

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2019-14727  
(P2019-14727A)**

(43) 公開日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A 61 K 49/00	(2006.01)	A 61 K 49/00	Z N A 2 G O 4 3
C 12 Q 1/02	(2006.01)	C 12 Q 1/02	4 B O 6 3
G 01 N 21/64	(2006.01)	G 01 N 21/64	4 C O 8 5
C 09 B 69/10	(2006.01)	G 01 N 21/64	4 H O 4 5
C 07 K 7/00	(2006.01)	C 09 B 69/10	B

審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-177692 (P2018-177692)	(71) 出願人	513249781 ザ ユニバーシティー コート オブ ザ ユニバーシティー オブ エジンバラ THE UNIVERSITY COUR T OF THE UNIVERSITY OF EDINBURGH イギリス国 ミドロシアン イーエイチ8 9ワイエル エジンバラ, サウス ブリ ッジ, オールド カレッジ
(22) 出願日	平成30年9月21日 (2018.9.21)		
(62) 分割の表示	特願2017-18646 (P2017-18646) の分割		
原出願日	平成24年4月5日 (2012.4.5)		
(31) 優先権主張番号	1106004.3	(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(32) 優先日	平成23年4月8日 (2011.4.8)	(74) 代理人	100196298 弁理士 井上 高雄
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】光撮像プローブ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞により取り込まれ、共焦点蛍光マイクロ内視鏡又は他の光検出器によるその後の可視化を可能にする染料を用い、細胞を可視化する方法の提供。

【解決手段】細胞取り込み前は実質的に検出可能な、又は少量しか、蛍光を示さないが、細胞取り込み後は細胞を in vivo で撮像するのに用いられる共焦点内視鏡を用いて検出可能な蛍光の増加を示す、染料構築物、及びその使用。該染料構築物は、蛍光染料に結合した表面基を有す多分岐分子であり、例えば、ペプチド配列を含む多分岐分子である。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞取り込み前は実質的に検出可能な、又は少量しか、蛍光を示さないが、細胞取り込み後は細胞を *in vivo* で撮像するのに用いられる共焦点内視鏡を用いて検出可能な蛍光の増加を示す、染料構築物。

**【請求項 2】**

細胞取り込み前は実質的に検出可能な、又は少量しか、蛍光を示さないが、細胞取り込み後は細胞を *in vivo* で撮像するのに用いられる共焦点内視鏡を用いて検出可能な蛍光の増加を示す、染料構築物の使用。

**【請求項 3】**

前記染料構築物が蛍光染料に結合した表面基を有す多分岐分子であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の染料構築物又は使用。

**【請求項 4】**

前記多分岐分子がペプチド配列を含むことを特徴とし、該ペプチド配列が ( i ) 適当な化学物質若しくは酵素により開裂可能な 1 つ以上の開裂部位を含む、又は ( ii ) 化学物質若しくは酵素により開裂可能な認識可能配列を含まないランダム配列を含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の染料構築物又は使用。

**【請求項 5】**

消光剤分子を更に含む、請求項 4 に記載の染料構築物又は使用。

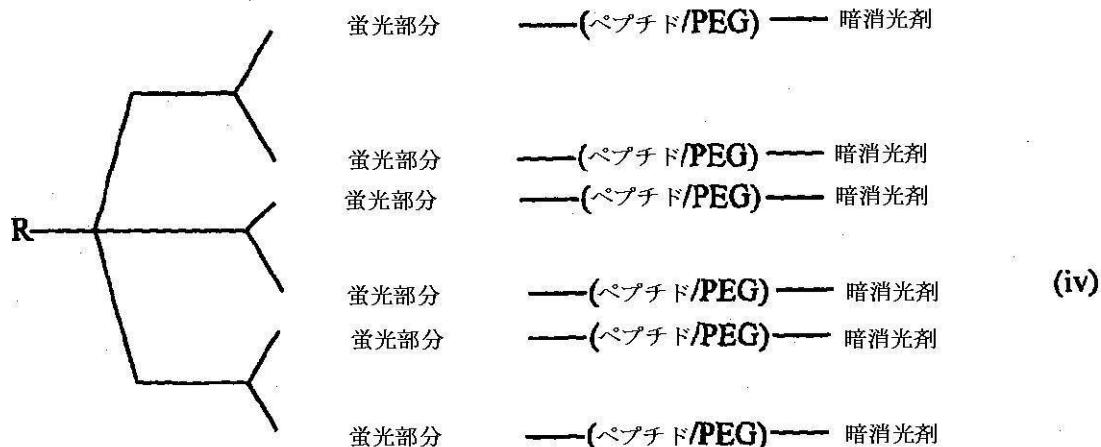
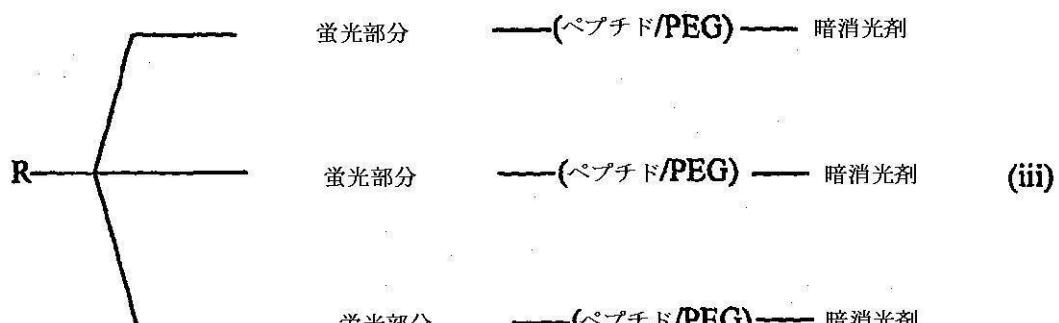
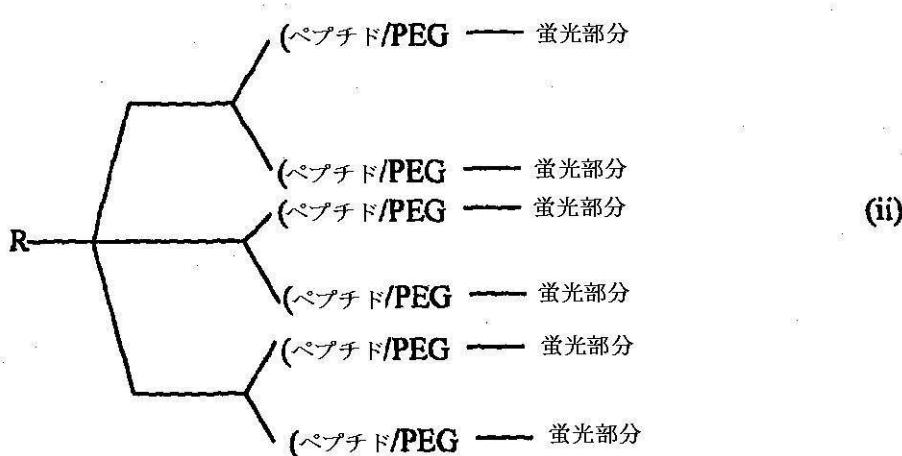
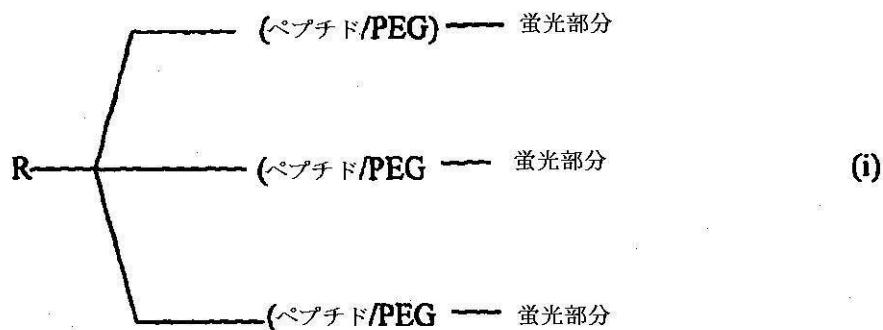
**【請求項 6】**

前記多分岐分子が以下の一般化構造：

10

20

【化1】



であつて、式中、R が  $\text{NH}_2$ 、 $\text{CONH}_2$ 、アミノ酸、 $\text{OH}$ 、アミノ酸- $\text{CONH}_2$ 、C

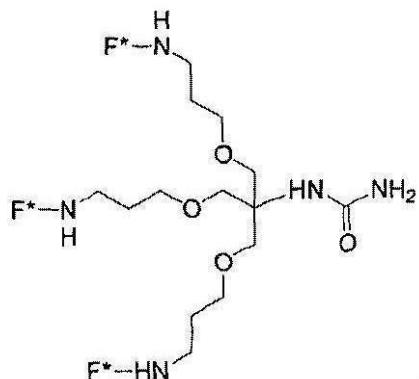
50

$\text{O NH}_2$  - アミノ酸、アルキルアミノ、アルコキシアミノ、尿素、チオール、カルボン酸、又は他の蛍光部分と同じ又は異なり得る更なる蛍光体部分から選択され、すべてのこうした基が分岐点に直接結合することができる、又はPEG基、アルキル若しくはアルケニル鎖、例えばC<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub>アルキル若しくはアルケニルであり得るスペーサーにより分岐点から分離することができる、構造のいずれかを有することを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

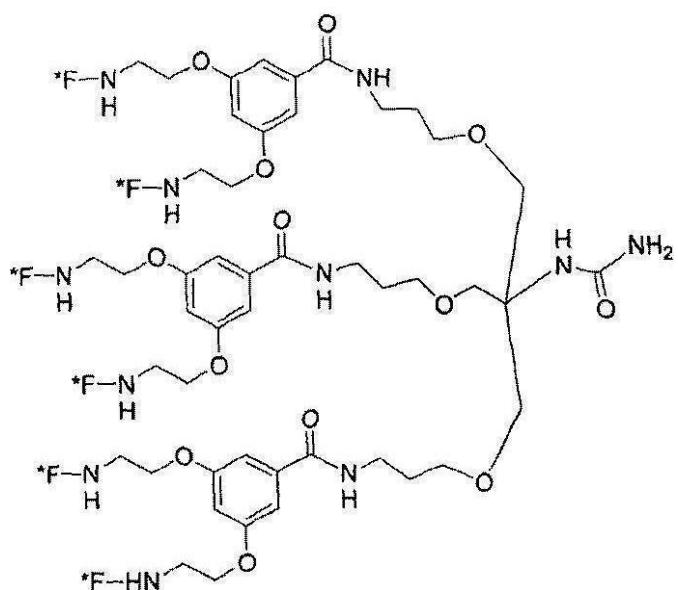
## 【請求項 7】

前記多分岐分子が以下の構造：

## 【化2】

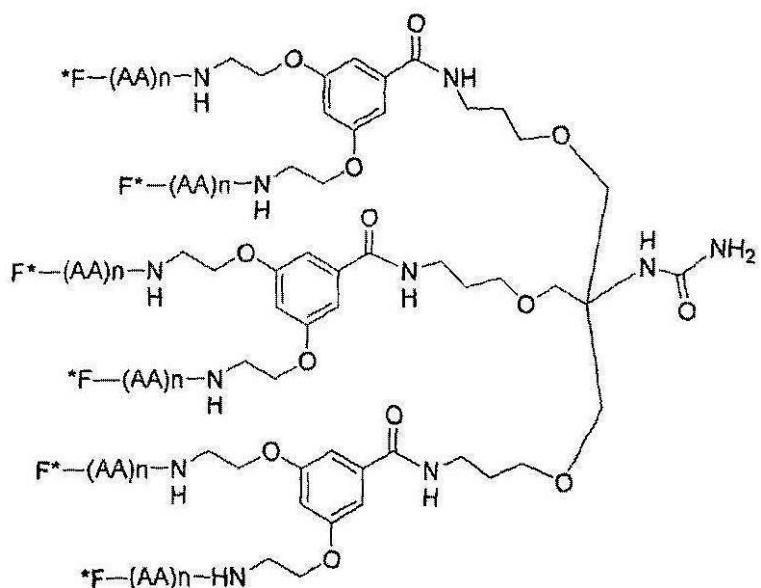
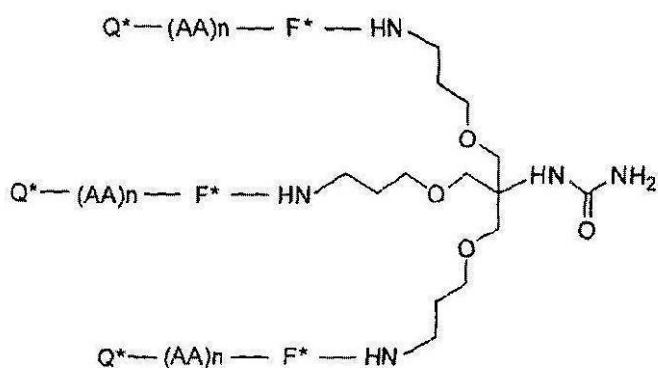
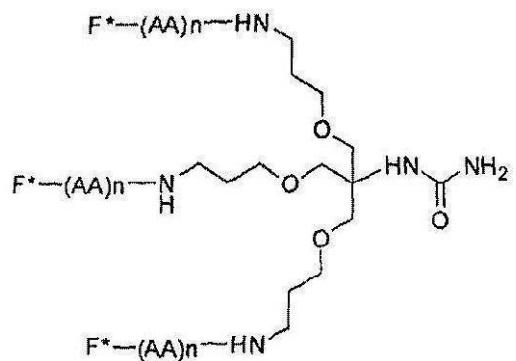


10

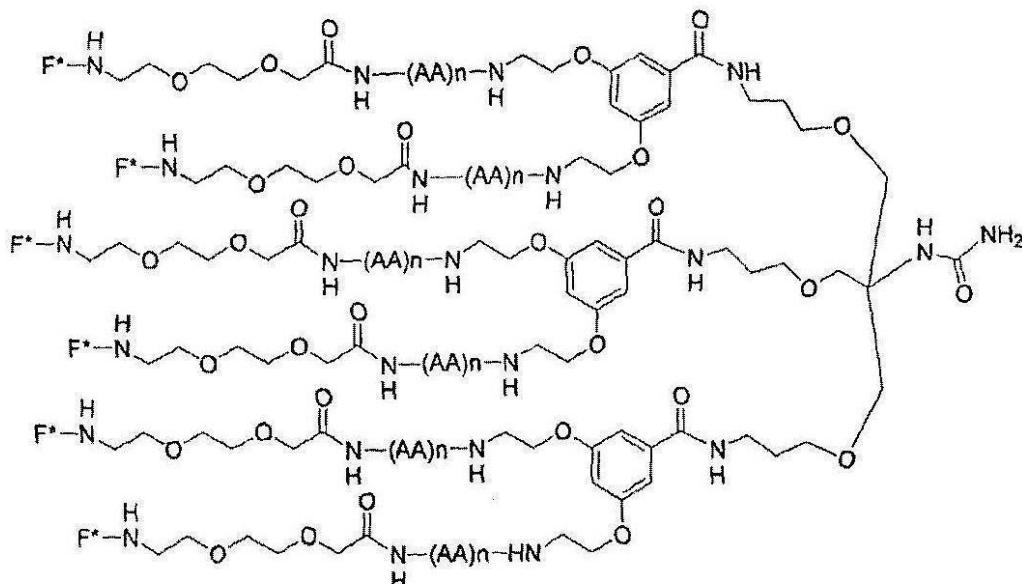


30

20



、または



10

であって、式中、(AA)<sub>n</sub>が任意であり、存在する場合AAがいずれかのアミノ酸を意味し、nが1～30の正の整数であり、\*Fが蛍光部分である、構造の1つから選択されることを特徴とする、請求項6に記載の染料構築物又は使用。

20

**【請求項8】**

\*Fが独立してFAM、ローダミン、シアニン染料又はBODIPY染料から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の染料構築物又は使用。

20

**【請求項9】**

Q\*が暗消光剤部分であり、独立してDABCYL、メチルレッド、BHQ1、BHQ2及びBHQ3から選択されることを特徴とする、請求項7又は8に記載の染料構築物又は使用。

30

**【請求項10】**

共焦点内視鏡を用いる前記撮像が、大及び小腸を含む腸；動脈及び静脈；肺を含む呼吸系；脳内カテーテルによるような脳；又は子宮及び卵管を含む生殖系において行われることを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

30

**【請求項11】**

前記染料構築物が損傷される組織の領域に局所投与されることを意図することを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

40

**【請求項12】**

前記染料構築物を取り込んだ細胞の検出が、前記染料構築物が被験者に投与されてから1～30分以内に行われることを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

**【請求項13】**

検出される前記1つ又は複数の細胞が活性化好中球であることを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

**【請求項14】**

被験者に投与される前記染料構築物の量が100μg未満であることを特徴とする、いずれかの前請求項に記載の染料構築物又は使用。

**【請求項15】**

1つ又は複数の細胞を共焦点マイクロ内視鏡により可視化することができるよう被験者への投与するための、いずれかの前請求項に記載の染料構築物を含む、カテーテル又は他の適切な投与装置。

**【請求項16】**

染料構築物を被験者の細胞に投与するステップであって、該染料構築物が細胞取り込み前は実質的に検出可能な、又は少量しか、蛍光を示さないが、細胞取り込み後は検出可能

50

な蛍光の増加を示す、ステップ、及び該染料構築物を取り込んだ1つ又は複数の細胞を、該1つ又は複数の細胞からの蛍光を共焦点マイクロ内視鏡を用いて観察することにより、観察するステップを含む、細胞の混合物内の特定の1つ又は複数の細胞を共焦点蛍光マイクロ内視鏡を用いてin vivoで可視化する方法。

#### 【請求項17】

前記構築物が投与され、蛍光が大及び小腸を含む腸；動脈及び静脈；肺を含む呼吸系；脳内カテーテルによるような脳；又は子宮及び卵管を含む生殖系において行われることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

#### 【請求項18】

前記方法が炎症反応に関連する細胞を検出するため肺において行われることを特徴とする、請求項17に記載の方法。 10

#### 【請求項19】

検出される前記1つ又は複数の細胞が活性化好中球であることを特徴とする、請求項17又は18に記載の方法。 20

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

本発明は、細胞により取り込まれ、よって共焦点蛍光マイクロ内視鏡又は他の光検出器によるその後の可視化を可能にするデンドリマー染料分子又は多分岐染料分子のような染料を用い、排他的にではないがとくにin vivoで細胞を可視化する方法に関する。 20  
共焦点蛍光マイクロ内視鏡により、排他的にではないがとくにin vivoで細胞を可視化するのに用いられる内部消光されたプローブ、並びに共焦点蛍光マイクロ内視鏡と組み合わせた内部消光されたプローブの、細胞によるプローブの取り込み及び脱消光によって細胞を可視化するための使用も提供される。特定の実施形態では、細胞は、被験者の肺内にあるような、活性化好中球である。

##### 【背景技術】

##### 【0002】

好中球優位肺炎症は罹患及び死亡の主な原因である<sup>1 1</sup>。しかし数十年の調査にもかかわらず、集中治療中の好中球優位肺傷害を有する患者の正確な層別化は、急性好中球性炎症を確実に且つ迅速に区別することができる臨床での治療診断の欠如により妨げられている<sup>2</sup>。臨床診断を行うことができれば、更なる好中球特異的な介入のため、こうした患者を正確に層別化できる可能性がある。過剰な好中球活性はマトリックス及び細胞受容体を分解し、前線維形成性媒介物を活性化し、上皮及び内皮細胞損傷に寄与する<sup>3 、 4 、 5</sup>。急性肺傷害、虚血再灌流傷害<sup>6 、 7</sup>、囊胞性線維症<sup>8</sup>及び慢性閉塞性肺疾患<sup>9</sup>のようないくつかの疾患における好中球の関与により、それらは調節の重要な標的となる。 30

##### 【0003】

ヒトの肺炎症における好中球性炎症のin situ in vivo検出はFDG PET撮像、PET撮像に依存してきた<sup>1 0</sup>が、鋭敏な感受性を提供することは厄介であり、費用がかかり、臨床分子撮像モダリティとして実施することが困難である。反対に、プローブ型共焦点レーザー内視鏡のような共焦点内視鏡の出現は、前臨床及び臨床アリナの両方において肺胞腔を直接可視化する能力を大きく変えた。しかしながら、まだこのモダリティは、肺胞腔内の自家蛍光構造体を撮像するため、又は非特異的な蛍光染料を用いてしか用いられない<sup>1 1 、 1 2</sup>。 40

##### 【0004】

活性化好中球活性の光検出は、動物の全身における酵素活性の撮像を実行可能である<sup>1 3</sup>。これらのアプローチは内部消光された分子標識を有する基質特異性を必要とする。多くの場合、脱消光は時間がかかり得、基質は非好中球プロテアーゼにより開裂され得る。

##### 【0005】

デンドリマーは十分に定義された構造及び分子組成を有する高分子の1つのクラスであ

10

20

30

40

50

る<sup>14</sup>、<sup>15</sup>。

### 【0006】

それらは、世代と称される繰り返し単位層におけるモノマー単位の段階的結合により形成され、中核上に構築される分岐を形成する。これらの分岐は、必要に応じて更なるデンドリマー成長若しくは修飾、又は特定の化合物の結合に用いることができる特定の化学官能基において終端する。

