

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成20年7月3日(2008.7.3)

【公表番号】特表2008-500828(P2008-500828A)  
 【公表日】平成20年1月17日(2008.1.17)  
 【年通号数】公開・登録公報2008-002  
 【出願番号】特願2007-514089(P2007-514089)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/26 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/26

【手続補正書】

【提出日】平成20年5月14日(2008.5.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、  
 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NO<sub>2</sub>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。

【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<sub>2</sub>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。

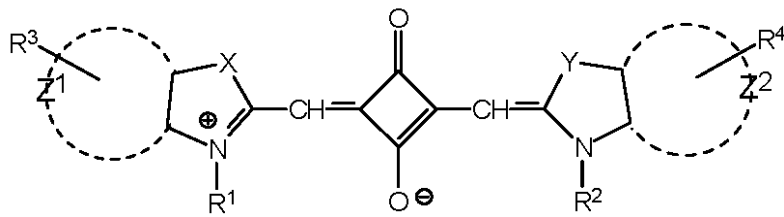
【請求項5】

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。

【請求項6】

前記スクアライン色素が次の式(I)のものである、請求項1乃至請求項5のいずれか1項記載の方法。

## 【化 1】



(I)

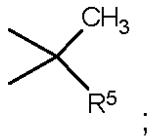
式中、

$R^3$  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】



$R^1$  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、

$R^1$  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。

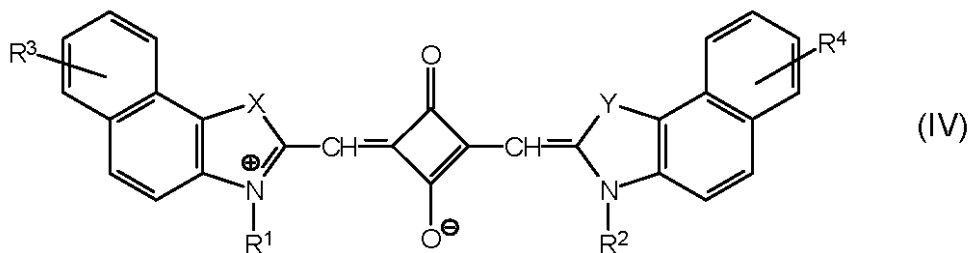
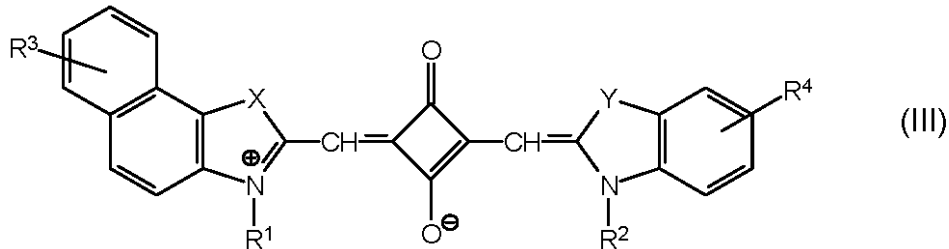
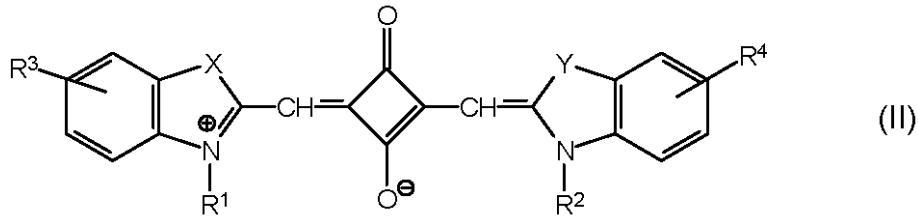
## 【請求項 7】

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 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

