

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3892035号

(P3892035)

(45) 発行日 平成19年3月14日(2007.3.14)

(24) 登録日 平成18年12月15日(2006.12.15)

(51) Int. Cl.

F I

CO7D 219/04	(2006.01)	CO7D 219/04	
CO9K 11/06	(2006.01)	CO9K 11/06	
GO1N 21/78	(2006.01)	GO1N 21/78	C
GO1N 33/532	(2006.01)	GO1N 33/532	B
GO1N 33/535	(2006.01)	GO1N 33/535	

請求項の数 50 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願平7-523011
 (86) (22) 出願日 平成7年3月1日(1995.3.1)
 (65) 公表番号 特表平9-509938
 (43) 公表日 平成9年10月7日(1997.10.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/002568
 (87) 国際公開番号 W01995/023971
 (87) 国際公開日 平成7年9月8日(1995.9.8)
 審査請求日 平成14年2月6日(2002.2.6)
 (31) 優先権主張番号 205,093
 (32) 優先日 平成6年3月2日(1994.3.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 ルミゲン インコーポレイテッド
 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 テン マ
 イル ロード 24485 リバーウッド
 リサーチ センター
 (74) 代理人
 弁理士 本多 一郎
 (72) 発明者
 ハシム アクハヴァン-タフティ
 アメリカ合衆国 ミシガン 48310
 スターリング ハイッ リアン ロード
 33858

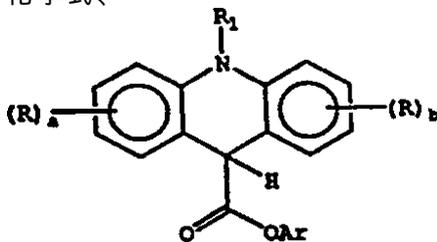
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学発光検出に有用な新規なアリアルN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化学式、



(ここで、R₁はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリアルオキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダン。

【請求項2】

Ar-Oがポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第1項記載のアクリダン。

【請求項3】

ジまたはポリハロ置換フェノキシ基が、式OC₆H_{5-m}X_m(式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である)で表される請求の範囲第1項記載のアクリダン

【請求項4】

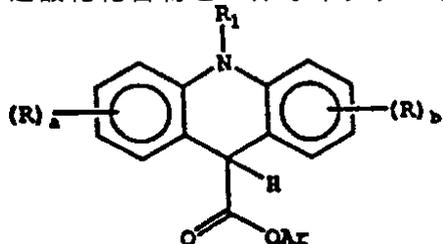
Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第1項、第2項または第3項記載のアクリダン。

【請求項5】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第1項、第2項または第3項記載のアクリダン。

【請求項6】

過酸化化合物とペルオキシダーゼと、化学式、



(ここで、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過氧化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンとの反応を含むことを特徴とする化学発光を生ずる方法。

【請求項7】

Ar-Oがポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第6項記載の方法。

【請求項8】

ジまたはポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_5-mX_m$ (式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である)で表される請求の範囲第6項記載の方法。

【請求項9】

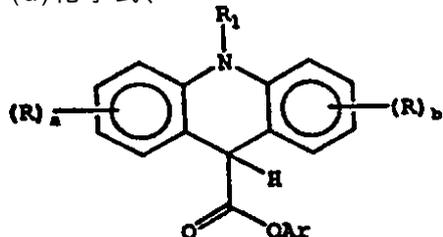
Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第6項、第7項または第8項記載の方法。

【請求項10】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第6項、第7項または第8項記載の方法。

【請求項11】

(a)化学式、



(ここで、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過氧化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンと、

(b)該アクリダンからの発光を強化し得る量のフェノール化合物と、

(c)該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応を誘発する量の過酸化化合物と、

(d)試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐ量

10

20

30

40

50

のキレート剤と、

(e)化学発光を改良し得る量の界面活性剤と、を含有することを特徴とする、ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物。

【請求項12】

Ar-0がポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第11項記載の試薬組成物。

【請求項13】

ジまたはポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_5-mX_m$ （式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である）で表される請求の範囲第11項記載の試薬組成物。

【請求項14】

Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第11項、第12項または第13項記載の試薬組成物。

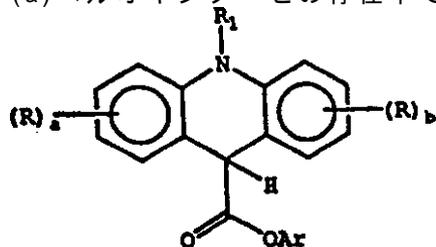
【請求項15】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第11項、第12項または第13項記載の試薬組成物。

【請求項16】

ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合した試料物質を化学発光反応によるアッセイ法で検出する方法において、

(a)ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物であって、化学式、



（ここで、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-0は脱離基で、過酸化化合物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である）で表されるアクリダンと、該アクリダンからの発光を強化し得る量のフェノール化合物と、該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応を誘発する量の過酸化化合物と、該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐ量のキレート剤と、化学発光を改良し得る量の界面活性剤とを含有する該試薬組成物を与えることと、

(b)該試料物質検出のため該試薬組成物にペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合した試料物質を添加して発光させること、を含むことを特徴とする検出方法。

【請求項17】

Ar-0がポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第16項記載の検出方法。

【請求項18】

ジまたはポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_5-mX_m$ （式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である）で表される請求の範囲第16項記載の検出方法。

【請求項19】

Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第16項、第17項または第18項記載の検出方法。

【請求項20】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第16項、第17項または第18項記載の検出方法。

【請求項21】

10

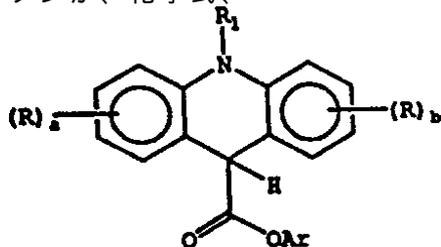
20

30

40

50

ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合した試料物質を化学発光反応によりアッセイ法で検出する方法において、該試料物質検出のための発光にアクリダンを過酸化物およびペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合した試料物質と反応させ、該アクリダンの化学式、



10

(ここで、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基より選択される基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンであることを特徴とする検出方法。

【請求項22】

$Ar-O$ がポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第21項記載の検出方法。

【請求項23】

ジまたはポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_{5-m}X_m$ (式中、 X はFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、 m は2から5である)で表される請求の範囲第21項記載の検出方法

20

【請求項24】

R の少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他の R は水素原子である請求の範囲第21項、第22項または第23項記載の検出方法。

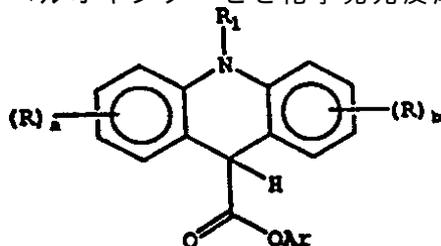
【請求項25】

R の少なくとも1個がメトキシ基であり、その他の R は水素原子である請求の範囲第21項、第22項または第23項記載の検出方法。

【請求項26】

ペルオキシダーゼを化学発光反応によりアッセイ法で検出する方法において、化学式、

30



(ここで、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基より選択される基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンを、過酸化物の存在下で反応させることを特徴とする検出方法。

40

【請求項27】

$Ar-O$ がポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第26項記載の検出方法。

【請求項28】

ポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_{5-m}X_m$ (式中、 X はFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、 m は2から5である)で表される請求の範囲第26項記載の検出方法。

【請求項29】

R の少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他の R は水素原子である請求の範囲第26項

50

、第27項または第28項記載の検出方法。

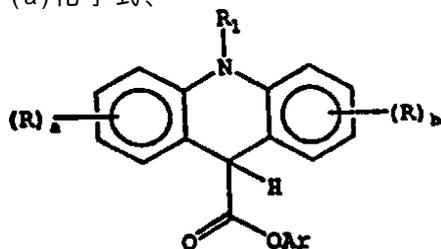
【請求項30】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第26項、第27項または第28項記載の検出方法。

【請求項31】

試料物質を化学発光反応の発光によりアッセイ法で検出するためのキットにおいて、

(a)化学式、



10

(ここで、R₁はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンに発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンと、

(b)過酸化物と、

20

(c)アクリダン化合物を過酸化物およびペルオキシダーゼと反応させることによるアッセイ法で光を検出する場合、単独のペルオキシダーゼと、または試料物質と結合した化合物に付着した形のペルオキシダーゼと、をそれぞれ独立した容器で供給することを特徴とするキット。

【請求項32】

Ar-Oがポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第31項記載のキット。

【請求項33】

ポリハロ置換フェノキシ基が、式OC₆H_{5-m}X_m(式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である)で表される請求の範囲第31項記載のキット。

【請求項34】

30

Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第31項、第32項または第33項記載のキット。

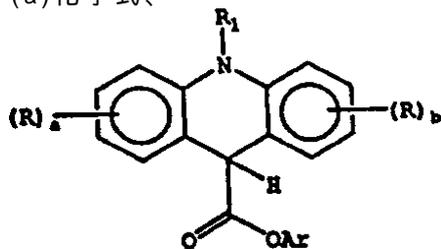
【請求項35】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第31項、第32項または第33項記載のキット。

【請求項36】

試料物質を化学発光反応の発光によりアッセイ法で検出するためのキットにおいて、

(a)化学式、



40

(ここで、R₁はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、Rは水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基より選択される基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンに発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基である)で表されるアクリダンと、該アクリダンからの発光を強化し得

50

る量のフェノール化合物、該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応を誘発する量の過酸化化合物、該試薬への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐ量のキレート剤、および化学発光を改良し得る量の界面活性剤とを含有し、ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物と、

(b)試薬組成物をペルオキシダーゼと反応させることによるアッセイ法で光を検出する場合、単独のペルオキシダーゼと、または試料物質と結合した化合物に付着した形のペルオキシダーゼと、をそれぞれ独立した容器で供給することを特徴とするキット。

【請求項 37】

Ar-Oがポリハロ置換フェノキシ基である請求の範囲第36項記載のキット。

【請求項 38】

ポリハロ置換フェノキシ基が、式 $OC_6H_{5-m}X_m$ （式中、XはFおよびClから選択されるハロゲン原子であり、mは2から5である）で表される請求の範囲第36項記載のキット。

【請求項 39】

Rの少なくとも1個がアルコキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第36項、第37項または第38項記載のキット。

【請求項 40】

Rの少なくとも1個がメトキシ基であり、その他のRは水素原子である請求の範囲第36項、第37項または第38項記載のキット。

【請求項 41】

2',6'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 42】

3',5'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 43】

2',4',6'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 44】

2',4',5'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 45】

2',3',6'-トリフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 46】

ペンタフルオロフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 47】

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 48】

2',3',6'-トリフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 49】

2',6'-ジフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【請求項 50】

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートである化合物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、過酸化化合物およびペルオキシダーゼとの反応によりアクリダンが発光（化学発光）する、化学発光性N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導體に関する。本出願はまた、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素などのオキシダントと、ある種のN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導體との作用により、化学的に発光（化学ルミネセンス）させ

10

20

30

40

50

るための改良された方法に関する。本出願はまた、特定の物質を用いて前記方法による化学発光の発光量を増大させるための改良された方法に関する。本出願はまた、前記方法を用いたペルオキシダーゼの検出に関する。本出願はまた、前記方法を用いた過酸化水素の検出に関する。本出願はまた、前記方法を用いた様々な生体分子の検出および定量に関する。たとえば、この方法は、免疫アッセイの技術によるハプテン、抗原、抗体の検出、ウェスタンブロットティングによるタンパク質の検出、サザンブロットティングおよびノーザンブロットティングによるDNA、RNAの検出に用いることができる。さらに、この方法は、DNAの配列決定におけるDNA検出に用いることができる。さらに、この方法は、従来知られているように、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼなど、過酸化水素を生成する酵素の検出に用いることができる。

10

背景技術

生体分子を感度よく検出および定量する方法としては、これまで特定分子を放射性同位元素で標識する方法が使われてきた。最近になって、放射性物質の持つ危険性やその取り扱いの難しさを解消するため、放射性物質を使わない技術が数多く開発されてきている。試料物質を酵素と結合させ、その触媒作用による基質の反応を測定する方法を使えば、増幅した形で反応が観測されるため、最も高感度で検出を行うことができる。そのため、着色光、蛍光、化学発光を発生する基質が作られるようになり、特に化学発光による高感度の検出が可能となってきている。

測定の感度がさらに向上すれば、微量物質の検出が可能となり、また測定に必要な時間や試薬の量が削減できるため、化学発光の用途は一層広がる。このような酵素を用いた化学発光アッセイの検出速度および感度を向上させるためには、たとえば基質としてより発光効率が高い物質、または長時間発光可能な物質を選ぶ必要がある。

20

免疫アッセイ、オリゴヌクレオチドの検出、およびハイブリッド核酸の作成などの酵素結合法を用いた検出に使われる酵素としては、これまでホースラディッシュペルオキシダーゼが最も一般的だった。従来知られている化学発光用の試薬では、分析時の感度の限界などにより、この酵素の特性を最大限に活かすことができなかった。ペルオキシダーゼ抱合体(conjugate)を用いて超高感度の検出を行うには、より微量な酵素の検出ができる試薬が要求される。具体的には、バックグラウンドの発光レベルや分析に不要な領域の発光レベルを上げることなく、特定領域において高い発光レベルを持つような試薬が必要である。このためには、従来よりも最大光度を上げるか、または発光持続時間を長くする必要が

30

a. アクリダンの酸化

過酸化ベンゾイル水溶液中でのアクリダンの酸化では、発光効率は非常に低く ($\phi_{CL}=3 \times 10^{-7}$)、しかもアクリジンなどの副生成物が生ずる (S. Steenken, Photochem. Photobiol., 11, 279-283 (1970))。N-メチルアクリダンは電気化学的に酸化されてN-メチルアクリジニウムとなる (P. Hapiot, J. Moiroux, J. M. Saveant, J. Am. Chem. Soc., 112 (4), 1337-43(1990); N. W. Koper, S. A. Jonker, J. W. Verhoeven, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 104 (11), 296-302 (1985))。N-アルキルアクリダン化合物の化学的酸化は、ヘキサシアノ鉄(II)酸イオン (A. Sinha, T. C. Bruice, J. Am. Chem. Soc., 106 (23), 7291-2 (1984))、ある種のキノン類 (A. K. Colter, P. Plank, J. P. Bergsma, R. Lahti, A. A. Quesnal, A. G. Parsons, Can. J. Chem., 62 (9), 1780-4 (1984))、亜硫酸リチウム (O. N. Chupakhin, I. M. Sosonkin, A. I. Matern, G. N. Strogov, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 250 (4), 875-7 (1980)) によって行われてきた。N-アルキルアクリダン誘導体の酸化は、コオキシダントとなるフラビン化合物の存在下または非存在下で、電気化学的に行われてきた (W. R. Knappe, J. Pharm. Sci., 67 (3), 318-20 (1978); G. A. Digenis, S. Shakshir, M. A. Miyamoto, H. B. Kostenbauer, J. Pharm. Sci., 65 (2), 247-51 (1976))。

