

(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
2020年9月3日(03.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/175688 A1

(51) 国際特許分類:

C07D 407/04 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
C07F 7/10 (2006.01) *C12Q 1/34* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/008432

(22) 国際出願日: 2020年2月28日(28.02.2020)

(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:
特願 2019-036670 2019年2月28日(28.02.2019) 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). 藤田 恭平 (FUJITA Kyohei); 〒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 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, 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.

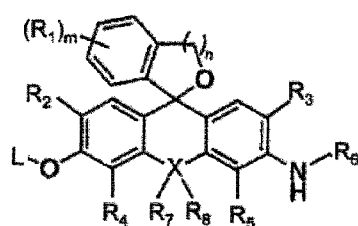
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,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

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING CANCER

(54) 発明の名称: 癌検出蛍光プローブ



(I)

(57) Abstract: [Problem] To provide a fluorescent probe capable of detecting breast cancer, lung cancer, and squamous cell cancer. [Solution] A fluorescent probe for detecting breast cancer and benign tumors of the breast, the probe containing a compound represented by general formula (I) or a salt thereof.

(57) 要約: 【解決課題】 乳癌、肺癌、扁平上皮癌を検出することが可能な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乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

WO 2020/175688 A1

明 細 書

発明の名称：癌検出蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、癌を特異的に検出することができる蛍光プローブに関する。より具体的には、本発明は、乳腺の悪性及び良性腫瘍、肺腺癌または肺扁平上皮癌を検出することが可能な蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] 悪性組織における酵素活性を評価する方法により、癌の検出を導くための有効なバイオマーカーについて情報を提供することができる。癌の蛍光誘導検出は、部分摘出手術の効率を改善するための最も有望なアプローチの1つである。本発明者らの研究グループは、これまで、活性型アミノペプチダーゼ反応性蛍光プローブ（非特許文献1）を開発し、局所的にプローブ溶液をスプレーすることによって数分以内にヒトの乳がんと食道がんを検出することに成功した（非特許文献2及び3）。

[0003] しかしながら、癌と正常組織との間のアミノペプチダーゼ活性に明らかな違いがないことから、これらの蛍光プローブによってまだ高い感度・特異度で検出されていない多くの悪性腫瘍がある。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Urano, Y. et al. Science Transl Med, 3, 110 (2011)

非特許文献2：Onoyama, H. et al. Sci. Rep., 6, 26399 (2016)

非特許文献3：Ueo, H. et al. Sci. Rep., 5, 12080 (2015)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

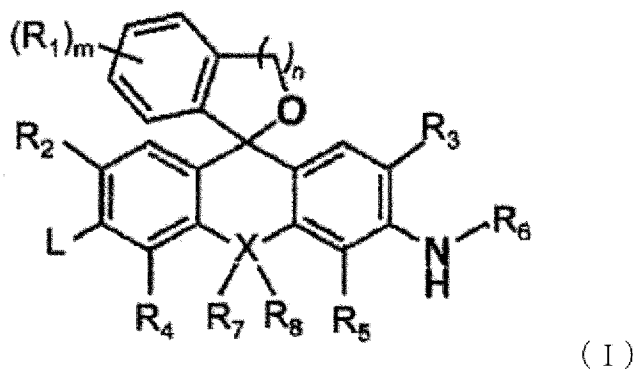
[0005] 本発明は、乳腺の悪性及び良性腫瘍、肺腺癌または肺扁平上皮癌を検出することが可能な蛍光プローブを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、癌におけるグリコシダーゼ活性に焦点を当て、異なるグリコシダーゼ活性を検出するための種々の蛍光プローブを調製し、これらの蛍光プローブを利用してヒト外科検体におけるグリコシダーゼ活性の包括的なスクリーニングを行うことにより、グリコシダーゼ活性が腫瘍の種類によって異なり、そしてある種の蛍光プローブが腫瘍の特異的画像化に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は、

[1] 以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。



（式中、

R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数1～5個のアルキル基、又は炭素数1～5個のフッ化アルキル基を示し；

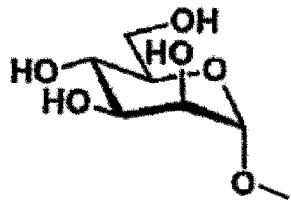
R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、Xが酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

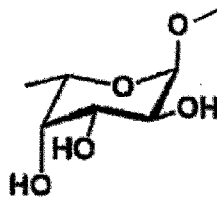
Xは、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

n は、1～3の整数であり；

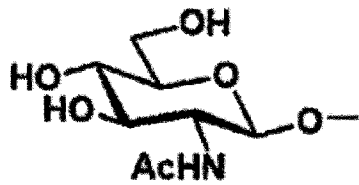
L は、以下の式（1）～（6）のいずれかの基から選択される。）



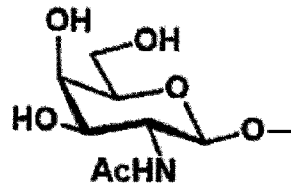
(1)



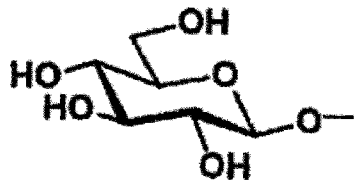
(2)



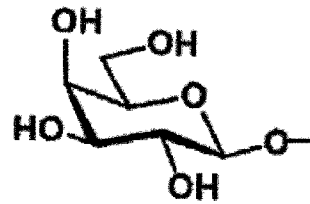
(3)



(4)



(5)



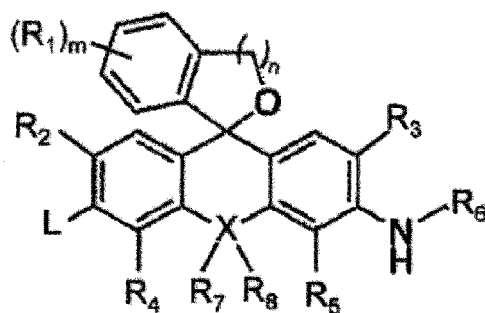
(6)

〔2〕 Xが酸素原子である、〔1〕に記載の蛍光プローブ。

〔3〕 R₆が炭素数1～5個のフッ化アルキル基である、〔1〕又は〔2〕に記載の蛍光プローブ。

〔4〕 〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の蛍光プローブと、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

〔5〕 以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩を含む肺腺癌または肺扁平上皮癌検出蛍光プローブ。



(I)

（式中、

R₁は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換

基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、又は炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基を示し；

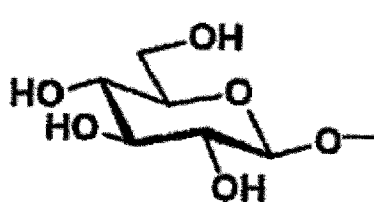
R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、 X が酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

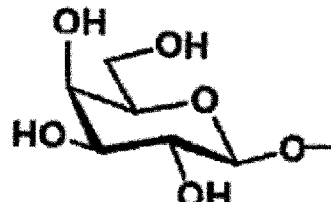
X は、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

n は、1 ～ 3 の整数であり；

L は、以下の式 (5) 又は (6) の基から選択される。）



(5)



(6)

[6] X が酸素原子である、[5] に記載の蛍光プローブ。

[7] R_6 が炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基である、[5] 又は [6] に記載の蛍光プローブ。

[8] 乳癌及び乳腺の良性腫瘍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乳房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乳房の臨床検体の蛍光像を測定することを含む、前記方法。

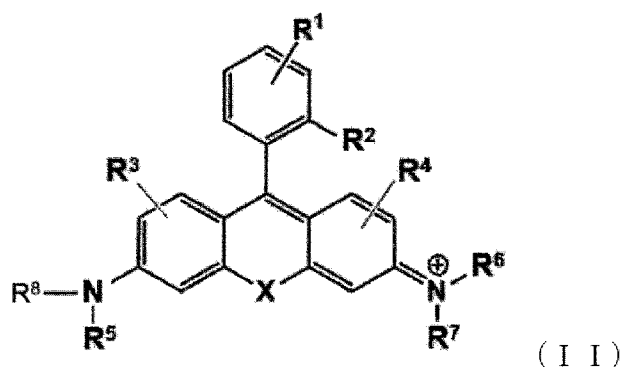
[9] 肺線癌又は肺扁平上皮癌を検知する方法であって、(a) [5] ～ [7] のいずれか 1 項に記載の蛍光プローブを肺線癌又は肺扁平上皮癌の臨床検体に適用する工程、及び

(b) 前記蛍光プローブを適用した肺線癌又は肺扁平上皮癌の臨床検体の蛍

光像を測定することを含む、前記方法。

[10] [1] ~ [4] のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

[11] 前記GGT活性検出プローブが、以下の一般式(II)で表される化合物又はその塩である、[10]に記載の乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。



(式中、

Xは、Si(R^a)(R^b)、Ge(R^a)(R^b)、Sn(R^a)(R^b)、C(R^a)(R^b)、P(=O)(R^a)又はOを表し、

ここで、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素原子、アルキル基、又はアリール基を表し；

R¹は、水素原子、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、アミド基、及びアジド基よりなる群から独立に選択される1~4個の同一又は異なる置換基を表し；

R²は、水素原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表し；

R³及びR⁴は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1~3個の同一又は異なる置換基を表し；

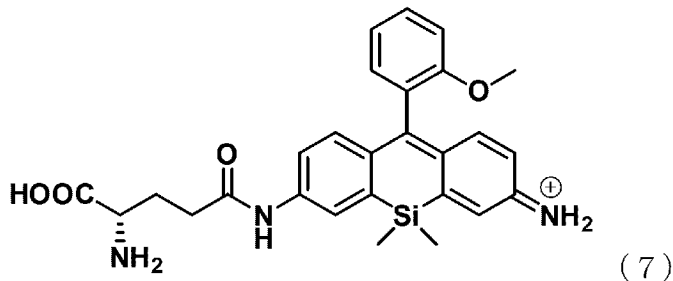
R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を表し、

ここで、R⁶又はR⁷は、それぞれR⁴と一緒に、それらが結合する窒素

原子を含む環構造を形成してもよく；

R⁸は、アミノ酸由来のアシル残基を表す。）

[12] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、以下の式(7)の化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。



[13] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キット。

[14] [1]～[4]のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キット。

[15] [5]～[7]のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、肺線癌又は肺扁平上皮癌検出用キット。

を提供するものである。

発明の効果

[0008] 本発明により、乳腺の悪性及び良性腫瘍を検出することが可能な蛍光プローブを提供することができる。

また、本発明により、肺腺癌又は肺扁平上皮癌を検出することが可能な蛍光プローブを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]実施例で合成した12種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブ。

[図2]乳癌と良性の検出のためのグリコシダーゼ反応性蛍光プローブのスクリーニング試験の結果を示す。

[図3]グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ(1、2、5、7、11及び12)を用いた乳癌検体における蛍光プローブの評価結果。

[図4]グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5及び11について、乳癌、乳腺繊維腺腫（良性腫瘍）における蛍光の上昇を比較した結果。

[図5]12種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブを用いた、乳癌（IDC）についての蛍光イメージングの実験結果を示す。

