



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117480175 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202280041659.4

内田孝俊

(22) 申请日 2022.06.23

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

11322

(30) 优先权数据

专利代理师 龙淳 谢弘

2021-105163 2021.06.24 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2023.12.11

C07K 5/062 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/025205 2022.06.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/270607 JA 2022.12.29

(71) 申请人 东北泰克诺亚奇股份有限公司

地址 日本宫城县

申请人 五稜化药株式会社

千寿制药株式会社

(72) 发明人 中泽彻 铃木悠记 冈隆之

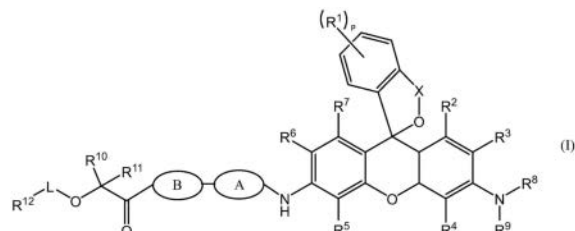
权利要求书4页 说明书45页 附图35页

(54) 发明名称

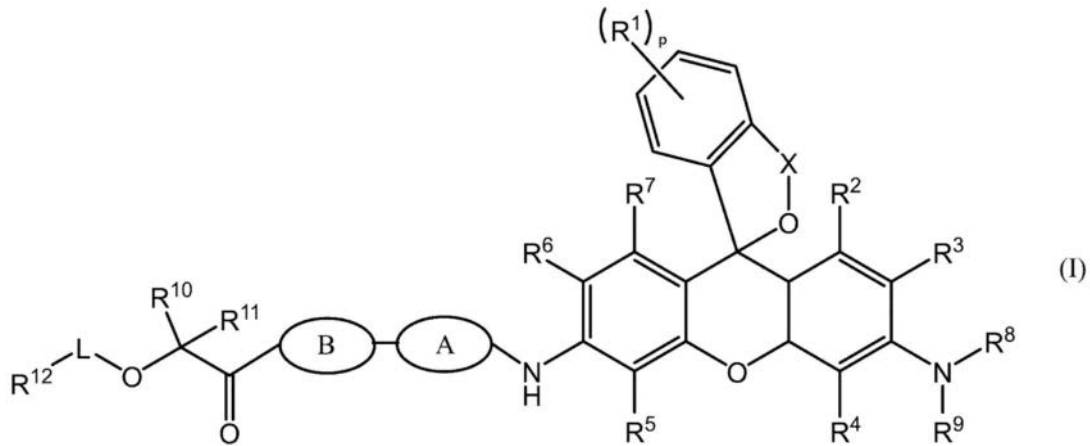
荧光探针

(57) 摘要

本发明的目的在于提供以高灵敏度检测钙蛋白酶活性的荧光探针。本发明通过在肽链的N末端结合具有与氧原子结合的 α 碳的酰胺基,来使与钙蛋白酶的酶反应性提高。与以往报告的HMRG荧光探针相比,本发明的探针与钙蛋白酶的反应性提高,因此本发明提供以更高灵敏度检测钙蛋白酶活性的荧光探针。具体而言,本发明涉及下述通式(I)所示的化合物或其盐。



1. 一种下述的通式 (I) 所示的化合物或其盐:



式中, A和B分别独立地表示相同或不同的氨基酸残基,

其中, A与结合于A的NH之间的键为A的C末端与该NH之间的酰胺键, A与B以酰胺键结合, 且B与结合于B的羰基(C=O)之间的键为B的N末端与该羰基(C=O)之间的酰胺键;

R^1 相同或不同, 表示结合于苯环的取代基;

p表示0~4的整数;

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 分别独立地表示氢原子、羟基(OH基)、卤原子、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基;

R^8 和 R^9 分别独立地表示氢原子、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基, 或者 R^8 与 R^9 可以结合形成环, 或者 R^3 与 R^8 可以结合形成环, 和/或 R^4 与 R^9 可以结合形成环;

X表示直链或支链C1~C3亚烷基;

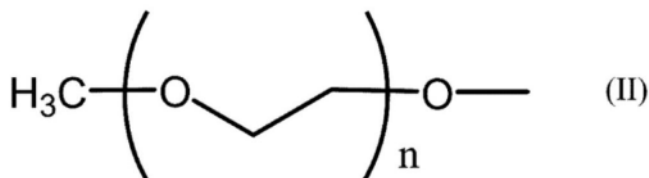
R^{10} 和 R^{11} 分别独立地表示氢原子、羟基(OH)、烷氧基、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基, 或者 R^{10} 与 R^{11} 可以结合形成环;

R^{12} 表示氢原子; 可以被取代的直链、支链或环状烷基; 可以被取代的直链或支链烯基; 可以被取代的直链或支链炔基; 可以被取代的芳基; 或可以被取代的杂环基, 或者可以与 R^{10} 或 R^{11} 结合形成环;

L表示酰胺键、酯键或—(直链或支链亚烷基—O—)_n—, 或者表示单键, 式—(直链或支链亚烷基—O—)_n—中, n为1~10的整数。

2. 如权利要求1所述的化合物或其盐, 其特征在于:

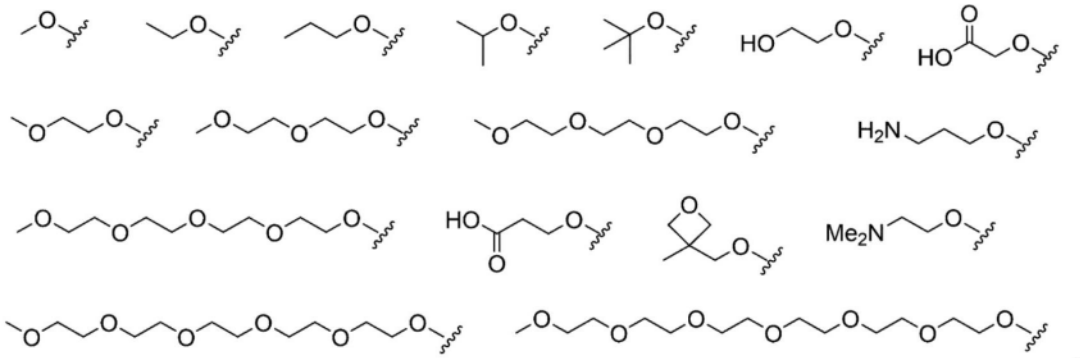
在所述式 (I) 中, —O—L— R^{12} 所示的基团为以下的式 (II) 所示的基团,



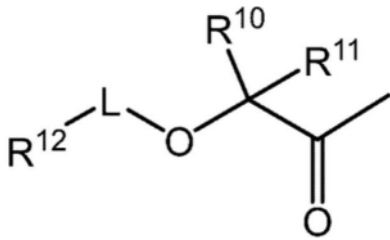
式 (II) 中, n表示0~10的整数。

3. 如权利要求1所述的化合物或其盐, 其特征在于:

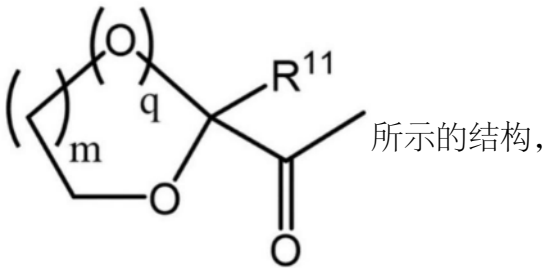
在所述式 (I) 中, —O—L— R^{12} 所示的基团为羟基或选自以下的基团:



4. 如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于:
在所述式(I)中,



所示的部分结构为以下的式:



式中,m为1~3的整数,q表示0或1。

5. 如权利要求1~权利要求4中任一项所述的化合物或其盐,其特征在于:

R¹⁰和R¹¹为烷基,或者互相结合为环烷基。

6. 如权利要求1~权利要求5中任一项所述的化合物或其盐,其特征在于:

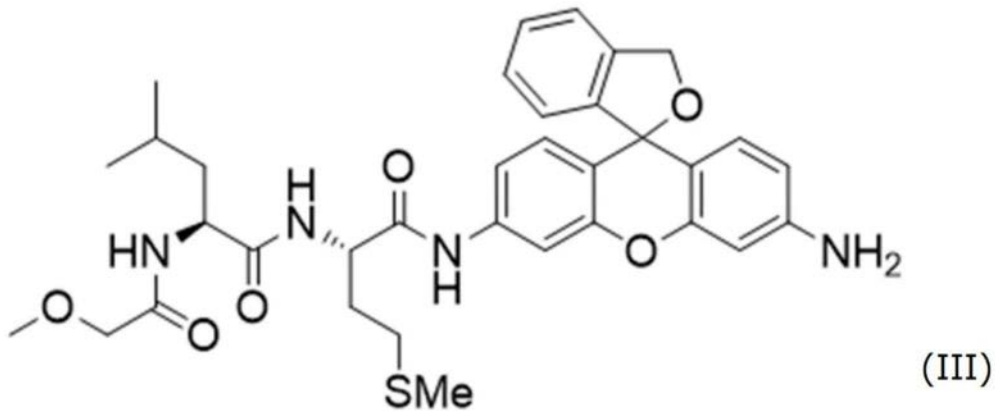
在所述式(I)中,氨基酸B为Leu。

7. 如权利要求1~权利要求6中任一项所述的化合物或其盐,其特征在于:

在所述式(I)中,氨基酸A为Met、Thr、His、Tyr、Phe、Ser、Gln、Arg、Lys、Nle或MetO。

8. 如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于:

由下述的通式(III)所示:



9. 一种荧光探针,其特征在于:

包含权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐。

10. 如权利要求9所述的荧光探针,其特征在于:

用于检测钙蛋白酶活性。

11. 一种样品中的钙蛋白酶活性的测定方法,其特征在于,包括:

使权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐与样品接触的步骤;和

测定从所述接触后的权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物发出的荧光的步骤。

12. 一种与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断用组合物,其特征在于,包含:

权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐。

13. 如权利要求12所述的诊断用组合物,其特征在于:

所述与钙蛋白酶活性相关的疾病为眼部疾病、肌肉疾病、糖尿病、炎症性疾病、自身免疫疾病、神经疾病、心脏或血管疾病、癌症、脑肿瘤、衰老综合征、早衰症、感染症、创伤性脑损伤、马查多-约瑟夫病、先兆子痫或肺纤维化。

14. 如权利要求13所述的诊断用组合物,其特征在于:

所述眼部疾病为青光眼、常染色体显性新生血管炎性玻璃体视网膜病变、视网膜色素变性、老年性黄斑变性、糖尿病性视网膜神经病变或视网膜血管阻塞性疾病、视网膜缺血或白内障。

15. 如权利要求14所述的诊断用组合物,其特征在于:

所述青光眼为正常眼压青光眼。

16. 如权利要求13所述的诊断用组合物,其特征在于:

所述癌症为黑色素瘤、乳癌、大肠癌、肾癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌或软组织肉瘤。

17. 一种提供用于诊断哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其特征在于,包括:

使权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐与来自所述哺乳类对象的样品接触的步骤;和

测定从所述接触后的权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐发出的荧光的步骤。

18. 一种用于判定候补化合物对与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗效果的试验方法,

其特征在于,包括:

在与钙蛋白酶活性相关的疾病模型中,制备未施用候补化合物和施用候补化合物的样品的步骤;

使权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐与所述样品接触的步骤;和
测定从所述接触后的权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐发出的荧光的步骤。

19.一种提供用于监测哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其特征在于,包括:

使权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐与来自所述哺乳类对象的样品接触的步骤;和

测定从所述接触后的权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐发出的荧光的步骤。

20.如权利要求9所述的荧光探针,其特征在于:

在使用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物的、该疾病的治疗或预防中,为了判定其效果的程度,使所述荧光探针与该医药组合物组合使用。

21.如权利要求9所述的荧光探针,其特征在于:

所述荧光探针被用于预先检查治疗对象候补或预防对象候补是否适合使用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物的治疗对象或预防对象。

22.如权利要求9所述的荧光探针,其特征在于:

用于检测组织蛋白酶活性。

23.如权利要求9所述的荧光探针,其特征在于:

用于检测胰液。

24.一种胰液检测用试剂盒,其特征在于:

包含权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐。

25.一种含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物,其特征在于:

被施用于以下治疗或预防对象,所述治疗或预防对象是以治疗或预防对象候补或者来自该候补的样品中的钙蛋白酶与权利要求1~权利要求8中任一项所述的化合物或其盐的相互作用引起的荧光应答为指标,被判定为对钙蛋白酶抑制剂具有感受性的治疗或预防对象。

荧光探针

技术领域

[0001] 本发明涉及检测钙蛋白酶的活性的荧光探针。

背景技术

[0002] 钙蛋白酶是以Ca²⁺依赖性的方式被活化的半胱氨酸蛋白酶,是通过底物蛋白质的限制切割来调节该蛋白质的功能或结构的调节剂分子。钙蛋白酶被报道与各种生命现象相关,而另一方面,其活性或其基因的致病性突变与神经退行性疾病、心脏和肌肉疾病、缺血性疾病、癌症、眼部疾病等各种疾病有关。此外,还存在钙蛋白酶对于病原体的生存或感染等至关重要的感染症,例如已知疟疾、锥虫病、血吸虫病(Schistosomiasis)等也与钙蛋白酶有关。因此,在钙蛋白酶相关病的诊断或疾病机理的分析/药物开发研究中,使钙蛋白酶的活性可视化很重要。

[0003] 为了实时检测钙蛋白酶活性,荧光成像法是有用的手段。特别是作为不依赖于基因导入检测活细胞中的钙蛋白酶活性的手段,目前为止开发出了利用香豆素(非专利文献1)或羟甲基罗丹明绿(Hydroxymethyl Rhodamine Green,HMRG)(专利文献1)这样的有机小分子的荧光探针。

[0004] 特别是作为绿色的荧光探针,报道了使肽与作为荧光色素的羟甲基罗丹明绿(HMRG)结合得到的探针(专利文献1、非专利文献2)。HMRG探针的特征在于,在酶不存在时为无荧光性的,荧光底物通过与酶反应而变成荧光性的。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开公报W02016/137004

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY(1993)268:23593—23600

[0010] 非专利文献2:BIOCONJUGATE CHEMISTRY(2020)31:2241—2251

发明内容

[0011] 发明所要解决的技术问题

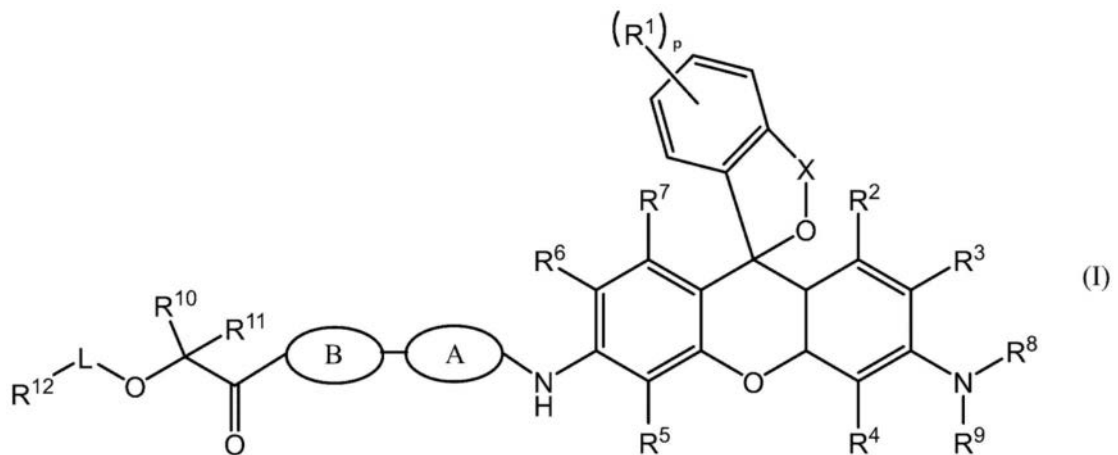
[0012] 专利文献1中记载的现有的HMRG探针在酶存在下的荧光强度仍有改善的余地。本发明的目的在于提供高灵敏度地检测钙蛋白酶活性的荧光探针。

[0013] 用于解决技术方案的技术方案

[0014] 本发明的发明人发现通过提高钙蛋白酶与荧光探针的反应性,钙蛋白酶活性的检测灵敏度提高,更具体而言,通过在荧光探针上以酰胺键结合有肽的钙蛋白酶探针的基本骨架中,在肽链的N末端结合具有与氧原子结合的 α 碳的酰胺基,来与钙蛋白酶的酶反应性提高。

[0015] 本发明涉及下述的通式(I)所示的化合物或其盐(以下,有时也称为“化合物(I)”):

[0016]



[0017] [式中,A和B分别独立地表示相同或不同的氨基酸残基,

[0018] 其中,A与结合于A的NH之间的键为A的C末端与该NH之间的酰胺键,A和B以酰胺键结合,且B与结合于B的羰基(C=O)之间的键为B的N末端与该羰基(C=O)之间的酰胺键;

[0019] R¹相同或不同,表示与苯环结合的取代基;

[0020] p表示0~4的整数;

[0021] R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶和R⁷分别独立地表示氢原子、羟基(OH基)、卤原子、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基;[0022] R⁸和R⁹分别独立地表示氢原子、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基,或者R⁸和R⁹可以结合形成环,或者R³和R⁸可以结合形成环,和/或R⁴和R⁹可以结合形成环;

[0023] X表示直链或支链C1~C3亚烷基;

[0024] R¹⁰和R¹¹分别独立地表示氢原子、羟基(OH)、烷氧基、或者可以被取代的直链、支链或环状烷基,或者R¹⁰和R¹¹可以结合形成环;[0025] R¹²表示氢原子;可以被取代的直链、支链或环状烷基;可以被取代的直链或支链烯基;可以被取代的直链或支链炔基;可以被取代的芳基;或者可以被取代的杂环基,或者可以与R¹⁰或R¹¹结合形成环;[0026] L表示酰胺键、酯键、或—(直链或支链亚烷基—O—)_n—(n为1~10的整数),或者表示单键。][0027] 在化合物(I)中,R¹表示结合于苯环的取代基。p为0~4的整数,可以为0~3、0~2、0~1、1或0。作为R¹,例如能够列举可以被取代的直链或支链烷基;可以被取代的直链或支链烷氧基;卤原子;可以被取代的氨基;取代甲硅烷基;或酰基等,不限于于这些。在p为2以上的情况下,多个R¹分别可以相同也可以不同。[0028] 在R⁸与R⁹结合形成环的情况下、R³与R⁸结合形成环的情况下、R⁴与R⁹结合形成环的情况下、R¹⁰与R¹¹结合形成环的情况下,该环可以包含杂原子(氧原子、氮原子、硫原子等),例如可以为环烷基或环状醚。在R¹²与R¹⁰或R¹¹结合形成环的情况下,该环可以为环状醚。另外这些环可以形成为3~14元、3~10元、3~8元、或3~6元环。

[0029] 在本说明书整体中,作为烷基或其他基团的烷基部分中的取代基,能够列举:卤原子、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、巯基、烷基巯基、磺酰基、烷基磺酰基、烷氧基、环状醚基、羧基、烷基羰基、烷氧基羰基、烷氧基羰基氨基、烷基羰基氧基、烷基氨基羰基、烷基羰基氨基、羰基氨基、胍基。在烷基被取代的情况下,该取代基的数量例如可以设为1~6个、1

~5个、1~4个、1~3个、1~2个、1个、2个或3个。

[0030] 作为氨基中的取代基,可以为可以被取代的直链或支链烷基。在氨基被取代的情况下,该取代基的数量可以设为1~2个、1个或2个。

[0031] 作为取代甲硅烷基的取代基,可以为可以被取代的直链或支链烷基或可以被取代的苯基。甲硅烷基的取代基的数量例如可以设为1~4个、1~3个、1~2个、1个、2个、3个或4个。

[0032] 在通式(I)中,氨基酸只要是可以利用钙蛋白酶切断的氨基酸即可,可以为天然存在的氨基酸或其衍生物,例如可以为天然氨基酸的立体异构体。作为氨基酸,例如可以为Met、Ser、Ala、Thr、Val、Tyr、Leu、Asn、Ile、Gln、Pro、Asp、Phe、Glu、Trp、Lys、Cys、Arg、Gly、His(以上,以氨基酸三字母记号表示)、正亮氨酸(Nle)、或甲硫氨酸亚砷(MetO)。

[0033] 在本说明书中,“烷基”或其他基团中的“烷基”部分是指直链、支链或环状的饱和烃基,优选为碳原子数为1~6个的饱和烃基,例如,可以列举甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、戊基、异戊基、2,3-二甲基丙基、己基、环丙基、环丁基、环戊基和环己基等,更优选为C1~5烷基,例如,可以列举甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、戊基、异戊基、或2,3-二甲基丙基。更加优选为C1~3烷基,例如为甲基、乙基、正丙基和异丙基,最优选为甲基或乙基。另外,“亚烷基”为通过从上述烷基去掉1个氢原子而得到的2价基团。

[0034] “烷氧基”是上述烷基经由氧原子进行结合的基团((烷基)-O-基),该烷基部分如上述所定义。例如烷氧基中,烷基部分的碳原子数可以为1~6个。作为烷氧基,例如,可以列举甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、2-甲基-1-丙氧基、2-甲基-2-丙氧基、2,2-二甲基-1-丙氧基、1-丁氧基、2-丁氧基、2-甲基-1-丁氧基、3-甲基-1-丁氧基、2-甲基-2-丁氧基、3-甲基-2-丁氧基、1-戊氧基、2-戊氧基、3-戊氧基、2-甲基-1-戊氧基、3-甲基-1-戊氧基、2-甲基-2-戊氧基、3-甲基-2-戊氧基、1-己氧基、2-己氧基、3-己氧基等。作为C1~6烷氧基,优选为C1~5烷氧基,更优选为甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、异丁氧基、戊氧基、异戊氧基和2,3-二甲基丙基氧基。

[0035] “烯基”是从具有1个以上的碳-碳间双键的直链、支链或环的不饱和烃的任意碳原子上去除一个氢原子而成的一价基团,例如碳原子数可以为2~10个、2~6个或2~4个。作为C2~10烯基,例如可以列举乙烯基、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、1-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-甲基-1-丁烯基、1-甲基-2-丁烯基、1-甲基-3-丁烯基、1-甲烯基丁基、2-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2-甲基-3-丁烯基、2-甲烯基丁基、3-甲基-1-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、3-甲基-3-丁烯基、1-乙基-1-丙烯基、1-乙基-2-丙烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、1-甲基-1-戊烯基、1-甲基-2-戊烯基、1-甲基-3-戊烯基、1-甲基-4-戊烯基、1-甲烯基戊基、2-甲基-1-戊烯基、2-甲基-2-戊烯基、2-甲基-3-戊烯基、2-甲基-4-戊烯基、2-甲烯基戊基、3-甲基-1-戊烯基、3-甲基-2-戊烯基、3-甲基-3-戊烯基、3-甲基-4-戊烯基、3-甲烯基戊基、4-甲基-1-戊烯基、4-甲基-2-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、4-甲基-4-戊烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基、6-庚烯基、辛烯基、壬烯基、和癸烯基。

[0036] “炔基”是从具有1个以上的碳—碳间三键的直链或支链状的不饱和烃的任意碳原子上去除一个氢原子而成的一价基团,例如碳原子数可以为2~6个或2~4个。作为炔基,能够列举乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、戊炔基、己炔基、苯基乙炔基等。

[0037] “酰基”与烷酰基的意义相同,为 $R-C(=O)-$ 所示的基团。作为该结构所示的酰基中的R部分,可以列举氢原子、可以被取代的直链或支链烷基、或者可以被取代的芳基。例如,酰基的碳原子数可以为2~7个,包括乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基、新戊酰基、戊酰基、异戊酰基、己酰基、庚酰基。

[0038] “芳基”是1价的芳香族烃基,例如可以具有6~10个碳原子,包括苯基和萘基。

[0039] “杂环基”是包含至少1个选自氮原子、氧原子和硫原子中的1种以上的杂原子的1价基团,优选为5~14元环。杂环基可以为单环式杂环基或稠合杂环基。5~14元的杂环基所含有的杂原子的数量例如可以为1~5个、1~4个、1~3个、1~2个、2个、1个。例如存在包含1个氮原子的杂环基、包含2个氮原子的杂环基、包含3个氮原子的杂环基、包含1个氧原子的杂环基、包含2个氧原子的杂环基、包含1个氧原子和1个氮原子的杂环基、包含1个硫原子的杂环基等各种组合。5~14元的杂环基既可以为芳香族性的,也可以为非芳香族性的。单环式杂环基优选为5~6元环。稠合杂环基优选为8~10元环。作为5~14元的杂环基,例如,能够列举哌啶基、哌嗪基、吗啉基、奎宁基(quinuclidyl)、吡咯烷基(pyrrolidyl)、氮杂环丁烷基、杂氧环丁基(oxetyl)、氮杂环丁烷-2-酮-基、氮丙啶基(aziridinyl)、托烷基(tropanyl)、呋喃基、四氢呋喃基、噁吩基、吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基(pyrrolidinyl)、二氧环戊烷基、噁唑基、噁唑啉基、异噁唑基、噁唑基、噁唑啉基、异噁唑基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、噁唑烷基、噁唑啉基、吡唑基、吡唑啉基、吡唑烷基、噁二唑基、呋吡基(furazanyl)、噁二唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、四唑基、吡喃基、吡啶基、哌啶基、吡嗪基(pyridazinyl)、嘧啶基、吡嗪基、哌嗪基、二噁烷基、噁嗪基、吗啉基、噁嗪基、三嗪基、苯并呋喃基(benzofuranyl)、异苯并呋喃基、二氢苯并呋喃基、二氢异苯并呋喃基、苯并噁吩基、异苯并噁吩基、二氢苯并噁吩基、二氢异苯并噁吩基、四氢苯并噁吩基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、酞嗪基、蝶啶基(pteridinyl)、香豆基(coumaryl)、苯并呋喃酮基(chromonyl)、1,4-苯并二氮杂萘基(1,4-benzodiazepinyl)、吡啶基、异吡啶基、苯并咪唑基、苯并呋喃基(benzofuryl)、嘌呤基、吡啶基、吩噁嗪基、吩噁嗪基、苯并噁唑基、苯并噁唑基、吡唑基、苯并咪唑基、苯并二噁茂烷基(benzodioxolanyl)、苯并二噁烷基苯并吡喃基(benzodioxanylchromenyl)、苯并二氢吡喃基(chromanyl)、异苯并二氢吡喃基、苯并二氢吡喃酮基(chromanonyl)、噌嗪基(cinnolinyl)、喹啉基、喹啉基、喹啉烷基(quinolidinyl)、咪唑并吡啶基、萘啶基(naphthyridinyl)、二氢苯并噁嗪基、二氢苯并噁唑基(dihydrobenzoxazolynonyl)、二氢苯并噁嗪酮基(dihydrobenzoxazinonyl)和苯并噁噁烷基(benzothioxanyl)。

[0040] 在本说明书中,“卤原子”是指氟原子、氯原子、溴原子和碘原子,优选为氟原子、氯原子和溴原子,更优选为氟原子或氯原子。在本说明书中,“羧基”是指 $-C(=O)-OH$ 所示的基团。

[0041] 作为氨基酸A,优选为Met、Thr、His、Tyr、Phe、Ser、Gln、Arg、Lys、MetO和Ile。作为氨基酸B,优选为疏水性氨基酸,例如为Leu、Val,更优选为Leu。作为(氨基酸B)-(氨基酸A)

的组合,能够优选列举Leu—Met、Leu—Nle、Leu—Phe、Leu—Tyr、Leu—Thr、Leu—Arg、Leu—Lys、Leu—His、Leu—MetO、Val—Tyr、Val—Met、和Leu—Ser。

[0042] 作为R¹,优选为直链或支链烷基。另外,p优选为0或1,更优选为0。

[0043] 作为R²,优选为氢原子。

[0044] 作为R³,优选为氢原子。

[0045] 作为R⁴,优选为氢原子。

[0046] 作为R⁵,优选为氢原子。

[0047] 作为R⁶,优选为氢原子。

[0048] 作为R⁷,优选为氢原子。

[0049] 作为R⁸,优选为氢原子。

[0050] 作为R⁹,优选为氢原子。

[0051] 作为R¹⁰,优选为氢原子、烷基或烷氧基,更优选为氢原子、甲基或甲氧基。

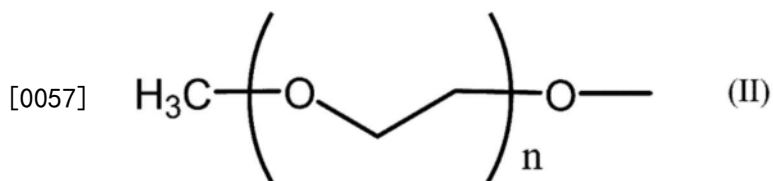
[0052] 作为R¹¹,优选为氢原子、烷基或烷氧基,更优选为氢原子、甲基或甲氧基。

[0053] 或者,作为R¹⁰和R¹¹,优选互相结合形成环烷基,更优选形成C3—C5环烷基。

[0054] 作为R¹²,优选为氢原子或可以被取代的直链、支链或环状烷基,更优选为氢原子或可以被选自羟基、羧基、环醚基、烷氧基(例如甲氧基、乙氧基)、磺酰基、卤原子、氨基、甲基氨基和二甲基氨基中的1个以上的基团取代的碳原子数1~6的直链、支链或环状烷基,更加优选为氢原子或可以被选自羟基、羧基、环醚基、烷氧基(例如甲氧基、乙氧基)、磺酰基、卤原子、氨基、甲基氨基和二甲基氨基中的1个以上的基团取代的碳原子数1~4的直链或支链烷基(例如甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基)。或者,R¹²优选与R¹⁰或R¹¹结合,形成包含1个或2个氧原子的3~8元的杂环基(例如为二氧环戊烷基、二噁烷基)。

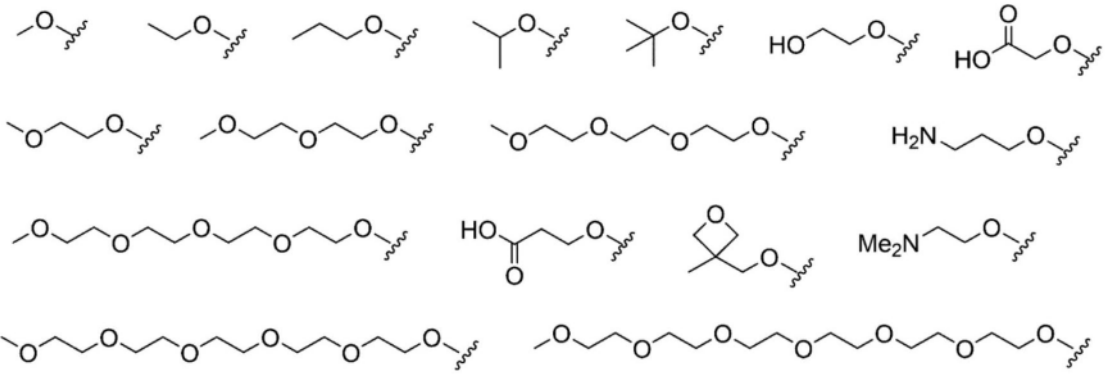
[0055] 作为L优选为—(直链或支链亚烷基—O—)_n—(n为1~10的整数)或单键。直链或支链亚烷基例如可以为碳原子数1~4、优选为碳原子数2或3、更优选为碳原子数2的亚烷基。

[0056] 例如,在上述式(I)中,—O—L—R¹²所示的基团可以为以下的式(II)所示的基团。

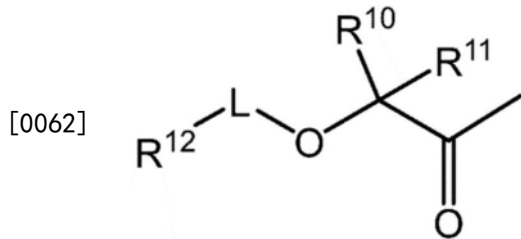


[0058] [式中,n表示0~10的整数。]

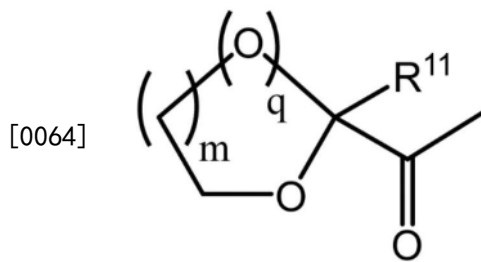
[0059] 另外,例如在上述式(I)中,—O—L—R¹²所示的基团可以为羟基或选自以下的基团。



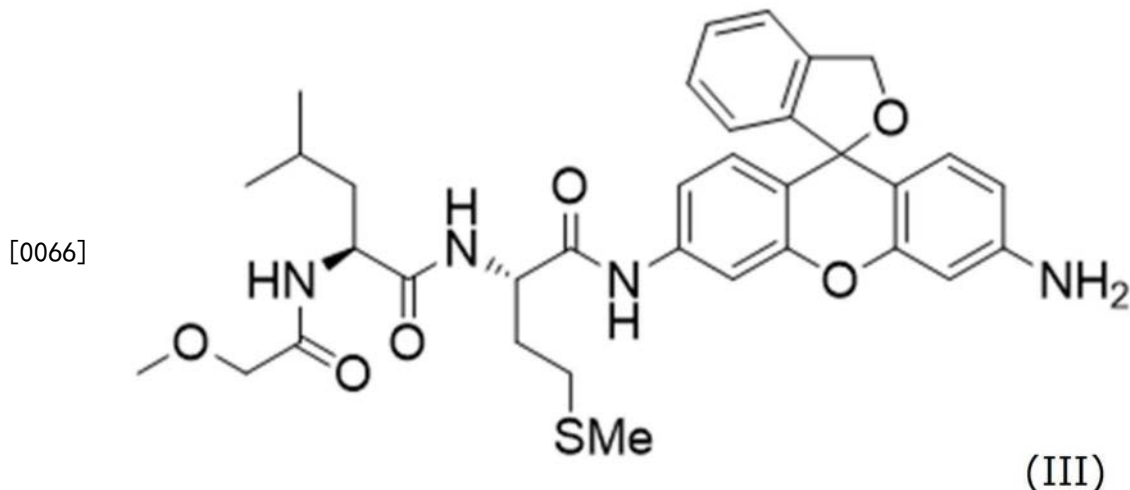
[0061] 另外,例如在上述式(I)中,



[0063] 所示的部分结构可以为以下的式子(式中,m为1~3的整数,q表示0或1)所示的结构。



[0065] 作为本发明的化合物,例如能够优选列举式(III)的化合物。另外,在式(III)中,适当变更氨基酸的组合得到的化合物也能够优选作为本发明的化合物例示。



[0067] 作为化合物(I)的盐,能够列举碱加成盐、酸加成盐、氨基酸盐等。作为碱加成盐,例如能够列举:锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐等的金属盐;铵盐、甲基胺盐、二甲基胺盐、二环己基胺盐、三(羟基甲基)氨基甲烷盐、N,N-双(羟基乙基)哌嗪盐、2-氨基-2-甲基-1-丙醇盐、乙醇胺盐、N-甲基葡萄糖胺盐、L-葡萄糖胺盐、三乙胺盐、哌啶盐、吗啉盐等的有机胺

盐;或与赖氨酸、 δ -羟基赖氨酸、精氨酸等的碱性氨基酸的盐。作为酸加成盐,例如能够列举:盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等的无机酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、乙酸盐、丙酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、扁桃酸盐、肉桂酸盐、乳酸盐、乙醇酸盐、葡萄糖醛酸盐、抗坏血酸盐、烟酸盐、水杨酸盐等的有机酸盐。作为氨基酸盐,能够例示甘氨酸盐等。本发明的化合物的盐不特别限定于这些盐。

