

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-534712

(P2010-534712A)

(43) 公表日 平成22年11月11日(2010.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64 F	4 C 0 6 1
A 6 1 B 1/00 (2006.01)	A 6 1 B 1/00 3 0 0 D	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2010-518652 (P2010-518652)	(71) 出願人	305040710 ジーイー・ヘルスケア・リミテッド イギリス国エイチピー7・9エヌエイ、バ ッキンガムシャー、リトル・チャルフォン ト、アメルシャム・ブレイス
(86) (22) 出願日	平成20年7月29日 (2008. 7. 29)	(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 聡志
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月19日 (2010. 3. 19)	(74) 代理人	100105588 弁理士 小倉 博
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/059942	(74) 代理人	100129779 弁理士 黒川 俊久
(87) 国際公開番号	W02009/016181		
(87) 国際公開日	平成21年2月5日 (2009. 2. 5)		
(31) 優先権主張番号	PCT/GB2007/002907		
(32) 優先日	平成19年7月31日 (2007. 7. 31)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0718957. 4		
(32) 優先日	平成19年9月28日 (2007. 9. 28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/976, 817		
(32) 優先日	平成19年10月2日 (2007. 10. 2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学イメージング剤

(57) 【要約】

本発明は、ベンゾピリリウム色素とペプチドのような生物学的標的化部分とのコンジュゲートを含んでなる、インビボ光学イメージングのために適したイメージング剤に関する。また、医薬品組成物及びキット並びにインビボイメージング方法も開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類の身体のインビボ光学イメージングのために適したイメージング剤を生体適合性キャリアーと共に含んでなる、哺乳類への投与に適した形態の医薬品組成物であって、前記イメージング剤が下記式 I のコンジュゲートを含んでいる医薬品組成物。



(I)

(式中、

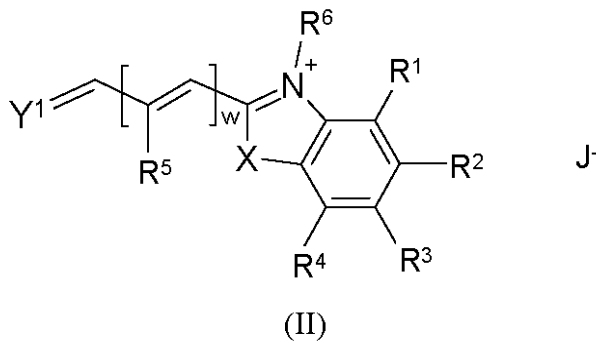
B T M は生物学的標的化部分であり、

n は 0 又は 1 の値を有する整数であり、

L は式 $-(A)_m-$ (式中、m は 1 ~ 20 の値を有する整数であり、各 A は独立に $-C R_2-$ 、 $-C R = C R -$ 、 $-C - C -$ 、 $-C R_2 C O_2 -$ 、 $-C O_2 C R_2 -$ 、 $-N R C O -$ 、 $-C O N R -$ 、 $-N R (C = O) N R -$ 、 $-N R (C = S) N R -$ 、 $-S O_2 N R -$ 、 $-N R S O_2 -$ 、 $-C R_2 O C R_2 -$ 、 $-C R_2 S C R_2 -$ 、 $-C R_2 N R C R_2 -$ 、 C_{4-8} シクロヘテロアルキレン基、 C_{4-8} シクロアルキレン基、 C_{5-12} アリーレン基又は C_{3-12} ヘテロアリーレン基、或いはアミノ酸、糖又は単分散ポリエチレングリコール (PEG) 構成単位であり、各 R は独立に H、 C_{1-4} アルキル、 C_{2-4} アルケニル、 C_{2-4} アルキニル、 C_{1-4} アルコキシアルキル及び C_{1-4} ヒドロキシアルキルから選択される。) の合成リンカー基であり、

B z p^M は下記式 I I のベンゾピリリウム色素である。

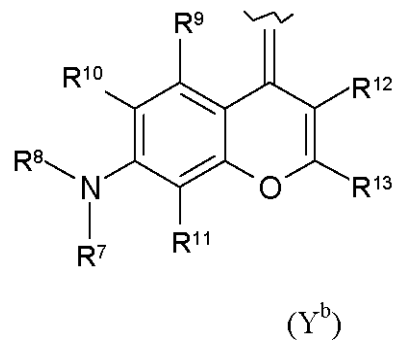
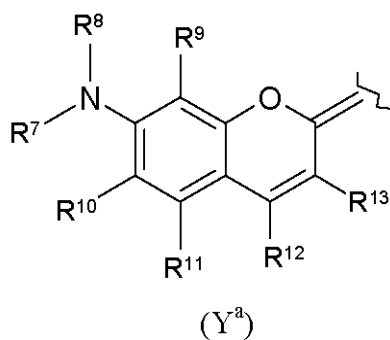
【化 1】



(式中、

Y¹ は下記式 Y^a 又は Y^b の基であり、

【化 2】



R¹ ~ R⁴ 及び R⁹ ~ R¹³ は H、 $-S O_3 M^1$ (式中、各 M¹ は独立に H 又は B^c であり、B^c は生体適合性陽イオンである。)、H a l、R^a 及び C_{3-12} アリールから独立に選択され、

R^5 はH、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-6} カルボキシアルキル、 C_{3-12} アリールスルホニル又はC1であり、或いは任意には R^6 、 R^{14} 、 R^{15} 又は R^{16} の1つと共に五員又は六員の不飽和脂肪族環、不飽和ヘテロ脂肪族環又は芳香環を形成でき、

R^6 及び R^{16} は独立に R^a 基であり、

R^7 及び R^8 は独立に C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} ヒドロキシアルキルであり、或いは任意には R^9 及び/又は R^{10} の一方又は両方と共に五員又は六員のN含有複素環又はヘテロアリール環を形成でき、

Xは $-CR^{14}R^{15}-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-NR^{16}-$ 又は $-CH=CH-$ （式中、 $R^{14} \sim R^{16}$ は独立に R^a 基である。）であり、

R^a は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル、 C_{1-6} カルボキシアルキル又は C_{1-6} ヒドロキシアルキルであり、

wは1又は2であり、

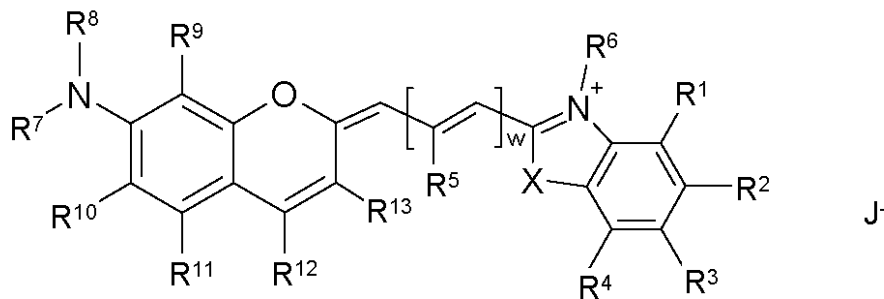
Jは生体適合性陰イオンであり、

Bz p^Mは $R^1 \sim R^{16}$ 基から選択される1以上のスルホン酸置換基を含むことを条件とする。））

【請求項2】

Bz p^Mが下記式IIaを有する、請求項1記載の組成物。

【化3】



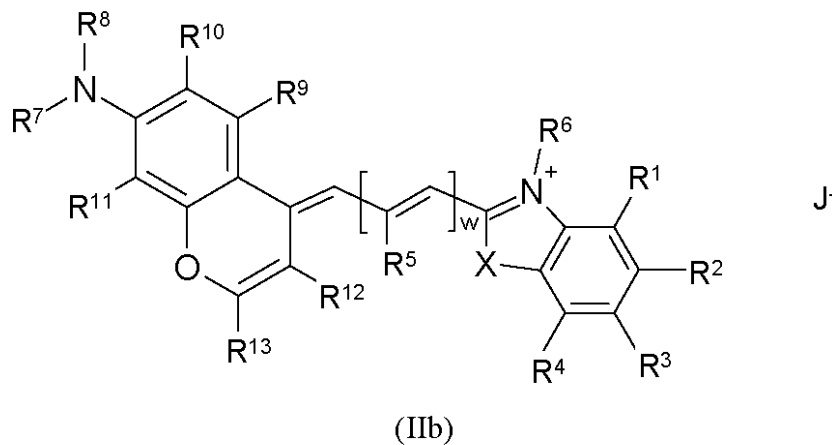
20

30

【請求項3】

Bz p^Mが下記式IIbを有する、請求項1記載の組成物。

【化4】



40

【請求項4】

Bz p^Mが2～4のスルホン酸置換基を含む、請求項1乃至請求項3のいずれか1項記

50

載の組成物。

【請求項 5】

B z p^Mが 1 以上の C₁₋₄スルホアルキル置換基を含む、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 6】

スルホアルキル置換基が式 - (CH₂)_k - SO₃M¹ (式中、M¹は独立に H 又は B[○]であり、k は 1 ~ 4 の値を有する整数である。) を有する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

w が 1 である、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 8】

R⁵が H である、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の組成物。

10

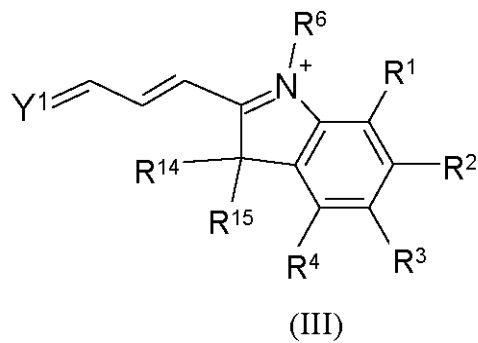
【請求項 9】

X が - C R¹⁴ R¹⁵ - である、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 10】

B z p^Mが下記式 III を有する、請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載の組成物。

【化 5】



20

J-

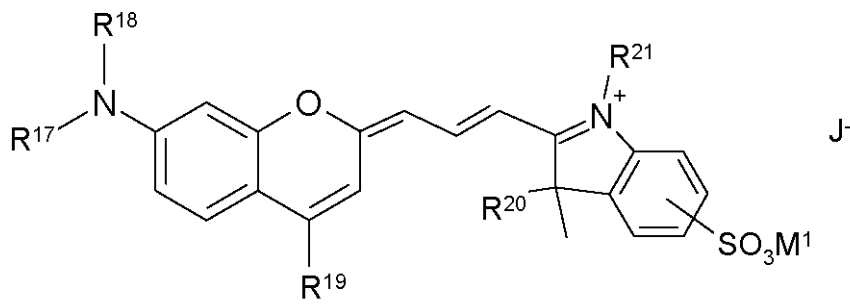
(式中、Y¹、R¹ ~ R⁴、R⁶、R¹⁴、R¹⁵及び J は請求項 1 に定義した通りである。)

【請求項 11】

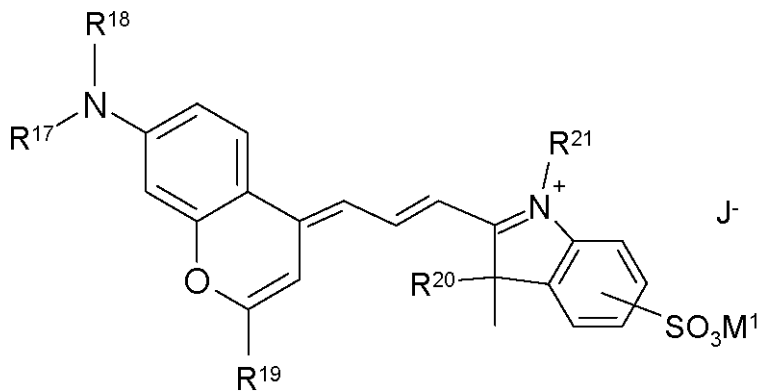
下記式 III c、III d 又は III e を有する、請求項 1 記載の組成物。

30

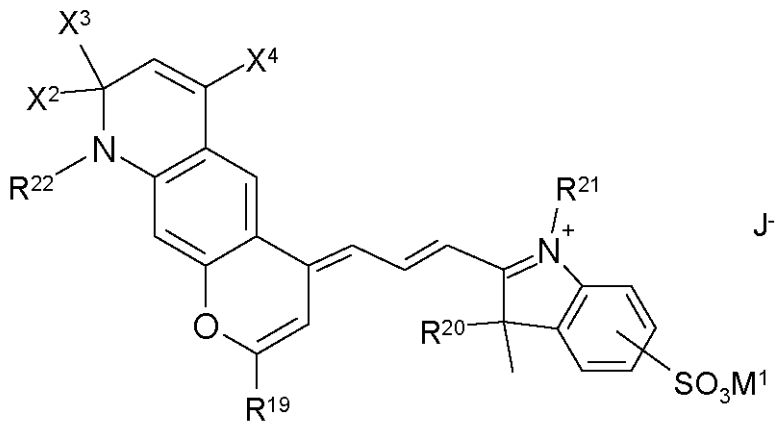
【化6】



10



20



30

40

(式中、

 M^1 は請求項1に定義した通りであり、 R^{17} 及び R^{18} は独立に C_{1-4} アルキル及び C_{1-4} スルホアルキルから選択され、 R^{19} はH又は C_{1-4} アルキルであり、 R^{20} は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} カルボキシアリルであり、 R^{21} は C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} カルボキシアリルであり、 R^{22} は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} カルボキシアリルであり、 X^2 、 X^3 及び X^4 は独立にH又は C_{1-4} アルキルである。)

【請求項12】

B T Mが

50

(i) 3 ~ 1 0 0 量体ペプチド、
 (i i) 酵素基質、酵素拮抗剤又は酵素阻害剤、
 (i i i) レセプター結合化合物、
 (i v) オリゴヌクレオチド、及び
 (v) オリゴDNAフラグメント又はオリゴRNAフラグメント
 から選択される、請求項 1 乃至請求項 1 1 のいずれか 1 項記載の組成物。

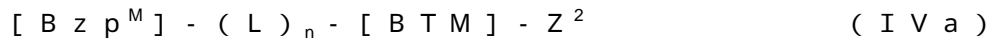
【請求項 1 3】

B T M が 3 ~ 1 0 0 量体ペプチドである、請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 4】

下記式 I V a 又は I V b を有する、請求項 1 3 記載の組成物。

10



(式中、

Z^1 は B T M ペプチドの N 末端に結合して、H 又は M^{1G} であり、

Z^2 は B T M ペプチドの C 末端に結合して、OH、 $O B^c$ (式中、 B^c は請求項 1 に定義した通りである。) 又は M^{1G} であり、

M^{1G} は、生体適合性基である代謝抑制基であって、B T M ペプチドの酵素代謝を阻止又は抑制する基である。)

【請求項 1 5】

Z^1 及び Z^2 の各々が独立に M^{1G} である、請求項 1 4 記載の組成物。

20

【請求項 1 6】

1 人の患者用に適した用量を有し、適当な注射器又は容器に入れて供給される、請求項 1 乃至請求項 1 5 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 乃至請求項 1 6 のいずれか 1 項記載の医薬品組成物を製造するためのキットであって、当該キットは請求項 1 乃至請求項 1 5 に記載された式 I のコンジュゲートを無菌固体形態で含んでいて、生体適合性キャリアーの無菌供給物で再構成すれば溶解が起こって所望の医薬品組成物が得られる、キット。

【請求項 1 8】

無菌固体形態が凍結乾燥固体である、請求項 1 7 記載のキット。

30

【請求項 1 9】

下記式 I のコンジュゲート。



(I)

(式中、L 及び n は請求項 1 に定義した通りであり、 $B z p^M$ は請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか 1 項に定義した通りであり、 $B T M '$ は請求項 1 2 又は請求項 1 3 に定義した B T M であると共に合成品である。)

【請求項 2 0】

哺乳類の身体の内視鏡光学イメージング方法であって、請求項 1 乃至請求項 1 6 のいずれか 1 項記載の医薬品組成物を用いて内視鏡で B T M の局在部位の画像を得る段階を含んでなる方法。

