

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5079600号
(P5079600)

(45) 発行日 平成24年11月21日 (2012.11.21)

(24) 登録日 平成24年9月7日 (2012.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76	
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	
CO 7 D 277/66 (2006.01)	CO 7 D 277/66	C S P

請求項の数 33 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-146920 (P2008-146920)	(73) 特許権者	593089149
(22) 出願日	平成20年6月4日 (2008.6.4)		プロメガ コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2004-537859 (P2004-537859)		Promega Corporation
	の分割		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
原出願日	平成15年9月16日 (2003.9.16)		11-5399 マディソン ウッズ ホ
(65) 公開番号	特開2008-281575 (P2008-281575A)		ロー ロード 2800番地
(43) 公開日	平成20年11月20日 (2008.11.20)	(74) 代理人	100092093
審査請求日	平成20年6月4日 (2008.6.4)		弁理士 辻居 幸一
(31) 優先権主張番号	60/412, 254	(74) 代理人	100082005
(32) 優先日	平成14年9月20日 (2002.9.20)		弁理士 熊倉 禎男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084663
(31) 優先権主張番号	60/483, 309		弁理士 箱田 篤
(32) 優先日	平成15年6月27日 (2003.6.27)	(74) 代理人	100093300
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シトクロム P 4 5 O 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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞におけるシトクロム P 4 5 O 酵素の活性を測定するインビトロ方法であって、以下の工程、

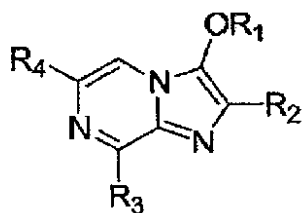
(a) シトクロム P 4 5 O の基質でありかつ生物発光酵素の基質前駆体である発光原分子を提供する工程、

(b) 細胞を発光原分子及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工程、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 P 4 5 O 活性を決定する工程、

を有し、前記発光原分子が、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体又は D - ルシフェリン誘導体であり、前記セレンテラジン誘導体が、次式 (1) で示され、前記 D - ルシフェリン誘導体が、次式 (2) で示されることを特徴とする方法。

式 (1) :



(式中、

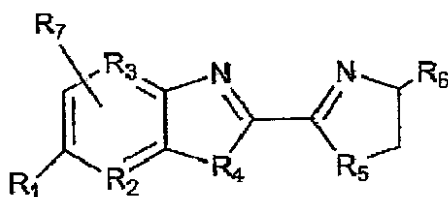
R_1 は、 C_{1-20} アルキル、分枝鎖 C_{3-20} アルキル、 C_{3-20} シクロアルキル、アラルキル、 C_{1-20} アルキルであって C_{1-20} アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-20} アルキルアミノ又はジ C_{1-20} アルキルアミノで置換された C_{1-20} アルキル、アラルキルであって C_{1-20} アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-20} アルキルアミノ又はジ C_{1-20} アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、かつ

10

R_2 、 R_3 及び 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、アリアル、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} アルキルアミノ又はジ 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} アルキルアミノ又はジ C_{1-20} アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリアルであって C_{1-20} アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、 C_{1-20} アルキルアミノ又はジ C_{1-20} アルキルアミノで置換されたアリアルである。)

20

式(2)：



(式中、

30

R_1 は、水素、ヒドロキシ、 C_{1-20} アルコキシ又は C_{1-20} アルケニルオキシを表し、この場合、アルコキシ及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、ヘテロアリアル又はハロアルキルで置換されたアリアルで置換されており、

R_2 及び R_3 は、独立してC又はNを表し、

R_4 及び R_5 は、独立してS、O、 NR_8 (ここで R_8 は水素又は C_{1-20} アルキルを表す)、 CR_9R_{10} (ここで、 R_9 及び R_{10} は独立してH、 C_{1-20} アルキル又はフッ素を表す)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} アルケニル又は OM^+ (ここで、 M^+ はアルカリ金属又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、ハロゲン又は C_{1-6} アルコキシドを表すが、

40

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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び R_5 がともにSである(ルシフェリン)ということではなく、

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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び R_5 がともにSである(デヒドロルシフェリン)ということではなく、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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び 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。)

【請求項2】

非ヒト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、以下の工

50

程、

(a) シトクロム P 4 5 0 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工程、

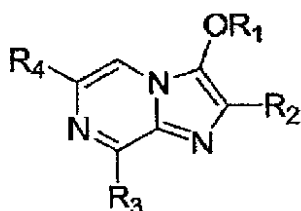
(b) 細胞を発光原分子及び生物発光酵素と接触させることにより混合物を作製する工程、ならびに

(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 P 4 5 0 活性を決定する工程、

を有し、前記発光原分子が、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体又は D - ルシフェリン誘導体であり、前記セレンテラジン誘導体が、次式 (1) で示され、前記 D - ルシフェリン誘導体が、次式 (2) で示されることを特徴とする方法。

10

式 (1) :



(式中、

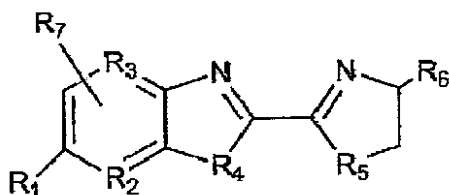
20

R₁ は、C₁₋₂₀ アルキル、分枝鎖 C₃₋₂₀ アルキル、C₃₋₂₀ シクロアルキル、アラルキル、C₁₋₂₀ アルキルであって C₁₋₂₀ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₂₀ アルキルアミノ又はジ C₁₋₂₀ アルキルアミノで置換された C₁₋₂₀ アルキル、アラルキルであって C₁₋₂₀ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₂₀ アルキルアミノ又はジ C₁₋₂₀ アルキルアミノで置換されたアラルキルであり、かつ

R₂、R₃ 及び R₄ は、独立して水素、C₁₋₂₀ アルキル、C₃₋₂₀ シクロアルキル、分枝鎖 C₃₋₂₀ アルキル、アリアル、アラルキル、C₁₋₂₀ アルキルであって C₁₋₂₀ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₂₀ アルキルアミノ又はジ C₁₋₂₀ アルキルアミノで置換された C₁₋₂₀ アルキル、アラルキルであって C₁₋₂₀ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₂₀ アルキルアミノ又はジ C₁₋₂₀ アルキルアミノで置換されたアラルキル、アリアルであって C₁₋₂₀ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁₋₂₀ アルキルアミノ又はジ C₁₋₂₀ アルキルアミノで置換されたアリアルである。)

30

式 (2) :



40

(式中、

R₁ は、水素、ヒドロキシ、C₁₋₂₀ アルコキシ又は C₁₋₂₀ アルケニルオキシを表し、この場合、アルコキシ及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、ヘテロアリアル又はハロアルキルで置換されたアリアルで置換されており、

R₂ 及び R₃ は、独立して C 又は N を表し、

R₄ 及び R₅ は、独立して S、O、NR₈ (ここで R₈ は水素又は C₁₋₂₀ アルキルを表す)、CR₉R₁₀ (ここで、R₉ 及び R₁₀ は独立して H、C₁₋₂₀ アルキル又はフッ素を表す) を表し、

R₆ は、CH₂OH、COR₁₁ (ここで、R₁₁ は水素、ヒドロキシ、C₂₋₂₀ アルケニル又

50

は OM^+ (ここで、 M^+ はアルカリ金属又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、ハロゲン又は 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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び 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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び 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 及び R_3 がともに炭素、かつ R_4 及び 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。) 10

【請求項 3】

前記発光原分子が、

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、又は

ルシフェリン 6' 3 - ピコリニルエーテル、

である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記発光原分子が、

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、及び

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 1 又は 2 に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記細胞が、生物発光酵素を発現する請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

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 又は 2 に記載の方法。 30

【請求項 7】

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 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記二次反応混合物が、界面活性剤をさらに含む請求項 7 に記載の方法。 40

【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 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞が、動物組織又は動物内に位置している請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

前記動物が、生物発光酵素導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

シトクロム P 450 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請求項 10 又は 11 に記載の方法。 50

【請求項 1 3】

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 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

工程 (a) の前に、前記細胞を、試験化合物と接触させて、シトクロム P 4 5 0 の活性に与える影響をスクリーニングする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞が、前記生物発光酵素を発現する請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

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 1 4 に記載の方法。 10

【請求項 1 7】

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 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

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 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記二次反応混合物が、界面活性剤をさらに含む請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

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 1 8 に記載の方法。 20

【請求項 2 1】

前記細胞が、動物組織又は動物内に位置している請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記動物が、生物発光酵素導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記試験化合物を前記動物に投与する請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

シトクロム P 4 5 0 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請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。 30

【請求項 2 5】

蛍光が、前記動物から得られた生物学的試料において測定される請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記生物学的試料が、血液、血清、胆汁、尿、糞便又は組織を含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

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 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

シトクロム P 4 5 0 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を含む請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 2 9】

さらに、細胞を、スクリーニングしようとする化合物、発光原分子及び 1 つ又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、前記発光原分子が、シトクロム P 4 5 0 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 つ又は複数の化合物を有する請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記細胞が、生物発光酵素を発現する請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

外来の供給源由来の生物発光酵素が用いられる請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

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 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞、化合物、発光原分子及び生物発光酵素を同時に接触させる請求項 29 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 P 450 の基質またはシトクロム P 450 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 P 450 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 P 450 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、P 450 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 (i P P 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 (i P P) 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。

10

20

【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】

30

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 P 450 ファミリーである。シトクロム P 450 (CYP 450) 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。

40

【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 P 450 が同定されている (18: 非特許文献 1)。CYP 450 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 CYP 450 は、400 ~ 530 アミノ酸長である。同酵

50

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 P 450 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 CYP 450 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】

