

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5977355号
(P5977355)

(45) 発行日 平成28年8月24日 (2016. 8. 24)

(24) 登録日 平成28年7月29日 (2016. 7. 29)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/37 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/37

G O 1 N 21/64 (2006. 01)

G O 1 N 21/64

F

C O 7 D 239/91 (2006. 01)

C O 7 D 239/91

C O 7 D 401/12 (2006. 01)

C O 7 D 401/12

C O 7 D 403/12 (2006. 01)

C O 7 D 403/12

請求項の数 17 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-532457 (P2014-532457)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (65) 公表番号 特表2014-530210 (P2014-530210A)
 (43) 公表日 平成26年11月17日 (2014. 11. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2012/052196
 (87) 国際公開番号 W02013/045854
 (87) 国際公開日 平成25年4月4日 (2013. 4. 4)
 審査請求日 平成27年9月11日 (2015. 9. 11)
 (31) 優先権主張番号 1158732
 (32) 優先日 平成23年9月29日 (2011. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 514077888
 エコール ノルマル シュペリウール ド
 ウ リヨン
 フランス国 エフ-69342 リヨン
 セデックス 07, パーペー 7000
 , パルヴィ ルネ デカルト 15
 (73) 特許権者 595040744
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェ
 ルシュ・シャンティフィク
 CENTRE NATIONAL DE
 LA RECHERCHE SCIENT
 IFIQUE
 フランス国、75016 パリ、リュ・ミ
 シェル・アンジュ 3

最終頁に続く

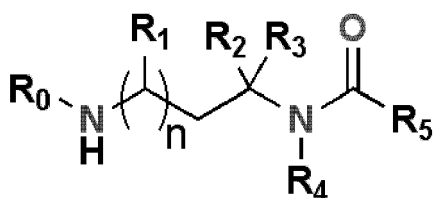
(54) 【発明の名称】 ペプチダーゼの蛍光発生基質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光学異性体若しくはジアステレオ異性体の任意の割合の混合物、又は、光学異性体若しくはジアステレオ異性体が濃縮された形態である、下記式 (I) で表されるペプチダーゼ基質。

【化 1】



(式中、R₀ は、カルボキシ末端を介してNH基に結合したペプチジル又はアミノ酸基であり、

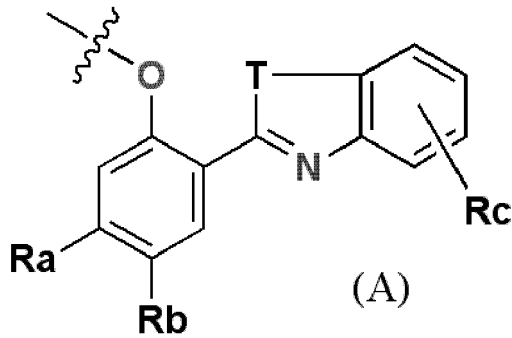
n は 0 又は 1 であり、

R₁ は、水素原子又はアミノ酸の側鎖であり、

R₅ は、対応するフェノール誘導体が E S I P T 型フルオロフォアに属するフェノキシ誘導体であり、以下から選択され：

【化 2】

*



10

(式中、Tは、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}$ 、N-アルキル又はN-ア
リールであり、

Raは、水素、又は、電子吸引基である炭素含有置換基、例えば $-\text{CN}$ 若しくは $-\text{COORd}$ (Rdは (C_1-C_4) アルキル基)等であるか、又は、Raは $-\text{CONReRf}$ (Re及びRfは同一又は異なって水素又は (C_1-C_4) アルキル基)であるか、又は、Raは、 $-\text{CF}_3$ 、2-オキサゾリル、2-チアゾリル、(ベンゾ縮合した若しくはして
いない) 2-イミダゾリル、4-ピリミジノン-2-イル、又は、キナゾリノン-2-イ
ルであり、

20

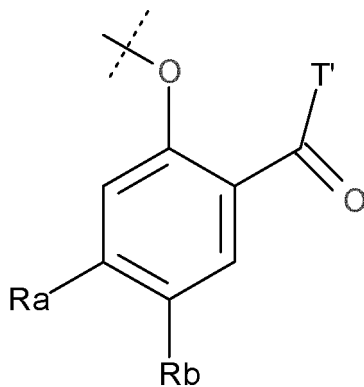
Rbは、水素、塩素原子、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NRgRh}$ 又は $-\text{ORg}$ (Rg及びRh
は同一又は異なって (C_1-C_4) アルキル基)であるか、又は、

Ra及びRbは互いに結合して飽和又は不飽和の置換又は非置換四員～五員炭化水素鎖を
形成しており、前記炭化水素鎖には、N、S及びOから選択される1又は複数のヘテロ原
子が介在していてもよく、

Rcは、水素、Br、Cl、I又はFである。) ;

【化 3】

*



30

(式中、T'は、 NH_2 、 OH 、アリール、 (C_1-C_4) アルキル、 SH 、 NHR 、 OR 、 NR_2 、 SR (Rは (C_1-C_4) アルキル又はアリール)であり、

40

Raは、水素、又は、電子吸引基である炭素含有置換基、例えば $-\text{CN}$ 若しくは $-\text{COORd}$ (Rdは (C_1-C_4) アルキル基)等であるか、又は、Raは $-\text{CONReRf}$ (Re及びRfは同一又は異なって水素又は (C_1-C_4) アルキル基)であるか、又は、Raは、 $-\text{CF}_3$ 、2-オキサゾリル、2-チアゾリル、(ベンゾ縮合した若しくはして
いない) 2-イミダゾリル、4-ピリミジノン-2-イル、又は、キナゾリノン-2-イ
ルであり、

Rbは、水素、塩素原子、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NRgRh}$ 又は $-\text{ORg}$ (Rg及びRh
は同一又は異なって (C_1-C_4) アルキル基)であるか、又は、

Ra及びRbは互いに結合して飽和又は不飽和の置換又は非置換四員～五員炭化水素鎖を
形成しており、前記炭化水素鎖には、N、S及びOから選択される1又は複数のヘテロ原

50

子が介在していてもよい。)、

R_2 、 R_3 及び R_4 は以下の通り：

R_2 が $(C_1 - C_4)$ アルキル基又は水素原子、 R_3 が $(C_1 - C_4)$ アルキル基、且つ、 R_4 が $(C_1 - C_4)$ アルキル基であるか、又は、

R_2 が $(C_1 - C_4)$ アルキル基又は水素原子、且つ、 R_3 及び R_4 が互いに結合してそれらが結合する炭素原子及び窒素原子と共に脂肪族複素環を形成し、前記複素環は、前記基質の水溶性を高めることができるアンモニウム型、カルボン酸型又はスルホン酸型の基で置換されていてもよい、又は、

R_4 が $(C_1 - C_4)$ アルキル基、且つ、 R_2 及び R_3 が互いに結合してそれらが結合する炭素原子と共に脂肪族炭素環を形成する。)

10

【請求項 2】

R_2 は H であり、 R_3 及び R_4 は互いに結合して配列： $-(CH_2)_m-$ ($m = 3, 4$ 又は 5) を形成することを特徴とする請求項 1 記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 3】

R_2 、 R_3 及び R_4 は同一又は異なって、 $(C_1 - C_4)$ アルキル基を表すことを特徴とする請求項 1 記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 4】

R_2 、 R_3 及び R_4 は同一又は異なって、メチル又はエチルを表すことを特徴とする請求項 3 記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 5】

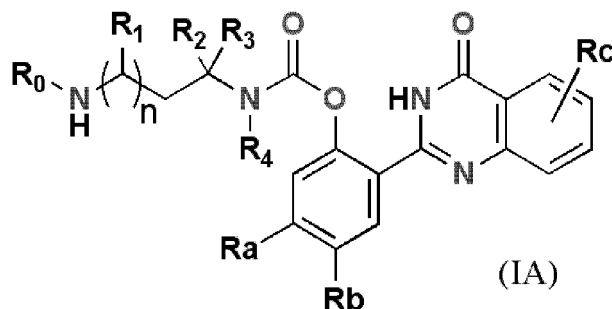
$R_2 = R_3 = R_4 = -CH_3$ であることを特徴とする請求項 4 記載のペプチダーゼ基質。

20

【請求項 6】

光学異性体若しくはジアステレオ異性体の任意の割合の混合物、又は、光学異性体若しくはジアステレオ異性体が濃縮された形態である、下記式 (IA) で表される請求項 1～5 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

【化 4】



30

(式中、 R_0 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 n 、 Ra 、 Rb 及び Rc は請求項 1～5 の記載と同義。)

【請求項 7】

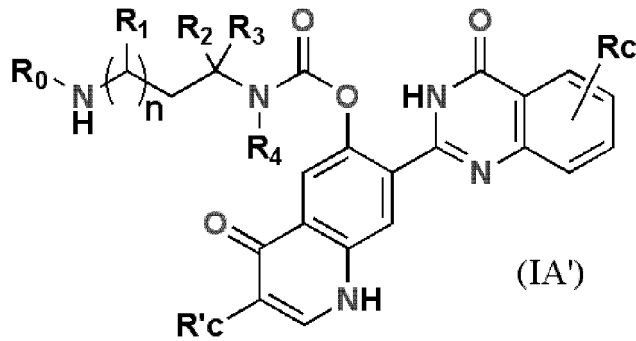
$Ra = Rb = Rc = H$ 、又は、 $Ra = H$ 、 $Rb = Rc = Cl$ であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

40

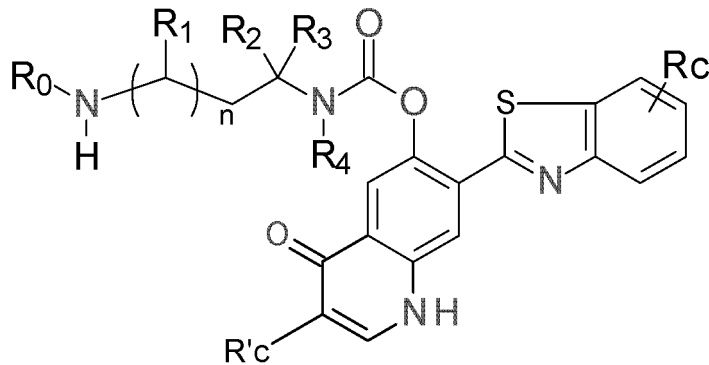
【請求項 8】

Ra 及び Rb が互いに結合して、本発明の基質が、光学異性体若しくはジアステレオ異性体の任意の割合の混合物、又は、光学異性体若しくはジアステレオ異性体が濃縮された形態である、下記式 (IA') 又は (IB') となることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

【化 5】



10



20

(式中、 n 、 R_0 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_c は請求項 1～5 の記載と同義であり、 $R'c$ は、水素原子又は $-COO(C_1-C_4)$ アルキル基を表す。)

【請求項 9】

R_0 は、アミノ酸基を表すか、又は、同一若しくは異なる 10 以下のアミノ酸からなるペプチジル基を表すことを特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 10】

R_0 は、アミノ酸基を表すか、又は、同一若しくは異なる 6 以下のアミノ酸からなるペプチジル基を表すことを特徴とする請求項 9 記載のペプチダーゼ基質。

30

【請求項 11】

前記アミノ酸基、又は前記ペプチジル基を構成するアミノ酸は、天然アミノ酸から選択され、N 末端は非置換であっても、アシル基： $-COR''$ (R'' は (C_1-C_6) アルキル基又は $O-(C_1-C_6)$ アルキル基) で置換されていてもよいことを特徴とする請求項 9 又は 10 記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 12】

$n = 0$ であることを特徴とする請求項 1～11 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 13】

$n = 1$ であり、 R_1 は、アミノ酸の側鎖を表すことを特徴とする請求項 1～12 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

40

【請求項 14】

R_1 は、メチル、イソプロピル、イソブチル又はベンジル基を表すことを特徴とする請求項 13 記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 15】

前記ペプチジル又はアミノ酸基 R_0 は、ロイシンアミノペプチダーゼ、カスパーゼ-3、HIV-1 ペプチダーゼ、レニン、トロンビン、トリプターゼ、カテプシン K、ACE プラスメプシン I 若しくは II、 β -セクレターゼ、又は、前立腺特異抗原 (PSA) の基質であることを特徴とする請求項 1～14 のいずれか 1 項記載のペプチダーゼ基質。

【請求項 16】

50

触媒活性を有するペプチダーゼの存在を検出する方法であって、
前記ペプチダーゼを含んでいる疑いがあるサンプルを請求項1～15のいずれか1項記載の基質と接触させる工程と、
NHとR₀の共有結合を切断した後、スパーサーを環化して-C(O)-R₅結合を切断することによって蛍光沈殿物を形成するのに適した条件を適用する工程と、
前記蛍光沈殿物を定量又は定性分析する工程とを含む方法。

【請求項17】

前記蛍光沈殿物の分析は、
前記蛍光沈殿物の吸収波長の光を発生可能な光源に前記蛍光沈殿物を暴露する工程と、
得られる沈殿物の蛍光を検出する工程とを含む、請求項16項記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素活性を検出するプローブの技術分野に関する。特に、本発明は、触媒活性を有するペプチダーゼの存在を検出するための新規蛍光発生基質及びその基質を用いた検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生物学的又は化学的サンプルの分析において、ペプチダーゼ（又はプロテアーゼ）活性の検出は非常に有用である場合がある（非特許文献1）。ペプチダーゼ活性を検出することが可能な生物学的又は化学的サンプルの例として、全ての生物、細胞又は細胞抽出物、生体液又は化学物質混合物が挙げられる。エキソ型又はエンド型プロテアーゼは、膨大な数の酵素からなる酵素群であり、各種病状の多くのバイオマーカーが含まれる。また、上記酵素は多くの良性細胞プロセスに関与しているため、細胞生物学者としては数えきれないほど多くの研究のテーマとなっている。従って、上記酵素を検出することで、例えば特定の代謝又は罹患症状に関する情報が得られる場合がある。

20

【0003】

それ故に、ペプチダーゼ活性を検出可能なプローブは非常に有用である。その活性を蛍光を捉えることによって検出することは、単にプローブによって吸光させる際に残りの白色光を回収することに比べてはるかに感度の高い方法である。すなわち、検出閾値ははるかに低い。蛍光発光の検出は非常に適用しやすいため、蛍光プローブは生命科学において非常に魅力的な道具である。例えば、ESIPT（Excited State Intramolecular Proton Transfer）と呼ばれる励起状態分子内プロトン移動を生じさせるフルオロフォアの種類が非特許文献2及び3に記載されている。特定のフェノール化合物においてESIPT現象として見出された強い蛍光を初めて解説したのは、Weller（サリチル酸メチルの場合：非特許文献4）並びにHeller及びWilliams（ヒドロキシフェニルベンゾオキサゾールの場合：非特許文献5）であるかもしれない。

30

【0004】

上記種類のESIPTフルオロフォアは、従来のフルオロフォアと比べて並外れた特性を有するため、生命科学の研究者にとって特に魅力的である。ESIPTフルオロフォアの並外れた特性は以下の通りである。

40

【0005】

（a）130nmを超えることが多く、250nmの値にまで達することが可能な大きなストークスシフトを示し、これにより機器を選択することができ、検出感度を最大限にできる。

【0006】

（b）光退色に対する耐性に優れ、その度合いはフルオレセインのようなフルオロフォアモデルよりも数桁大きい場合もある。

【0007】

50

(c) 全ての公知のフルオロフォアにおいてまれな特性である固体状態で明るい蛍光を発するというフルオロフォアを設計することが可能である。この性能により、拡散による希釈を最小限にしつつ、プローブの活性化部位において強度の高いシグナルを生成できる。

【0008】

(d) 組織の透明度が最も高くなる赤色光又は近赤外光(600~850nm)を発するESIPTフェノール系フルオロフォアを設計することが可能である。対応のプローブは、生きている動物のイメージングに特に適しているだろう。

【0009】

このようなフルオロフォアをプローブに組み込んだ場合、上記特性の大部分は従来の市販プローブと比べて著しく貢献するであろう。従来の市販プローブでは、小さなストークスシフト及び中～高度の光退色によって性能が妨げられている他、一切例外なく溶液状態のフルオロフォアとなる。

【0010】

本発明の範囲内において、本発明者らは、酵素により切断できる単位であって、上述したESIPTフルオロフォアを含み、所望の部位及び組織に到達するための前提条件である完全な水溶性を有する完全なプローブを提供できる単位を好適に選択することに興味を抱いた。このようなプローブがあれば、検出感度は著しく高まり、それにより、毒性の問題を減少させながら用量を低減できるため、特にインビボイメージングの用途に適合させることができる。感度は、(i) 光退色度、(ii) 蛍光シグナルの生成部位での蓄積度(従って、この部位からの拡散率、及び、フルオロフォアが沈殿しているか否かを知る問題)、(iii) プローブが作動するリアルオン/オフモード(プローブの自然加水分解による偽陽性シグナルが存在しないこと)、並びに、(iv) 励起スペクトル及び発光スペクトルの重畳度(ベースラインで上記スペクトルが分離していることが最も好ましい構成である(上記項目(a)を参照))と密接な関係がある。項目(iv)はとりわけ特に重要であるが、これは、ベースラインで完全に分離していれば、(考えられるあらゆる波長で分子を励起させる)光源のフィルターに関して、より重要なことには(フルオロフォアにより発せられる全ての波長の光子を回収する)検出器のフィルターに関して広範な選択肢から選択できる機会が得られるためである。また、組織自己蛍光(小さなストークスシフトを有する天然フルオロフォアの特徴)は、同様にストークスシフトが小さい確立されたフルオロフォアにおいて繰り返し見られる問題であるが、項目(iv)によって、この組織自己蛍光による検出プロセスの攪乱を最小限にできる。

