

(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
2022年12月29日(29.12.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/270607 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 5/062 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/025205

(22) 国際出願日: 2022年6月23日(23.06.2022)

(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 2021-105163 2021年6月24日(24.06.2021) JP

(71) 出願人:株式会社 東北テクノアーチ(Tohoku Techno Arch Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒9800845 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468番地 Miyagi (JP). 五稜化薬株式会社(Goryo Chemical, Inc.) [JP/JP]; 〒0600008 北海道札幌市中央区北8条西18丁目35番地100エアリービル5階 Hokkaido (JP). 千寿製薬株式会社(Senju Pharmaceutical Co.,

LTD.) [JP/JP]; 〒5410048 大阪府大阪市中央区瓦町三丁目1番9号 Osaka (JP).

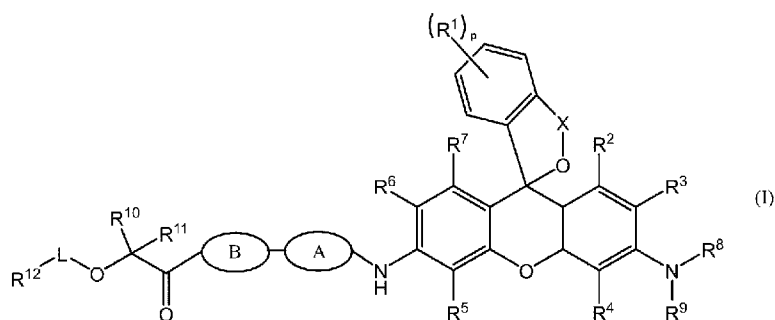
(72) 発明者:中澤 徹(NAKAZAWA Toru); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平2丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 鈴木 悠記(SUZUKI Yuki); 〒0600008 北海道札幌市中央区北8条西18丁目35番地100エアリービル5階 五稜化薬株式会社内 Hokkaido (JP). 岡隆之(OKA Takayuki); 〒5410048 大阪府大阪市中央区瓦町三丁目1番9号 千寿製薬株式会社内 Osaka (JP). 内田 孝俊(UCHIDA Takatoshi); 〒5410048 大阪府大阪市中央区瓦町三丁目1番9号 千寿製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 粉井 孝文(MOMII Takafumi); 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目4番4号 アクア堂島東館7階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

(54) Title: FLUORESCENT PROBES

(54) 発明の名称: 蛍光プローブ



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a fluorescent probe that detects calpain enzymatic activity with high sensitivity. This invention increases the enzymatic reactivity with calpain by bonding an amino group which has an α carbon bonded to an oxygen atom, to the N terminal of a peptide chain. In comparison with conventionally reported HMRG fluorescent probes, this probe has improved reactivity with calpain, so a fluorescent probe is provided which that detects calpain activity with higher sensitivity. Specifically, the present invention relates to the compound represented in general formula (I) or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明は、カルパイン酵素活性を高感度に検出する蛍光プローブを提供することを目的とする。本発明は、ペプチド鎖のN末端に、酸素原子と結合した α 炭素を有するアミド基を結合することで、カルパインとの酵素反応性が向上する。本発明のプローブは、従来報告されているHMRG蛍光プローブと比較して、カルパインとの反応性が向上していることから、より高感度にカルパイン活性を検出する蛍光プローブを提供するものである。具体的には、本発明は、下記の一般式(I)で表される化合物又はその塩に関する:

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： 蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、カルパインの活性を検出する蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] カルパインは、 Ca^{2+} 依存的に活性化されるシステインプロテアーゼであり、基質タンパク質の限定切断により、そのタンパク質の機能や構造を調節するモジュレーター分子である。カルパインは、さまざまな生命現象に関わる一方で、その活性やその遺伝子の病原性変異が、神経変性疾患、心・筋疾患、虚血性疾患、がん、眼疾患など、様々な疾患に関連することが報告されている。さらには、カルパインが病原体の生存や感染などに必須な感染症もあり、例えば、マラリア、トリパノソーマ症、シストソーマ（住血吸虫）症などにも、カルパインが関連することが知られている。よって、カルパイン関連疾患の診断や疾患メカニズムの解析／創薬研究において、カルパインの活性を可視化することは重要である。

[0003] カルパイン活性をリアルタイムに検出するためには、蛍光イメージング法が有用な手段となる。特に、生細胞中のカルパイン活性を遺伝子導入に頼らないで検出する手段として、これまでにクマリン（非特許文献1）やHydroxymethyl Rhodamine Green (HMRG)（特許文献1）といった有機小分子による蛍光プローブが開発されている。

[0004] 特に、緑色の蛍光プローブとして、蛍光色素であるHydroxymethyl Rhodamine Green (HMRG) にペプチドを結合させたプローブが報告されている（特許文献1、非特許文献2）。HMRGプローブは酵素非存在下では無蛍光性であり、蛍光基質が酵素と反応することで蛍光性となることを特徴とする。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開公報WO2016/137004

非特許文献

[0006] 非特許文献1：THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1993) 268:23593-23600

非特許文献2：BIOCONJUGATE CHEMISTRY (2020) 31:2241-2251

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1に記載される従来型のHMRGプローブには、酵素存在下における蛍光強度に改善の余地があった。本発明は、カルパイン酵素活性を高感度に検出する蛍光プローブを提供することを目的とする。

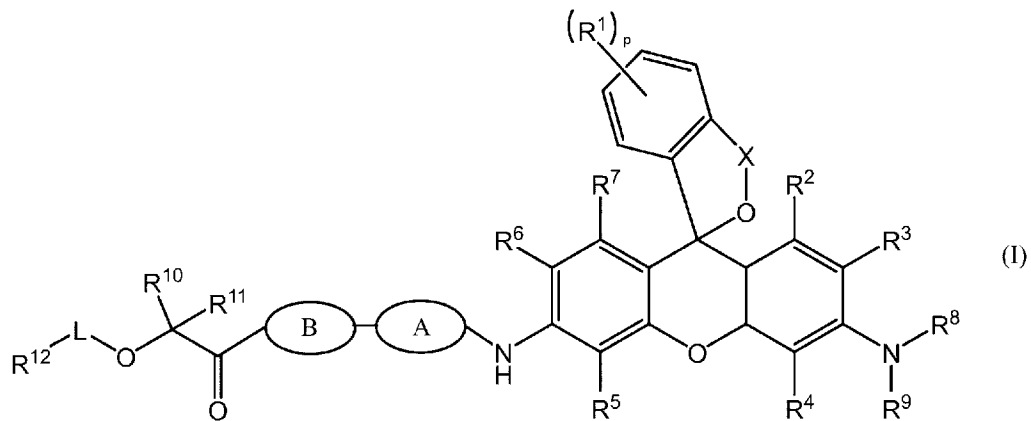
課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、カルパインと蛍光プローブの反応性を高めることでカルパイン活性の検出感度が向上すること、より具体的には、蛍光プローブにペプチドをアミド結合したカルパインプローブの基本骨格において、ペプチド鎖のN末端に、酸素原子と結合した α 炭素を有するアミド基を結合することで、カルパインとの酵素反応性が向上することを見出した。

[0009] 本発明は、下記の一般式(1)で表される化合物又はその塩（以下、「化合物(1)」ということがある）に関する：

[0010]

[化1]



[式中、A及びBは、それぞれ独立して、同一又は異なるアミノ酸残基を表し、

ここで、Aと、Aに結合するNHとの間の結合は、AのC末端と該NHとの間のアミド結合であり、AとBはアミド結合で結合しており、かつ、Bと、Bに結合するカルボニル(C=O)との間の結合は、BのN末端と該カルボニル(C=O)との間のアミド結合であり；

R¹は、同一又は異なって、ベンゼン環に結合する置換基を表し；

pは、0～4の整数を表し；

R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基(OH基)、ハロゲン原子、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アルキル基を表し；

R⁸及びR⁹は、それぞれ独立して、水素原子、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アルキル基を示すか、あるいは、R⁸とR⁹とが結合して環を形成していてもよく、あるいは、R³とR⁸とが結合して環を形成していてもよく、かつ／又はR⁴とR⁹とが結合して環を形成していてもよく；

Xは、直鎖又は分岐C1～C3アルキレン基を表し；

R¹⁰及びR¹¹は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基(OH)、アルコキシ基、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アル

キル基を示すか、あるいは、 R^{10} と R^{11} とが結合して環を形成していてもよく；

R^{12} は、水素原子；置換されても良い、直鎖、分岐若しくは環状アルキル基；置換されても良い、直鎖若しくは分岐アルケニル基；置換されても良い、直鎖若しくは分岐アルキニル基；置換されても良いアリール基；又は、置換されても良い複素環基を示すか、あるいは、 R^{10} 又は R^{11} と結合して環を形成していてもよく；

Lは、アミド結合、エステル結合、又は $-(直鎖若しくは分岐アルキレン-O-)_n-$ （ n は1～10の整数）を示すか、あるいは、単結合を示す。]

[0011] 化合物（1）において、 R^1 はベンゼン環に結合する置換基を示す。 p は0～4の整数であり、0～3、0～2、0～1、1、又は0であってもよい。

R^1 としては、例えば、置換されても良い、直鎖又は分岐アルキル基；置換されても良い、直鎖又は分岐アルコキシ基；ハロゲン原子；置換されていてもよいアミノ基；置換シリル基；又はアシル基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。 p が2以上の場合、複数の R^1 は、各々同一でも異なってもよい。

[0012] R^8 と R^9 とが結合して環を形成する場合、 R^3 と R^8 とが結合して環を形成する場合、 R^4 と R^9 とが結合して環を形成する場合、 R^{10} と R^{11} とが結合して環を形成する場合、当該環は、ヘテロ原子（酸素原子、窒素原子、硫黄原子など）を含んでいてもよく、例えば、シクロアルキル又は環状エーテルであってもよい。 R^{12} と R^{10} 又は R^{11} とが結合して環を形成する場合、当該環は、環状エーテルであってもよい。またこれらの環は3～14員、3～10員、3～8員、又は3～6員とすることができる。

[0013] 本明細書全体にわたって、アルキル基又はその他の基のアルキル部分における置換基としては、ハロゲン原子、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、チオール基、アルキルチオール基、スルホニル基、アルキルスルホニル基、アルコキシ基、環状エーテル、カルボキシ基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシカルボニルアミ

ノ基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルアミノカルボニル基、アルキルカルボニルアミノ基、カルボニルアミノ基、ヒドラジニル基、を挙げることができる。アルキル基が置換されている場合、該置換基の数は、例えば、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、1個、2個、又は3個とすることができる。

[0014] アミノ基における置換基としては、置換されても良い、直鎖又は分岐アルキル基であってもよい。アミノ基が置換されている場合、該置換基の数は、1～2個、1個、又は2個とすることができる。

[0015] 置換シリル基の置換基としては、置換されても良い、直鎖又は分岐アルキル基又は置換されても良いフェニル基であってもよい。シリル基の置換基の数は、例えば、1～4個、1～3個、1～2個、1個、2個、3個、又は4個とすることができる。

[0016] 一般式(1)において、アミノ酸は、カルパインにより切断されるアミノ酸であれば、天然に存在するアミノ酸又はその誘導体であってもよく、例えば、天然アミノ酸の立体異性体であってもよい。アミノ酸としては、例えば、Met、Ser、Ala、Thr、Val、Tyr、Leu、Asn、Ile、Gln、Pro、Asp、Phe、Glu、Trp、Lys、Cys、Arg、Gly、His（以上、アミノ酸三文字表記で表す）、ノルロイシン(Nle)、又はメチオニンスルホキシド(MetO)であってよい。

[0017] 本明細書において、「アルキル基」又はその他の基における「アルキル」部分は、直鎖、分岐、又は環状の飽和炭化水素基を意味し、好ましくは、炭素数が1～6個の飽和炭化水素基であり、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、2,3-ジメチルプロピル基、ヘキシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、及びシクロヘキシル基などが挙げられ、より好ましくは、C1～5アルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、イソブチル基、

ペンチル基、イソペンチル基、又は2，3－ジメチルプロピル基が挙げられる。更に好ましくは、C 1～3アルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、n－プロピル基、及びi－プロピル基であり、最も好ましくは、メチル基又はエチル基である。また、「アルキレン基」は、上記アルキル基から水素原子を1個除くことにより得られる2価の基である。

[0018] 「アルコキシ基」は、上記アルキル基と酸素原子を介して結合する基（（アルキル基）－O－基）のことであり、該アルキル基部分は上述にて定義した通りである。例えば、アルコキシ基は、アルキル基部分の炭素原子数が1～6個であってもよい。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、1－プロピルオキシ基、2－プロピルオキシ基、2－メチル－1－プロピルオキシ基、2－メチル－2－プロピルオキシ基、2，2－ジメチル－1－プロピルオキシ基、1－ブチルオキシ基、2－ブチルオキシ基、2－メチル－1－ブチルオキシ基、3－メチル－1－ブチルオキシ基、2－メチル－2－ブチルオキシ基、3－メチル－2－ブチルオキシ基、1－ペンチルオキシ基、2－ペンチルオキシ基、3－ペンチルオキシ基、2－メチル－1－ペンチルオキシ基、3－メチル－1－ペンチルオキシ基、2－メチル－2－ペンチルオキシ基、3－メチル－2－ペンチルオキシ基、1－ヘキシルオキシ基、2－ヘキシルオキシ基、3－ヘキシルオキシ基などが挙げられる。C 1～6アルコキシ基として、好ましくはC 1～5アルコキシ基であり、より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、n－プロピルオキシ基、i－プロピルオキシ基、n－ブチルオキシ基、sec－ブチルオキシ基、t－ブチルオキシ基、イソブチルオキシ基、ペンチルオキシ基、イソペンチルオキシ基、及び2，3－ジメチルプロピルオキシ基である。

[0019] 「アルケニル基」は、1つ以上の炭素－炭素間の二重結合を有する直鎖、分岐、又は環の不飽和炭化水素の任意の炭素原子から一個の水素原子を除去してなる一価の基であり、例えば、炭素原子数が2～10個、2～6個、又は2～4個であってもよい。C 2～10アルケニル基としては、例えば、ビニル基、プロペニル基、イソプロペニル基、1－ブテニル基、2－ブテニル

基、3-ブテニル基、1-ペンテニル基、1-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、1-メチル-1-ブテニル基、1-メチル-2-ブテニル基、1-メチル-3-ブテニル基、1-メチリデンブチル基、2-メチル-1-ブテニル基、2-メチル-2-ブテニル基、2-メチル-3-ブテニル基、2-メチリデンブチル基、3-メチル-1-ブテニル基、3-メチル-2-ブテニル基、3-メチル-3-ブテニル基、1-エチル-1-プロペニル基、1-エチル-2-プロペニル基、1-ヘキセニル基、2-ヘキセニル基、3-ヘキセニル基、4-ヘキセニル基、5-ヘキセニル基、1-メチル-1-ペンテニル基、1-メチル-2-ペンテニル基、1-メチル-3-ペンテニル基、1-メチル-4-ペンテニル基、1-メチリデンペンチル基、2-メチル-1-ペンテニル基、2-メチル-2-ペンテニル基、2-メチル-3-ペンテニル基、2-メチル-4-ペンテニル基、2-メチリデンペンチル基、3-メチル-1-ペンテニル基、3-メチル-2-ペンテニル基、3-メチル-3-ペンテニル基、3-メチル-4-ペンテニル基、3-メチリデンペンチル基、4-メチル-1-ペンテニル基、4-メチル-2-ペンテニル基、4-メチル-3-ペンテニル基、4-メチル-4-ペンテニル基、1-ヘプテニル基、2-ヘプテニル基、3-ヘプテニル基、4-ヘプテニル基、5-ヘプテニル基、6-ヘプテニル基、オクテニル基、ノネニル基、及びデセニル基が挙げられる。

[0020] 「アルキニル基」は、1以上の炭素-炭素間の三重重結合を有する直鎖又は分岐状の不飽和炭化水素の任意の炭素原子から一個の水素原子を除去してなる一価の基であり、例えば、炭素原子数が2～6個又は2～4個であってもよい。アルキニル基としては、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基、フェニルエチニル基などを挙げることができる。

[0021] 「アシル基」はアルカノイル基と同義であり、 $R-C(=O)-$ で表される基である。この構造で示されるアシル基におけるR部分としては、水素原子、置換されても良い、直鎖又は分岐アルキル基、又は置換されても良いア

リール基が挙げられる。例えば、アシル基は炭素原子数2～7個であってもよく、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基、バレリル基、イソバレリル基、ヘキサノイル基、ヘプタノイル基を包含する。

[0022] 「アリール基」とは、1価の芳香族炭化水素基のことであり、例えば、6～10個の炭素原子を有していてもよく、フェニル基及びナフチル基を包含する。

[0023] 「複素環基」は、窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から選択される1種類以上のヘテロ原子を少なくとも1個含む1価の基であり、好ましくは5～14員である。複素環基は、単環式複素環基又は縮合複素環基であってもよい。5～14員の複素環基が含有するヘテロ原子の数は、例えば、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、2個、1個であってもよい。例えば、窒素原子を1個含む複素環基、窒素原子を2個含む複素環基、窒素原子を3個含む複素環基、酸素原子1個を含む複素環基、酸素原子を2個含む複素環基、酸素原子1個と窒素原子1個を含む複素環基、硫黄原子を1個含む複素環基など様々な組み合わせが存在する。5～14員の複素環基は、芳香族性であっても、非芳香族性であってもよい。単環式複素環基は、好ましくは、5～6員環である。縮合複素環基は、好ましくは、8～10員環である。5～14員の複素環基としては、例えば、ペリリジン、ピペラジン、モルホリン、キヌクリジン、ピロリジン、アゼチジン、オキセチン、アゼチジン-2-オン、アジリジン、トロパニン、フリル、テトラヒドロフリル、チエニル、ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ジオキサニル、オキサゾリル、オキサゾリニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、チアゾリニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、チアゾリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、オキサジアゾリル、フラザニル、チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、テトラゾリル、ピラニル、ピリジン、ピペリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ジオキサ

ニル、オキサジニル、モルホリニル、チアジニル、トリアジニル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロイソベンゾフラニル、ベンゾチエニル、イソベンゾチエニル、ジヒドロベンゾチエニル、ジヒドロイソベンゾチエニル、テトラヒドロベンゾチエニル、キノリル、イソキノリル、キナゾリニル、フタラジニル、プテリジニル、クマリル、クロモニル、1,4-ベンゾジアゼピニル、インドリル、イソインドリル、ベンズイミダゾイル、ベンゾフリル、プリニル、アクリジニル、フェノキサジニル、フェノチアジニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾジオキサラニル、ベンゾジオキサニルクロモニル、クロマニル、イソクロマニル、クロマノニル、シンノリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、イミダゾピリジル、ナフチリジニル、ジヒドロベンゾオキサジニル、ジヒドロベンゾオキサゾリノニル、ジヒドロベンゾオキサジノニル、及びベンゾチオキサニルを挙げることができる。

[0024] 本明細書において、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、及びヨウ素原子を意味し、好ましくは、フッ素原子、塩素原子、及び臭素原子であり、より好ましくは、フッ素原子、又は塩素原子である。本明細書において、「カルボキシル基」とは、 $-C(=O)-OH$ で表わされる基のことである。

[0025] アミノ酸Aとして、好ましくはMet、Thr、His、Tyr、Phe、Ser、Gln、Arg、Lys、MetO、及びNleである。アミノ酸Bとして、好ましくは、疎水性アミノ酸、例えばLeu、Valであり、より好ましくはLeuである。(アミノ酸B)-(アミノ酸A)の組み合わせとして好ましくは、Leu-Met、Leu-Nle、Leu-Phe、Leu-Tyr、Leu-Thr、Leu-Arg、Leu-Lys、Leu-His、Leu-MetO、Val-Tyr、Val-Met、及びLeu-Serを挙げることができる。

[0026] R^1 として好ましくは、直鎖又は分岐アルキル基である。また、pは好まし

くは0又は1であり、より好ましくは0である。

[0027] R^2 として好ましくは、水素原子である。

[0028] R^3 として好ましくは、水素原子である。

[0029] R^4 として好ましくは、水素原子である。

[0030] R^5 として好ましくは、水素原子である。

[0031] R^6 として好ましくは、水素原子である。

[0032] R^7 として好ましくは、水素原子である。

[0033] R^8 として好ましくは、水素原子である。

[0034] R^9 として好ましくは、水素原子である。

[0035] R^{10} として好ましくは、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基であり、より好ましくは水素原子、メチル基又はメトキシ基である。

[0036] R^{11} として好ましくは、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基であり、より好ましくは水素原子、メチル基又はメトキシ基である。

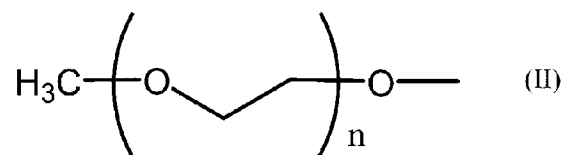
[0037] あるいは、 R^{10} 及び R^{11} として好ましくは、互いに結合してシクロアルキル基を形成し、より好ましくはC3-C5シクロアルキル基を形成する。

[0038] R^{12} として好ましくは、水素原子又は置換されても良い、直鎖、分岐若しくは環状アルキル基であり、より好ましくは、水素原子又は水酸基、カルボキシル基、シクロエーテル、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基）、スルホニル基、ハロゲン原子、アミノ基、メチルアミノ基、及びジメチルアミノ基から選択される1つ以上の基で置換されても良い炭素数1~6の直鎖、分岐若しくは環状アルキル基であり、さらに好ましくは水素原子又は水酸基、カルボキシル基、シクロエーテル、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基）、スルホニル基、ハロゲン原子、アミノ基、メチルアミノ基、及びジメチルアミノ基から選択される1つ以上の基で置換されても良い炭素数1~4の直鎖若しくは分岐アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基）である。あるいは、 R^{12} は、好ましくは R^{10} 又は R^{11} と結合して酸素原子を1個又は2個含む3~8員の複素環基（例えば、ジオキサニル、ジオキサニル）を形成する。

[0039] Lとして好ましくは、 $-(\text{直鎖若しくは分岐アルキレン}-\text{O})_n-$ (n は1～10の整数)又は単結合である。直鎖若しくは分岐アルキレンは、例えば炭素数1～4、好ましくは炭素数2又は3、より好ましくは炭素数2のアルキレンであり得る。

[0040] 例えば、上記式(1)において、 $-\text{O}-\text{L}-\text{R}^{12}$ で表される基は、以下の式(11)で表される基であってもよい。

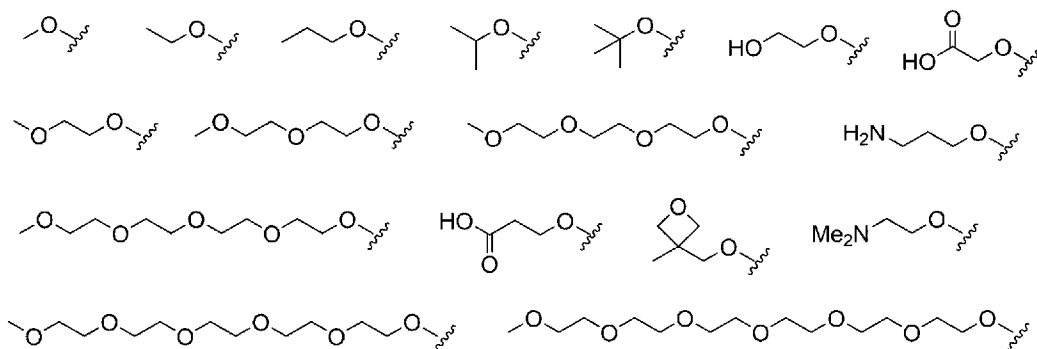
[0041] [化2]



[式中、 n は0～10の整数を表す。]

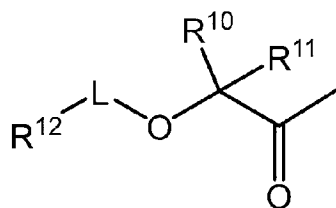
[0042] また、例えば、上記式(1)において、 $-\text{O}-\text{L}-\text{R}^{12}$ で表される基は、水酸基又は以下から選択される基であってもよい。

[0043] [化3]



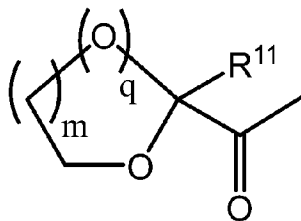
[0044] また、例えば、上記式(1)において、

[0045] [化4]



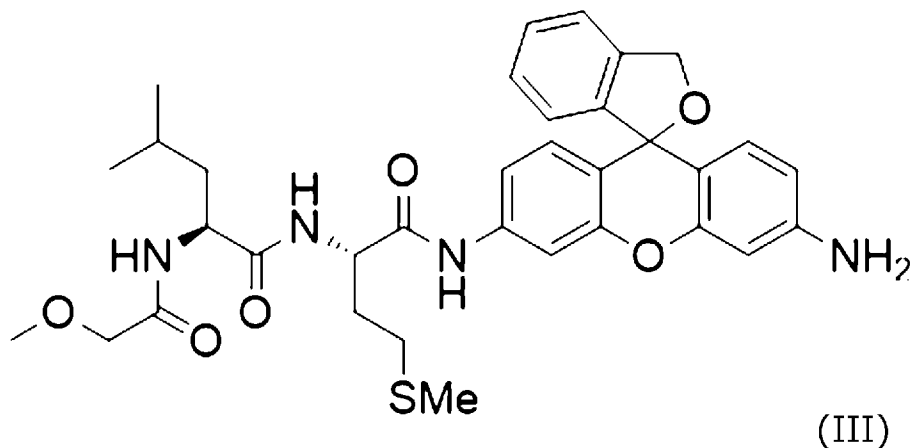
で表される部分構造は、以下の式（式中、 m は1～3の整数、 q は0又は1を表す）で表される構造であってもよい。

[0046] [化5]



[0047] 本発明の化合物として、好ましくは、例えば式（III）の化合物を挙げることができる。また、式（III）において、アミノ酸の組み合わせを適宜変更した化合物もまた、本発明の化合物として好ましく例示することができる。

[化6]



[0048] 化合物（I）の塩としては、塩基付加塩、酸付加塩、アミノ酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩；アンモニウム塩、メチルアミン塩、ジメチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩、N，N－ビス（ヒドロキシエチル）ピペラジン塩、2－アミノ－2－メチル－1－プロパノール塩、エタノ

ールアミン塩、N-メチルグルカミン塩、L-グルカミン塩、トリエチルアミン塩、ピペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩；又はリジン、 δ -ヒドロキシリジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸との塩を挙げることができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの鉱酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、マンデル酸塩、ケイ皮酸塩、乳酸塩、グリコール酸塩、グルクロン酸塩、アスコルビン酸塩、ニコチン酸塩、サリチル酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。アミノ酸塩としてはグリシン塩などを例示することができる。もっとも、本発明の化合物の塩はこれらに限定されることはない。

[0049] 化合物（I）は、置換基の種類に応じて1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があります、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合があります。純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。また、一般式（I）で表される化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。本明細書において「化合物（I）」との言及は、それが明らかに不適合である場合を除き、明示されていない場合にも、化合物（I）の異性体の任意の混合物又は特定の立体異性体、化合物（I）の薬理的に許容される塩、水和物及び溶媒和物、並びに化合物（I）の薬理的に許容される塩の水和物又は溶媒和物をも含む。

[0050] 別の態様において、本発明は化合物（I）を含む蛍光プローブに関する。本発明の蛍光プローブは、酵素との接触により、蛍光応答をするプローブである。好ましくは、本発明の蛍光プローブは、酵素と反応しない状態では蛍

光を発せず、酵素と反応することで蛍光を発する。このような酵素としては、カルパインが含まれる。すなわち、該蛍光プローブは、カルパインの存在下で蛍光応答をすることから、カルパイン活性検出用とすることができる。また、本発明は化合物（１）又はその塩を有効成分として含むカルパイン活性測定剤を含む。

[0051] カルパインは、ヒトのカルパインー１（ μ -カルパイン、 μ CANP、 μ 80K、カルパインⅠ、CDP Ⅰ）の触媒ドメインに有意に相同性のある配列領域を有する遺伝子産物であり、カルパインー１～１６を含む。例えば、カルパインー１はCAPN1とCAPNS1のヘテロ二量体であり、カルパインー２は、CAPN2とCAPNS1とのヘテロ二量体である。カルパインが種々の疾患に関与することが知られているため、化合物（１）は、カルパイン活性に関連する疾患の診断薬として利用することができる。よって、本発明は、化合物（１）を含有する、カルパイン活性に関連する疾患の診断用組成物に関する。

[0052] カルパイン活性に関連する疾患とは、カルパインの発現又はその活性が発症又は増悪化に寄与する疾患であり得る。カルパイン活性に関連する疾患としては、例えば、正常眼圧緑内障を含む緑内障、常染色体優性新生血管炎症性硝子体網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性、糖尿病に伴う網膜神経障害又は網膜血管閉塞性疾患、網膜虚血などの網膜疾患又は網膜神経障害、あるいは白内障などの眼疾患；筋ジストロフィなどの筋疾患；糖尿病；急性食道炎、多発性硬化症、特発性炎症性筋疾患、自己免疫性脳炎などの炎症性疾患又は自己免疫疾患；脊髄損傷、パーキンソン病、神経変性疾患、滑脳症、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症などの神経疾患；心虚血再灌流障害、慢性心疾患、腹部大動脈瘤・アテローム性動脈硬化症などの心・血管疾患；黒色腫、乳がん、大腸がん、腎がん、胃がん、子宮頸がん、卵巣がん、軟部肉腫などのがん；脳腫瘍；加齢症候群；早老症；マラリア感染症、トリパノソーマ症、アフリカ睡眠病、シストソーマ（住血吸虫）症、リーシュマニア症、鎌形赤血球症などの寄生虫・病原性微生物の感染症；外傷性脳障害；マカ

ドジョセフ病；子癇前症；肺線維症を挙げることができる。

[0053] 本発明の化合物（１）は、カルパイン阻害剤と組み合わせて使用することができる。具体的には、化合物（１）は、カルパイン阻害剤の適応や治療効果を判定するために使用され得る。よって、本発明は、治療対象候補又は当該候補由来のサンプルにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答を指標にして、カルパイン阻害剤に対する感受性を有する治療対象を同定又は選択すること、及び、当該感受性を有する治療対象に、カルパイン阻害剤を有効成分として含有する医薬組成物を投与すること、を含む、カルパイン活性に関連する疾患の治療方法に関する。本発明はまた、治療対象にカルパイン阻害剤を有効成分として含有する医薬組成物を投与すること、及び、当該治療対象又は治療対象由来のサンプルにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答を指標にして、当該医薬組成物の治療効果を判定すること、を含む、医薬組成物の治療効果の判定方法に関する。本発明はさらに、カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療するための医薬組成物であって、治療対象候補又は当該候補由来のサンプルにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答を指標にして、カルパイン阻害剤に対する感受性を有すると判定された治療対象に投与される、医薬組成物に関する。本発明はさらに、該医薬組成物の製造におけるカルパイン阻害剤の使用にも関する。治療対象候補又は当該候補由来のサンプルなどにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答は、蛍光イメージング手法を用いて可視化又は画像化することができる。例えば、治療対象候補又は当該候補由来のサンプルなどにおいて測定される化合物（１）からの蛍光強度に基づいて、カルパインの濃度若しくは量又はカルパイン活性を得ることができる。カルパイン阻害剤に対する感受性を有する治療対象の同定又は選択は、例えば、後述のＤ項に記載の方法を用いて行うことができる。また、医薬組成物の治療効果の判定は、例えば、後述のＣ項に記載の方法を用いて行うことができる。上記医薬組成物の対象疾患としては、上述のカルパイン活性に関連する疾患であ

ればよく、例えば、緑内障疾患であってもよい。本発明はまた、カルパイン活性に関連する疾患の予防において、予防対象にカルパイン阻害剤を有効成分として含有する医薬組成物を投与すること、及び、当該予防対象又は予防対象由来のサンプルにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答を指標にして、当該医薬組成物の予防効果を判定すること、を含む、医薬組成物の予防効果の判定方法に関する。予防対象の同定又は選択は、治療対象の同定又は選択と同様にして行うことができる。治療対象又は予防対象は、代表的には哺乳類対象である。

[0054] 一態様において本発明の蛍光プローブ（より具体的には、化合物（１））は、カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を用いた当該疾患の治療又は予防において、その効果の程度を判定するために、当該医薬組成物と組み合わせて用いられ得る。別の態様において本発明の蛍光プローブ（より具体的には、化合物（１））は、治療対象候補又は予防対象候補が、カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を用いた治療対象又は予防対象に該当するか否かを予め検査するための診断薬（いわゆる、コンパニオン診断薬）として用いられ得る。

[0055] 一態様において本発明は、化合物（１）を有効成分として含有する、がん外科治療又はがん検査において用いられるがん診断薬又はがん領域特定用医薬組成物であってよく、がん外科治療又はがん検査としては、例えば、開頭、開胸、若しくは開腹などの開創手術、鏡視下手術、又は内視鏡検査をあげることができる。本発明のがん診断薬又はがん領域特定用医薬組成物は、術中迅速診断用とすることもできる。

[0056] 本発明の蛍光プローブ（より具体的には、化合物（１））は、一態様において、カテプシンと反応しない状態では蛍光を発せず、カテプシンと反応することで蛍光を発する。すなわち、該蛍光プローブは、カテプシンの存在下で蛍光応答をすることから、カテプシン活性検出用とすることができる。

[0057] カテプシンは、リソソームに局在する酸性プロテアーゼの総称であり、システインを活性部位とするカテプシンB、C、F、H、K、L 1、L 2、O、S、W、X/Z、セリンを活性部位とするカテプシンA、G、アスパラギン酸を活性部位とするカテプシンD、Eを含む。カテプシンは腓液に含まれていることから、カテプシンの存在下で蛍光応答をする本発明の蛍光プローブ（より具体的には、化合物（1））は、腓液の検出に用いることができる。よって、一態様において本発明は、化合物（1）を含む腓液検出用キットであり得る。キットは、サンプル採取器具、サンプル処理液などの試薬を含んでいてもよく、さらに、検出に必要な器具などを含んでいてもよい。

[0058] 本発明はまた、以下の方法を提供する。

[A] サンプル中のカルパイン活性の測定方法であって、化合物（1）とサンプルとを接触させること、及び、上記接触後の化合物（1）からの蛍光を測定することを含む方法。

[B 1] 哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の診断のための情報を提供する方法であって、化合物（1）と、上記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、及び上記接触後の化合物（1）からの蛍光を測定すること、を含む方法。

[B 2] 哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の診断方法であって、化合物（1）を、上記哺乳類対象に投与すること、上記投与後の化合物（1）からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいて上記哺乳類対象がカルパイン活性に関連する疾患に罹患している可能性を判定すること、を含む方法。

[C] カルパイン活性に関連する疾患に対する候補化合物の治療効果を判定するための試験方法であって、カルパイン活性に関連する疾患モデルにおいて、候補化合物が未投与及び投与のサンプルを調製すること、化合物（1）と、上記サンプルとを接触させること、及び上記接触後の化合物（1）からの蛍光を測定すること、を含む方法。

[D 1] 哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患のモニタリング

のための情報を提供する方法であって、化合物（１）と、上記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、上記前記接触後の化合物（１）からの蛍光を測定すること、を含む方法。

〔Ｄ２〕哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患のモニタリング方法であって、化合物（１）を、上記哺乳類対象に投与すること、上記投与後の化合物（１）からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいてカルパイン活性に関連する疾患の経過を判定すること、を含む方法。