[図6]12種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブを用いた、良性腫瘍（FA）についての蛍光イメージングの実験結果を示す。

[図7]グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5（HMRef-a-D-Man）を用いた乳腺腫瘍イメージングの実験結果を示す。

[図8]グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5（HMRef-a-D-Man）を用いた乳腺腫瘍イメージングの実験結果を示す。

[図9]グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5及びgGlu-2-OMeSiR600を併用して二色イメージングを行った結果。

発明を実施するための形態

[0010] 本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基（例えばアルコキシ基など）のアルキル部分は、特に言及しない場合には例えば炭素数1～6個、好ましくは炭素数1～4個、更に好ましくは炭素数1～3個程度の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基などを挙げることができる。

[0011] 本明細書において「ハロゲン原子」という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、塩素原子、又は臭素原子である。

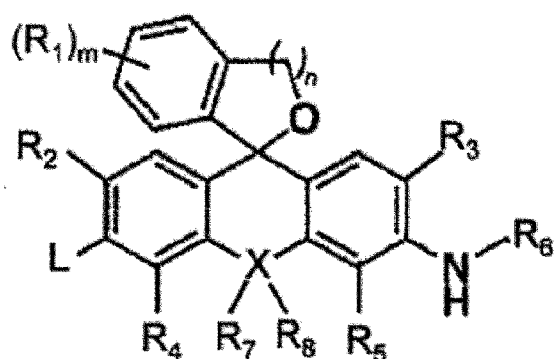
[0012] 本発明者らは、癌におけるグリコシダーゼ活性に焦点を当て、異なるグリコシダーゼ活性を検出するための種々の蛍光プローブを調製した。そして、調製した蛍光プローブを利用することにより、外科的に切除した癌組織における無傷のグリコシダーゼ活性をホモジナイズすることなく可視化および評

価することに成功した。

具体的には、本発明者らは、ヒト外科標本におけるグリコシダーゼ活性の包括的なスクリーニングを行い、グリコシダーゼ活性が腫瘍の種類によって異なり、そしてある種の蛍光プローブが癌の特異的画像化に有効であることを明らかにした。その詳細について以下に説明する。

[0013] 1. 乳癌検出蛍光プローブ

本発明の1つの実施態様は、以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩を含む乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブである(以下「実施態様1」とも言う)。



(1)

[0014] 一般式(1)において、 R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示す。一価の置換基としては、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル基等が挙げられる。

[0015] m は、0～4の整数である。

本発明の1つの好ましい側面においては、 m が0であり、 R_1 は存在しない。即ち、キサントゲン骨格に結合するベンゼン環は無置換のベンゼン環である。

[0016] 一般式(1)において、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示す。

R_2 及び R_3 がアルキル基を示す場合には、該アルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが1個又は2個以上存在していてもよく、例えば R_2 又は R_3 が示すアルキル基は

ハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。R₂及びR₃がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましい。R₂及びR₃がハロゲン原子である場合は、R₂及びR₃がともにフッ素原子であるか、塩素原子である場合が好ましい。

本発明の1つの好ましい側面においては、R₂及びR₃がともに水素原子である。

[0017] R₄及びR₅は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、又はハロゲン原子を示し、R₂及びR₃について説明したものと同様である。R₄及びR₅がともに水素原子であることが好ましい。

[0018] R₆は、水素原子、炭素数1～5個のアルキル基、又は炭素数1～5個のフッ化アルキル基を示す。R₆のアルキル基としては、メチル基、エチル基が好ましい。R₆のフッ化アルキル基としては、 $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ が好ましい。

本発明の1つの好ましい側面においては、R₆は、 $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ である。

[0019] 一般式(1)において、R₇及びR₈は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリール基を示すが、R₇及びR₈は、それぞれ独立に、炭素数1～3個のアルキル基であることが好ましく、R₇及びR₈がともにメチル基であることがより好ましい。R₇及びR₈が示すアルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが1個又は2個以上存在していてもよく、例えばR₇又はR₈が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。

R₇又はR₈がアリール基を示す場合には、アリール基は単環の芳香族基又は縮合芳香族基のいずれであってもよく、アリール環は1個又は2個以上の環構成ヘテロ原子(例えば窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子など)を含んでいてもよい。アリール基としてはフェニル基が好ましい。アリール環上には1個又は2個以上の置換基が存在していてもよい。置換基としては、例えばハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコ

キシ基などが1個又は2個以上存在していてもよい。

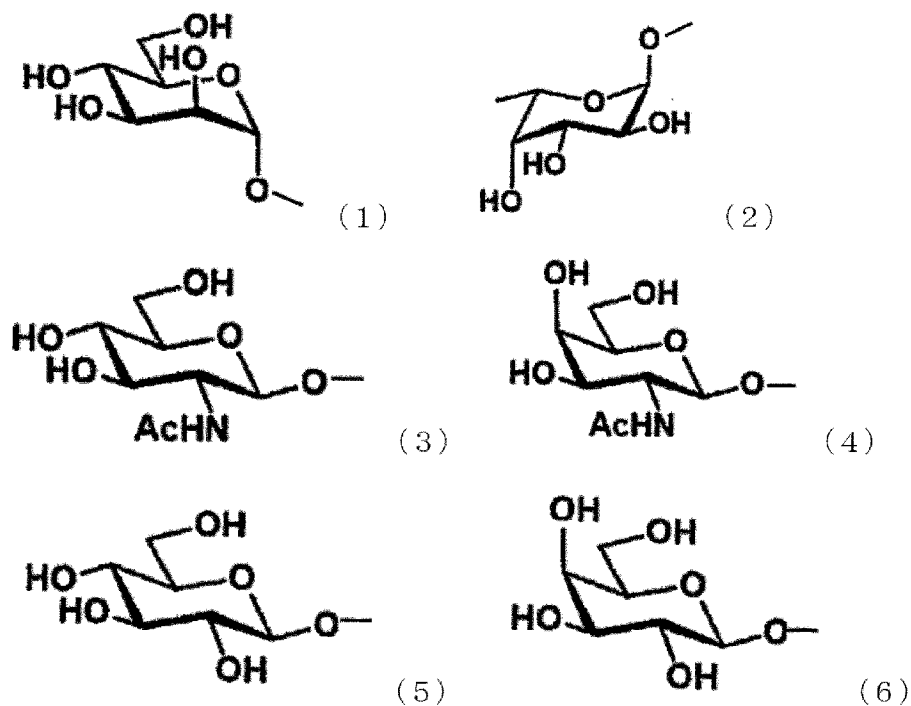
[0020] また、後述するXが酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在しない。

[0021] Xは、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示す。

本発明の1つの好ましい側面においては、Xは酸素原子である。

[0022] nは、1～3の整数であり、好ましくは、nは1である。

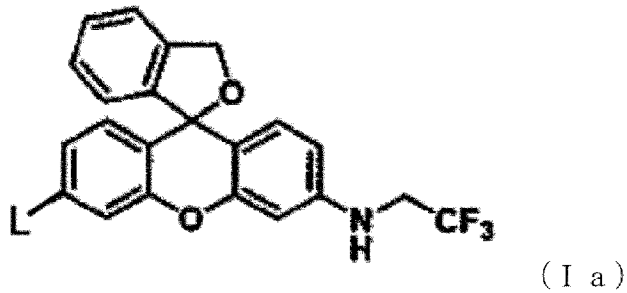
[0023] 一般式(1)において、Lは、以下の式(1)～(6)のいずれかの基から選択される。



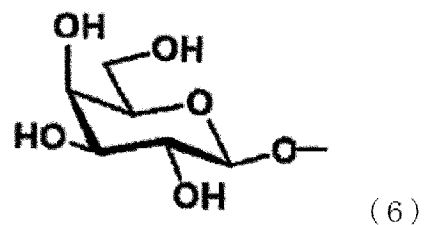
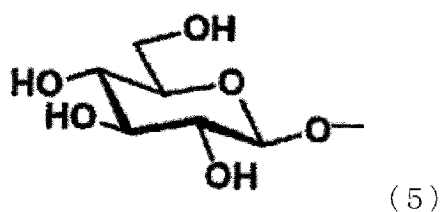
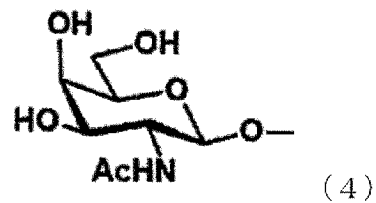
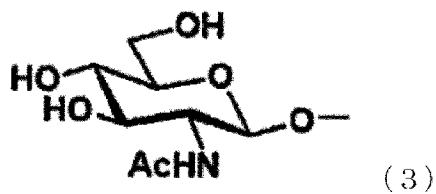
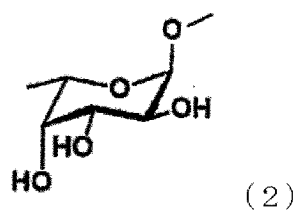
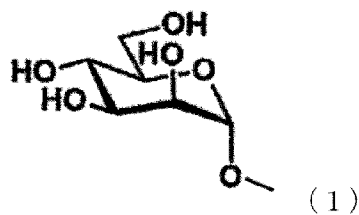
[0024] Lとして式(1)の基を有する蛍光プローブは、 α -マンノシダーゼ、(2)の基を有する蛍光プローブは α -ラーフコシダーゼ、(3)の基を有する蛍光プローブは β -ヘキソサミニダーゼ、(4)の基を有する蛍光プローブは β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ反応性蛍光プローブであり、(5)の基を有する蛍光プローブは β -グルコシダーゼ、(6)の基を有する蛍光プローブは β -ガラクトシダーゼ反応性蛍光プローブであり、本発明者らの検討結果によると、これら蛍光プローブは、乳腺線維腺腫および浸潤性乳管癌、非浸潤性乳管癌の画像診断に有効であった。従って、Lとして式(1)～(6)のいずれかの基を有する本発明の蛍光プローブは、乳癌及び良性腫瘍の

両方を検出することが可能である。

[0025] 本発明の実施態様1の1つの好ましい側面は、以下の式(1a)で表される化合物又はその塩を含む乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブである。

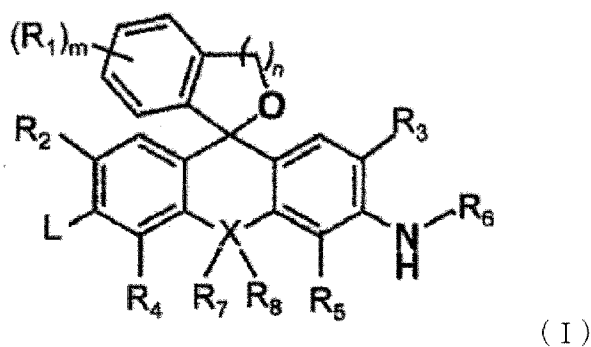


[0026] ここで、Lは、以下の式(1)～(6)のいずれかの基から選択される。



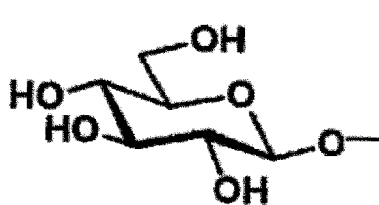
[0027] 2. 肺癌又は扁平上皮癌検出蛍光プローブ

本発明のもう1つの実施態様は、以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩を含む肺線癌又は肺扁平上皮癌検出蛍光プローブである(以下「実施態様2」とも言う)。

