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

特許第5350785号
(P5350785)

(45)発行日　平成25年11月27日(2013.11.27)　(24)登録日　平成25年8月30日(2013.8.30)

(51)Int.Cl.		F I		
C07D 277/66	(2006.01)	C07D	277/66	CSP
C12Q 1/25	(2006.01)	C12Q	1/25	
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q	1/26	
C12Q 1/34	(2006.01)	C12Q	1/34	
C12Q 1/37	(2006.01)	C12Q	1/37	

請求項の数 8　(全 223 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2008-514754 (P2008-514754)
(86)(22)出願日	平成18年5月31日 (2006.5.31)
(65)公表番号	特表2008-545746 (P2008-545746A)
(43)公表日	平成20年12月18日 (2008.12.18)
(86)国際出願番号	PCT/US2006/020731
(87)国際公開番号	WO2006/130551
(87)国際公開日	平成18年12月7日 (2006.12.7)
審査請求日	平成21年6月1日 (2009.6.1)
(31)優先権主張番号	60/685,957
(32)優先日	平成17年5月31日 (2005.5.31)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/693,034
(32)優先日	平成17年6月21日 (2005.6.21)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　593089149
プロメガ　コーポレイション
Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７１１－５３９９　マディソン　ウッズ　ホロー　ロード　２８００番地
(74)代理人　100092093
弁理士　辻居　幸一
(74)代理人　100082005
弁理士　熊倉　禎男
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井　賢治

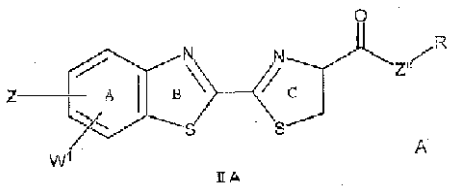
最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子または状態を検出するための発光性化合物および蛍光性化合物、ならびに方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

一般式ＩＩＡ：



IIA

（式中、

ＺはＯＲ^{1}、ＮＨＲ^{1}、または、ＮＲ^{1}Ｒ^{1}を表し；

Ｚ''は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、または（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシを表し；

Ｒは、Ｈ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アン

モニウム（C_1-C_{20}）アルキル、ヘテロアリール（C_1-C_{20}）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、もしくはサッカライドを表すか、または、Z''が酸素を表すときに、任意のM^+（ここで、Mはアルカリ金属を表す）を表し；

R^1は、（C_6-C_{30}）アリール、ヘテロアリール、複素環、（C_1-C_{20}）アルキルチオ、（C_1-C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1-C_{20}）アルキル－SO_2、－SO_3（C_1-C_{20}）アルキル、（C_1-C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6-C_{30}）アリールチオ、（C_6-C_{30}）アリール－Ｓ（Ｏ）－、（C_6-C_{30}）アリール－SO_2、－SO_3（C_6-C_{30}）アリール、（C_6-C_{30}）アリールホスフェート、もしくは（C_6-C_{30}）アリールホスホネートを表すか、または、R^1は、R^2で置換された（C_1-C_{20}）アルキルを表し；

R^2は、（C_2-C_{20}）アルキニル、（C_3-C_{20}）シクロアルキル、（C_1-C_{20}）アルコキシル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボキシル、ヒドロキシル、－ＣＯＯR^X、－SO_3R^X、（C_1-C_{20}）アルキルチオ、（C_6-C_{30}）アリールチオ、（C_1-C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1-C_{20}）アルキル－SO_2－、ニトロ、アミノ、ＮＨ（C_1-C_6）アルキル、ＮＨ（C_1-C_6）アルキニル、Ｎ（（C_1-C_6）アルキル）$_2$、またはＮ（（C_1-C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、または、トリフルオロメチルを表し；または、

ＺがＮR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているＮと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または、複素環基は、（C_1-C_{20}）アルキル、（C_2-C_{20}）アルケニル、（C_2-C_{20}）アルキニル、（C_3-C_{20}）シクロアルキル、（C_1-C_{20}）アルコキシル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－ＣＯＯR^X、－SO_2R^X、－SO_3R^X、（C_1-C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1-C_{20}）アルキル－SO_2－、ホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスホネート、ニトロ、アミノ、ＮＨ（C_1-C_6）アルキル、ＮＨ（C_1-C_6）アルキニル、Ｎ（（C_1-C_6）アルキル）$_2$、Ｎ（（C_1-C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1-C_{20}）アルキルチオ、（C_6-C_{30}）アリール、（C_6-C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝Ｏ、ヘテロアリール、および複素環から選択される１、２、３、４、または、５の置換基（ここで、各置換基は、１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されてもよく；

R^Xは、Ｈまたは（C_1-C_6）アルキルを表し；

ＺがＯR^1を表すときに、一般式ＩＩＡで示される化合物は、一般式ＩＩＡで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C_1-C_{12}）アルキルジラジカルを含有しているリンカーを介して、２つの環Ａにおいて結合した２量体であってもよく（ここで、（C_1-C_{12}）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは複素環基により割り込まれていてもよく、一般式ＩＩで示される化合物の２量体に結合している各Ｚ基のR^1基は、前記架橋により置き換えられている）；

A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在する）

で示される、請求項１に記載の化合物、または、その塩。

【請求項２】

Ｚ''－Ｒが、－ＯＨまたはＯ（C_1-C_{20}）アルキルを表す、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】

W^1がＦ、Ｃｌ、Ｂｒ、または、Ｉを表す、請求項１に記載の化合物。

【請求項４】

試料の中にある、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法であって：

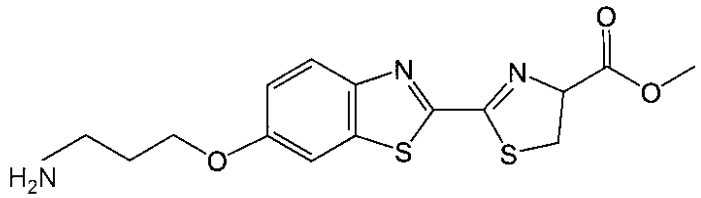
ａ）試料、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および、非ルシフェラーゼの基質である請求項１～３のいずれか１項に記載のルシフェリン誘導体を接触させて、第１混合物を生じさせる工程；
ｂ）前記第１混合物の少なくとも一部、および甲虫ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物を接触させて、第２混合物を生じさせる工程；ならびに、
ｃ）前記第２混合物中の発光を検出または決定することによって、試料の中にある、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定する工程；
を含んでおり、
前記分子が前記試料の中に存在している場合に、第１混合物は甲虫ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を含んでおり、
前記誘導体は、アミノ基にペプチド結合を介して、プロテアーゼ基質を含むように修飾され、さらに、保護されたカルボキシル基を有していてもよいアミノルシフェリン、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－サルフェート、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－ホスフェート、Ｄ－ルシフェリル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｄ－ルシフェリル－Ｌ－Ｎ$^{\alpha}$－アルギニン、またはシトクロムＰ４５０酵素の基質ではない、方法。

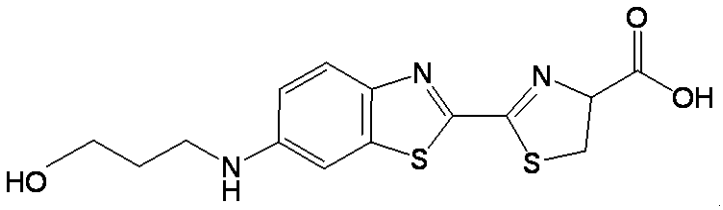
【請求項５】
前記非ルシフェラーゼ酵素が、モノアミンオキシダーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼ、グリコシダーゼ、グルタチオンＳトランスフェラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ホスファターゼ、サルファターゼ、デアセチラーゼ、デホルミラーゼ、デアルキラーゼ、エステラーゼ、デヒドロゲナーゼ、ペプチダーゼ、デメチラーゼ、または、Ｐ４５０酵素である、請求項４に記載の方法。

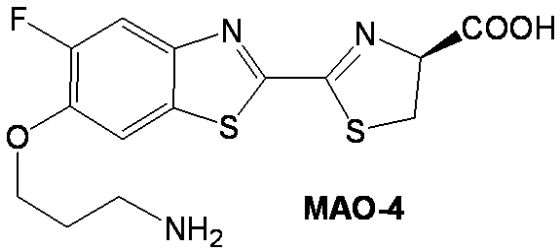
【請求項６】
試料の中にある、分子の存在または量を検出するための方法であって：
ａ）試料、非酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および請求項１～３のいずれか１項に記載のルシフェリン誘導体を接触させて、分子の存在下において、甲虫ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を含んでいる第１混合物を生じさせる工程；
ｂ）前記第１混合物の少なくとも一部、甲虫ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物を接触させて、第２混合物を生じさせる工程；ならびに、
ｃ）前記第２混合物中の発光を検出または決定することによって、前記分子の存在または量を、検出もしくは決定する工程；
を含んでいる方法。

【請求項７】
試料の中にある、シトクロムＰ４５０酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法であって：
ａ）試料、シトクロムＰ４５０酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、シトクロムＰ４５０酵素の基質である請求項１～３のいずれか１項に記載のルシフェリン誘導体を接触させて、第１混合物を生じさせる工程；
を含んでおり、
前記分子が試料の中に存在する場合に、前記第１混合物が、甲虫ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を含ことを特徴とする、方法。

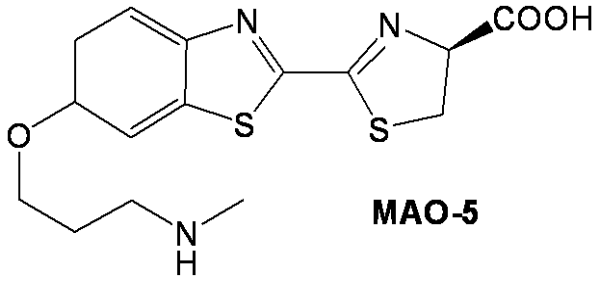
【請求項８】
下記に示された構造で示された化合物のいずれかである請求項１に記載の化合物。



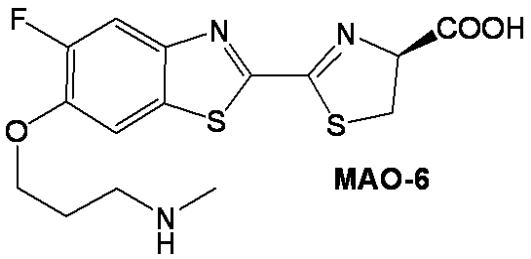




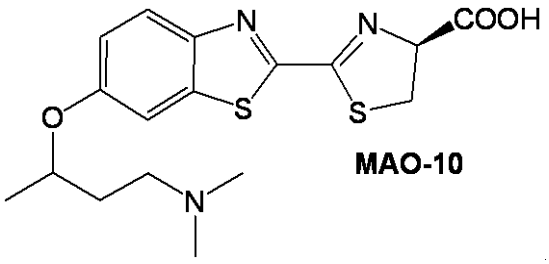
MAO-4



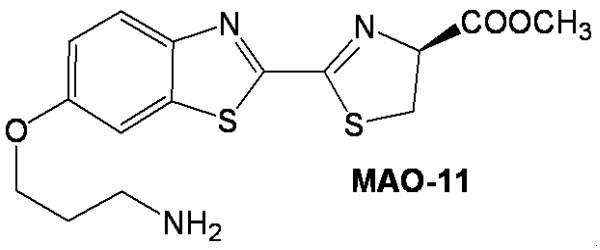
MAO-5



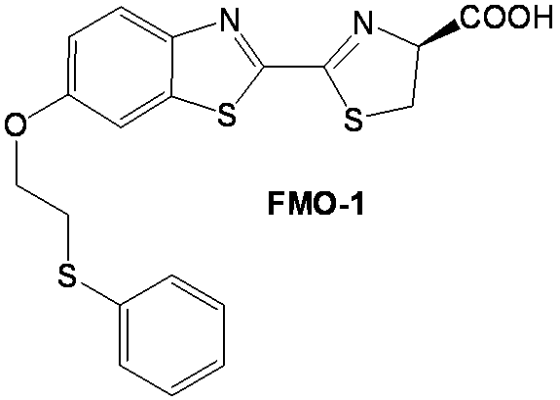
MAO-6



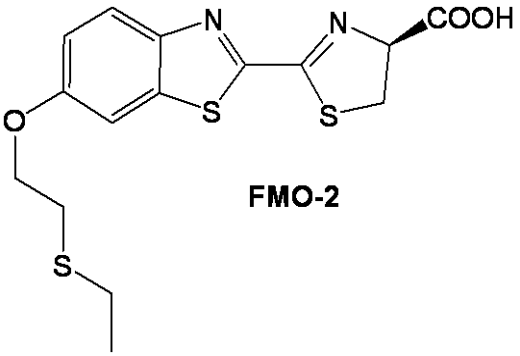
MAO-10



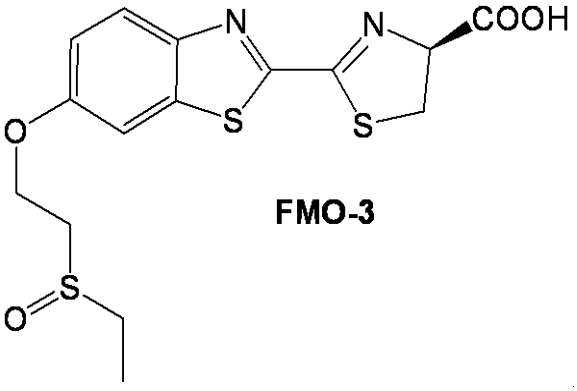
MAO-11



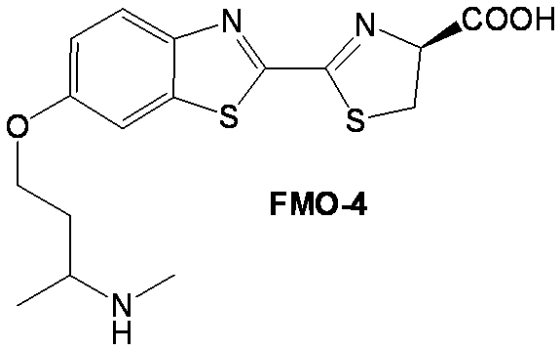
FMO-1



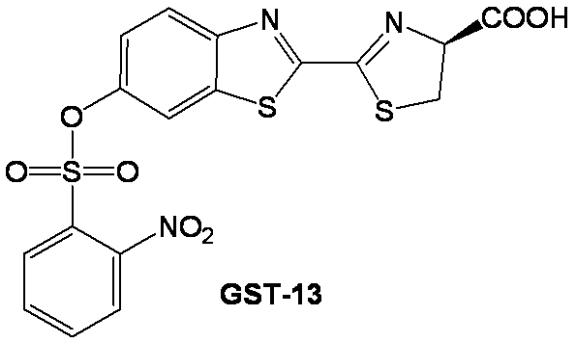
FMO-2



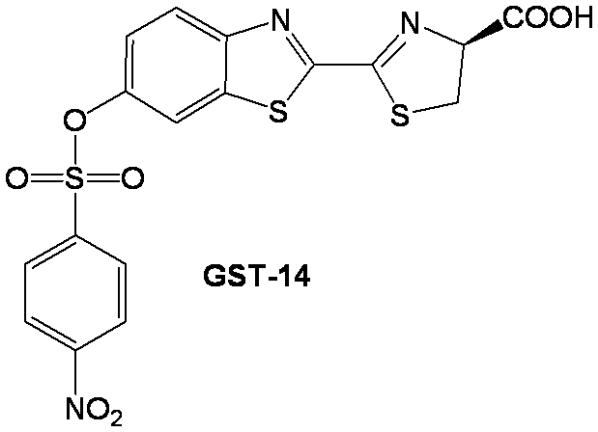
FMO-3



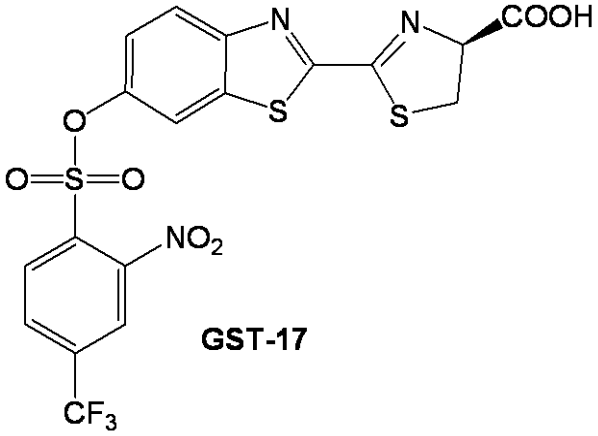
FMO-4



GST-13

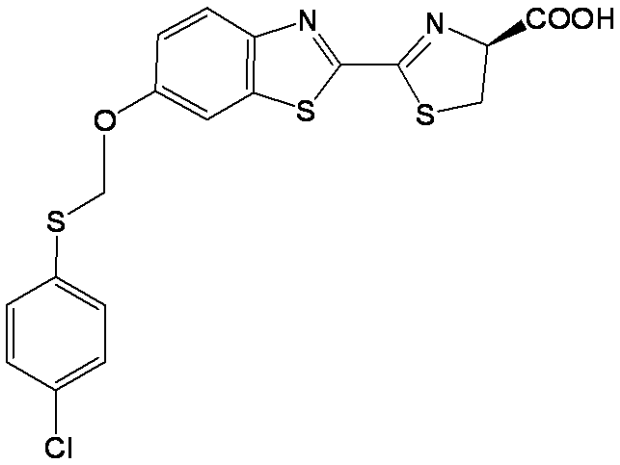


GST-14



GST-17

、及び



ＣＣＸＸＸＸＩ

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【０００１】

〔関連出願の相互参照〕

本願は、米国特許出願第６０／６８５，９５７号明細書（２００５年５月３１日出願）、米国特許出願第６０／６９３，０３４号明細書（２００５年６月２１日出願）、米国特許出願第６０／６９２，９２５号明細書（２００５年６月２２日出願）、および、米国特許出願第６０／７９０，４５５号明細書（２００６年４月１２日出願）の出願日の利益を主張するものである。なお、上記明細書における開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０００２】

〔発明の背景〕

特定の生物において、ルシフェラーゼに媒介された酸化反応の結果、発光が生じる。多種多様の非常に異なる種に由来するルシフェラーゼ遺伝子、特にフォチヌスピラリス（Ｐｈｏｔｉｎｕｓ　ｐｙｒａｌｉｓ）およびフォチュリスペンシルバニカ（Ｐｈｏｔｕｒｉｓ　ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉｃａ（北米のホタル））、ピロフォラスプラギオフタラマス（Ｐｙｒｏｐｈｏｒｕｓ　ｐｌａｇｉｏｐｈｔｈａｌａｍｕｓ（ジャマイカのコメツキムシ））、レニラレニフォルミス（Ｒｅｎｉｌｌａ　ｒｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（ウミシイタケ））ならびにいくつかの細菌（例えばゼノラブダスルミネッセンス（発光）（Ｘｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ　ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｓ）およびビブリオｓｐｐ）に由来するルシフェラーゼ遺伝子は、広く普及している発光レポーター遺伝子である。ホタルのルシフェラーゼは、ＡＴＰの濃度を決定するための定評のあるレポーターでもあり、その役割として、バイオマスを検出するために広く用いられている。また、発光は、他の酵素が特定の合成基質と一緒に混合されたときに、上記他の酵素によって生じる。他の基質としては、例えば、アルカリホスファターゼ、アダマンチルジオキセタンホスフェートまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ、および、ルミノールが挙げられる。

【０００３】

ルシフェラーゼ遺伝子は、非放射性の性質、感度、および、発光アッセイにおける直線範囲が極めて優れているために、レポーター遺伝子として広く用いられている。例えば、わずか10^{-20}モルのホタルのルシフェラーゼを、検出することができる。その結果、遺伝子活性のルシフェラーゼアッセイが、事実上あらゆる生物実験系に用いられている。上記実験系としては、例えば、原核生物細胞の培養物と真核生物細胞の培養物との両方、トランスジェニック植物、トランスジェニック動物、および、無細胞発現系が挙げられる。同様に、ＡＴＰの濃度を検出するために用いられるルシフェラーゼアッセイは、高感度であるので、10^{-16}モルよりも少ないものを検出することができる。

【０００４】

ルシフェラーゼは、酵素特異的な基質（例えばルシフェリン）の酸化を介して、光を発

生することができる。ホタルのルシフェラーゼ、および、全ての他の甲虫ルシフェラーゼに関して言えば、発光は、ルシフェリン、マグネシウムイオン、酸素、および、ＡＴＰの存在下において起こる。花虫類のルシフェラーゼ（レニラ（Ｒｅｎｉｌｌａ）ルシフェラーゼ）に関して言えば、酸素のみが、基質のコエレントラジン（ｃｏｅｌｅｎｔｒａｚｉｎｅ）と一緒に要求される。一般的に、遺伝子活性を決定するための発光アッセイにおいて、反応基質および他の発光活性化試薬が、レポーター酵素を発現していると考えられる生物系に導入される。生じた発光は、（少しでもあれば）、その後、ルミノメーター、または、任意の適切な放射エネルギー測定装置を用いて決定される。アッセイは、非常に迅速であり、感度がよいので、放射性試薬を必要とせずに、素早く容易に遺伝子の発現データを得ることができる。

【０００５】

ほとんどの酵素反応は、ルシフェラーゼと同じくらい理想的な生成物を生成しないので、細胞レベルの解析に有用な酵素反応のための、および、ハイスループットなスクリーニングに適用するための、ルシフェラーゼに媒介されるアッセイの有用性は、この分野に従事する人にとって魅力的であると考えられる。しかしながら、そのような酵素アッセイまたは生物アッセイの基礎としての、そのようなルシフェラーゼに媒介されるアッセイの発展は、限られていた。ルシフェラーゼに媒介される反応は、非常に多くの他の分子（例えば、ＡＴＰまたは乳酸デヒロドゲナーゼ）を検出するために用いられていた。それらの反応のいくつかにおいて、天然に生じた基質の誘導体が用いられている。野生型のホタルのルシフェリン、ポリテロサイクリック（ｐｏｌｙｔｈｅｒｏｃｙｃｌｉｃ）有機酸（Ｄ－（－）－２－（６’ヒドロキシ－２’ベンゾチアゾリル）－Δ^{2}－チアゾリン－４－カルボジリック酸（ｃａｒｂｏｚｙｌｉｃ　ａｃｉｄ））が図１に示されている。例えば、プロ基質として、酵素（プロテアーゼなど）の認識部位を有しているルシフェリン誘導体を用いる方法が、Ｍｉｓｋａらに記載された（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，　２５：２３　（１９８７））。不均質なアッセイは、ルシフェリン誘導体と適切な酵素（例えばプロテアーゼ）とを、特定の期間インキュベートして、それらの混合物のアリコートを、ルシフェラーゼを含有している溶液に移すことによって実施された。Ｍａｓｕｄａ－Ｎｉｓｈｉｍｕｒａらは、ガラクトシダーゼ基質を用いて修飾されたルシフェリンを用いた、単一チューブの（均質な）アッセイの使用を報告した。（Ｌｅｔｔｅｒｓ　ｉｎ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏ．，　３０：１３０　（２０００））。これらのルシフェリン誘導体では、非ルシフェラーゼ酵素の活性に関する反応基として機能する誘導体の部分は、Ｄ－ルシフェリン骨格またはアミノルシフェリン骨格と結合しているので、非ルシフェラーゼ酵素の作用に応じて、Ｄ－ルシフェリン分子またはアミノルシフェリン分子を、ルシフェラーゼの基質として機能するような反応の直接生成物として生産することができる。非ルシフェラーゼ酵素の基質として機能するように、ルシフェリン分子を修飾するためには、非ルシフェラーゼ酵素の活性により、ルシフェラーゼの基質としての機能を保持しているＤ－ルシフェリン分子またはアミノルシフェリン分子が、直接産生されなければならない、という信念が、ルシフェラーゼに媒介される反応を、他の酵素アッセイに広く適用することを主に妨害していた。

【０００６】

したがって、Ｄ－ルシフェリン、または、アミノルシフェリンが、非ルシフェラーゼの酵素反応の直接的な結果として放出されることに関わらず、非ルシフェラーゼ酵素の基質または他の有用な生物分子として、そして、ルシフェラーゼのプロ基質として機能するルシフェリン誘導体を同定することによって、ルシフェラーゼに媒介される反応の有用性を非ルシフェラーゼ酵素に拡張することが、生物アッセイの分野において必要とされている。

【０００７】

〔発明の要旨〕

本発明は、ルシフェリン誘導体を提供する。また、本発明は、ルシフェリン誘導体が所

望の酵素の基質として機能するとともに、ルシフェラーゼのプロ基質であるか、あるいは、ルシフェリン誘導体が、目的の分子によって修飾され、修飾された分子がルシフェリンの基質である場合に、酵素活性アッセイまたは非酵素的生物アッセイにおいてそのような誘導体を用いる方法を提供する。驚いたことに、ルシフェリン誘導体の多くは、発光アッセイにおいてルシフェラーゼの基質としての活性を有している。したがって、ルシフェリンの骨格（または、ルシフェラーゼの適切な基質を構成している他の化学的部分）に結合している所望の非ルシフェラーゼ酵素の特定の酵素認識部位を有しており、これにより、所望の非ルシフェラーゼ酵素の基質およびルシフェラーゼのプロ基質が得られるルシフェリン誘導体を提供することによって、多数の非ルシフェラーゼ酵素を、生物発光アッセイにおいて決定することができる。なお、上記特定の酵素認識部位は、特定の酵素の基質と呼ばれる分子における、反応性化学基のことである。また、上記ルシフェリン誘導体としては、例えば、ルシフェリンの６’ヒドロキシル基またはアミノルシフェリンの６’アミノ基が修飾された誘導体が挙げられる。

【０００８】

本発明の誘導体の範囲内において、ルシフェリンの修飾には、環原子の１以上の置換、環原子に結合している置換基（原子または基）の１以上の置換、および／または、環への１以上の原子の付加（例えば、環の伸長もしくは付加）、あるいは、それらの組み合わせが含まれる。Ｄ－ルシフェリンにおける、いくつかの環原子に関する番号付けが図１に示されている。天然の蛍ルシフェリンは、６位にＯＨ基を有している６員環（以下、「環Ａ」または「Ａ環」と記載する）、当該６員環に連結している５員のチアゾール環（以下、「環Ｂ」または「Ｂ環」と記載する）、および、５位にカルボキシル基により修飾されている５員のチアゾール環（以下、「環Ｃ」または「Ｃ環」と記載する）という、３つの連結した環を有している。例えば、Ａ環が修飾されたルシフェリン誘導体では、Ａ環のＣ原子が別の原子で置換されていてもよいし、環が付加されていてもよいし、環原子に結合している置換基が異なる原子もしくは基で置換されていてもよいし、あるいは、それらが任意に組み合わされていてもよい。Ｂ環が修飾されたルシフェリン誘導体では、５員環に原子が付加されていてもよいし（例えば、１以上の原子が挿入されて、Ｂ環が６員環などに拡張されていてもよい）、５員環の原子が置換されていてもよいし、５員環のＮもしくはＳが異なる原子（例えばＣもしくはＯ）で置換されていてもよいし、環原子に結合している置換原子もしくは置換基が置換されていてもよいし、あるいは、それらが任意に組み合わされていてもよい。Ｃ環が修飾されたルシフェリン誘導体では、環原子が別の原子で置換されていてもよいし、環原子に結合している置換基が、異なる原子または基で置換されていてもよいし、あるいは、それらが任意に組み合わされていてもよい。１実施の形態では、本発明の誘導体は、１よりも多い位置において修飾されている誘導体である。例えば、本発明の誘導体では、Ａ環が２以上修飾されているか、Ｂ環が２以上修飾されているか、Ｃ環が２以上修飾されているか、あるいは、それらが組み合わられている。１実施の形態では、１つの修飾は、Ｄ－ルシフェリンの１つの環における置換基が、非ルシフェラーゼ酵素の基質で置換されているか、または、非ルシフェラーゼ酵素の基質およびリンカーで置換されている。

【０００９】

Ａ環が修飾されている典型的な誘導体は、レダクターゼ（例えばシトクロムＰ４５０レダクターゼ）、モノアミンオキシダーゼ（ＭＡＯ）、フラビンモノオキシゲナーゼ（ＦＭＯ）、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、デアルキラーゼ、デアセチラーゼ、デホルミラーゼ、ホスファターゼ（例えばアルカリホスファターゼ（ＡＰ））、スルファターゼ、ベーターラクタマーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、プロテアーゼ（例えば、プロテオソーム、カテプシン、カルパイン、ベーターセクレターゼ、トロンビン、または、グランザイム）、ルシフェラーゼの基質であってもよいし、あるいは、活性酸素種（ＲＯＳ）、ペルオキシダーゼ（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、および、酸化還元の状態を検出するのに利用される基質であってもよい。少なくともＢ環が修飾されている誘導体を用いて検出される典型的な分子もしくは状態には、デアルキラ

ーゼ、ＧＳＴまたはルシフェラーゼ、あるいは、酸化還元の状態が含まれるが、これらに限定されない。それらの誘導体を用いて検出される典型的な分子には、シトクロムＰ４５０酵素、エステラーゼ（例えばアセチルコリンエステラーゼ）、ＯＨラジカル、デメチラーゼ、デアセチラーゼ、デホルミラーゼまたはマイコプラズマカルボキシペプチダーゼが含まれる。Ｃ環が修飾されている誘導体を用いて検出される典型的な分子には、エステラーゼが含まれるが、これに限定されない。

【００１０】

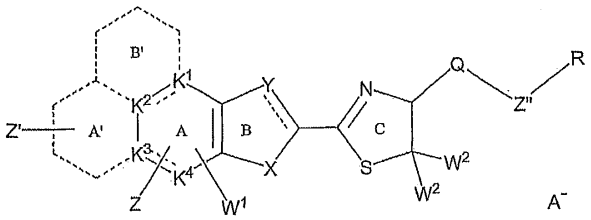
１実施の形態では、ルシフェリンまたはアミノルシフェリンの誘導体は、下記の構造を有している。Ｌ－Ｘ－Ｍ－Ｙ－Ｒ（一般式ＩＶで示される化合物）。式中、Ｌは、存在する場合に、酵素の基質を表してもよいし、酵素と相互作用する別の分子を表してもよい。Ｘは、Ｏ、ＮＨ、またはリンカー（例えば、ＬがＬ－Ｘ－Ｍ－Ｙ－Ｒから除去された後に、自発的に切断してＭ－Ｙ－Ｒを生じさせる自己切断可能なリンカー）を表してもよい。Ｍは、ルシフェリン、キノリニルルシフェリン、もしくはナフチルルシフェリン、またはアミノルシフェリン、もしくはアミノキノリニルルシフェリンを表してもよい。Ｙは、Ｏ（エステル）、ＮＨ（アミド）、ＮＨ－ＮＨ（ヒドラジド）またはＳ（チオエステル）を表す。Ｒは、存在する場合、アルキル、芳香族分子、ペプチド、オリゴヌクレオチド、または、酵素の基質に結合している自己切断可能なリンカーを表してもよい。

【００１１】

１実施の形態では、本発明は、一般式Ｉ：

【００１２】

【化１】



I

（式中、Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、またはＣＨを表し；

ＹがＮを表すときに、ＸはＳを表さず；

Ｘは、Ｓ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨ、または、ＣＨ＝Ｎを表し；

ＸがＳを表すときに、ＹはＮを表さず；

Ｚ、およびＺ’は独立して、Ｈ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；

Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｑは、カルボニル、または、ＣＨ$_2$を表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_4$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表すか；あるいは、

Ｗ^{1}およびＺは、両方とも環Ａ上のケト基を表し、環Ａにおいて任意の２重結合を表している破線の少なくとも１つが、存在しておらず；

各Ｗ^{2}は独立して、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_4$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；

各Ｋ^1、Ｋ^2、Ｋ^3、およびＫ^{4}は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルを表し、Ｋ^{1}とＫ^{2}との間の破線およびＫ^{3}とＫ^{4}との間の破線は、任意の２重結合を表し；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’およびＢ’のうちの１つだけが化合物に存在しており；

Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、

Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

各Ｒは、独立して、Ｈ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アルキルスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アリールスルフィニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アンモニウム（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールチオ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスフェート、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスホネート、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールホスフェート、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくは、サッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意のＭ$^{+}$（ここで、Ｍはアルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ＺもしくはＺ’がＮＲ^{1}Ｒ^{1}を表すときに、Ｒ^{1}Ｒ^{1}は、それらが結合しているＮと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または、複素環基は、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルカルボニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－ＣＯＯＲ^{X}、－ＳＯ$_{2}$Ｒ^{X}、－ＳＯ$_{3}$Ｒ^{X}、ニトロ、アミノ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル－Ｓ（０）－、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル－Ｓ０$_{2}$－、ホスフェート、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスフェート、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスホネート、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキニル、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル）$_{2}$、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルチオ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝Ｏ、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

Ｒ^{X}は、Ｈ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、または、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールを表し；

ＺまたはＺ’が窒素部分を含有しているときに、前記Ｚもしくは前記Ｚ’の窒素部分の１つまたは両方の水素は、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、または、Ｌ基により置き換えられてもよく（ここで、前記Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルを表すときに、Ｗ^{2}の少なくとも１つはＨを表さず；

Ｚがヒドロキシル基または窒素部分を表すときに、前記ヒドロキシル基または窒素部分のＨは、（ＨＯ）$_{2}$Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ$_{2}$－、スルホ、または、－ＰＯ$_{3}$Ｈ$_{2}$により、あるいは、１－約１２の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により、置き換えられていてもよく；ただし、環Ｂがチアゾール環を表すときに、前記スルホ基または前記－ＰＯ$_{3}$Ｈ$_{2}$基は、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキレン基を介してヒドロキシル基の酸素に結合しており；

ＺまたはＺ’がヒドロキシル基または窒素部分を表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒドロキシル基を表すときに、前記ヒドロキシル基または窒素部分の１つのＨは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、前記リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、置換されていてもよい芳香環、または、ペプチド結合により割り込まれていてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合

しており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基、Ｚ’基、または、Ｚ’’－Ｒ基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；

ＺがＯＲを表すときに、一般式Ｉで示される化合物は、一般式Ｉで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルキルジラジカルを含んでいるリンカーを介して、２つのＡ環において結合した２量体であってもよく（ここで、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは、複素環基により割り込まれていてもよく、一般式Ｉで示される化合物の２量体に結合している各Ｚ基のＲ基は、前記架橋により置き換えられている）；

$Ａ^{-}$はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；

環Ａおよび環Ｂが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成するときに、$Ｗ^{1}$は水素を表さず；

環Ａの置換基がＯＨであるときに、－Ｑ－Ｚ’’－Ｒは、－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－$ＮＨ_{2}$を表さず；

ＹがＮまたはＣＨを表し、ＸがＣＨ＝ＣＨを表し、$Ｗ^{1}$がＨを表すときに、Ｚは$Ｋ^{3}$に結合したＯＨを表さず；

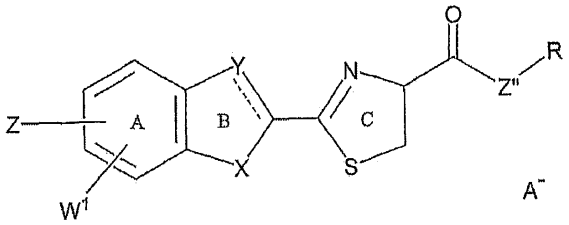
ＹがＮまたはＣＨを表し、ＸがＣＨ＝ＣＨを表し、ＺがＨを表すときに、$Ｗ^{1}$は$Ｋ^{3}$に結合したＯＨを表さない）で示される化合物、または、その塩を提供する。

【００１３】

もう１つ別の実施の形態では、本発明は、一般式ＩＡ：

【００１４】

【化２】



IA

（式中、Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキルまたはＣＨを表し；

ＹがＮを表すときに、ＸはＳを表さず；

ＸはＳ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨ、または、ＣＨ＝Ｎを表し；

ＸがＳを表すときに、ＹはＮを表さず；

ＺはＨ、ＯＲ、ＮＨＲまたはＮＲＲを表し；

Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、またはＮ＝Ｎを表し；

$Ｗ^{1}$は、Ｈ、ハロ（ｈａｌｏ）、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル、または、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルコキシを表し；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

各Ｒは独立して、Ｈ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルコキシ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルスルホキシ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルスルホニル、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルスルフィニル、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル、Ｎ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アンモニウム（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールチオ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルホスフェート、（$Ｃ_{1}$－

C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6－C_{30}）アリールホスフェート、（C_6－C_{30}）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくは、サッカライドを表すか、または、Z’’が酸素を表すときに任意のM^+（ここで、Mはアルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ZもしくはZ’がNR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているNと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基または複素環基は、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－COOR^X、－SO2R^X、－SO_3R^X、ニトロ、アミノ、（C_1－C_{20}）アルキル－S（0）－、（C_1－C_{20}）アルキル－$S0_2$－、ホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、NH（C_1－C_6）アルキル、NH（C_1－C_6）アルキニル、N（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、N（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝O、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３の官能基Rで置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^xは、H、（C_1－C_6）アルキルまたは（C_6－C_{30}）アリールを表し；

A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；

環AおよびBが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成しているときに、W^1は水素を表さず；

環Aの置換基がOH基であるときに、Q－Z’’－Rは、C（O）－NH－NH_2を表さず；

YがNまたはCHを表し、XがCH＝CHを表し、W^1がHを表すときに、Zは環Aの６位の炭素（図１に示されているような炭素６）に結合したOHを表さず；

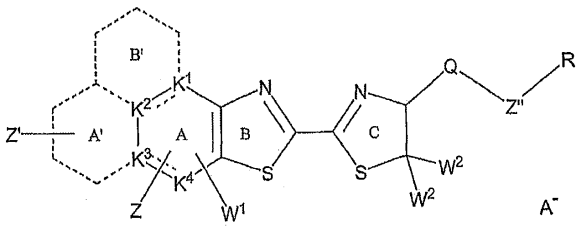
YがNまたはCHを表し、XがCH＝CHを表し、ZがHを表すときに、W^1は環Aの６位の炭素に結合したOHを表さない）で示される化合物、または、その塩を提供する。

【００１５】

もう１つ別の実施の形態では、本発明は、一般式ＩＩ：

【００１６】

【化３】



II

（式中、ZおよびZ’は、独立してOR^1、NHR^{1}またはNR^{1}R^{1}を表し；

Z’’は、O、S、NH、NHRまたはN＝Nを表し；

Qは、カルボニルまたはCH_2を表し；

W^1は、H、ハロ（ｈａｌｏ）、（C_1－C_6）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、ヒドロキシル、または、（C_1－C_6）アルコキシを表すか、あるいは、W^1およびZは、両方とも環A上のケト基を表し、環Aの任意の２重結合を表している破線の少なくとも１つが、存在しておらず；

各K^1、K^2、K^3、および、K^4は独立して、CH、N、N－酸化物、または、N－（C_1－C_6）アルキルを表し、K^1とK^2との間の破線およびK^3とK^4との間の破線

は、任意の２重結合を表し；
Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’およびＢ’のうちの１つだけが化合物に存在しており；
Ｂ’が存在するときは官能基Ｚが存在し、
Ａ’が存在するときは官能基Ｚが存在しておらず；
Ｒは、Ｈ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルコキシ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルスルホキシ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル、Ｎ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アンモニウム（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、もしくは、サッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意の$Ｍ^{+}$（ここで、Ｍはアルカリ金属を表す）を表し；
$Ｒ^{1}$は、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルチオ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－$ＳＯ_{2}$、－$ＳＯ_{3}$（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、サッカライド、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルホスフェート、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルホスホネート、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールチオ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール－Ｓ（Ｏ）－、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール－$ＳＯ_{2}$、－$Ｓ０_{3}$（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールホスフェート、もしくは（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールホスホネートを表すか、または、$Ｒ^{1}$は、$Ｒ^{2}$で置換された（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルを表し；
$Ｒ^{2}$は、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルコキシル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルカルボニル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルカルボキシル、ヒドロキシル、－$ＣＯＯＲ^{X}$、－$ＳＯ_{3}Ｒ^{X}$、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルチオ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールチオ、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－$ＳＯ_{2}$－、ニトロ、アミノ、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキニル、Ｎ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$もしくはＮ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、サッカライド、または、トリフルオロメチルを表すか；あるいは、
ＺもしくはＺ’が$ＮＲ^{1}Ｒ^{1}$を表すときに、$Ｒ^{1}Ｒ^{1}$は、それらが結合しているＮと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；
任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基または複素環基は、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルコキシル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルカルボニル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－$ＣＯＯＲ^{X}$、－$ＳＯ_{2}Ｒ^{X}$、－$ＳＯ_{3}Ｒ^{X}$、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－Ｓ（０）－、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル－$Ｓ０_{2}$－、ホスフェート、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルホスフェート、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルホスホネート、ニトロ、アミノ、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル、ＮＨ（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキニル、Ｎ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$、Ｎ（（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキルチオ、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリール、（$Ｃ_{6}$－$Ｃ_{30}$）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝Ｏ、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されいてもよく；
上記$Ｒ^{x}$は、Ｈ、または（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキルを表し；
ＺまたはＺ’が、窒素部分を含んでいるときに、ＺまたはＺ’の窒素部分の水素が、官能基Ｌにより置き換えられていてもよく（ここで、前記Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルを表す

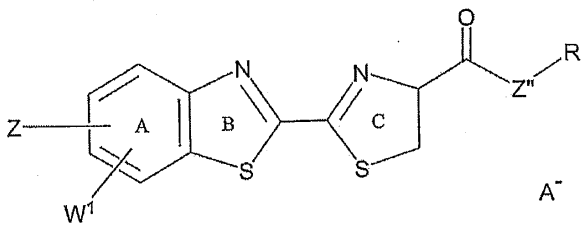
ときに、W^1またはW^2の少なくとも１つはＨを表さず；
Ｚがヒドロキシル基または窒素部分を表すときに、ヒドロキシル基または窒素部分のＨは、（ＨＯ）$_2$Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ$_2$－、スルホ、または、－ＰＯ$_3$Ｈ$_2$により、あるいは、１－約１２炭素原子の炭素鎖を介して官能基Ｚに結合しているセファロスポラニン酸により、置換られていてもよく；ただし、スルホまたは－ＰＯ$_3$Ｈ$_2$基が、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキレン基を介して、ヒドロキシル基の酸素に結合しており；
ＺまたはＺ’が、ヒドロキシル基または窒素部分を表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒドロキシル基を表すときに、ヒドロキシル基または窒素部分の１つのＨは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、前記リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、置換されていてもよい芳香環、または、ペプチド結合により割り込まれていてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられていてもよく、
リンカーは、リンカーの１つの末端にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合しており、リンカーのもう一方の末端は、Ｚ基、Ｚ’基、またはＺ’’－Ｒ基とエーテル結合、エステル結合、または、アミド結合を形成しており；
ＺがＯＲ^{1}を表すときに、一般式ＩＩで示される化合物は、一般式ＩＩで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$）アルキルジラジカルを含んでいるリンカーを介して、２つのＡ環において結合した２量体であってもよく（ここで、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは、複素環基により割り込まれていてもよく、一般式ＩＩで示される化合物の２量体に結合している各Ｚ基のＲ^{1}基は、前記架橋により置き換えられている）；
炭化水素がK^3に直接結合しておらず；
A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在している）で示される化合物、または、その塩を提供する。

【００１７】

さらにもう１つ別の実施の形態では、本発明は、一般式ＩＩＡ：

【００１８】

【化４】



IIA

（式中、ＺはＯＲ^1、ＮＨＲ^1、またはＮＲ^{1}Ｒ^{1}を表し；
Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲまたはＮ＝Ｎを表し；
W^1は、Ｈ、ハロ（ｈａｌｏ）、ヒドロキシル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；
Ｒは、Ｈ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル）$_2$、トリ（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アンモニウム（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、もしくは、サッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意のM^+（ここで、Ｍはアルカリ金属を表す）を表し；

R^1は、（C_6－C_{30}）アリール、ヘテロアリール、複素環、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_1－C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1－C_{20}）アルキル－SO_2、－SO_3（C_1－C_{20}）アルキル、サッカライド、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6－C_{30}）アリールチオ、（C_6－C_{30}）アリール－Ｓ（Ｏ）－、（C_6－C_{30}）アリール－SO_2、－$S0_3$（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールホスフェート、もしくは（C_6－C_{30}）アリールホスホネートを表すか、または、R^1は、R^2で置換された（C_1－C_{20}）アルキルを表し；

R^2は、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ヒドロキシル、－$COOR^X$、－SO_3R^X、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリールチオ、（C_1－C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1－C_{20}）アルキル－SO_2－、ニトロ、アミノ、ＮＨ（C_1－C_6）アルキル、ＮＨ（C_1－C_6）アルキニル、Ｎ（（C_1－C_6）アルキル）$_2$もしくはＮ（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、サッカライド、または、トリフルオロメチルを表すか；あるいは、

ＺもしくはＺ’がNR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているＮと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または、複素環基は、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－$COOR^X$、－SO_2R^X、－SO_3R^X、（C_1－C_{20}）アルキル－Ｓ（０）－、（C_1－C_{20}）アルキル－$S0_2$－、ホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、ニトロ、アミノ、ＮＨ（C_1－C_6）アルキル、ＮＨ（C_1－C_6）アルキニル、Ｎ（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、Ｎ（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝Ｏ、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^xは、Ｈ、または（C_1－C_6）アルキルを表し；

ＺがOR^1を表すときに、一般式ＩＩＡで示される化合物は、一般式ＩＩＡで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C_1－C_{12}）アルキルジラジカルを含んでいるリンカーを介して、２つのＡ環において結合した２量体であってもよく（ここで、（C_1－C_{12}）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは、複素環基により、割り込まれていてもよく、一般式ＩＩで示される化合物の２量体に連結している各Ｚ基のR^1基は、前記架橋より置換られていている）；

炭化水素がK^3に直接結合しておらず；

A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在している）で示される化合物、または、その塩を提供する。

【００１９】

他の誘導体および発光性アッセイにおける該他の誘導体の使用を、以下に記載する。

【００２０】

本明細書に記載されているルシフェリン誘導体を使用することによって、非ルシフェラーゼ分子との相互作用（この相互作用によって、ルシフェリン誘導体の構造が変化することがある）に基づく、光学特性の測定可能な変化を生じるアッセイを行うことができる。本明細書に記載されているように、ルシフェリン誘導体と非ルシフェラーゼ酵素または他の有益な分子との間の反応生成物は、Ｄ－ルシフェリンまたはアミノルシフェリンである

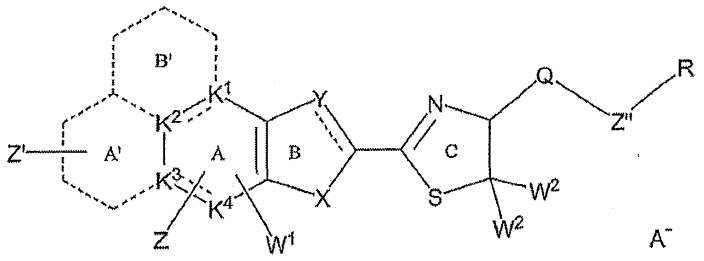
必要はない。例えば、ルシフェリン誘導体は、非ルシフェラーゼ酵素のための化学反応基を含有している基質を含んでいてもよい。上記化学反応基は、化学リンカーを介してルシフェリンまたはアミノルシフェリンに連結している。非ルシフェラーゼ酵素による上記誘導体の化学反応基の変換は、基質の一部、化学リンカーの一部、化学リンカー、または、基質および化学リンカーの一部を含有している（保持している）生成物を生じることがあり、上記生成物はルシフェラーゼの基質である。また、非ルシフェラーゼ酵素または他の分子と相互作用した後に、必要に応じて１以上の更なる反応（例えばβ－脱離）を受けて、ルシフェラーゼの適切な酵素を生じる生成物を生産することがある、ルシフェリン誘導体が提供される。チアゾール環のカルボキシの位置において有意に修飾されているものを提供することと同様に、ルシフェリン骨格の環構造が、さらに修飾されているルシフェリン誘導体（例えばキノリルルシフェリンまたはナフチルルシフェリン）が、ルシフェリン誘導体の改良された特徴をもたらすために提供される。特定の修飾を有する誘導体は、特定の非ルシフェラーゼ酵素または特定の分子に対する、アッセイを提供する、または、そのアッセイを改良する。例えば、下記に記載されているように、ｐＨに感受性のないルシフェリン誘導体は、生理的ｐＨ以外のｐＨ（すなわち約ｐＨ７．０よりも低く、約ｐＨ７．８よりも大きいｐＨ）において実施されてもよい生物アッセイに有用であることが、確認された。したがって、本発明のルシフェリン誘導体を用いる生物発光方法は、１以上の分子、または、１以上の状態（例えば酸化還元の状態）を検出するために用いてもよい。上記分子としては、例えば、酵素、酵素反応のための補助因子（ＡＴＰなど）、酵素の基質、酵素の阻害物質、酵素の活性化物質、またはＯＨラジカルが挙げられる。

【００２１】

１実施の形態では、上記方法は、一般式ＩＩＩ：

【００２２】

【化５】



III

（式中、Ｙは、Ｎ、窒素酸化物、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、または、ＣＨを表し；

ＸはＳ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨ、または、ＣＨ＝Ｎを表し；

ＺおよびＺ’は独立してＨ、ＯＲ、ＮＨＲ、またはＮＲＲを表し；

Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｑは、カルボニルまたはＣＨ$_2$を表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ（ｈａｌｏ）、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表すか、あるいは、Ｗ^{1}およびＺは、両方とも環Ａ上のケト基を表し、環Ａの任意の２重結合を表している破線の少なくとも１つが、存在しておらず；

各Ｗ^{2}は、独立して、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_4$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；

各Ｋ^1、Ｋ^2、Ｋ^3、およびＫ^{4}は、独立して、ＣＨ、Ｎ、窒素酸化物、または、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルを表し、Ｋ^{1}とＫ^{2}との間の破線およびＫ^{3}とＫ^{4}との間の破線は、任意の２重結合を表し；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’およびＢ’のうちの１つだけが化合物に存在しており；

Ｂ’が存在するときにＺ基が存在し、

Ａ’が存在するときにＺ基が存在しておらず；

Ｂ環の破線は、任意の２重結合を表し；

各Ｒは独立して、Ｈ、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{2}－Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}－Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}－Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{12}$）アルコキシ、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルスルホキシ、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルスルホニル、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルスルフィニル、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキル、Ｎ（（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アンモニウム（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールチオ、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルホスフェート、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルホスホネート、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールホスフェート、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくは、サッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意の$Ｍ^{+}$（ここでＭは、アルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ＺもしくはＺ’が$ＮＲ^{1}Ｒ^{1}$を表すときに、$Ｒ^{1}Ｒ^{1}$は、それらが結合しているＮと一緒に、ヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基または複素環基は、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{2}－Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}－Ｃ_{20}$）アルキニル、（$Ｃ_{3}－Ｃ_{20}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルコキシル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルカルボニル、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－ＣＯＯ$Ｒ^{X}$、－$ＳＯ_{2}Ｒ^{X}$、－$ＳＯ_{3}Ｒ^{X}$、ニトロ、アミノ、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル－Ｓ（０）－、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル－$ＳＯ_{2}$－、ホスフェート、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルホスフェート、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルホスホネート、ＮＨ（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキル、ＮＨ（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキニル、Ｎ（（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキル）$_{2}$、Ｎ（（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキルチオ、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリール、（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝Ｏ、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

$Ｒ^{X}$は、Ｈ、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキルまたは（$Ｃ_{6}－Ｃ_{30}$）アリールを表し；

ＺまたはＺ’が、窒素部分を含んでいるときに、ＺまたはＺ’の窒素部分の１つまたは両方の水素は、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{20}$）アルキル、または、Ｌ基（ここで、Ｌは、アミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）で置換られていてもよく；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカル、または、ペプチドラジカルを表すときに、$Ｗ^{2}$はＨを表さず；

Ｚがヒドロキシル基または窒素部分を表すときに、前記ヒドロキシル基または窒素部分のＨは、$（ＨＯ）_{2}Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ_{2}－$、スルホ、または、$－ＰＯ_{3}Ｈ_{2}$により、あるいは、１－約１２の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられていてもよく；ただし、環Ｂがチアゾール環を表すときに、前記スルホ基または前記$－ＰＯ_{3}Ｈ_{2}$基は、（$Ｃ_{1}－Ｃ_{6}$）アルキレン基を介してヒドロキシル基の酸素に結合しており；

ＺまたはＺ’が、ヒドロキシル基または窒素部分を表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒドロキシル基を表すときに、ヒドロキシル基または窒素部分の１つのＨは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、前記リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、置換されていてもよい芳香環、または、ペプチド結合により割り込まれていてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられていてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの末端にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合

しており、リンカーのもう一方の末端は、Ｚ基、Ｚ’基、またはＺ’’－Ｒ基とエーテル結合、エステル結合、または、アミド結合を形成しており；

ＺがＯＲを表すときに、一般式ＩＩＩで示される化合物は、一般式ＩＩＩで示される化合物２量体の間に架橋を形成するための（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルキルジラジカルを含んでいるリンカーを介して、２つのＡ環において結合した２量体であってもよく（ここで、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{12}$）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは、複素環基により割り込まれていてもよく、一般式ＩＩＩで示される化合物の２量体に連結している各Ｚ基のＲ基は、前記架橋により置き換えられている）；

$Ａ^{-}$はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在している）で示される化合物、または、その塩を用いる。

【００２３】

ただし、一般式ＩＩＩで示される化合物は、ペプチド結合を介して、アミノ基においてプロテアーゼ基質を含むように修飾されたアミノルシフェリン（ここで、アミノルシフェリンは、環Ｃの５位に保護されたカルボキシル基を有していてもよい）、または、任意のルシフェリン６’－メチルエーテル、ルシフェリン６’－クロロエチルエーテル、６’デオキシルシフェリン、６’－ルシフェリン－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’－エチルエーテル、６’－ルシフェリンプレニルエーテル、β’－ルシフェリン２－ピコリニルエーテル、６’－ルシフェリン３－ピコリニルエーテル、６’－ルシフェリン４－ピコリニルエーテル、ルシフェリン６’－ベンジルエーテル、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－β－ガラクトピラノシド、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－サルフェート、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－ホスフェート、および、Ｄ－ルシフェリル－Ｌ－$Ｎ^{\alpha}$－アルギニンでなはないか；あるいは、１以上のシトクロムＰ４５０酵素の基質ではなく、非シトクロムＰ４５０酵素の基質であってもよい。

【００２４】

１実施の形態では、１以上の非ルシフェラーゼ酵素を検出するための生物発光アッセイ方法が、提供される。上記方法は、１以上の非ルシフェラーゼ酵素、基質、または、反応のための補助因子を有していると考えられる試料を、非ルシフェラーゼ酵素の基質である、ルシフェリン誘導体またはアミノルシフェリン誘導体を含有している対応する反応混合物と接触させる工程を含んでいる。１実施の形態では、上記誘導体は、Ｄ－ルシフェリンのベンゼン環において、非ルシフェラーゼ酵素（例えばモノアミンオキシダーゼ）の認識部位を含んでいる修飾を有している誘導体である。もう１つ別の実施の形態では、上記誘導体は、Ｄ－ルシフェリンのチアゾール環（環Ｂ）において、誘導体がルシフェラーゼの基質であり、非ルシフェラーゼ酵素の基質である修飾を有していてもよい誘導体である。もう１つ別の実施の形態では、上記誘導体は、ルシフェリンのチアゾール環（環Ｃ）において、有益な酵素（例えばアセチルコリンエステラーゼ）の認識部位を含んでいる修飾を有している誘導体である。もう１つ別の実施の形態では、上記誘導体は、環の１つに、有益な酵素の認識部位を含んでいる修飾を有しており、さらにその環または１以上の他の環に修飾を有している誘導体である。

【００２５】

以前に、ルシフェリン誘導体を用いてテストされることができた酵素は、芳香族構造（Ｄ－ルシフェリンまたはアミノルシフェリン）の極めて近くで、且つ、芳香族構造の近くで安定である認識部位（基質）と相互作用した酵素である。本明細書に記載されているように、（ｉ）芳香族環の近くの構造と必ずしも反応しない、または、（ｉｉ）芳香族構造よりも、アリール鎖に結合したときの方がよい安定である認識部位を有する基質と必ずしも反応しない、非ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリン誘導体が、同定された。例えば、ベンゼン環に、ヒドロキシル基を介して結合したホスフェート基を有している、前述されたルシフェリン誘導体（すなわち、アルカリホスファターゼの基質）を用いたアッセイは、上記ホスフェートが自発的に加水分解するので、高いバックグラウンドによっ

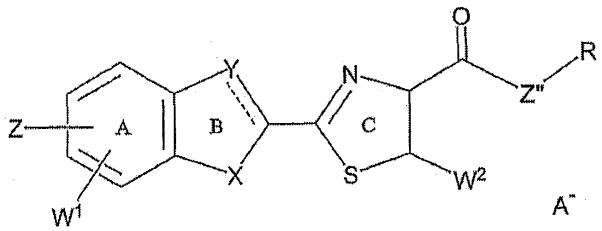
て制限される。ホスフェートをアリール鎖に結合させることによって安定化が起こり、このため、アルカリホスファターゼの基質である誘導体を可能にすることがあり、バックグラウンドを減少させることがある。したがって、ホスファターゼアッセイ（アルカリホスファターゼアッセイなど）の感度および有用性が、本発明のルシフェリン誘導体を用いることにより、増加する。一般的に、ルシフェラーゼの基質は、遊離型のヒドロキシル基（ルシフェリン）または遊離型のアミノ基（アミノルシフェリン）を、ベンゼン環に有している。遊離型のヒドロキシル基または遊離型のアミノ基を有している、ルシフェリンの別の骨格（キノリニルルシフェリンまたはナフチルルシフェリンなど）は、ルシフェラーゼの基質である。修飾がルシフェリンへ作られることができ、ルシフェラーゼ基質を生じる結果になる骨組みを拡張するために、酸素または窒素を介して、ルシフェリンのＡ環に結合しているアリールまたは他の鎖を有しているルシフェリン誘導体が調製される。Ａ環に窒素を有している誘導体は、明るい発光を生じるために、甲虫ルシフェラーゼによって利用されている。さらに、（光を引き起こして、濃度を減少させる野生型ルシフェリンの混入とは反対であるような）耐熱性のルシフェラーゼによって、反応を引き起こされたときに、アリールまたはアルキル鎖を有しているルシフェリン誘導体の濃度が、減少したことがＨＰＬＣによって、証明された。また、そのようなルシフェリン誘導体は、他のルシフェラーゼによって利用されることも、本明細書に示されている。さらに、これらの骨組み（例えば、ルシフェリンのＡ環における酸素または窒素を介して結合している基を有しているルシフェラーゼの基質）は、酵素の基質、もう１つ別の分子の結合部位、または、細胞の生物活性分子などの分子（例えば、セカンドメッセンジャー例えばｃＡＭＰを測定するためのＡＭＰ結合部位、または、カルシウムもしくはＩＰ３を測定するためのカルモジュリン）を測定するために、有用な任意の反応基を含むように修飾されてもよい。

【００２６】

１実施の形態では、ルシフェラーゼを検出するための方法は、一般式ＩＩＩＡ：

【００２７】

【化６】



IIIA

（式中、Ｙは、Ｎ、窒素酸化物、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルまたはＣＨを表し；
ＸはＳ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨまたはＣＨ＝Ｎを表し；
ＺはＨ、ＯＲ、ＮＨＲまたはＮＲＲを表し；
Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲまたはＮ＝Ｎを表し；
Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ（ｈａｌｏ）、ヒドロキシル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{10}$）アルケニル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；
Ｗ^{2}は、Ｈ、Ｆ、またはメチルを表し；
環Ｂの破線は任意の２重結合を表し；
各Ｒは独立して、Ｈ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホニル、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルフィニル、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル）$_2$、トリ（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）

アンモニウム（C_1-C_{20}）アルキル、ヘテロアリール（C_1-C_{20}）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（C_6-C_{30}）アリールチオ、（C_1-C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6-C_{30}）アリールホスフェート、（C_6-C_{30}）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくは、サッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意のM^+（ここで、Ｍは、アルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ＺもしくはＺ’がNR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているＮと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基または複素環基は、（C_1-C_{20}）アルキル、（C_2-C_{20}）アルケニル、（C_2-C_{20}）アルキニル、（C_3-C_{20}）シクロアルキル、（C_1-C_{20}）アルコキシル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1-C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－ＣＯＯR^X、－SO_2R^X、－SO_3R^X、ニトロ、アミノ、（C_1-C_{20}）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（C_1-C_{20}）アルキル－SO_2－、ホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1-C_{20}）アルキルホスホネート、ＮＨ（C_1-C_6）アルキル、ＮＨ（C_1-C_6）アルキニル、Ｎ（（C_1-C_6）アルキル）$_2$、Ｎ（（C_1-C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1-C_{20}）アルキルチオ、（C_6-C_{30}）アリール、（C_6-C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝０、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のＲ基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^xは、Ｈ、（C_1-C_6）アルキルまたは（C_6-C_{30}）アリールを表し；

ＺがＯＲを表すときに、一般式ＩＩＩで示される化合物は、一般式ＩＩＩで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C_1-C_{12}）アルキルジラジカルを含んでいるリンカーを介して、２つのＡ環において結合した２量体であってもよく（ここで、（C_1-C_{12}）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは、複素環基により、割り込まれていてもよく、一般式ＩＩＩで示される化合物の２量体に連結している各Ｚ基のR^1基は、前記架橋より置換られていている）；

A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在している）で示される化合物、または、その塩を用いる。

【００２８】

ただし、一般式ＩＩＩで示される化合物は、ペプチド結合を介して、アミノ基においてプロテアーゼ基質を含むように修飾されたアミノルシフェリン（ここで、アミノルシフェリンは、環Ｃの５位に保護されたカルボキシル基を有していてもよい）、または、任意のルシフェリン６’－メチルエーテル、ルシフェリン６’－クロロエチルエーテル、６’デオキシルシフェリン、６’－ルシフェリン－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’－エチルエーテル、６’－ルシフェリンプレニルエーテル、β’－ルシフェリン２－ピコリニルエーテル、６’－ルシフェリン３－ピコリニルエーテル、６’－ルシフェリン４－ピコリニルエーテル、ルシフェリン６’－ベンジルエーテル、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－β－ガラクトピラノシド、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－サルフェート、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－ホスフェート、および、Ｄ－ルシフェリル－Ｌ－N^{α}－アルギニンでなはないか；あるいは、１以上のシトクロムＰ４５０酵素の基質ではなく、非シトクロムＰ４５０酵素の基質であってもよい。

【００２９】

また、ルシフェリン誘導体にチオール化合物が含まれることによって、ルシフェラーゼに媒介されるアッセイの、反応における発光が効果的に安定化されることがあり、これにより、「グロー」反応速度論が与えられる。すなわち、ルシフェラーゼに媒介される反応

の発光強度が、誘導体の添加後の時間経過において、比較的に一定である。そのような化合物も、非ルシフェラーゼ酵素の存在もしくは活性、または、非酵素的生物反応をモニターする、生物発光性アッセイにおいて用いられてもよい。

【００３０】

任意の非ルシフェラーゼ酵素の基質もしくは他の分子と同様に、ルシフェラーゼの基質として直接的に機能する誘導体に関して、当該誘導体は、ルシフェラーゼ、補助因子、または、ルシフェラーゼ反応の阻害物質もしくは活性化物質を直接的に検出するために用いられてもよい。誘導体がルシフェラーゼのプロ基質である場合は（すなわち、誘導体と非ルシフェラーゼ酵素との反応の生成物がルシフェラーゼの基質である場合は）、非ルシフェラーゼ酵素とルシフェラーゼとに対する逐次反応または同時反応が、実施されてもよい。例えば、ルシフェラーゼのプロ基質であるルシフェリン誘導体を含んでいる、非ルシフェラーゼ酵素に対するアッセイが、単一の反応槽において、この反応槽に添加された甲虫ルシフェリンの反応混合物を用いて実施されてもよい。もう１つ別の実施の形態では、ルシフェリンのプロ基質であるルシフェリン誘導体を含んでいる、非ルシフェラーゼ酵素に対するアッセイのための反応混合物が、単一の反応槽において、甲虫ルシフェラーゼの反応混合物を有している異なる槽に、添加されたその反応物の一部を用いて実施されてもよい。また、代わりに、非ルシフェラーゼおよびルシフェラーゼの反応が、同じ槽において同時に実施されてもよい。

【００３１】

したがって、１実施の形態では、本発明は、試料における、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法を提供する。上記方法は、試料、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および、非ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリン誘導体を接触させて、ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を含有している第１混合物を生じさせる工程を含んでいる。１実施の形態では、上記誘導体は、一般式Ｉで示される化合物である。もう１つ別の実施の形態では、上記誘導体は、一般式ＩＩで示される化合物である。上記第１混合物の少なくとも１部を、ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物と接触させて、第２混合物を生じさせる。その後、第２反応において発光が検出または決定されることにより、試料における非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量（例えばコントロール（対照）と比較されたもの）が、検出もしくは決定される。１実施の形態では、上記誘導体は、トランスフェラーゼ（例えばグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ））の基質である。ＧＳＴを検出するのに役に立つ典型的な誘導体が、図１２に示されている。いくつかの実施の形態では、第２ルシフェラーゼ酵素が、第１非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応の生成物を化学的にさらに変換するために用いられてもよく、これによりルシフェラーゼの基質が生じる。例えば、試料、非ルシフェラーゼの反応混合物、または、ルシフェラーゼの反応混合物は、エステラーゼを含んでいてもよいし、あるいは、エステラーゼが、別々に添加されてもよい。

【００３２】

１実施の形態では、非ルシフェラーゼ酵素（Ｐ４５０酵素またはモノアミンオキシダーゼ（ＭＡＯ））、あるいは他の酵素（フラビンモノアミンオキシダーゼ（ＦＭＯ）、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ホスファターゼ（例えばアルカリホスファターゼ）、またはスルファターゼ）などを検出するための、エステル修飾を有しているルシフェリン誘導体が、本発明の方法に用いられる。というのも、上記誘導体では、非ルシフェラーゼ酵素の基質としての性質が改善されている可能性があるからである。特に、本明細書に示されているように、ルシフェリン誘導体のチアゾール環のカルボキシ位にエステル基を付加することにより、２つのＰ４５０酵素（２Ｄ６および２Ｃ１９）によって認識される基質が提供された。これらのＰ４５０酵素は、シトクロムＰ４５０の基質である、以前に記載されたルシフェリン誘導体と反応しなかった（米国特許出願公開第２００４０１７１０９９号明細書）。

【００３３】

もう１つ別の実施の形態では、試料における、第１の非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法、が提供される。上記方法は、試料、非ルシフェラーゼに媒介される酵素反応のための反応混合物、および、非ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリン誘導体を接触させて、混合物を生じさせる工程を含んでいる。非ルシフェラーゼ酵素と誘導体との反応により、ルシフェリンの基質である発光性生成物が生じる。上記混合物中の発光が、検出または決定されることによって、試料における非ルシフェラーゼに媒介される反応のための分子の存在または量が、検出もしくは決定される。

【００３４】

また、本発明は、試料における非酵素（酵素ではない）分子の存在または量を検出するための方法を対象とした実施の形態を提供する。上記方法は、試料、非酵素分子に媒介される反応のための第１反応混合物、および、上記非酵素分子の存在下において、ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を生じるルシフェリン誘導体を接触させる工程、ならびに、第１反応物の一部と、ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物とを接触させて、第２反応を生じさせる工程を含んでいる。これによれば、第２反応物中の発光が検出または決定されることによって、上記分子の存在または量が、検出もしくは決定される。例えば、試料、非酵素分子に媒介される反応のための第１反応混合物、および、上記非酵素分子の存在下において、甲虫ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を生じるルシフェリン誘導体を有している、混合物が提供される。第１混合物の少なくとも１部と、甲虫ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物が、混合されて、第２混合物が得られる。そして、当該第２混合物中の発光が、検出または決定されることにより、上記非酵素分子の存在または量が、検出もしくは決定される。

【００３５】

Ｄ－ルシフェリンまたはアミノルシフェリンよりも、バックグラウンドが低いルシフェリン誘導体を用いる、本明細書に記載の生物発光性アッセイに関して、そのようなアッセイでは、（例えば、発光の小さい変化を検出することができるので）少量の誘導体、または、（例えば、基質量が増加することによって改善される反応において）多量の誘導体を用いることができる。さらに、このとき、それら誘導体の（例えば非ルシフェラーゼ酵素への）反応性は、改善されていてもよい。さらに、本明細書に記載の何れの生物発光性アッセイに関して、他の試薬が、反応混合物に添加されてもよい。上記他の試薬としては、例えば、ルシフェラーゼの不活性化を阻害または阻止する試薬、あるいは、シグナルを拡張または増強する別の試薬を挙げることができるが、これらに限定されない。また、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応の調節物質を同定するための方法が提供される。上記方法は、１以上の作用物質、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および、非ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリン誘導体を接触させて、第１混合物を生じさせる（すなわちそのような混合物を提供する）工程を含んでいる。１以上の作用物質が存在しない第１混合物は、甲虫ルシフェラーゼの基質である発光性生成物を含んでいる。第１混合物の少なくとも１部と、甲虫ルシフェラーゼに媒介される反応のための第２反応混合物とを、混合して、第２混合物を生じさせる。この第２混合物中の発光を、コントロール混合物中の発光と比較することにより、１以上の作用物質が非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応を調節するか否かを、同定することができる。

【００３６】

本発明のさらなる実施の形態では、ルシフェラーゼの基質としての活性を直接的に保持しているルシフェリン誘導体は、（例えば、上記ルシフェリン誘導体を共有結合修飾することにより、または、上記ルシフェリン誘導体の競合的阻害物質もしくは非競合的阻害物質として）ルシフェラーゼ酵素を不活性化または阻害するために利用されてもよい。この実施の形態では、ルシフェラーゼの不活性化を阻止する化合物を、スクリーニングするための方法が提供される。また、本発明のルシフェリン誘導体を用いた、ルシフェラーゼに媒介される反応の調節物質を同定するための方法も提供される。

【００３７】

さらに、本発明は、１以上の分子または１以上の状態（例えば酸化還元の状態）を検出するための、修飾された蛍光物質の誘導体を用いた蛍光発生的な方法を提供する。上記分子としては、例えば、酵素、酵素反応のための補助因子（ＡＴＰなど）、酵素の基質、酵素の阻害物質、酵素の活性化物質、またはＯＨラジカルが挙げられる。したがって、本発明は、試料における、分子の量、活性、または存在を検出するための生物発光性および蛍光性アッセイを提供する。

【００３８】

また、本発明は、蛍光性アッセイ、および、非ルシフェラーゼのタンパク質非分解性酵素の基質である蛍光物質の誘導体を対象とした実施の形態を提供する。したがって、蛍光分析法により、試料におけるタンパク質非分解性酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法が、提供される。上記方法は、試料、非ルシフェラーゼのタンパク質非分解性酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および、上記酵素の基質を含んでいる蛍光物質を接触させて、第１混合物を生じさせる工程を含んでいる。ここで、試料に分子が存在していれば、上記第１混合物はヒドロキシ蛍光生成物を含有している。上記酵素と上記誘導体との相互作用により、イミニウムおよび／またはアルデヒド中間体が状況に応じて生産される。さらに、上記中間体は、非触媒性β－脱離を状況に応じて受けて、ヒドロキシ蛍光生成物が生じる。上記混合物における蛍光が、検出または決定され、これにより、試料の中にある、非タンパク質分解性酵素に媒介される反応のための分子の存在または量が、検出もしくは決定される。また、本発明は、酵素反応の阻害物質、活性化物質、基質、または補助因子を同定するための、本発明の蛍光物質の誘導体を用いた方法を提供する。

【００３９】

本発明は、本発明のルシフェリン誘導体および／または蛍光物質の誘導体を１以上有している、組成物もしくはキットを提供する。キットは、必要に応じて、他の試薬（例えば、酵素および反応混合物など）を含んでいてよい。本発明の生物発光性反応混合物、組成物、およびキットは、（ｉ）反応速度を減速する作用物質（例えば、アミノメチルベンゾチアゾール（ＡＭＢＴ）またはアミノフェニルメチルベンゾチアゾール（ＡＰＭＢＴ）（米国特許出願公開第２００４０１７１０９９号明細書を参照のこと）、および／または、（ｉｉ）光の産生を安定化する作用物質（例えばチオールまたは補酵素Ａ）を必要に応じて含んでいてもよい。なお、上記反応速度を減速する作用物質を用いることにより、グロー反応速度論が得られる。

【００４０】

〔図面の簡単な説明〕

図１は、甲虫ルシフェリン（Ｄ－ルシフェリン）における、６員環（「Ａ環」または「環Ａ」）、中央の５員環（「Ｂ環」または「環Ｂ」）、および他の５員環（「Ｃ環」または「環Ｃ」）の環原子の番号付けを示す図である。

【００４１】

図２は、酵素のためのルシフェリン典型的な誘導体を示す図である。

【００４２】

図３は、５’フルオロルシフェリンの構造を示す図である。

【００４３】

図４Ａ－Ｂは、酸化還元センサーとして役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。

【００４４】

図５Ａ－Ｂは、典型的な基質を示す図である。

【００４５】

図６は、酸化還元の基質を示す図である。

【００４６】

図７Ａ－Ｂは、他の典型的なルシフェリン誘導体を示す図である。

【００４７】

図８Ａは、３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェ

リン誘導体（ルシフェリンエチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００４８】

図８Ｂは、室温で２０分間インキュベートしたときの、アミノルシフェリン誘導体（イソプロピルウレタンルアミノルシフェリンメチルエステル；５０μＭ）を含み、エステラーゼ有または無しの反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００４９】

図９は、３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェリン誘導体（ルシフェリンメチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００５０】

図１０は、３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェリン誘導体（Ｄ－ルシフェリンピコリニルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００５１】

図１１は、モノアミンオキシド（ＭＡＯ）の基質として役に立つ蛍光性誘導体の誘導体のグラフを示す図である。

【００５２】

図１２Ａ－Ｂは、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）を検出するのに役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。

【００５３】

図１３Ａ－Ｄは、ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体の誘導体のグラフ表示を示す図である。図１３Ｂの誘導体は、ＭＡＯによって利用されなかった。

【００５４】

図１４は、フラビンモノオキシゲナーゼ（ＦＭＯ）基質として役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。

【００５５】

図１５は、典型的なＦＭＯの基質を示す図である。

【００５６】

図１６は、典型的なＡＰの基質を示す図である。

【００５７】

図１７は、一連のルシフェリン誘導体、および、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれに関するＲＬＵを示す図である。

【００５８】

図１８は、一連のルシフェリン誘導体、および、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれに関するＲＬＵを示す図である。

【００５９】

図１９は、Ｐ４５０酵素を検出するのに役に立つ、典型的な誘導体の構造を示す図である。

【００６０】

図２０は、ルシフェリン－ＭＥに対するＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の活性のグラフを示す図である。

【００６１】

図２１は、ルシフェリン－ＭＥメチルエステルに対するＰ４５０の活性のグラフを示す図である。

【００６２】

図２２は、エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、ルシフェリン－ＭＥピコリニルエステルに対するＣＹＰ２Ｄ６の活性のグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＣＹＰ２Ｄ６を含んでいた。

【００６３】

図２３は、エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、ルシフェリン－Ｈピコリニルエステルに対するＣＹＰ２Ｃ１９の活性のグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＣＹＰ２Ｃ１９を含んでいた。

【００６４】

図２４は、Ｐ４５０酵素の一団の１つおよびルシフェリン誘導体（Ｃ環が修飾されているＤ－ルシフェリンエチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００６５】

図２５は、Ｐ４５０酵素の一団の１つおよびルシフェリン誘導体（Ｃ環が修飾されているＤ－ルシフェリンメチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０または５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９を含んでいた。

【００６６】

図２６は、エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、３つのＰ４５０酵素のうちの１つおよびルシフェリン－ＭＥ－エチレングリコールエステルを含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００６７】

図２７Ａは、ルシフェラーゼ反応における、アミノルシフェリン誘導体（Ｎ－イソプロピルアミノルシフェリン）（５０μＭ）に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００６８】

図２７Ｂは、ルシフェラーゼ反応における、アミノルシフェリン誘導体（ジメチルアミノルシフェリン；１００μＭ）およびアミノルシフェリン（１００μＭ）に関するＲＬＵのグラフを示す図である。

【００６９】

図２８は、４’，６’ジメチルエーテルルシフェリンと、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれとの反応に関する、バックグラウンドに対するシグナルの割合のグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７０】

図２９は、ルシフェリン誘導体（２－（６－メトキシキノリン－２－イル）－４，５－ジヒドロチアゾール－４－カルボキシレート）と、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれとの反応に関する、バックグラウンドに対するシグナルの割合のグラフ表示を示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７１】

図３０は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（２－（７－メチオキシ（ｍｅｔｈｙｏｘｙ）－キノキサリン（ｑｕｉｎｏｘａｌｉｎ）－２－イル）－４－５－ジヒドロ－チアゾール－４－カルボン酸）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７２】

図３１は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－（（３－クロロ－４－（２－（ジメチルアミノ）－１－フェニルプロポキシ）ベンジロキシ）カルボニル）－６’－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７３】

図３２は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン４－ピペリジンメチルエーテル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７４】

図３３は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－（２－クロロエトキシカルボニル）－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７５】

図３４は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（４’－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）メチル－６’（Ｏ－メチル）ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７６】

図３５は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（４－（Ｎ，Ｎ－字メチルアミノエチル）－６－メトキシキノリルルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７７】

図３６は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン２－（１－ピペラジン）エチルエーテル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００７８】

図３７Ａは、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メター－Ｎ－メチルピコリニルルシフェリンメチルエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。３７℃で３０分インキュベートした後、エステラーゼが添加されているか、または、添加されていないルシフェリン検出試薬において室温で２０分インキュベートした。

【００７９】

図３７Ｂは、室温で２０分インキュベーションしたときの、エステラーゼを用いているか、または、用いていない、ルシフェリン誘導体（メター－Ｎ－メチルピコリニルルシフェリンメチルエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００８０】

図３８は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メタンフェタミン－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００８１】

図３９は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－イソブトキシカルボニル－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００８２】

図４０は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン－Ｈメチルエステル）、ならびにエステラーゼを含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００８３】

図４１は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン－ＭＥエチレングリコールエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０、５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９、または、４０μｇのＨＬＭを含んでいた。

【００８４】

図４２は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メトキシキノリルルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０を含んでいた。

【００８５】

図４３は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’（ｏ－トリフルオロメチルベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。１ｐｍｏｌのＰ４５０または５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９。

【００８６】

図４４は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’メトキシ－ルシフェリン－ヒドラジド）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である

。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０または５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９を含んでいた。
【００８７】
図４５は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’－（３－（（４－フェニルピペリジン－１－イル））メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０または２０μｇのＨＬＭを含んでいた。
【００８８】
図４６は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’－（２，４，６－トリメチルベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０または５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９を含んでいた。
【００８９】
図４７は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’（４－クロロフェニルチオ）メトキシルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。反応物は、１ｐｍｏｌのＰ４５０または５ｐｍｏｌのＣＹＰ１９を含んでいた。
【００９０】
図４８は、ルシフェリン－F_5ＢＥ（６’－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジロキシペンタフルオロベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【００９１】
図４９は、ルシフェリン－ＰＰＸ４ＦＥ（６’－（２，３，４，６－テトラフルオロ－５－（（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【００９２】
図５０は、ルシフェリン－ＰＰＸＥ（６’－（３－（（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【００９３】
図５１は、ルシフェリン－ＰＰＸＥを用いた、反応において、リファンピシン、ケトコナゾール、または、リファンピシンおよびケトコナゾールにより処理した後の、ヒトの肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ４の活性を示す図である。
【００９４】
図５２は、ルシフェリン－F_5ＢＥを用いた、反応において、リファンピシン、ケトコナゾール、または、リファンピシンおよびケトコナゾールにより処理した後の、ヒトの肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ４の活性を示す図である。
【００９５】
図５３は、ルシフェラーゼの基質の可能性がある、ルシフェリン誘導体（Ｎ－イソプロピルアミノルシフェリン、ビセチルアミノルシフェリン、およびベンジルアミノルシフェリン）を示す図である。
【００９６】
図５４は、異なるルシフェラーゼの基質の可能性がある、ルシフェリン誘導体の構造を示す図である。
【００９７】
図５５は、異なるｐＨでのルシフェラーゼ反応における、ルシフェリンまたは５－フルオロルシフェリンに関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【００９８】
図５６は、５’フルオロルシフェリンおよびルシフェリンのＡＴＰ滴定を示す図である。
【００９９】

図５７は、７’フルオロルシフェリンのＡＴＰ滴定を示す図である。
【０１００】
図５８は、様々なフルオロルシフェリンのスペクトルを示す図である。
【０１０１】
図５９は、７’フルオロルシフェリンのｐＨ滴定を示す図である。
【０１０２】
図６０は、ルシフェラーゼの基質として役に立つルシフェリン誘導体、および、非ルシフェラーゼの基質として役に立つルシフェリン誘導体の骨組みを示す図である。
【０１０３】
〔発明の詳細な説明〕
〔Ｉ．定義〕
本明細書中において使用される場合、以下の用語および表現は、示された意味を有する。本発明の化合物が、非対称的に置換された炭素原子を含み、光学活性体またはラセミ体に単離され得ることは明らかである。例えば、ラセミ体の分解によって、または光学的に活性な出発材料からの合成によって光学活性体をどのようにして調製するのかは当該分野において周知である。全てのキラル体、ジアステレオ体、ラセミ体および全ての幾何異性体の構造が、本発明の一部である。
【０１０４】
ラジカル、置換基について以下に列挙した特定値および範囲は、例示のためのみのものである；これらは、ラジカルおよび置換基について他に規定された値または規定された範囲内の他の値を排除しない。
【０１０５】
本明細書中において使用される場合、用語「置換された（置換されている）」は、示された原子の通常の原子価が超えておらず、その置換が安定な化合物を生じる限り、「置換された」を使用する表現に示された基における１以上（例えば、１，２，３，４または５；いくつかの実施形態において、１，２または３；他の実施形態において１または２）の水素が、示された基より選択された基または当業者に公知の適切な基と置換されていることを示すことが意図される。示された基に好適なもののとしては、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリフルオロメチルチオ、ジフルオロメチル、アシルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルフォニル、アリールスルフィニル、アリールスルフォニル、ヘテロアリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフォニル、複素環スルフィニル、複素環スルフォニル、ホスフェート、スルフェート、ヒドロキシルアミン、ヒドロキシ（アルキル）アミン、およびシアノが挙げられる。さらに、示された基に好適なもののとしては、例えば、以下が挙げられ得る：－Ｘ，－Ｒ，－Ｏ$^{-}$，－ＯＲ，－ＳＲ，－Ｓ$^{-}$，－ＮＲ$_{2}$，－ＮＲ$_{3}$，＝ＮＲ，－ＣＸ$_{3}$，－ＣＮ，－ＯＣＮ，－ＳＣＮ，－Ｎ＝Ｃ＝Ｏ，－ＮＣＳ，－ＮＯ，－ＮＯ$_{2}$，＝Ｎ$_{2}$，－Ｎ$_{3}$，ＮＣ（＝Ｏ）Ｒ，－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ，－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ
－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｏ$^{-}$，－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$ＯＨ，－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｒ，－ＯＳ（＝Ｏ）$_{2}$ＯＲ，
－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$ＮＲ，－Ｓ（＝Ｏ）Ｒ，－ＯＰ（＝Ｏ）Ｏ$_{2}$ＲＲ，Ｐ（＝Ｏ）Ｏ$_{2}$ＲＲ
－Ｐ（＝Ｏ）（Ｏ$^{-}$）$_{2}$，－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）$_{2}$，－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ，－Ｃ（＝Ｏ）Ｘ，
－Ｃ（Ｓ）Ｒ，－Ｃ（Ｏ）ＯＲ，－Ｃ（Ｏ）Ｏ$^{-}$，－Ｃ（Ｓ）ＯＲ，－Ｃ（Ｏ）ＳＲ，－Ｃ（Ｓ）ＳＲ，－Ｃ（Ｏ）ＮＲＲ，－Ｃ（Ｓ）ＮＲＲ，－Ｃ（ＮＲ）ＮＲＲ。ここで、各Ｘは独立してハロゲン（「ハロ」：Ｆ、Ｃｌ、ＢｒまたはＩ）であり、各Ｒｈａ，Ｈ、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、保護基またはプロドラッグ部分である。当業者に容易に理解されるように、置換基がケト（＝Ｏ）またはチオキソ（＝Ｓ）などである場合、置換された原子上に２つの水素原子が置換される。
【０１０６】

「安定な化合物」および「安定な構造」は、反応混合物から有用な程度まで精製する単離に耐える、十分に強固である化合物が示されることが意図される。安定な化合物のみが、本発明において企図されかつ請求される。しかし、例えば、容易に単離され得ない特定の不安定な化合物が、本明細書中に記載の方法に使用され得る。

【０１０７】

１つのジアステレオ体が、別のものと比較して優れた特性または活性を示し得る。必要であれば、ラセミ材料の分離が、キラルカラムを用いるＨＰＬＣによって、または分解剤（例えば、Ｔｈｏｍａｓ Ｊ．Ｔｕｃｋｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．１９９４，３７，２４３７－２４４４によって記載されるような樟脳酸（ｃａｍｐｈｏｎｉｃ）クロリド）を用いる分解によって、達成され得る。キラル化合物はまた、キラル触媒またはキラルリガンド（例えば、Ｍａｒｋ Ａ．Ｈｕｆｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９９５，６０，１５９０－１５９４）を用いて直接的に合成され得る。

