

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4838239号
(P4838239)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q	1/26
C 0 9 B 23/01 (2006.01)	C 0 9 B	23/01
C 0 9 B 23/02 (2006.01)	C 0 9 B	23/02
C 0 9 K 11/06 (2006.01)	C 0 9 K	11/06 6 4 5
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	C 0 9 K	11/06 6 5 5
請求項の数 19 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-514089 (P2007-514089)
 (86) (22) 出願日 平成17年5月24日 (2005. 5. 24)
 (65) 公表番号 特表2008-500828 (P2008-500828A)
 (43) 公表日 平成20年1月17日 (2008. 1. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/002057
 (87) 国際公開番号 W02005/118839
 (87) 国際公開日 平成17年12月15日 (2005. 12. 15)
 審査請求日 平成20年5月14日 (2008. 5. 14)
 (31) 優先権主張番号 0411993.9
 (32) 優先日 平成16年5月28日 (2004. 5. 28)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

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

最終頁に続く

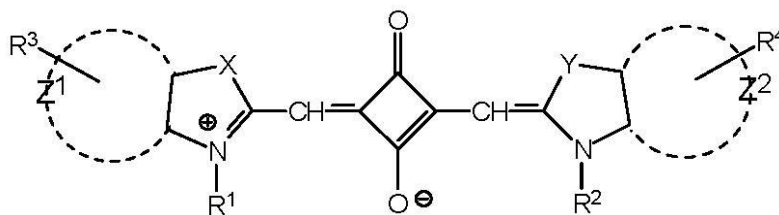
(54) 【発明の名称】 ニトロレダクターゼ酵素活性の測定法及び試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物中のニトロレダクターゼ酵素活性を検出する方法であって、当該方法が、
 i) ニトロレダクターゼ活性を促進する条件下で組成物を色素分子と混合する段階と、
 i i) ニトロレダクターゼ活性の尺度としての、上記色素分子の光学的性質の変化を測定する段階と
 を含み、上記色素分子が、1個以上のNO₂基を含む次の式(I)のスクアライン色素であることを特徴とする方法。

【化 1】

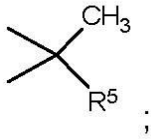


(I)

式中、

R^3 は環構造 Z^1 に結合しており、 R^4 は環構造 Z^2 に結合しており、
 Z^1 及び Z^2 は独立にフェニル又はナフチル環系を表し、
 X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され

【化2】



10

R^1 基及び R^2 基は独立に $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 、 $-\{(CH_2)_2-O\}_p$
 $-R^6$ 及び W 基から選択され(式中、 P は $COOR^7$ 、 SO_3^- 及び OH から選択され、 W は
 一置換又は二置換ニトロベンジルであり、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 は H 、 C_1
 $\sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。)か
 ら選択され、 n は $1 \sim 10$ の整数であり、 p は $1 \sim 3$ の整数である。)、

R^3 基及び R^4 基は独立に水素、 NO_2 、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び
 $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、 m は 0 又は $1 \sim 5$ の整数
 である。)から選択され、

R^5 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであって、 $COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りである。
)、 SO_3^- 又は OH で適宜置換されていてもよく、

20

R^1 基、 R^2 基、 R^3 基及び R^4 基の少なくとも1つが1個以上の NO_2 基を含む。

【請求項2】

前記組成物が1以上の細胞又は細胞抽出物を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

当該方法が、ニトロレダクターゼ酵素活性に対する効果を測定すべき試薬の存在下で実施
 される、請求項1又は請求項2記載の方法。

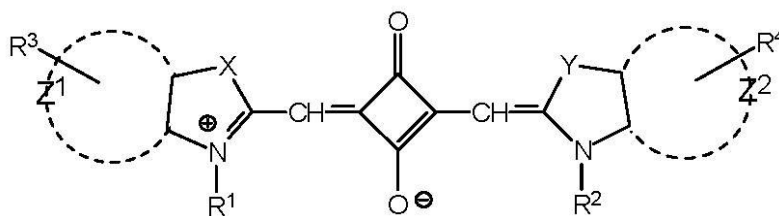
【請求項4】

i) ニトロレダクターゼをコードする配列と作用可能に連結した発現調節配列を含む核酸
 分子を形質移入した宿主細胞を色素分子と接触させる段階と、

ii) ニトロレダクターゼ活性の尺度としての、上記色素分子の光学的性質の変化を測定
 する段階とを含む方法であって、上記色素が、1個以上の NO_2 基を含む次の式(I)の
 スクアライン色素であることを特徴とする方法。

30

【化3】



40

(I)

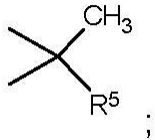
式中、

R^3 は環構造 Z^1 に結合しており、 R^4 は環構造 Z^2 に結合しており、
 Z^1 及び Z^2 は独立にフェニル又はナフチル環系を表し、

X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され

、

【化4】



R^1 基及び R^2 基は独立に $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 、 $-\{(CH_2)_2-O\}_p$ 、 $-R^6$ 及びW基から選択され(式中、Pは $COOR^7$ 、 SO_3^- 及びOHから選択され、Wは一置換又は二置換ニトロベンジルであり、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。)

10

R^3 基及び R^4 基は独立に水素、 NO_2 、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、mは0又は1~5の整数である。)から選択され、

R^5 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであって、 $COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りである。)、 SO_3^- 又はOHで適宜置換されていてもよく、

R^1 基、 R^2 基、 R^3 基及び R^4 基の少なくとも1つが1個以上の NO_2 基を含む。

【請求項5】

前記光学的性質の変化が色素分子の蛍光強度の増大であり、当該増大がニトロレダクターゼ活性の尺度としての、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

20

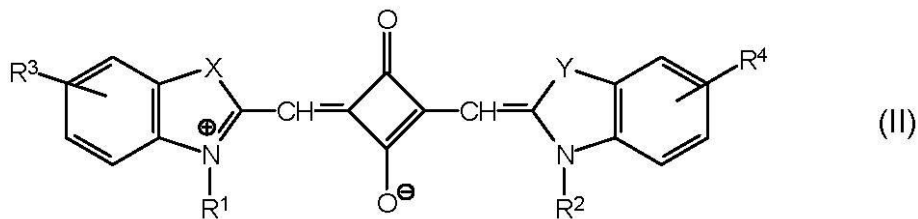
【請求項6】

前記色素が細胞透過性であるか、或いは細胞透過性にされる、請求項4又は請求項5記載の方法。

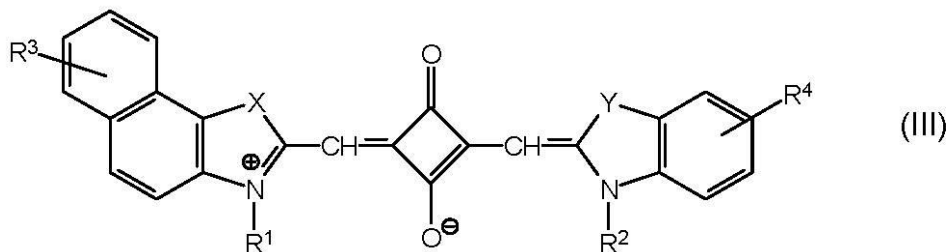
【請求項7】

前記スクアライン色素が、以下の式の色素から選択される化合物である、請求項1乃至請求項6のいずれか1項記載の方法。

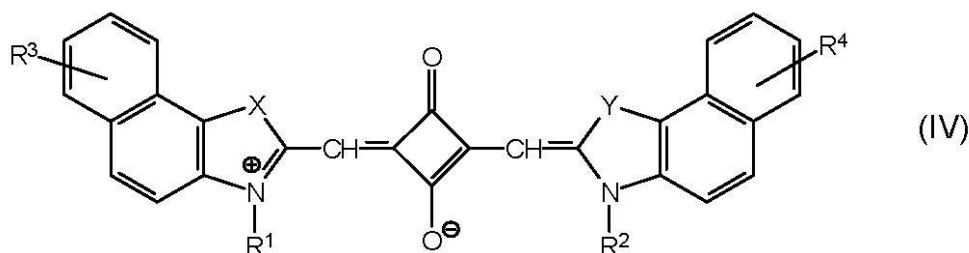
【化5】



30



40

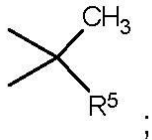


式中、

50

X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され、

【化 6】



(式中、 R^5 は上記で定義した通りである。)、

R^1 基及び R^2 基の少なくともいずれかが W 基 (W は上記で定義した通りである。) であり 10

、
残りの R^1 基又は R^2 基があれば、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 及び $-(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ から選択され (式中、P は $COOR^7$ 、 SO_3^- 及び OH から選択され、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t-ブチルである。)) から選択され、n は 1 ~ 10 の整数であり、p は 1 ~ 3 の整数である。)、

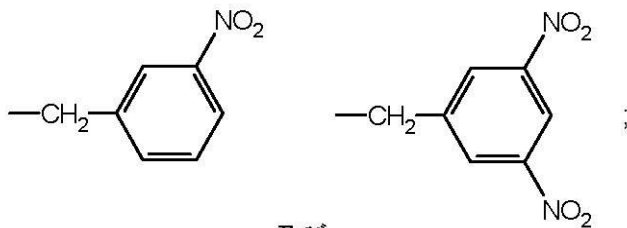
R^3 基及び R^4 基は独立に水素、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、m は 0 又は 1 ~ 5 の整数である。) から選択される。

【請求項 8】

20

R^1 基及び R^2 基の一方が、以下の基から選択される W から選択され、

【化 7】



及び

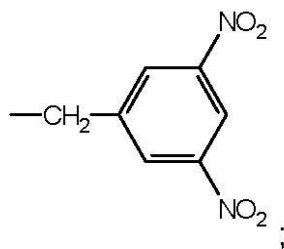
30

残りの R^1 基又は R^2 基がメチル及びエチルから選択されるか、或いは $-(CH_2)_n-COOR^7$ 基 (式中、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t-ブチルである。)) から選択され、n は 1 ~ 10 の整数である。である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

W が次式の基であり、

【化 8】



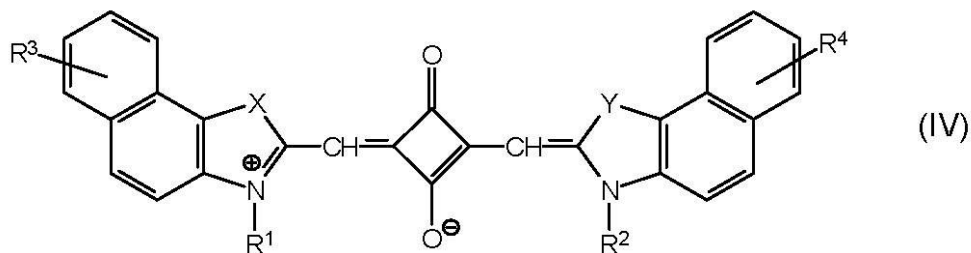
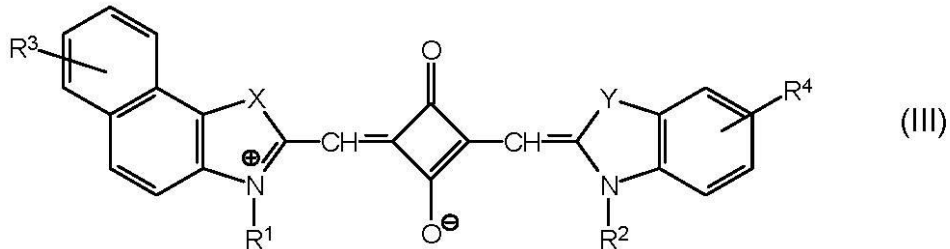
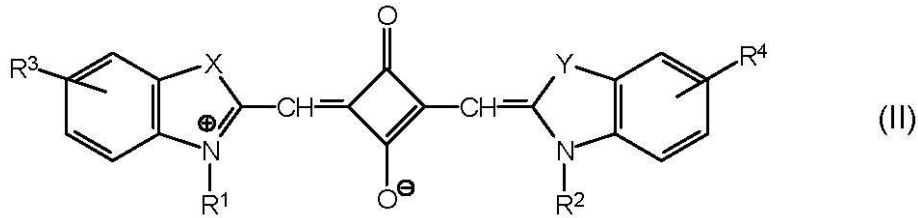
40