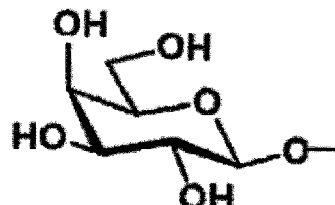


[0028] 一般式 (I) における、 $R_1 \sim R_8$ 、 X 及び n は、実施態様 1 で説明したのと同様である。

[0029] 実施態様 2 においては、 L は、以下の式 (5) 又は (6) の基から選択される。



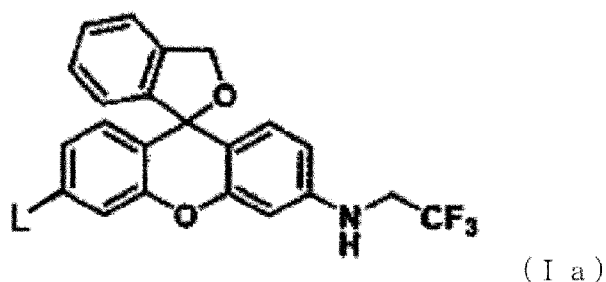
(5)



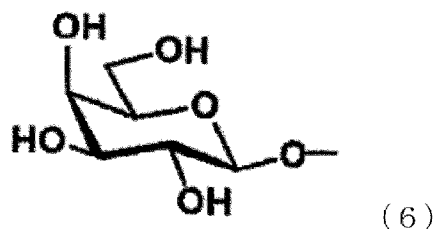
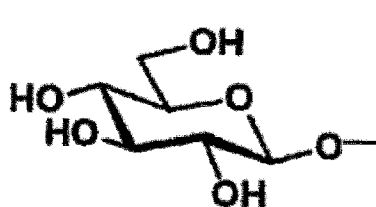
(6)

[0030] L として式 (5) 又は (6) の基を有する蛍光プローブは、 β -グルコシダーゼ又は β -ガラクトシダーゼ反応性蛍光プローブであり、本発明者らの検討結果によると、これら蛍光プローブは、アミノペプチダーゼ反応性蛍光プローブでは検出できなかった肺扁平上皮癌に加えて、肺腺癌を含む主要な肺癌の特異的イメージングに有効であることがわかった。従って、 L として式 (5) 又は (6) の基を有する本発明の蛍光プローブは、肺腺癌又は肺扁平上皮癌を特異的に検出することが可能である。

[0031] 本発明の実施態様 2 の 1 つの好ましい側面は、以下の式 (Ia) で表される化合物又はその塩を含む肺線癌又は肺扁平上皮癌検出蛍光プローブである。



[0032] ここで、Lは、以下の式(5)又は(6)の基から選択される。



[0033] 実施態様1及び2における一般式(1)で表される化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩として存在することができる。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、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、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などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。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、本発明においては、これらの物質も用いることができる。

[0034] 一般式(1)で表される化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素有する場合があるが、本発明においては、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体なども用いることができる。

[0035] 一般式(1)で表される化合物の代表的化合物の製造方法を本明細書の実施例に具体的に示した。従って、当業者は、これらの説明をもとにして、反応原料、反応条件、及び反応試薬などを適宜選択して、必要に応じてこれら

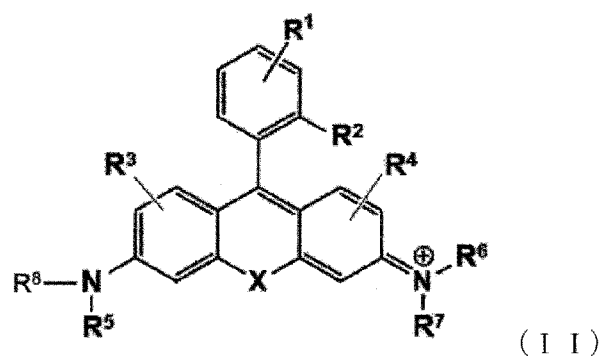
の方法に修飾や改変を加えることにより、一般式（I）で表される化合物を製造することができる。

[0036] 3. GGT 活性検出プローブとの併用蛍光プローブ

実施態様 1 の蛍光プローブは、GGT 活性検出プローブと併用することができる。例えば乳癌の検出にあたって、赤色 GGT プローブと実施態様 1 の蛍光プローブを併用すれば、乳癌（悪性腫瘍）及び良性腫瘍の両方について同様に赤色蛍光を発するのに対して、本発明で用いるグリコシダーゼ反応性蛍光プローブは特に良性腫瘍において強い緑色蛍光を発する。両者の画像を複合すると、乳癌組織は赤色に、良性腫瘍組織は黄色に画像化する事が可能であった。従って、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブと GGT プローブを併用することにより、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブだけが蛍光発色する部位が良性腫瘍部、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブと GGT プローブの双方が蛍光発色する部位が乳癌（悪性腫瘍）部であると判定することが可能となり、良性腫瘍と悪性腫瘍を判別することが可能になる。これにより、外科手術において良性腫瘍部位を切除せずに、部分摘出手術の効率を改善することが可能である。

[0037] 即ち、本発明のもう 1 つの実施態様は、実施態様 1 の蛍光プローブと、GGT 活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブである。

[0038] ここで、GGT 活性検出プローブとしては、以下の一般式（II）で表される化合物又はその塩が挙げられる。



[0039] 一般式（II）において、Xは、Si(R^a)(R^b)、Ge(R^a)(R^b)

)、 $S_n(R^a)(R^b)$ 、 $C(R^a)(R^b)$ 、 $P(=O)(R^a)$ 又は O を表す。ここで、 R^a 及び R^b は、それぞれ独立に水素原子、アルキル基、又はアリール基を表す。

R^1 は、水素原子、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、アミド基、及びアジド基よりなる群から独立に選択される 1～4 個の同一又は異なる置換基を表す。

R^2 は、水素原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルコキシ基、アリーール、又はヘテロアリーールを表す。

R^3 及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される 1～3 個の同一又は異なる置換基を表す。

R^5 、 R^6 、及び R^7 は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を表す。

ここで、 R^6 又は R^7 は、それぞれ R^4 と一緒になって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。

[0040] R^8 は、アミノ酸由来のアシル残基を表す。ここで、当該アシル残基は、アミノ酸のカルボキシル基から OH 基を除去した残りの部分構造である残基を意味する。すなわち、アミノ酸由来のアシル残基のカルボニル部分と式 (1) の R^8 に隣接する NH とがアミド結合を形成し、これによりローダミン骨格と連結している。

「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基の両方を有する化合物であれば任意の化合物を用いることができ、天然及び非天然のものを含む。中性アミノ酸、塩基性アミノ酸、又は酸性アミノ酸のいずれであってもよく、それ自体が神経伝達物質などの伝達物質として機能するアミノ酸のほか、生理活性ペプチド（ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドのほか、オリゴペプチドを含む）やタンパク質などのポリペプチド化合物の構成成分であるアミノ酸を用いることができ、例えば α アミノ酸、 β アミノ酸、 γ アミノ酸などであってもよい。アミノ酸としては、光学活性アミノ酸を用いることが好

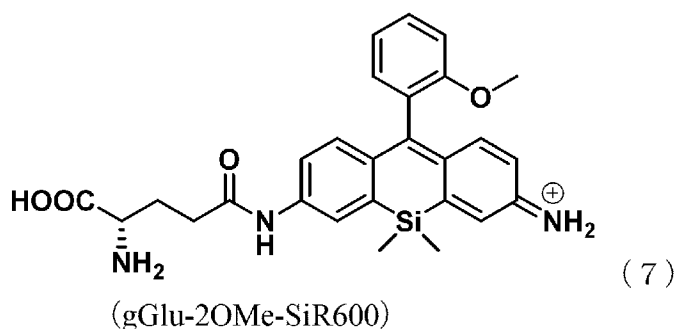
ましい。例えば、 α アミノ酸についてはD-又はL-アミノ酸のいずれを用いてもよいが、生体において機能する光学活性アミノ酸を選択することが好ましい場合がある。

[0041] R^8 は、標的とするペプチダーゼとの反応によって切断される部位である。前記標的ペプチダーゼが、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)、ジペプチジルペプチダーゼ I V (DPP-IV)、又はカルpain であることができる。それゆえ、標的ペプチダーゼが γ -グルタミルトランスペプチダーゼである場合、 R^8 は、 γ -グルタミル基であることが好ましい。また、標的ペプチダーゼがジペプチジルペプチダーゼ I V である場合、 R^8 は、プロリン残基を含むアシル基であることが好ましい。標的ペプチダーゼがカルpain である場合、 R^8 は、例えば、システイン残基を含むアシル基であることができ、或いは、カルpain 基質として当該技術分野において公知の Suc-Leu-Leu-Val-Tyr (Suc-LLVY) や AcLM を用いることもできる。

一般式 (I) で表される化合物の発蛍光の原理は、係属中の出願である特願 2018-210101 を参照。

[0042] 本発明の 1 つの好ましい態様は、実施態様 1 の蛍光プローブと、 R^8 が γ -グルタミル基である一般式 (I) の化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブである。

[0043] 一般式 (I) で表される化合物の中でも以下の化合物を好適に用いることができる。



[0044] 一般式 (I) で表される化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩として存在

することができる。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、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、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などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。一般式(11)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、本発明においては、これらの物質も用いることができる。

[0045] 一般式(11)で表される化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、本発明においては、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体なども用いることができる。

[0046] 本発明の1つの好ましい態様は、実施態様1の蛍光プローブと、式(7)の化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブである。

[0047] 4. 本発明の蛍光プローブを用いた乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キット

本発明のもう1つの実施態様は、実施態様1の蛍光プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キットである。

また、本発明のもう1つの実施態様は、実施態様1の蛍光プローブと、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キットである。GGT活性検出プローブについては上記で説明した通りである。

また、本発明のもう1つの実施態様は、実施態様2の蛍光プローブを含む、肺線癌又は肺扁平上皮癌検出用キットである。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 本発明のもう1つの実施態様は、乳癌及び乳腺の良性腫瘍を検知する方法であって、(a)実施態様1の蛍光プローブを乳房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乳房の臨床検体の蛍光像を測定することを含む、方法である。

(a)の工程で蛍光プローブを乳房の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乳房の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。

[0051] また、本発明のもう1つの実施態様は、肺線癌又は肺扁平上皮癌を検知する方法であって、(a)実施態様2の蛍光プローブを肺線癌又は肺扁平上皮癌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肺線癌又は肺扁平上皮癌の臨床検体の蛍光像を測定することを含む、方法である。

(a)の工程で蛍光プローブを肺線癌又は肺扁平上皮癌の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肺線癌又は肺扁平上皮癌の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。

実施例

[0052] 以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0053] [合成実施例1]

プローブ1 (β -グルコシダーゼ反応性プローブ) の合成

HMR ef (0.426 g、1.07 mmol)、2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl α -D-glucopyranosyl bromide (8.26 g、20.1 mmol)、Ag₂O (4.71 g、20