### 【0007】

国際特許公開第WO2003014743号は、in vitro蛍光アッセイシステムにおける信号を向上するための、デンドリマー及び多分岐分子の使用について記載する<sup>16</sup>。

10

### 【0008】

国際特許公開第WO2003014743号に開示される分子は、適当な化学物質又は酵素で処理される場合、分子内の選択的結合の開裂及びその後の分子の蛍光特性の変化、もっとも顕著には蛍光の増加をもたらす開裂部位を含む。しかしながら、国際特許公開第WO2003014743号はin vitroデータの結果のみを示し、どのように分子をin vivo環境において用いることができるか、又は実際これが可能であるかの示唆又は教示はない。

### 【発明の概要】

### 【0009】

本発明の目的は、前述の不利点の少なくとも1つを除去及び/又は軽減することである<sup>20</sup>。

### 【0010】

本発明の目的は、共焦点マイクロ内視鏡を用い、被験者の肺内の活性化好中球のような細胞をin vivoで可視化する手段を提供することである。

### 【0011】

第一態様では、細胞取り込み前は実質的に検出可能な、又は少量しか、蛍光を示さないが、細胞取り込み後は細胞をin vivoで撮像するのに用いられる共焦点内視鏡を用いて検出可能な蛍光の増加を示す、染料構築物が提供される。

### 【0012】

染料構築物は、国際特許公開第WO/2003/014743号に開示されるような、蛍光染料に結合した表面基を有する多分岐分子、又は本明細書に更に記載されるような分子であってもよい。<sup>30</sup>

### 【0013】

「蛍光の検出可能な増加」は、共焦点マイクロ内視鏡技術により検出することができる蛍光に関する理解される。染料構築物が初期に低いが検出可能なレベルの蛍光を示す場合、1つ又は複数の細胞による取り込み後、検出可能な増加を観察することができる。初めに、本発明において用いられる染料構築物は内部消光される。すなわち、染料構築物は、蛍光基が消光されるため、全く又は十分には蛍光しない。しかしながら、細胞による取り込み後、脱消光が起こり、蛍光の増加を検出することができる。

### 【0014】

一般的には蛍光検出は蛍光強度に関する理解され、蛍光寿命及び極性化も検出することができる。一般的には「低又は少量の蛍光」は共焦点マイクロ内視鏡技術を用いて実際に検出可能ではなく、又は蛍光の「増加」の明確な識別を可能にするには十分に低い。一般的には、適切な増加は1.2倍以上の増加であると理解される。<sup>40</sup>

### 【0015】

本発明者らは、共焦点内視鏡可視化技術をデンドリマー染料分子又は多分岐分子結合蛍光染料の局所投与と組み合わせることにより、明らかな蛍光の増加を有する、本発明の染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を取り込む特定の細胞を、蛍光によりin vivoで観察することが可能であることを見出した。理論に縛られることを望むことなく、本発明の染料構築物/多分岐染料分子は、細胞内メカニズムが構築物に作用し、蛍光の増加

50

を引き起こす前に、細胞により取り込まれる、又は吸収されると考えられる。

**【0016】**

本発明者らは、本明細書に記載される染料構築物／多分岐分子の使用によって、こうした分子は特定の細胞により数秒又は数分以内に取り込まれ得ることを見出した。しかしながら、時間とともに多くの異なる細胞型は本明細書に記載される染料構築物／多分岐分子を取り込むことができ、そのようなものとして、本明細書に記載される染料構築物／多分岐分子を急速に取り込む所望の細胞を観察するため、蛍光の検出は染料構築物の投与の数分以内 一般的には数秒～数分、例えば1～30分、一般的には1～10分以内に行われるべきである。この方法では、こうした構築物を数時間以内のようなかなり長い時間をかけて取り込まれ得る細胞は検出されず、よって染料構築物を急速に取り込む細胞は他の細胞から容易に識別可能である。診断手順ができるだけ短時間で行われるので、これは患者にとっても有益である。更に、内視鏡が取り出されると、染料構築物の投与の部位を再度見つけることは困難であり得る。

10

**【0017】**

共焦点内視鏡又はマイクロ内視鏡はリアルタイムの *in vivo* でのヒト及び動物撮像を可能にする。装置はカスタムビルトの蛍光スリット走査共焦点顕微鏡を光ファイバーカーテールに組み合わせる。更なる教示は、当業者に読むことを薦め、その内容を本明細書に参照により組み入れる、Thiberville et al<sup>17</sup> 及び国際特許公開第WO2008020130号に見ることができる。

20

**【0018】**

更なる態様では、共焦点マイクロ内視鏡を用いて細胞の混合物内の特定の1つ又は複数の細胞を *in vivo* で可視化する方法であって、染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を該細胞の混合物に加えるステップ、及び該染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を取り込んだ1つ又は複数の細胞を、共焦点マイクロ内視鏡を用いて該1つ又は複数の細胞からの蛍光を観察することにより、観察するステップを含む、方法が提供される。便利なことに、染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料は本明細書に記載される構築物の1つであってもよい。

**【0019】**

一般的には、染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を取り込むことにより検出することができる細胞は、活性化好中球である。脱顆粒及びプロテアーゼ放出により特徴づけられる活性化好中球は、炎症の部位で見ることができ、従って肺内、消化管内、生殖管内又はその他の内視鏡でアクセス可能な開口部のような被験者の体内のさまざまな場所で共焦点内視鏡技術を用いて検出することができる。

30

**【0020】**

好適な実施形態では、活性化好中球は被験者の肺において検出される。一般的には、被験者は、こうした活性化好中球の早期検出が望ましい、集中治療中の患者のような、すでに入院している被験者であってもよい。

**【0021】**

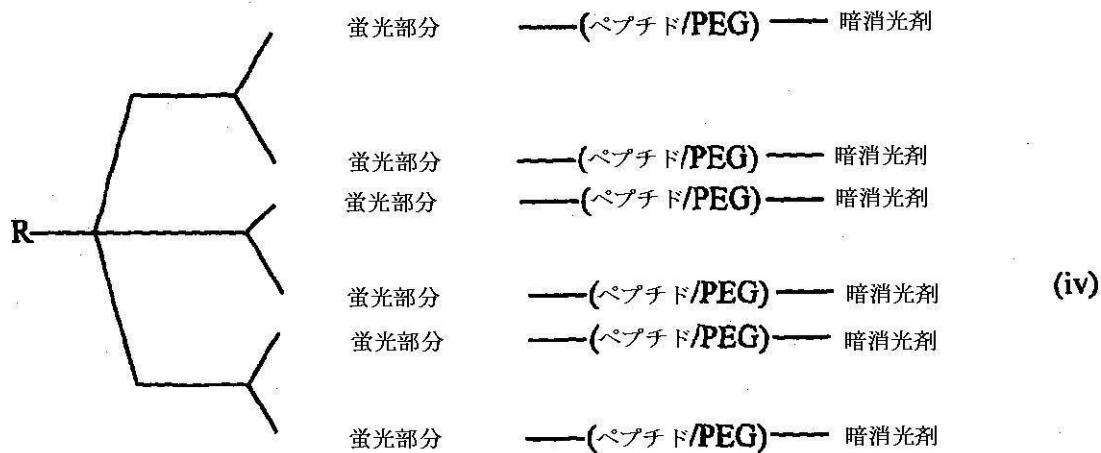
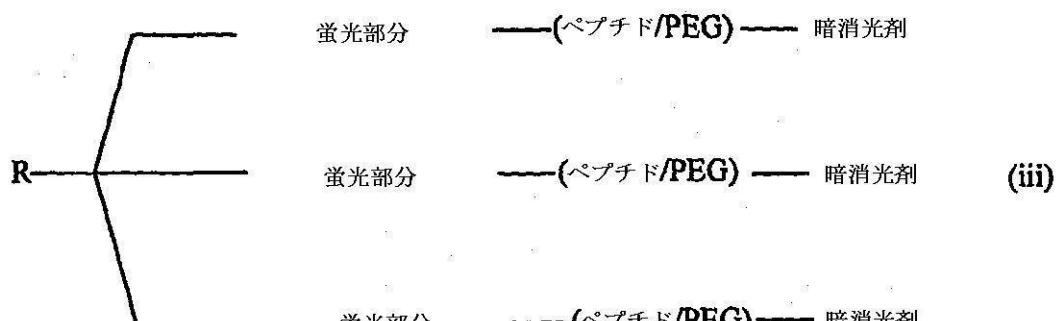
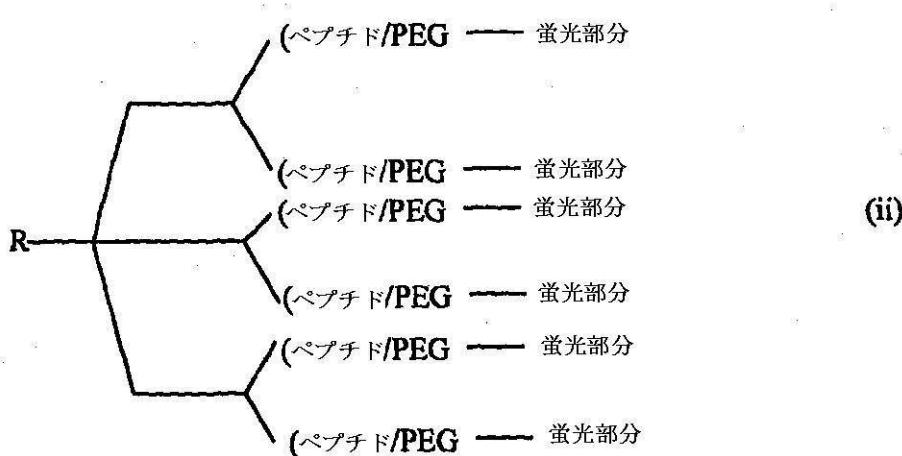
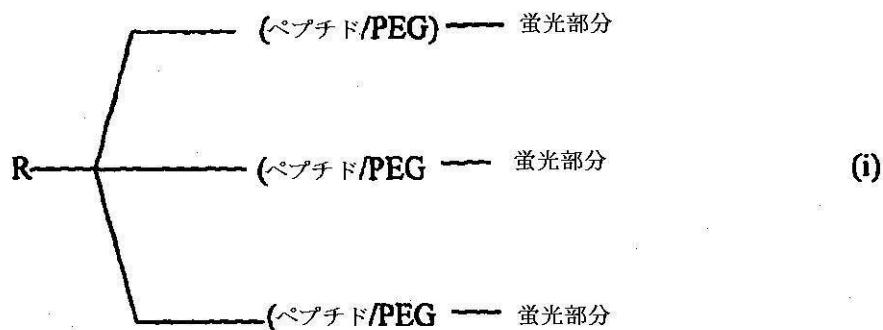
染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料は、適当な化学又は酵素手段により開裂可能な1つ以上の開裂部位を含む、例えば、国際特許公開第WO/2003/014743号（当業者に読むことを勧め、その全内容を本明細書に参照により組み入れる）に記載される形態であってもよい。好適な分子は、3つ以上、一般的には6つ以上の分岐を含み、蛍光部分の脱消光後、蛍光の顕著な増加を観察することができる。

40

**【0022】**

国際特許公開第WO2003/014743号に記載される分子に加えて、本発明の好適な多分岐分子は以下のようない般化構造：

【化1】



を有し、式中、RはN H<sub>2</sub>、C O N H<sub>2</sub>、N H<sub>2</sub> C O N H<sup>-</sup>、アミノ酸、O H、アミノ酸

50

-CONH<sub>2</sub>、CONH<sub>2</sub>-アミノ酸、アルキルアミノ、アルコキシアミノ、尿素、チオール、カルボン酸、又は他の蛍光部分と同じ又は異なり得る更なる蛍光体部分から選択される。すべてのこうした基は分岐点に直接結合することができる、又はPEG基、アルキル若しくはアルケニル鎖、例えばC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル若しくはアルケニルであり得るスペーサーにより分岐点から分離することができる。他の結合基については、国際特許公開第WO2003/014743号及び参考文献14に記載される。

#### 【0023】

上記一般化構造は、本発明において用いるのに適切であり得るプローブを模式的に示す。ペプチド及び/又はポリエチレングリコール(PEG)部分の使用はデンドリマー/分岐分子の可溶性を向上することを意図している。存在する場合、ペプチド配列は酵素若しくは化学開裂認識配列を含み得る、又はランダムであり得る、すなわち認識可能な酵素若しくは化学開裂認識配列を含まない。ペプチド及び/又はPEG部分の代替として、当技術分野において知られるいずれかの適切な可溶化基を用いることができる。理論に縛られることを望むことなく、ランダムペプチド配列が用いられる場合、ペプチド配列は、検出する細胞中に存在する酵素により開裂されると考えられない。よって、ランダムペプチド配列を含む本発明の分子の取り込み後に観察される蛍光の増加は、以前の教示とは反対に、ペプチド部分の開裂及び以前消光された蛍光部分の放出のためであるとは考えられない。

10

#### 【0024】

酵素開裂可能配列が用いられる場合、ペプチド配列は、細胞の外に存在し得る酵素により開裂することができ、これにより低量の蛍光を観察することができる。しかしながら、更に大きな観察可能な蛍光の増加は分子/プローブの取り込み後に観察される。このように、脱消光剤部分の蛍光部分及び他の細胞メカニズムからの分離により、蛍光の顕著な増加が観察される。よって、細胞の外である程度の蛍光を観察することができる実施形態では、構築物が取り込まれる場合、検出可能な(例えば、細胞の外で観察されるいずれかの蛍光と比較して1.2倍より大きい)増加が観察されることが理解されるべきである。あるレベルの蛍光がいずれかの細胞の外で観察されることにより細胞を識別することが一般的には可能であるが、構築物が取り込まれ、蛍光の増加が観察されると、所望の細胞はより容易に識別することができるので、これは実際に利点であり得る。

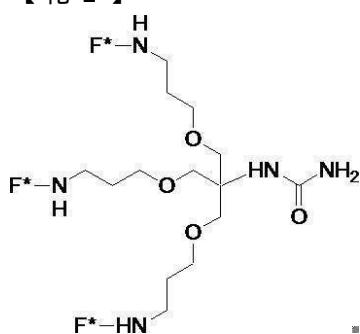
20

#### 【0025】

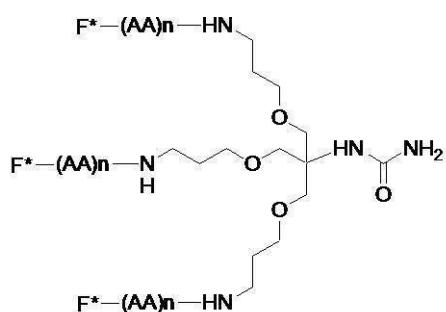
30

本発明のとくに好適な分子は、以下の構造:

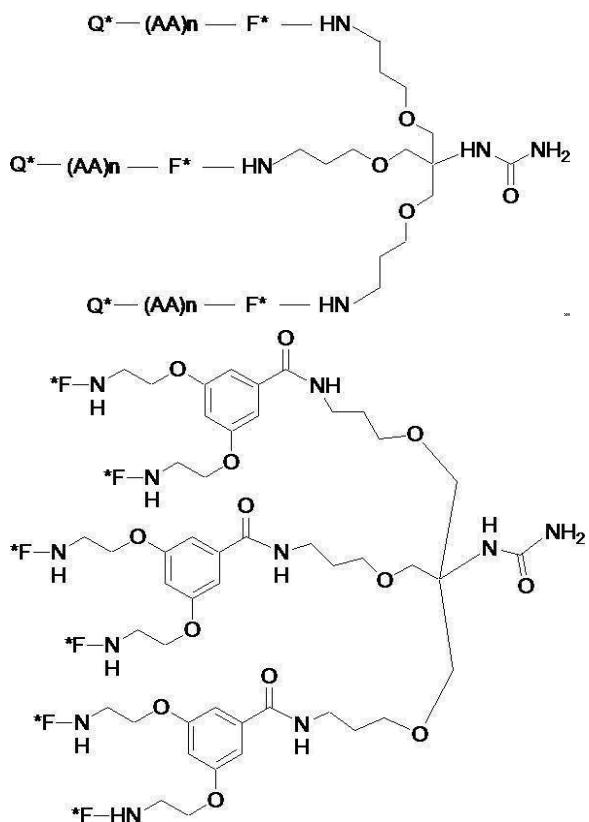
#### 【化2】



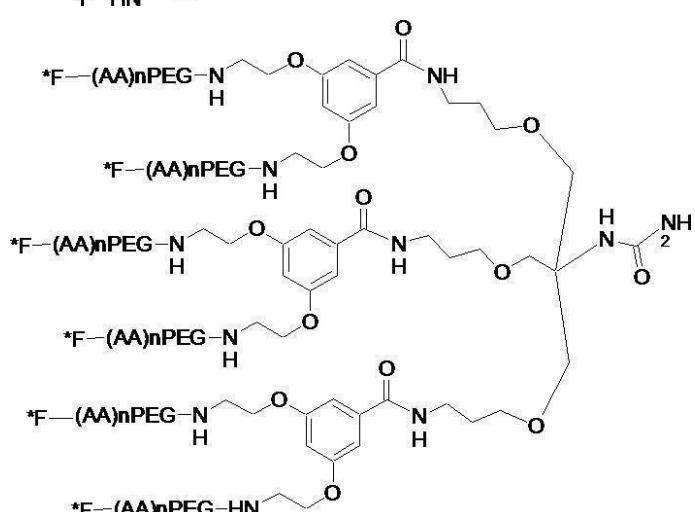
40



10



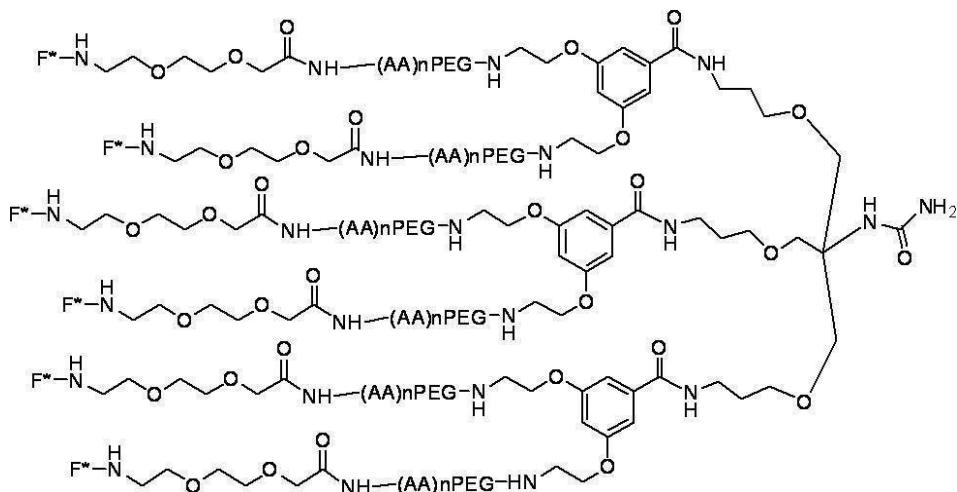
20



30

40

、または



の 1 つから選択される。

#### 【 0 0 2 6 】

( A A )  $n$  P E G は存在するペプチド及び / 又は P E G 部分として理解されるべきである。すなわち一方若しくは他方又は両方である。実際、2つ以上の P E G が存在し得る。上記分子は、<sup>\*</sup> F で示される、複数の蛍光消光部分を含む。1つのこうした蛍光部分は F A M であるが、ローダミン、シアニン染料及び B O D I P Y 染料のような、多くの他の蛍光部分を用いることができる。本発明の分子は F A M の使用に限定されないことが理解されるべきである。Q <sup>\*</sup> は、D A B C Y L、メチルレッド、B H Q 1、B H Q 2 及び B H Q 3 のような暗消光剤部分である。

20

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の分子は、上記構造において ( A A )  $n$  と表されるペプチド結合を含むことができるが、式中、 A A はいずれかのアミノ酸を意味し、  $n$  はゼロであり得、又は 1 ~ 3 0 の正の整数、例えば 1 ~ 2 0 、若しくは 1 ~ 1 5 である。こうしたペプチド配列は従ってランダム配列であり得、ペプチド又はタンパク質内に含有される既知の配列に一致する。酵素好中球エラスターーゼにより認識される配列としては、A - A - P - V 、 A - A - A - P - V - K 、 E - E - I - N 1 e - R - R が挙げられる。多くの他のペプチド配列は当業者に知られ、本発明のプローブにおいて用いることができ、例としては G - P - K - G - L - K - G ( M M P - 9 ) 、 V - A - D - C - A - D - Y ( プロテイナーゼ 3 ) 、 A - A - P - F 、又は F - V - T - G n f - S - W が挙げられ、式中、 G n f = 非タンパク質原性 4 - グアニジン - I - フェニルアラニン ( カテプシン G ) 及び D - C - V - D ( カスパー ) である。更なる態様では、本発明は、活性化好中球のような細胞を *i n v i v o* で可視化するのに用いられる、上述したような新規染料構築物を提供する。後述するようなこうした分子の調製方法も提供される。

