

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-535584

(P2004-535584A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 21/76

F I

GO 1 N 21/76

テーマコード (参考)

2 GO 5 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2003-514259 (P2003-514259)	(71) 出願人	504018150 カーディオジニクス インコーポレーテッド カナダ エム9ダヴリュ 4ワイ9 オンタリオ, トロント, スカイウェイ アヴェニュー 96
(86) (22) 出願日	平成14年7月15日 (2002. 7. 15)	(74) 代理人	100064447 弁理士 岡部 正夫
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月15日 (2004. 1. 15)	(74) 代理人	100085176 弁理士 加藤 伸晃
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/001077	(74) 代理人	100106703 弁理士 産形 和央
(87) 国際公開番号	W02003/008969	(74) 代理人	100096943 弁理士 白井 伸一
(87) 国際公開日	平成15年1月30日 (2003. 1. 30)		
(31) 優先権主張番号	2, 353, 120		
(32) 優先日	平成13年7月16日 (2001. 7. 16)		
(33) 優先権主張国	カナダ (CA)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケージド化合物の開裂方法

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 ケージド化合物、すなわち化学活性または生化学活性が一般に光分解により制御されて、化学反応または生化学反応に参与する活性部分を放出する合成化学化合物を、光ではなくて電流にさらして、活性部分を放出させる。この方法は、反応を誘発する入力エネルギーと測定目的での光出力との間の混同を回避するため、測定下で分析物を定量化するために光出力を測定することが必要とされる場合に、化学発光生化学活性において特に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性部分が不活性形態で保持されているケージド化合物から該活性部分を放出する方法であって、前記ケージド化合物を高エネルギーの電流パルスにさらす工程を含む方法。

【請求項 2】

前記ケージド化合物が、該ケージド化合物を前記高エネルギーの電流パルスにさらす時点で、前記活性部分に対して化学的に活性である少なくとも 1 つの試薬も含有する電解質媒質中に溶解または懸濁される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記活性化学部分および前記少なくとも 1 つの試薬が、それらの化学反応が測定可能なシグナルを生じるように選択される請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記測定可能なシグナルが発光である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記電流が DC 電流である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 DC 電流パルスが、総エネルギー約 0.01 mJ ~ 約 15 J を供給する請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ケージド化合物が芳香環含有保護基を有する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 8】

前記ケージド化合物が、ヘテロ原子により前記活性部分に連結された 2 - ニトロベンジル基を含む請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記活性部分が、測定可能な結果を伴う化学反応を誘発するのに必要な化合物である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記活性部分が、カルシウムイオン、ATP、GTP、フルオレセイン、ビオチンまたはストレプトアビジンである請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

所定の分析物に対する生化学的結合アッセイを実施する方法であって、前記分析物を含有するか、または前記分析物を含有することが疑わしい媒質、前記分析物に対する少なくとも 1 つの特異的結合パートナー、および成分の 1 つがケージングされているシグナル発生系の他の成分の混合物を調製する工程、ケージド化合物を高エネルギー電気パルスにさらすことにより活性形態でケージド化合物から活性部分を放出させる工程、および前記シグナル発生系より発生したシグナルを測定する工程を含む方法。

【請求項 12】

前記シグナルが発光である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記電流が DC 電流である請求項 11 または 12 に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記 DC 電流パルスが、総エネルギー約 0.01 mJ ~ 約 15 J を供給する請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記分析物が、触媒の存在下でルシフェリンと反応可能な発光タンパク質に連結または結合されて化学発光を放出する請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記触媒が、前記ケージド化合物にケージングされている請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記触媒がカルシウムである請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記発光タンパク質が、貝虫類 (ostracods) または介形虫類 (cypridina) のエクオリン、オペリン、ニミオブシン、ペロピン、フォラシン、ルシフェラーゼである請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記分析物が、測定可能な結果を発生するためのルシフェラーゼ酵素に連結または結合されている請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ケージド化合物が触媒ケージド ATP である請求項 19 に記載の活性部分をケージド化合物から放出する方法。 10

【請求項 21】

前記ケージド化合物がケージドルシフェリンである請求項 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

結合アッセイのシグナル伝達メカニズムが一旦活性化されると発光をもたらす、所定の分析物に対する結合アッセイを実施する方法であって、電解質媒質中に、前記分析物を含有するかまたは前記分析物を含有することが疑わしい液体、前記分析物に対する 1 つまたは複数の特異的結合パートナー、および成分の 1 つまたは複数ケージングされている光発生シグナル伝達メカニズムの他の必須成分の混合物を調製する工程、ケージド化合物からの活性部分のアンケージングおよびそれによる光生成反応の開始をもたらす高エネルギー電気パルスに前記媒質をさらすことにより、活性形態で前記ケージド化合物から活性部分を放出する工程、および前記シグナル伝達メカニズムから放出された光シグナルを測定する工程を含む方法。 20

【請求項 23】

前記シグナル伝達メカニズムが、発光タンパク質化学発光反応による光発生である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記シグナル伝達メカニズムが、ルシフェラーゼ化学発光反応による光発生である請求項 22 に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、「ケージド化合物」(caged compounds)として知られる化学複合体、ならびに化学反応および生化学反応を開始する際におけるそれらの使用に関する。より具体的には、本発明は、ケージド化合物を開裂させて、そこから反応性の化学的成分または生化学的成分を放出させて、化学反応または生化学反応(例えば、生化学的アッセイ)において放出された活性物を利用する手順に関する。

【背景技術】

【0002】

化学基によっては、それらが光化学的に除去または破壊され得るという利便性の高い特性を有するものもある。かかる光反応性化学基は広く記述されており、各種用途で使用されている。化学反応の経過中での必須活性化学種の光発生は、一般に使用される開裂方法よりも穏やかな開裂方法を提供する。したがって、光不安定性化学基を含有する化合物は、有機反応および生体有機反応で広く使用されている。 40

【0003】

重要な試薬、例えばアデノシン三リン酸(ATP)の活性を調節または阻止し、したがってその生化学機能を妨げる光不安定性化合物を調製することができることにより、試薬の局在化された送達が可能となる。これは「化学ケージング」(chemical caging)と称されている。本質的に、光分解は瞬時にその場(in situ)で反応物 50

を放出し、反応を進行させる。

【0004】

ケージド化合物は、その生物学的活性または生化学的活性が光触媒反応により制御される合成物である。ケージド化合物は、所望の分子（「活性部分」）と適切な光除去可能な保護基すなわち「ケージング基」との共有結合により最も一般的に設計され、その結果活性部分の活性はマスキングされるか、またはケージングされる。一種の化学ケージングでは、適切な波長の光照射（光分解）時に、光不安定性結合が破壊されて、化学反応または生化学反応に参与することができる活性部分を放出し、その結果、それはすぐ周囲の媒質中で化学反応または生化学反応を開始させる。別の種類の化学ケージングでは、光不安定性結合が適切な波長を用いた光照射（光分解）時に破壊されて、化学反応の必須成分の1つの除去をもたらす活性部分を放出する。換言すると、ケージド化合物を用いた光触媒反応は、化学反応から必須成分を添加または除去することができる。

10

【0005】

「ケージド」という用語は、生物学的活性種または生化学的活性種が、より大きな化学的「フレームワーク」内部に捕捉およびマスキングされ、照射時に「放出」させることができ、したがって活性内容物をアンケージングすることができることを示すものとして利用される。「ケージド」という用語は、それは厳密に正確であるというよりは簡潔かつ視覚的であることからポピュラーになっている（Adams et al., Annu. Rev. Physiol. 55:755-784, 1993を参照）。

【0006】

化学部分をケージングおよびマスキングするために光不安定化学基を利用する重要な用途の1つは、生物学的系のプロービングである。例えば、ケージド化合物の光不安定化学基の光分解、およびそれによる酵素系に参与する活性化学部分の放出は、かかる系における生化学応答の迅速な動態または空間的不均質性を検査するための最良の技法の1つである。照射は、時期、位置および強度において容易に制御することが可能である。ケージド化合物のような不活性な光不安定性化合物を生物学的系に導入した後、それを光で非常に迅速に活性化することにより、生理学的に活性な化合物を複雑な系に導入することについて時間的および空間的制御を発揮することができる。このことは、制御された強度で、活性種の濃度の急激な変化および局在化された変化を引き起こす手段を提供する。これは、迅速な機械的混合が、例えば、多かれ少なかれ、無傷細胞、組織またはタンパク質結晶の表面上またはそれらの内部で実行不可能である場合に特に貴重である。

