(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 806 134**

(51) Int. CI.:

A61K 49/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
A61B 1/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/JP2015/069867**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16006678**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15819326 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3168288**

(54) Título: **Sonda fluorescente para detectar dipeptidil peptidasa IV**

(30) Prioridad:

11.07.2014 JP 2014143105

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

URANO, YASUTERU;
SETO, YASUYUKI;
ONOYAMA, HARUNA;
KURIKI, YUGO y
KAMIYA, MAKO

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Sonda fluorescente para detectar dipeptidil peptidasa IV

Campo técnico

La presente invención se refiere a una sonda fluorescente para detectar dipeptidil peptidasa IV, tal como se define en las reivindicaciones. Más específicamente, se refiere a una sonda fluorescente para detectar la dipeptidil peptidasa IV expresada en células cancerosas, a un método de detección que usa la sonda fluorescente y a un kit de detección que comprende la sonda.

Técnica anterior

El cáncer de esófago afecta a muchos pacientes en todo el mundo. El porcentaje de hombres afectados en particular ha ido aumentando año tras año. En general, se sabe que el pronóstico para el cáncer de esófago es muy malo entre los cánceres del tracto gastrointestinal, incluyendo los cánceres de estómago y de colon. El tratamiento del cáncer de esófago consiste en un único método de tratamiento o una combinación de múltiples métodos de tratamiento seleccionados entre el tratamiento endoscópico, la cirugía, el tratamiento con radiación y la quimioterapia, dependiendo de la etapa de la enfermedad. La cirugía, sin embargo, que es el método de tratamiento más común, es altamente invasiva y también conlleva un alto riesgo de complicaciones, tales como complicaciones del tracto respiratorio, parálisis nerviosa recurrente y dehiscencia de suturas. Aunque los resultados de la cirugía han mejorado en los últimos años, aún se dice que la tasa de recurrencia y la tasa de mortalidad son altas en comparación con otros tipos de cáncer del tracto gastrointestinal.

La detección temprana del cáncer de esófago no solo permite evitar la cirugía altamente invasiva y permite el tratamiento radical mediante un tratamiento endoscópico y terapia de quimiorradiación relativamente menos invasivos, sino que también se puede esperar que mejore el pronóstico a largo plazo a partir de entonces. Además, la evaluación del margen de extirpación también es posible y se puede llevar a cabo un tratamiento sin residuos si se puede detectar tejido canceroso durante la cirugía o la disección endoscópica de submucosa (DES). Dado este antecedente, se desea fuertemente el desarrollo de un método para detectar el cáncer de esófago de manera rápida y precisa.

Sin embargo, dado que el cáncer de esófago temprano es difícil de descubrir mediante un examen endoscópico ordinario solo, los agentes de yodo a menudo se usaban en combinación. El problema, sin embargo, fue que tienen fuertes síntomas de irritación, tales como acidez estomacal e incomodidad, y no se pueden usar en pacientes con alergia al yodo.

Por otro lado, la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que es una enzima que elimina específicamente un dipéptido del extremo N-terminal de proteínas y polipéptidos, se sabe que está relacionada con muchas patologías. Recientemente se aclaró que la dipeptidil peptidasa IV se expresa a un nivel más alto que en las células normales en el tejido de cáncer de esófago (Referencia no de patente 1).
Masayo Sakabe et al. desvelaron una estrategia de diseño general para el desarrollo de sondas fluorescentes para una amplia gama de proteasas y dipeptidasas, en donde el grupo acetilo de Ac-HMRG (verde de hidroximetil rodamina acetilada) se reemplaza por un sustrato para una proteasa de interés (*Journal of the American Chemical Society,* vol. 135, N.º 1, 9 de enero de 2013, páginas 409-414). Tras la escisión en una sola etapa del resto del sustrato por la enzima diana, la sonda inicialmente no fluorescente se vuelve fluorescente. Ac-GlyPro-HMRG es una sonda para la detección de la dipeptidasa FAP (proteína de activación de fibroblastos).
Lorey S. et al. desvelan los compuestos Gly-Pro-R110, Ala-Pro-R110 y Phe-Pro-R110 *(Advances in Experimental Medicine and Biology,* Springer, EE. UU., vol. 421, 1 de enero de 1997, páginas 157-160). Estos sustratos a base de rodamina permiten la detección sensible de DP-IV en la superficie de las líneas de linfocitos T. DP-IV cataliza la escisión de los dipéptidos, de los cuales el penúltimo resto es prolina o alanina.
Lorey S. et al. desvelan sustratos para DP-IV, por ejemplo, DP-IV asociado a la superficie celular, tal como Gly(Ala)-Pro-R110-R, en donde R es un resto de anclaje (*Journal of Biological Chemistry,* The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., vol. 277, N.º 36, 6 de septiembre de 2002, páginas 33170-33177). Los compuestos no son fluorescentes; La hidrólisis catalizada por DP-IV libera la molécula fluorescente. Gly-Pro o Ala-Pro es un sustrato específico de DP-IV.
Tomohiko Fuji et al. desvelan sondas fluorescentes dirigidas a catepsina sobreexpresada en cáncer mediante la incorporación de péptidos de sustrato enzimático en el andamio HMRG, por ejemplo, Z-Phe-Arg-HMRG o Z-Arg-Arg-HMRG (*Bioconjugate Chemistry,* vol. 25, N.º 10, 19. septiembre de 2014, páginas 1838-1846). La sonda inicialmente no fluorescente se convierte en un HMRG altamente fluorescente después de la escisión por catepsina. Esto permite visualizar el cáncer de ovario. La obtención de imágenes fluorescentes *in vivo* en tiempo real del cáncer se realiza con un catéter endoscópico con pulverizador.

Referencias de la técnica anterior

Referencias no de patente

Referencia no de patente 1: Goscinski et al., APMIS, 116, 823-31, 2008.

Divulgación de la invención

La invención se refiere a una sonda fluorescente para detectar dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende un compuesto tal como se define en las reivindicaciones. La invención también se refiere a un método para detectar dipeptidil peptidasa IV usando dicha sonda fluorescente, a un método para detectar células diana que expresan dipeptidil peptidasa IV usando dicha sonda, y a un kit para detectar dipeptidil peptidasa IV que comprende dicha sonda, tal como se define en las reivindicaciones.

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solamente con fines de información. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

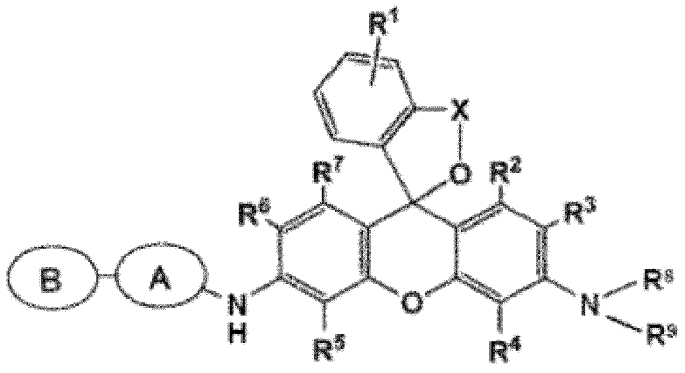
Problemas a resolver por la invención

Por lo tanto, la presente invención se centra en la dipeptidil peptidasa IV que se expresa a un alto nivel en el tejido de cáncer de esófago y tiene como objetivo proporcionar una nueva sonda fluorescente para dicha peptidasa con el objetivo de desarrollar un medio para detectar el cáncer de esófago rápidamente y con alta sensibilidad.

MEDIOS USADOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS ANTERIORMENTE MENCIONADOS

Como resultado de estudios en profundidad destinados a resolver los problemas anteriores, los presentes inventores descubrieron que la dipeptidil peptidasa IV se puede detectar específicamente mediante una respuesta de fluorescencia activada/desactivada mediante el uso de un compuesto con una estructura principal de xanteno que tiene un sitio dipéptido como sonda fluorescente y que esto hace posible detectar el cáncer de esófago rápidamente y con alta sensibilidad. La presente invención se completó basándose en estos descubrimientos.

De manera específica, la presente invención, en una realización, proporciona una sonda fluorescente para detectar la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) o una sal del mismo:



(I)

,

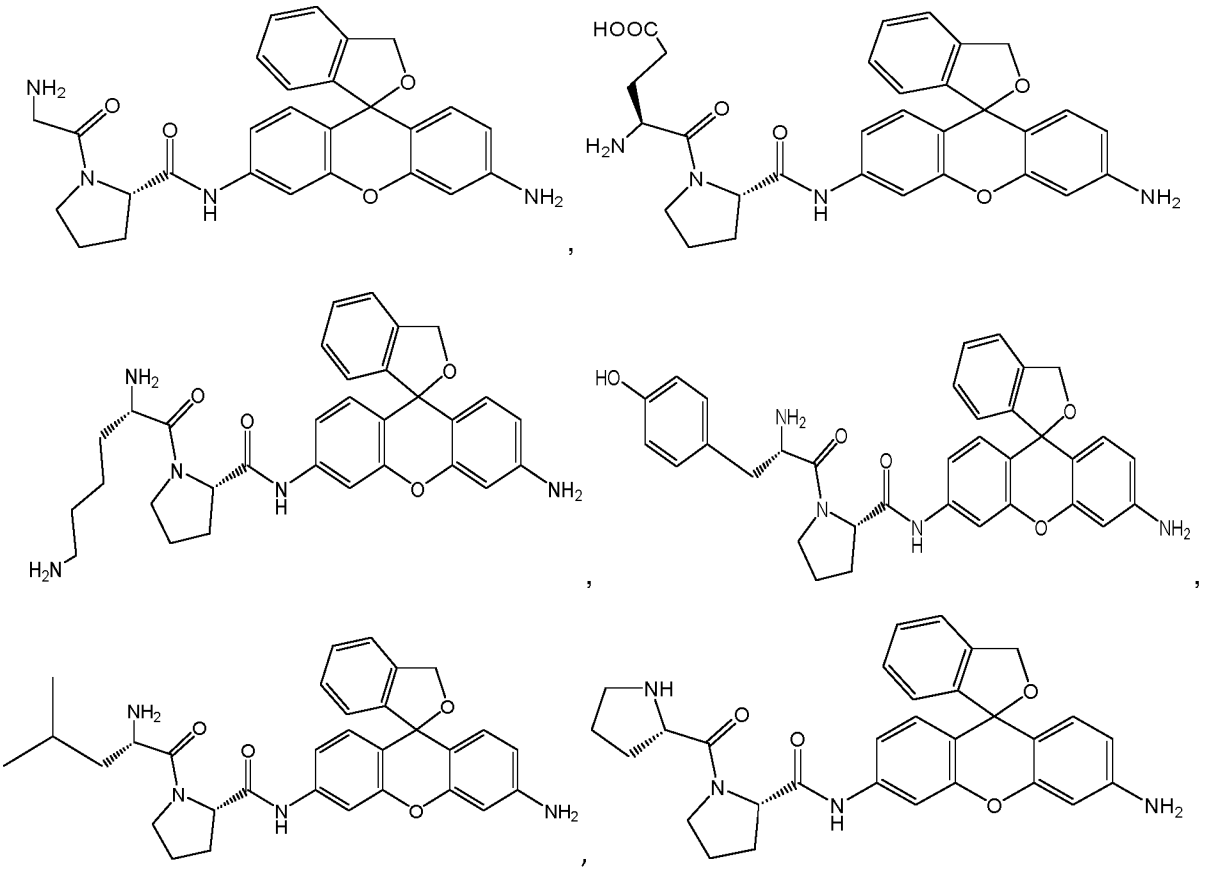
en donde
A y B son iguales o diferentes y cada uno representa independientemente un resto de aminoácido; en donde A se une formando un enlace amida con el NH adyacente en la fórmula y B se une formando un enlace amida con A, y en donde un resto de aminoácido es una estructura que se corresponde con la estructura parcial que queda después de que un grupo hidroxilo ha sido eliminado de un grupo carboxilo de un aminoácido; en donde A es un resto de aminoácido seleccionado de prolina y alanina;
R^1 representa un átomo de hidrógeno o uno a cuatro de los mismos o diferentes sustituyentes unidos a un anillo de benceno, siendo dichos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo amino monosustituido o disustituido, un grupo sililo sustituido y un grupo acilo;
R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 y R^7 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo o un átomo de halógeno;
R^8 y R^9 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo;
X representa un grupo alquileno C_1-C_3,
en donde el grupo alquilo es un grupo hidrocarbonado alifático de cadena lineal, ramificada, cíclica o una combinación de los mismos, y el grupo alcoxi es una estructura en la que un grupo alquilo está unido a un átomo de oxígeno.