30

#### 【 0 0 2 8 】

本発明の分子及び実際に国際特許公開第 W O / 2 0 0 3 / 0 1 4 7 4 3 号に記載される分子はまず消光される、すなわち、適当な励起後に蛍光部分から検出することができる蛍光について、それらは少ししか、又は全く蛍光を示さない。しかしながら、検出する 1 つ又は複数の細胞による分子の取り込み後、分子の脱消光が起こり、適切な波長の光を用いる励起後、蛍光信号の増加を検出することができる<sup>1~8</sup>。

40

#### 【 0 0 2 9 】

また、本発明者らは、認識可能に開裂可能なペプチド配列を有さない本発明の特定の分子がそれにもかかわらず活性化好中球のような特定の細胞により取り込まれ、脱消光、すなわち蛍光の増加を観察することができることを見出した。理論により縛られることを望むことなく、プローブは内部消光効率に直接作用する酸性化空胞構造中に取り込むことができると考えられる。

#### 【 0 0 3 0 】

よって、例えば、国際特許公開第 W O 2 0 0 3 0 1 4 7 4 3 号により記載されるものと

50

は異なる方法で、本発明の分子は、細胞及びとくに活性化好中球を可視化するため、認識可能な酵素開裂可能なペプチド配列を有さなければならないとは限らない。

#### 【0031】

本発明者らは、共焦点内視鏡によって、細胞を *in situ in vivo* で可視化することができる。そのようなものとして、「*in vivo*」の語は生体内の細胞に関する理解され、よって体から抽出又は切除された組織試料から得られる細胞を可視化することとは区別されるべきである。本方法は、マイクロ内視鏡カテーテルを挿入することができるいずれの臓器上又は内で行うこともできる。これは、例えば、大及び小腸を含む腸；動脈及び静脈；肺を含む呼吸系；脳内カテーテルによるような脳；並びに子宮及び卵管を含む生殖系であってもよい。

10

#### 【0032】

とくに好適な実施形態では、本発明の方法は、肺における、例えば肺胞腔における細胞を可視化しながら行うことができる。

#### 【0033】

本発明者らは、本明細書において記載される染料構築物／多分岐分子の使用によって、こうした分子は活性化好中球により取り込まれることを見出した。活性化好中球によるこうした取り込みは非常に急速に、数秒又は数分以内に行われ、こうしたものとして活性化好中球は、本発明の分子の被検者の検査部位、例えば肺内での投与後 1 ~ 30 分、一般的には 1 ~ 10 分以内に可視化することができる。上記のように、本明細書に記載されるような検出の方法は一般的には、本発明の分子を急速に取り込む、又は吸収する活性化好中球のような細胞のみが検出されるように、まず消光された分子の局所投与後、短時間以内に、一般的には投与の数分以内に行われるべきである。他の細胞型も分子を取り込むことができるが、かなり長時間かかる。よって、本発明の技術に従って、混合細胞集団中の活性化好中球を急速に検出することが可能である。とくに好適な実施形態では、被験者の肺胞腔中のような肺内の活性化好中球を検出することが可能である。

20

#### 【0034】

更に、蛍光部分の脱消光後の感度及び蛍光の増加のため、投与された 50 µg 又は 10 µg 以下のようないかだ（一般的には 100 µg 未満）の染料構築物のみから蛍光を検出することができる。これはいずれかの外因性分子を投与する場合、多量の使用及び毒性に関する特定の考えられる規制問題の観点からとくに有益であるが、本発明の分子は実際いずれの例でも顕著に非毒性であり得る。こうした低微量の分子が、投与される場合、マイクロ内視鏡技術を用いて検出可能な信号を誘発することは、実際とくに驚くべきことである。

30

#### 【0035】

よって、更なる実施形態では、本発明は、共焦点マイクロ内視鏡を用い、細胞の混合物内の特定の1つ又は複数の細胞（例えば活性化好中球）を *in vivo* で可視化する方法であって、微量（すなわち、100 µg 未満、50 µg、又は 10 µg 未満）の染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を該細胞の混合物に加えるステップ、及び共焦点マイクロ内視鏡を用いて該1つ又は複数の細胞から蛍光を観察することにより、デンドリマー染料分子又は多分岐分子結合蛍光染料を取り込んだ1つ又は複数の細胞を観察するステップを含む、方法を提供する。

40

#### 【0036】

本発明は、100 µg 未満、50 µg、又は 10 µg 未満の量の本発明のデンドリマー染料分子又は多分岐分子結合蛍光染料の、共焦点内視鏡を用いて細胞を *in vivo* で可視化するための使用も提供する。

#### 【0037】

1つ又は複数の細胞が共焦点内視鏡により可視化され得るように、被験者への投与のための、微量（すなわち、100 µg 未満、50 µg、又は 10 µg 未満）の本発明の染料構築物又は多分岐分子結合蛍光染料を含むカテーテル又は他の適切な投与装置も提供される。

50

## 【0038】

本発明の1つの潜在的な利点は、酸素又は空気の投与に関して呼吸サポートを受けてい  
る、並びにそのようなものとしてその口及び／若しくは鼻を覆うフェイスマスクを有し得  
る、又は挿管されている被験者に対して行うことができる事である。こうした状況でも  
、共焦点マイクロ内視鏡カーテルを、鼻経路を通して又は気管内チューブによって肺中  
に挿入することが可能である。このように、本発明は、被験者を必ずしも過度に動かす必  
要なく、真に臨床で行うことができる。更に、こうした被験者のため、炎症反応の重要な  
マーカーであるいずれかの活性化好中球を検出する能力は非常に重要であり、そのような  
ものとして本発明は、別の場所に動かすことが望ましくない、及び／又は問題となる場合  
もあり得る、こうした重篤患者にとくに用いることができる。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0039】

本発明について、例として、及び以下の図面を参照して、ここで更に記載する。

【図1】一次ヒト細胞によるFAM吸収のリアルタイムのタイムラプス共焦点撮像を示す。  
A)新しく単離されたヒト好中球(PMN)の10 μMのA23187(カルシウムイオノフォア)での活性化は点状の細胞関連蛍光の急速な出現をもたらす(刺激後15分で撮像);B)このFAMの吸収はダイナミン阻害剤ダイナソール(Dynasore)での予備処理により妨げられる;C)細胞特異性:PMN(白矢印)、単球(白抜き矢印)、及びリンパ球(矢頭)。活性化PMNのみがFAMを取り込む。細胞はSyto-85核染料(赤)により描写される。

20

## 【図2】いくつかのデンドリマーの構造を示す。

【図3】新しく単離された好中球の10 μMのA23187(カルシウムイオノフォア)での活性化が点状の細胞関連蛍光の急速な出現をもたらし、これはデキストラン647とは共存するが、ダイナソールでの処理により阻害され、液相IQR1吸収を示すことを示す。

20

【図4】本発明による好適な分子の構造を示す。(AA)<sub>n</sub>はL又はDであってもよい。

【図5】ヒト細胞特異性を示す:活性化PMN(白矢印)、単球(白抜き矢印)及びリンパ球(矢頭)。PMNのみがIQR1.2を活性化する。細胞はSyto-85核染料(赤)により描写される;スケールバー:10 μm。

30

【図6】炎症性肺疾患を有する患者から単離された気管支肺胞洗浄(BAL)における細胞特異性:PMN(白矢印)、肺胞マクロファージ(白抜き矢印)を示す。活性化PMNのみがIQR1.2を活性化する。細胞はSyto-85核染料(赤)により描写される;スケールバー:10 μm。

【図7】上皮細胞に対する細胞特異性を示す:活性化PMN(DiDで染色)をヒト肺胞上皮細胞上に配置し(位相画像上で解像)、24時間連続して撮像した。上皮細胞はIQR1.2により検出される吸収を24時間示さなかった;スケールバー:10 μm。

【図8】大腸菌リポ多糖を1日前に受容したマウスのBALから回収された細胞を示す。好中球(白矢印全矢印)及びマクロファージ(白矢印白抜き矢印)の混合細胞浸潤物を得た。ベースライン及びIQR1.2プローブの存在下で10 ng/mlのPMAを用いる活性化後15分での細胞のリアルタイム共焦点撮像。活性化は観察されなかった。画像はn=グループ当たり3動物から2つの実験で得られたデータを表す。スケールバー:10 μm。

40

【図9】点状の細胞関連蛍光の出現をもたらさない、新しく単離されたヒト好中球の非デンドリマー系FRETプローブの存在下での10 μMのA23187(カルシウムイオノフォア)を用いる活性化を示す。

【図10】一次ヒト好中球におけるプローブのリアルタイムのタイムラプス共焦点撮像を示す。A)新しく単離されたヒト好中球の10 μMのA23187(カルシウムイオノフォア)での活性化は、IQR1.2の点状の細胞関連蛍光の急速な出現(刺激後15分で撮像)をもたらす。スケールバー:10 μm。B)活性化前のベースラインの割合としての時間に対する好中球当たりの平均蛍光強度の定量化。データは視野当たり平均20個の

50

好中球を有する高倍率視野上での3つのドナーからの5つの実験を表す。データは平均及び平均の標準誤差である。C) IQR 1.2 及びデキストラン647のこの吸収は、ダイナミン阻害剤ダイナソールでの予備処理により妨げられる。

【図11】プローブの in vitro 及び in vivo 毒性の欠如を示す。A) HeLa細胞を 100 μM のプローブ IQR 1.3 及び IQR 2.3 又は 1 mM のスタウロスポリンで 24 時間処理した。細胞生存性をその後、細胞における ATP 生成を測定するプロメガの CellTiter Glo 生物発光キットを用いて評価した。プローブは対照と比較して毒性を示さなかった；B) 高用量の IQR 2.3、200 μM の 50 μl を 25 g のマウスに気管内注射した。動物を 48 時間及び 14 日後に屠殺した。マウスの体重を週に 2 回モニターした。対照マウスと比較して、プローブ注射後に体重の減少は見られなかった。BAL を屠殺後マウスから回収し、BAL の細胞計数 (C) 及びサイトスピンを行った (D)。BALにおいて総細胞数に差は見られず、好中球の浸潤は IQR 2.3 の滴下後 48 時間又は 14 日では明らかでなかった。(E) H & E 染色での肺の組織学的分析は肺毒性を示さなかった。

【図12】1.5 ml のマイクロチューブにおいて活性化された後、異なる IQR に 15 分間曝露され、Cellvizio (登録商標) 488 nm 光ファイバー共焦点システムを用いて撮像された、新しく単離されたヒト好中球を示す。その後細胞を遠心沈殿させ、プローブを培地から取り出した。洗浄前、FAM、IQR 1.3 及び IQR 2.3 の間に明瞭な背景の違いがある。活性化細胞を FAM 単独で解像することはできない。洗浄後、活性化細胞は 3 つのチューブすべてにおいて可視的であるが、消光の増加とともに信号雑音比が増加する。

【図13】人工呼吸を受けるヒツジモデルを示す。(A) ヒツジの肺の深くにある活性化細胞を識別するという概念の証拠を示す。(B) 新しく単離されたヒト好中球 (C)、プローブ単独 (IQR 2.3)、活性化単球 (D)、及び活性化ヒト好中球 (E) をヒツジの肺のサブセグメントに滴下した。5 分後、2 ml の IQR 2.3 (5 μg の最終濃度) をサブセグメントに滴下した。この後 Cellvizio (登録商標) で光ファイバー共焦点撮像を行い、画像を取得した。活性化好中球 (E) を有するセグメントのみ光学的に検出可能な細胞を示した。

【図14】エンドサイトシス単独では作用剤の細胞由来信号にとって十分ではないことを示す。ヒト血液単球由来マクロファージ (10 % 自家血清で 7 日培養) の IQR 1 の存在下でのカルシウムイオノフォア A23187 (10 μM) での活性化をレーザー走査共焦点顕微鏡により撮像する (t + 5 分で示す) 場合、ヒト好中球において見られるような点状の細胞関連蛍光信号の出現をもたらさない。しかしながら、液相エンドサイトシスを標識する Alexa-647 標識デキストランの点状の吸収は依然として見られる (白矢印)。スケールバー : 10 μm。

【図15】A) IQR 1.2 が、プローブ型共焦点レーザーマイクロ内視鏡 (pCLE: Cellvizio、aliveoflex; 488 nm 励起) により撮像された、ヒト全血で灌流された、人工呼吸を受ける ex vivo ヒツジ肺 (Lee et al. PAS, 2009 参照) における細菌性リポ多糖 (LPS; 100 μg) による循環から得られるヒト好中球を検出する；及び B) IQR 1.2 が予め LPS を滴下していない同じ肺の対照セグメントに送達される場合、信号は検出されないことを示す。

【図16】A) 組換えヒト好中球エラスター (HNE; 11.2 μg / ml) でのインキュベーションからもたらされる IQR 4 脱消光の時間経過が、蛍光プレートリーダーを用いて測定された。HNE でのインキュベーションが、HNE 阻害剤、シベレスタット (50 μM) の存在により阻害されるプローブ IQR 4 からの蛍光の急速な増加をもたらす；及び B) ヒト好中球ライセート (1 × 10 - 7 / ml) でのインキュベーションが、シベレスタット (50 μM) の存在により阻害されるプローブ IQR 4 蛍光の急速な増加もたらすことを示す。

【図17】A) 新しく単離されたヒト好中球のカルシウムイオノフォア A23187 (10 μM) での活性化が、レーザー走査共焦点顕微鏡により撮像される (t + 15 分で示さ

10

20

30

40

50

れる)場合、プローブ I Q R 4 からの点状の細胞関連蛍光信号の急速な出現をもたらす; スケールバー: 10 μm; 及び B ) シベレスタット (50 μM) での予備処理 (10 分) が、好中球が A 2 3 1 8 7 で活性化される (t + 15 分で示される) 場合、プローブ I Q R 4 からのこの点状の細胞関連蛍光の出現を阻害する; スケールバー: 10 μm; ことを示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0040】

##### 材料と方法

##### 一般的情報

市販の試薬を更なる精製なく用いた。NMRスペクトルを Bruker ACスペクトロメーターを使用し、<sup>1</sup>Hについて 250、360、500 MHz で操作して記録した。化学シフトを ppm 単位でスケールにて記録し、残留した非重水素化溶媒の共鳴を参照した。カラムクロマトグラフィーによる順相精製をシリカゲル 60 (230 ~ 400 メッシュ) により行った。分析用逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を、Discovery C18 逆相カラム (5 cm × 4.6 mm, 5 μm) を備えた HP1100 システムにより、流速 1 ml / 分で、6 分にわたり H<sub>2</sub>O / MeOH / HCOOH (95 / 5 / 0.05) ~ H<sub>2</sub>O / MeOH / HCOOH (5 / 95 / 0.05) で、95 % MeOH で 4 分間保持して溶出することにより行い、254 及び 495 nm で、並びに蒸发光錯乱により検出した。半分取 RP-HPLC を、Phenomenex Producing C18 逆相カラム (250 × 10 mm, 5 μm) を備えた HP1100 システムにより、流速 2.5 ml / 分で、18 分にわたり 5 ~ 95 % の勾配の H<sub>2</sub>O 中の 0.1 % HCOOH (A) 及び CH<sub>3</sub>CN 中の 0.1 % HCOOH (B) で、初期の均一濃度時間を 5 分間として溶出することにより、行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を ESI モードの Agilent Technologies LC/MSD シリーズ 1100 四重極質量分析計 (QMS) により行った。MALDIスペクトルを、0.1 % TFA を添加した水中の 50 % MeCN 中のシナピン酸のマトリックス溶液 (10 mg / ml) を用いて、Voyager-DE (商標) STR MALDI-TOF MS (Applied Biosystems) により、得た。

##### 【0041】

##### (6) モノマーの合成

モノマー 6 をスキーム 1 に示されるように 6 つのステップ<sup>1~9</sup> で合成した。すなわち、アクリロニトリルへの、1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)アミノ-メタンのヒドロキシ基の 1,4-付加、それに続くアミノ保護 (Boc)、及びボラン-THF 複合体を用いたニトリル基の還元により、3 を得た。これを、Dde-OH により処理し、トリス-Dde (2-アセチル-ジメドン) で保護されたアミン 4 を得た。Boc 保護基を除去した後、Knolker<sup>2,0</sup> の手法に従ってイソシアネート 6 を調製した。

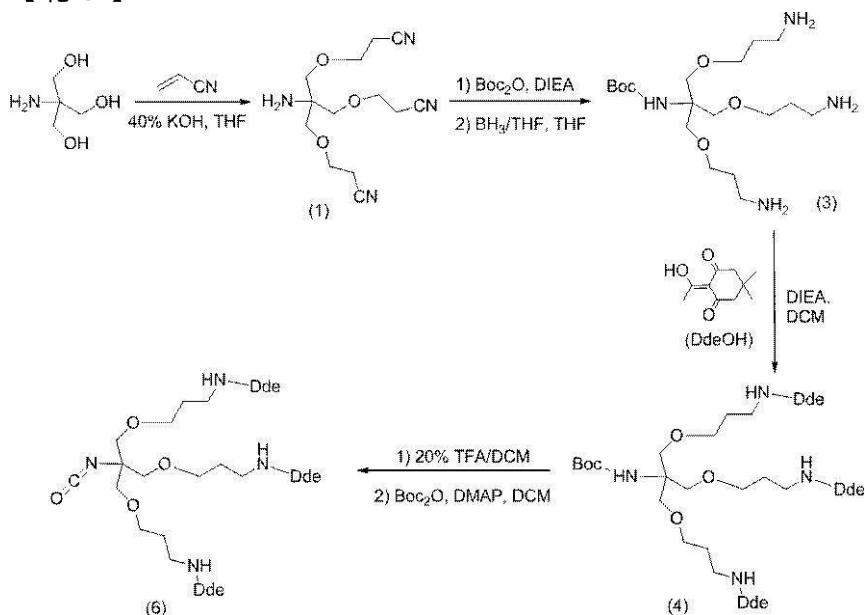
10

20

20

30

## 【化3】



10

20

30

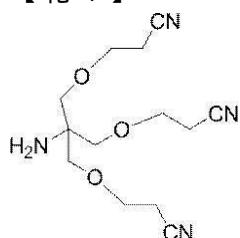
40

## スキーム 1：モノマー（6）の合成

## 【0042】

3 - [ 2 - アミノ - 3 - ( 2 - シアノ - エトキシ ) - 2 - ( 2 - シアノ - エトキシメチル ) - プロポキシ ] プロピオニトリル ( 1 )

## 【化4】

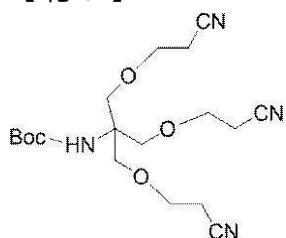


THF (100 ml) 中のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (6.0 g、4.9 mmol) の溶液に、40% KOH 水溶液 (2 ml) 及びアクリロニトリル (12.9 ml、200 mmol) を順番に加え、得られた溶液を終夜攪拌した。溶媒を真空下で除去し、水 (100 ml) を残渣に加えた。水層をジクロロメタン (3 × 100 ml) で抽出し、有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により乾燥させた。有機溶媒を真空下で蒸発させ、生成物 (10.7 g の油、73%) を更なる精製なく次のステップで用いた；<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 5.3 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>) , 3.7 (t, J = 6 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>) , 3.4 (s, 6 H, CH<sub>2</sub>O) , 2.6 (t, J = 6 Hz, 6 H, CH<sub>2</sub>CN) ; MS (ES) m/z: 281 [(M + 1)<sup>+</sup>, 100] , 303 [(M + Na)<sup>+</sup>, 20]。これらのデータは文献<sup>19</sup>とよく一致している。

## 【0043】

[ 2 - ( 2 - シアノ - エトキシ ) - 1 , 1 - ビス - ( 2 - シアノ - エトキシメチル ) - エチル ] - カルバミン酸 *t* e r t - ブチルエステル ( 2 )

## 【化5】



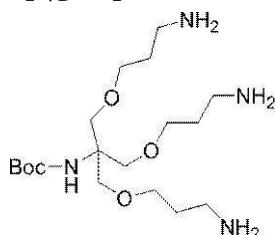
50

攪拌した THF (100 ml) 中のアミン (1) (10.7 g, 38 mmol) の溶液に、THF (30 ml) 中の二炭酸ジ-tert-ブチル (12.4 g, 57 mmol) の溶液を 0 度加え、続いて D I E A (10.0 ml, 57 mmol) を加えた。反応物を室温まで温め、終夜攪拌した。THF を真空下で蒸発させ、残渣を酢酸エチル (250 ml) 中に溶解させた。有機層を 1N KHSO<sub>4</sub> (100 ml)、飽和 NaHCO<sub>3</sub> (100 ml)、及び塩水 (100 ml) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により乾燥させ、溶媒を蒸発させて、油として化合物 (2) (14.4 g, 100%)を得た; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 4.9 (s, 1H, NH), 3.8 (t, J = 6 Hz, 6H, OCH<sub>3</sub>, 3.7 (s, 6H, CH<sub>2</sub>O), 2.6 (t, J = 6 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>CN), 1.4 (s, 9H, CH<sup>3</sup>); MS (ES) m/z: 403 [(M + Na)<sup>+</sup>, 30], 281 [(M - Boc)<sup>+</sup>, 100]。これらのデータは文献<sup>1,9</sup>とよく一致している。