【0011】

近年、トリガー/結合剤/フルオロフォアの3成分を用い、結合剤として自己犠牲スペーサーを使用した酵素基質の設計に対して関心が高まっている。重要な種類のESIPTフルオロフォアのなかでも、水性/生理的媒体に完全に不溶であり、且つ、固体状態で及び固体状態だけで強い蛍光性を有する点から、2-ヒドロキシフェニルキナゾリノン(HPQ)に特に関心が集まっている。しかしながら、アシルヒドロラーゼ(エステラーゼ又はペプチダーゼ)の活性に関する情報を提供する分子プローブの設計においてHPQを使用するのは非常に困難である。また、既に設計(及び市販)されたHPQ系プローブの対象とする主要な活性はホスファターゼ及びグリコシダーゼのものである。これは、アシル化されたフェノール性ヒドロキシルを有するHPQ系プローブを安定した状態で生成できないためであって、得られる生成物が急速に自然に加水分解されやすく、言うまでもなく、不溶性の遊離HPQが放出され、それにより、誤った蛍光シグナル(偽陽性シグナル)が生成されるからである。なお、そのようなアシル化化合物(ELF97エステラーゼ基質(ELF97酢酸塩)及びELF97リパーゼ基質(ELF97パルミチン酸塩))のMolecular Probesによる販売は2005年に中断され、幾人かの研究者によるそれらの研究は見過ごされている(非特許文献6)。その理由は、フェノールエステル、特にESIPTフェノールエステルが加水分解に対して本質的に不安定であるからであり、この不安定性は、内部求核剤(イミンの窒素)が加水分解を抗キメラ型に進行させやすくすることでさらに悪化する。

10

20

30

40

50

【0012】

この自己分解を取り除くため、別の解決策、すなわち、ヒドロキシ基の代わりにアミノ基を有するHPQ由来ESIPTフルオロフォアに切り換えることが他のチームによって検討された。この解決策が検討されたのは、カルボン酸エステルの代わりにカルボキサミド結合を形成する対応のアシル化化合物がもはや自然な加水分解をあまり受けそうにないことが知られているためである（非特許文献7並びに特許文献1及び2）。

【0013】

ところが、この手法には以下の欠点がある。

【0014】

・（HPQに存在するような）フェノール単位の代わりにアニリン単位を有し、ESIPT効果を発現可能なフルオロフォア類似化合物は、大きいストークスシフトが特徴のESIPTバンドをほとんど示さない。最良の事例では、上記フルオロフォアは、ストークスシフトの小さい、従って励起波長に近い発光波長を有する「通常の」フルオロフォアのようにふるまう。さらに、以下の著者は上記化合物が「非蛍光性である」又は「ESIPT蛍光を示さない」と述べている（非特許文献8及び9）。HPQと比べて「アニリン」類似体がESIPT蛍光を示さないこの現象は、本出願の発明者の1人によって「キナゾリノン」群でも確認された（非特許文献10）。ベンゾチアゾール、オキサゾール又はイミダゾールの代わりにキナゾリノン（→HPQ）を用いて実施する利点は、キナゾリノンの優れた不溶性に基づいており、それにより、標的酵素により変換されてフルオロフォアが沈殿する代わりにシグナルが最大化する。この最大の不溶性は、沈殿生成物の結晶格子中のラクタム単位間の2つの分子間水素結合を介した二量化現象によるものである（非特許文献11）。

【0015】

・アミノ基がアシル化（非特許文献12）又はスルホニル化（非特許文献13）されているため、電子吸引基を有し、常に窒素原子上に水素原子を有するアニリン単位（2-アミノフェニル）を有し、ESIPT効果を発現可能なフルオロフォア類似化合物は、非アシル化誘導体に比べて強度の高いESIPT蛍光を示す。従って、上記基を有し、ペプチダーゼを標的とするプローブは、むしろ「オン→オフ」作動モードを示すはずであるが、このモードは、シグナルの強度の減少が初期プローブの変換によるものなのか、単なる拡散によるものなのかを決定しづらいため、あまり魅力的ではない。

【0016】

また、2010年に本出願の発明者の1人は非特許文献14に、ペプチド配列／スパーサー／HPQ（上記スパーサーは、HPQに結合したアシル化されたO、O-アセタール基を含む）の3成分を有する酵素基質を開示した。この試験プローブは生理的条件下で比較的安定であるものの、依然として、細胞イメージングの用途で偽陽性蛍光シグナルをもたらす分解率を有している。

【0017】

インビトロ用途及びインビボ用途で使用する場合の基本的な前提条件である、プローブの自然分解、結果として誤ったシグナルの生成がより顕著に、さらには完全に起こらないことを可能にする解決策が、フェノール系フルオロフォアにグラフト化されたパラ-アミノベンジルスパーサーを使用して提案されている（特許文献3及び非特許文献15）。上記パラ-アミノベンジルスパーサーは、80年代の始めからプロドラッグの設計において既に使用されているものの（非特許文献16、17及び18並びに特許文献4）、人工酵素基質においてパラ-アミノベンジルスパーサー（又はその酸素化類似体）を使用すると、タンパク質が、多くの場合触媒部位付近又はその部位内において、持続的にアルキル化されるという大きな欠点があることが知られている。その後、このマイナスの特性は、下記スキーム1に示されるように、酵素を不活性化する基質、すなわち、さらに基質分子を変換することがもはやできない酵素にする基質を提案した多くの文献において活用された。

【0018】

スキーム1

10

20

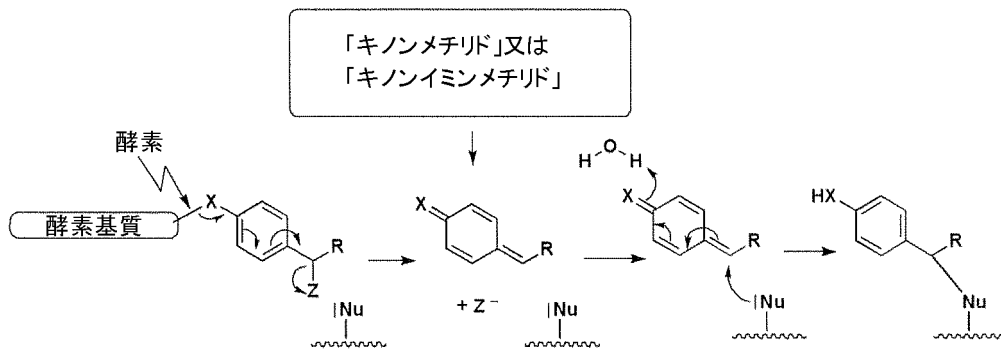
30

40

50

【0019】

【化1】



X = N, O ; Z = 脱離基 ; Nu : 酵素上の求核剤

【0020】

オルトー又はパラアミノー（又はヒドロキシー）ベンジル系酵素基質を用いた酵素標識に関する様々な研究から、キノンイミンメチリドは反応性が高く、求核剤をアルキル化し、すぐ近くにある生体巨大分子の分子特性を無作為に変化させる危険性があることが示されている。言うまでもなく、標的酵素の触媒活性化又は触媒能の低下は、酵素増幅作用が失われることから、上記蛍光発生プローブを使用したイメージング実験の感度に非常に悪影響をもたらす。標的酵素を直接不活性化する場合を除き、上記タンパク質又は隣接する他のタンパク質の表面の無作為アルキル化には免疫応答の危険性もある。いずれの場合でも、それぞれの生物体における耐性は限られており、従ってそれら生物体に対して高い毒性を示す。

【0021】

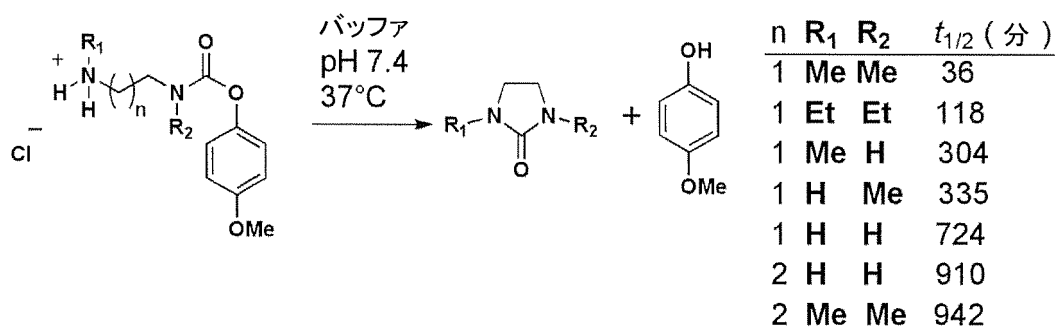
このような状況に鑑み、本出願人は、1) E S I P Tフルオロフォアを含む安定したプローブを、従って未変換のプローブのバックグラウンド蛍光を最小限にしつつ、作製することができ、2) 毒性に関して、当該技術分野で公知のアミノベンジルスパーサーと同様な危険性を持たない他のスパーサーを提供することを提案した。本出願人はジアミンスパーサーに興味を持った。第3級フェノール系カルバメートの一部であるジアミンスパーサーは、特異的標的酵素によって変換された後に活性薬剤に変換され得るプロドラッグを作製するために既に使用されている。フェノール系アミノエチルカルバメートは、下記スキーム2に示されるように、2つのアミンが2級アミンである場合、すなわち、それぞれが2つアルキル化されている場合にのみ、生理的条件下でかなり量が犠牲にされることが、プロドラッグ設計分野において周知である（非特許文献19）。

【0022】

スキーム2

【0023】

【化2】



【0024】

特許文献5に記載のプロドラッグの設計に関する実験結果から、遠位のアミンが1級（1

10

20

30

40

50

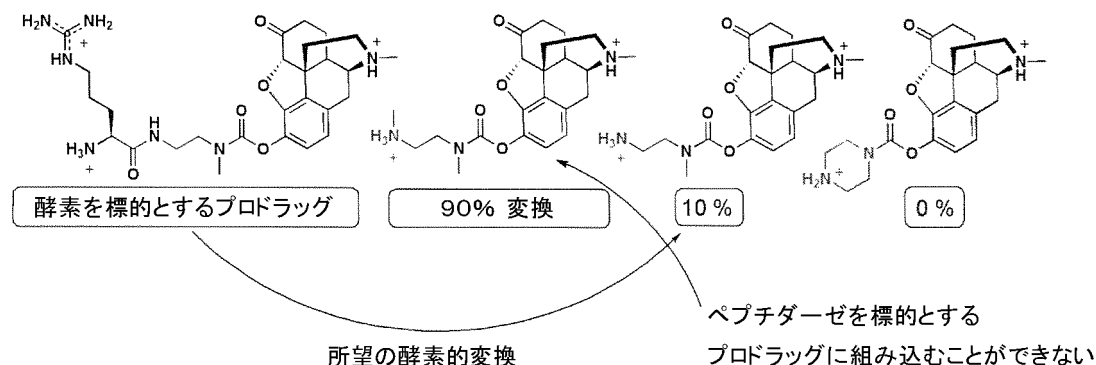
つのみがアルキル置換基)であって、2級アミンではない場合、スペーサーの犠牲量に悪影響が及ぼされることが明確に示されている。得られた変換率を下記スキーム3に示す。

【0025】

スキーム3

【0026】

【化3】



10

【0027】

2つの2級アミンを有する構造では、生理的媒体中、24時間で90%の遊離フェノールが犠牲になっているが、1級アミンと2級アミン(第3級カルバメートの一部)を有する構造では、上記条件下で10%しか変換されていない。

20

【0028】

特許文献6で強調されている重要な点は、ほとんどのペプチダーゼ(又はアミダーゼ)が第3級ペプチド結合を認識しないため、2つの2級アミンを有するスペーサー(生理的条件下では変換率90%)はペプチダーゼを標的とするプロドラッグ中に組み込むのに有用でないことである。長い間確立されてきたこの事実は、ごく最近の研究において、前蛍光性(profluorescent)ペプチダーゼを標的とするプローブによるフェノール系フルオロフォアの放出に関して確かめられている(非特許文献20)。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0029】

【特許文献1】国際公開第2008/152305号(Fabrega, O.; James, A.; Salwatura, V. L.; Orenge, S.; Stanforth, S. P.)

【特許文献2】国際公開第2008/152306号(Fabrega, O.; James, A.; Salwatura, V. L.; Orenge, S.; Stanforth, S. P.)

【特許文献3】国際公開第2008/145830号

【特許文献4】米国特許出願公開第2003096743号明細書(Senter, P. D.)

40

【特許文献5】国際公開第2007/140272号

【特許文献6】国際公開第2007/142172号

【非特許文献】

【0030】

【非特許文献1】Boonacker E. and Van Noorden C. J. F. J. Histochem. Cytochem. (2001) 49, 1473-1486

【非特許文献2】Ormson, S. M., et al. Progress in Reaction Kinetics (1994) 19, 45-91

【非特許文献3】Legourrierec, D., et al. Progress i

50

- n Reaction Kinetics (1994), 19, 211-275
- 【非特許文献4】Weller, A. (1961). Fast Reactions of Excited Molecules. Progress in Reaction Kinetics and Mechanism 1, 187
- 【非特許文献5】Heller A., and Williams, D. L., J. Phys. Chem. (1970) 74, 4473-4480
- 【非特許文献6】C. Kragelund et al. / FEMS Microbiology Ecology 54 (2005) 111-122
- 【非特許文献7】Marie Cellier, Olivier J. Fabrega, Elizabeth Fazackerley, Arthur L. James, Sylvain Orenge, John D. Perry, Vindhya L. Salwatura, Stephen P. Stanforth, Bioorganic & Medicinal Chemistry 19 (2011) 2903-2910, title: "2-Arylbenzothiazole, benzoxazole and benzimidazole derivatives as fluorogenic substrates for the detection of nitroreductase and aminopeptidase activity in clinically important bacteria"
- 【非特許文献8】J. K. Dey; S. K. Dogra, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991, 64, 3142-3152
- 【非特許文献9】K. Kuldov, Y. Eichen, P. Emele, H. P. Trommsdorff, Journal of Luminescence 72-74 (1997) 513-514
- 【非特許文献10】Michael Waibel, Jens Hasserodt, Tetrahedron Letters 50 (2009) 2767-2769
- 【非特許文献11】Diwu, Z.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P., SPIE Advances in Fluorescence Sensing Technology IV (1999), 3602, 265-274
- 【非特許文献12】S. Santra et al., J. Phys. Chem. A 2000, 104, 476-482
- 【非特許文献13】Christoph J. Fahrni et al., J. Phys. Chem. A 2002, 106, 7655-7663
- 【非特許文献14】Chem. Eur. J. (2010), 16, 792-795
- 【非特許文献15】Richard, J. A., et al. Bioconjugate Chemistry (2008) 19, 1707-1718
- 【非特許文献16】Wakselman, M. New Journal of Chemistry (1983), 7, 439-447
- 【非特許文献17】Carl, P. L., et al. Journal of Medicinal Chemistry (1981) 24, 479-480
- 【非特許文献18】Toki, B. E., et al. Journal of Organic Chemistry (2002) 67, 1866-1872
- 【非特許文献19】Saari, W. S., et al. Journal of Medicinal Chemistry (1990) 33, 97-101
- 【非特許文献20】Meyer, Y., et al. OrgBiomolChem (2010) 8, 1777-1780
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0031】

このような状況に鑑み、本発明の目的は、水性媒体で安定であり、放出されたフルオロフォア自体が蛍光性を有する波長と全く異なる波長では非蛍光性又は蛍光性が弱いままであ

るが、ペプチダーゼと反応してHPQ等のESIPTに基づく蛍光低分子を生成する新規ペプチダーゼ基質を提供することである。本発明によれば、以下の特性を有するペプチダーゼ基質を提供することが検討される。

- ・特定のペプチダーゼに対する特異性
- ・プローブの自然分解により生成される偽陽性シグナルが、特にO, Oアセタールスペーサーを有するプローブと比較して全く存在しないこと
- ・良好な犠牲反応速度
- ・アミノベンジルスペーサーの使用に伴う毒性が認められない生体適合性

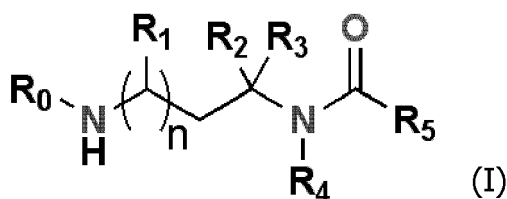
【課題を解決するための手段】

【0032】

すなわち、本発明は、光学異性体若しくはジアステレオ異性体の任意の割合の混合物、又は、光学異性体若しくはジアステレオ異性体が濃縮された形態である、下記式(I)で表されるペプチダーゼ基質に関する。

【0033】

【化4】



【0034】

(式中、

- ・ R_0 は、カルボキシ末端を介してNH基に結合したペプチジル又はアミノ酸基であり、
- ・ n は0又は1であり、
- ・ R_1 は、水素原子又はアミノ酸の側鎖であり、
- ・ R_5 は、対応するフェノール誘導体がESIPT型フルオロフォアに属するフェノキシ誘導体であり、
- ・ R_2 、 R_3 及び R_4 は以下の通り：
 - R_2 が($C_1 - C_4$)アルキル基又は水素原子、 R_3 が($C_1 - C_4$)アルキル基、且つ、 R_4 が($C_1 - C_4$)アルキル基であるか、又は、
 - R_2 が($C_1 - C_4$)アルキル基又は水素原子、且つ、 R_3 及び R_4 が互いに結合してそれらが結合する炭素原子及び窒素原子と共に脂肪族複素環を形成し、上記複素環は、上記基質の水溶性を高めることができるアンモニウム型、カルボン酸型又はスルホン酸型の基で置換されていてもよい、又は、
 - R_4 が($C_1 - C_4$)アルキル基、且つ、 R_2 及び R_3 が互いに結合してそれらが結合する炭素原子と共に脂肪族炭素環を形成する。)