残りの R^1 基又は R^2 基が上記で定義した通りである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記スクアライン色素が以下の式の化合物である、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

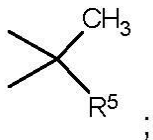
【化9】



式中、

X及びYは同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され、

【化10】



(式中、 R^5 は上記で定義した通りである。)

R^1 基又は R^2 基は独立に $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 及び $-\{(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ から選択され(式中、Pは $COOR^7$ 、 SO_3^- 及びOHから選択され、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。)、

R^3 基及び R^4 基の少なくともいずれかが NO_2 であり、

残りの R^3 基又は R^4 基があれば、水素、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、mは0又は1~5の整数である。)から選択される。

【請求項11】

ニトロレダクターゼ遺伝子発現に対する効果を測定すべき試薬のスクリーニング方法であって、当該方法が、

a) 請求項4乃至請求項10のいずれか1項記載の方法を上記試薬の非存在下及び存在下で実施する段階と、

b) 試薬の非存在下及び存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量を測定する段階とを含み、

10

20

30

40

50

上記試薬の非存在下及び存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量の差が、ニトロレダクターゼ遺伝子発現に対する上記試薬の効果の指標となる、方法。

【請求項 1 2】

ニトロレダクターゼ遺伝子発現に対する効果を測定すべき試薬のスクリーニング方法であって、

a) 請求項 4 乃至請求項 1 0 のいずれか 1 項記載の方法を上記試薬の存在下で実施する段階と、

b) ニトロレダクターゼ遺伝子発現量を、試薬の非存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量についての対照値と比較する段階と

を含む方法。

10

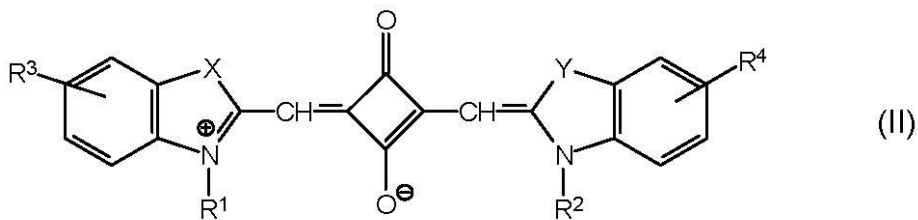
【請求項 1 3】

前記対照値がデータベースその他の電子的フォーマットに電子的に記憶される、請求項 1 2 記載の方法。

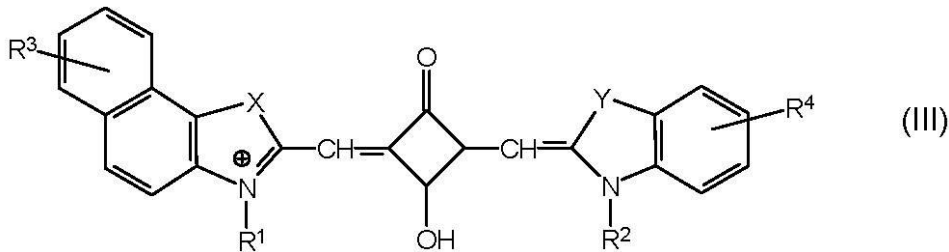
【請求項 1 4】

以下の式の色素から選択される化合物。

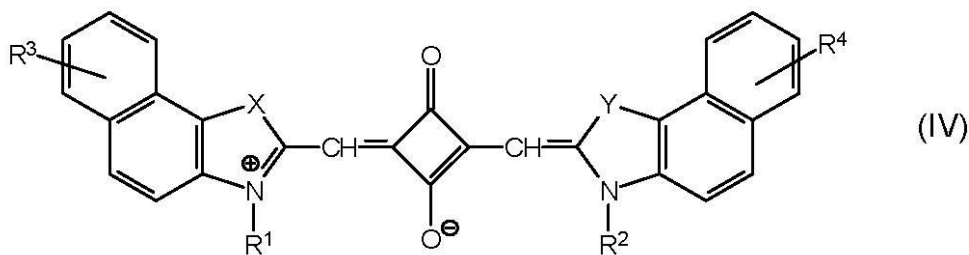
【化 1 1】



20



30

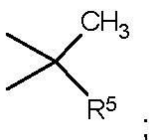


式中、

X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、-C H = C H - 及び次式の基から選択され、

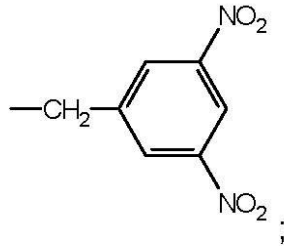
40

【化 1 2】



R¹ 基及び R² 基の一方が、以下の基から選択される W から選択され、

【化13】



残りの R^1 基又は R^2 基がメチル、エチル及び $-(CH_2)_n-COOR^7$ 基（式中、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ （式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。）から選択され、 n は 1 ~ 10 の整数である。）であり、

R^3 基及び R^4 基は独立に水素、 NO_2 、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ （式中、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ （式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。）から選択され、 m は 0 又は 1 ~ 5 の整数である。）から選択され、

R^5 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであって、 $COOR^7$ （式中、 R^7 は上記で定義した通りである。） SO_3^- 又は OH で適宜置換されていてもよい。

【請求項15】

残りの R^1 基又は R^2 基が $-(CH_2)_5-COOR^7$ 基及び $-(CH_2)_6-COOR^7$ 基（式中、 R^7 は上記で定義した通りである。）から選択される、請求項14記載の化合物。

【請求項16】

以下の a) ~ f) から選択される化合物。

- a) 2 - (1 - メチル - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 1)、
- b) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 2)、
- c) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - ベンズインドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 3)、
- d) 2 - (1 - エチル - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 5)、
- e) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 6)、及び
- f) 3 - (5 - カルボキシペンチル) - 1 - (2 - (2 - メトキシエトキシ) エチル - 3 - メチル - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - インドール - 2 - イリデンメチル - 4 - ((1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 3H - インドリウム - 2 - イル) メチレン) - 3 - オキソシクロプト - 1 - エン - 1 - オレート (化合物 7)。

【請求項17】

以下の a) 及び b) から選択される化合物。

- a) 2 - (3 - エチル - 6 - ニトロ - 2 - ベンゾチアゾリニリデンメチル) - 4 - (1 - (2 - (2 - メトキシエトキシ) エチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物 4)、及び
- b) 2 - ((3, 3 - ジメチル - 5 - スルホ - 1 - (4 - スルホブチル) - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - インドール - 2 - イリデン) メチル) - 4 - ((1 - メチル - 6 - ニトロキ

ノリニウム - 2 - イル)メチレン) - 3 - オキソシクロプト - 1 - エン - 1 - オレート (化合物 8)。

【請求項 1 8】

ニトロレダクターゼ酵素活性の検出及び/又は測定用の基質としての、請求項 1 4 乃至請求項 1 7 のいずれか 1 項記載の化合物の使用。

【請求項 1 9】

前記化合物をインピボで投与し、光学画像化によってニトロレダクターゼ酵素活性を求め、請求項 1 8 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は酵素アッセイの分野に関する。具体的には、本発明は、ニトロレダクターゼ酵素アッセイ、並びに細胞系中のニトロレダクターゼ酵素活性及びニトロレダクターゼ遺伝子発現を測定するための新規レポーター色素に関する。

【背景技術】

【0002】

レポーター遺伝子技術は、シグナル伝達及び遺伝子発現に関連する細胞事象をモニターするため広く使用されている。レポーター遺伝子の発現に共役した転写調節が、多種多様な細胞事象をモニターするため日常的に使用されている。レポーター遺伝子アッセイを確立するために、レポーター遺伝子がプロモーターの転写制御下又は最小限のプロモーターを備えるエンハンサーの転写制御下に置かれる。レポーターは、増殖抑制化合物(例えば、抗生物質など)に対する耐性を付与する選択マーカーを典型的には含有する好適なプラスミドベクターに挿入される。ベクター DNA が、標準的な実験室手法を用いて細胞に導入される。好適なアゴニストの添加によって、細胞のシグナル伝達経路にスイッチが入り、転写因子の活性化及び遺伝子発現がもたらされる。レポーター遺伝子技術の総説は、Naylor 他によって、Biochem. Pharmacol. (1999)、58、749~757 に示される。

20

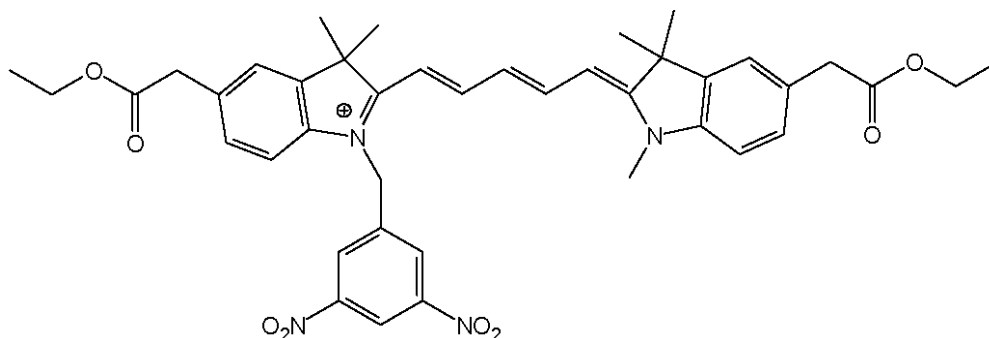
【0003】

細胞に基づく蛍光性の遺伝子レポーター系が記載されており、これは、細菌のニトロレダクターゼ(NTR)と、酵素の基質として機能する細胞透過性のニトロ置換消光型(又は非蛍光性)シアニン色素(これは以下の化合物(i)として示される)とを用いるアッセイである(米国特許出願公開第2003/0186348号、Thomas, N. 他)。

30

【0004】

【化1】



40

化合物 (i)

原形質膜を通しての能動的拡散による基質の細胞取り込みは、潜在的極性官能基を遮蔽するためのエチルエステル基の使用によって促進された。細胞ヒドロラーゼによるこのエ

50

ステル基の細胞内切断によって、生細胞の内部における基質が保持される。ニトロレダクターゼを発現する細胞に基質を加えると、ニトロ基がヒドロキシルアミンに還元され、蛍光放射が増大する。消光型シアニン色素の構造に依存して、NTR反応の生成物からの蛍光放射が、広い波長域、典型的には500nm~900nmで生じる。長波長側での放射は、バックグラウンド蛍光の回避及び生物学的システムでの感度の増大に好都合である。

【0005】

レポーター構築物から発現した野生型ニトロレダクターゼは宿主細胞の細胞質に局在化する(Spooner他、Int. J. Cancer(2001)、93、123~30)。アッセイからの最大のシグナル出力を達成するためには、基質がニトロレダクターゼによる活性化のために利用できるように、基質をレポーター酵素と同じ細胞区画(即ち、宿主細胞の細胞質内)に局在化させることが望ましい。基質分子上の親水性の基、又は、基質分子に結合している親水性の基を遮蔽することによって、膜透過性の化合物が得られる。さらに、そのような遮蔽基は、基質を細胞内(好ましくは、細胞の細胞質内)で生じさせるために細胞内で基質から切断されるように設計することができる。ニトロ置換シアニン色素を細胞の細胞質に比較的均一に送達できるようにするための遮蔽方法論は、完全に成功しているとは立証されていない。蛍光顕微鏡を使用した、細胞透過性の消光型シアニン色素(Cy-Q)誘導体の細胞内での局在化の研究では、内部の細胞膜及びオルガネラ(主として、細胞のミトコンドリア)に対する基質のある程度の局在化が示されている。親油性で、カチオン性のニトロ置換シアニン色素基質のミトコンドリア内での蓄積には、プローブの蛍光の増大が伴い、また、この蓄積はNTRアッセイにおけるバックグラウンド蛍光の増大をもたらしている。従って、より低いバックグラウンド蛍光、改善された蛍光シグナル及び細胞分布を示すNTR基質として使用される新規且つ改善された試薬が求められている。

【特許文献1】米国特許出願公開第2003/0186348号明細書

【特許文献2】欧州特許第645680号明細書

【特許文献3】PCT国際特許出願公開WO97/40104号明細書

【非特許文献1】Naylor他、Biochem. Pharmacol. (1999)、58、749~757

【非特許文献2】Spooner他、Int. J. Cancer(2001)、93、123~30

【非特許文献3】Jansen, A. B. A. 及びRussell, T. J., J. Chem. Soc., 2127~2132(1965)

