

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6040157号
(P6040157)

(45) 発行日 平成28年12月7日(2016.12.7)

(24) 登録日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(51) Int.Cl.		F I		
C07D 487/04	(2006.01)	C07D	487/04	144
C12Q 1/00	(2006.01)	C07D	487/04	CSP
C07H 17/02	(2006.01)	C12Q	1/00	Z
		C07H	17/02	

請求項の数 12 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2013-537779 (P2013-537779)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月2日(2011.11.2)
 (65) 公表番号 特表2013-544242 (P2013-544242A)
 (43) 公表日 平成25年12月12日(2013.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/058924
 (87) 国際公開番号 W02012/061477
 (87) 国際公開日 平成24年5月10日(2012.5.10)
 審査請求日 平成26年10月9日(2014.10.9)
 (31) 優先権主張番号 61/409, 413
 (32) 優先日 平成22年11月2日(2010.11.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(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 537
 11-5399 マディソン ウッズ ホ
 ロー ロード 2800番地
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

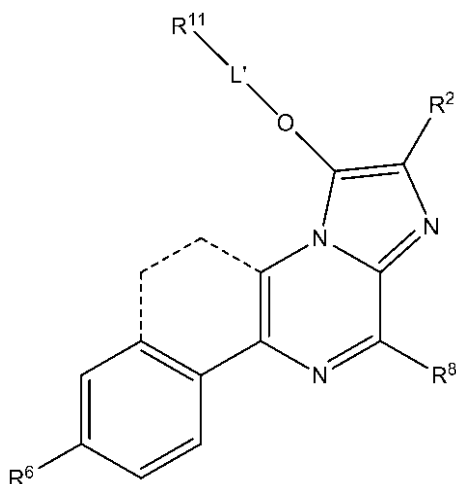
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セレンテラジン誘導体およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

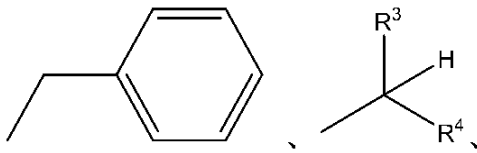
式(II)で示される化合物。



式中、R²は、-(CH₂)_n-TまたはC₁-₅アルキルであり；

R⁶は、-H、-OH、-NH₂、-OC(O)Rまたは-OCH₂OC(O)Rから成る群から選択され；

R⁸は、



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R¹¹は、ペプチド、アミノ酸、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または
 $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

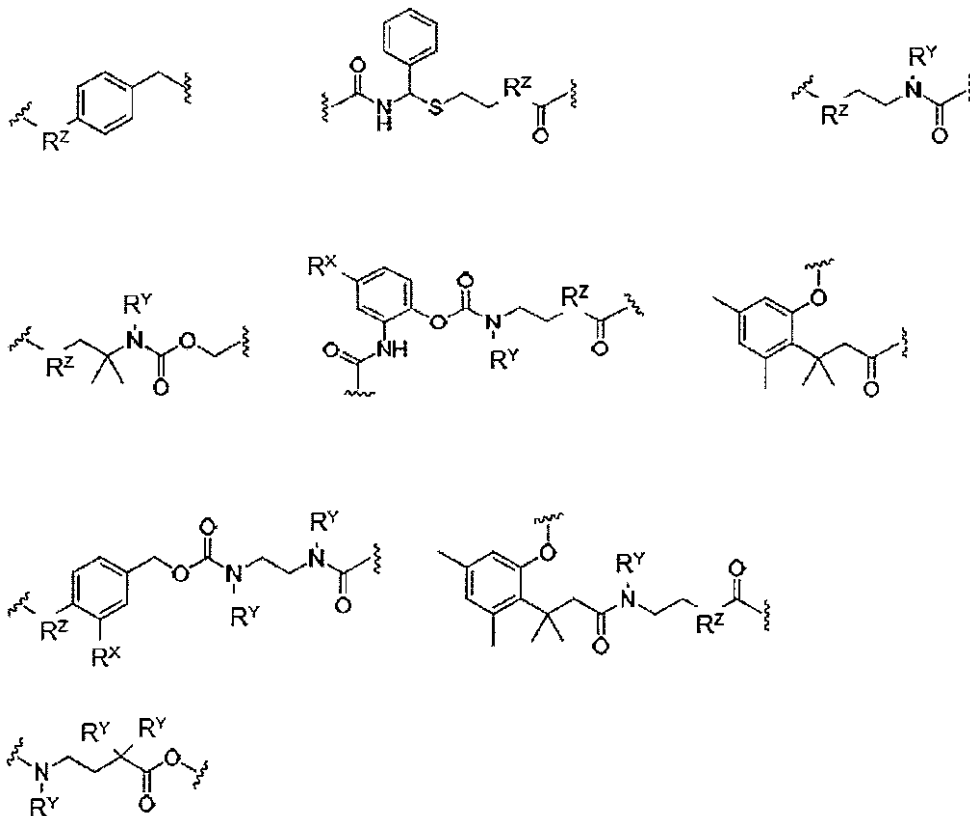
式中、R³およびR⁴は共に水素、または共にC₁₋₂アルキルであり；

R^Aは、C₁₋₄アルキル、置換C₁₋₄アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$
 であり；

R^Bは、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^Cは、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

L'は、以下の基から選択されるリンカー、



ここで、R^Xは、独立に、水素、ハロゲンまたはNO₂であり、

R^Yは、独立に、水素またはMeであり、そして

R^Zは、独立に、NH、NMe、OまたはSであり；

nは、0~3であり；

Rは、それぞれ独立して、C₁₋₇アルキルであり；

Tは、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

Vは、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であつてもよい。

10

20

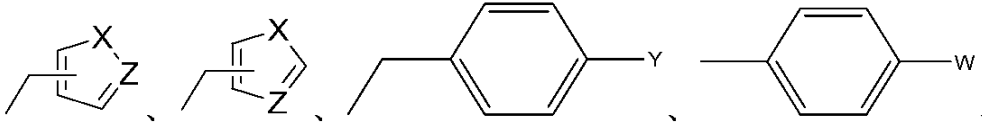
30

40

50

【請求項 2】

式中、 R^2 は、



または、 $C_2 \sim 5$ 直鎖アルキルであり；

Xは、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

Zは、 $-CH-$ または $-N-$ であり；

Yは、 $-H$ または $-OH$ であり；

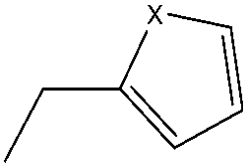
Wは、 $-NH_2$ 、ハロ、 $-OH$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-CO_2R$ であり；および

Rは、 $C_1 \sim 7$ アルキルである、

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

式中、 R^2 は、



であり；および

Xは、OまたはSである、

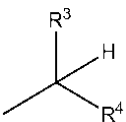
請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

式中、 R^2 は、 $C_2 \sim 5$ 直鎖アルキルである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

式中、 R^8 は、



低シクロアルキル、またはHであり、

R^3 および R^4 は、共に水素、または共に $C_1 \sim 2$ アルキルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

式中、 R^8 は、ベンジルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

Vが、Sである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

酵素を含有すると思われるサンプルを、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物と接触させる工程、および

サンプルの発光を検出する工程、

を含むことを特徴とする酵素の存在または量の検出方法。

【請求項 9】

発光が、定量化されている、請求項 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

サンプルには第2酵素が含有されると疑われ、
前記サンプルを、請求項1～7のいずれか一項に記載の、第2酵素のための基質を含有する第2化合物と接触させる工程、および
該サンプルの発光を検出する工程、
を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項 11】

請求項1～7のいずれか一項に記載の化合物をトランスジェニック非ヒト動物に投与する工程、および
発光を検出する工程、
を含む、*in vivo*で酵素の存在を検出する方法。

10

【請求項 12】

請求項1～7のいずれか一項に記載の化合物を動物に投与する工程、
動物からサンプルを得る工程、および
サンプルの発光を検出する工程、
を含む、酵素の存在を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

20

本願は、2010年11月2日に出願された米国特許出願第61/409,413号に対する優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に援用される。

本発明は、酵素の存在と活性をアッセイする化合物および方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

酵素の存在および活性を使用して、細胞の健康状態または代謝状態を決定することができる。酵素はまた、ある酵素の出現および活性が特定の細胞にとって特有である場合が多いため、特定の細胞型のマーカーにもなり得る。例えば、ある酵素の活性を利用して、バクテリア、植物もしくは動物由来の細胞を区別したり、または酵素が由来する組織の同一性を区別したりできる。

30

【0003】

グリコシドヒドロラーゼとしても知られているグリコシダーゼは、グリコシド結合の加水分解を触媒し、二つのより小さな糖を生成する。グリコシダーゼは、セルロースやヘミセルロースなどのバイオマス分解を含む天然分解、抗バクテリア防御戦略(例えば、リゾチーム)、発症機序(例えば、ウイルス・ノイラミニダーゼ)および通常の細胞機能(例えば、N結合型糖タンパク質生合成に関与するマンノシダーゼのトリミング)における役割を担う、極めて一般的な酵素である。バクテリアおよび原核生物において、グリコシダーゼは、細胞内酵素および細胞外酵素として知られており、主に栄養獲得に関与している。バクテリアにおける重要なグリコシダーゼ出現の一つとして、大腸菌におけるラクトースオペロン発現の制御に関与する酵素ベータガラクトシダーゼ(LacZ)が挙げられる。より高等な生物においては、グリコシダーゼは、N結合型糖タンパク質の処理に関与する小胞体やゴルジ体内に、また糖鎖構造の分解に関与する酵素としてリソソーム中に認められる。特定のリソソームグリコシダーゼが欠乏することにより、様々なリソソーム蓄積障害を惹起し、その結果、発達障害が発生し、あるいは死に至る場合もある。グリコシダーゼは、体内におけるグリコーゲンの生合成および分解に関与している。グリコシルトランスフェラーゼと共に、グリコシダーゼは、グリコシド結合の合成および切断のための主要な触媒機構を形成する。

40

【0004】

ジアホラーゼは、ジ-およびトリ-リン酸ピリジンヌクレオチド、すなわち、NADH、NADPHの還元形態から、様々な化合物の還元を触媒する、ユビキタスクラスのフラ

50

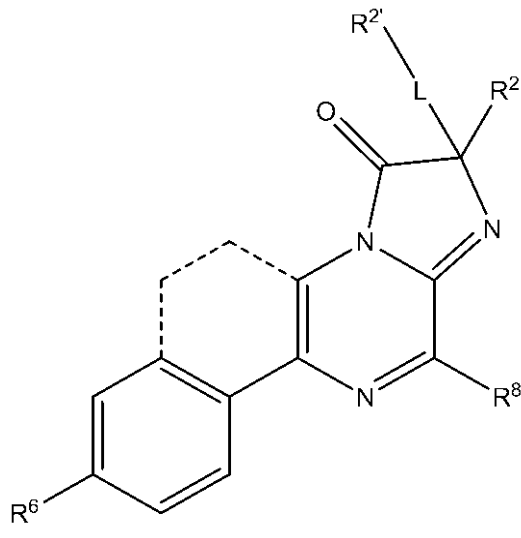
ピン結合型酵素であり、水素受容体の役目を担う。細胞のエネルギー代謝は、一連の酵素反応および化学反応を通じて、細胞のエネルギー蓄積を可能とする、複雑なプロセスである。細胞エネルギー代謝の一つの重要な態様は、細胞の酸素還元状態である。生きた細胞の代謝状態ならびに酵素活性および/または代謝レベルのアッセイは、レドックスが定めるコファクターのNAD(P)/NAD(P)Hを測定することで決定され得る。

【発明の概要】

【0005】

一つの態様において、本発明は、式(I)の化合物

【化1】



10

20

を提供し、

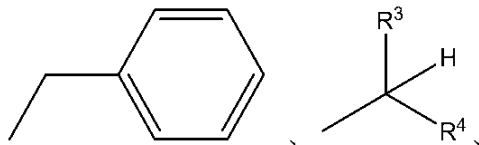
式中、 R^2 は $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり；

$R^{2'}$ は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

【化2】



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または共に C_{1-2} アルキルであり；

R^A は C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または CH_2-V-R^C であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールであり；

Lはリンカーであり；

nは0~3であり；

Rは、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；

Tはアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

Vは、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

破線の結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

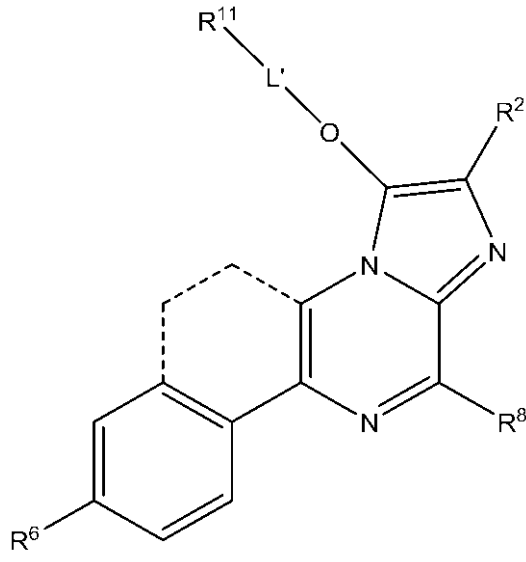
40

50

【0006】

別の態様では、本発明は、式(I I)の化合物

【化3】



(I I)

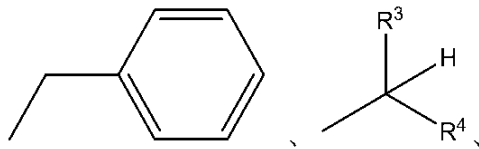
を提供し、

式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-$ または C_{1-5} アルキルであり；

R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

【化4】



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{11} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または共に C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

L' は直接結合またはリンカーであり；

n は0~3であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；

T はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

破線の結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

【0007】

さらなる態様では、本発明は、式(I I I)の化合物

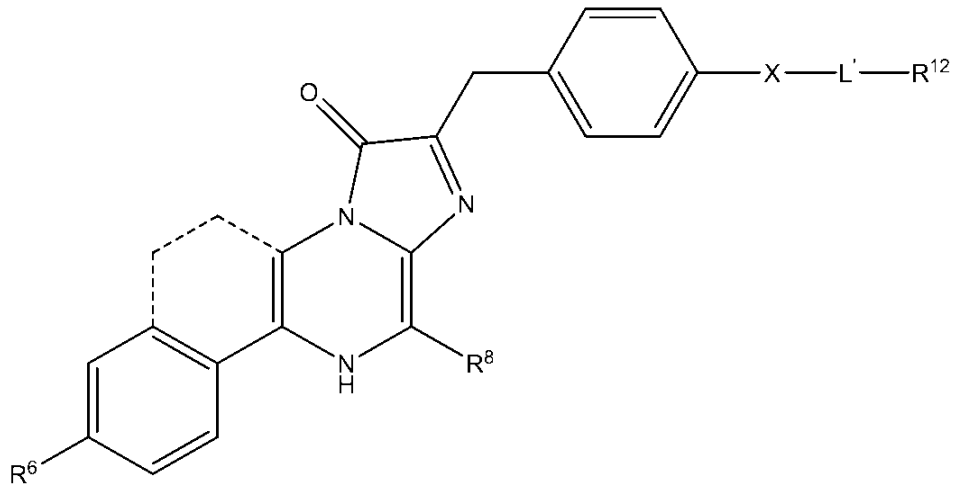
10

20

30

40

【化5】



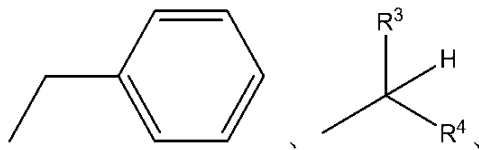
10

を提供し、

式中、 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

【化6】



20

水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{12} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