40

10-メチルアクリダン-9-カルボン酸のアリールおよびアルキルエステルは、強塩基性の双極中性溶媒中で自動酸化されてN-メチルアクリドンとなり、化学発光を起こす (F. McCapra, Accts. Chem. Res., 9 (6), 201-8 (1976); F. McCapra, M. Roth, D. Hysert, K. A

50

. Zaklika in Chemiluminescence and Bioluminescence, Plenum Press, New York, 1973, pp. 313-321; F. McCapra, Prog. Org. Chem., 8, 231-277 (1971); F. McCapra, Pure Appl. Chem., 24, 611-629 (1970); U.S. Patent No. 5,283,334 to McCapra)。化学発光の量子収量は、 10^{-5} から0.1の範囲で、脱離するフェノールまたはアルコールのpKaが低下するのにしたがって増大することが分かっている。また、水溶液中では、中間生成物が発光を伴わない競合反応により分解するため、量子収量が有意に低下した。カチオン界面活性剤 (CTAB) を添加すると、この競合反応が抑制されるため、見かけの光収量は130倍に増大した。

本出願の原出願となるNo.08/061,810では、酵素を用いてN-アルキルアクリダンカルボン酸誘導体およびその置換体を酸化することにより、化学発光を起こさせる方法が初めて開示されている。ペルオキシダーゼおよび過酸化物の存在下で、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体は効率的に酸化されてN-アルキルアクリドンとなるとともに、化学発光による青色光を生ずる。

b. アクリジニウムエステルの酸化による化学発光

N-アルキルアクリジニウムカルボン酸の脂肪族および芳香族エステルをアルカリ性溶液中で H_2O_2 により酸化することにより発光させる反応はよく知られている。この場合の化学発光の量子収量は0.1と高いため、生体分子に結合する反応基を持った誘導体を開発することができるようになり、アクリジニウムエステルを標識とした化学発光によるイムノアッセイやオリゴヌクレオチドプローブアッセイが多数報告されるようになってきた。

アクリジニウムエステル(AE's)を使用する場合、特にタンパク質やオリゴヌクレオチドを標識する場合には、2つ問題がある。まず第1に、加水分解の安定性が低いことである。アクリジニウムエステル抱合体は、室温またはそれよりやや高い温度で、徐々に分解が進行する。長期間保存するには、脱離基の性質にもよるが、 $-20^{\circ}C$ に保つことが必要となる。アクリジニウムエステルの第2の問題は、水などのような求核性試薬を9-部位に付加することによって自発的に擬似塩基性の中間物を生成し、これがpH値によっては発光を伴わずに分解反応を起こすことである。したがって実際に反応させる際には、アクリジニウムエステルを含む溶液のpHを、はじめは擬似塩基の生成を防ぐため低く保ち、 H_2O_2 添加後は発光を起こさせるため高くする必要がある。

N-アルキルアクリジニウムカルボン酸のアミド、チオエステル、スルホンアミドも、同様の条件で酸化されることにより、発光することが分かっている (T. Kinkel, H. Lubbers, E. Schmidt, P. Molz, H. J. Skripczyk, J. Biolumin. Chemilumin., 4, 136-139, (1989); G. Zomer, J. F. C. Stavenuiter, Anal. Chim. Acta, 227, 11-19 (1989))。しかし、このように脱離基を変えても、貯蔵安定性はわずかしが向上しない。

アクリジニウムエステルの化学発光を利用して標識を行う際に、より根本的な問題は、標識分子としてタンパク質やオリゴヌクレオチドに直接結合させると、多くても10分子程度しか結合できないということにある。発光時の量子収量 (10%) を考えると、アクリジニウムエステルで標識した試料物質は、多くても光子1個分の光しか生じないことになる。これに対し、試料物質を酵素で標識し、その発光反応を検出するにすれば、酵素の持つ触媒作用の結果、試料物質1分子当たりの発光量は数桁も高くすることができる。

イムノアッセイにおいて試料物質になるべく多くのアクリジニウムエステル分子を結合させるため、不特定の数のアクリジニウムエステルを含むリポソームと抗体との抱合体を作成する方法が採られている (S. J. Law, T. Miller, U. Piran, C. Klukas, S. Chang, J. Unger, J. Biolumin. Chemilumin., 4, 88-98, (1989))。この方法では、アクリジニウムエステルの直接標識による方法と比べ、シグナルはわずかしが増大しない。

c. ホースラディッシュペルオキシダーゼの化学発光検出

ルミノール、イソルミノールなど、アミノ基で置換した環状アシルヒドラジドは、 H_2O_2 および (ホースラディッシュペルオキシダーゼ、HRPのような) ペルオキシダーゼと塩基性環境で反応して発光する。この反応は、 H_2O_2 およびペルオキシダーゼの基本的な検出法として使われてきた。さらにその発展として、ルミノール様物質 (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) を使ったHRPによる化学発光アッ

10

20

30

40

50

セイが行われてきた (M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada, M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 193 (2), 540-5 (1993))。この化合物をイムノアッセイに利用すると、ルミノールを使った場合と比べ、検出能力が2倍になった。ペルオキシダーゼと過酸化物によって酸化されて発光する化合物としては、他にヒドロキシ基で置換したフタルヒドラジドがある (Akhavan-Tafti, U.S. Patent Application No. 965,231, 1992年10月23日出願)。本出願の原出願となるNo.08/061,810 (1993年5月17日出願)では、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応して発光する化学発光性N-アルキルアクリダンカルボン酸のエステルおよびスルホンイミドを用いて、ペルオキシダーゼの検出および各種アッセイを行う方法が開示されている。

ルミノールによる発光の光度および持続時間を向上させる手段として、様々な強化剤が用いられている。たとえば、D-ルシフェリンのようなベンゾチアゾール誘導体、p-ヨードフェノールやp-フェニルフェノールを含む種々のフェノール化合物、芳香族アミンなどである (G. Thorpe, L. Kricka, in *Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives*, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 199-208 (1987))。ここでは、フェノール化合物とは、上記のヒドロキシフェノール化合物の置換体の他、2-ナフトール、6-ブロモ-2-ナフトールなど、ペルオキシダーゼによる反応を促進することが知られている化合物を含めた、ヒドロキシ基を持つ芳香族化合物を総称するものとする。アミノ基で置換された環状アシルヒドラジドのペルオキシダーゼによる酸化発光を促進する物質としては、この他に4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール (M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada, M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 193 (2), 540-5 (1993))、U.S. Patent No.5,171,668 (Sugiyama)で開示された一群の化合物、2-ヒドロキシ-9-フルオレノン、U.S. Patent No.5,206,149 (Oyama)で開示された一群のヒドロキシ化ベンゾキサゾール誘導体などがある。環状アシルヒドラジドが過酸化物およびペルオキシダーゼによって酸化される機構は極めて複雑で、議論が大きく分れている (A. Lundin, L. Hallander, in *Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives*, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 555-558 (1987); S. Vlasenko, A. Arefyev, A. Klimov, B. Kim, E. Gorovits, A. Osipov, E. Gavrilova, A. Yegorov, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4, 164-176 (1989))。そのため、ペルオキシダーゼの触媒作用を利用した発光反応を新たに開発することが困難となっている。

d. HRPによるアッセイ

ホースラディッシュペルオキシダーゼは、ルミノールやイソルミノールの基質とした化学発光の検出による酵素イムノアッセイやDNAハイブリッド形成アッセイに広く使われるようになっている (G. H. Thorpe, L. J. Kricka, S. B. Mosely, T. P. Whitehead, *Clin. Chem.*, 31, 1335 (1985); J. A. Matthews, A. Batki, C. Hynds, L. J. Kricka, *Anal. Biochem.*, 151, 205 (1985); P. Walsh, J. Varlaro, R. Reynolds, *Nuc. Acids Res.* 20 (19), 5061-5065 (1992))。HRPの抱合によってルミノールの化学発光を強化させるためのキットも市販されている。ペルオキシダーゼによる従来の化学発光アッセイでは、極微量の酵素を検出することができないため、甲状腺ホルモンTSHなどの試料物質に対しては、極微量の検出が不可能だった。このため、より微量な酵素でも検出可能な化学発光試薬が要求されている。

e. 界面活性剤による化学発光の強化

高分子または低分子の界面活性剤により発光反応を促進する方法が従来より知られている。これは、発光体の光量子収量を増大させる、励起状態で生成される目的分子の比率を上げる、競合する副反応を抑制することによって化学発光に関与する分子の比率を上げる (McCapra, *Accts. Chem. Res.*, 9 (6), 201-8 (1976))、または触媒として働く酵素の活性を高める、などの方法により、いずれか一つまたは二つ以上の反応段階を操作することによって行われている。高分子または低分子の界面活性剤が発光反応に与える影響については、明確な、あるいは一致したパターンがあるわけではない。したがって、ある特定の反応において、界面活性剤が化学発光を強化するのかどうか、もしするならば、どの界面活性剤がそうなのかというようなことは、予測が不可能であり、実験事実の積み重ねによ

10

20

30

40

50

って明らかにする以外にない。

U.S. Patent No.5,145,772 (Voyta)では、高分子化合物の存在下で酵素による1,2-ジオキセタンの化学発光を強化する方法が開示されている。ここでは、ある種のカチオン性高分子化合物は化学発光の強化に有効であり、非イオン性高分子化合物は概して効果がなく、アニオン性高分子化合物の中では、例45に示すものが唯一発光量を有意に低下させたと述べられている。

U.S. Patent No.4,927,769 (Chang)では、過酸化水素を用いて、アルカリ性環境で界面活性剤によるアクリジニウムエステルの化学的酸化を促進する方法が開示されている。ここに記載されているアクリジニウムエステル化合物は、酵素無しで反応するという点で、本発明の化合物とは異なる。実験で使った界面活性剤(該文献の表2参照)の中では、いくつかに

ついてはわずかな反応促進効果が見られたに過ぎないことが述べられている。ホタルルシフェリンルシフェラーゼ反応に対する界面活性剤の影響に関する研究(L. J. Kricka, M. DeLuca, Arch. Biochem. Biophys., 217, 674 (1983))によると、非イオン界面活性剤による酵素活性の変化の効果として光収量が増大したとされている。また、カチオン界面活性剤の場合は、酵素阻害効果により、発光が完全に消失したという。

また、ある研究(T. Goto, H. Fukatsu, Tetrahedron. Lett., 4299 (1969))によると、ウミホタルルシフェリンの化学的酸化による発光において、発光体からの蛍光の量子収量は、カチオン、アニオンおよび非イオン界面活性剤のいずれを使った場合でも増大するが、非イオンおよびカチオン界面活性剤が化学発光を強化するのに対し、アニオン界面活性剤は強化しないことが明らかにされている。

さらに、別の研究(K. Sasamoto, Y. Ohkura, Chem. Pharm. Bull., 39 (2), 411-6 (1991))では、環状ジアシルヒドラジドのジアルキルアミノベンゾフラニル化合物の化学的酸化による発光が、カチオン界面活性剤によって強化されることが報告されている。また、アニオン界面活性剤は発光を強化しなかったが、非イオン界面活性剤は発光を低下させたという。

発明の開示

以上に述べたことから、本発明の目的は、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、生体物質および化合物を検出する上で優れた性質を持ったN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を提供し、さらにそのため改良された方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、溶液中または膜上におけるN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、ペルオキシダーゼおよび酵素抱合体を検出するための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、溶液中および表面上での核酸アッセイを行うための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、ウェスタンブロッティングでタンパク質を、サザンブロッティングやその他のDNAハイブリッド形成アッセイでDNAを検出するための改良された方法およびキットを提供することである。さらに、本発明の別の目的は、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を使って、ペルオキシダーゼの作用によって化学発光を生じさせることにより、酵素イムノアッセイでハプテン、タンパク質および抗体を検出するための改良された方法およびキットを提供することである。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明による2',6'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5a)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5aを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのED

TA、(2)前記の5aの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬 (AMERSHAM ECL, Amersham, PLC, Amersham, U.K.)とした。図1から分かるように、この条件下では、本発明による試薬(5a)は、従来技術による化合物(4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートおよびルミノール)と比較して、相対光量単位(RLU)における発光量が多い。

図2は、本発明による3',5'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5b)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5bを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5bの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図2から分かるように、本発明による試薬(5b)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が多い。

10

図3は、本発明による2',4',6'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5c)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5cを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5cの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図3から分かるように、本発明による試薬(5c)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が多い。

20

図4は、本発明による2',4',5'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5d)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5dを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5dの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図4から分かるように、本発明による試薬(5d)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が多い。

30

図5は、本発明による2',3',6'-トリフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5e)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5eを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5eの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図5から分かるように、本発明による試薬(5e)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が多い。

40

図6は、本発明によるペンタフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5f)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3

50

試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5fを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5fの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図6から分かるように、本発明による試薬(5f)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が大きい。

図7は、本発明による2',3',6'-トリフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5h)を含む試薬、アクリダンとして4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬、およびルミノールを含む市販の試薬の発光特性を比較したグラフである。3試薬は、別々に、各40 μ Lを 1.4×10^{-16} molのHRP水溶液1 μ Lと反応させた。3試薬の組成はそれぞれ、(1)0.05mMのアクリダン化合物5hを含むpH8.0、0.01Mのトリス緩衝液、0.4mMの過酸化尿素、0.1mMのp-フェニルフェノール、0.025%のTWEEN20、1mMのEDTA、(2)前記の5hの代わりに4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外はまったく同じ組成の試薬、(3)ルミノールを含む最適試薬とした。図7から分かるように、本発明による試薬(5h)は、従来技術による化合物と比較して、発光量が大きい。

図8は、本発明による試薬とルミノールを含む市販の最適試薬のHRP検出における直線性を比較したグラフである。アクリダン5eまたは5hを含む試薬および市販の試薬(AMERSHAM ECL)各40 μ Lを、別々に、所定量の酵素を含むHRP試料1Lと室温で混合した。アクリダン5eおよび5hを含む試薬については15分後の光度、ECL試薬については最大光度を測定した。図中のS-Bとは、HRP存在下でのRLUにおける化学発光シグナル(S)を、HRP不存在下でのバックグラウンドの化学発光(B)に対して補正したものである。アクリダン5eまたは5hを含む試薬の場合、ECL試薬と比べて検出感度が100倍であった。