[0068] 化合物(I)有时根据取代基的种类具有1个或2个以上的手性碳,有时存在光学异构体或非对映异构体等的立体异构体。纯粹形态的立体异构体、立体异构体的任意的混合物、消旋体等都包括在本发明的范围内。另外,通式(I)所示的化合物或其盐有时作为水合物或溶剂合物的形式存在,这些物质均包括在本发明的范围内。形成溶剂合物的溶剂的种类没有特别限定,例如能够例示乙醇、丙酮、异丙醇等的溶剂。在本说明书中“化合物(I)”的提及,除了其明显不适合的情况,在没有明确说明的情况下,也包括化合物(I)的异构体的任意的混合物或特定的立体异构体、化合物(I)的药理学上可接受的盐、水合物和溶剂合物、以及化合物(I)的药理学上可接受的盐的水合物或溶剂合物。

[0069] 在另一个方式中,本发明涉及包含化合物(I)的荧光探针。本发明的荧光探针是通过与酶的接触而发生荧光应答的探针。优选本发明的荧光探针在不与酶反应的状态下不发出荧光,通过与酶反应而发出荧光。作为这样的酶,包括钙蛋白酶。即,该荧光探针在钙蛋白酶的存在下进行荧光应答,因此能够用于钙蛋白酶活性检测。另外,本发明包括作为有效成分包含化合物(I)或其盐的钙蛋白酶活性测定剂。

[0070] 钙蛋白酶是在人的钙蛋白酶-1(μ -钙蛋白酶、 μ CANP、 μ 80K、钙蛋白酶I、CDP I)的催化结构域具有显著同源性的序列区域的基因产物,包括钙蛋白酶-1~16。例如,钙蛋白酶-1是CAPN1与CAPNS1的异源二聚体,钙蛋白酶-2是CAPN2与CAPNS1的异源二聚体。已知钙蛋白酶与各种疾病相关,因此化合物(I)能够作为与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断药物来利用。因此,本发明涉及含有化合物(I)的与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断用组合物。

[0071] 与钙蛋白酶活性相关的疾病可以是钙蛋白酶的表达或其活性导致发病或恶化的疾病。作为与钙蛋白酶活性相关的疾病,例如能够列举:包括正常眼压青光眼的青光眼、常染色体显性新生血管炎性玻璃体视网膜病变、视网膜色素变性、老年性黄斑变性、糖尿病性视网膜神经病变或视网膜血管阻塞性疾病、视网膜缺血等的视网膜疾病或视网膜神经病变、或者白内障等的眼部疾病;肌营养不良等的肌肉疾病;糖尿病;急性食管炎、多发性硬化症、特发性炎症性肌病、自身免疫性脑炎等的炎症性疾病或自身免疫疾病;脊髓损伤、帕金森病、神经退行性疾病、无脑回畸形、阿尔茨海默病、脊髓小脑变性症等的神经疾病;心肌缺血再灌注损伤、慢性心脏病、腹主动脉瘤·动脉粥样硬化等的心血管疾病;黑色素瘤、乳癌、大肠癌、肾癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、软组织肉瘤等癌症;脑肿瘤;衰老综合征;早衰症;疟疾感染症、锥虫病、非洲昏睡病、血吸虫病(Schistosomiasis)、利什曼病、镰状细胞病等的寄生虫、病原性微生物的感染症;创伤性脑损伤;马查多-约瑟夫病;先兆子痫;肺纤维化。

[0072] 本发明的化合物(I)能够与钙蛋白酶抑制剂组合使用。具体而言,化合物(I)能够被用于判定钙蛋白酶抑制剂的适应或治疗效果。因此,本发明涉及一种与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗方法,其包括:以治疗对象候补或来自该候补的样品中的钙蛋白酶与化合

物(I)的相互作用引起的荧光应答为指标,鉴定或选择对钙蛋白酶抑制剂具有感受性的治疗对象的步骤;和对该具有感受性的治疗对象施用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的医药组合物的步骤。本发明还涉及一种医药组合物的治疗效果的判定方法,其包括:对治疗对象施用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的医药组合物的步骤;和以该治疗对象或来自治疗对象的样品中的钙蛋白酶与化合物(I)的相互作用引起的荧光应答为指标,判定该医药组合物的治疗效果的步骤。本发明还涉及一种医药组合物,其为含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物,其对以下治疗对象施用,该治疗对象以治疗对象候补或来自该候补的样品中的钙蛋白酶与化合物(I)的相互作用引起的荧光应答为指标,被判定为对钙蛋白酶抑制剂具有感受性。本发明还涉及钙蛋白酶抑制剂在制造该医药组合物中的应用。治疗对象候补或来自该候补的样品等中的钙蛋白酶与化合物(I)的相互作用引起的荧光应答能够使用荧光成像方法进行可视化或图像化。例如,能够根据治疗对象候补或来自该候补的样品等中所测得的从化合物(I)发出的荧光强度,得到钙蛋白酶的浓度或量或钙蛋白酶活性。对钙蛋白酶抑制剂具有感受性的治疗对象的鉴定或选择例如能够使用后述的D项中记载的方法进行。另外,医药组合物的治疗效果的判定例如能够使用后述的C项中记载的方法进行。作为上述医药组合物的对象疾病,只要是上述的与钙蛋白酶活性相关的疾病即可,例如可以为青光眼疾病。本发明还涉及一种医药组合物的预防效果的判定方法,其包括:在与钙蛋白酶活性相关的疾病的预防中,对预防对象施用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的医药组合物的步骤;和以该预防对象或来自预防对象的样品中的钙蛋白酶与化合物(I)的相互作用引起的荧光应答为指标,判定该医药组合物的预防效果的步骤。预防对象的鉴定或选择能够与治疗对象的鉴定或选择同样地进行。治疗对象或预防对象代表性地为哺乳类对象。

[0073] 在一个方式中,本发明的荧光探针(更具体而言为化合物(I))在使用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物的该疾病的治疗或预防中,为了判定其效果的程度,可以与该医药组合物组合使用。在另一个方式中,本发明的荧光探针(更具体而言为化合物(I))可以作为如下的诊断药物(所谓的伴随诊断药物)使用,该诊断药物被用于预先检查治疗对象候补或预防对象候补是否适合使用含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物的治疗对象或预防对象。

[0074] 在一个方式中,本发明可以是含有化合物(I)作为有效成分的、在癌症外科治疗或癌症检查中使用的癌症诊断药物或用于识别癌症区域的医药组合物,作为癌症外科治疗或癌症检查,例如能够列举开颅、开胸、或剖腹等的开放手术、内镜下手术、或内窥镜检查。本发明的癌症诊断药或用于识别癌症区域的医药组合物也能够用于术中快速诊断。

[0075] 在一个方式中,本发明的荧光探针(更具体而言为化合物(I))在不与组织蛋白酶反应的状态下不发荧光,通过与组织蛋白酶反应而发出荧光。即,该荧光探针由于在组织蛋白酶的存在下发生荧光应答,所以能够用于检测组织蛋白酶活性。

[0076] 组织蛋白酶是位于溶酶体的酸性蛋白酶的总称,包括以半胱氨酸为活性位点的组织蛋白酶B、C、F、H、K、L1、L2、O、S、W、X/Z、以丝氨酸为活性位点的组织蛋白酶A、G、以天冬氨酸为活性位点的组织蛋白酶D、E。组织蛋白酶包含于胰液中,因此在组织蛋白酶的存在下发生荧光应答的本发明的荧光探针(更具体而言为化合物(I))能够用于胰液的检测。因此,在

一个方式中,本发明可以为包含化合物(I)的胰液检测用试剂盒。试剂盒可以包含样品采集用具、样品处理液等的试剂,还可以包含检测所需要的用具等。

[0077] 本发明还提供以下的方法。

[0078] [A]一种样品中的钙蛋白酶活性的测定方法,其包括:使化合物(I)与样品接触的步骤;和测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。

[0079] [B1]一种提供用于诊断哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其包括:使化合物(I)与来自上述哺乳类对象的样品接触的步骤;和测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。

[0080] [B2]一种哺乳类对象中的与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断方法,其包括:向上述哺乳类对象施用化合物(I)的步骤;测定从上述施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和根据测定结果判定上述哺乳类对象患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性的步骤。

[0081] [C]一种用于判定候补化合物对与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗效果的试验方法,其包括:在与钙蛋白酶活性相关的疾病模型中,制备未施用候补化合物和施用候补化合物的样品的步骤;使化合物(I)与上述样品接触的步骤;和测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。

[0082] [D1]一种提供用于监测哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其包括:使化合物(I)与来自上述哺乳类对象的样品接触的步骤;和测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。

[0083] [D2]一种哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的监测方法,其包括:向上述哺乳类对象施用化合物(I)的步骤;测定从上述施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和根据测定结果判定与钙蛋白酶活性相关的疾病的病程的步骤。

[0084] 本发明还提供一种含有钙蛋白酶抑制剂作为有效成分的用于治疗或预防与钙蛋白酶活性相关的疾病的医药组合物,其被施用于以下治疗或预防对象,该治疗或预防对象是以治疗或预防对象候补或者来自该候补的样品中的钙蛋白酶与化合物(I)的相互作用引起的荧光应答为指标,被判定为对钙蛋白酶抑制剂具有感受性的治疗或预防对象。

[0085] 发明的效果

[0086] 与现有型的HMRG探针相比,由本发明提供的探针与钙蛋白酶的反应性提高,因此能够更高灵敏度地检测钙蛋白酶活性。

附图说明

[0087] 图1的(a)是各pH下的化合物19的吸收光谱,(b)是各pH下的化合物19的荧光光谱。

[0088] 图2的(a)是表示向化合物19添加钙蛋白酶-1所引起的吸收光谱的变化的图,(b)是表示向化合物19添加钙蛋白酶-1所引起的荧光光谱的变化的图。

[0089] 图3是向化合物19添加钙蛋白酶-1所得到的HPLC色谱图。

[0090] 图4是表示向化合物16和化合物19添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图。

[0091] 图5的(a)是表示向化合物16和化合物19-25添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(b)是表示向化合物16-18和化合物26-29添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(c)是表示向化合物16和化合物30-36添加钙蛋白酶-1的10

分钟后的荧光强度的变化的图表。

[0092] 图6的(a)是表示向化合物37添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(b)是表示向化合物42添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(c)是表示向化合物45添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表。

[0093] 图7的(a)是表示向化合物48添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(b)是表示向化合物51添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(c)是表示向化合物53添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表。

[0094] 图8的(a)是表示向化合物55添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(b)是表示向化合物57添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表,(c)是表示向化合物59添加钙蛋白酶-1所引起的荧光强度的经时变化的图表。

[0095] 图9的(a)是表示向化合物37-41添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(b)是表示向化合物42-44添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(c)是表示向化合物45-47添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表。

[0096] 图10的(a)是表示向化合物48-50添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(b)是表示向化合物51和化合物52添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(c)是表示向化合物53和化合物54添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表。

[0097] 图11的(a)是表示向化合物55和化合物56添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(b)是表示向化合物57和化合物58添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表,(c)是表示向化合物59-66添加钙蛋白酶-1的10分钟后的荧光强度的变化的图表。

[0098] 图12的(a)是使用化合物16的活细胞成像,(b)是使用化合物19的活细胞成像。

[0099] 图13的(a)是使用化合物20的活细胞成像,(b)是使用化合物21的活细胞成像,(c)是使用化合物22的活细胞成像。

[0100] 图14的(a)是使用化合物23的活细胞成像,(b)是使用化合物38的活细胞成像,(c)是使用化合物56的活细胞成像。

[0101] 图15是施用化合物19的眼底拍摄图像(大鼠)。

[0102] 图16是施用化合物19的眼底的HMRG阳性细胞数(大鼠)。

[0103] 图17是NMDA给药组、施用化合物19的眼底拍摄图像(兔)。

[0104] 图18是PBS给药组、施用化合物19的眼底拍摄图像(兔)。

[0105] 图19是NMDA给药组、施用化合物16(19 μ L)的眼底拍摄图像(兔)。

[0106] 图20是NMDA给药组、施用化合物16(38 μ L)的眼底拍摄图像(兔)。

[0107] 图21是PBS给药组、施用化合物16(19 μ L)的眼底拍摄图像(兔)。

[0108] 图22是PBS给药组、施用化合物16(38 μ L)的眼底拍摄图像(兔)。

[0109] 图23是施用化合物16和化合物19的眼底的HMRG阳性细胞数(兔)。

[0110] 图24是使用了化合物19的视网膜神经节细胞的荧光成像。

[0111] 图25是使用了化合物19的来自iPS细胞的三维立体视网膜组织的荧光拍摄图像(谷氨酸最终浓度0 μ M)。

[0112] 图26是使用了化合物19的来自iPS细胞的三维立体视网膜组织的荧光拍摄图像

(谷氨酸最终浓度300 μ M)。

[0113] 图27是使用了化合物19的来自iPS细胞的三维立体视网膜组织的荧光拍摄图像(谷氨酸最终浓度1mM)。

[0114] 图28是表示使用了化合物19的来自iPS细胞的三维立体视网膜组织的荧光强度的图表。

[0115] 图29是表示化合物19与化合物16的荧光强度的比较结果的图表。

[0116] 图30是在钙蛋白酶抑制剂存在下或非存在下的使用了化合物19的活细胞成像。

[0117] 图31是钙蛋白酶抑制剂给药组或对照组中的施用化合物19的眼底拍摄图像(大鼠)。

[0118] 图32是钙蛋白酶抑制剂给药组或对照组中的施用化合物19的眼底拍摄图像(大鼠)中的HMRG阳性细胞数。

[0119] 图33是钙蛋白酶抑制剂给药组或对照组中的施用化合物19的眼底拍摄图像(大鼠)中的HMRG阳性细胞数。

[0120] 图34是钙蛋白酶抑制剂给药组或对照组中的施用化合物19的眼底拍摄图像(大鼠)中的HMRG阳性细胞数。

[0121] 图35是各钙蛋白酶抑制剂给药组中的施用化合物19的眼底拍摄图像中的HMRG阳性细胞数。

[0122] 图36是使用了化合物19的来自iPS细胞的RGC轴突模型的荧光拍摄图像。

[0123] 图37是表示向化合物19添加或未添加组织蛋白酶B时的荧光强度的经时变化的图表。

具体实施方式

[0124] (A. 化合物(I)的合成)

[0125] 化合物(I)能够使用任意合适的方法合成。例如化合物(I)能够按照本申请实施例2中记载的方法合成。在实施例2所示的合成方案中,在工序a中,HMRG的N原子与氨基酸的C末端形成酰胺键。之后通过固相合成法通过工序b中将化合物A1载持于树脂,依次通过工序c进行氨基酸的保护基的脱保护、通过工序d进行氨基酸的延伸。通过工序e将氨基酸的保护基脱保护,通过工序f使具有式(I)的 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ 的部分结构的羧基化合物 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})-COOH$ 或者衍生的酸酐或酰基卤化物等反应,在肽链的N末端上结合具有 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ -基的酰胺基。通过在工序g中进行从树脂的切出,能够得到式(I)的化合物。在工序g中,也能够适当同时进行各取代基R和氨基酸A、氨基酸B所含的保护基的脱保护。所得到的式(I)的化合物的粗纯化物也可以进一步纯化。例如所得到的粗纯化物可以用反相柱色谱纯化。

[0126] (B. 钙蛋白酶活性的测定方法或检测方法)

[0127] 化合物(I)由于与钙蛋白酶反应而进行荧光应答,所以能够用于钙蛋白酶或钙蛋白酶活性的测定或检测。因此,在另一个方式中,本发明涉及一种样品中的钙蛋白酶(或钙蛋白酶活性)的测定方法(或检测方法),其包括:使化合物(I)与样品接触的步骤;和测定(或检测)从接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。在检测出荧光的情况下,可以意味着该样品中存在钙蛋白酶或钙蛋白酶活性。另外,检测出的荧光能够表示该样品的钙蛋白酶浓

度或钙蛋白酶活性的程度。钙蛋白酶(或钙蛋白酶活性)的测定和检测可以通过使用测定得到的荧光强度作为绝对值进行,或者可以将测定得到的荧光强度作为荧光强度的经时变化量、或将对照的荧光强度作为比较对象进行测定。这样的对照的荧光强度可以通过同时测定样品和对照来得到,也可以使用预先用对照得到的值。化合物(I)与样品的接触可以列举通过添加、涂布、喷雾或注入包含化合物(I)的溶液或悬浊液来进行,可以根据样品的形态或测定环境等适当选择。接触时的温度条件只要钙蛋白酶能够发挥其催化作用即可没有限制。从接触后的化合物(I)发出的荧光能够在接触后的任意时刻(例如从刚接触后直至经过数小时为止的任意时间点)对样品照射440~510nm左右的可见光作为激发波长来进行测定。另外,可以根据需要对预先判明浓度或活性的含钙蛋白酶的样品用同样的方法进行测定来制作标准曲线,利用该标准曲线算出钙蛋白酶浓度或活性。作为样品,可以使用来自生物体的组织、液体、或它们的处理物;细胞培养物、细胞培养上清、细胞破碎物、细胞裂解液、或它们的处理物;分离纯化的酶等,例如可以例示来自后述的哺乳类对象的样品。另外,上述钙蛋白酶活性的测定或检测方法通过作为测定或检出对象的样品适用生物体,也可以在体内(in vivo)进行。在体内进行上述钙蛋白酶活性的测定或检测方法的情况下,化合物(I)与样品的接触通过对测定或检测对象的生物体施用化合物(I)来进行。化合物(I)向生物体的施用可以根据钙蛋白酶活性的测定或检测的对象部位选择任意的适当的路径和方法。作为施用方法,例如可以列举滴眼、滴鼻、滴耳、注射、点滴等。作为测定或检测对象的生物体,可以列举后述的哺乳类对象。

[0128] 以下的方法中的钙蛋白酶的测定可以根据上述的测定方法进行。

[0129] (C. 与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断方法)

[0130] 如上所述,钙蛋白酶已知参与各种疾病,因此通过利用化合物(I)测定钙蛋白酶活性,能够诊断与钙蛋白酶活性相关的疾病,或判定其病情,或监测病况。因此,本发明涉及一种提供用于诊断哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其包括:使化合物(I)与来自上述哺乳类对象的样品接触的步骤;测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。根据由本发明的方法提供的信息,能够诊断作为上述诊断对象的哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病。作为所提供的信息,可以列举荧光强度、发出荧光的细胞数(例如,每单位面积的发出规定强度以上的荧光的细胞数)、发出荧光的范围的面积等的反映荧光应答的信息。与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断例如可以通过将上述所提供的信息与规定的基准值进行比较来进行。作为这样的基准值,可以列举来自没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象(以下称为阴性对照)的样品的测定值、来自患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象(以下称为阳性对照)的样品的测定值等。上述基准值可以是与样品的测定同时测定的值,也可以预先测定得到的值,还可以是从预先测定得到的值以统计学方法计算得到的值。在一个实施方式中,在提供了反映超过基于阴性对照的基准值的荧光应答的信息的情况和/或提供了反映基于阳性对照的基准值以上的荧光应答的信息的情况下,能够诊断为存在患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性。在另一个实施方式中,在提供了反映基于阴性对照的基准值以下的荧光应答的信息的情况和/或提供了反映低于基于阳性对照的基准值的荧光应答的情况下,能够诊断为存在没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性。另外,本发明涉及一种提供用于监测哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的信息的方法,其包括:使化合物(I)与来自上述哺乳类对象的样品接触的步骤;和

测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。基于通过本发明的方法提供的信息,能够判定上述哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的病程。作为所提供的信息,可以列举与上述同样的反映荧光应答的信息。与钙蛋白酶活性相关的疾病的病程的判定例如可以通过将上述所提供的信息与其以前从该哺乳类对象得到的信息比较来进行。在一个实施方式中,在提供了反映比以前得到的荧光应答低的荧光应答的信息的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病治愈或改善、或者被预防的可能性。在另一个实施方式中,在提供了反映以前得到的荧光应答以上的荧光应答的信息的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病没有治愈或改善、或者不被预防的可能性。在再一个实施方式中,在提供了反映与以前得到的荧光应答相同程度的荧光应答的信息的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病的进展被抑制或预防发病的可能性。

[0131] 在另一个方式中,本发明涉及一种哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的诊断方法,其包括:对上述哺乳类对象施用化合物(I)的步骤;测定从上述施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和基于测定结果判定上述哺乳类对象患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性的步骤。上述测定结果例如与上述同样,可以为荧光强度、发出荧光的细胞数(例如每单位面积的发出规定强度以上的荧光的细胞数)、发出荧光的范围的面积等的反映荧光应答的信息。上述哺乳类对象患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性的判定例如可以通过将上述测定结果与规定的基准值比较来进行。作为这样的基准值,可以列举阴性对照的测定值、阳性对照的测定值等。上述基准值可以为与样品的测定同时测定得到的值,也可以是预先测定得到的值或从预先测定得到的值以统计学方法计算得到的值。在一个实施方式中,在测定结果超过基于阴性对照的基准值的情况和/或为基于阳性对照的基准值以上的情况下,能够判定为存在上述哺乳类对象患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性。在另一个实施方式中,在测定结果为基于阴性对照的基准值以下的情况和/或低于基于阳性对照的基准值的情况下,能够判定为存在上述哺乳类对象没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的可能性。另外,本发明涉及一种哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的监测方法,其包括:对上述哺乳类对象施用化合物(I)的步骤;测定从上述施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和基于测定结果判定与钙蛋白酶活性相关的疾病的病程的步骤。上述测定结果例如可以为上述反映荧光应答的信息。上述哺乳类对象的与钙蛋白酶活性相关的疾病的病程的判定例如可以通过将上述测定结果与其以前在该哺乳类对象中测定得到的测定结果比较来进行。在一个实施方式中,在得到了显示以前的测定结果以上的荧光应答的测定结果的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病没有治愈或改善、或者没有被预防的可能性。在另一个实施方式中,在得到了显示比以前的测定结果低的荧光应答的测定结果的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病治愈或改善、或者被预防的可能性。在另一个实施方式中,在得到的显示与以前的测定结果相同程度的荧光应答的测定结果的情况下,能够判定为存在与钙蛋白酶活性相关的疾病的进展被抑制或发病被预防的可能性。

[0132] “监测”可以包括在对上述哺乳类对象施用候补治疗药物、或对上述哺乳类对象适用成为候补的治疗方法后,判定其治疗效果的步骤。因此,上述监测方法包括在监测工序之前对上述哺乳类对象施用候补治疗药物的步骤;或对上述哺乳类对象适用成为候补的治疗方法的步骤,疾病没有治愈或改善表示该治疗药物或治疗方法没有效果,疾病治愈或改善

或者疾病的进展被抑制表示该治疗药物或治疗方法有效果。

[0133] 例如在眼科领域中,在对哺乳类对象施用化合物(I)的情况下,通过使用在眼科领域已经通用的荧光素荧光眼底造影检查设备,能够进行荧光观察。

[0134] 在本说明书中,“来自哺乳类对象的样品”是指从哺乳类对象采集的样本,可以列举组织或体液。“体液”是指来自受试者的液体,例如,可以列举:全血、血浆、血清、全血或血细胞的溶血液等的血液;唾液;尿;泪液;渗出液;淋巴液;浆液;脊髓液;脑脊液;关节液;房水;玻璃体液或它们的分级物或处理物、以及它们的稀释液或浓缩液。

[0135] 作为没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的对照样品,可以为来自已知没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象的样品、或来自明显没有患与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象的样品。作为患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的对照样品,可以为来自已知患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象的样品、或来自明显患有与钙蛋白酶活性相关的疾病的哺乳类对象由来的样品。

[0136] 上述来自哺乳类对象的样品与化合物(I)的接触能够在体内(in vivo)、体外(in vitro)、或离体(ex vivo)进行。

[0137] 作为“哺乳类对象”,例如包括人、牛、马、狗、猫、猪、羊、兔、大鼠等的哺乳动物,优选为人。

[0138] 在整个本说明书中,判定或可能性是指利用它们预测哺乳类对象(例如,患者)的状态,并不意味着能够以100%的准确率判断。

[0139] 在本说明书整体中,所比较的“荧光强度”可以是根据需要转换为从该荧光强度算出的值(例如浓度、量或活性值)的值。例如可以通过同样的方法测定预先判明了浓度的含钙蛋白酶的样品,制作标准曲线,利用该标准曲线算出钙蛋白酶浓度,使用钙蛋白酶浓度比较样品之间的荧光强度的上升(浓度上升)。

[0140] (D.通过钙蛋白酶抑制剂能够治疗的哺乳类对象的选择和治疗方法)

[0141] 作为与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗药物已知有钙蛋白酶抑制剂。特别是在该疾病中,钙蛋白酶浓度高或钙蛋白酶活性强的情况下,被认为钙蛋白酶抑制剂容易发挥效果(换言之,对钙蛋白酶抑制剂具有感受性)。因此,本发明涉及一种选择能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的方法,其包括:使化合物(I)与来自受试哺乳类对象的样品接触的步骤;测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和基于测定结果选择能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的步骤。或者,本发明涉及一种选择能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的方法,其包括:对受试哺乳类对象施用化合物(I)的步骤;测定从上述施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和基于测定结果选择能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的步骤。上述测定结果例如可以为C项中记载的反映荧光应答的信息。能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的选择例如能够通过将上述测定结果与规定的基准值比较来进行。作为这样的基准值,可以列举阴性对照的测定值、阳性对照的测定值等。上述基准值可以是与样品的测定同时测定得到的值,也可以是预先测定得到的值或从预先测定得到的值以统计学方法计算得到的值。在一个实施方式中,在测定结果超过基于阴性对照的基准值的情况和/或为基于阳性对照的基准值以上的情况下,能够选择上述受试哺乳类对象作为能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象。

[0142] 上述能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的治疗方法可以还包括对被选择为能够通过钙蛋白酶抑制剂进行治疗的哺乳类对象的哺乳类对象施用钙蛋白酶抑制剂的步骤。

[0143] 作为钙蛋白酶抑制剂,能够列举ALLNa1、PD150606、calpeptin、MDL28170、钙蛋白酶抑制剂XI (Calpain inhibitor XI) (AK295)、钙蛋白酶抑制蛋白肽 (calpastatin peptide) (CAST)、SNJ-1945、SJA6017、ABT-957、BDA-410、大环状醛 (Macrocyclic aldehyde) (CAT811)、NH₂-GRKKRRQRRRPP QPDALKSRTLRL-COOH (Tat- μ CL)、 α,β -不饱和二肽酯 (Dipeptidyl α,β -unsaturated ester)、高价有机碲化合物 (Hypervalent organotellurium compound) (RF19)、Sm-p80 (重组蛋白质)。

[0144] (E. 与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗药物的筛选方法)

[0145] 此外,化合物(I)能够用于测定特定的候补化合物或治疗方法是否影响钙蛋白酶水平或钙蛋白酶活性,因此能够研究以钙蛋白酶为靶标的治疗效果。因此,化合物(I)能够用于与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗药物的筛选方法。作为一例,本发明涉及一种用于判定候补化合物或候补治疗方法对与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗效果的方法,其包括:对与钙蛋白酶活性相关的疾病模型施用候补化合物或适用候补治疗方法的步骤;使化合物(I)与来自上述疾病模型的样品接触的步骤或对上述疾病模型施用化合物(I)的步骤;测定从上述接触或施用后的化合物(I)发出的荧光的步骤;和基于测定结果判定上述候补化合物或候补治疗方法对与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗效果的步骤。上述测定结果例如可以为C项中记载的反映荧光应答的信息。治疗效果的判定例如可以通过将上述测定结果与规定的基准值比较来进行。作为这样的基准值,可以使用未施用候补化合物或未适用候补治疗方法的疾病模型的测定结果。在一个实施方式中,在测定结果显示上述规定的基准值以上的荧光应答的情况下,能够判定为上述化合物或治疗方法对与钙蛋白酶活性相关的疾病没有治疗效果。在另一个实施方式中,在测定结果显示低于上述规定的基准值的荧光应答的情况下,能够判定为上述化合物或治疗方法对与钙蛋白酶活性相关的疾病有治疗效果。另外,本发明涉及一种用于判定候补化合物对与钙蛋白酶活性相关的疾病的治疗效果的试验方法,其包括:在与钙蛋白酶活性相关的疾病模型中,制备未施用和施用候补化合物的样品的步骤;使化合物(I)与上述样品接触的步骤;和测定从上述接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。基于该测定结果,能够与上述同样判定候补化合物的治疗效果。作为与钙蛋白酶活性相关的疾病模型,例如,可以列举由NMDA诱导的视网膜疾病模型、由谷氨酸诱导的视网膜神经节细胞损伤模型等。

[0146] 在整个本说明书中,“水平”是指与数值化的存在量相关的指标,可以包含例如浓度、量或能够代替它们使用的指标。因此,水平可以是荧光强度等测定值其本身,也可以是换算为浓度的值。另外,水平可以为绝对数值(存在量、每单位面积的存在量等),或者根据需要也可以是与设定的比较对照比较得到的相对数值

[0147] 在本说明书整体中,在与钙蛋白酶活性相关的疾病为眼科疾病的情况下,化合物(I)的施用能够通过玻璃体注射进行。

[0148] (F. 组织蛋白酶活性的测定方法或检测方法)

[0149] 化合物(I)与组织蛋白酶反应进行荧光应答,因此能够用于组织蛋白酶或组织蛋白酶活性的测定或检测。因此,在另一个方式中,本发明涉及一种样品中的组织蛋白酶(或

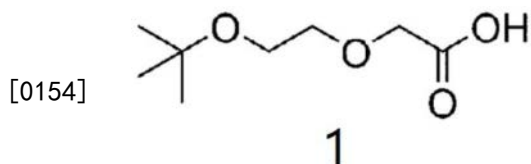
组织蛋白酶活性)的测定方法(或检测方法),其包括:使化合物(I)与样品接触的步骤;和测定(或检测)从接触后的化合物(I)发出的荧光的步骤。在检测到荧光的情况下,可以意味着该样品中存在组织蛋白酶或组织蛋白酶活性。另外,检测到的荧光可以表示该样品的组织蛋白酶浓度或组织蛋白酶活性的程度。组织蛋白酶(或组织蛋白酶活性)的测定和检测可以通过使用测定得到的荧光强度作为绝对值来进行,或者也可以将测定得到的荧光强度作为荧光强度的经时变化量、或将对照的荧光强度作为比较对象进行测定。这样的对照的荧光强度可以通过与样品同时测定对照来得到,也可以使用预先使用对照得到的值。关于样品、化合物(I)与样品的接触、从接触后的化合物(I)发出的荧光的测定,如关于钙蛋白酶活性的测定方法或检测方法所记载那样进行。

[0150] 以下使用实施例对本发明进行更详细的说明,但并不限定本发明的范围。此外,本申请说明书通篇引用的文献通过参照将其整体引入本申请说明书中。

[0151] 实施例

[0152] (实施例1)化合物1-5的合成

[0153] (1)化合物1的合成

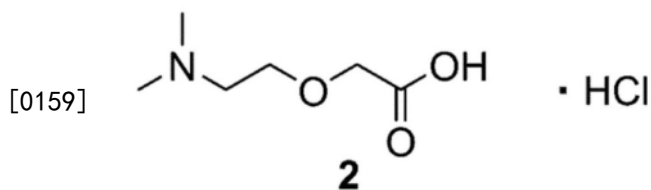


[0155] 在NaH(1.20g,30.0mmol)的THF溶液(30mL)中,在0℃加入乙二醇单叔丁醚(Ethylene Glycol Monotertbutyl Ether)(1.4mL,11.0mmol)、溴乙酸(Bromoacetic acid)(1.39g,10.0mmol),在室温搅拌14小时。在反应溶液中加入水,用二乙醚提取。在水相中加入2M盐酸,将溶液中和,用乙酸乙酯提取。将有机相用硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去,得到目标化合物(1.22g,69%)。

[0156] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 1.26 (9H, s), 3.55—3.59 (2H, m), 3.72—3.77 (2H, m), 4.14 (2H, s)

[0157] HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 199.0946; found, 199.0941 (−0.5mmu)

[0158] (2)化合物2的合成

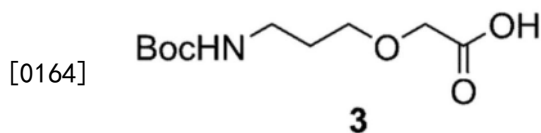


[0160] 在NaH(1.20g,30.0mmol)的THF溶液(30mL)中,在0℃加入N,N-二甲基氨基乙醇(N,N-dimethyl amino ethanol)(1.1mL,11.0mmol)、溴乙酸(1.39g,10.0mmol),在室温搅拌14小时。在反应溶液中加入2M盐酸,用二乙醚提取。将水相回收,将溶剂减压蒸馏除去,得到目标化合物(1.80g,98%)。

[0161] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, D_2O) δ 2.95 (6H, s), 3.39 (2H, t, $J=4.8\text{Hz}$), 3.89 (2H, t, $J=4.8\text{Hz}$), 4.19 (2H, s)

[0162] HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 148.0968; found, 148.0967 (−0.1mmu)

[0163] (3)化合物3的合成

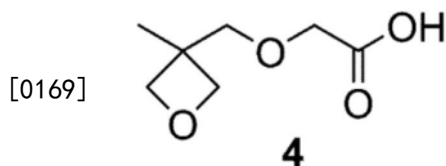


[0165] 在NaH(0.40g, 10.0mmol)的THF溶液中,在0℃加入3-(叔丁氧基羰基氨基)-1-丙醇(3-(tert-butoxycarbonylamino)-1-propanol)(1.0mL, 5.88mmol)、溴乙酸(742mg, 5.34mmol),在室温搅拌19.5小时。在反应溶液中加入蒸馏水,用二氯甲烷提取。在水相中加入2M盐酸,将溶液中和,用二氯甲烷提取。将有机相用硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去。将所得到的残渣用硅胶柱色谱(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯=85/15→35/65)纯化,得到目标化合物(0.578g, 46%)。

[0166] $^1\text{H NMR}$ (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)

[0167] HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 256.1161; found, 256.1151 (-1.0mmu)

[0168] (4) 化合物4的合成

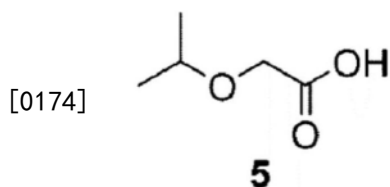


[0170] 在NaH(2.00g, 50.0mmol)的THF溶液中,在0℃加入3-甲基-3-氧杂环丁烷甲醇(3-Methyl-3-oxethanemethanol)(2.4mL, 30.0mmol)、溴乙酸(1.39g, 10.0mmol),在室温搅拌2小时。在反应溶液中加入水,用二乙醚提取。在水相中加入2M盐酸,将溶液中和,用乙酸乙酯提取。将有机相用硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去,得到目标化合物(1.7g, 79%)。

[0171] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 1.34 (3H, s), 3.66 (2H, s), 4.19 (2H, s), 4.42 (2H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 4.60 (2H, d, $J=6.0\text{Hz}$)

[0172] HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 183.0633; found, 183.0629 (-0.4mmu)

