

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501923

(P2004-501923A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 487/22	C O 7 D 487/22	4 C O 5 0
A61K 31/409	A 6 1 K 31/409	4 C O 8 5
A61K 39/395	A 6 1 K 39/395	C 4 C O 8 6
A61P 25/00	A 6 1 K 39/395	L
A61P 29/00	A 6 1 P 25/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 221 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-505786 (P2002-505786)	(71) 出願人	501132907
(86) (22) 出願日	平成13年6月26日 (2001.6.26)		カタリスト バイオメディカ リミテッ ド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)		イギリス国 エヌダブル1 2ビーイー ロンドン ユーストン ロード 183
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002846	(74) 代理人	100072051
(87) 国際公開番号	W02002/000662		弁理士 杉村 興作
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)	(72) 発明者	ロス ウィリアム ポーイル
(31) 優先権主張番号	60/214,075		イギリス国 イースト ヨークシャー エ イチユウ17 7イーキュウ ビバリー バーニー クロス 45
(32) 優先日	平成12年6月26日 (2000.6.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	0113784.3		
(32) 優先日	平成13年6月6日 (2001.6.6)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発色団の改善及び発色団に関する改善

(57) 【要約】

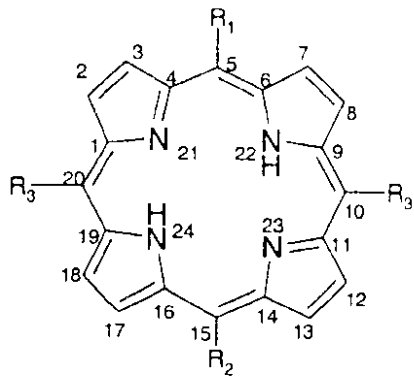
本発明は、新規なポルフィリン及びポルフィリン系発色団並びにポルフィリンとポルフィリン系発色団との組合せに関し、これらは特に、光化学治療及び蛍光分析及び画像処理を含む光線力学的な適用に広く有用である。特に、本発明は、新規で有用なポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリン発色団；かかる発色団の製造方法；及びかかる発色団の分析及び医学での使用方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の式 (I) のポルフィリン発色団：

【化 1】

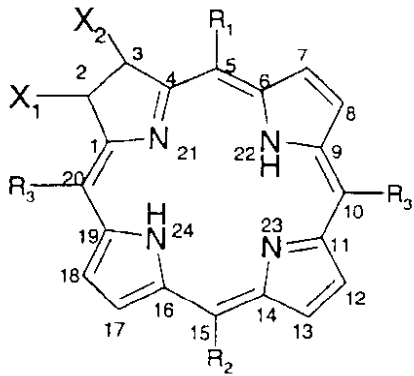


(I)

10

又は次の式 (II)、(III)、(IV)、及び (V) のいずれかのクロリン発色団：

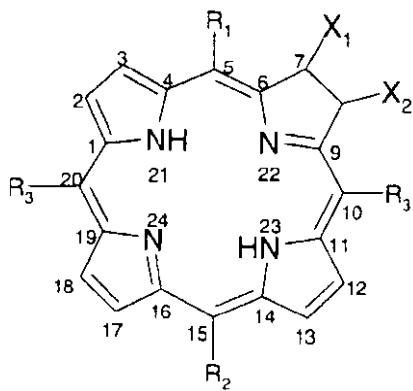
【化 2】



(II)

20

【化 3】

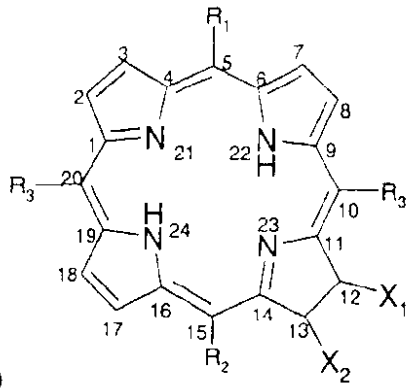


(III)

30

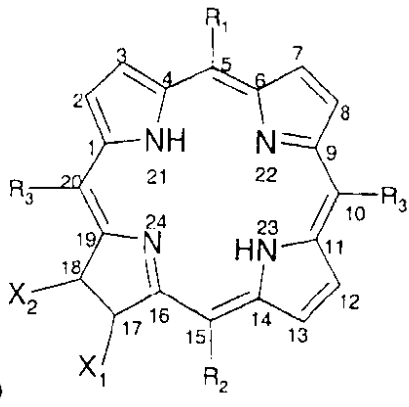
40

【化 4】



10

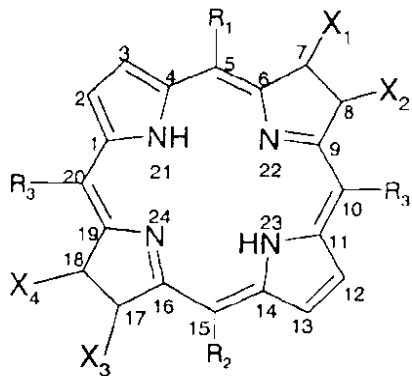
【化 5】



20

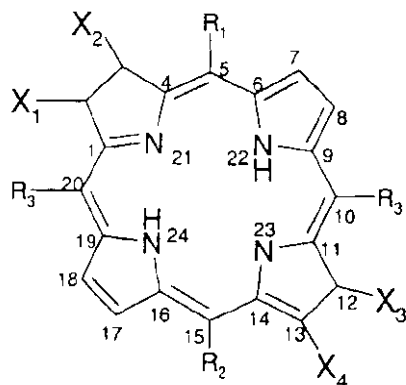
又は次の式 (VI) 及び (VII) のいずれかのバクテリオクロリン発色団：

【化 6】



30

【化 7】



(VII)

〔式中、 R_1 がアリール部分であり、このアリール部分が接合基 Z に連結し、この接合基がインビトロ又はインビボの所定の生物学的標的に発色団を送達するためのポリペプチド分子に前記発色団を接合させることができ；

R_2 が親水性アリール部分であり；

R_3 が H 又は親水性アリール又は親水性非芳香族部分であり；

及び X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 のそれぞれが、無関係に、H、OH、ハロゲン、 C_{1-3} アルキル及び OC_{1-3} アルキルから選ばれるか、又は隣接する C - C 結合を有する X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 がエポキシド又はシクロプロパニル構造を形成するように、 X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 が互いに、O、 CH_2 、 CHC_{1-3} アルキル、又は $C(C_{1-3} \text{アルキル})_2$ から選ばれる架橋部分を形成し；

式中、前記 R_2 及び前記 R_3 の一方又は双方が、フェニル環を含んでおり、このフェニル環が 1 又はそれ以上の回数、好ましくは少なくとも 2 回、1 又はそれ以上の親水性置換基によって置換されており、この親水性置換基が前記 R_2 及び / 又は前記 R_3 の親水性を高める役目を果たすか、又は四級化ピリジル（ピリジニウム）環のようなヘテロアリール環を含んでおり、このヘテロアリール環が随意に 1 又はそれ以上の回数、好ましくは少なくとも 2 回、1 又はそれ以上の親水性置換基によって置換されており、この親水性置換基が前記 R_2 及び / 又は前記 R_3 の親水性を高める役目を果たしており；

前記 1 又はそれ以上の親水性置換基が、無関係に、ヒドロキシ；メトキシ又はエトキシのようなアルコキシ； $C_2 \sim C_{15}$ ポリエチレングリコール；N - メチルピリジニウムのような四級化ピリジル（ピリジニウム）；モノ -、ジ - 又はポリ - 糖類； C_{1-6} アルキルスルホン酸；ホスホニウム基 $R_4 P(R_5)(R_6)(R_7)$ （式中、 R_4 が、単結合か、又は C_{1-6} アルキルであり、及び R_5 、 R_6 及び R_7 のそれぞれが、無関係に、水素、フェニル環のようなアリール環、ピリジル環のようなヘテロアリール環、及び C_{1-6} アルキル鎖から選ばれ、これらアリール環、ヘテロアリール環又は C_{1-6} アルキル鎖が置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキル又はアルコキシ、アリール、オキソ、ハロゲン、ニトロ、アミノ又はシアノによって置換されている。）；又はリン酸基又はホスホネート基 {それぞれ、 $R_8 OP(O)(OR_9)(OR_{10})$ 又は $R_8 P(O)(OR_9)(OR_{10})$ で表され、式中、 R_8 が、単結合か、又は C_{1-6} アルキルであり、及び R_9 及び R_{10} のそれぞれが無関係に水素及び C_{1-6} アルキルから選ばれている。} から選ばれており、

式中、前記 R_1 、 R_2 及び R_3 のそれぞれが随意に、更に 1 又はそれ以上の回数、- OH、- CN、- NO_2 、ハロゲン、- T、又は - OT {式中、T が C_{1-15} アルキル、シクロアルキル又はアリール基又はそれらのヒドロキシ化、ハロゲン化、硫酸化、スルホン化又はアミノ化誘導体又はそれらのカルボン酸、エステル、エーテル、ポリエーテル、アミド、アルデヒド又はケトン誘導体である。} によって置換されている。]

であることを特徴とする発色団。

【請求項 2】

10

20

30

40

50

前記アリール部分 R_1 がフェニル環を含んでおり、このフェニル環が前記発色団の大環状コアに、単結合によって連結しているか、又は C_{1-6} の分枝状又は線状アルキル鎖によって連結しているかのいずれかである請求項 1 記載の発色団。

【請求項 3】

R_3 が H であるか、又は C_{1-6} アルキル鎖のような親水性のアルキル部分であり、これが、1 又はそれ以上の回数、ヒドロキシ又は C_{2-15} ポリエチレングリコールのような 1 又はそれ以上の親水性置換基によって置換されている請求項 1 又は 2 記載の発色団。

【請求項 4】

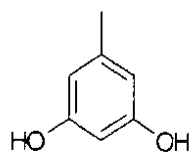
R_3 が親水性アリール部分からなり、このアリール部分が前記親水性アリール部分 R_2 と同じである請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の発色団。

10

【請求項 5】

前記 R_2 及び前記 R_3 の一方又は双方が、無関係に、
m, m - (ジヒドロキシ)フェニル

【化 8】

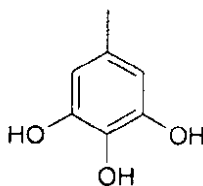


又はその PEG 化誘導体；

m, m, p - (トリヒドロキシ)フェニル

20

【化 9】

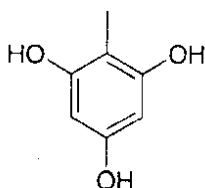


又はその PEG 化誘導体；

o, p, o - (トリヒドロキシ)フェニル

30

【化 10】

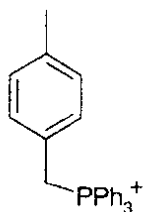


又はその PEG 化誘導体；

p - (メチルトリフェニルホスホニウム)フェニル

40

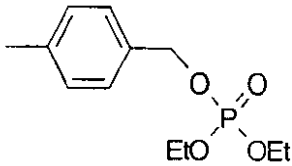
【化 11】



のような m - 又は p - (C_{1-6} アルキルトリフェニルホスホニウム)フェニル；

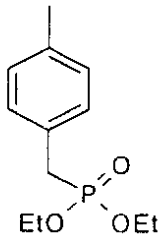
p - (メチルホスホノ - ジ - エトキシ)フェニル

【化 1 2】



のような m - 又は p - (C₁ - 6 アルキルホスホノ - ジ - アルコキシ) フェニル ;
p - (メチルホスホナト - ジ - エトキシ) フェニル

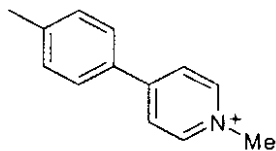
【化 1 3】



10

のような m - 又は p - (C₁ - 6 アルキルホスホナト - ジ - アルコキシ) フェニル ;
m - 又は p - (N - メチル - ピリジニウム) フェニル

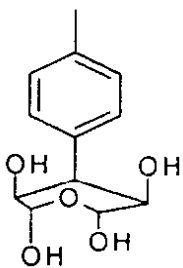
【化 1 4】



20

; ペントース - 、 ヘキソース - 又は二糖類 - 置換フェニル

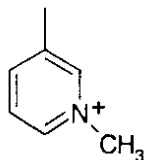
【化 1 5】



30

のようなメタ - 又はパラ - 糖 - 置換フェニル ;
及び m - N - メチルピリジニウム

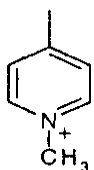
【化 1 6】



40

又は p - N - メチルピリジニウム

【化 1 7】

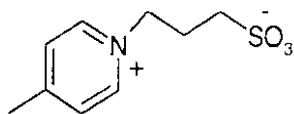


のような p - N - (C₁ - 6 アルキル) ピリジニウム基又は m - N - (C₁ - 6 アルキ 50

ル)ピリジニウム基のような四級化ピリジル(ピリジニウム)基;

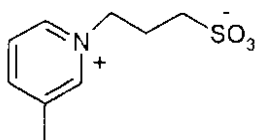
及び p - N - (C₁ - 6 アルキルスルホン酸)ピリジニウム又は m - N - (C₁ - 6 アルキルスルホン酸)ピリジニウム、特に、 p - N - (プロピルスルホン酸)ピリジニウム

【化 18】



又は m - N - (プロピルスルホン酸)ピリジニウム

【化 19】



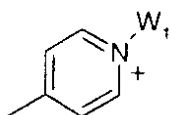
のような双性イオン基

から選ばれる請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の発色団。

【請求項 6】

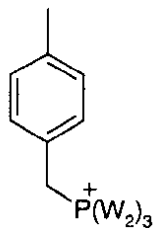
前記 R₃ が H であり、及び前記 R₂ が、

【化 20】



[式中、W₁ が、C₁ - 6 アルキル、又はヒドロキシ;メトキシ又はエトキシのようなアルコキシ;C₂ ~ C₁₅ ポリエチレングリコール;N - メチルピリジニウム基のような四級化ピリジル(ピリジニウム);モノ -、ジ - 又はポリ - 糖類;C₁ - 6 アルキルスルホン酸;ホスホニウム基 R₄ P (R₅) (R₆) (R₇) (式中、R₄ が、単結合か、又は C₁ - 6 アルキルであり、及び R₅、R₆ 及び R₇ のそれぞれが、無関係に、水素、フェニル環のようなアリアル環、ピリジル環のようなヘテロアリアル環、及び C₁ - 6 アルキル鎖から選ばれ、これらアリアル環、ヘテロアリアル環又は C₁ - 6 アルキル鎖が置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、ヒドロキシ、C₁ - 6 アルキル又はアルコキシ、アリアル、オキソ、ハロゲン、ニトロ、アミノ又はシアノによって置換されている。);又はリン酸基又はホスホネート基 {それぞれ、R₈ O P (O) (O R₉) (O R₁₀) 又は R₈ P (O) (O R₉) (O R₁₀) で表され、式中、R₈ が、単結合か、又は C₁ - 6 アルキルであり、及び R₉ 及び R₁₀ のそれぞれが無関係に水素及び C₁ - 6 アルキルから選ばれている。} から選ばれる親水性置換基である。];及び

【化 21】



[式中、W₂ が水素、C₁ - 6 アルキル、複素環式基又は芳香族基である。]

から選ばれることを特徴とする請求項 1 記載の発色団。

【請求項 7】

前記 R₂ 及び前記 R₃ が、

10

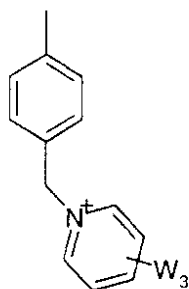
20

30

40

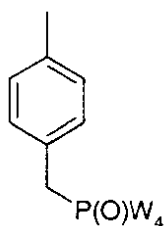
50

【化 2 2】



〔式中、 W_3 が、水素、又はヒドロキシ；メトキシ又はエトキシのようなアルコキシ； $C_2 \sim C_{15}$ ポリエチレングリコール；N-メチルピリジニウムミルのような四級化ピリジル（ピリジニウムミル）；モノ-、ジ-又はポリ-糖類； $C_1 \sim 6$ アルキルスルホン酸；ホスホニウム基 $R_4 P(R_5)(R_6)(R_7)$ （式中、 R_4 が、単結合か、又は $C_1 \sim 6$ アルキルであり、及び R_5 、 R_6 及び R_7 のそれぞれが、無関係に、水素、フェニル環のようなアリール環、ピリジル環のようなヘテロアリール環、及び $C_1 \sim 6$ アルキル鎖から選ばれ、これらアリール環、ヘテロアリール環又は $C_1 \sim 6$ アルキル鎖が置換されていないか、又は1又はそれ以上の回数、ヒドロキシ、 $C_1 \sim 6$ アルキル又はアルコキシ、アリール、オキソ、ハロゲン、ニトロ、アミノ又はシアノによって置換されている。）；又はリン酸基又はホスホネート基 {それぞれ、 $R_8 OP(O)(OR_9)(OR_{10})$ 又は $R_8 P(O)(OR_9)(OR_{10})$ で表され、式中、 R_8 が、単結合か、又は $C_1 \sim 6$ アルキルであり、及び R_9 及び R_{10} のそれぞれが無関係に水素及び $C_1 \sim 6$ アルキルから選ばれている。} から選ばれる親水性置換基である。〕；又は

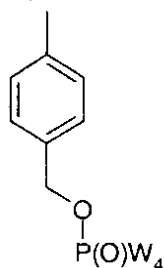
【化 2 3】



30

又は

【化 2 4】



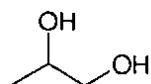
40

〔式中、 W_4 が OH 、 ONa 、及び $O(C_1 \sim 6$ アルキル) から選ばれる。〕
 の同じものであることを特徴とする請求項 1 記載の発色団。

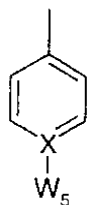
【請求項 8】

前記 R_3 が、

【化 2 5】

であり、及び前記 R_2 が、基

【化 2 6】



〔式中、 W_5 が、ヒドロキシ；メトキシ又はエトキシのようなアルコキシ； $C_2 \sim C_{15}$ ポリエチレングリコール； N -メチルピリジニウムミルのような四級化ピリジル（ピリジニウムミル）；モノ-、ジ-又はポリ-糖類； $C_1 \sim 6$ アルキルスルホン酸；ホスホニウム基 $R_4 P (R_5) (R_6) (R_7)$ (式中、 R_4 が、単結合か、又は $C_1 \sim 6$ アルキルであり、及び R_5 、 R_6 及び R_7 のそれぞれが、無関係に、水素、フェニル環のようなアリアル環、ピリジル環のようなヘテロアリアル環、及び $C_1 \sim 6$ アルキル鎖から選ばれ、これらアリアル環、ヘテロアリアル環又は $C_1 \sim 6$ アルキル鎖が置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、ヒドロキシ、 $C_1 \sim 6$ アルキル又はアルコキシ、アリアル、オキソ、ハロゲン、ニトロ、アミノ又はシアノによって置換されている。)；又はリン酸基又はホスホネート基 {それぞれ、 $R_8 OP(O)(OR_9)(OR_{10})$ 又は $R_8 P(O)(OR_9)(OR_{10})$ で表され、式中、 R_8 が、単結合か、又は $C_1 \sim 6$ アルキルであり、及び R_9 及び R_{10} のそれぞれが無関係に水素及び $C_1 \sim 6$ アルキルから選ばれている。} から選ばれる親水性置換基であり；及び X が C 又は N である。〕である請求項 1 記載の発色団。

10

20

【請求項 9】

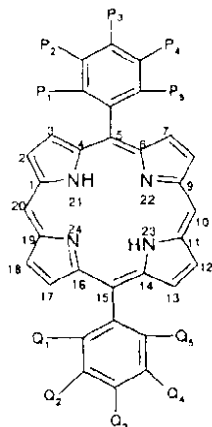
5, 15 - ジフェニルポルフィリン、5, 15 - ジフェニルクロリン又は 5, 15 - ジフェニルバクテリオクロリン発色団であって、5 - 及び 15 - フェニル基の各オルト-、メタ-、及び / 又はパラ-位のそれぞれが、置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ によってそれぞれ置換されており、それら置換基が無関係に H 又は不活性置換基であり、この置換基が他の置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ と相まって発色団の蛍光特性を実質的に損なうことなく；及び発色団が更に接合基 Z を含み、この接合基がインピトロ又はインピボの所定の生物学的標的に発色団を送達するためのポリペプチド分子に前記発色団を接合させることができることを特徴とする発色団。

30

【請求項 10】

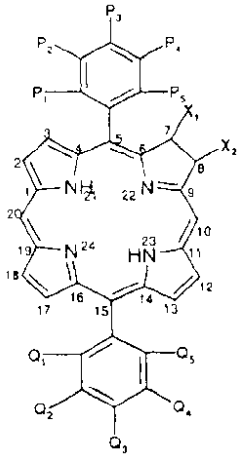
次の化合物：

【化 2 7】



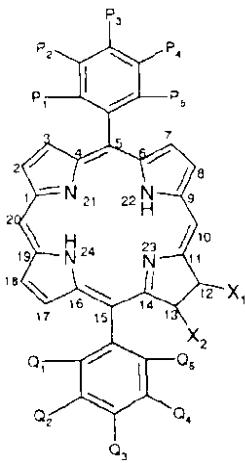
40

【化 2 8】



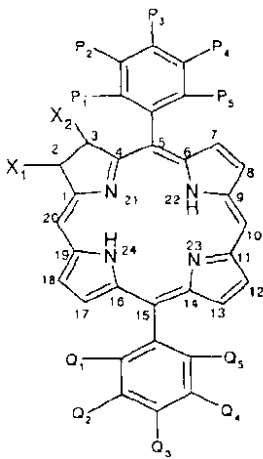
10

【化 2 9】



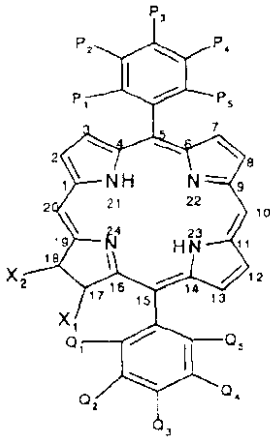
20

【化 3 0】



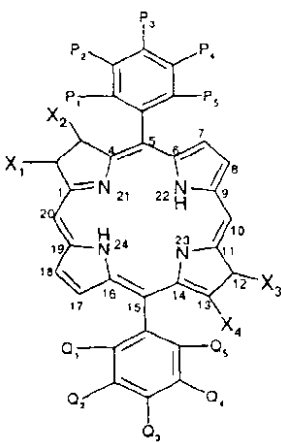
30

【化 3 1】



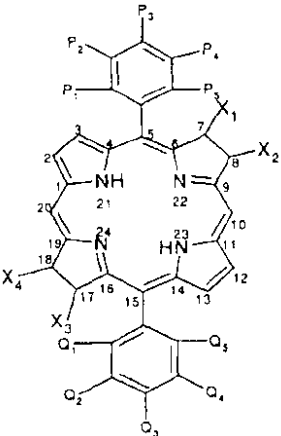
10

【化 3 2】



20

【化 3 3】



30

〔式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 のそれぞれが、無関係に、 H 、 OH 、ハロゲン、 C_{1-3} アルキル及び OC_{1-3} アルキルから選ばれるか、又は隣接する $C-C$ 結合を有する X_1 及び X_2 及び/又は X_3 及び X_4 がエポキシド又はシクロプロパニル構造を形成するように、 X_1 及び X_2 及び/又は X_3 及び X_4 が互いに、 O 、 CH_2 、 CHC_{1-3} アルキル、又は $C(C_{1-3}アルキル)_2$ から選ばれる架橋部分を形成する。〕から選ばれる請求項 9 記載の発色団。 40

【請求項 1 1】

前記 $P_1 \sim P_5$ のそれぞれが、前記 2 つの主要なフェニル環が対称的に置換されるように、前記 $Q_1 \sim Q_5$ の相当する 1 種と同じであるか、又は実質的に同じである請求項 9 又は 10 記載の発色団。

【請求項 1 2】

50

前記 P₁ ~ P₅ の 1 又はそれ以上が、前記 2 つの主要なフェニル環が対称的に置換されないように、前記 Q₁ ~ Q₅ の相当する 1 種と同じでない請求項 9 又は 10 記載の発色団。

【請求項 13】

前記発色団が空气中で実質的に不活性であるが、実質的な範囲で、前記発色団のコアの周りの 2、3、7、8、12、13、17 又は 18 位での選択的な付加又は置換を抑制しないように、前記置換基 P₁ ~ P₅ 及び Q₁ ~ Q₅ が、全体として、前記発色団の自発的酸化の速度を減少させるのに十分な程度の前記発色団のコアの周りの立体障害を提供する請求項 9 ~ 12 のいずれか一項記載の発色団。

【請求項 14】

前記置換基 P₁ ~ P₅ 及び Q₁ ~ Q₅ の 1 又はそれ以上が、H、-OH、-CN、-NO₂、ハロゲン、-T、又は -OT (式中、T が C₁ ~ C₁₅ アルキル、シクロアルキル又はアリール基又はそれらのヒドロキシル化、ハロゲン化、硫酸化、スルホン化又はアミノ化誘導体又はそれらのカルボン酸、エステル、エーテル、ポリエーテル、アミド、アルデヒド又はケトン誘導体である。) ; 又は C₃ ~ C₁₂ シクロアルキル及び / 又はアリール環構造、又は 2 と 6 との間の、好ましくは 2 ~ 3 の、融合されたか、又は連結された C₃ ~ C₁₂ シクロアルキル及び / 又はアリール環構造 (それらの各環構造が随意に 1 又はそれ以上の N、O 又は S 原子を含むことがある。) からなる請求項 9 ~ 13 のいずれか一項記載の発色団。

【請求項 15】

前記置換基 P₁ ~ P₅ 及び Q₁ ~ Q₅ の 1 又はそれ以上が、無関係に、A₁Z₁A₁₄ (式中、Z₁ が Z₂、Z₂A₅ 又は Z₂A₅A₆ であり ;

A₁ 及び A₅ が、無関係に、-(CA₂A₃)_n-、-C(Y)(CA₂A₃)_n-、-C(Y)Y'(CA₂A₃)_n-、-C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n-、-NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n-、-NA₄(CA₂A₃)_n-、-YC(Y')(CA₂A₃)_n- 及び -Y(CA₂A₃)_n- から選ばれており ; n = 0 ~ 6 であり ; Y 及び Y' が無関係に O 又は S であり ; A₂、A₃ 及び A₄ が無関係に H 又は C₁ ~ C₂ アルキルであり、この基が置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており ; A₆ = -(C₂H₄O)_m- 又は -S(O)_p であり ; m = 1 ~ 12 であり ; p = 0 ~ 2 であり ;

Z₂ が単結合又は Z₃ であり ; Z₃ が Z₄、Z₅ 及び Z₆ から選ばれており、この Z₃ が、置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、OH、ハロ、CN、NO₂、A₁A₁₀、A₆A₈、NA₁₀A₁₁、C(Y)A₇、C(Y)Y'A₇、Y(CH₂)_qY'A₇、Y(CH₂)_qA₇、C(Y)NA₁₀A₁₁、Y(CH₂)_qC(Y')N A₁₀A₁₁、Y(CH₂)_qC(Y')A₉、NA₁₀C(Y)NA₁₀A₁₁、NA₁₀C(Y)A₁₁、NA₁₀C(Y)Y'A₉、NA₁₀C(Y)Z₆、C(NA₁₀)NA₁₀A₁₁、C(NCN)NA₁₀A₁₁、C(NCN)SA₉、NA₁₀C(NCN)SA₉、NA₁₀C(NCN)NA₁₀A₁₁、NA₁₀S(O)₂A₉、S(O)_rA₉、NA₁₀C(Y)C(Y')NA₁₀A₁₁、NA₁₀C(Y)C(Y')A₁₀ 又は Z₆ によって置換されており ; q = 0、1 又は 2 であり ; r = 0 ~ 2 であり ; A₇ が無関係に H 及び A₉ から選ばれており ; A₈ が O 又は A₉ であり ; A₉ が C₁ ~ C₄ アルキルであり、このアルキルが置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており ; A₁₀ が O A₉ 又は A₁₁ であり ; A₁₁ は、A₇ であるか、又は A₁₀ 及び A₁₁ が NA₁₀A₁₁ としてのときには、それらが窒素と共に、炭素原子だけからなるか、又は炭素原子と、O、N 及び S から選ばれる少なくとも 1 つのヘテロ原子とからなる 5 乃至 7 員環を形成することができ ;

Z₄ が C₆ ~ C₁₂ アリール又はアリールオキシ C₁ ~ C₃ アルキルであり ;

Z₅ が、フラニル、テトラヒドロフラニル、インダニル、インデニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、チオピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、1 又は 2 の不飽和結合を含む C₃ ~ C₈ シクロアルキル又は C₄ ~ C₈ シクロアルキル、及び C₇ ~ C₁₁ ポリシクロアルキルから選ばれており ;

Z₆ が、N - アゾリル、ジオキサジアジニル、ジオキサジアゾリル、ジオキサニル、2 - N - ジオキサトリアジニル、ジオキサジニル、N - ジオキサゾリル、ジオキサソリル、ジチアジニル、ジチアジアゾリル、N - ジチアトリアジニル、ジチアジニル、N - ジチアゾリル、1 - N - イミダゾリル、N - モルフォリニル、ピロールイル、テトラゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ナフチドリニル、オキサジアジニル、オキサジアゾリル、オキサテトラジニル、オキサトリアジニル、オキサトリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ペンタジニル、フタルアジニル、N - ピペリジニル、N, N - ピペラジニル、1 - N - ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、テトラチアジニル、テトラジニル、1 - N - テトラゾリル、テトロキサジニル、チアジニル、チアジアゾリル、チアテトラジニル、チアトリアジニル、チアトリアゾリル、チアゾリル、トリアジニル、1 - N - トリアゾリル、トリオキサダジニル、トリオキサニル、トリオキサジニル、トリオキサゾリル、トリチアジニル、トリチアゾリルから選ばれており；

10

式中、Z₄、Z₅ 又は Z₆ が、Z₄、Z₅ 及び Z₆ から無関係に選ばれる 1 又はそれ以上の他の構成員に融合することができ；

A₁₋₄ が、水素、メチル、ヒドロキシ、アリール、八口置換アリール、アリーロキシ C₁₋₃ アルキル、八口置換アリーロキシ C₁₋₃ アルキル、インダニル、インデニル、C₇₋₁₁ ポリシクロアルキル、テトラヒドロフラニル、フラニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、テトラヒドロチオピラニル、チオピラニル、C₃₋₆ シクロアルキル、又は 1 又は 2 の不飽和結合を含む C₄₋₆ シクロアルキル (シクロアルキル又は複素環式部分が置換されていないか、又は 1 ~ 3 のメチル基、1 のエチル基、又はヒドロキシル基によって置換されている。) である。) からなる群より選ばれる一員からなる請求項 9 ~ 14 のいずれか一項記載の発色団。

20

【請求項 16】

前記 P₁ ~ P₅ 及び前記 Q₁ ~ Q₅ の 1 つが前記接合基 Z を含む接合置換基である請求項 9 ~ 15 記載の発色団。

【請求項 17】

前記接合置換基が、A₁ Z₁ Z；

〔式中、Z₁ が Z₂、Z₂ A₅ 又は Z₂ A₅ A₆ であり；

A₁ 及び A₅ が、無関係に、- (C A₂ A₃)_n -、- C (Y) (C A₂ A₃)_n -、- C (Y) Y' (C A₂ A₃)_n -、- C (Y) N A₄ (C A₂ A₃)_n -、- N A₄ C (Y) (C A₂ A₃)_n -、- N A₄ (C A₂ A₃)_n -、- Y C (Y') (C A₂ A₃)_n - 及び - Y (C A₂ A₃)_n - から選ばれており；n = 0 ~ 6 であり；Y 及び Y' が無関係に O 又は S であり；A₂、A₃ 及び A₄ が無関係に H 又は C₁₋₂ アルキルであり、この基が置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており；

30

A₆ = - (C₂ H₄ O)_m - 又は - S (O)_p であり；m = 1 ~ 12 であり；p = 0 ~ 2 であり；

Z₂ が単結合又は Z₃ であり；Z₃ が、Z₄、Z₅ 及び Z₆ から選ばれており、この Z₃ が、置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、OH、八口、CN、NO₂、A₁ A₁₀、A₆ A₈、N A₁₀ A₁₁、C (Y) A₇、C (Y) Y' A₇、Y (C H₂)_q Y' A₇、Y (C H₂)_q A₇、C (Y) N A₁₀ A₁₁、Y (C H₂)_q C (Y') N A₁₀ A₁₁、Y (C H₂)_q C (Y') A₉、N A₁₀ C (Y) N A₁₀ A₁₁、N A₁₀ C (Y) A₁₁、N A₁₀ C (Y) Y' A₉、N A₁₀ C (Y) Z₆、C (N A₁₀) N A₁₀ A₁₁、C (N C N) N A₁₀ A₁₁、C (N C N) S A₉、N A₁₀ C (N C N) S A₉、N A₁₀ C (N C N) N A₁₀ A₁₁、N A₁₀ S (O)₂ A₉、S (O)_r A₉、N A₁₀ C (Y) C (Y') N A₁₀ A₁₁、N A₁₀ C (Y) C (Y') A₁₀ 又は Z₆ によって置換されており；q = 0、1 又は 2 であり；r = 0 ~ 2 であり；A₇ が無関係に H 及び A₉ から選ばれており；A₈ が O 又は A₉ であり；A₉ が C₁₋₄ アルキルであり、このアルキルが置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており；A₁₀ が O A₉ 又は A₁₁ であり；A₁₁ は、A₇ であるか

40

50

、又は A_{10} 及び A_{11} が NA_{10} A_{11} としてのときには、それらが窒素と共に、炭素原子だけからなるか、又は炭素原子と、O、N及びSから選ばれる少なくとも1つのヘテロ原子とからなる5乃至7員環を形成することができ；

Z_4 が C_{6-12} アリール又はアリールオキシ C_{1-3} アルキルであり；

Z_5 が、フラニル、テトラヒドロフラニル、インダニル、インデニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、チオピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、1又は2の不飽和結合を含む C_{3-8} シクロアルキル又は C_{4-8} シクロアルキル、及び C_{7-11} ポリシクロアルキルから選ばれており；

Z_6 が、N-アゾリル、ジオキサジアジニル、ジオキサジアゾリル、ジオキサニル、2-N-ジオキサトリアジニル、ジオキサジニル、N-ジオキサゾリル、ジオキサソリル、ジチアジニル、ジチアアゾリル、N-ジチアトリアジニル、ジチアジニル、N-ジチアゾリル、1-N-イミダゾリル、N-モルフォリニル、ピロールイル、テトラゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ナフチドリニル、オキサジアジニル、オキサジアゾリル、オキサテトラジニル、オキサトリアジニル、オキサトリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ペンタジニル、フタルアジニル、N-ピペリジニル、N,N-ピペラジニル、1-N-ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、テトラチアジニル、テトラジニル、1-N-テトラゾリル、テトロキサジニル、チアジニル、チアアゾリル、チアテトラジニル、チアトリアジニル、チアトリアゾリル、チアゾリル、トリアジニル、1-N-トリアゾリル、トリオキサダジニル、トリオキサニル、トリオキサジニル、トリオキサゾリル、トリチアアジニル、トリチアジニル、トリチアアゾリルから選ばれており；

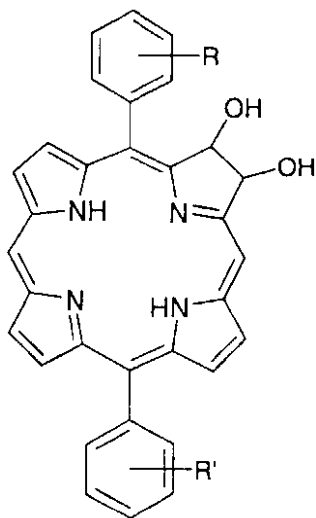
Z_4 、 Z_5 又は Z_6 が、無関係に、 Z_4 、 Z_5 及び Z_6 から選ばれる1又はそれ以上の他の構成員に融合することができる。]

からなる群より選ばれる一員からなる請求項16記載の発色団。

【請求項18】

次の(x)、(y)又は(z)

【化34】

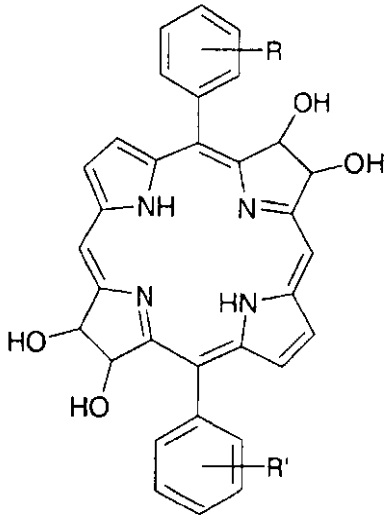


(x)

30

40

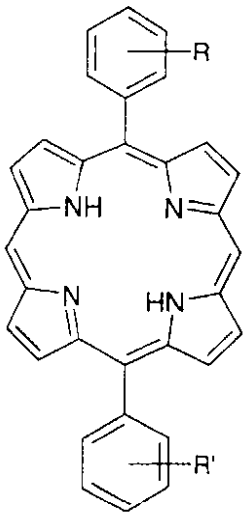
【化 3 5】



(y)

10

【化 3 6】



(z)

20

30

(式中、R 及び R' が以下の組合せ

R	R'
4 - H	4 - N C S
4 - M e	4 - N C S
4 - B r	4 - N C S
4 - C O ₂ M e	4 - N C S
3, 4, 5 - トリス (O M e)	4 - N C S
4 - N C S	4 - O M e
4 - N C S	4 - M e
4 - N C S	4 - C O ₂ M e
4 - N C S	4 - B r
4 - N C S	4 - C N
4 - N C S	4 - C O ₂ M e

40

のいずれかであることができる。)

として示される構造を有する請求項 9 ~ 17 のいずれか一項記載の発色団。

【請求項 19】

50

$X_1 \sim X_4$ のそれぞれ又はいくつかが H 又は OH である請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の発色団。

【請求項 20】

前記接合基 Z が、イソシアナート、イソチオシアナート、又は N H S エステル基；又は - N H₂、- N H (C₁ ~ 6 アルキル)、マレアミド、ヨードアセトアミド、ケトン又はアルデヒドのような；ポリペプチド分子に共有結合で結合することができる結合基からなる請求項 1 ~ 19 記載の発色団。

【請求項 21】

前記接合基 Z が、比較的高い程度の剛直性及び / 又は立体障害を有する連結部分を含んでおり、連結部分が、前記発色団の大環状コアに対する前記結合基の連結に適合する請求項 20 記載の発色団。

10

【請求項 22】

マルチカラー蛍光色素分析用の蛍光色素マーカーの組合せであって、ポルフィリン発色団、クロリン発色団及びバクテリオクロリン発色団からなる群より選ばれる少なくとも 2 つの発色団からなり、それらの各発色団が同じポルフィリン骨格からなり、それらの各発色団が前記ポルフィリン骨格上の 1 又はそれ以上の置換基を含んでおり、それらの置換基の 1 つが接合基 Z を含む接合置換基 L であり、Z が、複数の異なる所定の生物学的標的の 1 つに各発色団を送達するためのポリペプチド分子に、前記各発色団を接合させることができる接合基であることを特徴とする蛍光色素マーカーの組合せ。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の 2 又はそれ以上のポルフィリン、相当するクロリン、及び相当するバクテリオクロリンからなる請求項 22 記載の蛍光色素マーカーの組合せ。

20

【請求項 24】

前記接合基 Z が、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質に接合するか；又は架橋ポリペプチドに接合し、この架橋ポリペプチドが、前記発色団を相補的な架橋ポリペプチドに連結させるために、前記相補的な架橋ポリペプチドに対する結合に適合する請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団又は請求項 22 又は 23 記載の組合せ。

【請求項 25】

前記架橋ポリペプチドが前記相補的な架橋ポリペプチドに結合し、及び前記相補的な架橋ポリペプチドが、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質からなるか、これに連関するか、又はこれと融合する請求項 24 記載の発色団又は組合せ。

30

【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれか一項記載の発色団又は発色団の組合せからなる発色団のキットであって、前記発色団又は各発色団が架橋ポリペプチドに接合され、この架橋ポリペプチドが、前記発色団を相補的な架橋ポリペプチドに連結させるために、前記相補的な架橋ポリペプチドに対する結合に適合し；及び構成物又は複数の構成物が、それぞれ、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質に融合するか、又は連関する前記相補的な架橋ポリペプチドからなり；その配列が、前記発色団又は各発色団を、前記所定の生物学的標的に対して特異性を有する結合タンパク質に連結させるために、キット中の前記発色団又は各発色団を、前記所定の生物学的標的に対して特異性を有するキット中の異なる構成物への結合に適合させていることを特徴とする発色団のキット。

40

【請求項 27】

前記結合タンパク質が、前記生物学的標的の表面上の標的特異的分子に対して特異性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体又はそれらの断片のような抗体からなる請求項 24 ~ 26 のいずれか一項記載の発色団、発色団の組合せ又は発色団のキット。

【請求項 28】

前記抗体がファージ抗体であり、バクテリオファージの表面上に発現される抗体である請求項 27 記載の発色団、発色団の組合せ又は発色団のキット。

50

【請求項 29】

前記結合タンパク質が、血清アルブミンタンパク質；又は細胞膜中への挿入のために適合される脂肪酸鎖のような低密度リポタンパク質のような 1 又はそれ以上の細胞表面分子又は受容体への結合に適合するタンパク質からなる請求項 24 ~ 26 のいずれか一項記載の発色団、発色団の組合せ又は発色団のキット。

【請求項 30】

前記架橋ポリペプチドがカルモジュリンからなり、及び前記相補的な架橋ポリペプチドがカルモジュリン結合ペプチドからなり；又は逆もまた同じで；又は前記架橋ポリペプチドがアビジン又はストレプトアビジンからなり、及び前記相補的な架橋ポリペプチドがビオチンからなり；又は逆もまた同じである請求項 24 ~ 29 のいずれか一項記載の発色団、発色団の組合せ又は発色団のキット。

10

【請求項 31】

前記発色団又は各発色団がアビジンに接合しており、及び前記構成物又は各構成物が、前記生物学的標的の表面上の標的特異的分子に対して特異性を有するビオチン化モノクローナル抗体からなる請求項 30 記載の発色団のキット。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項記載の発色団を、前記所定の生物学的標的又は標的群に対して付着させるにあたり、請求項 26 ~ 31 のいずれか一項記載のキットを提供する工程、及び前記キットの成分を、前記結合タンパク質又は各結合タンパク質の前記所定の生物学的標的又は標的群に対する結合を可能にするための適切な条件下に、前記所定の生物学的標的又は標的群の近くに導入する工程を含むことを特徴とする発色団の付着方法。

20

【請求項 33】

前記所定の生物学的標的が、癌細胞、腫瘍細胞、HIV にか、又は任意の他の微生物又はウイルスに感染した細胞、自己免疫疾患において有害な活性を引き起こす細胞、外来のか、又は異常細胞、又は任意の他のそのような細胞のような細胞又は膜である請求項 1 ~ 32 のいずれか一項記載の発色団、発色団の組合せ又は発色団のキット。

【請求項 34】

細胞の混合物から標的細胞を蛍光活性化選別するにあたり、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項記載の発色団又は請求項 22 ~ 30 のいずれか一項記載の発色団の組合せを前記標的細胞に付着させ、前記標的細胞に付着した前記発色団の 1 又はそれ以上の蛍光を生じさせるために、細胞の前記混合物に照射をし、蛍光を発する細胞に荷電を与え、及び前記荷電細胞を前記混合物から分離するか、又は分離させるために、細胞の前記混合物を偏光環境に通す工程を含むことを特徴とする蛍光活性化選別方法。

30

【請求項 35】

2 又は 3 の異なる細胞種の細胞を含む複数の標的細胞を可視化するか及び / 又は計数するにあたり、請求項 22 ~ 30 のいずれか一項記載の発色団の組合せを提供する工程であって、この発色団の組合せが 2 又は 3 の発色団を含み、各発色団が異なる 1 つの前記細胞種に送達されるのに適合する工程；その組合せ中の前記発色団を前記標的細胞に付着させる工程；前記発色団によって蛍光の発光を生じさせるために、前記標的細胞に照射をする工程；前記各発色団によって生じる蛍光発光バンドを検出する工程；及び随意に前記各バンドについて、それぞれの個別の細胞種の蛍光細胞の数の測定値を得るために、発光 / 波長曲線の下での領域を測定する工程を含むことを特徴とする標的細胞の可視化及び / 又は計数方法。

40

【請求項 36】

標的細胞を消滅させるにあたり、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団を前記細胞に付着させ、及び一重項酸素の生成を前記細胞の近くで起こさせるために、前記細胞に照射をする工程を含み、それによって、細胞の死を起こさせることを特徴とする標的細胞の消滅方法。

【請求項 37】

腫瘍、癌、HIV 感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症の

50

ような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を処置するにあたり、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団の有効な量を必要としている患者に投与する工程であって、その発色団が前記細胞への付着を生じるように、その発色団が前記異常細胞か又は望ましくない細胞の表面上の標的細胞特異的分子に対してそれらへの付着のための標的にされるのに適合し、及び前記細胞の近くで一重項酸素の生成を生じさせるために、光を用いて前記細胞に照射をする工程を含み、それによって前記細胞を死滅させることを特徴とする疾病又は障害の処置方法。

【請求項 38】

腫瘍、癌、HIV 感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症のような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を処置するために患者に投与される薬学組成物であって、組成物が、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団であって、前記異常細胞か又は望ましくない細胞へ送達されるのに適合する発色団、及び適切な担体からなることを特徴とする薬学組成物。

【請求項 39】

腫瘍、癌、HIV 感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症のような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を患う患者の処置において用いる薬剤の製造における、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団の使用であって；前記発色団が、前記異常細胞か又は望ましくない細胞に対する送達のために適合することを特徴とする発色団の使用。

【請求項 40】

それぞれが親水性又は両親媒性部分を有している 1 又はそれ以上の親水性発色団、及びあまり親水性でない複数の物質及び / 又は分子を含む混合物を分離するにあたり、前記混合物を疎水性溶出溶媒に導入し、及び、前記 1 又はそれ以上の発色団が前記固相上に停止すると共に前記物質及び / 又は分子が前記固相から前記溶出溶媒によって溶出するか、又は実質的に溶出するように、前記混合物及び前記溶出溶媒を親水性又は極性固相上に通す工程を含むことを特徴とする混合物の分離方法。

【請求項 41】

5, 10, 15 及び 20 メソ - 位に選定された置換基を有する 5, 10, 15, 20 - テトラ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団を合成するにあたり；5, 15 - ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団を提供する工程；脱離基 Q を前記発色団の 10 及び 20 メソ - 位に付着させる工程であって、脱離基 Q がハロゲン化物及びトリフレートから選ばれている工程；連関試薬 ($R_{11}O$) ($R_{12}O$) BR_{13} を提供する工程であって、 R_{11} 及び R_{12} が、無関係に、H 又は C_{1-6} アルキルから選ばれているか、又は R_{11} 及び R_{12} が互いに前記 2 つの O 原子でつながれている C_{1-6} アルキル鎖を構成し、及び R_{13} が、上記 R_3 に関して規定される親水性アリアル部分のようなビニル又はアリアルである工程；及び前記発色団と前記連関試薬とを、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、炭酸セシウム及び水酸化バリウムから選ばれる塩基、及び Pd₀ 触媒の存在下に反応させる工程を含み；前記 R_{13} を前記発色団の 10 - 及び 20 - メソ位で前記脱離基 Q と交換することを特徴とするポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンの合成方法。

【請求項 42】

前記 5, 15 - ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団が、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の発色団であるか、又はそれらの保護形態である請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

前記 R_{13} がビニルであり、及び前記 5, 10, 15, 20 - テトラ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団が、前記連関反応に次いで、前記 10 - 及び 20 - ビニル置換基をヒドロキシアルキルに転換させるように、 OsO_4 によってオ

スミレーション反応を受ける請求項 4 1 又は 4 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔発明の属する技術分野〕

本発明は、新規なポルフィリン及びポルフィリン系発色団及びポルフィリン及びポルフィリン系発色団の組合せに関し、これらは特に、光化学治療及び蛍光分析及び画像処理を含む光線力学的な適用に広く有用である。

【0002】

〔従来技術〕

例えば蛍光標示式細胞分取器 (FACS) における研究道具、及び光線力学的治療 (PDT) におけるインビボでの標的にされた細胞の消滅をもたらすための治療薬としての、ポルフィリン及びポルフィリン系発色団の双方の重要性は、この技術で広く認識されている。これらの適用のそれぞれは、入射光線によって一重項の励起状態に励起され、及び結果的なエネルギーの放出を伴ってより一層低いエネルギー状態に減衰されるべき発色団の能力に依存する。このエネルギーは特定の波長での蛍光の光の形態で放出される場合があり、それによって、減衰する発色団に付着した細胞又は生物学的構造物が、可視化され、及び/又は FACS によって選別され得る。あるいはまた、励起のエネルギーは、最初の一重項発色団の三重項励起状態への転換によって逸散され、次いで、二原子酸素のような他の三重項へエネルギーを転移し、結果的な一重項酸素の形成を伴うことがある。一重項酸素は強力な細胞障害性の薬剤であり、従ってこの後者の過程が細胞においてか又は細胞のすぐ近くで発生すると、それは通常その細胞に死を招く。したがって、発色団は、その蛍光特性、及び光増感剤として働く能力の双方のために用いることができる。

【0003】

明らかに、蛍光画像処理又は分析、又は PDT のために、インビトロ又はインビボにおいて、ある程度の発色団の局在性の制御が必須である。このことは、特に、光線力学的治療において重要であり、発色団の減衰によって生成する一重項酸素の照射の代表的範囲が直径 0.1 μm 未満の場合、結果として、標的細胞の死をもたらすために、発色団は通常その細胞のすぐそば、又は好ましくはその細胞内に位置しなければならない。

【0004】

〔発明が解決しようとする課題〕

しかし、これまでに、PDT の目的のために、インビボでの特定の標的細胞に対するポルフィリンの光増感剤のターゲティングを制御することについて、わずかの試みが行われているに過ぎない。その代わりに、代表的に、ポルフィリンが、腫瘍構造物からのリンパのドレナージがない場合には、腫瘍に蓄積する固有の傾向があることに信頼性が置かれている。Photofrin (R) [ホトフリン (登録商標)]、ヘマトポルフィリン - IX から酸で処理によって誘導されるポルフィリン構造体の混合物からなる光増感性薬剤は、癌腫及び肉腫の処置に商業上用いられており、例えば、任意のターゲティング媒体又は手段を用いることなく、患者に従来どおり全身的に投与されている。このことは、明らかに、望ましくなく、光増感剤の間違った局在性が、光化学治療の効率を低下させるだけでなく、健康な細胞の死を招くことがある。

【0005】

特に、FACS 及び蛍光画像処理の目的のために、発色団を適切なタンパク質送達分子に共有結合的に接合させることによって、発色団の生物学的標的へのインビトロでの特定の付着を達成するための努力が行われてきた。しかし、この手法は種々の問題にさらされた。第一に、細胞表面へのポルフィリン発色団の非特異的結合によって生じるバックグラウンド蛍光の程度を減少させるのが困難であることが分かった。第二に、発色団のタンパク質分子への付着によって、近位のタンパク質による著しい程度の励起状態のクエンチングが生じ、これが、マーカーとしてか、又は標的にされた光線力学的適用における発色団の有効性を明らかに減少させることが見出された。

これらの影響の減少が引き続き望ましい目標である。

10

20

30

40

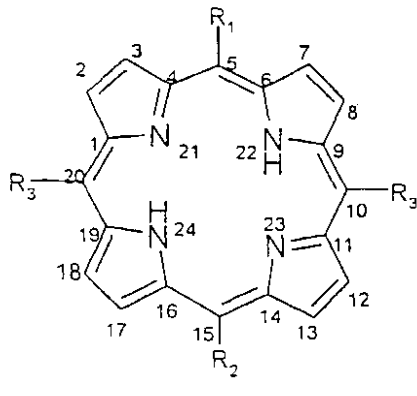
50

【 0 0 0 6 】

〔 課題を解決するための手段 〕

したがって、本発明の1つの見地によれば、次の式 (I) のポルフィリン発色団：

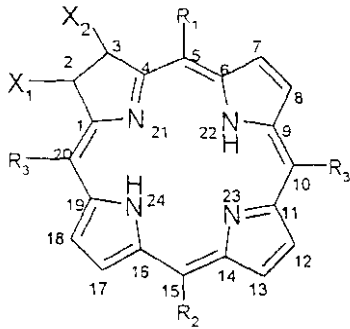
【 化 3 7 】



10

又は次の式 (I I) 、 (I I I) 、 (I V) 、 及び (V) のいずれかのクロリン発色団：

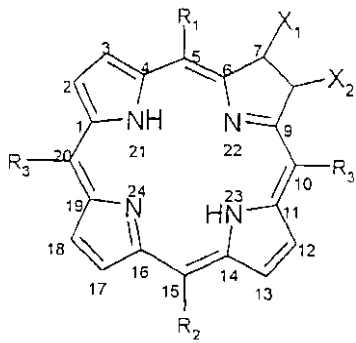
【 化 3 8 】



(II)

20

【 化 3 9 】

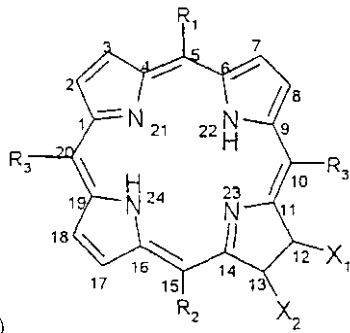


(III)

30

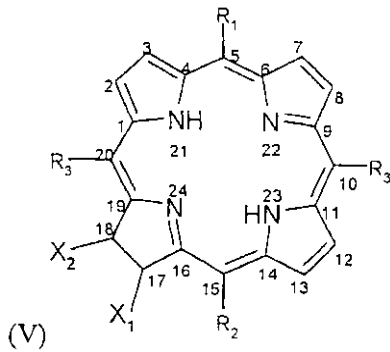
40

【 化 4 0 】



10

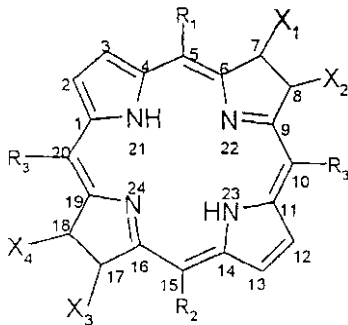
【化 4 1】



20

又は次の式 (VI) 及び (VII) のいずれかのバクテリオクロリン発色団：

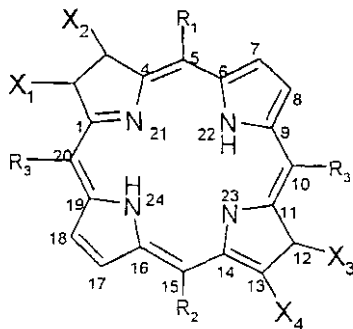
【化 4 2】



30

及び

【化 4 3】



40

〔式中、 R_1 がアリール部分であり、このアリール部分が接合基 Z に連結し、この接合基がインピトロ又はインピボの所定の生物学的標的に発色団を送達するためのポリペプチド分子に前記発色団を接合させることができ；

50

R_2 が親水性アリール部分であり；

R_3 がH又は親水性アリール又は親水性非芳香族部分であり；

及び X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 のそれぞれが、無関係に、H、OH、ハロゲン、 C_{1-3} アルキル及び OC_{1-3} アルキルから選ばれるか、又は隣接するC-C結合を有する X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 がエポキシド又はシクロプロパニル構造を形成するように、 X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 が互いに、O、 CH_2 、 CHC_{1-3} アルキル、又は $C(C_{1-3} \text{アルキル})_2$ から選ばれる架橋部分を形成し；

式中、前記 R_1 、 R_2 及び R_3 が随意に、更に1又はそれ以上の回数、-OH、-CN、-NO₂、ハロゲン、-T、又は-OT（式中、Tが C_{1-15} アルキル、シクロアルキル又はアリール基又はそれらのヒドロキシ化、ハロゲン化、硫酸化、スルホン化又はアミノ化誘導体又はそれらのカルボン酸、エステル、エーテル、ポリエーテル、アミド、アルデヒド又はケトン誘導体である。）によって置換されている。）

を提供する。

【0007】

本発明に従って発色団のコアの周りに1又はそれ以上の親水性置換基を含めることは、タンパク質の生物学的接合 (bioc conjugation) において通常用いられる塩基性緩衝液 / DMSO 又は DMF 共溶液中での高められた溶解度を招く。また、高められた親水性は、非共有結合的にタンパク質に結合する発色団の傾向を著しく低下させる。発色団が、例えば、PDT 又は FACS の目的のために、所定の細胞又は組織に送達するためのモノクローナル抗体のようなターゲティングタンパク質に接合すべきである場合、発色団とタンパク質との間の非共有結合の減少は、発色団が細胞表面に非特異的に転移する程度を減少させ、興味のある細胞又は組織への発色団のターゲティングの精度を実質的に向上させる。

【0008】

したがって、本発明の他の見地はまた、それぞれが親水性又は両親媒性部分を有する1又はそれ以上の親水性発色団、及びあまり親水性でない複数の物質及び / 又は分子を含む混合物を分離するにあたり、前記混合物を疎水性溶離液に導入し、及び、前記1又はそれ以上の発色団が前記固相上に停止すると共に前記物質及び / 又は分子が前記固相から前記溶出溶媒によって溶出するか、又は実質的に溶出するように、前記混合物及び前記溶出溶媒を親水性又は極性固相上に通す工程を含む方法を提供する。

【0009】

例えば、前記方法は、Sephadex (R) [セファデックス (登録商標)、(デキストラン)] カラム、又は逆相 HPLC 上のクロマトグラフィを含む。代表的に、前記あまり親水性でない物質及び / 又は分子の混合物は、細胞及び / 又は膜の混合物を含むことができる。有利には、前記1又はそれ以上の親水性発色団は、本発明にかかる1又はそれ以上の発色団を含む。

【0010】

いくつかの具体例では、 $X_1 \sim X_4$ のそれぞれか、又はいくつかはHである。しかし、特に好ましい具体例では、 $X_1 \sim X_4$ のそれぞれがOHである。したがって、前記発色団は、上記式 (II)、(III)、(IV) 又は (V) のジヒドロキシクロリン又は上記式 (VI) 又は (VII) のテトラヒドロキシバクテリオクロリンであってもよい。ジヒドロキシクロリン及びテトラヒドロキシバクテリオクロリンの親水性は、相当するポルフィリンのものよりも、発色団のコアの周りの特別な親水性ヒドロキシ基の存在によって、高いことが見出される。

【0011】

好ましくは、前記アリール部分 R_1 はフェニル環を含んでおり、このフェニル環は、前記発色団の大環状コアに、単結合によって連結しているのが好ましく、あるいはまた C_{1-6} の分枝状又は線状アルキル鎖によってそれに連結していてもよい。有利には、前記接合基 Z は前記フェニル環にそのパラ (4') 位に連結することができる。

【0012】

10

20

30

40

50

接合基 Z は、ポリペプチド分子上のアミン基に共有結合で結合することができる基；例えば、イソシアナート、イソチオシアナート、又は N H S エステル基を含むことができる。したがって、有利には、前記ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンの周りのメソ置換基のそれぞれが、前記接合基 Z に共有結合することになる場合がある - N H₂、- N H₂⁺ - 又は - N H₃⁺ を含まないべきである。このことは、前記発色団内の内部架橋の可能性を減少させるように働く。あるいはまた、前記接合基 Z は、他の任意のタンパク質接合基、例えば、- N H₂、- N H (C₁ -₆ アルキル)、マレアミド、ヨードアセトアミド、ケトン又はアルデヒドを含むことができる。かかる基のタンパク質分子への接合を達成する方法は、この技術において既知である。

【 0 0 1 3 】

特に好ましい具体例では、前記接合基はイソチオシアナート基を含む。イソチオシアナートはリジン残基とたやすく反応してタンパク質に対する安定な連鎖を生じ、従って本発明の発色団の生物学的接合にとって特に安定である。

【 0 0 1 4 】

前記接合基 Z は前記アリアル部分 R₁ に単結合によって直接連結されることができる。あるいはまた、前記接合基 Z は、前記アリアル部分 R₁ に、比較的高い程度の剛直性及び/又は立体障害を有する連結部分によって連結され得る。前記連結部分は、例えば、1 0 0 0 g モル⁻¹ よりも大きくない全分子量を有する融合されたか、又は連結されたシクロアルキル及び/又はシクロアルキル環構造物の鎖を含むことができる。特に、前記連結部分は、アントラセン、アクリジン、アントラニル、ナフチル又はナフタレン部分、又はポリアセチレン、フェニルアセチレン、又はポリフェニルアセチレン部分を含むことができる。前記発色団がポリペプチド分子に対する前記接合基 Z によって接合する場合、従って前記連結部分が前記ポリペプチドとは別の前記発色団の光活動性のコアを保持する役目を果たすことができ、これによって、前記発色団が蛍光を生じる場合に前記ポリペプチドによって生じることがある蛍光消光(クエンチング)を減少させるのに役立つ。前記連結部分は上述した種類の親水性又は両親媒性部分、例えば、C₂ ~ C₃。ポリエチレングリコール部分を含むことができる。このことは、発色団の親水性が前記連結部分の存在によって損なわれないことを確実にするのに役立つ。

【 0 0 1 5 】

随意に、前記アリアル部分 R₁ は、更に 1 又はそれ以上の、ヒドロキシのような、前記発色団の親水性を改善する役目を果たす、親水性置換基によって置換されていてもよい。

【 0 0 1 6 】

前記親水性アリアル部分 R₂ は、フェニル環を含んでいることができ、このフェニル環が 1 又はそれ以上の回数、好ましくは少なくとも 2 回、1 又はそれ以上の親水性置換基によって置換されていてもよく、この親水性置換基は前記アリアル部分 R₂ の親水性を高める役目を果たす。前記フェニル環は、好ましくは、単結合によって、前記発色団の大環状コアに連結されるか、又は代わりに、C₁ -₆ の分枝状又は線状アルキル鎖によってそれに連結されてもよい。あるいはまた、前記親水性アリアル部分 R₂ は、ピリジル又は四級化(quarterised)ピリジル{ピリジニウムミル(pyridiniumyl)}環のようなヘテロアリアル環を含んでよく、ヘテロアリアル環は随意に 1 又はそれ以上の回数、好ましくは少なくとも 2 回、1 又はそれ以上の親水性置換基によって置換されることができ、親水性置換基は前記アリアル部分 R₂ の親水性を高める役目を果たす。前記ヘテロアリアル環は、好ましくは、単結合によって、前記発色団の大環状コアに連結されるか、又は代わりに、C₁ -₆ の分枝状又は線状アルキル鎖によってそれに連結されてもよい。前記 1 又はそれ以上の親水性置換基は、有利には、ヒドロキシ；メトキシ又はエトキシのようなアルコキシ；C₂ ~ C₁₅ ポリエチレングリコール；N - メチルピリジニウムミルのような四級化ピリジル(ピリジニウムミル)；モノ -、ジ - 又はポリ - 糖類；C₁ -₆ アルキルスルホン酸；ホスホニウム基 R₄ P (R₅) (R₆) (R₇) (式中、R₄ が、単結合か、又は C₁ -₆ アルキルであり、及び R₅、R₆ 及び R₇ のそれぞれが、無関係に、水素、フェニル環のようなアリアル環、ピリジル環のようなヘテロアリアル環、及び

10

20

30

40

50

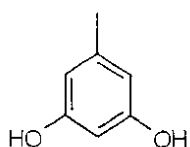
C₁ - 6 アルキル鎖から選ばれ、これらアリール環、ヘテロアリール環又はC₁ - 6 アルキル鎖が置換されていないか、又は1又はそれ以上の回数、ヒドロキシ、C₁ - 6 アルキル又はアルコキシ、アリール、オキソ、ハロゲン、ニトロ、アミノ又はシアノによって置換されている。) ; 又はリン酸基又はホスホネート基 {それぞれ、R₈OP(O)(OR₉)(OR₁₀)又はR₈P(O)(OR₉)(OR₁₀)で表され、式中、R₈が、単結合か、又はC₁ - 6 アルキルであり、及びR₉及びR₁₀のそれぞれが無関係に水素及びC₁ - 6 アルキルから選ばれている。} から選ぶことができる。好ましくは、R₅、R₆及びR₇のそれぞれは同じであることができ、及び有利には、置換されていないフェニルでよい。適切には、前記R₈はメチルでよい。有利には、前記R₉及びR₁₀は同じであることができ、及び/又はメチル又はエチルでよい。

10

【0017】

特に好ましい具体例では、前記親水性アリール部分R₂は、
m, m - (ジヒドロキシ)フェニル

【化44】

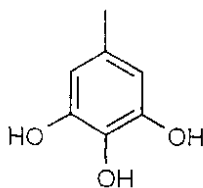


又はそのPEG化(PEGylated)誘導体;

m, m, p - (トリヒドロキシ)フェニル

20

【化45】

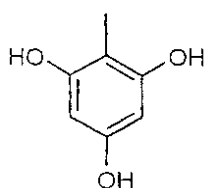


又はそのPEG化誘導体;

o, p, o - (トリヒドロキシ)フェニル

30

【化46】

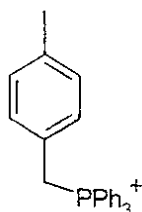


又はそのPEG化誘導体;

p - (メチルトリフェニルホスホニウム)フェニル

40

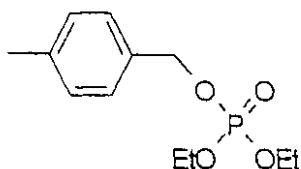
【化47】



のようなm - 又はp - ((C₁ - 6)アルキルトリフェニルホスホニウム)フェニル;