En la fórmula (I) B anterior es preferiblemente un resto de aminoácido seleccionado de glicina, ácido glutámico, lisina, tirosina, leucina o prolina. Más preferentemente, A es un resto de prolina y B es un resto de glicina.

También en la fórmula anterior (I), R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8y R^9 son preferentemente átomos de hidrógeno, y X es preferentemente un grupo metileno.

En una realización preferida de la presente invención, el compuesto representado por la fórmula (I) o una sal del mismo es un compuesto seleccionado del siguiente grupo, o una sal del mismo.

[Fórmula química 2]



En otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar dipeptidil peptidasa IV caracterizado por comprender una etapa para poner una muestra en contacto con la sonda fluorescente anterior según la invención fuera del cuerpo y una etapa para observar la respuesta de fluorescencia debido a la reacción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) contenida en la muestra y la sonda fluorescente. Preferentemente, el presente método se caracteriza además por el hecho de que la respuesta de fluorescencia se visualiza utilizando medios de obtención de imágenes fluorescentes.

En otra realización más, la presente invención proporciona un método para detectar células diana que expresan dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) usando la sonda fluorescente anterior de acuerdo con la invención. Preferentemente, las células diana son células cancerosas; más preferentemente, las células cancerosas son células cancerosas del esófago.

En otra realización más, la presente invención proporciona un kit para detectar la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende la sonda fluorescente anterior de acuerdo con la invención.

La presente memoria descriptiva describe además un dispositivo para poner en contacto una solución química que contiene la sonda fluorescente anterior con una muestra que se va a medir en la que el dispositivo está equipado con una unidad de alojamiento de solución química para alojar una solución química que comprende la sonda fluorescente anterior y una de pulverización de solución química construida para hacer posible pulverizar la solución química sobre la muestra. El dispositivo también puede estar equipado con medios de obtención de imágenes fluorescentes para observar la respuesta de fluorescencia debido a la reacción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)

contenida en la muestra y la sonda fluorescente anterior. El dispositivo anterior puede ser un endoscopio.

Ventajas de la invención

La presente invención hace posible detectar la dipeptidil peptidasa IV expresada a un alto nivel en tejido de cáncer de esófago con una respuesta de fluorescencia mediante el uso de un compuesto con una estructura principal de xanteno que tiene un resto de aminoácido como una sonda fluorescente y por lo tanto logra el efecto excepcional de hacer posible especificar y obtener imágenes de la presencia de cáncer de esófago con precisión, rápidamente y con alta sensibilidad.

La sonda fluorescente de la presente invención hace posible la detección temprana del cáncer de esófago mediante el uso, por ejemplo, durante el examen endoscópico, y hace posible el tratamiento radical mediante un tratamiento endoscópico menos invasivo y quimiorradiación sin tratamiento quirúrgico altamente invasivo. También hace posible la evaluación del margen de extirpación mediante adaptación durante la DES o la cirugía, y se puede esperar que permita un tratamiento libre de residuos. También se resuelven los problemas de los síntomas de irritación, tales como acidez estomacal e incomodidad para el paciente cuando se usan agentes de yodo convencionales y la incapacidad de usarlos en pacientes con alergia al yodo. Por lo tanto, se puede decir que la presente invención tiene un valor de utilización médica e industrial extremadamente alto y un valor económico.

Además, el método de detección que utiliza la sonda fluorescente de la presente invención permite la detección mediante luz visible que es segura para el cuerpo vivo, además de que el procedimiento de detección es simple. La cantidad de sonda fluorescente que debe usarse también es minúscula. El método de detección que usa la sonda fluorescente de la presente invención también tiene una excelente utilidad a este respecto.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] Muestra los cambios en el espectro de absorción y los cambios en el espectro de fluorescencia debido a la adición de DPP-IV a GP-HRMG, que es una sonda fluorescente de la presente invención.

[FIG. 2] Muestra un cromatograma por HPLC asociado con la adición de DPP-IV a GP-HRMG, que es una sonda fluorescente de la presente invención.

[FIG. 3] Gráfico que muestra la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia de una sonda fluorescente de la presente invención seis minutos después de la adición de DPP-IV.

[FIG. 4] Gráfico que representa la dependencia del tiempo de la intensidad de fluorescencia de una sonda fluorescente de la presente invención asociada con la adición de DPP-IV.

[FIG. 5] Imagen por obtención de imagen de células vivas de células de cáncer de esófago cultivadas usando una sonda fluorescente de la presente invención.

[FIG. 6] Imagen por obtención de imagen de muestras de biopsia de cáncer de esófago humano usando una sonda fluorescente de la presente invención.

[FIG. 7] Gráfico que representa gráficamente la dependencia del tiempo de la intensidad de fluorescencia en la obtención de imágenes de la FIG. 6.

[FIG. 8] Imagen por obtención de imágenes (FIG. 8a) de muestras quirúrgicas de cáncer de esófago humano usando una sonda fluorescente de la presente invención, y una imagen que muestra una comparación con una imagen teñida con yodo (FIG. 8b).

[FIG. 9] Imagen por obtención de imagen (FIG. 9a) de muestras de DES de cáncer de esófago humano usando una sonda fluorescente de la presente invención, y una imagen que muestra una comparación con una imagen teñida con yodo (FIG. 9b).

[FIG. 10] Imagen por obtención de imagen de muestras quirúrgicas de cáncer de esófago humano cuando se añadió el inhibidor.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Las realizaciones de la invención se explican a continuación.

1. Definiciones

En la presente memoria descriptiva, un "átomo de halógeno" significa un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo.

En la presente memoria descriptiva, "alquilo" puede ser cualquier grupo hidrocarbonado alifático de cadena lineal, ramificada, cíclica o una combinación de los mismos. El número de átomos de carbono de un grupo alquilo no está particularmente restringido, pero es, por ejemplo, 1-20 (C_{1-20}), 3-15 (C_{3-15}) o 5-10 (C_{5-10}). Cuando se especifica el número de átomos de carbono, significa un "alquilo" que tiene un número de átomos de carbono dentro de ese intervalo numérico. Por ejemplo, los alquilos C_{1-8} incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, n-heptilo y n-octilo. En la presente memoria descriptiva, un grupo alquilo puede tener uno o más sustituyentes opcionales. Los ejemplos de estos sustituyentes incluyen un grupo alcoxi, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo amino monosustituido o disustituido, un grupo sililo sustituido, o acilo. Cuando un grupo alquilo tiene dos o más sustituyentes, pueden ser iguales o diferentes. Lo mismo también es cierto para el resto alquilo de otros sustituyentes (por ejemplo, un grupo alcoxi o un grupo arilalquilo) que incluye un resto alquilo.

En la presente memoria descriptiva, cuando ciertos grupos funcionales se definen como "opcionalmente sustituidos" el tipo de sustituyente, la posición de la sustitución y el número de sustituyentes no están particularmente restringidos. Cuando hay dos o más sustituyentes, pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de sustituyentes incluyen un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un átomo de halógeno, un grupo sulfo, un grupo amino, un grupo alcoxicarbonilo y un grupo oxo. Otros sustituyentes pueden estar presentes en estos sustituyentes. Los ejemplos de tales casos incluyen un grupo alquilo halogenado y un grupo dialquilamino.

En la presente memoria descriptiva, un "grupo alcoxi" se refiere a una estructura en la que un grupo alquilo anterior está unido a un átomo de oxígeno; los ejemplos que incluyen grupos alcoxi saturados que son lineales, ramificados, cíclicos o una combinación de los mismos. Los ejemplos preferidos incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propoxi, un grupo isopropoxi, un grupo ciclopropoxi, un grupo n-butoxi, un grupo isobutoxi, un grupo s-butoxi, un grupo t-butoxi, un grupo ciclobutoxi, un grupo ciclopropilmetoxi, un grupo n-pentiloxi, un grupo ciclopentiloxi, un grupo ciclopropiletiloxi, un grupo ciclobutilmetiloxi, un grupo n-hexiloxi, un grupo ciclohexiloxi, un grupo ciclopropilpropiloxi, un grupo ciclobutiletiloxi y un grupo ciclopentilmetiloxi.

En la presente memoria descriptiva, un "grupo ariloxi" es un grupo en el que el grupo arilo se une a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos ariloxi incluyen un grupo fenoxi, un grupo 2-tieniloxi, un grupo 3-tieniloxi, un grupo 2-piridiloxi, un grupo 3-piridiloxi, un grupo 4-piridiloxi, un grupo 2-furiloxi, un grupo 3-furiloxi, un grupo 2-tiazoliloxi, un grupo 4-tiazoliloxi, un grupo 5-tiazoliloxi, un grupo 2-oxazoliloxi, un grupo 4-oxazoliloxi, un grupo 5-oxazoliloxi, un grupo 1-pirazoliloxi, un grupo 3-pirazoliloxi, un grupo 4-pirazoliloxi, un grupo 2-piraziniloxi, un grupo 2-pirimidiniloxi, un grupo 4-pirimidiniloxi, un grupo 5-pirimidiniloxi, un grupo 1-piroliloxi, un grupo 2-piroliloxi, un grupo 3-piroliloxi, un grupo 1-imidazoliloxi, un grupo 2-imidazoliloxi, un grupo 4-imidazoliloxi, un grupo 3-piridaziniloxi, un grupo 4-piridaziniloxi, un grupo 3-isotiazoliloxi, un grupo 3-isoxazoliloxi, un grupo 1,2,4-oxadiazol-5-iloxi y un grupo 1,2,4-oxadiazol-3-iloxi.

En la presente memoria descriptiva, "alquilamino" y "arilamino" significan un grupo amino en el que los átomos de hidrógeno de un grupo $-NH_2$ han sido sustituidos por uno o dos de los alquilos o arilos. Los ejemplos incluyen metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, etilmetilamino y bencilamino. De manera similar, "alquiltio" y "ariltio" significan un grupo en el que los átomos de hidrógeno de un grupo -SH han sido sustituidos por el alquilo o arilo. Los ejemplos incluyen metiltio, etiltio y benciltio.

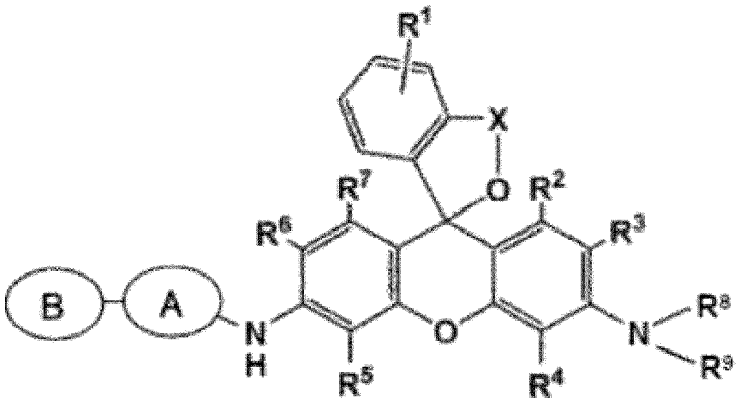
"Amida", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye tanto RNR'CO- (cuando R = alquilo, alquilaminocarbonilo-) como RCONR'- (cuando R = alquilo, alquilcarbonilamino-).

En la presente memoria descriptiva, la frase "estructura de anillo" significa un grupo heterocíclico o carbocíclico cuando está formado por una combinación de dos sustituyentes. Tales grupos pueden ser saturados, insaturados o aromáticos. Por lo tanto, incluye los cicloalquilos, cicloalquenilos, arilos y heteroarilos definidos anteriormente. Los ejemplos incluyen cicloalquilo, fenilo, naftilo, morfolinilo, piperidinilo, imidazolilo, pirrolidinilo y piridilo. En la presente memoria descriptiva, los sustituyentes pueden formar estructuras de anillo con otros sustituyentes, y los expertos en la materia pueden entender que una sustitución específica, por ejemplo, la unión a hidrógeno, se forma cuando dichos sustituyentes se unen entre sí. Por lo tanto, cuando se afirma que los sustituyentes específicos juntos forman una estructura de anillo, los expertos en la materia pueden entender que esta estructura de anillo se puede formar mediante una reacción química ordinaria o se genera fácilmente. Cualquiera de estas estructuras de anillo y sus procesos de formación están dentro del alcance de los expertos en la materia.

2. Molécula de sonda fluorescente

La sonda fluorescente de la presente invención se caracteriza por tener una estructura en la que un sitio de dipéptido que sirve como sustrato de dipeptidil peptidasa IV se ha introducido en una estructura principal de xanteno y, en una realización, incluye un compuesto que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (I) según la reivindicación 1.