[0173] (5) 化合物5的合成



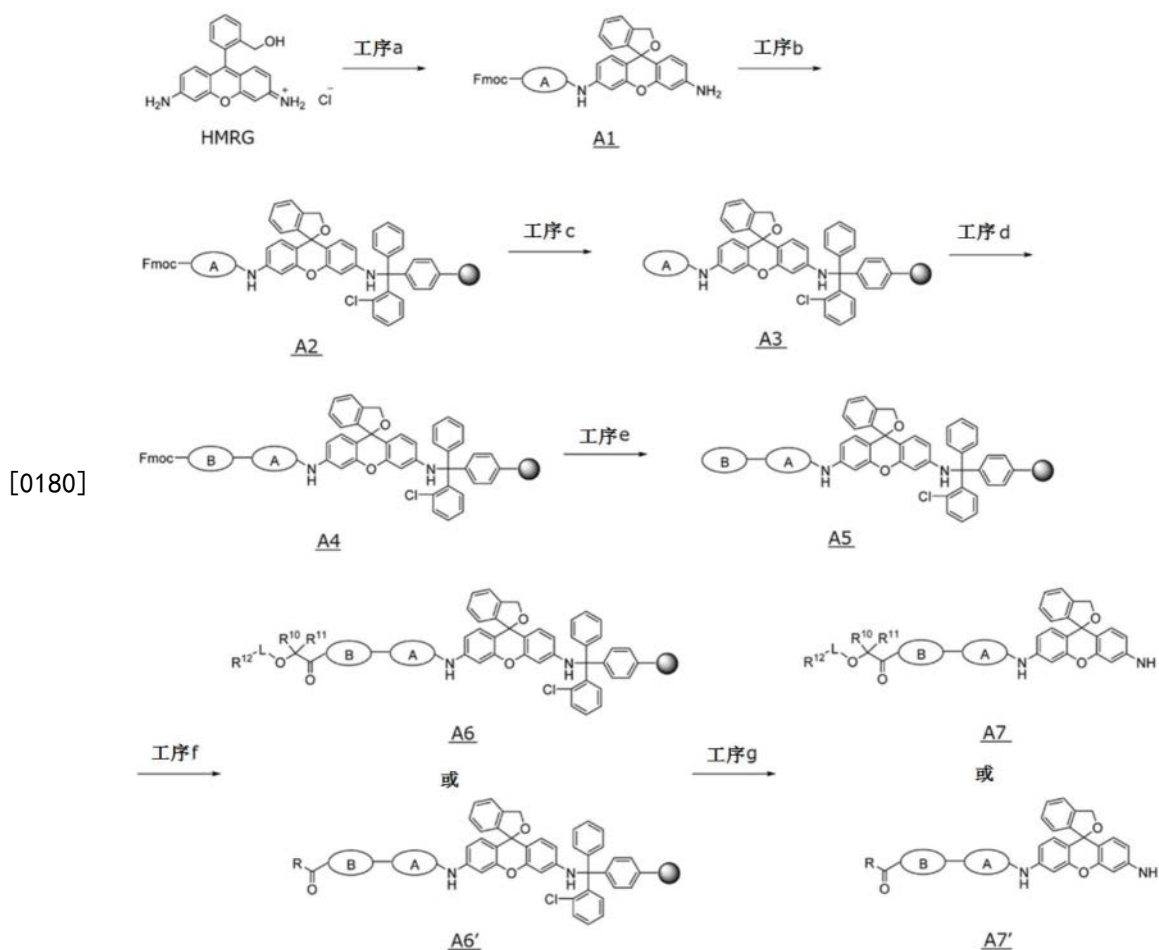
[0175] 在NaH(0.60g, 15.0mmol)的THF溶液中,在0℃加入2-丙醇(0.77mL, 10.0mmol)、溴乙酸(0.695g, 5.0mmol),在室温搅拌21小时。在反应溶液中加入水,用二氯甲烷提取。在水相中加入2M盐酸,将溶液中和,用二氯甲烷提取。将有机相用硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去,得到目标化合物(0.219g, 37%)。

[0176] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 1.24 (6H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 3.76 (1H, qn, $J=6.0\text{Hz}$), 4.08 (2H, s)

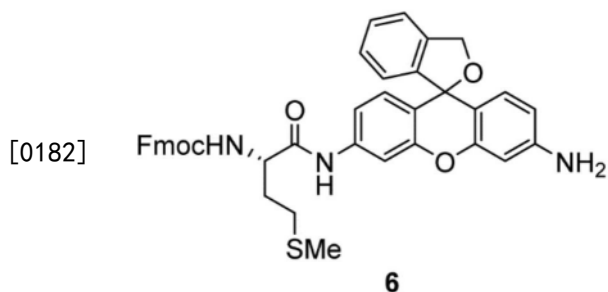
[0177] HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 119.0703; found, 119.0704 (0.1mmu)

[0178] (实施例2) 化合物A7和化合物A7'的合成

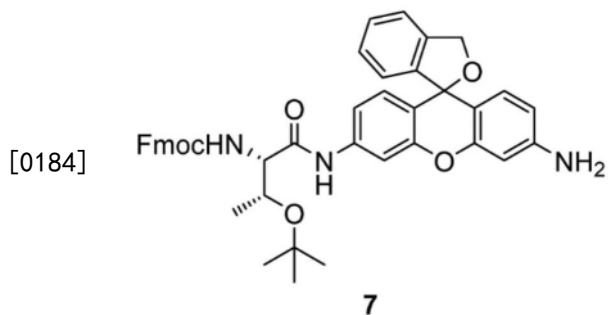
[0179] 通过以下的方案所记载的步骤,合成具有各种肽位点的化合物A7和化合物A7'。



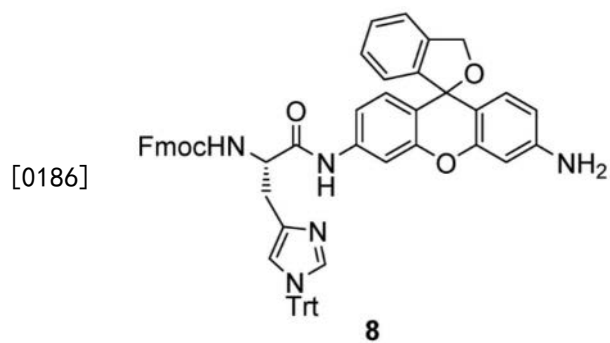
[0181] (1) 作为化合物A1,合成了化合物6~化合物15。



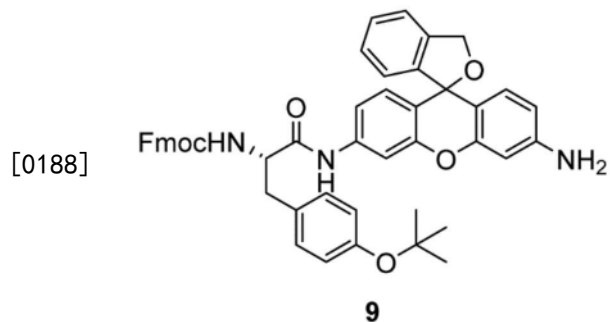
[0183] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 670.2370; found, 670.2311 (−5.9mmu)



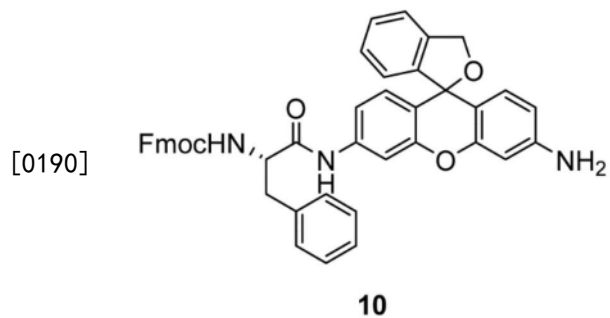
[0185] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 696.3068; found, 696.3093 (2.5mmu)



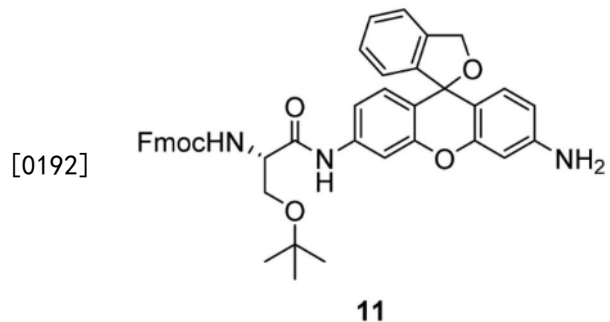
[0187] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 918.3650; found, 918.3627 (−2.3mmu)



[0189] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 758.3225; found, 758.3242 (1.7mmu)

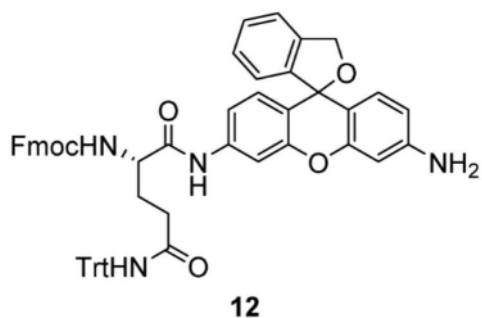


[0191] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 686.2649; found, 686.2654 (0.5mmu)

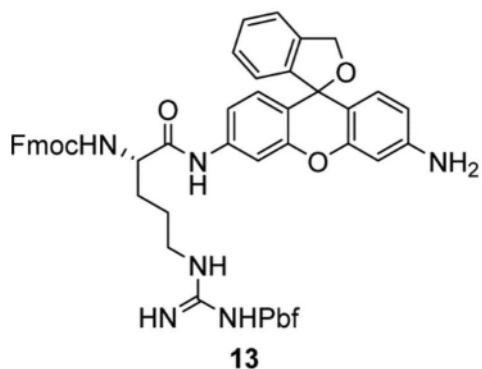


[0193] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 682.2912; found, 682.2914 (0.2mmu)

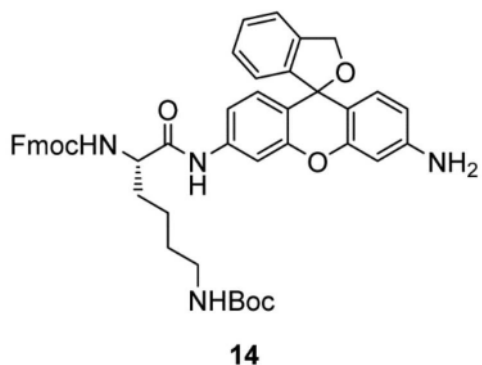
[0194]

[0195] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 909.3647; found, 909.3628 (−1.9mmu)

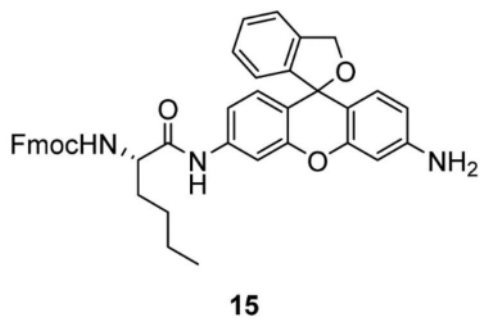
[0196]

[0197] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 947.3797; found, 947.3770 (−2.7mmu)

[0198]

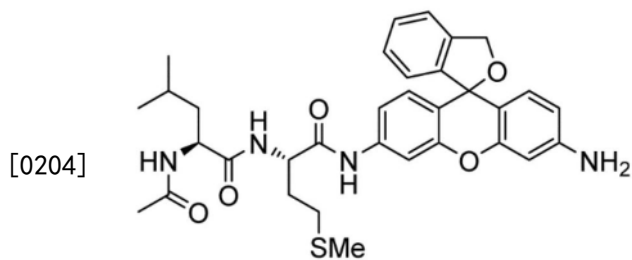
[0199] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 767.3439; found, 767.3486 (4.7mmu)

[0200]

[0201] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 652.2806; found, 652.2797 (−0.9mmu)

[0202] (2) 作为化合物A7和化合物A7', 合成了化合物16~60。

[0203] (2-1) 化合物16的合成



16

[0205] 在HMRG盐酸盐(五稜化药株式会社, 1.41g, 2.83mmol)的DMF溶液(13mL)中, 在室温加入DIPEA(2.1mL, 12.0mmol)、Fmoc-Met-OH(1.49g, 4.00mmol)、HATU(1.52g, 4.00mmol), 搅拌15小时。将溶剂减压蒸馏除去, 通过硅胶色谱法将残渣粗纯化。所得到的化合物6不经过进一步纯化而用于下一个工序。

[0206] 在化合物6的二氯甲烷溶液(10mL)中, 在室温加入DIPEA(1.0mL, 5.73mmol)、Cl-Trt(2-Cl)-Resin(818mg, 1.33mmol), 振荡15小时。将反应溶液过滤, 将树脂用DMF清洗, 得到化合物A2(A=Met)。

[0207] 在化合物A2(A=Met)中加入20%哌啶(Piperidine)/DMF溶液(10mL), 在室温振荡1小时。过滤反应溶液, 将树脂依次用DMF、CH₂Cl₂清洗, 得到化合物A3(A=Met)。

[0208] 在化合物A3(A=Met)中依次加入DMF(20mL)、DIPEA(2.1mL, 12.0mmol)、Fmoc-Leu-OH(1.41g, 3.99mmol)、HATU(1.52g, 3.99mmol), 在室温振荡13.5小时。用DMF清洗树脂, 得到化合物A4(A=Met, B=Leu)。

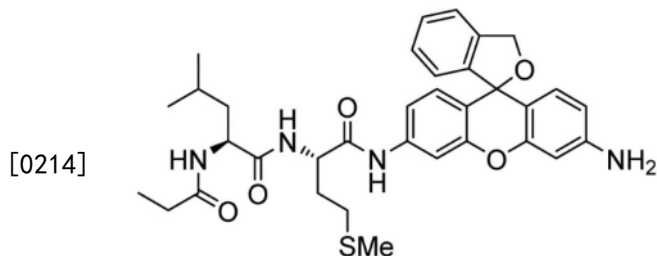
[0209] 在化合物A4(A=Met, B=Leu)中加入20%哌啶/DMF溶液(10mL), 在室温振荡1小时。过滤反应溶液, 将树脂依次用DMF、CH₂Cl₂清洗。将树脂进行真空干燥, 得到化合物A5(A=Met, B=Leu)。

[0210] 在相当于0.05mmol的化合物A5(A=Met, B=Leu)中加入20%Ac₂O/CH₂Cl₂溶液1mL, 在室温振荡1小时。过滤反应溶液, 用CH₂Cl₂清洗树脂, 得到化合物A6'(A=Met, B=Leu, R=Me)。

[0211] 在化合物A6'(A=Met, B=Leu, R=Me)中加入TFA/TES/H₂O=15:1:1溶液(1mL), 在遮光下以室温振荡1小时。过滤除去树脂, 将滤液减压蒸馏除去。将残渣用反相柱色谱(H₂O(0.1%TFA)/CH₃CN(0.1%TFA)=80:20→65:35)纯化, 得到目标化合物(7.6mg)。

[0212] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 603.2636; found, 603.2643(0.7mmu)

[0213] (2-2) 化合物17的合成



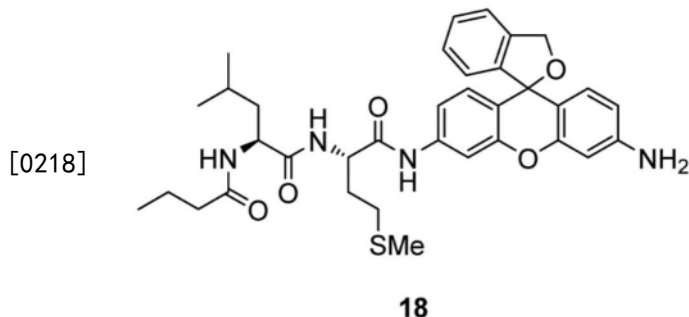
17

[0215] 在相当于0.05mmol的化合物A5(A=Met, B=Leu)中依次加入DMF(4mL)、DIPEA(0.09mL, 0.50mmol)、丙酸(0.014mL, 0.15mmol)、HATU(57.0mg, 0.15mmol), 在室温振荡12小

时。过滤反应溶液,将树脂用DMF、CH₂Cl₂依次清洗。加入TFA/TES/H₂O=15:1:1溶液(1mL),在遮光下以室温振荡1小时。过滤树脂,将滤液减压蒸馏除去。将残渣用反相色谱(H₂O(0.1%TFA)/CH₃CN(0.1%TFA)=80:20→65:35)纯化,得到目标化合物的TFA盐(7.5mg)。

[0216] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,617.2792;found,617.2802(1.0mmu)

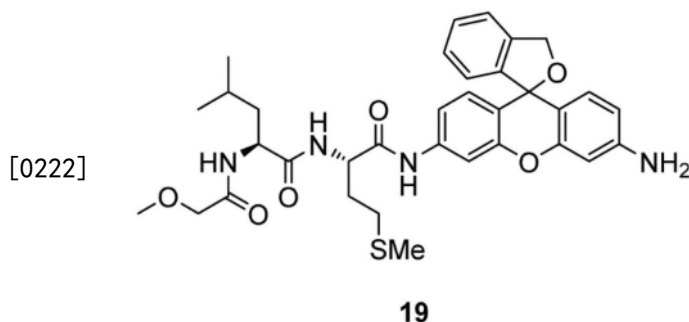
[0217] (2-3) 化合物18的合成



[0219] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物18。羧酸使用丁酸,得到目标化合物的TFA盐(7.3mg)。

[0220] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,631.2949;found,631.2962(1.3mmu)

[0221] (2-4) 化合物19的合成



[0223] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物19。羧酸使用甲氧基乙酸(Methoxyacetic Acid),得到目标化合物的TFA盐(12.8mg)。

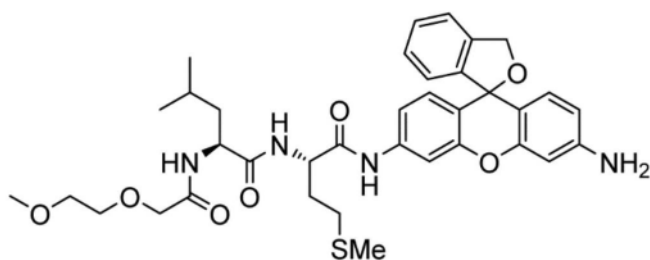
[0224] ¹H NMR(400MHz,CD₃OD+Na₂CO₃)

[0225] δ0.94(3H,d,J=6.0Hz),0.97(3H,d,J=6.0Hz),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=7.2Hz),4.59(1H,dd,J=5.2,9.2Hz),5.25(2H,s),6.41(1H,d,J=8.4Hz),6.50(1H,s),6.65(1H,d,J=8.4Hz),6.81(1H,d,J=7.6Hz),6.84(1H,d,J=8.8Hz),7.13(1H,d,J=8.8Hz),7.27(1H,t,J=7.2Hz),7.38(1H,t,J=7.6Hz),7.41(1H,t,J=7.6Hz),7.62(1H,s)

[0226] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,633.2741;found,633.2723(-1.8mmu)

[0227] (2-5) 化合物20的合成

[0228]

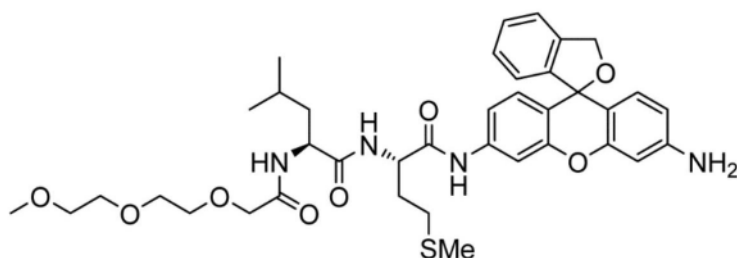
**20**

[0229] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物20。羧酸使用2-(2-甲氧基乙氧基)乙酸(2-(2-Methoxyethoxy)acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(16.3mg)。

[0230] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,677.3003;found,677.2997(-0.6mmu)

[0231] (2-6)化合物21的合成

[0232]

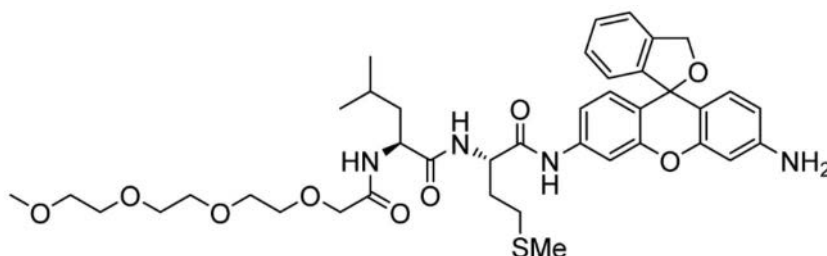
**21**

[0233] 通过(2-2)同样的方法合成化合物21。羧酸使用[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙酸([2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(19.7mg)。

[0234] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,721.3266;found,721.3246(-2.0mmu)

[0235] (2-7)化合物22的合成

[0236]

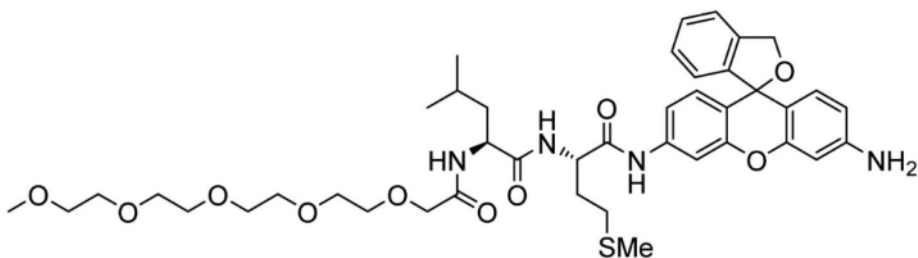
**22**

[0237] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物22。羧酸使用2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙酸(2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(5.9mg)。

[0238] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,765.3528;found,765.3520(-0.8mmu)

[0239] (2-8)化合物23的合成

[0240]

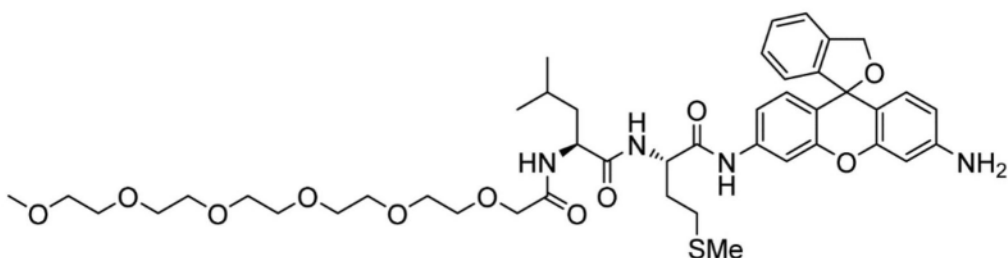
**23**

[0241] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物23。羧酸使用[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸([2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(10.8mg)。

[0242] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,809.3790;found,809.3821(3.1mmu)

[0243] (2-9)化合物24的合成

[0244]

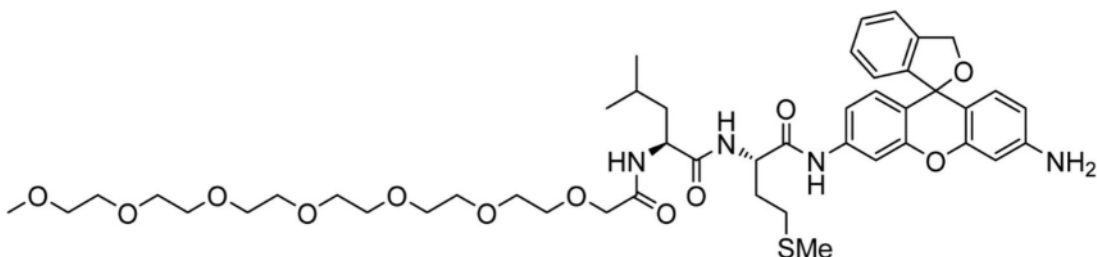
**24**

[0245] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物24。羧酸使用[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸([2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(10.8mg)。

[0246] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,853.4052;found,853.4048(-0.4mmu)

[0247] (2-10)化合物25的合成

[0248]

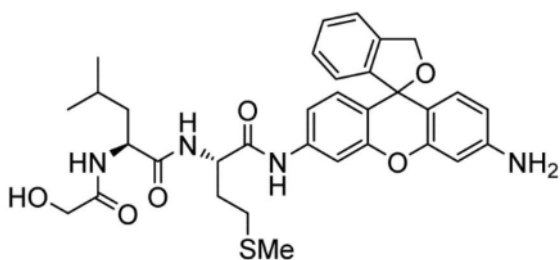
**25**

[0249] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物25。羧酸使用[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸([2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]acetic acid),得到目标化合物的TFA盐(10.8mg)。

[0250] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,897.4314;found,897.4312(-0.2mmu)

[0251] (2-11)化合物26的合成

[0252]

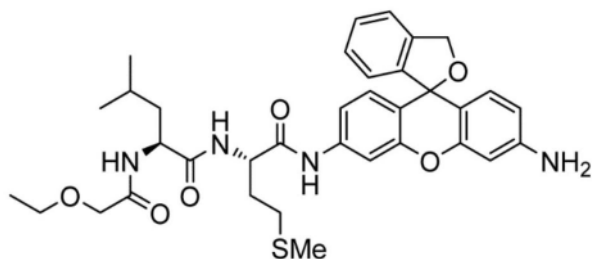
**26**

[0253] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物26。羧酸使用羟基乙酸,得到目标化合物的TFA盐(7.1mg)。

[0254] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,619.2585;found,619.2595(1.0mmu)

[0255] (2-12) 化合物27的合成

[0256]

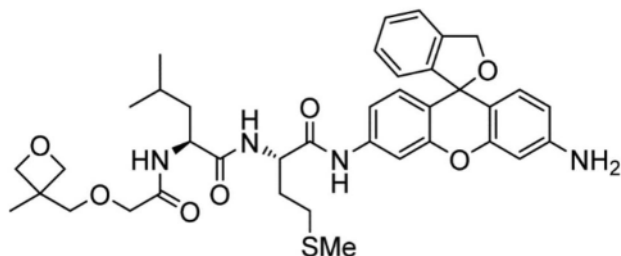
**27**

[0257] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物27。羧酸使用乙氧基乙酸(Ethoxyacetic acid),得到目标化合物的TFA盐(8.2mg)。

[0258] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,647.2898;found,647.2898(0.0mmu)

[0259] (2-13) 化合物28的合成

[0260]

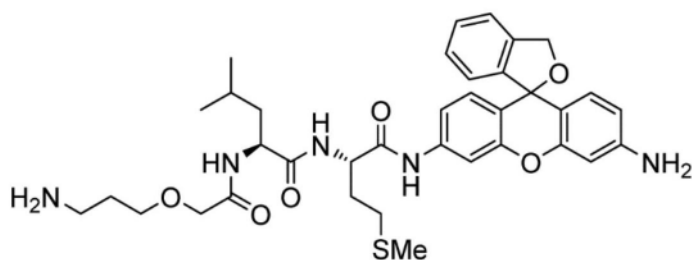
**28**

[0261] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物28。羧酸使用化合物4,得到目标化合物的TFA盐(11.8mg)。

[0262] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,703.3160;found,703.3160(0.0mmu)

[0263] (2-14) 化合物29的合成

[0264]

**29**

[0265] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物29。羧酸使用化合物3,得到目标化合物的TFA盐(11.8mg)。

[0266] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,676.3163;found,676.3137(-2.6mmu)

[0267] (2-15)化合物30的合成

[0268]

**30**

[0269] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物30。羧酸使用化合物1,得到目标化合物的TFA盐(13.9mg)。

[0270] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,663.2847;found,663.2837(-1.0mmu)

[0271] (2-16)化合物31的合成

[0272]

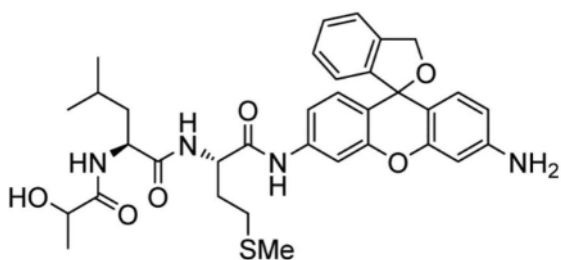
**31**

[0273] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物31。羧酸使用化合物5,得到目标化合物的TFA盐(28.3mg)。

[0274] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,661.3054;found,661.3044(-1.0mmu)

[0275] (2-17)化合物32的合成

[0276]

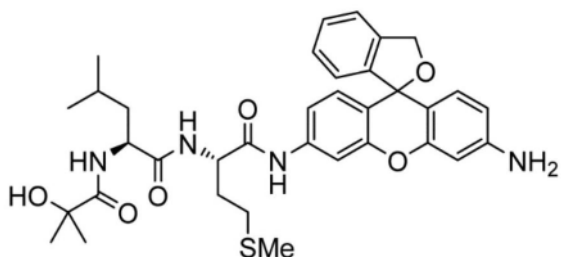
**32**

[0277] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物32。羧酸使用DL-乳酸,得到目标化合物的TFA盐(26.2mg)。

[0278] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 633.2741; found, 633.2731 (-1.0mmu)

[0279] (2-18) 化合物33的合成

[0280]

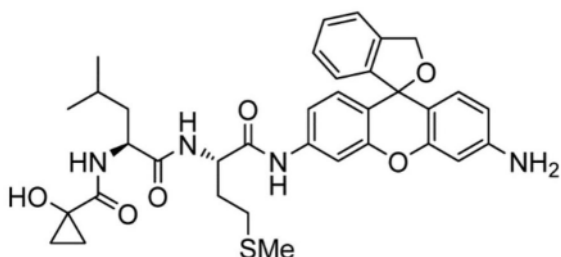
**33**

[0281] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物33。羧酸使用2-羟基异丁酸,得到目标化合物的TFA盐(19.9mg)。

[0282] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 647.2898; found, 647.2890 (-0.8mmu)

[0283] (2-19) 化合物34的合成

[0284]

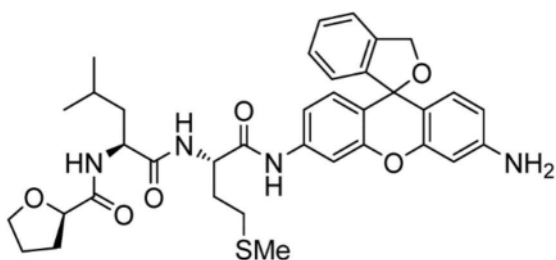
**34**

[0285] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物34。羧酸使用1-羟基环丙烷甲酸(1-Hydroxycyclopropanecarboxylic acid),得到目标化合物的TFA盐(18.4mg)。

[0286] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 645.2741; found, 645.2717 (-2.4mmu)

[0287] (2-20) 化合物35的合成

[0288]



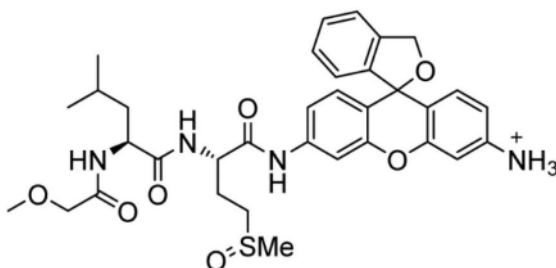
35

[0289] 通过与(2-2)同样的方法合成化合物35。羧酸使用(R) - (+) - 四氢呋喃-2-甲酸,得到目标化合物的TFA盐(6.4mg)。

[0290] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 659.2898; found, 659.2885 (-1.3mmu)

[0291] (2-21) 化合物36的合成

[0292]



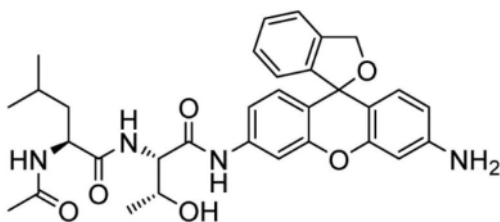
36

[0293] 在化合物19(0.0410g, 0.0647mmol)的THF溶液(2mL)中加入过氧化氢水(0.5mL),在室温搅拌2小时。在反应溶液中加入饱和碳酸氢钠水溶液、饱和硫代硫酸钠水溶液,用二氯甲烷提取。将有机相用硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去,得到目标化合物(0.0417g, 99%)。

[0294] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 649.2690; found, 649.2660 (-3.0mmu)

[0295] (2-22) 化合物37的合成

[0296]



37

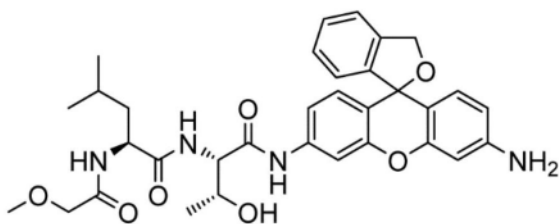
[0297] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物37。

[0298] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代成Fmoc-Thr(tBu)-OH,合成化合物7。从化合物7通过同样的工序合成化合物A5(A=Thr(tBu), B=Leu),使用相当于0.05mmol的化合物A5(A=Thr(tBu), B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(5.5mg)。

[0299] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 573.2708; found, 573.2715 (0.7mmu)

[0300] (2-23) 化合物38的合成

[0301]

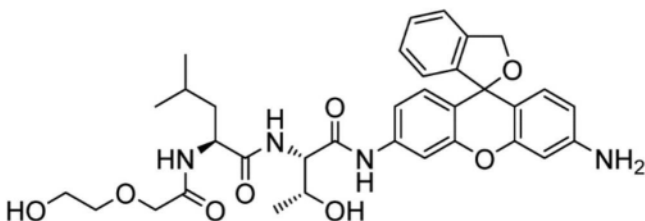
**38**

[0302] 通过与(2-4)同样的工序合成化合物38。使用相当于0.05mmol的化合物A5 (A=Thr (tBu), B=Leu), 得到目标化合物的TFA盐(10.7mg)。

[0303] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 603.2813; found, 603.2818 (0.5mmu)

[0304] (2-24) 化合物39的合成

[0305]

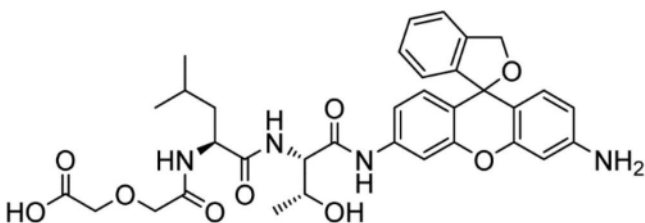
**39**

[0306] 通过与(2-15)同样的工序合成化合物39。使用相当于0.05mmol的化合物A5 (A=Thr (tBu), B=Leu), 得到目标化合物的TFA盐(3.6mg)。

[0307] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 633.2919; found, 633.2876 (-4.3mmu)

[0308] (2-25) 化合物40的合成

[0309]

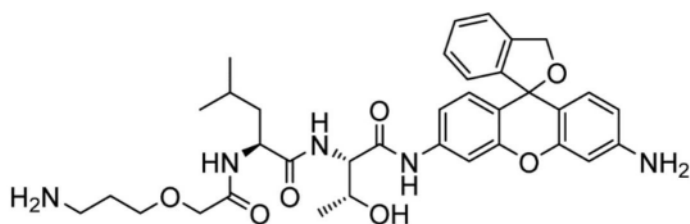
**40**

[0310] 在相当于0.05mmol的化合物A5 (A=Thr (tBu), B=Leu) 的CH₂Cl₂溶液(1mL) 中加入DIPEA(0.043mL, 0.25mmol)、二甘醇酸酐(Diglycolic anhydride) (29.0mg, 0.25mmol), 在室温振荡24小时。过滤反应溶液, 将树脂用CH₂Cl₂清洗。加入TFA/ TES/H₂O=15:1:1溶液(1mL), 在遮光下以室温振荡1小时。过滤除去树脂, 将滤液减压蒸馏除去。将残渣用反相色谱纯化, 得到目标化合物(18.6mg)。