【非特許文献4】Daehne, W. 他、J. Med. Chem., 13、697~612(1970)

【非特許文献5】Madhu他、J. Ocul. Pharmacol. Ther. (1998)、14、5、pp389~399

【非特許文献6】Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 14.5~14.20

【非特許文献7】Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 16.56~16.57

【非特許文献8】Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 16.30~16.46

【非特許文献9】Bridgewater他、Eur. J. Cancer(1995)、31A、2362~70

【非特許文献10】Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique(第2版、Alan R. Liss Inc., 1987

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

バックグランド蛍光が低く、蛍光シグナル及び細胞分布の改善されたNTR基質として使用される新規な改良試薬に対するニーズが存在する。

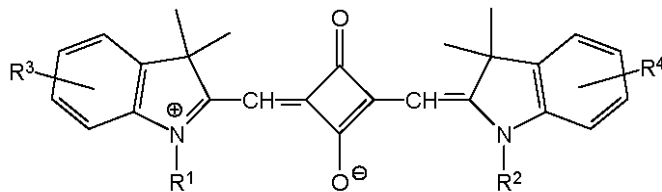
【課題を解決するための手段】

【0007】

スクアリリウム(スクアライン)色素は、全体的な電気的中性を有する一群の色素であり、一例が以下の化合物(ii)として示される。

【0008】

【化2】



化合物(ii)

ニトロ置換スクアライン色素は、電子写真画像化プロセスに使用される近赤外吸収性の添加剤として欧州特許第645680号(Bugner D.他)から知られている。PCT国際特許出願公開WO97/40104号(Hamilton, AL他)は、スクアライン色素、及び、スクアライン色素と生物学的分子(例えば、ペプチド、タンパク質及びヌクレオドなど)との付加物を開示する。色素は電子供与性置換基及び電子吸引性置換基(例えば、ニトロ)で置換し得る。しかし、ニトロ置換色素の蛍光特性は開示されていない。本発明者らは、今回、ニトロ基を含有する消光型スクアライン色素が、スクアライン色素の光学的性質の変化(好ましくは、スクアライン色素の蛍光放射の変化)をもたらすニトロ基の還元を介してニトロレダクターゼに対する効果的な基質であることを見いだした。ニトロレダクターゼ活性を測定するためのアッセイにおけるニトロ置換スクアライン色素の使用は、従来のNTR基質を用いるアッセイの場合よりも大きい感度及び低いバックグランド蛍光をもたらす。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の第1の態様では、組成物中のニトロレダクターゼ酵素活性を検出する方法であって、

i) ニトロレダクターゼ活性を促進する条件下で組成物を色素分子と混合する段階と、
ii) ニトロレダクターゼ活性の尺度としての、上記色素分子の光学的性質の変化を測定する段階とを含み、
上記色素分子が、1個以上のNO₂基を含むスクアライン色素であることを特徴とする方法が提供される。

【0010】

一実施形態では、ニトロレダクターゼ酵素活性が検出される組成物は1個以上の細胞又は細胞抽出物を含む。細胞はエキスビボでも、インビボでもよい。例えば、細胞は標準的な実験室条件のもとで培養してもよいし、組成物は動物の生細胞であってもよい。

【0011】

別の実施形態では、当該方法は、ニトロレダクターゼ酵素活性に対する効果を測定すべき試薬の存在下で実施される。

【0012】

本発明の第2の態様では、

i) ニトロレダクターゼをコードする配列と作用可能に連結した発現調節配列を含む核酸分子を形質移入した宿主細胞を色素分子と接触させる段階と、

ii) ニトロレダクターゼ活性の尺度としての、上記色素分子の光学的性質の変化を測定する段階とを含み、

上記色素分子が、1個以上のNO₂基を含むスクアライン色素であることを特徴とする方法が提供される。

【0013】

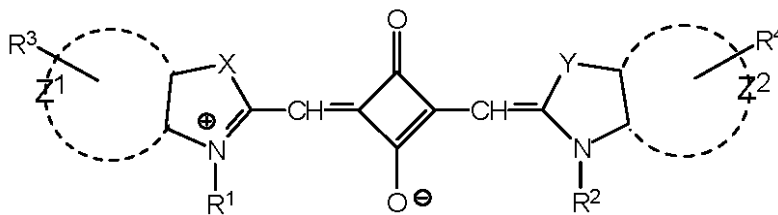
色素分子において測定される光学的性質は、好適には、色素に対する酵素の作用の結果としての蛍光放射の増大が存在するように蛍光放射強度である。例えば、組成物を第1の波長（好適には、色素の励起極大）で励起することができ、蛍光放射強度を、酵素反応の生成物の放射極大に対応する第2の波長で測定することができる。色素分子の励起及び蛍光放射の測定もまた、放射シグナルを最大にし、励起シグナル及び放射シグナルを区別するように、ある範囲の様々な波長にわたって可能である。或いは、光学的性質における測定された変化は、ニトロレダクターゼ酵素の作用の前後における色素の蛍光寿命の変化であってもよい。蛍光寿命の変化はまた、酵素反応の生成物を、基質として使用されている色素分子から区別するために使用することができる。さらなる代替として、光学的性質の変化は、生成物の吸収極大に対する色素分子の吸収極大の変化であってもよい。好ましい実施形態では、光学的性質の変化は色素分子の蛍光強度の増大であり、その増大はニトロレダクターゼ活性の量の尺度となる。

【0014】

好適には、第1の態様及び第2の態様によるスクアライン色素は次の式(I)の化合物である。

【0015】

【化3】



(I)

式中、

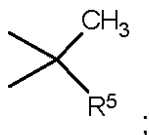
R³ は環構造 Z¹ に結合しており、R⁴ は環構造 Z² に結合しており、

Z¹ 及び Z² は独立にフェニル又はナフチル環系を表し、

X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、-CH=CH- 及び次式の基から選択され、

【0016】

【化4】



10

20

30

40

50

R¹基及びR²基は独立にC₁~C₄アルキル、-(CH₂)_n-P、-{(CH₂)₂-O}_p-R⁶及びW基から選択され(式中、PはCOOR⁷、SO₃⁻及びOHから選択され、Wは一置換又は二置換ニトロベンジルであり、R⁶はメチル又はエチルであり、R⁷はH、C₁~C₄アルキル及びCH₂OC(O)R⁸(式中、R⁸はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。)

R³基及びR⁴基は独立に水素、NO₂、ハロゲン、SO₃⁻、C₁~C₄アルコキシ及び-(CH₂)_m-COOR⁷(式中、R⁷は上記で定義した通りであり、mは0又は1~5の整数である。)から選択され、

R⁵はC₁~C₆アルキルであって、COOR⁷(式中、R⁷は上記で定義した通りである。)、SO₃⁻又はOHで適宜置換されていてもよく、

R¹基、R²基、R³基及びR⁴基の少なくとも1つが1個以上のNO₂基を含む。

【0017】

好適には、式(I)のスクアライン色素は対イオンを含んでいてもよく、対イオンは、色素発色団又は置換基の形式荷電を釣り合わせる正イオンでも負イオンでもよい。対イオンの性質は本発明では重要でなく、多くの公知のイオンのいずれか(例えば、H⁺、NH₄⁺、K⁺、Na⁺、トリフルオロ酢酸塩(F₃C-CO₂⁻)、過塩素酸塩(ClO₄⁻)、Br⁻又はI⁻など)でよい。

【0018】

好適には、式(I)の色素に含まれる1個以上のニトロ基は環構造Z¹及び環構造Z²に直接に結合することができる。この実施形態では、スクアライン色素のR³基及びR⁴基の一方又は両方がNO₂である。代替の実施形態では、上記スクアライン色素のR¹基及びR²基の一方又は両方がW基(Wは上記で定義した通りである。)である。スクアライン色素はさらに、芳香族環構造に結合した1個又は2個のニトロ基で適宜置換されていてもよい。

【0019】

好ましい様々な実施形態では、本発明の方法において用いられるスクアライン色素は細胞に対して透過性である。これらの実施形態では、R¹基、R²基、R³基及びR⁴基の1個以上が細胞膜透過性の基を含む。膜透過性化合物は、より疎水性の化合物を提供するために親水性の基を遮蔽することによって作製することができる。遮蔽基は、由来する基質を細胞内で生じさせるために細胞内で基質から切断されるように設計することができる。基質はその膜透過性誘導体よりも親水性であるので、細胞内に捕捉される。好適な細胞膜透過基を、哺乳動物の内因性の細胞内エステラーゼによって容易に切断されるアセトキシメチルエステル(Jansen, A. B. A. 及びRussell, T. J., J. Chem. Soc., 2127~2132(1965); 及び, Daehne, W. 他, J. Med. Chem., 13, 697~612(1970))、及び、ピバロイル基(Madhu他, J. Ocul. Pharmacol. Ther., (1998), 14, 5, pp 389~399)から選択することができる。だが、他の好適な基が当業者によって認識される。

【0020】

一実施形態では、スクアライン色素のR¹基及びR²基の一方又は両方がW基(Wは上記で定義した通りである。)である。本発明の方法のこの実施形態では利用される具体的なスクアライン色素は、以下の式(II)、式(III)及び式(IV)の色素から選択されるスクアライン色素である。

【0021】

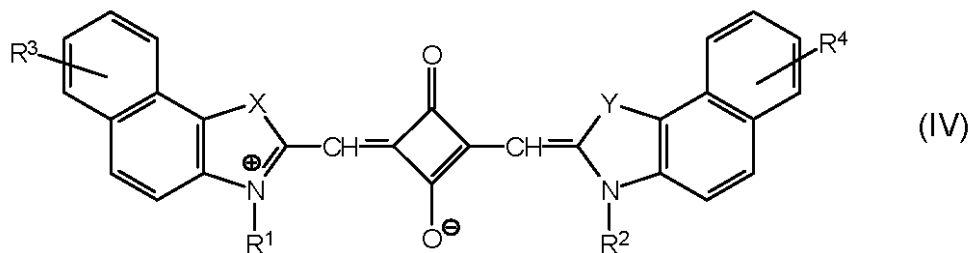
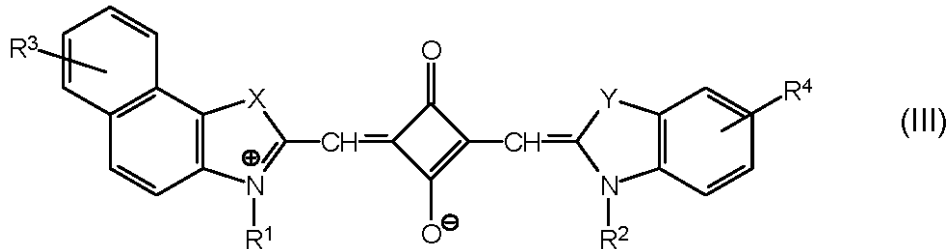
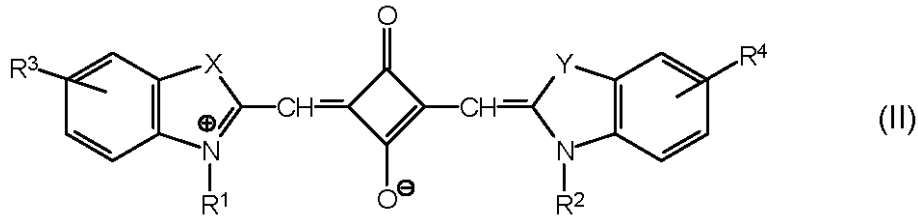
10

20

30

40

【化5】

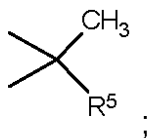


式中、

X及びYは同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され、

【0022】

【化6】



(式中、 R^5 は上記で定義した通りである。)、

R^1 基及び R^2 基の少なくともいずれかがW基(Wは上記で定義した通りである。)であり、

残りの R^1 基又は R^2 基があれば、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 及び $-(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ から選択され(式中、Pは $COOR^7$ 、 SO_3^- 及びOHから選択され、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。)、

R^3 基及び R^4 基は独立に水素、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、mは0又は1~5の整数である。)から選択される。

