

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年9月4日(04.09.2014)

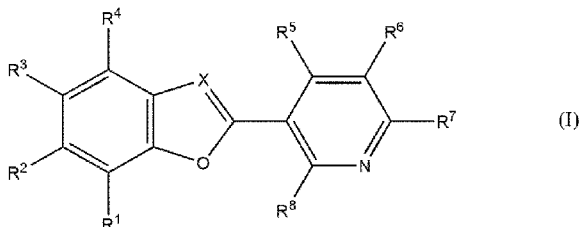


(10) 国際公開番号  
WO 2014/132919 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 51/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054326
- (22) 国際出願日: 2014年2月24日(24.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-038304 2013年2月28日(28.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 佐治 英郎(SAJI, Hideo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 小野 正博(ONO, Masahiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 猪原 匡史(IHARA, Masafumi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 野村 健一, 外(NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機館4階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: DIAGNOSTIC COMPOSITION

(54) 発明の名称: 診断用組成物



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a  $\beta$ -amyloid protein imaging probe for SPECT that is clinically usable in practice and an imaging probe for diagnosing diabetes. Provided is a composition for diagnosing a conformation disease, characterized by comprising a compound represented by general formula (I) [wherein: one of  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  and  $R^4$  represents a radioactive iodine atom and the remainder represent a hydrogen atom;  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  and  $R^8$  independently represent a hydrogen atom, an amino group, a methylamino group, a dimethylamino group, a methoxy group or a hydroxy group; and X represents CH or N] or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

(57) 要約: 臨床的に実用可能な SPECT 用  $\beta$ -アミロイドタンパク質イメージングプローブ及び糖尿病を診断するためのイメージングプローブを提供することを目的として、一般式 (I) [式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、及び  $R^4$  は、いずれか一つが放射性ヨウ素原子を表し、他は水素原子を表し、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、及び  $R^8$  は、互いに独立して、水素原子、アミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、メトキシ基、又はヒドロキシ基を表し、X は CH 又は N を表す。] で表される化合物、又はこれらの化合物の医薬上許容される塩を含有することを特徴とするコンフォメーション病診断用組成物が提供される。

WO 2014/132919 A1

## 明 細 書

発明の名称：診断用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、アルツハイマー病などのコンフォメーション病を診断するための組成物に関し、特に、シングルフォトン断層撮像法に用いられる組成物に関する。

### 背景技術

[0002] 近年、先進諸国における認知症患者の増加は大きな社会問題となっている。アルツハイマー病(AD)は認知症の中で最も大きな割合を占めており、全世界におけるADの患者数は、2006年の時点で2660万人と推定される。今後、急速に高齢化が進むことに伴い、2050年にはADの患者数が1億680万人に達すると予測されており、その早期診断法および根本治療薬の開発が強く望まれている。

[0003] ADは、その発症段階や軽度認知障害(MCI)の段階で、記憶・認知機能の低下などの臨床症状や脳萎縮が認められる。一方、ADの脳内における特徴的病理学的変化である、シート構造をとった $\beta$ -アミロイドタンパク質(A $\beta$ )を主構成成分とする老人斑と過剰リン酸化されたタウタンパク質からなる神経原線維変化の蓄積は、認知機能が正常な段階から認められ、臨床症状が認められる時点ではほぼ一定に達していることが知られている。老人斑の沈着はアミロイド前駆タンパク質から、分解酵素である $\beta$ -セクレターゼ、 $\gamma$ -セクレターゼによって順次切り出されたA $\beta$ (1-40)、A $\beta$ (1-42)が凝集、線維化することで形成される。また、神経原線維変化は、タウタンパク質が過剰にリン酸化されることで微小管との結合能を失い、遊離したタウタンパク質が互いに凝集することで起こる。特に、A $\beta$ 凝集体を主構成成分とする老人斑の沈着はAD発症過程の最も初期段階より始まり、また、疾患特異性が高いことから、A $\beta$ はADの早期診断法および治療薬の開発における重要な標的分子となっている。

[0004] 核医学分子イメージング法は、放射線の透過性を活かした、高精度かつ高感度な定量評価を行えることから、ADの早期臨床診断に適した手法であると考えられる。これまでに多くのポジトロン断層撮像法(PET)用A $\beta$ イメージングプローブが開発されており、中でも (E)-4-(2-(6-(2-(2-(2-[<sup>18</sup>F]フルオロエトキシ)エトキシ)エトキシ)ピリジン-3-イル)ビニル)-N-メチルアニリン(AV-45)は2012年4月にアメリカ食品医薬品局(FDA)に認可され、現在米国において臨床使用が開始されている (Cselenyi Z, Jonhagen ME, Forsberg A, Halldin C, Julin P, et al. (2012) J Nucl Med 53: 415-424)。しかしながら、PET用プローブの問題点として、PET装置を有する施設が少ないことや、使用する放射性核種の物理的半減期が短いことが挙げられる。

[0005] 今後、一層の患者数の増加が予測されるADの診断に対応するために、PETに比べ、施設数が多く、物理的半減期の長い放射性核種を使用できるという点で汎用性に優れるシングルフォトン断層撮像法 (SPECT)の利用が期待されている。これまでに放射性ヨウ素を含む化合物や<sup>99m</sup>Tcで標識された化合物が、SPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして開発されてきた。 [<sup>123</sup>I]6-ヨード-2-(4'-ジメチルアミノ)フェニル-イミダゾ[1,2-a]ピリジン (IMPY) は、ヒトで試験された最初のSPECT用A $\beta$ イメージングプローブである (Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Zhang B, Skovronsky D, et al. (2002) Brain Res 956: 202-210、Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Cross AJ, Maier DL, et al. (2004) Eur J Nucl Med Mol Imaging 31: 1136-1145、Newberg AB, Wintering NA, Plossl K, Hochold J, Stabin MG, et al. (2006) J Nucl Med 47: 748-754)。この化合物は、合成されたA $\beta$ ペプチドの凝集体に対し親和性を示し、AD患者の脳切片においてアミロイドプラークに選択的に結合したが、AD患者と健常者間で、生体分布に有意な差を示さなかった (Newberg AB, Wintering NA, Plossl K, Hochold J, Stabin MG, et al. (2006) J Nucl Med 47: 748-754)。この原因は、IMPYの親油性が高いことや生体内での安定性が低いことによると考えられる。このように、SPECT用A $\beta$ イメージングプローブは既に幾つか開発されているが、現在のところ、臨床的に実用化されたものは存在しない。

[0006] 最近、本発明者らは、 $^{18}\text{F}$ で標識されたピリジルベンゾフラン誘導体（非特許文献1）やピリジルベンゾオキサゾール誘導体（非特許文献2）がPET用A $\beta$ イメージングプローブとして利用できることを報告している。しかし、これらの誘導体をSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして利用することについての報告はない。

[0007] 上記のようにA $\beta$ は疾患と関連する代表的なアミロイドであるが、A $\beta$ 以外にも疾患と関連するアミロイドは数多く知られている。例えば、二型糖尿病の患者の膵臓ランゲルハンス島にも、アミロイドが沈着することが知られている（Opie E, J. Exp. Med., 5:527-541, 1991）。このアミロイドの主要構成成分は、アミリンと呼ばれるペプチドであり、ヒトのアミリンは、アミロイドとして沈着するのに重要な構造である $\beta$ -sheet構造を持っている（Glennier GG, Eanes ED, Wiley CA, Biochem. Biophys. Res. Comm., 155:608-614, 1988）。

[0008] ADだけでなく、糖尿病についても、PETやSPECTにより、診断する試みは以前からなされている。例えば、膵臓の $\beta$ 細胞に分布するGLP-1R（グルカゴン様ペプチド1受容体）と結合するペプチドを元にイメージングプローブを製作し、このプローブにより、膵島量を測定し、糖尿病を診断する方法が報告されている（特許文献1）。しかし、上述したアミリンを標的とするイメージングプローブや糖尿病の診断法は、これまでに報告されていない。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開W02010/032509

### 非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui M, Kagawa S, et al. (2011)

J Med Chem 54: 2971-2979

非特許文献2：Cui, M.; Wang, X.; Yu, P.; Zhang, J.; Li, Z.; Zhang, X.;

Yang, Y.; Ono, M.; Jia, H.; Saji, H.; Liu, B. J. Med. Chem. 20

12, 55, 9283-96

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、臨床的に実用可能なSPECT用A $\beta$ イメージングプローブを提供することを目的とする。また、本発明は、糖尿病を診断するためのイメージングプローブを提供することも目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体又はピリジルベンゾオキサゾール誘導体をADモデルマウスと野生型マウスに投与し、SPECT撮像を行ったところ、両マウスの脳において放射能集積に明確な差異があること、即ち、前記誘導体が臨床的に実用可能なSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとなり得ることを見出した。

[0013] 前述したように、ピリジルベンゾフラン誘導体やピリジルベンゾオキサゾール誘導体をPET用A $\beta$ イメージングプローブとして利用することは既に知られている。しかし、以下の理由から、本願出願時において、これらの誘導体をSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして利用できるとは予測されなかった。

1) ヨウ素は、フッ素に比べ分子量が大きいため、標識される物質の性質を変えてしまう。このため、放射性ヨウ素で標識されたピリジルベンゾフラン誘導体等は、放射性フッ素で標識されたピリジルベンゾフラン誘導体等と同様の性質を示さない可能性があった。

2) 上述したように、IMPYの生体分布は、AD患者と健常者間で有意な差を示さなかった。ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体又はピリジルベンゾオキサゾール誘導体は、IMPYと構造が類似しているため（共にヨウ素を含み、5員環と6員環の縮合環と6員環とからなる。）、IMPYと同様にAD患者と健常者間で生体分布に差異を示さないだろうと予想された。

[0014] また、本発明者は、上述した放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体が、二型糖尿病患者に見られるアミロイドの主要構成成分であるアミリ

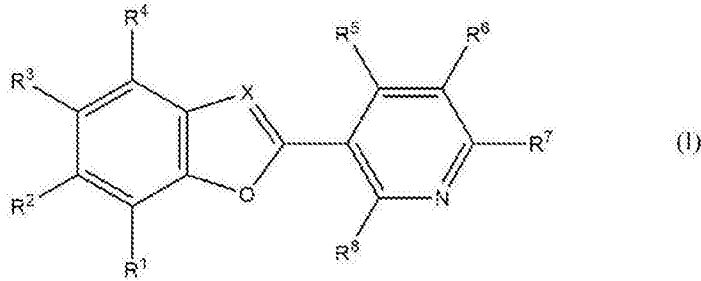
ンとも結合することを見出した。

[0015] 本発明は、以上の知見に基づいて、完成されたものである。

[0016] 即ち、本発明は、以下の(1)～(9)を提供する。

(1) 一般式(1)

[化1]



[式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、及び $R^4$ は、いずれかが放射性ヨウ素原子を表し、他は水素原子を表し、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、及び $R^8$ は、互いに独立して、水素原子、アミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、メトキシ基、又はヒドロキシ基を表し、 $X$ はCH又はNを表す。]

で表される化合物、又はこれらの化合物の医薬上許容される塩を含有することを特徴とするコンフォメーション病診断用組成物。

(2) 一般式(1)における $R^3$ が放射性ヨウ素原子であり、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^4$ が水素原子であることを特徴とする(1)に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(3) 一般式(1)における $R^7$ がアミノ基、メチルアミノ基、又はジメチルアミノ基であり、 $R^5$ 、 $R^6$ 、及び $R^8$ が水素原子であることを特徴とする(1)又は(2)に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(4) 放射性ヨウ素原子が、 $^{123}\text{I}$ 又は $^{125}\text{I}$ であることを特徴とする(1)乃至(3)のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(5) シングルフォトン断層撮像法に用いられることを特徴とする(1)乃至(4)のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(6) コンフォメーション病が、アルツハイマー病である(1)乃至(5)

のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(7) コンフォメーション病が、二型糖尿病である(1)乃至(5)のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物。

(8) (1)乃至(4)のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物を動物に投与し、その動物の脳の画像を撮影し、画像における一般式(1)で表される化合物の状態に基づいて、アルツハイマー病の診断を行うことを特徴とするアルツハイマー病の診断方法。

(9) (1)乃至(4)のいずれかに記載のコンフォメーション病診断用組成物を動物に投与し、その動物の膵臓の画像を撮影し、画像における一般式(1)で表される化合物の状態に基づいて、二型糖尿病の診断を行うことを特徴とする二型糖尿病の診断方法。

### 発明の効果

[0017] 本発明は、臨床的に実用可能なSPECT用 $A\beta$ イメージングプローブを提供する。また、本発明は、糖尿病を診断するためのイメージングプローブも提供する。

### 図面の簡単な説明

[0018] [図1]ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体の合成経路を示す図。図中の番号は化合物の番号を示す。

[図2]放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体の合成経路を示す図。図中の番号は化合物の番号を示す。

[図3]放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾフラン誘導体を投与したマウスの各臓器における放射能の変化を示す図。