[Fórmula química 3]



(I)

En la fórmula general (I), R^1 representa un átomo de hidrógeno o de uno a cuatro sustituyentes unidos a un anillo de benceno, siendo dichos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo amino monosustituido o disustituido, grupo sililo sustituido y grupo acilo. Cuando hay dos o más sustituyentes en el anillo de benceno, pueden ser iguales o diferentes. R^1 es preferentemente un átomo de hidrógeno.

R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 y R^7 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo o un átomo de halógeno. R^2 y R^7 son preferentemente átomos de hidrógeno. R^3, R^4, R^5y R^6 también son preferentemente átomos de hidrógeno. Es más preferido que R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 y R^7 sean todos átomos de hidrógeno.

R^8 y R^9 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo. Cuando tanto R^8 como R^9 son grupos alquilo, pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se prefiere cuando R^8 y R^9 son ambos átomos de hidrógeno, y cuando R^8 es un grupo alquilo y R^9 es un átomo de hidrógeno, y más preferido cuando ambos R^8 y R^9 son átomos de hidrógeno.

X representa un grupo alquileno C_1-C_3. El grupo alquileno puede ser un grupo alquileno lineal o un grupo alquileno ramificado. Por ejemplo, además de un grupo metileno (-CH_2-), un grupo etileno (-CH_2-CH_2-), y un grupo propileno (-CH_2-CH_2-CH_2-), -CH(CH_3)-, -CH_2-CH (CH_3)-, y -CH (CH_2-CH_3)-, también se puede usar como grupos alquileno ramificados. Entre ellos, se prefiere un grupo metileno o un grupo etileno, y se prefiere más un grupo metileno.

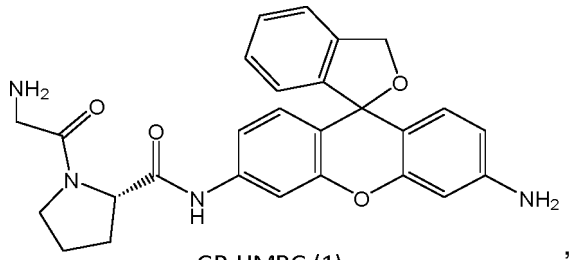
A y B representan cada uno independientemente los mismos o diferentes restos de aminoácidos. De acuerdo con la invención, A es un resto de aminoácido seleccionado de prolina y alanina.
Aquí, A se une formando un enlace amida con el NH adyacente en la fórmula, es decir, se une con la estructura principal de xanteno por el resto carbonilo del resto de aminoácido A y el NH de fórmula (I) formando un enlace amida. Además, A se une con B de la misma manera que una cadena peptídica ordinaria. Como resultado, B se une formando un enlace amida con A. En la presente memoria descriptiva, un "resto de aminoácido" significa una estructura correspondiente con la estructura parcial que queda después de que un grupo hidroxilo se haya eliminado de un grupo carboxilo de un aminoácido. Por lo tanto, B tiene una estructura igual que el llamado residuo del extremo N-terminal, y A, que es el resto de aminoácido medio, se une con B de la misma manera que una cadena peptídica ordinaria.

En la presente memoria descriptiva, un "aminoácido" incluye compuestos naturales y no naturales y se puede usar un compuesto arbitrario siempre que sea un compuesto que tenga tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Los aminoácidos neutros, los aminoácidos básicos y los aminoácidos ácidos son aceptables, y los aminoácidos que son componentes estructurales de los péptidos bioactivos (incluidos los oligopéptidos, así como los dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos), las proteínas y otros compuestos polipeptídicos de este tipo se pueden usar además de aminoácidos que funcionan como neurotransmisores y otros transmisores similares. Los ejemplos incluyen α aminoácidos, β aminoácidos, y *γ* aminoácidos. Es preferible usar un aminoácido ópticamente activo tal como un aminoácido. Por ejemplo, se puede usar el D-aminoácido o L-aminoácido de un α aminoácido, pero a veces es preferible seleccionar un aminoácido ópticamente activo que funcione en el cuerpo vivo.

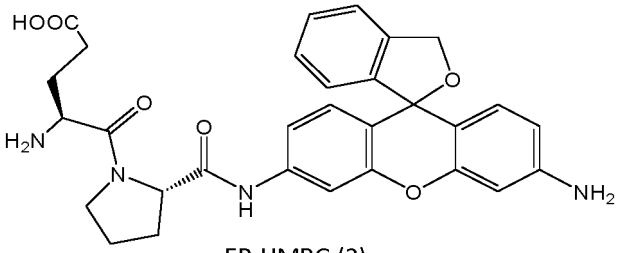
Desde el punto de vista del propósito de la presente invención, que es detectar dipeptidil peptidasa IV, A y B son preferentemente una combinación de restos de aminoácidos que son péptidos sustrato de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y se pueden hidrolizar selectivamente fácilmente. Más específicamente, A es un resto de aminoácido seleccionado de prolina o alanina, y B es preferentemente un resto de aminoácido seleccionado de glicina, ácido glutámico, lisina, tirosina, leucina o prolina. Más preferentemente, A es un resto de prolina y B es un resto de glicina.

Los ejemplos concretos de compuestos de fórmula (I) incluyen compuestos de fórmulas 1-6 a continuación.

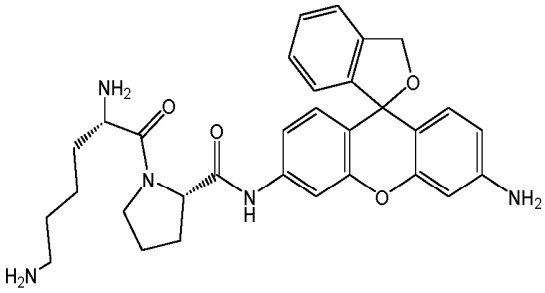
[Fórmula química 4]



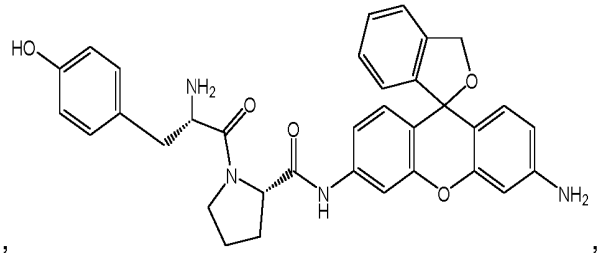
GP-HMRG (1),



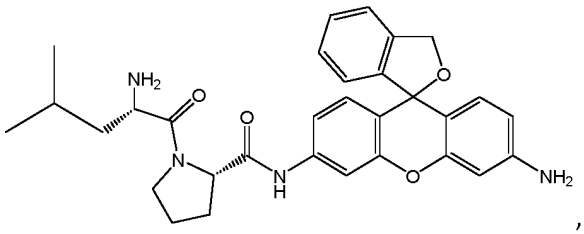
EP-HMRG (2)



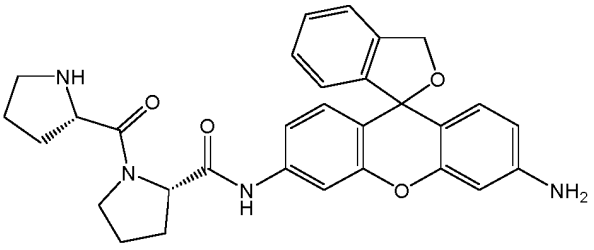
KP-HMRG (3),



YP-HMRG (4),



LP-HMRG (5),



PP-HMRG (6)

Como es evidente a partir de estas estructuras químicas, los compuestos de fórmulas 1-6 son ejemplos en los que la combinación de A y B (A-B) es, en orden, prolina-glicina; prolina-ácido glutámico; prolina-lisina; prolina-tirosina; prolina-leucina; y prolina-prolina.

Los compuestos representados por la fórmula general (I) anterior pueden existir como sales. Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de bases, sales de adición de ácido y sales de aminoácidos. Los ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio y otras sales metálicas similares, sales de amonio o sales de trietilamina, sales de piperidina, sales de morfolina u otras sales de aminas orgánicas similares. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen clorhidratos, sulfatos, nitratos y otras sales de ácido mineral, carboxilatos, metanosulfonatos, p-toluenosulfonatos, citratos, oxalatos y otras sales de ácidos orgánicos de este tipo. Los ejemplos de sales de aminoácidos incluyen sales de glicina.

Los compuestos representados por la fórmula (I) pueden tener uno o más carbonos asimétricos dependiendo de los tipos de sustituyentes, y algunas veces existen como isómeros ópticos, diastereómeros u otros estereoisómeros similares. Los estereoisómeros de forma pura, cualquier mezcla de estereoisómeros y racematos están todos comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos representados por la fórmula (I) o sus sales también pueden existir como hidratos o solvatos. Estas sustancias están todas incluidas dentro del alcance de la presente invención. El tipo de disolvente para formar un solvato no está particularmente restringido; ejemplos incluyen etanol, acetona, isopropanol y otros disolventes similares.

Los compuestos representados por la fórmula general (I) se pueden producir fácilmente, por ejemplo, acilando el grupo amino de la posición 3 después de haber convertido el grupo 2-carboxifenilo o el grupo 2-alcoxicarbonilfenilo de la posición 9 en un grupo hidroxialquilo usando como materia prima un compuesto de xanteno que tiene grupos amino en las posiciones 3 y 6 y que tiene un grupo 2-carboxifenilo o un grupo 2-alcoxicarbonilfenilo en la posición 9.

Los ejemplos de compuestos de 3,6-diaminoxanteno que se pueden usar como materia prima incluyen la rodamina 110 y la rodamina 123 disponibles comercialmente. Los compuestos, sin embargo, no se limitan a estos, y los compuestos de xanteno adecuados se pueden seleccionar de acuerdo con la estructura del compuesto diana. Además, también se puede producir una sonda fluorescente que tenga las mismas funciones que la fórmula general (I) en la presente invención usando un compuesto que tenga un esqueleto de una forma en la que los átomos de oxígeno del resto del esqueleto de xanteno en un compuesto representado por la fórmula general (I) han sido sustituidos por un átomo de C o un átomo de Si que tiene sustituyentes específicos o un átomo de Ge o un átomo de Pb.

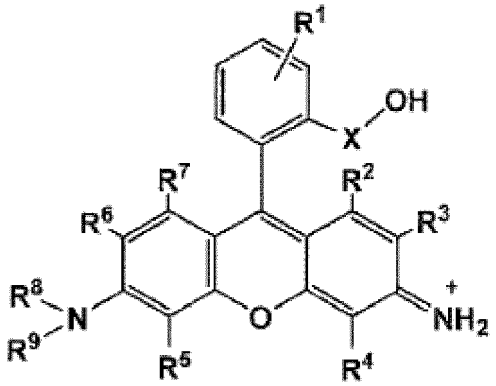
Además, dado que los métodos para producir compuestos representativos incluidos entre los compuestos de la presente invención representados por la fórmula general (I) se ilustran concretamente en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, los expertos en la materia pueden producir compuestos arbitrarios abarcados por la fórmula general (I) fácilmente haciendo referencia a la divulgación de la presente memoria descriptiva y seleccionando adecuadamente la materia prima de partida y los reactivos, y las condiciones de reacción según sea necesario.

La sonda fluorescente anterior se puede usar como una composición combinando aditivos comúnmente usados en la preparación de reactivos según sea necesario. Por ejemplo, los auxiliares de disolución, los ajustadores de pH, los tampones, los agentes isotonificantes y otros aditivos similares se pueden usar como aditivos para su uso en un entorno fisiológico, y las cantidades compuestas se pueden seleccionar según sea apropiado por un experto en la técnica. Estas composiciones se pueden proporcionar como una composición de una forma adecuada tal como una mezcla en forma de polvo, producto liofilizado, gránulos, comprimidos o líquido.

3. Mecanismo de emisión de luz de la molécula de sonda fluorescente

Los compuestos mostrados por la fórmula (I) anterior son la estructura principal de los colorantes fluorescentes de xanteno ampliamente utilizados en la obtención de bioimágenes debido a su alta solubilidad en agua y alto rendimiento cuántico de fluorescencia, pero la sonda fluorescente en sí es sustancialmente no absorbente/no fluorescente (respuesta de fluorescencia en un estado "apagado") en la región neutral (por ejemplo, un intervalo de pH de 5-9) cuando la porción superior de la estructura principal de xanteno está en un estado de anillo cerrado. A diferencia de esto, el sitio del dipéptido en BA-NH se hidroliza por la dipeptidil peptidasa IV, convirtiéndose rápidamente en un tautómero de anillo abierto cuando se escinde de la estructura principal de xanteno y produce el siguiente compuesto fuertemente fluorescente.