[0311] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 647.2712; found, 647.2716 (0.4mmu)

[0312] (2-26) 化合物41的合成

[0313]



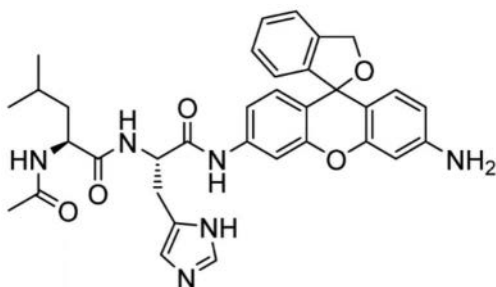
41

[0314] 通过与(2-14)同样的方法合成化合物41。使用相当于0.05mmol的化合物A5 (A=Thr (tBu)、B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(16.5mg)。

[0315] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 646.3235; found, 646.3206 (-2.9mmu)

[0316] (2-27) 化合物42的合成

[0317]



42

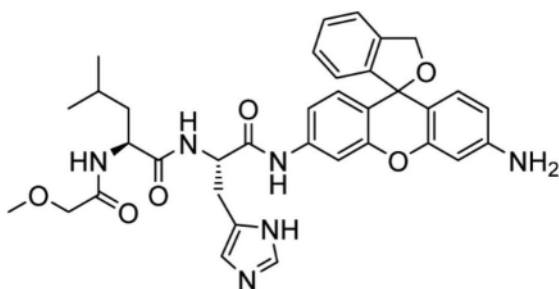
[0318] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物42。

[0319] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-His(Trt)-OH,合成了化合物8。从化合物8通过同样的工序合成化合物A5 (A=His(Trt), B=Leu),使用相当于0.05mmol的化合物A5 (A=His(Trt), B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(7.9mg)。

[0320] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 609.2820; found, 609.2820 (0mmu)

[0321] (2-28) 化合物43的合成

[0322]



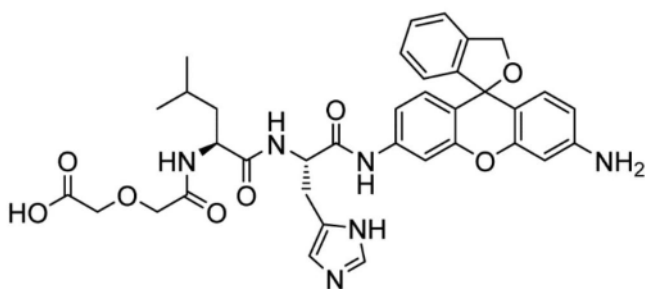
43

[0323] 通过与(2-4)同样的工序合成化合物43。使用相当于0.10mmol的化合物A5 (A=His(Trt), B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(15.9mg)。

[0324] HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 639.2926; found, 639.2949 (2.3mmu)

[0325] (2-29) 化合物44的合成

[0326]

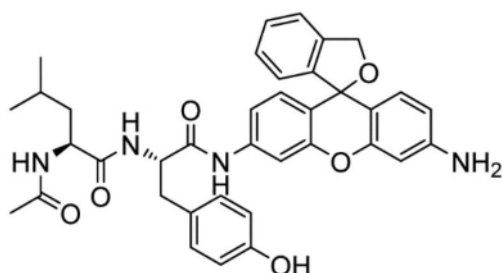
**44**

[0327] 通过与(2-25)同样的工序合成化合物44。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=His(Trt),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(11.2mg)。

[0328] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,683.2824;found,683.2820(-0.4mmu)

[0329] (2-30) 化合物45的合成

[0330]

**45**

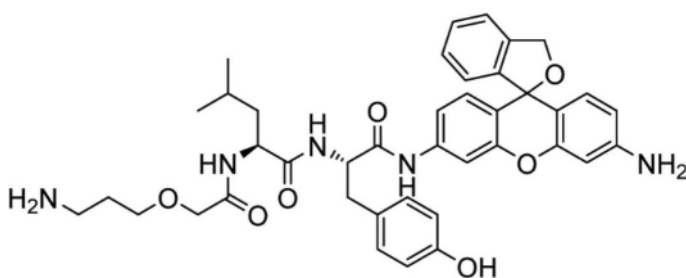
[0331] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物45。

[0332] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-Tyr(tBu)-OH,合成了化合物9。从化合物9通过同样的工序合成化合物A5(A=Tyr(tBu),B=Leu),使用相当于0.025mmol的化合物A5(A=Tyr(tBu),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(3.0mg)。

[0333] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,635.2864;found,635.2867(0.3mmu)

[0334] (2-31) 化合物46的合成

[0335]

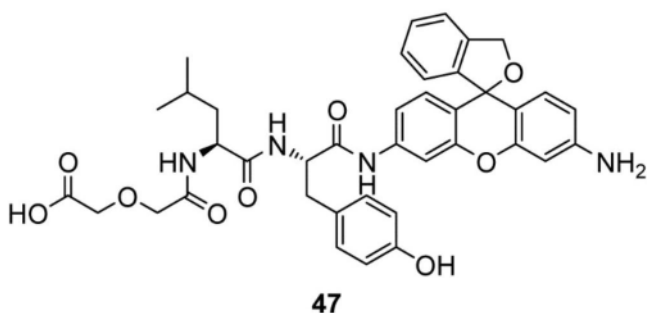
**46**

[0336] 通过与(2-14)同样的工序合成化合物46。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Tyr(tBu),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(23.1mg)。

[0337] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,708.3392;found,708.3358(-3.4mmu)

[0338] (2-32) 化合物47的合成

[0339]

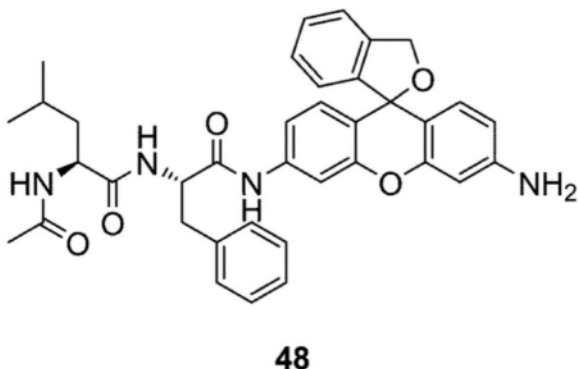


[0340] 通过与(2-25)同样的工序合成化合物47。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Tyr(tBu),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(22.1mg)。

[0341] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,709.2868;found,709.2868(0.0mmu)

[0342] (2-33)化合物48的合成

[0343]



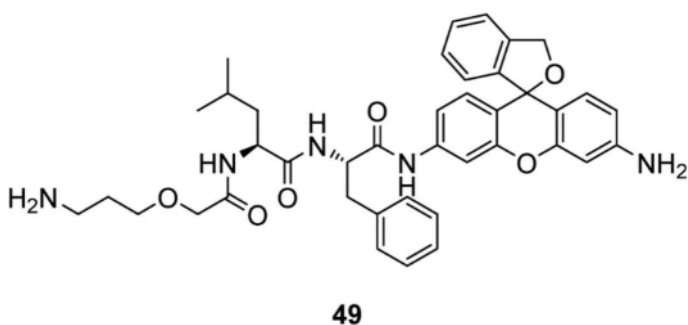
[0344] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物48。

[0345] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-Phe-OH,合成了化合物10。从化合物10通过同样的工序合成化合物A5(A=Phe,B=Leu),使用相当于0.025mmol的化合物A5(A=Phe,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(3.0mg)。

[0346] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,619.2915;found,619.2910(-0.5mmu)

[0347] (2-34)化合物49的合成

[0348]

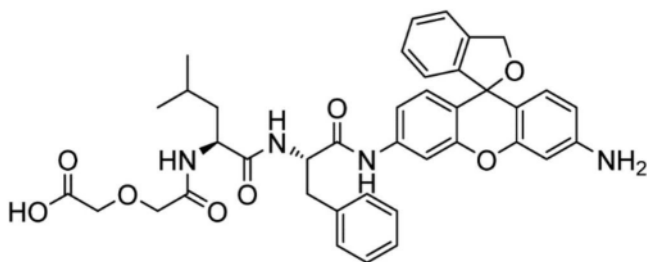


[0349] 通过与(2-14)同样的工序合成化合物49。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Phe,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(15.4mg)。

[0350] HRMS(ESI⁺):calcd for[M+H]⁺,692.3443;found,692.3412(-3.1mmu)

[0351] (2-35)化合物50的合成

[0352]



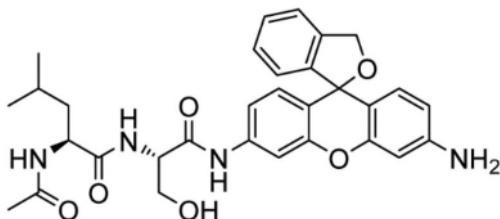
50

[0353] 通过与(2-25)同样的工序合成化合物50。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Phe,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(7.3mg)。

[0354] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,693.2919;found,693.2922(0.2mmu)

[0355] (2-36)化合物51的合成

[0356]



51

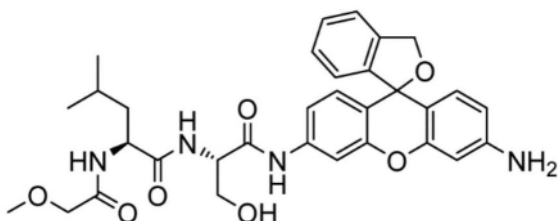
[0357] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物51。

[0358] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-Ser(tBu)-OH,合成了化合物11。从化合物11通过同样的工序合成化合物A5(A=Ser(tBu),B=Leu),使用相当于0.025mmol的化合物A5(A=Ser(tBu),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(6.4mg)。

[0359] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,559.2551;found,559.2555(0.4mmu)

[0360] (2-37)化合物52的合成

[0361]

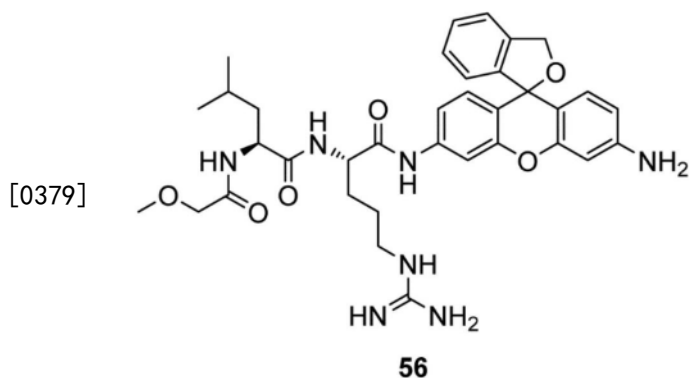


52

[0362] 通过与(2-4)同样的工序合成化合物52。使用相当于0.025mmol的化合物A5(A=Ser(tBu),B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(7.2mg)。

[0363] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,589.2657;found,589.2692(3.5mmu)

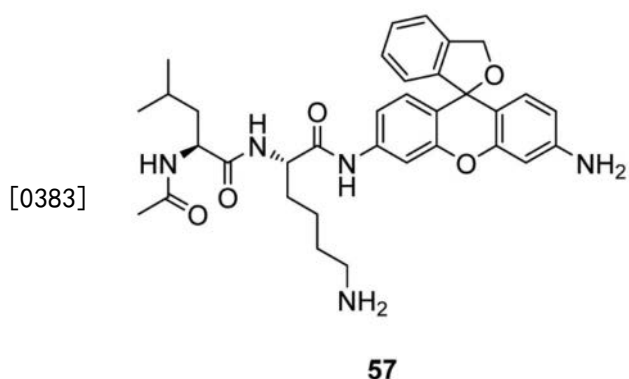
[0364] (2-38)化合物53的合成



[0380] 通过与(2-4)同样的工序合成化合物56。使用相当于0.025mmol的化合物A5 (A=Arg(Pbf), B=Leu), 得到目标化合物的TFA盐(3.3mg)。

[0381] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 658.3348; found, 658.3353 (0.5mmu)

[0382] (2-42) 化合物57的合成

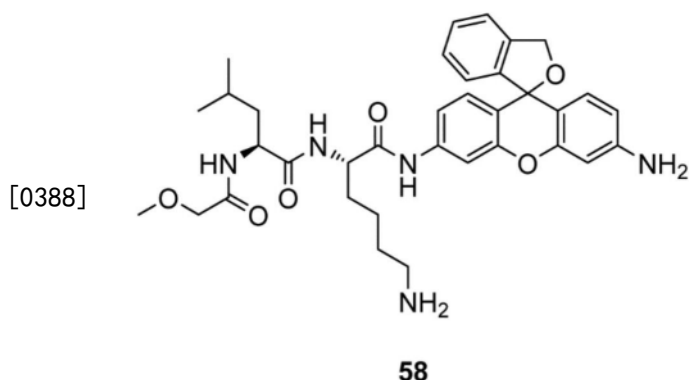


[0384] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物57。

[0385] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-Lys(Boc)-OH, 合成了化合物14。从化合物14通过同样的工序合成化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu), 使用相当于0.050mmol的化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu), 得到目标化合物的TFA盐(11.1mg)。

[0386] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 600.3180; found, 600.3176 (-0.4mmu)

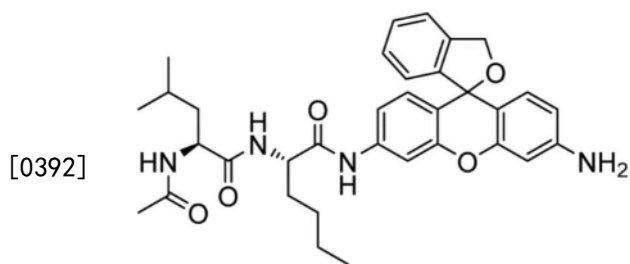
[0387] (2-43) 化合物58的合成



[0389] 通过与(2-4)同样的工序合成化合物58。使用相当于0.10mmol的化合物A5 (A=Lys(Boc), B=Leu), 得到目标化合物的TFA盐(12.1mg)。

[0390] HRMS(ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 630.3286; found, 630.3287 (0.1mmu)

[0391] (2-44) 化合物59的合成



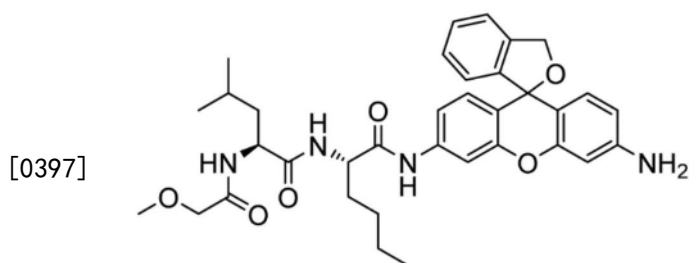
59

[0393] 通过与(2-1)同样的方法合成化合物59。

[0394] 将工序(a)的氨基酸从Fmoc-Met-OH取代为Fmoc-Nle-OH,合成了化合物15。从化合物15通过同样的工序合成化合物A5(A=Nle,B=Leu),使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(6.7mg)。

[0395] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,585.3071;found,585.3077(0.6mmu)

[0396] (2-45)化合物60的合成

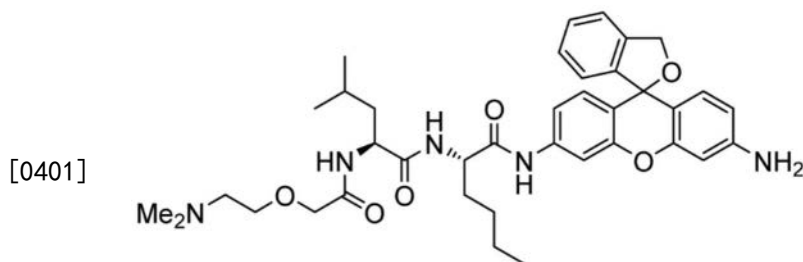


60

[0398] 通过与(2-4)同样的方法合成化合物60。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(8.2mg)。

[0399] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,615.3177;found,615.3184(0.7mmu)

[0400] (2-46)化合物61的合成



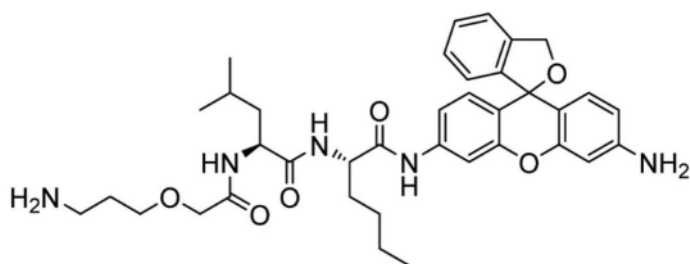
61

[0402] 在相当于0.05mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu)中依次加入DMF(4mL)、DIPEA(0.09mL,0.50mmol)、化合物2(29.6mg,0.20mmol)、HATU(57.0mg,0.15mmol),在室温振荡24小时。过滤反应溶液,将树脂用DMF、CH₂Cl₂依次清洗。加入TFA/TES/H₂O=15:1:1溶液(1mL),在遮光下以室温振荡1小时。过滤除去树脂,将滤液减压蒸馏除去。将残渣用反相色谱(H₂O(0.1%TFA)/CH₃CN(0.1%TFA)=80:20→65:35)纯化,得到目标化合物的TFA盐(4.7mg)。

[0403] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,672.3756;found,672.3762(0.6mmu)

[0404] (2-47)化合物62的合成

[0405]

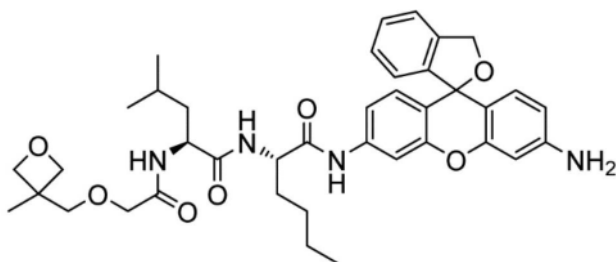
**62**

[0406] 通过与(2-14)同样的方法合成化合物62。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(12.1mg)。

[0407] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,658.3599;found,658.3608(0.9mmu)

[0408] (2-48)化合物63的合成

[0409]

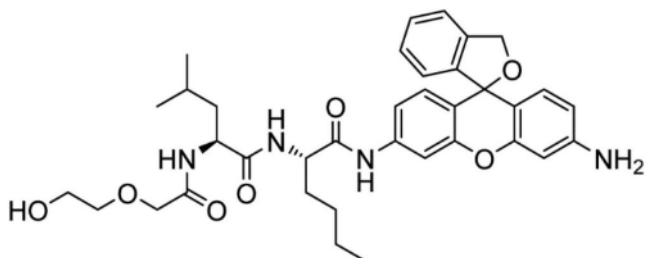
**63**

[0410] 通过与(2-13)同样的方法合成化合物63。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(9.1mg)。

[0411] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,685.3596;found,685.3607(1.1mmu)

[0412] (2-49)化合物64的合成

[0413]

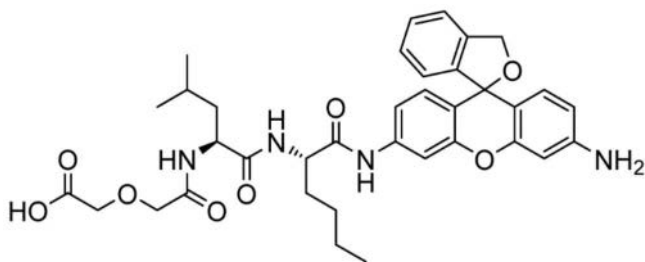
**64**

[0414] 通过与(2-15)同样的方法合成化合物64。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(4.6mg)。

[0415] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,645.3283;found,645.3256(-2.7mmu)

[0416] (2-50)化合物65的合成

[0417]



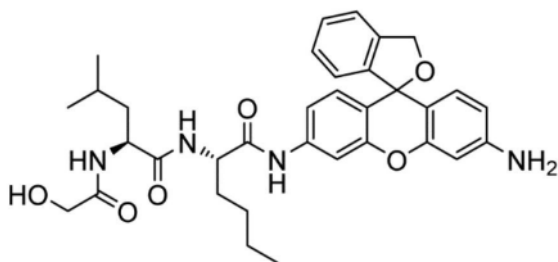
65

[0418] 通过与(2-25)同样的方法合成化合物65。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(8.0mg)。

[0419] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,659.3075;found,659.3073(-0.2mmu)

[0420] (2-51)化合物66的合成

[0421]



66

[0422] 通过与(2-11)同样的方法合成化合物66。使用相当于0.050mmol的化合物A5(A=Nle,B=Leu),得到目标化合物的TFA盐(5.5mg)。

[0423] HRMS(ESI⁺):calcd for [M+H]⁺,601.3021;found,601.3046(2.5mmu)

[0424] (实施例3)荧光探针的光学特性

[0425] 分别测定化合物19的各pH下的吸收光谱和荧光光谱。具体而言,在pH2~11的各pH的10mM磷酸缓冲液中添加化合物19的DMSO溶液(0.1mM),以最终探针浓度为1μM、最终DMSO浓度为1%的方式制备测定溶液。测定溶液的荧光光谱在激发波长490nm下测定。

[0426] 图1a、b表示各pH下的光谱。作为本发明的荧光探针的化合物19在中性条件下主要呈现无色无荧光性。

[0427] (实施例4)荧光探针(化合物19)对钙蛋白酶的反应性

[0428] 使钙蛋白酶-1作用于化合物19,测定吸收光谱和荧光光谱的变化。具体而言,在50mM TRIS缓冲液(pH7.4,5mM CaCl₂,100mM NaCl,1mM EGTA)中添加化合物19的DMSO溶液(0.5mM)、钙蛋白酶-1(100Units)(来自人红细胞的Calpain-1,Cat.No.208713,Merck Millipore公司,以下同样),制作2mL的反应溶液(最终探针浓度5μM)。在37℃实施酶反应。在激发波长490nm下测定反应溶液的荧光光谱。另外,通过HPLC色谱分析反应溶液。作为对照,使用未添加钙蛋白酶-1的化合物19(最终浓度5μM)。

[0429] 将测定吸收和荧光光谱得到的结果表示于图2的(a)、(b)。伴随钙蛋白酶-1的添加,观测探针溶液的吸光度和荧光强度的增加。另外,将HPLC的结果表示于图3。通过与钙蛋白酶-1的反应,化合物19的峰位置与HMRG相同。因此,表明:通过由钙蛋白酶-1水解化合物19的肽位点,生成荧光物质HMRG。

[0430] (实施例5) 钙蛋白酶—1所引起的荧光强度的经时变化

[0431] 对于化合物19和化合物16,进行经时的荧光测试。具体而言,在包含10 μ M合成的荧光探针的50mM TRIS缓冲液(pH7.4,2mM EGTA,2mM DTE)中加入17.4U/mL的钙蛋白酶—1和5mM CaCl₂,在37 $^{\circ}$ C实施酶反应。作为阴性对照,也同样测定未添加钙蛋白酶—1、CaCl₂的各化合物。

[0432] 将测定钙蛋白酶—1所引起的荧光强度的经时变化的结果表示于图4(激发波长475nm,荧光波长500—550nm)。化合物16和化合物19均作为对钙蛋白酶—1的荧光探针发挥功能。特别是表明化合物19与钙蛋白酶—1的反应性进一步提高。另外,确认了钙蛋白酶的活化被Ca₂⁺引起,因此在不含Ca₂⁺的溶液中不引起荧光上升。

[0433] (实施例6) 荧光探针(化合物16—36)对钙蛋白酶的反应性

[0434] 同样实施化合物16—36的荧光测试。在包含10 μ M所合成的荧光探针的50mM TRIS缓冲液(pH7.4,2mM EGTA,2mM DTE)中,加入50U/mL(化合物16,19—25)或17.4U/mL(化合物16—18,26—36)的钙蛋白酶—1和5mM CaCl₂,在37 $^{\circ}$ C实施酶反应。

[0435] 将添加钙蛋白酶—1后10分钟的荧光强度的增加表示于图5的(a)和(b)(激发波长475nm,荧光波长500—550nm)。任一化合物都显示作为对钙蛋白酶—1的荧光探针的功能。另外,化合物19—25的荧光强度比化合物16的荧光强度大,化合物26—29的荧光强度比化合物16—18的荧光强度大。将添加钙蛋白酶—1后30分钟的荧光强度的增加表示于图5的(c)(激发波长460nm,荧光波长530nm)。任一化合物都显示对钙蛋白酶—1的荧光探针的功能。另外,化合物30—36的荧光强度比化合物16的荧光强度大。

[0436] 由上可以确认,与作为比较化合物的化合物16或化合物17、18相比,作为本发明的化合物的化合物19—36与钙蛋白酶的酶反应性提高。另外,作为本发明的化合物,式(I)的R¹⁰或R¹¹具有烷基的化合物、由R¹⁰与R¹¹形成环的化合物、和R¹²—L—与R¹⁰形成环的化合物都显示与钙蛋白酶的酶反应性良好。另一方面,与化合物16相比,作为比较化合物的化合物17、18荧光强度减少。即,表明:在式(I)中在肽链的N末端结合具有R¹²—L—O—C(R¹⁰)(R¹¹)—基的酰胺基对钙蛋白酶—1的酶活性检测的灵敏度提高是重要的。各种R¹²—L—O—C(R¹⁰)(R¹¹)—基同样显示提高灵敏度的效果,因此暗示R¹²—L—O—C(R¹⁰)(R¹¹)—基不限于本实施例所记载的化学结构,即使是任意的化学结构都同样带来提高对钙蛋白酶活性检测的灵敏度的效果。

[0437] (实施例7) 钙蛋白酶所引起的荧光探针(化合物37、42、45、48、51、53、55、57、59)的经时变化

[0438] 接着,对化合物37、42、45、48、51、53、55、57、59,实施利用钙蛋白酶—1的同样的荧光测试。具体而言,在含有10 μ M合成的荧光探针的50mM TRIS缓冲液(pH7.4,2mM EGTA,2mM DTE)中加入17.4U/mL的钙蛋白酶—1和5mM CaCl₂,在37 $^{\circ}$ C实施酶反应。使用未添加钙蛋白酶—1的各化合物作为对照。

[0439] 将绘制荧光强度的时间依赖性的结果表示于图6~图8(激发波长475nm,荧光波长500—550nm)。任一探针都通过与钙蛋白酶—1作用而观察到荧光强度的增加,表明成为钙蛋白酶—1酶底物。

[0440] (实施例8) 荧光探针(化合物37—66)对钙蛋白酶的反应性

[0441] 为了评价在氨基酸相同的化合物之间R¹²—L—O—基所引起的对与钙蛋白酶—1的

反应性的影响,对化合物37—66按照上述方法实施利用钙蛋白酶—1的荧光测试。具体而言,在含有10 μ M合成的荧光探针的50mM TRIS缓冲液(pH7.4,2mM EGTA,2mM DTE)中加入17.4U/mL的钙蛋白酶1和5mM CaCl₂,在37 $^{\circ}$ C实施酶反应,测定添加钙蛋白酶—1的10分钟后的荧光强度的增加。

[0442] 将所得到的结果表示于图9~图11。确认到任一化合物均在具有R¹²-L-O-基的化合物中与不具有R¹²-L-O-基的化合物相比荧光强度都进一步增强。关于氨基酸A和B的多种组合,表明具有R¹²-L-O-基的化合物也能够有效检测出钙蛋白酶活性。

[0443] 在化合物16—66中,对钙蛋白酶—1的反应性依赖于式(I)中的R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基,在存在R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基的情况下,可以观察到对钙蛋白酶—1的反应性提高。进而,具有R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基所引起的与钙蛋白酶的反应性提高对于氨基酸A和B的多种组合也可以看到效果。

[0444] (实施例9)利用荧光探针(化合物16和化合物19)的活细胞成像

[0445] 对于通过上述实验确认的本发明的化合物与钙蛋白酶的酶反应性的提高在细胞内是否也同样进行了验证。对于化合物16和19,实施了SH-SY5Y细胞中的钙蛋白酶活性成像。具体而言,将SH-SY5Y细胞(美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection),VA,USA),在Dulbecco改良的Eagle培养基/Ham's F-12混合培养基(DMEM/F-12;Thermo Fisher Scientific)(包含10%小牛血清(FBS;Thermo Fisher Scientific,MA,USA)和100U/mL青霉素-100 μ g/mL链霉素(PS;Thermo Fisher Scientific))中在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂-95%空气的条件下培养。在由聚-D-赖氨酸(Thermo Fisher Scientific)和层粘连蛋白(BD Biosciences,CA,USA)包被的多孔板(μ -Plate 96Well;ibidi,Grafelfing,Germany)中接种6 \times 10⁴~8 \times 10⁴细胞/孔的细胞,用培养液进行预孵育。将孔内的培养液除去后,立即加入200 μ L的测试液(包含5 μ M探针的培养液),在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂-95%空气的条件下孵育,10分钟后用共聚焦显微镜(LSM710,Zeiss,Oberkochen,Germany)拍摄明视野图像和荧光图像。

[0446] 如图12的(a)、(b)所示,在任何情况下通过添加化合物,都观察到了SH-SY5Y细胞内的钙蛋白酶活性。与化合物16相比,在化合物19的情况下形成了清晰的成像,由此表明式(I)中的R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基带来的酶反应性的提高在活细胞成像中也有效。

[0447] (实施例10)利用荧光探针的活细胞成像

[0448] 与实施例9同样,对于化合物20—23、化合物38和化合物56,实施SH-SY5Y细胞中的钙蛋白酶活性成像。对化合物20—23和化合物38在30分钟的孵育后拍摄明视野图像和荧光图像,对化合物56在20分钟的孵育后拍摄明视野图像和荧光图像。如图13和图14所示,在任一化合物中都观察到了SH-SY5Y细胞内的钙蛋白酶活性。

[0449] 如上述的实施例所验证的那样,通过本发明,能够提供以钙蛋白酶为靶标的新的荧光探针。具体而言,发现通过使式(I)具有R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基,能够创建出与钙蛋白酶的酶反应性提高的探针。作为R¹²-L-O-C(R¹⁰)(R¹¹)-基,在大范围的基团都确认到这样的提高,例如在具有羟基、羧基、烷氧基和/或氨基等取代基的情况下,也显示良好的酶反应性。另外,在R¹²与R¹⁰或R¹¹结合形成了环的情况下、R¹⁰和R¹¹为烷基的情况下、或R¹⁰与R¹¹形成了环的情况下,都与钙蛋白酶的酶反应性良好。此外,在氨基酸A和B为各种氨基酸的情况下,与钙蛋白酶的酶反应性也都得到了良好的结果。此外,在细胞的荧光成像中,也观

察到了依赖于 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ —基的荧光强度的增强。以上的结果表明通过使式(I)具有 $R^{12}-L-O-C(R^{10})(R^{11})$ —基,具有任意的氨基酸A和B的化合物都能够有效检测钙蛋白酶活性。即,实际证明了本发明的荧光探针是能够有效检测钙蛋白酶的酶活性的化合物。

[0450] (实施例11) 使用大鼠NMDA损伤模型的评价

[0451] 使用异氟烷对黑色Brown—Norway大鼠进行全身麻醉。在眼内施用PBS或N—甲基—D—天冬氨酸(NMDA)(10mM, 2 μ L)。6小时后用氯胺酮—赛拉嗪(xylazine)混合液进行再次麻醉,在眼内施用化合物19(18.3 μ M, 3 μ L)。在化合物19的施用前和施用20分钟后,用F10(尼德克公司的共聚焦生物显微镜)拍摄眼底。

[0452] 将其结果表示于图15。由箭头所示的部位表示由HMRG染色的神经细胞的例子。施用了PBS的大鼠中,在施用化合物19前没有确认到信号(图15a),在20分钟后(图15b)神经细胞基本没有被染色。施用了NMDA的大鼠的情况下,如图15c所示,在施用化合物19前没有确认到明显的信号。但是如图15d所示,在施用化合物19的20分钟后神经细胞明显大量被染色。另外,将计测图15所示的大鼠的眼底拍摄图像的HMRG阳性神经细胞数的结果在图16中表示。对于施用了PBS的大鼠,HMRG阳性细胞数极少,施用了NMDA的大鼠的HMRG阳性细胞数被确认到显著增加。

[0453] 由于大鼠NMDA视网膜损伤模型被认为是视网膜疾病模型,所以本发明的荧光探针可以被视为对视网膜疾病的诊断有用。特别是能够迅速检测眼底的钙蛋白酶的活化,有望被用于临床诊断和治疗选择。此外,可以期待发明的荧光探针对于钙蛋白酶抑制剂带来的治疗效果的评价也有用。具体而言,对确定了钙蛋白酶活性上升的哺乳类对象(例如患者)实施利用钙蛋白酶抑制剂的治疗,还可以判定其治疗效果等,本发明的荧光探针的医疗上、产业上的利用价值、经济效果极大。

[0454] (实施例12) 使用兔NMDA损伤模型的化合物19的评价

[0455] 使用氯胺酮—赛拉嗪的混合液对黑色荷兰兔进行全身麻醉。在眼内施用N—甲基—D—天冬氨酸(NMDA)(12mM, 50 μ L)或PBS。9小时后用氯胺酮—赛拉嗪的混合液进行再次麻醉,在眼内施用化合物19(18.3 μ M, 19 μ l)、化合物16(20 μ M, 19 μ l)或化合物16(20 μ M, 38 μ l)。在各化合物的施用前和施用经过规定时间后,用Mirante(尼德克公司,共焦扫描型二极管激光检眼镜)拍摄眼底。

[0456] 将其结果表示于图17~22。由箭头所示的部位表示由HMRG染色的神经细胞的例子。如图17的a所示,在化合物19施用前没有确认到明显的信号。但是,如图17的b~图17的d所示,在施用了NMDA的兔中,在施用化合物19的30分钟后、45分钟后、60分钟后,大量神经细胞明显被HMRG染色。

[0457] 将PBS施用眼的结果表示于图18。如图18的a所示,化合物19施用前没有确认到明显的信号。另外,如图18的b~图18的d所示,在施用化合物19的30分钟后、45分钟后、60分钟后也基本没有确认到神经细胞由HMRG得到的染色。

[0458] 如图19的a和图20的a所示,在化合物16(19 μ l或38 μ l)施用前没有确认到明显的信号。但是,如图19的b~d、图20的b~d所示,在施用了NMDA的兔中,在施用化合物16(19 μ l或38 μ l)的30分钟后、45分钟后、60分钟后大量神经细胞明显被HMRG染色。

[0459] 另一方面,在施用了PBS的兔中,如图21的a、图22的a所示,在化合物16(19 μ l或38 μ

1) 施用前在任何一个组中都没有确认到信号,另外,如图21的b~d、图22的b~d所示,在30分钟后、45分钟后、60分钟后也基本没有确认到神经细胞由HMRG得到的染色。

[0460] 将计测图17~22所示的化合物19和化合物16 (19 μ l和38 μ l) 的眼底拍摄图像的视神经盘上方的一定区域 (819 \times 819pix) 的HMRG阳性神经细胞数的结果表示于图23。对于施用了NMDA的兔,化合物19的HMRG阳性细胞数比化合物16 (19 μ l) 显著上升,存在比化合物16 (38 μ l) 还高的倾向。对于施用了PBS的兔,HMRG阳性细胞数极少,化合物19和化合物16 (38 μ l) 的HMRG阳性细胞数比施用了NMDA的兔的HMRG细胞数显著减少。

