

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月20日(20.10.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/220232 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 21/64 (2006.01) C07K 5/062 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/017566

(22) 国際出願日: 2022年4月12日(12.04.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

63/173,574 2021年4月12日(12.04.2021) US
特願 2021-081777 2021年5月13日(13.05.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 浦野 泰照 (URANO Yasuteru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 神谷 真子 (KAMIYA Mako); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 長谷川 潔 (HASEGAWA Kiyoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 石沢 武彰 (ISHIZAWA Takeaki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 高橋 龍玄 (TAKAHASHI Ryugen); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小野 誠, 外 (ONO Makoto et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目1番1号 大手町パークビルディング アンダーソン・毛利・友常法律事務所 外国法共同事業 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

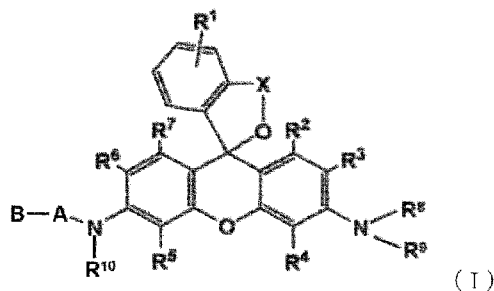
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: FLUORESCENT PROBE FOR USE IN DETECTION OF PANCREATIC CANCER

(54) 発明の名称: すい臓がん検出用蛍光プローブ



(57) Abstract: [Problem] To provide a fluorescent probe capable of detecting pancreatic cancer specifically. [Solution] A fluorescent probe for use in the detection of pancreatic cancer, which comprises a compound represented by general formula (I) or a salt thereof.

(57) 要約: 【解決課題】 すい臓がんを特異的に検出することができる蛍光プローブを提供すること。【解決手段】 以下の一般式 (I) で表される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブ。

WO 2022/220232 A1

明 細 書

発明の名称： すい臓がん検出用蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、すい臓がん検出用蛍光プローブ、及びこれを用いたすい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法に関わる。

背景技術

[0002] すい臓癌は生命を脅かす主要な疾患の1つである（例えば、非特許文献1）。化学療法および放射線療法の最近の進歩にもかかわらず、癌組織の完全切除は依然として治癒的治療の中心である（非特許文献2～3）。

しかしながら、手術中の癌の広がり境界を正確に同定することはしばしば困難であり、このことから癌組織の不完全な除去および好ましくない術後生存につながる可能性がある（非特許文献2～3）。特に術前化学療法（非特許文献4）を受けている患者では、切除標本の病理学的検査によっても生存可能な癌組織の同定がより困難になる可能性がある（非特許文献5）。

[0003] 2011年に、本発明者の一人である浦野と共同研究者は、a c t i v a t a b l e（活性化可能な）型プローブを用いた新たな蛍光イメージング技術を報告した。このプローブは、最初は蛍光を発しないが、がん細胞に過剰発現したγ-グルタミルトランスペプチダーゼによる加水分解の直後に可視蛍光シグナルを発する（非特許文献6）。それ以来、アミノ酸またはグルコースおよびヒドロキシメチルローダミンググリーン（HMRG）のような蛍光物質からなる400以上の活性化可能な蛍光プローブが開発され（非特許文献7～8）、乳癌、食道癌、肝癌、肺癌、頭頸部癌、結腸直腸癌 および甲状腺癌の可視化を可能にした。

[0004] しかしながら、すい臓がんを特異的に検出することができる蛍光プローブは未だ開発されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Hidalgo M. Pancreatic cancer. N Engl J Med. 2010 Apr 29; 362(17): 1605-17.

非特許文献2: Demir IE, Jager C, Schlitter AM, Konukiewicz B, Stecher L, Schorn S, et al. R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. Ann Surg. 2018 Dec; 268(6): 1058-1068.

非特許文献3: Tummers WS, Groen JV, Sibinga Mulder BG, Farina-Sarasqueta A, Morreau J, Putter H, et al. Impact of resection margin status on recurrence and survival in pancreatic cancer surgery. Br J Surg. 2019 Jul; 106(8): 1055-1065.

非特許文献4: Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. PLoS Med. 2010 Apr 20; 7(4): e1000267.

非特許文献5: Verbeke C, Lohr M, Karlsson JS, Del Chiaro M. Pathology reporting of pancreatic cancer following neoadjuvant therapy: challenges and uncertainties. Cancer Treat Rev. 2015 Jan; 41(1): 17-26.

非特許文献6: Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, et al. Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. Sci Transl Med. 2011 Nov 23; 3(110): 110ra119.

非特許文献7: Fujita K, Kamiya M, Yoshioka T, Ogasawara A, Hino R, Kojima R, et al. Rapid and Accurate Visualization of Breast Tumors with a Fluorescent Probe Targeting α -Mannosidase 2C1. ACS Cent Sci. 2020 Dec 23; 6(12):2217-2227.

非特許文献8: Kuriki et al. in press

発明の開示

発明が解決しようとする課題

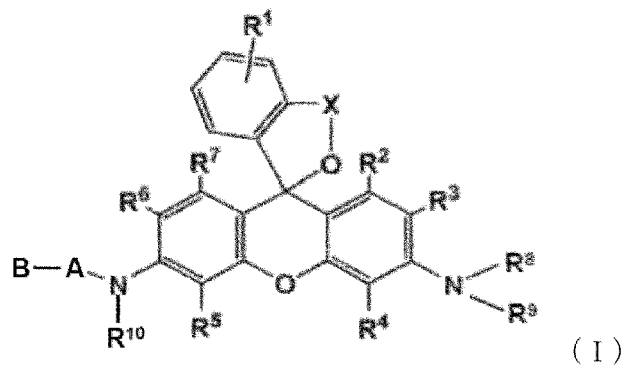
[0006] 本発明は、すい臓がんを特異的に検出することができる蛍光プローブを提供することを目的とする。また、本発明は、当該蛍光プローブを用いたすい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、膵癌切除検体から癌組織片と非癌部膵組織片を採取してライセートを作成し、およそ400種類のHMRG誘導体プローブからなる酵素プローブのライブラリーを用いて、膵癌を特異的に検出し得る蛍光プローブを探索した結果、特定の構造を有するHMRG誘導体プローブがすい臓がんを特異的に検出することができることを見出し、本発明を完成した。

[0008] 即ち、本発明は、

[1] 以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブ。



(式中、

R^1 は水素原子又はベンゼン環に結合する1～4個の同一又は異なる置換基を表し；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、及び R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ基、アルキル基、又はハロゲン原子を表し；

R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し；

Xは C_1-C_3 アルキレン基を表し；

Aは、プロリン残基であり；

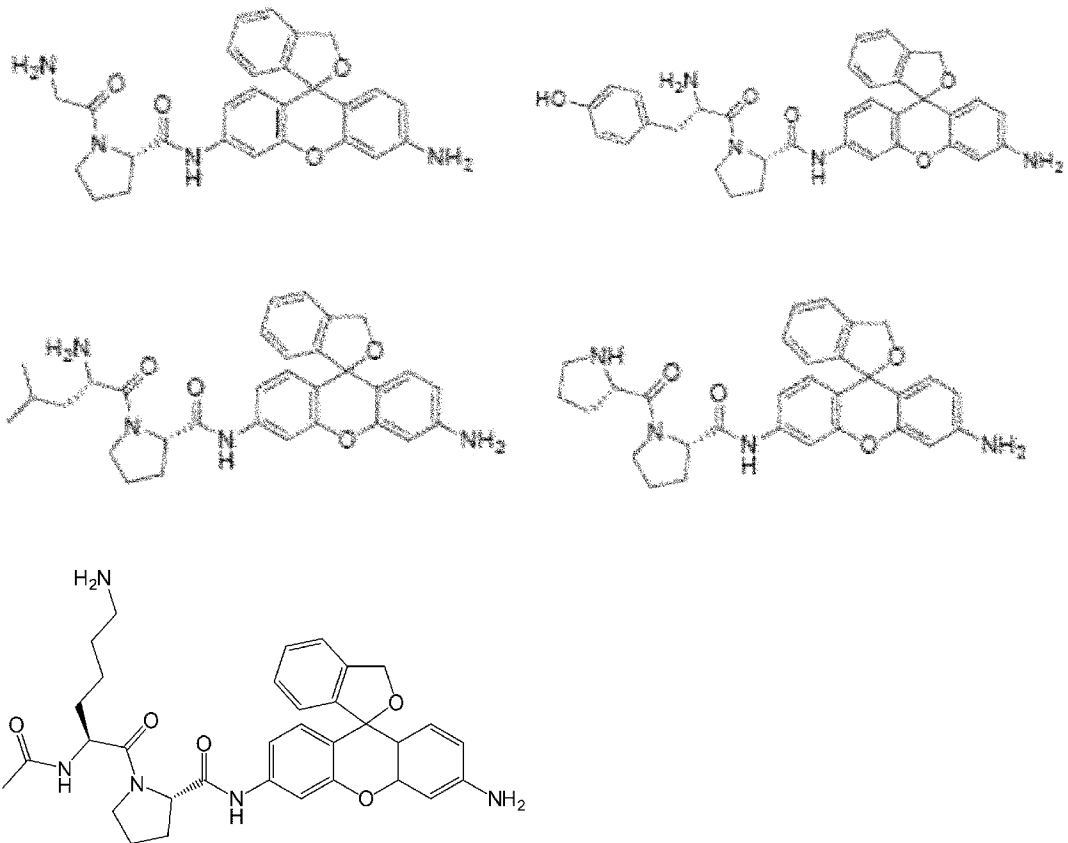
Bは、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又は N^α -アセチル-L-リシン残基から選択されるアミノ酸残基であり；

ここで、Aは隣接する式中のNHとアミド結合を形成して連結し、BはAとアミド結合を形成して連結している。)

[2] Bがグリシン残基である、[1]に記載の蛍光プローブ。

[3] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子であり、Xがメチレン基である、[1]又は[2]に記載の蛍光プローブ。