【0035】

本発明に係る基質は、蛍光を検出することで特異的酵素活性の有無を明らかにすることが可能な分子プローブのように作用する。具体的には、上記プローブは、標的酵素と出会うまでは目に見えないが(すなわち、「ステルスプローブ」)、上記酵素によって化学修飾されるとカスケード反応によって断片化されて強い蛍光を生じる。上記プローブは、以下の3つの分子成分：i) 一方の側に保持されたスマートスペーサー、ii) もう一方の側の標的酵素の基質、iii) 上記断片化により放出されると、対応のフェノール誘導体を形成することでESIPT型フルオロフォアに属するフェノキシ誘導体からなる。第3級カルバメート基に対して遠位の1級アミン基を有するアミノエチルカルバメートスペーサーに関連する好ましくない犠牲反応速度を克服するために、本発明は、環状尿素へと環化されるよう事前組織化するように置換した新規ジアミンスペーサー群を提案する。この事前組織化によって、酵素による変換時の犠牲プロセスが促進される。さらに、本発明の範囲内で使用されるスペーサーが環化されると、安定性が高く、一般的に生体適合性を有す

10

20

30

40

50

ることが知られている尿素が形成される。

【0036】

この技術革新によって、対応の分子プローブの以下の2つの基本的特性（a）及び（b）を得ることが可能となる。（a）自然分解、従って、偽陽性蛍光シグナルの生成について影響されなくなること、及び、（b）標的酵素による変換時の断片化反応速度が速くなって生命科学分野での用途に適した性能となること。 R_0 基は、標的ペプチダーゼの作用によって基質の残部から切断することが可能であり、これにより中間体が生成され、この中間体が自然に急速に犠牲にされて蛍光シグナルが生成される。

【0037】

ペプチダーゼ基質のNHと R_0 の共有結合の切断後、スペーサーが環化されて $-C(O)-R_5$ 結合が切断されることで得られる沈殿物によって、蛍光シグナルが生成される。特定の実施形態では、この沈殿物は強い蛍光性を示すが、元のペプチダーゼ基質の蛍光性はあまり高くないか、又は、全く蛍光性を示さない。従って、無傷のプローブはオフ/オンモードで作動する。

【0038】

別の態様によれば、本発明は、本発明に係る基質によって、触媒活性を有するペプチダーゼの存在を検出する方法に関する。具体的には、本発明は、触媒活性を有するペプチダーゼの存在を検出する方法であって、

- ・上記ペプチダーゼを含んでいる疑いがあるサンプルを本発明に係る基質と接触させる工程と、
- ・蛍光沈殿物を形成するのに適した条件を適用する工程と、
- ・上記蛍光沈殿物を定量又は定性分析する工程とを含む方法に関する。特に、上記検出方法は、生理的条件下、特にpH7.4程度に緩衝された水性媒体中で行ってもよい。

【0039】

本発明の一実施形態では、上記蛍光沈殿物の分析は、

- ・上記蛍光沈殿物の吸収波長の光を発生可能な光源に上記蛍光沈殿物を暴露する工程と、
- ・得られる沈殿物の蛍光を検出する工程とを含む。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】走査モードで得た典型的なイメージを示し、6列（1～6）、4行（A～D）の格子で表されるマルチウェルプレート（Corning）のウェル中の、インキュベーション40時間後の酵素により引き起こされた蛍光の強度の空間図を示す。

【図2】プローブI.1に行った別の実験の高分解能の走査モードで得たイメージを示し、酵素により活性化されたプローブ（ウェルA2及びA3）がウェルの中心だけでなく端にも沈殿する傾向を示す。

【図3】PLA酵素の存在下の濃度18 μ MのプローブI.2の場合、及び、酵素の非存在下の濃度100 μ MのプローブI.2の場合のウェルで測定された蛍光に相当するシグナルG(t)を示す。

【図4】上記方法で得た、時間に対して示した蛍光シグナルF(t)の経時変化であって、PLA酵素の非存在下、pH $\sim$ 7.6に緩衝された水溶液中の10 μ M及び100 μ Mの化合物I.1並びに10 μ M及び100 μ Mの化合物I.2（これら2つのシグナルはほとんど全て重なっている）の蛍光シグナルF(t)の経時変化を示す。

【図5】上記方法で得たシグナルF(t)であって、PLA酵素の存在下の化合物I.1（378 μ M、100 μ M及び59 μ M）及び化合物I.2（100 μ M及び59 μ M）、並びに、PLAの非存在下のそれぞれ100 μ Mの両化合物（コントロール）のシグナルF(t)を線形スケールで示す。

【図6】上記方法で得たシグナルF(t)であって、PLA酵素の存在下及び非存在下、各種濃度10 $\sim$ 100 μ Mとなるよう新たに溶解させた化合物I.1、並びに、PLAを新たに添加した水溶液中で3週間保管した378 μ M（希釈時に元の濃度に従って計算した）の同化合物（ $\ll$ 3週間 $\gg$ ）のシグナルF(t)を対数スケールで示す。

【図7】上記方法で得たシグナルF(t)であって、PLA酵素の存在下及び非存在下、各種濃度10～100 μMとなるよう新たに溶解させた化合物I. 2の場合のシグナルF(t)を対数スケールで示す。

【図8】上記方法で得たシグナルF(t)であって、PLA酵素の存在下の濃度100、32及び10 μMの化合物I. 1及びI. 2のシグナルF(t)を比較しながら対数スケールで示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明をより詳細に説明する。まず、基質(I)を定義するのに用いる特定の用語を定義する。

10

【0042】

「アルキル」とは、直鎖状又は分枝状であってもよい飽和炭化水素鎖を意味する。(C₁—C₄)アルキル(炭素数1～4のアルキル)基の例として、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、イソブチル及びtert-ブチルが挙げられる。

【0043】

「アリール」とは、フェニル、ナフチル又はシンナミル基を意味する。

【0044】

「ペプチジル」とは、ペプチド結合を介して互いに結合した2以上のアミノ酸からなる配列を意味する。本発明の範囲内において、R₀中に存在するアミノ酸は天然アミノ酸であってもそうでなくてもよいが、塩化又は保護された形態であってもよい20個の天然アミノ酸(=タンパク質を構成するアミノ酸)から選択されるのが好ましい。末端アミノ酸のN末端官能基は、所望により塩化又は官能化されていてもよい。塩化された形態の例としては、塩酸塩、トシレート又はトリフルオロ酢酸塩の形態が挙げられる。

20

【0045】

「アミノ酸の側鎖」とは、1級アミノ酸の側鎖を意味する。そのような側鎖の例としては、メチル(アラニンの側鎖)、イソプロピル(バリンの側鎖)、イソブチル(ロイシンの側鎖)、ベンジル(フェニルアラニンの側鎖)基が挙げられる。

【0046】

「蛍光」とは、所定の波長を有する光で励起される分子がより大きい波長の光を発する特性である。蛍光は、フルオロフォアと入射光子との相互作用により生じる現象である。この過程を励起という。光子が吸収されると、フルオロフォア中の電子がその基底状態を通過して、より高いエネルギー準位に達する。続いて、電子は光子を放出して元の準位に戻る。この過程を蛍光発光という。そして、フルオロフォアは、吸収した光子よりも大きい波長の光を発する。これは、単に、励起状態で存在する間にエネルギーが散逸するため、放出された光子のエネルギーは吸収された光子よりも低いからである。この定義は、国際公開第2004/058787号に記載されている。

30

【0047】

本発明に係る化合物(I)は、ペプチダーゼにより触媒される化学反応中に別の基質へと変換されるため、「ペプチダーゼ基質」と呼ぶ。この反応中、化合物(I)(「プローブ」ともいう)は、特異的ペプチダーゼの作用によって切断されて蛍光沈殿物及び非蛍光生成物となる。

40

【0048】

R₅は、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい1又は複数の不飽和炭素環によってフェニル基が置換及び／又は縮合されたO-フェニル基で構成される。—O—Phで表されるこのフェノキシ誘導体は、基質に結合していない場合、ESIPT型フルオロフォアに属するフェノール誘導体HO—Phに相当する。R₅は、このように配列：—CO—O—Phに従ってオキシ橋を介して基質に結合したフルオロフォアHO—Phに相当する。

【0049】

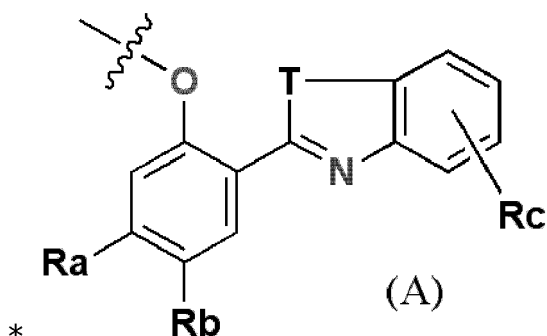
基質に結合していなければESIPTフルオロフォアに相当する、—O—Phで表されるフェノキシ誘導体R₅は、例えば以下の好ましい構造(A)又は(B)に相当するもので

50

あってもよい。

【0050】

【化5】



10

【0051】

(式中、

・ Tは、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}$ 、N-アルキル又はN-アリールであり、

・ Raは、水素、又は、電子吸引基である炭素含有置換基（ $-\text{CN}$ 若しくは $-\text{COORd}$ （Rdは (C_1-C_4) アルキル基）等）であるか、又は、Raは $-\text{CONReRf}$ （Re及びRfは同一又は異なって水素又は (C_1-C_4) アルキル基）であるか、又は、Raは、 $-\text{CF}_3$ 、2-オキサゾリル、2-チアゾリル、（ベンゾ縮合した若しくはしていない）2-イミダゾリル、4-ピリミジノン-2-イル、又は、キナゾリノン-2-イル基であり、

20

・ Rbは、水素、塩素原子、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NRgRh}$ 又は $-\text{ORg}$ （Rg及びRhは同一又は異なって (C_1-C_4) アルキル基）であるか、又は、

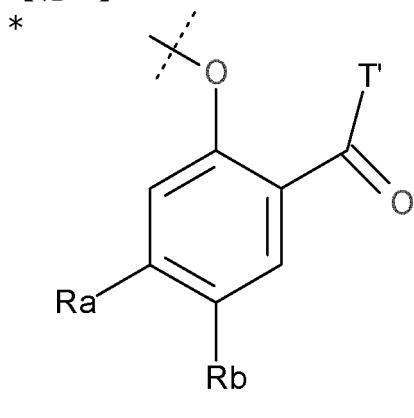
・ Ra及びRbは互いに結合して飽和又は不飽和の置換又は非置換四員～五員炭化水素鎖を形成しており、上記炭化水素鎖には、N、S及びOから選択される1又は複数のヘテロ原子が介在していてもよく、

・ Rcは、水素、Br、Cl、I又はFである。）

【0052】

30

【化6】



40

【0053】

(式中、

・ T'は、 NH_2 、 OH 、アリール基、 (C_1-C_4) アルキル基、SH、NHR、OR、 NRR' 、SR（R及びR'は (C_1-C_4) アルキル又はアリール）であり、

・ Raは、水素、又は、電子吸引基である炭素含有置換基（ $-\text{CN}$ 若しくは $-\text{COORd}$ （Rdは (C_1-C_4) アルキル基）等）であるか、又は、Raは $-\text{CONReRf}$ （Re及びRfは同一又は異なって水素又は (C_1-C_4) アルキル基）であるか、又は、Raは、 $-\text{CF}_3$ 、2-オキサゾリル、2-チアゾリル、（ベンゾ縮合した若しくはしていない）

50

ない) 2-イミダゾリル、4-ピリミジノン-2-イル、又は、キナゾリノン-2-イルであり、

・ R b は、水素、塩素原子、-OH、-NH₂、-NR_gR_h 又は -OR_g (R_g 及び R_h は同一又は異なって (C₁-C₄) アルキル基) であるか、又は、

・ R a 及び R b は互いに結合して飽和又は不飽和の置換又は非置換四員～五員炭化水素鎖を形成しており、上記炭化水素鎖には、N、S 及び O から選択される 1 又は複数のヘテロ原子が介在していてもよい。))

【0054】

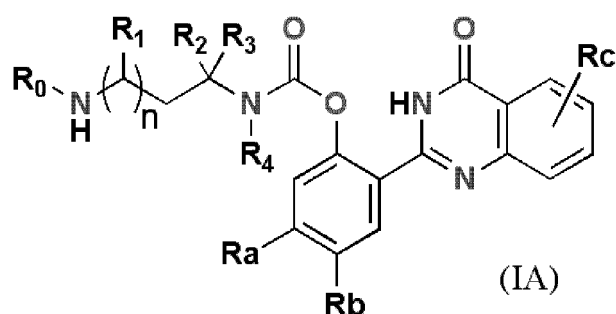
スペーサーのカルバミル基とは反対側の遊離 1 級アミノ基が標的ペプチダーゼによって放出されると、スペーサーは自然に環化し、それによりフェノールが放出されるため、蛍光性が強くなる。

【0055】

特定の実施形態では、本発明に係るペプチダーゼ基質は下記式 (IA) で表される。

【0056】

【化 7】



【0057】

(式中、n、R₀、R₁、R₂、R₃、R₄、R a、R b 及び R c は、上記 (I) 及び (A) の記載と同義。)

特定の実施形態によれば、本発明は、式 (I) (R₅ は (A) 又は (B) 基) の化合物及び式 (IA) (R a = R b = R c = H、又は、R a = H、R b = R c = Cl (R c は好ましくは窒素原子の位置に対してパラ位) の化合物) に関する。他の特定の実施形態によれば、R a 及び R b が互いに結合して、本発明に係る基質は下記式 (IA') 又は (IB') となる。

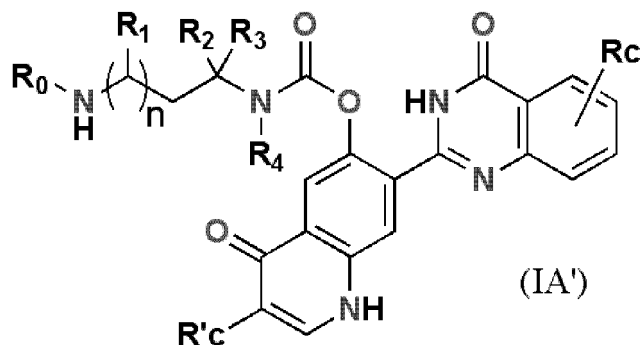
【0058】

10

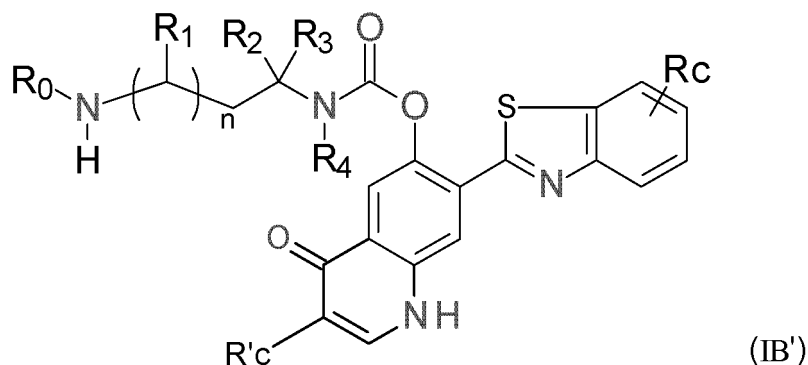
20

30

【化 8】



10



20

【0059】

(式中、 n 、 R_0 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_c は、上記(I)及び(A)の記載と同義であり、 R'_c は、水素原子又は $-COO(C_1-C_4)$ アルキル基を表す。)窒素原子に対してパラ位の $R_c = H$ 又は Cl の化合物が好ましい。

【0060】

本発明に係る基質(I)、(IA)、(IA')及び(IB')の一実施形態において、 R_2 はHであり、 R_3 及び R_4 は互いに結合して配列： $-(CH_2)_m-$ ($m = 3, 4$ 又は 5)を形成する。

30

【0061】

本発明に係る基質(I)、(IA)、(IA')及び(IB')の別の実施形態において、 R_2 、 R_3 及び R_4 は同一又は異なって (C_1-C_4) アルキル基、例えばメチル又はエチル等、例えば $R_2 = R_3 = R_4 = -CH_3$ 等である。

【0062】

環状尿素へと環化されるようエチレンジアミンスペーサーを事前組織化するこれら2つの方法は、カルバメート基の α 炭素上に2つのアルキル置換基を導入するか、又は、カルバメート基の窒素とその α 炭素との結合を複素環中に含ませることからなるものであり、これらの方法により犠牲プロセスが促進される。カルバメート基の窒素とその α 炭素との結合は、例えば、ピロリジン(五員)型又はピペリジン(六員)型に属する複素環に導入される。

40

【0063】

これら各種実施形態においては、 n は0又は1であってもよい。 $n = 1$ の場合、 R_1 はメチル、イソプロピル、イソブチル又はベンジル基であるのが好ましい。

【0064】

下記スキーム4に、 $n = 0$ の場合の2つの蛍光発生基質例(実施例I. 1及びI. 2)と、標的ペプチダーゼによる切断により開始されてから上記基質が断片化される一連の反応を示す。