[0059] 本発明はまた、カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物であって、治療若しくは予防対象候補又は該候補由来のサンプルにおけるカルパインと化合物（１）との相互作用による蛍光応答を指標にして、カルパイン阻害剤に対する感受性を有すると判定された治療又は予防対象に投与される、医薬組成物を提供する。

発明の効果

[0060] 本発明によって提供されるプローブは、従来型のHMRGプローブと比較して、カルパインとの反応性が向上していることから、より高感度にカルパイン活性を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0061] [図１]（a）は各pHにおける化合物１９の吸収スペクトルであり、（b）は各pHにおける化合物１９の蛍光スペクトルである。

[図２]（a）は化合物１９へのカルパインー１添加による吸収スペクトルの変化を示した図であり、（b）は化合物１９へのカルパインー１添加による蛍光スペクトルの変化を示した図である。

[図３]化合物１９へのカルパインー１添加によるHPLCクロマトグラムである。

[図４]化合物１６及び化合物１９へのカルパインー１添加による蛍光強度の経時変化を示した図である。

[図５]（a）は化合物１６及び化合物１９－２５へのカルパインー１添加１０

分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(b)は化合物16-18及び化合物26-29へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(c)は化合物16及び化合物30-36へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフである。

[図6] (a)は化合物37へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(b)は化合物42へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(c)は化合物45へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフである。

[図7] (a)は化合物48へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(b)は化合物51へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(c)は化合物53へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフである。

[図8] (a)は化合物55へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(b)は化合物57へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフであり、(c)は化合物59へのカルパイン-1添加による蛍光強度の経時変化を示したグラフである。

[図9] (a)は化合物37-41へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(b)は化合物42-44へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(c)は化合物45-47へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフである。

[図10] (a)は化合物48-50へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(b)は化合物51及び化合物52へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(c)は化合物53及び化合物54へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフである。

[図11] (a)は化合物55及び化合物56へのカルパイン-1添加10分後

における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(b)は化合物57及び化合物58へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフであり、(c)は化合物59-66へのカルパイン-1添加10分後における蛍光強度の変化を示したグラフである。

[図12](a)は化合物16を用いた生細胞イメージングであり、(b)は化合物19を用いた生細胞イメージングである。

[図13](a)は化合物20を用いた生細胞イメージングであり、(b)は化合物21を用いた生細胞イメージングであり、(c)は化合物22を用いた生細胞イメージングである。

[図14](a)は化合物23を用いた生細胞イメージングであり、(b)は化合物38を用いた生細胞イメージングであり、(c)は化合物56を用いた生細胞イメージングである。

[図15]化合物19投与の眼底撮影像(ラット)である。

[図16]化合物19投与の眼底におけるHMRG陽性細胞数(ラット)である。

[図17]NMDA投与群、化合物19投与の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図18]PBS投与群、化合物19投与の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図19]NMDA投与群、化合物16投与(19 μ L)の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図20]NMDA投与群、化合物16投与(38 μ L)の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図21]PBS投与群、化合物16投与(19 μ L)の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図22]PBS投与群、化合物16投与(38 μ L)の眼底撮影像(ウサギ)である。

[図23]化合物16及び化合物19投与の眼底におけるHMRG陽性細胞数(ウサギ)である。

[図24]化合物19を用いた網膜神経節細胞の蛍光イメージングである。

[図25]化合物19を用いたiPS細胞由来3次元立体網膜組織の蛍光撮影像（グルタミン酸最終濃度 0 μ M）である。

[図26]化合物19を用いたiPS細胞由来3次元立体網膜組織の蛍光撮影像（グルタミン酸最終濃度 300 μ M）である。

[図27]化合物19を用いたiPS細胞由来3次元立体網膜組織の蛍光撮影像（グルタミン酸最終濃度 1 mM）である。

[図28]化合物19を用いたiPS細胞由来3次元立体網膜組織の蛍光強度を示したグラフである。

[図29]化合物19と化合物16の蛍光強度の比較結果を示したグラフである。

[図30]カルパイン阻害剤存在下又は非存在下での化合物19を用いた生細胞イメージングである。

[図31]カルパイン阻害剤投与群又はコントロール群における化合物19投与の眼底撮影像（ラット）である。

[図32]カルパイン阻害剤投与群又はコントロール群における化合物19投与の眼底撮影像（ラット）におけるHMRG陽性細胞数である。

[図33]カルパイン阻害剤投与群又はコントロール群における化合物19投与の眼底撮影像（ラット）におけるHMRG陽性細胞数である。

[図34]カルパイン阻害剤投与群又はコントロール群における化合物19投与の眼底撮影像（ラット）におけるHMRG陽性細胞数である。

[図35]各カルパイン阻害剤投与群における化合物19投与の眼底撮影像におけるHMRG陽性細胞数である。

[図36]化合物19を用いたiPS細胞由来RGC軸索モデルの蛍光撮影像である。

[図37]化合物19へのカテプシンB添加又は未添加時の蛍光強度の経時変化を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0062] (A. 化合物(1)の合成)

化合物(1)は、任意の適切な方法で合成することができる。例えば、化合物(1)は、本願実施例2に記載の方法に準じて合成することができる。実施例2に示す合成スキームにおいて、工程aでは、HMRGのN原子とアミノ酸のC末端でアミド結合を形成する。以降は、固相合成法により、工程bにて化合物A1をレジンに担持し、順次、工程cによるアミノ酸の保護基の脱保護、工程dにてアミノ酸の伸長を行う。工程eでアミノ酸の保護基を脱保護し、工程fにて式(1)の $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ の部分構造を有するカルボキシ化合物 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})-COOH$ 又は誘導される酸無水物もしくは酸ハロゲン化物などを反応させて、ペプチド鎖のN末端に、 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基を有するアミド基を結合する。工程gでレジンからの切り出しを行うことで、式(1)の化合物を得ることができる。工程gでは、適宜、各置換基R及びアミノ酸A、アミノ酸Bに含まれる保護基を同時に脱保護することもできる。得られる式(1)の化合物の粗精製物は、更に精製してもよい。例えば、得られた粗精製物は逆相カラムクロマトグラフィーで精製してもよい。

[0063] (B. カルパイン活性の測定方法又は検出方法)

化合物(1)は、カルパインと反応して蛍光応答をすることから、カルパイン又はカルパイン活性の測定又は検出に用いることができる。よって、別の態様において、本発明は、サンプル中のカルパイン(又はカルパイン活性)の測定方法(又は検出方法)であって、化合物(1)とサンプルとを接触させること、及び、接触後の化合物(1)からの蛍光を測定(又は検出)することを含む方法に関する。蛍光が検出された場合には、該サンプル中にカルパイン又はカルパイン活性が存在することを意味し得る。また、検出された蛍光が該サンプルのカルパイン濃度又はカルパイン活性の程度を示し得る。カルパイン(又はカルパイン活性)の測定及び検出は、測定された蛍光強度を絶対値として用いることにより行ってもよく、又は測定された蛍光強度を蛍光強度の経時的な変化量や、コントロールの蛍光強度を比較対象として測定してもよい。このようなコントロールの蛍光強度は、サンプルと同時に

コントロールを測定することにより得てもよいし、予めコントロールを使用して得た値を使用してもよい。化合物（１）とサンプルとの接触は、化合物（１）を含む溶液又は懸濁液を添加、塗布、噴霧、あるいは注入することにより行うことが挙げられるが、サンプルの形態や測定環境などに応じて適宜選択することができる。接触時の温度条件はカルパインがその触媒作用を発揮し得る限りにおいて制限されない。接触後の化合物（１）からの蛍光は、接触後の任意の時点（例えば、接触直後から数時間経過するまでの任意の時点）で、４４０～５１０ｎｍ程度の可視光を励起波長としてサンプルに照射して測定することができる。また、必要に応じてあらかじめ濃度や活性の判明しているカルパイン含有サンプルを同様の方法で測定して標準曲線を作成し、当該標準曲線を利用してカルパイン濃度や活性を算出してもよい。サンプルとしては、生体由来の組織、液体、又はそれらの処理物；細胞培養物、細胞培養上清、細胞破碎物、細胞溶解液、又はそれらの処理物；単離精製した酵素などを用いることができ、例えば、後述の哺乳類対象由来のサンプルが例示できる。また、上記カルパイン活性の測定又は検出方法は、測定又は検出対象のサンプルとして生体を適用することによって、*in vivo*でも行われ得る。*in vivo*で上記カルパイン活性の測定又は検出方法を行う場合、化合物（１）とサンプルとの接触は、化合物（１）を測定又は検出対象の生体に投与することによって行われる。化合物（１）の生体への投与は、カルパイン活性の測定又は検出の対象部位に応じて任意の適切な経路及び方法が選択され得る。投与方法としては、例えば、点眼、点鼻、点耳、注射、点滴などが挙げられる。測定又は検出対象の生体としては、後述の哺乳類対象が挙げられる。

[0064] 以下の方法におけるカルパインの測定は、上述の測定方法に準じて行うことができる。

[0065] （Ｃ．カルパイン活性に関連する疾患の診断方法）

上述の通り、カルパインは、種々の疾患に関与することが知られているため、化合物（１）を利用してカルパイン活性を測定することにより、カルパ

イン活性に関連する疾患を診断したり、その病状を判定したり、病態をモニタリングしたりすることができる。よって、本発明は、哺乳類対象におけるカルpain活性に関連する疾患の診断のための情報を提供する方法であって、化合物（1）と、上記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、及び、上記接触後の化合物（1）からの蛍光を測定することを含む方法に関する。本発明の方法によって提供される情報に基づいて、上記診断対象である哺乳類対象におけるカルpain活性に関連する疾患を診断することができる。提供される情報としては、蛍光強度、蛍光を発する細胞数（例えば、単位面積当たりにおける所定の強度以上の蛍光を発する細胞数）、蛍光を発する範囲の面積などの蛍光応答を反映する情報が挙げられる。カルpain活性に関連する疾患の診断は、例えば、上記提供される情報を所定の基準値と比較することによって行われ得る。このような基準値としては、カルpain活性に関連する疾患に罹患していない哺乳類対象（以下、陰性コントロール）由来のサンプルにおける測定値、カルpain活性に関連する疾患に罹患している哺乳類対象（以下、陽性コントロール）由来のサンプルにおける測定値などが挙げられる。上記基準値は、サンプルの測定と同時に測定された値でもよく、予め測定された値であってもよく、予め測定された値から統計学的に算出した値であってもよい。1つの実施形態においては、陰性コントロールに基づく基準値を超える蛍光応答を反映する情報が提供された場合及び／又は陽性コントロールに基づく基準値以上の蛍光応答を反映する情報が提供された場合に、カルpain活性に関連する疾患に罹患している可能性があるとして診断することができる。別の実施形態においては、陰性コントロールに基づく基準値以下の蛍光応答を反映する情報が提供された場合及び／又は陽性コントロールに基づく基準値未満の蛍光応答を反映する情報が提供された場合に、カルpain活性に関連する疾患に罹患していない可能性があるとして診断することができる。また、本発明は、哺乳類対象におけるカルpain活性に関連する疾患のモニタリングのための情報を提供する方法であって、化合物（1）と、上記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、及び、上記接

触後の化合物（１）からの蛍光を測定することを含む方法に関する。本発明の方法によって提供される情報に基づいて、上記哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の経過を判定することができる。提供される情報としては、上記と同様の蛍光応答を反映する情報が挙げられる。カルパイン活性に関連する疾患の経過の判定は、例えば、上記提供される情報をそれ以前に当該哺乳類対象から得られた情報と比較することによって行われ得る。１つの実施形態においては、以前に得られた蛍光応答よりも低い蛍光応答を反映する情報が提供された場合に、カルパイン活性に関連する疾患が治癒又は改善している、あるいは予防されている可能性があるとは判定することができる。別の実施形態においては、以前に得られた蛍光応答以上の蛍光応答を反映する情報が提供された場合に、カルパイン活性に関連する疾患が治癒又は改善していない、あるいは予防されていない可能性があるとは判定することができる。さらに別の実施形態においては、以前に得られた蛍光応答と同程度の蛍光応答を反映する情報が提供された場合に、カルパイン活性に関連する疾患の進行が抑制されている又は発症が予防されている可能性があるとは判定することができる。

[0066] 別の態様において本発明は、哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の診断方法であって、化合物（１）を、上記哺乳類対象に投与すること、上記投与後の化合物（１）からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいて上記哺乳類対象がカルパイン活性に関連する疾患に罹患している可能性を判定すること、を含む方法に関する。上記測定結果は、例えば、上記と同様に、蛍光強度、蛍光を発する細胞数（例えば、単位面積当たりにおける所定の強度以上の蛍光を発する細胞数）、蛍光を発する範囲の面積などの蛍光応答を反映する情報であり得る。上記哺乳類対象がカルパイン活性に関連する疾患に罹患している可能性の判定は、例えば、上記測定結果を所定の基準値と比較することによって行われ得る。このような基準値としては、陰性コントロールにおける測定値、陽性コントロールにおける測定値などが挙げられる。上記基準値は、サンプルの測定と同時に測定された値でもよく

、予め測定された値又は予め測定された値から統計学的に算出した値であってもよい。1つの実施形態においては、測定結果が陰性コントロールに基づく基準値を超える場合及び／又は陽性コントロールに基づく基準値以上である場合に、上記哺乳類対象がカルパイン活性に関連する疾患に罹患している可能性があるとは判定することができる。別の実施形態においては、測定結果が陰性コントロールに基づく基準値以下である場合及び／又は陽性コントロールに基づく基準値未満である場合に、上記哺乳類対象がカルパイン活性に関連する疾患に罹患していない可能性があるとは判定することができる。また、本発明は、哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患のモニタリング方法であって、化合物（I）を、上記哺乳類対象に投与すること、上記投与後の化合物（I）からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいてカルパイン活性に関連する疾患の経過を判定すること、を含む方法に関する。上記測定結果は、例えば、上記蛍光応答を反映する情報であり得る。上記哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の経過の判定は、例えば、上記測定結果をそれ以前に当該哺乳類対象において測定された測定結果と比較することによって行われ得る。1つの実施形態においては、以前の測定結果以上の蛍光応答を示す測定結果が得られた場合、カルパイン活性に関連する疾患が治癒又は改善していない、あるいは予防されていない可能性があるとは判定することができる。別の実施形態においては、以前の測定結果より低い蛍光応答を示す測定結果が得られた場合、カルパイン活性に関連する疾患が治癒又は改善している、あるいは予防されている可能性があるとは判定することができる。さらに別の実施形態においては、以前の測定結果と同程度の蛍光応答を示す測定結果が得られた場合、カルパイン活性に関連する疾患の進行が抑制されている又は発症が予防されている可能性があるとは判定することができる。

[0067] 「モニタリング」は、候補治療薬を上記哺乳類対象に投与し、又は候補となる治療方法を上記哺乳類対象に適用した後に、その治療効果を判定することを含み得る。よって、上記モニタリング方法は、モニタリング工程の前に

候補治療薬を上記哺乳類対象に投与すること、又は候補となる治療方法を上記哺乳類対象に適用することを含み、疾患が治癒又は改善していないことが当該治療薬又は治療方法が効果がないことを示し、疾患が治癒又は改善していること又は疾患の進行が抑制されていることが当該治療薬又は治療方法が効果があることを示していてもよい。

[0068] 例えば、眼科領域においては、化合物（I）を哺乳類対象に投与する場合、眼科領域で既に汎用されているフルオレセイン蛍光眼底造影検査機器を用いることにより、蛍光観察が可能である。

[0069] 本明細書において、「哺乳類対象由来のサンプル」とは、哺乳類対象から採取された検体を意味し、組織又は体液が挙げられる。「体液」とは、被験者由来の液体を意味し、例えば、全血、血漿、血清、全血又は血球の溶血液などの血液；唾液；尿；涙液；浸出液；リンパ液；漿液；髄液；脳脊髄液；関節液；眼房水；硝子体液又はそれらの分画物若しくは処理物、並びにこれらの希釈液や濃縮液が挙げられる。

[0070] カルパイン活性に関連する疾患に罹患していないコントロールサンプルとしては、カルパイン活性に関連する疾患に罹患していないことが知られている哺乳類対象由来のサンプル、又はカルパイン活性に関連する疾患に罹患していないことが明らかな哺乳類対象由来のサンプルであってもよい。カルパイン活性に関連する疾患に罹患しているコントロールサンプルとしては、カルパイン活性に関連する疾患に罹患していることが知られている哺乳類対象由来のサンプル、又はカルパイン活性に関連する疾患に罹患していることが明らかな哺乳類対象由来のサンプルであってもよい。

[0071] 上記哺乳類対象由来のサンプルと化合物（I）との接触は、*in vivo*、*in vitro*、又は*ex vivo*で行うことができる。

[0072] 「哺乳類対象」としては、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ラットなどの哺乳動物を含み、好ましくは、ヒトである。

[0073] 本明細書全体において、判定や可能性は、それにより哺乳類対象（例えば

、患者)の状態を予測することを意味し、100%の正確さで判断可能であることを意味するものではない。

[0074] 本明細書全般において、比較される「蛍光強度」は、必要に応じて当該蛍光強度から算出された値(例えば、濃度、量、又は活性値)に変換された値であってもよい。例えば、あらかじめ濃度の判明しているカルパイン含有サンプルを同様の方法で測定して標準曲線を作成し、当該標準曲線を利用してカルパイン濃度を算出し、カルパイン濃度を用いてサンプル間の蛍光強度の上昇(濃度上昇)を比較してもよい。

[0075] (D. カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象の選択及び治療方法)

カルパイン活性に関連する疾患の治療薬としてカルパイン阻害剤が知られている。特に、当該疾患において、カルパイン濃度が高いか又はカルパイン活性が強い場合、カルパイン阻害剤が効果を奏しやすい(換言すれば、カルパイン阻害剤に対する感受性を有する)と考えられる。よって、本発明は、カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象を選択する方法であって、化合物(1)と、被験哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、上記接触後の化合物(1)からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいてカルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象を選択することを含む方法に関する。あるいは、本発明は、カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象を選択する方法であって、化合物(1)を被験哺乳類対象に投与すること、上記投与後の化合物(1)からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいてカルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象を選択することを含む方法に関する。上記測定結果は、例えば、C項に記載の蛍光応答を反映する情報であり得る。カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象の選択は、例えば、上記測定結果を所定の基準値と比較することによって行われ得る。このような基準値としては、陰性コントロールにおける測定値、陽性コントロールにおける測定値などが挙げられる。上記基準値は、サンプルの測定と同時に測定された値でもよく、予め測定された値又は予め測定された値から統計学的に算出した値であってもよい。1つの実施形態においては、測定

結果が陰性コントロールに基づく基準値を超える場合及び／又は陽性コントロールに基づく基準値以上である場合に、上記被験哺乳類対象を、カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象として選択することができる。

[0076] 上記カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象の治療方法は、更に、カルパイン阻害剤により治療可能な哺乳類対象として選択された哺乳類対象にカルパイン阻害剤を投与することを含んでいてもよい。

[0077] カルパイン阻害剤としては、ALLNaI、PD150606、calpeptin、MDL28170、Calpain inhibitor XI (AK295)、calpastatin peptide (CAST)、SNJ-1945、SJA6017、ABT-957、BDA-410、Macrocyclic aldehyde (CAT811)、NH₂-GRKKRRQRRRPP QPDALKSRTLRCOOH (Tat- μ CL)、Dipeptidyl α , β -unsaturated ester、Hypervalent organotellurium compound (RF19)、Sm-p80 (組換えタンパク質) を挙げることができる。

[0078] (E. カルパイン活性に関連する疾患の治療薬のスクリーニング方法)

更には、化合物(1)は特定の候補化合物や治療方法がカルパインレベル又はカルパイン活性に影響を与えるかどうかを測定することに用いることができることから、カルパインを標的とした治療効果を調べることができる。よって、化合物(1)はカルパイン活性に関連する疾患の治療薬のスクリーニング方法に用いることができる。一例として、本発明は、候補化合物又は候補治療方法のカルパイン活性に関連する疾患に対する治療効果を判定するための方法であって、カルパイン活性に関連する疾患モデルに、候補化合物を投与すること又は候補治療方法を適用すること、化合物(1)と上記疾患モデル由来のサンプルとを接触させること又は上記疾患モデルに化合物(1)を投与すること、上記接触又は投与後の化合物(1)からの蛍光を測定すること、及び、測定結果に基づいて上記候補化合物又は候補治療方法のカル

パイン活性に関連する疾患に対する治療効果を判定することを含む方法に関する。上記測定結果は、例えば、C項に記載の蛍光応答を反映する情報であり得る。治療効果の判定は、例えば、上記測定結果を所定の基準値と比較することによって行われ得る。このような基準値としては、候補化合物未投与又は候補治療方法の未適用の疾患モデルにおける測定結果が用いられ得る。

1つの実施形態においては、測定結果が上記所定の基準値以上の蛍光応答を示す場合に、上記化合物又は治療方法にカルパイン活性に関連する疾患に対する治療効果がないと判定することができる。別の実施形態においては、測定結果が上記所定の基準値未満の蛍光応答を示す場合に、上記化合物又は治療方法にカルパイン活性に関連する疾患に対する治療効果があると判定することができる。また、本発明は、カルパイン活性に関連する疾患に対する候補化合物の治療効果を判定するための試験方法であって、カルパイン活性に関連する疾患モデルにおいて、候補化合物が未投与及び投与のサンプルを調製すること、化合物(1)と上記サンプルとを接触させること、及び、上記接触後の化合物(1)からの蛍光を測定すること、を含む方法に関する。当該測定結果に基づいて、上記と同様にして、候補化合物の治療効果を判定することができる。カルパイン活性に関連する疾患モデルとしては、例えば、NMDAで誘導される網膜疾患モデル、グルタミン酸で誘導される網膜神経節細胞障害モデルなどが挙げられる。

[0079] 本明細書全体において、「レベル」とは、数値化された存在量に関する指標を意味し、例えば、濃度、量あるいはその代わりとして用いることができる指標を含む。よって、レベルは蛍光強度などの測定値そのものであってもよいし、濃度に換算された値であってもよい。また、レベルは、絶対的な数値（存在量、単位面積当たりの存在量など）であってもよいし、又は必要に応じて設定された比較対照と比較した相対的な数値であってもよい

[0080] 本明細書全般において、カルパイン活性に関連する疾患が眼科疾患である場合、化合物(1)の投与は、硝子体注射により行うことができる。

[0081] (F. カテプシン活性の測定方法又は検出方法)

化合物（１）は、カテプシンと反応して蛍光応答をすることから、カテプシン又はカテプシン活性の測定又は検出に用いることができる。よって、別の態様において、本発明は、サンプル中のカテプシン（又はカテプシン活性）の測定方法（又は検出方法）であって、化合物（１）とサンプルとを接触させること、及び、接触後の化合物（１）からの蛍光を測定（又は検出）することを含む方法に関する。蛍光が検出された場合には、該サンプル中にカテプシン又はカテプシン活性が存在することを意味し得る。また、検出された蛍光が該サンプルのカテプシン濃度又はカテプシン活性の程度を示し得る。カテプシン（又はカテプシン活性）の測定及び検出は、測定された蛍光強度を絶対値として用いることにより行ってもよく、又は測定された蛍光強度を蛍光強度の経時的な変化量や、コントロールの蛍光強度を比較対象として測定してもよい。このようなコントロールの蛍光強度は、サンプルと同時にコントロールを測定することにより得てもよいし、予めコントロールを使用して得た値を使用してもよい。サンプル、化合物（１）とサンプルとの接触、接触後の化合物（１）からの蛍光の測定については、カルパイン活性の測定方法又は検出方法に関して記載した通りである。

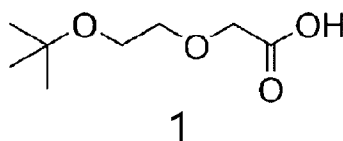
[0082] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。なお、本願明細書全体を通じて引用する文献は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

実施例

[0083] （実施例１）化合物１－５の合成

（１）化合物１の合成

[0084] [化7]



[0085] NaH（１．２０ｇ，３０．０ｍｍｏｌ）のTHF溶液（３０ｍＬ）に、

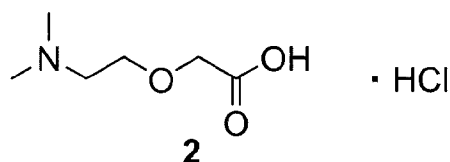
0℃にて、Ethylene Glycol Monotertbutyl Ether (1.4 mL, 11.0 mmol)、Bromoacetic acid (1.39 g, 10.0 mmol) を加え、室温にて14時間攪拌した。反応溶液に水を加え、ジエチルエーテルで抽出した。水相に2 M塩酸を加え、溶液を中和し、酢酸エチルで抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して目的化合物を得た (1.22 g, 69%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (9H, s), 3.55–3.59 (2H, m), 3.72–3.77 (2H, m), 4.14 (2H, s)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 199.0946; found, 199.0941 (−0.5 mmu)

[0086] (2) 化合物2の合成

[0087] [化8]



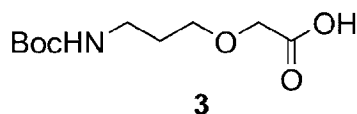
NaH (1.20 g, 30.0 mmol) のTHF溶液 (30 mL) に、0℃にて、N,N-dimethylethanolamine (1.1 mL, 11.0 mmol)、Bromoacetic acid (1.39 g, 10.0 mmol) を加え、室温にて14時間攪拌した。反応溶液に2 M塩酸を加え、ジエチルエーテルで抽出した。水相を回収し、溶媒を減圧留去して目的化合物を得た (1.80 g, 98%)。

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 2.95 (6H, s), 3.39 (2H, t, $J=4.8$ Hz), 3.89 (2H, t, $J=4.8$ Hz), 4.19 (2H, s)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 148.0968; found, 148.0967 (−0.1 mmu)

[0088] (3) 化合物3の合成

[0089] [化9]



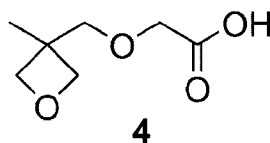
[0090] NaH (0.40g, 10.0mmol) のTHF溶液に、0℃にて、3-(tert-butoxycarbonylamino)-1-propanol (1.0mL, 5.88mmol)、Bromoacetic acid (742mg, 5.34mmol) を加え、室温にて19.5時間攪拌した。反応溶液に蒸留水を加え、ジクロロメタンで抽出した。水相に2M塩酸を加え、溶液を中和し、ジクロロメタンで抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン／酢酸エチル＝85／15→35／65）で精製し、目的化合物を得た（0.578g, 46%）。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.44 (9H, s), 1.78 (2H, q, $J=6.0\text{Hz}$), 3.32 (2H, br-s), 3.60 (2H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 4.09 (2H, s)

HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 256.1161; found, 256.1151 (−1.0mmu)

[0091] (4) 化合物4の合成

[0092] [化10]



[0093] NaH (2.00g, 50.0mmol) のTHF溶液に、0℃にて、3-Methyl-3-oxethanemethanol (2.4mL, 3

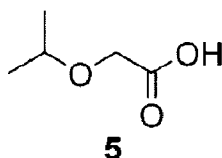
0.0 mmol)、Bromoacetic acid (1.39 g, 10.0 mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応溶液に水を加え、ジエチルエーテルで抽出した。水相に2 M塩酸を加え、溶液を中和し、酢酸エチルで抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して目的化合物を得た (1.7 g, 79%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.34 (3H, s), 3.66 (2H, s), 4.19 (2H, s), 4.42 (2H, d, $J=6.0$ Hz), 4.60 (2H, d, $J=6.0$ Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 183.0633; found, 183.0629 (−0.4 mmu)

[0094] (5) 化合物5の合成

[0095] [化11]



[0096] NaH (0.60 g, 15.0 mmol) のTHF溶液に、0℃にて、2-プロパノール (0.77 mL, 10.0 mmol)、Bromoacetic acid (0.695 g, 5.0 mmol) を加え、室温にて21時間攪拌した。反応溶液に水を加え、ジクロロメタンで抽出した。水相に2 M塩酸を加え、溶液を中和し、ジクロロメタンで抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して目的化合物を得た (0.219 g, 37%)。

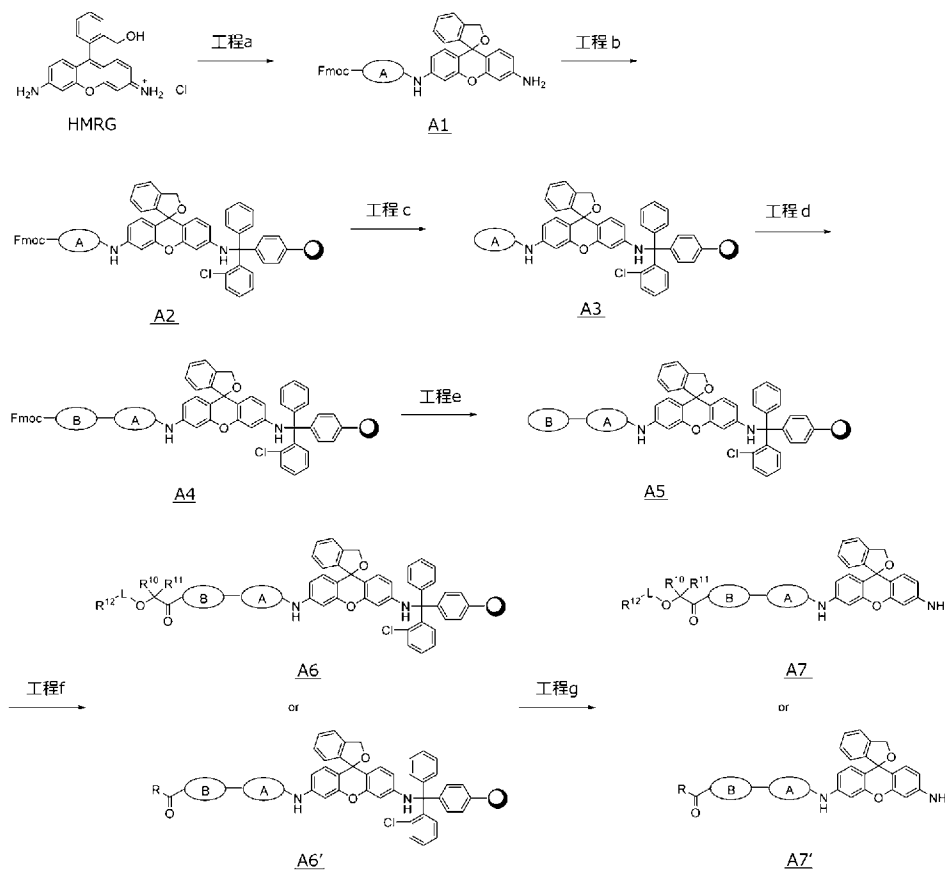
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (6H, d, $J=6.0$ Hz), 3.76 (1H, qn, $J=6.0$ Hz), 4.08 (2H, s)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 119.0703; found, 119.0704 (0.1 mmu)

[0097] (実施例2) 化合物A 7 及び化合物A 7 ′ の合成

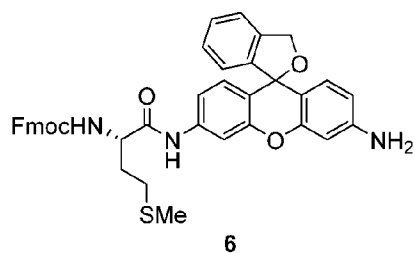
以下のスキームに記載のステップにより、種々のペプチド部位を有する化合物A 7 及び化合物A 7 ′ を合成した。

[0098] [化12]



[0099] (1) 化合物A 1 として、化合物6～化合物1 5 を合成した。

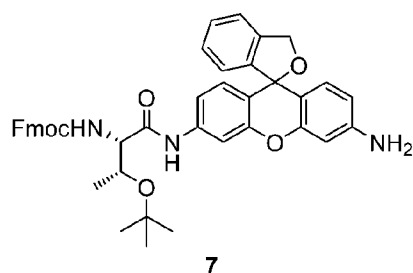
[0100] [化13]



[0101] HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 670.2370

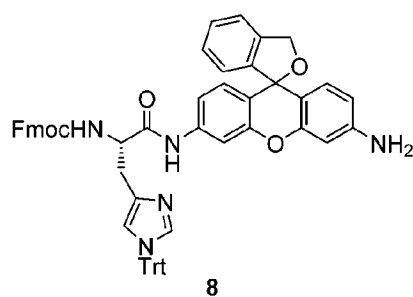
; found, 670.2311 (−5.9 mmu)

[0102] [化14]



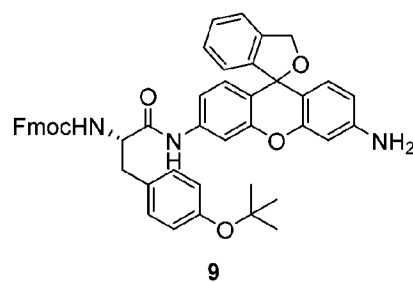
HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 696.3068; found, 696.3093 (2.5 mmu)

[0103] [化15]



HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 918.3650; found, 918.3627 (−2.3 mmu)

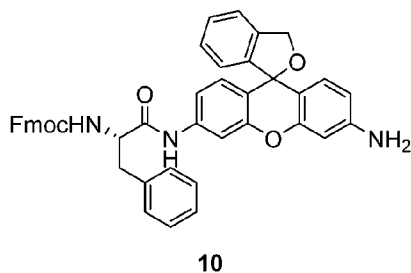
[0104] [化16]



HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 758.3225; found, 758.3242 (1.7 mmu)

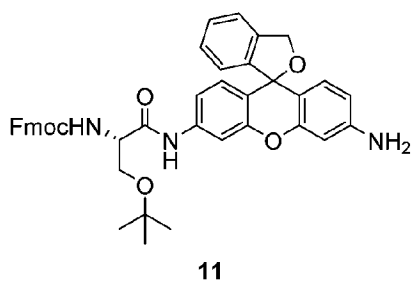
[0105]

[化17]



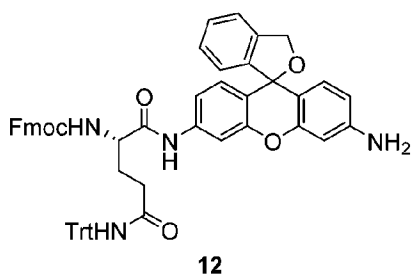
HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 686.2649; found, 686.2654 (0.5 mmu)

[0106] [化18]



HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 682.2912; found, 682.2914 (0.2 mmu)

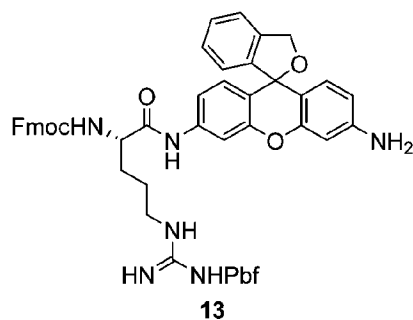
[0107] [化19]



HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 909.3647; found, 909.3628 (-1.9 mmu)

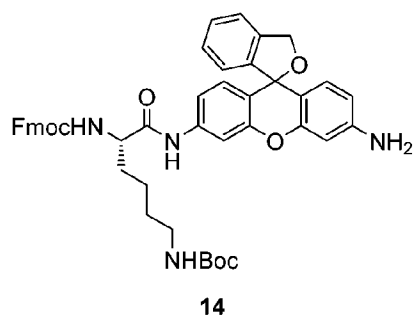
[0108]

[化20]