CYP 450 をコードする遺伝子のいくつかは、CYP 450 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)。CYP 450 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 CYP 450 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 CYP 1、CYP 2 および CYP 3 によってのみ触媒される。ヒトにおける P 450 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 CYP 1A1、CYP 1A2、CYP 2A6、CYP 2B6、CYP 2C8、CYP 2C9、CYP 2C18、CYP 2C19、CYP 2D6、CYP 2E1、CYP 3A4、CYP 3A5 および CYP 3A7 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 CYP 450 が果たす中心的役割ゆえに、CYP 450 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 CYP 450 / 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。CYP 450 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、CYP 450 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)。CYP 450 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、O₂ 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 6 143 492 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)、「P 450 : 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・ジャーナル誌 (FASEB J.)、第 10 巻、p . 206 - 214、1996 年

【非特許文献 2】Prositate の P D O C 00081、シトクロム P 450 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.)、「P 450 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 P 450 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．(Nelson, D.R.) ら、1996 年、「P 450 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、「薬剤代謝に関するヒト肝臓シトクロム P 450 (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 P 450 阻害剤のハイスループット蛍光スクリーニング (Fluorometric high-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・サイエンス誌 (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。CYP 450 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 P 450 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、P 450 の基質または P 450 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 P 450 基質でありルシフェラーゼの基質前駆体である。事前に P 450 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 P 4 5 0 活性を決定すること
を包含する方法が提供される。

【 0 0 1 9 】

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。

【 0 0 2 0 】

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。

【 0 0 2 1 】

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 P 4 5 0 の酵素活性の測定方法であって、以下の：

(a) シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 活性を決定すること
を包含する方法が提供される。

【 0 0 2 2 】

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。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロム P 4 5 0 の酵素活性の測定方法であって、以下の：

(a) シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 活性を決定すること
を包含する方法が提供される。

【 0 0 2 4 】

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。

【 0 0 2 5 】

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 P 4 5 0 の酵素活性の測定方法であって、以下の：

(a) シトクロム P 4 5 0 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

10

20

30

40

50

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 1 】

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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。

【 0 0 3 2 】

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。

【 0 0 3 3 】

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【 0 0 3 4 】

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。

【 0 0 3 5 】

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【 0 0 3 6 】

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。

10

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。

【 0 0 3 7 】

本発明の別の実施形態では、シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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； (i i) 1 つまたは複数のシトクロム P 4 5 0 酵素；および (i i i) 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

20

(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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 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。

【 0 0 3 8 】

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 P 4 5 0 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。

30

【 0 0 3 9 】

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 P 4 5 0 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。

【 0 0 4 0 】

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 P 4 5 0 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。

40

【 0 0 4 1 】

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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

50

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

10

20

30

40

50

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。

10

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

20

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】

30

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】

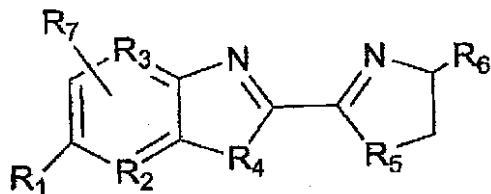
本発明のこの実施形態の別の態様では、工程(b)または工程(c)が(iv)ピロホスファターゼ、例えば無機ピロホスファターゼをさらに含む。

40

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、NR₈ (ここで R_8 は水素または C_{1-20} アルキルを表す)、CR₉R₁₀ (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、CH₂OH、COR₁₁ (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 NR₁₂R₁₃ (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、

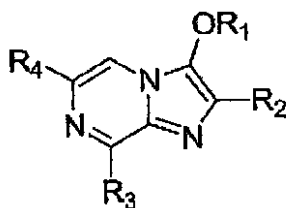
ただし、同時に R_1 が OH または NH₂ であり、 R_7 が H であり、 R_6 が COR₁₁ であり、 R_{11} が OH であり、 R_3 および R_2 がともに炭素であり、かつ R_4 および R_5 がともに S である (ルシフェリンおよびアミノルシフェリン) という事はない) を有する。

【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 P 450 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 P 450 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。

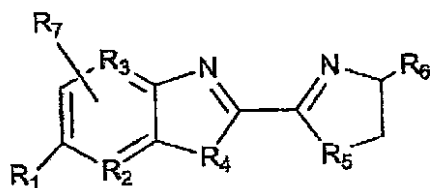
【0061】

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 P 450 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、

10

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、

20

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) という事はない) を有する。

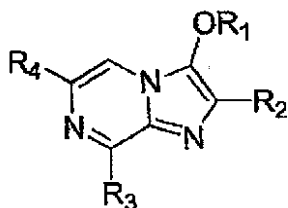
【0063】

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】

30



(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

40

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)

50

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 P 450 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 P 450 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。

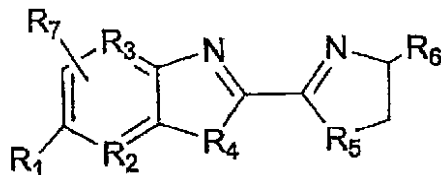
【0067】

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_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

10

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

20

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

30

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

40

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。

50

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 P 4 5 0 酵素活性の測定方法であって、以下の：

(a) P 4 5 0 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 P 4 5 0 活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【 0 0 7 6 】

10

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロム P 4 5 0 酵素活性の測定方法であって、以下の：

(a) P 4 5 0 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 P 4 5 0 活性を決定すること

を包含する方法が提供される。

【 0 0 7 7 】

20

本発明の別の実施形態では、シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 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。

30

【 0 0 7 8 】

本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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。

40

【 0 0 7 9 】

本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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。

50

【 0 0 8 0 】

本発明の別の実施形態では、動物におけるシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素活性を決定すること
- を包含する方法が提供される。

10

【 0 0 8 1 】

本発明の別の実施形態では、シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 (i i) 1 つまたは複数のシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 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。

20

【 0 0 8 2 】

本発明の別の実施形態では、細胞のシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 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。

30

【 0 0 8 3 】

本発明の別の実施形態では、動物組織のシトクロム P 4 5 0 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) C Y P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 酵素

40

50

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。

【 0 0 8 4 】

本発明の別の実施形態では、動物のシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素との相互作用の結果得られるシトクロム P 4 5 0 酵素活性（もしあれば）を決定する工程

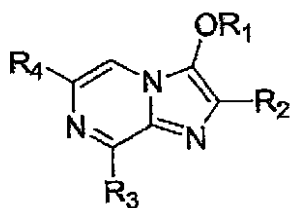
を包含する方法が提供される。

【 0 0 8 5 】

本発明の別の実施形態では、シトクロム P 4 5 0 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：

【 0 0 8 6 】

【 化 6 】



（ 式中、

R₁ は、C₁ - 20 アルキル、分枝鎖 C₃ - 20 アルキル、C₃ - 20 シクロアルキル、アラルキル、C₁ - 20 アルキルであって C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたはジ C₁ - 20 アルキルアミノで置換される C₁ - 20 アルキル、アラルキルであって C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたはジ C₁ - 20 アルキルアミノで置換されるアラルキルであり、かつ

R₂、R₃ および R₄ は、独立して水素、C₁ - 20 アルキル、C₃ - 20 シクロアルキル、分枝鎖 C₃ - 20 アルキル、アリール、アラルキル、C₁ - 20 アルキルであって C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたはジ C₁ - 20 アルキルアミノで置換される C₁ - 20 アルキル、アラルキルであって C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたはジ C₁ - 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 C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたはジ C₁ - 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。

【 0 0 8 7 】

本発明のこの実施形態の一態様では、好ましくは、R₄ がアリールあるいはアリールであって C₁ - 20 アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲン、C₁ - 20 アルキルアミノまたは C₁ - 20 ジアルキルアミノで置換されるアリールである。

【 0 0 8 8 】

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 H H、

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1 μM ~ 約1 mM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1 μM ~ 約500 μM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10 μM ~ 約200 μM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100 μM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關与する、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が触媒する酸化に關連する、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。発光に關与する酵素が、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、または關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、關与する酵素は「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。

【 0 0 9 4 】

「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、P 4 5 0の基質、またはP 4 5 0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。

10

【 0 0 9 5 】

「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P 4 5 0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P 4 5 0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P 4 5 0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。

20

【 0 0 9 6 】

「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1 0 / 0 5 3 , 4 8 2号（2 0 0 1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（Promega Corporation：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。

30

【 0 0 9 7 】

「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c D N A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。

40

【 0 0 9 8 】

「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

50

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. Bacteriol. 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（1992）（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（Vinitzky, 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）；ヒューズ他（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）（キサントシン-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: 81（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.）、Antibiot. 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。

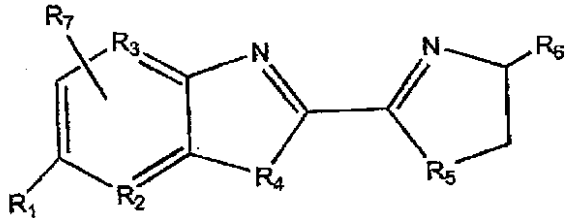
【0099】

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】



10

(式中、

R₁ は、水素、ヒドロキシル、アミノ、C₁₋₂₀ アルコキシ、置換C₁₋₂₀ 置換アルコキシ、C₂₋₂₀ アルケニルオキシ、C₂₋₂₀ 置換アルケニルオキシ、C₁₋₂₀ ハロゲン化アルコキシ、C₁₋₂₀ 置換ハロゲン化アルコキシ、C₃₋₂₀ アルキニルオキシ、C₃₋₂₀ 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、C₁₋₂₀ アルキルアミノ、C₁₋₂₀ 置換アルキルアミノ、C₁₋₂₀ 置換アルキルアミノC₁₋₂₀ ジアルキルアミノまたはC₁₋₂₀ 置換ジアルキルアミノ、C₂₋₂₀ アルケニルアミノ、C₂₋₂₀ 置換アルケニルアミノ、C₂₋₂₀ ジアルケニルアミノ、C₂₋₂₀ 置換ジアルケニルアミノ、C₂₋₂₀ アルケニルアルキルアミノまたはC₂₋₂₀ 置換アルケニルアルキルアミノ、C₃₋₂₀ アルキニルアミノ、C₃₋₂₀ 置換アルキニルアミノ、C₃₋₂₀ ジアルキニルアミノ、C₃₋₂₀ 置換ジアルキニルアミノ、C₃₋₂₀ アルキニルアルキルアミノ、C₃₋₂₀ 置換アルキニルアルキルアミノ、C₃₋₂₀ アルキニルアルケニルアミノまたはC₃₋₂₀ 置換アルキニルアルケニルアミノを表し、

