(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5037127号
(P5037127)

(45)発行日　平成24年9月26日(2012.9.26)　(24)登録日　平成24年7月13日(2012.7.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C07J 43/00	(2006.01)	C07J	43/00	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q	1/26	
C09B 57/00	(2006.01)	C09B	57/00	Z
C09B 15/00	(2006.01)	C09B	15/00	

請求項の数 14　(全 27 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-521676 (P2006-521676)
(86)(22)出願日　平成16年7月30日 (2004.7.30)
(65)公表番号　特表2007-500182 (P2007-500182A)
(43)公表日　平成19年1月11日 (2007.1.11)
(86)国際出願番号　PCT/GB2004/003341
(87)国際公開番号　WO2005/012901
(87)国際公開日　平成17年2月10日 (2005.2.10)
審査請求日　平成19年7月30日 (2007.7.30)
(31)優先権主張番号　0317743.3
(32)優先日　平成15年7月30日 (2003.7.30)
(33)優先権主張国　英国(GB)

前置審査

(73)特許権者　398048914
ジーイー・ヘルスケア・ユーケイ・リミテッド
イギリス国　エイチ　ピー　７　９　エヌ　エイ　バッキンガムシャー　リトル　チョーフォント　アメルシャム　プレイス　（無番地）
(74)代理人　100137545
弁理士　荒川　聡志
(74)代理人　100105588
弁理士　小倉　博
(74)代理人　100129779
弁理士　黒川　俊久

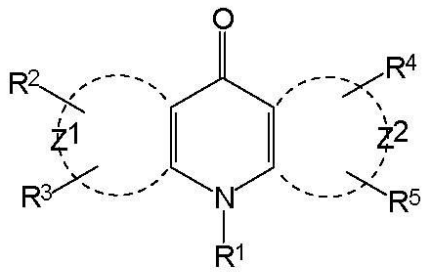
最終頁に続く

(54)【発明の名称】アロマターゼ活性の測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の式Ｉの化合物であって、アロマターゼ活性を有する酵素の作用を受けた際に蛍光寿命に関して当該化合物の蛍光信号が変化することを特徴とする化合物。

Ｒ－Ｌ－Ｓ　　（Ｉ）

式中、Ｒは蛍光染料分子であって、以下の式ＩＩのアクリドン染料又は式ＩＩＩのキナクリドン染料のいずれかであり、
【化１】

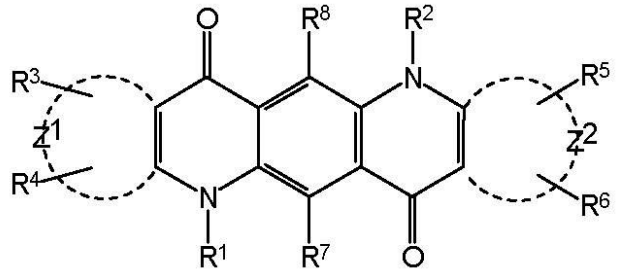


(II)

（式中、基Ｒ^{2}及びＲ^{3}はＺ^{1}環構造に結合しており、基Ｒ^{4}及びＲ^{5}はＺ^{2}環構造に結合しており、

Z^1及びZ^2は独立に１又は２個の芳香族又は複素芳香族縮合環系を完成するのに必要な原子を表し、各環は、炭素原子と適宜酸素、窒素及びイオウから選択される２個以下の原子とから選択される５又は６個の原子を有し、
R^1、R^2、R^3、R^4及びR^5は独立に水素、ハロゲン、アミド、ヒドロキシル、シアノ、アミノ、モノ又はジC_1～C_4アルキル置換アミノ、スルフヒドリル、カルボニル、C_1～C_6アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、C_1～C_{20}アルキル、アラルキル、並びに基－（CH_2－）$_n$Ｙ（式中、Ｙはスルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、四級アンモニウム及びカルボキシルから選択され、ｎは０又は１～６の整数である）から選択される。）

【化２】



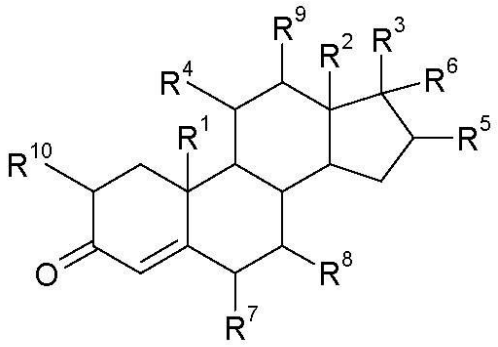
(III)

（式中、基R^3及びR^4はZ^1環構造に結合しており、基R^5及びR^6はZ^2環構造に結合しており、
Z^1及びZ^2は独立に１又は２個の芳香族又は複素芳香族縮合環系を完成するのに必要な原子を表し、各環は、炭素原子と適宜酸素、窒素及びイオウから選択される２個以下の原子とから選択される５又は６個の原子を有し、
R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7及びR^8は独立に水素、ハロゲン、アミド、ヒドロキシル、シアノ、アミノ、モノ又はジC_1～C_4アルキル置換アミノ、スルフヒドリル、カルボニル、カルボキシル、C_1～C_6アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、C_1～C_{20}アルキル、アラルキル、並びに基－（CH_2－）$_n$Ｙ（式中、Ｙはスルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、四級アンモニウム及びカルボキシルから選択され、ｎは０又は１～６の整数である）から選択される。）、
Ｌは以下の基から選択されるリンカー基であり、

$$\{(-CHR'-)_p-Q-(-CHR'-)_r\}_s$$

（式中、各ＱはＣＨＲ’、ＮＲ’、Ｏ、－ＣＨ＝ＣＨ－、Ａｒ及びＣＯＮＨ－から選択され、
各Ｒ’は独立に水素又はC_1～C_4アルキルであり、
各ｐは独立に０～５であり、
各ｒは独立に０～５であり、
ｓは１又は２である。）
Ｓは次の式ＩＸの酵素アロマターゼの基質基であり、

【化３】



(IX)

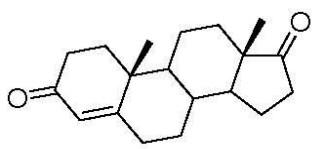
（式中、R^1及びR^2はH及びメチルから選択され、
R^3はH、C_1～C_8アルキル、シアノ、－（CH_2）$_k$－OR^a、－（CH_2）$_k$－$COOR^a$、－（CH_2）$_k$－SO_3R^a、－（CH_2）$_k$－CHO、－（CH_2）$_k$－NR^bR^c及び－（CH_2）$_k$－COR^dから選択され、
R^4はH、－COR^a及びヒドロキシルから選択され、
R^5はH、－COR^a、ヒドロキシル、シアノ及びハライドから選択され、
R^6はH及びヒドロキシルから選択され、
R^7、R^8及びR^9は独立にH、－COR^a及びヒドロキシルから選択され、
R^{10}はH及びハライドから選択され、
但し、R^aはH、及びOHで適宜置換されたC_1～C_4アルキルから選択され、
R^b及びR^cはH及びC_1～C_4アルキルから選択され、
R^dはC_1～C_8アルキル、又は$COOR^a$、OH、OR^a若しくはSO_3R^aで適宜置換されたC_1～C_8アルキルから選択され、
kは０又は１～８の整数である。）
リンカー基Ｌは、式ＩＩのアクリドン染料のR^1基又は式ＩＩＩのキナクリドン染料のR^1もしくはR^2基によって蛍光染料分子Ｒと結合しているとともに、式ＩＸのR^3又はR^6基で基質基Ｒに結合している。

【請求項２】
Ｑが－ＣＨＲ’－、－Ｏ－及び－ＣＯＮＨ－（式中、Ｒ’は水素又はC_1～C_4アルキルである）からなる群から選択される、請求項１記載の化合物。

【請求項３】
基Ｓが、４－アンドロステン－３－オン、４－コレステン－３－オン、４－エストレン－３－オン及び４－プレグネン－３－オンからなるステロイドファミリーの群から選択されるステロイドである、請求項１又は請求項２記載の化合物。

【請求項４】
Ｓが次の式Ｘのアンドロステンジオンである、請求項１又は請求項２記載の化合物。

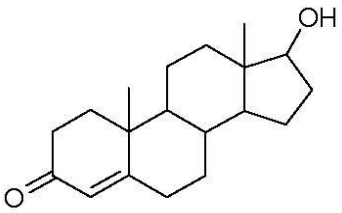
【化４】



(X)

【請求項５】
Ｓが次の式ＸＩのテストステロンである、請求項１又は請求項２記載の化合物。

【化５】

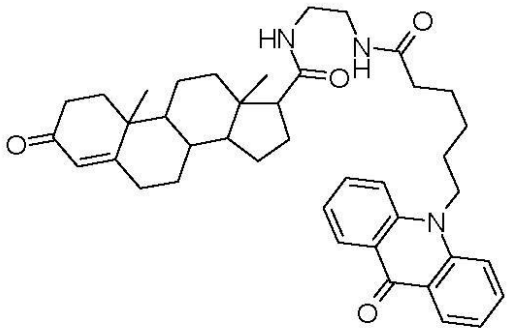


(XI)

【請求項６】

次の式ＸＸの請求項１乃至請求項５のいずれか１項記載の化合物。

【化６】



(XX)