図9A、9B、9Cは、分画したヤギ抗ヒトトランスフェリン血清・ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体を用いた、化学発光検出によるPVDF上でのヒトトランスフェリンのウェスタンブロッティングの実験結果である。ヒトトランスフェリンは、5つのスロットにそれぞれ、(1)1000pg、(2)200pg、(3)50pg、(4)20pg、(5)5pgを加えた。化学発光の検出は、ルミノールを含む市販の試薬(ECL、図9A)、アクリダンとして本出願の原出願となるNo.08/061,810で開示された4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬(図9B)、アクリダンとして本発明の5eを含む試薬(図9C)の3種類の試薬を用いて行った。プロットは14分間インキュベートした後、X-OMAT AR Xフィルムに15秒間暴露した。画像はスキャンしてデジタル信号処理により再生した。本発明によるアクリダン5eで最も優れた結果が得られた。

図10A、10B、10Cは、分画したヤギ抗ヒトトランスフェリン血清・ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体を用いた、化学発光検出によるニトロセルロース上でのヒトトランスフェリンのウェスタンブロッティングの実験結果である。ヒトトランスフェリンは、5つのスロットにそれぞれ、(1)1000pg、(2)200pg、(3)50pg、(4)20pg、(5)5pgを加えた。化学発光の検出は、ルミノールを含む市販の試薬(ECL、図10A)、アクリダンとして本出願の原出願となるNo.08/061,810で開示された4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む試薬(図10B)、アクリダンとして本発明の5eを含む試薬(図10C)の3種類の試薬を用いて行った。プロットは15分間インキュベートした後、X-OMAT AR X線フィルムに1分間暴露した。画像はスキャンしてデジタル信号処理により再生した。本発明によるアクリダン5eで最も優れた結果が得られた。

図11は、アクリダンとして5hを含む本発明による試薬と市販のTSHイムノアッセイキットとを利用し、化学発光による酵素イムノアッセイで甲状腺刺激ホルモン(TSH)を検出したときの直線性を示したグラフである。アッセイの結果では、0.003mIU/Lから4桁以上にわたって検量線が直線となっている。5分後、10分後、15分後の各ウエルにおける光度を測定したところ、測定感度はよく一致し、ともに見事な直線性を示している。図中のS-Bの意味は図8と同様である。また、参考までに、同一メーカーの比色分析法によるアッセイでは、検出限界は0.05mIU/Lであった。

10

20

30

40

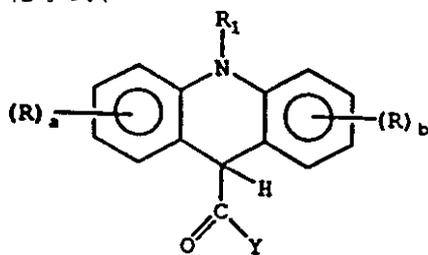
50

図12は、アクリダンとして5hを含む本発明による化学発光試薬を用い、ヒト成長ホルモン(hGH)に対して図11に示す酵素イムノアッセイを行った結果を示したグラフである。Sorin Biomedica (Vercelli, Italy)製の市販の比色分析アッセイキットを使い、検出試薬を変更した以外は添付の説明書にしたがって分析した。アッセイの結果では、検量線は直線とならなかった。図中のS-B意味は図8と同様である。

図13は、二次抗体・HRP抱合体を10倍に希釈し、同様の化学発光による酵素イムノアッセイでhGHを検出したときの直線性を示したグラフである。アッセイの結果では、0.05ng/mLから3桁以上にわたって検量線が直線となっている。2.5分後、5分後、7.5分後、10分後の光強度を測定したところ、各測定感度はよく一致し、ともに見事な直線性を示している。図中のS-Bの意味は図8と同様である。また、参考までに、同一メーカーの比色分析法によるアッセイでは、検出限界の計算値は0.05ng/mLで、結果は直線とならなかった。

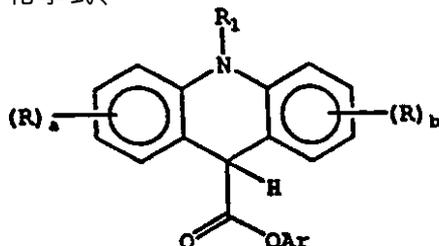
図14A、14Bは、フルオレセインで標識したv-mosプローブとホースラディッシュペルオキシダーゼ・抗フルオレセイン抱合体を使い、化学発光検出により、ナイロン上でEcoRI制限マウスゲノムDNAのサザンプロットを行った結果を示したものである。化学発光の検出は、アクリダンとして5eを含む本発明による試薬(図14A)、およびルミノールを含む市販の試薬(ECL図14B)を別々に用いて行った。プロットは22分間インキュベートした後、X-OMAT AR X線フィルムに10分間暴露した。画像はスキャンしてデジタル信号処理により再生した。本発明によるアクリダン5eで優れた結果が得られた。

発明を実施するための最良の形態
化学式、



で表され、R₁は、アルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より選択される基、Rは発光を生じさせる任意の基、aおよびbは0から4までの整数値、Yは過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光(化学発光)させる脱離基(leaving group)であることを特徴とするアクリダンをを用いた、化学発光によるペルオキシダーゼおよび過酸化物の検出方法は、本出願の原出願となるNo.08/061,810(1993年5月17日出願)で開示されている。しかし、ジハロアリアルおよびポリハロアリアルエステルの誘導体(化学式(I)においてY=OArX_n)など、ある種のアクリダン誘導体が、より優れた化学発光特性を持つことが分かってきた。

本発明は、特に、
化学式、



で表され、R₁はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より選択される基、Rは発光を生じさせる任意の基、aおよびbは0から4までの整数値、Ar-Oは脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であることを特徴とする、改良したアクリダンに関する。Ar-O基が2個以上のハロゲン置換基を含む場合に、化学発光およびアッセイにおいて予期せぬ優れた特性を発揮する。

10

20

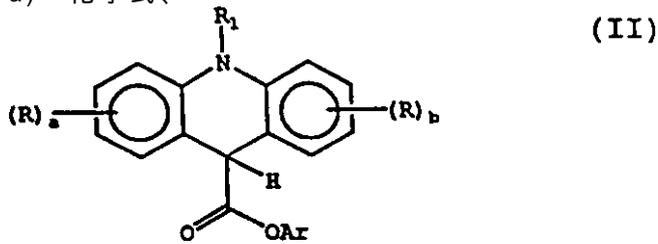
30

40

50

本発明は、ペルオキシダーゼの存在下で発光することを特徴とする、改良された試薬組成物に関するものであって、

a) 化学式、



で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であるアクリダンと、

b) 場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物と、

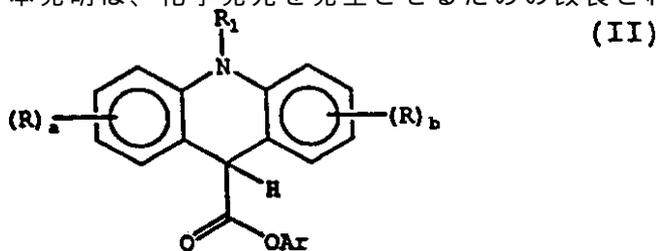
c) 該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関わる過酸化化合物と、

d) 該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、

e) 界面活性剤と、

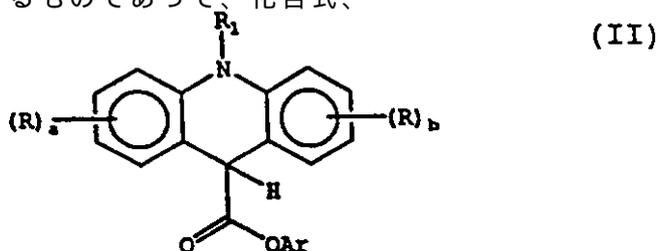
を含むことを特徴とする試薬組成物に関する。

本発明は、化学発光を発生させるための改良された方法に関するものであって、化学式、



で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であるアクリダンを、過酸化化合物およびペルオキシダーゼと反応させることを含むことを特徴とする方法に関する。

本発明はまた、ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合したもしくは結合可能な試料物質を、化学発光反応によってアッセイ法で検出するための、改良された方法に関するものであって、化学式、



で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であるアクリダンを、過酸化物およびペルオキシダーゼとの反応によって発光させることにより、該試料物質を検出することを特徴とする方法に関する。

本発明はまた、ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼと結合したもしくは結合可能な

10

20

30

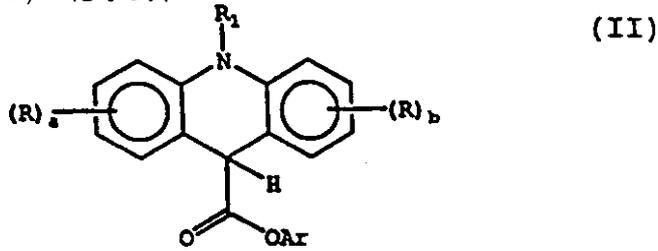
40

50

試料物質を、化学発光反応によってアッセイ法で検出するための、改良された方法に関するものであって、

ペルオキシダーゼの存在下で発光する試薬組成物であって、

a) 化学式、



10

で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であるアクリダンと、

該アクリダンと該ペルオキシダーゼとの反応に関わる過酸化化合物と、

該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物などの強化物質と、

該試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、

界面活性剤と、

20

を含む試薬を与えることと、

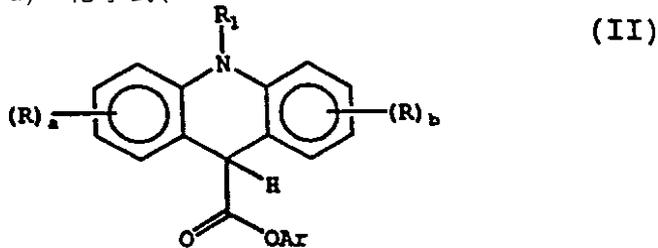
b) 該試料物質検出のため該試薬組成物にペルオキシダーゼを添加して発光させることと、

、

を含むことを特徴とする方法に関する。

本発明はまた、試料物質を化学発光反応の発光によってアッセイ法で検出するためのキットに関するものであって、

a) 化学式、



30

で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化物およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロ置換フェノキシ基から成る群より選択される基であることを特徴とするアクリダンと、

過酸化物と、

40

場合により、該アクリダンからの発光を強化するフェノール化合物などの強化物質と、

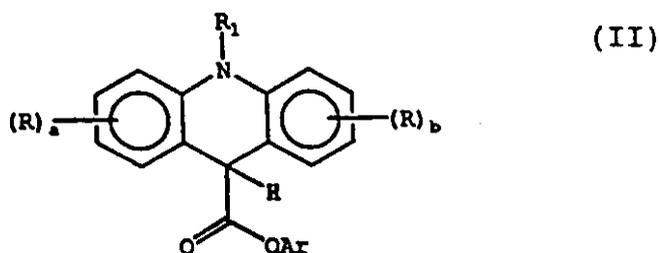
場合により、試薬組成物への該ペルオキシダーゼ添加の前に該過酸化化合物が反応するのを防ぐキレート剤と、

界面活性剤と、

b) 該試薬とペルオキシダーゼとの反応による光をアッセイ法で検出するためのペルオキシダーゼと、

を、それぞれ独立した容器に含むことを特徴とするキットに関する。

本発明はまた、過酸化水素を化学発光反応によってアッセイ法で検出するための改良された方法に関するものであって、化学式、

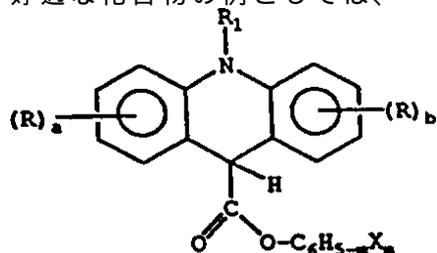


で表され、 R_1 はアルキル基、ヘテロアルキル基、アラルキル基より成る群より選択される基、 R は発光を生じさせる任意の基、 a および b は0から4までの整数値、 $Ar-O$ は脱離基で、過酸化水素およびペルオキシダーゼと反応することにより該アクリダンを発光させるジおよびポリハロゲン置換フェノキシ基から成る群より選択される基であるアクリダンを、過酸化水素およびペルオキシダーゼと反応させることを含むことを特徴とする方法に関する。

本発明は、以下の少なくともひとつにおいて優れた特性を持つ、改良されたN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体に関する。即ち、発光持続時間が長い、発光光度が高い、最大発光光度までの立ち上がりが速い、バックグラウンドの発光レベルが低い、シグナル/バックグラウンド比が高い、化学発光検出試薬の貯蔵安定性が高い、膜上での発光が強い、などである。 R 基と Ar 基の組み合わせを変えることにより、用途に応じて最適な化合物を選択することができる。特に、2個以上のハロゲン置換基を Ar 基に持つN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体は、極めて優れた発光特性を持つ。これは、 Ar 基に2個以上のハロゲン置換基が導入されると、アクリダンの脱離基の特性が良くなり、競合する非発光性の副反応を抑えることにより発光反応を促進するためと考えられる。

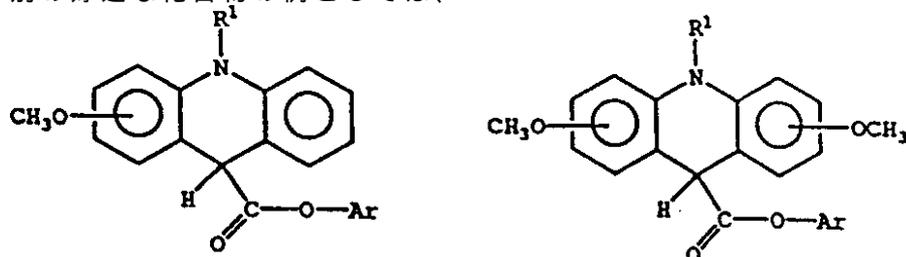
一般的に、光度の立ち上がりを速くしたい場合、または最大光度を高くしたい場合は、 $Ar-O$ -アニオンの共役酸($Ar-OH$)の pK_a が $Ph-OH$ の pK_a よりも低く(好ましくは約9.5以下)なるよう、 $O-Ar$ 基を選択するのが良い。たとえば、ハロゲン原子などの電子求引性の基には pK_a を下げる作用があるため、フェノールまたはその化合物($Ar-OH$)にこれらの置換基を導入すると、同じ pH でもイオン化しやすくなる。そのため、エステルの $O-Ar$ 基を水、水酸化物イオン、過酸アニオンなどの求核性試薬で置換するような求核性置換反応においては、より良好な脱離基として作用する傾向にある。また、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を含む化学発光試薬の貯蔵安定性を高めたい場合には、 R 基のうち少なくともひとつをアルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基などで置換すると良い。