40

【請求項 2 1】

医薬品組成物が前記哺乳類の身体に予め投与されている、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 記載の方法であって、

(i) 哺乳類の身体内の検査対象組織表面を励起光で照明する段階、

(i i) $B z p^M$ の励起によって生じるイメージング剤からの蛍光を蛍光検出器を用いて検出する段階、

(i i i) 蛍光検出器によって検出された光を任意に濾光して蛍光成分を分離する段階、及び

50

(i v) 段階 (i i) 又は (i i i) の蛍光から前記検査対象組織表面の画像を形成する段階

を含んでなる方法。

【請求項 2 3】

段階 (i) の励起光が連続波 (C W) の性質を有する、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 1 記載の方法であって、

(a) 不均質組成を有する前記哺乳類の身体の光散乱性生体組織を、所定の経時変動強度を有する光源からの光に暴露してイメージング剤を励起する段階であって、組織が励起光を多重散乱させる段階、

(b) 前記暴露に応答した組織からの多重散乱発光を検出する段階、

(c) 組織内の様々な位置における蛍光特性のレベルにそれぞれ対応する複数の値をプロセッサで確定することにより、発光から組織全体の蛍光特性を定量化する段階であって、蛍光特性のレベルが組織の不均質組成に応じて変化する段階、及び

(d) 段階 (c) の値に従って組織の不均質組成のマッピングを行うことで組織の画像を生成する段階

を含んでなる方法。

【請求項 2 5】

光学イメージング方法が蛍光内視鏡検査からなる、請求項 2 0 乃至請求項 2 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 6】

インビボ光学イメージングが、哺乳類の身体の疾患状態の検出、ステージング、診断、疾患進行のモニタリング又は治療のモニタリングを支援するために使用される、請求項 2 0 乃至請求項 2 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 7】

哺乳類の身体の疾患状態の検出、ステージング、診断、疾患進行のモニタリング又は治療のモニタリングを行う方法であって、請求項 2 0 乃至請求項 2 6 のいずれか 1 項記載のインビボ光学イメージング方法を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インビボ光学イメージングのために適したイメージング剤であって、ペンゾピリリウム色素とペプチドのような生物学的標的化部分とのコンジュゲートを含んでなるイメージング剤に関する。また、医薬品組成物及びキット並びにインビボイメージング方法も開示される。

【背景技術】

【0002】

米国特許第 6 7 5 0 3 4 6 号には、下記式 A、B 及び C のレーザー適合性近赤外 (N I R) マーカー色素が開示されている。

【0003】

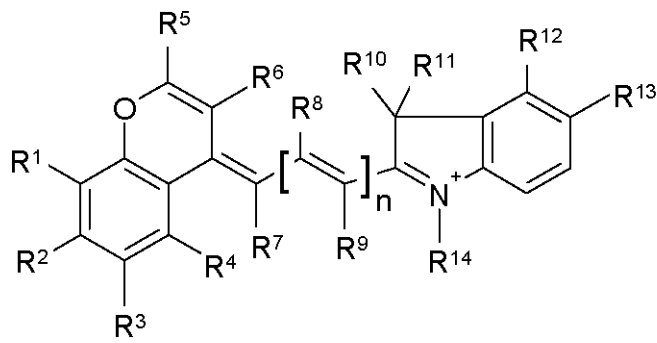
10

20

30

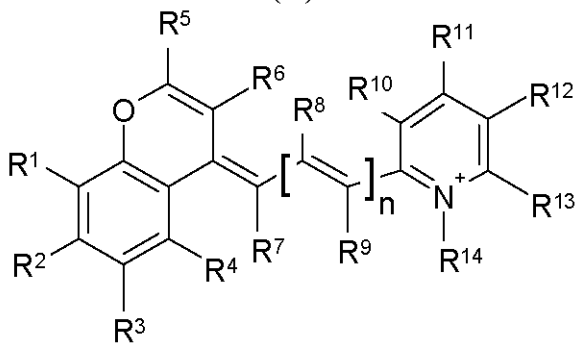
40

【化 1】



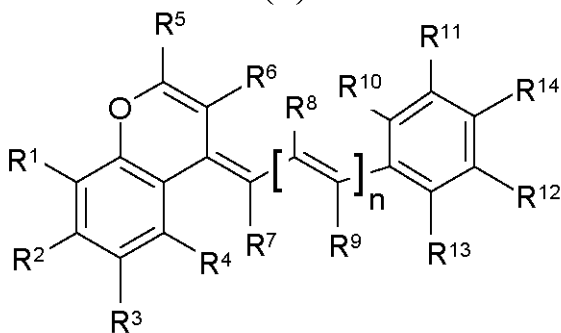
10

(A)



20

(B)



30

(C)

式中、

n は 1、2 又は 3 であり、

$R^1 \sim R^{14}$ は同一又は異なるものであって、H、Cl、Br 並びに炭素原子数 12 以下の脂肪族基及び単核芳香族基から選択される。これらの基は、置換基として、C 及び H に加えて 4 以下の酸素原子及び 0、1 若しくは 2 の窒素原子又は硫黄原子、或いは硫黄原子及び窒素原子を含み得るか、或いは H 又は (C、H 及び 2 以下のスルホン酸基からなる群から選択される) 炭素原子数 8 以下の置換基の 1 以上が結合した窒素原子を有するアミノ官能基を表す。

40

【0004】

米国特許第 6750346 号の色素は、好ましくは $R^1 \sim R^{14}$ の 1 以上が可溶化基又はイオン化基を含むように選択される。かかる基は、シクロデキストリン、糖、 SO_3^- 、 PO_3^{2-} 、 CO_2^- 及び NR_3^+ を含むと言われている。米国特許第 6750346 号は、かかる色素及びそれから導かれる系 (コンジュゲート) が、細胞特性診断のための光学的な (特に蛍光光学的な) 定性及び定量測定方法、バイオセンサー (ポイント・オブ・ケア測定) 並びにゲノム及び小型化技術の探求において使用できることを教示している。典型的な

50

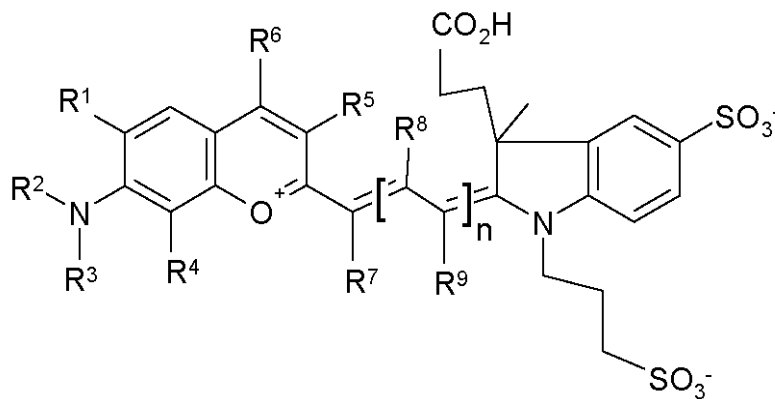
かかる用途は、サイトメトリー、細胞選別、蛍光相関分光法 (F C S)、超高スループットスクリーニング (U H T S)、多色蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) 並びにマイクロアレイ (遺伝子及びタンパク質チップ) の分野にある。

【 0 0 0 5 】

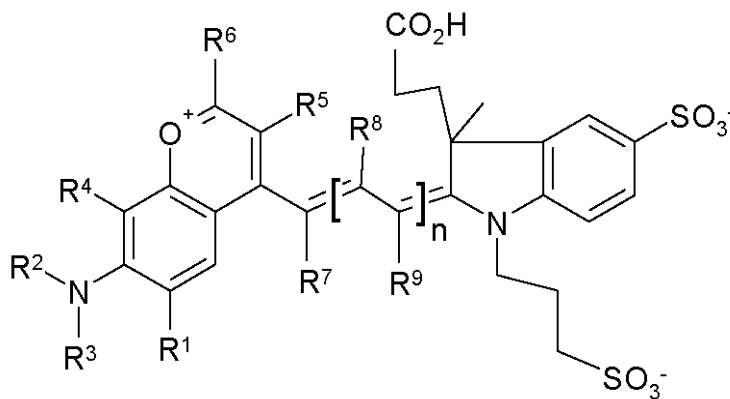
米国特許第 6 9 2 4 3 7 2 号には、下記式 D 及び E の非対称ポリメチン色素が開示されている。

【 0 0 0 6 】

【 化 2 】



(D)



(E)

式中、

n は 0、1、2 又は 3 であり、

R¹ ~ R⁹ は同一又は異なるものであって、H、アルキル、tert-アルキル、アリール、カルボキシアリール、ジカルボキシアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アルキルオキシ、アルキルメルカプト (「アルキル」及び「シクロアルキル」はオレフィン結合残基も含む)、アリールオキシ、アリールメルカプト、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールメルカプト、ヒドロキシ、ニトロ又はシアノ残基であり得ると共に、R¹及びR²、R²及びR³、R³及びR⁴、R⁵及びR⁷は1以上の脂肪族環、ヘテロ脂肪族環又は芳香環を形成し得る。

【 0 0 0 7 】

米国特許第 6 9 2 4 3 7 2 号の R¹ ~ R⁹ 置換基の 1 以上は、任意には可溶化置換基又はイオン化置換基 (例えば、SO₃⁻、PO₃²⁻、CO₂H、OH、NR₃⁺、シクロデキストリン又は糖) であり得るか、或いは任意には色素を別の分子に共有結合させる反応基 (例えば、イソチオシアネート、ヒドラジン、活性エステル、マレイミド又はヨードアセトアミド) であり得る。式 D 及び E の色素は、細胞特性又はバイオセンサーの診断、通例はサイ

10

20

30

40

50

トメトリー及び細胞選別において有用であるといわれている。

【0008】

Lisy他 [J . Biomed . Optics , 11 (6) 064014 (2006)] は、近赤外光学イメージング及び標識単球又はマクロファージを用いる腹膜炎の診断方法を開示している。単球 - マクロファージは、色素DY - 676 (Dyomics GmbH) によってインビトロで標識できた。腹膜炎の動物モデルにおいて色素DY - 676自体をインビボで投与すると、腹膜炎の領域で蛍光の増加が生じた。著者らは、単球 - マクロファージ標識がインビボで起こったと結論づけた。

【0009】

Lisy他 [Invest . Radiol . , 42 (4) 235 - 241 (2007)] は、蛍光性マグネトソームで標識されたナノ粒子を含むバイモダル (MRI 及び光学) 造影剤を開示している。蛍光性マグネトソームナノ粒子は、食作用のプロセスによってマクロファージを標識するために使用された。マグネトソームを標識するために使用された色素は、やはりDY - 676であった。

10

【0010】

Dyomics GmbHのウェブサイト (www.dyomics.com) は、 " Visualisation of Arthritis in a Rat by Accumulation of DY - 676 in Joints " と題するI. Hilgerの提供画像を含んでいる。それ以上の詳細は示されていない。

【0011】

国際公開第2007/139815号は、前駆細胞に係るイメージング方法及び治療方法を開示している。下記に示す式のコジュゲートが開示されている。

20

$A_B - X$

式中、

A_B は $CD133^+Flk1^+$ 内皮前駆細胞に結合するビタミン又は類似体を含み、
X は定量化可能なマーカーである。

定量化可能なマーカーは、例えば放射性プローブ又は蛍光性プローブであり得る。好適な蛍光性プローブは、フルオレセイン、ローダミン、Texas Red、フィコエリトリン、Oregon Green、Alexa Fluor 488...、Cy3、Cy5、Cy7などであると述べられている。国際公開第2007/139815号の実施例30は、5量体ペプチドリンカー (Asp - Arg - Asp - Asp - Cys) を介してフォレートにコジュゲートされたただ1種のベンゾピリリウム色素 (DyLightTM 680) を開示している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

欧州特許出願公開第1281405号明細書

【発明の概要】

【0013】

本発明は、生物学的標的化部分 (BTM) にコジュゲートされた特定の部類のベンゾピリリウム色素を含んでなる、インビボ光学イメージングのために適したイメージング剤を提供する。本発明者らは、かかる共有結合BTMコジュゲートの一部として、インビボ光学イメージング用途のために適したスルホン化ベンゾピリリウム色素を確認した。

40

【0014】

本発明のベンゾピリリウム色素 ($Bz p^M$) は下記のような性質の組合せを有し、したがってインビボ光学イメージング用途のために有用である。

- (i) 生物学的標的化分子 (BTM) へのコジュゲーションの可能性、
- (i i) 水溶性、
- (i i i) 電磁スペクトルの赤色、遠赤色又は近赤外部分での吸光及び発光、
- (i v) 高い吸光係数、

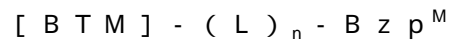
50

- (v) 低い血漿タンパク質結合度、
- (vi) 高い光安定性及び輝度、
- (vii) 血液中における色素及び色素 - BTM コンジュゲートの高い安定性、
- (viii) インビボでの血液からの迅速なクリアランス、並びに
- (ix) (Meteor/Derek 分析による) 潜在的に危険な代謝産物の欠如。

【発明を実施するための形態】

【0015】

第1の態様では、本発明は、哺乳類の身体のインビボ光学イメージングのために適したイメージング剤を生体適合性キャリアーと共に含んでなる、哺乳類への投与に適した形態の医薬品組成物であって、前記イメージング剤が下記式Iのコンジュゲートを含んでいる医薬品組成物を提供する。



(I)

式中、

BTMは生物学的標的化部分であり、

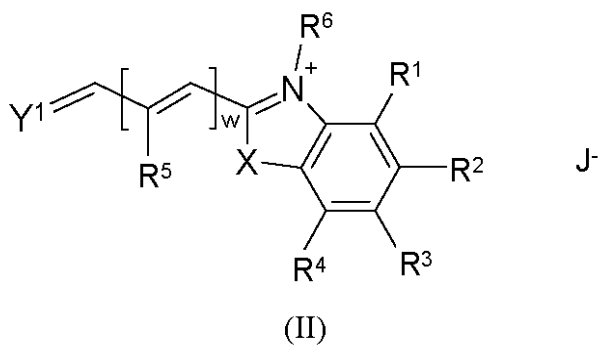
nは0又は1の値を有する整数であり、

Lは式 - (A)_m - (式中、mは1~20の値を有する整数であり、各Aは独立に - CR₂ -、 - CR = CR -、 - C - C -、 - CR₂CO₂ -、 - CO₂CR₂ -、 - NRCO -、 - CONR -、 - NR(C=O)NR -、 - NR(C=S)NR -、 - SO₂NR -、 - NRSO₂ -、 - CR₂OCR₂ -、 - CR₂SCR₂ -、 - CR₂NRCR₂ -、C₄₋₈シクロヘテロアルキレン基、C₄₋₈シクロアルキレン基、C₅₋₁₂アリーレン基又はC₃₋₁₂ヘテロアリーレン基、或いはアミノ酸、糖又は単分散ポリエチレングリコール(PEG)構成単位であり、各Rは独立にH、C₁₋₄アルキル、C₂₋₄アルケニル、C₂₋₄アルキニル、C₁₋₄アルコキシアルキル及びC₁₋₄ヒドロキシアルキルから選択される。)の合成リンカー基であり、

Bz p^Mは下記式IIのベンゾピリリウム色素である。

【0016】

【化3】



(式中、

Y¹は下記式Y^a又はY^bの基であり、

【0017】

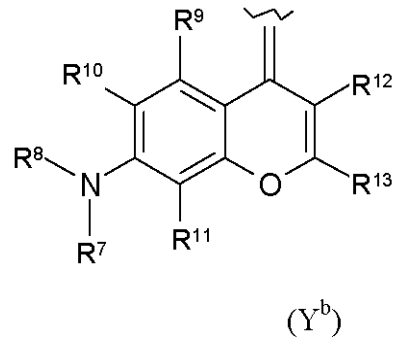
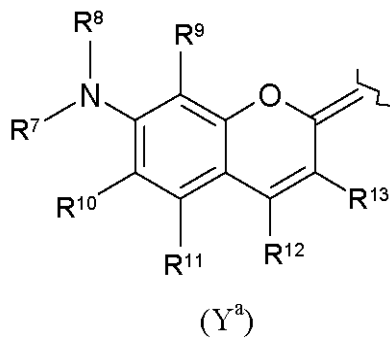
10