【請求項７】

試料のアロマターゼ活性のインビトロ測定方法であって、

ｉ）前記試料に請求項１乃至請求項６のいずれか１項記載の化合物を加える前に、該化合物の蛍光寿命を測定する段階と、

ｉｉ）前記試料に前記化合物を加える段階と、

ｉｉｉ）段階ｉｉ）に続いて、前記化合物の蛍光寿命の変化を測定する段階と

を含み、

蛍光寿命の前記変化がアロマターゼ活性の測定に使用することができる、方法。

【請求項８】

試料が抽出物、細胞、組織及び有機体からなる群から選択される、請求項７記載の方法。

【請求項９】

アロマターゼの活性に対する効果を測定しようとする試験薬剤のインビトロスクリーニング方法であって、

ｉ）前記薬剤の存在下で請求項７又は請求項８記載の方法を実施する段階と、

ｉｉ）前記薬剤の存在下での前記アロマターゼの活性と、前記薬剤の非存在下でのアロマターゼの活性の既知の値とを比較する段階とを含み、

前記薬剤の存在下での前記アロマターゼの活性と、前記薬剤の非存在下での前記既知の値との差がアロマターゼの活性に対する試験薬剤の効果を示す、方法。

【請求項１０】

前記既知の値を電子データベースに保存する、請求項９記載の方法。

【請求項１１】

アロマターゼの活性に対する効果を測定しようとする試験薬剤のインビトロスクリーニング方法であって、当該方法が

ｉ）前記薬剤の存在下及び非存在下で請求項７又は請求項８記載の方法を実施する段階と、

ｉｉ）前記薬剤の存在下及び非存在下で前記酵素の活性を測定する段階

を含み、
前記薬剤の存在下と非存在下での前記アロマターゼの活性の差が、アロマターゼの活性に対する試験薬剤の効果を示す、方法。
【請求項１２】
前記薬剤の非存在下と存在下でのアロマターゼの活性の前記活性の差を標準化し、電子的に保存し、基準化合物の値と比較する、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
アロマターゼ活性を測定するためのインビトロ又はインビボ画像形成用プローブとして使用される請求項１乃至請求項６のいずれか１項記載の化合物。
【請求項１４】
ｉ）請求項１乃至請求項６のいずれか１項記載の化合物と、ｉｉ）アッセイ緩衝液と、適宜ｉｉｉ）停止緩衝液とを含む、アロマターゼ活性測定用キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アロマターゼ活性を測定するための化合物、方法及びキットに関する。本発明は、インビトロとインビボの両方で、酵素活性を測定し、阻害物質を特定／特性決定するために使用することができる。
【背景技術】
【０００２】
酵素活性を測定するためのアッセイは薬学及び環境科学において広く用いられている。コンビナトリアルケミストリーと高生産性スクリーニングの出現にともなって、潜在的な酵素活性の修飾因子をスクリーニングするための簡単で、感度良くかつ費用効果の高いアッセイの必要性が増大している。
【０００３】
酵素アロマターゼシトクロムＰ４５０　１９　Ａ１（ＥＣ１．１４．１４．１）は遺伝子のＰ４５０スーパファミリーのメンバーであるＣＹＰ１９遺伝子の産生物である。アロマターゼは、それがアンドロゲンのΔ^4－３－オン環をエストロゲンのフェノールＡ環に転換するので芳香族化と称される反応である、エストロゲン生合成の律速段階であるC_{19}アンドロゲン性ステロイドの対応するエストロゲンへの転換（図１）での触媒作用をする（Ｃｉｏｌｉｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ，８３，３３３－３３７）。
【０００４】
エストロゲンは、閉経前と閉経後両方における女性の多くの乳癌の成長と進行における最も重要な病因的要素である。閉経後の女性の乳房腫瘍は、血漿１７β－エストラジオール濃度が低いにもかかわらず、高レベルの１７β－エストラジオールを含む。乳房腫瘍が、副腎アンドロゲン前駆体から１７β－エストラジオールを合成できることは現在広く認められている。合成は、アロマターゼによるアンドロステンジオンのエストロンへの芳香族化、続く１７β－ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ１型によるエストロンの１７β－エストラジオールへの転換によって行う（Ｊａｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ　１４２，１４９７－１５０５）。
【０００５】
インビトロで測定した場合、隣接の又は健康な脂肪細胞より、乳房腫瘍においてアロマターゼ活性がより高いことが見いだされた。さらに、癌性細胞を取りまく脂肪間質細胞は、非癌性領域における対応細胞より、より高いレベルのアロマターゼｍＲＮＡを含むことが分かった（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ　Ｃａｎｃｅｒ，６，１４９－１５６）。したがって、腫瘍又は周囲の組織でのアロマターゼ活性は、エストロゲンの局所的な生成に起因して、腫瘍の増殖を促進するのに重要な役割を果たすと考えられている。
【０００６】

アロマターゼは、活性を低下させ、その結果、腫瘍の部位で合成されるエストロゲンのレベルを低下させることによって、乳癌の治療における処置のキーポイントとなる。したがって、アロマターゼ阻害物質は多くの乳癌患者に多大な利益を提供する（Ｊａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １４２，１４９７－１５０５）。

【０００７】

阻害物質は潜在的な環境有害物質、すなわち、いわゆる「内分泌攪乱物質」として特定されているので、アロマターゼは、乳癌の治療における医学的及び薬学的見地からだけでなく、環境の観点からも重要な酵素である（Ｍａｋ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ，１０７，８５５－８６０）。したがって、アロマターゼ活性の修飾因子、特に阻害物質を特定するための簡単で高い処理能力のスクリーニングアッセイの開発は、大きな商業的関心事である。

蛍光検出法

蛍光ベースのアッセイは、操作の簡易さ、感度、コスト及び自動化の容易さの点で、酵素活性を測定するための放射化学的ＥＬＩＳＡ、抗体及びより伝統的な技術を凌ぐ大きな利点をもたらす。最近、同一分子上に供与体と消光性受容体を有する基質を使用する蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）アッセイ適用に大きな関心が寄せられている。例えば、国際公開第９４／２８１６６号は、プロテアーゼによる加水分解によってより強く蛍光を発するポリペプチド基質に結合しているそうしたＦＲＥＴ標識の使用を報告している。

【０００８】

ＦＲＥＴ技術は、スクリーニングアッセイで使用するのに、単なる蛍光強度技術より高い感度と信頼性をもたらすが、その複雑な性質のため、基質は調製し精製するのに著しく高価である。したがって、ＦＲＥＴ標識の調製は、分析及び／又は精製と材料のコストの両方の点で要求が高まってきている。さらに、従来の蛍光又はＦＲＥＴ標識を識別するための唯一の方法はその吸収スペクトル及び発光スペクトルによるものである。

【０００９】

本発明で使用できる蛍光寿命測定は、蛍光強度を定量化することだけを基にしている従来の蛍光技術を凌駕する著しい利点を提供する。蛍光寿命は、スペクトル分解した同じ強度信号により測定されるだけでなく、さらに時間領域で分解される。蛍光寿命技術は、信号が「バックグラウンドノイズ」によって殆んど影響されないので、より高い識別度を提供する。この技術のさらなる利点は、複数の異なる事象を、識別可能な寿命を有する標識を選択し、多重化することによって、同時に測定できることである。さらに、蛍光寿命の測定は濃度効果及び光退色による影響を受けない。

アロマターゼアッセイ

アロマターゼ活性の測定のために、複数のアッセイ様式が報告されている。これらは、「天然」基質か又は代理基質の使用によって、２つのカテゴリーに分けることができる。検出方法には、放射性同位元素純トレーサー（例えば、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ＆ Ｓｉｉｔｅｒｉ，１９７４，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２４９，５３６４－５３７２）、蛍光強度（Ｃｒｅｓｐｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９７，２４８，１８８－１９０）、酵素活性（例えば、Ｃｈａｂａｂ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２５，１６５－１６９）及び高速液体クロマトグラフィー（Ｆａｕｓｓ ＆ Ｐｙｅｒｉｎ，１９９３，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２１０，４２１－４２３）の使用が含まれる。

【００１０】

Ｏｄｕｍ ａｎｄ Ａｓｈｂｙ（Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ（２００２），１２９，１１９－１２２）は、アロマターゼ活性測定のための「トリチウム化水アッセイ」を用いた放射能アッセイを記載している。このアッセイは、芳香族化の際の基質の１β位からの、$^{3}H_{2}O$としての^{3}Hの放出に基づいて酵素活性を定量する。最終反応は、ジメチルスルホキシド中の基質１β（^{3}H）－アンドロステンジオン及び潜在的アロマタ

ーゼ阻害物質と一緒に、ラットの卵巣ミクロソーム及びＮＡＤＰＨ発生システムを含んだ。反応を、基質を加えて開始させ、３７℃で３０分間実施した。クロロホルム－メタノールを加えて反応を停止させ、混合物を６０秒間振盪させた。溶媒を除去した後、デキストランコーティングした活性炭の懸濁液を加えた。混合物を４℃で１時間放置し、遠心分離にかけ、５００μｌの上澄みをシンチラントに加え、液体シンチレーションカウンタでカウントとした。

【００１１】

このアッセイは、潜在的な阻害物質を特定するための手段として文献で広く用いられているが（例えば、国際公開第０３／０４５９２５号）、労働集約的であり、多大な時間を必要とし、かつ放射能標識した基質を必要とするので、明らかに、高い処理能力の手順に応じられるものではない。

【００１２】

Ｃｒｅｓｐｉ ｅｔ ａｌ．（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９７），２４８，１８８－１９０）は、昆虫細胞中に発現し、ミクロソームとして調製された組み換えられたヒトアロマターゼの活性を測定するために使用できる、マイクロタイタープレートをベースとした蛍光定量的強度アッセイを記載している。このアッセイは、基質としてジベンジルフルオレセイン（ＤＢＦ）を使用しており、このアッセイによって、多くの場合報告されている値と異なる多数のＩＣ$_{50}$値が報告されている。これらの差は、基質の選択及び細胞基準系の使用などの方法上のばらつきに起因していると報告されている。この第２の様式における「代理」基質の使用によって、ＩＣ$_{50}$が何故公表されている値と異なるかが明らかとなる。

【特許文献１】国際公開第９４／２８１６６号パンフレット
【特許文献２】国際公開第０３／０４５９２５号パンフレット
【特許文献３】国際公開第０２／０８１５０９号パンフレット
【特許文献４】国際公開第０２／０５６６７０号パンフレット
【特許文献５】米国特許第５９６８４７９号明細書
【特許文献６】国際公開第９８／４７５３８号パンフレット号
【特許文献７】国際公開第０２／０９９４２４号パンフレット
【特許文献８】国際公開第０２／０９９４３２号パンフレット
【非特許文献１】Ｃｉｏｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，８３，３３３－３３７
【非特許文献２】Ｊａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １４２，１４９７－１５０５
【非特許文献３】Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｃａｎｃｅｒ，６，１４９－１５６
【非特許文献４】Ｍａｋ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ，１０７，８５５－８６０
【非特許文献５】Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ＆ Ｓｉｉｔｅｒｉ，１９７４，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２４９，５３６４－５３７２
【非特許文献６】Ｃｒｅｓｐｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９７，２４８，１８８－１９０
【非特許文献７】Ｃｈａｂａｂ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ステロイド Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２５，１６５－１６９
【非特許文献８】Ｆａｕｓｓ ＆ Ｐｙｅｒｉｎ，１９９３，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２１０，４２１－４２３
【非特許文献９】Ｏｄｕｍ ａｎｄ Ａｓｈｂｙ（Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ（２００２），１２９，１１９－１２２）
【非特許文献１０】Ｂｈａｔｎａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７６，１９９－２０２

【非特許文献１１】Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，（Ｃｈａｐｔｅｒ４） ｅｄ．Ｊ Ｒ Ｌａｋｏｗｉｃｚ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９９，Ｋｌｕｗｅｒ／Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ
【非特許文献１２】Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，（Ｃｈａｐｔｅｒ５） ｅｄ．Ｊ Ｒ Ｌａｋｏｗｉｃｚ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９９，Ｋｌｕｗｅｒ／Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ
【非特許文献１３】Ｓａｎｄｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２２７（２），３０２－３０８

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

したがって、薬学及び環境科学において、アロマターゼ活性を測定するための改善された蛍光ベースアッセイの必要性が引き続き存在している。そうしたアッセイは、以下の特質、すなわち均質性、高感度、良好な信頼性、堅牢さ、使用の簡単さ、低コスト、自動化の容易さ、標識特異性及び／又は標識化合物を識別するための２つ以上の検出の形のうちの１以上を有することができる。改善されたアッセイは、これらの特徴のうちの２つ以上を示すことが好ましく、これらの特徴のすべてを示すことが好ましい。本発明は、そうしたアッセイを実施するための新規の試薬と方法を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明の第１の態様によれば、式Ｉの化合物であって、アロマターゼ活性を有する酵素がその化合物に作用した際に、蛍光強度又は蛍光寿命に関して前記化合物の蛍光信号が変化することを特徴とする化合物を提供する。