[4] 以下の群から選択される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブ。



[5] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん検出用組成物。

[6] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん検出用キット。

[7] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん診断用組成物。

[8] がん外科治療又はがん検査に用いられる[7]に記載のすい臓がん診

断用組成物。

〔 9 〕 前記がん外科治療が、開創手術又は鏡視下手術である〔 8 〕に記載のすい臓がん診断用組成物。

〔 1 0 〕 〔 1 〕 ～ 〔 4 〕 のいずれか 1 項に記載の蛍光プローブを、被検体のすい臓から採取した組織に適用する工程、

適用後の前記組織に対して励起光を照射する工程、及び

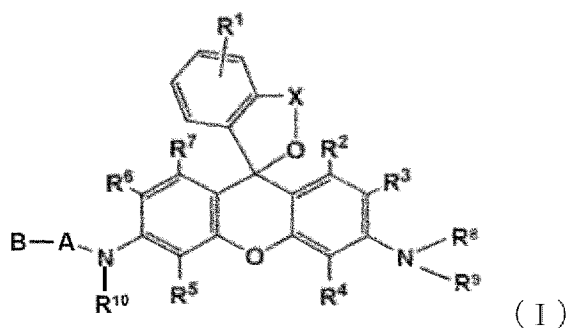
前記組織からの蛍光を検出する工程、

を含む、すい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法。

〔 1 1 〕 すい臓がんを検知する方法であって、（ a ） 〔 1 〕 ～ 〔 4 〕 のいずれか 1 項に記載の蛍光プローブをすい臓がんの臨床検体に適用する工程、及び（ b ） 前記蛍光プローブを適用したすい臓がんの臨床検体の蛍光像を測定することを含む、前記方法。

〔 1 2 〕 蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光像を可視化することを更なる特徴とする、〔 1 1 〕 に記載の方法。

〔 1 3 〕 （ a ） 被検体のすい臓から外科的に切除された標本に、以下の一般式（ I ） で表される化合物又はその塩を含む蛍光プローブを適用する工程、及び（ b ） 前記蛍光プローブを適用した切除標本の蛍光像を測定することを含む、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する、及び／又は、すい臓がん組織の範囲を同定する、方法。



（式中、

R¹ は水素原子又はベンゼン環に結合する 1 ～ 4 個の同一又は異なる置換基を表し；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、及び R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基、アルキル基、又はハロゲン原子を表し；

R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し；

Xは C_1-C_3 アルキレン基を表し；

Aは、プロリン残基であり；

Bは、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又は N^α -アセチル-L-リシン残基から選択されるアミノ酸残基であり；

ここで、Aは隣接する式中のNHとアミド結合を形成して連結し、BはAとアミド結合を形成して連結している。）

[14] Bがグリシン残基である、[13]に記載の方法。

[15] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子であり、Xがメチレン基である、[13]又は[14]に記載の方法。

[16] 蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光像を可視化することを更なる特徴とする、[13]～[15]のいずれか1項に記載の方法。

[17] [13]～[16]のいずれか1項に記載の方法が、すい臓がんの外科治療中に行われる、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する、及び／又は、すい臓がん組織の範囲を同定する、方法。

[18] 前記すい臓がんの外科治療が、開創手術又は鏡視下手術である、[17]に記載の方法。

を提供するものである。

発明の効果

[0009] 本発明により、すい臓がんを特異的に検出することができる蛍光プローブを提供することができる。また、本発明の蛍光プローブを用いることで、すい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法を提供することができる。

本発明のすい臓がん検出用蛍光プローブにより、ヒト切除標本における生存すい臓癌組織のリアルタイム同定が可能である。

[0010] また、本発明の蛍光プローブを用いることにより、すい臓がんの外科治療中に、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する方法、及び／又は、

すい臓がん組織の範囲を同定する方法を提供することができる。これにより、被検体のすい臓から外科的に切除された標本において、蛍光領域として癌組織を周囲の非癌組織と明確に識別することが可能となる。

また、術前化学療法を受けた患者では、脾動脈等の血管の周囲で肉眼では確認できない癌浸潤が発生することがあるが、本発明の同定方法を用いると、蛍光イメージングにより脾動脈等の血管の周囲の肉眼では確認できない癌浸潤の可視化が可能であり、これにより手術中のがんの取り残しを低減することが可能である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1A]膵癌患者から得られたライセートを用いた一次選択における候補プローブのF I 増加を示す。

[図1B]組織フラグメントに対する5種類のプローブ投与後30分でのF I 増加に基づくT B Rを示す。

[図1C]G P－H M R G投与後の癌及び非癌組織断片におけるF I 増加の傾向を示す。

[図2]膵がん組織における蛍光シグナルの均一な増加を示す、G P－H M R Gを用いた全外科標本上の蛍光イメージング（患者番号2）を示す。

[図3]膵がん組織における蛍光シグナルの不均一な増加を示す、G P－H M R Gを用いた全外科標本上の蛍光イメージング（患者番号6）を示す。

[図4]脾動脈へのがん浸潤を示す、G P－H M R Gを用いた全外科標本上の蛍光イメージング（患者番号8）を示す。

[図5]各酵素添加時のG P－H M R Gの蛍光強度の経時変化を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 1. 定義

本明細書中において、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を意味する。

[0013] 本明細書中において、「アルキル」は直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせからなる脂肪族炭化水素基のいずれであってもよい。アルキ

ル基の炭素数は特に限定されないが、例えば、炭素数1～20個 ($C_{1\sim20}$)、炭素数3～15個 ($C_{3\sim15}$)、炭素数5～10個 ($C_{5\sim10}$) である。炭素数を指定した場合は、その数の範囲の炭素数を有する「アルキル」を意味する。例えば、 $C_{1\sim8}$ アルキルには、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、*neo*-ペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル等が含まれる。本明細書において、アルキル基は任意の置換基を1個以上有していてもよい。該置換基としては、例えば、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、モノ若しくはジ置換アミノ基、置換シリル基、又はアシルなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。アルキル基が2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。アルキル部分を含む他の置換基（例えばアルコキシ基、アリールアルキル基など）のアルキル部分についても同様である。

[0014] 本明細書において、ある官能基について「置換基を有していてもよい」と定義されている場合には、置換基の種類、置換位置、及び置換基の個数は特に限定されず、2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ハロゲン原子、スルホ基、アミノ基、アルコキシカルボニル基、オキソ基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの置換基にはさらに置換基が存在していてもよい。このような例として、例えば、ハロゲン化アルキル基、ジアルキルアミノ基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0015] 本明細書中において、「アルコキシ基」とは、前記アルキル基が酸素原子に結合した構造であり、例えば直鎖状、分枝状、環状又はそれらの組み合わせである飽和アルコキシ基が挙げられる。例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、シクロプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、イソブトキシ基、*s*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、シクロブトキシ基、シクロプロピルメトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、シクロペンチルオ

キシ基、シクロプロピルエチルオキシ基、シクロブチルメチルオキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロプロピルプロピルオキシ基、シクロブチルエチルオキシ基又はシクロペンチルメチルオキシ基等が好適な例として挙げられる。

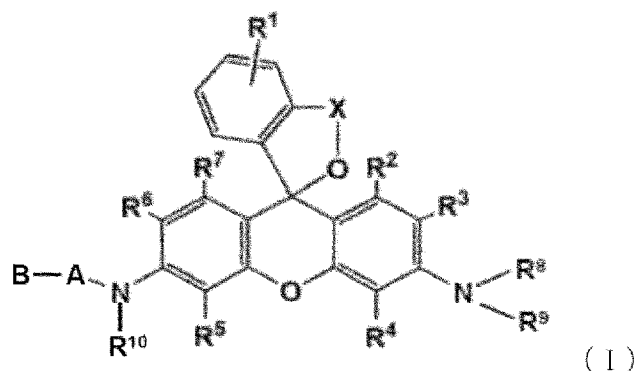
[0016] 本明細書中において、「アルキルアミノ」及び「アリールアミノ」は、 $-NH_2$ 基の水素原子が上記アルキル又はアリールの1又は2で置換されたアミノ基を意味する。例えば、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノ、ベンジルアミノ等が挙げられる。同様に、「アルキルチオ」及び「アリールチオ」は、 $-SH$ 基の水素原子が上記アルキル又はアリールで置換された基を意味する。例えば、メチルチオ、エチルチオ、ベンジルチオ等が挙げられる。

[0017] 本明細書中において用いられる「アミド」とは、 $RNR'CO-$ (R =アルキルの場合、アルキルアミノカルボニル) および $RCONR'-$ (R =アルキルの場合、アルキルカルボニルアミノ) の両方を含む。

[0018] 本明細書中において、「環構造」という用語は、二つの置換基の組み合わせによって形成される場合、複素環または炭素環基を意味し、そのような基は飽和、不飽和、または芳香族であることができる。従って、上記において定義した、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、及びヘテロアリールを含むものである。例えば、シクロアルキル、フェニル、ナフチル、モルホリニル、ピペルジニル、イミダゾリル、ピロリジニル、およびピリジルなどが挙げられる。本明細書中において、置換基は、別の置換基と環構造を形成することができ、そのような置換基同士が結合する場合、当業者であれば、特定の置換、例えば水素への結合が形成されることを理解できる。従って、特定の置換基が共に環構造を形成すると記載されている場合、当業者であれば、当該環構造は通常の化学反応によって形成することができ、また容易に生成することを理解できる。かかる環構造およびそれらの形成過程はいずれも、当業者の認識範囲内である。

[0019] 2. すい臓がん検出用蛍光プローブ

本発明の1つの実施態様は、以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブである（以下「本発明の蛍光プローブ」とも言う）。



[0020] 上記一般式（I）において、R¹は水素原子又はベンゼン環に結合する1個ないし4個の置換基を表す。置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、モノ若しくはジ置換アミノ基、置換シリル基、又はアシル基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。ベンゼン環上に2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。R¹としては水素原子が好ましい。