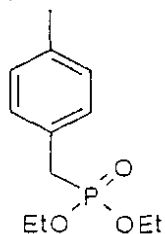
p - メチルホスホノ - ジ - エトキシ)フェニル

【化48】



のような m - 又は p - (C₁ - 6 アルキルホスホノ - ジ - アルコキシ) フェニル ;
p - メチルホスホナト - ジ - エトキシ) フェニル

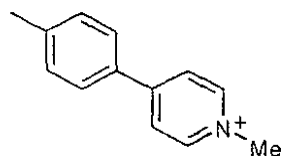
【化 4 9】



10

のような m - 又は p - (C₁ - 6 アルキルホスホナト - ジ - アルコキシ) フェニル ;
m - 又は p - (N - メチル - ピリジニウム) フェニル

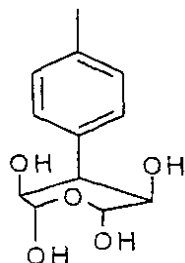
【化 5 0】



20

; ペントース - 、ヘキソース - 又は二糖類 - 置換フェニル

【化 5 1】



30

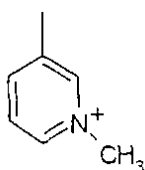
のようなメタ - 又はパラ - 糖 - 置換フェニル
から選ばれる。

【0018】

他の好ましい具体例では、前記親水性アリール部分 R₂ は、p - N - (C₁ - 6 アルキル)
ピリジニウム基又は m - N - (C₁ - 6 アルキル) ピリジニウム基のような四級化
ピリジル (ピリジニウム) 基を含む。四級化ピリジル (ピリジニウム) 基は高度に親
水性であり、及び本発明の発色団に組み込まれる場合、有利な特性を示す。この点で特に
好ましい基は、m - 又は p - N - ((C₁ - 6) アルキル) ピリジニウム基、例えば、
m - N - メチルピリジニウム

40

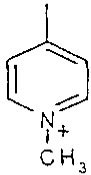
【化 5 2】



又は p - N - メチルピリジニウム

【化 5 3】

50

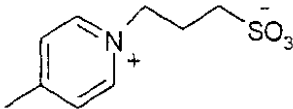


である。

【0019】

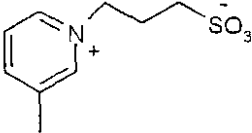
他の特に好ましい具体例では、前記四級化ピリジニウム基は、p - N - (C₁ - 6 アルキルスルホン酸)ピリジニウム又はm - N - (C₁ - 6 アルキルスルホン酸)ピリジニウム；特に、p - N - (プロピルスルホン酸)ピリジニウム

【化54】



又はm - N - (プロピルスルホン酸)ピリジニウム

【化55】



のような双性イオン基からなることができる。

【0020】

好ましくは、その又はそれぞれの四級化ピリジニウム基R₂は、ヨウ化物対イオン、又は、最も好ましい具体例では、塩化物対イオンのようなハロゲン化物対イオンと結び付くことができる。

【0021】

いくつかの有利な具体例では、R₃はHであり、前記発色団は5, 15 - ジアリール - ポルフィリン、 - クロリン又は - バクテリオクロリンを構成する。他の有利な具体例では、前記R₃は、親水性アリールであるか、又は非芳香族部分である。例えば、前記R₃は、R₂に関して、上記に規定するように親水性アリール部分を含むことができる。前記親水性アリール部分R₃は、前記親水性アリール部分R₂と同じでよく、発色団は、その10, 15及び20位に同じ置換基を持つか；又は前記親水性アリール部分R₂と異なってもよい。あるいはまた、前記R₃は、1又はそれ以上の回数、ヒドロキシ又はC₂ - 1₅ ポリエチレングリコールのような1又はそれ以上の親水性置換基によって置換されているC₁ - 6 アルキル鎖のような親水性のアルキル部分を含むことができる。特に好ましい具体例では、前記R₃は、1, 2 - ジヒドロキシエチルのようなポリヒドロキシ(C₁ - 6 アルキル)からなる。

【0022】

R₂がR₃と同じ本発明の発色団は、この技術において既知の方法、例えば、ピロールを用いるベンズアルデヒドの酸触媒縮合によるか、又はジピロメタンからのポルフィリンを合成するための“MacDonald (マクドナルド) 2 + 2”法 [Arsenaault (アルセナート) 等のJ. Chem. Soc. 1960, 82: 4384 ~ 4389 - 参考として本明細書に組み入れる。]に従って合成することができる。

【0023】

本発明の5 - イソチオシアナトフェニル - 15 - ピリジニウムポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリンを合成するための一般化された図式を、次の図式1として提示するが、式中、“RX”は、式(I)から(VII)に関して上記に規定するようなC₁ - 6 アルキル又は親水性置換基のような四級化する基を示す：

10

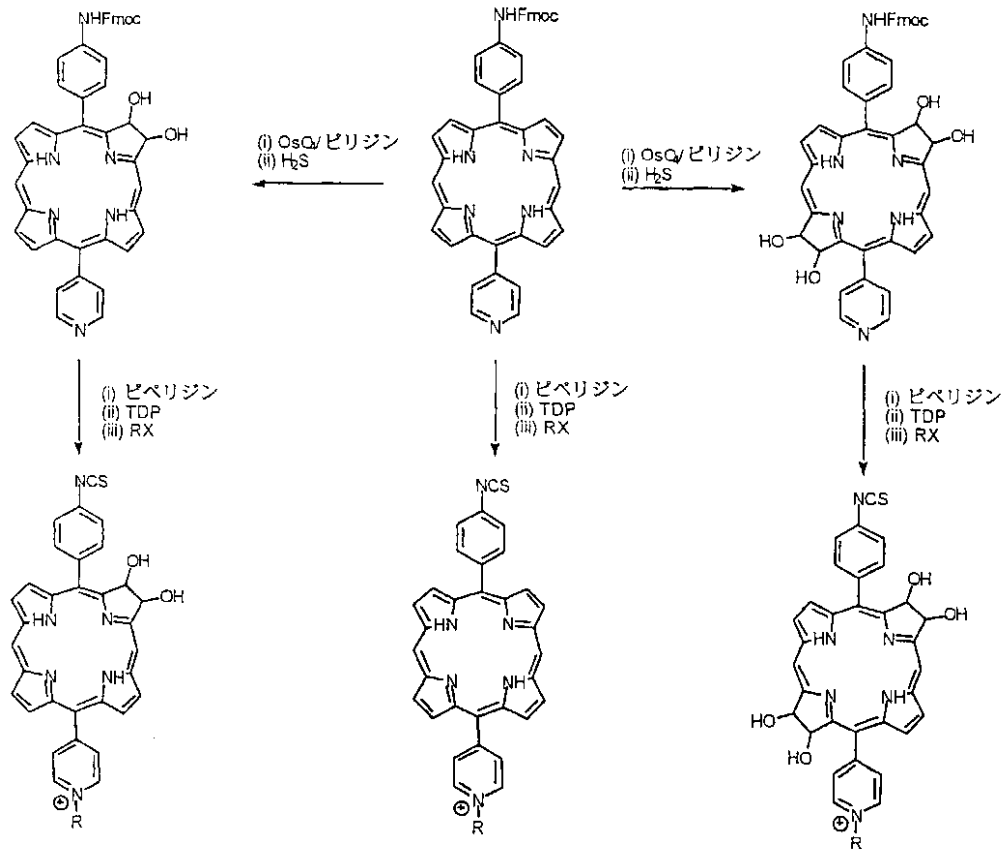
20

30

40

50

【化56】



10

20

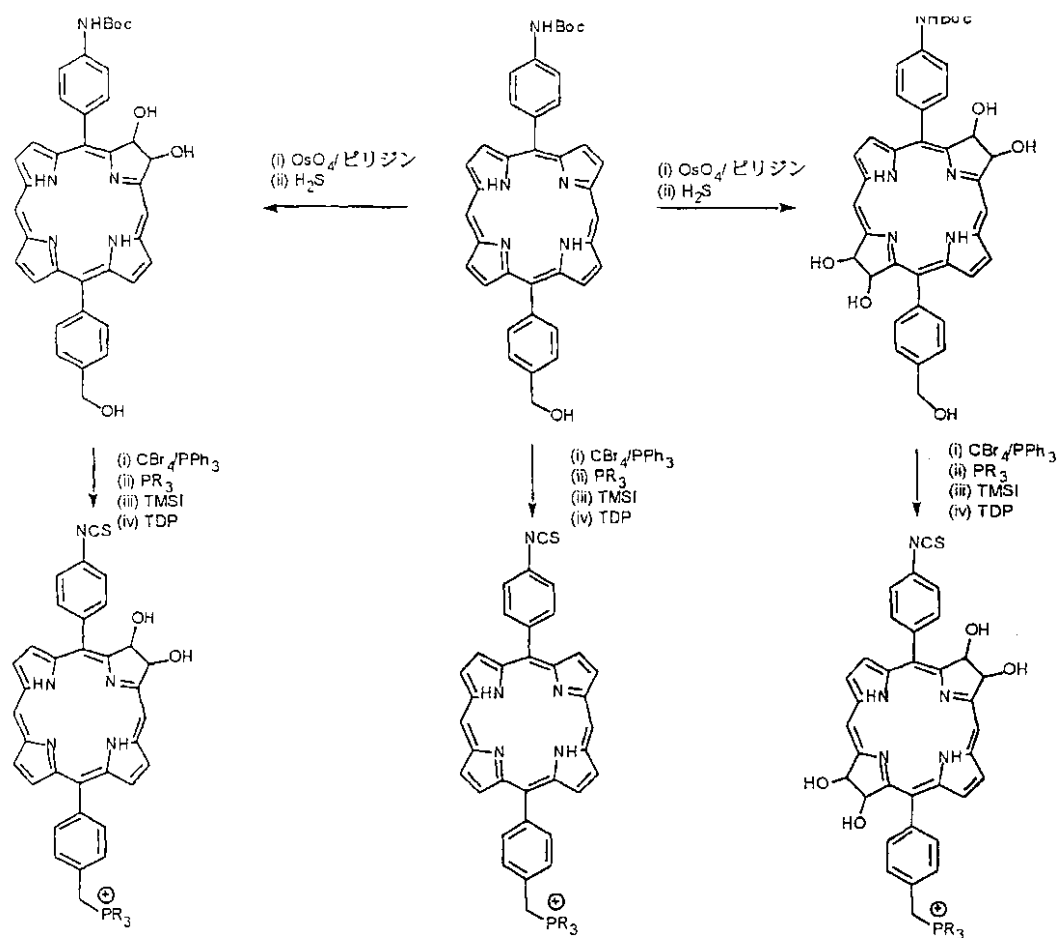
図式1

【0024】

本発明の5-イソチオシアナトフェニル-15-メチルホスホニウムフェニルポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリンを合成するための一般化された図式を、次の図式2として提示するが、式中、Rは、水素、C₁-6アルキル、ヘテロ環式基又は芳香族基を示す：

30

【化57】



10

20

図式2

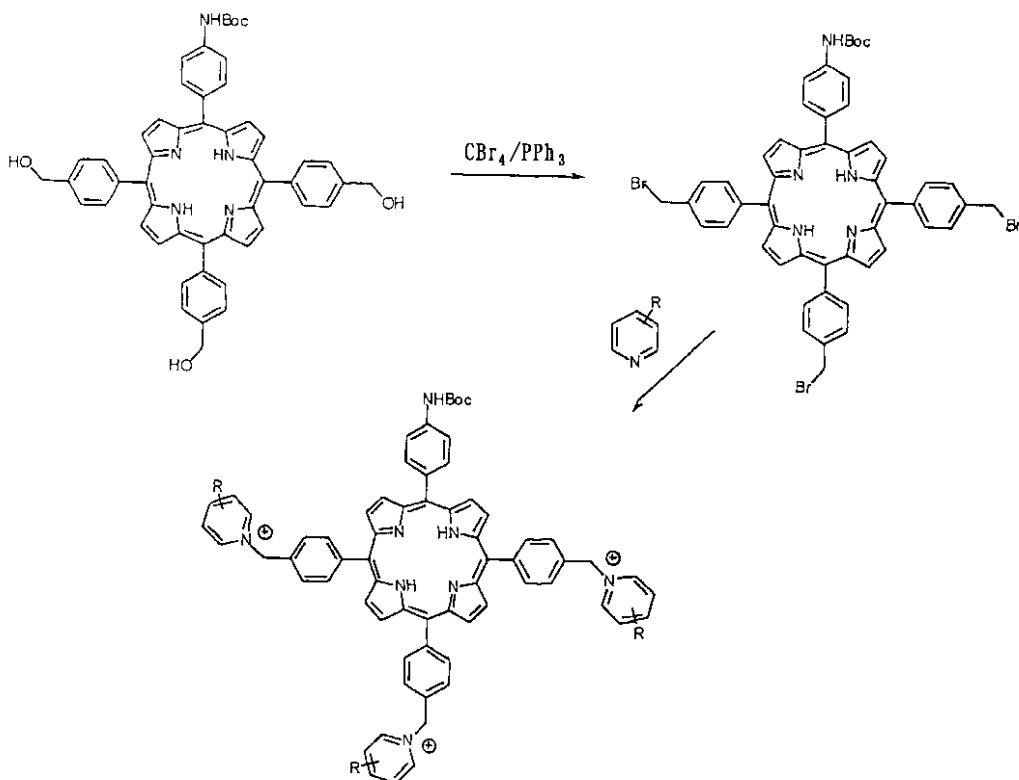
【0025】

R_2 及び随意に R_3 がピリジニウムミルフェニルからなる本発明のポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリンは、図式3として次に提示する一般化された反応図式に従って合成することができ、式中、“R”は、式(I)から(VII)に関して上記に規定するような水素か、又は1又はそれ以上の親水性置換基を示す：

30

【化58】

図式3



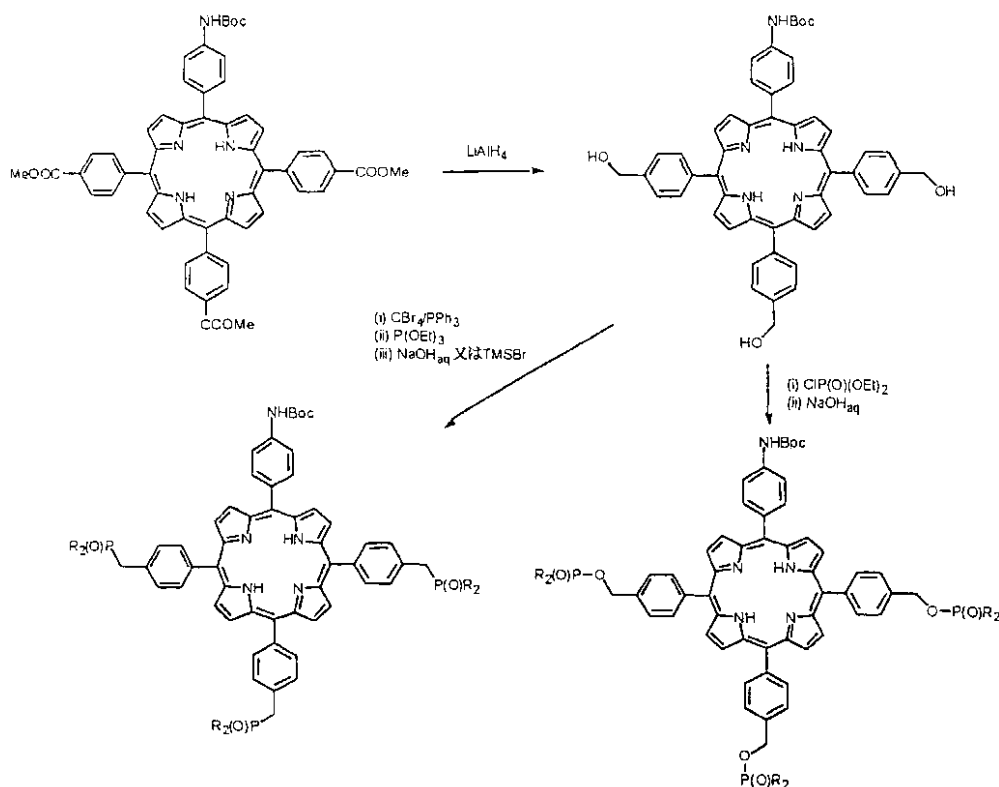
10

20

【 0 0 2 6 】

前記 R_2 及び随意に R_3 がアルキルホスホナトフェニル又はアルキルホスホノフェニルからなる本発明のポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリンは、図式4として次に提示する一般化された反応図式に従って合成することができ、式中、“R”は、OH、ONa、又はO(C₁ - 6 アルキル)を示す：

【 化 5 9 】



図式4

【0027】

本発明の更なる見地においては、5, 10, 15及び20メソ-位に選定された置換基を有する5, 10, 15, 20-テトラ-メソ-置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団を合成するための新規な方法であって; 5, 15-ジ-メソ-置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団を提供する工程; 脱離基Qを前記発色団の10及び20メソ-位に付着させる工程であって、脱離基Qがハロゲン化物及びトリプレートから選ばれている工程; 連関(カップリング)試薬(R_1O)(R_2O) B R_3 を提供する工程であって、 R_1 及び R_2 が、無関係に、H又は C_{1-6} アルキルから選ばれているか、又は R_1 及び R_2 が互いに前記2つのO原子でつながれている C_{1-6} アルキル鎖を構成し、及び R_3 が、上記 R_3 に関して規定される親水性アール部分のようなビニル又はアールである工程; 及び前記発色団と前記連関試薬とを、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、炭酸セシウム及び水酸化バリウムから選ばれる塩基、及びPd₀触媒の存在下に反応させる工程を含み; 前記 R_3 を前記発色団の10-及び20-メソ位で前記脱離基Qと交換する方法を提供する。

30

【0028】

ボロン酸又はボロンエステル試薬を用いるPd₀-触媒Suzuki(スズキ)カップリング反応は、この技術において既知であり、及び例えば、Miyaura(ミヤウラ)及びSuzukiの、オルガノボロン化合物のパラジウム-触媒クロス-カップリング反応、Chem. Rev. (1995) 95: 2457~2483に記載されており; その開示を参考としてここに組み入れる。しかし、これまでに、ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンのメソ-位で、選定された置換基を前記メソ位上に取り込む手段として、Suzuki-カップリングを行う試みは失敗している。しかし、本発明者は、本発明にかかる反応条件下に、Suzuki-カップリングが、出発ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンの10-及び20-メソ位で速やかに及び首尾よく進むことを見出した。この方法は、それに関して、テトラ-メソ-置換されたポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンの都合のよい合成をSuzuki-カップリングによって可能にする。

40

50

【 0 0 2 9 】

前記脱離基 Q は、塩化物、臭化物、ヨウ化物又はトリフレート（トリフルオロメタンスルホネート）でよい。適切には、前記脱離基 Q は臭化物でよい。ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリンのメソ - プロム化のための方法は、この技術において既知である。例えば、前記 5 , 1 5 - ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団は、その 1 0 - 及び 2 0 - メソ - 位で、プロモスクシンイミドのようなハロスクシンイミドとの反応によりハロゲン化することができる。

【 0 0 3 0 】

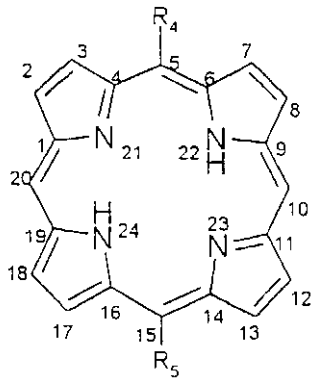
前記関連試薬は、ボロン酸エステル又はボロン酸からなることができる。好ましい具体例では、前記 R_{1 1} 及び R_{1 2} のそれぞれは H であり、前記関連試薬はボロン酸である。

10

【 0 0 3 1 】

有利には、前記 5 , 1 5 - ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団は、本発明の発色団であるか、又はその保護された形態である。したがって、前記 5 , 1 5 - ジ - メソ - 置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団は、次の式 (V I I I) のポルフィリン発色団：

【 化 6 0 】

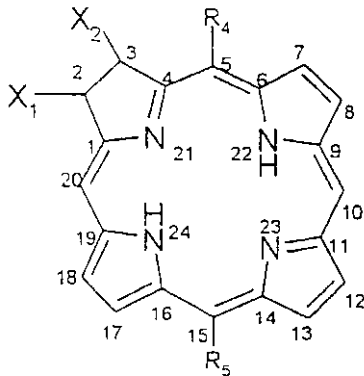


20

(VIII)

又は次の式 (I X)、(X)、(X I)、及び (X I I) のいずれかのクロリン発色団：

【 化 6 1 】

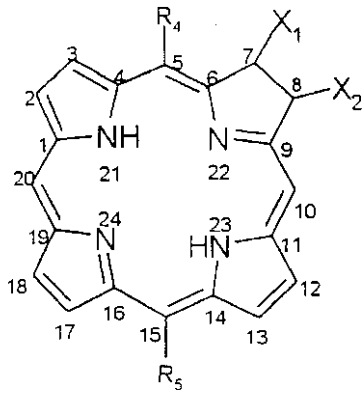


30

(IX)

【 化 6 2 】

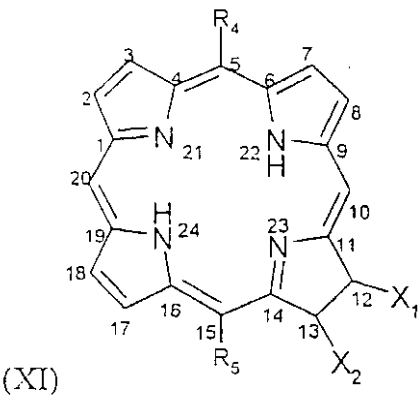
40



(X)

10

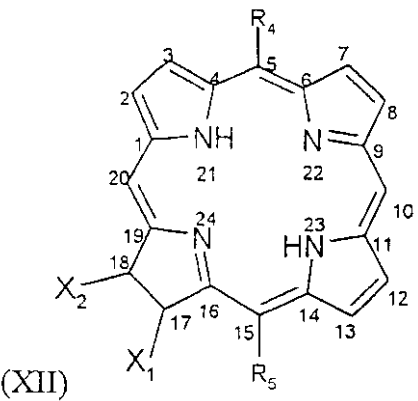
【化 6 3】



(XI)

20

【化 6 4】



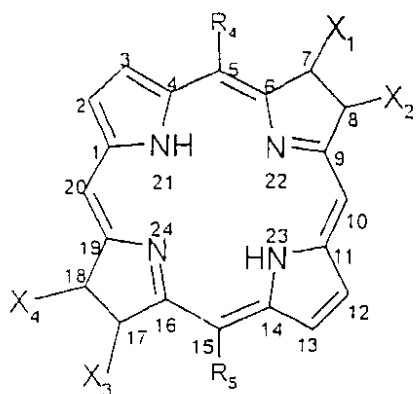
(XII)

30

又は次の式 (XIII) 及び (XIV) のいずれかのバクテリオクロリン発色団 :

【化 6 5】

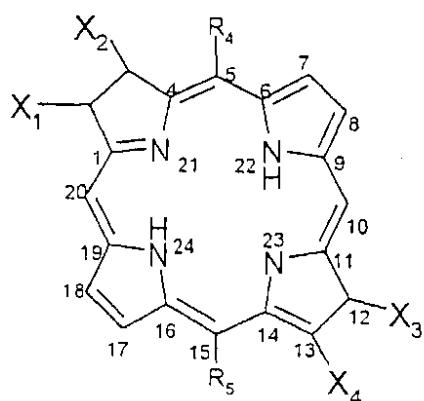
40



(XIII)

10

【化66】



(XIV)

20

から選ぶことができ、

式中、 R_4 は、式 (I) から (VII) に関して上記に規定するような基 R_1 であるか、又はその保護形態であるか、又はそれに対して転換できる基であり； R_5 は、式 (I) から (VII) に関して上記に規定するような基 R_2 であるか、又はその保護形態であるか、又はそれに対して転換できる基であり；及び X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 のそれぞれは、無関係に、H、OH、ハロゲン、 C_{1-3} アルキル及び OC_{1-3} アルキルから選ばれるか、又は隣接する C-C 結合を有する X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 がエポキシド又はシクロプロパニル構造を形成するように、 X_1 及び X_2 及び / 又は X_3 及び X_4 は互いに、O、 CH_2 、 CHC_{1-3} アルキル、又は $C(C_{1-3} \text{アルキル})_2$ から選ばれる架橋 (bridging) 部分を形成する。

30

【0032】

したがって、式中、 R_{13} は、 R_3 に関して上記に規定するような親水性アリアル置換基であり、また、前記 5, 10, 15, 20-テトラ-メソ-置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団は、本発明の発色団を構成することができる。

40

【0033】

前記 Pd_0 触媒は、例えば、 $Pd(PPh_3)_4$ 、 $PdCl_2(PPh_3)_2$ 、又は $Pd(OAc)_2$ からなることができる。有利には、前記 Pd_0 触媒は $Pd(PPh_3)_4$ からなることができる。

【0034】

前記連関反応は、溶媒中で行われ、溶媒はトルエン又はドライ THF から選ぶことができる。連関反応はドライ THF 中ですばやく進むことがわかったので、ドライ THF が溶媒として好ましい。

【0035】

随意に、式中、前記 R_{13} はビニルであり、前記 5, 10, 15, 20-テトラ-メソ-

50

置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団は、前記連関反応に次いで、前記10-及び20-ビニル置換基をヒドロキシアルキルに転換させるような、 OsO_4 を用いるオスミレーション反応を受けさせることができる。前記オスミレーション反応は、ポルフィリンをジ-ベータ-ヒドロキシ-クロリンに転換し次いでテトラ-ベータ-ヒドロキシ-バクテリオクロリンにするのに適切な条件と同じ条件下で行うことができる。この工程が、本発明により、DiMagna(ジマグノ)等のJ. Org. Chem. 1993: 58, 5983~5993, (参考としてここに組み入れる。)に記載されたビニルトリブチルスズを連関試薬として用いる方法に従って、前記5, 15-ジ-メソ-置換発色団において行われたPd-触媒Stille(シュティレ)カップリングによる方法のような本発明の方法によらないで得られた5, 10(ビニル), 15, 20(ビニル)-メソ-置換ポルフィリン、クロリン又はバクテリオクロリン発色団上でも行えることが注目される。

10

【0036】

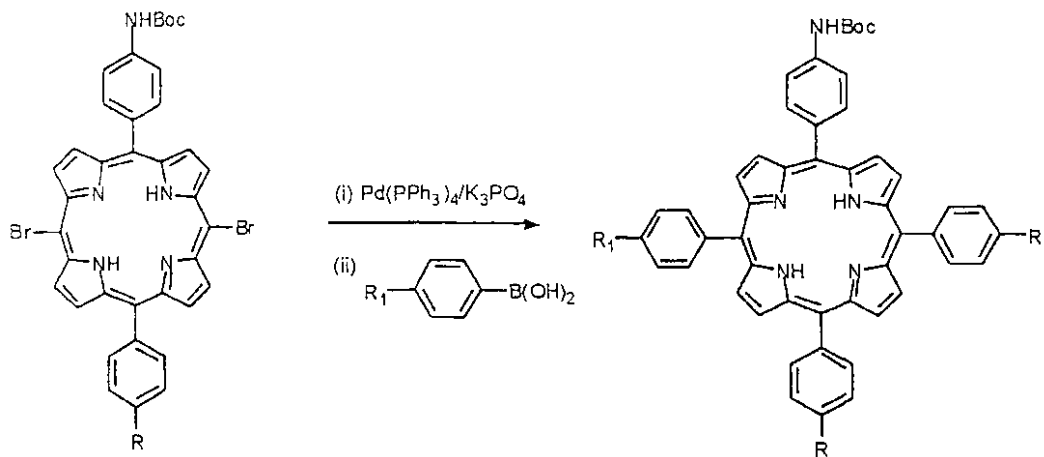
前記テトラ-メソ-置換発色団がポルフィリン又はクロリン発色団である場合、前記発色団は、それぞれ、この技術における熟練者に既知の方法に従って、クロリン又はバクテリオクロリン発色団にか、又はバクテリオクロリン発色団に転換させることができる。例えば、前記ポルフィリン又はクロリン発色団は、ジ-ベータ-ヒドロキシ-クロリン又はテトラ-ベータ-ヒドロキシ-バクテリオクロリンを生成させるような、 OsO_4 を用いる反応によってオスミレーションすることができる。

【0037】

本発明にかかる反応のための一般化された図式を次の図式5及び6において提示する。図式5において、“R”及び“R₁”は、それぞれ、R₂及びR₃のそれぞれに関して上記に規定するような1又はそれ以上の親水性置換基を示す。図式6において、“R”は、R₂に関して上記に規定するような1又はそれ以上の親水性置換基を示し、及び“X”は炭素又は窒素原子を示す。

20

【化67】

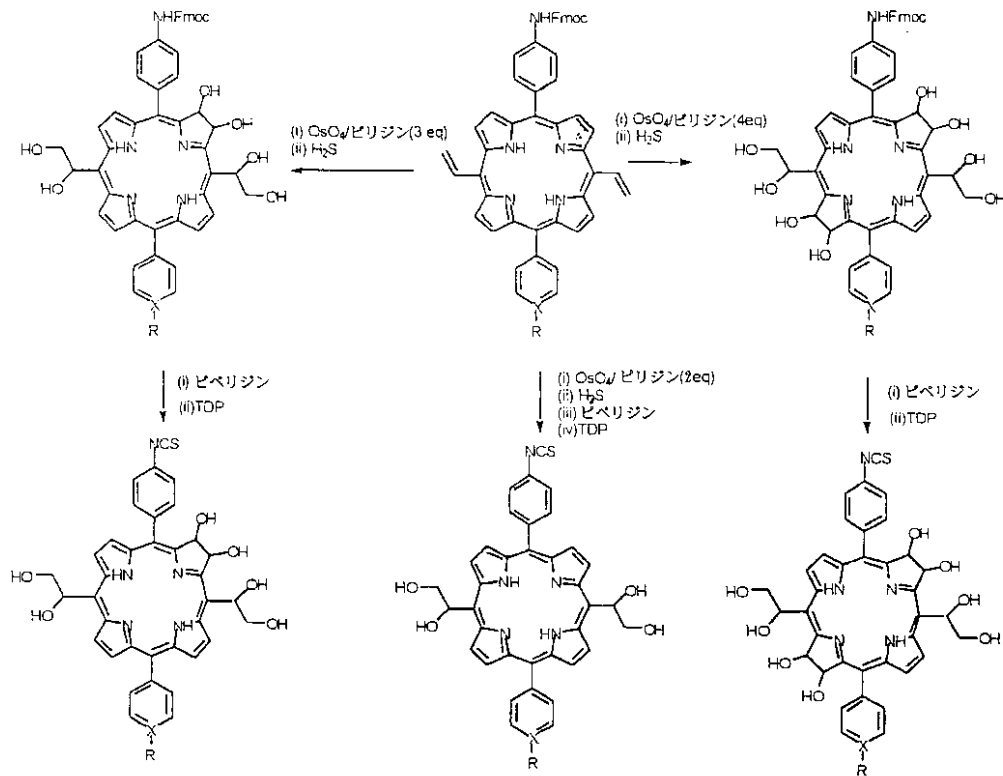


30

図式5

40

【化68】



10

20

図式6

【0038】

本発明の他の見地において、5, 15 - ジフェニルポルフィリン、5, 15 - ジフェニルクロリン又は5, 15 - ジフェニルバクテリオクロリン発色団であって、5 - 及び15 - フェニル基のそれぞれのオルト -、メタ -、及びノ又はパラ - 位のそれぞれが、置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ のそれぞれによって置換されており、それら置換基が無関係にH又は不活性置換基であり、この置換基が他の置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ と相まって発色団の蛍光特性を実質的に損なうことなく；及び発色団が更に接合基Zを含み、この接合基がインビトロ又はインビボの所定の生物学的標的に発色団を送達するためのポリペプチド分子に前記発色団を接合させることができる発色団を提供する。

30

【0039】

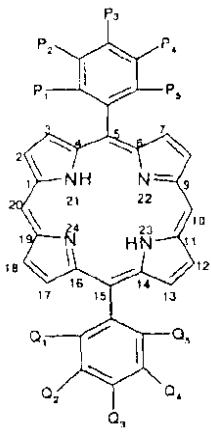
かかる発色団は、新規であり、及びそれぞれが、異なり及び実質的に重なりのない波長の蛍光の光を発光させる励起において有能である。上記に示したように、接合基Zの提供は、本発明の発色団が所定の生物学的標的を特異的に標的にするのを可能にし、従って、インビトロ又はインビボでの発色団の局在性の制御を促進する。したがって、本発明の発色団は、蛍光分析及び画像処理適用 (FACSを含む)、又はPDTにおいて、有効に用いることができる。

【0040】

有利には、前記蛍光色素は、次の化合物：

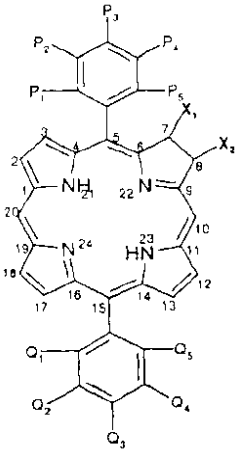
【化69】

40



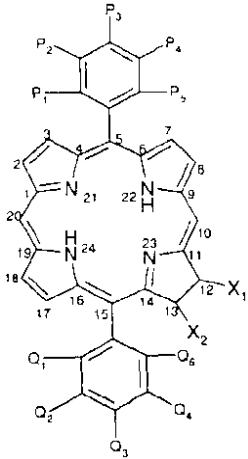
10

【化 7 0】



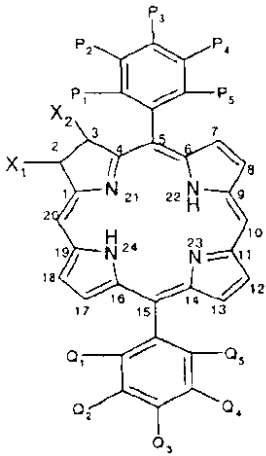
20

【化 7 1】



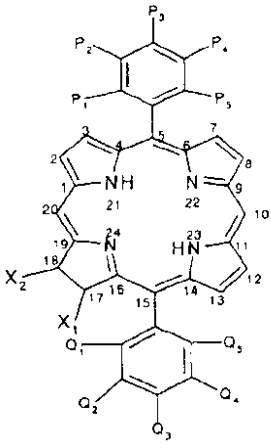
30

【化 7 2】



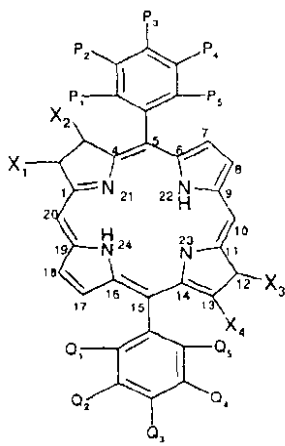
10

【化 7 3】



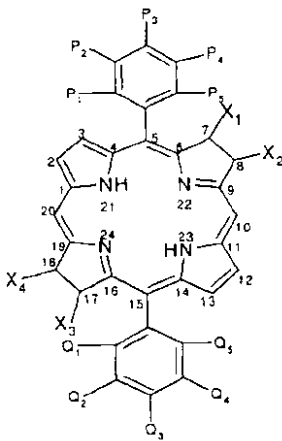
20

【化 7 4】



30

【化 7 5】



10

から選ばれ、式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 及び X_4 のそれぞれは、本発明の第 1 の見地に関して上記に規定されるようなものである。随意に、前記発色団は、更に、1 又はそれ以上のその 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 又は 18 位で、 C_{1-3} アルキル置換基によって置換されることができる。

【0041】

上記化学構造式において、Z は、明確にするために除外している。しかし、前記 Z 置換基は、各発色団の任意の 1 ~ 4, 6 ~ 14, 又は 16 ~ 20 位に付着することができるか、又は置換基 $P_1 \sim P_5$ 又は $Q_1 \sim Q_5$ の 1 つでよいか、又は前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 又は $Q_1 \sim Q_5$ の 1 つによって 5 - 又は 15 - フェニル基の 1 つに付着することができる。

20

【0042】

いくつかの具体例において、 $P_1 \sim P_5$ のそれぞれは、前記 2 つの主要なフェニル環が対称的に置換されるように、前記 $Q_1 \sim Q_5$ の相当する 1 種と同じであるか、又は実質的に同じである。他の具体例では、 $P_1 \sim P_5$ の 1 又はそれ以上は、前記 2 つの主要なフェニル環が対称的に置換されないように、 $Q_1 \sim Q_5$ の相当する 1 種と同じでない。特に、 $P_1 \sim P_5$ のすべて及び / 又は $Q_1 \sim Q_5$ のすべては、前記 2 つの主要なフェニル環の一方又は双方が置換されないように、H からなることができる。

【0043】

有利には、前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ が、全体として、前記発色団の自発的酸化の速度を減少させるのに十分な程度の前記発色団のコアの周りの立体障害を提供し、前記発色団が空气中で実質的に不活性であるが、実質的な範囲で、前記発色団のコアの周りの 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 又は 18 位での選択的な付加又は置換を抑制しない。したがって、 P_1 、 P_5 、 Q_1 及び Q_5 のそれぞれは H でよい。代表的に、前記置換基 $P_1 \sim P_5$ のすべての累積的な分子量は 1000 g モル^{-1} を超えず、及び前記置換基 $Q_1 \sim Q_5$ のすべての累積的な分子量は 1000 g モル^{-1} を超えない。

30

【0044】

前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ の 1 又はそれ以上は、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-T$ 、又は $-OT$ からなることができ、式中、T は C_{1-15} アルキル、シクロアルキル又はアリール基又はそれらのヒドロキシル化、ハロゲン化、硫酸化又はアミノ化誘導体又はそれらのカルボン酸、エステル、エーテル、ポリエーテル、アミド、アルデヒド又はケトン誘導体である。前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ の 1 又はそれ以上は、追加として又は代わりに、 C_{3-12} シクロアルキル及び / 又はアリール環構造、又は 2 と 6 との間の、好ましくは 2 ~ 3 の、融合されたか、又は連結された C_{3-12} シクロアルキル及び / 又はアリール環構造からなることができ、それらの環構造のそれぞれが随意に 1 又はそれ以上の N、O 又は S 原子を含むことがある。特に、1 又はそれ以上の前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ は、N - メチルピリジル (ピリジニウム) 基のような四級化アミン又はピリジル基からなることができる。

40

【0045】

好ましくは、 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ の 1 種は前記接合基 Z からなる接合置換基である

50

。特に好ましい具体例では、前記接合置換基は P_3 又は Q_3 であり、前記接合基 Z は 2 つの主要なフェニル環の 1 つのパラ位上に提供される。

【0046】

適切には、前記接合基は、本発明の第 1 の見地に関して上記に規定されるようなものである。

【0047】

特に、前記置換基 $P_1 \sim P_5$ 及び $Q_1 \sim Q_5$ の 1 又はそれ以上は、前記接合置換基でなく、 $A_1 Z_1 A_{14}$

からなる群より無関係に選ばれる一員からなることができ、式中、 Z_1 は、 Z_2 、 $Z_2 A_5$ 又は $Z_2 A_5 A_6$ であり；

A_1 及び A_5 は、無関係に、 $-(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-C(Y)(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-C(Y)Y'(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-C(Y)NA_4(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-NA_4C(Y)(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-NA_4(CA_2 A_3)_n-$ 、 $-YC(Y')(CA_2 A_3)_n-$ 及び $-Y(CA_2 A_3)_n-$ から選ばれており； $n = 0 \sim 6$ であり； Y 及び Y' は無関係に O 又は S であり； A_2 、 A_3 及び A_4 は無関係に H 又は C_{1-2} アルキルであり、このアルキルは置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており；

$A_6 = -(C_2 H_4 O)_m-$ 又は $-S(O)_p$ であり； $m = 1 \sim 12$ であり； $p = 0 \sim 2$ であり；

Z_2 は単結合又は Z_3 であり； Z_3 は Z_4 、 Z_5 及び Z_6 から選ばれており、この Z_3 は、置換されていないか、又は 1 又はそれ以上の回数、 OH 、 H 、 CN 、 NO_2 、 $A_1 A_{10}$ 、 $A_6 A_8$ 、 $NA_{10} A_{11}$ 、 $C(Y)A_7$ 、 $C(Y)Y'A_7$ 、 $Y(CH_2)_q Y'A_7$ 、 $Y(CH_2)_q A_7$ 、 $C(Y)NA_{10} A_{11}$ 、 $Y(CH_2)_q C(Y')NA_{10} A_{11}$ 、 $Y(CH_2)_q C(Y')A_9$ 、 $NA_{10} C(Y)NA_{10} A_{11}$ 、 $NA_{10} C(Y)A_{11}$ 、 $NA_{10} C(Y)Y'A_9$ 、 $NA_{10} C(Y)Z_6$ 、 $C(NA_{10})NA_{10} A_{11}$ 、 $C(NCN)NA_{10} A_{11}$ 、 $C(NCN)SA_9$ 、 $NA_{10} C(NCN)SA_9$ 、 $NA_{10} C(NCN)NA_{10} A_{11}$ 、 $NA_{10} S(O)_2 A_9$ 、 $S(O)_r A_9$ 、 $NA_{10} C(Y)C(Y')NA_{10} A_{11}$ 、 $NA_{10} C(Y)C(Y')A_1$ 又は Z_6 によって置換されており； $q = 0, 1$ 又は 2 であり； $r = 0 \sim 2$ であり； A_7 は無関係に H 及び A_9 から選ばれており； A_8 は O 又は A_9 であり； A_9 は C_{1-4} アルキルであり、このアルキルは置換されていないか、又は 1 又はそれ以上のフッ素によって置換されており； A_{10} は OA_9 又は A_{11} であり； A_{11} は、 A_7 であるか、又は A_1 及び A_{11} が $NA_{10} A_{11}$ としてのときには、それらが窒素と共に、炭素原子だけからなるか、又は炭素原子と、 O 、 N 及び S から選ばれる少なくとも 1 つのヘテロ原子とからなる 5 乃至 7 員環を形成することができる；

Z_4 は C_{6-12} アリール又はアリールオキシ C_{1-3} アルキルであり；

Z_5 は、フラニル、テトラヒドロフラニル、インダニル、インデニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、チオピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、1 又は 2 の不飽和結合を含む C_{3-8} シクロアルキル又は C_{4-8} シクロアルキル、及び C_{7-11} ポリシクロアルキルから選ばれており；

Z_6 は、 N -アゾリル、ジオキサジアジニル、ジオキサジアゾリル、ジオキサニル、2- N -ジオキサトリアジニル、ジオキサジニル、 N -ジオキサゾリル、ジオキサソリル、ジチアアジアジニル、ジチアアジアゾリル、 N -ジチアトリアジニル、ジチアジニル、 N -ジチアゾリル、1- N -イミダゾリル、 N -モルフォリニル、ピロールイル、テトラゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ナフチドリニル、オキサジアジニル、オキサジアゾリル、オキサテトラジニル、オキサトリアジニル、オキサトリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ペンタジニル、フタルアジニル、 N -ピペリジニル、 N 、 N -ピペラジニル、1- N -ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、テトラチアジニル、テトラジニル、1- N -テトラゾリル、テトロキサジニル、チアアジアジニル、チアアジアゾリル、チアテトラジニル、チアトリアジニル、チアトリアゾリル、

10

20

30

40

50

チアゾリル、トリアジニル、1-N-トリアゾリル、トリオキサダジニル、トリオキサニル、トリオキサジニル、トリオキサゾリル、トリチアジニル、トリチアジニル、トリチアジニルから選ばれており；

Z₄、Z₅又はZ₆は、Z₄、Z₅及びZ₆から無関係に選ばれる1又はそれ以上の他の構成員に融合することができ；

A₁₄は、水素、メチル、ヒドロキシ、アリール、八口置換アリール、アリーロキシC₁₋₃アルキル、八口置換アリーロキシC₁₋₃アルキル、インダニル、インデニル、C₇₋₁₁ポリシクロアルキル、テトラヒドロフラニル、フラニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、テトラヒドロチオピラニル、チオピラニル、C₃₋₆シクロアルキル、又は1又は2の不飽和結合を含むC₄₋₆シクロアルキル{シクロアルキル又は複素環式部分が置換されていないか、又は1~3のメチル基、1つのエチル基、又はヒドロキシル基によって置換されている。}である。

10

【0048】

前記接合置換基は、A₁Z₁Zからなる群より選ばれる一員からなることができ、

式中、Z₁はZ₂、Z₂A₅又はZ₂A₅A₆であり；

A₁及びA₅は、無関係に、-(CA₂A₃)_n-、-C(Y)(CA₂A₃)_n-、-C(Y)Y'(CA₂A₃)_n-、-C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n-、-NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n-、-NA₄(CA₂A₃)_n-、-YC(Y')(CA₂A₃)_n-及び-Y(CA₂A₃)_n-から選ばれており；n=0~6であり；Y及びY'は無関係にO又はSであり；A₂、A₃及びA₄は無関係にH又はC₁₋₂アルキルであり、このアルキルは置換されていないか、又は1又はそれ以上のフッ素によって置換されており；

20

A₆=-(C₂H₄O)_m-又は-S(O)_pであり；m=1~12であり；p=0~2であり；

Z₂は単結合又はZ₃であり；Z₃はZ₄、Z₅及びZ₆から選ばれており、このZ₃は、置換されていないか、又は1又はそれ以上の回数、OH、八口、CN、NO₂、A₁₀、A₆A₈、NA₁₀A₁₁、C(Y)A₇、C(Y)Y'A₇、Y(CH₂)_qY'A₇、Y(CH₂)_qA₇、C(Y)NA₁₀A₁₁、Y(CH₂)_qC(Y')N A₁₀A₁₁、Y(CH₂)_qC(Y')A₉、NA₁₀C(Y)NA₁₀A₁₁、NA₁₀C(Y)A₁₁、NA₁₀C(Y)Y'A₉、NA₁₀C(Y)Z₆、C(NA₁₀)NA₁₀A₁₁、C(NCN)NA₁₀A₁₁、C(NCN)SA₉、NA₁₀C(NCN)SA₉、NA₁₀C(NCN)NA₁₀A₁₁、NA₁₀S(O)₂A₉、S(O)_rA₉、NA₁₀C(Y)C(Y')NA₁₀A₁₁、NA₁₀C(Y)C(Y')A₁₀又はZ₆によって置換されており；q=0、1又は2であり；r=0~2であり；A₇は無関係にH及びA₉から選ばれており；A₈はO又はA₉であり；A₉はC₁₋₄アルキルであり、このアルキルは置換されていないか、又は1又はそれ以上のフッ素によって置換されており；A₁₀はOA₉又はA₁₁であり；A₁₁は、A₇であるか、又はA₁₀及びA₁₁がNA₁₀A₁₁としてのときには、それらが窒素と共に、炭素原子だけからなるか、又は炭素原子と、O、N及びSから選ばれる少なくとも1つのヘテロ原子とからなる5乃至7員環を形成することができ；

30

40

Z₄はC₆₋₁₂アリール又はアリーロキシC₁₋₃アルキルであり；

Z₅は、フラニル、テトラヒドロフラニル、インダニル、インデニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、チオピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチエニル、チエニル、1又は2の不飽和結合を含むC₃₋₈シクロアルキル又はC₄₋₈シクロアルキル、及びC₇₋₁₁ポリシクロアルキルから選ばれており；

Z₆は、N-アゾリル、ジオキサジアジニル、ジオキサジアゾリル、ジオキサニル、2-N-ジオキサトリアジニル、ジオキサジニル、N-ジオキサゾリル、ジオキサソリル、ジチアジニル、ジチアジニル、N-ジチアトリアジニル、ジチアジニル、N-ジチアゾリル、1-N-イミダゾリル、N-モルフォリニル、ピロールイル、テトラゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ナフチドリニル、オキサジアジ

50

ニル、オキサジアゾリル、オキサテトラジニル、オキサトリアジニル、オキサトリアゾリル、オキサジニル、オキサゾリル、ペンタジニル、フタルアジニル、N - ピペリジニル、N, N - ピペラジニル、1 - N - ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、テトラチアジニル、テトラジニル、1 - N - テトラゾリル、テトロキサジニル、チアジアジニル、チアジアゾリル、チアテトラジニル、チアトリアジニル、チアトリアゾリル、チアゾリル、トリアジニル、1 - N - トリアゾリル、トリオキサダジニル、トリオキサニル、トリオキサジニル、トリオキサゾリル、トリチアジアジニル、トリチアジニル、トリチアジアゾリルから選ばれており；

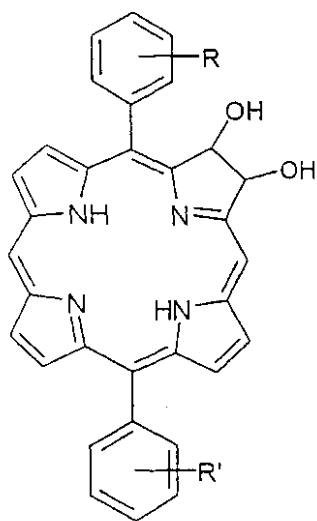
Z₄、Z₅ 又は Z₆ は、Z₄、Z₅ 及び Z₆ から無関係に選ばれる 1 又はそれ以上の他の構成員に融合することができる。

10

【0049】

本発明の特に好ましい具体例では、前記発色団は、次の (x)、(y) 又は (z) として提示される構造を有する発色団からなることができ：

【化76】

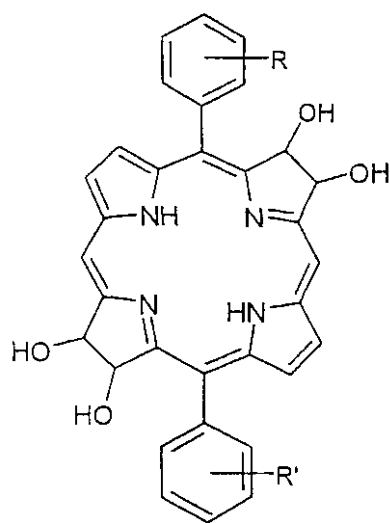


(x)

20

30

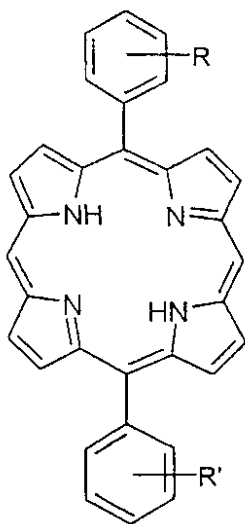
【化77】



(y)

40

【化78】



10

(z)

式中、R 及び R' は、以下の組合せ：

R	R'
4 - H	4 - N C S
4 - M e	4 - N C S
4 - B r	4 - N C S
4 - C O ₂ M e	4 - N C S
3, 4, 5 - トリス (O M e)	4 - N C S
4 - N C S	4 - O M e
4 - N C S	4 - M e
4 - N C S	4 - C O ₂ M e
4 - N C S	4 - B r
4 - N C S	4 - C N
4 - N C S	4 - C O ₂ M e

20

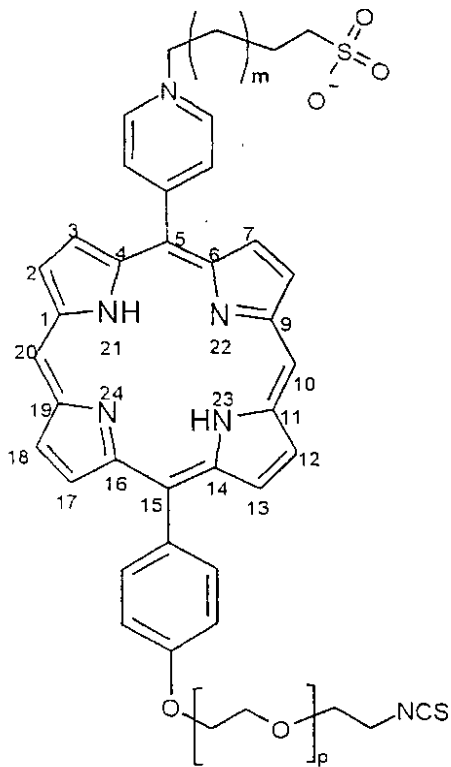
のいずれかであることができる。

30

【 0 0 5 0 】

本発明の他の具体例では、前記発色団は次に提示する構造を有するポルフィリン発色団からなることができ：

【 化 7 9 】



10

20

式中、 $m = 0 \sim 6$ であり； $p = 0 \sim 15$ 、好ましくは $0 \sim 5$ であり；又は相当するクロリン又はバクテリオクロリン発色団である。

【0051】

本発明の他の見地においては、マルチカラー蛍光色素分析用の蛍光色素マーカの組合せであって、ポルフィリン発色団、クロリン発色団及びバクテリオクロリン発色団からなる群より選ばれる少なくとも2つの発色団からなり、それらの各発色団が同じポルフィリン骨格からなり、それらの各発色団が前記ポルフィリン骨格上の1又はそれ以上の置換基を含んでおり、それらの置換基の1つが接合基Zを含む接合置換基Lであり、Zが、複数の異なる所定の生物学的標的の1つに各発色団を送達するためのポリペプチド分子に、前記各発色団を接合させることができる接合基である組合せを提供する。

30

【0052】

好ましくは、骨格上の他の前記置換基のそれぞれは、無関係に、H、又は前記接合置換基L及びすべての他のコア置換基とともに各発色団の蛍光特性を実質的に損なわない不活性置換基Rである。

【0053】

本発明の組合せにおける各発色団が、励起において、異なる別々の波長で蛍光の光を放出することが見出された。したがって、組合せ中のすべての発色団は、単一レーザーによって励起され、実質的に個々に消散(resolve)されることがある分かれた放出バンドを生成する。さらに、前記組合せにおいて提供される発色団のすべては、同じ分子構造を実質的に共有し、及び従って、与えられた条件下での生物学的標的に対する生物学的接合の同じ程度の効率を実質的に含む、同じ生物学的及び物理化学的特性を実質的に共有する。したがって、本発明の発色団の組合せは、FACSを含む、種々の種類の細胞又は他の生物学的標的の都合のよい選別及び分析のための蛍光分析及び選別の適用に有効に用いることができる。かかる組合せの構成成分は、例えば、1又はそれ以上の前記異なる所定の生物学的標的を含む混合物に、各発色団をそのそれぞれの所定の生物学的標的に送達させる条件の下で導入され；及び前記混合物は、前記発色団に蛍光を生じさせるように光に曝されることができる。次いで、マルチカラー分析を、各発色団によって生じる異なる放出バンドを確認するために実行し、それによって、それぞれの異なる生物学的標的の位置の計数及び可視化を可能にすることができる。

40

50

【0054】

前記発色団の組合せは、特に、本発明の任意の見地の2又はそれ以上のポルフィリン発色団、相当するクロリン発色団、及び相当するバクテリオクロリン発色団からなることができる（ここで、“相当する”は、分子の大環状コアの周りに同じメソ-置換基を有することを意味する）。

【0055】

本発明の発色団において、又は本発明の発色団の組合せのそれぞれの構成員において、前記接合基Zは、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質に接合することができる。あるいはまた、前記接合基Zは、架橋ポリペプチドに接合ことができ、この架橋ポリペプチドは、前記発色団を相補的架橋ポリペプチドに関連させるために、前記相補的架橋ポリペプチドに対する結合に適合する。

10

【0056】

いくつかの具体例では、前記架橋ポリペプチドは、前記相補的架橋ポリペプチドに結合することができる、及び前記相補的架橋ポリペプチドは、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質からなるか、これに関連するか、又はこれと融合することができる。したがって、前記発色団は、前記結合タンパク質と、前記架橋ポリペプチド及び前記相補的架橋ポリペプチドによって共有結合的に連結される場合がある。

【0057】

本発明の他の見地においては、本発明の発色団又は本発明の発色団の組合せからなるキットであって、前記発色団又は各発色団が架橋ポリペプチドに接合され、この架橋ポリペプチドが、前記発色団を相補的な架橋ポリペプチドに関連させるために、前記相補的な架橋ポリペプチドに対する結合に適合し；及び構成物又は複数の構成物が、それぞれ、前記生物学的標的に対する特異的な結合に適合する結合タンパク質に融合するか、又は関連する前記相補的な架橋ポリペプチドからなり；その配列が、前記発色団又は各発色団を、前記所定の生物学的標的に対して特異性を有する結合タンパク質に連結させるために、キット中の前記発色団又は各発色団を、前記所定の生物学的標的に対して特異性を有するキット中の異なる構成物への結合に適合されているキットを提供する。

20

【0058】

例えば、前記結合タンパク質は、前記生物学的標的の表面上の標的特異的分子に対して特異性を有するモノクローナル又はポリクローナル抗体又はそれらの断片のような抗体でよい。特に、前記抗体は、ファージ抗体であり、バクテリオファージの表面上に発現される抗体であることができる。あるいはまた、前記結合タンパク質は、血清アルブミンタンパク質のような1又はそれ以上の細胞表面分子又は受容体に対する結合に適合するタンパク質からなることができる。また更に代わりとして、前記結合タンパク質は、細胞膜中への挿入のために適合される脂肪酸鎖のような低密度リポタンパク質からなることができる。発色団に接合させる場合、かかるリポタンパク質は、発色団を細胞膜に固定する役目を果たすことができる。

30

【0059】

前記架橋ポリペプチドは、カルモジュリンからなることができ、及び前記相補的架橋ポリペプチドは、カルモジュリン結合ペプチドからなることができ；又は逆もまた同じである。しかし、好ましくは、前記架橋ポリペプチドは、アビジン又はストレプトアビジンからなることができ、及び前記相補的架橋ポリペプチドはビオチンからなることができ；又は逆もまた同じである。特に、本発明のキット中の前記発色団又は各発色団は、アビジンに接合することができる、及び前記構成物又は各構成物は、前記生物学的標的の表面上の標的特異的分子に対して特異性を有するビオチン化モノクローナル抗体からなることができる。したがって、前記アビジン-連結発色団が前記ビオチン化抗体を結合させる場合、前記発色団は前記抗体にしっかりと連結することになる。都合のよいことには、前記発色団又は各発色団を望ましい生物学的標的に送達させるために、キット中の前記ビオチン化モノクローナル抗体又は各ビオチン化モノクローナル抗体は、選定され及び/又はたやすく置換することができる。モノクローナル抗体の調製のための及びそのビオチン化のための方

40

50

法は、この技術においてよく知られている。

【0060】

本発明の他の見地においては、本発明の発色団又は本発明の発色団の組合せを、前記所定の生物学的標的又は標的群に対して付着させるにあたり、本発明のキットを提供する工程、及び前記キットの成分を、前記結合タンパク質又は各結合タンパク質の前記所定の生物学的標的又は標的群に対する結合を可能にするための適切な条件下に、前記所定の生物学的標的又は標的群の近くに導入する工程を含む方法を提供する。有利には、前記キットの成分は、前記発色団又は各発色団に接合する架橋ポリペプチドを、キット中の1つの前記構成物上に提供される相補的な架橋ポリペプチドに結合させるために、前記標的又は標的群の導入に先立って、互いに結び付かせることができる。このことは、キット中の前記発色団又は各発色団が、前記発色団の前記標的又は標的群への導入に先立って、結合タンパク質に連結するのを確実にする。あるいはまた、前記キットの成分は、前記標的又は標的群に次いで導入することができる。

10

【0061】

代表的に、前記所定の生物学的標的は、細胞又は膜でよい。前記所定の生物学的標的は、インピボ又はインピトロ（イクスピボ）であってよい。例えば、前記生物学的標的は、癌細胞、腫瘍細胞、HIVにか、又は任意の他の微生物又はウイルスに感染した細胞、自己免疫疾患において有害な活性を引き起こす細胞、外来のか、又は異常細胞（*disease cell*）、又は任意の他のそのような細胞である場合がある。

【0062】

本発明のいくつかの具体例では、前記生物学的標的は、インピトロの細胞であり、及び前記標的特異的分子は、ポリペプチド、糖質（*carbohydrate*）、脂肪酸、リポタンパク質、リン脂質又は他の生物学的分子のような、前記細胞の表面上に露出する分子からなる。好ましくは、前記標的特異的分子は、前記細胞によって特異的に発現されるか、又は余分に発現（*over-express*）されている。例えば、前記標的特異的分子は、CD4又はCD8のようなT細胞マーカーでよい。したがって、本発明の発色団又は本発明の発色団の組合せの一部分を形成する発色団は、前記細胞に付着し、及び前記細胞が、前記発色団の蛍光を生じさせるために照射され、発色団の蛍光によって、前記細胞が可視化され、及びFACSによる計数が行われ及び/又は選別される。

20

【0063】

したがって、本発明の更なる見地においては、細胞の混合物から標的細胞を蛍光活性化選別するにあたり、本発明の発色団又は本発明の発色団の組合せを前記標的細胞に付着させ、前記標的細胞に付着した前記発色団の1又はそれ以上の蛍光を生じさせるために、細胞の前記混合物に照射をし、蛍光を発する細胞に荷電を与え、及び前記荷電細胞を前記混合物から分離するか、又は分離させるために、細胞の混合物を偏極環境（*polarised environment*）に通す工程を含む方法を提供する。

30

【0064】

本発明の他の見地においては、複数の標的細胞であって、前記標的細胞が2又は3の異なる細胞種の細胞を含んでいる複数の標的細胞の可視化及び/又は計数にあたり、本発明の発色団の組合せを提供する工程であって、発色団の組合せが2又は3の発色団を含み、各発色団が異なる1つの前記細胞種に送達されるのに適合する工程；その組合せ中の前記発色団を本発明の方法に従って前記標的細胞に付着させる工程；前記発色団によって蛍光の発光を生じさせるために、前記標的細胞に照射をする工程；前記各発色団によって生じる蛍光発光バンドを検出する工程；及び随意に前記各バンドについて、それぞれの個別の細胞種の蛍光細胞の数の測定値を得るために、発光/波長曲線の下での領域を測定する工程を含む方法を提供する。

40

【0065】

本発明の他の具体例では、前記標的細胞は、癌細胞、腫瘍細胞、又は感染したか、外来のか又は異常細胞のようなインピトロの細胞であり、及び前記標的特異的分子は、前記標的細胞の表面によって発現されるか、又は余分に発現されるか、又はそれに付着するか、及

50

びその上に露出する；標的細胞特異的膜タンパク質のような標的細胞特異的分子である。したがって、本発明の発色団が前記標的細胞特異的分子に送達される場合、前記発色団は前記細胞に対して付着することになる。前記細胞が次いで、前記発色団の励起を起こさせるのに適切な波長で光を用いて照射される場合、前記細胞に付着する前記発色団は、励起を起こされ、及びこれが前記細胞のすぐ近くにおいて一重項酸素の生成を招き、従ってその細胞の死をもたらす。

【0066】

特に好ましい具体例では、前記標的細胞特異的分子は、前記細胞の表面上の内部移行（インターナリゼーション）受容体からなり、この内部移行受容体は前記結合タンパク質と結合することができ、及びそれによって前記細胞内での前記発色団の内部移行を媒介する。したがって、その後の、前記発色団の励起を起こさせるのに適切な波長での前記細胞の光を用いる照射は、前記細胞内での一重項酸素の生成を招き、従って前記細胞の死をもたらす。

10

【0067】

したがって、本発明は、標的細胞の消滅を起こさせるにあたり、本発明の発色団を前記細胞に付着させ及び一重項酸素の生成を前記細胞の近くで起こさせるために、前記細胞に照射をする工程を含み、それによって、細胞の死を起こさせる方法を包含する。好ましくは、前記発色団は、前記細胞の表面上の内部移行受容体に付着し、この内部移行受容体は、前記細胞内での前記発色団の内部移行を媒介することができ、及び前記細胞はその後、前記細胞内での一重項酸素の生成が生じるように照射をされ、それによって細胞の死が生じる。

20

【0068】

好ましくは、前記発色団が細胞内に内部移行されるのに適合する場合、前記発色団は、ミトコンドリア膜上の正味負電荷（*net negative charge*）によって、細胞のミトコンドリアの周りの前記発色団の細胞内蓄積を促進するために、四級化アミン又はピリジル（ピリジニウム）基、又はホスホニウム基のような、陽イオン性の基を含む。このことは、発色団の崩壊（*decay*）による一重項酸素の提示があった場合に、細胞の迅速かつ効率的な消滅をもたらす。

【0069】

本発明の他の見地においては、腫瘍、癌、HIV感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症のような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を処置するにあたり、本発明の発色団の有効な量をそれを必要としている患者に投与する工程であって、その発色団が前記細胞への付着を生じるように、その発色団が前記異常細胞か又は望ましくない細胞の表面上の標的細胞特異的分子に対してそれらへの付着のための標的にされるのに適合し、及び前記細胞の近くで一重項酸素の生成を生じさせるために、光を用いて前記細胞に照射をする工程を含み、それによって前記細胞を死滅させる方法を提供する。適切には、前記標的細胞特異的分子は内部移行受容体からなり、及び前記発色団は、前記内部移行受容体への送達において細胞内に内部移行するのに適合し、その照射によって前記細胞内での一重項酸素の生成が可能にされる。

30

40

【0070】

前記発色団は、局所的にか、又は全身的に前記患者に投与することができる。例えば、前記発色団は注射によって投与することができる。

【0071】

本発明の更に他の見地においては、腫瘍、癌、HIV感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症のような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を処置するために患者に投与される薬学組成物であって、組成物が、本発明の発色団であって、前記異常細胞か又は望ましくない細胞へ送達されるのに適合する発色団、及び適切な担体からなる薬学組成物を提供する。

50

【0072】

本発明の更に他の見地は、腫瘍、癌、HIV感染のようなウイルス感染、又はリウマチ様関節炎又は多発性硬化症のような自己免疫疾患のような、異常細胞か又は望ましくない細胞の体内での存在によって特徴付けられる疾病又は障害を患う患者の処置において用いる薬剤の製造において使用するための、本発明の発色団であって；前記発色団が、前記異常細胞か又は望ましくない細胞に対する送達のために適合する発色団を構想する。

【0073】

本発明の例の詳細な説明

以下は、実例としてのみの、本発明の具体例及び本発明を実施するための方法の説明及び例である。

10

発色団の合成

計測手段 (Instrumentation) 及び材料

融点は修正しない。 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMRスペクトルをJeol JNM EX270 FT-NMR分光計上で記録し、特に明記しない限り、テトラメチルシランを基準にした。I.R.スペクトルを一連の1600 FT-I.R.を用いて得、及び公称マススペクトルをKratos Kompact (クラトコンパクト) MALDI II分光計によって得た。正確な質量をEPSRC Mass Spectrometry Service (マススペクトロメトリーサービス), Swansea (スウォンジ) から得た。電子スペクトルをUnicam (ユニカム) UV-2又はUV-4分光計を用いて得、及び特に明記しない限り、DCMにおいて取得した。すべての試薬及び溶媒は、市場で入手できるもので、試薬等級又はより一層高い等級であり、及び特別の定めのない限り、受け取ったものとして用いた。TLC分析をMerck silica-gel (メルクシリカゲル) 60プレート (F254, 500 μm の厚さ) 上で行った。メルクシリカゲル60 (230~400メッシュ) をフラッシュクロマトグラフィーの精製のために用いた。

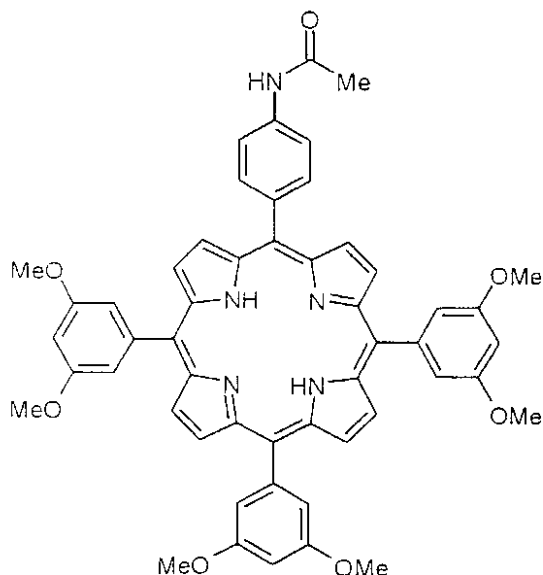
20

【0074】

説明

(1) 5 - { 4 - アセトアミドフェニル - 10 , 15 , 20 - トリス (3 , 5 - ジメトキシフェニル) ポルフィリン }

【化80】



30

40

4 - アセトアミドベンズアルデヒド (3 . 36 g , 0 . 02 モル) 及び 3 , 5 - ジメトキシベンズアルデヒド (10 mL , 0 . 06 モル) をプロピオン酸 (300 mL) 中 90 で攪拌した。ピロール (5 . 5 mL , 0 . 08 モル) を添加し、及びその混合物を 30 分間還流させながら攪拌した。冷却の際に、反応混合物を減圧中で蒸発させ、濃い紫色 (dark purple) の固体を得た。ポルフィリン異性体の粗製の混合物をフラッシュ

50

クロマトグラフィー（シリカ、溶出液： $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{EtOAc}$ ，4：1）によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥（ Na_2SO_4 ）させ、及び減圧中に蒸発させ、紫色の固体（1.55 g，9.1%）としての1を得た； $R_f = 0.50$ （シリカ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{EtOAc}$ ，4：1）；融点 > 350 分解（decomp.）； $^1\text{H NMR}$ [270 MHz， CDCl_3] - 2.96 (2H, br s, NH)，2.23 (3H, s, NHCOCH_3)，3.93 (18H, s, 3, 5-O CH_3)，6.99 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H)，7.07 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$ ，5-Ar-3, 5-H)，7.38 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2, 6-H)，7.44 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$ ，5-Ar-2, 6-H)，8.86 - 8.93 (8H, m, -H)，10.42 (1H, br s, NHCOCH_3)； $^{13}\text{C NMR}$ [67.5 MHz， CDCl_3] 20.4，23.9，103.9，113.5，117.3，119，119.4，119.6，120，129，131.1，131.3，131.4，131.8，134.5，135.6，136.8，139.3，143.1，158.6，160.3，167.9，168.7；UV-vis (CH_2Cl_2) m_{ax} 421，515，551，590，650 nm；MS (MALDI-TOF) m/z 852 (M^+ ，100%)。

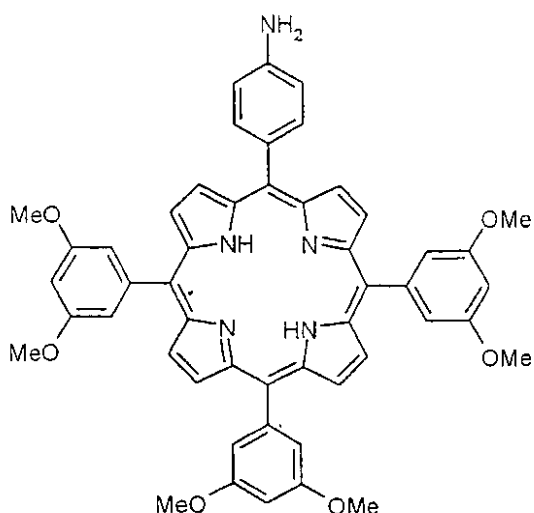
10

【0075】

(2) 5-(4-アミノフェニル)-10,15,20-トリス(3,5-ジメトキシフェニル)ポルフィリン

【化81】

20



30

ポルフィリン1（500 mg，0.587ミリモル）を18% HCl （100 mL）中に溶解し、及びその溶液を還流下に2時間加熱した。冷却の際に、反応混合物を減圧中に蒸発させ、粗製の緑色の固体を得た。その固体を9：1の混合物のジクロロメタン/トリエチルアミン（200 mL）中に再び溶解し、及び室温で10分間攪拌した。次いで、その溶液を、水（ $3 \times 200\text{ mL}$ ）及び鹹水（brine）（200 mL）を用いて洗浄し、その有機層を分離し、及び乾燥（ Na_2SO_4 ）させた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させ、及びその粗製の紫色固体をフラッシュクロマトグラフィー（シリカ、溶出液： $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{EtOAc}$ ，4：1）によって精製した。関連する画分を組み合わせ、乾燥（ Na_2SO_4 ）させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体（426 mg，89.7%）としての2を得た； $R_f = 0.89$ （シリカ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{EtOAc}$ ，4：1）；融点 > 350 分解； $^1\text{H NMR}$ [270 MHz， CDCl_3] - 2.80 (2H, br s, NH)，3.96 (18H, s, 3, 5-O CH_3)，6.90 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H)，7.06 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$ ，5-Ar-3, 5-H)，7.40 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2, 6-H)，7.98 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$ ，5-Ar-2, 6-H)，8.93 (8H, m, -H)； $^{13}\text{C NMR}$ [67.5 MHz， CDCl_3] 20.4，23.9，103.9，113.5，117.3，119，119.4，119.6，120，129，131.1，131.3，131.4，131.8，134.5，135.6，136.8，139.3，143.1，158.6，160.3，167.9，168.7；UV-vis (CH_2Cl_2) m_{ax} 421，515，551，590，650 nm；MS (MALDI-TOF) m/z 852 (M^+ ，100%)。

40

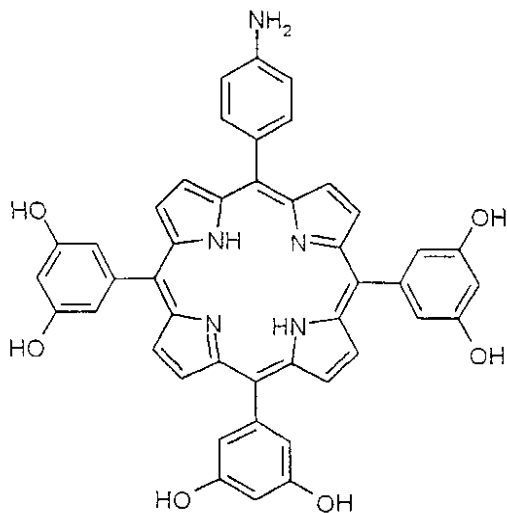
50

MR [67.5 MHz, CDCl₃] 20.13, 100.6, 113.9, 114.3, 115.7, 119.8, 120.1, 121.4, 130.2, 131.4, 132.7, 136.1, 144.5, 144.6, 146.5, 159.3; UV-vis (CH₂Cl₂) m_{\max} 422, 517, 553, 593, 651 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 809 (M⁺, 100%).