【００１５】

Ｒ－Ｌ－Ｓ
（Ｉ）

式中、Ｒは蛍光染料分子であり、
ＬはＮ、Ｏ及びＳなどの他の原子も含んでいてもよい炭化水素鎖を含む１個以上の原子を含む適宜の連結基であり、
Ｓは酵素アロマターゼの基質基を含む分子である。

【００１６】

Ｒは、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、ＢＯＤＩＰＹ（商標）染料、フェノキサジン、シアニン、Ａｌｅｘａｆｌｕｏｒｓ（商標）、メロシアニン、Ｃｙ３Ｂ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、アクリドン、キナクリドン及びスクエア酸染料からなる群から選択されることが適切である。

【００１７】

本発明によって蛍光レポーター部分Ｒとして使用できるある範囲の蛍光標識は市販されている。例としては、これらに限定されないが、国際公開第０２／０８１５０９号に記載のオキサジン（例えば、ＭＲ１２１、ＪＡ２４２、ＪＡ２４３）及びローダミン誘導体（例えば、ＪＡ１６５、ＪＡ１６７、ＪＡ１６９）が含まれる。他の例（国際公開第０２／０５６６７０号に記載のような）には、これらに限定されないが、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５及びＣｙ７（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、メロシアニン（Ｆｅｗ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、ＩＲＤ４１及びＩＲＤ７００（Ｌｉｃｏｒ）、ＮＩＲ－１及びＩＣ５－ＯＳｕ（Ｄｏｊｉｎｄｏ）、Ａｌｅｘａ ｆｌｕｏｒ６６０ ＆ Ａｌｅｘａ ｆｌｕｏｒ６８０（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）、ＬａＪｏｌｌａ Ｂｌｕｅ（Ｄｉａｔｒｏｎ）、ＦＡＲ－Ｂｌｕｅ、ＦＡＲ－Ｇｒｅｅｎ Ｏｎｅ ＆ ＦＡＲ－Ｇｒｅｅｎ Ｔｗｏ（Ｉｎｎｏｓｅｎｓｅ）、ＡＤＳ７９０－ＮＳ及びＡＤＳ８２１－ＮＳ（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｙｅ Ｓｏｕｒｃｅ）、インドシアニングリーン（ＩＣＧ）及びその類似体（米国特許第５９６８４７９号）、インドトリカルボシアニン（ＩＴＣ、国際公開第９８／４７５３８）号、蛍光量子ドット（硫化亜鉛キャップセレン化カドミウムナノ結晶－ＱｕａｎｔｕｍＤｏｔ Ｃ

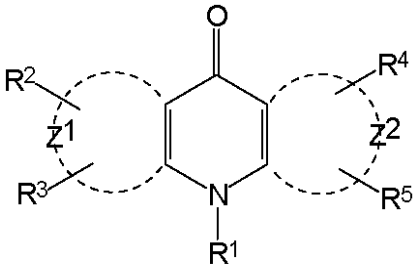
ｏｒｐ．）並びにキレート化ランタニド化合物（蛍光ランタニド金属にはユウロピウム及びテルビウムが含まれる）が含まれる。

【００１８】

Ｒは、国際公開第０２／０９９４２４号に記載の式ＩＩのアクリドン染料であることが好ましい。

【００１９】

【化１】



(II)

式中、基Ｒ^{2}及びＲ^{3}はＺ^{1}環構造に結合しており、基Ｒ^{4}及びＲ^{5}はＺ^{2}環構造に結合しており、

Ｚ^{1}及びＺ^{2}は独立に１又は２個の芳香族又は複素芳香族縮合環系を完成するのに必要な原子を表し、各環は炭素原子並びに酸素、窒素及びイオウから選択される２個以下の適宜の原子から選択される５又は６個の原子を有し、

Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}及びＲ^{5}は独立に水素、ハロゲン、アミド、ヒドロキシル、シアノ、アミノ、モノ又はジＣ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキル置換アミノ、スルフィドリル、カルボニル、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{20}$アルキル、アラルキル、基－Ｅ－Ｆ（式中、Ｅは炭素、窒素、酸素、イオウ及びリン原子からなる群から選択される１～６０個の原子の鎖を有するスペーサー基であり、Ｆは目標結合基である）、並びに基－（ＣＨ$_{2}$－）$_{n}$Ｙ（式中、Ｙはスルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、四級アンモニウム及びカルボキシルから選択され、ｎは０又は１～６の整数である）から選択される。

【００２０】

目標結合基Ｆは反応基又は官能基であることが適切である。式（ＩＩ）による蛍光染料の反応基は、適切な条件下で、基質の官能基（すなわち、基Ｌ又はＸ）と反応することができ、式（ＩＩ）による化合物の官能基は、適切な条件下で、基質の反応基と反応することができる。これらの反応基及び官能基によって、式（ＩＩ）による蛍光染料は、基質と反応し、かつ共有結合で結合することができ、それによって基質は蛍光染料で標識される。

【００２１】

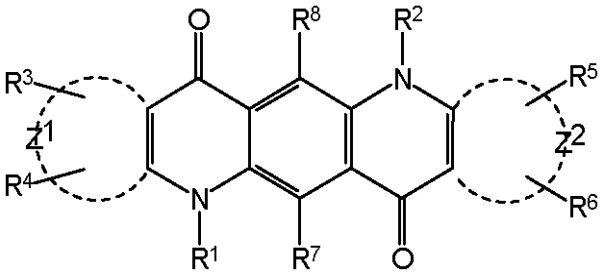
Ｆが反応基である場合、それは、スクシニミジルエステル、スルホ－スクシニミジルエステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミド、酸ハライド、ビニルスルホン、ジクロロトリアジン、カルボジイミド、ヒドラジド及びホスホロアミダイトからなる群から選択されることが好ましい。Ｆが官能基である場合、それは、ヒドロキシ、アミノ、スルフィドリル、イミダゾール、アルデヒド及びケトンを含むカルボニル、ホスフェート並びにチオホスフェートから選択されることが好ましい。

【００２２】

Ｒは、国際公開第０２／０９９４３２号に記載の式ＩＩＩのキナクリドン染料であることが好ましい。

【００２３】

【化２】



(III)

式中、基Ｒ[3]及びＲ[4]はＺ[1]環構造に結合しており、基Ｒ[5]及びＲ[6]はＺ[2]環構造に結合しており、
Ｚ[1]及びＺ[2]は独立に１つ若しくは２つの芳香族又は複素芳香族縮合環系を完成するのに必要な原子を表し、各環は炭素原子並びに酸素、窒素及びイオウから選択される２個以下の適宜の原子から選択される５又は６個の原子を有し、
Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[3]、Ｒ[4]、Ｒ[5]、Ｒ[6]、Ｒ[7]及びＲ[8]は独立に水素、ハロゲン、アミド、ヒドロキシル、シアノ、アミノ、モノ又はジＣ[1]～Ｃ[4]アルキル置換アミノ、スルフィドリル、カルボニル、カルボキシル、Ｃ[1]～Ｃ[6]アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、Ｃ[1]～Ｃ[20]アルキル、アラルキル、基－Ｅ－Ｆ（式中、Ｅは炭素、窒素、酸素、イオウ及びリン原子からなる群から選択される１～６０個の原子の鎖を有するスペーサー基であり、Ｆは目標結合基である）、並びに基－（ＣＨ[2]－）[n]Ｙ（式中、Ｙはスルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、四級アンモニウム及びカルボキシルから選択され、ｎは０又は１～６の整数である）から選択される。

【００２４】

目標結合基Ｆは反応基又は官能基であることが適切である。式（ＩＩＩ）による蛍光染料の反応基は、適切な条件下で、基質の官能基と反応することができ、式（ＩＩＩ）の化合物の官能基は、適切な条件下で、基質の反応基と反応することができる。これらの反応基及び官能基によって、式（ＩＩＩ）による蛍光染料は基質と反応し、かつ共有結合で結合することができ、それによって基質は蛍光染料で標識される。

【００２５】

Ｆが反応基である場合、それは、スクシニミジルエステル、スルホ－スクシニミジルエステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミド、酸ハライド、ビニルスルホン、ジクロロトリアジン、カルボジイミド、ヒドラジド及びホスホロアミダイトからなる群から選択されることが好ましい。Ｆが官能基である場合、それは、ヒドロキシ、アミノ、スルフィドリル、イミダゾール、アルデヒド及びケトンを含むカルボニル、ホスフェート並びにチオホスフェートから選択されることが好ましい。

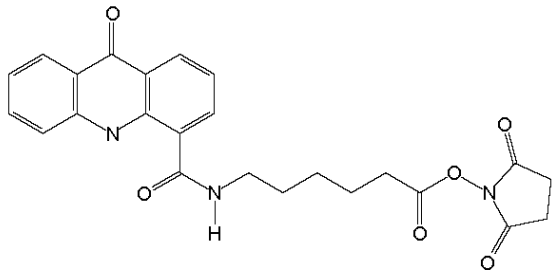
【００２６】

アクリドン染料及びキナクリドン染料（及びその対応する寿命（ナノ秒））の好ましい例を、表１に化合物（ＩＶ）、（Ｖ）、（ＶＩ）、（ＶＩＩ）及び（ＶＩＩＩ）をそのＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシニミジル）エステルとして示す。

【００２７】

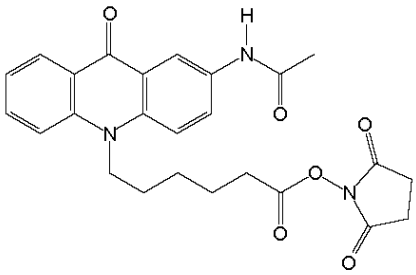
【表１】

表1



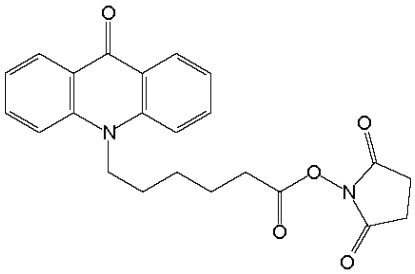
(IV) (4nsec)

O-(N-スクシニミジル)-6-(9-オキソ-9H-アクリジン-4-カルボキシアミド)ヘキサノエート (III)



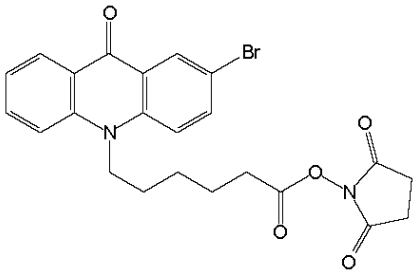
(V) (17nsec)