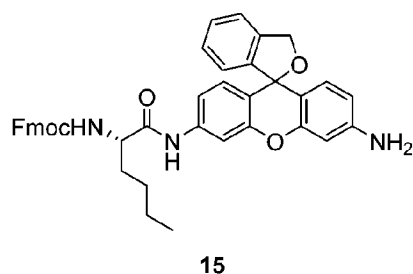
HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 947.3797; found, 947.3770 (−2.7 mmu)

[0109] [化21]



HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 767.3439; found, 767.3486 (4.7 mmu)

[0110] [化22]

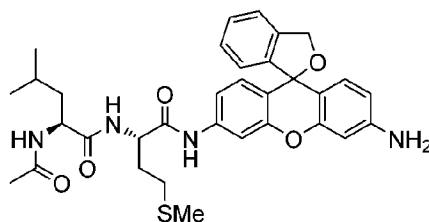


HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 652.2806; found, 652.2797 (−0.9 mmu)

[0111] (2) 化合物A7及び化合物A7'として、化合物16～60を合成した。

(2-1) 化合物16の合成

[0112] [化23]



16

[0113] HMRG塩酸塩（五稜化薬株式会社，1.41g，2.83mmol）のDMF溶液（13mL）に、室温にてDIPEA（2.1mL，12.0mmol）、Fmoc-Met-OH（1.49g，4.00mmol）、HATU（1.52g，4.00mmol）を加え、15時間攪拌した。溶媒を減圧留去して、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにて粗精製した。得られた化合物6は、さらなる精製をせずに、次工程へ使用した。

[0114] 化合物6のジクロロメタン溶液（10mL）に、室温にてDIPEA（1.0mL，5.73mmol）、Cl-Trt（2-Cl）-Resin（818mg，1.33mmol）を加え、15時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンをDMFで洗浄し、化合物A2（A=Met）を得た。

[0115] 化合物A2（A=Met）に20%Piperidine/DMF溶液（10mL）を加え、室温にて1時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンをDMF、CH₂Cl₂の順に洗浄し、化合物A3（A=Met）を得た。

[0116] 化合物A3（A=Met）に、DMF（20mL）、DIPEA（2.1mL，12.0mmol）、Fmoc-Leu-OH（1.41g，3.99mmol）、HATU（1.52g，3.99mmol）を順次加え、室温にて13.5時間振とうした。レジンをDMFで洗浄し、化合物A4（A=Met，B=Leu）を得た。

[0117] 化合物A4（A=Met，B=Leu）に20%Piperidine/DMF溶液（10mL）を加え、室温にて1時間振とうした。反応溶液をろ

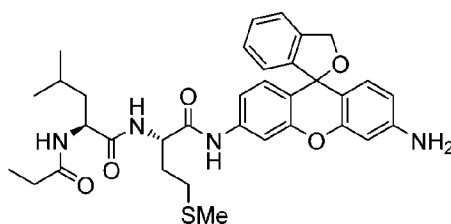
過し、レジンにDMF、 CH_2Cl_2 の順に洗浄した。レジンに真空乾燥して化合物A5 (A=Met, B=Leu)を得た。

[0118] 0.05 mmol相当の化合物A5 (A=Met, B=Leu)に20% $\text{Ac}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 溶液を1 mL加え、室温にて1時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンに CH_2Cl_2 で洗浄し、化合物A6' (A=Met, B=Leu, R=Me)を得た。

[0119] 化合物A6' (A=Met, B=Leu, R=Me)にTFA/TES/ $\text{H}_2\text{O}=15:1:1$ 溶液(1 mL)を加え、遮光下で室温にて1時間振とうした。レジンにろ去し、ろ液を減圧留去した。残渣を逆相カラムクロマトグラフィー(H_2O (0.1% TFA)/ CH_3CN (0.1% TFA)=80:20→65:35)で精製し、目的化合物を得た(7.6 mg)。
HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 603.2636; found, 603.2643 (0.7 mmu)

[0120] (2-2) 化合物17の合成

[0121] [化24]



17

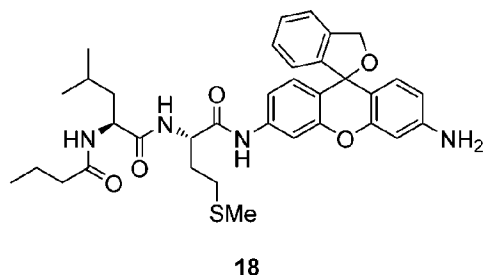
[0122] 0.05 mmol相当の化合物A5 (A=Met, B=Leu)にDMF (4 mL)、DIPEA (0.09 mL, 0.50 mmol)、Propionic acid (0.014 mL, 0.15 mmol)、HATU (57.0 mg, 0.15 mmol)を順次加え、室温にて12時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンにDMF、 CH_2Cl_2 で順次洗浄した。TFA/TES/ $\text{H}_2\text{O}=15:1:1$ 溶液(1 mL)を加え、遮光下で室温にて1

時間振とうした。レジン进行ろ去し、ろ液を減圧留去した。残渣を逆相カラムクロマトグラフィー（H₂O（0.1%TFA）／CH₃CN（0.1%TFA）＝80：20→65：35）で精製し、目的化合物のTFA塩を得た（7.5mg）。

HRMS（ESI⁺）：calcd for [M+H]⁺, 617.2792；found, 617.2802（1.0mmu）

[0123]（2-3）化合物18の合成

[0124] [化25]

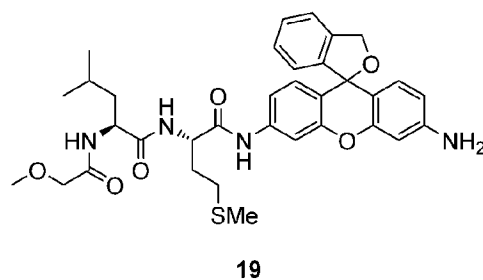


[0125] 化合物18を（2-2）と同様の手法によって合成した。カルボン酸にはButyric Acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た（7.3mg）。

HRMS（ESI⁺）：calcd for [M+H]⁺, 631.2949；found, 631.2962（1.3mmu）

[0126]（2-4）化合物19の合成

[0127] [化26]



[0128] 化合物19を（2-2）と同様の手法によって合成した。カルボン酸には

Methoxyacetic Acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(12.8mg)。

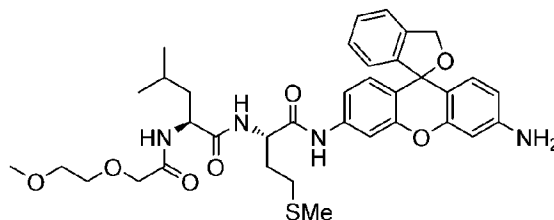
^1H NMR (400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{Na}_2\text{CO}_3$)

δ 0.94 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 0.97 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 1.59–1.73 (3H, m), 1.97–2.08 (1H, m), 2.09 (3H, s), 2.11–2.21 (1H, m), 2.49–2.65 (2H, m), 3.43 (3H, s), 3.94 (2H, s), 4.51 (1H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 4.59 (1H, dd, $J=5.2, 9.2\text{Hz}$), 5.25 (2H, s), 6.41 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 6.50 (1H, s), 6.65 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 6.81 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$), 6.84 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$), 7.13 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$), 7.27 (1H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 7.38 (1H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 7.41 (1H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 7.62 (1H, s)

HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 633.2741; found, 633.2723 (−1.8mmu)

[0129] (2-5) 化合物20の合成

[0130] [化27]



20

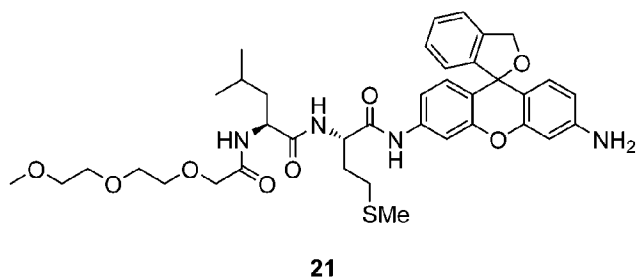
[0131] 化合物20を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には2-(2-Methoxyethoxy)acetic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(16.3mg)。

HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 677.300

3 ; f o u n d , 6 7 7 . 2 9 9 7 (- 0 . 6 m m u)

[0132] (2-6) 化合物21の合成

[0133] [化28]

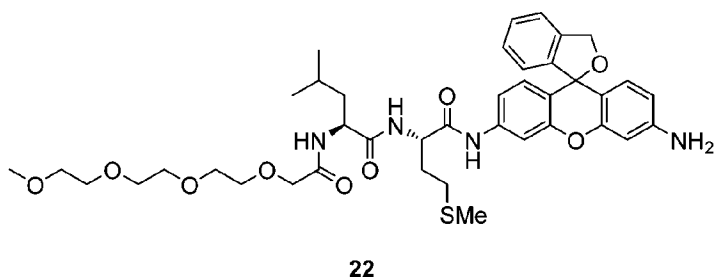


[0134] 化合物21を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetic
acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(19.7mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 721.3266;
found, 721.3246 (-2.0mmu)

[0135] (2-7) 化合物22の合成

[0136] [化29]

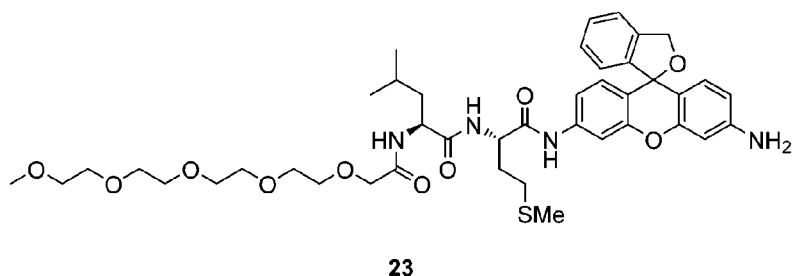


化合物22を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]et
hoxy]acetic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た
(5.9mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 765.3528;
found, 765.3520 (-0.8mmu)

[0137] (2-8) 化合物23の合成

[0138] [化30]

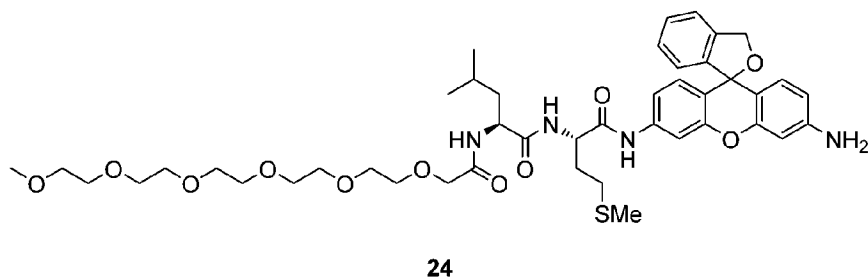


[0139] 化合物23を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
 [2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acidを用い、目的化合物の
 TFA塩を得た(10.8mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 809.3790; found, 809.3821 (3.1mmu)

[0140] (2-9) 化合物24の合成

[0141] [化31]

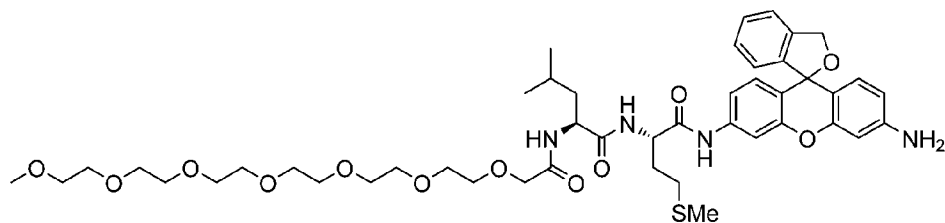


[0142] 化合物24を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
 [2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acid
 を用い、目的化合物のTFA塩を得た(10.8mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 853.4052; found, 853.4048 (-0.4mmu)

[0143] (2-10) 化合物25の合成

[0144] [化32]



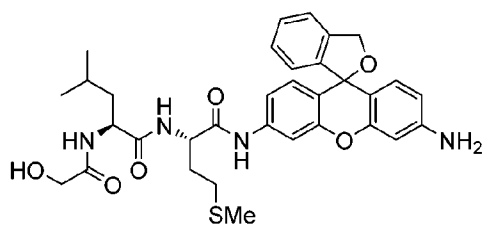
25

[0145] 化合物25を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
 [2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(10.8mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 897.4314; found, 897.4312 (-0.2mmu)

[0146] (2-11) 化合物26の合成

[0147] [化33]



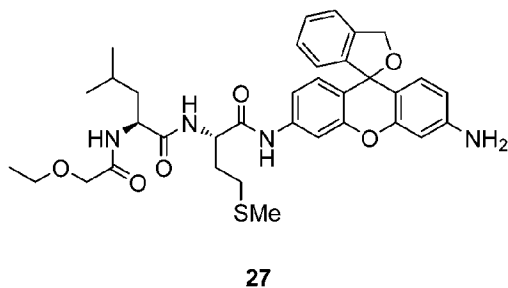
26

[0148] 化合物26を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には
 Hydroxyacetic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(7.1mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 619.2585; found, 619.2595 (1.0mmu)

[0149] (2-12) 化合物27の合成

[0150] [化34]

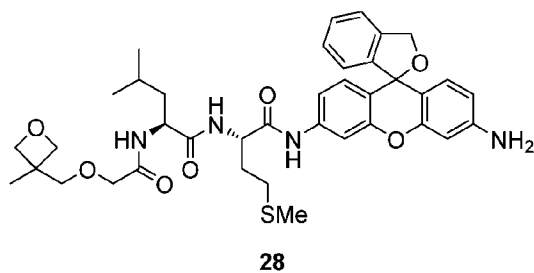


[0151] 化合物27を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には Ethoxyacetic acid を用い、目的化合物の TFA 塩を得た (8.2 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 647.2898; found, 647.2898 (0.0 mmu)

[0152] (2-13) 化合物28の合成

[0153] [化35]



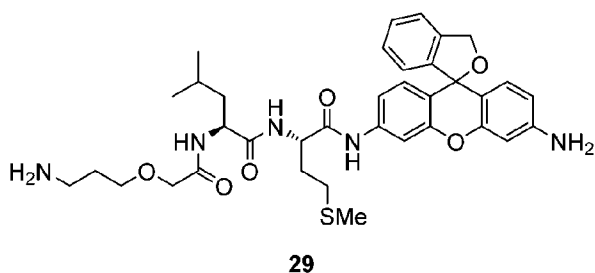
[0154] 化合物28を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には 化合物4 を用い、目的化合物の TFA 塩を得た (11.8 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 703.3160; found, 703.3160 (0.0 mmu)

[0155] (2-14) 化合物29の合成

[0156]

[化36]

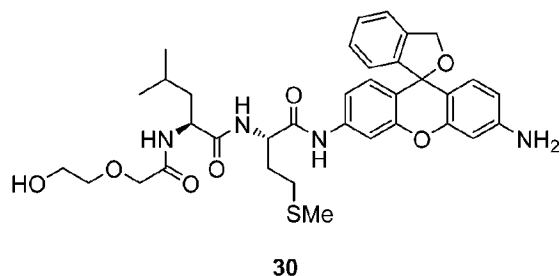


化合物 29 を (2-2) と同様の手法によって合成した。カルボン酸には化合物 3 を用い、目的化合物の TFA 塩を得た (11.8 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 676.3163; found, 676.3137 (−2.6 mmu)

[0157] (2-15) 化合物 30 の合成

[0158] [化37]



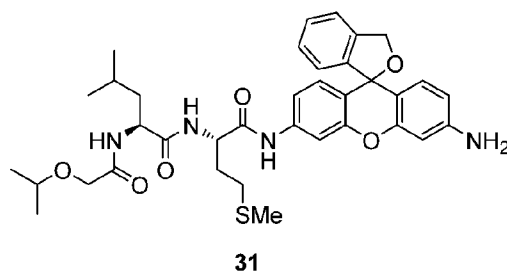
[0159] 化合物 30 を (2-2) と同様の手法によって合成した。カルボン酸には化合物 1 を用い、目的化合物の TFA 塩を得た (13.9 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 663.2847; found, 663.2837 (−1.0 mmu)

[0160] (2-16) 化合物 31 の合成

[0161]

[化38]

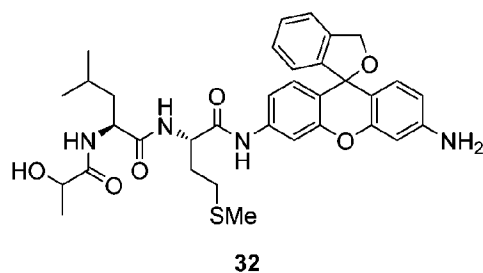


[0162] 化合物31を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には化合物5を用い、目的化合物のTFA塩を得た(28.3mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 661.3054; found, 661.3044 (−1.0mmu)

[0163] (2-17) 化合物32の合成

[0164] [化39]



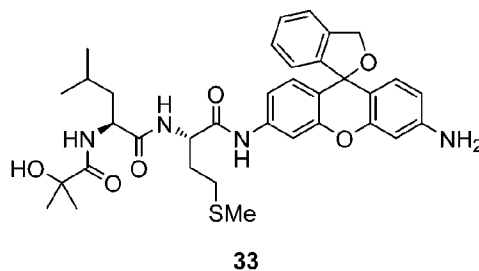
[0165] 化合物32を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸にはDL-Lactic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(26.2mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 633.2741; found, 633.2731 (−1.0mmu)

[0166] (2-18) 化合物33の合成

[0167]

[化40]

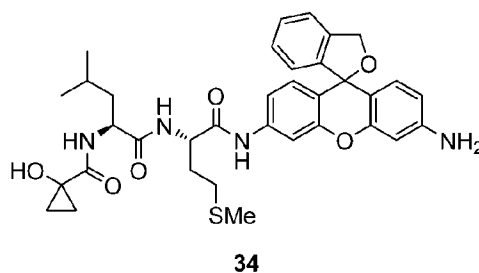


[0168] 化合物33を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には 2-Hydroxyisobutyric acidを用い、目的化合物の TFA塩を得た(19.9mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 647.2898; found, 647.2890 (−0.8mmu)

[0169] (2-19) 化合物34の合成

[0170] [化41]



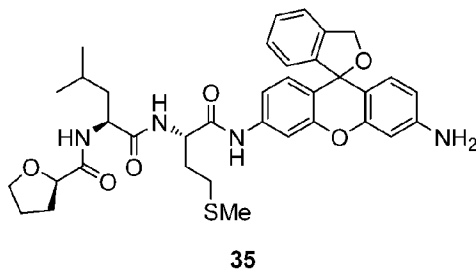
[0171] 化合物34を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には 1-Hydroxycyclopropanecarboxylic acidを用い、目的化合物の TFA塩を得た(18.4mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 645.2741; found, 645.2717 (−2.4mmu)

[0172] (2-20) 化合物35の合成

[0173]

[化42]

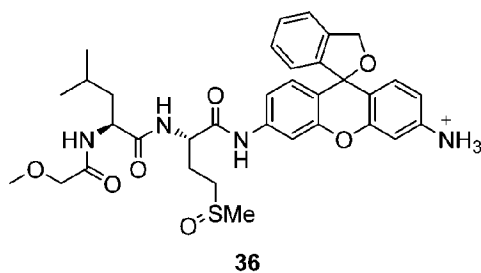


化合物35を(2-2)と同様の手法によって合成した。カルボン酸には(R) - (+) - Tetrahydrofuran-2-carboxylic acidを用い、目的化合物のTFA塩を得た(6.4mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 659.2898; found, 659.2885 (-1.3mmu)

[0174] (2-21) 化合物36の合成

[0175] [化43]



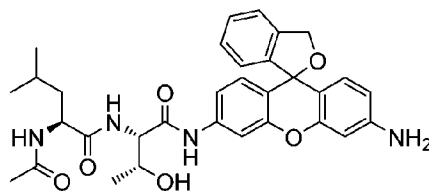
[0176] 化合物19(0.0410g, 0.0647mmol)のTHF溶液(2mL)に、過酸化水素水(0.5mL)を加え、室温にて2時間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して目的化合物を得た(0.0417g, 99%)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 649.2690; found, 649.2660 (-3.0mmu)

[0177] (2-22) 化合物37の合成

[0178]

[化44]



37

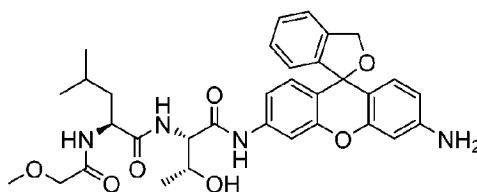
[0179] 化合物37を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Thr(tBu)-OHに置き換え、化合物7を合成した。化合物7から同様の工程により化合物A5(A=Thr(tBu), B=Leu)を合成し、化合物A5(A=Thr(tBu), B=Leu)を0.05mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(5.5mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 573.2708; found, 573.2715 (0.7mmu)

[0180] (2-23) 化合物38の合成

[0181] [化45]



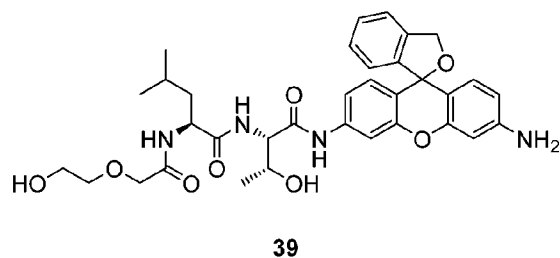
38

[0182] 化合物38を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.05mmol相当の化合物A5(A=Thr(tBu), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(10.7mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 603.2813; found, 603.2818 (0.5mmu)

[0183] (2-24) 化合物39の合成

[0184] [化46]

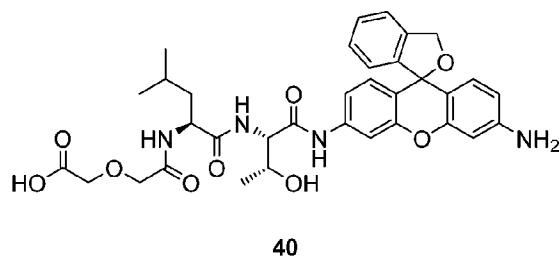


[0185] 化合物39を(2-15)と同様の工程によって合成した。0.05 mmol相当の化合物A5 (A=Thr(tBu), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(3.6 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 633.2919; found, 633.2876 (−4.3 mmu)

[0186] (2-25) 化合物40の合成

[0187] [化47]



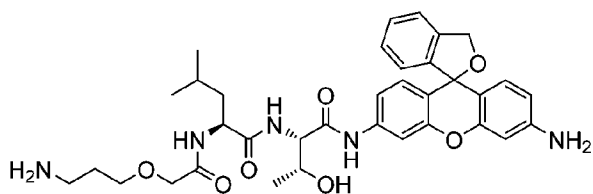
[0188] 0.05 mmol相当の化合物A5 (A=Thr(tBu), B=Leu)のCH₂Cl₂溶液(1 mL)に、DIPEA(0.043 mL, 0.25 mmol)、Diglycolic anhydride(29.0 mg, 0.25 mmol)を加え、室温にて24時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンをCH₂Cl₂で洗浄した。TFA/TES/H₂O=15:1:1溶液(1 mL)を加え、遮光下で室温にて1時間振とうした。レジンをろ去し、ろ液を減圧留去した。残渣を逆相カラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物を得た(18.6 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 647.271

2 ; f o u n d、647. 2716 (0. 4 m m u)

[0189] (2-26) 化合物41の合成

[0190] [化48]



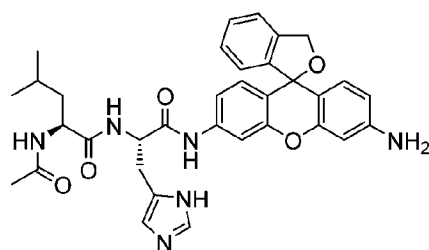
41

[0191] 化合物41を(2-14)と同様の手法によって合成した。0. 05 m m o l 相当の化合物A5 (A=T h r (t B u)、B=L e u)を用いて、目的化合物のT F A塩を得た(16. 5 m g)。

H R M S (E S I⁺) : c a l c d f o r [M+H]⁺, 646. 3235 ; f o u n d, 646. 3206 (-2. 9 m m u)

[0192] (2-27) 化合物42の合成

[0193] [化49]



42

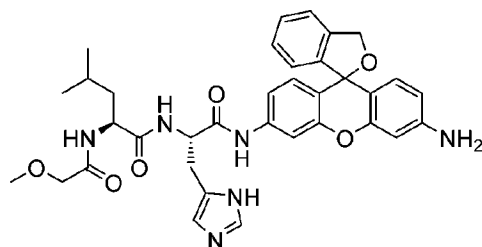
[0194] 化合物42を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をF m o c - M e t - O HからF m o c - H i s (T r t) - O Hに置き換え、化合物8を合成した。化合物8から同様の工程により化合物A5 (A=H i s (T r t)、B=L e u)を合成し、化合物A5 (A=H i s (T r t)、B=L e u)を0. 05 m m o l 相当用いて、目的化合物のT F A塩を得た(7. 9 m g)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 609.2820; found, 609.2820 (0 mmu)

[0195] (2-28) 化合物43の合成

[0196] [化50]



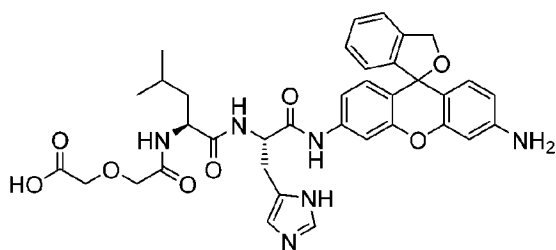
43

[0197] 化合物43を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.10 mmol相当の化合物A5 (A=His (Trt), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(15.9 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 639.2926; found, 639.2949 (2.3 mmu)

[0198] (2-29) 化合物44の合成

[0199] [化51]



44

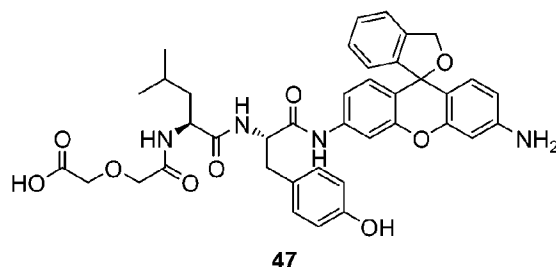
[0200] 化合物44を(2-25)と同様の工程によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=His (Trt), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(11.2 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 683.282

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 708.3392
; found, 708.3358 (−3.4 mmu)

[0207] (2-32) 化合物47の合成

[0208] [化54]

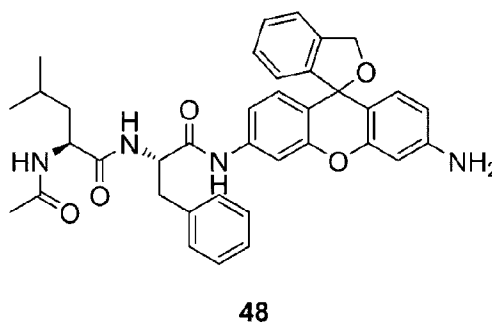


[0209] 化合物47を(2-25)と同様の工程によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Tyr(tBu), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(22.1 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 709.2868
; found, 709.2868 (0.0 mmu)

[0210] (2-33) 化合物48の合成

[0211] [化55]



[0212] 化合物48を(2-1)と同様の手法によって合成した。

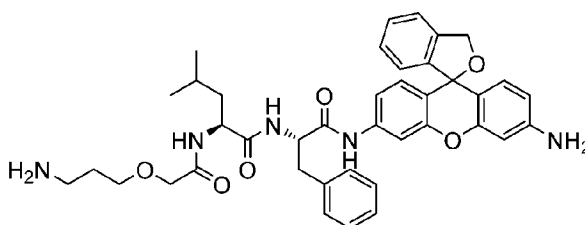
工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Phe-OHに置き換え、化合物10を合成した。化合物10から同様の工程により化合物A5 (A=Phe, B=Leu)を合成し、化合物A5 (A=Phe, B=Leu)を0.025 mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得

た (3.0 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 619.2915
; found, 619.2910 (−0.5 mmu)

[0213] (2-34) 化合物49の合成

[0214] [化56]



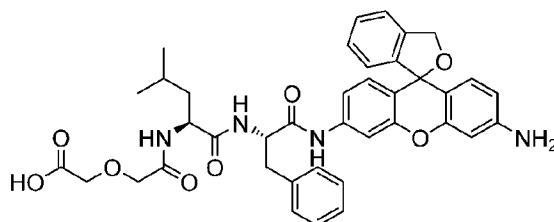
49

[0215] 化合物49を(2-14)と同様の工程によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Phe, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(15.4 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 692.3443
; found, 692.3412 (−3.1 mmu)

[0216] (2-35) 化合物50の合成

[0217] [化57]



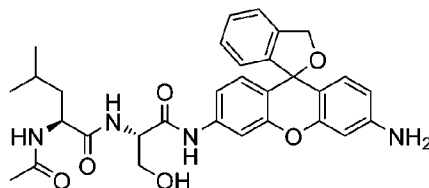
50

[0218] 化合物50を(2-25)と同様の工程によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Phe, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(7.3 mg)。

HRMS (ESI⁺) : calcd for [M+H]⁺, 693.2919
; found, 693.2922 (0.2 mmu)

[0219] (2-36) 化合物51の合成

[0220] [化58]



51

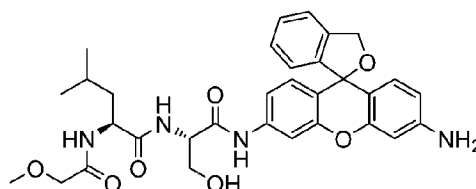
[0221] 化合物51を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Ser(tBu)-OHに置き換え、化合物11を合成した。化合物11から同様の工程により化合物A5(A=Ser(tBu), B=Leu)を合成し、化合物A5(A=Ser(tBu), B=Leu)を0.025mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(6.4mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 559.2551; found, 559.2555 (0.4mmu)

[0222] (2-37) 化合物52の合成

[0223] [化59]



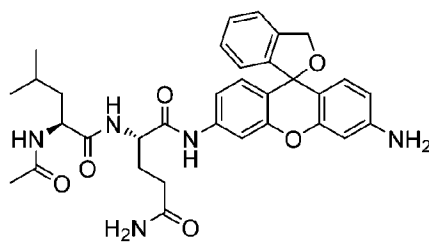
52

[0224] 化合物52を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.025mmol相当の化合物A5(A=Ser(tBu), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(7.2mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 589.2657; found, 589.2692 (3.5mmu)

[0225] (2-38) 化合物53の合成

[0226] [化60]



53

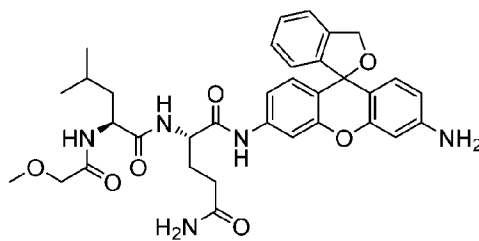
化合物53を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Gln(Trt)-OHに置き換え、化合物12を合成した。化合物12から同様の工程により化合物A5(A=Gln(Trt), B=Leu)を合成し、化合物A5(A=Gln(Trt), B=Leu)を0.025mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(2.9mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 600.2817; found, 600.2821 (0.4mmu)

[0227] (2-39) 化合物54の合成

[0228] [化61]



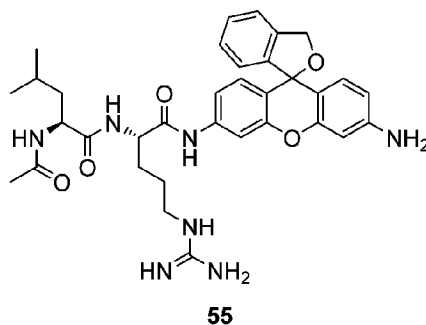
54

[0229] 化合物54を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.025mmol相当の化合物A5(A=Gln(Trt), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(3.4mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 630.2922; found, 630.2916 (-0.6mmu)

[0230] (2-40) 化合物55の合成

[0231] [化62]



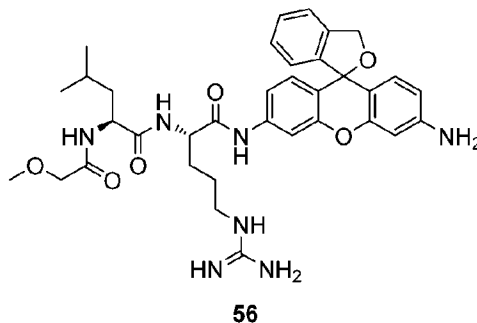
[0232] 化合物55を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Arg(Pbf)-OHに置き換え、化合物13を合成した。化合物13から同様の工程により化合物A5(A=Arg(Pbf), B=Leu)を合成し、化合物A5(A=Arg(Pbf), B=Leu)を0.025mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(1.5mg)。

HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 628.3242; found, 628.3237 (-0.5mmu)

[0233] (2-41) 化合物56の合成

[0234] [化63]



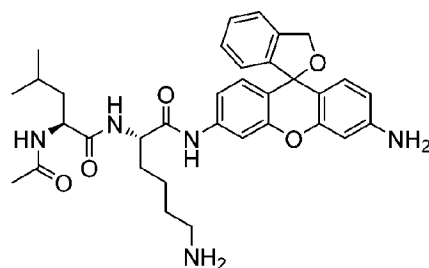
化合物56を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.025mmol相当の化合物A5(A=Arg(Pbf), B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(3.3mg)。

HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 658.3348

; found, 658.3353 (0.5 mmu)

[0235] (2-42) 化合物57の合成

[0236] [化64]



57

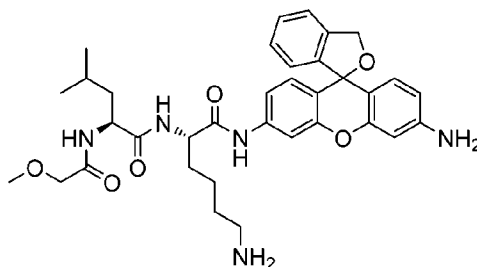
[0237] 化合物57を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Lys(Boc)-OHに置き換え、化合物14を合成した。化合物14から同様の工程により化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu)を合成し、化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu)を0.050 mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(11.1 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 600.3180
; found, 600.3176 (-0.4 mmu)

[0238] (2-43) 化合物58の合成

[0239] [化65]



58

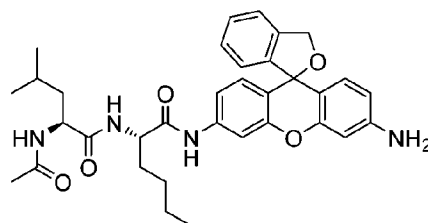
[0240] 化合物58を(2-4)と同様の工程によって合成した。0.10 mmol相当の化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu)を用いて、目的

化合物のTFA塩を得た(12.1mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 630.3286
; found, 630.3287 (0.1mmu)

[0241] (2-44) 化合物59の合成

[0242] [化66]



59

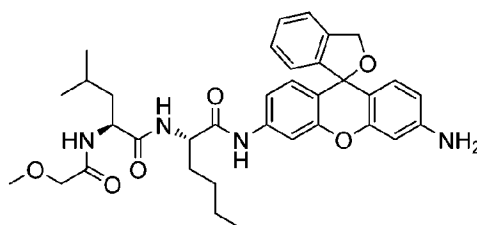
[0243] 化合物59を(2-1)と同様の手法によって合成した。

工程(a)のアミノ酸をFmoc-Met-OHからFmoc-Nle-OHに置き換え、化合物15を合成した。化合物15から同様の工程により化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を合成し、化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を0.050mmol相当用いて、目的化合物のTFA塩を得た(6.7mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 585.3071
; found, 585.3077 (0.6mmu)