20

R₂ および R₃ は、独立してCまたはNを表し、

R₄ および R₅ は、独立してS、O、NR₈（ここでR₈ は水素またはC₁₋₂₀ アルキルを表す）、CR₉R₁₀（ここで、R₉ および R₁₀ は独立してH、C₁₋₂₀ アルキルまたはフッ素を表す）を表し、

30

R₆ は、COR₁₁（ここで、R₁₁ はH、OH、C₁₋₂₀ アルコキシド、C₂₋₂₀ アルケニル、CH₂OHまたはNR₁₂R₁₃（ここで、R₁₂ および R₁₃ は独立してHまたはC₁₋₂₀ アルキルを表す）を表す）を表し、かつ

R₇ は、H、C₁₋₆ アルキル、C₁₋₂₀ アルケニル、ハロゲンまたはC₁₋₆ 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。

40

【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

50

用する。シトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素を含まないもの）と比較することにより決定される。P 4 5 0 反応が起きるためには、P 4 5 0 レダクターゼ、N A D P H 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 A T P および Mg^{+2} の存在が一般に必要なが、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 1 0 n M ~ 1 m M の範囲にあり、好ましくは特定の P 4 5 0 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 / P 4 5 0 アイソフォーム反応について K m、またはその反応について V m a x となる濃度である。

【 0 1 0 3 】

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、P 4 5 0 活性を決定するための方法も提供する。P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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、P 4 5 0 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 P 4 5 0 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、P 4 5 0 の活性を、P 4 5 0 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 1 0 / 0 5 3 , 4 8 2 号（2 0 0 1 年 2 月 1 1 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。

【 0 1 0 4 】

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、A T P 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 . 1 $\mu g / mL$ ~ 約 2 0 0 $\mu g / mL$ 、好ましくは約 0 . 5 $\mu g / mL$ ~ 約 1 0 0 $\mu g / mL$ の範囲である。反応混合物中に用いられ得る P 4 5 0 酵素の量は、一般に約 0 . 1 ピコモル ~ 約 2 0 0 ピコモル、好ましくは約 0 . 4 ~ 約 8 0 . 0 ピコモルの範囲である。

【 0 1 0 5 】

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、H E P P S、H E P E S、M O P S、トリス、グリシルグリシン、リン酸塩等が、p H 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 A T P に悪影響を及ぼし得る金属含有プロ

10

20

30

40

50

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な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、光電子倍增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、光を生じ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 P 4 5 0 活性を間接的に決定する。

【 0 1 0 9 】

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、P 4 5 0 / 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 P 4 5 0 酵素を抑制するので、分析者は、活性 P 4 5 0 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、P 4 5 0 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、T e r g i t o l（登録商標）（非イオン性）；B r i j（登録商標）3 5（非イオン性）；B r i j 5 8（非イオン性）；ポリミキシン（P o l y m i x i n）B；T r i t o n（登録商標）X - 1 0 0（非イオン性）；T r i t o n X - 3 0 5（非イオン性）；T r i t o n N 1 0 1（非イオン性）；C h a p s（両イオン性）；C h a p s o（両イオン性）；B i g c h a p（非イオン性）；T h e s i t（登録商標）（非イオン性）；P l u r o n i c（登録商標）L 6 4（非イオン性）；R h o d a s u r f（登録商標）8 7 0；C h e m a l L A - 9；スルホニル（S u l f o n y l）4 6 5；デオキシコール酸（陰イオン性）；および C T A B（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、T e r g i t o l 型の N P - 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 . 0 3 % ~ 約 2 . 0 %、好ましくは約 0 . 1 % ~ 約 1 . 0 % の範囲である。

【 0 1 1 0 】

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 C Y P 2 C 9 に関しては p H 7 . 4 の 2 5 m M K P O ₄、C Y P 1 A 2 に関しては p H 7 . 4 の 1 0 0 m M K P O ₄ 等を含めた。その他の構成成分は、1 . 3 m M の N A D P +、3 . 3 m M のグルコース - 6 - リン酸、0 . 4 ユニット / m L のグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、3 . 7 m M の M g C l ₂ であった。一段階の系に関しては、2 0 0 μ M の A T P 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、5 m M ~ 2 0 0 m M のトリシン緩衝液、好ましくは 2 0 m M ~ 2 0 0 m M のトリシン緩衝液が用いられるが、しかし H E P E S、H E P P S、M O P S、リン酸塩および B i c i n e の緩衝液も有用である。その他の構成成分としては、0 . 7 m M ~ 7 . 1 m M の M g S O ₄（または M g C l ₂）および 0 . 1 μ M ~ 1 m M、好ましくは 1 0 μ M ~ 2 5 0 μ M の A T P 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 2 0 ~ 4 2、好ましくは約 2 2 ~ 3 7 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 ~ 6 0、好ましくは約 2 0 ~ 4 2 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 1 8 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 1 0 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 1 8 時間後、好ましくは直後 ~ 約 3 時間後に決定される。

【 0 1 1 1 】

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实际的制限を課する。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。一般に阻害剤の量は、反応混合物中に約1 μ M～約1mM、好ましくは反応混合物中に約1 μ M～約500 μ M、さらに好ましくは反応混合物中に約10 μ M～約200 μ Mの範囲であり、最も好ましくは反応混合物中に約100 μ M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る。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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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。

10

【 0 1 1 5 】

本発明の別の態様では、薬剤候補を最初に P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素を含まないもの）と比較することにより決定される。

【 0 1 1 6 】

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 P 4 5 0 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、P 4 5 0 酵素と薬剤候補との相互作用の結果得られる P 4 5 0 活性を決定する。

20

【 0 1 1 7 】

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 1 0 0 μ M の範囲であり、通常は約 1 0 μ M 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。

30

【 0 1 1 8 】

本発明のこの態様の実施に際しては、P 4 5 0 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。

【 0 1 1 9 】

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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、P 4 5 0 酵素と化合物との相互作用の結果得られる P 4 5 0 活性を決定する。

40

【 0 1 2 0 】

本発明の一態様では、化合物を最初に P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素を含まない）反応と比較することにより決

50

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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素を含まない）反応混合物と比較することにより、P 4 5 0 酵素と試験化合物との相互作用の結果得られる P 4 5 0 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、P 4 5 0 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、P 4 5 0 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、P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 P 4 5 0 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 CYP 4 5 0 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 CYP 4 5 0 遺伝子または遺伝子調節配列を備えた CYP 4 5 0 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、P 4 5 0 酵素活性のレ

10

20

30

40

50

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キサ(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・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)、HepLiuta肝細胞株(マルチセル・テクノロジー(MultiCellTechnologies)(米国ロードアイランド州ウォーウィック(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1000 μ M、通常は約10~100 μ M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pH 7.4 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。

10

【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）X 100 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、P 450 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。

20

30

【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 P 450（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。そのままの状態ですべて直接的に、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、P 450 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。

40

【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 P 450 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 P 450 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

50

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じ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 P 450 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 CYP 450 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に処理すればよい。糞便検体は、抽出物を生成するように処理すればよい。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 P 450 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。

10

20

【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 P 450 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。

30

【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 P 450 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。

40

【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

50

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に調整可能であるが、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 $10 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 、好ましくは約 $100 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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

40

50

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 P 4 5 0 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。P 4 5 0 酵素活性を抑制する薬剤はシグナルを減少させ、P 4 5 0 遺伝子発現を誘導する薬剤はシグナルを増強する。

【 0 1 4 1 】

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 (i P P) 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 i P P の存在は、i P P 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 A T P、O 2 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、i P P 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、i P P 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 i P P 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 i P P 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 P 4 5 0 反応においては、不便であるかまたは实际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 (i P P 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 i P P、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 i P P 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、i P P 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 P 4 5 0 (P 4 5 0) の発光アッセイにピロホスファターゼ、例えば i P P 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 i P P アーゼは i P P の増加を防止するとともに i P P をオルトリン酸塩へと加水分解して溶液から i P P を除去するように作用する。

【 0 1 4 2 】

本発明の実施に際しては、ピロホスファターゼ、例えば i P P アーゼを、ルシフェラーゼを添加する前、添加と同時に、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 i P P 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 i P P およびルシフェラーゼ反応中に生成される i P P 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 i P P 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 i P P 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 i P P アーゼの存在下では、反応混合物中の i P P 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 i P P 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。i P P 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 i P P アーゼが好ましい。

【 0 1 4 3 】

本発明の一実施形態では、ピロホスファターゼ、例えば i P P アーゼを、無細胞または細胞を用いる発光 P 4 5 0 アッセイに含めることができる。P 4 5 0 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、P 4 5 0 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 A T P 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、p H を緩衝するために第一段階において K P O ₄ 緩衝液を使用し、その濃度を変

10

20

30

40

50

えることにより特定の P 4 5 0 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 K P O₄ 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 i P P 夾雑物を含むものがある。反応混合物に i P P アーゼを添加することにより、あらゆる i P P 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。

【 0 1 4 4 】

本発明の別の実施形態では、ピロホスファターゼ、例えば i P P 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 i P P アーゼを添加することにより、ルシフェラーゼの i P P 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 i P P 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 i P P アーゼの使用が挙げられ得る。

10

【 0 1 4 5 】

本発明の別の実施形態では、C Y P 4 5 0 の活性、またはシトクロム P 4 5 0 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 P 4 5 0 酵素；1つまたは複数の種類のシトクロム P 4 5 0 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、A T P、M g 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 i P P 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）複数の容器に入れてもよい。好ましいキットは、P 4 5 0 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 i P P 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 A T P を含有する希釈用緩衝液（凍結乾燥したルシフェラーゼ / A T P 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。

20

30

【 0 1 4 6 】

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 P 4 5 0 酵素を含まないもの（陰性対照）も含まれうる。