20

30

【0007】

ケージド化合物は、時分解ラウエ結晶解析を使用することにより、短命の酵素中間体の構造を確定するのに利用されている。高速な酵素プロセスを研究する際に、数多くの研究者等がケージド化合物を使用して、必須官能基をマスキングしており、その結果化学反応は光パルスにより開始され得る。

【0008】

化合物をケージングする際に使用される光不安定性保護基の多く（しかしすべてではない）は芳香環を含む。生化学系で有用であるためには、保護基は幾つかの要件を満たさなくてはならない。光不安定性保護基による化合物のケージングは、ケージド化合物を使用される生化学系に対して不活性なものとするべきである。光不安定性保護基は、生化学調製物にとって不利益ではない波長での光分解によって、高収率かつ十分な速度で活性化学部分を放出すべきである。さらに、活性部分以外の光産物は、系と相互作用すべきではなく、あるいは系を干渉すべきでない。今日までに報告されているほぼすべての有用なケージド生物学的分子において、活性部分を含む単純な共有結合形成が、生物学的認識に重要である幾つかの特徴をマスキングする。当該共有結合の光化学的開裂は、活性種（活性部分）または活性部分に対して変化した（通常かなり低減されたか、またはかなり増大された）親和性を有する光産物を放出する。

40

【0009】

現時の文献で最も頻繁に記載されるケージング化合物は、2-ニトロベンジル誘導体の光

50

異性化に基づいたものである。ニトロベンジル基は、ヘテロ原子、通常O、SまたはNを介した結合により活性分子に組み込まれる。広範囲な他の光不安定性保護基もまた市販されている。

【0010】

これらの光不安定性保護基すべてにおいて、光活性化プロセスは光源を必要とする。任意の適切な従来の光源を利用して、光エネルギーのパルスを送達して、光不安定性化合物をアンケーシングして活性物を放出してもよい。最も一般的には、紫外線(UV)または赤外線領域のエネルギーを放出するレーザーが使用される。光パルスの短い高流束放出は、光不安定性保護基の光除去をもたらす。また、UVスペクトル領域で放出するか、またはそれらの光出力をフィルタリングしてUV照射を送達するUVフラッシュランプは、ケージド化合物の光化学に広く応用されている。

10

【0011】

光学源の波長およびエネルギーは、ケージド化合物の特定の光不安定性結合を破壊する適切なパルスが発生するように適応されてきた。光不安定性化学基およびそれらの除去に関する最適波長の非網羅的一覧は、最近公表された(1998年) *Methods in Enzymology* Volume 291 「ケージド化合物(Caged Compounds)」に見出され得る。

【0012】

また、化学反応または生化学反応において種々の機能を媒介するケージング化合物を生産するために種々の特性を有する各種化学物および生化学物において様々な光不安定性化学基を包含することはまた、上記に引用した最近の参考文献に見出される。

20

【0013】

光不安定性保護基による化学ケージングは、アミノ酸、核酸、酵素基質、生化学反応の触媒、および親和性が照射時に変化する結合分子との結合に使用されている。生化学系で使用するためのケージド化合物形態で使用される活性部分の一般例には、カルシウムイオン、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン三リン酸(GTP)、フルオレセインおよびピオチンが挙げられる。

【0014】

生化学プロセスでのケージド化合物の使用の具体例は、イムノアッセイ、核酸結合アッセイおよび受容体結合アッセイのような生体親和性結合アッセイにおけるものである。かかる結合アッセイでは、親和性パートナーの特異的結合は、容易に測定され得る特性の変化をもたらす。変化した特性は、酵素活性またはある特定の酵素活性を生じる親和性の変化であり得る。変化した活性はまた、結合反応より前にある特定の特性の変化により測定することができる。かかる変化は、光発生、色吸光度の変化または色の発生であり得る。

30

【0015】

アビジンまたはストレプトアビジンへのピオチンの結合の親和性は、化学における最強の非共有結合の1つである。ピオチンおよびストレプトアビジンの両方が首尾よくケージングされ、それらの結合が空間的または時間的条件で制御される必要がある光分解反応で利用される。また、これらの結合パートナーの高親和性を利用するために、両分子は様々な化合物に首尾よく結合された。

【0016】

米国特許第5,981,207号では、Burbaum等は、レポーター酵素活性、および推論によって創薬のための細胞ベースのアッセイにおける試験下での化合物の活性化因子または抑制因子がモニタリングされ得る生体内(in vivo)細胞ベースのレポーター遺伝子結合アッセイ中での遺伝的に改変された細胞におけるプローブとしてのケージド酵素基質の利用について開示している。また、国際特許出願PCT/CA00/00718号では、Gawadは、ケージド化合物を利用することにより生体外(in vitro)結合アッセイをモニタリングするプロセスについて開示している。両発明において、化学発光反応は、結合アッセイに関与する活性部分のケージド化合物からの光分解放出により誘発される。生じた化学発光シグナルは収集されてモニタリングされる。かかる光不安定性反応では、結合動態は厳密に制御される。

40

50

【0017】

かかるプロセスに伴う難題は、ケージド化合物からの結合反応シグナルを開始するのに必要な活性部分の放出を誘発する光源、および化学発光反応の放出光出力を測定するための光検出システムの両方の必要性である。かかる光シグナルは互いに干渉することができ、(ケージド化合物のアンケージングを引き起こすための)誘発性光シグナルと化学発光反応から生じる放出光との間の混同を引き起こす。さらに、十分な発光が意義ある測定のために収集されるべきである場合、光入力を供給するシステムの存在下で発光を測定するのに必要な電子検出システムは複雑であり、扱いにくく、また高価である。さらに、誘発性光は、2つの異なる光シグナルを分離するための光フィルトレーションプロセスの必要性に起因して、結合アッセイの感度を減少させる。

10

【発明の開示】

【0018】

本発明の目的は、化学反応に関与することが可能な活性部分を放出するためのケージド化学化合物の開裂に関与するプロセスを実行する新規方法を提供することである。

【0019】

本発明のさらなるより具体的な目的は、発光生化学親和性アッセイを実施する新規方法を提供することである。

【0020】

全部ではないが多くのケージド化合物は、高エネルギー電流のパルスにさらされることにより活性条件で開裂されて、ケージド化学部分を放出することができることを今回見出した。本発明によれば、光分解により所望の活性部分の放出を誘発するのではなく、まったく異なる入力、すなわち高エネルギー電気パルスが使用され、その結果、活性部分がケージド化合物から放出され、続いてこの活性部分が特に光発生を包含するシグナル発生のための反応に関与する系で、活性部分を放出させるための入力は、反応からの出力と混同され得ない。このことが、より簡素な検出システムの採用へと、また光出力のより正確な測定へと導く。

20

【0021】

さらに、ケージド化合物からの活性部分の放出を誘発する方法が光パルス以外である光発生反応では、あまり複雑でない機械を用いて、反応結果の定量化の感度の増大を達成することができる。

30

【0022】

したがって、本発明の第1の態様によれば、活性部分が不活性形態で保持されているケージド化合物から該活性部分を放出する方法であって、ケージド化合物を高エネルギー電流のパルスにさらすことを含む方法が提供される。

【0023】

第2のより具体的な態様によれば、所定の分析物に対する生化学的結合アッセイを実施する方法であって、液体媒質中に、前記分析物と前記分析物に対する特定の結合パートナーとの複合物および構成成分の1つがケージングされているシグナル発生系の他の構成成分を含む混合物を調製する工程、ケージド化合物を高エネルギー電気パルスにさらすことにより活性形態でケージド化合物から活性部分を放出させる工程、およびシグナル発生系より発生されたシグナルを測定する工程を含む方法が提供される。