【0076】

(3) 5-(4-アミノフェニル)-10,15,20-トリス(3,5-ジヒドロキシフェニル)ポルフィリン

【化82】



新しく蒸留したクロロホルム (50 mL) 中の 2 の攪拌した溶液 (1 g, 1.23 ミリモル) に、三臭化ホウ素 (1.17 mL, 0.012 モル) を添加した。反応を、アルゴン下に 17 時間、室温で進ませた。次いで、反応物を 0 に冷却し、水 (20 mL) を添加し、及びその溶液を更に 60 分間攪拌した。反応物を減圧中で蒸発乾燥し、及び 9 : 1 の混合物のクロロホルム / トリエチルアミン (500 mL) 中に再び溶解した。その溶液を、水 (3 × 500 mL) 及び鹼水 (かん水 500 mL) を用いて洗浄し、その有機層を分離し、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中で蒸発させて粗製の紫色固体を得た。その粗製の固体をフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液: CHCl₃ / MeOH, 9 : 1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (667 mg, 74.5%) としての 3 を得た; R_f = 0.19 (シリカ, CHCl₃ / MeOH, 9 : 1); 融点 > 350 分解; ¹H NMR [270 MHz, (CD₃)₂SO] - 2.95 (2 H, br s, NH), 5.56 (2 H, br s, NH₂), 6.69 (3 H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.02 (2 H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-3, 5-H), 7.06 (6 H, s, 10, 15, 20-Ar-2, 6-H), 7.87 (2 H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-2, 6-H), 8.94 (8 H, s, -H), 9.75 (6 H, br s, 3, 5-OH); ¹³C NMR [67.5 MHz, (CD₃)₂SO] 102.3, 112.5, 113.9, 114.1, 119.2, 119.7, 121.5, 127.5, 128.3, 130.7 - 131.3, 135.5, 142.8, 142.9, 148.6, 156.4, 156.5; UV-vis (CH₂Cl₂) m_{\max} 422, 517, 553, 592, 649 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 726 (M⁺, 100%)。

【0077】

(4) 5-(4-アセトアミドフェニル)-10,15,20-トリス(4-ピリジル)ポルフィリン

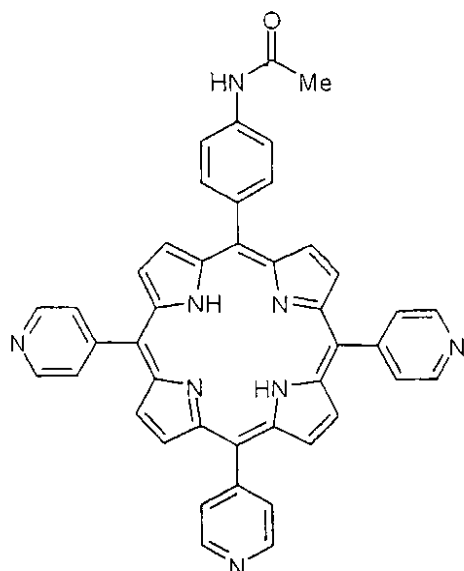
【化83】

10

20

30

40



10

4 - アセトアミドベンズアルデヒド (3 . 2 6 g , 0 . 0 2 モル) 及び 4 - ピリジンカルボキシャルデヒド (5 . 6 6 m L , 0 . 0 6 モル) をプロピオン酸 (3 0 0 m L) 中、90 で攪拌した。ピロール (5 . 4 m L , 0 . 0 8 モル) を添加し、及びその混合物を還流下に 3 0 分間攪拌した。冷却の際に、反応混合物を減圧中で蒸発させ、濃い紫色の固体を得た。ポルフィリン異性体の粗製の混合物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液 : $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 1 9 : 1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na_2SO_4) させ、及び減圧中に蒸発させて紫色の固体 (5 2 6 m g , 3 . 9 %) としての 4 を得た ; $R_f = 0 . 2 2$ (シリカ , $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 1 9 : 1) ; 融点 $> 3 5 0$ 分解 ; $^1\text{H NMR}$ [2 7 0 M H z , CDCl_3] - 2 . 7 9 (2 H , br s , NH) , 2 . 4 9 (3 H , s , NHCOCH_3) , 8 . 0 7 (2 H , m , $J^* = 8 \text{ Hz}$, 5 - Ar - 3 , 5 - H) , 8 . 2 1 - 8 . 2 8 (8 H , m (重複) , 5 - Ar - 2 , 6 - H 及び 1 0 , 1 5 , 2 0 - Py - 2 , 6 - H) , 8 . 8 4 - 9 . 0 6 (8 H , m , - H) , 9 . 1 0 - 9 . 1 5 (6 H , m , 1 0 , 1 5 , 2 0 - Py - 3 , 5 - H) , 1 0 . 3 5 (1 H , br s , NHCOCH_3) ; $^{13}\text{C NMR}$ [6 7 . 5 M H z , CDCl_3] 2 6 . 8 , 1 0 6 . 9 , 1 1 0 . 1 , 1 1 0 . 2 , 1 1 7 . 9 , 1 2 1 . 1 , 1 2 1 . 5 , 1 2 2 . 1 , 1 2 2 . 2 , 1 2 3 . 3 , 1 2 3 . 8 , 1 2 3 . 9 , 1 3 4 . 7 , 1 4 0 . 1 , 1 4 2 . 5 , 1 4 5 . 1 , 1 4 8 . 2 , 1 4 9 , 1 4 9 . 3 , 1 4 9 . 4 , 1 4 9 . 6 , 1 5 0 . 1 , 1 7 5 . 2 ; UV - vis (CH_2Cl_2) $m a x$ 4 1 8 , 5 1 4 , 5 4 8 , 5 8 7 , 6 4 4 n m ; MS (MALDI - TOF) m / z 6 7 5 (M^+ , 1 0 0 %) 。

20

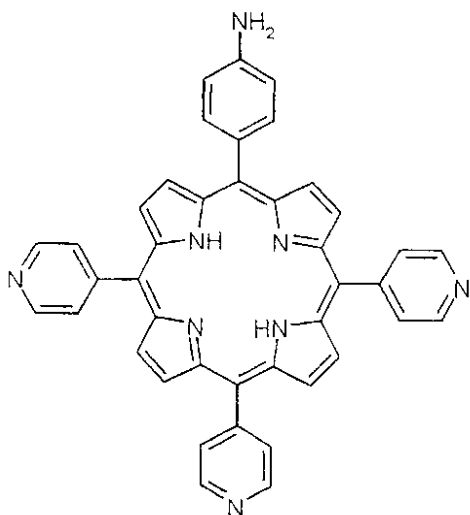
30

【 0 0 7 8 】

(5) 5 - (4 - アミノフェニル) - 1 0 , 1 5 , 2 0 - トリス (4 - ピリジル) ポルフィリン

【 化 8 4 】

40



10

ポルフィリン 4 (500 mg, 0.74 ミリモル) を 18% HCl (100 mL) 中に溶解し、及びその溶液を還流下に 2 時間加熱した。冷却の際に、反応混合物を減圧中で蒸発させ、粗製の緑色の固体を得た。その固体を 9 : 1 の混合物のジクロロメタン / トリエチルアミン (200 mL) 中に再び溶解し、10 分間室温で攪拌した。次いで、その溶液を、水 (3 × 200 mL) 及びかん水 (200 mL) を用いて洗浄し、その有機層を分離し、乾燥 (Na₂SO₄) させた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させ、及び紫色の粗製の固体をフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液 : CHCl₃ / MeOH, 20 : 1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中に蒸発させて紫色の固体 (422 mg, 90.1%) としての 5 を得た ; R_f = 0.31 (シリカ, CHCl₃ / MeOH, 20 : 1) ; 融点 > 350 分解 ; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] - 2.86 (2H, br s, NH), 4.09 (2H, br s, NH₂), 7.08 (2H, m, J* = 8 Hz, 5 - Ar - 3, 5 - H), 7.98 (2H, m, J* = 8 Hz, 5 - Ar - 2, 6 - H), 8.16 (6H, m, J* = 5 Hz, 10, 15, 20 - Py - 2, 6 - H), 8.80 - 9.01 (8H, m, - H), 9.04 (6H, m, J* = 5 Hz, 10, 15, 20 - Py - 3, 5 - H) ; ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] 113.6, 116.7, 117.4, 117.9, 122.7, 129.5, 131.7, 135.9, 146.5, 148.4, 148.5, 149.8, 150.2 ; UV - vis (CH₂Cl₂) m_ax 418, 515, 552, 592, 653 nm ; MS (FAB) m/z 633 (M⁺, 100%) 。

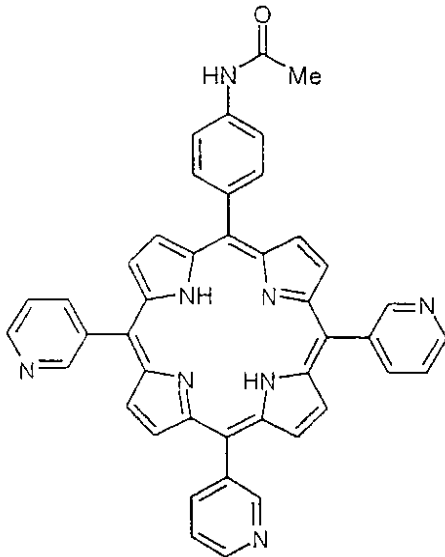
20

30

【0079】

(6) 5 - (4 - アセトアミドフェニル) - 10, 15, 20 - トリス (3 - ピリジル) ポルフィリン

【化85】



10

4 - アセトアミドベンズアルデヒド (5 g, 0.031 mol) 及び 3 - ピリジンカルボキシャルデヒド (8.67 mL, 0.092 mol) を、プロピオン酸 (300 mL) 中 90 で攪拌した。ピロール (8.5 mL, 0.123 mol) を添加し、及びその混合物を還流下に 30 分間攪拌した。冷却の際に、反応混合物を減圧中に蒸発させて濃い紫色の固体を得た。そのポルフィリン異性体の粗製の混合物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカ, 溶出液: $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 19:1) によって精製した。関連した画分を組み合わせて、乾燥 (Na_2SO_4) し、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (0.96 g, 4.6%) としての 6 を得た; $R_f = 0.26$ (シリカ, $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 19:1); 融点 > 350 分解; $^1\text{H NMR}$ [270 MHz, CDCl_3] - 2.97 (2H, br s, NH), 2.17 (3H, s, NHCOCH_3), 7.40 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$, 5 - Ar - 3, 5 - H), 7.49 (3H, m, 10, 15, 20 - Py - 5 - H), 7.98 (2H, m, $J^* = 8\text{ Hz}$, 5 - Ar - 2, 6 - H), 8.21 - 8.33 (3H, m, 10, 15, 20 - Py - 6 - H), 8.57 - 8.82 (11H, m (重複), 10, 15, 20 - Py - 4 - H 及び - H), 8.99 (1H, br s, NHCOCH_3), 9.26 (3H, m, 10, 15, 20 - Py - 2 - H); UV - vis (CH_2Cl_2) m_{ax} 419, 516, 552, 592, 648 nm; MS (MALDI - TOF) m/z 675 (M^+ , 100%)。

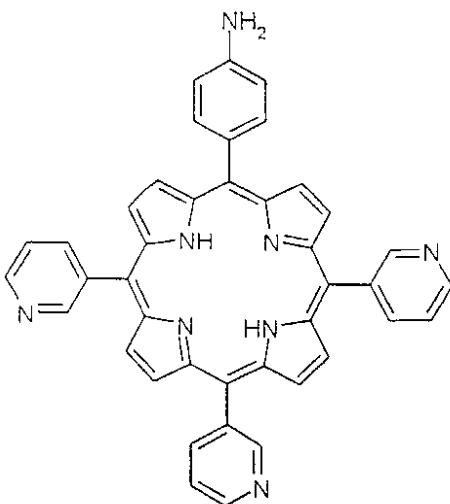
20

30

【0080】

(7) 5 - (4 - アミノフェニル) - 10, 15, 20 - トリス (3 - ピリジル) ポルフィリン

【化86】



40

50

ポルフィリン 6 (300 mg, 0.45 ミリモル) を 18% HCl (100 mL) 中に溶解し、及びその溶液を還流下に 2 時間加熱した。冷却の際に、反応混合物を減圧中で蒸発させて粗製の緑色の固体を得た。その固体を 9:1 の混合物のジクロロメタン/トリエチルアミン (200 mL) 中に再び溶解し、及び 10 分間室温で撹拌した。次いで、その溶液を、水 (3 × 200 mL) 及びかん水 (200 mL) を用いて洗浄し、その有機層を分離し、及び乾燥 (Na₂SO₄) させた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させ、及び紫色の粗製の固体をフラッシュクロマトグラフィー (シリカ, 溶出液: CHCl₃ / MeOH, 20:1) によって精製した。関連した画分を組み合わせて、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (206 mg, 68.5%) としての 7 を得た; R_f = 0.38 (シリカ, CHCl₃ / MeOH, 20:1); 融点 > 350 分解; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] - 2.74 (2H, br s, NH), 3.93 (2H, br s, NH₂), 6.91 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-3, 5-H), 7.67 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 7.93 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-2, 6-H), 8.48 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 8.79-9.02 (11H, m (重複), 10, 15, 20-Py-4-H 及び -H), 9.47 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] 113.3, 115.6, 116.1, 116.7, 121.9, 122.3, 131, 131.4, 131.8, 132.1, 132.3, 135.7, 137.5, 137.7, 137.8, 140.8, 146.3, 149, 149.2, 153.5; UV-vis (CH₂Cl₂) max 420, 517, 553, 597, 649 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 632 (M⁺, 100%)。

【0081】

(8) 5-(4-アセトアミドフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)ポルフィリン, Dolphin (ダルフィン) 等の方法 (1998 年、5-フェニルジピロメタン及び 5, 15-ジフェニルポルフィリン Org. Synth. 76, 287~293 参考としてここに組み入れる) に従って DDP を合成した。3 つのポルフィリンの得られた混合物を、クロマトグラフ処理し、5, 15-(4-メトキシ)-DDP を除去させるために最初に DCM を用いて溶出し、及び次いで、酢酸エチル / DCM (1:4) を続けて紫色の結晶 (150 mg, 12%) としての所要の生成物を溶出した; R_f = 0.40 (DCM / MeOH, 19:1); 融点 305~307 (分解); UV-vis (DCM) max (相対強度) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 10.35 (s, 2H, 10+20-H), 9.43 (d, 4H, J = 4.8 Hz, -H), 9.14 (d, 4H, J = 4.8 Hz, -H), 8.65 (m, 2H, J = 7.2 Hz, 5-m-Ar), 8.22-8.12 (m, 4H, (重複), J = 8.1 Hz, 5+15-o-Ar), 7.56 (m, 2H, J = 8.1 Hz, 15-m-Ar), 4.14 (s, 3H, CH₃), -3.00 (br s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 550.3 (M⁺, 100%)。

【0082】

(9) 5-(4-アミノフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)ポルフィリン, 5-(4-アセトアミドフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)ポルフィリン 8 (1 等量 (eq.), 100 mg, 0.182 ミリモル) を 5 M の HCl 水溶液 (100 mL) 中に溶解し、及びその溶液を還流下に 3 時間加熱した。熱い反応混合物を減圧中で濃縮して粗製の緑色の固体を得た。その固体を、DCM / トリエチルアミン (9:1) (200 mL) の混合物中に再び溶解し、及び 10 分間室温で撹拌した。次いで、その溶液を、水 (3 × 200 mL)、飽和かん水 (200 mL) を用いて洗浄し、及びその有機層を分離し、及び乾燥 (Na₂SO₄) させ、次いで、減圧中で濃縮した。粗製の紫色の固体を、クロマトグラフ処理し、DCM を用いて溶出して、及び紫色の結晶性固体 (51 mg

, 54%)としての望ましいポルフィリンを与えた, $R_f = 0.30$ (DCM), 融点 300 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 410 (1.0), 503 (0.045), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.005) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 634 nm (励起 = 410 nm); 1H NMR (270 MHz, CDCl₃) 10.30 (s, 2H, 10 + 20 - H), 9.39 (d, 4H, J = 4.9 Hz, -H), 9.17 (d, 2H, J = 4.9 Hz, -H), 9.10 (d, 2H, J = 4.9 Hz, -H), 8.19 (m, 2H, J = 8.8 Hz, 15 - o - Ar), 8.07 (m, 2H, J = 8.1 Hz, 5 - o - Ar), 7.35 (m, 2H, J = 8.8 Hz, 15 - m - Ar), 7.14 (m, 2H, J = 8.1 Hz, 5 - m - Ar), 4.13 (s, 3H, CH₃), 4.08 (br s, 2H, NH), 3.06 (br s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 508.3 ([M + 1]⁺, 100%). C₃₃H₂₆N₅O ([M + 1]⁺) に対して計算された ES-HRMS は、508.2137、見出されたのは 508.2144 である。

【0083】

(10) 17, 18 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリン及び

(11) 7, 8 - ジヒドロキシ 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリンのレジオイソマー、

ポルフィリン 9 (28 mg, 55.2 μ mol) を、Sutton (サットン) 等の方法 (2000 Functionalised diphenylchlorins and bacteriochlorins - their synthesis and bioconjugation for targeted photodynamic therapy and tumour cell imaging J. Porphyrin and Phthalocyanines 4, 655 - 658) に従って、クロリンレジオイソマーの所要の混合物に転換させた。次いで、その粗製の反応混合物を、クロマトグラフ処理し、DCM中の1% MeOHを用いて溶出させた。最初に、いくつかの未反応の出発物質を溶出させ、次いで、茶色っぽい紫色 (brown-purple) の結晶性固体としてのより一層高い R_f 値のクロリン異性体 10 を溶出した; $R_f = 0.28$ (DCM/MeOH, 19:1)。より一層低い R_f 値の異性体 11 を、DCM中の2.5% MeOHを用いる更なる溶出によって得、及びまた、茶色っぽい紫色の結晶性固体 ($R_f = 0.17$ (DCM/MeOH, 19:1)) を与えた。高い R_f 値のクロリンレジオイソマー (以前与えられた 17, 18 - ジヒドロキシ - 15 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - (4 - アミノフェニル) クロリン (26)) (7.0 mg, 24%), 融点 165 ~ 167 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 401 (0.99), 414 (1.0), 503 (0.08), 535 (0.07), 582 (0.035), 636 (0.22) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 639 nm (励起 = 412 nm); 1H NMR (270 MHz, CDCl₃ 中の 10% CD₃OD) 9.95 (s, 1H, 10 - H), 9.42 (s, 1H, 20 - H), 9.17 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.03 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.97 (s, 2H, -H), 8.78 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.51 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.05 (m, 2H, J = 8.9 Hz, o - Ar), 7.94 (m, 2H, J = 8.1 Hz, o' - Ar), 7.25 (m, 2H, J = 8.9 Hz, m - Ar), 7.12 (m, 2H, J = 8.1 Hz, m' - Ar), 6.42 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 17 - H), 6.03 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 18 - H), 4.08 (s, 3H, CH₃), {NHのものの交換及びOHのものは観察されない (NH's exchanged & OH's not observed)}; MALDI-MS m/z 542.2 ([M + H]⁺, 100%); C₃₃H₂₈N₅O₃ ([M + H]⁺) に対して計算された ES-HRMS は、542.2192、見出されたのは 542.2187 である。低い R_f のクロリンレジオオソマー (7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリン) (8.5 mg, 3

0%)、融点 168 ~ 171 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 401 (0.99), 413 (1.0), 507 (0.08), 536 (0.06), 586 (0.025), 637 (0.20) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 639 nm (励起 = 412 nm); $^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 中の 10% CD_3OD) 9.96 (s, 1H, 20-H), 9.40 (s, 1H, 10-H), 9.18 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.05 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.98 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.92 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.74 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.58 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.13 (m, 1H, J = 8.9 Hz, o-Ar), 8.08 (m, 1H, J = 8.9 Hz, o-Ar), 7.95 (m, 1H, J = 8.1 Hz, o'-Ar), 7.79 (m, 1H, J = 8.1 Hz, o'-Ar), 7.36 (m, 1H, J = 8.9 Hz, m-Ar), 7.30 (m, 1H, J = 8.9 Hz, m-Ar), 7.11 (m, 1H, J = 8.1 Hz, m'-Ar), 7.05 (m, 1H, J = 8.1 Hz, m'-Ar), 6.42 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 7-H), 6.09 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 8-H), 4.11 (s, 3H, CH_3), (NHのものの交換及びOHのものの交換は観察されない); MALDI-MS m/z 542.2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%) $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) に対して計算された ES-HRMS は、542.2192、見出されたのは 542.2185 である。

【0084】

(12) 5-(4-フルオレニルメチルアミノフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)ポルフィリン、

無水の 1,4-ジオキサン (2.5 mL) 中のポルフィリン 9 (28 mg, 55 μmol) の攪拌した溶液中に、固体の炭酸水素ナトリウム (6 等量, 28 mg, 0.33 ミリモル) を添加した。次いで、この混合物に、 N_2 下、1,4-ジオキサン (0.5 mL) 中の 9-フルオレニルメチルクロロホルメート (2 等量, 0.11 ミリモル, 28.5 mg) の溶液を添加した。反応フラスコをアルミニウムホイルで覆い、光を遮り、及び室温で 3 時間攪拌した。このときに、反応が完結した (TLC によって監視されたように)。1,4-ジオキサンを減圧中で除去し、及び残留物が水 (25 mL) 及び DCM (2 x 25 mL) の間に分配された。組み合わせられた有機抽出物を飽和かん水 (25 mL) を用いて洗浄し、次いで乾燥 (Na_2SO_4) し、ろ過し、及び減圧中で濃縮した。所要のポルフィリンを、DCM で溶出するクロマトグラフィーによって得た。望ましいポルフィリンが紫色の結晶 (38 mg, 95%) として得られた、 $R_f = 0.39$ (DCM), 融点 292 ~ 295 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 410 (1.0), 505 (0.042), 541 (0.02), 578 (0.015), 633 (0.01) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 635 nm (励起 = 410 nm); $^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) 10.35 (s, 2H, 10 + 20-H), 9.69 (br. s, 1H, NH), 9.44 (d, 4H, J = 4.8 Hz, -H), 9.12 (d, 4H, J = 4.8 Hz, -H), 8.20 - 8.17 (m (重複), 4H, J = 8.1 Hz, 5 + 15 - o-Ar), 7.85 (m, 4H, 5 + 15 - m-Ar), 7.76 - 7.66 (m, 2H, フルオレノ - Ar), 7.51 - 7.30 (m, 6H, フルオレノ - Ar), 4.69 (d, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2), 4.30 (t, 1H, J = 7.2 Hz, CH), 4.13 (s, 3H, CH_3), -3.15 (br. s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 731.5 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 508.3 ($[\text{M} - \text{FMOC} + 2]^+$, 50%); $\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) に対して計算された ES-HRMS は、730.2818、見出されたのは 730.2809 である。

【0085】

(13, 14) シス/トランス-7,8,17,18-テトラヒドロキシ-5-(4-フルオレニルメチルアミノフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)バクテリオクロリン
ポルフィリン 12 (35 mg, 48.0 μmol) を、Sutton 等の方法 (2000

Functionalised diphenylchlorins and bacteriochlorins - their synthesis and bioconjugation for targeted photodynamic therapy and tumour cell imaging J. Porphyrin and Phthalocyanines 4, 655 - 658 - 参考としてここに組み入れる。)の軽微な修正によって、バクテリオクロリン立体異性体の所要の混合物に転換した(反応は、12を溶解させるために1,4-ジオキサン(5mL)を用いて行った。)粗製の反応混合物を、最初にDCM中の1%MeOHを用いてクロリン副産物を除去するクロマトグラフ処理した。さらに、2%MeOH/DCMを用いる溶出によって、双方の立体異性のバクテリオクロリントロールを分離させた。より一層高い R_f -トランスバクテリオクロリン異性体13をピンク-グリーンの結晶性固体として単離した、(6mg, 15%), $R_f = 0.25$ (DCM/MeOH, 19:1), 融点142~145 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 374 (1.0), 512 (0.23), 702 (0.52) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 708 nm (励起 = 512 nm); 1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$ 中の10% CD_3OD) 9.20 (s, 2H, 10+20-H), 8.78 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, -H), 8.36 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, -H), 7.95 (m, 2H, o-Ar), 7.85 (m, 2H, $J = 7.3$ Hz, フルオレノ-Ar), 7.79 (m, 2H, o'-Ar), 7.65 (m, 2H, m'-Ar), 7.47 - 7.38 (m, 6H, フルオレノ-Ar), 7.24 (m, 2H, m-Ar), 6.27 - 6.24 (m, 2H, 7+17-H), 5.85 (m, 2H, 8+18-H), 4.65 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.39 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH), 4.06 (s, 3H, CH_3), -1.94 (br s (部分的に交換), 2H, NH), (OHのものは観察されない); MALDI-MS m/z 800.4 ($[M+H]^+$, 100%); $C_{48}H_{40}N_5O_7$ ($[M+H]^+$) に対して計算されたES-HRMSは、798.2927、見出されたのは798.2921である。

より一層低い R_f のシス-バクテリオクロリン異性体14をピンク-グリーンの結晶性固体として単離した、(8.5mg, 21%), $R_f = 0.2$ (DCM/MeOH, 19:1), 融点148~150 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 374 (1.0), 512 (0.24), 703 (0.54) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 708 nm (励起 = 512 nm); 1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$ 中の10% CD_3OD) 9.12 (s, 2H, 10+20-H), 8.76 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, -H), 8.34 (d (重複), 2H, $J = 4.8$ Hz, -H), 8.02 (m, 2H, o-Ar), 7.85 (m (不明瞭), 2H, $J = 8.0$ Hz, o'-Ar), 7.83 (m, 2H, $J = 7.3$ Hz, フルオレノ-Ar), 7.76 (m, 2H, $J = 8.0$ Hz, m'-Ar), 7.50 - 7.38 (m, 6H, フルオレノ-Ar), 7.24 (m, 2H, m-Ar), 6.27 - 6.23 (m, 2H, 7+17-H), 5.85 - 5.82 (m, 2H, 8+18-H), 4.65 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.39 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH), 4.05 (s, 3H, CH_3), -1.88 (br s (部分的に交換), 2H, NH), (OHのものは観察されない); MALDI-MS m/z 800.4 ($[M+H]^+$, 100%); $C_{48}H_{40}N_5O_7$ ($[M+H]^+$) に対して計算されたES-HRMSは、798.2927、見出されたのは798.2921である。

【0086】

(15) 5-(3,4,5-トリスメトキシフェニル)ジピロメタン
3,4,5-トリスメトキシベンズアルデヒド(5.0g, 25.5ミリモル)を新しく蒸留したピロール(75mL)中に溶解し、及びその溶液を、乾燥 N_2 を用いる10分間の通気によって脱気した。TFA(0.075等量, 0.15mL, 1.91ミリモル)を添加し、及びその混合物を、最初のアルデヒドがTLC(約(ca.)10分)によって検出されないようになるまで N_2 下で撹拌した。反応混合物を減圧中、水吸引器圧(蒸

発装置水浴温度75)で、次いで高い減圧下で16時間濃縮し、過剰のピロールを除去した。粗製の生成物を熱エチルアセテート/nヘキサンから再結晶し、及び白色の固体としての所要のジピロメタンを与えた、(5.41g, 68%) : μ_{max} (ヌジヨールマル) / cm^{-1} 3378 (br. NH), 1594 (C=C), 1233, 1040; UV-VIS (MeOH) μ_{max} / (相対強度 (rel. intensity)) 222 (1.0), 280 (0.75) nm; H (270 MHz; CDCl₃) 8.07 (2H, br. s, NH), 7.53 (2H, m, 1-H), 6.68 (2H, s, 2'-H), 6.37 (2H, m, 2-H), 5.93 (2H, m, 3-H), 5.38 (1H, s, メタン), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.73 (6H, s, 3'+5'-OCH₃); C (68 MHz; CDCl₃) 152.7 (CH, 2'-C), 137.3 (q, 3'+5'-C), 136.1 (q, 4'-C), 131.8 (q, 4-C), 116.7 (CH, 1-C), 107.9 (CH, 2-C), 106.6 (CH, 3-C), 104.9 (q, 1'-C), 60.3 (CH₃), 55.5 (CH₃), 43.7 (CH., メタン); MS (MALDI) m/e 311.2 (100%, (M-1)⁺)。 10

【0087】

(16) 5-(4-アセトミドフェニル)ジピロメタン

ジピロメタンを、最初のアルデヒドの同じモル量を用いる上記詳述の一般的な方法を用いて合成した。粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル(350 mL)上でクロマトグラフ処理し、(50 mLのフラッシュシリカゲルにエチルアセテートから乾燥負荷(dry load)し)、及び40%のエチルアセテート/DCMで溶出し、及びオフホワイトの固体としての純粋な生成物を与えた、(4.3g, 50%) : μ_{max} (ヌジヨールマル) / cm^{-1} 3409 (NH, アミド), 3248 (br. NH), 1650 (C=O), 1593 (C=C), 1320, 1009; UV-VIS (MeOH) μ_{max} / (相対強度) 224 (1.0) nm; H (270 MHz; CDCl₃) 8.00 (2H, br. s, NH), 7.40 (2H, d, J = 8.5 Hz, o-Ar), 7.30 (1H, br. s, NH-アセトミド), 7.13 (2H, d, J = 8.5 Hz, m-Ar), 6.68 (2H, m, 1-H), 6.16 (2H, m, 2-H), 5.90 (2H, m, 3-H), 5.42 (1H, s, メタン), 2.14 (3H, s, NH-C₂H₅); C (68 MHz; CDCl₃) 168.4 (q, C-OCH₃), 138.2 (q, 4'-C), 136.5 (q, 2'-C), 132.4 (q, 4-C), 128.9 (CH, 2'-C), 120.3 (CH, 3'-C), 117.2 (CH, 1-C), 108.4 (CH, 2-C), 107.1 (CH, 3-C), 43.4 (CH., メタン), 24.5 (CH₃); MS (MALDI) m/e 279.4 (100%, (M)⁺)。 30

【0088】

(17) 5-(4-メトキシフェニル)ジピロメタン

ジピロメタンを最初のアルデヒドの同じモル量を用いる上記詳述の一般的な方法を用いて合成した。粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル(350 mL)上でクロマトグラフ処理し、(50 mLのフラッシュシリカゲルにエチルアセテートから乾燥負荷し)、及び30%のnヘキサン/DCMで溶出し、及びオフホワイトの固体としての純粋な生成物を与えた、(4.3g, 50%) : μ_{max} (ヌジヨールマル) / cm^{-1} , 3382 (br. NH), 1598 (C=C), 1300, 1050; UV-VIS (MeOH) μ_{max} / (相対強度) 224 (1.0) nm; H (270 MHz; CDCl₃) 7.87 (2H, br. s, NH), 7.10 (2H, d, J = 8.8 Hz, m-Ar), 6.83 (2H, d, J = 8.8 Hz, o-Ar), 6.66 (2H, m, 1-H), 6.14 (2H, m, 2-H), 5.89 (2H, m, 3-H), 5.40 (1H, s, メタン); MS (MALDI) m/e 252.4 (100%, (M)⁺)。 40

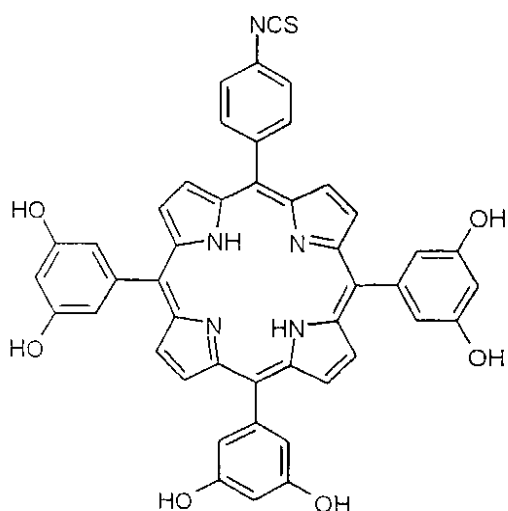
【0089】

例1

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10,15,20-トリス(3,5-ジヒドロ 50

キシフェニル) ポルフィリン

【化 8 7】



10

新しく蒸留した THF (25 mL) 中の 3 (100 mg, 0.137 ミリモル) の攪拌した溶液に、1, 1'-チオカルボニルジ-2-(1H)-ピリドン (64 mg, 0.276 ミリモル) を添加した。反応を、アルゴン下に 4 時間、室温で進ませた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させて粗製の紫色固体を得た。この固体を、最少量のクロロホルム/メタノール (9:1) 中に溶解し、及びフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液: CHCl₃ / MeOH, 9:1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (67.5 mg, 63.8%) としての上記化合物を得た; R_f = 0.29 (シリカ, CHCl₃ / MeOH, 9:1); 融点 > 350 分解; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃ / CD₃OD, 3:1] 6.77 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.12 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2, 6-H), 7.64 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-3, 5-H), 8.19 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-2, 6-H), 8.76-9.0 (8H, m, -H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃ / CD₃OD, 3:1] 101.9, 107.1, 114.7, 117.6, 119.9, 120.1, 120.1, 123.9, 130.9, 134, 135.2, 136.1, 141.2, 142, 143.6, 155.8; UV-vis (MeOH) m_{ax} 422, 516, 552, 592, 648 nm; C₄₅H₂₉N₅O₆S [M+H]⁺ に対する計算された HRMS (ES) m/z は 768.1914、見出されたのは 768.1908 である。

20

30

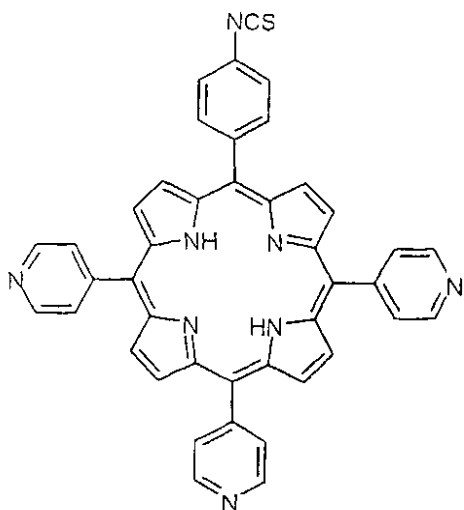
【0090】

例 2

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10, 15, 20-トリス(4-ピリジル)ポルフィリン

【化 8 8】

40



10

新しく蒸留したジクロロメタン (20 mL) 中の 5 (100 mg, 0.158 ミリモル) の攪拌した溶液に、1, 1' - チオカルボニルジ - 2 (1H) - ピリドン (320 mg, 1.38 ミリモル) を添加した。反応を、アルゴン下に 4 時間、室温で進ませた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させて粗製の紫色固体を得た。この固体を、最少量のクロロホルム中に溶解し、及びフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液: $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 49 : 1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na_2SO_4) させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (104 mg, 97.5%) としての上記化合物を得た; $R_f = 0.57$ (シリカ, $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$, 49 : 1); 融点 > 350 分解; $^1\text{H NMR}$ [270 MHz, CDCl_3] - 2.91 (2H, br s, NH), 7.65 (2H, m, $J^* = 8 \text{ Hz}$, 5 - Ar - 3, 5 - H), 8.15 - 8.21 (8H, m (重複), 10, 15, 20 - Py - 2, 6 - H 及び 5 - Ar - 2, 6 - H), 8.67 (8H, br s, -H), 9.06 (6H, m, $J^* = 5 \text{ Hz}$, 10, 15, 20 - Py - 3, 5 - H); $^{13}\text{C NMR}$ [67.5 MHz, CDCl_3] 117.4, 117.6, 119.7, 124.7, 129.3, 131.6, 135.4, 136.9, 140.6, 148.4, 149.8; UV - vis (CH_2Cl_2) $m a x$ 417, 514, 548, 587, 643 nm; $\text{C}_{42}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{S}$ (M+H) に対する計算された HRMS (ES) m/z は 675.2079、見出されたのは 675.2078 である。

20

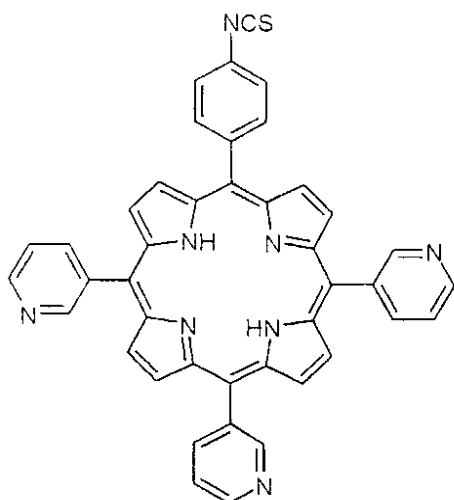
30

【0091】

例 3

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 10, 15, 20 - トリス (3 - ピリジル) ポルフィリン (160)

【化 89】



10

新しく蒸留したジクロロメタン (40 mL) 中の 7 (200 mg, 0.316 ミリモル) の攪拌した溶液に、1, 1'-チオカルボニルジ-2(1H)-ピリドン (640 mg, 2.76 ミリモル) を添加した。反応を、アルゴン下に 17 時間、室温で進ませた。過剰の溶媒を減圧中で蒸発させ粗製の紫色固体を得た。この固体を、最少量のクロロホルム中に溶解し、及びフラッシュクロマトグラフィー (シリカ、溶出液: CHCl₃ / MeOH, 49 : 1) によって精製した。関連した画分を組み合わせ、乾燥 (Na₂SO₄) させ、及び減圧中で蒸発させて紫色の固体 (171 mg, 80.3%) としての上記化合物を得た; R_f = 0.55 (シリカ, CHCl₃ / MeOH, 49 : 1); 融点 > 350 °C 分解; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] - 2.83 (2H, br s, NH), 7.65 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-3, 5-H), 7.78 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 8.20 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-2, 6-H), 8.54 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 8.83 - 8.88 (8H, m, -H), 9.07 (3H, m, 10, 15, 20-Py-4-H), 9.07 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] 116.6, 122.1, 124.2, 131.5, 135.5, 137.7, 140.8, 140.9, 149.2, 153.5; UV-vis (CH₂Cl₂) max 421, 513, 547, 587, 657 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 674 (M⁺, 100%)。

20

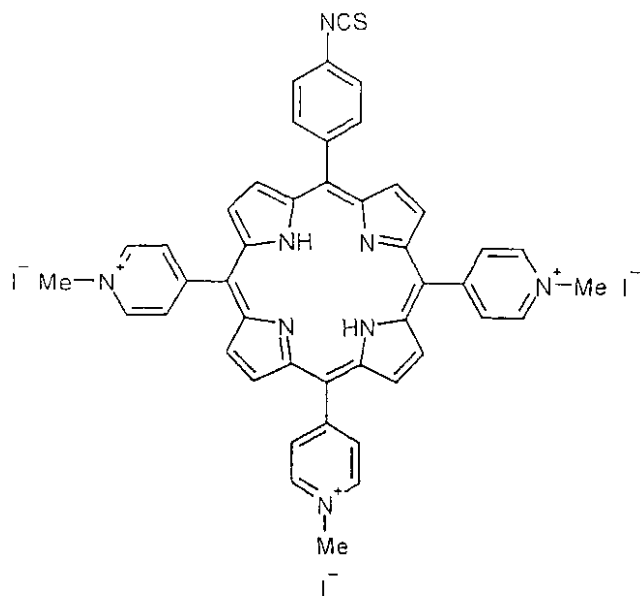
30

【0092】

例 4

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10, 15, 20-トリス(4-N-メチルピラジニウム)ポルフィリントリヨウ化物

【化90】



10

無水DMF (10 mL, CaH₂ から蒸留した、0.1トル)中の例2 (50 mg, 0.074ミリモル)の溶液に、ヨードメタン (1 mL, 0.016モル)を添加した。反応物を、アルゴン下、3時間、室温で攪拌し、及び水/飽和硝酸カリウム水溶液/アセトニトリル (1:1:8) 溶媒系中のTLC (順相シリカ)によって監視した。反応の完結の際に、過剰のDMFを減圧 (0.1トル)中、30~40 で蒸発させて光沢のある紫色の固体 (77 mg, 95%) としての上記化合物を得た; R_f = 0.32 (シリカ, H₂O/飽和KNO₃水溶液/MeCN, 1:1:8); 融点 > 350 分解; ¹H NMR [270 MHz, (CD₃)₂SO] - 3.03 (2H, br s, NH), 4.74 (9H, br s, N-CH₃-ピリジン), 7.96 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-3, 5-H), 8.32 (2H, m, J* = 8 Hz, 5-Ar-2, 6-H), 9.03 (6H, m, J* = 6 Hz, 10, 15, 20-Py-2, 6-H), 9.16 (8H, m, -H), 9.50 (6H, m, J* = 6 Hz, 10, 15, 20-Py-3, 5-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, (CD₃)₂SO] 47.9, 114.7, 115.3, 121.1, 124.8, 130.6, 132, 134.7, 135.4, 139.7, 144.1, 156.3, 156.4; UV-vis (H₂O) m_{ax} 423, 520, 585 nm; MS (FAB) m/z 719 (M⁺, 100%), 704 (M-CH₃, 26%), 689 (M-2CH₃, 20%), 674 (M-3CH₃, 5%); C₄₅H₃₅N₈S (M+H)に対する計算されたHRMS (ES) m/z は719.2705、見出されたのは719.2686である。

20

30

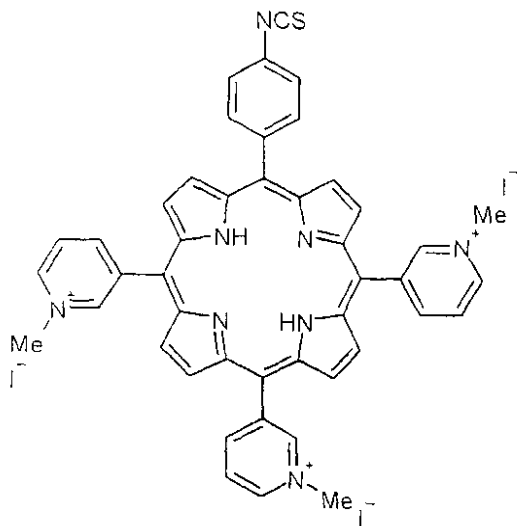
【0093】

例5

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10,15,20-トリス(3-N-メチルピリジニウム)ポルフィリントリヨウ化物

40

【化91】



10

無水DMF (5 mL, CaHから蒸留した、0.1トル)中の例3 (50 mg, 0.074ミリモル)の溶液に、ヨードメタン (1 mL, 0.016モル)を添加した。反応物を、アルゴン下、4時間、室温で攪拌し、及び水/飽和硝酸カリウム水溶液/アセトニトリル (1:1:8) 溶媒系中のTLC (順相シリカ)によって監視した。反応の完結の際に、過剰のDMFを減圧 (0.1トル)中、30~40 で蒸発させて光沢のある紫色の固体 (72 mg, 89%) としての上記化合物を得た; $R_f = 0.46$ (シリカ, H_2O / 飽和 KNO_3 水溶液 / $MeCN$, 1:1:8); 融点 > 350 分解; 1H NMR [270 MHz, $(CD_3)_2SO$] - 3.07 (2H, br s, NH), 4.69 (9H, br s, N- CH_3 -ピリジン), 7.97 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-3, 5-H), 8.31 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-2, 6-H), 8.64 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 9.03-9.25 (8H, m, -H), 9.35 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 9.57 (3H, m, 10, 15, 20-Py-4-H), 10.03 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ^{13}C NMR [67.5 MHz, $(CD_3)_2SO$] 48.3, 112.3, 112.9, 120.7, 124.8, 126.3, 126.4, 126.6, 130.6, 132.1, 132.3, 132.4, 132.6, 132.8, 133.1, 133.4, 134.7, 135.4, 139.8, 139.9, 140, 145.5, 145.6, 147.4, 147.5, 147.8, 147.9, 148.5, 155.9; UV-vis (H_2O) m_{ax} 419, 516, 552, 581, 637 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 689 ($[M - 2CH_3]^+$, 100%)。

20

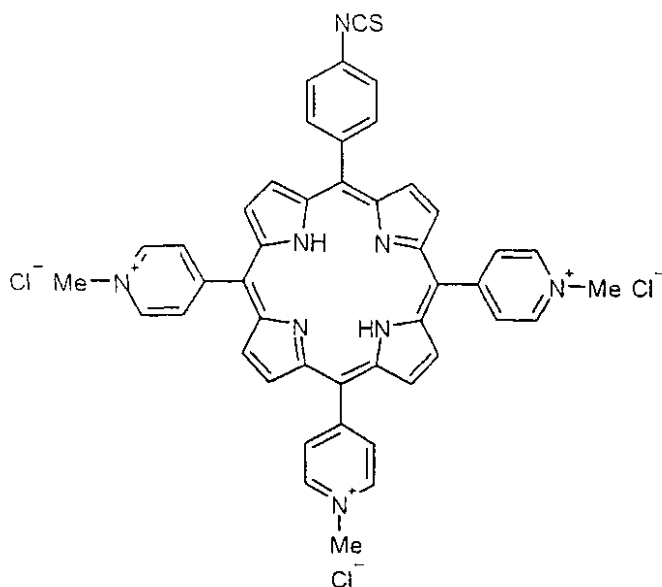
30

【0094】

例6

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10,15,20-トリス(4-N-メチルピリジニウム)ポルフィリントリ塩化物

【化92】



10

無水メタノール（30 mL）中の例4（30 mg，0.027ミリモル）の溶液に、アンバーライト〔Amberlite（R）、登録商標〕IRA400（1 g）を添加し、及びその混合物を1時間室温で攪拌した。Amberlite（R）IRA400樹脂を減圧下にろ過し、及びポルフィリンろ液を回収し、乾燥（ Na_2SO_4 ）させ、及び減圧中で蒸発させて水溶性の紫色の固体（22 mg，96.4%）としての上記化合物を得た。例4及び6のポルフィリンは、それらのそれぞれの水における溶解度によってだけ区別された。

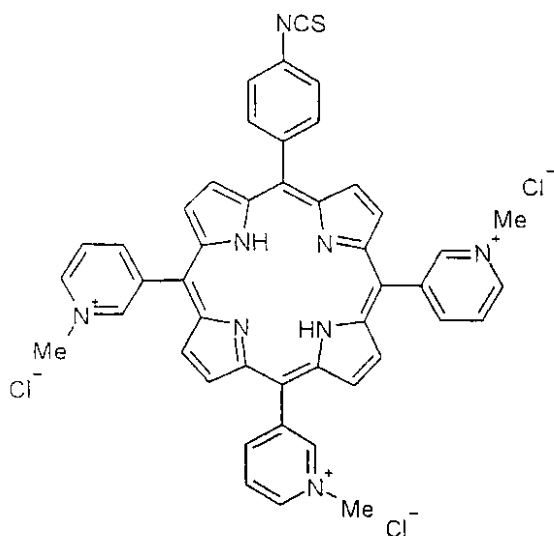
20

【0095】

例7

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 10, 15, 20 - トリス(4 - N - メチルピリジニウム)ポルフィリントリ塩化物

【化93】



30

40

無水メタノール（30 mL）中の例5（30 mg，0.027ミリモル）の溶液に、Amberlite（R）IRA400（1 g）を添加し、及びその混合物を1時間室温で攪拌した。Amberlite（R）IRA400樹脂を減圧下にろ過し、及びポルフィリンろ液を回収し、乾燥（ Na_2SO_4 ）させ、及び減圧中で蒸発させて水溶性の紫色の固体（21 mg，92.0%）としての上記化合物を得た。例5及び7のポルフィリンは、それらのそれぞれの水における溶解度によってだけ区別された。

【0096】

50

例 8

17, 18 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリン ,
 より一層高い R_f のレジオイソマーのクロリン 10 (17.5 mg , 23.2 μ モル) を以下の方法によって相当するイソチオシアナートに転換した。新しく蒸留した DCM (20 mL) 中の 10 (1 等量 , 50 mg , 0.099 ミリモル) の攪拌した溶液に、1, 1' - チオカルボニルジ - 2 (1 H) - ピリドン (2 等量 , 46 mg , 0.198 ミリモル) を添加した。反応物をアルゴン下に、2 時間室温で攪拌させ、その後反応混合物をろ過し、及び濃縮し次いでクロマトグラフ処理し、DCM 中の 1% MeOH で溶出して表題の化合物を与えた。表題の化合物を茶色っぽい紫色の結晶性固体として単離した、(17 mg , 90%) , $R_f = 0.36$ (DCM / MeOH , 19 : 1) ; 融点 155 ~ 158 (分解) ; UV - vis (DCM) m_{max} (相対強度) 410 (1.0) , 505 (0.09) , 534 (0.06) , 586 (0.04) , 637 (0.18) nm ; 蛍光 (DCM) m_{max} 639 nm (励起 = 412 nm) ; 1H NMR (270 MHz , CDCl₃ 中の 10% CD₃OD) 10.0 (s , 1 H , 10 - H) , 9.45 (s , 1 H , 20 - H) , 9.20 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 9.06 (d , 1 H , J = 4.0 Hz , - H) , 9.02 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.84 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.64 (d , 1 H , J = 4.0 Hz , - H) , 8.55 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.21 (m , 1 H , J = 8.1 Hz , 5 - o - Ar) , 8.15 (m , 1 H , J = 8.1 Hz , 5 - o - Ar) , 8.05 (m , 1 H , J = 8.9 Hz , 15 - o - Ar) , 7.93 (m , 1 H , J = 8.9 Hz , 15 - o - Ar) , 7.65 (m , 2 H , 5 - m - Ar) , 7.24 (m , 2 H , 15 - m - Ar) , 6.43 (d , 1 H , J = 6.5 Hz , 17 - H) , 6.04 (d , 1 H , J = 6.5 Hz , 18 - H) , 4.08 (s , 3 H , CH₃) , (NH のものの交換及び OH のものは観察されない) ; MALDI - MS m/z 583.7 ([M + H]⁺ , 100%) ; C₃₄H₂₆N₅O₃S ([M + H]⁺) に対しての計算された ES - HRMS は 584.1757、見出されたのは 584.1756 である。

【 0097 】

例 9

シス - 7 , 8 , 17 , 18 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン
 DCM における 25% MeOH (1.25 mL) 中のシス - バクテリオクロリン 14 (8.5 mg , 10.7 μ モル) をピペリジン (50 等量 , 53 μ L , 0.53 ミリモル) を用いて処理し、及び光を遮って 3 時間の間室温で N₂ 下に攪拌させた。反応混合物を減圧 (0.1 トル) 中で濃縮しピペリジンのすべての痕跡量を除去した。次いで、粗製のアミンを上述の方法に従って所要のイソチオシアナートに転換した。このシス - バクテリオクロリン__イソチオシアナートをピンク - グリーンの結晶性固体 (5.0 mg , 76%) として単離した、 $R_f = 0.40$ (DCM / MeOH , 19 : 1) , 融点 132 ~ 135 (分解) ; UV - vis (DCM) m_{max} (相対強度) 375 (1.0) , 516 (0.22) , 702 (0.48) nm ; 蛍光 m_{max} 709 nm (励起 = 516 nm) ; 1H NMR (270 MHz , CDCl₃ 中の 10% CD₃OD) 9.20 (s , 1 H , メソ - H) , 9.18 (s , 1 H , メソ - H) , 8.77 (d , 2 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.40 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.34 (d , 1 H , J = 4.8 Hz , - H) , 8.14 (m , 2 H , o - Ar) , 8.05 (m , 2 H , o' - Ar) , 7.42 - 7.08 (m , 4 H , 5 + 15 - m - Ar) , 6.20 (m , 2 H , 7 + 17 - H) , 5.98 (m , 1 H , 8 - H) , 5.93 (m , 1 H , 18 - H) , 4.04 (s , 3 H , CH₃) , - 1.80 (br s , 2 H , 部分的に交換した - NH) , (OH のものは観察されない) ; MALDI - MS m/z 618.9 ([M + H]⁺ , 100%) ; C₃₄H₂₈N₅O₅S ([M + H]⁺) に対して計算された ES - HRMS は 618.1815、見出されたのは 618.1810 である。

【0098】

例10, 11, 12, 13

17, 18 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アセトアミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン / 7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アセトアミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリンレジオイソマー, 及び

シス/トランス - 7, 8, 17, 18 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - アセトアミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)バクテリオクロリン立体異性体,

ポルフィリン8 (100 mg, 0.18ミリモル)を、単一反応において、Sutton等の方法に従ってクロリンジオール/バクテリオクロリンテトールの混合物に転換した

。38時間後、反応を停止させた。次いで、粗製の反応混合物をクロマトグラフ処理し、DCM中の10% MeOHでの溶出を用い、最初の、いくつかの未反応の出発物質、次いで、茶色っぽい紫色の結晶性固体 (5 mg, 5%) としての例10のより一層高いR_fのクロリン異性体を与えた。例11のより一層低いR_fの異性体は、DCM中の3.5% MeOHを用いる更なる溶出によって得、及びまた茶色っぽい紫色の結晶性固体 (7.0 mg, 7%) を与えた。DCM中の5% MeOHを用いる更なる溶出は、例12及び13のそれぞれの所要のトランス/シスバクテリオクロリンテトールを、それぞれ、ピンク/グリーン

の固体 (5.0 mg, 5%) 及び (7.0 mg, 7%) として与えた。例10の高いR_fのクロリンレジオイソマー〔これまでのデータに基づいて割り当てられた17,

18 - ジヒドロキシ - 15 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - (4 - アセトアミドフェニル)クロリン〕 (26) R_f = 0.40 (DCM/MeOH, 37:3), 融点186 ~

188 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.12), 535 (0.08), 585.5 (0.05), 637 (0.18) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.97 (s, 1H, 10-H), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.19 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 9.03 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.98 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.89 (d, 1H, J = 4.0 Hz, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.52 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.14 - 8.10 (m, 3H, 5-o/m-Ar), 7.96 - 7.82 (m, 3H, 5+15-o/m-Ar), 7.50 (s, 1H, NH), 7.34 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.48 (m, 1H, 17-H), 6.20 (m, 1H, 18-H), 4.08 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), -1.89, -2.20 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%); C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出されたのは582.2137である。

例11の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例12の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例13の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例14の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例15の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例16の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例17の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例18の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

例19の低いR_fのクロリンレジオイソマー〔7, 8 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル)クロリン〕 R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), 融点182 ~ 185 (分解); UV-vis (DCM) _{max} (相対強度) 410 (1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; 蛍光 (DCM) _{max} 639 nm (励起 = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 9.00 (m, 1H, -H), 8.92 (m, 1H, -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, -H), 8.53 (m, 1H, -H), 8.18 - 7.91 (m, 6H, 5+15-o/m-Ar), 7.33 - 7.28 (m, 2H, 15-m-Ar), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ([M+H]⁺, 100%)。C₃₅H₂₈N₅O₄ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは582.2141、見出

されたのは582.2137である。

されたのは582・2135である。

例12の高い R_f -トランスバクテリオクロリン; $R_f = 0.29$ (DCM/MeOH, 37:3:1), 融点152~155 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 373.5 (1.0), 514 (0.25), 702 (0.49) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 708 nm (励起 = 514 nm); 1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) 10.27 (s, 1H, NH), 9.16 (s, 2H, 10 + 20 - H), 8.96 (d, 2H, J = 4.0 Hz, -H), 8.24 (d, 2H, J = 4.0 Hz, -H), 7.99 - 7.89 (m, 6H, 5 + 15 - o / m - Ar), 7.25 (m, 2H, 15 - m - Ar), 6.30 (m, 2H, 7 + 17 - H), 6.15 (m, 2H, 8 + 18 - H), 5.63 (m, 2H, OH), 5.32 (m, 2H, OH), 3.99 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), -1.87 (br s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 616.3 ([M+H]⁺, 100%). C₃₅H₃₀N₅O₆ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは616.2196、見出されたのは616.2192である。

低い R_f シス-トランスバクテリオクロリン13; $R_f = 0.24$ (DCM/MeOH, 19:1), 融点148~151 (分解); UV-vis (DCM) m_{max} (相対強度) 373.5 (1.0), 514.5 (0.24), 703 (0.50) nm; 蛍光 (DCM) m_{max} 708 nm (励起 = 514 nm); 1H NMR (270 MHz, CDCl₃ 中の20% CD₃OD) 9.20 (s, 2H, 10 + 20 - H), 8.78 (m, 2H, -H), 8.35 (m, 2H, -H), 8.05 (m, 2H, 5 - o - Ar), 7.89 - 7.86 (m, 3H, 5 + 15 - o / m - Ar), 7.75 (m, 1H, 15 - o - Ar), 7.20 - 7.17 (m, 2H, 15 - m - Ar), 6.25 (m, 2H, 7 + 17 - H), 5.86 (m, 2H, 8 + 18 - H), 4.06 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), (NHのものの交換); MALDI-MS m/z 616.4 ([M+H]⁺, 100%). C₃₅H₃₀N₅O₆ ([M+H]⁺) に対して計算されたES-HRMSは616.2196、見出されたのは616.2192である。