O-(N-スクシニミジル)-6-(2-アセトアミド-9-オキソ-9H-アクリジン-10-イル)ヘキサノエート (IV)



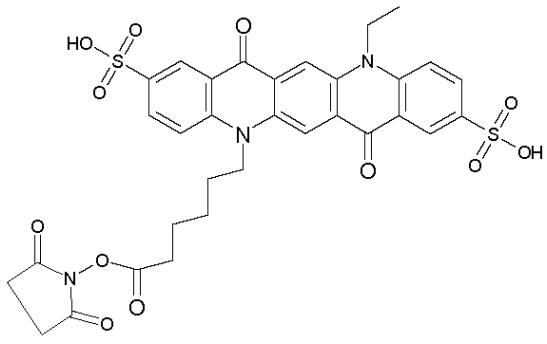
(VI) (14nsec)

O-(N-スクシニミジル)-6-(9-オキソ-9H-アクリジン-10-イル)ヘキサノエート (V)



(VII) (8nsec)

O-(N-スクシニミジル)-6-(2-ブロモ-9-オキソ-9H-アクリジン-10-イル)ヘキサノエート (VI)



(VIII) (22nsec)

6-(12-エチル-7,14-ジオキソ-2,9-ジスルホ-7,14-ジヒドロキノ[2,3-*b*]アクリジン-5(12*H*)-イル)ヘキサン酸スクシニミジルエステル (VIII)

Ｌは、－ＮＲ’－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＨ＝ＣＨ－、－Ｃ＝Ｃ－、－ＣＯＮＨ－及びフェニレニル基（式中、Ｒ’は水素及びＣ$_1$～Ｃ$_4$アルキルから選択される）から選択される１種以上の基を適宜含むことができる炭素原子から選択される１～４０個の連結原子を含むリンカー基であることが適切である。

【００２８】

Ｌは、２～３０個の原子、好ましくは６～２０個の原子を含むリンカー基であることが

適切である。

【００２９】

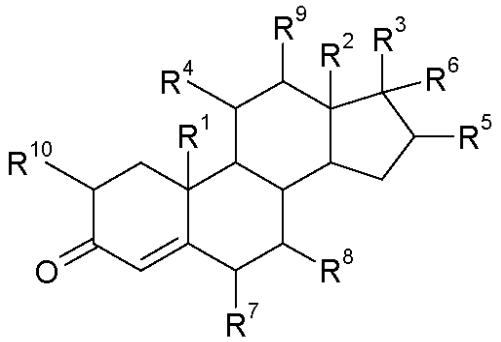
Ｌは、基｛（－ＣＨＲ’－）ｐ－Ｑ－（－ＣＨＲ’－）ｒ｝ｓ（式中、各ＱはＣＨＲ’、ＮＲ’、Ｏ、－ＣＨ＝ＣＨ－、Ａｒ及び－ＣＯＮＨ－から選択され、各Ｒ’は独立に水素又は$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキルであり、各ｐは独立に０～５であり、各ｒは独立に０～５であり、ｓは１又は２である）から選択されるリンカー基であることが好ましい。Ｑは－ＣＨＲ’－、－Ｏ－及び－ＣＯＮＨ－（Ｒ’は水素又は$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキルである）からなる群から選択されることがより好ましい。

【００３０】

基Ｓは式ＩＸのステロイド又はその誘導体であることが好ましい。

【００３１】

【化３】



(IX)

式中、$Ｒ^{1}$及び$Ｒ^{2}$はＨ及びメチルから選択され、

$Ｒ^{3}$はＨ、$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{8}$アルキル、シアノ、－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－$ＯＲ^{a}$、－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－$ＣＯＯＲ^{a}$、－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－$ＳＯ_{3}Ｒ^{a}$、－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－ＣＨＯ、－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－$ＮＲ^{b}Ｒ^{c}$及び－（$ＣＨ_{2}$）$_{k}$－$ＣＯＲ^{d}$から選択され、

$Ｒ^{4}$はＨ、－$ＣＯＲ^{a}$及びヒドロキシルから選択され、

$Ｒ^{5}$はＨ、－$ＣＯＲ^{a}$、ヒドロキシル、シアノ及びハライドから選択され、

$Ｒ^{6}$はＨ及びヒドロキシルから選択され、

$Ｒ^{7}$、$Ｒ^{8}$及び$Ｒ^{9}$は独立にＨ、－$ＣＯＲ^{a}$及びヒドロキシルから選択され、

$Ｒ^{10}$はＨ及びハライドから選択され、

但し、$Ｒ^{a}$はＨ、及びＯＨで適宜置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキルから選択され、

$Ｒ^{b}$及び$Ｒ^{c}$はＨ及び$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキルから選択され、

$Ｒ^{d}$は$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、又は$ＣＯＯＲ^{a}$、ＯＨ、$ＯＲ^{a}$若しくは$ＳＯ_{3}Ｒ^{a}$で適宜置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキルから選択され、

ｋは０又は１～８の整数である。

【００３２】

ハロゲン及びハライド基はフッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選択される。

【００３３】

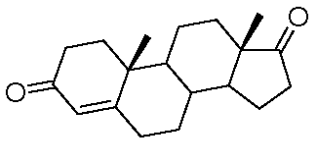
基Ｓは、４－アンドロステン－３－オン、４－コレステン－３－オン、４－エストレン－３－オン及び４－プレグネン－３－オン誘導体からなるステロイドファミリーの群から選択されるステロイドであることが適切である。

【００３４】

基Ｓは式Ｘのアンドロステンジオン又はその誘導体であることが好ましい。

【００３５】

【化４】

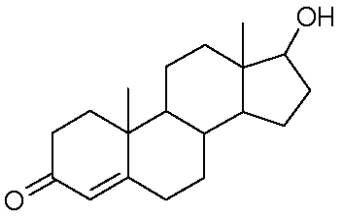


(X)

基Ｓは式ＸＩのテストステロン又はその誘導体であることが好ましい。

【００３６】

【化５】



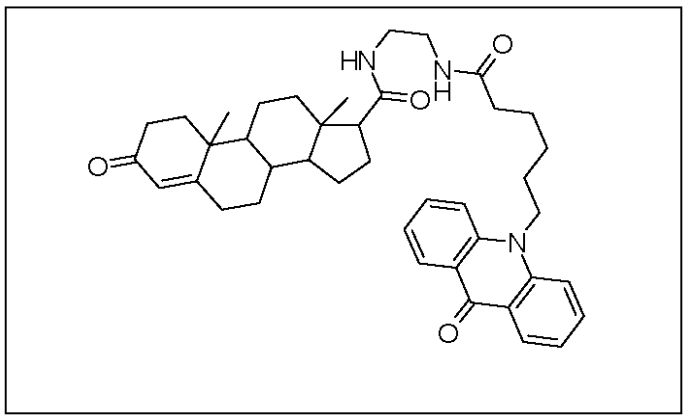
(XI)

第１の態様の好ましい実施形態では、式ＸＩＩの化合物を提供する。

【００３７】

【化６】

(XII)



本発明の第２の態様では、試料のアロマターゼ活性を測定する方法であって、その方法が

ｉ）前記試料にそれを加える前に、先行する請求項のいずれか１項記載の化合物の蛍光強度又は蛍光寿命を測定する段階と、

ｉｉ）アロマターゼ活性に好都合な条件下で前記試料に前記化合物を加える段階と、

ｉｉｉ）段階ｉｉ）に続いて前記化合物の蛍光強度又は蛍光寿命の変化を測定する段階とを含み、

蛍光強度又は蛍光寿命の前記変化を、アロマターゼ活性を測定するために使用することができる方法を提供する。

【００３８】

試料は抽出物、細胞、組織及び有機体からなる群から選択されることが適切である。細胞又は有機体は、天然由来のものでも、アロマターゼなどの特定のタンパク質を過剰発現するように遺伝子操作された組み換え細胞又は有機体であってもよい。

【００３９】

本発明の第３の態様では、アロマターゼの活性に対するその効果を測定する試験薬剤をスクリーニングするための方法であって、前記方法が

ｉ）前記薬剤の存在下で上記の方法を実施する段階と、
ｉｉ）上記薬剤の存在下での前記アロマターゼの活性と、上記薬剤の非存在下でのアロマターゼの活性の既知の値とを比較する段階とを含み、
上記薬剤の存在下での上記アロマターゼの活性と、上記薬剤の非存在下での前記既知の値との差がアロマターゼの活性に対する試験薬剤の効果を示す方法を提供する。

【００４０】

例えば、試験薬剤は、合成分子又は天然産物（例えばペプチド、オリゴヌクレオチド）などの任意の有機若しくは無機化合物、或いはエネルギー形態（例えば光又は熱或いは電磁気放射の他の形態）であってよい。

【００４１】

既知の値を電子データベースに保存しておくことが適切である。適宜、その値を標準化し（例えば、１００％アロマターゼ活性を表すため）、試験薬剤の存在下で、標準化された酵素の活性と比較する。このようにして、ある最少量で酵素活性に影響を及ぼす試験薬剤のみが、さらに評価をするために選ばれる。

【００４２】

本発明の第４の態様によれば、アロマターゼの活性に対する効果を測定しようとする試験薬剤をスクリーニングするための方法であって、前記方法が、
ｉ）上記薬剤の存在下及び非存在下で上記のようにアロマターゼ活性を測定する方法を実施する段階と、
ｉｉ）上記薬剤の存在下及び非存在下で前記酵素の活性を測定する段階
を含み、
上記薬剤の存在下と非存在下での上記アロマターゼの活性の差がアロマターゼの活性に対する試験薬剤の効果を示す方法を提供する。

【００４３】

薬剤の存在下又は非存在下での酵素の活性の間の差を、標準化し、電子的に保存し、基準化合物の値と比較することが適切である。したがって、例えば、活性の差を電子データベースに阻害率（又は刺激率）として保存し、この値を、アロマターゼの標準阻害物質の対応する値と比較することができる。このようにして、ある所定の閾値を満たす（例えば、基準化合物と同等か又はより効果的である）試験薬剤のみを、関係するものとしてさらなる試験のために選ぶことができる。

【００４４】

本発明によるアッセイ方法は好ましくは、マルチウェルプレート、例えば２４個、９６個、３８４以上の密度のウェル、例えば８６４又は１５３６個のウェルを有するマイクロタイタープレート中のウェルで実施する。或いは、アッセイは、マルチ流体装置又はＦＡＣＳ設備のアッセイチューブ又はマイクロチャンネルで実施することができる。一般的なアッセイでは、関係する物質を含む試料を、ウェル中で反応混合物と混合する。酵素を加えて反応を開始させる。反応を一定時間進行させ、停止試薬でこれを停止させる（例えばＥＤＴＡ）。