[図4]化合物 $[^{123}\text{I}]8$ 投与後のTg2576マウス(A)及び野生型マウス(B)の脳SPECT画像。

[図5]化合物 $[^{123}\text{I}]8$ 投与後のTg2576マウス(A)及び野生型マウス(B)の脳切片のex vivo オートラジオグラム。A及びBと同じ脳切片のチオフラビンSによる蛍光染色画像を、それぞれC及びDに示した。

[図6]化合物 $[^{125}\text{I}]7$ (A)、化合物 $[^{125}\text{I}]8$ (B)、及び化合物 $[^{125}\text{I}]9$ (C)と

インキュベートしたAD脳切片のin vitro オートラジオグラム。A $\beta$  プラークを免疫染色によって確認した (D)。

[図7]ヨウ素を含むピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成経路を示す図。図中の番号は化合物の番号を示す。

[図8]放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成経路を示す図。図中の番号は化合物の番号を示す。

[図9]放射性ヨウ素を含むピリジルベンゾオキサゾール誘導体を投与したマウスの各臓器における放射能の変化を示す図。

[図10]化合物[<sup>125</sup>I]29 (○)、化合物[<sup>125</sup>I]30 (△)、又は化合物[<sup>125</sup>I]31 (◇) を投与した正常マウスの脳における放射能の変化を示す図。

[図11]化合物[<sup>125</sup>I]29 (A)、化合物[<sup>125</sup>I]30 (B)、及び化合物[<sup>125</sup>I]31 (C) とインキュベートしたAD脳切片のin vitro オートラジオグラム。A $\beta$  プラークを免疫染色によって確認した (D)。

[図12]化合物[<sup>123</sup>I]31を投与した16ヶ月齢Tg2576マウス (A)、25ヶ月齢Tg2576マウス (D)、16ヶ月齢野生型マウス (C)、及び25ヶ月齢野生型マウス (F) の脳切片のex vivo オートラジオグラム。Tg2576マウスの脳切片と同じ脳切片をチオフラビンSによって染色した (B及びE)。

[図13]化合物[<sup>123</sup>I]31投与後の25ヶ月齢Tg2576マウス (A) 及び25ヶ月齢野生型マウス (B) の脳SPECT画像。

[図14]化合物[<sup>125</sup>I]9のアミリン凝集体への結合飽和実験の結果を示す図。

[図15]化合物[<sup>125</sup>I]9とインキュベートした膵臓切片のin vitro オートラジオグラム。

### 発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0020] 一般式 (1) における R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、及びR<sup>4</sup>は、好適には、水素原子である。

[0021] 一般式 (1) における R<sup>3</sup>は、好適には、放射性ヨウ素原子である。

[0022] 一般式 (1) における R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、及びR<sup>8</sup>は、好適には、水素原子である。

[0023] 一般式 (1) における R<sup>7</sup>は、好適には、アミノ基、メチルアミノ基、又は



ジメチルアミノ基であり、より好適には、XがCHのときはメチルアミノ基であり、XがNのときはジメチルアミノ基である。

[0024] 放射性ヨウ素原子は、好適には、<sup>123</sup>I又は<sup>125</sup>Iであり、より好適には、<sup>123</sup>Iである。

[0025] 一般式(1)で表される化合物のうち代表的なものを下表に示す。なお、表中の「Me」はメチル基を表し、「I」は放射性ヨウ素原子を表す。

[0026] [表1]

番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	X
I-1	H	H	I	H	H	H	H	H	CH
I-2	H	H	I	H	NH <sub>2</sub>	H	H	H	CH
I-3	H	H	I	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	H	CH
I-4	H	H	I	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	H	CH
I-5	H	H	I	H	OMe	H	H	H	CH
I-6	H	H	I	H	OH	H	H	H	CH
I-7	H	H	I	H	H	NH <sub>2</sub>	H	H	CH
I-8	H	H	I	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	CH
I-9	H	H	I	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	CH
I-10	H	H	I	H	H	OMe	H	H	CH
I-11	H	H	I	H	H	OH	H	H	CH
I-12	H	H	I	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H	CH
I-13	H	H	I	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	CH
I-14	H	H	I	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	CH
I-15	H	H	I	H	H	H	OMe	H	CH
I-16	H	H	I	H	H	H	OH	H	CH
I-17	H	H	I	H	H	H	H	NH <sub>2</sub>	CH
I-18	H	H	I	H	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	CH
I-19	H	H	I	H	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	CH
I-20	H	H	I	H	H	H	H	OMe	CH
I-21	H	H	I	H	H	H	H	OH	CH
I-22	H	H	I	H	H	H	H	H	N
I-23	H	H	I	H	NH <sub>2</sub>	H	H	H	N
I-24	H	H	I	H	NMe	H	H	H	N
I-25	H	H	I	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	H	N
I-26	H	H	I	H	OMe	H	H	H	N
I-27	H	H	I	H	OH	H	H	H	N
I-28	H	H	I	H	H	NH <sub>2</sub>	H	H	N
I-29	H	H	I	H	H	NMe	H	H	N
I-30	H	H	I	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	H	N
I-31	H	H	I	H	H	OMe	H	H	N
I-32	H	H	I	H	H	OH	H	H	N
I-33	H	H	I	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H	N
I-34	H	H	I	H	H	H	NMe	H	N
I-35	H	H	I	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	N
I-36	H	H	I	H	H	H	OMe	H	N
I-37	H	H	I	H	H	H	OH	H	N
I-38	H	H	I	H	H	H	H	NH <sub>2</sub>	N
I-39	H	H	I	H	H	H	H	NMe	N
I-40	H	H	I	H	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	N
I-41	H	H	I	H	H	H	H	OMe	N
I-42	H	H	I	H	H	H	H	OH	N

[0027] 上記化合物のうちで、好ましい化合物としてI-12(化合物7)、I-13(化合物8)、I-14(化合物9)、I-33(化合物29)、I-34(化合物30)、I-35(化合物31)を挙げることができ、より好ましい化合物として、I-13、I-35を挙げることができる。

[0028] 一般式(1)で表される化合物は、実施例に記載された方法に従って、あ

るいはその記述を参照しつつそれらの方法に適宜に改変や修飾を加えた方法に従って合成することができる。

[0029] 本発明のコンフォメーション病診断用組成物には、一般式(1)で表される化合物の代わりに、一般式(1)で表される化合物の医薬上許容される塩を使用してもよい。このような塩としては、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩）、硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩などを例示できる。

[0030] 本発明において「コンフォメーション病」とは、 $A\beta$ 、タウタンパク質、プリオン、アミリンなどコンフォメーション変換によって異常化したタンパク質が原因の疾患群を意味し、ADのほか、ダウン症候群、オランダ型アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血症 (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis—Dutch type: HCHWA-D)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)やウシ海綿状脳症(BSE)、二型糖尿病などが含まれる。また、診断対象となる疾患には、一般には「疾患」と認識されない疾患の前駆症状も含まれる。このような疾患の前駆症状としては、ADの発症前にみられる軽度認知障害(MCI)などを例示できる。

[0031] 上記組成物によるコンフォメーション病の診断は、通常、この組成物を動物に投与し、その後、その動物の臓器の画像を撮影し、画像における一般式(1)で表される化合物の状態(量、分布等)に基づいて行う。具体的には、SPECTなどにより診断することができる。対象とする動物はヒト(診断対象者)であっても、ヒト以外の動物(マウス、ラット、ウサギなどの実験動物など)であってもよい。撮影する臓器は、診断対象とするコンフォメーション病に応じて決めればよく、例えば、ADを診断するのであれば脳の画像を撮影し、二型糖尿病を診断するのであれば膵臓の画像を撮影する。

[0032] 組成物の投与方法は特に限定されず、化合物の種類、標識物質の種類などに応じて適宜決めることができるが、通常は、皮内、腹腔内、静脈、動脈、又は脊髄液への注射又は点滴等によって投与する。組成物の投与量は特に限定されず、化合物の種類、標識物質の種類などに応じて適宜決めることがで

きるが、成人の場合、一般式 (I) で表される化合物を 1 日当たり  $10^{-10} \sim 10^{-3}$  mg 投与するのが好ましく、 $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mg 投与するのが更に好ましい。

[0033] 上記のようにこの組成物は、通常、注射又は点滴によって投与するので、注射液や点滴液に通常含まれる成分を含んでいてもよい。このような成分としては、液体担体（例えば、リン酸カリウム緩衝液、生理食塩水、リンゲル液、蒸留水、ポリエチレングリコール、植物性油脂、エタノール、グリセリン、ジメチルスルホキサイド、プロピレングリコールなど）、抗菌剤、局所麻酔剤（例えば、塩酸プロカイン、塩酸ジブカインなど）、緩衝液（例えば、トリスー塩酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）、浸透圧調節剤（例えば、グルコース、ソルビトール、塩化ナトリウムなど）を例示できる。

## 実施例

[0034] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 ピリジルベンゾフラン誘導体の合成及びその応用

〔実験方法〕

(1) 試薬、機器等

合成において使われるすべての試薬は、ナカライテスク社、和光純薬工業社またはアルドリッチ社から購入され、更なる精製なしで使われた。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (400MHz) は、TMSを内部の標準とし、室温で、JEOL JNM-AL400 NMR 分光計によって得られた。化学シフトは、内部のTMSと比較して  $\delta$  値 (ppm) として報告される。結合定数は、ヘルツで報告される。多重度は、s (一重線)、d (二重線)、t (三重線)、m (多重線) によって定義される。質量スペクトルは、島津GC-MS-QP2010 Plus (ESI) で得られた。蛍光観察は、BV-2Aフィルターセットを用いた顕微鏡 (ニコン社、Eclipse 80i) で実行された (励起, 400-440 nm; ダイクロイックミラー, 455 nm; ロングパスフィルター, 470 nm)。逆相HPLC、並びに放射性標識及び非放射性類似物の分析は、流量1.0 mL/minで供給される移動相 (アセトニトリル : 水 = 7:3) を用いたCosmosil C18カラム (ナカライテスク社、5C<sub>18</sub>-AR-II、4.6 mm×150 mm) と島津システ

ム (SPD-10A紫外線検出器 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) を持つLC-10ATポンプ) で、行われた。ddYマウス (5週齢、22-25 g、雄) は、清水実験材料株式会社から購入された。Tg2576トランスジェニックマウス及び野生型マウスは、タコニック・ファームズ社から購入された。小動物用micro-SPECT/CT (FX3300、ガンマ・メディカ・アイデアズ社) は、放射性同位元素総合センター (京都大学) で行われた。すべての動物実験は、本発明者の組織のガイドラインに従って行われ、Kyoto University Animal Care Committeeの承認を得た。

[0035] (2) ピリジルベンゾフラン誘導体の合成

5- (5-ブロモベンゾフラン-2-イル) ピリジン-2-アミン (化合物1) の合成

2 Mの $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (水溶液) /ジオキサン (150ml、1:1) を溶媒とする5-ブロモベンゾフラン-2-ボロン酸 (722 mg、3.0 mmol) 、2-アミノ-5-ヨードピリジン (660 mg、3.0 mmol) 、及び $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$  (366 mg、0.3 mmol) の溶液を一晩還流させながら攪拌した。混合物を室温まで冷却し、1Mの $\text{NaOH}$  (20 mL) を追加した。酢酸エチルで抽出した後、有機相を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、濾過した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=1:6) により精製し、273 mgの化合物1を得た (31.5%)。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.66 (s, 2H), 6.57 (d, 1H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ ), 6.79 (s, 1H), 7.32 (d, 1H,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ ), 7.33 (d, 1H,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ), 7.66 (d, 1H,  $J = 1.6 \text{ Hz}$ ), 7.86 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 2.4 \text{ Hz}$ ), 8.58 (d, 1H,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ ). MS:  $m/z$  290 ( $\text{M}^+\text{H}$ ).

[0036] 5- (5-ブロモベンゾフラン-2-イル) -N-メチルピリジン-2-アミン (化合物2) の合成

2 Mの $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (水溶液) /ジオキサン (20 ml、1:1) を溶媒とする5-ブロモベンゾフラン-2-ボロン酸 (120 mg、0.5 mmol) 、5-ヨード-N-メチルピリジン-2-アミン (117 mg、0.5 mmol) 及び $\text{Pd}(\text{PH}_3\text{P})_4$  (61 mg、0.05 mmol)の溶液を一晩還流させながら攪拌した。混合物を室温まで冷却し、1 Mの $\text{NaOH}$  (20 mL) を追加した。酢酸エチルで抽出した後、有機相を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、濾過した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサ

ン：酢酸エチル=1:1) により精製し、57.6 mgの化合物2を得た (38.0%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.98 (d, 3H, J = 5.2 Hz), 4.80 (s, 1H), 6.45 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.75 (s, 1H), 7.32 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 7.52 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.87 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, J<sub>2</sub> = 2.4 Hz), 8.60 (d, 1H, J = 2.8 Hz). MS: m/z 304 (M<sup>+</sup>H).