20

30

40

【化4】



10

20

30

40

50

$R^1 \sim R^4$ 及び $R^9 \sim R^{13}$ は H、 $-SO_3M^1$ (式中、各 M^1 は独立に H 又は B° であり、 B° は生体適合性陽イオンである。)、Hal、 R^a 及び C_{3-12} アリールから独立に選択され、 R^5 は H、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-6} カルボキシアルキル、 C_{3-12} アリールスルホニル又は Cl であり、或いは任意には R^6 、 R^{14} 、 R^{15} 又は R^{16} の 1 つと共に五員又は六員の不飽和脂肪族環、不飽和ヘテロ脂肪族環又は芳香環を形成でき、
 R^6 及び R^{16} は独立に R^a 基であり、
 R^7 及び R^8 は独立に C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} ヒドロキシアルキルであり、或いは任意には R^9 及び / 又は R^{10} の一方又は両方と共に五員又は六員の N 含有複素環又はヘテロアリール環を形成でき、
X は $-CR^{14}R^{15}-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-NR^{16}-$ 又は $-CH=CH-$ (式中、 $R^{14} \sim R^{16}$ は独立に R^a 基である。) であり、
 R^a は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル、 C_{1-6} カルボキシアルキル又は C_{1-6} ヒドロキシアルキルであり、
w は 1 又は 2 であり、
J は生体適合性陰イオンであり、
 $Bz p^M$ は $R^1 \sim R^{16}$ 基から選択される 1 以上のスルホン酸置換基を含むことを条件とする。)

「イメージング剤」という用語は、完全な (即ち、無傷の) 哺乳類の身体の検査対象領域のインビボ光学イメージングを行うために適した化合物を意味する。好ましくは、哺乳類はヒトの患者である。イメージングは侵襲的 (例えば、手術中検査又は内視鏡検査) であってもよいし、或いは非侵襲的であってもよい。イメージングは、任意には (例えば、内視鏡器具の生検チャンネルを通しての) 生検又は (例えば、腫瘍縁の同定による手術処置中の) 腫瘍切除を容易にするために使用できる。

【0018】

「光学イメージング」という用語は、緑色乃至近赤外領域 (波長 500 ~ 1200 nm) の光との相互作用に基づいて、疾患の検出、ステージング又は診断、疾患進展の追跡或いは疾患治療の追跡のための画像を形成する任意の方法を意味する。光学イメージングはさらに、いかなる装置も使用しない直接可視化並びに各種スコープ、カテーテル及び光学イメージング装置 (例えば、断層撮影表示用のコンピューター支援ハードウェア) のような装置の使用を伴う直接可視化のためのあらゆる方法を包含する。かかるモダリティ及び測定技法には、特に限定されないが、ルミネセンスイメージング、内視鏡検査、蛍光内視鏡検査、光学コヒーレンス断層撮影、透過率イメージング、時間分解透過率イメージング、共焦点イメージング、非線形顕微鏡検査、光音響イメージング、音響光学イメージング、スペクトル分析、反射スペクトル分析、干渉分析、コヒーレンス干渉分析、拡散光学断層撮影及び蛍光媒介拡散光学断層撮影 (連続波、時間ドメイン及び周波数ドメインシステム)、並びに光の散乱、吸光、偏光、ルミネセンス、蛍光寿命、量子収量及び消光の測定

がある。これらの技法のさらなる詳細は、Tuan Vo-Dinh (編) : “Biomedical Photonics Handbook” (2003), CRC Press LLC、Mycek & Pogue (編) : “Handbook of Biomedical Fluorescence” (2003), Marcel Dekker, Inc.、Splinter & Hopper : “An Introduction to Biomedical Optics” (2007), CRC Press LLCに示されている。

【0019】

緑色乃至近赤外領域の光は、好適には500~1200nm、好ましくは550~1000nm、最も好ましくは600~800nmの波長を有する。光学イメージング方法は、好ましくは蛍光内視鏡検査である。第6の態様の哺乳類の身体は、好ましくは人体である。イメージング剤の好ましい実施形態は、第1の態様に関して(上記に)記載した通りである。特に、使用するBz p^M色素は蛍光性であることが好ましい。

10

【0020】

「生体適合性キャリアー」という用語は、組成物が生理学的に許容され得るようにして(即ち、毒性又は過度の不快感なしに哺乳類の身体に投与できるようにして)イメージング剤を懸濁又は溶解できる流体(特に液体)を意味する。生体適合性キャリアーは、好適には、無菌のピロジェンフリー注射用水、(有利には注射用の最終生成物が等張性になるように平衡させ得る)食塩水のような水溶液、或いは1種以上の張度調整物質(例えば、生体適合性対イオンを有する血漿陽イオンの塩)、糖(例えば、グルコース又はスクロース)、糖アルコール(例えば、ソルビトール又はマンニトール)、グリコール(例えば、グリセロール)又は他の非イオン性ポリオール物質(例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなど)の水溶液のような注射可能なキャリアー液体である。好ましくは、生体適合性キャリアーはピロジェンフリー注射用水又は等張食塩水である。

20

【0021】

「コンジュゲート」という用語は、BTM、(L)_n基及びBz p^M色素が共有結合によって結合されていることを意味する。

【0022】

式Iのコンジュゲートはインビボイメージングのために適するが、それはインビトロ用途(例えば、生物学的試料中のBTMを定量するアッセイ又は組織試料中のBTMの可視化)も有し得る。好ましくは、イメージング剤はインビボイメージングのために使用される。

30

【0023】

「スルホン酸置換基」という用語は、式-SO₃M¹(式中、M¹はH又はB[°]であり、B[°]は生体適合性陽イオンである。)の置換基を意味する。-SO₃M¹置換基は炭素原子に共有結合され、炭素原子はアリール(即ち、R¹又はR²が-SO₃M¹である場合のようなスルホアリール)又はアルキル(即ち、スルホアルキル基)であり得る。「生体適合性陽イオン」(B[°])という用語は、イオン化して負に帯電した基(この場合にはスルホネート基)と共に塩を形成する正に帯電した対イオンを意味する。この場合、前記正に帯電した対イオンも無毒性であり、したがって哺乳類の身体(特に人体)への投与に適している。好適な生体適合性陽イオンの例には、アルカリ金属であるナトリウム及びカリウム、アルカリ土類金属であるカルシウム及びマグネシウム、並びにアンモニウムイオンがある。好ましい生体適合性陽イオンはナトリウム及びカリウムであり、最も好ましくはナトリウムである。

40

【0024】

「生体適合性陰イオン」(J⁻)という用語は、イオン化して正に帯電した基(この場合にはインドリニウム基)と共に塩を形成する負に帯電した対イオンを意味する。この場合、前記負に帯電した対イオンも無毒性であり、したがって哺乳類の身体(特に人体)への投与に適している。対イオン(J⁻)は、モル相当量で存在することでBz p^M色素上の正電荷をバランスさせる陰イオンを表す。電荷をバランスさせる量が存在する限り、陰イオ

50

ン（J）は好適には単一又は複数の電荷を有する。陰イオンは好適には無機酸又は有機酸から導かれる。好適な陰イオンの例には、塩化物イオン又は臭化物イオンのようなハロゲン化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、クエン酸イオン、酢酸イオン、リン酸イオン及びホウ酸イオンがある。好ましい陰イオンは塩化物イオンである。

【0025】

「生物学的標的化部分」（BTM）という用語は、哺乳類の身体にインビボで投与した後、前記哺乳類の身体の特定位位に選択的に取り込まれるか又は特定位位に局在する化合物を意味する。かかる部位は、例えば、特定の疾患状態に係るものであるか、或いは器官又は代謝過程がいかん機能しているかを表すものであり得る。生物学的標的化部分は、好ましくは、線状ペプチド、環状ペプチド又はこれらの組合せであり得る3～100量体ペプチド、ペプチド類似体、ペプチド又はペプチド模倣体、或いは酵素基質、酵素拮抗剤又は酵素阻害剤、合成レセプター結合化合物、オリゴヌクレオチド、又はオリゴDNAフラグメント若しくはオリゴRNAフラグメントからなる。

10

【0026】

「ペプチド」という用語は、ペプチド結合（即ち、1つのアミノ酸のアミンを別のアミノ酸のカルボキシルに連結するアミド結合）によって連結された（下記に定義するような）2以上のアミノ酸を含む化合物を意味する。「ペプチド模倣体」又は「模倣体」という用語は、ペプチド又はタンパク質の生物学的活性を模倣するが、化学的性質がペプチド的でない（即ち、いかなるペプチド結合（つまり、アミノ酸間のアミド結合）も含まない）生物学的活性化化合物をいう。ここでは、ペプチド模倣体という用語は広い意味で使用され、性質が完全にはペプチド的でない分子（例えば、プソイドペプチド、セミペプチド及びペプチド）を包含する。「ペプチド類似体」という用語は、下記に記載するような1種以上のアミノ酸類似体を含むペプチドをいう。“*Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*”, M. Goodman et al., Houben-Weyl E22c, Thiemeも参照されたい。

20

【0027】

「アミノ酸」という用語は、L-又はD-アミノ酸、アミノ酸類似体（例えば、ナフチルアラニン）或いはアミノ酸模倣体を意味し、これらは天然のもの又は純粋に合成由来のものであってよく、光学的に純粋なもの（即ち、単一の鏡像異性体）、したがってキララなものであるか、或いは鏡像異性体の混合物であってよい。本明細書中では、アミノ酸に関する通常の三文字略語又は一文字略語が使用される。好ましくは、本発明のアミノ酸は光学的に純粋なものである。「アミノ酸模倣体」という用語は、アイソスター（即ち、天然化合物の立体構造及び電子構造を模倣するように設計されたもの）である天然アミノ酸の合成類似体を意味する。かかるアイソスターは当業者にとって公知であり、特に限定されないが、デプシペプチド、レトロ-インベルソペプチド、チオアミド、シクロアルカン又は1,5-二置換テトラゾールを包含する[M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137 (1985)]を参照されたい。

30

【0028】

好適な酵素の基質、拮抗剤又は阻害剤には、グルコース及びグルコース類似体（例えば、フルオロデオキシグルコース）、脂肪酸、或いはエラスターゼ、アンギオテンシンII又はメタロプロテイナーゼ阻害剤がある。好ましい非ペプチドのアンギオテンシンII拮抗剤はロサルタンである。好適な合成レセプター結合化合物には、エストラジオール、エストロゲン、プロゲステロン、プロゲステロン及び他のステロイドホルモン、ドーパミンD-1又はD-2レセプター用リガンド及びトロパンのようなドーパミン輸送体用リガンド、並びにセロトニンレセプター用リガンドがある。レセプター結合化合物がフォレートである場合、リンカー基は5量体ペプチドAsp-Arg-Asp-Asp-Cysを含まないことが好ましい。最も好ましくは、レセプター結合化合物はフォレートでない。

40

【0029】

式IIのベンゾピリリウム色素（Bzp^M）は、緑色乃至近赤外波長（500～1200nm、好ましくは550～1000nm、さらに好ましくは600～800nm）の光

50

を用いる光学イメージング方法で直接又は間接に検出できる蛍光色素又は発色団である。好ましくは、 $Bz p^M$ は蛍光性を有する。

【0030】

式Iのリンカー基 - (A)_m - の役割の1つは、 $Bz p^M$ をBTMの結合部位から遠ざけることにありと想定されている。これが特に重要であるのは、 $Bz p^M$ が比較的バルキーであり、したがって不都合な立体相互作用が起こり得るからである。これは、 $Bz p^M$ が結合部位から離れて位置する自由を与えるたわみ性(例えば、単純アルキル鎖)及び/又は $Bz p^M$ を結合部位から離すように定位させる剛性(例えば、シクロアルキル又はアールスペース)を組み合わせることで達成できる。リンカー基の性質はまた、イメージング剤の生体分布を調整するためにも使用できる。即ち、例えばリンカー中にエーテル基を導入することは、血漿タンパク質結合を最小限に抑えるために役立つ。- (A)_m - がポリエチレングリコール(PEG)構成単位又は1~10のアミノ酸残基を有するペプチド鎖からなる場合、リンカー基はインピボでイメージング剤の薬物動態及び血中クリアランス速度を調整するために機能し得る。かかる「バイオモディファイア」リンカー基は、バックグラウンド組織(例えば、筋肉又は肝臓)及び/又は血液からのイメージング剤のクリアランスを促進することで、バックグラウンド妨害を少なくして一層良好な診断画像を与えることができる。バイオモディファイアリンカー基はまた、特定の排泄経路(例えば、肝臓経由ではなく腎臓経由の排泄)を有利にするためにも使用できる。

10

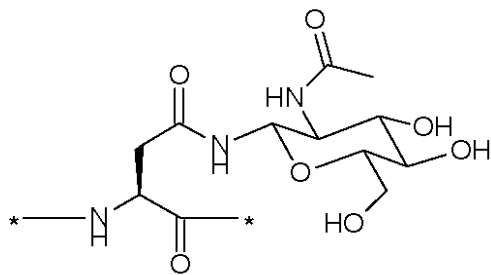
【0031】

「糖」という用語は、単糖、二糖又は三糖を意味する。好適な糖には、グルコース、ガラクトース、マルトース、マンノース及びラクトースがある。任意には、アミノ酸への容易なカップリングを可能にするように糖を官能化することができる。即ち、例えばアミノ酸のグルコサミン誘導体は、ペプチド結合を介して他のアミノ酸にコンジュゲートすることができる。(Nova Biochem社から商業的に入手できる)アスパラギンのグルコサミン誘導体はこれの一例である。

20

【0032】

【化5】



30

式Iは、- (L)_n [Bz p^M]部分がBTMの任意適宜の位置に結合し得ることを示している。- (L)_n [Bz p^M]部分に対して好適なかかる位置は、インピボで活性部位への結合に係わるBTM部分から離れた位置にあるように選択される。式Iの[BTM] - (L)_n部分は、式IIのBz p^Mの任意適宜の位置に結合し得る。[BTM] - (L)_n - 部分は、既存の置換基(例えば、R¹~R¹⁶基の1つ)に取って代わるか、或いはBz p^Mの既存の置換基に共有結合する。[BTM] - (L)_n - 部分は、好ましくはBz p^Mのカルボキシアルキル置換基を介して結合する。

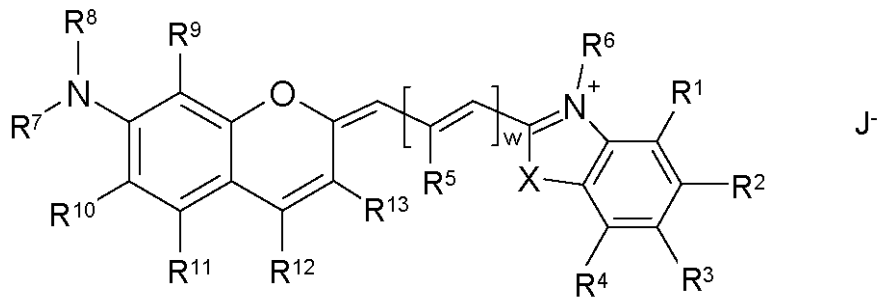
40

【0033】

本発明の好適なイメージング剤は、 $Bz p^M$ が下記式IIa又は式IIbを有するものである。

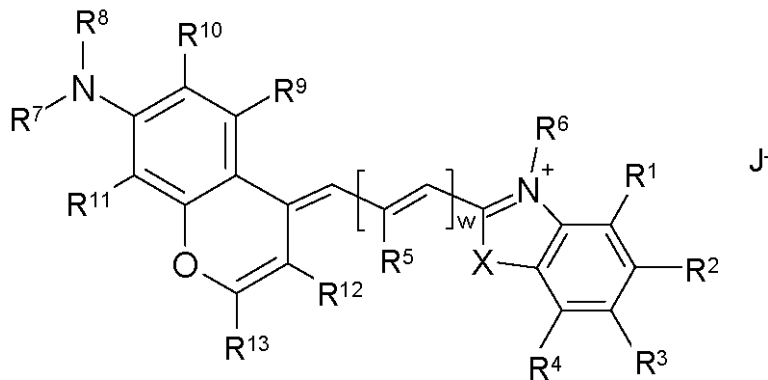
【0034】

【化6】



(IIa)