【 実施例 】

40

【 0 1 4 7 】

（材料） S f 9 細胞で発現させた C Y P 4 5 0 調製物（S u p e r s o m e s（登録商標））、プール化ヒト肝臓ミクロソームおよび N A D P H 生成系（N A D P +、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（L u c M E）、エチル（L u c E E）、クロロエチル（L u c C E E）およびベンジル（L u c B E）エーテルおよびデヒドロキシルシフェリン（H - L u c）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。L u c M E および L u c E E 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

50

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 60 MHz R - 1200 NMR 分光計またはバリアン (Varian) V X - 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) MAT 90 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 (15 mL) 中の D - ルシフェリン遊離酸 (0.43 g、1.53 mmol) 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 1 M 溶液を 1.8 mL、1.8 mmol) をシリンジで滴下した。淡黄色溶液を、窒素下で一晩 (約 15 h) 放置して周囲温度に暖めた。追加のボラン - THF (THF 中の 1 M 溶液を 2.5 mL、2.5 mmol) を添加し、反応をさらに 24 h 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 x 75 mL) 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 (70 g) 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 2.54 cm (1 インチ) のシナジー (Synergi) 4 μ MAX - RP 80 A カラム (100 x 21.20 mm) 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、10 mg (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/z 264.4 (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 1 L の三首フラスコに、ジメチルスルホキシド (DMSO、100 mL) 中のシアニ化カリウム (1.50 g、23.0 mmol) の懸濁液を調製した。2 - クロロベンゾチアゾール (2.6 g、2.0 mL、15.3 mmol) 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 x 100 mL) 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 (100 g) 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、1.4 g (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 ¹H 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 50 mL の二首丸底フラスコ中に、アセトン (5 mL) 中の 2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (1.0 g、5.68 mmol) の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム (1.57 g、11.3 mmol) 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 (1.06 g、0.56 mL、7.38 mmol) をシリンジで添加し、反応混合物を加熱攪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 (2.84 mmol、0.21 mL) 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 (2.84 mmol、0.21 mL) および炭酸カリウム (0.60 g、4.37 mmol) 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、反応物を一晚還流した。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 (2.84 mmol、0.21 mL) および炭酸カリウム (0.60 g、4.37 mmol) 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 (1.3 g) を、4 : 1 ヘプタン - 酢酸エチルを用いてシリカゲル (100 g) 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、1.0 g (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¹H 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100 mLの二首丸底フラスコ中に、アセトン (5 mL) 中の2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (1.0 g、5.68 mmol) の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム (0.94 g、6.82 mmol) 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 (1.49 g、6.25 mmol) を添加し、加熱攪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、1.7 g (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¹H 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100 mLの二首丸底フラスコ中に、アセトン (35 mL) 中の2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (0.35 g、2.00 mmol) の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム (0.33 g、2.40 mmol) 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 (0.41 g、0.29 mL、2.40 mmol) を添加し、反応混合物を加熱攪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、0.51 g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 (24 g) 上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、410 mg (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¹H 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100 mLの二首丸底フラスコ中に、アセトン (5 mL) 中の2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (1.00 g、5.68 mmol) の懸濁液を調製した。無水炭酸カリウム (1.18 g、8.52 mmol) 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 (1.37 g、0.88 mL、7.38 mmol) を添加し、反応混合物を加熱攪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、2.84 mmol) および炭酸カリウム (0.5当量、2.84 mmol) 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、2.2 g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、800 mg (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¹H 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(5 mL)、無水炭酸カリウム(1.2 g、8.4 mmol)および臭化ゲラニル(1.5 mL、7.3 mmol)を含有する乾燥した25 mL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 g、5.6 mmol)を添加した。混合物を攪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、2.1 g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、0.84 gの固体を得た。DMSO-d₆中での¹H NMR分析により構造を確認した。

10

【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(5 mL)、無水炭酸カリウム(1.2 g、8.4 mmol)および臭化プレニル(839 μL、7.3 mmol)を含有する乾燥した25 mL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(1.0 g、5.6 mmol)を添加した。混合物を攪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、1.7 g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、0.8 gの固体を得た。DMSO-d₆中での¹H NMR分析により、構造を確認した。

20

【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(プロモメチル)ピリジン(1.87 g、7.38 mmol)および2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール(1.00 g、5.68 mmol)をアセトン(50 mL)中に懸濁した。炭酸カリウム(1.96 g、14.2 mmol)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。

30

【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(50 mL)中の2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール(0.39 g、2.2 mmol)の溶液に、3-臭化水素酸(プロモメチル)ピリジン(0.7 g、2.76 mmol)、炭酸セシウム(2.15 g、6.6 mmol)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。

40

【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(50 mL)中の2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール(1.18 g、6.71 mmol)の溶液に、3Aのモレキュラーシーブおよび炭酸セシウム(3.98 g、12.2 mmol)を添加した。その結果生じた懸濁液を室温で2時間攪拌した。次に別途等量の炭酸セシウム(1.99 g、6.1 mmol)を導入し、その後、臭化水素酸4-(プロモメチル)ピリジン(1.0 g、6.1 mmol)および触媒量のヨウ化セシウムを添加した

50

。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-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-TFM-BE) : 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

10

20

30

40

50

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 145 mg (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 (0.8 g) 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、101 mg の固体を得た。DMSO - d₆ 中での ¹H 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 (0.8 g) 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、339 mg の帯黄色の固体を得た。DMSO - d₆ 中での ¹H 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 (250 mg、0.94 mmol) 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 (250 mg、0.94 mmol) 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 (267 mg、1.0 mmol) から調製した (ただし、5 mL 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 KPO₄ 緩衝剤の量 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2D6 および CYP2E1 に関しては 100 mM ; CYP2C8 および CYP2C19 に関しては 50 mM ; 2C9 ならびにプール化ヒト肝臓ミクロソームに関しては 25 mM ; CYP3A4 に関しては 200 mM) で、CYP450 反応物 20 マイクロリットルを pH 7.4 で調製した。CYP2A6 に関しては、100 mM トリス (pH 7.5) を KPO₄ の代わりに用いた。反応混合物には、1.3 mM の NADP⁺、3.3 mM のグルコース - 6 - リン酸、0.4 U / m

10

20

30

40

50

1 のグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、3.3 mM 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 0.4 pmol 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 °C でインキュベーションして反応を開始した。37 °C 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、250 μM の ATP、5 ~ 25 $\mu g / mL$ 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)、20 mM のトリシン (pH 7.8)、0.1 mM の EDTA、8 mM の $MgCl_2$ 、0.6 mM の補酵素 A および 33 mM 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)、グラニル (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 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 2 P E、L u c 3 P E および L u c 4 P E に関しては、発生する光の最も明らかな増大は C Y P 1 A 1 および C Y P 3 A 4 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 L u c 3 P E 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 - L u c を基質として用いた場合、C Y P 1 A 2 および C Y P 2 C 9 は、対照を上回る光を発生した。H - L u c 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 C Y P 2 C 9 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 S f 9 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。C Y P 1 A 1、C Y P 1 A 2、C Y P 2 C 8、C Y P 2 C 9 および C Y P 3 A 4 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）。

【 0 1 7 3 】

（実施例 3：二段階の C Y P 4 5 0 の発光反応における C Y P 4 5 0 / 基質インキュベーション時間依存性）

L u c M E と C Y P 1 A 2、C Y P 2 C 8 および C Y P 2 C 9、H - L u c と C Y P 2 C 9、そして L u c B E と C Y P 3 A 4 のインキュベーションについて、経時変化を調べた（図 4）。C Y P 4 5 0 反応混合物にルシフェラーゼ反応混合物を添加して 1 2 分以内に測定した発光量は、L u c M E または H - L u c と C Y P 2 C 9 に関して、ならびに L u c B E と C Y P 3 A 4 に関しては 6 0 分までの間、直線的に増大した。C Y P 1 A 2 および C Y P 2 C 8 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、6 0 分近くでは C Y P 2 C 8 に関しては控えめに増大しただけで、C Y P 1 A 2 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、バクリタキセル、ジクロフェナクおよびテストステロンを用いた C Y P 1 A 2、C Y P 2 C 8、C Y P 2 C 9 および C Y P 3 A 4 の活性を反映している（10、11、12）。

【 0 1 7 4 】

（実施例 4：二段階の C Y P 4 5 0 の発光反応からの光入力の変化）

この実施例では、ルシフェラーゼ反応の構成成分を C Y P 4 5 0 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 6 0 分間、C Y P 4 5 0 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。- C Y P 4 5 0 対照では、C Y P 4 5 0 S f 9 細胞ミクロソームを H₂O 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 2 8 4 分間、ターナーの R e p o r t e r（商標）ルミノメーターで発光を読取った。試験した C Y P 4 5 0 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。

【 0 1 7 5 】

（実施例 5：室温における一段階の C Y P 4 5 0 / ルシフェラーゼ反応）

この実施例では、一段階の C Y P 4 5 0 / 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 P 4 5 0 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。C Y P 4 5 0 アイソフォームに最適な K P O₄ 緩衝剤の量（二段階の反応の方法を参照のこと）で、C Y P 4 5 0 反応物 1 0 0 マイクロリットルを p H 7.4 で調製した。反応混合物には、1.3 m M の N A D P⁺、3.3 m M のグルコース - 6 - リン酸、0.4 U / m l のグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、3.7 m M の M g S O₄、0.6 m M の補酵素 A、ルシフェリン誘導体 / C Y P 4 5 0 基質、250 μ M の A T P および 21 μ g / m l 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 9 9 1 4 3 3 6 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

10

20

30

40

50

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る。

【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 L u c B E 活性の阻害は、C Y P 3 A 4 および / または C Y P 2 C 8 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 L u c B E 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 - 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 C Y P 1 A 2 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 - ナフトフラボンにより L u c B E に対する活性がわずかに刺激されるということは、C Y P 3 A 4 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 - ナフトフラボンにより刺激されるからである (1 6)。

【 0 1 7 9 】

(実施例 8 : 既知の P 4 5 0 阻害剤による C Y P 4 5 0 の阻害の検出)