好適な化合物の例としては、



で表される化合物であって、 X はF、Cl、Br、Iのうちから選択されるハロゲン原子、 m は2から5までの数である化合物が挙げられる。

別の好適な化合物の例としては、



で表される化合物が挙げられる。

より好適な化合物の例としては、

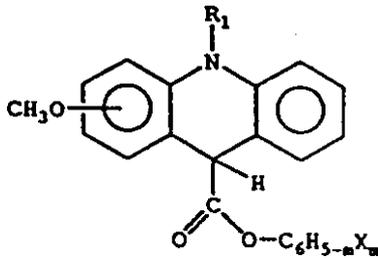
10

20

30

40

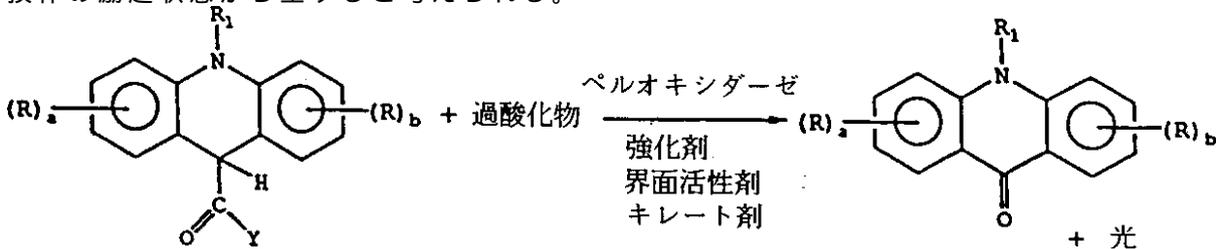
50



で表される化合物であって、XはF、Cl、Br、Iのうちから選択されるハロゲン原子、mは2から5までの数である化合物が挙げられる。

これらの他に調製および発光実験を行ったアクリダン化合物は、フェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2',6'-ジメチルフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-ヨードフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-フェニルフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、3',5'-ジカルボメトキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-(N-ブチルアミノカルボニル)フェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-メトキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2',6'-ジメトキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-アセトアミドフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-(2-(スクシンイミジルオキシカルボニル)エチル)フェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、3'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2',6'-ジヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2',3'-ジヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、2',3',5',6'-テトラフルオロ-4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、ナフチル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート、6'-ヒドロキシナフチル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートなどである。これらの化合物では、本発明による化合物ほどの効果が見られなかった。

本発明によるN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体のうち、ある種のもは、過酸化およびペルオキシダーゼと反応し、アッセイに適した化学発光特性を発揮する。この化学発光は、下記的一般反応式で示されるように、N-アルキルアクリドンまたはその置換体の励起状態から生ずると考えられる。



本発明は、ペルオキシダーゼ、過酸化化合物、および強化剤の作用によってN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体を酸化することにより、化学発光を起こすための方法に関する。本発明はまた、この方法を用いてペルオキシダーゼを高感度で検出するための方法に関する。さらに、本発明は、この方法を用いて、化学的または物理的にこの酵素に結合させた様々な生体分子を検出および定量するための方法に関する。さらに、本発明は、この方法を用いて、この酵素に結合可能な様々な生体分子を、例えば、ビオチンで標識した試料やストレプトタビジン・ペルオキシダーゼ抱合体を使って検出および定量するための方法に関する。また、フルオレセインと抗フルオレセイン、ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン、相補的配列を持つ核酸同士など、上記以外の新和性の高い一般的な物質の組を用いて、ペルオキシダーゼを試料物質に結合させることにより、本発明を適用することもできる。標識された有機分子または生体分子は、得られる化学発光の光度から直接定量することができる。この方法は、たとえば、イムノアッセイの技術によるハプテン、抗原、抗

体の検出、ウェスタンブロットティングによるタンパク質の検出、サザンブロットティングおよびノーザンブロットティングによるDNA、RNAの検出に用いることができる。さらに、この方法は、DNAの配列決定におけるDNA検出に用いることができる。さらに、この方法は、コレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ガラクトース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどの酵素が生成する過酸化水素の検出に用いることができる。したがってこの方法は、これら過酸化水素を生成する酵素の検出に用いることもできる。

本発明による反応は、緩衝液などの溶液中、またはビード、チューブ、マイクロウェルプレートもしくは膜などの固体担体の表面上で行うことにより、良好な結果が得られる。使用できる緩衝液としては、一般的な緩衝液のうち、pHを7~10程度に保つことができるものであればよく、たとえばホスフェート、ボレート、カーボネート、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が挙げられる。ただし、本発明を適用する際に具体的にどのような条件が適しているかは、たとえば、イムノアッセイ、ウェスタンブロットティング、サザンブロットティングなど、どんな用途に適用するかによって異なる。膜上での分析の場合は、使用する膜材料をキットの中に含めることもできる。

N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体が過酸化水素およびペルオキシダーゼに酸化されることにより生ずる化学発光は、高感度で検出することができる。化学発光を強化する物質でこの反応を促進すれば、さらに微量のペルオキシダーゼを測定することが可能である。この酵素を分析したい生体分子と結合させることにより、その生体分子を高感度で検出することができる。

フェノール化合物の置換体のうち、ある種のものを、単独でまたは界面活性剤とともに反応混合系に加えると、添加されたペルオキシダーゼおよび過酸化物の存在下で生ずる化学発光を強化することができる。その結果、光度が増すか、発光持続時間が伸びるか、またはその両者を併せた効果が得られる。ペルオキシダーゼの関与するその他の反応を促進し、本発明による化学発光を強化することが分かっているフェノール化合物としては、p-フェニルフェノール、p-ヨードフェノール、p-プロモフェノール、p-ヒドロキシケイ皮酸、2-ナフトール、6-プロモ-2-ナフトールがあるが、これらに限定されるわけではない。また、この他のフェノール化合物および芳香族アミン化合物が本発明の範囲に含まれることは自明である。そのような化合物には、前記のG. Thorpe, L. Kricka, in *Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives*, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 199-208 (1987); M. Ii, H. Yoshida, Y. Aramaki, H. Masuya, T. Hada, M. Terada, M. Hatanaka, Y. Ichimori, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 193 (2), 540-5 (1993); U.S. Patent Nos. 5,171,668, 5,206,149などに記載されたホタルルシフェリン、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール、p-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2-クロロ-4-フェニルフェノール、1-プロモ-2-ナフトール、1,6-ジプロモ-2-ナフトール、2-ヒドロキシ-9-フルオレノン、6-ヒドロキシベンゾキサゾール誘導体、4-ヒドロキシ-3-[3-(4-ヒドロキシフェニル)1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オンなどがある。

ペルオキシダーゼの不存在下で起こる過酸化水素とN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体の発光反応を抑制する添加剤は、本発明の有用性をさらに高めることができる。また、シクロデキストリンなどのある種の化合物、 $C_{12} \sim C_{20}$ の硫酸アルキルおよびスルホン酸アルキル、硫酸デキストラン、 $C_{12} \sim C_{20}$ のアルキルトリメチルアンモニウム塩などの界面活性剤、ポリオキシアルキレンアルキルフェノール、ポリオキシアルキレンアルコール、ポリオキシアルキレンエーテル、ポリオキシアルキレンソルビトールエステルなどの非イオン界面活性剤は、シグナル/バックグラウンド比を高めることにより、本発明を利用したアッセイでのペルオキシダーゼの検出感度を向上させることが知られている。これは、おそらくアクリダン誘導体の自動酸化による分解速度が低下することにより、ペルオキシダーゼ不存在下での(バックグラウンドでの)化学発光が減少するためであると考えられる。

10

20

30

40

50

本発明による試薬の好適な成分組成を表1に示す。

表1

アクリダン5	0.01~10mM
フェノール強化剤	0.001 ~10mM
界面活性剤	0.005 ~5%
過酸化物	0.01~10mM
キレート剤	0.01~5mM

10

本発明は、緩衝液中に

- 1) フェノール強化剤またはその塩と、
 - 2) 過酸化水素、過酸化尿素、過ホウ酸塩などの過酸化化合物と、
 - 3) 本発明によるアクリダン化合物と、
 - 4) エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸 (EGTA) およびこれらの塩などのキレート剤から成る群より選択することができるカチオン錯化剤と、
 - 5) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などのアニオン界面活性剤 (または、好ましくは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、ポリオキシエチレン化ソルビトールエステルなどの非イオン界面活性剤)、またはその他の界面活性剤と、
- を含む水溶性緩衝液に関する。

20

本発明の好適な適用例として、pH7~10の緩衝液中に、終濃度約0.01M~ 1×10^{-6} Mのp-フェニルフェノールなどのフェノール化合物、終濃度約5%~0.005% (v/v) の非イオン界面活性剤、過酸化水素などの過酸化物 (好ましくは過ホウ酸塩もしくは過酸化尿素)、終濃度約 1×10^{-3} M~ 1×10^{-5} MのEDTAなどのカチオン錯化剤を含む水溶液を、本発明によるアクリダン化合物を含む第2の溶液と混合して終濃度が約0.001M~ 1×10^{-5} Mとなるようにし、検出用試薬溶液を調製する。この溶液を、溶液中または固体担体上に付着するペルオキシダーゼと接触させる。各成分の最適濃度は、分析毎に個別に決定する必要がある。特に、最大限の発光光度を得るため、アクリダン化合物と強化剤の濃度は、状況に応じて的確に決める必要がある。検出反応は、20~40 前後の温度範囲で行うことが可能である。室温で行うのが容易であり、かつ良好な結果が得られる。

30

また、検出用試薬溶液中の酵素を除去すると、その貯蔵可能期間が大幅に長くなることが分かった。この方法にしたがって本発明による検出用試薬を保存すると、ペルオキシダーゼの作用によって生ずる化学発光の光量をより長い期間にわたって維持することができる。こうして貯蔵安定性が増すことにより、試薬や費用を削減することができる。

本発明によるN-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体および試薬の大きな利点は、ペルオキシダーゼの検出感度が高いことと、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体が加水分解に対して安定であるということである。比較実験の結果、本発明による試薬は、ルミノールおよび強化剤を含む検出試薬と比較して、HRPの検出が100倍高いことが分かった。また別の利点は、ペルオキシダーゼ濃度の測定におけるダイナミックレンジ (dynamic range) が広いことである。また、N-アルキルアクリダンカルボキシレート誘導体の別の利点は、熱安定性と光化学的安定性、および精製の容易さである。ルミノールなどのアミノアリアル環状ジアシルヒドラジドは、ペルオキシダーゼの関与する従来技術による発光反応の基質として最もよく知られているが、調製が難しいばかりでなく、高純度に維持するのが困難なため、暗所に保存するか、または使用する直前に精製する必要がある (R. A. W. Scott, L. J. Kricka, Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich, et al., Eds., pp. 237-240 (1987))。ある種のN-アルキルアク

40

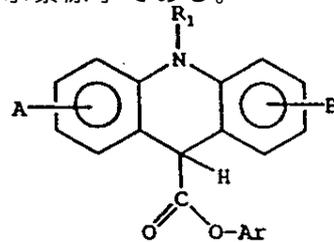
50

リダンカルボン酸誘導体を用いることによる別の利点は、従来の化合物よりも化学発光の持続時間が長いことである。持続時間が長くなることにより、反応のタイミングを厳密に調整する必要がなくなるため測定が容易になるだけでなく、フィルムによる検出方法を用いた場合には検出感度が良くなる。

実施例

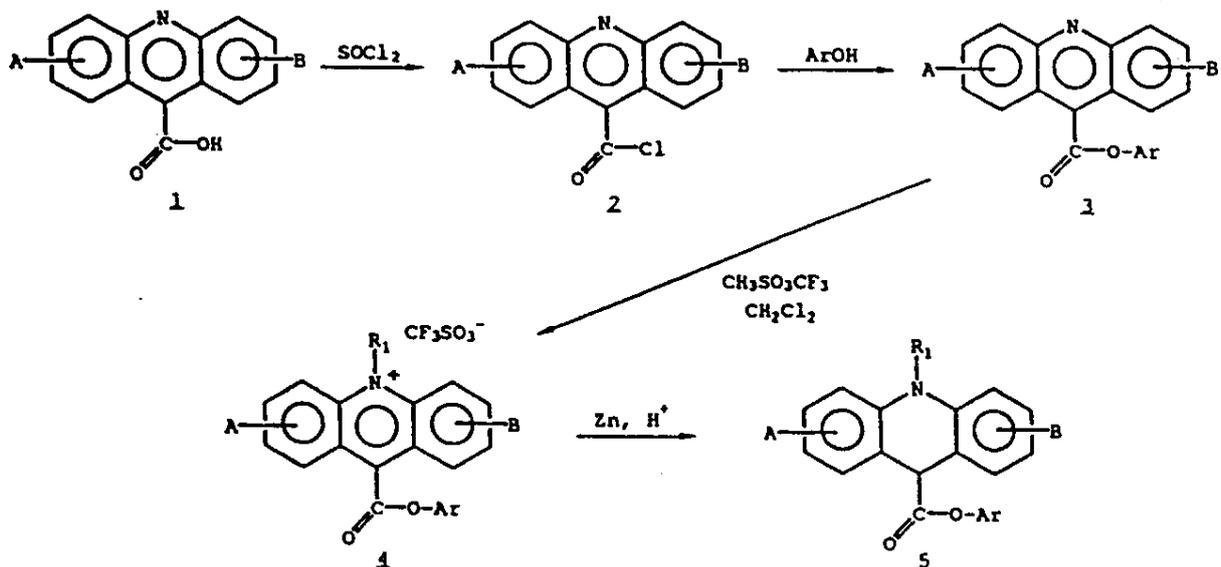
例1. アクリダン誘導体の合成

アクリダンカルボキシレート誘導体の5a~5jを反応手順1に示す方法で、相応するアクリジン-9-カルボン酸から合成した。下記の構造で、化学式(II)中の基(R) aは、置換基Aで特に示す以外は、全て水素原子であり、また、化学式(II)中の基(R) bは、置換基Bで特に示す以外は全て水素原子である。



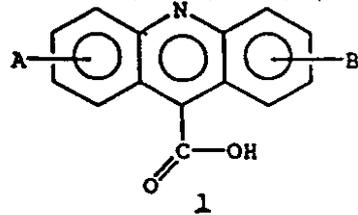
化合物	A	B	Ar
5a	H	H	2,6-ジフルオロフェニル
5b	H	H	3,5-ジフルオロフェニル
5c	H	H	2,4,6-トリクロロフェニル
5d	H	H	2,4,5-トリクロロフェニル
5e	H	H	2,3,6-トリフルオロフェニル
5f	H	H	ペンタフルオロフェニル
5g	2-OCH ₃	H	2,3,6-トリフルオロフェニル
5h	3-OCH ₃	H	2,3,6-トリフルオロフェニル
5i	3-OCH ₃	H	2,6-ジフルオロフェニル
5j	2-OCH ₃	7-OCH ₃	2,3,6-トリフルオロフェニル

反応手順1.



