(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-281575
(P2008-281575A)
(43)公開日 平成20年11月20日(2008.11.20)

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
G01N 21/76	(2006.01)	G01N 21/76		2G054
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q 1/26		4B063
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q 1/02		
C12Q 1/66	(2006.01)	C12Q 1/66		
C07D 277/66	(2006.01)	C07D 277/66	CSP	

審査請求 有 請求項の数 156 ＯＬ （全 79 頁） 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2008-146920(P2008-146920)
(22)出願日	平成20年6月4日(2008.6.4)
(62)分割の表示	特願2004-537859(P2004-537859)の分割
原出願日	平成15年9月16日(2003.9.16)
(31)優先権主張番号	60/412,254
(32)優先日	平成14年9月20日(2002.9.20)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/483,309
(32)優先日	平成15年6月27日(2003.6.27)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人 593089149
プロメガ　コーポレイション
Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７１１－５３９９　マディソン　ウッズ　ホロー　ロード　２８００番地
(74)代理人 100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人 100105957
弁理士　恩田　誠
(74)代理人 100142907
弁理士　本田　淳
(74)代理人 100149641
弁理士　池上　美穂

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シトクロムＰ４５０活性を測定するための発光を利用する方法およびプローブ

(57)【要約】
【課題】本発明は、細胞、組織および動物における代謝活性を分析するために、そしてシトクロムＰ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用に関してスクリーニングするために有用な方法、組成物、基質およびキットを提供する。
【解決手段】シトクロムＰ４５０基質でありかつ生物発光酵素、例えばルシフェラーゼの基質前駆体でもある発光原分子、例えばルシフェリンまたはセレンテラジンを用いた、一段階および二段階の方法が提供される。Ｐ４５０反応にルシフェリン誘導体またはその他の発光原分子を添加すると、Ｐ４５０反応においてＰ４５０酵素により該発光原分子が代謝されて生物発光酵素の基質、例えばルシフェリンおよび／またはルシフェリン誘導体代謝産物になる。その結果生じる代謝産物（単数または複数）は、光を生成する二次反応において、生物発光酵素、例えばルシフェラーゼの基質としての役割を果たす。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性を測定する方法であって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｂ）細胞を発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製すること、ならびに
（ｃ）前記混合物の発光を測定することにより細胞のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項２】
前記細胞が生物発光酵素を発現する請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記工程（ｂ）において細胞をさらに溶解試薬と接触させる請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記細胞を前記工程（ｂ）の前に溶解させる請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記細胞を前記工程（ｃ）の前に溶解させる請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞を最初に前記発光原分子と接触させて一次反応混合物を作製した後、前記生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記二次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記二次反応混合物がピロホスファターゼをさらに含む請求項６に記載の方法。
【請求項１０】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
動物組織におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性を測定する方法であって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｂ）動物組織を発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製すること、ならびに
（ｃ）前記混合物の発光を測定することにより前記組織のシトクロムＰ４５０の活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１２】
前記組織を最初に前記発光原分子と第１の所定時間接触させた後、前記生物発光酵素と接触させて二次混合物を提供する請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記二次反応混合物が界面活性剤を含む請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記界面活性剤が非イオン性である請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記二次反応混合物がピロホスファターゼをさらに含む請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】

動物におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性を測定する方法であって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｂ）前記発光原分子を動物に投与すること、
（ｃ）前記動物から生物学的試料を得ること、
（ｄ）前記生物学的試料を生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および
（ｅ）発光を測定することにより前記動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１８】
前記反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記界面活性剤が非イオン性である請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記反応混合物がピロホスファターゼをさらに含む請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
生物発光酵素導入遺伝子を有するトランスジェニック動物におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性を測定する方法であって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｂ）生物発光酵素導入遺伝子を有するトランスジェニック動物に前記発光原分子を投与すること、および
（ｃ）前記トランスジェニック動物由来の組織の発光を測定することにより前記動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項２３】
前記生物発光酵素導入遺伝子がルシフェラーゼ導入遺伝子である請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
シトクロムＰ４５０活性に及ぼす化合物の作用について化合物をスクリーニングする方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、
（ｂ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｃ）化合物、発光原分子、少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素、および生物発光酵素を接触させることにより反応混合物を作製すること、ならびに
（ｄ）前記反応混合物の発光を測定することにより前記化合物と前記シトクロムＰ４５０酵素との相互作用に起因するシトクロムＰ４５０活性（もしあれば）を決定すること
を包含する方法。
【請求項２５】
前記化合物、前記発光原分子、前記シトクロムＰ４５０酵素および前記生物発光酵素をほぼ同時に接触させることを特徴とする請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記化合物、前記発光原分子および前記少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素を接触させて一次反応混合物を作製した後、前記生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
前記二次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記工程（ｃ）がピロホスファターゼをさらに含む請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させて一次反応混合物を作製し、次に前記一次反応混合物を前記発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製し、そして次に前記二次反応混合物を生物発光酵素と接触させて三次反応混合物を作製する請求項２４に記載の方法。
【請求項３２】
前記三次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を試験化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させる工程であって、前記発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であることを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）前記細胞からの発光を測定し、前記試験化合物に曝露されていない第２の細胞と比較することにより、前記試験化合物への前記細胞の曝露に起因する前記細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項３５】
前記細胞が前記生物発光酵素を発現する請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞を最初に前記化合物と接触させて一次反応混合物を作製した後、前記発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製する請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
前記二次反応混合物が生物発光酵素をさらに含む請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記生物発光酵素が所定時間後に前記二次反応混合物に添加される請求項３６に記載の方法。
【請求項３９】
前記二次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記工程（ｂ）がピロホスファターゼをさらに含む請求項３４に記載の方法。
【請求項４２】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
動物組織のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験化合物を提供する工程、
（ｂ）動物組織を前記試験化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させる工程であって、前記発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆

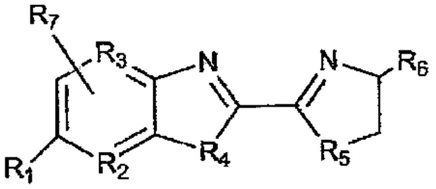
体であることを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）前記組織からの発光を測定し、前記試験化合物に曝露されていない対照組織と比較することにより、前記試験化合物への前記組織の曝露に起因する組織のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項４４】
前記動物組織が前記生物発光酵素を発現する請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記組織を前記試験化合物と接触させて一次混合物を作製した後、前記発光原分子と接触させて二次混合物を作製する請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記二次混合物が生物発光酵素をさらに含む請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記生物発光酵素が所定時間後に前記二次反応混合物に添加される請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記二次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記工程（ｂ）がピロホスファターゼをさらに含む請求項４３に記載の方法。
【請求項５１】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供すること、
（ｂ）試験化合物を動物に投与すること、
（ｃ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を前記動物に投与すること、
（ｄ）前記動物から生物学的試料を得ること、
（ｅ）前記生物学的試料を生物発光酵素と接触させること、および
（ｆ）前記生物学的試料からの発光を測定し、前記試験化合物に曝露されていない動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、前記試験化合物への前記動物の曝露後の前記動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項５３】
前記工程（ｃ）は前記工程（ｂ）の後に所定時間が経過した後で実施される請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
試験化合物への曝露の直前に動物から生物学的試料が採取される請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
生物学的試料が血液、血清、胆汁、尿、糞便または組織を含む請求項５２に記載の方法。
【請求項５６】
生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供すること、
（ｂ）生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物に試験化合物を投与

すること、
（ｃ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を動物に投与すること、および
（ｄ）トランスジェニック動物からの組織の発光を測定し、試験化合物に曝露されていない別のトランスジェニック動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、動物を試験化合物に曝露した後の該動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項５７】
前記工程（ｃ）は前記工程（ｂ）の後に所定時間が経過した後で実施される請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
生物発光酵素の導入遺伝子がルシフェラーゼ導入遺伝子である請求項５６に記載の方法。
【請求項５９】
シトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、
（ｂ）スクリーニングしようとする化合物を（ｉ）シトクロムＰ４５０基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子；（ｉｉ）１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素；および（ｉｉｉ）１つまたは複数の生物発光酵素と接触させることにより各々１つまたは複数の化合物を有する反応混合物を作製すること、ならびに
（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０の酵素活性（もしあれば）を決定すること
を包含する方法。
【請求項６０】
化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させて一次反応混合物を作製し、次に一次反応混合物を発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製し、そして次に二次反応混合物を生物発光酵素と接触させて三次反応混合物を作製する請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記三次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素および発光原分子と接触させて一次反応混合物を作製した後、１つまたは複数の生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する請求項５９に記載の方法。
【請求項６４】
前記二次反応混合物が界面活性剤をさらに含む請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記界面活性剤が非イオン性である請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
化合物を１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素および発光原分子と同時にまたは同時期に接触させて一次反応混合物を作製した後、１つまたは複数の生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する請求項５９に記載の方法。
【請求項６７】
前記工程（ｂ）がピロホスファターゼをさらに含む請求項５９に記載の方法。

【請求項６８】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および１つまたは複数の生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および
（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０の酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項７０】
前記細胞が生物発光酵素を発現する請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
外来の供給源由来の生物発光酵素が用いられる請求項６９に記載の方法。
【請求項７２】
工程（ｂ）および前記工程（ｃ）のうち少なくともいずれかがピロホスファターゼをさらに含む請求項６９に記載の方法。
【請求項７３】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
細胞を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させ、次に生物発光酵素と第２の所定時間接触させる請求項６９に記載の方法。
【請求項７５】
第２の所定時間において界面活性剤が存在する請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
細胞を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、そして次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる請求項７５に記載の方法。
【請求項７８】
第３の所定時間において界面活性剤が存在する請求項７７に記載の方法。
【請求項７９】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
細胞を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる請求項６９に記載の方法。
【請求項８１】
細胞、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる請求項６９に記載の方法。
【請求項８２】
動物組織のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）動物組織を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および１つまたは

複数の生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項８３】
組織が少なくとも１つの生物発光酵素を発現する請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
組織を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させた後、生物発光酵素と接触させる請求項８２に記載の方法。
【請求項８５】
第１の所定時間の後に界面活性剤を添加する請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
界面活性剤および生物発光酵素を同時に添加する請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
界面活性剤を生物発光酵素の添加の前に添加する請求項８５に記載の方法。
【請求項８８】
組織を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、そして次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる請求項８２に記載の方法。
【請求項８９】
第２の所定時間の後に界面活性剤を添加する請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
界面活性剤および生物発光酵素を同時に添加する請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
界面活性剤を生物発光酵素の添加の前に添加する請求項８９に記載の方法。
【請求項９２】
組織を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる請求項８２に記載の方法。
【請求項９３】
組織、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる請求項８２に記載の方法。
【請求項９４】
前記工程（ｂ）または前記工程（ｃ）が（ｉｖ）ピロホスファターゼをさらに含む請求項８２に記載の方法。
【請求項９５】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）生きている硬骨魚を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）試験化合物を含む反応混合物の発光を測定して試験化合物を含まない対照混合物と比較することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する

工程
を包含する方法。
【請求項９７】
前記硬骨魚がトランスジェニック体であり、かつ生物発光酵素を発現する請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
硬骨魚を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させた後、生物発光酵素と接触させる請求項９６に記載の方法。
【請求項９９】
硬骨魚を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、その次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる請求項９６に記載の方法。
【請求項１００】
硬骨魚を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる請求項９６に記載の方法。
【請求項１０１】
硬骨魚、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる請求項９６に記載の方法。
【請求項１０２】
前記工程（ｂ）または前記工程（ｃ）が（ｉｖ）ピロホスファターゼをさらに含む請求項９６に記載の方法。
【請求項１０３】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
シトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす物質の作用を決定するためのキットであって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体である１つまたは複数の発光原分子、および
（ｂ）キットを使用するための使用説明書
を含むキット。
【請求項１０５】
１つまたは複数の生物発光酵素をさらに含む請求項１０４に記載のキット。
【請求項１０６】
前記生物発光酵素がルシフェラーゼである請求項１０３に記載のキット。
【請求項１０７】
前記生物発光酵素がホタルルシフェラーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼである請求項１０５に記載のキット。
【請求項１０８】
ＡＴＰおよびマグネシウムイオンをさらに含む請求項１０４に記載のキット。
【請求項１０９】
界面活性剤をさらに含む請求項１０８に記載のキット。
【請求項１１０】
前記界面活性剤が非イオン性である請求項１０９に記載のキット。
【請求項１１１】
ピロホスファターゼをさらに含む請求項１０９に記載のキット。
【請求項１１２】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項１１１に記載のキット。
【請求項１１３】
前記発光原分子がシトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体であるＤ－ルシフェリン誘導体である、請求項１０４に記載のキット。

【請求項１１４】
前記ルシフェリン誘導体が次式：
【化１】


（式中、

R_1は、水素、ヒドロキシル、アミノ、C_{1-20}アルコキシ、置換C_{1-20}アルコキシ、C_{2-20}アルケニルオキシ、置換C_{2-20}アルケニルオキシ、ハロゲン化C_{2-20}アルコキシ、置換ハロゲン化C_{2-20}アルコキシ、C_{3-20}アルキニルオキシ、置換C_{3-20}アルキニルオキシ、C_{3-20}シクロアルコキシ、置換C_{3-20}シクロアルコキシ、C_{3-20}シクロアルキルアミノ、置換C_{3-20}シクロアルキルアミノ、C_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{1-20}アルキルアミノ、ジC_{1-20}アルキルアミノ、置換ジC_{1-20}アルキルアミノ、C_{2-20}アルケニルアミノ、置換C_{2-20}アルケニルアミノ、ジC_{2-20}アルケニルアミノ、置換ジC_{2-20}アルケニルアミノ、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルアミノ、置換C_{3-20}アルキニルアミノ、ジC_{3-20}アルキニルアミノ、置換ジC_{3-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{3-20}アルキニルC_{1-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノまたは置換C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノを表し、

R_2およびR_3は、独立してＣまたはＮを表し、

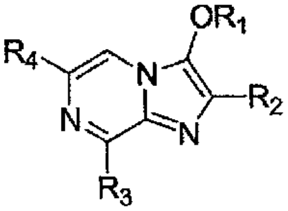
R_4およびR_5は、独立してＳ、Ｏ、NR_8（ここでR_8は水素またはC_{1-20}アルキルを表す）、CR_9R_{10}（ここで、R_9およびR_{10}は独立してＨ、C_{1-20}アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

R_6は、CH_2OH、COR_{11}（ここで、R_{11}はＨ、ＯＨ、C_{1-20}アルコキシド、C_{2-20}アルケニルまたは$NR_{12}R_{13}$（ここで、R_{12}およびR_{13}は独立してＨまたはC_{1-20}アルキルを表す）を表す）または$-OM^+$（ここで、M^+はアルカリ金属またはその製薬上許容可能な塩を表す）を表し、

R_7は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、C_{1-20}アルケニル、ハロゲンまたはC_{1-6}アルコキシドを表すが、

ただし、同時にR_1がＯＨまたはNH_2であり、R_7がＨではあり、R_6がCOR_{11}であり、R_{11}がＯＨであり、R_3およびR_2がともに炭素であり、かつR_4およびR_5がともにＳである（ルシフェリンおよびアミノルシフェリン）ということはない）
を有する請求項１１３に記載のキット。

【請求項１１５】
前記発光原分子がセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を含む請求項１１４に記載のキット。

【請求項１１６】
前記セレンテラジン誘導体が次式：
【化２】


（式中、

R_1は、C_{1-20}アルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、かつ

R_2、R_3およびR_4は、独立して水素、C_{1-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、アリール、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアリールである）

を有する請求項１１５に記載のキット。

【請求項１１７】

前記R_4がアリールあるいはC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはC_{1-20}ジアルキルアミノで置換されたアリールである請求項１１６に記載のキット。

【請求項１１８】

可逆的ルシフェラーゼ阻害剤をさらに含む請求項１０４に記載のキット。

【請求項１１９】

前記可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－４６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）である請求項１１８に記載のキット。

【請求項１２０】

シトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体であるＤ－ルシフェリン誘導体。

【請求項１２１】

請求項１２０に記載のＤ－ルシフェリン誘導体を含む組成物。

【請求項１２２】

ピロホスファターゼをさらに含む請求項１２１に記載の組成物。

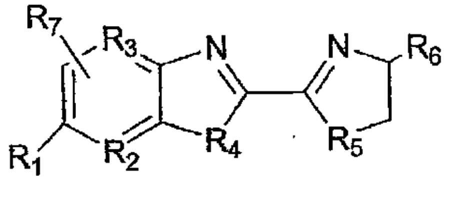
【請求項１２３】

前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項１２２に記載の組成物。

【請求項１２４】

次式：

【化３】



（式中、

R_1は、水素、ヒドロキシ、C_{1-20}アルコキシまたはC_{1-20}アルケニルオキシを表し、この場合、アルコキシおよびアルケニルオキシはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、アジド、ヘテロアリール、またはハロアルキルで置換されたアリールで置換されており、あるいは

R_1は、C_{3-20}アルキニルオキシ、シクロアルコキシ、シクロアルキルアミノ、C_{1-20}アルキルアミノ、ジC_{1-20}アルキルアミノ、C_{2-20}アルケニルアミノ、ジC_{2-20}アルケニルアミノ、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルアミノ、ジC_{3-20}アルキニルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{1-20}アルキルアミノまたはC_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノを表し、この場合、上記の基は各々任意選択で、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、アジド、ヘテロアリール、またはハロアルキルで置換されたアリールで置換されており、

R_2およびR_3は、独立してＣまたはＮを表し、

R_4およびR_5は、独立してＳ、Ｏ、NR_8（ここでR_8は水素またはC_{1-20}アルキルを表す）、CR_9R_{10}（ここで、R_9およびR_{10}は独立してＨ、C_{1-20}アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

R_6は、CH_2OH、COR_{11}（ここで、R_{11}は水素、ヒドロキシ、C_{2-20}アルケニルを表す）または$-OM^+$（ここで、M^+はアルカリ金属またはその製薬上許容可能な塩を表す）を表し、

R_7は、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ハロゲンまたはC_{1-6}アルコキシドを表すが、

ただし、

R_1がヒドロキシである場合、R_7が水素、R_{11}がヒドロキシ、R_2およびR_3がともに炭素、かつR_4およびR_5がともにＳである（ルシフェリン）ということはなく、

R_1が水素である場合、R_7が水素、R_{11}がヒドロキシ、R_2およびR_3がともに炭素、かつR_4およびR_5がともにＳである（デヒドロルシフェリン）ということはなく、そして

R_1がヒドロキシである場合、R_7が水素、R_6がCH_2OH、R_2およびR_3がともに炭素、かつR_4およびR_5がともにＳである（ルシフェロール）ということはない）を有するＤ－ルシフェリン誘導体。

【請求項１２５】

以下の：

ルシフェリン６’２－クロロエチルエーテル、

ルシフェリン６’４－ピコリニルエーテル、

ルシフェリン６’４－トリフルオロメチルベンジルエーテル、

ルシフェリン６’２－ピコリニルエーテル、または

ルシフェリン６’３－ピコリニルエーテル

である請求項１２４に記載の化合物。

【請求項１２６】

以下の：

ルシフェリン６’２－クロロエチルエーテル、

ルシフェリン６’ベンジルエーテル、

ルシフェリン６’４－ピコリニルエーテル、

ルシフェリン６’４－トリフルオロメチルベンジルエーテル、

ルシフェリン６’フェニルエチルエーテル、

ルシフェリン６’ゲラニルエーテル、

ルシフェリン６’プレニルエーテル、

ルシフェリン６’２－ピコリニルエーテル、および

ルシフェリン６’３－ピコリニルエーテル

からなる群から選択される化合物。

【請求項１２７】

以下の：

ルシフェリン６’ベンジルエーテル、

ルシフェリン６’フェニルエチルエーテル、

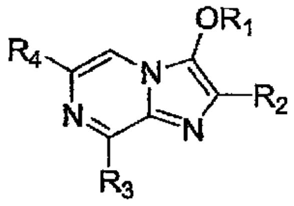
ルシフェリン６’ゲラニルエーテル、および

ルシフェリン６’プレニルエーテル、
からなる群から選択される請求項１２６に記載の化合物。
【請求項１２８】
以下の：
ルシフェリン６’２−クロロエチルエーテル、
ルシフェリン６’４−ピコリニルエーテル、
ルシフェリン６’４−トリフルオロメチルベンジルエーテル、
ルシフェリン６’２−ピコリニルエーテル、および
ルシフェリン６’３−ピコリニルエーテル
からなる群から選択される請求項１２５に記載の化合物。
【請求項１２９】
請求項１２４に記載のＤ−ルシフェリン誘導体を含む組成物。
【請求項１３０】
ピロホスファターゼをさらに含む請求項１２９に記載の組成物。
【請求項１３１】
前記ピロホスファターゼが無機ピロホスファターゼである請求項１３０に記載の組成物。
【請求項１３２】
Ｐ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）前記セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および
（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することによりシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１３３】
細胞におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）細胞を前記セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製すること、および
（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより前記細胞のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１３４】
前記工程（ｂ）の細胞をさらに溶解試薬と接触させる請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
前記細胞を工程（ｂ）の前に溶解させる請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３６】
前記細胞を工程（ｃ）の前に溶解させる請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３７】
動物組織におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）動物組織を前記セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体および生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製すること、ならびに
（ｃ）混合物の発光を測定することにより組織のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。

【請求項１３８】
動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）前記セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を動物に投与すること、
（ｃ）前記動物から生物学的試料を得ること、および
（ｄ）前記試料の化学発光を測定することにより前記動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１３９】
シトクロムＰ４５０活性に及ぼす化合物の作用に関する化合物のスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、
（ｂ）シトクロムＰ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｃ）前記化合物、前記セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体およびシトクロムＰ４５０酵素を接触させることにより反応混合物を作製すること、ならびに
（ｄ）反応混合物の化学発光を測定することにより、化合物とシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０活性（もしあれば）を決定すること
を包含する方法。
【請求項１４０】
細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を、試験化合物、およびシトクロムＰ４５０基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させる工程、ならびに
（ｃ）細胞からの化学発光を測定し、試験化合物に曝露されていない第２の細胞と比較することにより、試験化合物への細胞の曝露の結果得られる細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４１】
動物組織のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験化合物を提供する工程、
（ｂ）動物組織を、試験化合物、およびシトクロムＰ４５０基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させる工程、ならびに
（ｃ）組織からの化学発光を測定し、前記試験化合物に曝露されていない対照組織と比較することにより、試験化合物への組織の曝露の結果得られる組織のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４２】
動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供すること、
（ｂ）試験化合物を動物に投与すること、
（ｃ）シトクロムＰ４５０基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を投与すること、
（ｄ）前記動物から生物学的試料を得ること、および
（ｅ）前記生物学的試料からの化学発光を測定し、試験化合物に曝露されていない動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、試験化合物への動物の曝露後

の動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること
を包含する方法。
【請求項１４３】
シトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）スクリーニングしようとする化合物を（ｉ）シトクロムＰ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体；および（ｉｉ）１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させることであって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４４】
細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４５】
動物組織のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）ＣＹＰ４５０活性を有する動物組織を提供する工程、
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）動物組織を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４６】
動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）生きている硬骨魚を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは

複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに
（ｃ）試験化合物を含む反応混合物の化学発光を測定して試験化合物を含まない対照混合物と比較することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法。
【請求項１４７】
前記セレンテラジン誘導体が次式：
【化４】



（式中、
R_1は、C_{1-20}アルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、そして
R_2、R_3およびR_4は、独立して水素、C_{1-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、アリール、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアリールである）
を有する請求項１３２～１４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４８】
R_4がアリール、あるいはC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはC_{1-20}ジアルキルアミノで置換されたアリールである請求項１４７に記載の方法。
【請求項１４９】
前記セレンテラジン誘導体がセレンテラジンＨＨ、メトキシセレンテラジンＨＨまたはセレンテラジンである請求項１４７に記載の方法。
【請求項１５０】
ルシフェラーゼを用いた反応混合物により生じる発光シグナルの安定性を増強する方法であって、ルシフェラーゼを、ルシフェラーゼ阻害剤の非存在下におけるルシフェラーゼを用いた同様の反応混合物中で生じる発光シグナルに比して安定性を増強し、発光シグナルの寿命を延長するのに有効な量の可逆的ルシフェラーゼ阻害剤と接触させることを包含する方法。
【請求項１５１】
前記可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が拮抗阻害剤である請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
前記可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）を含む請求項１５０に記載の方法。

【請求項１５３】
阻害剤の有効量が反応混合物中約１μＭ～約１ｍＭの範囲である請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５４】
阻害剤の有効量が反応混合物中約１μＭ～約５００μＭの範囲である請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５５】
阻害剤の有効量が反応混合物中約１０μＭ～約２００μＭの範囲である請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５６】
阻害剤の有効量が反応混合物中約１００μＭである請求項１５０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、動物、細胞、または無細胞反応系における代謝活性を分析するための、そして代謝活性に及ぼす試験化合物の作用に関して同化合物をスクリーニングするための、方法、基質化合物およびキットに関する。具体的には、シトクロムＰ４５０の基質またはシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体の二重の基質として、発光原分子（luminogenic molecule）、例えばルシフェリン誘導体またはセレンテラジンを用いることにより、代謝活性を分析することができる。発光原分子がシトクロムＰ４５０の基質および生物発光酵素の基質前駆体である場合、一次反応において発光原分子がＰ４５０により代謝されて生物発光酵素の基質が生成される。次に生物発光酵素は、光を発生する二次反応において該基質に作用する。次に、反応混合物の発光を対照の反応混合物と比較して測定することにより、Ｐ４５０の活性が確認される。本発明は、無機ピロホスファターゼ酵素（ｉＰＰアーゼ）のようなピロホスファターゼを用いる、ルシフェラーゼ阻害剤である無機ピロリン酸塩（ｉＰＰ）によるルシフェラーゼの阻害を軽減するための方法およびキットにも関する。
【背景技術】
【０００２】
酵素の存在および活性は、細胞の健康または代謝状態を決定するために用いられ得る。ある種の酵素の出現および活性はしばしば特定の細胞に特徴的であるため、酵素は細胞の種類に関するマーカーでもある。例えばある種の酵素の活性はしばしば、細菌、植物または動物起源の細胞を識別するために、あるいは該酵素を生じる特定の組織を識別するために用いられ得る。
【０００３】
酵素の存在および活性の検出は、当該酵素により変換されて少なくとも１つの測定可能な特性を有する生成物となる基質を用いれば容易になり得る。これらのレポーター分子としては、蛍光基質および発色基質が挙げられる。蛍光基質は、多くの場合、それらが非常に高い感度を有し、そして生きた単一の細胞において空間的かつ時間的に高い解像度での測定を可能にし得るため、よく用いられてきた。発色基質は非常に特異的であり得るが、高度の解像度には欠けることが多い。
【０００４】
生きている細胞の活動または細胞抽出物中の活性を測定するために有用な酵素ファミリーの１つは、シトクロムＰ４５０ファミリーである。シトクロムＰ４５０（ＣＹＰ４５０）は、細胞の増殖および発生における内因性の役割のほかに、親油性の生体異物、例えば治療薬、発癌性化学物質および環境毒素の解毒および活性化のための多数の触媒を含む、大きなヘム含有酵素ファミリーである。１または複数の代謝産物が親化合物より有毒である場合もある。しかしながら他の場合には、治療用化合物の代謝により同化合物の生物学的利用能が低減され、効力が低下する。このファミリーの遺伝子およびファミリー内の多型は、薬剤代謝、副作用の発生および重症度、ならびに治療の失敗における個体間変動に

重要な役割を果たす。

【０００５】

細菌、真菌、植物および動物などの多様な生物において数百のシトクロムＰ４５０が同定されている（１８：非特許文献１）。ＣＹＰ４５０は全て、ヘム補因子を用い、構造上の属性を共有する。ほとんどのＣＹＰ４５０は、４００～５３０アミノ酸長である。同酵素の二次構造は、約７０％のα‐ヘリックスおよび約２２％のβ‐シートである。同タンパク質のＣ末端部分のヘム結合部位周囲の領域は、シトクロムＰ４５０間で保存されている。このヘム鉄リガンド領域における１０アミノ酸のシグネチャ配列が同定されており、同配列には、第五配位部位におけるヘム鉄の結合に関与する保存システイン残基が含まれる。真核生物ＣＹＰ４５０では、一般に約１５個の疎水性残基とそれに続く正に荷電した残基とからなる、同タンパク質の最初の１５～２０アミノ酸の中に、通常は膜貫通領域が見出される（１８：非特許文献１、１９：非特許文献２）。

【０００６】

ＣＹＰ４５０をコードする遺伝子のいくつかは、ＣＹＰ４５０が代謝する化合物により転写レベルで誘導可能である（１：非特許文献３、２：非特許文献４）。ＣＹＰ４５０をコードする遺伝子は、推定アミノ酸配列の相同性に基づいたファミリーに分けられている（３：非特許文献５）。全ての哺乳類は少なくとも１４のＣＹＰ４５０ファミリーを共有するが、ほとんどの薬剤代謝は３つのファミリー：すなわちＣＹＰ１、ＣＹＰ２およびＣＹＰ３によってのみ触媒される。ヒトにおけるＰ４５０が触媒する薬剤代謝のほとんどが肝臓で起こり、約１３の酵素：すなわちＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ａ６、ＣＹＰ２Ｂ６、ＣＹＰ２Ｃ８、ＣＹＰ２Ｃ９、ＣＹＰ２Ｃ１８、ＣＹＰ２Ｃ１９、ＣＹＰ２Ｄ６、ＣＹＰ２Ｅ１、ＣＹＰ３Ａ４、ＣＹＰ３Ａ５およびＣＹＰ３Ａ７によるものとして説明される（４：非特許文献６）。

【０００７】

薬剤のクリアランス、毒性および薬剤－薬剤間相互作用においてＣＹＰ４５０が果たす中心的役割ゆえに、ＣＹＰ４５０は、薬剤開発プロセスにおいて開発をすすめるべき化合物の領域を狭めるための有用な標的を提供する（５：非特許文献７、８：非特許文献８）。さらにＣＹＰ４５０／薬剤相互作用についての知見は、患者において薬剤が示す傾向を予示し得る。ハイスループット（高処理量）方式で使用可能なスクリーニング・アッセイが必要とされている。ＣＹＰ４５０により酸化されると容易に検出可能な方法で変化する特性を有する化合物は、ＣＹＰ４５０活性に及ぼす作用を検出するためのハイスループット・アッセイにおけるプローブとして有用である（６：非特許文献９、７：特許文献１）。ＣＹＰ４５０アイソザイムに特異的であり、かつ容易に検出可能な生成物を生じる基質を用いて、生理学的条件下で細胞中の代謝活性を分析するための方法も必要とされている。シグナルは、細胞の無細胞の細胞抽出物中ならびに生きている細胞中で検出可能である必要があり、かつアッセイのバックグラウンドシグナルは低くなければならない。