10



(IIb)

20

式中、X、w、J及び $R^1 \sim R^{13}$ は式IIに関して定義した通りである。

【0035】

R^5 が $R^6 / R^{14} \sim R^{16}$ の1つと共に五員又は六員の不飽和脂肪族環、不飽和ヘテロ脂肪族環又は芳香環を形成する場合、好適なかかる芳香環には、フェニル、フラン、チアゾール、ピリジル、ピロール及びピラゾール環がある。好適な不飽和環は、少なくとも R^5 が結合した $C=C$ を含んでいる。

30

【0036】

R^7 及び/又は R^8 が R^9 及び/又は R^{10} の一方又は両方と共に五員又は六員のN含有複素環又はヘテロアリアル環を形成する場合、好適なかかる環には、チアゾール、ピリジル、ピロール及びピラゾール環並びにこれらの部分水素化変種がある。好ましくは、ピリジル又はジヒドロピリジルである。

【0037】

別の実施形態では、式IIbの色素は、任意には $R^1 \sim R^4$ の1以上がF又は $-(CF_2)_f - F$ （色素中、fは1~4の値を有する整数である。）であるように選択できる。

【0038】

医薬品組成物は、注射器又はカニューレによる溶液の追加及び抜取りを許しながら、無菌保全性の維持、さらに任意には不活性ヘッドスペースガス（例えば、窒素又はアルゴン）の維持を可能にする密封容器からなる適当なバイアル又は容器に入れた状態で供給される。好ましいかかる容器は、気密蓋を（通例はアルミニウムからなる）オーバーシールと共にクrimpオン式セプタム封止バイアルである。蓋は、無菌保全性を維持しながら皮下注射針による1回又は数回の穿刺に適したもの（例えば、クrimpオン式セプタムシール蓋）である。かかる容器は、（例えば、ヘッドスペースガスの変更又は溶液のガス抜きのために）所望される場合には蓋が真空に耐え得ると共に、酸素又は水蒸気のような外部大気ガスの侵入を許すことなしに減圧のような圧力変化にも耐え得るといふ追加の利点を有している。

40

50

【 0 0 3 9 】

好ましい複数用量容器は、複数の患者用量を含む（例えば、容積 10 ~ 30 cm³の）単一のバルクバイアルからなり、したがって臨床的状况に合わせて製剤の実用寿命中に様々な時間間隔で 1 回分の患者用量を臨床グレードの注射器中に抜き取ることができる。予備充填注射器は 1 回分のヒト用量又は「単位用量」を含むように設計され、したがって好ましくは臨床用に適した使い捨て注射器又は他の注射器である。本発明の医薬品組成物は、好ましくは 1 人の患者用に適した用量を有し、上述したような適当な注射器又は容器に入れて供給される。

【 0 0 4 0 】

かかる医薬品組成物は、抗菌防腐剤、pH調整剤、フィラー、安定剤又は重量オスモル濃度調整剤のような追加賦形剤を任意に含むことができる。「抗菌防腐剤」という用語は、潜在的に有害な微生物（例えば、細菌、酵母又はかび）の増殖を阻止する薬剤を意味する。抗菌防腐剤はまた、使用する用量に応じて多少の殺菌性を示すこともある。本発明の抗菌防腐剤の主な役割は、医薬品組成物中におけるこのような微生物の増殖を阻止することである。しかし、抗菌防腐剤は、任意には投与に先立って前記組成物を製造するために使用されるキットの 1 種以上の成分中における潜在的に有害な微生物の増殖を阻止するためにも使用できる。かかるキットは第 2 の態様（下記）で記載される。好適な抗菌防腐剤には、パラベン類（即ち、メチル、エチル、プロピル又はブチルパラベン或いはこれらの混合物）、ベンジルアルコール、フェノール、クレゾール、セトリミド及びチオメルサールがある。好ましい抗菌防腐剤はパラベン類である。

【 0 0 4 1 】

「pH調整剤」という用語は、組成物の pH がヒト又は哺乳類への投与のために許容し得る範囲（およそ pH 4 . 0 ~ 10 . 5）内にあることを保証するために有用な化合物又は化合物の混合物を意味する。好適なかかる pH調整剤には、トリシン、リン酸塩又は TRIS [即ち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン] のような薬学的に許容し得る緩衝剤、及び炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム又はこれらの混合物のような薬学的に許容し得る塩基がある。組成物をキットの形態で使用する場合には、pH調整剤を任意には独立のバイアル又は容器に入れて供給することができ、その結果としてキットのユーザーは多段操作の一部として pH を調整することができる。

【 0 0 4 2 】

「フィラー」という用語は、製造及び凍結乾燥中における材料の取扱いを容易にすることができる薬学的に許容し得る増量剤を意味する。好適なフィラーには、塩化ナトリウムのような無機塩、及びスクロース、マルトース、マンニトール又はトレハロースのような水溶性糖又は糖アルコールがある。

【 0 0 4 3 】

第 1 の態様の医薬品組成物は、無菌製造条件下で（即ち、クリーンルーム内で）製造して所望の無菌で非発熱性の生成物を得ることができる。基本構成部分、特に関連する試薬並びにイメージング剤に接触する装置部品（例えば、バイアル）は無菌であることが好ましい。かかる構成部分及び試薬は、無菌濾過或いは（例えば、線照射、オートクレーブ処理、乾熱又は（例えば、エチレンオキシドによる）化学処理を用いる）終末滅菌をはじめとする、当技術分野で公知の方法によって滅菌できる。一部の構成部分を予め滅菌しておけば、最小数の操作を実施すれば済むので好ましい。しかし、予防策として、医薬品組成物の製造における最終段階として少なくとも無菌濾過段階を含めることが好ましい。

【 0 0 4 4 】

第 1 の態様の医薬品組成物は、好ましくは第 2 の態様に関して下記に記載するようなキットから製造される。

【 0 0 4 5 】

好ましい特徴

イメージング剤の分子量は、好適には 30000 ダルトン以下である。好ましくは、分子量は 1000 ~ 20000 ダルトンの範囲内にあり、最も好ましくは 2000 ~ 180

10

20

30

40

50

00ダルトンの範囲内にあり、2500～16000ダルトンが特に好ましい。

【0046】

B T Mは合成品又は天然品であり得るが、好ましくは合成品である。「合成品」という用語はその通常の意味を有し、即ち、天然の供給源（例えば、哺乳類の身体）から単離されるものではなく人造のものを意味する。かかる化合物は、その製造及び不純物プロファイルを完全に制御できるという利点を有している。したがって、天然由来のモノクローナル抗体及びそのフラグメントは、本明細書中で使用する「合成品」という用語の範囲外にある。

【0047】

B T Mは、好ましくは3～100量体ペプチド、酵素基質、酵素拮抗剤及び酵素阻害剤から選択される。B T Mは、最も好ましくは3～100量体ペプチド又はペプチド類似体である。B T Mがペプチドである場合、それは好ましくは4～30量体ペプチドであり、最も好ましくは5～28量体ペプチドである。

10

【0048】

式Iの[B T M]-(L)_n-部分は、好ましくは式IIのBz p^MのR⁵、R⁶、R¹⁴、R¹⁵又はR¹⁶の位置、さらに好ましくはR⁶、R¹⁴、R¹⁵又はR¹⁶の位置、最も好ましくはR⁶、R¹⁴又はR¹⁵の位置に結合している。結合を容易にするため、関連するR⁵、R⁶、R¹⁴、R¹⁵又はR¹⁶置換基は好ましくはC₁₋₆カルボキシアルキル、さらに好ましくはC₃₋₆カルボキシアルキルであり、カルボキシ基は活性エステルとして使用される。

【0049】

ベンゾピリリウム色素(Bz p^M)は、好ましくは2以上のスルホン酸置換基、さらに好ましくは2～6のスルホン酸置換基、最も好ましくは2～4のスルホン酸置換基を有する。好ましくは、スルホン酸置換基の少なくとも1つはC₁₋₄スルホアルキル基である。かかるスルホアルキル基は、好ましくは式IIのR⁶、R⁷、R⁸、R¹⁴、R¹⁵又はR¹⁶の位置にあり、さらに好ましくはR⁶、R⁷、R⁸、R¹⁴又はR¹⁵の位置にあり、最も好ましくはR⁷及びR⁸の一方又は両方と共にR⁶の位置にある。式IIのスルホアルキル基は、好ましくは式-(CH₂)_kSO₃M¹(式中、M¹はH又はB^oであり、kは1～4の値を有する整数であり、B^oは(上記に定義したような)生体適合性陽イオンである。)を有する。kは好ましくは3又は4である。

20

【0050】

式II中、wは好ましくは1である。R⁵は好ましくはH又はC₁₋₄カルボキシアルキルであり、最も好ましくはHである。Xは好ましくは-CR¹⁴R¹⁵-又は-NR¹⁶-であり、最も好ましくは-CR¹⁴R¹⁵-である。

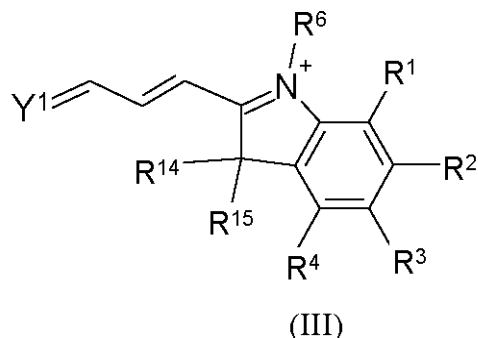
30

【0051】

好ましいBz p^M色素は下記式IIIを有する。

【0052】

【化7】



40

式中、Y¹、R¹～R⁴、R⁶、R¹⁴、R¹⁵及びJは式IIに関して定義した通りである。

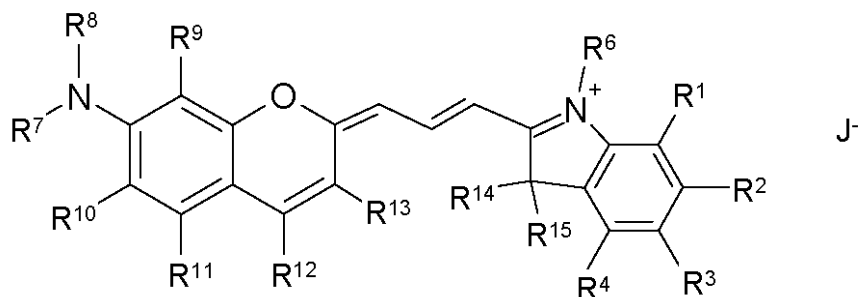
【0053】

50

式 I I I の好適な色素は、下記式 I I I a 又は I I I b を有する。

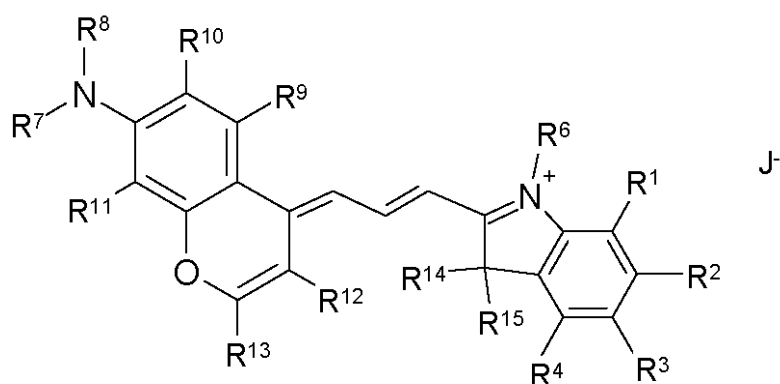
【 0 0 5 4 】

【 化 8 】



(IIIa)

10



(IIIb)

20

式 I I I、I I I a 及び I I I b の好ましい $R^1 \sim R^4$ 及び $R^6 \sim R^{13}$ 基は、式 I I a 及び I I b に関して上記に定義した通りである。式 I I I、I I I a 及び I I I b 中、 R^{14} 及び R^{15} は好ましくは一方が R^b 基でありかつ他方が R^c 基であるように選択される。 R^b は C_{1-2} アルキル、最も好ましくはメチルである。 R^c は C_{1-4} アルキル、 C_{1-6} カルボキシアルキル又は C_{1-4} スルホアルキル、好ましくは C_{3-6} カルボキシアルキル又は $-(CH_2)_k SO_3 M^1$ (式中、 k は 3 又は 4 であるように選択される。) である。

30

【 0 0 5 5 】

好ましくは、式 I I I の色素は、B T M への容易な共有結合を可能にするために C_{1-6} カルボキシアルキル置換基を有する。

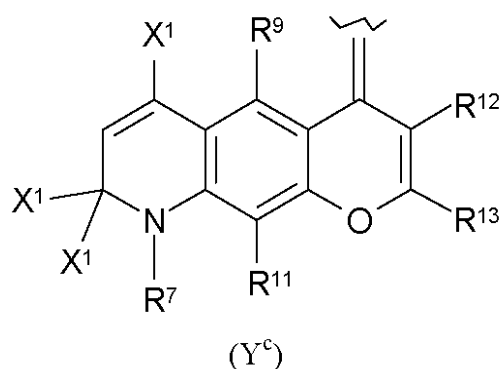
【 0 0 5 6 】

式 I I 又は I I I 中、 R^7 及び / 又は R^8 が R^9 及び / 又は R^{10} の一方又は両方と共に五員又は六員の N 含有複素環又はヘテロアリアル環を形成する場合、好ましいかかる環はピリジル又はジヒドロピリジルである。 R^8 基が R^{10} と共に環化された好ましいかかる Y^1 基は、下記式 Y^c を有する。

40

【 0 0 5 7 】

【化 9】

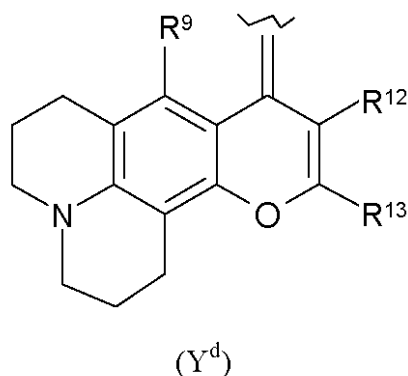


10

R⁷及びR⁸基の両方が環化された好ましいかかるY¹基は、下記式Y^dを有する。

【0058】

【化10】



20

30

式中、R⁷、R⁹及びR¹¹～R¹³は上記に定義した通りであり、各X¹は独立にH又はC₁₋₄アルキルである。

【0059】

式Y^c中、好ましくは下記の通りである。

各X¹はCH₃であり、

R⁹ = R¹¹ = Hであり、

R¹²はHであり、

R¹³はCH₃又は-C(CH₃)₃、さらに好ましくは-C(CH₃)₃である。

【0060】

式Y^d中、好ましくは下記の通りである。

R⁹はHであり、

R¹²はHであり、

R¹³は好ましくはCH₃又は-C(CH₃)₃、さらに好ましくは-C(CH₃)₃である。

【0061】

式IIIの-NR⁷R⁸基は下記のいずれかであることが好ましい。

(i) この基は開鎖形態にある。即ち、R⁷/R⁸基はR⁹/R¹⁰の一方又は両方と共に環化されていない。好ましいかかるR⁷及びR⁸基は、C₁₋₄アルキル及びC₁₋₄スルホアルキルから独立に選択され、最も好ましくはエチル及びC₃₋₄スルホアルキルから独立に選択される。

