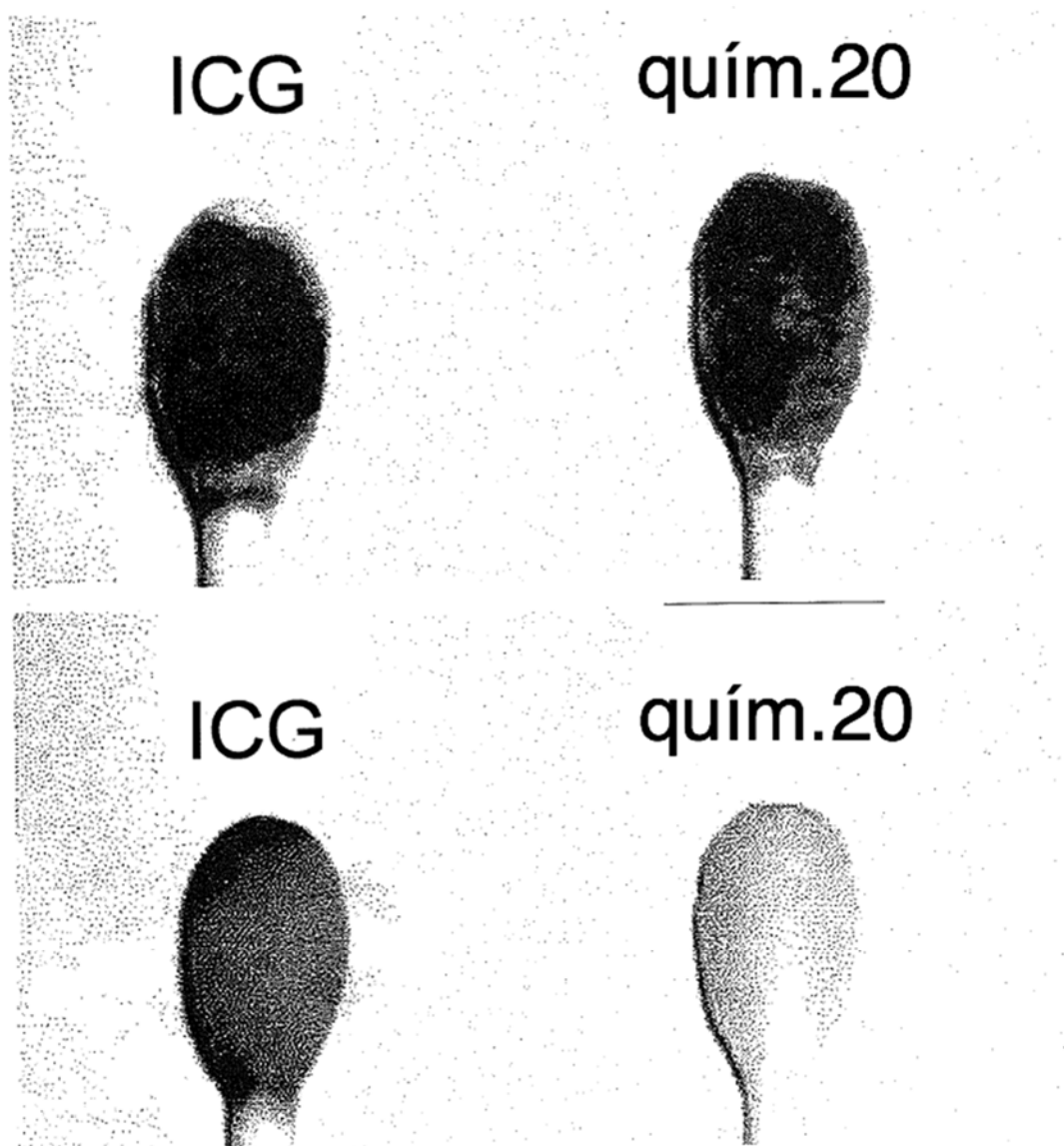


Fig.3

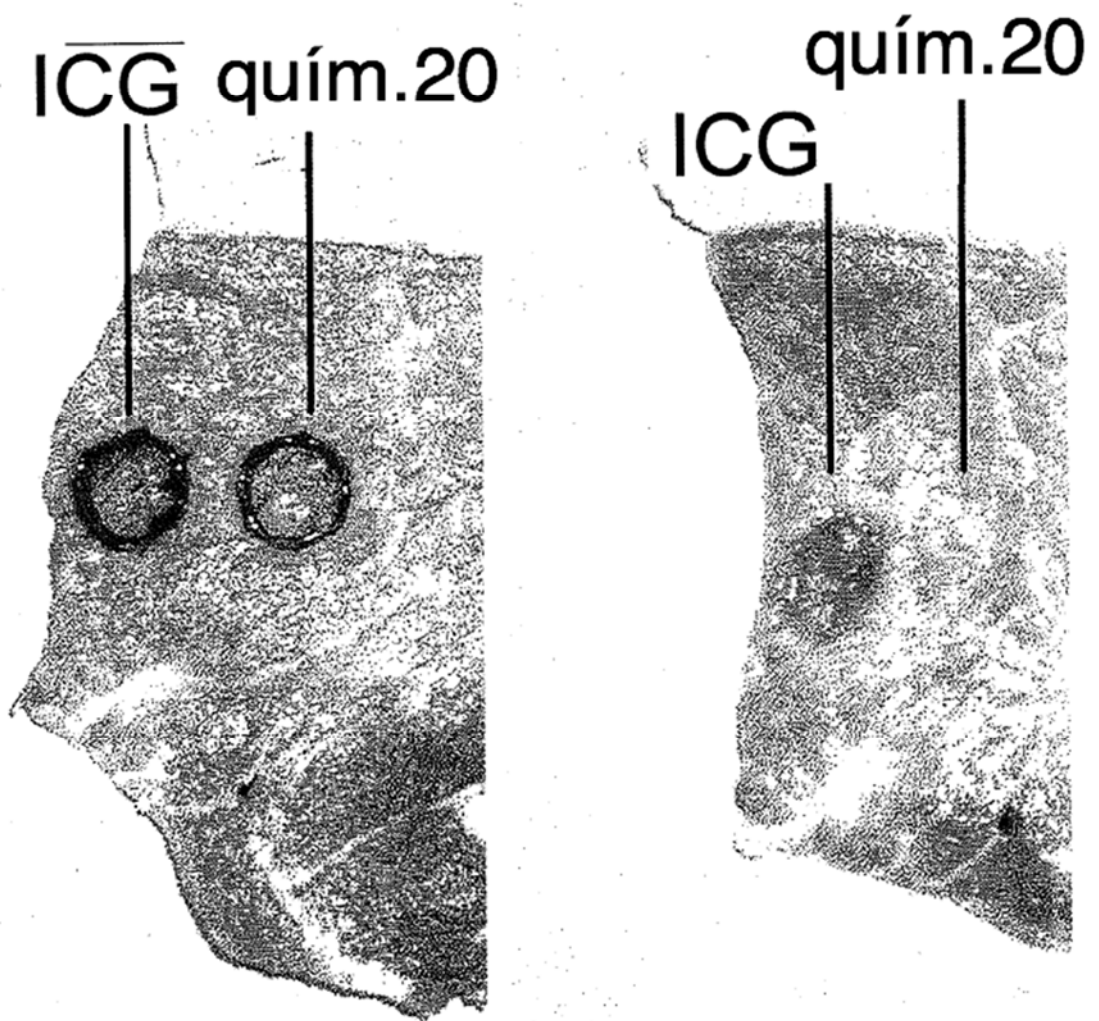


Fig.4

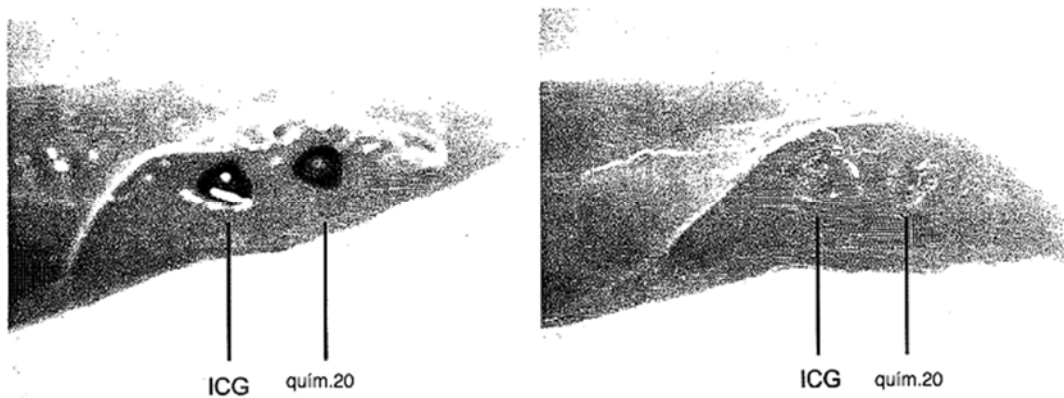