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 7 のいずれか 1 項記載の方法。

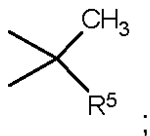
## 【化3】



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4】



(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、

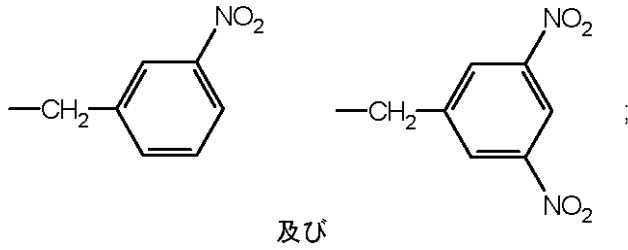
残りの $R^1$ 基又は $R^2$ 基があれば、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_n-P$ 及び $-(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ から選択され(式中、Pは $COOR^7$ 、 $SO_3^-$ 及びOHから選択され、 $R^6$ はメチル又はエチルであり、 $R^7$ はH、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $CH_2OC(O)R^8$ (式中、 $R^8$ はメチル又はt-ブチルである。)から選択され、nは1~10の整数であり、pは1~3の整数である。)、

$R^3$ 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。

## 【請求項9】

$R^1$ 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5】

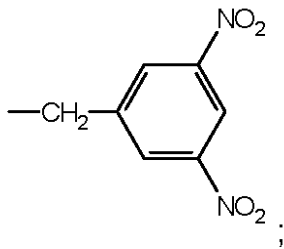


残りの  $\text{R}^1$  基又は  $\text{R}^2$  基がメチル及びエチルから選択されるか、或いは  $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOR}^7$  基 (式中、 $\text{R}^7$  は  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$  アルキル及び  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$  (式中、 $\text{R}^8$  はメチル又は  $t$ -ブチルである。)) から選択され、 $n$  は  $1 \sim 10$  の整数であり、好ましくは  $5$  又は  $6$  である。) である、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

W が次式の基であり、

## 【化6】

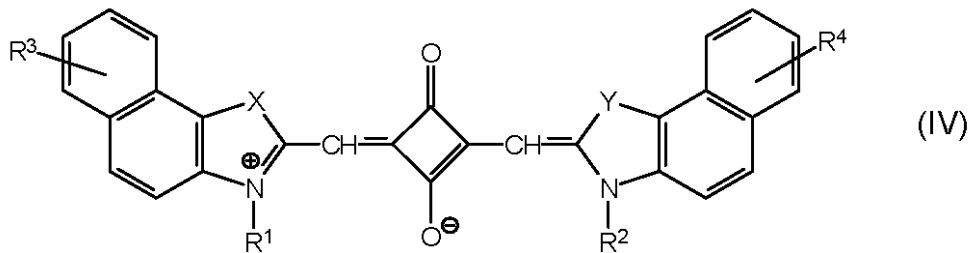
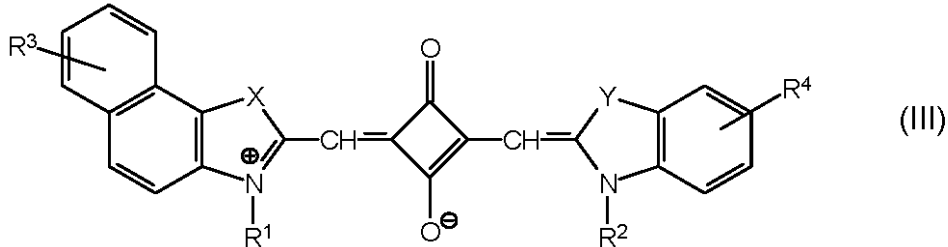
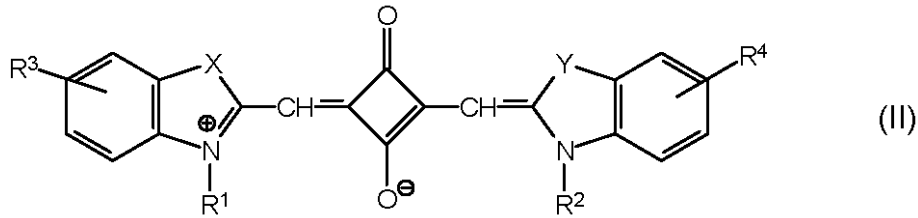


残りの  $\text{R}^1$  基又は  $\text{R}^2$  基が上記で定義した通りである、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

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 7 のいずれか 1 項記載の方法。

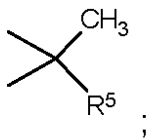
## 【化 7】



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 8】



( 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 1 2】

ニトロレ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 1 1 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、

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 13】

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 11 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。