40

【0024】

「分析物」(analyte)は一般に使用される当該技術分野の用語であり、その存在および/または量が試験媒質中で決定されるべき標的化合物を表す。分析物は通常、反応スキームにおける必須反応物である。かかる分析物に対するアッセイでは、生体親和性または酵素触媒反応に基づいた結合反応が一般に使用される。試験下で分析物に対して特異的結合親和性を有することが知られている特異的結合パートナー、例えば適切に選択された抗体、天然ホルモン結合タンパク質、レクチン、酵素、受容体、DNA、RNAまたはペプチド核酸(PNA)、あるいは人工抗体または核酸プローブは、分析物と複合体を形成するのに使用され、それは複合体を定量化するための標識を包含する。本発明のプロセ

50

ス、すなわちケージド化合物を高エネルギー電流にさらして、ケージド化合物から活性成分を放出させることは、分析物と結合パートナーの複合体を形成するか、またはシグナル発生系を活性化するのに必要とされる活性成分のいずれかを反応媒質に提供するために適用することができる。

【0025】

第3のさらに具体的な態様によれば、所定の分析物に対する結合アッセイを実施する方法であって、結合アッセイのシグナル伝達メカニズムが一旦活性化されると、発光をもたらすことを特徴とする方法が提供される。この態様によれば、電解質媒質中に、前記分析物を含むか、または前記分析物を含むことが疑わしい液体、前記分析物に対する1つまたは複数の特異的結合パートナー、および成分の1つがケージングされている光発生シグナル伝達メカニズムの他の必須成分の混合物を調製する工程、ケージド化合物からの活性部分のアンケージングおよびそれによる光生成反応の開始をもたらす高エネルギー電気パルスに媒質をさらすことにより、活性形態でケージド化合物から活性部分を放出する工程、およびシグナル伝達メカニズムから放出された光シグナルを測定する工程を含む方法が提供される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明により使用するための高エネルギー電気パルスにさらすことに応答して活性部分の放出を受けるケージド化合物は、有機保護基および活性形態で光化学的に放出可能な活性部分を有する、文献でこれまでに報告されている実質的にすべてのものを包含する。本発明により使用するためのケージド化合物の好ましい保護基としては、2-ニトロベンジル、カルボキシ-2-ニトロベンジル、2,2'-ジニトロベンズヒドリル、1-(2-ニトロフェニル)エチル、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル、1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)エチル、5-カルボキシメトキシ-2-ニトロベンジル、((5-カルボキシメトキシ-2-ニトロベンジル)オキシ)カルボニル、臭化(1-ジアゾベンジル)ピレン、臭化N-ヒドロキシ-2-チオピリドン、臭化N-ヒドロキシスクシンイミジル、p-アジドベンゾエート、臭化p-アジドベンゾイルグリシンのN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、臭化N-ヒドロキシスクシンイミジル、(1-(2-ニトロ-4,5-ジメトキシ)フェニル-ジアゾエタン、1-(2-ニトロ)フェニル-ジアゾエタン、1-(2-ニトロ-3,4,5,6-テトラメチル-ジアゾエタン、デスオキシベンゾイニル、ヒドロキシフェナシル、6-ニトロベラトリルオキシカルボニル、6-ニトロピペロニルオキシ-カルボニル、-ジメチル-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-1,2-ジアミノエタン-N,N,N,N-四酢酸(DNMP)、および1-ピレニルメチルが挙げられる。以下にさらに論述するように、これらの保護基と本発明で使用するための好ましい基質(ATP、GTP、Caイオン等)との最良の組合せを決定するために、またそれらの開裂のための最適電流パルス特性を決定するために、幾つかのルーチンな実験が熟練操作者側に必要とされる場合がある。

20

30

【0027】

本発明のプロセスは、高エネルギー電気パルスを利用して、化学結合を破壊することにより、あるいは電気パルスを印加する前と後でのケージング分子の化学親和性の変化により、活性形態でケージド化合物から活性部分を放出させる。交流ACパルスの使用は、ケージド化合物の最も効率的な開裂を実施するために電流の周波数のきめ細かい調整を必然的に伴うため、好ましくは電気パルスは直流DCパルスである。エネルギーが光不安定性ケージング基を開裂させるのに十分大きく、化学反応の1つまたは複数の成分を破壊するほど大きくない場合、かかる問題はDC電流に直面しない。最小量の直流電流を用いて、光不安定性化学部分を開裂させる。幾つかのパラメータ、すなわち電流、電圧、および反応が実施される系の物理的パラメータ(例えば、電流を送達するための電極の形状、電解質の性質、電極の材料および反応容器の形状)がケージング化合物に送達されるエネルギーレベルを決める。これらの要因のすべてによって、光不安定性化学基に送達される電流密

40

50

度が定まる。所望の結合開裂を実施するのに供給されるべき必要なエネルギー量は、選択した結合の結合エネルギーに関連するが、電解質の性質および電解質が吸収するために光不安定性結合に到達しない印加電気エネルギー量といった要因があるので、その関係性は直接的ではない。

【0028】

本発明の好ましい実施形態において供給される総エネルギーは、約0.01mJ～約15Jである。供給されるエネルギーは、電流が送達される時間、ならびに電流強度に依存する。例えば、供給されるDC電流が高電圧(300ボルト以上)である場合、ケージド化合物を開裂させるのに必要とされるパルスの持続時間は1μ秒程度と短くてもよい。より低電圧(例えば、70ボルト)が使用される場合、1μ秒のパルス持続時間では単にケージド化合物から活性部分の一部を放出するにすぎず、ケージド化合物すべてを放出させるためにはかかる持続時間の反復パルスが必要とされる。化学反応の様々な態様を制御するために、ケージド活性部分の一部のみの放出が望ましい場合がある。より長いパルスは重大な問題を引き起こさないようである。より長いパルス(3.3秒)のための低電圧(例えば、4.8V)は実際に満足いくように使用されている。かかる低電圧およびより長い時間の使用はエネルギー損失を最低限に抑えるが、液体媒質を加熱させ得る。最適電気入力を決定するために、選択したシステムを用いた幾つかのルーチンな実験が望まれる場合があるが、かかる実験は十分に当業者の範囲内である。

10

【0029】

実際に、本発明のプロセスを実行する好ましい方法は、2つの間隔をあけて配置された電流送達電極を包含する反応セルを利用することであり、電流は電解質を通じてその電極間を通ることができる。セルは、適切な程度に、ケージド化合物を含む必要とされる反応成分全てを含有する電解質媒質で充填される。DC電流送達時に、ケージド化合物の光不安定性化学基は、所望の化学反応を開始させるのに必要な活性部分を放出する。反応成分の1つがケージド化合物である光発生化学反応では、光受容検出システムが提供されて、反応溶液からの光放出を受け入れて定量化する。

20

【0030】

所定の電圧および持続期間、すなわち所定のエネルギーレベルのパルスDC電流を供給するための適切な電気回路は、電極に接続され、そして、活性化されてケージド化合物の開裂を引き起こす。ケージド化合物の開裂を引き起こすのに入射光は使用されないため、光発生化学反応で放出された光を収集するのに、耐光性シャッターまたは濾光装置もしくははビーム分割装置のような特殊な方法は必要とされない。

30

【0031】

本発明のプロセスは、上述のように結合アッセイにおける化学反応からの発光放出を引き起こす際の有用性を示すだけでなく、ケージド化合物のアンケージングおよび化学反応の進行に必須な活性部分の放出に起因する検出可能な変化が観察される他の領域でも有用性を示す。

【0032】

さらに、本発明のプロセスは、反応系の一成分の制御された空間的または時間的送達を提供し、かかる成分の複雑な機械的送達メカニズムを設計することを不要にする。本発明のプロセスから利益を得る各種化学反応には、多くの結合アッセイが包含される。例えば、細菌に対する抗体が、固体基質に結合することができ、そして、後にケージド化合物から放出される活性成分と反応する選択された酵素に選択的に結合して、酵素活性の検出可能な変化が測定される食品中の細菌混入の測定である。