[Fórmula química 5]



De manera específica, la sonda fluorescente de la presente invención que incluye como ingrediente activo un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo tiene la propiedad de ser hidrolizada por la dipeptidil peptidasa IV expresada en tejido de cáncer de esófago y dando el compuesto abierto de anillo anterior que emite una fuerte fluorescencia. Por lo tanto, el uso de la sonda fluorescente de la presente invención hace posible observar la dipeptidil peptidasa IV por el cambio en la intensidad de fluorescencia y por lo tanto detectar la presencia de cáncer de esófago que expresa esta dipeptidil peptidasa IV.

Más específicamente, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo prácticamente no emite fluorescencia cuando se irradia por luz de excitación de, por ejemplo, aproximadamente 440-510 nm, en la región neutral, pero el compuesto de anillo abierto anterior emite fluorescencia muy fuerte (por ejemplo, emisión: 524 nm) en las mismas condiciones.
Por lo tanto, la luz visible de aproximadamente 440-510 nm se puede irradiarse normalmente cuando se realiza la detección usando la sonda fluorescente de la presente invención. La longitud de onda de fluorescencia a observar es normalmente de aproximadamente 510-800 nm; es preferible observar, por ejemplo, fluorescencia de aproximadamente 516-556 nm.

Se puede usar un compuesto representado por la fórmula (I) anterior o una sal del mismo puede sin modificación como la sonda fluorescente de la presente invención, pero se puede usar según sea necesario como composición mezclando aditivos comúnmente usados en la preparación de reactivos. Por ejemplo, los auxiliares de disolución, los ajustadores de pH, los tampones, los agentes isotonificantes y otros aditivos similares se pueden usar como aditivos para su uso en un entorno fisiológico, y las cantidades compuestas se pueden seleccionar según sea apropiado por un experto en la técnica. Estas composiciones se pueden proporcionar como una composición de una forma adecuada tal como una mezcla en forma de polvo, producto liofilizado, gránulos, comprimidos o líquido, pero se debe usar por disolución en agua destilada para inyección o un tampón adecuado en el momento del uso.

Además, la sonda fluorescente de la presente invención se puede usar, por ejemplo, durante la cirugía, durante las pruebas o después de la cirugía. El término "cirugía" en la presente memoria descriptiva abarca cualquier cirugía, incluyendo endoscopia o laparoscopia, y otra cirugía endoscópica similar. Además, el término "prueba" abarca las pruebas realizadas en tejidos separados y extraídos de un cuerpo vivo, además de la prueba con un endoscopio y extirpación de tejido, recolección y otros tratamientos similares asociados con las pruebas.

4. Método de detección utilizando la sonda fluorescente

De acuerdo con dicho mecanismo de emisión de luz, el método para detectar la dipeptidil peptidasa IV de la presente invención se caracteriza por comprender una etapa para poner la sonda fluorescente anterior en contacto con una muestra fuera del cuerpo y una etapa para observar la respuesta de fluorescencia debido a la reacción de la dipeptidil peptidasa IV contenida en la muestra y la sonda fluorescente. La detección de dipeptidil peptidasa IV mediante dicho método también hace posible detectar células diana que expresan dipeptidil peptidasa IV. Las células diana son preferentemente células cancerosas, más preferentemente células de cáncer de esófago. El término "detección" en la presente memoria descriptiva se debe interpretar en el sentido más amplio para incluir mediciones cuantitativas, cualitativas y otro tipo de mediciones para diversos fines.

Se puede utilizar un fluorómetro que tenga una longitud de onda de medición amplia como medio para observar la respuesta de fluorescencia, pero la respuesta de fluorescencia también se puede visualizar utilizando medios de obtención de imágenes fluorescentes que permiten la visualización como una imagen bidimensional. Dado que la respuesta de fluorescencia se puede visualizar en dos dimensiones utilizando medios de obtención imágenes fluorescentes, es posible ver las células diana que expresan dipeptidil peptidasa IV instantáneamente. Los dispositivos conocidos en la técnica se pueden usar como dispositivos de obtención de imágenes fluorescentes. Además, en algunos casos, la reacción de la dipeptidil peptidasa IV y la sonda fluorescente también se puede detectar por el cambio en el espectro de absorción ultravioleta-visible (por ejemplo, un cambio en la absorbancia a una longitud de onda de absorción específica).

Los ejemplos típicos de los medios para poner en contacto la muestra a medir y la sonda fluorescente incluyen agregar, aplicar o pulverizar una solución que comprende la sonda fluorescente en una muestra. No obstante, se puede seleccionar un medio adecuado de acuerdo con la forma de la muestra o el ambiente de medición. Cuando una solución que comprende la sonda fluorescente se pulveriza sobre una muestra, se puede usar un dispositivo equipado, por ejemplo, con una unidad de alojamiento de solución química para alojar la solución química que comprende la sonda fluorescente y una unidad de pulverización de solución química construida para permitir que la solución química se pulverice sobre la muestra a medir. Tal dispositivo puede ser un endoscopio. Se describen ejemplos de endoscopios que tienen tal función, por ejemplo, en los documentos JP Kokai 2010-240188 y JP Kokai 2015-23904. Además, el dispositivo también puede estar equipado con medios de obtención de imágenes fluorescentes tal como se describió anteriormente para observar la respuesta de fluorescencia debida a la sonda fluorescente.

La concentración aplicable de la sonda fluorescente de la presente invención no está particularmente restringida; por ejemplo, se puede aplicar una solución de una concentración de aproximadamente 0,1-10 µM.

La detección de la dipeptidil peptidasa IV por el método de la presente invención se puede realizar generalmente en condiciones neutras, por ejemplo un intervalo de pH de 5,0-9,0, preferentemente, un intervalo de pH de 6,0-8,0, más preferentemente, un intervalo de pH de 6,8-7,6. Cualquier ajustador de pH y tampón conocido en la técnica, tal como el tampón fosfato, se puede usar como medio para ajustar el pH.

5. Kit

Un kit para detectar dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende la sonda fluorescente anterior se usa preferentemente en el método de detección de la presente invención. En particular, cuando la proteasa anterior es quimotripsina, el kit incluye preferentemente la sonda fluorescente y la tripsina anteriores, y la sonda fluorescente y la tripsina se almacenan preferentemente para que no se mezclen durante el tiempo anterior a la realización de la medición. La sonda fluorescente de la presente invención generalmente se prepara como una solución en este kit, pero también se puede proporcionar como una composición de una forma adecuada, tal como una mezcla en forma de polvo, producto liofilizado, gránulos, comprimidos o líquido, y también se puede aplicar disuelta en agua destilada

para inyección o un tampón adecuado en el momento del uso.

Este kit también puede incluir otros reactivos según sea necesario. Por ejemplo, los auxiliares de disolución, los ajustadores de pH, los tampones, los agentes isotonificantes y otros aditivos de este tipo se pueden usar como aditivos, y un experto en la materia puede seleccionar las cantidades del compuesto según sea apropiado.

Ejemplos

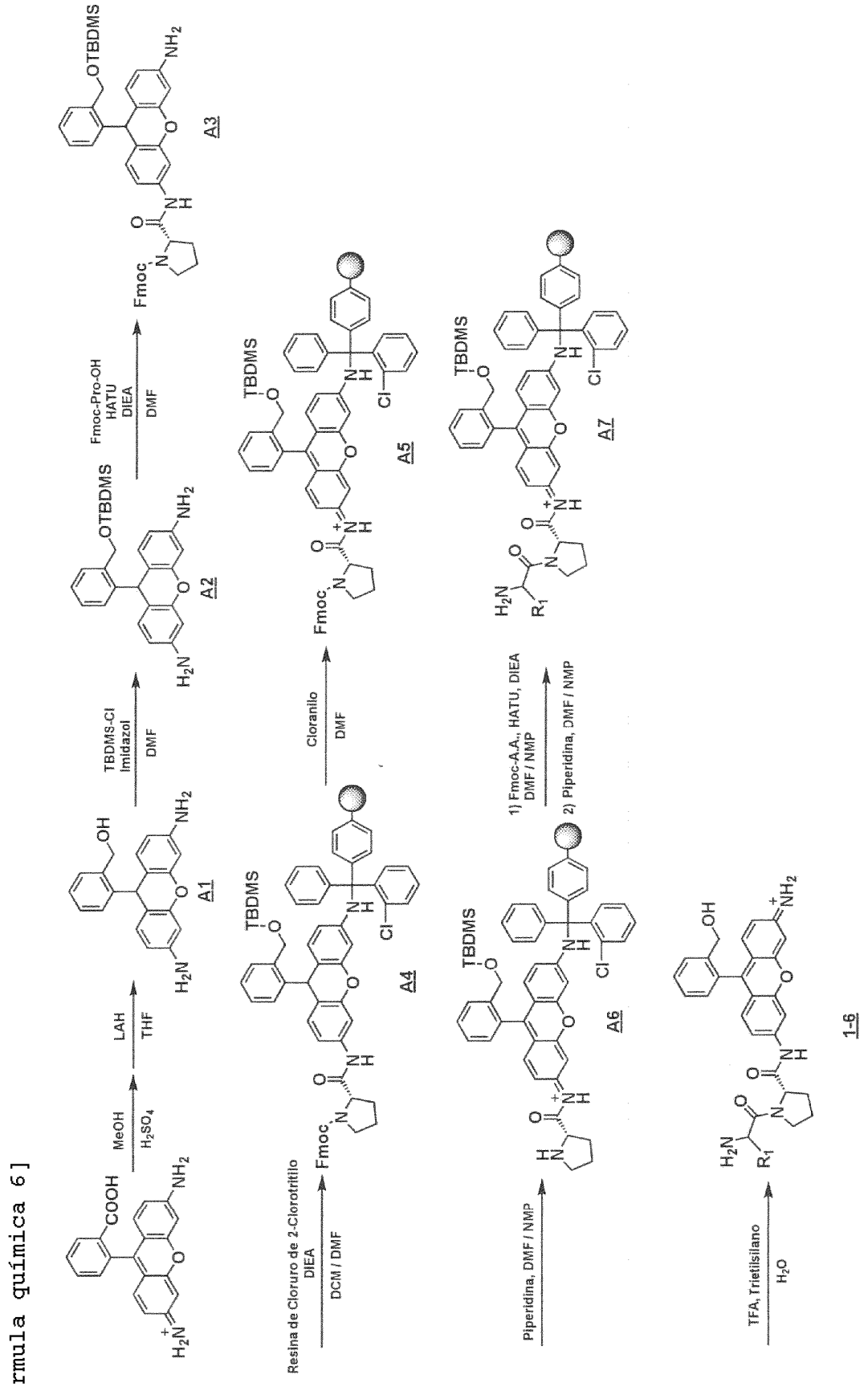
La presente invención se explica en mayor detalle a continuación a través de los ejemplos.

Ejemplo 1

1. Síntesis de una sonda fluorescente

El verde hidroximetil rodamina (HRMG) que tiene diversos sitios de dipéptido se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema. Además, los compuestos 1-6 que tienen diferentes sitios de dipéptido se obtuvieron variando el aminoácido Fmoc usado durante la síntesis del compuesto A7.

