

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4686126号
(P4686126)

(45) 発行日 平成23年5月18日(2011.5.18)

(24) 登録日 平成23年2月18日(2011.2.18)

(51) Int. Cl. F I
C O 7 D 219/02 (2006.01) C O 7 D 219/02
C O 7 D 219/04 (2006.01) C O 7 D 219/04
C O 7 D 219/06 (2006.01) C O 7 D 219/06
C O 7 D 409/04 (2006.01) C O 7 D 409/04
C O 7 D 411/04 (2006.01) C O 7 D 411/04

請求項の数 50 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-554650 (P2003-554650)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月18日(2002.12.18)
 (65) 公表番号 特表2005-514396 (P2005-514396A)
 (43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/037611
 (87) 国際公開番号 W02003/053934
 (87) 国際公開日 平成15年7月3日(2003.7.3)
 審査請求日 平成17年12月15日(2005.12.15)
 (31) 優先権主張番号 10/029, 222
 (32) 優先日 平成13年12月20日(2001.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/205, 050
 (32) 優先日 平成14年7月25日(2002.7.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504236547
 ルミゲン インク
 アメリカ合衆国 ミシガン 48034
 サウスフィールド ダブリュー・エイト
 マイル ロード 22900
 (74) 代理人 100096714
 弁理士 本多 一郎
 (74) 代理人 100096161
 弁理士 本多 敬子
 (72) 発明者 ハシエム アクハヴァン-タフティ
 アメリカ合衆国 ミシガン 48834
 ハウエル ヴィーナス ロード 4545

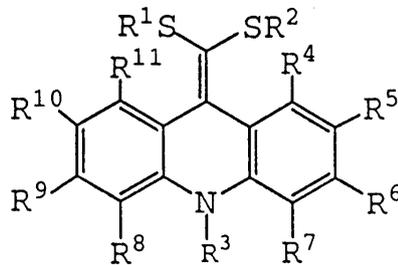
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペルオキシダーゼによって化学ルミネセンスを発生する優良化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式、



(式中、 R^1 と R^2 は相互に無関係に、1 ~ 20 個の炭素原子を有するアルキル、置換されたアルキル、ヘテロ原子としてN原子、O原子またはS原子を含むヘテロアルキル、置換されたヘテロアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル及び置換されたアリールアルキル基から選択される基である。但し、前記置換されたアルキル、置換されたヘテロアルキル、置換されたアリールおよび置換されたアリールアルキル基は、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基、ホスホニウム塩の基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基およびシアノ基からなる群から選択される置換基で置換されたもの

である。 R^1 と R^2 は、相互に結合して、アルキレン又はヘテロ原子としてN原子、O原子またはS原子を含むヘテロアルキレン鎖によって相互に結合した5～30個の原子を含有する環を形成することができ、また、ベンゼン環または置換されたベンゼン環に縮合した5～30個の原子を含有する環によって相互に結合することができ、

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリアル基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R^3 は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリアルオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシ基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基である。

10

但し、 R^1 と R^2 がベンゼン環または置換されたベンゼン環に縮合した5～30個の原子を含有する環によって相互に結合する場合は、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基、およびホスホニウム塩の基から選ばれる基であるZを有する。)で表されることを特徴とする化合物。

【請求項2】

$R^4 \sim R^{11}$ の少なくとも1個が、アルキル、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基又は1あるいは2個のアルキル又はアリアル基で置換されたアミノ基から選択され、 $R^4 \sim R^{11}$ の残余のものが水素原子である請求項1に記載の化合物。

20

【請求項3】

$R^4 \sim R^{11}$ のいずれもが水素原子である請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

R^3 が、メチル、フェニル、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたフェニル、ベンジル、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたベンジル、2-ナフチル及びp-アニシル基から選択される基である請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

R^1 と R^2 との少なくとも1個が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボキシレート塩の基、アンモニウム塩の基及びホスホニウム塩の基から選択される基で置換されるアルキル基である請求項1に記載の化合物。

30

【請求項6】

R^1 と R^2 との少なくとも1個がスルホネート塩の基で置換されたアルキル基である請求項5に記載の化合物。

【請求項7】

R^1 と R^2 との少なくとも1個がホスフェート塩の基で置換されたアルキル基である請求項5に記載の化合物。

【請求項8】

R^3 が、フェニル、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたフェニル、ベンジル基、及び、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたベンジル基から選択される基である請求項6に記載の化合物。

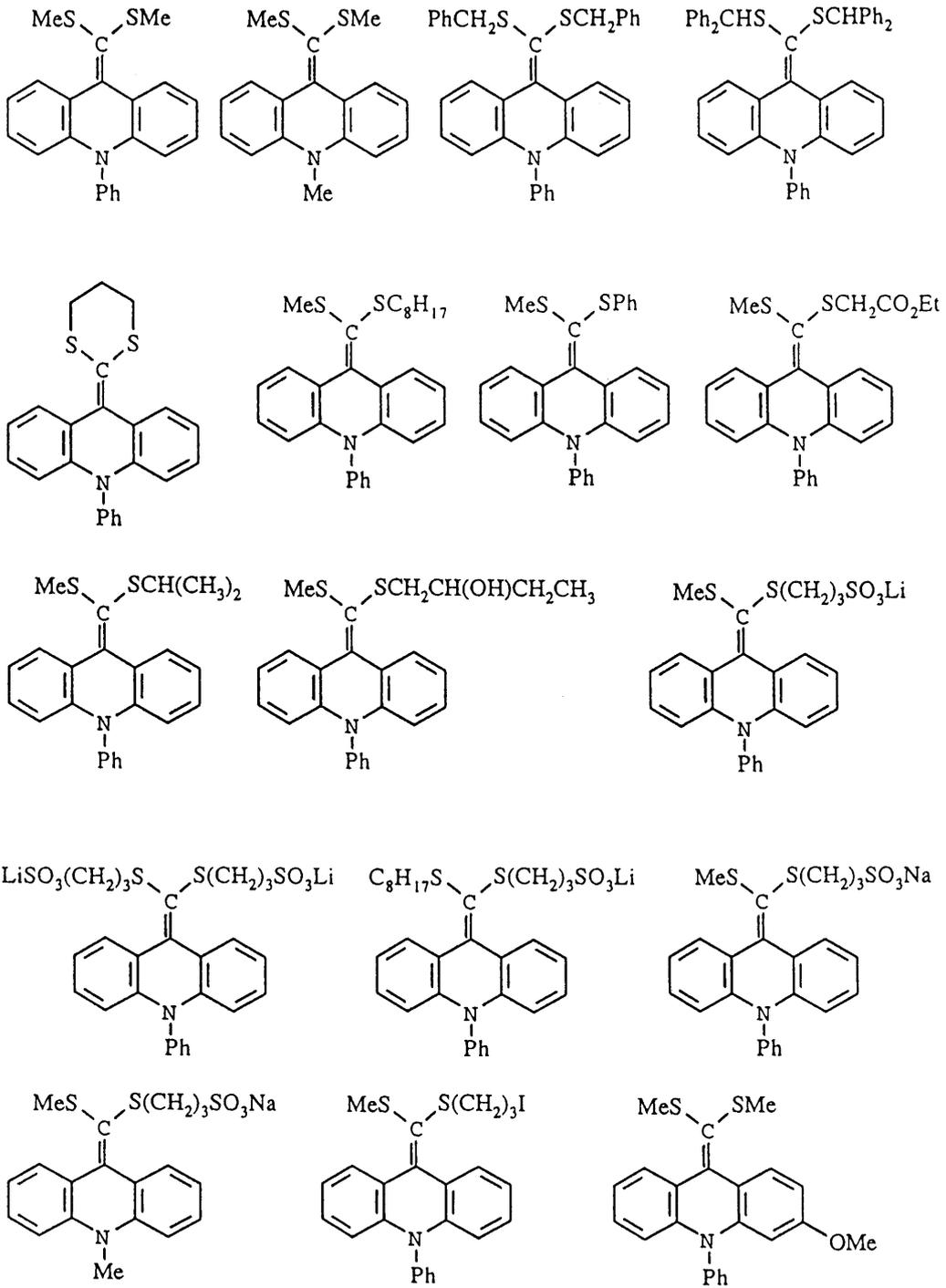
40

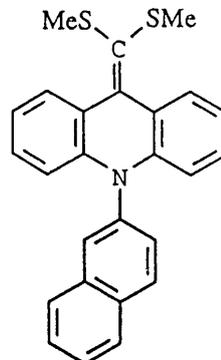
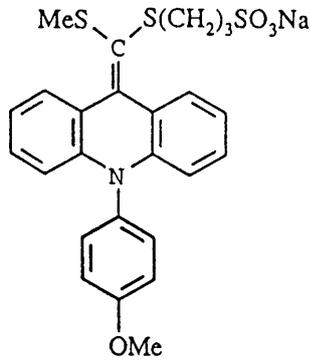
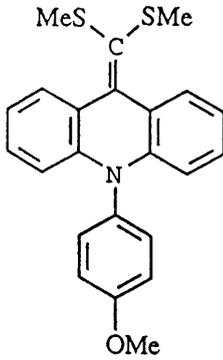
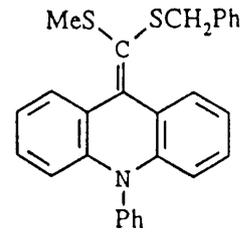
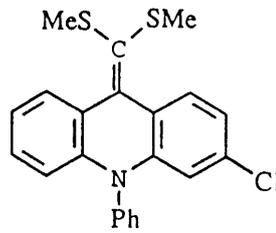
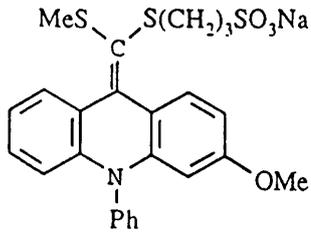
【請求項9】

R^3 が、フェニル、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたフェニル、ベンジル基、及び、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基で置換されたベンジル基から選択される基である請求項7に記載の化合物。

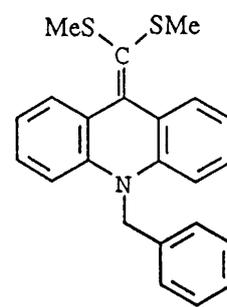
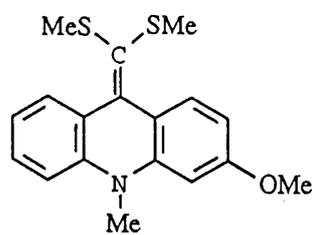
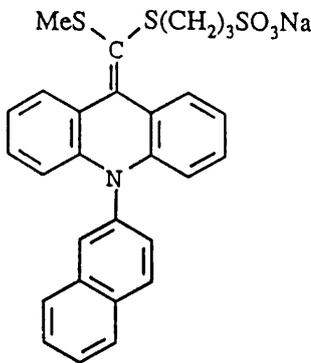
【請求項10】

下記式、

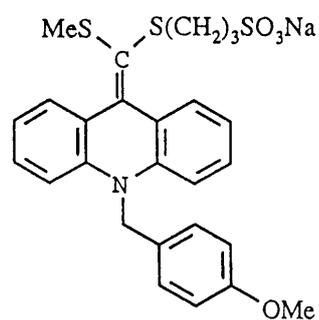
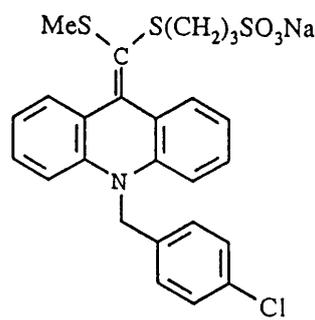
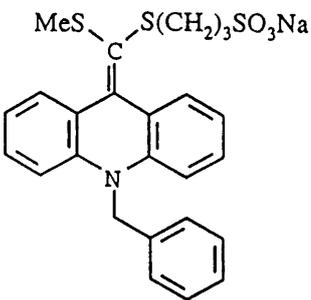




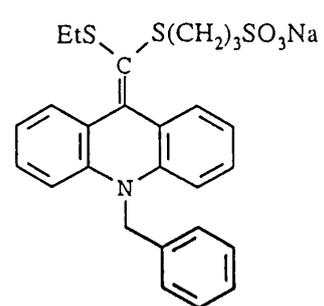
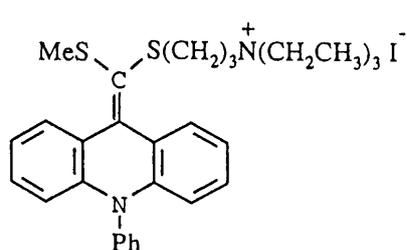
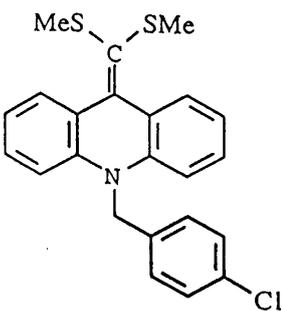
10



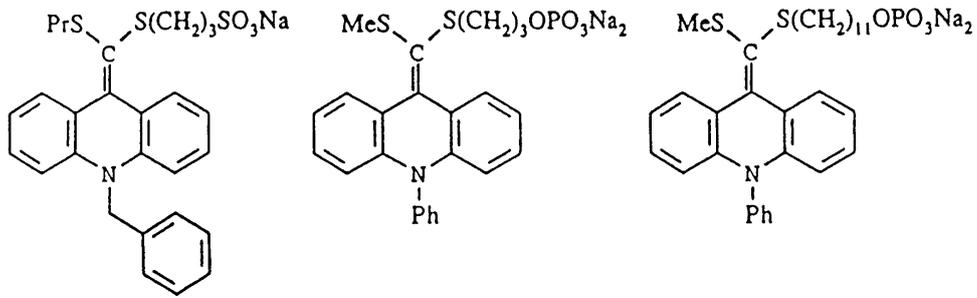
20



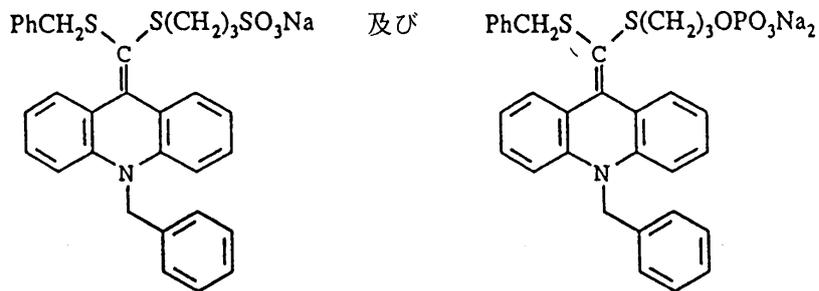
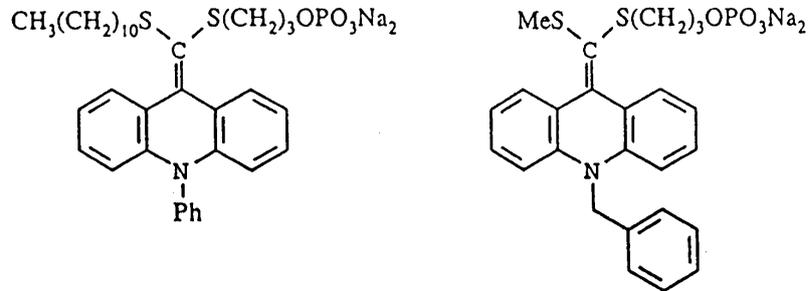
30



40



10

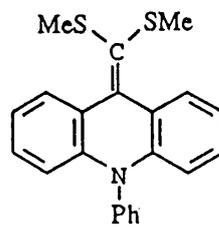


20

で表される化合物の群から選択される請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 1】

下記式、

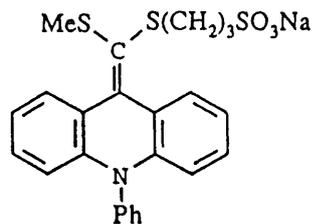


30

で表される請求項 1 0 に記載の化合物。

【請求項 1 2】

下記式、

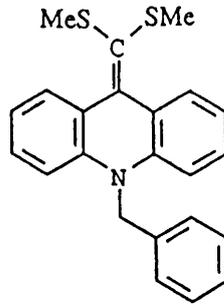


40

で表される請求項 1 0 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

下記式、

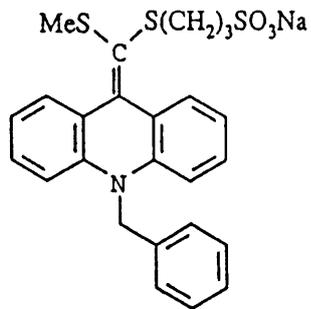


で表される請求項 10 に記載の化合物。

10

【請求項 14】

下記式、

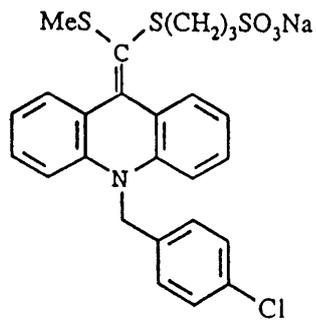


20

で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 15】

下記式、

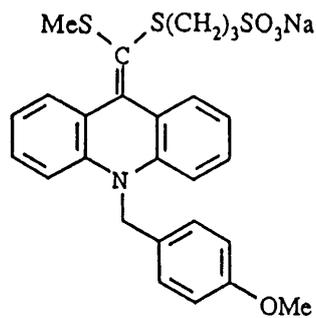


30

で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 16】

下記式、

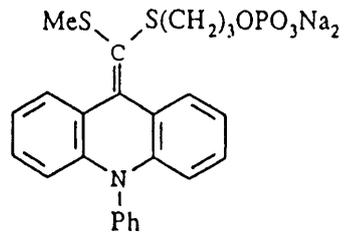


40

で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 17】

下記式、

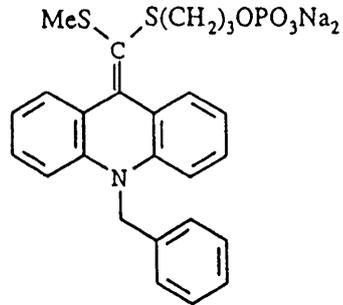


で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 18】

下記式、

10

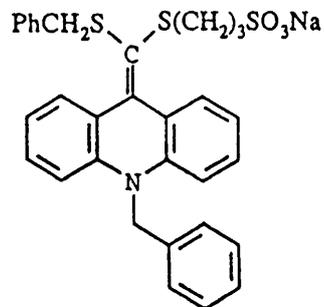


で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 19】

下記式、

20

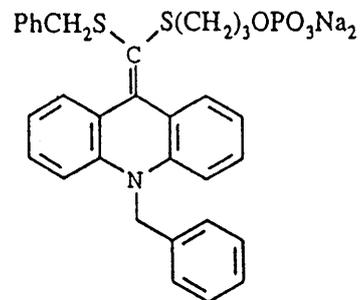


で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 20】

下記式、

30

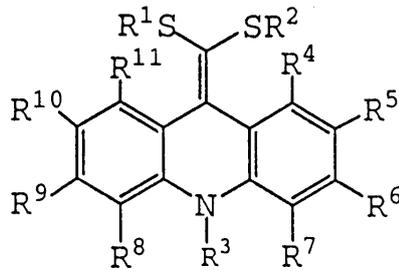


で表される請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 21】

下記式、

40



(式中、 R^1 と R^2 は置換したアルキレン又はヘテロ原子としてN原子、O原子またはS原子を含むヘテロアルキレン鎖によって相互に結合して5～30個の原子を含有する環を形成する基である。但し、前記置換したアルキレンは、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基、ホスホニウム塩の基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基およびシアノ基からなる群から選択される置換基で置換されたものである。)

10

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリール基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R^3 は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基である。)で表されることを特徴とする化合物。

20

【請求項22】

アルキレン鎖を含有する環が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zによって置換されている請求項21に記載の化合物。

【請求項23】

基 R^3 が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zによって置換されている請求項21に記載の化合物。

30

【請求項24】

R^1 と R^2 とを連結する環が、5～7個の原子を含有する請求項21に記載の化合物。

【請求項25】

R^3 が、アルキル、ヘテロアルキル、フェニル及びベンジル基から選択される基である請求項22に記載の化合物。

【請求項26】

Zが、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボキシレート塩の基、アンモニウム塩の基及びホスホニウム塩の基から選択されるものである請求項22に記載の化合物。

40

【請求項27】

Zが、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボキシレート塩の基、アンモニウム塩の基及びホスホニウム塩の基から選択されるものである請求項23に記載の化合物。

【請求項28】

$R^4 \sim R^{11}$ の少なくとも1個が、アルキル、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ、又は1～2個のアルキル若しくはアリール基によって置換されたアミノ基から選択されたものであり、 $R^4 \sim R^{11}$ の残余のものが水素原子である請求項21に記載の化合物。