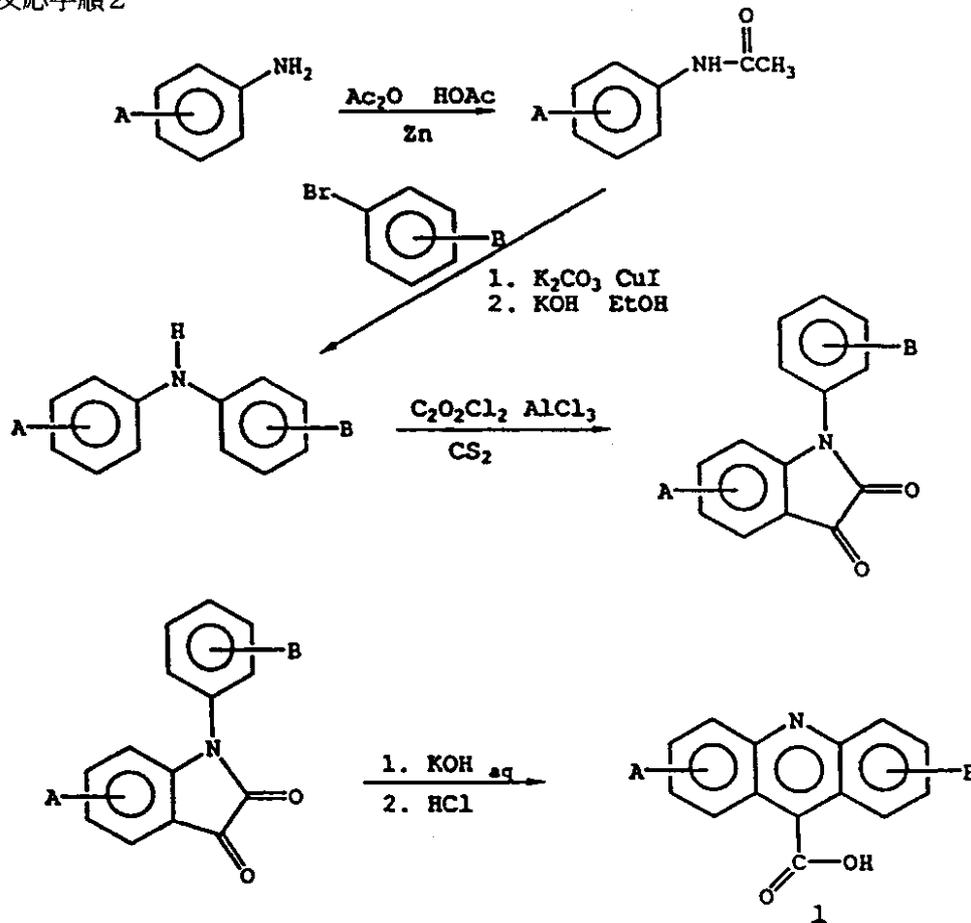
夫々対応するアクリジン-9-カルボン酸化合物1が、市販品から入手できない場合には、反

応手順2記載の反応順序で製造した。(G. Zomer, J. Stavenuiter, R. Van Den Berg, E. Jansen, In Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis, W. Baeyens, D. De Keukeleire, K. Korkidis, eds., Dekker, New York, 505-521, (1991); R. Stoll, J. Prakt. Chem., 105, 137, (1992)).



化合物	A	B
1a	H	H
1f	2-OCH ₃	H
1g	3-OCH ₃	H
1i	2-OCH ₃	7-OCH ₃

反応手順2



化合物3の一般的合成法

アクリジン-9-カルボン酸(化合物1a、オールドリッキ(Aldrich)、0.2~0.5g)を、過剰の塩化チオニル(3~10mL)に懸濁させ、反応混液を3時間還流した。溶媒を減圧下で溜去して、黄色の固体を得、これをアルゴン雰囲気下で塩化メチレンとピリジン(2~3当量)に溶解した。塩化メチレン中フェノール(1~1.5当量)の溶液を滴下した。溶液を室温で一晩

10

20

30

40

50

中撈拌し、さらに塩化メチレン(100mL)で希釈し、水(3×30mL)で洗浄した。有機相をNa₂S O₄上で乾燥し、濃縮して生成物を得た。

化合物3	化合物1	塩化チオニル	フェノール		ピリジン
a	a 0.50g	10mL	2,6-ジフルオロ-	0.32g	0.44g
b	a 0.25g	10mL	3,5-ジフルオロ-	0.16g	0.22g
c	a 0.50g	7mL	2,4,6-トリクロロ-	0.50g	0.52g
d	a 0.50g	7mL	2,4,5-トリクロロ-	0.50g	0.52g
e	a 0.50g	5mL	2,3,6-トリフルオロ-	0.365g	0.53g
f	a 0.50g	10mL	ペンタフルオロ-	0.454g	0.44g
g	g 1.20g	10mL	2,3,6-トリフルオロ-	0.80g	3mL
h	h 1.50g	10mL	2,3,6-トリフルオロ-	0.878g	0.7mL
i	h 1.70g	20mL	2,6-ジフルオロ-	1.0g	2mL
j	j 1.0g	10mL	2,3,6-トリフルオロ-	1.4g	1mL

10

化合物4の一般的合成法

化合物3(1~2mモル)をアルゴン雰囲気下で塩化メチレン(5~10mL)に溶解し、メチルトリフルオロメタンスルフォネート(5~10当量)を加えた。溶液で室温で一晩中撈拌し、薄い黄色沈殿物を得た。この沈殿物を濾過し、エーテルで洗浄し、乾燥して黄色結晶の生成物を得た。

化合物4	化合物3	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ OSO ₂ CF ₃
a	a 0.40 g	5 mL	0.945 mL 7 eq.
b	b 0.20 g	5 mL	0.472 mL 7 eq.
c	c 0.54 g	10 mL	1.5 mL 10 eq.
d	d 0.25 g	10 mL	0.70 mL 10 eq.
e	e 0.30 g	25 mL	0.95 mL 10 eq.
f	f 0.50 g	15 mL	1.0 mL 7 eq.
g	g 0.020 g	2 mL	0.10 mL 19 eq.
h	h 0.24 g	3 mL	0.10 mL 1.4 eq.
i	i 0.38 g	5 mL	1.0 mL 8.8 eq.
j	j 0.45 g	10 mL	1.0 mL 8.8 eq.

20

30

化合物5の一般的合成法(方法A)

化合物4(0.2~0.3mモル)を、無水エタノール(15~30mL)中に懸濁させ、溶液を10分間還流して、透明な溶液を得た。過剰の塩化アンモン(10~50当量)を、溶液に分割添加し、続いて亜鉛(NH₄Cl量と同当量)を添加すると、直ちに溶液が脱色された。無色の溶液を30分還流した。冷却した溶液を濾過し、沈殿物をエタノール(3×20mL)で洗浄した。溶液を濃縮し、クリーム状の固体を得、これを塩化メチレンに再溶解して、水(3×50mL)で洗浄した。塩化メチレンを蒸発して得た粗製物をシリカゲルのクロマトグラフにかけ(酢酸エチル/ヘキサン)、純粋な生成物を白色固体とて得た。

化合物5の一般的合成法(方法B)

化合物4(0.3~0.6mモル)を、氷酢酸10mL中に溶解し、黄色溶液を得、亜鉛(100当量)を加えると、直ちに溶液が脱色された。室温で5分間撈拌した後、反応混液の薄膜クロマトグラフによって、無極性物質であることが判った。酢酸をデカントし、固体を塩化メチレンで洗浄した。一緒にした有機溶液を蒸発させ、粗製の固体を得、これを塩化メチレンに再溶解し、2又は3~50mLの水で分割洗浄を行なった。塩化メチレンを蒸発させて得た粗製物をシリカゲルのクロマトグラフ(20~30%の酢酸エチル/ヘキサン)にかけ、純品を、白い固体とて得た。

40

化合物5aから5jまで、及びその中間品を下表の如く製造した。

方法	化合物5	化合物4	亜鉛	エタノール	塩化アンモン	酢酸
A	a	a 0.10g	0.65g	15 mL	0.535 g	-
B	b	b 0.20g	1.30g	-	-	10 mL
B	c	c 0.34g	3.9 g	-	-	10 mL
B	d	d 0.12g	1.4 g	-	-	10 mL
B	e	e 0.20g	2.5 g	-	-	10 mL
B	f	f 0.080g	0.4 g	-	-	5 mL
A	g	g 0.005g	0.15g	10 mL	0.15 g	-
A	h	h 0.035g	4.0g	15 mL	4.0 g	-
A	i	i 0.20g	2.0g	20 mL	2.0 g	-
A	j	j 0.17g	2.0g	50 mL	2.0 g	-

実施例1.化合物5aの合成

2',6'-ジフルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3a).

生成物をシリカゲルのクロマトグラフにかけ(30%酢酸エチル/ヘキサン)、純品をクリーム状の固体として得た。¹H NMR(CDCI₃) 7.13-7.39(m,3H), 7.68-8.35(m,8H).

2',6'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート(4a). ¹H NMR(アセトン-d₆) 5.28(s,3H), 7.44-7.68(m,3H), 8.32-9.13(m,8H).

2',6'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5a).方法A. ¹H NMR(CDCI₃) 3.49(s,3H), 5.29(s,1H), 6.82-7.10(m,7H), 7.29-7.41(m,4H).

実施例2.化合物5bの合成

3',5'-ジフルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3b). ¹H NMR(CDCI₃) 6.84-7.09(m,3H), 7.67-8.37(m,8H).

3',5'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート(4b).化合物3bを二塩化メタン中で、メチル トリフルオロメタンスルフォネートと3日間反応した。¹H NMR(アセトン-d₆) 5.25(s,3H), 7.22-7.59(m,3H), 8.32-9.09(m,8H).

3',5'-ジフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5b).方法B. ¹H NMR(CDCI₃) 3.44(s,3H), 5.16(s,1H), 6.49-6.65(m,3H), 6.99-7.36(m,8H).

実施例3.化合物5cの合成

2',4',6'-トリクロロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3c).黄色固体:¹H NMR(CDCI₃) 7.55(s,2H), 7.67-8.61(m,8H).

2',4',6'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート(4c). ¹H NMR(アセトン-d₆) 5.28(s,3H), 7.93(s,2H), 8.31-9.13(m,8H).

2',4',6'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5c).方法B. ¹H NMR(CDCI₃) 3.42(s,3H), 5.27(s,1H), 6.97-7.39(m,10H).

実施例4.化合物5dの合成

2',4',5'-トリクロロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3d).黄色固体:¹H NMR(CDCI₃) 7.63-8.34(m,10H).

2',4',5'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート(4d). ¹H NMR(アセトン-d₆) 5.26(s,3H), 8.09(s,1H), 8.26-9.11(m,9H).

2',4',5'-トリクロロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5d).方法B. ¹H NMR(CDCI₃) 3.43(s,3H), 5.23(s,1H), 6.97-7.42(m,10H).

実施例5.化合物5eの合成

2',3',6'-トリフルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3e).黄色固体を更にエーデルで洗浄し、過剰のフェノールを除去した(収率82%):¹H NMR(CDCI₃) 7.08-7.28(m,2H), 7.71-8.42(m,8H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートトリフルオロメタンスルフォネート(4e).溶解度が低い為、化合物3dは、塩化メチレン25mL中に懸濁し、常法に従って処理した。¹H NMR(アセトン-d₆) 5.29(s,3H), 7.50-7.67(m,2H),

10

20

30

40

50

8.26-9.14(m,8H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5e).方法B.
 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.44(s,3H), 5.29(s,1H), 6.76-6.84(m,2H), 6.99-7.39(m,8H).

実施例6.化合物5fの合成

ペンタフルオロフルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート(3f). $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$
) 7.70-8.35(m,8H).

ペンタフルオロフルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート トリ
 フルオロメタンスルフォネート(4f). $^1\text{H NMR}(\text{アセトン-d}_6)$ 5.29(s,3H), 8.33-9.15(m,8
 H).

ペンタフルオロフルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5f).方法B 10
 . $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.45(s,3H), 5.31(s,1H), 6.97-7.04(m,4H), 7.32-7.37(m,4H).

実施例7.化合物5gの合成

2-メトキシアクリジン-9-カルボン酸(1g). $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 3.967(s,3H), 7.22-8.30(m
 ,7H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2-メトキシアクリジン-9-カルボキシレート(3g). $^1\text{H N}$
 $\text{MR}(\text{CDCl}_3)$ 4.030(s,3H), 7.11-8.30(m,9H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2-メトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレ
 ート トリフルオロメタンスルフォネート(4g). $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 4.113(s,3H), 4.974(
 s,3H), 7.57-8.97(m,9H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート 20
 (5g).方法A. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.414(s,3H), 3.821(s,3H), 5.272(s,1H), 6.78-7.38(m,9H
).

実施例8.化合物5hの合成

3-メトキシアクリジン-9-カルボン酸(1h).ジアリアルアミンとオキサリルクロリドとの縮
 合で、3-メトキシと1-メトキシの異性体の混合物を得、これをエステルに転化の後、シリ
 カ上のカラム・クロマトグラフにより、20%酢酸エチル/ヘキサンを用いて分離した。 ^1H
 $\text{NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 4.048(s,3H), 7.47-8.24(m,7H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 3-メトキシアクリジン-9-カルボキシレート(3h). : ^1H
 $\text{NMR}(\text{CDCl}_3)$ 4.043(s,3H), 7.08-8.25(m,9H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレ 30
 ート トリフルオロメタンスルフォネート(4h). $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 4.288(s,3H), 4.837(
 s,3H), 7.64-8.89(m,9H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート
 (5h).方法A. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.422(s,3H), 3.847(s,3H), 5.25(s,1H), 6.54-7.39(m,9H)
 .