40

【0033】

本発明は、以下の具体的な実験例で、単に説明の目的でさらに記載される。

[本発明の方法の特定の実施形態]**【0034】**

本発明の方法は、反応媒質への電気パルスの送達時の化学反応の誘因である。本発明の方法を使用するための前提条件は、化学反応の開始のためにケージド化合物が存在すること

50

であり、それはケージド状態では不活性であるか、または誘因化合物を反応を活性化するのに接近しにくいものにする誘因化合物を保有する。電流パルスによる反応の活性化の本発明の方法を使用すると、化学反応は、ケージド不活性前駆体から活性化合物を放出することにより開始される。ケージド化合物は、試薬の送達のための化学的捕捉方法を提供し、これは化学試薬の物理的捕捉（例えば、リポソーム中）のような他の送達方法、あるいは機械的手段による送達より優れている。

【0035】

ある特定の化学反応は、反応の加速、反応動力学の制御により、あるいは試薬の時間精度の高い添加に必要な機械を簡素化することにより、化学反応が進行するのに必要なケージド化合物から活性化合物を放出するために電流を印加する本発明の方法から、利益を得ることができる。単純な化学反応の一般スキームは以下の通りである：

10



【0036】

Cが最終反応生成物であり、測定することができるにせよ、あるいはCがこの反応を定量化する測定可能なシグナルを発生するための別の化学反応につなげられるにせよ、本発明の方法を使用することができる。反応成分はすべて測定可能な結果に必須であり、成分のいずれかまたはすべてが光不安定性結合でケージングすることができ、適切な電気回路により供給される本発明による高エネルギー直流電気パルスにより放出させることができる。

【0037】

本発明の方法から利益を得るための反応の前提条件は、反応物すべてを一緒に混合することであり、1つまたは複数の試薬がケージングされ、反応の進行を促進しない。本発明の方法による化学反応が進行するのに必要とされる活性部分としてのケージド成分の放出は、測定可能な生成物の生産をもたらす。本発明のプロセスで供給される電気パルスの特性に応じて、反応速度が制御され得る。

20

【0038】

測定可能な結果を生じ、ケージド化合物を放出する本発明の方法から利益を得ることができる様々な化学反応の例は、光生成化学反応、例えば酵素および結果が可視的である化学反応を包含するものが挙げられる。本発明の方法から利益を得ることができる各種化学反応の具体的な実施例は以下の通りである：

30

【0039】

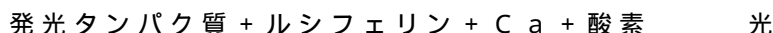
実施例1：光生成化学発光反応

数多くの化学発光反応が知られており、研究および臨床検査で利用される。化学発光反応を開始させるのに必要な1つまたは複数の化合物のケージング、および本発明の方法による必要な化合物の放出は、光発生速度および強度に関する制御、同様に活性化学化合物の放出時期に関する制御を提供する。

【0040】

例えば、発光タンパク質を使用する化学発光反応では、反応の開始は反応混合物へのCaの添加に依存する。発光タンパク質化学発光反応は、以下の方程式で説明することができる：

40



【0041】

荷電発光タンパク質（すでにルシフェリンに結合された発光タンパク質）へのCaの添加により、即時の化学反応および光発生が生じる。CaをケージドCa化合物で置換すること、および本発明の電気パルスによりケージドCaの放出を誘発することにより、化学発光反応および光発生が開始される。

【0042】

電気パルス特性に応じて、化学発光反応からの光発生は、光の単一閃光、または幾つかの閃光、あるいは本発明の方法で使用される電気パルスの特性により規定されるCa放出量に応じた固定発光であり得る。

50

【0043】

電流パルスが光不安定性ケージング化合物を変化させ、Caを放出させて発光タンパク質化学発光を誘発したことを確認するために、反応成分の1つを反応チャンバから省いた。光不安定性Caケージング化合物を反応から省いた場合、化学発光光発生は起こらなかった。発光タンパク質を省くと、化学発光光放出は起こらなかった。しかしながら、電気パルス後に発光タンパク質を添加することで化学発光光が発生する。

【0044】

さらに、このプロセスがケージング化合物の変化および反応を誘発するためのCaの放出に特異的であることを確認するために、発光タンパク質よりもCaに対して高い親和性を有する非光不安定性Caキレート剤(EDTA)を、Caケージング化合物を含むすべての他の反応成分を含有する反応セルに添加した。かかる条件下では、放出されたCaが非光不安定性Caキレート剤によりキレート化されるため、光発生は起こらない。

10

【0045】

さらに、この形態のエネルギーによる光不安定性誘発化合物のアンローディングの特異性を確認するために、Caケージング化合物の存在下の同じ化学発光反応を誘発する試みにおいて、別の形態のエネルギーを利用した。同じ電気回路により電磁石の電磁場を誘発することで光発生は生じなかった。

【0046】

発光タンパク質の例は、貝虫類および介形虫類のエクオリン、オベリン、ニミオブシン、ペロピン、フォラシン、ルシフェラーゼである。

20

【0047】

別の例である本発明の方法が有用な化学発光反応は、ルシフェラーゼを使用する化学発光反応である。光を発生するホタルルシフェラーゼ媒介性化学反応は、以下のように例示することができる：

ルシフェラーゼ + ルシフェリン + ATP + Mg + 酸素 光

【0048】

ルシフェラーゼ媒介性化学発光光発生反応中、反応の1つまたは複数の必須成分がケージド形態で存在し得る。存在する反応構成成分すべてにより、ケージド分子のアンケージングのために本発明の方法を利用することで、ルシフェラーゼ化学発光反応から光発生を誘導する。反応を誘発するための電流パルスの本発明の方法により反応を誘発することで、ケージド成分の制御された放出が起き、放出された活性部分は反応を誘発して、光発生をもたらす。制御された方式で、1つまたは複数のケージド化合物を放出するための電流パルスの調節は、モニタリングすることができる発光を生じるであろう。

30

【0049】

一般に、ルシフェラーゼ媒介性化学発光反応は、せいぜい1秒程度しか持続しないために測定およびモニタリングするのが困難である光バーストの放出をもたらす。幾つかの従来技術の特許は、1つまたは複数の補因子を反応に添加することにより光出力を変化させる方法を開示している。本発明の方法を利用することにより、ケージド化合物の放出を制御することによって、放出される光量を制御し、また発光をモニタリングするのに必要な機械を簡素化する。ルシフェラーゼ酵素の化学発光系の幾つかの成分は、ケージド形態(例えば、ルシフェラーゼ酵素自体、ルシフェリンおよびATP)ですでに市販されている。また、ケージドキレート剤を利用して、Mgをケージングすることができる。これらのほとんどがMolecular Probes(Eugene)から入手可能である。

40

【0050】

実施例2：非化学発光光放出反応

蛍光結合反応では、結合アッセイの感度は、反応が実施される媒質ならびに容器の蛍光により制限される。高い非特異的バックグラウンドシグナルは、蛍光アッセイの検出の下限を制限する。特異的シグナルの蛍光を刺激する前に反応媒質の非特異的蛍光を消去することにより、より低いバックグラウンドをもたらす、その結果検出の下限を低減させることが示唆されている。幾つかのケージド蛍光化合物がこの目的で開発された。ケージド蛍光

50

化合物が存在する媒質を照射することにより、媒質の蛍光が消去され、同時に枯渇することなくケージド蛍光化合物は維持される。そして、本発明の方法を用いた蛍光化合物のアンケージングは、放出シグナルを集めるのに必要とされる機械を簡素化するであろう。というのは、別の方法ではケージド化合物をUV光で照射する必要があり、近年の蛍光化合物の刺激スペクトルのほとんどが可視域に存在するためである。したがって、本発明の方法を利用することが、様々な検出システムの光学構成部品を単純化する。

【0051】

実施例3：色酵素反応

高エネルギー電気パルスの利用によりケージド化合物をアンローディングまたはアンケージングして、活性部分を放出させる本発明の方法は、酵素が媒介する色変化を用いた結合アッセイで使用することができる。数多くの結合反応および結合アッセイが、検討中の化学物の量を示す測定可能な色変化をもたらす酵素を利用する。これらの反応のほとんどにおいて、酵素触媒プロセスは、ある色から別の色への基質の変換をもたらす。そして、色変化量は化学物の量を示す。かかる反応中、系に1つまたは複数の成分を添加することにより反応の開始が誘発される。一般に、この工程は機械的に実施される。機械的工程を本発明の方法で置き換えることにより、測定用機械が簡素化される。