【0065】

スキーム4

50

ロイシンアミノペプチダーゼ



【化 1 0】

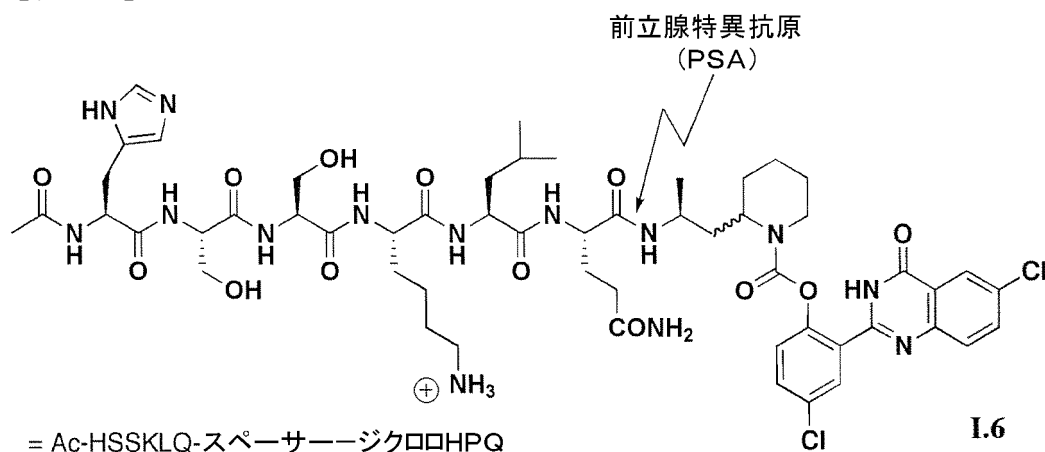


50

であってもよい。下記基質 I. 6 は、 $n=1$ のスペーサー基が、切断しやすいペプチド結合 (Schechter 及び Berger の変換における「P1」位 (Schechter and Berger (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27 (2): 157-162)) の C 末端のそばの第一アミノ酸残基の側部を模倣したものとなっている本発明における一例である。 $n=1$ の本発明に係るスペーサーを用いて実施する利点は、標的ペプチダーゼの好ましいペプチド配列の第一の「後切断しやすい」側部 (アラニンではメチル) も有するプローブのエンドプロテアーゼ (PSA 等) による分子認識が向上することであり (Coombs et al. Chem. Biol. 1998, 5, 475)、これにより、変換率が高まり、さらにはある種のエンドプロテアーゼでは何らかの変形が観察される。この部分が存在するとスペーサーの犠牲反応速度に有利であり、それにより、五員 ($n=0$) スペーサーから六員スペーサー ($n=1$) になることによる速度の損失を少なくとも部分的に補える場合があることが強調されよう。さらに、基質 I. 6 は、生理的媒体中でその沈殿物が有利な粒度を有しているために Invitrogen-Molecular Probes 社によって ELF97 技術において使用されている HPQ のジクロロ誘導体を構成する。

【0070】

【化11】



【0071】

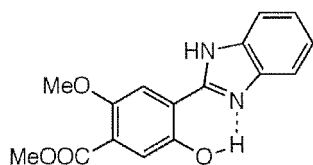
実施例 I. 1 及び I. 2 は、通常の ESIPT フルオロフォアヒドロキシフェニルーキナゾリノン (「HPQ」) (米国特許第 3169129 号明細書) を構成し、実施例 I. 3、I. 5 及び I. 6 は、置換様式に応じて最大発光波長が 500~550 nm となるジクロロ-HPQ を構成する。しかしながら、本発明は、実施例 I. 4 の場合のように ESIPT 現象を生じさせることができる全てのフェノールに適用可能である。これは、ESIPT 蛍光を消す化学作用が同一であり且つ単純であるからである。すなわち、カルバメート基にフェノール性ヒドロキシルを組み込むことによって内部水素結合の形成が妨げられるからである。本発明では、 $Ra=Rb=H$ の最も単純なフルオロフォア (A) も使用できる。各種置換を施したより複雑なフルオロフォアを使用することもできる。それらの調製については、例えば欧州特許出願公開第 0641351 号明細書や国際公開第 2004/058787 号を参照できる。

【0072】

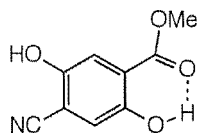
以下に、文献に記載されているもので、本発明の範囲内で使用できる ESIPT フェノール系フルオロフォアの幾つかの例、それらの励起及び発光の最大値、並びに、それらの量子収率 (「QY」) を列挙する。

【0073】

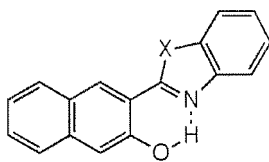
【化 1 2】



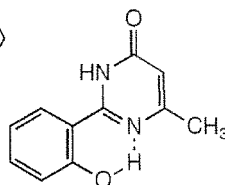
1
蛍光 (MeCN)
370 (Exc) / 570 (Em)
QY : 0,20



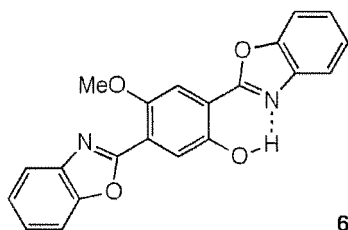
2
明るい青色蛍光
(H₂O)
360 (Exc) / 516 (Em)
QY : 0,60



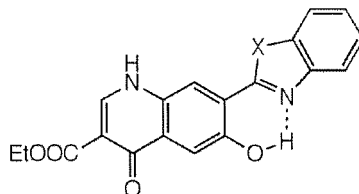
3a X = O, 明るさなし、
文献記載のQYなし
Exc : 360; Em(max) : 670
nm
3b X = NH, 300 / 600



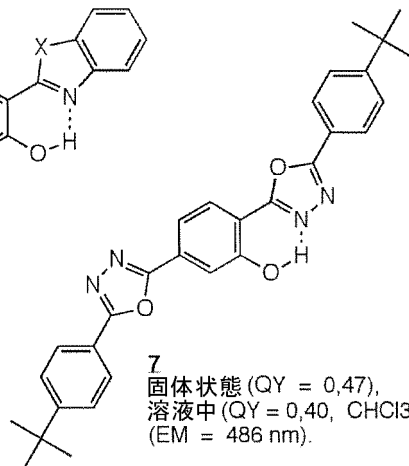
4
強い緑色蛍光



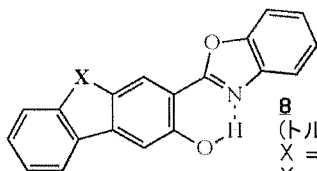
5
3-メチル-ペンタン中 :
Exc(max) : 385 nm
Em(max) : 550 nm
QY = 0,50



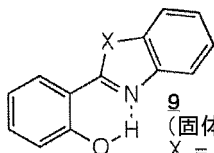
6
X = O
Ex/Em 429 / 596 nm
QY : 0,15
X = S
Ex/Em 442 / 636 nm
QY : 0,25



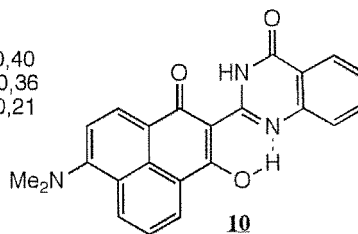
7
固体状態 (QY = 0,47),
溶液中 (QY = 0,40, CHCl₃),
(EM = 486 nm).



8
(トルエン中で300nmで励起)
X = O Em(max) : 545 nm QY 0,40
X = S Em(max) : 565 nm QY 0,36
X = NEt Em(max) : 600 nm QY 0,21



9
(固体状態で300nmで励起)
X = S 517 nm (Em) QY 0,30
X = O 506 nm (Em) QY 0,42
X = NH 462 nm (Em) QY 0,035



10

【0074】

- 1 : Stefani, V. , et al. Dyes and Pigments (1999) 20, 97-107
- 2 : Yamada, S. , et al. Chemistry Letters (1999), 197-198
- 3a : Nagaoka, S. , et al. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry (1999) 122, 151-159
- 3b : Douhal, A. , et al. Chemical Physics Letters (1994) 217, 619-625
- 4 : Kemp, D. S. , et al. , Journal of Organic Chemistry (1981) 46, 1804-1807
- 5 : Mordzinski, A. , et al. Journal of Physical Chemistry (1986) 90, 1455-1458
- 6 : Lins, g. O. W. , et al. Dyes and Pigments (2010) 84, 114-120
- 7 : Seo, J. , et al. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry (2007) 191, 51-58

10

20

30

40

50

8: Kaufman, J. M., et al. Journal of Heterocyclic Chemistry (1995) 32, 1541-1555

9: Heller, A., et al. J. Phys. Chem. (1970) 74, 4473-4480

10: 特開2004-142131号公報

【0075】

従って、R₅基は、上記ペプチダーゼ基質が、標的ペプチダーゼにより切断された後、ESIPTフェノール系フルオロフォア1、2、3a、3b、4、5、6、7、8、9及び10から選択されるフルオロフォアPh-OHを放出するように選択できる。

【0076】

式(I)、(IA)又は(IA')の化合物中のR₀では、ペプチダーゼの基質を構成するありとあらゆるペプチジル又はアミノ酸基を使用できる。アミノ酸は、特にR₀のN末端において官能化されていてもいなくてもよい。本発明の一実施形態によれば、ペプチジル残基は、同一又は異なってもよいアミノ酸を10以下有する。特定の実施形態によれば、基質のコストの観点から、ペプチジル残基は、同一の又は異なるアミノ酸を6以下有する。ペプチジル残基のアミノ酸は、天然アミノ酸から選択されるのが好ましい。しかしながら、アミノ酸又はペプチジル基のN末端は、アシル基-COR''(R''は(C₁-C₆)アルキル基又はO-(C₁-C₆)アルキル基)で官能化されていてもよい。アシル基(R''CO-)による所定プローブのN末端の官能化が考慮されるのは、ある種のエンドプロテアーゼが末端に遊離アミノ酸を有する基質と相互作用しないことによる。また、このN末端官能化はR₀がペプチジル基の場合に好ましく、R₀がアミノ酸の場合にはそのN末端官能基は遊離しているか、又は、好ましくはアンモニウム形態で塩化されている。カルバメートの保護基(本明細書では「アシル」基も構成する)を用いたペプチドの固相合成(SPPS)によって、多くの場合、上記N末端にカルバメートを有するプローブの合成がより簡単になる。アミノペプチダーゼの場合には、アミノ酸であるR₀基を使用することが好ましく、エンドペプチダーゼの場合には、ペプチジル基であるR₀基を使用することが好ましい。n=1であり、R₁がアミノ酸の側鎖(メチル、イソプロピル、イソブチル又はベンジル基等)を表す実施形態は、R₀がペプチジル基であり、単一のアミノ酸ではない場合に特に有利である。

【0077】

例として、以下のペプチジル基が挙げられる。Leu(ロイシンアミノペプチダーゼの場合)、Ser-Gln-Asn-Tyr(HIV-1のペプチダーゼの好ましい切断配列のN末端部分)、Asp-Glu-Val-Asp-(カスパーゼ3の場合)、His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln(前立腺「PSA」特異抗原の場合)。あるいは、N末端は遊離していても、アシル基「-COR''」(R''は(C₁-C₆)アルキル基又はO-(C₁-C₆)アルキル基)(-COMe基等)で置換されていてもよい。

【0078】

ペプチジル又はアミノ酸基は、その適合性に加えて、それを認識する標的ペプチダーゼの公知の配列選択性に基づいて選択される。ペプチジル又はアミノ酸基は、特に表1に示されるように、特定の疾患に関与するペプチダーゼがその疾患に対して示す好ましい作用に基づいて選択されてもよい。

【0079】

【表 1】

イメージングの際、生物学的現象又は疾患のバイオマーカーとして使用できるペプチダーゼの例

ペプチダーゼ	型	機能	疾患
ロイシニアミノペプチダーゼ	Zinc	I 型として示されたペプチドのプロテアソーム後の成熟	-
カスパーゼ-3	Cys	アポトーシス	ガン
HIV-1 ペプチダーゼ	Asp	HIV 複製	AIDS
レニン	Asp	アンジオテンシンIの産生	高血圧
トロンビン	Ser	血液凝固	心筋梗塞
トリプターゼ	Ser	食作用	喘息
カテプシンK	Cys	骨吸収	骨粗鬆症
ACE	Zinc	アンジオテンシンIIの産生	高血圧
プラスメプシンI及びII	Asp	ヘモグロビンの分解	マラリア
β -セクレターゼ	Asp	β アミロイドの合成	アルツハイマー病
PSA (カリクレインIII)	Ser	精液射精物の液化	前立腺ガン

【0080】

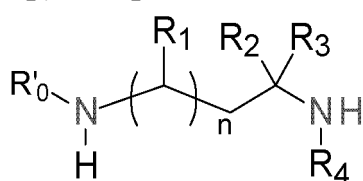
実施例 I. 1～I. 6 は、2つの異なる種類に属する各ペプチダーゼ：エキソペプチダーゼ、具体的にはアミノペプチダーゼ（I. 1～I. 4ではロイシニアミノペプチダーゼ EC 3. 4. 11. 1）、及び、2種のエンドペプチダーゼ（a）カスパーゼ-3（I. 5では EC 3. 4. 22. 56）；（b）PSA＝《カリクレインIII》（I. 6では EC 3. 4. 21. 35）を標的とする。エキソペプチダーゼがペプチド鎖の末端からアミノ酸残基を1つしか切断できないのに対し、大部分のエンドペプチダーゼはペプチド主鎖内のペプチド結合を切断する真性プロテアーゼであるため、配列の特異性がより大きい又は小さい。カスパーゼ-3の好ましい切断配列は、Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Aspである。蛍光発生プローブを形成するには、好ましい配列のN末端部分（切断しやすいペプチド結合の左側）、すなわち、Asp-Glu-Val-Asp（又は、1語コードではDEV D）のみペプチダーゼに供すれば充分であるが、この場合、触媒的変換率が徐々に損なわれることになる。しかしながら、カスパーゼによりDEV Dを認識させるには、N末端はアセチル化するのが望ましい。遊離アミノ末端は酵素による認識を無効にし得るからである。

【0081】

本発明に係る基質（I）は、下記式（II）のアミン：

【0082】

【化13】



(II)

10

20

30

40

50

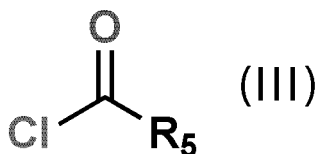
【0083】

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 は、式 (I) の基質の記載と同義であり、 R'_0 は、式 (I) の基質の記載と同義の R_0 基、又は、最も多くの場合、含まれるアミン又は酸官能基が保護されている上記 R_0 基を表す。)

を下記式 (III) の塩素化誘導体：

【0084】

【化14】



10

【0085】

(式中、 R_5 は、式 (I) の基質の記載と同義。)
でカップリングし、場合によってはその後、置換基 R'_0 のアミン又は酸官能基を脱保護して R_0 とすることによって得ることができる。

【0086】

このようなカップリングは特にトリエチルアミン等の塩基の存在下で行ってもよい。

【0087】

保護反応及び脱保護反応は当業者に周知の方法に従って行う。アミン及び酸官能基の保護は、Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T. W. and Wuts P. G. M., ed. John Wiley & Sons, 2006、及び、Protecting groups, Kocienski P. J., 1994, Georg Thieme Verlagに記載のもの等、当業者に周知の、アミン又はカルボン酸を一時的に保護する基によって実施されることとなる。

20

【0088】

アミン、特にアミノ酸鎖又はペプチジル残基の末端に位置するアミンを保護する基の例としてはtert-ブトキシカルボニル (Boc) 基が挙げられ、酸官能基を保護する基の例としては、中間体としてエステルを形成するtert-ブチル基が挙げられる。

30

【0089】

後述の実施例において化合物 (II) の合成例を幾つか詳細に説明するが、この実施例によって当業者は類推して実施することができよう。化合物 (III) の調製においては、文献に既に記載された対応のフェノール、さらには市販のフェノールから例えばトリホスゲンの作用などによって上記化合物を得ることもできる。

【0090】

本発明に係る各種化合物は、特に明記しない限り、考えられるあらゆる光学異性体又はジアステレオ異性体の形態であってもよく、場合によっては任意の割合の混合物であってもよい。特定の実施形態においては、不斉炭素を含む本発明に係る化合物はラセミ体であり、R体及びS体はほぼ等しい比率である。別の実施形態によれば、本発明の式 (I) の化合物は、ジアステレオ異性体過剰率又は鏡像体過剰率が80%超、さらには95%超、さらには純粋な異性体の形態、すなわちジアステレオ異性体又は鏡像体過剰率が99%超である、ジアステレオ異性体又は鏡像体が濃縮された形態であってもよい。

40

【0091】

化合物 (I) は、従来の分離法によって、ジアステレオ異性体又は鏡像体が濃縮された形態で単離される。例えば、光学活性な酸又は塩基を使用してラセミ塩の分別再結晶化を行ってもよく、この原理は周知である。あるいは、最も多くの場合、キラル相又は非キラル相での従来のクロマトグラフ法を行ってもよい。

【0092】

本発明によれば、例えばHPQ型 (又はHPQ類似体) 等のESIPTフルオロフォアを

50

使用して蛍光イメージングによってペプチダーゼ活性を知ることができる。自然分解（すなわち、生理的媒体中、標的ペプチダーゼの非存在下）による偽陽性シグナルは観察されない。プローブ自体は、特に、検出／イメージング機器が調整される遊離 E S I P T フルオロフォアの発光波長において蛍光性があまり高くないか、又は、全く蛍光性がない（本質的に蛍光性がない）。従って、プローブはオフ／オンモードで作動するため、このプローブを使用して最大感度の分析法を開発することができる。本発明では、エキソ（アミノ）ペプチダーゼだけでなく、特定のアミノ酸配列に対して高い選択性を有するエンドペプチダーゼも標的とすることができる。これは、スマートスペーサーの末端に特定のエンドプロテアーゼの特異的ペプチド配列をカップリングすることにより可能である。

【0093】

さらに、本発明は、本発明のプローブは生理的条件下で自然分解が全く見られないため、偽陽性蛍光シグナルをほとんど全く生成しないという特徴を有する点で、Zhang, X. -B., Waibel, M., and Hasseroth, Chem. Eur. J. (2010), 16, 792-795 と比べて改善されている。R₀ を担持する窒素原子が、アルキル基ではなく水素を担持する場合（ほとんど例外（プロリダーゼ）なく 2 級ペプチド結合のみを切断し、3 級ペプチド結合は切断しないペプチダーゼを標的とするのに必要である）、ジアミンスペーサーの遅い犠牲反応という技術的障害を克服できる。結果として生じる環化速度の損失（Saari, W. S., et al. (上記参照) によれば、10 倍）は、環状尿素を形成するようジアミンスペーサーを事前組織化すること（E S I P T フルオロフォアの放出をもたらすプロセス）によって相殺される。スペーサーの事前組織化による環化速度の大きな増加は、2 つの独立した分子系において本出願人によって既に確認されている（Waibel, M., Zhang, X. -B., and Hasseroth, J. Synthesis (2008) 318-324、及び、Zhang, X. B., Waibel M., and Hasseroth, J. Chemistry-a European Journal (2010) 16, 792-795）。最初の文献では、生理的条件下の断片化は瞬間的であり、次の文献では非常に早かった。しかしながら、2 つの系とも、フェノールに第 3 級カルバメートが結合していることによる恩恵を受けておらず、依然として生理的条件下で分解する。