10

C Y P 4 5 0 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 C Y P 4 5 0 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 C Y P 4 5 0 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、I C 5 0 を決定した。試験した阻害剤は、C Y P 2 C 9 に関してはスルファフェナゾール、C Y P 1 A 2 に関しては α - ナフトフラボン、ならびに C Y P 2 C 8 および 3 A 4 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、I C 5 0 は、他の基質を用いたアッセイに関して報告された I C 5 0 (1 3) に匹敵した。阻害剤は C Y P 4 5 0 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)。

20

【 0 1 8 0 】

表 1 は、通常の基質および D - ルシフェリン誘導体との C Y P 4 5 0 の反応に対する、ケトコナゾール、α - 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 C Y P 4 5 0 アッセイを実施した。この場合、C Y P 4 5 0 を約 4 0 n M ~ 1 0 μ M の濃度範囲の阻害剤に 1 0 分間曝露した後、D - 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、I C 5 0 を算出した。* 印を付けた記載事項は参考文献 1 3 から得た。

【 0 1 8 1 】

30

【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/ イトキシメソルフィン *	0.4	---	---
CYP1A2/ フェナントレン *	3.8	---	---
CYP1A2/ イマブリン *	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/ジアセペム *	---	---	0.5
CYP2C9/ フェナントレン *	---	---	0.7
CYP3A4/Luc BE	---	0.06	---
CYP3A4/ジアセペム *	---	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。

* 参考文献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分析により確認した(図10)。100 μM のLuc ME、H-Luc、Luc CEEおよびLuc 3PEを、150 μl 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し、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(HPL050 MWD)および蛍光検出器(HPL046A)を装備したHPL050 LCシステムで実施した。0.05 MのKH₂PO₄/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、5 μm 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330 nmにおける吸光度により基質を検出し、励起波長330 nmにおける520 nm (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 P 4 5 0 1 A 1 および 1 A 2 の基質と阻害剤プローブの特異性 (Specificity 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 P 4 5 0 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: P 4 5 0 2 C の個別の有効性および部位選択性 (Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes p450 active sites: particular efficiency and regioselectivity of 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 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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)、200 μM の ATP、0.1% の tergitol (v/v)、4.0 mM の MgSO_4 および 100 mM のトリシン (pH 8.4) 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 IC₅₀ (μM) である。

(実施例 11: Cyp 450 / 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-セレンテラジン HH およびセレンテラジン HH を用いて、P 4 5 0 活性を決定した。これらのアッセイでは、P 4 5 0 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、P 4 5 0 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、P 4 5 0 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、P 4 5 0 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 (25.0 g、152.0 mmol) 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 (250 mL) 中に再溶解させた。この溶液に、無水酢酸 (170 mL、1.8 mol) を添加し、溶液を周囲温度で 15 h 攪拌した。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 (700 mL) 中に溶解し、次に 0.1 M の HCl 水溶液で 3 回洗浄した (3 × 200 mL)。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 (250 g) 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、24 g の乾燥固体を得た。この物質を THF (150 mL) 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 (51 mL, 580 mmol) を滴下した。10 分後、DMF (7.5 mL) 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 (100 mL) 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 (200 mL) 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 1.0 M 溶液を 152 mL, 152 mmol) 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。2 M の HCl 水溶液 (100 mL) 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 (500 mL) で希釈し、次に 0.1 M の HCl 水溶液で 2 回洗浄した (2 × 100 mL)。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 (250 g) 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、13.5 g (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 (125 mL) 中の 2 - アミノ - 3 - ベンジル - 5 - フェニルピラジン²⁰ (2.0 g, 8.0 mmol) および 2 - オキソ - 3 - フェニル - プロピオンアルデヒド (3.0 g, 16 mmol) 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 (4.0 mL) 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 (40 mL) とともに粉碎して、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、1.28 g (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 (10 mL) 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 (0.25 g, 0.6 mmol) の撹拌溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (1.1 mL, 6.0 mmol) を全て一度に添加し、その後ヨウ化メチル (0.4 mL, 6.0 mmol) 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 (75 mL) 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 (30 g) 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、200 mg (77%) の所望の化合物を得た。

【0187】

(II) P450 アッセイ

200 mM の KPO₄、pH 7.4 (CYP3A4 に関して) または 100 mM の KPO₄、pH 7.4 (CYP1A1、1A2、2B6、2D6、2E1 に関して) または 50 mM の KPO₄、pH 7.4 (CYP2C8、2C19 に関して) または 25 mM の KPO₄、pH 7.4 (CYP2C9 に関して) または 100 mM の トリス、pH 7.5 (

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(1 pmol)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;1.3 mMのNADP⁺;3.3 mMのグルコース-6-リン酸;3.3 mMのMgCl₂;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(3 μMのセレンテラジン、3 μMのセレンテラジンHHおよび10 μMのメトキシ-セレンテラジンHH)を、37 °Cで60分間インキュベートした。

【0188】

80マイクロリットルの37.5 mMのHepes、pH 7.4;625 mMのKCl;0.125 mMのEDTA、pH 8.0;0.25%のTriton(登録商標)X-100;0.125%のMazur(登録商標);1.25%グリセロール;0.25 mg/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(1.2 ng/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倍)。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な低減が認められた。

【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的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、1 pmolのCYP1A2(対照反応物にはSF9膜)、1.3 mMのNADP⁺、3.3 mMのグルコース-6-リン酸、0.2 U/mlのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、3.3 mMのMgCl₂、0.01 mMのLuc-ME、ならびに100 mMのKPO₄、pH 7.4(阻害作用を有する緩衝剤)または100 mMのKPO₄、pH 7.4(阻害作用のない緩衝剤)を含めた。反応物を37 °C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(100 mg/ml);400 μMのATP、0.4%のPrionex(登録商標)、40 mMのトリシン(pH 7.8)、8 mMのMgSO₄、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、P450

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。i P P アーゼ (シグマ社 (Sigma Company) 、カタログ番号 I 1 8 9 1) 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。

【 0 1 9 2 】

図 1 3 および図 1 5 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 i P P による阻害を解除するのに有効であった。

【 0 1 9 3 】

(実施例 1 3 : 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・バイオラプス・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 M 0 2 9 6) 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 I 1 8 9 1) 、ならびに高度好熱菌 (T t h) 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 P 4 5 0 反応における i P P 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。

【 0 1 9 4 】

この実験において、P 4 5 0 反応混合物 (5 0 マイクロリットル) を調製した。反応物には、1 p m o l の C Y P 1 A 2 (対照反応物では S f 9 膜) 、1 . 3 m M の N A D P ⁺ 、3 . 3 m M のグルコース - 6 - リン酸、0 . 2 U / m l のグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、3 . 3 m M の M g C l ₂ 、0 . 0 1 m M の L u c - M E 、ならびに 1 0 0 m M の K P O ₄ 、p H 7 . 4 (阻害作用を有する緩衝剤) または 1 0 0 m M の K P O ₄ 、p H 7 . 4 (阻害作用のない緩衝剤) を含めた。反応物を 3 7 ° で 1 時間インキュベートした。国際公開第 9 9 1 4 3 3 6 号パンフレット (1 9 9 9 年 3 月 2 5 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 1 0 0 m g / m L 、4 0 0 m M の A T P 、0 . 6 % の P r i o n e x (登録商標) 、4 0 m M のトリシン (p H 7 . 8) 、8 m M の M g S O ₄ 、0 . 2 % の T e r g i t o l (登録商標) 、0 . 0 2 % の M a z u (登録商標) を含有する等容積の試薬の添加により、P 4 5 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。慣用的方法で単離された、ニューイングランド・バイオラプス・インコーポレイテッドの i P P 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 M 0 2 9 6) 、シグマの i P P アーゼ (カタログ番号 I 1 8 9 1) 、または高度好熱菌 (T t h) の i P P アーゼを、一部の反応物に添加した。室温で 3 0 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。

【 0 1 9 5 】

図 1 4 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 K P O ₄ 緩衝剤が P 4 5 0 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 i P P アーゼ酵素が i P P 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) 。

【 0 1 9 6 】

(実施例 1 4 : 酵母 i P P アーゼを用いた添加 i P P からのルシフェラーゼの保護)

本実施例は、添加された i P P の存在下におけるルシフェラーゼ反応阻害の i P P アーゼによる解除を例示し、阻害作用のない 2 0 0 m M の K P O ₄ 緩衝剤に 3 m M の N a P P i を含めた場合の阻害能が、阻害作用を有する 2 0 0 m M の K P O ₄ 緩衝剤の阻害能と同様であり、かつ i P P アーゼが添加された N a P P i の作用を解除することを示す。

【 0 1 9 7 】

反応物には、1 0 0 m M のトリシン (p H 8 . 4) 、1 0 m M の M g S O ₄ 、0 . 1 % の T e r g i t o l (登録商標) 、0 . 0 1 % の M a z u (登録商標) 、5 0 m g / m L

10

20

30

40

50

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）、200 mMのATP、0.2%のPrionex（登録商標）、0.5 mM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200 mMの KPO_4 、pH 7.4または阻害作用を有する200 mMの KPO_4 、pH 7.4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3 mM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。

10

【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ウェル組織培養プレートに播種した。2 mM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0.3 mL/ウェルのHepatoZyme-SFM（製品名）培地中で、37℃、相対湿度95%、5%CO₂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・バイオサイエンス（BD Biosciences）、米国マサチューセッツ州ベッドフォード所在）を0.25 mg/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。

20

30

【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0.3 mL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ため、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（200 mMトリシン、pH 8.4、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100 $\mu g/mL$ （Ultra Glow（商標）ルシフェラーゼ、プロメガ社（Promega, Corp.）から入手可能）、400 μM のATP、20 mM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、一部のウェ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

40

50

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、一部のウェ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、これらのウェ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ウェ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。ブランクウェルの発光値を対応するウェ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)

10

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KPO₄、1.3mMのNADP⁺、3.3mMのグルコース-6-リン酸、3.3mMのMgCl₂、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MgSO₄、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。

20

【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。

30

【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 mapping, accession numbers and nomenclature", *Pharmacogenetics*, 6, 1-42. 10
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. 20
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. 30
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. 40
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).

10

20. This compound was prepared from phenylglyoxal aldoxime²¹ and 1-cyano-2-phenyl-ethylamine hydrochloride²² 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.