【0099】

例16

5-(4-イソチオシアナトフェニル)-10,15,20-トリ(4-メチルホスホニウムフェニル)-ポルフィリン及び5-(4-イソチオシアナトフェニル)-15-(4-メチルホスホニウムフェニル)-ポルフィリン-一般的合成方法
 ボック(Boc)N-保護された5-(4-アミノフェニル)-10,25,20-トリ(4-カルボメトキシフェニル)ポルフィリン及び5-(4-アミノフェニル)-15-(4-カルボメトキシフェニル)ポルフィリンを、それぞれ、Lindsey (リンジー) 条件 [Lindsey, J. S., Schreiman (シュレイマン), I. C., Hsu (スウ), H. C., Kearney (カーニー), P. C., Margueretta (マルグレッタ), A. M. (1987) J. Org. Chem. 52, 827] を用いる混合凝縮 (mixed condensation) 又はBoyle (ボイル) 等の [Boyle, R. W., Bruckner (ブルックナー), C., Posakony (ポサコニー), J., James (ジェームス), B. R., Dolphin (ドルフィン), D. (1999) Organic Syntheses. 76, 287 - 参考としてここに組み入れる。] により記載されているように適切に置換された5-フェニルジピロメタンによる2+2凝縮法によって合成した。次いで、これらのポルフィリン上の(4-カルボメトキシフェニル)基を、次の標準的な方法: ポルフィリン(0.2ミリモル)を乾燥THF(25 mL)中に0 で溶解し、及びアルゴン下に10分間攪拌する方法を用いて、(4-(1-プロモメチル)フェニル)基に転換した。リチウムアルミニウム水素化物(0.7ミリモル)を添加し、及び攪拌を24時間続けた。反応物をTLCによって監視し、反応が完結したとき、エチルアセテート(2 mL)を添加し、及び反応物をHCl水溶液(0.2 M, 20 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(30 mL

）及び最後にかん水（20 mL）を用いて洗浄した。その有機層を乾燥（ $MgSO_4$ ）し、及び乾くまで蒸発させて、3つ又は1つの還元型のカルボメトキシ基をそれぞれ有する相当する（4 - （1 - ヒドロキシメチル）フェニル）置換ポルフィリンを得た。（4 - （1 - ヒドロキシメチル）フェニル）置換ポルフィリン（0.2ミリモル）を乾燥クロロホルム（40 mL）中に溶解し、及びアルゴン下で攪拌し、一方でトリフェニルホスフィン（1.0ミリモル）及び四臭化炭素（1.6ミリモル）を添加した。反応物を、暗所で24時間攪拌し、及び次いでTLCによって監視した。一旦すべてのヒドロキシメチル基をプロモメチル基に転換させて、反応混合物をジクロロメタン（40 mL）を用いて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム（ 2×2 mL）次いでかん水（ 2×2 mL）を用いて洗浄し、及び有機層を乾燥（ $MgSO_4$ ）させた。減圧中での溶媒の除去によって紫色の結晶性固体としての相当するプロモメチルポルフィリンを与えた。 10

ボックスN - 保護された5 - （アミノフェニル） - 10, 25, 20 - トリ - （4 - プロモメチルフェニル）ポルフィリン及び5 - （アミノフェニル） - 15 - （4 - プロモメチルフェニル）ポルフィリン（0.75ミリモル）を、乾燥ジクロロメタン（50 mL）中に、アルゴン雰囲気下25 で溶解した。ジクロロメタン（10 mL）中に溶解したトリアリール又はトリアルキルホスフィン（7.5ミリモル）をシリンジによって注入し、及び反応の進行の後にはTLCを行った。完結の際に、溶媒を減圧中で反応物から蒸発させ、及び粗製の生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカ；勾配溶出：ジクロロメタンからメタノールまで）によって精製し、光沢のある紫色の結晶性固体としての所要のボックス - N - 保護 - 5 - （アミノフェニル） - メチルホスホニウム - メソ - アリールポルフィリンを得た。ボックス保護基を、溶解度及びトリメチルシリルヨウ化物（5.0等量）の添加に応じて、クロロホルム又はアセトニトリル中のポルフィリンの溶解によって除去し、30分後、メタノール（10 mL）を用いて反応をクエンチングさせた。蒸発による溶媒の除去、次いで、フラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカ；勾配：ジクロロメタンからメタノールまで）によって、5 - （アミノフェニル） - メチルホスホニウム - メソ - アリールポルフィリンを与え、これは、標準的な方法〔Clarke（クラーク）, O. J. 及びBoyle, R. W. (1999, J. C. S. Chem. Commun. 2231)〕を用いる1, 1' - チオカルボニルジ - 2 (1H) - ピリドンでの処理によって所要のモノ - 4 - （イソシアナトフェニル）化合物に転換された。 20

【0100】 30

例17

5 - （4 - イソチオシアナトフェニル） - 10, 15, 20 - トリ（（4 - メチルホスホノ - ジ - エトキシ）フェニル） - ポルフィリン及び5 - （4 - イソチオシアナトフェニル） - 15 - （（4 - メチルホスホノ - ジ - エトキシ）フェニル） - ポルフィリン - 一般的な合成方法

ボックスN - 保護された5 - （4 - アミノフェニル） - 10, 15, 20 - トリ - （4 - プロモメチルフェニル）ポルフィリン及び5 - （アミノフェニル） - 15 - （4 - プロモメチルフェニル）ポルフィリン（0.75ミリモル）をトリエチル亜リン酸エステル（15ミリモル）及び乾燥アセトニトリル（50 mL）の混合物中に溶解した。還流冷却器を装着し、及びアルゴン下に還流させた。反応物をTLCにかけ、及び完結の際に、飽和炭酸水素ナトリウム（ 2×20 mL）、水（ 2×20 mL）及びかん水（ 2×20 mL）を用いて洗浄した。次いで、有機層を乾燥（ $MgSO_4$ ）し、及び溶媒を減圧中に蒸発させた。次いで、粗製の生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカ；勾配溶出：ジクロロメタンからエチルアセテートまで）によって精製し、紫色の結晶性固体としての表題の化合物を与えた。次いで、メチルホスホノ - ジ - エトキシ基を、水酸化ナトリウム水溶液中での1時間の超音波処理、次いで逆相中圧クロマトグラフィー〔C₁₈；勾配溶出0.1% TFA水溶液からメタノールまで〕（Boyle, R. W. 及びvan Lieer（ファンリエル）, J. E. (1993) Synlett 351）によるメチルホスホノ - モノ - エトキシナトリウム基にか、又はプロモトリエチルシラン（メチルホスホノ - ジ - エトキシ基当たり2等量）を用いる2時間の処理、次いで、逆相クロマトグラフィー 40 50

による精製クロマトグラフィー (C_{18} ; 勾配溶出 0.1% TFA 水溶液からメタノールまで) [McKenna (マッケナ), C. E., Higa (ヒガ), M. T., Cheung (チューン), N. H., McKenna, M. C. (1977) 2, 155] による十分に脱保護されたメチルホスホン酸にかのいずれかに脱保護した。ボックの脱保護 (上記参照) に次いで、マスクされてない 4 - (アミノフェニル) 基のそのイソチオシアナト類似体への転換を、標準的な方法 (Clarke, O. J. 及び Boyle, R. W. (1999) J. C. S. Chem. Commun. 2231) を用いて行った。

【0101】

例 18

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 10, 15, 20 - トリ ((4 - メチルホスホナト - ジ - エトキシ) フェニル) - ポルフィリン 及び 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - ((4 - メチルホスホナト - ジ - エトキシ) フェニル) - ポルフィリン - 一般的な合成方法 10

ボック N - 保護された 5 - (アミノフェニル) - 10, 15, 20 - トリ - (4 - ヒドロキシメチルフェニル) ポルフィリン 及び 5 - (アミノフェニル) - 15 - (4 - ヒドロキシメチルフェニル) ポルフィリン (0.75 ミリモル) を、アルゴン雰囲気下に、ジクロロメタン及びピリジン (4:1) の混合物中に溶解した。ジエチルクロロホスフェート (ヒドロキシメチル基当たり 2 等量) を注入し、及び混合物を 16 時間攪拌した。反応混合物からの溶媒の蒸発に次いで、クロマトグラフィーによる精製によって相当するトリ又はモノ ((4 - メチルホスホナト - ジ - エトキシ) フェニル) ポルフィリンを与えた。水酸化ナトリウム (1M) を用いる処理によって、トリ又はモノ ((4 - メチルホスホナトエトキシ) フェニル) ポルフィリンのナトリウム塩を与えた (Boyle, R. W. 及び van Lier, J. E. (1995) Synthesis 1079)。ボック脱保護及びイソチオシアナト基の生成は上述の様にして行った。 20

【0102】

例 19

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 10, 15, 20 - トリ ((4 - メチルピリジニウム) フェニル) - ポルフィリン 及び 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - ((4 - メチルピリジニウム) フェニル) - ポルフィリン - 一般的な合成方法 30

ボック N - 保護 5 - (アミノフェニル) - 10, 25, 20 - トリ - (4 - ブロモメチルフェニル) ポルフィリン 及び 5 - (アミノフェニル) - 15 - (4 - ブロモメチルフェニル) ポルフィリン (0.75 ミリモル) を、ジクロロメタン (50 mL) 及びピリジン (15 ミリモル) 中に溶解し、又は置換されたピリジン (15 ミリモル) を要求に応じ添加した。還流冷却器を装着し、及び反応物をアルゴン下に還流させた。反応物を TLC にかけて、完結の際に、乾くまで減圧中で蒸発させた。残留物を逆相媒体圧クロマトグラフィー (C_{18} ; 勾配溶出 0.1% TFA 水溶液からメタノールまで) によって精製し、N - ボック保護 4 - アミノフェニル化合物を得た。アミノフェニル基 (複数) の脱保護及びイソチオシアナト類似体 (複数) への転換を標準的なプロトコル (上記参照) を用いて行った。

【0103】

例 20

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - アリール - 10, 20 - (1, 2 - ジヒドロキシエチル) - ポルフィリン - 一般的な合成方法 40

エフモック (Fmoc) 保護された 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - アリールポルフィリン (0.8 ミリモル) を乾燥クロロホルム (300 mL) 中にアルゴンの雰囲気下で溶解した。乾燥クロロホルム (20 mL) 中に、新しく再結晶した N - ブロモスクシンイミド (1.8 ミリモル) をシリンジによって注入し、及び混合物を 30 分間攪拌した。次いで、溶媒を減圧中で蒸発させ、及び粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (シリカ; 勾配溶出: ヘキサンからエチルアセテートまで) によって精製し、紫色の結晶性固体としての所要の 5, 15 - ジブロモ - 10, 20 - ジアリールポルフィリンを与えた 50

。次いで、生成物を、酢酸亜鉛二水和物（80ミリモル）のクロロホルム/メタノール（9：1）溶液中での還流によってメタレートした。メタレーションに次いで、可視分光法を行い、完結の際に、中性のアルミナの短いカラムに通し、配位してない亜鉛を除去した。亜鉛5，15 - ジブロモ - 10，20 - ジアリアルポルフィリン（0，6ミリモル）を乾燥THF中に溶解し、それにテトラキス（トリフェニルホスフィン） - パラジウム（0）（0.6ミリモル）及びビニルトリブチルスズ（1.4ミリモル）を添加した。混合物を窒素下に48時間還流させ、その後、溶媒を減圧中で蒸発させ、及び残留物をフラッシュカラム（シリカ；勾配溶出：ジクロロメタンからエチルアセテートまで）によってクロマトグラフ処理し、紫色の結晶性固体としてのジंक5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ジエテニルポルフィリンを与えた。ジंक5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ジエテニルポルフィリンを、ジクロロメタン中のトリフルオロ酢酸（1% v/v）の溶液における溶解によって脱メタレーションし、水を用いる抽出及び減圧中での有機層からの溶媒の蒸発後に、5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ジエテニルポルフィリンを与えた。最後に、10及び20のエテニル基を、記載したように（Sutton J, Fernandez (フェルナンデス) N, Boyle RW (2000) J. Porphyrins and Phthalocyanines 4, 655)、四酸化オスミウムによってヒドロキシル化するが、エテニル基と四酸化オスミウムとの間の反応が迅速であるために、反応時間及び化学量論の制御によってこれらの基の選択的なヒドロキシル化が可能であった。条件の代表的な組合せにおいては、5 - （エフモックアミノフェニル - 15 - アリアル - 10，20 - ジエテニルポルフィリンは、10%ピリジン/クロロホルム中の四酸化オスミウム（5等量）を用いて24～48時間処理する場合に、望ましい5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ビス（1，2 - ジヒドロキシエチル）ポルフィリンを与え、一方で、より一層長い反応時間（72時間）及び四酸化オスミウムのより一層高いモル比（7.5又は10等量）を同じ条件下で用いる場合は、5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ビス（1，2 - ジヒドロキシエチル）7，8 - ジヒドロキシクロリン及び5 - （エフモックアミノフェニル） - 15 - アリアル - 10，20 - ビス（1，2 - ジヒドロキシエチル）7，8，17，18 - テトラヒドロキシバクテリオクロリンのそれぞれが得られる。すべての上記生成物は、アミノ基のピペリジン媒介脱保護（上記参照）及び標準的な方法（Clarke, O. J. 及びBoyle, R. W. (1999, J. C. S. Chem. Commun. 2231))を用いる1，1' - チオカルボニルジ - 2（1H） - ピリドンでの処理の際に、相当するイソチオシアナートにきれいに転換される。

【0104】

例21

5 - （4 - イソチオシアナトフェニル） - 15 - フェニル - 10，20 - （ジアリアル） - ポルフィリン - PD⁰ 媒介Suzukiカップリングによる5，15 - ジフェニルポルフィリンからの合成

ボックN - 保護5 - （アミノフェニル） - 15 - フェニルポルフィリンを上述したように10及び20メソ位でプロム化した。メソ10，20 - ジブロム化した生成物（0.75ミリモル）を乾燥THF（50mL）又はトルエン（50mL）中に溶解し、カップリング反応で用いるボロン酸に応じて、テトラキス - （トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（0.75ミリモル）及び無水リン酸カリウム（0.75ミリモル）を添加し、次いで、還流冷却器をフラスコに装着し、及び全体の装置をアルゴン雰囲気下に配置した。次いで、所要のアリアル又は複素環式ボロン酸を適切な溶媒（10mL）中の溶液として注入によって添加した。反応物を還流させ、TLCによって完結させた。完結の際に、粗製の反応混合物をジクロロメタン（100mL）で希釈し、及び飽和炭酸水素ナトリウム（2×50mL）、水（2×50mL）及びかん水（2×50mL）で抽出した。有機層を乾燥（MgSO₄）し、及び減圧中の蒸発によって濃縮した。最後に、残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカ；勾配溶出：ジクロロメタンからメタノールまで

) によって精製し、紫色の結晶性固体としてのボックN - 保護5 - (アミノフェニル) - 15 - フェニル - 10, 20 - (ジアリール) - ポルフィリンを与えた。ボック保護基を、クロロホルム又はアセトニトリル中のポルフィリンの溶解、溶解度に応じ、更にトリメチルシリルヨウ化物 (1.2 等量) の添加によって除去し、30 分後、メタノール (10 mL) を用いて反応をクエンチングさせた。蒸発による溶媒の除去、次いで、フラッシュカラムクロマトグラフィー (シリカ; 勾配: ジクロロメタンからメタノールまで) によって精製し、5 - (アミノフェニル) - 15 - フェニル - 10, 20 - (ジアリール) - ポルフィリンを与え、これを標準的な方法 [Clarke, O. J. 及び Boyle, R. W. (1999). J. C. S. Chem. Commun. 2231)] を用いる 1, 1' - チオカルボニルジ - 2 (1H) - ピリドンでの処理によって表題の化合物に転換した。

10

【0105】

例 2 2

5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 10, 15, 20 - トリ (4 - グリコシルフェニル) - ポルフィリン及び 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - (4 - グリコシルフェニル) - ポルフィリン - 一般的な合成方法

4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシルオキシ) ベンズアルデヒドを、Lindsey (リンジー) 条件 [Sol (ソル), V., Blais (ブレイズ), J. C., Carre (カレ), V., Granet (グラネ), R., Guilloton (ギロトン), M., Spiro (シュピーロ), M., Krausz (クラウス), P. (1999) J. Org. Chem. 64, 4431)] を

20

用いて、4 - ニトロベンズアルデヒド及びピロールで凝縮させ、及び粗製の反応混合物をフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製し、5 - (4 - ニトロフェニル) - 10, 15, 20 - トリス [4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシルオキシ) フェニル] ポルフィリンを与えた。あるいはまた、4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシロキシ) ベンズアルデヒドを用い、Boyle の方法 (Boyle, R. W., Bruckner, C., Posakony, J., James, B. R., Dolphin, D. (1999) Organic Syntheses. 76, 287) を用いることで、5 - (4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシロキシ) フェニル) ジピロメタンを合成し、次いで凝縮して、5 - (4 - ニトロフェニル) - 15, - [4

30

- (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシルオキシ) フェニル] ポルフィリンを与えた。これらのポルフィリンのニトロ基の還元を THF 中への溶解及び炭素上での 10% パラジウムの添加によって行った。混合物の H₂ 下での 5 時間の攪拌に次いで Celite (セライト) によるろ過を行い、及びフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製して相当するアミノポルフィリンを与え、これを、アルゴン下、無水 1, 4 - ジオキサンにおいて炭酸水素ナトリウム (6 等量) の存在下にエフモッククロライド (2 等量) と反応させることによって N 保護した。反応を TLC によって監視し、及び完結の際、ジクロロメタンで希釈し、及び水で洗浄し次いで有機層の乾燥 (MgSO₄) の前にかん水で洗浄した。フラッシュカラムクロマトグラフィーによる精製は、エフモックN - 保護5 - (4 - アミノフェニル) - 10, 15, 20 - トリス [4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシルオキシ) フェニル] ポルフィリン又は 5 - (4 - アミノフェニル) - 15, - [4 - (2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシルオキシ) フェニル] ポルフィリン

40

を与えた。N 及び O 保護基を、ジクロロメタン/モルフォリン (1:1) 中でのポルフィリンの溶解及び 1 時間の攪拌によって除去した。減圧中での蒸発による溶媒の除去に次いで残留物をジクロロメタン及びメタノール (4:1) 中で再溶解した。乾燥メタノール中のナトリウムメタノレート (sodium methanolate) (OAc 基当たり 1.5 等量) を添加し、及びその混合物を 1 時間攪拌した。十分に脱保護したポルフィリンを、ヘキサンを用いた沈殿によって回収した。最後に、5 - (4 - アミノフェニル) ポルフィリンを乾燥メタノール中で溶解し、及び 1, 1' - チオカルボニルジ - 2 (1H)

50

- ピリドン (2 等量) を添加した。反応物を、アルゴン下、2 時間攪拌し、及び T L C によって監視し、完結の際、溶媒を減圧中で蒸発させ、及び粗生成物を調製用の媒体圧逆相クロマトグラフィー (C₁₈; 勾配溶出: 0.1% T F A 水溶液からメタノールまで) によって精製した。

【0106】

例 23:

対称的なポルフィリン/クロリンジオール/バクテリオクロリンテトラールシリーズ

5, 15 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) ポルフィリン (一般的方法)

3 L の丸底フラスコに、5 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) ジピロメタン (1.86 g, 6 ミリモル)、次いで、N₂ 下に D C M (1 L) を添加した。この攪拌した溶液に、オルトギ酸トリメチル (48 mL, ミリモル) を添加した。次いで、D C M (500 mL) 中のトリクロロ酢酸 (23.0 g, ミリモル) の溶液を含有する圧均等滴下漏斗をそのフラスコに装着し、及びその溶液をその反応混合物に 10 分間にかけて滴下して加えた。反応容器をアルミニウムホイル中に被覆して光を遮り、及び N₂ 下に 3.5 時間攪拌した。次いで、ピリジンを反応混合物中に、迅速に攪拌しながら添加し、及び反応物を更に 16 時間、光を遮りながら、N₂ の下に室温で攪拌させた。アルミニウムホイルを除去し、及びその溶液中で空気を 20 分間泡立てた。この後、その反応物を更に 3 時間室温でアルミニウムホイルを除去した状態で栓なしで攪拌させた。次いで、反応混合物を減圧中で濃縮して、蒸発、次いで高い減圧によって D C M 及び残留するピリジンを除去した。次いで、粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル (250 mL) 上でクロマトグラフ処理し (D C M 及び少しのメタノールから 50 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷して完全な溶解性を確保した。)、クロロホルムを用いて溶出した。表題の化合物を紫色の結晶性固体として得た (347 mg, 18%); m_ax / (相対強度) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm; U V - V I S (C H₂ C l₂) (蛍光) m_ax = 634 nm (励起 = 408 nm); (270 MHz, C D C l₃) 10.32 (2 H, s, 10 - H, 20 - H), 9.40 (4 H, d, J = 4.8 Hz, - H), 9.18 (4 H, d, J = 4.8 Hz, - H), 7.52 (4 H, s, o - A r), 4.20 (6 H, s, C H₃), 4.00 (12 H, s, C H₃), - 3.10 (2 H, b r . s, N H); M S (M A L D I) m / z = 643.4 (100%, M⁺)。 10 20 30

【0107】

7, 8 - ジヒドロキシ 5, 15 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) クロリン (一般的方法)

H P L C 等級のクロロホルム (5.0 mL) 中の 5, 15 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) ポルフィリン (50 mg, 77.8 μモル) の攪拌した溶液に、無水ピリジン (0.5 mL) 中の四酸化オスミウム (2.5 等量, 0.195 ミリモル, 49 mg) の溶液を添加した。反応容器に N₂ を流し、及びわずかに油を塗ったガラス栓を用いて密封し、次いでアルミニウムホイル中に被覆し光を遮り、及び 72 時間室温で攪拌させた。この期間の後、反応容器のガラス栓をプラスチック栓と置き換え、及び硫化水素ガスの連続した流れによって反応混合物中を 5 分間泡立てた (ガス出口ニードルを取り付け、及び過剰な硫化水素ガスを、鉱油及び漂白溶液でそれぞれ満たされた一連の D r e s h e l (ドレッシェル) ボトル中に逃がした)。この時間の後、反応混合物を C e l i t e (R) (登録商標) によってろ過し、及び次いで減圧中で濃縮した。いくらかの過剰なピリジンを高減圧下に除去した。次いで、粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル (100 mL) 上でクロマトグラフ処理し (D C M 及び少しのメタノールから 20 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷して完全な溶解性を確保した。)、D C M 中の 1% メタノールを用いて溶出した。いくつかの発物質を回収し (15%)、及び表題の化合物をブラウニー - パープルの結晶性固体として得た、(26 mg, 50%); 融点 170 (分解); U V - V I S (C H₂ C l₂) m_ax (相対強度) 410 (1.0), 504 (0.09), 534 (0.06), 582 (0.04), 636 (0.18) nm; U V - V I S (40 50

CH_2Cl_2) (蛍光) m_{ax} 639 nm (励起 410 nm); ^1H (270 MHz, CDCl_3) 9.98 (1H, s, 10-H), 9.42 (1H, s, 20-H), 9.20 (1H, m, -H), 9.04 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, -H), 8.99 (2H, s, -H), 8.79 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, -H), 8.66 (1H, m, -H), 7.45 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, 15-o-Ar), 7.42 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, 15-o-Ar), 7.40 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, 5-o-Ar), 7.19 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, 15-O-Ar), 6.49 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, 7-H), 6.23 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, 8-H), 4.17 (3H, s, CH_3), 4.15 (3H, s, CH_3), 4.04 (3H, s, CH_3), 4.00 (3H, s, CH_3), 3.98 (3H, s, CH_3), 3.91 (3H, CH_3), -1.80 (1H, br. s, NH), -2.19 (1H, br. s, NH), (OHのものは観察されない); MS (MALDI) $m/z = 677.3$ (100%, M^+); $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$ についての計算された HRMS は: 676.2533、見出されたのは: 676.2587 である。

【0108】

7, 8, 17, 18 - テトラヒドロキシ - 5, 15 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) バクテリオクロリン (一般的方法)

HPLC 等級のクロロホルム (5.0 mL) 中の 5, 15 - (3, 4, 5 - トリスメトキシフェニル) ポルフィリン (50 mg, 77.8 μ mol) の攪拌した溶液に、無水ピリジン (0.5 mL) 中の四酸化オスミウム (5.0 等量, 0.39 ミリモル, 49 mg) の溶液を添加した。反応容器に N_2 を流し、及びしっかりと油を塗ったガラス栓を用いて密封し、次いでアルミニウムホイル中に被覆し光を遮り、及び 72 時間室温で攪拌させた。この期間の後、反応容器のガラス栓をプラスチック栓と置き換え、及び硫化水素ガスの連続した流れによって反応混合物中を 5 分間泡立てた (ガス出口ニードルを取り付け、及び過剰な硫化水素ガスを、鉱油及び漂白溶液でそれぞれ満たされた一連のドレッシェルボトル中に逃がした)。この時間の後、反応混合物を Celite (R) によってろ過し、及び次いで減圧中で濃縮した。いくらかの過剰なピリジンを高減圧下に除去した。次いで、粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル (100 mL) 上でクロマトグラフ処理し (DCM 及び少しのメタノールから 20 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷して完全な溶解性を確保した。)、最初に DCM 中の 1% メタノールを用いる溶出でクロリン副産物を溶出し、次いで DCM 中の 2.5% メタノールで、主要なバクテリオクロリン異性体 [トランス型と思われる Bruckner (ブレックナー) 等の (1995) Tetrahedron Lett. 36, 9425] を溶出させた。表題の化合物を緑がかった - ピンク (greeny - pink) の結晶性固体として得た、(20 mg, 36%); 融点 135 (分解); UV - VIS (CH_2Cl_2) m_{ax} (相対強度) 374 (1.0), 512 (0.23), 702 (0.52) nm; UV - VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{ax} 708 nm (励起 512 nm); ^1H (270 MHz, CDCl_3) 9.23 (2H, s, 10-H, 20-H), 8.79 (2H, d, $J = 3.2$ Hz, -H), 8.44 (2H, d, $J = 3.2$ Hz, -H), 7.37 (2H, s, 5 + 15 - o - Ar), 7.13 (2H, s, 5 + 15 - o - Ar), 6.31 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, 7 - H, 17 - H), 6.01 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, 8 - H, 18 - H), 4.12 (6H, s, CH_3), 3.92 (6H, s, CH_3), 3.89 (6H, s, CH_3), -1.97 (2H, br. s, NH), (OHのものは観察されない); MS (MALDI) $m/z = 712.4$ (100%, $(M+1)^+$); $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{10}$ についての計算された HRMS は: 710.2590、見出されたのは: 710.2607 である。

【0109】

例 24

生物学的接合のための非対称ポルフィリン / クロリンジオール / バクテリオクロリンテトラオール蛍光色素の組合せ

10

20

30

40

50

5 - (4 - アセトミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン

所要の非対称ジフェニルポルフィリンを、先立って概要を述べた一般的な方法を用いるが、わずかな改変のみを行って合成した。この例では、ジピロメタンの混合物を用いた。それぞれのジピロメタンの異なる反応性により、混合されたポルフィリンの最適化に必要な量は異なっていた。同じ規模の反応のために、5 - (4 - メトキシフェニル) ジピロメタン (505 mg, 2 ミリモル) 及び 5 - (4 - アセトミドフェニル) ジピロメタン (838 mg, 3 ミリモル) を用いた。ポルフィリン混合物をシリカゲル (400 mL) 上でクロマトグラフ処理し (DCM 及び少しのメタノールから 20 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷して完全な溶解性を確保した。)、最初に DCM (1 ガラスピペットいっばいのトリエチルアミンを溶出液の 500 mL に添加し溶出を助けた。) を用いて溶出し、5 - (4 - アセトミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリンの副産物を除去した。この成分の分離後、溶出をクロロホルムで続け、5 - (4 - アセトミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリンを収集した。望ましいポルフィリンを紫色の結晶として得た (150 mg, 12%) ; m_{max} / (相対強度) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm ; H (270 MHz, $CDCl_3$) 10.35 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.43 (4H, d, J = 4.8 Hz, -H), 9.14 (4H, d, J = 4.8 Hz, -H), 8.65 (2H, d, J = 7.2 Hz, 5-m-Ar), 8.22 - 8.12 (4H, d (重複), J = 8.1 Hz, 5-o-Ar + 15-o-Ar), 7.56 (2H, d, J = 8.1 Hz, 15-m-Ar), 4.14 (3H, s, CH_3), -3.00 (2H, br. s, NH) ; MS (MALDI) m/z = 550.3 (100%, M^+)。 10 20

【0110】

5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン

5 - (4 - アセトミドフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン (100 mg, 0.182 ミリモル) を 18% 塩酸 (200 mL) で処理し、及び空気冷却機を取り付けた。緑色の溶液を 3 時間 85 に温めた。冷却に先立って、反応混合物を減圧中で濃縮し (水流吸引機 ; 蒸発装置水浴 75)、過剰の塩酸を除去し、次いで、DCM 中のトリエチルアミン (50 mL) の溶液を用いて慎重に処理した。有機抽出物を、乾燥 (無水 Na_2SO_4) に先立って、水 (100 mL) 次いで飽和かん水 (100 mL) で洗浄し、ブフナー漏斗によつてろ過し、及び最後に減圧中で濃縮した。所要のポルフィリンをシリカゲル (100 mL) 上のクロマトグラフィー (10 mL の DCM 中での液体負荷)、DCM (1 ガラスピペットいっばいのトリエチルアミンを 500 mL の溶出液に添加し溶出を助けた。) を用いる溶出によつて得た。望ましいポルフィリンを、紫色の結晶として得た ; (150 mg, 12%) ; m_{max} / (相対強度) 410 (1.0), 503 (0.045), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.005) nm ; UV - VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{max} = 634 nm (励起 = 410 nm) ; H (270 MHz, $CDCl_3$) 10.30 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.39 (4H, d, J = 4.9 Hz, -H), 9.17 (2H, d, J = 4.9 Hz, -H) 9.10 (2H, d, J = 4.9 Hz, -H), 8.19 (2H, d, J = 8.8 Hz, 15-o-Ar), 8.07 (2H, d, J = 8.1 Hz, 5-o-Ar), 7.35 (2H, d, J = 8.8 Hz, 15-m-Ar), 7.14 (2H, d, J = 8.1 Hz, 5-m-Ar), 4.13 (3H, s, CH_3), 4.08 (2H, br. s, NH), -3.06 (2H, br. s, NH) ; MS (MALDI) m/z = 508.3 (100%, $(M+1)^+$)。 30 40

【0111】

5 - (4 - フルオレノメチルアミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン

無水 1, 4 - ジオキサン (2.5 mL) 中の 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン (28 mg, 55 μ モル) の攪拌した溶液に、固体の炭酸水素ナトリウム (6 等量, 28 mg, 0.33 ミリモル) を添加した。次いで、この混 50

合物に、1, 4 - ジオキサソ (0.5 mL) 中の 9 - フルオレノメチルクロロフォルメート (2 等量, 0.11 ミリモル, 28.5 mg) の溶液を N_2 下に添加した。反応フラスコをアルミニウムホイルで被覆し光を遮り、及び室温で 3 時間攪拌した。このとき、反応が完結した (TLC によって監視したように)。1, 4 - ジオキサソを減圧中で除去し、及び残留物を水 (25 mL) と DCM (2 x 25 mL) との間に分配させた。組み合わせた有機抽出物を飽和かん水 (25 mL) で洗浄し、次いで乾燥させ (無水 Na_2SO_4)、ろ過し、及び減圧中で濃縮した。所要のポルフィリンをシリカゲル (100 mL) 上のクロマトグラフィー (溶解のために DCM 及び少しのメタノールから 10 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷した。)、DCM を用いる溶出によって得た。望ましいポルフィリンを、紫色の結晶として得た; (38 mg, 95%); m_{max} / (相対強度) 410 (1.0), 505 (0.042), 541 (0.02), 578 (0.015), 633 (0.01) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) $m_{max} = 635$ nm (励起 = 410 nm); H (270 MHz, $CDCl_3$) 10.35 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.69 (1H, br. s, NH), 9.44 (4H, d, J = 4.8 Hz, -H), 9.12 (4H, d, J = 4.8 Hz, -H), 8.20 - 8.17 (4H, 2 x d (重複), J = 8.1 Hz, 5 + 15 - o - Ar), 7.85 (4H, m, 5 + 15 - m - Ar), 7.76 - 7.66 (2H, m, フルオレノ - Ar), 7.51 - 7.30 (6H, m, フルオレノ - Ar), 4.69 (2H, d, J = 7.2 Hz, CH_2), 4.30 (1H, t, J = 7.2 Hz, CH), 4.13 (3H, s, CH_3), -3.15 (2H, br. s, NH); MS (MALDI) $m/z = 731.5$ (100%, (M + 1)⁺), 508.3 (52%, (M - FMOC + 1)⁺)。 10

【0112】

17, 18 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリン 及び 7, 8 - ジヒドロキシ 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) クロリンレジオイソマー 5 - (4 - アミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン (28 mg, 55.2 μ モル) を、先立って述べた一般的なクロリン形成方法を用いて、クロリンジオールのレジオイソマーの混合物に転換した。次いで、粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル (200 mL) 上でクロマトグラフ処理し (DCM 及び少しのメタノールから 20 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷し完全な溶解性を確保した。)、DCM 中の 1% メタノールで溶出し、最初にいくつかの未反応出発物質、次いでブラウニー - パープルの結晶性固体としてのより一層高い R_f のクロリン異性体を溶出した。より一層低い R_f の異性体を、更に DCM 中の 2.5% のメタノールでの溶出によって得、及びまたブラウニー - パープルの結晶性固体を与えた。 30

高い R_f のクロリンレジオイソマー [2, 3 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - メトキシフェニル) - 15 - (4 - アミノフェニル) クロリン, nOe measurements (ノエメジャーメント) 及び JPP paper (ペーパー) から]: (8.5 mg, 30%) ; 融点 165 (分解); UV-VIS (CH_2Cl_2) m_{max} (相対強度) 401 (0.99), 414 (1.0), 503 (0.08), 535 (0.07), 582 (0.035), 636 (0.22) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) $m_{max} = 639$ nm (励起 412 nm); H (270 MHz, $CDCl_3$ 中の 10% MeOH - d_4) 9.95 (1H, s, 10-H), 9.42 (1H, s, 20-H), 9.17 (1H, d, J = 4.8 Hz, -H), 9.03 (1H, d, J = 4.0 Hz, -H), 8.97 (2H, s, -H), 8.78 (1H, d, J = 4.8 Hz, -H), 8.51 (1H, d, J = 4.8 Hz, -H), 8.05 (2H, d, J = 8.9 Hz, o - Ar), 7.94 (2H, d, J = 8.1 Hz, o' - Ar), 7.25 (2H, d, J = 8.9 Hz, m - Ar), 7.12 (2H, d, J = 8.1 Hz, m' - Ar), 6.42 (1H, d, J = 6.5 Hz, 17 - H), 6.03 (1H, d, J = 6.5 Hz, 18 - H), 4.08 (3H, s, CH_3), (NH のものの交換), (OH のものは観察されない); MS (MALDI) $m/z = 642.2$ (100%, (M + 1)⁺) 40

+)。

低い R_f のクロリンレジオイソマー〔nOe measurements及びJPP paperからの2,3-ジヒドロキシ-5-(4-アミノフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)クロリン〕: (8.5 mg, 30%); 融点168 (分解); UV-VIS (CH_2Cl_2) m_{ax} (相対強度) 401 (0.99), 413 (1.0), 507 (0.08), 536 (0.06), 586 (0.025), 637 (0.20) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{ax} 639 nm (励起412 nm); ^1H (270 MHz, CDCl_3 中の10% MeOH- d_4) 9.96 (1H, s, 20-H), 9.40 (1H, s, 10-H), 9.18 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 9.05 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 8.98 (1H, d, $J=4.0$, -H), 8.92 (1H, d, $J=4.0$ Hz, -H), 8.74 (1H, d, $J=4.0$ Hz, -H), 8.58 (1H, d, $J=4.0$ Hz, -H), 8.13 (1H, d, $J=8.9$ Hz, o-Ar), 8.08 (1H, d, $J=8.9$ Hz, o-Ar), 7.95 (1H, d, $J=8.1$ Hz, o'-Ar), 7.79 (1H, d, $J=8.1$ Hz, o'-Ar), 7.36 (1H, d, $J=8.9$ Hz, m-Ar), 7.30 (1H, d, $J=8.9$ Hz, m-Ar), 7.11 (1H, d, $J=8.1$ Hz, m'-Ar), 7.05 (1H, d, $J=8.1$ Hz, m'-Ar), 6.42 (1H, d, $J=6.5$ Hz, 7-H), 6.09 (1H, d, $J=6.5$ Hz, 8-H), 4.11 (3H, s, CH_3), (NHのものの交換), (OHのものは観察されない); MS (MALDI) $m/z = 642.2$ (100%, $(M+1)^+$)。 10 20

【0113】

17, 18-ジヒドロキシ-5-(4-イソチオシアナトフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)クロリン(より一層高い R_f レジオイソマー) DCM (25 mL) 中の1, 1'-チオカルボニルジ-2(1H)-ピリドン(1.07 等量, 7.6 mg, 43.5 ミリモル)の攪拌した溶液に、(活性化アルミナカラム中の通過によって乾燥させた。)、DCM (10 mL) 中の17, 18-ジヒドロキシ-5-(4-メトキシフェニル)-15-(4-アミノフェニル)クロリン(17.5 mg, 23.2 モル)の溶液を添加した。反応フラスコをアルミニウムホイルで被覆し光を遮り、及び N_2 下に2時間攪拌し、その時間でTLCが発物質の完全な消失を示した。次いで、反応混合物を水(2×50 mL)及び飽和かん水(50 mL)で洗浄し、次いで、乾燥した(無水 Na_2SO_4)。次いで、有機抽出物をろ過し、及び10 mLのフラッシュシリカゲル上で濃縮し、及びフラッシュシリカゲル(100 mL)上でクロマトグラフ処理し、DCM中の1%メタノールで溶出して所要のイソチオシアナトクロリンジオールを溶出した(すべてのTDPのNB.微量成分を、カラムクロマトグラフィーからの生成物の濃縮に先立って除去しなければならず、さもないと、3つのより一層高い R_f の副産物に対していくつかの分解が発生する。これらのことは、このときには確認できない。)表題の化合物をブラウニー-パープルの結晶性固体として得た(17 mg, 90%); 融点155 (分解); UV-VIS (CH_2Cl_2) m_{ax} (相対強度) 410 (1.0), 505 (0.09), 534 (0.06), 586 (0.04), 637 (0.18) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{ax} 639 nm (励起412 nm); ^1H (270 MHz, CDCl_3 中の10% MeOH- d_4) 10.0 (1H, s, 10-H), 9.45 (1H, s, 20-H), 9.20 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 9.06 (1H, d, $J=4.0$ Hz, -H), 9.02 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 8.84 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 8.64 (1H, d, $J=4.0$ Hz, -H), 8.55 (1H, d, $J=4.8$ Hz, -H), 8.21 (1H, d, $J=8.1$ Hz, o-Ar), 8.15 (1H, d, $J=8.1$ Hz, o-Ar), 8.05 (1H, d, $J=8.9$ Hz, o'-Ar), 7.93 (1H, d, $J=8.9$ Hz, o'-Ar), 7.65 (2H, m, m-Ar), 7.24 (2H, m, m'-Ar), 6.43 (1H, d, $J=6.5$ Hz, 17-H), 6.04 (1H, d, $J=6.5$ Hz, 18-H), 4.08 (3H, s, CH_3), (NHのもの) 30 40 50

の交換), (OHのものは観察されない); MS (MALDI) $m/z = 583.7$ (100%, M^+); $C_{34}H_{26}N_5O_3S$ についての計算されたHRMSは: 584.1757 、見出されたのは: 584.1756 ($(M+1)^+$) である。

【0114】

7, 8, 17, 18 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - フルオレノメチルアミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン (シス/トランス立体異性体) 5 - (4 - フルオレノメチルアミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン (35 mg, 48.0 モル) を、先立って述べた一般的なバクテリオクロリン形成方法を用いて、バクテリオクロリンの立体異性体の混合物に転換した。次いで、粗製の反応混合物をフラッシュシリカゲル (200 mL) 上でクロマトグラフ処理し (DCM及び少しのメタノールから 20 mL のフラッシュシリカゲルに乾燥負荷し完全な溶解性を確保した。)、DCM中の1%メタノールで最初に溶出し、より一層高い R_f のクロリン副産物を溶出し、次いで2%メタノール/DCMで2つの立体異性のバクテリオクロリンを別々に溶出した。より一層高い R_f - トランスのバクテリオクロリン異性体を、ピンキー - グリーンの結晶性固体として単離した (6 mg, 15%) ; 融点 142 (分解) ; UV - VIS (CH_2Cl_2) m_{max} (相対強度) 374 (1.0), 512 (0.23), 702 (0.52) nm ; UV - VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{max} 708 nm (励起 512 nm) ; H (270 MHz, $CDCl_3$ 中の 10% MeOH - d_4) 9.20 (2H, s, 10 - H, 20 - H), 8.78 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, - H), 8.36 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, - H), 7.95 (2H, m, o - Ar), 7.85 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, フルオレノ - Ar), 7.79 (2H, m, o' - Ar), 7.65 (2H, m, m' - Ar), 7.47 - 7.38 (6H, m, フルオレノ - Ar), 7.24 (2H, m, m - Ar), 6.27 - 6.24 (2H, 2xd (重複), $J = 6.5$ Hz, 7 - H, 17 - H), 5.85 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, 8 - H, 18 - H), 4.65 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.39 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, CH), 4.06 (3H, s, CH_3), - 1.94 (2H, br. s (部分的に交換), NH), (OHのものは観察されない) ; MS (MALDI) $m/z = 800.4$ (100%, $(M+1)^+$) 。

より一層低い R_f - シスのバクテリオクロリン異性体を、ピンキー - グリーンの結晶性固体として単離した (8.5 mg, 21%) ; 融点 148 (分解) ; UV - VIS (CH_2Cl_2) m_{max} (相対強度) 374 (1.0), 512 (0.24), 703 (0.54) nm ; UV - VIS (CH_2Cl_2) (蛍光) m_{max} 708 nm (励起 512 nm) ; H (270 MHz, $CDCl_3$ 中の 10% MeOH - d_4) 9.12 (2H, s, 10 - H, 20 - H), 8.76 (2H, d, $J = 4.8$ Hz, - H), 8.34 (2H, 2xd (重複), $J = 4.8$ Hz, - H), 8.02 (2H, m, o - Ar), 7.85 (2H, d (不明瞭), $J = 8.0$ Hz, o' - Ar), 7.83 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, フルオレノ - Ar), 7.76 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, m' - Ar), 7.50 - 7.38 (6H, m, フルオレノ - Ar), 7.24 (2H, m, m - Ar), 6.27 - 6.23 (2H, 2xd (重複), $J = 6.5$ Hz, 7 - H, 17 - H), 5.85 - 5.82 (2H, 2xd (重複), $J = 6.5$ Hz, 8 - H, 18 - H), 4.65 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.39 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, CH), 4.05 (3H, s, CH_3), - 1.88 (2H, br. s (部分的に交換), NH), (OHのものは観察されない) ; MS (MALDI) $m/z = 800.4$ (100%, $(M+1)^+$) 。

【0115】

7, 8, 17, 18 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - イソチオシアナトフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン (より一層低い R_f シス立体異性体) DCM中の25%メタノール (1.25 mL) における7, 8, 17, 18 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - フルオレノメチアミノフェニル) - 15 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン (より一層低い R_f シス立体異性体) (8.5 mg, 10.7 μ モル)

)の溶液をピペリジン(50等量, 53 μ L, 0.53ミリモル)で処理し、及び3時間の時間光を遮ってN₂下に室温で撹拌した。反応混合物を減圧中に濃縮しピペリジンのすべての微量成分を除去した(高い減圧が必要である。)。DCM中の1, 1'-チオカルボニルジ-2(1H)-ピリドン(1.07等量, 7.6mg, 43.5ミリモル)(25mL)の撹拌した溶液に、(活性化させたアルミナカラムに通すことによって乾燥させて)DCM中の2, 3, 12, 13-テトラヒドロキシ-5-(4-アミノフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)バクテリオクロリン(6.1mg, 10.7 μ モル)(10mL)の溶液を添加した。反応フラスコをアルミニウムホイルで被覆し光を遮り、及びN₂下に2時間、TLCが出発物質の完全な減少を示す時間撹拌させた。次いで、反応混合物を水(2 \times 50mL)で及び飽和かん水(50mL)で洗浄し、次いで乾燥させた(無水Na₂SO₄)。次いで、有機抽出物をろ過し、及び10mLのフラッシュシリカゲル上で濃縮してフラッシュシリカゲル(100mL)上でクロマトグラフ処理し、DCM中の2%メタノールで溶出して所要のイソチオシアナトバクテリオクロリンテトラールを溶出させた(すべてのTDPのNB.微量成分を、カラムクロマトグラフィからの生成物の濃縮に先立って除去しなければならず、さもなければ、若干の分解が起こる。)。より一層低いR_fシスバクテリオクロリン異性体をピンキー-グリーンの結晶性固体として単離した(5.0mg, 76%); 融点132 (分解);)UV-VIS(CH₂Cl₂)_{max}(相対強度)375(1.0), 516(0.22), 702(0.48)nm; UV-VIS(CH₂Cl₂)(蛍光)_{max}709nm(励起516nm); H(270MHz, CDCl₃中の10%MeOH-d₄)9.20(1H, s, メソ-H)、9.18(1H, s, メソ'-H)、8.77(2H, d, J=4.8Hz, -H)、8.40(1H, d, J=4.8Hz, -H)、8.34(1H, d, J=4.8Hz, -H)、8.14(2H, m, o-Ar)、8.05(2H, m, o'-Ar)、7.42-7.08(4H, m, 5+15-m-Ar)、6.20(2H, 2 \times d(重複), J=6.5Hz, 7-H, 17-H)、5.98(1H, d, J=6.5Hz, 8-H)、5.93(1H, d, J=6.5Hz, 18-H)、4.04(3H, s, CH₃)、-1.80(2H, br.s(部分的に交換), NH)、(OHのものは観察されない); MS(MALDI)m/z=618.9(100%, (M+1)⁺); C₃₄H₂₈N₅O₅Sについて計算されたHRMSは: 618.1815、見出されたのは: 618.1810((M+1)⁺)である。

10

20

30

【0116】

また、さらなる合成プロトコル及び方法論プロトコルは、Sutton等のPorphyrin, Chlorin and Bacteriochlorin Isothiocyanates - Synthesis and Potential Applications in Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy(Journal of Pthalocyanine S&Photosensitizers - 印刷中)及びOliver(オリバ)J Clarke(クラーク), Isothiocyanato Porphyrins for bioconjugation synthesis and applications in photochemotherapy and fluorescence imaging(博士号論文, 2001年4月, エセックス大学)に記載されている; 各々のすべての内容を参考として本明細書に組み入れる。

40

【0117】

方法論の記載1: 一般的な生物学的接合プロトコル

ヘキサヒドロキシPITC + 抗体

DMSO中のヘキサヒドロキシPITCの保存溶液を0.027のモル濃度に調製し、この溶液を乾燥させ及び必要なときまで0で貯蔵した。抗体の溶液を滅菌したPBSに対して大規模に透析しアジ化物の任意の微量成分を除去した。次いで、透析した抗体の溶液を遠心性の濃縮によって10mg/mLの濃度に調整し、及び250 μ Lのアリコートに分けた。

50

炭酸水素ナトリウムの 1 M 溶液を調製し、及び 2 M 水酸化ナトリウムを用いて pH 9.0 に調整した。

抗体の 250 μ L のアリコートに、30 μ L の 1 M 炭酸水素ナトリウムを添加した。次いで、所定の容積のヘキサヒドロキシ P I T C の保存溶液を添加し、望ましいモル比 (M R) のポルフィリンを抗体に与えた。例えば、20 の M R は、250 μ L の 10 mg / mL の抗体に 10 μ L の保存溶液の添加によって達成された。生物学的接合反応混合物中での D M S O の一定の濃度を維持するために、保存溶液のすべてのアリコートを更に一部の D M S O を用いて 25 μ L に希釈した。

【 0 1 1 8 】

[表1]

望ましいMR	抗体溶液の容積	抗体溶液の濃度 [C]	1M炭酸水素ナトリウムの容積	P I T C 保存溶液の容積	追加の D M S O の容積
20	250 μ L	10mg/mL	30 μ L	10 μ L	15 μ L
10	250 μ L	10mg/mL	30 μ L	5 μ L	20 μ L
5	250 μ L	10mg/mL	30 μ L	2.5 μ L	22.5 μ L
2.5	250 μ L	10mg/mL	30 μ L	1.25 μ L	23.75 μ L

表1. 0 生物学的接合のための試薬の量

【 0 1 1 9 】

P I T C の添加に次いで、生物学的接合の反応物を 25 で 1 時間緩徐に攪拌した。1 時間後、粗製の生物学的接合反応混合物を、滅菌した P B S (25 mL) で前もって平衡化された予め包装された P D 10 寸法排除カラムの頂上に直接負荷した。カラムを無菌の P B S で溶出させた。抗体 - ポルフィリン接合物を最初の色のバンド / 画分中に溶出させた。抗体 - ポルフィリン接合物の濃度はクロマトグラフィーの間の希釈により 1.25 mg / mL として測定された。抗体に対するポルフィリンの標識の程度 (D O L , d e g r e e o f l a b e l l i n g) を、ポルフィリン及びタンパク質の双方についてのモル吸光率の既知の定数を用いる標準的な分光法によって算出した。

抗体 - ポルフィリン接合物を、更に濃縮することなく、他に断らない限り、P B S + アジ化物中、0 で保存した。

【 0 1 2 0 】

N - メチルピリジニウムクロライド P I T C + 抗体

D M S O 中の N - メチルピリジニウムクロライド P I T C の保存溶液を 0.027 モル濃度に調製し、この溶液を乾燥させ、及び用いるまで 0 で保存した。抗体の溶液を滅菌した P B S に対して大規模に透析しアジ化物の任意の微量成分を除去した。次いで、透析した抗体の溶液を遠心性の濃縮によって 10 mg / mL の濃度に調整し、及び 250 μ L のアリコートに分けた。

炭酸水素ナトリウムの 1 M 溶液を調製し、及び 2 M 水酸化ナトリウムを用いて pH 9.0 に調整した。

抗体の 250 μ L のアリコートに、250 μ L の滅菌 P B S 、次いで 60 μ L の 1 M 炭酸水素ナトリウムを添加した。次いで、所定の容積の N - メチルピリジニウムクロライド P I T C の保存溶液を添加し、望ましいモル比 (M R) のポルフィリンを抗体に与えた。例えば、20 の M R は、500 μ L の 5 mg / mL の抗体に 10 μ L の保存溶液を添加することによって達成された。生物学的接合反応混合物中での D M S O の一定の濃度を維持するために、保存溶液のすべてのアリコートを更に一部の D M S O を用いて 25 μ L に希釈した。

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

〔表2〕

望まし いMR	抗体 溶液の 容積	抗体 溶液の [C]	1M炭酸 水素ナトリ ウムの容積	PITC 保存溶液 の容積	追加の DMSO の容積
20	500 μ L	5mg/mL	60 μ L	10 μ L	15 μ L
10	500 μ L	5mg/mL	60 μ L	5 μ L	20 μ L
5	500 μ L	5mg/mL	60 μ L	2.5 μ L	22.5 μ L
2.5	500 μ L	5mg/mL	60 μ L	1.25 μ L	23.75 μ L

表2. 0 生物学的接合のための試薬の量

10

【0122】

PITCの添加に次いで、生物学的接合の反応物を25で1時間緩徐に撹拌した。1時間後、粗製の生物学的接合反応混合物を、滅菌PBS(25mL)で前もって平衡化された予め包装されたPD10寸法排除カラムの頂上に直接負荷した。カラムを滅菌PBSで溶出させた。抗体-ポルフィリン接合物を最初の色のバンド/画分中に溶出させた。抗体-ポルフィリン接合物の濃度はクロマトグラフィーの間の希釈によって1.25mg/mLとして測定された。抗体に対するポルフィリンの標識の程度(DOL)を、ポルフィリン及びタンパク質の双方についてのモル吸光率の既知の定数を用いる標準的な分光法によって算出した。

抗体-ポルフィリン接合物を、更に濃縮することなく、他に断らない限り、PBS+アジ化物中、0で保存した。

20

【0123】

方法論の記載2：標準的な光細胞障害性

細胞を、集密にまでか、又は適当な密度にまで増殖させ、次いで2回PBS(リン酸緩衝食塩水)で洗浄し、FBS(ウシ胎児血清)のすべての痕跡成分を除去した。細胞密度を、FBSを含まない培地中で 1.5×10^6 細胞/mLに調整し、及び次いで、これらを1時間、暗所(37度C, 5%CO₂)、光増感剤/接合物濃度の範囲で温置する。温置後、細胞を更に培地(FBSを含まない)で洗浄して結合しない光増感剤を除去し、次いで再懸濁させ、及びクワドルプレート(quadruplicate)中の96ウェルプレート(1×10^5 細胞/ウェル)に播種した。次いで、プレートを照射するか(フィルターを通した赤色光600nmの 3.6 J/cm^2)、又は暗所中で“暗所毒性コントロール”として、同じ時間(~14分)の間放置するかのいずれかを行う。FBSの5マイクロリットル(5%/ウェル)を、照射/暗所の期間の後、添加し、及びプレートを、一昼夜の温置に戻す。処理後12から24時間まで、10 μ LのMTT溶液[PBS中のSigma Thiazolyl blue(シグマチアゾリルブルー)、 4.8×10^{-4} M]を、ウェル当たり添加し、及びプレートを、発色まで(1及び4時間の間)インキュベータに戻す。酸-アルコールの溶液(イソプロパノール中の0.04NのHClの100 μ L/ウェル)を添加し、及び十分に混合し濃青色の結晶を溶解する。次いで、プレートをマイクロプレート読み取り機において570nmで読み取り、及びその%の細胞生存率をコントロールに対して算出する。

30

40

【0124】

方法論の記載3：初期(initial)フローサイトメトリー発色団分析

2つの蛍光色素プローブを、2,3-ジヒドロキシ-5-(4-メトキシフェニル)-15-(4-イソチオシアナトフェニル)クロリン(より一層高いR_fのレジオイソマー)及び2,3,12,13-テトラヒドロキシ-5-(4-イソチオシアナトフェニル)-15-(4-メトキシフェニル)バクテリオクロリン(より一層低いR_fシス立体異性体)とアビジンとの先立って述べた標準的な生物学的接合プロトコルの下での別々の反応から作製した。初期フロー実験をこれらの各々のアビジンのRAJI細胞及びビオチンモノクローナル抗体(HLA-DRI, L243)との接合物を利用することによって行った(レーザ励起488nm, <640nm(FL2)>670nm(FL3)での発光の収

50

集)。データは、D P B C 試料からの信号が、発光フィルター (F L 3) に良好に適合するために、著しく高いことを示した。アビジン D P C H 又は D P B C の L 2 4 3 抗体との接合物はコントロールに比べ蛍光において中程度の増加を示した。アビジン - D P C H / D P B C のより一層高い濃度を用いることによって、ピークの蛍光が増加し、それは接合物の初期濃度が、受容体を飽和させるのにか、又はそれほどではないにせよ、若干の非共有性の結合にとって余りに低いためのいずれかかもしれない。アビジン - D P C H / D P B C (抗体のない) とのコントロール試料は、L 2 4 3 抗体の不存在下に若干の背景蛍光を示し、接合物の R A J I 細胞に対する若干の非特異的結合が生じるか、又は若干の量の非共有的に結合するフルオロフォアがタンパク質から細胞表面に移ったことを示唆する。F I T C - アビジンのコントロールは、わずかにより一層高い信号が F L 2 に存在し、それはまた広い発光バンドのために F L 3 にも現れることを示した。L 2 4 3 抗体の存在において、平均の信号は 1 5 0 % の増加を示した。このことは、非共有結合が F I T C - アビジン接合物に対してあまり重要でないことを示した。 10

【 0 1 2 5 】

実験を、フルオロフォアのタンパク質表面 (B S A 及びアビジン) に対する非共有結合のレベルを決定するために行った。非反応性の D P C H 及び D P B C 誘導体 2 , 3 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - メトキシフェニル) - 1 5 - (4 - アセトミドフェニル) クロリン (より一層高い R_f のレジオイソマー) 及び 2 , 3 , 1 2 , 1 3 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - アセトミドフェニル) - 1 5 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン (より一層高い R_f のトランス立体異性体) と B S A 及びアビジンの双方の混合物を用いる ' ブランク ' の生物学的接合を実行し、及び得られたタンパク質溶液を先に記載した反応性プローブのために記載したように、ゲルろ過 (P D - 1 0) によって精製した。U V 分析は、ほぼ同様の量の非反応性プローブがタンパク質に非共有的に結合することを示した。B S A 又はアビジンにとって、1 つの非反応性 D P C H が各タンパク質分子に結合するが、D P B C は、おそらくその増加した極性及び非両親媒性の性質によって 1 つより少ない。 20

【 0 1 2 6 】

初期の研究を行い、S D S - P A G E を用いて、タンパク質 (B S A 及びアビジン) から、非共有的に結合したフルオロフォアを除去した。' ブランク ' の生物学的接合の混合物を S D S - P A G E にかける場合、すべての非共有的に結合したフルオロフォアの分離が行えた (可溶化したゲルセグメントの、B S A についての 6 6 0 0 0 D 及びアビジンモノマーについての 1 6 5 0 0 D の U V / 蛍光は信号を示さなかった。) 。さらに、これらの検討に加えて、我々は、B S A (又はアビジン) に非共有結合するフルオロフォアがヒーラ細胞の表面に移ることを示すことができた。ヒーラ細胞を非共有結合的なフルオロフォア - タンパク質複合体の溶液に添加し、及び 2 0 分間温置する場合、ヒーラ細胞を除去した溶液から蛍光が除去された。この効果は、2 , 3 - ジヒドロキシ - 5 - (4 - メトキシフェニル) - 1 5 - (4 - アセトミドフェニル) クロリン (より一層高い R_f のレジオイソマー) で 2 , 3 , 1 2 , 1 3 - テトラヒドロキシ - 5 - (4 - アセトミドフェニル) - 1 5 - (4 - メトキシフェニル) バクテリオクロリン (より一層高い R_f のトランス立体異性体) よりも極めて顕著であった。細胞の再懸濁及び蛍光の測定は、D P C H の場合において蛍光の 1 0 倍の増加を示したが、D P B C だけは中程度の増加を示した。これらの測定によって、タンパク質による D P C H 及び D P B C の双方の重大な蛍光クエンチングが起こること、及び D P C H の両親媒性の性質がヒーラ細胞の膜中に組み込まれてほとんど完全な蛍光の修復が起こることを示唆する。D P B C は、非両親媒性であり、それがタンパク質に対して行うように同様な方法でヒーラ細胞の表面を複雑にすることができ、同様な蛍光のクエンチングを起こす。 40

【 0 1 2 7 】

フルオロフォア接合物が S D S - P A G E によって精製できるので、我々は、非共有結合的に結合したフルオロフォアの除去のための技術として、調製用電気泳動の使用を検討した。このために、我々は、M i l l i p o r e (ミリポア社) から購入した C e n t r i 50

l u t o r (R) (セ ン ト リ ル ー タ 、 登 録 商 標) m i c r o - e l e c t r o e l u t e r (マ イ ク ロ - エ レ ク ト ロ エ ル ー タ) を 用 い た 。 こ の 装 置 は S D S ゲ ル か ら 純 粋 な タ ン パ ク 質 フ ル オ ロ フ ォ ア 接 合 物 を 回 収 さ せ た 。

【 0 1 2 8 】

方法論の記載4：Micro-Electroeluterを用いるSDS PAGEからの接合物の溶出

・著しく抑制した照明での作業、所要のタンパク質接合物のSDS-PAGEを小さなストリップに切断し、及びセントリルータ試料管に添加し、及びその頂上を閉じた（半分以下、3～4試料管を用いた）。

・エレクトロエルータのより一層低い緩衝液チャンバーを脱気したSDSランニング緩衝液を用いて第1電極のレベルまで満たした。 10

・ミリポア社からの3から4のCentricon(R)（セントリコン、登録商標）の遠心装置（BSA接合物のためのYM-30及びアビジン接合物のためのYM-3を用いた。）をエレクトロエルータの上側緩衝液チャンバーラック中の孔に下から（フィルター膜を下にして）しっかり挿入し、及びそのラックの空の孔を、ラックの下側から栓を設けることにより塞いだ。

・上側の緩衝液チャンバーを、エレクトロエルータの同じ側に並べた双方の電極を有する下側の緩衝液チャンバー中に配置した。

・次いで、上側の緩衝液チャンバーを、脱気したSDSランニング緩衝液（上述のような）によって、すべてのCentricon(R)ユニットの頂上が完全に浸漬するまで満たした。漏出が検出されない場合、Centricon(R)ユニットの下に捕捉された気泡を、曲がったプラスチックピペット（ペーパークリップを用いて強化した）によって除去した。 20

・次いで、セントリルータ試料管をCentricon(R)ユニットの頂上中に配置して、試料管がぴったりと装着されるようにし、及び試料緩衝液（気泡を上述の様に除去した）で完全に満たした。

・エレクトロエルータの安全カバーを追加し、及び電源装置を接続した（200V，50mAを用いた）。

・2～3時間の後、電源装置を除去し、及びCentricon(R)フィルターをエレクトロエルータの上側緩衝液チャンバーから引き出した。 30

・ろ液バイアルをフィルターユニットに追加し、及び濃縮水のトップ（retentate top）を追加した。次いで、過剰の緩衝液を、5000G（BSA）及び7,500G（アビジン）で2時間の遠心分離によって除去した。新鮮な0.5Mリン酸緩衝液（pH7.0）をCentricon(R)ユニットに添加し、及びその方法をすべてのSDSが除去されるまで繰り返した。

・次いで、濃縮された精製接合物を、フィルターユニットの濃縮水バイアル中に、反転及び遠心分離によって収集した。アジ化ナトリウム（2M，20mL）を添加し、及び接合物を4で保存した。

【 0 1 2 9 】

方法論の記載5：FACS接合物結合プロトコル 40

リン酸緩衝食塩水（PBS）pH7.3を用いて細胞のフラスコを洗浄する。PBS中の5mMのEDTAを用いて37で10分間処理する。フラスコを軽くたたいて細胞を移動させ、50mLのポリプロピレン管中に配置し、及び400gの3分間で小さく丸める。10mLのPBS中に再懸濁し、及び細胞を計数する。FACS管〔ファルコン（Falcon）2054〕中に 2×10^5 で配置し、及び1mLのPBSを用いて遠心分離（400g3分）によって洗浄し、及びかき混ぜによって再懸濁させる。

細胞を、500 μ LのPBS中の2%マーベルミルク粉末、1%BSA中で30分間室温でブロックする。

細胞を1mLのPBS/BSA/アジ化物遠心分離中で洗浄し、及びペレットを再懸濁させる（上述のように）。

10 μ L の適切な希釈度の抗体を添加する。氷上で1時間温置する。

細胞を1 mL の PBS / BSA / アジ化物遠心分離中で洗浄し、及びペレットを再懸濁させる（上述のように）。

50 μ L のラビット抗 - マウス : FITC [Serotec (セロテック) , 1 / 100 希釈] を添加し、及び氷上暗所で1時間温置する。

細胞を1 mL の PBS / BSA / アジ化物遠心分離中で洗浄し（上述のように）、及びペレットを400 μ L の PBS / BSA / アジ化物中で再懸濁させる。

試料を、FACS 機械に、CellQuest (セルクエスト) 捕捉 (acquisition) ソフトウェアを用いて通し、データを収集する。

PBS / BSA / アジ化物

250 mL PBS

0.625 g BSA

1.56 mL アジ化ナトリウム (1.6 M)

【 0130 】

方法論の記載 6 : SDS - PAGE

分離ゲル

成分	ゲルの %	5	20
アクリルアミド / ビス (40 % w / v)		1.67 mL	6.66 mL
1.5 M の トリス - 塩酸 (pH 8.8)		2.5 mL	2.5 mL
水		5.67 mL	0.7 mL
TEMED		10 μ L	10 μ L
10 % 過硫酸アンモニウム		50 μ L	50 μ L
SDS		100 μ L	100 μ L

勾配ゲル 5 ~ 20 % のために、ペリスタポンプに連通させた勾配攪拌機を用いる。

スタッキングゲル (3 %)

成分	mL
アクリルアミド / ビス (40 % w / v)	1.3
1 M の トリス - 塩酸 (pH 6.8)	1.25
水	7.4
TEMED	20 μ L
10 % 過硫酸アンモニウム	50 μ L
SDS	100 μ L

ランニング緩衝液

0.025 M トリス , 0.192 M グリシン , 0.1 % SDS , 水中 pH 8.3。

サンプル緩衝液

1 M の トリス - 塩酸 (pH 6.8)	13 mL
20 % SDS	6.5 mL
グリセロール	5.2 mL
0.5 % プロモフェノールブルー	0.26 mL

BIORAD (バイオラド社) プロテアン 2 (Protean 2) 装置を製造者の指示に従って用いた。

試料 (1 ~ 10 μ g の試料タンパク質を含有する全量 15 ~ 20 μ L) をゲル上に負荷した。

ゲルを 200 V で約 1 時間運転した。次いで、ゲルを光によってスキャンし、その後、それらを、クーマシーブルー染色を用いて染色し、次いで、酢酸 / メタノールを用いて脱染した。

【 0131 】

本発明の更なる例証

我々の独創的な研究において、特に、Sutton J , Fernandez , N , 及び Boyle , R . W . (2000) Functionalised Diphenylc

10

20

30

40

50

hlorins and Bacteriochlorins - Their Synthesis and Bioconjugation for Targeted Photodynamic Therapy and Tumour Cell Imaging. J. Porphyrin and Phthalocyanines 4, 655 - 658); 及び Clarke, O. J. 及び Boyle, R. W. (1999) Isothiocyanatoporphyrins, useful intermediates for the conjugation of porphyrins with biomolecules and solid supports., J. C. S. Chem. Commun. 2231 - 2232 に記載されるように、それらのそれぞれを参考として本明細書に組み入れ、それは、ポルフィリン、クロリン及びバクテリオクロリン分子の組合せが、安定なチオ尿素結合によってタンパク質に効率的に接合することができ、及びこれらの接合物が蛍光造影剤としての潜在能力を有することを示した。