【0094】

本発明の基質は、他の公知の蛍光発生酵素基質と比べて細胞膜への浸透性が良好であることによる恩恵を受けており、容易に細胞内に進入することができ（Duhamel, S. et al. Journal of Microbiological Methods 75 (2008) 269-278 と比較）、その結果、本基質は非常に様々な細胞において各種用途に使用することができる。さらには、本発明に係る基質は、通常可溶性であるが、水に溶解した状態では蛍光性があまり高くないものの（本質的に蛍光性）、上記基質と対応のペプチダーゼとを含む水溶液中では蛍光性の高いシグナルを発する。HPQ の場合、HPQ はほとんどの溶媒、特に水性媒体に高度に難溶性であるため、この蛍光シグナルは、ペプチダーゼの作用により形成される沈殿物から固体状態で発せられる。他の E S I P T フルオロフォアも水性媒体中の溶解性はあまり高くないが、そのほとんどは沈殿したとしても蛍光発光能を保持している。ペプチダーゼによる加水分解時に蛍光沈殿物を形成するのに適した条件は、緩衝媒体や生理的媒体等の純粋な水性媒体である。重要な点は、ペプチダーゼによる加水分解時に、ペプチダーゼ活性を損なうことなく沈殿物が形成されることである。そうすれば、生物学的サンプルでの局在研究や、非変性 PAGE 法及びウエスタンブロットトランスファー法での分離バンドの検出において使用できる。使用できる検出条件及び検出方法に関する詳細は、国際公開第 2004/058787 号及び欧州特許出願公開第 0641351 号明細書に記載されており、そのまま本発明に適用することができる。

【0095】

本発明に係るプローブは、生命科学分野の高感度を要する多くの用途、特に以下の用途にとって魅力的である。（1）ゲロスプレートの細菌コロニーにより発現されるペプチダ

10

20

30

40

50

ーゼ活性の高収率スクリーニング（コロニーの分析）；（２）生体液中のペプチダーゼのインビトロ検出（血液学的検出等）；（３）フローサイトメトリーにおける単一細胞としてのペプチダーゼ活性の観察；（４）培養細胞中の細胞内ペプチダーゼの検出（共焦点蛍光顕微鏡観察）；（５）（組織レベルでの）ペプチダーゼの組織化学的検出；最後に、（６）動物の全身のインビボイメージング。本発明に係るプローブは、既存のものよりロバスト性の高いプローブを作製する分野の当業者が求める要件を満たすものである（National Research Council of the U. S. A. (2006) Visualizing Chemistry: The Progress and Promise of Advanced Chemical Imaging, The National Academies Press）。特に、急成長するインビボ分子イメージング分野では、十分なロバスト性を有するとともに、分子的複雑性が抑えられているためコストを抑えて製造できるスマートなステルスプローブが乏しい（Baker, M. (2010). Whole-animal imaging: The whole picture. Nature 463, 977-980）。

【0096】

従って、本発明に係るペプチダーゼ基質には多くの用途が考えられる。そのような用途の例として以下のものが挙げられる。

【0097】

（a）細菌コロニーの分析設計。ここでは、マルチウエルプレートのウェル等の分離された区画中に積極的に分離することなく最大3000コロニーを識別できるゲロスプレート（ペトリ皿）で行う。従って、（１）一連の細菌細胞株から所望の病原性細胞株を同定可能な臨床サンプルの試験を設計すること、（２）通常の細菌宿主（多くの場合、市販の宿主）により発現される固有の一連のタンパク質の大量の平行試験を行うことが可能である。このタンパク質群には、言うまでもなく、所望の特定のタンパク質、例えば特定のアミノ酸配列に対して選択性を有するプロテアーゼ、又は、非天然カルボキサミド結合を加水分解するプロテアーゼ等が含まれてもよい。一般的にはタンパク質、特に酵素を指示通り開発する分野では、 10^6 を超えがちな非常に多くのタンパク質変異体をスクリーニングするために効率的で感度の高い分析を行うことが強く望まれている。本発明に係るプローブは、ゲロス溶液に溶解してから、ゲル化させるプレートに注ぐことによってより簡単に適用することができる。別の方法としては、フィルターを浸漬してからコロニーに押し付けることによって、基質をコロニーとともにインキュベーションする。そのようなコロニーの分析に対して本発明に係るプローブが貢献する主な利点は、フルオロフォアのその場合沈殿であり、従って、拡散による蛍光シグナルの希釈が大いに減少するため、より長い間インキュベーションすることができ、その結果、分析の感度が高くなる。HPQ（約140nm）又はHPQ類似体の非常に大きいストークス変位を十分に評価しないままにすべきではない。このストークス変位もまた優れた感度に貢献し、生物学的サンプルに由来する天然の蛍光と区別しやすくするからである。

【0098】

（b）インビトロ（組織学）及びインビボイメージング。遊離HPQ及びHPQ類似体の非常に低い溶解性を考慮すれば、複雑な生物学的環境でこれらが放出された場合、いかなる場合でも、高度に空間的に制御しつつ蛍光イメージングを行うことができる。蛍光イメージングは、細胞内構造を識別するために広く用いられている技術である。本発明に係るプローブを使用して特異的ペプチダーゼ活性を高分解能で探知（位置決定）することが可能である。

【0099】

一方、受動的蛍光プローブ（酵素により変換されないもの）は、細胞受容体の特異的リガンドに取り付けられて、非共有相互作用によって上記受容体に結合する。その結果、シグナルに希釈の影響が全く及ぼされることがないということはない。とりわけ、最良の受容体は蛍光マーカーに等しい。このようなプローブを用いた分析の感度は、シグナルの触媒的増幅の恩恵を受ける活性プローブよりも必然的にはるかに低い。

【0100】

また、本発明に係るプローブは、巨視的な蛍光イメージング、すなわち生物体全体の蛍光イメージングに使用することもできる。プローブが細胞壁を貫通して所望のペプチダーゼ活性が得られれば、遊離フルオロフォアの放出において、細胞外空間に存在することでシグナルが急速に希釈されるといったことがなくなる。これにより、通常は、イメージング前により長くインキュベーションすることができるため、発現される触媒活性が弱い場合には特に有用である。

【0101】

本発明に係るペプチダーゼ基質は、以下の実施例に詳述する公知の方法で調製することができる。例えば、保護されていてもよいペプチジル又はアミノ酸基をスペーサー基にグラフト化してもよい。フルオロフォアをそのフェノール性ヒドロキシルを介して導入するカップリング工程後、ペプチジル又はアミノ酸基を脱保護してもよい。その結果得られる完全なプローブを従来の方法で精製してから使用してもよい。

【実施例】

【0102】

以下の実施例によって本発明を説明するが、それらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0103】

基本

60メッシュシリカゲル(40~63 μm)を使用してカラムでのクロマトグラフィーを行った。¹H及び¹³C NMRスペクトルは、特に明記しない限り、重水素化クロロホルム中、それぞれ200.13 MHz及び50.13 MHzで記録した。化学シフト(δ)は、ppmで表し、テトラメチルシランを参照物質として又は溶媒の残留シグナルに従って記載した。以下の略号を使用した。s=一重線、d=二重線、t=三重線、m=多重線、br=ブロード。NMR結合定数(J)はヘルツで表した。蛍光分析は、黒色ポリプロピレン製96ウェル(Corning、Corning Inc.)又は384ウェル(NUNC LONE、Nunc Inc.)プレート中で行い、マイクロプレートを備えた蛍光光度計(Mithras LB940、Berthold Technologies製)で記録した。明記しない限り、薬品は分析試薬品質のものを購入し、さらに特に精製することなく使用した。

【0104】

市販の無水THF及びDCMを、アルゴン下、活性アルミナのカラム(GT S100 Solvant Station System)に通液して脱水及び精製した。水素化カルシウムを使用してトリエチルアミンを蒸留し、KOHタブレット上に保持した。無水試薬と記載した他の試薬は分子篩によって脱水した。特に明記しない限り、全ての反応は、市販の溶媒及び試薬をさらに特に脱水又は精製することなく使用して空気雰囲気中で行った。精製装置Elga Purelabから得たMillipore水を全ての実験で使用した。

【0105】

以下の略号を使用する。

Me=メチル

Et=エチル

cbz=カルボベンゾキシ

tBu=tert-ブチル

Boc=tert-ブトキシカルボニル

DCC=ジサイクロヘキシルカルボジイミド

TEA=トリエチルアミン

pTsOH=パラトルエンスルホン酸

EA=酢酸エチル

Cy=シクロヘキサン

H O B t = N-ヘドロキシベンゾトリアゾール

T F A = トリフルオロ酢酸

T H F = テトラヒドロフラン

L e u = L-ロイシル

B o c L e u = N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ロイシル

E D C = 1-エチル-3-(3,5-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩

T L C = 薄層クロマトグラフィー

D M F = ジメチルホルムアミド

D C M = ジクロロメタン

D D Q = 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノ

D C U = ジーサイクロヘキシル尿素

P L A = ミクロソームロイシンアミノペプチダーゼ

【0106】

実施例 I. 1

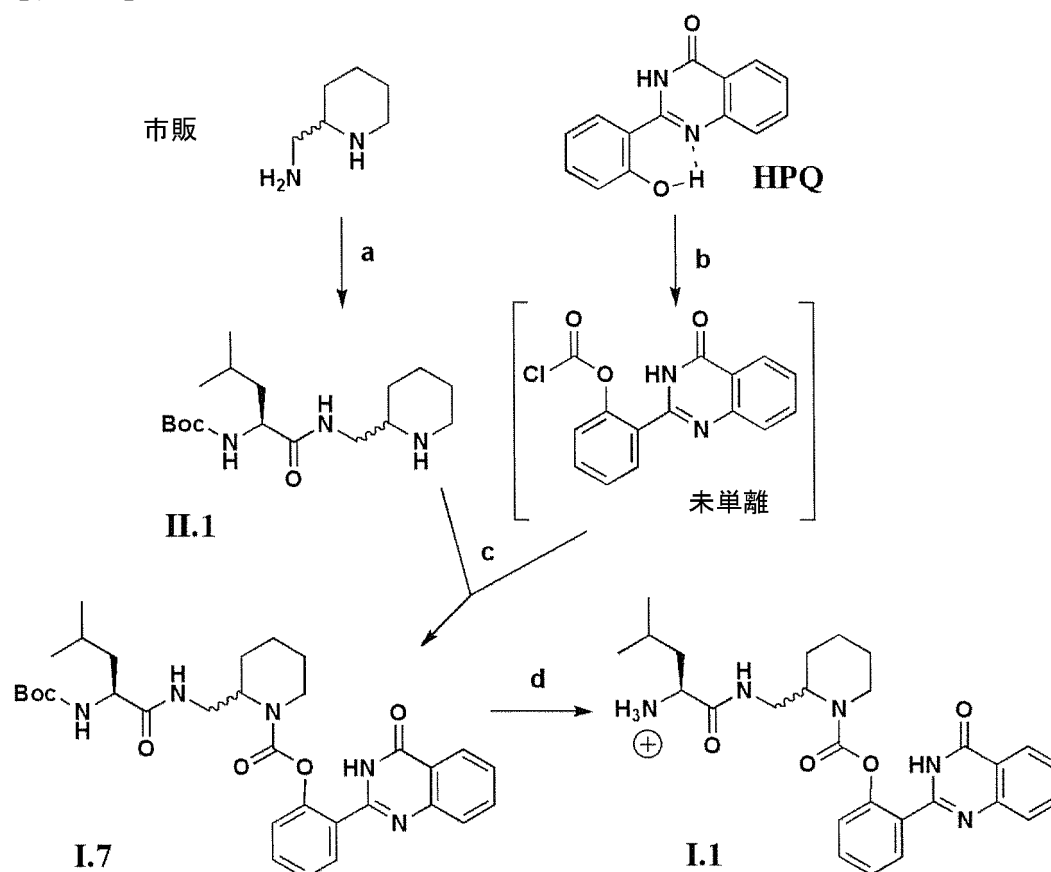
以下のスキーム 5 に記載されるように基質 I. 1 を調製する。

【0107】

スキーム 5：実施例 I. 1 の化学合成

【0108】

【化15】



a) B o c L e u O H, D C C ; b) トリホスゲン ; c) トリエチルアミン ; d) p T s O H

【0109】

化合物 I I. 1 の調製：

B o c L e u O H (4 . 3 8 5 g , 1 9 . 0 m m o l ; 市販 ; F l u k a , 1 5 4 5 0 , $\geq 99.0\%$) を無水雰囲気下、無水 D C M (5 0 m L) 中に完全に溶解した後、氷浴により混合液の温度を 0°C まで下げる。幾らか D C C (3 . 9 5 g , 1 9 . 1 m m o l) を添加し、混合液を 5 分間攪拌した後、アミノメチルピペリジン (2 . 1 1 g , 1 8 . 5 m

10

20

30

40

50

mol;市販;Aldrich 656518, 97%)を添加する。混合液を氷浴から外して室温に戻す。24時間攪拌した後、白色固体として沈殿したDCUを多孔度3のフリットで濾別し、固体をDCMでゆすぐ。得られた黄色溶液を飽和 Na_2CO_3 で洗浄してから、0.5Mリン酸バッファ(pH>10)で洗浄し、その後、塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、 Na_2SO_4 を濾別し、蒸発させて、黄色油状物(6.6g)を得る。この油状物を一晚4℃に保持すると、DCUが沈殿し、これを上記と同様にして分離する。未精製物のNMRスペクトルから、DCCカップリングの通常の寄生物質、すなわちアミノ酸でアシル化されたDCUによってほんの少しだけ汚染されているものの、ほとんど純粋な所望の生成物の存在が示される。EA:Cy:MeOH勾配(1:1:0→1:1:1(v:v:v))でシリカカラムにより精製すると、無色固体として純粋な生成物II.1(2.703g;42%)が得られる。NMRスペクトルから、(a)ピペリジン環に不斉中心があるためにモル比1:1で2つのジアステレオ異性体の存在が示され、(b)上記スペクトルは、環の各種構造異性体が存在するため複雑化しているように思われる。

10

【0110】

^1H NMR(200MHz, CDCl_3): 7.09–6.81((s, br+s, br), 1H), 5.70–5.34((s, br+d, br, 7.6Hz), 1H), 4.08–3.98(m, 1H), 3.31–3.15(m, 1H), 3.11–2.90(m, 2H), 2.70–2.44(m, 2H), 2.14(s, br, 1H, 溶媒及び濃度感受性シフト, NH), 1.76–1.41(m, 6H), 1.33(s, 9H), 1.32–1.00(m, 3H), 0.88(d, 2.1Hz, 3H), 0.87(d, 2.4Hz, 3H) ppm.

20

【0111】

^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3): ジアステレオ異性体1:173.0;155.7;79.6;55.8;53.2;46.5;45.0;41.3;30.1;28.3(×3);26.3;24.7;24.2;22.9;22.0;ジアステレオ異性体2:173.1;155.8;79.7;55.5;53.2;46.5;45.1;41.2;30.2;28.3(×3);26.2;24.7;24.2;22.9;22.0 ppm. HSQC, COSY及びjmodスペクトルによりシグナルの帰属が完成する。

30

HRMS(TOF MS ESI+)[$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3$] $^+ = [\text{MH}]^+$ からの計算値:m/z=328.2595, 実測値328.2589.

【0112】

化合物I.7の調製:

無水アルゴン雰囲気下、HPQ(76mg;0.32mmol)を入れた二口フラスコ中に、無水TEA(57mg;0.56mmol;1.8当量)及び無水DCM(1.2mL)を投入し、混合液を0℃に冷却する。攪拌下、トリホスゲン(124mg;0.42mmol)の無水DCM(1.2mL)溶液を迅速に注入する。混合液を0℃で40分間攪拌してから25℃で20分間攪拌した後、2つの液体窒素トラップで保護したベーンポンプによって蒸発乾固する。得られたベージュ色固体を、化合物II.1(19mg;0.058mmol;0.2当量)を無水TEA(101mg;1mmol;3当量)及び無水DCM(1.2mL)に溶かして得た溶液で室温下、処理する。オリーブ様緑色の溶液を2時間攪拌した後、飽和 NaHCO_3 に注ぐ。水相を CHCl_3 で抽出し、有機相を回収し、飽和 NaHCO_3 と塩水とで洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥させ、 Na_2SO_4 を濾別し、蒸発乾固する。残渣を CHCl_3 に溶かし、Celiteで2回濾過して、HPQの残部を除去し、濾液を蒸発させて、緑色をおびたペースト状固体(70mg)を得る。シリカカラムにより精製(EA:Cy:MeOH勾配、2:2:0→2:2:1(v:v:v))すると、純粋な化合物I.7(15mg;0.025mmol;44%)が得られる。NMRスペクトルから、(a)ピペリジン環に不斉中心があるためにモル比1:1で2つのジアステレオ異性体の存在が示され、(b)上記スペクトルは、環の各

40

50

種構造異性体（1核当たり最大4つの共鳴が生じる）が存在するため複雑化しているように思われる。

【0113】

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 8.60 (s, br; 0.5H) ; 8.36–7.92 (m, 2H) ; 7.89–7.78 (m; 2.5H) ; 7.58–7.47 (m; 2H) ; 7.39–7.35 (m; 1H) ; 7.31–7.15 (m; 1H) ; 6.86–6.81 (m; 0.1H) ; 5.66–5.60 (m; 0.1H) ; 5.05–4.88 (d, br+d, br; 8.5 & 6.5 Hz; 1H; $\text{NH}_{\text{カルバメート}}$) ; 4.71–4.66 (m; 0.8H) ; 4.46–4.34 (m; 1H) ; 4.20–3.94 (m; 1H) ; 3.87–3.51 (m; 1H) ; 3.43–2.89 (m; 2H) ; 1.77–1.43 (m; 9H) ; 1.09–0.84 (m, 15H) ppm.