[0244] (2-45) 化合物60の合成

[0245] [化67]



60

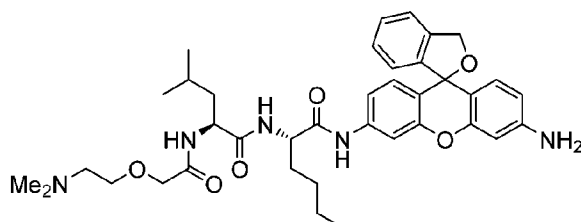
[0246] 化合物60を(2-4)と同様の手法によって合成した。0.050mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物の

TFA塩を得た(8.2mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 615.3177
; found, 615.3184 (0.7mmu)

[0247] (2-46) 化合物61の合成

[0248] [化68]



61

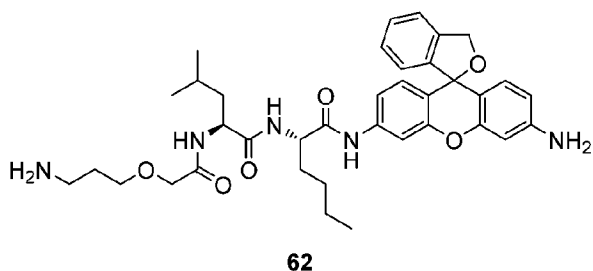
[0249] 0.05mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu) にDMF (4mL)、DIPEA (0.09mL, 0.50mmol)、化合物2 (29.6mg, 0.20mmol)、HATU (57.0mg, 0.15mmol) を順次加え、室温にて24時間振とうした。反応溶液をろ過し、レジンをDMF、CH₂Cl₂で順次洗浄した。TFA/TES/H₂O=15:1:1溶液(1mL)を加え、遮光下で室温にて1時間振とうした。レジンをろ去し、ろ液を減圧留去した。残渣を逆相カラムクロマトグラフィー(H₂O (0.1%TFA)/CH₃CN (0.1%TFA)=80:20→65:35)で精製し、目的化合物のTFA塩を得た(4.7mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 672.3756
; found, 672.3762 (0.6mmu)

[0250] (2-47) 化合物62の合成

[0251]

[化69]

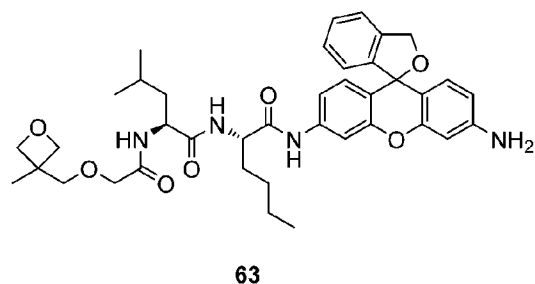


[0252] 化合物62を(2-14)と同様の手法によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(12.1 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 658.3599; found, 658.3608 (0.9 mmu)

[0253] (2-48) 化合物63の合成

[0254] [化70]



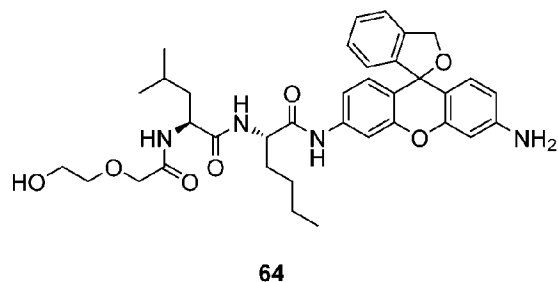
[0255] 化合物63を(2-13)と同様の手法によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(9.1 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 685.3596; found, 685.3607 (1.1 mmu)

[0256] (2-49) 化合物64の合成

[0257]

[化71]

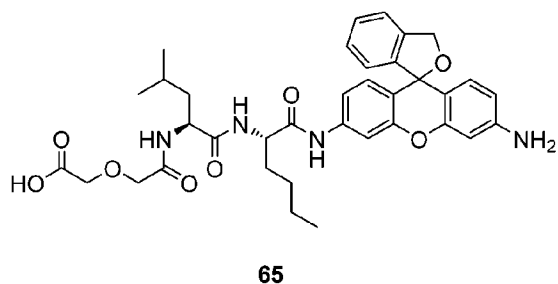


[0258] 化合物64を(2-15)と同様の手法によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(4.6 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 645.3283; found, 645.3256 (−2.7 mmu)

[0259] (2-50) 化合物65の合成

[0260] [化72]



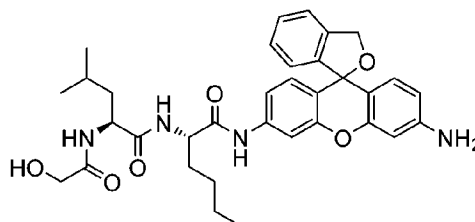
[0261] 化合物65を(2-25)と同様の手法によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(8.0 mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 659.3075; found, 659.3073 (−0.2 mmu)

[0262] (2-51) 化合物66の合成

[0263]

[化73]



66

[0264] 化合物66を(2-11)と同様の手法によって合成した。0.050 mmol相当の化合物A5 (A=Nle, B=Leu)を用いて、目的化合物のTFA塩を得た(5.5mg)。

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 601.3021; found, 601.3046 (2.5 mmu)

[0265] (実施例3) 蛍光プローブの光学特性

化合物19の各pHにおける吸収スペクトル及び蛍光スペクトルをそれぞれ測定した。具体的には、pH2~11の各pHの10 mMリン酸緩衝液に、化合物19のDMSO溶液(0.1 mM)を添加して、最終プローブ濃度1 μM、最終DMSO濃度1%となるように測定溶液を調製した。測定溶液の蛍光スペクトルは励起波長490 nmにて測定した。

[0266] 図1a、bに各pHにおけるスペクトルを示す。本発明の蛍光プローブである化合物19は、中性条件では主に無色無蛍光性となることが示された。

[0267] (実施例4) カルパインに対する蛍光プローブ(化合物19)の反応性

化合物19にカルパイン-1を作用させ、吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの変化を測定した。具体的には、50 mM TRIS緩衝液(pH7.4, 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA)に、化合物19のDMSO溶液(0.5 mM)、カルパイン-1(100 Units) (Calpain-1 from Human Erythrocytes, Cat. No. 208713, Merck Millipore社, 以下同様)を添加して、2 mLの反応溶液を作成した(最終プローブ濃度5 μM)。37℃で酵素反応を実施した。反応溶液の蛍光スペクトルを励起

波長 490 nm にて測定した。また、反応溶液を HPLC クロマトグラフィーにより解析した。コントロールとして、カルパインー 1 未添加の化合物 19（最終濃度 5 μ M）を使用した。

[0268] 吸収及び蛍光スペクトルを測定した結果を図 2（a）、（b）に示す。カルパインー 1 の添加に伴い、プローブ溶液の吸光度及び蛍光強度の増加が観測された。また、HPLC の結果を図 3 に示す。カルパインー 1 との反応によって、化合物 19 のピーク位置が HMRG と同一となった。したがって、カルパインー 1 によって化合物 19 のペプチド部位が加水分解されることで、蛍光物質である HMRG が生成されることが示された。

[0269]（実施例 5）カルパインー 1 による蛍光強度の経時変化

化合物 19 と化合物 16 について、経時的な蛍光アッセイを行った。具体的には、10 μ M の合成した蛍光プローブを含む 50 mM TRIS 緩衝液（pH 7.4, 2 mM EGTA, 2 mM DTE）に、17.4 U/mL のカルパインー 1 及び 5 mM CaCl_2 を加えて、37°C で酵素反応を実施した。陰性対照として、カルパインー 1 や CaCl_2 未添加の各化合物も、同様に測定した。

[0270] カルパインー 1 による蛍光強度の経時変化を測定した結果を図 4 に示す（励起波長 475 nm, 蛍光波長 500–550 nm）。化合物 16 及び化合物 19 は、いずれもカルパインー 1 に対する蛍光プローブとして機能した。特に、化合物 19 は、カルパインー 1 との反応性がより向上していることが示された。また、カルパインの活性化は Ca^{2+} によって引き起こされるため、 Ca^{2+} を含まない溶液中では蛍光上昇は起こらないことが確認された。

[0271]（実施例 6）カルパインに対する蛍光プローブ（化合物 16–36）の反応性

同様に、化合物 16–36 の蛍光アッセイを実施した。10 μ M の合成した蛍光プローブを含む 50 mM TRIS 緩衝液（pH 7.4, 2 mM EGTA, 2 mM DTE）に、50 U/mL（化合物 16, 19–25）又は 17.4 U/mL（化合物 16–18, 26–36）のカルパインー 1 及

び5 mM CaCl_2 を加えて、37℃で酵素反応を実施した。

[0272] カルパインー1添加後10分における蛍光強度の増加を図5(a)及び(b)に示す(励起波長475 nm, 蛍光波長500–550 nm)。いずれの化合物もカルパインー1に対する蛍光プローブとして機能することが示された。また、化合物19–25の蛍光強度は化合物16と比較して大きく、化合物26–29の蛍光強度は化合物16–18と比較して大きかった。カルパインー1添加後30分における蛍光強度の増加を図5(c)に示す(励起波長460 nm, 蛍光波長530 nm)。いずれの化合物もカルパインー1に対する蛍光プローブとして機能することが示された。また、化合物30–36の蛍光強度は化合物16と比較して大きかった。

[0273] 以上より、本発明の化合物である化合物19–36は、比較化合物である化合物16又は化合物17、18と比較して、カルパインとの酵素反応性が向上することが認められた。また、本発明の化合物として、式(1)の R^{10} や R^{11} にアルキル基を有する化合物、 R^{10} と R^{11} で環形成した化合物、及び、 $R^{12}-L$ が R^{10} と環形成をした化合物はいずれもカルパインとの酵素反応性が良好であることが示された。一方で、比較化合物である化合物17、18は、化合物16と比較して蛍光強度が減少した。すなわち、カルパインー1の酵素活性検出への感度向上には、式(1)において、ペプチド鎖のN末端に、 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ 基を有するアミド基が結合することが重要であることが示された。様々な $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ 基が同様に感度向上への効果を示したことから、 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ 基は本実施例に記載された化学構造に限定されることなく、任意の化学構造であっても同様にカルパイン活性検出への感度向上の効果をもたらすことが示唆された。

[0274] (実施例7) カルパインによる蛍光プローブ(化合物37、42、45、48、51、53、55、57、59)の経時変化

[0275] 続いて、化合物37、42、45、48、51、53、55、57、59について、カルパインー1による同様の蛍光アッセイを実施した。具体的に

は、 $10\ \mu\text{M}$ の合成した蛍光プローブを含む $50\ \text{mM}$ TRIS緩衝液（ pH 7.4, $2\ \text{mM}$ EGTA, $2\ \text{mM}$ DTE）に、 $17.4\ \text{U/mL}$ のカルパイン-1及び $5\ \text{mM}$ CaCl_2 を加えて、 37°C で酵素反応を実施した。カルパイン-1を未添加の各化合物をコントロールとして使用した。蛍光強度の時間依存性をプロットした結果を図6～図8に示す（励起波長 $475\ \text{nm}$, 蛍光波長 $500\text{--}550\ \text{nm}$ ）。いずれのプローブも、カルパイン-1と作用することで蛍光強度の増加がみられ、カルパイン-1酵素基質となることが示された。

[0276] （実施例8）カルパインに対する蛍光プローブ（化合物37-66）の反応性

アミノ酸が同一の化合物間において、 $\text{R}^{12}\text{-L-O-}$ 基によるカルパイン-1との反応性への影響を評価するため、化合物37-66について、カルパイン-1による蛍光アッセイを上述の方法に従って実施した。具体的には、 $10\ \mu\text{M}$ の合成した蛍光プローブを含む $50\ \text{mM}$ TRIS緩衝液（ pH 7.4, $2\ \text{mM}$ EGTA, $2\ \text{mM}$ DTE）に、 $17.4\ \text{U/mL}$ のカルパイン1及び $5\ \text{mM}$ CaCl_2 を加えて、 37°C で酵素反応を実施し、カルパイン-1添加10分後における蛍光強度の増加を測定した。

[0277] 得られた結果を図9～図11に示す。いずれの化合物も $\text{R}^{12}\text{-L-O-}$ 基を有する化合物において、 $\text{R}^{12}\text{-L-O-}$ 基を有さない化合物と比較して蛍光強度がより増大することを確認した。アミノ酸A及びBの多様な組み合わせについても、 $\text{R}^{12}\text{-L-O-}$ 基を有する化合物はカルパイン活性を効果的に検出できることが示された。

[0278] 化合物16-66において、カルパイン-1に対する反応性は式（1）中の $\text{R}^{12}\text{-L-O-C}(\text{R}^{10})(\text{R}^{11})$ -基に依存し、 $\text{R}^{12}\text{-L-O-C}(\text{R}^{10})(\text{R}^{11})$ -基が存在する場合に、カルパイン-1に対する反応性向上がみられた。さらには、 $\text{R}^{12}\text{-L-O-C}(\text{R}^{10})(\text{R}^{11})$ -基を有することによるカルパインとの反応性向上は、アミノ酸A及びBの多様な組み合わせに対しても効果がみられた。

[0279] (実施例9) 蛍光プローブ(化合物16及び化合物19)による生細胞イメージング

上述の実験により確認された本発明の化合物とカルパインとの酵素反応性の向上が、細胞内でも同様であるかについて検証した。化合物16と19について、SH-SY5Y細胞におけるカルパイン活性イメージングを実施した。具体的には、SH-SY5Y細胞(American Type Culture Collection, VA, USA)を、ダルベッコ改変イーグル培地/ハムF-12混合培地(DMEM/F-12; Thermo Fisher Scientific)(10%ウシ胎仔血清(FBS; Thermo Fisher Scientific, MA, USA)及び100U/mLペニシリン-100µg/mLストレプトマイシン(PS; Thermo Fisher Scientific)を含む)中、37℃、5%CO₂-95%空気の条件下で培養した。ポリ-D-リジン(Thermo Fisher Scientific)及びラミニン(BD Biosciences, CA, USA)でコートしたマルチウェルプレート(µ-Plate 96 Well; ibidi, Grafelfing, Germany)に、 $6 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 細胞/ウェルの細胞を播種し、培養液でプレインキュベーションした。ウェル内の培養液を除去した後、直ちに200µLのアッセイ液(5µMプローブを含む培養液)を加え、37℃、5%CO₂-95%空気の条件下でインキュベーションし、10分後に共焦点顕微鏡(LSM710, Zeiss, Oberkochen, Germany)で明視野像及び蛍光像を撮影した。

[0280] 図12(a)、(b)で示すように、いずれにおいても化合物を添加することにより、SH-SY5Y細胞内のカルパイン活性を観察することができた。化合物16と比較して、化合物19では明瞭なイメージングができたことから、式(1)中のR¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基による酵素反応性の向上が生細胞イメージングにおいても効果的であることが示された。

[0281] (実施例10) 蛍光プローブによる生細胞イメージング

実施例9と同様に、化合物20-23、化合物38、及び化合物56について、SH-SY5Y細胞におけるカルパイン活性イメージングを実施した。化合物20-23と化合物38は30分間のインキュベーション後に、化合物56は20分間のインキュベーション後に明視野像及び蛍光像を撮影した。図13及び図14に示すように、いずれの化合物においてもSH-SY5Y細胞内のカルパイン活性を観察することができた。

[0282] 上述の実施例で例証したように、本発明により、カルパインをターゲットとした新たな蛍光プローブを提供することができる。具体的には、式(1)が $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基を有することで、カルパインとの酵素反応性が向上したプローブを創出できることを見出した。 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基としては、幅広い基でこのような向上が確認され、例えば、水酸基、カルボキシル基、アルコキシ基、及び／又はアミノ基などの置換基を有している場合においても、良好な酵素反応性を示した。また、 R^{12} と R^{10} 又は R^{11} とが結合して環を形成している場合、 R^{10} 及び R^{11} がアルキル基の場合や、 R^{10} と R^{11} が環を形成している場合でも、カルパインとの酵素反応性は良好であった。さらには、アミノ酸A及びBが様々なアミノ酸である場合も、カルパインとの酵素反応性は良好な結果を与えた。さらに、細胞の蛍光イメージングにおいても、 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基に依存して蛍光強度の増強がみられた。以上の結果は、式(1)が $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基を有することにより、任意のアミノ酸A及びBを有する化合物がカルパイン活性を効果的に検出できることを示した。すなわち、本発明の蛍光プローブはカルパインの酵素活性を効果的に検出できる化合物であることを実証するものである。

[0283] (実施例11) ラットNMDA障害モデルを用いた評価

黒色Brown-Norwayラットにイソフルランを用いて全身麻酔を行った。PBS又はN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)(10mM, 2 μ L)を眼内に投与した。6時間後にケタミン・キサラジン混合液で再度麻酔を行い、眼内に化合物19(18.3 μ M, 3 μ L)を投与した。

化合物 19 の投与前及び投与 20 分後に、F 10（ニデック社共焦点生体顕微鏡）で眼底を撮影した。

[0284] その結果を図 15 に示す。矢印で示す箇所は、HMRG で染色された神経細胞の例を示す。PBS を投与したラットでは、化合物 19 投与前にシグナルを認められず（図 15 a）、20 分後（図 15 b）にはほとんど神経細胞が染色されていない。NMDA を投与したラットでは、図 15 c で示すように、化合物 19 投与前には明らかなシグナルを認めていない。しかし、図 15 d で示すように化合物 19 を投与して 20 分後に明らかに神経細胞が多数染色された。また、図 15 で示したラットの眼底撮影画像の HMRG 陽性神経細胞数を計測した結果を図 16 で示す。PBS を投与したラットについて、HMRG 陽性細胞数はごくわずかであり、NMDA を投与したラットの HMRG 陽性細胞数は有意な増加がみられた。

[0285] ラット NMDA 網膜障害モデルは、網膜疾患モデルと考えられていることから、本発明の蛍光プローブは、網膜疾患の診断に有用であると考えられる。特に眼底におけるカルパインの活性化を迅速に検出することが可能であり、臨床診断や治療選択に有用であると期待される。さらに、本発明の蛍光プローブは、カルパイン阻害薬による治療効果の評価にも有用であると期待される。具体的には、カルパイン活性上昇が確認された哺乳類対象（例えば、患者）にカルパイン阻害薬による治療を実施し、その治療効果も判定するなど、本発明の蛍光プローブの医療上、産業上の利用価値、経済効果は極めて大きい。

[0286] （実施例 12）ウサギ NMDA 障害モデルを用いた化合物 19 の評価

黒色ダッチウサギにケタミン・キサラジンの混合液を用いて全身麻酔を行った。N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）（12 mM, 50 μ L）、又は PBS を眼内に投与した。9 時間後にケタミン・キサラジンの混合液で再度麻酔を行い、眼内に化合物 19（18.3 μ M, 19 μ L）、化合物 16（20 μ M, 19 μ L）、又は化合物 16（20 μ M, 38 μ L）を投与した。各化合物の投与前及び投与から所定時間経過後に、Mirant

e（ニデック社，共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡）で眼底を撮影した。

[0287] その結果を図17～22に示す。矢印で示す個所はHMRGで染色された神経細胞の例を示す。図17aで示すように、化合物19投与前には明らかなシグナルを認めていない。しかし、図17b～17dで示すように、NMDAを投与したウサギでは、化合物19を投与して30分後、45分後、60分後には明らかに多数の神経細胞がHMRGで染色された。

[0288] PBS投与眼の結果を図18に示す。図18aで示すように、化合物19投与前には明らかなシグナルを認めていない。また図18b～18dで示すように、化合物19を投与して30分後、45分後、60分後にも神経細胞のHMRGによる染色はほとんど認められていない。

[0289] 図19aと図20aで示すように、化合物16（19 μ l又は38 μ l）投与前には明らかなシグナルを認めていない。しかし、図19b～d、図20b～dで示すように、NMDAを投与したウサギでは、化合物16（19 μ l又は38 μ l）を投与して30分後、45分後、60分後には明らかに多数の神経細胞がHMRGで染色された。

[0290] 一方、PBSを投与したウサギでは、図21a、図22aで示すように、化合物16（19 μ l又は38 μ l）投与前にはいずれの群でもシグナルは認められず、また図21b～d、図22b～dで示すように、30分後、45分後、60分後にも神経細胞のHMRGによる染色はほとんど認められていない。

[0291] 図17～22で示した化合物19及び化合物16（19 μ l及び38 μ l）の眼底撮影画像の視神経乳頭上方の一定の領域（819×819pixel）のHMRG陽性神経細胞数を計測した結果を図23に示す。NMDAを投与したウサギについて、化合物19のHMRG陽性細胞数は、化合物16（19 μ l）よりも有意に上昇しており、化合物16（38 μ l）よりも上昇している傾向にあった。PBSを投与したウサギについて、HMRG陽性細胞数はごくわずかであり、化合物19及び化合物16（38 μ l）のHMRG

陽性細胞数は、NMDAを投与したウサギのHMRG細胞数よりも有意に減少した。

[0292] ウサギNMDA障害モデルは、網膜疾患モデルと考えられていることから、本発明の蛍光プローブは、網膜疾患の診断に有用であると考えられる。中型動物であるウサギの眼球サイズは、小型動物であるラットの眼球サイズよりもヒトの眼球サイズに類似しており、ヒトでの投与条件に類似しているものと考えられる。さらに、化合物19は化合物16よりも低用量で良好な反応性が得られていることから、本発明の蛍光プローブは特にヒトの眼内投与に有用であると考えられる。

[0293] 以上の結果は、本発明の化合物を用いることによって、硝子体内のカルパイン活性を検出でき、カルパイン活性由来の緑内障の診断薬として有用であることを実証するものである。

[0294] (実施例13) ヒトiPS細胞由来立体網膜組織によるカルパインプローブの評価

既報の方法に軽微な修正を加えてヒトiPS細胞(201B7株, CiRAより購入)から人工的に3次元立体網膜組織を分化誘導し、37℃、5%CO₂インキュベーターで60日間維持培養した。このiPS細胞由来3次元立体網膜組織に対してカルパインを活性化し網膜神経節細胞の障害を誘導するグルタミン酸障害モデルを作製し、化合物19によるカルパイン活性を評価した。まずグルタミン酸障害による網膜神経節細胞障害を同定するため、iPS細胞由来3次元立体網膜組織からautoMACS pro(登録商標)を用いてCD90 Microbeadsで網膜神経節細胞を単離した。この細胞に対して、グルタミン酸(最終濃度300μM)を添加し、1時間反応させた。グルタミン酸の添加から1時間後に化合物19(最終濃度5μM)を添加し、その1時間後に蛍光顕微鏡(ZEISS Axio Vert. A1)でその状態及び蛍光を撮影(RGB及びB/Wモード)したところ、神経突起の減弱及び蛍光の増強を認めており、カルパイン活性化による網膜神経節細胞障害が誘導されていることを確認した(図24)。

[0295] 次に、より生体に近い条件での反応を確認するために分化誘導60日目のiPS細胞由来3次元立体網膜組織を反応培地（HBSS溶液に CaCl_2 （最終濃度2.4 mM）、HEPES（最終濃度20 mM）を添加したもの）を1 mLずつ入れた24 well plateへ静置した（ $n=5$ ）。反応培地1 mLで2回洗浄し、グルタミン酸を最終濃度が $0\ \mu\text{M}$ 、 $300\ \mu\text{M}$ 、1 mMとなるように添加し、1時間反応させた。グルタミン酸の添加から1時間後に化合物19の最終濃度 $0\ \mu\text{M}$ 、 $0.25\ \mu\text{M}$ 、 $1.2\ \mu\text{M}$ 、 $5.0\ \mu\text{M}$ となるように添加し、その1時間後に蛍光顕微鏡（ZEISS Axio Vert. A1）にてその蛍光を撮影（RGBモード（下段）及びB/Wモード（上段））した。全ての撮影において露出時間は200 msで固定した。グルタミン酸の最終濃度が $0\ \mu\text{M}$ 、 $300\ \mu\text{M}$ 、及び1 mMの結果を、それぞれ図25、図26、及び図27に示す。グルタミン酸の最終濃度が $300\ \mu\text{M}$ 、1 mMの群において化合物19の濃度に比例して蛍光発現の増強を認めた。また、B/Wモードで撮影した蛍光強度の平均値を算出し（ $n=3$ ）、グラフ化したものを図28に示す。この結果から、グルタミン酸濃度が同一の条件下においては化合物19の濃度依存的に蛍光が強く確認され、グルタミン酸の濃度に応じて蛍光が強く発現することが確認された。また、化合物19と化合物16の蛍光強度の比較検討を行った結果を図29に示す。グルタミン酸の最終濃度1 mMの条件で各化合物を添加したところ、最終濃度 $0.25\ \mu\text{M}$ 、 $1.2\ \mu\text{M}$ 、 $5.0\ \mu\text{M}$ において化合物19の方が蛍光発現を多く認めていた。

[0296] 以上より、化合物19はヒトiPS細胞由来のカルパイン活性化による網膜神経節細胞障害を評価するのに有用であると考えられる。化合物19はヒトiPS細胞由来の網膜神経節細胞及び立体網膜組織で反応性が確認されたことから、ヒト生体の網膜でのカルパイン活性化による網膜神経節細胞の評価に有用であることが期待される。

[0297] 本発明の一態様である蛍光プローブは、上述のとおり、公知又は新規のカルパイン阻害剤と併用できる。例えば当該カルパイン阻害剤により治療又は

予防可能な哺乳類対象を蛍光プローブで選択した上で当該哺乳類対象にカルパイン阻害剤を投与する形態での併用も可能であるし、また例えば当該カルパイン阻害剤が投与された哺乳類対象に蛍光プローブを投与することで当該カルパイン阻害剤による治療又は予防効果の程度を判別する形態での併用も可能である。本発明の一態様である蛍光プローブは、哺乳類対象に対するカルパイン阻害剤の投与前、投与後、投与前後、又は投与と同時に当該哺乳類対象に投与されてそのカルパイン活性など（換言すれば、カルパイン阻害剤の効果）を評価可能にし得る。以降の実施例群では、蛍光プローブとカルパイン阻害剤の併用による作用を具体的に示す。

[0298] （実施例 1 4）生細胞イメージングでのカルパイン阻害剤との併用

蛍光プローブとして化合物 1 9 を用い、アッセイ液が公知のカルパイン阻害剤である SNJ-1945 を $10\ \mu\text{M}$ の濃度でさらに含むこと以外は実施例 9 と同様にして行った生細胞イメージング結果を図 3 0 に示す。図 3 0 中、（a）は阻害剤含有アッセイ液を使用したイメージングであり、（b）が阻害剤非含有アッセイ液を使用したイメージングである）。図 3 0 に示されるとおり、阻害剤含有アッセイ液を使用した場合（図 3 0（a））、阻害剤非含有アッセイ液を使用した場合（図 3 0（b））と比べて細胞内蛍光強度が減弱している。このように本発明による蛍光プローブは、カルパイン阻害剤の生細胞に対する薬理作用の判別のために併用できる。

[0299] （実施例 1 5）哺乳類対象でのカルパイン阻害剤との併用 1

カルボキシメチルセルロースナトリウムを蒸留水に溶かして 0.5%（w/v）CMC 溶液を調製した。0.5%（w/v）CMC 溶液に SNJ-1945 を 2.5%（w/v）になるように懸濁して阻害剤含有 CMC 溶液を調製した。ラットにイソフルランを用いて全身麻酔を行い、NMDA（10 mM, $2\ \mu\text{L}$ ）を眼内に投与した。NMDA 投与から 2 時間後に、阻害剤含有 CMC 溶液を、SNJ-1945 の投与量が 100 mg/kg 体重となるようにラットに腹腔内投与した。阻害剤の投与から 4 時間後（NMDA 投与から 6 時間後）に、ラットにイソフルランで再度麻酔を行い、眼内に化合物

19 (15 μ M, 4 μ L) を投与した。化合物19の投与から20分～30分後に、F10で眼底を撮影した。なお、コントロール群 (N=8) には、阻害剤含有CMC溶液の代わりに0.5% (w/v) CMC溶液を投与したこと以外はSNJ-1945投与群 (N=8) と同様の操作を行った。

[0300] 結果を図31に示す。図31に示すとおり、コントロール群では、SNJ-1945投与群よりも神経細胞が多数染色されている。図31で示したラットの眼底撮影画像のHMRG陽性神経細胞数を計測した結果を図32に示す。図32に示すとおり、SNJ-1945投与群では、コントロール群に比べてHMRG陽性神経細胞数が有意に減少していた。

[0301] (実施例16) 哺乳類対象でのカルパイン阻害剤との併用2

カルボキシメチルセルロースナトリウムを蒸留水に溶かして0.5% (w/v) CMC溶液を調製した。0.5% (w/v) CMC溶液にSNJ-1945を2.5% (w/v) になるように懸濁して阻害剤含有CMC溶液を調製した。ラットにイソフルランを用いて全身麻酔を行い、NMDA (10 mM, 2 μ L) を眼内に投与した。NMDA投与から2時間後に、阻害剤含有CMC溶液を、SNJ-1945の投与量が100 mg/kg体重となるようにラットに経口投与した。阻害剤の投与から4時間後 (NMDA投与から6時間後) に、ラットにイソフルランで再度麻酔を行い、眼内に化合物19 (15 μ M, 4 μ L) を投与した。化合物19の投与から20分～30分後に、F10で眼底を撮影した。なお、コントロール群 (N=7) には、阻害剤含有CMC溶液の代わりに0.5% (w/v) CMC溶液を投与したこと以外はSNJ-1945投与群 (N=8) と同様の操作を行った。

[0302] 眼底撮影画像のHMRG陽性神経細胞数を計測した結果を図33に示す。図33に示すとおり、SNJ-1945投与群では、コントロール群に比べてHMRG陽性神経細胞数が有意に減少していた。

[0303] (実施例17) 哺乳類対象でのカルパイン阻害剤との併用3

カルボキシメチルセルロースナトリウムを蒸留水に溶かして0.5% (w/v) CMC溶液を調製した。0.5% (w/v) CMC溶液にSNJ-1

945を2.5% (w/v) になるように懸濁して阻害剤含有CMC溶液を調製した。阻害剤含有CMC溶液を、SNJ-1945の投与量が100 mg/kg体重となるようにラットに腹腔内投与した。腹腔内投与から2時間後にラットにイソフルランを用いて全身麻酔を行い、NMDA (10 mM, 2 μ L) を眼内に投与した。NMDA投与から6時間後に、ラットにイソフルランで再度麻酔を行い、眼内に化合物19 (15 μ M, 4 μ L) を投与した。化合物19の投与から20分～30分後に、F10で眼底を撮影した。なお、コントロール群 (N=7) には、阻害剤含有CMC溶液の代わりに0.5% (w/v) CMC溶液を投与したこと以外はSNJ-1945投与群 (N=8) と同様の操作を行った。

[0304] 眼底撮影画像のHMRG陽性神経細胞数を計測した結果を図34に示す。図34に示すとおり、SNJ-1945投与群では、コントロール群に比べてHMRG陽性神経細胞数が有意に減少していた。

[0305] 実施例15～17に示されるように、本発明による蛍光プローブは、哺乳類対象におけるカルpain阻害剤の治療又は予防効果の程度を判別するためにカルpain阻害剤と併用できる。具体的には、実施例15および16は、カルpainが活性化している（結果として、カルpain活性剤に対して感受性を有し得る）哺乳類対象にカルpain阻害剤を投与し、本発明による蛍光プローブを用いてその効果の程度を評価する態様に相当する。また、実施例17は、予防的にカルpain阻害剤が投与された哺乳類対象においてカルpainの活性化が惹起された場合におけるカルpain阻害剤の効果の程度を、本発明による蛍光プローブを用いて評価する態様に相当する。

[0306] （実施例18）哺乳類対象でのカルpain阻害剤との併用4

カルpain阻害剤として、共有結合的阻害剤であるSNJ-1945 (CAS 854402-59-8)、C21 (CAS 677275-28-4)、又はMDL 28,170 (CAS 88191-84-8) あるいは非共有結合的阻害剤であるPD-151746 (CAS 179461-52-0) を併用した場合の神経細胞のイメージングを比較した。具体的に

は、0.5% (w/v) CMC溶液に各カルpain阻害剤を2.5% (w/v) になるように懸濁して調製した阻害剤含有CMC溶液を用いたこと以外は実施例16と同様にして、ラットの神経細胞のイメージングを行った。

[0307] 眼底撮影画像のHMRG陽性神経細胞数を計測し、SNJ-1945投与群と他のカルpain阻害剤投与群との2群間比較を行った結果を図35に示す。図35に示すとおり、SNJ-1945投与群では、他のカルpain阻害剤投与群に比べてHMRG陽性神経細胞数が有意に減少していた。当該結果は、本発明の蛍光プローブが種々のカルpain阻害剤の阻害能を検出することが可能であることを示し、また、本発明の蛍光プローブは、カルpain阻害剤のうち、特に、SNJ-1945のカルpain阻害能をより高い精度で検出することが出来ることを示すものである。

[0308] (実施例19) *In vitro* RGC軸索モデルにおけるカルpain活性の検出

ヒトiPS細胞(201B7株、CiRAより購入)に対し、既報の方法(STEM CELLS TRANS L MED (2017) 6:1972-1986)を参考に、網膜神経節細胞で豊富に発現するBRN3Bのプロモーター下流にtdTomato蛍光タンパクの配列が挿入されたゲノム編集を行った。次に、既報の方法(METHODS CELL BIOL (2020) 159:279-302)に軽微な修正を加えてiPS細胞から網膜オルガノイドを分化誘導し、37℃, 5%CO₂-95%空気の条件下で、41日間の浮遊培養の後に7日間の接着培養をすることで、網膜神経節細胞由来の軸索伸長を誘導した。続いて、カルシウムイオノフォアA23187を50nMでインキュベートすることで細胞内カルシウム濃度を上昇させる評価系にて、化合物19の1μMを同時に添加し、HMRGが生成された細胞を共焦点顕微鏡LSM710により経時的に蛍光撮影した。さらに、HMRGの生成がカルpain活性化に起因することを証明するために、A23187添加の1時間前にSNJ-1945を100μMでインキュベートした網膜オルガノイドでも化合物19からのHMRG生成の確認を行った。結果

を図36(a)に示す。なお、図36中、(b)は、化合物19の添加のみを行い、SNJ-1945およびA23187をいずれも添加していない軸索の撮影画像であり、(c)は、化合物19およびA23187の添加のみを行い、SNJ-1945を添加していない軸索の撮影画像である。また、図36(a)～(c)の上列左端の画像は、これらの軸索においてtdTomatoの蛍光を検出するための蛍光撮影画像であり、いずれの画像においても網膜神経節細胞の軸索に発現したtdTomatoが確認できる。

[0309] 図36(a)～(c)から、カルシウムイオノフォアによってカルパイン活性が増大する(結果として、蛍光プローブ反応が増大する)こと、および、カルパイン阻害剤によって当該カルパイン活性の増大が消失したことがわかる。緑内障の発症又は進行に関連して、高眼圧になった場合には虚血が起こり、神経細胞内へカルシウムが流入する。また、グルタミン酸受容体を含む種々のカルシウム流入メカニズムが考えられ、これらのカルシウム流入に起因してカルパイン活性の増大が生じ得る。実施例19は、カルシウムイオノフォア刺激による非選択的なカルシウム流入モデルにおけるRGC軸索での蛍光プローブの反応性を確認したものであり、本発明の実施形態による蛍光プローブが軸索でのカルパイン活性の検出にも有効であることが分かる。