【０１０８】

本明細書中において使用される場合、用語「アルキル」は、分岐した、分岐していない、または環状の炭化水素をいう。この炭化水素は、例えば、１－３０個の炭素原子、しばしば１－１２個、または１－約６個の炭素原子を有している。例示としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：メチル、エチル、１－プロピル、２－プロピル、１－ブチル、２－メチル－１－プロピル、２－ブチル、２－メチル－２－プロピル（ｔ－ブチル）、１－ペンチル、２－ペンチル、３－ペンチル、２－メチル－２－ブチル、３－メチル－２－ブチル、３－メチル－１－ブチル、２－メチル－１－ブチル、１－ヘキシル、２－ヘキシル、３－ヘキシル、２－メチル－２－ペンチル、３－メチル－２－ペンチル、４－メチル－２－ペンチル、３－メチル－３－ペンチル、２－メチル－３－ペンチル、２，３－ジメチル－２－ブチル、３，３－ジメチル－２－ブチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシルなど。アルキルは置換されていなくてもされていてもよい。アルキルはまた、必要に応じて、部分的にかまたは完全に不飽和であり得る。また、アルキル基の詳述はアルケニル基およびアルキニル基の両方を含む。アルキルは、上述しかつ例示したように、一価の炭化水素ラジカルであり得、または二価の炭化水素ラジカル（すなわちアルケニル）であり得る。

【０１０９】

用語「アルケニル」は、モノラジカルな、分岐しているかまたは分岐していない、部分的に不飽和な炭化水素鎖をいう（すなわち、炭素－炭素、ｓｐ^{2}二重結合）。１つの実施形態において、アルケニル基は、２－１０個の炭素原子、または２－６個の炭素原子を有し得る。別の実施形態において、アルケニル基は、２－４個の炭素原子を有する。例示としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：ビニル、アリル、シクロペンタニル、５－ヘキセニルなど。アルケニルは置換されていなくても置換されていてもよい。

【０１１０】

用語「アルキニル」は、完全に不飽和な点（すなわち、炭素－炭素、ｓｐ三重結合）を有している、モノラジカルな、分岐しているかまたは分岐していない炭化水素鎖をいう。１つの実施形態において、アルキニル基は、２－１０個の炭素原子、または２－６個の炭素原子を有し得る。別の実施形態において、アルキニル基は、２－４個の炭素原子を有する。この用語は以下のような群によって例示される：１－プロピニル、２－プロピニル、１－ブチニル、２－ブチニル、３－ブチニル、１－ヘキシニル、２－ヘキシニル、３－ヘキシニル、１－オクチニルなど。アルキニルは置換されていなくても置換されていてもよい。

【０１１１】

用語「シクロアルキル」は、単環または複数の縮合環を有している、３－１０個の炭素原子の環状のアルキル基をいう。このようなシクロアルキル基としては、例示として以下が挙げられる：単環構造（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンタニル、シクロオクチルなど）、複数の環構造（例えば、アダマンタニル）など。シクロアルキル

は置換されていなくても置換されていてもよい。シクロアルキル基は一価または二価であり得、必要に応じて、アルキル基について上述したように置換され得る。シクロアルキル基は、必要に応じて、１つ以上の不飽和部位を含み得、例えば、シクロアルキル基は、１つ以上の炭素－炭素二重結合を含み得る（例えば、シクロヘキセン、１，３－シクロヘキサジエン、１，４－シクロヘキサジエンなど）。

【０１１２】

用語「アルコキシ」は、アルキル－Ｏ－基をいい、ここで、アルキルは本明細書中で規定されるものである。１つの実施形態において、アルコキシ基としては、例えば、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、ｉｓｏ－プロポキシ、ｎ－ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ｎ－ペントキシ、ｎ－ヘキソオキシ、１，２－ジメチルブトキシなどが挙げられ得る。アルコキシは置換されていなくても置換されていてもよい。

【０１１３】

本明細書中において使用される場合、「アリール」は、親芳香環系の単一の炭素原子から１つの水素原子を除去することから誘導される芳香族炭化水素基をいう。ラジカルは、親環系の飽和または不飽和の炭素原子であり得る。アリール基は６－３０個の炭素原子を有し得る。アリール基は、単環（例えばフェニル）または複数の縮合環（融合された環）を有し得、ここで、少なくとも１つの環が芳香環である（例えば、ナフチル、ジヒドロフェナントレニル、フルオレニルまたはアントリル）。典型的なアリール基としては、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから誘導されるラジカルが挙げられるがこれらに限定されない。アリールは、アルキル基について上述したように、置換されていなくても置換されていてもよい。

【０１１４】

用語「ハロ」は、フロオロ、クロロ、ブロモおよびイオドをいう。同様に、用語「ハロゲン」はフッ素、塩素、臭素およびヨウ素をいう。

【０１１５】

用語「ハロアルキル」は、本明細書において規定されるような１つ以上のハロ基によって置換された、本明細書において規定されるようなアルキルをいい、これらは同一であっても異なってもよい。１つの実施形態において、ハロアルキルは、１個、２個、３個、４個または５個のハロ基で置換され得る。用語ハロアルキルとしてはまた、ペルフルオロ－アルキル基が挙げられる。例示的なハロアルキル基としては、例示の目的で以下が挙げられる：トリフルオロメチル、３－フルオロドデシル、１２，１２，１２－トリフルオロドデシル、２－ブロモオクチル、３－ブロモ－６－クロロヘプチル、１Ｈ，１Ｈ－ペルフルオロオクチルなど。ハロアルキルは、必要に応じてアルキル基について上述したように置換され得る。

【０１１６】

用語「ヘテロアリール」は、単環系、二環系または三環系として本明細書中に規定される。１つ、２つまたは３つの芳香環を含み、少なくとも１つの窒素原子、酸素原子またはイオウ原子を芳香環内に含んでおり、「置換された」の規定において上述したように、１つ以上、より特定には１－３個の置換基で置換されていなくても置換されていてもよい。典型的なヘテロアリール基は、２－２０個の炭素原子を含み、さらに１つ以上のヘテロ原子（ｈｅｔｏｅｒｏａｔｏｍ）を含む。ヘテロアリール基の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：２Ｈ－ピロリル、３Ｈ－インドリル、４Ｈ－キノリジニル、アクリジニル、ベンゾ［ｂ］チエニル、ベンゾチアゾリル、β－カルボリニル、カルバゾリル、クロメニル、シンノリニル、ジベンゾ［ｂ，ｄ］フラニル、フラザニル、フリル、イミダゾリル、イミジゾリル、インダゾリル、インドリシニル（ｉｎｄｏｌｉｓｉｎｙｌ）、インドリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ナフチリジニル、オキサゾリル、ペリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナルサジニル（ｐｈｅｎａｒｓａｚｉｎｙｌ）、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリ

ミジニル、ピリミジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、テトラゾリルおよびキサンテニル。１つの実施形態において、用語「ヘテロアリール」は、５個または６個の環原子（炭素および１個、２個、３個または４個のヘテロ原子を含む。）を含む単環の芳香環を示し、ヘテロ原子は、非過酸化の酸素、イオウおよびＮ（Ｚ）（ここで、Ｚは存在しないか、またはＨ、Ｏ、アルキル、アリールまたは（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）アルキルアリールである。）より独立して選択される。別の実施形態において、ヘテロアリールは、上記単環の芳香環から誘導される約８－１０個の環原子のオルト縮合した二環の複素環を示し、特に、ベンズ誘導体、またはプロピレン、トリメチレンもしくはテトラメチレンのジラジカルを上記単環の芳香環に融合することによって誘導される誘導体である。

【０１１７】

用語「複素環」は、飽和しているかまたは部分的に不飽和な環系をいい、酸素、窒素およびイオウからなる群より選択されるヘテロ原子の少なくとも１つを含み、必要に応じて用語「置換された」のもとで本明細書中に規定されるような基の１つ以上で置換されている。複素環は、１つ以上のヘテロ原始を含む単環、二環または三環の基であり得る。複素環基はまた、環に結合したオキソ基（＝Ｏ）またはチオキソ基（＝Ｓ）を含み得る。複素環基としての非限定的な例としては、以下が挙げられる：１，３－ジヒドロベンゾフラン、１，３－ジオキソラン、１，４－ジオキサン、１，４－ジチアン、２Ｈ－ピラン、２－ピラゾリン、４Ｈ－ピラン、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、インドリル、イソクロマニル、イソインドリニル、モルフォリン、ピペラジニル、ピペリジン、ピペリジル、ピラゾリジン、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピロリジン、ピロリン、キヌクリジンおよびチオモルホリン。

【０１１８】

用語「複素環」は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ，Ｌｏｅ Ａ.；Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗ. Ａ. Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６８）の特にＣｈａｐｔｅｒ １，３，４，６，７および９；Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ Ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｇｒａｇｈｓ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９５０～現在）に記載の複素環のモノラジカルを、例示の目的かつ非限定的に含み得る。１つの実施形態において、「複素環」は、本明細書中に記載されるような「炭素環」を含み得、ここで、１つ以上（例えば、１，２，３または４個）の炭素原子がヘテロ原子（例えば、Ｏ，ＮまたはＳ）と置き換えられている。

【０１１９】

例示の目的かつ非限定的な複素環の例としては、以下が挙げられる：ジヒドロピリジル（ｄｉｈｙｄｒｏｙｐｙｒｉｄｙｌ）、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオフェニル酸化イオウ、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、６ｈ－１，２，５－チアジアジニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル（ｉｎｄａｚｏｌｙ）、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、フテリジニル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イニダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルフォリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシ

インドリル、ベンズオキサゾリニル、イサチノイルおよびｂｉｓ－テトラヒドロフラニル。

【０１２０】

例示の目的かつ非限定的な炭素結合複素環は、以下で結合される：ピリジンの２，３，４，５または６位；ピリダジンの３，４，５または６位；ピリミジンの２，４，５または６位；ピラジンの２，３，５または６位；フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールまたはテトラヒドロピロールの２，３，４または５位；オキサゾール、イミダゾールまたはチアゾールの２，４または５位；イソキサゾール、ピラゾールまたはイソチアゾールの３，４または５位；アジリジンの２または３位；アゼチジン２，３または４位；キノリンの２，３，４，５，６，７または８位；イソキノリンの１，３，４，５，６，７または８位。炭素結合複素環としては、以下が挙げられる：２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、５－ピリジル、６－ピリジル、３－ピリダジニル、４－ピリダジニル、５－ピリダジニル、６－ピリダジニル、２－ピリミジニル、３－ピリミジニル、５－ピリミジニル、６－ピリミジニル、２－チアゾリル、４－チアゾリル、５－チアゾリルなど。

【０１２１】

例示の目的かつ非限定的な窒素結合複素環は、以下で結合される：アジリジン、アゼチジン、ピロールピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾールの１位；イソインドールまたはイソインドリンの２位；モルフォリンの４位；およびカルバゾールまたはβ－カルバゾールの９位。１つの実施形態において、窒素結合複素環としては、以下が挙げられる：１－アジリジル、１－アゼテジル、１－ピロリル、１－イミダゾリル、１－ピラゾリルおよび１－ピペリジニル。

【０１２２】

用語「炭素環」は、飽和しているか、飽和していないか、または芳香族の環をいい、これは、３－８個の炭素原子を単環として有しているか、７－１２個の炭素原子を二環として有しているか、約３０個までの炭素原子を多環として有している。単環式の炭素環は、典型的には、３－６個の環原子を有し、より典型的には、５－６個の環原子を有している。

【０１２３】

二環式の炭素環は、例えば、ビシクロ［４，５］系、［５，５］系、［５，６］系もしくは［６，６］系として配置された７－１２個の環原子、またはビシクロ［５，６］系もしくは［６，６］系として配置された９－１０個の環原子を有している。炭素環の例としては、以下が挙げられる：シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキサ－１－エニル、１－シクロヘキサ－２－エニル、１－シクロヘキサ－３－エニル、フェニル、スピリルおよびナフチル。炭素環は、必要に応じて上述したようなアルキル基に置換され得る。

【０１２４】

用語「アルカノイル」または「アルキルカルボニル」は、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒをいい、ここでＲは上記にて規定されるようなアルキル基である。

【０１２５】

用語「アクイロキシ」または「アルキルカルボキシ」は、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）Ｒをいい、ここでＲは上記にて規定されるようなアルキル基である。アクイロキシの例としては、アセトキシ、プロパノイロキシ、ブタノイロキシおよびペンタノイロキシが挙げられるがこれらに限定されない。上記にて規定されるような任意のアルキル基が、アクイロキシ基を形成するために使用され得る。

【０１２６】

用語「アルコキシカルボニル」は－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ（すなわち「ＣＯＯＲ」）をいい、

ここでＲは上記にて規定されるようなアルキル基である。

【０１２７】

用語「アミノ」は－ＮＨ$_2$をいう。アミノ基は必要に応じて、本明細書中にて規定される用語「置換された（置換されている）」のように置換され得る。用語「アルキルアミノ」は－ＮＲ$_2$をいい、ここで、少なくとも１つのＲがアルキルであり、第２のＲがアルキルまたはハロゲンである。用語「アクリルアミノ」はＮ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒをいい、ここで、各Ｒは独立してハロゲン、アルキルまたはアリールである。

【０１２８】

用語「アミノ酸」は、Ｄ型またはＬ型の天然のアミノ酸（例えば、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｈｙｌ，Ｈｙｐ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒおよびＶａｌ）の残基、ならびに非天然のアミノ酸（例えば、ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸；馬尿酸、オクタヒドロインドール－２－カルボン酸、スタチン、１，２，３，４，－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、α－メチル－アラニン、パラ－ベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパニルグリシン（ｐｒｏｐａｒｇｙｌｇｌｙｃｉｎｅ）、ザルコシンおよびｔｅｒｔ－ブチルグリシン）の残基を含む。この用語はまた、慣用的なアミノ保護基（例えば、アセチルまたはベンジルオキシカルボニル）を保有する天然および非天然のアミノ酸、ならびにカルボキシ末端で保護された天然および非天然のアミノ酸（例えば、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、フェニルまたはベンジルのエステルまたはアミド；あるいはα－メチルベンジルアミド）を含む。適切な他のアミノ保護基およびカルボキシ保護基は当業者に公知である（例えば、Ｇｒｅｅｎｅ，Ｔ．Ｗ．；Ｗｕｔｚ，Ｐ．Ｇ．Ｍ．　Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐｓ　Ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２^{ｎｄ}　ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９１）および本文献に引用されている参考文献を参照のこと）。

【０１２９】

用語「ペプチド」は、２－３５個のアミノ酸の配列（例えば、本明細書中以下に規定されるようなもの）またはペプチジル残基を記載する。この配列は直線であっても環状であってもよい。例えば、環状ペプチドは調製され得るか、または配列中の２つのシステイン残基の間のジスルフィド結合の形成により生じ得る。好ましくは、ペプチドは３－２０個または５－１５個のアミノ酸を含む。ペプチド誘導体は、米国特許番号第４，６１２，３０２号；同第４，８５３，３７１号；および同４，６８４，６２０号に開示されるように、または本明細書の以下の実施例に記載されるように調製され得る。本明細書中で列挙されるペプチド配列は特に、アミノ末端を左側に、カルボキシ末端を右側に記載されている。

【０１３０】

用語「サッカライド」は、糖または他の炭水化物、特に単糖をいう。サッカライドは、Ｃ$_6$－ポリヒドロキシ化合物（典型的には、Ｃ$_6$－ペンタヒドロキシ）およびしばしば環状のグリカン（ｇｌｙｃａｌ）であり得る。この用語は、公知の単糖およびその誘導体、ならびに２つ以上のモノサッカライド基を有するポリサッカライドを含む。サッカライドは、アミノ酸の規定において上述したように、そのヒドロキシル基に保護基を含み得る。サッカライドのヒドロキシル基は、１つ以上のハロまたはアミノ基と置換され得る。さらに、炭素原子の１つ以上が、例えば、ケトまたはカルボキシル基に酸化され得る。

【０１３１】

用語「割り込まれした（割り込まれている）（ｉｎｔｅｒｒｕｐｔｅｄ）」は、この用語を用いる表現においていわれる特定の炭素鎖の隣接する２つの炭素原子（および、このような炭素原子（例えば、メチル（ＣＨ$_3$）、メチレン（ＣＨ$_2$）またはメチン（ＣＨ））が結合しているハロゲン原子）の間に別の基が挿入されていて、その結果示された原子の正常な結合価の各々を上回らないこと、およびこの中断が適切な化合物を生じることを

示す。炭素鎖を中断し得る適切な基としては、例えば、以下が挙げられる：１つ以上の非過酸化物を有するオキシ（－Ｏ－）、チオ（－Ｓ－）、イミノ（－Ｎ（Ｈ）－）、メチレンジオキシ（－ＯＣＨ$_2$Ｏ－）、カルボニル（－Ｃ（＝Ｏ）－）、カルボキシ（－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－）、カルボキシルジオキシ（－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ－）、カルボキシラト（－ＯＣ（＝Ｏ）－）、イミン（Ｃ＝ＮＨ）、スルフィニル（ＳＯ）およびスルフォニル（ＳＯ$_2$）。アルキル基は上述した適切な基の１つ以上（例えば、１，２，３，４，５または約６個）で中断され得る。中断部位はまた、アルキル基の炭素原子とそのアルキル基に結合している炭素原子との間であり得る。

【０１３２】

１つ以上の置換を含む上記の基のいずれかのように、このような基は、任意の置換、あるいは立体的に実行不可能な置換パターン、および／または合成的に不可能な置換パターンを含まないことが、もちろん理解される。さらに、本発明の化合物は、これらの化合物の置換から生じる全ての立体異性体を含む。

【０１３３】

本明細書中に記載された化合物内に選択された置換基は、回帰的な程度に存在する。この文脈において、「回帰的な置換基」は、置換基がそれ自身の別の例を列挙し得ることを意味する。このような置換基の回帰的な性質のために、理論的には、多数が、任意の所定のクレームに存在し得る。医薬化学および有機化学の当業者は、このような置換基の総数が意図される化合物の所望の特性によって道理的に制限されることを理解する。このような特性としては、例示の目的でありかつ非限定的に、物理的特性（例えば、分子量、可溶性、またはｌｏｇＰ）、適用特性（例えば、意図される標的に対する活性）および実用的特性（例えば、合成容易性）が挙げられる。

【０１３４】

回帰的な置換基は、本発明の意図される局面である。医薬化学および有機化学の当業者は、このような置換基の多面性（ｖｅｒｓａｔｉｌｉｔｙ）を理解する。回帰的な置換基が本発明のクレームに存在する程度まで、その総数は上述されたように決定される。

【０１３５】

本明細書中で使用される場合、用語「リンカー」は、２つの化学基と一緒に共有結合している炭素鎖であり、必要に応じて自己切断し得るか、または酵素に対する基質に共有結合している場合はその酵素または別の分子によって切断され得る。この鎖は、必要に応じて１つ以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環またはペプチド結合によって中断されている。

【０１３６】

用語「ルシフェラーゼ」は、他で特に述べない限り、天然に存在するルシフェラーゼまたは変異体ルシフェラーゼをいう。天然に存在するものの場合、ルシフェラーゼは当業者によって容易に取得され得る。ルシフェラーゼが、天然に存在するもの、またはルシフェラーゼ－ルシフェリン反応における活性を保持している変異体の場合、ルシフェラーゼをコードするｃＤＮＡを発現するように形質転換された細菌、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などから、あるいはルシフェラーゼをコードする核酸からそのルシフェラーゼを生成するためのインビトロの無細胞系から、容易に取得され得る。ルシフェラーゼは、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓから入手可能である。

【０１３７】

本明細書中で使用される場合、「蛍光物質（蛍光団）（ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ）」は、ある波長範囲でエネルギーを吸収して、その吸収範囲以外の波長範囲でエネルギーを放出する分子を含む。用語「励起波長」は、蛍光物質がエネルギーを吸収する波長範囲をいう。用語「発光波長」は、蛍光物質がエネルギーまたは蛍光を放出する波長範囲をいう。

【０１３８】

本明細書中で使用される場合、「生物発光性（ｂｉｏｌｕｍｉｎｏｇｅｎｉｃ）アッセイ」または「生物発光性反応」は、非ルシフェラーゼ酵素とルシフェリンもしくはアミノ

ルシフェリンの誘導体との間の反応の生成物がルシフェラーゼの基質である反応、またはルシフェリンもしくはアミノルシフェリンの誘導体を有する非酵素的反応の生成物がルシフェラーゼの基質である反応を含み、あるいはルシフェラーゼとルシフェリンまたはアミノルシフェリンの誘導体との間の反応が生物発光性（すなわち、測定可能な量の光を生成する）であることを含む。

【０１３９】

本明細書中で使用される場合、「生物発光（ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）」は酵素と、光を生成する基質との間の反応の結果として生成される光である。このような酵素（生物発光酵素）の例としては、以下が挙げられる：ホタルルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、Ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ、ウミボタルルシフェラーゼ、アクエリンルシフェラーゼ、オベリン（ｏｂｅｌｉｎ）発光タンパク質など。

【０１４０】

本明細書中で使用される場合、「生物発光性アッセイ試薬」は、生物発光性反応のための、基質、ならびに補助因子またはタンパク質のような他の分子（例えば、酵素）などを含み得る。

【０１４１】

「反応混合物」は、特定の反応のための試薬の全てを含んでいても、その反応のための試薬の少なくとも１つが欠けていてもよい。例えば、ルシフェラーゼ反応混合物は、ルシフェラーゼに対する基質以外の、反応のための試薬を含み得、例えば、試験試料がルシフェラーゼ基質を有しているか否かを決定するに有用な反応混合物であってもよい。非ルシフェラーゼ酵素についての反応混合物は、検出されるべき分子以外の、その反応のための試薬の全てを含み得、例えば、反応混合物は、非ルシフェラーゼ酵素についての補助因子以外の全ての試薬を含み、そのため、この混合物は、試験試料中の補助因子の存在を検出するに有用である。

【０１４２】

本明細書中で使用される場合、「ルシフェリン誘導体」または「アミノルシフェリン誘導体」は、非ルシフェラーゼ酵素の基質、ルシフェラーゼのプロ基質、ルシフェラーゼの基質、非ルシフェラーゼ酵素の基質およびルシフェラーゼの基質である分子であり、すなわち、非酵素的反応において生成される分子を検出するに有用である。本発明の誘導体は、Ｄ－ルシフェリンまたはアミノルシフェリンの骨格の三環の１つ以上に１つ以上の修飾を有している、および／またはその三環の１つ以上に結合した置換基を有している（図１を参照のこと）。

【０１４３】

「蛍光性（ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ）アッセイ」または「蛍光性反応」は、非ルシフェラーゼと、非タンパク質分解酵素と、蛍光物質の誘導体との間の反応の生成物が蛍光（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ）である反応である。「蛍光性アッセイ試薬」は、蛍光性反応のための、基質、ならびに補助因子またはタンパク質のような他の分子（例えば、酵素）などを含み得る。よって、本発明は、試料の中にある、非プロテアーゼ酵素媒介反応（非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応）に関する分子の存在または量を、検出もしくは決定するための方法を提供する。

【０１４４】

〔ＩＩ．本発明の方法〕

本発明は、ルシフェリンもしくはアミノルシフェリンの誘導体、または蛍光物質の誘導体を使用して、１つ以上の分子（例えば、酵素、酵素反応のための補助因子（例えばＡＴＰ）、酵素基質、酵素阻害物質、酵素活性化物質またはＯＨラジカル）または１つ以上の状態（例えば酸化還元状態）を検出する、生物発光性の方法または蛍光性の方法を提供する。よって、本発明は、試料中の分子の量、活性または存在を検出するための生物発光性アッセイまたは蛍光性アッセイを提供する。

【０１４５】

本発明の方法は、例えば、少なくとも１つの分子の存在もしくは量、または試料中の状

態を決定するために使用され得る。試料としては、動物（例えば脊椎動物）、生理学的流体（例えば、血液、血漿、尿、粘液分泌物など）、細胞、細胞溶解物、細胞上清、または細胞の精製画分（例えば亜細胞画分）が挙げられるがこれらに限定されない。１つの実施形態において、本発明の方法は、単一の試料（例えば、細胞のアリコートまたはその溶解物）中の１つ以上の分子を検出するための迅速法を提供する。１つの実施形態において、本発明は、生物発光性アッセイにおける分子（例えば、酵素、基質または補助因子）の存在、量または比活性を定量化する工程、あるいは蛍光性アッセイにおける酵素、基質または補助因子の存在または量を定量化する工程を包含する。生物発光性シグナルまたは蛍光性シグナルの強度は、対応する分子の存在または量の関数である。さらに、反応物は、１つ以上の試験剤（例えば酵素阻害物質もしくは酵素活性化物質）および／または種々の濃度の阻害物質もしくは活性化物質を含み得る。１つの実施形態において、本方法は、少なくとも２つの異なる反応を使用し、第１の反応は、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応であり、第２の反応は、甲虫ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応である。別の実施形態において、第１の反応は、非酵素的反応であり、第２の反応は、甲虫ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応である。さらに別の実施形態において、本方法は、単一の反応（例えば、甲虫ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応または蛍光反応）を使用する。

【０１４６】

従って、生物発光性アッセイは、例えば、酵素媒介反応の補助因子、酵素、酵素基質、酵素の阻害物質、酵素の活性化物質の量、存在または比活性を直接的または間接的に検出（例えば測定）し得、あるいは状態を直接的または間接的に検出（例えば測定）し得る。例えば、１つの実施形態において、甲虫ルシフェラーゼおよびルシフェリン誘導体（甲虫ルシフェラーゼに対する基質）が、ＡＴＰ濃度を検出するための生物発光性アッセイにおいて使用され得る。別の実施形態において、非ルシフェラーゼ酵素に対する基質であるルシフェリン誘導体（例えば、モノアミンオキシダーゼに対する基質である誘導体）が、甲虫ルシフェラーゼに対する基質である生成物を生産し、そしてオキシダーゼを検出する生物発光性アッセイにおいて使用され得る。１つの実施形態において、この誘導体は、甲虫ルシフェラーゼのプロ基質であり、これは、ルシフェラーゼに対する基質である生成物を生産するが、自身は甲虫ルシフェラーゼとの反応において相当量の光を生成しない。いくつかの実施形態において、この酵素は、非ルシフェラーゼに対する基質であるか、または別の分子の検出に有用であり、そして相当量の光を生成するルシフェラーゼに対する基質である。この実施形態において、この誘導体は、ルシフェラーゼによって修飾されるが、通常、光生成反応において効果的ではない。

【０１４７】

１つの実施形態において、本発明は、１つ以上の非ルシフェラーゼ酵素を検出するための生物発光性アッセイを提供する。本方法は、１つ以上の非ルシフェラーゼ酵素または非ルシフェラーゼ媒介反応のための基質もしくは補助因子を有している可能性のある試料を、対応する反応混合物と接触させる工程を包含する。この反応混合物は、ルシフェリン誘導体または非ルシフェラーゼ酵素に対する基質であるアミノルシフェリン誘導体を含む。１つの実施形態において、この誘導体は、Ｄ－ルシフェリンのＡ環に修飾を有しているものであり、これは、非ルシフェラーゼ酵素（例えばホスファターゼ）に対する認識部位を含んでいる。別の実施形態において、この誘導体は、Ｄ－ルシフェリンのＢ環に修飾を有しているものであり、この誘導体は、ルシフェラーゼに対する基質またはルシフェラーゼに対するプロ基質である。別の実施形態において、この誘導体は、ルシフェリンのＣ環に修飾を有しているものであり、これは、目的の酵素（例えばアセチルコリンエステラーゼ）に対する認識部位を含んでいる。別の実施形態において、この誘導体は、複数の環の１つに修飾を有しているものであり、これは、目的の酵素に対する認識部位を含んでおり、そして、その間または他の環の１つ以上に更なる修飾を含んでいる。

【０１４８】

ルシフェリンに対する基質であり、必要に応じて非ルシフェラーゼ酵素もしくは他の分子の基質である誘導体について、この誘導体は、ルシフェリン、あるいはルシフェラーゼ

反応の補助因子、阻害物質もしくは活性化物質を検出するために使用され得る。この誘導体がルシフェラーゼに対するプロ基質である（すなわちこの誘導体と非ルシフェラーゼ酵素との間の反応の生成物がルシフェラーゼに対する基質である）場合、非ルシフェラーゼ酵素およびルシフェラーゼについての連続的または同時発生的な反応が行われ得る。例えば、プロ基質を含む非ルシフェラーゼ酵素についての反応が、単一のウエル内で行われ得、甲虫ルシフェラーゼ反応混合物がそのウエルに添加される。別の実施形態において、プロ基質を含む非ルシフェラーゼ酵素についての反応が、単一のウエル内で行われ得、異なるウエルに、その反応物の一部が添加される。この異なるウエルは、甲虫ルシフェラーゼ反応混合物を有している。あるいは、同一ウエル内で反応が同時に行われ得る。

【０１４９】

従って、本発明は、試料の中にある、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定する方法を提供する。本方法は、試料、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための第１反応混合物、および非ルシフェラーゼ酵素に対する基質であるルシフェリン誘導体を接触させて第１混合物を生じさせる工程、あるいはルシフェリンに対する基質である発光性生成物を含む第１混合物を提供する工程、あるいはそのような第１混合物を提供する工程を包含する。１つの実施形態において、この誘導体は、一般式式Ｉで示される化合物である。別の実施形態において、この誘導体は、一般式ＩＩで示される化合物である。第１混合物の少なくとも一部が、甲虫ルシフェリン媒介反応のための第２反応混合物と接触され、第２生成物が生産される。次いで、第２混合物中の発光が検出または決定され、これにより試料の中にある、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量が、検出もしくは決定される。いくつかの実施形態において、非ルシフェラーゼ反応混合物またはルシフェリン反応混合物は、例えば、誘導体と非ルシフェラーゼ酵素との間の反応の生成物はエステル基を有しており、この生成物はルシフェラーゼのプロ基質である場合、エステラーゼを含み得る。エステラーゼは第１反応混合物とともに含まれても、ルシフェラーゼ反応混合物の開始前に添加されても、ルシフェラーゼ反応混合物中に含まれてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、ピコリニルエステルを有する誘導体の場合、この誘導体と非ルシフェラーゼ酵素との間の反応生成物は、外因性に添加されたエステラーゼの非存在下でルシフェラーゼに対する基質である。１つの実施形態において、エステル修飾を有するルシフェリン誘導体は、これらの誘導体が非ルシフェラーゼ基質として改善された特性を有し得る場合、本発明の方法（例えば、シトクロームＰ４５０酵素を含む非ルシフェラーゼ酵素を検出する方法）において使用される。任意の機構によって結合されることは意図されないが、Ｃ環の第５位にエステル修飾を含有することは、負電荷をブロックし得るか、または誘導体に脂肪親和性の特性を付与して誘導体を改善された基質にし得る。

【０１５０】

さらに、試料の中にある、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定する方法が提供される。本方法は、試料と、非ルシフェラーゼ媒介反応およびルシフェリン媒介反応のための反応混合物と、非ルシフェラーゼ酵素に対する基質であるルシフェリン誘導体とを接触させて混合を生じさせる工程を包含する。非ルシフェラーゼ酵素と誘導体との間の反応は、ルシフェラーゼに対する基質である発光性生成物を生成する。１つの実施形態において、誘導体は一般式Ｉで示される化合物である。別の実施形態において、誘導体は一般式ＩＩで示される化合物である。混合物中の発光が検出または決定され、これにより、試料の中にある非ルシフェラーゼ媒介反応のための分子の存在または量が、検出もしくは決定される。

【０１５１】

本発明はさらに、試料の中にある、ルシフェラーゼ媒介反応のための分子の存在または量を、検出もしくは決定する方法を提供する。本方法は、試料と、甲虫ルシフェラーゼのための反応混合物と、ルシフェラーゼに対する基質であるルシフェリン誘導体とを接触させて反応物を生じさせる工程を包含する。本発明はまた、試料中の分子の存在または量を検出する方法を提供する。本方法は、試料と、非酵素媒介反応のための第１反応混合物と

、上記分子の存在下でルシフェラーゼに対する基質であるルシフェリン誘導体とを接触させる工程、次いで、第１反応物の少なくとも一部と、ルシフェラーゼ媒介反応のための第２反応混合物とを接触させて第２反応物を生じさせる工程を包含する。第２反応物中の発光が検出または決定され、これにより、分子の存在または量が検出または決定される。例えば、試料と、非酵素媒介反応のための第１反応混合物と、甲虫ルシフェラーゼに対する基質である発光性生成物を上記分子の存在下で生成するルシフェリン誘導体とを有する混合物が提供される。第１反応物の少なくとも一部と、甲虫ルシフェラーゼ媒介反応のための第２反応混合物とが混合されて第２反応混合物が生成され、次いで、第２混合物中の発光が検出または決定され、これにより、分子の存在または量が検出または決定される。

【０１５２】

より低いバックグラウンドを有するルシフェリン誘導体を使用する、本明細書中に記載の生物発光性アッセイについて、これらのアッセイは、より少ない（またはより多い）量の誘導体を使用し得、これらの誘導体は、例えば、非ルシフェラーゼ酵素とともに、改善された反応性を有し得る。さらに、本明細書中に記載の生物発光性アッセイのいずれかについて、他の試薬が反応混合物に添加され得る。このような試薬として、ルシフェリンの不活性化を阻害または阻止する試薬、あるいは発光シグナルを拡大または増強する試薬が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１５３】

また、非ルシフェリン酵素媒介反応の調節物質の能力を同定または測定する方法が提供される。本方法は、１つ以上の作用物質と、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための第１反応混合物と、非ルシフェラーゼ酵素に対する基質であるルシフェリン誘導体とを接触させて第１混合物を生じさせる工程、あるいはそのような混合物を提供する工程を包含する。ここで、この誘導体は、Ｄ－ルシフェリンに関してＡ環またはＢ環に修飾を含有している。１つ以上の作用物質の非存在下での第１混合物は、甲虫ルシフェラーゼに対する基質である発光性生成物を含んでいる。第１反応物の少なくとも一部と、甲虫ルシフェラーゼ媒介反応のための第２反応混合物とが混合され、第２反応物が生成される。第２混合物中の発光がコントロール混合物と比較され、これにより１つ以上の作用物質が非ルシフェラーゼ媒介反応を調節するか否か、および／またはどの程度でどのような能力を有しているのか否かが同定される。

【０１５４】

本発明の１つの実施形態において、試験化合物がスクリーニングされ得、そして本発明のルシフェリンおよび蛍光物質の誘導体を使用することによって、酵素的反応または非酵素的反応の基質もしくは補助因子または調節因子（阻害物質または活性化物質のいずれか）としてのこれらの活性が評価され得る。試験化合物の非存在下において生物発光、蛍光または生物発光性生成物を生成する条件下で反応混合物を誘導体または試験化合物と接触させることにより、候補化合物は、反応の調節因子または基質であることが決定され得る。

【０１５５】

本発明の１つの局面において、基質と反応の阻害物質との間を区別する方法が提供される。例えば、酵素の阻害物質または基質の非存在下でルシフェリン誘導体と酵素との間の相互作用を適切にし得る条件下でルシフェリン誘導体を提供する前に化合物の代謝を可能にする条件下で、化合物が、少なくとも１つの酵素とインキュベートされる。１つの実施形態において、この反応の生成物は、ルシフェラーゼの基質であり、ルシフェラーゼの存在下で光を発する第２反応をもたらす。生じた発光反応は、酵素の阻害物質の非存在下でルシフェリン誘導体と酵素との間の相互作用を適切にし得る条件下で、酵素を化合物および誘導体と接触させることにより得られたものと比較される。酵素による化合物の代謝は、アッセイ媒体中のその濃度を減少させ、化合物の代謝がない条件と比較して阻害活性の明らかな損失を導き得、このことは、それが酵素の基質であることを示す。代謝されない阻害化合物は、基質の添加時期に関係なく、同等の能力を示す。

【０１５６】

本発明の１つの局面において、化合物は、先ず、予め決定された第１の期間にわたって酵素と接触される。その後、この混合物は、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、同時発生または同時進行で接触され、この混合物は、予め決定された第２の期間にわたってインキュベートされる。

【０１５７】

発明の別の局面において、化合物は、予め決定された第１の期間にわたって酵素とインキュベートされて第１の混合物を形成する。その後、第１の混合物は、ルシフェリン誘導体と接触されて、予め決定された第２の期間にわたってインキュベートすることを可能にする第２の混合物を形成する。次いで、第２の混合物は、生物発光酵素（例えば、ルシフェラーゼ）と接触されて、予め決定された第３の期間にわたってインキュベートすることを可能にする第３の混合物を形成する。その後、酵素と化合物との相互作用から生じた活性が、予め決定された第３の期間の間および／またはこの期間の後の蛍光を測定することによって、コントロール（例えば、化合物なし）と比較して決定される。この方法において、例えば、第１の酵素についてのメカニズムに基づく阻害物質が同定され、非メカニズム（ｎｏｎｍｅｃｈａｎｉｓｍ）に基づく阻害物質と区別され得る。なぜなら、試験化合物を有するがルシフェリン誘導体を有さない第１のインキュベーションが、メカニズムに基づく阻害物質による、より深い阻害を導き、第１の反応における第１のインキュベーションなしまたは基質なしで観察されるものよりも、低減した阻害を示すからである。

【０１５８】

本発明の別の実施形態において、化合物をスクリーニングして細胞の酵素活性に与えるその影響を決定するための、細胞に基づく方法が提供される。試験化合物が、予め決定された期間にわたって、天然に酵素を有するかまたは組換え発現を介して酵素を有する細胞、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）と接触されるか、あるいは、酵素およびルシフェラーゼを有する細胞、ならびにルシフェリン誘導体と接触される。よって、１つの実施形態において、一過性または安定的にリコンビナント酵素（例えば、生物発光酵素（例えばルシフェラーゼ））を発現する細胞が利用され得る。一過性または安定的にトランスフェクトされた細胞を作成するための任意の慣用的方法が使用され得る。１つの実施形態において、ルシフェリン誘導体が細胞と接触されて、細胞内に拡散する。そして、適切な分子が存在する場合、ルシフェラーゼに対する基質である生成物をもたらす。ルシフェラーゼが細胞内に存在する場合、発光が検出され得る。あるいは、ルシフェラーゼを欠く細胞において、生成物は、細胞から媒体に出て、その媒体に、ルシフェラーゼ反応混合物が添加される。その後、細胞と化合物との相互作用により生じた活性が、反応混合物中の発光をコントロール（試験化合物なし）反応混合物中の発光と比較して測定されることによって決定される。

【０１５９】

本発明の１つの局面において、化合物は、好ましくは、先ず、予め決定された期間にわたって細胞と接触される。その後、細胞は、ルシフェリン誘導体およびルシフェラーゼと同時発生または同時進行で接触され、この混合物は、予め決定された第２の期間にわたってインキュベートされ得る。反応混合物から生成された発光の量を、コントロール反応混合物（例えば、試験化合物なし）と比較して測定することによって、酵素活性が決定される。本発明の別の局面において、試験化合物は、好ましくは、先ず、予め決定された期間にわたって細胞と接触される。その後、曝露された細胞は、次いで、ルシフェリン誘導体と接触され、予め決定された第２の期間にわたってインキュベートされる。次いで、細胞は、ルシフェラーゼと接触されて第３の混合物を生成する。これは、予め決定された第３の期間にわたってインキュベートすることを可能にする。その後、細胞と試験化合物との相互作用により生じた細胞の活性が、反応混合物中の発光を、コントロール反応混合物（例えば、試験化合物なし）中の発光と比較して測定することによって、決定される。界面活性剤の添加は、細胞を破壊し得、細胞内容物を放出し得る。

【０１６０】

細胞培地中に存在する分子（例えば、細胞培地中に活性に存在する分子、または不活性

なメカニズムを介して存在する分子）に対する細胞に基づく発光検出アッセイは、ルシフェリン誘導体を有する反応混合物を細胞培地に添加する工程、またはルシフェリン誘導体を有する反応混合物に細胞培地を添加する工程、および発光を検出する工程を含み得る。

【０１６１】

本発明の細胞に基づくアッセイのなお別の実施形態において、細胞は、適切な溶解緩衝液中に溶解され得る。動物細胞については、０．１－１．０％の非イオン性界面活性剤（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ　１００またはＴｅｒｇｉｔｏｌ）を有する緩衝液が、典型的である。細菌、植物、真菌または酵母細胞は、通常溶解することがより困難である。界面活性剤、凍結／融解サイクル、低張性の緩衝液、超音波処理、キャビテーションまたはこれらの方法の組合せが用いられ得る。溶解物を生成する溶解法は、ルシフェラーゼまたは他の酵素の活性、あるいは他の分子または状態の検出と適合可能である。

【０１６２】

非ルシフェラーゼ酵素の存在または活性が、細胞培地中で増殖する細胞において、または動物（例えば、生存する動物）中の細胞において測定され得る。動物における細胞内の測定のために、ルシフェリン誘導体が動物に投与され得る（例えば、動物に注射されるか、または動物によって消費される水溶液（例えば、水）もしくは食品に添加されるか）。誘導体からルシフェラーゼ基質である生成物への変換は、動物における細胞（例えば、トランスジェニック細胞）内に発現されるルシフェラーゼによって媒介される発光によって、動物に投与（例えば、動物に注射）されたルシフェラーゼによって媒介される発光によって、あるいは、体液（例えば、血液、血漿、尿など）または組織の試料を収集してこれらをルシフェラーゼ試薬と合わせることによって、検出され得る。

【０１６３】

１つの実施形態において、本方法において使用される誘導体は、以下ではない：アミノルシフェリン（これは、アミノ基でペプチド結合を介して、プロテアーゼ基質を含むように修飾されており、必要に応じて、保護されたカルボキシル基も環Ｃの５位に有している。）、あるいは、任意のルシフェリン６’メチルエステル、ルシフェリン６’クロロエチルエステル、６’デオキシルシフェリン、６’ルシフェリン　４－トリフルオロメチルベンジルエステル、ルシフェリン６’フェニルエチルエステル、ルシフェリン６’ゲラニルエステル、ルシフェリン６’エチルエステル、６’ルシフェリンプレニルエステル、６’ルシフェリン　２－ピコニリルエステル、６’ルシフェリン　３－ピコニリルエステル、６’ルシフェリン　４－ピコニリルエステル、ルシフェリン６’ベンジルエステル、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－β－ガラクトピラノシド、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－スルフェート、Ｄ－ルシフェリン－Ｏ－ホスフェート、Ｄ－ルシフェリル－Ｌ－フェニルアラニン、およびＤ－ルシフェリル－Ｌ－Ｎ$^{\alpha}$－アルギニン。１つの実施形態において、本方法において使用される誘導体は、米国特許出願公開２００４０１７１０９９号（この文献の開示は、本明細書において参考として援用される。）に開示されるルシフェリン誘導体ではない。

【０１６４】

２つの反応を使用するアッセイは、タンパク質（ペプチドまたはポリペプチド）（例えば、酵素、基質、補助因子、酵素反応に対する阻害物質もしくは活性化物質、または状態（例えば、酸化還元状態）を含む、１つ以上の部分を検出するために、同時に（１工程で）または連続的に（２工程で）行われ得る。連続的な反応が、同一の容器（例えば、マルチウェルプレートのウェル）内で行われ得る。２工程のアッセイのために、第１の反応混合物は、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応のための全ての試薬、または全て未満の試薬を含み得る。ここで、存在しない１つ以上の試薬は、試料中で検出されるべきもの（例えば、細胞溶解物）である。例えば、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応は、非ルシフェラーゼの基質でありかつルシフェラーゼのプロ基質であるルシフェリン誘導体を、ルシフェラーゼの基質である生成物に変換するに効果的な条件下で行われる。第１の反応は、ルシフェラーゼ反応混合物の添加時または添加前にクエンチされ得る。例えば、第１の反応のクエンチャーは、ルシフェラーゼ反応混合物中に存在し得る。ルシフェラーゼ反応混合物は、好ましくは、ルシフェラーゼに対する基質を実質的に欠き、例えば、ルシフ

ェラーゼに対する基質の供給源のみが、非ルシフェラーゼ酵素と誘導体との間の反応によって提供される。第１の反応のための試薬の全てが第１反応混合物中に存在する場合、アッセイを使用して、反応を変更する部分（例えば、反応の阻害物質またはエンハンサー）を同定する。反応を行った後、同時にか連続的にかのいずれかで、１つ以上の分子または反応の１つ以上の阻害物質もしくは活性化物質の存在または量が、どの程度であるか、および／またはどのような能力を有しているのかを検出または決定される。

【０１６５】

１工程アッセイについて、反応混合物は、２つの反応のための試薬（例えば、非ルシフェラーゼ酵素に媒介される反応およびルシフェラーゼ媒介反応のための試薬、または非酵素的反応およびルシフェラーゼ媒介反応のための試薬）、あるいは単一反応（例えば、特定の酵素の基質である蛍光物質の誘導体とその酵素との間の反応、またはルシフェラーゼ媒介反応（例えば、ルシフェラーゼが試験されるべき試料中に懸濁されている））のための反応混合物を含み得る。

【０１６６】

２つの反応を利用するアッセイについて、そのアッセイのために添加する分子のオーダーは変更され得る。（同一の容器内であるか否かにおいて）連続的に開始され実施される場合、反応条件（例えば、試薬濃度、温度またはさらなる試薬）に対する調整が行われ得る。例えば、クエンチング剤または増強剤が、反応の間で添加され得る（例えば、米国特許第５，７７４，３２０号および同第６，５８６，１９６号（これらの開示は本明細書中において参考として特に援用される。）を参照のこと）。１つの実施形態において、２つ以上の反応が、単一の反応混合物中で同時に行われる。必要に応じて、このようなアッセイは同質のアッセイであり、例えば、成分が混合されて、次いでその混合物が試料に添加される。試薬をさらに移すことなく結果が読み取られ得る。

【０１６７】

よって、本発明のアッセイは、試料中での１つ以上の分子または状態の検出を可能にする。試料としては、例えば、真核生物細胞（例えば、酵母細胞、鳥類細胞、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞（ヒト、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ヤギまたはブタの細胞が挙げられるがこれらに限定されない。）または原核生物細胞、あるいは２つ以上の異なる組織由来の細胞、または細胞溶解物もしくはその上清）を含む試料、分子の精製形態（例えば、標準曲線を準備するに有用な、精製された非ルシフェラーゼ酵素）を含む試料が挙げられる。細胞は、組換え技術を介して遺伝学的に修飾されていなくてもよく、リコンビナント細胞であってもよい。リコンビナント細胞は、リコンビナントＤＮＡで一過性にトランスフェクトされている、および／または、そのゲノムがリコンビナントＤＮＡで安定に増大されている、あるいはそのゲノムが修飾されて遺伝子が破壊されている（例えば、プロモータ、イントロンまたはオープンリーディングフレームが破壊されている）、あるいはあるＤＮＡフラグメントが別のものと置換されている。リコンビナントＤＮＡまたは置換ＤＮＡフラグメントは、本発明の方法によって検出されるべき分子、または検出されるべき分子のレベルもしくは活性を変更する部分、ならびに／あるいはその分子またはその分子のレベルもしくは活性を変更する部分に関係のない遺伝子産物をコードし得る。

【０１６８】

本発明の方法は、酵素媒介反応、非酵素媒介反応または状態のための分子を検出するために利用され得る。例えば、本方法によって検出されるべき分子または状態としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：酵素（例えば、デメチラーゼ、オキシダーゼ（例えば、ＭＡＯ）、デアセチラーゼ、デホルミラーゼ、プロテアーゼ（プロテオソーム、カルパイン、β－セクレターゼ、カゼプシン、カルパイン、スロンビン、グランザイムＢ）、ホスファターゼ、キナーゼ、ペルオキシダーゼ、トランスフェラーゼ（例えば、ＧＳＴ）、スルフォターゼ、β－ラクタマーゼ、シトクロムＰ４５０酵素、エステラーゼ（例えば、アセチルコリンエステラーゼ）、デヒドロゲナーゼ、ルシフェラーゼ）、酵素媒介反応の基質、阻害物質、補助因子もしくは活性化物質、反応性酸素種、還元状態、および

転写調節因子（すなわち遺伝子転写の調節因子）。本方法において利用される酵素（検出されるべき酵素、または基質もしくは補助因子を検出するに有用な酵素）としては、リコンビナント酵素および内因性（ネイティブ）酵素を含む酵素の任氏の組合せから選択され得る。１つの実施形態において、検出されるべき酵素は、内因性の酵素である。別の実施形態において、酵素はリコンビナント酵素である。当業者に明らかな他の組合せが、本アッセイおよび本明細書中の教示に従う方法において使用され得る。酵素としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：プロテアーゼ、ホスファターゼ、ペリオキシダーゼ、スルファターゼ、ペプチダーゼ、オキシダーゼ、デアルキラーゼ、デホルミラーゼおよびグリコシダーゼ。酵素は、ヒドロラーゼ、オキシドレダクターゼ、リアーゼ、トランスフェラーゼ（例えば、グルタチオンＳトランスフェラーゼ）、イソメラーゼ、リガーゼ、またはシンターゼであり得る。特に目的の酵素は、生理学的な重要性を有している酵素のクラスである。これらの酵素としては、タンパク質ペプチダーゼ、エステラーゼ、タンパク質ホスファターゼ、グリコシダーゼ、プロテアーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシダーゼ、オキシゼナーゼ、レダクターゼ、メチラーゼなどが挙げられる。いくつかのプロテアーゼの切断部位の例示が図２に示される。目的の酵素としては、エステル生成またはエステル加水分解、有機および無機の両方、グリコシル化、およびアミドの加水分解に関与するものが挙げられる。いくつかのクラスにおいて、さらに再分され得る。

【０１６９】

特に、本発明において有用な酵素としては、酵素活性を示す任意のタンパク質（例えば、リパーゼ、ホスホリパーゼ、スルファターゼ、ウレアーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼおよびエステラーゼ）が挙げられ、酸ホスファターゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ガラクトシダーゼ、カルボキシルエステラーゼおよびルシフェラーゼを含む。１つの実施形態において、酵素は加水分解酵素である。加水分解酵素の例示としては、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、エステラーゼ、デカルボキシラーゼ、ホスホリパーゼＤ、Ｐ－キシローシダーゼ、β－Ｄ－フコシダーゼ、チオグルコシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、α－Ｄ－ガラクトシダーゼ、α－Ｄ－グルコシダーゼ、β－Ｄ－グルコシダーゼ、β－Ｄ－グルクロニダーゼ、α－Ｄ－マンノシダーゼ、β－Ｄ－マンノシダーゼ、β－Ｄ－フルクトフラノシダーゼ、およびβ－Ｄ－グルコシデュロナーゼ。

【０１７０】

１つの実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるような式ＩＩＩまたはＩＩＡの化合物の使用を提供する。

【０１７１】

１つの実施形態において、酵素（例えば、非タンパク質分解酵素）は、蛍光物質に共有結合した基質を用いて検出される。１つの実施形態において、基質は、酵素の認識部位を含む。適切な酵素または補助因子の非存在下において、このような基質を含む混合物は、例えば、クエンチ基の近接によって蛍光物質の蛍光特性がクエンチされているように、発光波長で最低限の光を生成する。適切な酵素の存在下において、接合体（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）の切断が蛍光をもたらす。

【０１７２】

〔ＩＩＩ．ルシフェリン誘導体〕

１実施の形態において、ルシフェリンまたはアミノルシフェリンの誘導体は、次の構造：Ｌ－Ｘ－Ｍ－Ｙ－Ｒ（一般式ＩＶで示される化合物）を有している。ここで、Ｌは、存在する場合に、酵素の基質であってもよいし、または酵素と相互作用する別の分子であってもよい。；Ｘは、Ｏ、ＮＨ、またはリンカー（例えば、ＬがＬ－Ｘ－Ｍ－Ｙ－Ｒの構造から除去された後、Ｍ－Ｙ－Ｒを生じるように自発的に切断する自己切断可能なリンカー）であってもよい。；Ｍは、ルシフェリン、キノリニルルシフェリンまたはナフチルルシフェリン（Ｘ＝Ｏ）、あるいは、アミノルシフェリンまたはアミノキノリニルルシフェリン（Ｘ＝ＮＨ）であってもよい。；Ｙは、Ｏ（エステル）、ＮＨ（アミド）、ＮＨ－ＮＨ（ヒドラジド）、または、Ｓ（チオエステル）であってもよい。；そして、ここで、Ｒは、存在する場合に、アルキル、芳香族分子、ペプチド、オリゴヌクレオチド、または酵素

の基質に結合した自己切断可能なリンカーであってもよい。１実施の形態において、誘導体は、ＬまたはＲに酵素（例えば、Ｐ４５０酵素、プロテアーゼ、ＭＡＯ、ＦＭＯもしくはＧＳＴ）の基質を含むように修飾されていてもよい。１実施の形態において、本発明の誘導体は、６－アミノキノリニルルシフェリンを含んでいるルシフェリンの基質である。前記６－アミノキノリニルルシフェリンは、光の出力が大きいルシフェリンの基質である。

【０１７３】

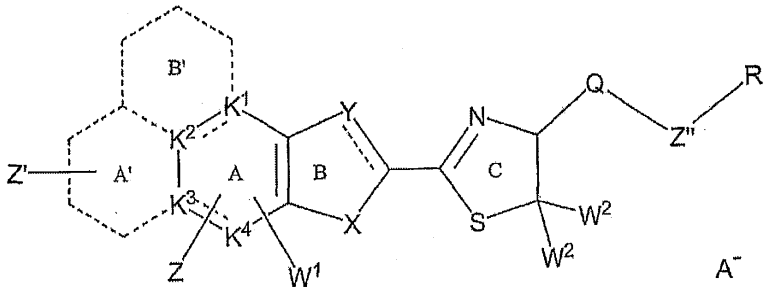
本発明によれば、生物発光の基質は、ルシフェリンまたはアミノルシフェリンの誘導体であって、すなわち、ルシフェリンまたはアミノルシフェリン以外の基質であり、以下に述べられた一般式（例えば一般式Ｉ、一般式ＩＩ）を備えている化合物を含んでいる。

【０１７４】

１実施の形態において、本発明は、一般式Ｉ：

【０１７５】

【化７】



Ｉ

（式中、

Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、または、ＣＨを表し；

ＹがＮを表すときに、ＸはＳを表さず；

ＸはＳ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨ、または、ＣＨ＝Ｎを表し；

ＸがＳを表すときに、ＹはＮを表さず；

ＺおよびＺ’は独立して、Ｈ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；

Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｑは、カルボニル、または、ＣＨ$_2$を表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；あるいは、

Ｗ^{1}およびＺは、両方とも環Ａ上のケト基を表し、環Ａにおいて任意の２重結合を表している破線の少なくとも１つが、存在しておらず；

各Ｗ^{2}は独立して、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_4$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシを表し；

各Ｋ^1、Ｋ^2、Ｋ^3、およびＫ^{4}は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルを表し、Ｋ^{1}とＫ^{2}との間の破線およびＫ^{3}とＫ^{4}との間の破線は、任意の２重結合を表し；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが化合物に存在しており；

Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、

Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

各Ｒは独立して、Ｈ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_6$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_1$－

C_{20}）アルキルスルホニル、（C_6－C_{30}）アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（C_1－C_{20}）アルキルスルフィニル、（C_6－C_{30}）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、アミノ、NH（C_1－C_6）アルキル、N（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、トリ（C_1－C_{20}）アンモニウム（C_1－C_{20}）アルキル、ヘテロアリール（C_1－C_{20}）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（C_6－C_{30}）アリールチオ、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6－C_{30}）アリールホスフェート、（C_6－C_{30}）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくは、サッカライドを表すか、または、Z’’が酸素を表すときに任意のM^+（ここでMは、アルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ZまたはZ’がNR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているNと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または、複素環基は、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－$COOR^X$、－SO_2R^X、－SO_3R^X、ニトロ、アミノ、（C_1－C_{20}）アルキル－S（O）－、（C_1－C_{20}）アルキル－SO_2－、ホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、NH（C_1－C_6）アルキル、NH（C_1－C_6）アルキニル、N（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、N（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝O、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のR基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^Xは、H、（C_1－C_6）アルキル、または、（C_6－C_{30}）アリールを表し；

ZまたはZ’が窒素部分を含有しているときに、前記ZもしくはZ’の窒素部分の１つまたは両方の水素は、（C_1－C_{20}）アルキル、または、L基によって置き換えられてもよく（ここで、Lはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）；ただし、Lがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルを表すときに、W^2の少なくとも１つはHを表さず；

Zがヒドロキシル基または窒素部分を表すときに、前記ヒドロキシル基または窒素部分のHは、（HO）$_2$P（O）－OCH_2－、スルホ、または－PO_3H_2により、あるいは、１－約１２の炭素原子の炭素鎖を介してZ基に結合したセファロスポラニン酸により、置き換えられてもよく；ただし、環Bが、チアゾール環を表すときに、前記スルホ基または前記－PO_3H_2基は、（C_1－C_6）アルキレン基を介してヒドロキシル基の酸素に結合しており；

ZまたはZ’がヒドロキシル基または窒素部分を表すとき、あるいは、Z’’－Rがヒドロキシル基を表すときに、前記ヒドロキシル基または窒素部分の１つのHは、L’基－リンカー（ここで、L’は、前記リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、置換されていてもよい芳香環、または、ペプチド結合により割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはNH基を介して、L’に結合しており、リンカーのもう１つの端末は、Z基、Z’基、または、Z’’－R環基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；

ZがORを表すときに、一般式Ｉで示される化合物は、一般式Ｉで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C_1－C_{12}）アルキルジラジカルを含有しているリ

ンカーを介して、２つの環Ａにおいて結合した２量体であってもよく（ここで、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは複素環基により割り込まれていてもよく、一般式Ｉの化合物の２量体に結合している各Ｚ基のＲ基は、前記架橋により置き換えられている）；

Ａ$^{-}$はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；

環Ａおよび環Ｂが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成するときに、Ｗ^{1}は水素を表さず；

環Ａの置換基がＯＨを表すときに、－Ｑ－Ｚ’’－Ｒは、－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－ＮＨ$_{2}$を表さず；

ＹがＮまたはＣＨを表し、ＸがＣＨ＝ＣＨを表し、Ｗ^{1}がＨを表すときに、ＺはＫ^{3}に結合したＯＨを表さず；

ＹがＮまたはＣＨを表し、ＸがＣＨ＝ＣＨを表し、ＺがＨを表すときに、Ｗ^{1}はＫ^{3}に結合したＯＨではない）

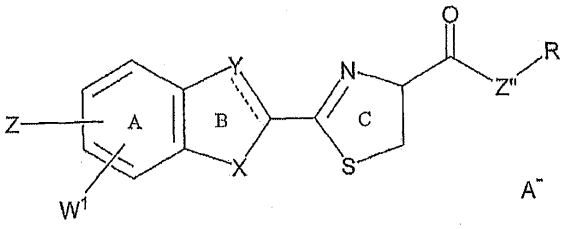
で示される化合物、または、その塩を提供している。

【０１７６】

もう１つ別の実施の形態において、本発明は、一般式ＩＡ：

【０１７７】

【化８】



IA

（式中、

Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、または、ＣＨを表し；

ＹがＮを表すときに、ＸはＳを表さず；

ＸはＳ、Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、Ｎ＝ＣＨ、または、ＣＨ＝Ｎを表し；

ＸがＳを表すときに、ＹはＮを表さず；

ＺはＨ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；

Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、または、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシを表し；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

各Ｒは独立して、Ｈ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルフィニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アンモニウム（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールチオ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスフェート、（Ｃ$_{1}$－

C_{20}）アルキルホスホネート、（C_6－C_{30}）アリールホスフェート、（C_6－C_{30}）アリールホスホネート、ホスフェート、サルフェート、もしくはサッカライドを表すか、または、Z’’が酸素を表すときに任意のM^+（ここで、Mはアルカリ金属を表す）を表すか；あるいは、

ZまたはZ’が、NR^1R^1を表すときに、R^1R^1は、それらが結合しているNと一緒にヘテロアリール基、または複素環基を形成しており；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または複素環基は、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－$COOR^X$、－SO_2R^X、－SO_3R^X、ニトロ、アミノ、（C_1－C_{20}）アルキル－S（O）－、（C_1－C_{20}）アルキル－SO_2－、ホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、NH（C_1－C_6）アルキル、NH（C_1－C_6）アルキニル、N（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、N（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝O、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は１－３のR基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^Xは、H、（C_1－C_6）アルキル、または、（C_6－C_{30}）アリールを表し；

A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；

環Aおよび環Bが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成するときに、W^1は水素を表さず；

環Aの置換基がOHを表すときに、－Q－Z’’－Rは、－C（O）－NH－NH_2を表さず；

YがNまたはCHを表し、XがCH＝CHを表し、W^1がHを表すときに、Zは環Aの６位の炭素に結合されたOHを表さず；

YがNまたはCHを表し、XがCH＝CHを表し、ZがHを表すときに、W^1は環Aの６位の炭素に結合されたOHではない）

で示される化合物、またはその塩を提供している。

【０１７８】

一般式ＩとＩＡとによって例証されたように、環Aと環Bとの中心構造は、多くの異なった環系であってもよい。環Bを修飾することによって、中心構造がベンゾフラン、ベンゾチオフェン、ベンゾオキサゾール、ナフタレン、キノリン、イソキノリン、キナゾリン、およびキノキシリン（ｑｕｉｎｏｘｙｌｉｎｅ）環系を含むことができる。前記環Bの修飾は、対応しているN－酸化物、およびN－アルキル誘導体を含んでいる。また、環Bの修飾によって、ベンゾ［ｄ］チアゾールのN－酸化物およびN－アルキルの誘導体を入手することが可能になる。さらに、一般式Ｉにおける環Aの炭素原子をN、N－酸化物、またはN－アルキルで置換することにより（例えば、K^1、K^2、K^3、または、K^4の値（ｖａｌｕｅ）の１つを、もう１つ別の値の代わりに用いることにより）、他の環系（１，８－ナフチリジン、１，７－ナフチリジン、１，６－ナフチリジン、および１，５－ナフチリジン環系；ピリド［３，２－ｂ］ピラジン、ピリド［４，３－ｂ］ピラジン、ピリド［３，４－ｂ］ピラジン、およびピリド［２，３－ｂ］ピラジン環系；ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン、ピリド［３，４－ｄ］ピリミジン、ピリド［４，３－ｄ］ピリミジン、およびピリド［３，２－ｄ］ピリミジン環系；ベンゾ［ｄ］オキサゾール、オキサゾロ［４，５－ｂ］ピリジン、オキサゾロ［４，５－ｃ］ピリジン、オキサゾロ［５，４－ｃ］ピリジン、およびオキサゾロ［５，４－ｂ］ピリジン環系；ならびに、チアゾロ［４，５－ｂ］ピリジン、チアゾロ［４，５－ｃ］ピリジン、チアゾロ［５，４－ｃ］ピリジン、およびチアゾロ［５，４－ｂ］ピリジン環系など）を得ることができる。

【０１７９】

また、環Ａの２位の炭素原子をＮ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－アルキルで置換することにより、上述したそれぞれの環系に対応している環Ａの類似物のピラジン、ピラミジン、および、ピリダジンを得ることができる、ということも、一般式Ｉは例証している。一般式Ｉの環Ａの３位の炭素原子をＮ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－アルキルで置換することは、対応している１，２，４－トリアジン環系誘導体を入手することができる。

【０１８０】

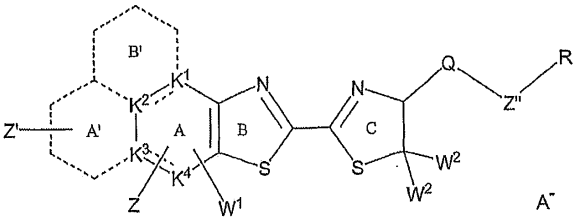
一般式ＩおよびＩＡは、各環系の様々なジヒドロ、テトラヒドロ、および、ヘキサヒドロの誘導体をさらに含んでいる。

【０１８１】

もう１つ別の実施の形態において、本発明は一般式ＩＩ：

【０１８２】

【化９】



II

（式中、

ＺおよびＺ’は独立して、ＯＲ^{1}、ＮＨＲ^{1}、または、ＮＲ^{1}Ｒ^{1}を表し；

Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｑはカルボニル、または、ＣＨ$_{2}$を表し；

Ｗ^{1}は、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、ヒドロキシル、または、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシを表し；あるいは、

Ｗ^{1}およびＺは、両方とも環Ａのケト基を表し、環Ａにおいて任意の２重結合を表している破線の少なくとも１つが、存在しておらず；

各Ｗ^{2}は独立して、Ｈ、ハロ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{4}$）アルケニル、ヒドロキシル、または（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシを表し；

各Ｋ^{1}、Ｋ^{2}、Ｋ^{3}、および、Ｋ^{4}は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキルを表し、Ｋ^{1}とＫ^{2}との間、Ｋ^{3}とＫ^{4}との間の破線は任意の２重結合を表し；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが化合物に存在しており；

Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、

Ａ’が存在しているときにＺ基が存在していなく；

Ｒは、Ｈ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{20}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）アルコキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルスルホキシ、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、Ｎ（（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル）$_{2}$、トリ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アンモニウム（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、ヘテロアリール（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、もしくはサッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに任意のＭ$^{+}$（ここでＭはアルカリ金属を表す）を表し；

Ｒ^{1}は、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルチオ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル－ＳＯ$_{2}$、－ＳＯ$_{3}$（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、サッカライド、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスフェート、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルホスホネート、（Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{30}$）アリールチオ、（Ｃ

$_{6}$－C$_{30}$）アリール－S（O）－、（C$_{6}$－C$_{30}$）アリール－SO$_{2}$、－SO$_{3}$（C$_{6}$－C$_{30}$）アリール、（C$_{6}$－C$_{30}$）アリールホスフェート、もしくは（C$_{6}$－C$_{30}$）アリールホスホネートを表すか、または、R^{1}は、R^{2}で置換された（C$_{1}$－C$_{20}$）を表し；

R^{2}は（C$_{2}$－C$_{20}$）アルケニル、（C$_{2}$－C$_{20}$）アルキニル、（C$_{3}$－C$_{20}$）シクロアルキル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルコキシル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルカルボニル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルカルボキシル、ヒドロキシル、－COOR^{X}、－SO$_{3}$R^{X}、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルチオ、（C$_{6}$－C$_{30}$）アリールチオ、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキル－S（O）－、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキル－SO$_{2}$－、ニトロ、アミノ、NH（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキル、NH（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキニル、N（（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキル）$_{2}$、または、N（（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、サッカライド、または、トリフルオロメチルを表し；あるいは、

ZまたはZ’がNR^{1}R^{1}を表すときに、R^{1}R^{1}は、それらが結合しているNと一緒にヘテロアリール基または複素環基を形成し；

任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または複素環基は、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキル、（C$_{2}$－C$_{20}$）アルケニル、（C$_{2}$－C$_{20}$）アルキニル、（C$_{3}$－C$_{20}$）シクロアルキル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルコキシル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルカルボニル、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－COOR^{X}、－SO$_{2}$R^{X}、－SO$_{3}$R^{X}、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキル－S（O）－、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキル－SO$_{2}$－、ホスフェート、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルホスフェート、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルホスホネート、ニトロ、アミノ、NH（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキル、NH（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキニル、N（（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキル）$_{2}$、N（（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキニル）$_{2}$、メルカプト、（C$_{1}$－C$_{20}$）アルキルチオ、（C$_{6}$－C$_{30}$）アリール、（C$_{6}$－C$_{30}$）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝O、ヘテロアリール、および、複素環から選択される１、２、３、４または５の置換基（ここで、各置換基は、１－３のR基で置換されていてもよい）で置換されていてもよく；

R^{X}は、H、または、（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキルを表し；

ZまたはZ’が窒素部分を含有しているときに、前記ZまたはZ’の窒素部分のHは、L基によって置き換えられてもよく（ここで、Lはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）；ただしLがアミノ酸ラジカル、または、ペプチドラジカルを表すときに、W^{1}またはW^{2}の少なくとも１つがHを表さず；

Zがヒドロキシル基または窒素部分を表すときに、前記ヒドロキシルまたは窒素部分のHが、（HO）$_{2}$P（O）－OCH$_{2}$－、スルホ、－PO$_{3}$H$_{2}$により、あるいは、１－約１２炭素原子の炭素鎖を介して、Z基に結合したセファロスポラニン酸によって置き換えられてもよく；ただし、前記スルホ基または－PO$_{3}$H基は、（C$_{1}$－C$_{6}$）アルキレン基を介してヒドロシキル基の酸素に結合しており；

ZまたはZ’がヒドロキシル基または窒素部分を表すとき、あるいは、Z’’－Rがヒドロキシル基を表すときに、ヒドロシキルまたは窒素部分の１つのHがL’基－リンカーにより置き換えられてもよく（ここで、L’基は、前記リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、置換されていてもよい芳香環、またはペプチド結合により割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）、

リンカーは、前記リンカーの１つの端に酸素原子またはNH基を介して、L’に結合されており、前記リンカーのもう１つの端は、Z基、Z’基、または、Z’’－R基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；

ZはOR^{1}を表すときに、一般式ＩＩで示される化合物は、一般式ＩＩで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C$_{1}$－C$_{12}$）アルキルジラジカルを含有しているリンカーを介して、２つの環Aにおいて結合した任意の２量体であってもよく（ここ

で、（Ｃ１－Ｃ１２）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは複素環により割り込まれいてもよく、一般式ＩＩで示される化合物の２量体に結合している各Ｚ基のＲ１基は、前記架橋により置き換えられている）；

サッカライドは直接Ｋ３と結合しておらず；

Ａ－はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在する）

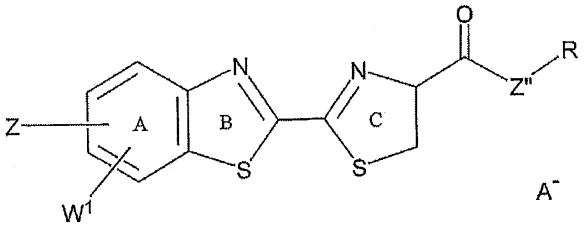
で示される化合物、または、その塩を提供している。

【０１８３】

さらにもう１つの実施の形態において、本発明は、一般式ＩＩＡ：

【０１８４】

【化１０】



IIA

（式中、

ＺはＯＲ１、ＮＨＲ１、または、ＮＲ１Ｒ１を表し；

Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

Ｗ１は、Ｈ、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、または（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシを表し；

Ｒは、Ｈ、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル、（Ｃ２－Ｃ２０）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ２０）アルキニル、（Ｃ３－Ｃ２０）シクロアルキル、（Ｃ１－Ｃ１２）アルコキシ、（Ｃ６－Ｃ３０）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルスルホキシ、（Ｃ６－Ｃ３０）アリールスルホキシ、ヘテロアリールスルホキシ、（Ｃ１－Ｃ２０）アルコキシカルボニル、アミノ、ＮＨ（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、Ｎ（（Ｃ１－Ｃ６）アルキル）２、トリ（Ｃ１－Ｃ２０）アンモニウム（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル、ヘテロアリール（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、もしくはサッカライドを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに、任意のＭ＋（ここで、Ｍはアルカリ金属を表す）を表し；

Ｒ１は、（Ｃ６－Ｃ３０）アリール、ヘテロアリール、複素環、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルチオ、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル－ＳＯ２、－ＳＯ３（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル、サッカライド、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルホスフェート、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルホスホネート、（Ｃ６－Ｃ３０）アリールチオ、（Ｃ６－Ｃ３０）アリール－Ｓ（Ｏ）－、（Ｃ６－Ｃ３０）アリール－ＳＯ２、－ＳＯ３（Ｃ６－Ｃ３０）アリール、（Ｃ６－Ｃ３０）アリールホスフェート、もしくは（Ｃ６－Ｃ３０）アリールホスホネートを表すか、または、Ｒ１は、Ｒ２で置換された（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルを表し；

Ｒ２は、（Ｃ２－Ｃ２０）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ２０）アルキニル、（Ｃ３－Ｃ２０）シクロアルキル、（Ｃ１－Ｃ２０）アルコキシル、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルカルボニル、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルカルボキシル、ヒドロキシル、－ＣＯＯＲＸ、－ＳＯ３ＲＸ、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキルチオ、（Ｃ６－Ｃ３０）アリールチオ、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル－Ｓ（Ｏ）－、（Ｃ１－Ｃ２０）アルキル－ＳＯ２－、ニトロ、アミノ、ＮＨ（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、ＮＨ（Ｃ１－Ｃ６）アルキニル、Ｎ（（Ｃ１－Ｃ６）アルキル）２、またはＮ（（Ｃ１－Ｃ６）アルキニル）２、メルカプト、サッカライド、または、トリフルオロメチルを表し；または、

ＺまたはＺ’がＮＲ１Ｒ１を表すときに、Ｒ１Ｒ１は、それらが結合しているＮと一緒

にヘテロアリール基または複素環基を形成しており；
任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アリール基、ヘテロアリール基、または、複素環基は、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボニル、（C_1－C_{20}）アルキルカルボキシル、ハロ、ヒドロキシル、－COOR^X、－SO_2R^X、－SO_3R^X、（C_1－C_{20}）アルキル－S（O）－、（C_1－C_{20}）アルキル－SO_2－、ホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスフェート、（C_1－C_{20}）アルキルホスホネート、ニトロ、アミノ、NH（C_1－C_6）アルキル、NH（C_1－C_6）アルキニル、N（（C_1－C_6）アルキル）$_2$、N（（C_1－C_6）アルキニル）$_2$、メルカプト、（C_1－C_{20}）アルキルチオ、（C_6－C_{30}）アリール、（C_6－C_{30}）アリールチオ、トリフルオロメチル、＝O、ヘテロアリール、および複素環から選択される１、２、３、４、または、５の置換基（ここで、各置換基は、１－３のR基で置換されていてもよい）で置換されてもよく；
R^Xは、Hまたは（C_1－C_6）アルキルを表し；
ZがOR^1を表すときに、一般式ＩＩＡで示される化合物は、一般式ＩＩＡで示される化合物の２量体の間に架橋を形成するための（C_1－C_{12}）アルキルジラジカルを含有しているリンカーを介して、２つの環Ａにおいて結合した２量体であってもよく（ここで、（C_1－C_{12}）アルキルジラジカルは、１－４の酸素原子、窒素原子、または、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基、もしくは複素環基により割り込まれていてもよく、一般式ＩＩで示される化合物の２量体に結合している各Z基のR^1基は、前記架橋により置き換えられている）；
サッカライドは直接K^3と結合しておらず；
A^-はアニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在する）
で示される化合物、または、その塩を提供する。

【０１８５】
一般式ＩＩとＩＩＡとによって例証されたように、環Ａと環Ｂとの中心構造もまた、様々な環系であってもよい。ベンゾ［ｄ］チアゾールにくわえて、一般式ＩＩの環Ａの炭素原子をＮ、Ｎ－酸化物、および、Ｎ－アルキルで置換することにより、チアゾロ［４，５－ｂ］ピリジン、チアゾロ［４，５－ｃ］ピリジン、チアゾロ［５，４－ｃ］ピリジン、およびチアゾロ［５，４－ｂ］ピリジン環系、ならびにそれらに対応しているＮ－酸化物およびＮ－アルキル誘導体を入手することが可能になる。

【０１８６】
また、一般式ＩＩは、環Ａの２位の炭素原子をＮ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－アルキルで置換することにより、上述したそれぞれの環系に対応している環Ａの類似物のピラジン、ピラミジン、および、ピリダジンを得ることができる、ということも例証している。一般式ＩＩの環Ａの３位の炭素原子を置換することにより、対応している１，２，４－トリアジン環系誘導体を入手することができる。

【０１８７】
一般式ＩＩおよびＩＩＡは、各環系の様々なジヒドロ、および、テトラヒドロの誘導体を含んでいる。

【０１８８】
上述の全ての環系が、本明細書に述べられた一般式、例えば一般式Ｉおよび／または一般式ＩＩにおいて説明されているように置換されていてもよい。本明細書における一般式において置換されているような個々の環系およびそれらの誘導体のそれぞれは、本発明の実施の形態から分離されている。

【０１８９】
発光性アッセイにおける他の誘導体、および該他の誘導体の使用が、下記に記載されている。

【０１９０】

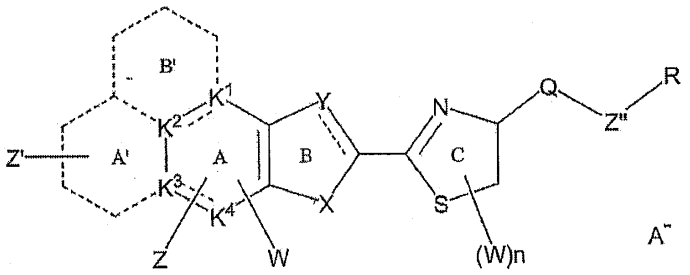
本明細書に述べられたルシフェリン誘導体の使用は、非ルシフェラーゼとの相互作用に基づく、光学的性質の測定可能な変化を示すアッセイに結実できる。前記相互作用は、ルシフェリン誘導体の構造を修飾してもよい。本明細書に述べられたように、ルシフェリン誘導体と非ルシフェラーゼ酵素または興味深い他の分子との間の反応生成物は、Ｄ－ルシフェリンまたはアミノルシフェリンである必要はない。例えば、ルシフェリン誘導体は、化学物質リンカーを介して、ルシフェリンまたはアミノルシフェリンに連結した非ルシフェラーゼ酵素に関する化学反応基を含有している基質を含んでいてもよい。非ルシフェラーゼ酵素による誘導体の化学反応基の変換により、基質の一部分、化学物質リンカーの一部分、化学物質リンカー、または基質と化学物質リンカーとの一部分を包含（保有）している生成物が生じてもよい。さらに、その生成物は、ルシフェラーゼの基質である。また、非ルシフェラーゼ酵素または他の分子と相互作用した後、適したルシフェリンの基質を生じるために、１以上のさらなる反応（例えばβ－脱離）を必要に応じて受ける生成物を生じてもよいルシフェリン誘導体が提供される。ルシフェリンのバックボーンの環構造が、さらに修飾されるルシフェリン誘導体（例えば、キノリルまたはナフチルルシフェリン）は、ルシフェリン誘導体の特徴をより改良するために、チアゾロ環におけるカルボキシに修飾を有利に提供するのと同様に提供される。特定の修飾を伴う誘導体は、特定の非ルシフェラーゼ酵素または分子に関するアッセイを提供するか、またはそのアッセイを改良する。一例をあげれば、下記に述べられるように、ｐＨ無感応のルシフェリン誘導体は、生理的なｐＨ以外のｐＨ（すなわち、ｐＨ約７．０よりも低く、かつｐＨ約７．８よりも高い）において実地されてもよい生物的アッセイにおいて有用であることが同定されていた。このように、本発明のルシフェリン誘導体を使用する生物発光方法が、１以上の分子（例えば、酵素、酵素反応のための補助因子（ＡＴＰなど）、酵素基質、酵素阻害物質、酵素活性化物質、またはＯＨラジカル）の検出に用いられてもよいし、または１以上の状態（例えば酸化還元の状態など）の検出に用いられてもよい。

【０１９１】

１実施の形態において、本発明は、一般式Ｖ：

【０１９２】

【化１１】



Ｖ

（式中、

Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－低級アルキル、またはＣＨを表し；

ＸはＳ、ＣＨ＝ＣＨ、またはＮ＝Ｃを表し；

Ｚ、およびＺ’はＨ、ＯＲ、ＮＨＲ、またはＮＲＲを表し；

Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、またはＮ＝Ｎを表し；

各Ｗは、独立して、Ｈ、ハロ、$Ｃ_{1-6}$アルキル、$Ｃ_{2-20}$アルケニル、ヒドロキシル、または、$Ｃ_{1-6}$アルコキシを表すか；または、

環Ａ上のＷおよびＺは、両方ともケト基を表し；

各$Ｋ^{1}$、$Ｋ^{2}$、$Ｋ^{3}$、および$Ｋ^{4}$は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－低級アルキルを表し；

Ｒは、Ｈ、$Ｃ_{1-20}$アルキル、置換された$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{2-20}$アルケニル、置換された$Ｃ_{2-20}$アルケニル、ハロゲン化された$Ｃ_{2-20}$アルケニル、置換されて、且つ、ハロゲン化された$Ｃ_{2-20}$アルケニル、$Ｃ_{3-20}$アルキニル、置換され

たC$_{3-20}$アルキニル、C$_{2-20}$アルケニルC$_{1-20}$アルキル、置換されたC$_{2-20}$アルケニルC$_{1-20}$アルキル、C$_{3-20}$アルキニルC$_{2-20}$アルケニル、置換されたC$_{3-20}$アルキニルC$_{2-20}$アルケニル、C$_{3-20}$シクロアルキル、置換されたC$_{3-20}$シクロアルキル、C$_{6-30}$アリール、ヘテロアリール、C$_{6-30}$アリールC$_{1-20}$アルキル、置換されたC$_{6-30}$アリール、置換されたヘテロアリール、置換されたC$_{6-30}$アリールC$_{1-20}$アルキル、アルキルスルホキシC$_{1-20}$アルキル、C$_{1-20}$アルコキシカルボニル、C$_{6-30}$アリールC$_{1-20}$アルコキシカルボニル、C$_{6-30}$アリールチオC$_{1-20}$アルキル、ヒドロキシC$_{1-20}$アルキル、トリC$_{1-20}$アンモニウムC$_{1-20}$アルキル、ヘテロアリールC$_{1-20}$アルキル、置換されたヘテロアリールC$_{1-20}$アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、およびＮ－メチル－テトラヒドロピリジニルであり、Ｚ’’が酸素を表すときにM^+（ここで、Ｍは、アルカリ金属を表している）を表し；アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、および／またはアルキニル基は、もう１つのC$_{1-20}$アルキル基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、C$_{1-20}$アルキルチオ基、C$_{6-30}$アリールチオ基、または、トリフルオロメチル基、置換されたC$_{6-30}$アリールC$_{1-20}$アルキルカルボニルで任意に置換されていてもよく；各Ｒ基は、１つよりも多く存在するならば、独立して定義されており；

Ｑは、（Ｃ＝Ｏ）$_n$、または、（ＣＨ$_2$）$_n$を表し；

ｎは０、１、または、２を表し；

ＺまたはＺ’’が、アミノを表すときに、水素の１つまたは両方が、C$_{1-20}$アルキル、または、Ｌ基によって置き換えられてもよく（ここで、Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカルであるか、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表している）；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルであるときは、ＷはＨを表さず；

Ｚが、ヒドロキシル、またはアミノを表すときに、Ｈは、（ＨＯ）$_2$Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ$_2$－、スルホ、または－ＰＯ$_3$Ｈ$_2$により置き換えられてもよいし、あるいは、１以上の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられてもよく；ただし、環Ｂが、チアゾール環を表すときに、前記スルホ基または－ＰＯ$_3$Ｈ$_2$基は、低級アルキレン鎖を介してヒドロキシル基の酸素に結合されており；

Ｚが、ヒドロキシルまたはアミノを表すとき、あるいはＺ’’－Ｒがヒドロキシルを表すときに、Ｈは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環、または、ペプチド結合により割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表してもよい）により置き換えられてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの端末に酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合されており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基と、エーテル、エステル、またはアミド結合を形成しており；

Ｚがヒドロキシルを表すときに、一般式Ⅴで示される化合物は、－ＯＣＨ$_2$Ｏ－の架橋を介して２つの環Ａにおいて結合したルシフェリン２量体を含んでおり；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが１度につき存在しており；

Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、

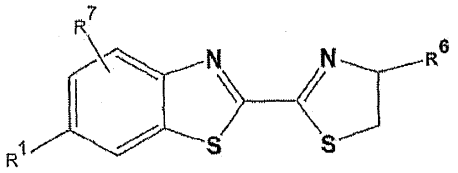
Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；

環Ａの１つの炭素は、Ｎ－酸化物の部分によって置き換えられてもよく；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

ＸがＮ＝Ｃを表すならば、環ＣはＮ＝Ｃ部分の炭素原子に結合されており；

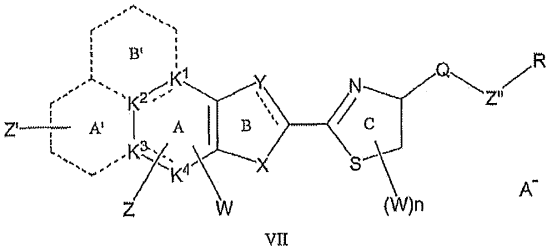
A^-は、アニオンを表し、第４級窒素が存在するときに、存在し；ただし、Wに結合された化合物が、ルシフェリン、ルシフェリンメチルエステル、または、アミノルシフェリンを表すときに、あるいは環Ａおよび環Ｂが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成するときに、Wは水素ではない）
で示される化合物、または、その塩を提供する。
【０１９３】
さらにルシフェリン、またはアミノルシフェリンの誘導体は、一般式ＶＩ：
【０１９４】
【化１２】



VI

（式中、
R^1は、水素、ヒドロキシル、アミノ、C_{1-20}アルコキシ、置換されたC_{1-20}アルコキシ、C_{2-20}アルケニルオキシ、置換されたC_{2-20}アルケニルオキシ、ハロゲン化されたC_{1-20}アルコキシ、置換されて、且つ、ハロゲン化されたC_{1-20}アルコキシ、C_{3-20}アルキニルオキシ、置換されたC_{3-20}アルキニルオキシ、C_{3-20}シクロアルコシキ、置換されたC_{3-20}シクロアルコシキ、C_{3-20}シクロアルキルアミノ、置換されたC_{3-20}シクロアルキルアミノ、C_{1-20}アルキルアミノ、置換されたC_{1-20}アルキルアミノ、ジC_{1-20}アルキルアミノ、置換されたジC_{1-20}アルキルアミノ、C_{2-20}アルケニルアミノ、置換されたC_{2-20}アルケニルアミノ、ジC_{2-20}アルケニルアミノ、置換されたジ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、置換された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、置換されたC_{3-20}アルキニルアミノ、ジC_{3-20}アルキニルアミノ、置換されたジC_{3-20}アルキニルアミノ、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノ、または、置換されたC_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニルアミノを表しており；
R^6は、CH_2OH、COR^{11}、$-OM^+$、塩を表しており；R^{11}は、H、OH、C_{1-20}アルコシキド、C_{2-20}アルケニル、または、$NR^{12}R^{13}$を表しており、R^{12}およびR^{13}は独立して、H、またはC_{1-20}アルキルを表し、M^+はアルカリ金属を表し；
R^7は、H、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}アルコキシドを表しており；ただし、R^1が、OH、またはNH_2を表し、R^7がHを表さず、R^6がCOR^{11}（ここで、R^{11}はOH、またはOMeを表す）を表さないときに、一般式ＶＩはルシフェリン、ルシフェリンメチルエステル、および、アミノルシフェリンを含まない）
で示された化合物を含有している。
【０１９５】
さらにルシフェリン、またはアミノルシフェリンの誘導体は、一般式ＶＩＩ：
【０１９６】