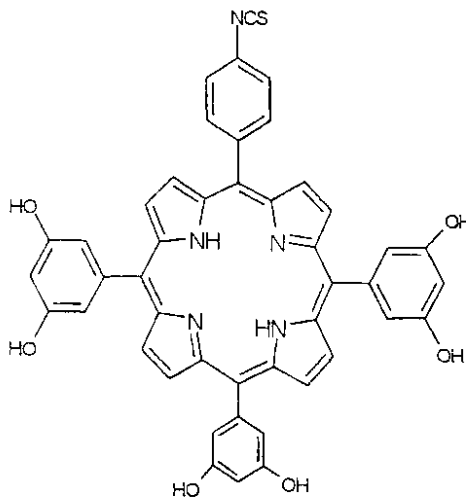
【0132】

本発明の例証として、我々は次に、ヒトの癌細胞に高度な特異性を有するモノクローナル抗体と、ポルフィリン系の光増感剤の我々の組合せとの間に接合を形成するためのこの方法の使用を記載する。この方法で形成された接合物は、相当する癌腫細胞に対する光線力学的な活性について、及びまた、標的でない細胞の存在下にこれらの標的の細胞に選択的に結合し、及び光増感するそれらの能力についてアッセイした。また、我々は、ポルフィリン - BSA 接合物のヒラ細胞への特異的な内部移行を例示する。

【0133】

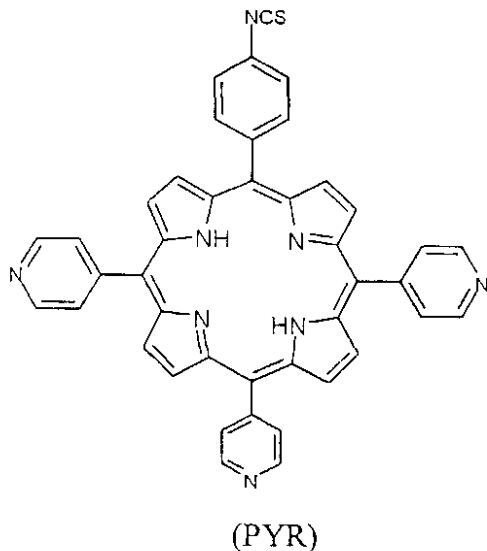
我々の例は、5, 10, 15 - トリス(3, 5 - ジヒドロキシフェニル) - 20 - (4 - イソチオシアナトフェニル) ポルフィリン(OH6) 及び 5, 10, 15 - トリス(ピリジル) - 20 - (4 - イソチオシアナトフェニル) ポルフィリン(PYR) を用い、我々が我々の以前の研究から見出したように、これらの発色団のそれぞれの光活動性のポルフィリンコアの周りの親水性置換基のパターンがタンパク質との効率的な接合を導き；親水性置換基がまた、より一層疎水性のポルフィリンで多く見られるように、光増感剤のタンパク質に対する非共有結合を最小化する。これらの発色団のための合成プロトコルを上記の例 1 及び 2 にそれぞれ記載する。

【化 9 4】



(OH6)

【化 9 5】



10

【0134】

例25 - 抗体に対する安定な接合

OH6及びPYRを上記例1及び2にそれぞれ記載したように調製した。抗体17.1Aを生物学的接合の方法のために選定した。17.1Aは結腸直腸の癌細胞、特に、Colo (コロ) 320細胞 (E C A C C, 寄託番号87061205) 上に余分に発現する受容体と特異的に反応する抗体である。しかし、適切な細胞系上で余分に発現する任意の抗原に対し反応する任意の抗体を、本発明にしたがって用いることができる。かかる抗体の例には、Ber-EP4及びMOK-31が含まれ、それぞれはDAKO Ltd (ダコ社), Ely (イーリー), ケンブリッジシャー州から商業的に入手でき、及びそれぞれは上皮細胞上に余分に発現する抗原に対して反応性である。

20

【0135】

抗体調製物の緩衝液pHを約pH9に増加させるために、先立って、及び生物学的接合の方法の目的のために、モノクローナル抗体調製物を、Centricon遠心機を用いるか、又はリン酸緩衝液を酢酸緩衝液に交換するために、透析にかけて、リン酸から酢酸緩衝液に交換した。

30

【0136】

OH6及びPYRのそれぞれを、17.1Aモノクローナル抗体と、方法論の記載1に記載した方法に従って別々に接合させ、2.5, 5, 10及び20のそれぞれのMRを有する接合希釈率の範囲を得た。

【0137】

酢酸緩衝液抗体調製物及びそれから得られたさまざまな希釈率の接合物を方法論の記載6に説明した方法に従ってSDS-PAGEにかけた。結果を図1~3にそれぞれ示す。図1は緩衝液交換した17.1Aの抗体(レーン1)、及び緩衝液交換した抗体/OH6接合物のMR2.5(レーン2, 3)、5(レーン4, 5)、10(レーン6, 7)及び20(レーン8, 9)、及び分子量マーカー(レーン10)を用いて負荷したゲルを示す。図2は透析した17.1Aの抗体(レーン1)、及び透析した抗体/OH6接合物のMR2.5(レーン2, 3)、5(レーン4, 5)、10(レーン6, 7)及び20(レーン8, 9)、及び分子量マーカー(レーン10)を用いて負荷したゲルを示す。図3は緩衝液交換した17.1Aの抗体(レーン1)、及び緩衝液交換した抗体/PYR接合物のMR2.5(レーン2, 6)、5(レーン3, 7)、10(レーン4, 8)及び20(レーン5, 9)、及び分子量マーカー(レーン10)を用いて負荷したゲルを示す。

40

【0138】

これらの図に示すように、緩衝液交換か、又は透析かのいずれの方法も、抗体構造を分裂させず、軽鎖及び重鎖は互いと結合したままであり、及びゲル(レーン1)のそれぞれに

50

共に移動する。また、OH6及びPYRの各MRでの接合をゲル(レーン2~9)上で確認することができる。

【0139】

例26 - FACS分析

FACS分析を方法論の記載5に従って行った。

図4はFITC標識化17.1A及びColo320細胞(3回繰り返し)を用いて引き出した結果を示し、及び抗体の細胞への結合が起こっていることを示す(すなわち、Colo320細胞が17.1Aに特異的な抗原を発現する)。

図5は検出のためのFITC標識化した抗17.1A抗体と共にOH6/17.1A接合物及びColo320細胞(3回繰り返し)を用いて引き出した結果を示し、及びOH6/17.1A接合物が細胞に結合していることを示す。 10

図6は検出のためのFITC標識化した抗17.1A抗体と共にPYR/17.1A接合物及びColo320細胞(3回繰り返し)を用いて引き出した結果を示し、及びPYR/17.1A接合物が細胞に結合していることを示す。

図7は、FITC標識化OX-34(3回繰り返し)を用いて引き出した結果を示し、OX-34は17.1Aと同じクラス(IgG2a)の抗体であるが、異なった高原特異性を有する。これらの結果は、OX-34がColo320細胞に結合せず、従ってColo320細胞上にはOX-34のための結合部位がないことを示す。

【0140】

例27 - 光細胞障害性の実験

方法論の記載2に説明した方法に従う光細胞障害性の試験を、種々の抗体接合物を用いてColo320細胞上で行った。 20

図8及び9はOH6/OX-34及びPYR/OX-34接合物のそれぞれを用いて行ったコントロール実験の結果を示す。例16に示すように、OX-34はColo320細胞の表面に発現する任意の抗原に対して特異性を欠くことが見出された。したがって、予想通りに、これらのコントロール実験は照射後の光細胞障害性を示さない。

【0141】

図10及び11は"キャップ(capped)"OH6及びPYRのそれぞれを用いて行った更なるコントロール実験の結果を示す。"キャップ"法は、各発色団上のNCS基とプロピルアミンとの反応を含み、血清タンパク質の接合をブロックする。図10では、暗所での細胞障害性を示さず、OH6がColo320細胞に対して無毒であることを示す。しかし、照射において、若干の光細胞障害性が観察され、キャップOH6のある量がColo細胞の表面に移ったことが示される。一方、図11は暗所での若干の細胞障害性を示し、PYRがColo320細胞に対する若干の程度の細胞障害性に関し、及び照射による光細胞障害性を増加させることを示唆し、再び、キャップPYRのある量がColo320細胞の表面に移ったことを示す。 30

【0142】

任意の抗体の欠損下で、キャップ発色団の細胞膜への移動は、おそらくキャップ発色団の両親媒性の性質に起因し、これはポルフィリンのコアの周りの親水性基及び疎水性プロピルアミンの"キャッピング"基の双方を有する。このことは特にそれらをColo320細胞膜のような脂質膜中に包埋させ易くする。 40

【0143】

図12及び13は、OH6/17.1A及びPYR/17.1A接合物をそれぞれ用い、種々の接合物希釈率(OH6/17.1Aについて2.5, 5, 10, 20; PYR/17.1Aについて10及び20)で得た結果を示す。これらの結果は、照射による細胞障害性の有意な増加を示し、生物学的接合物の細胞表面に対する結合が細胞上の感光性を与えることを示す。したがって、これらの種類はPDTの適切な候補である。

【0144】

例28 - インビボの光線力学的治療

本発明にかかる接合物を用いる、インビボでの光線力学的治療を行い評価するプロトコル 50

は、R Boyle等の、Br. J. Cancer (1992) 65: 813 - 817 ; R Boyle等の、Br. J. Cancer (1993) 67: 1177 - 1181 ; R Boyle等の、Br. J. Cancer (1996) 73: 49 - 53 ; 及びLapointe (ラポワント)等の、J. Nuclear Medicine, Vol. 40, No. 5 (May 1999) 876 - 882 に多様に記載されており ; これらの各内容を参考として本明細書に組み入れる。

【0145】

これらの論文に記載されているように、腫瘍をマウスのような動物に誘導するか、又は移植することができ、及び次いでその動物に、本発明にかかる抗原に特異性を有する抗体に接合した光増感剤のある量を注射することができ、この抗原は腫瘍細胞の表面上に特異的に発現されるか、又は余分に発現される。その後、動物に照射をすることができ、及び腫瘍に対する効果を、質的にか、又は計量的に、腫瘍の代謝を参照して評価することができる (Lapointe等の、J. Nuclear Medicine, Vol. 40, No. 5 (May 1999) 876 - 882 に記載されているように)。また、R Boyle等のBr. J. Cancer (1996) 73: 49 - 53 に記載されているように、インビボでの光増感剤の分布を、体内分布及び/又は血管性静止アッセイ (vascular stasis assays) によって測定することができる。

【0146】

例29 - 共焦点レーザー顕微鏡

10, 15, 20 - トリス (3, 5 - ジヒドロキシフェニル) 5 - イソチオシアナトフェニルポリフィリン (OH6 - NCS) とBSAとの接合物の細胞内局在性の予試験を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。容易に入手できる上皮性のヒト癌腫細胞系ヒーラを、接合物との温置のために選定した。すべての温置は、ヒーラ細胞のサブ集密的な (sub-confluent) 培養物を用いて、一連の、標識していないBSAのコントロール溶液、10, 15, 20 - トリス (3, 5 - ジヒドロキシフェニル) 5 - アミノフェニルポリフィリン (OH6 - NH₂, OH6 - NCSのアミノ前駆体)、及びPBSのそのままのものを含む、3通りで行った。細胞を35mmの皿においてカバーガラスの上に播種した。

【0147】

細胞の蛍光画像を、60x (NA 1.4) の油浸対物レンズを用いる倒立のオリンパスIX70顕微鏡上のBio-Rad Radiance (バイオラドラジアン) 2000の共焦点レーザー顕微鏡 [Bio-Rad Microscience (バイオラドマイクサイエンス), ケンブリッジ, MA] を用いて得た。照明源は25mWアルゴンイオンレーザーからの514nm線であった。ポリフィリンを、514nmのバンドパス励起フィルター、510nmの2色性ミラー、及び570nmの長波長パルスを発光フィルターを用いて可視化した。

【0148】

細胞の各フィールドを、一連の焦平面からの記録画像によって3次元的に区分化した。1つの焦平面から他のものへの移動は、顕微鏡のファインフォーカスコントロールに関連するステップモーターによって達成され、増分量 (step sizes) (0.5 μmから1.25 μmまでの範囲における) は用いられる開口寸法に関して選定し、隣接する区分の間に若干の重複が存在する。十分な垂直区分を採用し、各フィールドにおけるすべての細胞の頂部及び底部を記録する。収集された各画像は共焦点顕微鏡の通常の走査速度での4つの走査の平均値であった。各画像化セッション較正の間に、画像を: (i) 培地を含む顕微鏡スライド、背景レベルを測定するため; (ii) DMSO中に溶解したITCポリフィリンOH6 - NCSを含むスライド; 及び (iii) プローブでない (un-probed) ヒーラ細胞のみを有するスライドで採取した。

【0149】

画像データの取得及び遠隔顕微鏡の操作はBio-Rad Lasersharp 2000ソフトウェアを用いて行った。すべての画像を、Confocal Assistan

10

20

30

40

50

t (コンフォクリアルシスタント) バージョン 4.02、(構築 101) 1994 - 1996 Todd Clark Brelje (トッドクラークブレルヘ) を用いて管理した。人工的な色を標準的な Bio-Rad の参照表 (look-up tables, LUT) を用いてあてはめた。

【0150】

設定された CLSM 上で入手できる励起レーザー線のそれぞれでの OH6 - NCS の蛍光の予備的な評価は、DMSO 中の OH6 の 0.01 mM 溶液について行った。図 14 は OH6 - NCS の UV - 可視スペクトルを示し、その主要な吸収帯を確認できる。残念ながら、レーザー線は OH6 - NCS をそのソレー帯 m_{ax} で励起するために入手できなかった。図 15 は 422 nm (最適)、及び 4 種の波長、457、476、488、及び 514 nm のアルゴンイオンレーザーで励起した場合の OH6 - NCS についての蛍光発光の相対的強度を示す。

10

【0151】

514 nm で励起した場合の OH6 - NCS の溶液によって発光した蛍光の強度が、457、476、及び 488 nm の励起波長での蛍光発光よりおよそ 3 倍大きいことが示された。OH6 - NCS の UV - 可視吸収スペクトルは、516 nm のアルゴン - イオンレーザー線が OH6 - NCS に適合する唯一の励起源であることを示した。3 種の最も強いレーザー線、457、476、及び 488 nm は、OH6 - NCS のソレー帯及び第 1 帯の間の領域においてすべて励起し、一方、514 nm は 516 nm で Q 帯と十分に重複した。

20

【0152】

別々に接合物 OH6 - NCS - BSA 及び各々の 3 つのコントロールと温置した細胞培養物を、次いで、洗浄し及び固定した。次いで、温置した細胞を含むカバースリップを標準ガラス顕微鏡スライド上に注意して取り付け、画像化の準備をした。すべての 4 種のアルゴン - イオンレーザー線を試験するが、予想通り、蛍光の良好な解像度は 514 nm のレーザー線を用いることでのみ達成することができた。

【0153】

OH6 - NCS - BSA と温置したヒラ細胞の Z - 系列の蛍光画像を図 16 に示す (この図は左上から右下に見るべきである)。連続した区分を、顕微鏡によって分離された各焦平面の間の 2 μ M のステップで走査し、従って、細胞内での接合物の局在性の 3 次元の可視化を可能にする。明らかに、接合物 OH6 - NCS - BSA が細胞に入り、細胞の取り込みの性質の研究は行っていないが、取り込みが飲食細胞運動によって起こっている可能性が最も高い。接合物が核に入らないと思われ、細胞質の至るところに大部分分布していることがわかった。

30

【0154】

画像化のとき、BSA コントロール又は PBS コントロールと温置した細胞は、極めて低い、かろうじて検出できる程度の蛍光のみを示し、通常程度の細胞の自己蛍光のせいである。OH6 - NH2 (接合していないポルフィリンコントロール) の局在性を図 17 に示すが、これは、ポルフィリンコントロール細胞のズーム画を伴う CLSM 画像を示す。細胞内から発する蛍光は観察されず、代わりに、大多数の OH6 - NH2 は形質膜上に局在した。明らかに、接合物の BSA 成分はポルフィリンが細胞の内部に運ばれるのを促進するために必要である。

40

【0155】

要約すれば、ポルフィリン - BSA 接合物の細胞での局在性が、共有結合性のチオ尿素結合の形成によって構成され、通常 CLSM 技術を用いて画像化できることが示された。接合していないポルフィリン OH6 - NH2 は、細胞の膜を浸透しないことがわかったが、有意な程度の蛍光が OH6 - NCS - BSA と温置した細胞の内部から検出され、良好な接合物の浸透が示された。

【図面の簡単な説明】

【図 1】緩衝液交換した 17.1 A の抗体等を負荷したゲルを示す図である。

【図 2】透析した 17.1 A の抗体等を負荷したゲルを示す図である。

50

- 【図3】緩衝液交換した17.1Aの抗体等を負荷したゲルを示す図である。
- 【図4】FITC標識化17.1A及びColo320細胞の結果を示す図である。
- 【図5】検出のためのFITC標識化した抗17.1A抗体と共にOH6/17.1A接合物及びColo320細胞を用いた結果を示す図である。
- 【図6】検出のためのFITC標識化した抗17.1A抗体と共にPYR/17.1A接合物及びColo320細胞を用いた結果を示す図である。
- 【図7】FITC標識化OX-34を用いた結果を示す図である。
- 【図8】OH6/OX-34接合物のコントロール実験の結果を示す図である。
- 【図9】PYR/OX-34接合物のコントロール実験の結果を示す図である。
- 【図10】キャップOH6の更なるコントロール実験の結果を示す図である。
- 【図11】キャップPYRの更なるコントロール実験の結果を示す図である。
- 【図12】OH6/17.1A接合物の種々の希釈率の結果を示す図である。
- 【図13】PYR/17.1A接合物の種々の希釈率の結果を示す図である。
- 【図14】OH6-NCSのUV-可視スペクトルを示す図である。
- 【図15】4種の波長で励起した場合のOH6-NCSの蛍光発光の相対的強度を示す図である。
- 【図16】OH6-NCS-BSAと温置したヒラ細胞のZ-系列の蛍光画像を示す図である。
- 【図17】OH6-NH2の局在性を示す図である。

【図1】

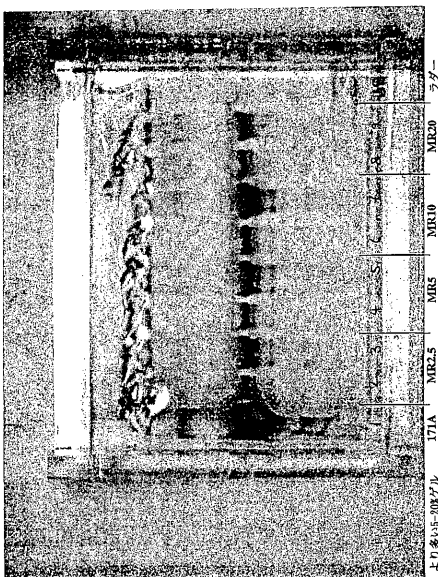


Figure 1

【図2】

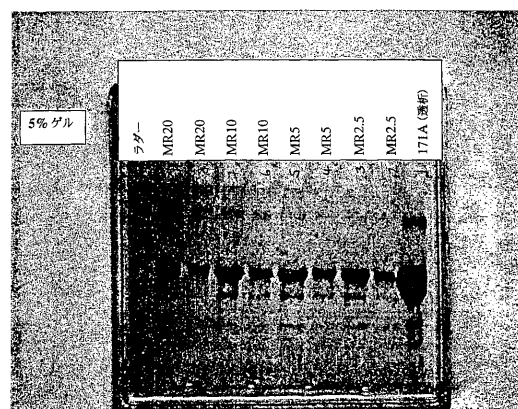


Figure 2

【 図 3 】

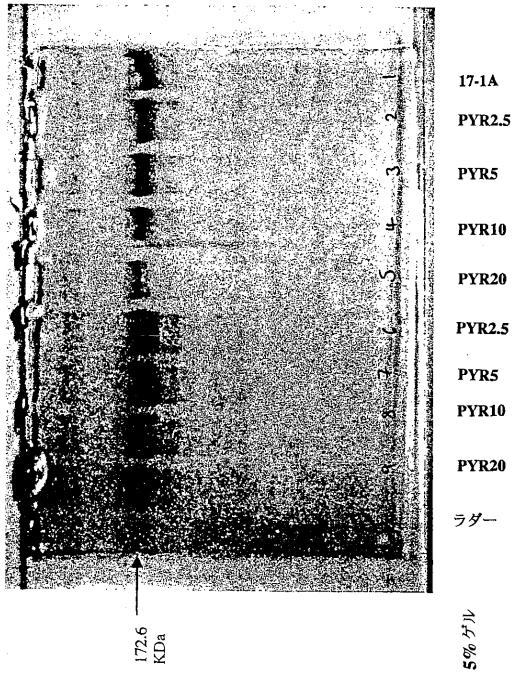


Figure 3

【 図 4 】

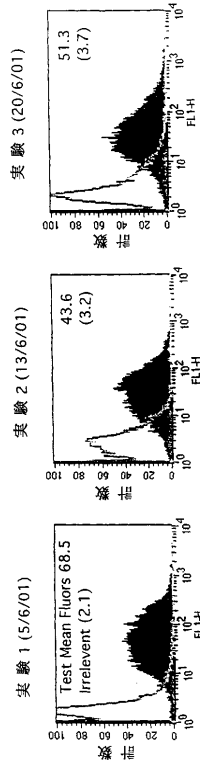


Figure 4

Cells 320
172.6
at 30 µg/ml

【 図 5 】

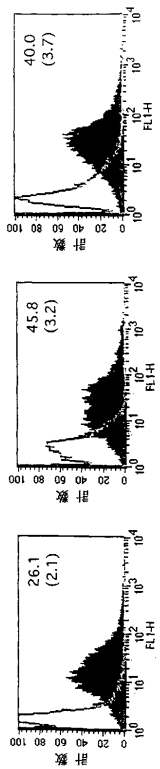


Figure 5

OH6 (20)
at 30 µg/ml

【 図 6 】

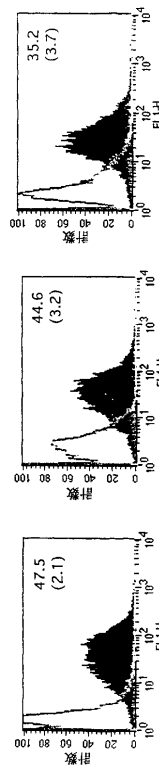


Figure 6

PYR (20)
at 30 µg/ml

【 図 7 】

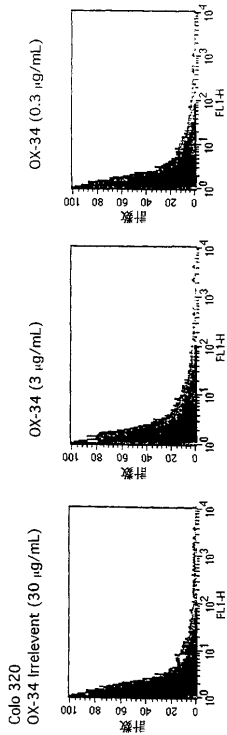


Figure 7

【 図 8 】

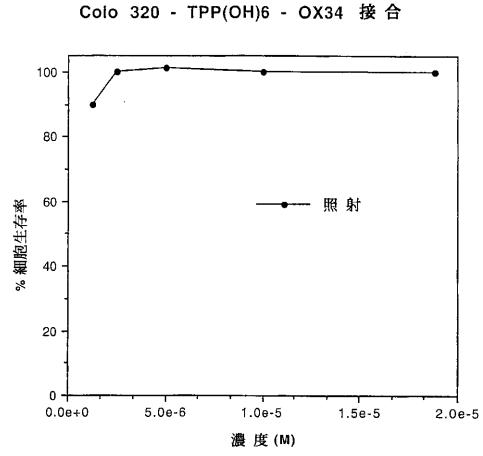


Figure 8

【 図 9 】

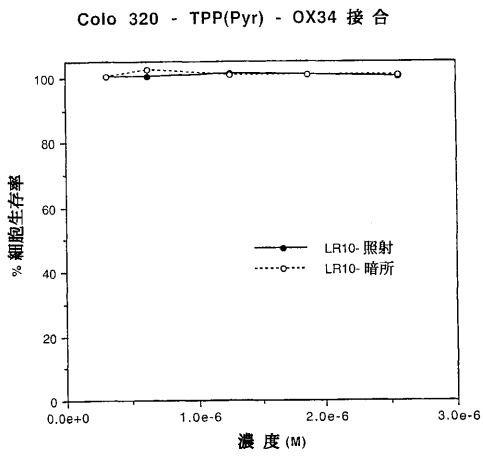


Figure 9

【 図 10 】

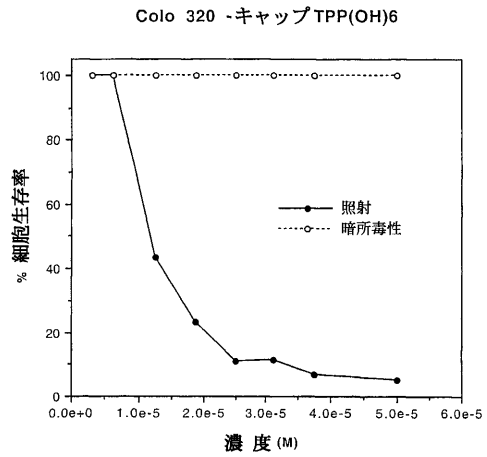


Figure 10

【 図 1 1 】

Colo 320 - TPP(Pyr) キャップ

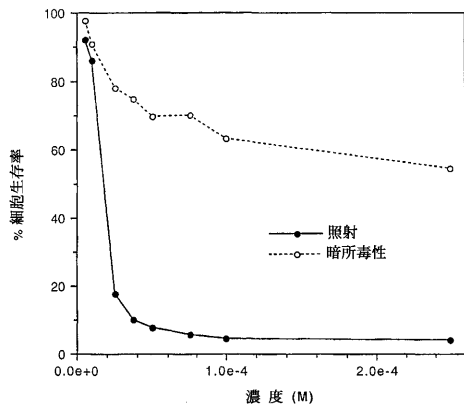


Figure 11

【 図 1 2 】

Colo 320 - TPP(OH)6 - 17-1A 接合

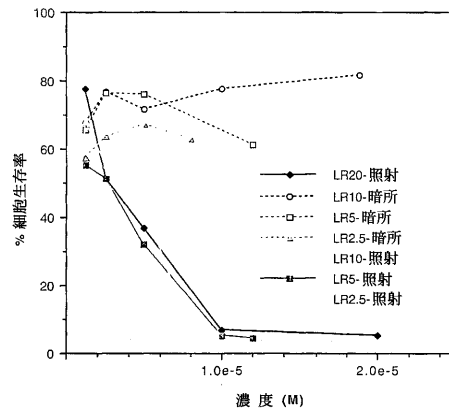


Figure 12

【 図 1 3 】

Colo 320 - TPP(Pyr) - 17-1A 接合

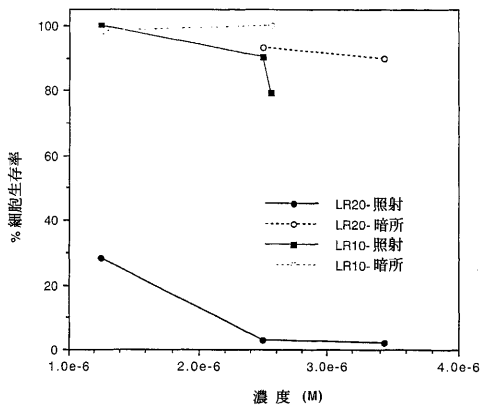


Figure 13

【 図 1 4 】

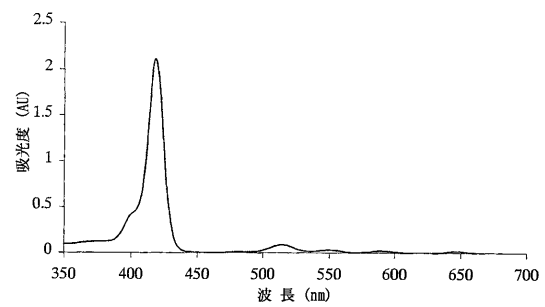


Figure 14

【 図 1 5 】

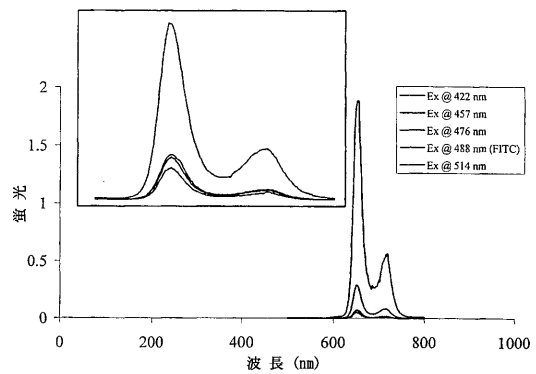


Figure 15

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00662 A1

- (51) International Patent Classification: C07D 487/22, C09K 9/02, A61K 31/40
Essex CO2 9EY (GB). GREENMAN, John [GB/GB]; 40 Churchill Avenue, Cottingham, East Yorkshire HU16 5NL (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02846
(74) Agents: CRUMP, Julian, Richard, John et al.; 11 Cleveland, 40-43 Chancery Lane, London WC2A 1JQ (GB).
- (22) International Filing Date: 26 June 2001 (26.06.2001)
- (25) Filing Language: English
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) Publication Language: English
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Priority Data:
60214.075 26 June 2000 (26.06.2000) US
0113784.3 6 June 2001 (06.06.2001) GB
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60214.075 (CIP)
Filed on 26 June 2000 (26.06.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): CATALYST BIOMEDICA LIMITED [GB/GB]; 183 Easton Road, London NW1 2BE (GB).
Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BOYLE, Ross, William [GB/GB]; 45 Burney Close, Beverley, East Yorkshire HU17 7EQ (GB). CLARKE, Oliver, James [GB/GB]; 5 George Odby Close, Keldgate, Beverley, East Yorkshire HU17 8HX (GB). SUTTON, Jonathan, Mark [GB/GB]; 1 Daniell Drive, Shrub End, Colchester.



WO 02/00662 A1

(54) Title: IMPROVEMENTS IN AND RELATING TO CHROMOPHORES

(57) Abstract: The present invention relates to novel porphyrin and porphyrin-based chromophores and sets of porphyrin and porphyrin-based chromophores, which may be particularly useful in a range of photodynamic applications, including photochemotherapy and fluorescence analysis and imaging. In particular, the present invention provides new and useful porphyrin, chlorin and bacteriochlorin chromophores; methods for the production of such chromophores; and methods for the use of such chromophores in analysis and in medicine.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

IMPROVEMENTS IN AND RELATING TO CHROMOPHORES

The present invention relates to novel porphyrin and porphyrin-based chromophores and sets of porphyrin and porphyrin-based chromophores, which may be particularly useful in a range of photodynamic applications, including photochemotherapy and fluorescence analysis and imaging.

The importance of porphyrin and porphyrin-based chromophores both as research tools, for example in fluorescence-activated cell sorting (FACS), and as therapeutic agents in photodynamic therapy (PDT) for bringing about the death of targeted cells in vivo, is widely recognised in the art. Each of these applications is dependent on the ability of the chromophore to be excited by incident light to a singlet excited state, and to decay to a lower energy state with the consequent emission of energy. This energy may be emitted in the form of fluorescent light at a specific wavelength, thereby enabling a cell or biostructure attached to the decaying chromophore to be visualised, and/or sorted by FACS. Alternatively, the energy of excitation may be dissipated by initial conversion of the singlet chromophore into the triplet excited state, followed by the transfer of energy to another triplet such as dioxygen, with the consequent formation of singlet oxygen. Singlet oxygen is a powerful cytotoxic agent, and hence where this latter process occurs in or in the immediate vicinity of a cell, it will usually result in the death of that cell. Accordingly, the chromophore can be exploited both for its fluorescent properties, and for its ability to act as a photosensitiser.

Evidently, for the purposes of fluorescence imaging or analysis, or PDT, some degree of control over the localisation of the chromophore in vitro or in vivo is a prerequisite. This is particularly important in photodynamic therapy, as the typical sphere of radiation of singlet oxygen produced by decay of a chromophore is no more than 0.1µm in diameter, so that in order to bring about the death of a target cell, the chromophore must usually be positioned immediately alongside, or preferably within, that cell.

Hitherto, however, few attempts have been made to control the targeting of porphyrin photosensitisers to particular target cells in vivo for the purposes of PDT. Instead, reliance has typically been placed on the inherent tendency of porphyrins to

WO 02/00662

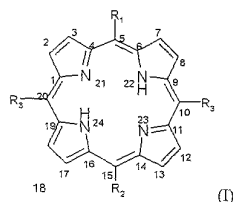
PCT/GB01/02846

accumulate in tumours in the absence of lymphatic drainage from tumour structures. Photofrin®, a photosensitising agent comprising a mixture of porphyrin structures derived from hematoporphyrin-LX by treatment with acids which is commercially used in the treatment of carcinomas and sarcomas, is, for example, conventionally administered systemically to patients without any targeting vehicle or means. This is evidently undesirable, as incorrect localisation of the photosensitiser will not only decrease the efficiency of the photochemotherapy, but may also result in the death of healthy cells.

Efforts have been made to achieve the specific attachment of chromophores to biological targets *in vitro*, in particular for the purposes of FACS and fluorescence imaging, by covalently conjugating the chromophores to suitable protein delivery molecules. This approach has however been subject to various problems. Firstly, the degree of background fluorescence caused by non-specific binding of porphyrin chromophores to cell surfaces has proved difficult to reduce. Secondly, it has been found that the attachment of a chromophore to a protein molecule can result in a significant degree of excited state quenching by the proximate protein, which will clearly reduce the efficacy of the chromophore as a marker or in targeted photodynamic applications.

A reduction in these effects remains a desirable objective.

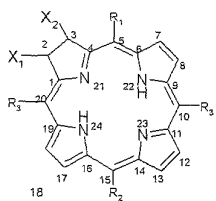
According to one aspect of the present invention therefore, there is provided a porphyrin chromophore of formula (I) below:



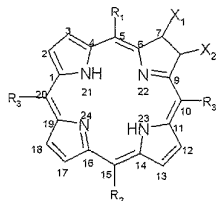
or a chlorin chromophore of any of formulas (II), (III), (IV), or (V) below:

WO 02/00662

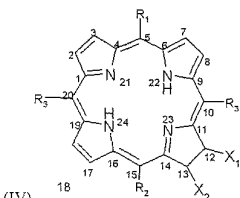
PCT/GB01/02846



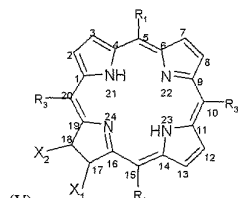
(II)



(III)

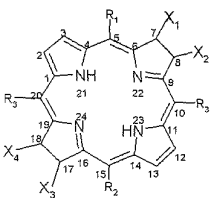


(IV)

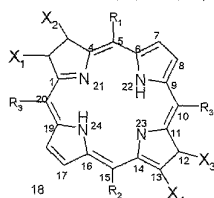


(V)

or a bacteriochlorin chromophore of any of formulas (VI) and (VII) below:



(VI)



(VII)

wherein R₁ is an aryl moiety which is linked to a conjugating group Z which is capable of conjugating the chromophore to a polypeptide molecule for delivering said chromophore to a specific biological target in vitro or in vivo; R₂ is a hydrophilic aryl moiety; R₃ is H or a hydrophilic aryl or hydrophilic non-aromatic moiety; and each of X₁,

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

X₂, X₃ and X₄ is independently selected from H, OH, halogen, C₁₋₃ alkyl and OC₁₋₃ alkyl, or X₁ and X₂ and/or X₃ and X₄ together form a bridging moiety selected from O, CH₂, CH C₁₋₃ alkyl, or C(C₁₋₃ alkyl)₂, such that X₁ and X₂ and/or X₃ and X₄ with the adjacent C-C bond form an epoxide or cyclopropanyl structure, wherein each of said R₁, R₂ and R₃ is optionally further substituted one or more times by -OH, -CN, -NO₂, halogen, -T or -OT, where T is a C₁-C₁₅ alkyl, cycloalkyl or aryl group or a hydroxylated, halogenated, sulphated, sulphonated or aminated derivative thereof or a carboxylic acid, ester, ether, polyether, amide, aldehyde or ketone derivative thereof.

It has been found that the inclusion of one or more hydrophilic substituents around the core of a chromophore in accordance with the invention results in enhanced solubility in basic buffer/DMSO or DMF co-solutions which are commonly used in protein bioconjugation. Increased hydrophilicity also produces a marked reduction in the tendency of the chromophore to bind non-covalently to proteins. Where the chromophore is to be conjugated to a targeting protein such as a monoclonal antibody for delivery to specific cells or tissues, for example for the purposes of PDT or FACS, a decrease in non-covalent binding between the chromophore and the protein will reduce the degree of non-specific transfer of chromophore to cell surfaces, which will substantially increase the accuracy of targeting the chromophore to the cells or tissue of interest.

Accordingly, according to yet another aspect of the present invention there is provided a method for separating a mixture which comprises one or more hydrophilic chromophores each having a hydrophilic or amphiphilic moiety, and a plurality of less hydrophilic substances and/or molecules, comprising the step of introducing said mixture to a hydrophobic eluting solvent, and passing said mixture and said eluting solvent over a hydrophilic or polar solid phase, such that said one or more chromophores are arrested on said solid phase whilst said substances and/or molecules are eluted or substantially eluted from said solid phase by said eluting solvent.

Said method may, for example, comprise chromatography on a Sephadex® (dextran) column, or reverse-phase HPLC. Typically, said mixture of less hydrophilic substances and/or molecules may comprise a mixture of cells and/or membranes. Advantageously, said one or more hydrophilic chromophores include one or more chromophores in accordance with the present invention.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

In some embodiments, each or some of X_1 - X_4 is H. In particularly preferred embodiments, however, each of X_1 - X_4 is OH. Accordingly, said chromophore may be a dihydroxychlorin of formula (II), (III), (IV) or (V) above or a tetrahydroxybacteriochlorin of formula (VI) or (VII) above. The hydrophilicity of dihydroxychlorins and tetrahydroxybacteriochlorins is found to be greater than that of the corresponding porphyrins, owing to the presence of extra hydrophilic hydroxy groups around the core of the chromophore.

Preferably, said aryl moiety R_1 may comprise a phenyl ring, which phenyl ring may preferably be linked by a single bond to the macrocyclic core of said chromophore or may alternatively be linked thereto by a C_{1-6} branched or linear alkyl chain. Advantageously, said conjugating group Z may be linked to said phenyl ring at the para ($4'$) position thereof.

Said conjugating group Z may comprise a group which is capable of bonding covalently to an amine group on a polypeptide molecule, such as an isocyanate, isothiocyanate, or NHS ester group. Advantageously, therefore, each of the meso substituents around said porphyrin, chlorin or bacteriochlorin should comprise no $-NH$ -, $-NH_2$ -, $-NH_2^+$ or $-NH_3^+$ groups which could become covalently bonded to said conjugating group Z. This will serve to reduce the probability of internal cross-linkage within said chromophore. Said conjugating group Z may alternatively comprise any other protein conjugating group, such as $-NH_2$ -, $-NH(C_{1-6} \text{ alkyl})$ -, maleamide, iodoacetamide, ketone or aldehyde. Methods for achieving the conjugation of such groups to protein molecules are known in the art.

In especially preferred embodiments, said conjugating group Z comprises an isothiocyanato group. Isothiocyanates react readily with lysine residues to produce a stable linkage to proteins, and hence are particularly suitable for bioconjugation of chromophores in accordance with the invention.

Said conjugating group Z may be linked directly to said aryl moiety R_1 by a single bond. Alternatively, said conjugating group Z may be linked to said aryl moiety R_1 by a linking moiety having a relatively high degree of inflexibility and/or steric hindrance. Said linking moiety may, for example, comprise a chain of fused or linked cycloalkyl and/or cycloaryl ring structures having a total molecular weight no greater than

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

1000 g mol^{-1} . In particular, said linking moiety may comprise an anthracene, acridine, anthranil, naphthyl or naphthalene moiety, or a polyacetylene, phenylacetylene, or polyphenylacetylene moiety. When said chromophore is conjugated by said conjugating group Z to a polypeptide molecule, therefore, said linking moiety can serve to keep the photoactive core of said chromophore apart from said polypeptide, thereby helping to reduce the degree of fluorescence quenching which may be caused by said polypeptide when said chromophore is caused to fluoresce. Said linking moiety may include a hydrophilic or amphiphilic moiety of the kind described above, such as a C₂-C₃₀ polyethylene glycol moiety. This will help to ensure that the hydrophilicity of the chromophore is not impaired by the presence of said linking moiety.

Optionally, said aryl moiety R₁ may be further substituted by one or more hydrophilic substituents, such as hydroxy, which will serve to improve the hydrophilicity of said chromophore.

Said hydrophilic aryl moiety R₂ may comprise a phenyl ring, which phenyl ring may be substituted one or more times, preferably at least two times, by one or more hydrophilic substituents which serve to increase the hydrophilicity of said aryl moiety R₂. Said phenyl ring may preferably be linked by a single bond to the macrocyclic core of said chromophore or may alternatively be linked thereto by a C₁₋₆ branched or linear alkyl chain. Alternatively, said hydrophilic aryl moiety R₂ may comprise a heteroaryl ring, such as a pyridyl or quaternised pyridyl (pyridiniumyl) ring, which heteroaryl ring may be substituted one or more times, preferably at least two times, by one or more hydrophilic substituents which serve to increase the hydrophilicity of said aryl moiety R₂. Said heteroaryl ring may preferably be linked by a single bond to the macrocyclic core of said chromophore or may alternatively be linked thereto by a C₁₋₆ branched or linear alkyl chain. Said one or more hydrophilic substituents may advantageously be selected from hydroxy; alkoxy such as methoxy or ethoxy; C₂-C₁₅ polyethylene glycol; quaternised pyridyl (pyridiniumyl) such as N-methylpyridiniumyl; mono-, di- or poly-saccharide; C₁₋₆ alkylsulfonate; a phosphonium group R₄P(R₅)(R₆)(R₇), wherein R₄ is a single bond or C₁₋₆ alkyl, and each of R₅, R₆ and R₇ is independently selected from hydrogen, an aryl ring such as a phenyl ring, a heteroaryl ring such as a pyridyl ring, and a C₁₋₆ alkyl chain, which aryl ring, heteroaryl ring or C₁₋₆ alkyl chain is unsubstituted or is substituted one or

WO 02/00662

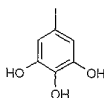
PCT/GB01/02846

more times by hydroxy, C₁₋₆ alkyl or alkoxy, aryl, oxo, halogen, nitro, amino or cyano; or a phosphate or phosphonate group R₈OP(O)(OR₉)(OR₁₀) or R₈P(O)(OR₉)(OR₁₀) respectively, wherein R₈ is a single bond or C₁₋₆ alkyl, and each of R₉ and R₁₀ is independently selected from hydrogen and C₁₋₆ alkyl. Preferably, each of said R₅, R₆ and R₇ may be the same, and may advantageously be unsubstituted phenyl. Suitably, said R₈ may be methyl. Advantageously, said R₉ and said R₁₀ may be the same, and/or may be methyl or ethyl.

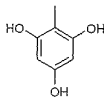
In especially preferred embodiments, said hydrophilic aryl moiety R₂ is selected from m,m-(dihydroxy)phenyl



or a PEGylated derivative thereof, m,m,p-(trihydroxy)phenyl

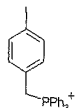


or a PEGylated derivative thereof, o,p,o-(trihydroxy)phenyl



or a PEGylated derivative thereof, m- or p-((C₁₋

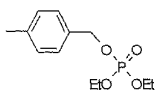
₆)alkyltriphenylphosphonium)phenyl such as p-(methyltriphenylphosphonium)phenyl



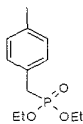
m- or p-(C₁₋₆alkylphosphono-di-alkoxy)phenyl such as p-methylphosphono-diethoxy)phenyl

WO 02/00662

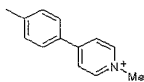
PCT/GB01/02846



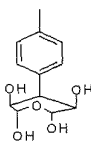
m- or p-(C₁₋₆alkylphosphonato-di-alkoxy)phenyl such as p-methylphosphonato-di-ethoxyphenyl



m- or p-(N-methyl-pyridiniumyl)phenyl



and meta- or para- sugar-substituted phenyl such as pentose- or hexose- or disaccharide-substituted phenyl



In other preferred embodiments, said hydrophilic aryl moiety R₂ comprises a quaternised pyridyl (pyridiniumyl) group such as a p-N-(C₁₋₆alkyl)pyridiniumyl group or m-N-(C₁₋₆alkyl)pyridiniumyl group. Quaternised pyridyl (pyridiniumyl) groups are highly hydrophilic and display advantageous properties when incorporated into chromophores in accordance with the invention. Particularly preferred groups in this regard are m- or p-N-(C₁₋₆alkyl)pyridiniumyl, such as m-N-methylpyridiniumyl

WO 02/00662

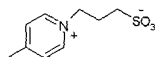
PCT/GB01/02846



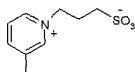
or p-N-methylpyridiniumyl



In other especially preferred embodiments, said quaternised pyridiniumyl group may comprise a zwitterionic group, such as p-N-(C₁₋₆alkylsulfonate)pyridiniumyl or m-N-(C₁₋₆alkylsulfonate)pyridiniumyl; in particular, p-N-(propylsulfonate)pyridiniumyl



or m-N-(propylsulfonate)pyridiniumyl



Preferably, the or each quaternised pyridiniumyl group R₂ may be associated with a halide counterion, such as an iodide counterion or, in most preferred embodiments, a chloride counterion.

In some advantageous embodiments, R₃ is H, such that said chromophore constitutes a 5,15-diaryl-porphyrin, -chlorin or -bacteriochlorin. In other advantageous embodiments, said R₃ is a hydrophilic aryl or non-aromatic moiety. For example, said R₃ may comprise a hydrophilic aryl moiety as defined above in relation to R₂. Said hydrophilic aryl moiety R₃ may be the same as said hydrophilic aryl moiety R₂, such that the chromophore possesses the same substituents at the 10, 15 and 20 positions thereof, or may be different from said hydrophilic aryl moiety R₂. Alternatively, said R₃ may comprise a hydrophilic alkyl moiety, such as a C₁₋₆ alkyl chain which is substituted one or more times by one or more hydrophilic substituents such as hydroxy or C₂₋₁₅ polyethylene

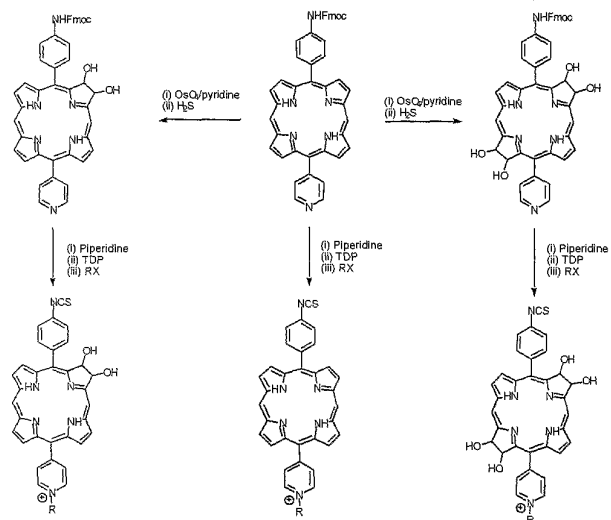
WO 02/00662

PCT/GB01/02846

glycol. In particularly preferred embodiments, said R₃ comprises polyhydroxy(C₁₋₆ alkyl), such as 1,2-dihydroxyethyl.

Chromophores in accordance with the invention wherein R₂ is the same as R₃ may be synthesised in accordance with methods known in the art, for example by acid catalysed condensation of benzaldehydes with pyrrole, or by means of the "MacDonald 2+2" method for synthesising porphyrins from dipyrromethanes (Arsenault et al, *J. Chem. Soc.* 1960, 82:4384-4389 – incorporated herein by reference).

A generalised scheme for the synthesis of 5-isothiocyanatophenyl-15-pyridinium porphyrins, chlorins and bacteriochlorins in accordance with the present invention is set out as Scheme 1 below, in which "RX" represents a quaternising group such as C₁₋₆ alkyl or a hydrophilic substituent as defined above in relation to formulas (I) to (VII):

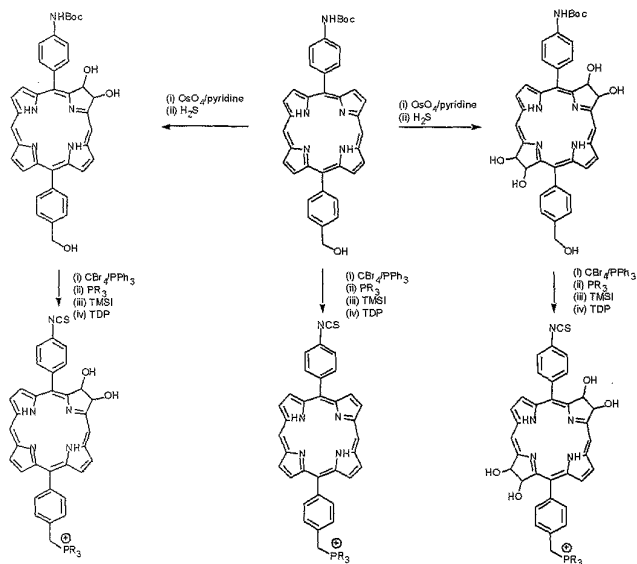


Scheme 1

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

A generalised scheme for the synthesis of 5-isothiocyanatophenyl-15-methylphosphoniumphenyl porphyrins, chlorins and bacteriochlorins in accordance with the present invention is set out as Scheme 2 below, wherein R represents hydrogen, C₁₋₆ alkyl, a heterocyclic group or an aromatic group :



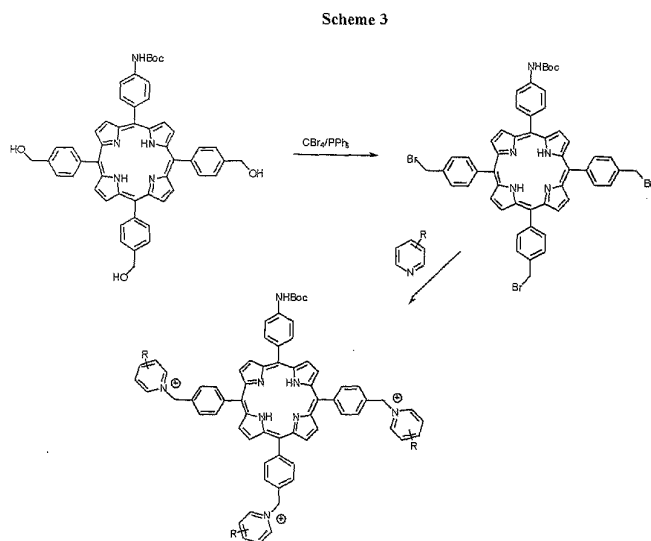
Scheme 2

Porphyrin, chlorin and bacteriochlorin chromophores in accordance with the present invention wherein said R₂ and optionally said R₃ comprises pyridiniumylphenyl may be synthesised in accordance with the generalised reaction scheme set out below as

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Scheme 3, wherein "R" represents hydrogen or one or more hydrophilic substituents as defined above in relation to formulas (I) to (VII):

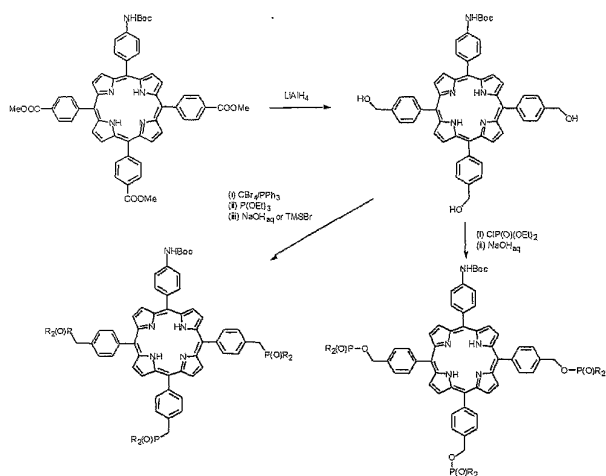


Porphyrin, chlorin and bacteriochlorin chromophores in accordance with the present invention wherein said R_2 and optionally said R_3 comprise alkylphosphonatophenyl or alkylphosphonophenyl may be synthesised in accordance

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

with the generalised reaction scheme set out below as Scheme 4, wherein "R" represents OH, ONa, or O(C₁₋₆ alkyl):



Scheme 4

In a further aspect of the invention, there is provided a novel method for the synthesis of a 5,10,15,20-tetra-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore having selected substituents at the 5, 10, 15 and 20 meso-positions thereof, comprising the steps of providing a 5,15-di-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore; attaching a leaving group Q to the 10 and 20 meso-positions of said chromophore, which leaving group Q is selected from halide and triflate; providing a coupling reagent (R₁O)(R₂O)BR₁₃, wherein R₁ and R₂ are independently selected from H or C₁₋₆ alkyl, or R₁₁ and R₁₂ together constitute a C₁₋₆ alkyl chain bridging said two O atoms, and R₁₃ is vinyl or aryl, such as a hydrophilic aryl moiety as

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

hereinbefore defined in relation to R_3 ; and reacting said chromophore with said coupling reagent in the presence of a base selected from potassium phosphate, sodium phosphate, caesium carbonate and barium hydroxide, and a Pd_0 catalyst; such that said R_{13} replaces said leaving group Q at the 10- and 20- meso positions of said chromophore.

Pd_0 -catalysed Suzuki coupling reactions using boronic acid or boronic ester reagents are known in the art, and are described for example in Miyaura & Suzuki, Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds, *Chem. Rev.* (1995) 95:2457-2483; the disclosure of which is incorporated herein by reference. Hitherto, however, attempts to carry out Suzuki-coupling at the meso-positions of porphyrins, chlorins or bacteriochlorins, as a means of importing selected substituents onto said meso-positions, have failed. The present inventors have found however that under the reaction conditions of the invention, Suzuki-coupling proceeds rapidly and successfully at the 10- and 20- meso-positions of the starting porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore. This method thereby enables convenient synthesis of tetra-meso-substituted porphyrins, chlorins or bacteriochlorins by Suzuki-coupling.

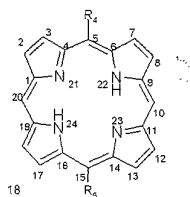
Said leaving group Q may be chloride, bromide, iodide or triflate (trifluoromethanesulfonate). Suitably, said leaving group Q may be bromide. Methods for the meso-bromination of di-meso-substituted porphyrins, chlorins or bacteriochlorins are known in the art. For example, said 5,15-di-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore may be halogenated at the 10- and 20- meso-positions thereof by way of reaction with halosuccinimide, such as bromosuccinimide.

Said coupling reagent may comprise a boronic ester or a boronic acid. In preferred embodiments, each of said R_{11} and R_{12} is H, such that said coupling reagent is a boronic acid.

Advantageously, said 5,15-di-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore is a chromophore in accordance with the invention, or a protected form thereof. Thus, said 5,15-di-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore may be selected from a porphyrin chromophore of formula (VIII) below:

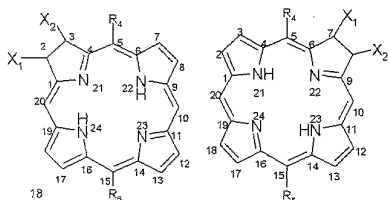
WO 02/00662

PCT/GB01/02846



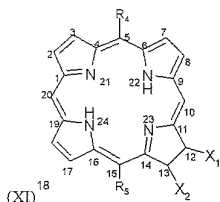
(VIII)

or a chlorin chromophore of any of formulas (IX), (X), (XI), and (XII) below:

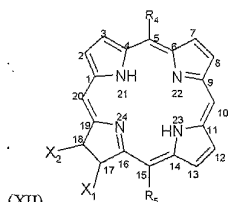


(IX)

(X)



(XI)

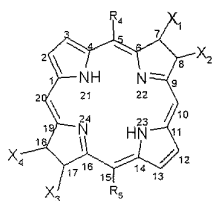


(XII)

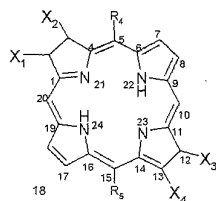
or a bacteriochlorin chromophore of any of formulas (XIII) and (XIV) below:

WO 02/00662

PCT/GB01/02846



(XIII)



(XIV)

wherein R_4 is a group R_1 as defined above in relation to formulas (I) to (VII) or a protected form thereof or a group convertible thereto; R_5 is a group R_2 as defined above in relation to formulas (I) to (VII) or a protected form thereof or a group convertible thereto; and each of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 is independently selected from H, OH, halogen, C_{1-3} alkyl and OC_{1-3} alkyl, or X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 together form a bridging moiety selected from O, CH_2 , CH , C_{1-3} alkyl, or $C(C_{1-3} \text{ alkyl})_2$, such that X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 with the adjacent C-C bond form an epoxide or cyclopropanyl structure.

Accordingly, where R_{13} is a hydrophilic aryl substituent as defined above in relation to R_3 , said 5,10,15,20-tetra-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore may also constitute a chromophore in accordance with the present invention.

Said Pd_0 catalyst may, for example, comprise $Pd(PPh_3)_4$, $PdCl_2(PPh_3)_2$, or $Pd(OAc)_2$. Advantageously, said Pd_0 catalyst may comprise $Pd(PPh_3)_4$.

Said coupling reaction is performed in a solvent, which may be selected from toluene or dry THF. It is found that the coupling reaction proceeds swiftly in dry THF, and so dry THF is preferred as solvent.

Optionally, where said R_{13} is vinyl, said 5,10,15,20-tetra-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore may be subjected following said coupling reaction to an osmylation reaction utilising OsO_4 , such as to convert said 10- and 20- vinyl substituents to hydroxyalkyl. Said osmylation reaction may be carried out under conditions identical to those suitable for converting a porphyrin to a di-beta-hydroxy-chlorin and then to a tetra-beta-hydroxy-bacteriochlorin. It is noted that this step

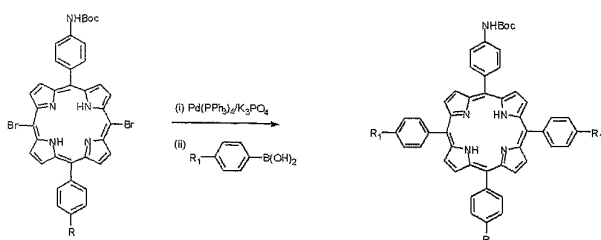
WO 02/00662

PCT/GB01/02846

may be performed in accordance with the invention on 5,10(vinyl),15,20(vinyl)-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophores which are obtained otherwise than in accordance with the method of the invention, such as by way of Pd-catalysed Stille coupling performed on said 5,15-di-meso-substituted chromophore in accordance with the method described in DiMugno et al, *J. Org. Chem.* 1993:58, 5983-5993. (incorporated herein by reference) wherein vinyl tributyl tin is used as a coupling reagent.

Where said tetra-meso-substituted chromophore is a porphyrin or a chlorin chromophore, said chromophore may be respectively converted to a chlorin or bacteriochlorin chromophore or to a bacteriochlorin chromophore in accordance with methods known to the man skilled in the art. For example, said porphyrin or chlorin chromophore may be osmylated by way of reaction with OsO_4 , such as to produce a di-beta-hydroxy-chlorin or a tetra-beta-hydroxy-bacteriochlorin.

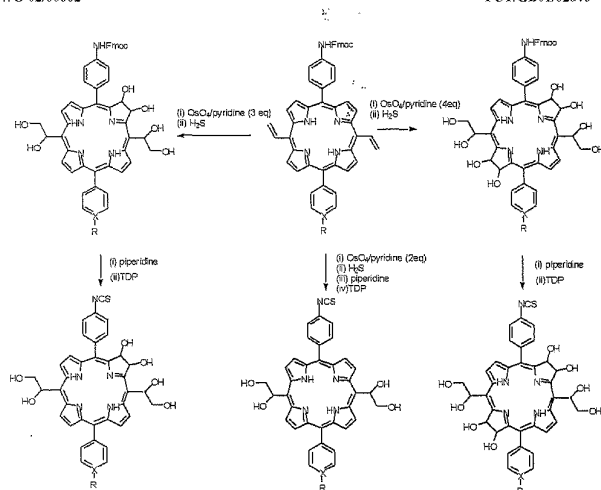
Generalised schemes for reactions in accordance with the present invention are set out in Schemes 5 and 6 below. In Scheme 5, "R" and "R₁" each represents one or more hydrophilic substituents as defined above in relation to R₂ and R₃ respectively. In Scheme 6, "R" represents one or more hydrophilic substituents as defined above in relation to R₂, and "X" represents a carbon or nitrogen atom.



Scheme 5

WO 02/00662

PCT/GB01/02846



Scheme 6

According to another aspect of the present invention, there is provided a 5,15-diphenylporphyrin, 5,15-diphenylchlorin or 5,15-diphenylbacteriochlorin chromophore, wherein each of the ortho-, meta-, and/or para- positions of each of the 5- and 15- phenyl groups is substituted by a substituent P₁-P₃ and Q₁-Q₃, respectively which is independently H or an inert substituent which in combination with the other substituents P₁-P₃ and Q₁-Q₃ does not substantially impair the fluorescent properties of the chromophore; and the chromophore further comprises a conjugating group Z which is capable of conjugating the chromophore to a polypeptide molecule for delivering said chromophore to a specific biological target in vitro or in vivo.

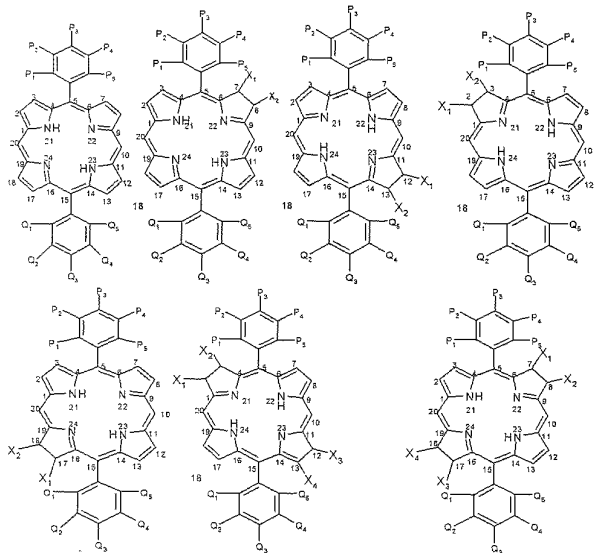
Such chromophores are novel, and are each capable on excitation of emitting fluorescent light at different and substantially non-overlapping wavelengths. As indicated above, the provision of conjugating group Z enables a chromophore in accordance with the invention to be specifically targetted to a specific biological target, thus facilitating

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

control over the localisation of the chromophore *in vitro* or *in vivo*. Chromophores in accordance with the invention may therefore be usefully employed in fluorescence analysis and imaging applications (including FACS), or in PDT.

Advantageously, said fluorochrome is selected from the following compounds:



wherein each of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 are as defined above in relation to the first aspect of the invention. Optionally, said chromophore may be further substituted at one or more of the 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 or 18 positions thereof by a C_{1-3} alkyl substituent.

In the foregoing chemical structures, Z has been omitted for clarity. However, said Z substituent may be attached to any of the 1-4, 6-14, or 16-20 positions of each chromophore, or may be one of the substituents P_1 - P_5 or Q_1 - Q_5 , or may be attached to one of the 5- or 15- phenyl groups through one of said substituents P_1 - P_5 or Q_1 - Q_5 .

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

In some embodiments, each of P₁-P₅ is the same or substantially the same as the corresponding one of Q₁-Q₅, such that said two primary phenyl rings are symmetrically substituted. In other embodiments, one or more of P₁-P₅ is not the same as the corresponding one of Q₁-Q₅, such that said two primary phenyl rings are not symmetrically substituted. In particular, all of P₁-P₅ and/or all of Q₁-Q₅ may comprise H, such that one or both of said two primary phenyl rings is or are unsubstituted.

Advantageously, said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ collectively provide a degree of steric hindrance around the core of said chromophore which is sufficient to reduce the rate of spontaneous oxidation of said chromophore, such that said chromophore is substantially inert in air, but which does not to a substantial extent inhibit selective addition or substitution at the 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 or 18 positions around the core of said chromophore. Thus, each of P₁, P₅, Q₁ and Q₅ may be H. Typically, the total cumulative molecular weight of said substituents P₁-P₅ does not exceed 1000g^{mol}⁻¹, and the total cumulative molecular weight of said substituents Q₁-Q₅ does not exceed 1000g^{mol}⁻¹.

One or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ may comprise -OH, -CN, -NO₂, halogen, -T or -OT, where T is a C₁-C₁₅ alkyl, cycloalkyl or aryl group or a hydroxylated, halogenated, sulphated or aminated derivative thereof or a carboxylic acid, ester, ether, polyether, amide, aldehyde or ketone derivative thereof. One or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ may additionally or alternatively comprise a C₃-C₁₂ cycloalkyl and/or aryl ring structures, or between two and six, preferably two - three, fused or linked C₃-C₁₂ cycloalkyl and/or aryl ring structures, each of which ring structures may optionally comprise one or more N, O or S atoms. In particular, one or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ may comprise a quaternised amine or pyridyl group, such as an N-methyl pyridyl (pyridiniumyl) group.

Preferably, one of P₁-P₅ and Q₁-Q₅ is a conjugating substituent which comprises said conjugating group Z. In particularly preferred embodiments, said conjugating substituent is P₃ or Q₃, such that said conjugating group Z is provided on the para-position of one of the two primary phenyl rings.