Fig.5

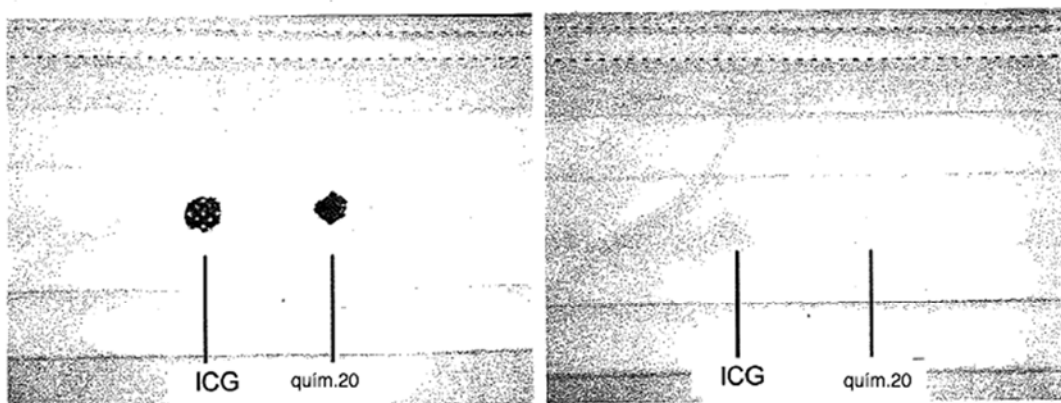


Fig.6

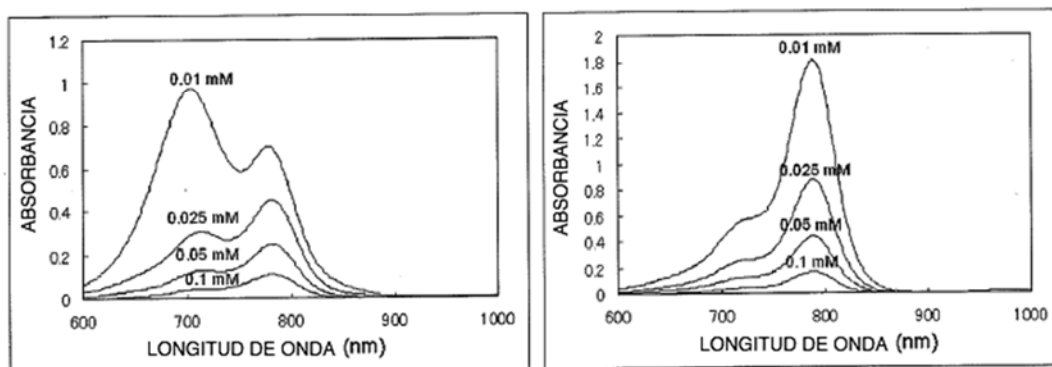


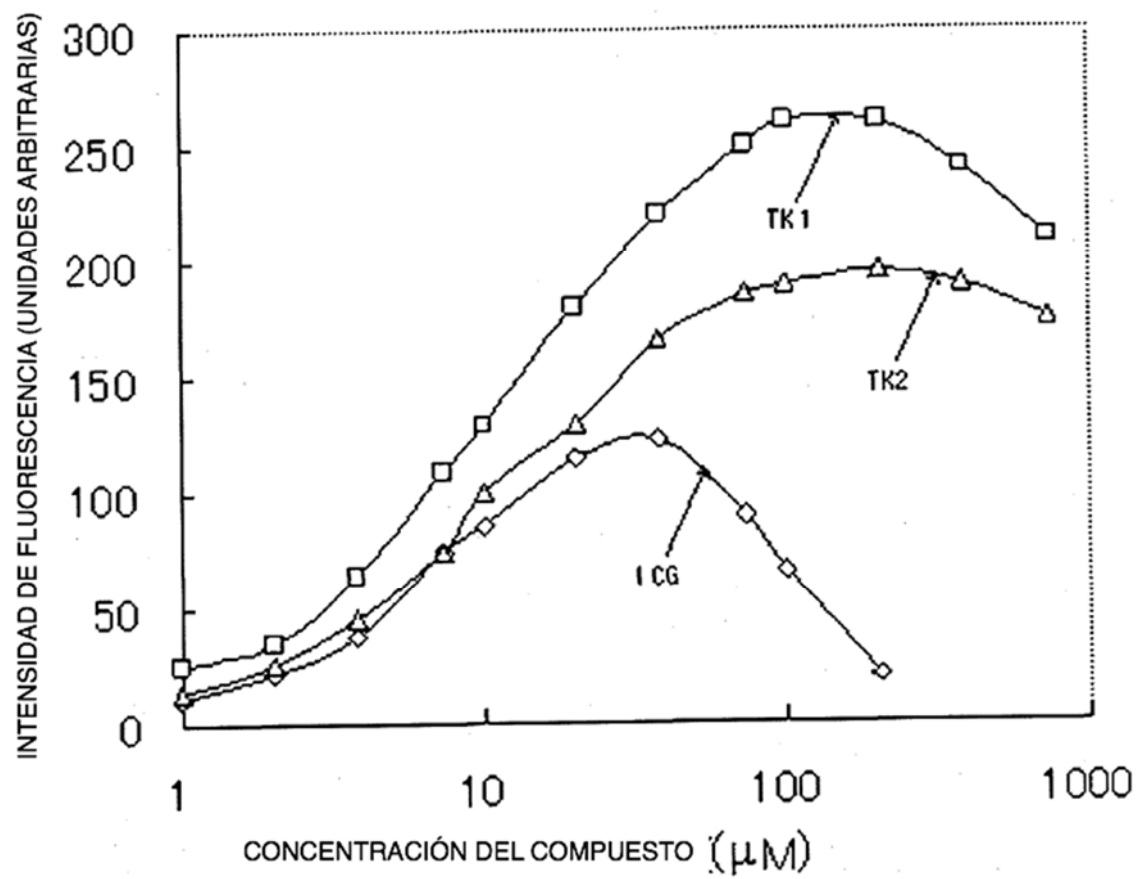