【0023】

この実施形態では、好ましくは、 R^1 基及び R^2 基の一方は、以下の基から選択されるWから選択され、

【0024】

10

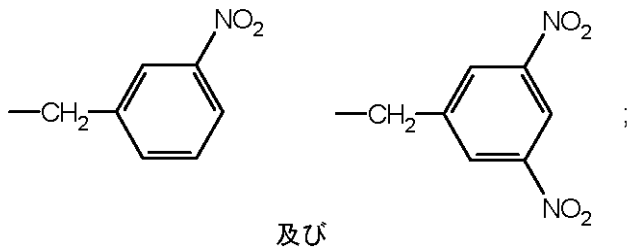
20

30

40

50

【化7】

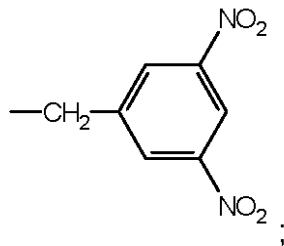


残りの R^1 基又は R^2 基がメチル及びエチルから選択されるか、或いは $-(CH_2)_n-COOR^7$ 基 (式中、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。)) から選択され、 n は 1 ~ 10 の整数であり、好ましくは 5 又は 6 である。) である。特に好ましい実施形態では、 W は次式の基であり、

【0025】

10

【化8】



20

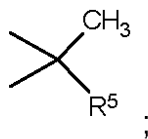
残りの R^1 基又は R^2 基は上記で定義した通りである。

【0026】

代わりの実施形態では、式 (II)、式 (III) 及び式 (IV) によるスクアライン色素の R^3 基及び R^4 基の一方又は両方が NO_2 である。この実施形態では、 X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、 $-CH=CH-$ 及び次式の基から選択され、

【0027】

【化9】



30

(式中、 R^5 は上記で定義した通りである。)、

R^1 基又は R^2 基は独立に $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 及び $- \{ (CH_2)_2-O \}_p-R^6$ から選択され (式中、 P は $COOR^7$ 、 SO_3^- 及び OH から選択され、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。)) から選択され、 n は 1 ~ 10 の整数であり、 p は 1 ~ 3 の整数である。)、

40

R^3 基及び R^4 基の少なくともいずれかが NO_2 であり、残りの R^3 基又は R^4 基があれば、水素、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ (式中、 R^7 は H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 R^8 はメチル又は t -ブチルである。)) から選択され、 m は 0 又は 1 ~ 5 の整数である。) から選択される。

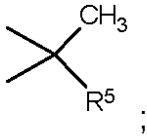
【0028】

好ましい実施形態では、 X 及び Y は、酸素、硫黄及び次式の基から選択される。

50

【 0 0 2 9 】

【 化 1 0 】



式中、 R^5 はメチルである。

10

【 0 0 3 0 】

好ましい $C_1 \sim C_4$ アルキル基はメチル及びエチルから選択される。特に好ましい $-(CH_2)_m-COOR^7$ は $-(CH_2)_5-COOR^7$ 基及び $-(CH_2)_6-COOR^7$ 基 (式中、 R^7 は上記で定義した通りである。) から選択される。

【 0 0 3 1 】

ハロゲン原子は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選択される。

【 0 0 3 2 】

第3の態様では、ニトロレダクターゼ遺伝子発現に対する効果を測定すべき試薬のスクリーニング方法が提供される。この方法は、a) 本発明の方法を上記試薬の非存在下及び存在下で実施する段階と、b) 上記試薬の非存在下及び存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量を測定する段階とを含み上記試薬の非存在下及び存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量の差が、ニトロレダクターゼ遺伝子発現に対する上記試薬の効果の指標である。

20

【 0 0 3 3 】

代わりに態様では、試薬のスクリーニング方法は、a) 第2の態様による方法を上記試薬の存在下で行い、b) ニトロレダクターゼ遺伝子発現量を、上記試薬の非存在下でのニトロレダクターゼ遺伝子発現量についての対照値との比較によって実施することができる。対照値はデータベースその他の電子的フォーマットに電子的に記憶できる。

【 0 0 3 4 】

様々な酵素遺伝子を哺乳動物細胞においてレポーター遺伝子として使用するための様々な方法が周知である (総説については、Naylor L. H. (1999)、Biochemical Pharmacology、58、749~757を参照のこと)。レポーター遺伝子は、遺伝子の生成物が他の細胞タンパク質の存在下で測定可能であることを可能にするように選択され、宿主細胞における遺伝子発現の変化にตอบสนองし得る選択された調節配列の制御下で細胞に導入される。典型的な調節配列には、ホルモンに対してตอบสนองし得る調節配列、セカンドメッセンジャー、並びに、細胞の他の制御因子及びシグナル伝達因子が含まれる。例えば、7回膜貫通受容体に結合するアゴニストは、cAMP 応答エレメント、NFAT、SRE 及び AP1 を含む様々なプロモーターエレメントを調節することが知られている。MAPキナーゼの活性化はSREの調節を生じさせ、これにより、Fos 及び Jun の転写を生じさせる。DNAの損傷はDNA修復酵素及び腫瘍抑制遺伝子 p53 の転写の活性化を生じさせる。適切な調節配列の選択によって、レポーター遺伝子を、研究中の選択された調節配列を伴う細胞プロセスに対する添加された薬剤の効果をアッセイするために使用することができる。

30

40

【 0 0 3 5 】

レポーターとしての使用のために、ニトロレダクターゼ遺伝子を周知の方法によって単離することができ、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の使用による cDNA ライブラリーからの増幅によって単離することができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 14.5~14.20)。単離されると、ニトロレダクターゼ遺伝子は、研究中の遺伝子調節配列との連係

50

及びその制御下での哺乳動物プロモーターとの使用のために好適なベクターに挿入することができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 16.56~16.57)。ニトロレダクターゼレポーター配列及び関連する調節配列を含有するベクターは、その後、周知の技術を使用してトランスフェクションによって宿主細胞に導入することができ、例えば、DEAE-デキストラン又はリン酸カルシウムの使用によって宿主細胞に導入することができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版)、Cold Spring Harbour Laboratory Press、1989、pp. 16.30~16.46)。様々な他の好適な技術が当業者に周知である。ニトロレダクターゼは、この様式で発現させられたとき、細胞に保持されることが示されている (Bridgewater 他、Eur. J. Cancer (1995)、31A、2362~70を参照のこと)。

10

【0036】

本発明の方法は、生物種 (例えば、ヒト、齧歯類、サル)、組織源 (例えば、脳、肝臓、肺、心臓、腎臓、皮膚、筋肉) 及び細胞タイプ (例えば、上皮細胞、内皮細胞) に関して任意の認められている供給源に由来する細胞タイプを含めて、標準的な組織培養用のプラスチック器具で培養できる任意の接着性の細胞タイプで使用することができる。様々な確立されたプロトコルを多様な細胞タイプの培養のために利用することができる (例えば、Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (第2版、Alan R. Liss Inc., 1987)を参照のこと)。選択された宿主細胞株は無菌の組織培養用の処理済みディッシュに接種され、好適な培地において、典型的には、10%のウシ胎児血清 + 2 mMのL-グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地において5%CO₂の加湿雰囲気中で37℃でインキュベーションされる。プラスミドベクターの哺乳動物細胞へのトランスフェクションを、周知の方法を使用して、例えば、カチオン性脂質、リン酸カルシウム及びエレクトロポレーションの使用によって達成することができる。トランスフェクション効率、再現性のあるデータが得られることを確実にするために試験に先立ってそれぞれの細胞株について最適化されることが勧められる。ニトロレダクターゼの一過性発現が、典型的には、トランスフェクション後の24時間~72時間でアッセイされる。調製されたニトロレダクターゼ遺伝子レポーターDNA/トランスフェクション試薬複合体がそれぞれのディッシュに滴下様式で加えられる。ディッシュの内容物が注意深く混合され、少なくとも4時間インキュベーションされる。5%CO₂の加湿雰囲気における37℃での一晚のインキュベーションが好都合である。インキュベーション後、培地がそれぞれのディッシュから除かれ、細胞の単層物が無菌のリン酸塩緩衝化生理的食塩水 (PBS) で洗浄される。トランスフェクションされた細胞をトランスフェクションディッシュにおいてそのままアッセイすることができ、或いはトランスフェクションされた細胞の懸濁物を作製するために、細胞をそれぞれのディッシュから剥がし、プールのことができる。ニトロレダクターゼの一過性発現が、典型的には、トランスフェクション後の24時間~72時間でアッセイされる。

20

30

40

【0037】

本発明による典型的なアデノウイルス型NTR遺伝子レポーターアッセイにおいて、選択された宿主細胞株はウイルス形質導入に先立って24時間継代培養され、5%CO₂の加湿雰囲気において37℃で一晩インキュベーションされる。細胞が、トリプシンを用いて剥がされ、各フラスコに由来する細胞が、細胞の懸濁物を作製するためにプールされる。懸濁状態の細胞が、好適な組織培養用の処理済みフラスコの底を覆うための十分な体積の完全培地において所定の感染多重度 (MOI) でウイルスと一緒にされ、5%CO₂の加湿雰囲気において37℃で一晩インキュベーションされる。細胞が、形質導入された細胞の懸濁物を作製するために剥がされる (トリプシン)。

【0038】

50

好適には、ニトロレダクターゼ含有ベクターは、遺伝子レポーターアッセイに使用される一過性の細胞及び安定な細胞の両方を作製するために使用することができる。安定な細胞株を作製するために、好適な試薬（例えば、抗生物質 G 4 1 8 など）を用いた選択が必要である。この手法によれば、細胞は、低密度で、好適には 1 0 0 ~ 2 0 0 で好適なディッシュに接種されなければならない。また、選択剤を培地に加えなければならない。選択剤の最適な濃度は、細胞タイプ及び所要の成長速度に依存して変化し、好適には、0 . 1 m g / m l ~ 1 m g / m l の間の濃度で添加される。

【 0 0 3 9 】

ニトロレダクターゼ活性に対する試薬の効果のアッセイのために、細胞がマイクロウェルプレートのウェルに、好ましくは、2 4 ウェル、9 6 ウェル、3 8 4 ウェル又はより高密度のウェル（例えば、1 5 3 6 ウェル）を有するマイクロタイタープレートのウェルに分注される。3 7 での一晩のインキュベーションの後、培地が除かれ、試薬が血清非含有培地において加えられる。血清非含有培地のみを含有するウェルが対照として使用される。インキュベーション後、ニトロレダクターゼの基質が添加され、蛍光シグナルの増大が、好適な蛍光計又は画像化システムを使用して経時的に測定される。

【 0 0 4 0 】

研究中の調節配列による細胞応答を活性化する試薬の活性をアッセイするために、ニトロレダクターゼレポーターで形質移入した細胞が試薬とインキュベーションされ、その後、細胞透過性のスクアライン色素基質（例えば、1 個以上の N O ₂ 基を含むスクアライン色素など）が加えられる。増大した蛍光を放射する形態への色素基質の変換に要する適切な期間の後、細胞からの蛍光放射が、好適な蛍光計又は画像化システムを使用して、選択されたスクアライン色素について適切な波長で測定される。

【 0 0 4 1 】

典型的には、遺伝子レポーターアッセイが、レポーター遺伝子の検出のために、「停止された」条件のもとで、例えば、細胞の溶解のもとで行われる。従って、反応を所定の時間進行させ、その後、停止試薬（通常的には、界面活性剤）で停止させることが可能である。停止試薬の一例が T r i t o n X - 1 0 0 であり、これは、細胞膜を破壊し、酵素活性を放出させるために使用される。加えて、細胞を、標準的な試薬（例えば、ホルムアルデヒドなど）を使用して「固定処理」することができ、ニトロレダクターゼ反応の生成物を細胞内に保持することができる。これは、読み取りのための好適な時間が得られるまで、アッセイプレートの保存を可能にする。

【 0 0 4 2 】

アッセイは、ニトロレダクターゼ活性に対する試薬の活性を測定するために一定の形式にされる場合、アッセイは基質の蛍光の連続測定のもとで実施できる。この形式では、基質の蛍光放射強度が連続的に変化する。反応の経時変化が得られ、速度論的研究がリアルタイムで可能となる。放射された蛍光の測定値を、試薬にさらされていない対照細胞からの蛍光測定値と比較することができ、調節配列で調節される遺伝子発現に対する試薬の効果が存在する場合、その効果は、対照細胞での蛍光に対する試験細胞での蛍光の比率から求められる。