【０００８】

最後に、ルシフェラーゼの阻害剤である無機ピロリン酸塩からルシフェラーゼ活性を保護することが必要である。本発明人等にはピロリン酸塩の供給源を限定する意図はないが、ピロリン酸塩は、ルシフェラーゼを用いる反応を含める緩衝液中に用いられるオルトリン酸塩中に夾雑物として存在し得るし、あるいはＡＴＰ、$Ｏ_2$およびルシフェリンとルシフェラーゼとの反応の生成物として生成され得る。

【特許文献１】米国特許第６１４３４９２号

【非特許文献１】グラハム‐ローレンス、エス．（Graham-Lorence, S.）およびジェイ．エイ．ピーターソン（J.A. Peterson ）、「Ｐ４５０：構造上の類似性ならびに機能上の相違点（P450s: Structural similarities and functional differences ）」、ジ・エフエイエスイービー・ジャーナル誌（FASEB J.）、第１０巻、ｐ．２０６‐２１４、１９９６年

【非特許文献２】ＰｒｏｓｉｔｅのＰＤＯＣ０００８１、シトクロムＰ４５０システインヘム鉄リガンドシグネチャ、１９９７年１１月

【非特許文献３】ブラック、エス．ディ．（Black, S.D. ）およびクーン、エム．ジェイ．（Coon, M.J.）、「Ｐ４５０シトクロム：構造と機能（P450 cytochromes: structure and function）、アドバンシズ・イン・エンザイモロジー・アンド・リレイテッド・エリアズ・オブ・モレキュラー・バイオロジー誌（Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. ）、第６０巻、ｐ．３５‐８７、１９８７年

【非特許文献４】フィリップス、アイ．アール．（Phillips, I.R.）およびシェファード、イー．エイ．（Shephard, E.A.）編、１９９８年、「シトクロムＰ４５０のプロトコール（Cytochrome P450 protocols ）」、第１０７巻、ｐ．ｖ‐ｖｉ

【非特許文献５】ネルソン、ディ．アール．（Ne lson, D.R.）ら、１９９６年、「Ｐ４５０スーパーファミリー：新規配列、遺伝子マッピング、アクセス番号および命名の最新版（P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature ）」、ファーマコジェネティクス誌（Pharmacogenetics）、第６巻、ｐ．１‐４２

【非特許文献６】ライトン、エス．エイ．（Wrighton, S.A.）およびスティーブンス、ジェイ．シー．（Stevens, J.C. ）、１９９２年、「薬剤代謝に関与するヒト肝臓シトクロムＰ４５０（The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism）」、クリティカル・レビューズ・イン・トキシコロジー誌（Critical Reviews in Toxicology ）、第２２巻第１号、ｐ．１‐２１

【非特許文献７】フリッキンガー、ビー．（Flickinger, B.）、２００１年、「開発初期における代謝データの利用（Using metabolism data in early development）」、ドラッグ・ディスカバリー・アンド・ディベロプメント誌（Drug Disc. Dev. ）、第４巻第９号、ｐ．５３‐５６

【非特許文献８】ハードマン、ジェイ．ジー．（Hardman, J.G. ）ら編、「治療の薬理学的基礎（The Pharmacological Basis of Therapeutics ）第９版」ｐｐ．１‐２７、マグローヒル（McGraw-Hill ）、１９９６年

【非特許文献９】ミラー、ブイ．ピー．（Miller, V.P.）ら、２０００年、「シトクロムＰ４５０阻害剤のハイスループット蛍光スクリーニング（Fluorometrichigh-throughput screening for inhibitors of Cytochrome P450）」、アナルズ・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンシズ誌（Ann. NY Acad. Sci.）、第９１９巻、ｐ．２６‐３２

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

ハイスループット（高処理量）方式で使用可能なスクリーニング・アッセイが必要とされている。ＣＹＰ４５０アイソザイムに特異的であり、かつ容易に検出可能な生成物を生じる基質を用いて、生理学的条件下で細胞中の代謝活性を分析するための方法も必要とされている。シグナルは、細胞の無細胞の細胞抽出物中ならびに生きている細胞中で検出可能である必要があり、かつアッセイのバックグラウンドシグナルは低くなければならない。ルシフェラーゼの阻害剤である無機ピロリン酸塩からルシフェラーゼ活性を保護することが必要である。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

［発明の概要］

特異性の高い様式でシトクロムＰ４５０酵素に影響を及ぼす化合物、例えば薬剤候補を同定し得る方法、基質化合物およびキットを提供することにより、出願人等は上記の必要を満たした。

【００１１】

本発明は、Ｐ４５０の基質またはＰ４５０の二重基質および生物発光酵素の基質前駆体として有用な発光原分子を提供する。本発明の一実施形態では、発光原分子は（４Ｓ）－４，５－ジヒドロ－２－（６－ヒドロキシ－ベンゾチアゾリル）－４－チアゾールカルボ

ン酸（Ｄ－ルシフェリン）または２－（４－ヒドロキシベンジル）－６－（４－ヒドロキシフェニル）－８－ベンジル－３，７－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］ピラジン－３－オン（セレンテラジン）の誘導体であり、同誘導体はＰ４５０基質でありルシフェラーゼの基質前駆体である。事前にＰ４５０により代謝されない場合、これらのルシフェリン誘導体は単独では発光反応においてルシフェラーゼと相互作用する能力に限界があるか、または相互作用する能力がない。これらの化合物は、ＣＹＰ４５０により選択的に変換されてルシフェラーゼ反応のための発光性基質となることにより、発光の読取りを伴うアッセイの基礎を提供する。

【００１２】

本発明は、天然セレンテラジンおよびセレンテラジン誘導体（包括してセレンテラジンと呼ぶ）である発光原分子を用いるＰ４５０活性の直接的および間接的決定のための方法も提供する。

【００１３】

本発明は、候補薬剤（または候補薬剤群）がＣＹＰ４５０酵素の基質もしくはレギュレータ（調節因子）またはＣＹＰ４５０遺伝子のレギュレータであるか否かを決定するための発光原分子の使用方法、ならびに少なくとも１つのＣＹＰ４５０酵素によりそれほど効率的に代謝されない、および／または少なくとも１つのＣＹＰ４５０酵素の阻害剤として作用しないか望ましくない薬剤－薬剤相互作用を発揮しないかのうち少なくともいずれかである候補薬剤を選択するための関連方法も提供する。本発明の候補薬剤（または薬剤候補のライブラリー）のスクリーニング方法は、無細胞の、細胞を用いる、組織を用いる、または動物を用いる環境中での一段階または二段階のＣＹＰ４５０／生物発光酵素の方法により実施されてもよいし、あるいは薬剤候補ライブラリーのハイスループットスクリーニングまたは超ハイスループットスクリーニングの一部であってもよい。

【００１４】

本発明は、夾雑物として存在するか、あるいはルシフェラーゼとＡＴＰ、Ｏ２およびルシフェリンとの反応の生成物として生成され得るルシフェラーゼ阻害剤である無機ピロリン酸塩（ｉＰＰ）によるルシフェラーゼの阻害を軽減するための方法およびキットも提供する。

【００１５】

本発明は、ルシフェラーゼを用いる反応において発光シグナルを増強しまたは安定化するための、可逆的ルシフェラーゼ阻害剤を用いる方法およびキットも提供する。

したがって、本発明の一実施形態では、シトクロムＰ４５０酵素の活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、

（ｂ）発光原分子を少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素および少なくとも１つの生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および

（ｃ）反応混合物の発光を測定することによりシトクロムＰ４５０活性を決定することを包含する方法が提供される。

【００１６】

本発明のこの実施形態の一態様では、工程（ｂ）がピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

本発明のこの実施形態の別の態様では、発光原分子、シトクロムＰ４５０酵素および生物発光酵素をほぼ同時に接触させる。

【００１７】

本発明のこの実施形態の別の態様では、発光原分子を少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素と接触させて一次反応混合物を作製した後、生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する。

【００１８】

本発明のこの実施形態の別の態様では、二次反応混合物が界面活性剤、好ましくは非イ

オン性界面活性剤をさらに含む。

本発明の別の実施形態では、細胞におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、

（ｂ）細胞を発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および

（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより細胞のシトクロムＰ４５０活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００１９】

本発明のこの実施形態の一態様では、細胞は組換え体であり生物発光酵素を発現する。

本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）において細胞をさらに溶解試薬と接触させる。

【００２０】

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を工程（ｂ）の前に溶解させる。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を工程（ｃ）の前に溶解させる。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を最初に発光原分子と接触させて一次反応混合物を作製した後、生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する。二次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、および／またはピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含んでいてもよい。

【００２１】

本発明の別の実施形態では、動物組織におけるシトクロムＰ４５０の酵素活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、

（ｂ）動物組織を発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製すること、および

（ｃ）混合物の発光を測定することにより組織のシトクロムＰ４５０活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００２２】

本発明のこの実施形態の一態様では、組織を最初に発光原分子と第１の所定時間接触させた後、生物発光酵素と接触させて二次混合物を作製する。二次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤および／またはピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含んでいてもよい。

【００２３】

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロムＰ４５０の酵素活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、

（ｂ）発光原分子を動物に投与すること、

（ｃ）動物から生物学的試料を得ること、および

（ｄ）生物学的試料を生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および

（ｅ）発光を測定することにより動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００２４】

本発明のこの実施形態の一態様では、反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、および／またはピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを

含む。
【００２５】
本発明の別の実施形態では、生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物におけるシトクロムＰ４５０の酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｂ）生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物に発光原分子を投与すること、および
（ｃ）トランスジェニック動物からの組織の発光を測定することにより動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法が提供される。
【００２６】
本発明のこの実施形態の別の態様では、生物発光酵素の導入遺伝子はルシフェラーゼ導入遺伝子である。
本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０活性に及ぼす化合物の作用について化合物をスクリーニングする方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、
（ｂ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供すること、
（ｃ）化合物、発光原分子、少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素、および生物発光酵素を接触させることにより反応混合物を作製すること、および
（ｄ）反応混合物の発光を測定することにより、化合物とシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０活性（もしあれば）を決定すること
を包含する方法が提供される。
【００２７】
本発明のこの実施形態の一態様では、化合物、発光原分子、シトクロムＰ４５０酵素、および生物発光酵素をほぼ同時に接触させる。
本発明のこの実施形態の別の態様では、化合物、発光原分子および少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素を最初に接触させて一次反応混合物を作製した後、生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する。二次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、および／またはピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含む。
【００２８】
本発明のこの実施形態の別の態様では、化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させて一次反応混合物を作製し、次に一次反応混合物を発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製し、次に二次反応混合物を生物発光酵素と接触させて三次反応混合物を作製する。三次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、および／またはピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含み得る。
【００２９】
本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を試験化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させる工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であることを特徴とする工程、および
（ｃ）細胞からの発光を測定し、試験化合物に曝露されていない第２の細胞と比較することにより、試験化合物への細胞の曝露の結果得られる細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。
【００３０】

本発明のこの実施形態の一態様では、細胞が組換え体であり、生物発光酵素を発現する。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を最初に化合物と接触させて一次反応混合物を作製した後、発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製する。二次混合物はさらに、生物発光酵素を含み得る。生物発光酵素は、所定時間を経た後で二次反応混合物に添加されてもよい。二次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、および／またはピロリン酸塩、例えば無機ピロリン酸塩を含む。

【００３１】

本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）はさらに、ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含む。

本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：

（ａ）試験化合物を提供する工程、

（ｂ）動物組織を、試験化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させる工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であることを特徴とする工程、および

（ｃ）組織からの発光を測定し、試験化合物に曝露されていない対照組織と比較することにより、試験化合物への組織の曝露の結果得られる組織のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程

を包含する方法が提供される。

【００３２】

本発明のこの実施形態の一態様では、動物組織が生物発光酵素を発現する。

本発明のこの実施形態の別の態様では、組織を試験化合物と接触させて一次混合物を作製した後、発光原分子と接触させて二次混合物を作製する。二次混合物は生物発光酵素をさらに含む。生物発光酵素は、所定時間を経た後に二次反応混合物に添加されてもよい。二次反応混合物はさらに、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤を含み得る。

【００３３】

本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）はさらに、ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含み得る。

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：

（ａ）試験するための化合物を提供すること、

（ｂ）試験化合物を動物に投与すること、

（ｃ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を動物に投与すること、

（ｄ）動物から生物学的試料を得ること、

（ｅ）生物学的試料を生物発光酵素と接触させること、および

（ｆ）生物学的試料からの発光を測定し、試験化合物に曝露されていない動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、動物を試験化合物へ曝露した後の該動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００３４】

本発明のこの実施形態の一態様では、工程（ｃ）は工程（ｂ）の後に所定時間が経過した後で実施される。

本発明のこの実施形態の別の態様では、試験化合物への曝露の直前に動物から生物学的試料が採取される。

【００３５】

本発明のこの実施形態の別の態様では、生物学的試料は血液、血清、胆汁、尿、糞便または組織を含む。

本発明の別の実施形態では、生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動

物におけるシトクロムＰ４５０酵素の活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：

（ａ）試験するための化合物を提供すること、

（ｂ）生物発光酵素の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物に試験化合物を投与すること、

（ｃ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を動物に投与すること、および

（ｄ）トランスジェニック動物からの組織の発光を測定し、試験化合物に曝露されていない別のトランスジェニック動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、動物を試験化合物に曝露した後の該動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００３６】

本発明のこの実施形態の一態様では、工程（ｃ）は工程（ｂ）の後に所定時間が経過した後で実施される。

本発明のこの実施形態の別の態様では、生物発光酵素の導入遺伝子はルシフェラーゼ導入遺伝子である。

【００３７】

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、

（ｂ）スクリーニングしようとする化合物を（ｉ）シトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子；（ｉｉ）１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素；および（ｉｉｉ）１つまたは複数の生物発光酵素と接触させることにより各々１つまたは複数の化合物を有する反応混合物を作製すること、ならびに

（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０の酵素活性（もしあれば）を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００３８】

本発明のこの実施形態の一態様では、化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させて一次反応混合物を作製し、次に一次反応混合物を発光原分子と接触させて二次反応混合物を作製し、そして次に二次反応混合物を生物発光酵素と接触させて三次反応混合物を作製する。三次反応混合物は界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤をさらに含んでもよい。

【００３９】

本発明のこの実施形態の別の態様では、化合物を最初に１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素および発光原分子と接触させて一次反応混合物を作製した後、１つまたは複数の生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する。二次反応混合物は界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤をさらに含んでもよい。

【００４０】

本発明のこの実施形態の別の態様では、化合物を１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素および発光原分子と同時にまたは同時期に接触させて一次反応混合物を作製した後、１つまたは複数の生物発光酵素と接触させて二次反応混合物を作製する。

【００４１】

本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）がピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットの

スクリーニング方法であって、以下の：

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、

（ｂ）細胞を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および１つまたは複数の生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および

（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０の酵素活性（もしあれば）を決定する工程を包含する方法が提供される。

【００４２】

本発明のこの実施形態の一態様では、細胞は組換え体であり、生物発光酵素を発現する。

本発明のこの実施形態の別の態様では、外来の供給源由来の生物発光酵素が用いられる。

【００４３】

本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）および／または工程（ｃ）がピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させ、次に生物発光酵素と第２の所定時間接触させる。第２の所定時間において、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤が存在していてもよい。

【００４４】

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、そして次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる。第３の所定時間において、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤が混合物中に存在していてもよい。

【００４５】

本発明の別の実施形態では、細胞を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる。

【００４６】

本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、

（ｂ）動物組織を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および１つまたは複数の生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および

（ｃ）反応混合物の発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程

を包含する方法が提供される。

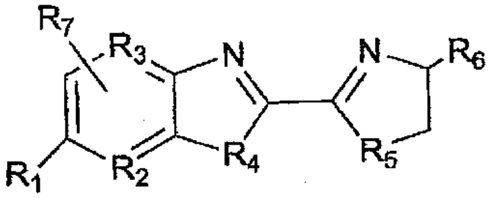
【００４７】

本発明のこの実施形態の一態様では、組織が少なくとも１つの生物発光酵素を発現する。

本発明のこの実施形態の別の態様では、組織を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させた後、生物発光酵素と接触させる。界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤を第１の所定時間の後に添加してもよい。界面活性剤および生物発光酵素を同時に添加してもよい。

【００４８】
本発明のこの実施形態の別の態様では、界面活性剤が生物発光酵素の添加の前に添加される。
本発明のこの実施形態の別の態様では、組織を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる。界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤を第２の所定時間の後に添加してもよい。界面活性剤および生物発光酵素を同時に添加してもよい。界面活性剤および生物発光酵素を同時に添加してもよい。
【００４９】
本発明のこの実施形態の別の態様では、組織を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる。
本発明のこの実施形態の別の態様では、組織、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる。
【００５０】
本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）または工程（ｃ）が（ｉｖ）ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。
本発明の別の実施形態では、動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）生きている硬骨魚を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子および生物発光酵素と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、発光原分子はシトクロムＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であり、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および
（ｃ）試験化合物を含む反応混合物の発光を測定して試験化合物を含まない対照混合物と比較することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。
【００５１】
本発明のこの実施形態の一態様では、硬骨魚がトランスジェニック体であり、かつ生物発光酵素を発現する。
本発明のこの実施形態の別の態様では、硬骨魚を最初に化合物および発光原分子と第１の所定時間接触させた後、生物発光酵素と接触させる。
【００５２】
本発明のこの実施形態の別の態様では、硬骨魚を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光原分子と第２の所定時間接触させ、その次に生物発光酵素と第３の所定時間接触させる。
【００５３】
本発明のこの実施形態の別の態様では、硬骨魚を最初に化合物と第１の所定時間接触させ、次に発光分子および生物発光酵素と第２の所定時間接触させる。
本発明のこの実施形態の別の態様では、硬骨魚、化合物、発光原分子および生物発光酵素を同時に接触させる。
【００５４】
本発明のこの実施形態の別の態様では、工程（ｂ）または工程（ｃ）が（ｉｖ）ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。
本発明の別の実施形態では、上記方法のいずれかにおいて、発光原分子がルシフェリン誘導体であり、生物発光酵素がルシフェラーゼである。好ましくは、ルシフェリン誘導体が次式：
【００５５】

【化１】



（式中、

Ｒ$_{1}$は、水素、ヒドロキシル、アミノ、Ｃ$_{1-20}$アルコキシ、置換Ｃ$_{1-20}$アルコキシ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルオキシ、置換Ｃ$_{2-20}$アルケニルオキシ、ハロゲン化Ｃ$_{2-20}$アルコキシ、置換ハロゲン化Ｃ$_{2-20}$アルコキシ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルオキシ、置換Ｃ$_{3-20}$アルキニルオキシ、Ｃ$_{3-20}$シクロアルコキシ、置換Ｃ$_{3-20}$シクロアルコキシ、Ｃ$_{3-20}$シクロアルキルアミノ、置換Ｃ$_{3-20}$シクロアルキルアミノ、Ｃ$_{1-20}$アルキルアミノ、置換Ｃ$_{1-20}$アルキルアミノ、ジＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、置換ジＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルアミノ、置換Ｃ$_{2-20}$アルケニルアミノ、ジＣ$_{2-20}$アルケニルアミノ、置換ジＣ$_{2-20}$アルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、置換Ｃ$_{2-20}$アルケニルＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルアミノ、置換Ｃ$_{3-20}$アルキニルアミノ、ジＣ$_{3-20}$アルキニルアミノ、置換ジアルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルＣ$_{2-20}$アルケニルアミノまたは置換Ｃ$_{3-20}$アルキニルＣ$_{2-20}$アルケニルアミノを表し、

Ｒ$_{2}$およびＲ$_{3}$は、独立してＣまたはＮを表し、

Ｒ$_{4}$およびＲ$_{5}$は、独立してＳ、Ｏ、ＮＲ$_{8}$（ここでＲ$_{8}$は水素またはＣ$_{1-20}$アルキルを表す）、ＣＲ$_{9}$Ｒ$_{10}$（ここで、Ｒ$_{9}$およびＲ$_{10}$は独立してＨ、Ｃ$_{1-20}$アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

Ｒ$_{6}$は、ＣＨ$_{2}$ＯＨ、ＣＯＲ$_{11}$（ここで、Ｒ$_{11}$はＨ、ＯＨ、Ｃ$_{1-20}$アルコキシド、Ｃ$_{2-20}$アルケニルまたはＮＲ$_{12}$Ｒ$_{13}$（ここで、Ｒ$_{12}$およびＲ$_{13}$は独立してＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルを表す）を表す）または－ＯＭ$^{+}$（ここで、Ｍ$^{+}$はアルカリ金属または製薬上許容可能な塩を表す）を表し、

Ｒ$_{7}$は、Ｈ、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-20}$アルケニル、ハロゲンまたはＣ$_{1-6}$アルコキシドを表すが、

ただし、同時にＲ$_{1}$がＯＨまたはＮＨ$_{2}$であり、Ｒ$_{7}$がＨであり、Ｒ$_{6}$がＣＯＲ$_{11}$であり、Ｒ$_{11}$がＯＨであり、Ｒ$_{3}$およびＲ$_{2}$がともに炭素であり、かつＲ$_{4}$およびＲ$_{5}$がともにＳである（ルシフェリンおよびアミノルシフェリン）ということはない）

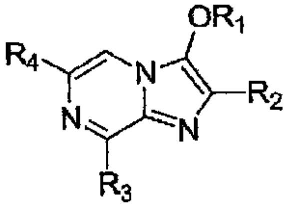
を有する。

【００５６】

本発明の別の実施形態では、上記方法のいずれかにおいて、発光原分子がセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を含み、生物発光酵素がルシフェラーゼである。好ましくは、セレンテラジン誘導体が次式：

【００５７】

【化２】



（式中、

Ｒ$_{1}$は、Ｃ$_{1-20}$アルキル、分枝鎖Ｃ$_{3-20}$アルキル、Ｃ$_{3-20}$シクロアルキル、アラルキル、Ｃ$_{1-20}$アルキルであってＣ$_{1-20}$アルコキシ、ヒドロキシ、ハロ

ゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、かつ

　R_2、R_3およびR_4は、独立して水素、C_{1-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、アリール、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアリールである）

を有する。好ましくは、R_4がアリールあるいはC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはC_{1-20}ジアルキルアミノで置換されたアリールである。

【００５８】

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす物質の作用を決定するためのキットであって、以下の：

（ａ）シトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体である１つまたは複数の発光原分子、および

（ｂ）キットを使用するための使用説明書

を含むキットが提供される。

【００５９】

本発明のこの実施形態の一態様では、キットはさらに、１つまたは複数の生物発光酵素、例えばルシフェラーゼを含む。ルシフェラーゼの例としては、ホタルルシフェラーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６０】

本発明のこの実施形態の別の態様では、キットはＡＴＰおよびマグネシウムイオンをさらに含む。

本発明のこの実施形態の別の態様では、キットは、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤をさらに含む。

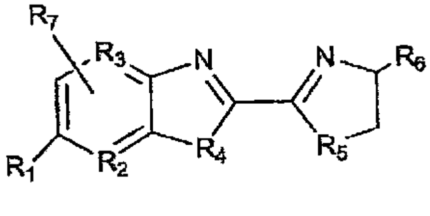
【００６１】

本発明のこの実施形態の別の態様では、キットは、ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

本発明のこの実施形態の別の態様では、発光原分子がシトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体であるＤ－ルシフェリン誘導体である。好ましくは、ルシフェリン誘導体が次式：

【００６２】

【化３】



（式中、

　R_1は、水素、ヒドロキシル、アミノ、C_{1-20}アルコキシ、置換C_{1-20}アルコキシ、C_{2-20}アルケニルオキシ、置換C_{2-20}アルケニルオキシ、ハロゲン化C_{2-20}アルコキシ、置換ハロゲン化C_{2-20}アルコキシ、C_{3-20}アルキニルオキシ、置換C_{3-20}アルキニルオキシ、C_{3-20}シクロアルコキシ、置換C_{3-20}シ

クロアルコキシ、C_{3-20}シクロアルキルアミノ、置換C_{3-20}シクロアルキルアミノ、C_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{1-20}アルキルアミノ、ジC_{1-20}アルキルアミノ、置換ジC_{1-20}アルキルアミノ、C_{2-20}アルケニルアミノ、置換C_{2-20}アルケニルアミノ、ジC_{2-20}アルケニルアミノ、置換ジC_{2-20}アルケニルアミノ、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルアミノ、置換C_{3-20}アルキニルアミノ、ジC_{3-20}アルキニルアミノ、置換ジC_{3-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{1-20}アルキルアミノ、置換C_{3-20}アルキニルC_{1-20}アルキルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノまたは置換C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノを表し、

R_2およびR_3は、独立してＣまたはＮを表し、

R_4およびR_5は、独立してＳ、Ｏ、NR_8（ここでR_8は水素またはC_{1-20}アルキルを表す）、CR_9R_{10}（ここで、R_9およびR_{10}は独立してＨ、C_{1-20}アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

R_6は、CH_2OH、COR_{11}（ここで、R_{11}はＨ、ＯＨ、C_{1-20}アルコキシド、C_{2-20}アルケニルまたは$NR_{12}R_{13}$（ここで、R_{12}およびR_{13}は独立してＨまたはC_{1-20}アルキルを表す）を表す）または$-OM^+$（ここで、M^+はアルカリ金属または製薬上許容可能な塩を表す）を表し、

R_7は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、C_{1-20}アルケニル、ハロゲンまたはC_{1-6}アルコキシドを表すが、

ただし、同時にR_1がＯＨまたはNH_2であり、R_7がＨであり、R_6がCOR_{11}であり、R_{11}がＯＨであり、R_3およびR_2がともに炭素であり、かつR_4およびR_5がともにＳである（ルシフェリンおよびアミノルシフェリン）ということはない）

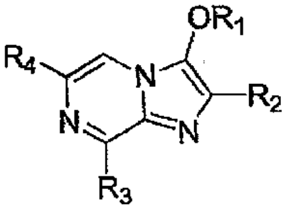
を有する。

【００６３】

本発明のこの実施形態の別の態様では発光原分子がセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を含む。好ましくは、セレンテラジン誘導体が次式：

【００６４】

【化４】



（式中、

R_1は、C_{1-20}アルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、かつ

R_2、R_3およびR_4は、独立して水素、C_{1-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、アリール、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されたアリールである）

を有する。好ましくは、Ｒ$_{4}$がアリールあるいはアリールであってＣ$_{1-20}$アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、Ｃ$_{1-20}$アルキルアミノまたはＣ$_{1-20}$ジアルキルアミノで置換されたアリールである。

【００６５】

本発明のこの実施形態の別の態様では、キットは、可逆的ルシフェラーゼ阻害剤をさらに含む。好ましくは、可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）である。

【００６６】

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体であるＤ－ルシフェリン誘導体が提供される。

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０酵素の基質でありかつルシフェラーゼ酵素の基質前駆体であるＤ－ルシフェリン誘導体を含む組成物が提供される。

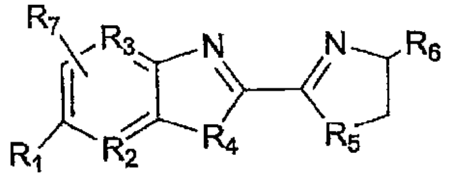
【００６７】

本発明のこの実施形態の一態様では、組成物はピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

本発明の別の実施形態では、次式：

【００６８】

【化５】



（式中、

Ｒ$_{1}$は、水素、ヒドロキシ、Ｃ$_{1-20}$アルコキシまたはＣ$_{1-20}$アルケニルオキシを表し、この場合、アルコキシおよびアルケニルオキシはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、アジド、ヘテロアリール、またはハロアルキルで置換されたアリールで置換されており、あるいは

Ｒ$_{1}$は、Ｃ$_{3-20}$アルキニルオキシ、シクロアルコキシ、シクロアルキルアミノ、Ｃ$_{1-20}$アルキルアミノ、ジＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルアミノ、ジＣ$_{2-20}$アルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルＣ$_{1-20}$アルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルアミノ、ジＣ$_{3-20}$アルキニルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルＣ$_{1-20}$アルキルアミノまたはＣ$_{3-20}$アルキニルＣ$_{2-20}$アルケニルアミノを表し、この場合、上記の基は各々任意選択で、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、アジド、ヘテロアリール、またはハロアルキルで置換されたアリールで置換されており、

Ｒ$_{2}$およびＲ$_{3}$は、独立してＣまたはＮを表し、

Ｒ$_{4}$およびＲ$_{5}$は、独立してＳ、Ｏ、ＮＲ$_{8}$（ここでＲ$_{8}$は水素またはＣ$_{1-20}$アルキルを表す）、ＣＲ$_{9}$Ｒ$_{10}$（ここで、Ｒ$_{9}$およびＲ$_{10}$は独立してＨ、Ｃ$_{1-20}$アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

Ｒ$_{6}$は、ＣＨ$_{2}$ＯＨ、ＣＯＲ$_{11}$（ここで、Ｒ$_{11}$は水素、ヒドロキシ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルまたは－ＯＭ$^{+}$（ここで、Ｍ$^{+}$はアルカリ金属または製薬上許容可能な塩である）を表す）を表し、

Ｒ$_{7}$は、水素、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{2-20}$アルケニル、ハロゲンまたはＣ$_{1-6}$アルコキシドを表すが、

ただし、

Ｒ$_{1}$がヒドロキシである場合、Ｒ$_{7}$が水素、Ｒ$_{11}$がヒドロキシ、Ｒ$_{2}$およびＲ$_{3}$がともに炭素、かつＲ$_{4}$およびＲ$_{5}$がともにＳである（ルシフェリン）ということはなく、

Ｒ$_{1}$が水素である場合、Ｒ$_{7}$が水素、Ｒ$_{11}$がヒドロキシ、Ｒ$_{2}$およびＲ$_{3}$がともに

炭素、かつ$Ｒ_4$および$Ｒ_5$がともにＳである（デヒドロルシフェリン）ということはなく、そして

$Ｒ_1$がヒドロキシである場合、$Ｒ_7$が水素、$Ｒ_6$が$ＣＨ_2ＯＨ$、$Ｒ_2$および$Ｒ_3$がともに炭素、かつ$Ｒ_4$および$Ｒ_5$がともにＳである（ルシフェロール）ということはない）

を有するＤ－ルシフェリン誘導体が提供される。

【００６９】

本発明のこの実施形態の一態様では、化合物が以下の：

ルシフェリン６’２－クロロエチルエーテル、

ルシフェリン６’４－ピコリニルエーテル、

ルシフェリン６’４－トリフルオロメチルベンジルエーテル、

ルシフェリン６’２－ピコリニルエーテル、または

ルシフェリン６’３－ピコリニルエーテル

からなる群から選択される。

【００７０】

本発明のこの実施形態の別の態様では、化合物が以下の：

ルシフェリン６’ベンジルエーテル、

ルシフェリン６’４－トリフルオロメチルベンジルエーテル、

ルシフェリン６’フェニルエチルエーテル、

ルシフェリン６’ゲラニルエーテル、または

ルシフェリン６’プレニルエーテル

からなる群から選択される。

【００７１】

本発明のこの実施形態の別の態様では、Ｄ－ルシフェリン誘導体を含む組成物が提供される。組成物はさらに、ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼを含み得る。