[0310] (実施例20) カテプシンBによる蛍光強度の経時変化

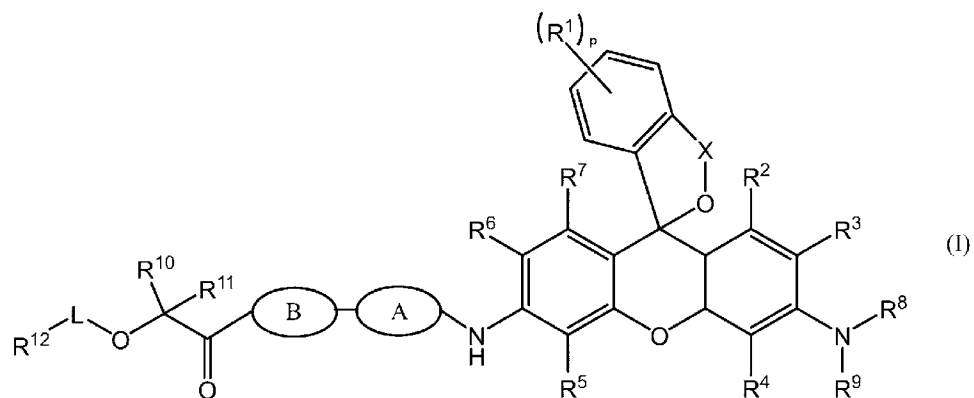
化合物19について、経時的な蛍光アッセイを行った。具体的には、10 μ Mの合成した蛍光プローブを含む50mM TRIS緩衝液(pH7.4, 2mM EGTA, 2mM DTE)に、880ng/mLの組換えヒトカテプシンB(953-CY; R&D Systems, MN, USA)を加えて、37°Cで酵素反応を実施した。陰性対照として、カテプシンBを添加しなかったこと以外は上記と同様の操作を行った。カテプシンBによる蛍光強度の経時変化を測定した結果を図37に示す(励起波長475nm, 蛍光波長500-550nm)。

[0311] 図37に示されるとおり、化合物19は、カテプシンBに対する蛍光プローブとして機能した。

請求の範囲

[請求項1] 下記的一般式（I）で表される化合物又はその塩：

[化1]



[式中、A及びBは、それぞれ独立して、同一又は異なるアミノ酸残基を表し、

ここで、Aと、Aに結合するNHとの間の結合は、AのC末端と該NHとの間のアミド結合であり、AとBはアミド結合で結合しており、かつ、Bと、Bに結合するカルボニル（C＝O）との間の結合は、BのN末端と該カルボニル（C＝O）との間のアミド結合であり；

R¹は、同一又は異なって、ベンゼン環に結合する置換基を表し；

pは、0～4の整数を表し；

R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基（OH基）、ハロゲン原子、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アルキル基を表し；

R⁸及びR⁹は、それぞれ独立して、水素原子、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アルキル基を示すか、あるいは、R⁸とR⁹とが結合して環を形成していてもよく、あるいは、R³とR⁸とが結合して環を形成していてもよく、かつ／又はR⁴とR⁹とが結合して環を形成していてもよく；

Xは、直鎖又は分岐C₁～C₃アルキレン基を表し；

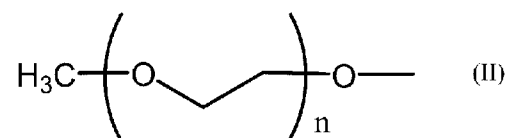
R^{10} 及び R^{11} は、それぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ基（OH）、アルコキシ基、又は、置換されても良い、直鎖、分岐、若しくは環状アルキル基を示すか、あるいは、 R^{10} と R^{11} とが結合して環を形成していてもよく；

R^{12} は、水素原子；置換されても良い、直鎖、分岐若しくは環状アルキル基；置換されても良い、直鎖若しくは分岐アルケニル基；置換されても良い、直鎖若しくは分岐アルキニル基；置換されても良いアリール基；又は、置換されても良い複素環基を示すか、あるいは、 R^{10} 又は R^{11} と結合して環を形成していてもよく；

Lは、アミド結合、エステル結合、又は－（直鎖若しくは分岐アルキレン－O－）_n－（nは1～10の整数）を示すか、あるいは、単結合を示す。]

[請求項2] 上記式（I）において、－O－L－ R^{12} で表される基は、以下の式（II）で表される基である、請求項1に記載の化合物又はその塩。

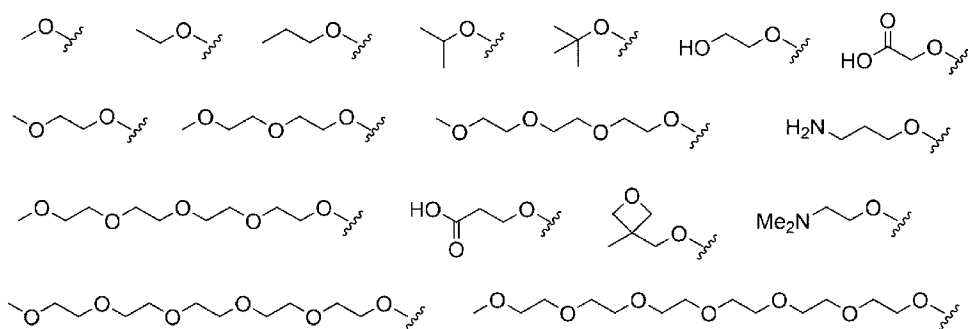
[化2]



[式中、nは0～10の整数を表す。]

[請求項3] 上記式（I）において、－O－L－ R^{12} で表される基が、水酸基又は以下から選択される基である、請求項1に記載の化合物又はその塩。

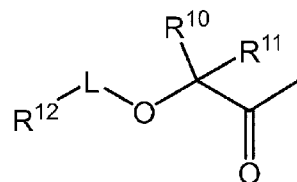
[化3]



[請求項4]

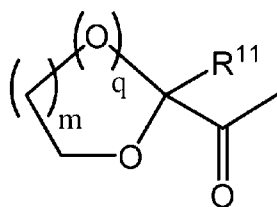
上記式 (1) において、

[化4]



で表される部分構造が、以下の式（式中、 m は1～3の整数、 q は0又は1を表す）

[化5]



で表される構造である、請求項1に記載の化合物又はその塩。

[請求項5]

R^{10} 及び R^{11} が、アルキル基であるか、互いに結合してシクロアルキル基である、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

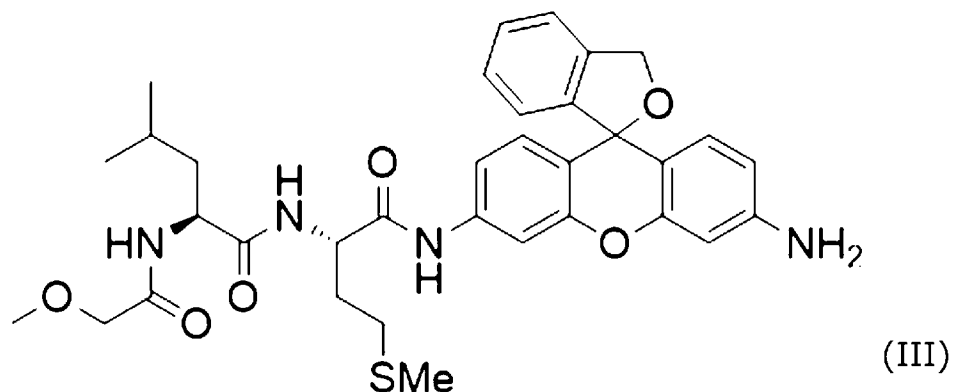
[請求項6]

上記式 (1) において、アミノ酸Bが、Leuである、請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

[請求項7] 上記式 (I) において、アミノ酸Aが、Met、Thr、His、Tyr、Phe、Ser、Gln、Arg、Lys、Nle、又はMetOである、請求項1～請求項6のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

[請求項8] 下記の一般式 (III) で表される、請求項1に記載の化合物又はその塩。

[化6]



[請求項9] 請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む、蛍光プローブ。

[請求項10] カルpain活性検出用である、請求項9に記載の蛍光プローブ。

[請求項11] サンプル中のカルpain活性の測定方法であって、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩とサンプルとを接触させること、及び、前記接触後の請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物からの蛍光を測定することを含む方法。

[請求項12] 請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む、カルpain活性に関連する疾患の診断用組成物。

[請求項13] 前記カルpain活性に関連する疾患が、眼疾患、筋疾患、糖尿病、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、心又は血管疾患、がん、脳腫瘍、加齢症候群、早老症、感染症、外傷性脳障害、マカドジョセフ病、子癇前症あるいは肺線維症である、請求項12に記載の診断用組成

物。

[請求項14] 前記眼疾患が、緑内障、常染色体優性新生血管炎症性硝子体網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性、糖尿病に伴う網膜神経障害又は網膜血管閉塞性疾患、網膜虚血あるいは白内障である、請求項13に記載の診断用組成物。

[請求項15] 前記緑内障が正常眼圧緑内障である、請求項14に記載の診断用組成物。

[請求項16] 前記がんが、黒色腫、乳がん、大腸がん、腎がん、胃がん、子宮頸がん、卵巣がん、又は軟部肉腫である、請求項13に記載の診断用組成物。

[請求項17] 哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患の診断のための情報を提供する方法であって、

請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と、前記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、及び

前記接触後の請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩からの蛍光を測定すること、を含む方法。

[請求項18] カルパイン活性に関連する疾患に対する候補化合物の治療効果を判定するための試験方法であって、

カルパイン活性に関連する疾患モデルにおいて、候補化合物が未投与及び投与のサンプルを調製すること、

請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と、前記サンプルとを接触させること、及び

前記接触後の請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩からの蛍光を測定すること、を含む方法。

[請求項19] 哺乳類対象におけるカルパイン活性に関連する疾患のモニタリングのための情報を提供する方法であって、

請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と、前記哺乳類対象由来のサンプルとを接触させること、及び

前記接触後の請求項 1 ～請求項 8 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩からの蛍光を測定すること、を含む方法。

[請求項20] カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を用いた該疾患の治療又は予防において、その効果の程度を判定するために、該医薬組成物と組み合わせて用いられる、請求項 9 に記載の蛍光プローブ。

[請求項21] 治療対象候補又は予防対象候補が、カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を用いた治療対象又は予防対象に該当するか否かを予め検査するために用いられる、請求項 9 に記載の蛍光プローブ。

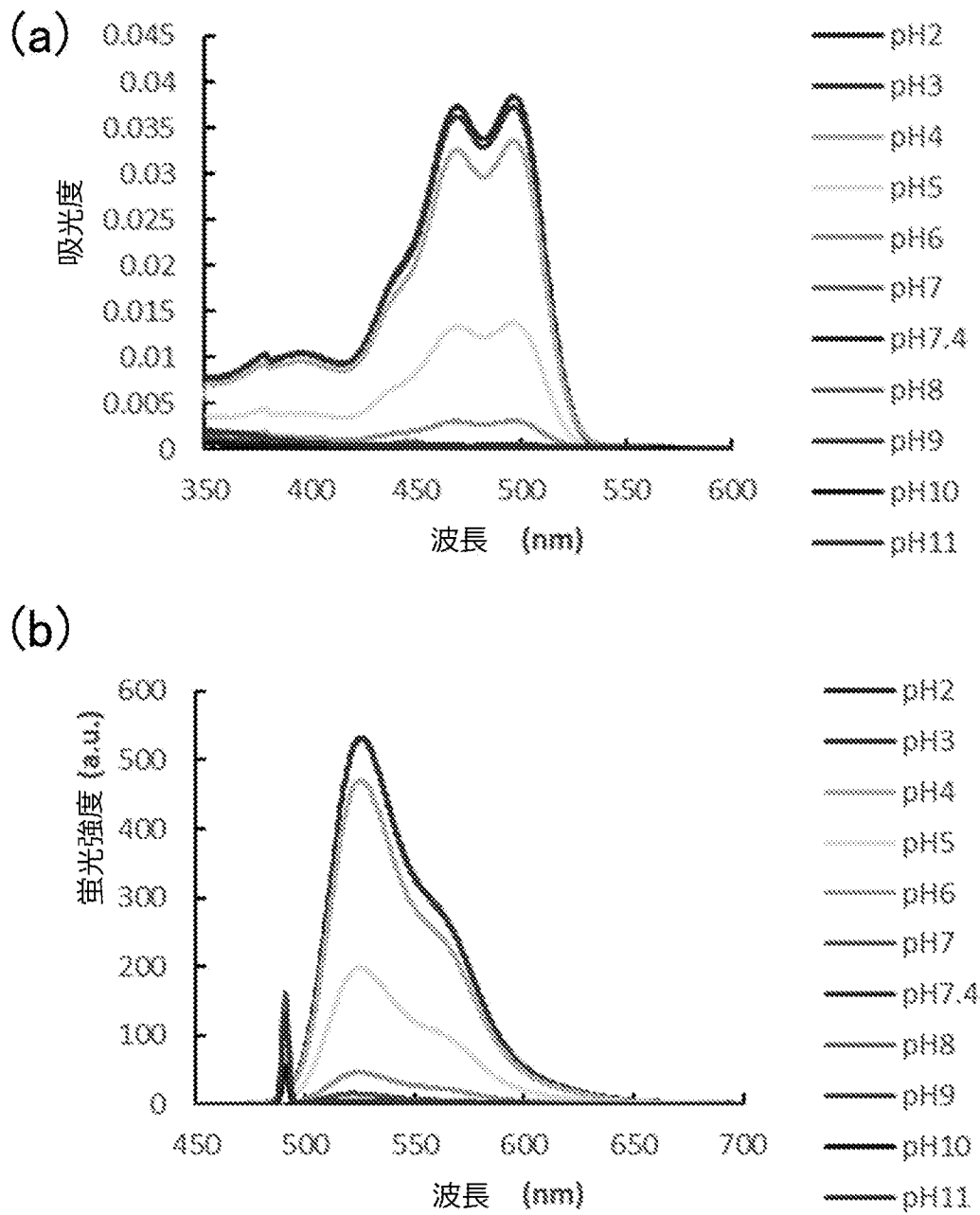
[請求項22] カテプシン活性検出用である、請求項 9 に記載の蛍光プローブ。

[請求項23] 腓液検出用である、請求項 9 に記載の蛍光プローブ。

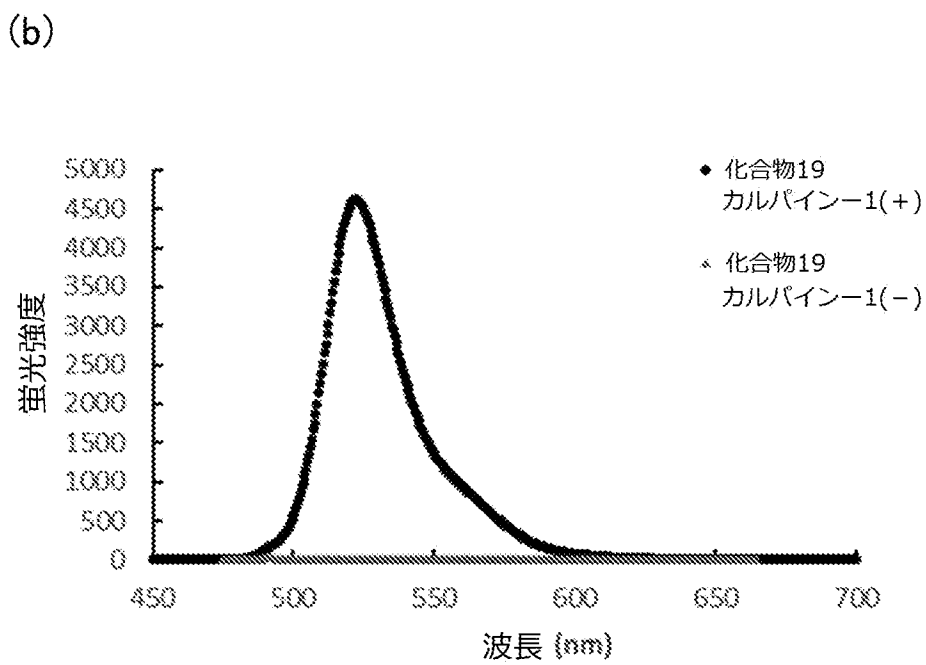
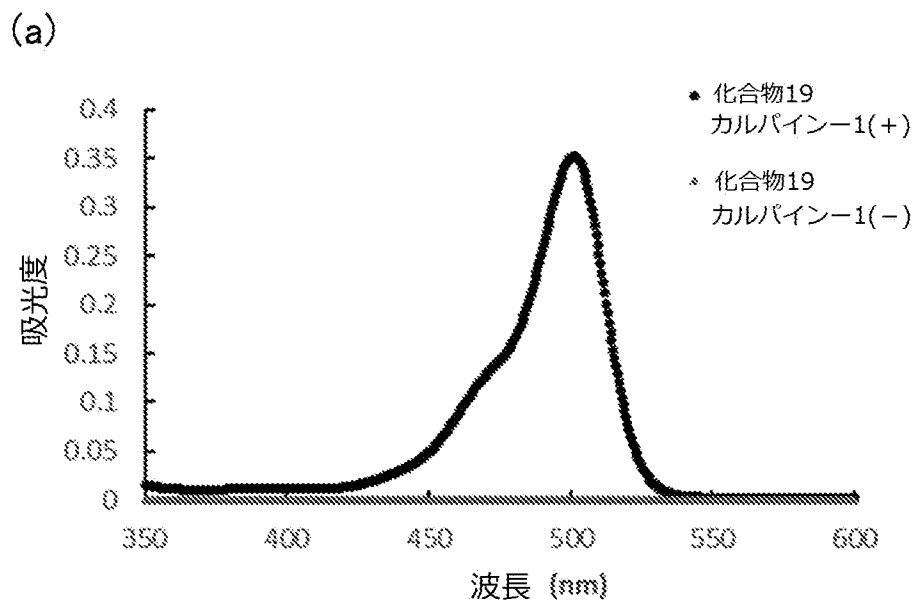
[請求項24] 請求項 1 ～請求項 8 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩を含む、腓液検出用キット。

[請求項25] カルパイン阻害剤を有効成分として含有するカルパイン活性に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物であって、治療若しくは予防対象候補又は該候補由来のサンプルにおけるカルパインと請求項 1 ～請求項 8 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩との相互作用による蛍光応答を指標にして、カルパイン阻害剤に対する感受性を有すると判定された治療又は予防対象に投与される、医薬組成物。

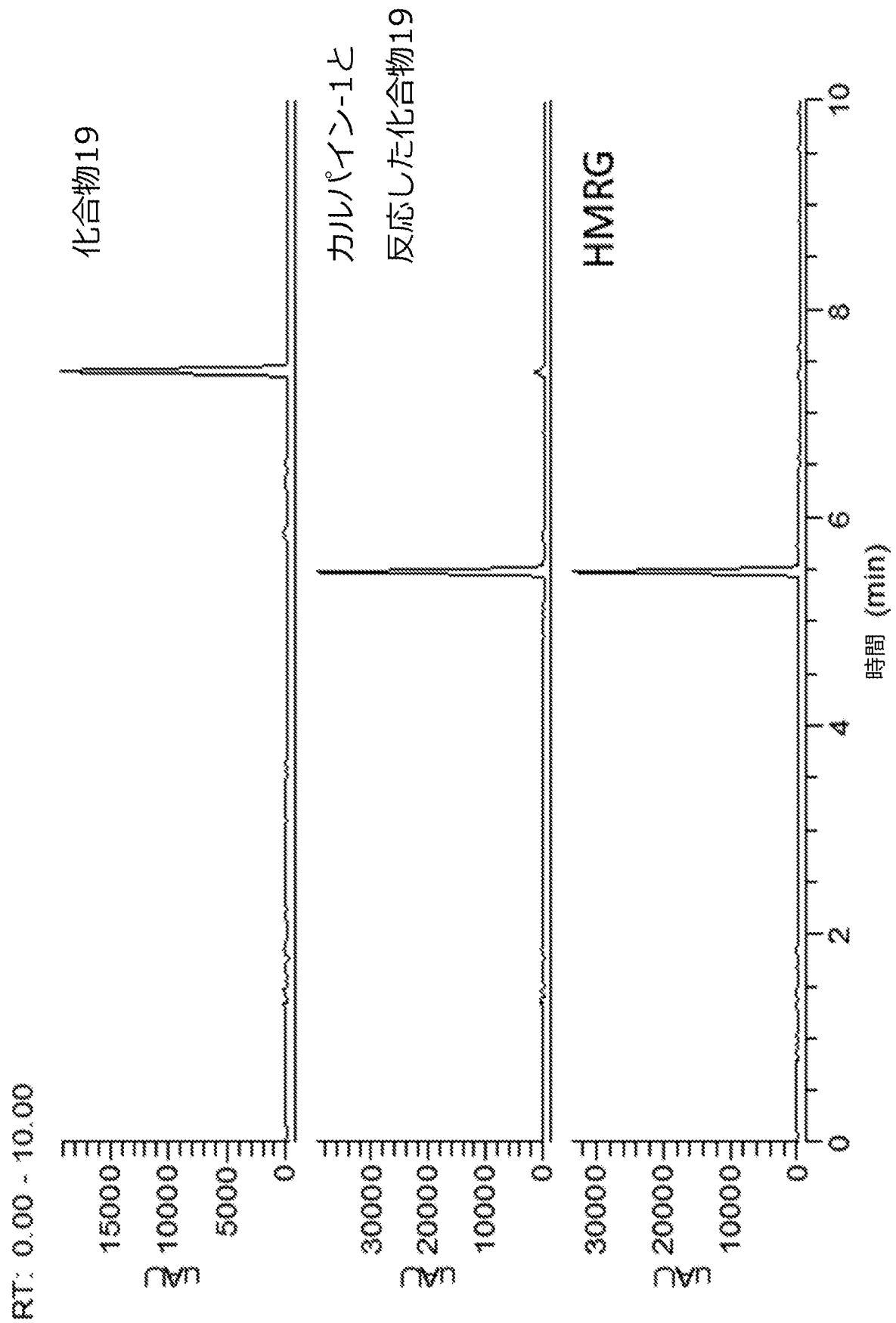
[図1]



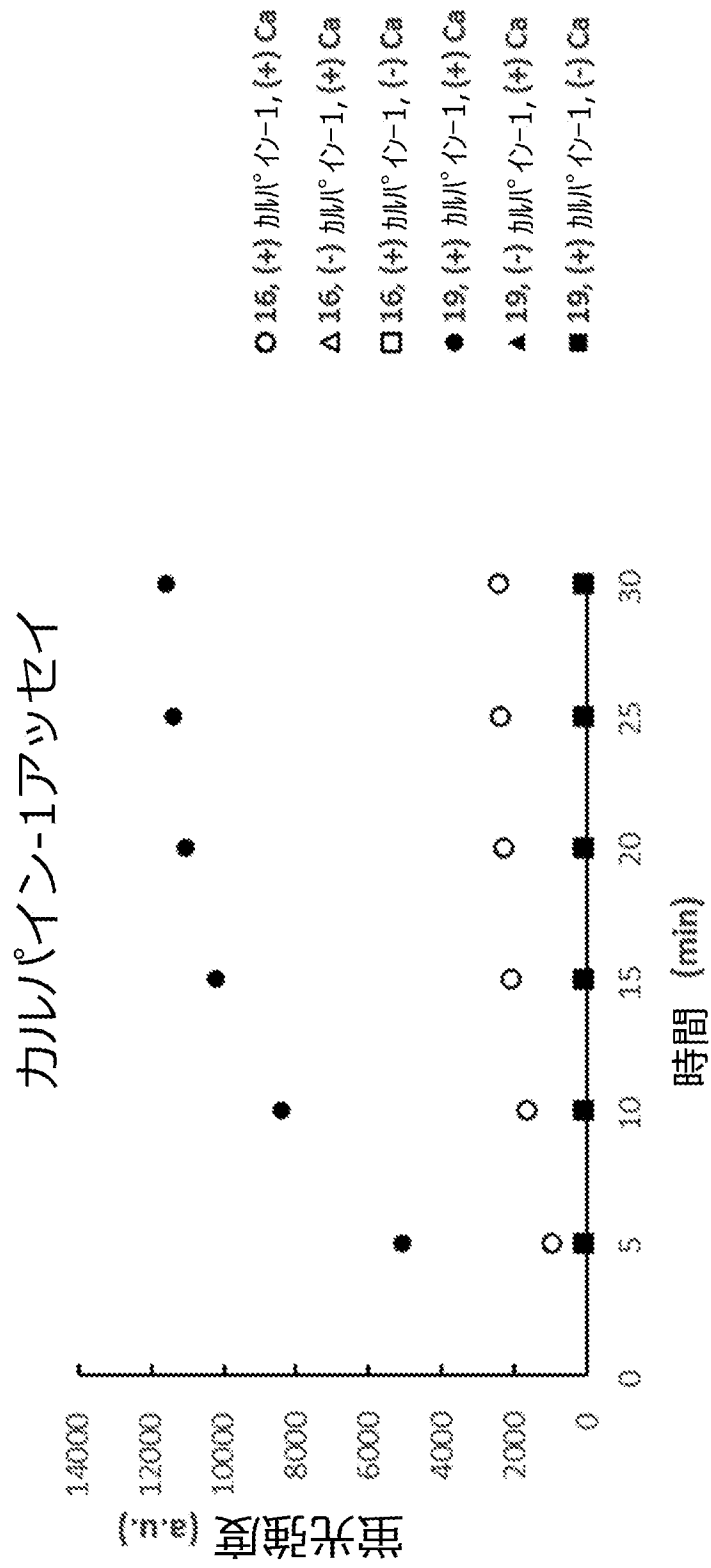
[図2]



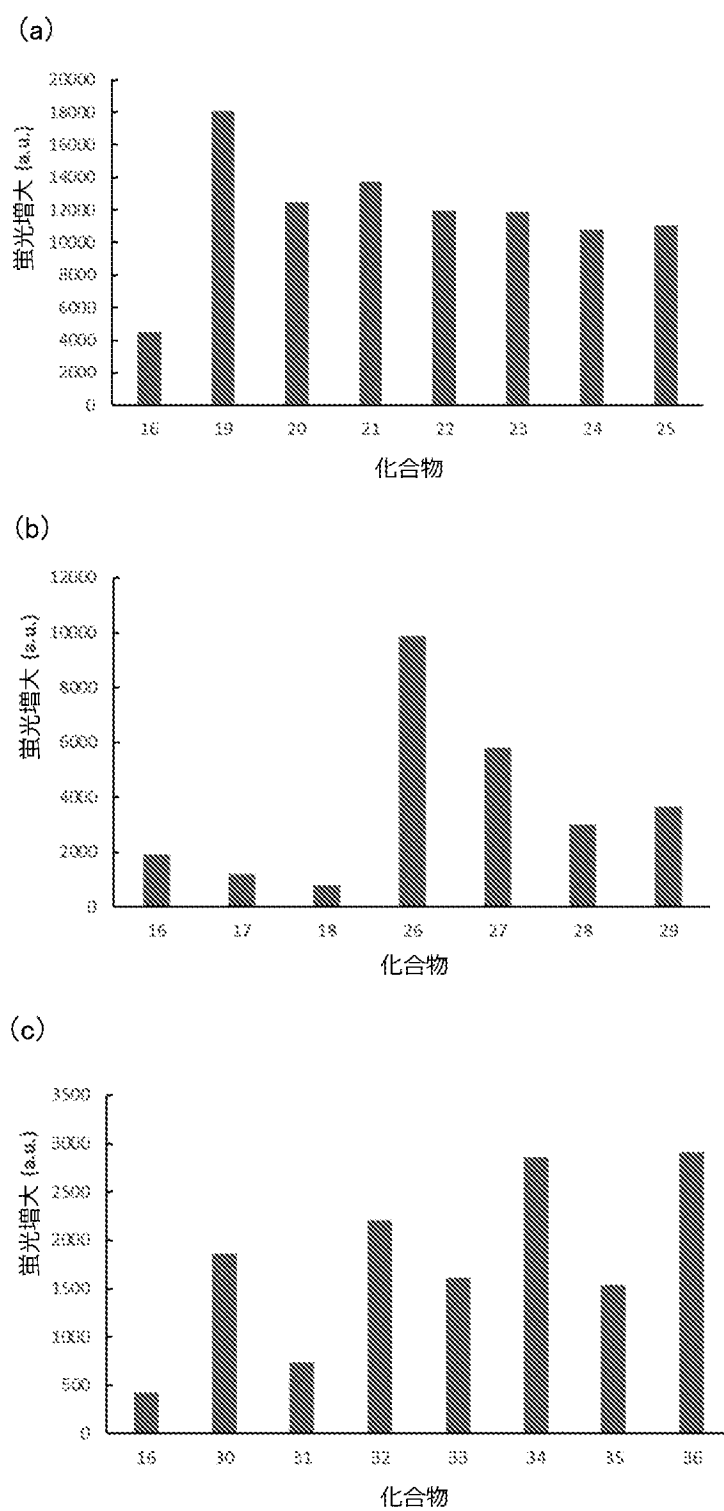
[図3]



[図4]

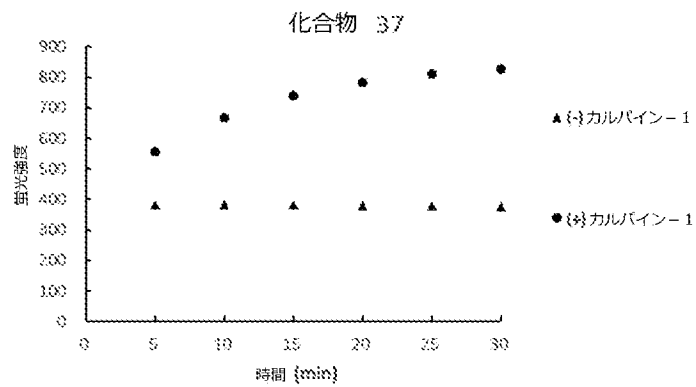


[図5]

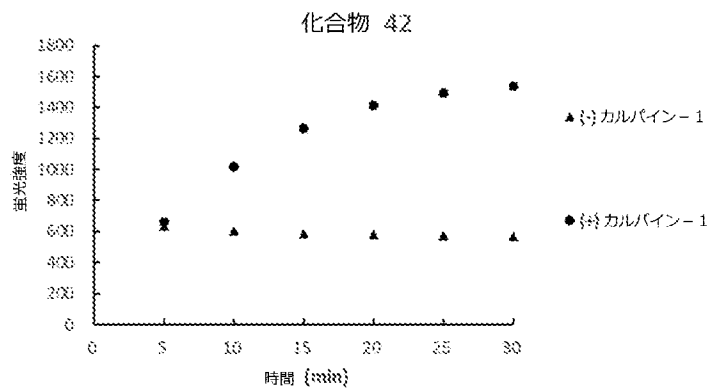


[図6]

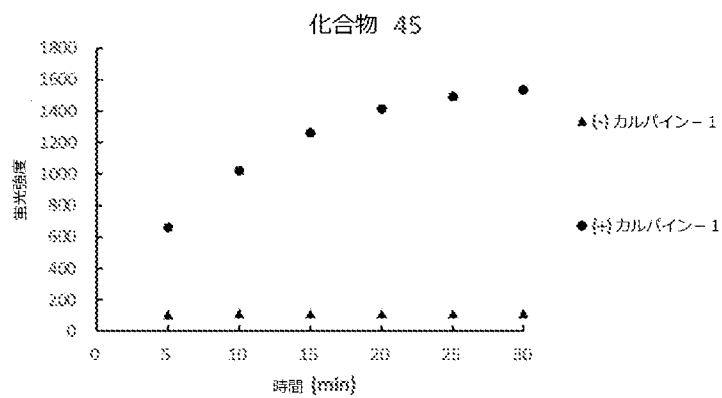
(a)



(b)

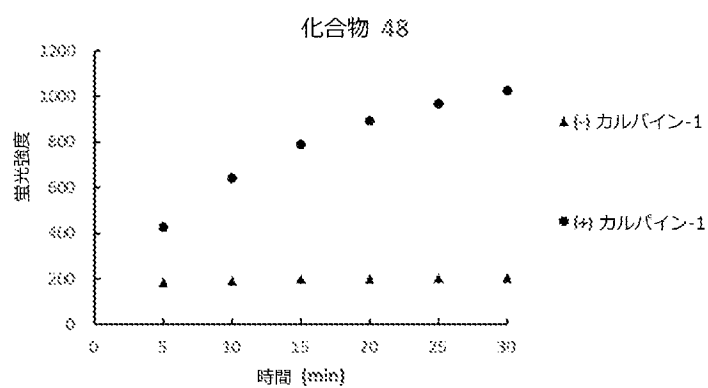


(c)

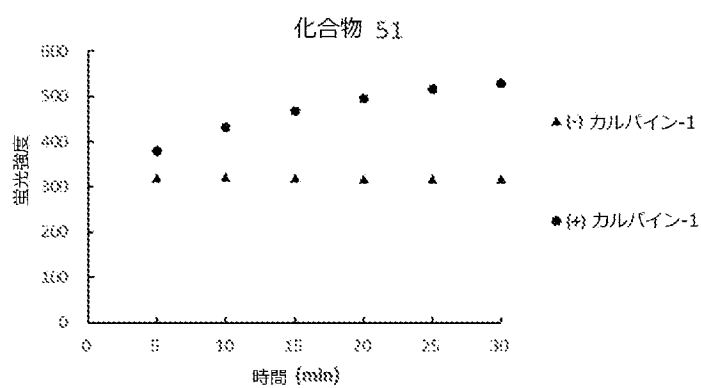


[図7]

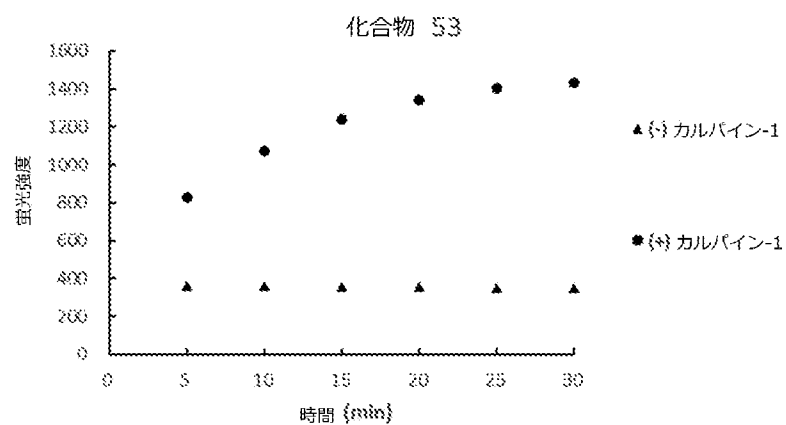
(a)



(b)

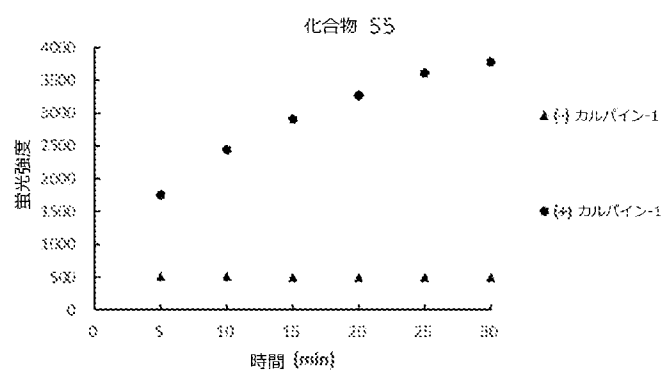


(c)