20

【図面の簡単な説明】

【 0 2 0 7 】

【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 3 A】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H₂O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。

30

【図 3 B】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。

40

【図 3 C】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 3 D】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

50

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H₂O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H₂O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H₂O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H₂O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H₂O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H₂O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H₂O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

10

20

30

40

50

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 H₂O 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 -ナフトフラボンのピヒクルは、H₂O 中の 1% アセトニトリルおよび 1 mg/ml ウシ血清アルブミンとした。「nt」の値は、ピヒクル対照である。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 100 μ M、100 μ M および 10 μ M 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（100 μ M）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 95 μ l アリコートで HPLC により分析し、330 nm での励起および 520 nm 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 50 μ g/ml の Ultra Glo（商標）ルシフェラーゼ、200 μ M の ATP、0.1% の Tergitol（v/v）、4.0 mM の MgSO₄ および 100 mM のトリシン、pH 8.4 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 H luc を用いたジクロフェナクによる CYP2C9 の阻害を示す。

【図 12 A】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

10

20

30

40

50

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-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-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-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に生成されるメトキシ-セレンテラジンHHからの化学発光(RLU)を示す。

10

【図12D】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。メトキシ-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-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-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-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。

20

【図12G】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(-)、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-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-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。

30

【図12I】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(-)、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-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。

40

【図12K】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(-)、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-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。

50

【図13】酵母 i P P 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 K P O₄ 緩衝液が用いられる場合、ルシフェラーゼの i P P 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 K P O₄ 緩衝液が用いられる場合、ルシフェラーゼの i P P による阻害を解除することが判明した。

【図15】i P P アーゼを用いた、添加 i P P 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 i P P が添加される場合、該反応の i P P による阻害を解除するのに有効であることが判明した。

10

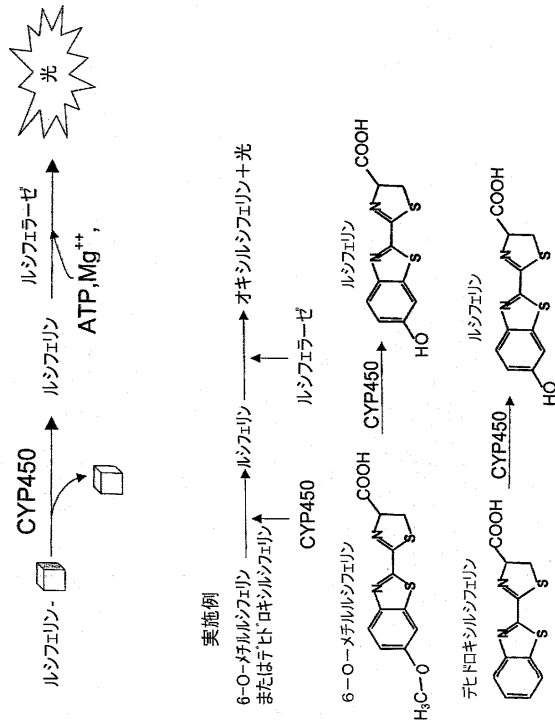
【図16】細胞を用いる C Y P 4 5 0 発光アッセイを示すグラフ。初代ラット肝細胞を、C Y P 4 5 0 遺伝子発現の誘導物質：5 μ M の 3 - メチルコラントレン (M C)、5 0 μ M のデキサメタゾン (D e x) または 5 0 μ M のリファンピシン (R i f) およびそれらのピヒクル対照としてそれぞれ 0 . 0 5、0 . 1 および 0 . 1 % の D M S O (誘導されない) ; ならびに C Y P 4 5 0 の阻害剤：1 0 0 μ M のトロレアンドマイシン (T r o) で 2 日間処理した。この誘導培地を、次に、肝細胞培地中に溶解した 1 0 0 μ M のルシフェリン - C E E (パネル A および B)、2 0 0 μ M のルシフェリン - B E、または 2 0 0 μ M のルシフェリン - B E + T r o 各 3 0 0 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 1 0 0 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 1 5 参照)、かつ 2 0 0 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 2 0 0 マイクロリットルに添加した。2 0 0 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。

20

【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 (A P M B T) または 2 - アミノ - 6 - メチルベンゾチアゾール (A M B T) によるルシフェラーゼの阻害は、C Y P 4 5 0 発光アッセイにおける発光シグナルを安定化する。5 0 マイクロリットルの C Y P 1 A 1 反応物 (0 . 5 p m o l の組換え C Y P 1 A 1 酵素、3 0 μ M のルシフェリンクロロエチルエーテル、1 0 0 m M の K P O₄、1 . 3 m M の N A D P⁺、3 . 3 m M のグルコース - 6 - リン酸、3 . 3 m M の M g C l₂、0 . 0 2 ユニットのグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ) を、3 7 ° C で 2 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、5 0 マイクロリットルのルシフェリン検出試薬 (1 0 0 μ g / m L の熱安定性ルシフェラーゼ (ホタル類 (photuris pennsylvanica) 由来)、4 0 0 μ M の A T P、0 . 6 % の P r i o n e x (登録商標)、2 ユニット / m L の i P P アーゼ、2 0 0 m M のトリシン、p H 8 . 4、2 0 m M の M g S O₄、2 % の T e r g i t o l) に 1 0 0 μ M の A P M B T、1 0 0 μ M の A M B T を含めて、または阻害剤を含めずに、C Y P 1 A 1 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。