【００４５】

反応混合物は、そうしたプレートのウェルの中に予め分注しておくことができる。

【００４６】

一般に、酵素アッセイは「停止した」状態の下で実施する。これは、反応を所定の時間進行させ、次いで停止試薬で終結させることを意味する。停止試薬の性質は一般に、強力な酵素の阻害物質であり、しばしば非特異的であり、例えば、酵素活性のために通常存在する金属イオンを封鎖するためにＥＤＴＡが使用される。第２、第３及び第４の態様の実施形態では、存在下か又は非存在下での試験化合物に対するアロマターゼ活性のためのアッセイは、連続測定の条件下で実施することができる。標識基質の蛍光強度及び／又は寿命を連続的にモニターし、変化を連続的に観察することができるので、標識基質を酵素反応の生成物から分離する必要がない。この方法で反応の時間的経過が得られ、それによって動力学的検討をリアルタイムで行うことができる。

【００４７】
通常、アッセイは複数の成分、一般には酵素、基質、共同因子、金属イオン、緩衝液塩、場合により試験又は標準阻害化合物からなることになる。
【００４８】
さらに、低い割合の有機溶媒、例えばＤＭＳＯの存在下でアッセイを実行する必要があることがある。本発明では、混合物に試薬のどれを加えることも可能であるが、重要な成分を任意の順序で除外することも可能である。次いでこの種の反応は非特異的効果についてモニターすることができる。対照としてさらに、酵素の存在しない混合物で構成することも可能である。反応の性質のために、最後の成分を加え、リアルタイムで又はその後のある時点で反応を停止させて変化をモニターすることができる。
【００４９】
本発明の方法は、細胞、組織、有機体及び抽出物から誘導された試料で実施することができる。生物試料は、例えば有機体全体、有機体若しくは組織の一部から調製されたホモジネート、溶解物又は抽出物であってよい。例えば、アッセイは、血液、粘液、リンパ液、滑液、髄液、唾液、羊水、尿、膣液及び精液などの様々な体液で実施することができる。特に、このアッセイは脂肪又は乳房の組織及び細胞で実施することができる。
【００５０】
さらに、アッセイを、真核細胞又は原核細胞をそこで成長させることができる普通ブイヨン又は類似の媒体などの媒体中で実施することができる。阻害物質をスクリーニングするためには、アロマターゼを過剰発現するように操作された細胞、例えばＡＴＣＣから得られるＪＥＧ３絨毛癌細胞（Ｂｈａｔｎａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７６，１９９－２０２）が特に有用である。
【００５１】
適切には、標識の蛍光強度及び／又は寿命を測定するために従来の検出方法を使用することができる。これらの方法には検出装置として光電子増倍管を用いた機器が含まれる。これらの方法を用いたいくつかの手法が可能である。例えば、
ｉ）時間相関の単光子計数法に基づく方法（ｃｆ．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，（Ｃｈａｐｔｅｒ４） ｅｄ．Ｊ Ｒ Ｌａｋｏｗｉｃｚ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９９，Ｋｌｕｗｅｒ／Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）
ｉｉ）周波数領域／位相変調に基づく方法（ｃｆ．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，（Ｃｈａｐｔｅｒ５） ｅｄ．Ｊ Ｒ Ｌａｋｏｗｉｃｚ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９９，Ｋｌｕｗｅｒ／Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）
ｉｉｉ）時間ゲート法に基づく方法（ｃｆ．Ｓａｎｄｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２２７（２），３０２－３０８）である。
【００５２】
マルチウェルプレートのすべてのウェルを画像化するために、走査画像装置又は領域画像装置などの電荷結合素子（ＣＣＤ）画像装置を用いて蛍光強度の測定を実施することができる。ＬＥＡＤｓｅｅｋｅｒ（商標）（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＫ）システムは、ワンパスで高密度マイクロタイタープレートの画像化が可能であるＣＣＤカメラを特徴としている。画像化は定量的でかつ迅速であり、画像化用途に適した計装化によってマルチウェルプレート全部を同時に画像化することが可能になる。
【００５３】
本発明の第５の態様によれば、上記のような組織内で化合物の分布を測定するための方法であって、上記化合物を、組織内の生細胞が取り込むことができ、その方法が、
ｉ）無細胞環境又は親宿主細胞において上記化合物の蛍光強度又は蛍光寿命を測定する段階と、

ｉｉ）上記化合物を、１以上の細胞又はアロマターゼを過剰発現するように操作した細胞に加える段階と、
ｉｉｉ）段階ｉｉ）に続いて上記化合物の蛍光強度又は寿命を測定する段階と
を含み、
蛍光強度又は蛍光寿命の変化がアロマターゼ活性を示し、それを使用して上記化合物の分布を測定することができる方法を提供する。遺伝子操作して親宿主細胞と比べてアロマターゼが過剰発現された細胞は、著しく高いレベルの酵素活性を示すことを理解されたい。

【００５４】

第１の被検体の組織内の化合物の分布を、第２被検体の組織内の化合物の分布と比較することが適切である。

【００５５】

被検体は、哺乳動物、植物、昆虫、魚、トリ、ハエ、線虫及び藻類からなる群から選択されることが適切である。哺乳動物はマウス又はラットであることが好ましい。

【００５６】

本発明の第６の態様では、インビトロ又はインビボでの画像形成用プローブとしてアロマターゼ活性を測定するための上記したような化合物の使用を提供する。

【００５７】

本発明の第７の態様では、第１の被検体から採取した試料中のアロマターゼの活性と、第２の健康な対照被検体から採取した試料中のアロマターゼの活性とを比較することを含む、被検体においてアロマターゼ活性の増大によって引き起こされた疾患を、上記の方法を用いて診断するための方法であって、上記第２の健康な対照被検体に対する上記第１の被検体から採取した試料の測定された活性の増大が疾患について指し示す方法を提供する。

【００５８】

本発明の第７の態様では、
ｉ）上記の化合物と、
ｉｉ）アッセイ緩衝液と、適宜
ｉｉｉ）停止緩衝液
を含むキットを提供する。

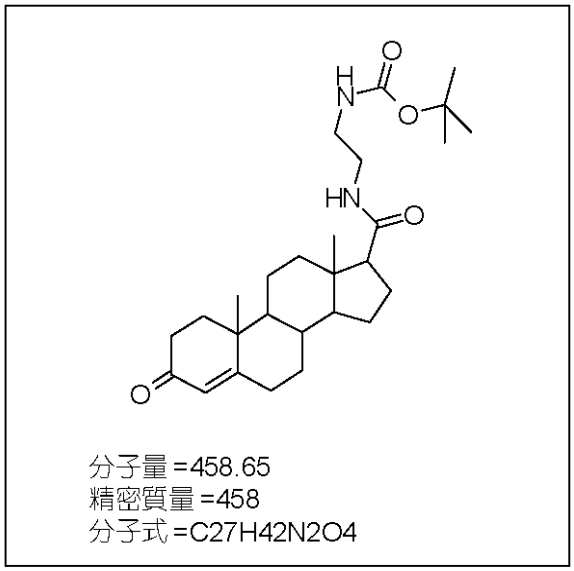
【発明を実施するための最良の形態】

【００５９】

アロマターゼ基質の合成
ｉ）Ｔｅｒｔ－ブチル２－｛［（３－オキソアンドロスター４－エン－１７－イル）カルボニル］アミノ｝－エチルカーバメート

【００６０】

【化７】



式 (XIII)

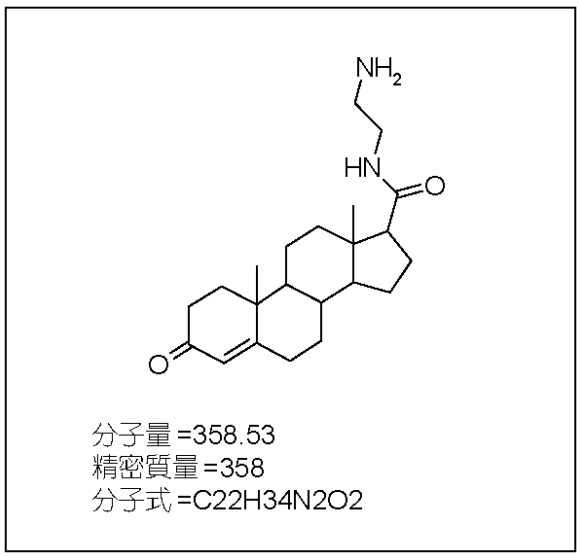
０．４９ｇの４－アンドロステン－３－オン－１７β－カルボン酸に、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３ｍｌ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．５５ｍｌ）及びＯ－（Ｎ－スクシニミジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（０．４８ｇ）を加えた。室温で（窒素雰囲気下で）１．５時間攪拌してｔｅｒｔブチルＮ－（２－アミノエチル）カーバメート（０．２５ｇ）を加えた。混合物を室温で３日間撹拌し、その後揮発成分をロータリーエバポレータで除去した。フラッシュクロマトグラフィーを実施し、関係する画分を一緒にし、ロータリーエバポレータを用いて溶媒をストリッピングした。これによって、０．５０ｇの所望の物質（式ＸＩＩＩ）を得た。マススペクトル：４５９．３０（Ｍ＋Ｈ）。

【００６１】

ｉｉ）Ｎ－（２－アミノエチル）－３－オキソアンドロスター－４－エン－１７－カルボキシアミド

【００６２】

【化８】



式 (XIV)

１６．５ｍｇのＴｅｒｔ－ブチル２－｛［（３－オキソアンドロスター－４－エン－１７

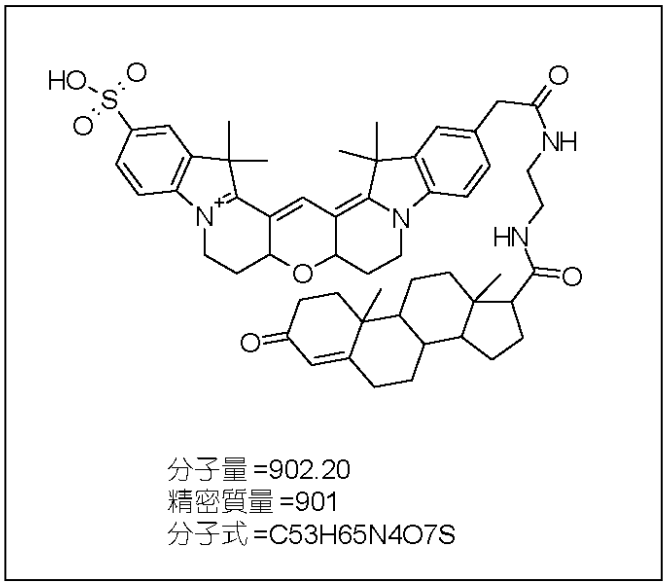
－イル）カルボニル］アミノ｝－エチルカーバメートに０．５ｍｌの９５％トリフルオロ酢酸／水を加えた。２時間放置し、ロータリーエバポレータで揮発成分を除去した。得られたオイル状の生成物（式ＸＩＶ）をさらに精製することなく使用した。マススペクトル：３５９．２３（Ｍ＋Ｈ）。