[Fórmula química 6]



Síntesis del compuesto A1

Mil ciento veintisiete miligramos (3,12 mmol, 1 Eq) de cloruro de rodamina 110 se disolvieron en 180 ml de metanol y se agitaron durante una noche a 80 °C en una atmósfera de argón después de añadir 9 ml de ácido sulfúrico. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente de la reacción se eliminó a presión reducida, el resto se neutralizó mediante la adición de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, y la solución se filtró. El sólido obtenido por filtración se disolvió en metanol y se recuperó, y el metanol se eliminó a presión reducida. El resto se disolvió en 200 ml de tetrahidrofurano, se añadieron 1545 mg (40,7 mmol, 13 Eq) de hidruro de litio y aluminio mientras se agitaba en un baño de hielo, y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, blindado de la luz por papel de aluminio. Después de añadir 30 ml de metanol mientras se agita la solución de reacción en un baño de hielo, el disolvente orgánico se eliminó a presión reducida. Se añadieron doscientos mililitros de solución acuosa saturada de sal de Rochelle y 100 ml de acetato de etilo al resto, y se agitó durante una noche en una atmósfera de argón, blindado de la luz por papel de aluminio. Después de extraer la capa de acetato de etilo de la solución de reacción mediante un procedimiento de separación, el acetato de etilo se eliminó a presión reducida. El resto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (diclorometano/metanol=90/10), y se obtuvo el compuesto diana (557 mg, 56 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, CD_3 DO): δ 4,63 (s, 2H), 5,38 (s, 1H), 6,30 (dd, 2H, J=2,1, 9,0Hz), 6,41 (d, 2H, J = 2,1Hz), 6,64 (d, 2H, J = 9,0Hz), 7,04-7,08 (m, 1H), 7,14-7,16 (m, 2H), 7,39-7,42 (m, 1H)
RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3 DO): δ 40,2, 63,0, 103,4, 112,2, 115,4, 127,3, 128,7, 128,9, 131,2, 131,9, 145,7, 148,5, 152,8 HRMS (ESI^+): calculado para $[M+H]^+$, 319,14018 hallado, 319,14465 (-4,48 umm)

Síntesis del compuesto A2

Se disolvieron quinientos cincuenta y siete miligramos (1,75 mmol, 1 Eq) de compuesto A1, 402 mg (2,66 mmol, 1,5 Eq) de cloruro de t-butildimetilsililo, y 242 mg (3,55 mmol, 2 Eq) de imidazol en 25 ml de N,N'-dimetilformamida y se agitaron durante cuatro horas en una atmósfera de argón, blindado de la luz por papel de aluminio. Después de añadir 100 ml de agua, se añadió acetato de etilo, y la capa de acetato de etilo se extrajo mediante un procedimiento de separación. El acetato de etilo se eliminó a presión reducida, y el resto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano=2/3), y se obtuvo el compuesto diana (713 mg, 94 %).
RMN de ^{1}H (400 MHz, acetona-d_6): δ 0,11 (s, 6H), 0,98 (s,9H), 4,72 (s, 4H), 4,79 (s, 2H), 5,44 (s, 1H), 6,35 (dd, 2H, J=2,9, 10,7Hz), 6,46 (d, 2H, J = 2,9Hz), 6,71 (d, 2H, J = 10,7Hz), 7,22-7,29 (m, 3H), 7,53-7. 57 (m, 1H)
RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ -5,47, 18,3, 25,9, 39,1, 62,9, 102,0, 110,6, 114,1, 126,4, 127,2, 127,4, 130,4, 130,7, 138,5, 143,9, 146,0, 151,3
HRMS (ESI^+): calculado para $[M+H]^+$, 433,23113 hallado, 433,23114 (0,01 umm)

Síntesis del compuesto A3

Se disolvieron trescientos once miligramos (0,720 mg, 2 Eq) de compuesto A2, 124 mg (0,368 mmol, 1 Eq) de Fmoc-prolina, y 137 mg (0,360 mmol, 1 Eq) de HATU en 5 ml de N, N'-dimetilformamida, seguido de la adición de 128 µl (0,722 mmol, 2 Eq) de N, N-diisopropiletilamina y agitación durante 90 minutos a 50 °C en una atmósfera de argón. Después de eliminar el disolvente de reacción a presión reducida, el resto se disolvió en acetato de etilo, se añadió solución salina saturada y se realizó un procedimiento de separación. La capa de acetato de etilo se extrajo y se eliminó a presión reducida, y el resto obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano=1/1), y se obtuvo el compuesto diana (167 mg, 62 %).
HRMS (ESI^+): calculado para $[M+H]^+$, 752,35197; encontrado, 752,35316 (1,19 umm)

Síntesis del compuesto A4

Se disolvieron ciento sesenta y siete miligramos (0,222 mmol, 1,5 Eq) de compuesto A3 en 1,6 ml de diclorometano y 0,4 ml de N,N'-dimetilformamida, luego se añadieron 102 mg (0,145 mmol, 1 Eq) de resina de cloruro de 2-clorotritilo y 200 µl (1,13 mmol, 7,8 Eq) de N,N-dietilisopropilamina y se agitó durante 24 horas en una atmósfera de argón, blindado de la luz por papel de aluminio. Después de eliminar el disolvente de reacción por filtración, la resina se lavó con diclorometano/metanol/N,N-diisopropiletilamina=solución mixta 17/2/1 y diclorometano. La resina obtenida se dividió en seis partes iguales.

Los compuestos A5-A7 y los compuestos 1-6 se sintetizaron a continuación de acuerdo con un método de síntesis de péptidos en fase sólida.

Síntesis del compuesto A5

El A4 obtenido se dividió en seis partes iguales, y se añadieron a cada una 1,1 ml de N, N'-dimetilformamida. Después de agitar durante una hora, la solución se eliminó por filtración, y se añadieron 1,6 ml de solución de tetracloro-p-benzoquinona 120 mM N,N'-dimetilformamida y se agitó durante 30 minutos. La solución se eliminó por filtración, se añadieron 1,1 ml de N,N'-dimetilformamida y se agitó durante un minuto, y la solución se eliminó por filtración.

Síntesis del compuesto A6

Se añadió una cantidad de 800 µl de solución de piperidina al 20% / N,N'-dimetilformamida (v/v) y se agitó durante tres minutos, la solución se eliminó por filtración, se añadieron nuevamente 800 µl de solución de piperidina al 20 % / N,N'-dimetilformamida (v/v) y se agitó durante 12 minutos, y la solución se eliminó por filtración. La operación de añadir 900 µl de N,N'-dimetilformamida y agitar durante un minuto, y eliminar la solución se realizó seis veces.

Síntesis del compuesto A7

Una cantidad de 440 µl de una solución de HATU 440 nM/N,N'-dimetilformamida, 200 µl de solución de N,N-dietilisopropilamina 2 M/N-metilpirrolidona y 400 µl de aminoácido Fmoc 480 mM (1; Fmoc-glicina, 2; Fmoc-ácido t-butil-glutámico, 3; Fmoc-Boc-lisina, 4; Fmoc-t-butil-tirosina, 5; Fmoc-leucina, 6; Fmoc-prolina)/N,N'-dimetilformamida en solución se agitó durante dos horas. La solución se eliminó por filtración, se añadieron 900 µl de N,N'-dimetilformamida y se agitó durante un minuto, y se eliminó la solución. Una cantidad de 440 µl de HATU 440 mM/ N,N'-dimetilformamida, 200 µl de solución de N,N-dietilisopropilamina 2M/N-metilpirrolidona y 400 µl de Fmoc-aminoácido 480 mM (los siguientes se usaron respectivamente de acuerdo con los compuestos 1-6. 1; Fmoc-glicina, 2; Fmoc-ácido t-butil-glutámico, 3; Fmoc-Boc-lisina, 4; Fmoc-t-butil-tirosina, 5; Fmoc-leucina, 6; Fmoc-prolina)/N,N'-dimetilformamida en solución se agitó de nuevo durante dos horas. La solución se eliminó por filtración, se añadieron 900 µl de N,N'-dimetilformamida y se agitó durante un minuto, y se eliminó la solución. Una cantidad de 440 µl de HATU 440 mM/N,N'-dimetilformamida, 200 µl de solución de N,N-dietilisopropilamina 2 M/N-metilpirrolidona y 400 µl de aminoácido Fmoc 480 mM (1; Fmoc-glicina, 2; Fmoc-ácido t-butil-glutámico, 3; Fmoc-Boc-lisina, 4; Fmoc-t-butil-tirosina, 5; Fmoc-leucina, 6; Fmoc-prolina)/N,N'-dimetilformamida en solución se agitó por tercera vez durante una hora. La solución se eliminó por filtración, se añadieron 900 µl de N,N'-dimetilformamida y se agitó durante un minuto, y se eliminó la solución. Se añadió una cantidad de 800 µl de solución de piperidina al 20 %/ N,N'-dimetilformamida (v/v) y se agitó durante tres minutos, la solución se eliminó por filtración, se añadieron nuevamente 800 µl de solución de piperidina al 20 % / N,N'-dimetilformamida (v/v) y se agitó durante 12 minutos, y la solución se eliminó por filtración. La operación de añadir 900 µl de N,N'-dimetilformamida y agitar durante un minuto, y eliminar la solución se realizó seis veces.

Síntesis del compuesto A7

La resina obtenida se transfirió a un vial de 30 ml y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético, 200 µl de agua y 200 µl de trietilsilano y se agitó durante dos horas. La resina se eliminó por filtración. Después de lavar con acetonitrilo, el filtrado se destiló a presión reducida y se añadieron 40 ml de éter dietílico al resto y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. Se eliminó el éter dietílico, se añadieron nuevamente 40 ml de éter dietílico y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, y se eliminó el éter dietílico. Después de secar al aire el resto durante la noche, se purificó usando HPLC. El compuesto 1-4, 6 se purificó por HPLC (eluyente A (H_2O TFA al 0,1 %) y eluyente B (CH_3CN al 80 %, H_2O al 20 %, TFA al 0,1 %) (A/B = 80/20 a 25/75, 45 min)), y se obtuvo el compuesto diana.
El compuesto 5 se purificó por HPLC (eluyente A (H_2O TFA al 0,1 %) y eluyente B (CH_3CN al 80 %, H_2O al 20 %, TFA al 0,1 %) (A/B=80/20 a 25/75, 45 min)), se purificó adicionalmente por HPLC (eluyente A (H_2O TFA al 0,1 %) y eluyente B (CH_3CN al 80 %, H_2O al 20 %, TFA al 0,1 %) (A/B=80/20 a 25/75, 45 min)), finalmente se purificó por HPLC (eluyente A (H_2O TFA al 0,1 %) y eluyente B (CH_3CN al 80 %, H_2O al 20 %, TFA al 0,1 %) (A/B = 80/20 a 25/75, 45 min)), y se obtuvo el compuesto diana.
[Rendimientos] Compuesto 1; 4,7 mg, 42 %, compuesto 2; 3,2 mg, 25 %, compuesto 3; 5,1 mg, 39 %, compuesto 4; 3,2 mg, 23 %, compuesto 5; 4,3 mg, 34 %, compuesto 6; 6,7 mg, 55 %)

Ejemplo 2

2. Ensayo de DPP-IV por sonda fluorescente

Se midieron los espectros de absorción y los espectros de fluorescencia del compuesto 1 (GP-HRMG) que tiene un sitio de dipéptido de glicina-prolina sintetizado en el Ejemplo 1 y verde de hidroximetil rodamina (HRMG) que no tiene un sitio de dipéptido. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	Longitud de onda de absorción máxima (nm)	Longitud de onda de fluorescencia máxima (nm)	Coeficiente de extinción molar $M^{-1}\,cm^{-1}$) a pH 7,4	Rendimiento cuántico de fluorescencia	p*K*cicl
HMRG	501	524	57.000	0,81	8,1
GP-HMRG	496	527	300	--	5,0

Los resultados en la Tabla 1 mostraron que el compuesto 1, que es una sonda fluorescente de la presente invención, está presente principalmente en una estructura de anillo cerrado incoloro, no fluorescente en condiciones neutras.

A continuación, se hizo que DPP-IV actuara sobre el compuesto 1, y se midieron los cambios en el espectro de absorción y el espectro de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 1 (la concentración del compuesto 1 fue de 3,5 µM). Se obtuvo un aumento en la absorbancia y la intensidad de fluorescencia del compuesto 1 en asociación con la adición de DPP-IV basándose en la Figura 1.

De manera similar, se hizo que DPP-IV actuara sobre el compuesto 1, y el análisis se realizó por cromatografía HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. La Figura 2 muestra que, dado que la posición máxima del compuesto 1 se vuelve igual a la de HRMG debido a la reacción con DPP-IV, el sitio dipéptido del compuesto 1 se hidroliza y se escinde por DPP-IV.

Además del compuesto 1, se realizaron ensayos de fluorescencia en los compuestos 2-6 sintetizados de la misma manera en el Ejemplo 1. Para las condiciones de la solución, se usó una solución que comprende 18 µl de solución que comprende una concentración de sonda fluorescente de 1,1 µM y tampón Tris HCl 20 mM (pH 7,1), y se usaron 2 µl de solución que comprende DPP-IV y tampón Tris HCl 20 mM. Los resultados obtenidos al añadir DPP-IV a cada solución que contiene una sonda fluorescente y medir el aumento de la intensidad de fluorescencia se muestran en las Figuras 3 y 4 (longitud de onda de excitación 501 nm, longitud de onda de fluorescencia 524 nm). La Figura 3 es un gráfico que muestra la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia seis minutos después de la adición de DPP-IV; La Figura 4 es un gráfico que representa la dependencia del tiempo de la intensidad de fluorescencia. Estos resultados aclararon que todos los compuestos funcionan como sondas fluorescentes para DPP-IV y que la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia depende del tipo de sitio de dipéptido.

Ejemplo 3

3. Obtención de imágenes de células vivas en células de cáncer de esófago cultivadas

La obtención de imágenes se realizó con el tiempo después de añadir GP-HMRG (compuesto 1) a seis tipos de células de carcinoma de células escamosas esofágicas humanas.