【化１３】



VII

（式中、

Ｙは、Ｎ－酸化物、Ｎ－低級アルキル、または、ＣＨを表し；

Ｘは、Ｓ、または、ＣＨ＝ＣＨを表し；または、

Ｙは、Ｎを表し、Ｘは、Ｎ＝Ｃ、または、ＣＨ＝ＣＨを表し；

ＺおよびＺ’はＨ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；または、

Ｚは、ホウ素原子を介して環Ａに結合された環状ジエーテル化ジヒドロキシボラン基（ｃｙｃｌｉｃ　ｄｉｅｔｈｅｒｉｆｉｅｄ　ｄｉｈｙｄｒｏｘｙｂｏｒａｎｅ　ｇｒｏｕｐ）を表し；

Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；

各Ｗは独立して、Ｈ、ハロ、C_{1-6}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ヒドロキシル、または、C_{1-6}アルコキシを表し；

各K^1、K^2、K^3、および、K^4は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－低級アルキルを表し；

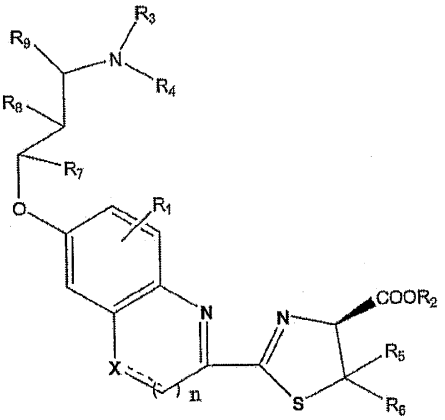
Ｒは、Ｈ、C_{1-20}アルキル、置換されたC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、置換されたC_{2-20}アルケニル、ハロゲン化されたC_{2-20}アルケニル、置換されて、且つ、ハロゲン化されたC_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキル、置換されたC_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキル、C_{3-20}アルキニル、置換されたC_{3-20}アルキニル、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニル、置換されたC_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニル、C_{3-20}シクロアルキル、置換されたC_{3-20}シクロアルキル、C_{6-30}アリール、ヘテロアリール、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルキル、置換されたC_{6-30}アリール、置換されたヘテロアリール、置換されたC_{6-30}アリールC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールチオC_{1-20}アルキル、ヒドロキシC_{1-20}アルキル、トリC_{1-20}アンモニウムC_{1-20}アルキル、ヘテロアリールC_{1-20}アルキル、置換されたヘテロアリールC_{1-20}アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、Ｎ－メチル－テトラヒドロピリジニル、ペンタフルオロフェニルスルホニルを表し、および、Ｚ’’が酸素であるときにM^+（Ｍは、アルカリ金属を表している）を表し；アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、および／またはアルキニル基が、もう１つのC_{1-20}アルキル基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、C_{1-20}アルキルチオ基、C_{6-30}アリールチオ基、または、トリフルオロメチル基で任意に置換されてもよく；各Ｒ基は、１つよりも多く存在するならば、独立して定義されており；

Ｑは、$(C=O)_n$、または$(CH_2)_n$を表し；

ｎは０、１、または、２を表し；

Ｚが、アミノを表すときに、水素の１つ、または両方が、C_{1-20}アルキルまたはＬ基（ここで、Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカルであるか、または非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表している）に

より置き換えられてもよく；
Ｚが、ヒドロキシル、またはアミノを表すときに、Ｈは、（ＨＯ）$_2$Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ$_2$－、スルホ、または－ＰＯ$_3$Ｈ$_2$により、あるいは、１以上の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられてもよく；
Ｚが、ヒドロキシルまたはアミノを表すとき、あるいはＺ’’－Ｒがヒドロキシルを表すときに、Ｈは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、
リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環、または、ペプチド結合により自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられてもよく、リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはＮＨ基を介してＬ’に結合しており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基のエーテル、エステル、または、アミド結合で形成しており；
Ｚがヒドロキシルを表すときに、一般式ＶＩＩで示される化合物は、－ＯＣＨ$_2$Ｏ－の架橋を介して２つの環Ａにおいて結合したルシフェリン２量体を含んでおり；
Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’およびＢ’のうちの１つだけが１度につき存在しており；
Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、
Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；
環Ａの１つの炭素は、Ｎ－酸化物の部分によって置き換えられてもよく；
環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；
ＸがＮ＝Ｃを表すならば、環ＣはＮ＝Ｃ部分の炭素原子に任意に結合されており；
Ａ$^-$は、アニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；ただし、Ｗに結合された化合物がルシフェリン、ルシフェリンメチルエステル、または、アミノルシフェリンを表すとき、あるいは環Ａおよび環Ｂがナフタレン環系を形成しているときに、Ｗは水素を表さない）
で示された化合物、または、その塩を含有している。
【０１９７】
もう１つ別の誘導体は、一般式ＶＩＩＩ：
【０１９８】
【化１４】



VIII

（式中、
ｎは０、または、１を表し；
ｎが０を表すときに、ＸはＳを表し、破線は単結合を表すか；または、
ｎが１を表すときに、ＸはＣＨを表し、破線は２重結合を表し；
Ｒ$_1$は、Ｈ、Ｆ、または、ＯＨを表し；
Ｒ$_2$は、Ｈ、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ベンジル、ヒドロキシエチル、または、ヒドロキシエチルのエステルを表し；

R_3およびR_4は独立して、H、メチル、エチル、プロピル、アリル、イミダゾリニルメチルであるか、R_3およびR_4は、それらが結合している窒素原子と一緒にピペリジノ、ピロリジノン、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）、またはアジリジノ環を形成しており；

R_5およびR_6は独立して、H、または、メチルを表し；

R_7は、H、または、メチルを表し；

R_8は、H、メチル、ヒドロキシル、または、アセチルを表し；

R_9は、H、または、メチルを表している）で示される化合物を含有している。

【０１９９】

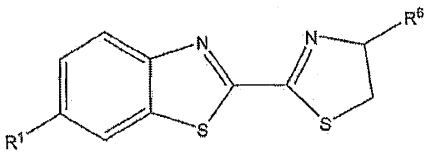
一般式ＶＩＩＩで示される化合物は、ＭＡＯ基質として役に立ってもよい。

【０２００】

さらに他の誘導体は、一般式ＩＸ：

【０２０１】

【化１５】



IX

（式中、

R^1は、H、ＯＲ、ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ベンジル、または、ＮＨ－Ｏ－イソ－ブチルを表し；

Ｒは、低級アルキル、ベンジル、２，４，６－トリメチルベンジル、フェニルピペラジノベンジル、ｏ－トリフルオロメチルベンジル、または、３－ピコリニル（ｐｉｃｏｌｉｎｙｌ）を表し；

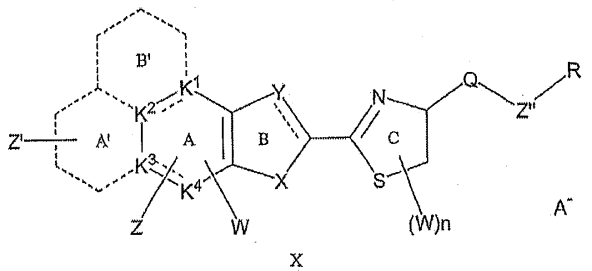
R^1がＨまたはＯＲを表すときに、R^6は、低級アルキル、３－ピコリニル、エチレングリコールによってエステル化されたカルボキシル基を表すか、または、R^1がＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ベンジルまたはＮＨ－Ｏ－イソ－ブチルを表すとき、あるいは、R^1がＯＲ（Ｒは、２，４，６－トリメチルベンジル、フェニルピペラジノベンジル、ｏ－トリフルオロメチルベンジルを表している）を表すときに、R^6はカルボキシルを表している）で示される化合物を含有している。前述の誘導体は、Ｐ４５０基質として役に立ってもよい。

【０２０２】

また、一般式Ｘ：

【０２０３】

【化１６】



X

（式中、

Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－低級アルキル、または、ＣＨを表し；

Ｘは、Ｓ、ＣＨ＝ＣＨ、または、Ｎ＝Ｃを表し；

ＺおよびＺ’は独立して、Ｈ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；
Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；
各Ｗは独立して、Ｈ、ハロ、$Ｃ_{1-6}$アルキル、$Ｃ_{2-20}$アルケニル、ヒドロキシル、または、$Ｃ_{1-6}$アルコキシを表すか；あるいは、
ＷおよびＺは、両方とも環Ａ上のケト基を表し、環Ａの破線は、存在しておらず；
各$Ｋ^{1}$、$Ｋ^{2}$、$Ｋ^{3}$、および、$Ｋ^{4}$は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－低級アルキルを表し、$Ｋ^{1}$と$Ｋ^{2}$との間の破線、および、$Ｋ^{3}$と$Ｋ^{4}$との間の破線は、任意の２重結合を表し；
Ｒは、Ｈ、アミノ、$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{2-20}$アルケニル、ハロゲン化された$Ｃ_{2-20}$アルケニル、$Ｃ_{3-20}$アルキニル、$Ｃ_{2-20}$アルケニル$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{3-20}$アルキニル$Ｃ_{2-20}$アルケニル、$Ｃ_{3-20}$シクロアルキル、$Ｃ_{6-30}$アリール、ヘテロアリール、$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{1-12}$アルコキシ、$Ｃ_{1-20}$アルキルスルホキシ、$Ｃ_{6-30}$アリールスルホキシ、$Ｃ_{6-30}$アリールスルホキシ$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{1-20}$アルキルスルホキシ$Ｃ_{1-20}$アルキル、$Ｃ_{1-20}$アルコキシカルボニル、$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルコキシカルボニル、$Ｃ_{6-30}$アリールチオ$Ｃ_{1-20}$アルキル、ヒドロキシ$Ｃ_{1-20}$アルキル、トリ$Ｃ_{1-20}$アンモニウム$Ｃ_{1-20}$アルキル、ヘテロアリールスルホキシ、ヘテロアリール$Ｃ_{1-20}$アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、Ｎ－メチル－テトラヒドロピリジニルを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときに$Ｍ^{+}$（ここでＭは、アルカリ金属を表す）を表し；
Ｒの任意のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アリール基、またはヘテロアリール基は、１以上（例えば、１、２、３、４、または５）の$Ｃ_{1-20}$アルキル基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、－ＣＯＯ$Ｒ^{1}$基、－$ＳＯ_{3}Ｒ^{1}$基、アミノ基、ニトロ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、$Ｃ_{1-20}$アルキルチオ基、$Ｃ_{6-30}$アリールチオ基、トリフルオロメチル基、$Ｃ_{1-20}$アルキルカルボキシル基、$Ｃ_{6-30}$アリール基、置換された$Ｃ_{6-30}$アリール基、$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルコキシル基、複素環$Ｃ_{1-20}$アルキル基、置換された$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルコキシル基、$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルキルカルボニル基、置換された$Ｃ_{6-30}$アリール$Ｃ_{1-20}$アルキルカルボニル基、または、別の未置換Ｒ基により必要に応じて置換されており；各Ｒ基は、１つよりも多く存在するならば、独立して定義されており；
複素環$Ｃ_{1-20}$アルキルは、１以上の、例えば、１、２、３、４、または５の置換基、Ｒ基で任意に置換されており；
$Ｒ^{1}$は、水素、または、$Ｃ_{1-6}$アルキルを表し；
Ｑは、Ｃ（＝Ｏ）、または、$ＣＨ_{2}$を表し；
ｎは、０、１、または、２を表し；
ＺまたはＺ’’がアミノを表すときに、アミノ基の水素の１つまたは両方が、$Ｃ_{1-20}$アルキル、またはＬ基によって置き換えられてもよく（ここで、Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または、非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表し）；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルを表すときに、ＷはＨを表さず；
Ｚが、ヒドロキシルまたはアミノを表すときに、ヒドロキシルまたはアミノのＨが、$（ＨＯ）_{2}Ｐ（Ｏ）－ＯＣＨ_{2}－$、スルホ、$－ＰＯ_{3}Ｈ_{2}$により、あるいは、１以上の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられてもよく；ただし、環Ｂが、チアゾール環を表すときに、前記スルホ基または$－ＰＯ_{3}Ｈ_{2}$基は、低級アルキレン鎖を介してヒドロキシル基の酸素に結合されており；
ＺまたはＺ’が、ヒドロキシルまたはアミノを表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒド

ロキシルを表すときに、ヒドロキシルまたはアミノの１つのＨは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、
リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環、またはペプチド結合によって割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられてもよく、リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合しており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基、Ｚ’基、または、Ｚ’’－Ｒ環基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；
ＺがＯＲを表すときに、一般式Ｘで示される化合物は、CH_2、または、$CH_2-C_6H_4-CH_2$の架橋を介して２つの環Ａにおいて結合した２量体であってもよく、一般式Ｘで示される化合物の２量体を結合している各Ｚ基のＲ基は、架橋によって置き換えられており；
Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが１度につき存在しており；
Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、
Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；
環Ａの１つの炭素は、Ｎ－酸化物部分により置き換えられてもよく；
環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；
ＸがＮ＝Ｃであるならば、環Ｃは、Ｎ＝Ｃ部分の炭素原子に任意に結合されており；
A^-は、アニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；
Ｗに結合された化合物はルシフェリン、ルシフェリンメチルエステル、または、アミノルシフェリンを表すとき、あるいは、環Ａおよび環Ｂがナフタレン、または、キノリン環系を形成するときに、Ｗは水素を表さず、
環Ａの置換基がＯＨを表すときに、－Ｑ－Ｚ’’－Ｒは、－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－NH_2を表さない）
で示される化合物、または、その塩も提供される。

【０２０４】

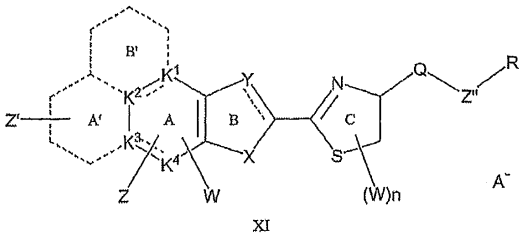
１実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、存在していない（すなわち、「ｎ」の値は０である）。もう１つ別の実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、ＨまたはＦを表している。

【０２０５】

さらに、一般式ＸＩ：

【０２０６】

【化１７】



XI

（式中、
Ｙは、Ｎ－酸化物、Ｎ－低級アルキル、または、ＣＨを表し；
Ｘは、Ｓ、または、ＣＨ＝ＣＨを表し；または、
Ｙは、Ｎを表し、Ｘは、Ｎ＝Ｃ、または、ＣＨ＝ＣＨを表し；
ＺおよびＺ’は、Ｈ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；または、
Ｚは、ホウ素原子を介して環Ａに結合された環状ジエーテル化ジヒドロキシボラン基を表し；
Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；
各Ｗは独立して、Ｈ、ハロ、C_{1-6}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ヒドロキシル、または、C_{1-6}アルコキシを表し；

各K^1、K^2、K^3、および、K^4は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－低級アルキルを表し、K^1とK^2との間の破線、および、K^3とK^4との間の破線は、任意の２重結合を表し；

Ｒは、Ｈ、C_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ハロゲン化されたC_{2-20}アルケニル、C_{3-20}アルキニル、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキル、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニル、C_{3-20}シクロアルキル、C_{6-30}アリール、ヘテロアリール、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルキルスルホキシ、C_{6-30}アリールスルホキシ、C_{6-30}アリールスルホキシC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルキルスルホキシC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールチオC_{1-20}アルキル、ヒドロキシC_{1-20}アルキル、トリC_{1-20}アンモニウムC_{1-20}アルキル、ヘテロアリールスルホキシ、ヘテロアリールC_{1-20}アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、Ｎ－メチル－テトラヒドロピリジニルを表すか、またはＺ’’が酸素であるときにM^+（ここで、Ｍは、アルカリ金属を表す）を表し；

Ｒのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、および、ヘテロアリール基は、１以上（例えば、１、２、３、４、または５）のC_{1-20}アルキル基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、－ＣＯＯＲ^{1}基、－SO_3R^1基、アミノ基、ニトロ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、C_{1-20}アルキルチオ基、C_{6-30}アリールチオ基、トリフルオロメチル基、置換されたC_{6-30}アリール基、C_{1-20}アルキルカルボキシル基、置換されたC_{6-30}アリール基、置換されたC_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシル基、置換されたC_{6-30}アリールC_{1-20}アルキルカルボニル基、または、別の未置換Ｒ基により必要に応じて置換されており；各Ｒ基は、１つよりも多く存在するならば、独立して定義されており；

R^1は、水素またはC_{1-6}アルキルを表し；

Ｑは、Ｃ（＝Ｏ）、またはCH_2を表し；

各ｎは独立して、０、１、または、２を表し；

Ｚがアミノを表すときに、アミノ基の水素の１つまたは両方は、C_{1-20}アルキルまたはＬ基（ここで、Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または、非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表している）により置き換えられてもよく；

ＺまたはＺ’が、ヒドロキシルまたはアミノを表すときに、ヒドロキシルまたはアミノのＨが、（ＨＯ）$_2$Ｐ（Ｏ）－ＯＣH_2－、スルホ、－PO_3H_2により、あるいは、１以上の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられてもよく；

Ｚが、ヒドロキシルまたはアミノを表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒドロキシルを表すときに、ヒドロキシルまたはアミノの１つのＨが、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、リンカーは、１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環、またはペプチド結合によって割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表している）により置き換えられてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合しており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基、Ｚ’基、または、Ｚ’’－Ｒ環基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；

Ｚが水素を表すときに、一般式ＸＩで示される化合物は、－ＯＣH_2Ｏ－の架橋を介して２つの環Ａにおいて結合したルシフェリン２量体を含んでおり；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するた

めに、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが１度につき存在しており；
　Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、
　Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；
環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；
ＸがＮ＝Ｃであるならば、環ＣはＮ＝Ｃ部分の炭素原子に任意に結合されており；
Ａ$^-$は、アニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；
環Ａおよび環Ｂがナフタレン環系を形成するときに、Ｗは水素を表さない）で示される化合物、または、その塩が提供される。

【０２０７】

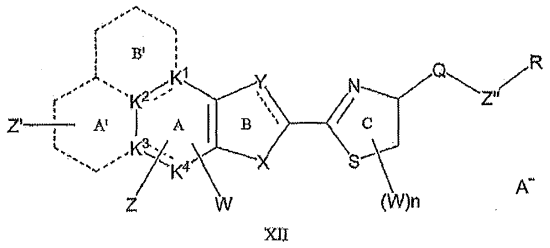
１実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、存在していない（すなわち、「ｎ」の値は０である）。もう１つ別の実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、ＨまたはＦを表している。

【０２０８】

また、一般式ＸＩＩ：

【０２０９】

【化１８】



XII

（式中、
Ｙは、Ｎ、Ｎ－酸化物、Ｎ－低級アルキル、または、ＣＨを表し；
Ｘは、Ｓ、ＣＨ＝ＣＨ、または、Ｎ＝Ｃを表し；
ＺおよびＺ’は独立して、Ｈ、ＯＲ、ＮＨＲ、または、ＮＲＲを表し；
Ｚ’’はＯ、Ｓ、ＮＨ、ＮＨＲ、または、Ｎ＝Ｎを表し；
各Ｗは独立して、Ｈ、ハロ、C_{1-6}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ヒドロキシル、または、C_{1-6}アルコキシを表し；あるいは、
ＷおよびＺは、両方とも環Ａ上のケト基を表し、環Ａの破線は、存在しておらず；
各K^1、K^2、K^3、および、K^4は独立して、ＣＨ、Ｎ、Ｎ－酸化物、または、Ｎ－低級アルキルを表し、K^1とK^2との間の破線、および、K^3とK^4との間の破線は、任意の２重結合を表し；
Ｒは、Ｈ、C_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、ハロゲン化されたC_{2-20}アルケニル、C_{3-20}アルキニル、C_{2-20}アルケニルC_{1-20}アルキル、C_{3-20}アルキニルC_{2-20}アルケニル、C_{3-20}シクロアルキル、C_{6-30}アリール、ヘテロアリール、複素環、置換された複素環、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルキルスルホキシ、C_{6-30}アリールスルホキシ、C_{6-30}アリールスルホキシC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルキルスルホキシC_{1-20}アルキル、C_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシカルボニル、C_{6-30}アリールチオC_{1-20}アルキル、ヒドロキシC_{1-20}アルキル、トリC_{1-20}アンモニウムC_{1-20}アルキル、ヘテロアリールスルホキシ、ヘテロアリールC_{1-20}アルキル、第４級窒素を有しているヘテロアリール、第４級窒素を有しているヘテロアリールカルボニル、Ｎ－メチル－テトラヒドロピリジニルを表すか、または、Ｚ’’が酸素を表すときにM^+（ここで、Ｍはアルカリ金属を表す）を表し；
Ｒのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、および、ヘテロアリール基は、１以上（例えば、１、２、３、４、または５）のC_{1-20}アルキル基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、－ＣＯＯR^1基、－SO_3R^1基、ア

ミノ基、ニトロ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、C_{1-20}アルキルチオ基、C_{6-30}アリールチオ基、トリフルオロメチル基、C_{1-20}アルキルカルボキシル基、C_{6-30}アリール基、置換されたC_{6-30}アリール基、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシル基、置換されたC_{6-30}アリールC_{1-20}アルコキシル基、C_{6-30}アリールC_{1-20}アルキルカルボニル基、置換されたC_{6-30}アリールC_{1-20}アルキルカルボニル基、または、別の未置換Ｒ基によって必要に応じて置換されており；各Ｒ基は、１つよりも多く存在するならば、独立して定義されてており；

置換されたアリール基は、１つ、または、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、複素環、あるいは、置換された複素環で置換されており、Ｒの複素環基は、１以上のC_{1-20}アルキル基、C_{6-10}アリール基、ハロ基、ヒドロキシル基、アセチル基、－ＣＯＯＲ^{1}基、アミノ基、ニトロ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキニルアミノ基、イミダゾリニルメチルアミノ基、ジ－低級アルキルアミノ基、ジ－低級アルキニルアミノ基、ピペリジノ基、ピロリジノ基、アゼチジノ（ａｚｅｔｉｄｉｎｏ）基、アジリジノ基、ジ－イミダゾリニルメチルアミノ基、メルカプト基、C_{1-20}アルキルチオ基、C_{6-30}アリールチオ基、トリフルオロメチル基で置換されていてもよく；

R^{1}は、水素またはC_{1-6}アルキルを表し；

Ｑは、Ｃ（＝Ｏ）またはCH_2を表し；

ｎは、０、１、または、２を表し；

ＺまたはＺ’’が、アミノを表すときに、アミノ基の水素の１つまたは両方が、C_{1-20}アルキル、または、Ｌ基（ここで、Ｌはアミノ酸ラジカル、最大で２０アミノ酸部分を有しているペプチドラジカル、または、非ルシフェラーゼの基質である任意の他の低分子を表す）により置き換えられてもよく；ただし、Ｌがアミノ酸ラジカルまたはペプチドラジカルを表すときに、ＷはＨを表さず；

Ｚが、ヒドロキシルまたはアミノを表すときに、Ｈは、$(HO)_2P(O)-OCH_2-$、スルホ、または$-PO_3H_2$により、あるいは、１以上の炭素原子の炭素鎖を介してＺ基に結合したセファロスポラニン酸により置き換えられてもよく；ＺまたはＺ’が、ヒドロキシルまたはアミノを表すとき、あるいは、Ｚ’’－Ｒがヒドロキシルを表すときに、１つのＨは、Ｌ’基－リンカー（ここで、Ｌ’は、リンカーを自由にするために、酵素により除去可能な基を表し、リンカーは１以上の窒素原子、酸素原子、カルボニル基、（置換された）芳香環、またはペプチド結合によって割り込まれてもよい、自己切断可能な炭素鎖を表す）により置き換えられてもよく、

リンカーは、リンカーの１つの端末にある酸素原子またはＮＨ基を介して、Ｌ’に結合しており、リンカーのもう１つの端末は、Ｚ基、Ｚ’基、または、Ｚ’’－Ｒ環基と、エーテル、エステル、または、アミド結合を形成しており；

Ｚが水素を表すときに、一般式ＸＩＩで示される化合物は、$-OCH_2O-$の架橋を介して２つの環Ａにおいて結合したルシフェリン２量体を含んでおり；

Ａ’およびＢ’は、環Ａと融合した任意の芳香環を表し、融合した３環系を形成するために、Ａ’とＢ’とのうちの１つだけが１度につき存在しており；

Ｂ’が存在しているときにＺ基が存在し、

Ａ’が存在しているときにＺ基が存在しておらず；

環Ｂの破線は、任意の２重結合を表し；

ＸがＮ＝Ｃであるならば、環ＣはＮ＝Ｃ部分の炭素原子に任意に結合されており；

A^{-}は、アニオンを表し、第４級窒素が存在するときに存在し；

Ｗに結合された化合物はルシフェリン、ルシフェリンメチルエステル、または、アミノルシフェリンを表すとき、あるいは、環Ａおよび環Ｂが、ナフタレンまたはキノリン環系を形成するときに、Ｗは水素を表さない）で示される化合物、または、その塩も提供され

る。

【０２１０】

１実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、存在していない（すなわち、「ｎ」の値は０を表し）。もう１つ別の実施の形態において、環Ｃに結合されたＷ基は、ＨまたはＦを表している。

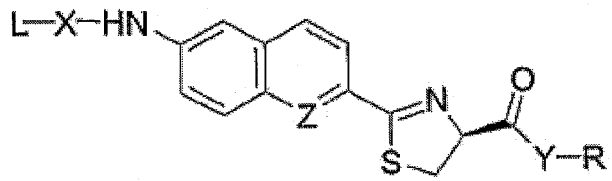
【０２１１】

〔ＩＶ．典型的なルシフェリン誘導体〕

６員環Ｂを有している誘導体には、一般式ＸＩＸ：

【０２１２】

【化１９】



一般式(XIX)で示される化合物

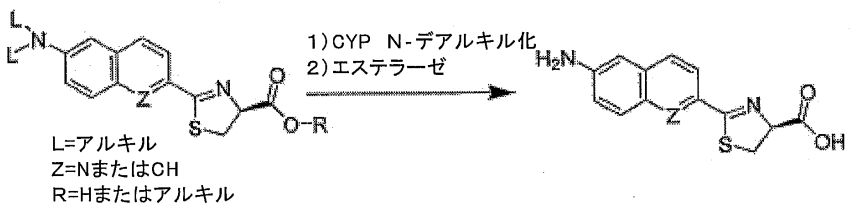
（式中、Ｌは、酵素のための任意の構造（例えばペプチド配列または低分子）を表してもよく；Ｘは、Ｏ、ＮＨ、または自己切断可能なリンカーを表し；Ｚは、Ｎ（アミノキノリニルルシフェリン）またはＣＨ（ナフチルルシフェリン）を表し；Ｙは、Ｏ（エステル）、ＮＨ（アミド）、ＮＨ－ＮＨ（ヒドラジド）またはＳ（チオエステル）を表し；Ｒは、アルキル、芳香族、ペプチド、オリゴヌクレオチド、または、酵素の基質に結合している自己切断可能なリンカーを表す）で示される化合物が含まれる。

【０２１３】

１実施の形態では、誘導体は、（例えばシトクロム（ＣＹＰ）Ｐ４５０のアイソザイムによる）Ｎ－脱アルキル化を検出するために使用されてもよい。エステル（Ｒ＝アルキル鎖）の場合、エステラーゼを、脱アルキル化反応を開始した後、または、脱アルキル化反応を開始した時点、および、ルシフェラーゼに媒介される反応を開始する前において、添加してもよい。

【０２１４】

【化２０】



一般式XXで示される化合物　　一般式XXIで示される化合物

【０２１５】

６－アミノキノリニルルシフェリン（一般式Ｖで示される化合物）による光の出力は、ｐＨ感受性であるが、コントロール反応などの反応は、同じｐＨで実施されてもよい。代わりに、６－アミノキノリニルルシフェリンは、芳香環の電子密度分布が変化するように、修飾されてもよい。この修飾としては、例えば、ハロゲン化が挙げられる。

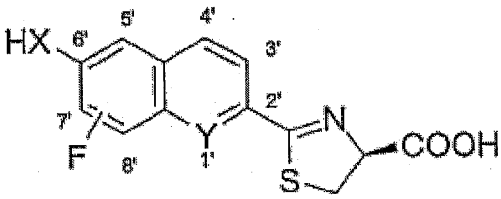
【０２１６】

本発明の誘導体としては、フッ素化ルシフェリン、キノリニルルシフェリン、アミノキノリニルルシフェリン、および、ナフチルルシフェリンなどが挙げられる。例えば、アミノキノリニルルシフェリンのフッ素化誘導体の光学特性は、フッ素の電子吸引力のために、変化してもよい。フッ素化誘導体には、一般式ＸＸＩＩおよびＸＸＩＩＩで示される化

合物が含まれる。

【０２１７】

【化２１】

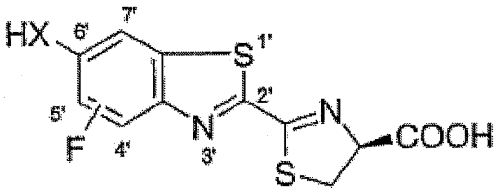


XXII

（式中、ＸはＯまたはＮＨを表し；ＹはＮまたはＣＨを表し；Ｆは３’、４’、５’、７’、または８’にあってもよい）。

【０２１８】

【化２２】



XXIII

（式中、ＸはＯまたはＮＨを表し；Ｆは４’、５’、または７’にあってもよい）。

【０２１９】

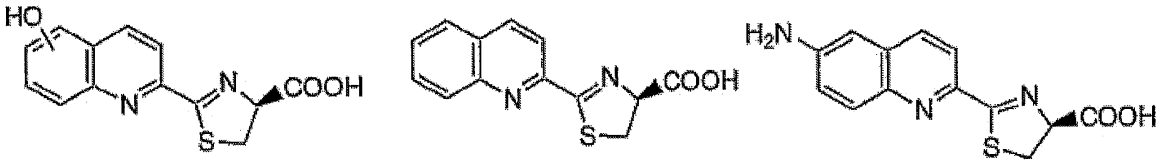
典型的なフッ素化誘導体は、５－フルオロ－６－アミノルシフェリンである（図３）。

【０２２０】

１実施の形態では、本発明は、キノリニル誘導体（一般式ＸＸＩＶ－ＸＸＶＩで示される化合物）を提供する。

【０２２１】

【化２３】



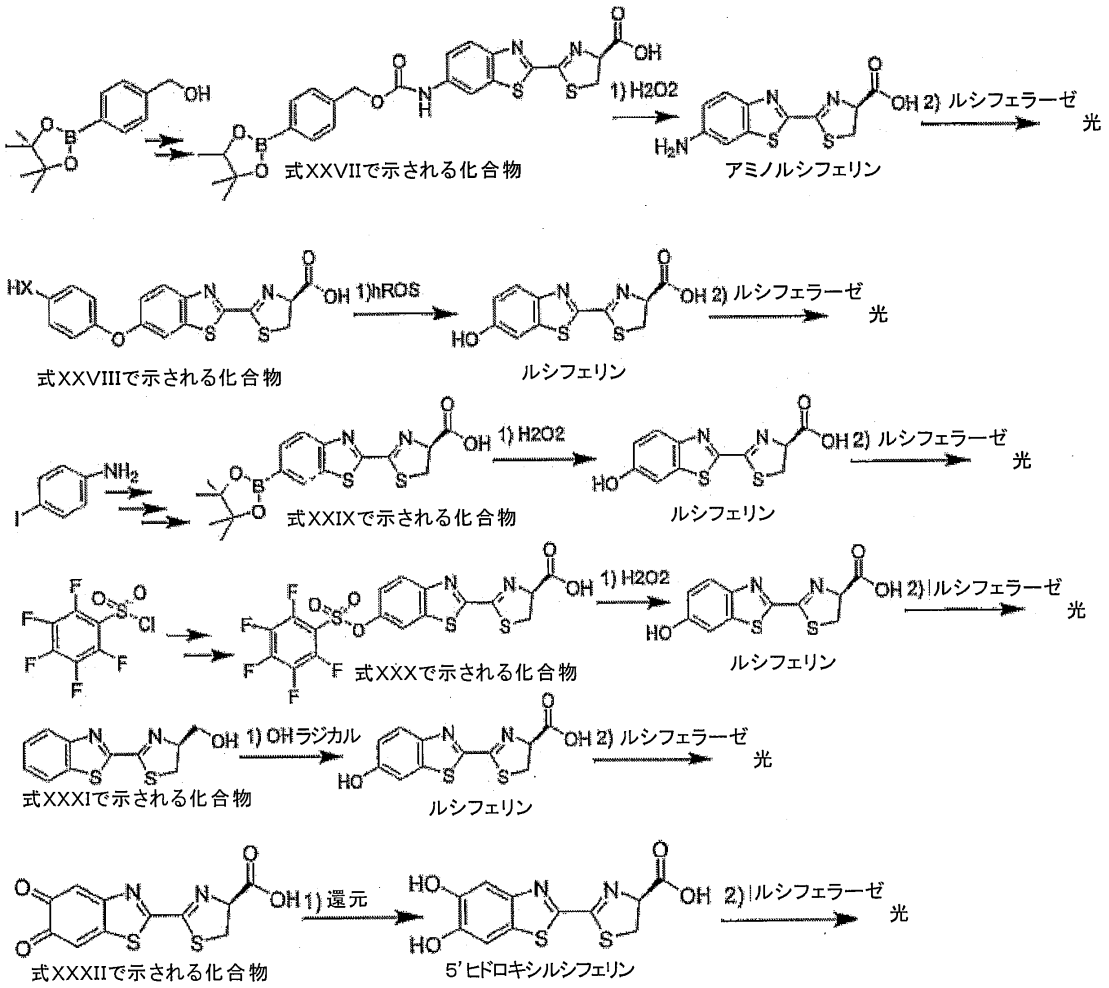
（式中、ＯＨは、６’および／または８’の位置にある）。

【０２２２】

本発明の誘導体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）および他の酵素に関する、活性酸素種（ＲＯＳ）のセンサーまたは酸化還元のセンサーとして使用されてもよい。そのような誘導体には、一般式ＸＸＶＩＩ－ＸＸＸＩＩで示される化合物が含まれる。

【０２２３】

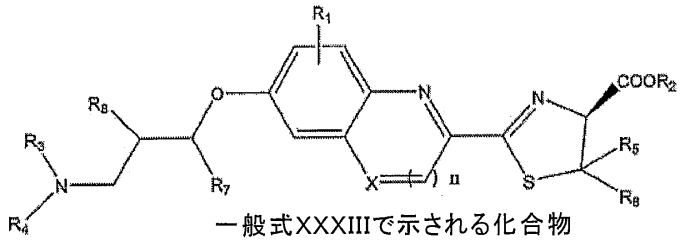
【化２４】



典型的なＭＡＯ用生物発光性基質には、一般式ＸＸＸＩＩＩ：

【０２２４】

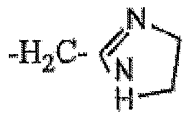
【化２５】



（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または、任意のエステルを表し；
R_3およびR_4はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$-H_2C-C=CH$、

【０２２５】

【化２６】



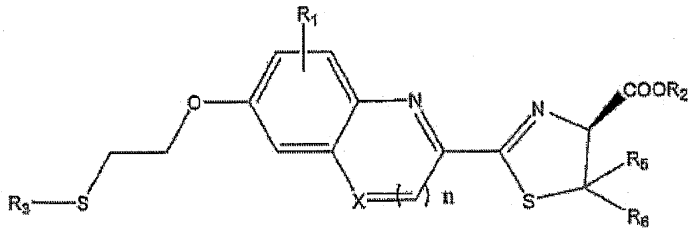
、またはＲ３＝（ＣＨ２）ｍＲ４を表し：Ｒ３とＲ４とはＣＨ２を表し、ｎは０、１、２、または３であり；
Ｒ５およびＲ６は、独立して、ＨまたはＣＨ３を表し；
Ｒ７はＨまたはＣＨ３を表し；
Ｒ８はＨ、ＣＨ３、ＯＨ、またはＣＯＣＨ３を表す）で示される化合物が含まれる。

【０２２６】

典型的なＦＭＯ用生物発光性基質には、一般式ＸＸＸＩＶ：

【０２２７】

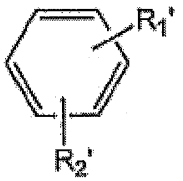
【化２７】



（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
Ｒ１はＨ、ＦまたはＯＨを表し；
Ｒ２はＨ、ＣＨ３、ＣＨ２ＣＨ３、ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３、ＣＨ２ＣＨ（ＣＨ３）２、ＣＨ２Ａｒ、ＣＨ２ＣＨ２ＯＨ、または任意のエステルを表し；
Ｒ３はＨ、ＣＨ３、ＣＨ２ＣＨ３、ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３、または任意のアルキル鎖、あるいは、

【０２２８】

【化２８】



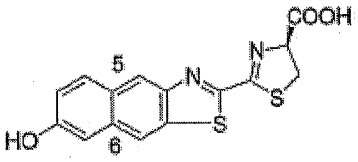
を表し、Ｒ１’およびＲ２’は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＮＯ２、ＣＨ３、ＯＣＨ３、ＮＨ２、またはＮ（ＣＨ３）２を表し；
Ｒ５およびＲ６は独立して、ＨまたはＣＨ３を表す）で示される化合物が含まれる。

【０２２９】

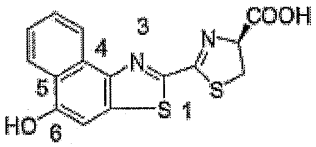
また、Ｄ－ルシフェリンのＡ環は、もう１つ別の環構造を含むように修飾されていてもよい（式ＸＸＸＶ－ＸＸＸＶＩで示される化合物）。

【０２３０】

【化２９】



式XXXVで示される化合物



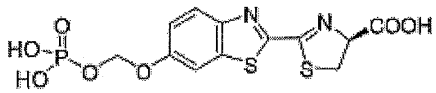
式XXXVIで示される化合物

【０２３１】

Ａ環が修飾されている他の基質には、ルシフェラーゼの基質であってもよいホスファターゼの安定な基質が含まれる（一般式ＸＸＸＶＩＩで示される化合物）。

【０２３２】

【化３０】



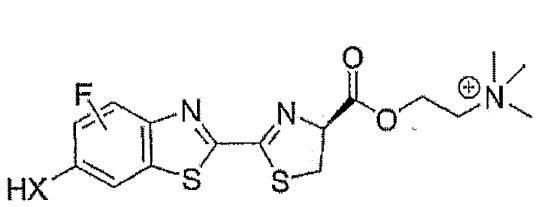
式XXXVIIで示される化合物

【０２３３】

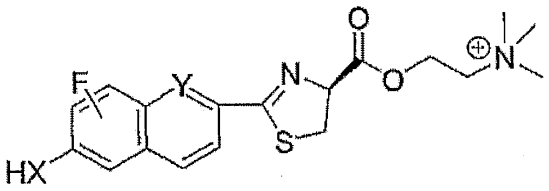
ルシフェリンのＣ環は、アセチルコリンエステラーゼ（ＡＣｈ）の基質を含むように修飾されてもよく、このとき、Ａ環またはＡ環およびＣ環がさらに修飾されていてもよい。ＡＣｈの代謝回転回数は、非常に大きく（２５，０００Ｓ$^{-1}$）、ＡＣｈは、２×１０^{8}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$というＫ$_{cat}$／Ｋ$_{M}$値により示されているように速度論的に申し分のない酵素である。ＡＣｈの基質である２種類の誘導体には、一般式ＸＸＸＩＸ－ＸＸＸＸで示される化合物が含まれる。

【０２３４】

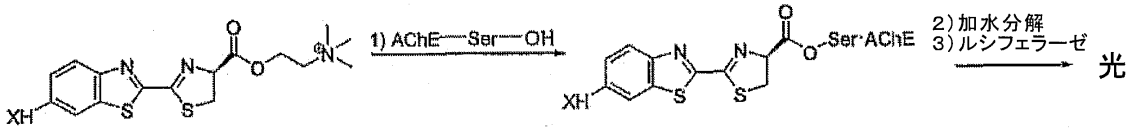
【化３１】



一般式XXXVIII
（式中、X=OまたはNH）
で示される化合物



一般式XXXIX
（式中、X=OまたはNH、および、
Y=NまたはCH）
で示される化合物



一般式XXXX
（式中、X=OまたはNH）
で示される化合物

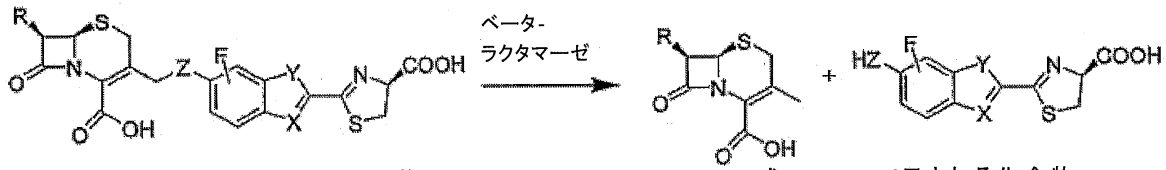
一般式XXXXIで示される化合物

【０２３５】

β－ラクタマーゼに媒介される反応を検出するために役に立つ誘導体には、キノリニルルシフェリン誘導体、アミノキノリニルルシフェリン誘導体、および、ナフチルルシフェリン誘導体が含まれる。これらの誘導体は、ハロゲンを用いて修飾されていてもよい（例えば、Ａ環のＣ原子に連結しているＨがＦに置き換えられている）。

【０２３６】

【化３２】



一般式XXXXIIで示される化合物

式XXXXIIIで示される化合物

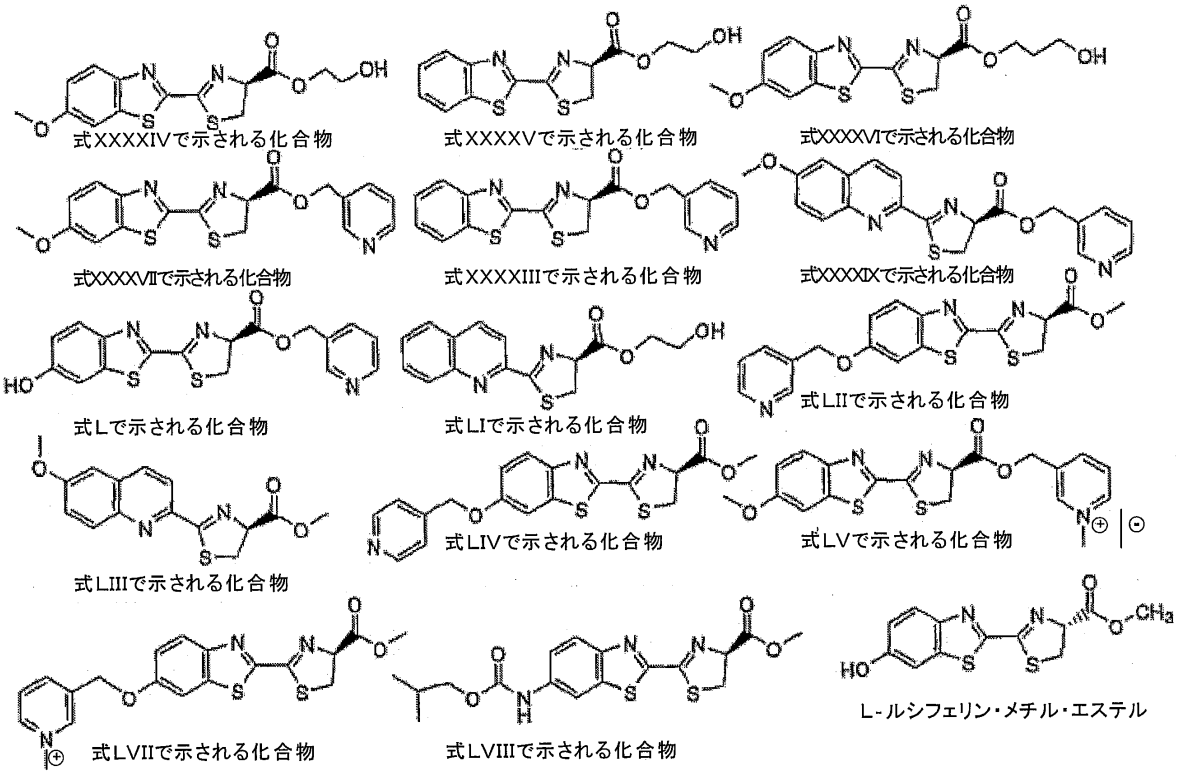
（式中、Ｒは異なる基を表し、ＸはＮまたはＣＨを表し、ＹはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＺはＯまたはＮＨを表す）。

【０２３７】

Ａ環またはＢ環、あるいは、Ａ環およびＣ環が修飾されていてもよい、ルシフェリンのエステル（Ｃ環の修飾）を含んでいる誘導体には、式ＸＸＸＸＩＶ－ＬＶＩＩＩで示される化合物が含まれる。

【０２３８】

【化３３】

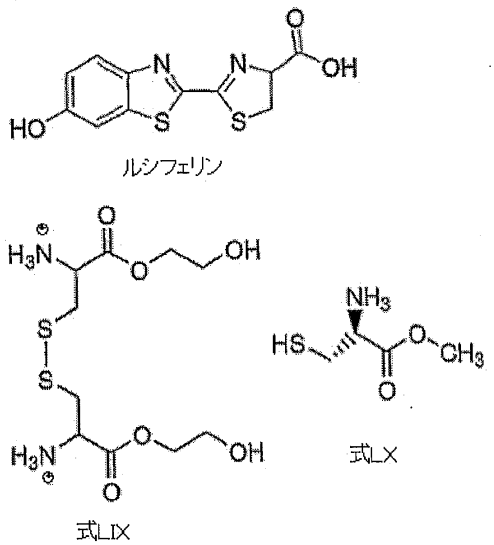


【０２３９】

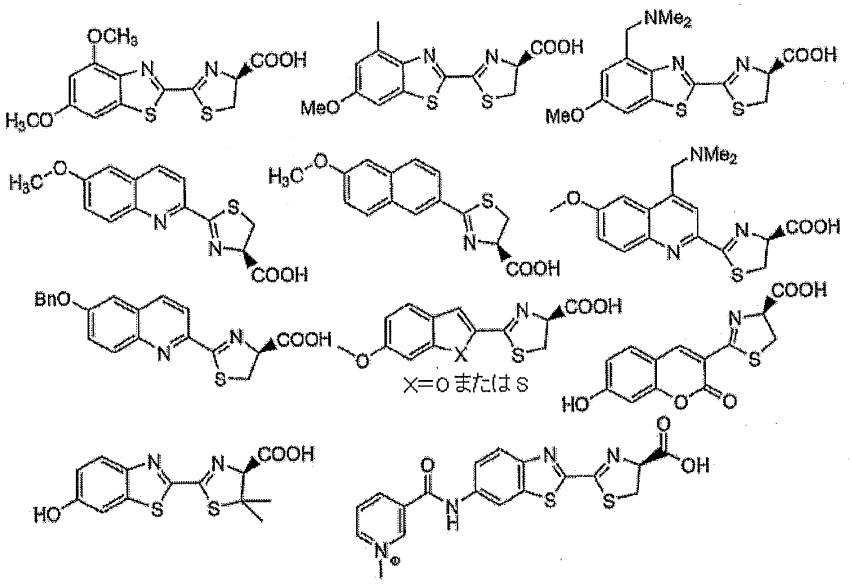
酵素（Ｐ４５０、ＭＡＯおよびＧＳＴなど）の基質であるエステル化されたルシフェリン誘導体を調製するために、環化処理が用いられる。環化処理では、シアノ基を含んでいる分子に添加される前に、エチレングリコールエステルＤ－システインを還元するために、ＴＣＥＰが使用されてもよい。例えば、炭酸水素カリウムを用いて中和されたＤ－システインエステルの溶液に、ＴＥＣＰを添加する。それから数分後に、ＴＥＣＰが添加された上記溶液を、メタノールに溶解している適切なニトリルに添加する。また、メチルエステルルシフェリン誘導体は、メチルエステルＤ－システインを用いてベンゾチオール誘導体を直接環化することによって、または、ジアゾメタンを用いてルシフェリンのカルボン酸をメチル化することによって、作製される。

【０２４０】

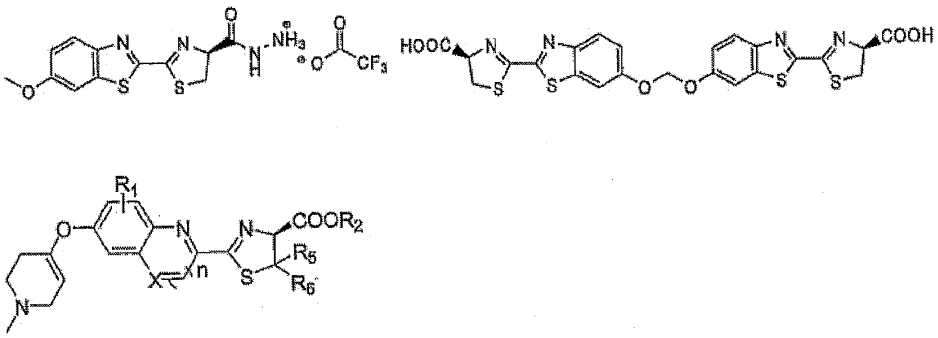
【化３４】



【０２４１】
Ａ環、Ｂ環、および／または、Ｃ環が修飾されているルシフェリン誘導体には、以下の式ＬＸＩ－ＬＸＸで示される化合物が含まれる。
【０２４２】
【化３５】

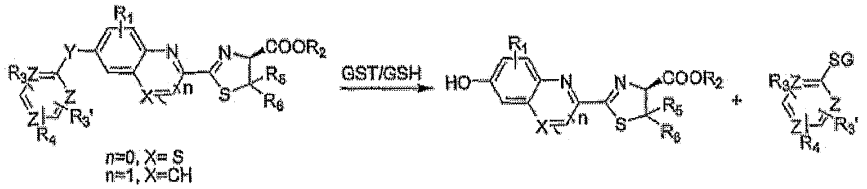


さらに、誘導体には、以下の一般式ＬＸＸＩ、ＬＸＸＩＩ、および、ＬＸＸＩＩＩで示される化合物が含まれる。
【０２４３】
【化３６】



（式中、R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；R_5およびR_6は、独立して、ＨまたはＣＨ$_3$を表す）。
【０２４４】
１実施の形態では、誘導体はＧＳＴの基質である（一般式ＬＸＸＩＶ－ＬＸＸＶで示される化合物）。
【０２４５】

【化３７】

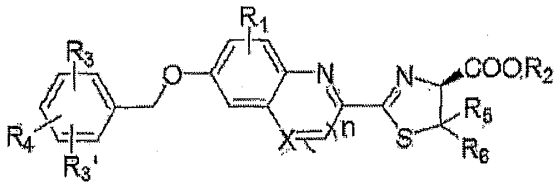


LXXIV

（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表し；
R_3、R_3’およびR_4は、独立して、＝NO_2、CF_3、またはＨを表す）。

【０２４６】

【化３８】

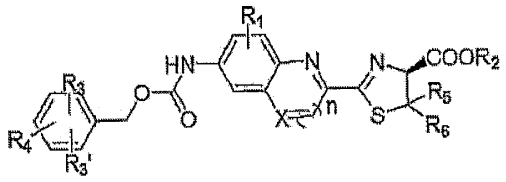


LXXV

（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表し；
R_3、R_3’またはR_4は、独立して、＝NO_2、CF_3、またはＨを表す）。

【０２４７】

【化３９】

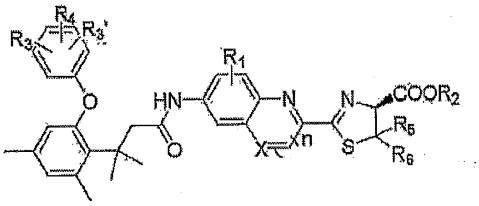


LXXVIII

（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表し；
R_3、R_3’、およびR_4は、独立して、NO_2、CF_3またはＨを表す）。

【０２４８】

【化４０】



LXXIX

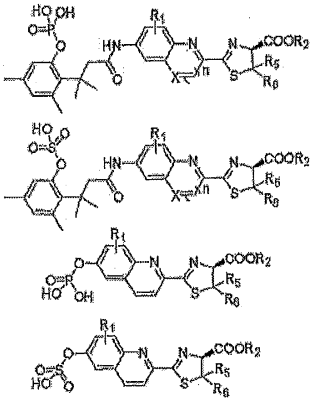
（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表し；
R_3、R_3’、およびR_4は、独立して、NO_2、CF_3またはＨを表す）。

【０２４９】

典型的なホスファターゼの基質およびスルファターゼの基質には、一般式ＬＸＸＸ－ＬＸＸＸＩＩＩで示される化合物が含まれる：

【０２５０】

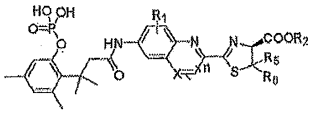
【化４１】



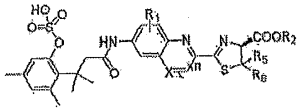
（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表し；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表し；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表す）。

【０２５１】

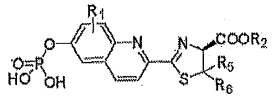
【化４２】



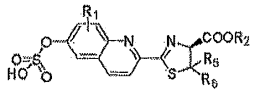
LXXXIV



LXXXV



LXXXVI



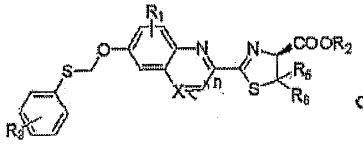
LXXXVII

【０２５２】

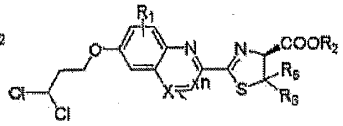
本発明の他の誘導体には、一般式ＬＸＸＸＶＩＩＩ－ＬＸＸＸＩＸで示される化合物が含まれる。：

【０２５３】

【化４３】



LXXXVIII



LXXXIX

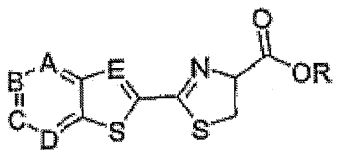
（式中、ｎは０であり、ＸはＳを表すか、または、ｎは１であり、ＸはＣＨを表すか；
R_1はＨ、Ｆ、またはＯＨを表すか；
R_2はＨ、CH_3、CH_2CH_3、$CH_2CH_2CH_3$、$CH_2CH(CH_3)_2$、CH_2Ar、CH_2CH_2OH、または任意のエステルを表すか；
R_3はＨ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、NO_2、CH_3、OCH_3、NH_2、または$N(CH_3)_2$を表すか；または、
R_5およびR_6は独立して、ＨまたはCH_3を表す）。

【０２５４】

酸化還元、または、デアルキラーゼの生物発光アッセイに用いられる誘導体には、一般式ＬＸＸＸＸ－ＬＸＸＸＸＩで示される化合物が含まれる。

【０２５５】

【化４４】



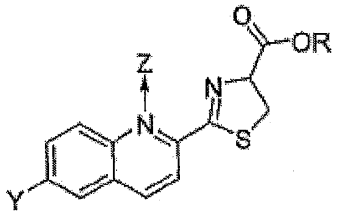
LXXXX

（式中、Ａは、ＣＨからＮＯ、ＮＭｅ、もしくはＮに修飾されているか；または、
Ｂは、ＣＨからＮＯ、ＮＭｅ、もしくはＮに修飾されているか；または、
Ｃは、ＣＯＨまたはＣＮＨ２からＮＯ、ＮＭｅ、もしくはＮに修飾されており；

Ｄは、ＣＨからＮＯ、ＮＭｅ、もしくはＮに修飾されているか；または、
Ｅは、ＮからＮＯ、もしくはＮＭｅに修飾されているか；あるいは、それらが任意に組み合わせられている。）。

【０２５６】

【化４５】



LXXXXI

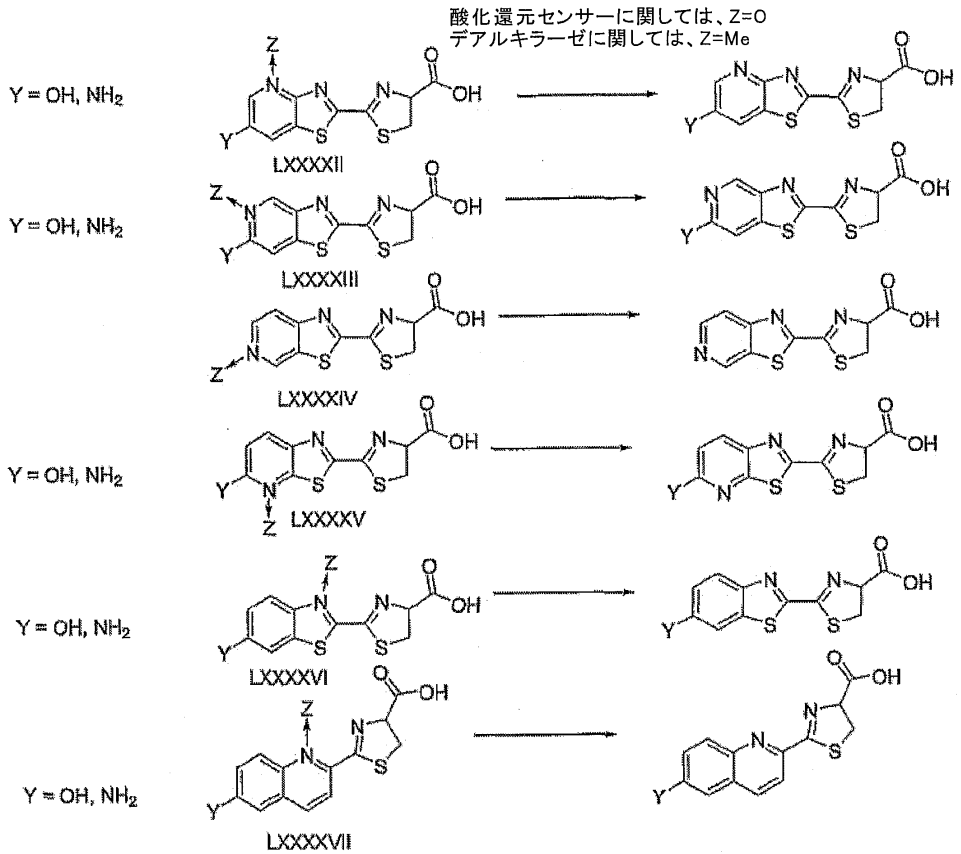
（式中、Ｚは、ＯまたはＭｅを表し；
Ｙは、ＯＨまたはNH_2を表し；
Ｒは、Ｈまたはアルキルを表す）。

【０２５７】

還元のセンサーまたはデアルキラーゼのセンサーとして役に立つ具体的な誘導体には、一般式ＬＸＸＸＸＩＩ－ＬＸＸＸＸＶＩで示される化合物が含まれる。

【０２５８】

【化４６】



酸化還元のセンサーの他の例は、図４および６に示されている。

【０２５９】

エステラーゼの他の基質は、図８－１０、２２－２３、２６、３７Ｂ、４０、および、４２に示されている。

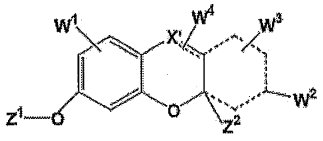
【０２６０】

〔Ｖ．蛍光物質の誘導体〕

１実施の形態では、本発明の蛍光物質の誘導体は、以下の構造Ｌ－Ｆを有している。ここで、Ｆは蛍光物質を表し、ＬはＯを介して、蛍光物質に連結した基質を表す。１実施の形態では、本発明の蛍光基質は、一般式ＸＩＩＩ

【０２６１】

【化４７】



XIII

（式中、破線で示された環は、存在していてもよいベンゾ環を表し；

破線で示された環が存在していないときのみ、Ｂ環において破線で示されている結合が存在しており；

破線で示された環が存在していないときに、Ｘ’はＣＨを表し；

破線で示された環が存在しているときに、Ｘ’はＮＨを表し；

破線で示された環が存在しているときに、Ｘ’は炭素原子を表すとともに、γ－ブチロカクトン環であるスピロ環系の一部を形成し（ここで、ラクトン環のαおよびβ炭素において融合し、γ炭素においてＸ’に結合した、置換されていてもよいベンゾ環を、上記γ－ブチロラクトン環は有している）；

W^1、W^3およびW^4は独立して、Ｈ、ハロ、カルボキシル、カルボキシエステル、低級アルキル、ヒドロキシ低級アルキル、C_{6-20}アリール、または、置換されたC_{6-20}アリールを表し；W^2は、ヒドロキシル、低級アルコキシ、または、アミノ（ここで、アミノ基の１または両方の水素は、低級アルキルで置換されていてもよい）を表し；

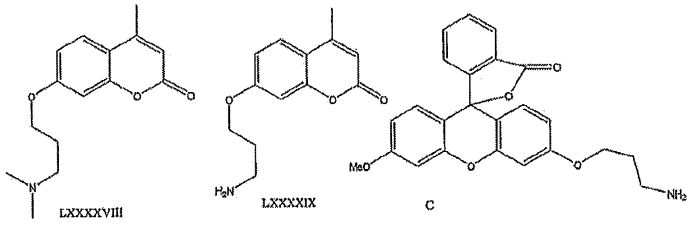
Z^1は、アミノ基により終結している低級アルキレン鎖、低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、チオール基、または、低級アルキルチオ基を表し；W_2は、アルコキシ、またはＯＣＨ（R_7）ＣＨ（R_8）ＣＨ（R_9）Ｎ（R_3R_4）を表し；Z^2はケト基を表し、ベンゾ環が存在しないときにのみ存在する）で示されるベンゾピランである。

【０２６２】

典型的なＭＡＯ用蛍光性基質には、式ＬＸＸＸＸＶＩＩＩ－Ｃで示される化合物が含まれる。

【０２６３】

【化４８】

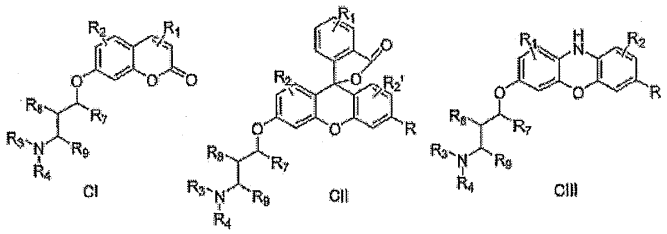


LXXXXVIII　LXXXXIX　C

ＦＭＯ用蛍光性基質には、一般式ＣＩ－ＣＩＩＩで示される化合物が含まれる。

【０２６４】

【化４９】



R_1, R_2, R_2'=H, F, Cl, Br, I, COOH, COOR(R=任意のエステル)

R_3, R_4=H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $-H_2C-C\equiv CH$, $-H_2C-$

or $R_3(CH_2)_mR_4$: R_3=R_4=CH_2, n=0, 1, 2, 3,

R_7= H, CH_3

R_8=H, CH_3, OH, $COCH_3$

R_9=H, CH_3

R=アルコキシ(任意)、または、対称的な鎖 COH(R7)CH(R8)CH(R9)N(R3R4)

酸化還元およびＭＡＯ反応のための、典型的な蛍光性基質に関する図５および１１を参照のこと。

【０２６５】

任意の蛍光物質は、蛍光性基質を調製するために用いられる。蛍光物質には、フルオロセイン（ｆｌｕｏｒｏｓｃｅｉｎ）、テキサスレッド（Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ）、ＤＡＰＩ、ＰＩ、アクリジンオレンジ、Ａｌｅｘａ　ｆｌｕｏｒｓ（例えばＡｌｅｘａ３５０、Ａｌｅｘａ４０５またはＡｌｅｘａ４８８）、シアニン染料（例えばＣｙ３）、クマリン、エチジウムブロマイド、フルオレセイン、ＢＯＤＩＰＹ、ｒｈｏｄｏｌ、Ｒｏｘ、５－カルボキシフルオレセイン、６－カルボキシフルオレセイン、アントラセン、２－アミノ－４－メトキシナフタレン、フェナレノン、アクリドン、フッ素化キサンテン誘導体、α－ナフトール（α－ｎａｐｈｔｏｌ）、β－ナプトール（β－ｎａｐｔｈｏｌ）、１－ヒドロキシピレン、クマリン（例えば７－アミノ－４－メチルクマリン（ＡＭＣ）、または、７－アミノ－４－トリフルオロメチルクマリン（ＡＦＣ））、ローダミン（例えばテトラメチルローダミン、ローダミン－１１０、または、カルボキシローダミン）、クレシルバイオレット、または、レソルフィン（ｒｅｓｏｒｕｆｍ）、ならびに、米国特許第６，４２０，１３０，号明細書に開示されている蛍光物質が含まれるが、これらに限定されない。なお、上記開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２６６】

〔ＶＩ．リンカー〕

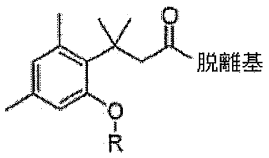
リンカー戦略を、Ａ環もしくはＣ環が修飾されたルシフェリンに用いて、あるいは、誘導体を含んでいる蛍光物質と一緒に用いて、興味深い酵素の基質に誘導してもよい。上記興味深い酵素として、デアセチラーゼ、デホルミラーゼ、および、デメチラーゼが挙げられ、他には、リンカーを自由にするために一般式Ｉで示される化合物（有益な酵素の基質）のＬ基を除去することができる酵素が挙げられる。なお、このような除去により、ルシフェラーゼの基質またはプロ基質が得られる。また、残っているリンカーは、非触媒反応により除去されてもよい。

【０２６７】

リンカーには、アルキルまたはアルコキシ鎖（（C_1－C_6）アルキルまたは（C_1－C_6）アルコキシ基）を用いることができる。鎖は、１以上の電子吸引性置換基Ｒ（アルデヒド、アセチル、スルフォキシド、スルホン、ニトロ、または、シアノ基、あるいは、それらの組み合わせ）を有していてもよい。他のリンカーには、トリメチルロック（ｔｒｉｍｅｔｈｙｌ　ｌｏｃｋ）、キニーネメチド（ｑｕｉｎｉｎｅ　ｍｅｔｈｉｄｅ）、および、ジケトピペラジンリンカー、ならびに、それらの誘導体が、含まれる。トリメチルロックリンカーを、以下のように例証することができる。

【０２６８】

【化５０】



CIV

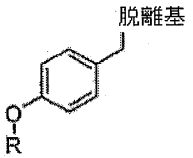
（式中、Ｒは、一般式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩの何れかで定義されているようなものを表す、酵素（例えばアッセイされている酵素）により除去可能な基であり；トリメチルロックリンカーは、Ｚ、Ｚ’、または、Ｚ’’－Ｒ基のうちの１つの水素原子と置き換わっており；「脱離基」は、一般式式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩで示される化合物の構造の残物である）。トリメチルロックリンカーの使用に関しては、Ｗａｎｇら，　Ｊ．　Ｏｒｇ．　Ｃｈｅｍ．，　６２：１３６３　（１９９７）、および、Ｃｈａｎｄｒａｎら，　Ｊ．　Ａｍ．　Ｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．　１２７：１６５２　（２００５）を参照のこと。

【０２６９】

キニーネメチドリンカーを、以下のように例証することができる。

【０２７０】

【化５１】



CV

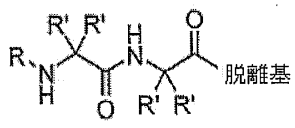
（式中、Ｒは、一般式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩの何れかで定義されているようなものを表す、酵素（例えばアッセイされている酵素）により除去可能な基であり；キニーネメチドリンカーは、Ｚ、Ｚ’、または、Ｚ’’－Ｒ基のうちの１つの水素原子と置き換わっており；「脱離基」は、一般式式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩで示される化合物の構造の残物である）。キニーネメチドリンカーの使用に関しては、Ｇｒｅｅｎｗａｌｄら，　Ｊ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ．．　４２：３６５７　（１９９９）、および、Ｇｒｅｅｎｗａｌｄら，　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，　１４：３９５　（２００３）を参照のこと。

【０２７１】

ジケトピペラジンリンカーを、以下のように例証することができる。

【０２７２】

【化５２】



CVI

（式中、Ｒは、一般式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩの何れかで定義されているようなもの

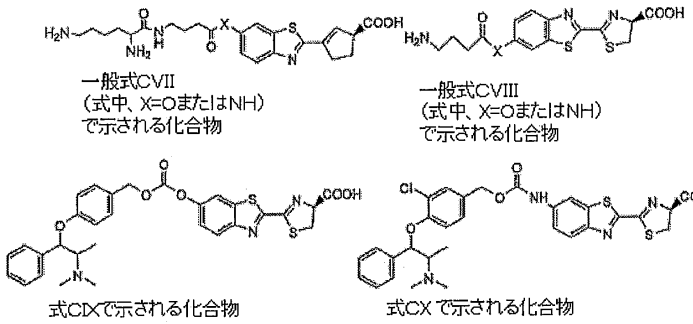
を表す、酵素（例えばアッセイされている酵素）により除去可能な基であり；ジケトピペラジンリンカーの各Ｒ’は独立して、Ｈ、あるいは、Ｏ、Ｓ、またはＮＨに割り込まれていてもよいアルキル鎖（好ましくはメチル基）を表し；ジケトピペラジンリンカーは、Ｚ、Ｚ’、または、Ｚ’’－Ｒ基のうちの１つの水素原子と置き換わっており；「脱離基」は、一般式式Ｉ－ＩＩＩまたはＶ－ＸＩＩで示される化合物の構造の残物である）。ジケトピペラジンリンカーの使用に関しては、Ｗｅｉら，　Ｂｉｏｏｒｇ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ．　Ｌｅｔｔ．　１０：　１０７３　（２０００）を参照のこと。

【０２７３】

誘導体に含まれる他のリンカーには、以下の一般式ＣＶＩＩ－ＣＸで示される化合物が含まれる。

【０２７４】

【化５３】

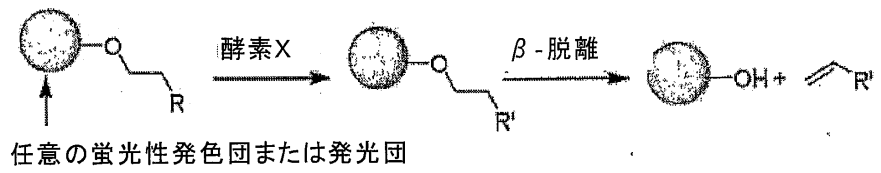


【０２７５】

生成物において電子吸引基Ｒ（アルデヒド、アセチル、スルホキシド、スルホン、ニトロ、またはシアノ）であるＲ基を有している基質を用いた、生物発光性または蛍光性反応の生成物のβ－脱離により、ルシフェラーゼまたは蛍光物質の基質が生じてもよい。

【０２７６】

【化５４】

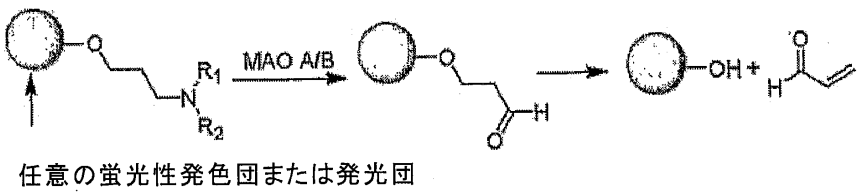


【０２７７】

例えば、ＭＡＯを検出するために、誘導体に以下の反応が用いられてもよい。

【０２７８】

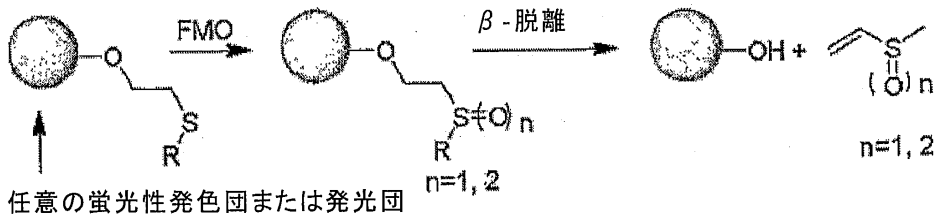
【化５５】



ＦＭＯを検出するために、誘導体に以下の反応が用いられてもよい。

【０２７９】

【化５６】

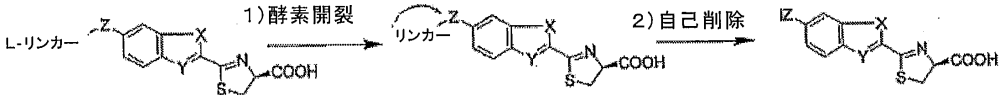


【０２８０】

リンカーを用いている一般式ＣＸＩ－ＣＸＶで示される誘導体、および、反応の具体的な実施の形態には、以下が含まれる。

【０２８１】

【化５７】

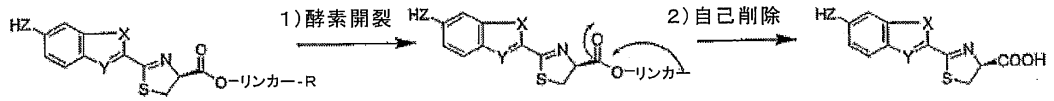


一般式CXIで示される化合物

（式中、Ｌは、デメチラーゼに関してはＭｅを表し、デアゼチラーゼに関してはＡｃを表し、デホルミラーゼに関してはＣＨＯを表し、ＸはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＹはＮまたはＣＨを表し、ＺはＯまたはＮＨを表す）。

【０２８２】

【化５８】

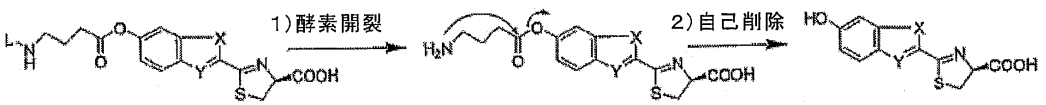


一般式CXIIで示される化合物

（式中、Ｒは、デメチラーゼに関してはＭｅを表し、デアゼチラーゼに関してはＡｃを表し、デホルミラーゼに関してはＣＨＯを表し、ＸはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＹはＮまたはＣＨを表し、ＺはＯまたはＮＨを表す）。

【０２８３】

【化５９】

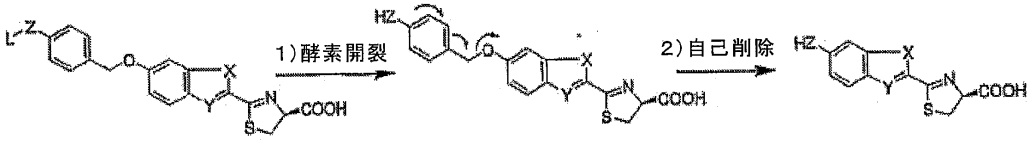


一般式CXIIIで示される化合物

（式中、Ｌは、デメチラーゼに関してはＭｅを表し、デアゼチラーゼに関してはＡｃを表し、デホルミラーゼに関してはＣＨＯを表し、ＸはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＹはＮまたはＣＨを表す）。

【０２８４】

【化６０】

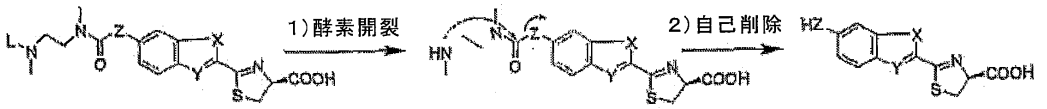


一般式CXIVで示される化合物

（式中、Ｌは、デメチラーゼに関してはＭｅを表し、デアゼチラーゼに関してはＡｃを表し、デホルミラーゼに関してはＣＨＯを表し、ＸはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＹはＮまたはＣＨを表し、ＺはＯまたはＮＨを表す）。

【０２８５】

【化６１】



一般式CXVで示される化合物

（式中、Ｌは、デメチラーゼに関してはＭｅを表し、デアゼチラーゼに関してはＡｃを表し、デホルミラーゼに関してはＣＨＯを表し、ＸはＳまたはＣＨ＝ＣＨを表し、ＹはＮまたはＣＨを表し、ＺはＯまたはＮＨを表す）。

【０２８６】

〔ＶＩＩ．ルシフェラーゼに媒介される反応において、光の産出の安定化に役立つ作用物質〕

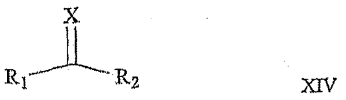
ルシフェラーゼに媒介される反応において、光の産出の安定化に役立つ作用物質には、有機化合物（すなわち、１以上の炭素原子を含んでいる化合物）が含まれる。そのような作用物質は、非ルシフェラーゼに媒介される反応またはルシフェラーゼに媒介される反応の、前に、開始時に、および／または、間に、添加されてもよい。適切な有機化合物には、炭素－硫黄結合、炭素－セレン結合が含まれていてもよい。例えば、適切な有機化合物には、炭素－硫黄２重結合（Ｃ＝Ｓ）、炭素－セレン２重結合（Ｃ＝Ｓｅ）、炭素－硫黄１重結合（Ｃ－Ｓ）、または、炭素－セレン１重結合（Ｃ－Ｓｅ）が含まれる。また、適切な有機化合物には、炭素が結合したメルカプト基（Ｃ－ＳＨ）、または、２つの炭素原子に結合した硫黄原子（Ｃ－Ｓ－Ｃ）も含まれる。１実施の形態では、化合物の性質は、親油性である。

【０２８７】

炭素－硫黄２重結合、または、炭素－セレン２重結合を含んでいる適切な化合物には、例えば、一般式ＸＩＶ：

【０２８８】

【化６２】



XIV

（式中、ＸはＳまたはセレンを表し；$Ｒ_{1}$および$Ｒ_{2}$は、互いに独立して、水素、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルキル、（$Ｃ_{3}$－$Ｃ_{8}$）シクロアルキル、（$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{20}$）アルコキシ、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルケニル、（$Ｃ_{2}$－$Ｃ_{20}$）アルキニル、アリール、ヘテロアリール、または、$ＮＲ_{a}Ｒ_{b}$を表すか；あるいは$Ｒ_{1}$および$Ｒ_{2}$は、それらが結合している炭素と一緒に、炭素を含んでおり、１、２または３のヘテロ原子を含んでいてもよい、飽和もし

くは不飽和の５、６、７、または８員環を形成し（ここで、上記ヘテロ原子は、オキシ（－Ｏ－）、チオ（－Ｓ－）または窒素（－ＮＲｃ－）から選ばれ、上記環は、１、２または３のハロ、ヒドロキシ、オキソ、チオキソ、カルボキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、あるいは、ヘテロアリールにより置き換えられていてもよい）；Ｒ$_a$、Ｒ$_b$、およびＲ$_c$は、互いに独立して、水素、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、ヘテロアリールを表し；Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_a$、Ｒ$_b$、およびＲ$_c$の任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、または（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニルは、１以上（例えば１、２、３または４）のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、チオキソ、カルボキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アリール、またはヘテロアリールにより置き換えられていてもよく；任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上（１、２、３または４）のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニルで任意に置き換えられていてもよい）で示される化合物、または、その塩が含まれる。

【０２８９】

メルカプト基を含んでいる適切な化合物には、例えば一般式Ｒ$_3$ＳＨ（式中、Ｒ$_3$は、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表し；Ｒ$_3$の任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、または、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニルは、１以上（例えば１、２、３または４）のハロ、ヒドロキシ、メルカプト　オキソ、チオキソ、カルボキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、または、ＮＲ$_d$Ｒ$_e$により置き換えられていてもよく；Ｒ$_d$およびＲ$_e$は、互いに独立して、水素、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル　アリール、または、ヘテロアリールを表し；任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上（１、２、３または４）のハロ、メルカプト、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい）で示される化合物、または、その塩が含まれる。

【０２９０】

他の適切な化合物には、一般式Ｒ$_4$ＮＣＳ（式中、Ｒ$_4$は、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表し；Ｒ$_3$の任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、または、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニルは、１以上（例えば１、２、３または４）のハロ、ヒドロキシ、メルカプト　オキソ、チオキソ、カルボキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、または、ＮＲ$_f$Ｒ$_g$により置き換えられていてもよく；Ｒ$_f$およびＲ$_g$は、互いに独立して、水素、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル　アリール、または、ヘテロアリールを表し；任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上（１、２、３または４）のハロ、メルカプト、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、

シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい）で示される化合物、または、その塩が含まれる。

【０２９１】

炭素－セレン１重結合または炭素－硫黄１重結合を含んでいる他の適切な化合物には、一般式Ｒ$_{5}$－Ｘ－Ｒ$_{6}$（式中、Ｘは、－Ｓ－または－Ｓｅ－を表し；Ｒ$_{5}$は、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表し；Ｒ$_{6}$は、水素、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表すか；あるいは、Ｒ$_{5}$およびＲ$_{6}$は、Ｘと一緒に、ヘテロアリールを形成し；Ｒ$_{5}$またはＲ$_{6}$の任意の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、もしくは、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニルは、１以上（例えば１、２、３または４）のハロ、ヒドロキシ、メルカプト　オキソ、チオキソ、カルボキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、または、ＮＲ$_{k}$Ｒ$_{m}$により置き換えられていてもよく；Ｒ$_{k}$およびＲ$_{m}$は、互いに独立して、水素、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニル　アリール、または、ヘテロアリールを表し；任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上（１、２、３または４）のハロ、メルカプト、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい）で示される化合物、または、その塩が含まれる。

【０２９２】

ラジカル、置換基および範囲に関する、以下に記載されている具体的で、且つ、好ましい値は、説明のためのものであり、他の定義された値、または、ラジカルおよび置換基に関する範囲を定義している他の値を排除するものではない。

【０２９３】

具体的に、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルキルは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ペンチル、３－ペンチル、または、ヘキシルであってもよい。（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、または、シクロヘキシルであってもよい。

【０２９４】

（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシは、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ペントキシ、３－ペントキシ、または、ヘキシルオキシであってもよい。（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルケニルは、ビニル、アリル、１－プロペニル、２－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、１，－ペンテニル、２－ペンテニル、３－ペンテニル、４－ペンテニル、１－ヘキセニル、２－ヘキセニル、３－ヘキセニル、４－ヘキセニル、または、５－ヘキセニルであってもよい。（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルキニルは、エチニル、１－プロピニル、２－プロピニル、１－ブチニル、２－ブチニル、３－ブチニル、１－ペンチニル、２－ペンチニル、３－ペンチニル、４－ペンチニル、１－ヘキシニル、２－ヘキシニル、３－ヘキシニル、４－ヘキシニル、または、５－ヘキシニルであってもよい。（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルは、アセチル、プロパノイル、または、ブタノイルであってもよい。（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$）アルコキシカルボニルは、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、ペントキシカルボニル、または、ヘキシルオキシカルボニルであってもよい。（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{20}$）アルカノイルオキシは、アセトキシ、プロパノイルオキシ、ブタノイルオキシ、イソブタノイルオキシ、ペンタノイルオキシ、または

ヘキサノイルオキシであってもよい。アリールは、フェニル、インデニル、または、ナフチルであってもよい。ヘテロアリールは、フリル、イミダゾリル、トリアゾリル、トリアジニル、オキサゾイル、イソキザゾイル、チアゾリル、イソチアゾイル、ピラゾリル、ピロリル、ピラジニル、テトラゾリル、ピリジル（または、その窒素酸化物）、チエニル、ピリミジニル（または、その窒素酸化物）、インドリル、イソキノリル（または、その窒素酸化物）、あるいは、キノリル（または、その窒素酸化物）であってもよい。

【０２９５】

具体的に、R_1およびR_2は、互いに独立して、水素、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、アリール、ヘテロアリール、または、NR_aR_bを表し；R_aおよびR_bは、互いに独立して、水素、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表し；R_1、R_2、R_a、およびR_bの任意の（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシ、（C_2－C_{20}）アルケニル（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、または、（C_2－C_{20}）アルキニルは、１または２のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、チオキソ、カルボキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、アリール、または、ヘテロアリールにより、置き換えられていてもよく；任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい。

【０２９６】

具体的に、R_1およびR_2は、互いに独立して、水素、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_2－C_{10}）アルケニル、（C_2－C_{10}）アルキニル、アリール、または、NR_aR_bを表してもよい。

【０２９７】

具体的に、R_1およびR_2は、それらが結合している炭素と一緒に、炭素を含んでおり、１または２のヘテロ原子を含んでいてもよい、飽和または不飽和の５もしくは６員環を形成することができる。なお、上記ヘテロ原子は、オキシ（－Ｏ－）、チオ（－Ｓ－）、または、窒素（－NR_c）－から選択され、上記環は、１、２または３のハロ、ヒドロキシ、オキソ、チオキソ、カルボキシ、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールにより置き換えられていてもよい。また、R_cは、水素、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、アリール、ヘテロアリールを表す。R_1、R_2およびR_cの任意の（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_{20}）シクロアルキル、（C_1－C_{20}）アルコキシ、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、または、（C_2－C_{20}）アルキニルは、１以上のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、チオキソ、カルボキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、アリール、または、ヘテロアリールにより置き換えられていてもよい。任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい。

【０２９８】

具体的に、R_1およびR_2は、互いに独立して、NR_aR_bを表してもよい。ここで、R_aおよびR_bは、互いに独立して、水素、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、（C_2－C_{20}）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表してもよい。また、任意の（C_1－C_{20}）アルキル、（C_3－C_8）シクロアルキル、（C_2－C_{20}）アルケニル （C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、または、（C_2－C_{20}）アルキニルは、１以上のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、チオキソ、カルボキシ、アリール、または、ヘテロアリールにより置き換えられていてもよい。任意のアリールまたはヘテロアリールは、１以上のハロ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよい。

【０２９９】

具体的に、R_1およびR_2は、互いに独立して、アミノ、（C_1－C_{20}）アルキル、（C_1－C_{20}）アルキルアミノ、アリルアミノ、２－ヒドロキシエチルアミノ、フェニルアミノ、または、４－チアゾイルアミノを表してもよい。