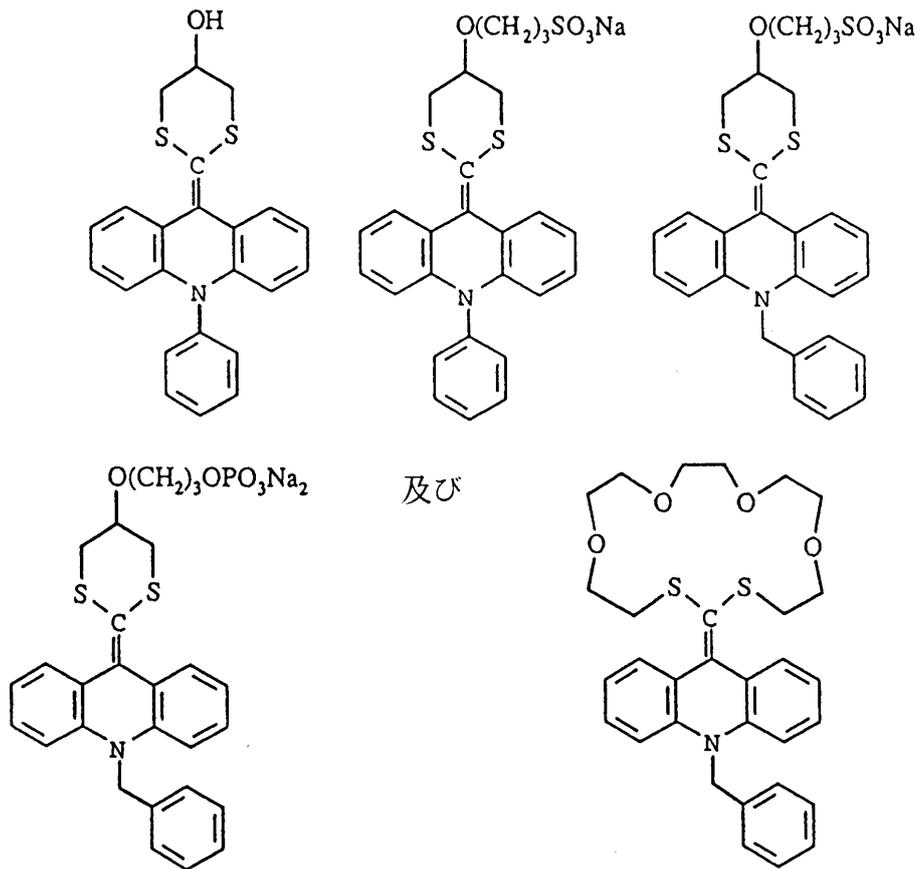
【請求項29】

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれもが水素原子である請求項21に記載の化合物。

50

【請求項 3 0】

下記式、



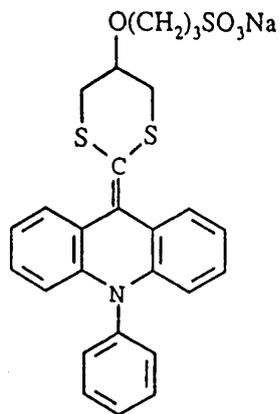
10

20

で表される化合物の群から選択される請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 3 1】

下記式、



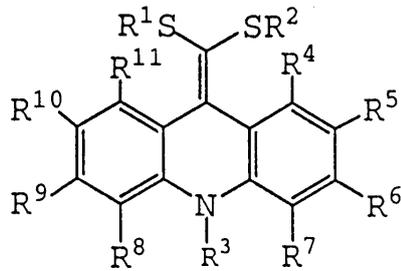
30

40

で表される請求項 3 0 に記載の化合物。

【請求項 3 2】

下記式、



(式中、 R^1 と R^2 は、ベンゼン環または置換されたベンゼン環に縮合した5～30個の原子を含有する環によって相互に結合する基であり、

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリール基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R^3 は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基である。 R^3 は、さらに、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zを含有する基である)で表されることを特徴とする化合物。

【請求項33】

縮合した第2の環が、ベンゼン環、又は、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基からなる群から選択される置換基で置換されたベンゼン環である請求項32に記載の化合物。

【請求項34】

縮合した第2の環が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基からなる群から選択される置換基Zによって置換されている請求項32に記載の化合物

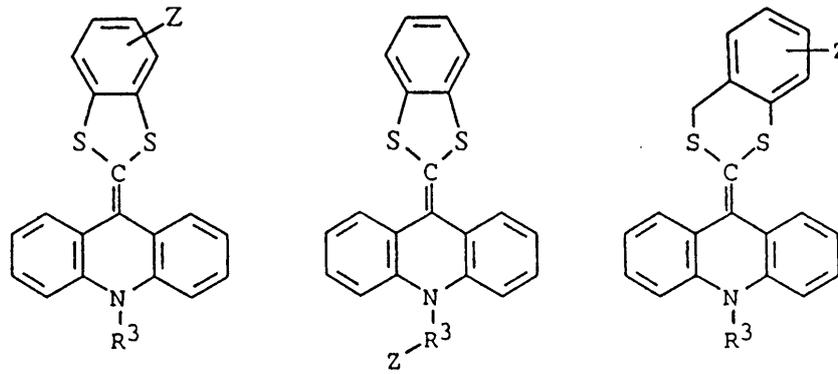
【請求項35】

下記式、

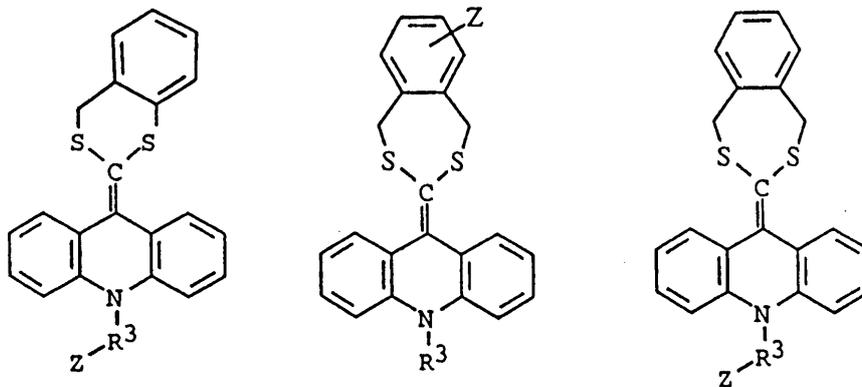
10

20

30

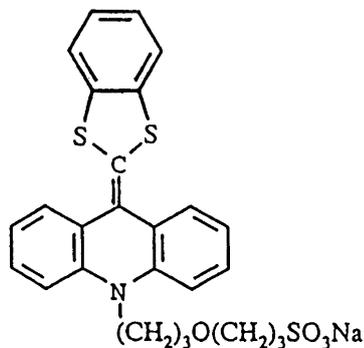


10



20

及び

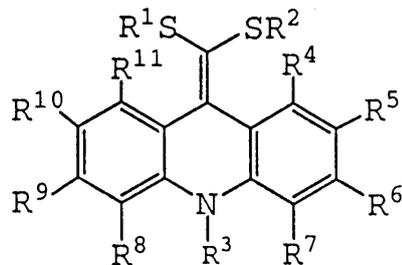


30

で表される化合物から選択される請求項 3 2 に記載の化合物。

【請求項 3 6】

ペルオキシダーゼ酵素を、過氧化物及び少なくとも 1 種の化学式 I、



40

(式中、 R^1 と R^2 とは、置換されたアルキレン又はヘテロ原子として N 原子、O 原子または S 原子を含むヘテロアルキレン鎖によって相互に結合して 5 ~ 30 個の原子を含有する環を形成する基である。但し、前記置換したアルキレンは、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基、ホスホニウム塩の基、アルコキシ基、アリーロキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基およびシアノ基からなる群から選択される置換基で置換されたものである。)

50

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリアル基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R^3 は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリアルオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基である。)で表される化合物と反応させて、化学ルミネセンスを発生することを包含する化学ルミネセンスの発生方法。

【請求項37】

アルキレン鎖を含有する環が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zで置換されている請求項36に記載の方法。

【請求項38】

基 R^3 が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zで置換されている請求項36に記載の方法。

【請求項39】

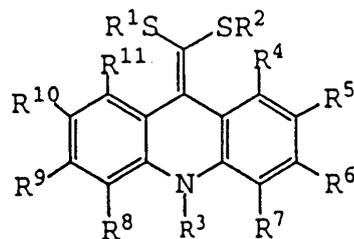
ペルオキシダーゼの活性を強化する強化剤化合物を供給することを包含する請求項36に記載の方法。

【請求項40】

強化剤が、フェノール性化合物、芳香族アミン、置換された及び無置換のアリアルポロン酸、アリアルポロン酸エステル、アリアルポロン酸無水物、フェノキサジン及びフェノチアジンから選択されるものである、ペルオキシダーゼの活性を強化する強化剤化合物を供給することを包含する請求項36に記載の方法。

【請求項41】

ペルオキシダーゼ酵素を、過酸化物及び少なくとも1種の化学式I、



I

(式中、 R^1 と R^2 とは、ベンゼン環または置換されたベンゼン環に縮合した5～30個の原子を含有する環によって相互に結合する基であり、

$R^4 \sim R^{11}$ はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリアル基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R^3 は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリアルオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基であり、更に、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基から選ばれる基Zを含有する基である)で表される化合物と反応させて、化学ルミネセンスを発生することを包含する化学ルミネセンスの発生方法。

【請求項42】

ペルオキシダーゼの活性を強化する強化剤化合物を供給することを包含する請求項41に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

強化剤が、フェノール性化合物、芳香族アミン、置換された及び無置換のアリールポロン酸、アリールポロン酸エステル、アリールポロン酸無水物、フェノキサジン及びフェノチアジンから選択されるものである、ペルオキシダーゼの活性を強化する強化剤化合物を供給することを包含する請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

化学式 I で表される化合物における縮合した第 2 の環が、ベンゼン環、又は、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩の基からなる群から選択される置換基で置換されたベンゼン環である請求項 4 1 に記載の方法。

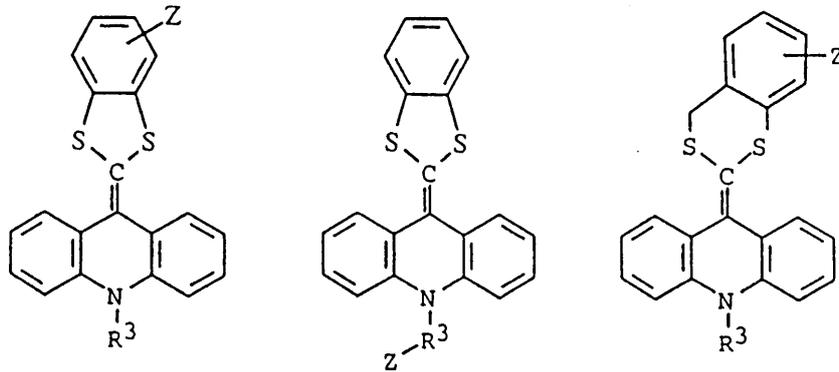
10

【請求項 4 5】

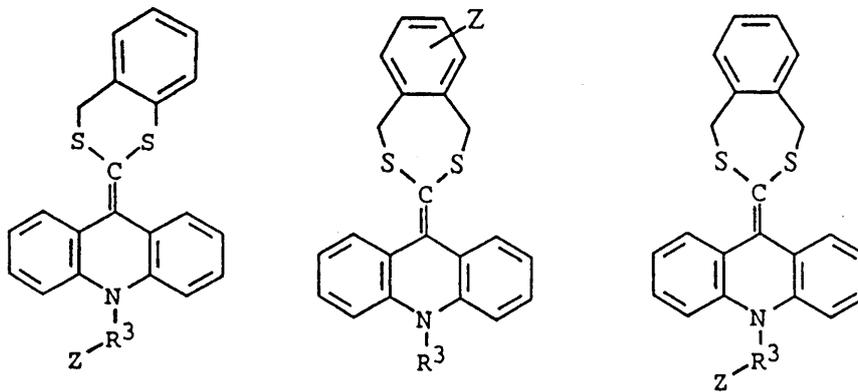
化学式 I で表される化合物における縮合した第 2 の環が、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基およびホスホニウム塩から選ばれる基 Z によって置換されている請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

化学式 I で表される化合物が、下記式、

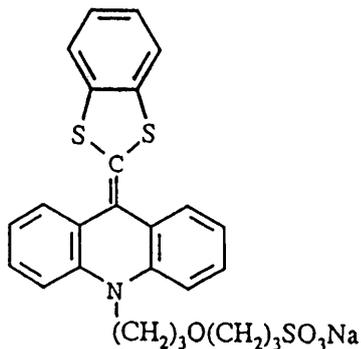


20



30

及び



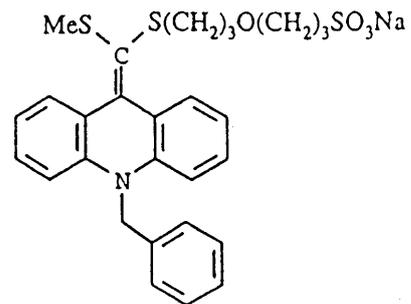
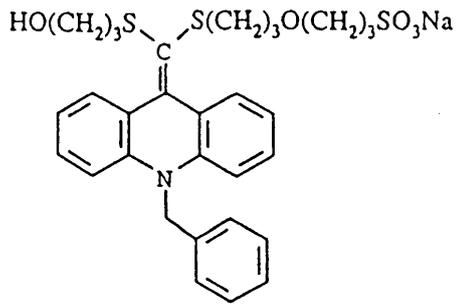
40

の化合物から選択されることを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

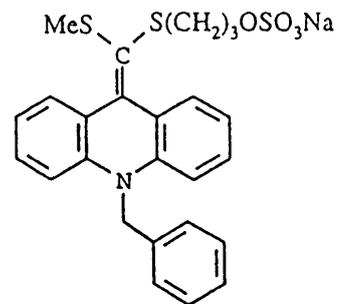
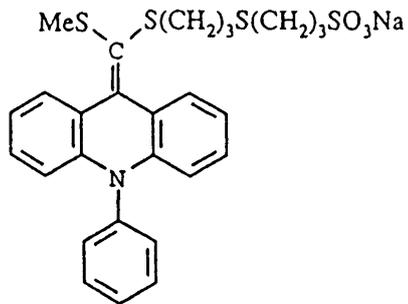
50

【請求項 4 7】

下記式、

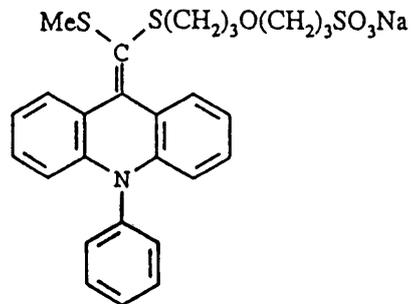


10



20

及び

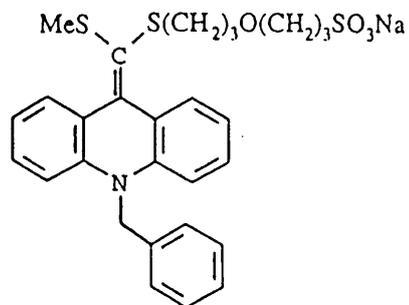


30

で表される化合物の群から選択される請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4 8】

下記式、

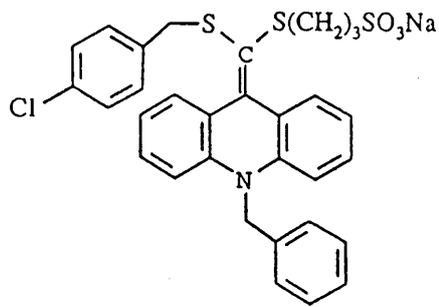
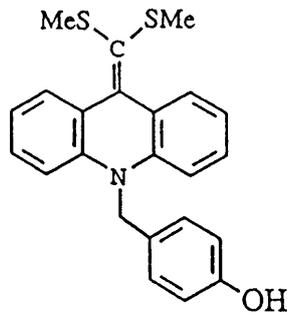


40

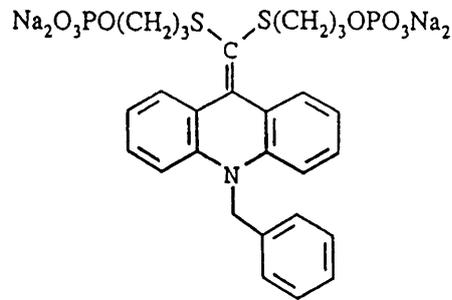
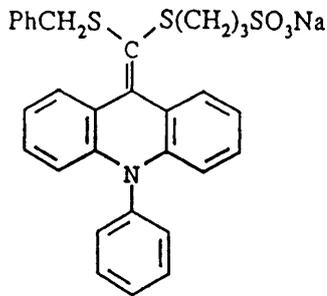
で表される請求項 4 7 に記載の化合物。

【請求項 4 9】

下記式、

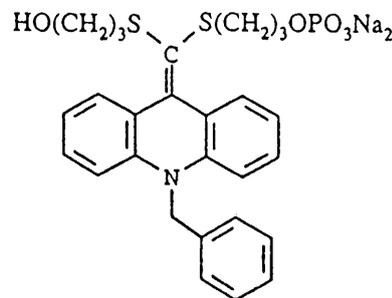


10



20

及び

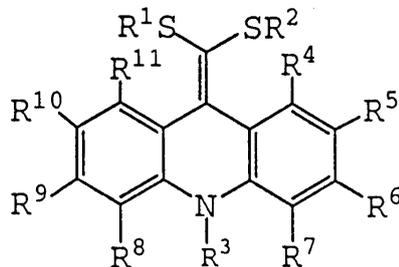


で表される化合物の群から選択される請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 50】

ペルオキシダーゼ酵素を、過酸化物及び少なくとも 1 種の化学式、



40

(式中、 R^1 と R^2 とは相互に無関係に、1 ~ 20 個の炭素原子を有するアルキル、置換されたアルキル、ヘテロ原子として N 原子、O 原子または S 原子を含むヘテロアルキル、置換されたヘテロアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル及び置換されたアリールアルキル基から選択される基である。但し、前記置換されたアルキル、置換されたヘテロアルキル、置換されたアリールおよび置換されたアリールアルキル基は、スルホネート塩の基、サルフェート塩の基、ホスホネート塩の基、ホスフェート塩の基、カルボン酸塩の基、アンモニウム塩の基、ホスホニウム塩の基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシル基、カルボアルコキシ基、カルボキシアミド基およびシアノ基からなる群から選択される置換基で置換されたものである。 R^1 と R^2 は、相互に結合して、アルキレン又はヘテロ原子として N 原子、O

50

原子またはS原子を含むヘテロアルキレン鎖によって相互に結合した5～30個の原子を含有する環を形成することができ、また、ベンゼン環または置換されたベンゼン環に縮合した5～30個の原子を含有する環によって相互に結合することができ、

R⁴～R¹¹はいずれも相互に無関係に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、および、1個あるいは2個のアルキルまたはアリール基で置換されたアミノ基からなる群から選択される1～50個の原子を含有する置換基であり、

R³は炭素原子数1～4のアルキル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基、または、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、カルボキシ基、カルボアルコキシ基、カルボキサミド基、シアノ基、スルホネート基およびホスフェート基からなる群から選択される置換基で置換されたフェニル基から選択される基 (10
 である) で表される化合物と反応させて、化学ルミネセンスを発生することを包含する化学ルミネセンスの発生方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応して化学ルミネセンスを発生する化学ルミネセンス性化合物並びに組成物に関する。特に、本発明は、ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応して可視的ルミネセンスを発生する新規なケテンジチオアセタール化合物を含有する優れた組成物に関する。本発明は更に、イムノアッセイ、核酸プローブアッセイ及び他の特異的結合対アッセイにおけるペルオキシダーゼの検出及びペルオキシダーゼ標識の特異的結合パートナー検出のためのアッセイ法に関する。 (20

【背景技術】

【0002】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)のようなペルオキシダーゼ酵素は、多くの場合、生体分子や他の重要な分析試料(analyte)、例えば、医薬品、ホルモン、ステロイド及びがん標識のための酵素結合アッセイにおいて、標識又はラベルとして使用される。これらの酵素の化学ルミネセンス検出法は、標本中の酵素の量、あるいは、酵素標識化分析試料が、又は、分析試料用の標識化特異的結合パートナーの量を測定する安全、簡便でかつ鋭敏な方法を提供する。 (30

【0003】

a、化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼ基質。

アミノ基置換環状アシルヒドラジド、例えば既知のルミノール及びイソルミノールは、H₂O₂及びペルオキシダーゼ触媒(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、HRP)と、塩基性条件下で反応して発光する。この反応は、H₂O₂の検出のため、及びペルオキシダーゼのための分析方法の基礎として用いられてきている。ルミノールのヘテロ環状類縁物、例えば8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド〔3,4-d-ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(M.Ii,ら、Biochem.Biophys.Res.Comm.,193巻(2)、540～5頁(1993年);ピリダジノキノキサリノン(米国特許第5,324,835号明細書)及び1,3-二置換ピラゾロ〔4',3':5',6'〕ピリド-〔2,3-d〕-ピラジンジオン(Y.Tominaga,ら、Tetrahedron Lett.,36巻、8641～4頁(1995年))は、ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応して化学ルミネセンスを生成することが既知である。ペルオキシダーゼ及び過酸化物によって酸化された場合、化学ルミネセンス性である他のヒドラジド化合物に、ヒドロキシ基置換フタルヒドラジド(米国特許第5,552,298号明細書)がある。 (40

【0004】

本出願人の、米国特許第5,491,072号明細書、第5,523,212号明細書及び第5,593,845号明細書には、ペルオキシダーゼ検出に、及び、アッセイに用いるための、過酸化物及びペルオキシダーゼとの反応によって発光する化学ルミネセンス性N-アルキルアクリダンカルボン酸エステル、チオエステル及びスルホンイミドが開示 (50

されている。PCT出願(WO第94/02486号公報)には、スピロアクリダン化合物と過酸化水素との化学ルミネセンス性反応が記載されている。この反応は、ホースラディッシュペルオキシダーゼの添加によって強化される。

【0005】

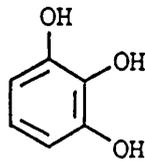
集合名詞としてルシフェリンと総称される、生物学的起源の各種化合物が、ペルオキシダーゼによって酸化される(L. J. Kricka及びG. H. G. Thorpeでの、*Luminescence Immunoassay and Molecular Applications*, K. Van Dyke and R. Van Dyke, 編集、CRC Press, Boca Raton, 1990年、77~98頁に集約されている)。過酸化水素を使用しない場合には、酵素がオキシダーゼとして作用する。

10

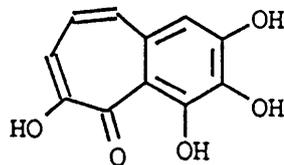
【0006】

ある種のフェノール化合物は、ペルオキシダーゼによる酸化で化学ルミネセンスを発生する。例えば、ピロガロールB-1及びプルプロガリンB-2が、Kricka及びThorpeの同文献に挙げられており、同様にクマリン系化合物のクマリン、ウンベリフェロン及びエスクリン(D. Slawinska, J. Slowinski, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4巻、226~30頁、(1989年))、フロコグルシノールB-3(M. Halmann, *ら*, *Photochem. Photobiol.*, 30巻、165~7頁(1979年))；及びアセトアミノフェンB-4(K. Schmitt, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.*, 51巻、719~23頁(1990年))がある。