Como células de carcinoma de células escamosas esofágicas humanas, se cultivaron dos tipos altamente diferenciados (KYSE30, KYSE270), dos tipos moderadamente diferenciados (KYSE140, KYSE520) y dos tipos poco diferenciados (KYSE150, KYSE 1170) durante dos días a 37 °C, CO_2 al 5 % usando un pocillo µ-Slide 8. Después de añadir 0,2 µl de una solución de DMSO (10 mM) de GP-HMRG (compuesto 1) disuelto en 200 µl de RPMI 1640 (sin fenol rojo) (concentración final de la sonda 10 µM) gota a gota a la misma, se observaron las células durante 60 minutos usando un TCS SP5. Como un experimento inhibidor, las células se observaron durante 60 minutos usando un TCS SP5 de la misma manera después de la adición gota a gota de 5 µM de GP-HMRG (compuesto 1) y 100 µM de inhibidor de DPP-IV disuelto en 200 µl de RPMI 1640 (sin fenol rojo).

Como resultado, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia con el tiempo en todas las células. Además, la intensidad de fluorescencia fue menor con la sonda con inhibidor añadido que con las sondas sin inhibidor añadido (Figura 5).

Ejemplo 4

4. Obtención de imágenes de muestras de biopsia de cáncer de esófago humano

Se recolectó una muestra de biopsia de un área tumoral y de un área no tumoral de pacientes sometidos a endoscopia preoperatoria superior, y se obtuvieron imágenes y se midió la intensidad de fluorescencia con el tiempo después de la adición gota a gota de varias sondas fluorescentes (compuestos 1-6).

Se disolvieron 0,5 µl de una solución DMSO (10 mM) de las diversas sondas fluorescentes en 100 µl de RPMI 1640 (sin fenol rojo) (concentración final de la sonda 50 µM), y se añadieron 50 µl de la solución resultante gota a gota a cada una de las muestras, después de lo cual se midió la intensidad de fluorescencia durante 30 minutos usando un Sistema de obtención de imágenes *in vivo* Maestro Ex. Como resultado, se descubrió que la intensidad de fluorescencia había aumentado en las áreas tumorales en comparación con las áreas no tumorales (Figuras 6 y 7). Además, la inmunotinción mostró alta expresión de DPP-IV en tejidos de las áreas tumorales.

Además, dado que fue posible reunir diez o más casos para GP-HMRG (compuesto 1), EP-HMRG (compuesto 2) y PP-HMRG (compuesto 6), el valor umbral se calculó a partir de los datos utilizando una curva ROC, y se determinó la sensibilidad, la especificidad, la tasa de diagnóstico correcta, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. Los resultados no fueron inferiores a los métodos convencionales de NBI (imagen de banda estrecha) y tinción con yodo (Tabla 2 (a)-(c)).

[Tabla 2]

Tabla 2(a) GP-HMRG (compuesto 1) (área tumoral: 14 casos, área no tumoral: 17 casos)

	5 min	10 min	30 min
ABC	0,99	0,98	0,95
Umbral	0,54	1,02	2,10
Sensibilidad	100	100	92,9
Especificidad	94,1	94,1	88,2
Tasa de diagnóstico correcta	96,8	96,8	90,3
Valor predictivo positivo	93,3	93,3	86,7
Valor predictivo negativo	100	100	93,8

Tabla 2(b) EP-HMRG (compuesto 2) (áreas tumorales: 32 casos, áreas no tumorales: 42 casos)

	5 min	10 min	30 min
ABC	0,93	0,93	0,95
Umbral	0,37	0,67	1,77
Sensibilidad	96,9	96,9	96,9
Especificidad	85,4	83,3	90,5
Tasa de diagnóstico correcta	90,5	89,2	93,2
Valor predictivo positivo	83,8	81,6	88,6
Valor predictivo negativo	97,3	97,2	97,4

Tabla 2(c) PP-HMRG (compuesto 3) (áreas tumorales: 15 casos, áreas no tumorales: 13 casos)

	5 min	10 min	30 min
ABC	0,88	0,94	0,94
Umbral	0,54	0,64	1,44
Sensibilidad	66,7	93,3	92,9
Especificidad	100	84,6	83,3
Tasa de diagnóstico correcta	82,1	89,3	88,5
Valor predictivo positivo	100	87,5	86,7
Valor predictivo negativo	72,2	91,7	90,9

Ejemplo 5

5. Obtención de imágenes de muestras quirúrgicas esofágicas humanas y muestras de DES

Las muestras de esófago de pacientes que se sometieron a cirugía y disección endoscópica de submucosa (DES) para cáncer de esófago se llevaron inmediatamente después de la extracción en cada tratamiento (es decir, muestras quirúrgicas y muestras de DES, respectivamente) a una sala de obtención de imágenes, y la obtención de imágenes se realizó con el tiempo después de pulverizarlas directamente con varias sondas fluorescentes (compuestos 1-6). Para muestras quirúrgicas, se disolvieron 10 µl de una solución de DMSO (10 mM) de las diversas sondas fluorescentes en 2 ml de RPMI 1640 (sin fenol rojo) (concentración final de la sonda 50 µM), y se realizó la obtención de imágenes utilizando un Sistema de obtención de imágenes *in vivo* Maestro Ex después de pulverizar la sonda fluorescente sobre la muestra usando un tubo de pulverizador para un endoscopio. Para muestras de DES, se disolvieron 3 µl de una solución de DMSO (10 mM) de las diversas sondas fluorescentes en 600 µl de RPMI 1640 (sin rojo de fenol) (concentración final de la sonda 50 µM), y la obtención de imágenes se realizó con un Sistema de obtención de imágenes *in vivo* Maestro Ex después de añadir la sonda fluorescente gota a gota a la muestra.

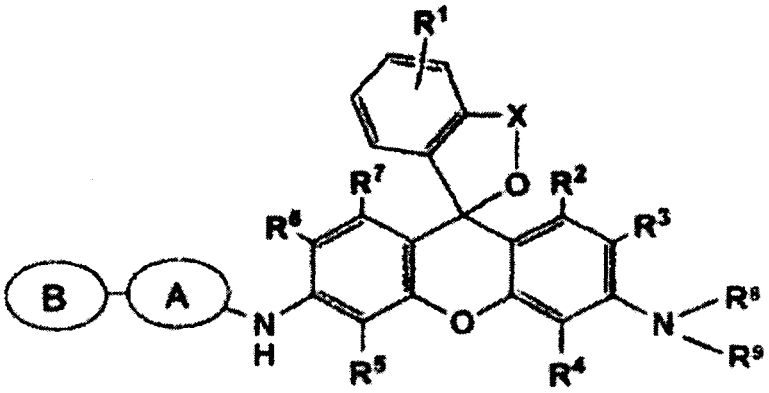
Como resultado, la visualización del área tumoral se logró varios minutos después de pulverizar la sonda (Figuras 8 y 9). La expresión de DPP-IV se observó mediante inmunotinción en muestras de las que se obtuvieron imágenes de las sondas fluorescentes, y se observó que correspondía a los resultados de imágenes fluorescentes anteriores.

Además, se realizó un experimento con inhibidores utilizando muestras quirúrgicas para mostrar que la sonda fluorescente reacciona a DPP-IV. De manera específica, se usó la gasa impregnada con 5 µl de una solución de DMSO (10 mM) de EP-HMRG (compuesto 2) disuelto en 1 ml de RPMI 1640 (sin fenol rojo) (concentración final de la sonda 50 µM) y la gasa impregnada con 5 µl de una solución de DMSO (10 mM) de EP-HMRG (compuesto 2) y 5 µl de un inhibidor de DPP-IV (10 mM) disuelto en 1 ml de RPMI 1640 (libre de rojo fenol). Cada uno se adhirió durante cinco minutos para cubrir la mitad de la muestra, y posteriormente se obtuvieron las imágenes. Como resultado, no se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en las áreas tumorales en los sitios donde se había pulverizado una sonda que comprende un inhibidor (Figura 10).

Los resultados anteriores demuestran que la presencia de cáncer de esófago humano se puede detectar con alta sensibilidad usando una sonda fluorescente de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una sonda fluorescente para detectar la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) o una sal del mismo:



(I)

en donde

A y B son iguales o diferentes y cada uno representa independientemente un resto de aminoácido; en donde A se une formando un enlace amida con el NH adyacente en la fórmula y B se une formando un enlace amida con A, y en donde un resto de aminoácido es una estructura que se corresponde con la estructura parcial que queda después de que un grupo hidroxilo ha sido eliminado de un grupo carboxilo de un aminoácido;

en donde A es un resto de aminoácido seleccionado de prolina y alanina;

R^1 representa un átomo de hidrógeno o uno a cuatro de los mismos o diferentes sustituyentes unidos a un anillo de benceno, siendo dichos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo amino monosustituido o disustituido, un grupo sililo sustituido y un grupo acilo;

R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 y R^7 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo o un átomo de halógeno;

R^8 y R^9 cada uno de manera independiente representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo;

X representa un grupo alquileno C_1-C_3,

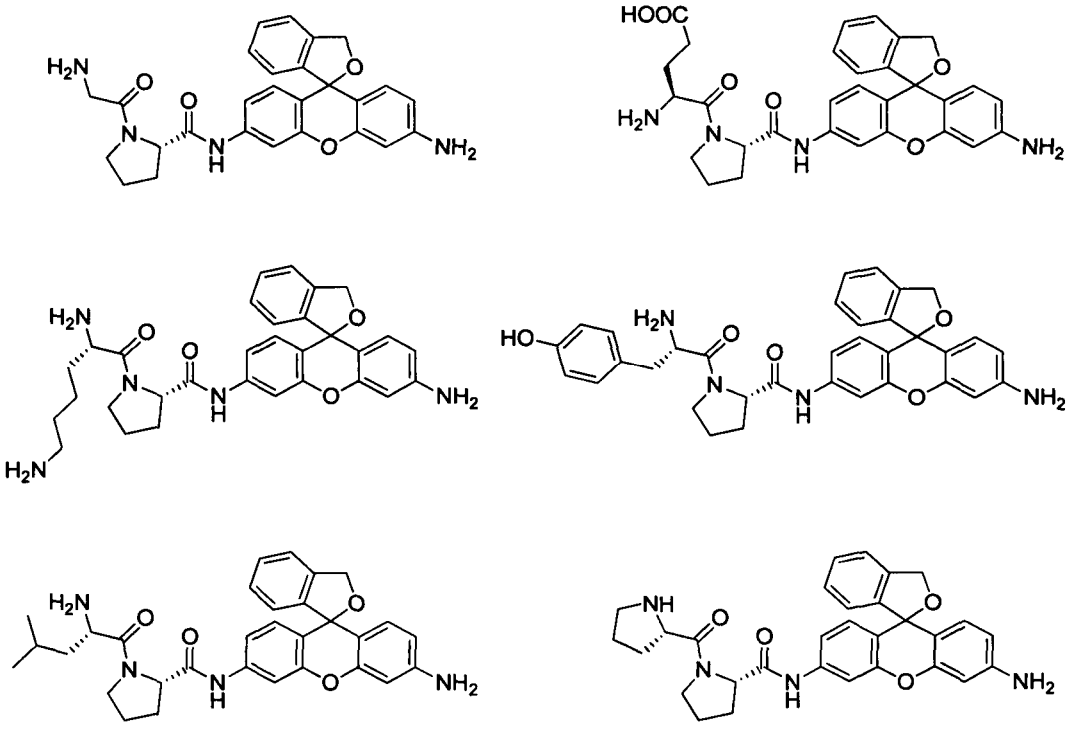
en donde el grupo alquilo es un grupo hidrocarbonado alifático de cadena lineal, ramificada, cíclica o una combinación de los mismos, y el grupo alcoxi es una estructura en la que un grupo alquilo está unido a un átomo de oxígeno.

2. La sonda fluorescente según la reivindicación 1, en la que B es un resto de aminoácido seleccionado de glicina, ácido glutámico, lisina, tirosina, leucina y prolina.

3. La sonda fluorescente según la reivindicación 1, en la que A es un resto de prolina y B es un resto de glicina.

4. La sonda fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8y R^9 son átomos de hidrógeno, y X es un grupo metileno.

5. Una sonda fluorescente para detectar dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende un compuesto seleccionado del siguiente grupo, o una sal del mismo:



6. Un método para detectar la dipeptidil peptidasa IV que comprende una etapa para poner la sonda fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en contacto con una muestra fuera del cuerpo y una etapa para observar la respuesta de fluorescencia debido a la reacción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP -IV) contenida en la muestra y la sonda fluorescente.

7. El método según la reivindicación 6 también caracterizado por visualizar la respuesta de fluorescencia usando medios de obtención de imágenes fluorescentes.