、3 mmol)、 Na_2SO_4 (720 mg、2.00 mmol) を30 mLのアセトニトリル (超脱水) に溶解し、室温で24時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を回収してアセトニトリルを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 95 : 5) で精製し、アセチル化糖付加体を得た。これをメタノールに溶解させ、NaOMe (520 mg、9.63 mmol) を5 mLのメタノールに溶解させた溶液を添加し、室温で5時間攪拌した。反応溶液をAmberlite IR 120で中和し、メタノールを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 90 : 10) で精製し、目的物 (301 mg、0.535 mmol) を収率50.2%で得た。

[0054] [合成実施例2]

プローブ5 (α -マンノシダーゼ反応性プローブ) の合成

HMRef (96.0 mg、0.24 mmol)、penta-O-acetyl-D-mannopyranoside (3.33 g、8.53 mmol)、boron trifluoride diethyl ether complex (8.0 mL、63.4 mmol)、 Na_2SO_4 (500 mg、3.34 mmol) を15 mLのジクロロメタンに溶解させ、24時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、1M NaOHを用いて分液操作でジクロロメタン層を抽出し、減圧除去した。残渣を15 mLのメタノールに溶解させ、NaOMe (1.60 g、29.6 mmol) をメタノール5 mLに溶解させた溶液を添加し5時間室温で攪拌した。反応溶液をAmberlite IR 120で中和し、メタノールを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 90 : 10) で精製し、粗生成物を得た。これをさらにHPLC (5–80% MeCN in water (0.1% TFA) over 90 min) により精製し、目的物 (61.6 mg、0.200 mmol) を収率45.6%で得た。

[0055] [合成実施例3]

プローブ7 (α -L-フコシダーゼ反応性プローブ) の合成

HMRef (90.0 mg、0.226 mmol)、2,3,4-Tri-O-acetyl-L-fucopyranosyl Trichloroacetimidate (862 mg、1.99 mmol)、TMSOTf (442 mg、1.99 mmol) を10 mLのジクロロメタンに溶解させ、 -41°C で12時間攪拌した。反応溶液をジクロロメタンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。有機層を分液操作で抽出し、減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH=95:5) で精製し、中間体を得た。これをメタノール5 mLに溶解し、NaOMe (1.33 g、24.6 mmol) をメタノール5 mLに溶解させた溶液を添加し5時間室温で攪拌した。反応溶液をAmberlite IR 120で中和し、メタノールを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH=95:5) で精製し、粗生成物を得た。これをさらにHPLC (5–80% MeCN in water (0.1% TFA) over 90 min) により精製し、目的物 (14.4 mg、0.0257 mmol) を収率11.7%で得た。

[0056] [合成実施例4]

プローブ12 (β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ反応性プローブ) の合成

HMRef (46.7 mg、0.117 mmol)、2-acetoamide-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl chloride (400 mg、1.09 mmol)、 Ag_2O (400 mg、1.72 mmol)、NaI (88.3 mg、0.589 mmol) and Na_2SO_4 (500 mg、3.34 mmol) を10 mLのアセトニトリル (超脱水) に溶解し、室温で24時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を回収してアセトニトリルを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH=95:5) で精製し、アセチル化糖付加体を得た。これをメ

タノールに溶解させ、NaOMe (0.50 g、9.25 mmol) を5 mLのメタノールに溶解させた溶液を添加し、室温で5時間攪拌した。反応溶液をAmberlite IR 120で中和し、メタノールを減圧除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂: MeOH = 90:10) で精製し、粗生成物を得た。これをさらにHPLC (5–80% MeCN in water (0.1% TFA) over 90 min) により精製し、目的物 (11.3 mg、0.0216 mmol) を収率28.2%で得た。

[0057] プローブ2に関してはMatsuzaki, H et al, Bioconju. Chem., 27(4), 973–981 (2016). の記載に、プローブ11に関してはAsanuma, D et al, Nat. Commun., 6, 6463 (2015). の記載に則り合成した。

また、プローブ3、4、6、8、9、10については、上記プローブと同様の方法で合成した。

[0058] [実施例1]

乳癌と良性の検出のためのグリコシダーゼ反応性蛍光プローブのスクリーニング

上記で合成した12種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブ (図1参照) を用いて、乳癌と良性の検出のためのスクリーニングを以下の手順で行った。

乳腺臨床検体を置いた各ウェルに、50 μM濃度の各蛍光プローブのPBS溶液200 μLを添加し、1、3、5、10、20、30分の540 nmの蛍光像をマエストロin vivo イメージングシステム (PerkinElmer) を用いて取得した。各蛍光強度値はマエストロソフトウェア上でRegions Of Interest (ROIs) をとり定量及び比較を行った。フィルター設定はEx/Em = 465–30 nm/515 nm long-passを用いた。

[0059] 結果を図2に示す。

図2のaは、外科的に切除されたヒト乳房標本を用いた蛍光プローブのス

クリーニングの結果を示す。

[0060] 図2のbは、各阻害剤の存在下および非存在下での乳房FA組織における30分での蛍光増加を示す。黒い棒グラフは阻害剤の非存在下での蛍光の増加を表し、灰色の棒グラフは、阻害剤の存在下での蛍光の増加を表す。蛍光プローブ濃度 = 50 μ M、阻害剤濃度 = 500 μ Mである。

[0061] 図2のcは、12種類の蛍光プローブを用いた正常乳房、IDC（乳癌）およびFA（良性腫瘍）組織における無傷のグリコシダーゼ活性の包括的分析の結果を示す。蛍光の増加は、蛍光プローブ添加後1分から30分後の増加を表す。各ドットは、左から順に、正常乳房、IDC、DCISおよびFA組織の蛍光の増加を表す。図3のcから、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ1、2、5、7、11及び12は、乳癌及びFA（良性腫瘍）組織の両方について蛍光の増加を示した。

[0062] 図2のdは、MAN2C1についての正常乳腺、FAまたはIDC組織の免疫組織化学的分析の結果を示す。染色された細胞が見つからなかった場合、組織を陰性と評価し、そうでなければそれらを陽性と評価した。結果として、正常組織よりもFA、IDC組織で強い染色を確認し、これらの組織におけるMAN2C1の過剰発現を確認した。

[0063] 図2のeはDEGアッセイの結果を示す。DEGアッセイは、J. Am. Chem. Soc., 135, 6002-6005 (2013)に記載されている手順に則って行った。

FA組織について、 α -マンノシダーゼ反応性プローブ5を用いて、DEGアッセイを実施したところ、二次元電気泳動でただ一つの蛍光スポットを認め、そのスポットからペプチドマスフィンガープリンティングによりMAN2C1を同定した。また、IDC組織においても二次元電気泳動で同様の蛍光スポットをただ一つ確認した。これらの結果から、 α -マンノシダーゼ反応性プローブ5の蛍光上昇に関与した責任酵素はMAN2C1である事が分かった。

[0064] 図2のcで蛍光の増加を示した6種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブ（1、2、5、7、11及び12）について、乳癌検体における蛍光プロ

ープの評価を行った。検体として、乳癌 I D C を 4 例、D C I S を 1 例用い、蛍光プローブ濃度 = 5 0 μ M で行った。

結果を図 3 に示す。図 3 から、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ 5 と 1 1 が蛍光の上昇が大きく、また腫瘍と正常組織間の蛍光強度比も大きいことが確認された。

[0065] グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ 5 (HMR e f - α - D - M a n) 及び 1 1 (HMR e f - β - D - G l c N A c) について、乳癌、良性腫瘍における蛍光の上昇を比較した結果を図 4 に示す (蛍光プローブ濃度 = 5 0 μ M)。

乳腺臨床検体を置いた各ウェルには、上記濃度の蛍光プローブの P B S 溶液 2 0 0 μ L を添加し、1、3、5、1 0、2 0、3 0 分の 5 4 0 n m の蛍光像をマエストロ i n v i v o イメージングシステム (P e r k i n E l m e r) を用いて取得した。各蛍光強度値はマエストロソフトウェア上で R e g i o n s O f I n t e r e s t (R O I s) をとり定量及び比較を行った。フィルター設定は E x / E m = 4 6 5 - 3 0 n m / 5 1 5 n m l o n g - p a s s を用いた。

[0066] 結果としてグリコシダーゼ反応性蛍光プローブ 5 (HMR e f - α - D - M a n)、1 1 (HMR e f - β - D - G l c N A c) は正常乳腺 (N o r m a l) に比べ腫瘍組織で高い蛍光上昇を示し、また癌組織 (I D C、D C I S) より良性腫瘍組織 (F A) でより高い蛍光を示した。これらの結果から両プローブは乳癌蛍光イメージング、もしくは良性腫瘍の特異的検出に有効である可能性が示唆された。

[0067] また、1 2 種類のグリコシダーゼ反応性蛍光プローブを用いた、乳癌 (I D C) 及び良性腫瘍 (F A) について、蛍光上昇の時間変化のイメージング画像を図 5 ~ 6 に示す。実験は以下の条件で行った。

乳腺臨床検体を置いた各ウェルには、上記濃度の蛍光プローブの P B S 溶液 2 0 0 μ L を添加し、1、3、5、1 0、2 0、3 0 分の 5 4 0 n m の蛍光像をマエストロ i n v i v o イメージングシステム (株) P e r k i n

Elmer)を用いて取得した。各蛍光強度値はマエストロソフトウェア上でRegions Of Interest (ROIs)をとり定量及び比較を行った。フィルター設定はEx/Em=465-30nm/515nm long-passを用いた。

図5は乳癌組織を用いた蛍光イメージングの結果(右図)であり、図6は良性腫瘍(FA)を用いた蛍光イメージングの結果(右図)である。

[0068] [実施例2]

HMRef-a-D-Manを用いた乳腺腫瘍イメージング

グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5 (HMRef-a-D-Man) (濃度: 50 μM)を用いて以下の条件でイメージングを行った。

乳腺臨床検体(正常部と腫瘍部の混在した検体)を置いたディッシュに上記濃度の蛍光プローブのPBS溶液3mLを添加し、各時間の蛍光画像を取得した。以下、DCIS、FAの臨床検体の蛍光画像はマエストロin vivo イメージングシステム(PerkinElmer)を用いて取得した。各フィルター設定はEx/Em=465-30nm/515nm long-passを用いた。IDCの臨床検体の蛍光画像はマエストロin vivo イメージングシステムと同等なhomme madeのポータブルイメージング装置を用いて取得した。

[0069] 結果を図7～8に示す。

図7のaは、外科切除されたIDC(乳がん)のイメージング結果を示す。

プローブ散布後、20分程度でIDC部位のみが強い蛍光で可視化された。

[0070] 図7のbは、上記検体の組織学的解析結果及び、MAN2C1の免疫染色結果を示す。蛍光上昇が確認された部位と組織学的にIDCである部位、MAN2C1が高発現している部位の一致が確認された。