【００６３】

ｉｉｉ）Ｎ－（２－｛［（２－（６，７，８，９，１０－テトラヒドロ－１４－スルホナート－１６，１６，１８，１８－テトラメチル－７ａＨ－ビスインドリニウム［３，２－ａ，３’，２’－ａ］ピラノ［３，２－ｃ，５，６－ｃ］ジピリジン－５－イウム）アセチル］アミノ｝エチル）－３－オキソアンドロスター－４－エン－１７－カルボキシアミド

【００６４】

【化９】



分子量=902.20
精密質量=901
分子式=C53H65N4O7S

式 (XV)

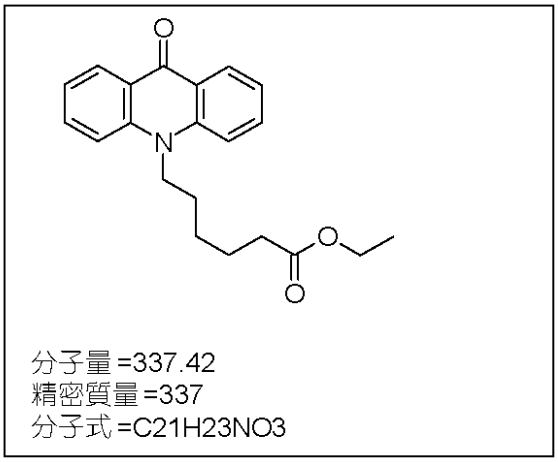
６，７，８，９，１０－テトラヒドロ－２－カルボキシメチル－１４－スルホナート－１６，１６，１８，１８－テトラメチル－７ａＨ－ビスインドリニウム［３，２－ａ，３’，２’－ａ］ピラノ［３，２－ｃ，５，６－ｃ］ジピリジン－５－イウムＮＨＳエステル（１．０ｍｇ）に、Ｎ－（２－アミノエチル）－３－オキソアンドロスター－４－エン－１７－カルボキシアミド（０．６ｍｇ）、ジイソプロピルエチルアミン（０．０１ｍｌ）及びジクロロメタン（０．２ｍｌ）を加えた。この混合物を１８時間ローラー上に置き、次いで分取ＨＰＬＣで精製した［カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｊｕｐｉｔｅｒ　１０ｕ　Ｃ１８　３００Ａ　２５０×２１．２ｍｍ。方法：２０ｍｌ／分、５％～５０％　Ｂ、３０分かけて（Ａ＝水０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝ＣＨ３ＣＮ　０．１％　ＴＦＡ）。ピークを５５９ｎｍで検出した。ＲＴ（生成物）約２７分］。関係する画分を一緒にしてロータリーエバポレータで濃縮した。次いでその物質を凍結乾燥して１．０ｍｇの所望の生成物（式ＸＶ）を得た。マススペクトル：９０２（Ｍ＋Ｈ）。

【００６５】

ｉｖ）エチル６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサノエート

【００６６】

【化１０】



式 (XVI)

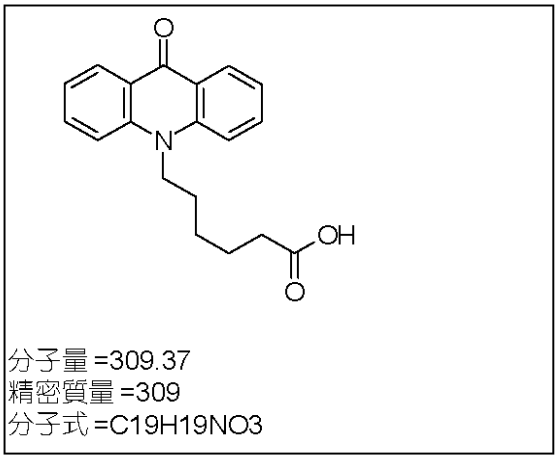
９（１０Ｈ）－アクリドン（１．０ｇ）に窒素雰囲気下でテトラヒドロフラン（１５ｍｌ）を加えた。撹拌しながら水素化ナトリウム（０．２５ｇ）を加え、３０分間後、エチル６－ブロモヘキサノエート（１．１２ｍｌ）を加え、混合物を加熱して１８時間還流させた。その後、水（１０ｍｌ）を加え、層を分離させた。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し蒸発させて乾燥した。ドライフラッシュクロマトグラフィーを実施して０．８５ｇの所要の物質（式ＸＶＩ）を得た。マススペクトル：３３８（Ｍ＋Ｈ）。

【００６７】

ｖ）６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサン酸

【００６８】

【化１１】



式 (XVII)

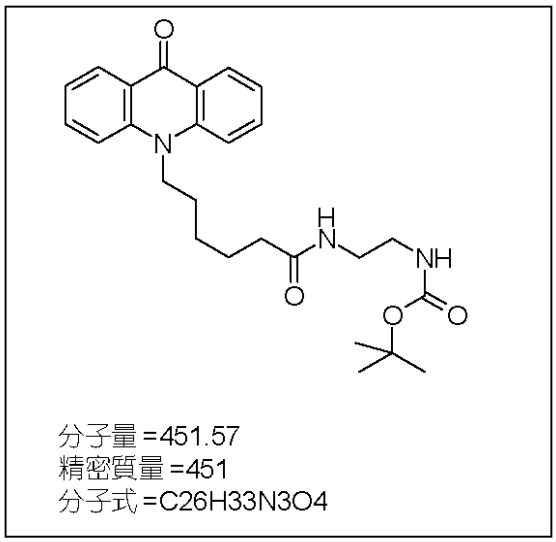
エチル６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサノエート（０．８０ｇ）に酢酸（９ｍｌ）と２Ｍ塩酸（２．５ｍｌ）を加えた。混合物を１００°Ｃで１８時間加熱し、続いて揮発成分をロータリーエバポレータで除去した。ジエチルエーテルを加え（２５ｍｌ）、混合物を１５分間撹拌した。得られた物質をろ別し、空気乾燥して０．３６ｇの最終生成物（式ＸＶＩＩ）を得た。マススペクトル：３１０（Ｍ＋Ｈ）。

【００６９】

ｖｉ）Ｔｅｒｔ－ブチル２－｛［６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサノイル］アミノ｝エチルカーバメート

【００７０】

【化１２】



式 (XVIII)

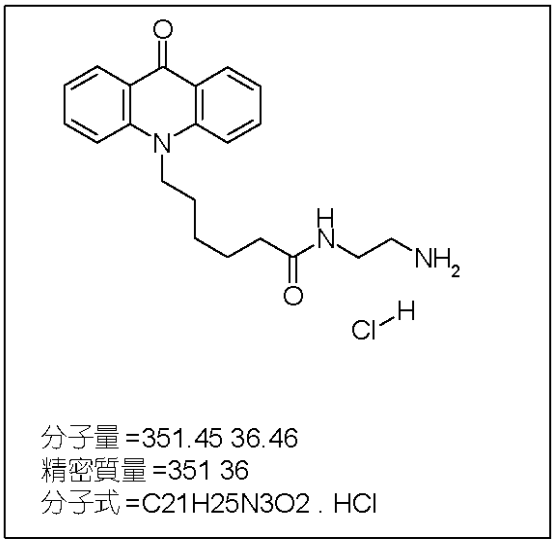
０．４８ｇの６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサン酸に、ジクロロメタン（６ｍｌ）と塩化チオニル（０．２ｍｌ）を加えた。この混合物を加熱して１時間還流させ、続いて真空を施して揮発成分を除去した。得られたオイルにジクロロメタン（３ｍｌ）、ピリジン（３ｍｌ）及びｔ－ブチルＮ－（２－アミノエチル）カーバメート（２５０ｍｇ）を加えた。この混合物を１８時間撹拌し、続いてこれを０．５Ｍ水酸化ナトリウム溶液（１５ｍｌ）に注加し、ジクロロメタン（２×１０ｍｌ）で抽出した。一緒にしたジクロロメタンを０．１Ｍ塩酸溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し蒸発させて乾燥した。得られた物質をカラムクロマトグラフィーで精製して０．３０ｇの固形状の最終生成物を得た（式ＸＶＩＩＩ）。

【００７１】

ｖｉｉ）Ｎ－（２－アミノエチル）－６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサンアミド塩酸塩

【００７２】

【化１３】



式 XIX

０．３０ｇのｔｅｒｔ－ブチル２－｛［６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－

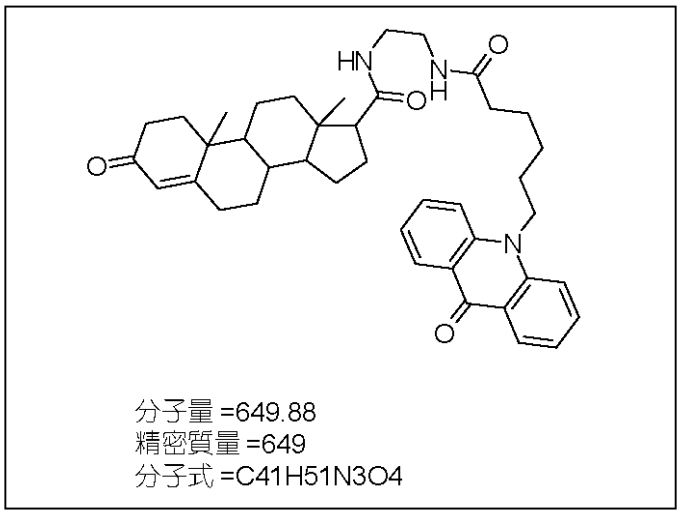
イル）ヘキサノイル］アミノ｝エチルカーバメートにジクロロメタン（ＤＣＭ；３０ｍｌ）を加えた。ＨＣｌ（ｇ）を溶液中で１０分間バブリングさせた。続いて混合物をろ過し、ＤＣＭ（３×２０ｍｌ）で洗浄して所望の生成物（０．１５ｇ；式ＸＩＸ）を得た。マススペクトル：３５２（Ｍ＋Ｈ）。

【００７３】

ｖｉｉｉ）３－オキソ－Ｎ－（２－｛［６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサノイル］アミノ｝エチル）アンドロスター－４－エン－１７－カルボキシアミド