【００７２】

本発明の別の実施形態では、Ｐ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）Ｐ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、

（ｂ）セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素と接触させることにより反応混合物を作製すること、および

（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することによりシトクロムＰ４５０活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００７３】

本発明の別の実施形態では、細胞におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：

（ａ）Ｐ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、

（ｂ）細胞をセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製すること、および

（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより細胞のシトクロムＰ４５０活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００７４】

本発明のこの実施形態の一態様では、工程（ｂ）の細胞をさらに溶解試薬と接触させる。

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を工程（ｂ）の前に溶解させる。

【００７５】

本発明のこの実施形態の別の態様では、細胞を工程（ｃ）の前に溶解させる。

本発明の別の実施形態では、動物組織におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）動物組織をセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体および生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製すること、および
（ｃ）混合物の化学発光を測定することにより組織のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法が提供される。
【００７６】
本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性の測定方法であって、以下の：
（ａ）Ｐ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｂ）セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を動物に投与すること、
（ｃ）動物から生物学的試料を得ること、および
（ｄ）試料の化学発光を測定することにより動物のシトクロムＰ４５０活性を決定すること
を包含する方法が提供される。
【００７７】
本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０活性に及ぼす化合物の作用に関する化合物のスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供すること、
（ｂ）シトクロムＰ４５０の基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を提供すること、
（ｃ）化合物、セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体およびシトクロムＰ４５０酵素を接触させることにより反応混合物を作製すること、および
（ｄ）反応混合物の化学発光を測定することにより、化合物とシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０活性（もしあれば）を決定すること
を包含する方法が提供される。
【００７８】
本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験するための化合物を提供する工程、
（ｂ）細胞を、試験化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させる工程、ならびに
（ｃ）細胞からの化学発光を測定し、試験化合物に曝露されていない第２の細胞と比較することにより、試験化合物への細胞の曝露の結果得られる細胞のシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。
【００７９】
本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：
（ａ）試験化合物を提供する工程、
（ｂ）動物組織を、試験化合物、およびシトクロムＰ４５０基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させる工程、ならびに
（ｃ）組織からの化学発光を測定し、試験化合物に曝露されていない対照組織と比較することにより、試験化合物への組織の曝露の結果得られる組織のシトクロム活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。

【００８０】

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす化合物の作用を決定する方法であって、以下の：

（ａ）試験するための化合物を提供すること、

（ｂ）試験化合物を動物に投与すること、

（ｃ）シトクロムＰ４５０基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を投与すること、

（ｄ）動物から生物学的試料を得ること、および

（ｅ）生物学的試料からの化学発光を測定し、試験化合物に曝露されていない動物から採取された第２の生物学的試料と比較することにより、試験化合物への動物の曝露後の動物のシトクロムＰ４５０酵素活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【００８１】

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、

（ｂ）スクリーニングしようとする化合物を（ｉ）シトクロムＰ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体；および（ｉｉ）１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素と接触させる工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに

（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程

を包含する方法が提供される。

【００８２】

本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、

（ｂ）細胞を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、ならびに

（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程

を包含する方法が提供される。

【００８３】

本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：

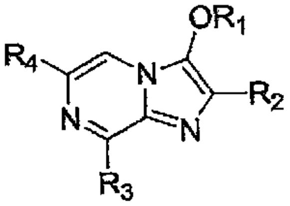
（ａ）ＣＹＰ４５０活性を有する動物組織を提供する工程、

（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、

（ｂ）動物組織を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および

（ｃ）反応混合物の化学発光を測定することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素

活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。
【００８４】
本発明の別の実施形態では、動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす複数の化合物の作用を決定するために複数の化合物を迅速にスクリーニングするためのハイスループットのスクリーニング方法であって、以下の：
（ａ）スクリーニングするための化合物を提供する工程、
（ｂ）生きている硬骨魚を、スクリーニングしようとする化合物、およびシトクロムＰ４５０の基質でありかつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体と接触させることにより反応混合物を作製する工程であって、反応混合物は各々１つまたは複数の化合物を有することを特徴とする工程、および
（ｃ）試験化合物を含む反応混合物の化学発光を測定して試験化合物を含まない対照混合物と比較することにより、１つまたは複数の化合物と１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素との相互作用の結果得られるシトクロムＰ４５０酵素活性（もしあれば）を決定する工程
を包含する方法が提供される。
【００８５】
本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０基質であり、かつ化学発光性であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体が関与する上記方法のいずれかにおいて、好ましくはセレンテラジン誘導体が次式：
【００８６】
【化６】



（式中、
R_1は、C_{1-20}アルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されるC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されるアラルキルであり、かつ
R_2、R_3およびR_4は、独立して水素、C_{1-20}アルキル、C_{3-20}シクロアルキル、分枝鎖C_{3-20}アルキル、アリール、アラルキル、C_{1-20}アルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されるC_{1-20}アルキル、アラルキルであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されるアラルキル、アリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはジC_{1-20}アルキルアミノで置換されるアリールである）
を有する。
【００８７】
本発明のこの実施形態の一態様では、好ましくは、R_4がアリールあるいはアリールであってC_{1-20}アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C_{1-20}アルキルアミノまたはC_{1-20}ジアルキルアミノで置換されるアリールである。
【００８８】
本発明のこの実施形態の別の態様では、セレンテラジン誘導体がセレンテラジンＨＨ、

メトキシセレンテラジンＨＨまたはセレンテラジンである。
本発明の別の実施形態では、ルシフェラーゼを用いた反応混合物により生じる発光シグナルの安定性を増強する方法であって、ルシフェラーゼを、ルシフェラーゼ阻害剤の非存在下におけるルシフェラーゼを用いた同様の反応混合物中で生じる発光シグナルに比して安定性を増強し、発光シグナルの寿命を延長するのに有効な量の可逆的ルシフェラーゼ阻害剤と接触させることを包含する方法が提供される。
【００８９】
本発明のこの実施形態の一態様では、可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が拮抗阻害剤である。
本発明のこの実施形態の別の態様では、可逆的ルシフェラーゼ阻害剤が２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）を含む。
【００９０】
本発明のこの実施形態の別の態様では、阻害剤の有効量が反応混合物中約１μＭ～約１ｍＭの範囲である。
本発明のこの実施形態の別の態様では、阻害剤の有効量が反応混合物中約１μＭ～約５００μＭの範囲である。
【００９１】
本発明のこの実施形態の別の態様では、阻害剤の有効量が反応混合物中約１０μＭ～約２００μＭの範囲である。
本発明のこの実施形態の別の態様では、阻害剤の有効量が反応混合物中約１００μＭである。
【発明を実施するための最良の形態】
【００９２】
［発明の詳細な説明］
本明細書中で定義する場合、「シトクロムＰ４５０」または「ＣＹＰ４５０」または「Ｐ４５０酵素」という用語は、別記しない限り、血中を循環する疎水性薬剤、発癌物質ならびにその他の潜在的に毒性を有する化合物および代謝産物の代謝に関与する、ヘムを含むオキシダーゼ酵素のファミリーを指す。周知のことであるが、肝臓は、高レベルの最も重要なＣＹＰ４５０混合機能オキシダーゼを含有する、生体異物代謝のための主要器官である。これらの混合機能オキシダーゼは、ＣＹＰ１Ａ、２Ａ、２Ｃ、２Ｄ、２Ｅおよび３Ａを含むサブファミリーに分けられる。これらのサブファミリー内には、しばしば「アイソザイム」または「アイソフォーム」と呼ばれる多数のヒトＰ４５０酵素が存在する。ヒトＣＹＰ３Ａ、ＣＹＰ２Ｄ６、ＣＹＰ２ＣおよびＣＹＰ１Ａアイソフォームは、薬剤代謝において重要であることが知られている（例えばマレー（Murray, M.）、23 Clin. Pharmacokinetics 132-46 （1992）参照）。ＣＹＰ３Ａ４は、明らかにヒト肝臓および小腸における主要アイソフォームであり、それらの組織中の総ＣＹＰ４５０タンパク質のそれぞれ３０％および７０％を構成する。主としてｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験に基づいて、ヒトに用いられる全薬剤の４０％～５０％の代謝はＣＹＰ３Ａ４が触媒する酸化に関連する、と概算されている（スメルおよびウィルキンソン（Thummel, K. E. & Wilkinson, G. R. ））、In Vitro and In Vivo Drug Interactions Involving Human CYP 3A, 38 Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 389-430 （1998）参照）。
【００９３】
「発光」という用語は、本明細書中で用いる場合、生物発光（すなわち生きている生物により生成される光）または化学発光（化学反応が進行した場合に生成される光）を含む。発光に関与する酵素が、生物において光を発生する目的で自然淘汰により進化したものである場合、または関与する酵素がそのような酵素の突然変異による誘導体である場合、発光反応は「生物発光反応」とも呼ばれ、関与する酵素は「生物発光酵素」とも呼ばれる。生物発光酵素の例としては、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼ、エクオリン発光タンパク質、オベリン発光タンパク質等が挙げ

られるが、これらに限定されない。

【００９４】

「発光原分子」という用語は、本明細書中で用いる場合、化学的または生化学的反応により光を生じることができる分子（例えば甲虫ルシフェリン（またはＤ－ルシフェリン）、セレンテラジン、またはその機能的類似体）を指す。発光原分子を、Ｐ４５０の基質、またはＰ４５０の基質／生物発光酵素の基質前駆体とすることができる。一般に、発光原分子は高エネルギー分子種（例えば安定化ジオキセタン）であるか、あるいは化学反応により高エネルギー分子種に変換されるかのいずれかである。化学反応は通常は、酸素、スーパーオキシドまたはペルオキシドによる酸化である。いずれの場合においても、発光原分子内のエネルギーは、化学反応により放出される。このエネルギーの少なくとも一部は光の光子として放出されるが、しかしエネルギーは他の形態、例えば熱としても放出され得る。光を生じない発光原分子は、しばしば「暗経路（dark pathway）」と呼ばれる代替的方式によりそれらのエネルギーを分散する。

【００９５】

「ルシフェリン誘導体」という用語は、本明細書中で用いる場合、Ｄ－ルシフェリンの実質的構造を有し、かつ１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素の基質でありルシフェラーゼの基質前駆体であり得る、ある種の発光原分子または化合物を指す。シトクロムＰ４５０の存在下では、該化合物はルシフェラーゼの基質であるルシフェリンへと代謝される。予めＰ４５０による代謝を受けない場合、一部の化合物（単数または複数）はルシフェリンによる反応を抑制する能力により立証されるようにルシフェラーゼと結合し得るが（データは示されていない）、光生成反応における基質としては代謝回転されない。いかなる作用理論にも縛られずに考えると、これらの化合物は、十中八九、ルシフェラーゼの拮抗阻害剤であると考えられる。

【００９６】

「セレンテラジン」という用語は、本明細書中で用いる場合、天然セレンテラジンおよびセレンテラジン誘導体を指す。セレンテラジンは、広範な種々の生物発光タンパク質、特に海洋性ルシフェラーゼの作用を受けると発光することが知られている。海洋性ルシフェラーゼの例としては、ウミシイタケルシフェラーゼ、エクオリン、カイアシルシフェラーゼ、発光エビルシフェラーゼおよびウミホタルルシフェラーゼが挙げられる。有用なセレンテラジンは米国特許出願第１０／０５３，４８２号（２００１年2月１１日出願）（この記載内容全体は、参照により本明細書に援用される）に開示されているが、これらに限定されない。セレンテラジンは、プロメガ社（PromegaCorporation ：米国ウィスコンシン州マディソン所在）から、ならびにモレキュラー・プローブス・インコーポレイテッド（Molecular Probes, Inc.：米国オレゴン州ユージーン所在）から入手可能である。セレンテラジンはまた、例えばシモムラ他（Shimomura et al.）、Biochem. J. 261: 913-20, 1989 ；イノウエ他（Inouye et al. ）Biochem. Biophys. Res. Comm. 233: 349-53, 1997；およびテラニシ他（Teranishi et al.）Anal. Biochem. 249: 37-43, 1997 に記載されているようにして合成可能である。

【００９７】

「ルシフェラーゼ」という用語は、別記しない限り、天然ルシフェラーゼまたは突然変異体ルシフェラーゼを指す。ルシフェラーゼは、天然のものの場合、生物から熟練者により容易に得られる。ルシフェラーゼが天然のものであるか、または天然ルシフェラーゼのルシフェラーゼ－ルシフェリン反応における活性を維持している突然変異体である場合、ルシフェラーゼをコードするｃＤＮＡを発現するよう形質転換された細菌、酵母、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞等の培養物から、あるいは同ルシフェラーゼをコードする核酸からルシフェラーゼを作製するためのｉｎ ｖｉｔｒｏ無細胞系から、該ルシフェラーゼを容易に得ることができる。ルシフェラーゼは、プロメガ社から入手可能である。

【００９８】

「ピロホスファターゼ」という用語は、別記しない限り、反応の進行中に生成されるか、反応混合物中にすでに存在するか、あるいは反応混合物中に導入されるピロリン酸塩を

分解または加水分解することができる任意の作用物質、例えば酵素（天然型または突然変異体）を指す。該作用物質は、ピロリン酸塩の蓄積を防止する速度で反応混合物中のピロリン酸塩の加水分解を触媒するか、または任意のその他の方法でピロリン酸塩の蓄積を防止するのに十分な濃度で添加される必要がある。必要とされる作用物質の量は、標準的な手法により容易に決定される。無機ピロホスファターゼ（ヒドロリアーゼ）は、本発明を実施するのに好ましい作用物質であるが、一方、本発明の実施に際して用いられ得る多数の酵素の種類（例えばトランスフェラーゼ、キナーゼおよびシンセターゼ）も存在する（例えば米国特許第６，２９１，１６４号（この記載内容全体は、参照により本明細書に援用される）参照）。複数のこのような酵素が組換え宿主中でクローン化され、発現されている（例えばラドール他（Ladror, U.S. et al. ）、J. Biol. Chem. 266: 16550-16555 （1991）（ピロリン酸塩：フルクトース－６－ホスフェート１－ホスホトランスフェラーゼ）；リー他（Leyh T. S. et al. ）、J. Biol. Chem. 263: 2409-2416 （1988）（ＡＴＰ：スルフェートアデニリルトランスフェラーゼ）；リー他（Leyh, T.S. et al. ）、J. Biol. Chem. 267: 10405-10410 （1992）（ＡＴＰ：スルフェートアデニリルトランスフェラーゼ）；ウェイスボーン他（Weissborn, A. C., et al.）、J. Bacteriology 176: 2611-2618 （1994）（ＵＴＰ：グルコース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ）；アレン他（Allen, T. et al.）、Mol. Biochem. Parasitol. 74: 99 （1995）（アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ボンステイン他（Vonstein, V. et al. ）、J. Babteriol. 177: 4540 （1995）（オロテートホスホリボシルトランスフェラーゼ）；チャーン他（Charng, Y. Y. et al.）、Plant Mol. Biol. 20: 37 （1992）（グルコース－１－リン酸アデニリルトランスフェラーゼ）；キムおよびスミス（Kim, D. J. and Smith, S. M. ）、Plant Mol. Biol. 26: 423 （1994）（ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ）；ジャン他（Jiang, Y. et al.）、Exp. Parasitol. 82: 73 （1996）（ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）；プラ他（Pla, J. et al. ）、Gene 165: 115 （1995）（ＡＴＰホスホリボシルトランスフェラーゼ）；フェルドマン他（Feldman, R. C. et al. ）、Infect. Immun. 60: 166 （19 92）（ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ヴィニスキー（Vinitsky, A.）、J. Bacteriol. 173:536 （1991）（ミコチネートホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ルディン他（Ludin, K. M. et al. ）、Curr. Genet. 25: 465 （1994）（アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ローズ他（Rose, A. B. et al.）、Plant Physiol. 100: 582 （1992）（アントラニレートホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ヒュージ他（Hughes, K.T. et al. ）、J. Bacteriol. 175: 479 （1993）（キノレートホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ジャガデスワラン他（Jagadeeswaran, P. et al.）、Gene 31: 309 （1984）（キサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）；ナガカワ（Nakagawa, S.）、Biosci. Biotech. Biochem. 59: 694 （1995）（ＦＭＮアデニリルトランスフェラーゼ）；マロルダおよびヴァルヴァーノ（Marolda, C. L. and Valvano, M. A. ）、J. Bacteriol. 175: 148 （1993）（マンノース－１－ホスフェートグアニリルトランスフェラーゼ）；カルマー（Kalmar, G. B. ）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6029 （1990）（コリンホスフェートシチジリルトランスフェラーゼ）；ムラーロバー他（Muller-Rober, B. et al. ）、Plant Mol. Biol. 27: 191 （1995）（グルコース－１－リン酸アデニリルトランスフェラーゼ）；シャムガム他（Shanmugam, K. et al.）、Plant Mol. Biol. 30: 281 （1996）（ｔＲＮＡヌクレオチジルトランスフェラーゼ）；ザパタ他（Zapata, G. A. et al.）、J. Biol. Chem. 264: 14769 （1989）（アシルノイラミネートシチジリルトランスフェラーゼ）；およびヴァキレンコ他（Vakylenko, S. B. et al. ）、Antiobiot. Khimioter. 38: 25 （1993）（ゲンタマイシン２’－ヌクレオチジルトランスフェラーゼ）参照）。このような酵素が用いられる場合、それは、ピロリン酸塩からリン酸基を受け取ってリン酸化生成物を生じるか、または酵素の存在下でピロリン酸基を転移させることができる基質を用いることも必要かもしれない。

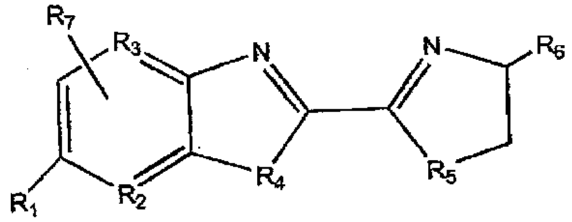
【００９９】

本発明の一実施形態では、ＣＹＰ４５０の基質でありかつルシフェラーゼの基質前駆体

であるルシフェリン誘導体が提供される。これらのルシフェリン誘導体がある種のＣＹＰ４５０アイソフォームに曝露されると、これらのアイソフォームにより該誘導体が代謝されて、酵素ルシフェラーゼの存在下で光放出反応において容易に検出可能な化合物となる。ＣＹＰ４５０の非存在下では、ルシフェリン誘導体はルシフェラーゼと結合し得るが、光生成反応における基質として代謝回転されることはない。本発明の実施に際しては、本発明のルシフェリン誘導体は好ましくは、次式：

【０１００】

【化７】



（式中、

Ｒ$_{1}$は、水素、ヒドロキシル、アミノ、Ｃ$_{1-20}$アルコキシ、置換Ｃ$_{1-20}$置換アルコキシ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルオキシ、Ｃ$_{2-20}$置換アルケニルオキシ、Ｃ$_{1-20}$ハロゲン化アルコキシ、Ｃ$_{1-20}$置換ハロゲン化アルコキシ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルオキシ、Ｃ$_{3-20}$置換アルキニルオキシ、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、シクロアルキルアミノ、置換シクロアルキルアミノ、Ｃ$_{1-20}$アルキルアミノ、Ｃ$_{1-20}$置換アルキルアミノ、Ｃ$_{1-20}$置換アルキルアミノＣ$_{1-20}$ジアルキルアミノまたはＣ$_{1-20}$置換ジアルキルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$置換アルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$ジアルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$置換ジアルケニルアミノ、Ｃ$_{2-20}$アルケニルアルキルアミノまたはＣ$_{2-20}$置換アルケニルアルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルアミノ、Ｃ$_{3-20}$置換アルキニルアミノ、Ｃ$_{3-20}$ジアルキニルアミノ、Ｃ$_{3-20}$置換ジアルキニルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルアルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$置換アルキニルアルキルアミノ、Ｃ$_{3-20}$アルキニルアルケニルアミノまたはＣ$_{3-20}$置換アルキニルアルケニルアミノを表し、

Ｒ$_{2}$およびＲ$_{3}$は、独立してＣまたはＮを表し、

Ｒ$_{4}$およびＲ$_{5}$は、独立してＳ、Ｏ、ＮＲ$_{8}$（ここでＲ$_{8}$は水素またはＣ$_{1-20}$アルキルを表す）、ＣＲ$_{9}$Ｒ$_{10}$（ここで、Ｒ$_{9}$およびＲ$_{10}$は独立してＨ、Ｃ$_{1-20}$アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

Ｒ$_{6}$は、ＣＯＲ$_{11}$（ここで、Ｒ$_{11}$はＨ、ＯＨ、Ｃ$_{1-20}$アルコキシド、Ｃ$_{2-20}$アルケニル、ＣＨ$_{2}$ＯＨまたはＮＲ$_{12}$Ｒ$_{13}$（ここで、Ｒ$_{12}$およびＲ$_{13}$は独立してＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルを表す）を表す）を表し、かつ

Ｒ$_{7}$は、Ｈ、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-20}$アルケニル、ハロゲンまたはＣ$_{1-6}$アルコキシドを表す）

を有する。

【０１０１】

本発明の実施に際しては、特に好ましいルシフェリン誘導体としては、ルシフェリン６’メチルエーテル（Ｌｕｃ　ＭＥ）、ルシフェリン６’エチルエーテル（Ｌｕｃ　ＥＥ）、ルシフェリン６’クロロエチルエーテル（Ｌｕｃ　ＣＥＥ）、ルシフェリン６’ベンジルエーテル（Ｌｕｃ　ＢＥ）、ルシフェリン６’３－ピコリニルエーテル（Ｌｕｃ　３ＰＥ）および６’デオキシルシフェリン（Ｈ　Ｌｕｃ）が挙げられる。

【０１０２】

本発明の別の実施形態では、シトクロムＰ４５０酵素の活性を測定するための方法が提供される。Ｐ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を、１つまたは複数のシトクロムＰ４５０酵素および生物発光酵素と、同時にまたは段階的に、所定時間接触させる。Ｐ４５０の存在下では、発光原分子が一次反応で代謝されて生物発光酵素のための基質となる。次に、生物発光酵素が光を生じる二次反応において基質に作

用する。シトクロムＰ４５０活性は、反応混合物から生成される発光量を測定して対照（例えばＰ４５０酵素を含まないもの）と比較することにより決定される。Ｐ４５０反応が起きるためには、Ｐ４５０レダクターゼ、ＮＡＤＰＨおよびMg^{+2}が一般に反応系に存在する。同様に、ホタルルシフェラーゼの活性にはＡＴＰおよびMg^{+2}の存在が一般に必要であるが、ウミシイタケルシフェラーゼの活性には必要ない。任意の適切な濃度の発光原分子を、反応混合物中に用いればよい。本発明の実施に際しては、発光原分子の濃度は一般に約１０ｎＭ～１ｍＭの範囲にあり、好ましくは特定のＰ４５０アイソフォームによる基質用量と応答の直線域にあり、最も好ましくは特定の基質／Ｐ４５０アイソフォーム反応についてＫｍ、またはその反応についてＶｍａｘとなる濃度である。

【０１０３】

本発明は、天然セレンテラジンおよびセレンテラジン誘導体（包括的にセレンテラジンと呼ばれる）である発光原分子を用いた、Ｐ４５０活性を決定するための方法も提供する。Ｐ４５０は、２つのうち一方の様式でこれらの発光原分子に作用する。一反応経路では、発光原分子はＰ４５０の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体であるが、特徴的なセレンテラジンの化学発光（生物発光酵素、例えばウミシイタケ型ルシフェラーゼの非存在下での発光）を示さない。一次反応におけるＰ４５０による発光原分子の代謝により、ウミシイタケルシフェラーゼのための基質が生成される。次にウミシイタケルシフェラーゼが光を発生する二次反応において基質に作用する。次に、反応混合物の発光を測定して対照反応混合物と比較することにより、Ｐ４５０活性が確認される。第２の反応経路では、セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体は化学発光を示し、かつウミシイタケ型ルシフェラーゼのための基質である。このような発光原分子がＰ４５０により代謝されると、化学発光およびウミシイタケ型ルシフェラーゼとの反応性を損失する。いずれのタイプの反応経路においても、Ｐ４５０の活性を、Ｐ４５０単独の作用による化学発光の変化により直接的に、あるいはウミシイタケ型ルシフェラーゼからの生物発光の変化により間接的に検出可能である。有用なセレンテラジンは米国特許出願第１０／０５３，４８２号（２００１年２月１１日出願）（この記載内容全体は、参照により本明細書に援用される）に開示されているが、これらに限定されない。

【０１０４】

ルシフェラーゼ類は、それらがルシフェラーゼ－ルシフェリン反応において活性を有するｐＨ、イオン強度、温度、ＡＴＰ濃度、マグネシウムイオン濃度、ルシフェリン濃度等の条件の範囲において多少異なっている。同様に、シトクロムＰ４５０酵素も、それらが活性を有するｐＨ、イオン強度、温度、補因子の要求性、基質濃度等の条件の範囲において多少異なっている。しかしながら、任意の特定のルシフェラーゼおよび任意の特定のシトクロムＰ４５０酵素に関して、このような範囲を、そして最適範囲をさえ、当業者が確認するのは簡単なことである。本発明の実施に際しては、反応混合物中に用いられ得るルシフェラーゼ酵素の量は、一般に約０．１μｇ／ｍＬ～約２００μｇ／ｍＬ、好ましくは約０．５μｇ／ｍＬ～約１００μｇ／ｍＬの範囲である。反応混合物中に用いられ得るＰ４５０酵素の量は、一般に約０．１ピコモル～約２００ピコモル、好ましくは約０．４～約８０．０ピコモルの範囲である。

【０１０５】

同様に当業者には知られたことであるが、例えば酵素の活性を保持するかまたは増大するために、あるいはアッセイ手法を施す試料のアリコートを得るために用いる手法の結果として、具体的に上記したもの以外の組成物が任意のアッセイ反応混合物中に存在することになるか、または存在してもよい。したがって典型的には、緩衝剤、例えばトリシン、ＨＥＰＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＭＯＰＳ、トリス、グリシルグリシン、リン酸塩等が、ｐＨおよびイオン強度を保持するために存在するであろうし、ルシフェラーゼ－ルシフェリン反応におけるルシフェラーゼの活性を増強するタンパク質様物質、例えば哺乳類の血清アルブミン（好ましくはウシ血清アルブミン）またはラクトアルブミンまたは卵白アルブミンが存在してもよいし、アッセイしようとするルシフェラーゼを抽出する系（例えば細胞）中に存在し得る、そしてルシフェラーゼまたはＡＴＰに悪影響を及ぼし得る金属含有プロ

テアーゼまたはホスファターゼの活性を抑制するために、ＥＤＴＡまたはＣＤＴＡ（シクロヘキシレンジアミン四酢酸塩）等が存在してもよい。ルシフェラーゼを安定化するグリセロールまたはエチレングリコールが存在することもありうる。同様に、界面活性剤または表面活性剤、特に非イオン性界面活性剤、例えばオクトキシノールの界面活性剤（例えばロム・アンド・ハーズ（Rohm & Haas ）の「トリトンＸ」の商標で販売されているもの、例えばトリトンＸ－１００）が、一般に、アッセイのためにルシフェラーゼを抽出する細胞を溶解するために用いる溶液の残留物として、本発明のアッセイに用いられる溶液中に持ち込まれて、含まれることがありうる。マグネシウムに対する対イオンが、もちろん存在する。熟練者が理解するように、これらの対イオンの化学的同一性および濃度は、マグネシウムイオンを提供するために用いられるマグネシウム塩、用いられる緩衝剤、溶液のｐＨ、ｐＨを調整するために用いられる物質（酸または塩基）、ならびにマグネシウム塩、緩衝剤およびｐＨを調整するために用いられる酸または塩基以外の供給源から溶液中に存在する陰イオンによって、広範に変わり得る。本発明の実施に際して、$MgSO_4$またはＭｇCl_2は、マグネシウムイオンの好ましい供給源である。一手法では、マグネシウムイオンは、所望のマグネシウムイオン濃度を提供するために、用いようとする緩衝剤（例えばトリシン）を有する溶液中に炭酸塩として供給され、次に、強酸、例えば硫酸の添加により緩衝溶液のｐＨを調整することができるが、硫酸の添加により炭酸塩（および重炭酸塩）のほとんどが二酸化炭素として失われ、かつこれらの陰イオンは、硫酸塩、硫酸水素塩、トリシン陰イオンそしておそらくはさらにまた別の種類の陰イオン（陰イオンを提供し、そして溶液中に存在し得るその他の物質（例えばリン酸塩）によって決まる）によって置換される。空気中からアッセイ法が実行される溶液中への酸素の拡散により、Ｐ４５０およびルシフェラーゼ－ルシフェリン反応に必要とされる分子酸素が十分提供される。いずれの場合においても、Ｐ４５０反応におけるＰ４５０酵素の活性およびルシフェラーゼ－ルシフェリン反応におけるルシフェラーゼの活性のために有効であるアッセイ反応混合物中の種々の構成成分、例えば本方法の説明において具体的に上記された構成成分の濃度を容易に確認することは、十分に当業者の技術の範囲内である。

【０１０６】

ルシフェリン－ルシフェラーゼ反応の発光は、市販のルミノメーター、シンチレーション計数器、光電子倍増管光度計または感光乳剤フィルムを用いて測定され得る。本発明の一態様では、Ｐ４５０活性を測定するための一段階の方法が提供される。

【０１０７】

一段階の方法では、発光原分子をシトクロムＰ４５０酵素および生物発光酵素の両方と、同時にまたは同時期に接触させ、そして混合物を所定時間インキュベートする。シトクロムＰ４５０は、発光原分子を一次反応における生物発光酵素のための基質へと代謝する。生物発光酵素は次に、光を生じる二次反応において該基質に作用する。シトクロムＰ４５０活性は、アッセイ混合物から生成される発光量を測定して対照混合物と比較することにより間接的に決定される。対照には、Ｐ４５０酵素を水またはＰ４５０緩衝剤に置き換えたもの、組換えＰ４５０膜調製物をＰ４５０酵素を欠く同様の調製物により置き換えたもの、ＮＡＤＰＨを排除したもの、あるいはルシフェリン基質添加前にＰ４５０酵素を熱変性させたものなどが挙げられる。発光は、所定のインキュベーション時間後に、あるいは反応が開始された時点から継続的に測定され得る。例えば図６および７に示されたアッセイ結果は、反応が開始された時間から継続的に読取ったものである。