【０３００】

具体的に、R_1およびR_2は、互いに独立して、アミノ、メチル、アリルアミノ、２－ヒドロキシエチルアミノ、フェニルアミノ、または、４－チアゾイルアミノを表してもよい。

【０３０１】

R_3の具体的な値は、１以上のハロ、メルカプト　オキソ、チオキソ、カルボキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、または、NR_dR_eにより置き換えられていてもよい（C_1－C_{20}）アルキルである。

【０３０２】

R_3の具体的な値は、２－アミノエチル、２－アミノ－２－カルボキシエチル、または、２－アシルアミノ－２－カルボキシエチルである。

【０３０３】

R_4の具体的な値は、１以上のハロ、メルカプト、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、（C_1－C_{20}）アルカノイル、（C_1－C_{20}）アルカノイルオキシ、スルホ、または、（C_1－C_{20}）アルコキシカルボニルにより置き換えられていてもよいアリールである。

【０３０４】

具体的に、R_5は、（C_1－C_{10}）アルキル、（C_3－C_6）シクロアルキル、（C_2－C_{10}）アルケニル、（C_2－C_{10}）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表し；R_6は、水素、（C_1－C_{10}）アルキル、（C_3－C_6）シクロアルキル、（C_2－C_{10}）アルケニル、（C_2－C_{10}）アルキニル、アリール、または、ヘテロアリールを表す。

【０３０５】

具体的に、R_5およびR_6は、Ｘと一緒に、ヘテロアリールを形成する。

【０３０６】

１実施の形態では、有機化合物は、１以上のメルカプト基（Ｃ－ＳＨ）を有しているポリペプチド、または、タンパク質ではない。

【０３０７】

１実施の形態では、有機化合物は、１以上のメルカプト基（Ｃ－ＳＨ）を含んでいる化合物ではない。

【０３０８】

好ましい化合物は、補酵素ＡおよびＤＴＴである。

【０３０９】
上述した化合物を、市販の源から入手することができるし、あるいは、合成化学の分野において知られている手法を用いて市販の出発原料から調製することができる。例えば、Ｊｅｒｒｙ Ｍａｒｃｈ, Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, ４ｔｈ ｅｄ. Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ, Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ、および、Ｓｏｎｓ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, １９９２を参照のこと。
【０３１０】
化合物が、安定な塩を形成するのに十分なほど、塩基性または酸性であれば、本発明の方法において、塩としての化合物を使用することが、適切になることがある。適切な塩の例としては、有機酸添加塩（例えば、トシレート、メタンスルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩（ｔａｒｔａｒａｔｅ）、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、α－ケトグルタル酸塩、および、α－グリセロホスフェート塩）が挙げられる。また、適切な無機塩が形成されてもよい。そのような無機塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、および、炭酸塩が挙げられる。
【０３１１】
塩を、技術的に公知の標準の手法を用いて（例えば、十分に塩基性の化合物と適切な酸とを反応させることにより）、得ることができる。また、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム）、または、アルカリ土類金属（例えばカルシウム）の塩も、用いることができる。
【０３１２】
本発明の方法にしたがって用いられたときに、本明細書に記載されている化合物は、任意の有効濃度における、発光反応中に存在することができる。所定の化合物の最適濃度は、用いられる発光用試薬、および、所定のアッセイが実施される特定の条件に依存する。しかしながら、適切な条件を、技術的に利用可能な標準の技術を用いて、決定することができる。
【０３１３】
具体的に、発光反応において存在することができる化合物の濃度は、少なくとも約０．０１μＭ、または、少なくとも約０．１μＭ、例えば少なくとも０．１ｍＭである。より具体的には、発光反応において存在することができる化合物の濃度は、約０．１μＭから約５００ｍＭまでの範囲（０．１μＭおよび５００ｍＭを含む）、約０．００１μＭ、０．０１μＭまたは０．１μＭから約２５０ｍＭまでの範囲（０．００１μＭ、０．０１μＭ、０．１μＭ、２５０ｍＭを含む）である。好ましくは、化合物は、約０．００１μＭ、０．０１μＭ、０．１μＭ、１μＭまたは１０μＭから約１００ｍＭ（０．００１μＭ、０．０１μＭ、０．１μＭ、１μＭ、１０μＭ、および１００ｍＭを含む）までの範囲の濃度で存在する。
【０３１４】
具体的に、アッセイを、精製された酵素、細胞ライセート、または、全細胞の存在下において実施することができる。
【０３１５】
具体的に、アッセイを、少なくとも約１０％の水を含んでいる溶媒中において実施することができる。より具体的に、本発明は、少なくとも約２５％の水、または、少なくとも約４０％の水を含んでいる溶媒中において実施することができる。
【０３１６】
〔ＶＩＩ．キット〕
本発明は、反応のための試薬であるかまたは反応を増強もしくは阻害する、１以上の分子の存在または活性を検出するためのキットも提供する。あるいは、本発明は、試料（無傷細胞、細胞ライセート（例えば、少なくとも部分的に精製されているライセート）もしくは細胞上清などの試料）の状態を検出するためのキットを提供する。１実施の形態では、キットには、本発明の誘導体が含まれている。以下のルシフェリンもしくはアミノルシフェリンの誘導体、蛍光物質の誘導体、別の基質、酵素、または、反応混合物のうちの２

以上を含んでいる本発明のキットについて言えば、（ｉ）それぞれは、別々の容器に収容されていてもよいし、（ｉｉ）いくつかの成分が、いくつかの容器において組み合わせられていてもよいし、あるいは、（ｉｉｉ）それらは単一の容器に収容されていてもよい。キットには、アッセイでの使用に、且つ、誘導体または酵素にとって好適な緩衝液が含まれていてもよい。また、緩衝液を、単一の容器に収容してもよい。また、キットには、非生物発光反応のための消光剤が含まれていてもよい。

【０３１７】

〔ＩＸ．典型的な合成〕

Ａ．　ルシフェリン変更のための実験手順

種々のルシフェリン誘導体の合成のための実験手順が下記に記載されている。

【０３１８】

＜Ｉ．ルシフェリンエステル合成のための一般的な手順＞

＜ＩＩ．Ｄ－システインまたはＤ－システインエステル＞

＜ＩＩＩ．ルシフェリンメチルエーテルまたはＨ－ルシフェリンのエステル＞

＜ＩＶ．キノリニルルシフェリン誘導体＞

＜Ｖ．その他＞。

【０３１９】

＜Ｉ．一般的なルシフェリンエステル類の一般的な合成手順＞

ルシフェリン－Ｈ、キノリニルルシフェリンを含むルシフェリンエステルおよび誘導体の合成には、ａ）Ｄ－システインまたはＤ－システインエステルなどの対応するシアノ基の直接環化、ｂ）３－ヨードメチルピリジンハイドライド（３－ヨードメチルピリジンヒドロヨージド（ピコリニルヨージド））または、３－ヨードプロパノールなどのハロゲン化有機化合物のエステル化をＣｓＦ－促進エステル化、の２種の合成方法がある。

【０３２０】

Ａ．　直接環化　ダイレクト環化

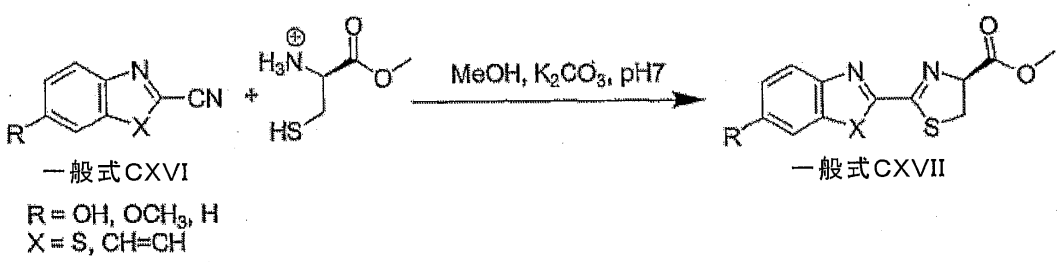
このカテゴリーにおいて、２つのＤ－システインエステルが使用された。一方は、Ｄ－システインメチルエステルそして、他方は、Ｄ－システイン２－ヒドロキシエチルエステルである。後者は、環化の前に還元剤を必要とする。

【０３２１】

ｉ）Ｄ－シテインメチルエステル（ｃｙｔｅｉｎｅ　ｍｅｔｈｙｌ　ｅｓｔｅｒ）

【０３２２】

【化６３】



２－シアノベンゾチアゾールまたは２－シアノキノリンの誘導体（１等量）をメタノールに溶かした。そして、ゆるやかな窒素の流れにより１０分間脱気した。一方、Ｄ－システインメチルエステル（１．５等量）を水に溶かした。そして、そのｐＨを約７に調整した。この溶液をまた、ゆるやかな窒素の流れにより５分間脱気した。その後、水溶液は、上記有機溶液に加えられた。その結果、得られた溶液を、基質に応じて、窒素雰囲気下で、３０分間から数時間の間攪拌した。反応は、ジクロロメタン中にメタノールを含む溶液を用いたＴＬＣにより追跡した。反応完結の後、混合物をろ過し、ＨＰＬＣにより精製した。典型的なＨＰＬＣの条件は以下の通りである。

【０３２３】

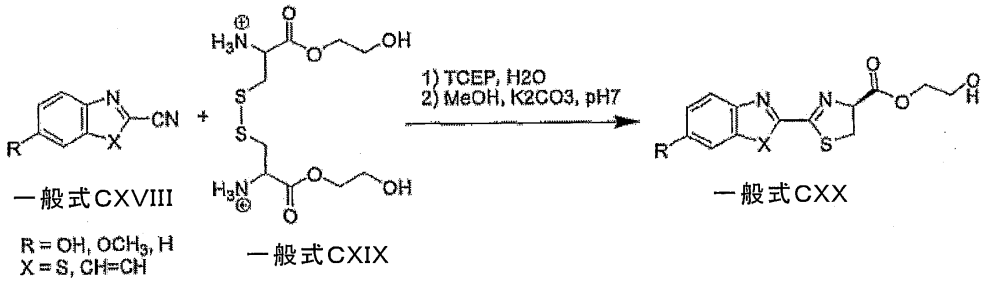
カラム：Ｄｙｎａｍａｘ　６０Å，１インチ，２５０ｎｍ，逆相Ｃ－１８カラム

移動相Ａ：水、または１００ｍＭ酢酸アンモニウム，ｐＨ７、または０．１％ＴＦＡ水溶液
移動相Ｂ：アセトニトリル
流速：２０ｍＬ／分
検出波長：３００ｎｍ
グラディエント：１００％Ａから１００％Ｂ，３０分間，および１００％Ｂを３０分間維持。

【０３２４】
その後、精製した化合物をＮＭＲ，ＵＶ－Ｖｉｓおよびｈｐｌｃにより同定した。

【０３２５】
ｉｉ）Ｄ－シスチン２－ヒドロキシエチルエステル

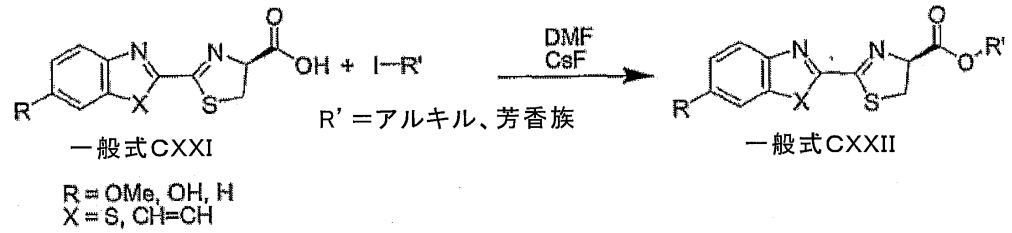
【０３２６】
【化６４】



Ｄ－シスチン２－ヒドロキシエチルエステルの環化の手順は、ｐＨ調整の前に、１等量のトリス（２－クロロエチル）リン酸塩トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ｈｙｄｒｏｘｈｌｏｒｉｄｅ）（ＴＣＥＰ）を加えた以外は、Ｄ－シテインメチルエステルと同様である。

【０３２７】
Ｂ．　ＣｓＦ－促進エステル化

【０３２８】
【化６５】

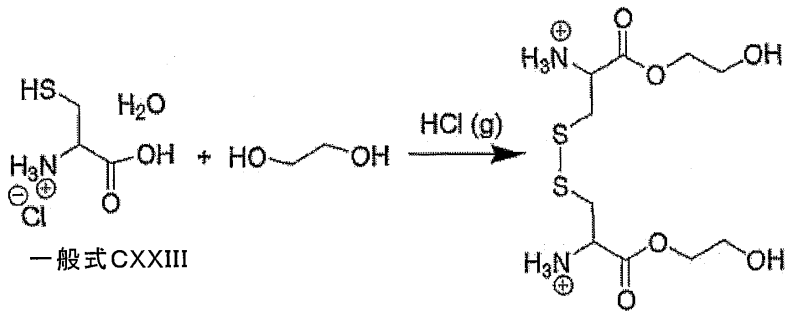


ＤＭＦ中にルシフェリンまたはその誘導体（１等量）を含む溶液に、フッ化セシウム（１．５等量）、つづいて、３－ヨードメチルピリジン　ヒドロヨージドまたは３－ヨードプロパノール（１．５等量）を加えた。ジクロロメタン中のメタノールを含む溶液によるＴＬＣによって反応を追跡しながら、得られた混合物を室温で数時間攪拌したの後、溶液を濃縮し、水を加えた。その後、混合物は、０．２μｍのフィルターによりろ過された。そして、上述と同様の条件でＨＰＬＣ精製にかけられた。

【０３２９】
＜ＩＩ．Ｄ－システインまたはＤ－シスチンエステル＞
１．Ｄ－シスチンの２－ヒドロキシエチルエステルの合成

【０３３０】

【化６６】



一般式CXXIII　　一般式CXXIV

【０３３１】

無水エチレングリコール溶液（１０ｍＬ）にＤ－システイン塩酸塩一水和物（１ｇ）を仕込んだ。ゆるやかな塩酸塩ガスの流れを約１時間の間、吹き込んだ。その後、溶液を１晩放置した。冷たいイソプロピルアルコール（１２．５ｍＬ）をゆっくり加えた。そして、その結果得られた混合物を２０℃で１時間おいた。白い沈殿物をろ別し、冷たいイソプロピルアルコールで洗った。そして、ろ過ケーキの吸引を継続することにより、液分を除去した。白い結晶（５９５ｍｇ）が得られた（収率：５２％）

【０３３２】

【化６７】

^{1}H NMR (DMSO-d6): 8.6-88 ppm (ブロード, 6 H), 4.35 ppm (ブロード 1重項 , 2 H), 4.20 ppm (m, 4 H), 3.63 ppm (m, 4 H), 3.05 ppm (ブロード 1重項 , 4H)

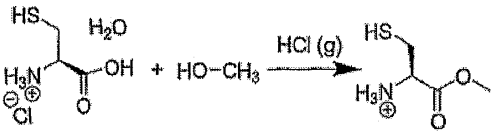
ES$^+$ 330.53 (M.W. 330.44)

【０３３３】

２．Ｄ－システインのメチルエステルの合成

【０３３４】

【化６８】



一般式CXXV　　一般式CXXVI

【０３３５】

メタノール溶液（１００ｍＬ）に、Ｄ－システイン塩酸塩一水和物（６ｇ）を仕込んだ。ゆるやかな塩酸塩ガスの流れを、１０５分間吹き込んだ。その後、溶液を、一晩中攪拌した。ついで、溶媒を、減圧下除去した。白い残留物を熱ネタノール（２５ｍＬ）に溶解し、２５ｍＬのイソプロピルアルコールを加えた。混合物は、溶液中に白い沈殿物が析出するまで、メタノールを除去するために、ｒｏｔａｖａｐにかけた。沈殿物は、一時的に氷の上に配置され、その後、減圧下でろ過し、冷たいイソプロピルアルコールで洗浄した。そして、ろ過ケーキの吸引を継続することにより、液分を除去した。

【０３３６】

【化６９】

^{1}H NMR (CD3OD): 4.35 ppm (t, 1H), 3.85 ppm (s, 3H), 3.10 ppm (d, 2H)

【０３３７】

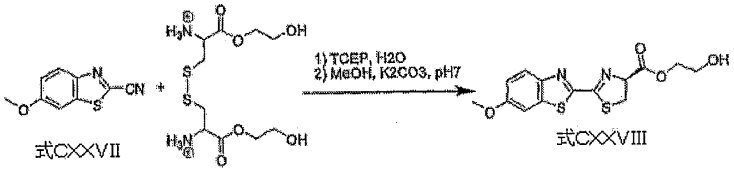
＜ＩＩＩ．ルシフェリンメチルエーテルエステル類＞

３．ルシフェリンメチルエーテルの２－ヒドロキシエチルエステルの合成

ａ．Ｄ－システインの２－ヒドロキシエチルエステルからの合成

【０３３８】

【化７０】



【０３３９】

２－シアノ－６－メトキシベンゾチアゾール（１００ｍｇ，０．５２６ｍｍｏｌ）をメタノール（２０ｍＬ）に溶解した。そして、１０分間のゆるやかな窒素の気流により、得られた溶液を脱気した。

【０３４０】

水（１０ｍＬ）に、Ｄ－システインの２－ヒドロキシエチルエステル（８７ｍｇ，０．２６３ｍｍｏｌ）を含む溶液に、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）（７７ｍｇ，０．２６３ｍｍｏｌ）を加えた。溶液のｐＨを、１Ｍの炭酸カルシウムを用いて約７に調整した。得られた溶液を、上述の溶液に加え、その後、得られた溶液を３０分間攪拌した。沈殿物は、０．２μｍのフィルターを介してろ別され、そして、ろ過液は、分取ＨＰＬＣによって精製された（一般的な手順を参照：移動相Ａ：水）。１０２ｍｇの精製された化合物が得られた（収率５２％）。

【０３４１】

【化７１】

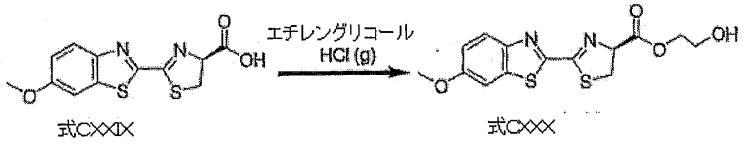
^{1}H NMR (CD3CN): 8.0 ppm (d, 1H), 7.55 ppm (d, 1H), 7.20 ppm (dd, 1H),
5.42 ppm (t, 1H), 4.25 ppm (m, 2H), 3.75 ppm (m, 4H)
MS: ES$^+$ 338.58 (M.W. 338.40)
(アセトニトリル中、325nmにおける)吸光係数:16, 630

【０３４２】

ｂ．エチレングリコールからの合成

【０３４３】

【化７２】



５ｍＬシュレンクフラスコ中、無水エチレングリコール（４ｍＬ）にルシフェリンメチルエーテル（エーテル（１００ｍｇ，０．３４ｍｍｏｌ）を含む溶液に、ゆるやかな塩酸塩

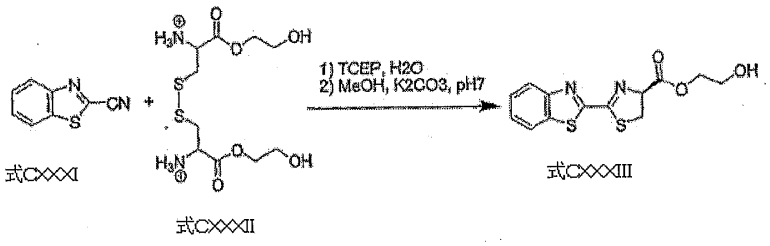
ガスの流れを流し込んだ。５分間のバブリングの後に、フラスコは、密閉され、６２℃のオイルバスに３時間つけた。ＨＣｌバブリングをさらに５分間繰返し、さらに１時間オイルバスにつけた。溶液を室温まで冷やした後、水（６ｍＬ）を添加し、そして得られた混合物は、ろ過され、分取ＨＰＬＣ（一般的手順参照：移動相Ａ：水）．により精製された。

【０３４４】

４．ルシフェリン－Ｈの２－ヒドロキシエチルエステルの合成

【０３４５】

【化７３】



この化合物は、上述した３ａの項と同様の方法で合成した。

【０３４６】

【化７４】

^{1}H NMR (CD3CN): 8.15 ppm (m, 2H), 7.60 ppm (m, 2H), 5.45 ppm (t, 1H), 4.25 ppm (m, 2H), 3.75 ppm (m, 4H), 1.95 ppm (t, 1H)

MS: ES$^+$ 308.58 (M.W. 308.38)

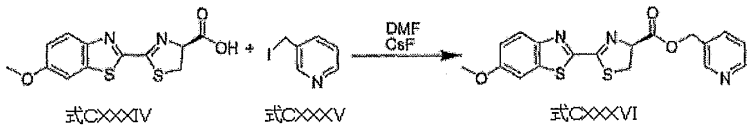
(アセトニトリル中、294nmにおける)吸光係数:14,050

【０３４７】

５．ルシフェリンメチルエーテルのｍ－ピコリニルエステルの合成

【０３４８】

【化７５】



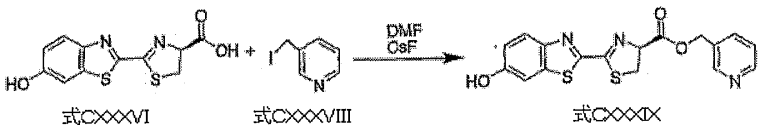
ＤＭＦ（３５ｍＬ）中にルシフェリンメチルエーテル（２１５ｍｇ，０．７３ｍｍｏｌ）を含む溶液に、フッ化セシウム（１７０ｍｇ，１．１ｍｍｏｌ）、続いて、３－ヨードメチルピリジンヒドロヨージド（３８０ｍｇ，１．１ｍｍｏｌ）を加えた。得られた混合物を室温で３時間２０分の間攪拌した後、溶液を約１０ｍＬまで濃縮し、６ｍＬの水を加えた。混合物を０．２μｍのフィルターを介してろ過し、ＨＰＬＣ精製にかけた。（一般的手順参照：移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）５７ｍｇの精製化合物が得られた。

【０３４９】

【化７６】

^{1}H NMR (CD_3CN): 8.62 ppm (s, 1H), 8.54 ppm (d, 1H), 7.96 ppm (d, 1H), 7.84 ppm (d, 1H), 7.56 ppm (d, 1 H), 7.41 ppm (m, 1H), 7.20 ppm (dd, 1H)
MS: ES^+ 385.77 (M.W. 385.46)

【０３５０】
６．ルシフェリンのｍ－ピコリニルエステルの合成
【０３５１】
【化７７】

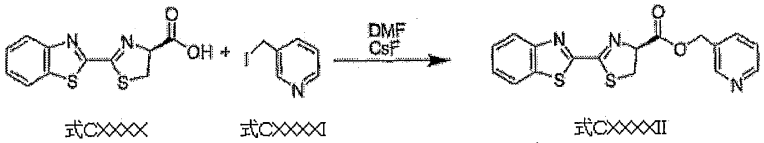


式CXXXVI　式CXXXVIII　式CXXXIX

ＤＭＦ（１０ｍＬ）中にルシフェリン一カリウム（５１ｍｇ，０．１６ｍｍｏｌ）を含む溶液に、フッ化セシウム（２４ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、続いて３－ブロモメチルピリジンハイドロブロマイド（４４ｍｇ，０．１７ｍｍｏｌ）を加えた。室温での１６時間の反応の後、溶媒を減圧下で除去した。その後、残留物を１０ｍＬの６０％ＤＭＦ水溶液に溶かした。得られた溶液は、０．２μｍのフィルターを介してろ過し、ＨＰＬＣ精製にかけられた（一般的手順参照、移動相Ａ：水）８．６ｍｇの精製化合物が得られた。
【０３５２】
【化７８】

^{1}H NMR (CD3OD-D2O): 8.58 ppm (s, 1H), 8.50 ppm (d, 1H), 7.90 ppm (d, 1H, 7.85 ppm (dd, 1H), 7.42 ppm (dd, 1H), 7.40 ppm (s, 1H), 7.10 ppm (dd, 1H), 5.45 ppm (t, 1H), 5.25 ppm (s, 2H), 3.75 ppm (m, 2H)
MS: ES^+: 371.65 (M.W. 371)
UV-Vis: 263 nm および 334 nm

【０３５３】
７．ルシフェリン－Ｈのｍ－ピコリニルエステルの合成
【０３５４】
【化７９】



式CXXXX　式CXXXXI　式CXXXXII

この化合物は、出発物質としてルシフェリン－Ｈを使用し、ルシフェリンメチルエーテルのｍ－ピコリニルエステルの合成と同様の方法により合成し、精製した。１３ｍｇの精製化合物が得られた。
【０３５５】

【化８０】

^{1}H NMR (CD3CN-D2O): 8.60 ppm (s, 1H), 8.52 ppm (d, 1H), 8.10 ppm (m, 2H), 7.85 ppm (m, 1H), 7.59 ppm (m, 2H), 7.42 ppm (m, 1H), 5.50 ppm (t, 1H), 5.28 ppm (s, 2H), 3.79 ppm (m, 2H)

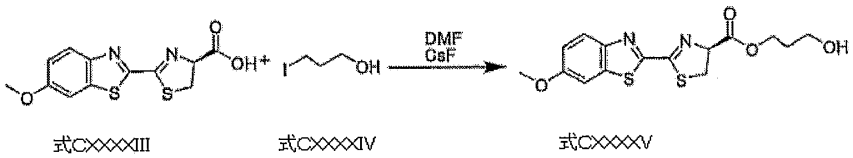
MS: ES$^+$ 355. 54 and 711.36 (2量体) (M.W. 355.43)

【０３５６】

８．ルシフェリンメチルエーテルの３－ヒドロキシプロピルエステルの合成

【０３５７】

【化８１】



式CXXXXIII　式CXXXXIV　式CXXXXV

この化合物は、出発物質として、ルシフェリンメチルエーテルおよび３－ヨードプロパノールを使用し、ルシフェリンメチルエーテルのｍ－ピコリニルエステルと同様の合成方法により合成した。

【０３５８】

【化８２】

^{1}H NMR (CD3OD): 7.95 ppm (d, 1H), 7.55 ppm (d, 1H), 7.18 ppm (dd, 1H), 5.41 ppm (t, 1H), 4.35 ppm (t, 2H), 3.92 ppm (s, 3H), 3.75 ppm (dd, 2H), 3.65 ppm (t, 2H), 1.92 ppm (m, 2H)

MS: ES$^+$: 352.70 (M.W. 352.43)

UV-Vis: 330 nm および 264 nm.

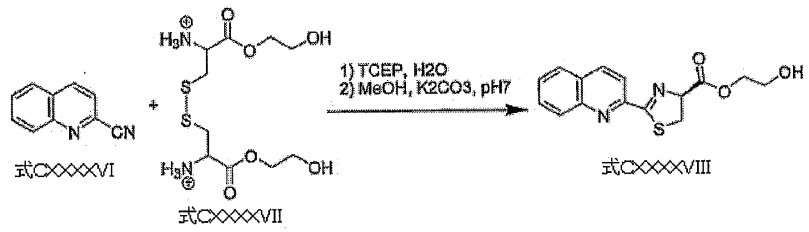
【０３５９】

＜ＩＶ．キノリニル　ルシフェリン誘導体＞

９．キノリニルルシフェリン－Ｈの２－ヒドロキシエステルの合成

【０３６０】

【化８３】



式CXXXXVI　式CXXXXVII　式CXXXXVIII

１，４－ジオキサン（５ｍＬ）中に２－シアノキノリン（５０ｍｇ，０．３２ｍｍｏｌ）を含む溶液を、窒素ガスのゆるやかな気流を５分間通じることにより脱気した。

【０３６１】

水（５ｍＬ）中に、システイン２－ヒドロキシエチルエステル塩酸塩（５３ｍｇ，０．１６ｍｍｏｌ）を含む溶液を、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（４６ｍｇ，０．１６ｍｍｏｌ）で処理した。この溶液のｐＨを１Ｍ炭酸カルシウムを用いて、

約７に調整した。その後、２－シアノキノリン溶液に滴下して加えた。得られた溶液を室温で、７．５時間攪拌した。そして、ルシフェリンのｍ－ピコリニルエステルと同様の方法で精製した（一般的手順参照、移動相Ａ：水）。１３ｍｇの精製化合物が得られた（収率２６．７％）。

【０３６２】

【化８４】

^{1}H NMR (CD3-OD-D2O): 8.40 ppm (d,1H), 8.15 ppm (d, 1H), 8.10 ppm (d, 1H), 7.95 ppm (d, 1H), 7.82 ppm (m, 1H), 7.68 ppm (m, 1H), 5.53 ppm (t, 1H), 4.25 ppm (m, 2H), 3.75 ppm (m, 2H), 3.65 pppm (m, 2H)

MS: ES$^+$: 302.35, 324.47 (M.W. 302.35)

UV-Vis: 247 nm および 295 nm.

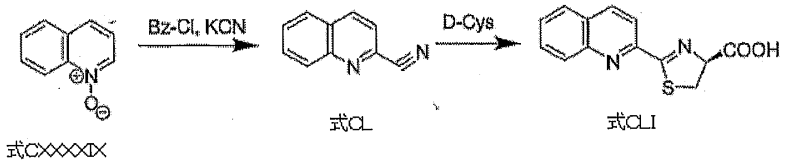
(アセトニトリル中、288nmにおける)吸光係数:7,500

【０３６３】

１０．キノリニルルシフェリン－Ｈの合成

【０３６４】

【化８５】



式CXXXXIX　式CL　式CLI

【０３６５】

ａ．２－シアノキノリン

キノリンＮ－オキサイド（２ｇ，１３．８ｍｍｏｌ）の溶液に、塩化ベンゾイル（２．６ｍＬ，２２．０ｍｍｏｌ）、つづいて水（２０ｍＬ）を加えた。その後、水（８０ｍＬ）中にシアン化カリウム（３．６ｇ，５５．１ｍｍｏｌ）を含む溶液を、１５分以上をかけてゆっくりと、力強く攪拌しつつ添加した。ジオキサン（１５ｍＬ）を溶解性を助けるために加えた。その後、混合物を室温で２．５時間攪拌した後、等量のジクロロメタンで３回抽出した。有機層を、無水硫酸ナトリウムにより乾燥し、溶媒は減圧下にて除去した。その後、残留物を３０％酢酸エチルヘキサン溶液によるフラッシュカラムクロマトフラフィーにより精製した。２．１ｇの目的物が得られた（収率１００％）

【０３６６】

【化８６】

NMR (CDCl3): 8.32 ppm (d, 1H), 8.18 ppm (d, 1H), 7.85 ppm (m, 2H), 7.65 ppm (m, 2H)

ES$^+$: 152.44 (M.W. 154.16)

【０３６７】

ｂ．キノリニルルシフェリン－Ｈ

２－シアノキノリン（５１ｍｇ，０．３３ｍｍｏｌ）を、１０ｍＬのメタノールに溶解した。そして、１０分間のゆるやかな窒素の気流を通じることにより、得られた溶液を脱気した。一方、Ｄ－システイン塩酸塩一水和物（９０ｍｇ，０．５１ｍｍｏｌ）を５ｍＬの水に溶かし、得られた溶液のｐＨを約７に調整した。その後、ゆるやかな窒素気流を通じることによって、５分間脱気した。ついで、水溶液を有機溶液に加えて、得られた混合

物を窒素雰囲気下で４時間攪拌した。その後、分取ＨＰＬＣによって精製した（一般的手順参照、移動相Ａ、０．１％ＴＦＡ水溶液）。

【０３６８】

【化８７】

NMR: 特徴的なピーク : 5.45 ppm (t, 1H), 3.68 ppm (m, 2H)

ES^+: 257.83 (M.W. 256.28)

UV-Vis: 295 nm

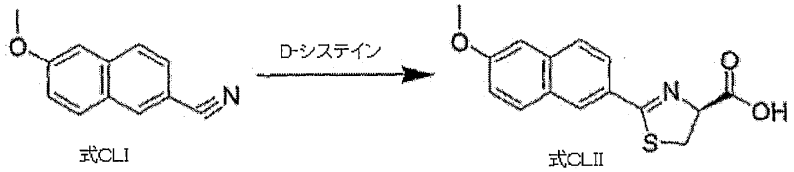
(メタノール中、242nm における) 吸光係数: 28, 530

【０３６９】

１１．ナフチルルシフェリンメチルエーテルの合成

【０３７０】

【化８８】



式CLI 式CLII

市販されている６－メトキシ－２－ナフトニトリルを出発原料として、この化合物は、キノリニルルシフェリン－Ｈと同様に一工程で合成された。

【０３７１】

【化８９】

NMR (CD3CN): 8.29 ppm (s, 1H), 8.05 ppm (dd, 1H), 7.94 ppm (d, 1H),
7.86 ppm (d, 1H), 7.36 ppm (d, 1H), 7.25 ppm (dd, 1H), 5.35 ppm (t, 1H),
3.95 ppm (s, 3H), 3.75 ppm (m, 2H)

ES^+: 288.23 (M.W. 287.33)

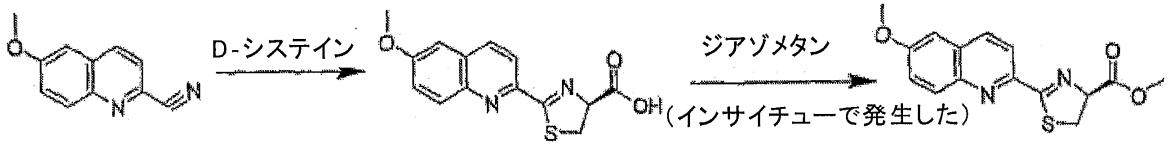
UV-Vis: 253 nm, 279 nm, 315 nm, 339 nm.

【０３７２】

１２．６‘－ヒドロキシキノリニルルシフェリンメチルエーテルのメチルエステルの合成

【０３７３】

【化９０】



式CLIV 式CLV 式CLVI

【０３７４】

ａ．６’－ヒドロキシキノリニルルシフェリンメチルエーテル

この化合物は、２－シアノ－６－メトキシキノリンおよびＤ－システインを出発物質して、キノリニルルシフェリン－Ｈの合成と同様の方法で合成した。

【０３７５】

【化９１】

NMR (CD3CN): 8.35 ppm (d, 1H), 8.16 ppm (d, 1H), 8.03 ppm (d, 1H), 7.52 ppm (dd, 1H), 7.38 ppm (d, 1H), 5.45 ppm (t, 1H), 3.97 ppm (s, 3H), 3.75 ppm (m, 2H)

ES^+: 289.33 (288.32)

UV-Vis: 343 nm, 329 nm, 261 nm.

吸光係数

【０３７６】

ｂ．６’－ヒドロキシキノリニルルシフェリンメチルエーテルのメチルエステル（８８１－９２）

氷上の４０％ＫＯＨ溶液３ｍＬと、１０ｍＬのエチルエーテルとのの混合物に、Ｎ－ニトロソ－Ｎ－メチルウレア（１ｇ，９．７ｍｍｏｌ）を５分間以上をかけて分割して添加した。気泡が一旦消失した後、最上の黄色の層を、エルレンマイヤーフラスコに水酸化カリウムと共に、注意深く静かに注いだ。混合物を１時間の間、氷上に静置した。

【０３７７】

１０ｍＬの無水ＴＨＦ中に、６－ヒドロキシキノリニルルシフェリンメチルエーテル（１９．５ｍｇ，０．０６８ｍｍｏｌ）を含む溶液に、口焼きしたガラスピペットを用いて、黄色が残存するようになるまで、ジアゾメタン溶液の液滴を添加した。ついで、過剰なジアゾメタンを消費するために、酢酸を５滴添加した。溶媒を、減圧下で除去した。残留物を、４０％の水を含むアセトニトリルに溶解した。そして、分取ＨＰＬＣによって精製した（一般的手順参照、移動相Ａ：水）。

【０３７８】

【化９２】

NMR (CD3CN): 8.25 ppm (d, 1H), 8.14 ppm (d, 1H), 7.96 ppm (d, 1H), 7.45 ppm (dd, 1H), 7.36 ppm (d, 1H), 5.42 ppm (t, 1H), 3.95 ppm (s, 3H), 3.80 ppm (s, 3H), 3.65 ppm (m, 3H)

ES^+: 303.49 (M.W. 302.35)

UV-Vis: 249 nm, 265 nm, 326 nm, 341 nm

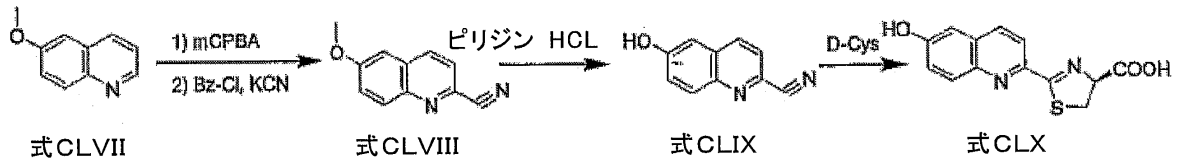
【０３７９】

１３．６－ヒドロキシキノリニルルシフェリン（標準的なキノリニルルシフェリン）の合成

この化合物は、文献に記載の手順により合成した。

【０３８０】

【化９３】



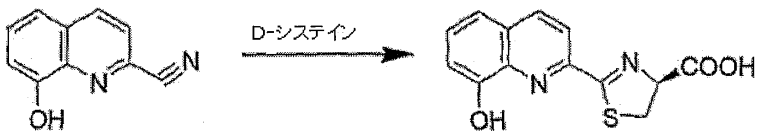
式CLVII　式CLVIII　式CLIX　式CLX

【０３８１】

１４．８－ヒドロキシキノリニルルシフェリンの合成

【０３８２】

【化９４】



式CLXI　　式CLXII

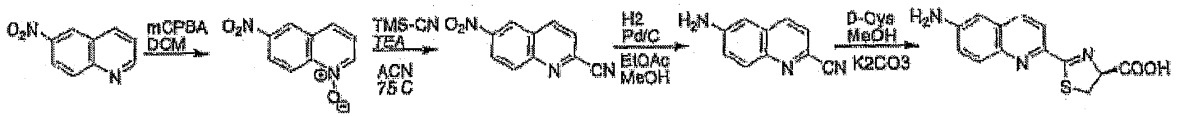
この化合物は、出発物質として、市販されている２－シアノ－８－ヒドロキシキノリンおよびＤ－システインを用いてキノリニルルシフェリン－Ｈを合成する方法と同じ方法で合成した。

【０３８３】

１５．６－アミノキノリニル　ルシフェリンの合成

【０３８４】

【化９５】



式CLXIII　式CLIX　式CLXX　式CLXXI　式CLXXII

【０３８５】

ａ．６－アミノ－２－シアノキノリン

この化合物は、文献の手順に従って合成した（国際公開ＷＯ０３／０９６９８０参照）

【０３８６】

ｂ．６－アミノキノリニル　ルシフェリン

６－アミノ－２－シアノキノリン（１００ｍｇ，０．５９ｍｍｏｌ）を３５ｍＬのメタノールに溶解した。得られた溶液を１０分間、ゆるやかな窒素の気流によって脱気した。一方、Ｄ－システイン塩酸塩一水和物（１３０ｍｇ，０．７４ｍｍｏｌ）を１５ｍＬの水に溶解し、得られた溶液をゆるやかな窒素の気流により、５分間脱気した。その後、水溶液を有機溶液に添加し、得られた溶液を窒素雰囲気下で４時間攪拌する。溶液の量を減圧下で減らし、その後、アセトニトリルによる分取ＨＰＬＣにより精製する。

【０３８７】

（一般的手順を参照、移動相Ａ：１００ｍＭ　NH_4Ac　ｐＨ７）

【０３８８】

【化９６】

NMR (CD3CN): 8.25 ppm (d, 1H), 7.95 ppm (m, 2H), 7.46 ppm (dd, 1H), 7.06 ppm (s, 1H), 5.53 ppm (t, 1H), 3.96 ppm (m, 2H)

ES^+: 274.67 (M.W. 273.31)

UV-Vis: 268 nm, 330 nm, および 373 nm.

(メタノール中、224nm における) 吸光係数: 15, 320

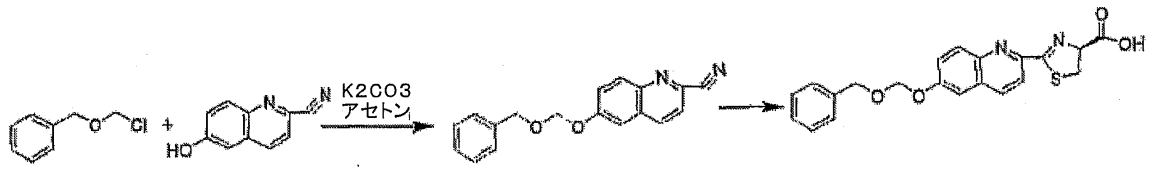
(メタノール中、274nm における) 吸光係数: 13, 020

【０３８９】

１６．キノリニルルシフェリンベンジルオキシメチルエーテルの合成

【０３９０】

【化９７】



式CLXXIII　式CLXXIVI　式CLXXV　式CLXXVI

【０３９１】

ａ．２－シアノ－６－ベンジルオキシメチルキノリン

１０ｍＬのアセトン中に２－シアノ－６－ヒドロキシキノリン（１００ｍｇ）を溶かした溶液に、炭酸カリウム（１２２ｍｇ）を溶かした。室温で３分間攪拌した後に、溶液を氷の上に置いた。ベンジルクロロメチルエーテル（１２２μＬ）をニードルを介して添加した。そして、得られた溶液を氷の上で２時間攪拌した。その後溶媒は減圧下で除去し、そして、残留物を、ジクロロメタンによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。１５７ｍｇが得られた。

【０３９２】

【化９８】

NMR (CDCl3): 8.18 ppm (d, 1H), 8.12 ppm (d, 1H), 7.65 ppm (d, 1H), 7.56 ppm (dd, 1H), 7.45 ppm (d, 1H), 7.34 ppm (m, 5H), 5.44 ppm (s, 2H), 4.76 ppm (s, 2H)

ES^+: 293.89 (M.W. 290.11)

UV-Vis: 250 nm, 325 nm, および 336 nm.

【０３９３】

ｂ．キノリニルルシフェリンベンジルオキシエーテル

１０ｍＬのメタノール中に、２－シアノ－６－ベンジルオキシメチルキノリン（７５ｍｇ，０．２５９ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、Ｄ－システイン塩酸塩一水和物（５５ｍｇ，０．３１ｍｍｏｌ）を加えた。トリエチルアミン（４４μＬ）を、ニードルを介して滴下した。溶液は、約１分間で不透明になり、そして、透明にするために、３ｍＬの水を添加した。得られた溶液を室温で４時間攪拌した。その後、溶液をＨＰＬＣによって精製した（一般的手順を参照、移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）。３７．１ｍｇの生成物が得られた。

【０３９４】

【化９９】

NMR (CD3CN): 8.28 ppm (d, 1H), 8.17 ppm (d, 1H), 8.03 ppm (d, 1H), 7.55 ppm (m, 4H), 7.33 ppm (m 5H), 5.49 ppm (s, 3H), 5.44 ppm (t, 1H), 4.78 ppm (s, 3H), 3.63 ppm (m, 2H)

ES^+: 396.03 (M.W. 394.14)

UV-Vis: 256 nm, 324 nm および 336 nm

(アセトニトリル中、323 nm における) 吸光係数: 10, 000

(アセトニトリル中、338 nm における) 吸光係数: 8, 770

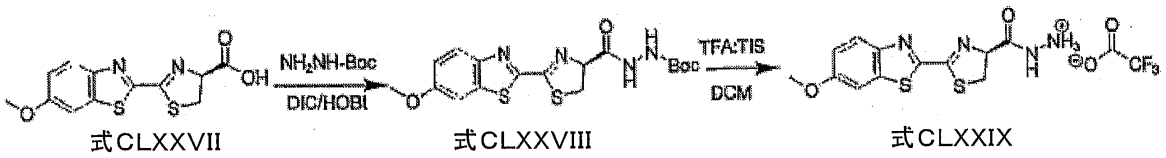
【０３９５】

＜Ｖ．その他＞

１７．ルシフェリンメチルエーテルのヒドラジドの合成

【０３９６】

【化１００】



式CLXXVII　　式CLXXVIII　　式CLXXIX

【０３９７】

ａ．ルシフェリンメチルエーテルのＮ’－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルヒドラジド

無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中に、ルシフェリンメチルエーテル（１００ｍｇ，０．３４ｍｍｏｌ）を含む懸濁溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）（１３０μＬ，０．８４ｍｍｏｌ）および無水ＴＨＦ（２ｍＬ）中にＨＯＢｔ（１１０ｍｇ，０．７２ｍｍｏｌ）を含む溶液をニードルを介して加えた。ついで、無水ＴＨＦ（３ｍＬ）中にカルバジン酸ｔｅｒｔ－ブチル（１００ｍｇ，０．７５ｍｍｏｌ）を含む溶液を加えた。得られた混合物を窒素雰囲気下で２９時間攪拌した。そして、溶媒を減圧下で除去した。残留物をジクロロメタン中に１％メタノールを含む溶液を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。１３９ｇの生成物が得られた（収率１００％）。

【０３９８】

【化１０１】

^{1}H NMR (CD2Cl2): 8.30 ppm (ブロード, 1H), 8.00 ppm (d, 1H), 7.40 ppm (d, 1H), 7.17 ppm (dd, 1H), 6.56 ppm (ブロード, 1H), 5.35 ppm (m, 1H), 3.90 ppm (s, 3H), 3.80 ppm (m, 2H), 1.48 ppm (s, 9H)

【０３９９】

ｂ．ルシフェリンメチルエーテルのヒドラジド

トリイソプロピルシラン（ＴＩＳ）６滴の存在下で、ルシフェリンメチルエーテルのＮ’－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルヒドラジドをＴＦＡ（１０ｍＬ）で７０分間処理した。ついで、減圧下でＴＦＡを除去し、残留物を水、アセトニトリル、ＤＭＦ（水：アセトニトリル：ＤＭＦ＝１：１：１）の混合液１０Ｌに溶解した。ＨＰＬＣ精製条件は、ルシフェリンのｍ－ピコリニルエステルの合成と同様であった（一般的な手順参照：移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）。６４ｍｇの精製された化合物が得られた。

【０４００】

【化１０２】

^{1}H NMR (CD3OD): 7.98 ppm (d, 1H), 7.56 ppm (d, 1H), 7.19 ppm (dd, 1H), 5.35 ppm (t, 1H), 3.90 ppm (s, 3H), 3.75 ppm (m, 2H)

ES$^+$: 308.36 (M.W. 308.38)

UV-vis: 331 nm, 267 nm

(アセトニトリル-水の混合物中、329 nm における) 吸光係数: 6, 000

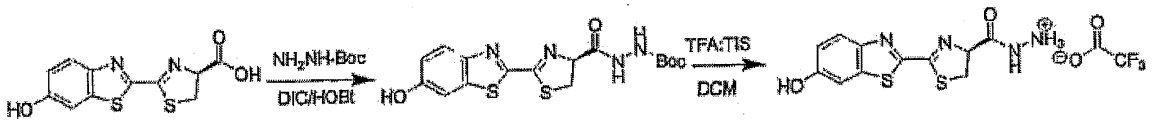
【０４０１】

１８．ルシフェリンのヒドラジドの合成

この化合物は、ルシフェリンメチルエーテルのヒドラジドと同様の方法で合成した。

【０４０２】

【化１０３】



式CLXXX　　式CLXXXI　　式CLXXXII

【０４０３】

ａ．ルシフェリンのＮ’－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルヒドラジド

【０４０４】

【化１０４】

^{1}H NMR (CDCl3): 7.81 ppm (d, 1H), 7.18 ppm (d, 1H), 6.93 ppm (dd, 1H), 5.20 ppm (m, 1H), 3.63 ppm (m, 2H), 1.33 ppm (s, 9H)

ES$^+$: 396.75 (M.W. 394.35)

【０４０５】

ｂ．ルシフェリンのヒドラジド

【０４０６】

【化１０５】

^{1}H NMR (DMF-d7): 9.52 ppm (broad, 1H), 8.15 ppm (d, 1H), 7.73 ppm (d, 1H), 7.33 ppm (dd, 1H), 5.47 ppm (t, 1H), 4.63 ppm (ブロード, 2H), 3.91 ppm (m, 2H)

MS: ES$^+$: 295.53 (M.W. 294.36)

UV-vis: 148 nm および 293 nm

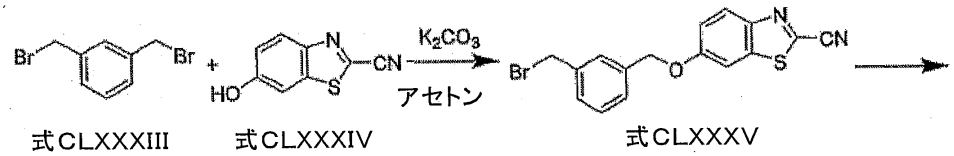
(アセトニトリル中、327nm における) 吸光係数: 16，900

【０４０７】

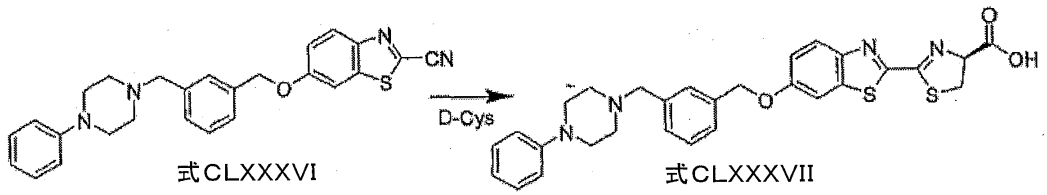
１９．ルシフェリン３－（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチルベンジルエーテルの合成

【０４０８】

【化１０６】



式CLXXXIII　　式CLXXXIV　　式CLXXXV



式CLXXXVI　　式CLXXXVII

【０４０９】

ａ．　２－シアノ－６－（３－ブロモメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール

３０ｍＬのアセトン中に２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１．０４ｇ）を含む溶液に、炭酸カリウム（１．６３ｇ）、続いて、α、α－ジブロモ－ｍ－キシレン（４．７ｇ）を加えた。得られた溶液を室温で１時間攪拌し、そして、溶媒を減圧下で除去した。残留物をジクロロメタンに再懸濁して、水で洗った。水相は、より多くのジクロ

ロメタン（２倍）で抽出し、そして、有機抽出相は、混合し、硫酸ナトリウムにより乾燥させた。そして、ジクロロメタンを用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。１．９４５ｇの生成物が得られた。

【０４１０】

【化１０７】

^{1}H NMR (CDCl3): 8.15 ppm (d, 1H), 8.44 ppm (d, 1H), 8.40 ppm (m, 4H), 7.20-7.30 ppm (m, 2H), 5.16 ppm (s, 2H), 5.52 ppm (s, 2H)

ES$^+$: 362.60 (Brの同位体効果が見られた) (M.W. 359.24)

【０４１１】

ｂ．２－シアノ－６－［３－（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチルベンジルオキシ］ベンゾチアゾール

２０ｍＬのジクロロメタン中に２－シアノ－６－（３－ブロモメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール（１ｇ，２．８ｍｍｏｌ）を含む溶液に、１－フェニルピペラジン（１．７ｍＬ，１１．２ｍｍｏｌ）を滴下により加えた。得られた溶液を室温で３０分間攪拌した。その後、２０ｍＬの飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えた。分配の後に、水相を２０ｍＬのジクロロメタンによって抽出した。有機抽出物は混合し、水で２回洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。溶媒は、除去され、残留物は、１％メタノールのジクロロメタン溶液を用いてフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。５９４ｍｇの生成物が得られた。

【０４１２】

【化１０８】

^{1}H NMR (CDCl3): 8.09 ppm (d, 1H), 7.47 ppm (ブロード, 1H), 7.43 ppm (d, 1H), 7.37 ppm (m, 2H), 7.34 ppm (d, 1H), 7.30 ppm (m, 1H), 7.26 ppm (d, 1H), 7.24 ppm (m, 1H), 6.92 ppm (d, 2H), 6.86 ppm (m, 1H), 5.18 ppm (s, 2H), 3.20 ppm (m, 4H), 2.63 ppm (m, 4H)

【０４１３】

ｃ．ルシフェリン３－（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチルベンジルエーテル

この化合物は、５９４ｍｇの２－シアノ－６－［３－（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチルベンジルオキシ］ベンゾチアゾールと、１４７ｍｇのＤ－システイン塩酸塩一水和物とを用いて、２－シアノ－６－［３－（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチルベンジルオキシ］ベンゾチアゾールのメタノールへの溶解性が低いために、その溶媒として、ＤＭＦを使用した以外は、６－アミノキノリニルルシフェリンの合成手順と同様にして合成した。反応混合物は、ＨＰＬＣにより精製した（一般的な手順参照：移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）。２８２ｍｇの生成物が得られた。

【０４１４】

【化１０９】

^{1}H NMR (CD3CN): 7.95 ppm (d, 1H), 7.40-7.60 ppm (m, 5 H), 7.25 ppm (m, 3H), 7.26 ppm (t, 1H), 7.23 ppm (s, 2H), 4.27 ppm (s, 2H), 3.70 ppm (m, 2H), 3.20-3.30 ppm (ブロード, 8H)

ES$^+$: 546.03 (M.W. 544.69)

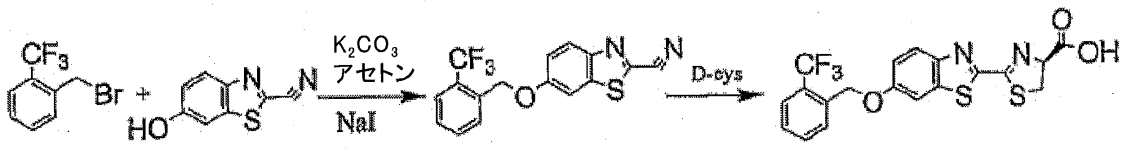
UV-vis: 268 nm および 328 nm

(アセトニトリル中、324nmにおける) 吸光係数: 16，380

【０４１５】

２０．ルシフェリン　ｏ－トリフルオロメチルベンジルエーテルの合成

【０４１６】
【化１１０】



式CLXXXVIII　式CLXXXIX　式CLXXXX　式CLXXXXI

【０４１７】
ａ．２－シアノ－６－（２－トリフルオロメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール
１０ｍＬのアセトン中に、２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチアゾール（１００ｍｇ，０．５６８ｍｍｏｌ）を含む溶液に、炭酸カリウム（１５７ｍｇ，１．１４ｍｍｏｌ）を加え、ついで、２－（トリフルオロメチル）ベンジルブロマイド（２０４ｍｇ，０．８５２ｍｍｏｌ）を加えた。混合物を室温で約５時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下で除去して、残留物をジクロロメタンに溶解した。ついで、得られた溶液をジクロロメタンで抽出した。有機相は、硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、ジクロロメタンを用いてフラッシュクロマトグラフィーを用いて精製した。１４８ｍｇの生成物が得られた。
【０４１８】
【化１１１】

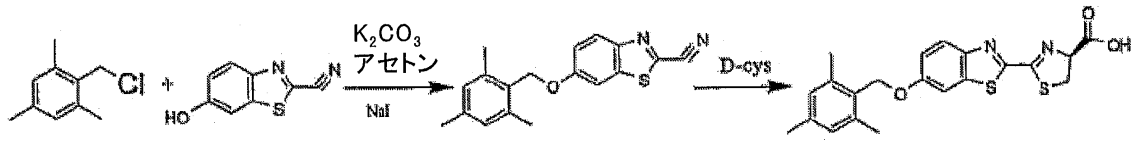
^{1}H NMR (CDCl3):8.12 ppm (d, 1H), 7.75 ppm (d, 2H), 7.60 ppm (t, 1H), 7.48 ppm (t, 1H), 7. 41 ppm (d, 1H), 7.34 ppm (dd, 1H), 5.28 ppm (s, 2H)
^{19}F NMR (CDCl3): 61 ppm
MS: ES^{+}: 335.74 (M.W. 334.32)

【０４１９】
ｂ．ルシフェリン２－トリフルオロメチルベンジルエーテル
この化合物は、２－シアノ－６－（２－トリフルオロメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール１５０ｍｇおよびＤ－システイン塩酸塩一水和物１２０ｍｇを用いて、６－アミノキノリニルルシフェリンと同じ方法で合成した。混合物は、ＨＰＬＣにより精製された（一般的手順参照：移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）。５５ｍｇの生成物が得られた。
【０４２０】
【化１１２】

^{1}H NMR (CD3CN): 8.03 ppm (d, 1H), 7.82 ppm (d, 1H), 7.70 ppm (t, 1H), 7.65 ppm (d, 1H), 7.58 ppm (t, 1H), 7.36 ppm (dd, 1H), 5.40 ppm (t, 1H), 5.39 ppm (s, 2H), 3.75 ppm (d, 2H)
ES^{+}: 440 (M.W. 438.44)
UV-vis: 267 nm and 325 nm
(323nmにおける)吸光係数:13, 940

【０４２１】
２１．ルシフェリン２，４，６－トリメチルフェニルエーテルの合成
【０４２２】

【化１１３】



式CLXXXXII　式CLXXXXI　式CLXXXXIV　式CLXXXXV

【０４２３】

ａ．２－シアノ－６－（２，４，６－トリメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール

この化合物は、α^2－クロロイソジュレン（１００ｍｇ，０．８５２ｍｍｏｌ）を使用して、２－シアノ－６－（２－トリフルオロメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾールと同様の方法で合成した。１６８ｍｇの生成物が得られた。

【０４２４】

【化１１４】

^{1}H NMR (CDCl3): 8.18 ppm (d, 1H), 7.52 ppm (d, 1H), 7.30 ppm (dd, 1H), 6.94 ppm (s, 2H), 5.09 ppm (s, 2H)

ES$^-$: 264.10 (M.W. 263.78)

【０４２５】

ｂ．ルシフェリン６－（２，４，６－トリメチルベンジル）エーテル

この化合物は、２－シアノ－６－（２，４，６－トリメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾール（８０ｍｇ，０．３０３ｍｍｏｌ）を使用して、２－シアノ－６－（２－トリフルオロメチルベンジルオキシ）ベンゾチアゾールと同じ方法で合成した。ついで、ＨＰＬＣ（一般的な手順参照：移動相Ａ：０．１％ＴＦＡ水溶液）を用いて精製した。８２ｍｇの生成物が得られた。

【０４２６】

【化１１５】

^{1}H NMR (CD3CN): 7.98 ppm (d, 1H), 7.65 ppm (d, 1H), 7.22 ppm (dd, 1H), 6.92 ppm (s, 2H), 5.40 ppm (t, 1H), 5.12 ppm (s, 2H), 3.75 ppm (d, 2H), 2.32 ppm (s, 6H), 2.28 ppm (s, 3H)

ES$^+$: 414 (M.W. 412.53)

UV-vis: 268 nm および 329 nm

(323nmにおける)吸光係数:18, 240

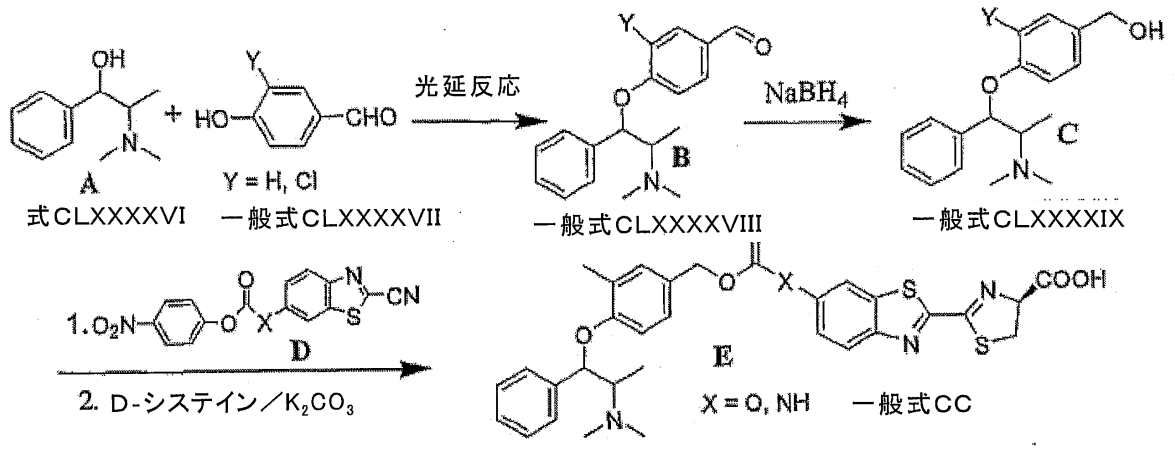
【０４２７】

２２．Ｎ－メチルエフェドリン－リンカー－ルシフェリン（Ｘ＝Ｏ，Ｙ＝Ｈ）またはＮ－メチルエフェドリン－リンカー－ルシフェリンの合成

これらの化合物は、ルシフェリンの酵素特異基質と結合させることにより、リンカー（ｌｉｎｋｅｒ）を介して合成した。この場合、酵素は、Ｐ４５０アイソザイムであった。しかし、一般には、他の酵素も同様に有用である。

【０４２８】

【化１１６】



化合物Ｂは、光延反応の条件下において、ＴＨＦ中のジイソプロピルアゾジカルボキシレートおよびトリホスフィンを使用して合成した。その後、メタノール中で、$NaBH_4$により化合物Ｂを還元して、化合物Ｃを製造した。

【０４２９】

化合物Ｄ（ルシフェリンにおいてＸ＝Ｏ、アミノルシフェリンにおいてＸ＝ＮＨ）を、対応するベンゾチアゾールおよびｐ－ニトロフェニルクロロギ酸エステルを用いて別々に合成した。ついで、塩基性条件下で、化合物Ｃと結合させた。そして、一般的にＤ－システインを環化することによって、上に示したような生成物を生成した。

【０４３０】

Ｃ．典型的なルシフェリン誘導体の合成

いくつかの例として上述したルシフェリン誘導体の合成を以下に説明する。

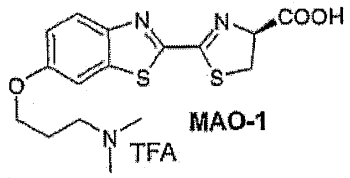
【０４３１】

Ｉ．ＭＡＯ用生物発光性基質

Ａ．

【０４３２】

【化１１７】

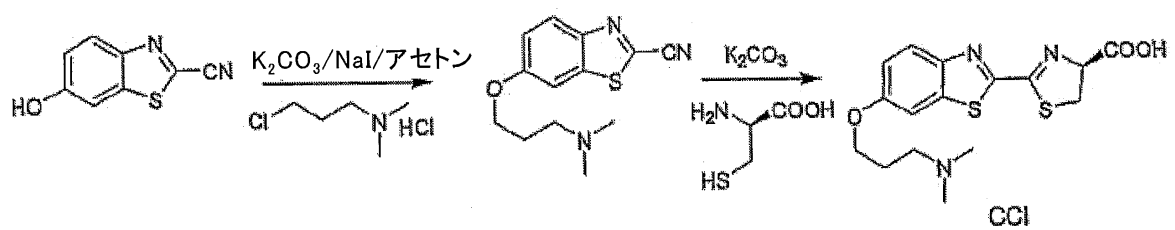


式CCI

６－（３－ジメチルアミノプロポキシ）ルシフェリン。

【０４３３】

【化１１８】



６－（３－ジメチルアミノプロポキシ）－２－シアノベンゾチアゾールの合成。アセト

ン（３０ｍＬ）中に６－ヒドロキシ－２－シアノベンゾチアゾール（０．３１１ｇ，１．７７ｍｍｏｌ），３－クロロプロピルジメチルアミン塩酸塩（０．３６ｇ，２．２７ｍｍｏｌ），炭酸カリウム（０．６３ｇ，４．５７ｍｍｏｌ）およびヨウ化ナトリウム（０．０３４ｇ）を含む混合物を加熱して一晩還流した。室温に冷やす前に、不溶性の固体をろ過により除去した。化合物は、溶出剤としてジクロロメタン／メタノール（９６：４）を使用してフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は、８６％（０．３８７ｇ）であった。

【０４３４】

【化１１９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.98 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 4.04 (t, J = 6.4 Hz, 2H, OCH_2), 2.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H, NCH_2), 2.13 (s, 6H, CH_3), 1.90 (m, 2H, CH_2).

【０４３５】

ＭＡＯ－１の合成。メタノール（５ｍＬ），CH_2CL_2（１ｍＬ）およびH_2O（１ｍＬ）中に、ジメチルアミン（０．２３５ｇ，０．９０ｍｍｏｌ）およびＤ－システイン（０．１５８ｇ，０．９０ｍｍｏｌ）を含む溶液に、K_2CO_3（０．１２５ｇ，０．９０ｍｏｌ）を加えた。混合物は、室温で５分間攪拌した。その後、わずかに酸性条件となるように中和した。有機溶媒を除去した後、生成物を、溶出剤として０．１％ＴＦＡ水／アセトニトリル溶液を用いてＨＰＬＣにより精製した。

【０４３６】

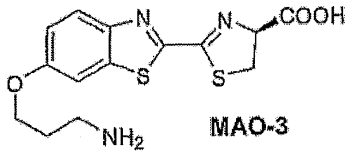
【化１２０】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.90 (d, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.04 (d, 1H), 5.37 (t, 1H, CHCOO), 4.10 (t, 2H, OCH_2), 3.79 (m, 2H, CH_2), 3.32 (t, 2H, CH_2N), 2.97 (s, 6H, CH_3), 2.30 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+), 365

Ｂ．

【０４３７】

【化１２１】



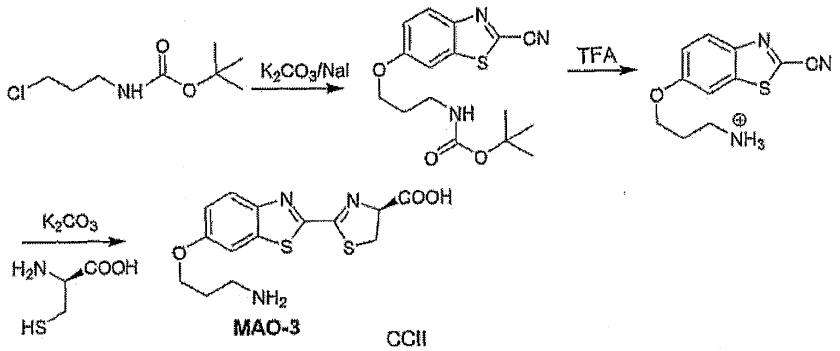
MAO-3

式CCII

６－アミノプロポキシルシフェリン，６－（３－ジメチルアミノプロポキシ）ルシフェリン。

【０４３８】

【化１２２】



CCII

化合物ＭＡＯ－３を、ＭＡＯ－１の合成と同様の方法を採用することにより合成した。アミノ基がｔ－ＢＯＣにより保護されており、６－ヒドロキシル－２－シアノベンゾチアゾールのアルキル化後に脱保護する点は除く。最終的な化合物は、反応物から析出し、ろ過により回収し、水およびメタノールを用いて洗浄した。

【０４３９】

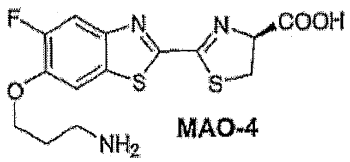
【化１２３】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.04 (d, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.19 (d, 1H), 5.40 (t, 1H, CHCOO), 4.08 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.0 (m, 2H, CH_2N), 2.05 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+), 337. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 15,500 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中).

Ｃ．

【０４４０】

【化１２４】

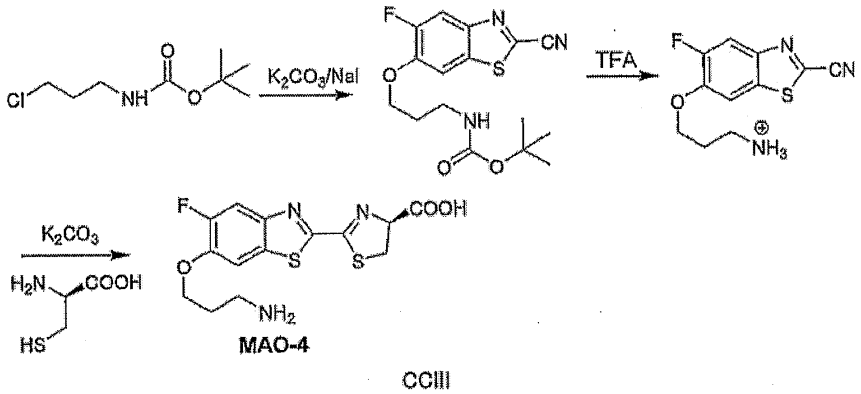


式CCIII

５－フルオロ－６－アミノプロポキシ－ルシフェリン．

【０４４１】

【化１２５】



CCIII

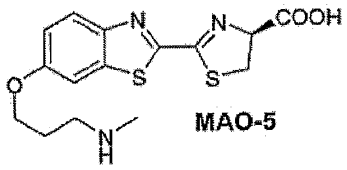
化合物ＭＡＯ－４は、ＭＡＯ－３の合成と同様の方法を採用することにより合成された。

【０４４２】
【化１２６】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.07 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 5.41 (t, 1H, CHCOO), 4.24 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.0 (m, 2H, CH_2N), 2.08 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 355 λ_{max} 326 nm, ε_{max} 15,600 $cm^{-1}M^{-1}$ （水中）.

D.

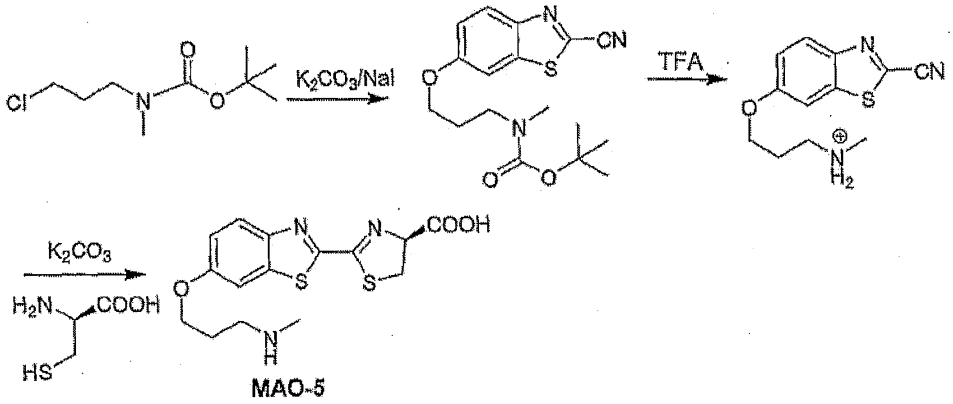
【０４４３】
【化１２７】



式CCIV

６－メチルアミノプロポキシ－ルシフェリン。

【０４４４】
【化１２８】



CCIV

化合物ＭＡＯ－５は、ＭＡＯ－３の合成と同様の方法を採用することにより合成された。

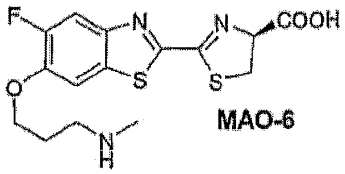
【０４４５】
【化１２９】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.04 (d, 1H), 7.74 (d, 1H), 7.19 (dd, 1H), 5.40 (t, 1H, CHCOO), 4.16 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.07 (m, 2H, CH_2N), 2.59 (t, 3H, NCH_3), 2.07 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 351. λ_{max} 328 nm, □$_{max}$ 17,500 $cm^{-1}M^{-1}$ （水中）

E.

【０４４６】

【化１３０】

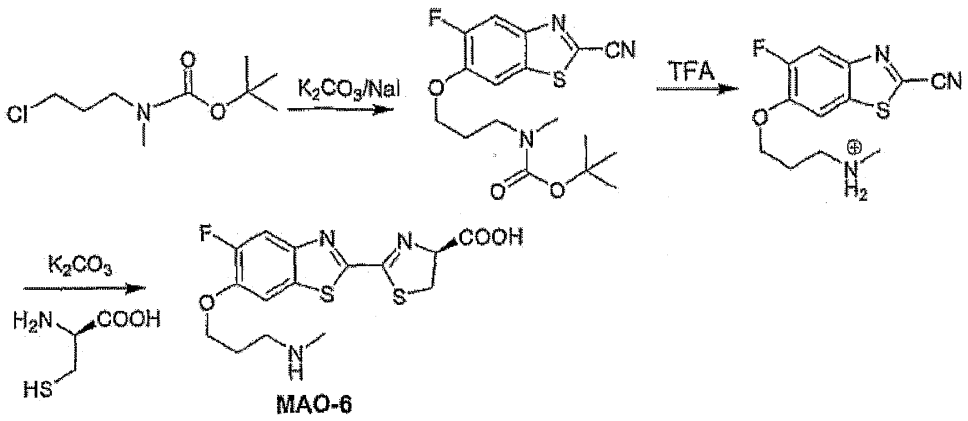


式CCV

５－フルオロ－６－メチルアミノプロポキシ－ルシフェリン。

【０４４７】

【化１３１】



CCV

化合物ＭＡＯ－６は、ＭＡＯ－３の合成と同様の方法を採用することにより合成された。

【０４４８】

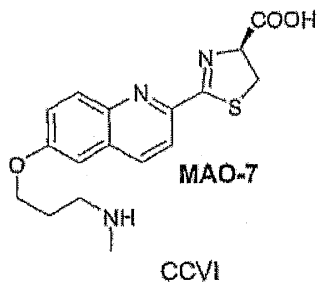
【化１３２】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.08 (d, 1H), 7.98 (d, 1H), 5.41 (t, 1H, CHCOO), 4.24 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.08 (m, 2H, CH_2N), 2.59 (t, 3H, NCH_3), 2.11 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 369

Ｆ．

【０４４９】

【化１３３】

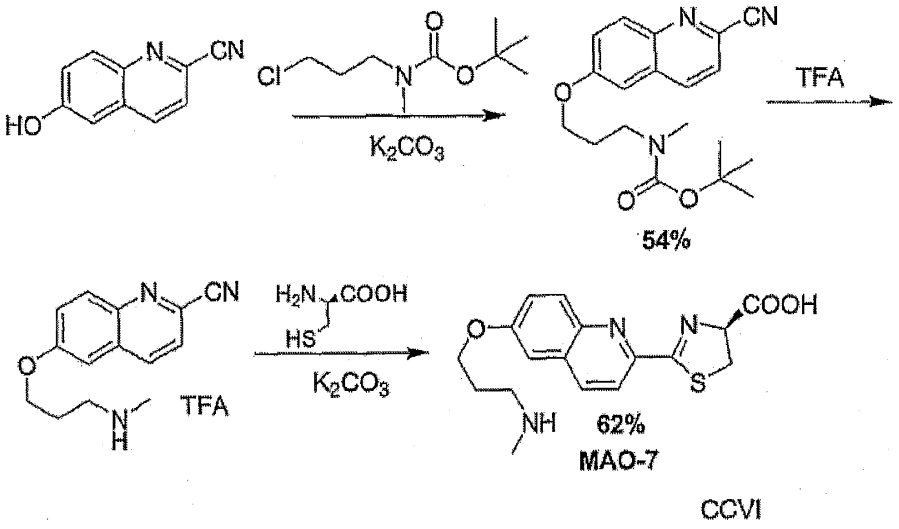


CCVI

６－（３－メチルアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリン。

【０４５０】

【化１３４】



CCVI

化合物ＭＡＯ－７を、６－ヒドロキシル－２－シアノキノリンを出発原料として、ＭＡＯ－３の合成と同様の方法により合成した。

【０４５１】

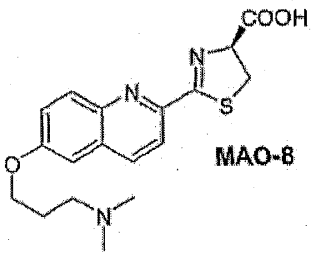
【化１３５】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.37 (d, J = 8.7 Hz), 8.13 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.44-7.54(m - オーバーラップ, 2H), 5.45 (dd, J = 8.10 Hz, J = 8.10 Hz, 1H, CH-COOH), 4.25 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 3.5-3.8 (m, 2H, SCH_2), 3.17 (m, 2H, NCH_2), 2.63 (m, 3H, CH_3), 2.15 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 346. λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 259/30,600; 326/10,400; 342/10,100 (水中).

Ｇ.

【０４５２】

【化１３６】

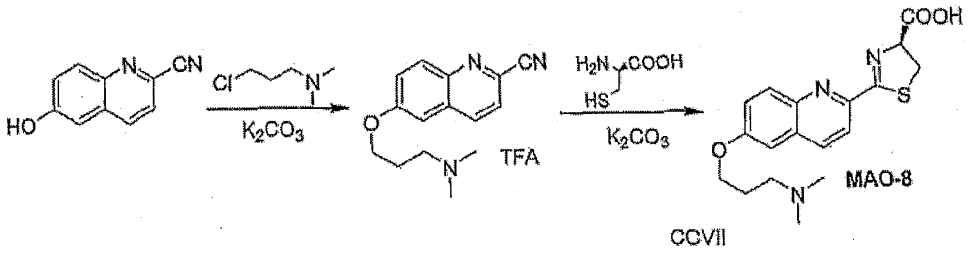


式CCVII

６－（３－ジメチルアミノプロポキシ）キノリニルールシフェリン。

【０４５３】

【化１３７】



CCVII

化合物ＭＡＯ－８を、ＭＡＯ－１の合成のために使用した方法と同様の方法を採用することにより合成した。

【０４５４】

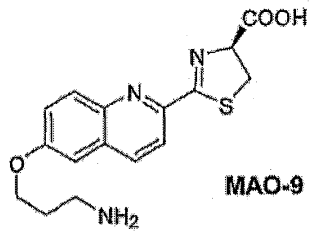
【化１３８】

^{1}H NMR (d6-DMSO/TFA): 8.28 (d, J = 8.4 Hz), 8.05 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.94-8.04 (m - オーバーラップ, 2H), 5.07 (t, J = 9.30 Hz, 1H, CH-COOH), 4.15 (t, J = 6.6 Hz, 2H, OCH_2), 3.35-3.62 (m, 2H, SCH_2), 2.40 (m, 2H, NCH_2), 2.16 (s, 6H, CH_3), 1.92 (m, 2H, CH_2). MS (ES): (M+1) m/e, 359. λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 258/33,200; 326/10,700; 340/10,700 (水中)。

Ｈ.

【０４５５】

【化１３９】

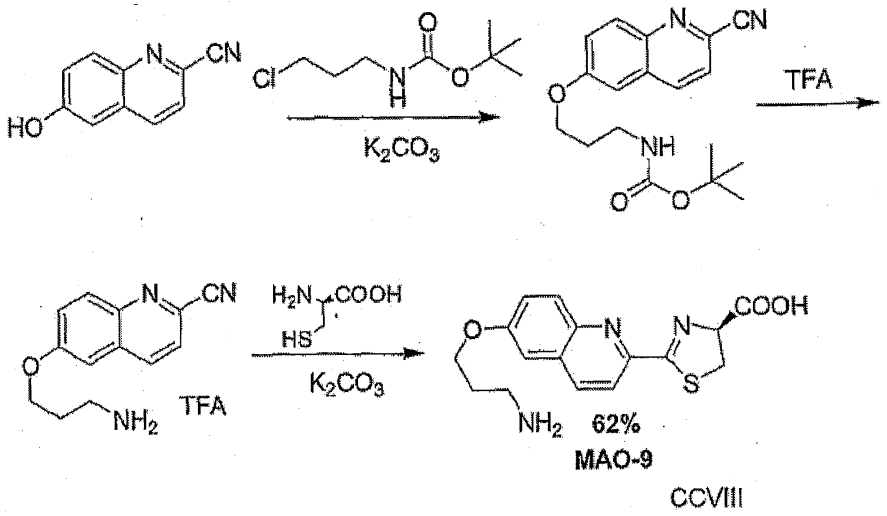


式CCVIII

６－（３－アミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリン。

【０４５６】

【化１４０】



CCVIII

化合物ＭＡＯ－９は、ＭＡＯ－３と同様の方法を採用することにより合成された。

【０４５７】

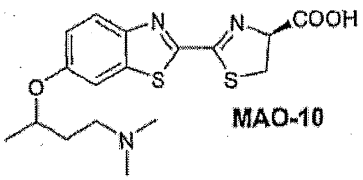
【化１４１】

^{1}H NMR (d_6-DMSO/TFA): 8.35 (d, J = 8.7 Hz), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.4-7.5(m - オーバーラップ, 2H), 5.07 (dd, J = 8.40 Hz, J = 8.4, 1H, CH-COOH), 4.23 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 3.50-3.54 (m, 2H, SCH_2), 3.0 (m, 2H, NCH_2), 2.08 (m, 2H, CH_2). MS (ES): (M+1) m/e, 332. λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 260/31,600; 327/11,200; 341/11,800 (水中).

Ｉ．

【０４５８】

【化１４２】

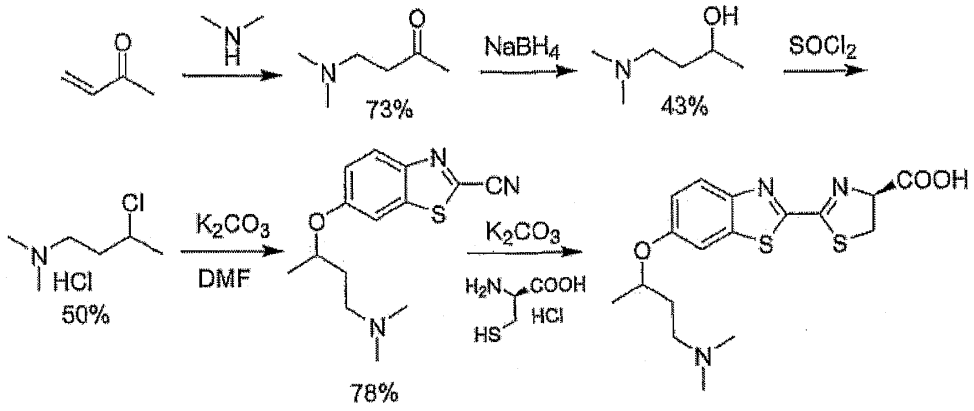


式CCIX

６－（３－ジメチルアミノ－３－ブトキシ）ルシフェリン。

【０４５９】

【化１４３】



化合物ＭＡＯ－１０は、ＭＡＯ－１の合成に使用した方法と同様の方法を採用することにより合成された。

【０４６０】

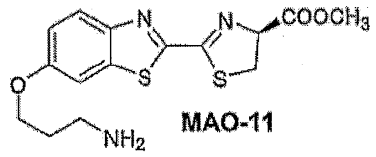
【化１４４】

^{1}H NMR(d6-DMSO): 8.07 (d, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.20 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 5.41 (t, 1H, CHCOO), 4.0-4.3 (m, 2H, CH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, SCH_2), 2.73 (m, 6H, NCH_3), 1.8-2.4 (m, 2H, CH_2), 1.31 (d, 3H, CH_3). MS (ES): (M+1) m/e, 380. λ_{max} 327 nm, ε_{max} 14,700 $cm^{-1}M^{-1}$ （水中）.

Ｊ．

【０４６１】

【化１４５】

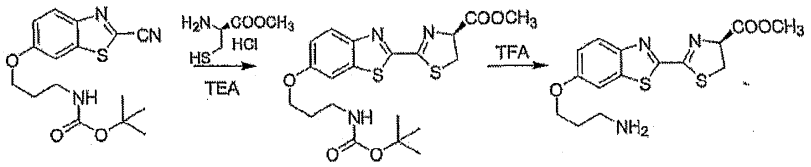


式CCX

メチル６－（３－アミノプロポキシ）ルシフェリンエステル．

【０４６２】

【化１４６】



メチル６－（ｔ－ＢＯＣ－３－アミノプロポキシ）ルシフェリンエステルの合成．１０ｍｌのメタノール中に２－シアノ－６－（ｔ－ＢＯＣ－３－アミノプロポキシ）ベンゾチアゾール（０．２７ｇ，０．８２ｍｍｏｌ）およびＤ－システインメチルエステル（０．２０ｇ，１．０５ｍｍｏｌ）を含む溶液に、ＴＥＡ（０．１１ｇ，０．１５ｍＬ）を加えた。反応混合物を５分間攪拌した。２０ｍＬの塩化メチレンおよび水を加えた。混合物は、塩化メチレンにより３回抽出した。有機相を併合し、硫酸マグネシウムにより乾燥した。化合物は、塩化メチレン／酢酸エチル（９５：５から９０：１０）を溶出剤として用い

てフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は、６０％であった。

【０４６３】

【化１４７】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.0 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 9.3 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 5.35 (t, J = 9.3 Hz, 1H, CHCOO), 4.12 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, SCH_2), 3.31 (q, 2H, CH_2N), 2.02 (m, 2H, CH_2), 1.42 (s, 9H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 452.

ＭＡＯ－１１の合成．ＴＦＡ（１ｍＬ）の溶液および１０ｍＬの塩化塩化メチレン中にトリイソプロピルシラン（３μＬ）を含む溶液を、０℃でメチル６－（ｔ－ＢＯＣ－３－アミノプロポキシ）ルシフェリンエステル（０．２３ｇ，０．４８８ｍｍｏｌ）に加えた。得られた混合物は、０℃で１時間攪拌した。エーテル３０ｍｌおよびメタノール２０ｍｌを加え、その後溶媒を蒸留により除去した。残留物を塩化メチレン／メタノール（９５：５）を溶出剤としてフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は５６％であった。

【０４６４】

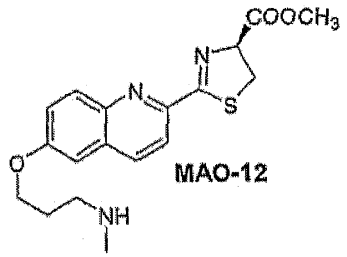
【化１４８】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.06 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 5.51 (dd, 1H, CHCOO), 4.08 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.9 (m, 5H, OCH_3+CH_2), 2.99 (m, 2H, CH_2N), 2.03 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 352. λ_{max} 331 nm, ε_{max} 17,100 $cm^{-1}M^{-1}$ （水中）.