[0021] R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ基、アルキル基、又はハロゲン原子を表す。R²及びR⁷が水素原子であることが好ましい。また、R³、R⁴、R⁵、R⁶が水素原子であることも好ましい。R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷がいずれも水素原子であることがさらに好ましい。

[0022] R⁸、R⁹及びR¹⁰は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を表す。R⁸及びR⁹がともにアルキル基を示す場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、R⁸及びR⁹の両者が水素原子である場合、及びR⁸がアルキル基であり、かつR⁹が水素原子である場合が好ましく、R⁸及びR⁹の両者が水素原子である場合がさらに好ましい。

また、R¹⁰は水素原子であることが好ましい。

[0023] XはC₁－C₃アルキレン基を表す。アルキレン基は直鎖状アルキレン基又は分枝鎖状アルキレン基のいずれであってもよい。例えば、メチレン基（－

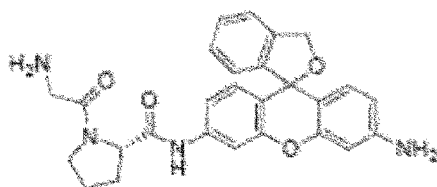
CH_2- ）、エチレン基（ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ）、プロピレン基（ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ）のほか、分枝鎖状アルキレン基として $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ なども使用することができる。これらのうち、メチレン基又はエチレン基が好ましく、メチレン基がさらに好ましい。

[0024] 本発明の蛍光プローブにおいて、一般式（I）のAは、プロリン残基であることが重要である。本研究において、約400種類のHMRG誘導体プローブからなる酵素プローブのライブラリーを用いてスクリーニング試験を行った結果、HMRGとアミド結合するC末端にプロリンを持つジペプチドから成る蛍光プローブ（XaaP-HMRGが、癌と非癌ライセートにおけるFI増加の間に有意差と比率を示す傾向があることが見出された。

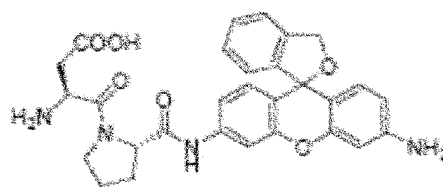
[0025] そして、更にスクリーニング試験を行った結果、上記Xaa（一般式（I）のB）としては、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又は N^α -アセチル-L-リシン残基から選択されるアミノ酸残基であることが見出された。更に、これらアミノ酸残基の中でも、Bとして、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又は N^α -アセチル-L-リシン残基が好ましく、グリシン残基であることが特に好ましい。

ここで、Aは隣接する式中のNHとアミド結合を形成して連結し、BはAとアミド結合を形成して連結している。

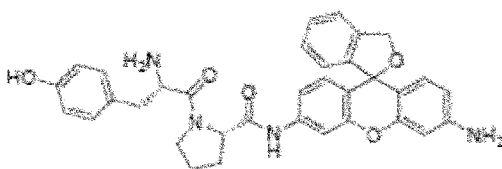
[0026] 一般式（I）の化合物の具体例としては、以下の化合物が挙げられる。ただし、これらに限定されるものではない。



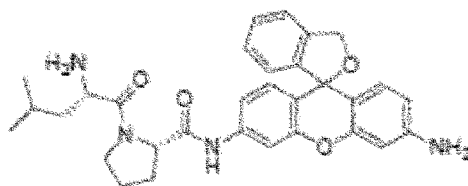
G P - H M R G



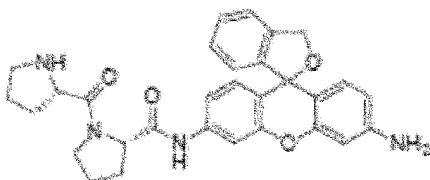
E P - H M R G



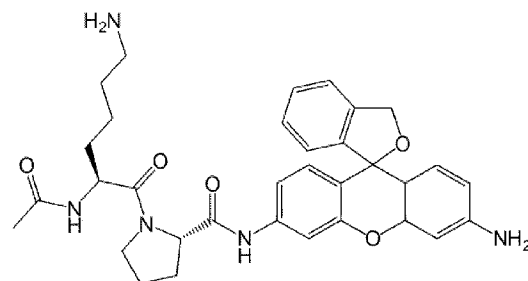
Y P - H M R G



L P - H M R G



P P - H M R G



A c K P - H M R G

[0027] 一般式(1)で表される化合物は塩として存在する場合がある。そのような塩としては、塩基付加塩、酸付加塩、アミノ酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩、ピペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩を挙げることができ、酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、カルボン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。アミノ酸塩としてはグリシン塩などを例示することができる。もっとも、これらの塩に限定されることはない。

- [0028] 一般式（１）で表される化合物は、置換基の種類に応じて１個または２個以上の不斉炭素有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。
- [0029] 一般式（１）で表される化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。
- [0030] 一般式（１）で表される化合物は、例えば、３位及び６位にアミノ基を有し、９位に２－カルボキシフェニル基又は２－アルコキシカルボニルフェニル基を有するキサンテン化合物などを原料として用い、９位の２－カルボキシフェニル基又は２－アルコキシカルボニルフェニル基をヒドロキシアルキル基に変換した後に３位のアミノ基をアシル化することにより容易に製造することができる。原料として使用可能な３，６－ジアミノキサンテン化合物としては、例えば、いずれも市販されているローダミン１１０やローダミン１２３などを例示することができるが、これらに限定されることはなく目的化合物の構造に応じて適宜のキサンテン化合物を選択することができる。
- [0031] 本発明の蛍光プローブは、必要に応じて試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で用いるための添加剤として、溶解補助剤、ｐＨ調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供され得る。
- [0032] 本発明の蛍光プローブとしては、一般式（１）で表される化合物又はその塩をそのまま用いてもよいが、必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、ｐＨ調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能で

ある。これらの組成物は、一般的には、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供されるが、使用時に注射用蒸留水や適宜の緩衝液に溶解して適用すればよい。

[0033] なお、本発明の蛍光プローブは、例えば手術中、検査中、手術後において用いることができる。本明細書において「手術」の用語は、内視鏡又は腹腔鏡などの鏡視下手術などを含めて、任意の手術を包含する。また、「検査」の用語は、内視鏡を用いた検査及び検査に伴う組織の切除や採取などの処置のほか、生体から分離・採取された組織に対して行う検査などを包含する。これらの用語は最も広義に解釈しなければならない、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

[0034] また、本明細書において、「がん組織」の用語はがん細胞を含む任意の組織を意味している。「組織」の用語は臓器の一部又は全体を含めて最も広義に解釈しなければならない、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。また、本明細書において「診断」の用語は任意の生体部位においてがん組織の存在を肉眼的又は顕微鏡下に確認することを含めて最も広義に解釈する必要がある。

[0035] 本発明の1つの態様は、本発明の蛍光プローブを含む、すい臓がん検出用組成物である。

[0036] また、本発明のもう1つの態様は、本発明の蛍光プローブを含む、すい臓がん診断用組成物である。

[0037] また、本発明のもう1つの態様は、本発明の蛍光プローブを含む、がん外科治療又はがん検査に用いられるすい臓がん診断用組成物である。

ここで、がん外科治療には、開創手術及び鏡視下手術が含まれる。

[0038] 3. 蛍光プローブを用いた検出方法

本発明のもう1つの実施態様は、本発明の蛍光プローブを、被検体のすい臓から採取した組織に適用する工程、

適用後の前記組織に対して励起光を照射する工程、及び

前記組織からの蛍光を検出する工程、

を含む、すい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法である。

ここで、被検体には、ヒト、及びヒト以外の哺乳類（例えば、イヌ、ネコ等）が含まれる。

[0039] 上記の（a）の工程で蛍光プローブを被検体のすい臓から採取した組織に適用するには、例えば、癌性又は非癌性組織サンプルから作製されたライセートを用いて、例えば384プレートのウェル等に適用することが挙げられるが、これに限定されない。

[0040] また、本発明のもう1つの実施態様は、すい臓がんを検知する方法であって、（a）本発明の蛍光プローブをすい臓がんの臨床検体に適用する工程、及び（b）前記蛍光プローブを適用したすい臓がんの臨床検体の蛍光像を測定することを含む、前記方法である。

[0041] 上記の（a）の工程で蛍光プローブを臨床検体に適用するには、例えば、蛍光プローブの溶液を局所的に又は全体的に臨床検体にスプレーすることによって行うことができる。

[0042] 本発明の検出方法、及び検知方法は、さらに蛍光イメージング手段を用いて蛍光応答を観測することを含むことができる。蛍光応答を観測する手段は、広い測定波長を有する蛍光光度計を用いることができるが、前記蛍光応答を2次元画像として表示可能な蛍光イメージング手段を用いて可視化することもできる。蛍光イメージングの手段を用いることによって、蛍光応答を2次元で可視化できるため、がん細胞又は組織を瞬時に視認することが可能となる。蛍光イメージング装置としては、当該技術分野において公知の装置を用いることができる。なお、場合によって、紫外可視吸光スペクトルの変化（例えば、特定の吸収波長における吸光度の変化）によって上記測定対象試料と蛍光プローブの反応を検出することも可能である。

[0043] 本発明の蛍光プローブの使用方法は特に限定されず、従来公知の蛍光プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との

混合物などに本発明の化合物又はその塩を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。本発明の蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いてもよい。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤などの添加物と組み合わせることができる。