Fig.7

Fig.8

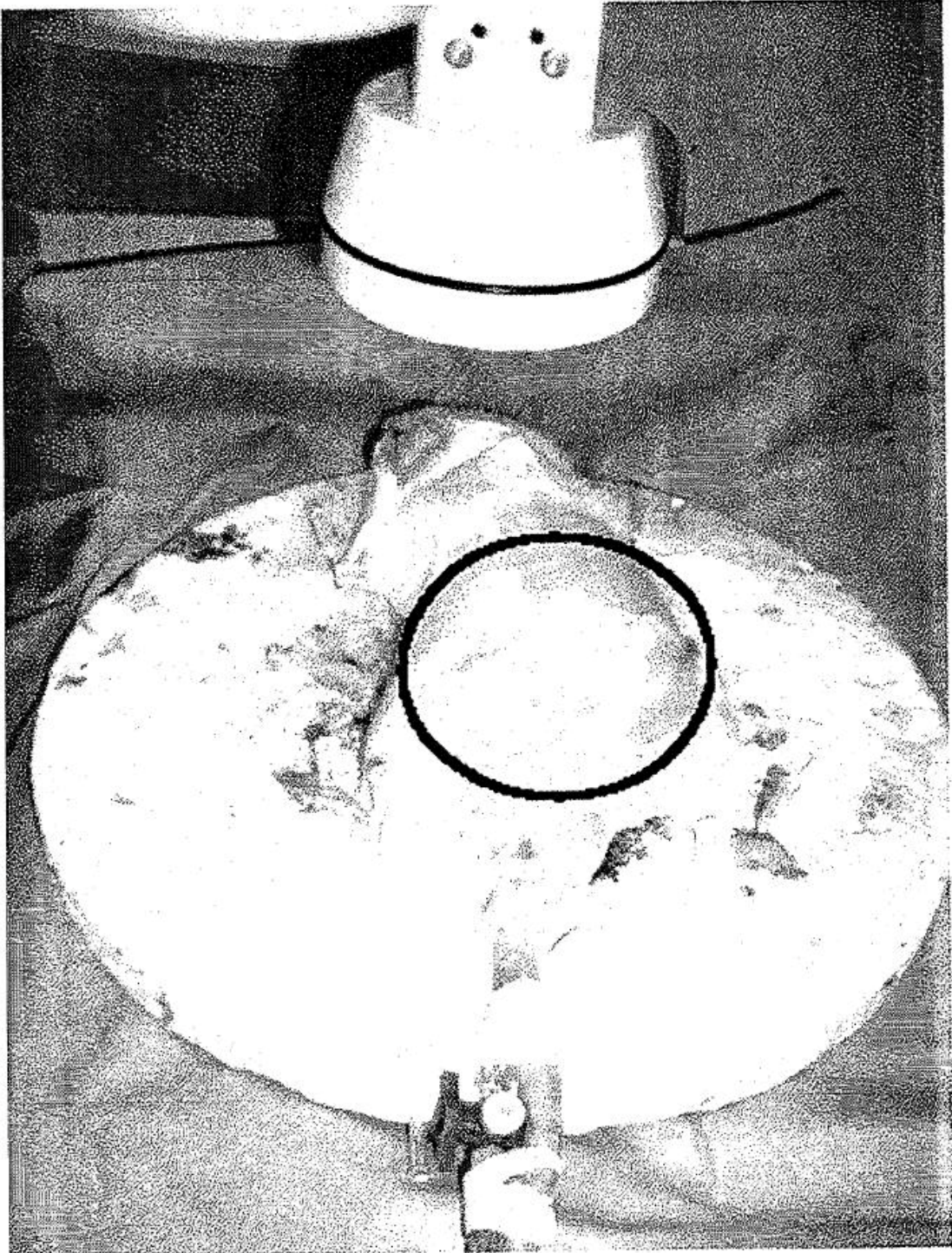


Fig.9



Fig.10

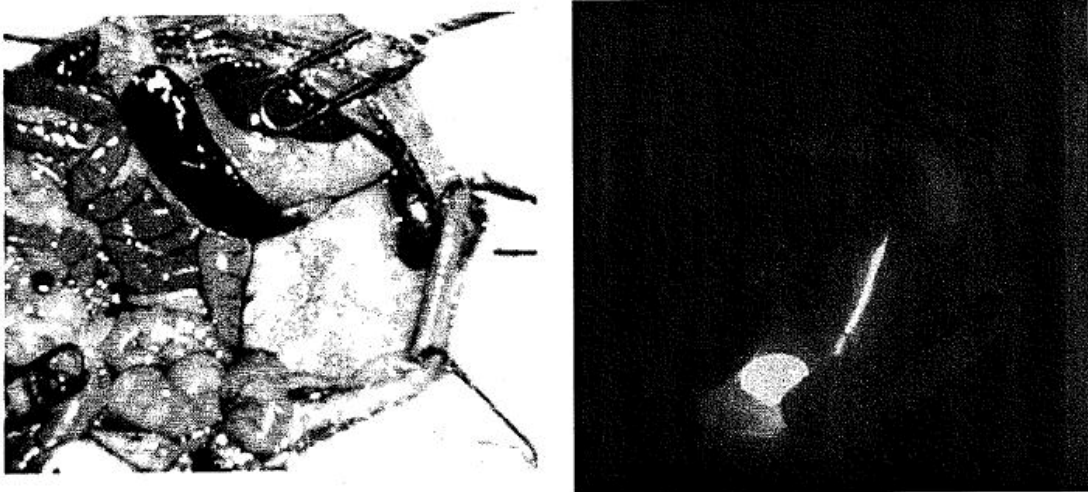


Fig.11