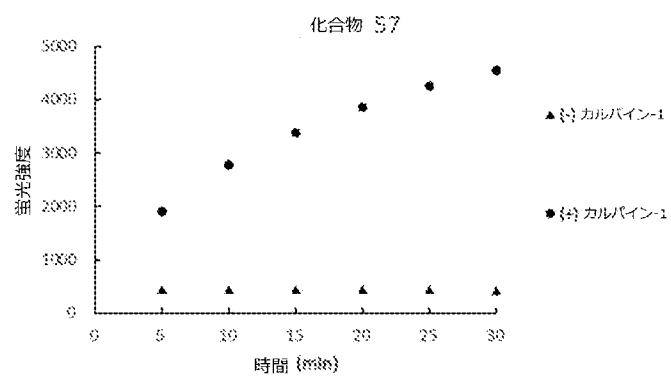


[図8]

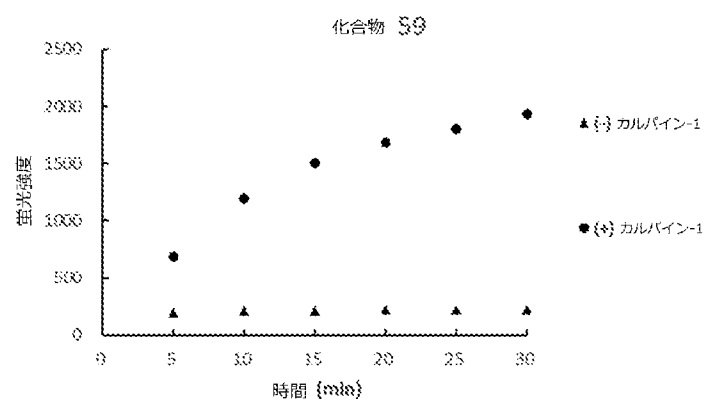
(a)



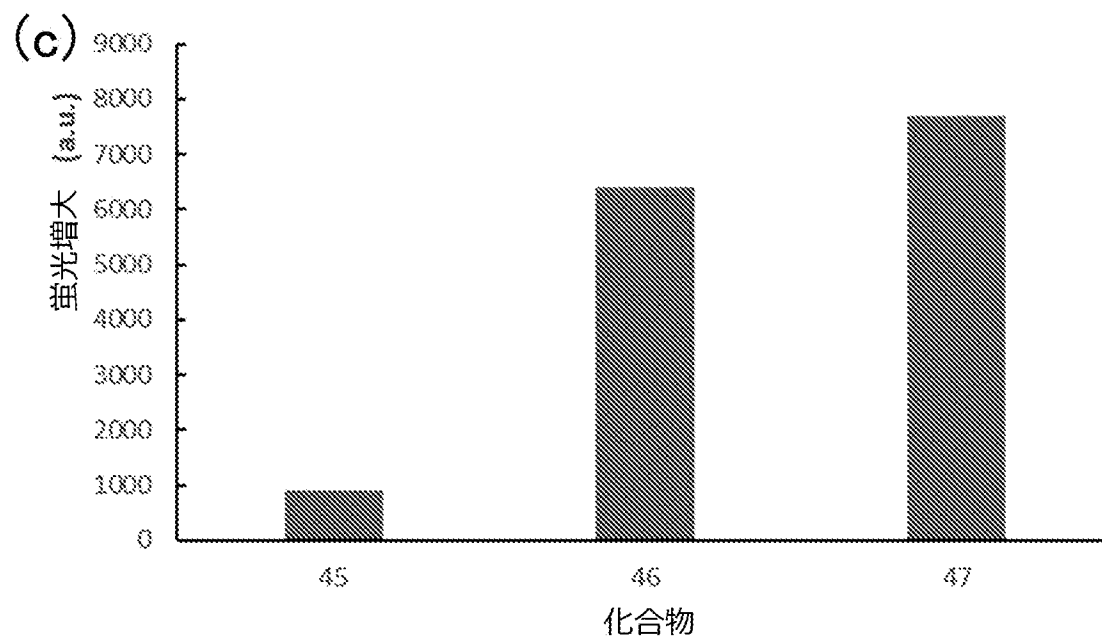
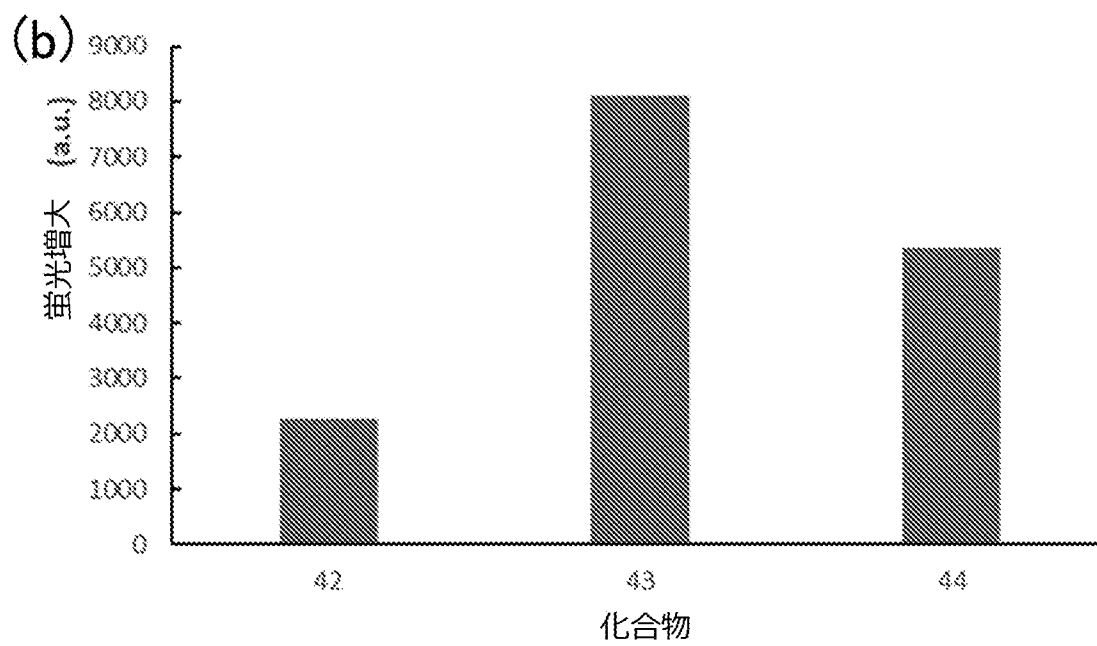
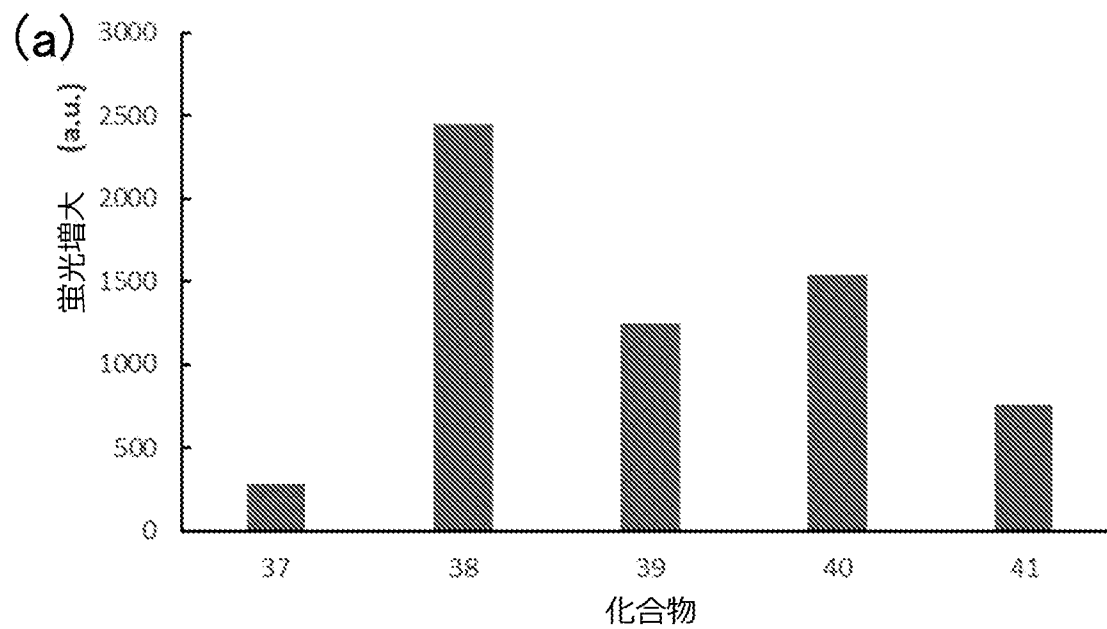
(b)



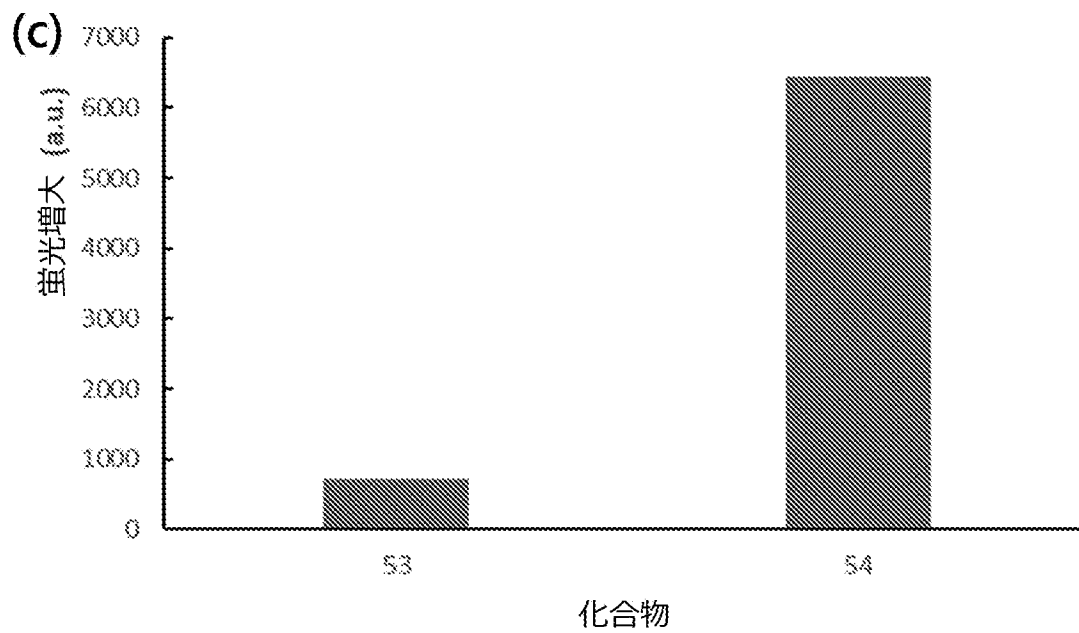
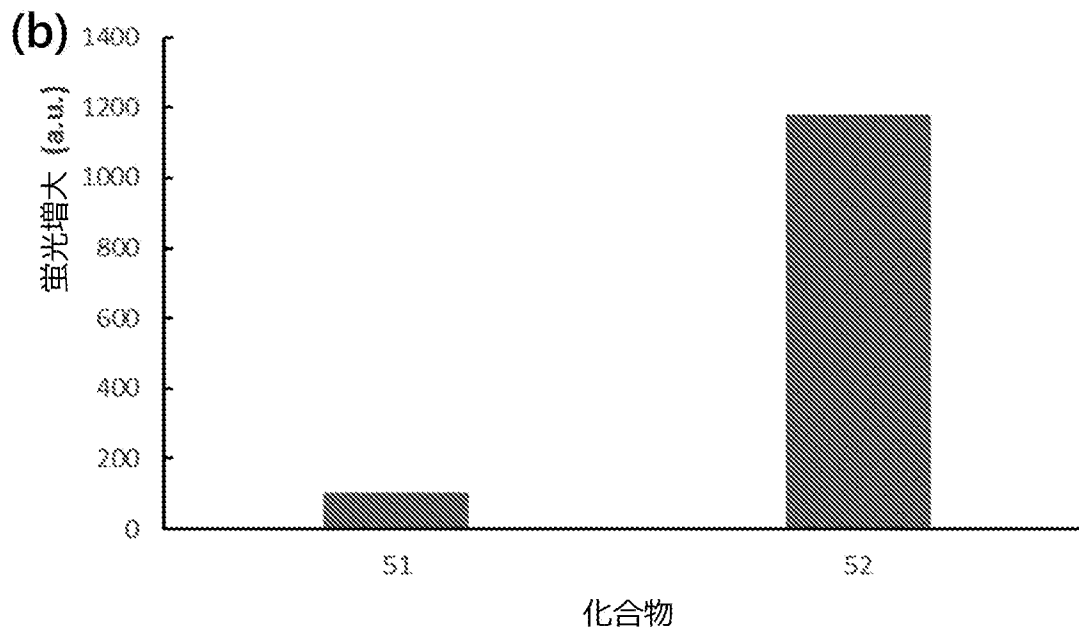
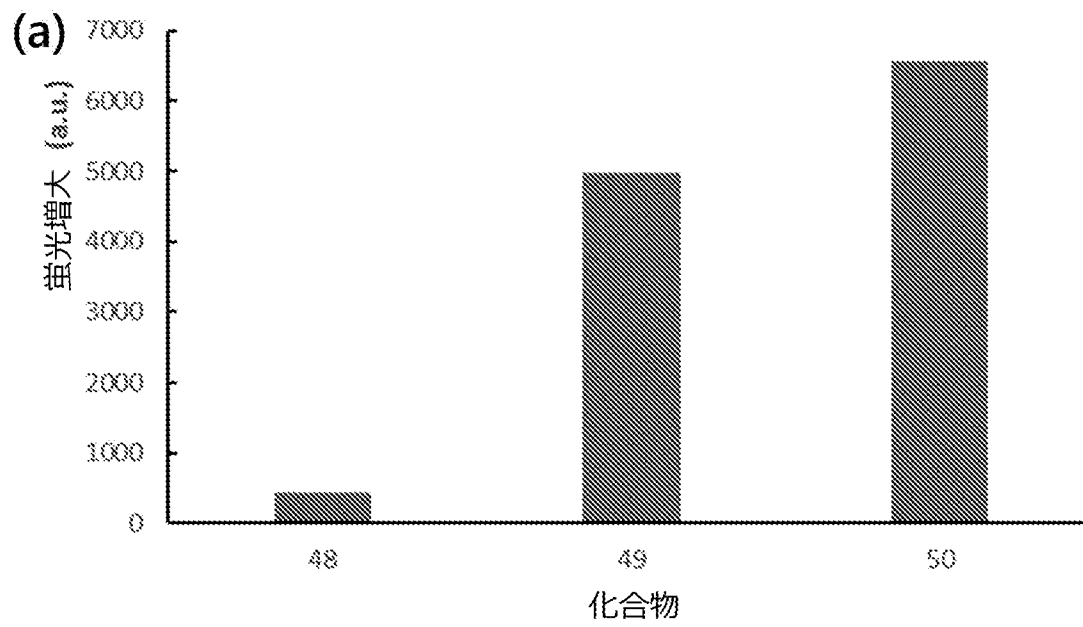
(c)



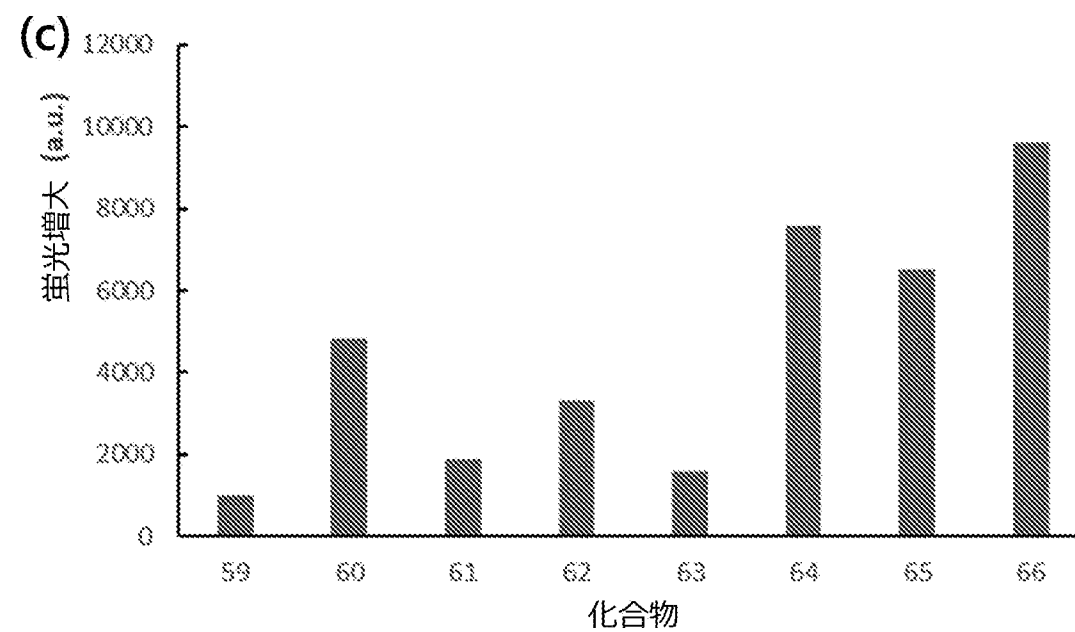
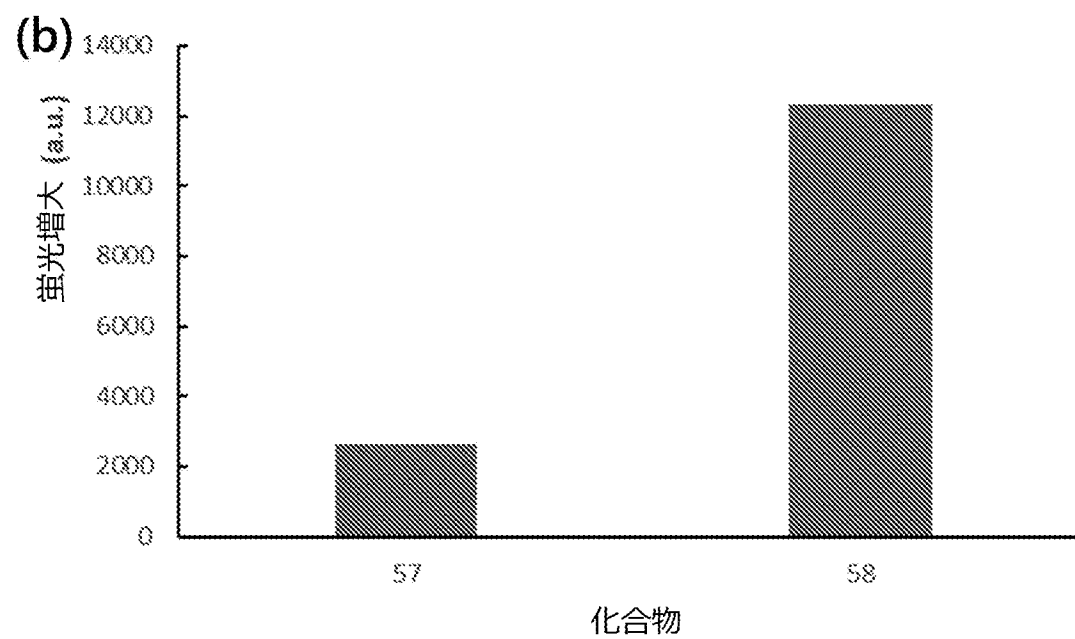
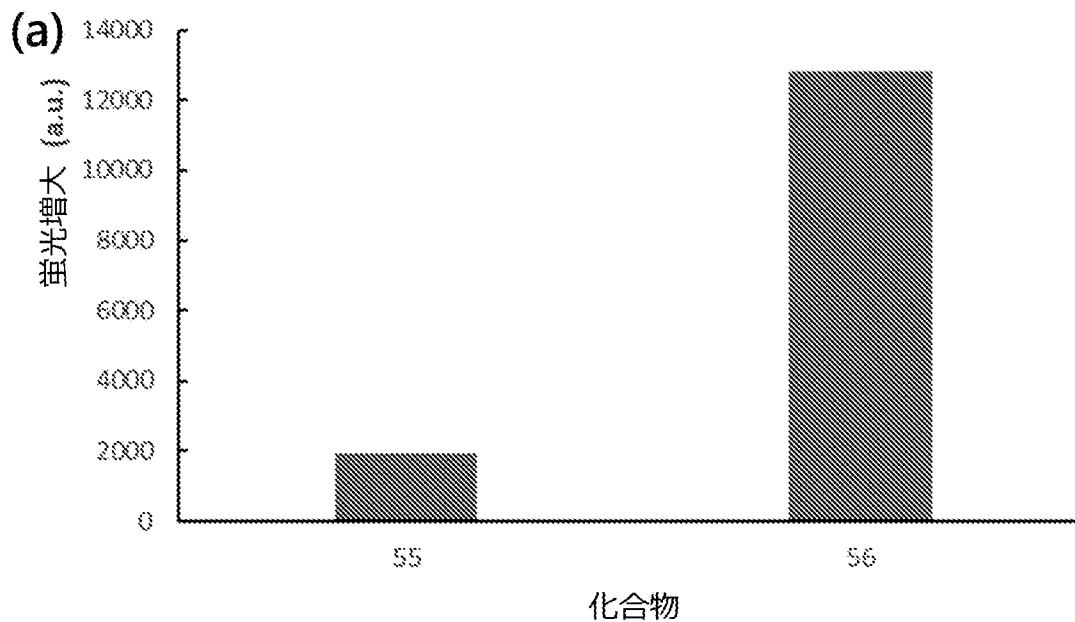
[図9]



[図10]

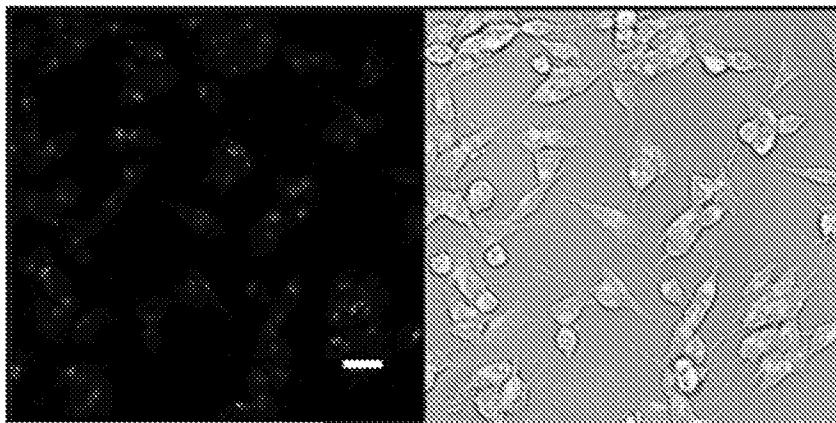


[図11]

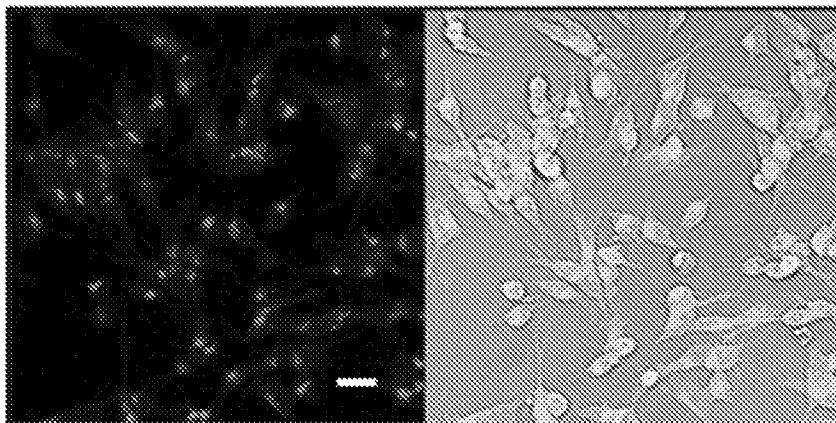


[図12]

(a) 化合物 16

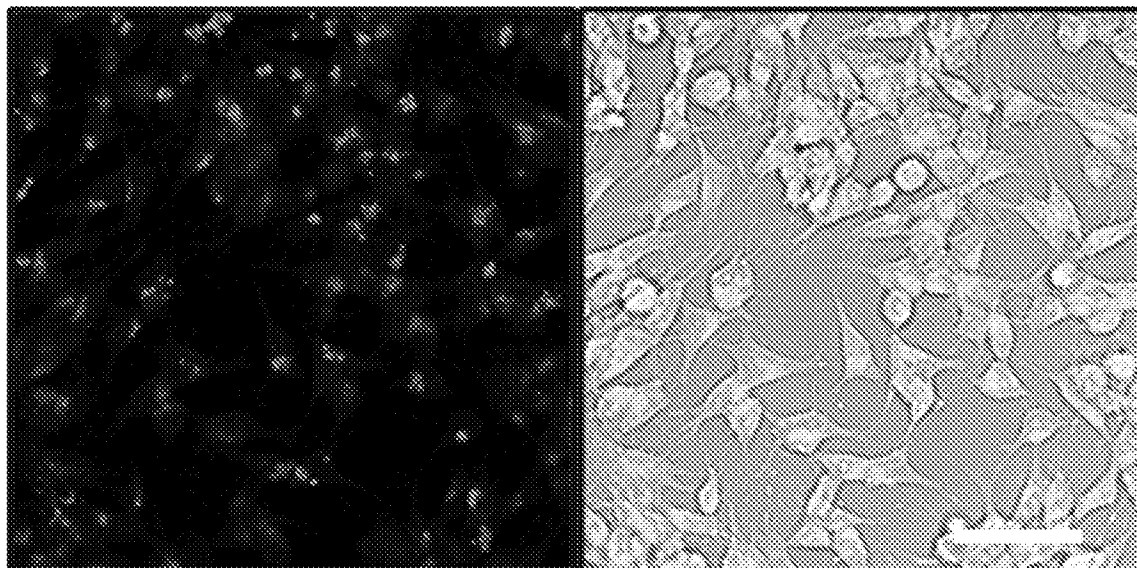


(b) 化合物 19

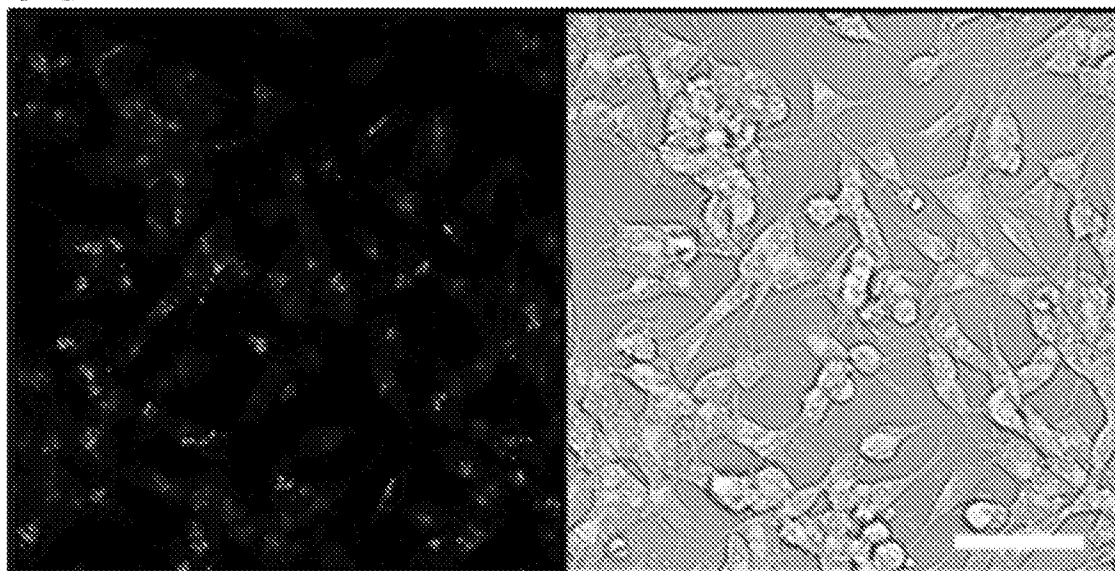


[図13]

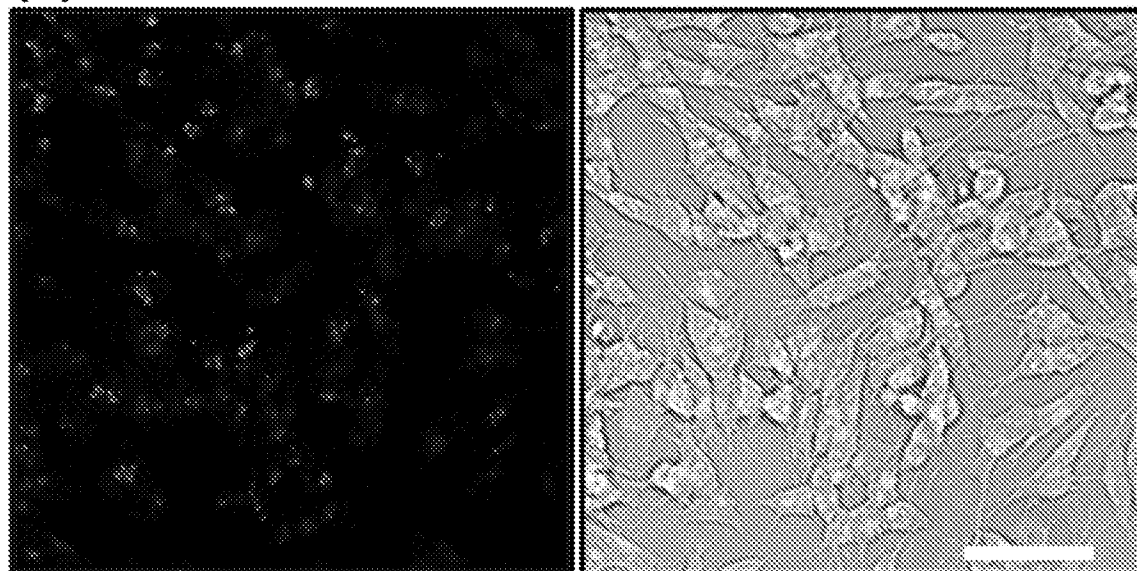
(a) 化合物 20



(b) 化合物 21

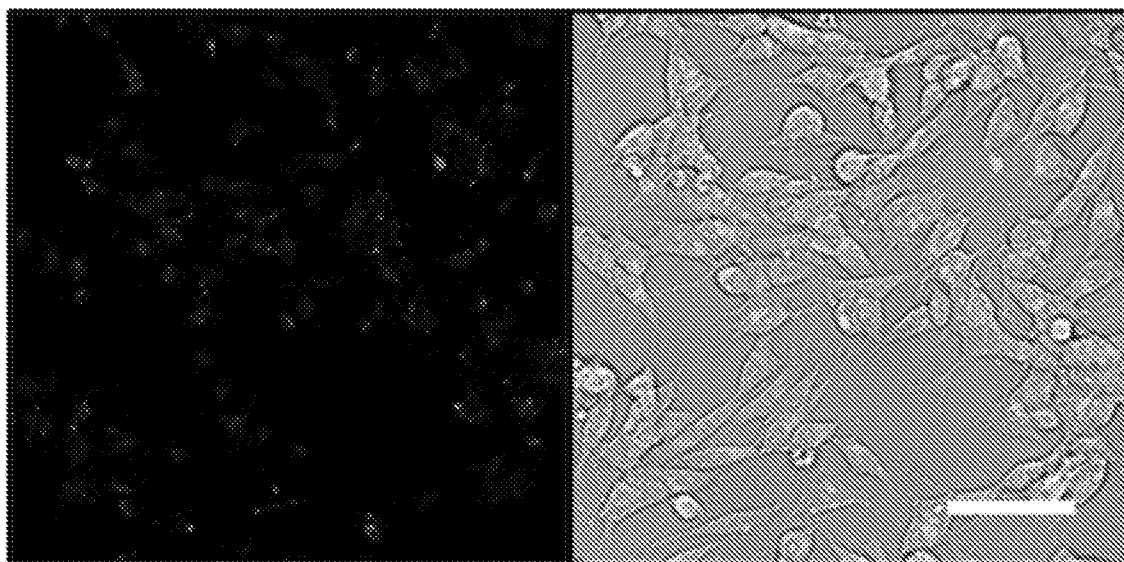


(c) 化合物 22

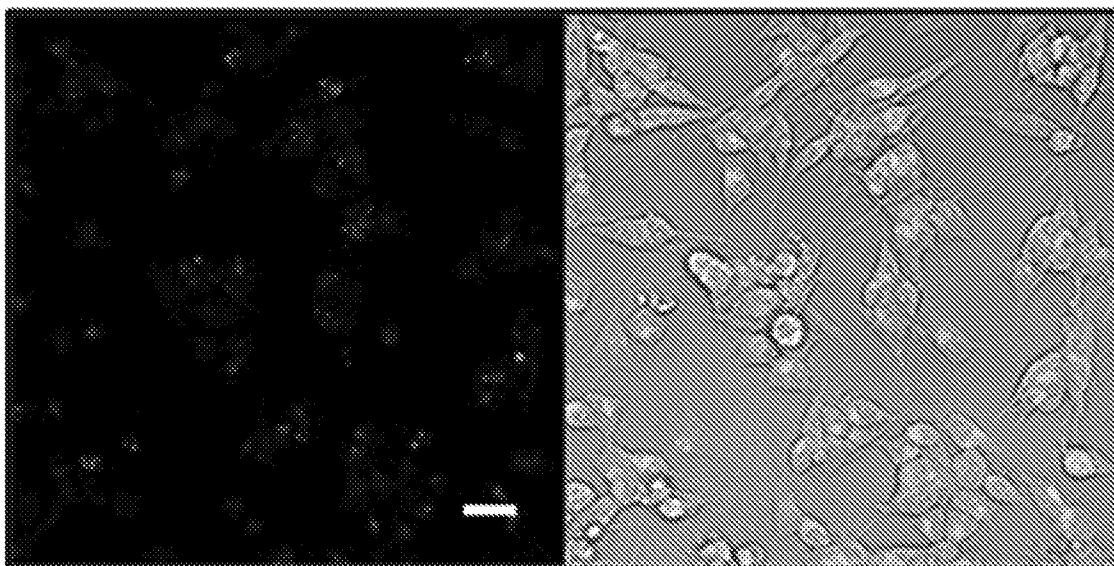


[図14]