## 【0044】

[2-(3-アミノ-プロポキシ)-1,1-ビス-(3-アミノ-プロポキシメチル)-エチル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル (3)

## 【化6】



10

20

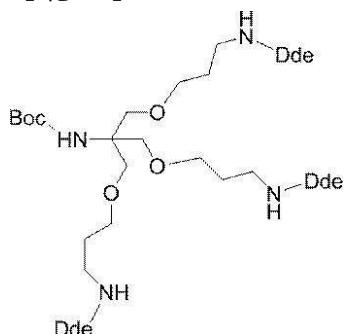
攪拌した乾燥 THF (50 ml) 中のトリス-ニトリル (2) (4.5 g, 12 mmol) の溶液に、BH<sub>3</sub>・THF 複合体 (THF 中の 1M 溶液、72 mmol, 72 ml) を滴下し、得られた混合物を 55 度で 5 時間攪拌した。冷却後、2M HCl を加えて見かけの pH を 1 ~ 2 とした。混合物を NaOH (1M 水溶液) で中和し、溶媒を真空下で除去した。粗生成物を精製なく次のステップに用いた。

## 【0045】

30

[2-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシ}-1,1-ビス-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシメチル}-エチル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル (4)

## 【化7】



40

40

粗生成物 (3) (4.5 g, 11.4 mmol) をメタノール (75 ml) 中に溶解し、D I P E A (2.4 ml, 13.68 mmol) を加えた。ジクロロメタン (40 ml) 中の 2-アセチル-ジメドン<sup>2,1</sup> (DdeOH, 7.3 g, 40.2 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を終夜攪拌した。溶媒を真空下で除去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン / メタノール 9 / 1 で溶出) により精製して、無色の油と

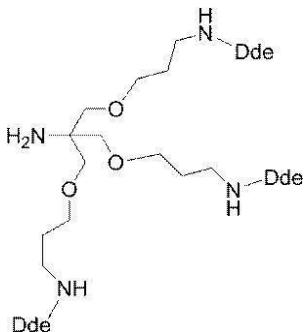
50

して生成物(2.4g、23%)を得た;<sup>1</sup>H-NMR(250Hz, CDCl<sub>3</sub>): 3.8(s, 6H, CH<sub>2</sub>O), 3.7-3.6(m, 12H, CH<sub>2</sub>), 2.7(s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.5(s, 12H, CH<sub>2</sub>), 2.1-2.0(m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.5(s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.1(s, 18H, CH<sub>3</sub>); MS(ES)m/z: 885[M<sup>+</sup>, 100]。データは文献<sup>19</sup>とよく一致している。

## 【0046】

[2-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシ}-1,1-ビス-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシメチル}-エチル]アミン(5)

## 【化8】



10

20

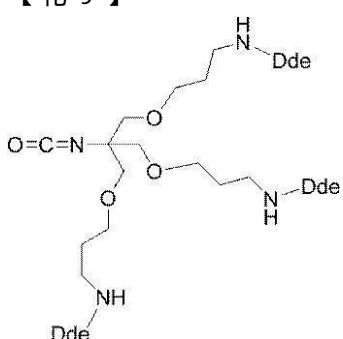
保護されたアミン(4)(2.3g、2.7mmol)をジクロロメタン(40ml)中の20%FTAに溶解し、得られた混合物を2時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残渣をジクロロメタン(150ml)中に溶解し、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(75ml)及び水(75ml)で洗浄した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、溶媒を真空中で除去した。粗生成物(2.1g)を精製なく直接次のステップで用いた;<sup>1</sup>H-NMR(360MHz, CDCl<sub>3</sub>): 13.1(bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.6(s, 6H, CH<sub>2</sub>O), 3.6-3.5(m, 12H, CH<sub>2</sub>), 2.5(s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.3(s, 12H, CH<sub>2</sub>), 1.9-1.8(m, 6H, CH<sub>2</sub>), 0.9(s, 18H, CH<sub>3</sub>); MS(BS)m/z: 785[M<sup>+</sup>, 100], 786[(M+1)<sup>+</sup>, 45], 787[(M+2)<sup>+</sup>, 10]; HPLC t<sub>R</sub>=3.75分。データは文献<sup>19</sup>とよく一致している。

30

## 【0047】

[2-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシ}-1,1-ビス-{3-[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチルアミノ]プロポキシメチル}-エチル]イソシアネート(6)

## 【化9】



40

乾燥DCM(10ml)中のBoc<sub>2</sub>O(0.82g、3.4mmol)の溶液を乾燥DCM(20ml)中のアミン5(2.1g、2.7mmol)及びDMAP(0.36g、2.97mmol)の混合物に滴下して加え、反応混合物を1時間攪拌した。溶媒を

50

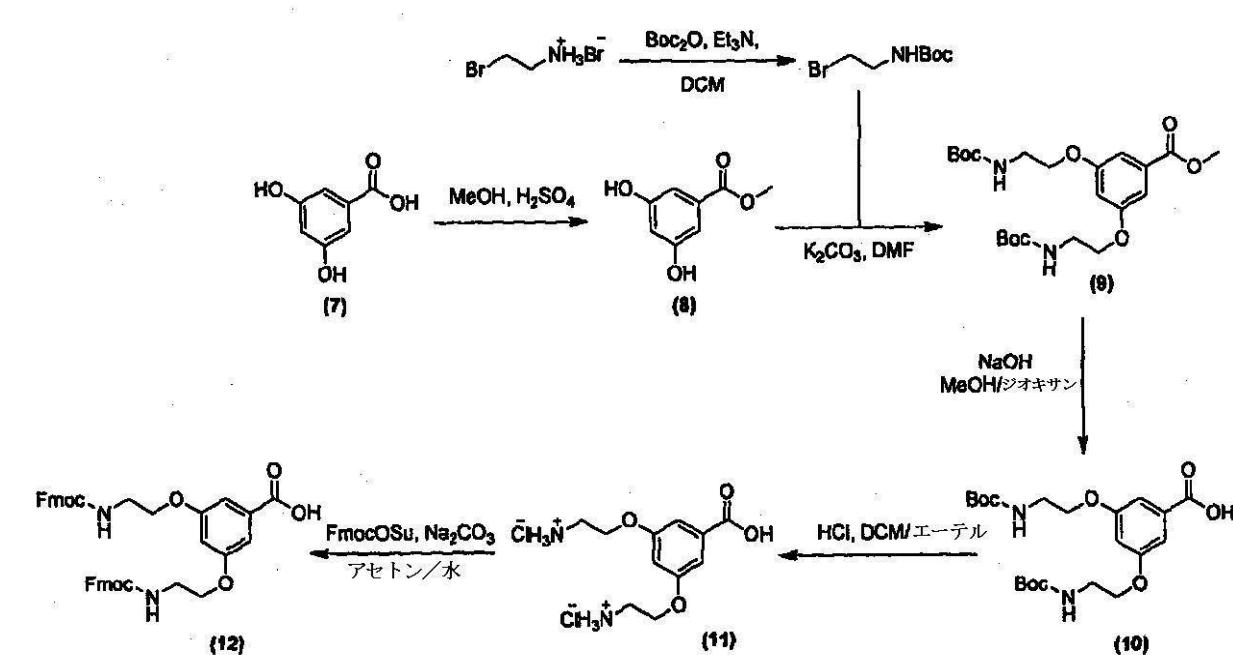
真空中で除去して 6 ( 2 . 0 g、 91 % ) を得た。イソシアネット 6 は直ちに使用した。  
<sup>1</sup> H - N M R ( 3 6 0 M H z , C D C l <sub>3</sub> ) : 3 . 6 - 3 . 4 ( m , 1 8 H , C H <sub>2</sub> )  
, 2 . 5 ( s , 9 H , C H <sub>3</sub> ) , 2 . 3 ( s , 1 2 H , C H <sub>2</sub> ) , 1 . 9 - 1 . 8 ( m ,  
6 H , C H <sub>2</sub> ) , 0 . 9 ( s , 1 8 H , C H <sub>3</sub> ) ; M S ( E S ) m / z : 8 1 1 [ M <sup>+</sup> ,  
1 0 0 ] ; I R ( ニート ) v ( c m <sup>-1</sup> ) : 2 9 5 3 , 2 8 6 7 , 2 2 4 4 , 1 6 3 7 ,  
1 5 6 9 , 1 4 6 1 , 1 3 3 2 , 1 1 0 7 , 8 0 6 , 7 2 0 。データは文献<sup>1</sup>とよく一致  
している。

## 【 0 0 4 8 】

## モノマー ( 1 2 ) の合成

6 分岐デンドリマーの調製に用いられるモノマー ( 1 2 ) を - レソルシル酸を出発物質として用いる 5 つのステップで合成した ( スキーム 2 ) 。メタノール中の ( 7 ) のエステル化により安息香酸メチル ( 8 ) が得られ、その後 D M F 中の炭酸カリウムの存在下での 2 - ( B o c - アミノ ) エチルプロミドを用いたアルキル化を経て、 ( 9 ) を得た。後者にその後、 N a O H / M e O H / ジオキサン混合液を用いることによるメチルエステルのけん化と、それに続く H C l を用いた B o c 保護基の除去を行い、塩酸塩 ( 1 1 ) としてアミンを得た。その後、アミン塩を F m o c O S u で選択的に保護して分岐モノマー ( 1 2 ) を得て、 F m o c 系固体支持体において用いた。

## 【 化 1 0 】



## スキーム 2 : モノマー ( 1 2 ) の合成

## 【 0 0 4 9 】

## 2 - N - ( t e r t - プトキシカルボニルアミノ ) エチルプロミド

## 【 化 1 1 】



ジクロロメタン ( 1 2 m l ) 中の ( 2 - ブロモエチル ) アミン ( 5 . 0 g、 2 5 m m o l ) 及び二炭酸ジ - t e r t - プチル ( 5 . 4 g、 2 5 m m o l ) の懸濁液を 0 ℃ まで冷却し、トリエチルアミン ( 4 m l 、 3 . 9 m m o l ) を滴下して加えた。2 4 時間攪拌した後、ジクロロメタン ( 1 5 0 m l ) を加え、溶液を 1 M K H S O <sub>4</sub> 、水、及び塩水で洗浄し、混合物を乾燥させ ( N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> ) 、真空中で濃縮した。生成物を透明な黄色の

10

20

30

40

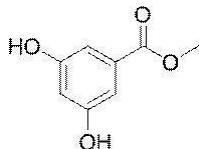
50

油 (5.22 g、90%) として分離した;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 4.96 (1H, br s, NH), 3.61 - 3.43 (4H, m, BrCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH), 1.48 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 155.4 (C=O), 79.6 (C), 42.2 (CH<sub>2</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 28.1 (CH<sub>3</sub>)。データは文献<sup>2,2</sup>とよく一致している。

## 【0050】

## 3,5-ジヒドロキシ安息香酸メチル (8)

## 【化12】



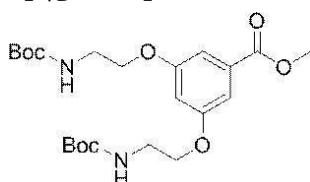
10

メタノール (170 ml) 中の 3,5-ジヒドロキシ安息香酸 (5.0 g、32 mmol) の溶液に触媒量の硫酸 (0.3 ml) を加えた。終夜還流で攪拌した後、混合物を冷却し、4 M NaOH (水溶液) を用いて中和した。濃縮後、残渣を酢酸エチル中に溶解させ、水及び塩水で洗浄した。有機層を乾燥させ (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、真空中で濃縮した。化合物 2 を白色の固体 (5.13 g、95%) として単離した; 融点 164 - 165 (酢酸エチル);  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) : 9.65 (2H, s), 6.81 (2H, d, J = 2.3 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6.43 (1H, d, J = 2.3 Hz, CH<sub>ar</sub>), 3.78 (3H, s, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) : 166.2 (C=O), 158.4 (C×2), 131.2 (C), 107.1 (CH), 107.0 (CH×2), 51.9 (CH<sub>3</sub>); MS (ES) : m/z : 167 [M-H]<sup>-</sup>; HPLC t<sub>R</sub> = 3.11; IR (ニート) v (cm<sup>-1</sup>) : 3229, 1688, 1600, 1486, 1305, 1161, 1102, 995, 765。データは文献<sup>2,2</sup>とよく一致している。

## 【0051】

## 3,5-[ジ-N-(tert-ブトキカルボニル)エトキシ]安息香酸メチル (9)

## 【化13】



30

無水ジメチルホルムアミド (110 ml) 中の 2-(boc-アミノ)エチルプロミド (36 g、170 mmol)、化合物 (8) (11.4 g、68 mmol)、炭酸カリウム (37.3 g、270 mmol) の混合物を 50 度で 16 時間攪拌した。混合物は Celite (登録商標) を通して濾過し、濾液を減少させた。残渣を酢酸エチル中に溶解させ、水及び塩水で洗浄し、有機層を乾燥させ (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、真空中で濃縮した。結晶化 (EtOAc / ヘキサン) により化合物 (3) を白色の固体 (11.9 g) として得た。残りの母液を真空中で減少させ、残留油をヘキサン中の 20% EtOAc を用いたシリカラムクロマトグラフィーにより精製し、13.7 g の (9) を得た。(合計収量 25.6 g、83%); 融点 96 - 98 (EtOAc / ヘキサン);  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.18 (2H, d, J = 2.2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6.63 (1H, t, J = 2.2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4.98 (2H, s, NH), 4.06 (4H, t, J = 5.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.60 - 3.56 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.47 (18H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 166.5 (C=O), 159.6 (C×2), 155.8 (C=O), 132.1 (C), 108.1 (CH×2), 106.4 (CH), 79

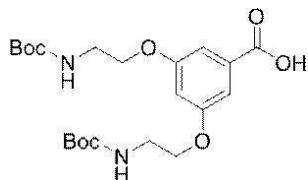
40

50

. 5 ( C ) , 67.5 ( C H<sub>2</sub> ) , 52.1 ( C H<sub>3</sub> ) , 40.0 ( C H<sub>2</sub> ) , 28.3 ( C H<sub>3</sub> ) ; M S ( E S )<sup>+</sup> m / z : 477 [ M + N a ]<sup>+</sup> ; H P L C t<sub>R</sub> = 4.46 分 ; I R ( ニート ) v ( cm<sup>-1</sup> ) : 3281, 1722, 1687, 1537, 1276, 1229, 1066, 841, 766。データは文献<sup>2,2</sup>とよく一致している。

## 【 0052】

3,5-[ジ-N-(tert-ブトキシカルボニル)エトキシ]-安息香酸 (10)  
【化14】



10

化合物 9 ( 1.06 g、2.3 mmol ) をジオキサン / メタノール / 4 M NaOH ( eq ) ( 14 : 5 : 2、20 ml ) 中に溶解させ、5 時間攪拌した。混合物の pH を 1 M KHSO<sub>4</sub> を用いて 2 に調節し、混合物を真空下で濃縮した。残渣をジクロロメタン及び水中に溶解させた。有機層を水及び塩水で洗浄し、乾燥させた ( Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> )。化合物 ( 10 ) を白色の固体として分離した ( 985 mg、96% ) ; m.p. 132-134 (ジクロロメタン) ; <sup>1</sup>H - N M R ( 500 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) : 7.21 ( 2H, broad s, Char ), 6.71 ( 1H, broad s, Char ), 4.51 ( 2H, s, NH ), 4.16-4.21 ( 4H, m, CH<sub>2</sub> ), 3.58-3.52 ( 4H, m, CH<sub>2</sub> ), 1.52 ( 18H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ); <sup>13</sup>C - N M R ( 125 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) : 159.8 ( C=O ), 159.6 ( C×2 ), 157.3 ( C=O ), 156.1 ( C=O ), 131.5 ( C ), 108.5 ( CH×2 ), 107.6 ( CH ), 79.9 ( C ), 67.5 ( CH<sub>2</sub> ), 67.4 ( CH<sub>2</sub> ), 67.1 ( CH<sub>2</sub>×2 ), 40.1 ( CH<sub>2</sub> ), 28.4 ( CH<sub>3</sub> ); M S ( E S )<sup>+</sup> m / z : 463 [ M + N a ]<sup>+</sup>; H R M S ( E S I )<sup>+</sup> m / z : C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [ M + H ]<sup>+</sup> 計算値 441.2231, 実測値 441.2283; H P L C t<sub>R</sub> = 4.26 分 ; I R ( ニート ) v ( cm<sup>-1</sup> ) : 3389, 2980, 1715, 1598, 1518, 1174, 1070, 871, 786。

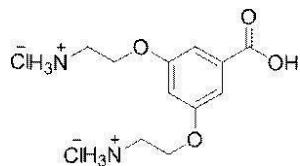
20

30

## 【 0053】

3,5-(ジアミノエトキシ)-安息香酸塩酸塩 (11)

## 【化15】



40

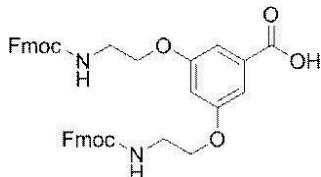
安息香酸 ( 10 ) ( 2.28 g、5.2 mmol ) をジクロロメタン ( 30 ml ) 中に溶解させ、塩酸で飽和したジエチルエーテル ( 30 ml ) を加えた。2 時間攪拌した後、混合物を真空下で濃縮した。塩酸塩 ( 11 ) を白色の固体 ( 1.64 g、定量 ) として得た；融点 < 250 (ジクロロメタン / エーテル) ; <sup>1</sup>H - N M R ( 500 MHz, D<sub>2</sub>O ) : 7.20 ( 2H, d, J = 2.2 Hz, Char ), 6.81 ( 1H, t, J = 2.2 Hz, Char ), 4.23 ( 4H, t, J = 5.0 Hz, CH<sub>2</sub> ), 3.38 ( 4H, t, J = 5.0 Hz, CH<sub>2</sub> ); <sup>13</sup>C - N M R ( 125 MHz, D<sub>2</sub>O ) : 170.6 ( C=O ), 158.7 ( C×2 ), 128.0 ( C ), 108.6 ( CH×2 ), 106.5 ( CH ), 64.2 ( CH<sub>2</sub> ), 38.8 ( CH<sub>2</sub> ); M S ( E S )<sup>+</sup> m / z : 241 [ M + N a ]<sup>+</sup>; H R M S ( E S )<sup>+</sup> m / z : C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [ M + H ]<sup>+</sup> 計算値 241.118、実測値 241.120; H P L C t<sub>R</sub> = 0.77 分。

50

## 【0054】

3,5-[ジ-(2-フルオレニルメチルオキシカルボニルアミノ)エトキシ]-安息香酸(12)

## 【化16】



10

塩酸塩(11)(717mg、2.2mmol)は炭酸ナトリウム(950mg、9mol)を含有するアセトン：水(1:1、100ml)中に溶解させた。この溶液にアセトン(25ml)中のFmoc-Osu(1.57g、4.6mmol)を室温で滴下して加えた。溶液を室温で18時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣を水中に溶解させ、エーテル(2×50ml)で抽出した。水層を氷浴中で冷却し、2M HClでpH3まで酸性化した。得られた白色の固体(12)を濾過し、水で洗浄し、真空下で乾燥させた(1.15g、77%)；融点192-195(水)；<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, d6-DMSO)：13.01(1H, 幅広s, OH), 7.87(4H, d, J=7.5Hz, CHar), 7.67(4H, d, J=7.5Hz, CHarr), 7.51(2H, t, J=5.5Hz, NH), 7.39(4H, t, J=7.5Hz, CHar), 7.29(4H, t, J=7.5Hz, CHarr), 7.06(2H, d, J=2.0Hz, CHarr), 6.95(1H, 幅広s, CHarr), 4.31(4H, d, J=6.9Hz, 2×CH), 4.01(4H, t, J=5.5Hz, CH2), 3.38-3.35(4H, m, CH2)；<sup>13</sup>C-NMR(125MHz, d6-DMSO)：159.8(C=O), 156.7(C=O×2), 144.2(C×4), 141.2(C×4), 128.0, 128.9, 127.5, 125.6(CH), 120.5(CH×2), 108.2(CH), 67.0(CH2×2), 65.8(CH2×2), 55.1(CH2×2), 47.2(CH×2)；MS(ES)<sup>+</sup> m/z : 707 [M+Na]<sup>+</sup>；HRMS(ESI)<sup>+</sup> m/z : C<sub>41</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 計算値 685.2544、実測値 685.2616；HPLC t<sub>R</sub> = 4.81分。IR(ニート)ν (cm<sup>-1</sup>) : 3320, 1699, 1603, 1543, 1449, 1268, 1168, 916, 760。

20

30

40

## 【0055】

樹脂結合デンドリマー足場(14)及び(15)の合成

## 樹脂結合3分岐デンドリマー足場(14)

樹脂13をアミノメチルPS樹脂(1.6mmol/g、1%DVB、100~200メッシュ)に付着させた4-[[(2,4-ジメトキシフェニル)-(Fmoc-アミノ)メチル]フェノキシ酢酸(Rinkアミドリンカー)を用いて合成した。よって、Fmoc-Rink-アミドリンカー(2.6g、4.8mmol)をDMF(16ml)中に溶解し、HOBT(0.7g、4.8mmol)を加えて、混合物を10分間攪拌した。DIC(0.7ml、4.8mmol)をその後加え、得られた混合物を更に5分間攪拌した。溶液をアミノメチルポリスチレン樹脂(1g、1.6mmol/g)に加え、2時間振盪した。得られた樹脂をDMF(3×10ml)、DCM(3×10ml)及びMeOH(3×10ml)で洗浄した。