8. El método según la reivindicación 6 o 7, en donde un dispositivo equipado con una unidad de alojamiento de solución química para alojar una solución química que comprende la sonda fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y una unidad de pulverización de solución química construida para hacer posible el pulverizado de dicha solución química sobre dicha muestra, se usa para pulverizar la solución química que comprende la sonda fluorescente sobre la muestra.

9. El método según la reivindicación 8, en donde el dispositivo está equipado además con medios de obtención de imágenes fluorescentes para observar la respuesta de fluorescencia debido a la reacción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) contenida en la muestra y la sonda fluorescente.

10. El método según la reivindicación 6 o 7, en donde el dispositivo es un endoscopio.

11. Un método para detectar células diana que expresan la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) en una muestra fuera del cuerpo usando la sonda fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

12. El método según la reivindicación 11, en donde las células diana son células cancerosas.

13. El método según la reivindicación 12, en donde las células cancerosas son células cancerosas del esófago.

14. Un kit para detectar la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que comprende la sonda fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

FIG. 1

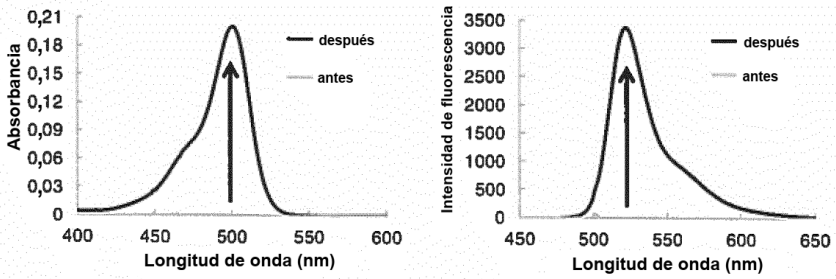
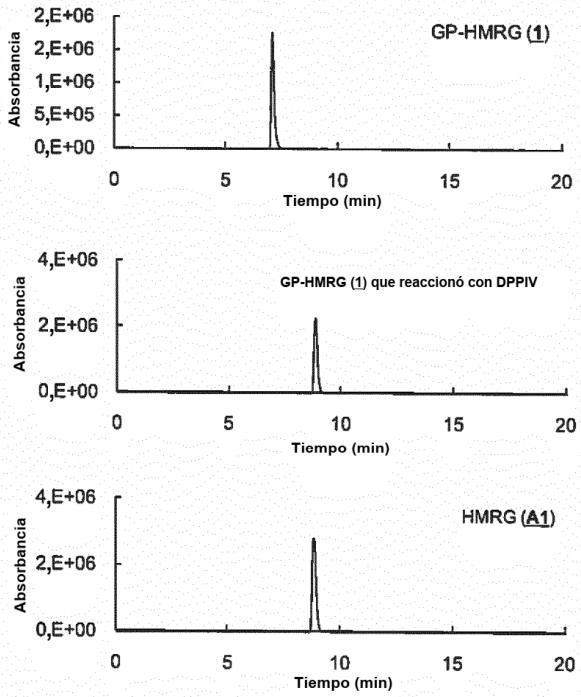
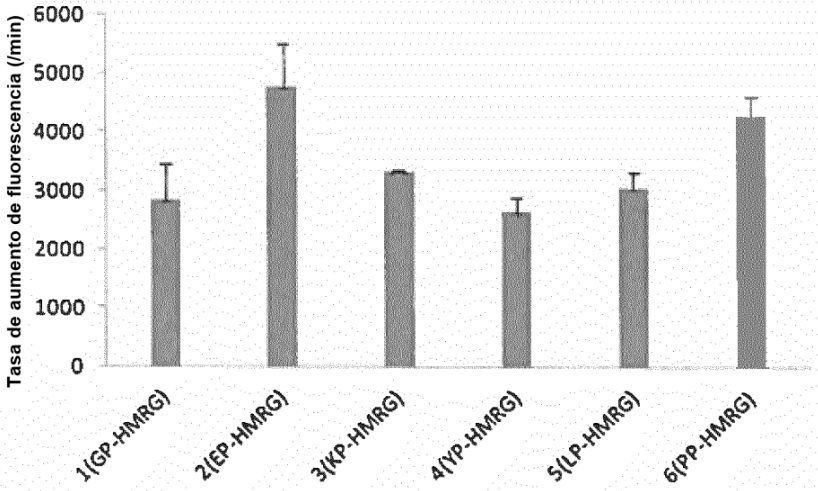


FIG. 2



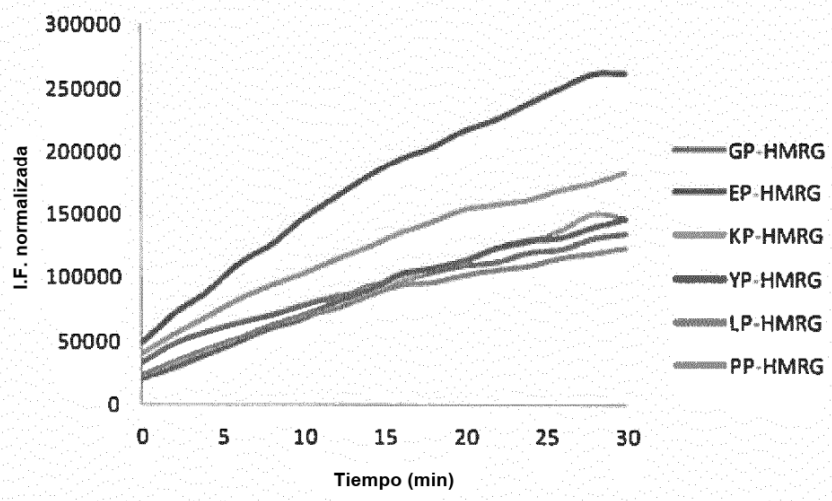
Cromatograma HPLC de GP-HMRG después de la reacción con DPPIV. También se muestran los cromatogramas de colorante sin reaccionar (7,1 min) y HMRG (8,9 min).
La elución se hizo con un gradiente lineal (eluyente, 0 min, CH_3CN al 20 %/TFA ac. al 0,1 % ~15 min, CH_3CN al 80 %/TFA ac. al 0,1 %; caudal = 1,0 ml/min).

FIG. 3



Tasa de aumento de fluorescencia (Ex/Em = 501 nm/524 nm) a 6 min de la sonda de 1,1 µM en 18 µl de Tris-HCl 20 mM y solución de DPPIV en 2 pl de Tris-HCl 20 mM. Incubado a 37 ºC. La barra de error representa la D.T. (n=4).

FIG. 4



Intensidad de fluorescencia normalizada (Ex/Em = 501 nm/524 nm) de la sonda de 1,1 µM en 18 µl de Tris-HCl 20 mM y solución de DPPIV en 2 µl de Tris-HCl 20 mM. Incubado a 37 ºC (n=4).

FIG. 5

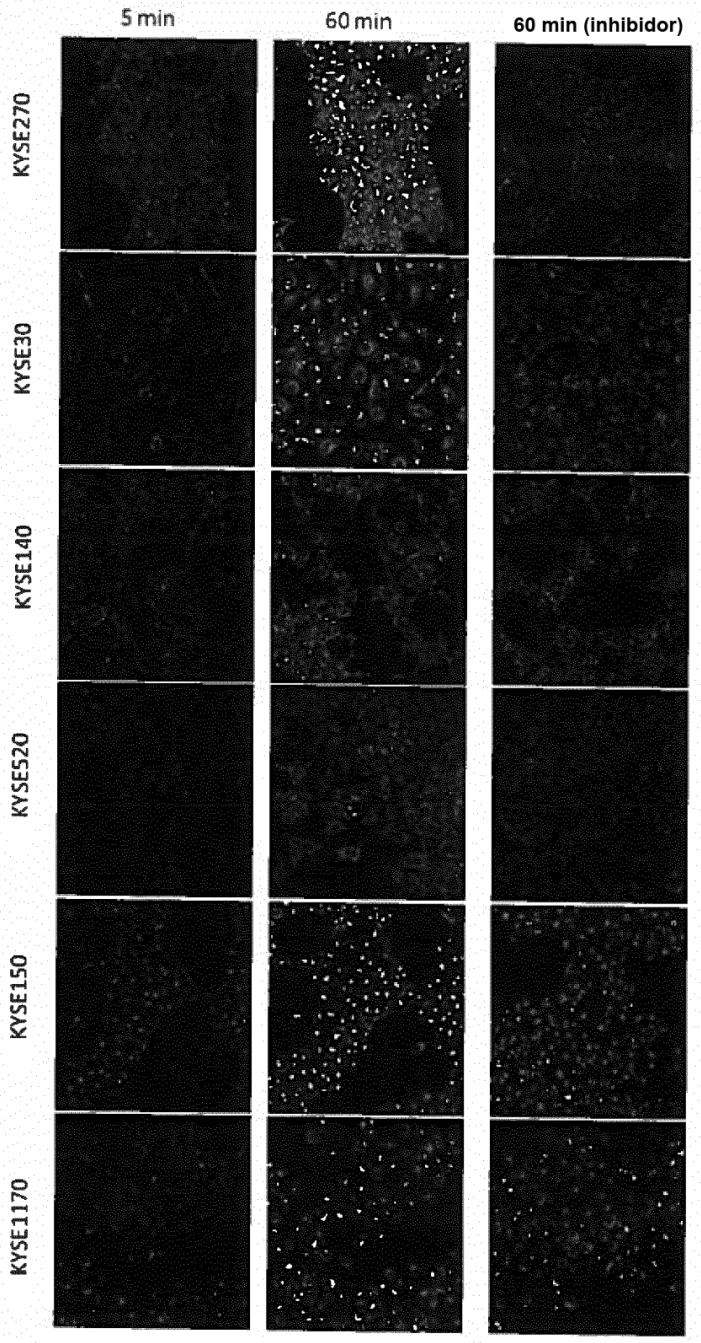

5 min
60 min
60 min (inhibidor)
KYSE270
KYSE30
KYSE140
KYSE520
KYSE150
KYSE1170

FIG. 6

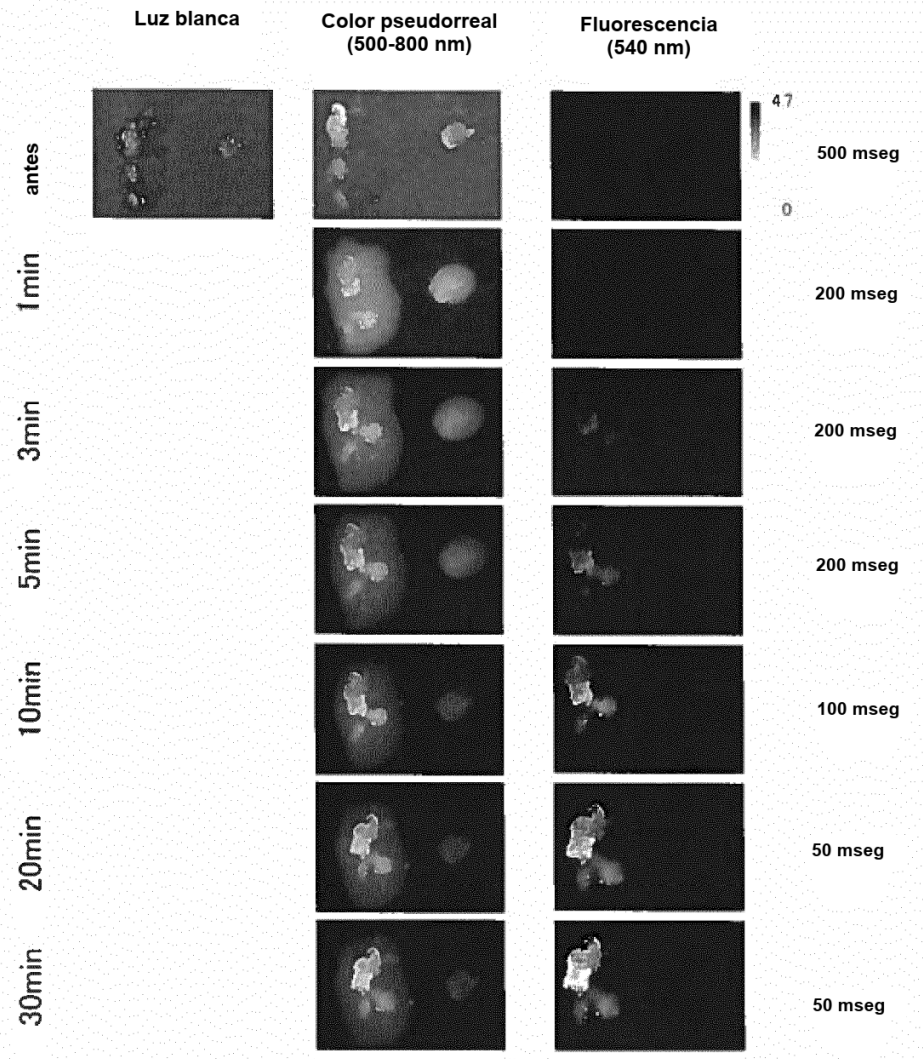


FIG. 5 Imágenes de Maestro de muestras de biopsia de cáncer de esófago humano (ejemplo usando GP-HMRG)