10

【0052】

本発明の方法はまた、ケージド化合物を電気パルスにより放出させることができ、かつ測定される特性が電気シグナルではない場合の結合アッセイで利用することができる。測定される出力が電気シグナルでないほとんどの生物学的系で、本発明の方法を利用して、様々なケージング化合物の光不安定性結合の開裂を誘発することができる。例えば、本発明の方法は、ケージド化合物を電気パルスにより放出させることができる細胞媒介性結合アッセイで使用することができる。この領域での応用リストは非常に幅広い。

20

【0053】

[実験結果]

本発明の方法は、幾つかの化学発光反応実験を実施することにより実証された。

【0054】

実験1

1回の実験において、総反応容積10 μ Lで、発光タンパク質化学発光反応の成分すべてを適切な電気セルに添加した(エクオリン(自然または組換え)および組換えオベリンは、0.5~6マイクログラムの量で利用した)。反応セルはまた、遊離Caレベルが発光を誘発しないような程度にCaを添加したCaケージング化合物を含んでいた。具体的には、Caケージング化合物は、Caを50%~77%の程度に加えたDNMPであった。2つの間隔を開けて配置された金属電極を適切な回路に接続して、DC電気パルスを送達した。電気パルス特性は変化して、反応からの発光がモニタリングされた。様々な金属、すなわち銀、アルミニウムおよび鋼鉄を種々の実験で使用し、また様々な異なる形状の電極(円柱状、U字形等)を使用した。種々の緩衝電解質溶液(放出された化合物に起因したpHの変化を抑えるため)を使用した。これらは、80mMのKClを有するMOPS緩衝液(pH7.4および7.2)、血清および血漿を含んでいた。実験はすべて首尾よく実行された。以下の表に結果をまとめる。

30

40

【0055】

【表1】

パルス電圧 (V)	パルス 持続時間 (S)	ピーク電流 (mA)	パルス／閃光の数
320	0.012	70	1
150	0.52	47	1
100	1.1	54	1
70	1.15	22.8	>5
63	1.1	19.5	15
60	0.52	29.6	11
50	2.4	17.6	>5
46	2.6	15.9	>8
24	2.4	40.9	>6
12	2.2	30.1	3
5	3.3	5.7	3

10

【0056】

先の実験それぞれにおいて、ある特定の電圧の電気パルスを送達するために、電極の形状および／または材料を変更したところ、発光プロフィールの特性が変化したが、すべての場合において、実験は首尾よく進行した。電解質媒質を純水で置き換えると実験は失敗した。

20

【0057】

実験2

電気パルスが光不安定性Caケージング化合物のアンローディングおよびCaの放出を誘導し、発光タンパク質の発光を誘発することを確認するために、反応成分の1つを反応から省いた。光不安定性Caケージング化合物を反応から省いた場合、化学発光光発生は起こらなかった。発光タンパク質(エクオリンまたはオベリン)を反応から省くと、化学発光光放出は同様に起こらなかった。しかしながら、ケージドCaの電気パルス後に発光タンパク質を添加することで化学発光光発生が開始された。これらの実験では、使用した総電気エネルギーは5.94Jである。

30

【0058】

実験3

さらに、このプロセスが化学発光反応を誘発するための光不安定性Caケージング化合物のアンローディングおよびCaの放出に特異的であることを確認するために、発光タンパク質よりもCaに対して高い親和性を有する非光不安定性Caキレート剤(EDTA)を、他の反応成分すべてを含有する反応セルに添加した。かかる条件下では、放出されたCaが非光不安定性Caキレート剤によりキレート化されるため、光発生は起こらなかった。この実験では、使用した電気エネルギーは5.94Jであった。

40

【0059】

実験4

この形態のエネルギーに対する光不安定性化合物の破壊の特異性を確認するために、化学発光を発生するのに使用される同じ電気回路によりパルス電磁石から磁場を発生させた。電磁場パルスの場合では、光発生は起こらなかった。

【0060】

実験5

本発明の方法を使用する化学発光反応からの光発生は、その持続時間ならびに強度に関して電気パルスの特性に依存する。この依存性を実証するために、異なる電気回路を使用した。電気コンデンサの速い放電に依存する電気回路を使用して、本発明の方法により化学発光反応の光を発生させた。100~330ボルトの電圧値および1~220μFの静電

50

容量を有するコンデンサを利用した。コンデンサ放電の電気パルス形状が、閃光または放出の特性および周波数を決める。さらに、別種の電気回路を使用して、本発明の方法を実証した。3 ~ 150 Vの出力電圧およびある特定の電圧が印加されたパルス持続時間を制御するためのスイッチング回路を伴うAD電源を使用して、発光タンパク質エクオリンおよびオベリンの化学発光の光発生を誘発した。先の表に列挙したような特徴を有する種々の電気パルスを印加することにより、発光の誘発が生じた。さらに、必要とされる特性に満たない直流電気パルスの印加は、同じ電気セルにおける同じ反応から光を発生しなかった。幾つかのパルスは発光前に印加されなくてはならなかった。

【0061】

実験6：

本発明の方法はまた、他のケージド試薬を使用する化学発光反応から発光を誘発するのに使用された。ルシフェラーゼの化学発光反応の発光は、反応を誘発するのに必要とされる様々なケージド化合物を用いて利用された。典型的なホタルルシフェラーゼ化学発光反応は、酸素の存在下で以下の必須成分、すなわちルシフェラーゼ酵素、ルシフェリン、マグネシウムおよびATPのすべてを必要とし、以下の反応に従って光を発生する：

ルシフェラーゼ + D - ルシフェリン + ATP + Mg⁺⁺ → 酸化ルシフェリン + ピロリン酸塩 + CO₂ + 光

【0062】

本発明の方法の有用性は、反応成分の1つがケージングされている先のルシフェラーゼ化学発光反応を実施することにより実証された。必要な電気パルスを送達すると、ケージド化合物はアンケージングされて、活性化合物の即時の放出および光発生を誘発を引き起こす。

【0063】

ケージドATPを利用して、電流パルスにより光発生を誘発する本発明の方法を実証した。ケージドATPはルシフェラーゼ化学発光の活性基質ではないが、ルシフェラーゼ反応にとっての基質として作用する機能性ATPは、本発明の方法により送達することができた。

【0064】

総反応容積12 μLで、以下のものを適切な電気反応セル中で混合する：ルシフェラーゼ/D - ルシフェリンの溶液ミックス(6 μL)、5 mMのPBS中のクエン酸Mg(3 μL)、ケージドATP溶液(3 μL)。電極を電源回路に接続して、電気パルスを誘発し、ATPをアンケージングして、光発生を開始させた。様々な電圧およびパルス持続時間を利用した。これらの実験条件下で、本発明の方法の使用は、ルシフェラーゼ化学発光反応から光発生をもたらした。

【0065】

また、電気パルス形状が調節される限りは、本発明の方法が様々なケージド化合物とともに使用することができることを実証するために、ルシフェラーゼ化学発光反応で使用される別のケージド化合物を利用した。この実験では、ケージドD - ルシフェリンを利用して、反応動力学を制御した。機能性D - ルシフェリンは、反応成分を電気パルスに暴露して、ケージドD - ルシフェリンから反応に送られた。

【0066】

総反応容積25 μLで、以下の成分を適切な電気セルに溶液として添加した：ルシフェラーゼ溶液(10 μL)、5 mMのPBS中のクエン酸Mg(5 μL)、1 mMのATP溶液(5 μL)およびケージドD - ルシフェリン溶液(5 μL)。適切な電気回路をセルに接続して、電気パルスを送った。電気パルスを送ると、ケージド化合物は、ルシフェラーゼ化学発光反応の光発生を誘発するのに必要とされる活性成分を放出した。2つのケージド化合物、すなわちケージドATPおよびケージドD - ルシフェリンを用いたルシフェラーゼ化学発光反応の両方の実験結果を以下にまとめる：

【0067】

【表2】

10

20

30

40

50

パルス電圧 (V)	パルス 持続時間 (S)	ピーク電流 (mA)	パルス／閃光の数
350	0.184	40.9	1
100	0.300	32.2	1
50	1.1	29.3	1