10

【0114】

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ = 174.6 ; 174.0 ; 171.3 ; 163.4 ; 162.9 ; 156.1 ; 155.7 ; 153.5 ; 152.8 ; 151.5 ; 151.2 ; 149.9 ; 149.7 ; 149.6 ; 149.4 ; 134.9 ; 134.9 ; 134.8 ; 132.1 ; 131.9 ; 130.7 ; 129.8 ; 128.3 ; 128.0 ; 127.1 ; 126.8 ; 126.6 ; 126.3 ; 126.1 ; 124.6 ; 123.1 ; 121.1 ; 120.9 ; 79.8 ; 54.4 ; 53.1 ; 52.6 ; 50.8 ; 43.6 ; 41.6 ; 41.3 ; 41.2 ; 39.9 ; 39.8 ; 39.7 ; 38.8 ; 29.4 ; 28.3 ; 28.2 ; 28.0 ; 27.1 ; 26.9 ; 25.6 ; 25.3 ; 24.9 ; 23.0 ; 22.3 ; 19.6 ; 19.3 ppm.

20

【0115】

HRMS (TOF MS ESI⁺) [$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6$]⁺ = [MH^+] からの計算値: m/z 592.3130 ; 実測値 592.3123.

【0116】

化合物 I. 1 の調製:

pTsOH · H₂O (61 mg, 0.32 mmol) を添加した無水エタノール (10 mL) に化合物 I. 7 (174 mg; 0.294 mmol) を溶解し、アルゴン雰囲気下に置き、8時間80℃に加熱する。反応後に TLC (EA: Cy: MeOH = 1:1:1 (v: v: v)) ; UV 及び ニンヒドリン) を行う。微量の HPQ スポット が 現れる 場合 も ある。未精製溶液をシリカカラムで精製し、微量の HPQ (EA: Cy: MeOH = 1:1:0 (v: v: v))、残留した微量の I. 7 (EA: Cy: MeOH = 1:1:0.15 (v: v: v)) 及び 固体 (149 mg) 状の未精製生成物 I. 1 (EA: Cy: MeOH = 1:1:0.3 (v: v: v)) を連続して得る。この生成物は UV ランプ 下 で わずかに青色の蛍光を発する。水を用いて摩砕して過剰量の TsOH をできる限り除去し、固体残差 (107 mg) から得た ^1H NMR スペクトルから、I. 1: トシレートがモル比 1:1 で示される。この固体の水溶性はあまり高くないが、MeOH (0.6 mL) に容易に溶解させた後、沈殿の恐れなく水で希釈することができる。NMR スペクトルから、(a) ピペリジン環に不斉中心があるためにモル比 1:1 で2つのジアステレオ異性体の存在が示され、(b) 上記スペクトルは、上記環の各種構造異性体 (1核当たり最大4つの共鳴が生じる) が存在するため複雑化しているように思われる。

30

40

【0117】

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) : δ = 8.20 (d; 8.1 Hz; 1H) ; 7.94 (明白な t; 7.9 Hz; 1H) ; 7.77–7.70 (m; 3H) ; 7.68–7.65 (m; 1H) ; 7.51–7.47 (m; 1H) ; 7.36–7.32 (m; 1H) ; 4.52–2.77 (m; 6H) ; 1.65–1.22 (m; 9H) ; 0.81–0.70 (m; 6H) ppm.

【0118】

^{13}C -NMR (D_2O , 125 MHz) : δ = 170.5 ; 170.3 ; 162.3 ; 162.2 ; 154.1 ; 153.9 ; 153.8 ; 148.2 ; 148.1 ; 141.

50

7 ; 141. 3 ; 137. 1 ; 137. 1 ; 135. 1 ; 134. 8 ; 130. 2 ; 130. 2 ; 129. 6 ; 127. 0 ; 123. 6 ; 123. 4 ; 123. 3 ; 122. 4 ; 122. 3 ; 122. 1 ; 122. 0 ; 119. 2 ; 52. 0 ; 51. 9 ; 51. 6 ; 51. 4 ; 50. 9 ; 40. 5 ; 40. 0 ; 40. 0 ; 39. 9 ; 38. 2 ; 25. 8 ; 25. 0 ; 25. 0 ; 24. 5 ; 23. 9 ; 23. 9 ; 21. 8 ; 20. 9 ; 20. 8 ; 18. 2 ; 18. 0 ppm.

【0119】

MS (ESI, ポジティブモード) : m/z 492. 3 : $[MH]^+$. MS (ESI, ネガティブモード) : m/z 490. 2 : $[M-H]^-$.

【0120】

NMRスペクトルは同じだが、化合物 I. 2 の調製とほぼ同様にして調製（ここでは、化合物 I. 8 の代わりに化合物 I. 7 を使用）したサンプルに対して、カチオンの HRMS (TOF MS ESI⁺) 分析を行った。この際の $[C_{27}H_{34}N_5O_4]^+ = [MH]^+$ からの計算値 : m/z 492. 2605, 実測値 492. 2592.

【0121】

実施例 I. 2

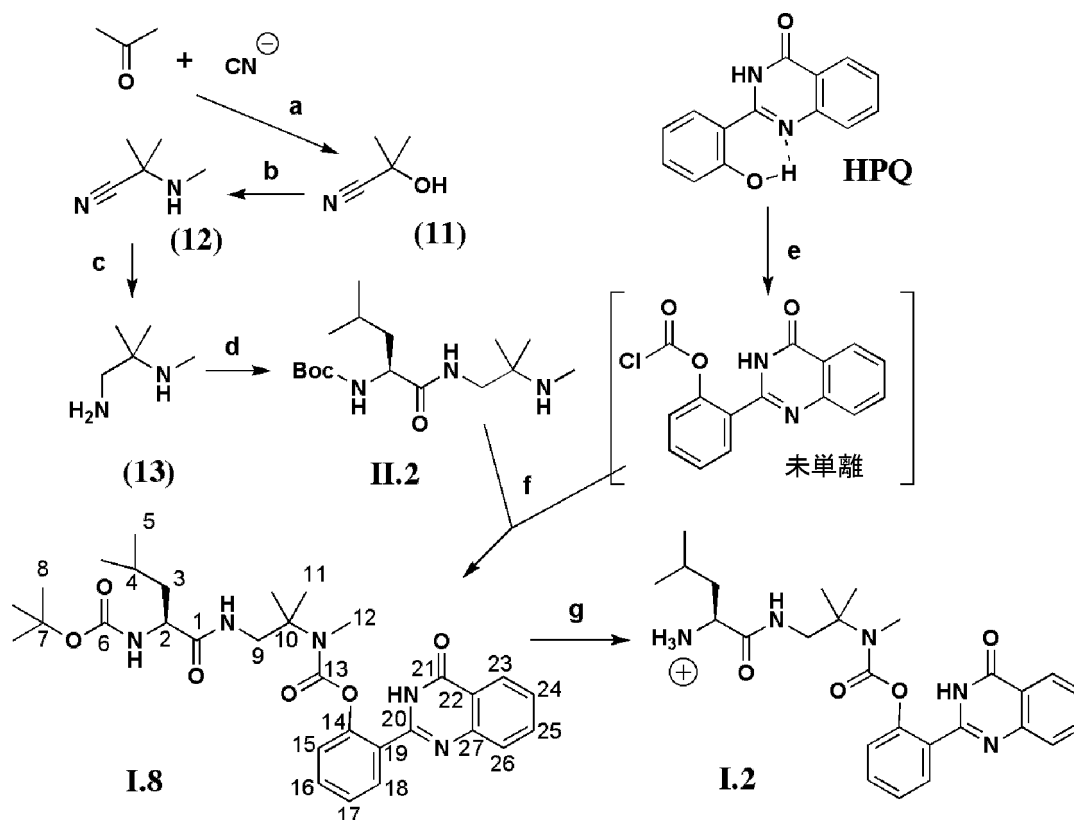
アミノメチルーピペリジン（市販化合物）の代わりに、まず N²-2-ジメチルプロパン-1, 2-ジアミン（13）を文献の好適な方法に従って 3 工程で合成しなければならないことを除き、上記基質 I. 1 と同様にして基質 I. 2 を合成する。

【0122】

スキーム 6 : 実施例 I. 2 の化学合成

【0123】

【化16】



a) $Na_2S_2O_5$, H_2O ; b) CH_3NH_2 ; c) $LiAlH_4$; d) BocLeuOH, DCC; e) トリホスゲン; f) TEA; g) TFA

【0124】

化合物 (11) の調製: (アセトンシアンヒドリン; Faghihi, K.; Zaman i, K.; Mirsamie, A.; RezaSangi, M., Eur. Polym.

10

20

30

40

50

J. 2003, 39 (2), 247-254の応用)

メタ重亜硫酸ナトリウム (11 g, 58 mmol) の水溶液 (20 mL) を穏やかに攪拌しながらアセトン (5.8 g, 100 mmol) で処理する。シアン化カリウム (6 g, 92 mmol) の水溶液 (20 mL) を添加すると、第二相 (上相) に所望のアセトンシアンヒドリンが分離される。この反応が完了したら、両相を分離し、上相を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して純粋なアセトンシアンヒドリン (11) を透明液体 (5.402 g, 69%) として得る。

【0125】

【数1】

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.43 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$) ppm; ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 29.4 ($2 \times \text{CH}_3$), 65.3 ($\underline{\text{C}}$ (Me)₂), 123.0 ($\text{C} \equiv \text{N}$) ppm; MS (ESI, ポジティブモード): m/z 86.1: [MH]⁺.

10

【0126】

化合物 (12) の調製: (2-メチルアミノ-2-メチルプロピオニトリル; Exner, L. J.; Luskin, L. S.; de Benneville, P. L., J. Am. Chem. Soc. 1953, 75 (19), 4841-4842の応用)

氷浴中のフラスコに入れたアセトンシアンヒドリン (11) (1 g, 12 mmol) にメチルアミン (2.8 g, 36 mmol) の水溶液 (40 質量%) をゆっくりと添加する。添加は、混合液の温度が 15°C を超えないようにゆっくりと行う。添加が完了したら、反応混合液を 1 時間半攪拌する。得られた溶液を Et_2O (3 × 10 mL) で抽出する。有機相を合わせて、 Na_2SO_4 で乾燥させた後、 Na_2SO_4 を濾別する。溶媒を減圧下で除去して生成物 (12) を無色液体 (0.700 g, 59%) として得る。

20

【0127】

【数2】

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.21 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.27 (s, 3H, NCH_3) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 27.5 ($2 \times \text{CH}_3$), 31.8 (NCH_3), 52.5 ($\underline{\text{C}}$ (Me)₂), 122.8 ($\text{C} \equiv \text{N}$) ppm; MS (ESI, ポジティブモード): m/z 99.1 [MH]⁺.

30

【0128】

化合物 (13) の調製: (N^2 -2-ジメチルプロパン-1, 2-ジアミン; 米国特許出願公開第 2005/0038078 号明細書の応用)

アルゴン雰囲気下、水素化アルミニウムリチウム (1.520 g, 40 mmol) の Et_2O (2 mL) 懸濁液に 2-メチルアミノ-2-メチルプロピオニトリル (12) (1.960 g, 20 mmol) を滴下する。混合液を室温で 3 時間攪拌した後、 Et_2O (30 mL) で希釈する。氷浴中に置いたら、飽和 K_2CO_3 水溶液を水素の放出がもはや観察されなくなるまで添加する。その後、無水 Na_2SO_4 を反応混合液に添加し、10 分間攪拌する。Celite で濾過して塩を除去した後、大量の Et_2O で洗浄する。その後、得られた濾液を減圧下で濃縮して N^2 -2-ジメチルプロパン-1, 2-ジアミン (13) を透明液体 (2.001 g, 98%) として得る。 ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 2.40 (s, 2H), 2.14 (s, ~3H, NHMe), 1.8 (s, br, 3H, $\text{NH} + \text{NH}_2$), 0.87 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 53.0 (CMe_2), 50.2 (CH_2), 28.3 (NHMe), 23.0 ($2 \times \text{Me}$) ppm; MS (ESI, ポジティブモード): m/z 103.1: [MH]⁺.

40

【0129】

化合物 I I. 2 の調製:

BocLeuOH (1.37 g; 5.92 mmol) の無水 DCM (50 mL) 溶液を—

50

5℃でDCC (1.227 g; 1当量)で処理し、5分間攪拌する。N²-2-ジメチルプロパン-1,2-ジアミン (13) (47質量% Et₂O溶液の1.50 g; >1当量)を添加した後、混合液の温度を室温まで昇温し、混合液を48時間攪拌しながら放置する。沈殿したDCU (無色)を多孔度3のガラスフリットで濾別する。ほとんど無色の濾液を飽和Na₂CO₃で洗浄して、残留したBocLeuOHを除去する。その後、DCM溶液をHCl (2M, 3×30 mL)で洗浄して、アミン成分を全て除去する。そして、得られたDCM溶液には副産物である尿素がアミノ酸でアシル化されたもののみが含まれている。その後、酸水溶液をKOH (5M, 40 mL)で直ちに塩基性化して、pHを>12に調整し、その後、両相が透明になるまでDCM (6×20 mL)で洗浄する。再び合わせた有機相を塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させる。濾過し、蒸発させた後、化合物II.2 (43 mol%, 52 wt%, 280 mg; 0.88 mmol)と、そのBoc基を失った誘導体 (H₂NLeu-NH-CH₂-C(Me)₂-NHMe, MW = 215.3 Da, 57 mol%, 48 wt%, 260 mg, 1.2 mmol)とを含む透明油状物0.54 gを得る。EA: Cy: MeOH勾配 (10:7:0→10:7:3 (v:v:v))を使用してシリカカラムでこの混合液を濾過して、生成物II.2のみを無色油状物として得る。この油状物は時間がたつと固化する (235 mg; 0.74 mmol, 13%)。化合物II.1のNMRスペクトルと違い、化合物II.2では予想通りジアステレオ異性体が存在しないことが確かめられる。NMR共鳴数を表す数字は、合成スキーム6に示された化合物I.8の対応する原子の番号を指す。

10

【0130】

20

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.80 (s, br; 1H; NH_{アミ}); 5.04 (~d, br; 7.7 Hz; 0.8H; NH_{Boc}); 4.12-4.08 (m; 1H; H-2); 3.26 (dd; 14.0 & 5.9 Hz; 1H; H-9); 3.17 (dd; 13.3 & 4.9 Hz; 1H; H-9'); 2.34 (s; 3H; 3×H-12); 2.14 (s, br; 1H; NH_{脂肪族}); 1.72-1.65 (m; 2H; H-4+H-3); 1.54-1.49 (m; 1H; H-3'); 1.46 (s; 9H; 9×H-8); 1.11 (s; 6H; 6×H-11); 0.96 (d; 3.7 Hz; 3H; 3×H-5); 0.95 (d; 3.6 Hz; 3H; 3×H-5') ppm.

【0131】

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 172.9 (C1); 155.8 (C6); 80.0 (C7); 53.7 (C10); 53.5 (C2); 46.6 (C9); 41.4 (C3); 28.4 (3×C8); 28.3 (C12); 24.9 (C4); 24.6 (2×C11); 23.0 (C5); 22.2 (C5') ppm. HSQC、COSY及びjmodスペクトルを測定してシグナルの帰属を確かめた。

30

【0132】

MS (ESI, ポジティブモード): m/z 316.3: [MH]⁺.

【0133】

化合物I.8の調製:

化合物I.7の調製とほぼ同様にして、HPQ (149 mg; 0.628 mmol)及び化合物II.2 (198 mg; 0.627 mmol)を投入して、化合物I.8を調製する。無水ピリジン中のピペラジンで未精製反応生成物を処理して、アミンと反応しなかったクロロギ酸HPQを捕集する。上述した水処理によって未精製の黄色油状物 (299 mg)を得る。この油状物には、化合物I.8と、幾らかのHPQと、微量のピペラジンとの反応生成物とが含まれている。未精製物 (200 mg)の一部を以下のようにして精製する。固体をDCM (2×1 mL)で処理し、溶解分をデカンテーションで分離する。その後、シリカカラムクロマトグラフィー (Cy: EA勾配 3:1→1:1 (v:v))で溶解分を精製して、非常に強い青色蛍光を有する稠密な無色粉体 (134 mg; 0.231 mmol; ここでの全収率は55%)として化合物I.8を得る。

40

【0134】

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.29 (d; 7.8 Hz; 1H; H

50

−2.3) ; 7.91 (d ; 7.3 Hz ; 0.8 H ; H−1.8) ; 7.80−7.78 (m ; 2.2 H ; H−2.5+H−1.6) ; 7.55−7.48 (m ; 2 H ; H−2.4+H−2.6) ; 7.39−7.35 (m ; 1 H ; H−1.7) ; 7.24 (d ; 8.3 Hz ; 1 H ; H−1.5) ; 6.84 (s, br ; 0.8 H ; H_{アミド}) ; 6.18 (s, br ; 0.1 H ; H_{アミド}) ; 5.60 (d ; br ; 6.8 Hz ; 0.7 H ; NH_{カルバマート}) ; 4.23−4.03 (m ; 1 H ; H−2) ; 3.81−3.37 (m ; 2 H ; 2×H−9) ; 3.05 (s ; 3 H ; 3×H−1.2) ; 1.80−1.49 (m ; 3 H ; H−4+2×H−3) ; 1.34 (s ; 6 H ; 6×H−1.1) ; 1.23 (s ; 9 H ; 9×H−8) ; 0.95 (d ; 6.6 Hz ; 3 H ; 3×H−5) ; 0.93 (d ; 6.5 Hz ; 3 H ; 3×H−5') ppm.