30

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

Lは直接結合またはリンカーであり；

Vは、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

Xは、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

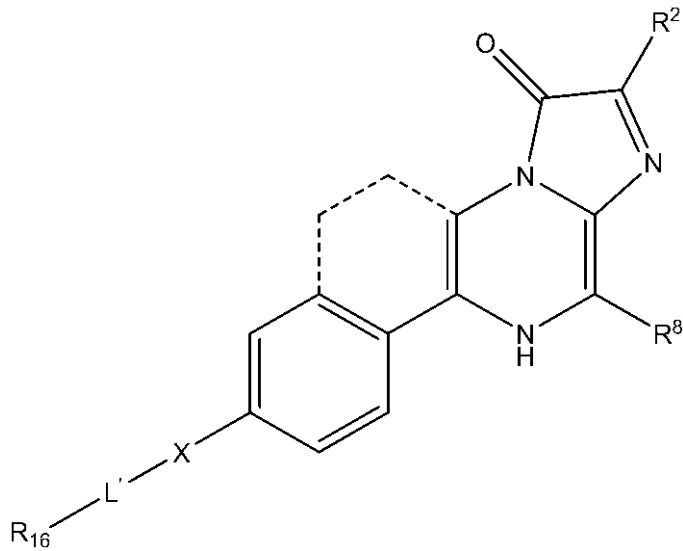
Rは、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

【0008】

別の態様では、本発明は、式(IV)の化合物

【化7】



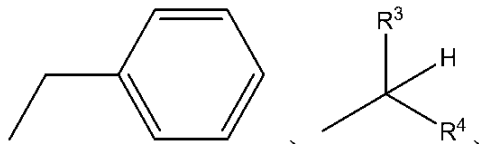
10

(IV)

を提供し、

式中、 R^2 は $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり； R^8 は、

【化8】



20

水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{16} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

30

 R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり； R^C はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、または置換ヘテロアリール； L' は直接結合またはリンカーであり； n は0~3であり；

T はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

 V は、 $-S-$ または $-O-$ であり； X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり； R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってよい。

40

【0009】

本発明はまた、上記化合物の利用方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】 z -DEV D-セレンテラジン-hの生物学的試験の結果を示す図である。

【図2】オプロフォルス誘導体ルシフェラーゼおよび z -DEV D-セレンテラジン-hを利用したカスパーゼ3アッセイの結果を示す図である。

【図3】好適なリンカーを示す図である。

【図4】誘導体化され得るセレンテラジンを示す図である。

50

【図5】グリコシダーゼアッセイに有益な pro - セレンテラジン糖類の例を示す図である。

【図6】様々なペプチド基質の酵素を示す図である。

【図7】プロテアーゼアッセイに利用されるのにふさわしい pro - セレンテラジンを示す図である。

【図8】化合物40および50で測定した発光と細胞数との間に直接的な関係があることを表す、細胞数と発光との線形相関を示す図である。

【図9】本発明に従い、pro - セレンテラジンをを用いてNADHを検出することを示す図である。

【図10】本発明による、その他のふさわしい pro - セレンテラジン基質を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、サンプルにおける様々な酵素の存在と活性をアッセイする化合物および方法を提供する。

【0012】

特段の明示的な指定がない限り、「comprising (含む)」という用語は、本明細書の中で使用される場合、「comprising (含む)」により羅列された物の他に、別の物が任意選択的に存在し得ることを示している。しかし、本発明の特定の実施形態では、「comprising (含む)」という用語は、別の物が存在しない可能性を包含する、すなわち、この実施形態の目的においては、「comprising (含む)」は、「consisting of (から成る)」の意味を有するとして理解されるべきであることを企図している。

20

【0013】

本明細書で使用される場合、以下の用語および表現は、指定された意味を有する。本発明の化合物は、非対称的に置換された炭素原子を含有し、光学的活性体またはラセミ体として単離され得ると理解され得ると理解されるであろう。光学的活性体の製造方法は、当技術分野において周知であり、例えば、ラセミ体の分解により、または光学活性の開始材料からの合成により、製造される。構造の全てのキラリ体、ジアステレオ異性体、ラセミ体および全ての幾何異性体は、本発明に含まれる。

30

【0014】

以下に記載のラジカル、置換基及び範囲に関する具体的な値は、説明のみを目的としている。ラジカルおよび置換基の定められた範囲内にあるその他の定められた値またはその他の値を除外するものではない。

【0015】

(定義)

「アルキル」という用語は、炭化水素化合物から水素原子を取り除くことにより得られる一価部分を指している。アルキル基には、1 ~ 30 個の炭素原子、または1 ~ 12 個の炭素原子、または1 ~ 10 個の炭素原子、または1 ~ 6 個の炭素原子、または1 ~ 4 個の炭素原子が含まれてもよい。アルキル基は、直鎖または分岐でもよく、かつ飽和でも、一部不飽和でも、または完全に不飽和でもよい。アルキル基は、任意選択的に、例えばハロで置換してもよい。直鎖アルキル基の実施例には、エチル、n - プロピル、n - ブチル、およびn - プロピル、n - ヘキシルおよびn - ヘプチルが含まれるが、これらに限定されない。一つまたは複数の炭素 - 炭素二重結合を有する直鎖不飽和アルキル基の実施例には、エチニル (ビニル、 $-CH=CH_2$)、2 - プロペニル (アリル、 $-CH-CH=CH_2$)、およびブテニルが含まれるが、これらに限定されない。一つまたは複数の炭素 - 炭素三重結合を含む不飽和アルキルの実施例として、エチニルおよび2 - プロピニル (プロパルギル) が含まれるが、これらに限定されない。分岐アルキル基の実施例には、イソプロピル、イソ - ブチル、sec - ブチル、t - ブチルおよびイソ - ペンチルが含まれる。

40

【0016】

50

「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および非天然アミノ酸の両方を指している。また、保護天然アミノ酸および保護非天然アミノ酸も含まれる。

【0017】

「アリール」という用語は、芳香族環から水素原子を取り除くことにより得られる一価部分を指している。アリール基は、6～10個の炭素原子(C₆₋₁₀アリール)を有してもよい。例えば、アリール基は、フェニルまたはナフチルであってもよい。

【0018】

「ハロ」という用語は、Cl、F、BrまたはIなどのハロゲンを指している。

【0019】

「ヘテロアリール」という用語は、ヘテロ芳香族環から水素原子を取り除くことにより得られる一価部分を指している。ヘテロ芳香族環は、5～10環原子(C₅₋₁₀ヘテロアリール(「C」の使用は、原子がC、N、OまたはSのいずれかであるに関わらず、環原子の合計数を意味すると理解されたし))を有してもよい。環原子は、炭素、窒素、硫黄または酸素であってもよい。複数のヘテロ原子が環に存在してもよい。例えば、ヘテロアリール基は、フリル、チエニル、チアゾリル、ピラゾリル、トリアゾリルまたはテトラゾリルであってもよい。

10

【0020】

「リンカー」という用語は、基質部分をセレンテラジン核にリンクする2～50個の原子の鎖を指している。リンカーには、一つまたは複数のヘテロ原子が含まれてもよい。リンカーはまた、オキシ基、アミノ基、アルキル基、ハロゲン基およびニトロ基により置換されてもよい。リンカーはまた、アリール基を含むことが出来る。ふさわしいリンカーとして、p-アミノベンジルリンカーなど、図3に示されるものが含まれる。リンカーは、「痕跡の無い(traceless)」または「自己分解性(self-immolative)」リンカーであることがふさわしい。「痕跡の無いリンカー」または「自己分解性リンカー」とは、リンカーから基質部分が裂けることで、自発的にリンカーがセレンテラジン核から裂けて、セレンテラジンを放つ。「自己分解性リンカー」の代表例には、図3に示されているものが含まれる。

20

【0021】

「低シクロアルキル」という用語は、3～6個の炭素原子を有する炭化水素化合物から水素原子を取り除くことにより得られる一価部分を指している。飽和低シクロアルキル基の実施例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、およびシクロヘキシルなどの基が含まれるが、これらに限定されない。一つまたは複数の炭素-炭素二重結合を有する不飽和低シクロアルキル基の実施例には、シクロプロベニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどの基が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0022】

「発光酵素」という用語は、特段の指定がない限り、基質としてセレンテラジンを使用する、天然由来、組み換えまたは突然変異の酵素を指している。天然由来の発光酵素の場合、当業者であれば容易に生物から取得可能である。発光酵素が天然由来のもの、または組み換えもしくは突然変異の発光酵素である場合、すなわち、天然由来の発光酵素のルシフェラーゼ-セレンテラジン反応において活性を保持するものであれば、バクテリア、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などの培養から容易に取得可能であり、変換されて発光酵素をエンコードする核酸を発現し得る。さらに、組み換えまたは突然変異の発光酵素は、ルシフェラーゼをエンコードする核酸を用いて、*in vitro*細胞遊離系から引き出すことができる。好適な発光酵素には、生物発光十脚類由来のルシフェラーゼ、例えば、オプロフォルス由来のルシフェラーゼ(Oplophorus-derived luciferase)など、ヒオドシエビ上科(Oplophoroidea)から引き出されるルシフェラーゼ、刺胞動物(例えば、ウミシイタケルシフェラーゼ)、Aristeidae、Solenoceridae、Luciferidae、サクラエビ科、PasipheidaeおよびThalassocarididae十脚目ファミリーなどの海洋生物から派生するルシフェラーゼ、ならびにエクオリンなどの発光タンパク

40

50

質が含まれる。

【0023】

「発光反応混合物」には、発光酵素により光信号、すなわちルミネセンスが生成され得る物質が含有される。混合物にはまた酵素が含有される。必要な物質、ならびに発光信号を生成するのに必要な物質の特定の濃度および/または量は、使用される発光酵素並ならびにアッセイのタイプによって異なる。多くの場合、その他の物質が溶液に加えらる。例えば、その他の物質には、適正なpHでの反応を維持するための緩衝剤、酵素活性の維持に役立つPRIONEXまたはウシ血清アルブミン(BSA)などの添加剤、還元剤、洗浄剤などが含まれる。

【0024】

「ペプチド」という用語は、少なくとも2つのアミノ酸の連続を指している。いくつかの実施形態では、ペプチドには、80個以下のアミノ酸、または35個以下のアミノ酸、または10個以下のアミノ酸が含有され得る。

【0025】

「糖類」という用語は、糖またはその他の炭水化物、特に単純な糖を指している。 - および - アノマー類の両方が含まれる。糖類は、C₆-ポリヒドロキシ化合物、典型的にはC₆-ペンタヒドロキシであり得、しばしば、環状グリカールであり得る。既知の単純な糖およびその誘導体、ならびに2つまたはそれ以上の単糖類残渣を有する多糖類が含まれる。糖類には、ヒドロキシル基上の保護基がふくまれ得る。糖類のヒドロキシル基は、一つまたは複数のアセタミド、ハロ、またはアミノ基で置換され得る。さらに、一つまたは複数の炭素原子を酸化して、例えば、ケト基またはカルボニル基にすることもできる。好適な糖類には、ガラクトース、グルコース、グルクロン酸およびノイラミン酸(neuraminic acid)が含まれる。

【0026】

「置換された」という用語は、「置換された」という表現で表される基の一つまたは複数(例えば、1、2、3、4または5、いくつかの実施形態では、1、2、または3、および他の実施形態では、1または2)の水素が、指定された基(複数可)から選択した基、または当業者に既知の好適な基で置換されていることを示すことを意図している。但し、指定された原子の正常原子価は超過でなく、置換の結果安定した化合物となる。好適な置換基には、ハロ、ヒドロキシル、フェニル、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、-SH、-CH(OMe)₂、-CF₃、-OCH₃、-SCH₃、C₁₋₄アルキル、ピペラジニル、およびアリアルで置換されたピペラジニルが含まれる。

【0027】

(化合物)

セレンテラジンは、海洋ルシフェラーゼなど、広範な種類の生物発光タンパク質が作用すると発光することが知られている。海洋ルシフェラーゼの実施例として、ウミシイタケルシフェラーゼ、エクオリン、ガウシアルシフェラーゼ、オプロフォルスルシフェラーゼ、およびウミホタルルシフェラーゼが含まれる。

【0028】

本発明は、非発光酵素の基質であり、また発光タンパク質のpro-基質でもある、セレンテラジン誘導体を提供する。いったん対象の非発光酵素が作用すると、前記誘導体は、発光タンパク質の基質となり、よって、当業者に既知の方法により検出可能となる。

【0029】

いくつかの実施形態では、前記誘導体は、以下に示される式IからIVの化合物であり；(1)

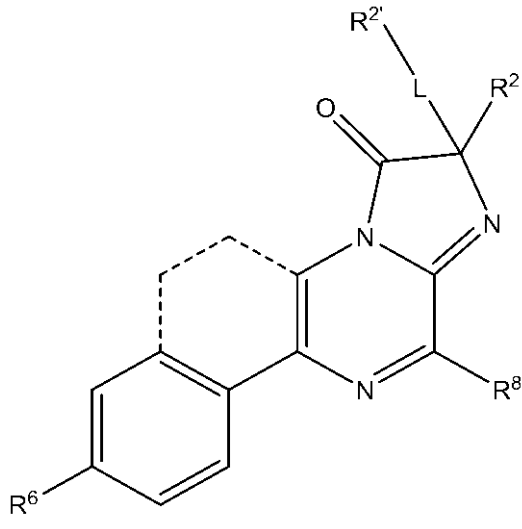
10

20

30

40

【化9】

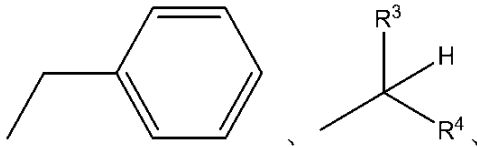


10

式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-$ または C_{1-5} アルキルであり；
 R^2' は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、
 または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；
 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成
 る群から選択され；
 R^8 は、