(ii) この基は環化されて、式Y^c又はY^d、さらに好ましくは式Y^cの環状Y¹置換基を

50

生じる。

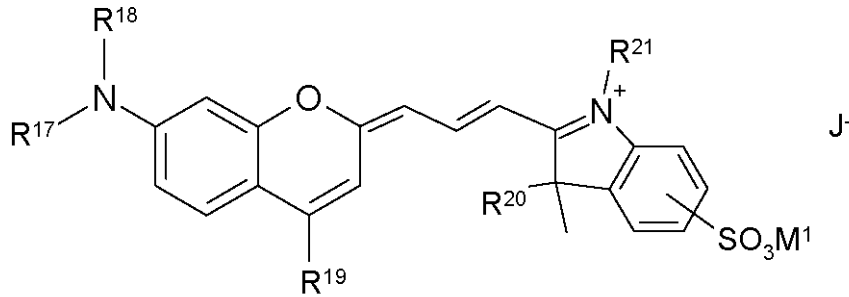
開鎖形態 (i) が最も好ましい。

【 0 0 6 2 】

式 I I I の特に好ましい色素は、下記式 I I I c、I I I d 又は I I I e を有する。

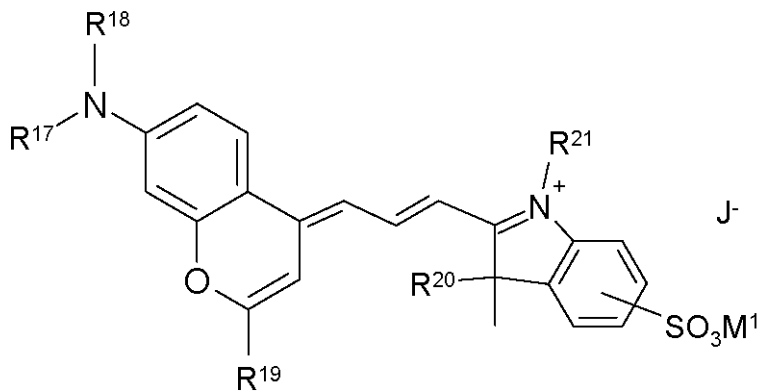
【 0 0 6 3 】

【 化 1 1 】



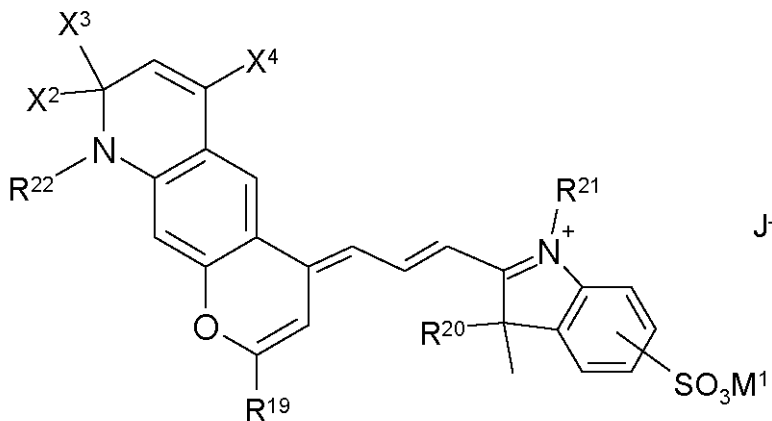
(IIIc)

10



(III d)

20



(III e)

30

40

式中、

M¹ 及び J は上記に定義した通りであり、

R¹⁷ 及び R¹⁸ は C₁₋₄ アルキル及び C₁₋₄ スルホアルキルから独立に選択され、

R¹⁹ は H 又は C₁₋₄ アルキルであり、

R²⁰ は C₁₋₄ アルキル、C₁₋₄ スルホアルキル又は C₁₋₆ カルボキシアルキルであり、

50

R^{21} は C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} カルボキシアルキルであり、

R^{22} は C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} スルホアルキル又は C_{1-6} カルボキシアルキルであり、

X^2 、 X^3 及び X^4 は独立にH又は C_{1-4} アルキルである。

式IIId、IIIe及びIIIfの色素は、好ましくは $R^{20} \sim R^{22}$ の1以上が C_{1-4} スルホアルキルであるように選択される。

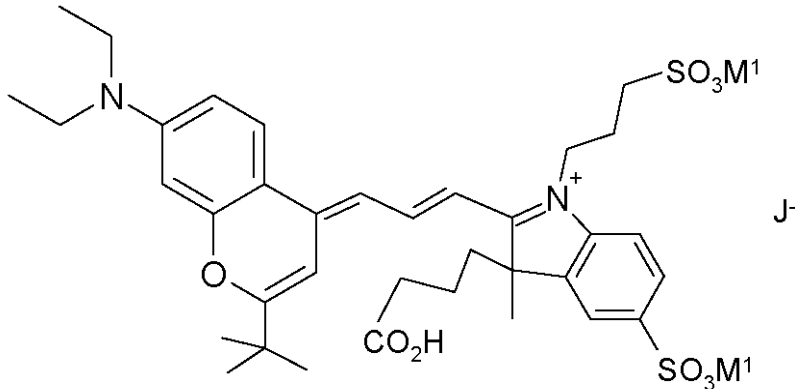
【0064】

式IIIdの好ましい特定の色素は、次式のDY-631及びDY-633である。

【0065】

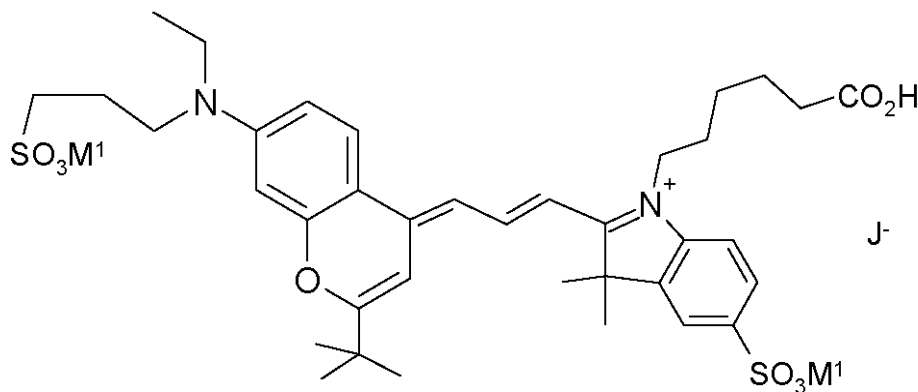
【化12】

10



DY-631

20



DY-633

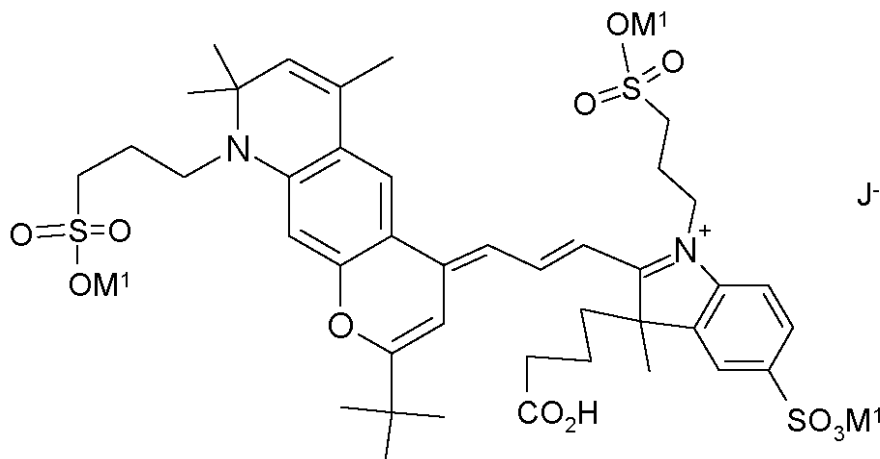
30

式IIIeの好ましい特定の色素は、次式のDY-652である。

【0066】

40

【化 1 3】



DY-652

10

20

30

40

50

好ましい特定の色素はDY - 631及びDY - 652であり、DY - 652が最も好ましい。

【0067】

BTMがペプチドである場合、好ましいかかるペプチドには以下のものがある。

- ソマトスタチン、オクトレオチド及び類似体。
- STレセプターに結合するペプチド(ここで、STとは大腸菌(E. coli)及び他の微生物によって産生される耐熱性毒素をいう。)
- ラミニンフラグメント、例えば、YIGSR、PDSGR、IKVAV、LRE及びKCQAGTFALRGDPQG。
- 白血球集積部位を標的化するためのN-ホルミルペプチド。
- 血小板第4因子(PF4)及びそのフラグメント。
- 例えば血管形成を標的化し得るRGD(Arg-Gly-Asp)含有ペプチド[R. Pasqualini et al., Nat Biotechnol. 1997 Jun; 15(6): 542-6]、[E. Ruoslahti, Kidney Int. 1997 May; 51(5): 1413-7]。
- α_2 -抗プラスミン、フィブロネクチン、 α_2 -カゼイン、フィブリノーゲン又はトロンボスポンジンのペプチドフラグメント。 α_2 -抗プラスミン、フィブロネクチン、 α_2 -カゼイン、フィブリノーゲン又はトロンボスポンジンのアミノ酸配列は、以下の参考文献中に見出すことができる。 α_2 -抗プラスミン前駆体[M. Tone et al., J. Biochem, 102, 1033(1987)]、 α_2 -カゼイン[L. Hansson et al, Gene, 139, 193(1994)]、フィブロネクチン[A. Gutman et al, FEBS Lett., 207, 145(1996)]、トロンボスポンジン1前駆体[V. Dixit et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5449(1986)]、R. F. Doolittle, An. Rev. Biochem., 53, 195(1984)。
- アンギオテンシンII: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe(E. C. Jorgensen et al, J. Med. Chem., 1979, Vol 22, 9, 1038-1044)及び[Sar, Ile]アンギオテンシンI: Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile(R. K. Turker et al., Science, 1972, 177, 1203)のようなアンギオテンシンの基質又は阻害剤であるペプチド。
- アンギオテンシンI: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu。

【0068】

B T Mがペプチドである場合、ペプチドの一方又は両方の末端（好ましくは両方の末端）に代謝抑制基（ M^{1G} ）がコンジュゲートされる。このようにして両方のペプチド末端を保護することは、インビボイメージング用途のために重要である。さもないと、急速な代謝の結果としてB T Mペプチドに対する選択的結合親和性が失われると予想されるからである。「代謝抑制基（ M^{1G} ）」という用語は、アミノ末端又はカルボキシ末端におけるB T Mペプチドの酵素（特にカルボキシペプチダーゼのようなペプチダーゼ）代謝を阻止又は抑制する生体適合性基を意味する。かかる基はインビボ用途のために特に重要であって、これらは当業者にとって公知であり、好適にはペプチドアミン末端に関してはN - アシル化基 - $NH(C=O)R^G$ （式中、アシル基 - $(C=O)R^G$ は C_{1-6} アルキル基及び C_{3-10} アリール基から選択される R^G を有するか、或いはポリエチレングリコール（PEG）構成単位を含む。）から選択される。好適なPEG基は、リンカー基（L）に関して下記に記載される。好ましいかかるPEG基は、式Bio 1又はBio 2（下記）のバイオモディファイアーである。好ましいかかるアミノ末端 M^{1G} 基はアセチル、ベンジルオキシカルボニル又はトリフルオロアセチルであり、最も好ましくはアセチルである。

10

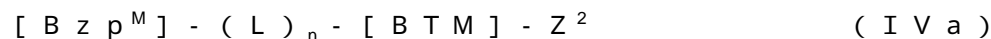
【0069】

ペプチドカルボキシル末端に関して好適な代謝抑制基には、カルボキサミド、tert - ブチルエステル、ベンジルエステル、シクロヘキシルエステル、アミノアルコール及びポリエチレングリコール（PEG）構成単位がある。B T Mペプチドのカルボキシ末端アミノ酸残基にとって好適な M^{1G} 基は、アミノ酸残基の末端アミンを C_{1-4} アルキル基（好ましくはメチル基）でN - アルキル化したものである。好ましいかかる M^{1G} 基はカルボキサミド又はPEGであり、最も好ましいかかる基はカルボキサミドである。

20

【0070】

いずれか一方又は両方のペプチド末端が M^{1G} 基で保護された場合、 $-(L)_n[Bz p^M]$ 部分は M^{1G} 基に任意に結合できる。好ましくは、少なくとも一方のペプチド末端は M^{1G} 基を有しておらず、その位置に $-(L)_n[Bz p^M]$ 部分が結合することでそれぞれ下記式IV a又はIV bの化合物が得られる。



式中、

Z^1 はB T MペプチドのN末端に結合していて、H又は M^{1G} であり、

Z^2 はB T MペプチドのC末端に結合していて、OH、 OB° （式中、 B° は（上記に定義したような）生体適合性陽イオンである。）又は M^{1G} である。

30

【0071】

式IV a及びIV b中、 Z^1 及び Z^2 は好ましくは共に独立に M^{1G} である。 Z^1 及び Z^2 にとって好ましいかかる M^{1G} 基は、ペプチド末端に関して上記に記載した通りである。いずれかのペプチド末端におけるB T Mペプチドの代謝抑制はこのように $-(L)_n[Bz p^M]$ 部分を結合することによっても達成できるが、 $-(L)_n[Bz p^M]$ 自体は本発明の M^{1G} の定義範囲外にある。

40

【0072】

B T Mペプチドは、任意には、 $Bz p^M$ の容易なコンジュゲーションのために適した側鎖を有しかつリンカー基（L）のA残基の一部をなす1以上の追加アミノ酸残基を含み得る。好適なかかるアミノ酸残基には、アミン官能化 $Bz p^M$ 色素とのコンジュゲーションのためのAsp又はGlu残基、或いはカルボキシ官能化又は活性エステル官能化 $Bz p^M$ 色素とのコンジュゲーションのためのLys残基がある。 $Bz p^M$ のコンジュゲーションのための追加アミノ酸残基は、好適にはB T Mペプチドの結合領域から離れて位置しており、好ましくはC末端又はN末端に位置している。好ましくは、コンジュゲーションのためのアミノ酸残基はLys残基である。

【0073】

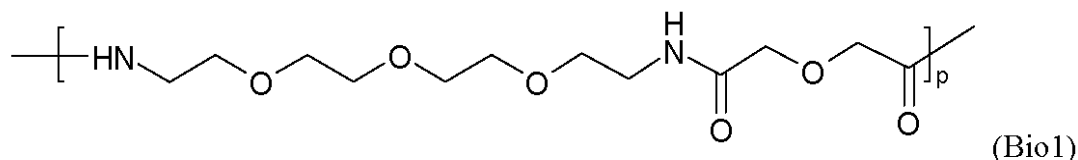
合成リンカー基（L）が存在する場合、それは好ましくは $[BTM]$ 及び $Bz p^M$ への

50

コンジュゲーションを容易にする末端官能基を含む。好適なかかる基 (Q^a) を以下に記載する。L が 1 ~ 10 のアミノ酸残基を有するペプチド鎖からなる場合、アミノ酸残基は好ましくはグリシン、リシン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びセリンから選択される。L が PEG 部分からなる場合、それは好ましくは下記式 Bio1 又は Bio2 の単分散 PEG 様構造のオリゴマー化で導かれる単位を含む。

【0074】

【化14】

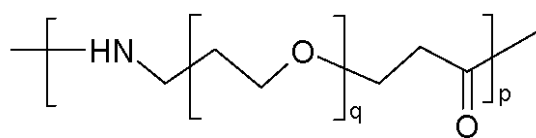


10

かかる PEG 様構造は、式 Bio1 (式中、p は 1 ~ 10 の整数である。) の 17 - アミノ - 5 - オキソ - 6 - アザ - 3, 9, 12, 15 - テトラオキサヘプタデカン酸であり得る。別法として、式 Bio2 のプロピオン酸誘導体に基づく PEG 様構造も使用できる。

【0075】

【化15】



(Bio2)

20

式中、p は式 Bio1 に関して定義した通りであり、q は 3 ~ 15 の整数である。式 Bio2 中、p は好ましくは 1 又は 2 であり、q は好ましくは 5 ~ 12 である。