実施例9.化合物5iの合成

2',6'-ジフルオロフェニル 3-メトキシアクリジン-9-カルボキシレート(3i).3-メトキシ
 と1-メトキシの異性体の混合物を得、これをシリカ上のカラム・クロマトグラフにより、
 20%酢酸エチル/ヘキサンを用いて分離した。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 4.047(s,3H), 7.14-8.28(
 m,10H).

2',6'-ジフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート
 トリフルオロメタンスルフォネート(4i). $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 4.289(s,3H), 4.838(s,3H
), 7.52-8.89(m,10H).

2',6'-ジフルオロフェニル 3-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5i).
 方法A. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.416(s,3H), 3.843(s,3H), 5.241(s,1H), 6.53-7.39(m,10H).

実施例10.化合物5jの合成

2,7-ジメトキシアクリジン-9-カルボン酸(1j).反応手順2に記載した反応によって酸を生
 成した。但し、ジアリアルアミンとオキサリルクロリドとの縮合は二塩化メタン溶剤中
 で行った。 $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ 3.862(s,6H), 7.234-7.242(d,2H), 7.523-7.583(dd,2H), 8.1
 03-8.136(d,2H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2,7-ジメトキシアクリジン-9-カルボキシレート(3j).
 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 4.010(s,6H), 7.06-7.25(m,2H), 7.379-7.387(d,2H), 7.436-7.476(dd,2H), 8.125-8.156(d,2H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート(4j).化合物3iを、二塩化メタン中でメチルトリフルオロメタンスルフォネートと数日間反応させた。アミン塩が生成したが、反応混合物から晶出しなかった。 $^1\text{H NMR}(\text{アセトン-d}_6)$ 4.159(s,6H), 5.184(s,3H), 7.40-8.98(m,8H).

2',3',6'-トリフルオロフェニル 2,7-ジメトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート(5j).方法A. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.375(s,3H), 3.811(s,3H), 5.230(s,1H), 6.78-6.96(m,8H). 10

比較例

4'-フルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレート.(収率90%) : $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 7.21-7.47(m,4H), 7.67-8.39(m,8H).

4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート トリフルオロメタンスルフォネート.4'-フルオロフェニル アクリジン-9-カルボキシレートを二塩化メタン中でメチルトリフルオロメタンスルフォネートと3日間反応させた。 $^1\text{H NMR}(\text{アセトン-d}_6)$ 5.23(s,3H), 7.37-7.81(m,4H), 8.23-9.08(m,8H).

4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート.方法B. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 3.43(s,3H), 5.17(s,1H), 6.87-7.38(m,12H). 20

化学ルミネセンスの測定

下記の例の実験は、光の減衰についてのニュートラル密度フィルター(neutral density filter)を備えたターナー・デザインズ(Turner Designs)TD-20e(Sunnyvale, California)ルミノメーターか、又はラブシステムズ ルミノスキャン(Helsinki, Finland)ルミノメーターを用いて行なった。データの収集、解析及び表示はソフトウェアで抑制した。

実施例11. 化合物5a~f、h、従来技術のアクリダン及びルミノールによるHRPの検出に関する光度-時間分布の比較

3試薬は、別々に、各40 μL を、HRPを 1.4×10^{-16} モルを含む水溶液1 μL と反応させた。3試薬の組成は、夫々次の通りである。

(1)0.05mMのアクリダン化合物5a~f又はhを含むpH8.0のトリス緩衝液0.01M、0.4mMの尿素過酸化物、0.1mMのパラフェニルフェノール、0.025%のTween20、1mMのEDTA。 30

(2)アクリダン5a~f又はhの代わりに、先に報告したアクリダンである4'-フルオロフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートを含む以外まったく同じ組成の試薬(F. Mc Capra, Pure Appl. Chem., 24, 611-629(1970))。

(3)ルミノールを含む最適試薬(別々の容器にAmersham ECL試薬と化酸化物)。

図1~7に、この条件下で本発明のアクリダン5a~f及びhを含む試薬を使用すると、従来技術の試薬に比べて、光放射が改良されることを示す。

実施例12. 処方の最適化

pH8.0のトリス緩衝液(0.01~0.2M)中、p-ヨードフェノール(0.1~2.25mM)或いはp-フェニルフェノール(0.01~2.25mM)と、過酸化尿素(0.1~1mM)と、Tween20(0~0.6%)とを含む溶液に、アクリダン5a、5c、5e及び5h(0.1~0.05mM)を用いて、最適化の基本的な実験を行なった。 40

酵素 1.4×10^{-15} から 1.4×10^{-19} モルの範囲内で、HRPの検出につき、感度とダイナミックレンジを評価した。特に有効な試薬の組成は、pH8.0(0.01M)のトリス緩衝液中で、アクリダン(0.05mM)、p-ヨードフェノール(1.1mM)又はp-フェニルフェノール(0.1mM)、過酸化尿素物(0.4mM)、1mMのEDTA、Tween20(0.025%)からなる。これらの条件では、各アクリダン化合物に対して試験した、酵素の全範囲に亘って、HRPに関して直線的な分析結果を得た。 CaCl_2 を0.5~5 μM の範囲で含有させることにより光度は増大した。レベルが高くなるに従い、バックグラウンドの発光が増加した。

実施例13. 5e、5h、ルミノールによるHRPの検出感度の比較

本発明の試薬と、ルミノールを含む市販品の最適試薬(Amersham ECL)とを用いて、HRP検出の直線性を比較した。実施例2に記載した如く、アクダリン5e又は5hを含有する溶液40 μ Lと、市販の試薬(Amersham ECL、メーカーの指示に従って作られたもの)40 μ Lとを、酵素 1.4×10^{-15} 乃至 1.4×10^{-19} モルを含有するHRPのアリコート1 μ Lと室温で混合した。図8は、測定したHRP量の直線範囲の比較である。アクダリン5eと5hを含有する試薬からのデータは、15分の所で測定したが、ECL試薬からのデータは、光度の上昇と減速が早いいため、光度の最大の点で測定した。しかし、ECL試薬では、最大の光度に達する時間が、HRPの量によって変わるので、HRP量の測定は困難であった。S-Bとは、HRP存在下でのRLUにおける化学発光シグナル(S)をHRPが存在下でのバックグラウンド化学発光(B)で補正したものである。アクダリン5e及び5hを含有する試薬は、ECL試薬よりも100倍の検出感度が可能であった。アクダリン5e又は5hを含有する試薬を用いると、同様な感度については、より早い時間で測定できた。

10

実施例 14. 5e含有ホースラディッシュ(西洋カラシ)ペルオキシダーゼ検出試薬の安定性

検出試薬は、適宜二つの容器に貯蔵し、第一溶液は過酸化水素、フェノール強化剤、TWEEN20及びEDTAを含有する水性緩衝液を含み、第二の溶液は1対1のエタノール/p-ジオキサンのような水混和性の有機溶剤中にアクリダン化合物5を含む。この方法で貯蔵すると、試薬組成物は数か月安定である。最終検出試薬は使用前に二溶液の適量を混合して作る。本発明のアクリダンの利点は、最終検出試薬混合物の安定性が大なることである。安定性は、一定量のHRPと反応したアリコート溶液からのピーク光度を測定することによって評価した。pH8.0のトリス緩衝液0.01M中に化合物5e(0.05mM)、p-ヨードフェノール(1.1mM)、過酸化尿素(0.4mM)、TWEEN20(0.025%)、EDTA(1mM)、1.25%p-ジオキサン及び1.25%エタノールを含有する検出試薬41 μ Lと、 1.4×10^{-16} モルのHRPとを室温で反応させたもので、種々の条件で貯蔵したのから得たピークの光度(I_{max})を以下に示す。

20

化合物 **貯蔵時間(hr)** **アルゴン・パーセント** **I_{max} (rel.)**

5e	0	無	1.0
	24	無	0.2
	24	有	1.0

30

試験試薬から酸素を除去すると、5eについて、特に優れた安定性が得られた。

実施例 15. 5h含有ホースラディッシュペルオキシダーゼ検出試薬の安定性

アクリダンを5hに代えて同様な組成物での試薬を用い、同様な組み合わせの実験を行った。安定性は、一定量のHRPと反応したアリコート溶液からのピークの光度を測定することによって評価した。pH8.0のトリス緩衝液0.01M中に化合物5h(0.05mM)、p-ヨードフェノール(1.1mM)、過酸化尿素(0.4mM)、TWEEN20(0.025%)、EDTA(1mM)、1.25%パラ-ジオキサン及び1.25%エタノールを含有する検出試薬41 μ Lと、 1.4×10^{-16} モルのHRPとを室温で反応させたもので、種々の条件で貯蔵したのから得たピストンの光度(I_{max})を以下に示す。

化合物 **貯蔵時間(hr)** **アルゴン・パーセント** **I_{max} (rel.)**

5h	0	無	1.0
	24	無	1.0*
	24	有	1.0

40

アクリダン5hを含む検出試薬は、先の化合物に比して優れた安定性を示し、特別な予防手段を講じなくても、少なくとも一日は安定である。

* この溶液は、ピークの光度に上昇するまでに、上昇時間が遅かった。

実施例 16. 緩衝液のpHの影響

pH範囲7.0~9.0における0.01Mのトリスか、またはpH範囲6.0~6.5における0.01Mのリン酸

50

カリウムのいずれかを用い、実施例14の組成に従って検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬バックグラウンドに対するシグナルの最善の比は、pH7.5~8.5の範囲による試薬で得られた。

実施例17. 緩衝塩の影響

種々の緩衝溶液に置き換えた以外は、実施例14の組成に従って、検出試薬溶液を作成し、HRPと反応させた。試薬のバックグラウンドに比して有用な光り強度のレベルは、トリス塩酸(tris hydrochloride)、トリス酢酸(tris acetate)、トリス・マレート(tris malate)、燐酸カリ、ジグリシン-カセイソーダ及びトリシンの緩衝液から作成された試薬で得られた。

実施例18. 強化剤の影響

種々のフェノール系強化剤に置き換え、実施例14の組成に従って検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグラウンドに比して有用な光度レベルは、p-ヨードフェノール、p-ヒドロキシシナミックアシッド及びp-フェニルフェノールを含有する試薬で得られた。

実施例19. 過酸化物の影響

種々の過酸化物に置き換え、実施例14の組成に従って、検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグラウンドに比して有用な光度レベルは、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム及び過酸化尿素を含有する試薬で得られた。

実施例20. 界面活性剤の影響

種々の界面活性剤に置き換え、実施例14の組成に従って、検出試薬溶液を調製し、HRPと反応させた。試薬のバックグラウンドに比して有用な光度レベルは、TWEEN(20(Aldrich, Milwaukee, WI)、TRITON(X-405(Aldrich))、BRIJ 35(Aldrich)、ナトリウムドデシルサルフェート、セチルトリメチルアムモニウム プロマイド、 β -シクロデキストリン及びデキストランサルフェートを含有する試薬で得られた。

実施例21. ウェスタンブロットによる蛋白質の改良された化学発光検出法

ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体をカベルプロダクツ(Durham, NC)から得た。ヒトトランスフェリンと、分画したヤギ抗ヒトトランスフェリン血清をシグマケミカル社(St. Louis, MO)から購入した。IgGのサンプルは、2分間10,000gで遠心分離し、上澄液を免疫学的反応に使用した。ポリビニリデン ジフルオライド(PVDF)の伝達膜(transfer membrane)(IMMOBILON P)はミリポア社(Bedford, MA)から入手した。コダック(Rochester, NY)のX-OMAT ARフィルムをアッセイ法に使用した。

SDS-PAGEをラエムリ(U. K. Laemmli, Nature(London), 227, 680(1970))に記載された緩衝液システムを用いて実施した。スタッキングゲル(stack gel)は、4.38%アクリルアミド:0.12%ビスアクリルアミドとした。セパレーティングゲル(separating gel)は6.81%アクリルアミド:0.19%ビスアクリルアミドとした。電気泳動の後、ゲルは伝達緩衝液(transfer buffer)と7~8分間平衡状態にあった。その緩衝液は、20mMのトリスと153mMのグリシンと20%(v/v)メタノールとを含有するものとした。そのゲルを伝達膜のシートとクロマトグラフィー紙3MM(Whatman)のシートとの間に挟持したものをトランスファーユニット(Bio-Red Laboratories, Richmond, CA)中に設置した。ゲル中の蛋白質を、100ボルトの一定電圧下4で25分間電気溶離した。その後膜を、pH7.4のトリス-HCl緩衝液の生理的食塩水(TBS)50mM中に4で一晩中放置した。その後、膜を15分間TBSで洗浄した。

膜を、1%の無脂肪粉乳(NFM)を含有する、pH7.4のトリス-HCl緩衝液の生理的食塩水中における0.05%のTWEEN-20(T-TBS)で、室温にて1時間処理した。このブロックした膜を、1%NFMを含有するT-TBSを用い、一次抗体(ヤギ抗ヒトトランスフェリンIgGフラクションの1500分の1の希釈液)と、室温で75分間インキュベートした。

次いで、膜を濯ぎ、室温でT-TBSで5分ずつ3回洗浄した。洗浄した膜を室温で1時間、二次抗体(ウサギ抗ヤギIgGペルオキシダーゼ抱合体の50,000分の1の希釈液)と、1%NFMを含有するT-TBSを用いて、インキュベートした。膜をすすぎ、室温でT-TBSで10分ずつ4回洗浄し、更にTBSで5分洗浄した。

洗浄した膜を、4種の検出試薬の一つに5分間浸漬し、脱水して、透明なフィルムのシート

10

20

30

40

50

の間に置いた。試薬Aは、ルミノール (Amersham ECL) を含有する市販の試薬とした。試薬Bは、本出願の原出願となるNo.08/061,810に開示されたアクリダン4'-ヒドロキシフェニル 10-メチルアクリダン-9-カルボキシレート含有したものである。試薬Cは、アクリダン5eを含有したものである。15分間インキュベートした後、エックス線フィルムを種々の時間膜に暴露し、現像した。アクリダン化合物を含有する検出試薬溶液の組成は以下の通りである。

トリス緩衝液、pH8.8	0.1 M	
アクリダン	0.05 mM	
p-ヨードフェノール	1.1mM	
TWEEN 20	0.5%(v/v)	10
NaBO ₃ · 3 · 4H ₂ O	2.5 mM	
EDTA	0.5 mM	
p-ジオキサン	1.25 %	
エタノール	1.25 %	