20

【化10】



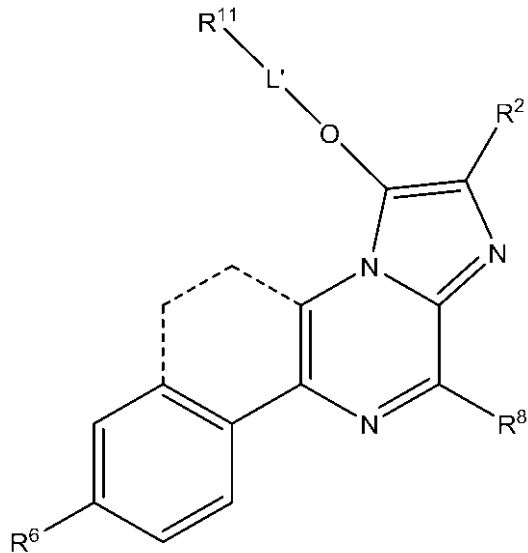
水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；
 式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；
 R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ で
 あり；
 R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；
 R^C はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、または置換ヘテロアリール；
 L はリンカーであり；
 n は0~3であり；
 R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；
 T はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアル
 キルであり；
 V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および
 破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和で
 あってもよく；

(2)

30

40

【化11】



10

(I I)

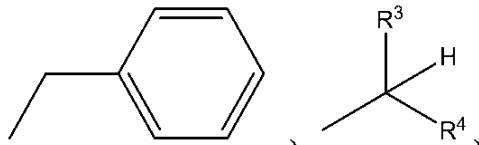
式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり；

R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

20

【化12】



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{11} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または共に C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

30

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

L' は直接結合またはリンカーであり；

n は0~3であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；

T はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

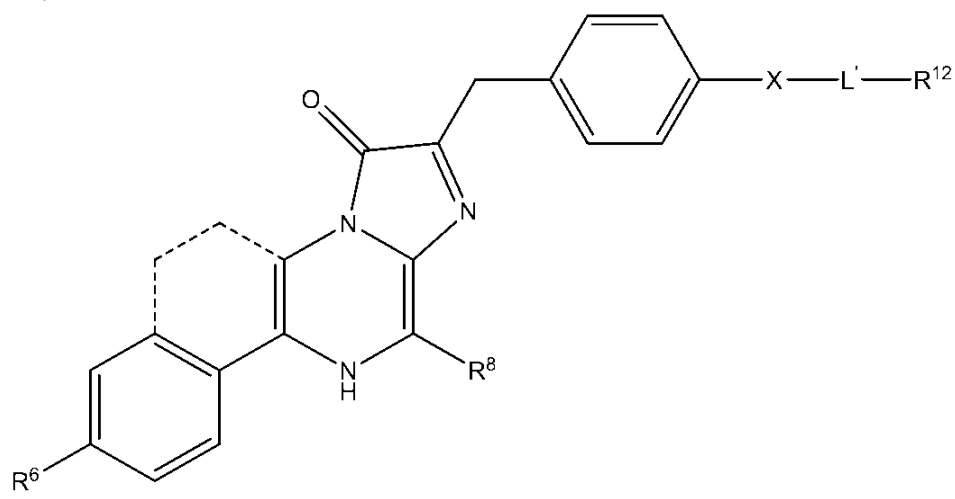
V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であつてもよく；

40

(3)

【化13】

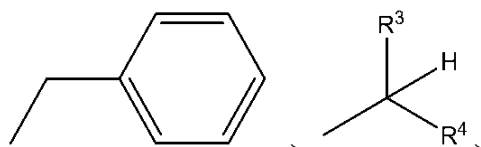


10

式中、 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

【化14】



20

水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{12} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

30

L' は直接結合またはリンカーであり；

V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；

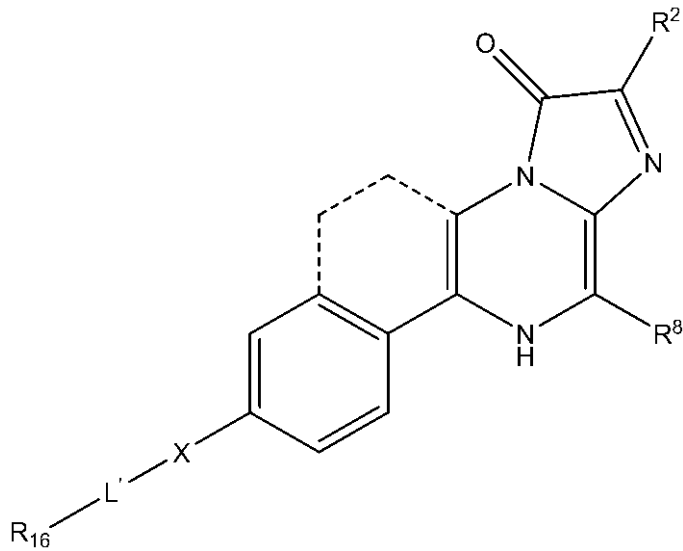
X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよく；

(4)

【化15】



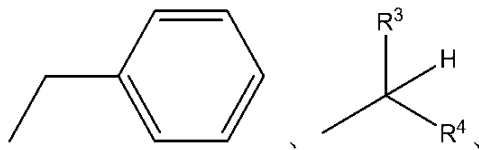
10

(IV)

式中、 R^2 は $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり；

R^8 は、

【化16】



20

水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{16} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

30

R^C はアリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリール；

L' は直接結合またはリンカーであり；

n は0~3であり；

T はアリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；

X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

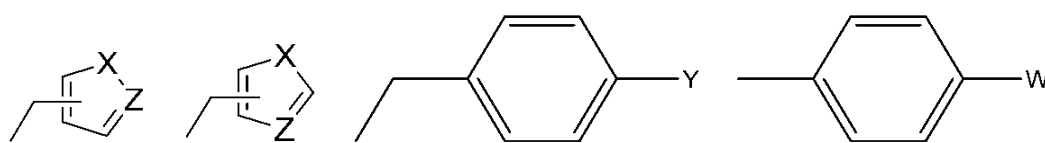
破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

40

【0030】

いくつかの実施形態では、 R^2 は、

【化17】



または、 C_{2-5} アルキルであり；

X はそれぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

Z は $-CH-$ または $-N-$ であり； Y は $-H$ または $-OH$ であり； W は $-NH_2$ 、八

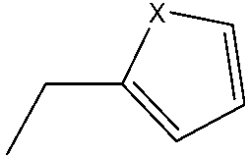
50

口、 $-OH$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-CO_2R$ であり；およびRは C_{1-7} アルキルである。

【0031】

いくつかの実施形態では、 R^2 は、

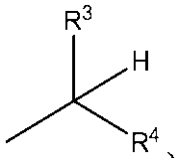
【化18】



であり；および

XはOまたはSである。別の実施形態では、 R^2 は C_{2-5} 直鎖アルキルである。ある実施形態では、 R^8 は、

【化19】



低シクロアルキル、またはHであり、式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルである。別の実施形態では、 R^8 はベンジルである。

【0032】

いくつかの実施形態では、VはSである。

【0033】

本発明の化合物には、天然由来の（「天然の」）セレンテラジンならびにその類似体がふさわしく、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される、国際公開第2003/040100号および米国特許出願第12/056,073号（パラグラフ「0086」）に開示されているものに加えて、セレンテラジン-n、セレンテラジン-f、セレンテラジン-h、セレンテラジン-hcp、セレンテラジン-cp、セレンテラジン-c、セレンテラジン-e、セレンテラジン-fcp、bis-デオキシセレンテラジン（「セレンテラジン-hh」）、セレンテラジン-i、セレンテラジン-icp、および2-メチルセレンテラジンが含まれる。本発明に従って誘導体化され得る追加の好適なセレンテラジンとして、図4に示されているものが含まれる。

【0034】

いくつかの実施形態では、本発明のセレンテラジン誘導体は、グリコシダーゼの基質である。好適な誘導体として、図5に示されているものが含まれる。

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明のセレンテラジン誘導体は、カスパーゼ2、カスパーゼ3/7、カスパーゼ6、カスパーゼ8、カスパーゼ9、ジペプチジルペプチダーゼ4（DPPIV）、カルパイン、キモトリプシン様プロテアソーム、トリプシン様プロテアソーム、カスパーゼ様プロテアソーム、グランザイムB、カテプシンB/L/K、トロンピン、トリプシン、アミノペプチダーゼ、およびSARSプロテアーゼなどのプロテアーゼの基質である。好適なペプチドおよびアミノ酸、およびそれらが基質となる酵素には、図6に羅列されているものが含まれる。好適な追加の誘導体には、図7に羅列されているものが含まれる。

【0036】

いくつかの実施形態では、本発明のセレンテラジン誘導体は、チトクロームP450酵素の基質である。

【0037】

いくつかの実施形態では、本発明のセレンテラジン誘導体は、ジアフォラーゼ酵素の基質である。

10

20

30

40

50

【0038】

(利用方法)

本発明のセレンテラジン誘導体は、チトクロームP450酵素、プロテアーゼまたはグリコシダーゼなどの非発光酵素の存在または活性を検出するために、アッセイ試薬で使用され得る。発光酵素およびその基質を使用するアッセイは、当技術分野で周知である。例えば、発光酵素、発光反応混合物および非発光酵素の基質であるセレンテラジン誘導体を、非発光酵素含有と思われるサンプルに加えてもよい。もし非発光酵素がサンプルに存在するならば、非発光酵素がセレンテラジン誘導体に作用して、発光酵素により認識され、発光信号を産生する。代わりに、非発光酵素が、発光性セレンテラジン誘導体を非発光性形態、すなわち信号アッセイの喪失状態に変換することもできる。

10

【0039】

いくつかの実施形態では、アッセイにおいて、セレンテラジンの化学発光を利用してもよい。例えば、非発光酵素の基質であるセレンテラジン誘導体を、非発光酵素を含有すると思われるサンプルに加えてもよい。もし、非発光酵素がサンプルに存在すれば、非発光酵素がセレンテラジン誘導体に作用し、化学発光となり、周知の技術で検出可能となり得る。

【0040】

セレンテラジン誘導体を、発光酵素の前にまたは同時に、サンプルに加えてもよい。ある実施形態では、サンプルは細胞でもよい。細胞は真核細胞でもよく、例えば、酵母、鳥類細胞、植物細胞、昆虫細胞、サル、ネズミ、イヌ、ウシ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ヤギもしくはブタの細胞などを含むがこれに限定されない哺乳動物細胞、または原核細胞、または2つもしくはそれ以上の異なる生物由来の細胞でもよく、または細胞溶液もしくはその上清であってもよい。細胞は、組み換え技術により遺伝子工学的に修飾されたものでもよい。ある態様では、細胞は、トランスジェニックなどの動物のものでよく、または、血液、血漿、尿、粘液の分泌物などの生理液でもよい。

20

【0041】

サンプルは、検出され得る複数の非発光酵素を含有してもよい。この場合、複数の発光酵素が使用され得る。さらに、複数の基質も使用され得る。複数の基質および/または発光酵素を使用して、複数の非発光酵素またはその他の対象分子(複数可)、例えば試験化合物を、例えば多様な反応において、同時に検出してもよい。

30

【0042】

セレンテラジン誘導体はまた、細胞を分析する*in situ*方法において有益である。ルシフェラーゼを利用して細胞の*in situ*分析を行う方法は、当技術分野において既知であり、例えば、米国特許第5,998,204号を参照されたし。セレンテラジン誘導体は、非発光酵素への曝露前は、発光酵素の基質ではない。しかし、非発光酵素に曝露すると同時に、前記誘導体は、発光酵素の存在下で、発光反応において容易に検出され得る化合物に変換する。よって、*in situ*イメージングにより、非発光酵素が細胞のどこに位置づけられるかを決定し得る。これは、発光酵素を発現する細胞をセレンテラジン誘導体と接触させることにより行い得る。

40

【0043】

代わりに、発光酵素の遺伝子を発現するトランスジェニック動物に、対象の特定の非発光酵素の基質であるセレンテラジン誘導体と投与することができる。その後、イメージング技術(例えば、*in vivo*バイオフィオトニックイメージング)を用いて、生きたインタクトな動物における発光酵素発現の部位で発光を測定することができる。よって、発光酵素を発現するトランスジェニック動物に、対象の適切な非発光酵素が発現される組織において発光酵素の基質に変換するセレンテラジン誘導体を投与し得る。また、発光酵素が組織で発現される場合、発光信号が産生され、任意の好適な手段により検出され得る。よって、薬剤などの試験化合物は、動物ベースのアッセイで試験され得る。試験化合物は、セレンテラジン誘導体前に動物に投与するべきである。代わりに、トランスジェニック動物由来の組織を、組織ベースのアッセイで使用することもできる。

50

【0044】

いくつかの実施形態では、非トランスジェニック動物へ、対象の特定の非発光酵素の基質であるセレンテラジン誘導体を投与してもよい。誘導体は、適切な非発光酵素が発現される組織において、発光酵素の基質へと変換する。血液、血清、胆汁、尿、糞便、または組織などの生物サンプルは、動物から取得可能であり、発光酵素と接触させることができる。その結果得られる信号は、任意の好適な手段により検出可能である。よって、薬剤などの試験化合物は、動物ベースのアッセイで試験され得る。試験化合物は、セレンテラジン誘導体の前に動物に投与するべきである。

【0045】

いくつかの実施形態では、候補薬剤などの試験化合物をスクリーニングし、その活性を評価することができる。例えば、(1)非ルシフェラーゼ酵素の基質、(2)非ルシフェラーゼ酵素の阻害剤、誘導剤または活性剤などの制御剤、または(3)細胞状態(例えば、生存力、反応性酸素種の増加、または還元可能性の増加)の調節剤などが挙げられる。セレンテラジン誘導体はまた、基質と非ルシフェラーゼ酵素との区別のために用いられる。スクリーニングは、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで行い得る。

10

【0046】

さらに、本明細書に記載の任意の生物発光アッセイに関しては、その他の試薬を、ルシフェラーゼの不活性化を阻害または防止するものを含むがこれに限定されない反応混合物に加えてもよく、そうでなければ、発光信号を拡張または強化してもよい。

【0047】

(キット)

本発明はまた、一つまたは複数の非ルシフェラーゼ酵素の存在または活性を決定するためのキットを提供する。キットには、以下のうち一つまたは複数が含まれ得る。すなわち、セレンテラジン誘導体(複数可)、非ルシフェラーゼ酵素(複数可)、セレンテラジン-依存性発光酵素(複数可)、および反応緩衝剤(複数可)である。反応緩衝剤は、非ルシフェラーゼ酵素反応および発光酵素反応のための個々の調剤に存在してもよく、または単独ステップアッセイの単独調剤に存在してもよい。本発明のキットにはまた、非ルシフェラーゼ酵素(複数可)の阻害剤、活性剤および/または強化剤が含まれ得る。本発明のキットにはまた、アッセイの陽性対照および/または陰性対照が含まれ得る。