40

## 【0056】

## Fmoc脱保護

樹脂(DCM中で予め膨潤)に、DMF(5ml)中の20%ピペリジンを加え、反応混合物を10分間振盪した。溶液をその後排出し、樹脂をDMF(3×10ml)、DCM(3×10ml)及びMeOH(3×10ml)で洗浄した。この手順を2回繰り返した。

50

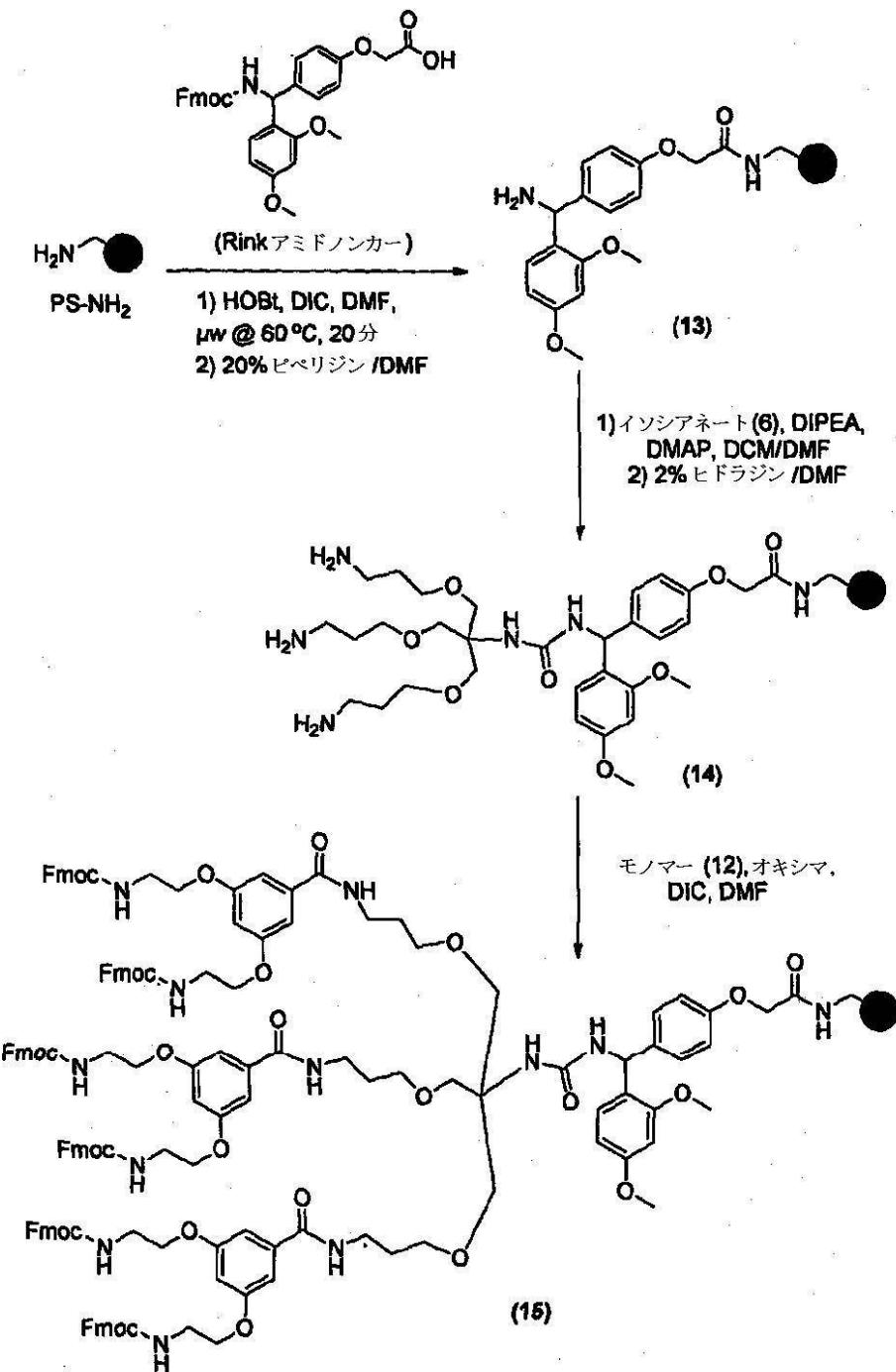
【0057】

## イソシアネートカップリング

DCM (10 ml) 中で予め膨潤させた樹脂 13 (625 mg、1.0 mmol) に、DCM / DMF 混合物 (1:1、10 ml) 中の、イソシアネートモノマー 6 (2.7 g、3.0 mmol)、DIPEA (0.5 ml、3.0 mmol) 及び DMAP (7 mg、0.6 mmol) の溶液を加え、混合物を終夜振盪し、反応物を定量ニンヒドリン試験によりモニターした。溶液を排出し、樹脂を DMF (3 × 20 ml)、DCM (3 × 20 ml)、MeOH (3 × 20 ml)、及び最後にエーテル (3 × 20 ml) で洗浄した。

【化17】

10



20

30

40

スキーム 3 : 3 及び 6 分岐デンドリマー足場 (14) 及び (15) の合成

50

## 【0058】

## D d e 脱保護

D C M ( 5 m l ) 中で予め膨潤させた樹脂 ( 2 0 0 m g 、 0 . 3 2 m m o l ) に D M F ( 3 m l ) 中の 2 % ヒドラジンを加え、反応混合物を 2 時間振盪した。溶液をその後排出し、樹脂 ( 1 4 ) を D M F ( 3 × 2 0 m l ) 、 D C M ( 3 × 2 0 m l ) 及び M e O H ( 3 × 2 0 m l ) で洗浄した。

## 【0059】

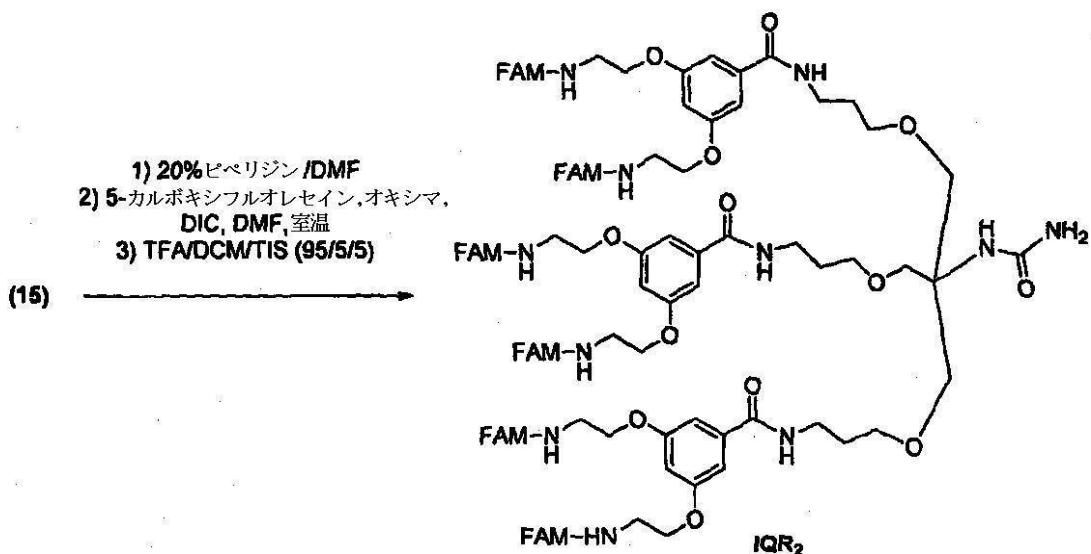
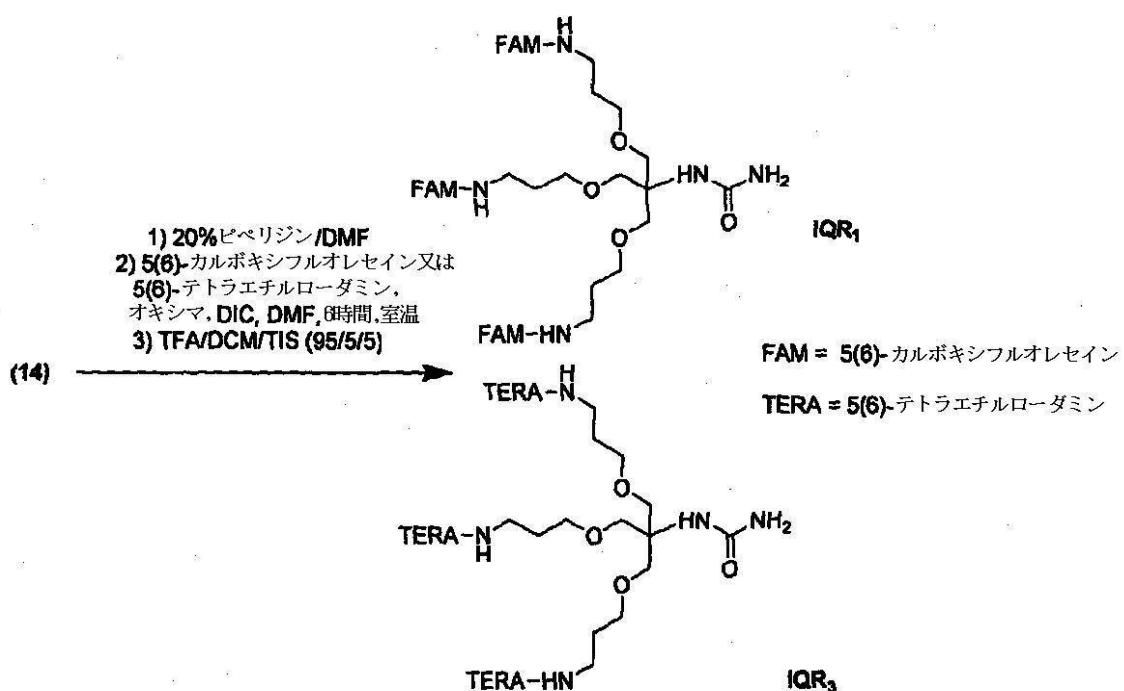
## 樹脂結合 6 分岐デンドリマー足場 ( 1 5 )

D M F ( 0 . 5 m l 、 1 M ) 中のモノマー ( 1 2 ) ( 3 7 9 m g 、 0 . 5 5 m m o l 、 4 . 5 当量) 及びオキシマ ( 7 9 m g 、 0 . 5 5 m m o l 、 4 . 5 当量) の溶液を 1 0 分間攪拌した。D I C ( 8 7  $\mu$  L 、 0 . 5 5 m m o l 、 4 . 5 当量) をその後加え、得られた溶液を更に 2 分間攪拌した。溶液をその後、D C M ( 2 m l ) 中で予め膨潤させた樹脂 ( 1 4 ) ( 1 0 0 m g 、 0 . 1 2 m m o l 、 1 当量) に加え、反応混合物を 2 時間振盪した。溶液を排出し、樹脂 ( 9 ) を D M F ( 3 × 2 m l ) 、 D C M ( 3 × 2 m l ) 及び M e O H ( 3 × 2 m l ) で洗浄した。  
10

## 【0060】

レポーター I Q R<sub>1</sub> 、 I Q R<sub>2</sub> 、 及び I Q R<sub>3</sub> の合成

【化18】



【0061】

## 5(6)-カルボキシフルオレセイン標識

D M F ( 7 0 0  $\mu$  l ) 中の 5(6)-カルボキシフルオレセイン ( 1 0 当量 ) 及び オキシマ ( 1 0 当量 ) の溶液を 1 0 分間攪拌した。 D C I ( 1 0 当量 ) をその後加え、得られた溶液を更に 5 分間攪拌した。この溶液を D C M 中で予め膨潤させた適当な樹脂 ( 1 当量 ) に加え、反応混合物を 6 時間振盪した。溶液を排出し、樹脂を D M F (  $\times$  3 ) 、 D C M (  $\times$  3 ) 及び M e O H (  $\times$  3 ) で洗浄した。カップリング反応を定量ニンヒドリン試験によりモニターした<sup>2 3</sup>。開裂前に、フルオレセインフェノールエステルを除去するため、樹脂を 2 0 % ピペリジンで洗浄した<sup>2 4</sup>。

【0062】

## 5(6)-テトラエチルローダミン標識

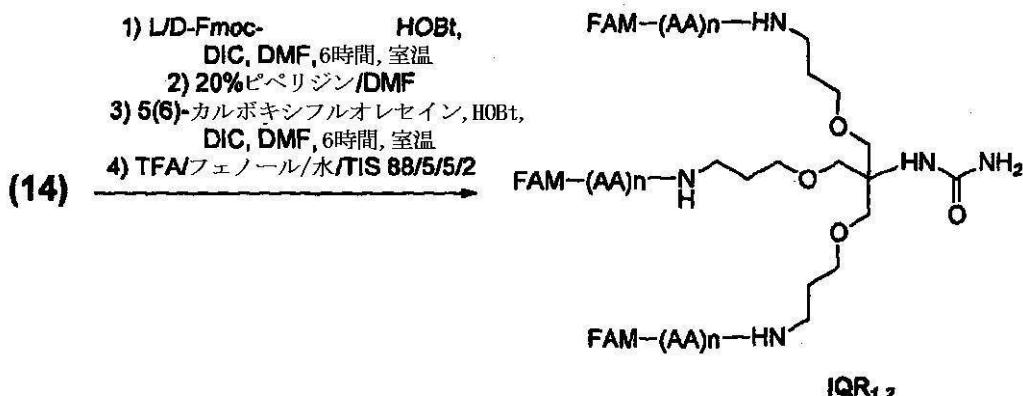
D M F ( 7 0 0  $\mu$  l ) 中の 5(6)-テトラエチルローダミン ( 1 0 当量 ) 及びオキシマ ( 1 0 当量 ) の溶液を 1 0 分間攪拌した。D I C ( 1 0 当量 ) をその後加え、得られた溶液を更に 5 分間攪拌した。この溶液を D C M 中で予め膨潤させた適当な樹脂 ( 1 当量 ) に加え、反応混合物を 6 時間振盪した。溶液を排出し、樹脂を D M F (  $\times$  3 ) 、D C M (  $\times$  3 ) 及び M e O H (  $\times$  3 ) で洗浄した。カップリング反応を定量ニンヒドリン試験によりモニターした。

## 【 0 0 6 3 】

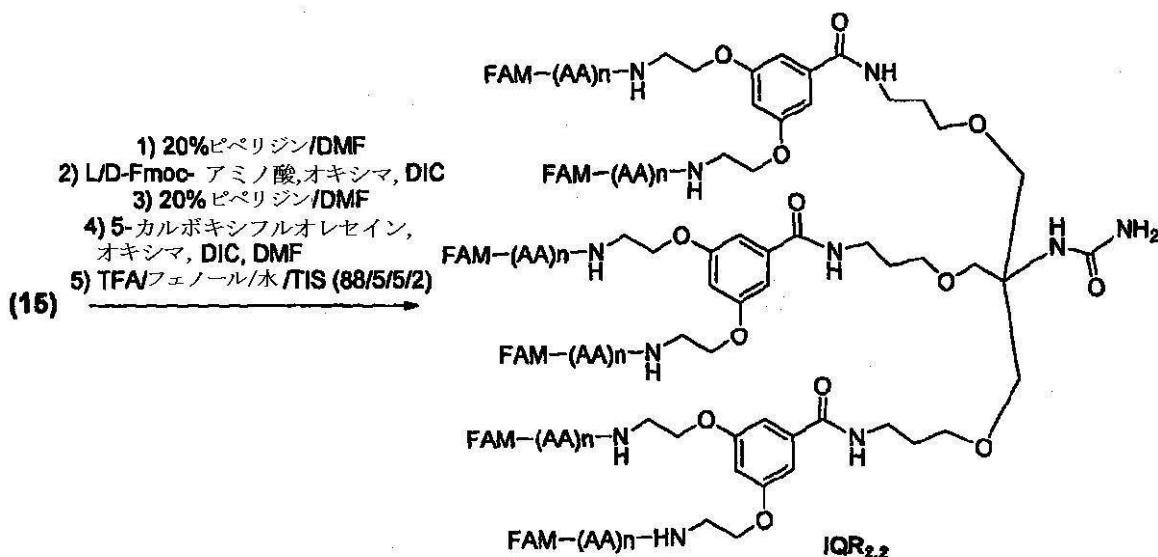
レポーター I Q R<sub>1.2</sub>、I Q R<sub>1.3</sub>、I Q R<sub>2.2</sub> 及び I Q R<sub>2.3</sub> の合成

## 【 化 1 9 】

10



20



30

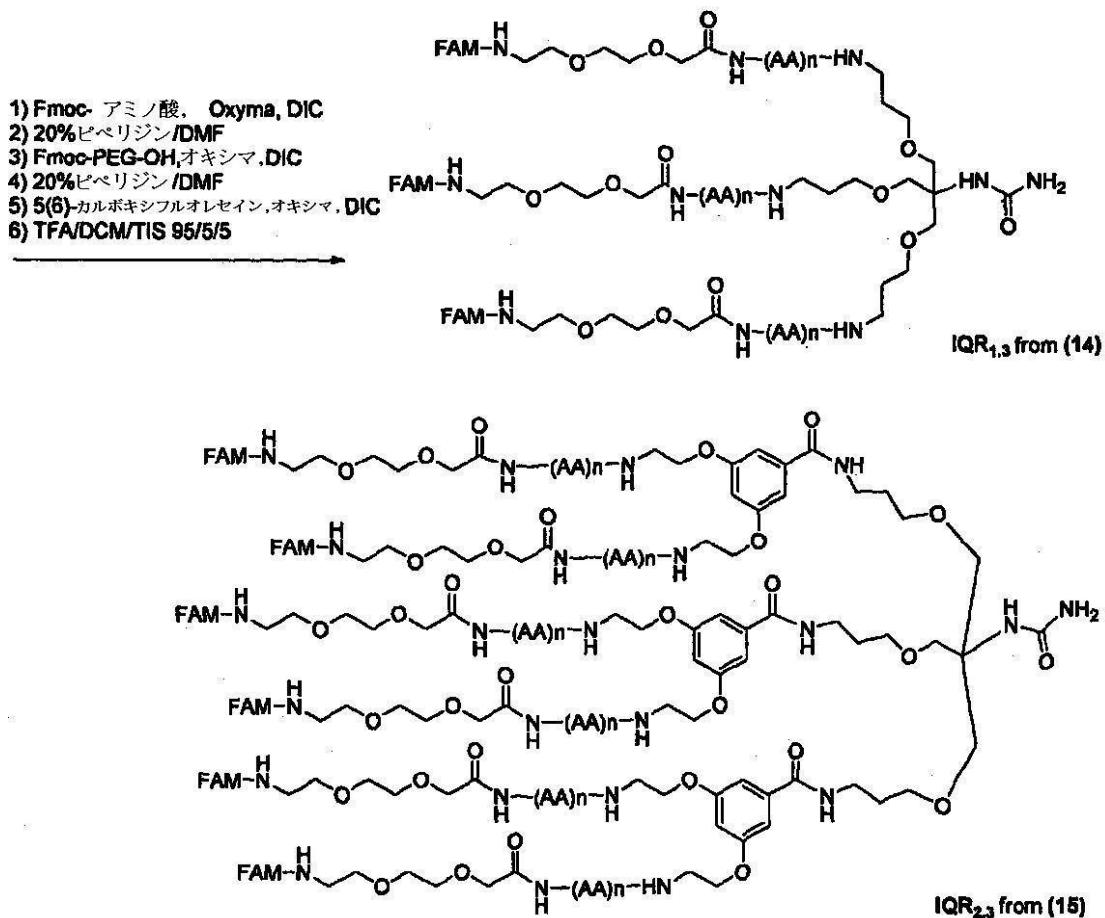
40

## 【 0 0 6 4 】

## ペプチドカップリング

D M F ( 1 M ) 中の適当な D - 又は L - F m o c アミノ酸 ( アミン当たり 3 当量 ) 及び H O B t 又はオキシマ ( アミン当たり 3 当量 ) の溶液を 1 0 分間攪拌した。D I C ( アミン当たり 3 当量 ) をその後加え、得られた溶液を更に 5 分間攪拌した。溶液をその後 D C M ( 1 0 m l ) 中で予め膨潤させた適当な樹脂 1 4 / 1 5 ( 1 当量 ) に加え、反応混合物を 1 ~ 3 時間振盪した。溶液を排出し、樹脂を D M F ( 3  $\times$  2 0 m l ) 、D C M ( 3  $\times$  2 0 m l ) 及び M e O H ( 3  $\times$  2 0 m l ) で洗浄した。カップリング反応を定量ニンヒドリン試験によりモニターした<sup>2 3</sup>。