[0461] 由于兔NMDA损伤模型被认为是视网膜疾病模型,所以可以认为本发明的荧光探针对视网膜疾病的诊断有用。作为中型动物的兔的眼球尺寸相比于作为小型动物的大鼠的眼球尺寸更类似于人的眼球尺寸,可以认为类似于人的施用条件。此外,化合物19以比化合物16低的用量可以得到良好的反应性,由此可以认为本发明的荧光探针特别是对于人的眼内给药有用。

[0462] 以上的结果实际证明了通过使用本发明的化合物,能够检测玻璃体内的钙蛋白酶活性,可以用作源自钙蛋白酶活性的青光眼的诊断药物。

[0463] (实施例13) 利用来自人iPS细胞的立体视网膜组织的钙蛋白酶探针的评价

[0464] 在已经报道的方法上加上轻微修正,从人iPS细胞 (201B7株,从CiRA购入) 人工地分化诱导三维立体视网膜组织,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内维持培养60天。对该来自iPS细胞的三维立体视网膜组织,将钙蛋白酶活化,诱导视网膜神经节细胞的损伤,制作谷氨酸损伤模型,评价利用化合物19的钙蛋白酶活性。首先为了鉴定谷氨酸障碍所引起的视网膜神经节细胞损伤,使用auto MACS pro (注册商标) 从来自iPS细胞的三维立体视网膜组织用CD90 Microbeads分离视网膜神经节细胞。对该细胞,添加谷氨酸 (最终浓度300 μ M), 反应1小时。在添加谷氨酸1小时后添加化合物19 (最终浓度5 μ M), 在其1小时后用荧光显微镜 (ZEISS Axio Vert.A1) 拍摄 (RGB和B/W模式) 其状态和荧光,结果确认到神经突起的减弱和荧光的增强,确认了钙蛋白酶活化诱导了视网膜神经节细胞损伤 (图24)。

[0465] 接着,为了确认在较接近于生物体的条件下的反应,将分化诱导第60天的来自iPS细胞三维立体视网膜组织在各加有1mL反应培养基 (在HBSS溶液中添加有CaCl₂ (最终浓度2.4mM)、HEPES (最终浓度20mM)) 的24孔板中静置 (n=5)。用1mL反应培养基清洗2次,以最终浓度成为0 μ M、300 μ M、1mM的方式添加谷氨酸,反应1小时。在添加谷氨酸1小时后以化合物19的最终浓度成为0 μ M、0.25 μ M、1.2 μ M、5.0 μ M的方式添加化合物19,在其1小时后用荧光显微镜 (ZEISS Axio Vert.A1) 拍摄其荧光 (RGB模式 (下段) 和B/W模式 (上段))。在全部拍摄中,曝光时间固定为200ms。将谷氨酸的最终浓度为0 μ M、300 μ M和1mM的结果分别表示于图25、图26和图27。在谷氨酸的最终浓度为300 μ M、1mM的组中,确认到荧光出现与化合物19的浓度成比例地增强。另外,算出在B/W模式下拍摄的荧光强度的平均值 (n=3),将图表化的结果表示于图28。根据该结果,确认到在谷氨酸浓度相同的条件下,荧光呈化合物19的浓度依赖性地增强,确认到荧光对应于谷氨酸的浓度而出现增强。另外,将进行化合物19和化合物16的荧光强度的比较研究的结果表示于图29。在谷氨酸的最终浓度1mM的条件下添加各化合物,结果,在最终浓度0.25 μ M、1.2 μ M、5.0 μ M下在化合物19确认到更多的荧光出现。

[0466] 由上可以认为化合物19对于评价来自人iPS细胞的钙蛋白酶活化造成的视网膜神经节细胞损伤是有用的。化合物19在来自人iPS细胞的视网膜神经节细胞和立体视网膜组

织确认到反应性,因此被期待对于人机体的视网膜的通过钙蛋白酶活化的视网膜神经节细胞的评价有用。

[0467] 如上所述,作为本发明的一个方式的荧光探针能够与公知或新型的钙蛋白酶抑制剂联用。例如能够以用荧光探针选择能够利用该钙蛋白酶抑制剂治疗或预防的哺乳类对象后,对该哺乳类对象施用钙蛋白酶抑制剂的方式联用,还例如能够以通过对施用了该钙蛋白酶抑制剂的哺乳类对象施用荧光探针,判别该钙蛋白酶抑制剂带来的治疗或预防效果的程度的方式联用。作为本发明的一个方式的荧光探针可以在钙蛋白酶抑制剂对哺乳类对象的施用前、施用后、施用前后或施用同时,对该哺乳类对象施用,能够评价其钙蛋白酶活性等(换言之,钙蛋白酶抑制剂的效果)。在以下的实施例组中,具体表示了荧光探针与钙蛋白酶抑制剂的联用带来的作用。

[0468] (实施例14)活细胞成像中与钙蛋白酶抑制剂的联用

[0469] 作为荧光探针使用化合物19,测试液以还包含10 μ M的浓度的公知的钙蛋白酶抑制剂SNJ-1945,除此以外,与实施例9同样进行活细胞成像,将其结果表示于图30。在图30中,(a)是使用含抑制剂的测试液的成像,(b)是使用不含抑制剂的测试液的成像。如图30所示,在使用含抑制剂的测试液的情况下(图30的(a)),与使用不含抑制剂的测试液的情况(图30的(b))相比,细胞内荧光强度减弱。这样,本发明的荧光探针能够在判别钙蛋白酶抑制剂对活细胞的药理作用时联用。

[0470] (实施例15)哺乳类对象中与钙蛋白酶抑制剂的联用1

[0471] 将羧甲基纤维素钠溶于蒸馏水中制备0.5% (w/v) CMC溶液。在0.5% (w/v) CMC溶液中将SNJ-1945以成为2.5% (w/v)的方式悬浊,制备含抑制剂的CMC溶液。对大鼠使用异氟烷进行全身麻醉,将NMDA (10mM, 2 μ L) 在眼内施用。在施用NMDA 2小时后,将含抑制剂的CMC溶液以SNJ-1945的施用量成为100mg/kg体重的的方式在大鼠进行腹腔内施用。在施用抑制剂4小时后(在施用NMDA 6小时后),对大鼠用异氟烷进行再次麻醉,在眼内施用化合物19 (15 μ M, 4 μ L)。在施用化合物19 20分钟~30分钟后,用F10拍摄眼底。此外,对照组 (N=8) 中,除了施用0.5% (w/v) CMC溶液代替含抑制剂的CMC溶液以外,与SNJ-1945给药组 (N=8) 进行同样的操作。

[0472] 将结果表示于图31。如图31所示,相比于SNJ-1945给药组,在对照组中,更多神经细胞被染色。将计测图31所示的大鼠的眼底拍摄图像的HMRG阳性神经细胞数的结果表示于图32。如图32所示,相比于对照组,在SNJ-1945给药组中,HMRG阳性神经细胞数显著减少。

[0473] (实施例16)哺乳类对象中与钙蛋白酶抑制剂的联用2

[0474] 将羧甲基纤维素钠溶于蒸馏水,制备0.5% (w/v) CMC溶液。在0.5% (w/v) CMC溶液中将SNJ-1945以成为2.5% (w/v)的方式悬浊,制备含抑制剂的CMC溶液。对大鼠使用异氟烷进行全身麻醉,在眼内施用NMDA (10mM, 2 μ L)。在施用NMDA 2小时后,将含抑制剂的CMC溶液以SNJ-1945的施用量为100mg/kg体重的的方式对大鼠进行口服施用。在施用抑制剂4小时后(在施用NMDA 6小时后)对大鼠用异氟烷再次进行麻醉,在眼内施用化合物19 (15 μ M, 4 μ L)。在施用化合物19 20分钟~30分钟后,用F10拍摄眼底。此外,对照组 (N=7) 中,除了施用0.5% (w/v) CMC溶液代替含抑制剂的CMC溶液以外,与SNJ-1945给药组 (N=8) 进行同样的操作。

[0475] 将计测眼底拍摄图像的HMRG阳性神经细胞数的结果表示于图33。如图33所示,与对照组相比,在SNJ-1945给药组中,HMRG阳性神经细胞数显著减少。

[0476] (实施例17) 哺乳类对象中与钙蛋白酶抑制剂的联用3

[0477] 将羧甲基纤维素钠溶于蒸馏水, 制备0.5% (w/v) CMC溶液。在0.5% (w/v) CMC溶液中将SNJ-1945以成为2.5% (w/v) 的方式悬浊, 制备含抑制剂的CMC溶液。将含抑制剂的CMC溶液以SNJ-1945的施用量成为100mg/kg体重的方式对大鼠进行腹腔内施用。在腹腔内施用2小时后, 对大鼠使用异氟烷进行全身麻醉, 在眼内施用NMDA (10mM, 2 μ L)。在施用NMDA6小时后, 对大鼠用异氟烷再次进行麻醉, 在眼内施用化合物19 (15 μ M, 4 μ L)。在施用化合物19 20分钟~30分钟后, 用F10拍摄眼底。此外, 对照组 (N=7) 中, 除了施用0.5% (w/v) CMC溶液代替含抑制剂的CMC溶液以外, 与SNJ-1945给药组 (N=8) 进行同样的操作。

[0478] 将计测眼底拍摄图像的HMRG阳性神经细胞数的结果表示于图34。如图34所示, 与对照组相比, 在SNJ-1945给药组中, HMRG阳性神经细胞数显著减少。

[0479] 如实施例15~17所示, 本发明的荧光探针为了判别哺乳类对象中的钙蛋白酶抑制剂的治疗或预防效果的程度能够与钙蛋白酶抑制剂联用。具体而言, 实施例15和16相当于如下方式: 对钙蛋白酶活化的 (作为结果, 对钙蛋白酶活性剂能够具有感受性的) 哺乳类对象施用钙蛋白酶抑制剂, 使用本发明的荧光探针评价其效果的程度。另外, 实施例17相当于如下方式: 使用本发明的荧光探针评价在预防性地施用了钙蛋白酶抑制剂的哺乳类对象中引发了钙蛋白酶的活化时的钙蛋白酶抑制剂的效果的程度。

[0480] (实施例18) 哺乳类对象中与钙蛋白酶抑制剂的联用4

[0481] 比较了作为钙蛋白酶抑制剂, 联用共价结合的抑制剂SNJ-1945 (CAS 854402-59-8)、C2I (CAS 677275-28-4)、或MDL 28,170 (CAS 88191-84-8) 或者非共价结合的抑制剂PD-151746 (CAS 179461-52-0) 时的神经细胞的成像。具体而言, 使用在0.5% (w/v) CMC溶液中将各钙蛋白酶抑制剂以成为2.5% (w/v) 的方式悬浊而制备的含抑制剂的CMC溶液, 除此以外, 与实施例16同样操作, 进行大鼠的神经细胞的成像。

[0482] 计测眼底拍摄图像的HMRG阳性神经细胞数, 进行SNJ-1945给药组与另一个钙蛋白酶抑制剂给药组的2组之间的比较, 将其结果表示于图35。如图35所示, 与其它钙蛋白酶抑制剂给药组相比, 在SNJ-1945给药组中, HMRG阳性神经细胞数显著减少。该结果表示本发明的荧光探针能够检测各种钙蛋白酶抑制剂的抑制能力, 另外, 表明本发明的荧光探针能够更高精度地检测出钙蛋白酶抑制剂中、特别是SNJ-1945的钙蛋白酶抑制能力。

[0483] (实施例19) 体外RGC轴突模型中的钙蛋白酶活性的检测

[0484] 对人iPS细胞 (201B7株, 从CiRA购入), 参照已经报道的方法 (STEM CELLS TRANSL MED (2017) 6:1972-1986), 进行在视网膜神经节细胞中大量表达的BRN3B的启动子下游插入tdTomato荧光蛋白的序列的基因组编辑。然后, 在已经报道的方法 (METHODS CELL BIOL (2020) 159:279-302) 上加上轻微修正, 从iPS细胞分化诱导视网膜类器官, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95%空气的条件下, 在41天的悬浮培养后进行7天的贴壁培养, 由此诱导源自视网膜神经节细胞的轴突延伸。然后, 用通过将钙离子载体A23187以50nM孵育而使细胞内钙浓度上升的评价体系, 同时添加1 μ M化合物19, 用共聚焦显微镜LSM710对生成了HMRG的细胞进行经时荧光拍摄。进而, 为了证明HMRG的生成起因于钙蛋白酶活化, 在对添加A23187的1小时前将SNJ-1945以100 μ M进行了孵育的视网膜类器官中, 也进行了从化合物19生成HMRG的确认。将结果表示于图36的 (a)。此外, 在图36中, (b) 是仅进行化合物19的添加、SNJ-1945和A23187均没有添加的轴突的拍摄图像, (c) 是进行化合物19和A23187的添加、而没有添加

SNJ-1945的轴突的拍摄图像。另外,图36的(a)~(c)的上列左端的图像是为了在这些轴突中检测tdTomato的荧光的荧光拍摄图像,在任一图像中都确认到了在视网膜神经节细胞的轴突表达的tdTomato。

[0485] 从图36的(a)~(c)可知,钙蛋白酶活性由于钙离子载体而增大(作为结果,荧光探针反应增大),以及该钙蛋白酶活性的增大由于钙蛋白酶抑制剂而消失。与青光眼的发病或进展相关,成为高眼压的情况下发生缺血,钙向神经细胞内流入。另外,可以考虑包含谷氨酸受体在内的各种钙流入机理,由于这些钙流入会产生钙蛋白酶活性的增大。实施例19确认了由于钙离子载体刺激引起非选择性钙流入模型中在RGC轴突的荧光探针的反应性,可知本发明的实施方式的荧光探针对于在轴突的钙蛋白酶活性的检测也是有效的。

[0486] (实施例20)组织蛋白酶B所引起的荧光强度的经时变化

[0487] 对化合物19进行经时荧光测试。具体而言,在包含 $10\mu\text{M}$ 合成的荧光探针的 50mM TRIS缓冲液($\text{pH}7.4$, 2mM EGTA, 2mM DTE)中加入 880ng/mL 的重组人组织蛋白酶B(953-CY; R&D Systems, MN, USA),在 37°C 实施酶反应。作为阴性对照,除了不添加组织蛋白酶B以外,与上述进行同样的操作。将测定组织蛋白酶B所引起的荧光强度的经时变化的结果表示于图37(激发波长 475nm , 荧光波长 $500-550\text{nm}$)。

[0488] 如图37所示,化合物19作为对组织蛋白酶B的荧光探针发挥功能。

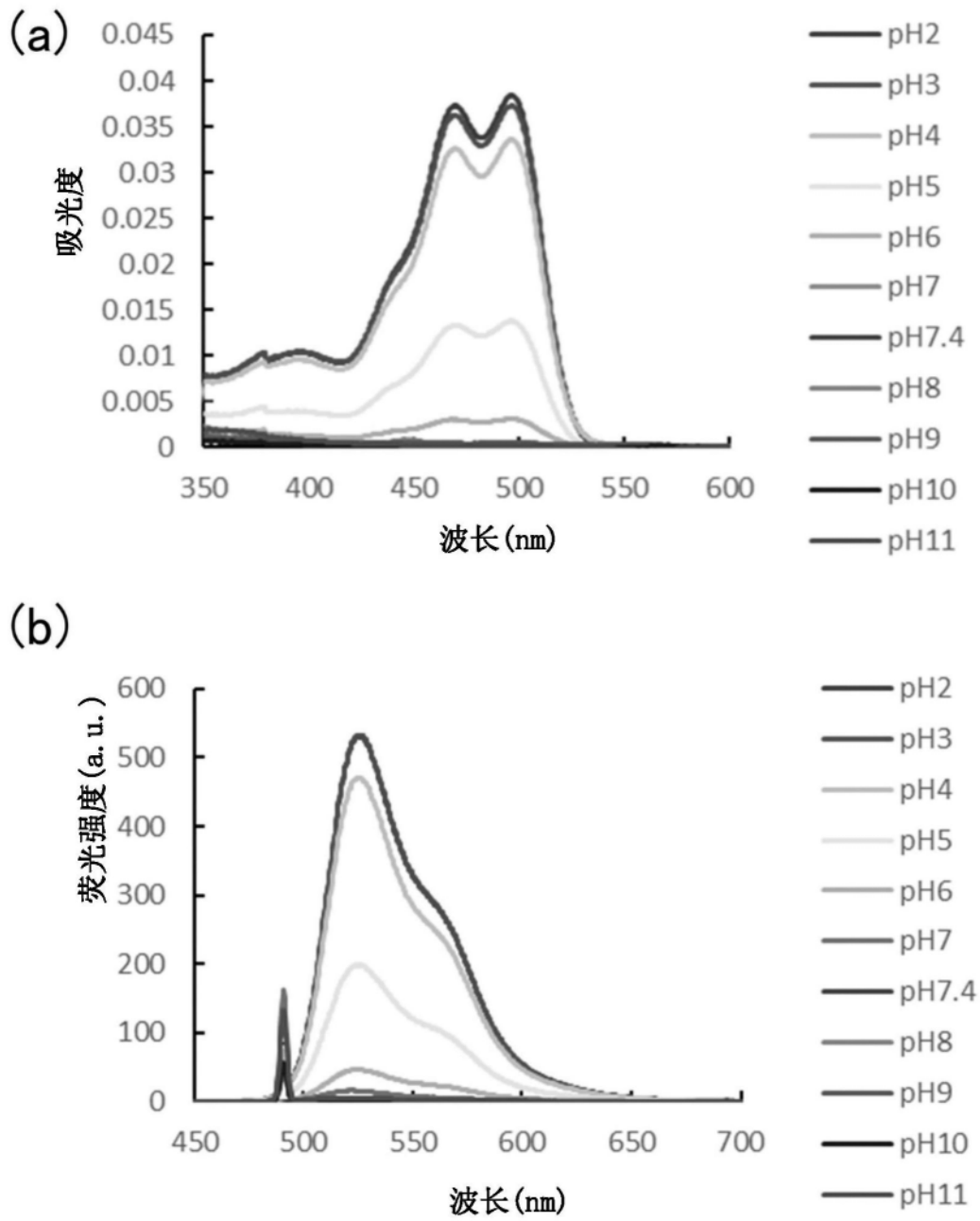


图1

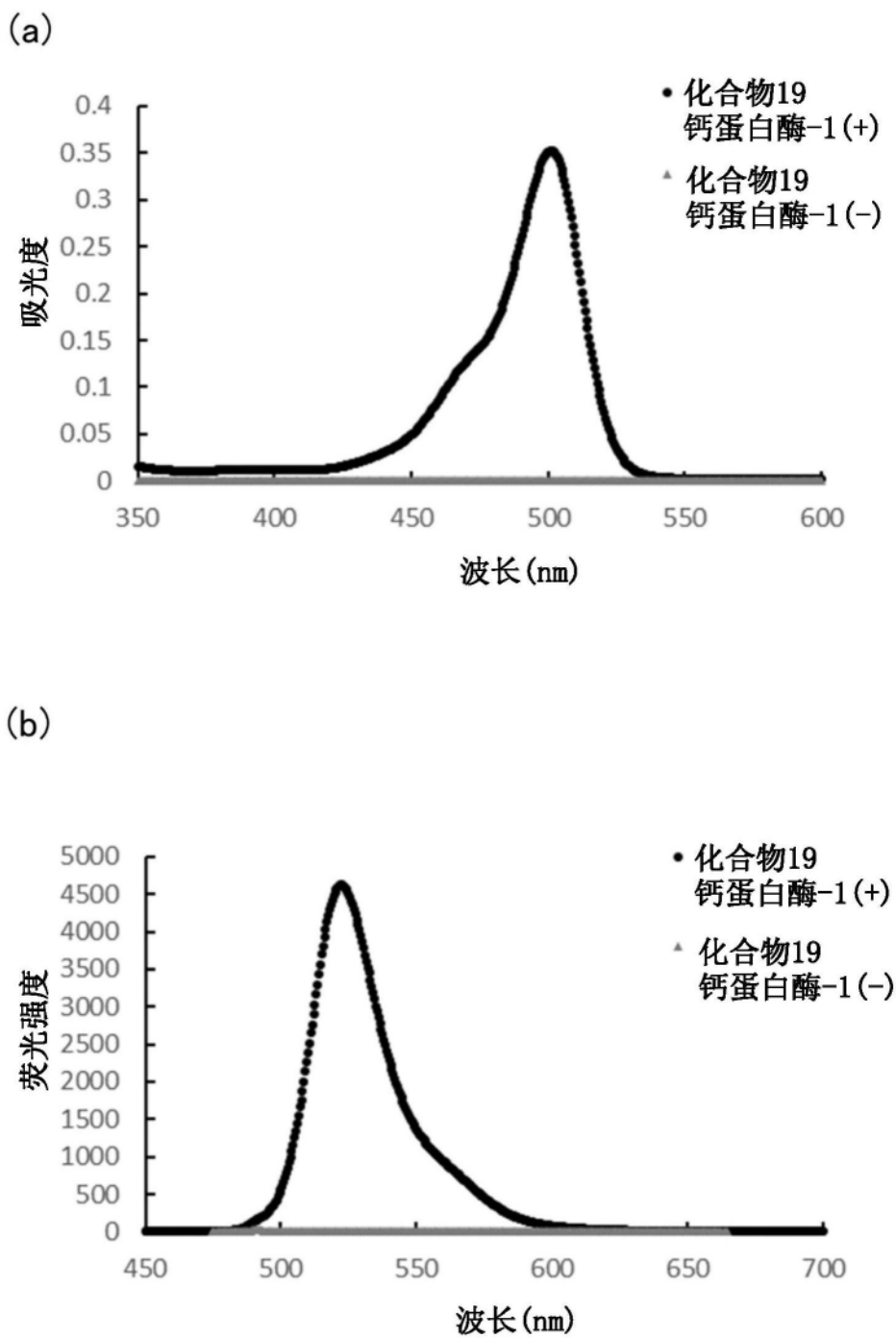


图2

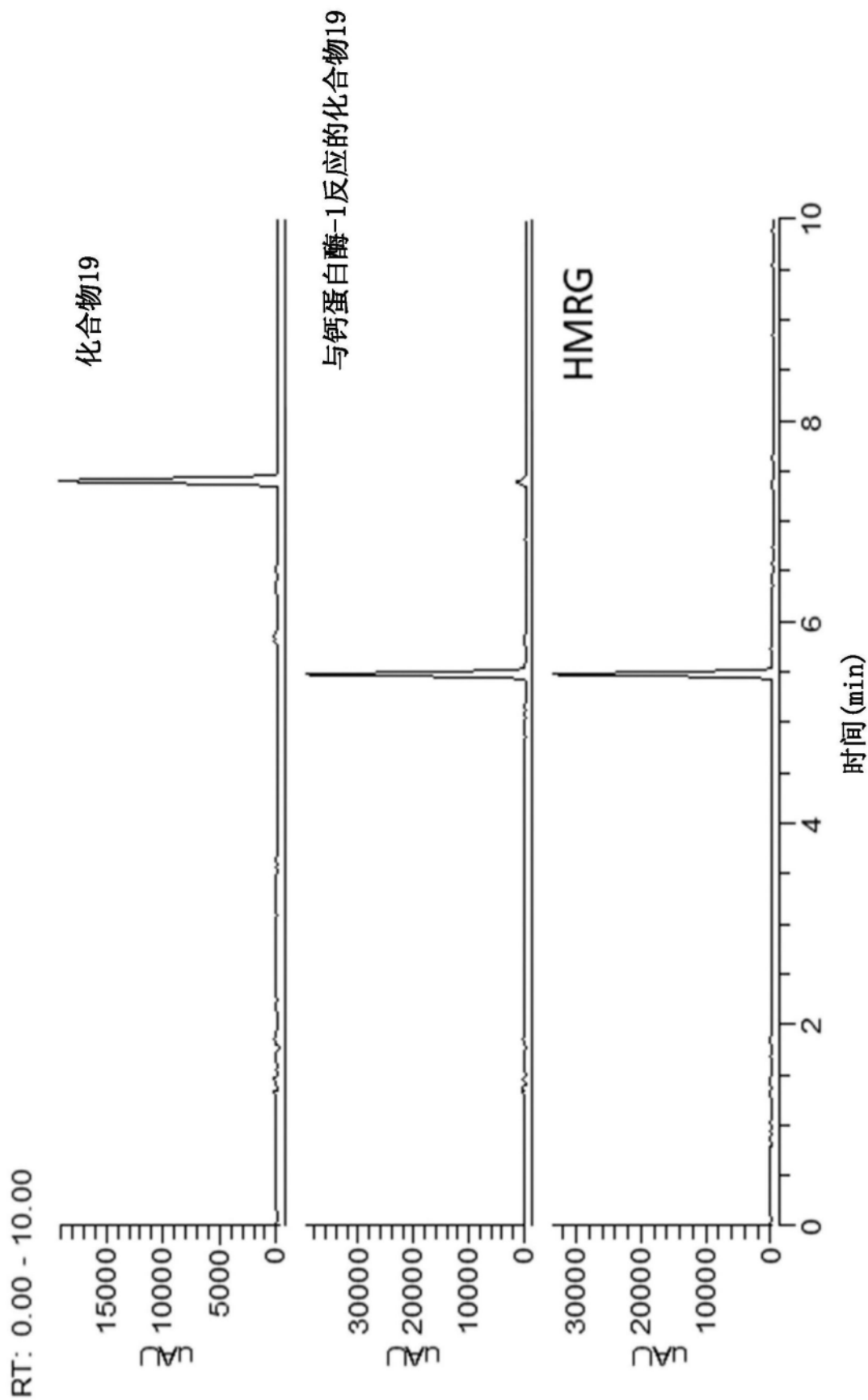


图3

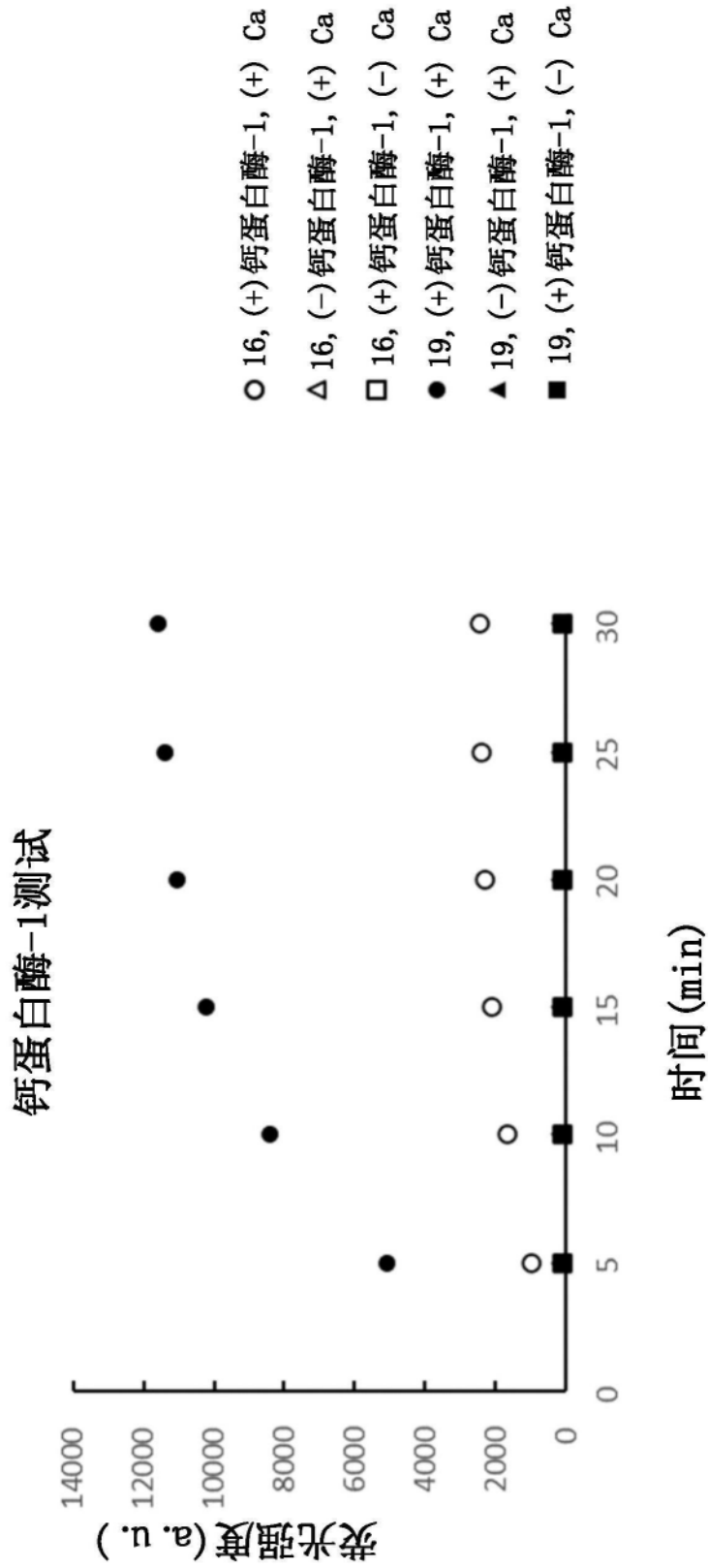


图4

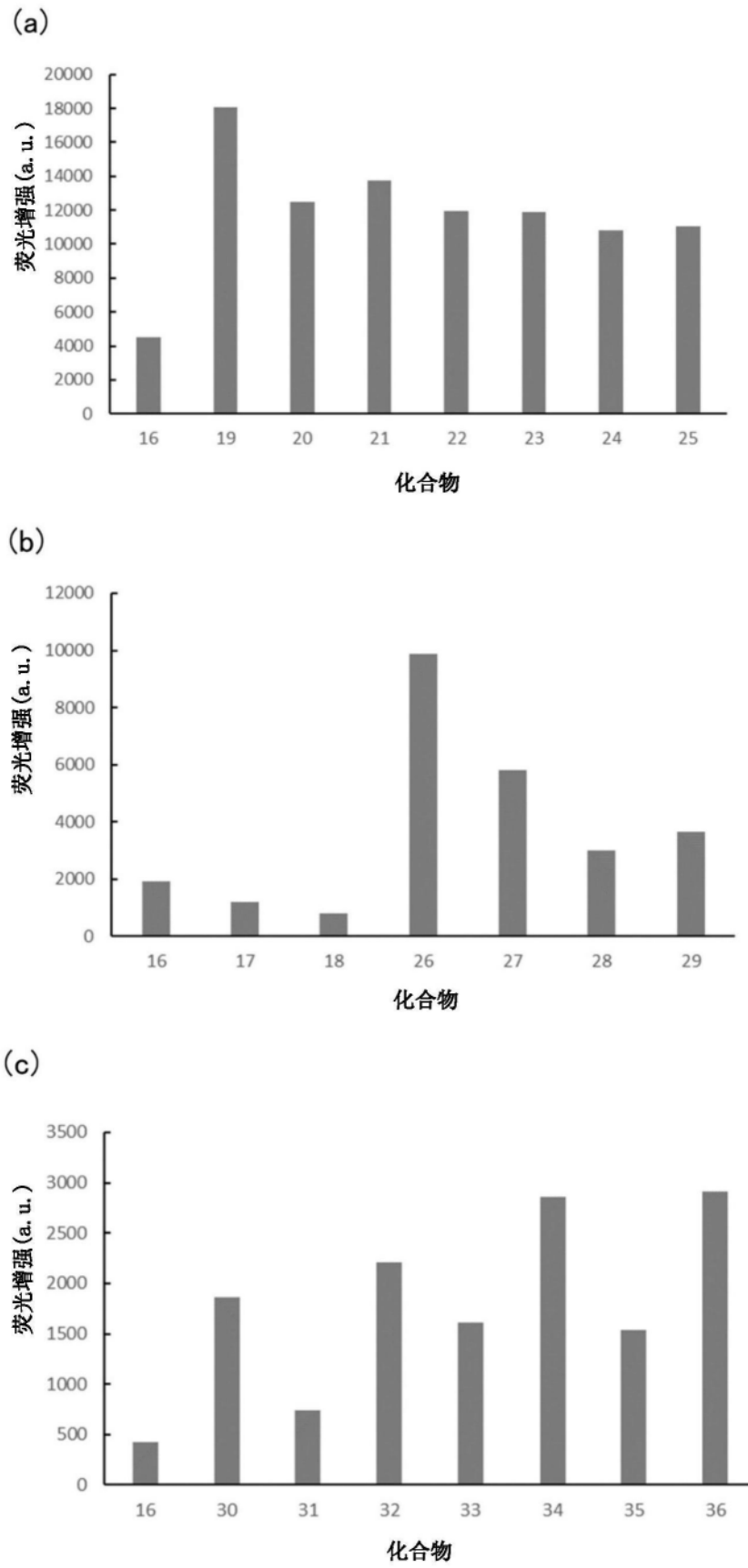


图5

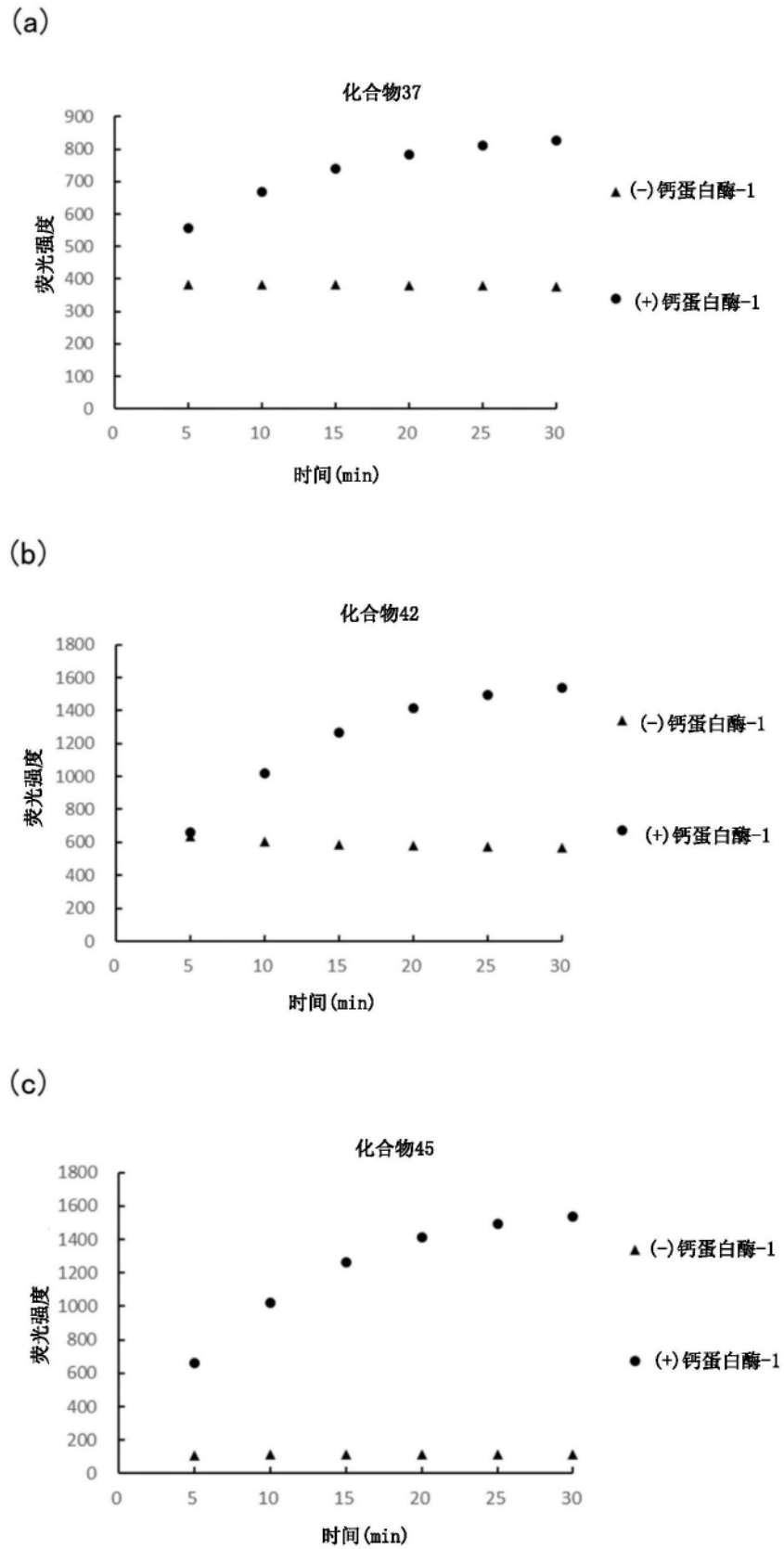
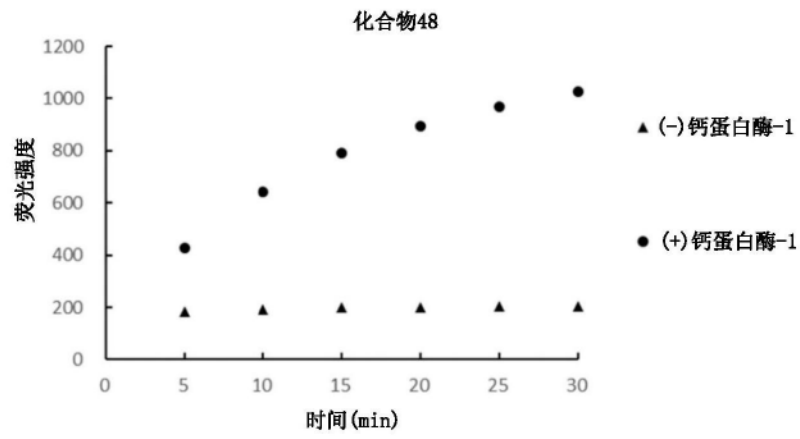
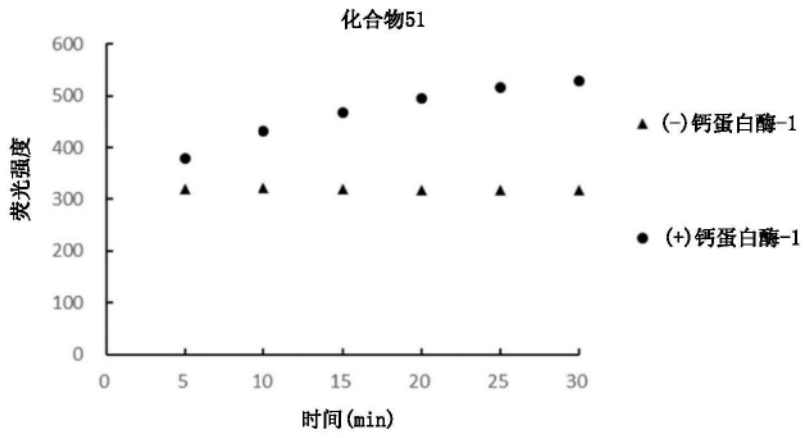