図7のcは、外科切除されたDCIS(乳がん)のイメージング結果を示す。プローブ散布後、15分以内でDCIS部位のみが強い蛍光で可視化された。

[0071] 図7のdは、上記検体のRegions Of Interest (ROIs)と、その組織学的解析結果及び、MAN2C1の免疫染色結果の例を示す。蛍光上昇が確認された部位と組織学的にDCISである部位、MAN2C1が高発現している部位の一致が確認された。また、1mm以下の非常に微小なDCIS組織の検出も確認された。

[0072] 図7のeは、上記検体のRegions Of Interest (ROIs)の15分での蛍光上昇値を示す。組織学的に正常である部位では蛍光の顕著な上昇は確認されず、組織学的にDCISである部位では顕著な蛍光上昇が認められた。

[0073] 図8のaは、外科切除されたFA（良性腫瘍）のイメージング結果を示す。プローブ散布後、10分以内でFA部位のみが強い蛍光で可視化された。

[0074] 図8のbは、上記検体の組織学的解析結果及び、MAN2C1の免疫染色結果を示す。蛍光上昇が確認された部位と組織学的にFAである部位、MAN2C1が高発現している部位の一致が確認された。

[0075] [実施例3]

HMR α -D-ManとGGTプローブを併用した良性腫瘍と乳癌の 区別

グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5 (HMR α -D-Man) (濃度: 50 μ M) 及びGGTプローブであるgGlu-2-OMeSiR600 (濃度: 50 μ M) を併用して以下の条件で二色イメージングを行った。

乳腺臨床検体を置いた各ウェルには、上記濃度の蛍光プローブのPBS溶液200 μ Lを添加し、1、3、5、10、20、30分の540nm及び640nmの蛍光像をマエストロin vivoイメージングシステム (PerkinElmer) を用いて取得した。各蛍光強度値はマエストロソフトウェア上でRegions Of Interest (ROIs) をとり定量及び比較を行った。グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5に関して、フィルター設定はEx/Em=465-30nm/515nm long-p

assを用いた。GGTプローブに関しては、 $E_x/E_m = 570 - 40\text{ nm} / 610\text{ nm}$ long-passを用いた。

[0076] 結果を図9に示す。

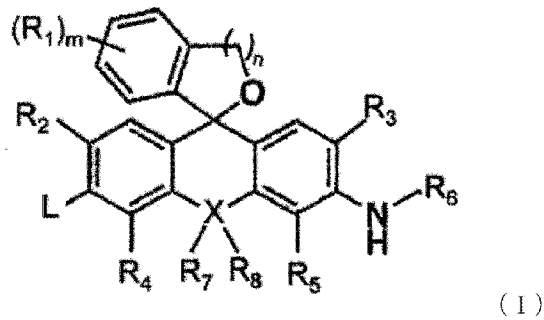
図9のaは、 540 nm での蛍光画像および $500 \sim 720\text{ nm}$ での疑似実カラー画像を示す。図9のbは、 640 nm での蛍光画像および $600 \sim 820\text{ nm}$ での疑似実カラー画像を示す。蛍光画像の露光時間（ミリ秒）は、各画像の下部に示されている。

図9のcは、両方のプローブを乳癌及び良性腫瘍の組織に投与後30分での緑色および赤色蛍光画像の合成画像を示す。露光時間は緑色の画像で40ミリ秒、赤色の画像で20ミリ秒である。図9のdは、各時点における合成画像の比較を示す。

図9のcから、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブ5は良性腫瘍について緑色蛍光を発したのに対して、赤色GGTプローブg Glu-2 OME-SiR600は乳癌（悪性腫瘍）及び良性腫瘍の両方について赤色蛍光を発した。両者の画像を複合すると、乳癌組織は赤色に、良性腫瘍組織は黄色に画像化する事が可能であった。従って、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブとGGTプローブを併用することにより、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブだけが蛍光発色する部位が良性腫瘍部、グリコシダーゼ反応性蛍光プローブとGGTプローブの双方が蛍光発色する部位が乳癌（悪性腫瘍）部であると判定することが可能となり、良性腫瘍と悪性腫瘍を判別することが可能になる。これにより、外科手術において良性腫瘍部位を切除せずに、部分摘出手術の効率を改善することが可能である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の一般式（1）で表される化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。



（式中、

R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数1～5個のアルキル基、又は炭素数1～5個のフッ化アルキル基を示し；

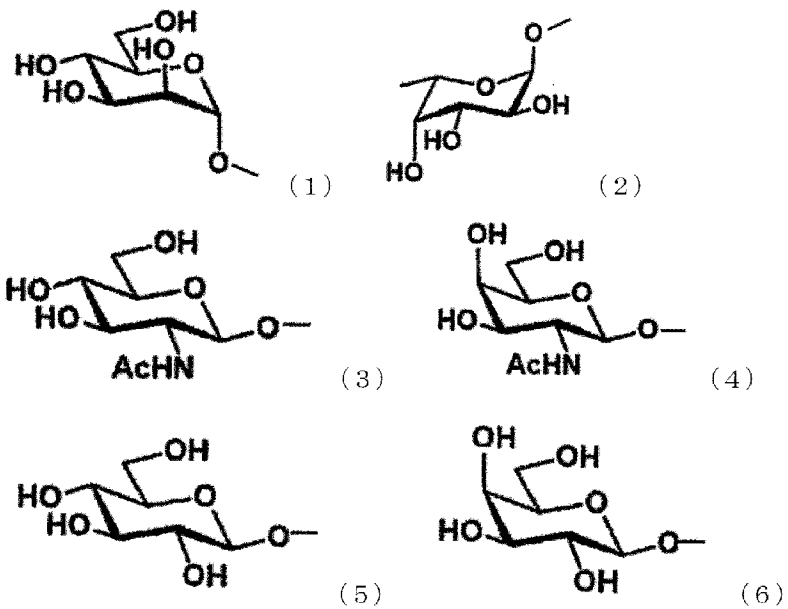
R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、Xが酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

Xは、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

nは、1～3の整数であり；

Lは、以下の式（1）～（6）のいずれかの基から選択される。）

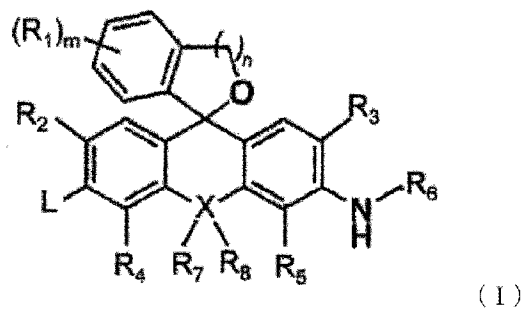


[請求項2] Xが酸素原子である、請求項1に記載の蛍光プローブ。

[請求項3] R_6 が炭素数1～5個のフッ化アルキル基である、請求項1又は2に記載の蛍光プローブ。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の蛍光プローブと、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

[請求項5] 以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩を含む肺腺癌または肺扁平上皮癌検出蛍光プローブ。



(式中、

R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアル

キル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、又は炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基を示し；

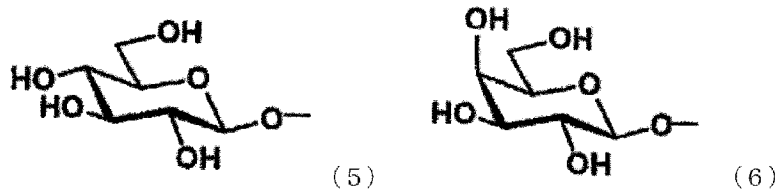
R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、 X が酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

X は、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

n は、1 ～ 3 の整数であり；

L は、以下の式 (5) 又は (6) の基から選択される。）



[請求項6] X が酸素原子である、請求項5に記載の蛍光プローブ。

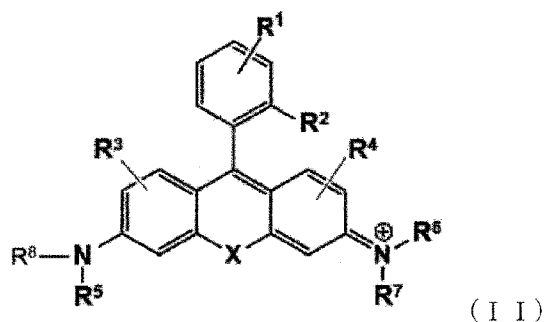
[請求項7] R_6 が炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基である、請求項5又は6に記載の蛍光プローブ。

[請求項8] 乳癌及び乳腺の良性腫瘍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乳房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乳房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9] 肺線癌又は肺扁平上皮癌を検知する方法であって、(a) 請求項5～7のいずれか1項に記載の蛍光プローブを肺線癌又は肺扁平上皮癌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肺線癌又は肺扁平上皮癌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10] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

[請求項11] 前記 GGT 活性検出プローブが、以下の一般式 (I I) で表される化合物又はその塩である、請求項 10 に記載の乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。



(式中、

Xは、Si(R^a)(R^b)、Ge(R^a)(R^b)、Sn(R^a)(R^b)、C(R^a)(R^b)、P(=O)(R^a)又はOを表し、

ここで、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素原子、アルキル基、又はアリール基を表し；

R¹は、水素原子、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシ基、エステル基、アルコキシ基、アミド基、及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～4個の同一又は異なる置換基を表し；

R²は、水素原子、ヒドロキシ基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表し；

R³及びR⁴は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシ基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～3個の同一又は異なる置換基を表し；

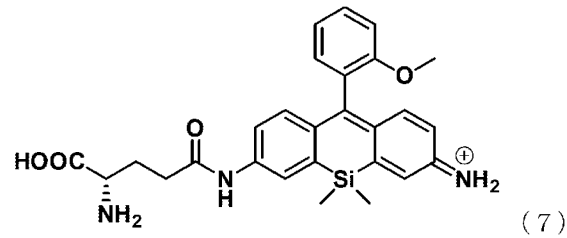
R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を表し、

ここで、R⁶又はR⁷は、それぞれR⁴と一緒に、それらが結合

する窒素原子を含む環構造を形成してもよく；

R⁸は、アミノ酸由来のアシル残基を表す。）

[請求項12] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、以下の式(7)の化合物又はその塩を含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出蛍光プローブ。