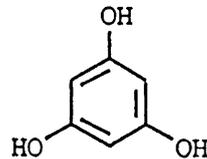
20



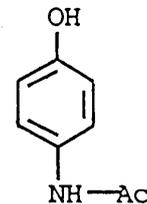
B-1



B-2



B-3



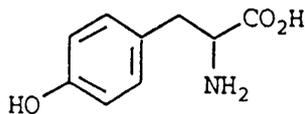
B-4

【0007】

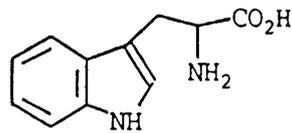
酸素又は過酸化物とペルオキシダーゼとの存在下で、弱い化学ルミネセンスを発生することが報告されている。他の各種の化合物は、合成シッフ塩基含有ポリマー(R. Zoulik, *ら*, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 60巻、95~103頁(1995年))；過酸化水素とともに、又は過酸化水素なしでキサンテン染料の存在下でのインドール-3酢酸(S. Krylov, A. Chebotareva, *FEBS*, 324巻(1)、6~8頁(1993年))；チロシン、トリプトファン及びクロルプロマジン(M. Nakano, *J. Biolumin. Chemilumin.* 4巻、231~40頁(1989年))及びMCLA B-8 M. (Mitani, *ら*, *J. Biolumin. Chemilumin.* 9巻、355~61頁(1994年))で、それぞれ、下記に示す如き構造B-5~B-8を有する。

30

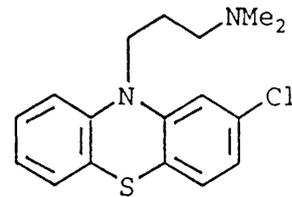
40



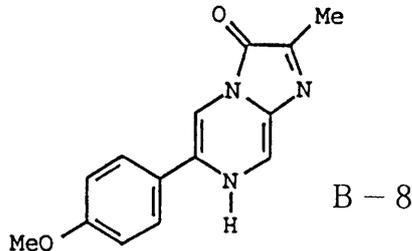
B-5



B-6



B-7



B-8

上記文献には、本記載の化合物の、ペルオキシダーゼによる化学ルミネセンス性酸化については、一切開示されていない。

【0008】

b、HRPによるエノールの反応。一連の刊行物には、エノール化可能なアルデヒドの、ペルオキシダーゼ接触作用での空気酸化が記載されている (H. Gallardo, ら、Biochim. Biophys. Acta, 789巻、57~62頁(1984年); W. J. Baader, ら、Biochem. Ed., 14巻(4)、190~2頁(1986年); I. Nantes, ら、Photochem. Photobiol., 63巻(6)、702~8頁(1996年))。反応性基質は、アルデヒドと平衡しているエノール状態の少量であると考えられる。アルデヒドの反応は、エノールホスフェートによって接触作用を受けるが、エノールホスフェートそのものは消費されない。文献によって、エノールホスフェートは、ペルオキシダーゼと反応して化学ルミネセンスを発生するのではないことが判る。蛍光性のエネルギーアクセプタへのエネルギー移動が発光を増大させる (M. T. Grijalba, ら、Photochem. Photobiol., 63巻(6)、697~701頁(1996年))。エノール・シリルエーテルとして (Baader, 同上文献) 又はエノール・アセテートとして遮蔽したアルデヒドを結合アッセイに使用する場合、最初に脱遮蔽してエノールを現場生成させ、次いでペルオキシダーゼと反応させて化学ルミネセンスを発生させた (A. Campa, ら、Photochem. Photobiol., 63巻(6)、742~5頁(1996年))。

【0009】

c、ペルオキシダーゼ強化剤。前記のルミノール及びアクリダンカルボン酸誘導体を含む既知の化学ルミネセンス基質とペルオキシダーゼとの反応からの化学ルミネセンスの増量及び持続性増大の目的で、多種の強化剤が使用されている。これらは、G. Thorpe, L. Krickaでの Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich, ら、編集、199~208頁(1987年)に挙げられているように、D-ルシフェリンのようなベンゾチアゾール誘導体や、各種のフェノール化合物、例えば、p-ヨードフェノール、p-フェニルフェノール、ナフトール及び芳香族アミンなどである。ペルオキシダーゼによるアミノ置換環状アシルヒドラジッドの化学ルミネセンス性酸化の強化剤として機能する他の化合物には、4-(4-ヒドロキシフェニル)-チアゾール (M. Ii, 同文献)、米国特許第5,171,668号明細書記載の化合物群、米国特許第5,206,149号明細書に開示の2-ヒドロキシ-9-フルオレノン及びヒドロキシ置換ベンズオキサゾール誘導体及び米国特許第5,629,168号明細書に記載の、ある種のフェニルボロン酸化合物がある。前掲の文献には、ペルオキシダーゼ単独又は強化剤の使用とともに本発明化合物の化学ルミネセンス性酸化が開示されていない。

10

20

30

40

50

【0010】

d、界面活性剤による化学ルミネセンス性ペルオキシダーゼ反応の強化。 高分子の、及び、非重合体の界面活性剤を用いて、ペルオキシダーゼ接触反応で発生する化学ルミネセンスを強化することは、当業者に既知である。強化は、一工程以上の出力に作用することによって生じさせることができ、例えば、発光体の蛍光量子収率の増加によって、又は励起状態で生じた生成分子の割合の増加によって、あるいは競合する副反応の抑圧による化学ルミネセンス反応生成分子部分の増大によって、若しくは、酵素触媒の作用促進によって生じさせることができる。化学ルミネセンス反応についての、高分子及び非重合体の界面活性剤の影響に関しては、明快な、又は不変の型式は存在しない。いずれにしても、どの界面活性化合物が特異な工程からの化学ルミネセンスを強化できるかを予測することは不可能であり、十分な実験によってのみ、決定することができる。

10

【0011】

カチオン性の高分子界面活性剤ポリ-N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミドは、負の電荷のインシュリン-ペルオキシダーゼ抱合体によってルミノールの化学ルミネセンス反応を阻害し、天然の酵素を用いた場合はより小さくなるまで化学ルミネセンスを減少させる。(S. B. Vlasenko, ら、J. Biolumin. Chemilum. , 4巻、164~176頁(1989年))。

【0012】

特開平06-242111号公報及び刊行物(R. Iwata, ら、Anal. Biochem. , 231巻、170~4頁(1995年))には、バックグラウンドの投射を低下させ、又は、信号/ノイズを強化する、ルミノールの化学ルミネセンス性過酸化における非イオン界面活性剤とスキムミルクの使用が開示されている。

20

【0013】

前記文献には、ペルオキシダーゼ又は界面活性剤による化学ルミネセンス強化による本発明化合物の化学ルミネセンス性酸化の開示はない。

【0014】

e、HRP使用の分析(アッセイ)。 酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼは、基質としてルミノール又はイソルミノールを用いる化学ルミネセンス検出による酵素イムノアッセイ及びDNAハイブリッド形成アッセイに、広い用途が見出されている。HRP抱合体と、強化ルミノール化学ルミネセンス検出を用いる市販キットが利用可能である。化学ルミネセンス性ペルオキシダーゼアッセイも又、前記米国特許第5,491,072号明細書、第5,523,212号明細書及び第5,593,845号明細書に開示されている。基質として、本発明化合物を用いる化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼアッセイを開示している文献はない。

30

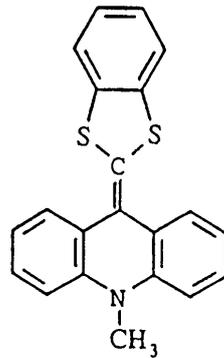
【0015】

f、新規な化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼ基質。 新規な種類の化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼ基質が、出願人によって、先行の米国特許第5,922,558号明細書及び公開されたPCT出願第WO99/14220号公報で開示されている。これら出願の開示内容は、全て本明細書に含まれている。これら刊行物の開示は、本発明の化合物の類に属する、ヘテロ環化合物の種類を記載するものであるが、本発明の化合物は、ペル

40

【0016】

g、ベンゾジチアフルバレン。 下記の構造、



10

を有するベンゾジチアフルバレンの合成が開示されている (K. Akiba, K. Ishikawa, N. Inamoto, Synthesis, 12 巻、861~2 頁 (1977 年))。化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼ基質として機能する、その能力に関しては、なんらの情報もない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

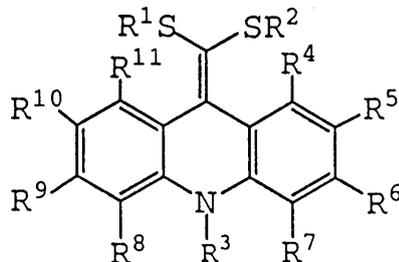
本発明の目的は、ペルオキシダーゼ及び過酸化剤と反応して化学ルミネセンスを供給する化合物を含有し、ペルオキシダーゼ検出のための優れた組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0018】

本発明の特に重要な目的は、優れた化合物と、これを含有する組成物とを提供することであり、ここで、この優れた化合物とは、下記式、



30

で表され、炭素 - 炭素二重結合を含有していて、該二重結合の一端は、いずれも別の基 R^1 又は R^2 と結合している 2 個のイオウ原子で置換されており、該二重結合の他の一端には窒素原子を含有する多環式ヘテロ環系の一部を形成したもので置換されている。

【0019】

本発明の化合物を含有する組成物は、好ましくは、本発明の化合物とペルオキシダーゼとの反応において生成する化学ルミネセンスを促進し、本発明の分析的利用を高めるための、強化剤 (エンハンサー) 化合物を含有する。

【0020】

本発明の、更なる目的は、本発明の化合物及び組成物を使用してペルオキシダーゼと過酸化剤との反応において化学ルミネセンスを迅速に発生させる方法を提供することである。

40

【0021】

本発明の更に他の目的は、イムノアッセイ、核酸プローブアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、サザンブロットアッセイ及び分析試料の検出のための酵素標識を用いる、一般的に既知の方法による他のアッセイにおけるペルオキシダーゼ及び抱合体の検出に用いるための化学ルミネセンス性組成物及び方法を提供することである。従って、該アッセイは、ペルオキシダーゼ又は抱合体を検出し、かつそれによって発生した化学ルミネセンスを分析試料の有無又は量と関連付けることによるかかるアッセイにおいて有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 2 2 】

定義：

アルキル - 1 ~ 20 個の炭素原子を含有する、分枝、直鎖又は環状の炭化水素基。ここで、低級アルキルとは、約 8 個以下の炭素原子を含有するアルキル基に関して用いる。

【 0 0 2 3 】

アルキレン - 2 価のアルキル鎖の基。

【 0 0 2 4 】

アルケニル - 少なくとも 1 個の C - C 二重結合を含有し、2 ~ 20 個の炭素原子を含有する、分枝、直鎖又は環状の炭化水素基。ここで、低級アルケニルとは、約 8 個以下の炭素原子を含有するアルケニル基に関して用いる。

10

【 0 0 2 5 】

アルキニル - 少なくとも 1 個の C - C 三重結合を含有し、2 ~ 20 個の炭素原子を含有する、分枝又は直鎖の炭素水素基。ここで、低級アルキニルとは、約 8 個以下の炭素原子を含有するアルキニル基に関して用いる。

【 0 0 2 6 】

分析試料 - その存在の有無又は量を、アッセイにより、標本について測定をすべき物質。分析試料には、特異的結合親和性を有する特異的結合パートナーが存在する、有機及び生体分子が含まれる。分析試料を例示すれば、これらの例に制限されるものではないが、一本鎖又は二本鎖の DNA、RNA、DNA - RNA 錯体、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体フラグメント、抗体 - DNA キメラ、抗原、ハプテン、たんぱく質、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンがある。その他の分析試料の例として、オキシダーゼ酵素及びペルオキシダーゼ酵素もある。

20

【 0 0 2 7 】

アリール - 1 ~ 5 個の炭素環式芳香環を含有する芳香環含有の基であり、1 個以上の H 以外の置換基で置換することができる。

【 0 0 2 8 】

ハロゲン - フッ素、塩素、臭素又はヨウ素原子。

【 0 0 2 9 】

ヘテロアルキル - 少なくとも 1 個の非末端炭素原子を、窒素、酸素又はイオウ原子によって置換している一価のアルキル鎖の基。

30

【 0 0 3 0 】

ヘテロアルキレン - 少なくとも 1 個の非末端炭素原子を、窒素、酸素又はイオウ原子によって置換している二価のアルキレン鎖の基。

【 0 0 3 1 】

ルミネセンス性 - 電子の励起状態に励起された場合の、光放射の可能性。光は、一重項励起状態からの崩落の場合、蛍光として放射され得るか、または三重項励起状態からの崩落の場合、燐光として放射され得るかのいずれかである。

【 0 0 3 2 】

過氧化物 - O - O 結合を含有する化合物で、好ましくは過酸化水素、又は過酸化水素の錯体、例えば、尿素過氧化物、過硼酸塩又は過炭酸塩。

40

【 0 0 3 3 】

標本 - アッセイしようとする 1 種以上の分析試料を含有するか、又は含有すると想定される流体。化学ルミネセンス反応の方法によって分析される代表的な標本は、体液、例えば血液、血漿、血清、尿、精液、唾液、セルリゼート、組織抽出物などの生物学的標本である。他の種類の標本には、食品の標本及び環境的標本で、例えば、汚物又は水がある。

【 0 0 3 4 】

特異的結合対 - 相互の結合親和性を示す 2 種の物質。その例には、抗原 - 抗体、ハプテン - 抗体又は抗体 - 抗体対、相補的オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、アビジン - ビオチン、ストレプトアビジン - ビオチン、ホルモン - レセプター、レクチン - 炭水化物、IgG - たんぱく質 A、核酸 - 核酸結合たんぱく質及び核酸 - 抗核酸抗体がある。

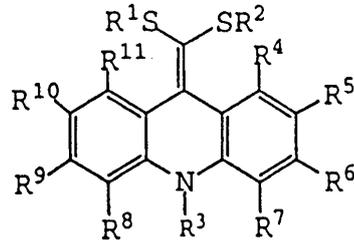
50

【 0 0 3 5 】

置換 - ある基について少なくとも 1 個の水素原子の、非水素原子の基による置き換えを意味する。置換基に関しては、別に明示されているのであれば、多くの置換点が存在し得る意味であることに留意すべきである。

【 0 0 3 6 】

後述の化学式 I で表される化合物が過氧化物及びペルオキシダーゼと反応して予想外に優れた性能を有する化学ルミネセンスを発生することが見出された。本発明のケテンジチオアセタール化合物は、化学式 I、



I

(式中、 R^1 と R^2 とはいずれも基中の原子の原子価を満たすに必要なH原子の所要数に加えて、1～約50個の非水素原子を含有する有機の基であり、また、 R^1 と R^2 とは相互に結合して環を形成し得るものである)で表される。基 R^1 及び R^2 は、C、N、O、S、P、Si及びハロゲン原子から選択される1～約50個の非水素原子を、より好ましくは1～20個の同様な原子を含有することができる。 R^1 及び R^2 として好ましい基は、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル及び置換されたアリールアルキル基である。より好ましいのはアルキル、置換されたアルキル、アリール、及び置換されたアリール基である。H原子以外の置換基、例えばイオン性の基又は極性基を、化合物の性能を改良するため、又は合成に便宜を供するために、炭素鎖又は環上に多数、かつ選ばれた位置に含有させることができる。かかる性能とは、例えば、化学ルミネセンス量子収率、酵素との反応速度、発光の最大強度、発光の持続時間、発光の波長、反応媒体への溶解度である。水溶性を与える好ましい基は、スルホネート塩の基 $-SO_3^-$ 、サルフェート塩の基 $-OSO_3^-$ 、ホスホネート塩の基 $-PO_3^-$ 、ホスフェート塩の基 $-OPO_3^{2-}$ 、カルボン酸塩の基 $-COO^-$ 及びアンモニウム塩の基 $-NR_3^+$ 並びにホスホニウム塩の基 $-PR_3^+$ である。特異的結合パートナーのような、他の分子に共有カップリングさせる1個以上の基もまた、 R^1 及び R^2 上の置換基として含ませることができる。特異的置換基として例を挙げれば、これらに制限されるものではないが、アルコキシ、アリールオキシ、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ、置換されたアミノ、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキシアミド、シアノ及びスルホネート基である。

【 0 0 3 7 】

R^1 と R^2 とが相互に結合して環を形成する場合は、環は好ましくは5～30個の原子であり、アルキレン鎖、ヘテロアルキレン鎖及び二重結合を含む不飽和鎖から選択される、追加の炭素及び/又は酸素原子を含有する。鎖中の炭素原子は、基 R^1 と R^2 とに関連して上記の如く、非水素原子で置換することもできる。好ましい環の大きさは、5～7原子である。

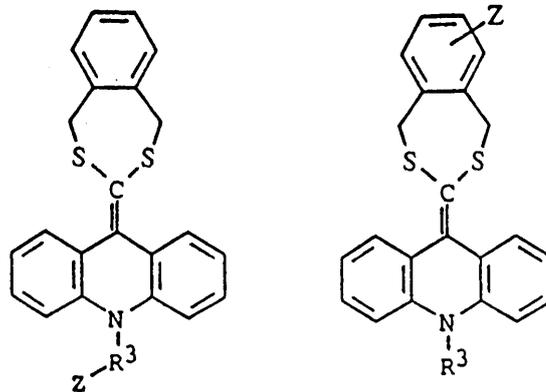
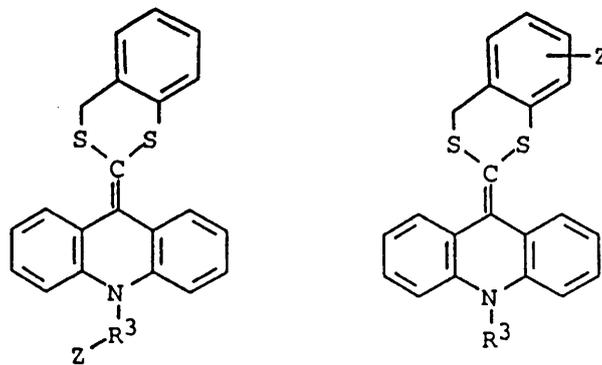
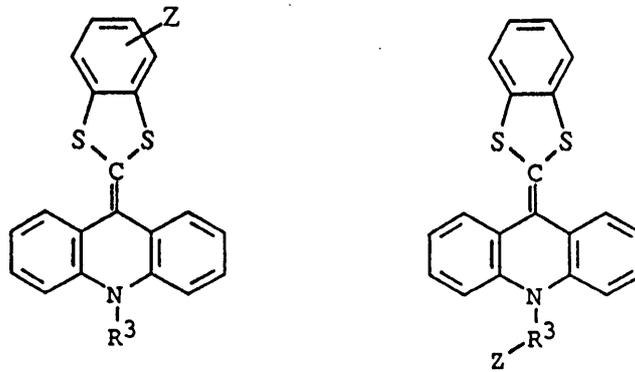
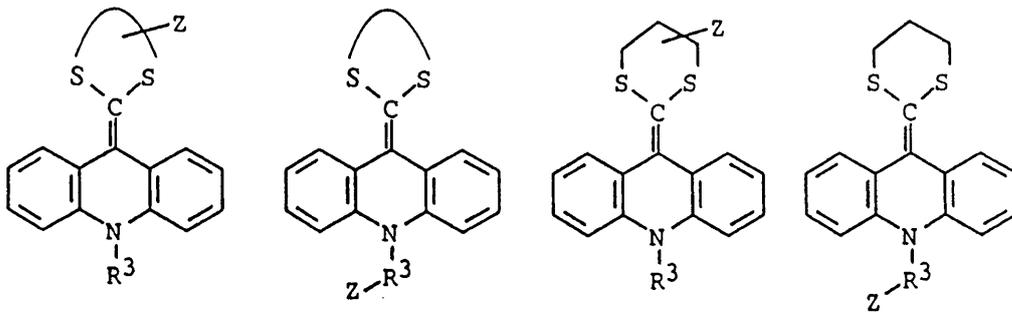
【 0 0 3 8 】

10

20

30

40



【0039】

好適実施形態においては、 R^1 及び R^2 は結合して、上述の如き少くとも1種の水溶性付与基Zで環上に置換している六員環を完成する。別の実施形態として、基Zを基 R^3 に結合する。結合している R^1 と R^2 とによって形成される環もまた、ベンゾ縮合環の如き第二の環に縮合した5~7員環であり得る。同様に少なくとも1個の水溶性付与の基Zは、縮合環の一つに、又は基 R^3 上に置換してもよい。例示構造式を上記に示した。

【0040】

本発明の化合物において、基 R^3 は、基中の原子の原子価を満たすに必要なH原子の所要数に加えて、C、N、O、S、P、Si及びハロゲン原子から選択される1~50個の

10

20

30

40

50

非水素原子を含有する有機の基である。より好ましくは、 R^3 は、1～20個の非水素原子を含有する。その有機の基は、好ましくは、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル及び置換されたアリールアルキル基から成る群から選択される。 R^3 としてより好ましい基は、置換又は無置換の $C_1 \sim C_4$ アルキル基、置換又は無置換のフェニル又はナフチル基、及び置換又は無置換のベンジル基である。置換される場合には、例示の置換基には、下記のものに限定するものではないが、アルコキシ、アリールオキシ、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ、置換されたアミノ、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキサミド、シアノ、スルホネート及びホスフェート基がある。好ましい R^3 基は、少なくとも1個の水溶性付与基で置換されたアルキル基又はヘテロアルキル基である。