【 0 0 6 8 】

ルシフェラーゼ化学発光のこれらの実験では、様々な電圧での電気コンデンサの放電に依存する電気回路を使用した。50～350ボルトの電圧値および10～150 μ Fの静電容量のコンデンサを利用して、電気パルス形状を変化させた。発光が反応から開始する前に約0.5秒のタイムラグが必要とされることが観察された。光発生は瞬時に開始するが、実質的な酵素活性化反応の前に、ケージド化合物から放出される活性誘因化合物の量が蓄積する必要があり、それによって光発生が観察できたと仮定された。

10

【 0 0 6 9 】

試薬：

- DM-EDTA (1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-1,2-ジアミノエタン-N,N,N,N-四酢酸)、Molecular Probes, Eugene, OR, USA (カタログ番号D-6814)。
- 組換えエクオリン、Aqualite、Molecular Probes, Eugene, OR, USA (カタログ番号A-6785)。
- 自然エクオリン、Friday Harbor Photoproteins, Friday Harbor, WA, USA。
- 組換えオベリン、curtsey of Dr. Eugene Vysotski, Dept. of Biochemistry, University of Georgia, Georgia, USA。
- 凍結乾燥したルシフェラーゼ/D-ルシフェリンの混合物を、トリシン再構成緩衝液 [NaOHでpH7.8に調節した50mMのN-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン、ロット1418]に溶解した。両方とも、アッセイキットとしてKikkomanにより提供された。(CheckLite HS Plus, カタログ番号60342)。
- NaOHで調節したpH7.8のトリシン緩衝液 [50mMのN-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン]に溶解したルシフェラーゼ酵素、Kikkomanにより提供、カタログでLUC T。
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4)中の5mMのクエン酸Mg溶液。
- メタノール中のケージドATP、300 μ L中5mg (Molecular Probes, Eugene, OR, USA、カタログ番号A-1049)。
- ジメチルスルホキシド (DMSO) 300 μ L中に溶解したケージドD-ルシフェリン5mg (Molecular Probes, Eugene, OR, USA、カタログ番号L-7085)。
- 100mMのATP溶液、pH7.5 (Amersham Pharmacia、カタログ番号272056)。

20

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008969 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/531, C12Q 1/66
- (21) International Application Number: PCT/CA02/01077
- (22) International Filing Date: 15 July 2002 (15.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 2,353,120 16 July 2001 (16.07.2001) CA
- (71) Applicant (for all designated States except US): CAR-
DIOGENICS INC. [CA/CA]: 96 Skyway Avenue,
Toronto, Ontario M9W 4Y9 (CA).
- (72) Inventor: and
- (73) Inventor/Applicant (for US only): GAWAD, Yahia, A.
[CA/CA]: Apartment 1110, 2121 Rathburn Road East,
Mississauga, Ontario L4W 2X3 (CA).
- (74) Agent: HIRONS, Robert, G.; Ridout & Maybee LLP,
Suite 2400, One Queen Street East, Toronto, Ontario M5C
3B1 (CA).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/008969 A1

(54) Title: CAGED COMPOUND CLEAVING PROCESS

(57) Abstract: Caged compounds, i.e. synthetic chemical compounds whose chemical or biochemical activity is normally controlled by photolysis to release an active moiety to participate in a chemical or biochemical reaction, are subjected to electrical current instead of light to release the active moiety. The process is especially useful in chemiluminescent biochemical assays, where it is required to measure the light output in order to quantify the analyte under measurement, since avoids confusion between input energy to trigger the reaction, and light output for measurement purposes.

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-1-

CAGED COMPOUND CLEAVING PROCESS**FIELD OF THE INVENTION**

5 This invention relates to chemical complexes known as "caged compounds", and their use in initiating chemical and biochemical reactions. More specifically, it relates to procedures for cleaving caged compounds to release active chemical or biochemical components therefrom, and utilizing the released active entity in chemical or biochemical reactions such as biochemical assays.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION AND PRIOR ART

Several chemical groups have the convenient property that they can be removed or destroyed photochemically. Such photolabile chemical groups have been widely described and have been used in various applications. The photogeneration of an essential active chemical species in the course of a chemical reaction offers a milder method of cleavage than normally employed. As such, compounds containing photolabile chemical groups have been widely employed in organic and bioorganic reactions.

20

The ability to prepare photolabile compounds that modulate or block the activity of a critical reagent, for example adenosine triphosphate (ATP), and thus prevent its biochemical function allows localized delivery of reagent. This has been termed "chemical caging". Essentially, photolysis instantaneously releases the reactant *in situ* allowing the reaction to proceed.

25

Caged compounds are synthetic entities whose biological or biochemical activity is controlled by photocatalytic reaction. Caged compounds are most commonly designed by covalently coupling of a desired molecule (the "active moiety") with a suitable photoremovable protecting or "caging" group such that the activity of the active moiety is masked or caged. In one kind of chemical caging, on photoirradiation

30

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-2-

- (photolysis) of appropriate wavelength, the photolabile bond is broken releasing an active moiety that could participate in a chemical or biochemical reaction such that it initiates the chemical or biochemical reaction in the immediate surrounding medium. In another kind of chemical caging, the photolabile bond is broken upon
- 5 photoradiation (photolysis) with the appropriate wavelength, releasing an active moiety that results in removal of one of the essential components of a chemical reaction. In other words, photocatalytic reactions employing caged compounds could either add or remove one essential component from a chemical reaction.
- 10 The term "caged" is utilized as an indication that a biologically or biochemically active species is trapped and masked inside a larger chemical "framework", and can be "released" upon illumination, thus uncaging the active content. The term "caged" has become popular because it is brief and pictorial, rather than being strictly accurate (see Adams et al., *Annu. Rev. Physiol.* 55: 755-784, 1993).
- 15 One important application that utilizes photolabile chemical groups to cage and mask chemical moieties is the probing of biological systems. For example, photolysis of photolabile chemical groups of caged compounds and the consequent release of active chemical moieties involved in enzyme systems is one of the best techniques to
- 20 examine the fast kinetics or spatial heterogeneity of biochemical responses in such systems. Illumination can be easily controlled in timing, location and amplitude. One can exert temporal and spatial control over the introduction of physiologically active compounds into complex systems, by introducing an inert photolabile compound such as a caged compound into the biological system and then activating it very rapidly with
- 25 light. This provides a means of causing abrupt and localized changes in concentration of active species, in controlled amplitudes. This is particularly valuable when rapid mechanical mixing is impractical, for example on the surface of or inside a more or less intact cell, tissue, or protein crystal.
- 30 Caged compounds have been utilized to determine the structures of short-lived enzymatic intermediates, by using time-resolved Laue crystallography. In studying

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-3-

rapid enzymatic processes, numerous investigators have used caged compounds to mask an essential functional group, so that a chemical reaction may be initiated by a light pulse.

- 5 Many, but not all, of the photolabile protecting groups used in caging compounds comprise aromatic rings. To be useful in a biochemical system, a protecting group must satisfy several requirements. Caging of a compound with a photolabile protecting group should render the caged compound inert to the biochemical system used. The photolabile protecting group should release the active
10 chemical moiety in high yield and at sufficient speed by photolysis at wavelengths not detrimental to the biochemical preparation. Further, photoproducts other than the active moiety should not interact with or interfere with the system. In nearly all useful caged biological molecules reported to date, simple covalent bond formation involving the active moiety masks some feature that is important for biological recognition. The
15 photochemical cleavage of that covalent bond releases the active species (active moiety) or photoproducts having altered affinity, usually much reduced or much increased, to the active moiety.

- The most frequently described caging compounds in the current literature are
20 those based on the photoisomerism of 2-nitrobenzyl derivatives. The nitrobenzyl group is incorporated into the active molecule by linkage through a heteroatom, usually O, S or N. A wide range of other photolabile protecting groups is also commercially available.

- 25 In all of these photolabile protecting groups, the photoactivation process requires a light source. Any suitable conventional light source may be utilized to deliver a pulse of light energy to uncage photolabile compounds and release the active entity. Most commonly, lasers emitting energy in the ultraviolet (UV) or the infrared region are used. A brief, high flux emission of a light pulse results in the photoremoval of the
30 photolabile protecting group. Also, UV flashlamps, which emit in the UV region of the spectrum or which their light output filtered to deliver UV radiation have been widely

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-4-

applied in the photochemistry of caged compounds.