[0037] 5- (5-ブromoベンゾフラン-2-イル) -N,N-ジメチルピリジン-2-アミン (化合物3) の合成

2 MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (水溶液) /ジオキサン (20 mL、1:1) を溶媒とする5-ブromoベンゾフラン-2-ボロン酸 (120 mg、0.5 mmol)、5-ヨード-N,N-ジメチルピリジン-2-アミン (124 mg、0.5 mmol)、及びPd (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (61 mg、0.05 mmol)の溶液を一晩還流させながら攪拌した。混合物を室温まで冷却し、1MのNaOH (20 mL) を追加した。酢酸エチルで抽出した後、有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=7:3) により精製し、59.0 mgの化合物3を得た (37.2%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.14 (s, 6H), 6.55 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.71 (s, 1H), 7.17 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, J<sub>2</sub> = 2.4 Hz), 7.32 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.53 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.88 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, J<sub>2</sub> = 2.4 Hz), 8.65 (d, 1H, J = 2.4 Hz). MS: m/z 318 (M<sup>+</sup>H).

[0038] 5- (5- (トリブチルスタンニル) ベンゾフラン-2-イル) ピリジン-2-アミン (化合物4) の合成

混合溶媒 (40 mL、3:1ジオキサン/トリエチルアミン混合物) 中の化合物1 (273 mg、0.95 mmol)、ビス (トリブチルスズ) (0.8 mL)、及び (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> PD (100 mg) の混合物を、一晩90°Cで攪拌した。酢酸エチルで抽出した後、有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1:1) により精製して、115.6 mgの化合物4を得た (24.6%)。NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.87-0.91 (m, 9 H), 1.06-1.10 (m, 6H), 1.32-1.39 (m, 6H), 1.54-1.62 (m, 6H), 4.75 (s, 2H), 6.54 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.82 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, J = 8.0 Hz)

), 7.47 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.63 (s, 1H), 7.85 (dd, 1H,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz), 8.59 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $C_{25}H_{36}N_2O_2Sn$  ( $M^+$ ) 500.1849, found 500.1847.

[0039] N-メチル-5-(5-(トリブチルスタニル)ベンゾフラン-2-イル)ピリジン-2-アミン (化合物5) の合成

化合物4の調製のための上記と同様の反応を用い、27.7 mgの化合物5を28.4%の収率で化合物2から得た。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.89 (t, 9H,  $J = 7.2$  Hz), 1.32-1.35 (m, 12H), 1.62-1.66 (m, 6H), 3.04 (s, 3H), 6.75 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 6.87 (s, 1H), 7.32 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 7.46 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.64 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz), 8.05 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 8.40 (d, 1H,  $J = 3.2$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $C_{26}H_{38}N_2O_2Sn$  ( $M^+$ ) 514.2006, found 514.1998.

[0040] N,N-ジメチル-5-(5-(トリブチルスタニル)ベンゾフラン-2-イル)ピリジン-2-アミン (化合物6) の合成

化合物4の調製のための上記と同様の反応を用い、88.9 mgの化合物6を25.1%の収率で化合物3から得た。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.89 (t, 9H,  $J = 7.2$  Hz), 1.04-1.12 (m, 6H), 1.30-1.39 (m, 6H), 1.53-1.60 (m, 6H), 3.14 (s, 6H), 6.57 (d, 1H,  $J = 9.6$  Hz), 6.79 (s, 1H), 7.29 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.47 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.62 (s, 1H), 7.88 (dd, 1H,  $J_1 = 9.6$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz), 8.67 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $C_{27}H_{40}N_2O_2Sn$  ( $M^+$ ) 528.2162, found 528.2158.

[0041] 5-(5-ヨードベンゾフラン-2-イル)ピリジン-2-アミン (化合物7)

$CHCl_3$  (5 mL) 中の化合物4 (100 mg, 0.20 mmol) の溶液に、室温で $CHCl_3$  (0.5 mL, 1 M) 中のヨウ素溶液を加えた。混合物を10分間室温で攪拌した。NaHSO<sub>3</sub>溶液 (3mL、水中5%) を順次加えた。混合物を5分間攪拌した後、有機相を分離した。水相を $CHCl_3$ で抽出し、合わせた有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) により精製して、34.9 mgの化合物7を得た (52.0%)

。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.66 (s, 2H), 6.57 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 6.77 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.51 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.84 (s, 1H), 7.85 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 8.58 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{IN}_2\text{O}$  ( $\text{M}^+$ ) 335.9760, found 335.9752.

[0042] 5- (5-ヨードベンゾフラン-2-イル) -N-メチルピリジン-2-アミン (化合物8)

化合物7の調製のための上記と同様の反応を用い、50.2 mgの化合物8を65.1%の収率で化合物5から得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.98 (d, 3H,  $J = 4.8$  Hz), 4.79 (s, 1H), 6.45 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 6.74 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.50 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.85 (s, 1H), 7.87 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 8.60 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{IN}_2\text{O}$  ( $\text{M}^+$ ) 349.9916, found 349.9923.

[0043] 5- (5-ヨードベンゾフラン-2-イル) -N,N-ジメチルピリジン-2-アミン (化合物9)

化合物7の調製のための上記と同様の反応を用い、32.8 mgの化合物9を45.6%の収率で化合物6から得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.14 (s, 6H), 6.55 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 6.70 (s, 1H), 7.25 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.47 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.82 (s, 1H), 7.84 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 8.65 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (EI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}$  ( $\text{M}^+$ ) 364.0073, found 364.0065.

[0044] (3) 放射性合成

ピリジルベンゾフラン誘導体の放射性ヨウ素標識体は、対応するトリブチルスズ誘導体から合成した。簡単に言えば、反応を開始するために、100  $\mu\text{L}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) が、密封したバイアル中のトリブチルスズ誘導体 (0.5 mg/100  $\mu\text{L}$  の EtOH)、7.4 MBqの  $^{123}\text{I}$  又は 0.74 MBqの  $^{125}\text{I}$ 、及び 1N の 100  $\mu\text{L}$  の HCl の混合物に加えられた。反応物を10分間室温で進行させ、 $\text{NaHSO}_3$  の添加により終了させた。重炭酸ナトリウムで中和した後、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  カラムを通過させて乾燥させ、窒素ガス流で乾燥

させた。放射性標識されたリガンドはHPLCによって精製された。

[0045] (4) 溶液中での凝集A $\beta$ ペプチドを用いたin vitro結合分析

A $\beta$  (1-42) は、ペプチド研究所 (大阪、日本) から購入した。凝集は、10 mMリン酸ナトリウム及び1 mM EDTAを含む緩衝液 (pH7.4) 中に、ペプチド (0.25 mg / ml) を穏やかに溶解させることにより行った。穏やかに一定に振とうさせながら、溶液を37°Cで、42時間インキュベートした。50  $\mu$ Lのヨウ素化されたピリジルベンゾフラン誘導体 (10%EtOH中0.008 pM-400  $\mu$ M) と50  $\mu$ Lの[<sup>125</sup>I]IMPY (0.02 nM) と50  $\mu$ LのA $\beta$  (1-42) 凝集体と850  $\mu$ Lの10% EtOHを含む混合物を3時間室温でインキュベートした。次いで、混合物を、ブランデルM-24セルハーベスターを用いたワットマンGF/Bフィルターを通して濾過し、そして結合した<sup>125</sup>Iリガンドを含有するフィルターの放射能を $\gamma$ カウンターで測定した。半最大阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) の値は、GraphPad Prismは5.0を使用して、3つの独立した実験の置換曲線から決定し、阻害定数 (K<sub>i</sub>) のためのそれらは、Cheng-Prusoffの式 (Cheng Y, Prusoff WH (1973) Biochem Pharmacol 22: 3099-3108):  $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$  を用いて計算された (ここで、[L]はアッセイで使用された[<sup>125</sup>I]IMPYの濃度であり、K<sub>d</sub>はIMPY (4.2 nM) の解離定数である。 )。

[0046] (5) 正常マウスにおける生体内分布

2 %イソフルラン麻酔下で、ddYマウスの尾静脈に、<sup>125</sup>I標識ピリジルベンゾフラン誘導体 (37 kBq) を含む10%エタノール(100  $\mu$ L)を直接注入した。マウス (各時点でn =5) は、注射後、2分、10分、30分、及び60分で屠殺した。目的の臓器を摘出して秤量し、放射能を自動ガンマカウンター (COBRAII、パッカー) で測定した。臓器ごとの線量の割合は、注入物の適宜希釈されたアリコートに、組織の数値を比較することにより算出した。サンプルのグラム当たりの線量の割合は、サンプルの数値を、希釈された初期線量の数値と比較することによって計算した。

[0047] (6) 小動物用SPECT/CT

マルチモダリティ前臨床イメージングプラットフォームFLEX Triumph (ガ



ンマ・メディカ社)を備えた前臨床イメージングシステムFX3300(ガンマ・メディカ社)を用いて、SPECT及びCTのデータを取得し、処理した。Tg2576トランスジェニックマウス(28ヶ月齢、雌)及び野生型マウス(28ヶ月齢、雌)を、それぞれ、アルツハイマー病のモデル及び年齢を一致させた対照として使用した。0.1% Tween80を含む10%EtOH水溶液中の化合物 $[^{123}\text{I}]8$ (20.5-26.5 MBq)を、尾静脈に注射した。投与から10分後にマウスをイソフルラン(2.0%イソフルラン)で麻酔し、麻酔したマウスの断層スパイラルSPECTスキャンを実行するため、4ヘッド検出機カメラを使用した。取得パラメータは以下の通りであった:回転角度,  $360^\circ$ ; 投影時間, 90秒; 投影回数, 32; コリメータ、マルチピンホールコリメータ(N5F75A10); 回転半径, 35mm。SPECTの取得後直ちに、麻酔したマウスのCT取得を行った。取得パラメータは以下の通りであった:連続フライングモードでのガントリ回転; 管電圧, 61 kV; 管電流,  $305\ \mu\text{A}$ ; スポットサイズ,  $50\ \mu\text{m}$ ;  $2\times 2$ ビニングと $1184\times 1120$ 投影行列サイズで、 $360^\circ$ の完全なスキャンで、合計512映像/1フレームを取得した。

[0048]  $0.177\times 0.177\times 0.177\ \text{mm}$ のボクセルサイズ( $512\times 512\times 512$ のイメージボリューム)で得られた修正3Dコーンビームフェルトカムプアルゴリズムを、CT投影を再構築するために使用した。SPECT投影決定を定量的画像の生成のために処理した。159 keVを中心とした20%のエネルギーウィンドウを、 $^{123}\text{I}$ の取得のために使用した。 $0.835\times 0.826\times 0.598\ \text{mm}$ のボクセルサイズで、 $80\times 80\times 80$ イメージ行列が生じる3Dの順序付けられたサブセット期待値最大化アルゴリズム(5回の反復、8サブセット)を、SPECT投影を再構築するために使用した。Amiraの3Dデータ解析と可視化ソフトウェア(マーキュリーコンピュータシステムズ社)を、画像分析を実行するために使用した。

[0049] (7) トランスジェニックマウス脳のex vivoオートラジオグラフィー

動物はSPECT分析の後断頭により殺された。脳をすぐに取り外し、ドライアイス/ヘキサンバスで凍結させた。 $20\ \mu\text{m}$ の切片を切り出し、一晚BASイメージングプレート(富士フィルム社、東京、日本)に暴露した。ex vivoでのフィルムオートラジオグラムを得た。オートラジオグラフィー検査後、同じ切片

を、 $A\beta$  プラークの存在を確認するために、チオフラビン-Sで染色した。チオフラビン-Sの染色のために、切片を、5分間、50%EtOHを含む0.125 %チオフラビン-S溶液中に浸漬し、50%エタノールで洗浄した。乾燥後、切片をB-2Aフィルターセット（励起, 450-490 nm; ダイクロイックミラー, 505 nm; ロングパスフィルター, 520 nm）を備えた顕微鏡（ニコン社、Eclipse 80i）を使用して調べた。

[0050] (8) ヒトAD脳切片を用いたin vitroオートラジオグラフィー

ADの剖検確認例（93歳、女性）の死後脳組織を、京都大学大学院医学研究科から得た。パラフィン包埋ブロックの6マイクロメートルの厚さの連続切片を、in vitroオートラジオグラフィーのために使用した。切片を、室温で1時間<sup>125</sup>I標識トレーサー（444 kBq/50  $\mu$ L）と共にインキュベートし、次いで、40% EtOH中の飽和 $Li_2CO_3$ 中に浸漬し（2回の2分洗浄）、40% EtOHで洗浄し（1回の2分洗浄）、30秒間水洗した。乾燥後、<sup>125</sup>I標識切片を一晩BASイメージングプレート（富士フィルム社、東京、日本）に暴露した。オートラジオグラフィー画像はBAS5000スキャナシステム（富士フィルム社）を用いて得られた。オートラジオグラフィー検査後、同じ切片は、アミロイド $\beta$ タンパク質免疫組織染色キット（和光純薬社）を用いて免疫染色された。

[0051] [実験結果]