20

【0048】

本発明はさらに、以下の非限定的実施例により記載される。

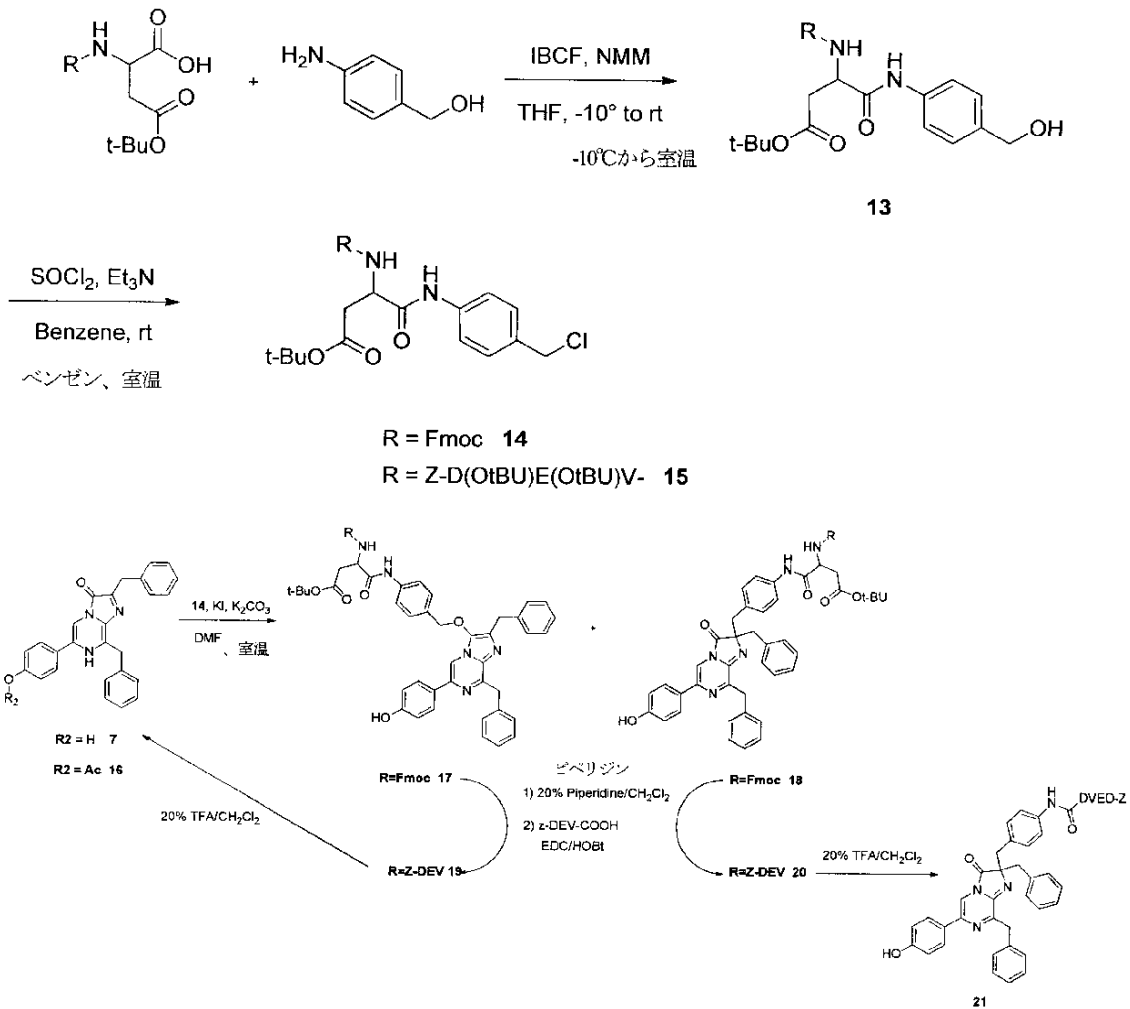
【実施例】

【0049】

実施例1: z - D E V D - セレンテラジン - h (化合物21)の合成

30

【化20】



【0050】

tert-ブチル 3 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ - 4 - ((4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) アミノ) - 4 - オキソプタノエート (13) :

フラスコに Fmoc - Asp (OtBu) - OH (6.7 g、16.28 mmol) および 100 ml の乾燥 THF を入れた。この溶液に、周囲温度で、無水 N - メチルモルホリン (1.9 mL、17.28 mmol) を加え、溶液を - 20 °C まで冷却した。無水イソブチルクロロホルメート (2.2 mL、16.96 mmol) をシリンジで加え、得られた懸濁液を 10 分間攪拌した。アミノアルコール (2.0 g、16.24 mmol) を一回分加え、反応混合物を 10 分間攪拌し、その後、冷浴から取り出し、周囲温度で 2 時間攪拌を続けた。前記反応混合物を 300 mL の酢酸エチルで希釈し、その混合物を 50 mL の水で 2 回、50 mL の 0.5 M の HCl、50 mL のブライン溶液で 2 回と、連続して洗浄した。有機相を乾燥させ (MgSO₄)、真空下で濃縮した。残渣を、ヘプタン / 酢酸エチルの勾配を用いたシリカクロマトグラフィーにかけた。これにより、白色固体として 5.2 g (10.7 mmol) の産物を得た。¹H NMR (300 MHz、dms_o)、d 10.02 (s、1 H)、7.89 (d、J = 7.5、2 H)、7.81 ~ 7.67 (m、3 H)、7.55 (d、J = 8.4、2 H)、7.47 ~ 7.27 (m、4 H)、7.24 (d、J = 8.4、2 H)、5.09 (t、J = 5.7、1 H)、4.51 (m、1 H)、4.43 (d、J = 5.7、2 H)、4.37 ~ 4.16 (m、3 H)、2.76 ~ 2.51 (m、2 H)、1.37 (s、9 H)。

【0051】

tert - ブチル 3 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 4 - ((4 - (クロロメチル) フェニル) アミノ) - 4 - オキソプタノエート (14) :

フラスコに、アルコール (13) (0 . 5 m g , 0 . 9 7 m m o l) および 1 5 m L の乾燥ベンゼンを入れた。この溶液に、周囲温度で、無水トリエチルアミンを加え、2 分間攪拌した後、混合物を氷 / 水浴槽で 1 0 分間冷却した。これに、無水塩化チオニル (7 8 μ L , 1 . 0 7 m m o l) を加え、2 分後に冷浴槽を取り除き、周囲温度で 3 時間攪拌を継続した。反応混合物を、セライトパッドを通じて濾過し、濾過ケーキを 3 0 m L の乾燥ベンゼンで濯いだ。濾過液を真空下で濃縮し、塩化メチレンを用いたシリカカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製した。これにより、粘着性白色固体として、4 5 7 m g (0 . 8 5 m m o l) の産物を得た。¹H NMR (3 0 0 M H z , d m s o) 1 0 . 1 6 (s , 1 H) , 7 . 8 9 (d , J = 7 . 5 , 2 H) , 7 . 7 9 (d , J = 8 . 1 , 1 H) , 7 . 7 6 ~ 7 . 6 8 (m , 2 H) , 7 . 6 1 (d , J = 8 . 5 , 2 H) , 7 . 4 4 ~ 7 . 2 7 (m , 6 H) , 4 . 7 2 (s , 2 H) , 4 . 5 8 ~ 4 . 4 4 (m , 1 H) , 4 . 3 3 ~ 4 . 1 8 (m , 3 H) , 2 . 6 3 (d d d , J = 6 . 0 , 1 4 . 6 , 2 1 . 8 , 2 H) , 1 . 3 7 (s , 9 H) 。

【 0 0 5 2 】

化合物 1 7 および 1 8 :

乾燥フラスコに、アルゴン雰囲気下で、セレンテラジン - h (7) (2 0 0 m g , 3 7 m m o l) および 1 5 m L の無水、脱酸素 DMF を入れた。この溶液に、ヨウ化カリウム (3 1 m g , 0 . 1 9 m m o l) および炭酸カリウム (5 1 m g , 0 . 3 7 m m o l) を加え、その混合物を約 2 時間攪拌した。これに、化合物 1 4 を加え、その混合物を 1 8 時間攪拌した。産物を逆相および順相クロマトグラフィー双方により精製した。

【 0 0 5 3 】

化合物 1 9 および 2 0 :

3 m L のジクロロメタンに化合物 1 7 または 1 8 のいずれか (3 6 5 m g , 0 . 4 m m o l) を周囲温度で混ぜた溶液に、7 m L のジクロロメタンにピペリジン (2 m L) を混ぜた溶液を加えた。反応混合物を 3 0 分間攪拌し、5 0 m L のトルエンで希釈し、真空下で濃縮した。残渣を、0 . 1 % T F A / 水とアセトニトリルの勾配を用いた逆相クロマトグラフィーにより精製し、アセトニトリルにした。位置異性体の混合物 (1 3 3 m g , 0 . 1 9 m m o l) を 2 m L の乾燥 DMF で分解し、H O B t (3 0 m g , 0 . 2 2 m m o l) および z - D E V D - C O ₂ H (1 4 0 m g , 0 . 2 3 m m o l) を加えた。この溶液に、周囲温度で、E D C (4 2 m g , 0 . 2 2 m m o l) を加え、その反応混合物を一晩中攪拌した。前記粗反応混合物を 1 m L のアセトニトリルで希釈し、2 0 m M の酢酸アンモニウムとアセトニトリルの勾配を用いて、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。これにより、5 4 m g の化合物 1 9 および 6 9 m g の化合物 2 0 を得た。

【 0 0 5 4 】

化合物 2 1 :

化合物 1 9 および 2 0 の粗混合物を、2 m L のジクロロメタンで分解し、周囲温度でこの溶液に、4 m L のトリフルオロ酢酸、2 m L のジクロロメタン、0 . 4 m L のトリスプロピルシラン、および 0 . 4 m L のチオアニソールを含む脱保護カクテルを加えた。反応混合物を 3 時間攪拌し、3 0 m L のジエチルエーテルで希釈した。この懸濁液を遠心分離し、その固体を 1 0 m L のジエチルエーテルで 2 回すりつぶした。残渣を、2 m L のメタノールで分解し、2 0 m M の酢酸アンモニウムとアセトニトリルの勾配を用いて、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。これにより、オレンジ色の固体として、9 m g の化合物 2 1 を得た。

【 0 0 5 5 】

実施例 2 : z - D E V D - セレンテラジン - h (化合物 2 1) の生物試験

5 0 m M の H E P E S 緩衝剤 p H 7 . 2 , 2 m M の D T T , および 0 . 5 % C H A P S

10

20

30

40

50

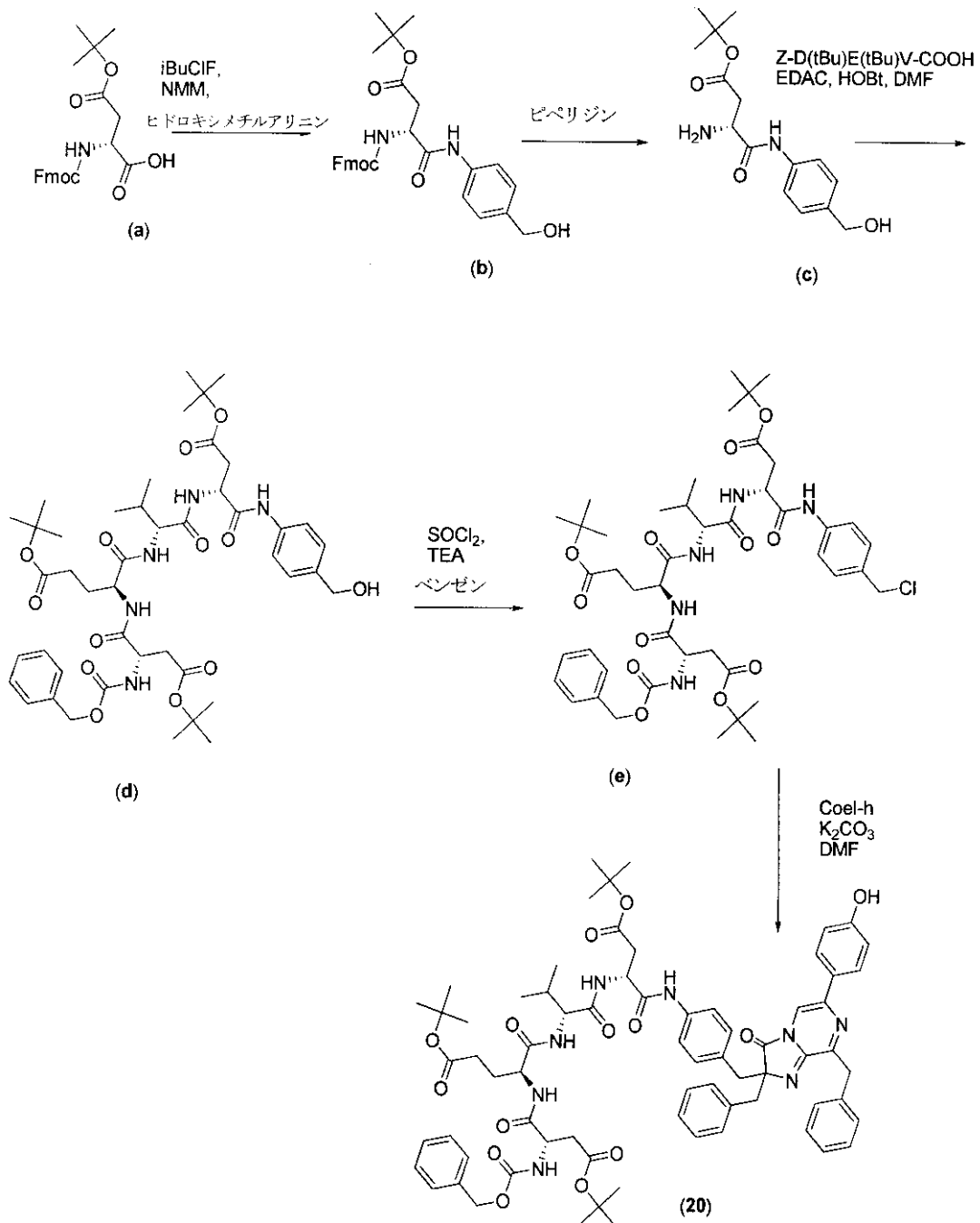
の中で、化合物 21 (50 μ M) を、ウミシイタケルシフェラーゼ (6.5 μ g/ml、ウミシイタケ - GST 融合) と混ぜ合わせ、20 分間培養し、ウミシイタケルシフェラーゼの基質となり得る任意の遊離セレンテラジン誘導体を取り除いた。精製されたカスパーゼ - 3 酵素 (50 U/ml) または緩衝剤コントロールを、最終濃度がそれぞれ 25 μ M の Z-DEVD-セレンテラジン h 誘導体基質、25 U/ml のカスパーゼ - 3 および 3.25 μ g/ml シフェラーゼを 1 : 1 の容積比で加えた。発光は、110 分間かけて測定した。経時的に、カスパーゼを含有しない対照サンプルと比べて、100 倍の発光増加が観察されたが、これはすなわち、セレンテラジンの酵素放出を示しており、本発明のセレンテラジン化合物が、カスパーゼ酵素 (図 1) の検出に用いられ得ることを実証したものである。

10

【0056】

実施例 3 : z-DEVD-セレンテラジン-h (化合物 21) の代替的合成

【化 21】



20

30

40

50

【0057】

(R) - tert - ブチル 3 - アミノ - 4 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニル) - 4 - オキソブタノエート (C)

250 mL の丸フラスコの中で、b (6 g、0.011 mole) をジメチルホルムアミド (60 mL) で分解した。ピペリジン (10 mL) を加えた。4 時間後、TLC が反応の完了を示した。溶媒を蒸発させた。残渣を、シーライト (250 mL の EtOAc 中 15 g) 上に載せ、MeOH (DCM 中 10 %) に向かって勾配する DCM を用いて、シリカ (80 g) 上で溶出することにより精製した。混ぜ合わされた分画を蒸発させた。収率 (76 %) ; Rf = 0.2 (50 / 50 Hept / EtOAc)、¹H NMR (300 MHz、dms o) 7.56 (d、J = 8.3、2 H)、7.22 (d、J = 8.3、2 H)、5.06 (t、J = 5.4、1 H)、4.41 (d、J = 4.6、2 H)、3.61 (t、J = 6.5、1 H)、2.59 (dd、J = 5.8、15.5、1 H)、2.41 (dd、J = 7.2、15.6、1 H)、1.35 (s、9 H) ; m / z.