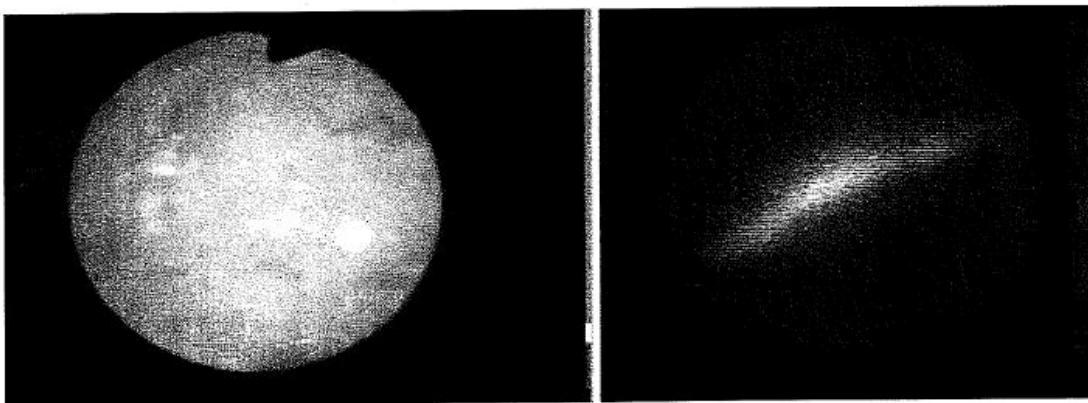


Fig.12

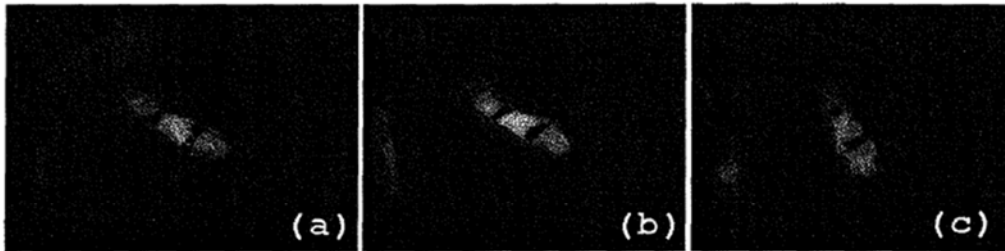


Fig.13

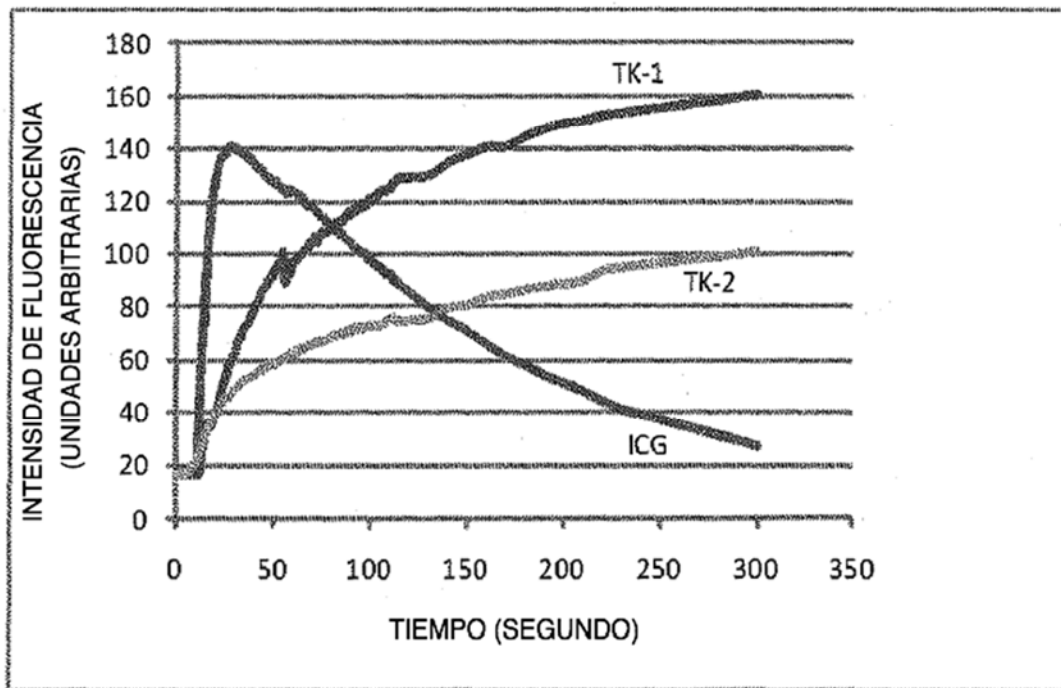