Ｋ．

【０４６５】

【化１４９】



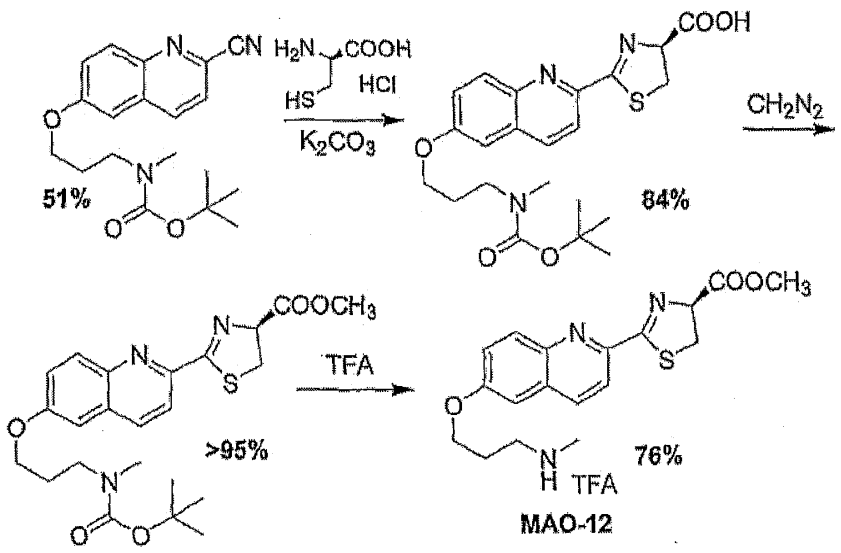
MAO-12

式CCXI

メチル６－（３－メチルアミノアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリンエステル。

【０４６６】

【化１５０】



６－（３－ｔ－ＢＯＣ－３－メチルアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリンの合成．

この化合物は、ＭＡＯ－３の合成と同様の方法を採用して合成した。

【０４６７】

【化１５１】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.33 (d, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 7.4-7.5 (m, 2H), 5.51 (dd, 1H, CHCOO), 4.12 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.9 (m, SCH_2), 3.37 (t, 2H, NCH_2), 1.99 (m, 2H, CH_2), 1.30 (s, br, 9H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 446

メチル６－（３－ｔ－ＢＯＣ－３－メチルアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリンエステルの合成．１５ｍＬのＴＨＦ中に、６－（３－ｔ－ＢＯＣ－３－メチルアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリン（０．６５１ｇ，１．４１８ｍｍｏｌ）を含む溶液に、溶液が黄色になるまで、合成したばかりのジアゾメタンを加えた。得られた混合物をさらに１０分間攪拌し、酢酸を加え、その後、２０ｍｌの水を加えた。得られた混合物は、３回塩化メチレンで抽出され、そして、硫酸マグネシウムを用いて乾燥した。生成物は、塩化メチレン／酢酸エチル（１００／０から９０／１０）を溶出剤としてフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は、９５％であった。

【０４６８】

【化１５２】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.35 (d, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.4-7.5 (m, 2H), 5.51 (dd, 1H, CHCOO), 4.06 (t, 2H, OCH_2), 3.71 (s, OCH3), 3.6-3.9 (m, SCH_2), 3.38 (t, 2H, NCH_2), 2.0 (m, 2H, CH_2), 1.25 (s, br, 9H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 461

ＭＡＯ－１２の合成。化合物ＭＡＯ－１２は、ＭＡＯ－１１の合成に使用した方法と同様の方法を採用して、メチル６－（３－ｔ－ＢＯＣ－３－メチルアミノプロポキシ）キノリニル－ルシフェリンエステルの脱保護により合成した。

【０４６９】

【化１５３】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.36 (d, J = 8.7 Hz), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 8.1 Hz, Hz, J = 2.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.7 Hz, 1H), 7.4s (s, 1H), 5.53 (dd, J = 8.40 Hz, J = 8.4 Hz, 1H, CH-COOH), 4.23 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 3.74 (s, 3H, CH_3), 3.50-3.73 (m, 2H, SCH_2), 3.09 (m, 2H, NCH_2), 2.60 (s, br, 3H, NCH3), 2.11 (m, 2H, CCH2). MS (ES): m/e (M+1), 361. λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 259/29,400; 326/9,800; 339/10,000 （水中）.

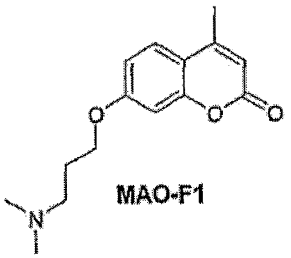
【０４７０】

ＩＩ．ＭＡＯ用蛍光性基質

Ａ．

【０４７１】

【化１５４】

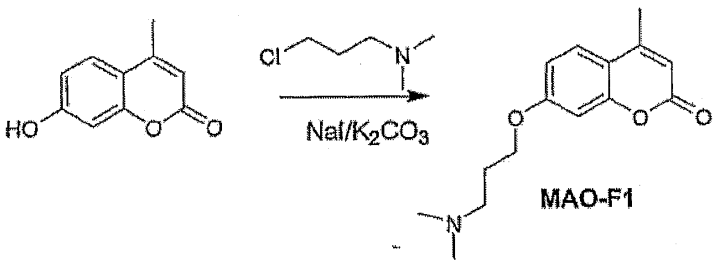


式CCXII

７－（４－メチル－３－ジメチルアミノプロポキシ）クマリン.

【０４７２】

【化１５５】



化合物ＭＡＯ－Ｆ１は、７－（４－メチル－３－プロポキシ）クマリンを塩基性条件下で３－クロロジメチルアミノ塩酸塩によりアルキル化するというＭＡＯ－１前駆体の合成に採用した方法と同様の方法を採用して調製した。化合物は、塩化メチレン／メタノール（９０：１０）を溶出剤として、フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は２１％であった。

【０４７３】

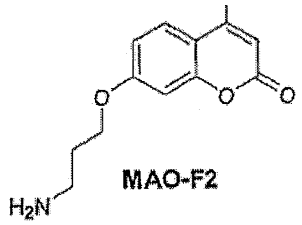
【化１５６】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 7.70 (d, 1H), 6.9-7.0 (m, 2H), 6.19 (s, 1H), 4.11 (t, 2H, OCH_2), 2.3-2.5 (m, 5H, NCH_2+CH_3), 2.18 (s, 6H, NCH_3), 1.88 (m, 2H, CH_2). λ_{max} 381 nm, ε_{max} 16,100 $cm^{-1}M^{-1}$ （緩衝液(pH7.5)中）.

Ｂ．

【０４７４】

【化１５７】

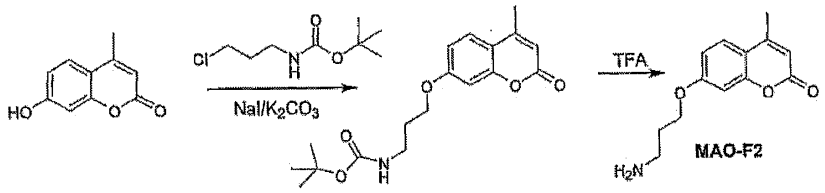


式CCXIII

７－（４－メチル－３－アミノプロポキシ）クマリン.

【０４７５】

【化１５８】



化合物ＭＡＯ－Ｆ２には、ｔ－ＢＯＣによって保護されたアミノプロピルクロライドを用いたクマリンのアルキル化、および、所望の生成物が得られる酸性条件下での脱保護により、ＭＡＯ－Ｆ１の合成に使用された方法と同様の方法が使用された。

【０４７６】

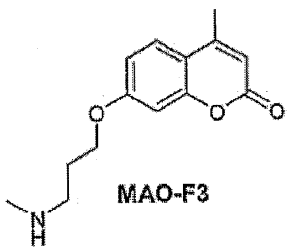
【化１５９】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 7.68 (d, 1H), 6.9-7.0 (m, 2H), 6.21 (s, 1H), 4.28 (t, 2H, OCH_2), 2.95 (m, 2H, NCH_2), 2.01 (m, 2H, CH_2). λ_{max} 384 nm, ε_{max} 15,500 $cm^{-1}M^{-1}$ (緩衝液(pH7.5)中)

C.

【０４７７】

【化１６０】

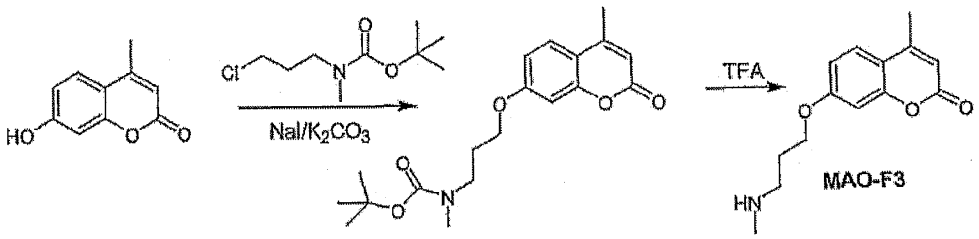


式CCXIV

７－（４－メチル－３－Ｎ－メチルアミノプロポキシ）クマリン。

【０４７８】

【化１６１】



化合物ＭＡＯ－Ｆ３は、ＭＡＯ－Ｆ２の合成に使用した方法と同様の方法を採用するこ

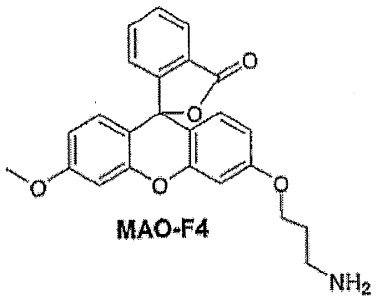
とにより合成された。

【０４７９】

Ｄ．

【０４８０】

【化１６２】

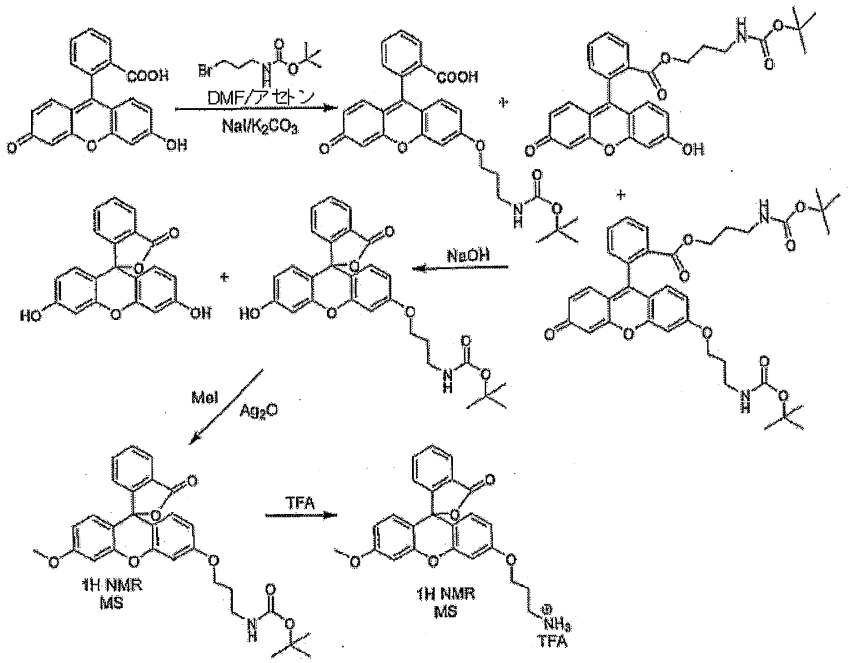


式CCXV

１－メトキシ－６－アミノプロポキシフルオレセイン　ラクトン

【０４８１】

【化１６３】



モノ－ｔ－ＢＯＣ－アミドプロピルフルオレセインの合成．ＤＭＦ／アセトン（１：１）中に、フルオレセイン（１．０ｇ，３．０ｍｍｏｌ）、ｔ－ＢＯＣ－アミドプロピルブロマイド（０．８６ｇ，３．６１ｍｍｏｌ）および炭酸カリウム（０．５０ｇ，３．６２ｍｍｏｌ）を含む溶液を加熱し、一晩還流した。ＴＬＣは、３種の生成物、モノエーテル、モノエステルおよびジエステルが生成されたことを示した。このことは、ＭＳにより確認した。生成物は、フルオレセインを除去するためにフラッシュクロマトグラフィーにより粗精製された。得られた未精製の生成物（０．８３ｇ）を２Ｎの水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、加熱還流を３時間行なった。溶液は酸性にされ、酢酸エチルで３回抽出した。併合した有機相を、硫酸マグネシウムにより乾燥した。溶媒を除去した後、化合物は、溶出剤としてヘプタン／酢酸エチル（７／３から１／１）を使用してフラッシュクロマトグラフィーにより精製された。収率は、２３％であった。

【０４８２】

【化１６４】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.98 (d, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.22 (d, 1H), 6.90 (s, br, 2H), 6.67 (d, 2H), 6.55 (d, 2H), 4.0 (t, 2H, OCH_2), 3.05 (q, 2H, NCH_2), 1.98 (m, 2H, CH_2), 1.38 (s, 9H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 490.

メトキシ－ｔ－ＢＯＣ－アミドプロピルフルオレセインの合成．ＴＨＦ／ベンゼン（５ｍｌ／１５ｍｌ）中にモノ－ｔ－ＢＯＣ－アミドプロピルフルオレセイン（０．４ｇ，０．８２ｍｍｏｌ）を含む溶液に、Ag_2O（０．５６ｇ，２．４５ｍｍｏｌ）およびヨウ化メチル（０．４６ｇ，３．２６ｍｍｏｌ）を加えた。得られた混合物を暗い中で一晩加熱した。室温まで冷やす前に、固形物をろ過により除去した。ろ液中の溶媒を減圧下除去し、生成物を溶出液としてヘプタン／酢酸エチル（７／３）を使用してフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。収率は、４７％であった。

【０４８３】

【化１６５】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.95 (d, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.14 (d, 2H), 6.78 (s, br, 2H), 6.55-6.72 (m, 2H), 4.03 (t, 2H, OCH_2), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.25 (q, 2H, NCH_2), 1.98 (m, 2H, CH_2), 1.40 (s, 9H, CH_3). MS (ES), m/e (M+1), 504.

ＦＭＡＯ－４の合成．化合物の合成は、ＭＡＯ－１１の合成のように、ｔ－ＢＯＣの脱保護により合成された。

【０４８４】

【化１６６】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2):
MS (ES), m/e (M+1), 404

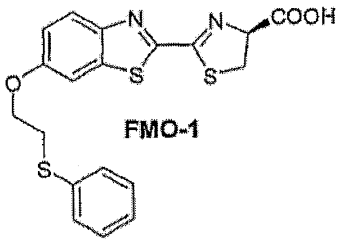
【０４８５】

ＩＩＩ．ＦＭＯ用生物発光性基質

Ａ．

【０４８６】

【化１６７】



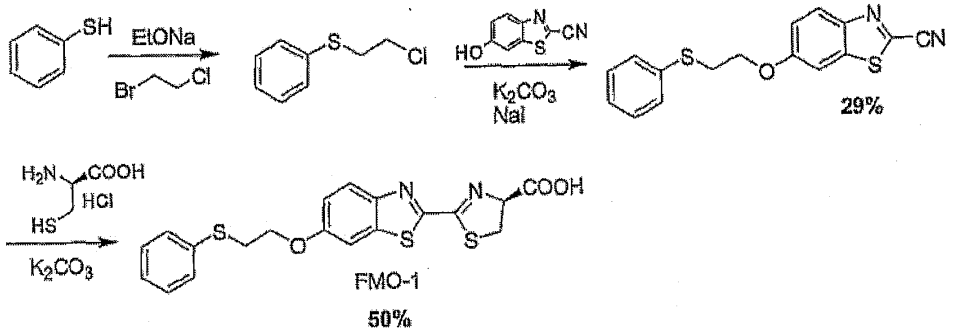
FMO-1

式CCXVI

６－（２－フェニルチオエチル）ルシフェリン

【０４８７】

【化１６８】



【０４８８】

２－クロロエチルフェニルスルフィドの合成

２００ｍｌの無水エタノールに０．２０ｍｏｌのナトリウムエトキシドを溶解した溶液に、ベンゼンチオール（１５．０ｇ、０．１３６ｍｏｌ）を添加した。混合溶液は、室温で１５分間撹拌した後、１００ｍｌのエタノールに１－ブロモ－２－クロロエタンを溶解した溶液に、さらに添加した。得られた混合溶液は、室温で３時間撹拌した後、３００ｍｌの水に注いだ。混合溶液は、エーテルにより３時間抽出した後、混合有機層を硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。次に、溶媒を除去し、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（１００～９７／３）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を７４％の収率で得た。

【０４８９】

【化１６９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.2-7.5 (m, 5H), 3.64 (t, 2H), 3.23 (t, 2H)

【０４９０】

２－シアノ－６－（２－フェニルチオエトキシ）ベンゾチオゾールの合成

上記化合物は、ＭＡＯ－１前駆体の合成において用いた方法と同様の方法によって合成した。そして、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（９０：１０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を２９％の収率で得た。

【０４９１】

【化１７０】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.09 (d, 1H), 7.45 (d, 2H), 7.34 (t, 2H), 7.3 (s, 1H), 7.28 (d, 1H), 7.22 (dd, 1H), 4.22 (t, 2H), 3.39 (t, 2H)

【０４９２】

ＦＭＯ－１の合成

ＦＭＯ－１は、ＭＡＯ－１の合成において用いた方法と同様の方法によって合成した。そして、溶離剤としてジクロロメタン／メタノール（９５：５）を用いたフラッシュクロマトグラフィによりＦＭＯ－１を精製した。結果、ＦＭＯ－１を５０％の収率で得た。

【０４９３】

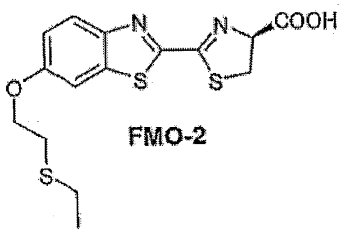
【化１７１】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.0 (d, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.40 (d, 2H), 7.32 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.12 (d, 1H), 5.39 (t, 1H, CHCOO), 4.24 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.40 (t, 2H, SCH_2). MS (ES) m/e (M+1): 417. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 19,900 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中)

Ｂ．

【０４９４】

【化１７２】

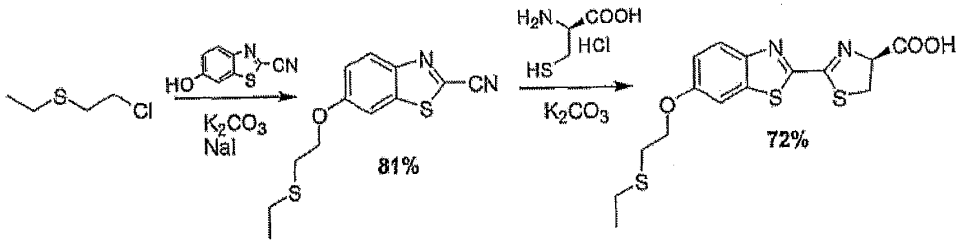


式CCXVII

６－（２－エチルチオエトキシ）ルシフェリン

【０４９５】

【化１７３】



化合物ＦＭＯ－２は、ＦＭＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０４９６】

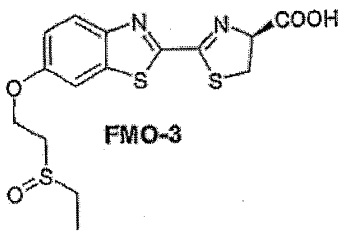
【化１７４】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.01 (d, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.17 (d, 1H), 5.39 (t, 1H, CHCOO), 4.22 (t, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 2.91 (t, 2H, SCH_2), 2.64 (q, 2H, CH2), 1.23 9t, 2H, CH3). MS (ES) m/e (M+1): 370. λ_{max} 328 nm, ϵ_{max} 17,600 $cm^{-1}M^{-1}$（メタノール中）．

Ｃ．

【０４９７】

【化１７５】

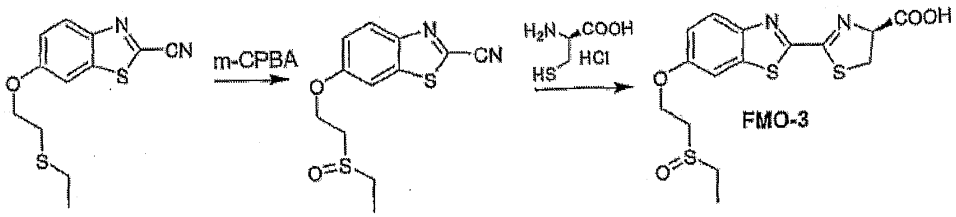


式CCXVIII

６－（２－エチルスルフォキシルエトキシ）ルシフェリン

【０４９８】

【化１７６】



２－シアノ－６－（２－エチルスルフォキシルエトキシ）ベンゼンチオゾールの合成

１０ｍｌのジクロロメタンに２－シアノ－６－（２－エチルチオエトキシ）ベンゾチオゾール（０．３４ｇ、１．２９ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ｍ－ＣＰＢＡ（０．３３ｇ、６７％、１．３０ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、１時間撹拌した。次に、溶離剤として酢酸エチル／メタノール（９０／１０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を８７％の収率で得た。

【０４９９】

【化１７７】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.11 (d, 1H), 7.47 (d, 2H), 7.26 (d, 1H), 4.54 (m, 2H, OCH_2), 3.0-3.3 (m, 2H, CH_2SO), 2.88 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.40 (t, 3H, CH_3). MS (ES), m/e (M+1), 282

【０５００】

ＦＭＯ－３の合成

ＦＭＯ－３は、ＦＭＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５０１】

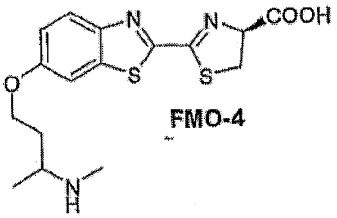
【化１７８】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.04 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.20 (d, 1H), 5.41 (t, 1H, CHCOO), 4.45 (m, 2H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, CH_2), 3.0-3.4 (m, 2H, $SOCH_2$), 2.6-3.0 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.23 (t, 2H, CH_3). MS (ES) m/e (M+1): 385. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 18,000 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中).

D.

【０５０２】

【化１７９】

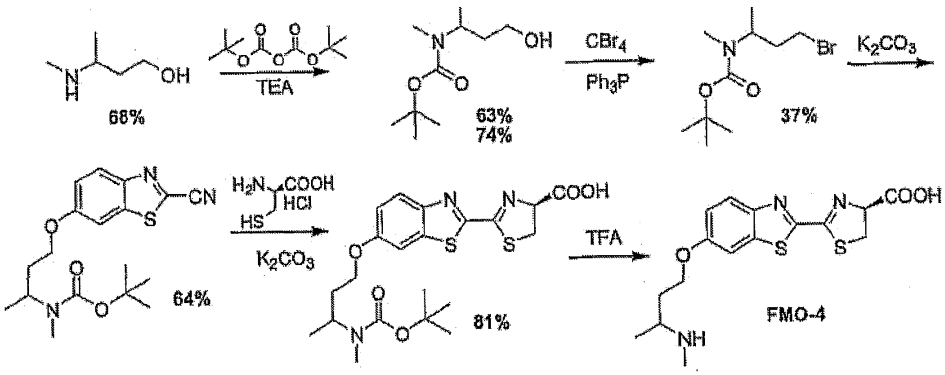


式CCXIX

６－（３－メチルアミノ－１－ブトキシ）ルシフェリン

【０５０３】

【化１８０】



１－メチル－３－ヒドロキシプロピルメチル－ｔ－ＢＯＣ－アミドの合成

１５０ｍｌの無水ジクロロメタンにｔ－ＢＯＣ無水物を溶解した溶液に、６０ｍｌのジクロロメタンに３－メチルアミノ－１－ブタノール（６．２２ｇ、０．０６０４ｍｏｌ）および（７．３３ｇ、０．０７２４ｍｏｌ）を溶解した溶液を、０℃の温度条件下で添加した。得られた混合溶液は、３時間撹拌した後、２００ｍｌのジクロロメタンをさらに添加した。混合溶液は、３回水洗した。混合有機層は、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（７０／３０～４０／６０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を収率７４％で得た。

【０５０４】

【化１８１】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 3.35 (m, 1H, CH), 2.8-3.5 (m, 2H, OCH_2), 2.63 (s, 3H, NCH_3), 1.65 (m, 2H, CH_2), 1.45 (s, 9H, CH_3), 1.18 (d, 3H, CH_3). MS (ES) m/e (M+1): 204

１－メチル－３－ブロモプロピルメチル－ｔ－ＢＯＣ－アミドの合成

１２０ｍｌの無水ジクロロメタンに１－メチル－３－ヒドロキシプロピルメチル－ｔ－ＢＯＣ－アミド（９．０１ｇ、０．０４４４ｍｏｌ）および四臭化炭素（１７．６７ｇ、０．０５３３ｍｏｌ）を溶解した溶液に、トリフェニルホスフィン（１４．０ｇ、０．０５３３ｍｏｌ）を０℃の温度条件下で添加した。得られた混合溶液は、一晩撹拌した。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（９０／１０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を３７％の収率で得た。

【０５０５】

【化１８２】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 4.32 (m, 1H, CH), 3.34 (t, 2H, $BrCH_2$), 2.69 (s, 3H, NCH_3), 1.8-2.2 (m, 2H, CH_2), 1.45 (s, 9H, CH_3), 1.16 (d, 3H, CH_3)

【０５０６】

２－シアノ－６－（１－メチル－３－プロピルメチル－ｔ－ＢＯＣ－アミド）ベンゾチオゾールの合成

上記化合物は、ＭＡＯ－１の前駆体の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５０７】

６－（１－メチル－３－プロピルメチル－ｔ－ＢＯＣ－アミド）ルシフェリンの合成

上記化合物は、ＭＡＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５０８】

【化１８３】

^{1}H NMR(CD_2Cl_2): 7.88 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.03 (d, 1H), 5.24 (t, 1H, CHCOO), 4.36 (s, br, 1 H, CH), 3.91 (t, 2H, OCH_2), 3.67 (d, 2H, SCH_2), 2.63 (s, 3H, NCH_3), 1.7-2.0 (m, 2H, CH_2), 1.25 (s, br, 9H, CH_3), 1.05 (d, 3H, CH_3). MS (ES), m/e (M+2): 467

【０５０９】

ＦＭＯ－４の合成

化合物ＦＭＯ－４は、ＭＡＯ－１１の合成において説明した酸としてＴＦＡを用いて、ｔ－ＢＯＣルシフェリンを脱保護することにより合成した。

【０５１０】

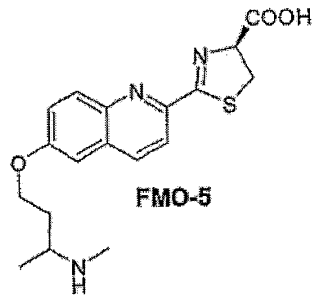
【化１８４】

^{1}H NMR(d6-DMSO): 8.04 (d, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.19 (dd, 1H), 5.38 (t, 1H, CHCOO), 4.18 (m, 1 H, OCH2), 3.6-3.8 (m, 2H, SCH_2), 3.38 (m, 1H, NCH), 2.49 (s, 3H, NCH_3), 1.8-2.3 (m, 2H, CH_2), 1.24 (d, 3H, CH_3). MS (ES), m/e (M+2): 367. λ_{max} 326 nm, ε_{max} 16,800 $cm^{-1}M^{-1}$（水中）

Ｅ.

【０５１１】

【化１８５】

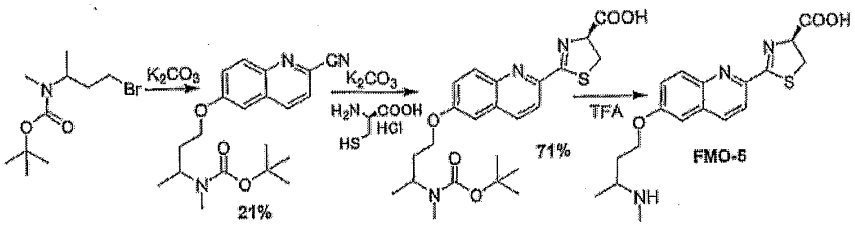


式CCXX

６－（３－メチルアミノ－１－ブトキシ）キノリニルルシフェリン

【０５１２】

【化１８６】



化合物ＦＭＯ－５は、ＦＭＯ－４の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５１３】

【化１８７】

^{1}H NMR(d6-DMSO): 8.34 (d, 1H), 8.10 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 7.47 (m, overlap, 2H), 5.40 (t, 1H, CHCOO), 4.27 (m, 1 H, OCH2), 3.5-3.6 (m, 2H, SCH_2), 3.38 (m, 1H, NCH), 2.60 (s, 3H, NCH_3), 1.9-2.3 (m, 2H, CH_2), 1.28 (d, 3H, CH_3).
MS(ES), m/e (M+2): 361. λ_{max} 327 nm, ε_{max} 9,970 $cm^{-1}M^{-1}$（水中）.

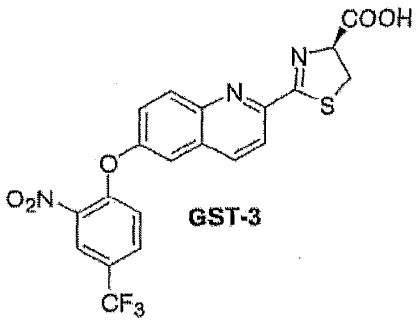
【０５１４】

ＩＶ．ＧＳＴ／グルタチオン用生物発光性基質

Ａ．

【０５１５】

【化１８８】



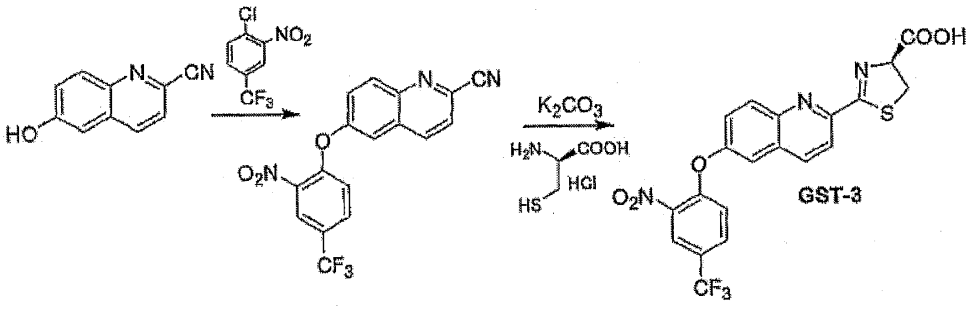
GST-3

式CCXXI

６－（２－ニトロ－４－トリフルオロメチル－フェノキシ）キノリニルルシフェリン

【０５１６】

【化１８９】



【０５１７】

２－シアノ－６－（２－ニトロ－４－トリフルオロメチル－フェノキシ）キノリンの合成

２－シアノ－６－ヒドロキシキノリン（０．５ｇ、２．９４ｍｍｏｌ）、２－ニトロ－４－トリフルオロメチルベンゼンクロライド（０．６７、２．９４ｍｍｏｌ）および、炭酸カリウム（０．４１ｇ、２．９７ｍｍｏｌ）を３０ｍＬのＤＭＳＯ中において、１００℃で３０分間加熱した。室温まで冷えたときに、混合物を３０ｍｌの冷水に注ぎ、メチレンクロライドを用いて３回抽出した。組み合わせた有機層を、水を用いて洗浄し、硫酸マグネシウム上にて乾燥した。生成物を、溶離剤としてヘプタン／メチレンクロライド（１：２）を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。上記化合物を３５％の収率で得た。

【０５１８】

【化１９０】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.36 (d, 1H), 8.25 (dd, 1H), 7.94 (dd, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.67 (dd, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.31 (d, 1H). MS (ES) m/e (M+2): 361.

【０５１９】

ＧＳＴ－３の合成

化合物ＧＳＴ－３は、ＭＡＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。次に、溶離剤としてジクロロメタン／メタノール（９５：５）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより得られた化合物を精製した。結果、上記化合物を２０％の収率で得た。

【０５２０】

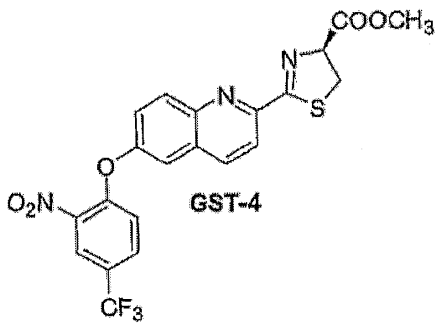
【化１９１】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.55 (s, 1H), 8.42 (d, 1H), 8.19 (m, 2H), 8.06 (d, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.71 (d, 1H), 7.46 (d, 1H), 5.22 (t, 1H, CHCOO), 3.45-3.75 (m, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+1): 464. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 9,900 $cm^{-1}M^{-1}$(メタノール中).

Ｂ.

【０５２１】

【化１９２】

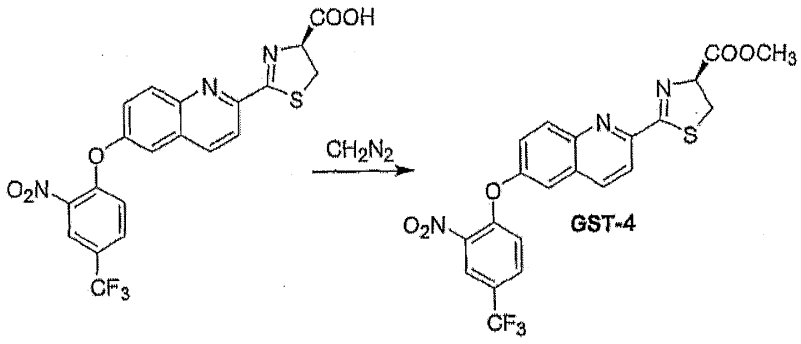


式CCXXII

６－（２－ニトロ－４－トリフルオロメチル－フェノキシ）キノリニルルシフェリンメチルエステル

【０５２２】

【化１９３】



化合物ＧＳＴ－４は、出発物質としてＧＳＴ－３を用いてＭＡＯ－１２の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。

【０５２３】

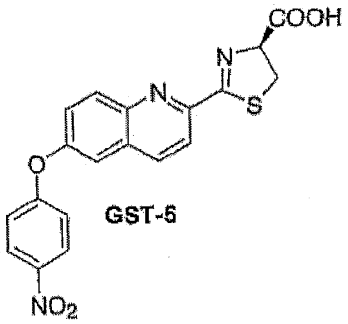
【化１９４】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.23 (s, 1H), 8.0-8.2 (m, 3H), 7.75 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.46 (d, 1H), 5.42 (t, 1H, CHCOO), 3.74 (s, 3H, CH_3), 3.58 (d, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+1): 478. λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 322/10,800; 328/8,800 (メタノール中.

C.

【０５２４】

【化１９５】



式CCXXIII

６－（４－ニトロフェノキシ）キノリニルルシフェリン

化合物ＧＳＴ－５は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。

【０５２５】

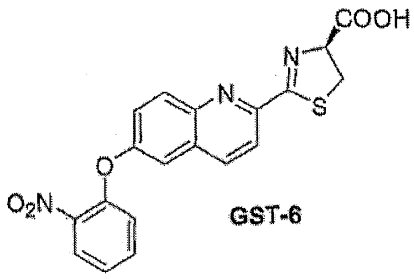
【化１９６】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.39 (d, 1H), 8.28 (d, 2H), 8.19 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.37 (t, 1H, CHCOO), 3.59 (d, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+2): 397. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 17,200 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中.

D.

【０５２６】

【化１９７】



式CCXXIV

６－（２－ニトロフェノキシ）キノリニルルシフェリン

化合物ＧＳＴ－６は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。

【０５２７】

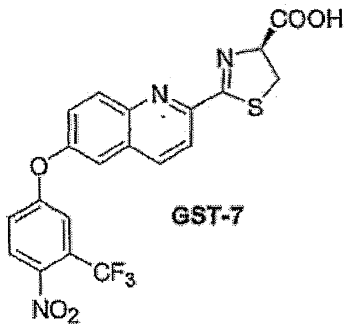
【化１９８】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.39 (d, 1H), 8.13 (m, 3H), 7.78 (t, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.38 (d, 1H), 5.37 (t, 1H, CHCOO), 3.59 (m, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+2): 397.λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 323/10,400; 327/9,500; 337/8,300 (メタノール中).

Ｅ．

【０５２８】

【化１９９】



GST-7

式CCXXV

６－（３－トリフルオロメチル－４－ニトロフェノキシ）キノリニルルシフェリン

化合物ＧＳＴ－７は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。

【０５２９】

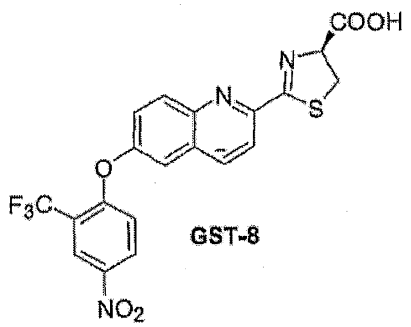
【化２００】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.47 (d, 1H), 8.15-8.30 (m, 3H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.73 (dd, 1H), 7.55 (d, 1H), 5.45 (t, 1H, CHCOO), 3.5-3.7 (m, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+1): 464. λ_{max} 321 nm, ε_{max} 11,000 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中)

Ｆ．

【０５３０】

【化２０１】



GST-8

式CCXXVI

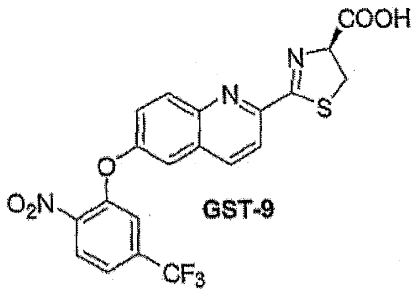
６－（２－トリフルオロメチル－４－ニトロフェノキシ）キノリニルルシフェリン

化合物ＧＳＴ－８は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによっ

て合成した。
【０５３１】
【化２０２】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.56 (d, 1H), 8.47 (d, 2H), 8.20 (dd, 2H), 7.92 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.33 (d, 1H), 5.44 (t, 1H, CHCOO), 3.5-3.7 (m, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+1): 464. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 10,100 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中).

Ｇ．
【０５３２】
【化２０３】



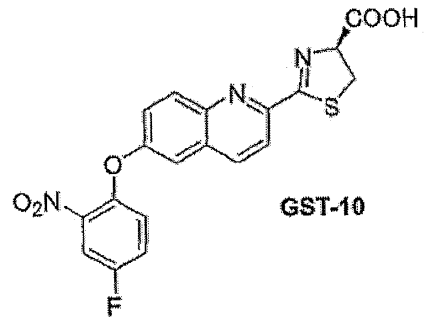
GST-9

式CCXXVII

６－（５－トリフルオロメチル－４－ニトロフェノキシ）キノリニルルシフェリン
化合物ＧＳＴ－９は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。
【０５３３】
【化２０４】

λ_{max} (nm) / ε_{max} ($cm^{-1}M^{-1}$): 321/10,400; 328/8,300 (メタノール中)

Ｈ．
【０５３４】
【化２０５】



GST-10

式CCXXVIII

６－（４－フルオロ－２－ニトロフェニル）キノリニルルシフェリン
化合物ＧＳＴ－１０は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。
【０５３５】

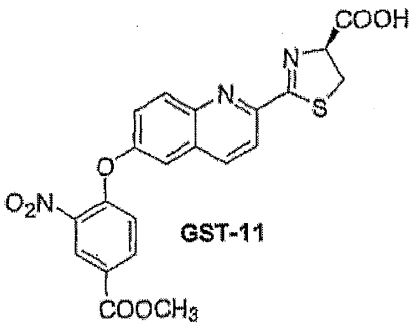
【化２０６】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.38 (d, 1H), 8.02-8.2(m, 3H), 7.6-7.8 (m, 2H), 7.5-7.6 (m, 2H, 1H), 5.34 (t, 1H, CHCOO), 3.5-3.7 (m, 2H, SCH_2).MS (ES) m/e (M+2): 415. λ_{max} 321 nm, ε_{max} 10,600 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中)

Ｉ．

【０５３６】

【化２０７】



式CCXXIX

６－（２－ニトロ－４－メチルカルボキシフェノキシ）キノリニルルシフェリン

化合物ＧＳＴ－１１は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法を用いることによって合成した。

【０５３７】

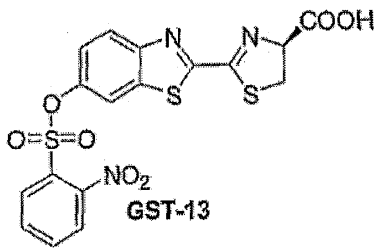
【化２０８】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.68 (d, 1H), 8.15-8.30 (m, 2H), 8.1-8.2 (m, 2H), 7.64-7.74 (m, 2H), 7.33 (d, 1H), 5.42 (t, 1H, CHCOO), 3.81 (s, 3H, CH_3), 3.5-3.7 (m, 2H, CH_2). MS (ES) m/e (M+2): 455. λ_{max} 321 nm, ε_{max} 16,200 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中)

Ｊ．

【０５３８】

【化２０９】

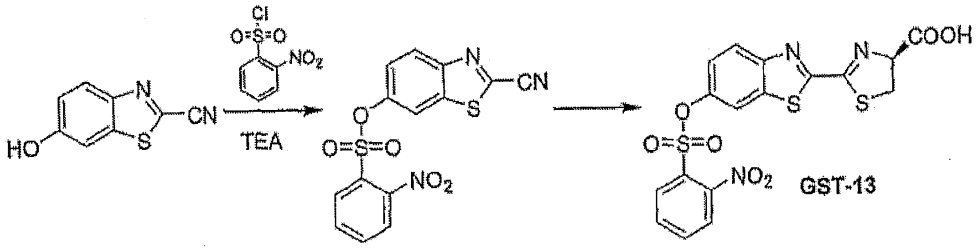


式CCXXX

６－（２－ニトロ－ベンゼンスルホン酸）ルシフェリンエステル

【０５３９】

【化２１０】



【０５４０】

２－シアノ－６－（２－ニトロ－ベンゼンスルホン酸）ベンゾチオゾールの合成

１５ｍｌの無水ジクロロメタンに６－ヒドロキシ－２－シアノベンゾチオゾール（０．５０ｇ、２．８４ｍｍｏｌ）および２－ニトロベンゼン－スルフォニルクロライド（０．６３ｇ、２．８４ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ＴＥＡ（０．５８ｇ、５．６８ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、３時間撹拌した。溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル／ジクロロメタン（７０／３０／１５）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を、５５％の収率で得た。

【０５４１】

ＧＳＴ－１３の合成

化合物ＧＳＴ－１３は、ルシフェリンＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５４２】

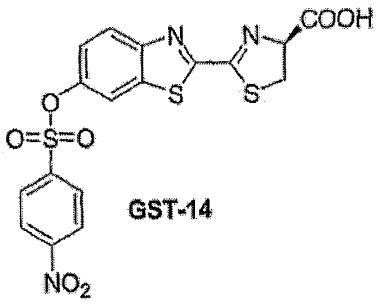
【化２１１】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.14-8.26 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.07 (td, J = 7.5 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 8.0 Hz, Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 7.85 (td, J = 7.8 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.4 Hz, 1H), 5.44 (t, J = 9.0 Hz, 1H, C<u>H</u>-COOH), 3.6-3.9 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 466. λ_{max} 292 nm, ε_{max} 19,100 $cm^{-1}M^{-1}$(メタノール中)

K.

【０５４３】

【化２１２】



式CCXXXI

６－（４－ニトロ－ベンゼンスルホン酸）ルシフェリンエステル

化合物ＧＳＴ－１４は、ＧＳＴ－１３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５４４】

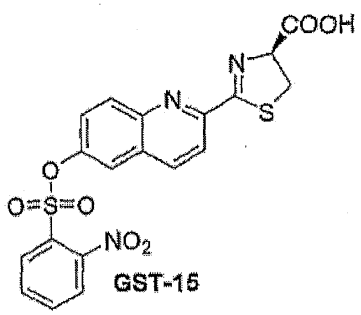
【化２１３】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.42 (d, 2H), 8.17 (m, 3H), 8.08 (d, 1H), 7.25 (dd, 1H), 5.44 (t, 1H, C<u>H</u>-COOH), 3.6-3.9 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 466. λ_{max} 292 nm, ε_{max} 19,400 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中).

Ｌ．

【０５４５】

【化２１４】



GST-15

式CCXXXII

６－（２－ニトロ－ベンゼンスルホン酸）キノリニル－ルシフェリンエステル

化合物ＧＳＴ－１５は、ＧＳＴ－１３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５４６】

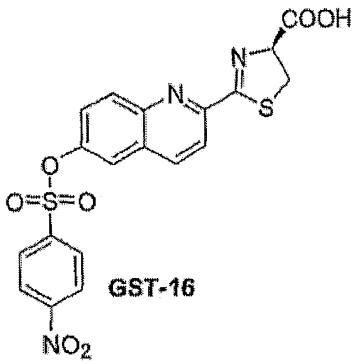
【化２１５】

^{1}H NMR (d_6-DMSO): 8.54 (d, 1H), 7.9-8.3 (m, 6H), 7.85 (t, 1H), 7.57 (dd, 1H), 5.41 (t, 1H, C<u>H</u>-COOH), 3.5-3.7 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+1), 460. λ_{max} 285 nm, ε_{max} 9,010 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中).

Ｍ．

【０５４７】

【化２１６】



GST-16

式CCXXXIII

６－（４－ニトロ－ベンゼンスルホン酸）キノリニル－ルシフェリンエステル

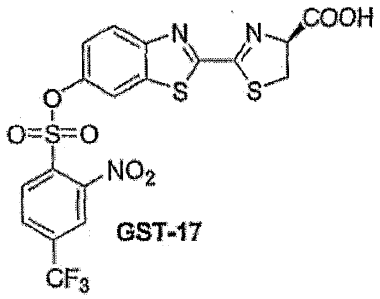
化合物ＧＳＴ－１６は、ＧＳＴ－１３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５４８】
【化２１７】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.23 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.18 (m, 3H), 8.13 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.3 Hz, J = 3 Hz, 1H), 5.42 (dd, J = 8.4 Hz, J = 8.4 Hz, 1H, CHCOO), 3.5-3.7 (m, 2H, CH2). MS (ES) m/e (M+1): 461. λ_{max} 285 nm, ε_{max} 12,400 cm^{-1}M^{-1} (メタノール中.

Ｎ．

【０５４９】
【化２１８】



式CCXXXIV

６－（２－ニトロ－４－トリフルオロベンゼンスルホン酸）ルシフェリンエステル
化合物ＧＳＴ－１７は、ＧＳＴ－１３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

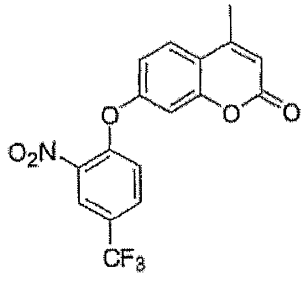
【０５５０】
【化２１９】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.82 (s, 1H), 8.15-8.30 (m, 4H), 7.43 (d, 1H), 5.43 (t, 1H, CHCOO), 3.6-3.9 (m, 2H, SCH_2). MS (ES) m/e (M+1): 534. λ_{max} 292 nm, ε_{max} 18,600 cm^{-1}M^{-1} (メタノール中.

その他のＧＳＴ基質を、図４４Ｂに示す。

【０５５１】
Ｖ．ＧＳＴ／グルタチオン用蛍光性基質
Ａ．

【０５５２】
【化２２０】

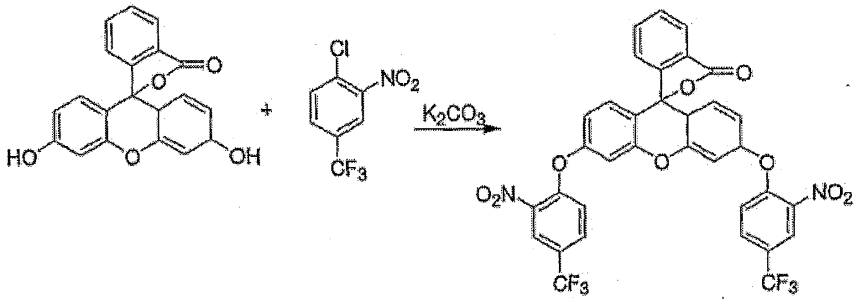


式CCXXXV

７－（５－トリフルオロメチル－２－ニトロフェノキシ）－４－メチルクマリン
上記化合物は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。
【０５５３】
【化２２１】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.37 (s, 1H), 7.88 (d, 2H), 7.70 (m, 2H), 7.28 (d, 1H), 7.05 (d, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 2.43 (s, 3H, CH_3). MS (ES) m/e (M+2): 367. λ_{max} 320 nm, ε_{max} 12,700 $cm^{-1}M^{-1}$ (メタノール中)

Ｂ．
【０５５４】
【化２２２】



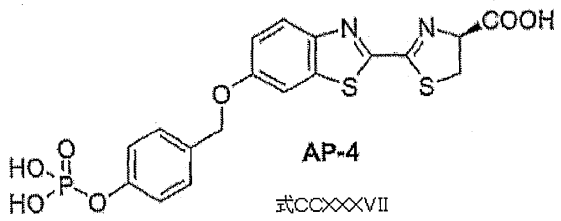
式CCXXXVI

【０５５５】
ビス（－５－トリフルオロメチル－２－ニトロフェノキシ）－フルオレセインラクトンの合成
５０ｍｌＤＭＳＯにフルオレセイン（２．０ｇ、６０ｍｍｏｌ）、２－ニトロ－４－トリフルオロメチルベンゼンクロライド（３．０ｇ、１３．３ｍｍｏｌ）および炭酸カリウム（２．０ｇ、１４．５ｍｍｏｌ）を混合した混合液を、１００℃で１時間加熱した。室温となるまで冷却した後、混合液に３０ｍｌの冷水を注ぎ、ジクロロメタンで３回抽出した。混合有機層は水洗し、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。次に、溶離剤としてヘプタン／ジクロロメタン／酢酸エチル（７／３／０～７／３／）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を８８％の収率で得た。
【０５５６】
【化２２３】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.28 (s, br, 2H), 8.05 (d, 1H), 7.84 (d, 2H), 7.66-7.82 (m, 2H), 7.26 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.92 (d, 2H), 6.84 (dd, 2H).

【０５５７】
ＶＩ．アルカリホスファターゼ用生物発光基質
Ａ．
【０５５８】

【化２２４】



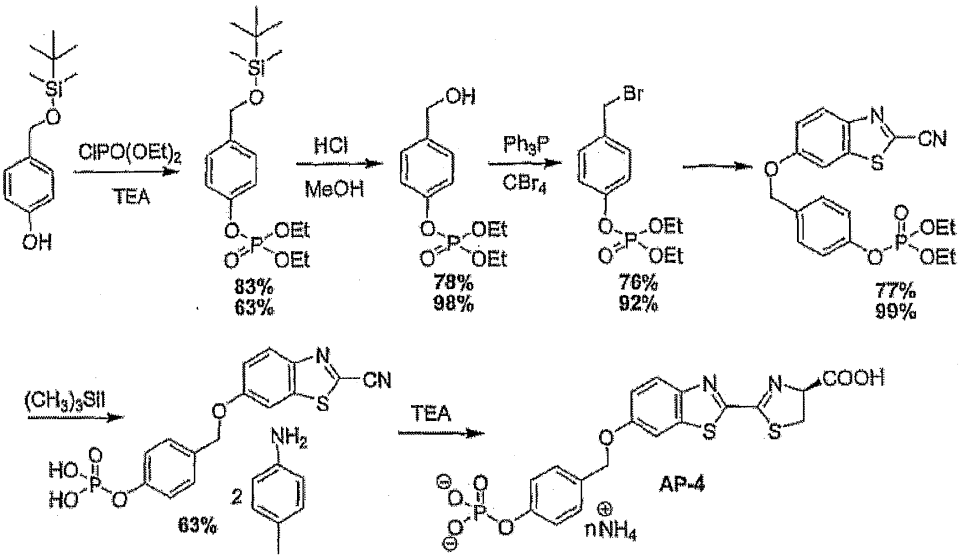
AP-4

式CCXXXVII

６－（４－リン酸ベンジルエステル）ルシフェリン

【０５５９】

【化２２５】



【０５６０】

ジエチル４－（ＴＢＤＭＳ－オキシメチル）フェニルホスフェイトの合成

４－ＴＢＤＭＳ－オキシメチル）フェノール（５．５３ｇ、２３．２ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（３．７９ｇ、３７．４ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ジエチルホスホニルクロライド（４．３１ｇ、２４．９ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、一晩撹拌した。次に、フラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を６３％の収率で得た。

【０５６１】

【化２２６】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.23 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 4.60 (s, 2H, OCH_2), 4.09 (q, 4H, $POCH_2$), 1.15 (t, 6H, CH_3), 0.92 (s, 9H, CH_3), 0.12 (t, 6H, $SiCH_3$). MS (ES): m/e (M+2), 376.

【０５６２】

ジエチル４－（ヒドロキシメチルフェニル）ホスフェイトの合成

１００ｍｌのエタノールに８ｍｌのＨＣｌを溶解した溶液に、ジエチル４－（ＴＢＤＭＳ－オキシメチル）フェニルホスフェイトを添加合した。得られた溶液は、２０分間撹拌し、炭酸水素ナトリウムを用いて中和させた。混合溶液をエーテルにより３回抽出した後、混合有機層を、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。次に、溶媒を除去し、上記化合物を９８％の収率で得た。なお、上記化合物は、さらなる精製を行うことなく、直接、次のステップに使用した。

【０５６３】

【化２２７】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.38 (d, 2H), 7.10 (d, 2H), 4.65 (s, 2H, OCH_2), 4.09 (q, 4H, $POCH_2$), 1.18 (t, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 261

【０５６４】

ジエチル４－（ブロモメチル）フェニルホスフェイトの合成

５０ｍｌのジクロロメタンに四臭化炭素（５．７３ｇ、１７．３ｍｍｏｌ）およびジエチル４－（ヒドロキシメチル）フェニルホスフェイト（３．７４ｇ、１４．４ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、トリフェニルホスフィン（４．５４ｇ、１７．３ｍｍｏｌ）を０℃の温度条件下で添加した。得られた混合溶液は、２時間撹拌した。次に、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（８０／２０～７０／３０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を９２％の収率で得た。

【０５６５】

【化２２８】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.41 (d, 2H), 7.20 (d, 2H), 4.53 (s, 2H, OCH_2), 4.20 (q, 4H, $POCH_2$), 1.17 (t, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 323

【０５６６】

リン酸４－（２－シアノ－ベンゾチオゾール－６－イルオキシメチル）－フェニルジエチルエステルの合成

上記化合物は、ＭＡＯ－１前駆体の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５６７】

【化２２９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.12 (d, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.46 (d, 2H), 7.33 (d, 1H), 7.26 (d, 2H), 5.18 (s, 2H, OCH_2), 4.20 (m, 4H, $POCH_2$), 1.34 (t, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 420

【０５６８】

４－（２－シアノ－ベンゾチアゾール－６－イルオキシメチル）フェニルリン酸の合成

１５ｍｌのジクロロメタンにリン酸４（２－シアノ－ベンゾチアゾール－６－イルオキシメチル）－フェニルジエチルエステルを溶解した溶液に、ヨードトリメチルシラン（０．４６ｇ、２．３１ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、４０分間撹拌し、続いて、ｐ－トルイジン（１．５０ｇ、１４．０ｍｍｏｌ）溶液を２０ｍｌ添加した。溶媒を一部除去した後、ろ過により淡黄色の沈殿を収集し、エタノールおよびエーテルで洗浄した。結果、上記化合物を６３％の収率で得た。

【０５６９】

【化２３０】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.18 (d, 1H), 8.0 (s, 1H), 7.43 (d, 2H), 7.38 (d, 1H), 7.19 (d, 2H), 6.82 (d, 3.75H), 6.45 (d, 3.75H), 5.19 (s, 2H, OCH_2), 2.16 (s, ~6 H, CH3). （約3．3モル当量のトルイジンを含んでいる） . MS (ES): m/e (M+2), 362

【０５７０】

ＡＰ－４の合成

ＡＰ－４は、ＭＡＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。そして、移動相として５ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリルを用いたＨＰＬＣにより精

製した。

【０５７１】

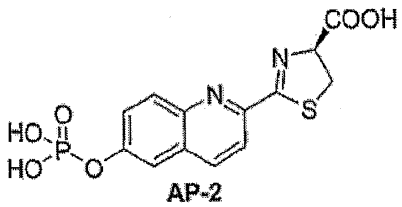
【化２３１】

^{1}H NMR (D_2O): 7.82 (d, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.39 (d, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.10 (d, 2H), 5.11 (t, 1H, CH-COOH), 5.06 (s, 2H, OCH_2), 3.45-3.80 (m, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+2), 468, λ_{max} 329 nm, ε_{max} 19,100 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中).

Ｂ．

【０５７２】

【化２３２】



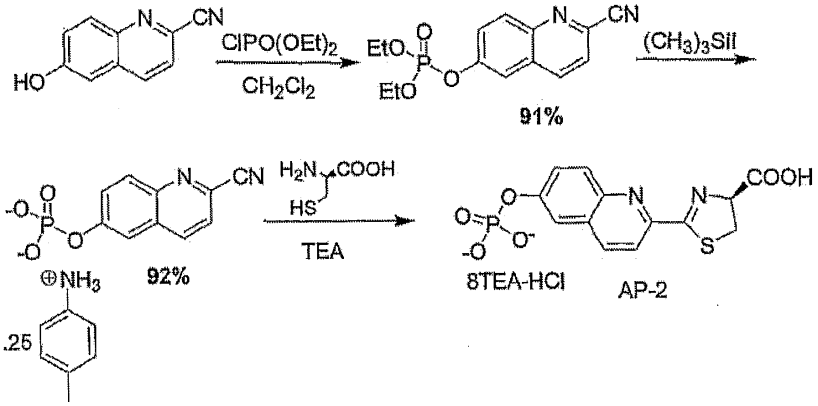
AP-2

式CCXXXVIII

６－リン酸－キノリニル－ルシフェリン

【０５７３】

【化２３３】



【０５７４】

ジエチル－（２－シアノ－キノリン－６イル）ホスフェイト

１５ｍｌの無水ジクロロメタンに２－シアノ－６－ヒドロキシキノリン（０．５０ｇ、２．９４ｍｍｏｌ）およびジエチルホスホロクロライド（０．６７ｇ、３．５３ｍｍｏｌ）を添加した混合溶液に、トリエチルアミン（０．５９ｇ、５．８８ｍｍｏｌ）を混合した。得られた混合溶液は、室温で５時間撹拌した。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチルを用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を９１％の収率で得た。

【０５７５】

【化２３４】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.35 (d, 1H), 8.18 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.6-7.8 (m, 2H), 4.26 (m, 4H, CH_2), 1.18 (t, 6H, CH_3). MS (ES) m/e (M-2): 306.

【０５７６】

（２－シアノ－キノリン－６－イル）リン酸の合成

１０ｍｌのジクロロメタンにジエチル（２－シアノ－キノリン－６－イル）ホスフェイト（０．５８ｇ、１．８６ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ヨードトリメチルシラン（０．８２ｇ、４．１ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、４０分間撹拌し、続いて、ｐ－トルイジン（１．５０ｇ、１４．０ｍｍｏｌ）溶液を２０ｍｌ添加した。溶媒を一部除去した後、ろ過により淡黄色の沈殿を収集し、エタノールおよびエーテルで洗浄した。結果、上記化合物を９２％の収率で得た。

【０５７７】

【化２３５】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.54 (d, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.95 (d, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.82 (s, br, 1H), 7.71 (dd, 1H), 6.85 (d, 2.5 H), 6.55 (d, 2.5 H), 2.13 (s, 3.85 H, CH3). （対イオンとして約1．25モル当量のトルイジンを含んでいる） . MS (ES) m/e (M-2): 248

ＡＰ－２の合成

ＡＰ－２は、ＡＰ－４の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０５７８】

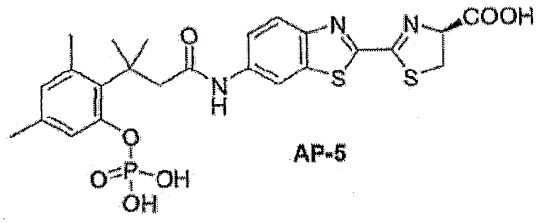
【化２３６】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz, 1H), 5.89 (dd, J = 8.4 Hz, J = 8.4 Hz, 1H, CHCOO), 3.4-3.65 (m, 2H, CH_2). （対イオンとして～8モル当量の TEA/HClを含んでいる） . MS (ES) m/e (M+): 352

Ｃ．

【０５７９】

【化２３７】



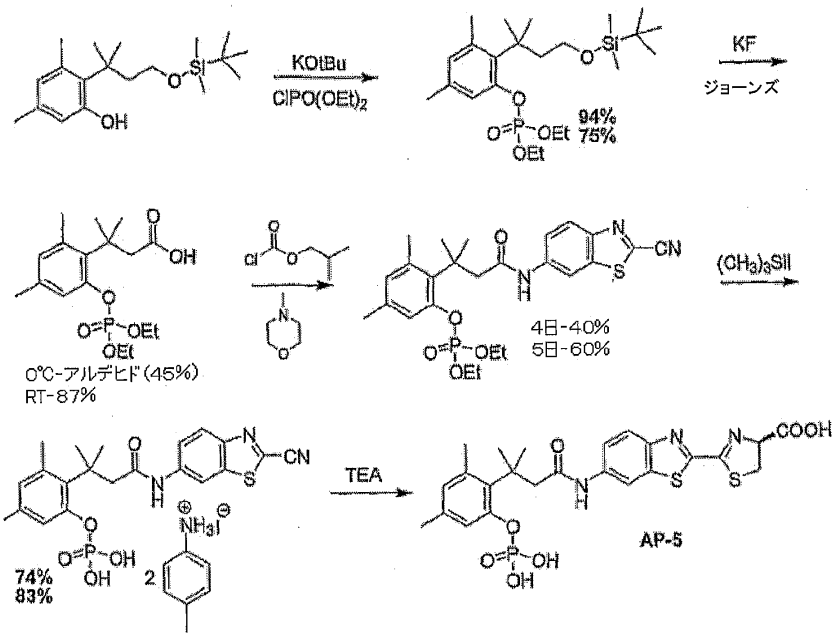
AP-5

式CCXXXIX

トリメチルロックホスフェイトルシフェリンアミド

【０５８０】

【化２３８】



【０５８１】

２－［３－（ｔｅｒｔ－ブチル－ジメチル－シラニルオキシ）－１，１－ジメチル－プロピル］－３，５－ジメチル－フェノールの合成

３０ｍｌの無水ＴＨＦにフェノール（１０．０ｇ、３１．２ｍｍｏｌ）およびカリウムｔ－ブトキシド（３．８５ｇ、３４．３ｍｍｏｌ）を溶解した溶液を、５分間６０℃で加熱し、ジエチルホスフェイトクロライド（５．８６ｇ、３３．９６ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、６０～７０℃で２．５時間加熱された。室温となるまで冷却した後、ろ過により混合溶液から不溶性の固体を除去した。次に、溶離剤としてヘプタンおよび酢酸エチル（９０／１０～８０／２０）を用いたフラッシュクロマトグラフィによりろ液の溶媒を除去した後に残った残渣を精製した。結果、上記化合物を７５％の収率で得た。

【０５８２】

【化２３９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.10 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.21 (q, 4H, OCH_2), 3.51 (t, 2H, CH_2OSi), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.25 (s 3H, CH_3), 2.13 (t, 2H, CH_3), 1.57 (s, 6H, CH_3), 1.37 (t, 6H, CH_3), 0.85 (s, 9H, CH3), 0.02 (s, 6H, $SiCH_3$). MS (ES): m/e (M+2), 460.

【０５８３】

３－［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－４，６－ジメチル－フェニル］－３－メチル－酪酸

５０ｍｌのアセトンに２－［３－（ｔｅｒｔ－ブチル－ジメチル－シラニルオキシ）－１，１－ジメチル－プロピル］－３，５－ジメチル－フェノールを溶解した溶液に、フッ化カリウム（０．６７８ｇ、１１．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合溶液を０℃まで冷却し、混合溶液が濃い橙色となるまで、３０分以上ジョーンズ試薬（Ｊｏｎｅ’ｓ　ｒｅａｇｅｎｔ）を添加した。得られた混合溶液は、室温まで温め、３時間撹拌した。ろ過により不溶性の固体を除去し、アセトンで数回洗浄した。ろ液の溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（７０／３０～４０／６０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を８７％の収率で得た。

【０５８４】
【化２４０】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.02 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 4.25 (q, 4H, OCH_2), 2.90 (s, 2H, CH_2), 2.52 (s, 3H, CH_3), 2.22 (s 3H, CH_3), 1.63 (s, 6H, CH_3), 1.38 (t, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 359.

【０５８５】
２－シアノ－６－（トリメチルロックジエチルホスフェイト）ベンゾチアゾールアミドの合成
２０ｍｌの無水ＴＨＦに３－［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－４，６－ジメチル－フェニル］－３－メチル－酪酸（０．９１ｇ、２．３６ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、イソブチルクロロホルメイト（０．３６ｇ、２．６０ｍｍｏｌ）およびＮ－メチルモルホリン（０．２６ｇ、２．６０ｍｍｏｌ）を０℃の温度条件下で添加した。次に、混合溶液を３０分間、室温で撹拌した（酸が無水物中において完全に変換したかを確認するために、ＴＬＣにより反応をチェックするべきである）。６－アミノベンゾチアゾール（０．２７５ｇ、１．５７ｍｍｏｌ）およびＮ－メチルモルホリン（０．５３ｇ、５．２０ｍｍｏｌ）をさらに混合し、混合溶液を室温で５日間撹拌した。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（８０／２０～７０／３０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を６０％の収率で得た。
【０５８６】
【化２４１】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 9.58 (s, 1H, NH), 8.55 (d, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.38 (dd, 1H), 7.0 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.36 (q, 4H, OCH2), 2.80 (s, 2H, CH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.20 (s, 3H, CH_3), 1.78 (s, 6H, CH_3), 1.48 (t, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 516.

【０５８７】
２－シアノ－６－（トリメチルロックリン酸）ベンゾチアゾールアミドの合成
ジエチルホスフェイトトリメチルロックアミドは、ＡＰ－４前駆体の合成に用いた方法と同様の方法により脱エチル化した。
【０５８８】
【化２４２】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.62 (d, 1H), 8.03 (d, 1H), 7.50 (dd, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.98 (d, 4.5 H), 6.75 (d, 4.5 H), 6.48 (s, 1H), 2.86 (s, 2H, CH_2), 2.38 (s, 3H, CH_3), 2.19 (s, ~6.75H, CH3), 2.07 (s 3H, CH_3), 1.65 (s, 6H, CH_3).
対イオンとして2.25モル当量のトルイジンを含んでいる）ＭＳ（ＥＳ）：ｍ／ｅ（Ｍ－１），459

【０５８９】
ＡＰ－５の合成
化合物ＡＰ－５は、ＡＰ－４の合成に用いた環状結晶化（ｒｉｎｇ　ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｔｉｏｎ）により調製し、移動相として５ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリルを用いたＨＰＬＣにより精製した。
【０５９０】

【化２４３】

^{1}H NMR (D_2O): 7.80 (s, 1H), 7.77 (d, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.06 (d, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.12 (t, 1H, CH-COOH), 3.5-3.8 (m, 2H, CH_2), 2.85 (s, 2H, CH_2), 2.28 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s 3H, CH_3), 1.60 (s, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 564. λ_{max} 322 nm, ε_{max} 16,700 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中).

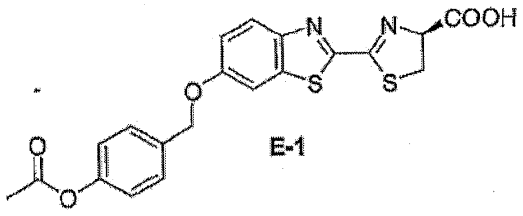
【０５９１】

ＶＩＩ．その他

Ａ．

【０５９２】

【化２４４】

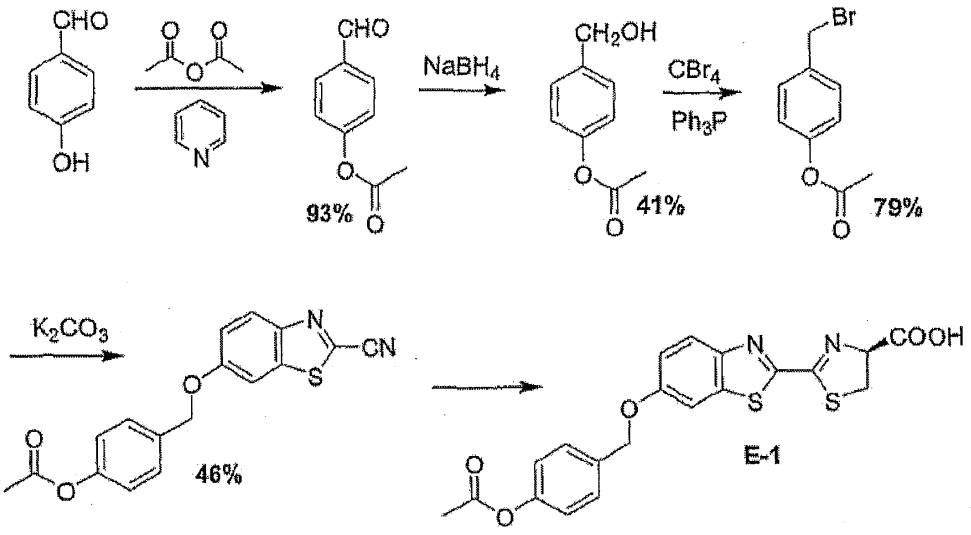


式CCXXXX

６－（４－リン酸ベンジルエーテル）ルシフェリン

【０５９３】

【化２４５】



【０５９４】

４－ホルミルフェノールアセテートの合成

１５０ｍｌのピリジンに４－ハイドロキシベンズアルデヒド（１０．０ｇ、８１．９ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、６０ｍｌのアセトアルデヒドを添加した。得られた混合溶液は、室温で２時間撹拌した。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／ジクロロメタン／酢酸エチル（２０／２０／１０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を９３％の収率で得た。

【０５９５】

【化２４６】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 10.0 (s, 1H, CHO), 7.86 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 2.32 (s, 3H, CH_3)

【０５９６】

４－ヒドロキシメチルフェノールアセテートの合成

６０ｍｌのメタノールに４－ホルミルフェノールアセテート（６．０ｇ、３６．４ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、水素化臭素ナトリウム（１．５０ｇ、３９．６ｍｍｏｌ）を０℃の温度条件下で添加した。得られた混合溶液は、１時間撹拌し、酢酸により中和された後、水に注いだ。混合溶液は、エーテルで３度抽出した後、混合有機層は、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（８０／２０～７０／３０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより上記化合物を精製した。結果、上記化合物を４１％の収率で得た。

【０５９７】

【化２４７】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.4 (d, 2H), 7.08 (d, 2H), 4.67 (s, 2H, CH_2), 2.30 (s, 3H, CH_3)

【０５９８】

４－ブロモメチルフェノールアセテートの合成

４０ｍｌのジクロロメタンに４－ヒドロキシメチルフェノールアセテート（２．５０ｇ、１５．０ｍｍｏｌ）および四臭化炭素（５．９７ｇ、１８ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、窒素雰囲気下でトリフェニルホスフィン（４．７３ｇ、１８０ｍｍｏｌ）を添加した。得られた混合溶液は、３時間撹拌した。次に、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（９０／１０～８０／２０）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を７９％の収率で得た。

【０５９９】

【化２４８】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.45 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 4.53 (s, 2H, CH_2), 2.29 (s, 3H, CH_3)

【０６００】

４－（２－シアノ－ベンゾチアゾール－６－イルオキシメチル）－フェノールアセテートの合成

上記化合物は、ＭＡＯ－１前駆体の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０６０１】

【化２４９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.14 (d, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.26 (d, 1H), 7.14 (d, 1H), 5.18 (s, 2H, OCH_2), 2.30 (s, 3H, CH_3).

【０６０２】

Ｅ－１の合成

Ｅ－１は、ＧＳＴ－１３の合成に用いた方法と同様の方法によって合成した。

【０６０３】

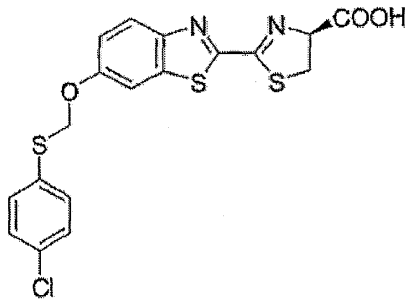
【化２５０】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.05 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.26 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.7 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.41 (dd, J = 8.40 Hz, J = 8.1Hz, 1H, C<u>H</u>-COOH), 5.20 (s, 2H, OCH_2), 3.6-3.80 (m, 2H, CH_2), 2.26 (s, 3H, CH_3). MS (ES): m/e (M+1), 429. λ_{max} 325 nm, ε_{max} 19,100 $cm^{-1}M^{-1}$(メタノール中)

Ｂ．

【０６０４】

【化２５１】

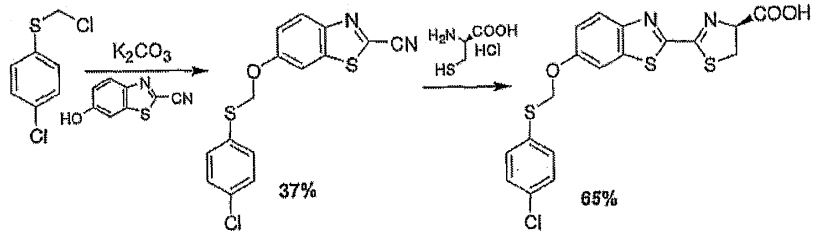


式CCXXXXI

６－（４－クロロ－フェニルチオメトキシ）ルシフェリン

【０６０５】

【化２５２】



【０６０６】

２－シアノ－６－（４－クロロ－フェニルチオメトキシ）－ベンゾチアゾールの合成

３０ｍｌのアセトンに、６－ヒドロキシ－２－シアノベンゾチアゾール（０．４５ｇ、２．５９ｍｍｏｌ）、１－クロロ－４－クロロメチルチオベンゼン（０．５０ｇ、２．５９ｍｍｏｌ）、炭酸カリウム（０．３６ｇ、２．６１ｍｍｏｌ）およびヨウ化ナトリウム（０．０１ｇ）を混合した混合溶液を、３０分間、リフラックスさせつつ、加熱した。室温まで冷却した後、ろ過により不溶性の固体を除去した。減圧下でろ液の溶媒を除去し、得られた残渣を加熱しつつ、最少量のアセトンに溶解した。溶液を０℃まで冷却し、黄色の結晶を迅速に形成させた。そして、ろ過により固体を収集した。結果、上記化合物を３７％の収率で得た。

【０６０７】

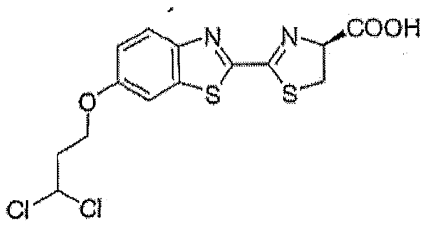
【化２５３】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.14 (d, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.45 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.32 (dd, 1H), 5.57 (z, 1H, CH_2).

【０６０８】
６－（４－クロロ－フェニルチオメトキシ）ルシフェリン
上記化合物は、ＭＡＯ－１の合成に用いた方法と同様の方法により合成した。そして、フラッシュクロマトグラフィにより精製した。
【０６０９】
【化２５４】

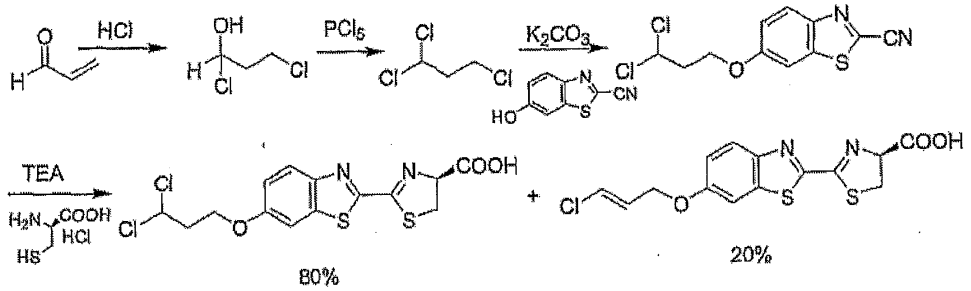
^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.06 (d, 1H), 7.87 (d, 1H), 7.47 (d, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.23 (dd, 1H), 5.79 (z, 1H, OCH_2), 5.22 (t, 1H, CH), 3.68 (d, 2H, CH_2). MS (ES): m/e (M+), 436. λ_{max} 324 nm, ε_{max} 16,300 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中).

Ｃ．
【０６１０】
【化２５５】



式CCXXXXII

６－（３，３－ジクロロ－プロピル）－ルシフェリン
【０６１１】
【化２５６】



【０６１２】
１，３－ジクロロプロパノールの合成
０℃で３時間、アクロレイン（５．０ｇ、８９．２ｍｍｏｌ）にＨＣｌガスをバブリングした。反応混合液にジクロロメタンを２００ｍｌ添加し、その結果得られた溶液を３回水洗し、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。溶媒を除去した後、生成物は、さらなる精製を行うことなく、直接、次のステップに使用した。
【０６１３】
【化２５７】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 5.17 (t, 1H), 3.68 (t, 2H, OCH_2), 2.13 (q, 2H, CH_2).

【０６１４】
１，１，３－トリクロロプロパンの合成
１００ｍｌの石油エーテル（４０～６０℃）にPCl_5（２３．５０ｇ、０．１１３ｍ

ｏｌ）を混合した混合溶液に、１，３－ジクロロプロパノール（１４．５ｇ、０．１１３ｍｏｌ）を滴下して添加した。４０～６０℃で溶媒を蒸留した後、温度を１２０℃にまで上昇させた。そして、減圧下（７０～８０ｍｍＨｇ）で留分（７０～９０℃）を収集した。蒸留した液体は、冷水に注ぎ、４時間撹拌した後、石油エーテル（４０～６０℃）で抽出した。混合有機層は、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。水溶液中における蒸留した液体のｐＨが中性となるまで、上記の工程を繰り返した。最後の蒸留において、生成物は、３．６４ｇであった（収率２２％）。

【０６１５】

【化２５８】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 6.03 (t, 1H), 3.74 (t, 2H, $ClCH_2$), 2.64 (q, 2H, CH_2).

２－シアノ－６－（３，３－ジクロロ－プロポキシ）－ベンゾチアゾール

上記化合物は、ＭＡＯ－１前駆体の合成に用いた方法と同様の方法により合成した。

【０６１６】

【化２５９】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 8.12 (d, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.23 (dd, 1H), 6.51 (t, 1H, $CHCl_2$), 4.24 (t, 2 H, OCH_2), 2.75 (q, 2H, SCH_2).

６－（３，３－ジクロロ－プロポキシ）－ルシフェリン

上記化合物は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法により合成した。

【０６１７】

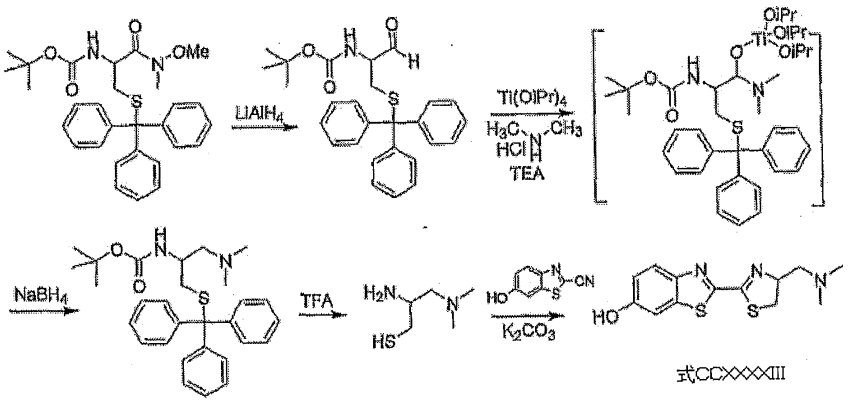
【化２６０】

^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.02 (d, 1H), 7.80 (d, 1H), 7.19 (dd, 1H), 6.46 (t, 1H, $CHCl_2$), 5.35 (t, 1H, CHCOO), 4.24 (t, 2 H, OCH_2), 3.6-3.8 (m, 2H, SCH_2), 2.69 (q, 2H, CH_2).

Ｄ．

【０６１８】

【化２６１】



式CCXXXXIII

【０６１９】

（１－ホルミル－２－トリチルチオエチル）カルバミン酸ｔｅｒｔ－ブチルエステルの合成

３０ｍｌの無水エーテルにｔ－ＢＯＣ－トリチル－ワインレブアミド（１．６７ｇ、３．３０ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ＬｉＡｌＨ$_4$（０．２５ｇ、６．５９ｍｍｏｌ）を３回に分けて、－５０℃の温度条件下で添加した。次に、温度を－３５℃まで上昇させ、得られた混合溶液を、－３５℃で２時間撹拌した。反応は、１５ｍｌの冷水をゆっくりと

添加することにより冷却しつつ行った。混合溶液は、エーテルで３回抽出し、混合有機層は、硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。溶媒を除去した後、溶離剤としてヘプタン／酢酸エチル（８／２～７／３）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を８７％の収率で得た。

【化２６２】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 9.21 (s, 1H, CHO), 7.2-7.7 (m, 15 H, Ar-H), 5.10 (s, br, 1H, NHCO), 3.83 (m, 1H, CH), 2.4-2.8 (m, 2H, CH_2), 1.22 (s, 9H, CH_3).

【０６２０】

（１－ジメチルアミノメチル－２－トリチオエチル）－カルバミン酸ｔｅｒｔ－ブチルエステルの合成

５ｍｌの無水エタノールにトリエチルアミン（０．１１ｇ、１．１２ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、ジメチルアミン塩酸塩（０．０９１２ｇ、１．１２ｍｍｏｌ）、イソプロポキシドチタン（ＩＶ）（０．３１７ｇ、１．１２ｍｍｏｌ）および（１－ホルミル－２－トリチルチオエチル）カルバミン酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル（０．２５ｇ、０．５６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合液は、室温で１０分間撹拌した。反応混合液に、$NaBH_4$（０．０４５ｇ、１．１２ｍｍｏｌ）をさらに添加し、得られた混合溶液をさらに４時間撹拌した。そして、反応は、混合溶液に１０ｍｌの水を添加することにより冷却しつつ行った。混合溶液は、エーテルで３回抽出し、混合有機層は、硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。溶媒を除去した後、溶離剤としてジクロロメタン／メタノール（９５／５）を用いたフラッシュクロマトグラフィにより生成物を精製した。結果、上記化合物を４１％の収率で得た。

【０６２１】

【化２６３】

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 7.2-7.7 (m, 15 H, Ar-H), 4.65 (s, br, 1H, NHCO), 3.62 (m, 1H, CH), 2.42 (t, 2H, NCH_2), 2.20 (m, 2H, SCH_2), 2.17 (s, 6H, NCH_3), 1.41 (s, 9H, CH_3). MS(ES): m/e (M+1), 477

【０６２２】

ジメチルアミノルシフェリンの合成

（１－ジメチルアミノ－メチル－２－トリチオエチル）－カルバミン酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル（０．１８ｇ、３．７８ｍｍｏｌ）に、ＴＥＡ（５０％）およびトリイソプロピルシラン（０．０７７ｇ）を溶解した溶液を添加した。得られた溶液は、３０分間撹拌し、２０ｍｌのエーテルをさらに添加した。減圧下で溶媒を除去した後、残渣をエーテルを用いて粉砕し、ろ過により黄色の固体を収集した。収集した固体は、さらなる精製を行うことなく、次のステップに供した。

【０６２３】

上記固体および２－シアノ－６－ヒドロキシベンゾチオゾール（０．０６７ｇ、０．３８ｍｍｏｌ）を２．５ｍｌのメタノール、０．５ｍｌのCH_2Cl_2、および１ｍｌのH_2Oに溶解した。溶液に、K_2CO_3（０．５２ｇ、０．３８ｍｍｏｌ）をさらに添加した。混合溶液は、室温で１時間撹拌し、次に、弱酸性条件において中和させた。有機溶媒を除去した後、溶離剤として０．１％ＴＦＡ含有水／アセトニトリルを用いたＨＰＬＣにより生成物を精製した。

【０６２４】

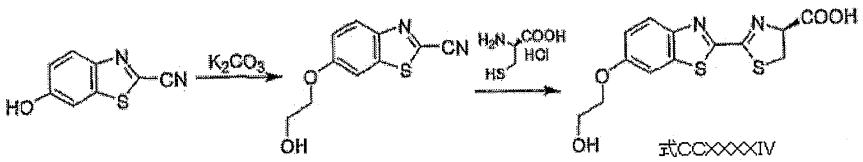
【化２６４】

^{1}H NMR (CD_3OD): 7.51 (d, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.25 (dd, 1H), 6.46 (t, 1H, $CHCl_2$), 5.12 (m, 1H, CH), 3.75, 3.22 (m, 2 H, SCH_2), 3.50 (m, 2H, NCH_2), 3.04 (s, 6H, CH_3). MS (ES): m/e (M+), 293.

Ｅ．

【０６２５】

【化２６５】



式CCXXXXIV

６’－（２－ヒドロキシエトキシル）ルシフェリンの合成

上記化合物は、ＧＳＴ－３の合成に用いた方法と同様の方法により合成した。

【０６２６】

【化２６６】

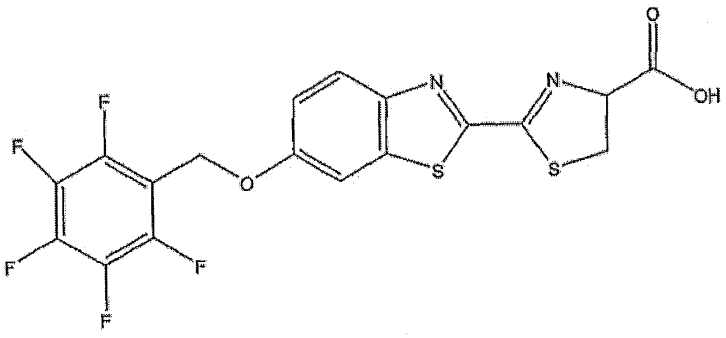
^{1}H NMR (d6-DMSO): 8.0 (d, 1H), 7.72 (d, 1H), 7.17 (dd, 1H), 5.18 (t, 1H, CH), 4.08 (t, 2 H, OCH_2), 3.74 (t, 2H, $HOCH_2$), 3.64 (m, 2H, SCH_2). MS (ES): m/e (M+1), 325. λ_{max} 328 nm, ε_{max} 16,500 $cm^{-1}M^{-1}$ (水中).