【 0 0 4 3 】

蛍光強度の変化の測定を、光電子増倍管を検出器として含む装置（例えば、“ U l t r a ” 蛍光計 (T e c a n) ）を使用して、又は、マイクロタイタープレートのウェルのすべてを画像化するための電荷結合デバイス (C C D) 画像化装置（例えば、走査画像化装置又は領域画像化装置など）によって行うことができる。L E A D s e e k e r ^{T M} システムは、高密度のマイクロタイタープレートの蛍光画像化を 1 回の走査で可能にする C C D カメラを特徴とする。画像化は定量的且つ迅速であり、画像化用途のために好適な計測は、現在では、マルチウェルプレートの全体を同時に画像化することができる。或いは、細胞を、I N C e l l ^{T M} 1 0 0 0 A n a l y z e r 又は I N C e l l ^{T M} 3 0 0 0 A n a l y z e r を使用して「生細胞」形式で画像化することができる。この形式では、好適な細胞マーカー（例えば、還元された基質の蛍光放射とは異なり、識別可能である蛍

10

20

30

40

50

光放射波長を有する細胞質ゾル蛍光標識、核蛍光標識又は膜蛍光標識など)を細胞に導入しなければならない。好適には、基質によって放射される蛍光の増大が、500nm~900nmの範囲での波長で、好ましくは550nm~780nmの範囲での波長で、最も好ましくは630nm~700nmの範囲での波長で検出される。例えば、化合物(1)(実施例1)については、蛍光放射を、630nmでの励起を用いて645nmでモニターすることができる。或いは、色素を、好適に操作された遺伝子導入動物モデルにインピボで投与することができる。その後、ニトロレダクターゼの活性及び局在化を、好適な光学システム(例えば、eXplore Optix™)を用いた画像化によって求めることができる。

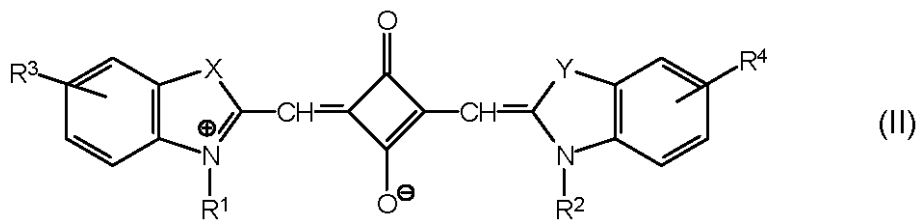
【0044】

10

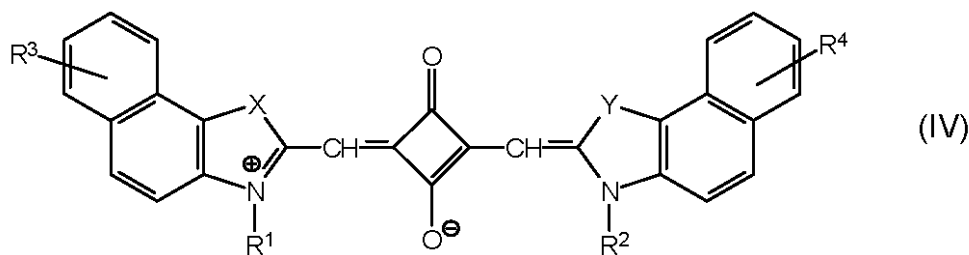
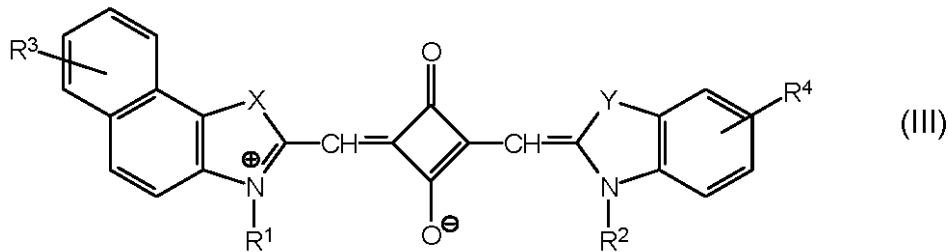
別の態様では、本発明は、次式の色素から選択されるニトロ置換スクアライン色素を提供する。

【0045】

【化11】



20



30

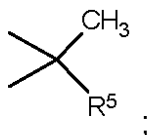
式中、

X及びYは同一又は異なるもので酸素、硫黄、-CH=CH-及び次式の基から選択され、

【0046】

40

【化12】



R¹基及びR²基は独立にC₁~C₄アルキル、-(CH₂)_n-P、-{(CH₂)₂-O}_p-R⁶及びW基から選択され(式中、PはCOOR⁷、SO₃⁻及びOHから選

50

択され、Wは一置換又は二置換ニトロベンジルであり、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ （式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。）から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。

）、
 R^3 基及び R^4 基は独立に水素、 NO_2 、ハロゲン、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ （式中、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ （式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。）から選択され、mは0又は1~5の整数である。）から選択され、

R^5 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであって、 $COOR^7$ （式中、 R^7 は上記で定義した通りである。））、 SO_3^- 又はOHで適宜置換されていてもよく、

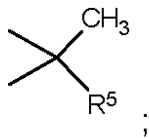
R^1 基、 R^2 基、 R^3 基及び R^4 基の少なくとも1つが1個以上の NO_2 基を含む。

【0047】

好ましくは、X及びYは、酸素、硫黄及び次式の基から選択される。

【0048】

【化13】



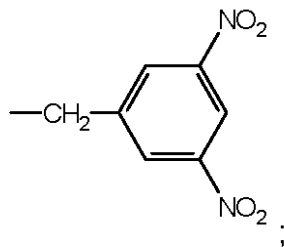
式中、 R^5 はメチルである。

【0049】

一実施形態では、 R^1 基及び R^2 基の一方は次式の基であり、

【0050】

【化14】



残りの R^1 基又は R^2 基は、メチル、エチル及び $-(CH_2)_n-COOR^7$ 基（式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、nは1~10の整数で、好ましくは5又は6である。）から選択される。

【0051】

代替の実施形態では、 R^1 基及び R^2 基が独立に $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-COOR^7$ 及び $-(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ から選択され、式中、 R^6 はメチル又はエチルであり、 R^7 はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ （式中、 R^8 はメチル又はt-ブチルである。）から選択され、n及びpは上記で定義した通りであり、

R^3 基及び R^4 基の少なくともいずれかが NO_2 であり、

残りの R^3 基又は R^4 基は、水素、 SO_3^- 、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ及び $-(CH_2)_m-COOR^7$ （式中、 R^7 は上記で定義した通りであり、mは0又は1~5の整数である。）から選択される。

【0052】

本発明のスクアライン色素は、ニトロレダクターゼ酵素活性の検出及び/又は測定用の

10

20

30

40

50

基質として、特に、ニトロレダクターゼ遺伝子発現量を細胞アッセイにおいて測定するための基質として有用である。

【0053】

本発明の第1の態様による色素の例には、以下のような化合物が挙げられる：

i) 2 - (1 - メチル - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物1) ;

ii) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物2) ;

iii) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - ベンズインドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物3) ;

iv) 2 - (3 - エチル - 6 - ニトロ - 2 - ベンゾチアゾリニリデンメチル) - 4 - (1 - (2 - (2 - メトキシエトキシ) エチル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物4) ;

v) 2 - (1 - エチル - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物5) ;

vi) 2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 5 - メトキシ - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物6) ;

vii) 3 - (5 - カルボキシペンチル) - 1 - (2 - (2 - メトキシエトキシ) エチル - 3 - メチル - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - インドール - 2 - イリデンメチル - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 3H - インドリウム - 2 - イル) メチレン) - 3 - オキソシクロプト - 1 - エン - 1 - オレート (化合物7) ; 及び

viii) 2 - ((3, 3 - ジメチル - 5 - スルホ - 1 - (4 - スルホブチル) - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - インドール - 2 - イリデン) メチル) - 4 - ((1 - メチル - 6 - ニトロキノリニウム - 2 - イル) メチレン) - 3 - オキソシクロプト - 1 - エン - 1 - オレート (化合物8) 。

【実施例】

【0054】

本発明は、図面及び実施例を参照してさらに例示される。

【0055】

実施例1

2 - (1 - メチル - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) - 4 - (1 - (3, 5 - ジニトロベンジル) - 3, 3 - ジメチル - 2 - インドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1, 3 - ジオレート (化合物(1)) の調製

【0056】

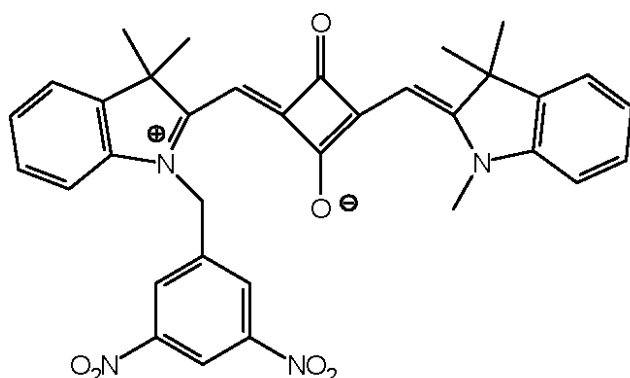
10

20

30

40

【化15】



化合物(1)

10

1.1 1-(3,5-ジニトロベンジル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨードの調製

2,3,3-トリメチルインドレニン(1.64g)に3,5-ジニトロベンジルヨード(3.71g)及びジクロロベンゼン(15ml)を加えた。90℃に6時間加熱した後、混合物を冷却し、得られた析出物を濾過で除いた。固体をジクロロベンゼン(10mlで2回)及びエーテル(50mlで2回)で洗浄した。この物質を真空乾燥機で乾燥して、生成物を黄色の固体として得た(2.69g)。

20

MALDI-TOF(C₁₈H₁₆N₃O₄の理論M⁺340)339、340。

【0057】

1.2 化合物(1)の調製

1-(3,5-ジニトロベンジル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨード(100mg)に、3-ヒドロキシ-4-(1,3,3-トリメチル-1,3-ジヒドロインドール-2-イリデンメチル)シクロブタ-3-エン-1,2-ジオン(54mg)、ピリジン(2.25ml)、酢酸(2.25ml)及び無水酢酸(0.5ml)を加えた。混合物を6時間加熱還流した後、溶媒を、ローターエバポレーションを使用して除いた。残渣を水とジクロロメタンとの間で分配し、有機相を薄い炭酸水素ナトリウム水溶液及び1MのHClで順次洗浄した。溶媒を除き、シリカでのフラッシュカラムクロマトグラフィーを行った(MeOH/DCM)。得られた物質を逆相HPLC(CH₃CN/H₂O/TFA)でさらに精製した。

30

MALDI-TOF(C₃₄H₃₀N₄O₆の理論M⁺590)591。

【0058】

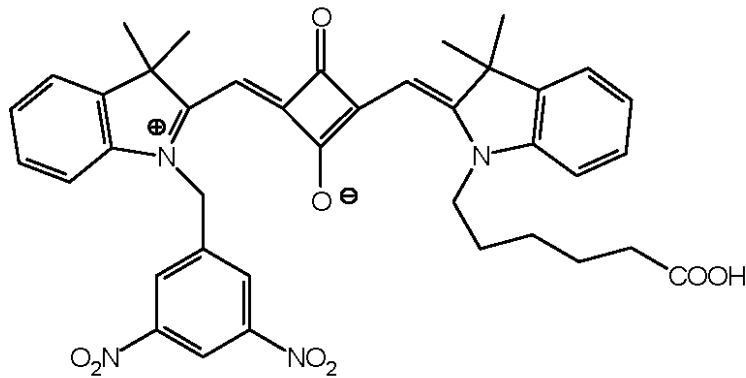
実施例2

2-(1-(5-カルボキシペンチル)-3,3-ジメチル-2-インドリニリデンメチル)-4-(1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-2-インドリニリデンメチル)シクロブテンジイリウム-1,3-ジオレート(化合物(2))の調製

40

【0059】

【化16】



化合物(2)