10

【0058】

(5 S、8 S、11 R、14 R) - tert - ブチル 5 - (2 - tert - ブトキシ - 2 - オキソエチル) - 8 - (3 - tert - ブトキシ - 3 - オキソプロピル) - 14 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニルカルバモイル) - 11 - イソプロピル - 3、6、9、12 - テトラオキソ - 1 - フェニル - 2 - オキサ - 4、7、10、13 - テトラアザヘキサデカン - 16 - オエート d)

100 mL の丸底フラスコに、Z - D (tBu) E (tBu) V - OH (3.96 g、6.5 mmol)、c (1.6 g、5.4 mmol)、HOBt (0.915 g、5.9 mmol)、および DMF (25 mL) を加えた。攪拌する溶液に、EDAC (1.15 g、5.9 mmol) を加えた。18 時間後、溶媒を蒸発させ、残渣を EtOAc (200 mL) で再分解した。溶液をクエン酸 (30%、50 mL)、重炭酸塩 (bicarbonate_{sat}) (50 mL)、水 (2 × 50 mL) およびブライン (50 mL) で洗浄した。材料をシーライト (15 g) 上で吸着し、ヘプタンから EtOAc へ勾配するシリカ上で精製した。収率 (74 %)。¹H NMR (300 MHz、dms o) 9.85 (s、1 H)、8.33 (d、J = 7.7、1 H)、7.95 (d、J = 8.1、1 H)、7.83 (d、J = 8.3、1 H)、7.59 (d、J = 8.3、1 H)、7.53 (d、J = 8.5、2 H)、7.43 ~ 7.26 (m、5 H)、7.21 (d、J = 8.6、2 H)、5.06 (t、J = 5.7、1 H (D₂O シェーク上で消失))、5.02 (d、J = 4.7、2 H)、4.70 (q、J = 7.7、1 H)、4.41 (d、J = 5.6、2 H (D₂O シェーク上で s ヘコラプス))、4.38 ~ 4.25 (m、2 H)、4.17 ~ 4.09 (m、1 H)、2.79 ~ 2.63 (m、1 H)、2.62 ~ 2.35 (m、4 H)、2.26 ~ 2.11 (m、2 H)、2.00 ~ 1.79 (m、2 H)、1.73 (d、J = 6.0、1 H)、1.34 (dd、J = 4.7、7.4、3 H)、0.81 (t、J = 6.3、6 H)。MS : C₄₅H₆₅N₅O₁₃ の計測値 883.5 ; 実測値 883.7。

20

30

【0059】

(5 S、8 S、11 R、14 R) - tert - ブチル 5 - (2 - tert - ブトキシ - 2 - オキソエチル) - 8 - (3 - tert - ブトキシ - 3 - オキソプロピル) - 14 - (4 - (クロロメチル) フェニルカルバモイル) - 11 - イソプロピル - 3、6、9、12 - テトラオキソ - 1 - フェニル - 2 - オキサ - 4、7、10、13 - テトラアザヘキサデカン - 16 - オエート (e)

100 mL の RB フラスコへ、ベンゼン (50 mL) と共に d (3.56 g、4 mmol) を加えた。溶液を蒸発させ、高真空下で、一晚中蓄積した。乾燥ベンゼン (70 mL) を TEA (610 μL、4.4 mmol) と共に固体に添加した。溶液を氷浴で冷却し、SOCl₂ (320 μL、4.4 mmol) をゆっくりと添加した。溶液が室温になるまで放置した。4 時間後、追加の TEA (241 μL) および SOCl₂ (100 μL) を加えた。さらに 2 時間後、反応混合物をシーライト (10 g) 上で吸着し、DCM から

40

50

DCM中5% MeOHへと勾配するシリカ上で溶出した。収率(33%)。¹H NMR (300 MHz, dms o) 10.00 (s, 1H)、8.35 (d, J = 7.8, 1H)、7.95 (d, J = 7.8, 1H)、7.84 (d, J = 8.3, 1H)、7.67 (d, J = 8.6, 3H)、7.41~7.22 (m, 7H)、5.11~4.91 (m, 2H)、4.77~4.59 (m, 3H)、4.43~4.21 (m, 2H)、4.19~4.04 (m, 1H)、3.30 (s, (水))、2.79~2.32 (m, 4H + DMSO)、2.26~2.07 (m, 2H)、2.00~1.79 (m, 2H)、1.77~1.60 (m, 1H)、1.40~1.24 (m, 27H)、0.81 (t, J = 6.4, 6H)。

【0060】

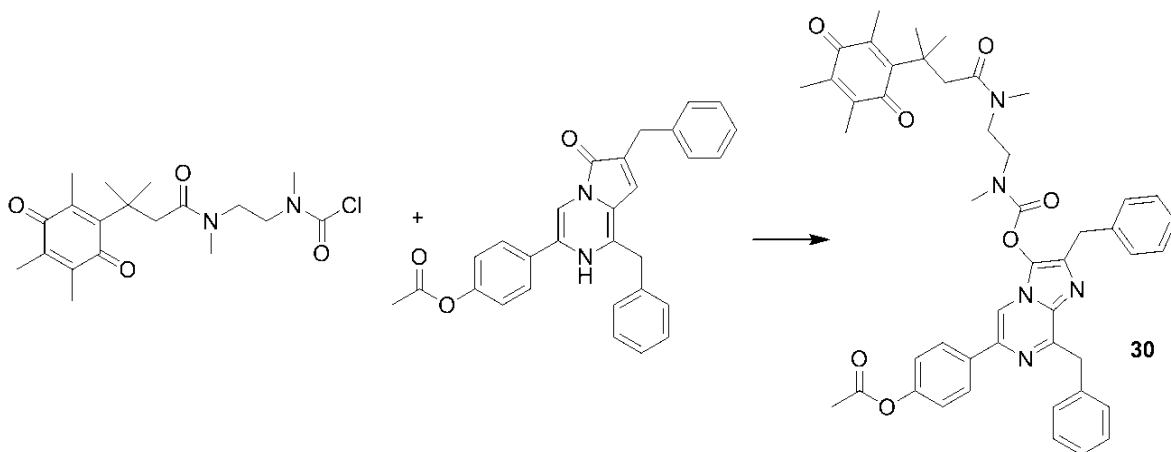
(5S, 8S, 11R, 14R) - tert - ブチル5 - (2 - tert - ブトキシ - 2 - オキソエチル) - 8 - (3 - tert - ブトキシ - 3 - オキソプロピル) - 14 - (4 - ((2, 8 - ジベンジル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル) イミダゾ [1, 2 - a] ピラジン - 3 - イルオキシ)メチル)フェニルカルバモイル) - 11 - イソプロピル - 3, 6, 9, 12 - テトラオキソ - 1 - フェニル - 2 - オキサ - 4, 7, 10, 13 - テトラアザヘキサデカン - 16 - オエート(20)。

セレンテラジン - h (50 mg, 122 μmol) および K₂CO₃ (34 mg, 245 μmol) を含有する、アルゴンガスで脱気したガラス瓶へ、DMF (500 μL) に e (133 mg, 147 μmol) を混ぜた脱気溶液を加えた。2時間後、PR - HPLC に直接反応を注入し、0.1% TFA (aq) からアセトニトリルへの勾配で溶出した。主要ピークを単離し、蒸発させた。収率(13%)。UV: ピークは250、300、および420 nm。¹H NMR (300 MHz, dms o) 9.79 (s, 1H)、8.27 (d, J = 7.5, 1H)、7.92 (d, J = 8.0, 1H)、7.85 (d, J = 10.1, 1H)、7.58 (d, J = 8.3, 1H)、7.53 (d, J = 8.7, 2H)、7.45~7.14 (m, 15H)、7.09~6.80 (m, 6H)、6.72 (d, J = 8.8, 2H)、5.13~4.90 (m, 2H)、4.73~4.53 (m, 1H)、4.22 (dd, J = 5.0, 17.7, 3H)、4.16~4.01 (m, 3H (D₂Oシェイク後2H))、3.25~3.01 (m, J = 10.0, 16.5, 4H)、2.76~2.53 (m, J = 15.6, 2H)、2.51~2.33 (m, 2H + DMSO)、2.24~2.04 (m, 2H)、1.99~1.77 (m, 2H)、1.76~1.61 (m, 1H)、1.40~1.07 (m, 27H)、0.89~0.62 (m, 6H)。MS: C₇₁H₈₄N₈O₁₄ の計算値は1272.6; 実測値は1272.8。

【0061】

実施例4: 30の合成

【化22】



20 ml のメチレンジクロライドの中で、セレンテラジンアセチルエステル (0.50 g, 1.14 mmol)、キノントリメチルロックC2 - ジアミンカルボニルクロリド (

10

20

30

40

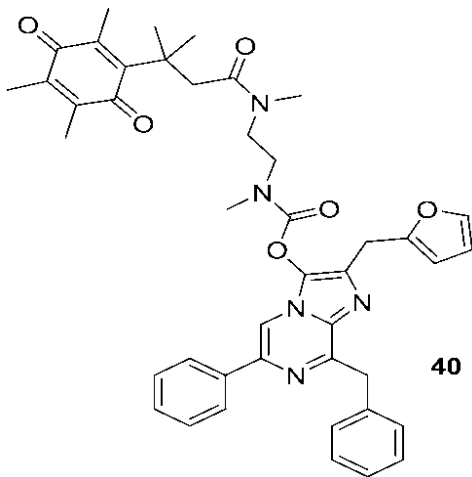
50

0.436 g、1.14 mmol)、DMAP (0.139 g、1.14 mmol) および TEA (0.115 g、1.14 mmol) の混合物を一晩中、室温で攪拌した。前記化合物を、ヘプタン/酢酸エチルを溶出剤として用いて、シリカクロマトグラフィで精製し、20% (0.184 g) の収率を得た。¹H NMR (300 MHz、CD₂Cl₂) 8.47 (s、1H)、8.04 (d、2H)、7.55 (d、2H)、7.0~7.5 (m、9H)、4.57 (s、2H、CH₂)、4.16 (s、2H、CH₂)、3.2~3.7 (m、4H、NCH₂)、2.7~3.2 (m、8H、2NCH₃+CH₂)、2.30 (s、3H、CH₃)、1.0~2.2 (m、15H、CH₃)。MS (m/e) : 796.5 (M⁺)。

【0062】

実施例5 : 40の合成

【化23】



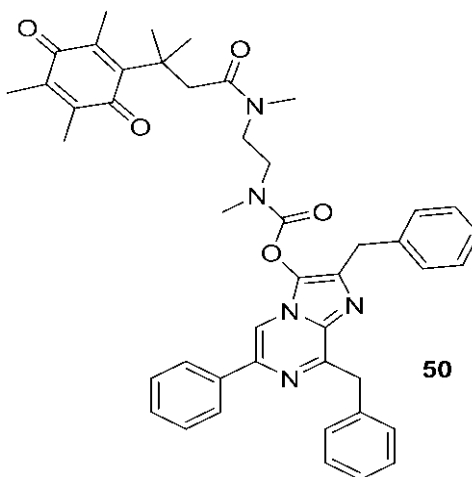
40

30の調製方法(実施例4)と類似の方法を活用して40を作成した。ヘプタン/酢酸エチルを溶出剤として用いて、シリカクロマトグラフィで精製し、60% (0.32 g) の収率を得た。¹H NMR (300 MHz、CD₂Cl₂) 8.47 (s、1H)、8.03 (m、2H)、7.57 (d、2H)、7.1~7.5 (m、7H)、6.33 (s、1H)、6.17 (s、1H)、4.58 (s、2H、CH₂)、4.19 (s、2H、CH₂)、3.3~3.7 (m、4H、NCH₂)、2.7~3.2 (m、8H、2NCH₃+CH₂)、1.0~2.2 (m、15H、CH₃)。MS (m/e) : 728.5 (M⁺)。HPLC精度 : 262 nmで90%

【0063】

実施例6 : 50の合成

【化24】



50

10

20

30

40

50

PBI4442の調製方法と類似の方法(実施例20)を活用して50を作成した。ヘプタン/酢酸エチルを溶出剤として用いて、シリカクロマトグラフィで精製し、17%(0.15g)の収率を得た。¹H NMR(300MHz、CD₂Cl₂) 8.42(s、1H)、7.99(m、2H)、7.57(d、2H)、7.1~7.5(m、10H)、4.58(s、2H、CH₂)、4.19(s、2H、CH₂)、3.3~3.7(m、4H、NCH₂)、2.7~3.2(m、8H、2NCH₃+CH₂)、1.0~2.2(m、15H、CH₃)。MS(m/e):738.5(M⁺)。HPLC精度:262nmで95%。

【0064】

実施例7:キノン誘導体を用いて代謝活性細胞を測定する

本実施例では、代謝活性細胞の量を測定するために、キナーゼ含有セレンテラジン誘導体の使用を示す。生細胞は代謝活性状態を維持するが、細胞が損傷すると、その状態が失われるのは不可避である。生きた細胞に入ると、キノンセレンテラジンは、オプロフォルスルシフェラーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼなど、セレンテラジンを利用したルシフェラーゼの基質であるセレンテラジン誘導体に還元する。キノンセレンテラジンの変換は、代謝活性細胞の数に比例し、よって、ルシフェラーゼ反応により産生される光をモニタリングすることで量的に測定することが可能である。