用いたトランスフェリンの標準は、コダックのX-OMAT AR X線フィルムに15秒暴露した後、バックグラウンド上で5pg/slotまで鮮明に見ることができた。膜が光りを放射し続けたので24時間の間に膜の暴露を何回もすることができた。図9は、14分インキュベートし、15秒暴露した実験の、デジタルでスキャンしたX線フィルムの画像である。

実施例22. ニトロセルロース膜を用いたウェスタンブロットによる蛋白質の化学発光分析

ヒトトランスフェリンのウェスタンブロット分析を、PVDFの代わりにニトロセルロースで蛋白質を吸いとり、他は実施例21の方法で行った。

用いたトランスフェリンの標準は、コダックX-OMAT AR X線フィルムに1分暴露した後、バックグラウンド上で20pg/slotまで鮮明に見ることができた。膜が光りを放射し続けたので12時間の間に膜の暴露を何回もすることができた。図10は、15分インキュベートし、1分暴露した実験の、デジタルでスキャンしたX線フィルムレコードの画像である。

実施例23. TSH 酵素のイムノアッセイ

TSHアッセイを、ロツシェ(Basel, Switzerland)製のTSH用COBAS Core酵素イムノアッセイキットのコンポーネントと、本発明の検出試薬を用いて行った。検出試薬の組成は次の通りである。

トリス緩衝液pH8.0	0.01 M	
アクリダン5h	0.05 mM	
p-ヨードフェノール	1.1 mM	
TWEEN 20	0.025 % (w/w)	
過酸化尿素	0.4 mM	
EDTA	1 mM	
p-ジオキサン	1.25 %	
エタノール	1.25 %	

この試薬は予め一日前に用意することができた。提供された標準から調製されたサンプルを、分析する段階までメーカーの仕様書に従って処理した。此处で、一次抗体/TSH/二次抗体-HRPの免疫学的抱合体で被覆されたビーズを、ホワイト96 ウェルプレート(Dynatech Microlite 1)のウェル中で100μLの検出試薬で処理した。2.5分毎にラブシステムズルミノスキャン ルミノメーターで、化学発光強度を測定した。アッセイ結果は、最小の検出量が0.003mIU/Lで4桁以上に亘って直線の検量線を得た。光度をウェル毎に、5、10、15分に測定したところ、見事な直線性と一致した分析精度が得られた(図11)。図中、S-Bとは、HRP存在下でのRLUにおける化学発光シグナル(S)をHRPが不存在下でのバックグラウンド化学発光(B)で補正したものである。同一メーカーの比色分析法によるアッセイの分析精度限界は、0.05mIU/Lであった。

実施例24. ヒトの成長ホルモン酵素のイムノアッセイ

hGHアッセイを、Sorin Biomedica(Vercelli, Italy)製のhGH用サンドイッチ式酵素イム

10

20

30

40

50

ノアッセイキットのコンポーネントと、本発明の検出試薬を用いて行った。検出試薬の組成は次の通りである。

トリス緩衝液pH8.0	0.01 M
アクリダン5h	0.05 mM
p-ヨードフェノール	1.1 mM
TWEEN 20	0.025% (w/w)
過酸化尿素	0.4 mM
EDTA	1 mM
p-ジオキサン	1.25 %
エタノール	1.25 %

10

この試薬は予め一日前に用意することができた。提供された標準から調製されたサンプルを、分析する段階までメーカーの仕様書に従って処理した。免疫学的反応を完結するに当たって、結合ビオチン(bound biotin)-一次抗体/TSH/二次抗体-HRPの免疫学的抱合体と共に、ストレプトアヴィジン(streptavidin)で被覆したウェル(メーカーからの提供)を検出試薬100 μ Lで処理した。2.5分毎にラブシステムズルミノスキャン ルミノメーターで化学発光度を測定した。この結果、非直線的検量線が得られ、0.05ng/mLまでhGHの直接測定ができた(図12)。図中、S-Bとは、HRP存在下でのRLUにおける化学発光シグナル(S)をHRPが不存在下でのバックグラウンド化学発光(B)で補正したものである。

キットに供給した二次抗体-HRP接合体を、メーカー提供の希釈緩衝液で10倍に希釈する条件に代えて、アッセイを繰り返した。アッセイの結果では、表示した検出限界であるhGHの0.05ng/mLから3桁以上の大きさに亘って直線の検量線が得られた。光度を2.5、5、7.5、10分後に測定したところ、見事な直線性と一致した分析精度が得られた(図13)。比色法に関するメーカーから提供された検量データは、2桁の大きさに亘って非直線となり、検出時間も30分を要する。メーカーによるアッセイの、分析精度の計算値(シグナル>2 ブランクの標準偏差)は0.05ng/mLである。

20

実施例25. サザンプロットの化学発光検出。

マウスの遺伝子DNA(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)を、50 μ g/mLの濃度で制限酵素EcoRI(Boehringer-Mannheim)で完全に(to completion)分割した。制限したDNAをフェノール/クロロホルムで1回、クロロホルムで1回抽出して精製し、エタノールで沈澱させた。精製したDNAを、それぞれ30 μ gと15 μ gの2部分に分け0.77%のアガロースゲルの電気泳動で分離した。電気泳動の緩衝液は40mMのトリスアセテートと2mMのEDTA(pH8.0)とした。電気泳動の後、ゲルを水で濯ぎ、次いで0.25Nの塩酸に12分穏やかに攪拌しながら浸漬した。

30

マグナグラフ ナイロン(Micron Separations Inc., Westboro, MA)を続けて水と10X SSC(20X SSCは3Mの食塩と0.3Mのクエン酸ナトリウムで、pH7.0)にそれぞれ2分と10分浸漬した。ゲルを水で濯ぎ、次いで0.5MNaOH/1.5MNaClで2回、それぞれ15分と30分濯いだ。ゲルを水で濯ぎ、後1Mトリス塩酸(pH7.5)/1.5M食塩水で15分ずつ3回処理した。ゲル中のDNAを毛細管で膜に移し、10X SSCを用いて一夜プロットングした。プロットを30分風乾シ、次いで80 $^{\circ}$ Cで2時間加熱した。

0.5Nの食塩と5%のブロッキング剤(Amersham#RPN.3000)を含有するハイブリッド形成緩衝液(Amersham#RPN.3000)中で、膜を42 $^{\circ}$ Cで60分間随時攪拌しながらプレハイブリッド操作をした。ハイブリッド形成プローブのv-mos DNA(Clontech Lab. Inc.)をメーカーの仕様(Amersham#RPN.3000)に従って、HRPで標識し、0.5N食塩、5%のブロッキング剤および300ng/mLのHRPで標識したv-mos DNAを含有するハイブリッド形成緩衝液を用いて、42 $^{\circ}$ Cで一夜ハイブリッド形成を進行させた。続けて室温で、膜を0.5X SSC/0.4%SDSで、5分及び30分洗い、その後、55 $^{\circ}$ Cでそれぞれ15分、3回洗い、更に2X SSCで2回、それぞれ5分室温で洗浄した。

40

膜を水で濯ぎ、過剰の溶液を除く為、3MMのプロットングペーパー上に1分間放置し、その後きれいな容器に移し、実施例21の検出試薬を加えた。1分間インキュベートした後、過剰の溶液を除去し、プロットを透明なフィルムのシートの間に挟んで、コダックのX-OM

50

AT XAR 5のフィルムに暴露した。

図14Aに示したように、本発明の試薬を、マウスの遺伝子DNAのシングル複製遺伝子の検出に使うことができる。15 μ gのリーディングトラック(leading tracks)においてターゲットDNA70pg(7×10^{-17} モル)とすると、ターゲット制限断片は14kbである。本発明の試薬を用いれば、シグナル複製遺伝子はプロットの両方のトラックで、明瞭に目視できる。一方、ルミノール試薬ではバンドは検出されなかった(図14B)。