10

【0041】

化合物の性能を改良するため、又は、最終化合物の合成に便宜を供することを目的として、多量に、かつ、ヘテロ環における選ばれた環又は連鎖の位置に、置換基を含有させることができる。かかる性能とは、下記のものに限定するものではないが、化学ルミネセンス量子収率、酵素との反応速度、最大の光強度、発光の持続性、発光の波長及び反応媒体における溶解性である。基 $R^4 \sim R^{11}$ は、同一でも異なってもよく、いずれもC、H、N、O、S、P、Si及びハロゲン原子から選択される1～50個の原子を含有することのできる置換基であり、発光することのできるものであり、下記の基に限定されるものではないが、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリールオキシ基、ハロゲン原子、アミノ、置換されたアミノ基、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキサミド、シアノ、スルホネート及びホスフェート基であり得る。好ましくは $R^4 \sim R^{11}$ は、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、アミノ、又は1個或いは2個のアルキル又はアリール基で置換されたアミノ基から選択される基である。化合物の好ましい基は、 R^5 、 R^6 、 R^9 又は R^{10} の1個が塩素原子であり、 $R^4 \sim R^{11}$ のうちの他のものが水素原子であるものである。

20

【0042】

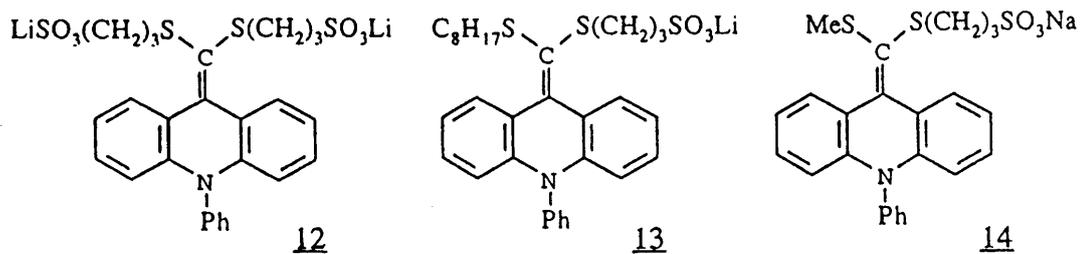
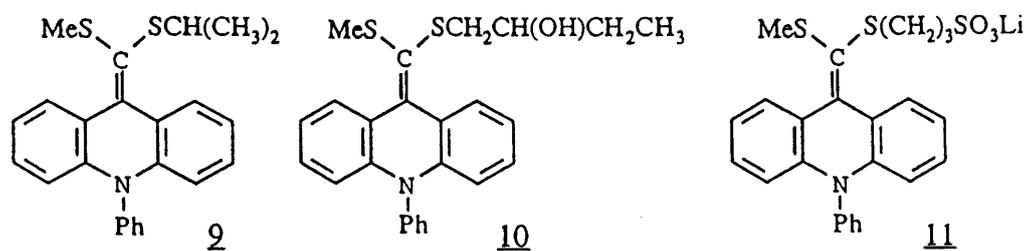
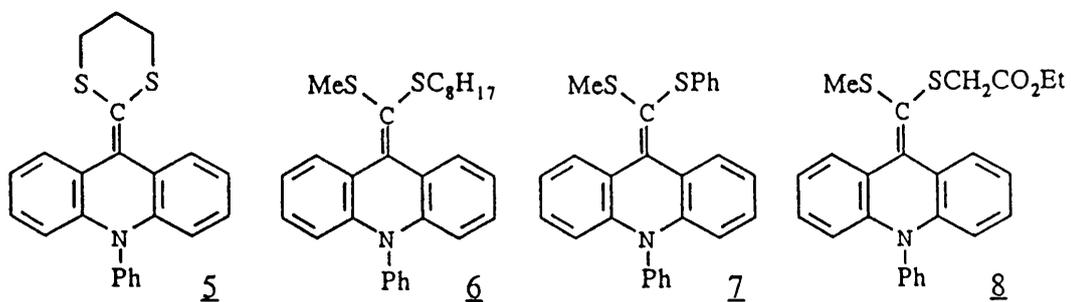
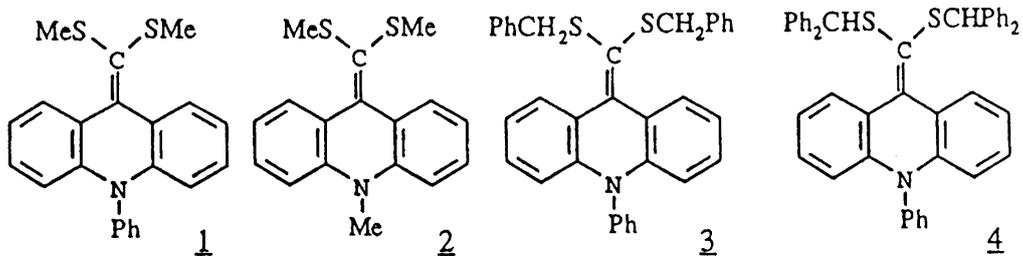
隣接する基の対、即ち R^4 と R^5 、又は R^5 と R^6 、又は R^6 と R^7 、又は R^8 と R^9 、又は R^9 と R^{10} 、又は R^{10} と R^{11} は、環外二重結合を有する環に縮合している少なくとも1個の5又は6員環を含む炭素環又はヘテロ環系として相互に結合し得る。更に他の縮合環が存在する場合、得られる化合物がベンゾアクリダン誘導体となる、縮合ベンゼン環の追加であることが好ましい。

30

【0043】

本発明の範囲内にある特有の化合物には、下記のものがあるが、これに限定されるものではない。

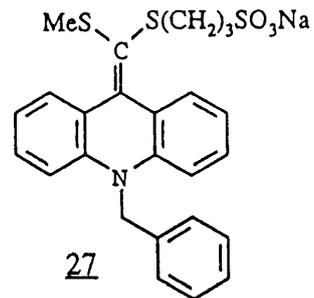
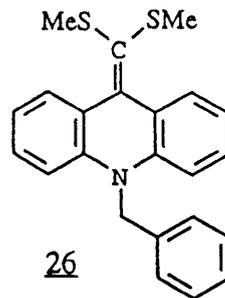
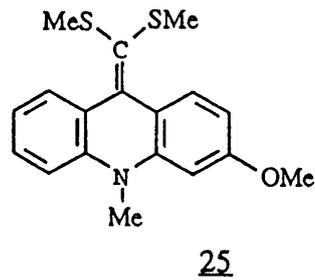
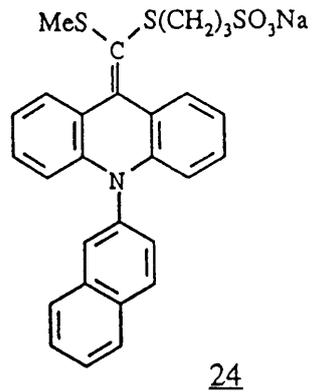
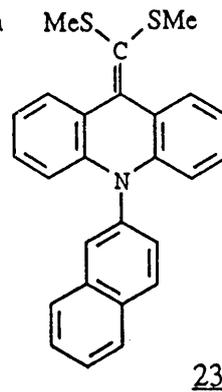
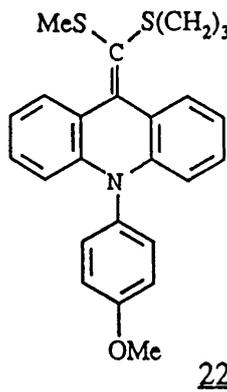
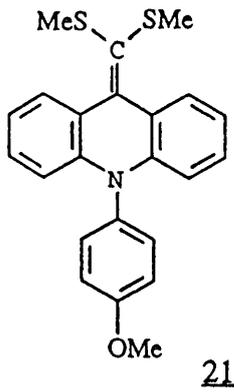
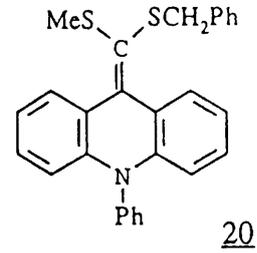
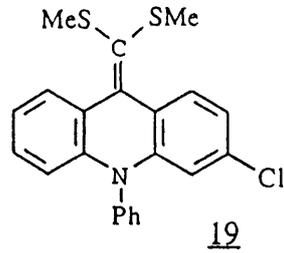
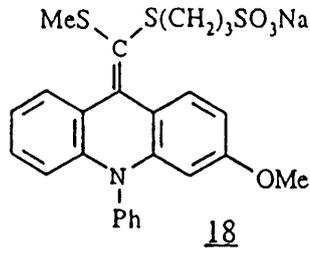
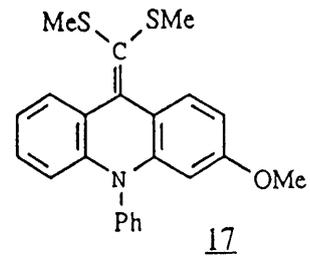
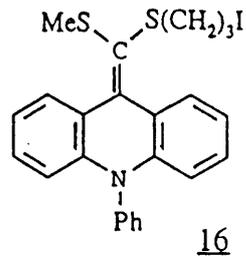
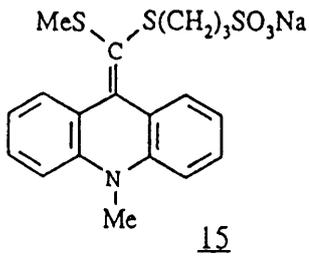
【0044】



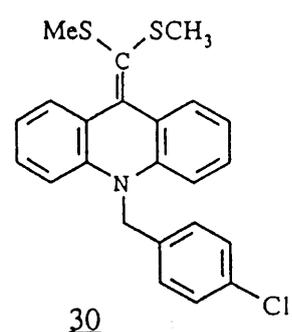
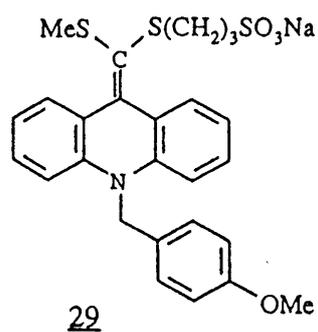
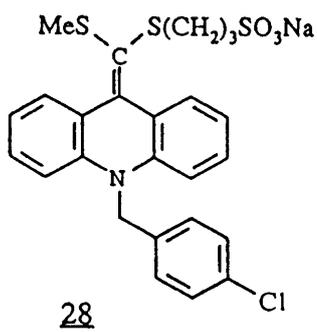
10

20

30



ルミゲン PS-atto

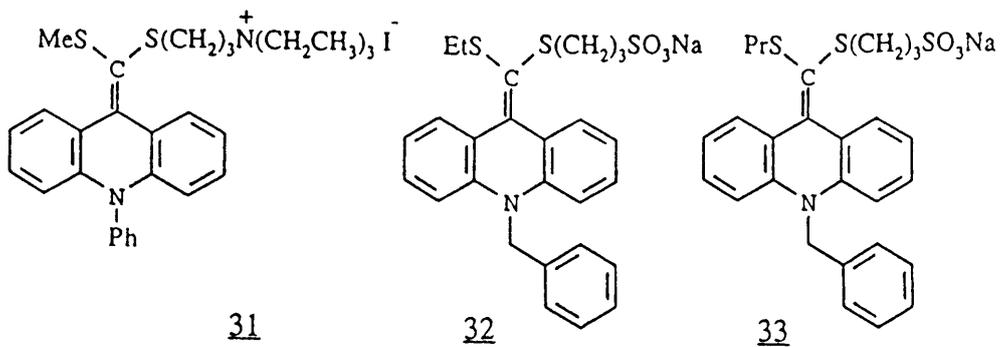


10

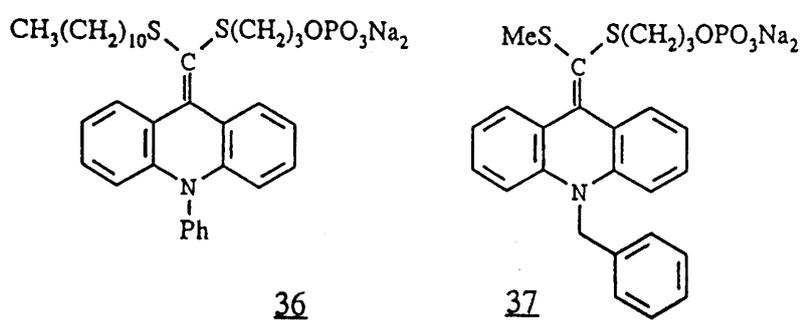
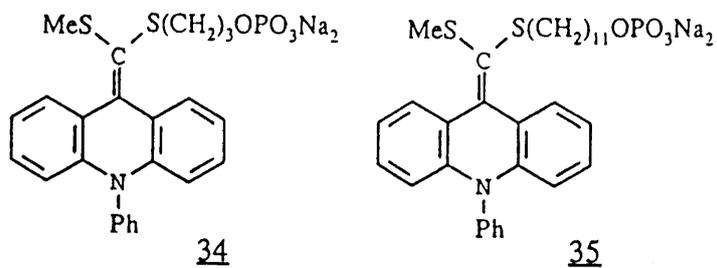
20

30

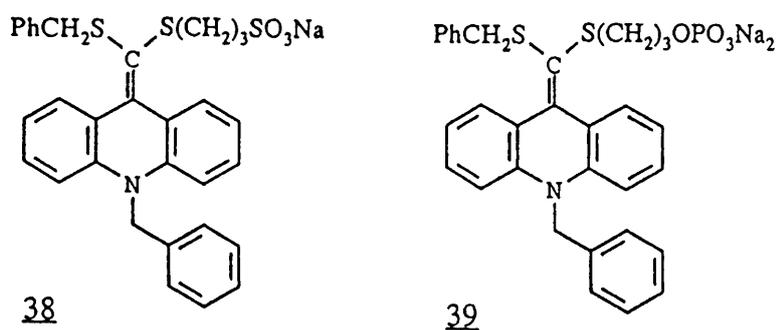
40



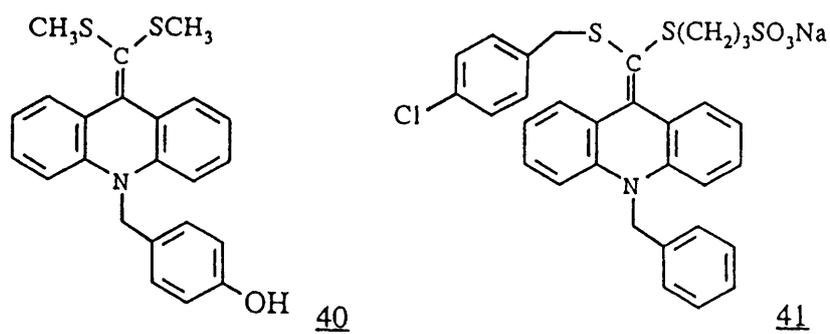
10



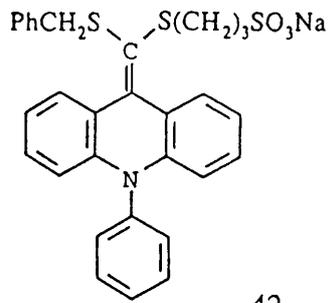
20



30

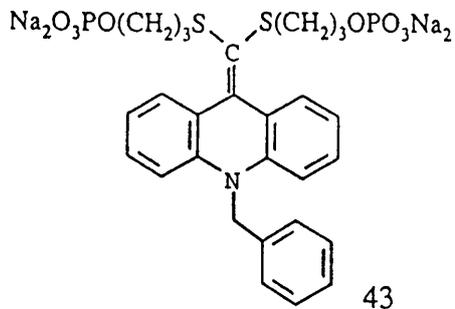


40

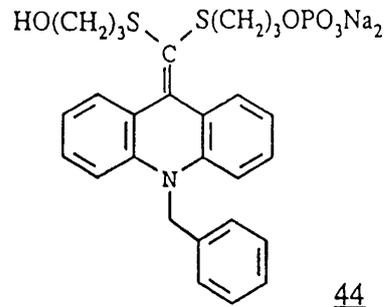


42

10

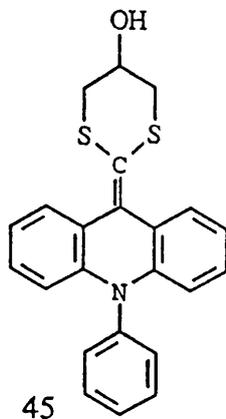


43

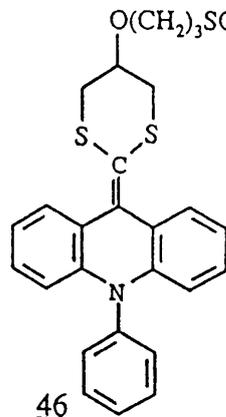


44

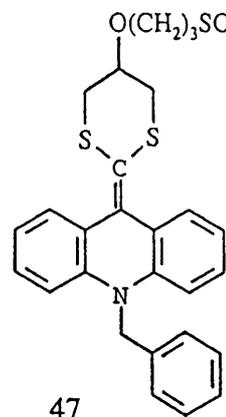
20



45



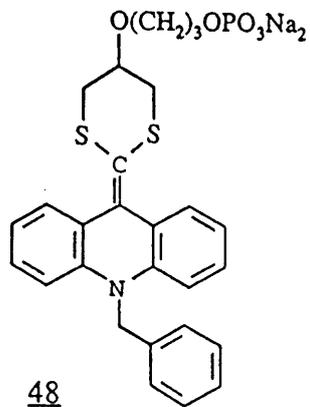
46



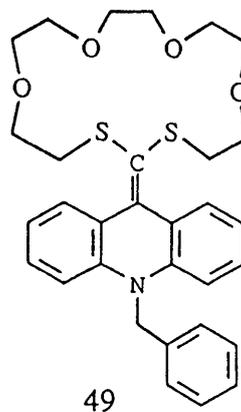
47

30

ルミゲン TMA-6

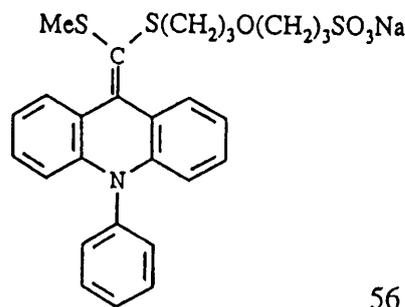
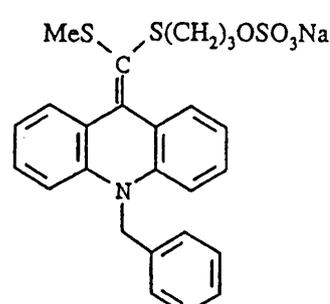
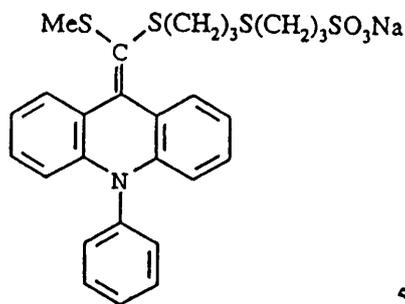
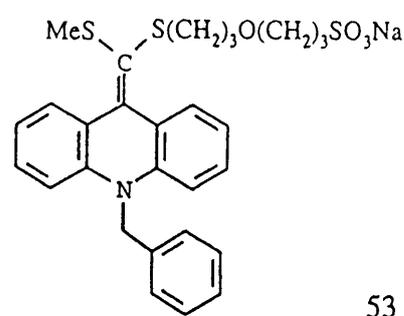
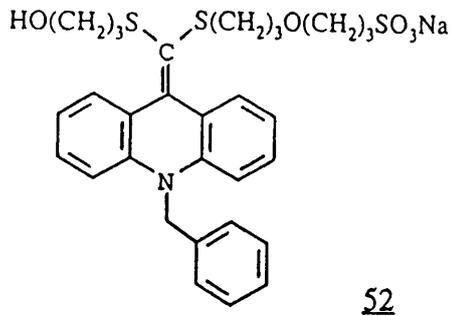
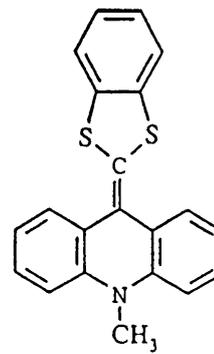
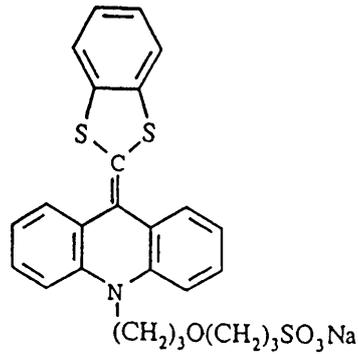


48



49

40



【 0 0 4 5 】

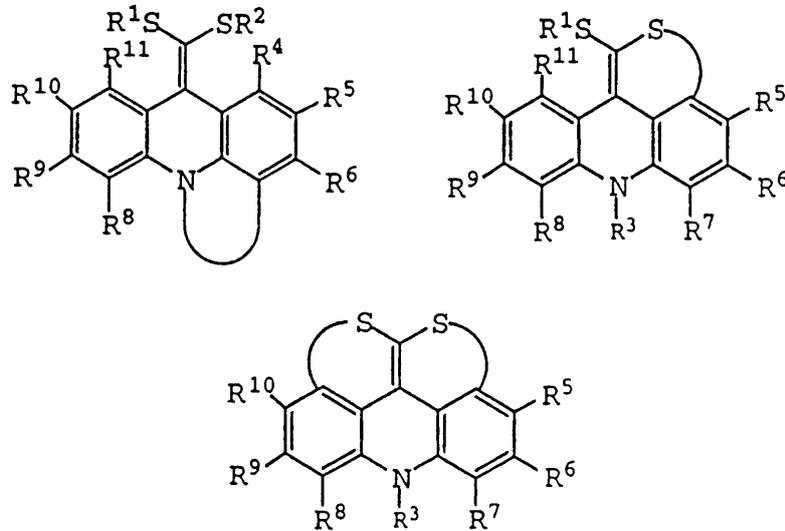
基 $R^1 \sim R^3$ の好ましい組み合わせには、 R^1 と R^2 のうちの 1 個又は両方が、スルホネート塩の基又はホスフェート塩の基で置換されたアルキル基を含み、 R^3 がフェニル、置換されたフェニル、ベンジル又は置換されたベンジル基である化合物がある。スルホネート又はホスフェート置換のアルキル基が唯一の場合には、その他の R^1 又は R^2 は、アルキル又はベンジル基が好適である。