【０６２７】

Ｆ．６’－（２，３，４，５，６－ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリン

【０６２８】

【化２６７】



式CCXXXXV

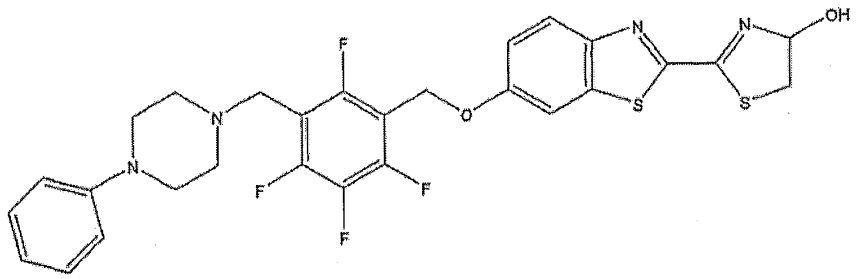
６’－（２，３，４，５，６－ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリンは、出発物質として臭化ベンジルの代わりに、ペンタフルオロ臭化ベンジルを用いることによって、ルシフェリンベンジルエステル（ＬｕｃＢＥ）と同様の方法により合成した。６’－（２，３，４，５，６－ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリン（式Ｉ’、ＩＩＩ’、ＶＩＩ’、またはＶＩＩＩ’の化合物）は、ＣＹＰアッセイで検査した。

【０６２９】

Ｇ．６’－（２，３，４，５，６－テトラフルオロ－５－（（４－フェニルピペリジン－１－イル）メチル）ベンジルオキシ）－ルシフェリン（ＬｕｃＰＰＸＥ４Ｆ）

【０６３０】

【化２６８】



式CCXXXXVI

この合成は、α，α’－ジブロモ－ｍ－テトラフルオロキシレンを用いた６’－（３－（（４－フェニルピペリジン－１－イル）ベンジルオキシ）－ルシフェリン（ＬｕｃＰＰＸＥ）の合成と同様の方法により行った。α，α’－ジブロモ－ｍ－テトラフルオロキシレンは、テトラフルオロイソフタル酸から２ステップで合成した。第１のステップでは、ＴＨＦ中においてボランを添加することによりテトラフルオロイソフタル酸を還元し、α，α’－ジヒドロキシ－ｍ－テトラフルオロキシレンを生成した。第２のステップでは、α，α’－ジヒドロキシ－ｍ－テトラフルオロキシレンを、α，α’－ジブロモ－ｍ－テトラフルオロキシレンに変換した。最も多く生じる副生成物は、モノブロモの化合物である。６’－（２，３，４，６－テトラフルオロ－５－（（４－フェニルピペリジン－１－イル）メチル）ベンジルオキシ）－ルシフェリン（式ＩＸ’の化合物）は、ＣＹＰアッセイで検査した。

【０６３１】

ａ．　α，α’－ジヒドロキシ－ｍ－テトラフルオロキシレン

５０ｍｌの無水テトラヒドロフランにテトラフルオロイソフタル酸（２ｇ、８．４ｍｍｏｌ）を溶解した溶液に、テトラヒドロフラン（３４ｍｌ、３３．６ｍｍｏｌ）に１Ｍボラン－テトラヒドロフランを混合した混合物を添加した。混合溶液は、窒素雰囲気下で４時間、リフラックスした。溶液は、室温となるまで冷却し、２００ｍｌの水を添加した。そして、得られた混合溶液を、エチルエーテル（２×１７５ｍｌ）で抽出した。抽出溶液は、混合し、飽和炭酸水素ナトリウム（２×２００ｍｌ）および水（１×２００ｍｌ）により洗浄した。有機相は、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、減圧下において溶媒を除去した。残渣は、さらなる精製を行うことなく、一晩膨張させた（１．３ｇ、収率７３．７％）。

【０６３２】

ｂ．α－α’－ジブロモ－ｍ－テトラフルオロキシレン

５ｍｌの無水アセトニトリルに臭化リチウム（３５０ｍｇ、４ｍｍｏｌ）を混合した混合液に、クロロトリメチルシラン（６５０μｌ、５ｍｍｏｌ）を添加した。この溶液に、１０ｍｌの無水アセトニトリルに溶解したα，α’－ジヒドロキシ－ｍ－テトラフルオロキシレン（２１０ｍｇ、１ｍｍｏｌ）を添加した。次に、得られた混合液は、窒素雰囲気下で６時間、リフラックスした。続いて、混合液に４０ｍｌのエチルエーテルを添加し、水（２×４０ｍｌ）、炭酸水素ナトリウム（１×４０ｍｌ）、および塩水（１×４０ｍｌ）で連続的に洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去した。そして、酢酸エチル：ヘプタン（１００：７０）の溶離剤を用いたフラッシュクロマトグラフィにより精製した（８５ｇ、収率２５％）。

【０６３３】

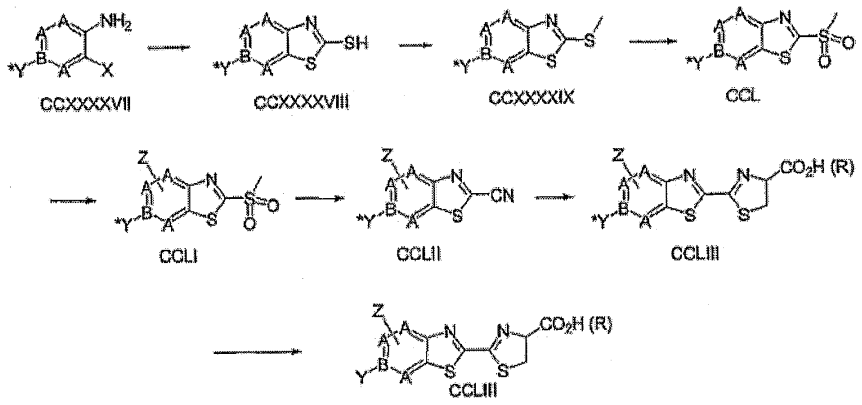
Ｂ．酸化還元または脱アルキラーゼ生物発光アッセイ用誘導体の合成スキーム

適切に置換したオルト－アミノハロピリジンを、２－チオヒドロキシピペリドチアゾールに変換し、続いて、ヨウ化メチルを用いたアルキル化により２－メチルチオピペリドチアゾールを得た。チオエーテルの機能は、スルホンに酸化させることである。ピリジンアミンは、所望の生成物をＮ－酸化物に酸化させるか、またはメチル化させるために用いる

。スルホンは、相当する２－シアノピリドチアゾールを得るために、シアン化合物に置換される。システイン（カルボン酸がエステル化されている、あるいはされていないＤ体、Ｌ体、ＤＬ体）は、シアノピリドチアゾールと縮合される。残余している保護基は、従来公知の方法により除去され、適切にメチル化あるいは酸化されたアザ－ルシフェリンを得た。

【０６３４】

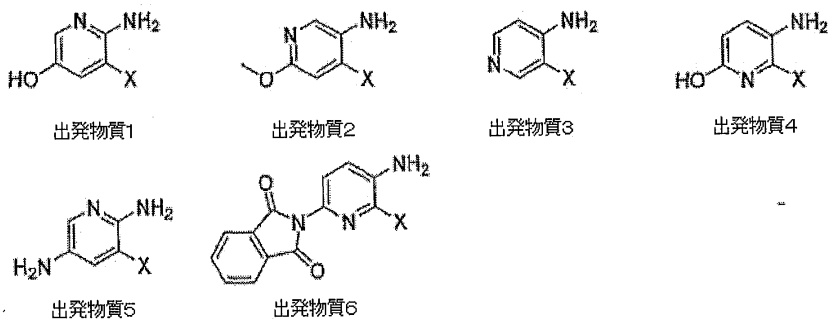
【化２６９】



出発物質であるオルトアミノハロピリジンの例

【０６３５】

【化２７０】



【０６３６】

例示した出発物質の合成の参考文献

出発物質１、３および４は、市販されている。出発物質２は、Ｍａｅｚａｓ，Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｅｓ，５０：１０６５（１９９９）に開示されている。出発物質５は、Ｋｕｒａｍｏｃｈｉ（米国特許公開第２００５００４１０３号明細書）に開示されている。出発物質６は、Ｋｏｌｅｓｎｉｋｏｖ（米国特許公開第２００３０２２５０３６号明細書）に開示されている。

【０６３７】

ルシフェリンのＮ３－酸化物は、酸化したベンズチアゾールを得るために、６－ヒドロキシ－２－メチルベンズチアゾールまたは６－アミノ－２－メチルベンズチアゾールを酸化することによって合成される。メチル基は、従来公知の方法（Ｔａｋａｈａｓｈｉら、Ｃｈｅｍ＆Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，１８：１１７６（１９７０）；Ｓａｓｓｏｎら、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，７：２１７７（２００５））によりニトリルに変換される。ニトリルは、システイン（カルボン酸がエステル化されている、あるいはされていないＤ体、Ｌ体、ＤＬ体）と縮合される。

【０６３８】

キノリニルルシフェリンのＮ１－酸化物は、２－メチル－６－ヒドロキシキノリンの酸化により合成されるか、または酸化したメチルキノリンから得られる。メチル基は、従来公知の方法（Ｔａｋａｈａｓｈｉら、Ｃｈｅｍ&Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，１８：１１７６（１９７０）；Ｓａｓｓｏｎら、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，７：２１７７（２００５））と同様の方法によりニトリルに変換される。ニトリルは、システイン（カルボン酸がエステル化されている、あるいはされていないＤ体、Ｌ体、ＤＬ体）と縮合される。

【０６３９】

本発明は、以下に示す権利範囲の制限されるものではない実施例により説明されるであろう。

【０６４０】

〔実施例〕

〔実施例１：ルシフェリン誘導体を用いたグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ活性またはグルタチオンの測定〕

Ａ．　ｐＨ６．６でのアッセイ

ＧＳＴの基質として、ルシフェリン誘導体（ＧＳＴ＃３）を調製した。該ルシフェリン誘導体を、２段階の構成で試験した。まず、第１段階目では、該ルシフェリン誘導体を、グルタチオンの存在下もしくは非存在下で、３種のＧＳＴのうちの１種のＧＳＴと混合させた。反応開始後、様々な時間に、一部を取り出して、ルシフェラーゼ反応混合液と混合した。時間がたって発光が増加する反応物は、該反応においてＧＳＴ＃３がＧＳＴの基質であることを示している。

【０６４１】

＜材料および方法＞

ウマＧＳＴ溶液は、２５ｍｇのウマＧＳＴ（Ｐａｒｔ　Ｇ　６５１１，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，　Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ）を5ｍｌの１０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ緩衝液（ｐＨ６．６）に溶解させて作製した。ブタＧＳＴ溶液は、１０ｍｇのブタＧＳＴ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｇ　６６３６）を２ｍｌの１０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ緩衝液（ｐＨ６．６）に溶解させて作製した。日本住血吸虫（Ｓ．　ｊａｐｏｎｉｃａ）ＧＳＴ溶液は、3ｍｇの日本住血吸虫ＧＳＴ（Ｐａｒｔ　Ｇ５６６３，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）が入った1つのバイアルビンを、５００μｌの１０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ緩衝液（ｐＨ６．６）に溶解させて作製した。（還元型）グルタチオン（Ｐａｒｔ　Ｇ　４２５１，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）は、水に溶解して、１００ｍＭの溶液とした。ＧＳＴ＃３は、アセトニトリルに溶解して、１２ｍＭの溶液とした。

【０６４２】

ルシフェリン検出試薬（Ｖ８５９Ｂ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍａｄｉｓｏｎ，　ＷＩ）１ビンを、Ｐ４５０－Ｇｌｏ緩衝液（Ｖ８６５Ｂ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）１ビンで溶解し、解凍して、室温に戻した。こうして得られた溶液１０ｍｌを8ｍｌの水と混合して、ルシフェリン検出溶液を調製した。

【０６４３】

反応物（表１）は、まず、各０．５ｍｌマイクロチューブに水および１Ｍ　ＢｉｓＴｒｉｓ溶液を加え、その後、ＧＳＴ＃３溶液を除く残りの成分を加えることにより調製した。最後に、該反応物に、ＧＳＴ＃３（図１２）溶液を添加して混合し、添加した時間を記録した。ＧＳＴ＃３を添加、混合してから、０．１分後、５分後、１０分後、１５分後に、１０μｌの試料を取って、９０μｌの上記ルシフェリン検出溶液と混合した。そして、該溶液からの発光を、直ちに、Ｔｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０／２０ルミノメーター（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）を用いて測定した。

【０６４４】

【表１】

	反応物							
成分	1	2	3	4	5	6	7	8
GST基質	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl
1M BisTris pH6.6	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl
100mM(還元型)グルタチオン		2μl		2μl		2μl		2μl
再溶解された日本住血吸虫GST			5μl	5μl				
再溶解されたブタGST					5μl	5μl		
再溶解されたウマGST							5μl	5μl
水	90μl	88μl	85μl	83μl	85μl	83μl	85μl	83μl

【０６４５】

＜結果＞

グルタチオンの存在下および非存在下で、ルシフェリン誘導体と、３種の由来のうちの１種由来のグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）とを反応させた。これらの反応物から試料を採取して、ルシフェラーゼ反応混合液に添加した。ルシフェリン検出試薬を含む反応物の混合物からの発光をＴｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０／２０ルミノメーターを用いて測定した。該反応によって測定された光の値を表２に示す。

【０６４６】

【表２】

時間(分)	1	2	3	4	5	6	7	8
0.1	33.26	35.72	32.67	32.57	46.95	71.1	30.42	252.2
5	38.2	36.07	32.42	40.79	51.85	269.1	32.98	3662
10	32.17	40.85	38.65	48.64	51.15	463.2	38.75	7629
15	35.53	46.43	33.82	61.54	48.41	619.3	38.39	9324

【０６４７】

ＧＳＴ存在下であっても、グルタチオンを添加していない反応物（反応物１、２、３、５、および７）からの発光の値は、時間がたっても、大きくは増加しなかった。しかし、ＧＳＴ＃３に加えて、グルタチオンおよびＧＳＴの両方を含む反応物で測定された光の値は、時間がたつと、大きく増加した。この結果は、グルタチオンと共同してＧＳＴが機能することにより、開始溶液に関連したルシフェラーゼ反応に由来する発光を増加させる物質が生成されることを示している。

【０６４８】

Ｂ．　弱塩基性のｐＨでのアッセイ

たとえ酵素がｐＨ６．５付近のｐＨで最大活性を示さなくとも、ＧＳＴアッセイは、一般的に、ｐＨ６．５付近のｐＨで行われる。そのような最適ではないｐＨを選択すると、グルタチオン自体が迅速かつ非酵素的に基質に対して作用して、ＧＳＴ反応の速度を測定するために行うコントロール反応のバックグラウンドを非常に高くするため、グルタチオンが迅速かつ非酵素的に基質と作用することを防止する必要が生じる。ＧＳＴの基質であるルシフェリン誘導体が、より低いｐＨにおける反応に有効であるかを調べるために、実施例１（Ａ）のルシフェリン誘導体、上記ＧＳＴのうちの１つ、および試薬（グルタチオン）を、ｐＨ６．５～８．５の範囲で試験した。

【０６４９】

＜材料および方法＞

ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）、ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．０、ｐＨ７．５、ｐＨ８．０）、およびＴｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．５）の緩衝液ストック溶液（１Ｍ）をＳｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎから取得した固体試薬を溶解させ、ｐＨを適切

に調整することにより調製した。これらの新しい緩衝液ストックを、実施例１（Ａ）のストック試薬として用い、表３に示す溶液を調製した。

【０６５０】

【表３】

反応物	緩衝液	GST#3	水	100mMグルタチオン
1	1M BisTris pH6.5を5μl	2μl	93μl	0
2	1M BisTris pH6.5を5μl	2μl	88μl	5μl
3	1M HEPES pH7.0を5μl	2μl	93μl	0
4	1M HEPES pH7.0を5μl	2μl	88μl	5μl
5	1M HEPES pH7.5を5μl	2μl	93μl	0
6	1M HEPES pH7.5を5μl	2μl	88μl	5μl
7	1M HEPES pH8.0を5μl	2μl	93μl	0
8	1M HEPES pH8.0を5μl	2μl	88μl	5μl
9	1M Tricine pH8.5を5μl	2μl	93μl	0
10	1M Tricine pH8.5を5μl	2μl	88μl	5μl

【０６５１】

ＧＳＴ＃３は、最後に添加した。ＧＳＴ＃３を添加後、直ちに該溶液を混合した。混合した直後、並びに２０分後および４０分後に１０μｌの試料を取り出し、該試料に９０μｌのルシフェリン検出溶液を加えて、実施例１（Ａ）で説明したように反応させた。混合後、該溶液からの発光をＴｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０／２０ルミノメーターを用いて測定した。

【０６５２】

＜結果＞

反応は、様々なｐＨで行った。ＧＳＴ＃３の変換速度は、グルタチオン存在下および非存在下で測定した。その後、グルタチオン含有および非含有の日本住血吸虫ＧＳＴを含む反応物を作製した。光の値を記録した（表４を参照）。

【０６５３】

【表４】

	光出力		
反応物	混合時	混合後20分	混合後40分
1	1.01	0.976	1.099
2	1.13	1.287	1.761
3	1.198	1.368	1.202
4	1.156	1.178	2.2
5	1.19	1.214	1.194
6	1.171	2.788	5.173
7	1.167	1.172	1.236
8	1.198	6.662	13.38
9	1.182	1.199	1.246
10	1.342	25.24	47.01

【０６５４】

グルタチオンを含む反応物（反応物２、４、６、８、および１０））からの光シグナルは、時間がたつと、増加した。一方、グルタチオンを含まない反応物からの光シグナルは

、大きく変化しなかった。実際には、シグナルの増加速度は、上記溶液のｐＨがｐＨ６．５から８．５に変化するにつれて、より大きくなった。光の値の上昇は、溶液中におけるグルタチオンを測定する方法として用いることができる。特に、高いｐＨで、上記溶液を適切なルシフェリン誘導体と反応させるのであれば、該光の値の上昇は、溶液中におけるグルタチオンを測定する方法として用いることができる。実施例１に示すように、この特定のＧＳＴは、比較的高い濃度で用いると、あまり強い光シグナルを生成しなかった。しかし、ｐＨを上昇させてＧＳＴ反応を行うことにより、この酵素は、より少ない酵素量で、より強いシグナルを生じることがわかった。

【０６５５】

酵素を用いて観察される正味のシグナルが、該酵素によって生成されるシグナルに対してとても小さくなるかどうかを調べるために、ＧＳＴを含む反応物から生成されるシグナルを、ＧＳＴの非存在下で測定されるシグナルと比較した。さらに、酵素を添加したときの正味の光増加が同じレベルに保たれている間、非酵素的に生成される光シグナルがより小さいかどうかを調べるために、１００ｍＭグルタチオン（ＧＳＨ）のストックを水で１０倍に希釈して、１０ｍＭ　ＧＳＨストックを調製し、この溶液を、様々な濃度で添加した。

【０６５６】

実施例１（Ａ）で用いた日本住血吸虫ＧＳＴのストックを、１０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）を用いて、１ｍｇ／ｍｌに希釈した。調製した溶液を、表５に示す。

【０６５７】

【表５】

Rx	GST#3	緩衝液	緩衝液量	酵素	GSH(10mM)	水
1	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	0	50μl	40μl
2	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	10μl	50μl	30μl
3	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	0	30μl	60μl
4	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	10μl	30μl	50μl
5	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	0	10μl	80μl
6	5μl	1M HEPES pH7.5	5μl	10μl	10μl	70μl
7	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	0	50μl	40μl
8	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	10μl	50μl	30μl
9	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	0	30μl	60μl
10	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	10μl	30μl	50μl
11	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	0	10μl	80μl
12	5μl	1M HEPES pH8.0	5μl	10μl	10μl	70μl
13	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	0	50μl	40μl
14	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	10μl	50μl	30μl
15	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	0	30μl	60μl
16	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	10μl	30μl	50μl
17	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	0	10μl	80μl
18	5μl	1M Tricine pH8.5	5μl	10μl	10μl	70μl

【０６５８】

ＧＳＴ＃３を添加して、混合することによって、反応を開始させた。混合してから４５分後に、１０μｌの試料を取り出して、９０μｌのルシフェリン検出試薬を添加した。そして、Ｔｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０／２０ルミノメーターを用いて光を測定した。この読取値を、表６に示す。

【０６５９】

【表６】

反応物	光読取値	反応物	光読取値	反応物	光読取値
1	26.3	7	65.98	13	295.2
2	61.58	8	152.3	14	532.4
3	19.21	9	48.41	15	199.4
4	55.18	10	135.6	16	416.7
5	10.73	11	22.52	17	97.89
6	52.23	12	97.47	18	267.3

【０６６０】
表６のデータを、各ｐＨレベルおよびグルタチオン濃度で、酵素存在下および酵素非存在下でのシグナル変化を容易に計算できるように、再構成した（表７を参照）。
【０６６１】
【表７】

反応物のpH		反応物（酵素有）	反応物（酵素無）	正味の光（差分）
7.5	5mM GSH	26.3	61.58	35.28
	3mM GSH	19.21	55.18	35.97
	1mM GSH	10.73	52.23	41.5
8.0	5mM GSH	65.98	152.3	86.32
	3mM GSH	48.41	135.6	87.19
	1mM GSH	22.52	97.47	74.95
8.5	5mM GSH	295.2	532.4	237.2
	3mM GSH	199.4	416.7	217.3
	1mM GSH	97.89	267.3	169.41

【０６６２】
これらの結果から、ＧＳＴ＃３は、ＧＳＴを含まない反応での発光を測定することにより、グルタチオンを測定するために用いることができることが確証づけられた。さらに、上記結果は、ｐＨ７．５以上のｐＨ値で反応させることにより、正味の光シグナルがより増強されることを示している。最後に、これらの結果は、グルタチオン濃度を５ｍＭよりも低くすると、光シグナルが小さくなること、および、日本住血吸虫ＧＳＴによって生成される正味の光シグナルは、グルタチオン濃度が５ｍＭから３ｍＭに減少させたとき、大きく変化しないことを示している。
【０６６３】
（Ｃ）グルタチオンの検出および測定
実施例１（Ｂ）において、ルシフェリン誘導体は、添加する溶液にグルタチオンが含まれていると、より強い強度の光シグナルを生成する種に変換されることが示された。さらに、酵素を含まない反応における結果は、非酵素的な変換が起こりうることを示していた。ずっと低いグルタチオン濃度を検出するために、この変換を触媒するＧＳＴの能力は、ずっと低い濃度のグルタチオン存在下で用いられた。
【０６６４】
＜材料と方法＞
マスターミックスは、０．４ｍｇ／ｍｌのブロット等級ＢＳＡ（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ． Ｗ３８４１）、および２００μｇ／ｍｌのウマＧＳＴ（ウマＧＳＴ５ｍｇ／ｍｌ溶液を希釈；Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ． 酵素）を含む２００ｍＭ Ｈ

ＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）とした。基質（ＧＳＴ＃３）は、２００μＭのＧＳＴ＃３水溶液を調製した。ＤＴＴについては、固体のＤＴＴ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ，　Ｖ３１５１）を水に溶解させることにより、２０ｍＭ　ＤＴＴのストックを作製した。このストックは、水で希釈することにより４ｍＭ　ＤＴＴストックを作製するために用いられた。２－メルカプトエタノールについては、純粋な２－メルカプトエタノール（Ｍ６２５０，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．）を水で希釈することにより、２０ｍＭの２－メルカプトエタノール溶液を作製した。このストックは、水で希釈することにより、４ｍＭの２－メルカプトエタノールストックを作製するために用いられた。１００ｍＭの（還元型）グルタチオンストックを蒸留水で希釈することによって、４００μＭ、３２０μＭ、２４０μＭ、２００μＭ、１６０μＭ、８０μＭ、および２０μＭの溶液を調製した。

【０６６５】

細胞抽出試料として、水を用いて、ウサギ網状赤血球ライセート（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）を、溶液２５μｌに対してライセート２μｌの割合で希釈することにより、ウサギ網状赤血球ライセートを希釈した溶液を調製した。希釈したコムギ胚芽ライセートの溶液は、水を用いて、コムギ胚芽抽出物（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）を、溶液２５μｌに対して抽出物２μｌの割合で希釈することにより作製した。

【０６６６】

ルシフェリン検出試薬については、実施例１（Ａ）を参照されたい。

【０６６７】

反応は、室温で、マイクロタイタープレート内で行った。反応は、上記マスターミックス溶液を添加することにより開始させた。以下の物質は、マイクロタイタープレートのウェルに添加した。

【０６６８】

行１～３については、行１～３の列Ａ～Ｈの全てのウェルに、２５μｌの基質溶液および２５μｌの水を添加した。さらに、列Ａ～Ｇのそれぞれに、４００ｍＭ、３２０ｍＭ、２４０ｍＭ、２６０ｍＭ、８０ｍＭ、および２０ｍＭのグルタチオン溶液を２５μｌずつ添加した。行１～３の列Ｈには、２５μｌの水を添加した。

【０６６９】

行４～６については、行４～６の列Ａ、Ｃ、Ｅ、およびＧに２５μｌの基質溶液と、２５μｌの水を添加した。行４～６の列Ｂ、Ｄ、Ｆ、およびＨには２５μｌの基質と、２５μｌの２００μＭ　グルタチオンとを添加した。その後、行４～６の列ＡおよびＢに、２５μｌの４ｍＭ　ＤＴＴを添加した。行４～６の列ＣおよびＤに、２５μｌの２０ｍＭ　ＤＴＴを添加した。行４～６の列ＥおよびＦには、２５μｌの４ｍＭ　２－メルカプトエタノールを添加した。行４～６の列ＧおよびＨには、２５μｌの２０ｍＭ　２－メルカプトエタノールを添加した。

【０６７０】

行７～９については、２５μｌの水に代えて、２５μｌの希釈したコムギ胚芽抽出物を用いたことを除いて、行１～３と同じ構成とした。

【０６７１】

行１０～１３については、２５μｌの水に代えて、２５μｌの希釈したウサギ網状赤血球ライセートを用いたことを除いて、行１～３と同じ構成とした。

【０６７２】

これらの全ての溶液を調製した後、マルチチャネルピペッターを用いて、上記溶液に２５μｌのマスターミックスを添加し、３回のピペッティングにより、該溶液を混合することによって、反応を開始させた。混合後直ちに、該溶液の１０μｌを、マルチチャネルピペッターを用いて取り出し、マイクロタイタールミノメータープレート内の９０μｌのルシフェリン検出試薬に添加した。もともとのマイクロタイタープレートの全てのウェルからの試料を添加した後、該ルミノメータープレートを透明なプレートシーラーでシールした。そして、室温で１５分間放置した。その後、発光を、Ｖｅｒｉｔａｓルミノメーター

で測定した。

【０６７３】

上記もともとのマイクロタイタープレートからさらに、１０μｌの試料を取り出し、ルシフェリン検出試薬で希釈して、マスターミックスを添加してから、１４．８分後、３３．７分後、４４．７５分後、５９．６分後、および１４０分後に上記の方法で、発光を測定した。

【０６７４】

＜結果＞

ＧＳＴ添加、不添加、およびグルタチオン源添加、不添加のＧＳＴ＃３を含む反応物を調製した。反応開始後、様々な時間に、該反応物の一部を、ルシフェラーゼ反応混合液に添加した。３つの反応物からの光を読み取り、平均値を算出した。その結果を以下の表に示す。

【０６７５】

【表８】

添加したライセートまたは還元剤がない場合の反応物において測定された光シグナル

添加したグルタチオン濃度（μＭ）

時間(分)	0	5	10	20	40	60	80	100
0	1234	1592	2269	2821	5110	5248	8038	6604
14.8	2689	43107	73802	125110	218325	273665	324305	337276
33.7	4362	90387	154525	277975	444877	552806	693907	773268
44.75	5378	107668	195083	361281	567948	741797	888763	935822
58.6	6015	142988	264698	694628	702468	956594	992455	1197938
140	11744	280230	498136	830155	1268954	1796833	2129202	2480280

【０６７６】

表８のデータは、５μＭグルタチオンの溶液でさえ、全くグルタチオンが存在しないときよりも、ずっと高い光シグナルを生成できることを示している。また、少なくとも試験した範囲のグルタチオン濃度にわたって、該光シグナルは、時間がたつと、増加することを示している。

【０６７７】

【表９】

コムギ胚芽抽出物を含む反応物で測定された光シグナル

添加したグルタチオン濃度（μＭ）

時間(分)	0	5	10	20	40	60	80	100
0	1851	1964	2390	2512	4371	3611	5335	4235
14.8	49004	71860	90718	115137	136851	182746	203690	218906
33.7	99432	152066	189073	279159	330741	435730	504985	519121
44.75	138755	195962	237008	333459	480389	540647	627461	558359
58.6	179435	244615	289289	618643	569417	586894	715805	835949
140	362693	465865	511594	816161	1053306	1316857	1265144	1809120

【０６７８】

グルタチオン不添加のコムギ胚芽抽出物を含む反応物において測定された光の値（表９）は、添加されたグルタチオンまたはコムギ胚芽抽出物を含まない反応物でみられたよりも、ずっと迅速に増加した（上記表の０μＭグルタチオン添加の行との比較）。しかし、該コムギ胚芽抽出物の存在により、約３０μＭよりも高いグルタチオンを加えた反応物に

おける正味の光シグナルは低下した（表１０を参照）。

【０６７９】

【表１０】

コムギ胚芽抽出物の存在下および非存在下での反応における正味の光シグナル

添加したグルタチオン濃度（μＭ）

時間(分)	0	5	10	20	40	60	80	100
0	617	372	120	-309	-739	-1637	-2703	-2369
14.8	46316	28753	16916	-9973	-81473	-90918	-120614	-118371
33.7	95071	61679	34548	1185	-114136	-117076	-188922	-254147
44.75	133377	88294	41926	-27822	-87559	-201150	-261302	-377463
58.6	173420	101627	24591	-75985	-133051	-369700	-276650	-361989
140	350949	185634	13458	-13994	-215648	-479975	-864057	-671160

【０６８０】

このように、コムギ胚芽抽出物は、おそらく、かなりの量のグルタチオンを含むと考えられる。また、該コムギ胚芽抽出物は、高濃度のグルタチオンのときに生じるシグナルレベルを減少させる阻害物質を含むと考えられる。しかし、かなりの濃度の分析物と、さらに、阻害物質とを含む試料における初発化合物の濃度を評価するために用いられる１つの技術は、分析物を添加したときに、シグナルが、相関して直線的に増加するか否かを調べ、その後、試料分析物を添加していない試料において生じるシグナルを２倍するために添加することが必要な分析物の量を測定することである。この場合、該シグナルは、該試料に添加した分析物の量に相関して直線的に増加する。したがって、希釈された抽出物のグルタチオンの値を評価して、試料中のグルタチオン濃度を１０μＭ～２０μＭの間にすることができる。この増加は、初期の抽出物２μｌから見られたので、実際の試料中の評価されたグルタチオン濃度は、５００μＭ～１ｍＭである。

【０６８１】

ウサギ網状赤血球を含むが、添加されたグルタチオンを含まない反応物における光の読取値は、添加されたグルタチオンまたはライセートを添加しない反応物の場合よりもずっと迅速に増加した（表８における読取値の時間経過のグルタチオン不添加の行と、表１１におけるグルタチオン不添加の行との比較）。

【０６８２】

【表１１】

ウサギ網状赤血球ライセートを含む反応物において測定された光シグナル

添加したグルタチオン濃度（μＭ）

時間(分)	0	5	10	20	40	60	80	100
0	2084	1816	1890	2168	2876	2754	3937	2822
14.8	83403	87258	90540	104181	130163	144804	152024	164924
33.7	171939	176106	188794	229026	269989	312938	348543	378781
44.75	229277	232897	237699	290097	345094	386012	448978	453140
58.6	292086	306830	308048	445066	442405	504909	553766	587558
140	572193	572518	610619	705215	819448	981057	1097061	1184652

【０６８３】

しかし、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた場合、該ライセートに加えたとき、正味のシグナルの増加はずっと小さかった。また、１００μＭのグルタチオンを加えるまで、該シグナルは２倍にはならなかった（表１１）。該反応物にグルタチオンを加えることにより生成されるシグナルの増加は、この場合も、添加するグルタチオンに対して、ほぼ直線であった。したがって、この場合も、評価対象である試料からのグルタチオン濃度を表

していた。しかし、この場合、ライセート自体を希釈することにより生じるグルタチオンの最終的な評価濃度は１００μｍであった。この増加は、初期の抽出物の試料２μｌから見られたので、もともとのライセートにおけるグルタチオンの推定濃度は、約２．５～５ｍＭである。

【０６８４】

添加されたグルタチオンの存在下または非存在下で、ＤＴＴまたは２－メルカプトエタノールを用いて実施された反応の平均化された結果を表１２に示す。

【０６８５】

【表１２】

添加したＤＴＴまたは２－メルカプトエタノール（ME）を含む反応物における平均シグナル

時間（分）

還元剤	50μmグルタチオン	0	14.8	33.7	44.75	58.6	140
無	無	1234	2689	4362	5378	6015	11744
1mM DTT	−	1672	61526	145772	153924	220284	565135
1mM DTT	+	7220	305825	731311	857849	1069468	1944007
5mM DTT	−	2332	67536	155069	197547	241226	526501
5mM DTT	+	7408	266152	636054	791397	960823	1648897
1mM 2-ME	−	1123	24736	62528	90732	S.L.*	260865
1mM 2-ME	+	5209	259259	542606	626141	S.L.	1763802
5mM 2-ME	−	1442	34787	88417	118636	160571	339791
5mM 2-ME	+	5708	252675	606326	850061	1060698	2073466
無	+**	5179	245995	498842	654873	829531	1532893

*サンプル紛失、

**表１１に示された４０μＭおよび６０μＭグルタチオンの反応物の結果からの推定

【０６８６】

還元剤を含むが、添加されたグルタチオンを含まない反応物は、これらの還元剤を含まないときに見られた光シグナルと同等であった。しかし、これらの結果から、正味のシグナルを算出したところ、これらの還元剤の存在下での正味のシグナルは、該還元剤が存在しない場合に見られた正味のシグナルに、とても近かった（表１３）。

【０６８７】

上記反応スキームは、試料中におけるその他の還元剤の有無に対して比較的非感受的であった。そして、それは、少なくとも２つの複合体細胞体ライセート、コムギ胚芽抽出物およびウサギ網状赤血球ライセートにおいて用いることができる。

【０６８８】

【表１３】

還元剤の存在下および非存在下での反応における正味のシグナル

時間（分）

還元剤	0	14.8	33.7	44.75	58.6	140
無	3945	243306	494480	649495	823516	1521149
1mM DTT	5548	244299	585540	703926	849184	1378872
5mM DTT	5077	198616	480985	593850	719597	1122396
1mM 2-ME	4086	234523	480078	535409	N.A.	1502937
5mM 2-ME	4266	217888	517909	731426	900127	1733675

【０６８９】

（Ｄ）グルタチオンおよびＧＳＴの測定のためのルシフェリンエステルの使用

異なるＧＳＴが特定のルシフェリン誘導体に対して選択性を有するか否かを調べるために、様々なＧＳＴ（または、コントロールとしてグルタチオンのみ）およびアセチルルシフェリンを用いて、生物発光アッセイを行った。

【０６９０】

＜材料および方法＞

酵素およびグルタチオンストック溶液は、実施例１（Ａ）に記載したとおりである。アセチルルシフェリンは、９ｍＭとなるように、アセトニトリルに溶解させた。

【０６９１】

Ｐ４５０　Ｇｌｏ試薬は、ルシフェリン検出試薬（Ｖ８５９Ｂ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ）１ビンを、Ｐ４５０－Ｇｌｏバッファー（Ｖ８６５Ｂ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ）１ビンに溶解させることにより調製した。

【０６９２】

１００μｌに希釈したときに、以下の物質を含むように設計した９０μｌの反応溶液を３６個作製した。反応物１～３は、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）と２０μＭアセチルルシフェリンとが含まれるように設計した。反応物４～１８は、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）と２０μＭアセチルルシフェリンと２ｍＭグルタチオンとが含まれるように設計した。反応物１９～２１は、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）と２μＭアセチルルシフェリンとが含まれるように設計した。反応物２２～３６は、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）と２μＭアセチルルシフェリンと２ｍＭグルタチオンとが含まれるように設計した。これらの反応溶液を調製後、酵素ストック溶液で、１：１０に希釈して、ＨＥＰＥＳ濃度を１０ｍＭとした。そして、該反応物に、以下の物質を添加した。

【０６９３】

ＧＳＴ　Ａ１－１（Ｓｉｇｍａ）は、腎臓、腸、肺、および肝臓を含む数個の生体組織で見出された酵素である。ＧＳＴ　Ｍ１－１（Ｓｉｇｍａ）は、ヒト肝臓から精製されたＧＳＴ　ｐｓｉに対応するタイプｂの対立遺伝子バリアントである。

【０６９４】

反応物	反応タイプ	添加物質
１～３および１９～２１	緩衝液コントロール	１０μｌ水
４～６および２２～２４	グルタチオンのみ	１０μｌ水
７～９および２５～２７	日本住血吸虫ＧＳＴ	１０μｌ　１：１０　日本住血吸虫ＧＳＴ
１０～１２および２８～３０	ウマＧＳＴ	１０μｌ　１：１０　ウマＧＳＴ
１３～１５および３１～３３	ＧＳＴ　Ａ１－１	１０μｌ　１：１０　ＧＳＴ　Ａ１－１
１６～１８および３４～３６	ＧＳＴ　Ｍ１－１	１０μｌ　１：１０　ＧＳＴ　Ｍ１－１

【０６９５】

反応を、室温で３０分間続けた。その後、それぞれの反応物にＰ４５０　Ｇｌｏ試薬１００μｌを添加して、その後の溶液からの発光をＶｅｒｉｔａｓルミノメーターで測定した。記録された読取値を表１４に示す。

【０６９６】

【表１４】

	生データ		グルタチオンシグナル		正味の酵素シグナル	
反応物	20mM AL*	2mM AL			正味20mM	正味2mM
緩衝液のみ	183,852	20,649				
グルタチオンのみ	330,916	35,206	147,064	14,557		
日本住血吸虫GST	1,233,199	126,288			902,203	91,082
ウマGST	361,356	39,036			30,440	3,830
GST A1-1	365,770	42,725			34,854	7,519
GST M1-1	419,400	42,867			88,484	7,661

*アセチルルシフェリン

【０６９７】
＜結果＞
上記結果は、実質的な非酵素的シグナルは、アセチルルシフェリンとグルタチオンとの反応により生じうることを示している。したがって、そのような反応は、試料中のグルタチオンの存在を検出および測定するために用いることができる。
【０６９８】
さらに、上記結果は、その他のＧＳＴ酵素に関連してアセチルルシフェリンと日本住血吸虫ＧＳＴとによって、ずっと強い正味のシグナルが生成されることを示していた。これは、ＧＳＴ＃３を用いて得られた結果と対照的である。該結果では、日本住血吸虫ＧＳＴは、その他の酵素で見られるのとほとんど同じ強度の正味のシグナルしか生成しなかった（表１）。したがって、ルシフェリンに結合させる化学基の修飾により、様々なＧＳＴ酵素の生成物である基質の相対的な選択性を変化させることができる。
【０６９９】
本実施例では、ルシフェリンのエステル（アセチルルシフェリン）を様々なＧＳＴ酵素に利用させることを行ったが、ヒトＧＳＴ酵素に対するよりも、日本住血吸虫由来の酵素に対するほうがより反応性が高かった。また、ＧＳＴ＃３を用いた場合に見られる選択性は逆であった。また、アセチルルシフェリンは、２ｍＭグルタチオンを含む溶液中で反応させることができることが示された。
【０７００】
＜要旨＞
実施例１（Ａ）で用いられた方法と同様の方法で、他のルシフェリン誘導体が、ＧＳＴに対して様々な選択性を有する基質であることが示された（表１２を参照）。したがって、様々な方法で修飾されたルシフェリンは、光シグナルの増加によって実証されたように、ＧＳＴによって、グルタチオンの存在下で、ルシフェラーゼがより効果的に利用可能な形に変換されうる。
【０７０１】
さらに、この作用物質がルシフェリン誘導体に対して直接作用することによって、高濃度のグルタチオン濃度を測定することができる。もしくは、ＧＳＴによって触媒される反応によって、もっと低濃度のグルタチオン濃度を測定することができる。さらに、ＧＳＴ酵素は、ルシフェリン誘導体に対して異なる選択性を示す。この選択性は、該ルシフェリン誘導体に存在する特定の修飾に依存する。
【０７０２】
特に、ＧＳＴ＃３およびＧＳＴを有することが予測される試料は、ｐＨ６．５～８．０でアッセイされる。ＧＳＴ＃３のエステルは、発光反応において、ＧＳＴ　Ａ１－１の基質としてよりも、ＧＳＴ　Ｍ１－１の基質として優れていた。一方、ＧＳＴ＃３は、発光反応において、ＧＳＴ　Ｍ１－１の基質およびＧＳＴ　Ａ１－１の基質としてよりも、ウマＧＳＴの基質として優れていた。

【０７０３】
いくつかの誘導体では、該誘導体の溶解性を高めるために、反応混合液に界面活性剤を添加してもよい。例えば、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４のような界面活性剤を、例えば、約０．０１～２０％の範囲（約０．１％～約０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４を含む）で、ＧＳＴ－２２を含む反応混合液に添加した。
【０７０４】
〔実施例２〕
（Ａ）ウマアルコールデヒドロゲナーゼの検出
ルシフェリン誘導体であるルシフェロールを、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）の基質として用いた。該ルシフェリン誘導体を、２段階の構成で試験した。まず、第１段階目では、上記ルシフェリン誘導体を、４つのＡＤＨのうちの１つを含む混合液に添加した。反応を開始させた後、様々な時間に、反応物の一部を取り出し、ルシフェラーゼ反応混合液と混合させた。時間の経過により発光が増加する反応は、ルシフェロールが該反応において、ＡＤＨの基質であることを示している。
【０７０５】
＜材料および方法＞
５００ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）の溶液は、固体を溶解し、ｐＨをｐＨ６．５に調整することにより作製した。その後、５０ｍＭの溶液は、このストックを水で希釈することにより作製した。
【０７０６】
Ａｌ　ＤＨ溶液は、２５ユニットのアルデヒドデヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ，　Ａ－６３３８）を、１ｍｌの５０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）に溶解させることにより作製した。
【０７０７】
Ｅｑ　ＡＤＨ溶液は、２０ユニットのウマアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．　Ｃｏ．，　Ａ９５８９）を、１ｍｌの５０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）に溶解させることにより作製した。
【０７０８】
Ｙ　ＡＤＨ溶液は、７５００ユニットの酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ　Ｃｏ．　Ａ　７０１１）を、１ｍｌの５０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）に溶解させることにより作製した。
【０７０９】
ＮＡＤ$^{+}$溶液は、６６ｍｇのＮＡＤ$^{+}$（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．　Ｃｏ．　Ｎ　１５１１－２５０）を、２ｍｌの５０ｍＭ　ＢｉｓＴｒｉｓ（ｐＨ６．５）および８ｍｌの水に溶解させることにより作製した。
【０７１０】
ルシフェロール溶液は、約４ｍｇのルシフェロールを、１ｍｌのジメチルホルムアミド（Ａｌｄｒｉｃｈ　２７，０５４－７）に溶解させることにより作製した。
【０７１１】
ルシフェラーゼ検出溶液については、Ｐ４５０　Ｇｌｏ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．　Ｖ８６５Ｂ）１ビンで、ルシフェリン検出試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．　Ｖ８５９Ｂ）１個を溶解し、その後、該溶液１０ｍｌを、８ｍｌの水で希釈して、本実施例で用いる検出溶液を作製した。
【０７１２】
表１５に示される反応溶液を調製した。
【０７１３】

【表１５】

反応物	500mM BisTris, pH6.5	NAD^+溶液	水	Eq ADH	Y ADH	Al DH
Rx1	20μl	20μl	155μl	0μl	0μl	0μl
Rx2	20μl	20μl	145μl	5μl	0μl	5μl
Rx3	20μl	20μl	145μl	0μl	5μl	5μl
Rx4	20μl	20μl	150μl	5μl	0μl	0μl
Rx5	20μl	20μl	150μl	0μl	5μl	0μl
Rx6	20μl	20μl	150μl	0μl	0μl	5μl

【０７１４】
ルシフェロールのＤＭＦ溶液の試料５μｌを、上記反応物のそれぞれに添加した。そして、第１のルシフェロール／ＤＭＦ溶液を反応物１に添加したときに、タイマーをスタートさせた。ＡＵ反応は、室温で保った。
【０７１５】
それぞれの反応が、ルシフェロールの添加後１０分に達したときに、それぞれの反応物から取り出した試料１０μｌを、ルミノメーターチューブに入った９０μｌのルシフェリン検出溶液に添加した。室温で５分間インキュベートした後、これらの試料からの発光を、Ｔｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０ルミノメーターを用いて測定した。さらに、試料を採取して、ルシフェリン検出試薬と混合し、ルシフェロールを添加後２０分および４０分に達したときに、上記の測定を行った。
【０７１６】
【表１６】

時間	Rx1	Rx2	Rx3	Rx4	Rx5	Rx6
10分	8.452	9.857	7.481	11.40	7.396	7.640
20分	10.04	13.91	8.292	15.26	8.670	7.640
40分	8.406	16.80	8.465	19.16	8.194	8.475

【０７１７】
＜結果＞
酵素不添加の反応物（反応物１）の試料からの発光の値を、ウマＡＤＨおよびＡｌ　ＤＨを含む反応物（反応物２）またはウマＡＤＨのみを含む反応物（反応物４）の試料からの発光の値と比較したところ、ウマアルコールデヒドロゲナーゼおよびNAD^+の溶液は、ルシフェロールを、より効果的に光の発光に用いられる形に変換できることが実証された（表１６）。しかし、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（NAD^+を含む）だけの溶液（反応物５）、Ａｌ　ＤＨを含む酵母アルコールデヒドロゲナーゼの溶液（反応物３）、またはＡｌ　ＤＨだけの溶液（反応物６）からの試料では、酵素を添加していない反応物（反応物１）で見られた発光を有意に上回る発光は見られなかった。
【０７１８】
上記結果は、以下の点で、多少驚かされるものである。
１）アルコールデヒドロゲナーゼは、通常、アルデヒドを生成物として生成し、そのような生成物は、ルシフェラーゼにとって有効な基質になるとは考えられない。
２）酵母由来の第２アルコールデヒドロゲナーゼは、ルシフェロールを十分に変換できず、アルデヒドを該アルデヒドに応じた酸に変換することが可能な酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼの存在下でさえ、効果的に測定することができなかった。
【０７１９】
（Ｂ）アルコールデヒドロゲナーゼによるルシフェロールの変換

酵素濃度または温度が、様々なＡＤＨとルシフェリン誘導体との反応のキネティクスを変化させるかどうかを調べるために、実施例２（Ａ）と同様の反応を実施した。そして、より長い時間にわたって、発光を測定した。

【０７２０】

＜材料と方法＞

緩衝液は、KPO_4緩衝液とし、水にKH_2PO_4を溶解させ、ＫＯＨでｐＨを調整することにより、５００ｍＭのKPO_4の溶液（ｐＨ７．４）を作製した。

【０７２１】

NAD^+については、６６ｍｇの固体のNAD^+（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．　Ｃｏ．Ｎ１５１１－２５０）を１０ｍｌの５０ｍＭ　KPO_4（ｐＨ７．４）に溶解させた。

【０７２２】

ウマＡＤＨ、酵母ＡＤＨ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ、並びにルシフェロールの溶液は、実施例５に記載したものを用いた。

【０７２３】

ルシフェリン検出試薬については、Ｐ４５０　Ｇｌｏ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．　Ｖ８６５Ｂ）１ビンで、ルシフェリン検出試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．　Ｖ８５９Ｂ）１個を溶解し、これにより得られた溶液５ｍｌを、３ｍｌの水で希釈し、本実施例で用いた検出溶液を調製した。

【０７２４】

上記作製した反応物を表１７にまとめている。

【０７２５】

【表１７】

反応物	NAD^+溶液	KPO_4緩衝液	水	酵素
Rx1および11	20μl	18μl	157μl	無
Rx2および12	20μl	18μl	147μl	10μlウマADH
Rx3および13	20μl	18μl	137μl	20μlウマADH
Rx4および14	20μl	18μl	127μl	30μlウマADH
Rx5および15	20μl	18μl	117μl	40μlウマADH
Rx6	20μl	18μl	112μl	40μlウマADH
Rx7	20μl	18μl	152μl	5μl酵母ADH
Rx8	20μl	18μl	147μl	10μl酵母ADH
Rx9	20μl	18μl	137μl	20μl酵母ADH
Rx10	20μl	18μl	132μl	20μl酵母ADH

【０７２６】

上記変換を開始するために、５μｌのルシフェロール溶液を、反応物１～５、反応物６～９、および反応物１１～１５に添加した。そして、反応物５および１０には、１０μｌのルシフェロール溶液を添加した。ルシフェロール添加後、チューブを混合した。反応物１にルシフェロールを添加した直後に、タイマーをスタートさせた。そして、残りのチューブには、ルシフェロールを添加した時間を記入した。混合後、反応物１１～１５は、３７℃に置いた。

【０７２７】

それぞれのチューブがルシフェロールを添加後３０分に達したとき、該反応物から５μｌの試料を取り出し、９５μｌのルシフェリン検出試薬に添加して、チューブを混合した。室温で１０分間インキュベートした後、これらの試料による発光をＴｕｒｎｅｒ　ＴＤ２０ルミノメーターを用いて測定した（表１８）。ルシフェロールを添加後６０分、９５分、１９０分、および２８０分のときにも、試料を採取し、ルシフェリン検出試薬と混合して、測定した（表１８）。

【０７２８】
【表１８】

反応物	30分	60分	95分	190分	280分
Rx1	6.077	6.091	5.849	4.364	7.694
Rx2	13.86	21.41	29.38	50.88	74.52
Rx3	28.21	49.00	69.94	123.5	166.5
Rx4	35.79	62.64	94.04	163.9	245.9
Rx5	42.30	80.23	120.5	199.8	297.6
Rx6	44.49	83.19	123.8	210.2	298.1
Rx7	6.184	6.052	5.980	6.640	7.988
Rx8	6.126	5.468	5.552	6.198	6.903
Rx9	5.406	5.608	6.301	5.825	6.734
Rx10	9.672	9.531	10.00	10.36	11.71
Rx11	5.814	6.078	6.302	6.889	8.399
Rx12	71.30	119.4	151.5	224.0	286.5
Rx13	127.0	213.3	293.1	461.0	619.7
Rx14	161.7	292.1	433.1	682.2	844.5
Rx15	192.7	365.4	525.7	842.8	1138

【０７２９】
＜結果＞
ウマアルコールデヒドロゲナーゼおよびＮＡＤ$^{+}$の溶液は、ルシフェロールを、ルシフェラーゼによる発光により効果的に用いられる形に変換した。生成された光シグナルの強度は、変換反応に用いられる時間の長さに依存していた（３０分、６０分、９５分、１９０分、および２８０分での反応物５からの光シグナルと、ウマＡＤＨの添加量との比較、および時間経過後の反応物１～５のシグナルの比較より）。さらに、３７℃および室温でインキュベートして反応を行ったとき、シグナルの増加速度は、ずっと速かった（反応物５および反応物１５のようなペアの反応の比較より）。最終的に、ウマＡＤＨを含む反応物におけるルシフェロール濃度を２倍にすると、シグナル強度はそれほど増加しなかった（反応物５と反応物６との比較）。また、酵母アルコールデヒドロゲナーゼでは、大きな光シグナルの変化は見られなかった。このように、アルコールデヒドロゲナーゼによるルシフェロールの変換速度は、反応溶液中に存在する酵素の量および反応温度に依存することが示された。
【０７３０】
（Ｃ）ウマアルコールデヒドロゲナーゼによるルシフェロールの変換に対する阻害物質の効果
本明細書に記載したように、ルシフェリン誘導体を用いた生物発光反応は、非ルシフェラーゼ媒介反応またはルシフェラーゼ媒介反応を調節する試薬を検出するために用いることができる。ウマＡＤＨの公知の阻害物質を、ルシフェリン誘導体であるルシフェロールを用いた生物発光反応において試験した。
【０７３１】
＜材料と方法＞
ウマアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．，　Ａ９５８９）の溶液は、１５ｍｇのウマアルコールデヒドロゲナーゼを７５０μｌの水に溶解して作製した。
【０７３２】
ピラゾール溶液は、３．４ｍｇのプラゾール（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．　Ｐ　５６６０－５）を５０ｍｌの水に溶解して作製した。

【０７３３】
トリクロロエタノール溶液は、０．４８ｍｌの２，２，２－トリクロロエタノール（Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｔ５４８０－５）を水に溶解して作製した。残りの溶液は、実施例５および６に記載したものを用いた。
【０７３４】
反応物は、それぞれ２つずつ作製した（表１９を参照）。
【０７３５】
【表１９】

反応物	NAD+	KPO_4緩衝液	水	ウマADH	その他
コントロール	10μl	9μl	59.5μl	20μl	無
+ピラゾール	10μl	9μl	49.5μl	20μl	10μlピラゾール
+トリクロロエタノール	10μl	9μl	49.5μl	20μl	10μlトリクロロエタノール

【０７３６】
＜結果＞
反応は、１．５μｌのルシフェロール溶液を添加することにより開始した。該ルシフェロール溶液を添加したときに、反応物を混合し、３７℃に置いた。３０分後、それぞれの反応物から５μｌの試料を取り出し、９５μｌのルシフェリン検出試薬と混合した。該溶液を１０分間、室温に放置した後、これらの溶液による発光をＴｕｒｎｅｒ　ＴＤ　２０ルミノメーターを用いて測定した。その後の光の読取値を記録した（表２０）。
【０７３７】
【表２０】

反応物	相対発光ユニット
コントロール＃１	1023
コントロール＃２	1087
＋ピラゾール＃１	516.4
＋ピラゾール＃２	490.7
＋トリクロロエタノール＃１	524.8
＋トリクロロエタノール＃２	342.1

【０７３８】
このように、ウマアルコールデヒドロゲナーゼおよびＮＡＤ$^+$の溶液によるルシフェロールの変換は、ウマアルコールデヒドロゲナーゼの公知の阻害物質によって遅くなった。この変換速度の減少は、この酵素に影響する作用物質を同定するために用いることができる。
【０７３９】
〔実施例３：本発明の誘導体を用いたＭＡＯアッセイおよびＦＭＯアッセイ〕
Ａ．　ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体
モノアミンオキシダーゼの基質として、一連のルシフェリン誘導体を調製した。これらの基質を、異なるタイプのＭＡＯ（ＭＡＯ　ＡおよびＭＡＯ　Ｂ）を用いた２段階のアッセイで試験した。テスト化合物がＭＡＯ媒介反応を阻害するか否かを調べるために、該化合物を用いて、追加のアッセイを行った。また、本明細書で後述するように、蛍光を発するＭＡＯの基質を調製し、１段階のアッセイで試験した。生物発光性および蛍光性ＭＡＯ基質は、モノアミンオキシダーゼ（ＭＡＯ）Ａおよび／またはＢによって酸化され、例えば、イミニウムおよび／またはアルデヒド中間体を生成する。該イミニウムおよび／またはアルデヒド中間体は、副次的にβ－脱離を起こして、７－ヒドロキシルシフェリンもしくはその誘導体、または、アンベィフェロン、フルオレセイン、およびそれらの誘導体を含む蛍光物質の水酸化物を遊離させる。イミニウムおよび／またはアルデヒド中間体のような生成物は、生物発光または蛍光発光により出力される光によって測定される。なお、

この生物発光において、ＭＡＯとルシフェリン誘導体との反応生成物は、ルシフェラーゼによって酸化される。生物発光性および／または蛍光性モノアミンオキシダーゼの基質、並びにそれらの類縁化合物は、モノアミンオキシダーゼ活性を検出するための高感度で簡便なツールである。したがって、これらの誘導体は、モノアミンオキシダーゼの基質やその阻害物質をハイスループットでスクリーニングするためにとても有用である。

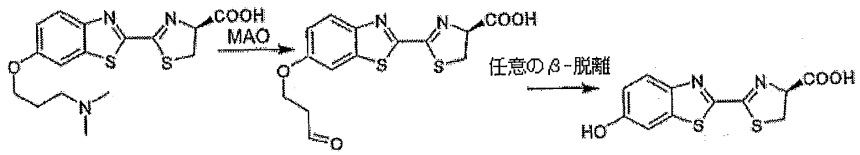
【０７４０】

＜材料および方法＞

本実施例に記載した方法では、ルシフェリン誘導体を、ＭＡＯとインキュベートした（ステップ１）。これにより、自発的なβ－脱離が起こり、ルシフェリンを形成する種が生じる。

【０７４１】

【化２７１】



式CCLIVで示される化合物

【０７４２】

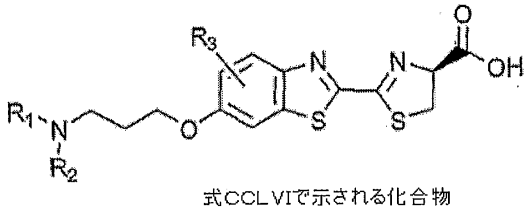
これとは別に、上記誘導体とＭＡＯとの反応生成物として、Ｄ－ルシフェリンではないが、ルシフェラーゼの基質である生成物が得られる。この後、液体状に戻したルシフェリン検出試薬を加え（ステップ２）、該混合液からの発光を、ＤｙｎｅｘまたはＶｅｒｉｔａｓプレートルミノメーターのいずれかを用いて測定した。

【０７４３】

例えば、式ＣＣＬＩＶの化合物を調製するために、メタノール（５ｍｌ）、CH_2Cl_2（１ｍｌ）、およびH_2O（１ｍｌ）にジメチルアミン（０．２３５ｇ、０．０００９０ｍｏｌ）とＤ－システイン（０．１５８ｇ、０．０００９０ｍｏｌ）とが溶解した溶液に、K_2CO_3（０．１２５ｇ、０．０００９０ｍｏｌ）を添加した。該混合液を室温で５分間撹拌した。その後、中和して、弱酸性条件にした。有機溶媒を除去した後、生成物を溶離液として０．１％ＴＦＡ／アセトニトリルを用いたＨＰＬＣによって精製した。該化合物を１Ｈ　ＮＭＲ／ＭＳによって確認した。収量は、０．２３ｇであった。該化合物を、１Ｈ　ＮＭＲおよびマススペクトルによって特徴付けた。関連化合物には、式ＣＣＬＶの化合物が含まれる。

【０７４４】

【化２７２】



式CCLVIで示される化合物

【０７４５】

ステップ２における液体に戻したルシフェリン検出試薬は、Ｐ４５０－Ｇｌｏ緩衝液（Ｖ８６５Ａ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）１ビンを解凍して室温に戻し、その後、１００μｌの２０％ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド（ＤＴＡＢ）（Ｄ－８６３８，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）と共に、ルシフェリン検出試薬（Ｖ８５９Ａ，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）１ビンに加えることにより調製した。上記ＤＴＡＢは、ＭＡＯを不活性化する

ために添加された。

【０７４６】

＜結果＞

（ＭＡＯ　ＢおよびＭＡＯ－３）

本実施例では、基質ＭＡＯ－３（図１３；ストックは、８．１９mMのＤＭＳＯ溶液）を、ＤＭＳＯで連続的に希釈した。希釈した基質をそれぞれ５μｌずつ、白色で不透明の９６穴プレートの別々のウェルに入れた。ステップ１を開始するために、４５μｌの酵素と緩衝液とをそれぞれのウェルに添加した。この４５μｌには、１０μｌの１Ｍ　Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）、５μｌの２００mM $MgSO_4$、２９μｌのH_2O、および１μｌの５ｍｇ／ｍｌミクロソームが含まれていた。なお、該ミクロソームは、バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＢ（ＭＡＯＢ）を含むミクロソーム（Ｍ－７４４１，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）である。ステップ１では、室温で１時間インキュベートした。ステップ２は、それぞれのウェルに、５０μｌの液体状に戻したルシフェリン検出試薬を添加することによって開始した。２０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＶｅｒｉｔａｓプレートルミノメーターで測定した。ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１でＭＡＯ　ＢをH_2Oで置換したコントロールのウェルからの発光シグナルもまた、測定した。

【０７４７】

相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表２１に示す。

【０７４８】

【表２１】

MAO-3(μM)	MAO無	MAO B	正味のRLUs
819.00	28342	54262	25920
409.50	13966	37602	23636
204.75	7294	29701	22407
102.38	3535	24242	20707
51.19	1757	20078	18321
25.59	1070	14104	13034
12.80	522	9317	8795
6.40	284	5493	5209
3.20	215	2973	2758
1.60	138	1617	1479
0.80	112	962	850

【０７４９】

このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ　Ｗｉｎｄｏｗｓ　ｖ１．０　（ＪａｎｄｅｌＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，　ＡＩＳＮ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、Ｋｍ値は２４±１μＭであり、Ｋｍ値でのシグナル／バックグラウンドの割合は、約１．３であった。

【０７５０】

（ＭＡＯ　ＡおよびＭＡＯ－７）

本実施例では、バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＡ（ＭＡＯ　Ａ）を含むミクロソーム（Ｍ－７３１６，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）（５ｍｇ／ｍｌ）を１００mM　Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）で１０倍に希釈した。該希釈したミクロソームを１０μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－７（図１３；ストックは２３．２mMのＤＭＳＯ溶液）は、ＤＭＳＯで連続的に希釈した。ステップ１を開始するために

、４０μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この４０μｌには、１０μｌの1Ｍ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）、５μｌの２００ｍＭ $MgSO_4$、１５μｌのH_2O、およびそれぞれの基質の希釈液１０μｌが含まれていた。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻したルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。２０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＤｙｎｅｘプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１でＭＡＯＡをH_2Oに置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。

【０７５１】

測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表２２に示す。

【０７５２】

【表２２】

MAO-7(μM)	MAO無	MAO A	正味のRLUs
4640	11.504	650.305	638.801
2320	6.0332	542.257	536.2238
1160	3.2977	390.469	387.1713
580	1.6627	224.458	222.7953
290	0.8456	124.435	123.5894
145	0.4563	64.975	64.5187
72.5	0.2556	32.52	32.2644
36.3	0.1312	16.821	16.6898
18.1	0.1033	8.5338	8.4305

【０７５３】

このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０ （Ｊａｎｄｅｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、Ｋｍ値は１５６０±１３０μＭであり、Ｋｍ値でのシグナル／バックグラウンドの割合は、約９５であった。

【０７５４】

（ＭＡＯ ＡおよびＭＡＯ－３、ＭＡＯ ＡおよびＭＡＯ－７、ＭＡＯ ＢおよびＭＡＯ－３、ならびに、ＭＡＯ ＢおよびＭＡＯ－７）

本実施例では、バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＡ（ＭＡＯ Ａ）を含むミクロソーム（Ｍ－７３１６， Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）（５ｍｇ／ｍｌ）を１００ｍＭ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）で１０倍に希釈した。該希釈したミクロソームを１０μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－３（ストックは、９．２ｍＭの０．２％H_2SO_4／ＤＭＳＯ溶液）およびＭＡＯ－７（ストックは２６ｍＭの０．２％H_2SO_4／ＤＭＳＯ溶液）を０．２％H_2SO_4／ＤＭＳＯ溶液で連続的に希釈した。ステップ１を開始するために、４０μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この４０μｌには、１０μｌの1Ｍ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）、５μｌの２００ｍＭ $MgSO_4$、５μｌの１０％Ｔｅｒｇｉｔｏｌ ＮＰ－９、１０μｌのH_2O、およびそれぞれの基質の希釈液１０μｌが含まれていた。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻したルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。２０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＤｙｎｅｘプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１でＭＡＯ ＡまたはＭＡＯ ＢをＨ２Ｏに置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。

【０７５５】
測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表２３および表２４に示す。
【０７５６】
【表２３】

MAO-3(μM)	MAO無	MAO A	MAO B	正味のA	正味のB
1840	34.224	155.693	362.398	121.469	328.174
920	19.128	108.18	231.563	89.052	212.435
460	10.157	65.297	143.784	55.14	133.627
230	4.8948	33.833	77.778	28.9382	72.8832
115	2.4175	17.977	40.089	15.5595	37.6715
57.5	1.2856	9.4777	20.741	8.1921	19.4554
28.8	0.5877	4.5843	10.46	3.9966	9.8723
14.4	0.3338	2.1812	5.5996	1.8474	5.2658
7.2	0.1692	1.2114	2.7601	1.0422	2.5909
3.6	0.1074	0.6851	1.6472	0.5777	1.5398

【０７５７】
【表２４】

MAO-7(μM)	MAO無	MAO A	MAO B	正味のA	正味のB
5200	10.65	553.51	52.972	542.86	42.322
2600	6.7022	490.271	43.713	483.5688	37.0108
1300	3.8297	342.71	39.242	338.8803	35.4123
650	2.1547	196.223	26.367	194.0683	24.2123
325	1.189	97.309	16.235	96.12	15.046
162.5	0.5589	50.033	9.1463	49.4741	8.5874
81.3	0.3343	22.845	5.0852	22.5107	4.7509
40.6	0.1641	11.762	2.7455	11.5979	2.5814
20.3	0.0942	6.1583	1.4467	6.0641	1.3525
10.2	0.0754	2.8488	0.7627	2.7734	0.6873

【０７５８】
このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０ （ＪａｎｄｅｌＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、表２５に示すＲＬＵｍａｘおよびＫｍ値が得られた。ＲＬＵｍａｘ／Ｋｍ値の割合によって示されるように、ＭＡＯ－３は、ＭＡＯ Ｂに対してより特異的な基質であり、ＭＡＯ－７は、ＭＡＯ Ａに対してより特異的な基質である。
【０７５９】

【表２５】

	RLUmax	Km(mM)	RLUmax/Km(mM^{-1})
MAO AおよびMAO-3	210	1.32	159
MAO BおよびMAO-3	660	1.88	351
MAO AおよびMAO-7	750	1.7	441
MAO BおよびMAO-7	48	0.65	74

【０７６０】

（ＭＡＯ　ＡおよびＭＡＯ－１１、ならびに、ＭＡＯ　ＢおよびＭＡＯ－１１）

本実施例では、基質の電荷を減少させ、ＭＡＯ酵素のＫｍ値を低下させることにより、酵素の特異性を増加させるために、ＭＡＯ－１１（図１３）、すなわちＭＡＯ－３のメチルエステル誘導体を合成した。バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＡ（ＭＡＯ　Ａ）またはＢ（ＭＡＯ　Ｂ）含むミクロソーム（それぞれＭ－７３１６およびＭ－７４４１，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）（５ｍｇ／ｍｌ）を１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）で５倍に希釈した。該希釈したミクロソームを５μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－１１（ストックは、１６．４ｍＭのＤＭＳＯ溶液）をＤＭＳＯで連続的に希釈した。ステップ１を開始するために、４５μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この４５μｌには、１０μｌの５００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、５μｌの２００ｍＭ　$MgSO_4$、２８μｌのH_2O、およびそれぞれの基質の希釈液２μｌが含まれていた。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻したルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。また、それぞれのウェルに、０．５μｌの３．５７ユニット／μｌブタ肝臓エステラーゼ（Ｅ－２８８４，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を添加して、ルシフェラーゼとの反応に先立ち、エステルを除去した。３０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＶｅｒｉｔａｓプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１でＭＡＯ　ＡまたはＭＡＯ　ＢをH_2Oに置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。

【０７６１】

測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表２６に示す。

【０７６２】

【表２６】

MAO-11(μM)	MAO無	MAO A	MAO B	正味のA	正味のB
656	117465	8633713	551608	8516248	434143
328	62791	8924217	515953	8861426	453162
164	33056	8079844	509311	8046788	476255
82	17316	6575618	466321	6558302	449005
41	10457	4799614	467175	4789157	456718
20.5	6653	2856723	454410	2850070	447757
10.25	3671	1136043	348002	1132372	344331
5.13	2084	475853	251284	473769	249200
2.56	1271	211752	183244	210481	181973
1.28	823	94496	114581	93673	113758
0.64	647	44547	67136	43900	66489
0.32	441	19973	31996	19532	31555

【０７６３】

このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０ （ＪａｎｄｅｌＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、ＭＡＯ ＡおよびＭＡＯ Ｂについて、それぞれ、Ｋｍ値は４７±６μＭおよび４．４±０．４μＭであり、Ｋｍ値でのシグナル／バックグラウンドの割合は、それぞれ約４５０および約１３０であった。これは、ＭＡＯ ＡおよびＭＡＯ ＢのＫｍ値がそれぞれ３３倍および５．５倍減少したことを示している。また、ステップ１でエステル化された基質を用い、ステップ２でエスラーゼを含有させることの有効性を示している。

【０７６４】

（IC_{50}値の測定）

本実施例では、試験化合物をH_2Oで連続的に希釈した。そして、それぞれの希釈溶液を１２．５μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－１１（ストックは１６．４ｍＭ）は、２００ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１０％グリセロール、ｐＨ７．４（ＭＡＯ Ｂの場合、さらに、２０％ジメチルスルホキシドを添加）で希釈した。１６０μＭまたは３６μＭのＭＡＯ－１１を、１２．５μｌずつ、ＭＡＯ ＡまたはＭＡＯ Ｂのそれぞれと反応させるために、各ウェルに添加した。バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＡ（ＭＡＯ Ａ）またはＢ（ＭＡＯ Ｂ）を含むミクロソーム（それぞれＭ－７３１６およびＭ－７４４１，Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）（５ｍｇ／ｍｌ）を１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ、５％グリセロール、ｐＨ７．４（ＭＡＯ Ｂの場合、さらに、１０％ジメチルスルホキシドを添加）で２５倍に希釈した。ステップ１を開始するために、該希釈したミクロソームを２５μｌずつ、各ウェルに添加した。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻した修飾されたルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。該修飾された試薬においては、ルシフェリン検出試薬（Ｖ８５９Ａ， Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．， Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）１ビンを、２００ｍＭ ＰＩＰＥＳ（ｐＨ６．７）、６．８ｍＭ $MgSO_4$、２％ Ｔｅｒｇｉｔｏｌ ＮＰ－９、０．２％ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド（ＤＴＡＢ）（Ｄ－８６３８， Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）、０．２％ Ｍａｚｕ ＤＦ－２０４、１８μＭ ２－（４－アミノフェニル）－６－メチルベンズチアゾール（ＡＰＭＢＴ）、および２０Ｕ／ｍｌブタ肝臓エステラーゼ（Ｅ－２８８４， Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）に溶解した。３０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＤｙｎｅｘプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１でＭ

ＡＯ　ＡまたはＭＡＯ　Ｂを１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、５％グリセロール、ｐＨ７．４（ＭＡＯ　Ｂの場合、さらに、１０％ジメチルスルホキシドを添加）に置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。

【０７６５】

測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表２７～表２９に示す。

【０７６６】

【表２７】

	MAO A		MAO B		活性（パーセント）	
クロルギリン（CLOR）（mM）	酵素有	酵素無	酵素有	酵素無	MAO A	MAO B
250.0000	20.839	25.21	96.566	4.2724	-0.009	11.286
83.3333	20.754	19.884	231.028	4.0911	-0.010	27.679
27.7778	22.496	19.544	460.408	3.992	0.018	55.645
9.2593	27.131	20.336	748.578	4.016	0.091	90.778
3.0864	35.455	20.883	799.833	3.8485	0.224	97.027
1.0288	66.13	21.173	824.099	4.052	0.714	99.985
0.3429	125.226	21.205	835.201	4.2169	1.657	101.339
0.1143	359.688	20.964	848.71	3.8082	5.399	102.986
0.0381	4403.78	20.538	855.032	3.8881	69.939	103.756
0.0127	5556.07	20.811	827.772	3.8107	88.329	100.433
0.0042	5848.05	21.288	828.424	3.9595	92.988	100.512
0.0014	6287.39	24.955	824.222	4.028	100.000	100.000

【０７６７】

【表２８】

	MAO A		MAO B		活性（パーセント）	
デプレニル（DEP）（mM）	酵素有	酵素無	酵素有	酵素無	MAO A	MAO B
125.00000	389.273	25.21	7.0808	4.2724	5.667	0.379
41.66667	1421.31	19.884	12.698	4.0911	21.565	1.071
13.88889	2941.09	19.544	25.154	3.992	44.977	2.603
4.62963	4928.34	20.336	55.661	4.016	75.590	6.357
1.54321	6019.12	20.883	129.138	3.8485	92.393	15.399
0.51440	6375.81	21.173	290.883	4.052	97.888	35.303
0.17147	6702.08	21.205	521.983	4.2169	102.914	63.742
0.05716	6549.63	20.964	704.981	3.8082	100.565	86.261
0.01905	6607.84	20.538	789.888	3.8881	101.462	96.709
0.00635	6810.54	20.811	825.09	3.8107	104.584	101.041
0.00212	6494.65	21.288	805.968	3.9595	99.718	98.688
0.00071	6512.94	24.955	816.628	4.028	100.000	100.000

【０７６８】

【表２９】

	MAO A		MAO B		活性（パーセント）	
フェネチルアミン（PEA）（mM）	酵素有	酵素無	酵素有	酵素無	MAO A	MAO B
13650.000	84.655	25.21	7.5654	4.2724	0.986	0.417
4550.000	282.629	19.884	11.202	4.0911	4.072	0.842
1516.667	789.167	19.544	24.813	3.992	11.969	2.434
505.556	2001.33	20.336	57.877	4.016	30.866	6.301
168.519	3890.4	20.883	130.845	3.8485	60.315	14.833
56.173	5520.26	21.173	322.368	4.052	85.723	37.230
18.724	6127.62	21.205	623.72	4.2169	95.192	72.470
6.241	6374.2	20.964	757.033	3.8082	99.036	88.060
2.080	6623.63	20.538	827.386	3.8881	102.924	96.287
0.693	6497.46	20.811	822.64	3.8107	100.957	95.732
0.231	6497.21	21.288	855.314	3.9595	100.953	99.553
0.077	6436.06	24.955	859.135	4.028	100.000	100.000

【０７６９】

このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０ （ＪａｎｄｅｌＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、公開されている値と一致するＩＣ$_{50}$値が得られた（表３０を参照）。

【０７７０】

【表３０】

	IC_{50}（μM）		公開されている値（μM）	
化合物	MAO A	MAO B	MAO A	MAO B
クロルギリン(CLOR)	0.024±0.007	24±5	0.025	79
デプレニル(DEP)	7.1±0.8	0.151±0.008	5	0.13
フェネチルアミン(PEA)	134±9	20±2	78-280	2-150

【０７７１】

Ｂ． 蛍光性誘導体を用いたアッセイ

以下の実施例では、低い蛍光を発する基質をＭＡＯとインキュベートさせる反応を実施した。これにより、自発的なβ－脱離が起こり、高い蛍光を発する物質を形成する種を生じる。その後、Ｆｌｕｏｒｏｓｋａｎ Ａｓｃｅｎｔプレートフルオロメーターを用いて、蛍光シグナルを測定した（励起／発光＝３５５／４６６ｎｍ）。

【０７７２】

バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えモノアミンオキシダーゼＡ（ＭＡＯ Ａ）またはＢ（ＭＡＯ Ｂ）を含むミクロソーム（それぞれＭ－７３１６およびＭ－７４４１， Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）を２００ｍＭ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）で１０倍に希釈した。該希釈したミクロソームを１０μｌずつ、黒色の９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－Ｆ３（図１１；ストックは、６９．１ｍＭのＤＭＳＯ溶液）をＤＭＳＯで連続的に希釈した。反応を開始するために、９０μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この９０μｌには、３５μｌの２００ｍＭ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）、３５μｌの２００ｍＭ Ｔｒｉｃｉｎｅ（ｐＨ８．３）（もしくは水）、１０μｌの２００ｍＭ $MgSO_4$、およびそれぞれの基質の希釈液１０μｌが含まれていた。該１００μｌの反応物を、室温で１時間、インキュベートし、Ｆｌｕｏｒｏｓｋａｎ Ａｓｃｅｎｔプレートフルオロメーターを用いて、蛍光シグナルを測定した。該誘導体の蛍光を測定するために、ＭＡＯ ＡまたはＭＡＯ ＢをH_2Oに置換したコントロールのウェルからの蛍光シグナルも測定した。

【０７７３】
測定した蛍光シグナルを表３１に示す。
【０７７４】
【表３１】

MAO-F3(μM)	MAO無	MAO A	MAO B	正味のA	正味のB
863.75	6761	21154	17322	14393	10561
431.88	5097	19530	16590	14433	11493
215.94	3375	16721	14149	13346	10774
107.97	2037	13930	11704	11893	9667
53.98	1210	11555	9885	10345	8675
26.99	633	8461	7468	7828	6835
13.50	348	6078	5239	5730	4891
6.75	197	4129	3683	3932	3486
3.37	118	2604	2198	2486	2080
1.69	78	1486	1353	1408	1275
0.84	57	815	689	758	632
0.42	48	431	375	383	327
0.21	48	240	202	192	154

【０７７５】
このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０ （Ｊａｎｄｅｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、ＭＡＯ ＡおよびＭＡＯ Ｂについて、それぞれ、Ｋｍ値は２１±１μＭおよび１６±１μＭであり、Ｋｍ値でのシグナル／バックグラウンドの割合は、それぞれ約１５および約１３であった。
【０７７６】
＜結論＞
このように、ルシフェリンおよび蛍光誘導体によれば、該誘導体の変換によりＭＡＯを測定することができる。該誘導体の変換は、本来のルシフェリンまたは蛍光性分子を直接生じるわけではないが、ルシフェリンまたは蛍光性分子に変化する中間体を生じるか、もしくは、ルシフェラーゼの基質である中間体を生成する。そのような化合物は、ＭＡＯ、またはＭＡＯの阻害物質もしくは基質を測定するために有効である。試験された１つのルシフェリン誘導体（フルオロルシフェリン）は、ｐＨに依存しない光シグナルを発生した。
【０７７７】
特に、ＭＡＯ＃１および＃３等のようなルシフェリン誘導体は、モノアミンオキシダーゼＡおよびＢによって、該誘導体よりもより効果的にルシフェラーゼによって利用される生成物に変換された。これにより、これらの酵素を容易かつ効果的に測定することができる。これらの化合物の一部は、例えば、ＭＡＯ＃１および＃３のように、モノアミンオキシダーゼ反応が、脱離反応でルシフェリン核を自発的に切断することができる生成物を生じさせるように設計された。上記データは、この離脱反応が起こるのであれば、驚くほど迅速に起こることを示唆していた。したがって、そのような反応は、上記脱離反応を完結させるための第２インキュベート工程を必要とすることなく、ＭＡＯ酵素の測定を可能にする。ルシフェリン核上のフッ素原子を除去することによって、上記脱離反応の速度を増加させるように設計されたさらなる誘導体を合成した。そのような脱離反応の増強は、一般的に、他の脱離反応において有効である。さらに、これらの反応の生成物は、ルシフェラーゼの基質として用いることができる。
【０７７８】

Ｃ．　ＦＭＯアッセイのためのルシフェリン誘導体

以下の実施例では、ルシフェリン誘導体をＦＭＯとインキュベートする反応を行った（ステップ１）。これにより、自発的なβ－脱離が起こって、ルシフェリンを生成する種が生じる。その後、液体状に戻したルシフェリン検出試薬（上説の実施例を参照）を加え、該混合物からの発光をＤｙｎｅｘまたはＶｅｒｉｔａｓプレートルミノメーターのいずれかを用いて測定した。

【０７７９】

（ＦＭＯ１およびＦＭＯ２、並びに基質ＦＭＯ－２）

本実施例では、バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えフラビン含有モノオキシゲナーゼ１（ＦＭＯ１）または３（ＦＭＯ３）を含むミクロソーム（それぞれＦ－４９２８　およびＦ－５０５３，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を、１μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。ステップ１を開始するために、４９μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この４９μｌには、５μｌの２００ｍＭ　ＣＨＥＳ（ｐＨ９．５）、２．５μｌのＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ａ、０．５μｌのＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｂ、３９μｌのH_2O、および２μｌの３．７５ｍＭ基質ＦＭＯ－２が含まれていた。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ＡおよびＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｂは、ＮＡＤＰＨ再生システム（Ｖ９５１０，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）の構成成分である。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ａは、２６ｍＭ　$NADP^+$、６６ｍＭグルコース６リン酸、および６６ｍＭ　$MgCl_2$を含む。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ｂは、５ｍＭクエン酸（ｐＨ５．５）に溶解した４０ユニット／ｍｌグルコース６リン酸デヒドロゲナーゼを含む。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻したルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。３０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＤｙｎｅｘプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１において、ＦＭＯ１またはＦＭＯ３を野生型のバキュロウィルスに感染した昆虫細胞由来のミクロソーム（Ｍ－７５６６，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）に置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。

【０７８０】

測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表３２に示す。

【０７８１】

【表３２】

試料	コントロール		FMO1		FMO3	
RLUs	8.7102	8.5489	11.778	12.006	12.194	10.425

【０７８２】

（ＦＭＯ３および基質ＭＡＯ－７）

本実施例では、バキュロウィルスに感染した昆虫細胞で発現させたヒト組換えフラビン含有モノオキシゲナーゼ３（ＦＭＯ３）を含むミクロソーム（Ｆ－５０５３，，　Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を、５μｌずつ、白色の不透明な９６穴プレートの別々のウェルに入れた。基質ＭＡＯ－７（図１３；ストックは１７．２ｍＭのＤＭＳＯ溶液）をＤＭＳＯで連続的に希釈した。

【０７８３】

ステップ１を開始するために、４５μｌの基質および緩衝液をそれぞれのウェルに加えた。この４５μｌには、１０μｌの２００ｍＭ　ＣＨＥＳ（ｐＨ９．５）、２．５μｌのＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ａ、０．５μｌのＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｂ、３０μｌのH_2O、およびそれぞれの基質希釈液２μｌが含まれていた。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ＡおよびＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｂは、ＮＡＤＰＨ再生システム（Ｖ９５１０，　Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）の構成成分である。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ａは、２６ｍＭ　ＮＡＤ

P^{+}、６６mMグルコース６リン酸、および６６mM $MgCl_2$を含む。Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｂは、５mMクエン酸（ｐＨ５．５）に溶解した４０ユニット／ｍｌグルコース６リン酸デヒドロゲナーゼを含む。ステップ１では、室温で１時間、インキュベートした。ステップ２は、液体状に戻したルシフェリン検出試薬５０μｌをそれぞれのウェルに添加することによって開始した。

【０７８４】

３０分後、上記１００μｌの反応物からの発光シグナルをＶｅｒｉｔａｓプレートルミノメーターで測定した。該ルシフェリン誘導体に対するルシフェラーゼの活性を測定するために、ステップ１において、ＦＭＯ３を野生型のバキュロウィルスに感染した昆虫細胞由来のミクロソーム（Ｍ－７５６６，Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ）に置換したコントロールのウェルからの発光シグナルも測定した。測定した相対発光ユニット（ＲＬＵｓ）を表３３に示す。

【０７８５】

【表３３】

MAO-7(μM)	コントロール	FMO3	正味のFMO3
688	7213	42707	35494
516	6137	40329	34192
344	4486	34036	29550
258	3592	28987	25395
172	2571	22463	19892
129	2004	19332	17328
86	1585	13646	12061
43	1043	8220	7177

【０７８６】

このデータを、ＴａｂｌｅＣｕｒｖｅ Ｗｉｎｄｏｗｓ ｖ１．０（ＪａｎｄｅｌＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ＡＩＳＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）でフィッティングしたところ、Ｋｍ値は２００±２０μＭであり、Ｋｍ値でのシグナル／バックグラウンドの割合は、約８．５であった。図１４および図１５には、典型的なＦＭＯ基質を示す。

【０７８７】

〔実施例４：アルカリホスファターゼの基質としてのルシフェリン誘導体〕

本実施例では、ＡＰ４（ルシフェリン誘導体）を、ルシフェラーゼおよびＡＴＰの存在下で、様々な量の子牛腸管アルカリホスファターゼと反応させた。そして、アルカリホスファターゼ活性を測定する一手段として、発光を記録した。

【０７８８】

＜材料および方法＞

ルシフェラーゼ誘導体であるＡＰ４を、５０mM ＴｒｉｓＣｌ（ｐＨ７．５）に溶解して、４．３mMの該化合物の溶液を作製した。

【０７８９】

アルカリホスファターゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．Ｍ１８２１）は、５０mM ＴｒｉｓＣｌ（ｐＨ９．３）、１mM $MgCl_2$、０．１mM $ZnCl_2$に溶解して、１ｆｍｏｌ／μｌ～０．０１ｚｅｐｔｏｍｏｌｅ／μｌの濃度とした。

【０７９０】

１μＭ ＡＰ４（図６９）、１００μｇ／ｍｌ熱安定性ルシフェラーゼ、２mM ＡＴＰ、１０mM $MgCl_2$、および１００μＭ $ZnCl_2$を含む５０mM ＴｒｉｓＣｌ（ｐＨ８．５）を含む反応溶液を作製した。該溶液を室温で１時間インキュベートして、発光のバックグランドを減少させた。

【０７９１】

１０μｌの上記希釈したアルカリホスファターゼストックと１００μｌの上記反応溶液とを、それぞれ、ルミノメータープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ　ｐｌａｔｅ）のウェル４つずつに入れた。該プレートを室温で３０分間インキュベートし、その後、該溶液による発光をＶｅｒｉｔａｓルミノメーターを用いて測定した。