また、本発明の蛍光プローブ中の本発明の化合物の濃度は、測定する細胞等の種類や測定条件等に応じて適切に定めることができる。

[0044] 本発明のもう1つの実施態様は、本発明の蛍光プローブを含む、すい臓のがん細胞又は組織の検出用キットである。

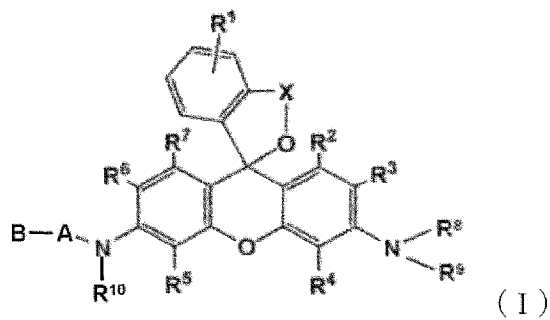
[0045] 当該キットにおいて、通常、本発明の蛍光プローブは溶液として調製されているが、例えば、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供され、使用時に注射用蒸留水や適宜の緩衝液に溶解して適用することもできる。

[0046] また、当該キットには、必要に応じてそれ以外の試薬等を適宜含んでもよい。例えば、添加剤として、溶解補助剤、pH調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。

[0047] 本発明の蛍光プローブの適用濃度は特に限定されないが、例えば0.1～10 μ M程度の濃度の溶液を適用することができる。

[0048] 4. 本発明の蛍光プローブのすい臓がんの外科手術への適用

本発明のもう1つの実施態様は、(a)被検体のすい臓から外科的に切除された標本に、以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩を含む蛍光プローブを適用する工程、及び(b)前記蛍光プローブを適用した切除標本の蛍光像を測定することを含む、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する、及び／又は、すい臓がん組織の範囲を同定する、方法である(以下「本発明の同定方法等」とも言う)。



ここで、被検体には、ヒト、及びヒト以外の哺乳類（例えば、イヌ、ネコ等）が含まれる。

[0049] 上記一般式（I）において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、X、A、Bについては、上記で詳述した通りである。

[0050] 本発明の同定方法等においては、一般式（I）において、Bがグリシン残基であることが特に好ましい。

[0051] また、本発明の同定方法等においては、一般式（I）において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子であり、Xがメチレン基であることが好ましい。

[0052] 本発明の同定方法等は、さらに蛍光イメージング手段を用いて蛍光像を可視化することを含むことができる。蛍光イメージング手段の詳細については、本発明の検出方法及び検知方法で記載した通りである。

[0053] 本発明の同定方法等は、すい臓がんの外科治療中に行うことができる。ここで、すい臓がんの外科治療には、開創手術、鏡視下手術が含まれる。

[0054] 本発明の蛍光プローブを用いて、すい臓がんの外科治療中に本発明の同定方法等を行うことにより、被検体のすい臓から外科的に切除された標本において、蛍光領域として癌組織を周囲の非癌組織と明確に識別することが可能となる。また、本発明の同定方法等を行うことにより、癌細胞の生存性に基づく癌組織の迅速かつリアルタイムの同定を可能にする。この結果、手術中において、がんの存在が疑われる組織の病理検査を行うことを低減させることが可能である。

[0055] また、術前化学療法を受けた患者では、脾動脈等の血管の周囲で肉眼では

確認できない癌浸潤が発生することがあるが、本発明の同定方法等を用いると、蛍光イメージングにより脾動脈等の血管の周囲の肉眼では確認できない癌浸潤の可視化が可能であり、これにより手術中のがんの取り残しを低減することが可能である。

[0056] このように、本発明の同定方法等による蛍光イメージングは、生きたすい臓癌細胞の広がりを実タイムで可視化することができ、これは外科的切除縁の術中診断および管内病変の術前内視鏡評価にも有用である。

実施例

[0057] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0058] 材料と方法

本研究は東京大学医学部附属病院治験審査委員会(IRB No. 2957- [11])により承認された。

[0059] 1. サンプルの採取

2017年4月から2020年12月までの期間に、膵癌に対し根治的切除術を施行した患者の切除標本から、組織片を採取した。(採取にあたり、前例でインフォームドコンセントを行い、同意を得た)

[0060] 2. 一次スクリーニング

最初に、非特許文献6～8に記載されている手順に則って、癌部・非癌部の組織片から作成したライセートをそれぞれ蛍光プローブと混合して蛍光強度の上昇値を測定し、候補となる蛍光プローブを選定した。概要を述べると、ジペプチド-HMRG化合物のライブラリー(非特許文献8) 15 μ Lが配列された黒色384プレートのウェルへ、5 μ Lのライセート(蛋白質濃度: 0.20 mg/dL)を滴下した。候補プローブ及びライセート蛋白質の最終濃度はそれぞれ1.0 μ M及び0.050 mg/dLであった。

各試料の蛍光強度(FI)は、37℃でインキュベートしながら、Envision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer (米国マサチューセッツ州))により、混合後0分後と60

分後を測定した。励起及び発光波長はそれぞれ485 nm及び535 nmに設定した。FI増加は以下のように定義した。

$$(FI \text{ 増加}) = (60 \text{ 分後の } FI) - (0 \text{ 分後の } FI)$$

癌および非癌ライセートにおけるFI増加の差または比が上位10%にあったプローブを候補プローブとして選定し、次の評価を行った。

[0061] 3. 二次スクリーニング

癌部および非癌部組織の組織片を8ウェルプレートに配置し、候補蛍光プローブを直接散布した。各蛍光プローブの濃度および量は、50 μ Mおよび200 μ Lとした。蛍光プローブの投与後0分（前）、1分、3分、5分、10分、15分、20分、25分及び30分に蛍光画像を撮像した。蛍光画像はMaestro in Vivo画像システム（PerkinElmer（米国マサチューセッツ州））により取得し、撮影条件は485～480 nmおよび490 nmの励起および発光波長とした。FIは、540 nmでの蛍光画像を抽出し、30分での関心領域（ROI）の平均蛍光値から1分での同領域の蛍光地を差し引くことにより計算した。癌と非癌組織間でFIの差最大であったものを膀胱癌標識蛍光プローブとして選定した。

[0062] 4. 外科的切除標本を用いた癌同定能の肉眼的評価

膀胱癌検体を摘出した直後に、すい臓癌組織の最大径を含むように切断した。次に、前述の蛍光プローブ（4 mL、50 μ M）を切断面に直接散布し、前述のように、Maestro in Vivoイメージングシステムを用いて蛍光イメージングを行った。蛍光イメージングの精度は、外科医（RT）と病理医（MT）が、同じ面の病理組織学的所見を参照して評価した。加えて、腫瘍／バックグラウンド比（TBR）も、切断面のマクロ／顕微鏡所見と対応する蛍光画像に基づいて、癌部と非癌部におけるプローブ投与後1分から30分までの平均FIの増加を測定することにより算出した。

[0063] 5. 標的酵素の探索

ジペプチジルペプチダーゼ4（DPP-IV）あるいはその類似酵素がすい臓癌組織で過剰発現している標的酵素であると考えられた。まず候補蛍光

プローブをDPP-IVや類似酵素が活性化するかを調べた。F-7000（日立（東京都））を用いて、ヒト組換えDPP-IV（50 μ L；D4943、Sigma-Aldrich）、DPP-VIII（1.0 μ g；ab162872、abcam）、DPP-IX（1.0 μ g；ab79621、abcam）を3.0 mLのプローブ溶液（1.0 μ M）中に注入し、2,000秒間のFIの変化を測定した。励起及び発光波長はそれぞれ495及び525 nmに設定した。

さらに、外科的切除標本の切断面におけるDPP-IVの発現を、免疫組織化学（IHC）染色によって評価した。抗体は、抗DPP-IVマウスモノクローナル抗体（TA500733；Origene Technologies Inc.（メリーランド州ロックビル））を用いた。抗原賦活化は110℃で15分間行った。抗DPP-IV抗体の濃度は1：100とし、インキュベーションは4℃、Overnightで行った。IHC染色の結果は、蛍光イメージングの結果を盲検化して、病理学者（MT）が評価した。

[0064] [実施例1]

一次及び二次プローブスクリーニング

5切除検体から作成したライセートと309種類の候補プローブを用いた一次選択では、HMRGとアミド結合するC末端にプロリンを持つジペプチドから成る蛍光プローブ（XaaP-HMRG）が、癌と非癌ライセートにおけるFI増加の間で差や増加比が大きい傾向を示した（図1A）。これらの中で、5つのプローブ（AcKP-、GP-、LP-、PP-、及びYP-HMRG）を、候補プローブとして選定し2次スクリーニングへ進んだ。2次スクリーニングでは、11人の患者から癌部・非癌部組織片を採取した。

[0065] 図1は、すい臓癌患者から得られたライセート及び組織断片を用いた一次および二次スクリーニングにおける、候補プローブのFI増加を示す。

具体的には、図1Aで示すように、5人の患者から得たライセートを用いた蛍光イメージングは、HMRGとアミド結合するC末端にプロリンを持つ

ジペプチドから成る6種類のプローブ（AcKP-、EP-、GP-、LP-、PP-、及びYP-HMRG）において、非癌組織（N、点線）とは対照的に癌組織（C、実線）においてFIの有意な増加を示した。

[0066] 図1Bは、組織片に対する、各プローブ投与後30分でのFI増加を示す。左側のプロットは癌組織についての結果であり、右側のプロットは非癌組織についての結果である。

GP-HMRGの癌部/非癌部のFI増加比は、AcKP-HMRG（0.95～1.36）、LP-HMRG（1.10～2.38）、PP-HMRG（2.37～3.20）及びYP-HMRG（1.62～3.01）を含む残りの候補の中でも、最も高かった（範囲、2.70～6.10）。バーは中央値を示す。

また、図1Cは、GP-HMRG投与後の癌及び非癌組織断片における経時的なFI増加の推移を示す。

[0067] 結果として、GP-HMRGを用いた蛍光イメージングは、癌組織と非癌組織の間で、30分でFIの最高のコントラストを示した（中央値〔範囲〕、3.22〔2.60～5.59〕a.u. vs. 1.14〔0.86～1.87〕a.u.、 $P=0.010$ 、Wilcoxonの順位和検定；図1Bおよび1C）。以上から、GP-HMRGを膀胱癌標識蛍光プローブとして選定し、外科的切除標本を用いて蛍光イメージングの癌検出能を評価した。