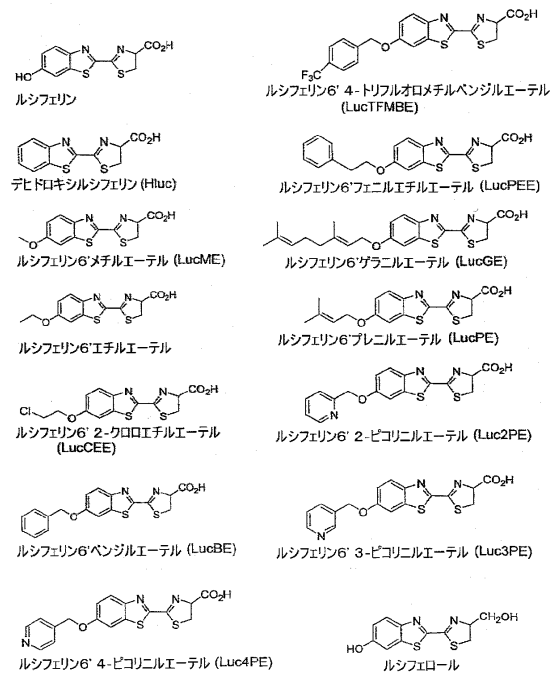
30

【図 1】

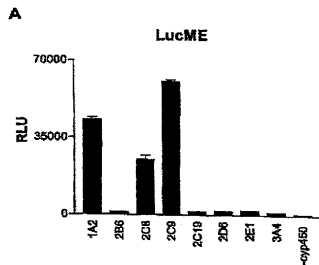


【図 2】

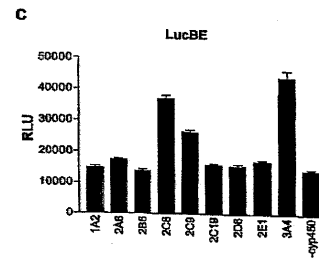
D-ルシフェリンおよびD-ルシフェリン誘導体



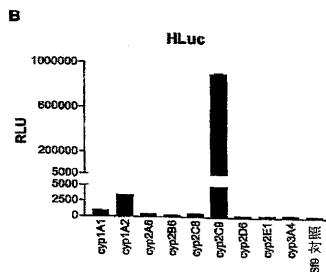
【図 3 A】



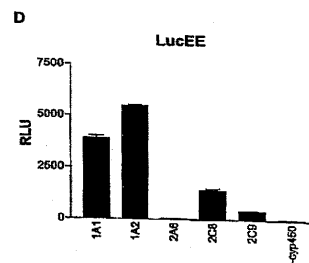
【図 3 C】



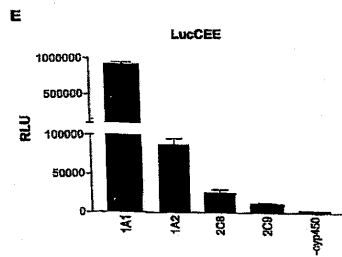
【図 3 B】



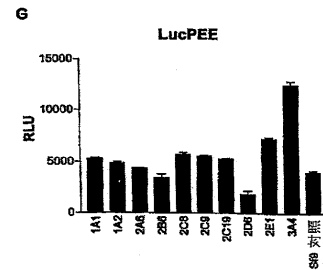
【図 3 D】



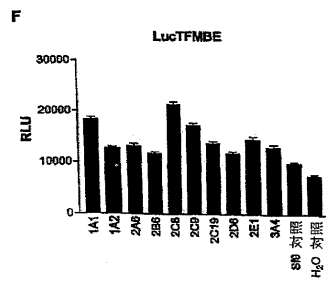
【図 3 E】



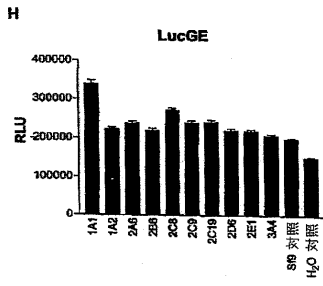
【図 3 G】



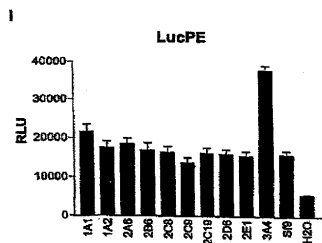
【図 3 F】



【図 3 H】

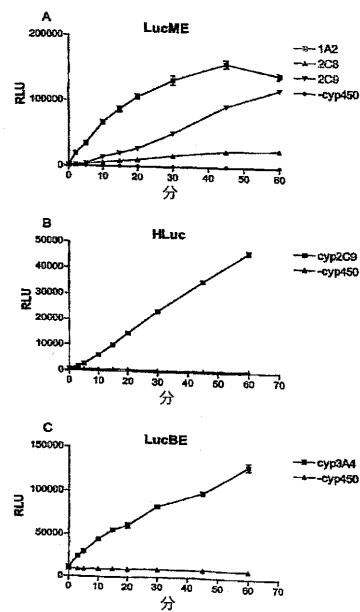


【図 3 I】



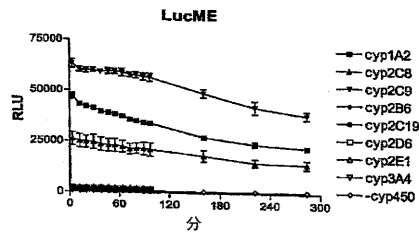
【図 4】

ド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
CYP450ノ基質インキュベーション時間依存性



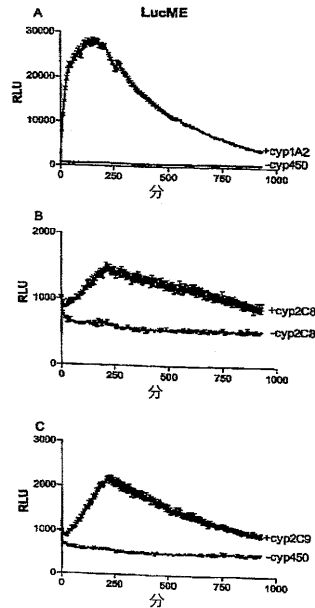
【図5】

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



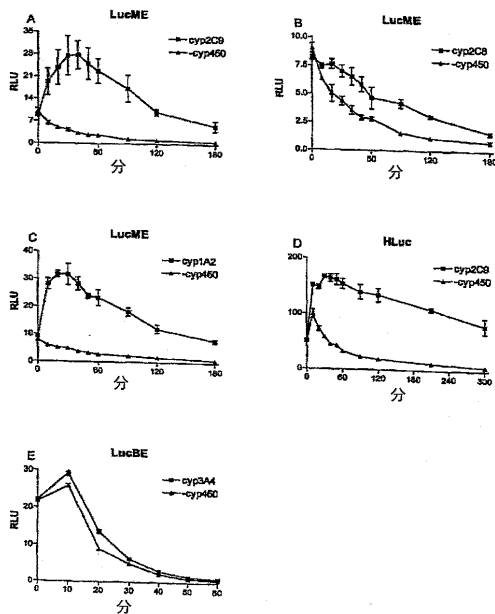
【図6】

LucMEを用いた室温での一段階のcyp450発光アッセイ



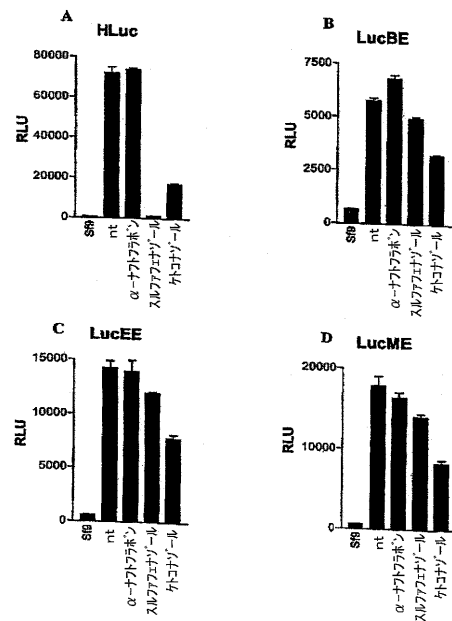
【図7】

D-ルシフェリン誘導体を用いた37°Cでの一段階のcyp450発光アッセイ



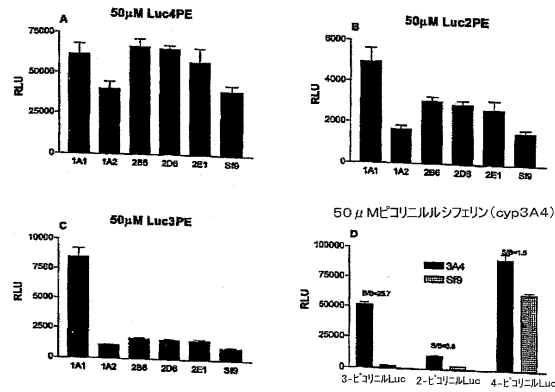
【図8】

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



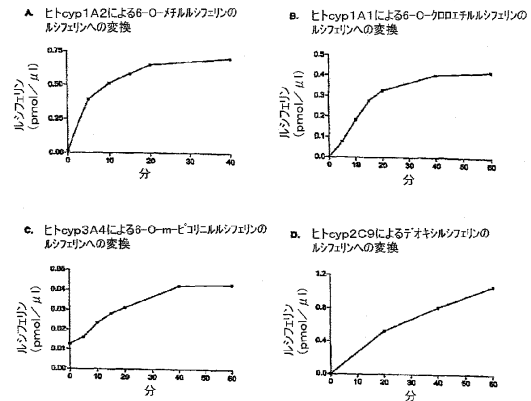
【図 9】

ピコニルD-ルシフェリン誘導体を用いたデピコ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

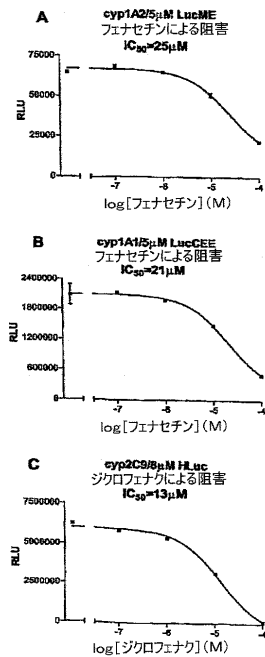


100 μM の6-O-メチルルシフェリン (パネルA)、100 μM の6-O-クロロエチルルシフェリン (パネルB)、25 μM の6-O-メチルルシフェリン (パネルC) または100 μM のデオキシルルシフェリン (パネルD) を、150 μM の反応容積中で、それぞれcyp1A2、cyp1A1、cyp3A4またはcyp2C9とともに37℃でインキュベートした。グラフに示した時間にTergitolを添加し、1% (v/v) として反応を停止させ、液体窒素中で瞬間凍結させた。各反応物95 μLをHPLCにより分離し、蛍光によりルシフェリンを検出した。基質を添加する前に0.1% Tergitol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。

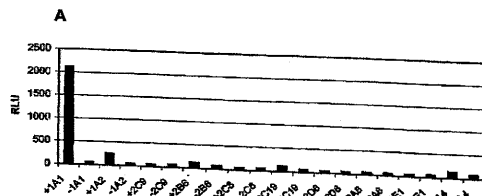
HPLC法: 多波長吸収 (HP1050 MWD) および蛍光検出器 (HP 1046A) を装備したHP1050 LCシステムで、高圧液体クロマトグラフィーを実施した。0.05Mの KH_2PO_4 / pH 6 溶液Aと80:20のアセトリル/水 (溶液B) との溶媒勾配を用いて、5 μmのAdsorbosphere (登録商標) HS C18カラム (オールテック・アソシエイツ) で分離を達成した。用いた勾配条件は、15% B → 95% B (10分間) であった。262または330nmにおける吸収強度により基質を検出し、励起波長330nmにおける520nm (発光波長) の蛍光によりルシフェリンを検出した。