Fig.14

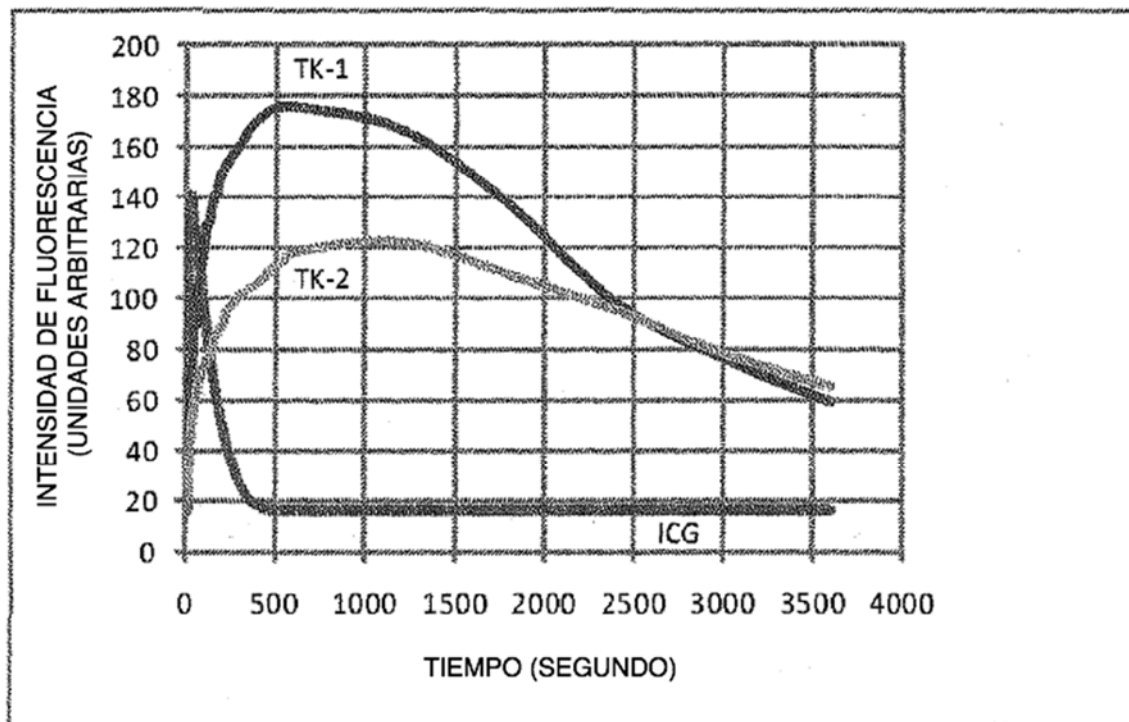


Fig.15

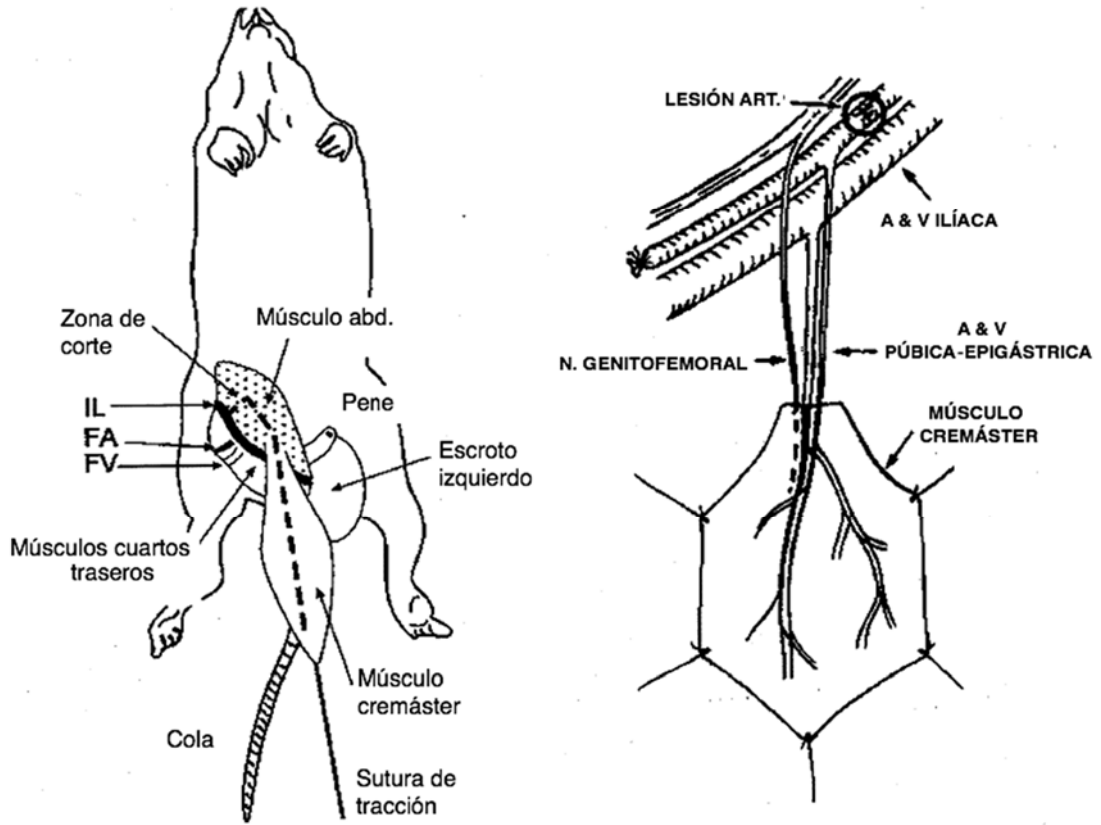


Fig.16



Fig.17



Fig.18