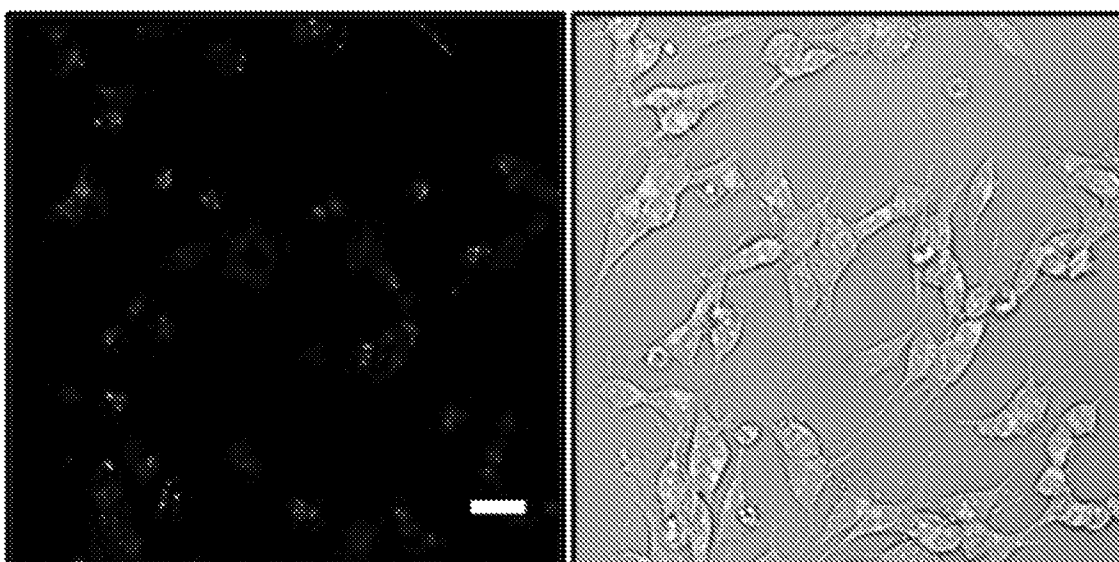
(a) 化合物 23



(b) 化合物 38



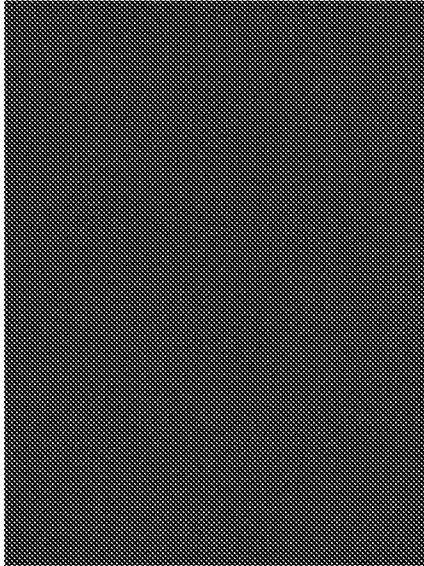
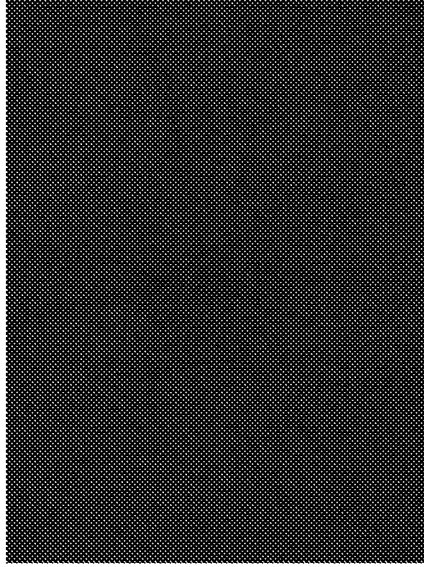
(c) 化合物 56



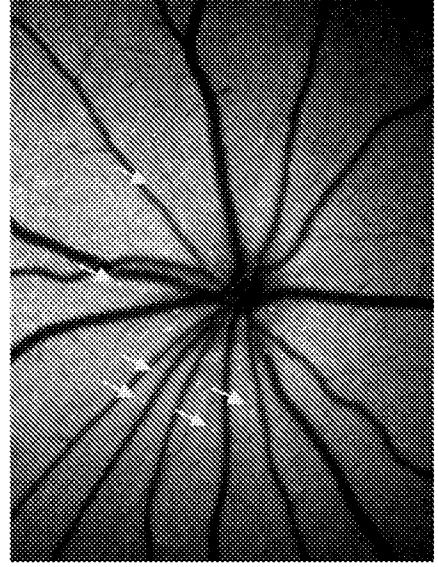
[図15]

ラットNMDA障害モデル 化合物19

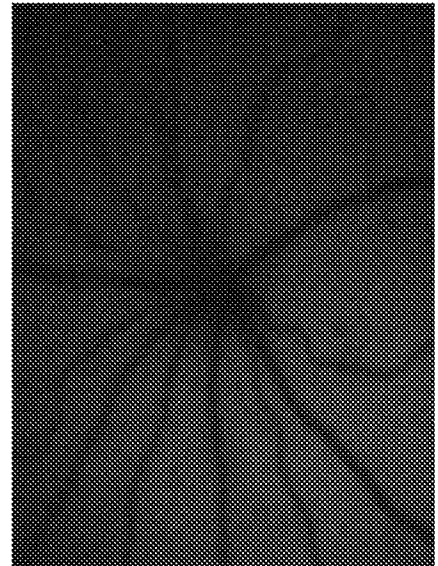
a. PBS ベースライン c. NMDA障害 ベースライン



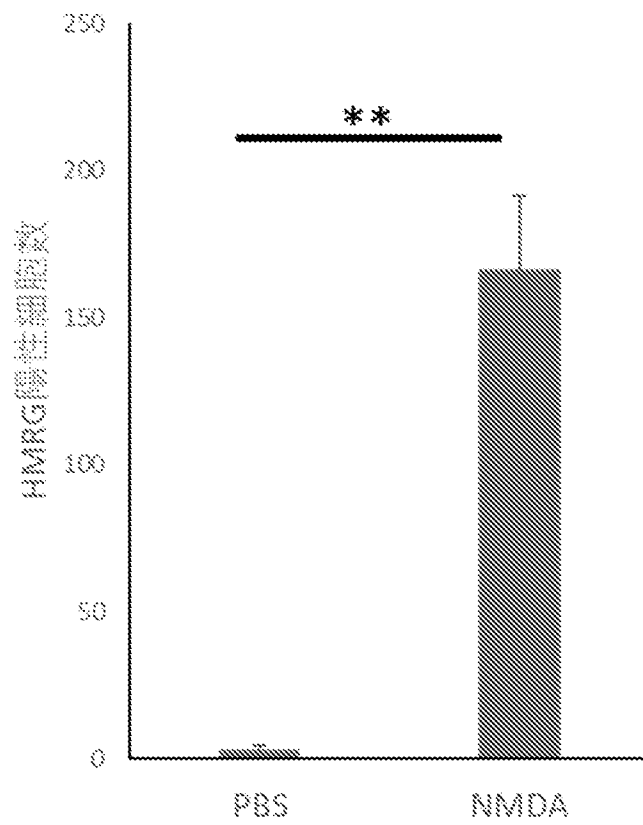
d. NMDA障害



b. PBS



[図16]



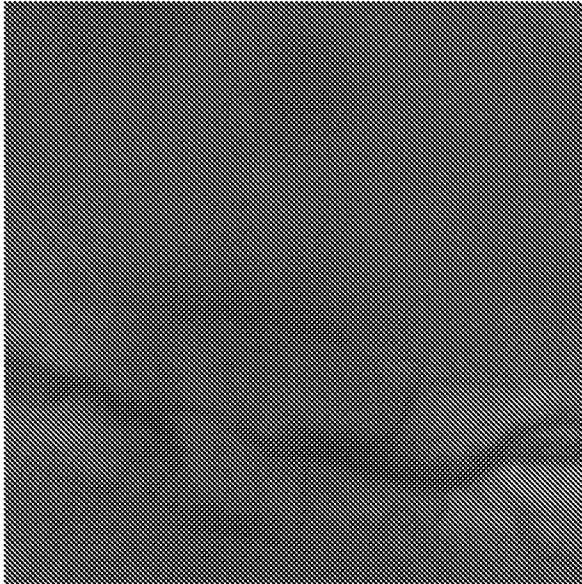
N = 6 (各群)

** P < 0.001 (Student t test)

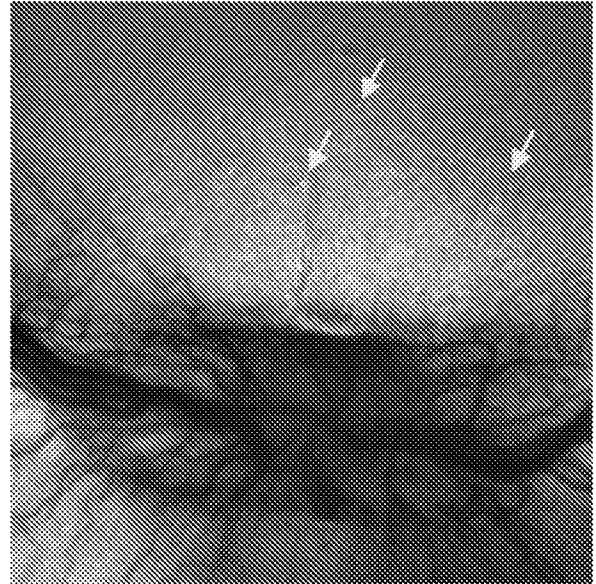
[図17]

ウサギNMDA 化合物 1 9 (19 μ l)

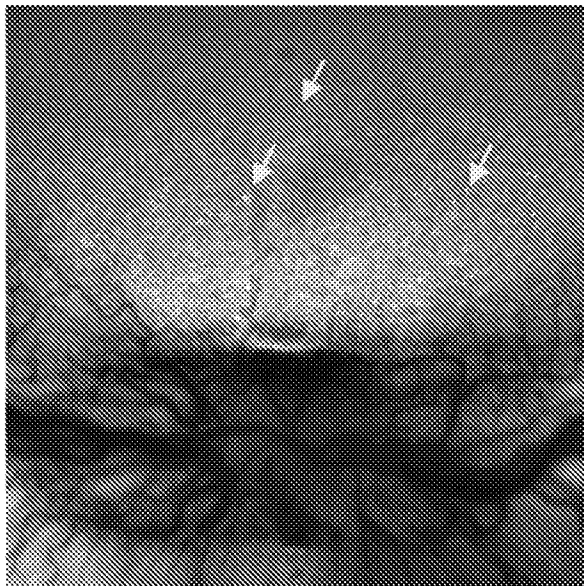
a. NMDA障害
ベースライン



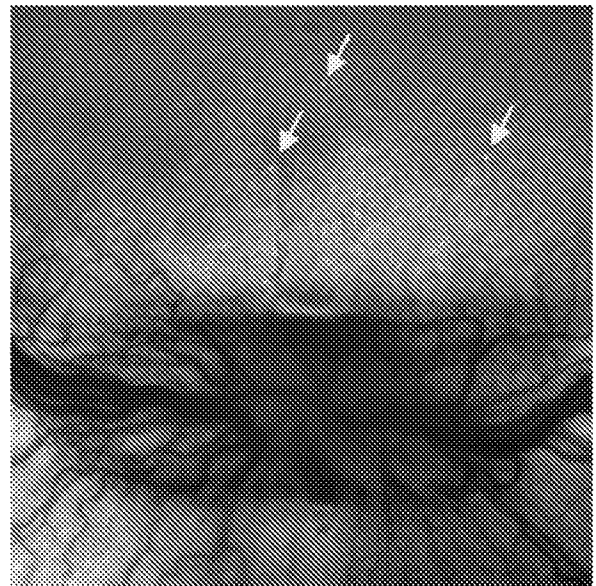
b. NMDA障害30分後



c. NMDA障害45分後



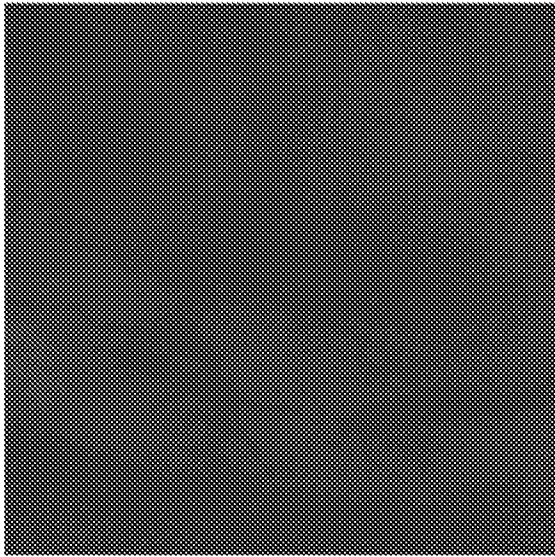
d. NMDA障害60分後



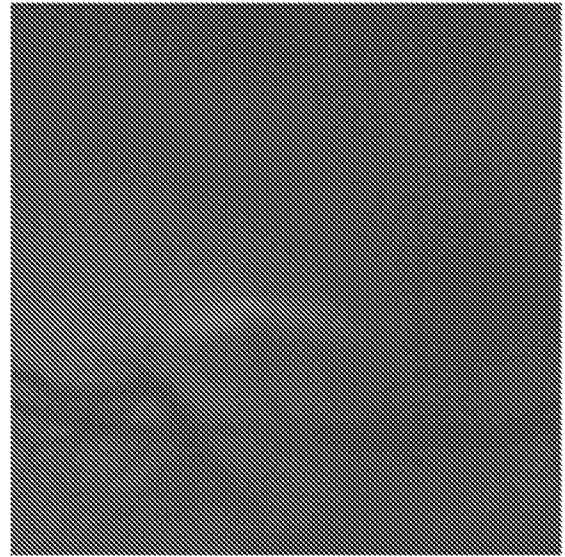
[図18]

ウサギPBS 化合物 1 9 (19 μ l)

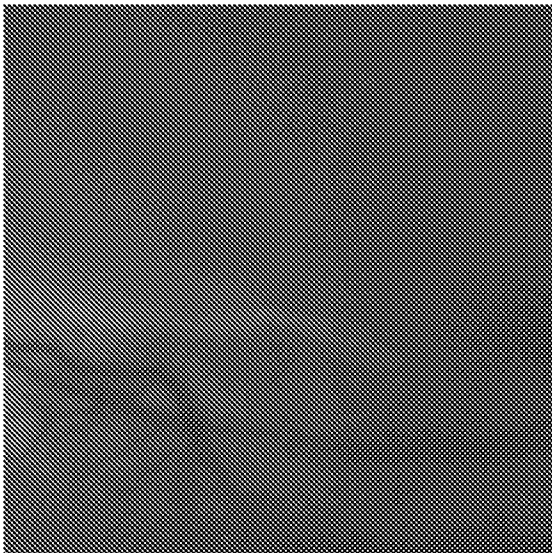
a. PBS ベースライン



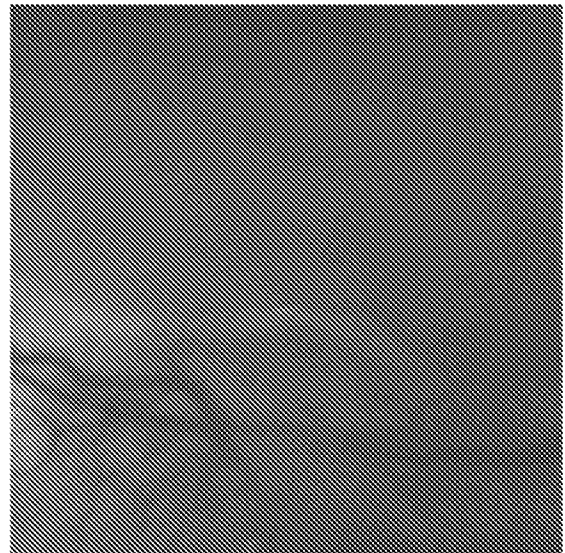
b. PBS 30分後



c. PBS 45分後



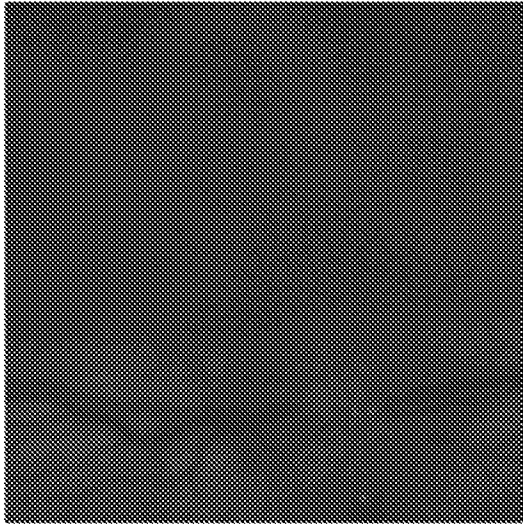
d. PBS 60分後



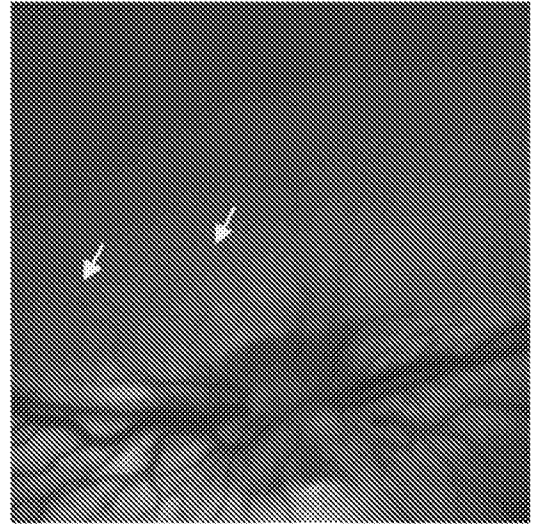
[図19]

ウサギNMDA 化合物 1 6 (19 μ l)

a. NMDA障害
ベースライン



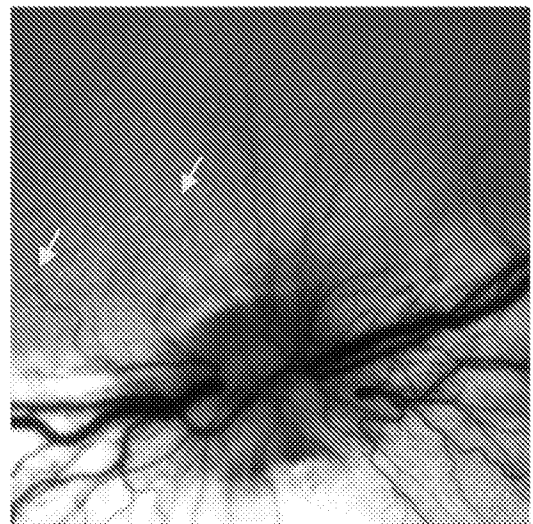
b. NMDA障害30分後



c. NMDA障害45分後



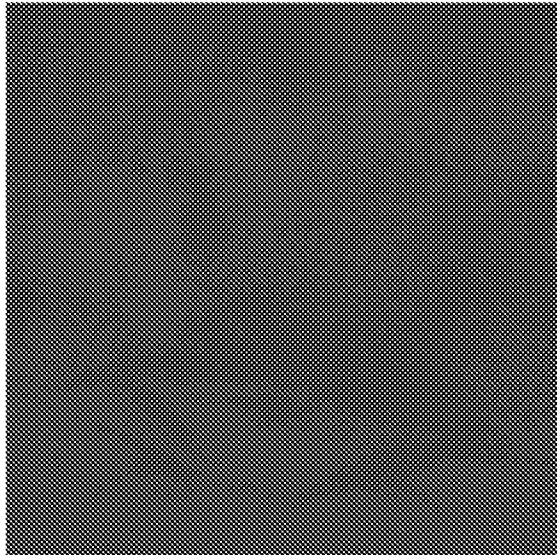
d. NMDA障害60分後



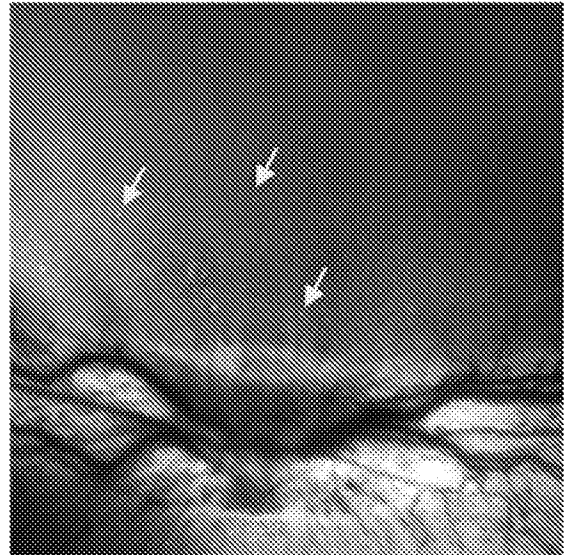
[図20]

ウサギNMDA 化合物 1 6 (38 μ l)

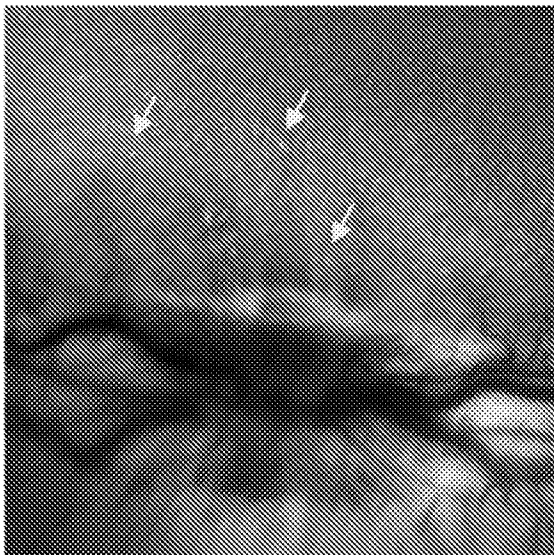
a. NMDA障害
ベースライン



b. NMDA障害30分後



c. NMDA障害45分後



d. NMDA障害60分後



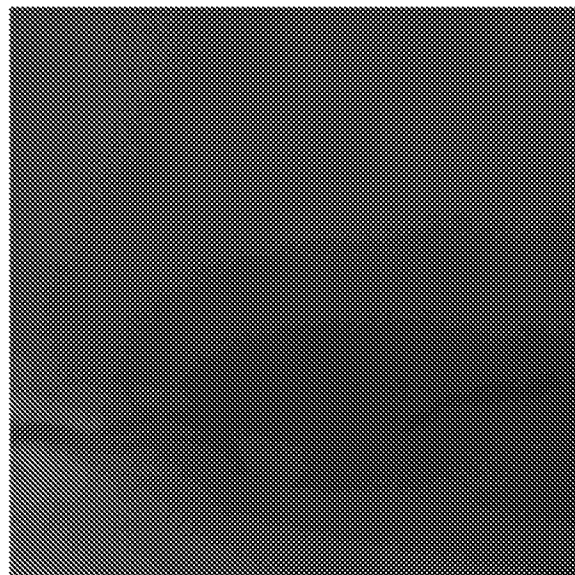
[図21]

ウサギPBS 化合物 1 6 (19 μ l)

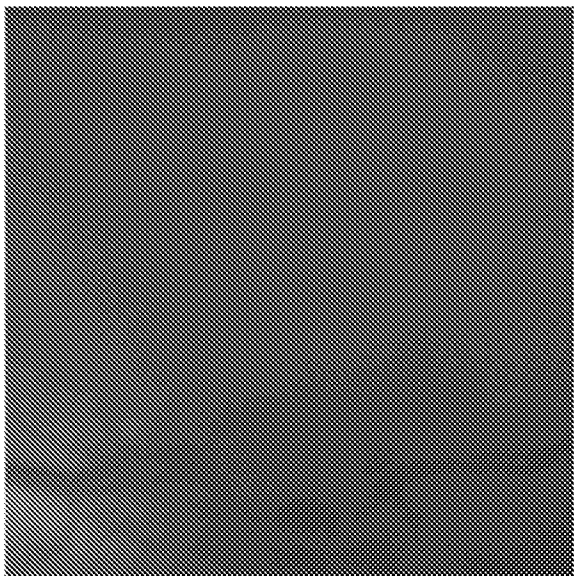
a. PBS ベースライン



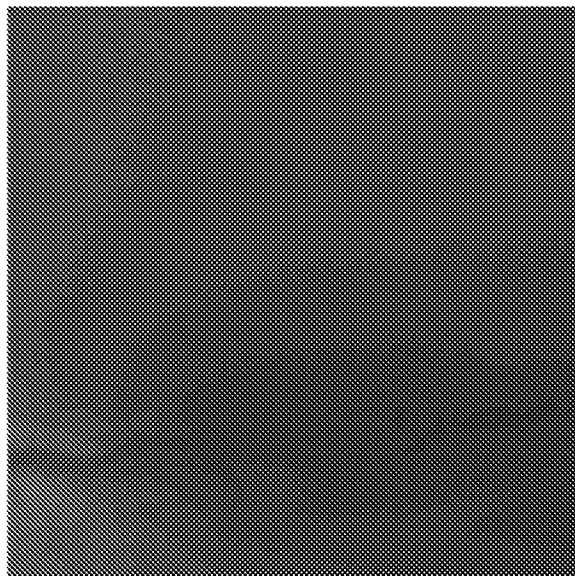
b. PBS 30分後



c. PBS 45分後



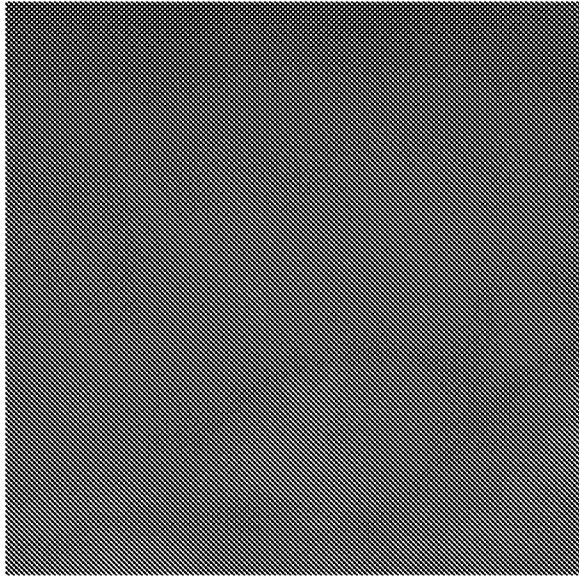
d. PBS 60分後



[図22]

ウサギPBS 化合物 1 6 (38 μ l)

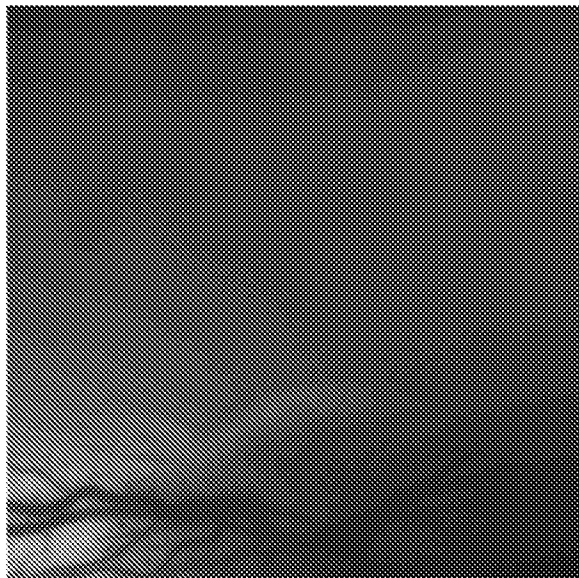
a. PBS ベースライン



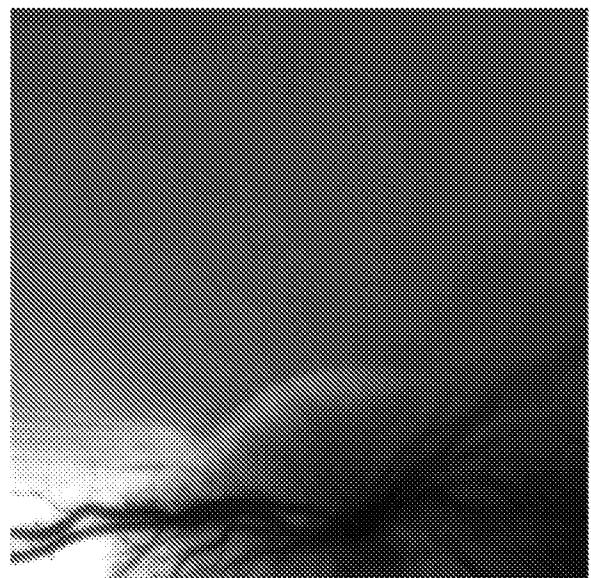
b. PBS 30分後



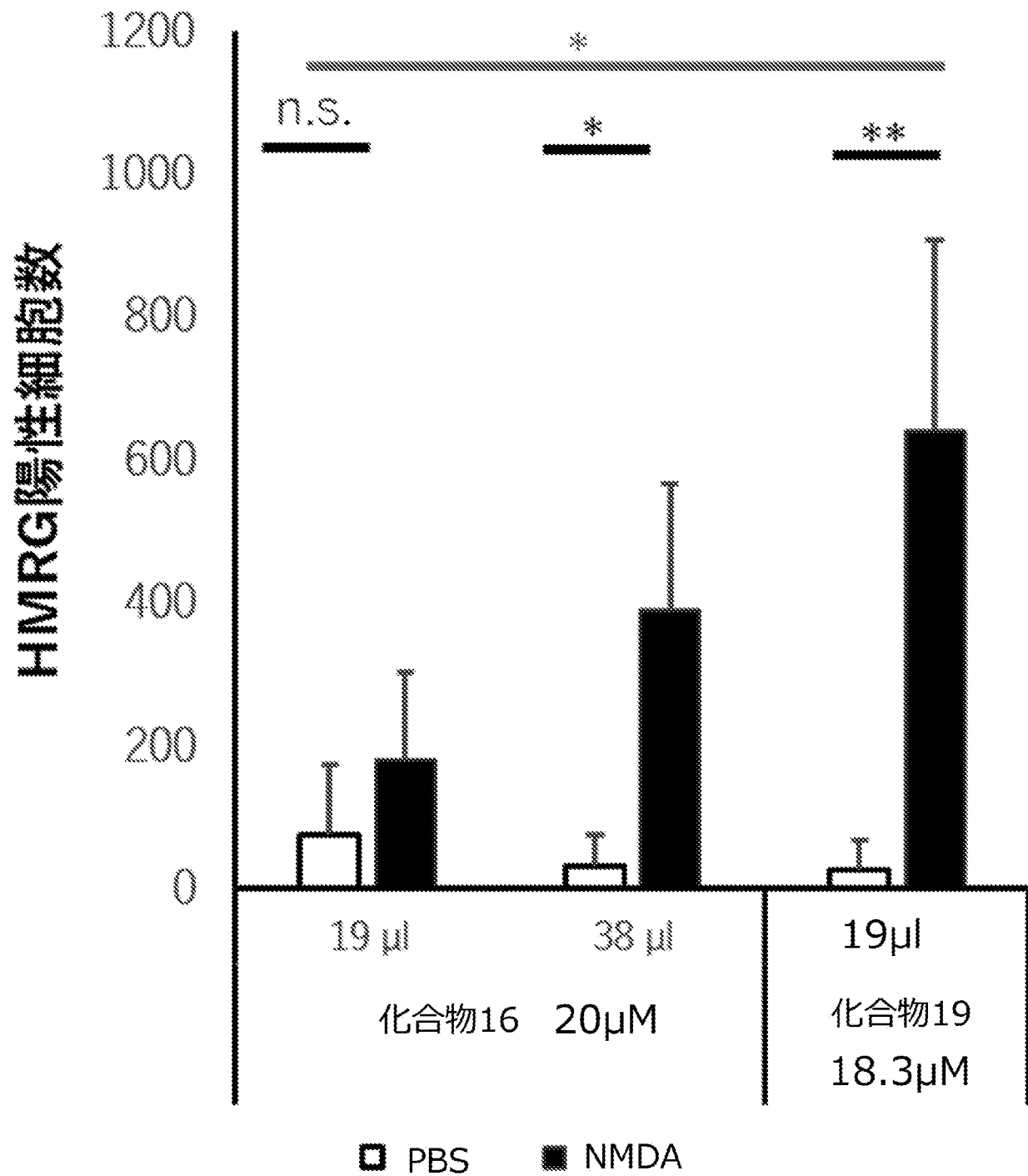
c. PBS 45分後



d. PBS 60分後



[図23]

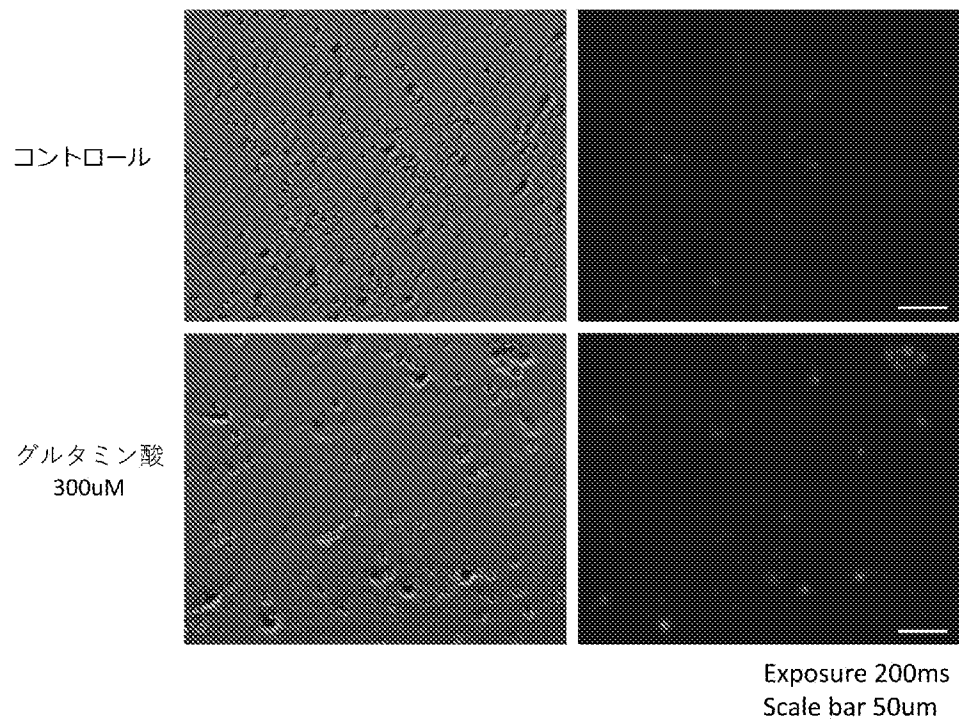


N = 3-5

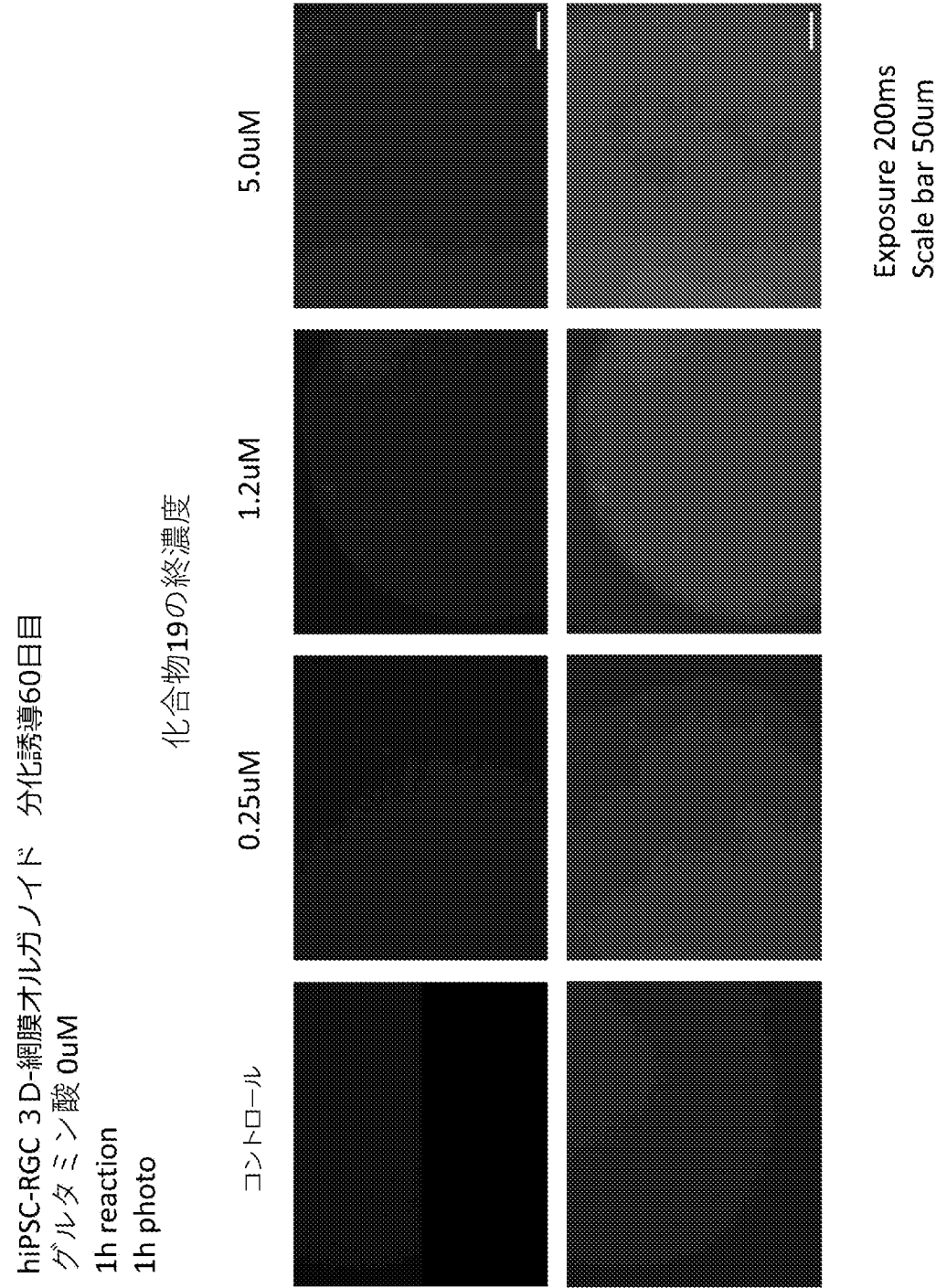
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student t test)