【 0 0 4 6 】

また、本発明化合物種類の範囲内と考えられるものとして、 R^1 又は R^2 、若しくは両方が、アクリダン環の最も近い位置、即ち、 R^4 又は R^{11} と結合して閉環し、環を追加する実施形態もある。

【 0 0 4 7 】

更に実施形態の追加として、窒素原子がアクリダン環の最も近い位置、 R^7 又は R^8 のいずれかに結合して、追加となる5～7員環を閉環し、 R^1 と R^2 とが相互に無関係に、1～20個の炭素原子を有するアルキル、置換されたアルキル、アリアル、置換されたアリアル、アリアルアルキル及び置換されたアリアルアルキル基から選択され、相互に結合して5～30個の原子を有する環を形成するか、又は、 R^1 あるいは R^2 、若しくは両方が、アクリダン環の最も近い位置に結合して追加となる環を閉環する。構造の例示は下記である。



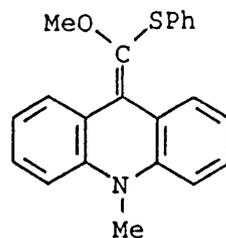
10

20

【0048】

上記に示したものを含め、化学式Iで表されるケテンジチオアセタール化合物の、過酸化水素及びペルオキシダーゼとの反応は迅速に極めて高い強度に到達する化学ルミネセンスを発生する。最大発光には、1分以下で到達し、数分間一定に保持される。他の既知の化学ルミネセンス・ペルオキシダーゼ基質で、これほど迅速に高強度の化学ルミネセンスを発生するものはない。構造的に相関のある化合物の、化学ルミネセンス時間の概要に関する、予想外で著しい差の有る動力学的挙動については、前出の米国特許第5,922,558号明細書に開示されている。例えば、下記式、

30



で表される化合物は、HRPと反応して、7分で最大ルミネセンス強度に達することが記載されている。本発明の化合物は、極めて迅速に安定な最大強度に到達し得る能力があるので、今日要請されている迅速な高処理量アッセイには、他の化合物よりも、より好適なものである。

40

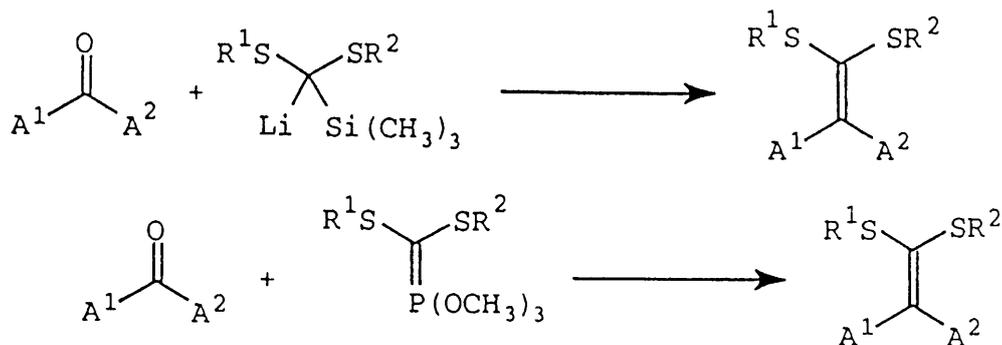
【0049】

本発明の化合物は、少なくとも5～10.5のpH範囲に亘って予想外に高い安定性を示し、酸性とアルカリ性両方のpH値でのその処方及び使用を可能とする。化学式Iで表される化合物の水性緩衝溶液は、室温で長期の貯蔵安定性を示し、4で無期限に安定である。水溶性の基を有する化学式Iで表される化合物の溶液を、実用的な濃度で調製することができ、補助溶剤を必要としない。強化剤配合組成物を調製することにより、ホースラディッシュペルオキシダーゼの最適活性化pHである、pH5～6で鋭敏な検出を可能にする。

【0050】

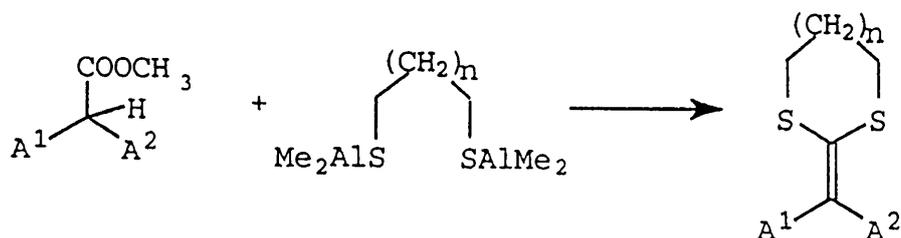
50

化学式 I の化合物を調製する方法は、下記 2 種のスキーム、



10

に従って、好適なカルボニル化合物に、リチオシラン (Lithiosilane) 化合物又はホスホラスイリドを求核付加することを含む (F. A. Carey, A. S. Court, J. Org. Chem., 37 巻、1926~29 頁、(1972 年))。別の方法として、E. J. Corey 及び A. P. Kozikowski, Tetrahedron Lett., 925~8 頁 (1975 年) に開示されているように、ビス (ジアルキルアルミニウム) - ジチオール試薬との反応によって、エステルをケテンジチオアセタールに転化する方法で、下記に示す通りである。



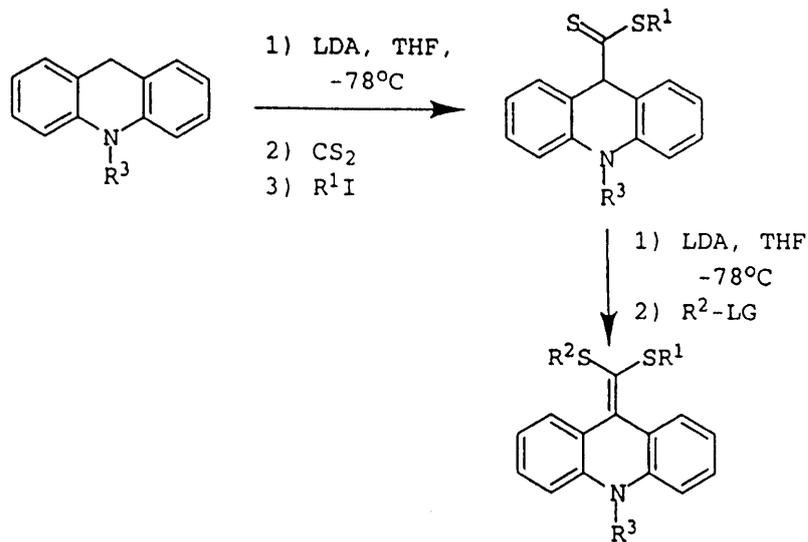
20

更に別の方法では、活性メチレン基のアニオンを CS_2 と反応させ、ジチオカルボキシレート、 R^1 基を含む試薬 $\text{R}^1\text{-LG}$ と反応させて、ジチオエステルを形成する。後者の方法論の例は、I. Shahak 及び Y. Sasson, Tetrahedron Lett., 4207~10 頁 (1973 年) に開示されている。ジチオエステルをエノラートに転化し、化学式 $\text{R}^2\text{-LG}$ 試薬と反応させる。代表的な脱離基には、ハロゲン原子、例えば塩素化物、臭素化物及びヨウ素化物、スルホネート、例えば、メタレンスルホネート及び p-トルエンスルホネート並びにトリフルオロメタンスルホネート、カルボキシレート、例えば、アセテート及びベンゾエート、特に、X がアシル基の場合には、X-LG は酸無水物、メトサルフェートのようなサルフェート及び他の基、例えばイミダゾール、トリアゾール、及びテトラゾール、マレイミド、スクシンイミドキシ基がある。

30

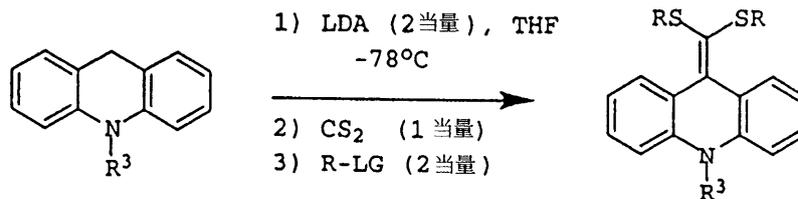
【0051】

方法A



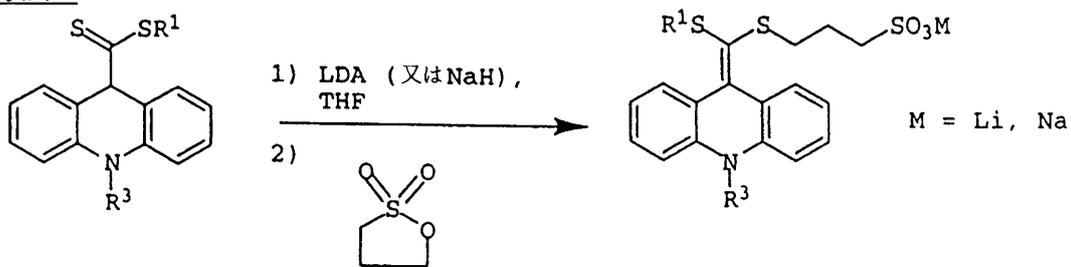
10

方法B



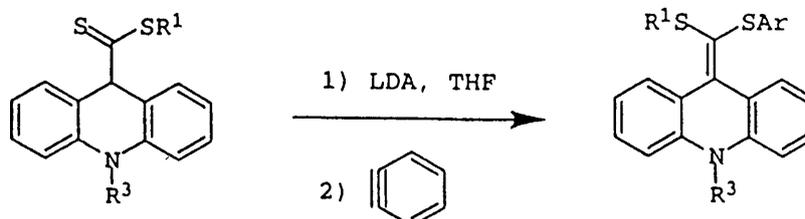
20

方法C



30

方法D



上記、方法Dは、反応性アリール化剤の一種としてのベンザイン中間体の生成を伴う。ベンザイン中間体は、例えば、臭素化ベンゼン化合物の、強塩基、例えば、*sec*-ブチルリチウム又はLDAによる処理によって、現場生成し得る (M. Watanabe, *ら*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37巻(1), 36~41頁、(1989年))

40

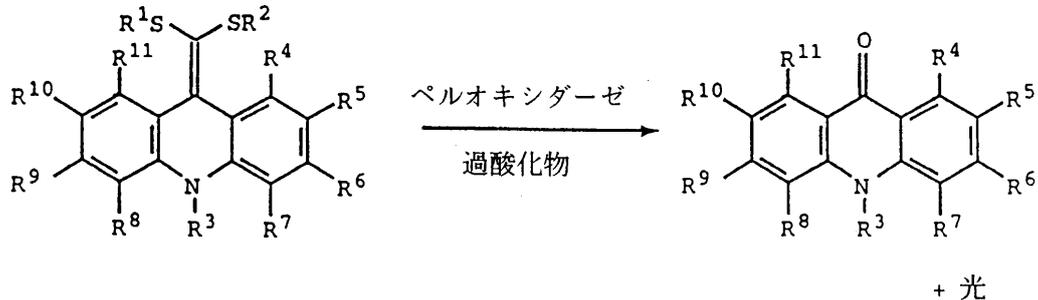
【0052】

その他の合成法としては、アクリドン化合物とベンゾジチオールから誘導されるホスホラスイリドの反応から成るものがある。手順と条件は、一般的には前述のAkibaらの文献並びにK. Ishikawa, K. Akiba及びN. Inamoto, *Tetrahedron Lett.*, 41巻、3695~3698頁(1976年)に記載されている。

50

【 0 0 5 3 】

本発明の化合物及び組成物は、ペルオキシダーゼとの反応による化学ルミネセンス発生方法において有用である。緩衝水溶液での、本発明化合物のペルオキシダーゼ及び過酸化物との反応は、検出可能な可視的ルミネセンスを容易に発生する。光強度は、室温で迅速に、代表的には約1分以内に最大水準に到達する。反応は、随意には強化剤の存在下で行われる。



10

【 0 0 5 4 】

化学ルミネセンスの好適発生方法において、化合物Iは、約8~10の間のpHのアルカリ性緩衝液で、ペルオキシダーゼ、過酸化物及び強化剤と反応して連続的な化学ルミネセンス信号を発生するが、それは酵素と化合物Iとの反応で開始される。分析感度は、非イオン性界面活性剤の含有によって強化し得るが、下記に更に詳述する。

20

【 0 0 5 5 】

化合物Iとペルオキシダーゼとの反応から発光する好適方法においては、反応は5と50との間、好ましくは20と40との間の温度で、約5と10.5との間のpH、好ましくは7と10との間のpHの緩衝水溶液において行われる。化合物Iを、1μMと20mMとの間の、好ましくは10μMと5mMとの間の濃度で使用する。酵素は遊離のペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ抱合体であり得る。

【 0 0 5 6 】

本発明の化合物は、一般に放射線の100~200nmの広域帯に亘って発光し、電磁スペクトルの可視領域への近紫外の波長で最大強度を示す。最大強度maxの典型的な波長は350~500nmの範囲内である。共有結合した発光団を有する式Iの化合物は、発光団の励起状態から、より長い波長での照射を生じる分子内エネルギー転移を行うことができるものと予想される。

30

【 0 0 5 7 】

化学式Iの、2個以上の化合物を、ペルオキシダーゼの作用による発光法に同時に使用することができる。ある場合には、2個以上の化学式Iの化合物をペルオキシダーゼと同時に反応させる方が有利である。2個以上の化合物が、異なるルミネセンス性能又は物理的性能を有する場合は、いずれか1個の化合物の使用によって容易には得られない特徴を持った発光反応を得るのに、2個の化合物の組み合わせが望ましいことがあり得る。化合物Iの間で変わり得るルミネセンス性能及び物理的性能の実例としては、照射スペクトル、発光の持続性、酵素の種類別、最高照射までの上昇速度、疎水性/親水性バランス及び溶解度がある。

40

【 0 0 5 8 】

過酸化物の成分は、ペルオキシダーゼと反応し得る任意の過酸化物又はアルキルヒドロペルオキシドである。好適な過酸化物としては、過酸化水素、尿素過酸化物及び過硼酸塩がある。

【 0 0 5 9 】

化学ルミネセンス反応を行うことができるペルオキシダーゼには、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、例えばバナジウム・プロモペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、カビペルオキシダーゼ、例えば、リグニンペルオキシダーゼ並びにアルトロマイセス・ラモサス

50

からのペルオキシダーゼ及び白腐れ病に生じるMn依存ペルオキシダーゼ及び大豆ペルオキシダーゼがある。ルミノールの化学ルミネセンス性酸化の接触作用をすることで知られる鉄錯体やMn-TPPS₄を含む、酵素ではないがペルオキシダーゼ様活性を有する、他のペルオキシダーゼ模擬化合物は、(Y. - X. Ci, ら, Mikrochem. J., 52巻, 257~62頁(1995年))ここで用いられるペルオキシダーゼの意味合の範囲内にあることは、明白である。

【0060】

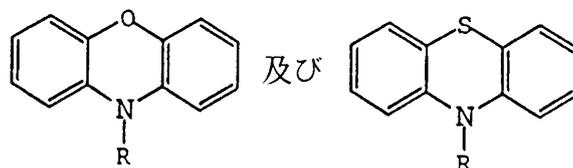
ペルオキシダーゼと生体分子との抱合体又は錯体もまた、抱合体ペルオキシダーゼ活性を示す場合に限り、化学ルミネセンス生成方法に使用することができる。ペルオキシダーゼの1個又はそれ以上の分子に抱合され得る生体分子には、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体フラグメント、抗体-DNAキメラ、抗原、ハプテン、たんぱく質、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンがある。ペルオキシダーゼを包含し、又は合体させる錯体、例えば、リポソーム、ミセル、小胞及び生体分子へ結合する機能を有するポリマーもまた、本発明の方法に用いることができる。

【0061】

反応混合物に、ある種の強化化合物を含有させることによって、酵素の反応性を促進する。これらの強化剤の内に含まれるものとしては、他のペルオキシダーゼ反応を強化することが知られているフェノール性化合物及び芳香族アミンであって、Thorpe及びKrickaにより、並びに、Ii, らによる前出の文献、及び米国特許第5,171,668号明細書並びに第5,206,149号明細書に記載されており、これらは参考のために本明細書に取り入れられているものである。米国特許第5,512,451号明細書に開示され、参考のために本明細書に取り入れられている置換又は無置換のアリールポロン酸化合物及びそのエステル並びに無水物誘導体もまた、本発明に有用な強化剤の範囲内にあると考えられる。好適な強化剤を挙げると、これらに限定されるものではないが、p-フェニルフェノール、p-ヨードフェノール、p-ブロモフェノール、p-ヒドロキシ桂皮酸、p-イミダゾリルフェノール、アセトンアミノフェン、2,4-ジクロロフェノール、2-ナフトール及び6-ブロモ-2-ナフトールがある。上掲の類別のものから、2種以上の強化剤の混合物もまた、使用することができる。

【0062】

本発明の化合物からの化学ルミネセンスの生成を強化するのに有効なことが見出されたその他の強化剤は、下記式、



で表されるフェノキサジン及びフェノチアジンである。但し、式中、フェノキサジン及びフェノチアジン強化剤の窒素原子に置換されるR基としては、1~8個の炭素原子を有するアルキル基、及び、スルホネート塩又はカルボキシレート塩の基で置換された1~8個の炭素原子を有するアルキル基がある。好適な強化剤としては、3-(N-フェノチアジニル)プロパンスルホン酸塩、3-(N-フェノキサジニル)プロパンスルホン酸塩、4-(N-フェノキサジニル)ブタンスルホン酸塩、5-(N-フェノキサジニル)ペンタン酸塩及びN-メチルフェノキサジン並びに関連同族体がある。

【0063】

本発明の化学ルミネセンス試薬における添加剤の非イオン界面活性剤は、可溶化目的に有用である。ペルオキシダーゼの使用による化学ルミネセンス生成のための反応に、非イオン界面活性剤を含有させることにより、ペルオキシダーゼに関する分析感度の向上を図ることができる。本発明の実施上有用な非イオン界面活性剤として例示をすれば、ポリオキシエチレン化アルキルフェノール、ポリオキシエチレン化アルコール、ポリオキシエチレン化エーテル及びポリオキシエチレン化ソルビトールエステルがある。

【0064】

C T A Bのような第4級アンモニウム塩化合物を包含する陽イオン界面活性剤は、本発明のある種の化合物をペルオキシダーゼ及び過酸化水素と反応させる場合、照射する化学ルミネセンスの水準を高めるのに用いて有利である。例えば、C T A Bが反応混合物に含有される場合には、本発明による後述の化合物11の反応によって得られる光強度を20倍以上増加される。

【0065】

本発明の反応を、ペルオキシダーゼで被覆した固形支持体、例えば、ビーズ、管、膜又はマイクロウェルプレート(microwell plate)の表面と接触できる水性緩衝液などの溶液中で実施する。好適緩衝液は、pHを約5～約10.5の範囲内に維持可能な通常用いられる任意の緩衝液で、例えば、ホスフェート、ボレート、アセテート、カルボネート、トリス(ヒドロキシメチルアミノ)メタン、グリシン、トリシン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、ジエタノールアミンなどである。これに関する本発明の好適実施方法は、特に使用しようとする目的での必要性によって決定される。

【0066】

本発明方法による照射光は、任意の好適な既知の方法、例えば、ルミノメーター、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラ、シンチレーション計数管、化学光量計又は視覚的な方法によって検出することができる。各検出方法は異なるスペクトル感度を有する。人間の眼は緑色の光に最適の感度を有し、CCDカメラは赤色光に最大感度を示し、X線フィルムは、紫外線から青色光又は緑色光への感応が最大であることを利用可能である。検出装置の選択は、適用分野及びコスト、便利さ及び永久記録の作成が必要かどうかの考慮によって支配される。

【0067】

本発明の化学ルミネセンス法の重要な用途は、化学ルミネセンス反応による検定手順における分析試料での存在の有無又は量の検出である。この方法は、分析試料を含有すると思われる標本を、本発明の化学ルミネセンス化合物と接触させ、定性法では発生した光を検出し、また、定量を必要とする場合には、分析試料の量に対して発生した光の量を関係付ける工程を包含する。光強度と分析試料の量との関係は既知量の分析資料によって描いた検量線の構成により、容易に認識できる。一般的に、化合物Iを、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-2}M$ 、好ましくは、約 $10^{-4}M$ ～約 $10^{-3}M$ の濃度で使用する。溶液中で検出する場合は、ペルオキシダーゼは、約 $10^{-9}M$ 以下が好適である。化学ルミネセンス反応法によって分析する代表的な標本は、体液、例えば、血液、血漿、血清、尿、精液、唾液、CSFなどである。

【0068】

本発明の方法によって検定することのできる分析試料には、ペルオキシダーゼがあり、この場合には、別のペルオキシダーゼを添加する必要はなく、他に、ペルオキシダーゼによって標識を付けることが可能であるか、又は、酵素標識化特異的結合パートナーによって特異的に検出できるペルオキシダーゼの阻害剤及び各種の有機分子並びに生体分子がある。分析試料結合化合物に標識として酵素を直接含有させ得る。これとは別に、分析試料結合化合物用の、少なくとも1種の酵素標識化特異的結合物質に対して、分析試料結合化合物を結合させることが可能である。また別に、分析試料結合化合物を、少なくとも1種の、第2特異的結合物質で標識付けすることが可能であり、次いで、第2特異的結合物質用酵素標識化結合パートナーに、それを結合させる。

【0069】

本発明はまた、化学式Iで表わされる化合物と、ペルオキシダーゼ酵素を用いる化学ルミネセンス反応による検定手順における過酸化水素を検出するための本方法の使用に関するものであり、この場合、発光量が、存在する過酸化水素の存在有無又は量に相関する。本発明方法をオキシダーゼ酵素及びデヒドロゲナーゼ酵素の検出に使用可能なことは、化学ルミネセンス・アッセイ関係の当業者には明らかである。これらの酵素は酸素の還元及びその生来の基質の酸化によって過酸化水素を発生する。次いで、このようにして発生した