[0068] [実施例2]

GP-HMRGを用いた全外科標本の蛍光イメージング

すい臓腺癌患者8名の切除直後の全外科標本の切断面にGP-HMRGをスプレーすることにより、蛍光イメージングの癌検出能を評価した。患者背景を表1にまとめた。ゲムシタビンとナブパクリタキセルによる術前補助化学療法（NAC）が2人の患者で適応となった。3名の患者は糖尿病で治療されたが、術前にDPP-IV阻害剤は投与されなかった。

[0069]

[表1]

患者の背景及びGP-HMRGを用いた蛍光イメージングの結果

Patients	Age (y)	Sex	DM	NAC (effect*)	Preoperative CA19-9 (IU/mL)	Surgical procedures	Histological type	A TBR ratio of F1
1	70	M	-	-	68	DP	Adenosquamous	3.44
2	83	F	-	-	55	DP	tub1 > tub2	2.06
3	63	F	-	-	9	PD	tub2 > tub1 > por	1.98
4	74	M	-	-	39	DP	tub2 > tub1	1.98
5	73	F	+	-	1	DP	tub1 > tub2	1.93
6	68	M	+	-	393	PD	tub2 > tub1	1.47
7	82	F	-	+, (1b)	25	DP-CAR	tub1 > tub2	1.26
8	84	F	-	+, (1b)	544	DP	tub1 > tub2**	1.13

[0070] 表 1 中の略号、記号は以下の通りである。

DM : 糖尿病、NAC : 術前化学療法、PD : 膵頭十二指腸切除術、DP : 膵体尾部切除術、DP-CAR : 膵体尾部切除術

pancreatectomy with celiac axis resection : 腹腔動脈幹合併膵体尾部切除術

TBR : 腫瘍/バックグラウンド比、tub 1/tub 2 : 高/中分化型管状腺癌

adenocarcinoma, por : poorly differentiated adenocarcinoma (低分化腺癌)

* : Evans分類に基づく

** : 脾動脈への神経周囲およびリンパ管への生存癌細胞の浸潤

[0071] GP-HMRG 散布 30 分後の蛍光画像の平均 TBR は 1.96 (範囲、1.31 - 2.04) であった。1.93 から 3.10 の範囲の TBR を有する 4 人の患者 (患者番号 : 1、2、4 及び 5) では、癌組織の蛍光シグナルは、ほぼ均一であり、周辺すい臓組織から肉眼的に識別可能であった (図 2)。

[0072] 図 2 は、すい臓癌組織における蛍光シグナルの均一な増加を示す、GP-HMRG を用いた全外科標本上の蛍光イメージング (患者番号 2) を示す。

図 2 の A は、膵体部癌の術前造影 CT (矢印) を示す。

図 2 の B は、腫瘍の断面を作成した後の DP 標本の肉眼の画像 OR を示し、C は腫瘍を含む切断面の拡大図である。

図 2 の D は、切断面に GP-HMRG をスプレーした後の蛍光シグナルの

増加を示す。

図2のEは、プローブ投与30分後の切断面の蛍光画像（左）と擬似リアルカラー画像（右）を示す。

図2のFは、試料の肉眼画像（B）に基づく癌組織（白実線）および周辺すい臓組織（白点線）の蛍光シグナルと分布の関係を示す。

図2のGは、蛍光画像（左、点線はがん境界を示す）に対応するヘマトキシリンーエオジン（H&E）染色の低倍率組織病理学的画像を示す。癌組織（赤）およびすい臓組織（青）におけるDPP-IVのH&E染色およびIHC染色の拡大図も示す（右）。スケールバーは、100 μ mである。

[0073] 術前化学療法を受けた2例を含む残りの4例では、癌組織は不均一な蛍光シグナルを示し、癌組織での蛍光シグナルは非癌組織よりも高いものの、癌組織と非癌組織との明確な識別が困難であった（図3）。

図3は、すい臓癌組織における蛍光シグナルの不均一な増加を示す、GP-HMRGを用いた全外科標本上の蛍光イメージング（患者番号6）を示す。

図3のAは、膵頭部癌の術前造影CT（矢印）を示す。

図3のBは、PD標本の肉眼像（左）および腫瘍を含む点線に沿った切断面（右）を示す。

図3のCは、切断面にGP-HMRGを散布した後の蛍光シグナルの増加を示す。

図3のDは、試料の肉眼像（B）に基づく癌組織（白実線）および周辺すい臓組織（白点線）の蛍光シグナルと分布の関係を示す。

図3のEは、蛍光画像に対応するH&E染色の低倍率病理組織像（左、点線はがん境界を示す）。癌組織（白実線）およびすい臓組織（白点線）におけるDPP-IVのH&E染色およびIHC染色の拡大図も示す（右）。スケールバーは、100 μ mである。

[0074] 後者のグループの1人の患者では、蛍光イメージングで脾動脈周囲の結合組織に有意なシグナル増加（a TBR（2.04））が確認され（図4D

の矢印)、後に病理学的検査で生存可能な癌細胞の神経周囲およびリンパ浸潤と診断されたが、主な腫瘍には、おそらく術前化学療法に起因すると思われる生存可能な癌細胞がほとんどない線維症および粘液性変化 (a T B R (1. 13)) が含まれていた (図4)。

[0075] 図4は、脾動脈へのがん浸潤を示す、GP-HMRGを用いた全外科標本の蛍光イメージング (患者番号8) を示す。

図4のAは、膵体部癌の術前造影CT (矢印) を示す。

図4のBは、DP標本の肉眼の画像 (左) および腫瘍を含む点線に沿った切断面 (右) を示す。

図4のCは、GP-HMRGを切断面にスプレーした後の蛍光シグナルの増加と30分での擬似リアルカラー画像を示す。

図4のDは、試料の肉眼画像 (B) に基づく癌組織 (白実線) および周辺すい臓組織 (白点線) の蛍光シグナルと分布の関係を示す。矢印は脾動脈を示す。

図4のEは、蛍光画像に対応するH&E染色の低倍率病理組織像 (左、点線はがん境界を示す) を示す。DPP-IVのH&E染色およびIHC染色による主腫瘍の蛍光 (赤) および少量の蛍光 (黒) 部分、脾動脈周囲の生存癌浸潤 (緑)、および非癌性すい臓組織 (青) の拡大図も示している (右)。スケールバーは、100 μ mである。

[0076] [参考例1]

GP-HMRGを活性化する標的酵素の同定

DPP添加後のGP-HMRGの*in vitro*蛍光スペクトルは、プローブがDPP-IVおよびDPP-IXとの反応で高蛍光HMRGに変換されることを示した (図5)。

ここで、図5は、各酵素添加時のGP-HMRGの蛍光強度の経時変化を示す。励起/発光波長は495 nm/525 nmであった。図5のAは DPP-IV、図5のBはDPP-VIII、図5のCは DPP-IXを添

加した結果である。

一方、上記の結果とは異なり、8人の患者の切除した試料でのIHC染色は、癌組織と周辺すい臓組織の間のDPP-IVの発現量の明らかな違いを示さなかった（表1及び図2～4）。

[0077] （考察）

本研究では、活性化可能な309種類の蛍光プローブの候補を用いてスクリーニングを行い、すい臓癌組織の同定のためにGP-HMRGを選定した。新鮮切除標本の切断面上のGP-HMRGを用いた蛍光イメージングは、8名の患者のうち4名において高い（>1.9）TBRを有する均一な蛍光領域として癌組織を可視化した。残りの4例では、癌組織の蛍光シグナルは不均一であり、癌組織での蛍光シグナルは非癌組織よりも高いものの、周囲の非癌組織との明確な識別には不十分であった。しかしながら、術前化学療法を受けた1人の患者では、蛍光イメージングにより脾動脈周囲の肉眼では確認できない癌浸潤の可視化が可能となった。これらの結果は、GP-HMRGを用いた蛍光イメージングが、viableなすい臓癌細胞の広がりを実時間で可視化する可能性を有し、これは外科的切除縁の術中診断および管内病変の術前内視鏡評価にも有用であることを示唆する。

[0078] 活性化可能なプローブを使用する主な利点は、酵素活性、すなわち癌細胞の生存性に基づく癌組織の迅速かつリアルタイムの同定を可能にあることである。実際、本研究では、GP-HMRGの局所投与後1分から癌組織における蛍光シグナルの増加が確認され、さらに、癌組織におけるFIは、おそらく術前化学療法による線維症および粘液性変化の結果として減少すると考えられた。

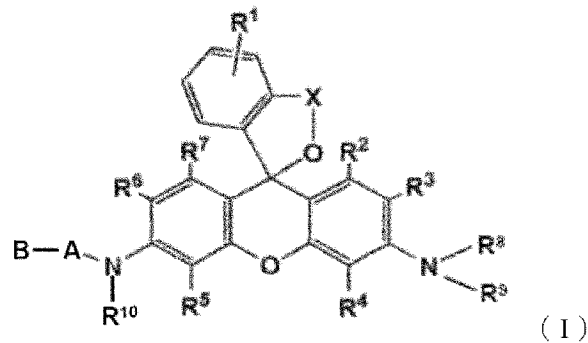
最近、いくつかの研究では、5-アミノレブリン酸、インドシアニングリーン、および炭水化物抗原19-9（CA19-9）、癌胎児性抗原（CEA）、上皮成長因子受容体（EGFR）、およびインスリン様成長因子1受容体（IGF-1R）を標的とする新規フルオロフォアを用いたすい臓癌の術中同定のための蛍光イメージング技術も開発された。

しかしながら、「非活性化可能な」プローブの全身投与に基づくこれらの技術は、通常、バックグラウンド組織からの蛍光剤のウォッシュアウトのためにより長い間隔を必要とし、それは、術中局所投与による活性化可能なプローブの使用と比較して、より低いTBRをもたらし得る。これに対して、本技術は癌組織の生存性と酵素活性の解明にも潜在的な利点があり、化学療法に対する感受性と術後転帰の予測を可能にし得る。