【０１０８】

本発明の別の好ましい態様では、Ｐ４５０活性を測定するための二段階の方法が提供される。この二段階の方法では、発光原分子を最初にシトクロムＰ４５０酵素とともに第１の所定時間インキュベートする。Ｐ４５０酵素により発光原分子が代謝されて生物発光酵素の基質へと変換される。その後、Ｐ４５０酵素および基質を含有する反応混合物を、生物発光酵素、例えばルシフェラーゼ酵素と第２の所定時間接触させる。生物発光酵素は、光を発生する二次反応において基質に作用する。次に、反応混合物から生成される発光の量を測定して対照（例えば活性Ｐ４５０酵素を含まないもの）と比較することにより、シ

トクロムＰ４５０活性を間接的に決定する。

【０１０９】

本発明のこの態様の実施に際して、界面活性剤、好ましくは非イオン性界面活性剤を、二段階の反応系の第二段階において生物発光酵素、例えばルシフェラーゼ酵素と接触させる直前または接触させるのと同時に、Ｐ４５０／発光原分子混合物に添加することが好ましい。界面活性剤は、ルシフェラーゼ酵素を妨げることなくＰ４５０酵素を抑制するので、分析者は、活性Ｐ４５０酵素により反応混合物中にルシフェリンが連続的に添加されるという複雑さを伴わず、反応の停止時点でルシフェリン（またはルシフェリン誘導体代謝産物（単数または複数））濃度依存性の発光を測定することができる。さらに非イオン性界面活性剤はルシフェラーゼを刺激するので、多少明るい反応を生じる。試験化合物、例えば薬剤がルシフェラーゼ阻害剤である場合、非イオン性界面活性剤はルシフェラーゼに及ぼす抑制作用を減少させるので、Ｐ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用のみに関心を有する分析者にとって有益である。適切な界面活性剤としては、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）（非イオン性）；Ｂｒｉｊ（登録商標）３５（非イオン性）；Ｂｒｉｊ５８（非イオン性）；ポリミキシン（Ｐｏｌｙｍｉｘｉｎ）Ｂ；Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００（非イオン性）；ＴｒｉｔｏｎＸ－３０５（非イオン性）；Ｔｒｉｔｏｎ　Ｎ１０１（非イオン性）；Ｃｈａｐｓ（両イオン性）；Ｃｈａｐｓｏ（両イオン性）；Ｂｉｇｃｈａｐ（非イオン性）；Ｔｈｅｓｉｔ（登録商標）（非イオン性）；Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｌ６４（非イオン性）；Ｒｈｏｄａｓｕｒｆ（登録商標）８７０；Ｃｈｅｍａｌ　ＬＡ－９；スルホニル（Ｓｕｌｆｏｎｙｌ）４６５；デオキシコール酸（陰イオン性）；およびＣＴＡＢ（陽イオン性）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の実施に際しては、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ型のＮＰ－９、ポリグリコールエーテル非イオン性界面活性剤が好ましい。アッセイ混合物中に存在する界面活性剤の量は、一般に約０．０３％～約２．０％、好ましくは約０．１％～約１．０％の範囲である。

【０１１０】

一段階の系ならびに二段階の反応系の第一段階に関しては、反応混合物に一般に以下の構成成分、すなわちＣＹＰ２Ｃ９に関してはｐＨ７．４の２５ｍＭ　KPO_4、ＣＹＰ１Ａ２に関してはｐＨ７．４の１００ｍＭ　KPO_4等を含めた。その他の構成成分は、１．３ｍＭのＮＡＤＰ＋、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、０．４ユニット／ｍＬのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、３．７ｍＭの$MgCl_2$であった。一段階の系に関しては、２００μＭのＡＴＰも用いられる。二段階の系の第二段階（ルシフェラーゼ反応）に関しては、５ｍＭ～２００ｍＭのトリシン緩衝液、好ましくは２０ｍＭ～２００ｍＭのトリシン緩衝液が用いられるが、しかしＨＥＰＥＳ、ＨＥＰＰＳ、ＭＯＰＳ、リン酸塩およびＢｉｃｉｎｅの緩衝液も有用である。その他の構成成分としては、０．７ｍＭ～７．１ｍＭの$MgSO_4$（または$MgCl_2$）および０．１μＭ～１ｍＭ、好ましくは１０μＭ～２５０μＭのＡＴＰが挙げられる。一段階の系および二段階の反応系の第一段階に関しては、反応は一般に約２０℃～４２℃、好ましくは約２２℃～３７℃で実行される。二段階の反応系の第二段階に関しては、反応は一般に約４℃～６０℃、好ましくは約２０℃～４２℃の温度で実行される。任意の適切な所定時間が一段階または二段階の反応系のために用いられ得るが、一方、一段階の反応系および二段階の反応系の第一段階に関する所定時間は、一般に約１分間～約１８時間であり、通常は約１分間～約４時間（一段階の反応系に関して）、あるいは約１０分間～約１時間（二段階の反応系の第一段階に関して）の範囲である。二段階の反応系の第二段階に関しては、発光は、ルシフェラーゼ反応の開始直後～約１８時間後、好ましくは直後～約３時間後に決定される。

【０１１１】

本発明の別の態様では、発光に基づく反応を安定化するための試薬、方法およびキットが提供される。ある種のルシフェラーゼ安定化分子、例えばルシフェラーゼの可逆的阻害剤の使用はルシフェラーゼ酵素について周知の自己触媒性自己分解に対する保護作用を提供し、したがって発光シグナルを延長し、反応混合物のバッチ処理を容易にする、ということが発見されている。本明細書中で定義されるように、ルシフェラーゼ安定化剤は、生

物発光反応を遅くすることによりルシフェラーゼの自己触媒性自己分解に対してルシフェラーゼを実質的に安定化する任意の分子または分子群である。安定化剤を用いない場合、発光シグナル半減期は数分、例えば約３分という低い値であり得る。安定化剤が用いられる場合は、ルシフェラーゼを用いる反応のシグナル半減期は、選択される安定化剤および用いられる濃度によって、２時間またはそれ以上、例えば一晩という長さで延長され得る。ルシフェラーゼ安定化分子の例としては、ルシフェラーゼの可逆的阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。生物発光シグナルは、特にホタルルシフェラーゼが用いられる場合、急速に減衰し得る。これらの酵素は、発光原反応速度と正の相関を示す速度で不活性化することが知られている。急速なルシフェラーゼ反応速度の結果得られる明るいシグナルは望ましいが、高速での急速な不活性化はアッセイに実際的制限を課する。安定な発光シグナルは、試料間の有意な時間依存的減衰を伴わずに、多数の試料を次々に読取るのを容易にする。安定な発光シグナルを達成するために、反応速度を遅くすることによりシグナル減衰速度を低下させることが可能である。ルシフェラーゼ反応速度を遅くするための一方法は、ルシフェリンと競合的なルシフェラーゼ阻害剤を含めることである。本発明において、ともにホタルルシフェラーゼの拮抗阻害剤である２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）または２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）が、安定な発光シグナルを達成するのに特に有用であることが判明した。一般にルシフェラーゼ安定化剤はＰ４５０反応の完了後に導入され、そして二段階のＣＹＰ４５０発光アッセイの第二段階の前または開始時に導入され得る。

【０１１２】

本発明のこの態様の実施に際しては、ルシフェラーゼを用いる反応混合物中でルシフェラーゼ阻害剤の非存在下で生成される発光シグナルと比較して、発光シグナルの安定性を増強し、シグナルの半減期を延長するのに有効な任意の適量のルシフェラーゼ阻害剤が用いられ得る。好ましくは阻害剤の量は、試料のバッチ処理を可能にするためにシグナル半減期が少なくとも約２時間またはそれ以上となるようにするべきである。一般に阻害量の量は、反応混合物中に約１μＭ～約１ｍＭ、好ましくは反応混合物中に約１μＭ～約５００μＭ、さらに好ましくは反応混合物中に約１０μＭ～約２００μＭの範囲であり、最も好ましくは反応混合物中に約１００μＭである。

【０１１３】

本発明の別の実施形態では、試験化合物、例えば候補薬剤は、発光原分子、例えば本発明のルシフェリン誘導体を用いることにより、シトクロムＰ４５０酵素の基質として、あるいは同酵素の阻害剤または活性化剤のいずれかである調節物質としての活性に関してスクリーニングおよび評価され得る。候補薬剤は、シトクロムＰ４５０酵素と候補薬剤とをそれらの間の相互作用に適した条件下で接触させ、シトクロムＰ４５０酵素の阻害剤または基質の非存在下で、シトクロムＰ４５０酵素との相互作用に適した条件下で少なくとも１つのルシフェリン誘導体を提供し、そしてルシフェラーゼの存在下でルシフェリンおよび／またはルシフェリン誘導体の代謝産物の発光シグナルの存在を検出することにより、シトクロムＰ４５０酵素の調節物質であるか基質であるかが決定され得るが、この場合、ルシフェリンおよび／またはルシフェリン誘導体の代謝産物は、シトクロムＰ４５０酵素の阻害剤の非存在下では、シトクロムＰ４５０酵素とルシフェリン誘導体との間の反応の生成物ということになろう。このような有効なＰ４５０基質および調節物質は、当業者により適切であるとみなされるように、候補薬剤に関する残りのスクリーニングにおいてこのような有効なシトクロムＰ４５０基質および調節物質が所望されない場合、スクリーニングライブラリーから除去すればよい。

【０１１４】

本発明の一態様では、シトクロムＰ４５０酵素の基質と阻害剤とを区別する方法が提供される。典型的には候補化合物は、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体をシトクロムＰ４５０酵素の阻害剤または基質の非存在下で同ルシフェリン誘導体とシトクロムＰ４５０酵素との相互作用に適した条件下で提供する前に候補化合物の代謝を可能にする条件下で、少なくとも１つのシトクロムＰ４５０酵素とともにインキュベートされる。ルシフェ

リン誘導体のＰ４５０代謝により生成される任意のルシフェリンは次に、光を発生する二次反応においてルシフェラーゼと相互作用する。その結果生じる光放出反応は、シトクロムＰ４５０酵素および候補薬剤をそれらの間の相互作用に適した条件下で接触させ、シトクロムＰ４５０酵素の阻害剤の非存在下でのルシフェリン誘導体とシトクロムＰ４５０酵素との相互作用に適した条件下で少なくとも１つのルシフェリン誘導体を提供することにより得られた光放出反応と比較される。シトクロムＰ４５０酵素により候補薬剤が代謝されると、候補薬剤が当該酵素に対する基質であることを示す化合物の代謝を伴わない条件と比較して、アッセイ媒体中の候補薬剤濃度が低下し、シトクロムＰ４５０抑制活性の見掛けの損失をもたらし得る。代謝されなかった抑制化合物は、シトクロムＰ４５０酵素の光学的基質の添加時間に関係なく、等しい効能を示す。

【０１１５】

本発明の別の態様では、薬剤候補を最初にＰ４５０酵素と第１の所定時間接触させることが好ましい。その後、混合物を発光原分子、例えばルシフェリン誘導体、ならびに生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと、同時にまたは同時期に接触させ、そして混合物を第２の所定時間インキュベートする。シトクロムＰ４５０活性は、反応混合物から生成される発光の量を測定して対照（例えばＰ４５０酵素を含まないもの）と比較することにより決定される。

【０１１６】

本発明のさらに別の（そして好ましい）態様では、薬剤候補を最初にＰ４５０酵素と第１の所定時間インキュベートして一次混合物を作製することが好ましい。その後、一次混合物を、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体と接触させて二次混合物を作製し、二次混合物を第２の所定時間インキュベートする。次に二次混合物を、生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと接触させて三次混合物を作製し、三次混合物を第３の所定時間インキュベートする。その後、第３の所定時間後に発光を測定して対照（例えば薬剤を含まない）反応と比較することにより、Ｐ４５０酵素と薬剤候補との相互作用の結果得られるＰ４５０活性を決定する。

【０１１７】

本発明の実施に際しては、化合物スクリーニングのための任意の適切な濃度範囲を用いることができる。ライブラリーの一次スクリーニングに関しては、用いられる試験化合物の濃度は、一般に約１～約１００μＭの範囲であり、通常は約１０μＭである。一次スクリーニングでヒットした試験化合物の二次およびそれ以上のスクリーニングには一般に、応答の用量依存性を確立するためにより広い範囲が用いられ、そして一部は試験化合物の効力によって決まる。

【０１１８】

本発明のこの態様の実施に際しては、Ｐ４５０酵素を変性または非活性化するために、ルシフェラーゼの添加前に非イオン性界面活性剤を二次混合物に添加することが好ましい。適切な界面活性剤および量は、上記されている。

【０１１９】

本発明の別の実施形態では、複数の化合物をスクリーニングして、シトクロムＰ４５０活性に及ぼすそれらの作用を決定するために、ハイスループットのアッセイ方法が提供される。試験化合物を、１つまたは複数の種類のＰ４５０酵素、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体、ならびに生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと、所定時間接触させる。その後、発光を測定することにより、Ｐ４５０酵素と化合物との相互作用の結果得られるＰ４５０活性を決定する。

【０１２０】

本発明の一態様では、化合物を最初にＰ４５０酵素と第１の所定時間接触させることが好ましい。その後、混合物を発光原分子、例えばルシフェリン誘導体、および生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと、同時にまたは同時期に接触させ、そして混合物を第２の所定時間インキュベートする。シトクロムＰ４５０活性は、第２の所定時間後に生成される発光の量を測定して対照（例えばＰ４５０酵素を含まない）反応と比較することにより決

定される。本発明のさらに別の（そして好ましい）態様では、化合物を最初にＰ４５０酵素と第１の所定時間接触させて一次混合物を作製することが好ましい。その後、一次混合物をルシフェリン誘導体と接触させて二次混合物を作製し、二次混合物を第２の所定時間インキュベートする。次に二次混合物をルシフェラーゼと接触させて三次混合物を作製し、三次混合物を第３の所定時間インキュベートする。その後、反応混合物の発光を測定して対照（例えばＰ４５０酵素を含まない）反応混合物と比較することにより、Ｐ４５０酵素と試験化合物との相互作用の結果得られるＰ４５０活性が決定される。本発明のこの態様の実施に際しては、ルシフェラーゼの添加前に、二次混合物に非イオン性界面活性剤を添加することが好ましい。適切な界面活性剤および量は、上記されている。

【０１２１】

化合物スクリーニングに関しては、Ｐ４５０を最初に試験化合物と所定時間接触させてから、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体を添加する。別の方法には、Ｐ４５０を薬剤およびルシフェリンと同時に接触させることが包含される。さらに別の方法には、Ｐ４５０を最初にルシフェリンと第１の所定時間接触させた後、試験化合物を添加することが包含される。

【０１２２】

本発明の別の実施形態では、試験化合物をスクリーニングして細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼすその作用を決定するために、細胞を用いる方法が提供される。試験化合物を、細胞、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体、および生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと、所定時間接触させる。その後、反応混合物の発光を測定して対照（試験化合物を含まない）反応混合物と比較することにより、細胞と化合物との相互作用の結果得られるＰ４５０活性が決定される。

【０１２３】

本発明の一態様では、化合物を最初に細胞と所定時間接触させることが好ましい。その後、細胞をルシフェリン誘導体およびルシフェラーゼと、同時にまたは同時期に接触させ、そして細胞をルシフェリン誘導体およびルシフェラーゼとともに第２の所定時間インキュベートする。細胞のシトクロムＰ４５０活性は、反応混合物から生成される発光の量を測定して対照反応混合物（例えば試験化合物を含まないもの）と比較することにより決定される。本発明の別の（そして好ましい）態様では、試験化合物を最初に細胞と所定時間接触させることが好ましい。その後、曝露した該細胞を次にルシフェリン誘導体と接触させて、第２の所定時間インキュベートする。次に細胞をルシフェラーゼと接触させて三次混合物を作製し、三次混合物を第３の所定時間インキュベートする。その後、反応混合物の発光を測定して対照反応混合物（例えば試験化合物を含まないもの）と比較することにより、細胞と試験化合物との相互作用の結果得られる細胞のＰ４５０活性を決定する。本発明のこの態様の実施に際しては、ルシフェリンまたはルシフェリン誘導体の代謝産物（単数または複数）をより完全に放出させてより強力なシグナルおよびより高感度のアッセイとするために、ルシフェラーゼの添加前または添加と同時に、二次混合物に非イオン性界面活性剤を添加することが好ましい。界面活性剤は細胞を破裂させ、ルシフェリンを放出させる。しかしながら界面活性剤の非存在下では、ルシフェリンまたはルシフェリン誘導体の代謝産物（単数または複数）は、その細胞透過性によって細胞から漏出し、そしてこのことが媒体中にルシフェラーゼおよびＡＴＰを有するリアルタイムの生細胞アッセイのための基礎を形成する。適切な界面活性剤および量は、上記されている。

【０１２４】

本発明のこの態様の実施に際しては、適切な細胞としては、１つまたは複数のＰ４５０酵素および同酵素に必要な補因子、例えばルシフェリン誘導体を利用するＰ４５０レダクターゼ、を発現する任意の細胞が挙げられる。このような細胞を用いて、試験化合物が適用される時点で細胞中に存在するＣＹＰ４５０酵素活性に及ぼす試験化合物の作用を検査し得る。この細胞を用いて、内在のＣＹＰ４５０遺伝子または遺伝子調節配列を備えたＣＹＰ４５０をコードする導入遺伝子の発現に及ぼす試験化合物の作用を調べることもできる。この場合、試験化合物により誘導された遺伝子発現の変化を、Ｐ４５０酵素活性のレ

ベルの変化を測定することにより検出することができる。代表例としては、（ａ）ヒトまたは動物の供給源由来の初代肝細胞（いくつかの供給元から市販されている：ゲンテスト（GenTest ）、米国マサチューセッツ州ウォバーン所在；クローンティックス・インコーポレイテッド（Clonetics, Inc. ）、米国カリフォルニア州サンディエゴ所在；ゼノテック・エルエルシー（Xenotech, LLC ）、米国カンザス州レネクサ（Lenexa）所在；（ｂ）肝細胞株：ＨｅｐＧ２、ＨｅｐＧ２Ｃ３Ａ（アンフィオクサス・セル・テクノロジーズ・インコーポレイテッド（Amphioxus Cell Technologies Inc.）（米国テキサス州ヒューストン所在）およびアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）（ＡＴＣＣ）から市販）、ＴＨＬＥ－３（ＡＴＣＣから市販）、ＨｅｐＬｉｕブタ肝細胞株（マルチセル・テクノロジーズ（MultiCellTechnologies）（米国ロードアイランド州ウォービック（Warwick ）所在）から市販）、ならびにＢＣ２ヒト肝細胞腫細胞株（ゴメズレコン他（Gomez-Lechon, M.J. et al. ）（2001）「高度に分化したヒト肝細胞種細胞株ＢＣ２による巨大な一群の薬剤代謝酵素の発現と誘導（Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2）」、Eur. J. Biochem. 268, 1448-1459 ）；（ｃ）組換えＰ４５０を発現する細胞、例えば：ＨｅｐＧ２（ヨシトミ他（Yoshitomi, S. et al ）（2001）「ＨｅｐＧ２においてヒトシトクロムＰ４５０サブタイプを発現する形質転換体の確立、ならびに薬剤代謝および毒性研究への応用（Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology ）」Toxicol. In Vitro 15 （３ ）, 245-256 ）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（ガベロバ他（Gabelova, A. et al）（2002）「シトクロムＰ４５０を安定に発現する、遺伝子操作したチャイニーズハムスターＶ７９細胞株における、７Ｈ‐ジベンゾ（ｃ，ｇ）カルバゾールの変異原性と組織特異的派生物（Mutagenicity of 7H-dibenzo（c,g ）carbazole and its tissue specific derivatives in genetically engineered Chinese hamster V79 cell lines stably expressing cytochrome p450）」、Mutation Research, 517 （1-2 ）, 135-145 ）、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ＳＶ４０で不死化したヒト気管支上皮細胞（コロンベ他（Coulombe, R.A. et al）（2002）「シトクロムＰ４５０を発現するヒト肺細胞におけるアフラトキシンＢ１の代謝と毒性（Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in cytochrome P450-expressing human lung cells）」J. Toxicol. Env. Health Part A, 65 （12）, 853-867 ）、ＭＣＬ－５Ｂリンパ芽球腫細胞株（マサチューセッツ州ウォバーン所在のゲンテスト（GenTest ）から市販）；ならびに（ｄ）Ｐ４５０（単数または複数）を自然に発現する、あるいは発現可能なＰ４５０ｃＤＮＡ（単数または複数）およびＰ４５０レダクターゼで形質転換された非哺乳類細胞、例えば酵母、細菌、植物、真菌等が挙げられる。

【０１２５】

細胞を用いる化合物スクリーニングに関しては、試験化合物の効力および毒性に応じて、任意で適量の試験化合物を用いればよい。ライブラリーの一次スクリーニングに関しては、用いる試験化合物の濃度は、典型的には約１～約１０００μＭ、通常は約１０～１００μＭの範囲である。任意で適切なインキュベーション時間を用いればよい。一般に細胞とともに試験化合物をインキュベートするための時間は、典型的には約１分間～約９６時間、通常は約２４時間～約７２時間の範囲である。

【０１２６】

細胞を用いる化合物スクリーニング、例えば細胞を用いるハイスループットスクリーニングのために、任意の適切な数の細胞を用いればよい。一個の細胞は、範囲全体の中で最も少ないが、一方、接着細胞の入った細胞培養用容器の表面に関しては、細胞が集密（コンフルエント）な状態または過密な状態は、接着細胞に関する範囲全体の中で最も多いと考えられよう。懸濁培養に関しては、細胞が飽和状態になった懸濁物が範囲全体の中で最も多いと考えられるであろう。本発明の実施に際して、好ましい細胞数は、範囲全体に関して上記した最大数の細胞によるバックグラウンドより上でシグナルを検出可能な、最小限の細胞数である。インキュベーション時間に関しては、適切な温度およびｐＨ範囲は、

細胞の要件によって変わることになる。一般にほとんどの細胞はｐＨ７．４かつ３７℃で培養されるが、ほとんどの細胞は、少なくとも一時的には、４～４２℃の温度範囲および約６～９のｐＨ範囲を超えても生存可能である。

【０１２７】

細胞を用いる発光検出アッセイは、複数の異なる方法で実施可能である。例えば一実施形態では、ルシフェラーゼおよびＡＴＰを細胞培地に添加すればよく、細胞からルシフェリンが漏出するのにつれて発光を直接的に検出可能である。この場合、温度、ｐＨ、塩濃度およびその他の増殖要件は、細胞の要件によって変わるであろう。ルシフェラーゼは一般に、細胞培養において通常用いられる生理学的な塩、ｐＨおよび温度条件で活性である。

【０１２８】

細胞を用いる発光検出アッセイの別の実施形態では、培地を培養物から取り出して、ルシフェラーゼ反応に添加する。このための条件は、上記の二段階の反応アッセイの第二段階に関してすでに述べられたものと本質的に同様であろう。

【０１２９】

本発明の細胞を用いるアッセイのさらに別の実施形態では、ＡＴＰ、ルシフェラーゼとともに確実に溶解するための界面活性剤（単数または複数）を含有する適切な溶解緩衝液中で細胞を溶解すればよく、次いで直ちに発光を読取る。動物細胞に関しては、０．１～１．０％の非イオン性界面活性剤、例えばＴｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ１００またはＴｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）を有する緩衝液で通常は十分である。細菌、植物、真菌または酵母細胞は一般に溶解するのがより難しい。界面活性剤、凍結／解凍の反復、低張緩衝液、超音波処理、空洞形成またはこれらの方法の組合せが用いられ得る。溶解の方法は、ルシフェラーゼ活性を損なわない溶解物を生じる方法でなければならない。界面活性剤が用いられる場合、該界面活性剤は活性ルシフェラーゼを損なわないものである。発光は、Ｐ４５０反応により生成された後細胞から放出されるルシフェリンまたはルシフェリン誘導体の代謝産物（単数または複数）に比例するであろう。細胞を用いる発光検出の代表例では、ある容積の溶解緩衝液が等容積の細胞培養後の培地に添加される。本発明のこの実施形態の変法では、細胞溶解物は、ルシフェラーゼおよびＡＴＰを含有しない溶解緩衝液を用いて調製され、次に該溶解物のアリコートが、上記のような一段階または二段階のルシフェラーゼを用いるアッセイに添加され得る。

【０１３０】

本発明の細胞を用いる発光検出アッセイのさらに別の実施形態では、組換え生物発光酵素、例えばルシフェラーゼを一過性にまたは安定的に発現する細胞が用いられ得る。一過性または安定的にトランスフェクションされた細胞を作製するための任意の慣用的方法が用いられ得る。細胞に導入された発現可能なｃＤＮＡベクターが、ルシフェラーゼをコードする。次に、細胞中にも存在するＰ４５０（単数または複数）が培地中に供給されたルシフェリン誘導体を代謝すると、発光が現れる。そのままの状態で直接的に、または溶解後に、所定時間後に発光を測定することにより、Ｐ４５０活性が決定され得る。一過性または安定的なトランスフェクションにより該細胞を作製するためのベクターは、プロメガ（Promega ）（米国ウィスコンシン州マディソン所在）、クロンテック（Clontech）（米国カリフォルニア州パロアルト所在）およびストラタジーン（Stratagene）（米国カリフォルニア州ラ・ホーヤ所在）から入手可能である。

【０１３１】

本発明の別の実施形態では、試験化合物または化合物のライブラリーをスクリーニングして、細胞のシトクロムＰ４５０活性に及ぼすそれらの作用を決定するための組織を用いる方法が提供される。試験化合物を、組織、発光原分子、例えばルシフェリン誘導体、および生物発光酵素、例えばルシフェラーゼと所定時間接触させる。その後、反応混合物の発光を測定して対照（試験化合物を含まない）反応混合物と比較することにより、組織と化合物との相互作用の結果得られるＰ４５０活性を決定する。組織の代表例としては、肝臓、小腸および肺が挙げられるが、これらに限定されない。組織は、細かく刻んだものま

たは薄片、例えば肝臓薄片の形態で用いられ得る。一般に細胞を用いるアッセイに関して上記したのと同一の考え方が適用可能であろう。

【０１３２】

本発明の別の実施形態では、試験化合物をスクリーニングして、動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼすその作用を決定するための方法が提供される。試験化合物および発光原分子、例えばルシフェリン誘導体を動物に投与する。所定時間後、生物学的検体を動物から取り出す。代表的な生物学的検体としては、血液および血清、尿、糞便、胆汁、脳脊髄液、リンパ、唾液、涙液および粘液（基本的にはＣＹＰ４５０代謝産物が見出され得る任意の体液）が挙げられる。血液／血清、尿、糞便および胆汁は、好ましい生物学的検体である。血液および糞便は、処理する必要があると思われる。例えば血液検体は、血球を除去して、血清を生成するよう処理すればよい。糞便検体は、抽出物を生成するよう処理すればよい。その他の流体はほとんどが、理想的にはルシフェラーゼアッセイに直接添加されてもよいし、あるいは任意選択で希釈してからルシフェラーゼアッセイに添加されてもよい。検体を次に、ルシフェラーゼ、ＡＴＰおよびMg^{2+}と接触させる。所定時間後、発光を測定して対照と比較することにより、動物と化合物との相互作用の結果得られるＰ４５０活性を決定する。対照の一型としては、試験化合物の投与前に動物から採取した検体が挙げられる。この型の対照には、薬剤への曝露を伴わずにルシフェリン誘導体を投与することが含まれ、試料および測定値を所定の時間に得る。後に、ルシフェリンがその系から取り除かれた後、試験用の実験、ルシフェリン誘導体＋薬剤への曝露を、同一の方法で同一の動物に関して実施する。この対照は、試験および対照用に同一の動物を用いるという利点を有する。この原理は、細胞を用いるアッセイおよび組織切片のアッセイにも適用され得る。代替的手法は、別個の試験動物および対照動物を用いることである。試験動物にはルシフェリン誘導体および薬剤を摂取させ、対照動物にはルシフェリン誘導体のみを摂取させる。

【０１３３】

本発明の一態様では、化合物およびルシフェリン誘導体を、好ましくは動物に同時にまたは同時期に投与する。第１の所定時間後、生物学的検体を動物から採取する。生物学的検体を次に、ルシフェラーゼと第２の所定時間接触させる。動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用を、反応混合物から生成される発光を測定して対照反応混合物（例えば上記のような対照動物から採取した検体）と比較することにより決定する。

【０１３４】

本発明の別の態様では、化合物を最初に動物に投与することが好ましい。第１の所定時間後、次にルシフェリン誘導体を動物に投与する。第２の所定時間後、生物学的検体を動物から採取する。生物学的検体を次に、ルシフェラーゼと所定時間接触させる。動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用は、ルシフェラーゼ反応混合物から生成される発光の量を測定して対照（例えば上記のような対照動物から採取した検体に基づくもの）と比較することにより決定される。

【０１３５】

試験化合物および発光原分子、例えばルシフェリン誘導体は、任意の適切な手段により処方可能であり、そして経口投与のための錠剤、カプセル剤またはエリキシル剤；直腸投与のための座剤；注射投与のための滅菌溶液、懸濁液等として用いられ得る。注射用医薬品は、液状の溶液または懸濁液、注射前に液状の溶液または懸濁液とするのに適した固体形態、あるいは乳濁液として、慣用的形態に調製され得る。適切な賦形剤は、例えば水、生理食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、塩酸システイン等である。さらに、所望により、注射用の薬学的組成物に、少量の非毒性の補助物質、例えば湿潤剤、ｐＨ緩衝剤等を含めてもよい。所望により、吸収を増強する調製物（例えばリポソーム）を利用可能である。

【０１３６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ用量として必要とされる試験組成物の量、ならびに用いられるルシフェリン誘導体の量は、投与経路、治療される動物の種類、および対象とする特定の動物の身

体的特質によって決まる。用量は所望の効果を達成するよう調整可能であるが、体重、食事、併用医薬品などの要因、ならびに医学界の当業者が認識するその他の要因によって決まる。

【０１３７】

ヒト以外の動物実験では、潜在的薬剤候補の適用を高い投薬量レベルで開始し、所望の作用がもはや達成されないかまたは副作用が消失するまで投薬量を低減させる。投薬量は、所望の作用および治療指標に応じて広範囲に及ぶ。典型的には投薬量は、体重に対して約１０μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約１００μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇであり得る。投与は、好ましくは経口である。経口投与が好ましいが、しかし皮膚または粘膜、静脈内、皮下または腹腔内注入経路による吸収を用いてもよい。投薬量の制御は場合によっては問題があるが、経口投与により、化合物が吸収される腸を裏打ちしている細胞中のｐ４５０により大いに影響を受ける初回通過代謝を分析者が検査するのが可能となる。注入による投与は、動物における用量を制御するためにはより良好であり得る。