图6

(a)



(b)



(c)

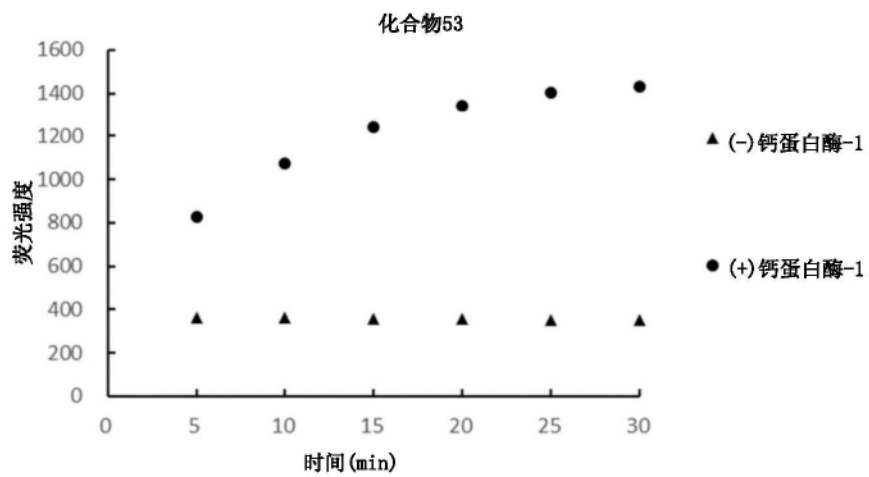


图7

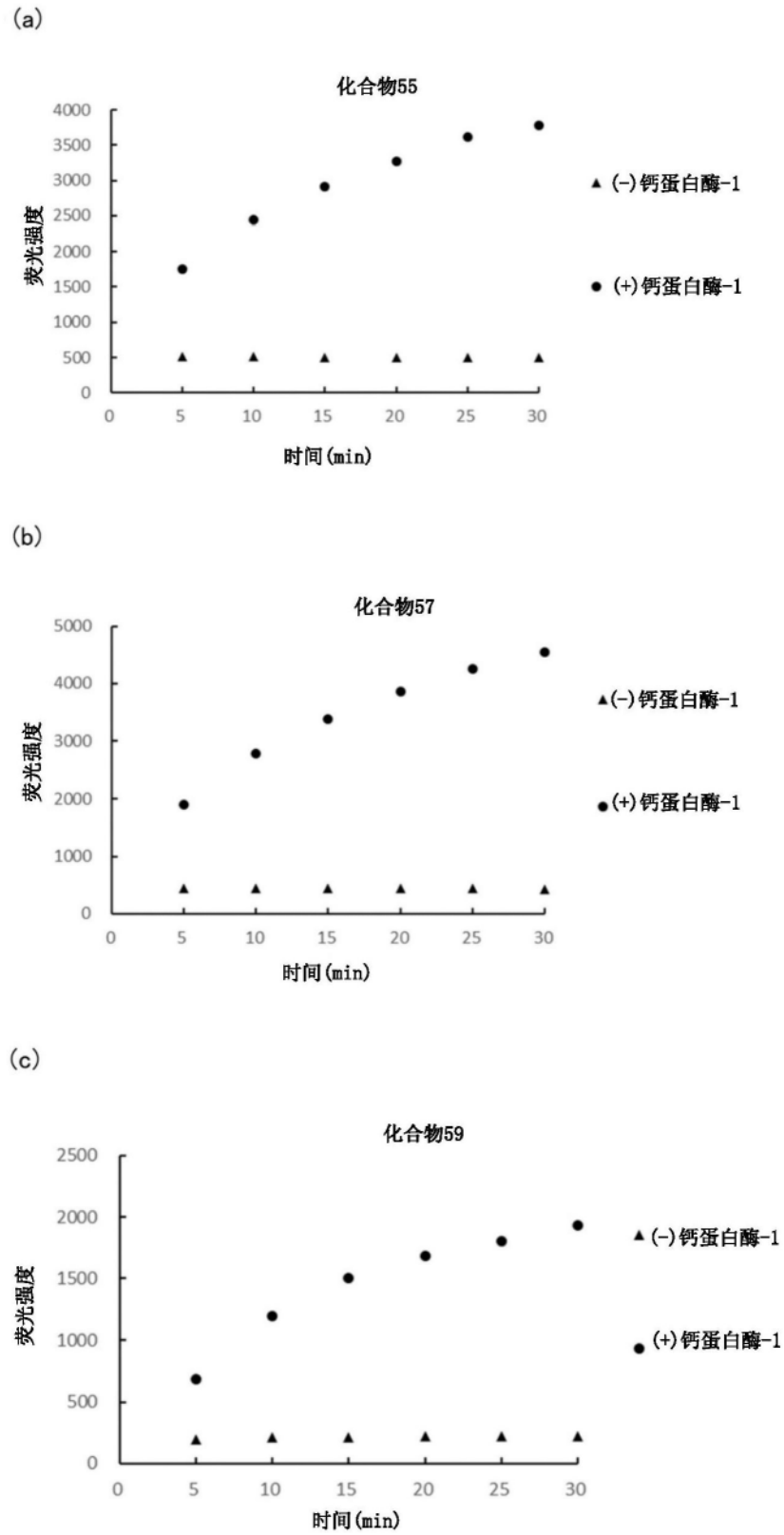


图8

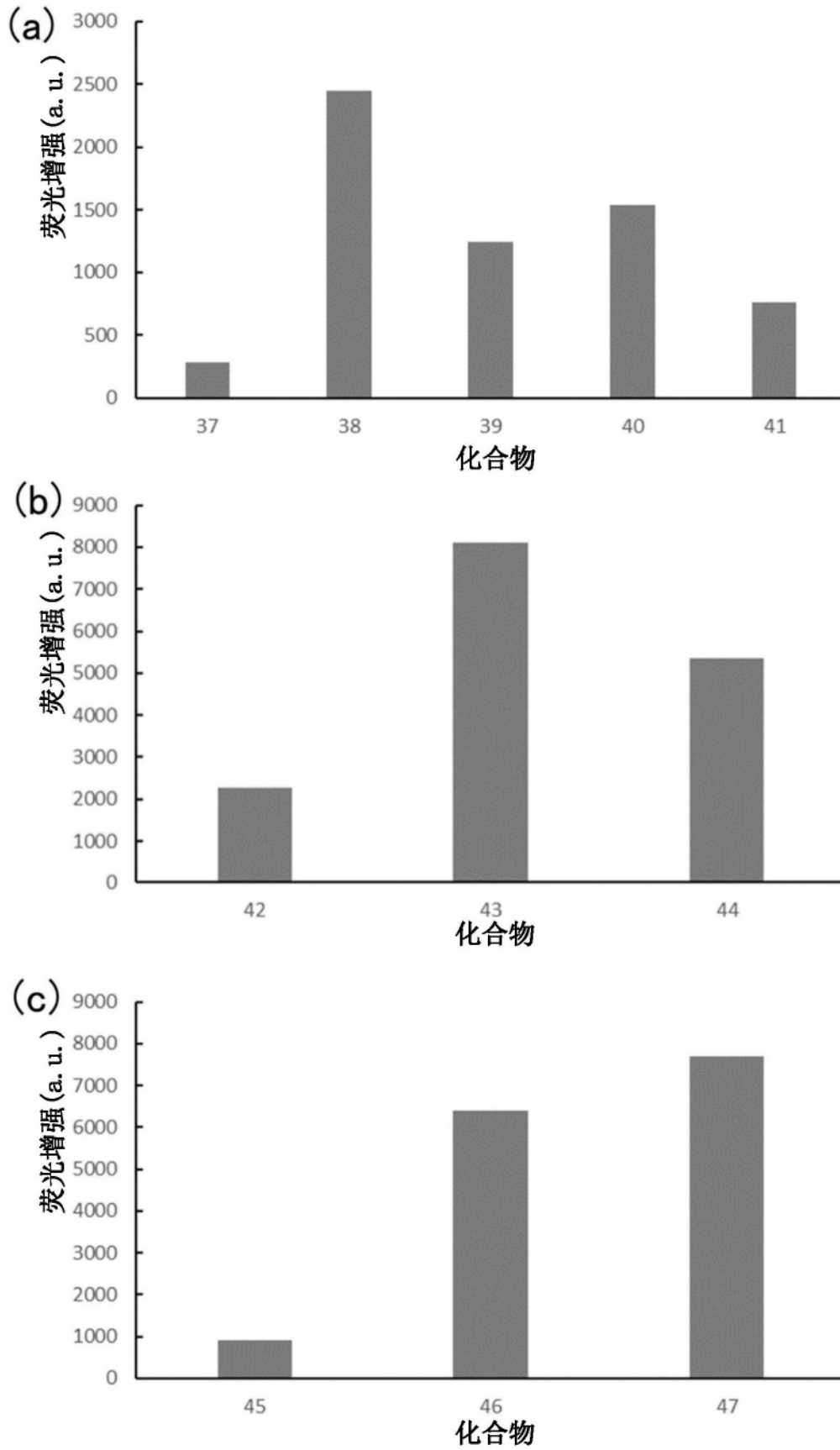


图9

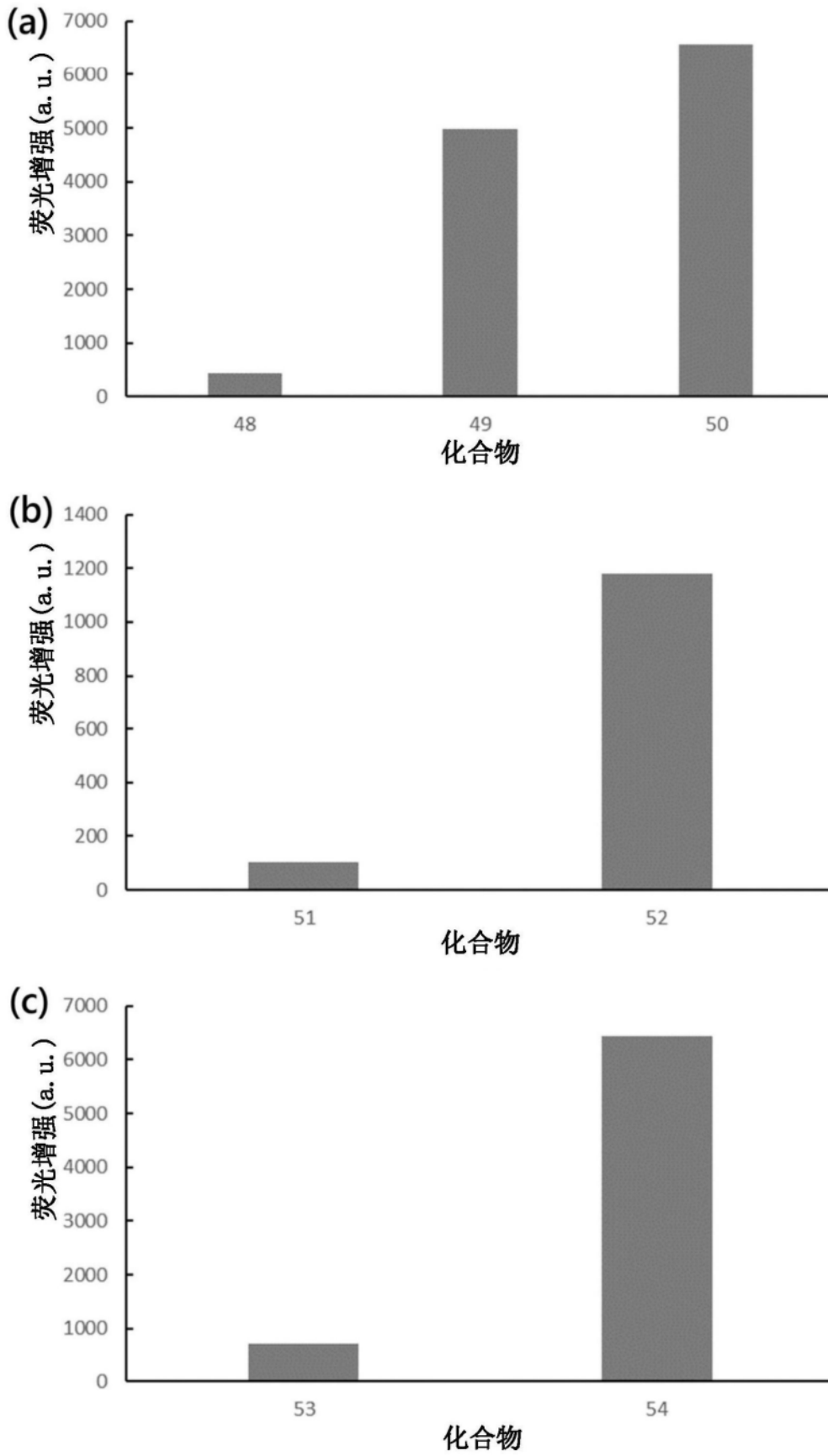


图10

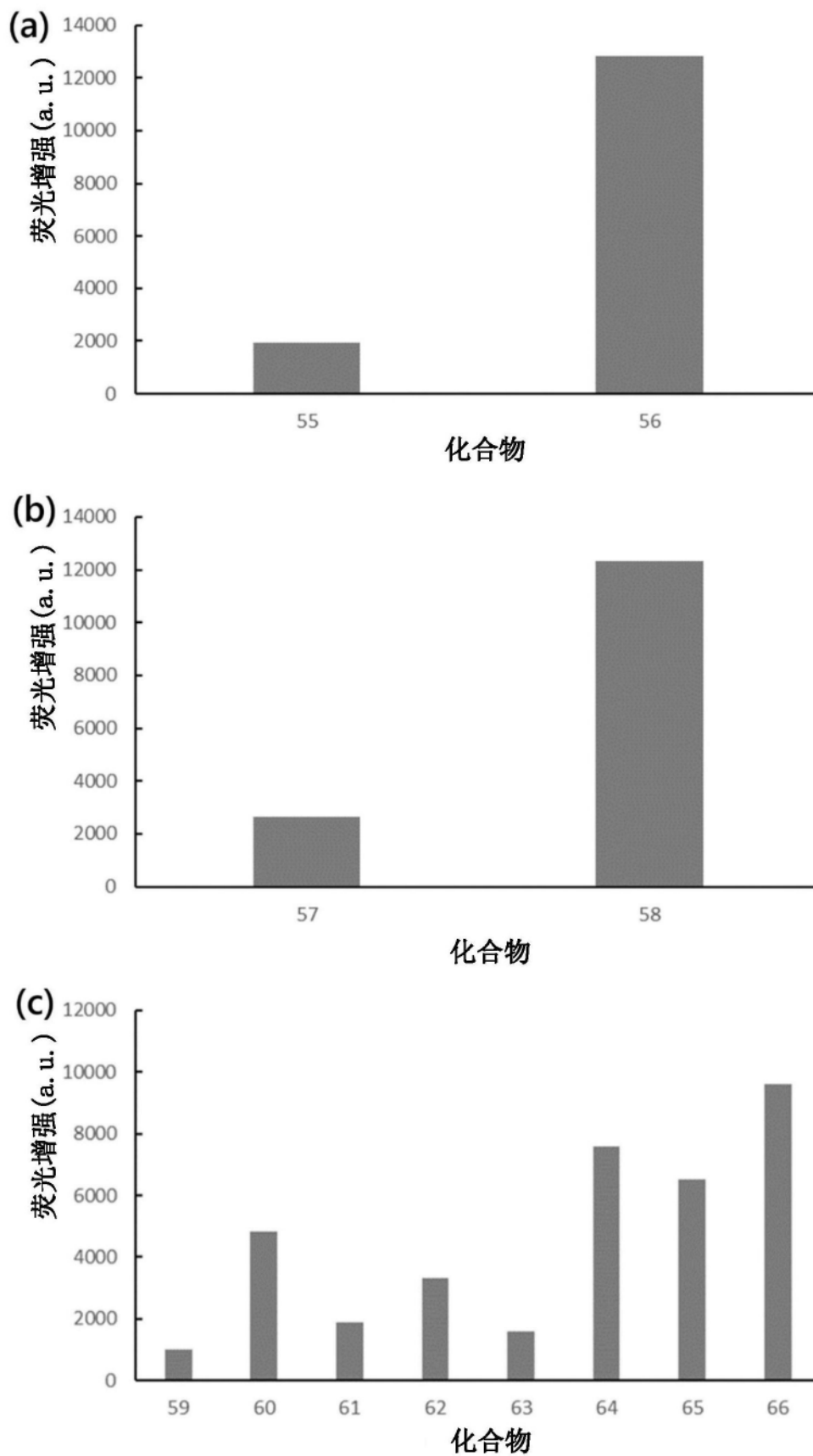
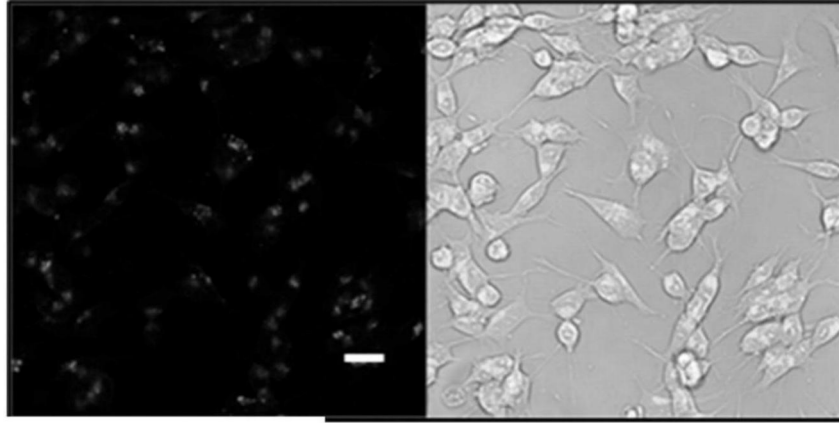


图11

(a) 化合物 16



(b) 化合物 19

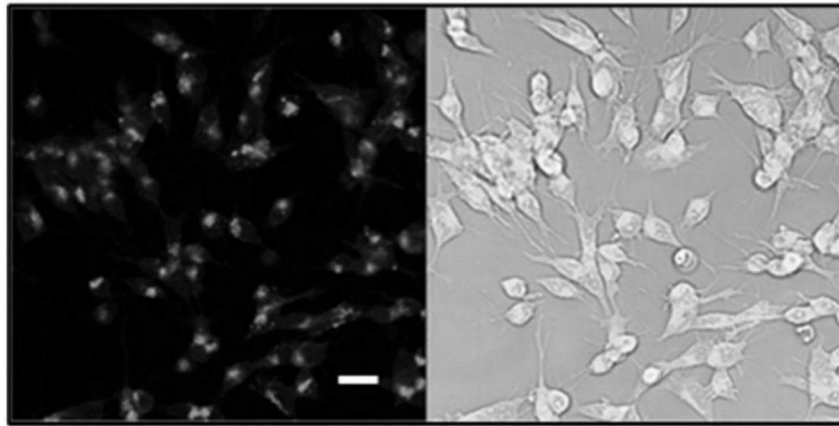
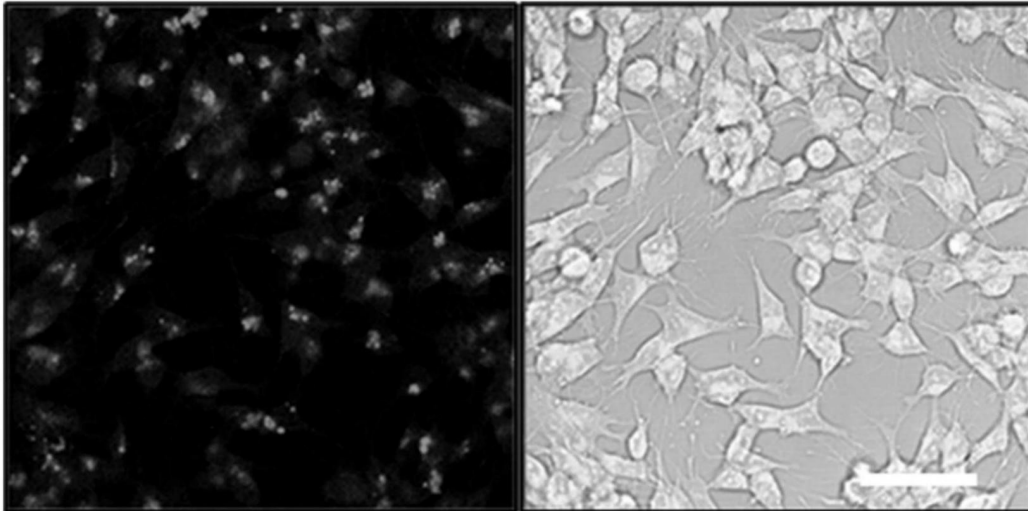
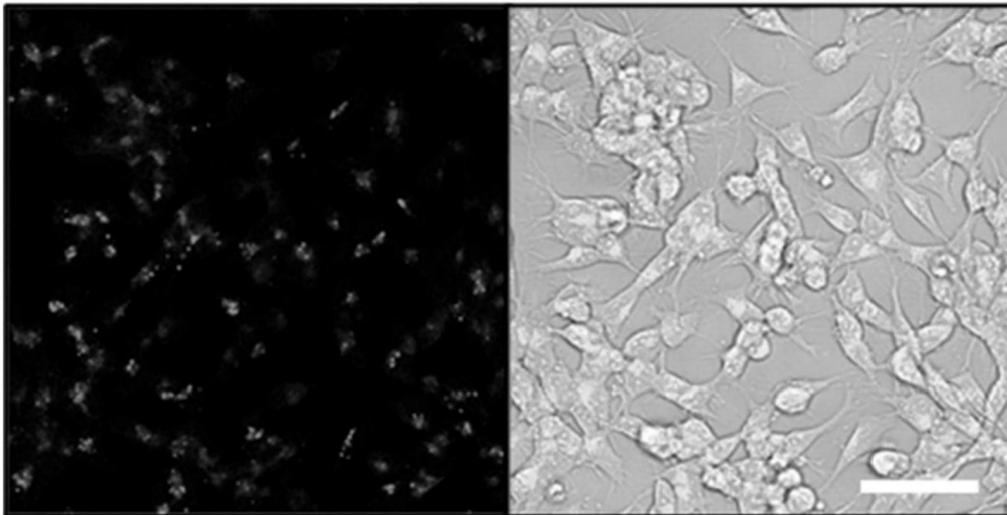


图12

(a) 化合物20



(b) 化合物21



(c) 化合物22

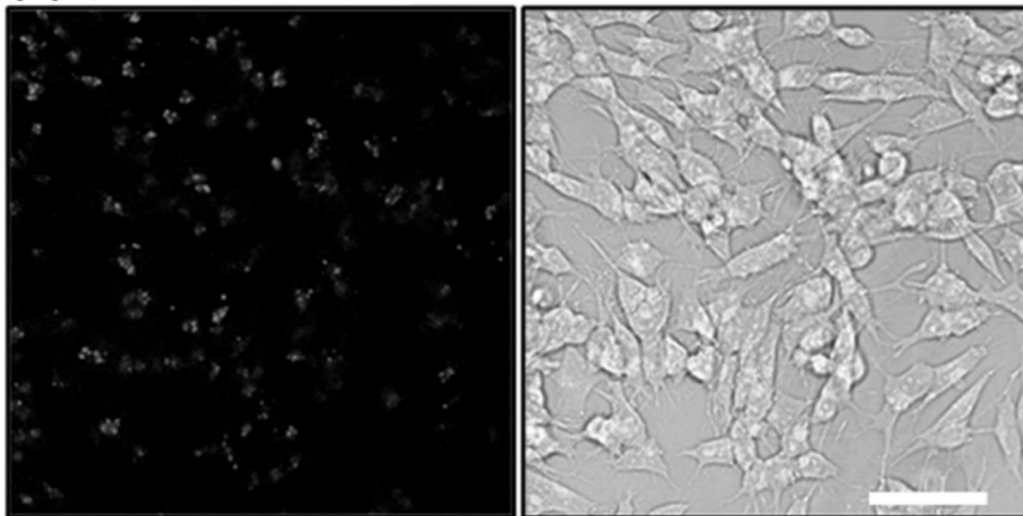
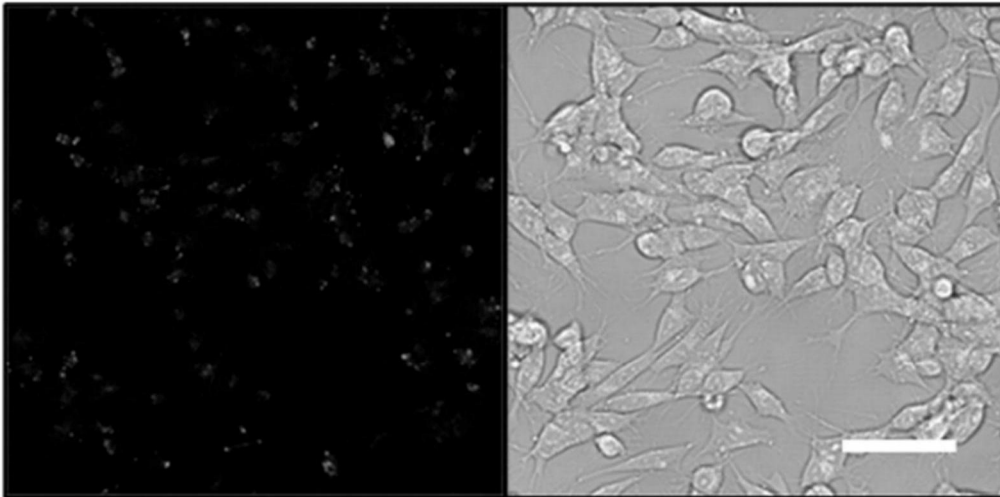
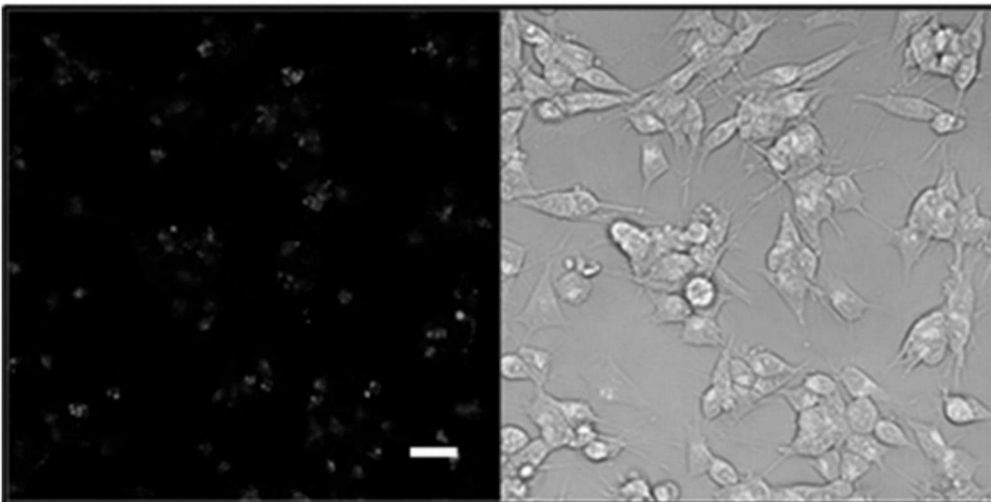


图13

(a) 化合物 23



(b) 化合物 38



(c) 化合物 56

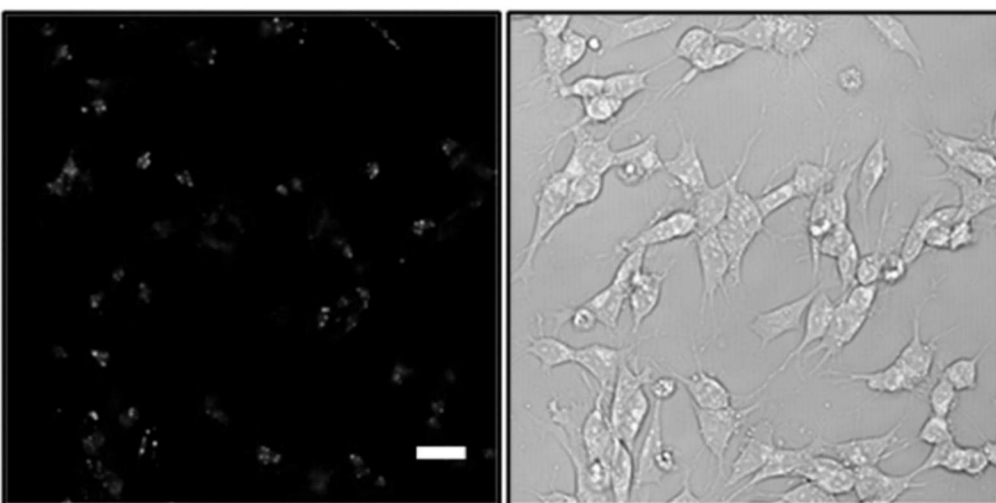


图14

大鼠NMDA损伤模型 化合物19

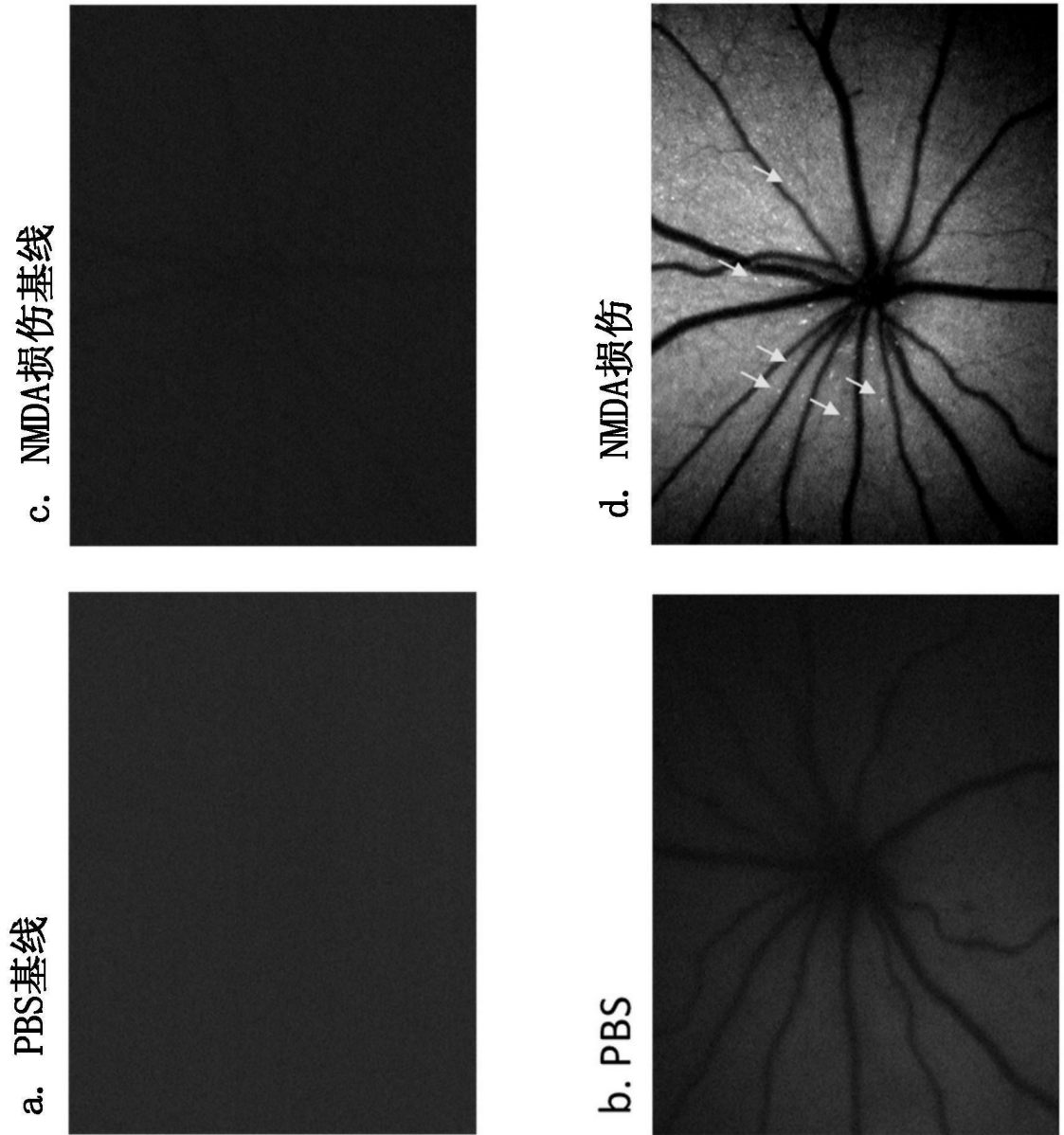
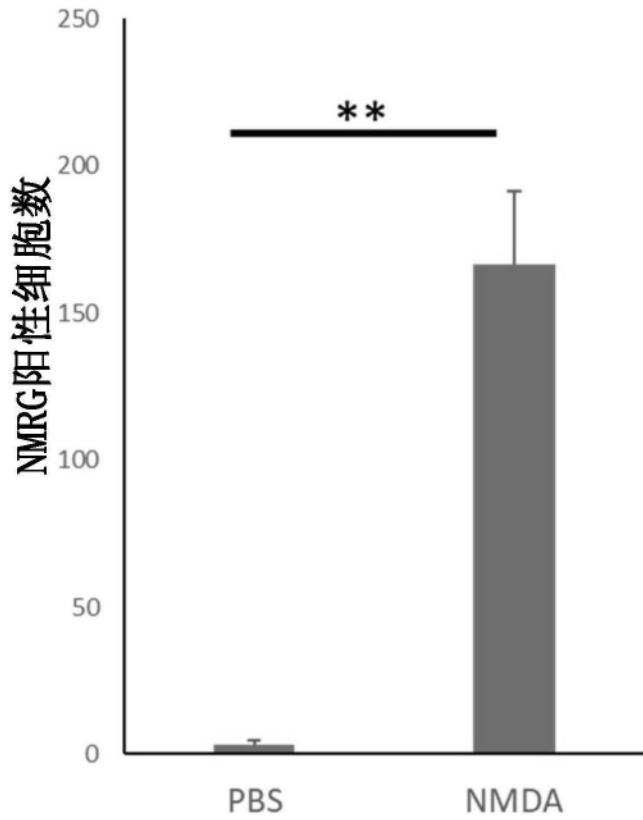