[0079] 以上の通り、結論として、GP-HMRGを用いた蛍光イメージングは、癌組織の酵素活性に基づくすい臓癌の迅速かつリアルタイムの可視化を可能にする。

請求の範囲

[請求項1] 以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブ。



（式中、

R^1 は水素原子又はベンゼン環に結合する1～4個の同一又は異なる置換基を表し；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、及び R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基、アルキル基、又はハロゲン原子を表し；

R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し；

Xは C_1-C_3 アルキレン基を表し；

Aは、プロリン残基であり；

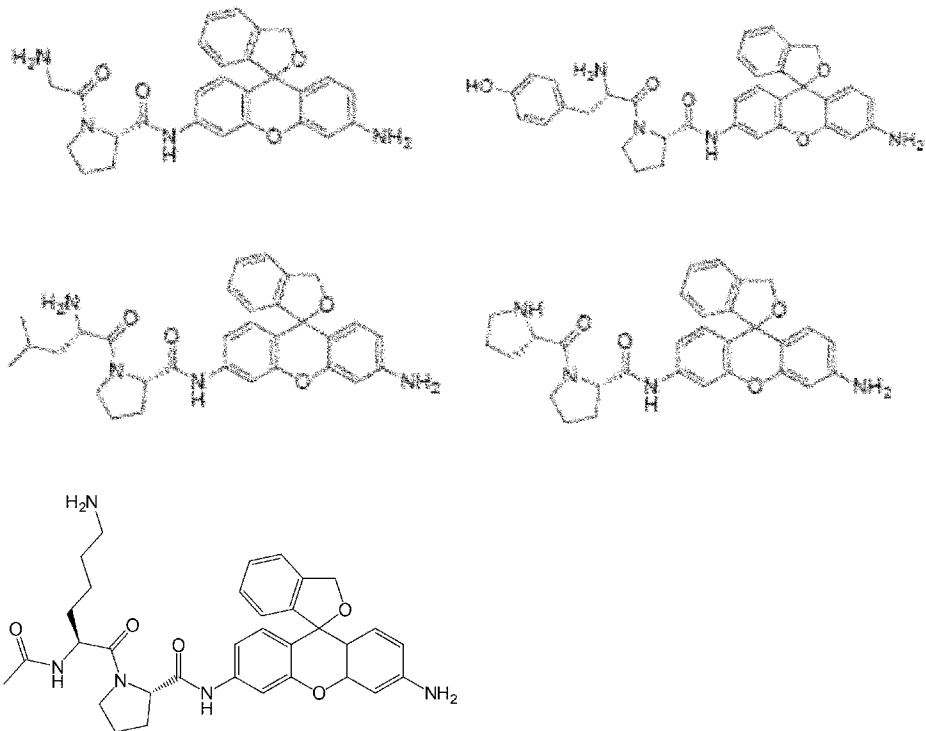
Bは、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又は N^α -アセチル-L-リシン残基から選択されるアミノ酸残基であり；

ここで、Aは隣接する式中のNHとアミド結合を形成して連結し、BはAとアミド結合を形成して連結している。）

[請求項2] Bがグリシン残基である、請求項1に記載の蛍光プローブ。

[請求項3] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子であり、Xがメチレン基である、請求項1又は2に記載の蛍光プローブ。

[請求項4] 以下の群から選択される化合物又はその塩を含む、すい臓がん検出用蛍光プローブ。

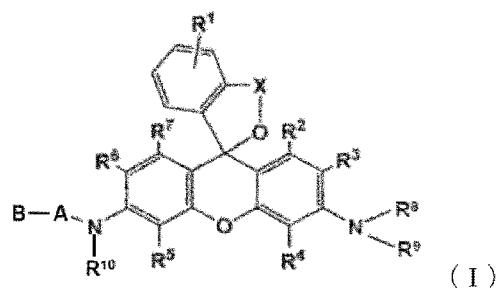


- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん検出用組成物。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん検出用キット。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、すい臓がん診断用組成物。
- [請求項8] がん外科治療又はがん検査に用いられる請求項7に記載のすい臓がん診断用組成物。
- [請求項9] 前記がん外科治療が、開創手術又は鏡視下手術である請求項8に記載のすい臓がん診断用組成物。
- [請求項10] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブを、被検体のすい臓から採取した組織に適用する工程、
適用後の前記組織に対して励起光を照射する工程、及び
前記組織からの蛍光を検出する工程、
を含む、すい臓のがん細胞またはがん組織の検出方法。
- [請求項11] すい臓がんを検知する方法であって、(a) 請求項1～4のいずれ

か1項に記載の蛍光プローブをすい臓がんの臨床検体に適用する工程、及び（b）前記蛍光プローブを適用したすい臓がんの臨床検体の蛍光像を測定することを含む、前記方法。

【請求項12】 蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光像を可視化することを更なる特徴とする、請求項11に記載の方法。

[請求項13] （a）被検体のすい臓から外科的に切除された標本に、以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩を含む蛍光プローブを適用する工程、及び（b）前記蛍光プローブを適用した切除標本の蛍光像を測定することを含む、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する、及び／又は、すい臓がん組織の範囲を同定する、方法。



(式中、

R¹は水素原子又はベンゼン環に結合する1～4個の同一又は異なる置換基を表し；

R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ基、アルキル基、又はハロゲン原子を表し；

R⁸、R⁹及びR¹⁰は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し；

XはC₁－C₃アルキレン基を表し；

Aは、プロリン残基であり；

Bは、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、プロリン残基、チロシン残基又はN^α-アセチル-L-リシン残基から選択されるアミノ酸残基であり；

ここで、Aは隣接する式中のNHとアミド結合を形成して連結し、B

はAとアミド結合を形成して連結している。)

[請求項14] Bがグリシン残基である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子であり、Xがメチレン基である、請求項13又は14に記載の方法。

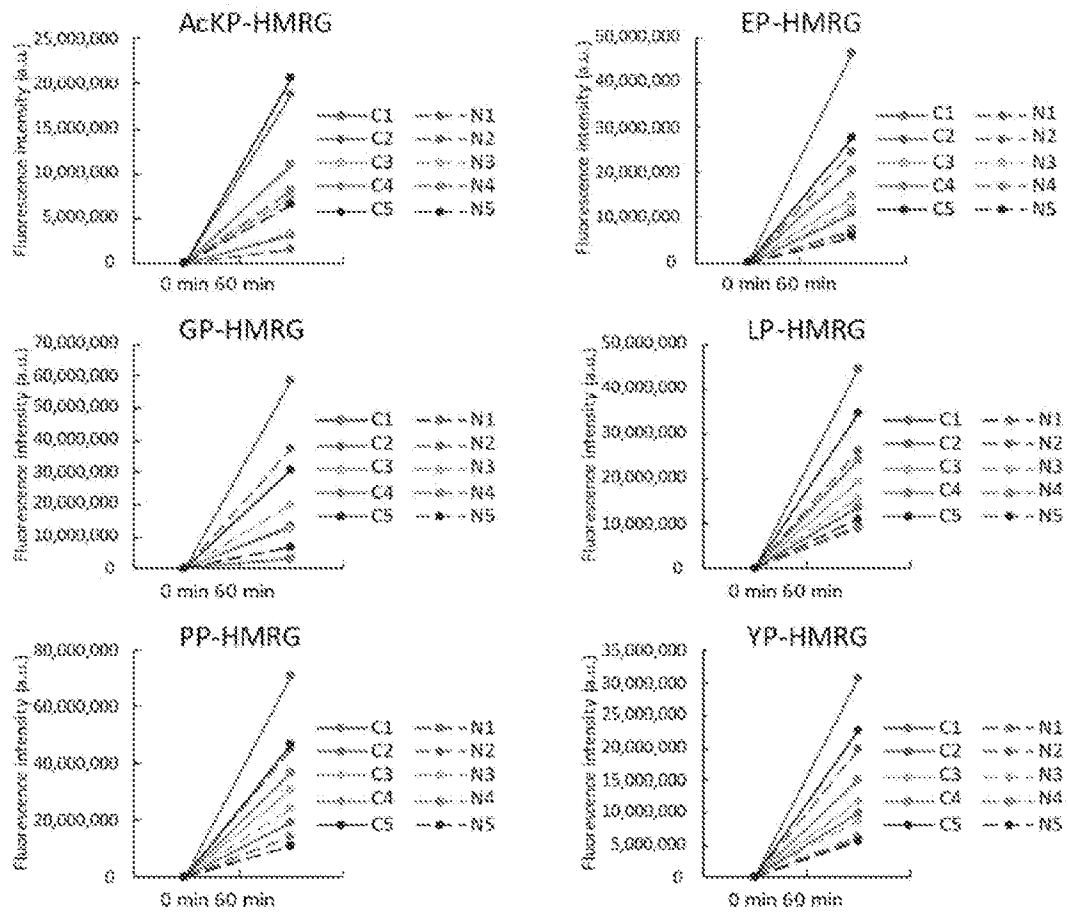
[請求項16] 蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光像を可視化することを更なる特徴とする、請求項13～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 請求項13～16のいずれか1項に記載の方法が、すい臓がんの外科治療中に行われる、被検体におけるすい臓がん細胞の存在を決定する、及び／又は、すい臓がん組織の範囲を同定する、方法。