## 【化20】



20

30

40

50

## 【0065】

## ペグ化

D M F ( 1 M ) 中の { 2 - [ 2 - ( F m o c - アミノ ) エトキシ ] エトキシ } 酢酸 ( アミン当たり 3 当量 ) 及びオキシマ ( アミン当たり 3 当量 ) の溶液を 10 分間攪拌した。 D I C ( アミン当たり 3 当量 ) をその後加え、得られた溶液を更に 5 分間攪拌した。溶液をその後 D C M ( 10 ml ) 中で予め膨潤させた適当な樹脂 14 / 15 ( 1 当量 ) に加え、反応混合物を 1 時間振盪した。溶液を排出し、樹脂を D M F ( 3 × 20 ml ) 、 D C M ( 3 × 20 ml ) 、 M e O H ( 3 × 20 ml ) で洗浄した。カップリング反応を定量ニンヒドリン試験によりモニターした<sup>2,3</sup>。

## 【0066】

T F A 開裂及びレポーター  $IQR_1 \sim IQR_3$  の精製

D C M ( 10 ml ) 中で予め膨潤させた適当な樹脂 ( 50 mg ) を T F A / D C M / T I S ( 95 / 5 / 5 、 500  $\mu$  l ) の開裂カクテルで 2 時間半処理した。溶液を排出し、樹脂を開裂カクテルで洗浄し、溶液を真空下で除去した。粗物質を最小限の量の開裂カクテル ( 300  $\mu$  l ) 中に溶解させ、氷冷エーテル ( 7.5 ml ) に加えた。沈殿した固体を遠心分離により回収し、デカンテーションにより溶媒を除去して、沈殿物を冷たいエーテル ( 3 × 5 ml ) で洗浄した。沈殿物をその後逆相分取 H P L C により精製し、必要な画分をプールし、凍結乾燥して、 $IQR_1 \sim IQR_3$  を得た；レポーター  $IQR_1$  : HPLC  $t_R = 4.3$  分、 E L S D による純度 > 98 % ; M A L D I : C<sub>77</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>

<sub>2 2</sub> : [M<sup>+</sup>] 計算値 1410.34, [M+2]<sup>+</sup> 実測値 1412.38; レポーター I Q R<sub>1.2</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 8.2 分、ELSD による純度 > 98%; レポーター I Q R<sub>1.3</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 2.67 分、ELSD による純度 > 98%; レポーター I Q R<sub>2</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 3.55 分; HRMS (ESI)<sup>+</sup> m/z : C<sub>173</sub>H<sub>135</sub>N<sub>11</sub>C<sub>49</sub> ([M+4H]/4)<sup>+</sup> 計算値 788.9692, 実測値 788.9799; IR (ニート) v (cm<sup>-1</sup>) : 1590.1, 1454.4, 1175.2, 1113.6, 852.6, 720.5; レポーター I Q R<sub>2.2</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 5.17 分、ELSD による純度 > 98%; レポーター I Q R<sub>2.3</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 3.66 分、ELSD による純度 > 98%; レポーター I Q R<sub>3</sub> : HPLC t<sub>R</sub> = 4.01 分; MALDI : [M+H]<sup>+</sup> 1741.36; HRMS (ESI)<sup>+</sup> m/z : C<sub>101</sub>H<sub>17</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub> ([M+3H]/3)<sup>+</sup> 計算値 581.2977, 実測値 581.3067; IR (neat) v (cm<sup>-1</sup>) : 1588.8, 1414.8, 1337.3, 1178.3, 1131.9, 683.5。 10

### 【0067】

#### 細胞単離及び培養

健康なボランティアからのヒト末梢血白血球を前述のように調製した<sup>2 5</sup>。簡潔には、クエン酸血を室温で 20 分間 350 g 遠心分離し、血小板に富んだ血漿を取り出した。2 mM の最終濃度まで CaCl<sub>2</sub> を加え、血小板に富んだ血漿の再石灰化により自家血清を調製した。白血球を 0.6% デキストラン T 500 (Pharmacia、英国ミルトンキーンズ) を用いるデキストラン沈殿により赤血球から分離し、白血球に富んだ上層をその後、等張 Percoll (Pharmacia) を用いて分画した。好中球及び单核白血球 (PBMC) を、それぞれ 68% / 81% 及び 55% / 68% 界面から回収した。いくつかの実験では、好中球を D-PBS (w/o Ca/Mg) 中の DiD (Invitrogen、分子プローブ) (2.5 μM) で、20 分間室温で標識した。 20

### 【0068】

PBMC 由来マクロファージは以下のように单核白血球から生成した (Rossi A G, McCutcheon JC, Roy N, Chilvers ER, Haslett C, Dansfield I. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. J Immunol. 1998 Apr 1; 160(7): 3562-8. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP)。单核白血球をポリ-d-リシンでコーティングしたカバースリップに 1 時間接着させた後、洗浄して非接着細胞を除去した。接着細胞は 10% 自家血清を含有する IMDM 中で 7 ~ 10 日間 in vitro で (DIV) 培養した。 30

### 【0069】

A549 細胞 (ATCC CCL-185) を、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気の、温度調節され (37°)、加湿された雰囲気中、10% (v/v) 热不活性化ウシ胎児血清 (FCS)、L-グルタミン (2 mM)、ストレプトマイシン (50 μg · ml<sup>-1</sup>) 及びペニシリソ (50 単位 · ml<sup>-1</sup>) が添加されたダルベッコ改变イーグル培地 (4.5 g · l<sup>-1</sup> グルコース) から構成される培地において 80 ~ 90% コンフルエンスで維持した。トリプシン / EDTA 曝露後に分離された急速に増殖する細胞 (2 × 10<sup>6</sup> 細胞) の懸濁液をその後カバースリップ又は 6 ウェルマイクロプレート上に播種し、コンフルエンスまで 24 ~ 48 時間増殖した。 40

### 【0070】

突発性肺線維症 (IPF) を有する患者から気管支肺胞洗浄 (BAL) を入手した。同意書はすべての被験者から得た。研究はロシアン研究倫理委員会より認可された。BAL は進行中の臨床研究実験の一部として行った。200 ml の生理食塩水を右中葉に滴下し、20 ml アリコートで洗浄した。試料を氷上に維持し、100 μl アリコートをカバースリット上にピペットで入れた後、詳述したようにすぐに染色し、POCmini (灌流

開閉) (P e C o n G m b H ) 培養室においてリアルタイム共焦点撮像を行った。

#### 【0071】

##### リアルタイム細胞撮像及び共焦点顕微鏡のための染色

直立型 A x i o s k o p F S 2 顕微鏡(対物 63 倍)を組み込むレーザー走査共焦点撮像システム( L S M 5 1 0 ; C a r l Z e i s s 、独国イエナ)を画像取得及び処理に用いた。光脱色及び毒性を最小化するため、488 nm 光への曝露を最大レーザー出力の 1 ~ 6 % に限定した。すべての例では、画像はカルマン平均なく、一般的には 3 . 2 μ s の画素滞留時間、1 エアリー単位に対応するピンホールの直径を得た。多重標識実験では、ピンホール直径を、最長励起波長の 1 エアリー単位に対応する同等深さの光 Z 断面をもたらすように調節した。すべてのリアルタイムのタイムラプス撮像を I M D M において行った。カバースリップを、30 に維持された、温度調節された環境ステージ( P O C M i n i )に移した<sup>26</sup>。薬剤を槽添加により加えた。フルオレセインが単独で検査された実験では、発光体は専用の 488 nm 線で励起し、発散光は N F T 5 4 5 フィルターから反射し、L P 5 0 5 フィルターを通過した。  
10

#### 【0072】

膜( D i D 、 I n v i t r o g e n )、又はデキストラン - 6 4 7 、及び I Q R プローブを含む多重標識実験では、画像を同時に得た。D i D 又はデキストラン - 6 4 7 は専用の 633 nm 線で励起し、発散光はメタ検出器( 650 ~ 705 nm )で検出した一方、フルオレセインは専用の 488 nm 線で励起し、発散光は N F T 5 4 5 フィルターから反射し、L P 5 0 5 フィルターを通過した。  
20

#### 【0073】

s y t o - 8 5 ( I n v i t r o g e n 、 2 . 5 μ m 、 3 0 分、 3 7 ) と組み合わせた I Q R プローブを用いる多重標識実験では、画像を連続的に取得した。フルオレセインは専用の 488 nm 線で励起し、発散光は N F T 5 4 5 フィルターから反射し、L P 5 0 5 フィルターを通過した一方、s y t o - 8 5 は専用の 543 nm 線で励起し、発散光はメタ検出器( 575 ~ 695 nm )で検出した。  
20

#### 【0074】

##### 細胞活性化の時間経過実験

好中球及び单核細胞(合計 6 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞)、又は P B M C 由来マクロファージを、10 μ g / ml のフィブロネクチン( S i g m a )で予めコーティングしたガラスカバースリップ上に播種した。細胞を接着させ、10 μ M (最終濃度) の I Q R 1 . 2 をウェルに加えた後、P O C m i n i に移し、環境室に入れた。リアルタイム撮像を 30 s 間隔で行った。ベースライン画像を 10 ~ 15 分間取得した後、A 2 1 3 8 7 ( 10 μ M 、 S i g m a ) を加え、リアルタイムのタイムラプス共焦点画像を更に 20 分間取得した。シベレスタット又はダイナソールが含まれる場合、細胞は撮像前に 10 分間予備処理した。  
30

#### 【0075】

##### A 5 4 9 上皮細胞 / 活性化好中球の終夜共培養

カバースリップ上の 6 ウェルプレート中でコンフルエンス( > 80 % )まで増殖された A 5 4 9 細胞を用い、上述したように培養した。カバースリップを P O C m i n i に移し、新しく単離された好中球を加えた( 0 . 6 ~ 1 . 2 × 1 0 <sup>6</sup> )。共培養物を 30 分間沈殿させ、P A F ( 血小板活性因子 )( 10 n M 、 S i g m a ) を 5 分間加えた後、f M L P ( f o r m y l - m e t - l e u - p h e )( 10 n M 、 S i g m a )( 1 . 8 mM アルミニウム ) を加えた。これらの実験には、I Q R は全体を通して 1 μ M で存在した。3 D 再構築のための Z スタック画像は終夜 15 時間、15 分毎に取得した。  
40

#### 【0076】

##### デコンボリューションのための画像

画像を正しいナイキストサンプリングレートで取得した。走査領域を最小まで低減し、より速い Z 断面当たりの走査時間を可能にした。画像を H y u g e n s E s s e n t i a l を用いてデコンボリューションした( 最大反復 1 0 0 0 回 )。

#### 【0077】

## マウス実験

リポ多糖（LPS）肺炎症を誘発するため、以前詳述した方法を用いた<sup>2 7</sup>。簡潔には、LPS（10 µg / マウス大腸菌LPS）を直接挿管により滴下され、好中球性肺胞炎を誘発した。24時間後、800 µlアリコートの氷冷PBSの、露出及び挿管されたマウスの気管への3回の投与でのマウスの安樂死後、BALを得た。

### 【0078】

#### 蛍光マイクロプレートリーダー実験

IQR4（0.5 µM）を、シベレスタット（50 µM）を含む、又は含まない、反応緩衝剤（50 mM Hepes緩衝剤、pH 7.4、0.75 M NaCl、0.05% Igepal CA-630（v/v））中のヒト好中球エラスター（HNE；11.3 µg / ml）でインキュベートした。蛍光脱消光の時間経過を、蛍光マイクロプレートリーダー（励起480 / 20、発光528 / 25）で30分間追った。蛍光増加はHNEの存在下でのみ見られ、これはシベレスタットの存在により阻害される。好中球ライセートを用いる実験のため、IQR4（0.5 µM）を、シベレスタット（50 µM）を含む、又は含まないIMDM中の冷凍・解凍好中球ライセート（10 × 10<sup>6</sup> 細胞 / ml）でインキュベートする。蛍光脱消光の時間経過を蛍光マイクロプレートリーダー（励起480 / 20、発光528 / 25）で30分間追った。

### 【0079】

#### In Vitro Cellvizio実験

ヒト好中球を上述のように単離し、活性剤を含む、又は含まないPBSに懸濁した。光ファイバー共焦点システム（488 Cellvizio）を用い、遊離FAM及びIQRの存在下、並びに細胞を培地において遊離FAM及びIQRから洗浄後の両方の、細胞のエッペンドルフ中の画像を取得した。撮像を60秒間行い、代表的な静止フレームをmpフォーマットに変換した。

### 【0080】

#### In Vivo Cellvizio実験

市販のヒツジを購入した。ヒツジは鎮静化され、挿管され、人工呼吸を受けた。細胞：好中球、活性化好中球及び活性単球を、3次気管支までの直接可視化（気管支鏡下）によって異なるヒツジサブセグメント中に滴下し（500万滴5ml）、その後マイクロカテーテルをワーキングチャンネル中に挿入し、細胞を可視化した。対照として、5mlのIQR2.2もサブセグメント中に滴下した。この後、マイクロカテーテルを取り外し、5分後5 µmの2mlの濃度のIQR2.2を指定サブセグメント中に滴下した。5分後、Alveoflex（光ファイバー束）にワーキングチャンネルを通過させることにより肺胞検査を行い、リアルタイム撮像は末梢肺胞検査の際に行った。画像は1秒当たり12フレームで撮像し、代表的なフレームはjpegフォーマットに変換した。

### 【0081】

#### Ex Vivo Cellvizio実験

Ex vivoヒツジ肺は人工呼吸を受け、ヒト血液（10%ヘマトクリット）で灌流した。この後、気管支鏡を用い、500 mcgの大腸菌LPSを右上セグメントに滴下した。対照としてPBSを左上セグメントに滴下した。6時間後、IQR1.2を各セグメントに滴下し（10 mcg）、プローブ型共焦点レーザーマイクロ内視鏡を用いてすぐに撮像した。

### 【0082】

#### IQR4の合成の実験

#### プローブIQR4の構造

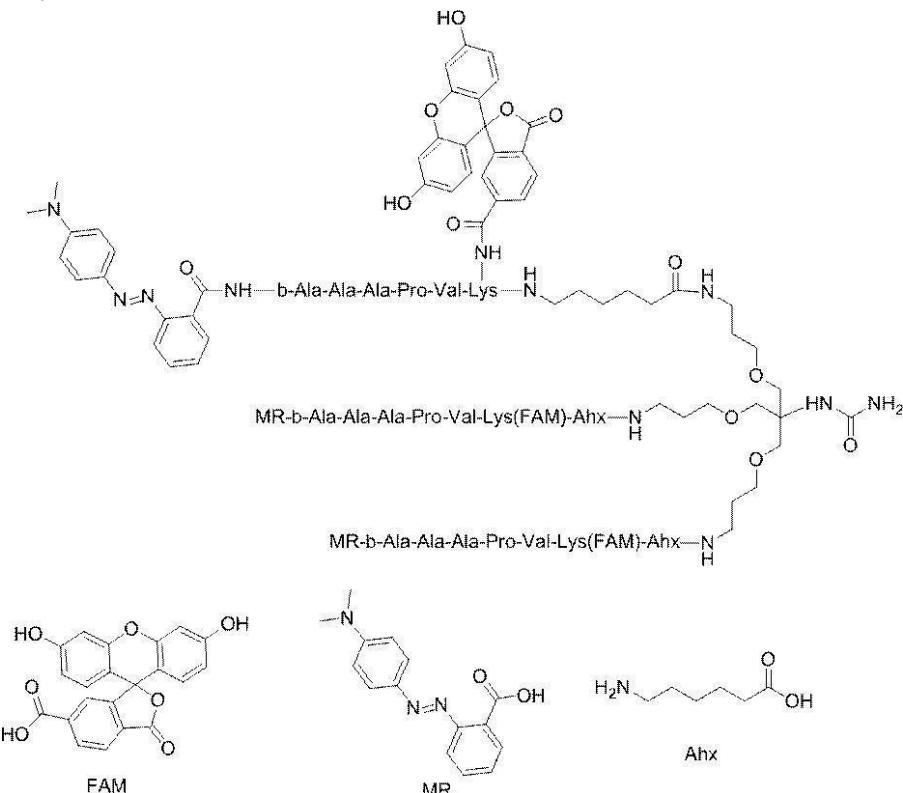
10

20

30

40

## 【化21】



化学式 : C<sub>215</sub>H<sub>264</sub>N<sub>38</sub>O<sub>46</sub>  
分子量 : 4116.62

## 【0083】

合成の概要 :

- 1 ) モノマーの調製、
- 2 ) F m o c - L y s ( D d e ) - O H の調製、
- 3 ) モノマーの P S 樹脂への結合、
- 4 ) 固相合成、
- 5 ) 樹脂からの開裂、
- 6 ) H P L C による精製。

## 【0084】

一般的な情報 :

すべてのアミノ酸、アミノメチルポリスチレン樹脂(1.23 mmol/g、100~200メッシュ、1%DVB)及びRinkアミドリンカーパーは、GL Biochem(Shanghai)Ltd及びNovaBiochemから購入した。5(6)-カルボキシフルオレセインはNovaBiochemから、及びオキシマはApollon Scientificから購入した。

## 【0085】

モノマー(6)の合成については前セクション(20ページ)に記載される。

## 【0086】

F m o c - L y s ( D d e ) - O H の合成

F m o c - L y s ( D d e ) - O H は3つのステップで調製される。

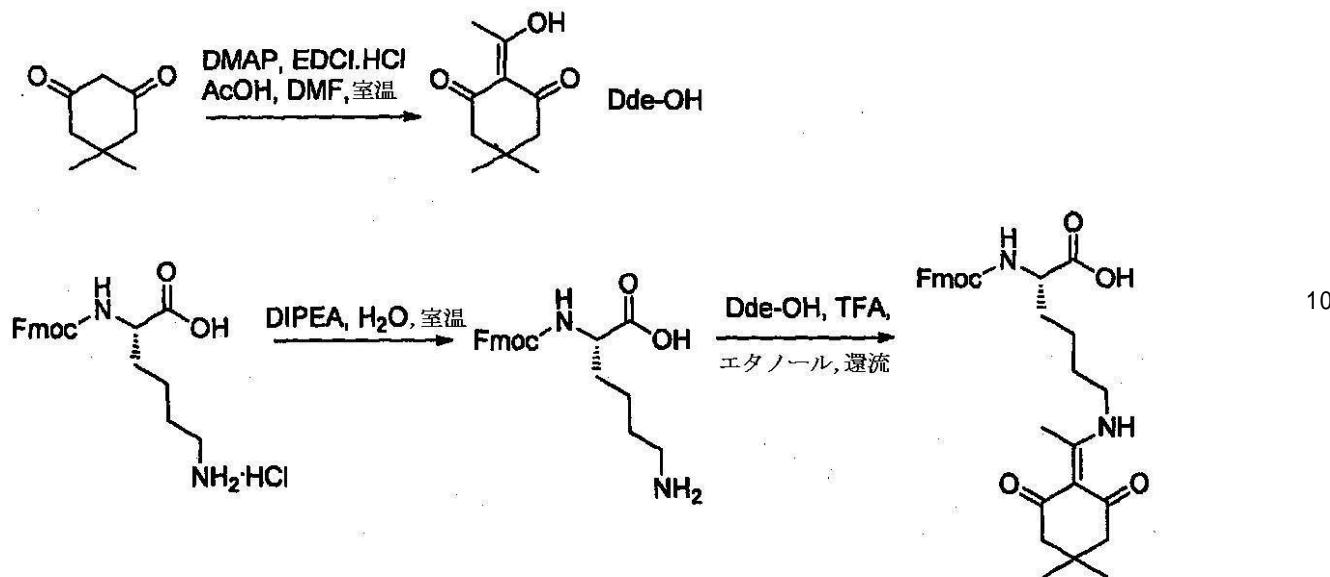
30

40

40

40

## 【化22】



スキーム1：Fmoc-Lys(Dde)-OHの合成

20

## 【0087】

## Dde-OHの合成：

ジメドン(21.2 g、151 mmol、1当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP、19.0 g、156 mmol、1.05当量)及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDCI.HCl、29.1 g、152 mmol、1.05当量)をDMF(145 mL)中に溶解した。酢酸(8.5 mL、148 mmol、1.05当量)を加え、反応物を終夜攪拌した。DMFを真空下で除去し、残渣をEtOAc(150 mL)中に溶解し、1M HCl(2×200 mL)及び水(2×200 mL)で洗浄した。有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮し、真空下で乾燥させ、黄色っぽい固体(22.4 g、83%)を得、これを更なる精製なく用いた。(参照: Org. Lett., 2008, 10(10), 2015)

30

## 【0088】

## Fmoc-Lys(Dde)-OHの合成：

Fmoc-Lys-OH.HCl(10.2 g、25.2 mmol)をH<sub>2</sub>O中に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA 1.1当量、4.8 mL、27.7 mmol)を加え、得られた固体は濾過により回収し、真空オーブンにおいて終夜乾燥させた。エタノール(250 mL)中のFmoc-Lys-OH(7.9 g、21.4 mmol、1当量)の攪拌懸濁液に、Dde-OH(7.8 g、42.8 mmol、2当量)及びTFA(160 μL、2.14 mmol、0.1当量)を加えた。反応物を60時間還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、溶媒を真空下で除去し、残渣をEtOAc(300 mL)中に溶解し、1M KHSO<sub>4</sub>(2×200 mL)及び1M HCl(2×200 mL)で洗浄した。有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。Fmoc-Lys(Dde)-OHをフラッシュカラムクロマトグラフィー(10%酢酸/酢酸エチルを有する溶出液)により分離し、酢酸エチル/ヘキサンからオフホワイトの固体(7.5 g、70%)として結晶化した。