The wavelength and energy of the optical source has been tailored to generate an appropriate pulse that breaks a particular photolabile bond of a caged compound. A non-exhaustive listing of photolabile chemical groups and the optimal wavelength for their removal may be found in the recently published (1998) *Methods in Enzymology* Volume 291 "Caged Compounds."

Also, the inclusion of the various photolabile chemical groups in a wide variety of chemical and biochemical entities of differing characteristics to produce caging compounds that mediate different functions in chemical or biochemical reactions is also to be found in the recent reference cited above.

Chemical caging with photolabile protecting groups has been employed in connection with amino acids, nucleic acids, enzyme substrates, catalysts of biochemical reactions and binding molecules whose affinities change upon irradiation. Among the common examples of active moieties employed in a caged compound form for use in biochemical systems are calcium ions, adenosine triphosphate (ATP), guanosine triphosphate (GTP), fluorescein and biotin.

A specific example of the use of caged compounds in biochemical processes is in bioaffinity binding assays such as immunoassays, nucleic acid binding assays and receptor binding assays. In such binding assays, the specific binding of affinity partners results in a modulation of a characteristic that may be easily measured. The modulated characteristics may be an enzymatic activity or a change in affinity that results in certain enzymatic activity. The modulated activity could also be measured through a change in certain characteristics prior to the binding reaction. Such a change could be the generation of light, modulation of colour absorbance or the generation of colour.

The affinity of binding of biotin to avidin or streptavidin is one of the strongest non-covalent bindings in chemistry. Both biotin and streptavidin have been successfully

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-5-

caged and utilized in photolytic reactions where their binding needs to be controlled in spatial or temporal terms. Also, both molecules have been successfully conjugated to various compounds in order to utilize the high affinity of these binding partners.

5 In United States patent 5,981,207 Burbaum et. al. disclose the utilization of caged enzyme substrates as probes in genetically-modified cells during *in vivo* cell-based reporter gene binding assays where the reporter enzyme activity and, by inference, the activator or suppressor activity of a compound under testing in a cell-based assay for drug discovery could be monitored. Also, in international patent
10 application PCT/CA00/00718 Gawad discloses a process of monitoring *in vitro* binding assays by utilizing caged compounds. In both inventions, a chemiluminescent reaction is triggered by the photolytic release from a caged compound of an active moiety that participates in the binding assay. The resultant chemiluminescent signal is collected and monitored. In such photolabile reactions, the binding kinetics are closely controlled

15 A difficulty with such a process is the need for both a light source that triggers release of the active moiety needed for initiating the binding reaction signal from the caged compound and a light detection system to measure the emitted light output of the chemiluminescent reaction. Such light signals could interfere with each other, causing
20 confusion between the triggering light signal (to cause uncaging of the caged compound) and the emitted light resulting from the chemiluminescent reaction. Moreover, the electronic detection system necessary to measure the light emissions, in the presence of a system providing light input, is complicated, cumbersome and expensive, if enough light emission is to be collected for meaningful measurements.
25 Furthermore, the triggering light results in a decrease in the sensitivity of the binding assay due to a need for a light filtration process to separate the two different light signals.

SUMMARY OF THE INVENTION

30

It is an object of the present invention to provide a novel method of conducting

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-6-

a process involving cleavage of a caged chemical compound to release an active moiety able to participate in a chemical reaction.

It is a further and more specific object of the present invention to provide a novel method for conducting luminescent biochemical affinity assays.

It has now been found that many if not all caged compounds can be cleaved to release the caged chemical moiety, in active condition, by being subjected to a pulse of high energy electric current. In accordance with the invention, instead of triggering release of the desired active moiety by photolysis, a totally different input is used, namely a high energy electric pulse, so that in a system where the active moiety is released from a caged compound and then this active moiety participates in a reaction for signal generation, particularly involving light generation, the input to release the active moiety cannot be confused with the output from the reaction. This leads to the adoption of simpler detection systems, and to more accurate measurements of light output.

Furthermore, in light-generating reactions where the method of triggering the release of the active moiety from the caged compound is other than a light pulse, an increase in the sensitivity of quantifying the reaction outcome can be achieved using less complicated machinery.

Thus according to a first aspect of the present invention, there is provided a process of releasing an active moiety from a caged compound in which said moiety is held in inactive form, which comprises subjecting the caged compound to a pulse of high energy electric current.

According to a second and more specific aspect, there is provided a process of conducting a biochemical binding assay for an analyte of interest, which comprises preparing, in a liquid medium, a mixture comprising a complex of said analyte with a specific binding partner for said analyte, and other components of a signal generating

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-7-

system wherein one of the components is caged, releasing the active moiety from the caged compound in an active form by subjecting the caged compound to a high energy electrical pulse, and measuring the signal generated by the signal generating system.

5 “Analyte” is a commonly used term of art, denoting a target compound whose presence and/or quantity is to be determined, in a test medium. The analyte is usually a necessary reactant in a reaction scheme. In assays for such an analyte, binding reactions are commonly used, based on bioaffinity or enzymatically catalyzed reactions. A specific binding partner known to have specific binding affinity for the analyte under
10 test, for example an appropriately chosen antibody, natural hormone binding protein, lectin, enzyme, receptor, DNA, RNA or peptide nucleic acid (PNA), or artificial antibody or nucleic probe, is used, to form a complex with the analyte, and including a label to quantify the complex. The process of the invention, i.e. the subjecting of a caged compound to high energy electric current to release the active ingredient from the
15 caged compound, can be applied to provide to the reaction medium any of the active components required either to form the complex of the analyte and binding partner, or to activate the signal generating system.

 According to a third and yet more specific aspect, there is provided a process of
20 conducting a binding assay for an analyte of interest where the signaling mechanism of the binding assay once activated results in the emission of light. According to this aspect, there is provided a process which includes the steps of preparing, in an electrolyte medium, a mixture of a fluid containing or suspected of containing the said analyte, one or more specific binding partners for said analyte and other essential
25 components of a light-generating signaling mechanism where one of said components is caged, releasing the active moiety from the caged compound, in active form, by subjecting the medium to a high energy electrical pulse which results in uncaging of the active moiety from the caged compound and thereby initiating the light generating reaction, and measuring the emitted light signal of the signaling mechanism.
30

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-8-

Caged compounds, which will undergo release of active moiety in response to
subjection to high energy electric pulse for use in accordance with the invention,
include substantially all of those previously reported in the literature having an organic
protecting group and an active moiety that is photochemically releasable in active form.

5 Preferred protective groups for caged compounds for use according to the invention
include 2-nitrobenzyl; carboxy-2-nitrobenzyl; 2,2'-dinitrobenzhydryl; 1-(2-
nitrophenyl)ethyl; 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl; 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl;
5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl; ((5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)carbonyl; (1-
diazobenzyl)pyrene bromide; N-hydroxy-2-thiopyridone bromide; N-
10 hydroxysuccinimidyl bromide; p-azidobenzoate, N-hydroxysuccinimidyl ester of p-
azidobenzoylglycine bromide; N-hydroxysuccinimidyl bromide; (1-(2-nitro-4,5-
dimethoxy)phenyl-diazoethane; 1-(2-nitro)phenyl-diazoethane; 1-(2-nitro-3,4,5,6-
tetramethyl-diazoethane; desoxybenzoinyl; hydroxyphenacyl; 6-
nitroveratryloxycarbonyl; 6-nitropiperonyloxy-carbonyl; alpha-dimethyl-
15 dimethoxybenzyloxycarbonyl; 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-1,2-diaminoethane-
N,N,N,N-tetraacetic acid (DNMP); and 1-pyrenylmethyl. Some routine experimentation
may be required, on the part of the skilled operator, to determine the best combinations
of these protective groups with the preferred substrates for use in the present invention
(ATP, GTP, Ca ions, etc), and to determine the optimum electric current pulse
20 characteristics for their cleavage, as further discussed below.