【0065】

ジャーカット細胞の2倍の段階希釈をPBSで調製し、ウェル毎に50μlずつ96ウェルプレートのウェルに移した。化合物40および50をPBSで希釈して、それぞれ50μMおよび100μMのストックを作成した。調製した化合物ストック10μlを細胞に加え、その細胞を37℃、5%CO₂の培養器に置いた。30分の培養後、前記細胞を培養器から取り出し、室温で10分間冷却し、50μlのオプロフォルスルシフェラーゼ検出試薬を直接ウェルに加えた。サンプルを混ぜ合わせ、室温で20分間培養し、発光を測定した。図8に細胞数と発光の線形相関が示したが、これはすなわち、発光と細胞数との間に直接的関係のあることを表している。

【0066】

実施例8:オプロフォルスルシフェラーゼと化合物21を用いたカスパーゼ3アッセイ

オプロフォルスルシフェラーゼ(OgLuc)異形、9B8optを、DEVDCasparase-3切断配列を含むpro-セレンテラジン基質を用いた生物発光アッセイに使用した。精製したカスパーゼ-3酵素を、製造者の取扱説明書に従って、HALOLINK(商標)樹脂(Promega社)を用いて精製した異形9B8optを発現する大腸菌の溶解物サンプルと混ぜ合わせ、100mMのMES pH6.0、1mMのCDTA、150mMのKCl、35mMのチオ尿素、2mMのDTT、0.25%のTERGITOL(登録商標)NP-9(v/v)、0.025%MAZU(登録商標)を含有し、100mMのHERPES pH7.5中の23.5μMz-DEVDCasparase-hを含むかまたは含まない緩衝剤で、10倍に希釈した。カスパーゼ-3酵素を、室温で3時間、溶解物サンプルで培養し、様々な時点において、Turner MODULUS(商標)ルミノメーターで発光を検出した。バクテリア溶出物のみを含有するサンプルおよびカスパーゼ-3のみを含有するサンプルを対照として使用した。3つの複製物が使用された。図2および表1は、本発明のpro-セレンテラジン基質を用いることで、対象の酵素が検出可能であることを示している。

10

20

30

40

【表 1】

+/-カスパーゼ	-	+
時間 (分)	RLU	RLU
5.0	26,023	25,411
15.3	7,707	36,906
29.9	4,013	41,854
60.9	2,305	43,370
190.3	1,155	42,448

【0067】

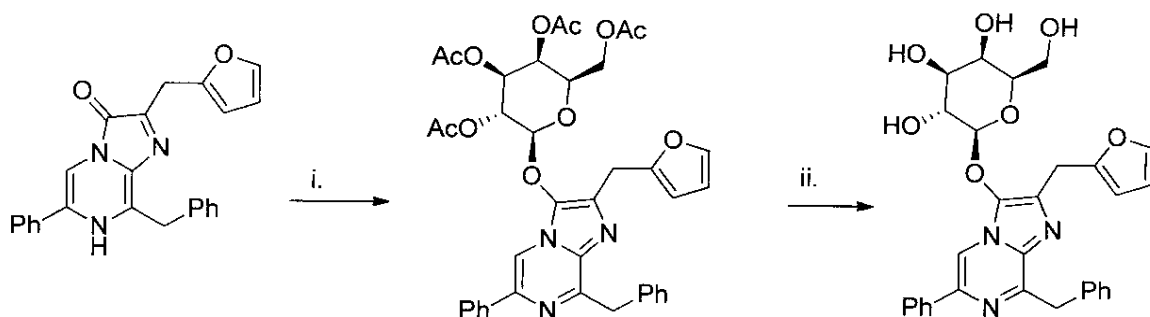
別のオプロフォルスルシルシフェラーゼ異形 L27V02 (「L27V」) を、DEV Dカスパーゼ-3切断配列を含む pro-セレンテラジン基質を用いた生物発光アッセイに使用した。100mMのMES pH6 (50μL) 中の精製されたカスパーゼ-3酵素 (1mg/mL) を、50μLアッセイ緩衝剤 (100mMのMES pH6、35mMのチオ尿素、0.5%のTERGITOL (登録商標) NP-9 (v/v)、1mMのCDTA、2mMのDTTおよび150mMのKCl) 中の227nMのL27V02異形および47μMのPBI-3741 (z-DEV D-セレンテラジン-h) と混ぜ合わせた。反応物を3時間室温で培養し、上記の通り発光を検出した。L27V02異形によるアッセイを、ホタルルシルシフェラーゼによるアッセイ、カスパーゼ-3/7G10 (カスパーゼ-G10、Promega社) と比較した。表2は、本発明の化合物を生物発光アッセイに用いることで、対象の酵素が検出可能であることを表している。

【表 2】

	(+) カスパーゼ	+/-	(-) カスパーゼ	+/-
L27V	11,532	93	803	25
カスパーゼ-G10	15,156, 567	793, 981	302	5

【0068】

予言的实施例9: O-(8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)-6-フェニルイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン-イル)ガラクトシド(25)
【化25】



i. アセトブromo- α -D-ガラクトース AgOTf, TMU, DCM. ii. KOMe, THF

【0069】

典型的な糖 pro-セレンテラジンの典型的な合成
(O-(8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)-6-フェニルイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン-イル)3,4,5,6-テトラアセトキシ-

- ガラクトシド)

【0070】

100 mLの丸底フラスコに、適切なアセトプロモ - 糖（例えば、アセトプロモ - D - ガラクトース）（1.1 EQ）、適切なセレンテラジン（例えば、（8 - ベンジル - 2 - （フラン - 2 - イルメチル） - 6 - フェニルイミダゾ [1 , 2 - a] ピラジン - 3 （7H） - オン）（1.0 EQ、100 mg）、およびトリフルオロメタンスルホン酸（67 mg、1 EQ）を加え、30分間アルゴンで脱気する。2 mLのジクロロメタンおよび70 μLのテトラメチル尿素を注入し、室温で3時間攪拌する。4 mLのアセトニトリルを加え、固体を濾過する。調製用の250 × 41 mmのC18 RP - HPLCカラムに上清を注入することによりサンプルを精製し、水とアセトニトリルまたはその他の適切な溶剤との勾配で溶出することにより、適切な分画を収集する。分画を蒸発させて化合物を得ることができる。

10

【0071】

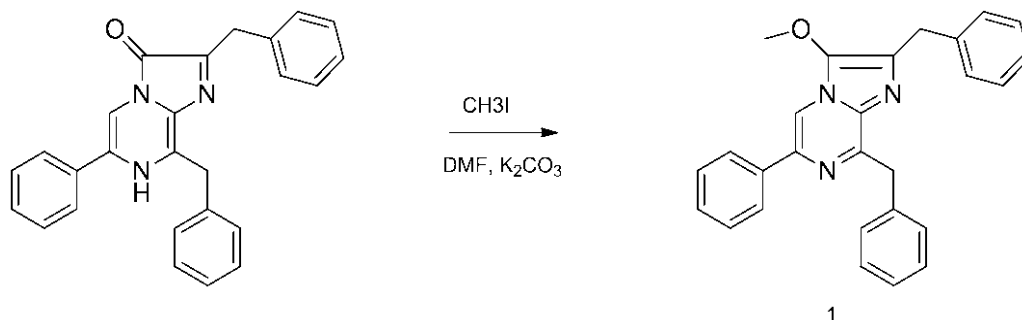
上記サンプルに、1 mLのメタノールを加え、氷浴で0 に冷却する。その後、メタノールまたはTHE中のポタジウムメトキシド（5.2 EQ）溶液を加えることができる。30分後、正確に5.2当量の酢酸を加える。その後、3 mLのアセトニトリルを加え、サンプルを濾過することができる。調製用の250 × 41 mmのC18 RP - HPLCカラムに上清を注入することによりサンプルを精製し、水とアセトニトリルまたはその他の適切な溶剤との勾配で溶出することにより、適切な分画を収集することができる。分画を蒸発させて化合物（25）を得ることができる。

20

【0072】

予言的实施例10：様々なP450基質の合成

【化26】



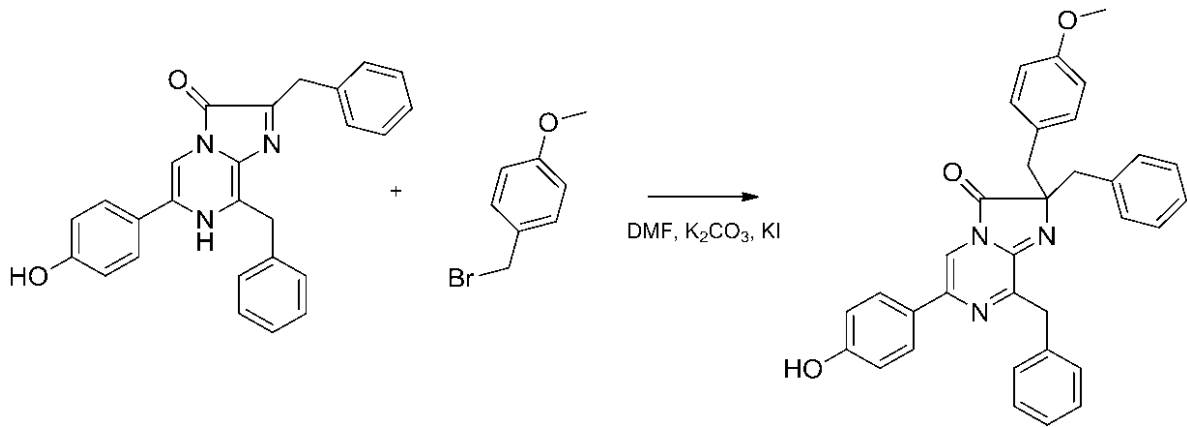
30

DMF中でセレンテラジンと1.1当量ポタジウム炭酸塩とを混ぜ合わせた混合物に、アルゴン雰囲気下で、1当量メチルヨウ化物を室温で加えることができる。薄層クロマトグラフィーにより反応進行をモニタリングすることができる。反応が完了すると同時に、混合物を数分間、氷浴で数分間冷却し、反応物容積と当量容積の水を加えることができる。得られた混合物は、好適な有機溶媒（例えば、酢酸エチル）で抽出することができ、その抽出物を濃縮して粗化合物1を産生する。前記材料をさらにシリカゲルクロマトグラフィーで精製してもよい。

【0073】

40

【化 2 7】



10

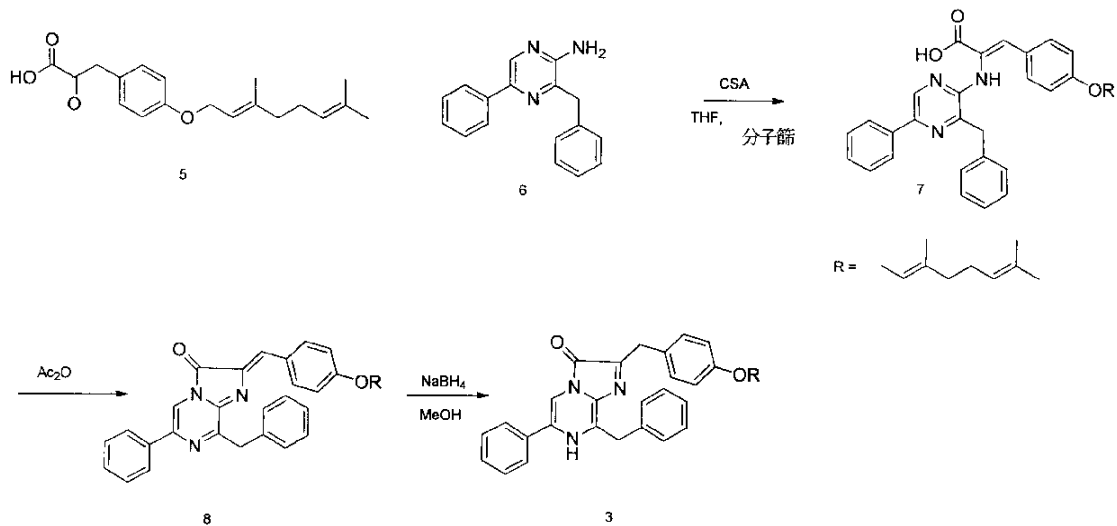
2

DMF中でセレンテラジンと1.1当量のポタジウム炭酸塩およびポタジウムヨウ化物とを混ぜ合わせた混合物に、アルゴン雰囲気下で、1当量のp-メトキシベンジル臭化物を室温で加えることができる。薄層クロマトグラフィーにより反応進行をモニタリングすることができ、反応が完了すると混合物を数分間、氷浴で数分間冷却し、その後、反応物容積と当量容積の水を加えることができる。得られた混合物は、好適な有機溶媒（例えば、酢酸エチル）で抽出することができ、その抽出物を濃縮して粗化合物2を産生する。前記材料をさらにシリカゲルクロマトグラフィーで精製してもよい。

20

【0074】

【化 2 8】



30

R =

THF中で3-ベンジル-5-フェニルピラジン-2-アミン(6)(1当量)、(E)-3-(4-(3,7-ジメチルオクタ-2,6-ジエン-1-イル)オキシ)フェニル)-2-オキソプロパン酸(5)(1.5当量)およびカンファースルホン酸(1.5当量)とを混ぜ合わせた混合物を、モレキュラーシブの存在下で、開始材料の濃縮が完了するまで環流で加熱する。反応混合物を酢酸エチルで容積の3倍に希釈し、水およびブライン溶液で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、真空下で溶媒を取り除き、化合物7を含有する残渣を乾燥DMFで分解した。得られた溶液を無水酢酸(1.5当量)およびピリジン(1.5当量)で、室温で処理する。TLCにより反応の進行をモニタリングすることができ、いったん完了すると、反応混合物を氷浴で数分間冷却し、その後、反応物容積と当量容積の水を加える。得られた混合物は、好適な有機溶媒(例えば、酢酸エチル)で抽出し、その抽出物を濃縮して粗化合物8を産生する。前記材料をメタノールで分解し、約0℃に冷却し、産物生成が完了するまで、水素化ホウ素ナトリウム(5~10当