1 - (3 , 5 - ジニトロベンジル) - 2 , 3 , 3 - トリメチル - 3 H - インドリウムヨ
ージド (4 6 7 m g) に、 3 , 4 - ジヒドロキシ - 3 - シクロブテン - 1 , 2 - ジオン (10
1 1 0 m g)、 1 - (5 - カルボキシペンチル) - 2 , 3 , 3 - トリメチル - 3 H - イン
ドリウムヨージド (3 5 4 m g)、ピリジン (4 . 5 m l)、酢酸 (4 . 5 m l) 及び無
水酢酸 (1 m l) を加えた。混合物を 3 時間加熱還流した後、溶媒を、ローターエバポレ
ーションを使用して除いた。この粗製物をシリカでのフラッシュカラムクロマトグラフィー
(Me O H / D C M による溶出) に供した。生成物を含有する画分を一緒にし、溶媒を
除いた。得られた物質を逆相 H P L C (C H ₃ C N / H ₂ O / T F A) でさらに精製した
。

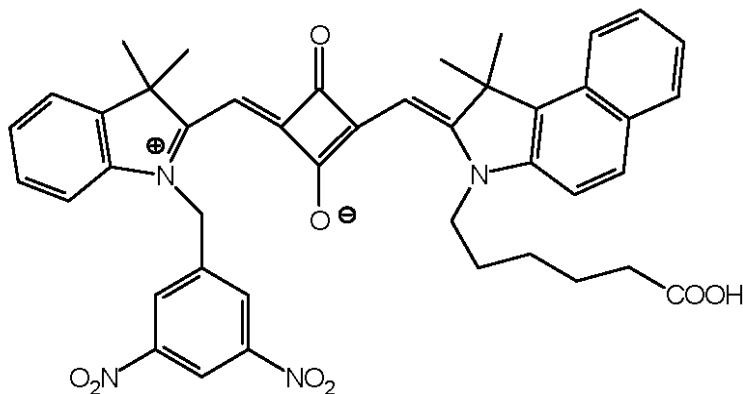
【0060】

実施例 3

2 - (1 - (5 - カルボキシペンチル) - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ベンゾインドリニリ
デンメチル) - 4 - (1 - (3 , 5 - ジニトロベンジル) - 3 , 3 - ジメチル - 2 - イン
ドリニリデンメチル) シクロブテンジイリウム - 1 , 3 - ジオレート (化合物 (3)) の
調製

【0061】

【化17】



化合物(3)

3 . 1 3 - (5 - カルボキシペンチル) - 1 , 1 , 2 - トリメチル - 1 H - ベンゾ [
e] インドリウムヨージドの調製

1 , 1 , 2 - トリメチル - 1 H - ベンゾ [e] インドレニン (1 6 . 2 g) に 6 - プロ
モヘキサン酸 (3 1 . 2 g) 及びジクロロベンゼン (5 0 m l) を加えた。混合物を 1 1
0 で 1 3 6 時間加熱し、室温に冷却し、氷で冷却し、濾過した。フィルターケーキをジ 50

クロロベンゼン (50 ml) 及びジエチルエーテル (50 ml) で洗浄し、低真空下で 40 で乾燥して、表題化合物をベージュ色の固体として得た (25.38 g)。

LCMS (C₂₁H₂₆NO₂ の理論 M⁺ 324) 324。

【0062】

3.2 化合物(3)の調製

1-(3,5-ジニトロベンジル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨージド (132 mg) に、3-(5-カルボキシペンチル)-1,1,2-トリメチル-1H-ベンゾ[e]インドリウムヨージド (114 mg)、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン (32 mg)、ピリジン (4.5 ml)、酢酸 (4.5 ml) 及び無水酢酸 (1 ml) を加えた。混合物を 90 に 4 時間加熱した後、溶媒を、ローターエバポレーションを使用して除いた。シリカでのフラッシュカラムクロマトグラフィーを行い (EA/DCM)、該当する画分を一緒にし、濃縮した。得られた物質を逆相 HPLC (CH₃CN/H₂O/TFA) でさらに精製して、1.7 mg を得た。

MALDI-TOF (C₄₃H₄₀N₄O₈ の理論 M⁺ 740) 741。

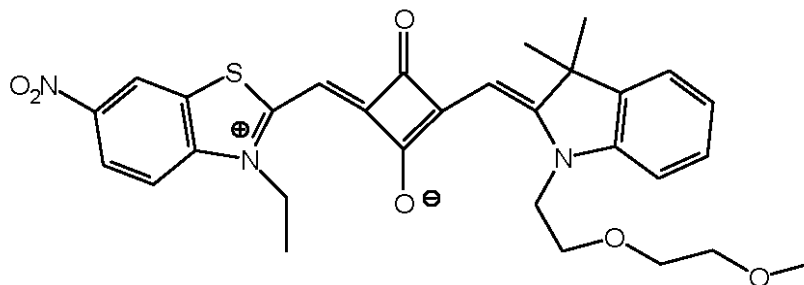
【0063】

実施例 4

2-(3-エチル-6-ニトロ-2-ベンゾチアゾリニリデンメチル)-4-(1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-3,3-ジメチル-2-インドリニリデンメチル)シクロブテンジイリウム-1,3-ジオレート(化合物(4))の調製

【0064】

【化18】



化合物(4)

4.1 1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムブロミドの調製

2,3,3-トリメチルインドレニン (1.59 g) に 1-ブロモ-2-(2-メトキシエトキシ)エタン (2.75 g) 及びジクロロベンゼン (5 ml) を加えた。混合物を 70 に一晩加熱した。揮発物を除き、物質を HPLC によって精製した。

MALDI-TOF (C₁₆H₂₄NO₂ の理論 M⁺ 262) 263。

【0065】

4.2 2-メチル-6-ニトロベンゾチアゾールの調製

濃硫酸 (80 ml) における 2-メチルベンゾチアゾール (22 g) を -5 に冷却した。濃硫酸 (12 ml) / 濃硝酸 (20 ml) の混合物を、温度を 5 未満で維持するように加えた (約 1.5 時間)。この後、混合物を室温に加熱し、溶液を氷に注ぎ、黄色の析出物を得た。固体を濾過で除き、エタノールから再結晶した。濾過後、固体をエタノールで洗浄し、真空乾燥機で乾燥して、18 g の所望する生成物を得た。

LCMS (C₈H₆N₂O₂S の理論 M⁺ 194) 195。

【0066】

4.3 3-エチル-2-メチル-6-ニトロベンゾチアゾリウムヨージドの調製

2-メチル-6-ニトロベンゾチアゾール (0.36 g) にヨウ化エチル (1.5 ml

10

20

30

40

50

)及びジクロロベンゼン(20ml)を加えた。混合物を120℃に2日間加熱した後、室温に冷却した。酢酸エチルを加え、得られた析出物を濾過で除いた。真空乾燥域で乾燥して所望する物質を得た(80mg)。

【0067】

4.4 化合物(4)の調製

3-エチル-2-メチル-6-ニトロベンゾチアゾリウムヨード(400mg)に、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(128mg)、1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムブロミド(420mg)、ピリジン(20ml)、酢酸(18ml)及び無水酢酸(8ml)を加えた。混合物を120℃に4時間加熱した後、室温に冷却した。揮発物をローターエバポレーションによって除いた。残渣をDCMに溶解し、シリカでのフラッシュクロマトグラフィー(DCM/EA/MeOH)を行った。物質を調製用TLCでさらに精製して、23mgを得た。

LCMS(C₃₀H₃₁N₃O₆Sの理論M⁺561)560。

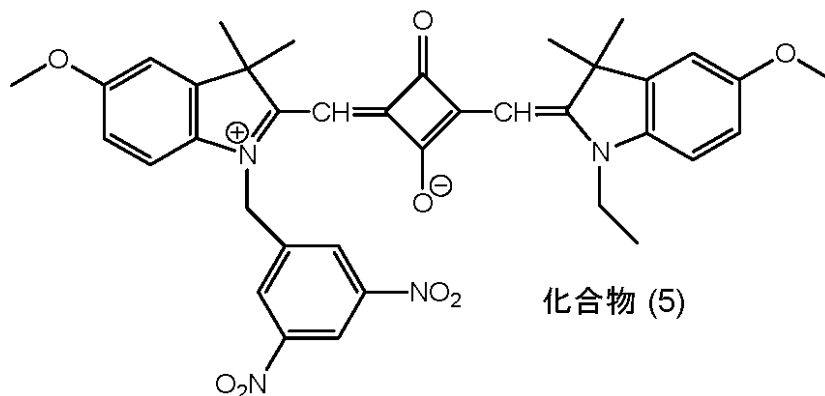
【0068】

実施例5

2-(1-エチル-3,3-ジメチル-5-メトキシ-2-インドリニリデンメチル)-4-(1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-5-メトキシ-2-インドリニリデンメチル)シクロブテンジイリウム-1,3-ジオレート(化合物(5))の調製

【0069】

【化19】



5.1 5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドールの調製

4-メトキシフェニルヒドラジン塩酸塩(4.84g)に3-メチル-2-ブタノン(6.4ml)及び酢酸(45ml)を加えた。混合物を100℃に2.5時間加熱した後、溶媒をローターエバポレーションによって除いた。フラッシュカラムクロマトグラフィーで生成物を得た(4.66g)。

¹H(270MHz;CDCl₃)1.3(6H,s)、2.2(3H,s)、3.8(3H,s)、6.8(2H,m)、7.4(1H,m)。

【0070】

5.2 1-エチル-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨードの調製

5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドール(1.9g)にヨードエタン(5ml)及び1,2-ジクロロベンゼン(10ml)を加えた。混合物を80℃に4時間加熱した後、混合物を冷却し、析出物を濾過で除き、ジクロロベンゼン及びジエチルエーテルで順次洗浄した。真空乾燥機で乾燥して生成物を得た(3g)。

¹H(270MHz;CDCl₃)1.6(3H,t)、1.6(6H,s)、3.1(3H,s)、3.9(3H,s)、4.7(2H,q)、7.1(2H,m)、7.7(

10

20

30

40

50

1 H, m)。

【0071】

5.3 1-(3,5-ジニトロベンジル)-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨージドの調製

5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドール(1.90g)に3,5-ジニトロベンジルヨージド(4.62g)及び1,2-ジクロロベンゼン(10ml)を加えた。混合物を75℃で3時間加熱し、その期間中にオレンジ色の固体が分離した。その後、混合物を氷浴で冷却し、固体画分を濾過によって回収した。固体をジクロロベンゼン及びジエチルエーテルで順次洗浄し、真空下で乾燥して、生成物を得た(2.62g)。

10

¹H(270MHz; DMSO-d₆) 1.6(6H, s)、2.9(~3H, s)、3.85(3H, s)、6.1(2H, s)、7.1(1H, dd)、7.55(1H, d)、7.8(1H, d)、8.65(2H, s)及び8.8(1H, s)。

【0072】

5.4 化合物(5)の調製

1-(3,5-ジニトロベンジル)-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨージド(250mg)に、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(55mg)、1-エチル-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨージド(175mg)、ピリジン(2.25ml)、酢酸(2.25ml)及び無水酢酸(0.5ml)を加えた。混合物を5時間加熱還流した後、溶媒を、ローターエバポレーションを使用して除いた。粗製物をDCMと1MのHClとの間で分配した。有機層を水でさらに洗浄した。シリカでのフラッシュカラムクロマトグラフィーを行い(DCM/MeOH)、該当する画分を一緒にし、濃縮した。得られた物質を逆相HPLC(CH₃CN/H₂O/TFA)でさらに精製した。

20

MALDI-TOF(C₃₇H₃₆N₄O₈の理論M⁺664)665。

【0073】

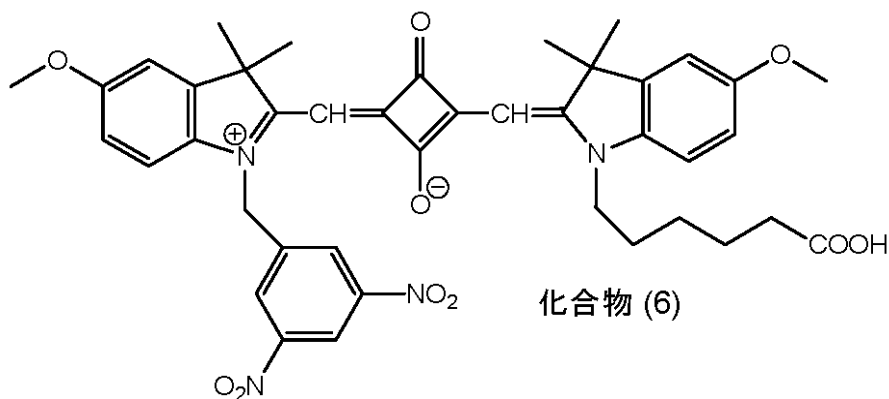
実施例6

2-(1-(5-カルボキシペンチル)-3,3-ジメチル-5-メトキシ-2-インドリニリデンメチル)-4-(1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-5-メトキシ-2-インドリニリデンメチル)シクロブテンジイリウム-1,3-ジオレート(化合物(6))の調製