【０１３８】

本発明のさらに別の態様では、化合物をスクリーニングするための動物を用いたハイスループットのアッセイが提供される。実験動物は、薬剤活性のメカニズムを明確にし、治療計画を検討するために有用である。さらに近年、ゼブラフィッシュおよびその他の硬骨魚が、動物全体を用いるｉｎ　ｖｉｖｏのハイスループット化合物スクリーニングのために特に有用であることが判明した。本明細書中で定義する場合、「硬骨魚」という用語は、体幹骨および放射状の鰭を有する多数の魚からなる群である真骨類または真口類を意味する、または属することを意味する。硬骨魚としては、例えばゼブラフィッシュ、メダカ、ジャイアントダニオ（Giant rerio ）およびフグが挙げられる。例えば米国特許第６，２９９，８５８号（譲受人：フィロニックス・インコーポレイテッド（Phylonix, Inc.）（この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）を参照されたい。例えば試験化合物およびルシフェリン誘導体を、マルチウエルプレート中に入った生きている硬骨魚胚に投与すればよい。硬骨魚を、適切な媒体、例えば水中に保持する。次に、１つまたは複数の所定時間後、媒体をルシフェラーゼと第２の所定時間接触させる。混合物から生成される発光を測定して試験化合物を含まない対照反応混合物と比較することにより、動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用を決定することができる。

【０１３９】

本発明の別の態様では、化合物を最初に硬骨魚に投与することが好ましい。第１の所定時間の後、動物をルシフェリン誘導体と接触させる。第２の所定時間の後、媒体を次にルシフェラーゼと接触させる。混合物から生成される発光を測定して試験化合物を含まない対照反応混合物と比較することにより、動物のシトクロムＰ４５０活性に及ぼす試験化合物の作用を決定することができる。

【０１４０】

ルシフェラーゼ導入遺伝子を有するトランスジェニック動物も、Ｐ４５０活性を確認するための、そして１つまたは複数の化合物をスクリーニングするための動物を用いるアッセイに有用である。ルシフェラーゼ導入遺伝子は、主としてマウスにおいて、肝臓中で効率的に発現されている。キセノゲン・インコーポレイテッド（Xenogen, Inc. ）およびその他の会社により、肝臓のような標的組織中で発現するルシフェラーゼ導入遺伝子を有するマウスおよびラットのようなトランスジェニック動物が開発されている（例えば米国特許第５，６５０，１３５号および第６，２１７，８４７号参照）（これらの記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）。一般にこのようなトランスジェニック動物にルシフェリンを注入し、次に画像処理技術（ｉｎ　ｖｉｖｏバイオフォトニックイメージング）を用いて、生きている動物全体におけるルシフェラーゼの発現部位での発光を測定する。したがって本発明の別の態様では、生物発光酵素、例えばルシフェラーゼの導入遺伝子を有するトランスジェニック動物に、適切なＰ４５０酵素が発現している組織中で生物発光酵素に対する基質へと変換される発光原基質を投与すればよい。生物発光酵素、例えばルシフェラーゼの導入遺伝子もその組織中で発現している場合は、光が生成され、こ

のような光を任意の適切な手段により検出すればよい。上記のように、動物を用いるアッセイにおいて、このようなトランスジェニック動物におけるＰ４５０の作用に関して、１つまたは複数の薬剤を試験することができる。あるいはこのようなトランスジェニック動物由来の組織を、組織を用いるアッセイに用いることもできる。Ｐ４５０酵素活性を抑制する薬剤はシグナルを減少させ、Ｐ４５０遺伝子発現を誘導する薬剤はシグナルを増強する。

【０１４１】

本発明はさらに、ホタルルシフェラーゼの阻害剤である無機ピロリン酸塩（ｉＰＰ）によるホタルルシフェラーゼの阻害を軽減するための方法およびキットを提供する。ルシフェラーゼを用いる反応におけるｉＰＰの存在は、ｉＰＰが反応の再現性に影響を及ぼし得るので、望ましくない。ピロリン酸塩は、ルシフェラーゼによるＡＴＰ、Ｏ２およびルシフェリンとの反応の産物である。ある条件下では、ｉＰＰが阻害作用を有するレベルに蓄積し得る。さらにルシフェラーゼを用いる反応の構成成分は、ｉＰＰが阻害作用を有する量となるのに寄与し得る。例えば反応を緩衝するために用いられるオルトリン酸塩は、夾雑物としてｉＰＰを含有し得る。リン酸緩衝溶液の使用を回避することによりｉＰＰの問題を解決し得るが、このことは、特にリン酸緩衝液が一般に用いられるＰ４５０反応においては、不便であるかまたは実際的でないことが多い。ルシフェラーゼを用いる反応中に、ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼ酵素（ｉＰＰアーゼ）を含めることにより、アッセイ混合物中にすでに存在している可能性のあるｉＰＰ、あるいはルシフェラーゼ反応の経過中に生成される可能性のあるｉＰＰによるルシフェラーゼ阻害が低減または防止される、ということが発見された。この発見は一般に、ｉＰＰによるルシフェラーゼ阻害の可能性が問題となり得る全てのルシフェラーゼを用いる反応に適用可能であるが、しかしシトクロムＰ４５０（Ｐ４５０）の発光アッセイにピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを含めることが特に有用であることが判明している。いかなる理論にも縛られずに考えると、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼはｉＰＰの増加を防止するとともにｉＰＰをオルトリン酸塩へと加水分解して溶液からｉＰＰを除去するように作用する。

【０１４２】

本発明の実施に際しては、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを、ルシフェラーゼを添加する前、添加と同時、または直後に添加すればよい。好ましくはピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを、ルシフェラーゼの添加と同時にアッセイ混合物に添加して、混合物中にすでに存在するｉＰＰおよびルシフェラーゼ反応中に生成されるｉＰＰを全て分解する。反応に用いられるピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼの量は、すでに存在するかまたはその後ルシフェラーゼ反応の経過中に生成され得る全てのｉＰＰを除去または排除するのに十分な量である。一般に、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼの存在下では、反応混合物中のｉＰＰのレベルは、ルシフェラーゼ反応においてルシフェラーゼ活性に有意な作用をほとんどまたは全く及ぼさない量まで排除または低減される。すなわちｉＰＰのレベルは十分低く、ルシフェラーゼ阻害は有意ではないレベルに低減される。ｉＰＰは、種々の供給源に由来しうる。供給源の例としては、例えば酵母、原核生物および哺乳類が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の実施に際しては、出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）由来のｉＰＰアーゼが好ましい。

【０１４３】

本発明の一実施形態では、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを、無細胞または細胞を用いる発光Ｐ４５０アッセイに含めることができる。Ｐ４５０酵素は、ホタルルシフェラーゼの基質前駆体であるルシフェリン誘導体をルシフェリン基質に変換し、ルシフェリン基質は次にルシフェラーゼと反応して、光を生じる。例えば、上記の二段階の方法の第一段階では、Ｐ４５０酵素を適切なアッセイ反応条件下でルシフェリン誘導体とともにインキュベートすればよい。第二段階では、ルシフェラーゼおよびＡＴＰが第一段階の混合物に添加されると、第一段階で生成されたルシフェリン基質が発光的に検出される。一般に、ｐＨを緩衝するために第一段階においてKPO_4緩衝液を使用し、その濃度を変

えることにより特定のＰ４５０アイソフォームに関する最適な塩濃度を提供するのが便利である。しかしながらＫＰＯ$_4$緩衝液の中には、ルシフェラーゼを阻害し、したがってルシフェリンの検出を妨害し得る十分量のｉＰＰ夾雑物を含むものがある。反応混合物にｉＰＰアーゼを添加することにより、あらゆるｉＰＰ夾雑物の存在による阻害を低減または防止することができる。

【０１４４】

本発明の別の実施形態では、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを、任意のルシフェラーゼ反応、例えば無細胞または細胞を用いるルシフェラーゼアッセイに含め得る。反応構成成分としてピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼを添加することにより、ルシフェラーゼのｉＰＰによる阻害に関する問題を伴わずに従来のリン酸緩衝液中でこれらのアッセイが実施可能となる。その他の用途としては、ルシフェラーゼ反応により生成されるｉＰＰが阻害作用を有するレベルに蓄積するルシフェラーゼアッセイにおけるｉＰＰアーゼの使用が挙げられ得る。

【０１４５】

本発明の別の実施形態では、ＣＹＰ４５０の活性、またはシトクロムＰ４５０酵素活性に及ぼす物質（例えば薬剤候補）の作用を決定するためのキットが提供される。このようなキットは、１つまたは複数の容器中に、通常はアッセイにおける使用を容易にするために便利に包装された状態で、本発明に従ってアッセイおよび方法を実行するのに不可欠な多量の種々の組成物を含んでいる。したがってキットは、１つまたは複数の種類のシトクロムＰ４５０酵素；１つまたは複数の種類のシトクロムＰ４５０酵素のための基質でありかつ生物発光酵素、例えばルシフェラーゼ酵素の基質前駆体である１つまたは複数の発光原分子、例えばＤ－ルシフェリン誘導体；生物発光酵素、例えばルシフェラーゼ酵素；ならびにキットを使用するための使用説明書を含み得る。任意選択で、キットは、ＡＴＰ、Ｍｇイオンの供給源、非イオン性界面活性剤、ピロホスファターゼ、例えばｉＰＰアーゼ、および／または緩衝剤もしくは適切なｐＨおよびイオン強度の溶液を提供するための任意のその他の反応構成成分を含む。上述したように、種々の構成成分を合わせて、例えば溶液または凍結乾燥した混合物として単一の容器に入れてもよいし、あるいは種々の組合せとして（１つ１つ別個にする場合も含む）複数の容器中に入れてもよい。好ましいキットは、Ｐ４５０基質（例えばＤ－ルシフェリン誘導体）の入ったバイアル（単数または複数）、生物発光酵素、例えばルシフェラーゼおよび任意のｉＰＰアーゼ（好ましくは出芽酵母由来）の混合物（好ましくは凍結乾燥調製物）の入ったバイアル（単数または複数）；ならびに生物発光酵素、例えばルシフェラーゼを希釈するためのＡＴＰを含有する希釈用緩衝液（凍結乾燥したルシフェラーゼ／ＡＴＰ調製物の場合、この緩衝液は「再構成緩衝液」である）の入ったバイアルを含む。希釈緩衝液または再構成緩衝液は、界面活性剤も含有することになる。

【０１４６】

キットには、当業者には周知のように、キットを用いて実行するアッセイの信頼性および精度を保証するために、種々の対照物および標準物、例えばＰ４５０酵素を含まないもの（陰性対照）も含まれうる。

【実施例】

【０１４７】

（材料）　Ｓｆ９細胞で発現させたＣＹＰ４５０調製物（Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標））、プール化ヒト肝臓ミクロソームおよびＮＡＤＰＨ生成系（ＮＡＤＰ＋、グルコース－６－リン酸およびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）を、ゲンテスト（GenTest 、米国マサチューセッツ州ウォバーン所在）から購入した。基質であるルシフェリン６’メチル（Ｌｕｃ　ＭＥ）、エチル（Ｌｕｃ　ＥＥ）、クロロエチル（Ｌｕｃ　ＣＥＥ）およびベンジル（Ｌｕｃ　ＢＥ）エーテルおよびデヒドロキシルシフェリン（Ｈ－Ｌｕｃ）は、プロメガバイオサイエンシズ（PromegaBiosciences 、米国カリフォルニア州サンルイスオビスポ所在）により製造された。Ｌｕｃ　ＭＥおよびＬｕｃ　ＥＥは、シグマアルドリッチ（Sigma-Aldrich 、米国セントルイス所在）からも購入した。ホタル（Ph

oturis pennsylvanica）由来のホタルルシフェラーゼの組換え突然変異体は、プロメガ（Promega ）から入手した（１７）。本明細書中で言及した化学試薬および溶媒は全て、多数の商業的供給元、例えばアルドリッチケミカル社（Aldrich Chemical Co.）またはフィッシャーサイエンティフィック（Fischer Scientific）から容易に入手可能である。日立６０ＭＨｚ　Ｒ－１２００　ＮＭＲ分光計またはバリアン（Varian）ＶＸ－３００　ＮＭＲ分光計で、ＮＭＲスペクトル分析を実施した。ミダック（Midac ）ＭシリーズＦＴ－ＩＲ計器を用いてＩＲスペクトルを得た。フィネガン（Finnegan）ＭＡＴ９０質量分析計を用いて質量スペクトルデータを得た。融点は全て補正される。

【０１４８】

（実施例１：ルシフェリン誘導体の合成）

（ａ）２－シアノベンゾチアゾール誘導体の調製

ルシフェロール：　ＴＨＦ（１５ｍＬ）中のＤ－ルシフェリン遊離酸（０．４３ｇ、１．５３ｍｍｏｌ）の懸濁液を－２０℃浴（ドライアイス－イソプロパノール）中で冷却した。懸濁液に、ボラン－ＴＨＦの溶液（ＴＨＦ中の１Ｍ溶液を１．８ｍＬ。１．８ｍｍｏｌ）をシリンジで滴下した。淡黄色溶液を、窒素下で一晩（約１５ｈ）放置して周囲温度に暖めた。追加のボラン－ＴＨＦ（ＴＨＦ中の１Ｍ溶液を２．５ｍＬ。２．５ｍｍｏｌ）を添加し、反応をさらに２４ｈ進行させた。１０％酢酸水溶液の添加により過剰なボラン－ＴＨＦをクエンチして、その結果生じた二層を酢酸エチル（３×７５ｍＬ）で抽出した。抽出物を合わせて乾燥、蒸発させ、橙色固体を得て、同固体を、４：１のジクロロメタン－メタノールを用いてシリカゲル（７０ｇ）によるクロマトグラフィーで精製した。この精製操作により、残存しているＤ－ルシフェリン遊離酸が極性の低い混合生成物から分離された。この極性の低い混合生成物を、メタノール－水勾配を用いた２．５４ｃｍ（１インチ）のシナジー（Synergi ）４μ　ＭＡＸ－ＲＰ　８０Ａカラム（１００×２１．２０ｍｍ）上での逆相ＨＰＬＣにより分離した。適切な画分をプールし、蒸発させて、１０ｍｇ（収率３％）の所望の物質を淡黄色固体として得た。この生成物は、ＨＰＬＣ分析によると純度９５．４％であった。ＭＳ（ＥＳＩ－）：ｍ／ｚ２６４．４（Ｍ－Ｈ）$^{-}$；計算値：２６５．０１。

【０１４９】

２－シアノベンゾチアゾール：　還流冷却器、加熱マントルおよび内部温度探針を装備した１Ｌの三首フラスコに、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ、１００ｍＬ）中のシアン化カリウム（１．５０ｇ、２３．０ｍｍｏｌ）の懸濁液を調製した。２－クロロベンゾチアゾール（２．６ｇ、２．０ｍＬ、１５．３ｍｍｏｌ）をピペットで反応フラスコに添加し、反応物を８０℃（内部温度）で加熱した。ＴＬＣ（９：１　ヘプタン－酢酸エチル）により、反応を定期的にモニタリングした。５時間後、反応は約５０％完了したように見えた。１７時間後、ＴＬＣ分析により反応は完了と判定された。反応混合物を室温まで冷却させて、次にエーテル（５×１００ｍＬ）で抽出した。抽出物を硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮して、黄色－橙色の固体を得た。この粗製固体を、９：１　ヘプタン－酢酸エチルを用いてシリカゲル（１００ｇ）上で精製した。生成物を含有する画分をプールし、濃縮して、１．４ｇ（５７％）の所望の物質を黄色－橙色の固体として得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５０】

６－（２－クロロエトキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　還流冷却器を装備した５０ｍＬの二首丸底フラスコ中に、アセトン（５ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．０ｇ、５．６８ｍｍｏｌ）の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム（１．５７ｇ、１１．３ｍｍｏｌ）を反応混合物に添加すると、懸濁液は黄色溶液に変わった。次に１－ブロモ－２－クロロエタン（１．０６ｇ、０．５６ｍＬ、７．３８ｍｍｏｌ）をシリンジで添加し、反応混合物を加熱撹拌プレートおよび油浴を用いて還流で加熱した。ＲＰ　ＨＰＬＣにより定期的に反応をモニタリングした。５時間後、反応は約３０％完了したように見えた。さらに１－ブロモ－２－クロロエタン（２．８４ｍｍｏｌ、０．２１ｍＬ）を添加し、反応物を一晩還流した。ＨＰＬＣ分析は、反応が約５０％完

了していることを示した。さらに１－ブロモ－２－クロロエタン（２．８４ｍｍｏｌ、０．２１ｍＬ）および炭酸カリウム（０．６０ｇ、４．３７ｍｍｏｌ）を添加し、反応物をその日の残りの時間（約７時間）還流した。反応は約６４％完了し、反応物を一晩還流した。翌朝、反応は約８４％完了したことが判明した。さらに１－ブロモ－２－クロロエタン（２．８４ｍｍｏｌ、０．２１ｍＬ）および炭酸カリウム（０．６０ｇ、４．３７ｍｍｏｌ）を添加し、反応物をその日の残りの時間（約７時間）還流した。この時点で反応は約９２％完了であった。反応混合物を室温まで冷却させて、次にガラス繊維紙を通して濾過し、アセトンですすいだ。濾液を濃縮して、黄色－褐色の固体を得た。この粗製固体（１．３ｇ）を、４：１　ヘプタン－酢酸エチルを用いてシリカゲル（１００ｇ）上で精製した。生成物を含有する画分をプールし、濃縮して、１．０ｇ（７４％）の所望の物質をオフホワイト色の固体として得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５１】

６－（４－トリフルオロメチルベンジルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：還流冷却器を装備した１００ｍＬの二首丸底フラスコ中に、アセトン（５ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．０ｇ、５．６８ｍｍｏｌ）の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム（０．９４ｇ、６．８２ｍｍｏｌ）を反応混合物に添加すると、懸濁液は黄色の溶液に変わった。次に臭化４－（トリフルオロメチル）ベンジル（１．４９ｇ、６．２５ｍｍｏｌ）を添加し、加熱撹拌プレートおよび油浴を用いて１５時間還流して反応混合物を加熱した。反応混合物を室温まで冷却させて、次に濾過して無機塩を除去した。濾液を回転蒸発により濃縮して、１．７ｇ（収率８９％）のオフホワイト色の固体を得て、これを精製せずに用いた。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５２】

６－（ベンジルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　還流冷却器を装備した１００ｍＬの二首丸底フラスコ中に、アセトン（３５ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（０．３５ｇ、２．００ｍｍｏｌ）の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム（０．３３ｇ、２．４０ｍｍｏｌ）を反応混合物に添加すると、懸濁液は黄色の溶液に変わった。次に臭化ベンジル（０．４１ｇ、０．２９ｍＬ、２．４０ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を加熱撹拌プレートおよび油浴を用いて１５時間還流して加熱した。反応混合物を室温に冷却させて、次に濾過して無機塩を除去した。濾液を回転蒸発により濃縮して、０．５１ｇの淡黄色固体を得た。この粗製物質を、４：１　ヘプタン－酢酸エチルの混合物から成る移動相を用いたシリカゲル（２４ｇ）上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、４１０ｍｇ（収率７７％）の所望の物質を白色発泡体として得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５３】

６－（２－フェニルエトキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　還流冷却器を装備した１００ｍＬの二首丸底フラスコ中に、アセトン（５ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．００ｇ、５．６８ｍｍｏｌ）の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム（１．１８ｇ、８．５２ｍｍｏｌ）を反応混合物に添加すると、懸濁液は黄色の溶液に変わった。次に（２－ブロモエチル）ベンゼン（１．３７ｇ、０．８８ｍＬ、７．３８ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を加熱撹拌プレートおよび油浴を用いて還流して加熱した。反応物のアリコートのＨＰＬＣ分析により、反応の進行をモニタリングした。１５時間の還流後、反応は約４０％完了した。さらに（２－ブロモエチル）ベンゼン（０．５当量、２．８４ｍｍｏｌ）および炭酸カリウム（０．５当量、２．８４ｍｍｏｌ）を、出発物質が消費されるまで２日間の経過中、定期的に添加した。反応混合物を周囲温度まで冷却させて、次に濾過して無機塩を除去した。回転蒸発により濾液を濃縮して、２．２ｇの粗製油を得た。この粗生成物を、９：１　ヘプタン－酢酸エチルの混合物から成る初期移動相を用いたシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。移動相を５：１のヘプタン－酢酸エチルの混合物に調整し、次に７：３のヘプタン－酢酸エチ

ルの混合物に調整して、８００ｍｇ（収率５０％）の所望の物質をオフホワイト色の発泡体として得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５４】

６－（ゲラニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　アセトン（５ｍＬ）、無水炭酸カリウム（１．２ｇ、８．４ｍｍｏｌ）および臭化ゲラニル（１．５ｍＬ、７．３ｍｍｏｌ）を含有する乾燥した２５ｍｌ丸底フラスコに、６－ヒドロキシ－２－シアノベンゾチアゾール（１ｇ、５．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を撹拌しながらアルゴン下で還流した。２：１のヘプタン－酢酸エチルで展開するＴＬＣ分析により、反応の進行をモニタリングした。２０時間後、冷却した反応混合物から炭酸カリウムを濾過した。溶液を真空濃縮して、２．１ｇの固体を得た。この固体を、９：１のヘプタン－酢酸エチルの混合物を用いたフラッシュクロマトグラフィーによりさらに精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、０．８４ｇの固体を得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により構造を確認した。

【０１５５】

６－（プレニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　アセトン（５ｍＬ）、無水炭酸カリウム（１．２ｇ、８．４ｍｍｏｌ）および臭化プレニル（８３９μＬ、７．３ｍｍｏｌ）を含有する乾燥した２５ｍｌ丸底フラスコに、６－ヒドロキシ－２－シアノベンゾチアゾール（１．０ｇ、５．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を撹拌しながらアルゴン下で還流した。２：１のヘプタン－酢酸エチルで展開するＴＬＣ分析により、反応の進行をモニタリングした。２８時間後、冷却した反応混合物から炭酸カリウムを濾過した。溶液を真空濃縮して、１．７ｇの固体を得た。この固体を、９：１のヘプタン－酢酸エチルを用いて徐々に４：１のヘプタン－酢酸エチルまで段階的に変化させるフラッシュクロマトグラフィーによりさらに精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、０．８ｇの固体を得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１５６】

６－（２－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　臭化水素酸（ブロモメチル）ピリジン（１．８７ｇ、７．３８ｍｍｏｌ）および２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．００ｇ、５．６８ｍｍｏｌ）をアセトン（５０ｍＬ）中に懸濁した。炭酸カリウム（１．９６ｇ、１４．２ｍｍｏｌ）の導入後、懸濁液を窒素下で７２時間還流した。混合物を冷却し、固体を濾過した後、濾液を濃縮し、ヘプタン中の５０％～７５％酢酸エチルを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製した。帯黄色の固体を収率７２％で得た。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　２６７．９０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：２６８．０５。

【０１５７】

６－（３－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　アセトン（５０ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（０．３９ｇ、２．２ｍｍｏｌ）の溶液に、３－臭化水素酸（ブロモメチル）ピリジン（０．７ｇ、２．７６ｍｍｏｌ）、炭酸セシウム（２．１５ｇ、６．６ｍｍｏｌ）および触媒量のヨウ化ナトリウムを添加した。３Ａのモレキュラーシーブを添加し、黄色の懸濁液を窒素下で４０時間還流した。混合物を冷却し、固体を濾過した後、濾液を濃縮し、ヘプタン中の５０％～１００％酢酸エチルを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製した。帯黄色の固体を収率６１％で得た。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　２６７．６４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：２６８．０５。

【０１５８】

６－（４－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール：　アセトン（５０ｍＬ）中の２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．１８ｇ、６．７１ｍｍｏｌ）の溶液に、３Ａのモレキュラーシーブおよび炭酸セシウム（３．９８ｇ、１２．２ｍｍｏｌ）を添加した。その結果生じた懸濁液を室温で２時間撹拌した。次に別途等量の炭酸セシウム（１．９９ｇ、６．１ｍｍｏｌ）を導入し、その後、臭化水素酸４－（ブロモメチル）ピリジン（１．０ｇ、６．１ｍｍｏｌ）および触媒量のヨウ化セシウムを添加した

。その結果生じた黄色の懸濁液を窒素下で４８時間還流した。混合物を冷却し、固体を濾過した後、濾液を濃縮し、ヘプタン中の３０％酢酸エチルを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製して、出発物質を除去し、次に酢酸エチル中の２５％メタノールを除去した。帯黄色の固体を収率７０％で得た。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　２６７．７４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：２６８．０５。

【０１５９】

（ｂ）２－シアノベンゾチアゾール誘導体をＤ－ルシフェリン誘導体へ変換させるための一般的手法

塩酸システイン一水和物の０．３９Ｍ水溶液（２－シアノベンゾチアゾール誘導体の量に基づいて、１．３当量）を、等容積の０．３９Ｍ炭酸カリウム溶液中に滴下し、このとき６Ｍ　ＨＣｌの添加によりｐＨを６～７に保持した。別個の反応フラスコ中で、０．１Ｍ溶液を調製するのに十分なメタノール中に２－シアノベンゾチアゾール誘導体を溶解した。この溶液を窒素でパージして、酸素を除去した。上記のシステイン／炭酸カリウム溶液を、２－シアノベンゾチアゾール誘導体が入っている反応フラスコに滴下し、このとき６Ｍ　ＨＣｌの添加によりｐＨを６～７に保持した。ＴＬＣにより反応をモニタリングし、完了時に、反応混合物を、冷水浴（＜３０℃）を用いて回転蒸発により濃縮した。

【０１６０】

６’－デオキシルシフェリン（Ｈ－Ｌｕｃ）：　一般的手法に従って、２－シアノベンゾチアゾール（１００ｍｇ、０．６２ｍｍｏｌ）から調製した。９：１のジクロロメタン－メタノールを用いたシリカゲル（２０ｇ）上でのフラッシュクロマトグラフィーにより固体の粗生成物を精製し、１６３ｍｇ（９９％）の所望の物質を淡黄色の固体として得た。この物質は、ＨＰＬＣ分析により純度９６％であった。ＭＳ（ＥＳＩ－）：ｍ／ｚ　２６３．４０（Ｍ－Ｈ）$^{-}$；計算値：２６２．９９。

【０１６１】

ルシフェリン６’－（２－クロロエチル）エーテル（Ｌｕｃ　ＣＥＥ）：　一般的手法に従って、６－（２－クロロエトキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（１．０ｇ、４．１９ｍｍｏｌ）から調製した。このようにして得られた固体生成物は、ＨＰＬＣ分析による純度が９９．５％であり、さらなる精製が必要であるとは思われなかった。この生成物の収量は、１．３６ｇ（収率９５％）であった。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　３４２．９４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：３４３．００。

【０１６２】

ルシフェリン６’－ベンジルエーテル（Ｌｕｃ　ＢＥ）：　一般的手法に従って、６－（ベンジルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（０．４１ｇ、１．５ｍｍｏｌ）から調製した。固体の粗生成物を、最初に１００％ジクロロメタンを用いて、徐々に８：２のジクロロメタン－メタノールまで段階的に変化させるシリカゲル（９０ｇ）上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物１９０ｍｇ（収率３４％）を得た。ＭＳ（ＥＳＩ－）：ｍ／ｚ　３６８．６７（Ｍ－Ｈ）$^{-}$；計算値：３６９．０４。

【０１６３】

ルシフェリン６’－（４－トリフルオロメチル）ベンジルエーテル（Ｌｕｃ　ＴＦＭＢＥ）：　一般的手法に従って、６－（４－トリフルオロメチルベンジルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（１．７ｇ、５．０８ｍｍｏｌ）から調製した。その結果生じた固体を、最初に９９：１のジクロロメタン－メタノールを用いて、徐々に９：１のジクロロメタン－メタノールまで段階的に変化させるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、所望の生成物７００ｍｇ（３１％）を固体として得た。

【０１６４】

ルシフェリン６’－（２－フェニルエチル）エーテル（Ｌｕｃ　ＰＥＥ）：　一般的手法に従って、６－（２－クロロエトキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（０．８０ｇ、２．８５ｍｍｏｌ）から調製した。その結果生じた固体を、最初に６：３：１のヘプタン－酢酸エチル－メタノールの混合物、次に５：３：２のメタノール－ヘプタン－酢酸エ

チルの混合物を用いるシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、所望の生成物１４５ｍｇ（１４％）を固体として得た。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　３８４．５２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：３８５．０７。

【０１６５】

ルシフェリン６’－ゲラニルエーテル（Ｌｕｃ　ＧＥ）：　一般的手法に従って、６－ゲラニルオキシ－２－シアノベンゾチアゾール（０．８ｇ）から調製した。その結果生じた固体を、９：１のジクロロメタン－メタノールを用いて、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、１０１ｍｇの固体を得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により、構造を確認した。

【０１６６】

ルシフェリン６’－プレニルエーテル（Ｌｕｃ　ＰＥ）：　一般的手法に従って、６－プレニルオキシ－２－シアノベンゾチアゾール（０．８ｇ）から調製した。その結果生じた固体を、最初に、９：１のジクロロメタン－メタノールを徐々に８：２のジクロロメタン：メタノールまで段階的に変化させるフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。次に該固体を２：１のヘプタン－酢酸エチルを用いるフラッシュクロマトグラフィーにより再精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、３３９ｍｇの帯黄色の固体を得た。ＤＭＳＯ－ｄ６中での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析により構造を確認した。蛍光ＨＰＬＣ分析によりバックグラウンドのルシフェリンが示されたので、分離用逆相ＨＰＬＣにより固体をさらに精製した。

【０１６７】

ルシフェリン６’－（２－ピコリニル）エーテル（Ｌｕｃ　２ＰＥ）：　一般的手法に従って、６－（２－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（２５０ｍｇ、０．９４ｍｍｏｌ）から調製した。このようにして得た固体生成物はＨＰＬＣ分析の結果純度９２．０％であり、この生成物の収率は８０％であった。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　３７１．５５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：３７２．０４。

【０１６８】

ルシフェリン６’－（３－ピコリニル）エーテル（Ｌｕｃ　３ＰＥ）：　一般的手法に従って、６－（３－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（２５０ｍｇ、０．９４ｍｍｏｌ）から調製した。このようにして得た固体生成物はＨＰＬＣ分析の結果純度９９．８％であり、さらなる精製は不要と思われた。この生成物の収率は６０％であった。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　３７１．６４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：３７２．０４。

【０１６９】

ルシフェリン６’－（４－ピコリニル）エーテル（Ｌｕｃ　４ＰＥ）：　一般的手法に従って、６－（４－ピコリニルオキシ）－２－シアノベンゾチアゾール（２６７ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）から調製した（ただし、５ｍＬのＤＭＦを使用して出発物質を溶解した）。このようにして得た固体生成物はＨＰＬＣ分析の結果純度９６．０％であり、さらなる精製は不要と思われた。この生成物の収率は２０％であった。ＭＳ（ＥＳＩ＋）：ｍ／ｚ　３７１．６１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；計算値：３７２．０４。