【図 11】

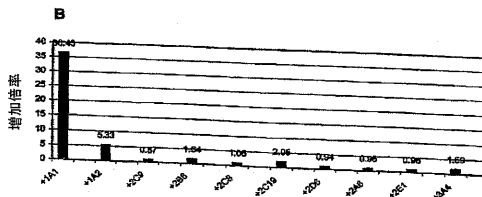
既知のcyp450基質によるcyp450の阻害



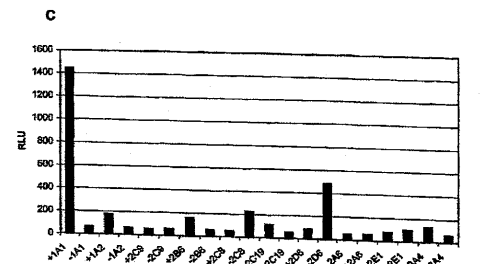
【図 12 A】



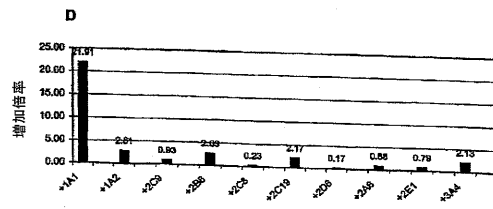
【図 12 B】



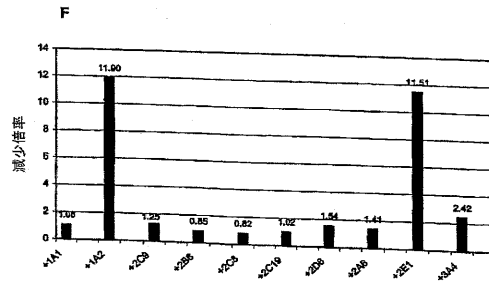
【図 12 C】



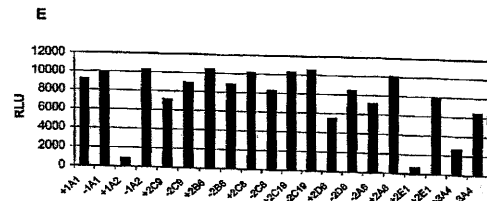
【図 1 2 D】



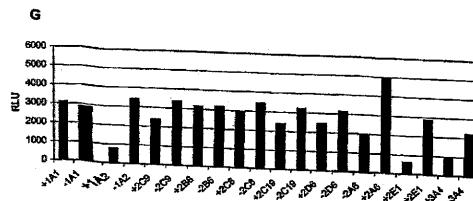
【図 1 2 F】



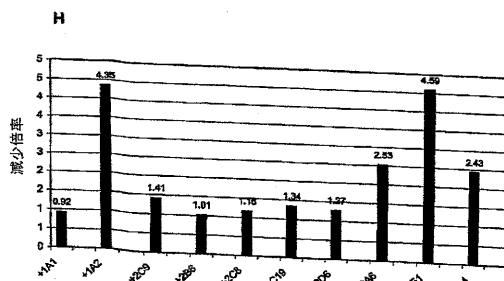
【図 1 2 E】



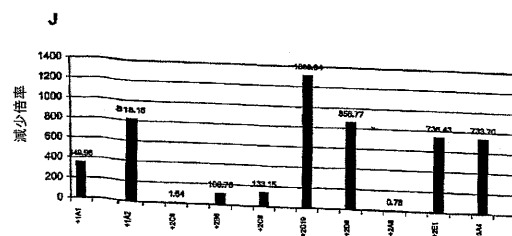
【図 1 2 G】



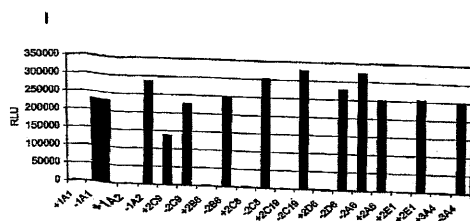
【図 1 2 H】



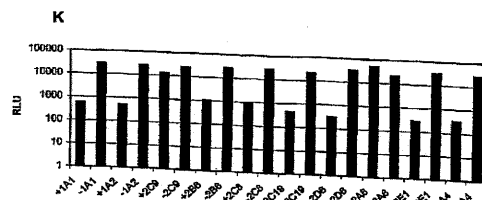
【図 1 2 J】



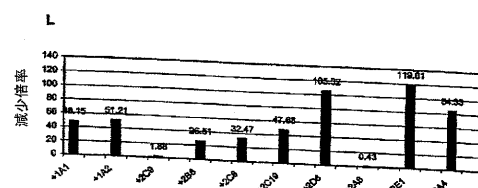
【図 1 2 I】



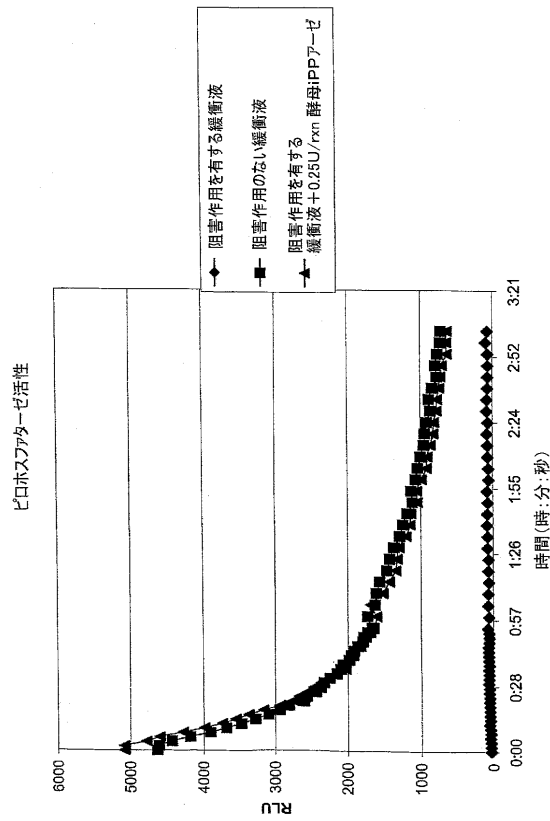
【図 1 2 K】



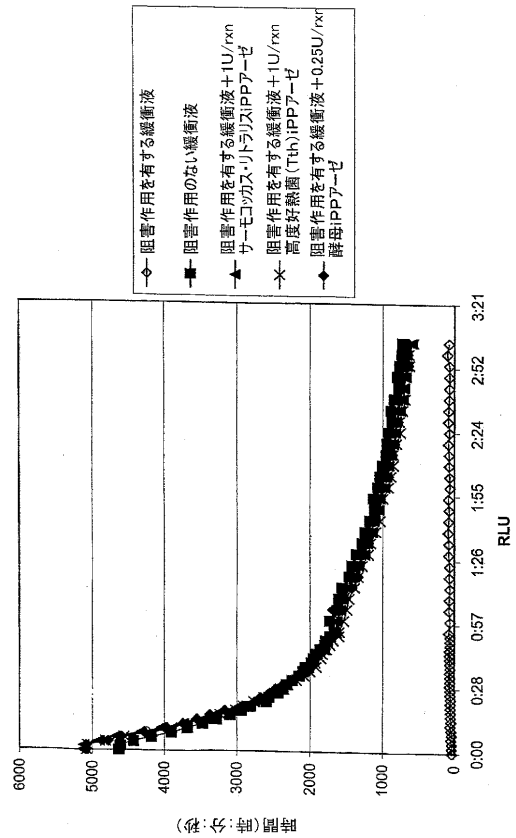
【図 1 2 L】



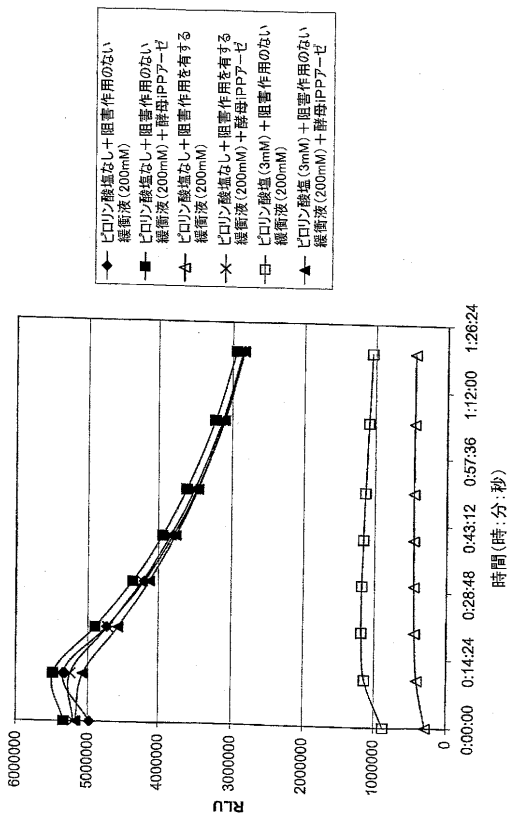
【図 13】



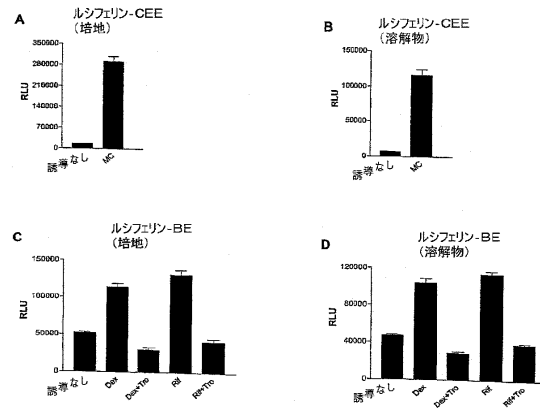
【図 14】



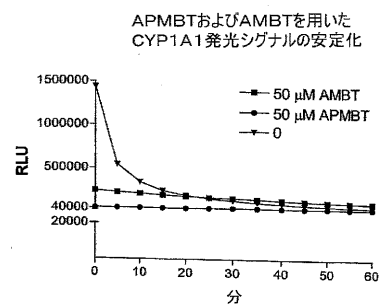
【図 15】



【図 16】



【図 17】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (72)発明者 カリー、ジェームズ ジェイ .
アメリカ合衆国 5 3 5 9 3 ウィスコンシン州 ベローナ ウエスト ローン サークル 5 1
2
- (72)発明者 クラウバート、ディーター
アメリカ合衆国 9 3 4 2 0 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
2 5 0
- (72)発明者 デイリー、ウィリアム
アメリカ合衆国 9 3 4 5 5 カリフォルニア州 サンタ マリア ムーンクレスト レーン 4
5 5
- (72)発明者 ホー、サミュエル キン サン
アメリカ合衆国 5 3 7 1 3 ウィスコンシン州 マディソン ルアーン レーン 2 2 3 4 ナ
ンバー 3 1 3
- (72)発明者 フラックマン、スーザン
アメリカ合衆国 5 3 7 0 5 ウィスコンシン州 マディソン タリー ホー レーン 3 2 0 6
- (72)発明者 ホーキンス、エリカ
アメリカ合衆国 5 3 7 1 1 ウィスコンシン州 マディソン プレーリー ロード 2 2 3 0
- (72)発明者 ウッド、キース ブイ .
アメリカ合衆国 5 3 5 7 2 ウィスコンシン州 マウント ホレブ スワン ロード 8 3 8 0

審査官 大竹 秀紀

- (56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 6 0 0 9 6 (W O , A 1)
国際公開第 0 0 / 0 3 5 9 0 0 (W O , A 1)
特表昭 6 3 - 5 0 1 5 7 1 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 3 2 4 8 7 (J P , A)
国際公開第 0 1 / 0 7 3 1 1 3 (W O , A 1)
Nicolas LEMBERT, Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light, BIOCHEMICAL
JOURNAL, 1 9 9 6 年 6 月 1 日, Vol. 317, 188-190
Olga Gandelman et al., Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of
bioluminescence from firefly lucifera, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescenc
e, 1 9 9 4 年, Volume 9, Issue 6, 363-371
Alexey Dukhovitch et al., Time course of luciferyl adenylate synthesis in the firefly l
uciferase reaction, FEBS Letters, 1 9 9 6 年 1 0 月 2 1 日, Volume 395, Number 2, 188-19
0

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 1 / 7 5 - G 0 1 N 2 1 / 8 3
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - G 0 1 N 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 0 0 - C 1 2 Q 1 / 7 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

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	JP5079600B2	公开(公告)日	2012-11-21
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		
当前申请(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、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)	山崎 一夫		
优先权	60/412254 2002-09-20 US 60/483309 2003-06-27 US		
其他公开文献	JP2008281575A		
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，萤光素或腔肠素，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，萤光素和/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（例如萤光素酶）的底物。【选择图】无