30

【0076】

リンカー基が PEG 又はペプチド鎖からなっていない場合、好ましい L 基は、2 ~ 10 の原子、最も好ましくは 2 ~ 5 の原子、特に好ましくは 2 又は 3 の原子を含む - (A)_m - 部分を構成する結合原子の主鎖を有している。2 つの原子を含む最小リンカー基主鎖は、いかなる望ましくない相互作用も最小限に抑えられるように Bz p^M を十分に引き離すという利点を与える。

【0077】

商業的に入手できない BTM ペプチドは、P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, 1997 に記載されているような固相ペプチド合成法によって合成できる。

40

【0078】

イメージング剤は次のようにして製造できる。

【0079】

BTM に対する Bz p^M のコンジュゲーションを容易にするため、Bz p^M には好適には反応性官能基 (Q^a) が結合されている。Q^a 基は、BTM の相補的な官能基と反応することで Bz p^M と BTM との間に共有結合を形成するように設計されている。BTM の相補

50

的な官能基は、BTMの固有部分であってもよいし、或いは当技術分野で公知のように二官能性基での誘導体化の使用によって導入してもよい。表1は、反応基及びその相補的な対応基を示している。

【0080】

【表1】

表1: 反応性基及びそれらと反応性の相補基

反応性基(Q ^a)	相補基
活性化エステル	第一アミノ、第二アミノ
酸無水物、酸ハライド、	第一アミノ、第二アミノ、ヒドロキシル
イソチオシアネート	アミノ基
ビニルスルホン	アミノ基
ジクロロトリアジン	アミノ基
ハロアセトアミド、マレイミド	チオール、イミダゾール、ヒドロキシル、アミン、チオホスフェート
カルボジイミド	カルボン酸
ヒドラジン、ヒドラジド	アルデヒド及びケトンを含めたカルボニル
ホスホルアミダイト	ヒドロキシル基

10

「活性化エステル」又は「活性エステル」という用語は、良好な脱離基であり、したがってアミンのような求核性化合物との一層容易な反応を可能にするように設計されたカルボン酸のエステル誘導体を意味する。好適な活性エステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ペンタフルオロフェノール、ペンタフルオロチオフェノール、p-ニトロフェノール及びヒドロキシベンゾトリアゾールである。好ましい活性エステルは、N-ヒドロキシスクシンイミド又はペンタフルオロフェノールエステルである。

20

【0081】

タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物などのBTM中に存在する官能基の例には、ヒドロキシ、アミノ、スルフヒドリル、カルボニル(アルデヒド及びケトンを含む)並びにチオホスフェートがある。好適なQ^a基は、カルボキシル、活性化エステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミド、ヒドラジド、ビニルスルホン、ジクロロトリアジン及びホスホラミダイトから選択できる。好ましくは、Q^aはカルボン酸の活性化エステル、イソチオシアネート、マレイミド又はハロアセトアミドである。

30

【0082】

相補基がアミン又はヒドロキシルである場合、Q^aは好ましくは活性化エステルであり、好ましいかかるとは上記の記載した通りである。Bz p^M上の好ましいかかると置換基は、5-カルボキシペンチル基の活性化エステルである。相補基がチオールである場合、Q^aは好ましくはマレイミド又はヨードアセトアミドである。

【0083】

色素を生物学的分子にコンジュゲートするための一般的な方法は、Licha他[Topics Curr. Chem., 222, 1-29 (2002); Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 1087-1108 (2005)]によって記載されている。本発明で使用するためのペプチド、タンパク質及びオリゴヌクレオチド基質は、末端位置で標識することができ、或いは別法として1以上の内部位置で標識することができる。蛍光色素標識試薬を用いるタンパク質標識の総説及び例に関しては、“Non-Radioactive Labelling, a Practical Introduction”, Garman, A. J., Academic Press, 1997、及び“Bioconjugation - Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, Aslam, M. and Dent, A., Macmillan Reference Ltd. (1998)を参照されたい。合成ペプチドにおいて部位特異的標識を達成するためのプロトコ

40

50

ルが利用できる。例えば、Hermanson, G. T., "Bioconjugate Techniques", Academic Press (1996)を参照されたい。

【0084】

好ましくは、イメージング剤の製造方法は、

(i) BTMのアミン官能基を式 $J^1 - (L)_n - [Bz p^M]$ の化合物と反応させるか、
(ii) BTMのカルボン酸又は活性化エステル官能基を式 $J^2 - (L)_n - [Bz p^M]$ の化合物と反応させるか、或いは

(iii) BTMのチオール官能基を式 $J^3 - (L)_n - [Bz p^M]$ の化合物と反応させる

ことを含んでいる。式中、

BTM、 M^{1G} 、L、n及び $Bz p^M$ は上記に定義した通りであり、

J^1 はカルボン酸基、活性化エステル基、イソチオシアネート基又はチオシアネート基であり、

J^2 はアミン基であり、

J^3 はマレイミド基である。

【0085】

J^2 は、好ましくは第一又は第二アミン基であり、最も好ましくは第一アミン基である。段階(iii)では、BTMのチオール基は好ましくはシステイン残基に由来する。

【0086】

段階(i)~(iii)では、BTMは $Bz p^M$ 誘導体と反応する可能性がある他の官能基を任意に有し得るが、これらは所望の部位のみで化学反応が選択的に起こるように適当な保護基で保護される。「保護基」という用語は、望ましくない化学反応を阻止又は抑制するが、分子の残部を変質させない程度に温和な条件下で問題の官能基から脱離させるのに十分な反応性を有するように設計された基を意味する。脱保護後には所望の生成物が得られる。アミン保護基は当業者にとって公知であり、好適にはBoc(ここでBocはtert-ブチルオキシカルボニルである。)、Fmoc(ここでFmocはフルオレニルメトキシカルボニルである。)、トリフルオロアセチル、アリルオキシカルボニル、Dde[即ち、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]及びNpys(即ち、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル)から適宜に選択される。好適なチオール保護基は、Trt(トリチル)、AcM(アセトアミドメチル)、t-Bu(tert-ブチル)、tert-ブチルチオ、メトキシベンジル、メチルベンジル及びNpys(3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル)である。さらに他の保護基の使用は、'Protective Groups in Organic Synthesis', Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts (John Wiley & Sons, 1991)に記載されている。好ましいアミン保護基はBoc及びFmocであり、最も好ましくはBocである。好ましいチオール保護基はTrt及びAcMである。

【0087】

BTMへのコンジュゲーションに適するように官能化されたベンゾピリリウム色素($Bz p^M$)は、Dyomics社(Dyomics GmbH, Winzerlaer Str. 2A, D-07745 Jene、ドイツ、www.dyomics.com)から商業的に入手できる。この場合、反応性官能基(Q^a)はNHSエステル、マレイミド、アミノ又はカルボン酸である。ベンゾピリリウム色素の合成のために適した前駆体は、米国特許第5405976号に記載されたようにして製造することもできる。光学レポーター色素をアミノ酸及びペプチドにコンジュゲートする方法は、Licha(上記参照)並びにFlanagan他[Bioconj. Chem., 8, 751-756(1997)]、Lin他[ibid., 13, 605-610(2002)]及びZaheer[Mol. Imaging, 1(4), 354-364(2002)]によって記載されている。リンカー基(L)をBTMにコンジュゲートする方法は、色素のみをコンジュゲ

10

20

30

40

50

トする方法（上記参照）と類似の化学作用を使用し、当技術分野で公知である。

【0088】

第2の態様では、本発明は、第1の態様の医薬品組成物を製造するためのキットであって、当該キットは式1のコンジュゲートを無菌固体形態で含んでおり、生体適合性キャリアの無菌供給物で再構成すれば溶解が起こって所望の医薬品組成物が得られるキットを提供する。「コンジュゲート」及び「生体適合性キャリア」並びにこれらの好ましい実施形態は、第1の態様に関して記載した通りである。

【0089】

キットに関しては、コンジュゲート及び上述したような他の任意賦形剤は、凍結乾燥粉末として適当なバイアル又は容器に入れて供給できる。かかる粉末は、次いで所望の生体適合性キャリアを用いて再構成することで、哺乳類への投与が可能な無菌で非発熱性の形態の医薬品組成物を与えるように設計されている。

【0090】

コンジュゲートの好ましい無菌固体形態は凍結乾燥固体である。無菌固体形態は、好ましくは医薬品組成物に関して（上記に）記載したような医薬品用容器に入れて供給される。キットを凍結乾燥する場合、配合物は糖類（好ましくはマンニトール、マルトース及びトリシン）から選択される凍結保護剤を任意に含むことができる。

【0091】

第3の態様では、本発明は下記式Iのコンジュゲートを提供する。



(I)

式中、L及びnは第1の態様に関して定義した通りであり、 $Bz p^M$ は上記に定義した式IIを有し、BTM'は第1の態様に関して定義したBTMであると共に、合成品であり、

- (i) 3 ~ 100 量体ペプチド、
 - (ii) 酵素基質、酵素拮抗剤又は酵素阻害剤、
 - (iii) レセプター結合化合物、
 - (iv) オリゴヌクレオチド、及び
 - (v) オリゴDNAフラグメント又はオリゴRNAフラグメント
- から選択される。

【0092】

「合成品」という用語は上記に示した定義を有する。コンジュゲート中の式IIの $Bz p^M$ の好ましい実施形態は、第1の態様に関して上記に記載した通りである。(i) ~ (v)のBTM'の好ましい態様は、これらのタイプのBTMに関して第1の態様で記載した通りである。BTM'は好ましくは3 ~ 100 量体ペプチドである。

【0093】

第3の態様のコンジュゲートは、本発明のイメージング剤医薬品組成物の製造に際して有用である。かかるコンジュゲートは第1の態様に記載したようにして製造できる。

【0094】

第4の態様では、本発明は、哺乳類の身体の内視鏡光学イメージング方法であって、第1の態様の医薬品組成物を用いて内視鏡でBTM局在部位の画像を得ることを含んだ方法を提供する。

【0095】

「光学イメージング」という用語は、第1の態様に関して（上記に）定義した通りである。

【0096】

第4の態様の方法では、イメージング剤医薬品組成物は好ましくは前記哺乳類の身体に予め投与されている。「予め投与されている」とは、臨床医の関与の下でイメージング剤を例えば静脈内注射によって患者に投与する段階がイメージングに先立って既に実施されていることを意味する。この実施形態は、BTMが関係している哺乳類の身体の状態

10

20

30

40

50

のインビボ光学イメージング用の診断剤を製造するために、第1の態様で定義したコンジュゲートを使用することを含んでいる。

【0097】

第4の態様の好ましい光学イメージング方法は、蛍光反射イメージング(FRI)である。FRIでは、本発明のイメージング剤を診断すべき被験体に投与し、次いで被験体の組織表面を励起光(通常は連続波(CW)励起)で照明する。光はイメージング剤のBz p^M色素を励起する。励起光によって生じるイメージング剤からの蛍光を、蛍光検出器を用いて検出する。好ましくは、戻る光を濾光することで蛍光成分を(単独に又は部分的に)分離する。蛍光から画像を形成する。通常、最小限の処理が実施され(寿命、量子収量などの光学パラメータを計算するためのプロセッサは使用されない)、画像は蛍光強度をマップする。イメージング剤は、疾患領域に集中して高い蛍光強度を生み出すように設計されている。したがって、疾患領域は蛍光強度画像中に正のコントラストを生み出す。画像は好ましくはCCDカメラ又はチップを用いて取得される結果、リアルタイムイメージングが可能である。

10

【0098】

励起用の波長は使用する特定のBz p^M色素に応じて変化するが、本発明の色素に関しては通例500~1200nmの範囲内にある。励起光を発生するための装置は、レーザー(例えば、イオンレーザー、色素レーザー又は半導体レーザー)、ハロゲン光源或いはキセノン光源のような通常の励起光源であり得る。任意には、各種の光学フィルターを用いて最適の励起波長を得ることができる。好ましいFRI方法は下記の段階を含んでいる。即ち、

20

(i) 哺乳類の身体内の検査対象組織表面を励起光で照明する段階、

(ii) Bz p^Mの励起によって生じるイメージング剤からの蛍光を蛍光検出器を用いて検出する段階、

(iii) 蛍光検出器によって検出された光を任意に濾光して蛍光成分を分離する段階、及び

(iv) 段階(ii)又は(iii)の蛍光から前記検査対象組織表面の画像を形成する段階

を含んでいる。段階(i)では、励起光は好ましくは連続波(CW)の性質を有する。段階(iii)では、検出される光は好ましくは濾光される。特に好ましいFRI方法は蛍光内視鏡検査である。

30

【0099】

第6の態様の別のイメージング方法は、FDPM(周波数ドメイン光子移動)を使用する。これは、組織内における色素の検出深度が大きいことが重要である場合、連続波(CW)方法に比べて利点を有する[Sevick-Muraca et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 642-650(2002)]。かかる周波数/時間ドメインイメージングのためには、Bz p^Mが、画像化すべき病変の組織深度及び使用する計装のタイプに応じて変調できる蛍光特性を有するならば有利である。

【0100】

FDPM方法は下記のようなものである。即ち、

40

(a) 不均質組成を有する前記哺乳類の身体の光散乱性生体組織を、所定の経時変動強度を有する光源からの光に暴露してイメージング剤を励起する段階であって、組織は励起光を多重散乱させる段階、

(b) 前記暴露に回答した組織からの多重散乱発光を検出する段階、

(c) 組織内の様々な位置における蛍光特性のレベルにそれぞれ対応する複数の値をプロセッサで確定することにより、発光から組織全体の蛍光特性を定量化する段階であって、蛍光特性のレベルは組織の不均質組成に応じて変化する段階、及び

(d) 段階(c)の値に従って組織の不均質組成のマッピングを行うことで組織の画像を生成する段階

を含んでいる。

50

【0101】

段階(c)の蛍光特性は、好ましくはイメージング剤の取込みに対応し、好ましくはさらにイメージング剤の投与前における組織の吸着係数及び散乱係数に対応する複数の量のマッピングを含んでいる。段階(c)の蛍光特性は、好ましくは蛍光寿命、蛍光量子効率、蛍光収量及びイメージング剤取込みの1以上に対応する。蛍光特性は、好ましくは蛍光強度に無関係であり、またイメージング剤濃度に無関係である。

【0102】

段階(c)の定量化は、好ましくは、(i)値の推定値を設定し、(ii)推定値の関数として計算発光を求め、(iii)計算発光を前記検出段階の発光と比較して誤差を求め、(iv)誤差の関数として蛍光特性の修正推定値を得ることを含んでいる。定量化は、好ましくは、組織の多重光散乱挙動をモデル化する数学的関係から値を求めることを含んでいる。第1のオプションの方法は、好ましくはさらに、前記蛍光特性の変動を検出することでインビボでの組織の代謝特性をモニターすることを含んでいる。

10

【0103】

第4の態様の光学イメージングは、好ましくは哺乳類の身体の疾患状態の管理を支援するために使用される。「管理」という用語は、検出、ステージング、診断、疾患進行のモニタリング又は治療のモニタリングでの使用を意味する。疾患状態は、好適にはイメージング剤のBTMが関係するものである。イメージング用途には、好ましくは、カメラに基づく表面イメージング、内視鏡検査及び外科的誘導がある。好適な光学イメージング方法のさらなる詳細は、Sevick-Muraca他[Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 642-650(2002)]によって総説されている。

20

【0104】

第5の態様では、本発明は、哺乳類の身体の疾患状態の検出、ステージング、診断、疾患進行のモニタリング又は治療のモニタリングを行う方法であって、第4の態様のインビボ光学イメージング方法を含んでなる方法を提供する。