30

【0074】

【化20】



40

6.1 1-(5-カルボキシペンチル)-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムブロミドの調製

5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドール(1.9g)に6-ブロモヘキサン酸(3g)及び1,2-ジクロロベンゼン(10ml)を加えた。混合物を10

50

0 に3時間加熱した後、室温に冷却した。ジエチルエーテルを加え、析出物を濾過によって分離した。真空乾燥機で乾燥して生成物を得た(3.12g)。

^1H (270 MHz; CDCl_3) 1.4 (2H, m)、1.5 (6H, s)、1.6 (2H, m)、1.8 (2H, m)、2.2 (2H, m)、2.8 (3H, s)、3.8 (3H, s)、4.4 (2H, m)、7.1 (1H, m)、7.5 (1H, m)、7.9 (1H, m)。

【0075】

6.2 化合物(6)の調製

1-(3,5-ジニトロベンジル)-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨード(500mg)(5.3を参照のこと)に、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(114mg)、1-(5-カルボキシペンチル)-5-メトキシ-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムブロミド(385mg)、ピリジン(4.5ml)、酢酸(4.5ml)及び無水酢酸(1ml)を加えた。混合物を110 に4.5時間加熱した後、溶媒を、ローターエバポレーションを使用して除いた。この粗製物をDCMと1MのHClとの間で分配した。有機層を水でさらに洗浄した。シリカでのフラッシュカラムクロマトグラフィーを行い(DCM/MeOH)、該当する画分を一緒にし、濃縮した。得られた物質を逆相HPLC($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$)でさらに精製した。

MALDI-TOF ($\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$ の理論 $\text{M}^+ 750$) 751。

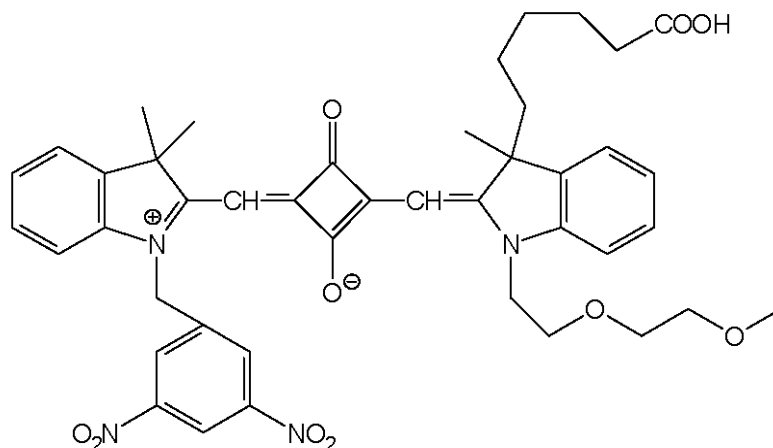
【0076】

実施例7

3-(5-カルボキシペンチル)-1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-3-メチル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデンメチル-4-((1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-3H-インドリウム-2-イル)メチレン)-3-オキソシクロブタ-1-エン-1-オレート(化合物(7))の調製

【0077】

【化21】



化合物(7)

7.1 3-(5-カルボキシペンチル)-1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-2,3-ジメチル-3H-インドリウムブロミドの調製

6-(2,3-ジメチル-3H-インドール-3-イル)ヘキサン酸(100mg)に1-プロモ-2-(2-メトキシエトキシ)エタン(1ml)を加え、混合物を90 に一晩加熱した。冷えたとき、ジエチルエーテル(10ml)を加え、物質を濾過で除いた。

LCMS ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NO}_4$ の理論 $\text{M}^+ 362$) 363。

【0078】

7.2 化合物(7)の調製

3-(5-カルボキシペンチル)-1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-2,3-ジメチル-3H-インドリウムプロミドに、スクエア酸(44mg)、1-(3,5-ジニトロベンジル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウムヨージド(177mg)、ピリジン(4.5ml)、酢酸(4.5ml)及び無水酢酸(1ml)を加えた。混合物を80℃に一晩加熱した。冷えたとき、調製用HPLCを行って、所望する物質を得た。

LCMS(C₄₃H₄₆N₄O₁₀の理論M⁺778)779。

【0079】

実施例8

化合物(7)のアセトキシメチルエステル誘導体の調製

3-(5-カルボキシペンチル)-1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-3-メチル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデンメチル-4-((1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-3H-インドリウム-2-イル)メチレン)-3-オキソシクロブタ-1-エン-1-オレート(14mg)に、アセトニトリル(3ml、Hunigs塩基(32μl)及び酢酸プロモメチル(9μl)を加えた。室温で2時間攪拌した後、HPLCを行って、所望する物質を得た(8mg)。

LCMS(C₄₆H₅₀N₄O₁₂の理論M⁺850)851。

【0080】

実施例9

化合物(7)のエチルエステル誘導体の調製

エタノール(10ml)にアセチルクロリド(1ml)を加え、その後、3-(5-カルボキシペンチル)-1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)-3-メチル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデンメチル-4-((1-(3,5-ジニトロベンジル)-3,3-ジメチル-3H-インドリウム-2-イル)メチレン)-3-オキソシクロブタ-1-エン-1-オレート(2mg)を加えた。混合物を室温で5時間攪拌した後、揮発物を真空下で除いた。

LCMS(C₄₅H₅₀N₄O₁₀の理論M⁺806)807。

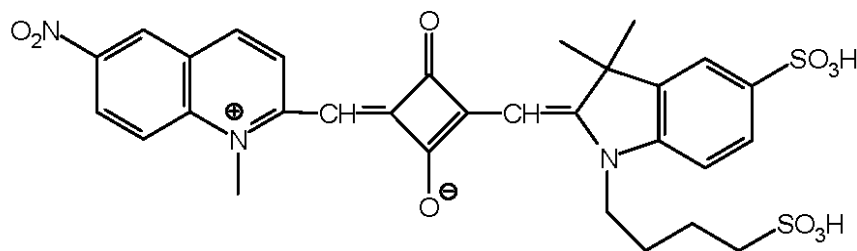
【0081】

実施例10

2-((3,3-ジメチル-5-スルホ-1-(4-スルホブチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデン)メチル)-4-((1-メチル-6-ニトロキノリニウム-2-イル)メチレン)-3-オキソシクロブタ-1-エン-1-オレート(化合物(8))の調製

【0082】

【化22】



化合物(8)

10.1 1,2-ジメチル-6-ニトロキノリニウムヨージドの調製

2-メチル-6-ニトロキノリン(0.5g、2.66mmol)及びヨードメタン(

10

20

30

40

50

1 ml、16 mmol) をアセトニトリル (10 ml) 中で一緒に48時間加熱還流した。混合物を室温に冷却し、灰色の物質が溶液から結晶化し、これを濾過して除いた。これは出発物質であることが示された。ろ液を酢酸エチル (200 ml) で希釈して、黄/緑色の析出物を得た。生成物を濾過して除き、酢酸エチルで洗浄した後、真空下で乾燥した。生成物を黄/緑色の固体として得た (147 mg、16.8%)。

LCMS ($C_{11}H_{11}N_2O_2$ の理論 $M^+ 203$) M^+ が 203 である 1 つだけの成分。

【0083】

10.2 2,3,3-トリメチル-5-スルホ-1-(4-スルホブチル)-3H-インドリウムのカリウム塩の調製

2,3,3-トリメチルインドレニン-5-スルホネート (カリウム塩) (6 g、21.6 mmol) 及び 1,4-ブタンスルトン (55 ml) を一緒に窒素下において90で24時間加熱した。冷えたとき、反応混合物物を酢酸エチルで希釈し、得られた固体を濾過して除き、酢酸エチルで洗浄し、真空下で乾燥した。生成物を薄いピンク色の固体として得た (10.3 g)。生成物を $^1H-NMR (CD_3OD)$ によって特徴付けた。

【0084】

10.3 化合物 (8) の調製

1,2-ジメチル-6-ニトロキノリニウムヨージド (100 mg、0.30 mmol)、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン (34.5 mg、0.30 mmol) 及び 2,3,3-トリメチル-5-スルホ-1-(4-スルホブチル)-3H-インドリウムのカリウム塩 (124 mg、0.30 mmol) を一緒に、ピリジン (3 ml)、酢酸 (3 ml) 及び無水酢酸 (2 ml) の混合物において120で1時間加熱した。反応混合物は、暗い緑/青色に変わることが認められる。冷えたとき、反応混合物を酢酸エチルに注いで、生成物を析出させた。生成物を濾過して除き、混合物を、水/アセトニトリル/0.1% TFA の溶出液混合物を使用する RPHPLC によって精製した。生成物を暗青色の固体として得た (14 mg)。

LCMS ($C_{30}H_{30}N_3O_{10}S_2$ の理論 $M^+ 656$) ES^- は $(M-H)^{2-}$ の再構成を与え、 M^- を 654 において与える。

【0085】

実施例 11

ニトロレダクターゼ遺伝子レポーターアッセイにおける基質としてのニトロ置換スクアリン色素 (化合物 (1)) とニトロ置換シアニン色素 (化合物 (i) 及び化合物 (ii)) との比較研究

NF- κ B 応答エレメントを NTR 遺伝子の 上流側に含有するレポーター構築物を pDC511 ($Admax^TM$) において構築した。このレポーターをヘルパー細胞 (HEK293) において Ad5 のゲノム DNA とパッケージングし、複製不能アデノウイルスを回収した。

【0086】

HeLa 細胞をウイルス形質導入に先立って24時間継代培養し、5% CO_2 の加湿雰囲気中で、10% のウシ胎児血清 + 2 mM の L グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地において37で一晩インキュベーションした。一晩のインキュベーションの後、細胞を、トリプシンを用いてそれぞれのフラスコから剥がし、細胞の懸濁物を作製するためにプールし、細胞濃度を求めた。HeLa 細胞の懸濁物を、組織培養フラスコの底を覆うための十分な最少体積の完全培地においてウイルスと所定の感染多重度 (MOI) で混合した (典型的には、 $T75cm^2$ の Costar フラスコにおいて 10^6 個の細胞について 15 ml)。細胞/ウイルス懸濁物をインキュベーターに戻し、5% CO_2 の加湿雰囲気において37で一晩放置した。翌日、培地をそれぞれのフラスコから除き、細胞の単層物を 5 ml ~ 10 ml の PBS ですすぎ洗いした。細胞を、トリプシンを用いて剥がし、形質導入された細胞の懸濁物を作製するためにプールした。細胞懸濁物の濃度を求め、 5.0×10^4 細胞/ml に調節した。200 μ l の細胞懸濁物を 96 ウェルマイクロ

10

20

30

40

50

タイタープレートの各ウェルに分注した(約 10^4 細胞/ウェル)。すべてのプレートを5%CO₂の加湿雰囲気において37℃で一晩インキュベーションした。一晩の培地を200μlのPBSと取り替えた。PBSを各ウェルから除き、血清非含有ダルベッコ改変イーグル培地におけるTNF-αアゴニスト(100ng/ml、90μl)と置き換え、又は、対照(90μlの血清非含有培地)を複製ウェルに加えた。プレートをインキュベーターに戻し、5%CO₂の加湿雰囲気において37℃で2時間置いた。この後、化合物(i)及び化合物(iii)(ニトロ置換シアニン色素)並びに化合物(I)(ニトロスクアライン色素)の10μM溶液の10μlを複製ウェルに個々に分注し、プレートを5%CO₂の加湿雰囲気において37℃に戻した。蛍光シグナルをTecan“Ultra”蛍光計で経時的にモニターした。すべての基質を、装置による人工的作用を避けるために、同一条件のもとで測定した。

10

【0087】

図2では、ニトロ基含有スクアライン色素(化合物(1))の成績が、ニトロ基含有シアニン色素(化合物(i)及び化合物(iii))と比較される。化合物(1)についてのシグナル対バックグラウンド比は、(化合物(i)についての1.3:1と比較して)3:1であった。このことは、蛍光シグナルにおける類似する増大と一緒に増大した、バックグラウンド蛍光の減少を明瞭に明らかにしている。