(1) ピリジルベンゾフラン誘導体の合成

ピリジルベンゾフラン骨格の形成に重要なステップは、鈴木カップリング反応によって達成された（図1）（Miyaura N, Yamada K, Suzuki A (1979) Tetrahedron Lett 36: 3437-3440）。鈴木カップリングによって、希望する化合物1-3を、それぞれ収率31.5%、38.0%、及び37.2%で得られた。ブromo化合物（1-3）を、触媒としてPd（0）を使用して、ビス（トリブチルスズ）と反応させ、対応するトリブチルスズ誘導体（4-6）を、それぞれ24.6%、28.4%、及び25.1%の収率で得た。これらのトリブチルスズ誘導体を直ちに室温でクロロホルム中のヨウ素と反応させ、ヨウ素誘導体（7-9）を、それぞれ52.0%、65.1%、及び45.6%の収率で得た。さらに、これらのトリブチルスズ誘導体

は、化合物[<sup>125</sup>I]7、化合物[<sup>123</sup>I/<sup>125</sup>I]8、及び化合物[<sup>125</sup>I]9の調製における放射性ヨウ素標識のための出発物質として使用することもできる。新規な放射性ヨウ素標識ピリジルベンゾフラン誘導体は、酸化剤として過酸化水素を使用してヨウ素化脱スタンニル反応によって得られた（図2）。担体無添加合成は、<sup>125</sup>I（81.4 TBq/mmol）と同様の理論上の特異的活性をもつ最終的な製品になるだろうと予想された。放射性ヨウ素標識リガンドの放射化学的同一性は、HPLCプロファイルによって非放射性化合物との共注入によって、それらのHPLCプロファイルから確認された。化合物[<sup>125</sup>I]7、化合物[<sup>123</sup>I/<sup>125</sup>I]8、及び化合物[<sup>125</sup>I]9は、HPLCの精製後に、61-89 %の放射化学収率で、>99%の放射化学的純度で得られた。

[0052] (2) Aβ (1-42) 凝集体への *in vitro* 結合分析

ヨウ素化されたピリジルベンゾフラン誘導体の親和性の初期スクリーニングは、競合放射性リガンドとして[<sup>125</sup>I]IMPYを使用して、Aβ (1-42) 凝集体について行った (Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, et al. (2010) ACS Med Chem Lett 1: 321-325、Ono M, Haratake M, Saji H, Nakayama M (2008) Bioorg Med Chem Lett 16: 6867-6872)。

これらの誘導体は、ナノモル範囲のK<sub>i</sub>値 (K<sub>i</sub>=2.4-10.3 nM) で、[<sup>125</sup>I]の結合を阻害した。このことは、それらが、Aβ (1-42) 凝集体に対する優れた親和性を有していたことを示す (表2)。コントロールとしてのIMPYとPIBのK<sub>i</sub>値は、それぞれ、10.5 nMおよび9.0 nMであった。

[0053] [表2]

Inhibition Constants for the Binding of [ <sup>125</sup> I]IMPY to Aβ(1-42) Aggregates.	
Compound	K <sub>i</sub> (nM) <sup>a</sup>
7	10.3 ± 1.48
8	2.94 ± 0.22
9	2.36 ± 0.53
IMPY <sup>b</sup>	10.5 ± 1.05
PIB <sup>b</sup>	9.00 ± 1.31

<sup>a</sup>Values are the means ± standard errors of the mean of three independent determinations.

<sup>b</sup>Data from Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui M, Kagawa S, et al. (2011) J Med Chem 54: 2971-2979.

[0054] (3) 正常マウスにおける *in vivo* 生体内分布

本発明者は、正常なマウスにおいて、化合物[<sup>125</sup>I]7、化合物[<sup>125</sup>I]8、及び化合物[<sup>125</sup>I]9の静脈内注射後の放射能の生体内分布を決定した(図3)。これらのすべての<sup>125</sup>I標識誘導体は、注射後直ちに(注射後2分で4.14-4.67 %ID/g)血液脳関門(BBB)を通過し、放射能が時間とともに脳から除去された(注射後60分で1.30-3.69 %ID/g)。化合物[<sup>125</sup>I]8は、注射後2分でピークに達し、化合物[<sup>125</sup>I]7、化合物[<sup>125</sup>I]9は、注射後10分でピークに達した。一般的に、インデックスとしての $\text{brain}_{2\text{min}}/\text{brain}_{60\text{min}}$ 比は、脳からの流出比を比較するために使用されている。化合物[<sup>125</sup>I]7、化合物[<sup>125</sup>I]8、及び化合物[<sup>125</sup>I]9の $\text{brain}_{2\text{min}}/\text{brain}_{60\text{min}}$ 比は、それぞれ、1.30、3.21及び1.12であった。放射能は、脳内の蓄積に加えて、例えば、肝臓、腎臓、胃、腸などの他の臓器にも分布した。胃や腸が時間をかけた放射能の蓄積を示す一方、肝臓や腎臓は初期の高い取り込みと経時的な流出を示した(図3)。

## [0055] (4) 小動物用SPECT/CT

*in vivo*でのA $\beta$ イメージングの実現可能性を証明するために、SPECT/CTは、化合物[<sup>123</sup>I]8の静脈内注射後Tg2576トランスジェニックマウスと野生型マウスで行った。脳における顕著なA $\beta$ 沈着から、Tg2576トランスジェニックマウスが、*in vitro*及び*in vivo*でのA $\beta$ イメージング剤の評価に広く使用されてきた(Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, et al. (1996) Science 274)。横断面のSPECT画像で、脳内の放射能の蓄積の明確な違いが、Tg2576マウスと野生型マウス間で観察された(図4)。

[0056] (5) トランスジェニックマウス脳の *ex vivo* オートラジオグラフィー

化合物[<sup>123</sup>I]8の脳内A $\beta$ プラークへの特異的結合の更なる特徴付けをするために、*ex vivo*オートラジオグラフィーのため、SPECT/CT実験後直ちに、脳を取り外し、凍結させ、切片化した(図5)。オートラジオグラフィーの画像は、Tg2576マウスの脳において(図5A)、A $\beta$ プラークの広範なラベルを示したが、野生型のコントロールにおいては(図5B)、そのようなものを示さなかった。A $\beta$ プラークの標識が同じ切片のチオフラビン-S(アミロイド染色

一般的に使用される病理染料)による共染色によって確認された(図5C)。

[0057] (6) 死後のAD脳切片のオートラジオグラフィー

AD脳切片を<sup>125</sup>I標識ピリジルベンゾフランとインキュベートしたとき、オートラジオグラフィー画像は、最小限のバックグラウンドノイズで、Aβプラークの優れた可視化を明らかにした(図6)。化合物[<sup>125</sup>I]8と化合物[<sup>125</sup>I]9の間で、ADの脳切片における放射能の蓄積に顕著な差は観察されなかった(図6B及び6C)。しかしながら、化合物[<sup>125</sup>I]7は、Aβプラークを標識した一方、脳の白質において非特異的結合放射能を示した(図6A)。皮質における化合物[<sup>125</sup>I]8由来の放射能スポットは、Aβ抗体による同じ脳切片の免疫染色により確認された(図6D)。

[0058] [実施例2] ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成及びその応用

[実験方法]

(1) 試薬および機器

[<sup>125</sup>I]NaIはMP Biomedical, Inc 製Iodine-125を、[<sup>123</sup>I]NH<sub>4</sub>Iは日本メジフィジックス社製を用いた。Aβ (Human, 1-42)[TFA form]は、ペプチド研究所より購入したものをを用いた。トランスジェニック(Tg2576)マウスおよび野生型マウスは、Taconic社より購入し、飼育後を用いた。その他の試薬は、市販の一般試薬または特級試薬を用いた。

[0059] 中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、山善株式会社より購入したポンプ PUMP 580D、紫外検出器 prep UV-254Dおよびフラクションコレクター Parallel Frac FR-260を使用した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた紫外可視分光分析には、島津製作所製紫外可視検出器SPD-20Aを装着した液体クロマトグラフLC-20ADを使用した。また、HPLCを用いた放射能分析には、アロカ社製NDW-101を使用した。カラムは、ナカライテスク社製Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-IIカラム(4.6 × 150 mm)を用いた。

[0060] マウス凍結脳切片の作製には、Leica社製マイクロトームCM1900を使用し、蛍光顕微鏡には、KEYENCE社製BZ-9000を用いた。

[0061] <sup>1</sup>H NMRはJEOL JNM-LM400を用い、テトラメチルシランを内標準物質として測

定した。質量分析は、SHIMADZU GCMS-QP2010を用いて測定した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wizard<sup>2</sup> 1470を用いた。オートラジオグラフィの解析には、FujiFilm社製のBASイメージングプレートおよびBAS5000スキャナーシステムを使用した。SPECT/CTによる画像の収集は、GMI FX-3300 Pre-Clinical Imaging Systemを用いて行い、データ解析にはOSEMを使用した。A $\beta$ 凝集体を用いた結合実験における吸引濾過には、Brandel社製M-24R cell harvesterならびにWhatman社製GF/Bfilter を用いた。

[0062] (2) ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成

5- (5-ブロモベンゾ[d]オキサゾール-2-イル) ピリジン-2-アミン(化合物23)の合成

2-アミノ-4-ブロモフェノール (376 mg, 2 mmol)と5- (トリフルオロメチル) ピリジン-2-アミン(486 mg, 3 mmol) を1 M水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) に溶解し、90°Cで加熱しながら3時間攪拌した。析出した固体を吸引濾取することで412 mg (収率 : 71.2%) の化合物23を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.87 (s, 2H), 6.60 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.84 (t, J = 1.1 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.94 (d, J = 1.8 Hz, 1H).

[0063] 5- (5-ブロモベンゾ[d]オキサゾール-2-イル) -N-メチルピリジン-2-アミン(化合物24)の合成

化合物23 (184 mg, 0.64 mmol) とパラホルムアルデヒド (115 mg, 3.84 mmol) をメタノール (10 mL)に溶解し、ナトリウムメトキシドのメタノール溶液 (0.512 mL, 5 M) を加え、1時間還流した。室温に戻した後、水素化ホウ素ナトリウム(121 mg, 3.2 mmol)を攪拌しながらゆっくり加え、2時間還流した。室温に戻し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、クロロホルムで抽出し無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィによって精製し、150 mg (収率 : 77.5%)の化合物24を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.03 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 5.03 (s, 1H), 6.49 (d, J = 9.

4 Hz, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.83 (s, 1H), 8.21 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 8.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H).

[0064] 5-(5-ブロモベンゾ[d]オキサゾール-2-イル)-N,N-ジメチルピリジン-2-アミン(化合物25)の合成

化合物23 (350 mg, 1.21 mmol)とパラホルムアルデヒド (436 mg, 14.5 mmol)を酢酸(7 mL)に溶解し、水素化シアノホウ素ナトリウム (608 mg, 9.68 mmol)を攪拌しながらゆっくり加え、室温で21時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、クロロホルムで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーによって精製し、109 mg (収率 : 28.4%)の化合物25を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87-1.66 (m, 27H), 3.20 (s, 6H), 6.60 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 8.23 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 9.01 (d, J = 2.3 Hz, 1H).

[0065] 5-(5-(トリブチルスタンニル)ベンゾ[d]オキサゾール-2-イル)ピリジン-2-アミン(化合物26)の合成

化合物23 (320 mg, 1.11 mmol)を1,4-ジオキサン (10 mL)に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (1.1 mL)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (509 mg, 0.44 mmol)、トリエチルアミン (5 mL)を加え、45分間還流した。反応溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーにより精製し、196 mg (収率 : 35.3%)の化合物26を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87-1.64 (m, 27H), 4.85 (s, 2H), 6.60 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 8.24 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.96 (d, J = 1.6 Hz, 1H).

[0066] N-メチル-5-(5-(トリブチルスタンニル)ベンゾ[d]オキサゾール-2-イル)ピリジン-2-アミン(化合物27)の合成

化合物24 (345 mg, 1.14 mmol)を1,4-ジオキサン (10 mL)に溶解し、ビ

ス(トリブチルスズ) (1.1 mL)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (527 mg, 0.46 mmol)、トリエチルアミン (5 mL) を加え、45分間還流した。反応溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーにより精製し、161 mg (収率 : 27.4%)の化合物27を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87-1.60 (m, 27H), 3.02 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 5.06 (s, 1H), 6.49 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.24 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.97 (d, J = 2.1 Hz, 1H).

[0067] N,N-ジメチル-5-(5-(トリブチルスタンニル)ベンゾ[d]オキサゾール-2-イル)ピリジン-2-アミン(化合物28)の合成

化合物25 (55 mg, 0.17 mmol) を1,4-ジオキサン (10 mL) に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (0.17 mL)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (78.6 mg, 0.07 mmol)、トリエチルアミン (5 mL) を加え、45分間還流した。反応溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 3を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーにより精製し、20.7 mg (収率 : 23.0%)の化合物28を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87-1.66 (m, 27H), 3.20 (s, 6H), 6.60 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 8.23 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 9.01 (d, J = 2.3 Hz, 1H).

[0068] 5-(5-ヨードベンゾ[d]オキサゾール-2-イル)ピリジン-2-アミン(化合物29)の合成

化合物26 (195 mg, 0.39 mmol) をクロロホルム (5 mL) に溶解し、ヨウ素のクロロホルム溶液 (1.5 mL, 0.2 M) を加え、室温で15分間攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、クロロホルム層を分液し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーによって精製し、24.8 mg (収率 : 18.9%)の化合物29を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.87 (s, 2H), 6.60 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.31 (d,



J = 8.5 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 10.9, 1.8 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.93 (d, J = 1.8 Hz, 1H). MS m/z 337 (M<sup>+</sup>).