【実施例】

【0105】

以下に詳述する非限定的な実施例によって本発明を例証する。実施例1は、cMetに対して結合する生物学的標的化ペプチド(ペプチド1)の合成法を示している。実施例2は、本発明のBz p^M色素をペプチド(特にペプチド1)にコンジュゲートする方法を示している。実施例3は、本発明のペプチド1のペプチドコンジュゲートがcMetに対する親和性を保有すること(即ち、コンジュゲートした色素が生物学的結合及び選択性を妨害しないこと)を実証するデータを示している。ヒト血清アルブミンに対する適度に低い結合及び血漿中での高い安定性が実証された。実施例4は、本発明のペプチドコンジュゲートが結腸直腸癌の動物モデルにおいて有用な腫瘍/バックグラウンド比を示すことを示している。実施例5は本発明の色素に関する予測ソフトウェアの使用を記載しており、本発明の色素がインビボで潜在的に危険な代謝産物を生じないことを実証している。実施例6は化合物6の毒性試験を記載しており、予想される臨床用量がいかなる薬物関連の副作用も生じることなく十分に許容されることを示している。

30

【0106】

40

【表 2】

表 2: 実施例のベンゾピリリウム色素の構造

	DY-630	DY-631	DY-633	DY-650	DY-651	DY-652
式	III _d	III _d	III _d	III _e	III _e	III _e
R ¹⁷	Et	Et	Et	-	-	-
R ¹⁸	Et	Et	R ^d	-	-	-
R ¹⁹	Bu ^t	Bu ^t	Bu ^t	Bu ^t	Bu ^t	Bu ^t
R ²⁰	CH ₃	R ^e	CH ₃	CH ₃	R ^e	R ^e
R ²¹	R ^f	R ^d	R ^f	R ^f	R ^d	R ^d
R ²²	-	-	-	Et	Et	R ^d
X ²	-	-	-	CH ₃	CH ₃	CH ₃
X ³	-	-	-	CH ₃	CH ₃	CH ₃
X ⁴	-	-	-	CH ₃	CH ₃	CH ₃

R^dは-(CH₂)₃SO₃H、R^eは-(CH₂)₃CO₂H、R^fは-(CH₂)₅CO₂Hである。

10

20

DY-752はDY-652と同じ環及び置換基パターンを有するが、DY-652のトリメチン結合の代わりにペンタメチン結合（即ち、w = 2 及び R⁵ = H）を有している。

【0107】

略語

通常の三文字及び一文字アミノ酸略語を使用する。

Acm:	アセトアミドメチル	
ACN:	アセトニトリル	30
Boc:	tert-ブチルオキシカルボニル	
DMF:	N,N'-ジメチルホルムアミド	
DMSO:	ジメチルスルホキシド	
Fmoc:	9-フルオレニルメトキシカルボニル	
HCl:	塩酸	
HPLC:	高速液体クロマトグラフィー	
HSPyU:	O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチレン ウロニウムヘキサフルオロホスフェート	
Ile:	イソロイシン	
LC-MS:	液体クロマトグラフィー質量分析法	40
TFA:	トリフルオロ酢酸	
NHS:	N-ヒドロキシスクシンイミド	
NMM:	N-メチルモルホリン	
NMP:	1-メチル-2-ピロリジノン	
Pbf:	2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホ ニル	
PBS:	リン酸塩緩衝食塩水	
tBu:	t-ブチル	
TFA:	トリフルオロ酢酸	
Trt:	トリチル	50

T S T U : O - (N - スクシンイミジル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウ
ロニウムテトラフルオロボレート

実施例 1 : ペプチド 1 の合成

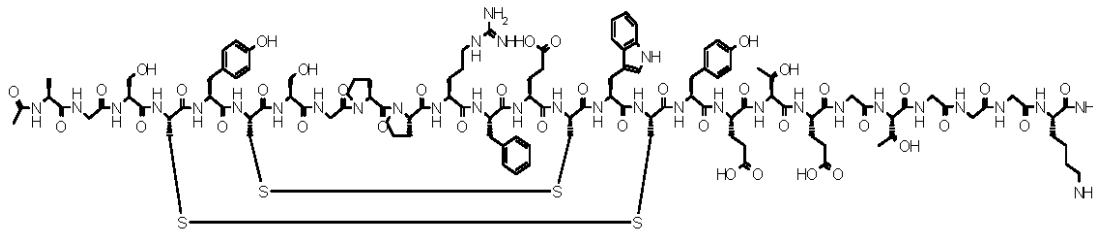
下記の配列を有しかつ 2 つの Cys - Cys 結合 (Cys 4 - 16 及び Cys 6 - 14)
を有する 26 量体二環式ペプチドを使用した。

A c - A l a - G l y - S e r - C y s - T y r - C y s - S e r - G l y - P r o -
P r o - A r g - P h e - G l u - C y s - T r p - C y s - T y r - G l u - T h r -
G l u - G l y - T h r - G l y - G l y - G l y - L y s - N H ₂ (「ペプチド 1」)

【 0 1 0 8 】

10

【 化 1 6 】



ペプチド 1

20

段階 (a) : ペプチド 1 の保護線状前駆体の合成

前駆体線状ペプチドは下記の配列を有している。

A c - A l a - G l y - S e r - C y s - T y r - C y s (A c m) - S e r - G l y -
P r o - P r o - A r g - P h e - G l u - C y s (A c m) - T r p - C y s -
T y r - G l u - T h r - G l u - G l y - T h r - G l y - G l y - G l y - L y s -
N H ₂。

【 0 1 0 9 】

0 . 1 m m o l の R i n k A m i d e N o v a g e l 樹脂から出発する F m o c 化
学を用いて、A p p l i e d B i o s y s t e m s 4 3 3 A ペプチド合成機上でペプ
チジル樹脂 H - A l a - G l y - S e r (t B u) - C y s (T r t) - T y r (t B u)
- C y s (A c m) - S e r (t B u) - G l y - P r o - P r o - A r g (P b f)
- P h e - G l u (O t B u) - C y s (A c m) - T r p (B o c) - C y s (T r t)
- T y r (t B u) - G l u (O t B u) - T h r (^{Me, Me} p r o) - G l u (O t
B u) - G l y - T h r (t B u) - G l y - G l y - G l y - L y s (B o c) - ポリ
マーをアセンブルした。カップリング段階では、(H B T U を用いて) 予備活性化した過
剰量の 1 m m o l アミノ酸を適用した。G l u - T h r プソイドプロリン (N o v a b i
o c h e m 0 5 - 2 0 - 1 1 2 2) を配列中に組み込んだ。樹脂を窒素バブラー装置に
移し、無水酢酸 (1 m m o l) 及び N M M (1 m m o l) を D C M (5 m L) に溶解した
溶液で 6 0 分間処理した。濾過によって無水物溶液を除去し、樹脂を D C M で洗浄してから窒素流下で乾燥した。

30

40

【 0 1 1 0 】

2 . 5 % の T I S 、 2 . 5 % の 4 - チオクレゾール及び 2 . 5 % の水を含む T F A (1
0 m L) 中で、側鎖保護基の除去及び樹脂からのペプチド切断を 2 時間 3 0 分にわたり同
時に実施した。樹脂を濾過によって取り除き、T F A を真空中で除去し、残留物にジエチ
ルエーテルを添加した。生じた沈殿をジエチルエーテルで洗浄し、空気乾燥することで、
2 6 4 m g の粗ペプチドを得た。

【 0 1 1 1 】

粗ペプチドを分取 H P L C (勾配 : 4 0 分で 2 0 ~ 3 0 % B (ただし、A = H ₂ O / 0

50

． 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：1 0 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 5 μ C 1 8 (2) 2 5 0 \times 2 1 . 2 0 m m、検出：U V 2 1 4 n m、生成物保持時間：3 0 分) によって精製することで、純粋なペプチド 1 の線状前駆体 1 0 0 m g を得た。純生成物を分析 H P L C (勾配：1 0 分で 1 0 ~ 4 0 % B (ただし、A = H₂O / 0 . 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：0 . 3 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 3 μ C 1 8 (2) 5 0 \times 2 m m、検出：U V 2 1 4 n m、生成物保持時間：6 . 5 4 分) によって分析した。さらに、エレクトロスプレー質量分析法を用いて追加の生成物特性決定を実施した (M H₂²⁺ 計算値：1 4 6 4 . 6、M H₂²⁺ 実測値：1 4 6 5 . 1)。

【 0 1 1 2 】

段階 (b) : C y s 4 - 1 6 ジスルフィドブリッジの形成

C y s 4 - 1 6 ; A c - A l a - G l y - S e r - C y s - T y r - C y s (A c m) - S e r - G l y - P r o - P r o - A r g - P h e - G l u - C y s (A c m) - T r p - C y s - T y r - G l u - T h r - G l u - G l y - T h r - G l y - G l y - G l y - L y s - N H₂。

【 0 1 1 3 】

段階 (a) からの線状前駆体 (1 0 0 m g) を 5 % D M S O / 水 (2 0 0 m L) に溶解し、アンモニアを用いて溶液を p H 6 に調整した。反応混合物を 5 日間攪拌した。次いで、T F A を用いて溶液を p H 2 に調整し、大部分の溶媒を真空中での蒸発によって除去した。生成物の精製のため、残留物 (4 0 m L) を分取 H P L C カラム上に少しずつ注入した。

【 0 1 1 4 】

残留物を分取 H P L C (勾配：0 % B を 1 0 分間、次いで 4 0 分で 0 ~ 4 0 % B (ただし、A = H₂O / 0 . 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：1 0 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 5 μ C 1 8 (2) 2 5 0 \times 2 1 . 2 0 m m、検出：U V 2 1 4 n m、生成物保持時間：4 4 分) によって精製することで、純粋なペプチド 1 の単環式前駆体 7 2 m g を得た。

【 0 1 1 5 】

(異性体 P 1 乃至 P 3 の混合物としての) 純生成物を分析 H P L C (勾配：1 0 分で 1 0 ~ 4 0 % B (ただし、A = H₂O / 0 . 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：0 . 3 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 3 μ C 1 8 (2) 5 0 \times 2 m m、検出：U V 2 1 4 n m、生成物保持時間：5 . 3 7 分 (P 1)、5 . 6 1 分 (P 2)、6 . 0 5 分 (P 3)) によって分析した。さらに、エレクトロスプレー質量分析法を用いて追加の生成物特性決定を実施した (M H₂²⁺ 計算値：1 4 6 3 . 6、M H₂²⁺ 実測値：1 4 6 4 . 1 (P 1)、1 4 6 4 . 4 (P 2)、1 4 6 4 . 3 (P 3))。

【 0 1 1 6 】

段階 (c) : C y s 6 - 1 4 ジスルフィドブリッジの形成 (ペプチド 1)

段階 (b) からの単環式前駆体 (7 2 m g) を窒素ブランケット下で 7 5 % A c O H / 水 (7 2 m L) に溶解した。1 M H C l (7 . 2 m L) 及び A c O H 中の 0 . 0 5 M I₂ (4 . 8 m L) をその順序で添加し、混合物を 4 5 分間攪拌した。1 M アスコルビン酸 (1 m L) を添加して無色の混合物を得た。大部分の溶媒を真空中で蒸発させ、残留物 (1 8 m L) を水 / 0 . 1 % T F A (4 m L) で希釈し、分取 H P L C を用いて生成物を精製した。残留物を分取 H P L C (勾配：0 % B を 1 0 分間、次いで 4 0 分で 2 0 ~ 3 0 % B (ただし、A = H₂O / 0 . 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：1 0 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 5 μ C 1 8 (2) 2 5 0 \times 2 1 . 2 0 m m、検出：U V 2 1 4 n m、生成物保持時間：4 3 ~ 5 3 分) によって精製することで、5 2 m g の純粋なペプチド 1 を得た。純生成物を分析 H P L C (勾配：1 0 分で 1 0 ~ 4 0 % B (ただし、A = H₂O / 0 . 1 % T F A 及び B = A C N / 0 . 1 % T F A)、流量：0 . 3 m L / 分、カラム：P h e n o m e n e x L u n a 3 μ C

10

20

30

40

50

18 (2) 50 × 2 mm、検出：UV 214 nm、生成物保持時間：6.54分) によって分析した。さらに、エレクトロスプレー質量分析法を用いて追加の生成物特性決定を実施した (MH₂²⁺計算値：1391.5、MH₂²⁺実測値：1392.5)。

【0117】

実施例2：ベンゾピリリウム色素のペプチドコンジュゲートの合成

一般コンジュゲーション方法

実施例1からのペプチド1 (4 mg、1.4 μmol) のDMF (0.5 mL) 溶液に、Bzp^M NHSエステル (1 mg、1 μmol) 及びsym-コリジン (8 μL、60 μmol) のDMF (0.5 mL) 溶液を添加した。反応混合物を (マイクロ波支援により) 60 で1時間加熱し、次いでRTで一晩放置した。次いで、反応混合物を20% ACN/水/0.1% TFA (7 mL) で希釈し、分取HPLCを用いて生成物を精製した。

10

【0118】

精製及び特性決定

粗ペプチドを分取HPLC (勾配：40分で20~40% B (ただし、A = H₂O / 0.1% TFA 及び B = ACN / 0.1% TFA)、流量：10 mL/分、カラム：Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 × 21.2 mm、検出：UV 214 nm) によって精製することで、純粋な [ペプチド1] - Bzp^Mコンジュゲートを得た。純生成物を分析HPLC (勾配：5分で10~40% B (ただし、A = H₂O / 0.1% TFA 及び B = ACN / 0.1% TFA)、流量：0.6 mL/分、カラム：Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 × 2 mm、検出：UV 214 nm) によって分析した。さらに、エレクトロスプレー質量分析法を用いて追加の生成物特性決定を実施した。

20

【0119】

製造した化合物を表3に示す。

【0120】

【表3】

表3: ペプチド1のペプチド-色素コンジュゲート

化合物	Bzp ^M	合成収率	MS 実測値 (MS 理論値)
1	DY-630	2.1 mg (44%)	1700.7 (MH ²⁺ 1699.7)
2	DY-631	2.5 mg (60%)	1740.2 (MH ²⁺ 1739.7)
3	DY-633	2.5 mg (60%)	1747.4 (MH ²⁺ 1746.7)
4	DY-650	3.1 mg (69%)	1726.1 (MH ²⁺ 1725.7)
5	DY-651	3.0 mg (77%)	1766.4 (MH ²⁺ 1765.7)
6	DY-652	3.3 mg (91%)	1813.5 (MH ²⁺ 1812.7)
7	DY-752	1.8 mg (45%)	1825.9 (MH ²⁺ 1825.7)

30

40

実施例3：インビトロ蛍光偏光アッセイ

蛍光偏光アッセイを用いて、cMet 標的に対するイメージング剤の結合親和性及びに血漿タンパク質に関する結合特性を検査した。蛍光偏光法の原理を簡単に述べれば、以下の通りである。

【0121】

単色光が水平偏光フィルターを通過し、試料中の蛍光分子を励起する。垂直偏光面内に正しく配向した分子のみが光を吸収し、励起され、次いで光を放出する。放出された光を水平面内及び垂直面内で測定する。異方性値 (A) は、下記の式に従った光強度の比である。

【0122】

50

【数 1】

$$A = \frac{\text{水平偏光子での強度} - \text{垂直偏光子での強度}}{\text{水平偏光子での強度} + 2 \times \text{垂直偏光子での強度}}$$

蛍光異方性測定は、Ex 635 / Em 678 nmで Tecan Saffire 蛍光偏光プレートリーダー（Tecan社、米国）を使用しながら、384 ウェルマイクロプレート中において結合緩衝液（PBS、0.01% Tween-20、pH 7.5）中 10 μ L の体積で実施した。色素標識ペプチドの濃度を一定（5 nM）に保つと共に、ヒト cMet / Fcキメラ（R&D Systems社）の濃度を 0 ~ 250 nM の範囲内で変化させた。結合混合物をマイクロプレート中において 30 で 10 分間平衡させた。観察された異方性の変化を下記の式に当てはめた。

10

【0123】

【数 2】

$$\gamma_{obs} = \gamma_{free} + (\gamma_{bound} - \gamma_{free}) \frac{(K_D + cMet + P) - \sqrt{(K_D + cMet + P)^2 - 4 \cdot cMet \cdot P}}{2 \cdot P}$$