Suitably, said conjugating group is as defined above in relation to the first aspect of the invention.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

In particular, one or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅, not being said conjugating substituent, may consist of a member independently selected from the group consisting of A₁Z₁A₁₄; wherein Z₁ is Z₂, Z₂A₅ or Z₂A₅A₆; A₁ and A₅ are independently selected from -(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)Y'(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n⁻, -NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n⁻, -NA₄(CA₂A₃)_n⁻, -YC(Y')(CA₂A₃)_n⁻ and -Y(CA₂A₃)_n⁻; n = 0 - 6; Y and Y' are independently O or S; A₂, A₃ and A₄ are independently H or C₁₋₂ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₆ = -(C₂H₄O)_m⁻ or -S(O)_p; m = 1 - 12; p = 0 - 2; Z₂ is a single bond or Z₃; Z₃ is selected from Z₄, Z₅ and Z₆, wherein Z₃ is unsubstituted or substituted one or more times by OH, halo, CN, NO₂, A₁A₁₀, A₆A₈, NA₁₀A₁₁, C(Y)A₇, C(Y)Y'A₇, Y(CH₂)_qY'A₇, Y(CH₂)_qA₇, C(Y)NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')A₉, NA₁₀C(Y)NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)A₁₁, NA₁₀C(Y)Y'A₉, NA₁₀C(Y)Z₆, C(NA₁₀)NA₁₀A₁₁, C(NCN)NA₁₀A₁₁, C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)NA₁₀A₁₁, NA₁₀S(O)₂A₉, S(O)_rA₉, NA₁₀C(Y)C(Y')NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)C(Y')A₁₀ or Z₆; q = 0, 1 or 2; r = 0 - 2; A₇ is independently selected from H and A₉; A₈ is O or A₉; A₉ is C₁₋₄ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₁₀ is OA₉ or A₁₁; A₁₁ is A₇ or when A₁₀ and A₁₁ are as NA₁₀A₁₁ they may together with the nitrogen form a 5 to 7 membered ring comprising only carbon atoms or carbon atoms and at least one heteroatom selected from O, N and S; Z₄ is C₆₋₁₂ aryl or aryloxyC₁₋₃alkyl; Z₅ is selected from furanyl, tetrahydrofuranyl, indanyl, indenyl, tetrahydropyranyl, pyranal, thiopyranal, tetrahydrothiopyranal, tetrahydrothienyl, thienyl, C₃₋₈ cycloalkyl or C₄₋₈ cycloalkyl containing one or two unsaturated bonds, and C₇₋₁₁ polycycloalkyl; Z₆ is selected from N-azolyl, dioxadiazinyl, dioxadiazolyl, dioxanyl, 2-N-dioxatriazinyl, dioxazinyl, N-dioxazolyl, dioxolyl, dithiadiazinyl, dithiadiazolyl, N-dithiatiazinyl, dithiazinyl, N-dithiazolyl, 1-N-imidazolyl, N-morpholinyl, pyrrollyl, tetrazolyl, thiazolyl, triazolyl, oxazinyl, oxazolyl, naphthydrinyl, oxadiazinyl, oxadiazolyl, oxatetrazinyl, oxatriazinyl, oxatriazolyl, oxazinyl, oxazolyl, pentazinyl, phthalazinyl, N-piperidinyl,

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

N,N-piperaziny, 1-N-pyrazoly, pyridaziny, pyridiny, pyrimidiny, tetrathiaziny, tetraziny, 1-N-tetrazoly, tetrazoziny, thiadiaziny, thiadiazoyl, thiatetraziny, thiatriaziny, thiatriazolyl, thiazoly, triaziny, 1-N-triazoly, trioxadaziny, trioxanyl, trioxaziny, trioxazolyl, trithiadiaziny, trithiaziny, trithiadiazolyl; wherein Z₄, Z₅ or Z₆ may be fused to one or more other members selected independently from Z₄, Z₅ and Z₆; A₁₄ is hydrogen, methyl, hydroxyl, aryl, halo substituted aryl, aryloxyC₁₋₃ alkyl, halo substituted aryloxyC₁₋₃ alkyl, indanyl, indenyl, C₇₋₁₁ polycycloalkyl, tetrahydrofuranly, furanyl, tetrahydropyranly, pyranly, tetrahydrothienyl, thienyl, tetrahydrothiopyranly, thiopyranly, C₃₋₆ cycloalkyl, or a C₄₋₆ cycloalkyl containing one or two unsaturated bonds, wherein the cycloalkyl or heterocyclic moiety is unsubstituted or substituted by 1 to 3 methyl groups, one ethyl group, or a hydroxyl group.

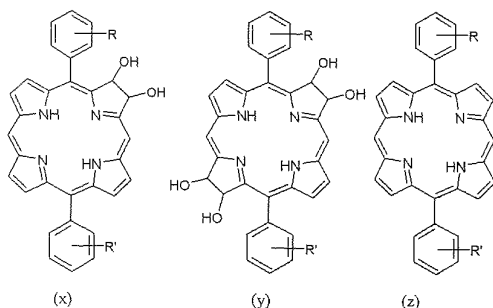
Said conjugating substituent may consist of a member selected from the group consisting of A₁Z₁Z, wherein Z₁ is Z₂, Z₂A₅ or Z₂A₅A₆; A₁ and A₅ are independently selected from -(CA₂A₃)_n-, -C(Y)(CA₂A₃)_n-, -C(Y)Y'(CA₂A₃)_n-, -C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n-, -NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n-, -NA₄(CA₂A₃)_n-, -YC(Y')(CA₂A₃)_n- and -Y(CA₂A₃)_n-; n = 0 - 6; Y and Y' are independently O or S; A₂, A₃ and A₄ are independently H or C₁₋₂ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₆ = -(C₂H₄O)_m- or -S(O)_p; m = 1 - 12; p = 0 - 2; Z₂ is a single bond or Z₃; Z₃ is selected from Z₄, Z₅ and Z₆, wherein Z₃ is unsubstituted or substituted one or more times by OH, halo, CN, NO₂, A₁A₁₀, A₆A₈, NA₁₀A₁₁, C(Y)A₇, C(Y)Y'A₇, Y(CH₂)_qY'A₇, Y(CH₂)_qA₇, C(Y)NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')A₉, NA₁₀C(Y)NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)A₁₁, NA₁₀C(Y)Y'A₉, NA₁₀C(Y)Z₆, C(NA₁₀)NA₁₀A₁₁, C(NCN)NA₁₀A₁₁, C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)NA₁₀A₁₁, NA₁₀S(O)₂A₉, S(O)_rA₉, NA₁₀C(Y)C(Y')NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)C(Y')A₁₀ or Z₆; q = 0, 1 or 2; r = 0 - 2; A₇ is independently selected from H and A₉; A₈ is O or A₉; A₉ is C₁₋₄ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₁₀ is OA₉ or A₁₁; A₁₁ is A₇ or when A₁₀ and A₁₁ are as NA₁₀A₁₁ they may together with the nitrogen form a 5 to 7

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

membered ring comprising only carbon atoms or carbon atoms and at least one heteroatom selected from O, N and S; Z₄ is C₆₋₁₂ aryl or aryloxyC₁₋₃alkyl; Z₅ is selected from furanyl, tetrahydrofuranyl, indanyl, indenyl, tetrahydropyranyl, pyranyl, thiopyranyl, tetrahydrothiopyranyl, tetrahydrothienyl, thienyl, C₃₋₈ cycloalkyl or C₄₋₈ cycloalkyl containing one or two unsaturated bonds, and C₇₋₁₁ polycycloalkyl; Z₆ is selected from N-azolyl, dioxadiazinyl, dioxadiazolyl, dioxanyl, 2-N-dioxatriazinyl, dioxazinyl, N-dioxazolyl, dioxolyl, dithiadiazinyl, dithiadiazolyl, N-dithiatriazinyl, dithiazinyl, N-dithiazolyl, 1-N-imidazolyl, N-morpholinyl, pyrrollyl, tetrazolyl, thiazolyl, triazolyl, oxazinyl, oxazolyl, naphthydrinyl, oxadiazinyl, oxadiazolyl, oxatetrazinyl, oxatriazinyl, oxatriazolyl, oxazinyl, oxazolyl, pentazinyl, phthalazinyl, N-piperidinyl, N,N-piperazinyl, 1-N-pyrazolyl, pyridazinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, tetrathiazinyl, tetrazinyl, 1-N-tetrazolyl, tetrazolyl, thiadiazinyl, thiadiazolyl, thiatetrazinyl, thiatriazinyl, thiatriazolyl, thiazolyl, triazinyl, 1-N-triazolyl, trixadazinyl, trioxanyl, trioxazinyl, trioxazolyl, trithiadiazinyl, trithiazinyl, trithiadiazolyl; wherein Z₄, Z₅ or Z₆ may be fused to one or more other members selected independently from Z₄, Z₅ and Z₆.

In particular embodiments of the present invention, said chromophore may comprise a chromophore having a structure set out as (x), (y) or (z) below:



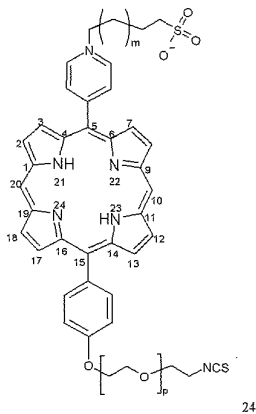
WO 02/00662

PCT/GB01/02846

wherein R and R' may be any of the following combinations:

R	R'
4-H	4-NCS
4-Me	4-NCS
4-Br	4-NCS
4-CO ₂ Me	4-NCS
3,4,5-tris(OMe)	4-NCS
4-NCS	4-OMe
4-NCS	4-Me
4-NCS	4-CO ₂ Me
4-NCS	4-Br
4-NCS	4-CN
4-NCS	4-CO ₂ Me

In another embodiment of the present invention, said chromophore may comprise a porphyrin chromophore having the structure set out below:



WO 02/00662

PCT/GB01/02846

wherein $m = 0-6$; $p = 0-15$, preferably $0-5$; or the corresponding chlorin or bacteriochlorin chromophore.

According to another aspect of the present invention, there is provided a set of fluorochromic markers for multicolour fluorochromic analysis, comprising at least two chromophores selected from the group consisting of a porphyrin chromophore, a chlorin chromophore and a bacteriochlorin chromophore, each of which chromophores comprises the same porphyrin skeleton, each of which chromophores comprises one or more substituents on said porphyrin skeleton, one of which substituents is a conjugating substituent L comprising a conjugating group Z, wherein Z is a conjugating group capable of conjugating each of said chromophores to a polypeptide molecule for delivering each chromophore to one of a plurality of different specific biological targets.

Preferably, each of the other of said substituents on the skeleton is independently H or an inert substituent R which together with said conjugating substituent L and all of the other core substituents does not substantially impair the fluorescent properties of each chromophore.

It has been found that each of the chromophores in a set in accordance with the present invention, on excitation, will emit fluorescent light at a different discrete wavelength. Thus, all of the chromophores within the set can be excited by a single laser, producing separate emission bands which can be substantially individually resolved. Moreover, all of the chromophores provided in said set share substantially the same molecular structure, and will accordingly share substantially the same biochemical and physicochemical properties, including substantially the same degree of efficiency of bioconjugation to a biological target under given conditions. Accordingly, a set of chromophores in accordance with the present invention may be usefully employed in fluorescence analysis and sorting applications, including FACS, for the convenient sorting and analysis of several types of cells or other biological targets. The components of such a set may, for example, be introduced to a mixture comprising one or more of said different specific biological targets, under conditions which will allow the delivery of each chromophore to its respective specific biological target; and said mixture may be exposed to light so as to cause said chromophores to fluoresce. A multicolour analysis may then be carried out for identifying the different emission bands produced by each

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

chromophore, thereby permitting counting and visualisation of the location of each of the different biological targets.

Said set of chromophores may in particular comprise two or more of a porphyrin chromophore in accordance with any aspect of the present invention, the corresponding chlorin chromophore, and the corresponding bacteriochlorin chromophore. (By "corresponding" herein is meant having the same meso-substituents around the macrocyclic core of the molecule).

In a chromophore in accordance with the present invention, or in each member of a chromophore set in accordance with the present invention, said conjugating group Z may be conjugated to a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target. Alternatively, said conjugating group Z may be conjugated to a bridging polypeptide which is adapted to bind to a complementary bridging polypeptide so as to couple said chromophore to said complementary bridging polypeptide.

In some embodiments, said bridging polypeptide may be bound to said complementary bridging polypeptide, and said complementary bridging polypeptide may comprise or be coupled to or fused with a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target. Accordingly, said chromophore may be covalently linked to said binding protein by means of said bridging polypeptide and said complementary bridging polypeptide.

According to another aspect of the present invention, there is provided a kit comprising a chromophore in accordance with the present invention or a set of chromophores in accordance with the present invention, wherein said chromophore or each chromophore is conjugated to a bridging polypeptide that is adapted to bind to a complementary bridging polypeptide so as to couple the chromophore to said complementary bridging polypeptide; and a construct or plurality of constructs each of which comprises said complementary bridging polypeptide fused or coupled to a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target; the arrangement being such that said chromophore or each chromophore in the kit is adapted to bind to a different construct in the kit with specificity for said specific biological target, so as to link said or each chromophore to a binding protein with specificity for said specific biological target.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Said binding protein may, for example, be an antibody such as a monoclonal or polyclonal antibody or a fragment thereof with specificity for a target specific molecule on the surface of said biological target. In particular, said antibody may be a phage antibody, that is an antibody expressed on the surface of a bacteriophage. Alternatively said binding protein may be a protein which is adapted to bind to one or more cell surface molecules or receptors, such as a serum albumin protein. As yet a further alternative, said binding protein may comprise a low density lipoprotein, such as a fatty acid chain, which is adapted for insertion into a cell membrane. When conjugated to a chromophore, such a lipoprotein can serve to anchor the chromophore to a cell membrane.

Said bridging polypeptide may comprise calmodulin, and said complementary bridging polypeptide may comprise calmodulin binding peptide; or vice versa. Preferably, however, said bridging polypeptide may comprise avidin or streptavidin, and said complementary bridging polypeptide may comprise biotin; or vice versa. In particular, said or each chromophore in a kit in accordance with the present invention may be conjugated to avidin, and said or each construct may comprise a biotinylated monoclonal antibody with specificity for a target specific molecule on the surface of said biological target. Accordingly, when said avidin-linked chromophore is allowed to bind said biotinylated antibody, said chromophore will become firmly linked to said antibody. Conveniently, said or each biotinylated monoclonal antibody in the kit may be selected and/or readily substituted, so as to enable said or each chromophore to be delivered to any desired biological target. Methods for the preparation of monoclonal antibodies and for the biotinylation thereof are well known in the art.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method for attaching a chromophore in accordance with the invention or a set of chromophores in accordance with the invention to said specific biological target or targets; comprising the steps of providing a kit in accordance with the present invention, and introducing the components of said kit into the vicinity of said specific biological target or targets, under conditions suitable for enabling the binding of said or each binding protein to said specific biological target or targets. Advantageously, the components of said kit may be allowed to associate with one another prior to introduction to said target or targets, so as to enable the bridging polypeptide conjugated to said or each chromophore to bind to a

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

complementary bridging polypeptide provided on one of said constructs in the kit. This will ensure that said or each chromophore in the kit is linked to a binding protein prior to introduction of said chromophore to said target or targets. Alternatively, the components of said kit may be introduced sequentially to said target or targets.

Typically, said specific biological target may be a cell or a membrane. Said specific biological target may be in vivo or in vitro (ex vivo). Said biological target may, for example, be a cancer cell, a tumour cell, a cell infected with HIV or with any other microbe or virus, a cell responsible for detrimental activity in auto-immune disease, a foreign or diseased cell, or any other such cell.

In some embodiments of the present invention, said biological target is a cell in vitro, and said target specific molecule comprises a molecule exposed on the surface of said cell, such as a polypeptide, carbohydrate, fatty acid, lipoprotein, phospholipid or other biological molecule. Preferably, said target specific molecule is specifically expressed by, or is over-expressed by, said cell. Said target specific molecule may, for example, be a T cell marker such as CD4 or CD8. Accordingly, when a chromophore in accordance with the present invention or a chromophore forming part of a set of chromophores in accordance with the present invention is attached to said cell, and said cell is illuminated so as to cause fluorescence of said chromophore, the fluorescence of the chromophore will enable said cell to be visualised and counted and/or sorted by FACS.

According to a further aspect of the present invention, therefore, there is provided a method for fluorescence-activated sorting of target cells from a mixture of cells, comprising the step of attaching to said target cells a chromophore in accordance with the invention or a set of chromophores in accordance with the invention, illuminating said mixture of cells so as to cause fluorescence of one or more of said chromophores attached to said target cells, imparting a charge to the fluorescing cells, and passing said mixture of cells through a polarised environment so as to cause or allow said charged cells to be separated from said mixture.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method for the visualisation and/or counting of a plurality of target cells, said target cells including cells of two or three different cell types, comprising the steps of providing a

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

chromophore set in accordance with the present invention, which chromophore set comprises two or three chromophores each of which is adapted to be delivered to a different one of said cell types; attaching said chromophores in the set to said target cells in accordance with the method of the present invention; illuminating said target cells so as to cause the emission of fluorescence by said chromophores; detecting the fluorescent emission bands produced by each of said chromophores; and optionally measuring for each of said bands the area under an emission/wavelength curve, so as to obtain a measure of the number of fluorescent cells of each respective cell type.

In other embodiments of the present invention, said target cell is a cell in vivo, such as a cancer cell, tumour cell, or an infected, foreign or diseased cell, and said target specific molecule is a target cell specific molecule which is specifically expressed by, or is over-expressed by, or is attached to, and is exposed on, the surface of said target cell, such as a target cell specific membrane protein. Accordingly, when a chromophore in accordance with the invention is delivered to said target specific molecule, said chromophore will be caused to be attached to said cell. If said cell is subsequently illuminated with light at a wavelength suitable for causing the excitation of said chromophore, said chromophore attached to said cell may be caused to be excited, and this may result in the production of singlet oxygen in the immediate vicinity of said cell, hence bringing about the death of the cell.

In especially preferred embodiments, said target cell specific molecule comprises an internalisation receptor on the surface of said cell, which internalisation receptor is capable of binding said binding protein and thereby mediating the internalisation of said chromophore within said cell. Accordingly, subsequent illumination of said cell with light at a wavelength suitable for causing excitation of said chromophore may result in the production of singlet oxygen within said cell, hence bringing about the death of said cell.

The present invention therefore comprehends a method for causing the death of a target cell, comprising the step of attaching a chromophore in accordance with the present invention to said cell and illuminating said cell so as to cause the production of singlet oxygen in the vicinity of said cell, thereby causing the death of the cell. Preferably, said chromophore is attached to an internalisation receptor on the surface of said cell, which

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

internalisation receptor is capable of mediating the internalisation of said chromophore within said cell, and said cell is thereafter illuminated such as to cause the production of singlet oxygen within said cell, thereby causing the death of the cell.

Preferably, where said chromophore is adapted to be internalised within the cell, said chromophore comprises a cationic group such as a quaternised amine or pyridyl (pyridiniumyl) group, or a phosphonium group, so as to promote the intracellular accumulation of said chromophore around the mitochondria of the cell, owing to the net negative charge on the mitochondrial membrane. This will result in the rapid and efficient killing of the cell, on production of singlet oxygen by decay of the chromophore.

In accordance with another aspect of the invention, there is provided a method for treating a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesired cells, such as tumours, cancers, viral infections such as HIV infection, or autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis, comprising the step of administering to a patient in need thereof an effective amount of a chromophore in accordance with the invention, which chromophore is adapted to be targeted to a target cell specific molecule on the surface of said diseased or undesired cells for attachment thereto, such that the chromophore is caused to be attached to said cells, and illuminating said cells with light so as to cause the production of singlet oxygen in the vicinity of said cells, thereby killing said cells. Suitably, said target cell specific molecule comprises an internalisation receptor, and said chromophore is adapted to be internalised within said cells on delivery to said internalisation receptor, such as to enable the production of singlet oxygen within said cells on illumination thereof.

Said chromophore may be administered topically or systemically to said patient. For example, said chromophore may be administered by injection.

In accordance with yet another aspect of the invention, there is provided a pharmaceutical composition for administration to a patient for the treatment of a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesired cells, such as tumours, cancers, viral infections such as HIV infection, or autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis, which composition comprises a chromophore in accordance with the present invention that is adapted to be delivered to said diseased or undesired cells, and a suitable carrier.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Yet another aspect of the invention envisages a chromophore in accordance with the invention for use in the production of a medicament, for use in the treatment of patients suffering from a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesirable cells, such as tumours, cancers, viral infections including HIV infection, and autoimmune disorders including rheumatoid arthritis or multiple sclerosis; said chromophore being adapted for delivery to said diseased or undesired cells.

Detailed Description of Examples of the Invention

Following are descriptions and examples, by way of illustration only, of embodiments of the invention and methods for putting the invention into effect.

Synthesis of Chromophores

Instrumentation and materials

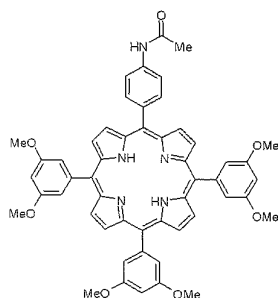
Melting points are uncorrected. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR spectra were recorded on Jeol JNM EX270 FT-NMR spectrometer, and are referenced to tetramethylsilane unless otherwise stated. I.R. spectra were obtained using a series 1600 FT-IR and nominal mass spectra were obtained by Kratos Kompact MALDI II spectrometer. Accurate mass were obtained from EPSRC Mass Spectrometry Service, Swansea. The electronic spectra were obtained using Unicam UV-2 or UV-4 spectrometers and were taken in DCM unless otherwise stated. All reagents and solvents were commercially available and of reagent grade or higher, and were, unless otherwise specified, used as received. TLC analysis were performed on Merck silica-gel 60 plates (F254, 500 μm thickness). Merck Silica-Gel 60 (230-400 mesh) was used for flash chromatographic purification.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Descriptions

(1) 5-(4-Acetamidophenyl)-10,15,20-tris(3,5-dimethoxyphenyl)porphyrin

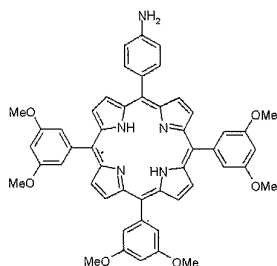


4-Acetamidobenzaldehyde (3.36 g, 0.02 mol) and 3,5-dimethoxybenzaldehyde (10 mL, 0.06 mol) were stirred in propionic acid (300 mL) at 90 °C. Pyrrole (5.5 mL, 0.08 mol) was added and the mixture stirred under reflux for 30 min. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a dark purple solid. The crude mixture of porphyrin isomers was purified by flash chromatography (silica, eluent: CH₂Cl₂/EtOAc, 4:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield 1 as a purple solid (1.55 g, 9.1%); *R_f* = 0.50 (silica, CH₂Cl₂/EtOAc, 4:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.96 (2H, br s, NH), 2.23 (3H, s, NHCOCH₃), 3.93 (18H, s, 3, 5-OCH₃), 6.99 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.07 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.38 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2,6-H), 7.44 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.86-8.93 (8H, m, β-H), 10.42 (1H, br s, NHCOCH₃); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 20.4, 23.9, 103.9, 113.5, 117.3, 119, 119.4, 119.6, 120, 129, 131.1, 131.3, 131.4, 131.8, 134.5, 135.6, 136.8, 139.3, 143.1, 158.6, 160.3, 167.9, 168.7; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 421, 515, 551, 590, 650 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 852 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(2) 5-(4-Aminophenyl)-10,15,20-tris(3,5-dimethoxyphenyl)porphyrin

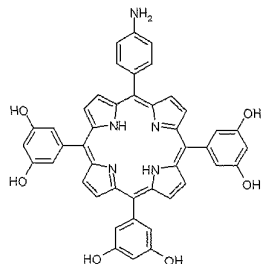


Porphyrin 1 (500 mg, 0.587 mmol) was dissolved in 18% HCl (100 mL) and the solution heated for 2 hours under reflux. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a crude green solid. The solid was redissolved in a 9:1 mixture of dichloromethane/triethylamine (200 mL) and stirred for 10 min at room temperature. The solution was then washed with water (3 × 200 mL) and brine (200 mL), the organic layer separated and dried (Na₂SO₄). Excess solvent was evaporated *in vacuo* and the crude purple solid purified by flash chromatography (silica, eluent: CH₂Cl₂/EtOAc, 4:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield 2 as a purple solid (426 mg, 89.7%); *R_f* = 0.89 (silica, CH₂Cl₂/EtOAc, 4:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.80 (2H, br s, NH), 3.96 (18H, s, 3, 5-OCH₃), 6.90 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.06 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.40 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2,6-H), 7.98 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.93 (8H, m, β-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 20.13, 100.6, 113.9, 114.3, 115.7, 119.8, 120.1, 121.4, 130.2, 131.4, 132.7, 136.1, 144.5, 144.6, 146.5, 159.3; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 422, 517, 553, 593, 651 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 809 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(3) 5-(4-Aminophenyl)-10,15,20-tris(3,5-dihydroxyphenyl)porphyrin

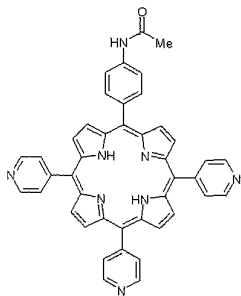


To a stirred solution of **2** (1 g, 1.23 mmol) in freshly distilled chloroform (50 mL) was added boron tribromide (1.17 mL, 0.012 mol). The reaction was allowed to proceed under argon for 17 hours at room temperature. The reaction was subsequently cooled to 0 °C, water (20 mL) added and the solution stirred for a further 60 min. The reaction was evaporated to dryness *in vacuo* and redissolved in a 9:1 mixture of chloroform/triethylamine (500 mL). The solution was washed with water (3 × 500 mL) and brine (500 mL), the organic layer separated, dried (Na₂SO₄), and evaporated *in vacuo* to yield a crude purple solid. The crude solid was purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 9:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield **3** as a purple solid (667 mg, 74.5%); *R_f* = 0.19 (silica, CHCl₃/MeOH, 9:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, (CD₃)₂SO] δ -2.95 (2H, br s, NH), 5.56 (2H, br s, NH₂), 6.69 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.02 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.06 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2,6-H), 7.87 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.94 (8H, s, β-H), 9.75 (6H, br s, 3, 5-OH); ¹³C NMR [67.5 MHz, (CD₃)₂SO] δ 102.3, 112.5, 113.9, 114.1, 119.2, 119.7, 121.5, 127.5, 128.3, 130.7-131.3, 135.5, 142.8, 142.9, 148.6, 156.4, 156.5; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 422, 517, 553, 592, 649 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 726 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(4) 5-(4-Acetamidophenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)porphyrin

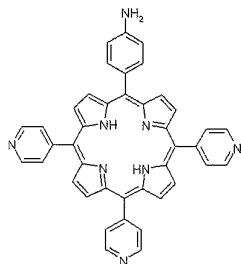


4-Acetamidobenzaldehyde (3.26 g, 0.02 mol) and 4-pyridinecarboxaldehyde (5.66 mL, 0.06 mol) were stirred in propionic acid (300 mL) at 90 °C. Pyrrole (5.4 mL, 0.08 mol) was added and the mixture stirred under reflux for 30 min. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a dark purple solid. The crude mixture of porphyrin isomers was purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 19:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield **4** as a purple solid (526 mg, 3.9%); *R_f* = 0.22 (silica, CHCl₃/MeOH, 19:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.79 (2H, br s, NH), 2.49 (3H, s, NHCOCH₃), 8.07 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 8.21-8.28 (8H, m (overlapping), 5-Ar-2,6-H & 10, 15, 20-Py-2,6-H), 8.84-9.06 (8H, m, β-H), 9.10-9.15 (6H, m, 10, 15, 20-Py-3,5-H), 10.35 (1H, br s, NHCOCH₃); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 26.8, 106.9, 110.1, 110.2, 117.9, 121.1, 121.5, 122.1, 122.2, 123.3, 123.8, 123.9, 134.7, 140.1, 142.5, 145.1, 148.2, 149, 149.3, 149.4, 149.6, 150.1, 175.2; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 418, 514, 548, 587, 644 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 675 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(5) 5-(4-Aminophenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)porphyrin

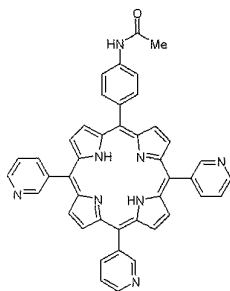


Porphyrin 4 (500 mg, 0.74 mmol) was dissolved in 18% HCl (100 mL) and the solution heated for 2 hours under reflux. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a crude green solid. The solid was redissolved in a 9:1 mixture of dichloromethane/triethylamine (200 mL) and stirred for 10 min at room temperature. The solution was then washed with water (3 × 200 mL) and brine (200 mL), the organic layer separated and dried (Na₂SO₄). Excess solvent was evaporated *in vacuo* and the purple crude solid purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 20:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield 5 as a purple solid (422 mg, 90.1%); *R_f* = 0.31 (silica, CHCl₃/MeOH, 20:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.86 (2H, br s, NH), 4.09 (2H, br s, NH₂), 7.08 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.98 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.16 (6H, m, *J** = 5 Hz, 10, 15, 20-Py-2,6-H), 8.80-9.01 (8H, m, β-H), 9.04 (6H, m, *J** = 5 Hz, 10, 15, 20-Py-3,5-H), ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 113.6, 116.7, 117.4, 117.9, 122.7, 129.5, 131.7, 135.9, 146.5, 148.4, 148.5, 149.8, 150.2; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 418, 515, 552, 592, 653 nm; MS (FAB) *m/z* 633 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(6) 5-(4-Acetamidophenyl)-10,15,20-tris(3-pyridyl)porphyrin

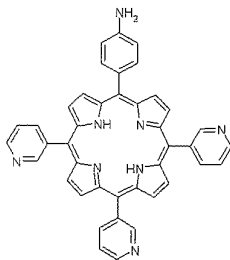


4-Acetamidobenzaldehyde (5 g, 0.031 mol) and 3-pyridinecarboxaldehyde (8.67 mL, 0.092 mol) were stirred in propionic acid (300 mL) at 90 °C. Pyrrole (8.5 mL, 0.123 mol) was added and the mixture stirred under reflux for 30 min. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a dark purple solid. The crude mixture of porphyrin isomers was purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 19:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield 6 as a purple solid (0.96 g, 4.6%); *R_f* = 0.26 (silica, CHCl₃/MeOH, 19:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.97 (2H, br s, NH), 2.17 (3H, s, NHC(=O)CH₃), 7.40 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.49 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 7.98 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.21-8.33 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 8.57-8.82 (11H, m (overlapping), 10, 15, 20-Py-4-H & β-H), 8.99 (1H, br s, NHC(=O)CH₃), 9.26 (3H, m, 10, 15, 20-Py-2-H); UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 419, 516, 552, 592, 648 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 675 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(7) 5-(4-Aminophenyl)-10,15,20-tris(3-pyridyl)porphyrin



Porphyrin 6 (300 mg, 0.45 mmol) was dissolved in 18% HCl (100 mL) and the solution heated for 2 hours under reflux. Upon cooling the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to yield a crude green solid. The solid was redissolved in a 9:1 mixture of dichloromethane/triethylamine (200 mL) and stirred for 10 min at room temperature. The solution was then washed with water (3 × 200 mL) and brine (200 mL), the organic layer separated and dried (Na₂SO₄). Excess solvent was evaporated *in vacuo* and the purple crude solid purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 20:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield 7 as a purple solid (206 mg, 68.5%); *R_f* = 0.38 (silica, CHCl₃/MeOH, 20:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.74 (2H, br s, NH), 3.93 (2H, br s, NH₂), 6.91 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.67 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 7.93 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.48 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 8.79-9.02 (11H, m (overlapping), 10, 15, 20-Py-4-H & β-H), 9.47 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 113.3, 115.6, 116.1, 116.7, 121.9, 122.3, 131, 131.4, 131.8, 132.1, 132.3, 135.7, 137.5, 137.7, 137.8, 140.8, 146.3, 149, 149.2, 153.5; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 420, 517, 553, 597, 649 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 632 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(8) 5-(4-Acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin,

The DDP was synthesised according to the method of Dolphin *et al.* (1998 5-Phenyldipyrromethane and 5, 15-Diphenylporphyrin *Org. Synth.* 76, 287-293 incorporated herein by reference) The resulting mixture of three porphyrins was chromatographed, eluting initially with DCM to allow removal of 5,15-(4-methoxy)-DPP, and then continuing with ethyl acetate/DCM (1:4) to elute the required product as purple crystals (150 mg, 12%); $R_f = 0.40$ (DCM/MeOH, 19:1); mp 305-307°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm; $^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ 10.35 (s, 2H, *10+20-H*), 9.43 (d, 4H, $J = 4.8$ Hz, $\beta\text{-H}$), 9.14 (d, 4H, $J = 4.8$ Hz, $\beta\text{-H}$), 8.65 (m, 2H, $J = 7.2$ Hz, *5-m-Ar*), 8.22-8.12 (m, 4H, (overlapping), $J = 8.1$ Hz, *5+15-o-Ar*), 7.56 (m, 2H, $J = 8.1$ Hz, *15-m-Ar*), 4.14 (s, 3H, CH_3), -3.00 (br s, 2H, *NH*); MALDI-MS m/z 550.3 (M^+ , 100%).

(9) 5-(4-Aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin,

5-(4-Acetamido phenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin **8** (1 eq., 100 mg, 0.182 mmol) was dissolved in 5 M aqueous HCl (100 mL) and the solution heated for 3 h under reflux. The hot reaction mixture was concentrated *in vacuo* to yield a crude green solid. The solid was re-dissolved in a mixture of DCM/triethylamine (9:1) (200 mL) and stirred for 10 min at room temperature. The solution was then washed with water (3 x 200 mL), saturated brine (200 mL) and the organic layer separated and dried (Na_2SO_4), then concentrated *in vacuo*. The crude purple solid was chromatographed, eluting with DCM, and gave the desired porphyrin as a purple crystalline solid (51 mg, 54%); $R_f = 0.30$ (DCM), mp 300°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0), 503 (0.045), 538(0.02), 578 (0.015), 630 (0.005) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 634 nm (λ excitation = 410 nm); $^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ 10.30 (s, 2H, *10+20-H*), 9.39 (d, 4H, $J = 4.9$ Hz, $\beta\text{-H}$), 9.17 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz, $\beta\text{-H}$), 9.10 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz, $\beta\text{-H}$), 8.19 (m, 2H, $J = 8.8$ Hz, *15-o-Ar*), 8.07 (m, 2H, $J = 8.1$ Hz, *5-o-Ar*), 7.35 (m, 2H, $J = 8.8$ Hz, *15-m-Ar*), 7.14 (m, 2H, $J = 8.1$ Hz, *5-m-Ar*), 4.13 (s, 3H, CH_3), 4.08 (br s, 2H, *NH*), -3.06 (br s, 2H *NH*); MALDI-MS m/z 508.3 ($[M+1]^+$, 100%). ES-HRMS calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ ($[M+1]^+$) 508.2137, found 508.2144.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(10) 17,18-Dihydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin and
 (11) 7,8-dihydroxy 5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin regioisomers,

Porphyrin 9 (28 mg, 55.2 μ mol) was converted into the required mixture of chlorin regioisomers following the procedure of Sutton *et al.* (2000 Functionalised diphenylchlorins and bacteriochlorins – their synthesis and bioconjugation for targeted photodynamic therapy and tumour cell imaging *J. Porphyrin and Phthalocyanines* 4, 655-658) The crude reaction mixture was then chromatographed, eluting with 1% MeOH in DCM. First, some un-reacted starting material was eluted, then the higher R_f chlorin isomer 10 as a brown-purple crystalline solid; R_f = 0.28 (DCM/MeOH, 19:1). The lower R_f isomer 11 was obtained by further elution with 2.5% MeOH in DCM and gave also a brown-purple crystalline solid (R_f = 0.17 (DCM/MeOH, 19:1).

High R_f chlorin regioisomer (17,18-dihydroxy-15-(4-methoxy phenyl)-5-(4-aminophenyl)chlorin assigned previously (26)) (7.0 mg, 24%), mp 165-167°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 401 (0.99), 414 (1.0), 503 (0.08), 535 (0.07), 582 (0.035), 636 (0.22) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 639 nm (λ excitation = 412 nm); 1H NMR (270 MHz, 10% CD₃OD in CDCl₃) δ 9.95 (s, 1H, 10-H), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.17 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 9.03 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.97 (s, 2H, β -H) 8.78 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.51 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.05 (m, 2H, J = 8.9 Hz, *o*-Ar), 7.94 (m, 2H, J = 8.1 Hz, *o*'-Ar), 7.25 (m, 2H, J = 8.9 Hz, *m*-Ar), 7.12 (m, 2H, J = 8.1 Hz, *m*'-Ar), 6.42 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 17-H), 6.03 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 18-H), 4.08 (s, 3H, CH₃), (NH's exchanged & OH's not observed); MALDI-MS *m/z* 542.2 ([M+H]⁺, 100%); ES-HRMS calcd. for C₃₃H₂₈N₃O₃ ([M+H]⁺) 542.2192, found 542.2187.

Low R_f chlorin regioisomer (7,8-dihydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin) (8.5 mg, 30%), mp 168-171°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 401(0.99), 413 (1.0), 507 (0.08), 536 (0.06), 586 (0.025), 637 (0.20) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 639 nm (λ excitation = 412 nm); 1H NMR (270 MHz, 10% CD₃OD in CDCl₃) δ 9.96 (s, 1H, 20-H), 9.40 (s, 1H, 10-H), 9.18 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 9.05 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.98 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H) 8.92 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.74 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.58 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.13 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *o*-Ar), 8.08 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *o*-Ar), 7.95 (m, 1H, J = 8.1 Hz, *o*'-Ar), 7.79

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

(m, 1H, J = 8.1 Hz, *o*'-Ar), 7.36 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *m*-Ar), 7.30 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *m*-Ar), 7.11 (m, 1H, J = 8.1 Hz, *m*'-Ar), 7.05 (m, 1H, J = 8.1 Hz, *m*'-Ar), 6.42 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 7-H), 6.09 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 8-H), 4.11 (s, 3H, CH₃), (NH's exchanged & OH's not observed); MALDI-MS *m/z* 542.2 ([M+H]⁺, 100%) ES-HRMS calcd. for C₃₃H₂₈N₃O₃ ([M+H]⁺) 542.2192, found 542.2185.

(12) **5-(4-Fluorenylmethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin,**

To a stirred solution of porphyrin 9 (28 mg, 55 μmol) in anhydrous 1,4-dioxane (2.5 mL) was added solid sodium hydrogen carbonate (6 eq., 28 mg, 0.33 mmol). To this mixture was then added a solution of 9-fluorenylmethyl chloroformate (2 eq., 0.11 mmol, 28.5 mg) in 1,4-dioxane (0.5 mL) under N₂. The reaction flask was covered with aluminium foil to exclude light and stirred at room temperature for a period of 3 h. At this time the reaction was complete (as monitored by TLC). The 1,4-dioxane was removed *in vacuo* and the residue partitioned between water (25 mL) and DCM (2 x 25 mL). The combined organic extracts were washed with saturated brine (25 mL) then dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The required porphyrin was obtained by chromatography, eluting with DCM. The desired porphyrin was obtained as purple crystals (38 mg, 95%), *R_f* = 0.39 (DCM), mp 292-295°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0), 505 (0.042), 541 (0.02), 578 (0.015), 633 (0.01) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 635 nm (λ excitation = 410 nm); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 10.35 (s, 2H, 10+20-H), 9.69 (br. s, 1H, NH), 9.44 (d, 4H, J = 4.8 Hz, β-H), 9.12 (d, 4H, J = 4.8 Hz, β-H), 8.20-8.17 (m (overlapping), 4H, J = 8.1 Hz, 5+15-*o*-Ar), 7.85 (m, 4H, 5+15-*m*-Ar), 7.76-7.66 (m, 2H, fluoreno-Ar), 7.51-7.30 (m, 6H, fluoreno-Ar), 4.69 (d, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 4.30 (t, 1H, J = 7.2 Hz, CH), 4.13 (s, 3H, CH₃), -3.15 (br. s, 2H, NH); MALD-MS *m/z* 731.5 ([M+H]⁺, 100%), 508.3 ([M-FMOC+2]⁺, 50%); ES-HRMS calcd. for C₄₈H₃₂N₃O₃ ([M+H]⁺) 730.2818, found 730.2809.

(13, 14) ***cis/trans*-7,8,17,18-Tetrahydroxy-5-(4-fluorenylmethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorins**

Porphyrin 12 (35 mg, 48.0 μmol) was converted into the required mixture of bacteriochlorin stereoisomers by minor modification of the procedure of Sutton *et al.* (2000 Functionalised diphenylchlorins and bacteriochlorins – their synthesis and bioconjugation for targeted photodynamic therapy and tumour cell imaging *J. Porphyrin*

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

and *Phthalocyanines* 4, 655-658 - incorporated herein by reference) (reaction carried out using 1,4-dioxane (5 mL) to allow dissolution of **12**). The crude reaction mixture was chromatographed, eluting initially with 1% MeOH in DCM to remove chlorin by-products. Further elution with 2% MeOH/DCM allowed isolation of both stereoisomeric bacteriochlorin tetrols. The higher *R_f*-*trans* bacteriochlorin isomer **13** was isolated as a pink-green crystalline solid. (6 mg, 15%), *R_f* = 0.25 (DCM/MeOH, 19:1), mp 142-145°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 374 (1.0) 512 (0.23), 702 (0.52) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 708 nm (λ excitation = 512 nm); ¹H NMR (270 MHz, 10% CD₃OD in CDCl₃) δ 9.20 (s, 2H, 10+20-H), 8.78 (d, 2H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.36 (d, 2H, J = 4.0 Hz, β -H), 7.95 (m, 2H, *o*-Ar), 7.85 (m, 2H, J = 7.3 Hz, *fluoreno*-Ar), 7.79 (m, 2H *o*'-Ar), 7.65 (m, 2H, *m*'-Ar), 7.47-7.38 (m, 6H, *fluoreno*-Ar), 7.24 (m, 2H, *m*-Ar), 6.27-6.24 (m, 2H, 7+17-H), 5.85 (m, 2H, 8+18-H), 4.65 (d, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 4.39 (t, 1H, J = 7.2 Hz, CH), 4.06 (s, 3H, CH₃), -1.94 (br s (partly exchanged), 2H, NH), (OH's not observed); MALDI-MS *m/z* 800.4 ([M+H]⁺, 100%); ES-HRMS calcd. for C₄₈H₄₀N₃O₇ ([M+H]⁺) 798.2927, found 798.2921.

The lower *R_f* *cis*-bacteriochlorin isomer **14** was isolated as a pink-green crystalline solid. (8.5 mg, 21%), *R_f* = 0.2 (DCM/MeOH, 19:1), mp 148-150°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 374 (1.0) 512 (0.24), 703 (0.54) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 708 nm (λ excitation = 512 nm); ¹H NMR (270 MHz, 10% CD₃OD in CDCl₃) δ 9.12 (s, 2H, 10+20-H), 8.76 (d, 2H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.34 (d (overlapping), 2H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.02 (m, 2H, *o*-Ar), 7.85 (m (obscured), 2H, J = 8.0 Hz, *o*'-Ar), 7.83 (m, 2H, J = 7.3 Hz, *fluoreno*-Ar), 7.76 (m, 2H, J = 8.0 Hz, *m*'-Ar), 7.50-7.38 (m, 6H, *fluoreno*-Ar), 7.24 (m, 2H, *m*-Ar), 6.27-6.23 (m, 2H, 7+17-H), 5.85-5.82 (m, 2H, 8+18-H), 4.65 (d, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 4.39 (t, 1H, J = 7.2 Hz, CH), 4.05 (s, 3H, CH₃), -1.88 (br s (partly exchanged), 2H, NH), (OH's not observed); MALDI-MS *m/z* 800.4 ([M+H]⁺, 100%); ES-HRMS calcd. for C₄₈H₄₀N₃O₇ ([M+H]⁺) 798.2927, found 798.2921.

(15) 5-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)dipyrromethane

3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde (5.0 g, 25.5 mmol) was dissolved in freshly distilled pyrrole (75 ml) and the solution degassed by bubbling with dry N₂ for 10 min. TFA (0.075 eq., 0.15 ml, 1.91 mmol) was added and the mixture stirred under N₂ until no starting aldehyde could be detected by TLC (ca. 10 min). The reaction mixture was

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

concentrated *in vacuo* at water aspirator pressure (evaporator water bath temp 75°C) then under high vacuum for 16 h to remove excess pyrrole. The crude product was recrystallised from hot ethylacetate/ nHexane and afforded the required dipyrromethane as a white solid, (5.41 g, 68%): ν_{\max} (nujol mull)/ cm^{-1} 3378 (br. NH), 1594 (C=C),

1233, 1040; UV-VIS (MeOH) λ_{\max} / (rel. intensity) 222 (1.0), 280 (0.75) nm;

δH (270 MHz; CDCl_3) 8.07 (2H, br. s, *NH*), 7.53 (2H, m, *I-H*), 6.68 (2H, s, *2'-H*), 6.37 (2H, m, *2-H*), 5.93 (2H, m, *3-H*), 5.38 (1H, s, *methane*), 3.80 (3H, s, *4'-OCH_3*), 3.73 (6H, s, *3'+5'-OCH_3*); δC (68 MHz; CDCl_3) 152.7 (*CH*, *2'-C*), 137.3 (*q*, *3'+5'-C*), 136.1 (*q*, *4'-C*), 131.8 (*q*, *4-C*), 116.7 (*CH*, *1-C*), 107.9 (*CH*, *2-C*), 106.6 (*CH*, *3-C*), 104.9 (*q*, *1'-C*), 60.3 (*CH_3*), 55.5 (*CH_3*), 43.7 (*CH_2*, *methane*); MS (MALDI) *m/e* 311.2 (100%, (*M-1*)⁺).

(16) 5-(4-Acetamidophenyl)dipyrromethane

The dipyrromethane was synthesised using the general procedure detailed above using the same molar quantity of starting aldehyde. The crude reaction mixture was chromatographed on flash silica-gel (350 ml), (dry loaded on to 50 ml flash silica-gel from ethylacetate) and eluted with 40% ethylacetate/ DCM and afforded the pure product as an off white solid, (4.3 g, 50%): ν_{\max} (nujol mull)/ cm^{-1} 3409 (NH, *amide*), 3248 (br. NH), 1650 (C=O), 1593 (C=C), 1320, 1009; UV-VIS (MeOH) λ_{\max} / (rel. intensity) 224 (1.0) nm; δH (270 MHz; CDCl_3) 8.00 (2H, br. s, *NH*), 7.40 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, *o-Ar*), 7.30 (1H, br. s, *NH-acetamido*), 7.13 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, *m-Ar*), 6.68 (2H, m, *I-H*), 6.16 (2H, m, *2-H*), 5.90 (2H, m, *3-H*), 5.42 (1H, s, *methane*), 2.14 (3H, s, *NHCH_3*); δC (68 MHz; CDCl_3) 168.4 (*q*, *COCH_3*), 138.2 (*q*, *4'-C*), 136.5 (*q*, *2'-C*), 132.4 (*q*, *4-C*), 128.9 (*CH*, *2'-C*), 120.3 (*CH*, *3'-C*), 117.2 (*CH*, *1-C*), 108.4 (*CH*, *2-C*), 107.1 (*CH*, *3-C*), 43.4 (*CH_2*, *methane*), 24.5 (*CH_3*); MS (MALDI) *m/e* 279.4 (100%, (*M*)⁺).

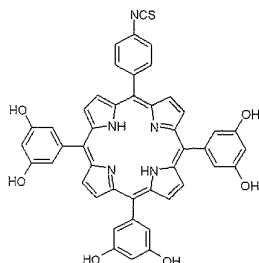
(17) 5-(4-Methoxyphenyl)dipyrromethane

The dipyrromethane was synthesised using the general procedure detailed above using the same molar quantity of starting aldehyde. The crude reaction mixture was chromatographed on flash silica-gel (350 ml), (dry loaded on to 50 ml flash silica-gel from ethylacetate) and eluted with 30% nHexane/ DCM and afforded the pure product as an off white solid, (4.3 g, 50%): ν_{\max} (nujol mull)/ cm^{-1} , 3382 (br. NH), 1598 (C=C), 1300, 1050; UV-VIS (MeOH) λ_{\max} / (rel. intensity) 224 (1.0) nm; δH (270 MHz; CDCl_3)

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

7.87 (2H, br. s, *NH*), 7.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, *m-Ar*), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, *o-Ar*), 6.66 (2H, m, *l-H*), 6.14 (2H, m, *2-H*), 5.89 (2H, m, *3-H*), 5.40 (1H, s, *methane*); MS (MALDI) m/e 252.4 (100%, (M)⁺).

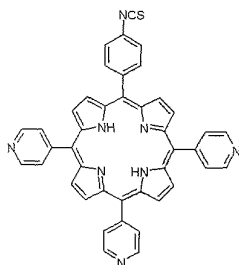
Example 1**5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(3,5-dihydroxyphenyl)porphyrin**

To a stirred solution of **3** (100 mg, 0.137 mmol) in freshly distilled THF (25 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridone (64 mg, 0.276 mmol). The reaction was allowed to proceed under argon for 4 hours at room temperature. Excess solvent was evaporated *in vacuo* to yield a crude purple solid. The solid was dissolved in a minimal amount of chloroform/methanol (9:1) and purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 9:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield the above compound as a purple solid (67.5 mg, 63.8%); $R_f = 0.29$ (silica, CHCl₃/MeOH, 9:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 3:1] δ 6.77 (3H, s, 10, 15, 20-Ar-4-H), 7.12 (6H, s, 10, 15, 20-Ar-2,6-H), 7.64 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-3,5-H), 8.19 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.76-9.0 (8H, m, β -H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 3:1] δ 101.9, 107.1, 114.7, 117.6, 119.9, 120, 120.1, 123.9, 130.9, 134, 135.2, 136.1, 141.2, 142, 143.6, 155.8; UV-vis (MeOH)

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

λ_{max} 422, 516, 552, 592, 648 nm; HRMS (ES) m/z calc'd for $C_{45}H_{29}N_5O_6S$ $[M+H]^+$
768.1914, found 768.1908.

Example 2**5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)porphyrin**

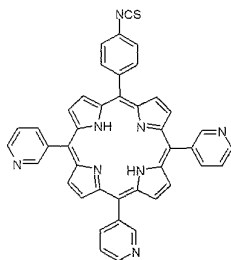
To a stirred solution of **5** (100 mg, 0.158 mmol) in freshly distilled dichloromethane (20 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridone (320 mg, 1.38 mmol). The reaction was allowed to proceed under argon for 4 hours at room temperature. Excess solvent was evaporated *in vacuo* to yield a crude purple solid. The solid was dissolved in a minimal amount of chloroform and purified by flash chromatography (silica, eluent: $CHCl_3/MeOH$, 49:1). Relevant fractions were combined, dried (Na_2SO_4) and evaporated *in vacuo* to yield the above compound as a purple solid (104 mg, 97.5%), $R_f = 0.57$ (silica, $CHCl_3/MeOH$, 49:1), mp >350 °C decomp., 1H NMR [270 MHz, $CDCl_3$] δ -2.91 (2H, br s, NH), 7.65 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-3,5-H), 8.15-8.21 (8H, m (overlapping), 10, 15, 20-Py-2,6-H & 5-Ar-2,6-H), 8.67 (8H, br s, β -H), 9.06 (6H, m, $J^* = 5$ Hz, 10, 15, 20-Py-3,5-H), ^{13}C NMR [67.5 MHz, $CDCl_3$] δ 117.4, 117.6, 119.7, 124.7, 129.3, 131.6, 135.4, 136.9, 140.6, 148.4, 149.8; UV-vis (CH_2Cl_2) λ_{max} 417, 514, 548, 587, 643 nm; HRMS (ES) m/z calc'd for $C_{42}H_{26}N_6S$ (M+H) 675.2079, found 675.2078.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Example 3

5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(3-pyridyl)porphyrin (160)



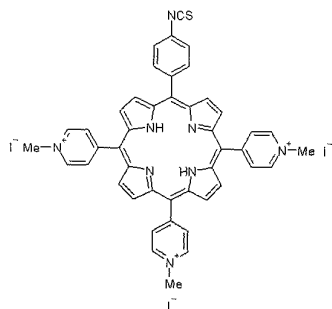
To a stirred solution of 7 (200 mg, 0.316 mmol) in freshly distilled dichloromethane (40 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridone (640 mg, 2.76 mmol). The reaction was allowed to proceed under argon for 17 hours at room temperature. Excess solvent was evaporated *in vacuo* to yield a crude purple solid. The solid was dissolved in a minimal amount of chloroform and purified by flash chromatography (silica, eluent: CHCl₃/MeOH, 49:1). Relevant fractions were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield the above compound as a purple solid (171 mg, 80.3%); *R_f* = 0.55 (silica, CHCl₃/MeOH, 49:1); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, CDCl₃] δ -2.83 (2H, br s, NH), 7.65 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-3,5-H), 7.78 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 8.20 (2H, m, *J** = 8 Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.54 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 8.83-8.88 (8H, m, β-H), 9.07 (3H, m, 10, 15, 20-Py-4-H), 9.07 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, CDCl₃] δ 116.6, 122.1, 124.2, 131.5, 135.5, 137.7, 140.8, 140.9, 149.2, 153.5; UV-vis (CH₂Cl₂) λ_{max} 421, 513, 547, 587, 657 nm; MS (MALDI-TOF) *m/z* 674 (M⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Example 4

5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridiniumyl) porphyrin triiodide

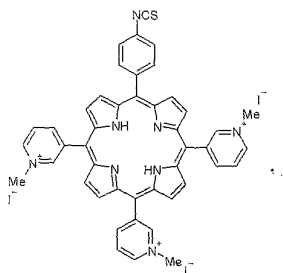


To a solution of Example 2 (50 mg, 0.074 mmol) in anhydrous DMF (10 mL, distilled from CaH_2 , 0.1 torr) was added iodomethane (1 mL, 0.016 mol). The reaction was stirred under argon for 3 hours at room temperature, monitored by TLC (normal phase silica) in a water/saturated aqueous potassium nitrate/acetonitrile (1:1:8) solvent system. Upon reaction completion excess DMF was evaporated *in vacuo* (0.1 torr) at 30-40 °C to yield the above compound as a lustrous purple solid (77 mg, 95%); $R_f = 0.32$ (silica, $\text{H}_2\text{O}/\text{sat. aq. KNO}_3/\text{MeCN}$, 1:1:8); mp >350 °C decomp.; $^1\text{H NMR}$ [270 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ -3.03 (2H, br s, NH), 4.74 (9H, br s, *N*-CH₃-pyridine), 7.96 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-3,5-H), 8.32 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-2,6-H), 9.03 (6H, m, $J^* = 6$ Hz, 10, 15, 20-Py-2,6-H), 9.16 (8H, m, β -H), 9.50 (6H, m, $J^* = 6$ Hz, 10, 15, 20-Py-3,5-H), $^{13}\text{C NMR}$ [67.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ 47.9, 114.7, 115.3, 121.1, 124.8, 130.6, 132, 134.7, 135.4, 139.7, 144.1, 156.3, 156.4; UV-vis (H_2O) λ_{max} 423, 520, 585 nm; MS (FAB) m/z 719 (M^+ , 100%), 704 ($M-\text{CH}_3$, 26%), 689 ($M-2\text{CH}_3$, 20%), 674 ($M-3\text{CH}_3$, 5%); HRMS (ES) m/z calc'd for $\text{C}_{43}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{S}$ ($M+H$) 719.2705, found 719.2686.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

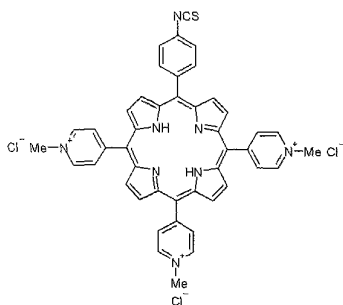
Example 5

5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(3-*N*-methylpyridiniumyl) porphyrin triiodide

To a solution of Example 3 (50 mg, 0.074 mmol) in anhydrous DMF (5 mL, distilled from CaH, 0.1 torr) was added iodomethane (1 mL, 0.016 mol). The reaction was stirred under argon for 4 hours at room temperature, monitored by TLC (normal phase silica) in a water/saturated aqueous potassium nitrate/acetonitrile (1:1:8) solvent system. Upon reaction completion excess DMF was evaporated *in vacuo* (0.1 torr) at 30-40 °C to yield the above compound as a lustrous purple solid (72 mg, 89%); $R_f = 0.46$ (silica, H₂O/sat.aq. KNO₃/MeCN, 1:1:8); mp >350 °C decomp.; ¹H NMR [270 MHz, (CD₃)₂SO] δ -3.07 (2H, br s, NH), 4.69 (9H, br s, *N*-CH₃-pyridine), 7.97 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-3,5-H), 8.31 (2H, m, $J^* = 8$ Hz, 5-Ar-2,6-H), 8.64 (3H, m, 10, 15, 20-Py-5-H), 9.03-9.25 (8H, m, β -H), 9.35 (3H, m, 10, 15, 20-Py-6-H), 9.57 (3H, m, 10, 15, 20-Py-4-H), 10.03 (3H, s, 10, 15, 20-Py-2-H); ¹³C NMR [67.5 MHz, (CD₃)₂SO] δ 48.3, 112.3, 112.9, 120.7, 124.8, 126.3, 126.4, 126.6, 130.6, 132.1, 132.3, 132.4, 132.6, 132.8, 133.1, 133.4, 134.7, 135.4, 139.8, 139.9, 140, 145.5, 145.6, 147.4, 147.5, 147.8, 147.9, 148.5, 155.9; UV-vis (H₂O) λ_{max} 419, 516, 552, 581, 637 nm; MS (MALDI-TOF) m/z 689 ([M-2CH₃]⁺, 100%).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

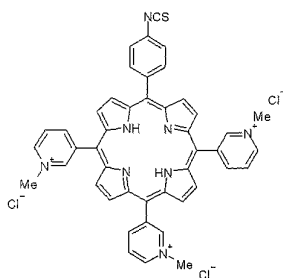
Example 6**5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridiniumyl) porphyrin trichloride**

To a solution of Example 4 (30 mg, 0.027 mmol) in anhydrous methanol (30 mL) was added Amberlite[®] IRA 400 (1g) and the mixture stirred for 1 hour at room temperature. Amberlite[®] IRA 400 resin was filtered under vacuum and the porphyrin filtrate recovered, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to yield the above compound as a water soluble purple solid (22 mg, 96.4%). Porphyrins of Examples 4 and 6 were distinguished only by their respective solubility in water.

Example 7**5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridiniumyl) porphyrin trichloride**

WO 02/00662

PCT/GB01/02846



To a solution of **5** (30 mg, 0.027 mmol) in anhydrous methanol (30 mL) was added Amberlite® IRA 400 (1g) and the mixture stirred for 1 hour at room temperature. Amberlite® IRA 400 resin was filtered under vacuum and the porphyrin filtrate recovered, dried (Na_2SO_4) and evaporated *in vacuo* to yield the above compound as a water soluble purple solid (21 mg, 92.0%). Porphyrins of Examples 5 and 7 were distinguished only by their respective solubility in water.

Example 8

17,18-Dihydroxy-5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin, The higher R_F regioisomeric chlorin **10** (17.5 mg, 23.2 μmol) was converted into the corresponding isothiocyanate according to the following method. To a stirred solution of **10** (1 *eq.*, 50 mg, 0.099 mmol) in freshly distilled DCM (20 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldi-2-(1*H*)-pyridone (2 *eq.*, 46 mg, 0.198 mmol). The reaction was allowed to stir under argon for 2 h at room temperature, after which the reaction mixture was filtered, and concentrated then chromatographed, eluting with 1% MeOH in DCM to afford the title compound. The title compound was isolated as a brown-purple crystalline solid, (17 mg, 90%), $R_f = 0.36$ (DCM/MeOH, 19:1), mp 155-158°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0) 505 (0.09), 534 (0.06), 586 (0.04), 637 (0.18) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 639 nm (λ excitation = 412 nm); ^1H NMR (270 MHz, 10% CD_3OD in CDCl_3) δ 10.0 (s, 1H, 1*O-H*), 9.45 (s, 1H, 2*O-H*), 9.20 (d, 1H, J =

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

4.8 Hz, β -H), 9.06 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H) 8.84 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.64 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.55 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.21 (m, 1H, J = 8.1 Hz, *5-o-Ar*), 8.15 (m, 1H, J = 8.1 Hz, *5-o-Ar*), 8.05 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *15-o-Ar*) 7.93 (m, 1H, J = 8.9 Hz, *15-o-Ar*), 7.65 (m, 2H, *5-m-Ar*), 7.24 (m, 2H, *15-m-Ar*), 6.43 (d, 1H, J = 6.5 Hz, *17-H*), 6.04 (d, 1H, J = 6.5 Hz, *18-H*), 4.08 (s, 3H, CH_3), (*NH*'s exchanged & *OH*'s not observed); MALDI-MS m/z 583.7 ($[M+H]^+$, 100%); ES-HRMS calcd. for $C_{34}H_{28}N_5O_3S$ ($[M+H]^+$) 584.1757, found 584.1756.

Example 9***cis*-7,8,17,18-Tetrahydroxy-5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)bacteriochlorin**

The *cis*-bacteriochlorin **14** (8.5 mg, 10.7 μ mol) in 25% MeOH in DCM (1.25 mL) was treated with piperidine (50 eq., 53 μ l, 0.53 mmol) and left to stir for a period of 3 h at room temperature under N_2 with light excluded. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* (0.1 torr) to remove all traces of piperidine. The crude amine was then converted into the required isothiocyanate following the procedure described above. The *cis*-bacteriochlorin_{isothiocyanate} was isolated as a pink-green crystalline solid (5.0 mg, 76%), R_f = 0.40 (DCM/MeOH, 19:1), mp 132-135°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 375 (1.0) 516 (0.22), 702 (0.48) nm; Fluorescence λ_{max} 709 nm (λ excitation = 516 nm); 1H NMR (270 MHz, 10% CD_3OD in $CDCl_3$) δ 9.20 (s, 1H, *meso-H*), 9.18 (s, 1H, *meso-H*), 8.77 (d, 2H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.40 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.34 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.14 (m, 2H, *o-Ar*), 8.05 (m, 2H, *o-Ar*), 7.42-7.08 (m, 4H, *5+15-m-Ar*), 6.20 (m, 2H, *7+17-H*), 5.98 (m, 1H, *8-H*), 5.93 (m, 1H, *18-H*), 4.04 (s, 3H, CH_3), -1.80 (br s, 2H, partly exchanged-*NH*), (*OH*'s not observed); MALDI-MS m/z 618.9 ($[M+H]^+$, 100%); ES-HRMS calcd. for $C_{34}H_{28}N_5O_3S$ ($[M+H]^+$) 618.1815, found 618.1810.

Examples 10, 11, 12, 13**17,18-Dihydroxy-5-(4-acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin/7,8-dihydroxy-5-(4-acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin regioisomers, and**

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

***cis/trans*-7,8,17,18-tetrahydroxy-5-(4-acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)bacteriochlorin stereoisomers,**

Porphyrin 8 (100 mg, 0.18 mmol) was converted, in a single reaction, to a mixture of chlorin diols/bacteriochlorin tetrols following the procedure of Sutton *et al.* After 38 h the reaction was stopped. The crude reaction mixture was then chromatographed, eluting with 2% MeOH in DCM to give first, some un-reacted starting material then the higher R_f chlorin isomer of Example 10 as a brown-purple crystalline solid (5 mg, 5%). The lower R_f isomer of Example 11 was obtained by further elution with 3.5% MeOH in DCM and gave also a brown-purple crystalline solid (7.0 mg, 7%). Further elution with 5% MeOH in DCM afforded the required *trans/cis*-bacteriochlorin tetrols of Examples 12 and 13 respectively as pink/green solids (5.0 mg, 5%) and (7.0 mg, 7%) respectively. High R_f chlorin regioisomer of Example 10 (17,18-dihydroxy-15-(4-methoxyphenyl)-5-(4-acetamidophenyl) chlorin assigned on the basis of past data)(26) R_f = 0.40 (DCM/MeOH, 37:3), mp 186-188°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410(1.0), 505.5 (0.12), 535 (0.08), 585.5 (0.05), 637 (0.18) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 639 nm (λ excitation = 410 nm); 1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ 9.97 (s, 1H, 10-H), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.19 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 9.03 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.98 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H) 8.89 (d, 1H, J = 4.0 Hz, β -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.52 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.14-8.10 (m, 3H, 5-*o/m-Ar*), 7.96-7.82 (m, 3H, 5+15-*o/m-Ar*), 7.50 (s, 1H, NH), 7.34 (m, 2H, 15-*m-Ar*), 6.48 (m, 1H, 17-H), 6.20 (m, 1H, 18-H), 4.08 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), -1.89, -2.20 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ($[M+H]^+$, 100%); ES-HRMS calcd. for $C_{35}H_{38}N_2O_4$ ($[M+H]^+$) 582.2141, found 582.2137. Low R_f chlorin regioisomer of Example 11 (7,8-dihydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin) R_f = 0.35 (DCM/MeOH, 37:3), mp 182-185°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 410(1.0), 505.5 (0.1), 535 (0.07), 585 (0.04), 636 (0.19) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 639 nm (λ excitation = 410 nm); 1H NMR (270 MHz, 10% DMSO- d_6 in $CDCl_3$) δ 9.96 (s, 1H, 10-H), 9.92 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, 20-H), 9.22 (m, 1H, β -H), 9.02 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 9.00 (m, 1H, β -H) 8.92 (m, 1H, β -H), 8.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, β -H), 8.53 (m, 1H, β -H), 8.18-7.91 (m, 6H, 5+15-*o/m-Ar*), 7.33-7.28 (m, 2H, 15-*m-Ar*), 6.36 (m, 1H, 7-H), 5.96 (m, 1H, 8-H), 4.10 (s, 3H, CH_3),

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

2.30 (s, 3H, CH_3), -1.74, -2.17 (s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 582.6 ($[M+H]^+$, 100%). ES-HRMS calcd. for $C_{35}H_{28}N_5O_4$ ($[M+H]^+$) 582.2141, found 582.2135.