【００７４】

【化１４】



分子量=649.88
精密質量=649
分子式=C41H51N3O4

式 XX

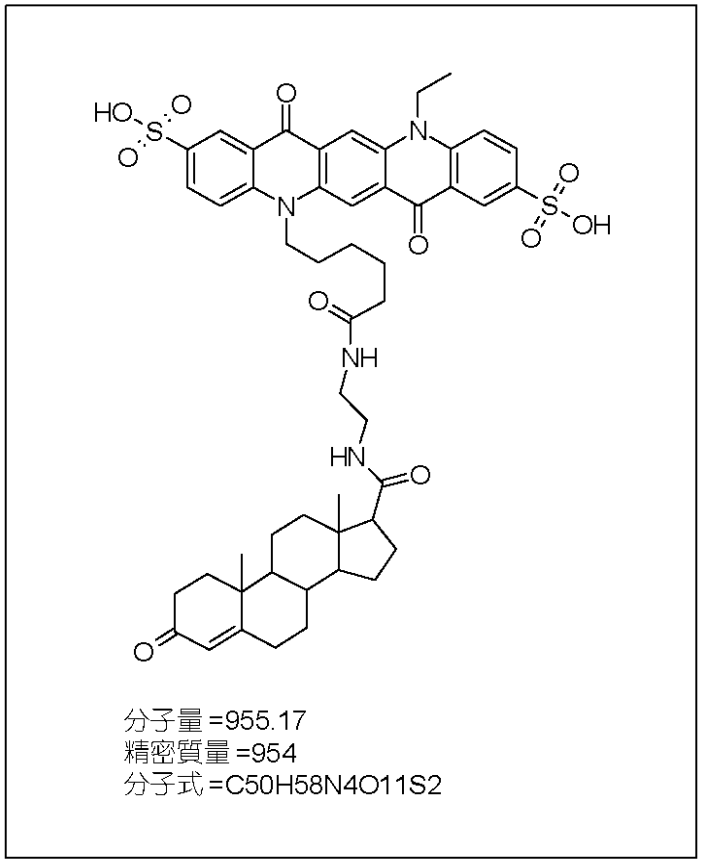
０．０８２ｇの４－アンドロステン－３－オン－１７Ｂカルボン酸にＤＭＦ（５ｍｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０４５ｍｌ）及びＯ－（Ｎ－スクシニミジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（０．０８ｇ）を加えた。１時間撹拌後、Ｎ－（２－アミノエチル）－６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサンアミド塩酸塩（化合物ＸＶＩＩ）（０．１０ｇ）を加え、３日間撹拌を継続した。分取ＨＰＬＣを実施し［カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｊｕｐｉｔｅｒ　１０ｕ　Ｃ１８　３００Ａ　２５０×２１．２ｍｍ；２０ｍｌ／分、５％～９５％　Ｂ、３０分かけて（Ａ＝水　０．１％　ＴＦＡ、Ｂ＝ＣＨ３ＣＮ　０．１％　ＴＦＡ）。ピークを２８０ｎｍで検出した。ＲＴ（生成物）約２３分］、関係する画分を一緒にしてロータリーエバポレータで濃縮した。凍結乾燥して０．０６８３ｇの生成物（式ＸＸ）を得た。マススペクトル：６５０（Ｍ＋Ｈ）。

【００７５】

ｉｘ）５－エチル－７，１４－ジオキソ－１２－｛６－オキソ－６－［（２－｛［（３－オキソアンドロスター－４－エン－１７－イル）カルボニル］アミノ｝エチル）アミノ］ヘキシル｝－５，７，１２，１４－テトラヒドロキノ［２，３－ｂ］アクリジン－２，９－ジスルホン酸

【００７６】

【化１５】



式 XXI

Ｎ－（２－アミノエチル）－３－オキソアンドロスター４－エン－１７－カルボキシアミド（１．０ｍｇ）をジクロロメタン（１ｍｌ）中に溶解し、ＤＭＦ（１ｍｌ）中の５－｛６－［（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ］－６－オキソヘキシル｝－１２－エチル－７，１４－ジオキソ－５，７，１２，１４－テトラヒドロキノ［２，３－ｂ］アクリジン－２，９－ジスルホン酸（２ｍｇ）の溶液を加えた。ＤＩＰＥＡ（０．０２ｍｌ）を加え、混合物を室温で１時間撹拌した。続いて分取ＨＰＬＣを実施して１．６ｍｇの所望の物質（式ＸＸＩ）を得た。マススペクトル：９５６（Ｍ＋Ｈ）。

【００７７】

アロマターゼアッセイ

ＮＡＤＰＨを調製して１００ｍＭリン酸１水素２ナトリウム緩衝液ｐＨ７．４中に１ｍＭの最終濃度にした。標識した基質（すなわち、３－オキソ－Ｎ－（２－｛［６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサノイル］アミノ｝エチル）アンドロスター－４－エン－１７－カルボキシアミド；式ＸＩＸ）又は発色団単独の（６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサン酸－化合物ＸＶＩ）をＮＡＤＰＨの溶液に加えて２μＭの最終濃度にした。

【００７８】

１００μｌのこの試薬を９６ウェルマイクロタイタープレートの同型ウェル中に分注した。各ウェルに、２０μｌ～３０μｌのミクロソームを含むＣＹＰ１９（アロマターゼ）か又は対照ミクロソーム（ＣＹＰ１９は存在しない）のどちらかを分注した。すべてのミクロソームをアッセイ緩衝液で同じタンパク質濃度に調節した。プレートを３７°Ｃで１時間インキュベートし、次いで蛍光強度をＥｎｖｉｓｉｏｎ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，ＵＳ）で、励起４０５ｎｍ／放射　ＢＦＰ４５０ｎｍで測定し記録した。

【００７９】

図２は「緩衝液のみ」の処理と、アロマターゼ活性を有するミクロソーム及びアロマターゼ活性を有しないミクロソームとの蛍光強度データを比較したものである。これから分かるように、対応する対照ミクロソーム調製物と比べて、活性アロマターゼを含むミクロソームはより大きい蛍光強度の減少をもたらす。ミクロソームの存在下での信号の減少は、タンパク質／脂質の存在に起因する基質信号の消光を表している。

【００８０】

蛍光信号はアッセイで存在する酵素／ミクロソームの量に比例していることが分かった。図３はアッセイ信号に対するミクロソーム体積の効果を示している。２０μｌのミクロソーム体積は、対照反応と比べて１７．５％の強度の減少をもたらす。これは、３０μｌのミクロソーム調合物の存在下でさらに２４．２％に増した。

【００８１】

図４はアロマターゼ（図中のＣＹＰ１９）活性のＮＡＤＰＨ依存性を示す。追加のＮＡＤＰＨの存在下で２４％の蛍光の減少が観察された。これは、追加の共同因子の非存在下での１６％と対比される。追加のＮＡＤＰＨの非存在下で観察された信号は、酵素調合物中でのＮＡＤ（Ｐ）Ｈの存在を反映している可能性がある。

【００８２】

図５は酵素のその基質についての特異性を示している。２０μｌのＣＹＰ１９アロマターゼ調合物の存在下では、対照に対して１７．５％の強度の変化が、標識ステロイドレポーターについて観察された。ＣＹＰ１９ミクロソームと一緒にインキュベートした場合、発色団単独（すなわち、６－（９－オキソアクリジン－１０（９Ｈ）－イル）ヘキサン酸－化合物ＸＶＩＩ）で、５％の強度の変化をもたらした。したがって、観察された蛍光強度の減少は、発色団に直接作用する酵素によるものではなかった。