[請求項18] 前記すい臓がんの外科治療が、開創手術又は鏡視下手術である、請求項17に記載の方法。

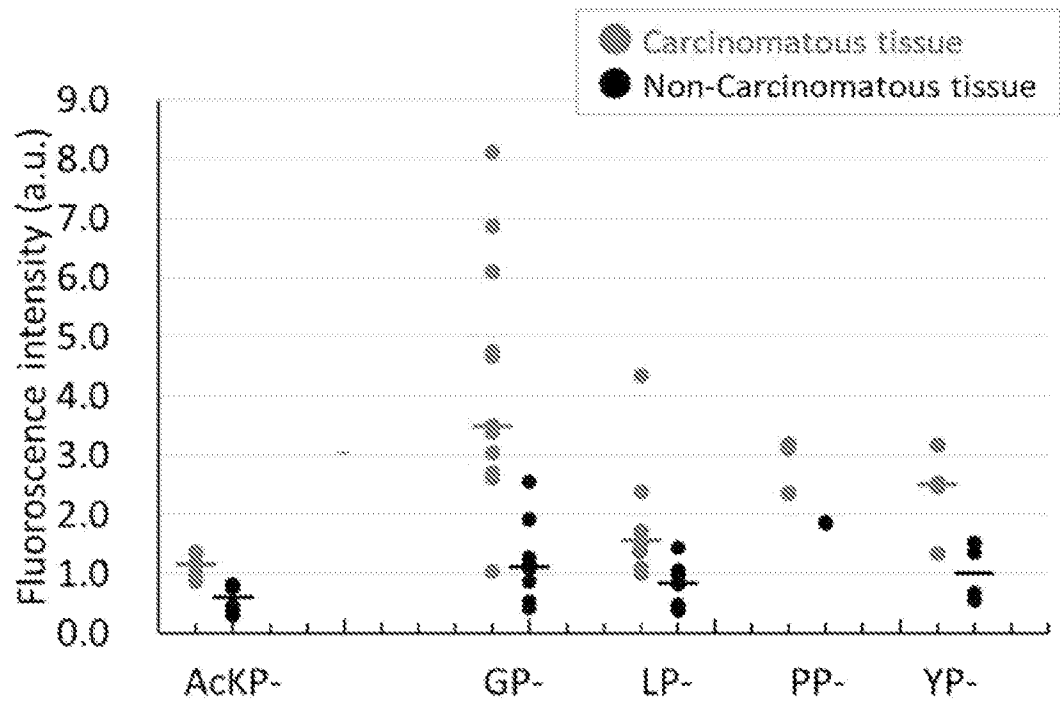
[図1A]

A



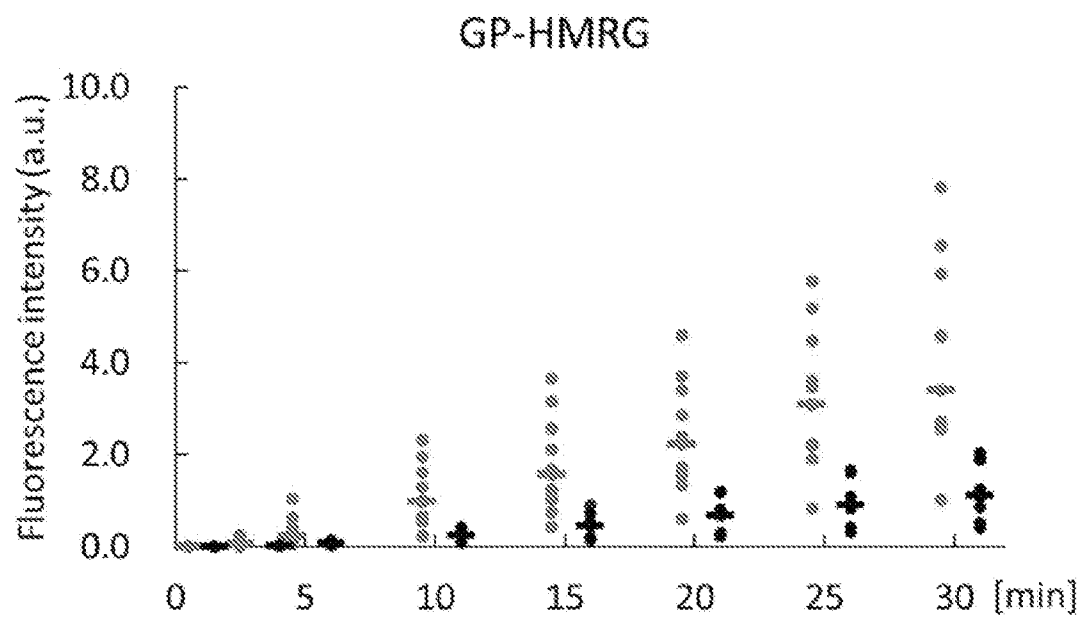
[図1B]

B

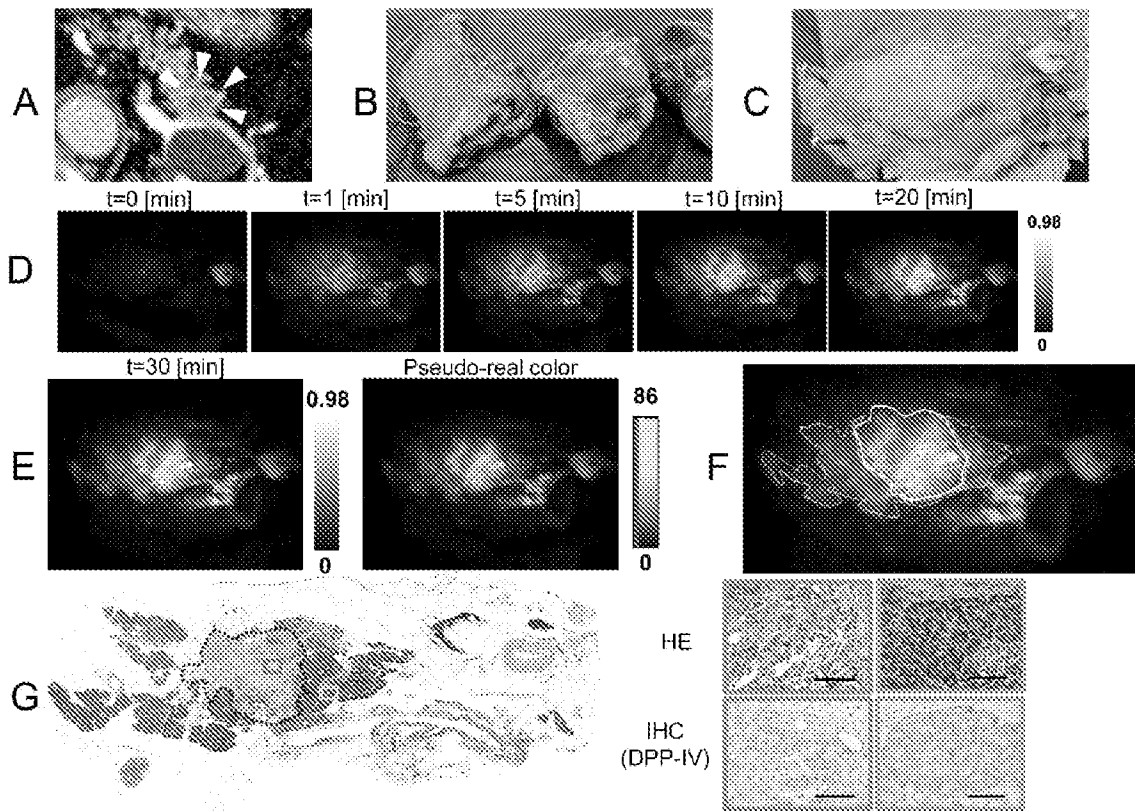


[図1C]