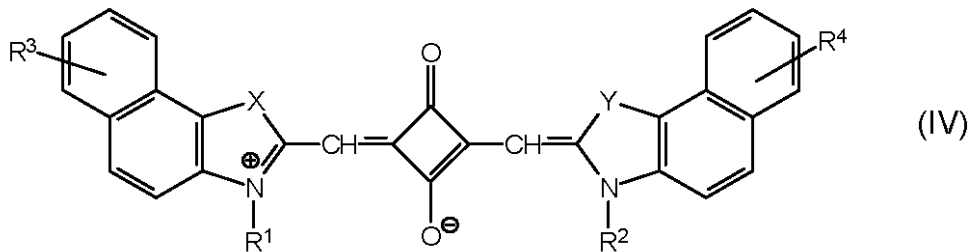
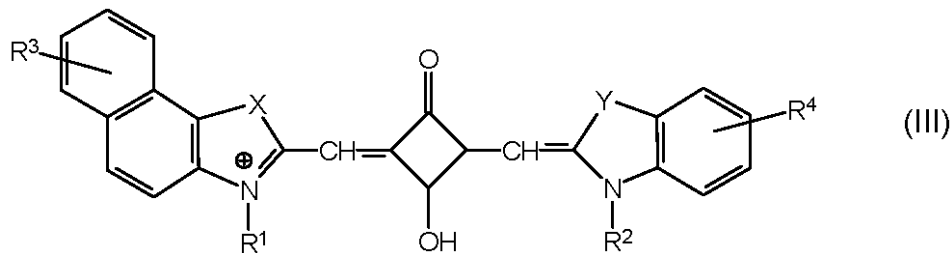
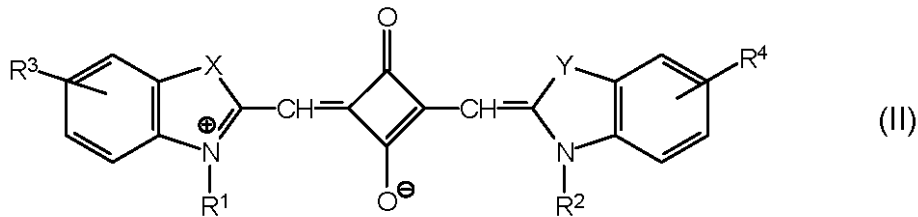
【請求項 14】

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 13 記載の方法。

【請求項 15】

以下の式の色素から選択される化合物。

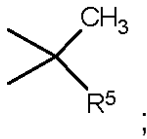
【化 9】



式中、

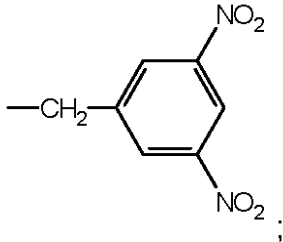
X 及び Y は同一又は異なるもので酸素、硫黄、-CH=CH- 及び次式の基から選択され、

## 【化 1 0】



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

## 【化 1 1】



残りの R<sup>1</sup> 基又は R<sup>2</sup> 基がメチル、エチル及び - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COOR<sup>7</sup> 基 (式中、R<sup>7</sup> は H、C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル及び CH<sub>2</sub>OC(O)R<sup>8</sup> (式中、R<sup>8</sup> 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<sup>3</sup> 基及び R<sup>4</sup> 基は独立に水素、NO<sub>2</sub>、ハロゲン、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルコキシ及び - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - COOR<sup>7</sup> (式中、R<sup>7</sup> は H、C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル及び CH<sub>2</sub>OC(O)R<sup>8</sup> (式中、R<sup>8</sup> 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<sup>5</sup> は C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであって、COOR<sup>7</sup> (式中、R<sup>7</sup> は上記で定義した通りである。) 、SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 又は OH で適宜置換されていてもよい。

## 【請求項 1 6】

残りの R<sup>1</sup> 基又は R<sup>2</sup> 基が - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> - COOR<sup>7</sup> 基及び - (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - COOR<sup>7</sup> 基 (式中、R<sup>7</sup> は上記で定義した通りである。) から選択される、請求項 1 5 記載の化合物。

## 【請求項 1 7】

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18】

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19】

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15乃至請求項18のいずれか1項記載の化合物の使用。

【請求項20】

前記化合物をインビボで投与し、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る、請求項19記載の使用。