【図面の簡単な説明】

【００８３】

【図１】アンドロステンジオンのエストロンへの転換におけるアロマターゼの生物化学的活性を示す図である。

【図２】蛍光アッセイ信号での緩衝液単独、対照ミクロソーム及びＣＹＰ１９ミクロソームの比較を示す図である。

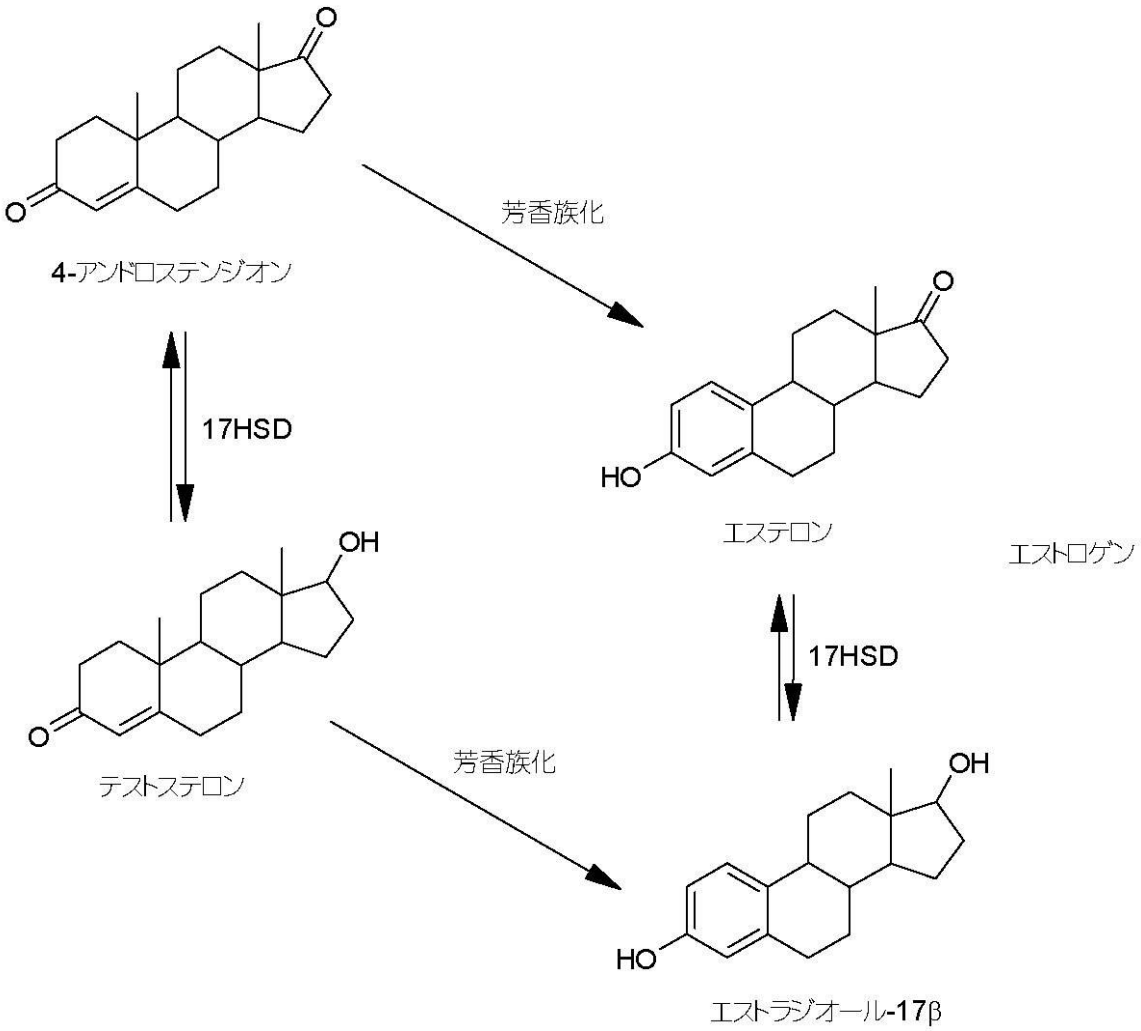
【図３】ミクロソームが有する体積の蛍光アッセイ信号に対する効果を示す図である。

【図４】ミクロソーム調製物（ＣＹＰ１９）／アロマターゼ酵素活性のＮＡＤＰＨ依存性を示す図である。

【図５】アロマターゼ酵素のその基質についての特異性を示す図である。

【図１】

Figure 1



【図２】

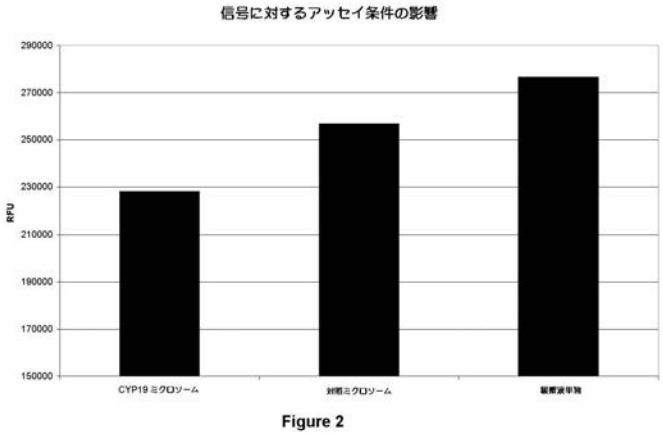


Figure 2

【図３】

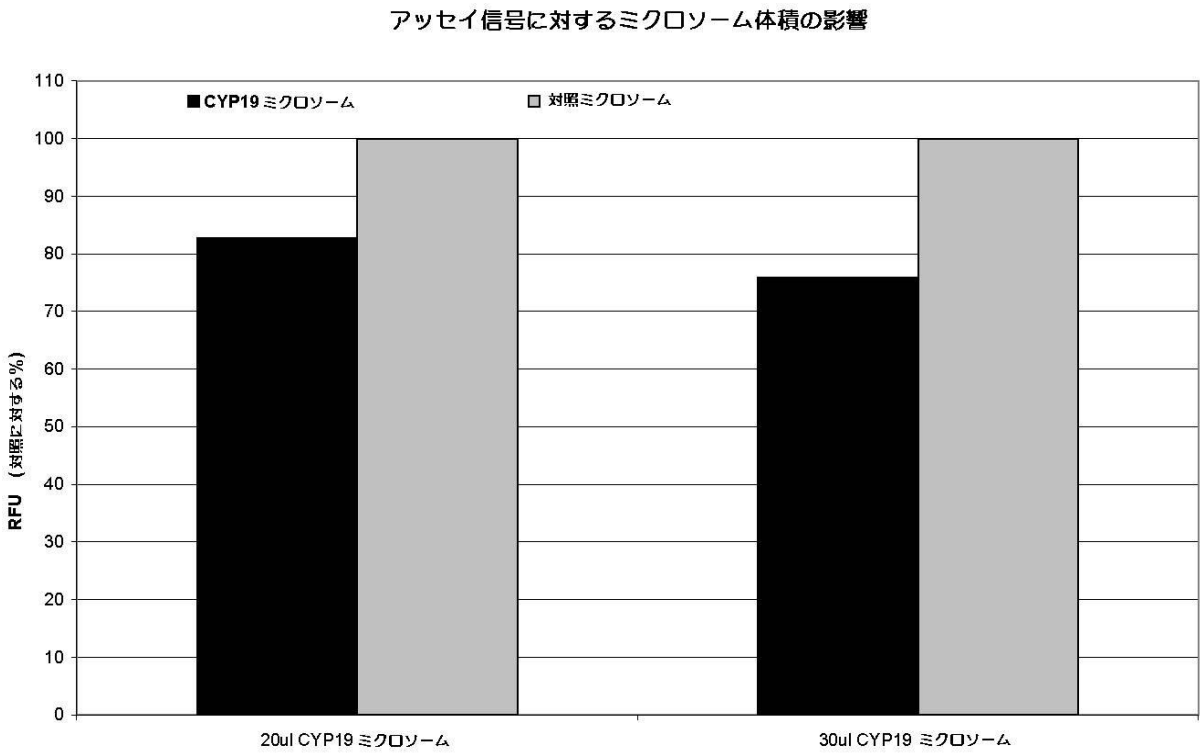


Figure 3

【図４】

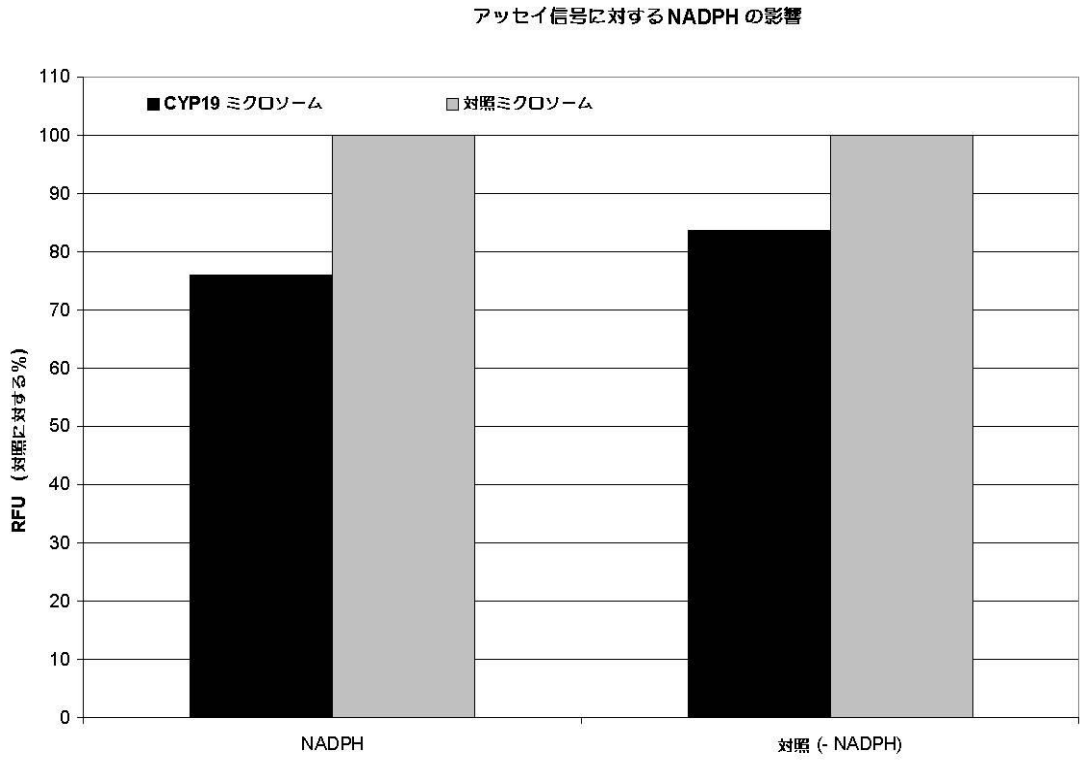


Figure 4

【図５】

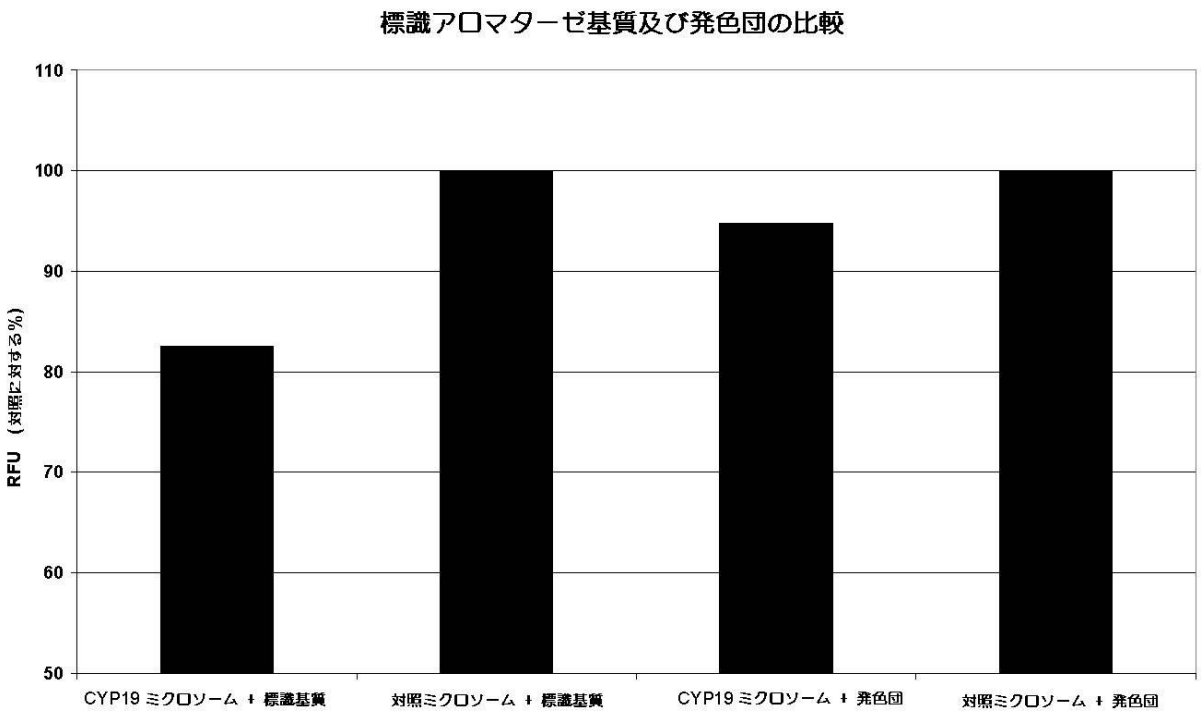

標識アロマターゼ基質及び発色団の比較
RFU（対照に対する%）
110
100
90
80
70
60
50
CYP19 ミクロソーム + 標識基質
対照ミクロソーム + 標識基質
CYP19 ミクロソーム + 発色団
対照ミクロソーム + 発色団

Figure 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C09B 48/00 (2006.01) C09B 48/00

(72)発明者 ホエートレイ, ジョン・ジェラルド
英国、カーディフ・シーエフ１４・７ワイティー、ホイットチャーチ、フォレスト・ファーム・エステート、ザ・メイナード・センター、アマシャム・バイオサイエンス・ユーケイ・リミテッド（番地なし）
(72)発明者 イスメイル, ラーマン・アジズ
英国、カーディフ・シーエフ１４・７ワイティー、ホイットチャーチ、フォレスト・ファーム・エステート、ザ・メイナード・センター、アマシャム・バイオサイエンス・ユーケイ・リミテッド（番地なし）
(72)発明者 ラフトン, ピーター・ゴードン
英国、カーディフ・シーエフ１４・７ワイティー、ホイットチャーチ、フォレスト・ファーム・エステート、ザ・メイナード・センター、アマシャム・バイオサイエンス・ユーケイ・リミテッド（番地なし）

審査官 吉住 和之

(56)参考文献 特開平０７－２２８５９３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０１／０１４３６１（WO，Ａ１）
国際公開第０３／０２０２９４（WO，Ａ１）
国際公開第０２／０９９４２４（WO，Ａ１）
STRESSER D M, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 米国, ACADEMIC PRESS, ２０００年, V284 N2, P427-430
Charles L. Crespi, Microtiter Plate Assays for Inhibition of Human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450, Analytical Biochemistry, １９９７年, 248(1), p. 188-190

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
CA/REGISTRY(STN)