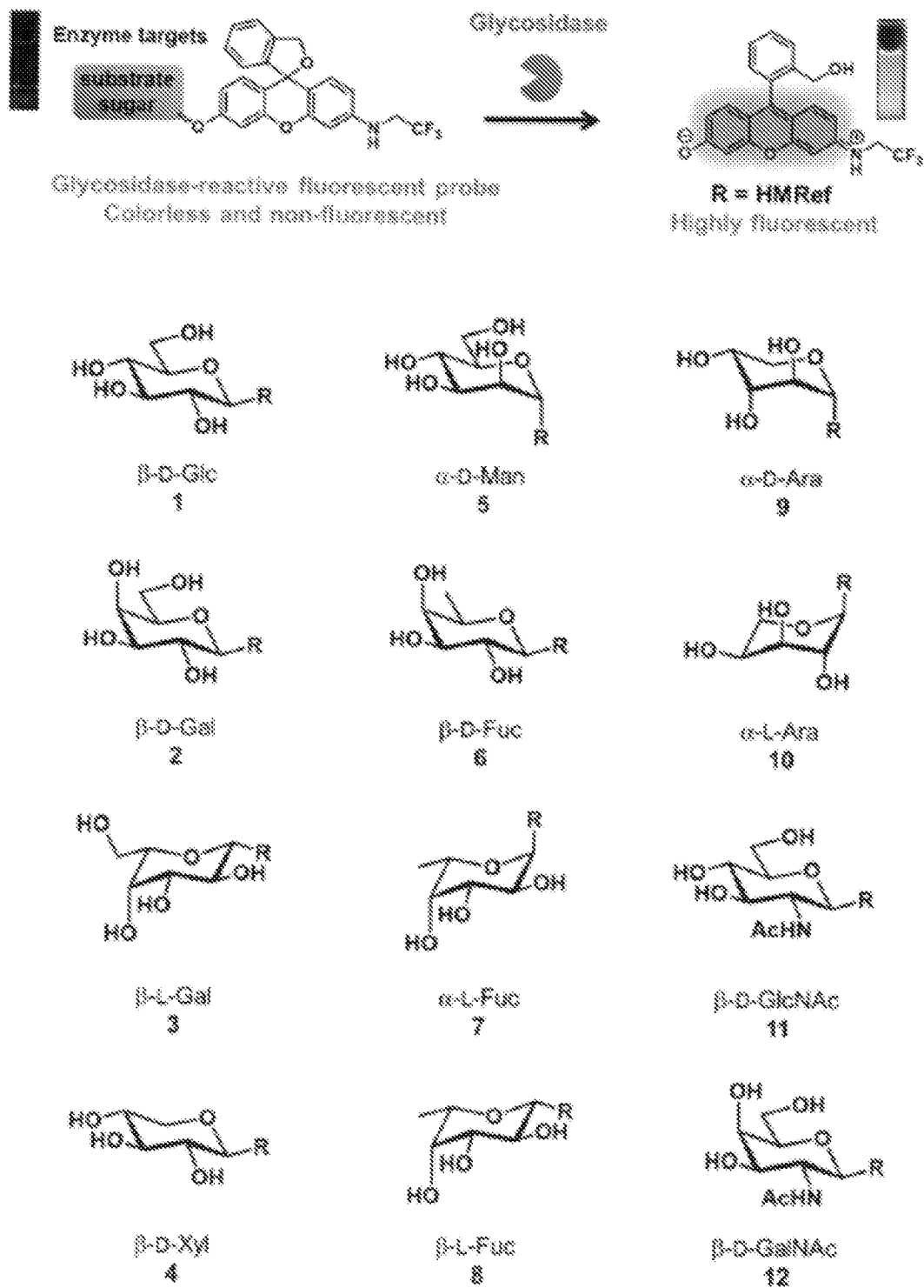


[請求項13] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キット。

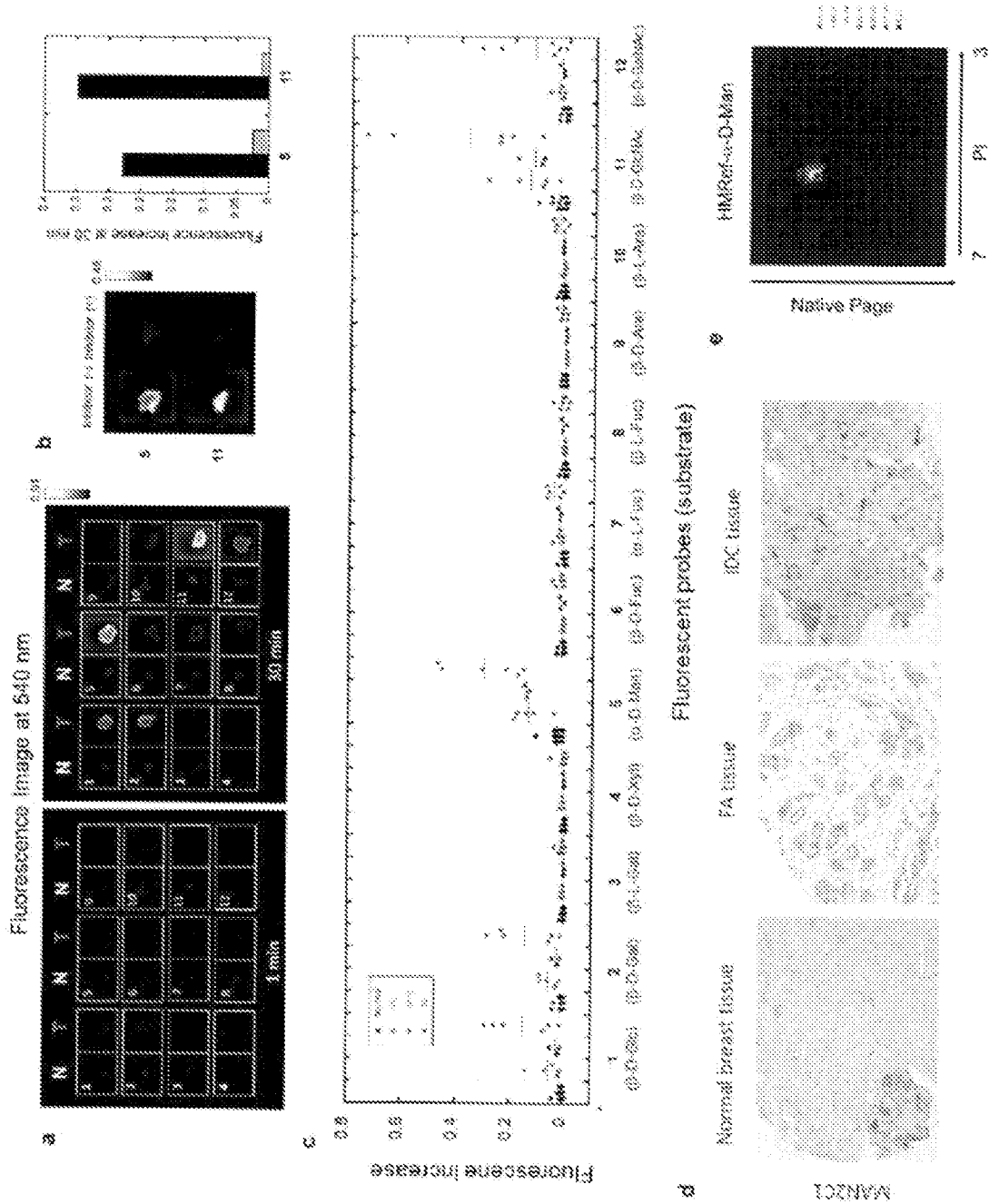
[請求項14] 請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ、及び、GGT活性検出プローブを含む、乳癌及び乳腺の良性腫瘍検出用キット。

[請求項15] 請求項5～7のいずれか1項に記載の蛍光プローブを含む、肺線癌又は肺扁平上皮癌検出用キット。

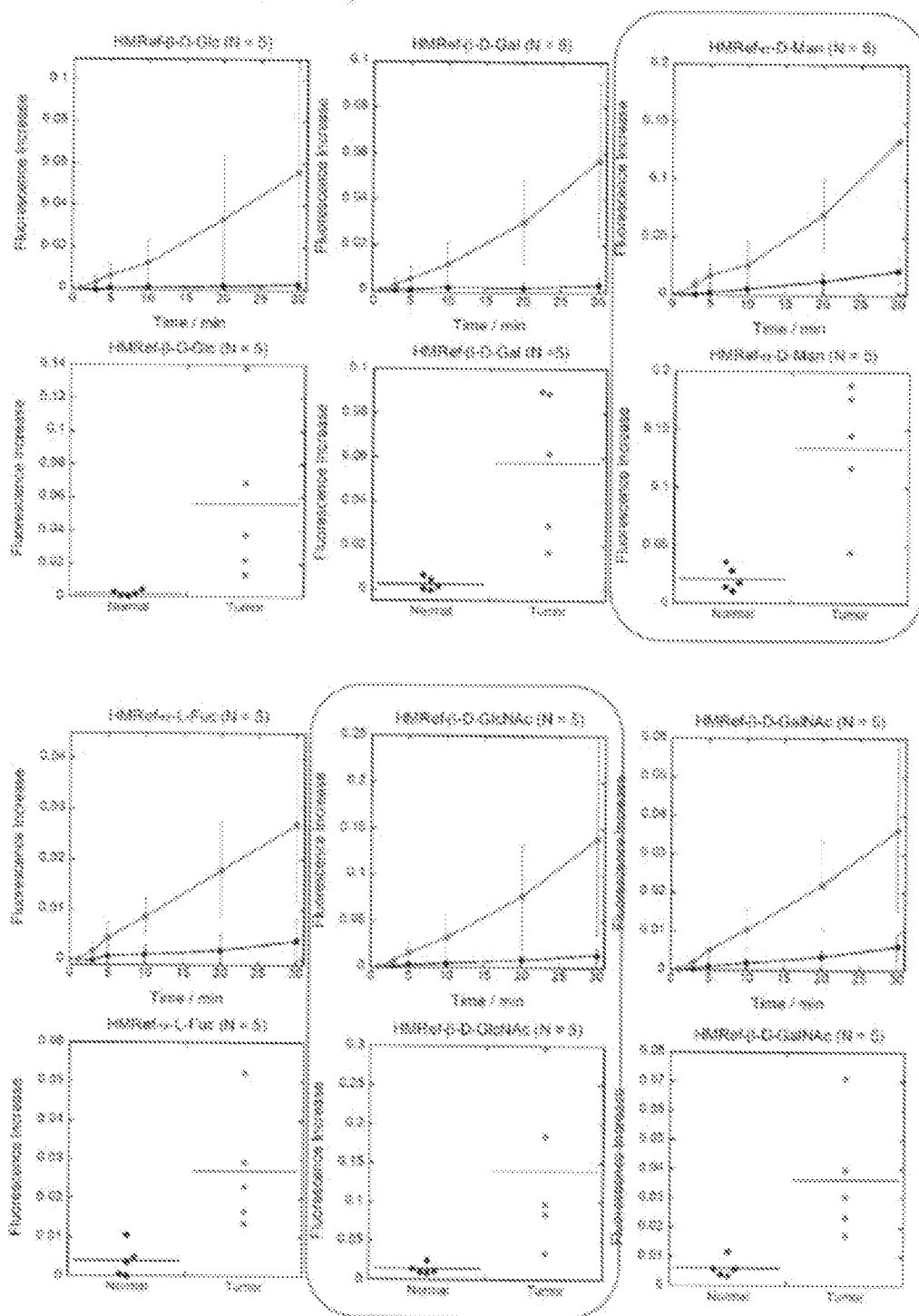
[図1]