[0069] 5- (5-ヨードベンゾ[d]オキサゾール-2-イル) -N-メチルピリジン-2-アミン(化合物30)の合成

化合物27 (160 mg, 0.31 mmol) をクロロホルム (5 mL) に溶解し、ヨウ素のクロロホルム溶液 (1.5 mL, 0.2 M) を加え、室温で15分間攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、クロロホルム層を分液し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1 を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーによって精製し、61.2 mg (収率 : 56.2%) の化合物30を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.03 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 5.01 (s, 1H), 6.49 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 8.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H). MS m/z 351 (M<sup>+</sup>).

[0070] 5- (5-ヨードベンゾ[d]オキサゾール-2-イル) -N,N-ジメチルピリジン-2-アミン(化合物31: PBOX-3)の合成

化合物28 (20 mg, 0.04 mmol) をクロロホルム (5 mL) に溶解し、ヨウ素のクロロホルム溶液 (1.5 mL, 0.2 M) を加え、室温で15分間攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、クロロホルム層を分液し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 3を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィーによって精製し、13.9 mg (収率 : 100%) の化合物31を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.20 (s, 6H), 6.60 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 8.5, 1.4 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.19 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 8.98 (d, J = 2.3 Hz, 1H). MS m/z 365 (M<sup>+</sup>).

[0071] (3) <sup>125</sup>I 標識ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成

各化合物の標識前駆体であるトリブチルスズ化合物のエタノール溶液(50  $\mu\text{L}$ , 1 mg/mL)に $^{125}\text{I}$ NaI (3.7-7.4 MBq)、1 M HCl (50  $\mu\text{L}$ )、3% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{L}$ )を加え、5分間室温で反応させた。続いて、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (100  $\mu\text{L}$ )を加えて反応を停止させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100  $\mu\text{L}$ )を加えて反応溶液を中和した。酢酸エチルを加えて抽出し、無水硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペットに通液して脱水した後、窒素気流化で溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物を標品として逆相HPLC (水 : アセトニトリル = 4 : 6-1 : 1)で分離精製した。

[0072] (4)  $^{123}\text{I}$  標識PBOX-3の合成

化合物30のエタノール溶液 (50 mL, 1 mg/mL)に $^{123}\text{I}$ NH<sub>4</sub>I (148 MBq)、1 M HCl (50 mL)、3% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 mL)を加え、15分間室温で反応させた。続いて、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (100  $\mu\text{L}$ )を加えて反応を停止させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100  $\mu\text{L}$ )を加えて反応溶液を中和した。酢酸エチルを加えて抽出し、無水硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペットに通液して脱水した後、窒素気流化で溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物を標品として逆相HPLC (水 : アセトニトリル = 4 : 6)で分離精製した。

[0073] (5) A $\beta$  (1-42)凝集体の調製

PBS (pH 7.4)を用い、A $\beta$  (1-42)が 0.25 mg/mL の濃度になるように調製した。37°Cで42時間インキュベートすることにより、A $\beta$  (1-42)凝集体溶液を調製した。凝集体溶液は実験に用いるまで、-80°Cで保存した。

[0074] (6) A $\beta$  凝集体を用いた競合阻害実験による $K_i$ の算出

$K_i$ の算出は実施例1と同様の方法で行った。

[0075] (7) AD患者脳切片を用いたin vitroオートラジオグラフィー

AD患者脳切片は、京都大学大学院医学研究科より提供されたものを使用した (6  $\mu\text{m}$ , 78歳、女性)。キシレン洗浄 (10分 $\times$ 2)、100% EtOH (1分 $\times$ 2)、90% EtOH、80% EtOH、70% EtOH 洗浄 各 (1分 $\times$ 1)および精製水洗浄 (30秒 $\times$

1)をすることで脱パラフィン処理を行った。化合物を10% EtOH溶液を用いて15 kBq/mLに希釈した。調製した放射性リガンドを切片上に滴下し1時間インキュベートした。その後、50% EtOHで1分間×2回洗浄した。BASイメージングプレートに24時間固定した後、BAS5000スキャナーシステムを用い分析を行った。

[0076] (8) 抗A $\beta$ 抗体を用いた免疫染色

免疫染色における抗体には、抗A $\beta$  (1-42)モノクローナル抗体 (クローンNo. BC05)を使用した。ギ酸 (90%)処理の後、精製水で5分間洗浄した。さらに、PBS-Tween 20で2分間洗浄後0.05% トリプシン溶液と15分間インキュベートさせた。PBS-Tween 20で5分間×2回洗浄した後、ブロッキング用血清と30分間インキュベートさせた。その後、抗A $\beta$  (1-42)抗体と室温で一晩インキュベートさせた。PBS-Tween 20で2分間×3回洗浄し、ストレプトアビジンビオチンペルオキシダーゼ複合体溶液と3時間インキュベートさせた。PBS-Tween 20で2分間×3回洗浄後、ジアミノベンジジン溶液と室温で10分間インキュベートした。蒸留水で1分間洗浄し、封入後顕微鏡で観察した。

[0077] (9)  $^{125}\text{I}$ 標識ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の正常マウスにおける体内放射能分布実験

$^{125}\text{I}$ 標識体を19-37 kBq/mL となるように、10% EtOH含有生理食塩水もしくは0.1% Tween 80および10% EtOH含有生理食塩水を用いて希釈した。1群5匹の5週齢ddY系雄性マウス (20-25 g) に、尾静脈より1.9-3.7 kBq (100  $\mu\text{L}$ ) に調製した化合物 $^{125}\text{I}$ 29、化合物 $^{125}\text{I}$ 30及び化合物 $^{125}\text{I}$ 31 (PBOX-3)を投与し、2、10、30、60 分後に屠殺、採血後、主要な臓器を取り出した。次いで速やかに血液および臓器の重量を測定後、放射能をガンマカウンターで測定した。

[0078] (10) Tg2576マウスを用いたSPECT撮像およびex vivoオートラジオグラフィ

0.1% Tween 80および10% EtOH含有生理食塩水に溶解した $^{123}\text{I}$ PBOX-3溶液(13-15もしくは35-53 MBq)をTg2576マウス(雌性、16もしくは25ヶ月齢)および

野生型マウス(雌性、16もしくは25ヶ月齢)に尾静脈より投与した。投与5分後に3% イソフルラン吸入により麻酔下においた。投与10分後より50分間SPECT撮像を行った後、CT撮像(管電流 ; 310 mA、管電圧 ; 60 kV)を行った。投与100分後に屠殺、脳を摘出後、SCEMで包埋し、ヘキサンバスにより凍結させた。ミクロトームを用いて厚さ20 mmの連続切片を作製し、BASイメージングプレートに12時間固定した後、BAS5000スキャナーシステムを用い分析した。同一切片をチオフラビンS溶液で染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0079] [実験結果]

(1) ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成

図7にピリジルベンゾオキサゾール誘導体の合成経路を示す。ピリジルベンゾオキサゾール骨格の合成は、以前に報告された方法に従って行った(Qiao, J. X.; Wang, T. C.; Hu, C.; Li, J.; Wexler, R. R.; Lam, P. Y. *Org. Lett.* 2011, 13, 1804-7)。2-アミノ-4-ブロモフェノールと5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-アミンを1 Mの水酸化ナトリウム水溶液中で反応させることで化合物23を収率71%で得た。化合物23を水素化ホウ素ナトリウム、ナトリウムメトキシドおよびパラホルムアルデヒドを用いてメチル化することで、モノメチル基を導入した化合物24を、水素化シアノホウ素ナトリウムおよびパラホルムアルデヒドを用いることで、ジメチルアミノ基を導入した化合物25をそれぞれ収率78%、28%で得た。トリブチルスズ誘導体26-28は、対応するブロモ化合物より、Pd(0)を触媒とするブロモ-スズ交換反応によって得た(収率 23-35%)。合成したトリブチルスズ体26-28とヨウ素をクロロホルム溶媒下、室温で反応させることによって対応するヨウ素化合物29-31を得た(収率 19-100%)。

[0080] (2) ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の放射性ヨウ素標識

図8に<sup>125</sup>I標識および<sup>123</sup>I標識経路を示す。目的とする化合物[<sup>125</sup>I]29、化合物[<sup>125</sup>I]30、化合物[<sup>125</sup>I]31 (PBOX-3)及び化合物[<sup>123</sup>I]31 (PBOX-3)はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を酸化剤として用いたスズ-ヨウ素交換反応によって行い、放射化学的収率30-50%、放射化学的純度95%以上で得た。<sup>125</sup>I標識体および<sup>123</sup>I標識体の同定は、それぞ

れに対応する非放射性化合物を用いた逆相HPLCによって行った。

[0081] (3) ピリジルベンゾオキサゾール誘導体のA $\beta$ (1-42)凝集体に対する結合親和性の検討

合成した種々のピリジルベンゾオキサゾール誘導体のA $\beta$ (1-42)凝集体への結合性を検討するため、 $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ を競合リガンドに用いたin vitro競合阻害実験を行い、GraphPad Prism 4.0を用いて阻害実験を作製しIC<sub>50</sub>を算出した(表3)。阻害定数は、 $K_i = \text{IC}_{50}/(1+[\text{L}]/K_d)$ の式を用いて算出した。

[0082] 競合阻害実験の結果、化合物29、化合物30、及び化合物31 (PBOX-3)は濃度依存的に $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ の結合を阻害したことから、いずれのピリジルベンゾオキサゾール誘導体もA $\beta$ (1-42)凝集体に対する結合親和性を有することが明らかになった。また、導入した置換基の種類により結合性に差が認められ、1級、2級、3級アミンの順に結合性は向上し、PBOX-3は最も強い結合親和性を示した。

[0083] [表3]

Inhibition constants ( $K_i$ ) for binding of PBOX derivatives determined using  $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$  as the ligand in A $\beta$ (1-42) aggregates.

Compound	$K_i$ (nM)*
29	138 $\pm$ 18.0
30	26.7 $\pm$ 2.54
31 (PBOX-3)	6.90 $\pm$ 1.14

\*Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean for 6 experiments.

[0084] (4) 脳移行性、脳からの消失性および体内放射能分布についての評価

正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行うことでピリジルベンゾオキサゾール誘導体の脳への取り込みとその後のクリアランスについて検討した。ピリジルベンゾオキサゾール誘導体を正常マウスに投与後の体内放射能分布の結果を図9に、脳における放射能分布を図10に示す。化合物 $[^{125}\text{I}]29$ 、化合物 $[^{125}\text{I}]30$ 及び化合物 $[^{125}\text{I}]31$  (PBOX-3)はいずれも投与2分後に4.7-6.6% ID/gの高い脳移行性を示した。また、投与60分後における脳内の値は0.4-1.4% ID/gであり、ピリジルベンゾオキサゾール誘導体が脳内へ移行後、速やかにクリアランスされることが示された。この結果より、ピリジルベンゾオキサ

ゾール誘導体は、2-フェニルインドール誘導体の問題点であった脳内放射能挙動を改善したことが明らかとなった。

[0085] (5) AD患者脳切片上の老人斑に対する結合性の検討

AD患者脳切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィーを行い、AD患者脳切片上に蓄積した老人斑への結合性について検討した (図11)。その結果、化合物31 (PBOX-3)はAD患者脳切片上に多数の放射能集積を認めた。この部位は、抗A $\beta$ 抗体を用いた免疫染色による染色部位と一致したことから、PBOX-3がAD患者脳切片上に蓄積した老人斑に結合性を有することが示された。一方、化合物29を用いた検討においては脳切片上に放射能集積は認められず、また、化合物30の放射能集積は不明瞭であった。これらの結果は、*in vitro*競合阻害実験において算出された $K_i$ 値を反映するものであった。

[0086] (6) *ex vivo* におけるアミロイド斑への結合性の検討

SPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして最も適した性質を有していると考えられた化合物31 (PBOX-3)について、Tg2576マウスおよび野生型マウスを用いた *ex vivo* オートラジオグラフィーを行った (図12)。Tg2576マウス脳内におけるアミロイド斑の蓄積は、12ヶ月齢よりはじまり23ヶ月齢においてはその蓄積が顕著に認められることが知られていることから (Kawarabayashi, T.; Younkin, L. H.; Saido, T. C.; Shoji, M.; Ashe, K. H.; Younkin, S. G. *J. Neurosci.* 2001, 21, 372-81)、本検討では、16および25ヶ月齢のTg2576マウスおよび野生型マウスを用いた。16ヶ月齢のTg2576マウス脳切片上にはチオフラビンSによる染色部位はほとんど認められず、*ex vivo* オートラジオグラフィーにおいても野生型マウスとの放射能集積の差は認められなかった。一方、25ヶ月齢のTg2576マウス脳切片上には、野生型マウス脳切片上には認められない多数の放射能集積が観察され、その集積部位はチオフラビンSの蛍光染色部位と一致した。以上の結果より、脳内での非特異結合が認められたものの、PBOX-3がマウス生体内においてアミロイド斑に対して結合性を有することが明らかとなった。