10

20

30

40

50

過酸化水素を、発生と同時に、乃至は本発明の化合物 I 及びペルオキシダーゼと次工程において反応させ、発光させることが可能である。この時発生した光の性能は、オキシダーゼ又はデヒドロゲナーゼ酵素の量に相関する。更にオキシダーゼ又はデヒドロゲナーゼ酵素は、分析試料検定における生体分子、或いは特異的結合対の一員への抱合体として存在し得る。

【0070】

化学式 I で表される化合物とペルオキシダーゼとの、化学ルミネセンスを発生する反応は、ペルオキシダーゼの存在の有無又は量を検出するための迅速かつ鋭敏な方法を構成する。従って、標本と化学式 I で表される化合物との反応による発光の量又は強度の測定による、標本中のペルオキシダーゼの存在の有無又は量を測定する目的で、本発明方法を用いることができる。かかる測定は、例えば、法廷検討における証拠としての哺乳類動物血液のペルオキシダーゼ活性検出に用途を見出すことができる。

10

【0071】

ペルオキシダーゼ活性の化学ルミネセンス測定に関する第 2 の応用分野は、酵素阻害剤の検出と測定に関するものである。例えば、ペルオキシダーゼ阻害剤には、シアン化物、硫化物及び高濃度過酸化水素がある。阻害剤の量又は特性、例えば、阻害定数 K_i 、又は阻害半減期 $t_{1/2}$ の測定は、検出可能な生成物を発生する、化学式 I で表される基質の存在下、ペルオキシダーゼ酵素を含有する標本の活性と、阻害剤の量とを測定することによってなされる。酵素と、化学ルミネセンス性化合物との反応は、阻害剤の存在下と不存在下で行われ、その結果を比較して、阻害剤の存在の有無又は量を測定する。阻害剤の効果としては、光強度の低減、光強度上昇速度の遅延、又は光放射開始前期間の遅延の 3 種の効果のうち、いずれか 1 種以上を有する。

20

【0072】

反応がペルオキシダーゼによって接触作用を受けるので、酵素の極めて少ない量で、検出可能な光量を充分発生する。1 a mol (1×10^{-18} モル) 以下の感度が達成されている。かかる少量のペルオキシダーゼを検出できる能力によって、本発明の化学ルミネセンス技術は、標本中に少量しか存在しない分析試料、又は、限られた大きさの標本中の少量の分析試料を検出できる酵素結合アッセイを用いる多種分析試料の分析に好適なものとなっている。この種のアッセイにおいては、ペルオキシダーゼを特異的結合対の一員として抱合する。一例は、化学ルミネセンス性酵素結合イムノアッセイ、例えばエリザ (ELISA) である。免疫化学の進歩を達成するための各種アッセイの企画及び実験計画は、当業者にはよく知られており、競合アッセイとサンドイッチアッセイの二つがある。このように形成された、検出可能な標識化結合対を、本発明の化合物及び方法をもって検定し得る。検出可能な標識がペルオキシダーゼ酵素である場合には、直接検出する。検出可能な標識が、他の特異的結合対の一員、例えば、ハプテンである場合には、ペルオキシダーゼとの結合パートナーの抱合体を先に反応させ、次いで、本発明方法に従ってペルオキシダーゼを検出する。業界既知の固体表面又は支持体に付着しているか、又は、溶液中に遊離しているか、あるいは有機的アセンブリー、例えばリポソーム内に包含された酵素標識化の種で測定を実施できるが、リポソームの場合には、溶解剤を使用してリポソームを溶解し、検出可能な酵素を遊離させる。

30

40

【0073】

他の例示的使用法には、ウェスタンブロットティングの技術によるたんぱく質の検出がある。たんぱく質分析試料を含有する標本を、特異的抗体、及び、認知して一次抗体に結合する酵素標識化二次抗体によって検出する。本発明の薬剤を用いる化学ルミネセンス・アッセイのように、標識酵素を、本発明の化合物を使用して、化学ルミネセンスによって検出する。ビオチン化抗体やアビジン HRP を使用する本技術の変法も、本発明方法を用いて遂行し得るアッセイの範囲内であると考えられる。

【0074】

本発明の化合物は、酵素標識化核酸プローブの使用による核酸の検出にも有用である。例示となる方法には、溶液ハイブリッド形成アッセイ、サザンブロットティングにおける D

50

NA 検出、ノーザンブロットングによる RNA、DNA アミノ酸配列分析 (DNA sequencing)、DNA フィンガープリント法、コロニーハイブリッド形成法及びブランクリフト法があり、実施方法については、当業者によく知られている。これらの方法を、本発明化合物とともに用いるためには、ペルオキシダーゼ酵素を標識として使用する。ペルオキシダーゼは、プローブ、オリゴヌクレオチド又は捕獲 (capture) オリゴヌクレオチドとの直接抱合体として存在し得るか、あるいは、業界既知の方法を用いる間接的結合方法によって含有される。

【0075】

上記の抗原 - 抗体、ハプテン - 抗体又は抗体 - 抗体の対に加えて、特異的結合対には、相補的オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、アビジン - ビオチン、ストレプトアビジン - ビオチン、ホルモン受容体、レクチン - 炭水化物、IgG - たんぱく質 A、核酸 - 核酸結合たんぱく質及び核酸 - 抗核酸抗体も有り得る。

10

【0076】

他の側面としては、本発明は、約 5 ~ 約 10.5 の間の pH を有する水性緩衝液と、0.01 ~ 10 mM の濃度での化学式 I で表される化合物並びに、0.01 ~ 10 mM の濃度の過酸化物を含有する、ペルオキシダーゼとの反応によって化学ルミネセンスを発生する試薬組成物に関する。該組成物は、任意に、化学ルミネセンスを強化するために有効な量の、好ましくは 0.001 ~ 10 mg/mL の、少なくとも 1 種の強化剤を含有することができる。該組成物はまた、任意に、0.01 ~ 10 mg/mL の濃度の界面活性剤を含有し得る。

20

【0077】

ペルオキシダーゼとの反応によって化学ルミネセンスを発生する好適な試薬組成物は、約 7.5 ~ 約 9 の間の pH を有する水性緩衝液と 0.01 ~ 10 mM の濃度での、化学式 I で表される化合物と、0.01 ~ 10 mM の濃度での過酸化物と、0.001 ~ 10 mg/mL の濃度の強化剤と、化学ルミネセンスを強化するに有効な量、好ましくは 0.001 ~ 10 mg/mL の界面活性剤とを含有する。該組成物は更にキレート剤、例えば EDTA を 0.01 ~ 10 mM の濃度で含有し得る。

【0078】

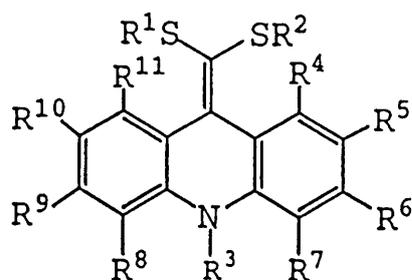
本発明の種々の面を更に詳細に説明するため、下記に実施例を示すが、いずれの場合も、これによって本発明の範囲が限定されるものではない。

30

【実施例】

【0079】

実施例 1、ケテンジチオアセタールの合成。 下記の化合物を調製した。



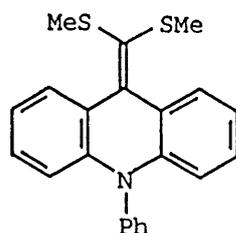
化合物	R ⁴⁻¹¹	R ³	R ¹	R ²	
1	-	Ph	Me	Me	10
2	-	Me	Me	Me	
3	-	Ph	ベンジル	ベンジル	
4	-	Ph	CHPh ₂	CHPh ₂	
5	-	Ph	-(CH ₂) ₃ -		
6	-	Ph	Me	n-オクチル	
7	-	Ph	Me	Ph	20
8	-	Ph	Me	CH ₂ COOEt	
9	-	Ph	Me	イソプロピル	
10	-	Ph	Me	2-ヒドロキシブチル	
11	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li	
12	-	Ph	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li	
13	-	Ph	n-オクチル	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li	30
14	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	
15	-	Me	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	
16	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ I	
17	6-OMe	Ph	Me	Me	
18	6-OMe	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	
19	6-Cl	Ph	Me	Me	
20	-	Ph	Me	CH ₂ Ph	40
21	-	An	Me	Me	

22	-	An	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
23	-	Np	Me	Me	
24	-	Np	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
25	6-OMe	Me	Me	Me	
26	-	CH_2Ph	Me	Me	
27	-	CH_2Ph	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	10
28	-	$\text{CH}_2\text{-p-C}_6\text{H}_4\text{Cl}$	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
29	-	$\text{CH}_2\text{-p-C}_6\text{H}_4\text{OMe}$	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
30	-	$\text{CH}_2\text{-p-C}_6\text{H}_4\text{Cl}$	Me	Me	
31	-	Ph	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{Et})_3\text{I}^-$	
32	-	CH_2Ph	Et	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
33	-	CH_2Ph	Pr	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
34	-	Ph	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$	20
35	-	Ph	Me	$(\text{CH}_2)_{11}\text{OPO}_3\text{Na}_2$	
36	-	Ph	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}$	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$	
37	-	CH_2Ph	Me	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$	
38	-	CH_2Ph	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	
39	-	CH_2Ph	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$	

Me = メチル、Et = エチル、Pr = n - プロピル、Ph = フェニル、Np = 2 - ナフチル、An = p - アニシル (4 - MeOPh)、 $\text{R}^4 \sim \text{R}^{11}$ は指示ない場合は H である。化合物 3、4 及び 6 は二重結合異性体の混合物として得られた。これらの化合物はいずれも、本発明において、化学ルミネセンスを発生する。

実施例 2、N - アリールアクリダン先駆物質の調製。 化合物、N - フェニルアクリダン、N - (4 - メトキシ) フェニルアクリダン及び N - (2 - ナフチル) アクリダンを、アクリダンとハロゲン化芳香族化合物、好ましくはヨウ素化アリール又は臭素化アリールとの、パラジウム触媒カップリング反応により調製した。例えば、プロモベンゼン、4 - プロモアニソール及び 2 - プロモナフタレンをカップリング反応に使用できる。パラジウム触媒工程は、3 級ホスフィンとパラジウム化合物、例えば、 PdCl_2 又は $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ から得られたパラジウム触媒を用い、一般に文献既知の方法を使用して実施した。

実施例 3、代表的合成手順。



1

化合物 1 の合成。 THF (150 mL) 中、-78 °C で、ジイソプロピルアミンと n - ブチルリチウムとから調製した LDA 溶液 (37 ミリモル) に、THF (50 mL) 中

のN-フェニルアクリダン(9.00g、35ミリモル)を添加した。混合物を-78で1時間攪拌し、次いで、CS₂(2.35mL、39ミリモル)を添加した。-78で1時間後、反応物を徐々に(1時間)、室温まで加温した。次に、再び反応混合物を-78に冷却し、MeI(2.86mL、46ミリモル)を添加した。添加後、ドライアイス浴を取り除き、反応を2時間室温で継続した。反応混合物を真空中で蒸発し、残渣をカラムクロマトグラフィ(ヘキサン/CH₂Cl₂ 7:1)にかけ、9.21gのメチルN-フェニルアクリダン-9-ジチオカルボキシレート(黄色結晶固体)として得た。収率76%。¹H NMR(CDCl₃): d 2.54(s, 3H), 6.02(s, 1H), 6.37(d, 2H), 6.92(t, 2H), 7.07(t, 2H), 7.35-7.43(m, 4H), 7.53(m, 1H), 7.64(m, 2H).

10

【0080】

THF(30mL)中のLDA溶液(1.1ミリモル)に、-78で、THF(5mL)中のジチオエステル(0.347g、1ミリモル)を添加し、混合物を-78で1時間攪拌した。次いで、MeI(0.10mL、1.6ミリモル)を、ピペットにより-78で添加し、得られた混合物を室温で一夜、攪拌した。真空中で溶媒を除去後、残渣をシリカゲル上(ヘキサン/EtOAc 20:1)、クロマトグラフィにかけ、0.317gの化合物1を淡黄色固体として得た(収率88%)。¹H NMR(CDCl₃): d 2.37(s, 6H), 6.52(d, 2H), 7.07-7.18(m, 4H), 7.41(d, 2H), 7.57(m, 1H), 7.67(m, 2H), 7.97(dd, 2H).

20

【0081】

化合物2、6、8、9、10、16、17、19、20、21、23、26、及び30もまた、同様の手順により、基礎原料としてLDA又はNaHのいずれかを用い、対応するジチオエステル中間体から調製した。

【0082】

化合物2 収率80%。¹H NMR(CDCl₃): 2.29(s, 6H), 3.48(s, 3H), 7.01-7.09(m, 4H), 7.30(m, 2H), 7.82(dd, 2H).

【0083】

化合物6 収率29%。¹H NMR(CDCl₃): 0.88(t, 3H), 1.20(br, 10H), 1.49(m, 2H), 2.32(s, 3H), 2.71(t, 2H), 6.47(t, 2H), 7.04-7.10(m, 4H), 7.36(d, 2H), 7.54(m, 1H), 7.64(m, 2H), 7.90(dd, 1H), 7.96(dd, 1H).

30

【0084】

化合物8 収率63%。¹H NMR(CDCl₃): 1.19(t, 3H), 2.25(s, 3H), 3.56(s, 2H), 4.08(q, 2H), 6.49(d, 2H), 7.03-7.12(m, 4H), 7.38(d, 2H), 7.55(m, 1H), 7.65(m, 2H), 7.93(dd, 1H), 8.00(dd, 1H).

【0085】

化合物9 収率83%。¹H NMR(CDCl₃): 1.21(d, 6H), 2.32(s, 3H), 3.22(m, 1H), 6.44-6.50(m, 2H), 7.04-7.12(m, 4H), 7.35(d, 2H), 7.54(m, 1H), 7.64(m, 2H), 7.85(dd, 1H), 8.03(dd, 1H).

40

【0086】

化合物10 収率65%。アルキル化剤として、1,2-エポキシブタンを使用。¹H NMR(CDCl₃): 0.86(t, 3H), 1.38(p, 2H), 1.74(br, 1H), 2.37(s, 3H), 2.49(dd, 1H), 3.02(dd, 1H), 3.30(m, 1H), 6.51(dd, 2H), 7.03-7.16(m, 4H), 7.35(d, 2H), 7.55(t, 1H), 7.62(t, 2H), 7.92(d, 2H).

50

dd, 1H), 8.00 (dd, 1H).

【0087】

化合物16. 収率96%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.35 (s, 6H), 6.51 (m, 2H), 7.08 (m, 4H), 7.43 (dd, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.93 (m, 4H), 8.00 (d, 1H), 8.12 (d, 1H).

【0088】

化合物17. 収率49%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.31 (s, 6H), 3.67 (s, 3H), 5.99 (d, 1H), 6.43 (dd, 1H), 6.63 (dd, 1H), 7.00 - 7.11 (m, 2H), 7.36 (d, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.80 (d, 1H), 7.93 (dd, 1H).

10

【0089】

化合物19. 収率90%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.29 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 6.37 (d, 1H), 6.48 (m, 1H), 6.97 (t, 1H), 7.01 - 7.17 (m, 3H), 7.36 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.73 (m, 1H).

【0090】

化合物20. 収率86%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.20 (s, 3H), 3.94 (m, 2H), 6.52 (m, 2H), 7.00 - 7.16 (m, 4H), 7.25 (m, 5H), 7.37 (d, 2H), 7.58 (t, 1H), 7.68 (t, 2H), 7.80 (dd, 1H), 7.93 (dd, 1H).

20

【0091】

化合物21. 収率96%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.30 (s, 6H), 3.92 (s, 3H), 6.50 (d, 2H), 7.00 - 7.15 (m, 6H), 7.28 (d, 2H), 7.87 (dd, 2H).

【0092】

化合物23. 収率84%. ^1H NMR (CDCl₃): 1.89 (p, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.77 (t, 2H), 2.90 (t, 2H), 6.48 (t, 2H), 7.01 - 7.13 (m, 4H), 7.37 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.86 (d, 1H), 7.95 (d, 1H).

【0093】

化合物26. 収率94%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.30 (s, 6H), 5.29 (s, 2H), 6.87 (d, 2H), 7.06 (t, 2H), 7.13 - 7.20 (m, 4H), 7.27 - 7.35 (m, 3H), 7.88 (d, 2H).

30

【0094】

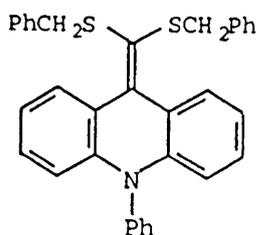
化合物30. 収率90%. ^1H NMR (CDCl₃): 2.32 (s, 6H), 5.25 (s, 2H), 6.83 (d, 2H), 7.10 (m, 4H), 7.19 (d, 2H), 7.12 (d, 2H), 7.91 (d, 2H).

【0095】

ジチオカルボキシル化の別法手順. THF (800 mL) 中、N-ベンジルアクリダン (43.8 g) の溶液に、アルゴン気流下、67 mL、2.5 M の n-BuLi 溶液を -78 で添加した。混合物を -78 で3時間攪拌し、冷却浴を取り外し、更に30分攪拌を継続した。溶液を再び -78 に冷却し、10.65 mL の CS₂ を加えた。-78 で1時間後、反応物を徐々に (1時間) 室温まで加温した。ヨウ素メチル (29.71 g) を添加し、反応を室温にて一夜継続した。次いで、反応混合物を真空蒸発し、残渣を CH₂Cl₂ に溶解し、溶液を短いシリカの充填物に通液し、溶媒を蒸発してオレンジ色の固形物を得、熱酢酸エチル (固形物 1 g 当り 10 mL) から再結晶した。

40

【0096】

3

化合物 3 の合成。 THF (60 mL) 中の LDA 溶液 (11.0 ミリモル) に、 -78 で THF (20 mL) 中の N-フェニルアクリダンを (1.285 g、5.0 ミリモル) を添加した。得られた混合物を -78 で 1 時間攪拌し、 CS_2 (0.33 mL、5.5 ミリモル) を添加した。 -78 で 30 分後、反応物を徐々に (1 時間) 室温まで昇温し、30 分間攪拌した。反応物を -78 に冷却し、ベンジルブロミド (1.67 mL、1.4 ミリモル) を添加した。 -78 で 20 分後、反応物を加温し、1.5 時間室温で攪拌した。終了後、シリカ上クロマトグラフィにかけ (ヘキサン/EtOAc 20:1)、1.565 g の 3 を得た (61% 収率)。 ^1H NMR (CDCl_3): 3.90 (s, 4H), 6.42 (d, 2H), 6.97 (t, 2H), 7.09 (t, 2H), 7.18 - 7.30 (m, 12H), 7.55 (m, 1H), 7.62 - 7.71 (dd, 4H) ppm.

【0097】

化合物 4 と 25 とを、同様にして調製した。

化合物 4 . 収率 26%。 ^1H NMR (CDCl_3): 5.95 (s, 4H), 6.38 (d, 2H), 6.88 (t, 2H), 7.07 (t, 2H), 7.12 (d, 2H), 7.21 - 7.30 (m, 20H), 7.40 (d, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.61 (m, 2H).

【0098】

化合物 25 . 収率 16%。 ^1H NMR (CDCl_3): 2.28 (d, 6H), 3.44 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.54 (d, 1H), 6.63 (dd, 1H), 7.00 - 7.08 (m, 2H), 7.29 (m, 1H), 7.72 (d, 1H), 7.87 (d, 1H).

【0099】

同様に、化合物 5 を、THF 中の 1,3-ジヨウ素化プロパンを用いて、対応するジチオカルボキシレートのアシル化により、調製し、収率 44% を得た。 ^1H NMR (CDCl_3): 2.16 (p, 2H), 2.90 (t, 4H), 6.44 (d, 2H), 6.99 - 7.10 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.71 (dd, 2H).

【0100】

化合物 11、12、14、15、18、22、24、27、28、29、32、33、及び 38 は、いずれも 1 又は 2 個のプロパンスルホン酸塩の基を有しており、ジチオカルボキシレート又はジチオカルボキシレートアシルエステルを、プロパンサルトンを用いてアシル化することにより調製した。

【0101】

化合物 11 (収率 98%)。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.92 (p, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.67 (t, 2H), 2.81 (t, 2H), 6.41 (t, 2H), 6.90 - 7.10 (m, 4H), 7.37 (d, 2H), 7.57 (t, 1H), 7.67 (t, 2H), 7.87 (d, 2H).

【0102】

化合物 12 (収率 68%)。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.99 (p, 4H), 2.73 (t, 4H), 2.91 (t, 4H), 6.42 (d, 2H), 6.97 - 7.06 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.55 (t, 1H), 7.67 (t, 2H), 7.89 (dd, 2H).