图15



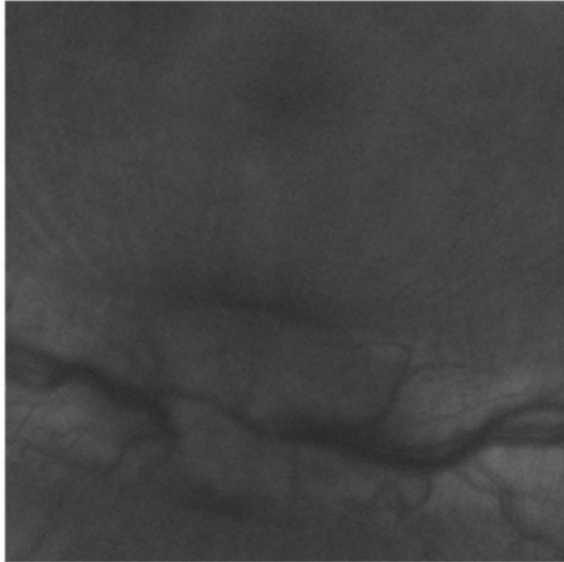
N = 6 (各组)

** P < 0.001 (Student t test)

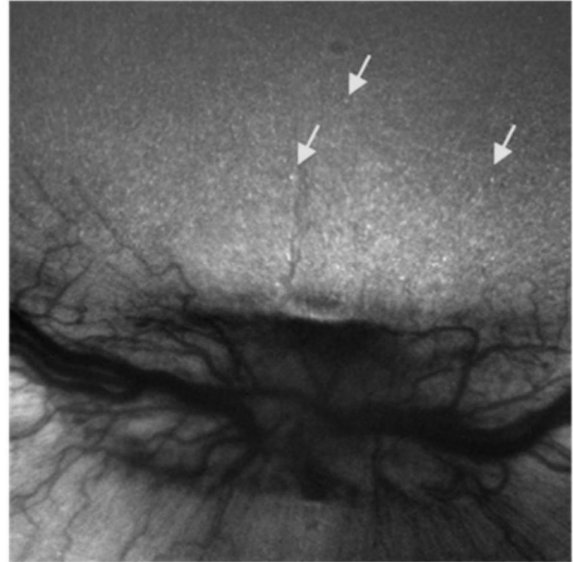
图16

兔NMDA化合物19 (19 μ l)

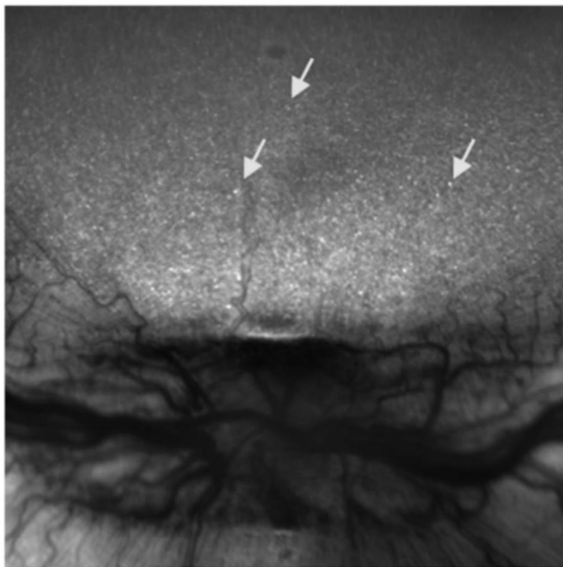
a. NMDA损伤基线



b. NMDA损伤30分钟后



c. NMDA损伤45分钟后



d. NMDA损伤60分钟后

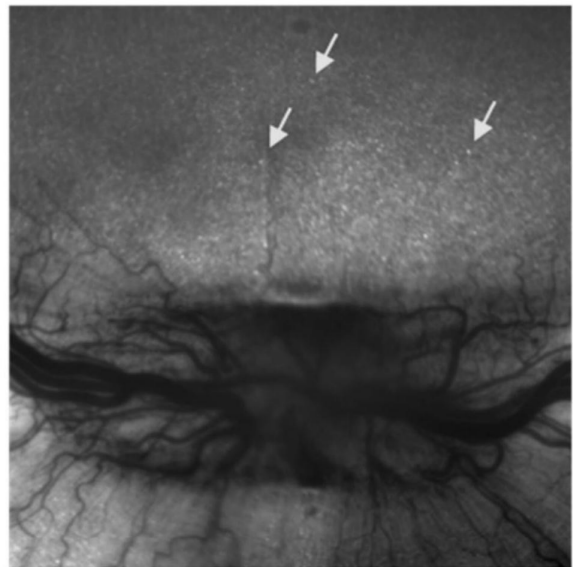
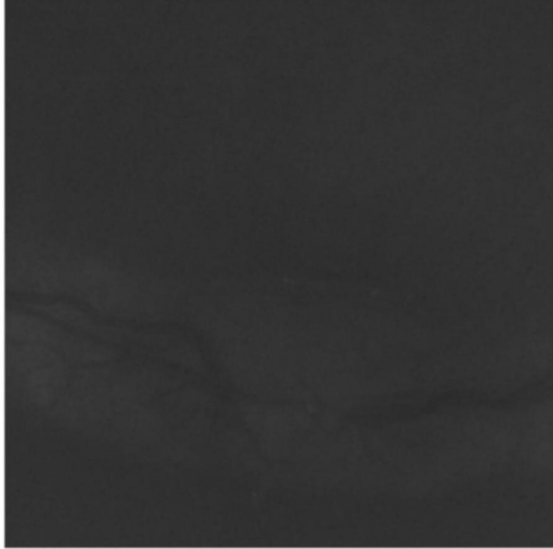


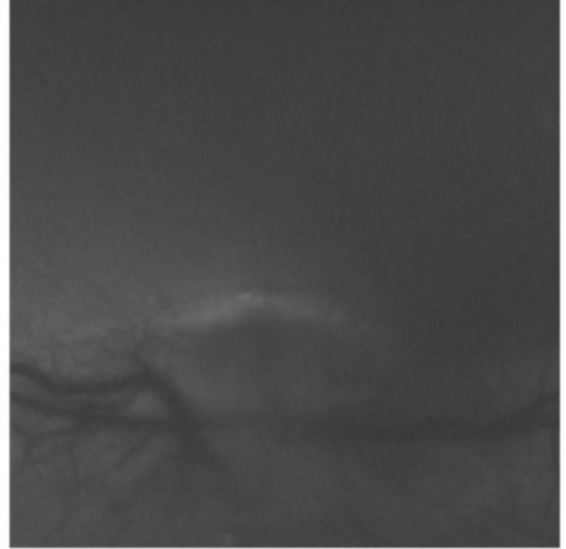
图17

兔PBS化合物19 (19 μ l)

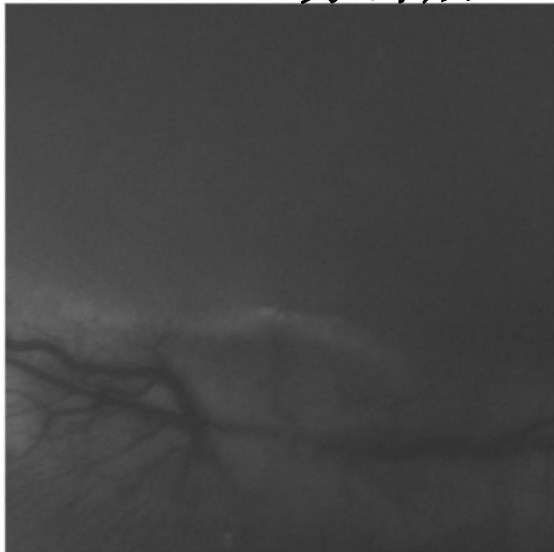
a. PBS基线



b. PBS 30分钟后



c. PBS 45分钟后



d. PBS 60分钟后

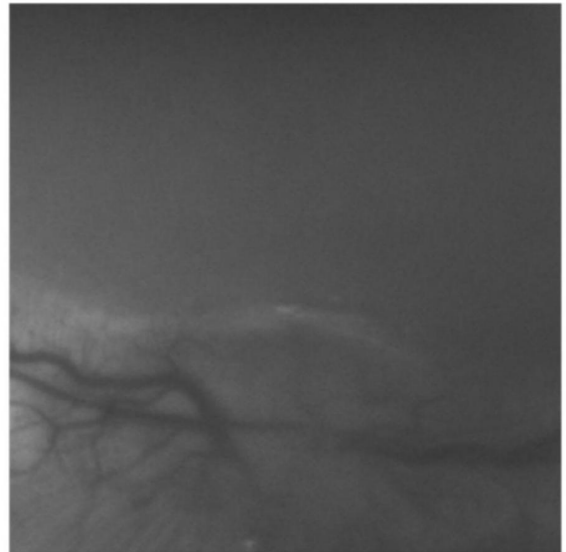
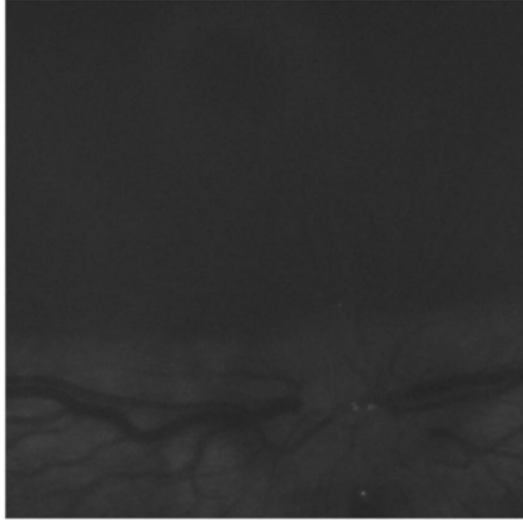


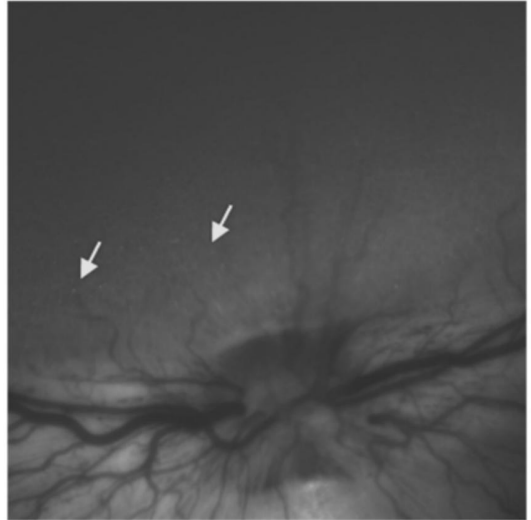
图18

兔NMDA化合物16 (19 μ l)

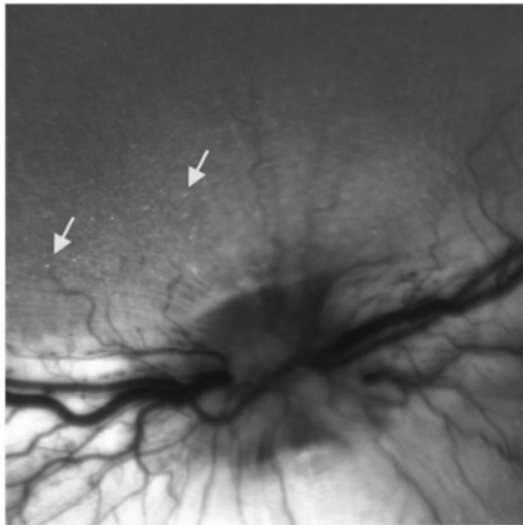
a. NMDA损伤基线



b. NMDA损伤30分钟后



c. NMDA损伤45分钟后



d. NMDA损伤60分钟后

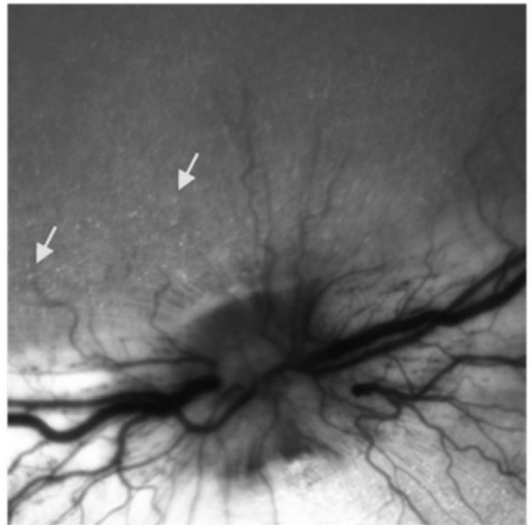
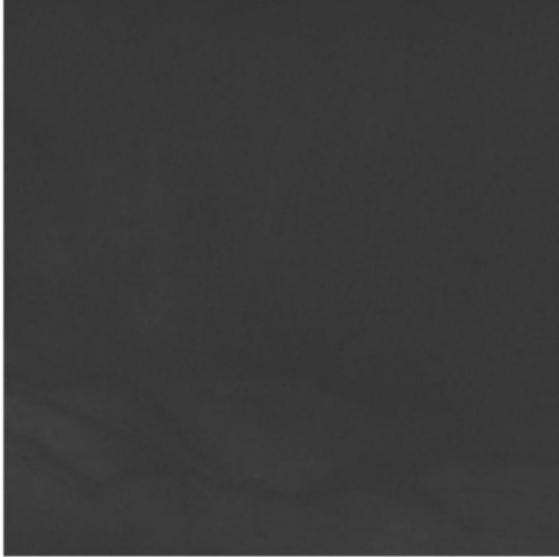


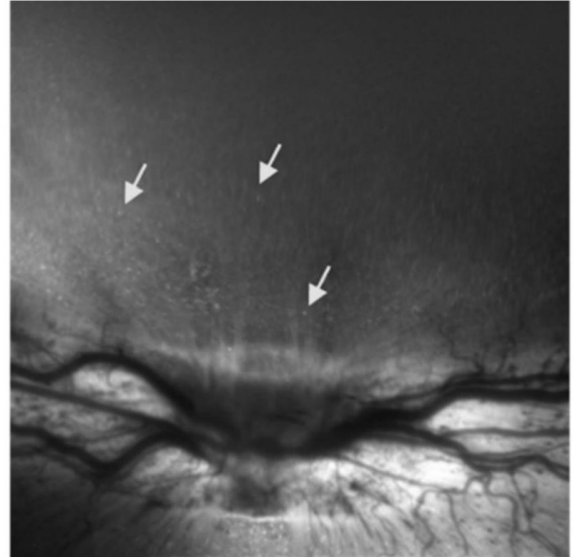
图19

兔NMDA化合物16 (38 μ l)

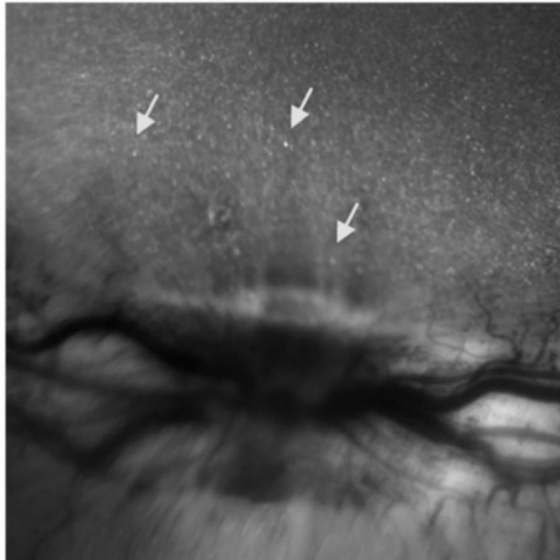
a. NMDA损伤基线



b. NMDA损伤30分钟后



c. NMDA损伤45分钟后



d. NMDA损伤60分钟后

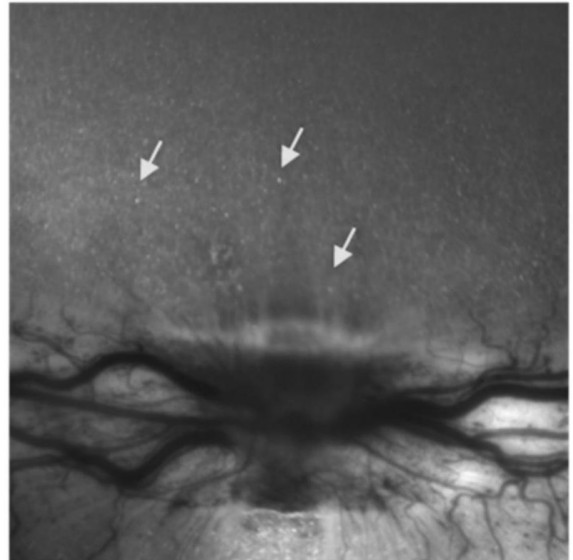


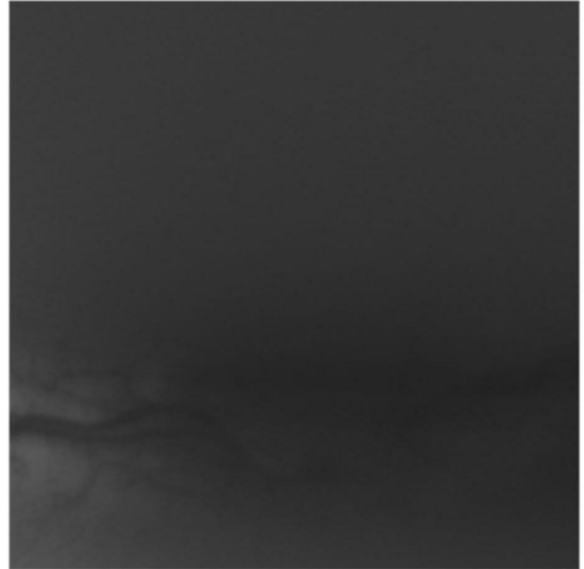
图20

兔PBS化合物16 (19 μ l)

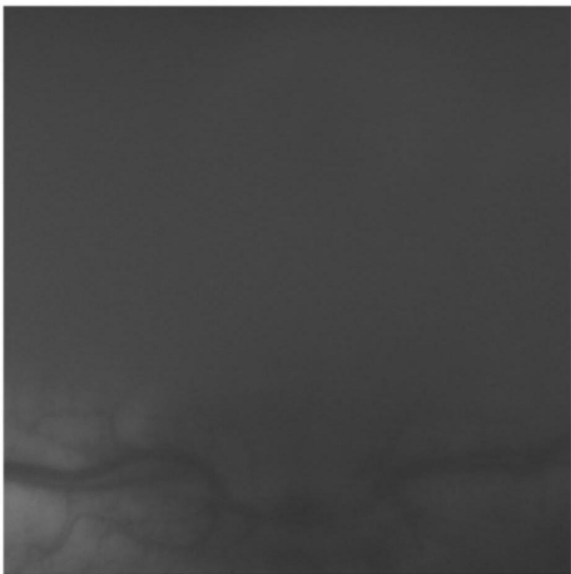
a. PBS基线



b. PBS 30分钟后



c. PBS 45分钟后



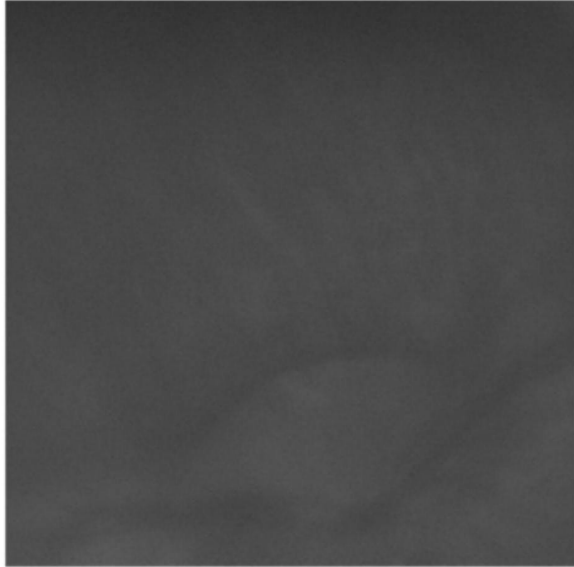
d. PBS 60分钟后



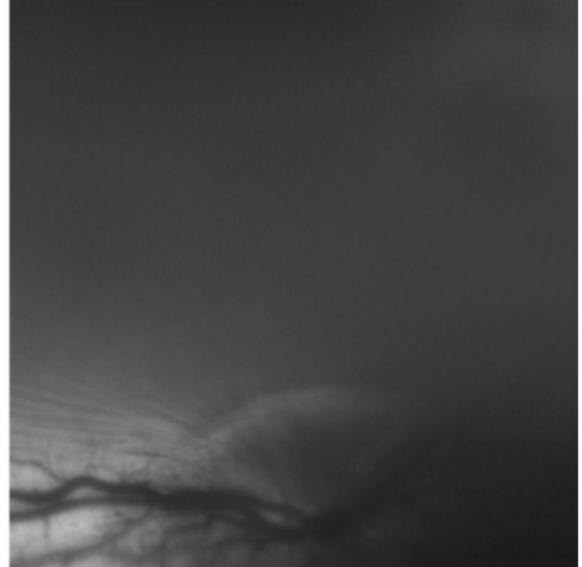
图21

兔PBS化合物16 (38 μ l)

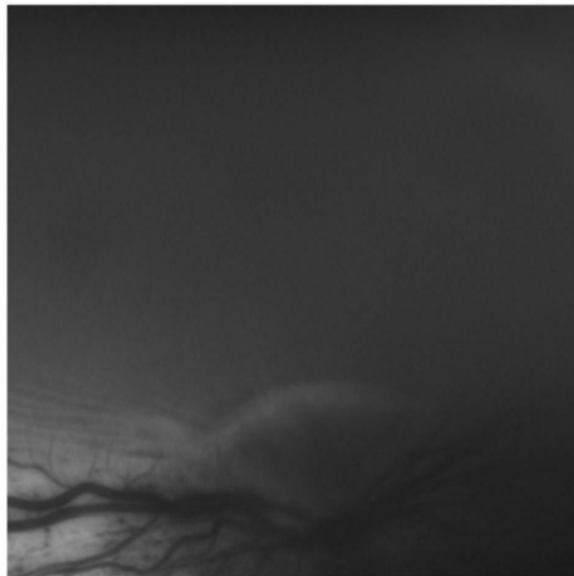
a. PBS基线



b. PBS 30分钟后



c. PBS 45分钟后



d. PBS 60分钟后

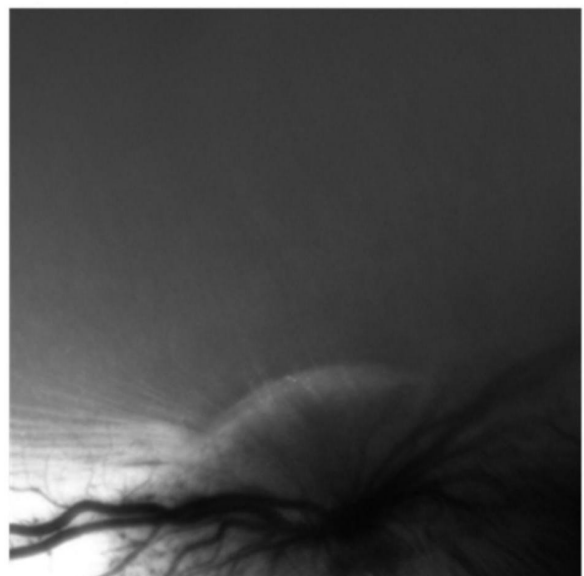
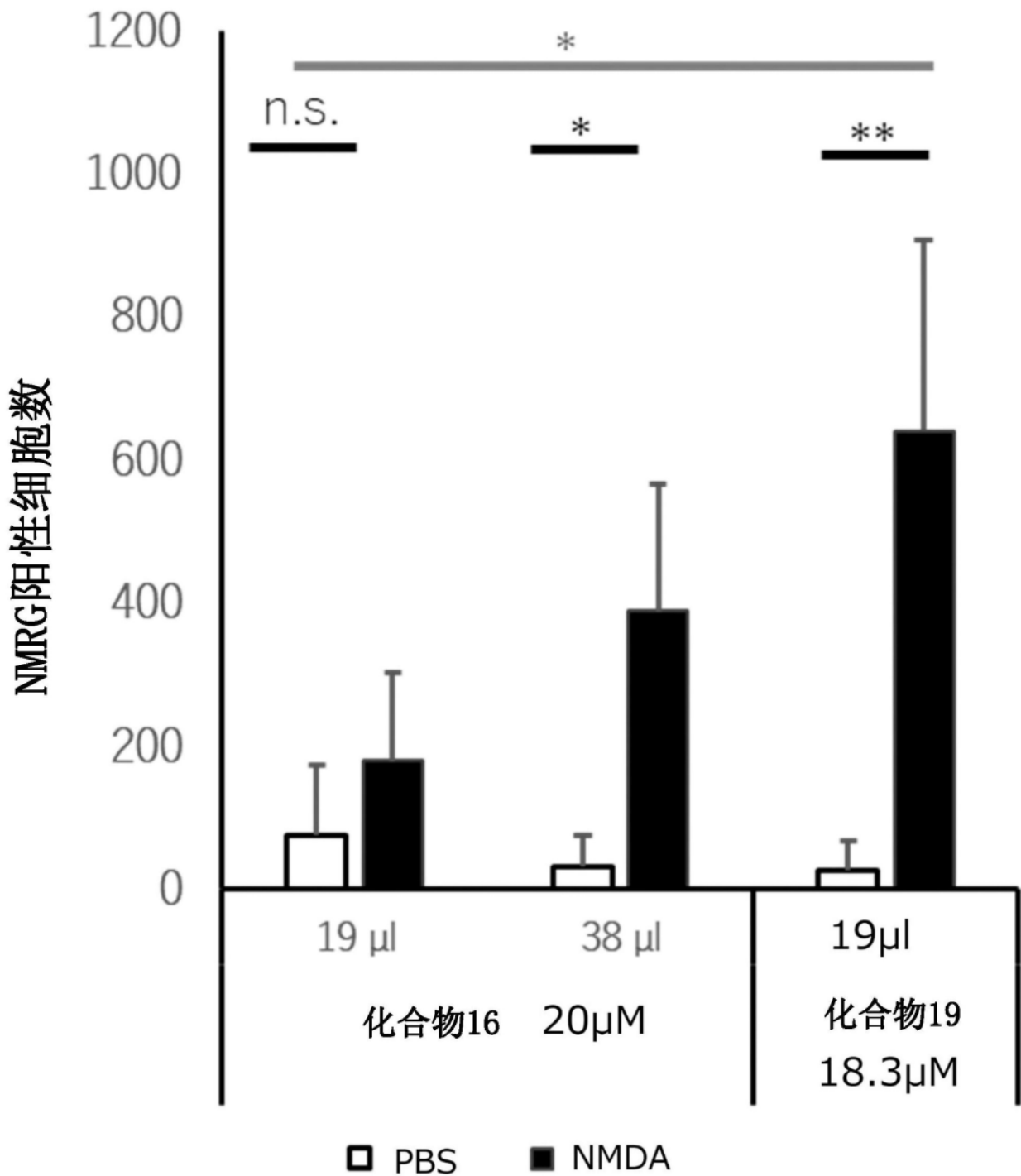