[0087] (7) SPECT撮像

25ヶ月齢のTg2576マウスおよび野生型マウスを用いたSPECT/CT撮像を行い、31 (PBOX-3)のSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとしての有用性についての評価を行った。矢印断面 (Sagittal) 及び横断面 (transverse) 画像を図13に示す。25ヶ月齢のTg2576マウスの脳のSPECT画像において、同月齢の野生型マウスの脳に比べ高い放射能集積が観察された。この結果より、PBOX-3を用いてSPECT撮像を行うことで、マウス脳内に蓄積したアミロイド斑を画像化できることが明らかとなった。

[0088] [実施例3] 放射性ヨウ素標識ピリジルベンゾフラン誘導体のアミリン凝集体への結合性の検討

[実験方法]

(1) アミリン凝集体の作製

アミリン凝集体の作製は、Langmuir 2010, 26, 3453-3461を参考にして行った。

アミリン(Human) (0.5 mg、ペプチド研究所, 4219-v)をDMSO (100  $\mu$ L)と20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH7.5) (900  $\mu$ L)の混合溶液に溶解した。さらに20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH7.5)で100  $\mu$ Mに希釈し、ストック溶液とした。

[0089] (2) 結合飽和実験

化合物[<sup>125</sup>I]9 (EtOH溶液)(500,000 cpm)、および非放射性化合物9(DMSO溶液)(250 nM)、それぞれを順次希釈し、16,000-500,000 cpm、7.8-250 nMの溶液に調製した。ガラスチューブに種々の濃度の[化合物[<sup>125</sup>I]9(50  $\mu$ L)、種々の濃度の非放射性化合物9溶液(50  $\mu$ L)、アミリン凝集体(最終濃度25 nM、50  $\mu$ L)、10%DMSO含有水溶液(850  $\mu$ L)を加え、3時間室温で静置した。また、非特異的結合は、最終濃度50 nMの非放射性化合物9のDMSO溶液(50  $\mu$ L)および最終濃度10 mMとなるようにチオフラビンT(Wako)を溶解させた10%DMSO含有水溶液(850  $\mu$ L)を加えることで算出した。静置後、反応溶液をM-24 cell harvesterを用いてGF/B filterに透過させた。フィルターに残存した放射能を $\gamma$ カウンターで計測し、得られたデータをGraphPad Prismで解析し、解離定数 $K_d$

を算出した。

[0090] (3) 膵臓切片を用いたin vitroオートラジオグラフィー

10  $\mu\text{Ci}/1\text{ mL}$ に調製した化合物 $^{125}\text{I}$ 9の10%EtOH含有水溶液を二型糖尿病患者膵臓切片(BioChain, Female, 69 years old)および健常者膵臓切片(BioChain, male, 71 years old)それぞれに添加し、室温で1時間静置した。その後、50%EtOH含有水溶液(1 min x 2)、水(30 sec)で洗浄し、イメージングプレート(BAS-SR、富士写真フィルム社)に3時間露光後、画像解析装置(Bio Imaging Analyzer BAS5000、富士フィルム社)を用いて、それぞれのオートラジオグラムを得た。同一切片をチオフラビンS (100  $\mu\text{M}$ )で染色し、洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

[0091] [実験結果]

(1) 結合飽和実験

得られた飽和曲線(図14)からスキャチャード解析を行い、結合解離定数(Kd)を算出したところ、 $K_d = 8.11\text{ nM}$ となり、化合物 $^{125}\text{I}$ 9がアミリン凝集体に高い結合性を示すことが明らかとなった。

[0092] (2) 膵臓切片を用いたin vitroオートラジオグラフィー

健常者の膵臓組織切片(図15右)に比べて、糖尿病患者切片(図15左)上には顕著な放射能集積が確認された。この放射能集積はアミロイド染色剤のチオフラビンSの蛍光像と一致したことから、化合物 $^{125}\text{I}$ 9が糖尿病患者組織に沈着したアミロイドに結合性を有することが示唆された。

### 産業上の利用可能性

[0093] ADの診断を目的としたA $\beta$ のイメージング試薬の開発、A $\beta$ を標的とする治療薬の開発支援、AD患者のA $\beta$ の蓄積を指標とした病状判定、などに利用できる。

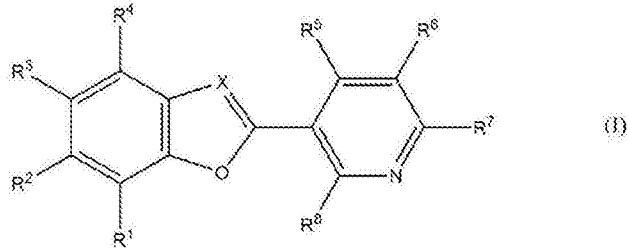
[0094] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願(特願2013-38304)の明細書および/または図面に記載されている内容を包含する。また、本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。



## 請求の範囲

[請求項1] 一般式 (1)

[化1]



[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>は、いずれか一つが放射性ヨウ素原子を表し、他は水素原子を表し、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、及びR<sup>8</sup>は、互いに独立して、水素原子、アミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、メトキシ基、又はヒドロキシ基を表し、XはCH又はNを表す。]

で表される化合物、又はこれらの化合物の医薬上許容される塩を含有することを特徴とするコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項2] 一般式 (1) におけるR<sup>3</sup>が放射性ヨウ素原子であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、及びR<sup>4</sup>が水素原子であることを特徴とする請求項1に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項3] 一般式 (1) におけるR<sup>7</sup>がアミノ基、メチルアミノ基、又はジメチルアミノ基であり、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、及びR<sup>8</sup>が水素原子であることを特徴とする請求項1又は2に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項4] 放射性ヨウ素原子が、<sup>123</sup>I又は<sup>125</sup>Iであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項5] シングルフォトン断層撮像法に用いられることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項6] コンフォメーション病が、アルツハイマー病である請求項1乃至5

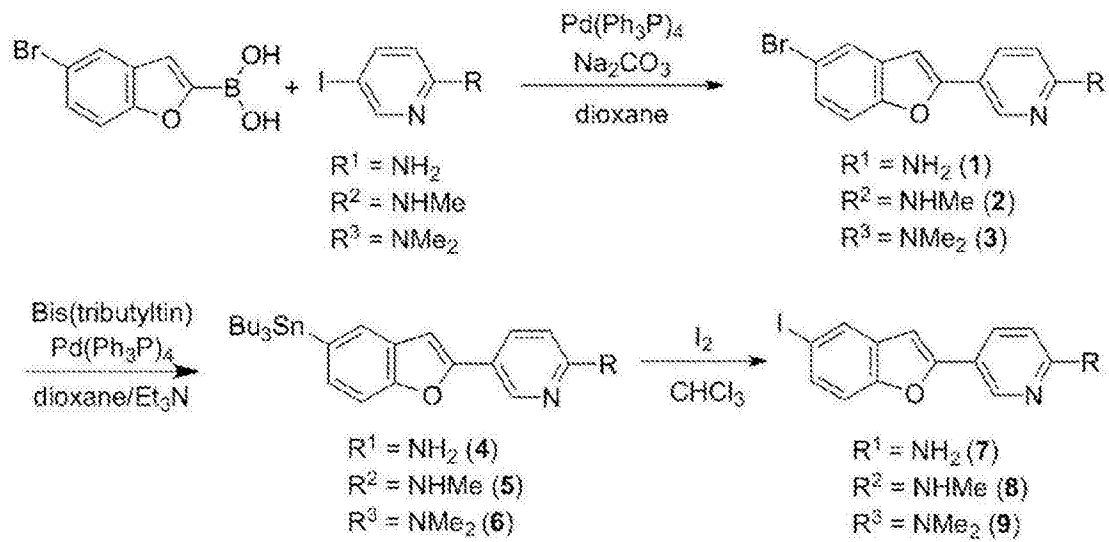
のいずれか一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

[請求項7]       コンフォメーション病が、二型糖尿病である請求項1乃至5のいずれか一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物。

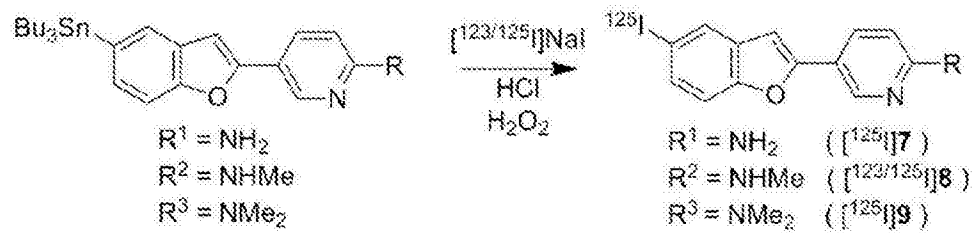
[請求項8]       請求項1乃至4のいずれか一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物を動物に投与し、その動物の脳の画像を撮影し、画像における一般式(1)で表される化合物の状態に基づいて、アルツハイマー病の診断を行うことを特徴とするアルツハイマー病の診断方法。

[請求項9]       請求項1乃至4のいずれかに一項に記載のコンフォメーション病診断用組成物を動物に投与し、その動物の膵臓の画像を撮影し、画像における一般式(1)で表される化合物の状態に基づいて、二型糖尿病の診断を行うことを特徴とする二型糖尿病の診断方法。

[図1]



[図2]



## [図3]

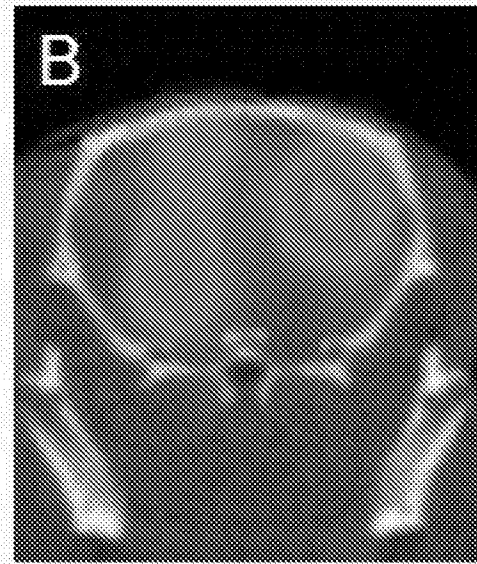
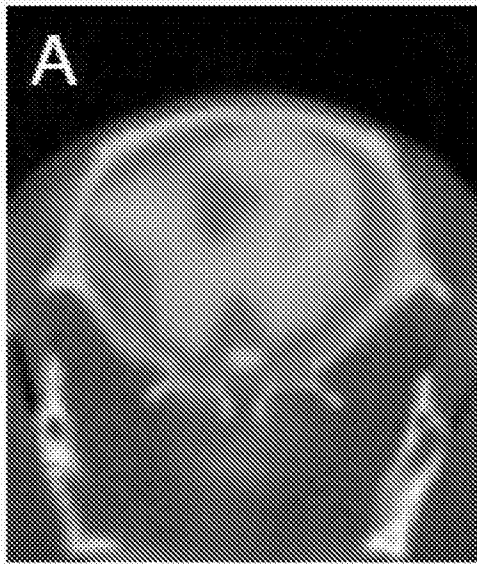
Biodistribution of Radioactivity after Injection of [<sup>125</sup>I]tracers in Normal Mice<sup>a</sup>.

organ	2 min	10 min	30 min	60 min
[ <sup>125</sup> I]7				
brain	4.67 (0.32)	5.49 (0.55)	3.60 (0.15)	1.68 (0.12)
blood	3.15 (0.24)	2.98 (0.25)	2.44 (0.14)	2.12 (0.30)
liver	12.22 (1.34)	12.02 (1.16)	7.80 (1.17)	4.10 (0.32)
kidney	11.07 (1.78)	6.97 (0.44)	4.14 (0.60)	3.22 (0.69)
pancreas	4.67 (0.28)	4.67 (0.23)	2.02 (0.11)	1.20 (0.11)
spleen	3.53 (0.24)	3.71 (0.19)	2.49 (0.05)	1.82 (0.26)
stomach <sup>b</sup>	1.51 (0.10)	5.09 (0.88)	11.65 (2.24)	14.02 (3.40)
intestine <sup>b</sup>	2.95 (0.50)	7.20 (0.54)	14.89 (2.35)	23.16 (4.11)
lung	11.66 (2.15)	5.73 (0.60)	3.26 (0.12)	2.18 (0.18)
heart	8.68 (1.03)	3.31 (0.29)	1.76 (0.05)	1.16 (0.11)
[ <sup>125</sup> I]8				
brain	4.17 (0.98)	4.03 (0.45)	2.56 (0.29)	1.30 (0.19)
blood	5.79 (0.74)	3.74 (0.38)	2.58 (0.15)	2.13 (0.44)
liver	16.17 (2.88)	14.20 (1.60)	7.40 (1.14)	5.21 (1.00)
kidney	12.50 (1.32)	6.92 (0.98)	4.86 (1.23)	3.94 (0.43)
pancreas	6.08 (1.10)	3.95 (0.51)	1.53 (0.25)	1.06 (0.11)
spleen	3.55 (0.71)	3.46 (0.39)	1.83 (0.11)	1.41 (0.32)
stomach <sup>b</sup>	1.66 (0.29)	4.05 (0.39)	6.74 (1.19)	9.35 (2.40)
intestine <sup>b</sup>	2.98 (0.78)	10.28 (1.48)	16.02 (1.75)	21.26 (6.54)
lung	11.80 (2.39)	6.14 (0.97)	3.92 (0.61)	3.03 (0.84)
heart	9.66 (2.64)	3.32 (0.52)	1.86 (0.15)	1.21 (0.22)
[ <sup>125</sup> I]9				
brain	4.14 (0.81)	5.14 (0.36)	4.06 (0.82)	3.69 (0.34)
blood	8.90 (2.70)	5.65 (0.42)	3.77 (0.58)	3.56 (0.34)
liver	31.73 (3.85)	21.54 (2.19)	12.19 (2.41)	11.86 (2.51)
kidney	20.35 (2.85)	11.55 (0.68)	6.26 (1.48)	6.92 (2.73)
pancreas	8.12 (1.60)	6.90 (0.28)	2.69 (0.43)	1.95 (0.21)
spleen	7.04 (1.96)	6.28 (0.23)	3.71 (0.50)	3.11 (0.39)
stomach <sup>b</sup>	2.52 (0.45)	7.15 (0.57)	14.87 (5.44)	15.77 (5.09)
intestine <sup>b</sup>	5.42 (1.25)	17.96 (3.86)	37.30 (6.47)	50.05 (1.03)
lung	27.42 (9.48)	9.72 (0.89)	4.93 (0.71)	4.43 (0.40)
heart	21.67 (3.04)	6.20 (0.43)	2.53 (0.51)	2.17 (0.29)