High R_f -*trans*-bacteriochlorin of Example 12; $R_f = 0.29$ (DCM/MeOH, 37:3:1), mp 152-155°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 373.5 (1.0) 514 (0.25), 702 (0.49) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 708 nm (λ excitation = 514 nm); 1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ 10.27 (s, 1H, NH), 9.16 (s, 2H, $10+20-H$), 8.96 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, $\beta-H$), 8.24 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, $\beta-H$), 7.99-7.89 (m, 6H, $5+15-o/m-Ar$), 7.25 (m, 2H, $15-m-Ar$), 6.30 (m, 2H, $7+17-H$), 6.15 (m, 2H, $8+18-H$), 5.63 (m, 2H, OH), 5.32 (m, 2H, OH), 3.99 (s, 3H, CH_3), 2.20 (s, 3H, CH_3), -1.87 (br s, 2H, NH); MALDI-MS m/z 616.3

($[M+H]^+$, 100%). ES-HRMS calcd. for $C_{35}H_{30}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 616.2196, found 616.2192. Low R_f *cis*-bacteriochlorin 13; $R_f = 0.24$ (DCM/MeOH, 19:1), mp 148-151°C (decomposed); UV-vis (DCM) λ_{max} (relative intensity) 373.5 (1.0) 514.5 (0.24), 703 (0.50) nm; Fluorescence (DCM) λ_{max} 708 nm (λ excitation = 514 nm); 1H NMR (270 MHz, 20% CD_3OD in $CDCl_3$) δ 9.20 (s, 2H, $10+20-H$), 8.78 (m, 2H, $\beta-H$), 8.35 (m, 2H, $\beta-H$), 8.05 (m, 2H, $5-o-Ar$), 7.89-7.86 (m, 3H, $5+15-o/m-Ar$), 7.75 (m, 1H, $15-o-Ar$), 7.20-7.17 (m, 2H, $15-m-Ar$), 6.25 (m, 2H, $7+17-H$), 5.86 (m, 2H, $8+18-H$), 4.06 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), (NH 's exchanged); MALDI-MS m/z 616.4 ($[M+H]^+$, 100%). ES-HRMS calcd. for $C_{35}H_{30}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 616.2196, found 616.2192.

Example 16 5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tri(4-methylphosphoniumphenyl)- porphyrin and 5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-(4-methylphosphoniumphenyl)- porphyrin – General Synthetic Procedure

Boc N-protected 5-(4-aminophenyl)-10,25,20-tri-(4-carbomethoxyphenyl) porphyrin and 5-(4-aminophenyl)-15-(4-carbomethoxyphenyl) porphyrin were synthesised by mixed condensation using Lindsey conditions (Lindsey, J.S., Schreiman, I.C., Hsu, H.C., Kearney, P.C., Marguerettaz, A.M. (1987) *J. Org. Chem.* 52, 827) or by 2+2 condensation methodology via the appropriately substituted 5-phenyldipyrromethanes as described by Boyle et al (Boyle, R.W., Bruckner, C., Posakony, J., James, B.R., Dolphin, D. (1999) *Organic Syntheses*. 76, 287 - incorporated herein by reference) respectively. The (4-carbomethoxyphenyl) groups on these porphyrins were then converted to (4-(1-bromomethyl)phenyl) groups using the following standard procedure: the porphyrin (0.2

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

mmol) was dissolved in dry THF (25 ml) at 0°C and stirred under argon for 10 minutes. Lithium aluminium hydride (0.7 mmol) was added and the stirring continued for 24 hours. The reaction was monitored by TLC and, when the reaction was complete ethyl acetate (2 ml) was added and the mixture washed with aqueous HCl (0.2 M, 20 ml), saturated sodium bicarbonate solution (30 ml) and finally, brine (20 ml). The organic layer was dried (MgSO₄) and evaporated to dryness to yield the corresponding (4-(1-hydroxymethyl)phenyl) substituted porphyrins, bearing three or one reduced carbomethoxy groups respectively. (4-(1-Hydroxymethyl)phenyl) substituted porphyrins (0.2 mmol) were dissolved in dry chloroform (40 ml) and stirred under argon while triphenylphosphine (1.0 mmol) and carbon tetrabromide (1.6 mmol) were added. The reaction was stirred, in the dark, for 24 hours and then monitored by TLC. Once all the hydroxymethyl groups had been converted to bromomethyl groups the reaction mixture was diluted with dichloromethane (40 ml), washed with saturated sodium bicarbonate (2 x 20 ml) then brine (2 x 20 ml) and the organic layer dried (MgSO₄). Removal of solvent by evaporation in vacuo afforded the corresponding bromomethyl porphyrins as purple crystalline solids.

Boc N-protected 5-(aminophenyl)-10,25,20-tri-(4-bromomethylphenyl) porphyrin and 5-(aminophenyl)-15-(4-bromomethylphenyl) porphyrin (0.75 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (50 ml) under an atmosphere of argon at 25°C. Triaryl or trialkylphosphine (7.5 mmol) dissolved in dry dichloromethane (10 ml) was injected by syringe and the progress of the reaction was followed by TLC. Upon completion the solvent was evaporated from the reaction in vacuo and the crude product was purified by flash column chromatography (silica; gradient elution: dichloromethane to methanol) to give the required Boc-N-protected-5-(aminophenyl)-methylphosphonium-meso-aryl porphyrins as lustrous purple crystalline solids. The Boc protecting group was removed by dissolution of the porphyrin in chloroform or acetonitrile, depending upon solubility, and addition of trimethylsilyl iodide (5.0 equivalents), after 30 minutes the reaction was quenched with methanol (10 ml). Removal of solvent by evaporation, followed by purification by flash column chromatography (silica; gradient: dichloromethane to methanol) gave the 5-(aminophenyl)-methylphosphonium-meso-aryl porphyrins which were converted to the required mono-4-(isothiocyanatophenyl) compounds by treatment

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

with 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone using standard procedures (Clarke, O.J. and Boyle, R.W. (1999) *J.C.S. Chem. Commun.* 2231).

Example 17**5-(4-Isothiocyanatophenyl)-10,15,20-tri((4-methylphosphono-di-ethoxy)phenyl)-porphyrin and 5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-((4-methylphosphono-di-ethoxy)phenyl)- porphyrin – General Synthetic Procedure**

Boc N-protected 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri-(4-bromomethylphenyl) porphyrin and 5-(aminophenyl)-15-(4-bromomethylphenyl) porphyrin (0.75 mmol) were dissolved in a mixture of triethyl phosphite (15 mmol) and dry acetonitrile (50 ml). A reflux condenser was fitted and the reaction was refluxed under argon. The reaction was followed by TLC and upon completion was washed with saturated sodium bicarbonate (2 x 20 ml), water (2 x 20 ml) and brine (2 x 20 ml). The organic layer was then dried (MgSO₄) and the solvent evaporated in vacuo. The crude product was then purified by flash column chromatography (silica, gradient elution: dichloromethane to ethyl acetate) to give the title compounds as purple crystalline solids. The methylphosphono-di-ethoxy groups were then deprotected to either methylphosphono-mono-ethoxy sodium groups by sonication in aqueous sodium hydroxide for 1 hour followed by reversed phase medium pressure chromatography (C₁₈; gradient elution 0.1% aqueous TFA to methanol) (Boyle, R.W. and van Lier, J.E. (1993) *Synlett* 351), or to the fully deprotected methylphosphonic acids by treatment with bromotrimethylsilane (2 equivalents per methylphosphono-di-ethoxy group) for 2 hours followed by reversed phase chromatographic purification chromatography (C₁₈; gradient elution 0.1% aqueous TFA to methanol) (McKenna, C.E., Higa, M.T., Cheung, N.H., McKenna, M-C. (1977) 2, 155). Boc deprotection (see above) followed by conversion of the unmasked 4-(aminophenyl) group to its isothiocyanato analogue was performed using standard procedures (Clarke, O.J. and Boyle, R.W. (1999) *J.C.S. Chem. Commun.* 2231).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Example 18**5-(4-Isothiocyantophenyl)-10,15,20-tri((4-methylphosphonato-di-ethoxy)phenyl)-porphyrin and 5-(4-isothiocyantophenyl)-15-((4-methylphosphonato-di-ethoxy)phenyl)- porphyrin – General Synthetic Procedure**

Boc N-protected 5-(aminophenyl)-10,15,20-tri-(4-hydroxymethylphenyl) porphyrin and 5-(aminophenyl)-15-(4-hydroxymethylphenyl) porphyrin (0.75 mmol) were dissolved in a mixture of dry dichloromethane and pyridine (4:1) under an atmosphere of argon. Diethyl chlorophosphate (2 equivalents per hydroxymethyl group) was injected and the mixture was stirred for 16 hours. Evaporation of solvent from the reaction mixture followed by chromatographic purification gave the corresponding tri or mono ((4-methylphosphonato-di-ethoxy)phenyl) porphyrins. Treatment with aqueous sodium hydroxide (1M) gave the sodium salts of tri or mono ((4-methylphosphonatoethoxy)phenyl) porphyrins (Boyle, R.W. and van Lier, J.E. (1995) Synthesis 1079). Boc deprotection and generation of the isothiocyanto group were performed as described above.

Example 19 5-(4-Isothiocyantophenyl)-10,15,20-tri((4-methylpyridiniumyl)phenyl)- porphyrin and 5-(4-isothiocyantophenyl)-15-((4-methylpyridiniumyl)phenyl)- porphyrin – General Synthetic Procedure

Boc N-protected 5-(aminophenyl)-10,25,20-tri-(4-bromomethylphenyl) porphyrin and 5-(aminophenyl)-15-(4-bromomethylphenyl) porphyrin (0.75 mmol) were dissolved in dichloromethane (50 ml) and pyridine (15 mmol), or substituted pyridine (15 mmol), as required, were added. A reflux condenser was fitted and the reaction was refluxed under argon. The reaction was followed by TLC and, upon completion, was evaporated to dryness in vacuo. The residue was purified by reversed phase medium pressure chromatography (C₁₈; gradient elution 0.1% aqueous TFA to methanol) to yield the N-Boc protected 4-aminophenyl compounds. Deprotection of the aminophenyl group(s) and conversion to the isothiocyanto analogue(s) were conducted using the standard protocols (see above).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Example 20 5-(4-Isothiocyanatophenyl)-15-aryl-10,20-(1,2-dihydroxyethyl)-porphyrin – General Synthetic Procedure

The Fmoc protected 5-(4-aminophenyl)-15-aryl porphyrin (0.8 mmol) was dissolved in dry chloroform (300 ml) under an atmosphere of argon. Freshly recrystallised N-bromosuccinimide (1.8 mmol) in dry chloroform (20 ml) was injected by syringe and the mixture was stirred for 30 min. The solvent was then evaporated in vacuo and the crude product purified by flash column chromatography (silica; gradient elution: hexane to ethyl acetate) to give the required 5, 15-dibromo-10, 20-diarylporphyrin as a purple crystalline solid. The product was then metallated by refluxing in a chloroform/methanol (9:1) solution of zinc acetate dihydrate (80 mmol). The metallation was followed by visible spectroscopy and, upon completion, was passed through a short column of neutral alumina to remove uncoordinated zinc. The zinc 5,15-dibromo-10, 20-diarylporphyrin (0,6 mmol) was dissolved in dry THF to which had been added tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (0.6 mmol) and vinyltributyltin (1.4 mmol). The mixture was refluxed under nitrogen for 48 hours after which the solvent was evaporated in vacuo and the residue chromatographed by flash column (silica; gradient elution: dichloromethane to ethyl acetate) to give zinc 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-diethenyl porphyrin as a purple crystalline solid. Zinc 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-diethenyl porphyrin was demetallated by dissolution in a solution of trifluoroacetic acid in dichloromethane (1% v/v) to give 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-diethenyl porphyrin after extracting with water and evaporation of solvent from the organic layer in vacuo. Finally the 10 and 20 ethenyl groups were hydroxylated by osmium tetroxide as described (Sutton J, Fernandez N, Boyle RW (2000) *J. Porphyrins and Phthalocyanines* 4, 655), however due to the rapidity of the reaction between the ethenyl groups and osmium tetroxide it was possible to selectively hydroxylate these groups by control of reaction time and stoichiometry. In a typical set of conditions the 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-diethenyl porphyrin, when treated with osmium tetroxide (5 equivalents) in 10% pyridine/chloroform for 24 – 48 hours, gave the desired 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-bis(1,2-dihydroxyethyl) porphyrin, while if longer reaction times (72 hours) and higher molar ratios of osmium tetroxide (7.5 or 10 equivalents) are used under the same conditions 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

bis(1,2-dihydroxyethyl) 7,8-dihydroxychlorin and 5-(Fmoc aminophenyl)-15-aryl-10,20-bis(1,2-dihydroxyethyl) 7,8,17,18-tetrahydroxybacteriochlorin respectively are obtained. All the above products are converted cleanly to the corresponding isothiocyanates upon piperidine mediated deprotection of the amino group (see above) and treatment with 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone using standard procedures (Clarke, O.J. and Boyle, R.W. (1999) *J.C.S. Chem. Commun.* 2231).

Example 21 5-(4-Isothiocyanatophenyl)-15-phenyl-10,20-(diaryl)-porphyrins – Synthesis from 5,15-diphenyl porphyrins by Pd⁰ mediated Suzuki coupling

Boc N-protected 5-(aminophenyl)-15-phenyl porphyrin was brominated at the 10 and 20 meso positions as described above. The meso-10,20-dibrominated product (0.75 mmol) was dissolved in dry THF (50 ml) or toluene (50 ml), depending upon the boronic acid used in the coupling reaction, tetrakis-(triphenylphosphine) palladium (0) (0.75 mmol) and anhydrous potassium phosphate (0.75 mmol) were added, a reflux condenser was then fitted to the flask and the whole apparatus was placed under an atmosphere of argon. The required aryl or heterocyclic boronic acid was then added as a solution in the appropriate solvent (10 ml) by injection. The reaction was brought to reflux and followed to completion by TLC. On completion the crude reaction mixture was diluted with dichloromethane (100 ml) and extracted with saturated sodium bicarbonate (2 x 50 ml), water (2 x 50 ml) and brine (2 x 50 ml). The organic phase was dried (Mg SO₄) and concentrated by evaporation in vacuo. Finally, the residue was purified by flash column chromatography (silica; gradient elution: dichloromethane to methanol) to give the Boc N-protected 5-(aminophenyl)-15-phenyl-10,20-(diaryl)-porphyrin as a purple crystalline solid. The Boc protecting group was removed by dissolution of the porphyrin in chloroform or acetonitrile, depending upon solubility, and addition of trimethylsilyl iodide (1.2 equivalents), after 30 minutes the reaction was quenched with methanol (10 ml). Removal of solvent by evaporation followed by purification by flash column chromatography (silica; gradient: dichloromethane to methanol) gave the 5-(aminophenyl)-15-phenyl-10,20-(diaryl)-porphyrin which was converted to the title compound by treatment with 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone using standard procedures (Clarke, O.J. and Boyle, R.W. (1999) *J.C.S. Chem. Commun.* 2231).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Example 22 5-(4-Isothiocyantophenyl)-10,15,20-tri(4-glycosylphenyl)- porphyrin and 5-(4-isothiocyantophenyl)-15-(4-glycosylphenyl)- porphyrin – General**Synthetic Procedure**

4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)benzaldehyde was condensed with 4-nitrobenzaldehyde and pyrrole using Lindsey conditions (Sol, V., Blais, J.C., Carre, V., Granet, R., Guilloton, M., Spiro, M., Krausz, P. (1999) *J. Org. Chem.* **64**, 4431) and the crude reaction mixture purified by flash column chromatography to give 5-(4-nitrophenyl)-10,15,20-tris[4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)phenyl] porphyrin. Alternatively, 4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)benzaldehyde was used to synthesise 5-(4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)phenyl) dipyrromethane using the method of Boyle (Boyle, R.W., Bruckner, C., Posakony, J., James, B.R., Dolphin, D. (1999) *Organic Syntheses*, **76**, 287) which was then condensed to give 5-(4-nitrophenyl)-15-[4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)phenyl] porphyrin. Reduction of the nitro group of these porphyrins was performed by dissolution in THF and addition of 10% palladium on carbon. Stirring of the mixture under H₂ for 5 hours followed by filtration through Celite and purification by flash column chromatography gave the corresponding amino porphyrins, which were N-protected by reaction with Fmoc chloride (2 equivalents) in anhydrous 1,4-dioxane in the presence of sodium bicarbonate (6 equivalents) under argon. The reaction was monitored by TLC and, upon completion, diluted with dichloromethane and washed with water then brine before drying the organic layer (MgSO₄). Purification by flash column chromatography gave the Fmoc N-protected 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tris[4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)phenyl] porphyrin or 5-(4-aminophenyl)-15-[4-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)phenyl] porphyrin. N and O protecting groups were removed by dissolution of the porphyrin in dichloromethane/morpholine (1:1) and stirring for 1 hour. Removal of solvent by evaporation in vacuo was followed by redissolution of the residue in a mixture of dichloromethane and methanol (4:1). Sodium methanolate in dry methanol (1.5 equivalents per OAc group) was added and the mixture stirred for 1 hour. The fully deprotected porphyrin was recovered by precipitation with hexane. Finally, the

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

5-(4-aminophenyl) porphyrin was dissolved in dry methanol and 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone (2 equivalents) was added. The reaction was stirred under argon for 2 hours and monitored by TLC, upon completion, solvent was evaporated *in vacuo* and the crude product was purified by preparative medium pressure reversed phase chromatography (C₁₈; gradient elution: 0.1% aqueous TFA to methanol).

Example 23 : Symmetrical Porphyrin/ Chlorin Diol/ Bacteriochlorin Tetrol Series
5,15-(3,4,5-Trismethoxyphenyl)porphyrin (A general procedure)

To a 3 L round bottom flask was added 5-(3,4,5-trismethoxyphenyl)dipyrromethane (1.86 g, 6 mmol), then DCM (1L) under N₂. To this stirred solution was added trimethylorthoformate (48 ml, mmol). A pressure equalizing dropping funnel containing a solution of trichloroacetic acid (23.0 g, mmol) in DCM (500 ml) was then fitted to the flask and the solution added dropwise to the reaction mixture over a period of 10 min. The reaction vessel was covered in aluminium foil to exclude light and allowed to stir under N₂ for a period of 3.5 h. Pyridine was then added to the reaction mixture, rapidly with stirring, and the reaction allowed to stir for a further 16 h. at room temperature under N₂ with the light excluded. The aluminium foil was removed and air was bubbled through the solution for a period of 20 min. After this the reaction was left to stir unstoppered for a further period of 3 h. at room temperature with the aluminium foil removed. The reaction mixture was then concentrated *in vacuo* to remove DCM and remaining pyridine by evaporator, then high vacuum. The crude reaction mixture was then chromatographed on flash silica-gel (250 ml), (dry loaded on to 50 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting with chloroform. The title compound was obtained as purple crystalline solid (347 mg, 18%); λ_{max} / (relative intensity) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} = 634 nm (λ excitation = 408 nm); (270 MHz, CDCl₃) 10.32 (2H, s, 1*O-H*, 2*O-H*), 9.40 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 9.18 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 7.52 (4H, s, *o-Ar*), 4.20 (6H, s, CH₃), 4.00 (12H, s, CH₃), -3.10 (2H, br. s, NH); MS (MALDI) m/z = 643.4 (100%, M⁺).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

7,8-Dihydroxy 5,15-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chlorin (A general procedure)

To a stirred solution of 5,15-(3,4,5-trimethoxyphenyl)porphyrin (50 mg, 77.8 μmol) in HPLC grade chloroform (5.0 ml) was added a solution, in anhydrous pyridine (0.5 ml), of osmium tetroxide (2.5 eq., 0.195 mmol, 49 mg). The reaction vessel was flushed with N_2 and sealed with a lightly greased glass stopper, then covered in aluminium foil to exclude the light and left to stir for 72 h at room temperature. After this period the reaction vessels glass stopper was replaced with a plastic stopper and a continuous stream of hydrogen sulfide gas was bubbled through the reaction mixture for 5 min., (a gas outlet needle was attached and allowed excess hydrogen sulfide gas to escape into a series of Drëshel bottles filled with mineral oil and a bleach solution respectively). After this time the reaction mixture was filtered through Celite® and then concentrated *in vacuo*. Any excess pyridine was removed under high vacuum. The crude reaction mixture was then chromatographed on flash silica-gel (100 ml), (dry loaded on to 20 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting with 1% methanol in DCM. Some starting material was recovered (15%) and the title compound was obtained as brownish-purple crystalline solid, (26 mg, 50%); m.p. 170 °C (decomposed); UV-VIS (CH_2Cl_2) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0) 504 (0.09), 534 (0.06), 582 (0.04), 636 (0.18) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (fluorescence) λ_{max} 639 nm (λ excitation 410 nm); δH (270 MHz, CDCl_3) 9.98 (1H, s, 10-H), 9.42 (1H, s, 20-H), 9.20 (1H, m, β -H), 9.04 (1H, d, J = 4.0 Hz, β -H), 8.99 (2H, s, β -H), 8.79 (1H, d, J = 4.0 Hz, β -H), 8.66 (1H, m, β -H), 7.45 (1H, d, J = 1.6 Hz, 15-o-Ar), 7.42 (1H, d, J = 1.6 Hz, 15-o-Ar), 7.40 (1H, d, J = 1.6 Hz, 5-o-Ar), 7.19 (1H, d, J = 1.6 Hz, 15-o-Ar), 6.49 (1H, d, J = 7.3 Hz, 7-H), 6.23 (1H, d, J = 7.3 Hz, 8-H), 4.17 (3H, s, CH_3), 4.15 (3H, s, CH_3), 4.04 (3H, s, CH_3), 4.00 (3H, s, CH_3), 3.98 (3H, s, CH_3), 3.91 (3H, CH_3), -1.80 (1H, br. s, NH), -2.19 (1H, br. s, NH). (OH's not observed); MS (MALDI) m/z = 677.3 (100%, M^+); HRMS calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$: 676.2533. Found: 676.2587.

7,8,17,18-Tetrahydroxy 5,15-(3,4,5-trimethoxyphenyl) bacteriochlorin (A general procedure)

To a stirred solution of 5,15-(3,4,5-trimethoxyphenyl)porphyrin (50 mg, 77.8 μmol) in HPLC grade chloroform (5.0 ml) was added a solution, in anhydrous pyridine (0.5 ml), of

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

osmium tetroxide (5.0 eq., 0.39 mmol, 49 mg). The reaction vessel was flushed with N₂ and sealed with a lightly greased glass stopper, then covered in aluminium foil to exclude the light and left to stir for 72 h at room temperature. After this period the reaction vessels glass stopper was replaced with a plastic stopper and a continuous stream of hydrogen sulfide gas was bubbled through the reaction mixture for 5 min., (a gas outlet needle was attached and allowed excess hydrogen sulfide gas to escape into a series of Dräshel bottles filled with mineral oil and a bleach solution respectively). After this time the reaction mixture was filtered through Celite® and then concentrated *in vacuo*. Any excess pyridine was removed under high vacuum. The crude reaction mixture was then chromatographed on flash silica-gel (100 ml), (dry loaded on to 20 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting initially with 1% methanol in DCM to elute chlorin by-product then 2.5 % methanol in DCM to elute the major bacteriochlorin isomer (assumed as *trans* form Brückner *et al* (1995) Tetrahedron Lett. 36, 9425). The title compound was obtained as a greeny-pink crystalline solid, (20 mg, 36%); m.p. 135°C (decomposed); UV-VIS (CH₂Cl₂) λ_{max} (relative intensity) 374 (1.0) 512 (0.23), 702 (0.52) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} 708 nm (λ excitation 512 nm); δH(270 MHz, CDCl₃) 9.23 (2H, s, 10-H, 20-H), 8.79 (2H, d, J = 3.2 Hz, β-H), 8.44 (2H, d, J = 3.2 Hz, β-H), 7.37 (2H, s, 5+15-*o*-Ar), 7.13 (2H, s, 5 + 15-*o*-Ar), 6.31 (2H, d, J = 6.5 Hz, 7-H, 17-H), 6.01 (2H, d, J = 6.5 Hz, 8-H, 18-H), 4.12 (6H, s, CH₃), 3.92 (6H, s, CH₃), 3.89 (6H, s, CH₃), -1.97 (2H, br. s, NH), (OH's not observed); MS (MALDI) *m/z* = 712.4 (100%, (M+1)⁺); HRMS calcd. for C₃₈H₃₆N₄O₁₀: 710.2590. Found: 710.2607.

Example 24 : Unsymmetrical Porphyrin/ Chlorin Diol/ Bacteriochlorin Tetrol Fluorochrome Sets for Bioconjugation

5-(4-Acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin

The required unsymmetrical diphenylporphyrin was synthesised using the general procedure outlined earlier, but with only slight modification. In this example a mixture of dipyrromethanes were used. Due to the different reactivities of the respective dipyrromethanes, the amounts needed for optimisation of mixed porphyrin were different. For the same scale reaction 5-(4-methoxyphenyl)dipyrromethane (505 mg, 2 mmol) and

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

5-(4-acetamidophenyl)dipyrromethane (838 mg, 3 mmol) were used. The porphyrin mixture was chromatographed on silica-gel (400 ml), (dry loaded on to 20 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting initially with DCM (1 glass pipette full of triethylamine was added to 500 ml of eluent to aid elution) to remove 5,15-(methoxyphenyl)porphyrin byproduct. After separation of this component the elution was continued with chloroform to allow 5-(4-Acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin collection. The desired porphyrin was obtained as purple crystals. (150 mg, 12%); λ_{max} / (relative intensity) 410 (1.0), 502 (0.04), 538 (0.02), 578 (0.015), 630 (0.01) nm; δ H(270 MHz, CDCl₃) 10.35 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.43 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 9.14 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 8.65 (2H, d, J = 7.2 Hz, 5-m-Ar), 8.22-8.12 (4H, d (overlapping), J = 8.1 Hz, 5-o-Ar+15-o-Ar), 7.56 (2H, d, J = 8.1 Hz, 15-m-Ar), 4.14 (3H, s, CH₃), -3.00 (2H, br. s, NH); MS (MALDI) m/z = 550.3 (100%, M⁺).

5-(4-Aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin

5-(4-Acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin (100 mg, 0.182 mmol) was treated with 18% hydrochloric acid (200 ml) and fitted with an air condenser. The green solution was left to warm to 85°C for a period of 3 h. Prior to cooling, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* (water aspirator; evaporator water bath at 75°C) to remove excess hydrochloric acid then treated carefully with a solution of triethylamine (50 ml) in DCM. The organic extract was washed with water (100 ml) then saturated brine (100 ml) prior to drying (*anhyd.* Na₂SO₄), filtering *via* Buckner funnel and finally concentration *in vacuo*. The required porphyrin was obtained by chromatography on silica-gel (100 ml), (liquid loaded in 10 ml DCM) eluting with DCM (1 glass pipette full of triethylamine was added to 500 ml of eluent to aid elution). The desired porphyrin was obtained as purple crystals; (150 mg, 12%); λ_{max} / (relative intensity) 410 (1.0), 503 (0.045), 538(0.02), 578 (0.015), 630 (0.005) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} = 634 nm (λ excitation = 410 nm); δ H(270 MHz, CDCl₃) 10.30 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.39 (4H, d, J = 4.9 Hz, β -H), 9.17 (2H, d, J = 4.9 Hz, β -H), 9.10 (2H, d, J = 4.9 Hz, β -H), 8.19 (2H, d, J = 8.8 Hz, 15-o-Ar), 8.07 (2H, d, J = 8.1 Hz, 5-o-Ar), 7.35 (2H, d, J = 8.8 Hz, 15-m-Ar), 7.14 (2H, d, J = 8.1 Hz, 5-m-Ar), 4.13 (3H, s, CH₃), 4.08 (2H, br. s, NH), -3.06 (2H, br. s, NH); MS (MALDI) m/z = 508.3 (100%, (M+1)⁺).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

5-(4-Fluorenomethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin

To a stirred solution of 5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin (28 mg, 55 μmol) in anhydrous 1,4-dioxane (2.5 ml) was added solid sodium hydrogen carbonate (6 *eq.*, 28 mg, 0.33 mmol). To this mixture was then added a solution of 9-fluorenomethylchloroformate (2 *eq.*, 0.11 mmol, 28.5 mg) in 1,4-dioxane (0.5 ml) under N_2 . The reaction flask was covered with aluminium foil to exclude light and stirred at room temperature for a period of 3 h. At this time the reaction had gone to completion (as monitored by TLC). The 1,4-dioxane was removed *in-vacuo* and the residue partitioned between water (25 ml) and DCM (2 x 25 ml). The combined organic extracts were washed with saturated brine (25 ml) then dried (*anhyd.* Na_2SO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. The required porphyrin was obtained by chromatography on silica-gel (100 ml), (dry loaded on to 10 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol for solubility) eluting with DCM. The desired porphyrin was obtained as purple crystals; (38 mg, 95%); λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0), 505 (0.042), 541 (0.02), 578 (0.015), 633 (0.01) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (fluorescence) $\lambda_{\text{max}} = 635$ nm (λ excitation = 410 nm); δH (270 MHz, CDCl_3) 10.35 (2H, s, 10-H, 20-H), 9.69 (1H, br. s, NH), 9.44 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 9.12 (4H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 8.20-8.17 (4H, 2 x d (overlapping), J = 8.1 Hz, 5+15-o-Ar), 7.85 (4H, m, 5+15-m-Ar), 7.76-7.66 (2H, m, fluoreno-Ar), 7.51-7.30 (6H, m, fluoreno-Ar), 4.69 (2H, d, J = 7.2 Hz, CH_2), 4.30 (1H, t, J = 7.2 Hz, CH), 4.13 (3H, s, CH_3), -3.15 (2H, br. s, NH); MS (MALDI) $m/z = 731.5$ (100%, $(\text{M}+1)^+$), 508.3 (52%, $(\text{M-FMOC}+1)^+$).

17,18-Dihydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) chlorin and 7,8-dihydroxy 5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) chlorin regioisomers

5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin (28 mg, 55.2 μmol) was converted to a mixture of chlorin diol regioisomers using the general chlorin formation procedure given earlier. The crude reaction mixture was then chromatographed on flash silica-gel (200 ml), (dry loaded on to 20 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting with 1% methanol in DCM to elute first some unreacted starting material then the higher R_f chlorin isomer as a brownish-purple

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

crystalline solid. The lower R_f isomer was obtained by further elution with 2.5% methanol in DCM and gave also a brownish-purple crystalline solid.

High R_f chlorin regioisomer (2,3-dihydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-15-(4-aminophenyl) chlorin, from nOe measurements and JPP paper): (8.5 mg, 30%); m.p. 165°C (decomposed); UV-VIS (CH_2Cl_2) λ_{max} (relative intensity) 401 (0.99), 414 (1.0), 503 (0.08), 535 (0.07), 582 (0.035), 636 (0.22) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (fluorescence) λ_{max} 639 nm (λ excitation 412 nm); δH (270 MHz, 10% MeOH- d_4 in CDCl_3) 9.95 (1H, s, 10-*H*), 9.42 (1H, s, 20-*H*), 9.17 (1H, d, J=4.8 Hz, β -*H*), 9.03 (1H, d, J=4.0 Hz, β -*H*), 8.97 (2H, s, β -*H*) 8.78 (1H, d, J=4.8 Hz, β -*H*), 8.51 (1H, d, J=4.8 Hz, β -*H*), 8.05 (2H, d, J=8.9 Hz, *o*-*Ar*), 7.94 (2H, d, J=8.1 Hz, *o*'-*Ar*), 7.25 (2H, d, J=8.9 Hz, *m*-*Ar*), 7.12 (2H, d, J=8.1 Hz, *m*'-*Ar*), 6.42 (1H, d, J=6.5 Hz, 17-*H*), 6.03 (1H, d, J=6.5 Hz, 18-*H*), 4.08 (3H, s, CH_3), (*NH*'s exchanged), (*OH*'s not observed); MS (MALDI) m/z = 642.2 (100%, ($\text{M}+1$)⁺).

Low R_f chlorin regioisomer (2,3-dihydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) chlorin from nOe measurements and JPP paper): (8.5 mg, 30%); m.p. 168°C (decomposed); UV-VIS (CH_2Cl_2) λ_{max} (relative intensity) 401(0.99), 413 (1.0), 507 (0.08), 536 (0.06), 586 (0.025), 637 (0.20) nm; UV-VIS (CH_2Cl_2) (fluorescence) λ_{max} 639 nm (λ excitation 412 nm); δH (270 MHz, 10% MeOH- d_4 in CDCl_3) 9.96 (1H, s, 20-*H*), 9.40 (1H, s, 10-*H*), 9.18 (1H, d, J=4.8 Hz, β -*H*), 9.05 (1H, d, J=4.8 Hz, β -*H*), 8.98 (1H, d, J=4.0, β -*H*) 8.92 (1H, d, J=4.0 Hz, β -*H*), 8.74 (1H, d, J=4.0 Hz, β -*H*), 8.58 (1H, d, J=4.0 Hz, β -*H*), 8.13 (1H, d, J=8.9 Hz, *o*-*Ar*), 8.08 (1H, d, J=8.9 Hz, *o*-*Ar*), 7.95 (1H, d, J=8.1 Hz, *o*'-*Ar*), 7.79 (1H, d, J=8.1 Hz, *o*'-*Ar*), 7.36 (1H, d, J=8.9 Hz, *m*-*Ar*), 7.30 (1H, d, J=8.9 Hz, *m*-*Ar*), 7.11 (1H, d, J=8.1 Hz, *m*'-*Ar*), 7.05 (1H, d, J=8.1 Hz, *m*'-*Ar*), 6.42 (1H, d, J=6.5 Hz, 7-*H*), 6.09 (1H, d, J=6.5 Hz, 8-*H*), 4.11 (3H, s, CH_3), (*NH*'s exchanged), (*OH*'s not observed); MS (MALDI) m/z = 642.2 (100%, ($\text{M}+1$)⁺).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

17,18-Dihydroxy-5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)chlorin (higher R_f regioisomer)

To a stirred solution of 1,1'-thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridone (1.07 eq., 7.6 mg, 43.5 mmol) in DCM (25 ml), (dried *via* passage through an activated alumina column) was added a solution of 17,18-dihydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-15-(4-aminophenyl)chlorin (17.5 mg, 23.2 μ mol) in DCM (10 ml). The reaction flask was covered with aluminium foil to exclude light and left to stir under N₂ for 2 h, at which time TLC indicated complete loss of starting material. The reaction mixture was then washed with water (2 x 50 ml) and saturated brine (50 ml) then dried (*anhyd.* Na₂SO₄). The organic extract was then filtered and concentrated on to 10 ml flash silica-gel and chromatographed on flash silica-gel (100 ml), eluting with 1% methanol in DCM to elute the required isothiocyanato chlorin diol (*NB.* traces of all TDP must be removed prior to concentration of product from column chromatography otherwise some decomposition to 3 higher R_f byproducts occurs. These have not been identified at this time). The title compound was isolated as a brownish-purple crystalline solid (17 mg, 90%); m.p. 155°C (decomposed); UV-VIS (CH₂Cl₂) λ_{max} (relative intensity) 410 (1.0) 505 (0.09), 534 (0.06), 586 (0.04), 637 (0.18) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} 639 nm (λ excitation 412 nm); δ H(270 MHz, 10% MeOH-d₄ in CDCl₃) 10.0 (1H, s, 1*O*-H), 9.45 (1H, s, 2*O*-H), 9.20 (1H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 9.06 (1H, d, J = 4.0 Hz, β -H), 9.02 (1H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 8.84 (1H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 8.64 (1H, d, J = 4.0 Hz, β -H), 8.55 (1H, d, J = 4.8 Hz, β -H), 8.21 (1H, d, J = 8.1 Hz, *o*-Ar), 8.15 (1H, d, J = 8.1 Hz, *o*-Ar), 8.05 (1H, d, J = 8.9 Hz, *o*'-Ar), 7.93 (1H, d, J = 8.9 Hz, *o*'-Ar), 7.65 (2H, m, *m*-Ar), 7.24 (2H, m, *m*'-Ar), 6.43 (1H, d, J = 6.5 Hz, 17-H), 6.04 (1H, d, J = 6.5 Hz, 18-H), 4.08 (3H, s, CH₃), (*NH*'s exchanged), (*OH*'s not observed); MS (MALDI) *m/z* = 583.7 (100%, M⁺); HRMS calcd. for C₃₄H₂₆N₃O₃S: 584.1757. Found: 584.1756 ((M+1)⁺).

7,8,17,18-Tetrahydroxy-5-(4-fluoromethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (cis/trans stereoisomers)

5-(4-Fluoromethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)porphyrin (35 mg, 48.0 μ mol) was converted to a mixture of bacteriochlorin stereoisomers using the general bacteriochlorin formation procedure given earlier. The crude reaction mixture was then

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

chromatographed on flash silica-gel (200 ml), (dry loaded on to 20 ml flash silica-gel from DCM and a little methanol to ensure complete solubility) eluting initially with 1% methanol in DCM to elute the higher R_f chlorin byproducts, then 2% methanol/ DCM to elute separately the two stereoisomeric bacteriochlorins. The higher R_f -*trans* bacteriochlorin isomer was isolated as a pinky-green crystalline solid, (6 mg, 15%); m.p. 142°C (decomposed); UV-VIS (CH₂Cl₂) λ_{max} (relative intensity) 374 (1.0) 512 (0.23), 702 (0.52) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} 708 nm (λ excitation 512 nm); δ H(270 MHz, 10 % MeOH-d₄ in CDCl₃) 9.20 (2H, s, 10-H, 20-H), 8.78 (2H, d, J=4.0 Hz, β -H), 8.36 (2H, d, J=4.0 Hz, β -H), 7.95 (2H, m, *o*-Ar), 7.85 (2H, d, J=7.3 Hz, *fluoreno*-Ar), 7.79 (2H, m, *o*'-Ar), 7.65 (2H, m, *m*'-Ar), 7.47-7.38 (6H, m, *fluoreno*-Ar), 7.24 (2H, m, *m*-Ar), 6.27-6.24 (2H, 2 x d (overlapping), J=6.5 Hz, 7-H, 17-H), 5.85 (2H, d, J=6.5 Hz, 8-H, 18-H), 4.65 (2H, d, J=7.2 Hz, CH₂), 4.39 (1H, t, J=7.2 Hz, CH), 4.06 (3H, s, CH₃), -1.94 (2H, br. s (partly exchanged), NH), (OH's not observed); MS (MALDI) m/z = 800.4 (100%, (M+1)⁺).

The lower R_f -*cis*-bacteriochlorin isomer was isolated as a pinky-green crystalline solid, (8.5 mg, 21%); m.p. 148°C (decomposed); UV-VIS (CH₂Cl₂) λ_{max} (relative intensity) 374 (1.0) 512 (0.24), 703 (0.54) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} 708 nm (λ excitation 512 nm); δ H(270 MHz, 10 % MeOH-d₄ in CDCl₃) 9.12 (2H, s, 10-H, 20-H), 8.76 (2H, d, J=4.8 Hz, β -H), 8.34 (2H, 2 x d (overlapping), J=4.8 Hz, β -H), 8.02 (2H, m, *o*-Ar), 7.85 (2H, d (obscured), J=8.0 Hz, *o*'-Ar), 7.83 (2H, d, J=7.3 Hz, *fluoreno*-Ar), 7.76 (2H, d, J=8.0 Hz, *m*'-Ar), 7.50-7.38 (6H, m, *fluoreno*-Ar), 7.24 (2H, m, *m*-Ar), 6.27-6.23 (2H, 2 x d (overlapping), J=6.5 Hz, 7-H, 17-H), 5.85-5.82 (2H, 2 x d (overlapping), J=6.5 Hz, 8-H, 18-H), 4.65 (2H, d, J=7.2 Hz, CH₂), 4.39 (1H, t, J=7.2 Hz, CH), 4.05 (3H, s, CH₃), -1.88 (2H, br. s (partly exchanged), NH), (OH's not observed); MS (MALDI) m/z = 800.4 (100%, (M+1)⁺).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

7.8.17.18-Tetrahydroxy-5-(4-isothiocyanatophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (lower R_F cis stereoisomer)

A solution of 7,8,17,18-tetrahydroxy-5-(4-fluorenomethylaminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (lower R_F cis stereoisomer), (8.5 mg, 10.7 μmol) in 25% methanol in DCM (1.25 ml) was treated with piperidine (50 eq., 53 μl, 0.53 mmol) and left to stir for a period of 3 h. at room temperature under N₂ with the light excluded. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to remove all traces of piperidine (high vacuum needed). To a stirred solution of 1,1'-thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridone (1.07 eq., 7.6 mg, 43.5 mmol) in DCM (25 ml), (dried *via* passage through an activated alumina column) was added a solution of 2,3,12,13-tetrahydroxy-5-(4-aminophenyl)-15-(4-methoxyphenyl)bacteriochlorin (6.1 mg, 10.7 μmol) in DCM (10 ml). The reaction flask was covered with aluminium foil to exclude light and left to stir under N₂ for 2 h, at which time TLC indicated complete loss of starting material. The reaction mixture was then washed with water (2 x 50 ml) and saturated brine (50 ml) then dried (*anhyd.* Na₂SO₄). The organic extract was then filtered and concentrated on to 10 ml flash silica-gel and chromatographed on flash silica-gel (100 ml), eluting with 2% methanol in DCM to elute the required isothionato bacteriochlorin tetrol (*NB.* traces of all TDP must be removed prior to concentration of product from column chromatography otherwise some decomposition occurs). The lower R_F *cis*-bacteriochlorin isomer was isolated as a pinky-green crystalline solid, (5.0 mg, 76%); m.p. 132°C (decomposed); UV-VIS (CH₂Cl₂) λ_{max} (relative intensity) 375 (1.0) 516 (0.22), 702 (0.48) nm; UV-VIS (CH₂Cl₂) (fluorescence) λ_{max} 709 nm (λ excitation 516 nm); δH(270 MHz, 10 % MeOH-d₄ in CDCl₃) 9.20 (1H, s, *meso*-H), 9.18 (1H, s, *meso*'-H), 8.77 (2H, d, J = 4.8 Hz, β-H), 8.40 (1H, d, J = 4.8 Hz, β-H), 8.34 (1H, d, J = 4.8 Hz, β-H), 8.14 (2H, m, *o*-Ar), 8.05 (2H, m, *o*'-Ar), 7.42-7.08 (4H, m, 5-15-*m*-Ar), 6.20 (2H, 2 x d (overlapping), J = 6.5 Hz, 7-H, 17-H), 5.98 (1H, d, J = 6.5 Hz, 8-H), 5.93 (1H, d, J = 6.5 Hz, 18-H), 4.04 (3H, s, CH₃), -1.80 (2H, br. s (partly exchanged), NH), (OH's not observed); MS (MALDI) m/z = 618.9 (100%, (M+1)⁺); HRMS calcd. for C₃₄H₂₈N₃O₅S: 618.1815. Found: 618.1810 ((M+1)⁺).

Further synthetic protocols and methodology protocols are also described in Sutton et al. Porphyrin, Chlorin and Bacteriochlorin Isothiocyanates – Synthesis and

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Potential Applications in Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy (*Journal of Phthalocyanines & Photosensitisers* – in press) and in Oliver J Clarke, Isothiocyanato Porphyrins for bioconjugation: synthesis and applications in photochemotherapy and fluorescence imaging (PhD thesis, April 2001, University of Essex); the entire contents of each of which are incorporated herein by reference.

Methodology Description 1: General Bioconjugation protocol

Hexahydroxy PITC + Antibody

A stock solution of hexahydroxy PITC in DMSO was prepared to a molarity of 0.027, this solution was desiccated and stored at 0°C until required. A solution of antibody was extensively dialysed against sterilised PBS to remove any trace of azide. The dialysed antibody solution was then adjusted to a concentration of 10 mg/mL *via* centrifugal concentration and separated into 250 µL aliquots.

A 1 M solution of sodium bicarbonate was prepared and adjusted to pH 9.0 with 2 M sodium hydroxide.

To a 250 µL aliquot of antibody was added 30 µL of 1 M sodium bicarbonate. A predetermined volume of hexahydroxy PITC stock solution was then added to give a desired molar ratio (MR) of porphyrin to antibody. For example an MR of 20 was achieved *via* the addition of 10 µL of stock solution to 250 µL of antibody at 10 mg/mL. In order to maintain a constant concentration of DMSO in the bioconjugation reaction mixture, all aliquots of stock solution were diluted to 25 µL with further portions of DMSO.

Desired MR	Vol. of antibody solution	[C] of antibody solution	Vol. of 1 M sodium bicarbonate	Vol. of PITC stock solution	Vol. of extra DMSO
20	250 µL	10 mg/mL	30 µL	10 µL	15 µL
10	250 µL	10 mg/mL	30 µL	5 µL	20 µL
5	250 µL	10 mg/mL	30 µL	2.5 µL	22.5 µL

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

2.5	250 μ L	10 mg/mL	30 μ L	1.25 μ L	23.75 μ L
-----	-------------	----------	------------	--------------	---------------

Table 1.0 Quantities of reagents for bioconjugation

Following addition of PITC the bioconjugation reaction was agitated gently for 1 hour at 25°C. After 1 hour the crude bioconjugation reaction mixture was loaded directly onto the top of a prepacked PD10 size exclusion column pre-equilibrated with sterile PBS (25 mL). The column was eluted with sterile PBS. Antibody-porphyrin conjugate was eluted in the first coloured band/fraction. The antibody-porphyrin conjugate concentration following dilution during chromatography was determined as 1.25 mg/mL. The degree of labelling (DOL) of porphyrin to antibody was calculated *via* standard spectroscopic methods using known constants of molar absorptivity for both porphyrin and protein.

Antibody-porphyrin conjugates were stored, without further concentration, in PBS + azide at 0°C unless otherwise stated.

***N*-Methylpyridinium chloride PITC + Antibody**

A stock solution of *N*-methylpyridinium chloride PITC in DMSO was prepared to a molarity of 0.027, this solution was desiccated and stored at 0°C until required. A solution of antibody was extensively dialysed against sterilised PBS to remove any trace of azide. The dialysed antibody solution was then adjusted to a concentration of 10 mg/mL *via* centrifugal concentration and separated into 250 μ L aliquots.

A 1 M solution of sodium bicarbonate was prepared and adjusted to pH 9.0 with 2 M sodium hydroxide.

To a 250 μ L aliquot of antibody was added 250 μ L of sterile PBS then 60 μ L of 1 M sodium bicarbonate. A predetermined volume of *N*-methylpyridinium chloride PITC stock solution was then added to give a desired molar ratio (MR) of porphyrin to antibody. For example an MR of 20 was achieved *via* the addition of 10 μ L of stock solution to 500 μ L of antibody at 5 mg/mL. In order to maintain a constant concentration of DMSO in the bioconjugation reaction mixture, all aliquots of stock solution were diluted to 25 μ L with further portions of DMSO.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Desired MR	Vol. of antibody solution	[C] of antibody solution	Vol. of 1 M sodium bicarbonate	Vol. of PITC stock solution	Vol. of extra DMSO
20	500 μ L	5 mg/mL	60 μ L	10 μ L	15 μ L
10	500 μ L	5 mg/mL	60 μ L	5 μ L	20 μ L
5	500 μ L	5 mg/mL	60 μ L	2.5 μ L	22.5 μ L
2.5	500 μ L	5 mg/mL	60 μ L	1.25 μ L	23.75 μ L

Table 2.0 Quantities of reagents for bioconjugation

Following addition of PITC the bioconjugation reaction was agitated gently for 1 hour at 25°C. After 1 hour the crude bioconjugation reaction mixture was loaded directly onto the top of a prepacked PD10 size exclusion column pre-equilibrated with sterile PBS (25 mL). The column was eluted with sterile PBS. Antibody-porphyrin conjugate was eluted in the first coloured band/fraction. The antibody-porphyrin conjugate concentration following dilution during chromatography was determined as 1.25 mg/mL. The degree of labelling (DOL) of porphyrin to antibody was calculated *via* standard spectroscopic methods using known constants of molar absorptivity for both porphyrin and protein.

Antibody-porphyrin conjugates were stored, without further concentration, in PBS + azide at 0°C unless otherwise stated.

Methodology Description 2 : Standard Photocytotoxicity

Cells are grown to confluence or appropriate density then washed 2 times with PBS (phosphate buffered saline) to eliminate all trace of FBS (fetal bovine serum). Cell density is adjusted to 1.5×10^6 cells/ml in medium without FBS and these are then incubated for 1 hour in the dark (37 degrees C, 5% CO₂) with a range of photosensitiser/conjugate concentrations. Post incubation, cells are washed further with

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

medium (without FBS) to eliminate unbound photosensitizer, then resuspended and seeded in 96 wells plates (1×10^5 cells/well) in quadruplicate. Plates are then either irradiated (3.6 J/cm^2 of filtered red light $\square 600 \text{ nm}$) or left in the dark as "dark toxicity controls" for the same period of time (~14 minutes). Five microliters (5%/well) of FBS is added after the irradiation/dark period and the plates are returned to the incubator overnight. Twenty to 24 hours after treatment, $10 \mu\text{l}$ of MTT solution (Sigma Thiazolyl blue, $4.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ in PBS) is added per well and the plates are returned to the incubator until color develops (between 1 and 4 hours). A solution of acid-alcohol ($100 \mu\text{l/well}$ of 0.04 N HCL in isopropanol) is added and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. Plates are then read at 570 nm in a microplate reader and the % cell survival calculated against controls.

Methodology Description 3 : Initial Flow Cytometry Chromophore Analysis

The two fluorochromic probes were generated from separate reactions of 2,3-dihydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-15-(4-isothiocyanatophenyl)chlorin (higher R_f regioisomer) and 2,3,12,13-tetrahydroxy-5-(4-isothionatophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (lower R_f *cis* stereoisomer) with avidin under the standard bioconjugation protocols given earlier. An initial flow experiment has been undertaken utilising these separate avidin conjugates with RAJI cells and biotin monoclonal antibodies (HLA-DR1, L243), (laser excitation 488 nm , collecting emissions at $< 640 \text{ nm}$ (FL2) $> 670 \text{ nm}$ (FL3)). Data indicated that the signals from the DPBC samples were much higher due to good match to emission filter (FL3). Samples containing avidin DPCH or DPBC conjugates with L243 antibodies indicated modest increases in fluorescence compared to controls. Using higher concentrations of avidin-DPCH/DPBC the peak fluorescence increased, which may either be due to the initial concentrations of conjugates being too low to saturate receptors or to a lesser extent to some non-covalent binding. Control samples with avidin-DPCH/DPBC (no antibody) showed some background fluorescence in the absence of L243 antibodies, suggesting that some non-specific binding of the conjugates to the RAJI cells had occurred or that a small quantity of non-covalently bound fluorophore had transferred from the protein to the cell surface. A FITC-avidin control indicated that a slightly higher signal was present in FL2 which appears also in

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

FL3 due to a broad emission band. In the presence of L243 antibody the mean signal increased by 150%. This indicates that non-covalent binding is less significant with FITC-avidin conjugates.

Experiments have been undertaken to determine the level of non-covalent binding of fluorophore to the protein surface (BSA and avidin). 'Blank' bioconjugations using mixtures of the unreactive DPCH and DPBC derivatives 2,3-dihydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-15-(4-acetamidophenyl)chlorin (higher R_f regioisomer) and 2,3,12,13-tetrahydroxy-5-(4-acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (higher R_f *trans* stereoisomer) with both BSA and avidin have been carried out and the resultant protein solutions have been purified by gel filtration (PD-10) as described for the reactive probes described earlier. UV analysis indicated that approximately similar amounts of unreactive probes non-covalently bind to the proteins. For BSA or avidin, 1 unreactive DPCH binds to each protein molecule, whereas DPBC is less than 1 due probably to its increased polarity and non-amphiphilic nature.

Initial studies have been undertaken to remove non-covalently bound fluorophore from the protein (BSA and avidin) using SDS-PAGE. When the 'blank' bioconjugation mixtures were subjected to SDS-PAGE separation of all non-covalently bound fluorophore was achieved (UV/fluorescence of a solubilised gel segment at 66000 D for BSA and 16500 D for avidin monomer indicated no signal). Further to these investigations, we have been able to show that fluorophore which is non-covalently bound to BSA (or avidin) transfers to the surface of HeLa cells. When HeLa cells were added to solutions of the non-covalent fluorophore-protein complexes, and incubated for 20 min, fluorescence was removed from the solution with removal of the HeLa cells. This effect was much more marked with 2,3-dihydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-15-(4-acetamidophenyl)chlorin (higher R_f regioisomer) than with 2,3,12,13-tetrahydroxy-5-(4-acetamidophenyl)-15-(4-methoxyphenyl) bacteriochlorin (higher R_f *trans* stereoisomer). Re-suspension of the cells and measurement of the fluorescence indicated a 10-fold increase in fluorescence in the case of the DPCH, whereas the DPBC only showed a modest increase. These measurements suggest that there is significant fluorescence quenching of both DPCH and DPBC by the protein and that the DPCH's amphiphilic nature has allowed incorporation into the HeLa cell membrane resulting in restoration of

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

almost complete fluorescence. The DPBC, being non-amphiphilic, may complex to the surface of the HeLa cell in a similar manner as it does to the protein resulting in similar fluorescence quenching.

Since the fluorophore conjugates can be purified by SDS-PAGE we have investigated the use of preparative electrophoresis as a technique for removal of non-covalently bound fluorophore. To this end we have used a Centriltutor® micro-electroeluter bought from Millipore. This device has allowed recovery of pure protein fluorophore conjugates from SDS gels.

Methodology Description 4 : Elution of Conjugates from SDS PAGE Utilising Micro-Electroeluter

- Working in greatly subdued lighting, the SDS-PAGE of the required protein conjugate was cut into small strips and added to the centriltutor sample tubes and the tops closed (no more than half full, 3-4 sample tube used).
- The lower buffer chamber of the electroeluter was filled with degassed SDS running buffer up to the level of the first electrode.
- 3 to 4 Centricon® centrifugal devices (YM-30 used for BSA conjugates and YM-3 for avidin conjugates) from Millipore were inserted firmly into the holes in the upper buffer chamber rack of the electroeluter from below (with filter membrane lowest) and the vacant holes of the rack were stoppered with stoppers provided, from the underside of the rack.
- The upper buffer chamber was placed into the lower buffer chamber with both electrodes aligned on the same side of the electroeluter.
- The upper buffer chamber was then filled with degassed SDS running buffer (as before) until all Centricon® unit tops were completely immersed. If no leaks were detected the air bubbles trapped below the Centricon® units were removed *via* an angled plastic pipette (reinforced with paper clip).
- The centriltutor sample tubes were then placed into the top of the Centricon® units, ensuring the sample tube fitted snugly and filled completely with sample buffer (air bubbles were removed as described earlier).

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

- The safety cover of the electroelutor was added and the power supply connected (200 V, 50 mA used).
- After a period of 2-3 h. the power supply was removed and the Centricon® filter extracted from the upper buffer chamber of the electroelutor.
- The filtrate vial was added to the filter unit and a retentate top added. The excess buffer was then removed by centrifugation at 5000G (BSA) and 7,500G (avidin) for 2 h. Fresh 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0) was added to the Centricon® unit and the procedure was repeated to ensure all SDS was removed.
- The concentrated purified conjugates were then collected in the retentate vials of the filter units by inversion and centrifugation. Sodium azide (2 M, 20 ml) was added and the conjugates were stored at 4°C.

Methodology Description 5: FACS Conjugate Binding Protocol

Wash flask of cells with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.3. Treat with 5mM EDTA in PBS for 10 min at 37C. Tap flask to dislodge cells, place in 50mL polypropylene tube and pellet at 400g 3 min. Resuspend in 10 mL PBS and count cells. Place 2×10^5 in FACS tube (Falcon 2054) and wash with 1mL PBS by centrifugation (400g 3min) and resuspension by agitation

Block cells in 500 μ L 2% Marvel milk powder in PBS, 1% BSA 30 min RT
Wash cells in 1 mL PBS/BSA/Azide centrifuge and resuspend pellet (as above)
Add 10 μ L appropriate antibody dilution. Incubate on ice 1h
Wash cells in 1 mL PBS/BSA/Azide centrifuge and resuspend pellet (as above)
Add 50 μ L Rabbit anti-mouse:FITC (Serotec, 1/100 dilution) and incubate on ice in the dark 1h
Wash cells in 1 mL PBS/BSA/Azide centrifuge (as above) and resuspend pellet in 400 μ L PBS/BSA/Azide.

Run samples through FACS machine using CellQuest acquisition software to collect data.

PBS/BSA/AZIDE
250 mL PBS

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

0.625g BSA
1.56 mL Sodium Azide (1.6M)

Methodology Description 6 : SDS-PAGE

Separating gel

Component	% of gel	5	20
Acrylamide/Bis (40% w/v)		1.67mL	6.66mL
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)		2.5mL	2.5mL
Water		5.67mL	0.7mL
TEMED		10 µL	10 µL
10% Ammonium persulphate		50 µL	50 µL
SDS		100 µL	100 µL

For gradient gel 5-20% a gradient mixer connected to a peristaltic pump is used.

Stacking gel (3%)

Component	mL
Acrylamide/Bis (40% w/v)	1.3
1M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25
Water	7.4
TEMED	20 µL
10% Ammonium persulphate	50 µL
SDS	100 µL

Running buffer

0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS, pH8.3 in water.

Sample buffer

1M Tris-HCl pH 6.8	13mL
20% SDS	6.5mL
Glycerol	5.2mL
0.5% Bromophenol blue	0.26mL

Biorad Protean 2 equipment was used in accordance with manufacturer's instructions

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Samples (total volume 15-20 μ L containing 1-10 μ g sample protein) were loaded onto a gel.

Gels were run at 200V for approximately 1h. Gels were then scanned by light, after which they were stained using Coomassie blue stain and subsequently destained using acetic acid/methanol.

Further exemplification of the invention

It has been demonstrated in our original work, described inter alia in Sutton, J., Fernandez, N. and Boyle, R.W. (2000) Functionalised Diphenylchlorins and Bacteriochlorins - Their Synthesis and Bioconjugation for Targeted Photodynamic Therapy and Tumour Cell Imaging. *J. Porphyrins and Phthalocyanines* 4, 655-658; and Clarke, O.J. and Boyle, R.W. (1999) Isothiocyanatoporphyrins, useful intermediates for the conjugation of porphyrins with biomolecules and solid supports. *J.C.S. Chem. Commun.* 2231-2232, each of which is incorporated herein by reference, that a set of porphyrin, chlorin and bacteriochlorin molecules can be efficiently conjugated to proteins via a stable thiourea bond, and that these conjugates have potential as fluorescence imaging agents.

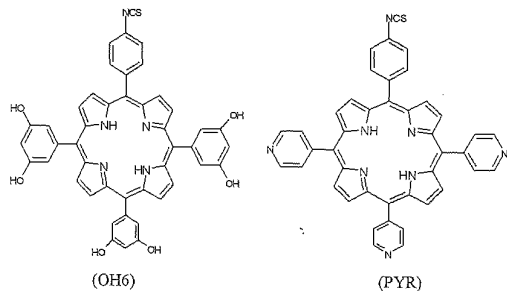
As exemplification of the present invention, we now describe the use of this method to form conjugates between monoclonal antibodies having high specificity for human cancer cells, and our set of porphyrin based photosensitisers. Conjugates formed in this way have been assayed for photodynamic activity against the corresponding carcinoma cells, and also for their ability to selectively bind to, and photosensitise, these target cells in the presence of non-target cells. We also demonstrate the specific internalisation of porphyrin-BSA conjugates into HeLa cells.

Our examples utilise 5,10,15-tris(3,5-dihydroxyphenyl)-20-(4-isothiocyanatophenyl) porphyrin (OH6) and 5,10,15-tris(pyridyl)-20-(4-isothiocyanatophenyl)porphyrin (PYR), as we have found from our previous studies that the pattern of hydrophilic substituents around the photoactive porphyrin core of each of these chromophores leads to efficient conjugation with proteins; hydrophilic substituents also minimise non-covalent binding of photosensitiser to protein, often found with more

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

hydrophobic porphyrins. Synthetic protocols for these chromophores are described in Examples 1 and 2 above respectively.



Example 25 – stable conjugation to antibodies

OH6 and PYR were prepared as described in Examples 1 and 2 above respectively. Antibody 17.1A was selected for the bioconjugation procedure. 17.1A is an antibody which reacts specifically with a receptor that is over-expressed on colorectal cancer cells, in particular Colo 320 cells (ECACC, deposit no. 87061205). However, any antibody which reacts against any antigen that is over-expressed on a suitable cell line may be utilised in accordance with the invention. Examples of such antibodies include Ber-EP4 and MOK-31, each of which is commercially available from DAKO Ltd, Ely, Cambridgeshire, and each of which is reactive against an antigen that is over-expressed on epithelial cells.

To increase the buffer pH of the antibody preparation to approximately pH9, prior to and for the purposes of the bioconjugation procedure, the monoclonal antibody preparation was either buffer-exchanged from a phosphate to an acetate buffer using a Centricon centrifuge or was subjected to dialysis so as to exchange the phosphate buffer for an acetate buffer.

Each of OH6 and PYR was separately conjugated with 17.1A monoclonal antibody in accordance with the method described in Methodology Description 1, to obtain a range of conjugation dilutions having respective MRs of 2.5, 5, 10 and 20..

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

The acetate-buffered antibody preparation and range of conjugation dilutions obtained therefrom were subjected to SDS-PAGE in accordance with the method described in Methodology Description 6. The results are shown in Figures 1-3 respectively. Figure 1 shows a gel loaded with buffer-exchanged 17.1A antibody (lane 1), and buffer-exchanged antibody/OH6 conjugations at MRs 2.5 (lanes 2, 3), 5 (lanes 4, 5), 10 (lanes 6, 7) and 20 (lanes 8, 9) and molecular weight markers (lane 10). Figure 2 shows a gel loaded with dialysed 17.1A antibody (lane 1), and dialysed antibody/OH6 conjugations at MRs 2.5 (lanes 2, 3), 5 (lanes 4, 5), 10 (lanes 6, 7) and 20 (lanes 8, 9) and molecular weight markers (lane 10). Figure 3 shows a gel loaded with buffer-exchanged 17.1A antibody (lane 1), and buffer-exchanged antibody/PYR conjugations at MRs 2.5 (lanes 2, 6), 5 (lanes 3, 7), 10 (lanes 4, 8) and 20 (lanes 5, 9) and molecular weight markers (lane 10).

As seen in these Figures, neither the buffer-exchange nor dialysis procedures disrupt the antibody structure, the light and heavy chains remaining associated with one another and migrating together on each of the gels (lane 1). Conjugation of OH6 and PYR at each of the MRs can also be seen on the gels (lanes 2-9).

Example 26 – FACS analysis

FACS analyses were run in accordance with Methodology Description 5.

Figure 4 shows results derived utilising FITC-labelled 17.1A and Colo 320 cells (3 repeats) and indicates that binding of the antibody to the cells has occurred (ie the Colo 320 cells express the antigen specific to 17.1A).

Figure 5 shows results derived utilising OH6/17.1A conjugate and Colo 320 cells with a FITC-labelled anti-17.1A antibody for detection (3 repeats) and indicates that the OH6/17.1A conjugate has bound to the cells.

Figure 6 shows results derived utilising PYR/17.1A conjugate and Colo 320 cells with a FITC-labelled anti-17.1A antibody for detection (3 repeats) and indicates that the PYR/17.1A conjugate has bound to the cells.

Figure 7 shows results derived utilising FITC-labelled OX-34 which is an antibody of the same class (IgG2a) as 17.1A but with a different antigen specificity (3

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

repeats). The results indicate that OX-34 has not bound to the Colo 320 cells and hence that there are no binding sites for OX-34 on Colo 320 cells.

Example 27 – Photocytotoxicity experiments

Photocytotoxicity tests in accordance with the method described in Methodology Description 2 were performed on Colo 320 cells utilising various antibody conjugates.

Figures 8 and 9 show the results of control experiments performed using OH6/OX-34 and PYR/OX-34 conjugates respectively. As described in Example 16 OX-34 has been found to lack specificity for any antigens expressed on the surface of Colo 320 cells. Accordingly, as expected these control experiments show no photocytotoxicity following irradiation.

Figures 10 and 11 show the results of further control experiments performed using "capped" OH6 and PYR respectively. The "capping" procedure involved reacting the NCS group on each chromophore with propylamine, so as to block serum protein conjugation. Figure 10 shows no cytotoxicity in the dark, indicating that OH6 is non-toxic to Colo 320 cells. On irradiation, however, some photocytotoxicity is observed, indicating that an amount of the capped OH6 has been transferred to the surface of the Colo 320 cells. Figure 11 meanwhile shows some cytotoxicity in the dark, suggesting that PYR is to some extent cytotoxic to Colo 320 cells, and increased photocytotoxicity on irradiation, which again indicates that an amount of the capped PYR has been transferred to the surface of the Colo 320 cells.

In the absence of any antibody, transfer of the capped chromophores to the cell membrane is probably attributable to the amphiphilic nature of the capped chromophores, which possess both hydrophilic groups around the porphyrin core and a hydrophobic propylamine "capping" group. This renders them particularly susceptible to becoming embedded in a lipid membrane such as the Colo 320 cell membrane.

Figures 12 and 13 show results obtained using OH6/17.1A and PYR/17.1A conjugates respectively, at various conjugation dilutions (2.5, 5, 10, 20 for OH6/17.1A; 10 and 20 for PYR/17.1A). The results indicate a significant increase in cytotoxicity on irradiation, indicating that the binding of the bioconjugates to the cell surface confers photosensitivity upon the cells. Hence, these species are suitable candidates for PDT.