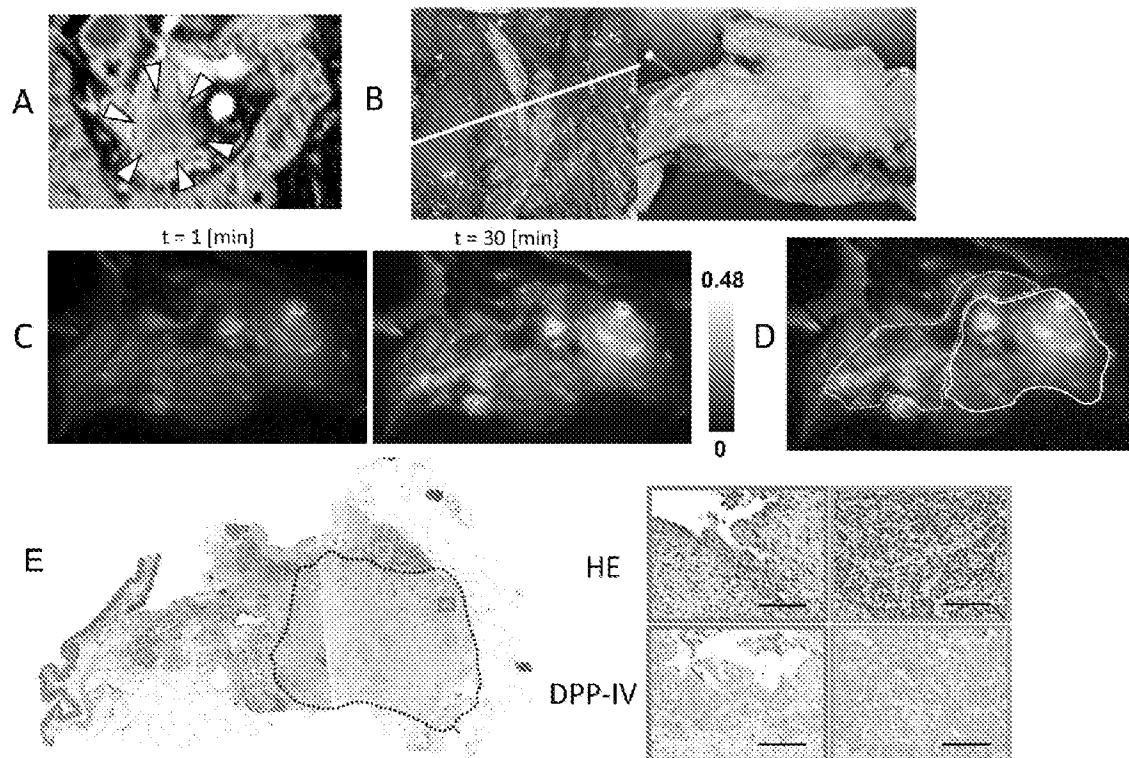
C



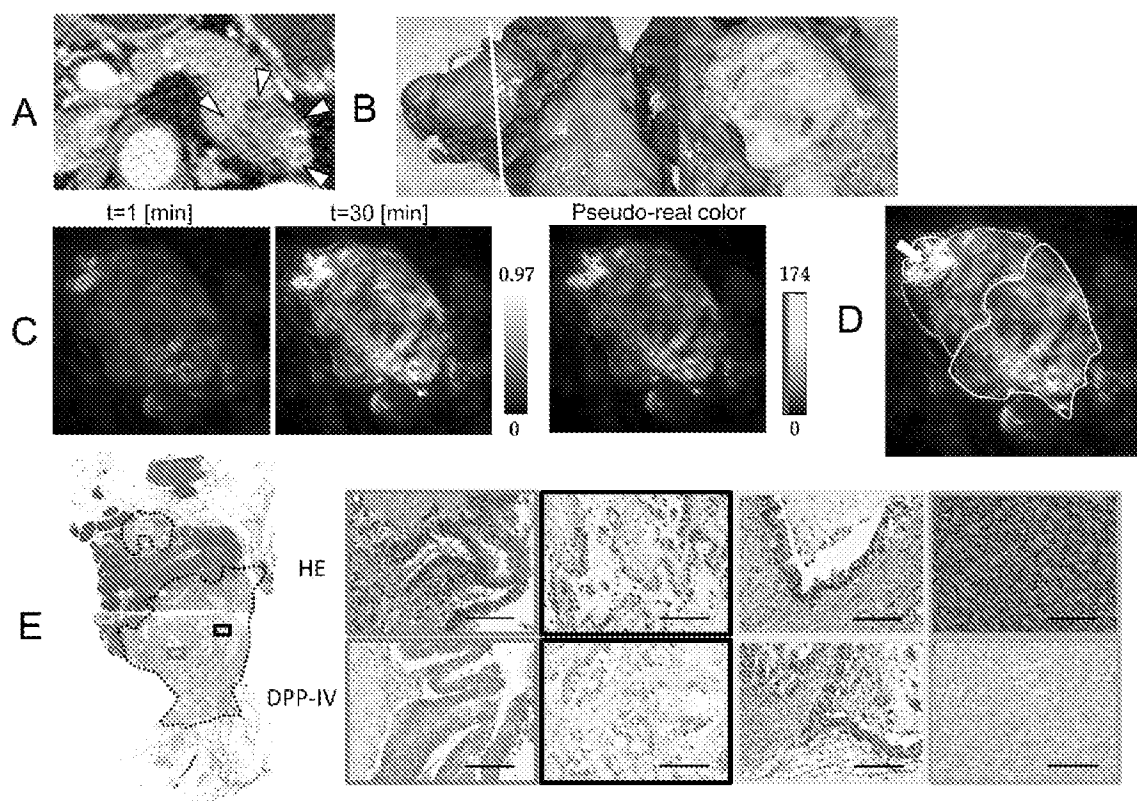
[図2]



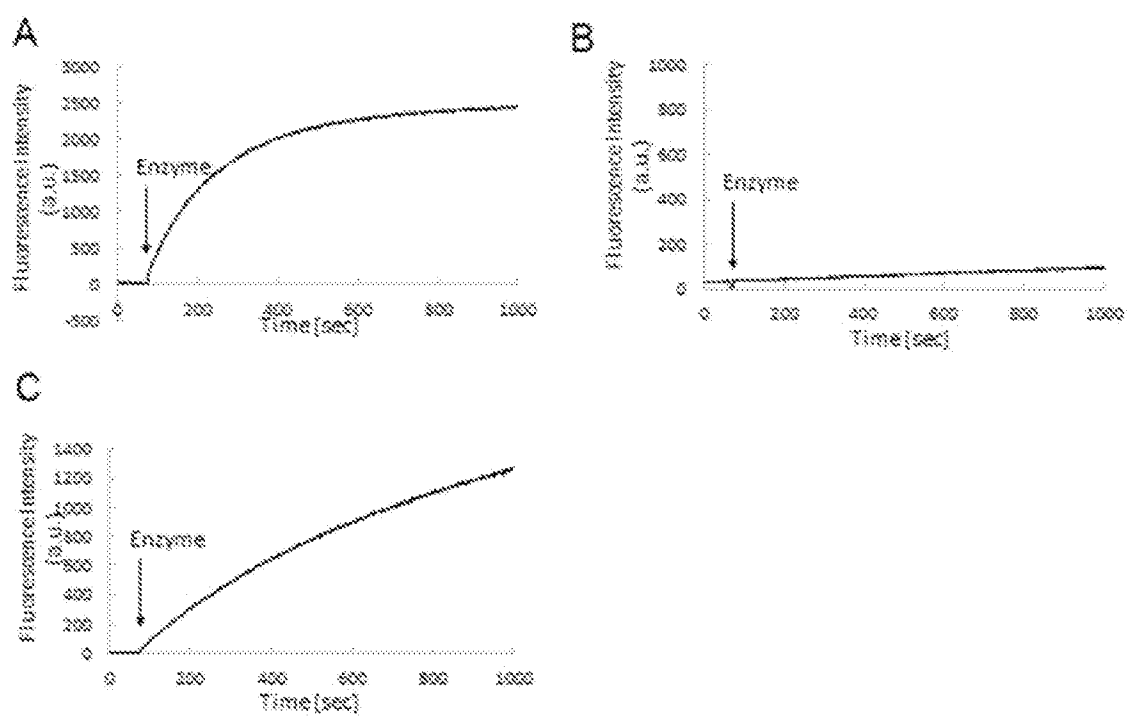
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/017566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N 21/64**(2006.01)i; **A61K 49/00**(2006.01)i; **C07K 5/062**(2006.01)i; **G01N 33/48**(2006.01)i

FI: G01N21/64 F; A61K49/00; G01N33/48 M; C07K5/062; G01N33/48 P

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)

G01N21/62-21/83; A61K49/00; C07K5/062; G01N33/48-33/98; C12Q1/00-1/70; C09K11/00-11/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022

Registered utility model specifications of Japan 1996-2022

Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/006678 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 14 January 2016 (2016-01-14) paragraphs [0001], [0009]-[0016], [0019], [0046]-[0060]	1-18
Y	JP 2004-533449 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 04 November 2004 (2004-11-04) claims 1, 14, paragraphs [0008], [0039], [0181]	1-18
A	WO 2020/235567 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 26 November 2020 (2020-11-26)	1-18
A	WO 2011/087000 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 21 July 2011 (2011-07-21)	1-18
A	WO 2013/180181 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 05 December 2013 (2013-12-05)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) 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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2022

Date of mailing of the international search report

05 July 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/017566

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2016/006678	A1	14 January 2016	US 2017/0157272 A1 paragraphs [0001], [0009]- [0017], [0020], [0056]-[0070] EP 3168288 A1	
JP	2004-533449	A	04 November 2004	US 2003/0031665 A1 claims 1, 14, paragraphs [0011], [0053], [0204] US 2007/0207143 A1 WO 02/092127 A1 EP 1392361 A1 CA 2446806 A1 CN 1671415 A CN 101172158 A KR 10-0863624 B1 AU 2002308637 B2 AU 2007209787 A	
WO	2020/235567	A1	26 November 2020	(Family: none)	
WO	2011/087000	A1	21 July 2011	US 2013/0023675 A1 US 2014/0206992 A1 EP 2524702 A1 EP 3323431 A1	
WO	2013/180181	A1	05 December 2013	US 2015/0152469 A1 EP 2857830 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 21/64(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; C07K 5/062(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i FI: G01N21/64 F; A61K49/00; G01N33/48 M; C07K5/062; G01N33/48 P		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N21/62-21/83; A61K49/00; C07K5/062; G01N33/48-33/98; C12Q1/00-1/70; C09K11/00-11/07 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2016/006678 A1 (国立大学法人 東京大学) 14.01.2016 (2016-01-14) [0001][0009]-[0016][0019][0046]-[0060]	1-18
Y	JP 2004-533449 A (ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム) 04.11.2004 (2004-11-04) [請求項1,14][0008][0039][0181]	1-18
A	WO 2020/235567 A1 (国立大学法人 東京大学) 26.11.2020 (2020-11-26)	1-18
A	WO 2011/087000 A1 (国立大学法人 東京大学) 21.07.2011 (2011-07-21)	1-18
A	WO 2013/180181 A1 (国立大学法人 東京大学) 05.12.2013 (2013-12-05)	1-18
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 21.06.2022		国際調査報告の発送日 05.07.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 伊藤 裕美 2J 9515 電話番号 03-3581-1101 内線 3258

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/017566

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2016/006678	A1	14.01.2016	US	2017/0157272	A1	
					[0001][0009]-[0017][0020]		
					[0056]-[0070]		
				EP	3168288	A1	
JP	2004-533449	A	04.11.2004	US	2003/0031665	A1	
					claims 1, 14, [0011][0053]		
					[0204]		
				US	2007/0207143	A1	
				WO	02/092127	A1	
				EP	1392361	A1	
				CA	2446806	A1	
				CN	1671415	A	
				CN	101172158	A	
				KR	10-0863624	B1	
				AU	2002308637	B2	
				AU	2007209787	A	
WO	2020/235567	A1	26.11.2020	(ファミリーなし)			
WO	2011/087000	A1	21.07.2011	US	2013/0023675	A1	
				US	2014/0206992	A1	
				EP	2524702	A1	
				EP	3323431	A1	
WO	2013/180181	A1	05.12.2013	US	2015/0152469	A1	
				EP	2857830	A1	