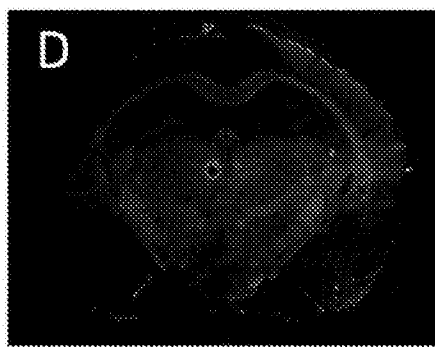
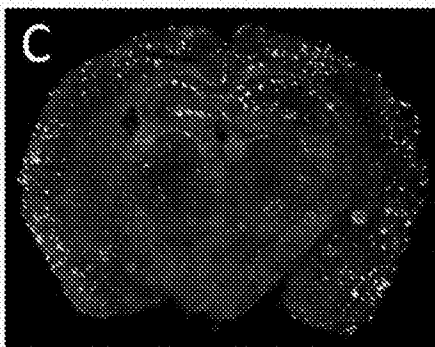
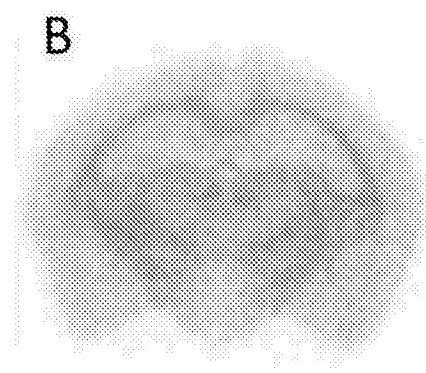
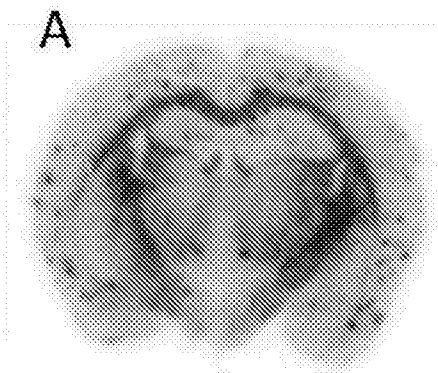
<sup>a</sup> Expressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (SD) for five animals at each interval.

<sup>b</sup> Expressed as % injected dose per organ.

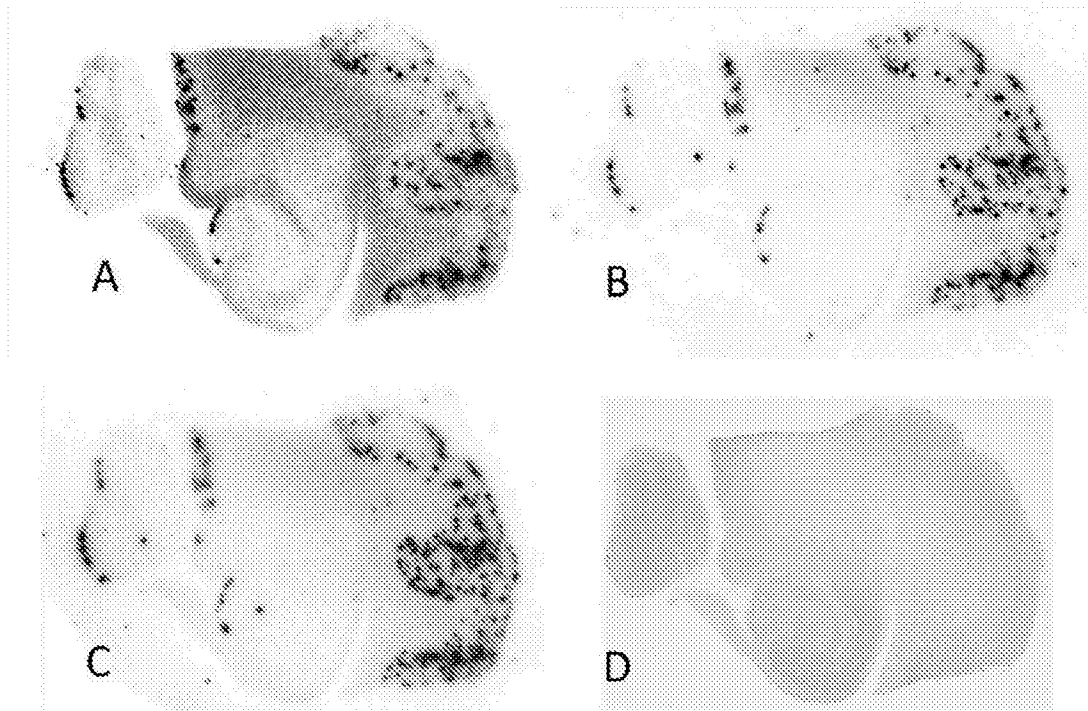
[図4]



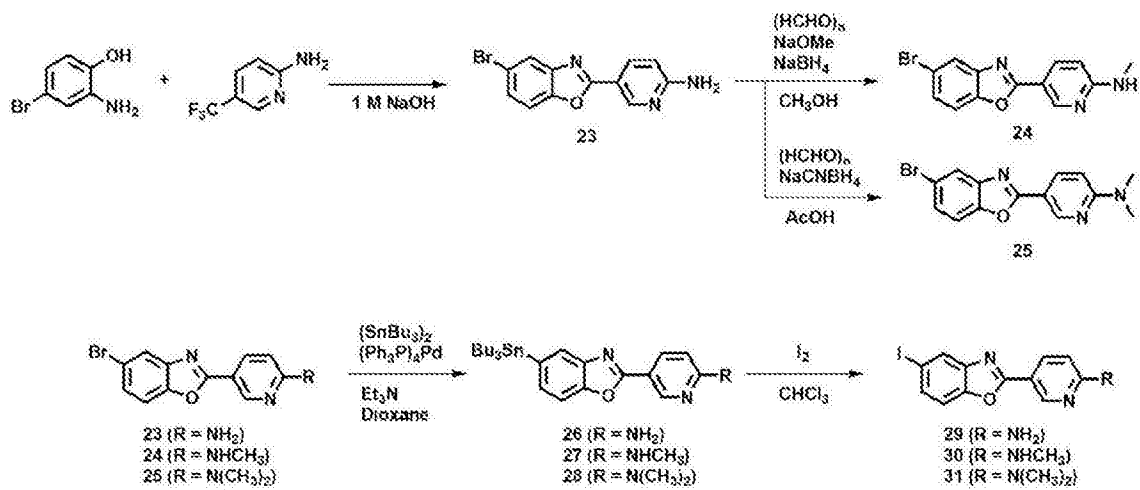
[図5]



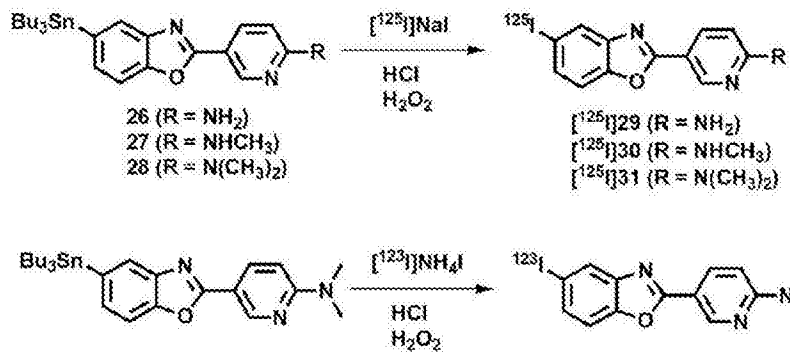
[圖6]



[圖7]



[圖8]



## [図9]

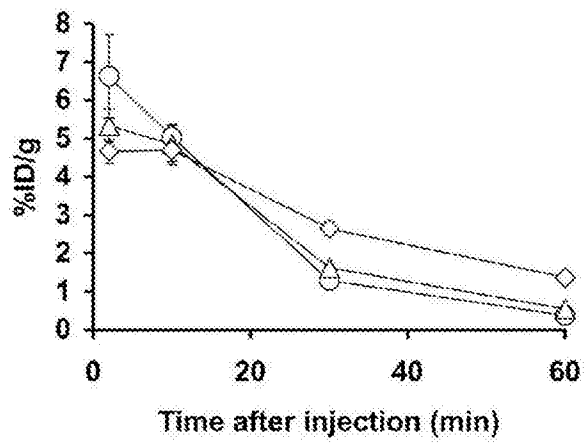
Biodistribution of radioactivity after injection of [ $^{125}$ I]29, [ $^{125}$ I]30, and [ $^{125}$ I]31 (PBOX-3) in normal mice<sup>a</sup>.

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[ $^{125}$ I]29				
Blood	3.17 (0.17)	3.42 (0.11)	2.84 (0.23)	2.41 (0.16)
Liver	7.19 (0.84)	7.46 (0.46)	4.36 (0.85)	3.21 (0.25)
Kidney	9.85 (0.99)	5.23 (0.28)	3.05 (0.31)	1.99 (0.15)
Intestine	2.92 (0.40)	4.30 (1.19)	7.76 (0.90)	8.62 (0.63)
Spleen	4.19 (0.82)	3.70 (0.71)	1.95 (0.60)	2.27 (1.37)
Pancreas	6.35 (0.70)	3.37 (0.18)	1.70 (0.31)	1.46 (0.47)
Heart	6.13 (0.95)	2.52 (0.13)	1.29 (0.08)	1.00 (0.12)
Stomach <sup>b</sup>	1.54 (0.23)	5.02 (0.88)	11.4 (1.62)	15.5 (3.16)
Brain	6.62 (1.09)	5.04 (0.31)	1.29 (0.22)	0.37 (0.03)
[ $^{125}$ I]30				
Blood	2.59 (0.24)	3.07 (0.15)	2.73 (0.13)	2.41 (0.24)
Liver	7.33 (0.58)	8.13 (0.43)	4.27 (0.61)	2.89 (0.63)
Kidney	8.34 (0.75)	4.96 (0.30)	3.30 (0.28)	3.24 (0.78)
Intestine	1.68 (0.13)	4.34 (0.65)	7.80 (1.47)	8.54 (1.06)
Spleen	3.39 (0.30)	3.32 (0.16)	1.85 (0.14)	1.49 (0.23)
Pancreas	6.29 (0.68)	3.43 (0.22)	1.54 (0.10)	1.25 (0.24)
Heart	5.39 (0.44)	2.66 (0.25)	1.38 (0.08)	1.18 (0.19)
Stomach <sup>b</sup>	1.43 (0.16)	4.80 (0.52)	10.91 (1.33)	12.21 (1.62)
Brain	5.34 (0.43)	4.84 (0.53)	1.62 (0.07)	0.54 (0.08)
[ $^{125}$ I]31 (PBOX-3)				
Blood	2.50 (0.30)	2.27 (0.15)	1.91 (0.07)	1.78 (0.11)
Liver	9.57 (1.93)	5.85 (1.40)	3.44 (0.42)	3.00 (0.26)
Kidney	10.30 (0.90)	7.06 (0.90)	3.91 (0.59)	3.30 (0.17)
Intestine	2.49 (0.59)	6.90 (1.45)	10.93 (2.74)	12.05 (2.04)
Spleen	3.43 (0.85)	2.88 (0.28)	1.60 (0.18)	1.36 (0.22)
Pancreas	5.43 (0.84)	3.41 (0.41)	1.69 (0.10)	1.50 (0.16)
Heart	7.32 (1.38)	2.58 (0.26)	1.38 (0.05)	1.25 (0.14)
Stomach <sup>b</sup>	1.15 (0.18)	2.90 (0.47)	4.62 (0.88)	5.74 (0.76)
Brain	4.66 (0.31)	4.70 (0.30)	2.64 (0.17)	1.37 (0.10)