20

式中、 r_{obs} は観察された異方性であり、 r_{free} は遊離ペプチドの異方性であり、 r_{bound} は結合ペプチドの異方性であり、 K_D は解離定数であり、 $cMet$ は総 $cMet$ 濃度であり、 P は総色素標識ペプチド濃度である。この式は、合成ペプチド及びレセプターが溶液中において 1 : 1 の化学量論比で可逆複合体を形成することを仮定している。Sigma Plot ソフトウェアを用いて非線形回帰によりデータ当てはめを行うことで K_D 値（一部位結合）を得た。

【0124】

ヒト $cMet$ （Fcキメラ）に対する結合に関して化合物 1 乃至化合物 6 を試験した。結果（表 4 参照）は、ヒト $cMet$ に対するすべての試験化合物の結合に関する nM 単位の K_D を示している。

30

【0125】

偏光値の変化が小さいことはインビボ用途に適した低い結合性に関連しているため、偏光値の変化を用いてヒト血清アルブミンに対する化合物の結合度を評価した。血漿タンパク質結合度（PPB）は Biacore 測定によって確認した。血漿中でのイメージング剤の安定性は、マウス血漿中において 37 で 2 時間インキュベートした後に残留する化合物の量を測定することで確認した。

【0126】

【表 4】

表 4: 化合物 1~6 のインビトロ特性

化合物	親和性 (Kd, nM)	PPB (偏光値の %変化率)	ヒト血清アルブミン 結合度 (Biacore)	マウス血漿安定 性 (2h, 37°C)
1	2.2	36	非常に高い	>95%
2	0.5	33	非常に低い	>95%
3	0.5	27	低い	>95%
4	3.2	55	非常に高い	>95%
5	2.2	49	中程度	>95%
6	0.9	46	非常に低い	>95%

10

実施例 4 : 化合物 2 ~ 6 のインビボ試験

(a) 動物モデル

この試験では雌の BALB/c / Aヌード (Bom) マウスを使用した。動物の使用は地方倫理委員会によって承認された。BALB/c / Aヌードは、他のヌードマウス系統に比べてヒト腫瘍に対し高い生着率を有する、同系交配された免疫無防備状態のマウス系統である。マウスは到着時に 8 週齢であり、試験の開始時には約 20 グラムの体重を有していた。動物は、HEPA 濾過空気を備えた個別換気ケージ (IVC、Scanbur BK社) 内に収容した。動物は、“ Rat and Mouse nr. 3 Breeding ” 飼料 (Scanbur BK社) 及び 1 mM のモル濃度に HCl を添加して酸性化した水道水 (pH 3.0) に随意にアクセスできた。

20

【 0 1 2 7 】

結腸癌細胞 HT - 29 はヒト結腸癌腫から導かれ、Zeng 他 [Clin. Exp. Metastasis, 21, 409 - 417 (2004)] によれば cMet を発現することが報告されている。この細胞株は、ヌードマウスに皮下接種した場合に腫瘍を形成することが判明した [Flatmark et al, Eur. J. Cancer, 40, 1593 - 1598 (2004)]。

30

【 0 1 2 8 】

10 % ウシ胎児血清及びペニシリン / ストレプトマイシンを補充した McCoy's 5a 培地 (Sigma # M8403) 中で HT - 29 細胞を増殖させた。継代数 4 (P4) で保存株を作成し、5 % DMSO を含むそれぞれの培地中における 10^7 細胞 / パイアルの量を液体窒素中で凍結して貯蔵した。移植当日、細胞を 37 °C の水浴中で急速に解凍し (約 2 分間)、洗浄し、PBS / 2 % 血清中に再懸濁した (1200 rpm で 10 分間の遠心)。投与用注射器中に細胞を吸引する際には、常にパイアル内の細胞を完全に混合してから行った。ファインポア注射針 (25 G) を用いて 0.1 ml の量の細胞懸濁液を肩及び背中に皮下注射した。次いで、動物をケージに戻し、腫瘍を 13 ~ 17 日間増殖させた。動物には、5 日以上の上昇期間を置いてから接種処置を施した。

40

【 0 1 2 9 】

(b) 処置

すべての試験物質は、凍結乾燥粉末から PBS を用いて再構成した。白色プリンター用紙の小さな堆積物をイメージ化してフラットフィールド画像を得、これを用いて照明の不均一性を補正した。光学イメージング処置中の不動化のため、酸素をキャリアーガスとするイソフルラン (通例 1.3 ~ 2 %) により、動物を同軸オープンマスク内で軽い外科レベル麻酔に麻酔した。動物を麻酔している間に、外科用鉗子及び微小はさみを用いて腫瘍

50

及び隣接する筋肉の部分から小さい皮膚片（3～5 mm）を取り除いた。これは、上方に位置する皮膚組織の妨害なしに腫瘍及び筋肉からの信号を測定するために行った。創傷は、液状の非蛍光性スプレー包帯（3 M社、米国ミネソタ州）を適用することで覆った。

【0130】

動物下方の空気圧センサー及び直腸温度プローブを用いるBioVetシステム（m2 m Imaging Corp. , 米国ニュージャージー州）によって動物の呼吸及び体温をモニターした。BioVetシステムはまた、イメージング処置期間（2時間）中に正常体温を維持するため、加熱マットセットを用いて40℃に外部加熱することを可能にした。造影剤投与のため、尾静脈中にVenflonカテーテルを配置した。各動物に1回の造影剤注射を施した。注射量は0.1 mlの試験化合物であり、その直後に0.2 mlの食塩水フラッシュを行った。注射の直前に蛍光画像を取得し、次いで2時間にわたり30秒ごとに取得した。

10

【0131】

(c) イメージング

イメージングは、光源を用いてレポーターを励起しかつ濾光系を用いて蛍光成分を抽出するように改造した臨床用腹腔鏡を通して実施した。レポーター分子の励起のためには635 nmレーザーを使用した。検出器としてはHamamatsu ORCA ERG CCDカメラを使用した。カメラは利得0の2×2ピンニングモードで動作させた。結腸イメージング用の標準露光時間は4秒であった。画像中の強度分布は、システム校正データにより、照明の不均一性について補正した。露出腫瘍及び正常筋肉バックグラウンドの上方に位置する検査対象領域から標的/バックグラウンド比を計算した。

20

【0132】

(d) 結果

試験化合物は、下記の平均腫瘍：筋肉比を有していた（表5）。

【0133】

【表5】

表5: 化合物2～6の腫瘍：筋肉比

化合物	平均腫瘍: 筋肉比 (注射後2注射後.)
2	2.40
3	1.67
4	1.52
5	1.22
6	1.57

30

実施例5：代謝及び毒性予測

Lhasa Ltd (22-23 Blenheim Terrace, Leeds LS2 9HD, 英国) からソフトウェアツールDerek及びMeteorを入手した。Derekは、既知の構造依存毒性に基づいて新しい化学的実在物の毒性を予測するために使用される。同様に、Meteorは新規化学物質から生じ得る代謝産物を予測する。両ツールは、化合物に関する公表データ及び未公表（だが確認済みの）データに基づいている。色素DY-652の化学構造を入力した。インビボでの潜在的に危険な代謝産物は予測されなかった。

40

【0134】

実施例6：化合物6の毒性試験

50

前臨床イメージング用量 (50 nmol/kg 体重) の 100 倍での化合物 6 の許容性を調べるため、限定急性用量毒性試験を行った。

【0135】

雄ラットに化合物を静脈内注射し、注射後 (p.i.) 1 日目、14 日目、21 日目及び 28 日目に屠殺した。検死時に、主要器官の肉眼的病理状態を検査し、以後の組織形態学的評価のために腎臓を中性緩衝ホルマリン中に採取した。注射直後には皮膚の弱い青色着色及び尿の中等度の青色着色が認められたが、注射後 1 日以内に消失した。検死時には、腎臓は注射後 1 日目で全般的に緑色であった。光学顕微鏡検査によれば、腎臓には化合物 6 に関連する所見は見られなかった。見られた他の小変化は偶発的なものであり、若い実験用ラット成体では普通のものであった。腎臓における血管の強い蛍光染色が注射後 1 日目に認められた。染色は注射後 14 日目までに減少し、注射後 21 日目には対照と識別できなかった。

【0136】

いずれの処理動物でも変性、壊死又は炎症の形跡は認められず、これは化合物の腎毒性が低いことを示唆している。予想される臨床用量の 100 倍で雄ラットに化合物 6 を 1 回だけ静脈内投与することは、いかなる薬物関連の副作用も生じることなく十分に許容されるという結論が得られた。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/059942
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C09B23/02 G01N33/58	C09B23/06 C12Q1/68	C09B23/08 A61K49/00 A61K47/48
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) C09B A61K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M.-R. LISY, E. SCHÜLER, F. LEHMANN, P. CZERNEY, W. A. KAISER, I. HILGER: "Diagnosis of peritonitis using near-infrared optical imaging of in vivo labeled monocytes-macrophages" JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, vol. 11, no. 6, 2 January 2007 (2007-01-02), pages 064014-1-064014-9, XP002548665 cited in the application abstract compound DY-676 item 2.5 from page 064014-2 item 4. from pages 064014-6 - 064014-8 ----- -/--	1-27
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 October 2009		Date of mailing of the international search report 28/12/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Constantinescu, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/059942

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 281 405 A2 (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST [DE]) 5 February 2003 (2003-02-05) paragraphs [0007] - [0009], [0016], [0019], [0024] - [0028] claims 1-6,10-18	1-27
X	EP 1 674 478 A1 (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT [DE]) 28 June 2006 (2006-06-28) paragraphs [0012], [0019], [0048] - [0057] claims 1-28	19,20
X	US 2004/162423 A1 (CZERNEY PETER [DE] ET AL) 19 August 2004 (2004-08-19) cited in the application column 1, lines 8-19,44-62 column 3, lines 9-22,29-39,44-50 column 4, lines 7-14 examples 1-22 figures 1-22 claim 1	19,20
X	WO 01/90253 A1 (DYOMICS GMBH [DE]; CZERNEY PETER [DE]; FRANK WILHELM [DE]; LEHMANN FRA) 29 November 2001 (2001-11-29) cited in the application compounds (I), (IIA) page 1, lines 3-13 page 2, lines 28-36 page 4, lines 28-36 page 5, line 21 - page 6, line 19 examples 1-10 figures 1-3 claims 1-3,12-19	19
X	US 2004/110161 A1 (KAPPEL ANDREAS [DE] ET AL) 10 June 2004 (2004-06-10) paragraphs [0001], [0002], [0008] - [0010], [0032], [0035], [0036], [0057], [0060], [0061], [0065] - [0067] compounds DY-630-NHS, DY-630-NHS claims 1-22	19
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/059942

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200774 Thomson Scientific, London, GB; Class B04, AN 2007-797046 XP002548429 -& WO 2007/074722 A (FURUKAWA ELECTRIC CO LTD; UNIV TOKUSHIMA) 5 July 2007 (2007-07-05) abstract Formula (3) page 14-15, compounds: DY-630, DY-631, DY-633, DY-635, DY-636, DY-650, DY-651 page 18, compound: DY-630-NHS</p>	19
X	<p>J. E. BERLIER, A. ROTHE, G. BULLER, J. BRADFORD, D. R. GRAY ET AL: "Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 51, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 1699-1712, XP002398136 HISTOCHEMICAL SOCIETY, NEW YORK, NY, US ISSN: 0022-1554 abstract page 1703, column 1, paragraph 2 - page 1704, column 1; paragraph 1 page 1706; table 2 compounds DY-630, DY-635, DY-680</p>	19
P,X	<p>WO 2008/015415 A2 (GE HEALTHCARE UK LTD [GB]; COOPER MICHAEL EDWARD [GB]) 7 February 2008 (2008-02-07) page 3, line 18 - page 4, line 8 page 17, line 30 - page 20, line 17 page 29, line 5 - page 30, line 9 page 30, lines 22-28 compounds (i)-(vi), (xiii), (xiv), (xxi); tables 2,3 examples 17,21,23-27 claims 1-4,8-35</p>	1-27
P,X	<p>WO 2007/139815 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US]; LOW PHILIP STEWART [US]; HILGENBRINK) 6 December 2007 (2007-12-06) cited in the application page 1, lines 9-13 page 4, line 31 - page 5, line 2 page 21, line 29 - page 22, line 31 example 30</p>	1-27
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/059942

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>N. KOSAKA, M. OGAWA, P. L. CHOYKE, H. KOBAYASHI, ET AL.: "In Vivo Stable Tumor-Specific Painting in Various Colors Using Dehalogenase-Based Protein-Tag Fluorescent Ligands" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 20, no. 7, 10 June 2009 (2009-06-10), pages 1367-1374, XP002550404 abstract page 1369, columns 1,2 page 1372 - page 1373 compound DY-633;figure 1 -----</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/059942

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1281405	A2	05-02-2003	NONE	
EP 1674478	A1	28-06-2006	WO 2006066959 A1 US 2008161199 A1	29-06-2006 03-07-2008
US 2004162423	A1	19-08-2004	DE 10258150 A1 EP 1428858 A1	08-07-2004 16-06-2004
WO 0190253	A1	29-11-2001	AT 308589 T AU 6581101 A BR 0106715 A CA 2380272 A1 DE 50107913 D1 EP 1283855 A1 JP 2003534435 T US 2002115862 A1	15-11-2005 03-12-2001 16-04-2002 29-11-2001 08-12-2005 19-02-2003 18-11-2003 22-08-2002
US 2004110161	A1	10-06-2004	AU 7063501 A CA 2417861 A1 DE 10038237 A1 WO 0212553 A2 EP 1307589 A2 JP 2004520010-T	18-02-2002 03-02-2003 14-02-2002 14-02-2002 07-05-2003 08-07-2004
WO 2007074722	A	05-07-2007	US 2008293584 A1	27-11-2008
WO 2008015415	A2	07-02-2008	CN 101522815 A EP 2046895 A2 US 2009252687 A1	02-09-2009 15-04-2009 08-10-2009
WO 2007139815	A2	06-12-2007	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ネアーン, ロバート・ジェームズ・ドーナット
イギリス、エイチピー7・9エルエル、バッキンガムシャー、アメルシャム、ホワイト・ライオン
・ロード、ザ・グローブ・センター、ジーイー・ヘルスケア・リミテッド

(72)発明者 ヘアレイ, アンドリュー・ジョン
ノルウェイ、エン - 0401、オスロ、ニイダレン、ピーオー・ボックス4220、ジーイー・ヘル
スケア・アクスイエ・セルスカブ

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 EA01 FA01

4C061 HH51 QQ04

4C085 HH11 JJ02 JJ20 KA27 KB55 KB56 KB82 KB91 LL18

专利名称(译)	光学成像剂		
公开(公告)号	JP2010534712A	公开(公告)日	2010-11-11
申请号	JP2010518652	申请日	2008-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气健康护理有限公司		
申请(专利权)人(译)	GE医疗集团有限公司		
[标]发明人	ネアーンロバートジェームズドナーネット ヘアレイアンドリュージュオン		
发明人	ネアーン,ロバート・ジェームズ・ドナーネット ヘアレイ,アンドリュージュオン		
IPC分类号	A61K49/00 G01N21/64 A61B1/00		
CPC分类号	C09B23/06 A61B5/0071 A61B5/4842 A61K49/0032 A61K49/0056		
FI分类号	A61K49/00.A G01N21/64.F A61B1/00.300.D		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/FA01 4C061/HH51 4C061/QQ04 4C085/HH11 4C085/JJ02 4C085/JJ20 4C085/KA27 4C085/KB55 4C085/KB56 4C085/KB82 4C085/KB91 4C085/LL18		
代理人(译)	小仓 博		
优先权	PCT/GB2007/002907 2007-07-31 WO 2007018957 2007-09-28 GB 60/976817 2007-10-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及适用于体内光学成像的成像剂，其包含苯并吡喃鎓染料与生物靶向部分（例如肽）的缀合物。还公开了药物组合物和试剂盒，以及体内成像方法。