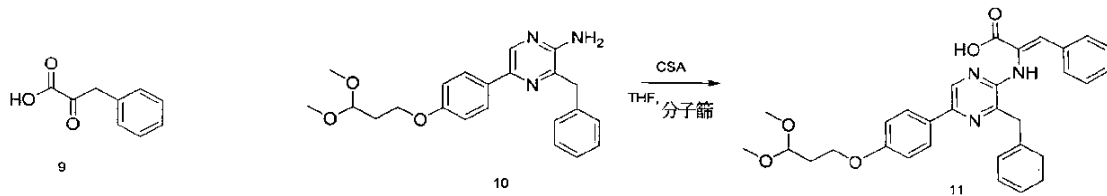
40

50

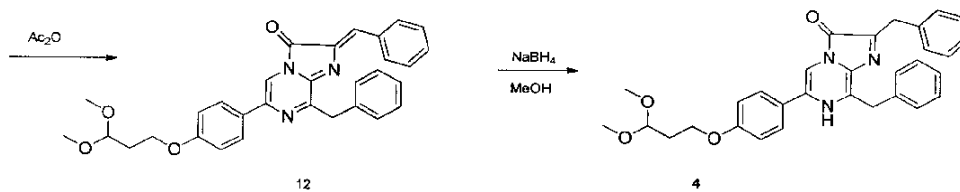
量)を少量ずつ使用して処理する。冷めたまま、反応混合物を、先に添加された水素化物の分子と当量の酢酸で処理することができ、反応混合物を真空下で濃縮することができる。残渣を水で数回すりつぶすと、粗化合物3を得ることができる。この材料をシリカゲルクロマトグラフィーで精製することもできる。

【0075】

【化29】



10



20

THF中で3-ベンジル-5-(4-(3,3-ジメトキシプロポキシ)フェニル)ピラジン-2-アミン(10)(1当量)、2-オキソ-3-フェニルプロピオン酸(9)(1.5当量)およびカンファースルホン酸(CSA)(1.5当量)と混ぜ合わせた混合物を、モレキュラーシブの存在下で、開始材料の濃縮が完了するまで環流で加熱する。反応混合物を酢酸エチルで容積の3倍に希釈し、水およびブライン溶液で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、真空下で溶媒を取り除き、11を含有する残渣を乾燥DMFで分解した。得られた溶液を無水酢酸(1.5当量)およびピリジン(1.5当量)で、室温で処理する。TLCにより反応の進行をモニタリングすることができ、いったん完了すると、反応混合物を氷浴で数分間冷却し、その後、反応物容積と当量容積の水を加える。得られた混合物は、好適な有機溶媒(例えば、酢酸エチル)で抽出することができ、その抽出物を濃縮して粗化合物12を産生する。前記材料をメタノールで分解し、約0℃に冷却し、産物生成が完了するまで、水素化ホウ素ナトリウム(5~10当量)を少量ずつ使用して処理する。冷めたまま、反応混合物を、先に添加された水素化物の分子と当量の酢酸で処理し、反応混合物を真空下で濃縮する。残渣を水で数回すりつぶすと、粗化合物4が得られる。この材料をシリカゲルクロマトグラフィーで精製することもできる。

30

【0076】

実施例11：NADHの測定

本発明のジアホラーゼ検出用pro-セレンテラジン基質を使用して、サンプルに存在するNADHの量を測定した。NADH、ジアホラーゼ、pro-セレンテラジン基質、およびエステラーゼを混ぜ合わせて、サンプルに存在するNADHを検出した。ジアホラーゼにより利用されるpro-セレンテラジンをセレンテラジンに変換した。生成されたセレンテラジンの量は、オプロフォルスルシフェラーゼ異形により検出され、生成された発光は、サンプルに存在するNADHの量に比例する。

40

【0077】

アッセイのために、10μLのNADH(60μMから0μMへとすりつぶす)、PBS中の10μLの12U/mLジアホラーゼ酵素、PBS中の10μLの165UEステラーゼ、およびPBS中の10μLの60μMPBI-4600を、1時間室温で培養した。培養後、オプロフォルスルシフェラーゼ異形(L27V)を10⁹希釈で含有す

50

るオプロフォルスルシルシフェラーゼ検出試薬（100 mMのMES pH 6、1 mMのCDTA、150 mMのKCl、35 mMのチオ尿素、1 mMのDTT、0.5% Tergitolおよび0.05% Mazu）を加えた。5分後と1時間後に発光を測定した（図9）。データによると、本発明の化合物を用いて、NADHを利用する酵素を検出することによりサンプル中のNADHを測定することができる。

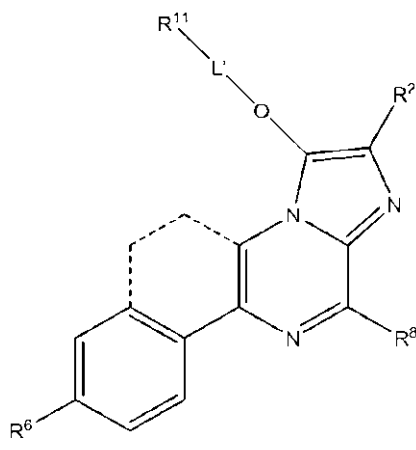
【0078】

全ての刊行物、特許および特許出願書は、参照により本明細書に援用される。前述の明細書では、本発明はそのある実施形態に関連して記載されたが、詳細の多くは説明を目的とするものであって、当業者であれば、本発明が追加の実施形態に対しても実行可能であり、本明細書に記載のある詳細は、本発明の基本的原則が逸脱しない限りにおいて、かなり多様であり得ると理解するであろう。

10

本発明の好ましい態様は以下の通りである。

1. 式 (II) で示される化合物。

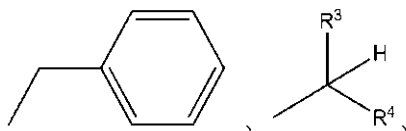


20

式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-$ Tまたは C_{1-5} アルキルであり；
 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、

30



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{11} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または共に C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

40

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

L' は直接結合またはリンカーであり；

n は、0~3であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；

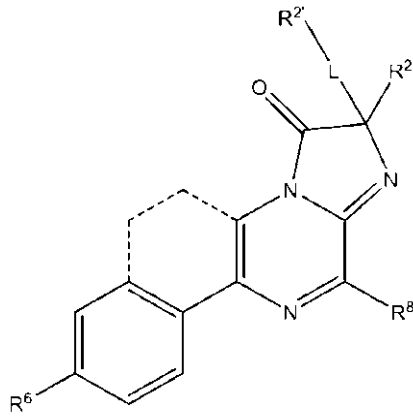
T は、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和で

50

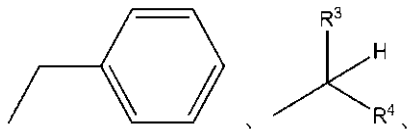
あってもよい；
 の化合物。
 2. 式 (I)



10

式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり；
 R^2 は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$
 または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；
 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成
 る群から選択され；
 R^8 は、

20

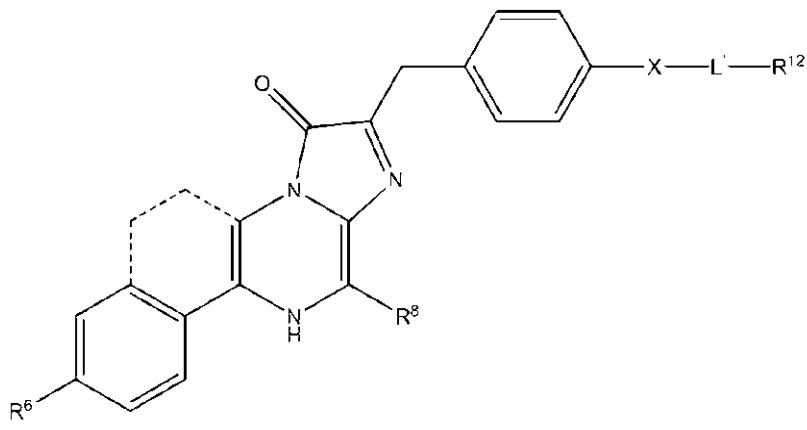


水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

30

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または共に C_{1-2} アルキルであり；
 R^A は C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ で
 あり；
 R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；
 R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；
 L は、リンカーであり；
 n は、 $0-3$ であり；
 R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；
 T は、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロア
 ルキルであり；
 V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および
 破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和で
 あってもよい。
 3. 式 (III) で示される化合物。

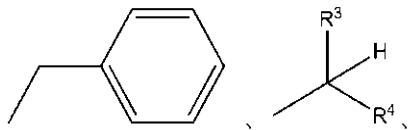
40



10

式中、 R^6 は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC(O)R$ または $-OCH_2OC(O)R$ から成る群から選択され；

R^8 は、



20

水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{12} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$ または $-NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリールであり；

L' は直接結合またはリンカーであり；

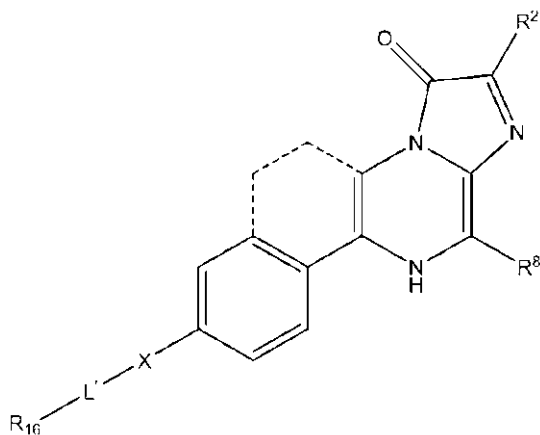
V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；および

X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

4. 式 (IV) で示される化合物。

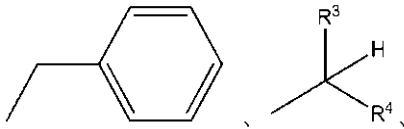


40

50

式中、 R^2 は、 $-(CH_2)_n-T$ または C_{1-5} アルキルであり；

R^8 は、



水素または低シクロアルキルから成る群から選択され；

R^{16} は、ペプチド、アミノ酸、糖類、 $-O-R^A$ 、 $-OC(O)O-R^A$ 、 $-N(R^B)_2$

または $NHC(O)OR^A$ から成る群から選択され；

式中、 R^3 および R^4 は共に水素、または C_{1-2} アルキルであり；

R^A は、 C_{1-4} アルキル、置換 C_{1-4} アルキル、 $-CH_2-R^C$ または $-CH_2-V-R^C$ であり；

R^B は、それぞれ独立して、 $-H$ または $-R^A$ であり；

R^C は、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、または置換ヘテロアリール；

L' は、直接結合またはリンカーであり；

n は0~3であり；

T は、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、置換ヘテロアリールまたはシクロアルキルであり；

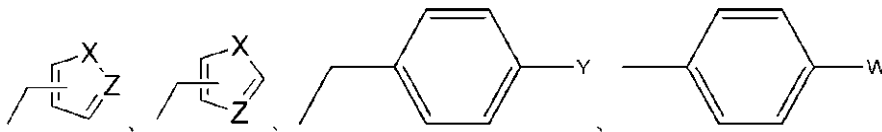
V は、 $-S-$ または $-O-$ であり；

X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

R は、それぞれ独立して、 C_{1-7} アルキルであり；および

破線結合手は、選択可能な環の存在を示しており、その環は飽和であっても、不飽和であってもよい。

5. 式中、 R^2 は、



または、 C_{2-5} 直鎖アルキルであり；

X は、それぞれ独立して、 $-S-$ 、 $-O-$ または $-NH-$ であり；

Z は、 $-CH-$ または $-N-$ であり；

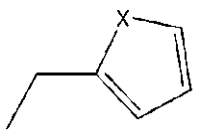
Y は、 $-H$ または $-OH$ であり；

W は、 $-NH_2$ 、ハロ、 $-OH$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-CO_2R$ であり；および

R は、 C_{1-7} アルキルである、

上記1, 2および4のいずれか一項に記載の化合物。

6. 式中、 R^2 は、



であり；および

X は、 O または S である、

上記5に記載の化合物。

10

20

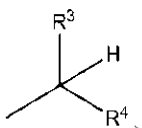
30

40

50

7. 式中、 R^2 は、 C_{2-5} 直鎖アルキルである、上記5に記載の化合物。

8. 式中、 R^8 は、



低シクロアルキル、またはHであり、

R^3 および R^4 は、共に水素、または共に C_{1-2} アルキルである、上記1~7のいずれか一項に記載の化合物。

10

9. 式中、 R^8 は、ベンジルである、上記1~7のいずれか一項に記載の化合物。

10. V が、 S である、上記1~9のいずれか一項に記載の化合物。

11. 酵素を含有すると思われるサンプルを、上記1~10のいずれか一項に記載の化合物と接触させる工程、および

サンプルの発光を検出する工程、
を含むことを特徴とする酵素の存在または量の検出方法。

12. 発光が、定量化されている、上記11に記載の方法。

13. サンプルには第2酵素が含有されると疑われ、

前記サンプルを、上記1~10のいずれか一項に記載の、第2酵素のための基質を含有する第2化合物と接触させる工程、および

20

該サンプルの発光を検出する工程、

を含む、上記11に記載の方法。

14. 上記1~10のいずれか一項に記載の化合物をトランスジェニック動物に投与する工程、および

発光を検出する工程、
を含む、*in vivo*で酵素の存在を検出する方法。

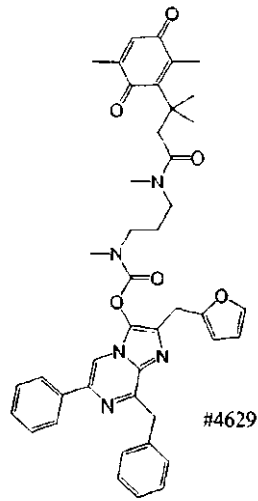
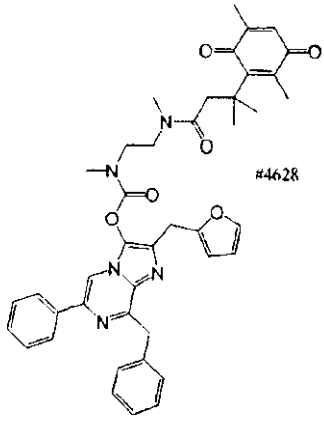
15. 上記1~10のいずれか一項に記載の化合物を動物に投与する工程、

動物からサンプルを得る工程、および

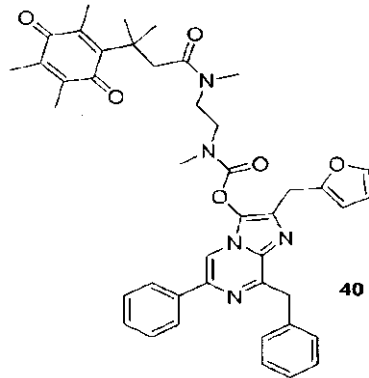
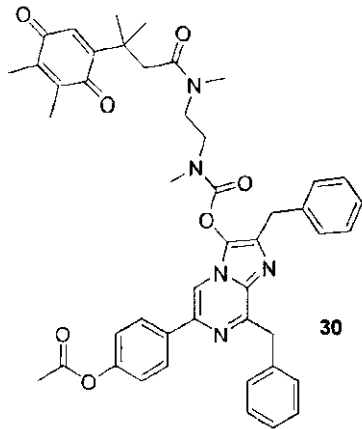
サンプルの発光を検出する工程、
を含む、酵素の存在を検出する方法。

30

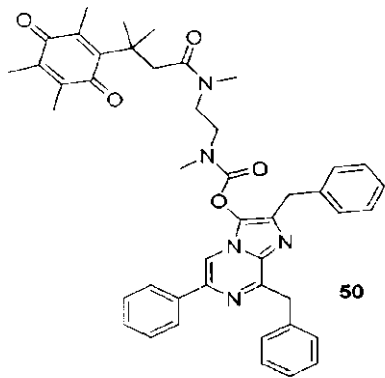
16.