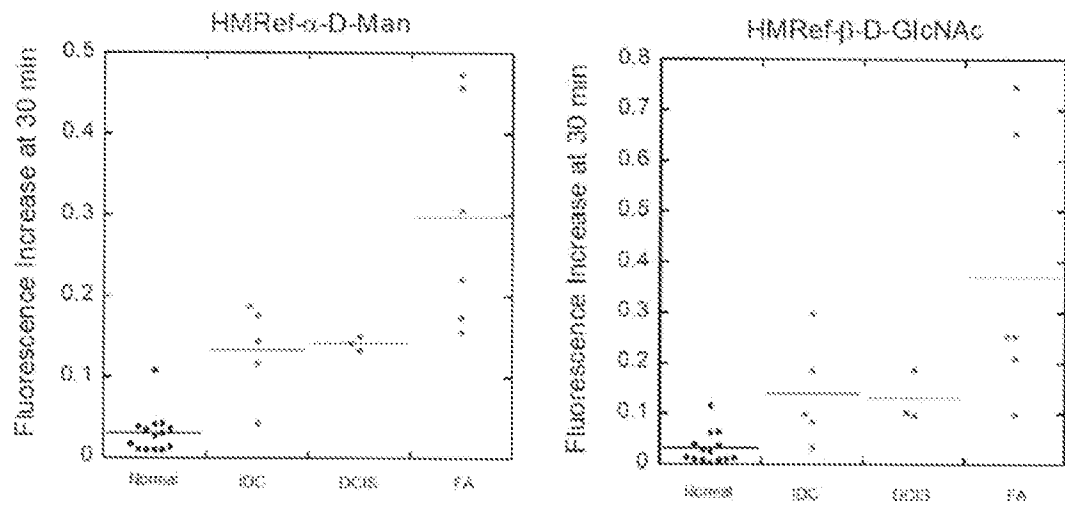
[図2]



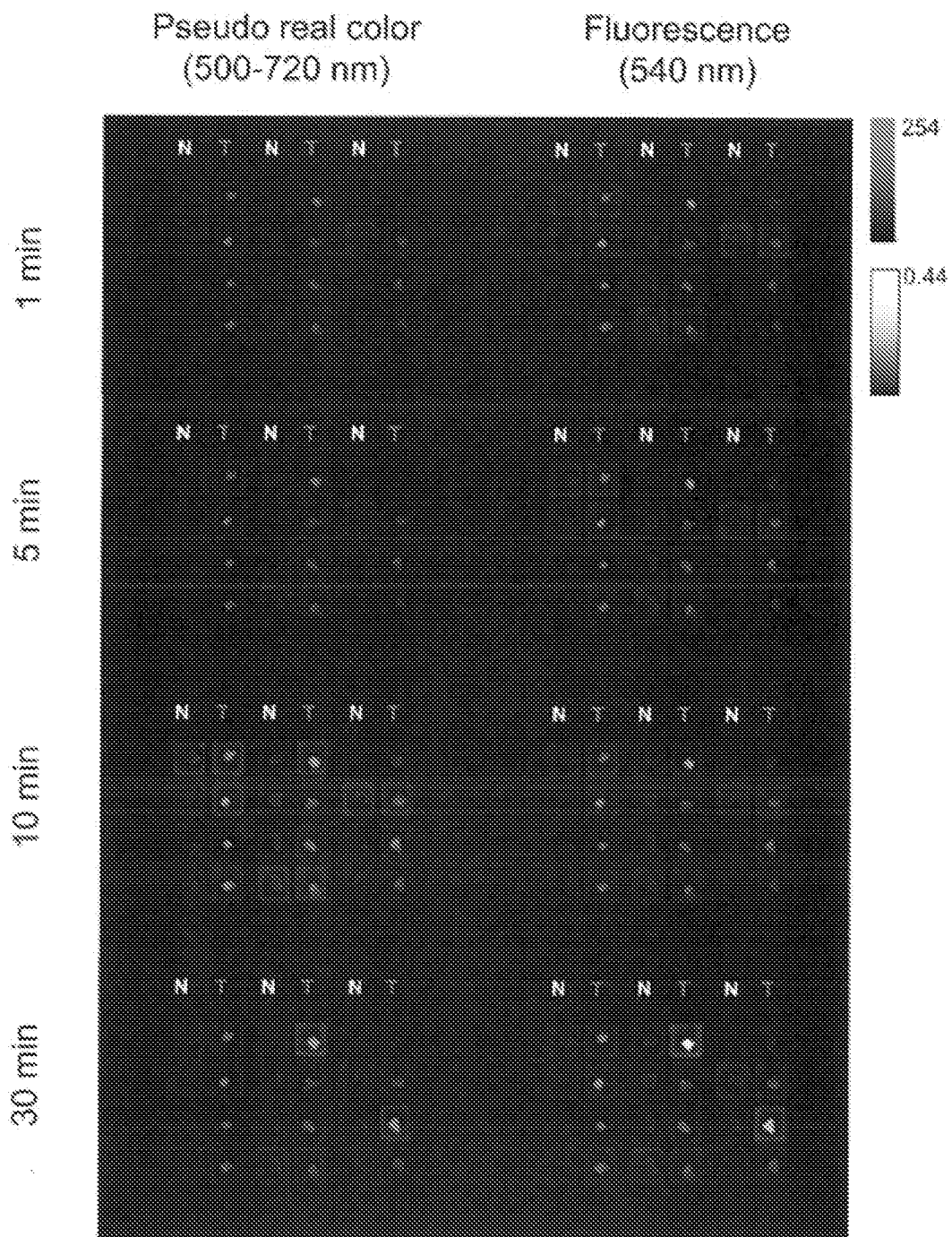
[図3]



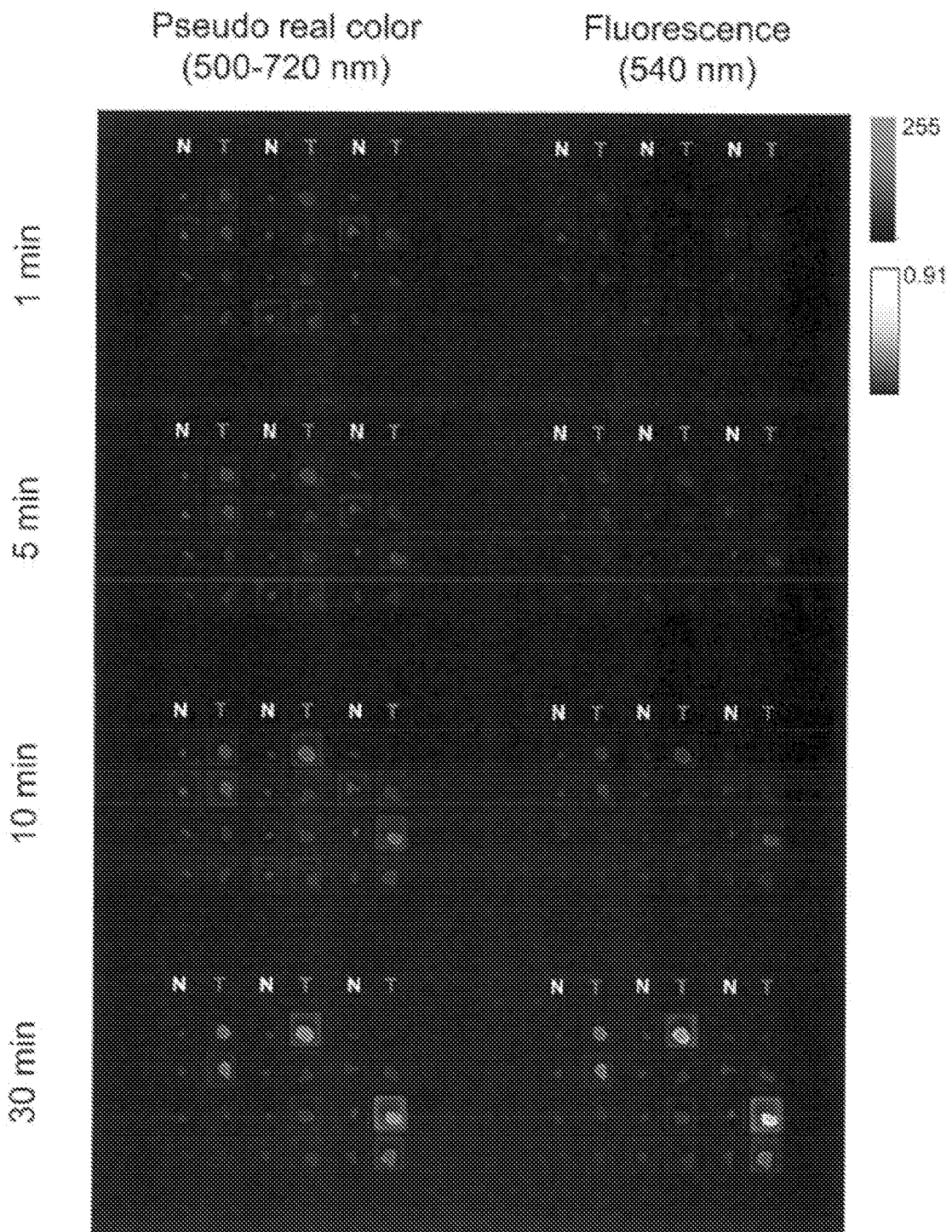
[図4]



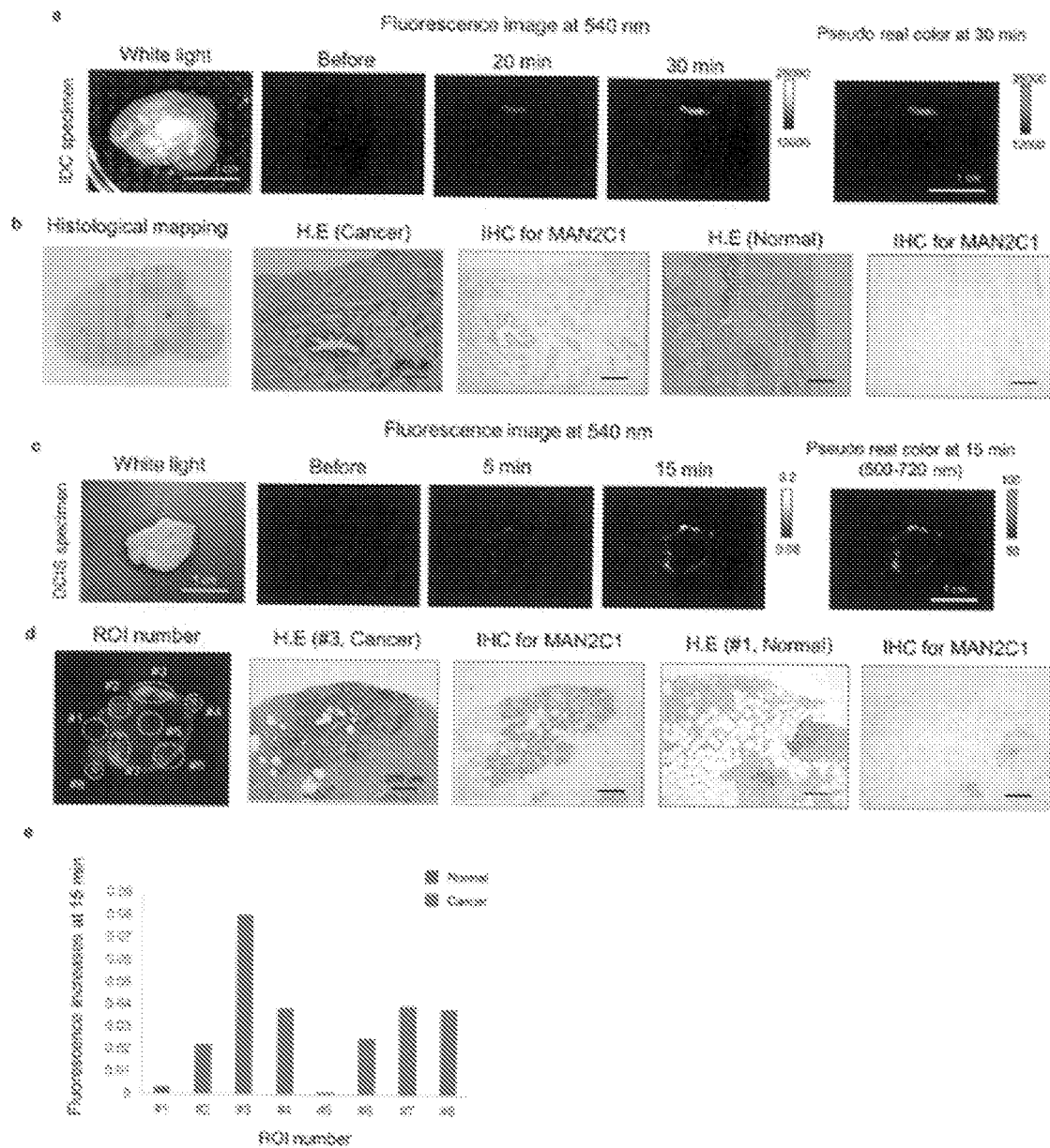
[図5]