10

【0135】

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ = 173.8 (C1) ; 162.5 (C21) ; 155.8 (C6) ; 154.8 (C13) ; 150.7 (C20) ; 149.4 (C27) ; 149.2 (C14) ; 134.9 (C25) ; 132.3 (C16) ; 130.7 (C18) ; 127.9 (C24) ; 127.6 (C23) ; 127.2 (C26) ; 126.6 (C22) ; 126.4 (C17) ; 123.8 (C15) ; 121.1 (C19) ; 79.5 (C7) ; 60.9 (C10) ; 53.6 (C2) ; 46.5 (C9) ; 41.2 (C3) ; 32.7 (C12) ; 28.3 (3×C8) ; 25.3 (C4) ; 25.0 (C11) ; 24.9 (C11') ; 23.2 (C5) ; 22.0 (C5') ppm.

20

【0136】

HSOQC及びCOSYスペクトルを測定してシグナルの帰属を確かめた。NMR共鳴数を表す数字は、合成スキーム6に示された番号を指す。

【0137】

MS (ESI, ポジティブモード) : m/z 580.3 : [MH]⁺. MS (ESI, ネガティブモード) : m/z 578.3 : [M−H][−].

【0138】

化合物I. 2の調製 :

56 mgのI. 8 (0.097 mmol) を無水DCM (1.5 mL) とTFA (1.5 mL) とで処理し、得られた溶液を室温で1時間攪拌した後、減圧下で揮発成分を全て除去する。未精製物のTLC分析 (Cy : EA : MeOH = 1 : 1 : 1 ; UV分析, ニンヒドリン及びKMnO₄により検出) から、化合物I. 8が全て消費され、HPQが存在しないことがわかる。しかしながら、シリカカラムクロマトグラフィー (Cy : EA : MeOH 勾配 1 : 1 : 0 → 1 : 1 : 1 (v : v : v)) を行って、化合物I. 2 (稠密な無色粉体 ; 48 mg ; 0.081 mmol ; 84%) を得る。NMR共鳴数を表す数字は、合成スキーム6に示された番号を指す。

30

【0139】

MS (ESI, ポジティブモード) : m/z 480.2 : [MH]⁺. MS (ESI, ネガティブモード) : m/z 478.3 : [M−H][−].

【0140】

¹H NMR (500 MHz ; D₂O) : δ = 8.02 (d ; 8.2 Hz ; 1 H ; H−2.3) ; 7.81−7.77 (m ; 1 H ; H−2.5) ; 7.64 (dd ; 7.4 & 1.7 Hz ; H−1.8) ; 7.60−7.56 (m ; 2 H ; H−1.6+H−2.6) ; 7.50−7.47 (m ; 1 H ; H−2.4) ; 7.40−7.37 (m ; 1 H ; H−1.7) ; 7.24 (d ; 8.2 Hz ; 1 H ; H−1.5) ; 3.81 (t ; 7.4 Hz ; 1 H ; H−2) ; 3.41 (d, br ; 13.4 Hz ; 1 H ; H−9) ; 3.08−3.00 (m ; 1 H ; H−9') ; 2.93 (s ; 3 H ; 3×H−1.2) ; 1.54−1.41 (m ; 3 H ; H−4+2×H−3) ; 1.02−0.83 (m ; 6 H ; 6×H−1.1) ; 0.81 (d, 4.9 Hz + d, 4.9 Hz ; 3 H + 3 H ; 6×H−5) ppm.

40

【0141】

50

^{13}C NMR (125 MHz; D_2O) : $\delta = 170.4$ (C1) ; 164.4 (*C21) ; 154.5 (*C13) ; 151.6 (*C27) ; 148.3 (C14) ; 147.8 (*C20) ; 136.0 (C25) ; 132.9 (C16) ; 129.7 (C18) ; 128.1 (C24) ; 126.5 (C23) ; 126.2 (C26) ; 126.0 (*C22) ; 126.0 (C17) ; 123.3 (C15) ; 119.7 (C19) ; 59.4 (C10) ; 52.0 (C2) ; 45.9 (C9) ; 40.0 (C3) ; 32.1 (C12) ; 24.0 (C4) , 23.8 ($2\times\text{C11}$) , 21.6 (C5) , 21.2 (C5') ppm. HSQC、HMBC、COSY及び udeft スペクトル(このスペクトルは、非常にゆっくりと緩和して、シグナルをほとんど示さない5つの星印のついた4級炭素用; *Piotto et al*, *Magn. Reson. Chem.* 2006 (44), 943–947を参照)を測定してシグナルの帰属を確かめた。

10

【0142】

MS (ESI, ポジティブモード) : m/z 480.2 : $[\text{MH}]^+$. MS (ESI, ネガティブモード) : m/z 478.3 : $[\text{M-H}]^-$.

【0143】

実施例 I. 3

下記スキーム7において合成中間体 II. 1 の代わりに化合物 II. 3 を使用して、上記基質 I. 1 と同様にして基質 I. 3 を合成する。THF 還流下、市販 cbz により保護されたプロリン-アミドをボラン BH_3 により還元することで、 cbz 保護基により保護されたジアミン (14) を文献に記載の収率 74% (*Wang, J., et al. Chem. Eur. J.* (2006) 12, 4321–4332) で調製する。

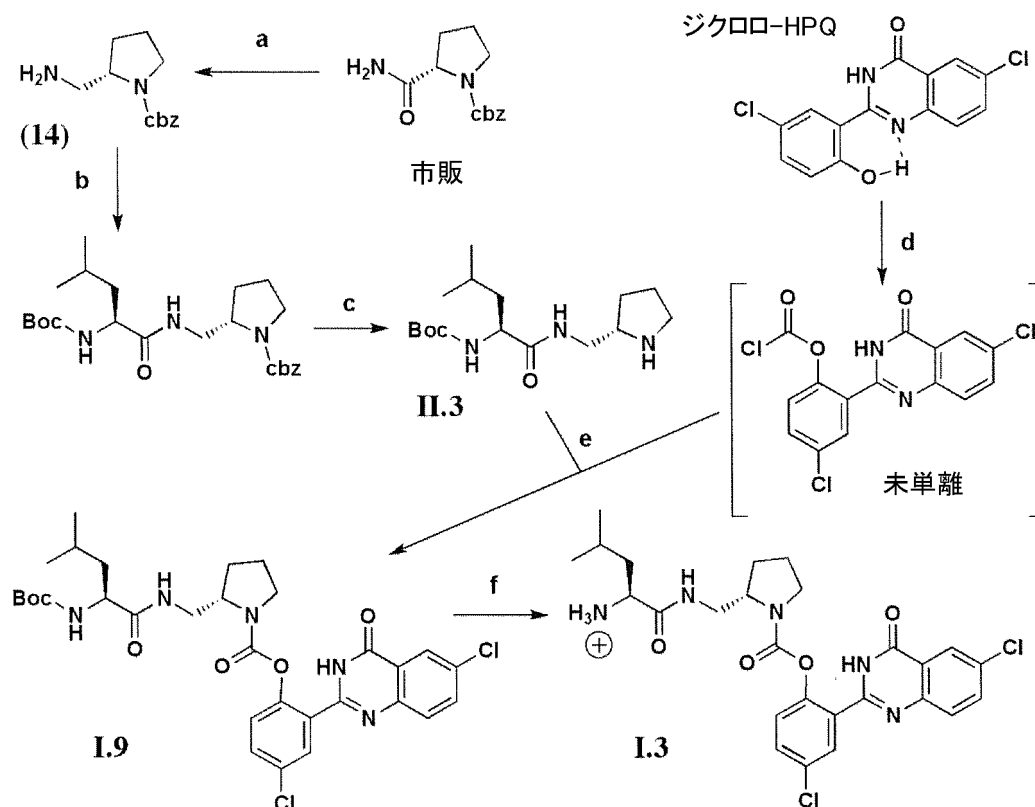
20

【0144】

スキーム 7

【0145】

【化17】



30

40

a) BH_3 , THF 還流, 7 h; b) BocLeuOH, DCC; c) H_2 , Pd/C (10%), MeOH, 1 h; d) トリホスゲン; e) TEA; (f) TFA

【0146】

50

本発明の範囲内においては、酵素試験を行う際、結晶核形成を引き起こす最低濃度に達すると、固体状フルオロフォアはまず容器（マルチウェルプレートのウェル）の壁に堆積し

た後に容器の底に堆積し始め得る。示した図の反応速度曲線において、核形成を引き起こす際に遅れ (≥ 10 分) を伴うことがよく見てとれる。実施した酵素試験を添付の図に示す。

【0152】

図1は、走査モードで得た典型的なイメージを示し、6列(1~6)、4行(A~D)の格子で表されるマルチウェルプレート(Corning)のウェル中の、インキュベーション40時間後の酵素により引き起こされた蛍光の強度の空間図を示す。ウェルA1、A6、B2、C3及びD4には、PLA酵素が初期濃度 $209\mu\text{M}$ のプロープI. 1とともに含まれ、ウェルB1、A2、C4及びD5には、PLA酵素が初期濃度 $80\mu\text{M}$ のプロープI. 1とともに含まれ、ウェルA3、B4、C5及びD6には、PLA酵素が初期濃度 $21.2\mu\text{M}$ のプロープI. 1とともに含まれ、その他のウェルには、PLAは全く含まれていないが、 $209\mu\text{M}$ のプロープI. 1(A4、B5、C6、D1、D3)又は $80\mu\text{M}$ のプロープI. 1(A5、B6、C1、D2)が含まれるか、又は、プロープI. 1も含まれていない(B3、C2)。シグナルはグレースケールで表示し、黒色は最大強度に相当する。

10

【0153】

図2は、プロープI. 1に行った別の実験の高分解能の走査モードで得たイメージを示し、酵素により活性化されたプロープ(ウェルA2及びA3)がウェルの中心だけでなく端にも沈殿する傾向を示す。ウェルA1にはバッファのみが含まれている。シグナルはグレースケールで表示し、黒色は最大強度である。

20

【0154】

図3は、PLA酵素の存在下の濃度 $18\mu\text{M}$ のプロープI. 2の場合、及び、酵素の非存在下の濃度 $100\mu\text{M}$ のプロープI. 2の場合のウェルで測定された蛍光に相当するシグナル $G(t)$ を示す。[I. 2、 $18\mu\text{M}$ 、酵素有り]組の場合、太線は、元のシグナル(結合していない三角形)の5つの一貫性のない(eratic)値(矢印)を削除するよう構成したアルゴリズムを適用した後に保持されたデータを示す。

【0155】

図4は、上記方法で得た、時間に対して示した蛍光シグナル $F(t)$ の経時変化であって、PLA酵素の非存在下、 $\text{pH}\sim 7.6$ に緩衝された水溶液中の $10\mu\text{M}$ 及び $100\mu\text{M}$ の化合物I. 1並びに $10\mu\text{M}$ 及び $100\mu\text{M}$ の化合物I. 2(これら2つのシグナルはほとんど全て重なっている)の蛍光シグナル $F(t)$ の経時変化を示す。

30

【0156】

図5は、上記方法で得たシグナル $F(t)$ であって、PLA酵素の存在下の化合物I. 1($378\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 及び $59\mu\text{M}$)及び化合物I. 2($100\mu\text{M}$ 及び $59\mu\text{M}$)、並びに、PLAの非存在下のそれぞれ $100\mu\text{M}$ の両化合物(コントロール)のシグナル $F(t)$ を線形スケールで示す。

【0157】

図6は、上記方法で得たシグナル $F(t)$ であって、PLA酵素の存在下及び非存在下、各種濃度 $10\sim 100\mu\text{M}$ となるよう新たに溶解させた化合物I. 1、並びに、PLAを新たに添加した水溶液中で3週間保管した $378\mu\text{M}$ (希釈時に元の濃度に従って計算した)の同化合物(《3週間》)のシグナル $F(t)$ を対数スケールで示す。

40

【0158】

図7は、上記方法で得たシグナル $F(t)$ であって、PLA酵素の存在下及び非存在下、各種濃度 $10\sim 100\mu\text{M}$ となるよう新たに溶解させた化合物I. 2の場合のシグナル $F(t)$ を対数スケールで示す。

【0159】

図8は、上記方法で得たシグナル $F(t)$ であって、PLA酵素の存在下の濃度 100 、 32 及び $10\mu\text{M}$ の化合物I. 1及びI. 2のシグナル $F(t)$ を比較しながら対数スケールで示す。

【0160】

50

蛍光読み取り装置用マルチウェルマイクロプレートに入れたインビトロ媒体中で標的酵素であるミクロソームロイシンアミノペプチダーゼ（EC 3. 4. 11. 2；「PLA」；市販）とともにインキュベーションしてプローブ I. 1 及び I. 2 を評価した。プローブは以下の基準に従って評価した。

【0161】

・通常、酵素活性の存在によって高い蛍光強度（「オン」）を検出。

【0162】

・標的酵素を含まないサンプルにおいて蛍光が全く存在しないこと（「消光」又は「オフ」）を検出（本質的に蛍光性なし）。

【0163】

・時間がたってもプローブが全く加水分解しないことを検出（偽陽性シグナルなし）。これは水性媒体中、pH 7でのプローブのロバスト性を表す。

【0164】

・酵素活性の存在に対する迅速な応答を検出。酵素活性が存在すれば最大シグナルを迅速に得ることができる。

【0165】

・測定シグナルとプローブ濃度との相互関係を検出。

【0166】

・広範囲照射した場合の固体状フルオロフォアの高い光安定性を蛍光読み取り装置により検出。

【0167】

pH 7. 4（生理的 pH）に緩衝された溶液中、25℃で主な試験を行った。37℃で試験を行った場合、例えばフィルムで覆うなどして、早期蒸発しないようウェルを保護しなければならなかっただろうが、これにより、蛍光測定の感度がひどく減少したであろう。従って、25℃の温度が好ましい。

【0168】

使用試薬：

酵素試験の最終溶液は全て、11mM NaClを含む25mM（全濃度）Tris／Tris・HClバッファによって（室温に応じて）pH 7. 4～7. 6の範囲に緩衝された。MgCl₂（10mM）を含む硫酸アンモニウム（3. 5M）中の懸濁液（タンパク質含量3. 5mg／mL、10～40U／mgタンパク質、ロイシン-パラ-ニトロアニリドを標準基質として測定）としてブタ肝臓のミクロソームロイシンアミノペプチダーゼ（EC 3. 4. 11. 2）をSigma（カタログ番号069K7356）から購入し、最長40日間4℃で冷蔵保管して使用した。この酵素懸濁液を最初に25mM Tris／Tris・HClバッファで100～200倍に希釈し、均質化し、室温で1時間放置してから使用した。これは、文献（例えばBeattie et al, Biochem. J.（1987）242, 281-283）の記載通り、MgCl₂又はMnCl₂の存在下又は非存在下、37℃で酵素をインキュベーションすると、結果として優れた反応性が示されなかったためである。活性ウェル中の酵素の最終濃度の値を3. 5μg／mLに調整した。プローブ I. 1 及び I. 2 は、常に、密封した丸薬容器に保管した固体の状態からMeOH（～5mg／mL）に溶解させた後、Tris／Tris・HClを添加してから、酵素試験に用いる最終濃度まで希釈した。

【0169】

実施した分析：

RFUとして測定した蛍光値を時間に対して読み取って分析を行った。分析は、96ウェル（Corning、Corning Inc.）又は384ウェル（Nunc lon、Nunc Inc.）の黒色ポリプロピレン製プレートで行い、マイクロプレート蛍光光度計（Mithras LB940、Berthold Technologies製）で記録した。この蛍光光度計は、ここでは3秒／ウェルとなるよう選択した読み取りを行って蛍光を測定するいわゆる反復モードで使用し、直径4mmの励起ビームをウェルの中

10

20

30

40

50

心に向けた。フルオロフォアが放出されると、まずウェルの壁に堆積し、ウェルの底及び中央に直ちには落下しない傾向（図2参照）にも関わらず、反復モードの分析（ウェルの中心の蛍光のみを考慮）は意義深いことが示された。なお、このモードでの使用は、上記種類のプローブに想定される用途の1つである蛍光によるハイスループット光学スクリーニングの操作に近い。図1及び図2のイメージは、励起ビーム及び読み取り装置が段階的に移動して各ウェル、特にその端までカバーするいわゆる走査モードで取得した。走査モードでは、ウェルを読み出し正方格子に分割し、典型的には 8×8 画素 $\sim 15 \times 15$ 画素の分解能のウェルとし、各画素を0.1 $\sim$ 0.3秒で読み取った。この走査モードによって、反復モードで処理したウェルの全蛍光の誤差と読み出しノイズ（フルオロフォアが放出されるとまず壁に堆積する傾向に由来）を一部除くことができる。また、ここで実施される走査モードはよりゆっくりしたものであり、反応速度の定性的観察への適性は低い。なお、このモードでの使用は、上記種類のプローブに想定される別の用途である細胞数測定

10

【0170】

図1において、観察された蛍光が各ウェル中の初期濃度によって異なる（プローブI. 1の初期濃度が209 μ M、80 μ M及び21 μ Mである3つのウェル群を容易に探知できる）こと、並びに、他のウェルに同等な蛍光が見られない（酵素の非存在下で209 μ M及び80 μ Mのプローブを含むウェルは、プローブを全く含まないウェルと同様に目に見えるものがない）こと、すなわち、40時間インキュベーションした後でも、プローブの（オフ）オン機能が消光しており、プローブの本質的な蛍光が全く見られず、プローブの自然加水分解による偽陽性シグナルが全く見られないことが注目される。

20

【0171】

バンドパスフィルターを備える蛍光計を使用して、励起ビームでは14nm、発光ビームでは10nmのバンド幅の波長を選択したため、プローブI. 1及びI. 2（HPQ系）の励起波長を355nmに設定し、探知される発光波長を510nmに設定した。