10

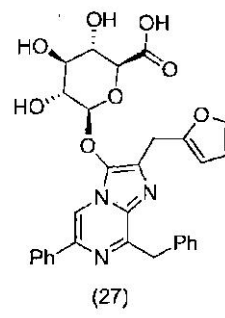
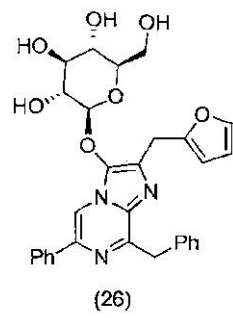
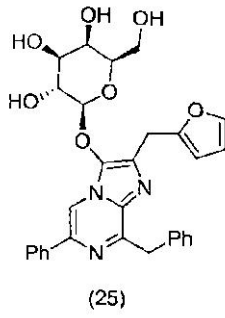


20

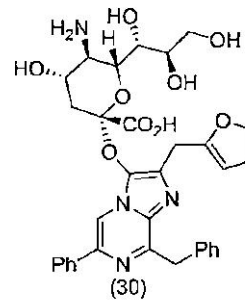
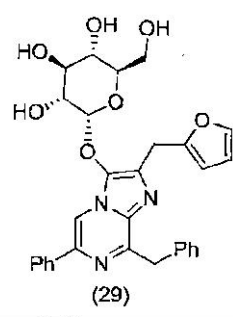
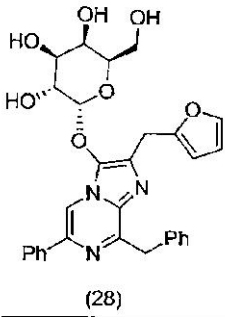


30

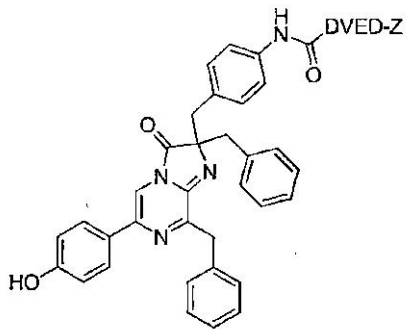
40



10



20



から成る群から選択される化合物。

30

【 図 1 】

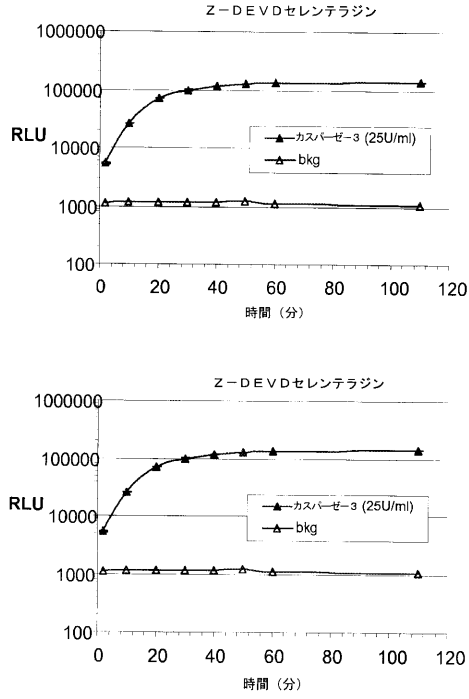


図 1

【 図 2 】

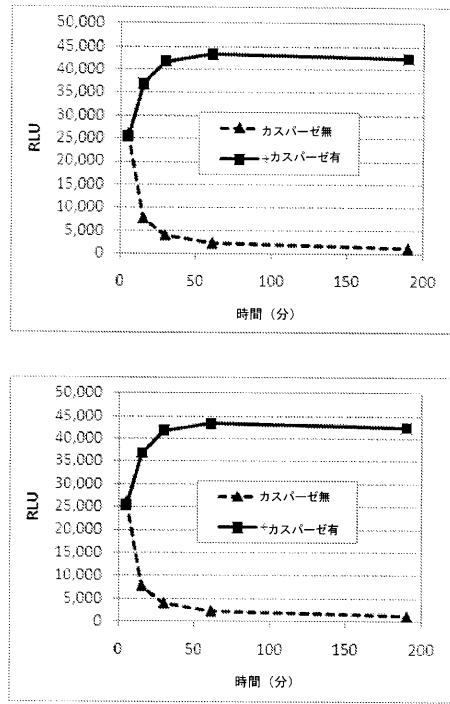
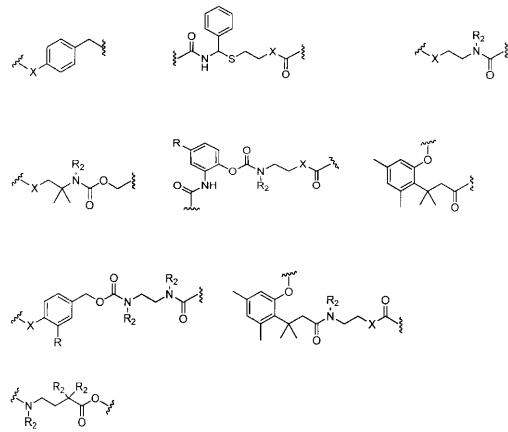


図 2

【 図 3 】



R₁は、それぞれ独立して、H、ハロゲンまたはNO₂
 R₂は、それぞれ独立して、HまたはMe
 Xは、それぞれ独立して、NH、NM_e、OまたはS

図 3

【 図 4 】

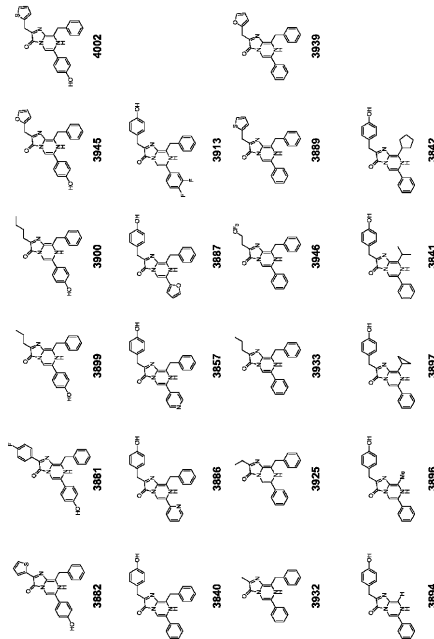
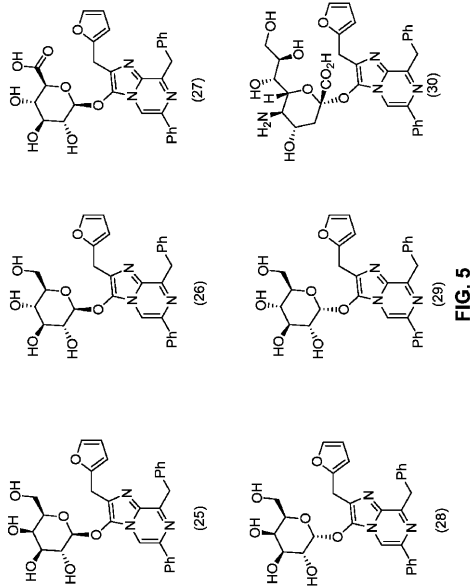


FIG. 4

【 図 5 】



【 図 6 】

基質	酵素
Asp-Glu-Val-Asp	カスパーゼ-3/7
Leu-Glu-Thr-Asp	カスパーゼ-8
Leu-Glu-His-Asp	カスパーゼ-9
Val-Asp-Val-Ala-Asp	カスパーゼ-2
Gly-Pro	ジベプチルペプチターゼ4 (DPP1V)
Val-Pro	ジベプチルペプチターゼ4 (DPP1V)
Leu-Lcu-Val-Tyr	カルバインおよびキモトリプシン様プロテアーゼ
Gln-Glu-Val-Tyr	カルバインおよびキモトリプシン様プロテアーゼ
Lcu-Arg-Arg	トリプシン様プロテアーゼ
norLeu-Pro-norLeu-Asp	カスパーゼ様プロテアーゼ
Ileu-Glu-Pro-Asp	グランザイムB
Ileu-Glu-Thr-Asp	グランザイムBまたはカスパーゼ-6
Phe-Arg	カテプシンB/L
Leu-Arg	カテプシンK
Gly-Pro-Arg	トロンピン
Gly-Gly-Arg	トロンピン
Lys	トリプシン
Ala-Ala-Phe	アミノペプチダーゼ
Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln	SARSプロテアーゼ
Val-Asn-Ser-Thr-Leu-Gln	SARSプロテアーゼ

図 6

【 図 7 】

VP-セレンテラジン	Boc-VPR-セレンテラジン
Z-QEVY-セレンテラジン	Z-PRNK-セレンテラジン
Z-IEPD-セレンテラジン	M-セレンテラジン
Z-IETD-セレンテラジン	L-セレンテラジン
Z-FR-セレンテラジン	Z-AGR-セレンテラジン
Z-LR-セレンテラジン	Z-RRVR-セレンテラジン
Z-GPR-セレンテラジン	Ac-PAL-セレンテラジン
Z-GGR-セレンテラジン	Ac-ANW-セレンテラジン
Ac-K-セレンテラジン	Z-LPSR-セレンテラジン
Z-TSAVLQ-セレンテラジン	Z-QTGG-セレンテラジン
Z-VNSTLQ-セレンテラジン	Ac- QTGG-セレンテラジン
Ac-RLR-セレンテラジン	Z-HLVLRIRGG-セレンテラジン
Z-LSTR-セレンテラジン	Ac-LRSR-セレンテラジン
Boc-LSTR-セレンテラジン	Z-WEHD-セレンテラジン
Suc-AAPF-セレンテラジン	Z-STFAQP-セレンテラジン
Z-ATAD-セレンテラジン	Boc-QAR-セレンテラジン
Z-IVLD-セレンテラジン	Ac-OFR-セレンテラジン

図 7

【 図 8 】

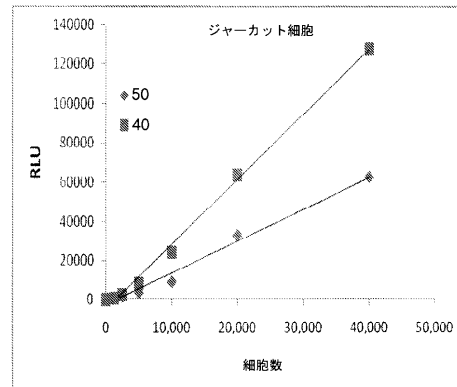


図 8

【 図 9 】

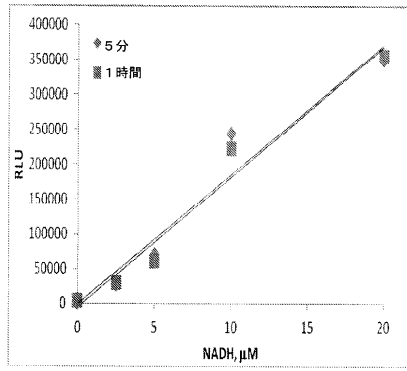


図 9

【 図 10 】

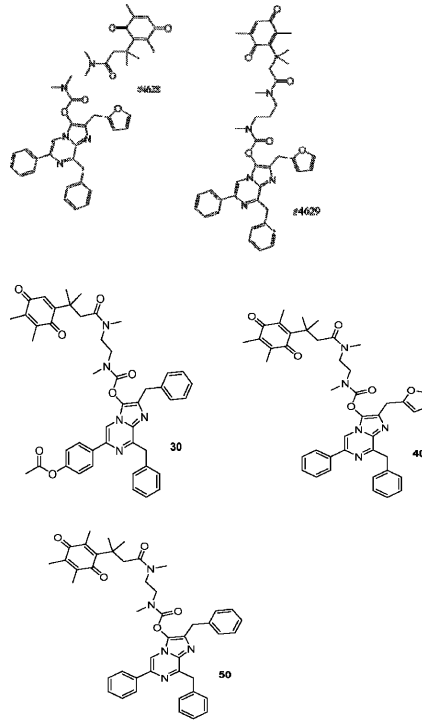


FIG. 10

フロントページの続き

- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (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
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (72)発明者 クラウバート ディーター エイチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 0 アロヨ グランデ ブルー スカイ ドライヴ
2 5 0
- (72)発明者 マイゼンハイマー ボンチョ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 0 1 サン ルイス オビスポ ヴィクトリア アヴ
ェニュー 2 8 6 8
- (72)発明者 アンク ジェームズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 0 アロヨ グランデ ルース アン ウェイ 2
5 7
- (72)発明者 チョウ ウェンファイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 5 4 サンタ マリア イヴリン コート 1 8 4 4

審査官 三木 寛

- (56)参考文献 特開平08-059686(JP,A)
特開平08-294397(JP,A)
特表2005-515977(JP,A)
特表2005-530485(JP,A)
特表2007-526766(JP,A)
特表2014-526443(JP,A)
特開平03-137188(JP,A)
特開平10-077286(JP,A)
特開2006-126152(JP,A)
Chemistry Letters, 1987年, No.2, p.417-418
Analytical Sciences, 1995年, Vol.11, No.6, p.1013-1015
Analytical Sciences, 1994年, Vol.10, No.5, p.813-814
Hawkins, E. 他, 生細胞におけるウミシイタケルシフェラーゼ発光の測定, Prometech Journal
, 2005年, Number 17, p.10-14
SHIMOMURA OSAMU, SEMI-SYNTHETIC AEQUORINS WITH IMPROVED SENSITIVITY TO CA2+ IONS, BIOCH
HEM. J., 1989年, Vol.261, P.913-920
PICHLER ANDREA, IMAGING REVERSAL OF MULTIDRUG RESISTANCE IN LIVING MICE WITH BIOLUMINE
SCENCE: 以下備考, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, 米国, NATION
AL ACADEMY OF SCIENCES, 2004年 2月10日, Vol.101 No.6, P.1702-1707, MDR1 P-GLYC
OPROTEIN TRANSPORTS COELENTERAZINE
Teranishi, Katsunori; Hisamatsu, Makoto; Yamada, Tetsuya, Synthesis and chemiluminesce
nt properties of the peroxy acid compound as an intermediate of coelenterate lucif
erin luminescence, Tetrahedron Letters, 1997年, Vol.38(15), p.2689-2692

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07D 487/04

C07H 17/02
CAplus/REGISTRY(STN)