[図24]

単離された3D-網膜オルガノイド由来 hiPSC-RGC



[図25]



[図26]

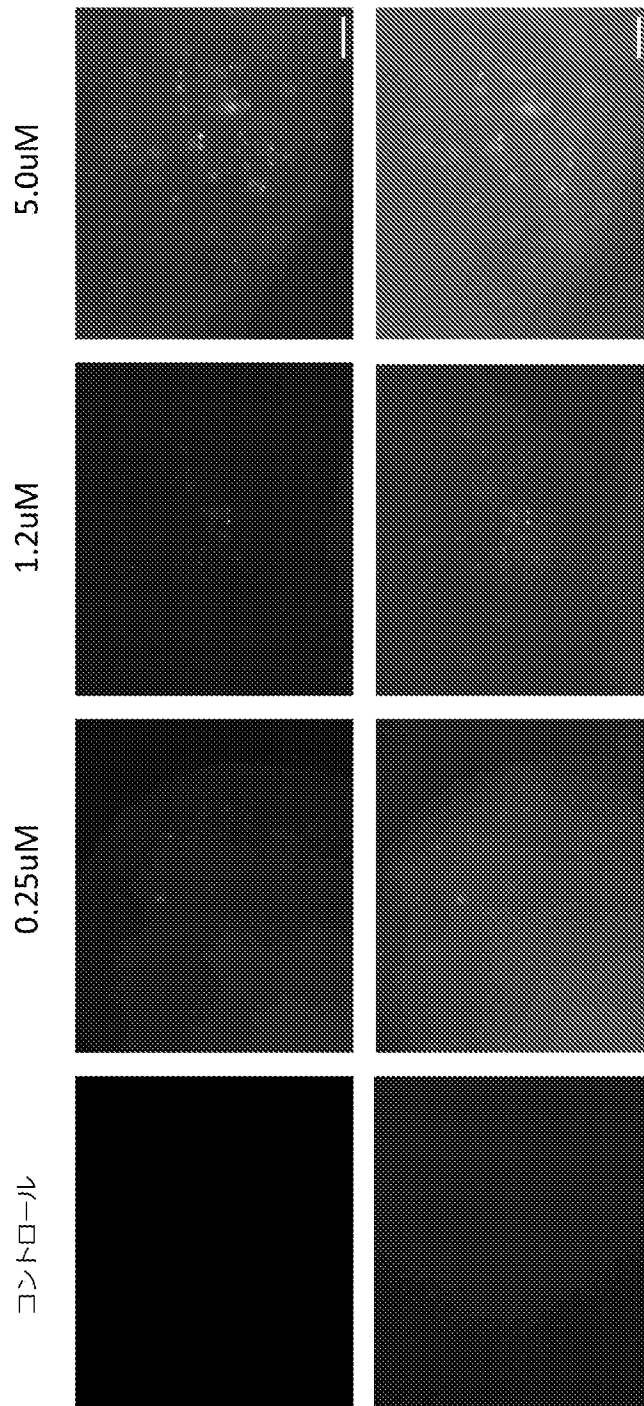
hiPSC-RGC 3D-網膜オルガノイド 分化誘導60日目

グルタミン酸 300uM

1h reaction

1h photo

化合物19の終濃度

Exposure 200ms
Scale bar 50um

[図27]

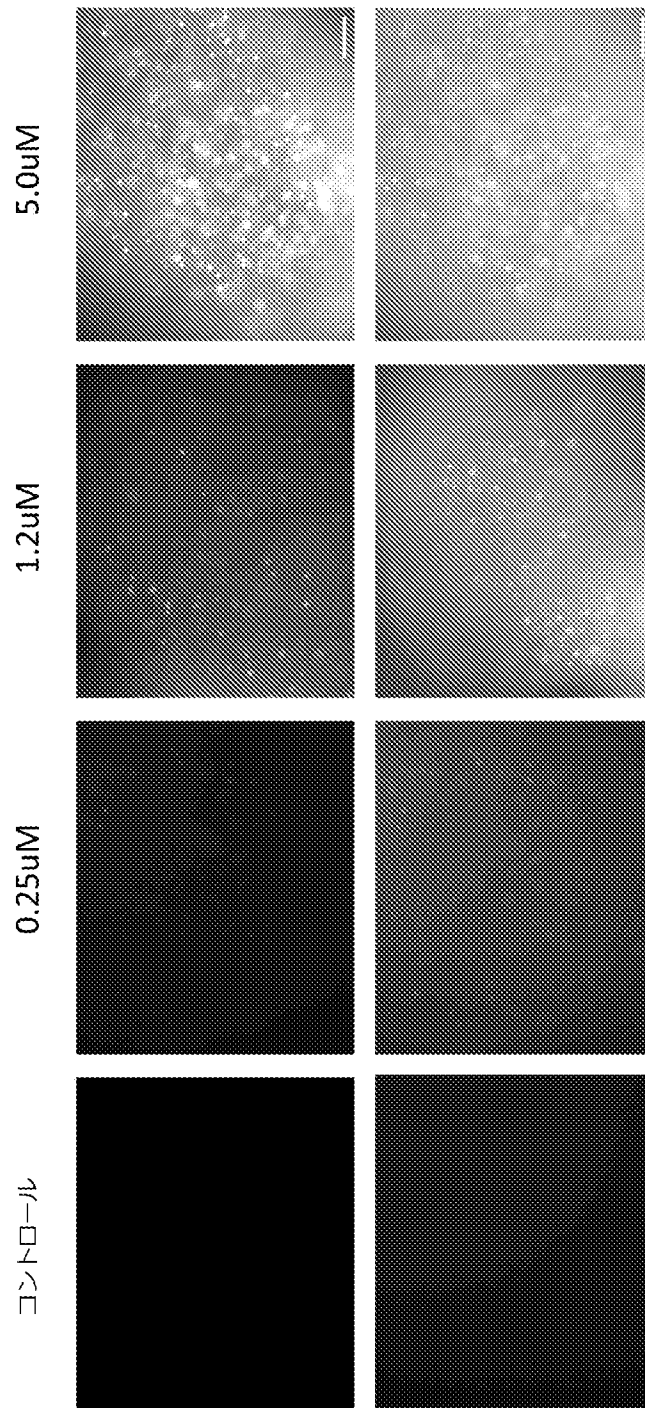
hiPSC-RGC 3D-網膜オルガノイド 分化誘導60日目

グルタミン酸 1mM

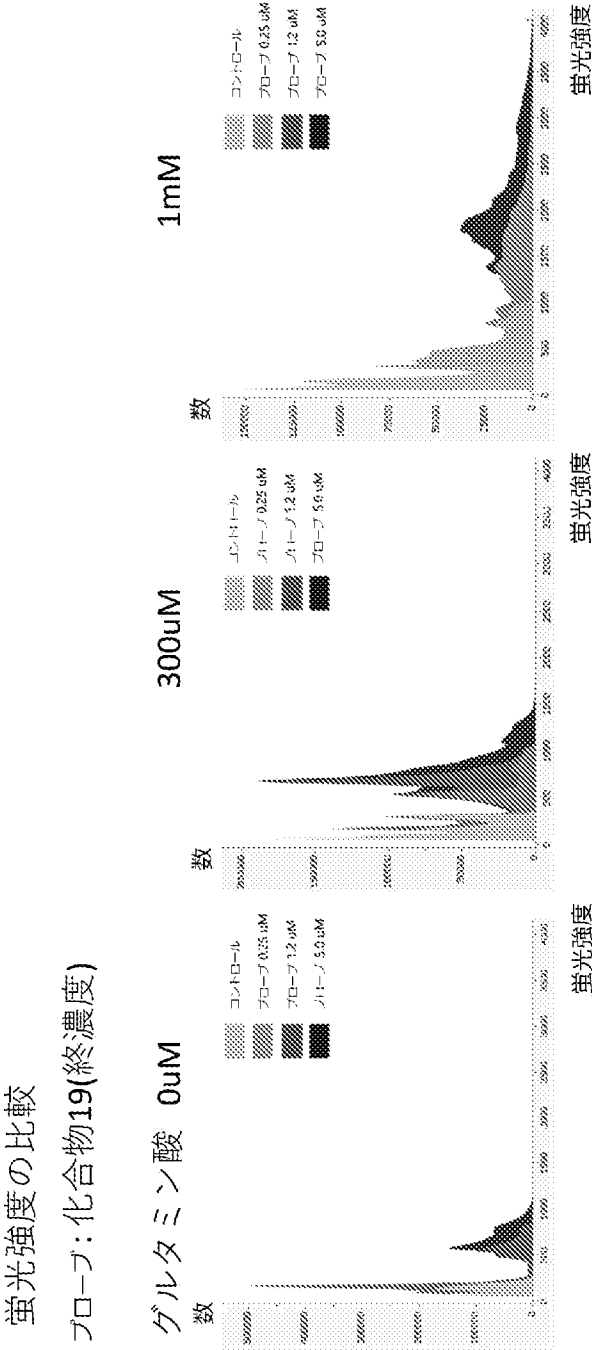
1h reaction

1h photo

化合物19の終濃度

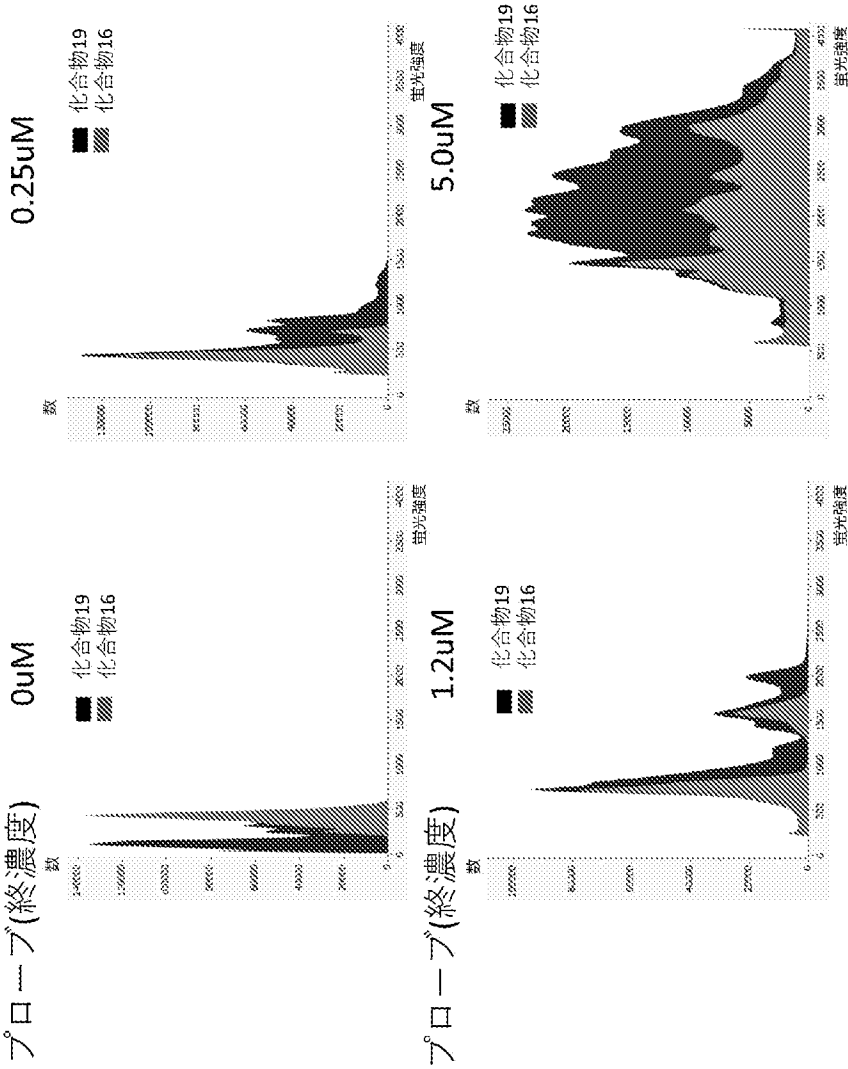
Exposure 200ms
Scale bar 50um

[図28]



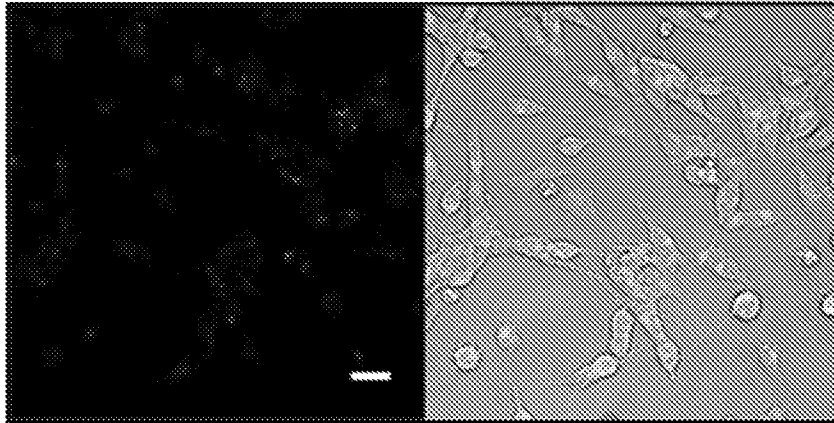
[図29]

化合物16と化合物19との蛍光強度の比較
グルタミン酸 1mM
1h reaction
1h photo

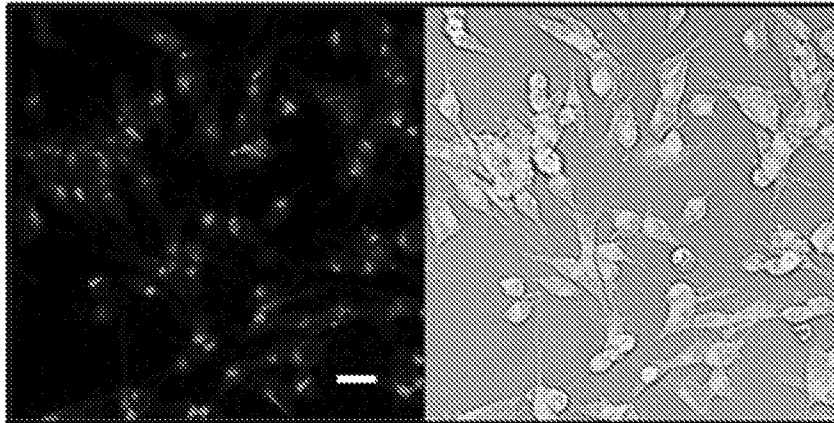


[図30]

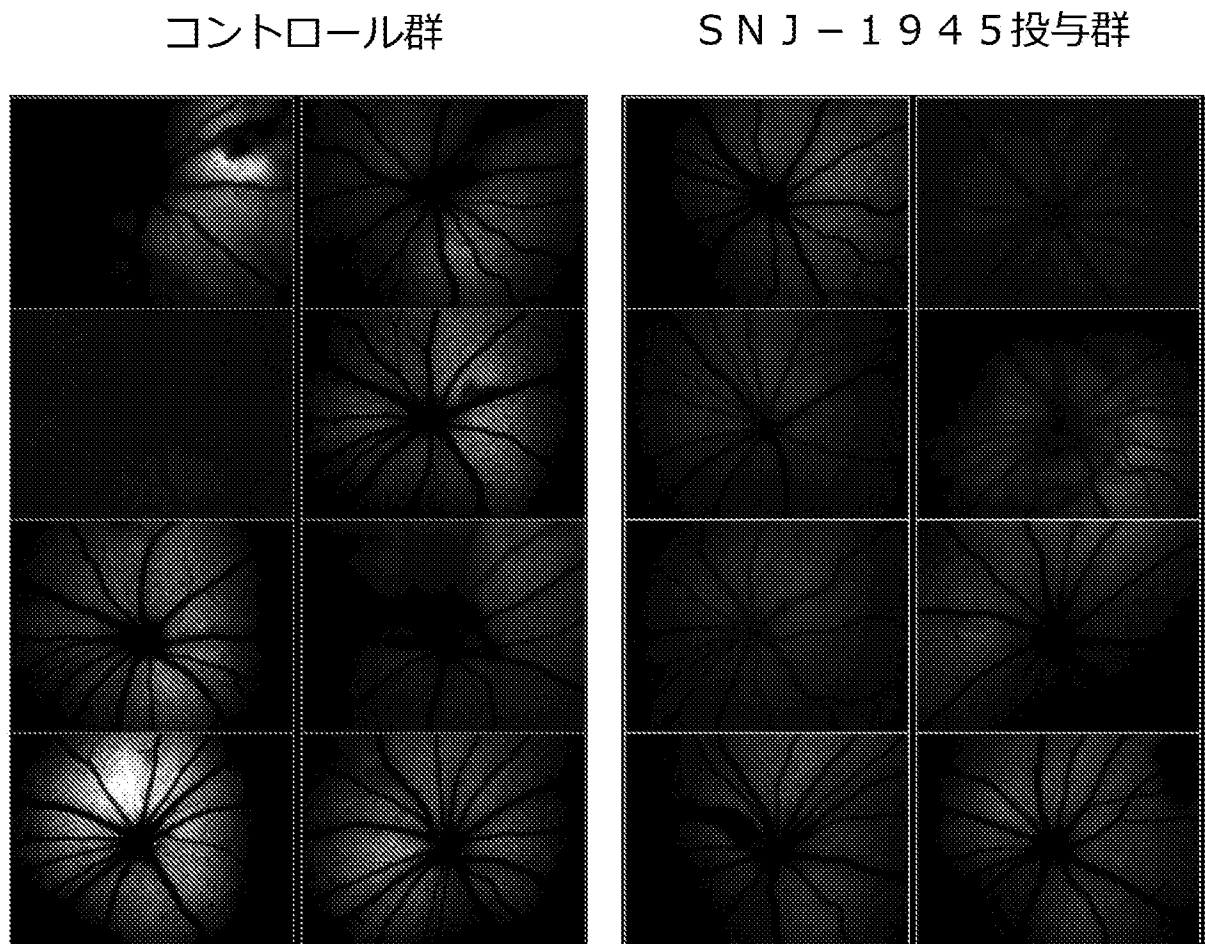
(a) Compound 19, SNJ1945



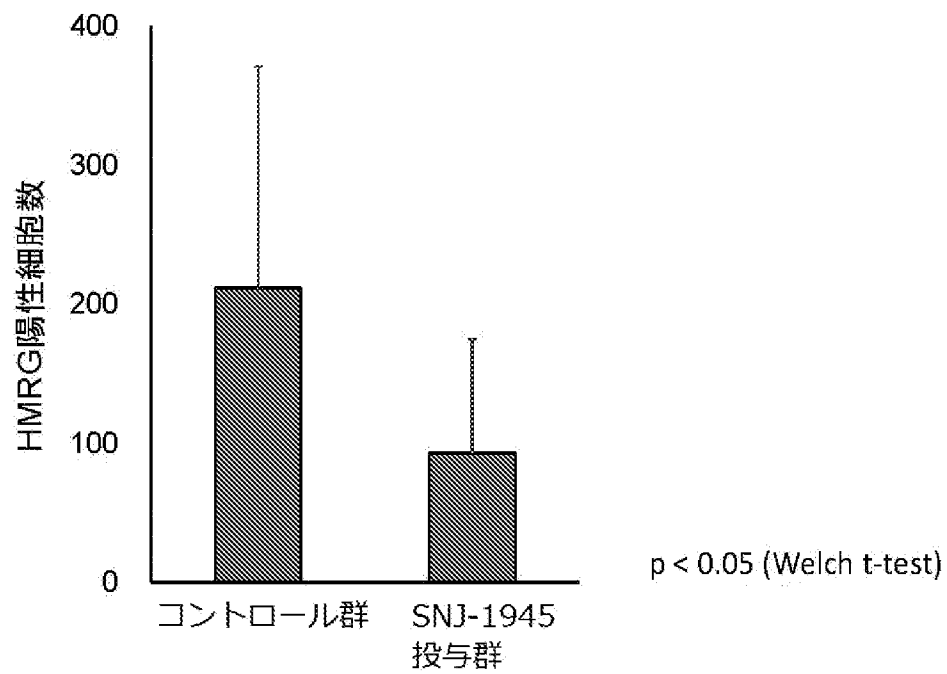
(b) Compound 19



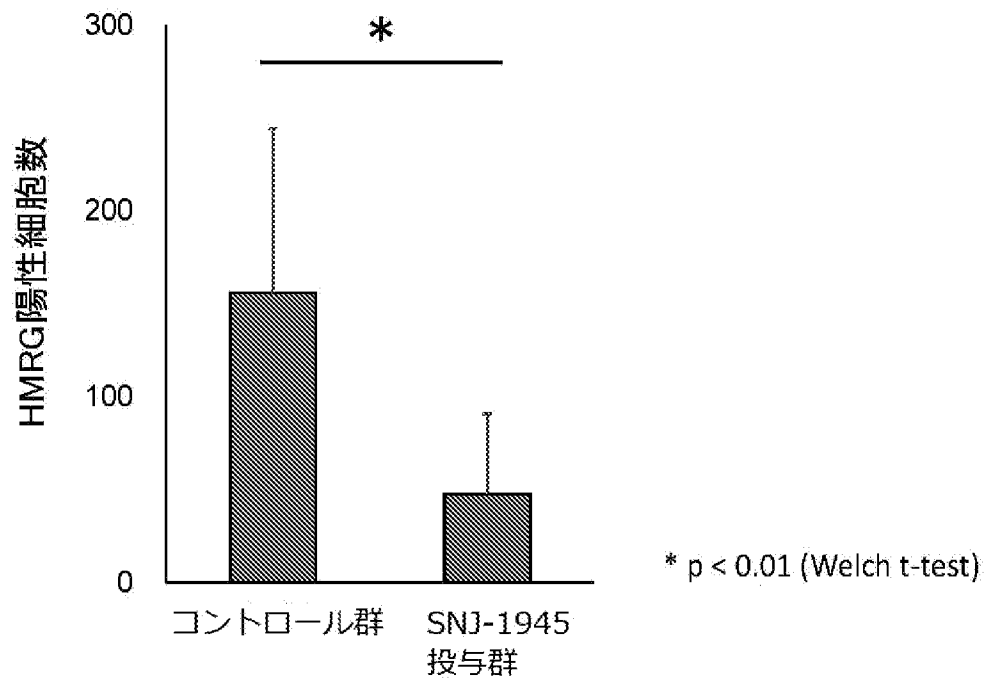
[図31]



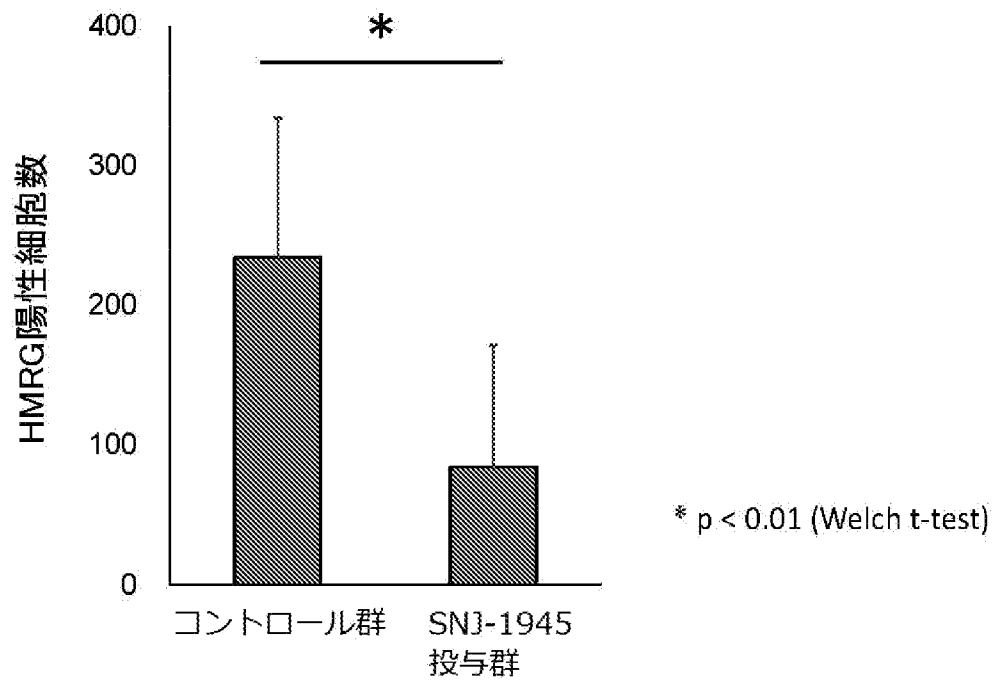
[図32]



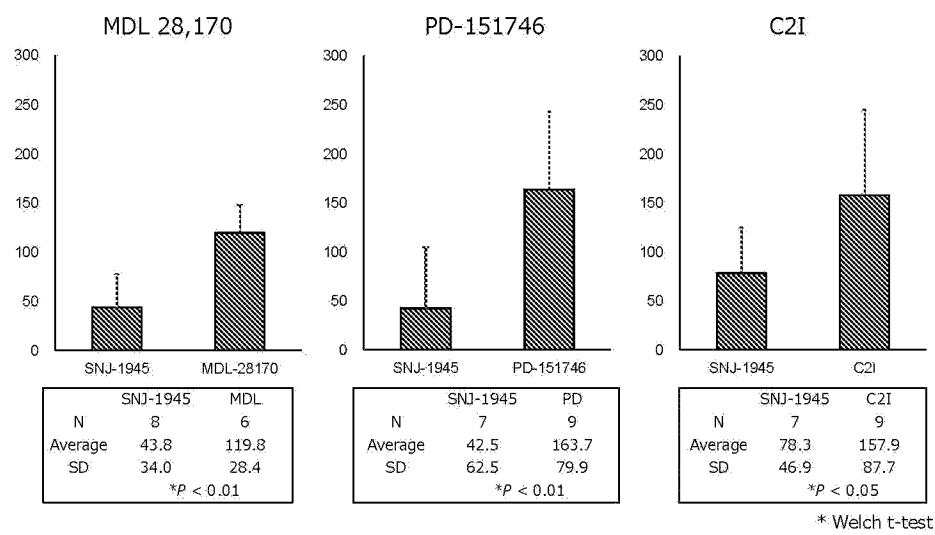
[図33]



[図34]

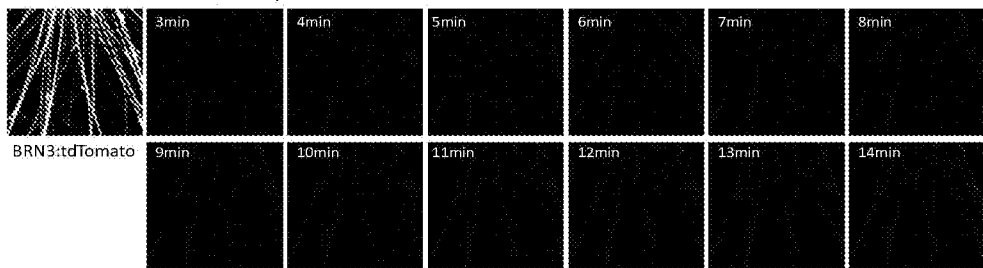


[図35]

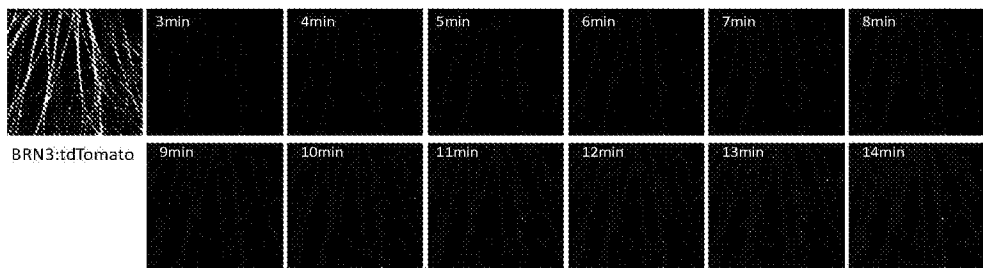


[図36]

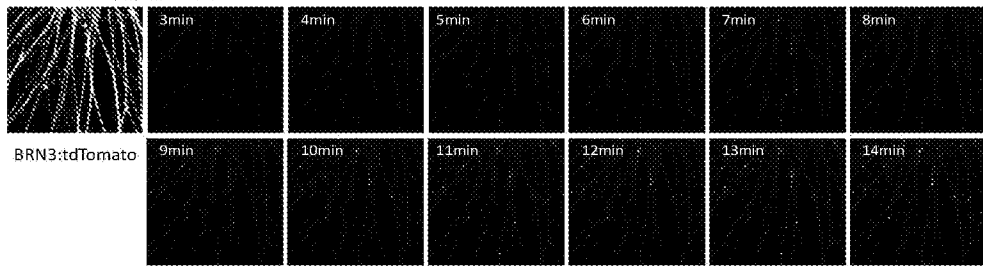
(a) 50nM A23187 + 100μM SNJ-1945



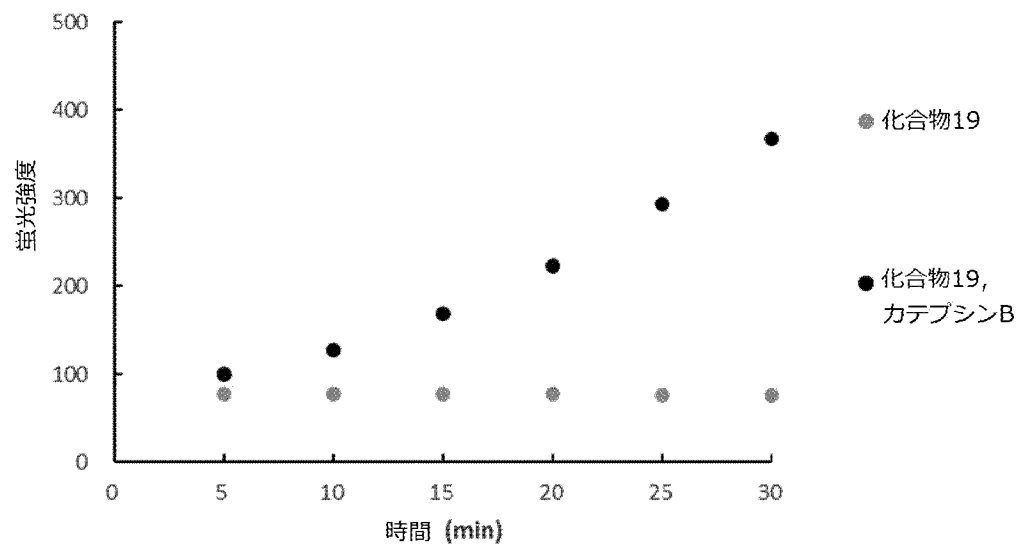
(b) Control



(c) 50 nM A23187



[図37]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/025205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/062(2006.01)i; **A61K 49/00**(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i; **C12Q 1/37**(2006.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i
 FI: C07K5/062; C12Q1/37; C12Q1/02; A61K49/00; G01N33/68

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)

C07K5/062; A61K49/00; C12Q1/02; C12Q1/37; G01N33/68

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/137004 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 01 September 2016 (2016-09-01)	1-25
A	WO 2014/136780 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 12 September 2014 (2014-09-12)	1-25
A	JP 2004-520850 A (GENETHON) 15 July 2004 (2004-07-15)	1-25
A	JP 2014-505685 A (ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION) 06 March 2014 (2014-03-06)	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2022

Date of mailing of the international search report

06 September 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/025205

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016/137004	A1	01 September 2016	US	2018/0162871	A1	
				EP	3275889	A1	
WO	2014/136780	A1	12 September 2014	US	2016/0102336	A1	
JP	2004-520850	A	15 July 2004	US	2004/0180395	A1	
				WO	2003/002730	A2	
				EP	1399545	A2	
				CN	1514878	A	
JP	2014-505685	A	06 March 2014	US	2014/0135380	A1	
				WO	2012/089352	A1	
				EP	2658982	A1	
				KR	10-2013-0136494	A	
				CA	2822161	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 5/062(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/37(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: C07K5/062; C12Q1/37; C12Q1/02; A61K49/00; G01N33/68		
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）） C07K5/062; A61K49/00; C12Q1/02; C12Q1/37; G01N33/68 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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
A	WO 2016/137004 A1 (国立大学法人 東京大学) 01.09.2016 (2016-09-01)	1-25
A	WO 2014/136780 A1 (国立大学法人 東京大学) 12.09.2014 (2014-09-12)	1-25
A	JP 2004-520850 A (ジェネトン) 15.07.2004 (2004-07-15)	1-25
A	JP 2014-505685 A (アローヘッド リサーチ コーポレイション) 06.03.2014 (2014-03-06)	1-25
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.08.2022		国際調査報告の発送日 06.09.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 千葉 直紀 4B 3434 電話番号 03-3581-1101 内線 3430

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/025205

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2016/137004	A1	01.09.2016	US	2018/0162871	A1	
				EP	3275889	A1	
WO	2014/136780	A1	12.09.2014	US	2016/0102336	A1	
JP	2004-520850	A	15.07.2004	US	2004/0180395	A1	
				WO	2003/002730	A2	
				EP	1399545	A2	
				CN	1514878	A	
JP	2014-505685	A	06.03.2014	US	2014/0135380	A1	
				WO	2012/089352	A1	
				EP	2658982	A1	
				KR	10-2013-0136494	A	
				CA	2822161	A	