10

20

30

40

50

【0103】

化合物14 (収率53%)。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.88 (p, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.63 (t, 2H), 2.78 (t, 2H), 6.37 (t, 2H), 6.90 - 7.05 (m, 4H), 7.32 (d, 2H), 7.52 (t, 1H), 7.63 (t, 2H), 7.83 (d, 2H)。

【0104】

化合物15 収率94%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.87 (p, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.64 (t, 2H), 2.81 (t, 2H), 3.45 (s, 3H), 6.90 - 7.09 (m, 4H), 7.24 (m, 2H), 7.79 (m, 2H)。

【0105】

化合物18 収率84%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.93 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.69 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 5.91 (dd, 1H), 6.39 (t, 1H), 6.62 (m, 1H), 6.90 - 7.08 (m, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.57 (t, 1H), 7.68 (t, 2H), 7.79 (dd, 1H), 7.90 (dd, 1H)。

【0106】

化合物22 収率90%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.91 (p, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.67 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 3.90 (s, 3H), 6.46 (t, 2H), 6.99 (m, 2H), 6.07 (m, 2H), 7.18 - 7.29 (m, 4H), 7.86 (d, 2H)。

【0107】

化合物24 収率78%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.95 (p, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.70 (t, 2H), 2.83 (t, 2H), 6.44 (dd, 2H), 7.03 (m, 4H), 7.40 (dd, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.90 (d, 2H), 8.01 (m, 3H), 8.16 (d, 1H)。

【0108】

化合物27 収率83%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.85 (p, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.59 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.88 (d, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.10 (m, 4H), 7.20 - 7.27 (m, 3H), 7.83 (dd, 2H)。

【0109】

化合物28 収率87%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.85 (p, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.60 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 5.30 (s, 2H), 6.86 (d, 2H), 6.96 - 7.17 (m, 6H), 7.27 (d, 2H), 7.80 - 7.87 (dd, 2H)。

【0110】

化合物29 収率91%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.85 (p, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.61 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 3.74 (s, 3H), 5.25 (s, 2H), 6.82 (d, 2H), 6.89 - 7.02 (m, 6H), 7.13 (t, 2H), 7.80 - 7.87 (dd, 2H)。

【0111】

化合物32。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.14 (t, 3H), 1.89 (p, 2H), 2.63 (t, 2H), 2.72 (q, 2H), 2.83 (t, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 7.09 - 7.26 (m, 7H), 7.83 (d, 1H), 7.89 (d, 1H)。

【0112】

化合物33。 ^1H NMR (CD_3OD): 0.82 (t, 3H), 1.46 (m, 2H), 1.92 (p, 2H), 2.68 (m, 4H), 2.83 (t, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.91 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 7.1 - 7.25 (m, 7H), 7.86 (t, 2H)。

10

20

30

40

50

【0113】

化合物38. ^1H NMR (CD_3OD): 1.9 (p, 2H), 2.6 (t, 2H), 2.8 (t, 2H), 3.93 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 6.9 (m, 3H), 7.2 (m, 13H), 7.6 (d, 1H), 7.8 (d, 1H).

【0114】

化合物7の合成。THF (30 mL) 中のLDA (2.5ミリモル)の溶液に、THF (10 mL) 中のメチルN-フェニルアクリダン-9-ジチオカルボキシレート (0.347 g、1.0ミリモル)を添加した。-78 で1時間後、反応物を-20 に加温し、次いで、臭素化ベンゼンを加えた。添加後、反応物を徐々に加温し、室温で3時間撹拌した。真空中で溶媒除去した後、クロマトグラフィにかけ(ヘキサン/EtOAc 20 : 1)、0.255 gの化合物7を得た(60%収率)。 ^1H NMR (CDCl_3): 2.20 (s, 3H), 6.45 (d, 1H), 6.53 (d, 1H), 6.92 (t, 1H), 7.03 - 7.24 (m, 4H), 7.33 - 7.47 (m, 6H), 7.56 (m, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.87 - 7.94 (m, 2H).

10

【0115】

化合物13の合成。N-フェニルアクリダン-9-ジチオカルボキシレートを、1-ヨウ素化オクタンとの反応によってn-オクチルチオエステルに転化した。-78 で、THF (70 mL) 中のLDA (4.48ミリモル)溶液に、THF (20 mL) 中のn-オクチルN-フェニルアクリダン-9-ジチオカルボキシレート (1.90 g、4.26ミリモル)を添加した。得られた混合物を-78 で1時間撹拌し、次に、THF (10 mL) 中、1,3-プロパンサルトン (0.78 g、6.39ミリモル)を添加した。-78 で45分後、反応物を室温まで加温し、更に3時間撹拌した。溶媒を除去して固体残渣を得、これを最小量の CH_2Cl_2 に溶解し、ヘキサンを用いて沈澱させた。溶液がTLCプレート上で蛍光性成分を示さなくなるまで、この操作を繰り返した。真空乾燥後、2.270 gの13を黄色粉末として得た。収率93%。 ^1H NMR (CDCl_3): 0.84 (t, 3H), 1.13 - 1.40 (m, 12H), 2.02 (q, 2H), 2.68 (t, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.90 (t, 2H), 6.42 (dd, 2H), 6.94 - 7.08 (m, 4H), 7.34 (d, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.86 (d, 1H), 7.92 (d, 1H).

20

【0116】

化合物31の合成。 CH_2Cl_2 (5 mL) 中の化合物16 (0.250 g、0.49ミリモル)を、室温で2.5日間、トリエチルアミン (9 mL) と共に撹拌した。揮発成分を真空中で除去し、残渣を最小量の CH_2Cl_2 に溶解し、エーテルで沈澱させた。この操作を洗浄液が蛍光成分を示さなくなるまで繰り返した。真空乾燥後、0.140 gの化合物31を黄色固体として得た。収率47%。 ^1H NMR (CD_3OD): 1.06 (m, 9H), 1.17 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.91 - 3.08 (m, 10H), 6.37 (d, 1H), 6.51 (d, 1H), 6.98 - 7.18 (m, 4H), 7.25 (d, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.82 (m, 1H), 8.02 (d, 1H).

30

【0117】

化合物35の合成。THF (80 mL) 中、メチルN-フェニルアクリダン-9-ジチオカルボキシレート (1.735 g、5.00ミリモル)に、NaH (0.460 g、鉍油中60%懸濁液、11.5ミリモル)を添加した。得た混合物を室温で3時間撹拌し、次いで、THF (20 mL) 中、11-臭素化ウンデカン-1-オール (1.633 g、6.50ミリモル)を添加した。一夜撹拌後、4 mLのMeOHを反応混合物に添加し、過剰のNaHを分解した。真空中で溶媒を除去し、得られた残渣をシリカゲル上でクロマトグラフィにかけ(ヘキサン/EtOAc 4:1)シロップ状液体として11-ヒドロキシウンデシルケテンジチオアセタール誘導体2.550 gを得た。収率98%。 ^1H NMR (CDCl_3): 1.19 - 1.60 (m, 19H), 2.32 (s, 3H), 2.70 (t, 2H), 3.64 (m, 2H), 6.46 (t, 2H), 7.05 (m, 4

40

50

H), 7.35 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.88 (dd, 1H), 7.95 (dd, 1H) ppm.

【0118】

CH₂Cl₂ (60 mL) 中の、上記調製剤化合物 (2.55 g、4.92 ミリモル) に、0 でピリジン (0.52 mL、6.40 ミリモル) を、次いで POCl₃ (0.60 mL、6.40 ミリモル) を添加した。0 で1時間反応を継続した後、アイスバスを取外して反応物を室温まで昇温させた (30分)。次いで、3-ヒドロキシプロピオニトリル (1.35 mL、19.7 ミリモル) を、ピリジン (3.18 mL、39.4 ミリモル) に添加した。一夜攪拌後、反応混合物を分液漏斗で水洗いした。有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥、蒸発させて残渣をシリカゲル上でクロマトグラフィにかけ (EtOAc)、ビス (シアノエチル) ホスフェート誘導体 2.70 g、収率 79% を得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.19 - 1.50 (m, 16H), 1.71 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.70 (t, 2H), 2.79 (t, 4H), 4.13 (q, 2H), 4.38 (q, 4H), 6.45 (t, 2H), 7.05 (m, 4H), 7.35 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.88 (dd, 1H), 7.94 (dd, 1H) ppm.

10

【0119】

シアノエチル保護基の加水分解を、保護されたホスフェート 2.70 g (3.84 ミリモル) アセトン (40 mL) 中、1M NaOH (7.68 mL、7.68 ミリモル) による、一夜に亘る処理によって実施し、2.36 g の化合物 35 を得た (96% 収率)。¹H NMR (CD₃OD): 1.08 - 1.34 (m, 16H), 1.56 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.64 (t, 2H), 3.79 (q, 2H), 6.42 (d, 2H), 6.95 - 7.09 (m, 4H), 7.31 (d, 2H), 7.58 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.84 (d, 1H), 7.89 (d, 1H).

20

【0120】

化合物 34、36、及び 37 を同様の方法で調製し、うち 36 は、ウンデシルジチオエステルから出発した。

化合物 34 ¹H NMR (CD₃OD): 1.77 (p, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.85 (t, 2H), 3.79 (q, 2H), 6.39 (t, 2H), 6.94 - 7.07 (m, 4H), 7.32 (d, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.83 (dd, 1H), 7.89 (dd, 1H)

30

【0121】

化合物 36 ¹H NMR (CD₃OD): 0.88 (t, 3H), 1.09 - 1.35 (m, 18H), 1.87 (p, 2H), 2.66 (t, 2H), 2.90 (t, 2H), 3.84 (q, 2H), 6.40 (m, 2H), 6.94 - 7.08 (m, 4H), 7.31 (d, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.82 (d, 1H), 7.95 (d, 1H)

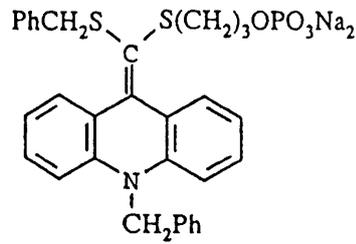
【0122】

化合物 37 ¹H NMR (CD₃OD): 1.75 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.89 (t, 2H), 3.83 (q, 2H), 5.35 (s, 2H), 6.92 (d, 2H), 7.01 (t, 2H), 7.15 (m, 4H), 7.29 (m, 3H), 7.88 (m, 2H).

40

【0123】

実施例 4、化合物 39 の合成。

39

化合物 39 を、下記合成法によって調製した。N - ベンジルアクリダンの陰イオンと、T H F 中の C S₂ との、- 78 °C での反応を、徐々に (1 時間) 室温まで加温し、次いで、ベンジルブロミドを添加して、N - ベンジルアクリダンのベンジルジチオエステルを得た。T H F 中の該ジチオエステル溶液を N a H を用いて処理し、得られた混合物を室温で攪拌した。次いで、3 - プロモプロパン - 1 - オール (1 . 6 3 3 g、6 . 5 0 ミリモル) を加え、反応を一夜実施した。生成したケテンジチオアセタールを、化合物 35 の合成に関して記載した方法に従い、ホスホリル化した。

【 0 1 2 4 】

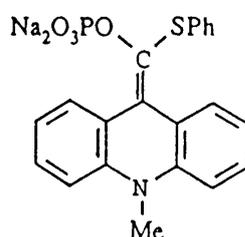
実施例 5、ケテンジチオアセタール化合物からの化学ルミネセンスの強化。 強化剤、過酸化水素、E D T A 及び化合物 1 又は 14 のいずれかを、ツイン 20 を含む緩衝液中の溶液を用いて、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと反応することを包含する試験計画により、各種の強化剤を試験し、光強度の最高値を測定した。そのうち、好適なものは、2 - ナフトール、6 - ブロモ - 2 ナフトール、p - ヒドロキシ桂皮酸、1 , 6 - ジブロモ - 2 - ナフトール、7 - メトキシ - 2 - ナフトール、4 - フェニルフェノール、3 - (N - フェノチアジニル) プロパンスルホン酸塩、3 - (N - フェノキサジニル) プロパンスルホン酸塩、4 - (N - フェノキサジニル) ブタンスルホン酸塩、5 - (N - フェノキサジニル) ペンタンスルホン酸塩及び N - メチルフェノキサジンであった。

【 0 1 2 5 】

実施例 6、化合物 1 による H R P の化学ルミネセンス検出。 0 . 0 1 M トリス緩衝液、p H 7 . 0 の 0 . 5 m M 尿素過酸化水素、0 . 1 m M の p - フェニルフェノール、1 m M の E D T A、0 . 0 2 5 % の ツイン 20 及び 5×10^{-5} M の化合物 1 を含有する試薬組成物を、3 個 1 組とした 1 0 0 μ L の等分液と、 1.4×10^{-15} ~ 1.4×10^{-20} モルの範囲内の H R P 1 0 μ L とを反応させることによって、化学ルミネセンス発生の試験を行った。発光は混合と同時に生じ、約 1 分以内に最高強度に到達した。化学ルミネセンス強度対酵素量の両対数プロットは、全試験範囲に亘って直線であった。

【 0 1 2 6 】

実施例 7、化合物 14 による H R P の化学ルミネセンス検出。 0 . 0 2 5 M トリス緩衝液、p H 8 . 0 の 2 . 5 m M 尿素過酸化水素、4 m M の p - ヒドロキシ桂皮酸、0 . 5 m M の E D T A、0 . 1 % の ツイン 20 及び 3×10^{-4} M の化合物 14 を含有する試薬組成物を、3 個 1 組とした 1 0 0 μ L の等分液と、 1.4×10^{-16} ~ 1.4×10^{-20} モルの範囲内の H R P 1 0 μ L とを反応させることによって、化学ルミネセンス発生の試験を行った。発光は混合と同時に生じ、約 1 分以内に最高強度に到達した。化学ルミネセンス強度と酵素量との関係図を、図 1 に描いた。比較のために、S - B と、H R P の量との関係を示し、下記式、



比較化合物 1

10

20

30

40

50

で表される比較化合物 1 についても示した。比較化合物についての結果は、 $1.4 \times 10^{-15} \sim 1.4 \times 10^{-19}$ モルの間の酵素を含む HRP 溶液 $10 \mu\text{L}$ を、 0.055 M トリス緩衝液、 $\text{pH } 8.6$ 、 0.25 mM の尿素過酸化物、 0.05 mM の *p*-フェニルフェノール、 0.5 mM の EDTA、 0.0125% のツイン 20 及び $3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ の比較化合物 1 を含有する試薬 $100 \mu\text{L}$ に対して添加し、15 分後に測定したものである。

【0127】

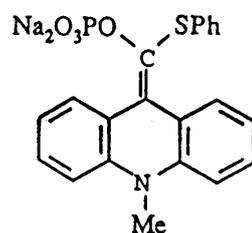
実施例 8、化合物 27 による HRP の化学ルミネセンス検出。 0.025 M トリス緩衝液、 $\text{pH } 8.0$ 、 2.5 mM の尿素過酸化物、 4 mM の *p*-ヒドロキシ桂皮酸、 0.5 mM の EDTA、 0.1% のツイン 20 及び $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ の化合物 27 を含有する試薬組成物を、3 個 1 組とした $100 \mu\text{L}$ の等分液と、 $1.4 \times 10^{-16} \sim 1.4 \times 10^{-20}$ モルの範囲内の HRP $10 \mu\text{L}$ とを反応させることによって、化学ルミネセンス発生の試験を行った。発光は混合と同時に生起し、約 1 分以内に最高強度に到達した。1.5 分での化学ルミネセンス強度と酵素量との関係図を図 2 に描くとともに、上述の如く、比較化合物 1 についての、15 分における結果をも併記した。

【0128】

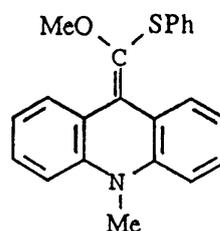
実施例 9、信号強度の比較。 0.01 M トリス緩衝液、 $\text{pH } 8$ 、 0.5 mM の尿素過酸化物、 0.1 mM の *p*-フェニルフェノール、 1 mM の EDTA、 0.025% のツイン 20 及び比較化合物 1 と名付けた化合物以外の下記表中の各化合物、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ を含有する試薬組成物を、 $100 \mu\text{L}$ 等分液を、 3.5×10^{-16} モルの HRP と反応させることによる化学ルミネセンスの発光につき、試験をした。比較化合物 1 についての試薬組成物は、 0.05 M トリス緩衝液、 $\text{pH } 8.6$ 、 0.25 mM の尿素過酸化物、 0.05 mM の *p*-フェニルフェノール、 0.5 mM の EDTA、 0.0125% のツイン 20 及び $3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ の比較化合物 1 を含有した。比較のために、データには比較化合物 1 と 2 とを提示した。

【0129】

化合物	信号/バックグラウンド
比較化合物 1	53
比較化合物 2	325
1	8060
2	953
11	849
13	7626
14	688
26	5200
27	533



比較化合物 1



比較化合物 2

10

20

30

40

50

【0130】

実施例10、信号強度の比較。化合物14及び27～29により発光した最大信号について、0.025Mのトリス緩衝液、pH8の2.5mM尿素過酸化物、4mMのp-ヒドロキシ桂皮酸、0.5mMのEDTA、0.1%のツイン20及び 3×10^{-4} Mの試験化合物を含有する試薬組成物100 μ L等分液と、 3.5×10^{-16} モルのHRPとの反応により比較した。各試薬とも約1分以内に、最大光度に到達した。

【0131】

化合物	信号/バックグラウンド
14	2491
27	6933
28	6717
29	6621
38	26000

10

【0132】

実施例11、ケテンジチオアセタール26を用いた化学ルミネセンス時間の分布(profile)。0.01Mのトリス緩衝液、pH8.0、0.5mMの尿素過酸化物、0.01mMのp-フェニルフェノール、1mMのEDTA、0.025%のツイン20及び 5×10^{-5} Mの化合物26を含有する試薬組成物を100 μ L等分液と、 3.5×10^{-16} モルのHRPとの反応による化学ルミネセンス発生について試験した。相対的ルミネセンス時間の分布を図3に示すが、比較化合物2と名付けた構造的に類似の化合物よりも早い化学ルミネセンスの発生が見られる。実施例1に挙げた他のケテンジチオアセタールを用いた化学ルミネセンス分布も、同様に早い立上りを示した。

20

【0133】

実施例12、ケテンジチオアセタール27を用いた化学ルミネセンス時間の分布。0.025Mのトリス緩衝液、pH8.0の2.5mM尿素過酸化物、4mMのp-ヒドロキシ桂皮酸、0.5mMのEDTA、0.1%のツイン20及び 3×10^{-4} Mの化合物27を含有する試薬組成物を100 μ L等分液と、 3.5×10^{-6} モルのHRPとの反応による化学ルミネセンス発生について試験した。相対的な化学ルミネセンス時間の分布を図4に示すが、この図では迅速な化学ルミネセンスの発生を示しており、前出実施例の薬剤より高水準の信号が発生している。

30

【0134】

実施例13、ケテンジチオアセタール基質を用いたウェスタンブロット。試験抗体としての β -ガラクトシダーゼについてのウェスタンブロットアッセイを、PVDf膜を用いて、U.K. Laemmli, Nature (ロンドン)、227巻、680頁(1970年)に記載された手順に従って実施した。5000～5pgの範囲にある β -ガラクトシダーゼ標準品である。化合物1を含有する検出試薬は、1分以下での検出を遂行できる。図5は、11分の後、5秒の露出による β -ガル(β -ガラクトシダーゼの略)の検出を示すものである。比較すると、米国特許第5,922,558号明細書に記載されている比較化合物1を含有する試薬を用いたウェスタンブロットの結果では、より低い強度の化学ルミネセンスしか発生せず、より多くのバンド(band)のある、同様な画像に到達するには、より長時間の露出を必要とする。更に、本発明の薬剤は、参考文献にある化合物を含有する薬剤では画像形成が不可能であった1pg以下の、少ないバンドでの画像形成が可能である。

40

【0135】

実施例14、別箇のケテンジチオアセタール基質を用いたウェットステンブロット。 β -ガラクトシダーゼのウェスタンブロットアッセイを、実施例13に従い、化合物27乃至化合物37のいずれか、及び強化剤と過酸化物とを用いて実施した。図6に化合物27

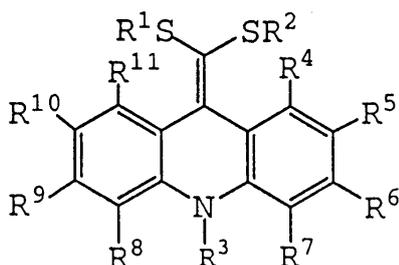
50

を用いて、60分後、1分の露出によるもの、並びに、化合物37を用いて8分後、1分の露出によるもので、 S^{2-} ガルの検出を示す。

【0136】

実施例15、その他のケテンジチオアセタール。下記の化合物を調製した。

【0137】



10

【0138】

化合物	R^{4-11}	R^3	R^1	R^2
40	-	$\text{CH}_2\text{-p-C}_6\text{H}_4\text{OH}$	CH_3	CH_3
41	-	CH_2Ph	$\text{CH}_2\text{-p-C}_6\text{H}_4\text{Cl}$	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$
42	-	Ph	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$
43	-	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$
44	-	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	$(\text{CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2$
45	-	Ph	$-\text{CH}_2\text{CH(OH)CH}_2-$	
46	-	Ph	$-\text{CH}_2\text{CH(O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na)CH}_2-$	
47	-	CH_2Ph	$-\text{CH}_2\text{CH(O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na)CH}_2-$	
48	-	CH_2Ph	$-\text{CH}_2\text{CH(O(CH}_2)_3\text{OPO}_3\text{Na}_2)\text{CH}_2-$	
49	-	CH_2Ph	$-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4-$	
50	-	$(\text{CH}_2)_3\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	$\text{o-C}_6\text{H}_4$	
51	-	CH_3	$\text{o-C}_6\text{H}_4$	
52	-	CH_2Ph	$(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	$(\text{CH}_2)_3\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$
53	-	CH_2Ph	CH_3	$(\text{CH}_2)_3\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$
54	-	Ph	CH_3	$(\text{CH}_2)_3\text{S(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$
55	-	CH_2Ph	CH_3	$(\text{CH}_2)_3\text{OSO}_3\text{Na}$
56	-	Ph	CH_3	$(\text{CH}_2)_3\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$

20

30

40

【0139】

化合物51を、前出のAkiba論文に記載された通りに調製した。

【0140】

実施例16、その他のものの、合成と性質。

化合物40： $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$: 2.28 (s, 6H), 4.74 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 6.76 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 7.00 (m, 4H), 7.12 (t, 2H), 7.85 (d, 2H).

50

【0141】

化合物41: ^1H NMR (CDCl_3): 2.03 (p, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.94 (t, 2H), 3.86 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 6.80 - 7.15 (m, 12H), 7.28 (m, 3H), 7.59 (d, 1H), 7.93 (d, 1H).

【0142】

化合物42: ^1H NMR (CDCl_3): 1.82 (p, 2H), 2.60 (t, 2H), 2.75 (t, 2H), 3.83 (s, 2H), 6.29 - 6.36 (m, 2H), 6.80 - 6.85 (t, 1H), 6.90 - 7.03 (m, 3H), 7.12 (s, 5H), 7.22 - 7.25 (d, 2H), 7.48 - 7.63 (m, 4H), 7.78 - 7.80 (d, 1H).