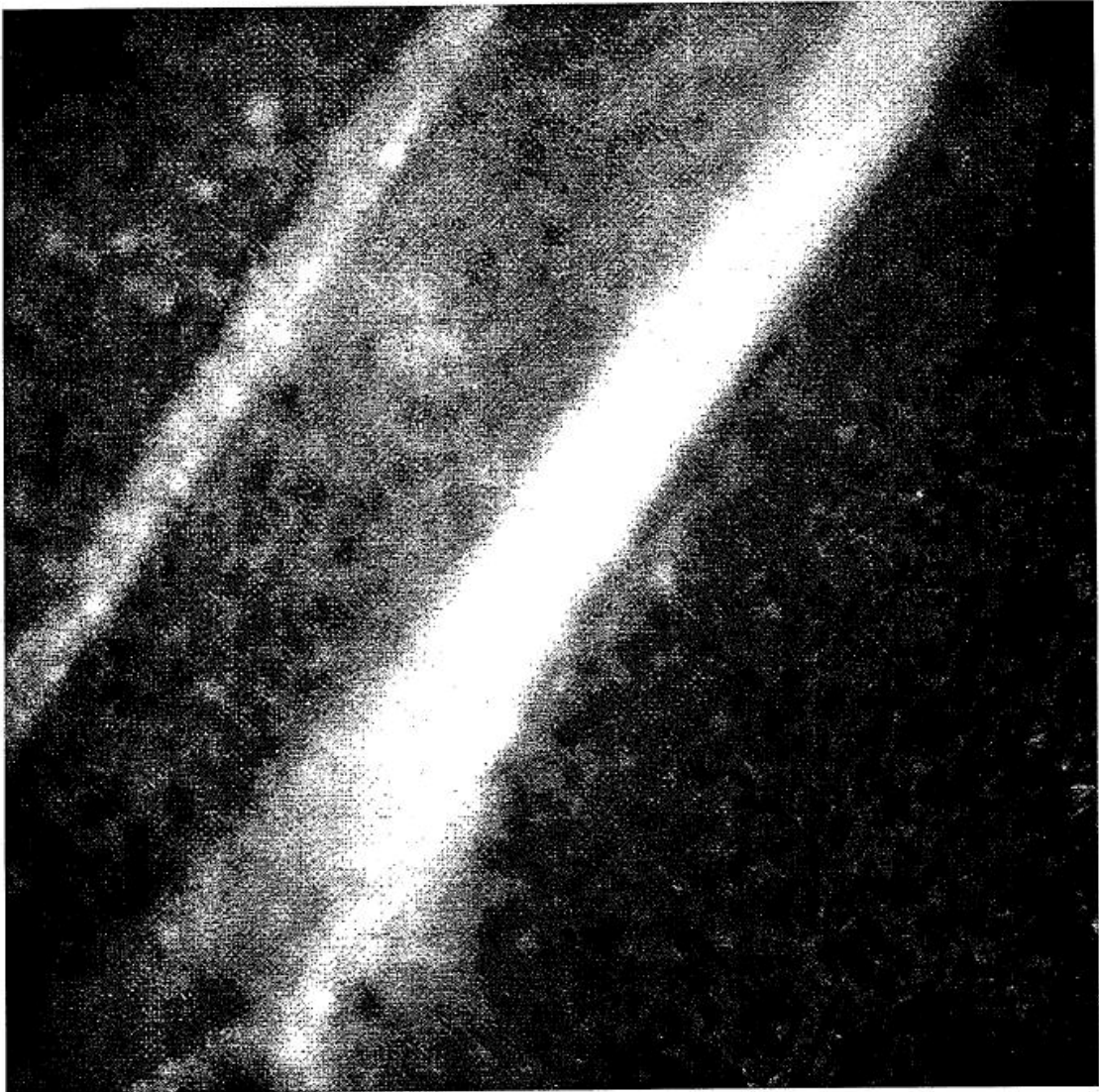


Fig.19

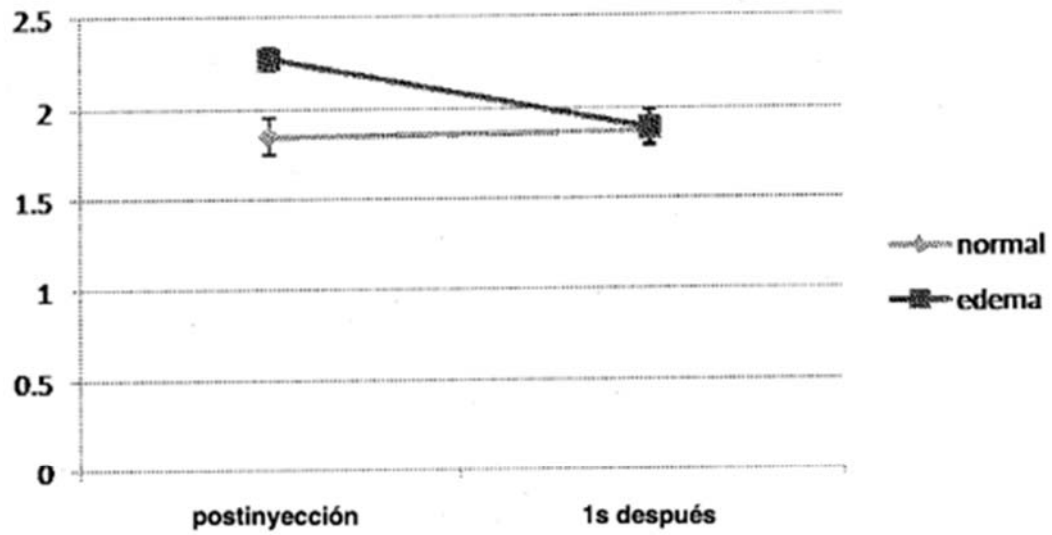


Fig.20

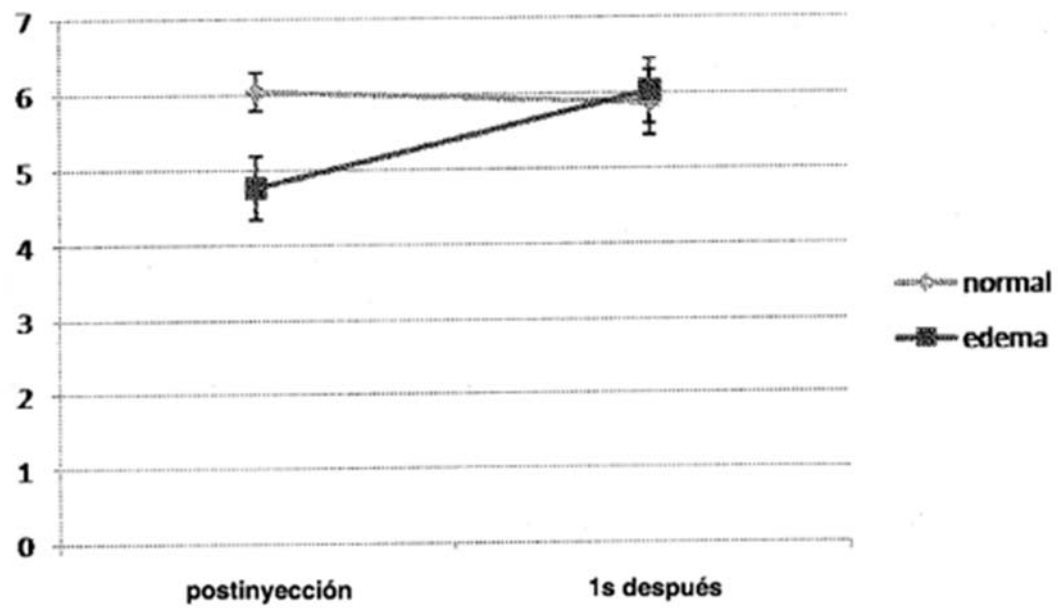