前記に述べたものは、本発明の例示に過ぎないものであって、本発明の請求の範囲によってのみ制限される。

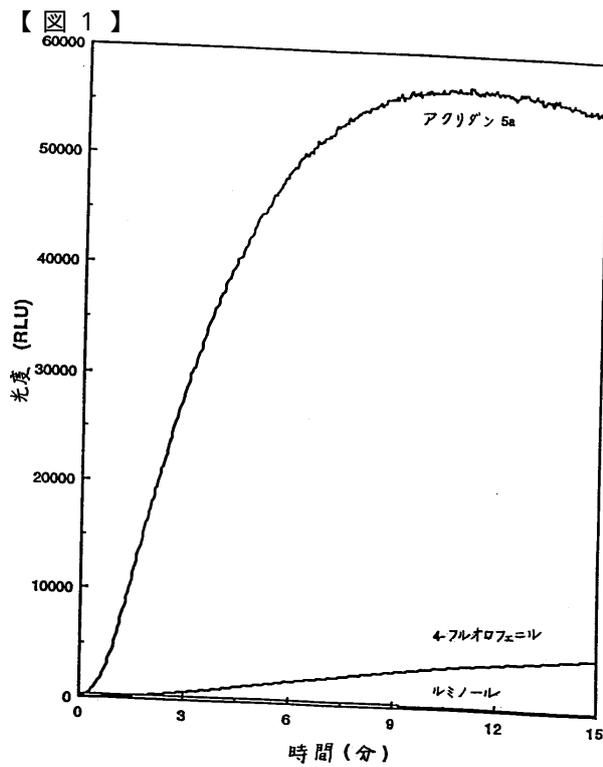


FIG. 1

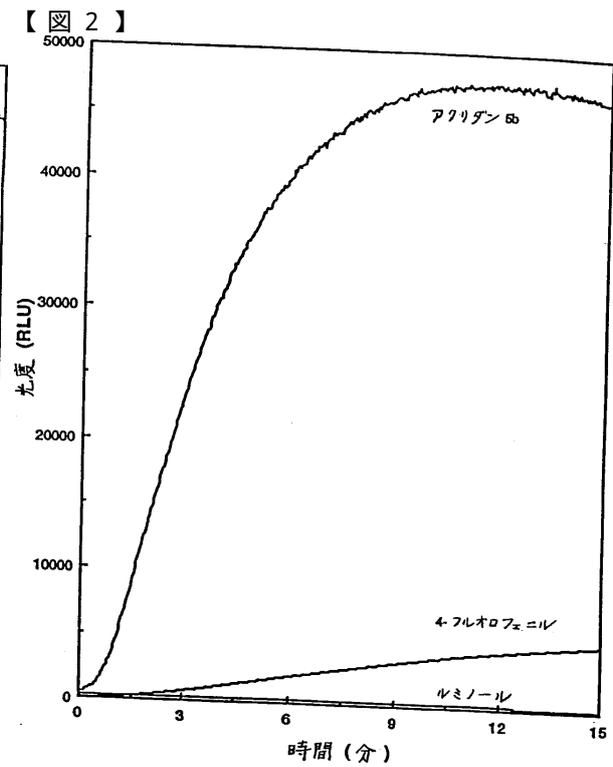


FIG. 2

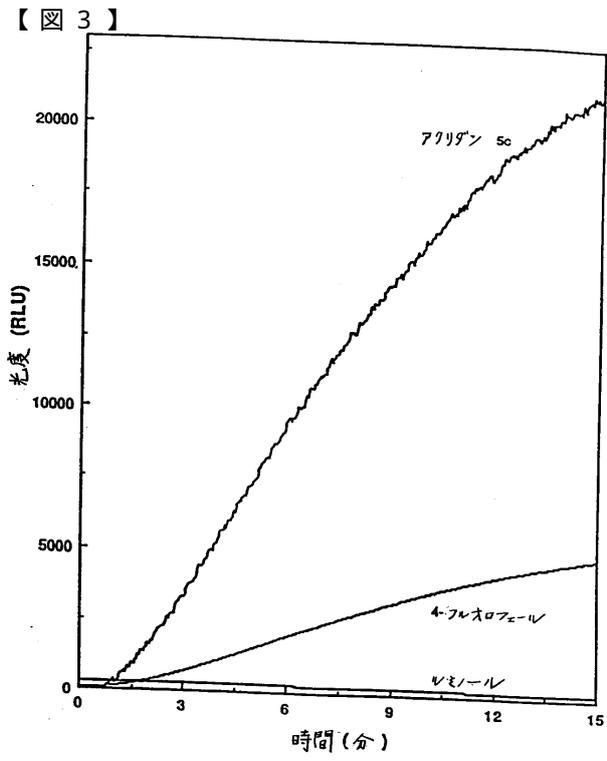


FIG. 3

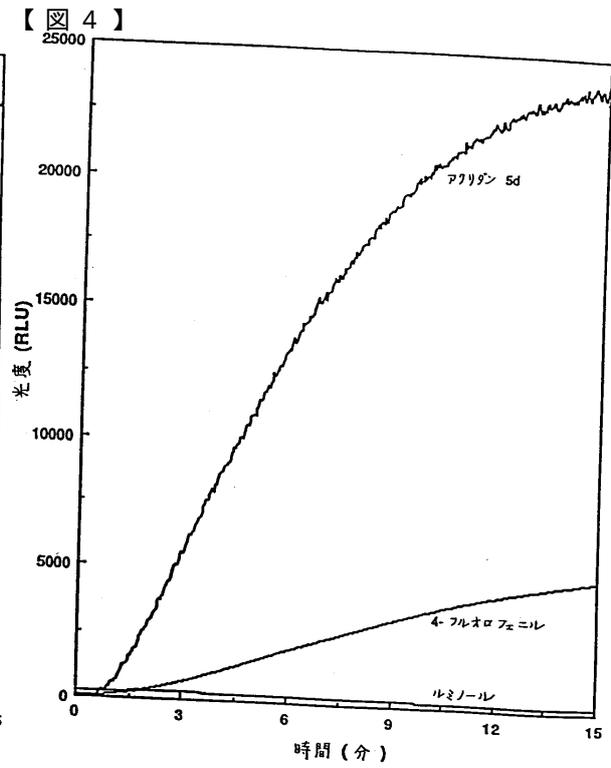


FIG. 4

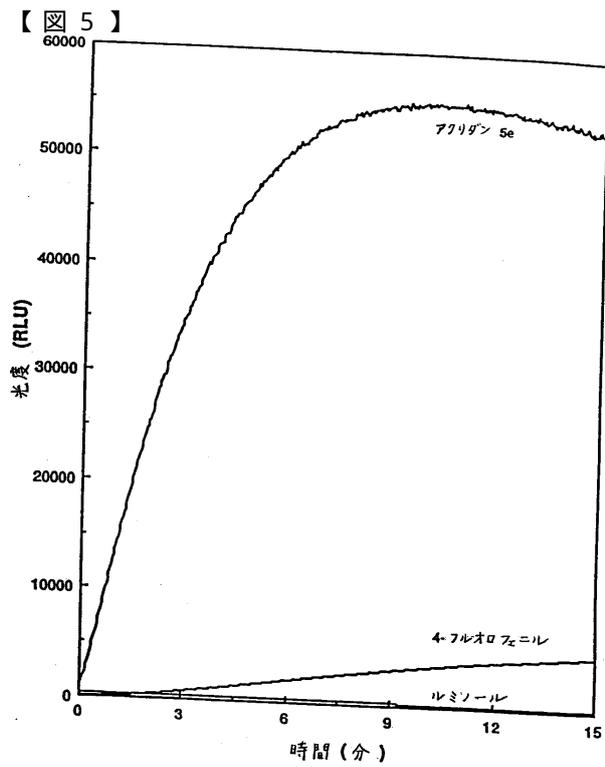


FIG. 5

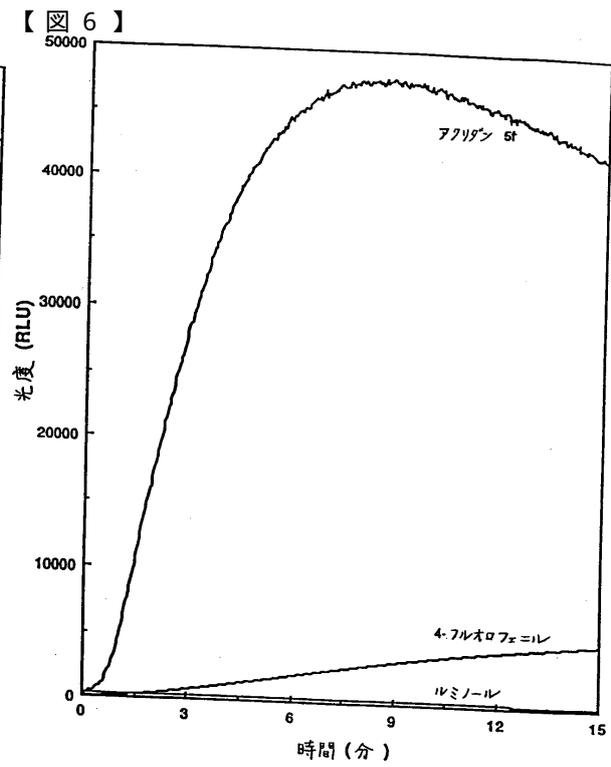


FIG. 6

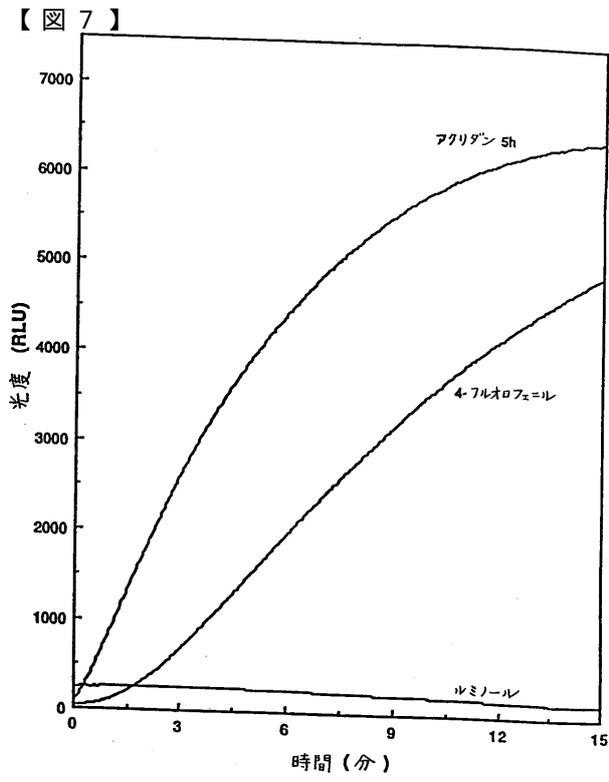


FIG. 7

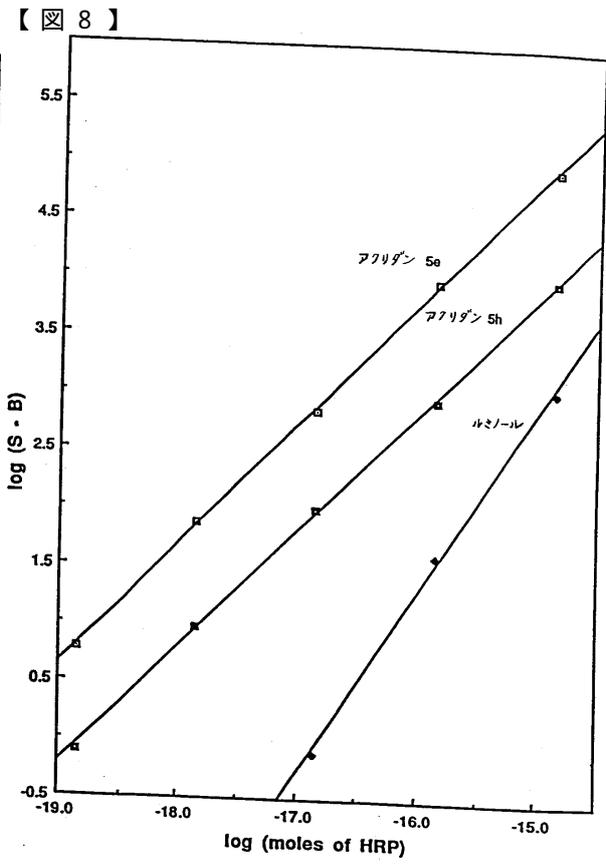
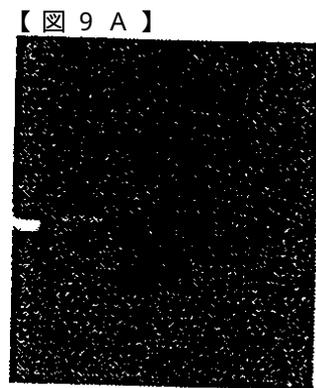
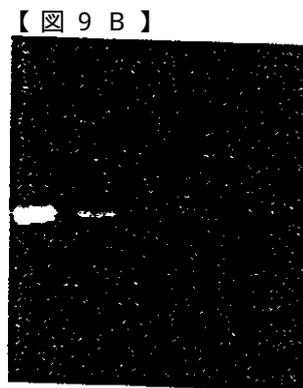


FIG. 8



1 2 3 4 5

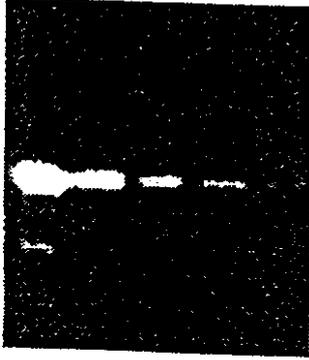
FIG. 9A



1 2 3 4 5

FIG. 9B

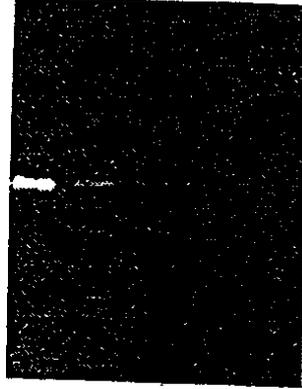
【 9 C】



1 2 3 4 5

FIG. 9C

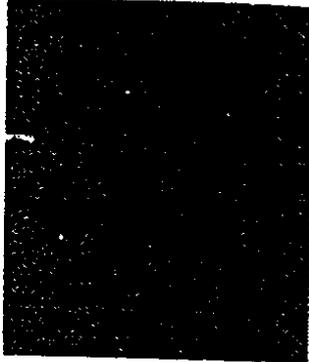
【 10 A】



1 2 3 4 5

FIG. 10A

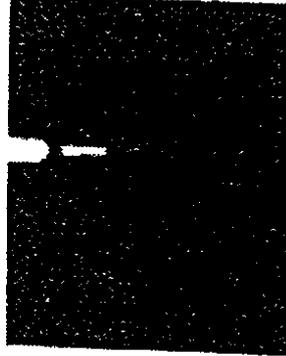
【 10 B】



1 2 3 4 5

FIG. 10B

【 10 C】



1 2 3 4 5

FIG. 10C

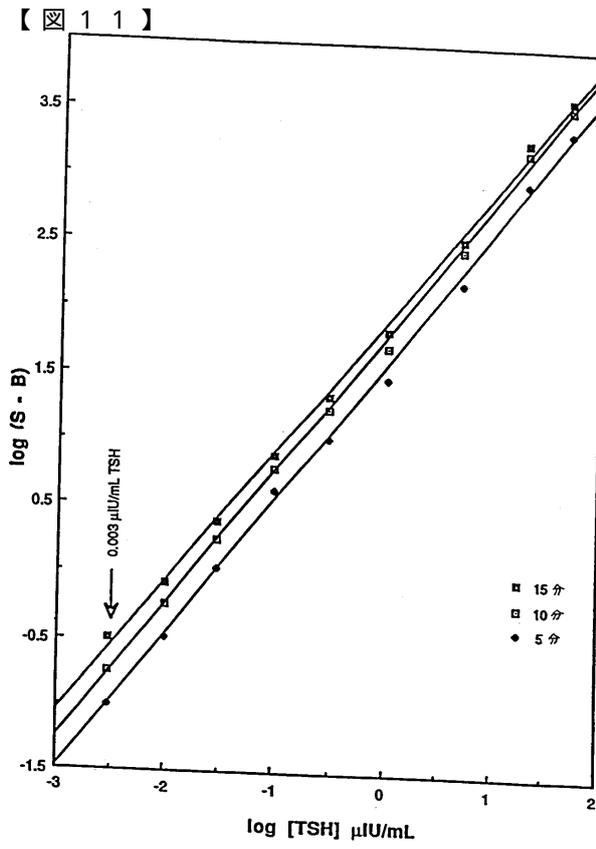


FIG. 11

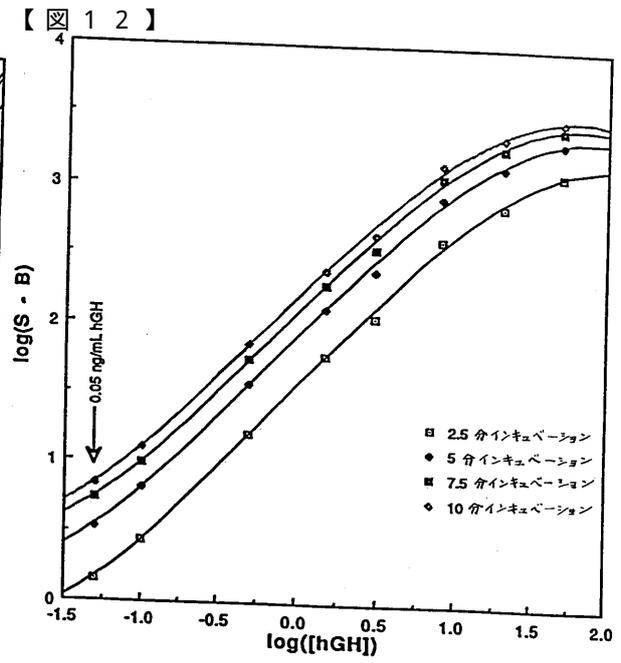


FIG. 12

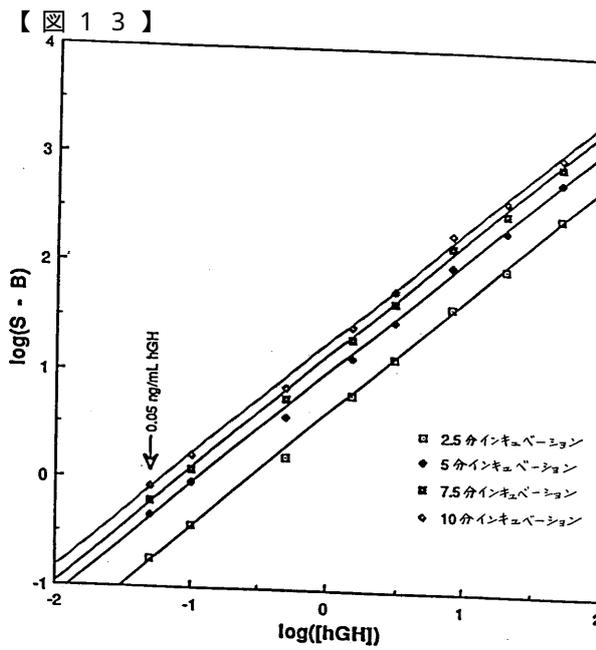
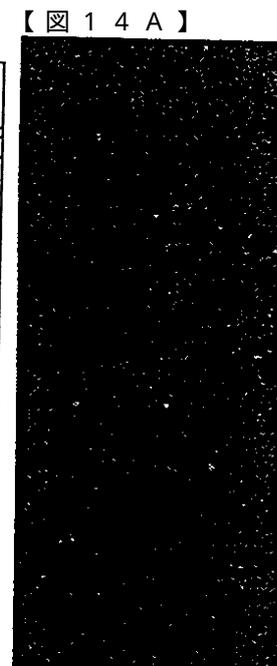
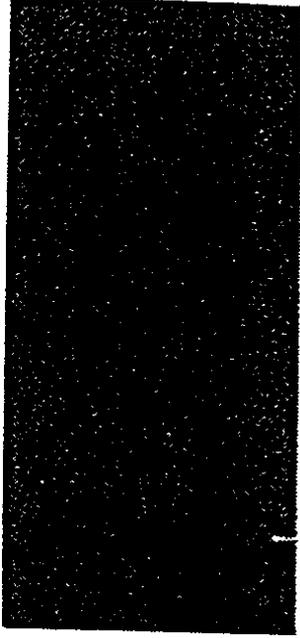


FIG. 13



1 2
FIG. 14A

【 1 4 B】



1 2
FIG. 14B

フロントページの続き

- (72)発明者 レヌカ デシルヴァ
アメリカ合衆国 ミシガン 48167 ノースヴィル デルタ ドライブ 40628
- (72)発明者 ザーラ アルガバニ
アメリカ合衆国 ミシガン 48310 スターリング ハイッ リアン ロード 33858
- (72)発明者 バリー エイ シェンフェルナー
アメリカ合衆国 ミシガン 48154 リボニア レオン 35629

審査官 新留 素子

(56)参考文献 特表平03-501772(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D219/04
C09K 11/06
G01N 21/78
G01N 33/532
G01N 33/535
CA(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)