【０１７０】

（実施例２：二段階のＣＹＰ４５０／ルシフェラーゼ反応およびルシフェリン誘導体の評価）

この実施例では、二段階のＣＹＰ４５０／ルシフェラーゼアッセイのための手法を提供する。この手法を用いて、ルシフェリン誘導体をＰ４５０基質およびルシフェラーゼ基質前駆体として評価した。所与のＣＹＰ４５０アイソフォームに最適なＫＰＯ$_{4}$緩衝剤の量（ＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｂ６、ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｅ１に関しては１００ｍＭ；ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ１９に関しては５０ｍＭ；２Ｃ９ならびにプール化ヒト肝臓ミクロソームに関しては２５ｍＭ；ＣＹＰ３Ａ４に関しては２００ｍＭ）で、ＣＹＰ４５０反応物２０マイクロリットルをｐＨ７．４で調製した。ＣＹＰ２Ａ６に関しては、１００ｍＭトリス（ｐＨ７．５）をＫＰＯ$_{4}$の代わりに用いた。反応混合物には、１．３ｍＭのＮＡＤＰ＋、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、０．４Ｕ／ｍ

lのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、３．３ｍＭの$MgCl_2$およびルシフェリン誘導体／ＣＹＰ４５０基質も含めた。Ｓｆ９細胞ミクロソーム膜でＣＹＰ４５０レダクターゼと同時発現させた０．４ｐｍｏｌの組換えヒトＣＹＰ４５０または４マイクログラムのプール化ヒト肝臓ミクロソームを添加し、３７℃でインキュベーションして反応を開始した。３７℃での初期インキュベーション期間後、２０マイクロリットルのＣＹＰ４５０反応物を８０マイクロリットルのルシフェラーゼ反応混合物と混合した。ルシフェラーゼ反応混合物には、２５０μＭのＡＴＰ、５～２５μｇ／ｍＬのホタル（Photuris pennsylvanica）由来の熱安定性ルシフェラーゼ（国際公報第９９１４３３６号パンフレット（１９９９年3月２５日公開、この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）に記載されているように調製した）、２０ｍＭのトリシン（ｐＨ７．８）、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、８ｍＭの$MgCl_2$、０．６ｍＭの補酵素Ａおよび３３ｍＭのＤＴＴを含めた。同様に、５０マイクロリットルのＣＹＰ４５０および（例えば図３Ｂ、表３の）ルシフェラーゼ反応容積を用いてアッセイを実施した。発生した光を、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）、ターナーの２０／２０またはベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで直ちに測定した。異なる製造業者の計器の較正は様々であるため、発生した光の定量は計器特異的であり、そして計器間で直接比較することはできない。

【０１７１】

Ｏ－脱アルキル化およびヒドロキシル化は、ＣＹＰ４５０が触媒する一般的な生体異物の変換である（９）。組換えヒトＣＹＰ４５０ミクロソーム調製物パネルを、ルシフェリン６’メチル（Ｌｕｃ　ＭＥ）、エチル（Ｌｕｃ　ＥＥ）、クロロエチル（Ｌｌｕｃ　ＣＥＥ）、ベンジル（Ｌｕｃ　ＢＥ）、ｐ－ＣＦ３ベンジル（Ｌｕｃ　ＴＦＭＢＥ）、フェニルエチル（Ｌｌｕｃ　ＰＥＥ）、ゲラニル（Ｌｕｃ　ＧＥ）、２、３、４ピコリニル（Ｌｕｃ　２ＰＥ、Ｌｕｃ　３ＰＥおよびＬｕｃ　４ＰＥ）およびプレニル（Ｌｕｃ　ＰＥ）エーテルに対するＯ－脱アルキル化酵素活性に関して、ならびにデヒドロルシフェリン（Ｈ－Ｌｕｃ）に対するヒドロキシル化酵素活性に関して試験した（図２）。これらの化合物は、光を生成するルシフェラーゼ反応において、不活性であるか、または真正ルシフェリンと比較するとあまり活性がない。試験したＣＹＰ４５０活性は、ＮＡＤＰＨ　ＣＹＰ４５０レダクターゼとの組合せで一種類の組換えヒトＣＹＰ４５０アイソフォームを過剰発現する昆虫細胞に由来するミクロソーム画分中に含まれている。ＣＹＰ４５０がルシフェリン誘導体の６’位を脱アルキル化またはヒドロキシル化すると、図１の式で説明されるように、光を生成するホタルルシフェラーゼ反応において酵素的に検出可能な真正ルシフェリンが生成されると考えられる。

【０１７２】

Ｌｕｃ　ＭＥ、Ｌｕｃ　ＥＥ、Ｌｕｃ　ＣＥＥ、Ｌｕｃ　ＢＥ、Ｈ－Ｌｕｃ、Ｌｕｃ　ＴＦＭＢＥ、Ｌｕｃ　ＰＥＥ、Ｌｕｃ　ＧＥ、Ｌｕｃ　２ＰＥ、Ｌｕｃ　３ＰＥおよびＬｕｃ　４ＰＥならびにＬｕｃ　ＰＥを二段階のアッセイに供したが、同アッセイにおいては、前記化合物を最初に、ＣＹＰ４５０が活性を示すことが既知である条件下で、ＣＹＰ４５０に富むミクロソームのパネルまたは対照ミクロソーム（検出可能なＣＹＰ４５０活性を示さない）とともにインキュベートした。パネルには、ＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ａ６、ＣＹＰ２Ｂ６、ＣＹＰ２Ｃ８、ＣＹＰ２Ｃ９、ＣＹＰ２Ｃ１９、ＣＹＰ２Ｄ６、ＣＹＰ２Ｅ１およびＣＹＰ３Ａ４を含めた。ＣＹＰ４５０を用いた初期インキュベーション後、ルシフェラーゼおよび同ルシフェラーゼに必要な補因子を添加し、発生した光をモニタリングした（図３Ａ～Ｉおよび図９）。Ｌｕｃ　ＭＥとＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９、Ｌｕｃ　ＢＥとＣＹＰ２Ｃ８、ＣＹＰ２Ｃ９およびＣＹＰ３Ａ４、Ｌｕｃ　ＥＥとＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９、Ｌｕｃ　ＣＥＥとＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９、Ｌｕｃ　ＴＦＭＢＥとＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９、Ｌｕｃ　ＰＥ、Ｌｕｃ　ＰＥＥとＣＹＰ３Ａ４、Ｌｕｃ　ＧＥとＣＹＰ１Ａ１、ならびにＬｕｃ　ＰＥとＣＹＰ３Ａ４において、発生した光は対照を上回って有意に増大した（図３Ａ～Ｉ）。Ｌｕ

ｃ　２ＰＥ、Ｌｕｃ　３ＰＥおよびＬｕｃ　４ＰＥに関しては、発生する光の最も明らかな増大はＣＹＰ１Ａ１およびＣＹＰ３Ａ４を用いた場合であって、作用はいずれのアイソフォームについてもＬｕｃ　３ＰＥの場合が最も顕著であった（図９）。これらのアイソフォームは、ルシフェリン６’アルキルエーテルおよび６’置換アルキルエーテルを脱アルキル化してルシフェリンを生成したように思われるが、試験した他のアイソフォームは脱アルキル化しなかった。Ｈ－Ｌｕｃを基質として用いた場合、ＣＹＰ１Ａ２およびＣＹＰ２Ｃ９は、対照を上回る光を発生した。Ｈ－Ｌｕｃがヒドロキシル化されてルシフェリンを生成したと考えられ、試験したパネル内では、この反応はＣＹＰ２Ｃ９アイソフォームを用いた場合に最も顕著であった。示されていないアイソフォーム／基質の組合せに関する値は、対照のＳｆ９細胞膜と同様であった。各パネルスクリーニングについて、バックグラウンドの発光は、少なくとも一部は、未反応のｄ－ルシフェリン誘導体調製物中に混入しているＤ－ルシフェリンの存在を反映している。ＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８、ＣＹＰ２Ｃ９およびＣＹＰ３Ａ４の発光反応は、基質に関して用量依存的であった（データは示されていない）。

【０１７３】

（実施例３：二段階のＣＹＰ４５０の発光反応におけるＣＹＰ４５０／基質インキュベーション時間依存性）

Ｌｕｃ　ＭＥとＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９、Ｈ－ＬｕｃとＣＹＰ２Ｃ９、そしてＬｕｃ　ＢＥとＣＹＰ３Ａ４のインキュベーションについて、経時変化を調べた（図４）。ＣＹＰ４５０反応混合物にルシフェラーゼ反応混合物を添加して１２分以内に測定した発光量は、Ｌｕｃ　ＭＥまたはＨ－ＬｕｃとＣＹＰ２Ｃ９に関して、ならびにＬｕｃ　ＢＥとＣＹＰ３Ａ４に関しては６０分までの間、直線的に増大した。ＣＹＰ１Ａ２およびＣＹＰ２Ｃ８に関しては、時間依存的な増大は認められたが、増大率は低下し、６０分近くではＣＹＰ２Ｃ８に関しては控えめに増大しただけで、ＣＹＰ１Ａ２に関しては全く増大しなかった。これらの経時変化は、それぞれの通常の基質であるフェナセチン、パクリタキセル、ジクロフェナクおよびテストステロンを用いたＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８、ＣＹＰ２Ｃ９およびＣＹＰ３Ａ４の活性を反映している（１０、１１、１２）。

【０１７４】

（実施例４：二段階のＣＹＰ４５０の発光反応からの光入力の経時変化）

この実施例では、ルシフェラーゼ反応の構成成分をＣＹＰ４５０反応物と組合せた後に発光シグナルを生成させ、該発光を長時間に亘ってモニタリングした（図５）。３７℃で６０分間、ＣＹＰ４５０反応混合物中でＤ－ルシフェリン誘導体をインキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。－ＣＹＰ４５０対照では、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを$Ｈ_2Ｏ$に置き換えた。反応物を合わせて３分後に開始して、図示したように間をおいて次々と２８４分間、ターナーのＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）ルミノメーターで発光を読取った。試験したＣＹＰ４５０および基質に関しては、シグナルは非常に安定しており、５時間より長い半減期で減衰した。

【０１７５】

（実施例５：室温における一段階のＣＹＰ４５０／ルシフェラーゼ反応）

この実施例では、一段階のＣＹＰ４５０／ルシフェラーゼアッセイのための手法を提供する。この手法を用いて、ルシフェリン誘導体をＰ４５０の基質およびルシフェラーゼの基質前駆体として評価した。ＣＹＰ４５０アイソフォームに最適な$ＫＰＯ_4$緩衝剤の量（二段階の反応の方法を参照のこと）で、ＣＹＰ４５０反応物１００マイクロリットルをｐＨ７．４で調製した。反応混合物には、１．３ｍＭのＮＡＤＰ＋、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、０．４Ｕ／ｍｌのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、３．７ｍＭの$ＭｇＳＯ_4$、０．６ｍＭの補酵素Ａ、ルシフェリン誘導体／ＣＹＰ４５０基質、２５０μＭのＡＴＰおよび２１μｇ／ｍＬのホタル（Photuris pennsylvanica）由来の熱安定性ルシフェラーゼ（国際公開第９９１４３３６号パンフレット（１９９９年3月２５日公開）（この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される））に記載されているよ

うに調製したもの）も含めた。Ｓｆ９細胞ミクロソーム膜（例えばゲンテスト（GenTest）のＳｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（商標））中でＣＹＰ４５０レダクターゼと同時発現させた２．０ｐｍｏｌの組換えヒトＣＹＰ４５０を添加し、室温または３７℃でインキュベーションして反応を開始した。発生した光を、ターナーのＲｅｐｏｒｔｅｒまたはベルソルド・オリオンのルミノメーターで、直ちにかつ継続的に測定した。

【０１７６】

ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９ミクロソーム調製物と共にインキュベートしたＬｕｃ　ＭＥと、ルシフェラーゼおよび同ルシフェラーゼに必要な補因子とを用いて、室温（～２２℃）で一段階アッセイを実施した。初期ベースラインの発光を測定し、次にＣＹＰ４５０の添加により反応が開始された時点から長時間に亘って発生した光をモニタリングした（図６）。各反応に関しては、ＣＹＰ４５０が反応混合物中に含まれる場合、発生する光の時間依存的増大が観察された。室温での最も頑健な応答は、ＣＹＰ１Ａ２を用いた場合に観察された。発光は約４０分後に最大レベルに増大し、約３時間安定を保持し、その後、アッセイの残り時間に亘って漸次減少した。ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９の室温における反応からの発光は、約３時間漸次増大し、約１時間安定を保持し、その後、アッセイの残り時間に亘って漸次減少した。Ｈ－ＬｕｃおよびＣＹＰ２Ｃ９を用いて、ならびにＬｕｃ　ＥＥおよびＣＹＰ２Ｃ８を用いて、同様の一段階アッセイを実施した（データは示されていない）。

【０１７７】

（実施例６：３７℃における一段階のＣＹＰ４５０／ルシフェラーゼ反応）

本実施例では、実施例５の一段階アッセイを３７℃で実施し、ＣＹＰ４５０の添加により反応が開始された時点から長時間に亘って光をモニタリングした（図７）。ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ２Ｃ９をＬｕｃ　ＭＥに対して、ＣＹＰ２Ｃ９をＨ－Ｌｕｃに対して、ＣＹＰ３Ａ４をＬｕｃ　ＢＥに対してアッセイした。ＣＹＰ１Ａ２およびＣＹＰ２Ｃ９は同様に、約３０分までに発光のピークまで増大し、その後、減少した。ＣＹＰ２Ｃ８の反応では、発生した光は－ＣＹＰ４５０対照の発光を超えたが、しかし試験条件および対照条件のいずれにおいても、反応が経過すると初期値から減少した。Ｈ－ＬｕｃとＣＹＰ２Ｃ９については、Ｌｕｃ　ＭＥと同様に、約３０分までに最大まで増大し、その後減少した。ＣＹＰ３Ａ４およびＬｕｃ　ＢＥと－ＣＹＰ４５０対照との間の発光の差は、あまり大きくなかった。各々の場合の－ＣＹＰ４５０対照物からの発光は、未反応のＤ－ルシフェリン誘導体調製物中にルシフェリンが混入している結果であると思われた。

【０１７８】

（実施例７：二段階のＣＹＰ４５０の発光反応におけるプール化ヒト肝臓ミクロソーム）

基質としてＨ－Ｌｕｃ、Ｌｕｃ　ＭＥ、Ｌｕｃ　ＥＥおよびＬｕｃ　ＢＥ（図８）を用いる二段階のＣＹＰ４５０の発光アッセイにおいて、ＣＹＰ４５０活性の混合物を含有するプール化ヒト肝臓ミクロソーム調製物を用いた。ＣＹＰ４５０活性を示さないＳｆ９細胞膜と比較して、有意量のＣＹＰ４５０活性が、各基質を用いた発光方法により検出された。発光全体に対する個々のアイソフォームの寄与は、スルファフェナゾール（ＣＹＰ２Ｃ９阻害剤）、α－ナフトフラボン（ＣＹＰ１Ａ２阻害剤）およびケトコナゾール（ＣＹＰ２Ｃ８およびＣＹＰ３Ａ４阻害剤）を用いた阻害により示唆された（１３）。特に注目すべきは、ＣＹＰ２Ｃ９の選択的阻害剤スルファフェナゾールにより、Ｈ－Ｌｕｃを用いた発光がほぼ完全に阻害されたことである。１００μＭのケトコナゾールによるＨ－Ｌｕｃの反応の部分的阻害も、同阻害剤がＣＹＰ２Ｃ９の活性に有効であることと一致する。このことと、Ｈ－ＬｕｃがＣＹＰ２Ｃ９に対して選択的であるという実証（図３Ａ～Ｉ）とを合わせると、Ｈ－Ｌｕｃに対するミクロソーム活性が主としてＣＹＰ２Ｃ９である、ということが示唆される。Ｌｕｃ　ＭＥおよびＬｕｃ　ＥＥの活性に及ぼすスルファフェナゾールおよびケトコナゾールの作用は、ＣＹＰ２Ｃ８活性が存在することと一致する。というのも、ＣＹＰ２Ｃ８はこれらの基質の両方に対して活性を有し、かついずれの阻害

剤によっても阻害されるからである。ケトコナゾールによるＬｕｃ　ＢＥ活性の阻害は、ＣＹＰ３Ａ４および／またはＣＹＰ２Ｃ８が存在することと一致する。というのも、いずれのアイソフォームもＬｕｃ　ＢＥに対して活性を有し、かついずれもケトコナゾールにより抑制されるからである。αーナフトフラボンによる阻害がないということは、ミクロソーム調製物中にＣＹＰ１Ａ２活性がほとんどまたは全く存在しない、ということを示す。αーナフトフラボンによりＬｕｃ　ＢＥに対する活性がわずかに刺激されるということは、ＣＹＰ３Ａ４活性の存在を反映している可能性がある。というのも、このアイソフォームはαーナフトフラボンにより刺激されるからである（１６）。

【０１７９】

（実施例８：既知のＰ４５０阻害剤によるＣＹＰ４５０の阻害の検出）

ＣＹＰ４５０の発光アッセイの基質としてのルシフェリン誘導体は、薬剤またはその他の生体異物によるＣＹＰ４５０の阻害を検出するためのプローブとして有用であるはずである。この仮説を試験するために、既知のＣＹＰ４５０阻害剤およびある種のルシフェラーゼ誘導体を反応物に添加し、ＩＣ５０を決定した。試験した阻害剤は、ＣＹＰ２Ｃ９に関してはスルファフェナゾール、ＣＹＰ１Ａ２に関してはαーナフトフラボン、ならびにＣＹＰ２Ｃ８および３Ａ４に関してはケトコナゾールであった。実施例２に記載したように、二段階のアッセイを実施した。これらの薬剤は、用量依存的に反応を抑制した（表１）。多くの場合、ＩＣ５０は、他の基質を用いたアッセイに関して報告されたＩＣ５０（１３）に匹敵した。阻害剤はＣＹＰ４５０に作用していた。基質としてルシフェリンを用いた対照アッセイにおいて、ルシフェラーゼの阻害は検出されなかった（データは示されていない）。

【０１８０】

表１は、通常の基質およびＤールシフェリン誘導体とのＣＹＰ４５０の反応に対する、ケトコナゾール、αーナフトフラボンおよびスルファフェナゾールによる阻害を総括したものである。実施例２に記載したのと基本的に同じように二段階で、ルシフェリン誘導体を用いてＣＹＰ４５０アッセイを実施した。この場合、ＣＹＰ４５０を約４０ｎＭ～１０μＭの濃度範囲の阻害剤に１０分間曝露した後、Ｄールシフェリン誘導体に曝露した。グラフパッド・プリズム（GraphPad Prism、商標）ソフトウエアを用いた非線型回帰分析により、$ＩＣ_{５０}$を算出した。＊印を付けた記載事項は参照文献１３から得た。

【０１８１】

【表１】

表1 CYP450阻害剤によるCYP450反応の阻害

P450／基質	α－ナフトフラボン	ケトコナゾール	スルファフェナゾール
CYP1A2/Luc ME	0.2	---	---
CYP1A2/ エトキシレゾルフィン *	0.4	---	---
CYP1A2/ フェナントレン *	3.8	---	---
CYP1A2/ イマプリン *	0.1	---	---
CYP2C8/Luc EE	---	26.4	---
CYP2C8/ フェナントレン *	---	8.9	---
CYP2C9/H-Luc	---	---	0.7
CYP2C9/Luc ME	---	---	0.4
CYP2C9/Luc EE	---	---	0.5
CYP2C9/ジアゼパム *	---	---	0.5
CYP2C9/ フェナントレン *	---	---	0.7
CYP3A4/Luc BE	---	0.06	---
CYP3A4/ジアゼパム *	---	0.5	---
CYP3A4/ フェナントレン *	---	0.03	---
CYP3A4/テストステロン *	---	0.04	---

CYP450アイソフォーム／基質の反応に対する IC_{50} （μM)を示す。
＊参照文献13から転載。

（実施例９：ＣＹＰ４５０により触媒されるルシフェリン誘導体のルシフェリンへの変換）

この実施例では、シトクロムＰ４５０酵素によるＬｕｃ　ＭＥ、Ｈ－Ｌｕｃ、Ｌｕｃ　ＣＥＥおよびＬｕｃ　３ＰＥのルシフェリンへの変換を、ＨＰＬＣ分析により確証した（図１０）。１００μＭのＬｕｃ　ＭＥ、Ｈ－Ｌｕｃ、Ｌｕｃ　ＣＥＥおよびＬｕｃ　３ＰＥを、１５０μｌの反応容積中、３７℃で、それぞれＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ９、ＣＹＰ１Ａ１およびＣＹＰ３Ａ４とともにインキュベートした。種々の時間間隔で、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）を添加して０．１％（ｖ／ｖ）として反応を停止させ、液体窒素中で瞬間凍結した。各反応混合物の９５マイクロリットルのアリコートを、ＨＰＬＣにより分画した。ＨＰＬＣ法：高速液体クロマトグラフィーを、多波長吸収（ＨＰ１０５０　ＭＷＤ）および蛍光検出器（ＨＰ　１０４６Ａ）を装備したＨＰ１０５０ＬＣシステムで実施した。０．０５ＭのＫＨ$_2$ＰＯ$_4$／ｐＨ６（溶媒Ａ）と８０：２０のアセトニトリル／水（溶媒Ｂ）との溶媒勾配を用いて、５μｍのＡｄｓｏｒｂｏｓｐｈｅｒｅ（登録商標）ＨＳ　Ｃ１８カラム（オールテック・アソシエイツ（Alltech Associates））で分離を達成した。用いた勾配条件は、１５％Ｂ→９５％Ｂ（１０分間）であった。２６２または３３０ｎｍにおける吸光度により基質を検出し、励起波長３３０ｎｍにおける５２０ｎｍ（発光波長）の蛍光によりルシフェリンを検出した。ゼロ時点は、酵素を含まない対照のデオキシルシフェリンまたはルシフェリン６’メチルエーテルに含まれるルシフェリン含量を表す。

【０１８２】

（実施例１０：既知のＣＹＰ４５０基質によるＣＹＰ４５０阻害の検出）

ＣＹＰ４５０発光アッセイの基質としてのルシフェリン誘導体は、他のＣＹＰ４５０基質を検出するためのプローブとして有用であろう。同一のＣＹＰ４５０アイソフォームに対する２つの別個の基質は活性部位に関して競合すると思われるため、既知の基質や新規の基質がルシフェリン誘導体との発光反応を阻害する能力を観察することにより、既知の基質の特性を解析し、新規の基質を同定することができる。この仮説を試験するために、既知のＣＹＰ４５０基質を反応に添加した（タッサニーヤクル他（Tassaneeyakul, W. et

al ）（1993）「ヒトシトクロムＰ４５０　１Ａ１および１Ａ２の基質と阻害剤プローブの特異性（S pecificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2）」, J. Pharmacol. Exp. Ther., 265, 401-407; マンシー他（Mancy, A. et al ）「ヒトシトクロムＰ４５０活性部位の研究におけるツールとしてのジクロフェナクおよびその誘導体：Ｐ４５０　２Ｃの個別の有効性および部位選択性（Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromesp450 active sites: particular efficiency and regioselectivityof p450 2Cs）」, Biochemistry, 38, 14264-14270 ）。試験した基質は、ＣＹＰ２Ｃ９についてはジクロフェナク、ＣＹＰ１Ａ１およびＣＹＰ１Ａ２についてはフェナセチンであった。これらの薬剤は用量依存的に反応を阻害し、したがってＣＹＰ４５０基質がこれらの発光アッセイにより検出され得るという予測を立証する（以下の表参照）。グラフパッド（GraphPad）ＰＲＩＳＭ（商標）（米国カリフォルニア州サンディエゴ）プログラムを用いた非線型回帰分析により、ＩＣ５０を算出した。実施例２に記載したように反応を実施したが、但し、第一段階（ＣＹＰ４５０反応）は、１ピコモルのＣＹＰ４５０を有する反応容積５０マイクロリットルで実施した。第二段階では、５０マイクロリットルのルシフェラーゼ反応物を添加して、最終濃度５０μｇ／ｍＬのプロメガ（Promega ）のホタル（Photuris pennsylvanica）由来ホタルルシフェラーゼ組換え突然変異体（１７）、２００μＭのＡＴＰ、０．１％のｔｅｒｇｉｔｏｌ（ｖ／ｖ）、４．０ｍＭの$MgSO_4$および１００ｍＭのトリシン（ｐＨ８．４）とした。図１１（ａ）～（ｃ）は、実際の阻害曲線を示す。

【０１８３】

【表２】

表2

CYP450 アイソフォーム/基質	ジクロフェナク	フェナセチン
CYP2C9/H-Luc	13	ND
CYP1A1/Luc CEE	ND	21
CYP1A2/Luc ME	ND	25

示した値は IC_{50}（μM）である。

（実施例１１：Ｃｙｐ４５０／ウミシイタケの二段階の反応およびセレンテラジン誘導体の評価）

この実施例では、二段階の反応系で、セレンテラジンおよびセレンテラジン誘導体、メトキシーセレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンＨＨを用いて、Ｐ４５０活性を決定した。これらのアッセイでは、Ｐ４５０は２つの方式のうちの一方式で、セレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体に作用する。第一の方式の反応では、ウミシイタケ型ルシフェラーゼの基質ではなくセレンテラジンの特徴的化学発光（ルシフェラーゼの非存在下での発光）も示さないセレンテラジン誘導体が、Ｐ４５０により変化してウミシイタケ型ルシフェラーゼの基質となり、化学発光を示す。この種類のセレンテラジン誘導体の一例は、メトキシセレンテラジンＨＨである。第二の方式の反応では、化学発光を示し、ウミシイタケ型ルシフェラーゼの拮抗基質であるセレンテラジンまたはセレンテラジンＨＨが、Ｐ４５０により変化してウミシイタケ型ルシフェラーゼによる化学発光および活性を失う。いずれの方式のアッセイにおいても、化学発光の変化により直接的に、またはウミシイタケ型ルシフェラーゼによる生物発光の変化により間接的に、Ｐ４５０活性を検出することができる。

【０１８４】

（Ｉ）セレンテラジン誘導体の合成

２－オキソ－３－フェニル－プロピオンアルデヒド：　フェニルピルビン酸（２５．０ｇ、１５２．０ｍｍｏｌ）を、乾燥ピリジンとともに２回蒸発させ、次に乾燥ピリジン（２５０ｍＬ）中に再溶解させた。この溶液に、無水酢酸（１７０ｍＬ、１．８ｍｏｌ）を添加し、溶液を周囲温度で１５ｈ撹拌した。ＴＬＣにより反応の進行をモニタリングし

た。反応が完了したら、溶液を蒸発させて粘性を有するシロップとした。このシロップをジクロロメタン（７００ｍＬ）中に溶解し、次に０．１ＭのＨＣｌ水溶液で３回洗浄した（３×２００ｍＬ）。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過して、蒸発させて、琥珀色のシロップとした。この生成物を、移動相としてジクロロメタンを用いてシリカゲル（２５０ｇ）上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、２４ｇの乾燥固体を得た。この物質をＴＨＦ（１５０ｍＬ）中に溶解し、溶液を氷水浴中で冷却した。この溶液に、塩化オキサリル（５１ｍＬ，５８０ｍｍｏｌ）を滴下した。１０分後、ＤＭＦ（７．５ｍＬ）を反応混合物に添加し、反応物を０℃で４時間撹拌した。トルエン（１００ｍＬ）を添加し、反応混合物を蒸発させて、濃厚な油状物を得た。この物質をトルエンとともに２回蒸発させて、粗生成物を真空下で５時間乾燥させた。乾燥物質をＴＨＦ－ジクロロメタンの１：１混合物（２００ｍＬ）中に溶解し、溶液をアルゴン下で－７８℃に冷却した（ドライアイス－イソプロパノール浴）。次に水素化トリ－ｔｅｒｔ－ブトキシアルミニウムリチウム（ＴＨＦ中の１．０Ｍ溶液を１５２ｍＬ、１５２ｍｍｏｌ）を、反応物の内部温度が－６０℃より低い状態であるような速度で添加した。添加完了後、反応物を－６０℃より低い温度で１０時間撹拌した。２ＭのＨＣｌ水溶液（１００ｍＬ）を徐々に添加することにより反応をクエンチし、混合物を周囲温度まで加温させた。反応混合物をジクロロメタン（５００ｍＬ）で希釈し、次に０．１ＭのＨＣｌ水溶液で２回洗浄した（２×１００ｍＬ）。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過して、蒸発させて、琥珀色のシロップを得た。この物質を、移動相として９５：５のヘプタン－酢酸エチルで出発して、次に９：１のヘプタン－酢酸エチルを用いて、シリカゲル（２５０ｇ）上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、１３．５ｇ（８０％）の所望の化合物を得た。

【０１８５】

２，８－ジベンジル－６－フェニル－７Ｈ－イミダゾ［１，２－ａ］ピラジン－３－オン（セレンテラジンＨＨ）：　エタノール（１２５ｍＬ）中の２－アミノ－３－ベンジル－５－フェニルピラジン[20]（２．０ｇ、８．０ｍｍｏｌ）および２－オキソ－３－フェニル－プロピオンアルデヒド（３．０ｇ、１６ｍｍｏｌ）の溶液を、アルゴンガスで２０分間、脱酸素化した。この溶液に濃塩酸（４．０ｍＬ）を添加し、反応混合物を１８時間還流加熱した。反応物を周囲温度まで冷却し、次に蒸発させて、褐色固体とした。この粗生成物をエタノール（４０ｍＬ）とともに粉砕して、その結果生じた固体物質を遠心分離で収集し、次に真空炉中で乾燥させて、１．２８ｇ（４１％）の所望の化合物を得た。この物質は、ＨＰＬＣ分析の結果純度８０％であった。

【０１８６】

２，８－ジベンジル－３－メトキシ－６－フェニル－イミダゾ［１，２－ａ］ピラジン（セレンテラジンＨＨメチルエーテル）：　アルゴン下で周囲温度の乾燥ＤＭＦ（１０ｍＬ）中の２，８－ジベンジル－６－フェニル－７Ｈ－イミダゾ［１，２－ａ］ピラジン－３－オン（０．２５ｇ、０．６ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、ジイソプロピルエチルアミン（１．１ｍＬ、６．０ｍｍｏｌ）を全て一度に添加し、その後ヨウ化メチル（０．４ｍＬ、６．０ｍｍｏｌ）を滴下した。１時間撹拌した後、ＴＬＣ分析により反応が完了した。反応混合物をジクロロメタン（７５ｍＬ）で希釈し、水で２回洗浄した。有機抽出物を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過して、蒸発させて、褐色の油状物を得た。この粗製油を、移動相としてジクロロメタンを用いて、シリカゲル（３０ｇ）上でフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。適切な画分をプールし、蒸発させて、２００ｍｇ（７７％）の所望の化合物を得た。

【０１８７】

（ＩＩ）Ｐ４５０アッセイ

２００ｍＭのKPO_4、ｐＨ７．４（ＣＹＰ３Ａ４に関して）または１００ｍＭのKPO_4、ｐＨ７．４（ＣＹＰ１Ａ１、１Ａ２、２Ｂ６、２Ｄ６、２Ｅ１に関して）または５０ｍＭのKPO_4、ｐＨ７．４（ＣＹＰ２Ｃ８、２Ｃ１９に関して）または２５ｍＭのKPO_4、ｐＨ７．４（ＣＹＰ２Ｃ９に関して）または１００ｍＭのトリス、ｐＨ７．５（