【0172】

取得の手順：

調製したウェルに最終的に酵素を添加した。酵素を添加した後、ウェルの内容物をピペットで2回吸い上げて放出して、出来るだけ混合液を均質化した。これにより、一回目の取得の前に、取得毎のウェル数に応じて5 $\sim$ 20分の遅れが生じたが、第一ウェルが蛍光を呈し始めた時点でこの遅れにより取得が妨げられることはなかった。ウェル間の読み取りの遅れを観察して、各ウェルに酵素を添加した。その結果、プレートを読み出す際は毎回各ウェルの反応時間を同一にして、異なるウェルで取得したデータを比較することができた（本実験では、隣接するウェルを読み出す間に3秒 $\sim$ 20秒の遅れが生じたが、これに、時間 t で取得して読み取られる最大77ウェルを乗じる）。特に明記しない限り、活性条件（基質の濃度及び性質、酵素濃度など）の各群Xについて5ウェル以上（繰り返しI）、並びに、コントロール条件（例えば、酵素なし及び／又は基質なし）の各群について3以上の繰り返しの蛍光値 $A_{X,i}(t)$ を各処置において測定した。読み出しと読み出しの間にプレートレットを約10秒間攪拌した。

30

【0173】

データの前処理

反復モードによって、RFUとして測定した各ウェルの蛍光値の時間に対する関数を取得できるが、この未加工値の関数は $A_{X,i}(t)$ （X群の繰り返しを表す指数）として記載する。緩衝溶液と、活性ウェルで使用したのと同じ量の酵素とを含むが、基質は含まない（3以上の）コントロールウェルからなる群で得られた未加工蛍光値（単位：RFU）の平均 $B(t)$ を計算する。そして、関数 $G^*_{X,i}(t) = A_{X,i}(t) - B(t)$ を計算して、とりわけプレートレット、酵素及び緩衝媒体による光の分散、空气中及びウェル表面上の埃による光の分散が原因となって生じる、測定シグナルに重なった環境シグナルを除いた。次に、 $G^*_{X,i}(t)$ を正規化して、各ウェルについて関数 $G_{X,i}(t) = G^*_{X,i}(t) \times B(t=0) / B(t)$ を得た。この正規化により、検出器の

40

50

校正のずれ（「検出器ドリフト」）や、24時間を超えて続く場合もある取得工程時のUVランプによる強度の起こり得る差異などの影響を少し補うことで蛍光値を経時的に比較できる。

【0174】

図3は、プローブI. 2が高濃度でも酵素の非存在下では分解しない（偽陽性シグナルが全く存在しない）が、酵素の存在下でははるかに低い濃度でも非常に強いシグナルを実際に生成できることを示す。

【0175】

一貫性のないデータ：

ある点（図3の矢印が示す点）がその隣と非常に異なる、例えば隣接値の算術平均よりもRFUが最大300%大きい又は小さいことがあったため、各ウェルの未加工データを調べてそれらの一貫性を検討した。この場合、これらは、取得したシグナルの自然な差異ではなく、例えば、光を分散させる分析板上にやって来たり、読み取り装置の近くで気流により吹き飛ばされたりした埃粒子の存在などに由来する一貫性のない値であると考慮した。従って、関係するウェルで得られた全曲線を保持しつつ、一貫性がないと考慮した上記点を捨てることに決めた。ある点を一貫性がないとするかどうかを決定するために試験を構成した。点 $G_{x,i}(t)$ について、隣接値の量に反比例して重みを付けた期待値を計算して、 $\mu_{x,i}(t) = [(3G_{x,i}(t-3) + 2G_{x,i}(t-2) + 2G_{x,i}(t+2) + 3G_{x,i}(t+3)) / 10]$ を得た。そして、 $\Delta_{x,i}(t) = [G_{x,i}(t) - \mu_{x,i}(t)]^2 / (|\mu_{x,i}(t)| + |G_{x,i}(t)|)$ の値を計算した。 $\Delta_{x,i}(t)$ の最大値に相当する点 $G_{x,i}(t)$ は、大きいものから順に拒否することができ、拒否する点が各組の得られた点の5%（例えば、図3の矢印の付いた5つの点）となるまで隣接点の新しい $\mu_{x,i}(t')$ の値を再計算した。この方法は取得の終了時頃（蛍光のプラトー領域とすることが必要）の値に適しているが、プローブの活性化に相当するシグナルの急速な増加を隠してしまう恐れがあるため初期データの3点には適用しなかった。この方法は、非線形の急速な増加に相当する蛍光値のデータ域にも適用しなかった。図3には、この方法で得た曲線（曲線 $G(t)$ に適用）もデータ点を三角形として太字で表し、除いた点（矢印付き）も示す。

【0176】

保持データ及び平均蛍光値 $F_x(t)$ の取得：

最も一貫性のあるデータを分析するために、（1）各群について常に3以上の繰り返しを保持され、（2）拒否したウェルのシグナルが、その値と群の総平均値 $M_x(t)$ との任意の偏差閾値を超えた場合、各群Xの最大2の繰り返しiの、一貫性のない点が全くないデータ曲線 $G_{x,i}(t)$ は拒否した。拒否を評価するため、関数 $|G_{x,i}(t) - M_x(t)|^2 / M_x(t)$ の全値の平均 $Q_{x,i}$ をまず計算した。この際、繰り返しiを拒否するには、比 $R_i = [Q_{x,i} / (M_x(t) \text{の最後の5つの点の平均値})]$ は0.025よりも大きくなくてはならない。このように各群Xについて最大 $Q_{x,i}$ を有するウェルiを拒否した後、 $M_x(t)$ 及び $Q_{x,i}$ を再計算して残りの $Q_{x,i}$ を再評価し、上記方法を再適用した。なお、この工程は、隣接値 $G_{x,i}(t)$ と $G_{x,i}(t')$ との起こり得る差異（この差はシグナル対ノイズ比と同等）に本質的に反対するものではない。保持された繰り返しを「許容可能」とし、保持された点群Xそれぞれについて、保持された関数の値 $G_{x,i}(t)$ を平均して、各条件のX群の一連の蛍光値 $F_x(t)$ を得た。

【0177】

取得データ：

反復モードで11時間取得を行って、（1）プローブI. 1及びI. 2の安定性を確認し、（2）それらの最少バックグラウンド蛍光値を示し、（3）様々な濃度範囲で、酵素活性により引き起こされる顕著なシグナルを示し、（4）プローブのおおよその作用速度を得、（5）酵素活性により得られたシグナルがこの急速な取得モードでは定量的とみなされるかどうかを経過時間に対して評価した。各プローブを10 μ M～100 μ Mの濃度範

10

20

30

40

50

囲で試験したが、各プローブについて、2組の安定性コントロール（1つは100 μM、1つは10 μM）を測定して、偽陽性シグナルが全く見られないことを確認した。プローブの非存在下の標準バッファ中に幾らか酵素を含むウェルを使用して、バックグラウンド蛍光のコントロール測定を行った。最後に、3週間前に調製したプローブ I. 1 溶液（「3週間」）を使用して測定を行って、さらに自然加水分解に対するこのプローブのロバスト性を実際に評価した。各読み出しはウェル毎に3秒間続けた。得られた結果を図4～8に図式的に示す。

【0178】

図4は、本発明に係る基質が自然分解に対して完全に安定であり、プローブ I. 1 及び I. 2 では11時間の取得中に偽陽性シグナルが全く見られないことを示す。それに比べて、本発明者の1人の先行文献（Zhang, Waibel and Hasseroth, Chem. Eur. J. 2010, 16, 792）に記載のプローブは、38 μMのプローブについて同様な条件下、酵素の非存在下のコントロールウェルのシグナルの増加が150分間で10～15%程度（従って偽陽性シグナル）であった。本発明に係るプローブを使用すれば、濃度100 μMで660分間の場合であっても、シグナルノイズに対するシグナルの増加は見られない。

10

【0179】

プローブ I. 2（使用した対イオン： CF_3CO_2^- ）では本質的な蛍光値は、その溶液中濃度に影響されないように思われるが、一方、プローブ I. 1（使用した対イオン： pTsO^- ）では蛍光値はその濃度に対して幾らかの依存性を示す。

20

【0180】

図5は、酵素の存在下、各種濃度の化合物 I. 1 及び I. 2 を使用して強い蛍光シグナルが迅速に得られること、並びに、この蛍光値と比較して本質的蛍光値（酵素の非存在下のプローブで観察）が弱いことを示す。なお、シグナルの急激な増加を得る際の遅れは非常に少なく、前文で検討した理由から約10分であるが、通常は100分未満である。

【0181】

図6は、酵素の存在下で化合物 I. 1 を使用して強い蛍光シグナルが迅速に得られるが、酵素の非存在下では同プローブで非常に小さいバックグラウンド蛍光値しか観察されないことを示す。500分以降では、最低濃度10 μMの化合物 I. 1 であっても、活性化酵素の非存在下で上記プローブ濃度の10倍に相当する100 μMで行われた測定でのバックグラウンド蛍光とさえも混動されないシグナルが得られることが強調されよう。また、プラトー領域に達すると、シグナルは時間がたっても減少せず、従って、機器の照射度は、探知可能な光分解を引き起こすほど高いものではない。

30

【0182】

化合物 I. 2 の場合の図7の曲線に示された結果は同等であり、従って同様に申し分のないものである。

【0183】

図8は、プローブ I. 1 及び I. 2 のシグナルを引き起こす速度の違いを濃度に対して示す。なお、ウェル中に存在するプローブが全て活性化することから予想される通り、同一濃度（100 μM及び32 μM）で比較した両プローブの蛍光プラトー値は同じである。

40

【0184】

酵素とともにインキュベーションしたプローブ I. 1 及び I. 2 について使用した方法で観察された時間 $t_{1/2}$ であって、11時間の取得中に観察された最大シグナルの半分に相当する時間 $t_{1/2}$ を計算し、表2に示す。それらの値によって、使用した酵素濃度が低い場合のプローブの作用の迅速さを評価できる。

【0185】

【表 2】

	値 $t_{1/2}$ (分)
I.1 , 378 μM «3週間»	71
I.1 , 100 μM	55
I.2 , 100 μM	125
I.1 , 59 μM	93
I.2 , 59 μM	162
I.1 , 32 μM	237
I.2 , 32 μM	344
I.1 , 18 μM	499
I.2 , 18 μM	460
I.1 , 10 μM	520
I.2 , 10 μM	533

10

20

【0186】

(200～400分後から取得の終了時まで)プローブ濃度378 μM ～32 μM で測定した「プラトー領域の」蛍光値(最大値;時間がたっても変化しない)を使用して、各ウェル組についてシグナルプラトー値/濃度比を評価した。各測定で得られたそれぞれの比の値には20%程度の差異しか見られなかったが、これにより、上記プローブのフルオロフォア部分が同じ場合、酵素を使用した試験で測定されたシグナルとプローブの初期濃度とが相関することがわかる。得られた比の平均値を使用して、活性ウェル中のプローブの初期濃度を評価した。得られた値を表3に示す。このように評価した値は、実際の値にかなり近い。濃度18 μM 及び10 μM の場合、プラトー領域に達することはなかったので、計算された濃度は予想通り低く評価されていることがわかる。

30

【0187】

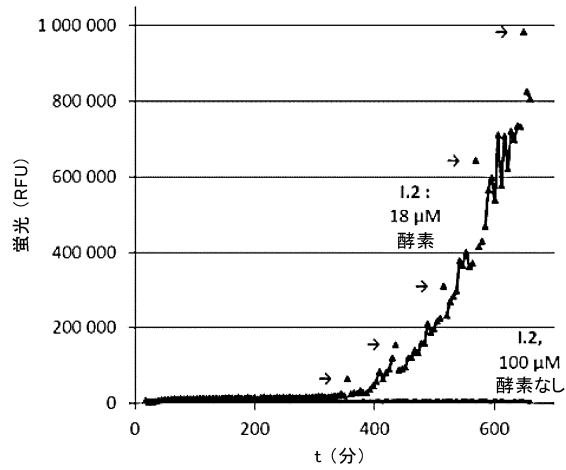
【表 3】

	シグナル/濃度 (RFU/ μ M)	予想濃度 (μ M)
I.1 , 378 μ M, 3週間	98684	419
I.1 , 100 μ M	95711	108
I.2 , 100 μ M	87269	98
I.1 , 59 μ M	63054	42
I.2 , 59 μ M	95096	63
I.1 , 32 μ M	72794	26
I.2 , 32 μ M	110289	40
I.1 , 18 μ M		6
I.2 , 18 μ M		6
I.1 , 10 μ M		0
I.2 , 10 μ M		1
比平均値	88985	

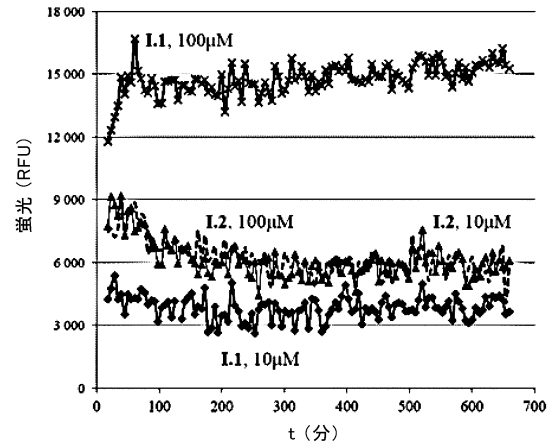
10

20

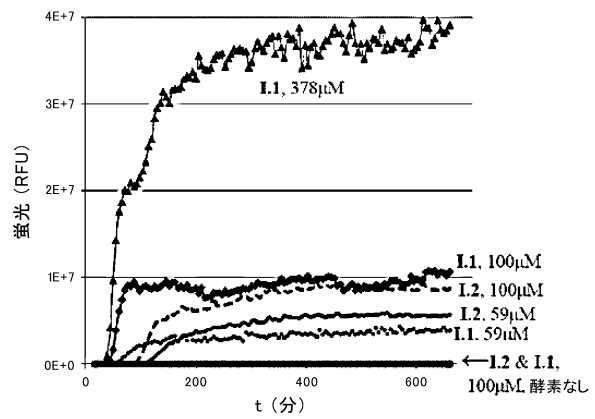
【図 3】



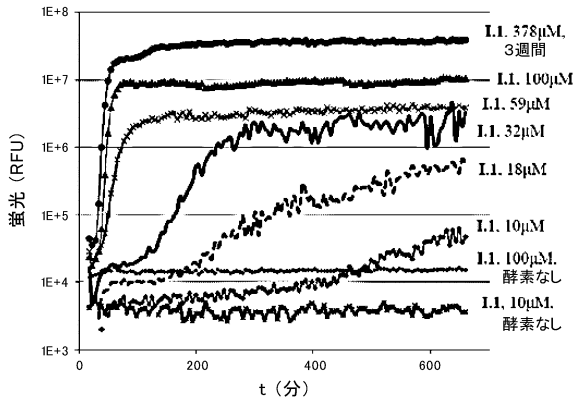
【図 4】



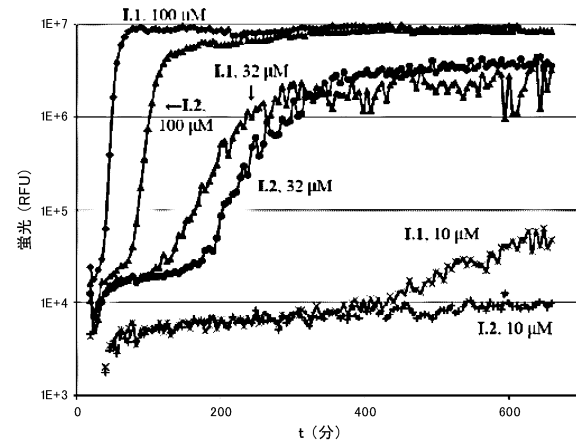
【図 5】



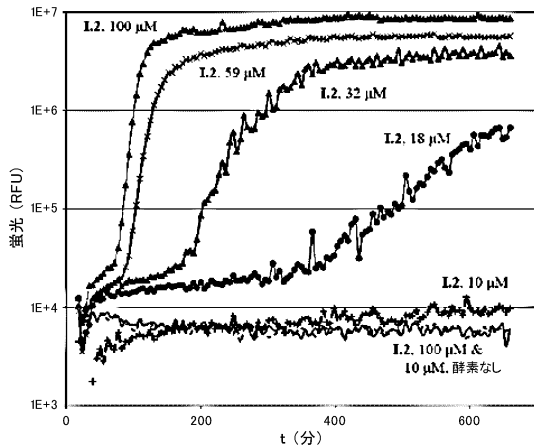
【図 6】



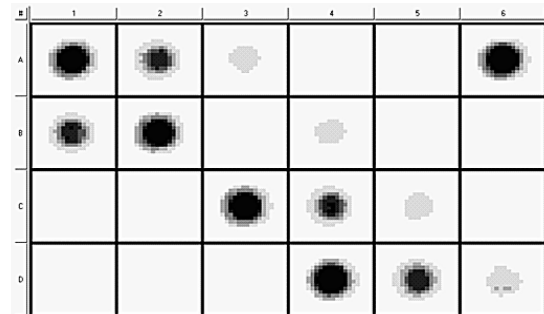
【図 8】



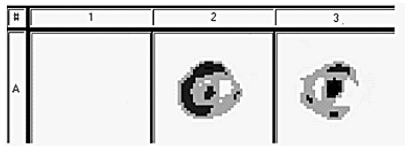
【図 7】



【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 D 417/14 (2006.01) C 0 7 D 417/14

(74)代理人 110000914

特許業務法人 安富国際特許事務所

(72)発明者 ハッサーオット, イェンス
フランス国 エフ-6 9 0 0 6 リヨン, リュ シュリー 1 3 0

(72)発明者 トルナーゼスホルト, オリバー
フランス国 エフ-6 9 0 0 1 リヨン, リュ セルジャン ブランダン 2 0

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 欧州特許出願公開第0 2 2 6 6 9 6 3 (EP, A1)
米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 0 5 9 8 4 7 (US, A1)
特表平0 8 - 5 0 0 9 6 1 (JP, A)
国際公開第2 0 1 1 / 0 3 1 3 5 0 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
G 0 1 N 2 1 / 6 2 - 2 1 / 7 4
C 0 7 D 2 3 9 / 0 0 - 2 3 9 / 9 6
C 0 7 D 4 0 1 / 0 0 - 4 2 1 / 1 4
CAplus/REGISTRY (STN)