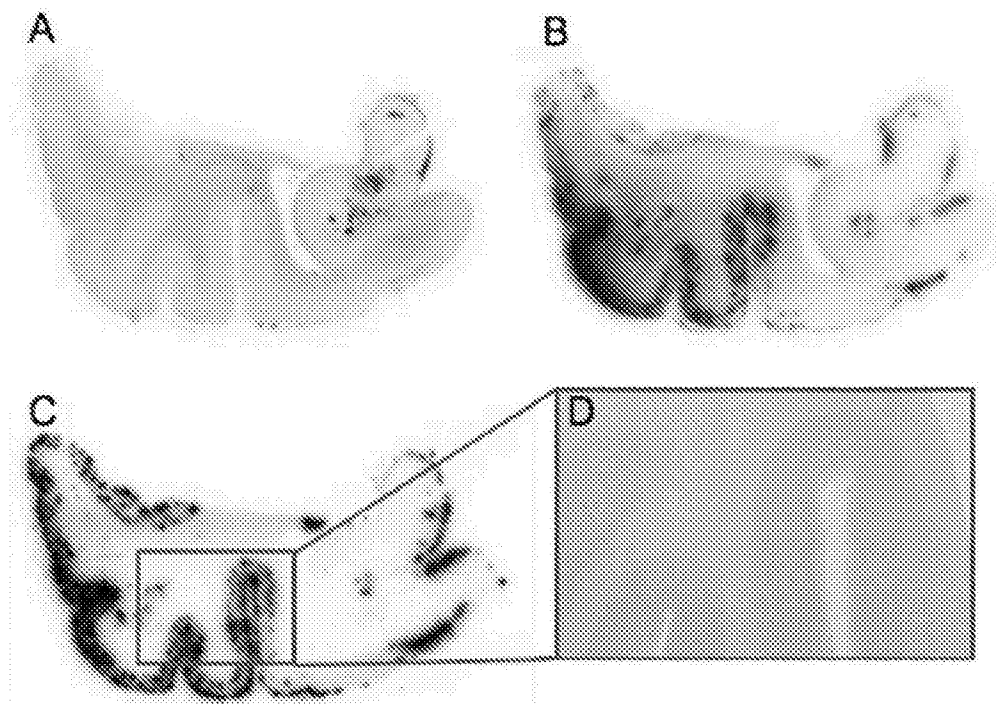
<sup>a</sup>Expressed as % injection dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 5 animals.

<sup>b</sup>Expressed as % injected dose per organ.

[図10]

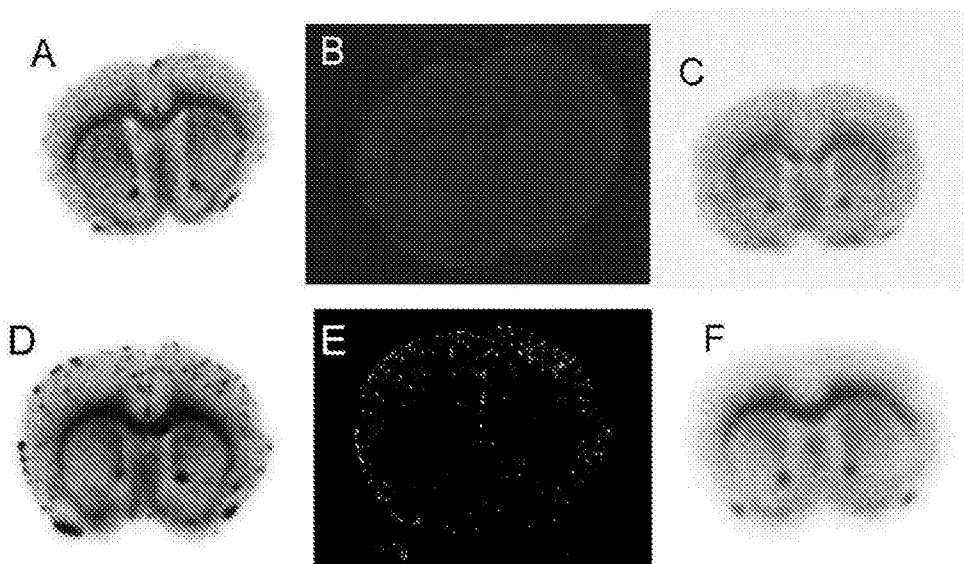


[図11]

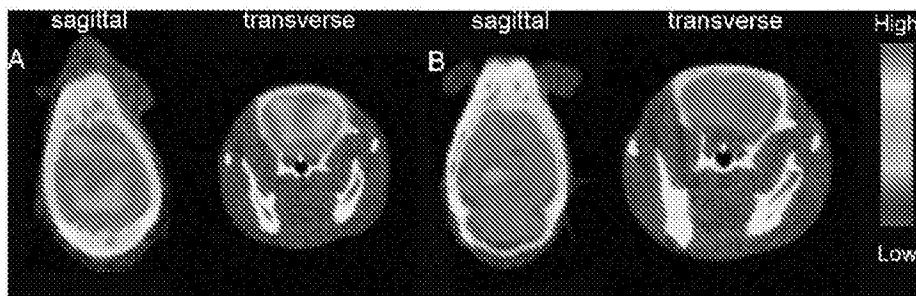




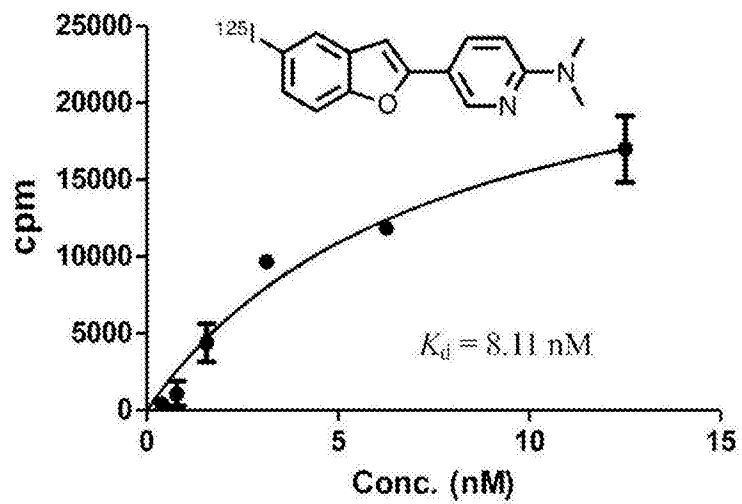
[図12]



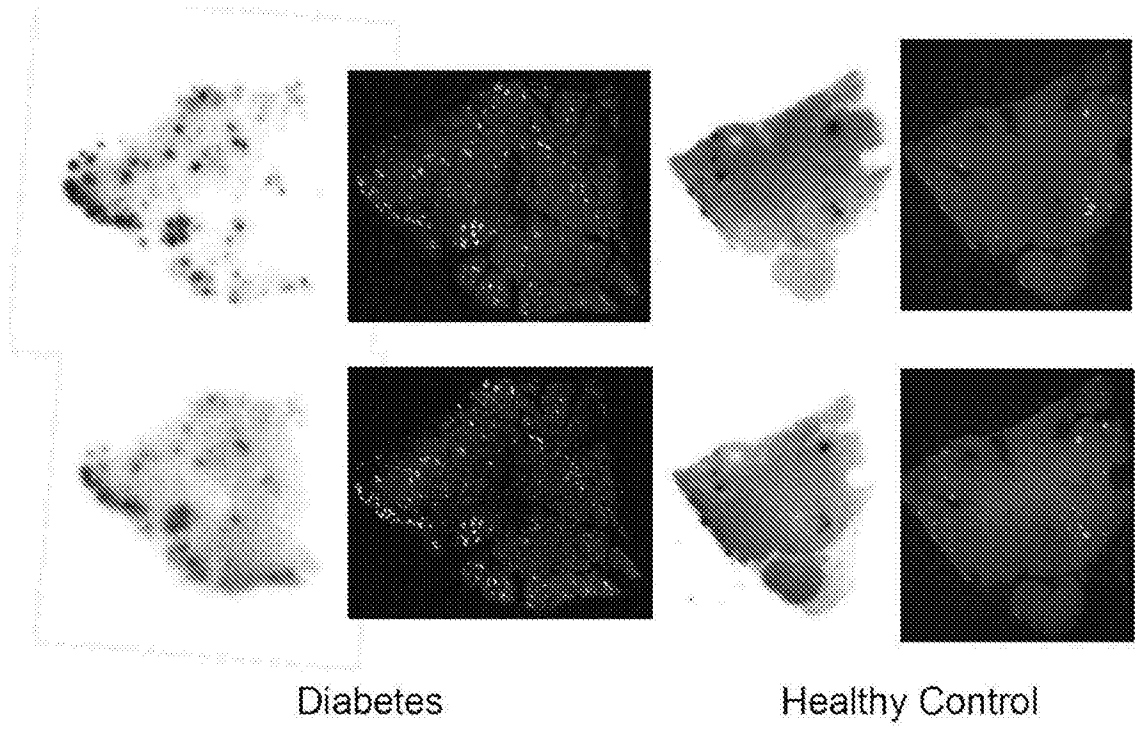
[図13]



[図14]



[図15]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/054326

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K51/00 (2006.01) i

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)  
 A61K51/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2009-541309 A (Astra Zeneca AB.), 26 November 2009 (26.11.2009), claims 2, 26, 46 to 49; paragraphs [0099] to [0105] & US 2008/0027051 A1      & EP 2035418 A & WO 2007/149030 A1      & UY 30419 A & AR 61515 A                  & NO 20090201 A & CA 2655084 A              & KR 10-2009-0021224 A & CN 101506201 A          & IL 195669 D & ZA 200810163 A          & AU 2007261786 A & MX 2008015718 A        & TW 200813035 A	1-6 7

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 May, 2014 (07.05.14)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2014 (20.05.14)
--------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054326

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012-507534 A (Merck Sharp & Dohme Corp.), 29 March 2012 (29.03.2012), claims 5 to 9 & US 2011/0212031 A1 & EP 2341909 A & WO 2010/051196 A1 & AU 2009309027 A & CA 2741668 A	1-6
Y	WO 2012/017891 A1 (Kyoto University), 09 February 2012 (09.02.2012), claims (Family: none)	7
A	Zhi-Ping Zhuang et al., 'IBOX (2-(4'- dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole): a ligand for imaging amyloid plaques in the brain', Nuclear Medicine and Biology, 28 (2001), 887-94	1-7
A	Mengchao Cui et al., 'Synthesis and Evaluation of Novel 18F Labeled 2-Pyridinylbenzoxazole and 2-Pyridinylbenzothiazole Derivatives as Ligands for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of $\beta$ -Amyloid Plaques', Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 55 (21), 9283-9296	1-7
A	Masahiro Ono et al., 'Novel 18F-Labeled Benzofuran Derivatives with Improved Properties for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of $\beta$ -Amyloid Plaques in Alzheimer's Brains', Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54 (8), 2971-2979	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/054326

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8, 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 and 9 involve methods for diagnosis to be practiced on the human body or animal body and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K51/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K51/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2009-541309 A (アストラゼネカ・アクチエボラーク) 2009. 11. 26, 請求項 2, 26, 46-49, 【0099】 - 【0105】 & US 2008/0027051 A1 & EP 2035418 A & WO 2007/149030 A1 & UY 30419 A & AR 61515 A & NO 20090201 A & CA 2655084 A & KR 10-2009-0021224 A & CN 101506201 A & IL 195669 D & ZA 200810163 A & AU 2007261786 A & MX 2008015718 A & TW 200813035 A	1-6 7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07. 05. 2014	国際調査報告の発送日 20. 05. 2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高岡 裕美 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9737

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2012-507534 A (メルク・シャープ・エンド・ドーム・コーポレイション) 2012.03.29, 請求項 5-9 & US 2011/0212031 A1 & EP 2341909 A & WO 2010/051196 A1 & AU 2009309027 A & CA 2741668 A	1-6
Y	WO 2012/017891 A1 (国立大学法人京都大学) 2012.02.09, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	7
A	Zhi-Ping Zhuang et al., 'IBOX (2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole): a ligand for imaging amyloid plaques in the brain', Nuclear Medicine and Biology, 28 (2001), 887-94	1-7
A	Mengchao Cui et al., 'Synthesis and Evaluation of Novel 18F Labeled 2-Pyridinylbenzoxazole and 2-Pyridinylbenzothiazole Derivatives as Ligands for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of $\beta$ -Amyloid Plaques', Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 55 (21), 9283-9296	1-7
A	Masahiro Ono et al., 'Novel 18F-Labeled Benzofuran Derivatives with Improved Properties for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of $\beta$ -Amyloid Plaques in Alzheimer's Brains', Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54 (8), 2971-2979	1-7

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 8,9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項8,9は人体又は動物の体の診断方法を包含するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。