40

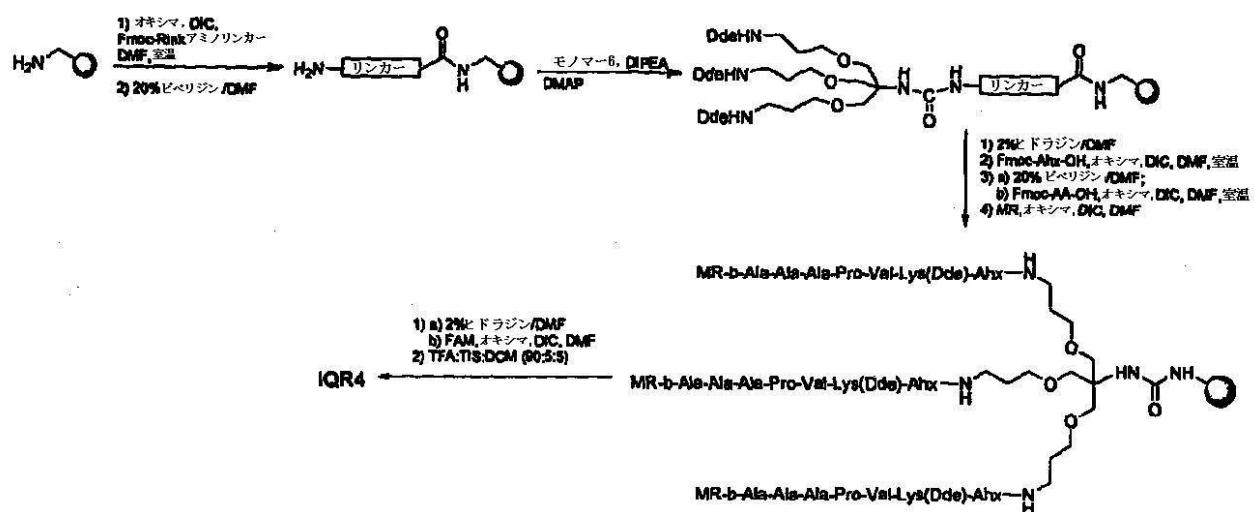
## 【0089】

## 固相ペプチド合成

固体支持体を用いるFmoc脱保護方法に基づくペプチドカップリング。

ペプチド配列：H-Ala-Ala-Ala-Pro-Val-Lys-

## 【化23】



## スキーム2：固相合成

## 【0090】

Fmoc-Rinkアミド-PS樹脂を、アミノメチルPS樹脂(1.23mmol/g、1%DVB、100~200メッシュ)に結合した4-[[(2,4-ジメトキシフェニル)-(Fmoc-アミノ)メチル]フェノキシ酢酸(Rinkアミドリンカー)を用いて調製した。よって、Fmoc-Rink-アミドリンカー(3当量)をDMF(0.1M)中に溶解し、オキシマ(3当量)を加え、混合物を10分間攪拌した。DIC(3eq)をその後加え、得られた混合物を更に5分間攪拌した。溶液をアミノメチルポリスチレン樹脂(1当量)に加え、2時間振盪した。得られた樹脂をDMF(3×10mL)、DCM(3×10mL)及びMeOH(3×10mL)で洗浄した。3分岐モノマーをDIPEA/DMAPに室温で終夜結合した(Tet. 2003, 59, 3945)。DMF溶液中の2%ヒドラジンを1時間半(2回)用い、Dde基を脱保護した。すべてのFmoc脱保護をDMF中20%ピペリジンで10分間行う。溶液をその後排出し、樹脂をDMF(3×10mL)、DCM(3×10mL)及びMeOH(3×10mL)で洗浄した。この手順を2回繰り返した。脱保護はカイザー試験(第1級アミン)及び第2級アミンについてクロラニル試験によりモニターした。

## 【0091】

## 固相結合：

DMF(0.1M)中の適当なFmoc-アミノ酸、メチルレッド(MR)又は5(6)-カルボキシフルオレセイン(FAM)(10当量)及びオキシマ(10当量)を10分間攪拌した。DIC(10当量)をその後加え、得られた溶液を更に5分間攪拌した。溶液をその後樹脂(1当量)に加え、DCM(10mL)中で予め膨潤させ、反応混合物を6時間振盪した。溶液を排出し、樹脂をDMF(3×20mL)、DCM(3×20mL)及びMeOH(3×20mL)で洗浄した。カップリング反応をカイザー及びクロラニル試験によりモニターした。FAMカップリング後、樹脂を20%ピペリジンで洗浄し、いずれかのフルオレセインフェノールエステルを除去した。プローブをその後TFA/TIS/DCM(90/5/5)のカクテルを用いて樹脂から3時間放出させた。濾液に冷たいエーテルを加え、生成物を沈殿させた。

## 【0092】

## プローブIQR4の精製

初期精製をエーテル沈殿により行った。冷たいエーテルを加え、遠心分離により回収した。洗浄を冷たいエーテルで4回繰り返した。プローブの精製を、Discovery

10

20

30

40

50

C 18 逆相カラム ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ ) を備えた RP - HPLC (HP 110) システムにより、 $1 \text{ mL}/\text{分}$  の流速で、25分にわたり 5~95% の勾配の  $\text{H}_2\text{O}$  中の 0.1%  $\text{HCOOH}$  (A) 及び  $\text{CH}_3\text{CN}$  中の 0.1%  $\text{HCOOH}$  (B) で、初期の均一濃度時間を2分として溶出することにより行った ( $t_r = 21.2 \text{ 分}$ )。プローブの分析は、Discovery C 18 逆相カラム ( $50 \times 4.6 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ ) を備えた RP - HPLC (HP 1260) システムにより、 $1 \text{ mL}/\text{分}$  の流速で、13分にわたり 5~95% の勾配の  $\text{H}_2\text{O}$  中 0.1%  $\text{HCOOH}$  (A) 及び  $\text{CH}_3\text{CN}$  中 0.1%  $\text{HCOOH}$  (B) で、初期の均一濃度時間を2分として溶出することにより行った ( $t_r = 9.4 \text{ 分}$ )。

## 【0093】

10

**結果**

液相発光体はベンチトップ共焦点内視鏡を用いる活性化好中球における細胞特異的な吸収 / 取り込みの検出を可能にする

まず、我々は静止及び活性化ヒト好中球を多数の発光体に曝露し、ヒト好中球における活性化依存性の発光体吸収を示した。活性化好中球又は透過処理好中球のみが点状に染料と結合した。好中球を発光体(図1)の存在下で連続的に撮像した。発光体の活性吸収はダイナミン阻害剤(図1)の存在により阻害され、このプロセスがダイナミン依存性であったことを示した。重要なことに、単球及びリンパ球は染料を吸収しなかった。

## 【0094】

20

IQRはヒトマクロファージのような他の高いピノサイトーシス / エンドサイトーシスを有する細胞と比較してとくに好中球において脱消光する

好中球及びマクロファージのような細胞において高レベルのエンドサイトーシスを示したので、我々は IQR 1 をマクロファージに用いたが、IQR 1 の脱消光又は蛍光増幅は示さなかった。これは好中球に密接に関連した細胞が高いエンドサイトーシス率を有するにもかかわらず脱消光を全く示さないことを示す(図14)。

## 【0095】

内部消光デンドリマーレポーターは信号雑音比の向上及びベンチトップ共焦点内視鏡上の吸収 / 取り込みの検出を可能にする

これらの染料による好中球特異的染色を示した後、我々は好中球活性化の光検出のプロファイルを最適化し、高い信号雑音比を可能にすることを望んでいた。その際、我々及び(より最近では)他者は多価蛍光ペプチドデンドリマーが内部蛍光消光の現象を示すことを示した<sup>1-8</sup>、<sup>2-8</sup>。デンドリマーは従来の線状ポリマーと比較して独特な分子構造及び寸法を有し、単分散であり、合成しやすく、それらのサイズは正確に制御することができる<sup>1-5</sup>。更にそれらの生体適合性、低毒性、及び細胞内コンパートメントにアクセスすることができるという重要な能力<sup>2-9</sup>、<sup>3-0</sup>は、蛍光体消光を可能にするための足場として、及びよって、それらの消光は本質的に炎症環境における高度な信号雑音識別を可能にすることができるので、好中球活性の潜在的な「スマートな」可視化可能センサーとしてのこれらの使用を支持する。典型的な発光体としてカルボキシフルオレセイン(FAM)又はローダミン(TAMRA)を用い、我々は染料をデンドリマー内部消光レポーター(IQR)として空間的に配向させることにより、高い信号雑音比を有する好中球活性化プローブが生成されるだろうと仮定した。概念的に、これらのプローブの炎症環境への送達は十分な細胞周囲消光を可能にし、活性化依存性の染料蓄積が起きた個別の細胞を容易に可視化する。従って、モノマー発光体とともに我々は、それぞれ IQR 1 及び IQR 2 と称される、3つ及び6つの分岐を有するデンドリマーを合成した(図2)。FAM デンドリマーが in vitro でより明るい信号を示したので、及びこの実験において用いられた光ファイバー共焦点装置がこの波長に合ったので、他の化合物を開発するのにローダミンではなく FAM デンドリマーを選択した。初期の実験は、これらの構造が好中球吸収/取り込み(蛍光共役デキストランとの共存により確認)の検出を可能にしたことを示した(図3)。またこれらの構造は吸収/取り込みの細胞特異的な検出を可能にした(図3)。

30

40

50

## 【0096】

可溶性を向上したFRET IQRではなくデンドリマーIQRが細胞特異的な検出を可能にする

これらの光レポーターのヒトの肺への最終的な送達のため、それらは上述のプローブと比較して向上した可溶性を必要とする。よってこれらのIQRの向上した可溶性を、少量のペプチドをデンドリマー骨格(IQR1.2及びIQR2.2)内に組み入れる、又はプローブ(IQR1.3及びIQR2.3)をペグ化することにより達成した(図4)。上のように、これらをまず炎症環境から一般的に得られる他の細胞; 単球、マクロファージ、リンパ球、及び上皮細胞に対する選択性についてin vitroで評価した。また、我々はリアルタイム共焦点撮像を用いてプローブの細胞特異性を確認した(図5)。これを、IPFを有する患者のBALから新しく単離された細胞で行った。BAL分析は混合炎症性浸潤物を示したが、同様に、刺激の前後両方で好中球のみがデンドリマー プローブ足場を活性化した(図6)。好中球及び上皮細胞の共培養は、24時間の上皮細胞のIQRへの曝露にもかからず、上皮細胞上でプローブ活性化は起らなかったことを示した(図7)。加えて驚くべきことに、この活性化依存性標識は種特異的だった(図8)。

## 【0097】

重要なことに、IQRを生成するための代替の構造的方法を用い、FRETプローブは細胞吸収の直接的な可視化を可能にしなかったが、これについては説明されないままである(図9参照)。よって、これらのデンドリマーIQRは、向上した信号雑音比を提供する、新しく単離された生物学的試料における好中球活性化状態を直接評価するための最適化された手段を提供する。

## 【0098】

実験をその後行い、モノマー染料を用いて行われるようなリアルタイムのタイムラプス共焦点顕微鏡を用い、可溶性デンドリマーレポーターを有する細胞における動的活性化を確認した。新しく単離されたヒト好中球を、刺激前及び直後に連続的に撮像し(図10)、細胞関連蛍光の目覚ましい急速な増加を示した(図10b)。正確な蛍光細胞位置を割り出すため、リアルタイム高解像度マルチスタッカ画像を好中球の刺激後に取得した。これらは細胞内活性化とともに顕著な膜周囲活性を示した(図10c)。これはピノサイトシスによる吸収を確認する蛍光デキストランと共に存し、またダイナミン依存性だった。

## 【0099】

我々は非デンドリマーFAMを本発明の分岐デンドリマーと比較した。デンドリマーの分岐数が増加すると、予想通り消光が増加し、得ることができる信号雑音比の増加をもたらした。

## 【0100】

好中球におけるIQR蛍光增幅はエンドサイトシス及び脱顆粒の組み合わせに依存する

我々は、ラトランクリン(アクチン細胞骨格阻害剤)を用いる実験を行い、蛍光の増幅の増加を示した。これらは、IQR好中球特異的信号が細胞活性化のプロセス中にアクチン細胞骨格再構築により影響を及ぼされ得ることを示した。我々は、脱消光はエンドサイトシス及び脱顆粒の組み合わせによるものであると考える。このようなものとして、我々は好中球顆粒の重要な成分をIQRに対して試験した。ミエロペルオキシダーゼ阻害剤、反応性酸素種では差は見られなかった。引き出された結論は、本発明のプローブが脱顆粒及びまたエンドサイトシスの両方を必要とするということだった。

## 【0101】

可溶化デンドリマーIQRはin vitro又はin vivo毒性を示さない

これらのプローブの直接送達をヒト臨床使用に適用するための基本は、毒性、とくに直接肺中に送達される場合肺毒性を示さないという要件だった。我々が用いた細胞のいずれにおいても細胞毒性は見られなかった(図11)。また、マウスへの1kg当たり数ミリグラムのプローブの気管内直接投与後、肺炎症反応は起らなかった(図11)。

## 【0102】

光ファイバー共焦点内視鏡を用いるin vitro及びin vivo実験は活性化好

10

20

30

40

50

### 中球を検出するためにプローブを用いる潜在的な有用性を確認する

将来ヒトの肺内及びとくに肺胞腔中深くの活性化好中球を検出するための方法を開発するため、我々がサイズの近いモデルを使用することは重要だった。その際、ヒツジ肺は活性化ヒト好中球の時空間的な可視化を評価するためのポテンシャルモデル<sup>3 1</sup>システムを提供した。我々はファイバー共焦点マイクロ内視鏡を用いる方法を用いた。これはヒト及び動物の両方における肺胞レベルでの細胞解像を可能にする。初期の分析は C e l l v i z i o ファイバーを用いてエッペンドルフ中で行った。これは優れた信号雑音比を有する 6 分岐 I Q R 2 . 3 の優れた消光を明確に示した（図 12）。とくにピノサイトシスを撮像するのに以前用いられていた単一の遊離染料は光ファイバー共焦点内視鏡でのこうした可視化を可能にしない（図 12）。その後、ヒト好中球をマイクロカテーテルによりヒツジ肺の定義されたサブセグメントに送達した。その後、微小量の I Q R を同セグメントに滴下した（44 μg）。C e l l v i z i o 4 8 8 での共焦点マイクロ内視鏡撮像を対照セグメント（活性化単球、静止好中球及びプローブ単独を予め送達）において行い、活性化好中球を受容したセグメントにおける撮像と比較した（図 13）。活性化好中球を受容したセグメントのみが蛍光細胞を明確に示した（図 13）。

#### 【 0 1 0 3 】

更なる実験（図 15）を行い、用いられた活性化ヒト好中球を撮像した。この実験では、e x v i v o ヒツジ肺は人工呼吸を受け、ヒト血液で灌流した。この後、肺のサブセグメントはリポ多糖を受容し、ヒト好中球の使用を誘発した。10 μg の I Q R 1 . 2 を対照セグメント及び L P S 滴下セグメント中に送達した。L P S セグメントのみがプローブ型共焦点マイクロ内視鏡を用いて撮像された信号向上を示した。この実験は用いられた活性化好中球を I Q R により検出することを結論的に示した。

#### 【 0 1 0 4 】

プローブ送達の方法及びタイミングはこのアプローチには重要である。微小量のみが必要であり（< 1 0 0 μg）、検出のタイミングは数分以内である。示差好中球ピノトーシスを撮像するため、撮像の遅延により数時間以内に他の細胞によるピノトーシス吸収が起こり得るので、撮像をすぐに行うことが重要である。微小量の直接送達にはいずれの毒性問題もなく、末梢肺中への直接滴下は共焦点マイクロ内視鏡には最適であり、分子解像を可能にする。i n v i v o 概念の証拠が示される。

#### 【 0 1 0 5 】

要約すると、好中球活性を直接的に可視化可能なレポーターは、とくに急性肺傷害のような好中球優位条件の環境における、潜在的な診断手段を提供する。臨床方法の開発は、非炎症性原因による胸部 X 線浸潤物を有する患者対無菌又は感染性肺傷害を有する患者の層別化を補助することができる。小濃度の分子プローブの送達と組み合わせた共焦点レーザーマイクロ内視鏡は、肺内深くの可視化を可能にし、ヒトにおけるこうしたプローブの送達及び撮像のための検出プラットフォームを提供する。

#### 【 0 1 0 6 】

F R E T 系エラスターゼレポーターを含むデンドリマー I Q R を生成し、組換え H N E 及び好中球ライセートにより脱消光されることを示したが、この効果は特定のエラスターゼ阻害剤シベレスタットにより阻害された（図 16）。更に、リアルタイム共焦点撮像実験では、この F R E T - デンドリマー I Q R 構築物は、蛍光細胞関連信号をシベレスタットが阻害することができたので、好中球に対するエラスターゼ活性を報告した（図 17）。エラスターゼ活性は暗消光剤部分を発光体 / デンドリマー足場から開裂するので、好中球のエラスターゼ依存性標識は、エラスターゼレポーターペプチド配列の細胞内又は細胞外開裂及びその後の開裂プローブの吸収 / 取り込み後、非 F R E T デンドリマー I Q R により示される脱颗粒依存性信号により起こると考えられる。

#### 【 0 1 0 7 】

#### 参考文献

<sup>1</sup> B a l a m a y o o r a n G , B a t r a S , F e s s l e r M B , H a p p e l K I , J e y a s e e l a n S . , A m J R e s p i r C e l l M o l

Biol. 2010, 43, 5.

<sup>2</sup> Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorrindo A, D'Alessio FR, Kubo K., Intern Med., 2009, 48, 621.

<sup>3</sup> Conway MA, Kefala K, Wilkinson TS, Dhaliwal K, Farrell L, Walsh T, Mackenzie SJ, Reid H, Davidson DJ, Haslett C, Rossi AG, Sallenave JM, Simpson AJ, Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180, 19.

<sup>4</sup> Pentz S, Horler H, J Microsc, 1992, 167, 97. 10

<sup>5</sup> Simpson AJ, Wallace WA, Marsden ME, Govan JR, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM, J Immunol, 2001, 167, 1778. Simpson AJ, Wallace WA, Marsden ME, Govan JR, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM, J Immunol, 2001, 167, 1778.

<sup>6</sup> den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL., Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2010, 299, 1283.

<sup>7</sup> Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A., Liver Transpl., 2010, 16, 1016. 20

<sup>8</sup> Downey DG, Bell SC, Elborn JS. Thorax., 2009, 64, 81.

<sup>9</sup> Demkow U, van Overveld FJ, Eur J Med Res., 2010, 15, 27.

<sup>10</sup> Chen DL, Schuster DP, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2004, 286, 834.

<sup>11</sup> Thiberville L, Salaun M, Lachkar S, Dominique S, Moreno-Swirc S, Vever-Bizet C, Bourg-Heckly G, Proc Am Thorac Soc., 2009, 6, 444 30

<sup>12</sup> Thiberville L, Salaun M, Lachkar S, Dominique S, Moreno-Swirc S, Vever-Bizet C, Bourg-Heckly G, Eur Respir J., 2009, 33, 974.

<sup>13</sup> <http://las.perkinelmer.com/Catalog/ProductinfoPage.htm?ProductID=NEV11169>.

<sup>14</sup> Astruc D, Boisselier E, Ornelas C, Chem. Rev., 2010, 110, 1857.

<sup>15</sup> Biricova V, Laznickova A, Bioorg. Chem., 2009, 37, 185. 40

<sup>16</sup> Cummins WJ, Hamilton A, Bradley M, Ellard J, Zollitsch T, Briggs MSJ, 2003 Feb 20, WO/2003/014743.

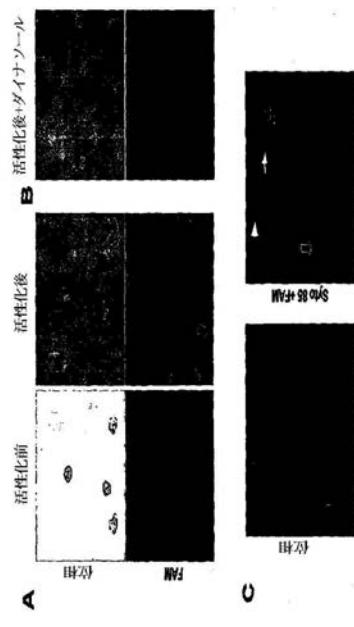
<sup>17</sup> Thiberville L, Moreno-Swirc S, Vercauteren T, Peltier E, Cave C, Bourg Heckly G. Am J Respir Crit Care Med., 2007, 175, 22.

<sup>18</sup> Ellard JM, Zollitsch T, Cummins WJ, Hamilton AL, Bradley M, Angew. Chem. Int. Ed Engl., 2002, 41, 3233.