ＣＹＰ２Ａ６に関して）を含有するＰ４５０反応物（２０マイクロリットル）；バキュロウイルスで発現させたＰ４５０（１ｐｍｏｌ）およびＰ４５０レダクターゼを含有する昆虫細胞ミクロソーム、あるいはＰ４５０を含まない対照反応物用の、野生型バキュロウイルスを感染させた昆虫細胞ミクロソーム；１．３ｍＭのＮＡＤＰ$^{+}$；３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸；３．３ｍＭのＭｇＣｌ；０．４ユニット／ｍｌのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ；ならびに基質（３μＭのセレンテラジン、３μＭのセレンテラジンＨＨおよび１０μＭのメトキシ－セレンテラジンＨＨ）を、３７℃で６０分間インキュベートした。

【０１８８】

８０マイクロリットルの３７．５ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４；６２５ｍＭのＫＣｌ；０．１２５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８．０；０．２５％のＴｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００；０．１２５％のＭａｚｕ（登録商標）；１．２５％グリセロール；０．２５ｍｇ／ｍＬゼラチンをＰ４５０反応物へ添加した直後に、Ｐ４５０により変化したセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体の化学発光を決定した。Ｐ４５０により変化したセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体の生物発光の検出のために、ウミシイタケルシフェラーゼ（１．２ｎｇ／ｍＬ）（ケミコン（Chemicon）から購入）を添加した。

【０１８９】

図１２Ａ～Ｌに示したように、メチル－セレンテラジンＨＨをＣＹＰ１Ａ１とともにインキュベーションした後、化学発光（パネルＣおよびＤ）および生物発光（図１２Ａおよび図１２Ｂ）のいずれにおいても大きな増大が認められた。ＣＹＰ１Ａ２、２Ｂ６および２Ｃ１９に関しては化学発光および生物発光のわずかな増大が認められた（２～５×）。セレンテラジンＨＨをＣＹＰ１Ａ２および２Ｅ１とともにインキュベーションした後の化学発光（パネルＧおよびＨ）および生物発光（図１２Ｅおよび図１２Ｆ）の両方において大きな低減が認められた。最後に、２Ｃ９および２Ａ６以外の試験した全てのＰ４５０アイソザイムとともにセレンテラジンをインキュベーションした後、化学発光（図１２Ｋおよび図１２Ｌ）および生物発光（図１２Ｉおよび図１２Ｊ）の両いずれにおいても非常に大きい低減が認められた。

【０１９０】

（実施例１２：酵母ｉＰＰアーゼの添加による、阻害作用を有する緩衝剤からのルシフェラーゼの保護）

本実施例は、阻害作用を有する緩衝剤の存在下における、ルシフェラーゼを用いるＰ４５０反応の阻害をｉＰＰアーゼにより解除することについて例示する。本明細書中で定義する場合、「阻害作用を有する」とは、ルシフェラーゼ反応を阻害するのに十分な量のｉＰＰを含む試薬（例えば緩衝剤）を指す。「阻害作用のない試薬」とは、ルシフェラーゼ反応に及ぼすｉＰＰの作用によって測定した場合、ｉＰＰを実質的に含まない試薬である。ｉＰＰ含量は、ホタルルシフェラーゼがｉＰＰにより阻害され、阻害がｉＰＰアーゼの添加により軽減され、そして阻害がＰＰｉの添加により回復可能であるという知見により実験的に決定される。

【０１９１】

Ｐ４５０反応物（５０マイクロリットル）には、１ｐｍｏｌのＣＹＰ１Ａ２（対照反応物にはＳＦ９膜）、１．３ｍＭのＮＡＤＰ$^{+}$、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、０．２Ｕ／ｍｌのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、３．３ｍＭの$ＭｇＣｌ_{2}$、０．０１ｍＭのＬｕｃ－ＭＥ、ならびに１００ｍＭの$ＫＰＯ_{4}$、ｐＨ７．４（阻害作用を有する緩衝剤）または１００ｍＭの$ＫＰＯ_{4}$、ｐＨ７．４（阻害作用のない緩衝剤）を含めた。反応物を３７℃で１時間インキュベートした。国際公開第９９１４３３６号パンフレット（１９９９年3月２５日公開）（この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）に記載されているように調製したホタル（Photuris pennsylvanica）由来の熱安定性ルシフェラーゼ（１００ｍｇ／ｍＬ）；４００μＭのＡＴＰ、０．４％のＰｒｉｏｎｅｘ（登録商標）、４０ｍＭのトリシン（ｐＨ７．８）、８ｍＭの$ＭｇＳＯ_{4}$、０．２％のＴｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）を含有する等容積の試薬を添加することにより、Ｐ４５

０反応により生成されたルシフェリンの検出を実行した。ｉＰＰアーゼ（シグマ社（Sigma Company ）、カタログ番号Ｉ１８９１）を一部の反応物に添加した。ベルソルド・オリオンのマイクロプレートルミノメーターを用いて、発光を検出した。

【０１９２】

図１３および図１５に示したように、酵母の無機ピロホスファターゼは、阻害作用を有する緩衝剤が用いられる場合、ルシフェラーゼのｉＰＰによる阻害を解除するのに有効であった。

【０１９３】

（実施例１３：無機ピロホスファターゼはピロホスファターゼの混入からルシフェラーゼを保護する）

本実施例では、３つの供給元からの慣用的方法により単離された熱安定性無機ピロホスファターゼ、すなわちニューイングランド・バイオラブス・インコーポレイテッド（New England Biolabs, Inc. 、米国マサチューセッツ州ビバリー所在、カタログ番号Ｍ０２９６）の熱安定性無機ピロホスファターゼ、シグマ（Sigma ）からの市販の酵母無機ピロホスファターゼ（カタログ番号Ｉ１８９１）、ならびに高度好熱菌（Ｔｔｈ）から単離されたピロホスファターゼについて、ルシフェラーゼを用いたＰ４５０反応におけるｉＰＰ混入緩衝剤の作用を解除する際の効率に関して評価した。

【０１９４】

この実験において、Ｐ４５０反応混合物（５０マイクロリットル）を調製した。反応物には、１ｐｍｏｌのＣＹＰ１Ａ２（対照反応物ではＳｆ９膜）、１．３ｍＭのＮＡＤＰ$^{+}$、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、０．２Ｕ／ｍｌのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、３．３ｍＭの$\mathrm{MgCl_2}$、０．０１ｍＭのＬｕｃ－ＭＥ、ならびに１００ｍＭの$\mathrm{KPO_4}$、ｐＨ７．４（阻害作用を有する緩衝剤）または１００ｍＭの$\mathrm{KPO_4}$、ｐＨ７．４（阻害作用のない緩衝剤）を含めた。反応物を３７℃で１時間インキュベートした。国際公開第９９１４３３６号パンフレット（１９９９年3月２５日公開、この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）に記載されたように調製したホタル（Photuris pennsylvanica）由来の熱安定性ルシフェラーゼ１００ｍｇ／ｍＬ、４００ｍＭのＡＴＰ、０．６％のＰｒｉｏｎｅｘ（登録商標）、４０ｍＭのトリシン（ｐＨ７．８）、８ｍＭの$\mathrm{MgSO_4}$、０．２％のＴｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）、０．０２％のＭａｚｕ（登録商標）を含有する等容積の試薬の添加により、Ｐ４５０反応により生成されたルシフェリンの検出を実行した。慣用的方法で単離された、ニューイングランド・バイオラブス・インコーポレイテッドのｉＰＰアーゼ（米国マサチューセッツ州ビバリー所在、カタログ番号Ｍ０２９６）、シグマのｉＰＰアーゼ（カタログ番号Ｉ１８９１）、または高度好熱菌（Ｔｔｈ）のｉＰＰアーゼを、一部の反応物に添加した。室温で３０分間インキュベーションした後、ベルソルド・オリオンのマイクロプレートルミノメーターを用いて、発光を検出した。

【０１９５】

図１４に示したように、様々な供給源からの無機ピロホスファターゼが、阻害作用を有する$\mathrm{KPO_4}$緩衝剤がＰ４５０反応に用いられるときのルシフェラーゼの阻害を解除した。反応条件、温度および酵素濃度は、種々のｉＰＰアーゼ酵素がｉＰＰ阻害を解除する際の効率に影響を及ぼすことが判明した（データは示されていない）。

【０１９６】

（実施例１４：酵母ｉＰＰアーゼを用いた添加ｉＰＰからのルシフェラーゼの保護）

本実施例は、添加されたｉＰＰの存在下におけるルシフェラーゼ反応阻害のｉＰＰアーゼによる解除を例示し、阻害作用のない２００ｍＭの$\mathrm{KPO_4}$緩衝剤に3ｍＭのＮａＰＰｉを含めた場合の阻害能が、阻害作用を有する２００ｍＭの$\mathrm{KPO_4}$緩衝剤の阻害能と同様であり、かつｉＰＰアーゼが添加されたＮａＰＰｉの作用を解除することを示す。

【０１９７】

反応物には、１００ｍＭのトリシン（ｐＨ８．４）、１０ｍＭの$\mathrm{MgSO_4}$、０．１％のＴｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）、０．０１％のＭａｚｕ（登録商標）、５０ｍｇ／ｍＬ

の熱安定性ルシフェラーゼ（国際公開第９９１４３３６号パンフレット（１９９９年3月２５日公開、この記載内容全体は、参照により本明細書中で援用される）に記載されたように調製したホタル（Photuris pennsylvanica）由来）、２００ｍＭのＡＴＰ、０．２％のＰｒｉｏｎｅｘ（登録商標）、０．５ｍＭのルシフェリンを含めた。全ての反応物に、阻害作用のない２００ｍＭのＫＰＯ$_4$、ｐＨ７．４または阻害作用を有する２００ｍＭのＫＰＯ$_4$、ｐＨ７．４のいずれかを含めた。ｉＰＰアーゼ（シグマ（Sigma ）、Ｉ１８９１）を一部の反応物に添加して最終濃度を2ユニット／ｍＬとした。ピロリン酸ナトリウム（ＮａＰＰｉ）を一部の反応物に添加して、最終濃度を３ｍＭとした。反応は室温で実施した。ベルソルド・オリオンのマイクロプレートルミノメーターを用いて、発光を検出した。

【０１９８】
図１５に示したように、無機ピロホスファターゼは、阻害作用を有するＫＰＯ$_4$緩衝剤が用いられる場合のルシフェラーゼの阻害を解除するのに有効であった。メカニズムと結びつけなくとも、ｉＰＰを添加しなければ有効な緩衝剤にｉＰＰを添加すると阻害作用を有する緩衝剤を再生し得ること、そしてその阻害はｉＰＰアーゼの添加により解除可能であることを、本発明人等は観察した。これらの知見は、阻害剤がｉＰＰであることを意味している。

【０１９９】
（実施例１５：細胞を用いるＣＹＰ４５０発光アッセイ）
本実施例では、細胞を用いるＣＹＰ４５０発光アッセイについて説明する。ＣＹＰ４５０遺伝子発現の誘導物質を、ＣＹＰ４５０活性に及ぼす該誘導物質の作用に関して評価した。性的に成熟した雄のスプレーグ・ドーリー（Sprague Dawley）ラット由来の初代肝細胞を、ゼノテック・エルエルシー（Xenotech, LLC 、米国カンザス州カンザスシティ所在）から凍結保存状態で入手した。１日目に、細胞を供給元が推奨するとおりに解凍して、トリパンブルー排除法により、生細胞の割合（％）を概算した。約１．５×１０^{5}個／ｃｍ^{2}の細胞を、コラーゲンでコーティングされた２４ウエル組織培養プレートに播種した。２ｍＭのＬ－グルタミンおよび１×ペニシリン－ストレプトマイシン（ライフ・テクノロジーズ・インコーポレイテッド（Life Technologies, Inc. ）、米国メリーランド州ロックビル所在）を補充した０．３ｍＬ／ウエルのＨｅｐａｔｏＺｙｍｅ‐ＳＦＭ（製品名）培地中で、３７℃、相対湿度９５％、５％ＣＯ$_2$で細胞を培養した。最初に細胞をプレートに6時間付着させてから、培地を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）（ビーディー・バイオサイエンシーズ（BD Biosciences）、米国マサチューセッツ州ベッドフォード所在）を０．２５ｍｇ／ｍｌとなるように添加した新鮮な培地と交換した。培地は毎日交換した。

【０２００】
細胞の播種後３日目に、培地を除去し、ＣＹＰ４５０遺伝子の誘導物質または誘導物質のビヒクル対照を含有する培地０．３ｍｌに交換した。４日目に培地を除去し、新鮮な誘導物質含有培地またはビヒクル対照培地に交換し、細胞が２日間曝露されるようにした。

【０２０１】
５日目に、誘導物質含有培地およびビヒクル対照培地を、発光原となるＣＹＰ４５０基質を含有する新鮮な培地に交換した。発光原基質とともにインキュベーションした期間の終了時に、２種類の発光アッセイを実施した。発光原基質は、おそらく受動的拡散により細胞に進入するので、いずれのアッセイ方式も可能であった。第一の種類のアッセイは、おそらくこれもまた受動的拡散によりＣＹＰ４５０反応のルシフェリン産物が細胞から出るので、可能である。第一の種類のアッセイに関しては、培地の試料を取り出して、等容積のルシフェリン検出試薬（２００ｍＭトリシン、ｐＨ８．４、ホタル（Photuris pennsylvanica）由来ホタルルシフェラーゼ熱安定性突然変異体１００μｇ／ｍＬ（Ultra Glow（商標）ルシフェラーゼ、プロメガ社（Promega, Corp.）から入手可能）、４００μＭのＡＴＰ、２０ｍＭのＭｇＳＯ$_4$および２％のＴｅｒｇｉｔｏｌ）と合わせて発光反応を開始する。第一の種類のアッセイについてブランクを決定するために、一部のウエルには発光原基質を入れず、ルシフェリン検出試薬とまず合わせてから培地のアリコートと合わせ

た。第二の種類のアッセイに関しては、等容積のルシフェリン検出試薬を細胞培地に直接添加して、ＣＹＰ４５０活性を停止させ、細胞溶解物を生成して、発光反応を開始した。第二の種類の反応についてブランクを決定するために、一部のウエルには発光原基質を入れず、ルシフェリン検出試薬をまず添加してから、これらのウエルに発光原基質を添加した。いずれの種類の反応物のアリコートも、白色不透明の９６ウエルプレートに移して、フルオスターオプティマ（Fluostar Optima 、製品名）ルミノメーター（ビーエムジー社（BMG, Inc. ））で発光を読取った。ブランクウエルの発光値を対応するウエルの値から差し引いた。結果を図１６に示す。

【０２０２】

（実施例１６：ルシフェラーゼ阻害剤を用いた発光シグナルの安定化）

本実施例では、２つのルシフェラーゼ競合阻害剤、２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）または２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）を評価して、発光シグナルの安定化に及ぼす作用を決定した。

【０２０３】

５０マイクロリットルのＣＹＰ１Ａ１反応物（０．５ｐｍｏｌの組換えＣＹＰ１Ａ１酵素、３０μＭのルシフェリンクロロエチルエーテル、１００ｍＭの$ＫＰＯ_4$、１．３ｍＭの$ＮＡＤＰ^+$、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、３．３ｍＭの$ＭｇＣｌ_2$、０．０２ユニットのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）を、３７℃で２０分間インキュベートした。インキュベーション後、５０マイクロリットルのルシフェリン検出試薬（１００μｇ／ｍＬの熱安定性ルシフェラーゼ（ホタル（Photuris pennsylvanica）由来）、４００μＭのＡＴＰ、０．６％のＰｒｉｏｎｅｘ、２ユニット／ｍＬのｉＰＰアーゼ、２００ｍＭのトリシン（ｐＨ８．４）、２０ｍＭの$ＭｇＳＯ_4$、２％のＴｅｒｇｉｔｏｌ）を、１００μＭのＡＰＭＢＴもしくは１００μＭのＡＭＢＴを含めるか、あるいは阻害剤を含めずに、各ＣＹＰ１Ａ１反応物に添加した。直後およびその後５分間隔で１時間、発光を読取った。結果を図１７に示す。

【０２０４】

図１７に示したように、阻害剤、例えば２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）によるルシフェラーゼの阻害により、ＣＹＰ４５０発光アッセイにおける発光シグナルを安定化する。

【０２０５】

本発明をここに説明し、いくつかの具体例を用いて例示してきたが、当業者には、本発明の精神を逸脱することなく、種々の修正、例えば変更、追加および省略を本明細書中に開示されたものについてなし得ることが理解できよう。したがってこれらの修正も本発明に含まれること、そして本発明の範囲は添付の特許請求の範囲と合法的に一致し得る最も広い解釈によってのみ限定されることを意味している。

【０２０６】

【表３】

参照文献

1. Black, S.D. and Coon, M.J. (1987) "P450 cytochromes: structure and function", *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol Biol*, 60, 35-87.

2. Phillips, I.R. and Shephard, E.A. eds. (1998) "Cytochrome P450 protocols", *Methods in Mol. Biol.*, 107, v-vi.

3. Nelson, D.R. *et al* (1996) "P450 superfamily: update on new sequences, gene mappin, accession numbers and nomenclature", *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.

4. Wrighton, S.A. and Stevens, J.C. (1992) "The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism", *Critical Reviews in Toxicology*, 22 (1), 1-21.

5. Flickinger, B. (2001) "Using metabolism data in early development", *Drug Disc. Dev.*, 4 (9), 53-56.

6. Miller, V.P. *et al* (2000) "Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of Cytochrome P450", *Ann. NY Acad. Sci*, 919, 26-32.

7. Makings, L.R. and Zlokarnik, G. (2000) "Optical molecular sensors for Cytochrome P450 activity", U.S. patent 6143492.

8. Hardman, J.G. *et al* (eds.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., pp.1-27, McGraw-Hill, 1996.

9. Guengerich, F.P. (2001) "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity", *Chem. Res. Tox.*, 14(6), 611-650.

10. Tassaneeyakul, W. *et al* (1993) "Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2", *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265 (1), 401-407.

11. Rahman, A. *et al* (1994) "Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8", *Cancer Res.* 54 (21), 5543-5546.

12. Leemann, T. *et al* (1993) "Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver", *Life Sci.* 52 (1), 29-34.

13. Sai, Y. *et al* (2000) "Assessment of specificity of eight chemical inhibitors using cDNA-expressed Cytochrome P450", *Xenobiotica* 30 (4), 327-343.

14. Yun, C-H, *et al* (2000) "Rate-determining steps in phenacetin oxidations by human Cytochrome P450 1A2 and selected mutants", *Biochemistry* 39, 11319-11329.

15. Miller, V.P. *et al* (2000) "Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 919, 26-32.

16. Shou, M. *et al* (2001) "A kinetic model for the metabolic interaction of two substrates at the active site of cytochrome P450 3A4", *J. Biol. Chem.* 276 (3), 2256-2262.

17. International publication WO 01/20002 (Promega Corp.).

18. Graham-Lorence, S. and J.A. Peterson, "P450s: Structural similarities and functional differences," FASEB J., 10:206-214 (1996).

19. Prosite: PDOC00081 Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature (Nov., 1997).

20. This compound was prepared from phenylglyoxal aldoxime[21] and 1-cyano-2-phenyl-ethylamine hydrochloride[22] according to the procedure described by Kishi, Y. *et al.* Tetrahedron Letters, No. 27, pp 2747-2748, 1972.

21. This compound was prepared from acetophenone according to the procedure described by Usami, K. *et al.* Tetrahedron, Vol 52, No. 37, pp 12061-12090, 1996.

22. This compound was prepared from phenylacetaldehyde according to the procedure described by Hirano, T. *et al.* Tetrahedron, Vol 53, No. 38, pp 12903-12916, 1997.

【図面の簡単な説明】

【０２０７】

【図１】ＣＹＰ４５０の発光反応スキームを示す図。

【図２】Ｄ－ルシフェリン（（４Ｓ）－４，５－ジヒドロ－２－（６－ヒドロキシ－ベンゾチアゾリル）－４－チアゾールカルボン酸）およびＤ－ルシフェリン誘導体の構造を示す図。

【図３Ａ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを$Ｈ_2Ｏ$と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）で発光を読取った。

【図３Ｂ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）で発光を読取った。

【図３Ｃ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）で発光を読取った。

【図３Ｄ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ

９細胞膜と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで発光を読取った。
【図３Ｅ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）で発光を読取った。
【図３Ｆ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜またはH_2Oと置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで発光を読取った。
【図３Ｇ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜またはH_2Oと置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで発光を読取った。
【図３Ｈ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜またはH_2Oと置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで発光を読取った。
【図３Ｉ】Ｄ－ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体をＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照においては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜またはH_2Oと置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナー社（Turner）のＲｅｐｏｒｔｅｒ（商標）またはベルソルド・オリオン（Berthold Orion）のルミノメーターで発光を読取った。
【図４】二段階のＣＹＰ４５０発光反応におけるＣＹＰ４５０／基質インキュベーション時間依存性を示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体を３７℃でＣＹＰ４５０反応混合物中でグラフに示した時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０を含まない対照に関しては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームをH_2Oと置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ターナーのＲｅｐｏｒｔｅｒ（パネルＡおよびＣ）またはベルソルド・オリオン（パネルＢ）のルミノメーターで発光を読取った。
【図５】二段階のＣＹＰ４５０発光反応から発生する光の時間経過を示すグラフ。　Ｌｕｃ　ＭＥを、ＣＹＰ４５０反応混合物中で３７℃で６０分間インキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。ＣＹＰ４５０の対照については、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームをH_2Oと置き換えた。ターナーのＲｅｐｏｒｔｅｒルミノメーターで、反応物を合わせた後３分で発光の読取りを開始し、２８４分間、グラフに示したように間をおいて次々と読取りを実施した。
【図６】室温での一段階のＣＹＰ４５０発光アッセイを示すグラフ。　Ｌｕｃ　ＭＥを、ＣＹＰ４５０およびルシフェラーゼ反応混合物を合わせた中で室温（～２２℃）でインキュベートした。ＣＹＰ４５０を含まない対照に関しては、ＣＹＰ４５０　Ｓｆ９細胞ミクロソームをH_2Oと置き換えた。ＣＹＰ４５０およびルシフェラーゼ反応混合物を同時に

ＣＹＰ４５０反応混合物に添加し、発生した光を直ちに読取った（時間＝０）。次にターナーのＲｅｐｏｒｔｅｒルミノメーターで１５．５時間、４．２５分毎に読み取りを実行した。

【図７】３７℃での一段階のＣＹＰ４５０発光アッセイを示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体を、ＣＹＰ４５０およびルシフェラーゼ反応混合物を合わせた中で３７℃でインキュベートした。ＣＹＰ４５０を含まない対照に関しては、ＣＹＰ450　Ｓｆ９細胞ミクロソームを$Ｈ_2Ｏ$と置き換えた。ＣＹＰ４５０およびルシフェラーゼ反応混合物を同時にＣＹＰ４５０反応混合物に添加し、発生した光を直ちに読取った（時間＝０）。次にターナーの２０／２０ルミノメーターで３時間、１０分毎に読み取りを実行した。

【図８】二段階のＣＹＰ４５０発光反応におけるプール化ヒト肝臓ミクロソームについて示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体を、３７℃で６０分間、プール化ヒト肝臓ミクロソームとともにＣＹＰ４５０反応混合物中でインキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。対照に関しては、肝臓ミクロソームを対照の（ＣＹＰ４５０を含まない）Ｓｆ９細胞膜と置き換えた。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオンのルミノメーターで発光を読取った。スルファフェナゾール、ケトコナゾールおよびα－ナフトフラボンのビヒクルは、$Ｈ_2Ｏ$中の１％アセトニトリルおよび１ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミンとした。「ｎｔ」の値は、ビヒクル対照である。反応物中のスルファフェナゾール、ケトコナゾールおよびα－ナフトフラボンの濃度は、それぞれ１００μＭ、１００μＭおよび１０μＭであった。

【図９】ＣＹＰ４５０デピコリニラーゼ活性の二段階の検出について示すグラフ。　Ｄ－ルシフェリン誘導体ｌｕｃ２ＰＥ、ｌｕｃ３ＰＥおよびｌｕｃ４ＰＥを、３７℃で６０分間、ＣＹＰ４５０反応混合物中でインキュベートした後、ルシフェラーゼ反応混合物と合わせた。この図において、「Ｓｆ９」と表示されたバーは、対照である。これらはＣＹＰ４５０発現を伴わないＳｆ９細胞膜である。反応物を合わせて１２分以内に、ベルソルド・オリオンのルミノメーターで発光を読取った。

【図１０】ＣＹＰ４５０により触媒されるルシフェリン誘導体のルシフェリンへの変換について示すグラフ。　ルシフェリン誘導体（１００μＭ）を、ＣＹＰ４５０反応混合物中でグラフに示した時間インキュベートした。各インキュベーション時間の終了時に、反応混合物を終濃度０．１％（ｖ／ｖ）のＴｅｒｇｉｔｏｌでクエンチして、次に液体窒素中で凍結させた。反応混合物の９５μｌアリコートをＨＰＬＣにより分析し、３３０ｎｍでの励起および５２０ｎｍでの放出を示す蛍光によりルシフェリンを検出した。ゼロ時間は、対照（酵素を含まない）についてのルシフェリン誘導体中のルシフェリン含量を表す。

【図１１】既知のＣＹＰ４５０基質によるＣＹＰ４５０阻害の検出について示すグラフ。

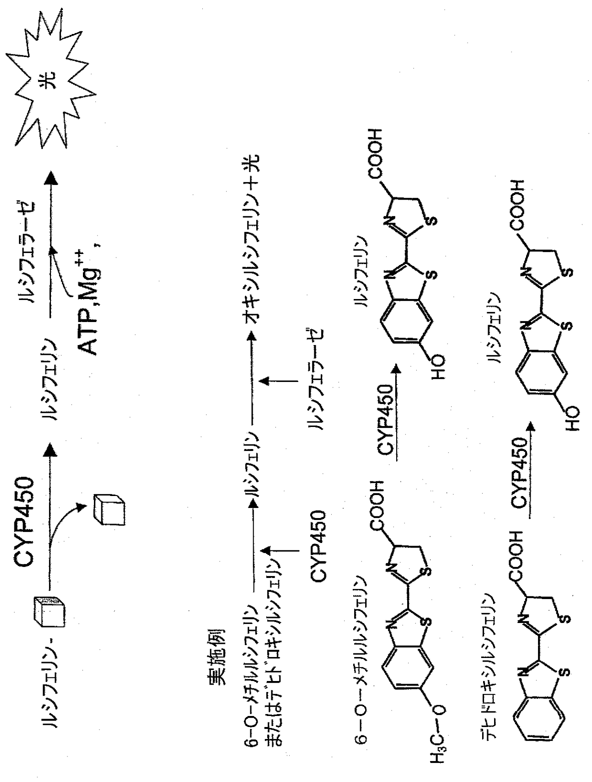
　ＣＹＰ４５０発光アッセイの基質としてのルシフェリン誘導体を、他のＣＹＰ４５０基質を検出するためのプローブとして評価した。試験したＣＹＰ４５０基質は、ＣＹＰ２Ｃ９についてはジクロフェナク、ＣＹＰ１Ａ１およびＣＹＰ１Ａ２についてはフェナセチンであった。反応は実施例１に記載されているように実施したが、但し、第一段階（ＣＹＰ４５０反応）は、１ピコモルのＣＹＰ４５０を含有する５０マイクロリットルの反応容積中で実施した。第二段階では、５０マイクロリットルのルシフェラーゼ反応物を添加して、最終濃度５０μｇ／ｍＬのＵｌｔｒａ　Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼ、２００μＭのＡＴＰ、０．１％のＴｅｒｇｉｔｏｌ（ｖ／ｖ）、４．０ｍＭの$ＭｇＳＯ_4$および１００ｍＭのトリシン、ｐＨ８．４とした。パネルＡは、基質としてＬｕｃ　ＭＥを用いたフェナセチンによるＣＹＰ１Ａ２の阻害を示す。パネルＢは、基質としてＬｕｃ　ＣＥＥを用いたフェナセチンによるＣＹＰ１Ａ１の阻害を示す。パネルＣは、基質としてＨＬｕｃを用いたジクロフェナクによるＣＹＰ２Ｃ９の阻害を示す。

【図１２Ａ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシ－セレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、メトキシ－セレンテラジンＨＨをインキュベーションした後の、ウミシイタケルシフェラーゼ含有反応物中に生成されるメトキシ－セレンテラジンＨＨからの生物発光（相対光

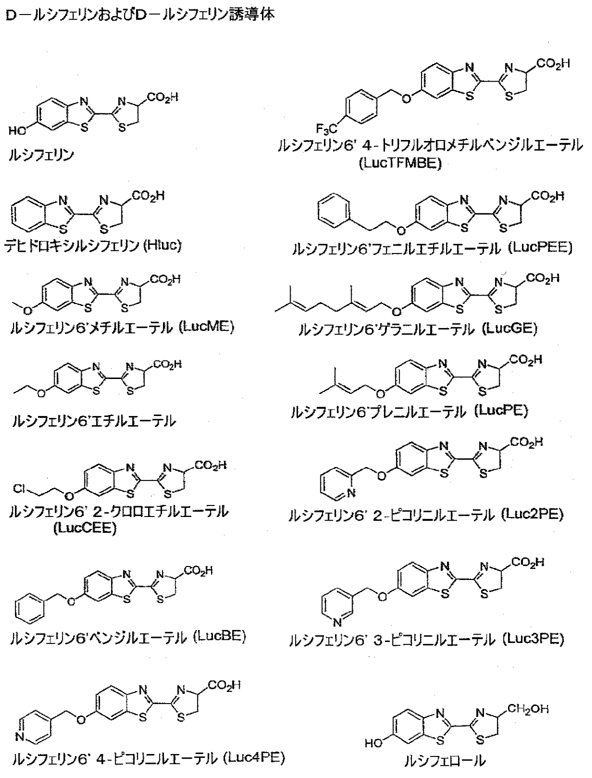
単位：ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｂ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。メトキシーセレンテラジンＨＨおよびＰ４５０を含有する反応物における生物発光の増加倍率（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｃ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、メトキシーセレンテラジンＨＨをインキュベーションした後に生成されるメトキシーセレンテラジンＨＨからの化学発光（ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｄ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。メトキシーセレンテラジンＨＨおよびＰ４５０を含有する反応物における化学発光の増加倍率（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｅ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、セレンテラジンＨＨをインキュベーションした後の、ウミシイタケルシフェラーゼ含有反応物中に生成されるセレンテラジンーＨＨからの生物発光（ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｆ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。セレンテラジンＨＨおよびＰ４５０を含有する反応物における生物発光の減少倍率（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｇ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、セレンテラジンＨＨをインキュベーションした後に生成されるセレンテラジンーＨＨからの化学発光（ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｈ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。セレンテラジンＨＨおよびＰ４５０を含有する反応物における化学発光の減少（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｉ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、セレンテラジンをインキュベーションした後の、ウミシイタケルシフェラーゼ含有反応物中に生成されるセレンテラジンからの生物発光（ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｊ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。セレンテラジンおよびＰ４５０を含有する反応物における生物発光の減少（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｋ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。種々のＰ４５０アイソザイムとともに（＋）またはＰ４５０アイソザイムを含めずに（－）、セレンテラジンをインキュベーションした後に生成されるセレンテラジンからの化学発光（ＲＬＵ）を示す。
【図１２Ｌ】化学発光および生物発光の検出による、メトキシーセレンテラジンＨＨ、セレンテラジンＨＨおよびセレンテラジンに及ぼすＰ４５０の作用について示すグラフ。セレンテラジンおよびＰ４５０を含有する反応物における化学発光の減少（＋Ｐ４５０　ＲＬＵ／－Ｐ４５０　ＲＬＵ）を示す。