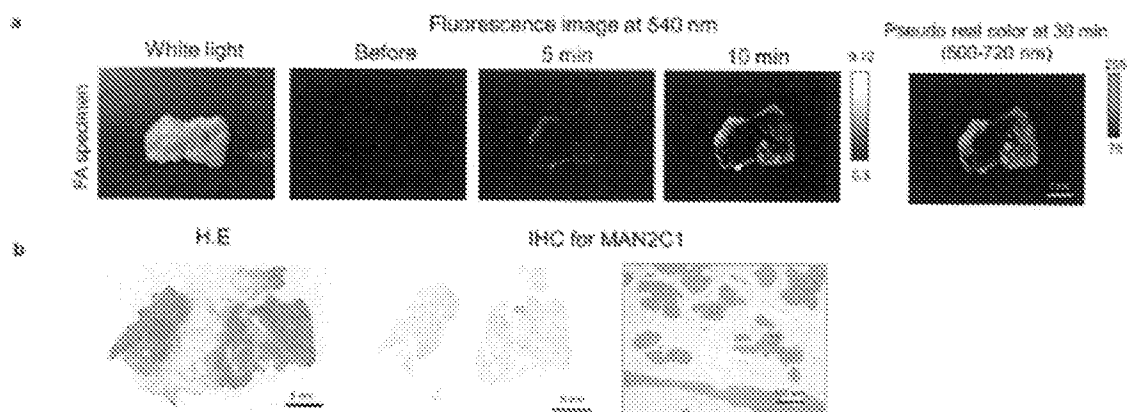
[図6]



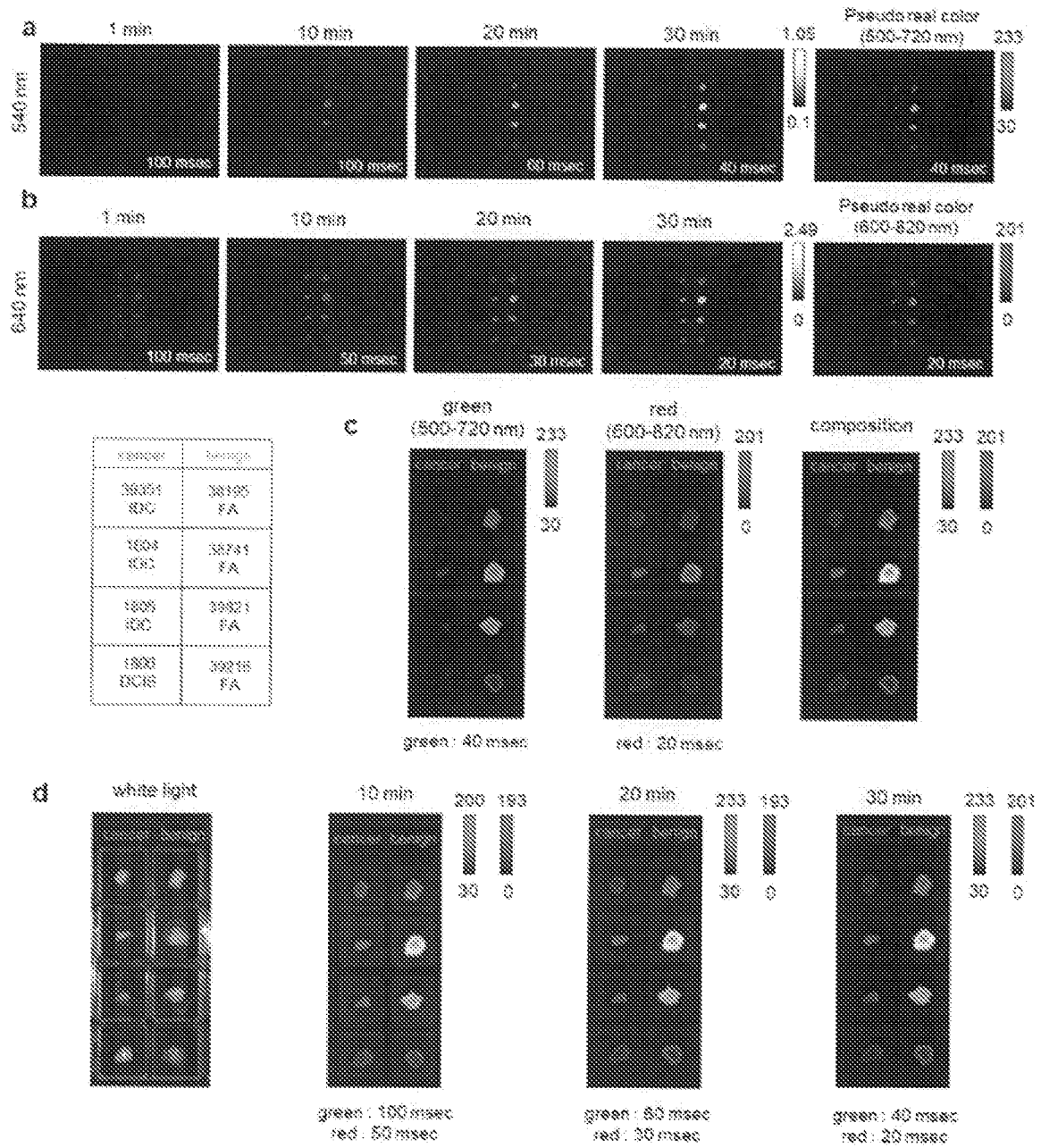
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/008432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 407/04(2006.01)i; C07F 7/10(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; C12Q 1/34(2006.01)i

FI: C12Q1/34; G01N21/64 F; A61K49/00; C07D407/04; C07F7/10 R

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)

C07D407/04; C07F7/10; G01N21/64; A61K49/00; C12Q1/34

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY
/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASANUMA, D. et al., "Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo", Nat. Commun., 2015, 6:6463, abstract, page 5, right column, lines 3-7, fig. 2	1-3, 8, 13
Y	abstract, page 5, right column, lines 3-7, fig. 2	1-15
X	MATSUZAKI, H. et al., "Novel hexosaminidase-targeting fluorescence probe for visualizing human colorectal cancer", Bioconjugate Chem., 2016, vol. 27, pp. 973-981, abstract, page 973, right column, lines 16-19, fig. 1	1-3, 8, 13
Y	abstract, page 973, right column, lines 16-19, fig. 1	1-15
Y	UEO, H. et al., "Rapid intraoperative visualization of breast lesions with γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green", Sci. Rep., 2015, 5:12080, abstract, fig. 1	1-15



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

"I" 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 May 2020 (21.05.2020)

Date of mailing of the international search report
02 June 2020 (02.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/008432

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-140971 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 13.09.2018 (2018-09-13) claims, paragraph [0067]	1-15
Y	WO 2014/106957 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 10.07.2014 (2014-07-10) claims, paragraph [0119]	1-15
Y	WO 2015/174460 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 19.11.2015 (2015-11-19) paragraph [0033]	1-15
Y	JP 2018-000074 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 11.01.2018 (2018-01-11) paragraph [0031]	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application no.

PCT/JP2020/008432

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-140971 A	13 Sep. 2018	WO 2018/15g631 A1 claims, paragraph [0067]	
WO 2014/106957 A1	10 Jul. 2014	US 2015/0353585 A1 claims, paragraph [0196]	
WO 2015/174460 A1	19 Nov. 2015	US 2017/0073321 A1 paragraph [0053]	
JP 2018-000074 A	11 Jan. 2018	US 2019/0256544 A1 paragraph [0060]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07D 407/04(2006.01)i; C07F 7/10(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; C12Q 1/34(2006.01)i FI: C12Q1/34; G01N21/64 F; A61K49/00; C07D407/04; C07F7/10 R		
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）） C07D407/04; C07F7/10; G01N21/64; A61K49/00; C12Q1/34		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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
X	ASANUMA D. et al., Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo, Nat. Commun., 2015, 6:6463 要約, 5ページ右欄3-7行, 図2	1-3, 8, 13
Y	要約, 5ページ右欄3-7行, 図2	1-15
X	MATSUZAKI H. et al., Novel hexosaminidase-targeting fluorescence probe for visualizing human colorectal cancer, Bioconjugate Chem., 2016, Vol. 27, pp.973-981 要約, 973ページ右欄16-19行, 図1	1-3, 8, 13
Y	要約, 973ページ右欄16-19行, 図1	1-15
Y	UEO H. et al., Rapid intraoperative visualization of breast lesions with γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green, Sci. Rep., 2015, 5:12080 要約, 図1	1-15
Y	JP 2018-140971 A (国立大学法人 東京大学) 13.09.2018 (2018-09-13) 特許請求の範囲, 段落[0067]	1-15
☒ 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 21.05.2020		国際調査報告の発送日 02.06.2020
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） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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 2014/106957 A1 (国立大学法人 東京大学) 10.07.2014 (2014 - 07 - 10) 特許請求の範囲, 段落[0119]	1-15
Y	WO 2015/174460 A1 (国立大学法人 東京大学) 19.11.2015 (2015 - 11 - 19) 段落[0033]	1-15
Y	JP 2018-000074 A (国立大学法人 東京大学) 11.01.2018 (2018 - 01 - 11) 段落[0031]	1-15

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/JP2020/008432

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2018-140971	A	13.09.2018	WO 2018/159631 A1 特許請求の範囲，段落 [0067]	
WO	2014/106957	A1	10.07.2014	US 2015/0353585 A1 特許請求の範囲，段落 [0196]	
WO	2015/174460	A1	19.11.2015	US 2017/0073321 A1 段落[0053]	
JP	2018-000074	A	11.01.2018	US 2019/0256544 A1 段落[0060]	