Example 28 – photodynamic therapy in vivo

Protocols for performing and assessing photodynamic therapy in vivo, utilising the conjugates of the invention, are variously described in R Boyle et al, *Br. J. Cancer* (1992) 65:813-817; R Boyle et al, *Br. J. Cancer* (1993) 67:1177-1181; R Boyle et al, *Br. J. Cancer* (1996) 73:49-53; and Lapointe et al, *J. Nuclear Medicine*, Vol. 40, No. 5 (May 1999) 876-882; the contents of each of which are incorporated herein by reference.

As described in these papers, tumours may be induced or transplanted into animals such as mice, and the animal may then be injected with a quantity of photosensitiser in accordance with the invention conjugated to an antibody with specificity for an antigen which is specifically expressed or over-expressed on the surface of the tumour cells. Thereafter, the animal may be subjected to irradiation, and the effects on the tumour assessed, qualitatively or metrically, with reference to tumour metabolism (as described in Lapointe et al, *J. Nuclear Medicine*, Vol. 40, No. 5 (May 1999) 876-882). As described in R Boyle et al, *Br. J. Cancer* (1996) 73:49-53, the distribution of the photosensitiser in vivo may also be measured, by biodistribution and/or vascular stasis assays.

Example 29 - Confocal Laser Scanning Microscopy

A preliminary examination of the intracellular localisation of a conjugate of 10,15,20-tris(3,5-dihydroxyphenyl)5-isothiocyanatophenylporphyrin (OH6-NCS) with BSA was carried out using confocal laser scanning microscopy. The readily available epithelial human carcinoma cell line HeLa was selected for incubation with the conjugate. All incubations were performed in triplicate with sub-confluent cultures of HeLa cells, including a series of control solutions of unlabelled BSA, 10,15,20-tris(3,5-dihydroxyphenyl)5-aminophenylporphyrin (OH6-NH₂, amino precursor of OH6-NCS), and PBS on its own. Cells were seeded onto coverslips in 35 mm dishes.

Fluorescence images of cells were obtained with a Bio-Rad Radiance2000 confocal laser scanning microscope (Bio-Rad Microscience, Cambridge, MA) on an inverted Olympus IX70 microscope using a 60× (NA 1.4) oil immersion objective lens. The illumination source was the 514 nm line from a 25 mW argon ion laser. Porphyrins

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

were visualised with a 514 nm band-pass excitation filter, a 510 nm dichroic mirror, and a 570 nm long-pass emission filter.

Each field of cells was sectioned 3-dimensionally by recording images from a series of focal planes. Movement from one focal plane to another was achieved by a stepper motor attached to the fine focus control of the microscope, the step sizes (in the range 0.5 μm to 1.25 μm) being chosen with regard to the aperture size being used, so that there would be some overlap between adjacent sections. Enough vertical sections were taken so that the tops and bottoms of all the cells in each field would be recorded. Each image collected was the average of four scans at the confocal microscope's normal scan rate. During each imaging session calibration images were taken of: (i) a microscope slide containing medium, in order to measure background levels; (ii) a slide containing ITC porphyrin OH6-NCS dissolved in DMSO; and (iii) a slide bearing only un-probed HeLa cells.

Image data acquisition and remote microscope operation was carried out using the Bio-Rad Lasersharp2000 software. All images were managed using Confocal Assistant version 4.02, (build 101) 1994-1996 Todd Clark Brelje. Artificial colour was applied using standard Bio-Rad look-up tables (LUT).

A preliminary evaluation of the fluorescence of OH6-NCS at each of the excitation laser lines available on the CLSM set-up was carried out for a 0.01 mM solution of OH6 in DMSO. Figure 14 shows the UV-visible spectrum of OH6-NCS identifying its principal absorption bands. Unfortunately, no laser line was available in order to excite OH6-NCS at its Soret band λ_{max} . Figure 15 demonstrates the relative intensities of fluorescence emission for OH6-NCS when excited at 422 nm (optimal), and at the four wavelengths of the argon ion laser, 457, 476, 488, and 514 nm.

It was determined that the intensity of fluorescence emitted by a solution of OH6-NCS when excited at 514 nm was roughly three times greater than fluorescence emission at excitation wavelengths of 457, 476, and 488 nm. The UV-visible absorption spectrum of OH6-NCS showed that the 516 nm argon-ion laser line was the only excitation source compatible with OH6-NCS. The three strongest laser lines, 457, 476, and 488 nm all excited in the region between the Soret and first Q band of OH6-NCS, whereas the 514 line overlapped well with the Q band at 516 nm.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

Cell cultures separately incubated with conjugate OH6-NCS-BSA and each of the three controls, were subsequently washed and fixed. Coverslips containing the incubated cells were then cautiously mounted onto standard glass microscope slides ready to be imaged. All four argon-ion laser lines were tested, but, as expected satisfactory resolution of fluorescence could only be achieved using the 514 nm laser line.

A Z-series fluorescence image of HeLa cells incubated with OH6-NCS-BSA is shown in Figure 16 (this Figure should be viewed from top left to bottom right). Consecutive sections were scanned with a 2 μ M step between each focal plane resolved by the microscope, thus enabling three dimensional visualisation of the localisation of the conjugate within the cell. Clearly the conjugate OH6-NCS-BSA had entered the cell, no studies of the nature of cellular uptake were conducted, however it is most likely that uptake had taken place *via* endocytosis. It can be seen that the conjugate has not entered the nucleus and appears to be largely distributed throughout the cytoplasm.

When imaged, cells incubated with the BSA control or the PBS control, showed only very low, barely detectable levels of fluorescence, attributed to normal levels of cellular autofluorescence. The localisation of OH6-NH2 (unconjugated porphyrin control), is shown in Figure 17, which shows a CLSM image of porphyrin control cells with zoom view. No fluorescence was found to emanate from inside the cells, instead it appeared that the majority of OH6-NH2 had become localised on the plasma membrane. Evidently the BSA component of the conjugate is required in order to facilitate the transport of porphyrin to the interior of the cell.

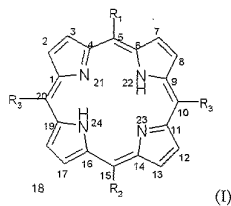
In summary, it has been shown that the cellular localisation of porphyrin-BSA conjugates, constructed *via* the formation of covalent thiourea linkages, can be imaged using conventional CLSM techniques. Unconjugated porphyrin OH6-NH2 was not found to penetrate the cellular membrane, whereas a significant level of fluorescence was detected from inside cells incubated with OH6-NCS-BSA, indicating good conjugate penetration.

WO 02/00662

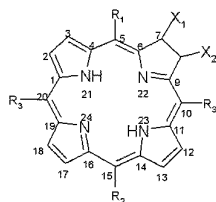
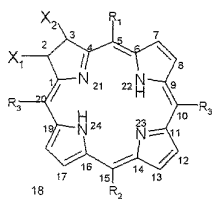
PCT/GB01/02846

CLAIMS

1 A porphyrin chromophore of formula (I) below:

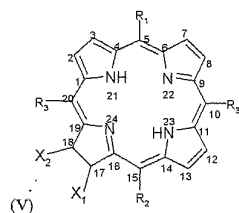
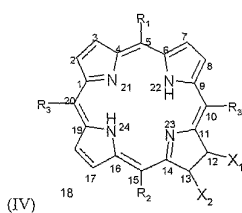


or a chlorin chromophore of any of formulas (II), (III), (IV), or (V) below:

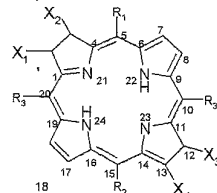
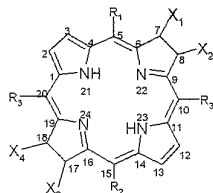


WO 02/00662

PCT/GB01/02846



or a bacteriochlorin chromophore of any of formulas (VI) and (VII) below:



wherein R_1 is an aryl moiety which is linked to a conjugating group Z which is capable of conjugating the chromophore to a polypeptide molecule for delivering said chromophore to a specific biological target in vitro or in vivo; R_2 is a hydrophilic aryl moiety; R_3 is H or a hydrophilic aryl or hydrophilic non-aromatic moiety; and each of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 is independently selected from H, OH, halogen, C_{1-3} alkyl and OC_{1-3} alkyl, or X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 together form a bridging moiety selected from O, CH_2 , CH C_{1-3} alkyl, or $C(C_{1-3}$ alkyl) $_2$, such that X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 with the adjacent C-C bond form an epoxide or cyclopropanyl structure; wherein each of said R_1 , R_2 and R_3 is optionally further substituted one or more times by -OH, -CN, -NO $_2$, halogen, -T or -OT, where T is a C_1 - C_{15} alkyl, cycloalkyl or aryl group or a hydroxylated, halogenated, sulphated, sulphonated or aminated derivative thereof or a carboxylic acid, ester, ether, polyether, amide, aldehyde or ketone derivative thereof.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

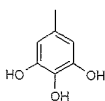
- 2 A chromophore as claimed in claim 1, wherein said aryl moiety R_1 comprises a phenyl ring, which phenyl ring is either linked by a single bond to the macrocyclic core of said chromophore or is linked thereto by a C_{1-6} branched or linear alkyl chain.
- 3 A chromophore as claimed in any preceding claim, wherein one or both of said R_2 and said R_3 comprises a phenyl ring which is substituted one or more times, preferably at least two times, by one or more hydrophilic substituents which serve to increase the hydrophilicity of said R_2 and/or said R_3 .
- 4 A chromophore as claimed in any of claims 1-3, one or both of said R_2 and said R_3 comprises a heteroaryl ring, such as a quaternised pyridyl (pyridiniumyl) ring, which ring is optionally substituted one or more times, preferably at least two times, by one or more hydrophilic substituents which serve to increase the hydrophilicity of said R_2 and/or said R_3 .
- 5 A chromophore as claimed in claim 3 or claim 4, wherein said one or more hydrophilic substituents are independently selected from hydroxy; alkoxy such as methoxy or ethoxy; C_2 - C_{15} polyethylene glycol; quaternised pyridyl (pyridiniumyl) such as N-methylpyridiniumyl; mono-, di- or poly-saccharide; C_{1-6} alkylsulfonate; a phosphonium group $R_4P(R_5)(R_6)(R_7)$, wherein R_4 is a single bond or C_{1-6} alkyl, and each of R_5 , R_6 and R_7 is independently selected from hydrogen, an aryl ring such as a phenyl ring, a heteroaryl ring such as a pyridyl ring, and a C_{1-6} alkyl chain, which aryl ring, heteroaryl ring or C_{1-6} alkyl chain is unsubstituted or is substituted one or more times by hydroxy, C_{1-6} alkyl or alkoxy, aryl, oxo, halogen, nitro, amino or cyano; or a phosphate or phosphonate group $R_8OP(O)(OR_9)(OR_{10})$ or $R_8P(O)(OR_9)(OR_{10})$ respectively, wherein R_8 is a single bond or C_{1-6} alkyl, and each of R_9 and R_{10} is independently selected from hydrogen and C_{1-6} alkyl.
- 6 A chromophore as claimed in any preceding claim, wherein one or both of said R_2 and said R_3 is or are independently selected from m,m-(dihydroxy)phenyl

WO 02/00662

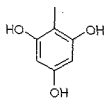
PCT/GB01/02846



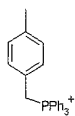
or a PEGylated derivative thereof, m,m,p-(trihydroxy)phenyl



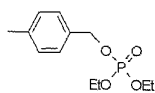
or a PEGylated derivative thereof, o,p,o-(trihydroxy)phenyl



or a PEGylated derivative thereof, m- or p-((C₁₋₆)alkyltriphenylphosphonium)phenyl such as p-(methyltriphenylphosphonium)phenyl



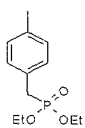
m- or p-(C₁₋₆alkylphosphono-di-alkoxy)phenyl such as p-methylphosphono-di-ethoxyphenyl



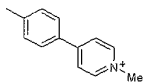
m- or p-(C₁₋₆alkylphosphonato-di-alkoxy)phenyl such as p-methylphosphonato-di-ethoxyphenyl

WO 02/00662

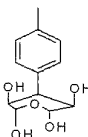
PCT/GB01/02846



m- or p-(N-methyl-pyridiniumyl)phenyl



meta- or para- sugar-substituted phenyl such as pentose-, hexose- or disaccharide-substituted phenyl



and a quaternised pyridyl (pyridiniumyl) group such as a p-N-(C₁₋₆alkyl)pyridiniumyl group or m-N-(C₁₋₆alkyl)pyridiniumyl group such as m-N-methylpyridiniumyl



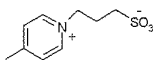
or p-N-methylpyridiniumyl



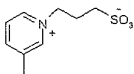
and a zwitterionic group, such as p-N-(C₁₋₆alkylsulfonate)pyridiniumyl or m-N-(C₁₋₆alkylsulfonate)pyridiniumyl; in particular, p-N-(propylsulfonate)pyridiniumyl

WO 02/00662

PCT/GB01/02846



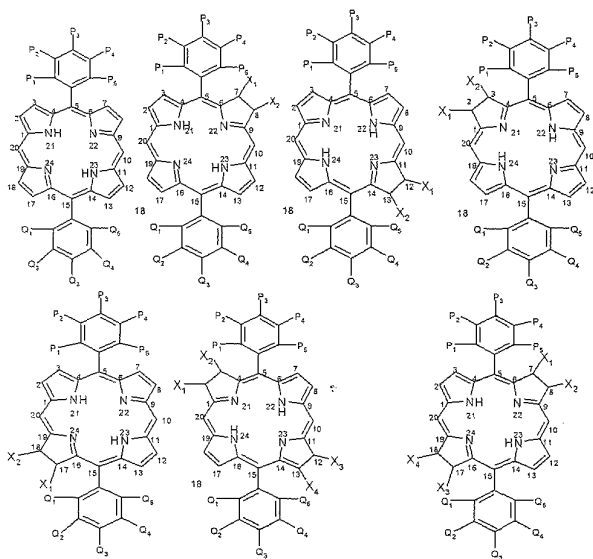
or m-N-(propylsulfonate)pyridiniumyl



- 7 A chromophore as claimed in any preceding claim, wherein R_3 is H or is a hydrophilic alkyl moiety, such as a C_{1-6} alkyl chain which is substituted one or more times by one or more hydrophilic substituents such as hydroxy or C_{2-15} polyethylene glycol.
- 8 A chromophore as claimed in any of claims 1-6, wherein R_3 comprises a hydrophilic aryl moiety which is the same as said hydrophilic aryl moiety R_2 .
- 9 A 5,15-diphenylporphyrin, 5,15-diphenylchlorin or 5,15-diphenylbacteriochlorin chromophore, wherein each of the ortho-, meta-, and/or para- positions of each of the 5- and 15- phenyl groups is substituted by a substituent P_1-P_3 and Q_1-Q_3 respectively which is independently H or an inert substituent which in combination with the other substituents P_1-P_3 and Q_1-Q_3 does not substantially impair the fluorescent properties of the chromophore; and the chromophore further comprises a conjugating group Z which is capable of conjugating the chromophore to a polypeptide molecule for delivering said chromophore to a specific biological target in vitro or in vivo.
- 10 A chromophore as claimed in claim 9, which is selected from the following compounds:

WO 02/00662

PCT/GB01/02846



wherein each of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 is independently selected from H, OH, halogen, C_{1-3} alkyl and OC_{1-3} alkyl, or X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 together form a bridging moiety selected from O, CH_2 , CH , C_{1-3} alkyl, or $C(C_{1-3} \text{ alkyl})_2$, such that X_1 and X_2 and/or X_3 and X_4 with the adjacent C-C bond form an epoxide or cyclopropanyl structure.

11 A chromophore as claimed in claim 9 or claim 10, wherein each of said P_1 - P_5 is the same or substantially the same as the corresponding one of said Q_1 - Q_5 , such that said two primary phenyl rings are symmetrically substituted.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

12 A chromophore as claimed in claim 9 or claim 10, wherein one or more of said P₁-P₅ is not the same as the corresponding one of said Q₁-Q₅, such that said two primary phenyl rings are not symmetrically substituted.

13 A chromophore as claimed in any of claims 9-12, wherein said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ collectively provide a degree of steric hindrance around the core of said chromophore which is sufficient to reduce the rate of spontaneous oxidation of said chromophore, such that said chromophore is substantially inert in air, but which does not to a substantial extent inhibit selective addition or substitution at the 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 or 18 positions around the core of said chromophore.

14 A chromophore as claimed in any of claims 9-13, wherein one or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ comprises H, -OH, -CN, -NO₂, halogen, -T or -OT, where T is a C₁-C₁₅ alkyl, cycloalkyl or aryl group or a hydroxylated, halogenated, sulphated or aminated derivative thereof or a carboxylic acid, ester, ether, polyether, amide, aldehyde or ketone derivative thereof; or a C₃-C₁₂ cycloalkyl and/or aryl ring structure, or between two and six, preferably two - three, fused or linked C₃-C₁₂ cycloalkyl and/or aryl ring structures, each of which ring structures may optionally comprise one or more N, O or S atoms.

15 A chromophore as claimed in any of claims 9-14, wherein one or more of said substituents P₁-P₅ and Q₁-Q₅ consists of a member independently selected from the group consisting of A₁Z₁A₁₄; wherein Z₁ is Z₂, Z₂A₅ or Z₂A₅A₆; A₁ and A₅ are independently selected from -(CA₂A₃)_n-, -C(Y)(CA₂A₃)_n-, -C(Y)Y'(CA₂A₃)_n-, -C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n-, -NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n-, -NA₄(CA₂A₃)_n-, -YC(Y')(CA₂A₃)_n- and -Y(CA₂A₃)_n-; n = 0 - 6; Y and Y' are independently O or S; A₂, A₃ and A₄ are independently H or C₁₋₂ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₆ = -(C₂H₄O)_m- or -S(O)_p; m = 1 - 12; p = 0 - 2; Z₂ is a single bond or Z₃; Z₃ is selected from Z₄, Z₅ and Z₆, wherein Z₃ is unsubstituted or substituted one or more times by OH, halo, CN, NO₂, A₁A₁₀, A₆A₈, NA₁₀A₁₁, C(Y)A₇, C(Y)Y'A₇.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

$Y(CH_2)_q Y' A_7$, $Y(CH_2)_q A_7$, $C(Y)NA_{10}A_{11}$, $Y(CH_2)_q C(Y')NA_{10}A_{11}$,
 $Y(CH_2)_q C(Y')A_9$, $NA_{10}C(Y)NA_{10}A_{11}$, $NA_{10}C(Y)A_{11}$, $NA_{10}C(Y)Y'A_9$,
 $NA_{10}C(Y)Z_6$, $C(NA_{10})NA_{10}A_{11}$, $C(NCN)NA_{10}A_{11}$, $C(NCN)SA_9$,
 $NA_{10}C(NCN)SA_9$, $NA_{10}C(NCN)NA_{10}A_{11}$, $NA_{10}S(O)_2 A_9$, $S(O)_r A_9$,
 $NA_{10}C(Y)C(Y')NA_{10}A_{11}$, $NA_{10}C(Y)C(Y')A_{10}$ or Z_6 ; $q = 0, 1$ or 2 ; $r = 0 - 2$; A_7 is
independently selected from H and Ag; Ag is O or Ag; Ag is C₁₋₄ alkyl which is
unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₁₀ is OA₉ or A₁₁; A₁₁ is A₇ or
when A₁₀ and A₁₁ are as NA₁₀A₁₁ they may together with the nitrogen form a 5 to 7
membered ring comprising only carbon atoms or carbon atoms and at least one
heteroatom selected from O, N and S; Z₄ is C₆₋₁₂ aryl or aryloxyC₁₋₃alkyl; Z₅ is
selected from furanyl, tetrahydrofuranyl, indanyl, indenyl, tetrahydropyranyl, pyranlyl,
thiopyranlyl, tetrahydrothiopyranlyl, tetrahydrothienyl, thienyl, C₃₋₈ cycloalkyl or C₄₋₈
cycloalkyl containing one or two unsaturated bonds, and C₇₋₁₁ polycycloalkyl; Z₆ is
selected from N-azolyl, dioxadiazinyl, dioxadiazolyl, dioxanyl, 2-N-dioxatriazinyl,
dioxazinyl, N-dioxazolyl, dioxolyl, dithiadiazinyl, dithiadiazolyl, N-dithiatrizinyl,
dithiazinyl, N-dithiazolyl, 1-N-imidazolyl, N-morpholinyl, pyrrollyl, tetrazolyl, thiazolyl,
triazolyl, oxazinyl, oxazolyl, naphthydrinyl, oxadiazinyl, oxadiazolyl, oxatetrazinyl,
oxatriazinyl, oxatriazolyl, oxazinyl, oxazolyl, pentazinyl, phthalazinyl, N-piperidinyl,
N,N-piperazinyl, 1-N-pyrazolyl, pyridazinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, tetrathiazinyl,
tetrazinyl, 1-N-tetrazolyl, tetroxazinyl, thiadiazinyl, thiadiazolyl, thiatetrazinyl,
thiatrizinyl, thiatrizolyl, thiazolyl, triazinyl, 1-N-triazolyl, trioxadiazinyl, trioxanyl,
trioxazinyl, trioxazolyl, trithiadiazinyl, trithiazinyl, trithiadiazolyl; wherein Z₄, Z₅ or Z₆
may be fused to one or more other members selected independently from Z₄, Z₅ and Z₆;
A₁₄ is hydrogen, methyl, hydroxyl, aryl, halo substituted aryl, aryloxyC₁₋₃ alkyl, halo
substituted aryloxyC₁₋₃ alkyl, indanyl, indenyl, C₇₋₁₁ polycycloalkyl, tetrahydrofuranyl,
furanyl, tetrahydropyranyl, pyranlyl, tetrahydrothienyl, thienyl, tetrahydrothiopyranlyl,
thiopyranlyl, C₃₋₆ cycloalkyl, or a C₄₋₆ cycloalkyl containing one or two unsaturated
bonds, wherein the cycloalkyl or heterocyclic moiety is unsubstituted or substituted by 1
to 3 methyl groups, one ethyl group, or a hydroxyl group.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

16 A chromophore as claimed in any of claims 9-15, wherein one of said P₁-P₅ and said Q₁-Q₅ is a conjugating substituent which comprises said conjugating group Z.

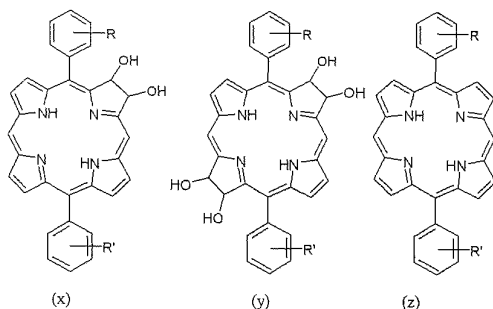
17 A chromophore as claimed in claim 16, wherein said conjugating substituent consists of a member selected from the group consisting of A₁Z₁Z₂, wherein Z₁ is Z₂, Z₂A₅ or Z₂A₅A₆; A₁ and A₅ are independently selected from -(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)Y'(CA₂A₃)_n⁻, -C(Y)NA₄(CA₂A₃)_n⁻, -NA₄C(Y)(CA₂A₃)_n⁻, -NA₄(CA₂A₃)_n⁻, -YC(Y')(CA₂A₃)_n⁻ and -Y(CA₂A₃)_n⁻; n = 0 - 6; Y and Y' are independently O or S; A₂, A₃ and A₄ are independently H or C₁₋₂ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₆ = -(C₂H₄O)_m⁻ or -S(O)_p; m = 1 - 12; p = 0 - 2; Z₂ is a single bond or Z₃; Z₃ is selected from Z₄, Z₅ and Z₆, wherein Z₃ is unsubstituted or substituted one or more times by OH, halo, CN, NO₂, A₁A₁₀, A₆A₈, NA₁₀A₁₁, C(Y)A₇, C(Y)Y'A₇, Y(CH₂)_qY'A₇, Y(CH₂)_qA₇, C(Y)NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')NA₁₀A₁₁, Y(CH₂)_qC(Y')A₉, NA₁₀C(Y)NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)A₁₁, NA₁₀C(Y)Y'A₉, NA₁₀C(Y)Z₆, C(NA₁₀)NA₁₀A₁₁, C(NCN)NA₁₀A₁₁, C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)SA₉, NA₁₀C(NCN)NA₁₀A₁₁, NA₁₀S(O)₂A₉, S(O)_rA₉, NA₁₀C(Y)C(Y')NA₁₀A₁₁, NA₁₀C(Y)C(Y')A₁₀ or Z₆; q = 0, 1 or 2; r = 0 - 2; A₇ is independently selected from H and A₉; A₈ is O or A₉; A₉ is C₁₋₄ alkyl which is unsubstituted or substituted by one or more fluorines; A₁₀ is OA₉ or A₁₁; A₁₁ is A₇ or when A₁₀ and A₁₁ are as NA₁₀A₁₁ they may together with the nitrogen form a 5 to 7 membered ring comprising only carbon atoms or carbon atoms and at least one heteroatom selected from O, N and S; Z₄ is C₆₋₁₂ aryl or aryloxyC₁₋₃alkyl; Z₅ is selected from furanyl, tetrahydrofuranlyl, indanyl, indenyl, tetrahydropyranlyl, pyranlyl, thiopyranlyl, tetrahydrothiopyranlyl, tetrahydrothienyl, thienyl, C₃₋₈ cycloalkyl or C₄₋₈ cycloalkyl containing one or two unsaturated bonds, and C₇₋₁₁ polycycloalkyl; Z₆ is selected from N-azolyl, dioxadiazinyl, dioxadiazolyl, dioxanyl, 2-N-dioxatriazinyl, dioxazinyl, N-dioxazolyl, dioxolyl, dithiadiazinyl, dithiadiazolyl, N-dithiatriazinyl,

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

dithiazinyl, N-dithiazolyl, 1-N-imidazolyl, N-morpholinyl, pyrrollyl, tetrazolyl, thiazolyl, triazolyl, oxazinyl, oxazolyl, naphthydrinyl, oxadiazinyl, oxadiazolyl, oxatetrazinyl, oxatriazinyl, oxatriazolyl, oxazinyl, oxazolyl, pentazinyl, phthalazinyl, N-piperidinyl, N,N-piperazinyl, 1-N-pyrazolyl, pyridazinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, tetrathiazinyl, tetrazinyl, 1-N-tetrazolyl, tetroxazinyl, thiadiazinyl, thiadiazoyl, thiatetrazinyl, thiatriazinyl, thiatriazolyl, thiazolyl, triazinyl, 1-N-triazolyl, trioxadiazinyl, trioxanyl, trioxazinyl, trioxazolyl, trithiadiazinyl, trithiazinyl, trithiadiazolyl, wherein Z₄, Z₅ or Z₆ may be fused to one or more other members selected independently from Z₄, Z₅ and Z₆.

18 A chromophore as claimed in any of claims 9-17, which has a structure set out as (x), (y) or (z) below:



wherein R and R' may be any of the following combinations:

R	R'
4-H	4-NCS
4-Me	4-NCS
4-Br	4-NCS

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

4-CO ₂ Me	4-NCS
3,4,5-tris(OMe)	4-NCS
4-NCS	4-OMe
4-NCS	4-Me
4-NCS	4-CO ₂ Me
4-NCS	4-Br
4-NCS	4-CN
4-NCS	4-CO ₂ Me

19 A chromophore as claimed in any preceding claim, wherein each or some of X₁-X₄ is H or OH.

20 A chromophore as claimed in any preceding claim, wherein said conjugating group Z comprises a bonding group which is capable of bonding covalently to a polypeptide molecule, such as an isocyanate, isothiocyanate, or NHS ester group, or -NH₂, -NH(C₁₋₆ alkyl), maleamide, iodoacetamide, ketone or aldehyde.

21 A chromophore as claimed in claim 20, wherein said conjugating group Z comprises a linking moiety having a relatively high degree of inflexibility and/or steric hindrance, which linking moiety is adapted to link said bonding group to the macrocyclic core of said chromophore.

22 A set of fluorochromic markers for multicolour fluorochromic analysis, comprising at least two chromophores selected from the group consisting of a porphyrin chromophore, a chlorin chromophore and a bacteriochlorin chromophore, each of which chromophores comprises the same porphyrin skeleton, each of which chromophores comprises one or more substituents on said porphyrin skeleton, one of which substituents is a conjugating substituent L comprising a conjugating group Z, wherein Z is a conjugating group capable of conjugating each of said chromophores to a polypeptide molecule for delivering each chromophore to one of a plurality of different specific biological targets.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

- 23 A set of chromophores as claimed in claim 22, comprising two or more of a porphyrin in accordance with any of claims 1-21, the corresponding chlorin, and the corresponding bacteriochlorin.
- 24 A chromophore as claimed in any of claims 1-21 or a set as claimed in claim 22 or claim 23, wherein said conjugating group Z is conjugated to a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target; or is conjugated to a bridging polypeptide which is adapted to bind to a complementary bridging polypeptide so as to couple said chromophore to said complementary bridging polypeptide.
- 25 A chromophore or a set as claimed in claim 24, wherein said bridging polypeptide is bound to said complementary bridging polypeptide, and said complementary bridging polypeptide comprises or is coupled to or fused with a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target.
- 26 A kit of chromophores comprising a chromophore or set of chromophores in accordance with any preceding claim, wherein said or each chromophore is conjugated to a bridging polypeptide that is adapted to bind to a complementary bridging polypeptide so as to couple the chromophore to said complementary bridging polypeptide; and a construct or plurality of constructs each of which comprises said complementary bridging polypeptide fused or coupled to a binding protein which is adapted to bind specifically to said biological target; the arrangement being such that said chromophore or each chromophore in the kit is adapted to bind to a different construct in the kit with specificity for said specific biological target, so as to link said or each chromophore to a binding protein with specificity for said specific biological target.
- 27 A chromophore, set of chromophores or kit of chromophores in accordance with any of claims 24-26, wherein said binding protein comprises an antibody such as a monoclonal or polyclonal antibody or a fragment thereof with specificity for a target specific molecule on the surface of said biological target.

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

- 28 A chromophore or set of kit of chromophores as claimed in claim 27, wherein said antibody is a phage antibody, that is an antibody expressed on the surface of a bacteriophage.
- 29 A chromophore, set of chromophores or kit of chromophores in accordance with any of claims 24-26, wherein said binding protein comprises a protein which is adapted to bind to one or more cell surface molecules or receptors, such as a serum albumin protein; or a low density lipoprotein, such as a fatty acid chain, which is adapted for insertion into a cell membrane.
- 30 A chromophore or set of kit of chromophores as claimed in any of claims 24-29, wherein said bridging polypeptide comprises calmodulin and said complementary bridging polypeptide comprises calmodulin binding peptide; or vice versa; or said bridging polypeptide comprises avidin or streptavidin and said complementary bridging polypeptide comprises biotin; or vice versa.
- 31 A kit of chromophores as claimed in claim 30, wherein said or each chromophore is conjugated to avidin, and said or each construct comprises a biotinylated monoclonal antibody with specificity for a target specific molecule on the surface of said biological target.
- 32 A method for attaching a chromophore in accordance with any of claims 1-30 to said specific biological target or targets; comprising the steps of providing a kit in accordance with any of claims 26-31, and introducing the components of said kit into the vicinity of said specific biological target or targets, under conditions suitable for enabling the binding of said or each binding protein to said specific biological target or targets.
- 33 A chromophore or set of kit of chromophores as claimed in any preceding claim, wherein said specific biological target is a cell or a membrane, such as a cancer cell, a tumour cell, a cell infected with HIV or with any other microbe or virus, a cell

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

responsible for detrimental activity in auto-immune disease, a foreign or diseased cell, or any other such cell.

34 A method for fluorescence-activated sorting of target cells from a mixture of cells, comprising the step of attaching to said target cells a chromophore in accordance with any of claims 1-30 or a set of chromophores in accordance with any of claims 22-30, illuminating said mixture of cells so as to cause fluorescence of one or more of said chromophores attached to said target cells, imparting a charge to the fluorescing cells, and passing said mixture of cells through a polarised environment so as to cause or allow said charged cells to be separated from said mixture.

35 A method for the visualisation and/or counting of a plurality of target cells, said target cells including cells of two or three different cell types, comprising the steps of providing a chromophore set in accordance with any of claims 22-30, which chromophore set comprises two or three chromophores each of which is adapted to be delivered to a different one of said cell types; attaching said chromophores in the set to said target cells; illuminating said target cells so as to cause the emission of fluorescence by said chromophores; detecting the fluorescent emission bands produced by each of said chromophores; and optionally measuring for each of said bands the area under an emission/wavelength curve, so as to obtain a measure of the number of fluorescent cells of each respective cell type.

36 A method for causing the death of a target cell, comprising the step of attaching a chromophore in accordance with any of claims 1-21 to said cell and illuminating said cell so as to cause the production of singlet oxygen in the vicinity of said cell, thereby causing the death of the cell.

37 A method for treating a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesired cells, such as tumours, cancers, viral infections such as HIV infection, or autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis, comprising the step of administering to a patient in need thereof an effective

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

amount of a chromophore in accordance with any of claims 1-21, which chromophore is adapted to be targeted to a target cell specific molecule on the surface of said diseased or undesired cells for attachment thereto, such that the chromophore is caused to be attached to said cells, and illuminating said cells with light so as to cause the production of singlet oxygen in the vicinity of said cells, thereby killing said cells.

38 A pharmaceutical composition for administration to a patient for the treatment of a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesired cells, such as tumours, cancers, viral infections such as HIV infection, or autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis, which composition comprises a chromophore in accordance with any of claims 1-21 that is adapted to be delivered to said diseased or undesired cells, and a suitable carrier.

39 Use of a chromophore in accordance with any of claims 1-21 in the production of a medicament, for use in the treatment of patients suffering from a disease or disorder which is characterised by the presence in the body of diseased or undesirable cells, such as tumours, cancers, viral infections including HIV infection, and autoimmune disorders including rheumatoid arthritis or multiple sclerosis; said chromophore being adapted for delivery to said diseased or undesired cells.

40 A method for separating a mixture which comprises one or more hydrophilic chromophores each having a hydrophilic or amphiphilic moiety, and a plurality of less hydrophilic substances and/or molecules, comprising the step of introducing said mixture to a hydrophobic eluting solvent, and passing said mixture and said eluting solvent over a hydrophilic or polar solid phase, such that said one or more chromophores are arrested on said solid phase whilst said substances and/or molecules are eluted or substantially eluted from said solid phase by said eluting solvent.

41 A method for the synthesis of a 5,10,15,20-tetra-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore having selected substituents at the 5, 10, 15 and 20 meso-positions thereof, comprising the steps of providing a 5,15-di-meso-substituted

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore; attaching a leaving group Q to the 10 and 20 meso-positions of said chromophore, which leaving group Q is selected from halide and triflate; providing a coupling reagent $(R_{11}O)(R_{12}O)BR_{13}$, wherein R_{11} and R_{12} are independently selected from H or C_{1-6} alkyl, or R_{11} and R_{12} together constitute a C_{1-6} alkyl chain bridging said two O atoms, and R_{13} is vinyl or aryl, such as a hydrophilic aryl moiety as hereinbefore defined in relation to R_3 ; and reacting said chromophore with said coupling reagent in the presence of a base selected from potassium phosphate, sodium phosphate, caesium carbonate and barium hydroxide, and a Pd_0 catalyst; such that said R_{13} replaces said leaving group Q at the 10- and 20- meso positions of said chromophore.

42 A method as claimed in claim 41, wherein said 5,15-di-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore is a chromophore in accordance with any of claims 1-21, or a protected form thereof.

43 A method as claimed in claim 41 or claim 42, wherein said R_{13} is vinyl, and said 5,10,15,20-tetra-meso-substituted porphyrin, chlorin or bacteriochlorin chromophore is subjected following said coupling reaction to an osmylation reaction utilising OsO_4 , such as to convert said 10- and 20- vinyl substituents to hydroxyalkyl.

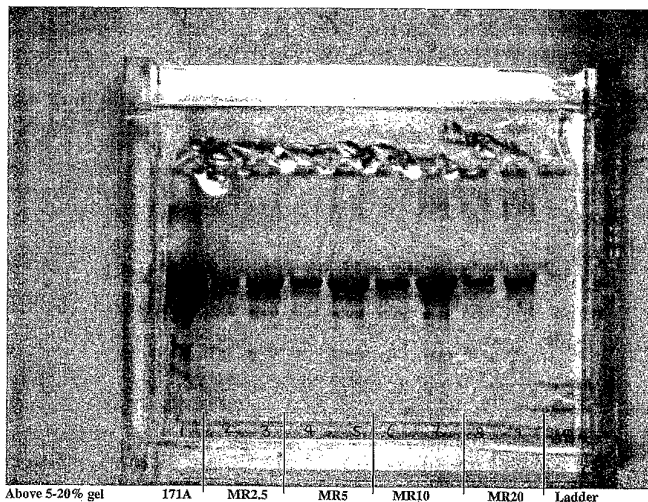


Figure 1

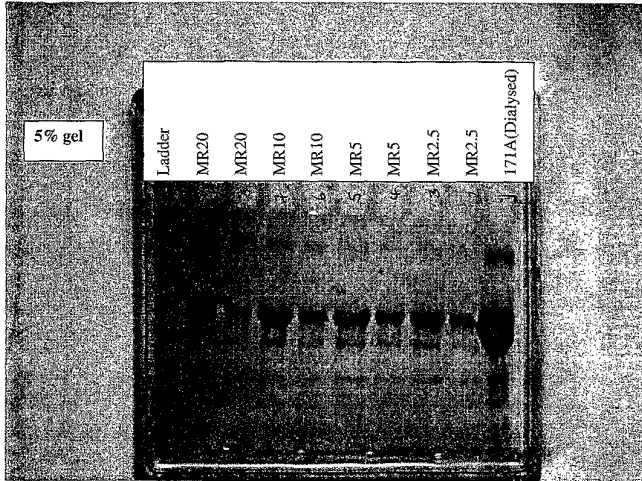
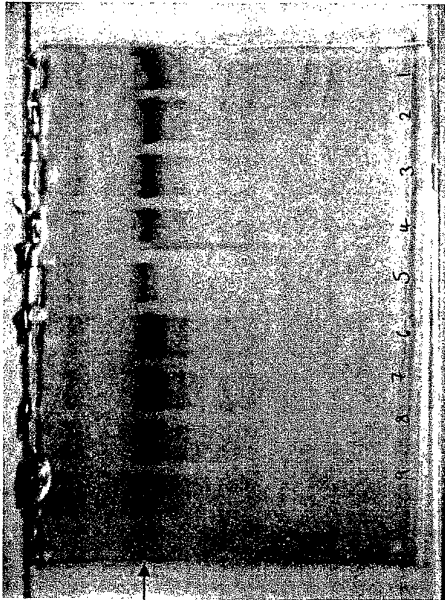


Figure 2

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

3/17



172.6
KDa

17-1A
PYR2.5
PYR5
PYR10
PYR20
PYR2.5
PYR5
PYR10
PYR20
Ladder

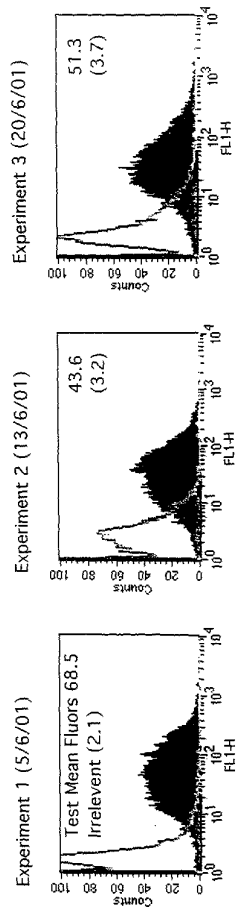
5% GEL

Figure 3

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

4/17



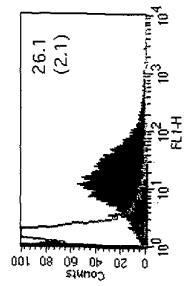
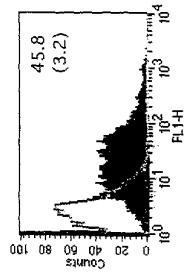
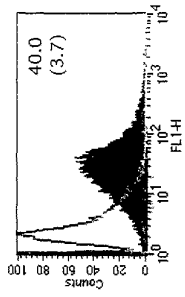
Colo 320
17-1A
at 30 µg/ml

Figure 4

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

5/17



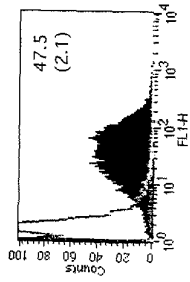
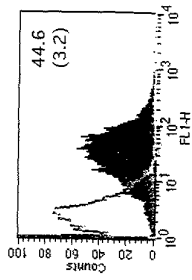
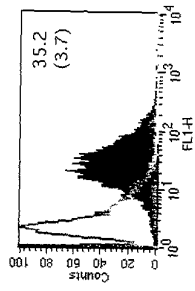
OH6 (20)
at 30 µg/ml

Figure 5

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

6/17



▲
PYR (20)
at 30 µg/ml

Figure 6

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

7/17

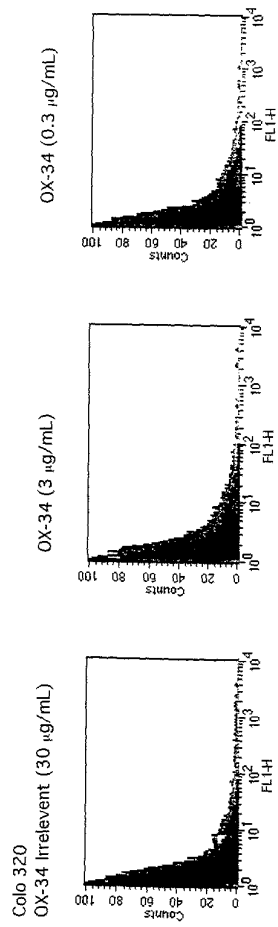


Figure 7

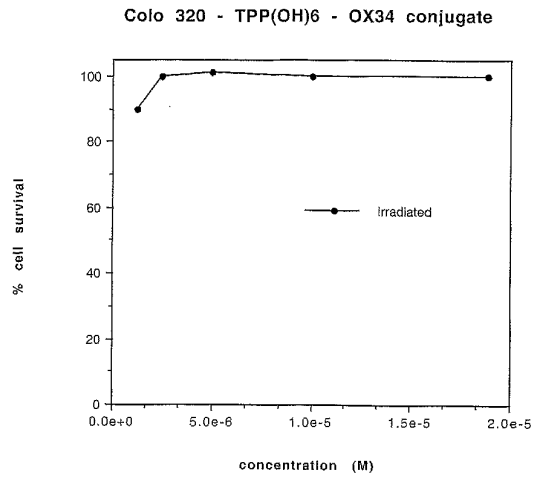


Figure 8

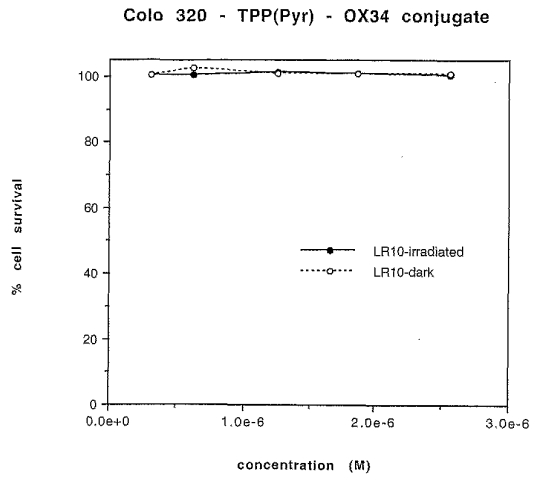


Figure 9

10/17

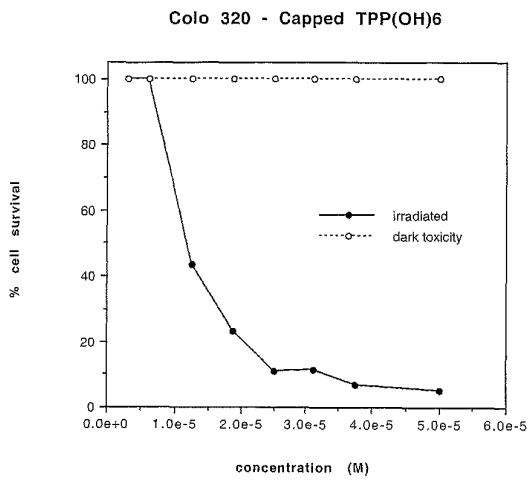


Figure 10

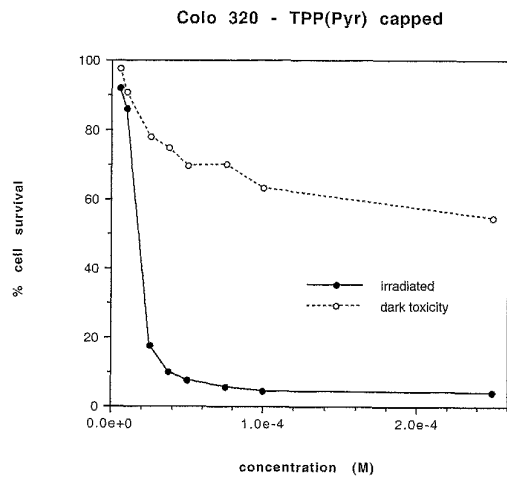


Figure 11

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

12/17

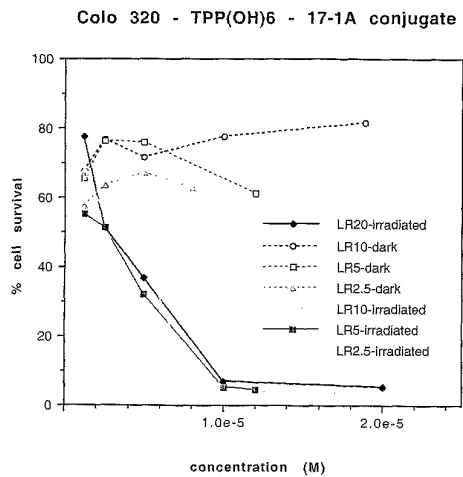


Figure 12

13/17

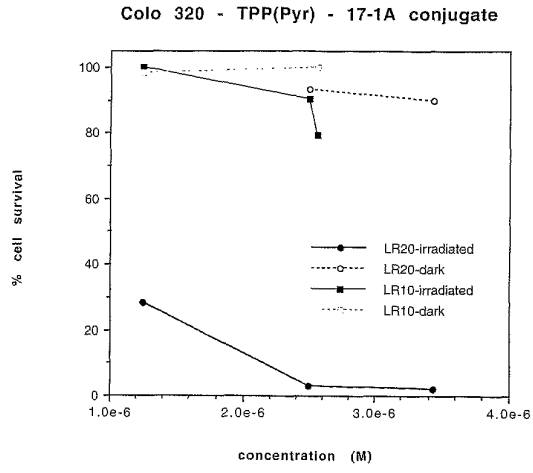


Figure 13

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

14/17

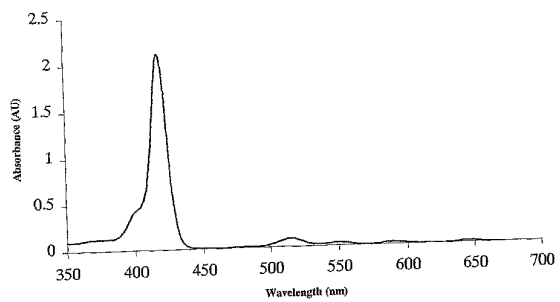


Figure 14

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

15/17

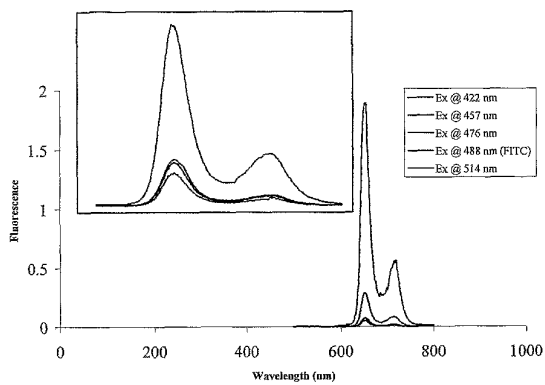


Figure 15

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

16/17

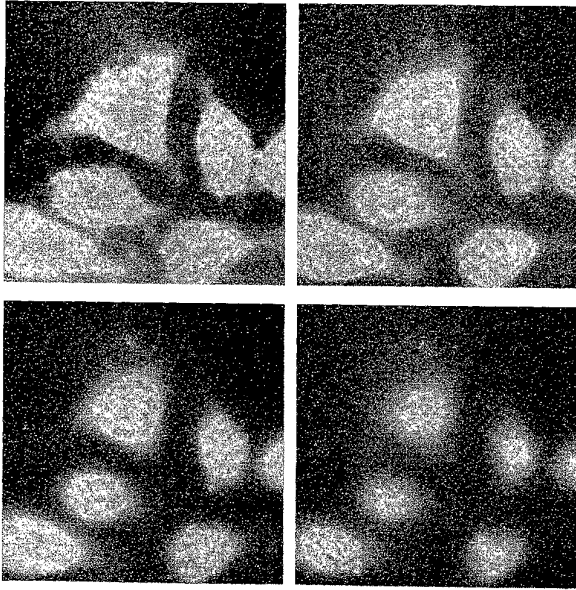


Figure 16

WO 02/00662

PCT/GB01/02846

17/17

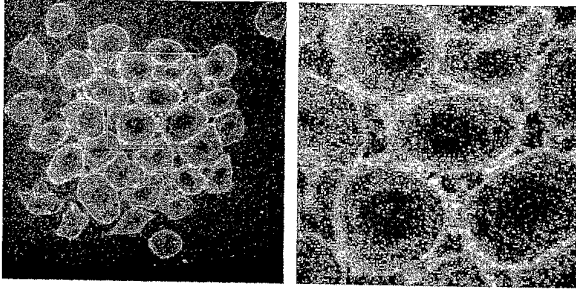


Figure 17

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00662 A1

- (51) International Patent Classification: C07D 487/22, Churchill Avenue, Cottingham, East Yorkshire HU16 5NL (GB); C09K 9/02, A61K 31/40
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02846
- (22) International Filing Date: 26 June 2001 (26.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/214,075 26 June 2000 (26.06.2000) US
01137843 6 June 2001 (06.06.2001) GB
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/214,075 (CIP)
Filed on 26 June 2000 (26.06.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): CATALYST BIOMEDICA LIMITED [GB/GB]; 183 Euston Road, London NW1 2BE (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BOYLE, Ross, William [GB/GB]; 45 Burney Close, Beverley, East Yorkshire HU17 7EQ (GB). CLARKE, Oliver, James [GB/GB]; 5 George Odby Close, Keldgate, Beverley, East Yorkshire HU17 8HX (GB). SUTTON, Jonathan, Mark [GB/GB]; 1 Daniell Drive, Shrub End, Colchester, Essex CO2 9EY (GB). GREENMAN, John [GB/GB]; 40
- (74) Agents: CRUMP, Julian, Richard, John et al.; 11 Cleveland, 40-43 Chancery Lane, London WC2A 1JQ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— with amended claims and statement
- Date of publication of the amended claims and statement:
4 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/00662 A1

(54) Title: IMPROVEMENTS IN AND RELATING TO CHROMOPHORES

(57) Abstract: The present invention relates to novel porphyrin and porphyrin-based chromophores and sets of porphyrin and porphyrin-based chromophores, which may be particularly useful in a range of photodynamic applications, including photochemotherapy and fluorescence analysis and imaging. In particular, the present invention provides new and useful porphyrin, chlorin and bacteriochlorin chromophores; methods for the production of such chromophores; and methods for the use of such chromophores in analysis and in medicine.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/02846
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D487/22 C09K9/02 A61K31/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07D C09K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SUTTON, JONATHAN M. ET AL: "Functionalized diphenylchlorins and bacteriochlorins: their synthesis and bioconjugation for targeted photodynamic therapy and tumor cell imaging" retrieved from STM Database accession no. 134:100684 XP002181756 CAS RN 318488-30-1 abstract & J. PORPHYRINS PHTHALOCYANINES (2000), 4(7), 655-658 , --- -/--	1-3, 5, 7, 9, 10, 12, 18-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 November 2001	Date of mailing of the international search report 19/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5316 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx: 31 051 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Frelon, D	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 01/02846

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LI, ZAO YING ET AL: "Synthesis of beta-cyclodextrin bonded metal porphyrins" retrieved from STN Database accession no. 133:187173 XP002181757 abstract & CHIN. CHEM. LETT. (2000), 11(6), 493-494	1-3,8,19
X,P	--- DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MILANESIO, E. ET AL: "Synthesis of asymmetrical porphyrins substituted in the meso-position from dipyrromethanes" retrieved from STN Database accession no. 133:252202 XP002181758 CAS RNs 57412-12-1,126442-89-5,155165-82-5,248280- 34-4 abstract & MOLECULES (2000), 5(3), 531-532 ,	1-3,5,8, 19
X,P	--- DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; DURANTINI, EDGARDO N.: "Synthesis of meso-nitrophenylporphyrins covalently linked to a polyphenylene chain bearing methoxy groups" retrieved from STN Database accession no. 133:17311 XP002181759 CAS RN 271772-24-8 abstract & J. PORPHYRINS PHTHALOCYANINES (2000), 4(3), 233-242 ,	1-3,8,19
	--- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02846

C./Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; IMAHORI, HIROSHI ET AL: "Chain Length Effect on the Structure and Photoelectrochemical Properties of Self-Assembled Monolayers of Porphyrins on Gold Electrodes" retrieved from STN Database accession no. 132:243120 XP002181760 CAS RNs 261734-23-0, 227287-27-6 abstract & J. PHYS. CHEM. B (2000), 104(6), 1253-1260 ,</p>	1-3, 8, 19
X	<p>--- DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; CLARKE, OLIVER J. ET AL: "Isothiocyanatoporphyrins, useful intermediates for the conjugation of porphyrins with biomolecules and solid supports" retrieved from STN Database accession no. 132:78395 XP002181761 CAS RNs 155165-82-5, 253666-30-7, 253666-35-2, 253666- -38-5, 253666-41-0 abstract & CHEM. COMMUN. (CAMBRIDGE) (1999), (21), 2231-2232 ,</p>	1-3, 7-11, 15, 18-20, 23
X	<p>--- DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; DURANTINI, EDGARDO N. ET AL: "Synthesis of 5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tris(4-sub- stituted phenyl)porphyrins using dipyrrromethanes" retrieved from STN Database accession no. 131:322462 XP002181762 CAS RN 248280-31-1 abstract & SYNTH. COMMUN. (1999), 29(19), 3353-3368 , --- -/--</p>	1-3, 5, 8, 19

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 01/02846

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; CLARKE, OLIVER J. ET AL: "Selective synthesis of asymmetrically substituted 5,15-diphenylporphyrins" retrieved from STN Database accession no. 129:302478 XP002181763 CAS RN 214554-51-5 abstract & TETRAHEDRON LETT. (1998), 39(39), 7167-7168 , ---	1-3,7, 9-11,14, 15,19
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LI, HANDONG ET AL: "A series of meso-tris(N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkyla midophenyl) porphyrins: Synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity" retrieved from STN Database accession no. 128:136146 XP002181764 CAS RNs 202419-70-3 154960-65-3 abstract & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1997), 1354(3), 252-260 , ---	1,2,4,8, 19,23
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TAN, QUAN ET AL: "Dynamics of Photoinduced Electron Transfer in a Carotenoid-Porphyrin- Dinitronaphthalenedicarboximide Molecular Triad" retrieved from STN Database accession no. 127:72866 XP002181765 CAS RN 191614-16-1 abstract & J. PHYS. CHEM. B (1997), 101(26), 5214-5223 , --- -/--	1-3,8,19

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02846

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HAN, WENHAI ET AL: "Stable Binding of Isothiocyanoporphyrin Molecules to Au(111): An STM Study" retrieved from STN Database accession no. 125:285640 XP002181766 CAS RN 182803-82-3 abstract & LANGMUIR (1996), 12(23), 5742-5744 , ---</p>	1-3, 8, 19, 20
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HOMBRECHER, HERMANN K. ET AL: "Synthesis and spectroscopic investigation of directly azobenzene bridged diporphyrins" retrieved from STN Database accession no. 120:298318 XP002181767 CAS RN 154365-54-5 abstract & TETRAHEDRON (1993), 49(42), 9489-94 , ---</p>	1-3, 8, 19
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; REDDI, E. ET AL: "Carotenoporphyrins as selective photodiagnostic agents for tumors" retrieved from STN Database accession no. 120:293101 XP002181768 CAS RN 155165-82-5 abstract & BR. J. CANCER (1994), 69(1), 40-5 , ---</p>	1-3, 5, 8, 19
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GUST, DEVENS ET AL: "Photoinduced electron transfer in a porphyrin dyad" retrieved from STN Database accession no. 119:107906 XP002181769 CAS RN 148808-63-3 abstract & J. PHYS. CHEM. (1993), 97(30), 7926-31 , ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3, 8, 19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02846

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; FISH, JUDITH R. ET AL: "Synthesis and electrochemistry of conductive copolymeric porphyrins" retrieved from STN Database accession no. 117:49720 XP002181770 CAS RN 141509-34-4 abstract & CHEM. MATER. (1992), 4(4), 795-803 , ---</p>	1-3,5,8, 19
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GUST, DEVENS ET AL: "Long-lived photoinitiated charge separation in carotene-diporphyrin triad molecules" retrieved from STN Database accession no. 115:8384 XP002181771 CAS RN 133833-26-8 abstract & J. AM. CHEM. SOC. (1991), 113(10), 3638-49 , ---</p>	1-3,8,19
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TREIBS, ALFRED ET AL: "Synthesis and electron spectra of ms-substituted porphines" retrieved from STN Database accession no. 70:37799 XP002181772 CAS RN 22220-20-8 abstract & JUSTUS LIEBIGS ANN. CHEM. (1968), 718, 183-207 , ---</p>	1-3,8,19
X	<p>CLARKE Q J ET AL: "Selective Synthesis of Asymmetrically Substituted 5,15-Diphenylporphyrins" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 39, 24 September 1998 (1998-09-24), pages 7167-7168, XP004133628 ISSN: 0040-4039 scheme 1 ---</p>	1-3,7,9, 10,12, 15,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02846

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHANMUGATHASAN S ET AL: "Advances in Modern Synthetic Porphyrin Chemistry" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 56, no. 8, February 2000 (2000-02), pages 1025-1046, XP004189718 ISSN: 0040-4020 scheme 37	1-3, 8, 19
X	WO 99 59641 A (UNIV ARIZONA ; MALLINCKRODT INC (US)) 25 November 1999 (1999-11-25) page 22	1-3, 5, 6, 8, 19
X	EP 0 186 962 A (EFAMOL LTD) 9 July 1986 (1986-07-09) page 5	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 01 02846

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 22,26,33,40,41

Present claims 1-17,20,21,23-25,27-32,34-39,42,43 relate to an extremely large number of possible compounds, products and methods essentially defined by reference to a desirable characteristic or property.

The use of expressions like:

- "a conjugating group Z which is capable of conjugating the chromophore to a polypeptide for delivering said chromophore to a specific biological target in vitro or in vivo" (Z in claim 1, claim 9 and dependent claims thereon - the group Z is not even defined in claims 16 and 17); similarly, "a bonding group which is capable of bonding covalently to a polypeptide molecule" (claim 20 and dependent claims thereon),
- "hydrophilic substituents which serve to increase the hydrophilicity" (claims 3, 4 and dependent claims thereon),
- "an inert substituent which (...) does not substantially impair the fluorescent properties of the chromophore" (claim 9 and dependent claims thereon),
- "substituents (which) provide a degree of steric hindrance around the core of said chromophore which is sufficient to reduce the rate of spontaneous oxidation of said chromophore, etc" (claim 13 and dependent claims thereon); similarly, "a linking moiety having a relatively high degree of inflexibility and/or steric hindrance, etc" (claim 21 and dependent claims thereon),
- "substantially the same" (claim 11 and dependent claims thereon),

consists of attempts to define the invention by a result to be achieved which should not be allowed because it encompasses subject-matters which are not the direct and positive results verified by tests or procedures adequately specified in the description or known to the person skilled in the art and which do not require undue experimentation.

The use of terms like "comprise" (claims 2-4,14,16,20,21 and dependent claims thereon), "such as" (claims 4-7,20 and dependent claims thereon) are not restrictive or limiting and therefore do not help to specify the claimed invention.

Claims 22,26,33,40 and 41 are not searchable since they are not specific enough in the absence of referring to any specific matter appropriately designated in the preceding claims. These claims also define subject-matters as desiderata.

In claims 15 and 17, the rest A8 is inadequately defined as either a bivalent group (O) or a monovalent group (A9); same remark applies to Z2 which is defined as a bond or a terminal group.

The claims cover all products having the characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP 01 02846

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT to such an extent as to render again a meaningful search of the claims impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely those compounds recited in the examples mentioned in the description, in claim 18 and closely related homologous compounds, i.e. compounds wherein R1 is phenyl para-substituted by NCS, NHCOCH₃, NH₂ or NHCH₂-fluorene; R2 is a (optionally substituted) phenyl or pyridyl; R3 is hydrogen, 1,2-dihydroxyethyl, (optionally substituted) phenyl or pyridyl; X1-X4 are H, OH, Hal, Alkyl, Alkoxy.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 01/02846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9959641	A	25-11-1999	US 6183727 B1	06-02-2001
			WO 9959641 A1	25-11-1999
			US 6207821 B1	27-03-2001
			US 6274729 B1	14-08-2001
EP 0186962	A	09-07-1986	AT 42037 T	15-04-1989
			AU 578329 B2	20-10-1988
			AU 5036785 A	05-06-1986
			CA 1257202 A1	11-07-1989
			DE 3569332 D1	18-05-1989
			EP 0186962 A1	09-07-1986
			HK 132493 A	10-12-1993
			IE 58500 B	06-10-1993
			JP 1928615 C	12-05-1995
			JP 6053665 B	20-07-1994
			JP 61130220 A	18-06-1986
			US 4837221 A	06-06-1989
			ZA 8508986 A	27-08-1986

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/18	
G 0 1 N 33/533	A 6 1 P 35/00	
	G 0 1 N 33/533	

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 オリヴァー ジェイムス クラーク
イギリス国 イースト ヨークシャー エイチユウ17 8 エイチエックス ビバリー ケルドゲート ジョージ オドバイ クロス 5

(72) 発明者 ジョナサン マーク サットン
イギリス国 エセックス シーオー2 9 イーワイ コルチェスター シュラブ エンド ダニエル ドライヴ 1

(72) 発明者 ジョン グリーンマン
イギリス国 イースト ヨークシャー エイチユウ16 5 エヌエル コッティンガム チャーチル アヴェニュー 40

F ターム(参考) 4C050 PA05
4C085 AA21 EE03
4C086 AA01 AA02 AA03 CB04 MA01 MA02 MA04 NA13 NA14 ZA02
ZB07 ZB15 ZB26 ZB33 ZC55

专利名称(译)	发色团的改进和发色团的改进		
公开(公告)号	JP2004501923A	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002505786	申请日	2001-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	催化剂生物药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	催化剂生物药物有限公司		
[标]发明人	ロスウィリアムボーイル オリヴァージェイムスクラーク ジョナサンマークサットン ジョングリーンマン		
发明人	ロス ウィリアム ボーイル オリヴァー ジェイム スクラーク ジョナサン マーク サットン ジョン グリーンマン		
IPC分类号	G01N33/533 A61K31/409 A61K39/395 A61K49/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 B01D15/42 C07D487/22 C09K9/02		
CPC分类号	A61K49/0036 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 B01D15/426 C07D487/22 C09K9/02		
FI分类号	C07D487/22 A61K31/409 A61K39/395.C A61K39/395.L A61P25/00 A61P29/00.101 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 G01N33/533		
F-TERM分类号	4C050/PA05 4C085/AA21 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/CB04 4C086 /MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZB07 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC55		
优先权	60/214075 2000-06-26 US 2001013784 2001-06-06 GB		
其他公开文献	JP2004501923A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新颖的卟啉和基于卟啉的生色团以及一组卟啉和基于卟啉的生色团，其在一系列光动力应用中特别有用，包括光化学疗法，荧光分析和成像。特别地，本发明提供了新的和有用的卟啉，二氢卟吩和细菌绿素发色团。这种生色团的生产方法；以及在分析和医学中使用此类生色团的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号
		特表2004-501923 (P2004-501923A)
		(43) 公表日 平成16年1月22日 (2004.1.22)
(6) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考)
C07D 487/22	C07D 487/22	4C050
A61K 31/409	A61K 31/409	4C085
A61K 39/395	A61K 39/395	C 4C086
A61P 25/00	A61K 39/395	L
A61P 29/00	A61P 25/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 221 頁) 最終頁に続く	
(2) 出願番号 特願2002-505786 (P2002-505786)	(7) 出願人 501132907	
(8) (2) 出願日 平成13年6月26日 (2001.6.26)	カタリスト バイオメディカ リミテッ ド	
(8) 翻訳文提出日 平成14年12月26日 (2002.12.26)	イギリス国 エヌダブル1 2 ビーイー ロンドン ユーストン ロード 183	
(8) 国際出願番号 PCT/GB2001/002846	(7) 代理人 100072051	
(8) 国際公開番号 W02002/000662	弁理士 杉村 興作	
(8) 国際公開日 平成14年1月3日 (2002.1.3)	(7) 発明者	
(3) 優先権主張番号 60/214,075	ロス ウィリアム ボーイル	
(3) 優先日 平成12年6月26日 (2000.6.26)	イギリス国 イースト ヨークシャー エ イチユウ17 7イーキュウ ビバリー パーニー クロス 45	
(3) 優先権主張国 米国 (US)		
(3) 優先権主張番号 0113784.3		
(3) 優先日 平成13年6月6日 (2001.6.6)		
(3) 優先権主張国 イギリス (GB)		