【0088】

実施例12

ニトロレダクターゼ遺伝子レポーターアッセイにおける基質としてのニトロ置換スクアライン色素(化合物(1)及び化合物(2))の比較研究

20

実施例11に記載される方法論と同じ方法論を使用して、HeLa細胞をアデノウイルスのNF-κBレポーター系で形質導入した。適切な時間で、化合物(1)及び化合物(2)を複製ウェルに個々に加えた。蛍光シグナルをTecan Ultra蛍光計で経時的にモニターした。データを図3に示す。

【0089】

化合物(2)は、アゴニスト(TNF-α)の存在下で化合物(1)と比較したとき、アッセイシグナルの著しい増大を明瞭に示している。化合物(2)はまた、レポーターを含有する対照サンプル細胞における基礎的な転写活性を検出することができた。この基礎活性は、アゴニストではなく、NF-κBレポーターを含有する細胞と、モック形質導入細胞との間では異なる。化合物(1)は、この低レベルの活性を検出するために十分な感度を有していなかった。アッセイ感度におけるこれらの改善は、改善された化合物の細胞内での利用性の直接的な結果であると考えられる。従って、化合物(2)は、発現したレポータータンパク質とも同じ区画である細胞の細胞質において利用可能であると考えられる。アッセイプレートの顕微鏡画像化は、強い赤色の細胞質染色をNTR発現後に有する細胞をもたらしている。

30

【0090】

図2及び図3からのデータは、ニトロ置換スクアライン色素(化合物(2))の改善された性質が、色素へのスクアリリウム成分の導入及びヘキサ酸基の付加の両方の結果であることを例示している。化合物(iii)(ニトロ置換シアニン色素)におけるヘキサ酸基の存在は、化合物(i)の細胞局在化を変化させるためにも、又は、NTRアッセイにおけるその成績を変化させるためにも十分ではなかった。

40

【0091】

実施例13HeLa細胞における化合物(2)の局在化

HeLa細胞を120,000個/ディッシュで置床し、10%のウシ胎児血清+2mMのL-グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地において37℃で一晩インキュベーションした。一晩の培地を除き、1μMの化合物(2)を含有する血清非含有培地の2mlと置き替えた。ディッシュを2時間インキュベーションに戻した後、Zeiss共焦点顕微鏡での画像化を行った。

50

【0092】

図4は、HeLa細胞における化合物(2)の取り込み及び分布を示す。化合物(2)がオルガネラに隔離されたことを示す証拠はなかった。細胞構造体のバックグラウンド標識化の証拠が認められるが、これはアッセイ成績を損なっていない。

【0093】

実施例14生細胞NTRアッセイにおけるニトロレダクターゼ基質としての化合物(2)、化合物(3)及び化合物(4)の評価

ニトロ置換スクアライン色素(化合物(2)、化合物(3)及び化合物(4))のニトロレダクターゼ基質としての利用性のさらなる例が生細胞NTRアッセイにおいて示される(図5)。化合物(3)について図5に示されるデータは、より長い波長で発光するスクアライン色素基質が、色素の共役系を延ばすことによって得られることを示している。ヘキサ酸基の存在は、細胞の固定処理によって明らかにされるように、細胞内でのプロープの保持特性を増大させている。化合物(2)及び化合物(3)は、固定処理後におけるシグナルの低下がほとんどないことを示し、一方で、化合物(4)は固定処理後においてシグナルのほぼ50%を失っている。

10

【0094】

実施例15基質に対するNTRの作用の後での吸収極大の変化の例

DMSOにおける化合物(8)(1mmol)(4 μ l)をPBS緩衝液(0.01M)(1.76ml)に希釈した。溶液のUV/Visスペクトルを測定した。この基質は682nmにおける吸収極大(AU=0.22)を有する。溶液にNADH(PBSにおいて0.01M)(200 μ l)及びNTR酵素(446ng/ml、37 μ l)を加え、混合物を室温で30分間放置した。この後、吸収スペクトルを再測定した。621nmにおける新しい吸収極大(AU=0.17)が観測される。

20

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】実施例11の場合のようにニトロレダクターゼ遺伝子レポーターアッセイにおける基質としての本発明のニトロ置換スクアライン色素(化合物(1))と比較される2つのニトロ置換シアニン型色素(化合物(i)及び化合物(iii))の分子構造を示す。

30

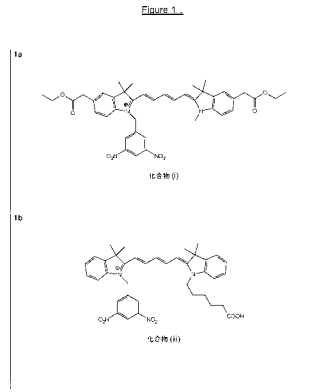
【図2】NTR遺伝子レポーターアッセイにおけるニトロ置換スクアライン(化合物(1))と比較される2つのニトロ置換シアニン色素(化合物(i)及び化合物(iii))の比較を示す。

【図3】ニトロレダクターゼ遺伝子レポーターアッセイにおける基質としてのニトロ置換スクアライン色素(化合物(1)及び化合物(2))の比較研究を示す。

【図4】HeLa細胞における化合物(2)の分布を示す。

【図5】生細胞NTRアッセイにおけるニトロレダクターゼ基質としての化合物(2)、化合物(3)及び化合物(4)の評価を示す。

【 図 1 】

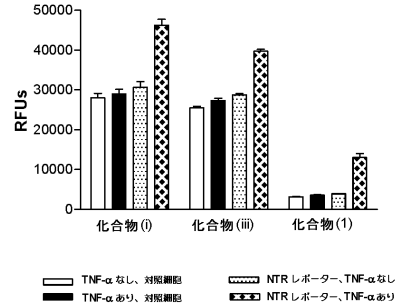


【 図 2 】

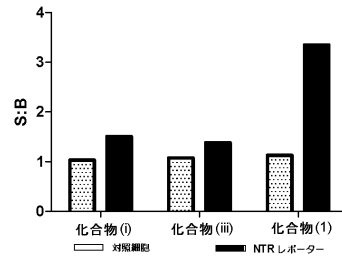
Figure 2

2種類のスニトロ置換シアニン色素(化合物(i)及び(iii))とスニトロ置換スクアライン色素(化合物(1))との対比

2a. 蛍光発光



2b. シグナルバックグラウンド

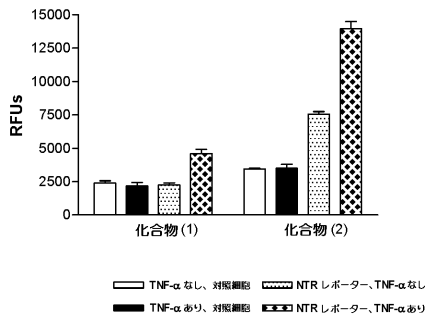


【 図 3 】

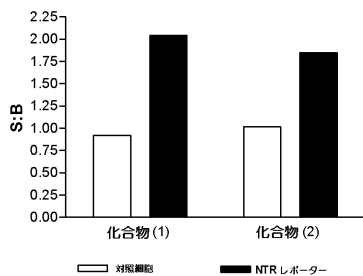
Figure 3

スニトロレダクターゼ遺伝子レポーターアッセイにおける基質としてのスニトロ置換スクアライン色素(化合物(1)及び(2))の比較研究

3a. 蛍光発光



3b. シグナルバックグラウンド

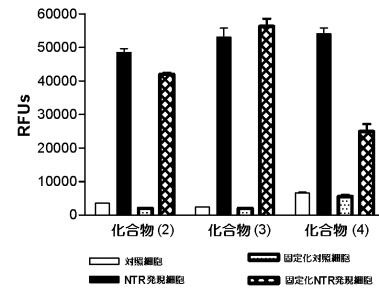


【 図 5 】

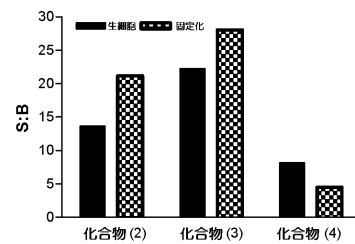
Figure 5

生細胞NTRアッセイにおけるスニトロレダクターゼ基質としての化合物(2)、(3)及び(4)の評価

5a. 蛍光発光



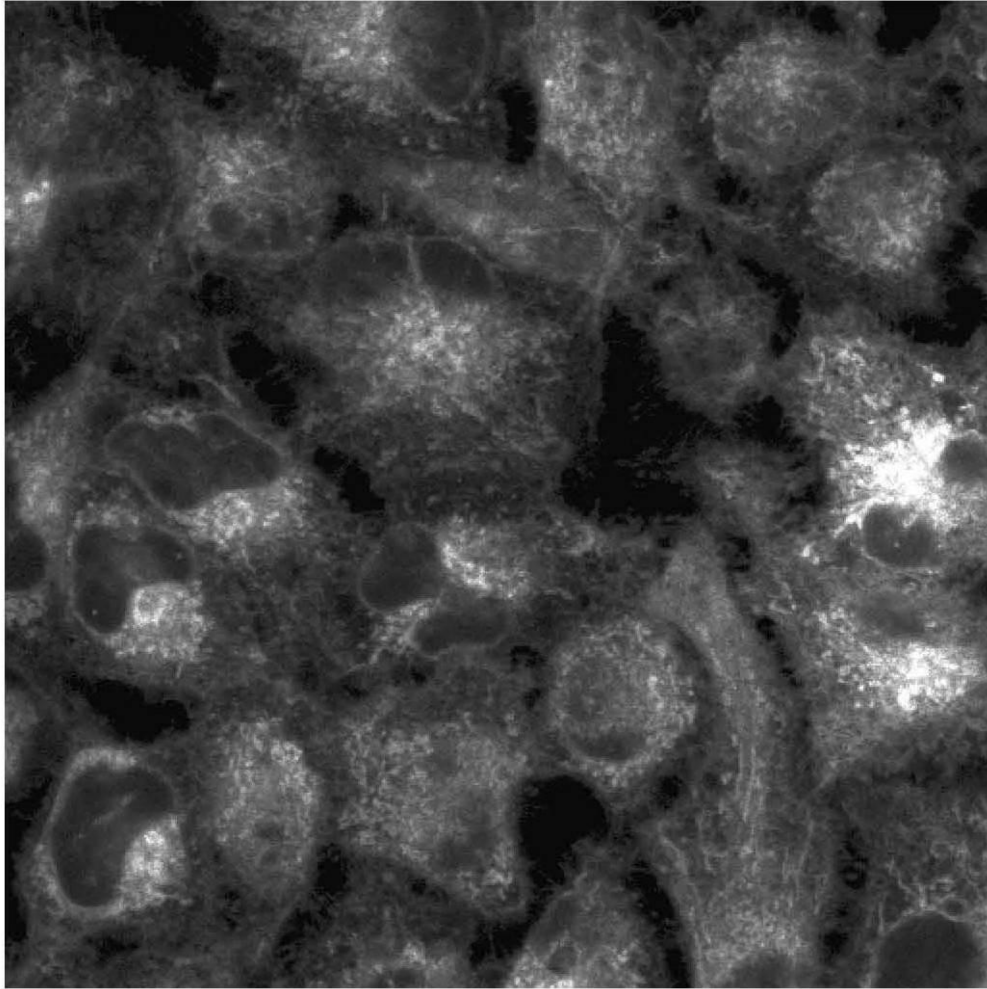
5b. シグナルバックグラウンド



【 図 4 】

Figure 4

HeLa細胞における化合物(2)の分布



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/78 C

(72)発明者 ウエスト, リチャード・マーティン
英国、カーディフ・シーエフ14・7ワイティール、ホイットチャーチ、フォレスト・ファーム・エ
ステート、ザ・メイナード・センター、アマシャム・バイオサイエンス・ユーケイ・リミテッド(番地なし)

(72)発明者 イスマイル, ラーマン
英国、カーディフ・シーエフ14・7ワイティール、ホイットチャーチ、フォレスト・ファーム・エ
ステート、ザ・メイナード・センター、アマシャム・バイオサイエンス・ユーケイ・リミテッド(番地なし)

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 特表2003-522333(JP, A)
特表2000-508709(JP, A)
特開平07-160028(JP, A)
国際公開第03/087052(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/26
C09B 23/00-23/16
CAPlus/REGISTRY(STN)
PubMed