【０７９２】

＜結果＞

以下の平均光読取値を、生データから算出した（表３４）。

【０７９３】

【表３４】

#AP分子	反応1	反応2	反応3	反応4	平均読取値	正味の読取値
0	2620	2735	2612	2531	2624.5	0
6	2706	2807	2631	紛失	2714.67	89
60	2920	2795	2728	2647	2772.5	148
600	3118	3051	3345	2805	3079.8	455
6,000	3189	3144	3002	3405	3185	560
60,000	5956	5641	5416	5728	5685.3	3060
600,000	30042	31132	29781	31679	30658.5	28034
6,000,000	281115	254693	265592	296642	274510.5	271886
60,000,000	2639163	2283882	2320675	2334267	2394497	2391872

【０７９４】

検出されたシグナルは、アルカリホスファターゼ分子の数が増加すると、ますます増加したので、該シグナルは、アルカリホスファターゼの作用によるものであった。典型的なＡＰ基質を図１６に示す。

【０７９５】

〔実施例５〕

Ａ．　ルシフェリン誘導体を用いたヒトチトクロームＰ４５０のスクリーニング

２段階の形態においてＰ４５０酵素を検出するために有用なルシフェリン誘導体の多く：（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）上にあるＡ、ＢおよびＣ環修飾、および、（４Ｓ）－４，５－ジヒドロ－２－（６－アミノベンゾチアゾリル）－４－チアゾールカルボン酸（アミノルシフェリン）上にあるＡ環修飾が調製された。特に、これらの誘導体は、これまでに調製された発光性基質（公開された米国出願２００４０１７０１９９）とともに実質的に活性ではない、または特定の酵素とともにより強い活性を示したＰ４５０酵素にとっての発光性基質を同定する目的において調製された。さらに、単独のＰ４５０酵素に対して向上された選択性を有する基質を同定することはまた、興味深いものであった。以下に説明するように、新規なＰ４５０基質のほかにルシフェリンエステルが、カルボキシルエステラーゼの発光性基質であるということが同定された。ルシフェリン誘導体は、チトクロームＰ４５０酵素の調査対象の一群のそれぞれにとっての基質として調べられた。Ｐ４５０基質として有用な誘導体が、特定のＰ４５０酵素にとっての阻害物質を検出する試験において、使用されてもよい（図１７および１８を参照のこと）。

【０７９６】

２段階の発光手法（Ｃａｌｉ，　Ｃｅｌｌ　Ｎｏｔｅｓ．　７：２（２００３）、Ｃａｌｉら，　Ｃｅｌｌ　Ｎｏｔｅｓ，　１３：８（２００５ａ）、ならびにＣａＩｉ，　Ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｐ４５０　ａｓｓａｙｓ　ｔｈａｔ　ｕｓｅ　Ｄ－ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ａｓ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅｓ　ｆｏｒ　ＣＹＰ　ｌＡｌ，　１Ａ２，　ＩＢｌ，　２Ｃ８，　２Ｃ９，　２Ｊ２，　３Ａ４，　３Ａ７，　４Ａｌ　１，　４ＦＳＢ，　４Ｆｌ　２　ａｎｄ　１９，　Ｐｒｏｃ．　１４ｔｈ　Ｉｎ

ｔ．Ｃｏｎｆ．Ｃｙｔｏｃｈｒｏｍｅｓ Ｐ４５０，Ｍｅｄｉｍｏｎｄ Ｉｎｔ．Ｐｒｏｃ．（２００５ｂ））が、Ｐ４５０活性の測定に用いられた。Ｐ４５０酵素は、ルシフェリン誘導体と反応して、反応生成物としてＤ－ルシフェリンを放出する。それから、上記Ｄ－ルシフェリンは、ルシフェラーゼ反応混合物において検出される。上記反応における発光は、Ｄ－ルシフェリンの量と直接に比例している。活性であるＰ４５０酵素を含む試料は、Ｐ４５０活性が欠失しているコントロールと比較される。上記コントロールを有為に超えて発光シグナルを生じさせるＰ４５０を含む試料は、反応機序を示すことなく、活性であるとして記録される。

【０７９７】

＜材料および方法＞

Ｐ４５０は、ディスカバリー ラブウェア（ＢＤ／Ｇｅｎｔｅｓｔ）から購入したＳｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）である。これらは、Ｐ４５０がＰ４５０還元酵素とともに共発現される昆虫細胞発現系に由来する膜画分である。ＣＹＰ２Ａ６、２Ｂ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１９、２Ｅ１、２Ｊ２、３Ａ４、３Ａ７、４Ｆ２、４Ｆ３Ａ、４Ｆ３Ｂおよび４Ｆ１２はまた、チトクロームｂ５を含んでいる。ＨＬＭは、ヒトの肝臓のミクロソームである。

【０７９８】

“コントロール”と標識された試料において、Ｐ４５０ Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）またはＨＬＭは、Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）用に使用される昆虫細胞発現系に由来するＰ４５０発現なしで、膜調製物と置き換えられた。

【０７９９】

Ｐ４５０のそれぞれにとっての２倍濃縮されたＰ４５０反応混合物は、以下の適切な緩衝液および基質：

（１）ＣＹＰ１Ａ１、１Ａ２、１Ｂ１、２Ｄ６、２Ｅ１、３Ａ５、３Ａ７、２Ｊ２、４Ｆ１２、１９、ＨＬＭおよび昆虫細胞コントロールに用いる、ｐＨ７．４および１００ｍＭのKPO_4

（２）ＣＹＰ２Ｂ６、２Ｃ８、２Ｃ１９、４Ｆ２、４Ｆ３Ａ、および４Ｆ３Ｂに用いる、ｐＨ７．４および５０ｍＭのKPO_4

（３）ＣＹＰ２Ｃ９に用いる、ｐＨ７．４および２５ｍＭのKPO_4

（４）ＣＹＰ３Ａ４に用いる、ｐＨ７．４および２００ｍＭのKPO_4（上記KPO_4は、ＣＹＰ３Ａ４混合物から差し引かれているが、次の段階において加えられる）

（５）ＣＹＰ２Ａ６、２Ｃ１８および４Ａ１１に用いる、ｐＨ７．５および１００ｍＭのｔｒｉｓＨＣｌ

のいずれかである１×緩衝液と；

５０μＭの１×基質濃縮物と、

を用いて調整された。

【０８００】

Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）反応混合物のそれぞれは、（ここに示された５ｐｍｏｌ／５０μｌ反応に用いたＣＹＰ１９を除いて、）１ｐｍｏｌのＰ４５０／５０μｌの反応を有していた。ＨＬＭ反応は、別に示されているものを除いて、２０ｍｇのＨＬＭ／５０μｌの反応を有していた。コントロールの昆虫細胞の膜は、５０μｇ／５０μｌであった。

【０８０１】

２×ＮＡＤＰＨ再生溶液は、ＣＹＰ３Ａ４を除いたすべての反応用に、２．６ｍＭのＮＡＤＰ＋、６．６ｍＭのグルコース６リン酸、６．６ｍＭの$MgCl_2$、および０．８ユニット／ｍｌのグルコース６リン酸脱水素酵素から調製された。ＣＹＰ３Ａ４用の２×ＮＡＤＰＨ再生溶液は、２．６ｍＭのＮＡＤＰ＋、６．６ｍＭのグルコース６リン酸、６．６ｍＭの$MgCl_2$、０．８ユニット／ｍｌのグルコース６リン酸脱水素酵素、および４００ｍＭのKPO_4から調製された。

【０８０２】

２５μｌの２×Ｐ４５０反応混合物のそれぞれは、不透明な白い９６穴プレートの３つのウェルに加えられた。反応は、２５μｌの上記２×ＮＡＤＰＨ再生溶液を加えることによって開始された。上記プレートは、３０分間、３７℃のH_2O槽に置かれた。上記反応が停止され、かつ５０μｌのルシフェリン検出試薬（ＬＤＲ）Ｐ４５０－Ｇｌｏ（登録商標）（プロメガ社（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．））を加えることによって、発光が開始した。２０ユニット／ｍｌのブタまたはウサギのエステラーゼ（ＰＥ）は、Ｐ４５０用発光性基質がカルボキシルエステルである場合において、ＬＤＲに加えられた（エステラーゼが含まれているときの指標に用いる個々の実験を参照のこと）。上記プレートは室温に移されて、２０分が経過した後、発光は、プレート読み取り照度計（ＢＭＧラブテックによるポーラスターオプティマ、またはターナーバイオシステムによるヴェリタス（登録商標））上において相対的な光ユニット（ＲＬＵ）として、読み取られた。

【０８０３】

＜結果＞

図１７－１８は、４１の異なるルシフェリン誘導体を用いた、組換えヒトＰ４５０、ＨＬＭ、およびＰ４５０活性が欠失したコントロールである昆虫細胞膜調製物の、調査対象の一群に対応するデータを示している。誘導物を発光性生成物に変換したＰ４５０は、コントロール試料よりも大きいシグナルを発するものとして同定される。また、誘導体に対するＰ４５０活性は、コントロールよりも大きいＨＬＭ反応からのシグナルによって示されている。図１７－１８の１１－１４は、２つのＡ環修飾を有する４つの異なるルシフェリン誘導体に関するデータを示している。１１における誘導体は、４位および６位において修飾されており、かつアイソザイム１Ａ１、１Ａ２、２Ｃ８および２Ｃ９に対して好ましい基質である。１２に示されている誘導体もまた、４位および６位において修飾されており、かつアイソザイム１Ａ１、１Ａ２、２Ｃ８および２Ｃ９に対して好ましい基質である。１３における誘導体は、５位および６位において修飾されており、かつアイソザイム１Ａ２および４Ａ１１に対して好ましい基質であり、程度は落ちるが、２Ｃ８および２Ｃ９の基質でもある。１４における誘導体は、５位および６位において修飾されており、かつアイソザイム２Ｃ９および４Ａ１１に対して好ましい基質である。

【０８０４】

図１７－１８の１－１０は、ルシフェリン誘導体に修飾された１０の異なるＡ環を有するチトクロームＰ４５０酵素の調査対象である一群について、ＲＬＵを示している。１０の誘導体のすべては、Ｐ４５０の基質であるが、異なる酵素選択性プロファイルを有していた。７および８における化合物は、ビスルシフェリンである。

【０８０５】

図１７－１８の１５－２０は、Ａ環およびＢ環が修飾されたルシフェリンを有するＰ４５０酵素の調査対象の一群について、ＲＬＵを示している。キノリルルシフェリン６メチルエーテルは、１Ａ２および４Ａ１１に対する好ましい基質であり、同時にキノリルルシフェリン６ベンジルエーテルは、３Ａ７に対する好ましい基質であり、かつ程度は低いが３Ａ４および２Ｃ８に対する基質であった。ナフチルルシフェリン６メチルエーテルおよびキノクサリルルシフェリン６メチルエーテルは、４Ａ１１に対する基質である。

【０８０６】

図１７－１８の２１－２３は、アミノルシフェリン誘導体に対するデータを示している。誘導体の２つは、１Ａ１の好ましい基質であると同時に、他の誘導体は、３Ａ７に対する基質であり、かつ程度は低いが２Ｃ８および２Ｃ９の基質であるが、誘導体に対するバックグラウンドのＲＬＵは高かった。

【０８０７】

図１７－１８の２４－３６は、ＣおよびＡ環修飾を有する誘導体に対するデータを示している。ＣおよびＡ環修飾を有する誘導体は、あるＰ４５０酵素（例えば、ＣＹＰ１Ａ１、ＣＹＰ１Ａ２、ＣＹＰ２Ｃ１９、およびＣＹＰ２Ｄ６）を有するコントロールを上回る相当なシグナルを示した。図１７－１８の２４－３６には、また、エステラーゼの添加（＋ＰＥ）によって、ＰＥなしよりも産生される光が実質的に多いこれらの誘導体（ルシフ

ェリン　Ｈ　エチレングリコールエステル、６－ｍ－ピコリニル　ルシフェリン　メチルエステル、およびルシフェリン　６－メチルエーテル　プロパノールエステル）のいくつかについて示されている。これは、Ｐ４５０がＡ環修飾の部位において反応し、かつ上記カルボキシルエステル（Ｃ環修飾）が、カルボキシルエステル活性によって切断されることを示している。Ａ環誘導体に対するＣ環修飾の付加によって、Ｐ４５０酵素の選択性プロファイルの変更を可能にする。例えば、３３－３６における化合物である、ルシフェリン　６メチルエーテルのＣ環誘導体のすべて（Ａ環誘導体）は、ＣＹＰ２Ｄ６とともに相当な活性を示し、一方において、ルシフェリン　６－メチルエーテルは、ＣＹＰ２Ｄ６とともに極めて低い活性を有している。

【０８０８】

Ｄ－ルシフェリンのＡまたはＣ環に対するピコリニルの添加によって、Ｐ４５０アイソザイムに対する異なる選択性および異なるＲＬＵを有する基質が産生された（図１７－１８における２７および２８－３２）。

【０８０９】

ＲＬＵが決して強くないいくつかの反応に対するＲＬＵは、エステラーゼの添加によって増強されてもよい（図１７－１８における２４－２５、２８－２９、３０－３１、３４－３５および３８－３９）。

【０８１０】

他の誘導体およびＰ４５０酵素についてのデータは、また、図２－２６、２８－３７Ａ、および３８－５０に示されている。

【０８１１】

十分な発光性基質が通常に存在しないＰ４５０に対する活性を示すのは、５，６－ジメトキシルシフェリン、６（ｐ－アミノフェニロキシ）－キノリルルシフェリンおよびルシフェリン－６－イソブチルカルボネートであった（図１７－１８における１４、１７および９）。ＣＹＰ２Ａ６、ＣＹＰ２Ｅ１およびＣＹＰ２Ｃ１８は、これらの化合物と反応するが、これまでに利用可能な発光性化合物とは反応しない酵素である。５，６－ジメトキシルシフェリンおよび６（ｐ－アミノフェニロキシ）－キノリルルシフェリンは、これらの基質と反応する酵素がゆっくりした速度になることを示すあらゆるＰ４５０とともに大きな発光シグナルを生成しなかった。ルシフェリン　６－イソブチルカルボネートは、さまざまなＰ４５０とともに大きな発光シグナルを発したという点において、非選択的であった。また、この化合物は、遊離型のＤ－ルシフェリンを生じるという点において、化学的に不安定なことを示す大きなバックグラウンドシグナル（負のＰ４５０コントロール試料）を発した。

【０８１２】

いくつかの化合物は、他のＰ４５０酵素を超えて、単独のＰ４５０酵素に対しての良好な選択性を示した。ビス－ルシフェリン－メチレンジエーテルおよびビス－ルシフェリン－キシリルジエーテルは、ＣＹＰ１Ａ１またはＣＹＰ３Ａ７に対して、それぞれ選択性を有していた。ＣＹＰ３Ａ７に対する後者の化合物の選択性は、それがＣＹＰ３Ａ７に対して高い選択性を有するプローブ基質であろうことを示している。また、６’－ｐ－クロロフェニルチオール－メトキシルシフェリン（図１７－１８における２）は、ＣＹＰ３Ａ７に対する選択性を示した（図４７）。ＣＹＰ３Ａ７の選択的な基質は、ＣＹＰ３Ａ７が優勢なＰ４５０である致命的な、かつ新生児の肝臓の試料、およびＣＹＰ３Ａ７がゆっくり時間をかけて徐々にＣＹＰ３Ａ４によって置き換えられる（Ｓｔｅｖｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｐｈａｒｍ．　Ｅｘｐ．　Ｔｈｅｒ．，　３０７：５７３（２００３））小児科の試料において特に有用であろう。これらの基質とともにＣＹＰ３Ａ７の活性は、ＣＹＰ３Ａ４のバックグラウンドおよび他のＰ４５０活性に対して、選択的に測定される。ＣＹＰ１Ａ１に対するビス－ルシフェリン－メチレンジエーテルの選択性は、他のＰ４５０、特に、ＣＹＰ１Ａ１と同じ基質の多くと反応し、かつ特定の組織においてＣＹＰ１Ａ１と共発現されるＣＹＰ１Ａ２およびＣＹＰ１Ｂ１（Ｓｈｉｍａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｄｒｕｇ　Ｍｅｔａｂ．　Ｄｉｓｐｏｓ．，　２９：６１７（１９９７））からＣＹＰ１

Ａ１の活性を区別するために有用である。単独のＰ４５０に対して向上した選択性を示すさらなる化合物が合成された。特に、Ｎ－ベンジルオキシカルボニル　アミノルシフェリンおよびＮ－イソブトキシカルボニル　アミノルシフェリンは、ＣＹＰ１Ａ１に対する強い選択性を示した（図１７－１８における２２－２３）。

【０８１３】

非カルボン酸ルシフェリン、ルシフェリン－６－メチルエーテルヒドラジド、およびルシフェリン－６－メチルエーテル－メトキシルアミドは、試験をした他のＰ４５０を超えてＣＹＰ１Ａ２に対する良好な選択性を示した（図１７－１８における４０－４１）。６’（２，５－ジトリフルオロメチルベンジルオキシ）－ルシフェリン、６’（ｏ－トリフルオロメチルベンジロキシ）－ルシフェリン、６’（２，３，４，５，６　ペンタフルオロ－ベンゾロキシ）－ルシフェリン、６’－（２，３，４，６－テトラフルオロ－５－（（４－フェニルピペリジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン、６’－（３－（（４－フェニル－ピペリジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン、６’（２，４，６－トリメチルベンジロキシ）－ルシフェリン、および６’ベンジロキシメトキシ－キノリルルシフェリンは、ＣＹＰ３Ａの３つのサブファミリーである、ＣＹＰ３Ａ４、ＣＹＰ３Ａ５およびＣＹＰ３Ａ７の対して選択的である（図４５－４５）。これは、ＣＹＰ３Ａに対する選択性について、これまでにＣＹＰ４Ｆ１２とともに反応することが示されていた（Ｃａｌｉ，　２００５ｂ）ベンジロキシルシフェリンを超えて、向上していた。

【０８１４】

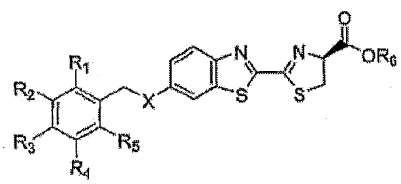
ヒトＣＹＰ３Ａ４酵素は、最も顕著な薬物代謝Ｐ４５０である。ＣＹＰ３Ａ４に対する確かな発光性基質が、これまでに同定された３Ａ４基質を超えて向上した特性を有しているか否かを決定するために、ルシフェリン６－ベンジルエーテルおよびルシフェリン６’３－ピコリニルエーテル、およびいくつかのルシフェリン誘導体が、合成され、かつより明るいシグナルに繋がる向上した選択性、低減されたバックグラウンド発光および増大した代謝回転率について試験された。上記ベンジルエーテルおよび上記ピコリニルエーテルは、ヒト３Ａ７と有為に交差反応し、かつ上記ベンジルエーテルはまた、ＣＹＰ４Ｆ１２と交差反応した。また、上記ベンジルエーテルは、Ｐ４５０によって脱ベンジル化の非存在下においてさえ生じる、ルシフェラーゼとの非能率的な光生成反応に由来する高いバックグラウンド発光を示した。

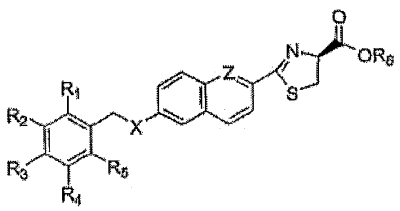
【０８１５】

ＣＹＰ３Ａ４に関して評価するための基質、例えば、増加した安定性、低減されたバックグラウンド、および／または細胞に基づく評価における有用性を有している基質を改良するために、ハロゲンを有するいくつかのルシフェリン誘導体が調製された（図１７－１８における５および６）。例えば、ルシフェリン－６－ベンジルエーテルにおける修飾（例えば、１つまたはそれ以上の環状を形成している原子に対してハロゲン、アルキル、ＯＨまたはNH_2の付加を含むこと）によって、より低いバックグラウンド発光を導いてもよい。このようにして、以下のような化合物は、増加した特異性および／または低減されたバックグラウンドを有し、かつ細胞に基づく評価に有用であってもよい。

【０８１６】

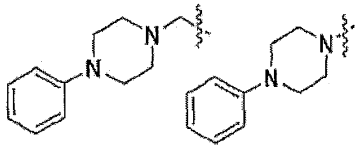
【化２７３】



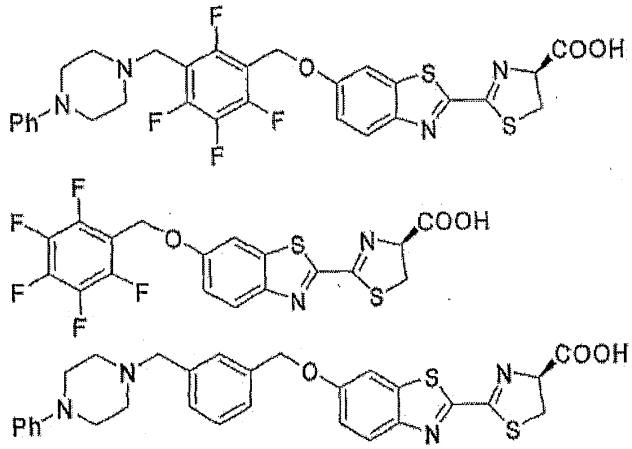


（式中、Ｘは、ＯまたはＮＨを表し、
Ｒ１－Ｒ５は、独立してＨ、Ｆまたは、

【０８１７】
【化２７４】



を表し、
Ｒ６は、Ｈ、低級アルキル、ヒドロキシアルキル、または短いＰＥＧを表す）。
例えば、以下のもの：
【０８１８】
【化２７５】



が合成された。
【０８１９】
＜結果＞
６’（３－（（４－フェニルピペリジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）ルシフェリン（６－フェニルピペラジネキシリル－ルシフェリン、図１７－１８における３）は、４Ｆ１２と交差反応せず、かつ３Ａ４との反応は通常に用いられる濃度におけるＤＭＳＯに対して非感受性であった。６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンについてのバックグラウンド発光は、ルシフェリン－６－ベンジルエーテルよりも低く（ＢＭＧ照度計において約２２００ＲＬＵに対して約５０００ＲＬＵ）、かつ６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンについてのシグナルは、ルシフェリン－６－ベンジルエーテルと同程度であった。さらに、６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンは、ただ１つの部位において競合しているルシフェリン－６－ベンジルエーテルと比較して、ＣＹＰ３Ａ４上にある３つの結合部位の２つにおいて競合していた。最初の結果は、６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンが細胞に基づく評価に使用され得ることを示した。
【０８２０】
６（２，３，４，５，６－ペンタフルオロベンジル）－ルシフェリンは、ルシフェリン－６－ベンジルエーテルおよび６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンよりも低いバックグラウンド発光を有していた（ＢＭＧ照度計上において約９００ＲＬＵ）。フッ素は、ルシフェリン－６－ベンジルエーテルと比較して、より少ない非酵素的な分解、および化合物にとってのルシフェラーゼの優先傾向の緩和が生じるように、化合物を安定化してもよい。このようにして、６－フェニル　ピペラジネキシリル－ルシフェリンは、基部にあるベンジル基に対してフッ素を付加することによって、さらに安定化されてもよく、結果としてさらに低いバックグラウンド発光を有する化合物を生じる。
【０８２１】

６（２，４，６トリメチルベンジル）－ルシフェリン、６－フェニルピペリジネキシリル－ルシフェリン、６－ｏ－トリフルオロメチルベンジル　ルシフェリン、６（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジロキシル）－ルシフェリン、および６－フェニルピペリジン－２，３，５，６－クアトラフルオロキシリル－ルシフェリンは、ＣＹＰ３Ａ４に対して相当な活性を示したが、ＣＹＰ４Ｆ１２と実質的に交差反応しなかった（図１７－１８の１－３および５－６）。これらの化合物のいくつかは、ヒトＣＹＰ３Ａ４に対して低減されたバックグラウンド発光およびより強いシグナルを示した。上記化合物に由来するより低いバックグラウンド発光は、ＣＹＰ３Ａ評価の感度の向上を提供する。

【０８２２】

ルシフェリン－６－トリフルオロメチルベンジルエーテルは、ＣＹＰ３Ａ５に対して増強された選択性を示した（図１７－１８における１０）。４－メチル－６（Ｏ－メチル）－ルシフェリン、および４－（Ｏ－メチル）－６－（Ｏ－メチル）－ルシフェリンは、これまでに記載された化合物とは対照的にＣＹＰ４Ａ１１がこれらの化合物と反応しないという点において、１Ａ２、２Ｃ８および２Ｃ９に対する増強された選択性が示された（図１７－１８における１１－１２）。ルシフェリン－６－メチルエーテルおよびキノリルルシフェリン－６－メチルエーテルは、ルシフェリン－６－メチルと比較して、ＣＹＰ４Ａ１１に対する増強された選択性が示された（図１７－１８における１５）。

【０８２３】

Ｂ．　ルシフェラーゼ誘導体を用いたＣＹＰ３Ａ４、ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の阻害物質のスクリーニング

＜材料および方法＞

ＣＹＰ３Ａ４、ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）は、ディスカバリー　ラブウェア（ＢＤ／Ｇｅｎｔｅｓｔ）から購入した。“昆虫細胞コントロール”は、上記Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）用に使用した発現系からＰ４５０発現をなくした膜調製物である。

【０８２４】

各Ｐ４５０に対する４×濃度のＰ４５０反応混合物は、適切な緩衝液および基質を用いて調製した。

【０８２５】

４×ＣＹＰ２Ｄ６反応混合：４００ｍＭのＫＰＯ$_4$（ｐＨ７．４）、１４０μＭのルシフェリン－６－メチルエーテル　エチレングリコールエステル（図１７－１８における３６）、ならびに１０ｐｍｏｌ　ＣＹＰ２Ｄ６　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）／ｍｌ

４×ＣＹＰ２Ｃ１９反応混合：２００ｍＭのＫＰＯ$_4$（ｐＨ７．４）、１００μＭのルシフェリン－Ｈ－エチレングリコールエステル（図１７－１８における２４および２５）、ならびに１０ｐｍｏｌ　ＣＹＰ２Ｃ１９　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）／ｍｌ

４×ＣＹＰ３Ａ４反応混合：２００μＭの６（２，３，４，５，６－ペンタフルオルベンジロキシ）－ルシフェリンまたは６－フェニルピペリジネキシリル－ルシフェリン（図１７－１８における３および５）、ならびに４０ｐｍｏｌ　ＣＹＰ３Ａ４　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）／ｍｌ

ＣＹＰ２Ｄ６用の４×コントロール反応混合：４００ｍＭのＫＰＯ$_4$（ｐＨ７．４）、１４０μＭのルシフェリン－６－メチルエーテル　エチレングリコールエステル、および１００μｇ／ｍｌ　ｍｇ　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）昆虫細胞のコントロール膜

ＣＹＰ２Ｃ１９用の４×コントロール反応混合：２００ｍＭのＫＰＯ$_4$（ｐＨ７．４）、１００μＭのルシフェリン－Ｈ－エチレングリコールエステル、および１００μｇ／ｍｌ　Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）昆虫細胞のコントロール膜

ＣＹＰ３Ａ４用の４×コントロール反応混合：２００μＭの６（２，３，４，５，６－ペンタフルオルベンジロキシ）－ルシフェリンまたは６－フェニルピペリジネキシリル－ルシフェリン（図１７－１８における３および５）、ならびに４００μｇ／ｍｌ　Ｓｕ

ｐｅｒｓｏｍｅｓ（登録商標）昆虫細胞のコントロール膜
ルシフェリン－６－メチルエーテル　エチレングリコールエステル、およびルシフェリン－Ｈ－エチレングリコールエステルは、アセトニトリルに溶解させた１０ｍＭのストック溶液から希釈され、ＣＹＰ３Ａ４基質は、ＤＭＳＯに溶解させた５０ｍＭのストック溶液から希釈された。

【０８２６】

２×ＮＡＤＰＨ再生溶液は、上述のように調整された。試験阻害物質は、４×濃度において調製された。これらは、表３４に示すようにストック溶液からH_2Oに希釈された。一連の各４×阻害物質の希釈物は、ストックの等価物から始めて、最も濃度の高い４×溶液に使われている溶媒の量を加えたH_2Oに調整された。０阻害物質は、H_2Oに希釈したストック溶液の溶媒である。１２．５μｌの４×阻害物質の各希釈物が、Ｐ４５０用の不透明な白いウェルの３つにおよびコントロール反応用のウェルの３つに加えられた。４×Ｐ４５０反応混合物またはコントロール反応混合物のそれぞれは、４×阻害物質または０阻害物質の溶媒コントロールが入っている適切なウェルに１２．５μｌずつ加えられた。プレートは、３７℃のH_2O槽に１０分間、置かれた。それから、２５μｌの上記２×ＮＡＤＰＨ再生溶液を加えることによって、反応が開始された。プレートは、３７℃のH_2O槽において３０分間、インキュベートされた。上記反応が停止され、そして反応ごとに加えられた２０ユニット／ｍｌのブタのエステラーゼを含む５０μｌのＰ４５０　Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェリン検出試薬（プロメガ社）を加えることによって、発光が開始した。プレートは、室温に移され、かつ２０分間待った後に、プレート読み取り照度計（ＢＭＧラブテックによるポーラスターオプティマ、またはターナーバイオシステムによるヴェリタス（登録商標））上において、発光がＲＬＵとして読み取られた。コントロール反応における発光が、Ｐ４５０反応から減じられ、かつ曲線の当てはめ（変量の傾斜を有するＳ字の濃度反応）およびIC_{50}の計算が、ＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭ（登録商標）プログラムを用いて行われた。各阻害物質は、IC_{50}の特徴（表３５－３６）を有する双曲線の、濃度依存的な阻害を起こした。このデータは、左の環修飾およびＣ環修飾を有している２つのルシフェリン誘導体のそれぞれが、Ｐ４５０の阻害を調べるための２つの異なるＰ４５０酵素との反応において、どのように使用され得るかという例を提供している。

【０８２７】

【表３５】

ＣＹＰ阻害剤	ストック溶液（ｍＭ）	担体	４×（水に希釈）（ｍＭ）	１×担体の濃度
テルフェダジン	10	DMSO	0.1	0.25% DMSO
キニジン	20	H_2O	4	
ブフラロール	20	H_2O	4	
ベラパミル	20	H_2O	4	
クロトリマゾール	10	DMSO	4	10% DMSO
ニフェジピン	50	DMSO	4	2% DMSO
ニカルジピン	150	DMSO	4	0.67% DMSO
トロレアンドマイシン	10	アセトニトリル	0.4	1% アセトニトリル
ビュープロピオン	150	DMSO	4	0.67% DMSO
ハロペリドール	50	DMSO	0.1	0.05% DMSO
キニーネ	125	H_2O	4	
デブリソキン	100	H_2O	4	
ピンドロル	100	DMSO	4	1% DMSO
ジソピラミド	100	H_2O	4	1.6% アセトニトリル
（ｓ）－（＋）－メフェニトイン	50	アセトニトリル	3.2	
フルボキサミン	5	H_2O	0.004	
イソニアジド	50	H_2O	1.6	

【０８２８】

【表３６】

阻害剤	CYP2C19 IC_{50}（μM）	CYP2D6 IC_{50}（μM）	CYP3A46 (2,3,4,5,6-ペンタフルオルベンジロキシ)-ルシフェリン IC_{50}（μM）	CYP3A46-フェニルピペリジネキシリルールシフェリン IC_{50}（μM）
テルフェダジン	―――	3.6	―――	―――
キニジン	―――	0.01	―――	―――
ブフラロール	―――	37	―――	―――
ベラパミル	―――	67	―――	―――
クロトリマゾール	―――	22.6	―――	―――
ニフェジピン	―――	131	―――	19.8
ニカルジピン	―――	8	―――	―――
トロレアンドマイシン	―――	―――	0.14	―――
ビュープロピオン	―――	33	―――	―――
ハロペリドール	―――	18	―――	―――
キニーネ	―――	11	―――	―――
デブリソキン	―――	77	―――	―――
ピンドロル	―――	76	―――	―――
ジソピラミド	―――	220	―――	―――
（ｓ）－（＋）－メフェニトイン	69	―――	―――	―――
フルボキサミン	0.25	―――	―――	―――
イソニアジド	76	―――	―――	―――

【０８２９】

Ｃ．　Ｐ４５０アッセイ用のルシフェリン誘導体

２段階の形態においてＰ４５０酵素を検出するために有用なルシフェリン誘導体の多く：

（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）上にある６’エーテルの修飾、（４Ｓ）－４，５－ジヒドロ－２－（６－アミノベンゾチアゾリル）－４－チアゾールカルボン酸（アミノルシフェリン）上にある６’修飾、ならびに６’修飾されたＤ－ルシフェリンおよび６’修飾されたキノリルルシフェリンが調製された。特に、これらの誘導体は、これまでに調製された発光性基質（公開された米国出願２００４０１７１０９９号）と実質的に活性がない、または特定の酵素とともにより強い活性を示したＰ４５０酵素の発光性基質を同定する目的において、調製された。さらに、単独のＰ４５０酵素に対して向上された選択性を有する基質を同定することは、また興味深いものであった。以下に説明するように、新規なＰ４５０基質のほかにルシフェリンエステルが、カルボキシルエステラーゼの発光性基質であるということが同定された。

【０８３０】

ヒトＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９は、現在使用されている治療薬の多くを酸化する（Ｒｅｎｄｉｃ，　Ｄｒｕｇ　Ｍｅｔａｂ．　Ｒｅｖ．　３４：８３－４４８（２００２））。それゆえ、薬の開発の試みは、Ｐ４５０活性における上記化合物の修飾的な影響を目的として、ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９に対する新しい化学物質の選別を含んでいる。したがって、これらの酵素に対しては強力な試験が必要である。

【０８３１】

＜材料および方法＞
図２０について、昆虫細胞発現系（Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）、ディスカバリーラブウェア）に由来する、１または５ピコモルの組換えＣＹＰ２Ｄ６またはＣＹＰ２Ｃ１９の膜画分は、ＮＡＤＰＨ再生系（上述の通り）を有する５０ｍＭ（ＣＹＰ２Ｃ１９）または１００ｍＭ（ＣＹＰ２Ｄ６）のＫＰＯ$_4$（ｐＨ７．４）の５０μｌの体積における、２００μＭのＤ－ルシフェリン６’メチルエーテル（ルシフェリンＭＥ）とともに、３７℃において６０分間、インキュベートされた。１時間のインキュベートのあと、Ｐ４５０反応が停止され、かつＤ－ルシフェリンを生成したＰ４５０の検出が、５０μｌのルシフェリン検出試薬を加えることによって、開始された。図２０について、ヒトＰ４５０の調査対象の一群は、上述のように、選別された。上記ルシフェリン検出試薬（プロメガ社）は、５０μｌにつき１ユニットのブタの肝臓にあるエステラーゼを補われた。発光は、エステラーゼを有するルシフェリン検出試薬を添加した後、２０分間、相対的な光ユニット（ＲＬＵ）として読み取られた。

【０８３２】
＜結果＞
６’修飾を有するルシフェリンは、ＣＹＰ２Ｄ６および２Ｃ９の基質として、かつＰ４５０の発光性アッセイに使用するために調べられたが、有為な２Ｄ６または２Ｃ１９活性は、これらの化合物のほとんどとともに検出されなかった。ルシフェリン６－メチルエーテルは、これらの酵素といくらも活性を示さなかったが、上記活性は、検出が高い基質および酵素濃度、ならびに長いインキュベート時間を要求するという点について、穏やかであった（図２０）。

【０８３３】
カルボン酸基およびｐＨ７．４において負の電荷を有するＤ－ルシフェリン誘導体が、実際には、ほとんどＣＹＰ２Ｄ６の基質ではないであろうということを、上記文献が示唆した。ＣＹＰ２Ｄ６の活性部位のモデルは、アスパラギン酸を含んでおり、負に荷電されたアスパラギン酸が、負に荷電したルシフェリン誘導体と反発すると予想される（Ｅｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，２７０：２９０５５（１９９５））。ルシフェリン－６－メチルエーテルにおける負の帯電を排除するために、ルシフェリンＭＥのカルボキシルメチルエーテルが調製された。Ｐ４５０は、まず、通常のＯ－脱アルキル化を触媒して上記６’メチル基を除去し（Ｇｕｅｎｇｅｒｉｃｈ，Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ Ｔｏｘ．，１４：６１１（２００１））、Ｄ－ルシフェリンのカルボキシルメチルエーテルを生成する。ルシフェリンのカルボキシルメチルエーテルは、光を発するためにルシフェラーゼと反応すると予想されるが、通常のＰ４５０の発光性アッセイに使用されるルシフェリン検出試薬にエステラーゼを加えることによって、脱エステル化される。この試験手法を用いて、ルシフェリンＭＥのカルボキシルエステルを有するＣＹＰ２Ｄ６の活性が、ルシフェリンＭＥを有するその活性を超えて、実質的に増強されることが分かった。また、ルシフェリンＭＥのカルボキシルエーテルは、ＣＹＰ２Ｃ１９を含んでいるさまざまな他のＰ４５０と強く反応した（図２０）。

【０８３４】
デオキシルシフェリンのカルボキシルメチルエーテル（ルシフェリン－Ｈ）は、同じＰ４５０の対象試料の一群に対して選別され、かつ試験された他のものを超えて、ＣＹＰ２Ｃ１９との実質的な活性およびこの酵素に対する強い選択性を示した（図１７－１８における２６）。

【０８３５】
ルシフェリン－６－メチルエーテルおよびルシフェリンＨのカルボキシルメチルエーテルは、上記Ｐ４５０のインキュベート後における脱エステル化ステップを含むＰ４５０の発光性アッセイにとって、良好な基質であった（図１７－１８における２６および３３）。しかし、両方の化合物は、水性のＰ４５０試験緩衝液において可溶性が低い。可溶性を向上させるために、ルシフェリン－６－メチルエーテルおよびルシフェリンＨの付加的なエステルが調製された。ピコリニルエステルは、向上された水溶性およびＰ４５０の交差

反応についてさらに限られた様式を示した（図１７－１８における２７および３３）。ルシフェリンメチルエーテルのカルボキシルピコリニルエーテルは、２Ｄ６、１Ａ１および１Ａ２に対する優先傾向を示すと同時に、ルシフェリン－Ｈのカルボキシルピコリニルエステルは、２Ｃ１９、１Ａ１および１Ａ２に対する優先傾向を示した。これらの化合物の両方は、エステラーゼを用いた処理が最大限のシグナルを達成するために必要ではないという、予期しない性質を有していた。つまり、これらの試験においてエステラーゼを添加したときと添加しなかったときとを比較しても、シグナルにおける実質的な差異は、観察されなかった。

【０８３６】

これらの結果は、上記基質が２つの部位、すなわち、これまでに示唆されている上記６’部位と、ピコリニル基のメチレンとにおいてＰ４５０によって酸化されることを示唆している。ピコリニルメチレンにおけるヒドロキシル化は、分解してピコリニルアルデヒドおよびＤ－ルシフェリンを形成する不安定な化合物を作る。Ｐ４５０によって複数の部位上に与えられた基質の一連の酸化については、記述がある（Ｃａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．，　２６６：７７７４（１９９１））。かわりに、Ｐ４５０の調製物に存在するカルボキシルエステラーゼが十分であれば、これらは、ピコリニルエステル基の除去の原因になる。ルシフェリン－６メチルエーテルピコリニルエステルまたはルシフェリン－Ｈピコリニルエステルを用いる実験、カルボキシルエステラーゼを実質的に含んでいない、純化した組換えＣＹＰ２Ｄ６またはＣＹＰ２Ｃ１９の調製物を用いる実験は、ピコリニルエステルを除去するＰ４５０およびエステラーゼの役割を明確にした。１ユニットのブタのエステラーゼが純化されたＰ４５０反応に加えらたとき、２段階の試験形態において、熱安定性のルシフェラーゼとともに、大きなシグナルが生成された。これに対して、上記エステラーゼが加えられなかったとき、エステラーゼを加えたときのシグナルの１０％未満が観察された。この比較的に低いシグナルは、それでもなお、完全にＰ４５０活性が欠如した（必須のＰ４５０のコファクターであるＮＡＤＰＨが抑えられている）反応に由来するシグナルより大きい。ひとまとめにして考えると、これらの結果は、Ｐ４５０（本実施例におけるＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）が、ヒドロキシル化または脱アルキル化によって、Ｄ－ルシフェリンの６’メチルエーテルおよび６’デオキシルシフェリンピコリニルエステルの６’位を、それぞれ修飾していることを示している。また、第２の主要ではない反応であるピコリニルメチレンの酸化は、脱エステル化に導くＰ４５０によって触媒される。しかし、昆虫細胞の膜（Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標））において、組換えＰ４５０を用いて観察された主要な脱エステル化は、上記膜調製物に存在する非Ｐ４５０のカルボキシルエステラーゼ活性によって触媒された。後者の点は、蓄積物が、カルボキシルエステラーゼ反応の予想された生成物であるピコリニルアルコールだと観察され、一方において、Ｐ４５０が媒介する脱エステル化の予想された生成物であるピコリニルアルデヒドが観察されなかったという、Ｓｕｐｅｒｓｏｍｅ（登録商標）のＨＰＬＣ分析によって確かめられた（データは示さず）。

【０８３７】

また、ルシフェリン－６－メチルエーテルおよびルシフェリン－Ｈのエチレングリコールエステルが、調製された。これらは、Ｐ４５０と反応性であり、かつメチルエステルおよびピコリニルエステルよりも水性緩衝液において優れた安定性を有していた（図１７－１８における２４－２５）。ピコリニルエステルとは違って、上記エチレングリコールエステルは、最大の活性を実現するには、エステラーゼの添加を必要とした。エステラーゼを加えなかった場合には、シグナルの減少が観察された（図１７－１８における２４－２５）。

【０８３８】

Ｄ－ルシフェリンエステルは、Ｐ４５０用に使用されたものと同様の２段階の発光試験において、カルボキシルエステラーゼの基質であった。Ｄ－ルシフェリンメチルエステル、Ｄ－ルシフェリンエチルエステルおよびＤ－ルシフェリンピコリニルエステルは、この形態において、効果的であった。このことはまず、２１の組換えヒトＰ４５０の調査対象

の一群に対して選別されたときの、これらの化合物の内の２つからの結果によって示唆された。それらの実験において、Ｐ４５０は、通常、組換えＰ４５０膜画分がＰ４５０を欠如したコントロール膜画分に置き換えられたコントロール反応を用いて観察されたシグナルよりも、実質的により明るい光を発しなかった。シグナルは、複数のＰ４５０の間において変化したが、コントロールよりもはるかに明るいＰ４５０調製物はなかった。その結果、上記シグナルが、調製物におけるＰ４５０の活性よるものではなく、むしろカルボキシルエステラーゼ活性の量の変化によるものであると考えられる。また、Ｄ－ルシフェリンのメチルエステル、エチルエステルおよびピコリニルエステルは、あらゆるＰ４５０を有していない純化されたブタのエステラーゼにとっての基質として特徴付けられた。この形態において、エステルと関連する基は、続いて光を発するルシフェラーゼと反応するＤ－ルシフェリンを産生するために、上記エステルによって切断される。

【０８３９】

修飾が６’に形成されたという事実にもかかわらず、アミノルシフェリンを用いて実質的な光生成活性を示したいくつかの化合物があった。６’に修飾を有するＤ－ルシフェリンが、通常、ルシフェラーゼの光生成基質として実質的に損なわれるため、これは予期されなかったものである。１００μＭのジメチルアミノルシフェリンを用いた熱安定性のルシフェラーゼ反応は、１００μＭのアミノルシフェリンを用いた反応の明るさの半分しかなかった。また、この通常の現象は、Ｎ，Ｎ－ベンジル－メチル－アミノルシフェリン、Ｎ，Ｎ－ベンジル－エチル－アミノルシフェリンおよびイソプロピルアミノルシフェリンとともに事実であった。ルシフェラーゼと反応して、非ルシフェラーゼ酵素を用いて、前反応なしで十分な量の光を発するＮ，Ｎ　ビスベンジル　アミノルシフェリンのような他の化合物は、ルシフェラーゼにとって良好な基質である。独立してルシフェラーゼにとって良好な基質であるアミノルシフェリン誘導体は、本明細書において説明されている反応の発光様式において、非ルシフェラーゼにとっての基質を作製するという利益のために、さらなる誘導体化に用いる骨格として使用されてもよい。この場合において、発光性の脱離基は、ジメチルアミノルシフェリンのようなアミノルシフェリン誘導体であろう。

【０８４０】

このようにして、エステル基を有するルシフェリン誘導体は、カルボキシルエステラーゼ基質として有用であり、かつこれらの誘導体は、必ずしもＰ４５０酵素にとっての基質ではない。エステル基およびＰ４５０基質を有する他のルシフェリン誘導体は、上記エステル基を欠如している対応誘導体が少なくともいくつかのＰ４５０酵素の基質ではない、または弱い基質であるルシフェリン誘導体を含んでいる、Ｐ４５０基質として有用である。さらに、いくつかのルシフェリン誘導体、例えば、ピコリニルルシフェリン－ＭＥおよびピコリニルルシフェリン－Ｈにとって、外来性のエステラーゼは、内在性のエステラーゼ活性を有する試料において、Ｐ４５０活性を検出するために必要とされなくてもよい。

【０８４１】

Ｄ．　ヒト肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ誘導試験

ある化合物は、結果としてＣＹＰ３Ａ酵素活性の水準を向上させるＣＹＰ３Ａ遺伝子の転写を誘導する。それゆえ、肝細胞のような細胞においてＰ４５０酵素活性の水準に関するそのような誘導を検出するためには、プローブを有することが好ましい（Ｍａｎｄａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｄｒｉｇ　Ｍｅｔａｂ．　Ｄｉｓｐｏｓ．，　３１：４２１（２００３））。６－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリンおよび６－フェニルピペリジネキシリルルシフェリンは、肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ誘導を検出するプローブとして調べられた（図５１－５２）。肝細胞において発現されたこれらのほとんどを代表しているＰ４５０酵素の調査対象の一群のスクリーニングに由来する結果は、単にこれらの基質がＣＹＰ３Ａ酵素と十分な程度に反応するということを示唆した（図１７－１８）。

【０８４２】

リファンピシンは、原型的なＣＹＰ３Ａ４遺伝子の誘導因子であり、かつＰ４５０用発光性基質がヒト肝細胞の非崩壊的な細胞に基づくアッセイにおいて誘導を検出するために

使用可能か否かを決定するために使用された。

【０８４３】

上記Ｐ４５０用発光性基質である、６－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリンおよび６－フェニルピペリジネキシリルルシフェリンは、細胞に移入し、かつ内在性のＰ４５０と反応してＤ－ルシフェリンを生成することを期待して、培養肝細胞の培養液に加えられた。上記Ｄ－ルシフェリンは、次々と細胞から排出され、かつ上記培養液に蓄積することが期待された。それから、上記培養液は、試料採集され、かつＣＹＰ３Ａ４酵素によって生成されたＤ－ルシフェリンの量に比例して光を発するルシフェラーゼ反応混合物と混合された。

【０８４４】

ヒト肝細胞は、計画されたＣＹＰ３Ａ４細胞に基づくアッセイの方法を確かめるために使用された（図５１－５２）。コラーゲンで覆った９６ウェルのプレート上に新たにまいたヒト肝細胞は、キャンブレックスバイオサイエンス（ウォーカービル、メリーランド州）から得られた。細胞は、男性の提供者に由来し、かつ環境温度における９６ウェルのプレートにおいてほぼ密集して生きているものとして準備された。到着すると、プラスティックの接着密封がプレートから取り除かれ、かつ上記細胞は５％のＣＯ２および３７℃のインキュベータに２時間、出荷されたときの培養液（ｓｈｉｐｐｉｎｇ　ｍｅｄｉａ）においてインキュベートされた。２時間後に、出荷されたときの培養液が取り除かれて、ウェルごとに、あらかじめ３７℃に温めておいた０．１ｍｌの肝細胞培養培地（ＨＣＭ、キャンブレックス）と置き換えられた。プレートは、１時間、上記インキュベータに戻された。１時間後に、０．２５ｍｇ／ｍｌのマトリゲル（Ｍａｔｒｉｇｅｌ）（ＢＤバイオサイエンス、ベッドフォード、マサチューセッツ州）を補った、付加的な冷やした０．１ｍｌのＨＣＭが、既にある０．１ｍｌのＨＣＭに加えて、各ウェルに添加された。それから、プレートは一晩中、上記インキュベータに戻されていた。翌日、培養液が取り除かれて、１０μＭのリファンピシン（ＣＹＰ３Ａ誘導化合物）または溶媒（０．０２％のＤＭＳＯ）のみを含んだ、マトリゲルなしの０．１ｍｌのあらたな培養液に置き換えられた。細胞を試験化合物に２日間さらすために、リファンピシンおよび溶媒を含んでいる培養液は、翌日に交換された。溶媒コントロールは、基準のＣＹＰ４５０活性を測定するために使用された。リファンピシンまたは溶媒に２日間さらした後、培養液が取り除かれて、５０μＭの６－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリンまたは６－フェニルピペリジネキシリル－ルシフェリン、あるいはＣＹＰ３Ａ４阻害物質ケトコナゾールを加えたこれらの基質を補った、０．１ｍｌのＨＣＭと置き換えられた。バックグラウンド発光の決定には、各発光性基質が、４つの空のウェル（細胞が入っていない）の一揃えに加えられた。リファンピシンを処理して誘導したＣＹＰ４５０活性の測定には、各発光性基質が、上記ＣＹＰ３Ａ４誘導因子リファンピシンを用いて処理した４つのウェルに加えられた。基準のまたはリファンピシン誘導のＣＹＰ４５０活性の測定には、ＣＹＰ３Ａ４阻害物質ケトコナゾールを加えた各発光性基質が、溶媒のみを用いて処理した４つのウェル、およびＣＹＰ３Ａ４誘導因子リファンピシンを用いて処理した４つのウェルに加えられた。

【０８４５】

試料は、上記発光性基質または阻害物質を加えた上記発光性基質とともに、４時間、インキュベートされた。発光性基質を用いた４時間のインキュベーションの終了において、１ｍｌの培養液は、室温において、９６ウェルの白い半透明の照度計のプレートにおける各ウェルから取り除かれて、０．１ｍｌのルシフェリン検出剤（プロメガ社）と混ぜ合わせられた。発光は、培養液とルシフェリン検出剤を混ぜ合わせた２０分後に、プレート読み取り照度計（ヴェリタス、ターナーバイオシステム）上において、読み取られた。バックグランドウェルの発光値の平均が、リファンピシン処理および未処理（溶媒コントロール）から引かれて、正味のＣＹＰ３Ａに依存する発光を示した。

【０８４６】

発光の基準の水準は、あきらかに基準のＣＹＰ３Ａ活性を反映している、溶媒コントロ

ールウェルにおいて見られ、かつリファンピシンによるこの活性の誘導は、両方の基質とともにコントロールを超えた発光の増強として反映された（図５１－５２）。ＣＹＰ３Ａ４による両方の発光性基質と両方の基準の、およびリファンピシン誘導の活性とのケトコナゾールによる阻害は、上記基準のおよび誘導された発光が発光基質とＣＹＰ３Ａ４の反応の結果であるという説明と一致している。６－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジルオキシ）－ルシフェリンを用いて測定された折りたたみの誘導は、６－フェニルピペリジネキシリル－ルシフェリンを用いて測定された誘導よりも大きかった。これは、リファンピシン誘導Ｐ４５０に対するこれまでの基質の選択性の向上、または肝細胞においてＰ４５０へのより良好な接近によるのでもあろう。上記結果は、両方の基質がＰ４５０酵素活性の水準においてＣＹＰ３Ａ遺伝子誘導を検出するプローブとして有用であることを示している。上記方法は、例えば、細胞生存アッセイを用いて試験化合物の細胞毒性を調べるような、付加的な解析にそれらが使用され得るように、完全に肝細胞から離れるという利点を有している。

【０８４７】

〔実施例６：ルシフェラーゼ基質〕

Ａ．　ホタルルシフェラーゼ

ホタルルシフェラーゼは、ルシフェラーゼが天然のルシフェリンを基質として使用する割合に匹敵する割合においてそれらがエーテルを形成するように修飾された、ルシフェリン誘導体を利用することが示されている。そのような化合物は、ルシフェラーゼによって利用され得ることは知られておらず、かつ実際に上記化合物の１つは、上記酵素にとっての基質ではないと報告された。さらに、上記データは、そのような誘導体の利用は、（１）ルシフェラーゼの不活性化および（２）ルシフェラーゼの蛍光標識を導くことができるが、ある化合物が光の産出を増強することを示した。

【０８４８】

＜材料および方法＞

ゲルおよびＨＰＬＣ停止溶液

固体のＥＤＴＡ（無酸）は、水とともにビーカーに入れられ、かつ上記溶液のｐＨは、ｐＨ７．０に調整された。それから、上記溶液の容積を調整して４００ｍＭのＥＤＴＡ溶液を生成した。

【０８４９】

酵素停止溶液

２０ｍＭのビストリス、ｐＨ６．５、２ｍＭのＥＤＴＡおよび１ｍｇ／ｍｌのウシ血清アルブミンを有する溶液が調製された。

【０８５０】

反応緩衝液（２×）

１００ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液、ｐＨ８．０、１０ｍＭの$MgCl_2$を有する溶液が調製された。

【０８５１】

ＤＴＴストック

固体のＤＴＴ（ジチオスレイトール）が水に溶かされ、それから固体の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ８．０に調整された。それから、上記溶液の体積を調整して１ＭのＤＴＴ溶液を生成した。

【０８５２】

＜結果＞

【０８５３】

【表３７】

反応物	反応緩衝液（２×）	１Ｍ　DTT	２０ｍＭ補酵素Ａ	ゲル／ＨＰＬＣ停止溶液	１０ｍＭ ATP	ルシフェリン
1	500μl	0μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンBE
2	500μl	0μl	50μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンBE
3	500μl	100μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンBE
4	500μl	0μl	0μl	100μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンBE
5	500μl	0μl	0μl	0μl	0μl	10μl 5mM ルシフェリンBE
6	500μl	0μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンME
7	500μl	0μl	50μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンME
8	500μl	100μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンME
9	500μl	0μl	0μl	100μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリンME
10	500μl	0μl	0μl	0μl	0μl	10μl 5mM ルシフェリンME

【０８５４】

表３７における上記溶液を生成した後に、すべての反応の体積は、水を用いて９９０μｌに調整された。反応は、反応にＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼ（プロメガ社、１４．９ｍｇ／ｍｌ）を加えることによって開始され、攪拌し、照度計のチューブに１００μｌを取り出し、かつ上記反応によって生成された光を読み取った。光の読み取りを行うと同時に、酵素停止溶液（氷上において４℃に冷やされたもの）を用いて５００μｌに希釈された１０μｌの反応試料は、混合して氷上に置かれ、かつ９０μｌの第２の反応試料は、１０μｌのゲル／ＨＰＬＣ停止溶液を加えて、チューブは－２０℃に置いた。タイマーは第１の反応の開始とともにスタートされ、かつ継続している反応の開始時間が記録された。１５分、３０分、４５分および６０分において、各反応は上述のように試料採集され、かつ上記照度計のチューブにおいて生成された光が測定された。７分および２２分において、上記照度計のチューブにおいて生成された光が読み取られたが、上記反応は、試料採集されなかった。

【０８５５】

すべての試料が採取された後に、酵素停止溶液に希釈した５０μｌの上記試料は、５０μｌのＳｔｅａｄｙ　Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ（プロメガ社）を用いて混合され、かつ生成された光は、１０分間、室温にインキュベートした後に測定した。これは、最初の反応においてルシフェラーゼ活性を測定した。

【０８５６】

ゲル／ＨＰＬＣ停止溶液を加えて凍らせた上記材料の試料は、融かされてＨＰＬＣによって分析され、さらに選択された試料は、ＳＤＳ　ＰＡＧＥローディングバッファーを用いて混合されて４－２０％のＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルにおいて分画され、かつＴｙｐｈｏｏｎ　Ｐｈｏｔｏｉｍｅｇｅｒにおいて可視化された。

【０８５７】

＜結果＞

上記反応からの発光について、以下の読み取りが得られた（表３８）。

【０８５８】

【表３８】

時間における光読取値

反応物	基質	添加	0分	7分	15分	22分	30分	45分	60分
1	ルシフェリンBE	添加無し	135.2	22.61	12.79	9.256	6.928	4.879	3.331
2		+Co A	139.5	11.92	10.99	9.941	7.379	7.284	6.433
3		+DTT	948	532.8	417	369.5	331.6	273.5	226.9
4		+EDTA	1.004	0.771	0.639	0.562	0.461	0.425	0.354
5		ATP無し	0.015	0	0.008	0.005	0	0	0.01
6	ルシフェリンME	添加無し	23.46	3.144	1.767	1.317	1.22	0.982	0.851
7		+Co A	18.31	2.276	1.239	1.178	1.145	0.916	0.714
8		+DTT	38.69	6.42	4.073	3.31	2.708	2.202	1.996
9		+EDTA	1.067	0.117	0.058	0.042	0.024	0.046	0.012
10		ATP無し	0	0.017	0.016	0	0	0.017	0.011

【０８５９】

ＨＰＬＣによる試料の分析は、上記ルシフェリンの少なくとも２０％が、上記反応物を除いて、反応溶液にＡＴＰが加えられていない、またはＥＤＴＡが存在している試料が採取されたあと１５分という時間までに使用されることを示した。これらの反応において、誘導体の使用は、これらの条件下においてほとんど見られなかった。

【０８６０】

試料における活性な酵素からの発光について、以下の読み取りが得られた（表３９）。

【０８６１】

【表３９】

時間における残りの活性な酵素に由来する光読取値

反応物	基質	添加	0分	15分	30分	45分	60分
1	ルシフェリンBE	添加無し	129.7	69.9	47.31	37.94	29.08
2		+Co A	186.7	179.6	179.4	157.9	161.8
3		+DTT	194	233.7	224.7	219.5	226.4
4		+EDTA	170	142.7	140.4	141.7	135.4
5		ATP無し	168.3	174.1	171.7	172.9	164
6	ルシフェリンME	添加無し	141.7	35.4	91.82	85.72	81.76
7		+Co A	163.3	161.8	147.7	144.7	145.6
8		+DTT	170	172.3	164.3	161.6	167.6
9		+EDTA	150.5	150	152.1	152.8	151
10		ATP無し	170	168.9	175.6	181.9	173.6

【０８６２】

上述の残余の活性な酵素の表におけるデータから分かるように、添加物なしの反応を除いて、上述の反応においてわずかな差が残余の酵素水準に見られた。添加物のなしの上記反応は、上記反応に存在する上記誘導体に依存する降下の大きさとともに時間依存的な降下を示している。

【０８６３】

これらの反応試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥとこれに続く、Ｔｙｐｈｏｏｎ　ｉｍｅｇｅｒを用いたゲルの画像の可視化によって、なにも加えられていない反応における上記タンパク質が、時間依存的な様式において蛍光的に標識されることが示された。

【０８６４】

このようにして、ルシフェリン誘導体の実質的な、および時間に依存する枯渇は、ルシフェリンが非常に活性である（添加なし、あるいは補酵素ＡまたはＤＴＴの添加をともなう上述の反応）、光の産出が上記誘導体とともに反応に見られる、という条件下においてみられ、さらに酵素の不活性およびタンパク質の標識がいくつかの条件下に見られた。したがって、この酵素は、これらのルシフェリン誘導体を使用することができる。上述のように、ルシフェリンの酸素がエーテル結合にある誘導体は、ルシフェリンにとっての基質でないという文献に報告されており、このことから、これらの材料が有効な基質であるという事実は、驚くべきことである。

【０８６５】

表４０における溶液を生成した後に、すべての反応の体積は、水を用いて９９０μｌに調整された。反応は、反応にＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼ（プロメガ社、１４．９ｍｇ／ｍｌ）を加えることによって開始され、攪拌し、照度計のチューブに１００μｌを取り出し、かつ上記反応によって生成された光を読み取った。光の読み取りを行うと同時に、酵素停止溶液（氷上において４℃に冷やされたもの）を用いて５００μｌに希釈された１０μｌの反応試料は、混合して氷上に置かれ、かつ９０μｌの第２の反応試料は、１０μｌのゲル／ＨＰＬＣ停止溶液を加えて、チューブは－２０℃に置いた。タイマーは第１の反応の開始とともにスタートされ、かつ継続している反応の開始時間が記録された。１５分、３０分、４５分および６０分において、各反応は上述のように試料採集され、かつ上記照度計のチューブにおいて生成された光が測定された。７分および２２分において、上記照度計のチューブにおいて生成された光が読み取られたが、上記反応は、試料採集されなかった。

【０８６６】

【表４０】

反応物	反応緩衝液（２×）	１Ｍ ＤＴＴ	２０ｍＭ 補酵素Ａ	１０ｍＭ ＡＴＰ	ルシフェリン
3A	500μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリン
3B	500μl	0μl	50μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリン
3C	500μl	100μl	0μl	10μl	10μl 5mM ルシフェリン
3D	500μl	0μl	0μl	0μl	10μl 5mM ルシフェリン
4A	500μl	0μl	0μl	10μl	10μl 5mM 20HETox ルシフェリン
4B	500μl	0μl	50μl	10μl	10μl 5mM 20HETox ルシフェリン
4C	500μl	100μl	0μl	10μl	10μl 5mM 20HETox ルシフェリン
4D	500μl	0μl	0μl	0μl	10μl 5mM 20HETox ルシフェリン

【０８６７】

以下の光の読み取りは、ターナー２０／２０上において集められた（表４１および４２）。

【０８６８】

【表４１】

天然のルシフェリンのデータ　　時間

Rx	Rx. ﾀｲﾌﾟ	0	7	15	22	30	45	60
3A	添加物無し	検出限界を超えた	検出限界を超えた	1,920,967,552	1,340,545,280	1,080,656,384	698,897,920	507,915,488
3B	+Co A	検出限界を超えた	検出限界を超えた	1,817,884,672	1,207,508,736	1,075,446,272	727,134,016	516,780,608
3C	+DTT	検出限界を超えた	検出限界を超えた	検出限界を超えた	1,828,845,952	1,369,086,080	882,840,768	640,560,896
3D	ATP無し	1,013,266	7,266	2,253	248,151	194,980	27,586	22,270

【０８６９】
【表４２】

２ヒドロキシ　エトキシエーテル　ルシフェリン

Rx	Rx. タイプ	0	7	15	22	30	45	60
4A	添加物無し	749,597	114,541	63,691	259,945	233,600	51,233	44,782
4B	+Co A	810,864	125,718	63,287	326,424	169,972	78,909	45,156
4C	+DTT	2,515,513	294,885	146,849	335,031	237,487		67,064
4D	ATP無し	87	106	387,497	218,745		11,499	20,100

【０８７０】
上記反応からのＨＰＣＬプロファイルは、これらの反応において反応しなかったルシフェリン基質を表すピークが、ＡＴＰを加えていない反応を除いて、非常によく似た割合において減衰していることを示した。この割合は、ルシフェリンＢＥおよびルシフェリンＭＥの使用について見られる割合と非常によく似ていた。
【０８７１】
上記試料において上記活性な酵素からの発光に対する以下の光の読み取りが、得られた（表４３）。
【０８７２】
【表４３】

試験時間（分）

反応物	0	15	30	45	60
3A	183.6	170.7	175.6	164.6	146.5
3B	243.6	218.2	211.1	208.2	192.1
3C	188.7	203.9	187.9	191.5	188.7
3D	199.9	194.2	190.4	197.4	194.2
4A	153.2	124.8	111.6	108.4	102.5
4B	207.7	202.5	172.8	191.3	180.8
4C	185.6	190.8	188.1	199.7	190.6
4D	174.3	178.3	176.2	182.2	192

【０８７３】
ＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼによる天然のルシフェラーゼの変化に由来する光の産出は、ルシフェラーゼ活性の大きな低下を導かない（表４３における反応３Ａを参照のこと）と同時に、２－ヒドロキシエトキシルシフェリン誘導体の変化は、酵素活性における有為な、かつ実質的な低下を導く（表４３における反応４Ａを参照のこと）。これは、例えば、ＤＴＴ（表４３における反応４Ｃを参照のこと）のようなさまざまな化合物の存在によって、非常に大きく拡大することを防止されている。これらには、ＱｕａｎｔｉＬｕｍ酵素によるルシフェリンの急速な代謝回転がいくつかの酵素の不活化を導くという報告があり、これと同時に、ルシフェリン誘導体を用いた反応にとっての不活化の割合は、はるかに急速であると思われる。さらに、ＱｕａｎｔｉＬｕｍ酵素とともにルシフェリンの酸素エーテル誘導体を用いた反応に対するＤＴＴの含有は、光の産出を増強した。
【０８７４】
上記試料のＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析は、弱い蛍光タンパク質のバンドが反応３Ａおよび４Ａにおいて形成されるが、他の反応条件下においてバンドが形成されないことを示した。
【０８７５】
これらの反応のＨＰＬＣプロファイルが、天然のルシフェリンに関して言えば、上記ルシフェリン誘導体にとっての基質の消失の割合とおよそ等しいことを示したので、修飾さ

れた基質およびルシフェリンにとっての割合は、およそ同じである。上記誘導体を用いた反応にとっての光の産出が、天然のルシフェリンにとっての光の産出よりもはるかにひくいので、ＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼによるこれらの誘導体の代謝回転は、天然のルシフェリンが有するような効率的な光の産出という結果を生じない。

【０８７６】

Ｂ．　骨格

本実施例において、実施された実験は、いくつかのルシフェリン誘導体による光の産出が、上記ルシフェリンと接触した特定の化学基に依存していることを示している。しかし、得られている１つの一般的な観察は、アミノルシフェリン誘導体がルシフェリンのオキシエーテルよりもはるかに光を生成するということである。このようにして、アミノルシフェリンの基幹は、ルシフェラーゼの基質、または非ルシフェラーゼ酵素にとっての基質であって、ルシフェラーゼの前駆基質である誘導体である、他のルシフェリン誘導体を調製する骨格として使用されてもよい。なお、ルシフェラーゼの前駆基質とは、非ルシフェラーゼ酵素と反応した後に、例えば、ジメチルアミノルシフェリンまたはイソプロピルアミノルシフェリンなどのアミノルシフェリン誘導体である生成物を産生する。

【０８７７】

＜材料および方法＞

ＤＴＴ、補酵素ＡおよびＱｕａｎｔｉＬｕｍストック溶液は、本明細書において記載されているものと同じである。

【０８７８】

酵素添加溶液は、４００ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．０、４０ｍＭの$MgCl_2$、２００μｇ／ｍｌのウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、４００μＭのＡＴＰおよび８μｌのＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼ（１４．９ｍｇ／ｍｌ）を有するものとして調製された。この溶液が水を用いて１対１に希釈されて、“添加なし”と標識された酵素溶液を作製した。この溶液が４００ｍＭのＤＴＴ、ｐＨ８．０の溶液を用いて１対１に希釈されて、＋ＤＴＴと標識された溶液を作製した。この溶液が４ｍＭの補酵素Ａの溶液を用いて１対１に希釈されて、＋Ｃｏ　Ａと標識された溶液を作製した。最後に、この溶液が４ｍＭの補酵素Ａおよび４００ｍＭのＤＴＴの両方を有する溶液を用いて１対１に希釈されて、＋Ｃｏ　ＡおよびＤＴＴと標識された溶液を作製した。

【０８７９】

＜結果＞

以下に一覧として示されたさまざまなルシフェリン誘導体は、５ｍＭのストック溶液から希釈されて、２００、１００、５０、２５、１２．５、６．２５および３．１２５μＭの誘導体を有する溶液を作製した。これらの溶液の内、５０μｌの試料が、照度計のマイクロタイタープレートのウェルに、列Ａ～列Ｇまでのそれぞれに、配置された。上記プレートの列Ｈは、５０μｌの水を入れられた。

【０８８０】

これらのプレートにおける反応は、１２連のマイクロピペットを用いて、ＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼを含む５０μｌの溶液を加えることによって開始された。上記複数の列に加えられた溶液は：列１、５および９には添加なしの溶液；列２、６および１０には＋Ｃｏ　Ａ溶液；列３、７および１１には＋ＤＴＴ溶液；および列４、８および１２には＋Ｃｏ　ＡおよびＤＴＴ溶液である。各プレート上の第１の列に上記酵素溶液を加えた後に、タイマーをスタートさせた。各プレート上の最後の列に上記酵素溶液を加えた後に、上記プレートは、密封され、かつヴェリタス照度計において読み取られた。以下の発光の値（表４４～４６）が得られた（“単独”は、添加なしを示している）。

【０８８１】

【表４４】

プレート1	ジメチルアミノルシフェリン				ジエチルアミノルシフェリン				メチルベンジルアミノルシフェリン			
誘導体濃度	単独	CoA	DTT	CoA+DTT	単独	CoA	DTT	CoA+DTT	単独	CoA	DTT	CoA+DTT
100	27421864	27183208	12461676	10059717	9082149	10142081	2180983	1960750	85579872	89117784	50806656	48409604
50	25967878	24213794	12561822	10272291	8176569	7206157	1826771	1538668	73867336	78390592	54238960	47965140
25	22309938	20845376	11892757	9925327	6763022	5623886	1304383	1067954	61572912	63598896	50632712	42613860
12.5	17014016	15077778	9239960	6714299	5418990	4485779	6826732	6455356	50528576	50418220	36663612	30367190
6.25	9091842	9170130	5998175	2602679	4009797	3457051	1657332	2612111	43052788	35730272	21756222	19738584
3.13	4526705	4109624	2766839	260502	2259570	1941060	47727	93423	34516960	23501282	8088743	9404429
1.07	304706	208370	702319	7119	656110	688887	5192	20592	25907602	12863007	929977	2037020
0	786	756	1135	1572	1154	1188	1802	4723	10614	8378	4621	2959

【０８８２】

【表４５】

プレート2	MAO#3				GST#4				GST#3			
誘導体濃度	単独	CoA	DTT	CoA+DTT	単独	CoA	DTT	CoA+DTT	単独	CoA	DTT	CoA+DTT
100	348013	741882	994617	1019425	2119	1853	1618	1990	16388	18343	21472	19129
50	179585	444494	868903	865209	1598	1366	1354	1729	17409	15440	22888	20009
25	272608	588881	733675	701503	1413	1026	1492	1640	15957	14791	21256	18145
12.5	252130	467021	525765	509896	1692	1275	1474	1891	11752	10674	16587	14298
6.25	201597	321914	348398	82531	1571	1562	1633	1730	7682	7149	11164	10423
3.13	131633	176814	200074	171233	1537	1635	1458	2034	4913	4832	9106	8826
1.07	94583	122510	111682	52637	1146	1533	1102	1714	3232	3081	5953	6964
0	528	450	734	1077	488	463	684	940	450	373	687	1299

【０８８３】

【表４６】

ﾌﾟﾚｰﾄ3	２ヒドロキシエトキシルシフェリンエーテル				ルシフェリンＢＥ				ルシフェリンＭＥ			
	単独	Co A	DTT	Co A+ DTT	単独	Co A	DTT	Co A+ DTT	単独	Co A	DTT	Co A+ DTT
100	53804	52640	128249	94724	31581	33199	54592	64460	3589	3389	5399	4550
50	38444	39320	98407	87170	30609	38349	80001	98716	2690	2704	4052	3635
25	27356	28679	76612	67303	40093	53097	84034	90306	2083	2224	3491	2992
12.5	19586	21636	61882	54630	40486	57996	94861	97371	1563	1768	2961	2510
6.25	14686	18532	48458	42815	38838	58288	100044	105912	1240	1673	2844	2882
3.13	10769	14986	36967	32555	32994	55778	86445	80626	1053	1360	3332	2853
1.07	8807	13847	24491	22105	29234	50144	57066	51799	1197	1523	3160	3180
0	462	852	952	1428	856	567	1294	1495	753	721	1378	1275

【０８８４】

このデータを収集しているときに達した所見は、高濃度のＤＴＴの存在が、ルシフェリンのアミノ誘導体からの光生成を減少させると同時に、ＤＴＴがオキシエーテル類縁物質からの光生成を増加させるというものであった。このようにして、これらのデータは、光生成が、上記誘導体の特定の濃度に依存して少なくとも３５０００倍にまで変化し、かつ上記誘導体の選択に依存して少なくとも１２０００倍にまで変化し得るということを明確に示している。

【０８８５】

Ｂ．　熱安定性のルシフェラーゼ

この実施例において、第２のルシフェラーゼは、ルシフェリン誘導体を使用することが示された。ふたたび、これらの基質の変化は、上記タンパク質が蛍光的に標識されるという方法において、上記タンパク質の共有結合性の修飾を導いた。

【０８８６】

＜材料および方法＞

熱安定性のルシフェラーゼ（米国出願６，６０２，６７７号におけるＬｕｃ　１４６－１Ｈ２を参照のこと）が、６．８ｍｇ／ｍｌの純化されたストックタンパク質濃度である純化形態において得られた。このストックは、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ、２００ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液、ｐＨ８．０および２０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$における２００μｇ／ｍｌの酵素溶液を有する酵素ストック溶液の生成に用いられた。

【０８８７】

ルシフェリンＢＥおよびルシフェリンＣＥＥ（プロメガ社）は、５ｍＭの初期の濃度から４００、８０および１６μＭの溶液に、水を用いて希釈された。

【０８８８】

溶液は、ｐＨが８．０に調整された１ＭのＤＴＴ、２０ｍＭの補酵素Ａ水溶液（両方とも上述の実施例に記載されている）、１００ｍＭのＡＴＰ溶液および水を用いて作製されて、以下の溶液：１００μＭのＡＴＰを有する溶液Ａ；１００μＭのＡＴＰおよび４ｍＭの補酵素Ａを有する溶液Ｂ；１００μＭのＡＴＰおよび４００ｍＭのＤＴＴを有する溶液Ｃ；ならびに１００μＭのＡＴＰ、４ｍＭのＡＴＰおよび４００ｍＭのＤＴＴを有する溶液Ｄを調製した。

【０８８９】

以下の反応が準備された（表４７）。

【０８９０】

【表４７】

反応物	ルシフェリンストック、量	水	溶液Ａ	溶液B	溶液C	溶液D
1	400μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
2	400μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
3	400μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
4	400μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
5	20μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
6	20μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
7	20μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
8	20μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
9	16μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
10	16μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
11	16μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
12	16μM ルシフェリンBE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
13	400μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
14	400μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
15	400μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
16	400μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
17	80μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
18	80μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
19	80μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
20	80μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
21	16μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	25μl	0μl	0μl	0μl
22	16μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	25μl	0μl	0μl
23	16μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	25μl	0μl
24	16μM ルシフェリンCEE 25μl	25μl	0μl	0μl	0μl	0μl
25	0μl	50μl	25μl	0μl	0μl	0μl

【０８９１】

＜結果＞

集めた後に、上記反応は、２５μｌの上述の熱安定性ルシフェラーゼ溶液を加えて、チューブの内容物と混合することによって開始された。５０μｌの試料は、すぐに取りだして照度計のチューブに置かれ、光が読み取られた。それから、上記チューブは室温においてチューブ立てに移された。光の読み取りが行われると同時に、（室温に保たれた）５μｌの残余の反応は、ｐＨ６．５の５０ｍＭのビストリス、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ、および４℃に予冷した１ｍＭのＥＤＴＡを有する溶液の４９５μｌを用いて希釈され、かつそのチューブは攪拌して、氷中に置かれた。照度計のチューブにおける試料による光の産出は、酵素を添加した後から２０分、４０分、６０分、９０分および１２０分において再読み取りされた。更なる５μｌの試料が取られて、酵素を添加した後から６０分および１２０分に、上述のように希釈された。これらのすべての読み取りおよび試料が取られると、５０μｌの希釈した試料は、照度計のチューブにおいて５０μｌのＳｔｅａｄｙ　Ｇｌｏと混合され、かつ上記チューブは、氷上において１０分間、インキュベートされた後に光の産出がターナーＴＤ２０／２０照度計上において読み取られた。

【０８９２】

照度計に直接に置かれた反応試料からの、以下の光の読み取りが得られた（表４８）。

【０８９３】

【表４８】

			時間（分）					
反応物	基質	添加物	0	20	40	60	90	120
1	ルシフェリンBE100	単独	160	48.21	19.25	8.305	2.843	1.311
2		+Co A	191.9	63.85	29.28	14.78	6.652	3.014
3		+DTT	148.7	77.9	48.39	32.26	21.71	14.25
4		+Co AおよびDTT	140.4	71.5	45.66	29.32	19.92	13.08
5	ルシフェリンBE25	単独	623.2	73.96	28.76	13.42	5.528	2.549
6		+Co A	972.4	127.4	58.9	31.96	17.54	9.727
7		+DTT	448.6	84.21	43.77	27.21	18.48	12.93
8		+Co AおよびDTT	402	85.37	45.87	27.94	18.94	13.13
9	ルシフェリンBE6.25	単独	785.5	62.64	22.11	11.22	5.189	2.995
10		+Co A	2575	207.1	83.73	45.54	24	14.42
11		+DTT	455.6	71.9	33.73	21.49	13.67	9.847
12		+Co AおよびDTT	436.9	80.41	38.47	22.83	16.08	12.01
13	ルシフェリンCEE100	単独	20.46	1.18	0.868	0.788	0.627	0.544
14		+Co A	97.88	10.3	7.127	5.562	3.969	2.845
15		+DTT	22.47	2.233	1.292	1.164	1.093	0.958
16		+Co AおよびDTT	25.41	3.278	2.027	1.666	1.27	1.157
17	ルシフェリンCEE25	単独	59.87	3.176	1.919	1.305	1.178	1.03
18		+Co A	489.2	45.45	25.08	16.96	11.03	7.309
19		+DTT	56.59	3.761	2.196	1.668	1.274	1.157
20		+Co AおよびDTT	57.98	5.721	3.272	2.192	1.379	1.174
21	ルシフェリンCEE6.25	単独	121	5.884	3.316	2.352	1.569	1.154
22		+Co A	1829	114	57.82	37.53	24.66	17.02
23		+DTT	72.52	5.903	3.073	2.089	1.431	1.125
24		+Co AおよびDTT	77.35	7.958	3.656	2.312	1.414	1.134
25	ルシフェリン無し	ATPのみ	198.8	1.177	0.123	0.119	0.101	0.089

【０８９４】

以下の表（表４９）は、Ｓｔｅａｄｙ　Ｇｌｏ試薬に希釈した反応試料を加えて得られた光の値を含んでいる。

【０８９５】

【表４９】

			読み込まれた試験時間		
反応物	基質	添加物	0分	60分	120分
1	ルシフェリンBE100	単独	1245	156.4	61.75
2		+Co A	1486	242.2	82.03
3		+DTT	1762	952.1	691
4		+Co AおよびDTT	1780	1016	778.7
5	ルシフェリンBE25	単独	1309	157.1	72.57
6		+Co A	1610	277.8	143.2
7		+DTT	1675	910.2	738.9
8		+Co AおよびDTT	1925	1102	836.3
9	ルシフェリンBE6.25	単独	2057	406.6	267.7
10		+Co A	1841	518.6	349.1
11		+DTT	1860	1173	1067
12		+Co AおよびDTT	1943	1235	1163
13	ルシフェリンCEE100	単独	1262	1203	1273
14		+Co A	1127	1055	770.5
15		+DTT	1168	501.5	1478
16		+Co AおよびDTT	1745	1319	1343
17	ルシフェリンCEE25	単独	1345	973.4	860.3
18		+Co A	1547	777.5	588.7
19		+DTT	1116	1372	1393
20		+Co AおよびDTT	529.6	1268	1329
21	ルシフェリンCEE6.25	単独	1402	1158	1073
22		+Co A	1647	976.8	921.4
23		+DTT	1631	1544	1695
24		+Co AおよびDTT	1836	1625	1622
25	ルシフェリン無し	ATPのみ	1415	1685	1863

【０８９６】

これらのデータは、試験した熱安定性のルシフェラーゼがこれらの２つのルシフェリン誘導体を基質として使用し得ることを示している。これらのルシフェリン誘導体および試験した上記ルシフェラーゼを用いて、ＤＴＴが、ＱｕａｎｔｉＬｕｍ酵素を用いて見られたような光の産出を劇的に刺激する能力を有しているとは思われない。しかし、ＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼを用いて見られたように、上記熱安定性のルシフェラーゼによるこれらの基質の使用は、上記反応にＤＴＴを加えることによって低減され得る上記酵素の不活化という結果を引き起こした。補酵素Ａの添加は光の産出の水準を向上させたが、この化合物は、添加物のみを用いた上記酵素の活性化の維持に関して、異なる影響を有すると思われる。また、上記不活化のいくらかの低減が、ルシフェリンＢＥを用いて見られ、かつ上記不活化の増強がルシフェリンＣＥＥを用いて見られた。

【０８９７】

＜要旨＞

ルシフェリンにおけるフェノール性水酸基が修飾されて酸素エーテルまたは誘導されたアミンになるように設計された誘導体は、驚くべきことに、ルシフェラーゼによって使用された。例えば、Ｎ－（３－ヒドロキシプロピル）－アミノルシフェリン（図７Ｂ）は、発光反応において十分な光の出力を供給する、ルシフェラーゼにとっての基質である。

【０８９８】
上記誘導体からの光の産出がさまざまな大きさの水準に変化したという事実もまた驚くべきことであった。本明細書において記載したように、最近のデータは、少なくともＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼとっての上記誘導体の利用は、天然のルシフェラーゼにおいて見られるものと同様の速さであり得るということを、明確に示している。しかし、光の産出がＤ－ルシフェリンからの光の産出と比べて１００００倍より少なくない。これは、光の産出は、誘導体が効率的に使用されているか否かを決定する、有効な手段ではないことを示している。このようにして、多くの上記誘導体から生成された光の水準が低いことは、実際における誘導体の急速な使用からの光の産出が低い水準であることよりもむしろ、天然のルシフェリンが非常に低い水準において混入したことが原因であると、誤って考えられ得る。
【０８９９】
例えば、Ｎ－（３－ヒドロキシプロピル）－アミノルシフェリン（図７Ｂ）は、発光反応において十分な光の出力を供給する、ルシフェラーゼにとっての基質である。
【０９００】
更なる研究によって、熱安定性のルシフェラーゼおよびＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼの両方が、いくつかの上記誘導体の存在下において活性化されたこと、およびＤＴＴのようないくつかの化合物が光の産出を変化させるかもしれないことが示された。光生成に関するＤＴＴの影響は、採用したルシフェラーゼと誘導体との特定の組み合わせに依存して、光の産出に関して影響なし、光の産出の増強、または光の産出の減少のいずれかの結果になり得る。さらに、補酵素Ａといった他の化合物は、ルシフェリン誘導体からの光の産出を実質的に増強したが、それは、ルシフェラーゼと誘導体との特定の組み合わせに依存して、（１）酵素の不活化の割合を向上させる、（２）酵素の不活化に関して明確な影響がない、または（３）酵素の不活化の割合を大幅に減少させるかもしれない。
【０９０１】
ＤＴＴのようなチオール化合物は、天然のルシフェリンの変化の間におけるルシフェラーゼの不活化を防止することが示されており、補酵素Ａが光の産出を刺激し得るという本発明におけるルシフェリン誘導体を用いた結果は、以下の理由から意外なものであった。つまり、その理由は、上記誘導体が未知のものであり、かつルシフェラーゼにとっての基質であるか否かが知られていなかったこと、そして、ルシフェリンのフェノール性の酸素が基質として機能するルシフェリンにとって非常に重要であると考えられていたため、少なくともいくつかの上記誘導体が基質であると予想されていなかったことである。もし、上記誘導体が基質ではないだろうというのであれば、ルシフェラーゼによるそれらの生体内変換が上記酵素の不活化を導くという予想に対する理由がなくなるだろう。さらに、上記誘導体が上記酵素を不活化することについて知られていなかったため、ＤＴＴが、ある誘導体を用いた反応における光の産出を変え得るという予想はされていなかったであろう。それゆえ、あらゆる特定の誘導体が上記誘導体の変化に由来する光の産出を実質的に増強し得ることを予想する理由はなかったであろう。これらの観察は、誘導体が変化することなく、ルシフェラーゼによって効率的に使用されるように、非常に高いバックグラウンドのシグナルを生成し得る基質の生成を最もよく回避される、特定の修飾を示唆している。加えて、そのような誘導体が使用されるという知見は、いくつかの誘導体が異なる濃度において使用されるときに予想外の光シグナルをなぜ産生するかを特定するかもしれない。さらに、ルシフェラーゼを不活化できる誘導体を特定することは、アッセイの発展に有用である。例えば、持続的な期間に渡って光のシグナルを生成するアッセイにとって、上記反応である消耗されてない誘導体による上記酵素の不活化を防止する試薬が、使用されてもよい。ルシフェラーゼの不活化を防止する試薬を含み、酵素的または化学的な過程によって変化したルシフェリン誘導体の量の測定に使用する、溶液が想像される。
【０９０２】
本明細書において記載された観察は、合成の方法を提供する。この方法は、変化していない誘導体が光を産生し、かつ異なる誘導体がはるかに異なる水準の光を産生するという

観察に基づいている。これらの観察の以前において、ルシフェリン誘導体の変化を介する酵素のアッセイに有用なすべての基質は、天然のルシフェリンの一部分を産生する必要があると考えられていた。光が、ルシフェリン誘導体の変化に基づくルシフェリンによって産生されてもよいという理解は、酵素的な変化が、光の産生によって測定される天然のルシフェリンの産生を必要とせず、単に上記産生は、元の誘導体よりも測定的に異なる（大きいまたは小さいのいずれかの）光の産生の水準を有しているということを示した。この方法は、見込みのある基質の設計を簡略化し、かつ天然のルシフェリンを生成することなく、最も強い光のシグナルを生成する上記基質が、フェノール性の酸素に代えてアミノ基を含む、および上記アミノ基が第３アミンであり得るそれらであるということを示唆している。もしそうなら、付属の基がメチル基より大きくないと同時に、その他の基が少なくともベンジル基と同程度に大きいであろう。