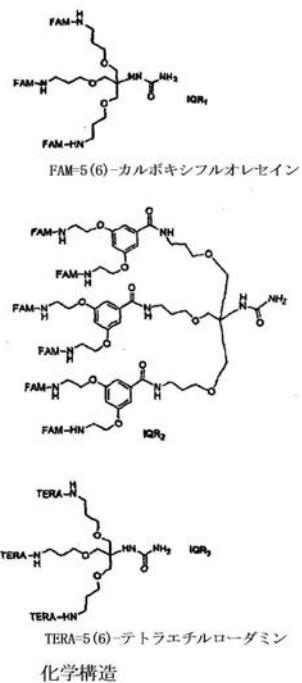
<sup>19</sup> Lebreton S, How SE, Buchholz M, Yingyongn 50

- a r o n g k u l   B E , B r a d l e y   M , T e t r a h e d r o n , 2 0 0 3 , 5  
9 , 3 9 4 5 .
- <sup>2</sup> <sup>0</sup> K n o l k e r   H J , B r a x m e i e r   T , S c h l e c h t i n g e n   G  
, A n g e w . C h e m . I n t . E d . , 1 9 9 5 , 3 4 , 2 4 9 7 .
- <sup>2</sup> <sup>1</sup> O . D e m m e r , I . D i j k g r a a f , M . S c h o t t e l i u s , H . J  
. W e s t e r , H . K e s s l e r , O r g   L e t . , 2 0 0 8 , 1 0 , 2 0 1 5 .
- <sup>2</sup> <sup>2</sup> B r o u w e r   A J , M u l d e r s   S J E , L i s k a m p   R M J , E u r  
. J . O r g . C h e m . 2 0 0 1 , 1 9 0 3 .
- <sup>2</sup> <sup>3</sup> K a i s e r   E , C o l e s c o t t   R L , B o s s i n g e r   C D , C o o  
k   P I , A n a l y t i c a l   B i o c h e m i s t r y , 1 9 7 0 , 3 4 , 5 9 5   10  
.
- <sup>2</sup> <sup>4</sup> F i s c h e r   R , M a d e r   O , J u n g   G , B r o c k   R , B i o c o  
n j u g a t e   C h e m . 2 0 0 3 , 1 4 , 6 5 3 .
- <sup>2</sup> <sup>5</sup> C h u a   F , L a u r e n t   G J , P r o c . A m   T h o r a c . S o c . 2  
0 0 6 , 3 , 4 2 4 .
- <sup>2</sup> <sup>6</sup> D o n n e l l y   S C , M a c G r e g o r   I , Z a m a n i   A , G o r d o  
n   M W , R o b e r t s o n   C E , S t e e d m a n   D J , L i t t l e   K , H  
a s l e t t   C , A m   J   R e s p i r . C r i t   C a r e   M e d . 1 9 9 5 ,  
1 5 1 , 1 4 2 8 .
- <sup>2</sup> <sup>7</sup> S h a p i r o   S D , A m   J   R e s p i r . C e l l   M o l   B i o l . 2  
0 0 2 , 2 6 , 2 6 6 .
- <sup>2</sup> <sup>8</sup> G a l a n d e   A K , H i l d e r b r a n d   S A , W e i s s l e d e r   R  
, T u n g   C H , J   M e d . C h e m . 2 0 0 6 , 4 9 , 4 7 1 5 .
- <sup>2</sup> <sup>9</sup> A l b e r t a z z i   L , S e r r e s i   M , A l b a n e s e   A , B e l t  
r a m   F , M o l   P h a r m . 2 0 1 0 , 7 , 6 8 0 .
- <sup>3</sup> <sup>0</sup> N a j l a h   M . & D ' E m a n u e l e   A , C u r r . O p i n . P h a r m  
a c o l . 2 0 0 6 , 6 , 5 2 2 .
- <sup>3</sup> <sup>1</sup> C o l l i e   D D , M a c A l d o w i e   C N , P e m b e r t o n   A D , W  
o o d a l l   C J , M c L e a n   N , H o d g s o n   C , K e n n e d y   M W ,  
M i l l e r   H R , C l i n   E x p   A l l e r g y . 2 0 0 1 , 3 1 , 1 6 3 6 .   30

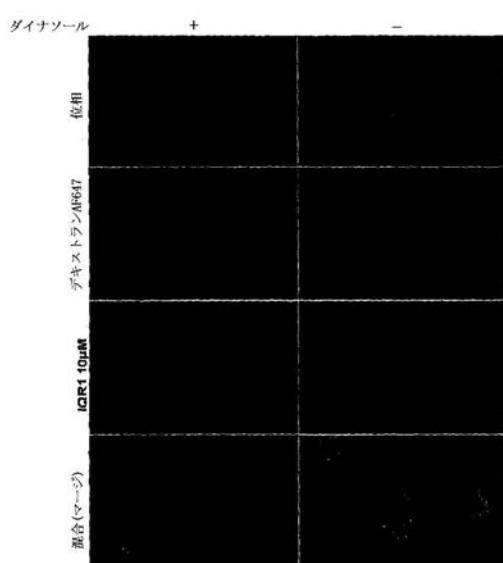
【 図 1 】



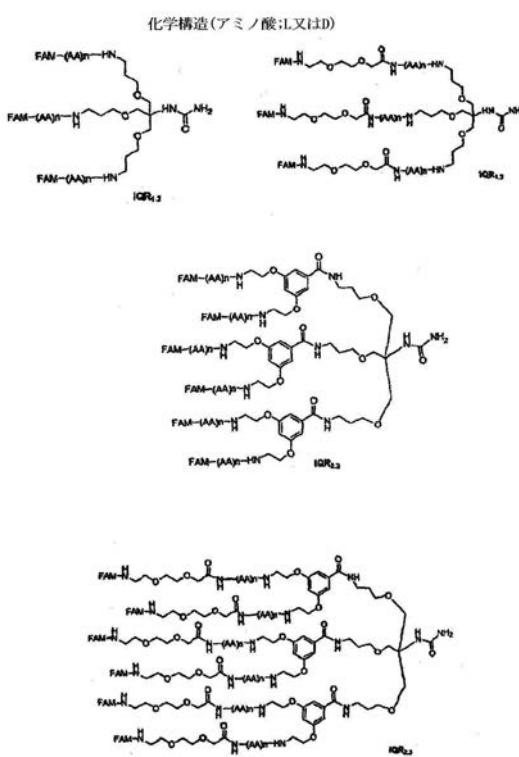
【 図 2 】



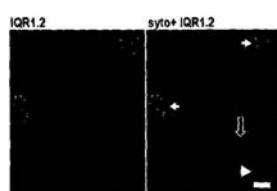
【 図 3 】



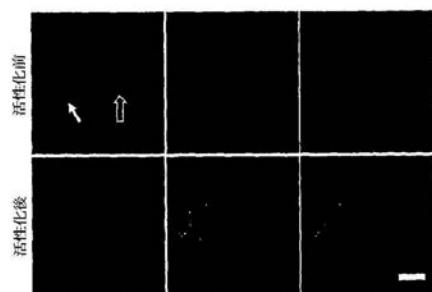
〔 四 4 〕



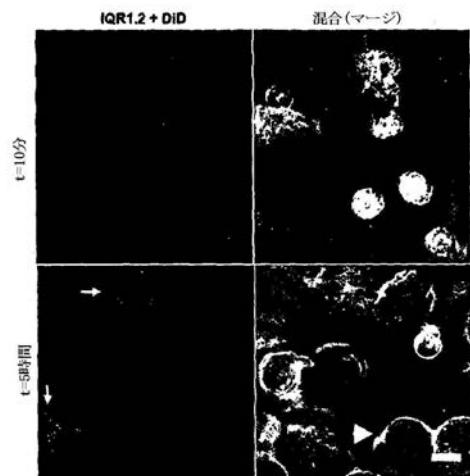
【図5】



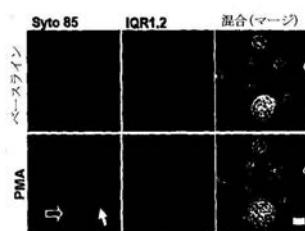
【図6】



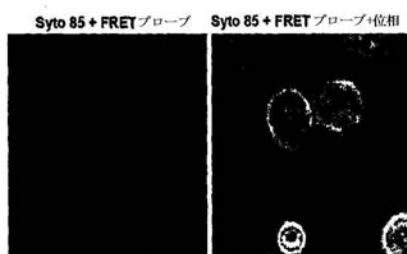
【図7】



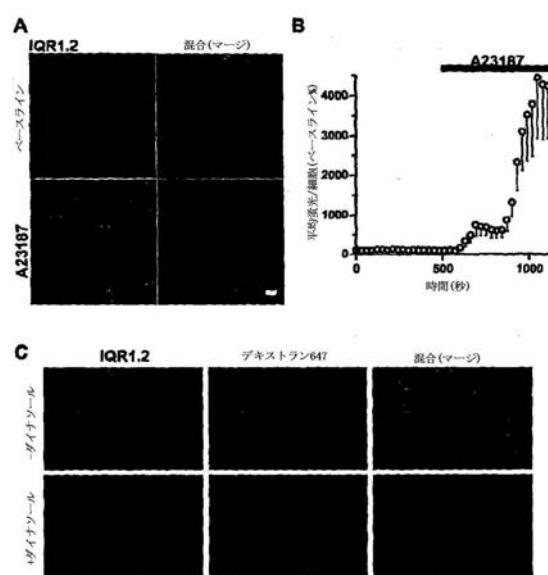
【図8】



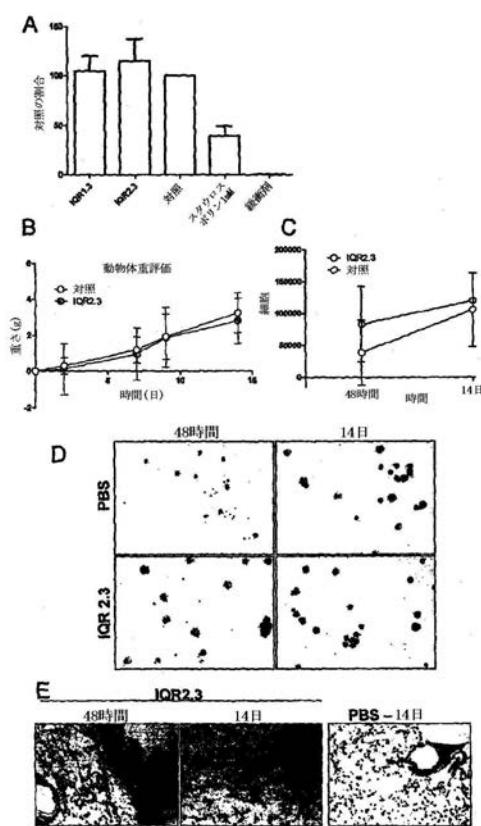
【図9】



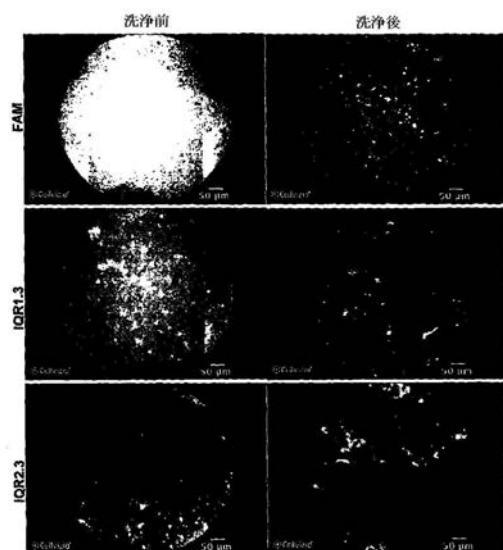
【図10】



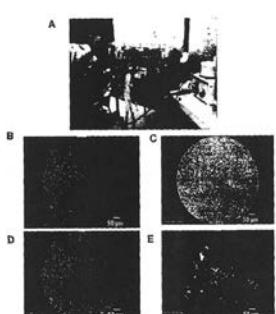
【図11】



【図12】



【図13】



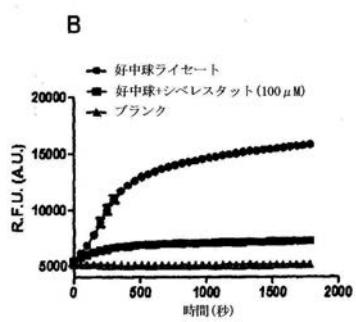
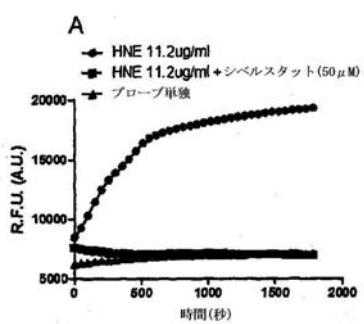
【図14】



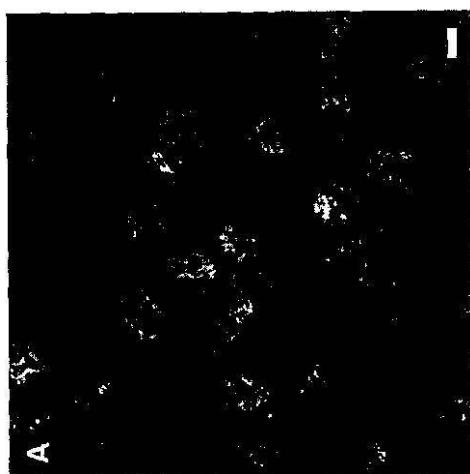
【図 15】



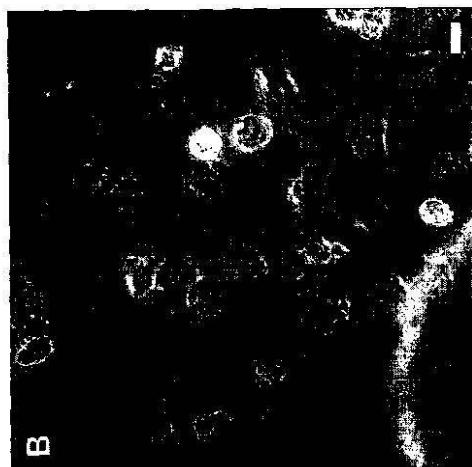
【図 16】



【図 17 a】



【図 17 b】



## 【手続補正書】

【提出日】平成30年10月5日(2018.10.5)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

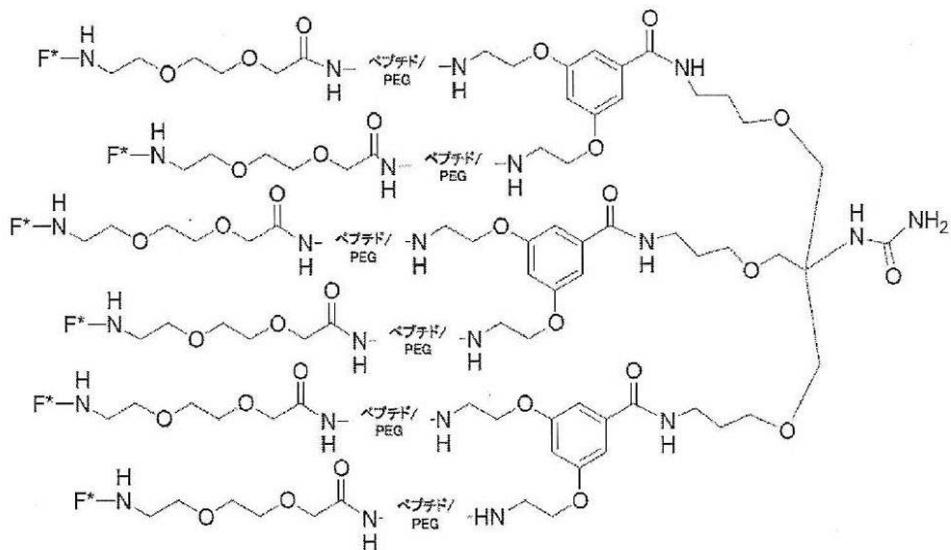
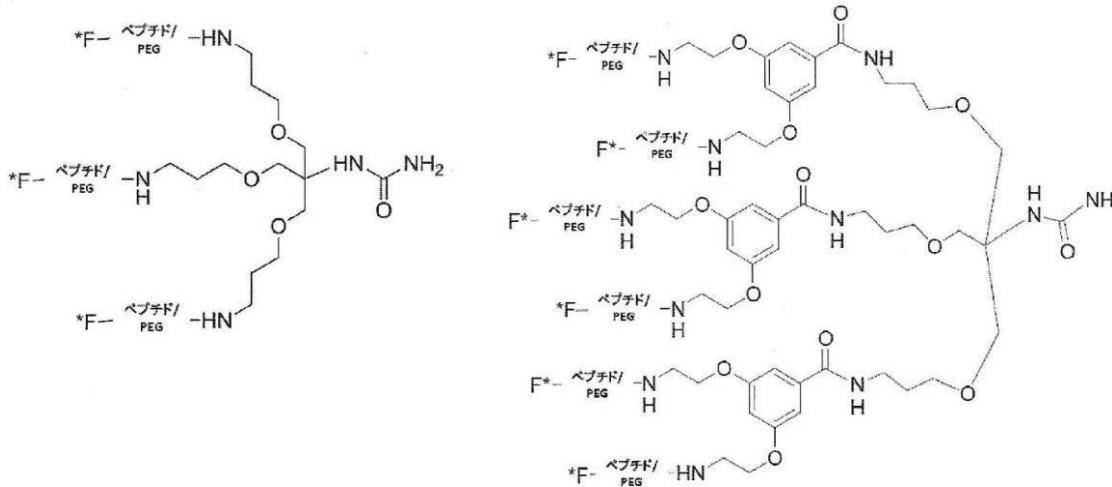
## 【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

in vivoで被験者の細胞を可視化する方法に用いる染料構築物であって、前記染料構築物が以下の一般化構造のいずれかを有する多分岐分子であり、

## 【化1】



式中、ペプチド / P E G はペプチド及び / 又は P E G を表し、前記ペプチドが A - A - P - V 、 A - A - A - P - V - K 、又は E - E - I - N l e - R - R であり、 \* F が独立して F A M 、ローダミン、シアニン染料又は B O D I P Y 染料であり、

前記染料構築物を取り込んだ 1 つ又は複数の細胞が、蛍光の 1 . 2 倍以上大きい増加を示す、染料構築物。

## 【請求項2】

前記構築物が局所的に投与され、蛍光が腸；動脈及び静脈；呼吸系；脳；又は子宮及び

卵管を含む生殖系において行われる、請求項 1 に記載の構築物。

**【請求項 3】**

肺において行われる、請求項 2 に記載の構築物。

**【請求項 4】**

活性化好中球を検出することに用いる、請求項 3 に記載の構築物。

**【請求項 5】**

前記染料構築物がイメージされる組織の領域に局所投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の構築物。

**【請求項 6】**

前記染料構築物を取り込んだ細胞の検出が、前記染料構築物が被験者に投与されてから 1 ~ 30 分以内に行われる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の構築物。

**【請求項 7】**

検出される前記 1 つ又は複数の細胞が活性化好中球である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の構築物。

**【請求項 8】**

被験者に投与される前記構築物の量が 100 µg 未満である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の構築物。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の構築物を含む、投与装置。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	C 0 9 B    69/10	A
	C 0 7 K    7/00	

- (72)発明者 タシュフェン ワルトン  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ9 3ジェージェー ウエスト マインズ ロード ジョセフ ブラック ビルディング ユニバーシティ オブ エジンバラ スクール オブ ケミストリー
- (72)発明者 マーク ブラッドリー  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ9 3ジェージェー ウエスト マインズ ロード ジョセフ ブラック ビルディング ユニバーシティ オブ エジンバラ スクール オブ ケミストリー
- (72)発明者 ケブ ダリワル  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ16 7ティージェー リトル フランス クレッシェント 47 ユニバーシティ オブ エジンバラ エムアールシー センター オブ インフォメーション リサーチ
- (72)発明者 ニコラス アヴィロニティス  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ16 7ティージェー リトル フランス クレッシェント 47 ユニバーシティ オブ エジンバラ エムアールシー センター オブ インフラメーション リサーチ
- (72)発明者 ク里斯 ハスレット  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ16 7ティージェー リトル フランス クレッシェント 47 ユニバーシティ オブ エジンバラ エムアールシー センター オブ インフラメーション リサーチ
- (72)発明者 ネイル マクドナルド  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ16 7ティージェー リトル フランス クレッシェント 47 ユニバーシティ オブ エジンバラ エムアールシー センター オブ インフラメーション リサーチ
- (72)発明者 マニュエル デブネ  
イギリス国 エジンバラ イーエイチ16 7ティージェー リトル フランス クレッシェント 47 ユニバーシティ オブ エジンバラ エムアールシー センター オブ インフラメーション リサーチ
- F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA06 EA01 FA01 FA06 JA03 KA02 KA09 LA03  
MA01  
4B063 QA19 QQ08 QR56 QS36 QX02  
4C085 HH11 KA27 KB46 KB49 KB74 KB82 LL01 LL05 LL09 LL12  
LL20  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA14 BA15 BA51 BA70 EA50

【外國語明細書】

2019014727000001.pdf