El lado izquierdo de las fotografías son muestras de zonas tumorales y el lado derecho son de zonas no tumorales (el lado izquierdo se enumera como CCE y el derecho como hallazgos no malignos en los diagnósticos de histopatología)

Fig. 7

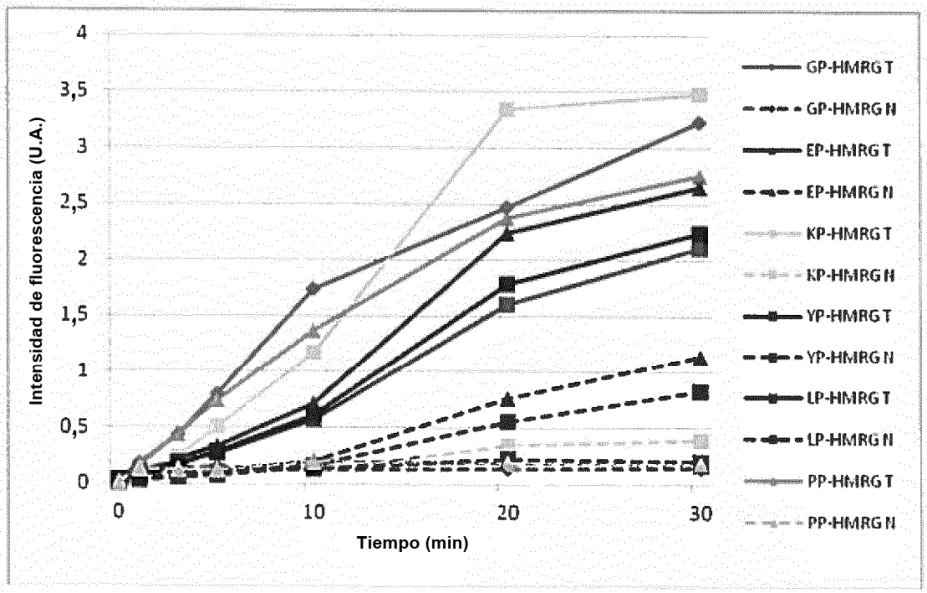
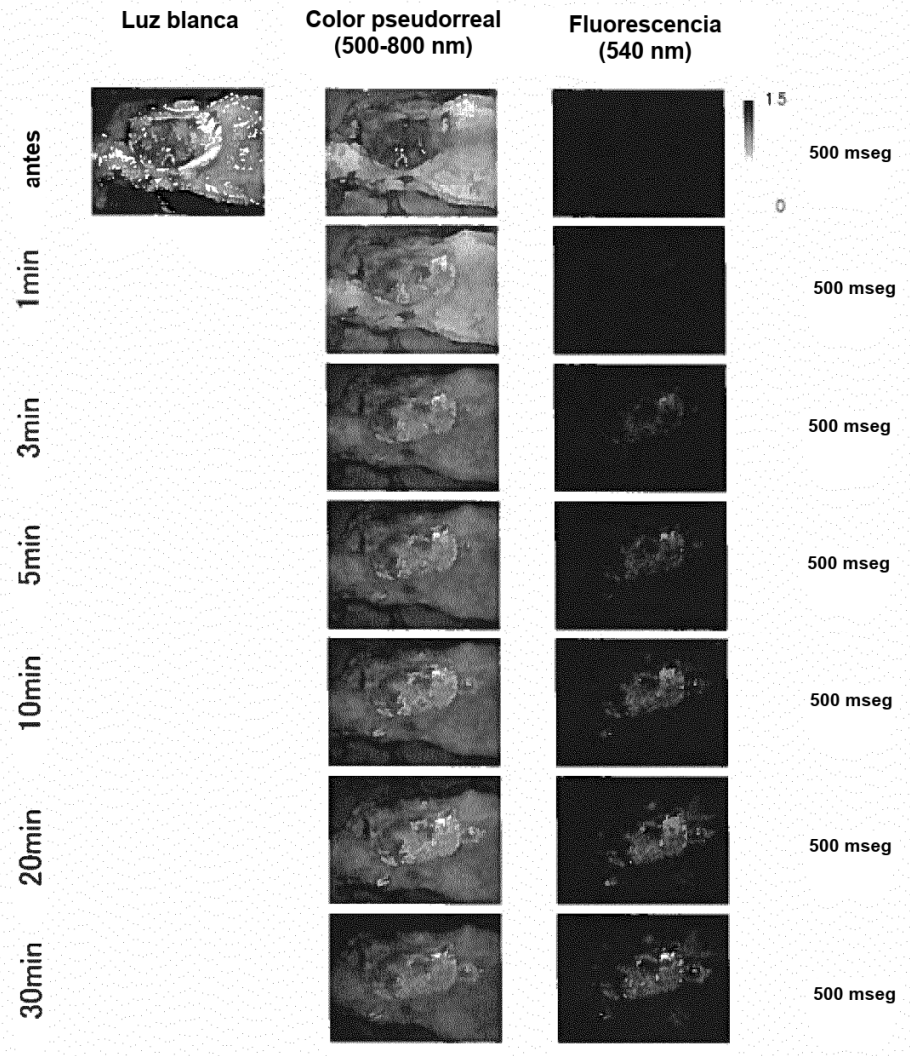


FIG. 6 Cambios en la intensidad de fluorescencia mediante obtención de imágenes de muestras de biopsia de cáncer de esófago humano (las líneas continuas son valores de zonas tumorales, las líneas punteadas son las de zonas no tumorales)

FIG. 8

(a) Imágenes de Maestro de muestras quirúrgicas de cáncer de esófago humano (ejemplo usando GP-HMRG)

[Fig.8(a)]



(b) Comparación de las imágenes mostradas en la Figura 8(a) con imágenes normales e imágenes teñidas con yodo

[Fig.8(b)]

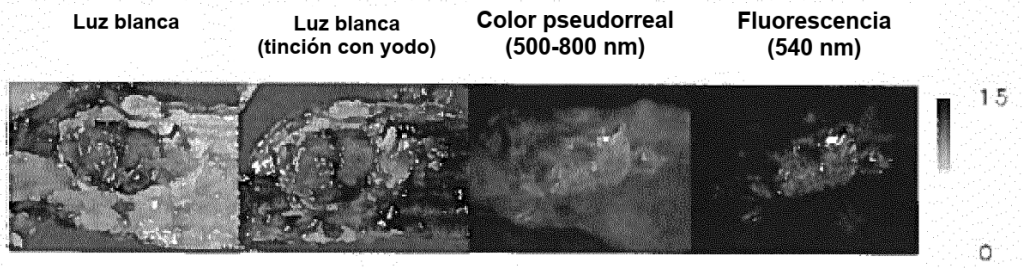
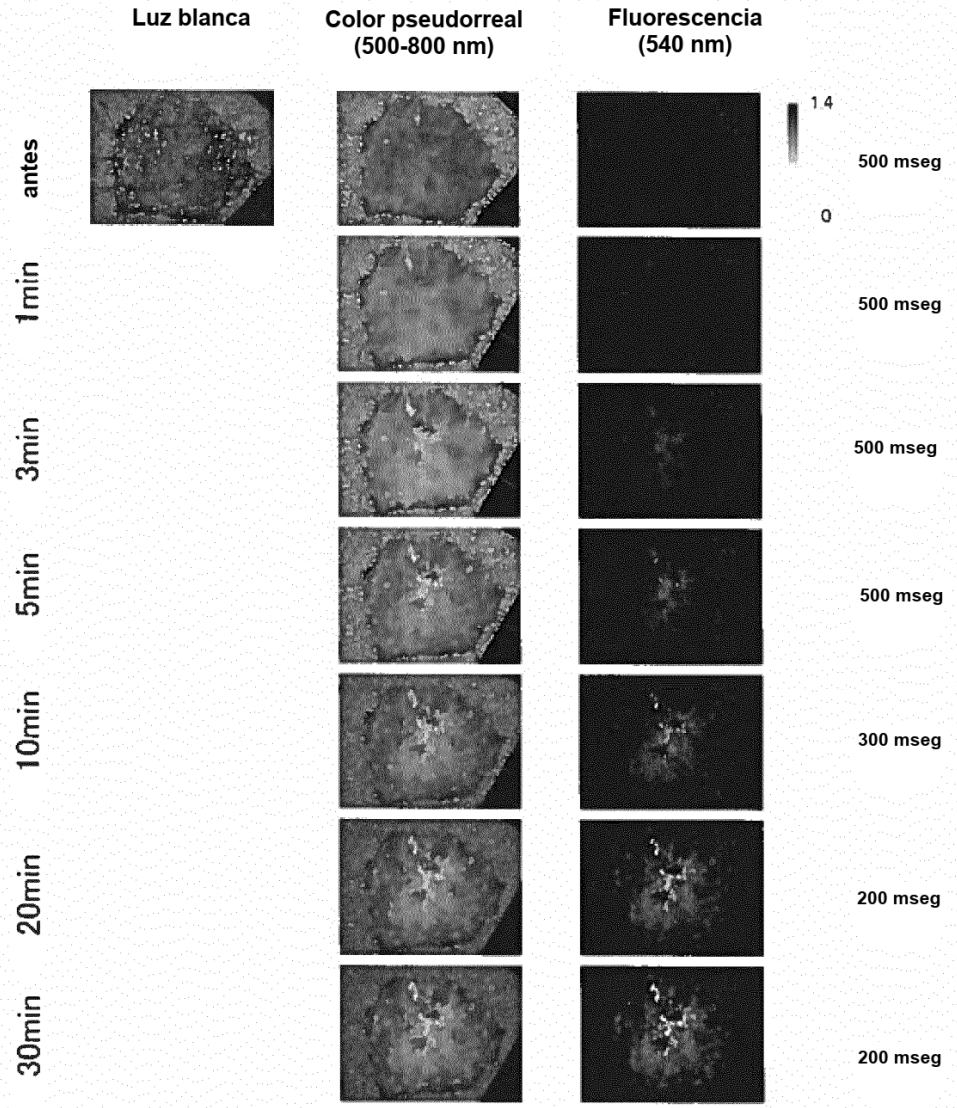


FIG. 9

(a) Imágenes de Maestro de muestras de DES de cáncer de esófago humano (ejemplo usando EP-HMRG)

[Fig.9(a)]



(b) Comparación de imágenes mostradas en la Figura 9(a) con imágenes normales e imágenes teñidas con yodo

[Fig.9(b)]

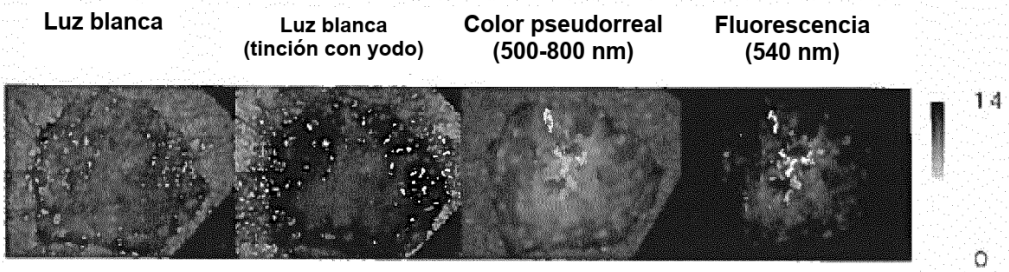
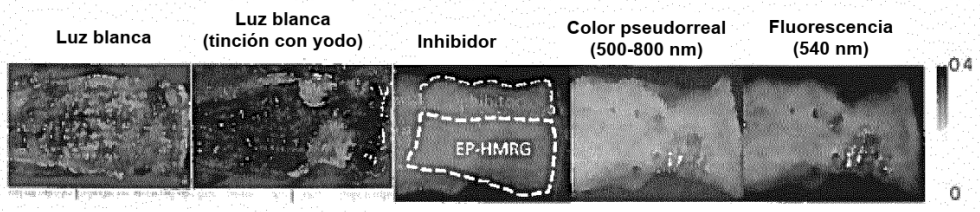


FIG. 10

Imágenes de Maestro de muestras quirúrgicas de cáncer de esófago humano con inhibidor añadido

[Fig.10]