【図１３】酵母ｉＰＰアーゼを用いた、阻害作用を有する緩衝液からのルシフェラーゼの保護について示すグラフ。　酵母の無機ピロホスファターゼは、阻害作用を有するＫＰＯ$_4$緩衝液が用いられる場合、ルシフェラーゼのｉＰＰによる阻害を解除するのに有効であることが判明した。
【図１４】無機ピロホスファターゼがピロホスファターゼの混入からルシフェラーゼを保護することについて示すグラフ。　種々の供給源由来の無機ピロホスファターゼが、阻害作用を有するＫＰＯ$_4$緩衝液が用いられる場合、ルシフェラーゼのｉＰＰによる阻害を解除することが判明した。
【図１５】ｉＰＰアーゼを用いた、添加ｉＰＰからのルシフェラーゼの保護について示すグラフ。　無機ピロホスファターゼは、ルシフェラーゼを用いる反応にｉＰＰが添加される場合、該反応のｉＰＰによる阻害を解除するのに有効であることが判明した。
【図１６】細胞を用いるＣＹＰ４５０発光アッセイを示すグラフ。　初代ラット肝細胞を、ＣＹＰ４５０遺伝子発現の誘導物質：５μＭの３－メチルコラントレン（ＭＣ）、５０μＭのデキサメタゾン（Ｄｅｘ）または５０μＭのリファンピシン（Ｒｉｆ）およびそれらのビヒクル対照としてそれぞれ０．０５、０．１および０．１％のＤＭＳＯ（誘導されない）；ならびにＣＹＰ４５０の阻害剤：１００μＭのトロレアンドマイシン（Ｔｒｏ）で２日間処理した。この誘導培地を、次に、肝細胞培地中に溶解した１００μＭのルシフェリン－ＣＥＥ（パネルＡおよびＢ）、２００μＭのルシフェリン－ＢＥ、または２００μＭのルシフェリン－ＢＥ＋Ｔｒｏ各３００マイクロリットルに置き換えて、４時間インキュベートさせた。次に１００マイクロリットルの培地をウエルから取り出してルシフェリン検出試薬と合わせ（実施例１５参照）、かつ２００マイクロリットルのルシフェリン検出試薬を細胞上の残りの培地２００マイクロリットルに添加した。２００マイクロリットルの培地反応物（パネルＡ＆Ｃ）および細胞溶解物反応物（パネルＢ＆Ｄ）からの発光を定量した。
【図１７】ルシフェラーゼ阻害剤を用いた発光シグナルの安定化を示すグラフ。　阻害剤２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）または２－アミノ－６－メチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）によるルシフェラーゼの阻害は、ＣＹＰ４５０発光アッセイにおける発光シグナルを安定化する。５０マイクロリットルのＣＹＰ１Ａ１反応物（０．５ｐｍｏｌの組換えＣＹＰ１Ａ１酵素、３０μＭのルシフェリンクロロエチルエーテル、１００ｍＭのＫＰＯ$_4$、１．３ｍＭのＮＡＤＰ$^+$、３．３ｍＭのグルコース－６－リン酸、３．３ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、０．０２ユニットのグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）を、３７℃で２０分間インキュベートした。インキュベーション後、５０マイクロリットルのルシフェリン検出試薬（１００μｇ／ｍＬの熱安定性ルシフェラーゼ（ホタル類（photuris pennsylvanica）由来）、４００μＭのＡＴＰ、０．６％のＰｒｉｏｎｅｘ（登録商標）、２ユニット／ｍＬのｉＰＰアーゼ、２００ｍＭのトリシン、ｐＨ８．４、２０ｍＭのＭｇＳＯ$_4$、２％のＴｅｒｇｉｔｏｌ）に１００μＭのＡＰＭＢＴ、１００μＭのＡＭＢＴを含めて、または阻害剤を含めずに、ＣＹＰ１Ａ１反応物の各アリコートに添加した。直ちに、そしてその後５分間隔で１時間、発光を読取った。

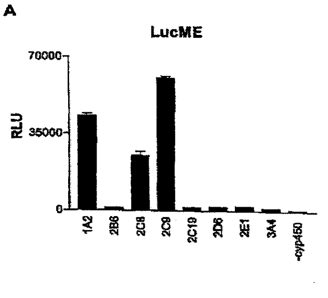
【図１】



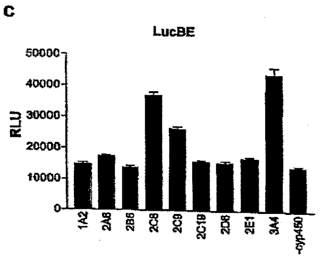
【図２】



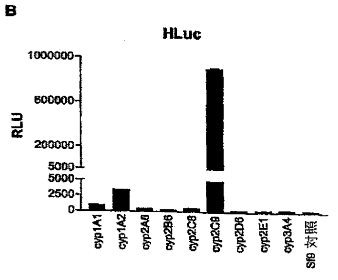
【図３Ａ】



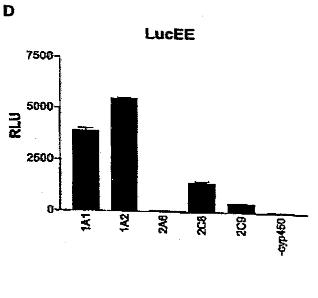
【図３Ｃ】



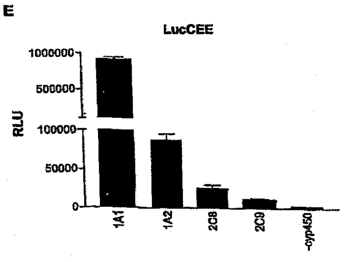
【図３Ｂ】



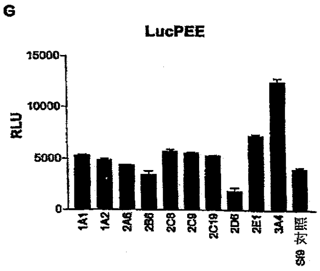
【図３Ｄ】



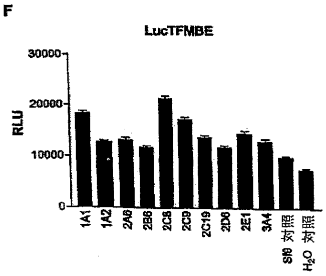
【図３Ｅ】



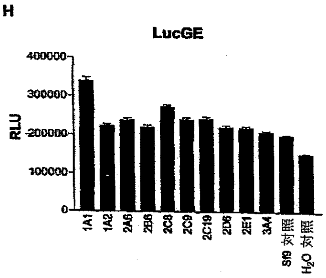
【図３Ｇ】



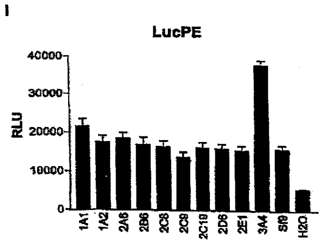
【図３Ｆ】



【図３Ｈ】

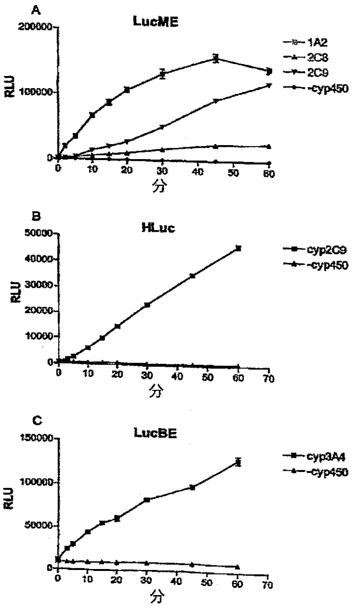


【図３Ｉ】



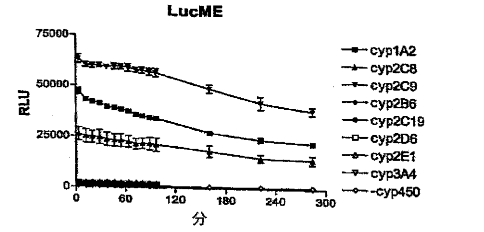
【図４】

Ｄ−ルシフェリン誘導体を用いた二段階のＣＹＰ４５０発光反応における
ＣＹＰ４５０／基質インキュベーション時間依存性



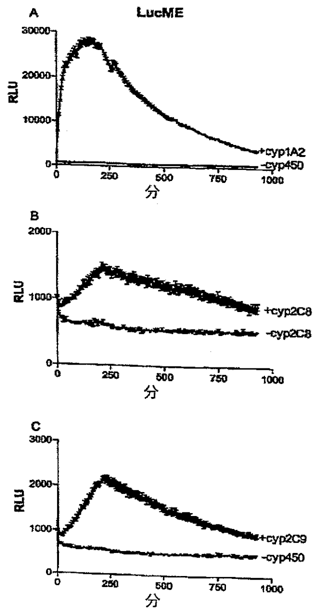
【図５】

LucMEを用いた二段階のcyp450発光反応から発生する光の時間経過



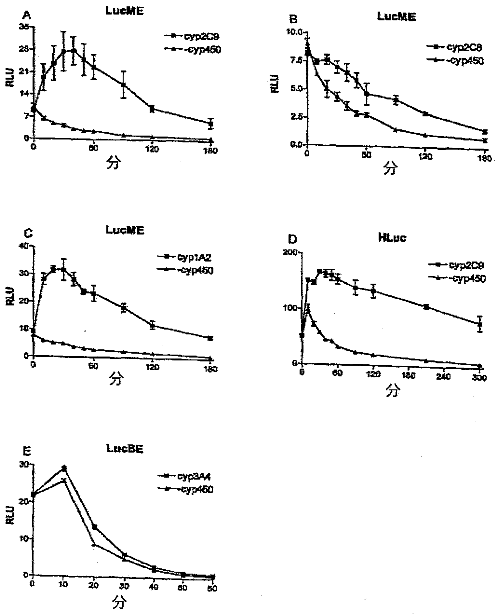
【図６】

LucMEを用いた室温での一段階のcyp450発光アッセイ



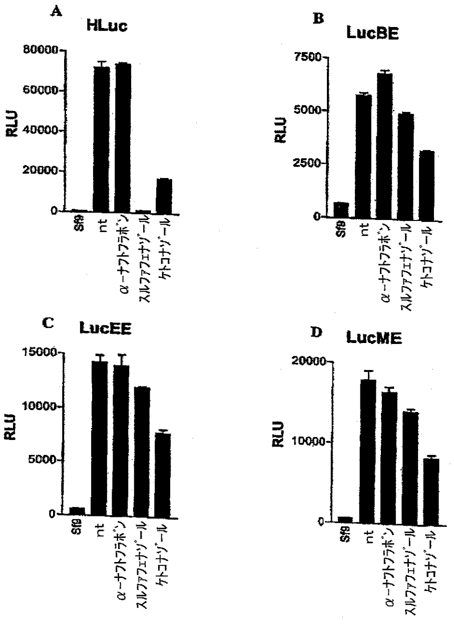
【図７】

Dールシフェリン誘導体を用いた37℃での一段階のcyp450発光アッセイ



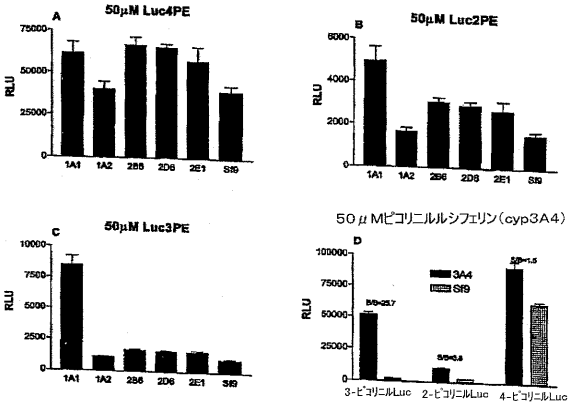
【図８】

Dールシフェリン誘導体を用いた二段階のcyp450発光反応における
プール化ヒト肝臓ミクロソーム



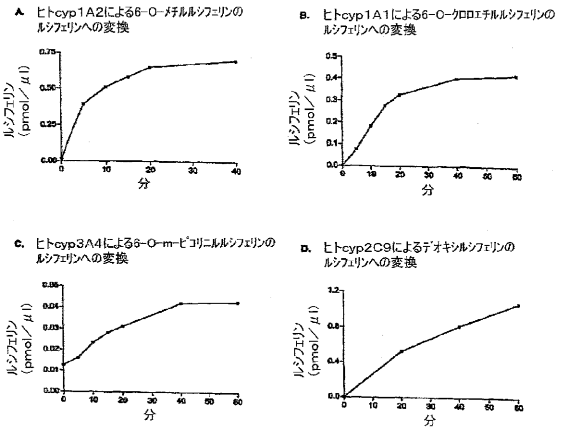
【図９】

ピコリニルD－ルシフェリン誘導体を用いたデピコリニラーゼ活性の二段階の検出



【図１０】

ヒトcyp450によるD－ルシフェリン誘導体のルシフェリンへの変換

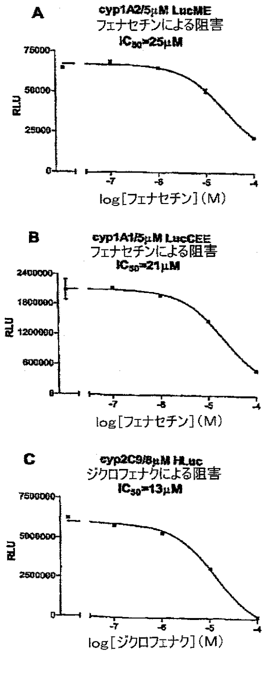


100μMの6－O－メチルルシフェリン（パネルA）、100μMの6－O－クロロエチルルシフェリン（パネルB）、
25μMの6－O－m－ピコリニルルシフェリン（パネルC）または100μMのデオキシルシフェリン（パネルD）を、
150μlの反応容積中で、それぞれcyp1A2、cyp1A1、cyp3A4またはcyp2C9とともに37℃で
インキュベートした。
グラフに示した時間にTergitolを添加し0．1％（v／v）として反応を停止させ、液体窒素中で瞬間凍結させた。
各反応物95μlをHPLCにより分画し、蛍光によりルシフェリンを検出した。
基質を添加する前に0．1％Tergitolを用いてcyp450を不活性化することにより（cyp1A1、1A2および3A4）、
あるいはデオキシルシフェリンを用いて酵素を含まない対照のルシフェリン含量を決定することにより（cyp2C9）、
ゼロ時点を決定した。

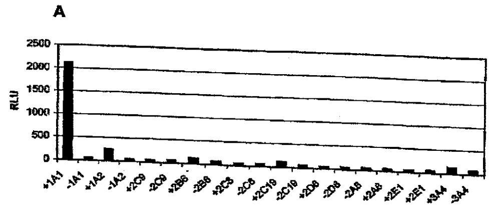
HPLC法：多波長吸収（HP1050 MWD）および蛍光検出器（HP 1046A）を装備した
HP1050LCシステムで、高圧液体クロマトグラフィーを実施した。
0．05Mの KH_2PO_4 / pH 6 溶媒A）と80：20のアセトニトリル／水（溶媒B）との溶媒勾配を用いて、
5μmのAdsorbosphere（登録商標） HS C18カラム（オールテック・アソシエイツ）で分離を達成した。
用いた勾配条件は、15％B→95％B（10分間）であった。
262または330nmにおける吸光度により基質を検出し、励起波長330nmにおける
520nm（発光波長）の蛍光によりルシフェリンを検出した。

【図１１】

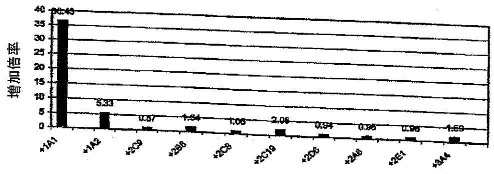
既知のcyp450基質によるcyp450の阻害



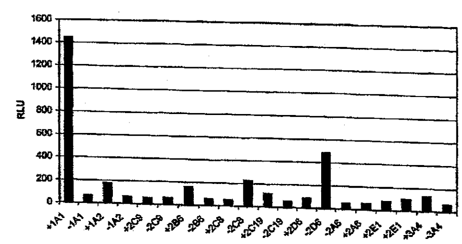
【図１２Ａ】



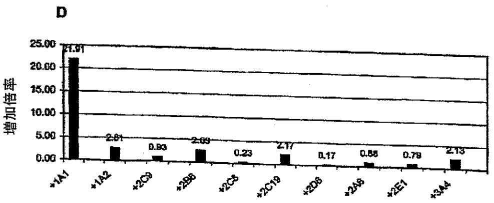
【図１２Ｂ】



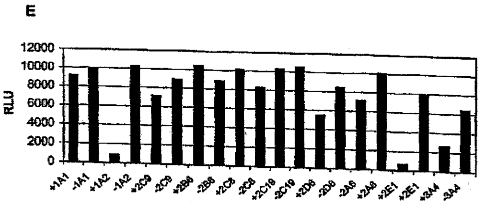
【図１２Ｃ】



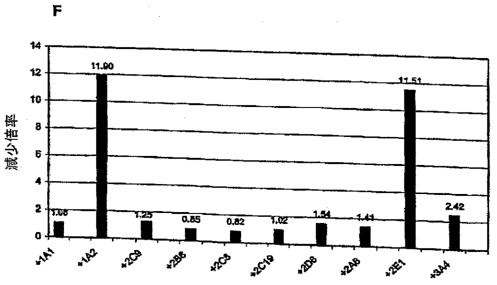
【図１２Ｄ】



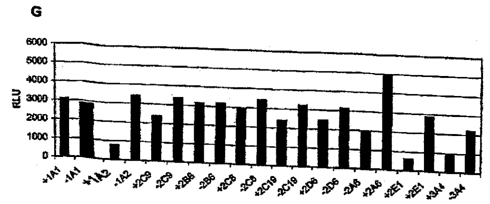
【図１２Ｅ】



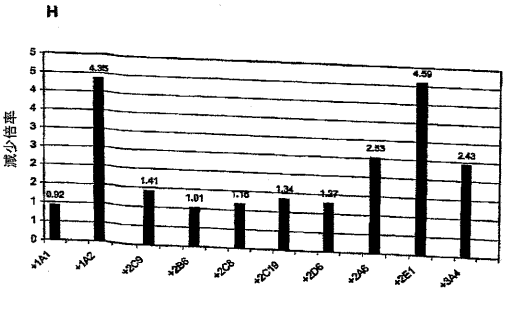
【図１２Ｆ】



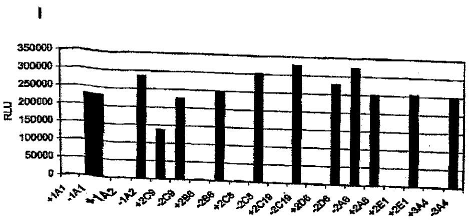
【図１２Ｇ】



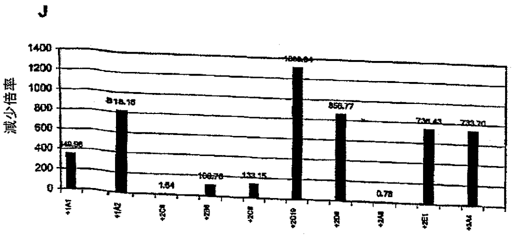
【図１２Ｈ】



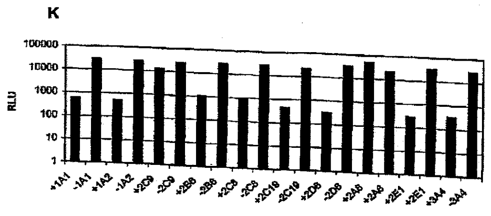
【図１２Ｉ】



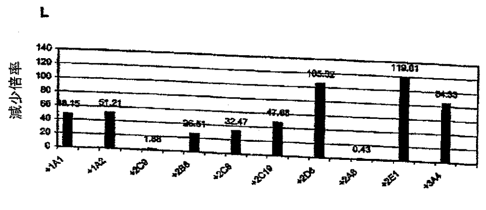
【図１２Ｊ】



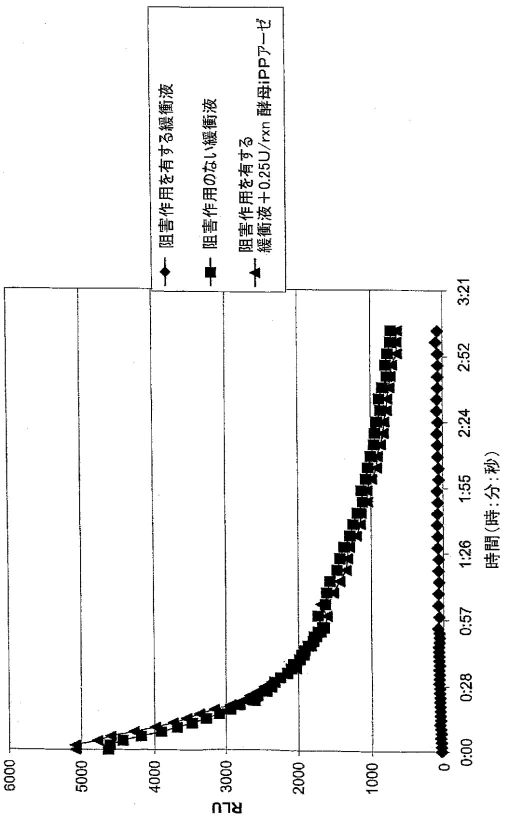
【図１２Ｋ】



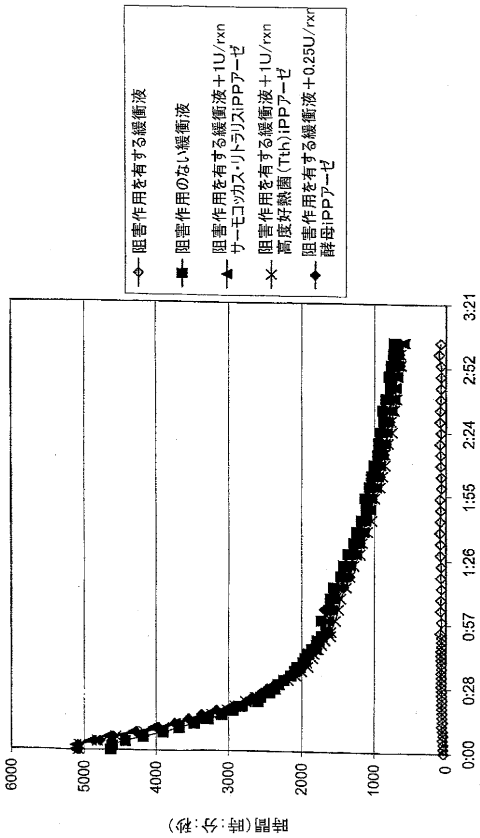
【図１２Ｌ】



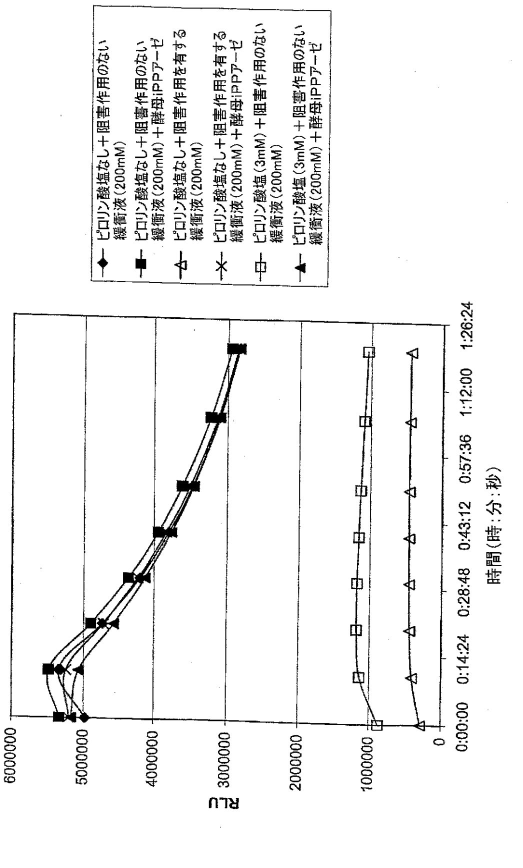
【図１３】



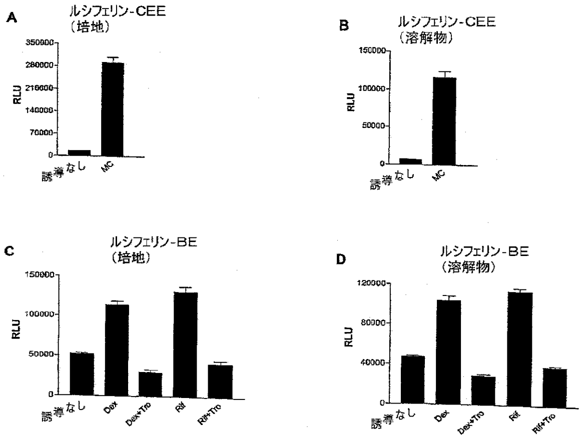
【図１４】



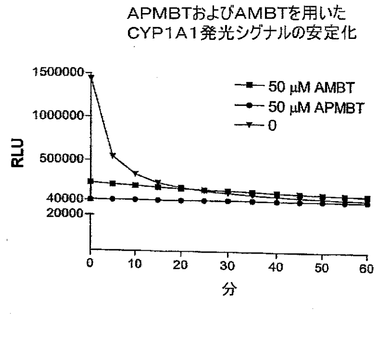
【図１５】



【図１６】



【図１７】



フロントページの続き

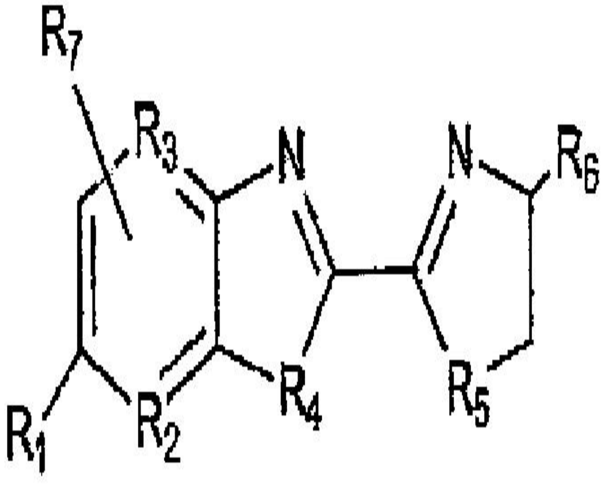
(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ　1/68	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ　1/68	Ｚ	

(72)発明者　カリー、ジェームズ　ジェイ.
アメリカ合衆国　５３５９３　ウィスコンシン州　ベローナ　ウエスト　ローン　サークル　５１２
(72)発明者　クラウバート、ディーター
アメリカ合衆国　９３４２０　カリフォルニア州　アロヨ　グランド　ブルー　スカイ　ドライブ　２５０
(72)発明者　デイリー、ウィリアム
アメリカ合衆国　９３４５５　カリフォルニア州　サンタ　マリア　ムーンクレスト　レーン　４５５
(72)発明者　ホー、サミュエル　キン　サン
アメリカ合衆国　５３７１３　ウィスコンシン州　マディソン　ルアーン　レーン　２２３４　ナンバー３１３
(72)発明者　フラックマン、スーザン
アメリカ合衆国　５３７０５　ウィスコンシン州　マディソン　タリー　ホー　レーン　３２０６
(72)発明者　ホーキンス、エリカ
アメリカ合衆国　５３７１１　ウィスコンシン州　マディソン　プレーリー　ロード　２２３０
(72)発明者　ウッド、キース　ブイ.
アメリカ合衆国　５３５７２　ウィスコンシン州　マウント　ホレブ　スワン　ロード　８３８０

Ｆターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB03 AB09 CA28 CE01 EA02 EB05
4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ22 QQ41 QQ61 QQ89 QQ91
QQ95 QR02 QR13 QR41 QR51 QR57 QR58 QR72 QR77 QR80
QS28 QS36 QS39 QX02

patsnap

专利名称(译)	利用发光测量细胞色素P450活性的方法和探针		
公开(公告)号	JP2008281575A	公开(公告)日	2008-11-20
申请号	JP2008146920	申请日	2008-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	蛇药制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	Promega公司		
[标]发明人	カリージェームズジェイ クラウバートディーター デイリーウィリアム ホーサミュエルキンサン フラックマンスーザン ホーキンスエリカ ウッドキースブイ		
发明人	カリー、ジェームズ ジェイ. クラウバート、ディーター デイリー、ウィリアム ホー、サミュエル キン サン フラックマン、スーザン ホーキンス、エリカ ウッド、キース ブイ.		
IPC分类号	G01N21/76 C12Q1/26 C12Q1/02 C12Q1/66 C07D277/66 C12Q1/68 C07D403/04 C07D413/04 C07D417/04 C07D417/14 C07F9/06 C12N9/02 C12Q1/00 G01N G01N33/53 G01N33/58		
FI分类号	G01N21/76 C12Q1/26 C12Q1/02 C12Q1/66 C07D277/66.CSP C12Q1/68.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB03 2G054/AB09 2G054/CA28 2G054/CE01 2G054/EA02 2G054/EB05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ22 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ95 4B063/QR02 4B063/QR13 4B063/QR41 4B063/QR51 4B063/QR57 4B063/QR58 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	60/412254 2002-09-20 US 60/483309 2003-06-27 US		
其他公开文献	JP5079600B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文所公开的是一种细胞，以便分析在组织和动物的和有用的方法的代谢活性来筛选对细胞色素P450酶活性，组合物中的试验化合物的效果，提供了底物和试剂盒。 A是细胞色素P450底物和生物发光酶，例如，发光的分子，其也底物前体萤光素酶，使用例如，荧光素或腔肠素，一个步骤和两步方法。在加入萤光素衍生物或其它发光的分子P450的反应，底物被P450酶在P450反应发光HikariHara分子代谢生物发光酶，例如，荧光素和/或萤光素衍生物的代谢产物。所产生的代谢物在产生光的二次反应中充当生物发光酶（例如荧光素酶）的底物。 【选择图】无