【０９０３】

〔実施例７〕

フルオロルシフェリンを用いたルシフェラーゼ反応は、ｐＨ敏感性がより小さい。

【０９０４】

Ａ．　５’－フルオロルシフェリン

以下に示すように、ホタルルシフェラーゼ（ＱｕａｎｔｉＬｕｍ（登録商標）ルシフェラーゼ、Ｅ１７０、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、マディソン、ＷＩ）は、ルシフェリンを使用するよりもｐＨ依存性の低い５－フルオロルシフェリン（図２４）を利用した。

【０９０５】

＜材料および方法＞

ＱｕａｎｔｉＬｕｍルシフェラーゼは、１ｍｇ／ｍｌＢＳＡ（パートＢＰ１６０５－１００部、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＮＪ）を含むＧｌｏリジス緩衝液（パートＥ２６６Ｂ、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）中において１４．７ｎｇ／ｍｌとなるようにに希釈した。

【０９０６】

ルシフェラーゼシグナルのｐＨ依存性を検査するために、３つの緩衝液の１つであり、４つのｐＨのうちの１つににルシフェラーゼ検出試薬が含まれている。そして、この組合せは、ルシフェリンと５’－ルシフェリンとにおいて同一である。ルシフェラーゼ検出試薬は、２４ｍｌの水に０．１８５０ｇのＤＴＴ（Ｖ３１５５、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、０．０１２１ｇのＡＴＰ（パート２７－１００６－０１、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＮＪ）、８０μｌのｐＨ８．０である０．５ＭＣＤＴＡ原料（ＡＡ８４２、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、および２４０μｌの１Ｍ硫酸マグネシウム原料（ＡＡ３１９、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を含む原料溶液を用いて作製した。これを２つに等分し、そしてルシフェリン（Ｅ１６０２、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）または５－フルオロルシフェリン（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｉｎｃ．、ＣＡ）を、この溶液中において、７８７．５μＭの最終濃度となるように添加した。等分したこれらの溶液は、チューブに入れられ、そして緩衝液を８０ｍＭに増加させた。したがって、最終的なルシフェリン検出試薬は、８０ｍＭの緩衝液、３０ｍＭのＤＴＴ、５００μＭのＡＴＰ、１ｍＭのＣＤＴＡ、６ｍＭの硫酸マグネシウム、および６３０μＭのルシフェリンまたは５－フルオロルシフェリンを含む。

【０９０７】

緩衝液は、ｐＨ８．３２７、８．１００、７．８３３および７．６７３のＴｒｉｃｉｎｅ、ｐＨ７．８９２、７．７２０、７．５２１および７．３０３のＨＥＰＥＳ、およびｐＨ７．４９９、７．２９６、７．１３３、６．９００のＭＯＰＳを用いた。

【０９０８】

発光反応は、１００μｌのルシフェラーゼ含有溶液および１００μｌのルシフェラーゼ検出溶液を混合することから開始した。発光は、Ｖｅｒｉｔａｓ社製のプレート照度計（

Ｔｕｒｎｅｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて試料を１秒ごとに積算した。それぞれの結果において、Ｎは３（Ｎ＝３）である。

【０９０９】

＜結果＞

平均発光は、表５０にリストアップされている各試料のセットから測定した（相対標準偏差≦４．０％）。相対発光には、それぞれを３倍とした平均発光を、ｐＨ８．３でのルシフェリンベースのルシフェラーゼ検出試薬の平均発光で割ったものが示されている。

【０９１０】

【表５０】

pH	緩衝液	ルシフェリンの絶対発光 (RLU)	5-フルオロルシフェリンの絶対発光 (RLU)	ルシフェリンの相対発光 (8.3のルシフェリンにおける%)	5-フルオロルシフェリンの相対発光 (8.3ルシフェリンにおける%)
8.327	Tricine	1,463,179	317,030	100%	22%
8.100	Tricine	1,422,936	357,041	97%	24%
7.883	Tricine	1,254,769	357,883	86%	24%
7.673	Tricine	1,041,115	351,411	71%	24%
7.892	HEPES	976,654	377,498	67%	26%
7.720	HEPES	815,317	378,927	56%	27%
7.521	HEPES	661,829	360,308	45%	25%
7.303	HEPES	482,253	323,456	33%	22%
7.499	MOPS	707,832	334,288	48%	23%
7.296	MOPS	585,743	331,515	40%	23%
7.133	MOPS	490,814	325,337	34%	22%
6.900	MOPS	330,277	272,127	23%	19%

【０９１１】

ルシフェラーゼ検出試薬を含むルシフェリンの場合、試験を行ったｐＨ範囲において発光が約５倍以上に増加していたことがこれらのデータに示されている。一方、ルシフェラーゼ検出試薬を含む５’－フルオロルシフェリンの場合、発光は約４０％のみの変化である。さらに、ルシフェラーゼ検出試薬は、ルシフェリンを含むものよりも５’－フルオロルシフェリンを含むものの場合の方が緩衝液の組成に対する敏感性がより小さい。ルシフェリンを含む緩衝液がＨＥＰＥＳからＴｒｉｃｉｎｅ（トリシン）に変更される場合、ルシフェリン発光は、ｐＨ７．８９の試薬において２８％増加している。しかし、５’－フルオロルシフェリンを含む試薬は緩衝液を変更した場合であっても、６％の減少のみである。ルシフェラーゼ検出試薬を含む５’－フルオロルシフェリンのｐＨ敏感性は、ルシフェラーゼ反応が低いｐＨ（特には約６．９よりも低いｐＨ）で行われる場合、または異なる試料間においてｐＨが変化する場合（例えば、高く緩衝化されて測定される試料であっても、全ての試料において同じｐＨではない）において有利な効果を奏することとなる。したがって、５’－フルオロルシフェリンの骨格は、非ルシフェラーゼ酵素活性または化学活性の部位を含む限り、変更されてもよい。誘導体は、ルシフェラーゼ活性、非ルシフェラーゼ酵素活性、または化学活性を評価するために用いることができる。

【０９１２】

Ｂ．　他のフルオロルシフェリン

＜材料および方法＞

反応は、５’－フルオロルシフェリン、７’－フルオロルシフェリンおよびルシフェリンにより生成されたスペクトルを比較するために組み立てた。試薬は、２００ｍＭのＨＥＰＥＳ、２００ｍＭのＰＩＰＥＳ、１ｍＭのＣＤＴＡ、０．５％のテルジトールＮＰ－９、０．０３％のベンジルドデシルジメチルアンモニウムブロマイド、３０ｍＭのチオ尿素、３ｍＭのＡＴＰ、６ｍＭの硫酸マグネシウム、および０．５ｍＭのルシフェリンまたは

フルオロルシフェリンを用いて作製した。試薬のｐＨは、７．４であった。フルオロルシフェリンおよびＡＴＰを除いた全ての化合物は、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌから購入した。ＡＴＰは、Ａｍｅｒｓｈａｍ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。ルシフェリンおよび全てのフルオロルシフェリンは、Ｐｒｏｍｅｇａ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．において作製した。反応は、当量の試薬（０．５ｍｌ）および０．１％プリオネックス（登録商標）を含むＤＭＥＭ溶剤（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および２．９４×１０$^{-2}$ｍｇ／ｍｌのＱｕａｎｔｉＬｕｍ（登録商標）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加することから開始した。

【０９１３】

スペクトルは、Ｓｐｅｘ　Ｆｌｕｏｒｏｌｏｇを用いて、１ｎｍごとの増加で０．５秒の積算により測定した。

【０９１４】

ｐＨ滴定のための試薬は、１００ｍＭのＨＥＰＥＳ、１００ｍＭのＰＩＰＥＳ、１００ｍＭのＴｒｉｃｉｎｅ、１ｍＭのＣＤＴＡ、０．５％のテルジオールＮＰ－９、０．０３％のベンジルドテシルジメチルアンモニウムブロマイド、３０ｍＭチオ尿酸、３ｍＭのＡＴＰ、６ｍＭの硫酸マグネシウム、および０．１５ｍＭの７’－フルオロルシフェリンを用いて作製した。フルオロルシフェリンおよびＡＴＰを除いた全ての化合物は、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌから購入した。ＡＴＰは、Ａｍｅｒｓｈａｍ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。溶液のｐＨは、８．５から６．４の範囲において調整した。反応は、当量（０．１ｍｌ）の試薬、０．１％プリオネックス（登録商標）を含むＤＭＥＭ溶剤（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および１．４×１０$^{-5}$ｍｇ／ｍｌのＱｕａｎｔｉＬｕｍ（登録商標）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加することから開始した。

【０９１５】

発光は、Ｔｕｒｎｅｒ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｖｅｒｉｔａｓを用いてウェルを０．５秒ごとに測定することにより発光を測定した。

【０９１６】

ルシフェリンおよび５’－フルオロルシフェリンに対するＡＴＰ滴定のための試薬は、１００ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、０．５ｍＭのＣＤＴＡ、３０ｍＭのＤＴＴ、６ｍＭの硫酸マグネシウム、および０．５ｍＭの５’－フルオロルシフェリンまたはルシフェリンを用いて作製した。５’－フルオロルシフェリンおよびＤＴＴを除く全ての化合物は、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌから購入した。この試薬の一部に５ｍＭのＡＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加し、そして３．２倍希釈列（ｈａｌｆ－ｌｏｇｓ）によって連続的に希釈し、０．０５ｍＭとした。反応は、当量（０．１ｍｌ）の試薬、０．１％プリオネックス（登録商標）を含むＤＭＥＭ溶剤（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および１．４×１０$^{-5}$ｍｇ／ｍｌのＱｕａｎｔｉＬｕｍ（登録商標）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加することから開始した。

【０９１７】

７’－フルオロルシフェリンに対するＡＴＰ滴定のための試薬は、１００ｍＭのＨＥＰＥＳ、１００ｍＭのＰＩＰＥＳ、１００ｍＭのＴｒｉｃｉｎｅ、１ｍＭのＣＤＴＡ、０．５％のテルジオールＮＰ－９、０．０３％のベンジルドテシルジメチルアンモニウムブロマイド、３０ｍＭチオ尿酸、１０ｍＭの硫酸マグネシウム、および０．１５ｍＭの７’－フルオロルシフェリンを用いて作製した。この溶液は３つに分けた。それぞれの試薬のｐＨは、７．４、７．２および６．７であった。この試薬の一部に１０ｍＭのＡＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加した。ＡＴＰは、１．８倍希釈列（ｑｕａｒｔｅｒ－ｌｏｇｓ）によって連続的に希釈し、１０ｍＭ～０．３２ｍＭとした。

【０９１８】

反応は、当量（０．０３ｍｌ）の試薬、０．１％プリオネックス（登録商標）を含むＤＭＥＭ溶剤（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および１．４×１０$^{-5}$ｍｇ／ｍｌ

のＱｕａｎｔｉＬｕｍ（登録商標）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を添加することから開始した。

【０９１９】

Ｂｅｒｔｈｏｌｄ　Ｏｒｉｏｎ　ｌｕｍｉｎｏｍｅｔｅｒを用いて、０．５秒ごとにウェルを測定することにより発光を測定した。

【０９２０】

＜結果＞

５’－フルオロルシフェリンを用いたルシフェリン反応は、ルシフェリンを用いた反応よりも高い濃度でＡＴＰを飽和した（図５６）。５’－フルオロルシフェリンを含むルシフェラーゼ反応は、ルシフェリンを含む反応における線形範囲を超えるＡＴＰレベルの測定に用いることができる。

【０９２１】

他のフルオロルシフェリンにおいて、発光の強度は、ＡＴＰと共に増加する（図５７）。ＡＴＰの必要量は、７’－フルオロルシフェリンを含むホタルルシフェラーゼ反応において、当初予想されたよりも非常に高いものであった。一般的に、ＡＴＰのＫｍは、１ｍＭ以下である。したがって、７’－フルオロルシフェリンは、ルシフェリンを利用した反応における線形範囲を超えるＡＴＰレベルを量るためのホタルルシフェラーゼ反応において、用いることができる。

【０９２２】

５’－フルオロルシフェリンのλ_{max}は、約２５ｎｍであるため、通常のルシフェリンから青色側にシフトした光が生成され、７’－フルオロルシフェリンのλ_{max}は、約２１ｎｍであるため、通常のルシフェリンから赤色側にシフトした光が生成される。７’－フルオロルシフェリンを用いたホタルルシフェラーゼ反応における至適ｐＨは、約７．５であり、至適ｐＨが８．２であるルシフェリンと比べて非常に低い。ホタルルシフェラーゼ反応もまた、ｐＨ７．０以下であり、高い強度を維持している。

【０９２３】

このように、５’－フルオロルシフェリンはより低い至適ｐＨ（図５９）および約１０ｎｍ以上青色側にシフトしたスペクトル（図５８）を有しており、７’－フルオロルシフェリンは、より低い至適ｐＨおよび約２０～３０ｎｍ以上赤色側にシフトしたスペクトルを有している。５’－フルオロアミノルシフェリン、７’－フルオロアミノルシフェリン、および７’，７’－フルオロアミノルシフェリンは、それらのルシフェリンに相当する部位において同様の特性を有していることが予想される。

【０９２４】

低いｐＨで実施した反応は、製剤におけるチオールおよびルシフェリンの安定性を増加させ、試薬全体の安定性も増加する。さらに、低いｐＨで実施した反応は、低いｐＨでより強い光を生成する結合酵素反応を可能にし、かつより高い活性で実行する標的酵素反応を可能とすることができる。さらに、反応は、低いｐＨで高い発光強度を得ることができる（また、ＡＴＰアーゼまたはプロテアーゼのような他の酵素活性を低減するために用いることもできる）。加えて、スペクトルのシフトは、多重化においてスペクトルをより一層分離することができる。７’－フルオロルシフェリンおよび７’，７’－フルオロアミノルシフェリンにおいて、スペクトルシフトは、ＰＭＴに基づいた照度計において測定することができる発光を増加することができる。５’，７’－ジフルオロアミノルシフェリンもまた、同様の特性を有していると考えられる。７’－フルオロルシフェリンでは、発光反応において必要とされるＡＴＰの必要量が非常に高い。したがって、さらなる試薬の変更を行うことなく、ＡＴＰのＫｍが高い反応において用いることができる。

【０９２５】

＜要旨＞

要約すれば、自然のルシフェリンから生成する光は、ｐＨ６．５から８．５の範囲のｐＨにおいて格段に変化するが、フルオロルシフェリンでは、同じｐＨ値において大きな変化は見られない。この影響は、自然のルシフェリンでは、より高いｐＨ値でさらなる光を

産出するが、フルオロルシフェリンでは、少なくとも強い光を産出するものの、より低いｐＨではさらなる光は生成しないことに帰着する。したがって、これらの化合物は、ｐＨを低くして実施しなければならないような反応に重要である追加シグナルにおいて特に有用である。

【０９２６】

さらに、ハロゲン元素で置換した誘導体を含むいくつかの誘導体は、光の産出に直接的に利用することができる。そして、本発明における幅広い範囲のルシフェリン誘導体のうちの様々な誘導体は、光度におけるそれぞれの等級に応じて、光の産出量を変化することができる。

【０９２７】

フッ素置換したルシフェリンは、より小さい至適ｐＨを有しており、レポーター遺伝子の測定、ＡＴＰ依存アッセイ、キナーゼアッセイ、またはカップルアッセイなどのその他のアッセイに有用である。具体的なアッセイとしては、カスパーゼ－３／７、カスパーゼ－８またはカスパーゼ－９アッセイなどのカスパーゼアッセイ、またはカセプシンＢ、カセプシンＬもしくはカルパインアッセイなどである。また、例えば約ｐＨ７．２よりも低いｐＨにおいて最大活性をもつプロテアーゼにおけるプロテアーゼ部位を有する誘導体を用いたルシフェラーゼセンサーとしても有用である。

【０９２８】

フッ素置換したルシフェリンでは、そのスペクトルが約１０ｎｍ以上、青色側にシフトしているため、全ての発光アッセイにおいて有用である。特には、生体内の本来の場所（ｉｎ　ｓｉｔｕ）における発光測定または生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）における発光測定（培養液における生存細胞または生体動物イメージング）、レポート遺伝子アッセイ、およびセンサーとしてルシフェラーゼを用いたアッセイなどに有用である。

【０９２９】

フッ素置換したルシフェリンでは、そのスペクトルが約２０～３０ｎｍ以上赤色側にシフトしているため、２ステップの２重測定における色の消光の向上において有用である。具体的には、Ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼシグナルの測定、他の２重レポーター遺伝子アッセイ、１つ以上のレポーター遺伝子アッセイ（例えばプロテアーゼなど）を用いた非ルシフェラーゼ酵素における多重アッセイ、または生体内の本来の場所（ｉｎ　ｓｉｔｕ）における発光測定または生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）における発光測定（培養液における生存細胞または生体動物イメージング）などのような発光アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、およびセンサーとしてルシフェラーゼを用いたアッセイなどのようなその他の発光アッセイにおいて有用である。

【０９３０】

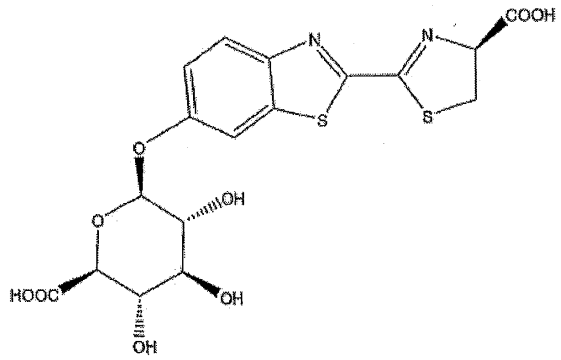
〔実施例８〕

（ベーターグルロニダーゼ用ルシフェリン誘導体）

ルシフェリン６’－グルクロニドは、ベーターグルクトニダーゼ（ＧＵＳ）の基質として設計された。５０ｍＭＭＥＳであり、ｐＨ６．３におけるこの化合物のＫｍ値は、１８０＋／－３０μＭであった。この化合物は、ＧＵＳ用蛍光基質であり、Ｋｍ値が５９＋／－８μＭである４－メチルウンベリフェリルグルクロニドと非常によく似ている。発光基質は、蛍光基質よりもより高感度であり、それぞれの検出限界は、発光基質が０．２８ｎｇ／ｍｌであるのに対して蛍光基質は２．０１ｎｇ／ｍｌである。ヒト酵素は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから調達した。ＧＵＳは、５０ｍＭＭＥＳ、ｐＨ６．３における基質と共に１５分間培養した。次に、当量のＰ４５０－Ｇｌｏルシフェリン検出試薬を添加し、発光を２分間測定した（表５１～５２）。

【０９３１】

【表５１】



基質（μM）	ＧＵＳ有り	ＧＵＳ無し
2548.0	1,335,243	209,219
849.3	994,977	91,975
283.1	696,778	34,127
94.4	423,619	13,091
31.5	232,533	5,068
10.5	107,502	2,190
3.5	46,210	1,108
0.0	612	451

【０９３２】

【表５２】

	シグナル対ノイズ	
GUS（ｎｇ/ｍｌ）	発光	蛍光
277.5	7300	861.4
138.8	3104	376.8
69.4	1411	164.6
34.7	649	76.5
17.3	296	34.7
8.7	133	15.6
4.3	68	7.5

【０９３３】

全ての刊行物、特許および特許出願が、本明細書において参照として援用される。本発明における上述の明細書は、その好適な特定の実施形態に関して説明しており、多様な詳述は、例証を目的として述べている。本発明は、さらなる実施形態も可能であり、本明細書等において説明した特定の詳述は、本発明の基本的な原則から逸脱することなく、大幅な変更が可能であることを、当業者であれば理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

【０９３４】

【図１】甲虫ルシフェリン（Ｄ－ルシフェリン）における、６員環（「Ａ環」または「環Ａ」）、中央の５員環（「Ｂ環」または「環Ｂ」）、および他の５員環（「Ｃ環」または「環Ｃ」）の環原子の番号付けを示す図である。

【図２】酵素のためのルシフェリン典型的な誘導体を示す図である。

【図３】５’フルオロルシフェリンの構造を示す図である。

【図４Ａ】酸化還元センサーとして役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。

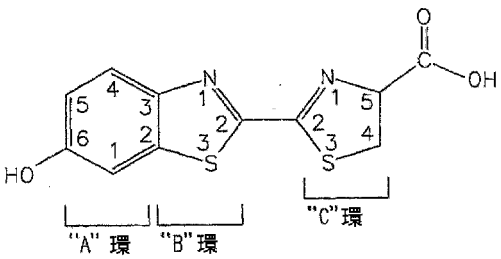
【図４Ｂ】酸化還元センサーとして役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。
【図５Ａ】典型的な基質を示す図である。
【図５Ｂ】典型的な基質を示す図である。
【図６】酸化還元の基質を示す図である。
【図７Ａ】他の典型的なルシフェリン誘導体を示す図である。
【図７Ｂ】他の典型的なルシフェリン誘導体を示す図である。
【図８Ａ】３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェリン誘導体（ルシフェリンエチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図８Ｂ】室温で２０分間インキュベートしたときの、アミノルシフェリン誘導体（イソプロピルウレタンルアミノルシフェリンメチルエステル；５０μＭ）を含み、エステラーゼ有または無しの反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図９】３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェリン誘導体（ルシフェリンメチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図１０】３７℃で２０分間インキュベートしたときの、エステラーゼおよびルシフェリン誘導体（Ｄ－ルシフェリンピコリニルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図１１】モノアミンオキシド（ＭＡＯ）の基質として役に立つ蛍光性誘導体の誘導体のグラフを示す図である。
【図１２Ａ】グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）を検出するのに役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。
【図１２Ｂ】グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）を検出するのに役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。
【図１３Ａ】ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体の誘導体のグラフ表示を示す図である。
【図１３Ｂ】ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体の誘導体のグラフ表示を示す図である。
【図１３Ｃ】ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体の誘導体のグラフ表示を示す図である。
【図１３Ｄ】ＭＡＯアッセイのためのルシフェリン誘導体の誘導体のグラフ表示を示す図である。
【図１４】フラビンモノオキシゲナーゼ（ＦＭＯ）基質として役に立つルシフェリン誘導体を示す図である。
【図１５】典型的なＦＭＯの基質を示す図である。
【図１６】典型的なＡＰの基質を示す図である。
【図１７】一連のルシフェリン誘導体、および、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれに関するＲＬＵを示す図である。
【図１８】一連のルシフェリン誘導体、および、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれに関するＲＬＵを示す図である。
【図１９Ａ】Ｐ４５０酵素を検出するのに役に立つ、典型的な誘導体の構造を示す図である。
【図１９Ｂ】Ｐ４５０酵素を検出するのに役に立つ、典型的な誘導体の構造を示す図である。
【図１９Ｃ】Ｐ４５０酵素を検出するのに役に立つ、典型的な誘導体の構造を示す図である。
【図２０Ａ】ルシフェリン－ＭＥに対するＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の活性のグラフを示す図である。
【図２０Ｂ】ルシフェリン－ＭＥに対するＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の活性のグラフを示す図である。

【図２１】ルシフェリン－ＭＥメチルエステルに対するＰ４５０の活性のグラフを示す図である。
【図２２】エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、ルシフェリン－ＭＥピコリニルエステルに対するＣＹＰ２Ｄ６の活性のグラフを示す図である。
【図２３】エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、ルシフェリン－Ｈピコリニルエステルに対するＣＹＰ２Ｃ１９の活性のグラフを示す図である
【図２４】Ｐ４５０酵素の一団の１つおよびルシフェリン誘導体（Ｃ環が修飾されているＤ－ルシフェリンエチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図２５】Ｐ４５０酵素の一団の１つおよびルシフェリン誘導体（Ｃ環が修飾されているＤ－ルシフェリンメチルエステル）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図２６】エステラーゼが存在するとき、または、存在しないときの、３つのＰ４５０酵素のうちの１つおよびルシフェリン－ＭＥ－エチレングリコールエステルを含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図２７Ａ】ルシフェラーゼ反応における、アミノルシフェリン誘導体（Ｎ－イソプロピルアミノルシフェリン）（５０μＭ）に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図２７Ｂ】ルシフェラーゼ反応における、アミノルシフェリン誘導体（ジメチルアミノルシフェリン；１００μＭ）およびアミノルシフェリン（１００μＭ）に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図２８】４’，６’ジメチルエーテルルシフェリンと、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれとの反応に関する、バックグラウンドに対するシグナルの割合のグラフを示す図である。
【図２９】ルシフェリン誘導体（２－（６－メトキシキノリン－２－イル）－４，５－ジヒドロチアゾール－４－カルボキシレート）と、Ｐ４５０酵素の一団のそれぞれとの反応に関する、バックグラウンドに対するシグナルの割合のグラフ表示を示す図である。
【図３０】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（２－（７－メチオキシ（ｍｅｔｈｙｏｘｙ）－キノキサリン（ｑｕｉｎｏｘａｌｉｎ）－２－イル）－４－５－ジヒドロ－チアゾール－４－カルボン酸）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３１】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－（（３－クロロ－４－（２－（ジメチルアミノ）－１－フェニルプロポキシ）ベンジロキシ）カルボニル）－６’－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３２】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン４－ピペリジンメチルエーテル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３３】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－（２－クロロエトキシカルボニル）－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３４】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（４’－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）メチル－６’（Ｏ－メチル）ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３５】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（４－（Ｎ，Ｎ－字メチルアミノエチル）－６－メトキシキノリルルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３６】図３６は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン２－（１－ピペラジン）エチルエーテル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３７Ａ】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メター－Ｎ－メチルピコリニルルシフェリンメチルエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフ

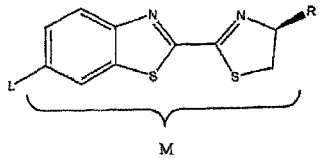
を示す図である。
【図３７Ｂ】室温で２０分インキュベーションしたときの、エステラーゼを用いているか、または、用いていない、ルシフェリン誘導体（メター－Ｎ－メチルピコリニルルシフェリンメチルエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３８】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メタンフェタミン－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図３９】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（Ｎ－イソブトキシカルボニル－アミノルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４０】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン－Ｈメチルエステル）、ならびにエステラーゼを含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４１】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（ルシフェリン－ＭＥエチレングリコールエステル）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４２】図４２は、Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（メトキシキノリルルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４３】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’（ｏ－トリフルオロメチルベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４４】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’メトキシ－ルシフェリン－ヒドラジド）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４５】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’－（３－（（４－フェニルピペリジン－１－イル））メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４６】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’－（２，４，６－トリメチルベンジロキシ）－ルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４７】Ｐ４５０酵素の一団の１つ、および、ルシフェリン誘導体（６’（４－クロロフェニルチオ）メトキシルシフェリン）を含んでいる、反応に関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図４８】ルシフェリン－F_5ＢＥ（６’－（２，３，４，５，６ペンタフルオロベンジロキシペンタフルオロベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【図４９】ルシフェリン－ＰＰＸ４ＦＥ（６’－（２，３，４，６－テトラフルオロ－５－（（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【図５０】ルシフェリン－ＰＰＸＥ（６’－（３－（（４－フェニルピペラジン－１－イル）メチル）ベンジロキシ）－ルシフェリン）を用いた、反応におけるニフェジピンによるＣＹＰ３Ａ４の活性の阻害を示す図である。
【図５１】ルシフェリン－ＰＰＸＥを用いた、反応において、リファンピシン、ケトコナゾール、または、リファンピシンおよびケトコナゾールにより処理した後の、ヒトの肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ４の活性を示す図である。
【図５２】ルシフェリン－F_5ＢＥを用いた、反応において、リファンピシン、ケトコナゾール、または、リファンピシンおよびケトコナゾールにより処理した後の、ヒトの肝細胞におけるＣＹＰ３Ａ４の活性を示す図である。
【図５３】ルシフェラーゼの基質の可能性がある、ルシフェリン誘導体（Ｎ－イソプロピルアミノルシフェリン、ビセチルアミノルシフェリン、およびベンジルアミノルシフェリン）を示す図である。
【図５４】異なるルシフェラーゼの基質の可能性がある、ルシフェリン誘導体の構造を示

す図である。
【図５５】異なるｐＨでのルシフェラーゼ反応における、ルシフェリンまたは５－フルオロルシフェリンに関するＲＬＵのグラフを示す図である。
【図５６】５’フルオロルシフェリンおよびルシフェリンのＡＴＰ滴定を示す図である。
【図５７】７’フルオロルシフェリンのＡＴＰ滴定を示す図である。
【図５８】様々なフルオロルシフェリンのスペクトルを示す図である。
【図５９】７’フルオロルシフェリンのｐＨ滴定を示す図である。
【図６０】ルシフェラーゼの基質として役に立つルシフェリン誘導体、および、非ルシフェラーゼの基質として役に立つルシフェリン誘導体の骨組みを示す図である。

【図１】

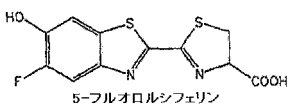


【図２】

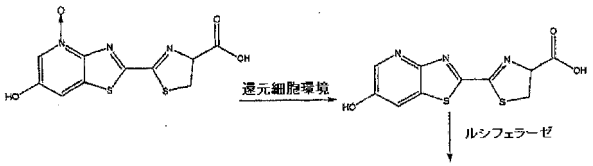


L	M	R	標的酵素
HO-	ルシフェリン	CH_2OH	アルコールデヒドロゲナーゼ
Boc-Orn(Ac)O-	ルシフェリン	CO_2H	ヒストンデアセチラーゼ
Boc-Lys(Ac)-HN-	ルシフェリン	CO_2H	ヒストンデアセチラーゼ
Suc-LLVY-HN-	ルシフェリン	CO_2H	プロテアソーム及びカルパイン基質
Z-KKR-SEVNLDAEFR-HN-	ルシフェリン	CO_2H	B-セクレターゼ基質
AAF-HN-	ルシフェリン	CO_2H	プロテアーゼ放出アッセイ
Z-FR-HN-	ルシフェリン	CO_2H	カテプシンB, Lアッセイ
Z-GGR-HN-	ルシフェリン	CO_2H	トロンビンアッセイ
Z-GPR-HN-	ルシフェリン	CO_2H	トロンビンアッセイ
Z-IEPD-HN-	ルシフェリン	CO_2H	細胞毒性応答CTL, グランザイムB
HO-	N-アセチル-2,3-ジヒドロルシフェリン	CO_2H	HRP基質
HO-	ルシフェリン	CO_2アミノ酸	マイコプラズマ

【図３】



【図４Ａ】



【図４Ｂ】

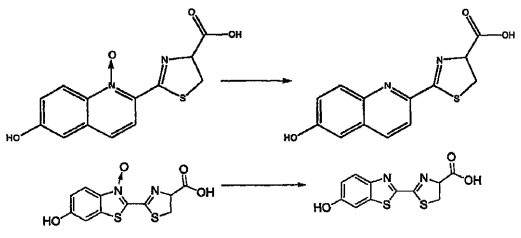


FIG. 4B

【図５Ａ】

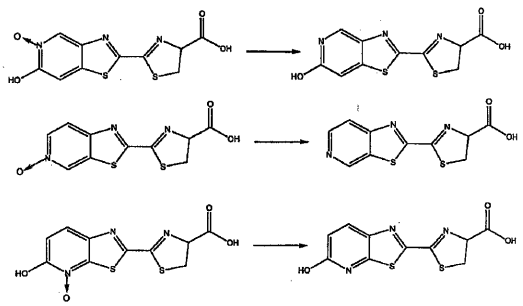
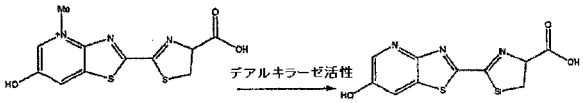


FIG. 5A

【図５Ｂ】



【図６】

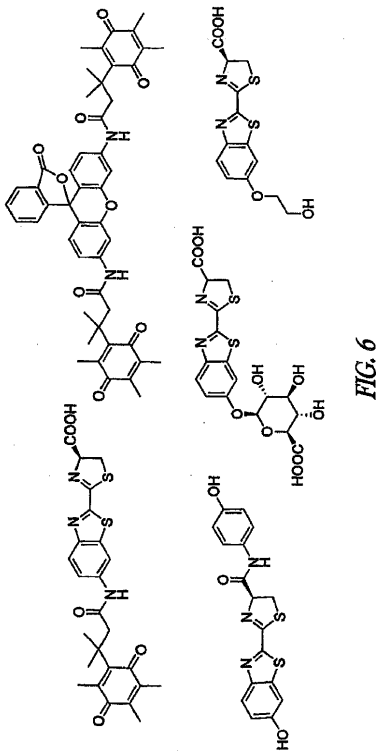


FIG. 6

【図７Ａ】

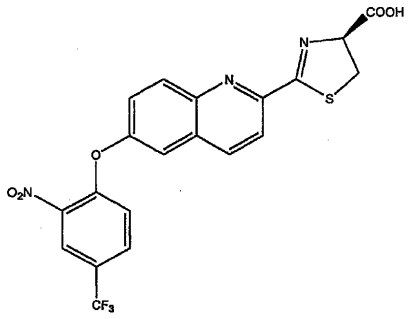


FIG. 7A

【図７Ｂ】

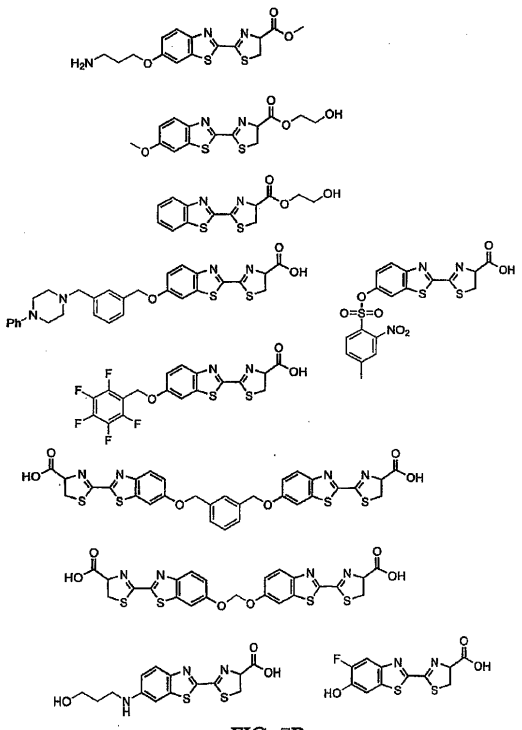
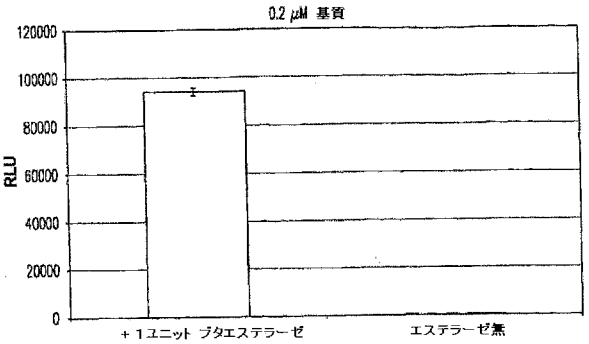
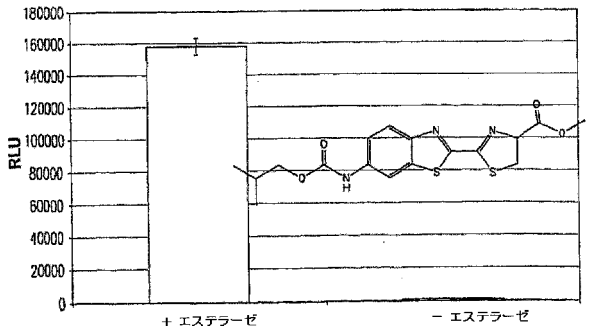


FIG. 7B

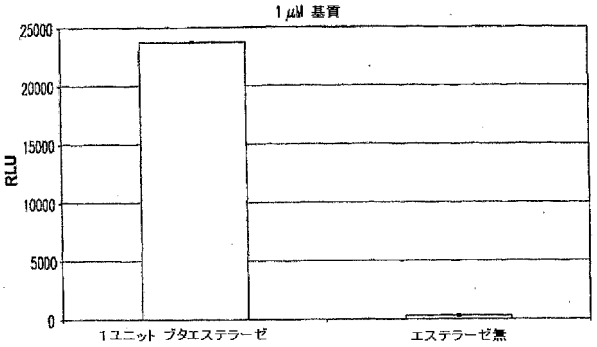
【図８Ａ】



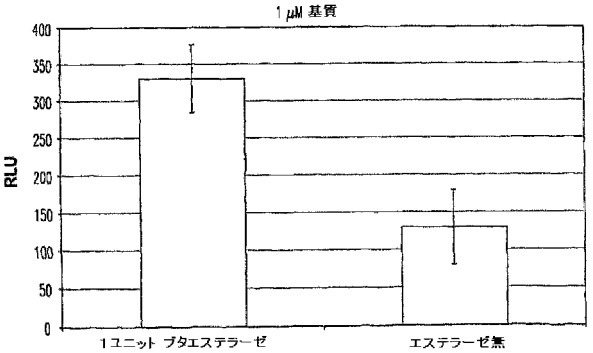
【図８Ｂ】



【図９】



【図１０】



【図１１】

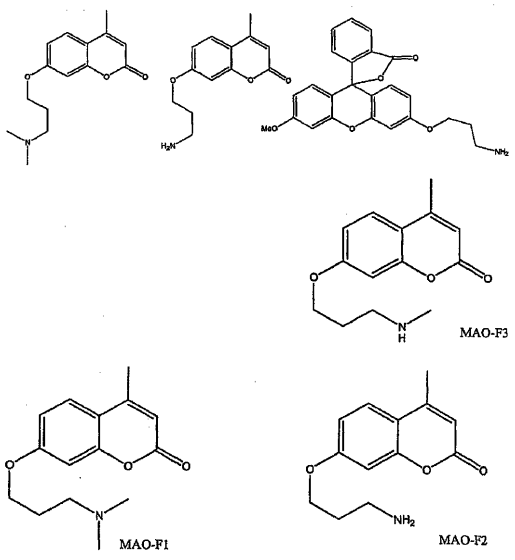


FIG. 11

【図１２Ａ】

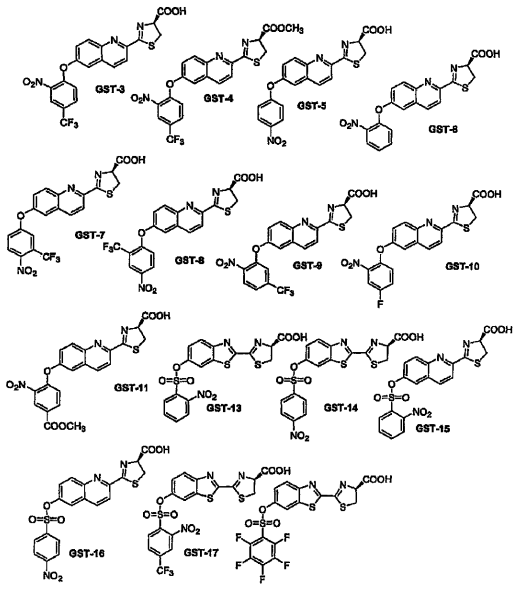


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

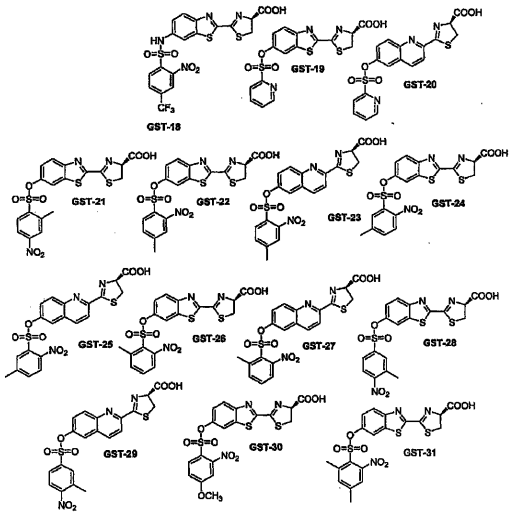


FIG. 12B

【図１３Ａ】

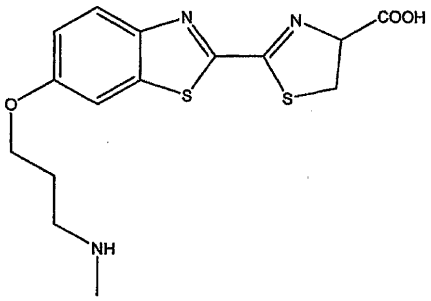


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

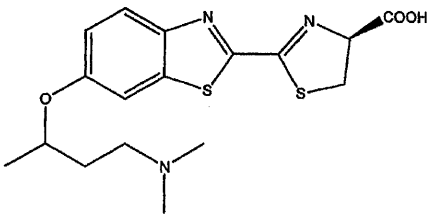


FIG. 13B

【図１３Ｃ】

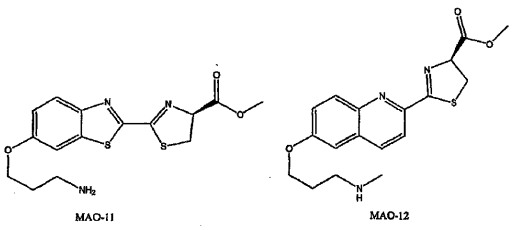


FIG. 13C

【図１３Ｄ】

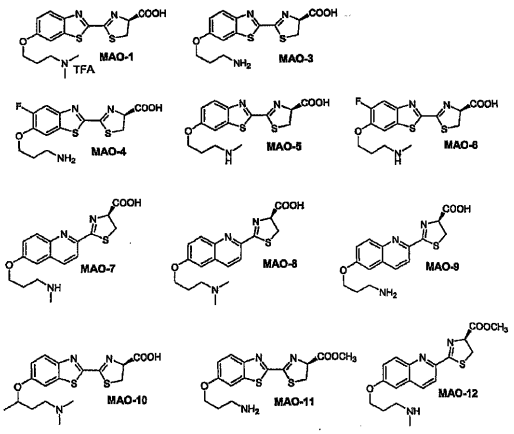


FIG. 13D

【図１４】

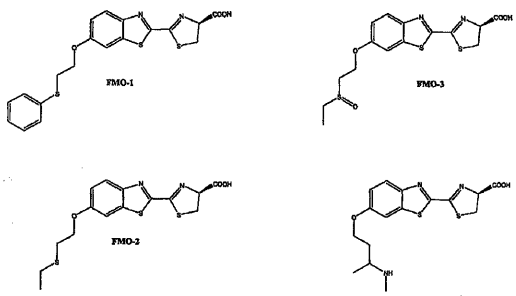


FIG. 14

【図１５】

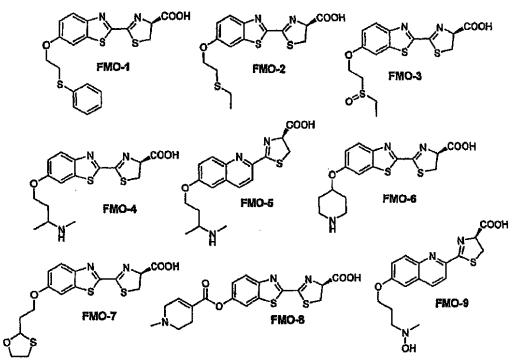


FIG. 15

【図１６】

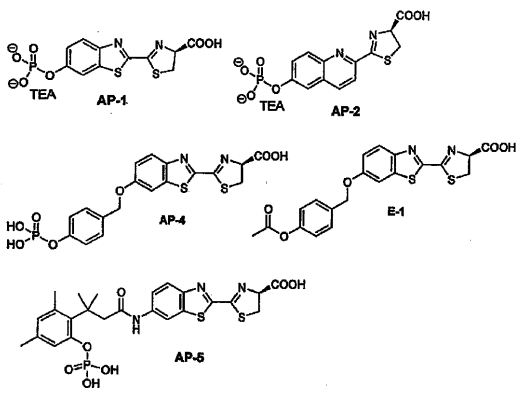
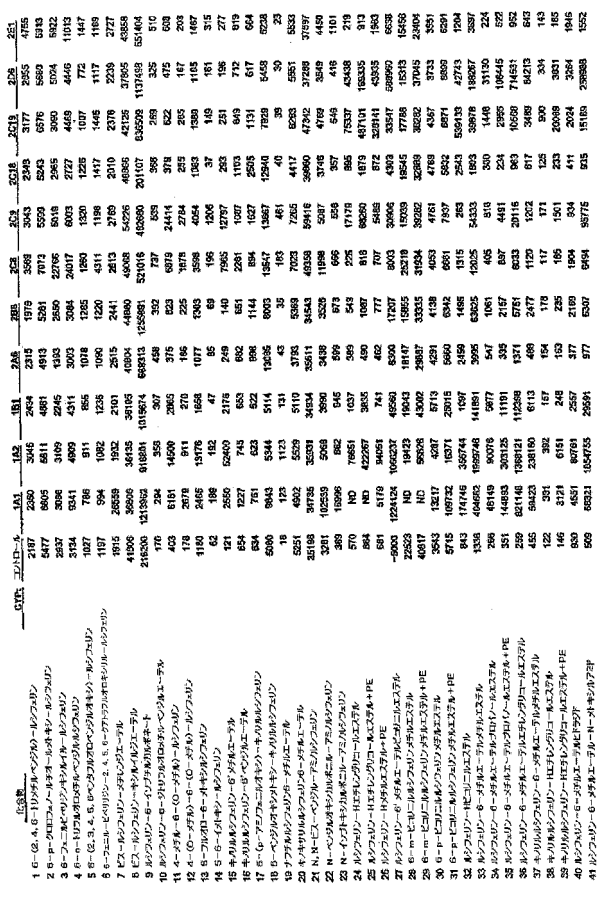
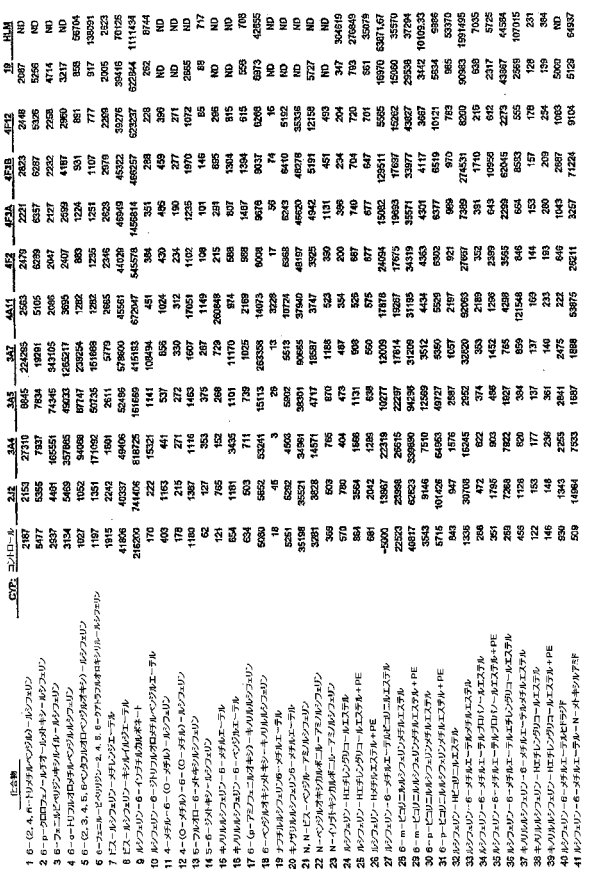


FIG. 16

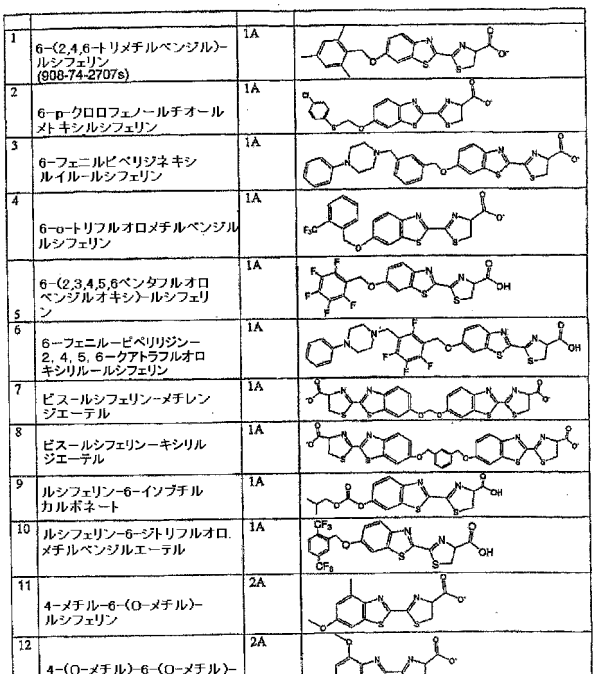
【図１７】



【図１８】



【図１９Ａ】



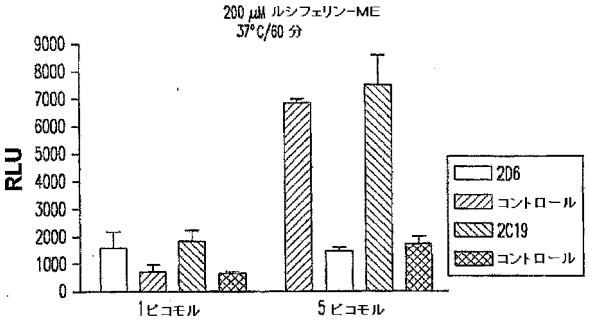
【図１９Ｂ】

14	5-6-ジメドキシールシフェリン	2A	
15	キノリルルシフェリン-6-メチルエーテル	1A 1B	
16	キノリルルシフェリン-6-ベンジルエーテル	1A 1B	
17	6-(p-アミノフェニルオキシ)-キノリルルシフェリン	1A 1B エステル	
18	6-ベンジルオキシメトキシ-キノリルルシフェリン	1A 1B エステル	
19	ナフチルルシフェリン 6-メチルエーテル	1A 1B	
20	キノザリルルシフェリン メチルエーテル	1A 1B	
21	N,N-ビス-ベンジル-アミノルシフェリン	1ANH	
22	N-ベンジルオキシカルボニル-アミノルシフェリン	1ANH	
23	N-イソプトキシカルボニル-アミノルシフェリン	1ANH	
24	ルシフェリン-Hエチレングリコールエステル	1A エステル	
26	ルシフェリン-Hメチルエステル	1A エステル	
27	ルシフェリン-6-メチルエーテルピコリニルエステル	1A エステル	

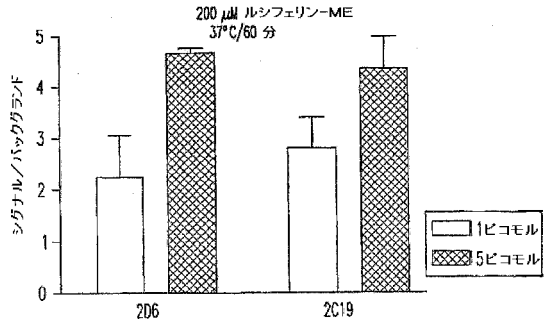
【図１９Ｃ】

28	6-m-ピコリニルルシフェリン メチルエステル	1A エステル	
30	6-p-ピコリニルルシフェリン メチルエステル	1A エステル	
32	ルシフェリン-Hピコリニル エステル	1A エステル	
33	ルシフェリン-6-メチルエーテル メチルエステル	1A エステル	
34	ルシフェリン-6-メチルエーテル プロパノールエステル	1A エステル	
36	ルシフェリン-6-メチルエーテル エチレングリコールエステル	1A エステル	
37	キノリルルシフェリン-6-メチル エーテルメチルエステル	1A 1B エステル	
38	キノリルルシフェリン-Hエチレン グリコールエステル	1A 1B エステル	
40	ルシフェリン-6-メチルエーテル ヒドラジド	1A ヒドラジド	
41	ルシフェリン-6-メチルエーテル -N-メトキシルアミド	1A メトキアミド	

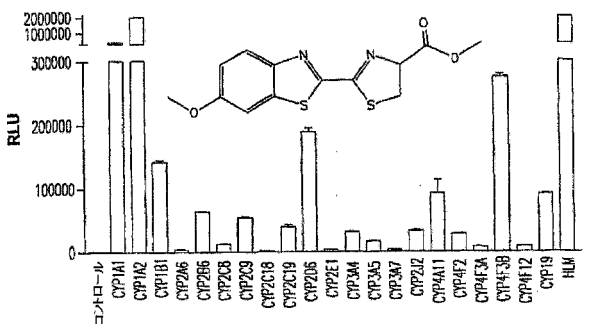
【図２０Ａ】



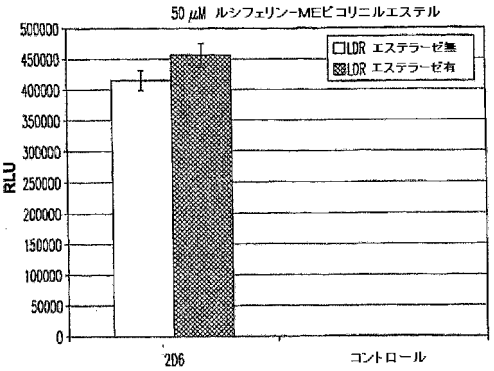
【図２０Ｂ】



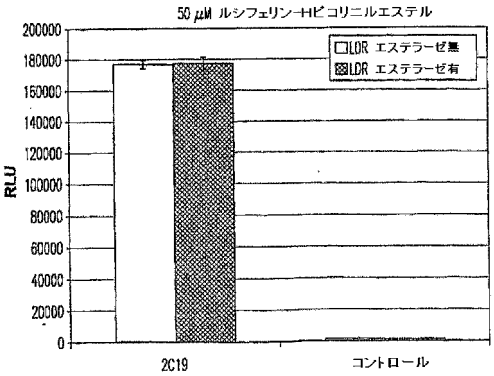
【図２１】



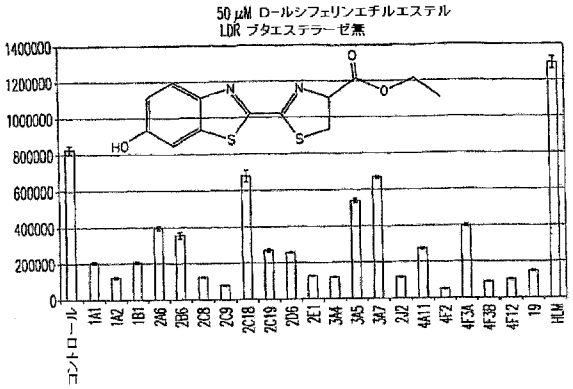
【図２２】



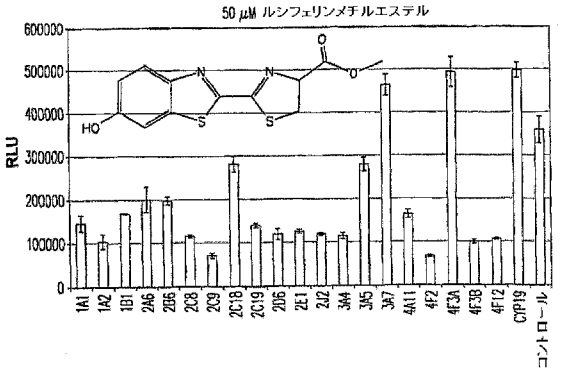
【図２３】



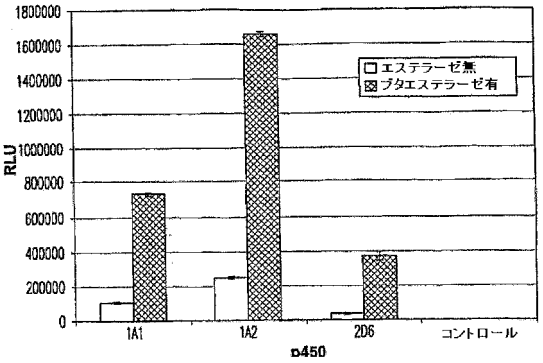
【図２４】



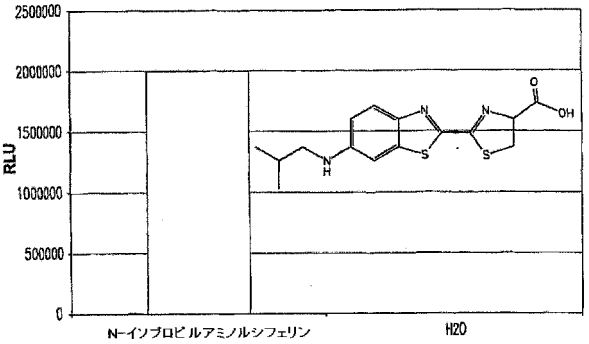
【図２５】



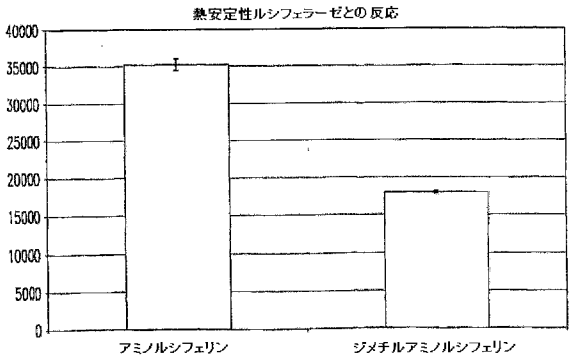
【図２６】



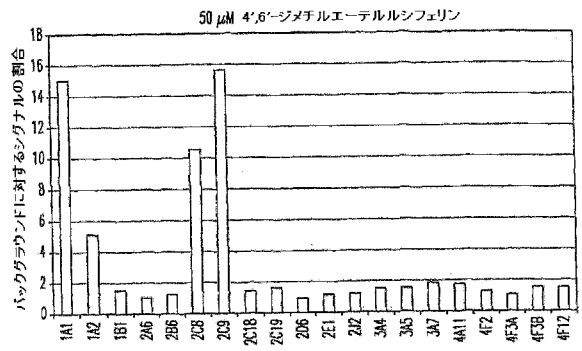
【図２７Ａ】



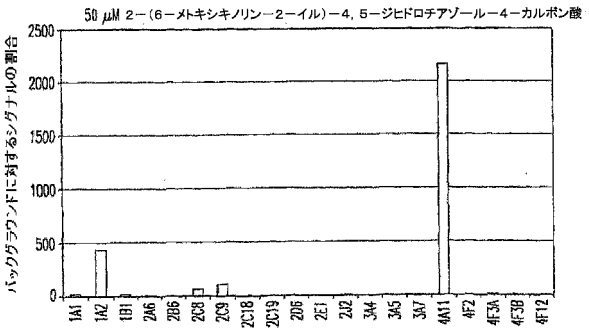
【図２７Ｂ】



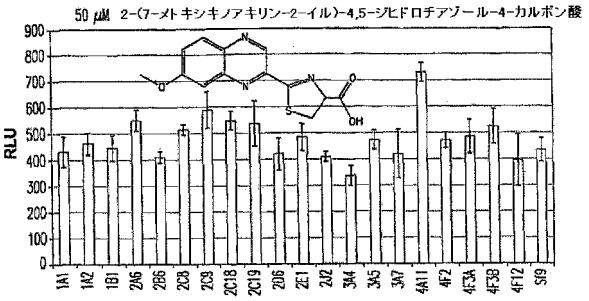
【図２８】



【図２９】



【図３０】



【図３１】

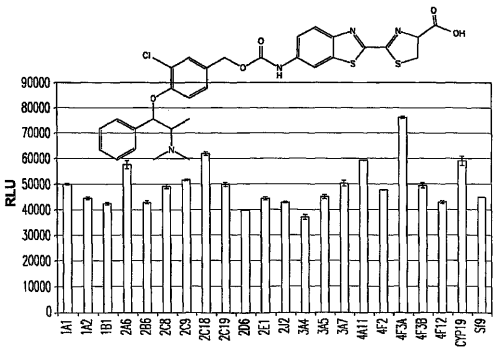
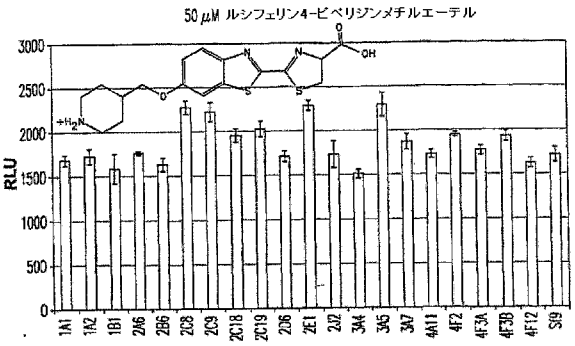


FIG. 31

【図３２】



【図３３】

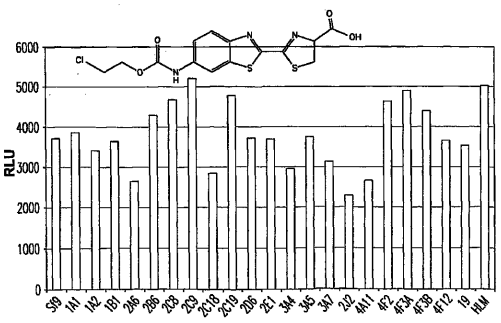
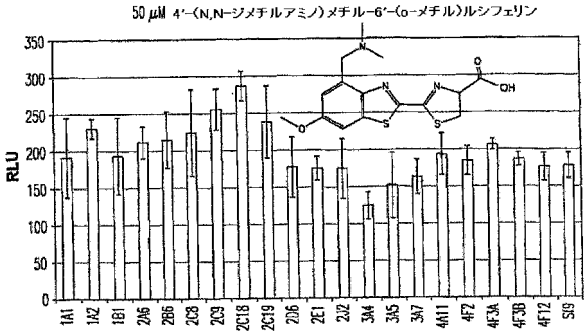
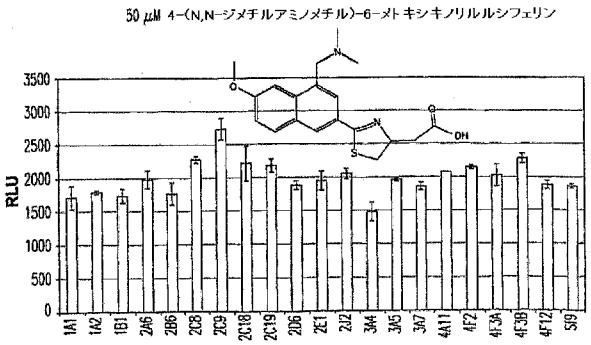


FIG. 33

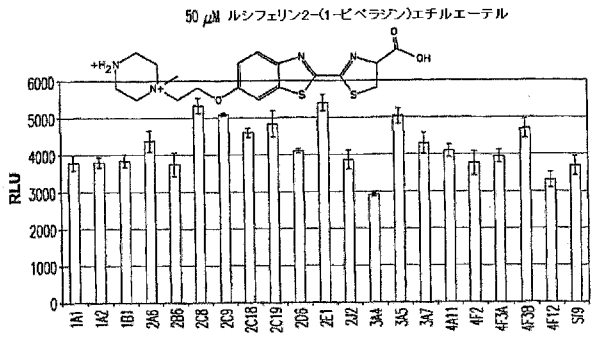
【図３４】



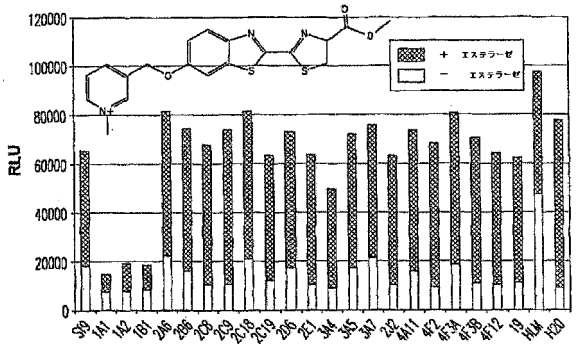
【図３５】



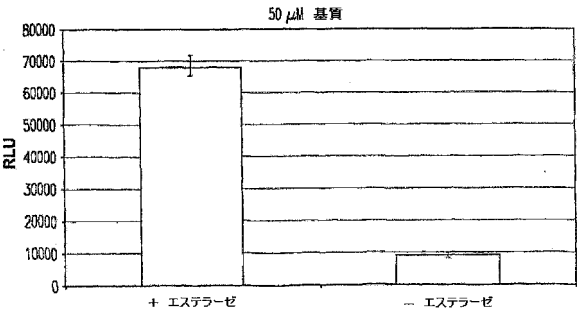
【図３６】



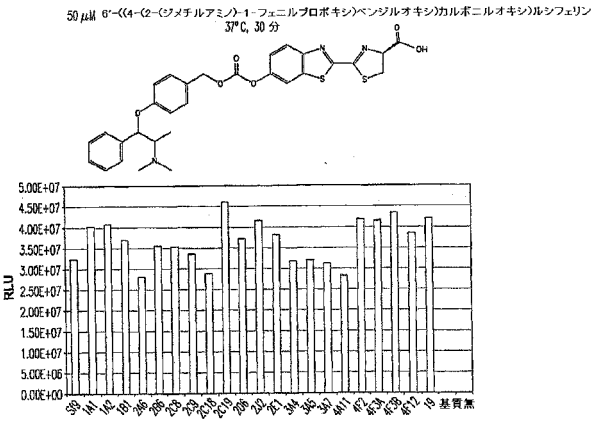
【図３７Ａ】



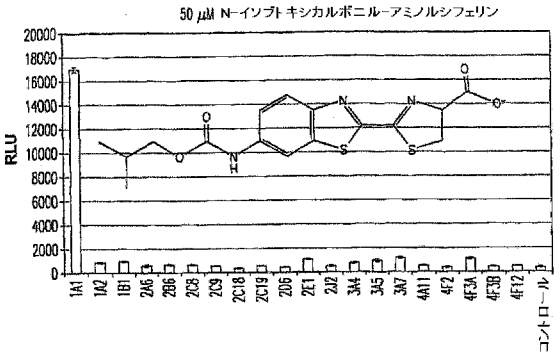
【図３７Ｂ】



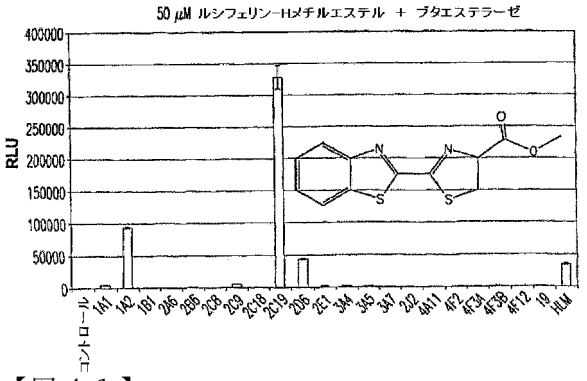
【図３８】



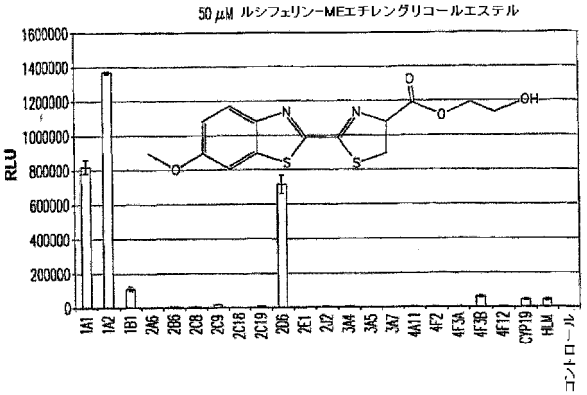
【図３９】



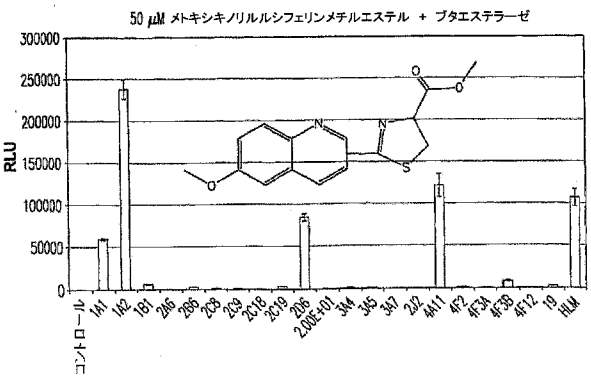
【図４０】



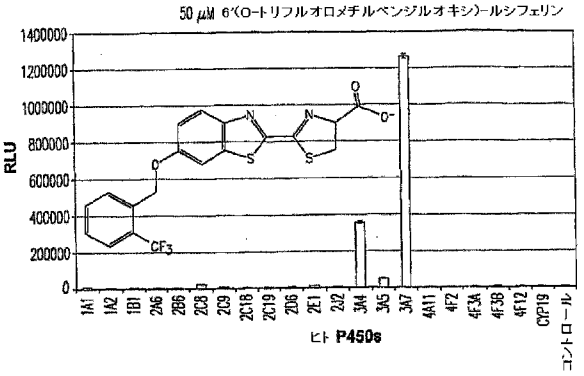
【図４１】



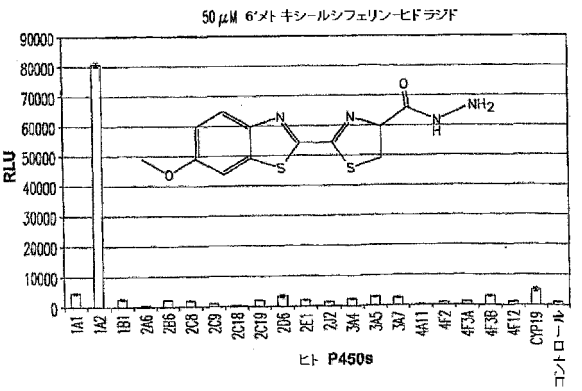
【図４２】



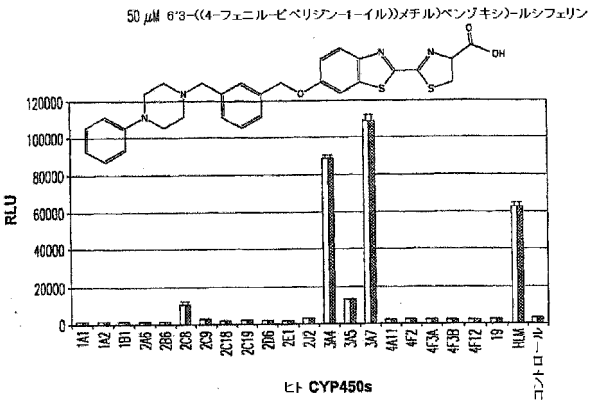
【図４３】



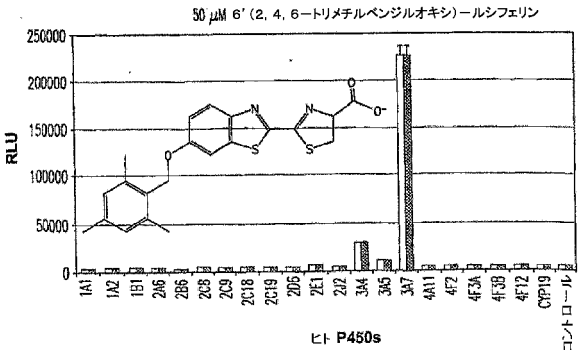
【図４４】



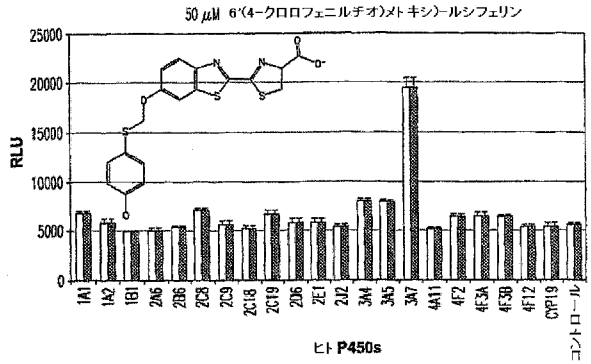
【図４５】



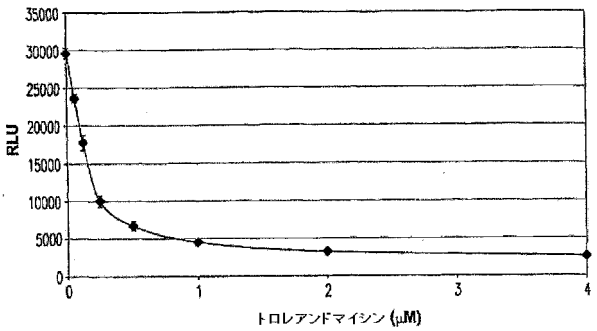
【図４６】



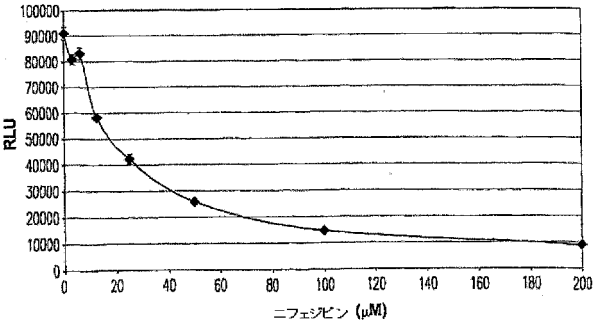
【図４７】



【図４８】



【図４９】



【図５０】

ニフェジピン阻害の3A4 PPXE アッセイ

uM	ニフェジピン	PPXE	PPXE	PPXE		
	200	8584	8236	7914	8244.667	335.0841
	100	13594	12898	12378	12956.67	610.1191
	50	22014	21868	23056	22312.67	647.8714
	25	33136	33182	32656	32991.33	291.3166
	12.5	49210	47340	48470	48340	941.7537
	6.25	82042	77646	81388	80358.67	2371.887
	3.125	91596	88630	89658	89294.67	2502.858
	0	136742	125432	129692	130622	5712.066

【図５１】

ヒト肝細胞(Cambrex社);ドナー(11歳、男性)
10μMリファンピシンで48時間インキュベート
50μM 5FBEで3時間インキュベート

ケト

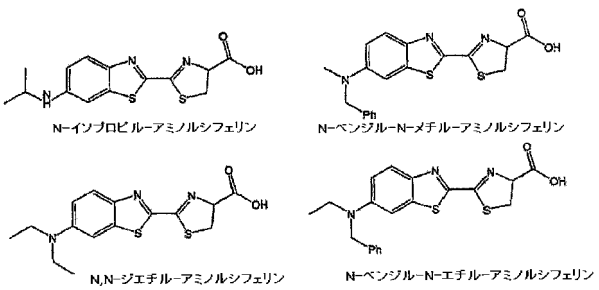
ルシフェリン-5FBE				平均	
溶剤	3174	3847	2900	5211	3783
溶剤+ke	835	1099	1197	621	938
10μMリファンピシン	36371	39351	34085	33834	35910.25
リファンピシン+ke	1199	1097	941	965	1050.5

【図５２】

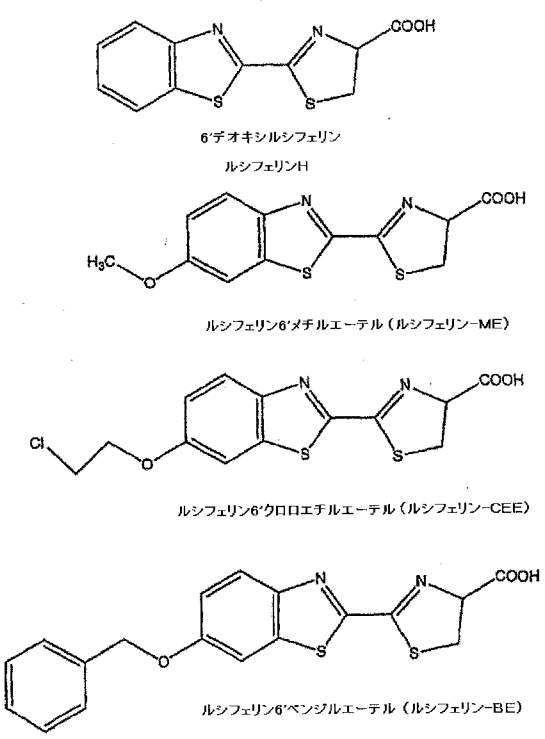
ヒト肝細胞(Cambrex社);ドナー(11歳、男性)
10μMリファンピシンで48時間インキュベート
50μM PPXEで3時間インキュベート

ルシフェリン-PPXE				平均		標準偏差
溶剤	1297	1641	1863	2367	1792	448.5131
溶剤+ke	20	196	238	224	169.5	101.1846
10μMリファンピシン	9311	8468	6355	10540	8668.5	1761.42
リファンピシン+ke	428	578	356	592	488.5	115.382

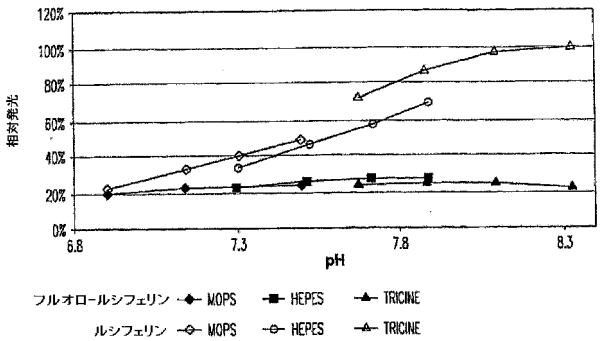
【図５３】



【図５４】

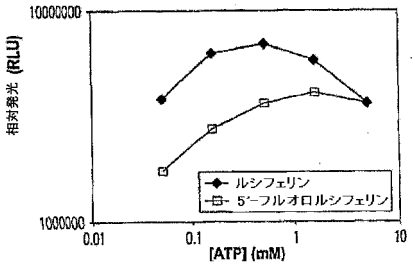


【図５５】



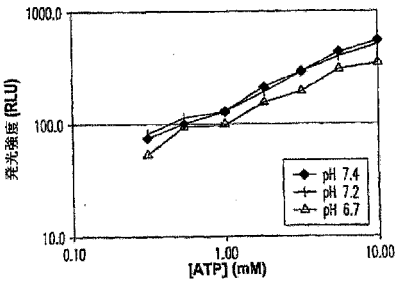
【図５６】

ATP (mM)	発光 (RLU) LH2	5'-FLH2
5	3690086	3721322
1.53	5924428	4148488
0.5	6866226	3671565
0.153	6277734	2790236
0.05	3880786	1753139
0	1061	574

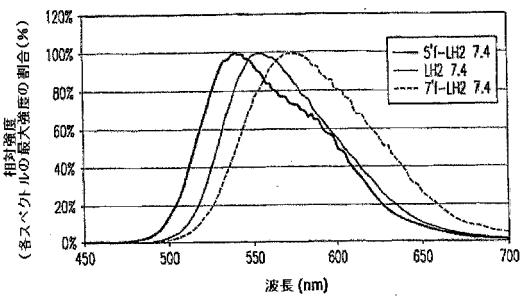


【図５７】

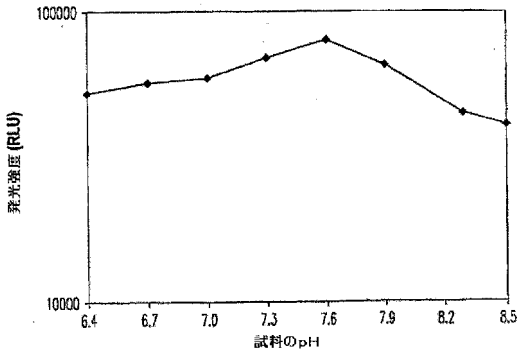
[ATP] (mM)	発光 (RLU) pH 7.4	pH 7.2	pH 6.7
10.00	554.2	510.2	342.9
5.62	430.9	390.2	305.6
3.16	287.6	264.2	199.6
1.78	207.8	185.9	154.9
1.00	126.2	128.9	99.6
0.56	99.6	110.9	96.2
0.32	76.2	79.6	56.2



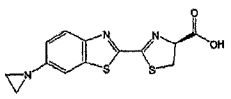
【図５８】

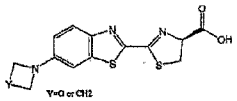


【図５９】

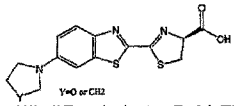


【図６０】

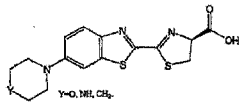




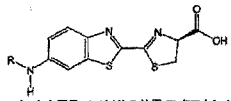
C1以外の位置で、ヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドのいずれかを含む1つの官能基に任意に置換されていてもよい。



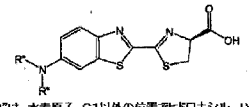
C1以外の位置で、ヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドのいずれかを含む1つの官能基に任意に置換されていてもよい。



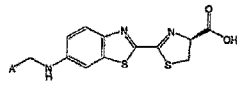
C1以外の位置で、ヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドのいずれかを含む1つの官能基に任意に置換されていてもよい。



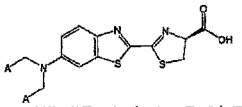
Riは、水素原子、C1以外の位置でヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよい環状鎖、分枝鎖、または非分枝鎖を有するC1－10のアルキル、アルケニル、アルキニルである。



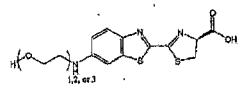
R"は、水素原子、C1以外の位置でヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよい環状鎖、分枝鎖、または非分枝鎖を有するC1－8のアルキル、アルケニル、アルキニルである。



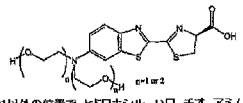
Aは、C1以外の位置でヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよいC6－10アリール、ヘテロアリールである。



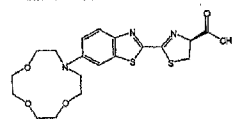
Aは、C1以外の位置でヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよいC6アリール、ヘテロアリールである。



C1以外の位置で、ヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドのいずれかを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよい。



C1以外の位置で、ヒドロキシル、ハロ、チオ、アミノ、ケトン、エステル、アミド、またはアルデヒドのいずれかを含む1つまたは2つの官能基に任意に置換されていてもよい。



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
C12Q 1/44	***(2006.01)***	C12Q 1/44	
C12Q 1/48	***(2006.01)***	C12Q 1/48	
G01N 33/15	***(2006.01)***	G01N 33/15	Z
G01N 33/50	***(2006.01)***	G01N 33/50	Z
G01N 21/76	***(2006.01)***	G01N 21/76	
C07D 277/10	*(2006.01)*	C07D 277/10	
C07D 417/14	*(2006.01)*	C07D 417/14	
C07D 417/04	*(2006.01)*	C07D 417/04	
C12Q 1/66	*(2006.01)*	C12Q 1/66	

(31)優先権主張番号 60/692,925
(32)優先日 平成17年6月22日(2005.6.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/790,455
(32)優先日 平成18年4月7日(2006.4.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

(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 キャリ, ジェイムズ ジェイ.
アメリカ合衆国 ５３５９３ ウィスコンシン州, ヴェローナ, ハーヴェスト レーン ５４６
(72)発明者 デイリー, ウィリアム
アメリカ合衆国 ９３４５５ カリフォルニア州, サンタ マリア, ムーンクレスト レーン ４５５
(72)発明者 ホーキンス, エリカ
アメリカ合衆国 ５３７１１ ウィスコンシン州, マディソン, プレーリー ロード ２２３０
(72)発明者 クラウバート, ディーター
アメリカ合衆国 ９３４２０ カリフォルニア州, アロヨ グランデ, ブルー スカイ ドライブ ２５０
(72)発明者 リュウ, ジァンクゥン
アメリカ合衆国 ９４５３９ カリフォルニア州, フリーモント, アンザ ストリート ３５７
(72)発明者 マイセンハイマー, ポンチョ
アメリカ合衆国 ９３４０１ カリフォルニア州, サン ルイ オビスポ, ヴィクトリア アベニュー ２８６８
(72)発明者 スクーリア, マイケル
アメリカ合衆国 ９３４０５ カリフォルニア州, サン ルイ オビスポ, ヘイズ ストリート １８４４
(72)発明者 シュルツ, ジョン ダブリュー.
アメリカ合衆国 ５３５９５ ウィスコンシン州, ヴェローナ, メロディー レーン ４０７
(72)発明者 アンチ, ジェイムズ
アメリカ合衆国 ９３４２０ カリフォルニア州, アロヨ グランデ, ルース アン ウェイ ２５７
(72)発明者 ウッド, キース ヴィー.
アメリカ合衆国 ５３５７２ ウィスコンシン州, マウント ホレブ, スワン ロード ８３８０
(72)発明者 ゾウ, ウェンフイ

アメリカ合衆国　９３４５４　カリフォルニア州，サンタ　マリア，エブリン　コート　１８４４
(72)発明者　ヴァリー，マイケル，ピー.
アメリカ合衆国　５３７１１　ウィスコンシン州，フィッチバーグ，シェイル　ロード　５４６３

審査官　早川　裕之

(56)参考文献　特開２００６－２１９３８１（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－０８０４７６（ＪＰ，Ａ）
特表２０００－５０５０８６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第００／０１６７６３（WO，Ａ１）
国際公開第２００４／０２７３７８（WO，Ａ１）
特開２０００－２７０８９４（ＪＰ，Ａ）
特表平０１－５０２４３１（ＪＰ，Ａ）
特表昭６３－５０１５７１（ＪＰ，Ａ）
J. Am. Chem. Soc.，２００６年，１２８，３１２２－３１２３
J. Am. Chem. Soc.，１９６３年，８５，３３７－３４３
Bioorg. Med. Chem. Lett.，２００４年，１４，１１６１－１１６３
Bioorganic Chemistry，１９７１年，１，９２－１２２
Chem. Commun.，１９６８年，２２－２３
J. Org. Chem.，１９６６年，３１，１４８４－１４８８
J. Org. Chem.，１９６５年，３０，２３４４－２３４８
Photochemistry and Photobiology，１９８９年，４９，６８９－６９５
Biol. Chem. Hoppe-Seyler，１９９２年，３７３，１１８７－１１９１
Carbohydrate Research，１９９０年，２０５，２２５－２３３
I. MASUDA-NISHIMURA, LETT. APPL. MICROBIOL.，２０００年，V30，P130-135
Bull. Chem. Soc. Jpn.，１９９２年，６５，２６０４－２６１０

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｄ　２７７／１０～６６
Ｃ０７Ｄ　４１７／０４～１４
Ｃ１２Ｑ　　１／２５～６６
Ｇ０１Ｎ　２１／７６
Ｇ０１Ｎ　３３／１５～５０
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）