Fig.21

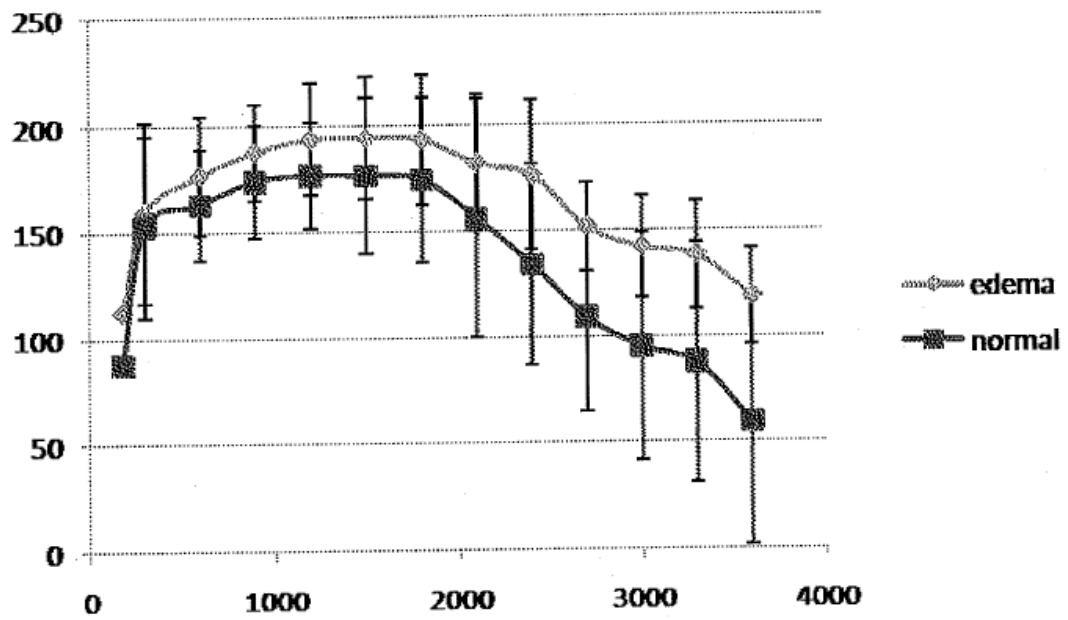


Fig.22

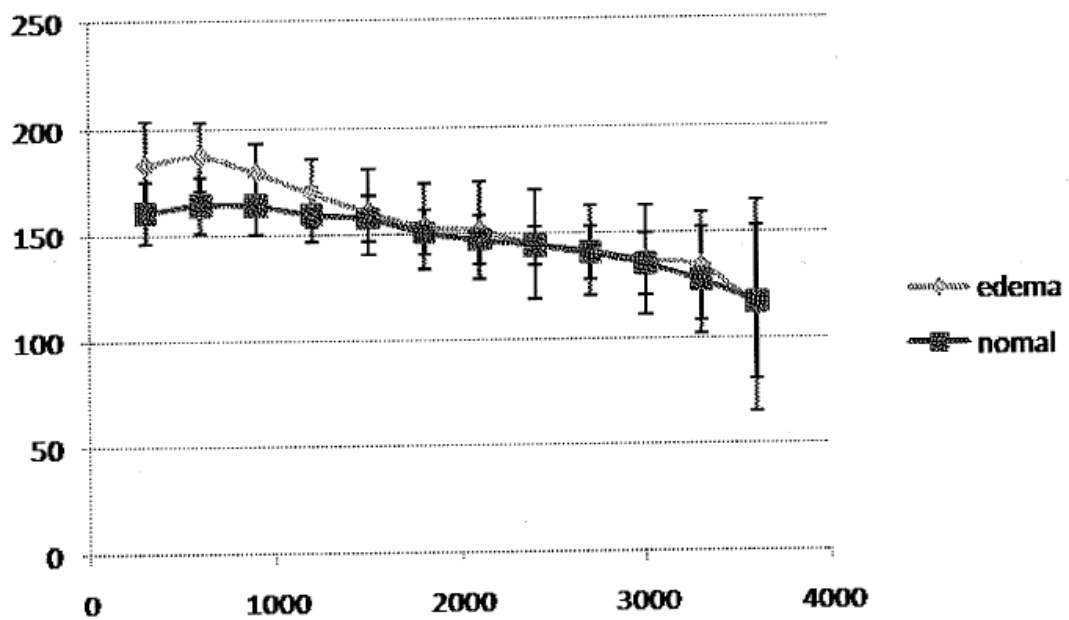


Fig.23