10

【0143】

化合物43: ^1H NMR (D_2O): 1.77 (p, 4H), 2.88 (t, 4H), 3.69 (q, 4H), 5.30 (s, 2H), 6.98 (d, 2H), 7.06 (m, 4H), 7.18 - 7.29 (m, 5H), 7.88 (d, 2H).

【0144】

化合物44: ^1H NMR (CD_3OD): 1.70 (p, 2H), 1.88 (p, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.92 (t, 2H), 3.15 (t, 2H), 3.85 (q, 2H), 5.29 (s, 2H), 6.90 (t, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.08 - 7.26 (m, 7H), 7.74 (d, 1H), 7.95 (d, 1H).

20

【0145】

化合物45の合成。 -78 で、THF (250 mL) 中のLDA (30.8ミリモル) 溶液に、THF (20 mL) 中のN-フェニルアクリダン (3.86 g、15.0ミリモル) を添加した。得られた混合物を、 -78 で1.5時間攪拌し、次いで、 CS_2 (0.99 mL、16.5ミリモル) を添加した。 -78 で45分後、反応物を室温まで加温し、更に30分間攪拌した後、THF (130 mL) 中で、[2-(1,3-ジプロモ)プロポキシ]-tert-ブチルジメチルシラン (5.23 g、15.8ミリモル) を加えた。一夜攪拌後、溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィにかけた(シリカゲル上、ヘキサン/ CH_2Cl_2 : 1/2.5)。化合物45 (6.15 g) を得た (81% 収率)。TBAFによるシロキシ基の脱離により、45を85% 収率で得た。 ^1H NMR (CDCl_3): 2.76 (dd, 2H), 2.82 (br, 1H), 3.19 (dd, 2H), 4.22 (m, 1H), 6.76 (d, 2H), 7.01 - 7.13 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.55 (t, 1H), 7.62 - 7.72 (m, 4H).

30

【0146】

化合物46の合成。 アルゴン気流下に、DMF (10 mL) 中の45 (1.00 g、2.57ミリモル) の溶液に、ナトリウム・ヒドリド (0.108 g、ミネラルオイル中60%、2.70ミリモル) を加えた。約1時間20分後、透明溶液を得、次いで3-プロパンサルトン添加し、混合物を室温で60時間攪拌した。反応混合物を、真空中でDMFを除去して、容量約3 mLまで濃縮し、アセトン (7 mL) を加えて生成物を沈澱させた。混合物を20分間混合した後、固形分を濾過して蒐集し、この固形分をアセトン (3 x 5 mL) で洗浄、乾燥して1.12 gの粗製生成物を得た。水とイソプロパノールによる再結晶で、0.80 gの純粋な46を黄色固体として得た (58% 収率)。 ^1H NMR (CDCl_3): 2.16 (p, 2H), 2.90 (t, 4H), 6.44 (d, 2H), 6.99 - 7.10 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.71 (dd, 2H).

40

【0147】

化合物47. ^1H NMR (CD_3OD): .03 (2H, m), 2.87 (4H, m), 3.08 (2H, m), 3.62 (2H, t, J = 6.5 Hz), 4.00 (1H, m), 5.26 (2H, s), 6.81 (2H, d, J = 8.2 Hz), 6.94 (2H

50

, m), 7.07 (4H, m), 7.21 - 7.29 (3H, m), 7.65 (2H, d, J = 7.5 Hz).

【0148】

化合物48. ^1H NMR (CD_3OD): 1.85 (2H, m), 2.84 (2H, m), 3.06 (2H, m), 3.63 (2H, t, J = 6.7 Hz), 3.87 (2H, m), 3.99 (1H, m), 5.21 (2H, s), 6.78 (2H, d, J = 8.1 Hz), 6.93 (2H, m), 7.05 (4H, m), 7.19 - 7.27 (3H, m), 7.64 (2H, d, J = 7.2 Hz). P^{31}NMR (CD_3OD): d 10.27 (s).

【0149】

化合物49. ^1H NMR (CDCl_3): 2.92 (4H, t, J = 7.1 Hz), 3.51 - 3.63 (16H, m), 5.27 (2H, s), 6.85 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.02 (2H, m), 7.11 - 7.16 (4H, m), 7.25 - 7.30 (3H, m), 7.93 (2H, d, J = 7.5 Hz).

【0150】

化合物50. ^1H NMR (CD_3OD): 2.03 (m, 4H), 2.85 (t, 2H), 3.48 (t, 4H), 4.14 (t, 2H), 7.02 - 7.10 (m, 4H), 7.18 - 7.33 (m, 6H), 7.45 (d, 2H).

【0151】

実施例17、信号強度の比較。化合物40~51の各々によって発光される最大信号を、0.025Mトリス緩衝液、pH8、2.5mMの尿素過酸化酵素、4mMのp-ヒドロキシ桂皮酸、0.5mMのEDTA、0.1%のツイン20及び1mM、0.3mM、0.15mM又は0.05mMのうち、いずれかの試験化合物を含有する試薬組成物100 μL 等分液と、 3.5×10^{-16} モルのHRPとを反応させることによって比較した。各薬剤は、1~3分以内に最大光強度に達した。

【0152】

10

20

化合物	配合処方	信号/バックグラウンド	
40	1.0	4011	
41	1.0	14000	
42	1.0	9100	
43	1.0	1121	
44	1.0	5810	
45	0.3	2102	10
46	1.0	13000	
47	1.0	7228	
48	1.0	4219	
49	0.05	4853	
50	0.3	1651	
51	0.05	4264	20
52	0.15	5840	
53	0.15	5742	
54	0.15	2502	
55	0.3	5408	

化合物 49 及び 51 は、水性処方中にごく僅かな溶解度しか無かった。

【0153】

実施例 18、ケテンジチオアセタール基質 46 を用いたウェスタンブロット。 - ガラクトシダーゼのウェスタンブロットアッセイを、ニトロセルロース膜、及び、0.025 M のトリス緩衝液、pH 8.0、2.5 mM の尿素過酸化物、4 mM の p - ヒドロキシ桂皮酸、0.5 mM の EDTA、0.1% のツイン 20 並びに 1 mM の化合物 46 を含有する検出試薬を用いたこと以外は、実施例 13 に従って行った。図 7 に、120 分までの種々の時点における卓越した感度を有する - ガルについての、迅速かつ簡便な検出を示した。 30

【0154】

実施例 19、その他の化合物。

化合物 52. ^1H NMR (CD_3OD): 1.59 - 1.70 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 2.72 - 2.83 (m, 6H), 3.18 (t, 2H), 3.34 (t, 2H), 3.45 (t, 2H), 5.29 (s, 2H), 6.91 - 7.02 (m, 4H), 7.09 - 7.25 (m, 7H), 7.82 (d, 1H), 7.88 (d, 1H) ppm. 40

【0155】

化合物 53. ^1H NMR (CD_3OD): 1.54 (p, 2H), 1.92 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.70 - 2.82 (m, 4H), 3.10 (t, 2H), 3.29 (t, 2H), 5.30 (s, 2H), 6.90 - 7.02 (m, 4H), 7.08 - 7.26 (m, 7H), 7.78 (d, 1H), 7.89 (d, 1H) ppm.

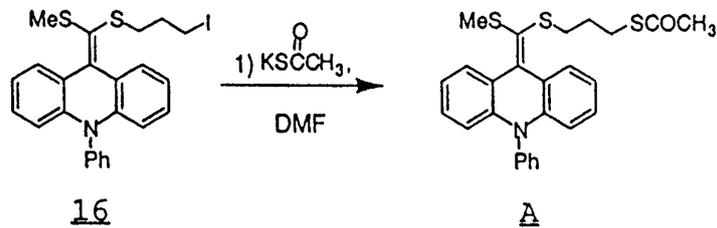
【0156】

化合物 56. ^1H NMR (CD_3OD): 1.60 (p, 2H), 1.93 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.71 - 2.82 (m, 4H), 3.14 (t, 2H) 50

, 3.32 (t, 2H), 6.43 (t, 2H), 6.98 - 7.10 (m, 4H), 7.32 (d, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.82 (d, 1H), 7.92 (d, 1H) ppm.

【0157】

実施例 20、化合物 54の合成。 DMF (10 mL) 中、化合物 16 (0.500 g、0.97ミリモル) と、カリウム・チオアセテート (0.166 g、1.45ミリモル) との混合物を、アルゴン気流下、室温にて一夜、攪拌した。真空中DMFを除去後、残渣をCH₂Cl₂で取り出し、シリカゲル充填物を通液した。溶媒を除去して0.46 gのAを発泡体状固形物として得た。

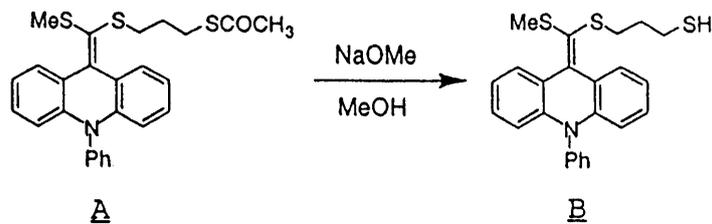


10

【0158】

化合物 A を、アルゴン気流下でMeOH (10 mL) とTHF (10 mL) との混合物に溶解し、この溶液にNaOMe (0.054 g、0.97ミリモル) を加えた。得られた混合物を3時間室温で攪拌し、次いで、ダウエックス (Dowex) 50WX8 - 100イオン交換樹脂を用いて、pHを5~6に調整した。樹脂を濾別し、濾液を蒸発・乾燥し、残渣をアセトンで取り出し、シリカゲル充填物に通液した。溶媒除去後、0.41 gのBを発泡体状固形物として得た。

20



30

B: ¹H NMR (CDCl₃): d 1.21 (t, 1H), 1.72 (p, 2H), 2.30 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.80 (t, 2H), 6.49 (t, 2H), 7.02 - 7.14 (m, 4H), 7.38 (d, 2H), 7.55 (t, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.88 (d, 1H), 7.95 (d, 1H) ppm.

【0159】

化合物 B を、上述した通りにDMF中でプロパンサルトン及びNaHを用いて反応させ、化合物 54に転化させた。¹H NMR (CD₃OD): 1.59 (p, 2H), 1.92 (p, 2H), 2.22 (t, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.45 (t, 2H), 2.73 - 2.85 (m, 4H), 6.43 (dd, 2H), 6.98 - 7.10 (m, 4H), 7.35 (d, 2H), 7.58 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.80 (d, 1H), 7.92 (d, 1H) ppm.

40

【0160】

実施例 21、化合物 55の合成。 DMF中、ジチオエステル (1.00 g、2.77ミリモル) とNaH (2.77ミリモル) との混合物を、アルゴン気流下、1時間攪拌した。次いで、1,3-プロパンジオール環式サルフェートを添加し、得られた混合物を室温で、一夜攪拌した。DMF除去後、残渣をアセトン/エーテル (1:3) を用いて洗浄し、MeOH/2-プロパノールを用いて再結晶して、1.40 gの55を得た (収率96%)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 1.69 (p, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.76 (t, 2H), 3.83 (t, 2H), 5.31 (s, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 7.10 (m, 4H), 7.24 (m

50

, 3 H), 7.83 - 7.88 (dd, 2 H) ppm.

【0161】

実施例 2 2、化合物 5 2 及び 5 3 による HRP の化学ルミネセンス検出。 0.025 M トリス緩衝液、pH 8.0 の 2.5 mM の尿素過酸化物、4 mM の p - ヒドロキシ桂皮酸、0.5 mM の EDTA、0.1% のツイン 20 及び 3×10^{-4} M の 化合物 5 2 又は 5 3 を含有する試薬組成物を、3 個 1 組とした 100 μ L の等分液と、 $1.4 \times 10^{-16} \sim 1.4 \times 10^{-21}$ モルの範囲内の 10 μ L の HRP と反応させることによる化学ルミネセンス発光の試験を行った。発光は混合と同時に生起し、急速に最高強度に到達した。化学ルミネセンス強度のピークと、酵素量との関係図を図 8 に示す。

【0162】

上記の詳細な説明及び実施例は、本発明の説明のために記載したものであり、本発明の技術思想と技術範囲は、これによって制限を受けるべきものではない。本発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ判断されるべきものである。

【図面の簡単な説明】

【0163】

【図 1】室温でトリガーされた、化合物 1 4 を含有する実施例 7 に記載した試薬の 100 μ L によって放射された 1.5 分における化学ルミネセンス強度と、HRP の量とに関するグラフである。化学ルミネセンス放射は、白色マイクロプレートのウェル中の、 $1.4 \times 10^{-16} \sim 1.4 \times 10^{-20}$ モルの間の酵素 100 μ L を添加することによって開始された。術語 S - B は、HRP の存在の場合の相対光量単位 (RLU) で表した化学ルミネセンス信号 (S) について、HRP の存在しない場合のバックグラウンドの化学ルミネセンス (B) を補正したものをいう。比較のために、S - B と HRP の量との関係は、15 分で測定した比較化合物 1 についても示されている。

【図 2】室温でトリガーされた、化合物 2 7 を含有する実施例 8 に記載した試薬の 100 μ L によって放射された 1.5 分における化学ルミネセンス強度と、HRP の量とに関するグラフである。比較のために、S - B と HRP の量との関係は、15 分で測定した比較化合物 1 についても示されている。

【図 3】 3.5×10^{-16} モルの HRP と 25 で、実施例 11 に記載した 化合物 2 6 を含有する試薬 100 μ L との反応から得られた化学ルミネセンスの経時的分布を示すグラフである。この関係の化学ルミネセンスの経時的分布は、構造的に類似する比較化合物 2 と命名した化合物より、迅速な化学ルミネセンスの発生を示している。

【図 4】 3.5×10^{-16} モルの HRP と 25 で、実施例 12 に記載した 化合物 2 7 を含有する試薬 100 μ L との反応から得られた化学ルミネセンスの経時的分布を示すグラフである。

【図 5】PVD F 膜上の HRP - 標識抗体による - ガラクトシダーゼと、化学ルミネセンス試薬組成物とのウェスタンブロット・アッセイからの X 線フィルムの画像である。たんぱく質の、夫々、5000、1000、180、30 及び 5 pg を含有する - ガラクトシダーゼの希釈液を、化合物 1 を含有する本発明の試薬によって、若しくは比較の為に、米国特許第 5,922,558 号明細書に記載された比較化合物 1 を含有する試薬によって検出した。膜を、各検出試薬中で、11 分培養後、X 線フィルムに 5 秒露出した。

【図 6】PVD F 膜上の HRP - 標識抗体による - ガラクトシダーゼと、化学ルミネセンス試薬組成物とのウェスタンブロット・アッセイからの X 線フィルムの画像である。たんぱく質の、夫々、5000、1000、180、30 及び 5 pg を含有する - ガラクトシダーゼの希釈液を、化合物 2 7 又は 化合物 3 7 を含有する本発明の試薬によって検出した。

【図 7】ニトロセルロース膜上の HRP - 標識抗体による - ガラクトシダーゼと、化合物 4 6 を含有する化学ルミネセンス試薬組成物とのウェスタンブロットアッセイからの X 線フィルムの画像である。たんぱく質の、夫々、5000、1000、180、30 及び 5 pg を含有する - ガラクトシダーゼの希釈液を、図の如く 2 時間に亘って、容易に検出した。

10

20

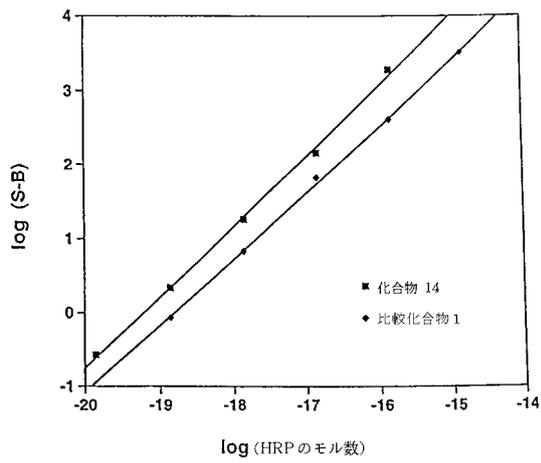
30

40

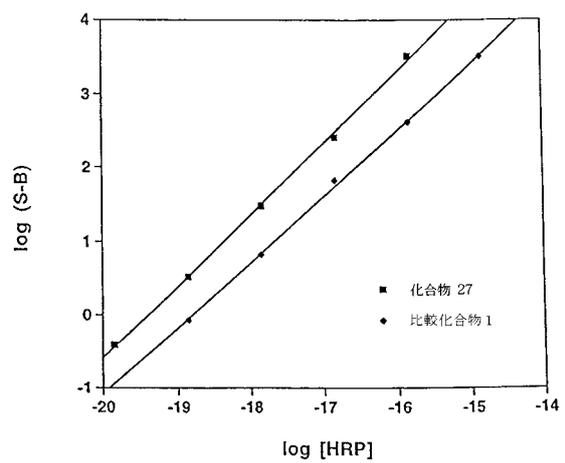
50

【図 8】室温でトリガーされた、化合物 5 2 又は 5 3 のいずれかを含有する実施例 2 2 に記載した試薬の 1 0 0 μ L によって放射された化学ルミネセンス強度と H R P の量に関するグラフである。

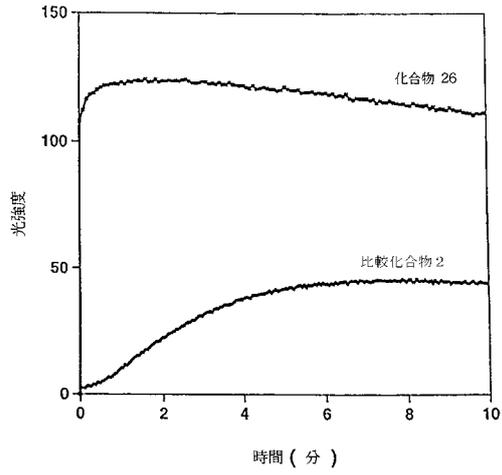
【図 1】



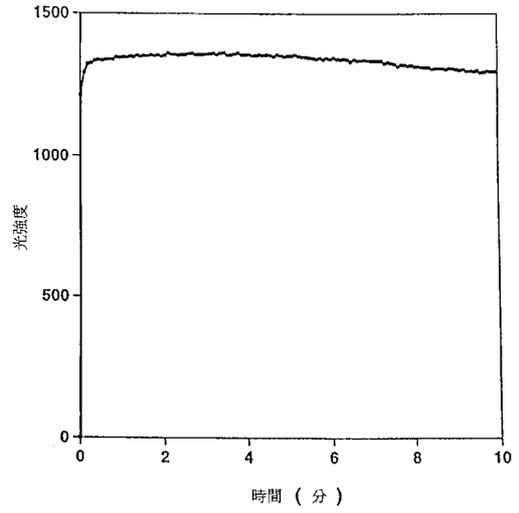
【図 2】



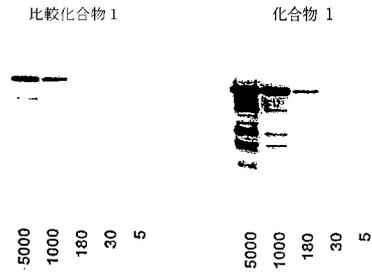
【 図 3 】



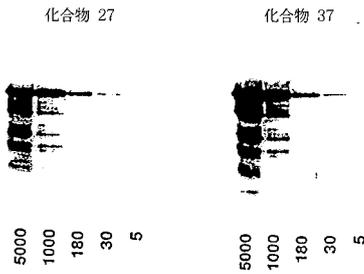
【 図 4 】



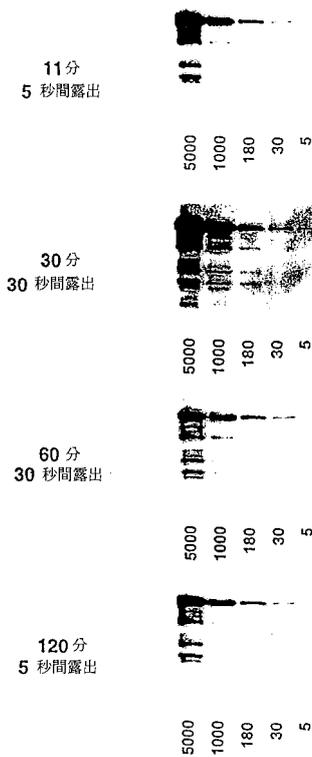
【 図 5 】



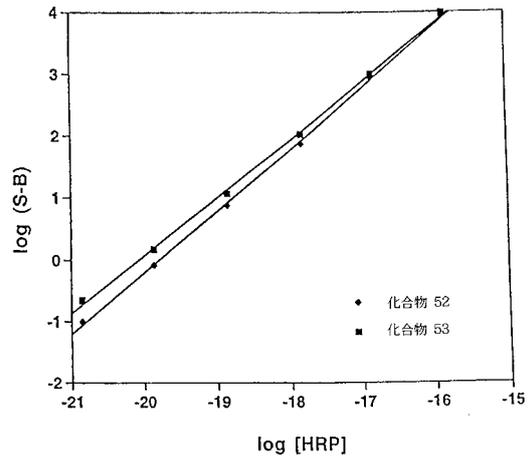
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/76 (2006.01) G 0 1 N 21/76
C 0 9 K 11/06 (2006.01) C 0 9 K 11/06

(72)発明者 レヌカ デ シルヴァ
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 6 7 ノースヴィル デルタ ドライブ 4 0 6 2 8
(72)発明者 ウェンファ シェ
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 3 7 5 ノヴィ ジェームズタウン 2 4 8 0 1

審査官 岡部 佐知子

(56)参考文献 特表2001-516760(JP,A)
国際公開第99/066005(WO,A1)
特表2001-516589(JP,A)
, BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, 1978年, vol. 51, no. 9, pages 2674 -
2683
Synthesis, 1977年, 12, 861-2

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 219/02
C07D 219/04
C07D 219/06
C07D 409/04
C07D 411/04
G01N 21/76
C09K 11/06
WPI
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)