图22



N = 3-5

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

图23

分离得到的来自3D视网膜类器官的hiPSC-RGC

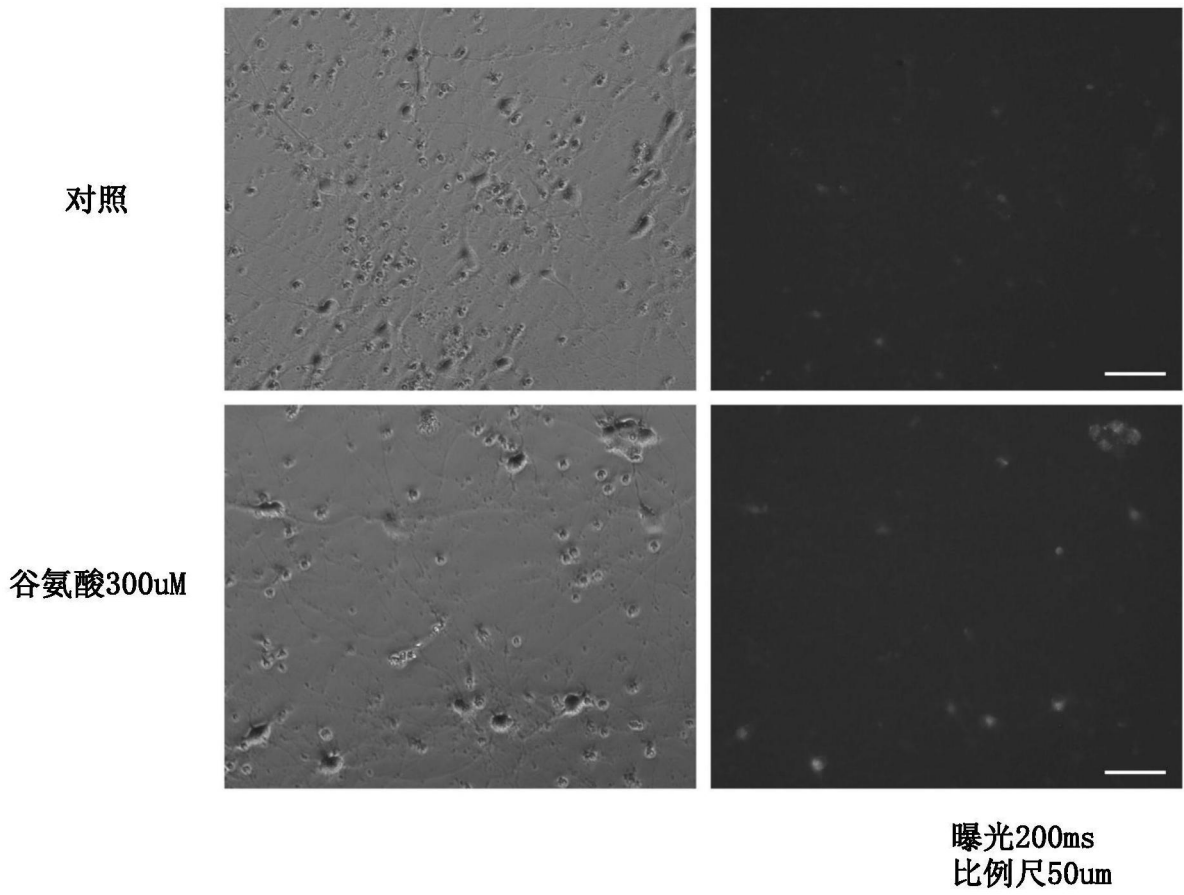


图24

hiPSC-RGC 3D视网膜类器官 分化诱导第60天

谷氨酸 0uM

1h反应

1h拍摄

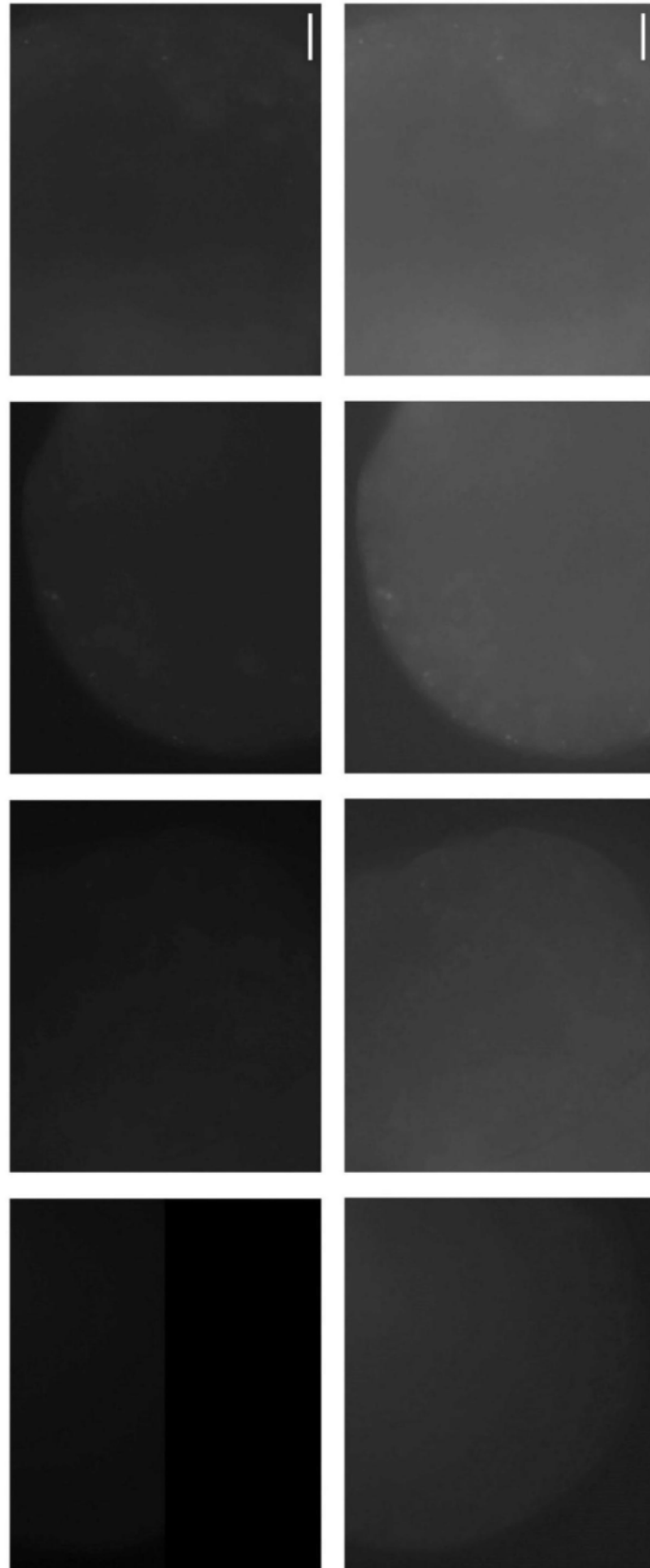
化合物19的终浓度

对照

0.25uM

1.2uM

5.0uM



曝光200ms
比例尺50um

图25

hiPSC-RGC 3D视网膜类器官 分化诱导第60天

谷氨酸 300uM

1h反应

1h拍摄

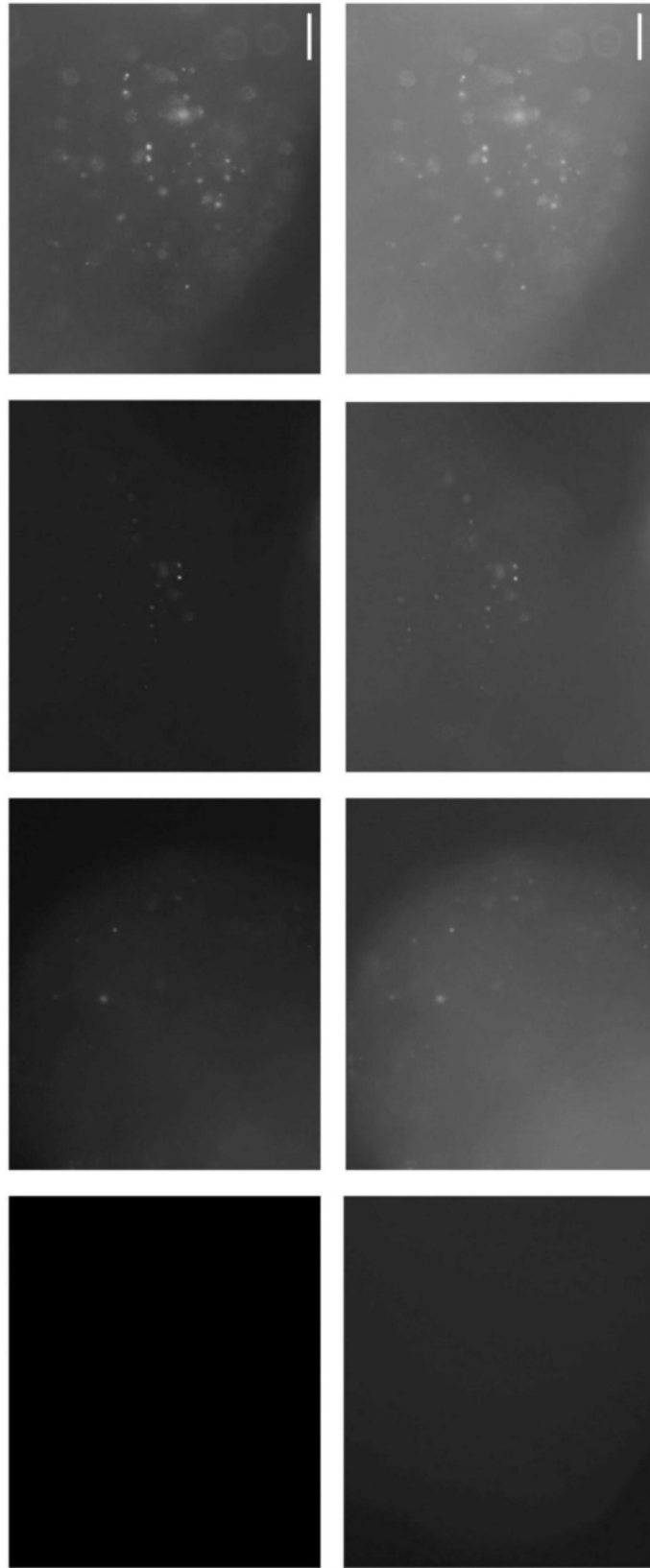
化合物19的终浓度

对照

0.25uM

1.2uM

5.0uM



曝光200ms
比例尺50um

图26

hiPSC-RGC 3D视网膜类器官 分化诱导第60天
谷氨酸 1mM
1h反应
1h拍摄

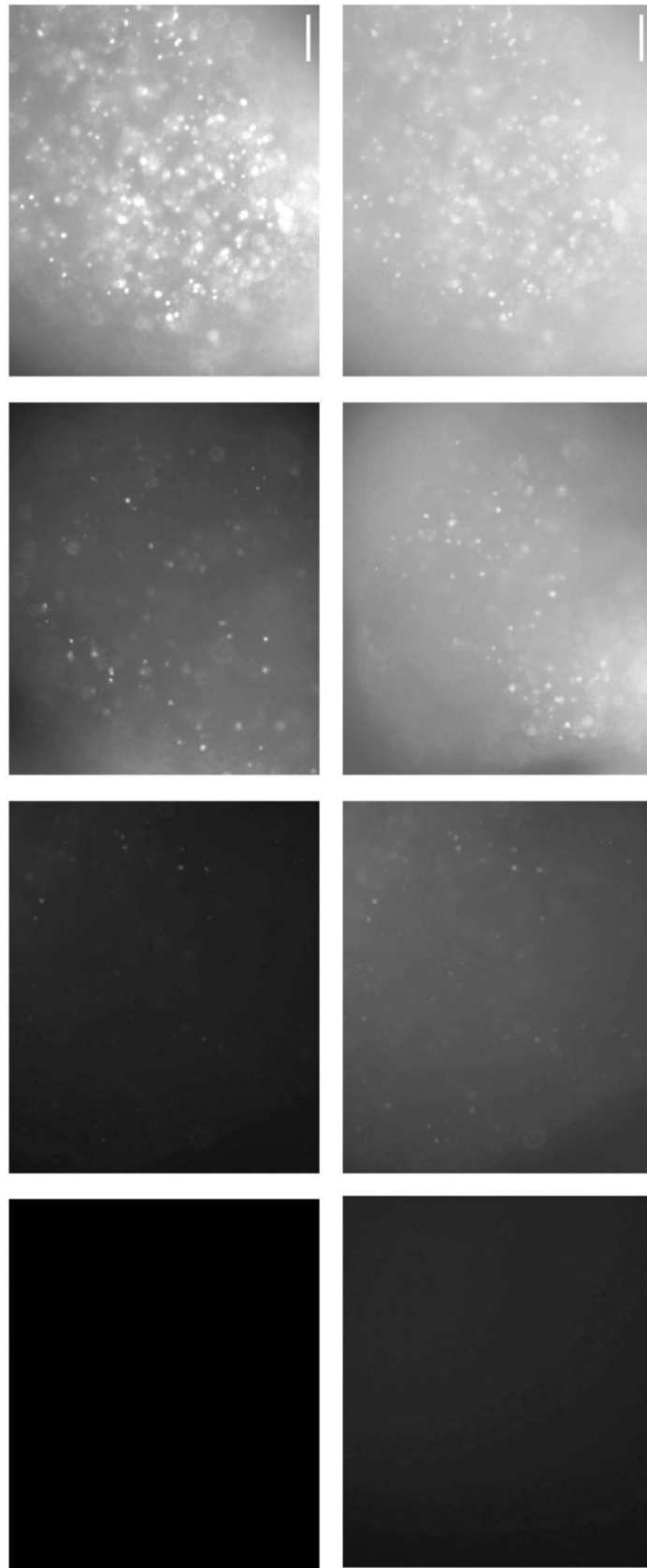
化合物19的终浓度

对照

0.25uM

1.2uM

5.0uM



曝光200ms
比例尺50um

图27

荧光强度的比较 探针：化合物19（终浓度）

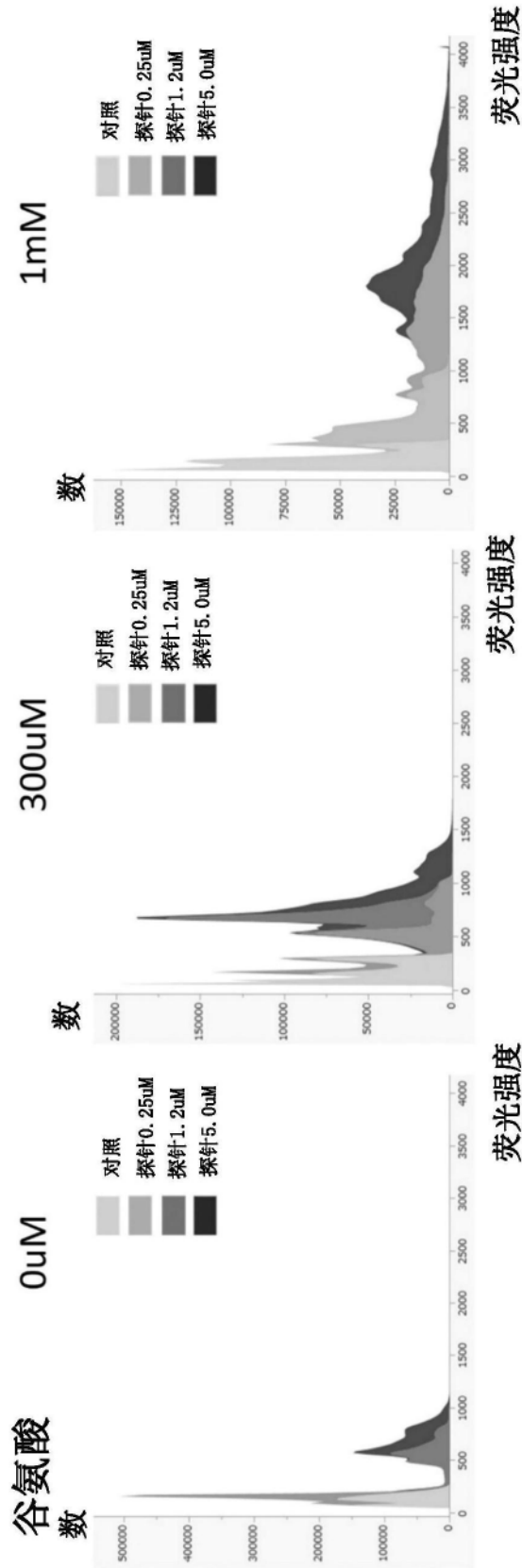


图28

化合物16与化合物19的荧光强度的比较
谷氨酸1mM
1h反应
1h拍摄

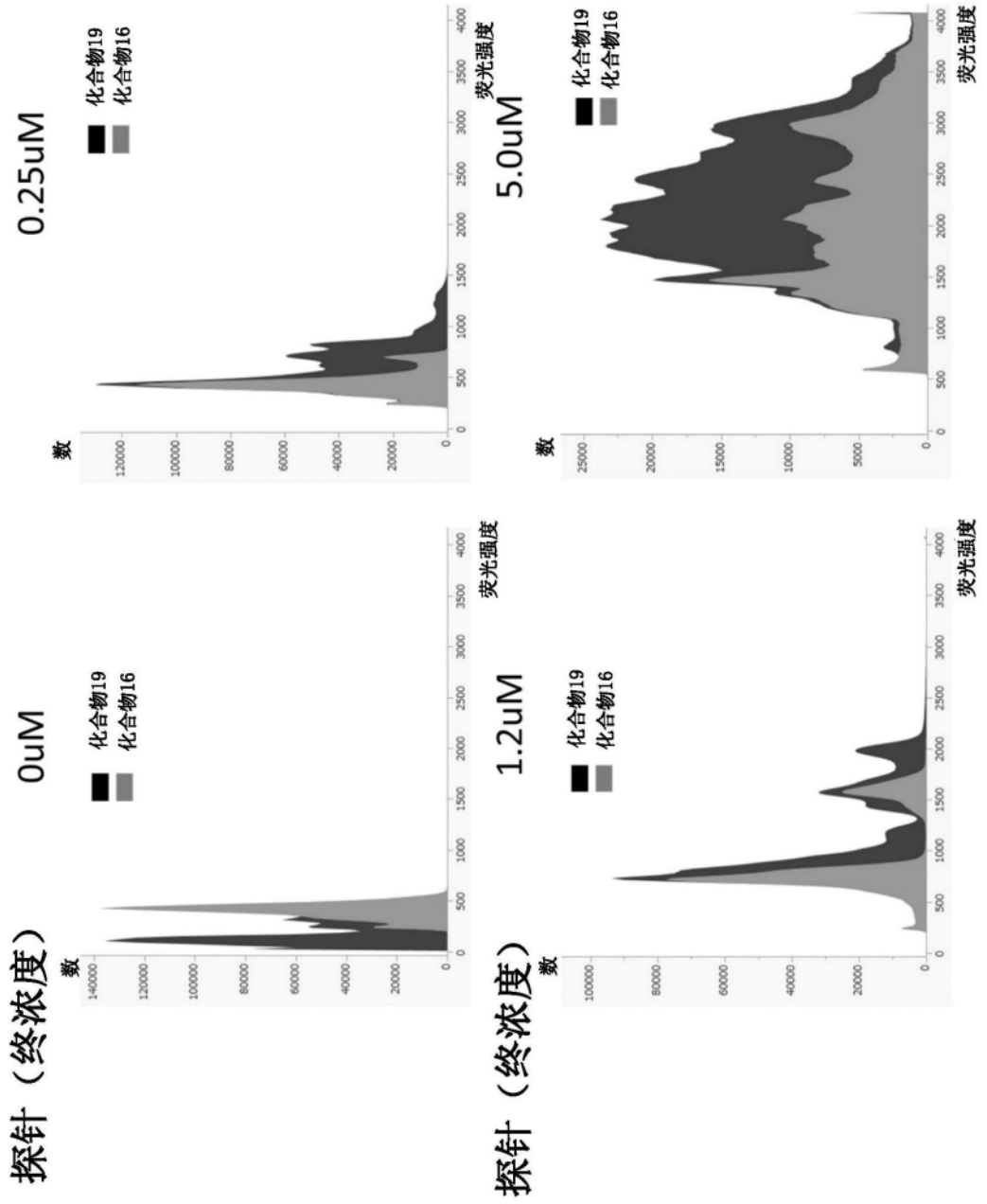
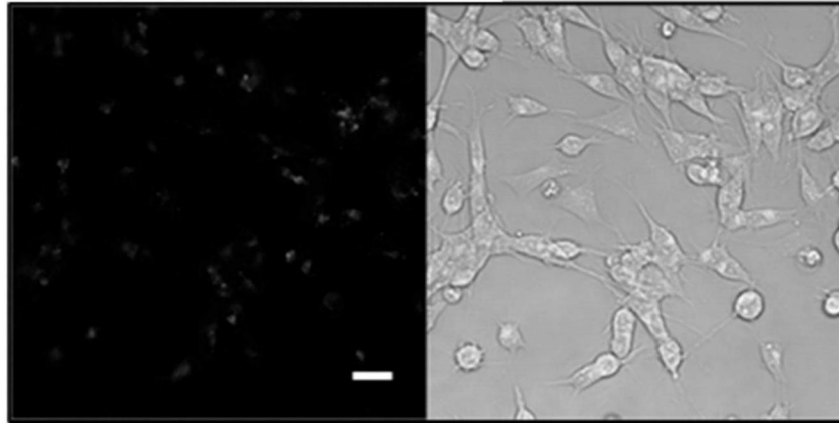


图29

(a) 化合物19, SNJ1945



(b) 化合物19

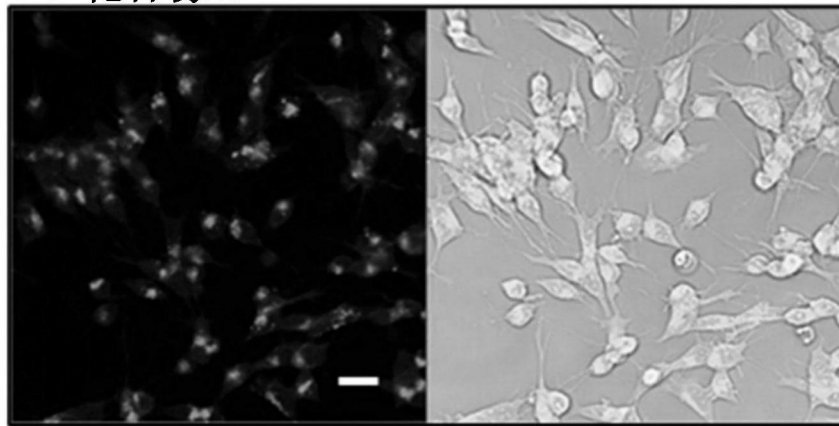


图30

对照组

SNJ-1945给药组

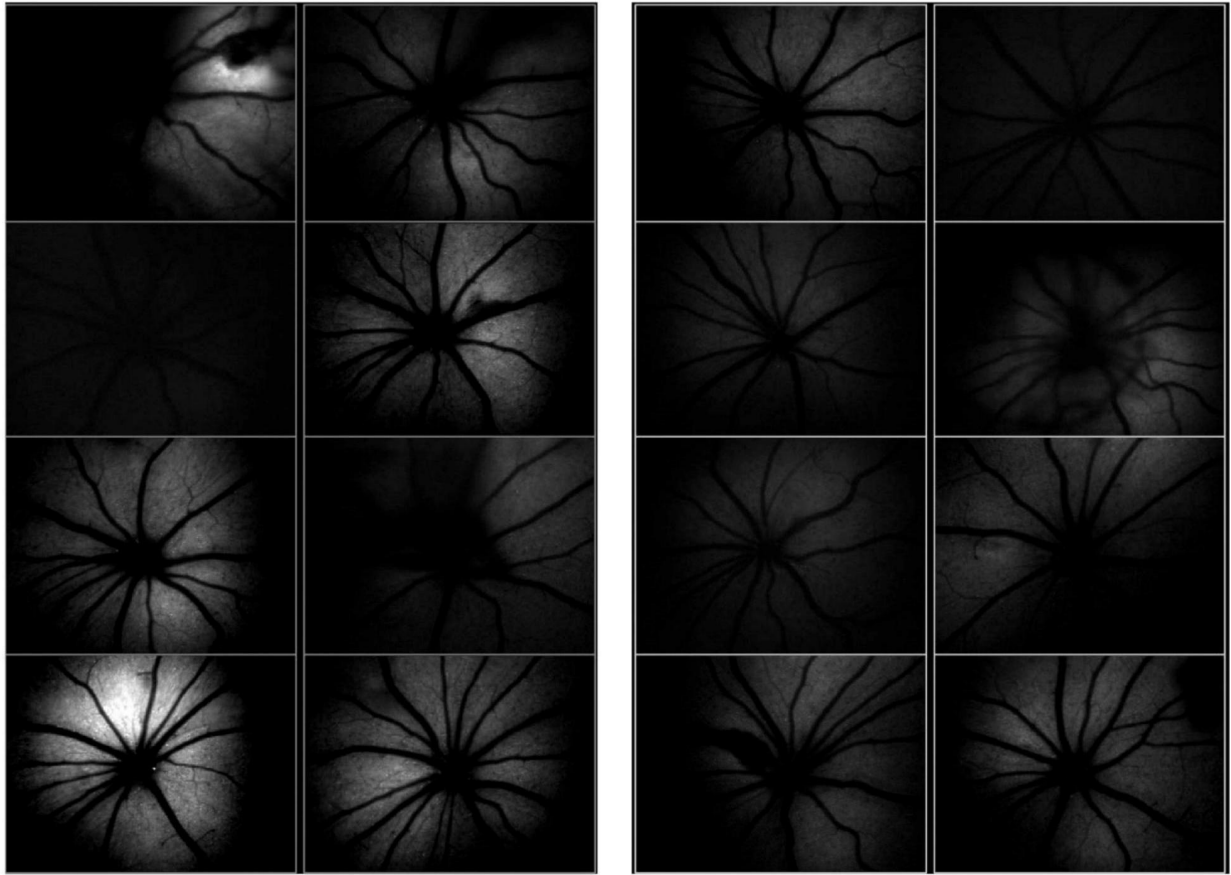


图31

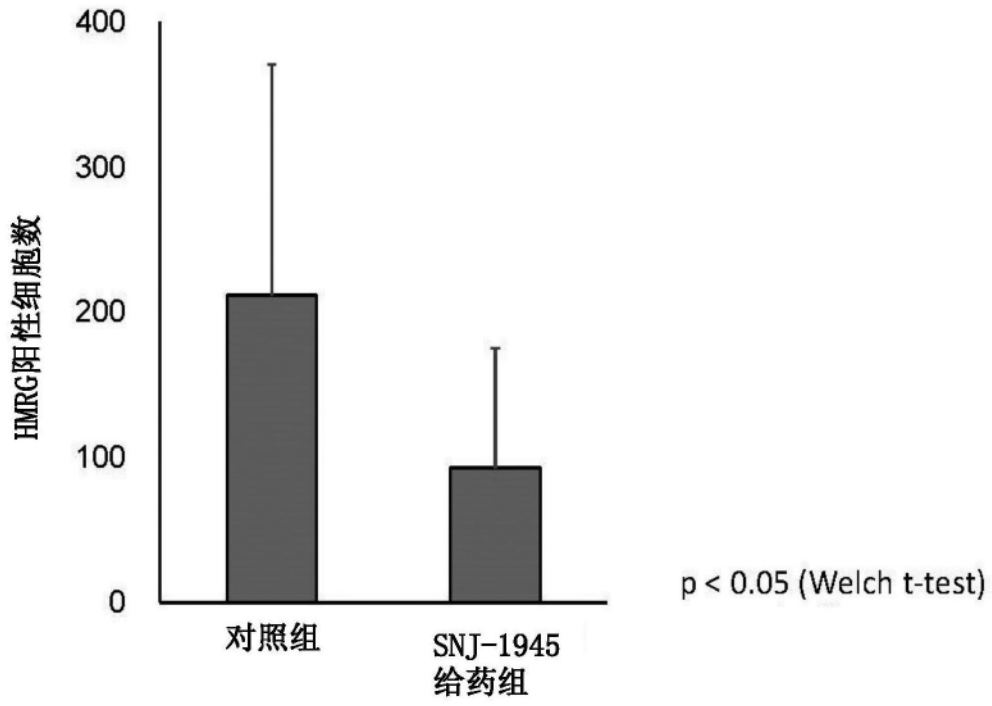


图32

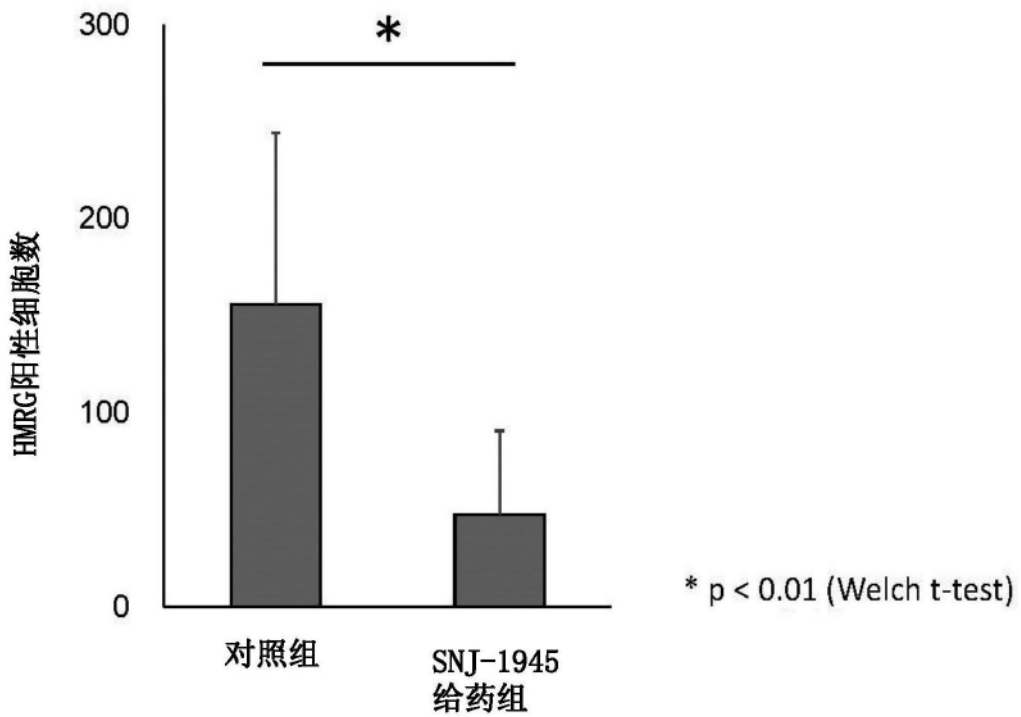


图33

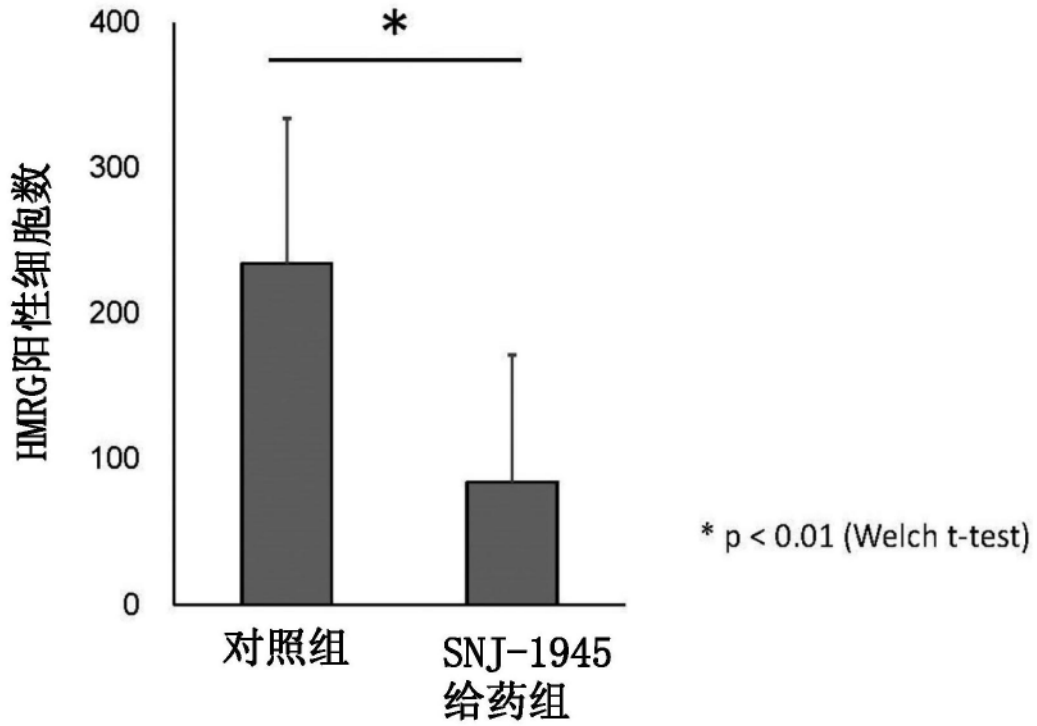


图34

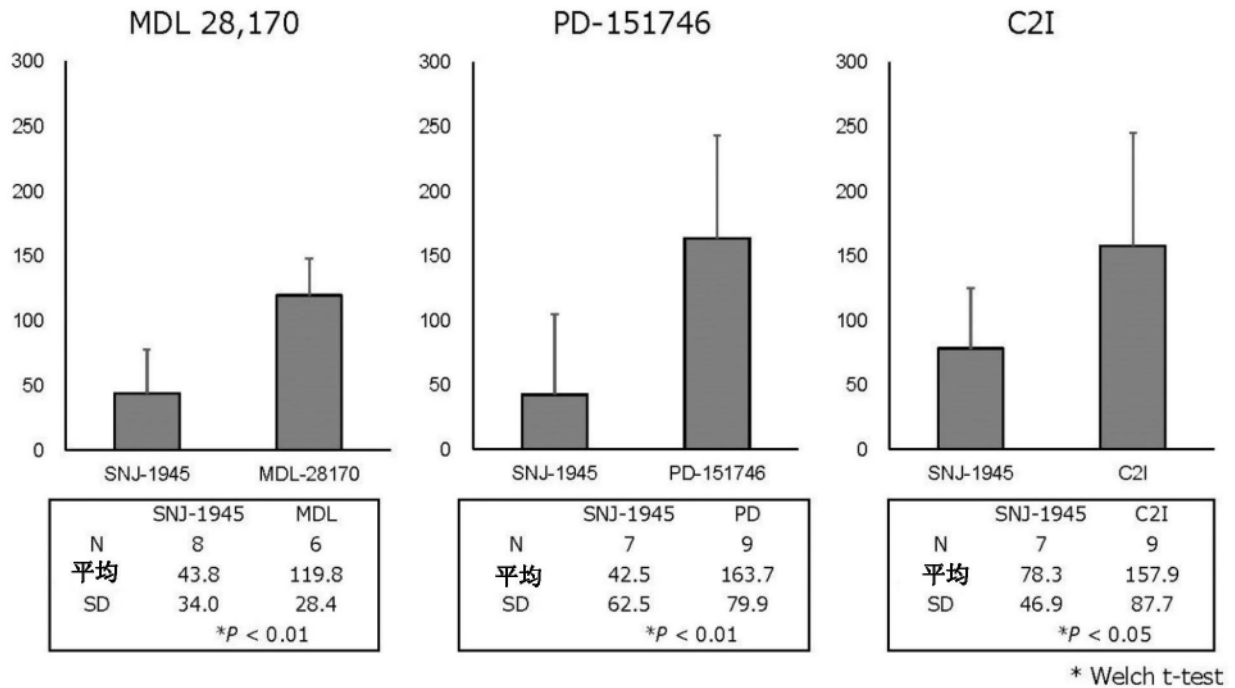
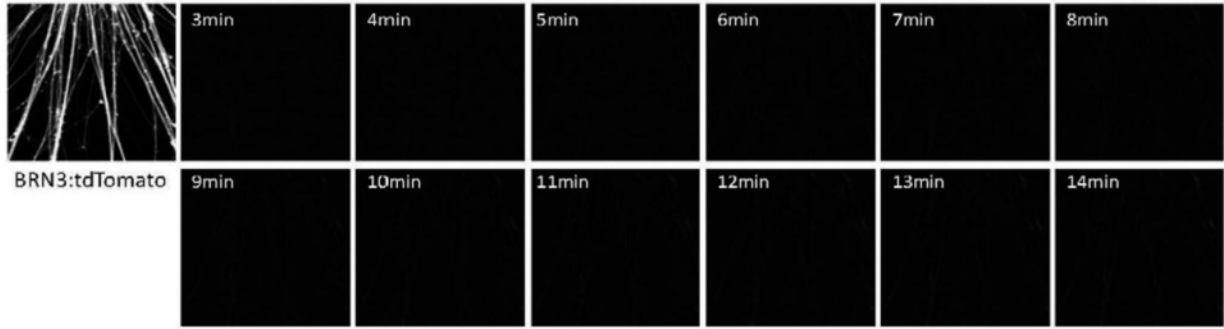
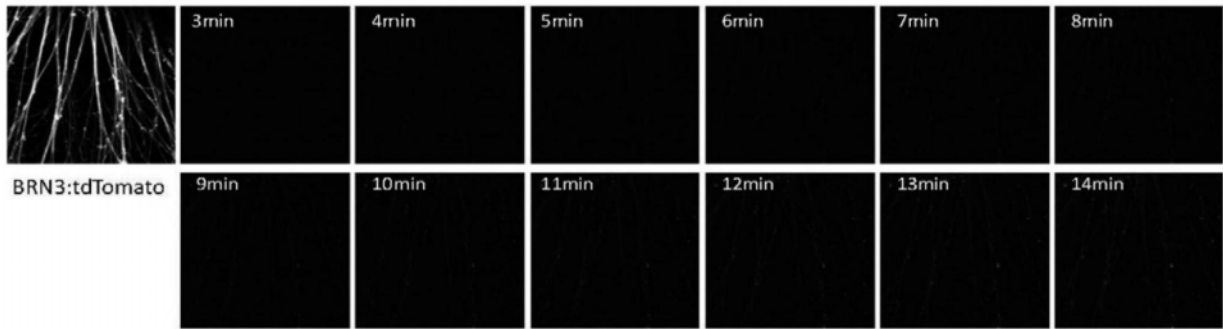


图35

(a) 50nM A23187+100μM SNJ-1945



(b) 对照



(c) 50 nM A23187

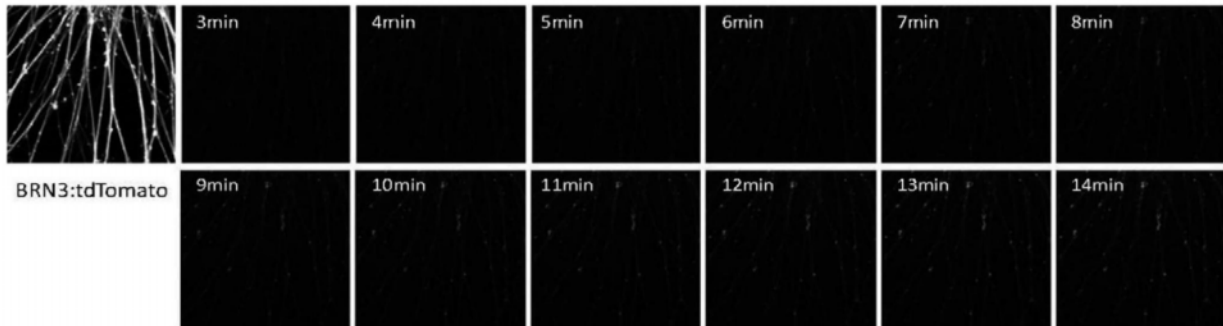


图36

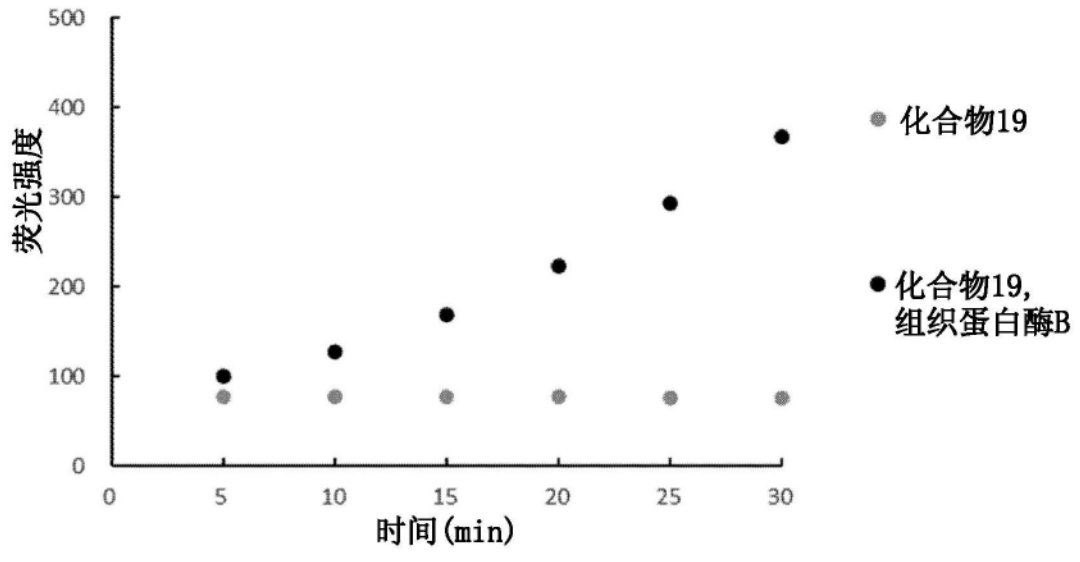


图37