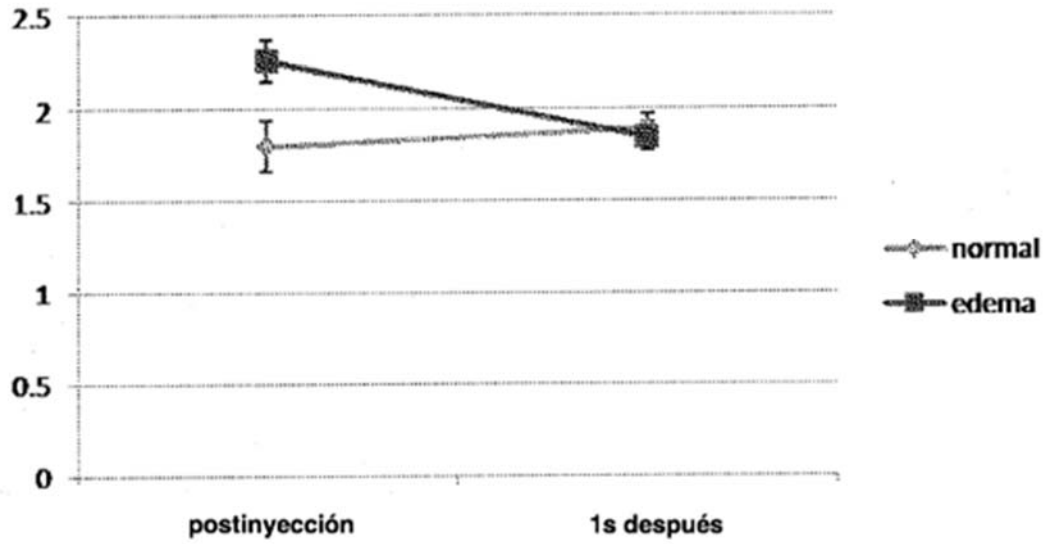


Fig.24

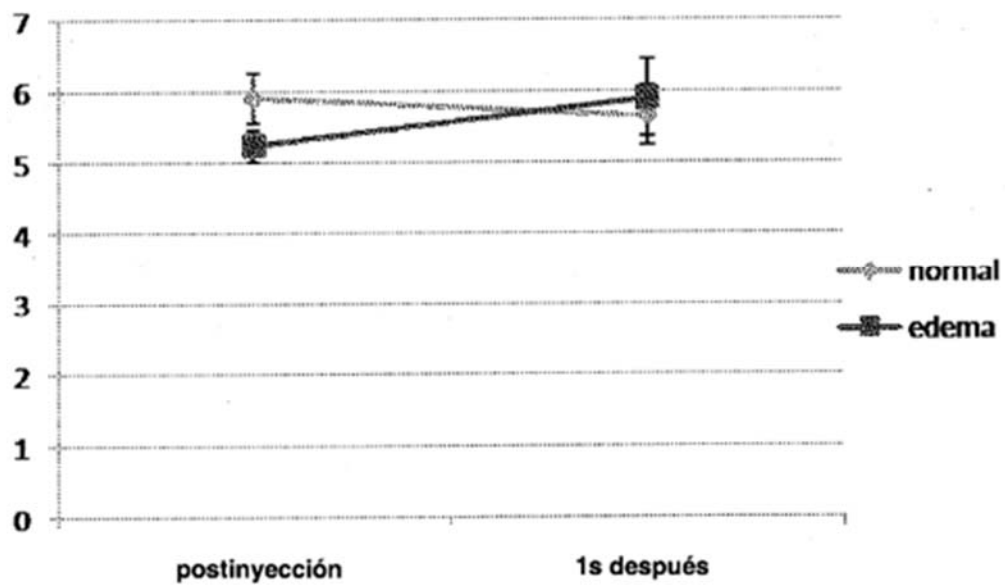


Fig.25

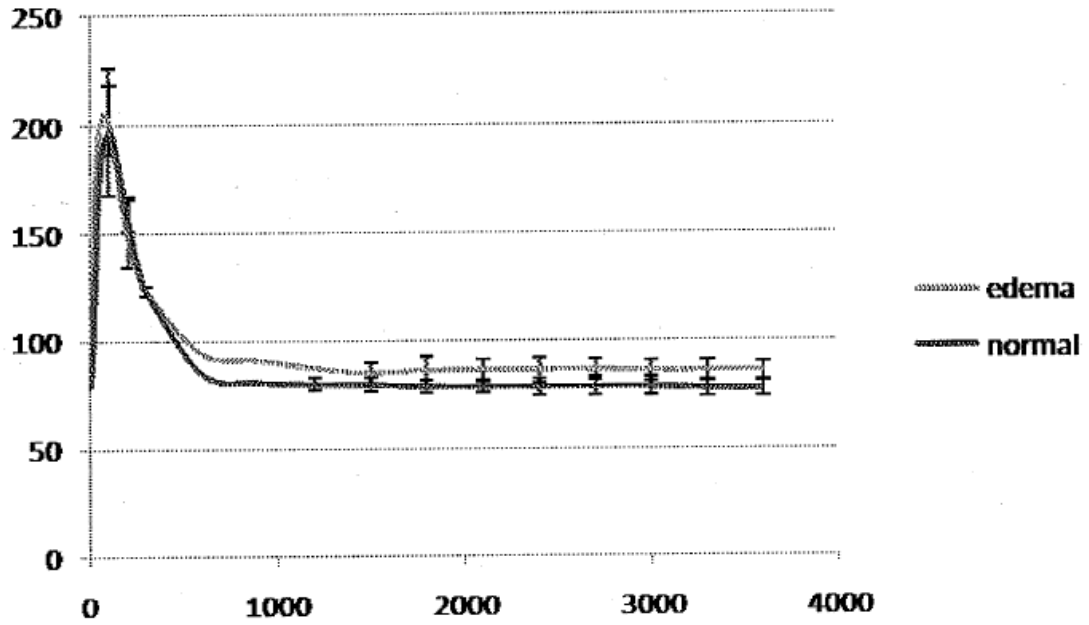


Fig.26