The process of the invention utilizes a high energy electrical pulse to release an
active moiety from the caged compound in active form through either breaking a
chemical bond or through a change of the chemical affinity of the caging molecule
25 before and after applying the electrical pulse. Preferably the electrical pulse is a direct
current DC pulse, since use of an alternating AC current pulse entails detailed tuning of
the frequency of the current to effect most efficient cleavage of the caged compound.
No such problems are encountered with DC current, provided that the energy is
sufficiently high to cleave the photolabile caging group, but not high enough to destroy
30 one or more components of the chemical reaction. A minimum amount of direct
electrical current is used to cleave the photolabile chemical moiety. Several parameters

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-9-

determine the level of energy delivered to the caging compound; the electrical current, the voltage, and the physical parameters of the system in which the reaction is conducted such as the shape of the electrodes to deliver the electrical current, the nature of the electrolyte, the material of the electrodes and the shape of the reaction vessel. All these factors determine the density of electrical current delivered to the photolabile chemical group. The amount of energy required to be furnished to effect the desired bond cleavage is related to the bond energy of the selected bond, but the relationship is not straightforward because of factors such as the nature of the electrolyte and the amount of the applied electrical energy which the electrolyte will absorb and hence will not reach the photolabile bonds.

The total energy supplied according to preferred embodiments of the invention is from about 0.01 m joules to about 15 joules. The energy supplied is dependent upon the time for which the current is delivered, as well as the strength of the current. For example, if the DC current supplied is of high voltage (300 volts and above), the duration of the pulse required to cleave the caged compound can be as short as one microsecond. When a lower voltage is used, e.g. 70 volts, a pulse duration of one microsecond will only release a portion of the active moiety from the caged compound, and repeated pulses of such duration are required to release all of the caged compound. There are occasions when the release of only a portion of the caged active moiety is desirable in order to control various aspects of the chemical reaction. Longer pulses do not appear to cause significant problems. A low voltage (4.8V, for example) for a longer pulse (3.3 seconds) has been satisfactorily used in practice. Use of such low voltages and longer times minimizes the loss of energy, which might otherwise heat up the liquid medium. Some routine experimentation with the chosen system, to determine the optimum electrical input, may be desirable, but such experimentation is well within the skill of the art.

In practice, a preferred method of conducting the process of the present invention is to utilize a reaction cell containing two spaced-apart current-delivering electrodes between which the current can be passed through an electrolyte. The cell is

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-10-

filled to an appropriate extent with an electrolyte medium containing all the needed reaction components including the caged compound. Upon delivery of the DC current, the photolabile chemical group of the caged compound releases the active moiety needed to initiate the desired chemical reaction. In light-generating chemical reactions in which one of the reaction components is a caged compound, a light receiving detection system is provided, to receive and quantify light emissions from the reaction solution.

Appropriate electrical circuitry to provide pulsed DC electric current, of predetermined voltage and duration, and hence energy level, is connected to the electrodes, and activated to cause cleavage of the caged compound. Incident light is not used to cause cleavage of the caged compound, and so no special measures such as light-proof shutters or light filtering or beam-splitting devices, are needed to collect light emitted in the light-producing chemical reaction.

The process of the invention shows utility not only in causing luminescent emissions from a chemical reaction in binding assays as described above, but also in other areas where a detectable change due to uncaging of a caged compound and release of an active moiety which is essential for the progression of a chemical reaction is observed.

Further, the process of the invention provides controlled spatial or temporal delivery of one component of a reaction system, which obviates designing complicated mechanical delivery mechanisms of such a component. The variety of chemical reactions, which might benefit from the process of the invention include many binding assays. For example, determination of bacterial contaminants in food, where antibodies to the bacteria can be bound to a solid substrate and bind selectively to a chosen enzyme which subsequently reacts with the released active component from the caged compound and a detectable change in the enzyme activity is measured.

The invention is further described, for illustrative purposes only, in the

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-11-

following specific experimental examples.

Specific Embodiments of the Method of the Invention.

5 The method of the invention is the trigger of a chemical reaction upon delivery
of an electric pulse to the reaction medium. As a prerequisite to employ the method of
the invention for the initiation the chemical reaction is the presence of caged chemical
compound, which is either inactive when in the caged condition or carry a trigger
compound rendering the trigger compound inaccessible to activate the reaction. Upon
10 employing the method of the invention of activation of the reaction by an electrical
current pulse, the chemical reaction is initiated by releasing an active compound from
the caged inactive precursor. Caged compounds offer a chemical entrapment method
for delivery of reagents, which is superior to other delivery methods such as physical
entrapment of chemical reagents (e.g. in liposomes) or delivery by mechanical means.

15 Certain chemical reactions could benefit from the method of the invention of
applying an electric current to release active compounds from caged compounds needed
for the chemical reaction to proceed by either speeding up the reaction, control of reaction
dynamics or by simplifying the machinery involved in timed-sensitive addition of reagents.

20 A general scheme of a simple chemical reaction is a follow:



25 Whether C is the final reaction product and can be measured, or whether C is linked
to another chemical reaction for generating a measurable signal that quantifies this
reaction, the method of the invention can be employed. All the reaction components are
essential for a measurable outcome and any or all of the components can be caged with
photolabile bond and can be released by a high-energy direct current electrical pulse in
accordance with the invention, supplied by appropriate electrical circuitry.

30 A requisite of the reaction to benefit from the method of the invention is that

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-12-

mixing all of the reactants together, with one or more of the reagents being caged, facilitates no progression of the reaction. Release of the caged component as an active moiety that is needed for the chemical reaction to proceed by means of the method of the invention results in the production of a measurable product. Depending on the specifics of the electrical pulse supplied in the process of the invention, the rate of the reaction can be controlled.

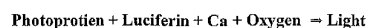
Examples of various chemical reactions that result in a measurable outcome and can benefit from the method of the invention of releasing caged compounds, include light-producing chemical reactions e.g. those involving enzymes and visible outcome chemical reactions. Specific examples of the various kinds of chemical reactions that can benefit from the method of the invention are as follows:

Example 1: Light producing chemiluminescent reactions.

Numerous chemiluminescent reactions are known and utilized in research and clinical laboratories. Caging of one or more compound needed to initiate a chemiluminescent reaction and the release of the needed compound by the method of the invention offers control over the speed and amplitude of light generation and also over the timing of release of an active chemical compound.

For example, in the chemiluminescent reactions, which use photoproteins, initiation of the reaction depends on the addition of Ca to the reaction mixture. A photoprotein chemiluminescent reaction can be illustrated by the following equation:

25



Addition of Ca to the charged photoprotein (photoprotein already bound to luciferin) results in an instantaneous chemical reaction and the generation of light. Substituting Ca by a caged Ca compound and triggering the release of the caged Ca by

30

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-13-

electrical pulse according to the invention will initiate the chemiluminescent reaction and the generation of light.

Depending on the electrical pulse characteristics, the light generation from the chemiluminescent reaction can be a single flash of light, or several flashes, or a steady light emission depending on the amounts of released Ca as determined by the characteristics of the electrical pulse used in the method of the invention.

To confirm that the electrical current pulse altered the photolabile caging compound and caused release of Ca to trigger photoprotein chemiluminescence, one of the reaction components was omitted from the reaction chamber. When the photolabile Ca caging compound was omitted from the reaction, no chemiluminescent light generation occurred. When the photoprotein is omitted, no chemiluminescent light emission occurs. However, adding the photoprotein after the electrical pulse generates chemiluminescent light.

Further, to confirm that this process is specific to the alteration of the caging compound and release of Ca to trigger the reaction, a non-photolabile Ca chelating agent (EDTA), which has a higher affinity for Ca than the photoprotein, was added to the reaction cell that contains all other reaction components, including the Ca-caging compound. Under such condition, no light generation occurred as the released Ca is chelated by the non-photolabile Ca chelating agent.

Further, to confirm the specificity of unloading of the photolabile trigger compound by this form of energy, another form of energy was utilized in an attempt to trigger the same chemiluminescent reaction in the presence of a Ca-caging compound. Triggering an electromagnetic field of an electromagnet through the same electric circuitry resulted in no generation of light.

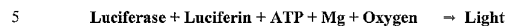
Examples of photoproteins are aequorin, obelin, mnemiopsin, berovin, phosalin, luciferase of ostracods and cypiridina.

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-14-

Another example chemiluminescent reaction where the method of the invention is useful is chemiluminescent reactions that employ the luciferases. Firefly luciferase-mediated chemical reaction, which generate light could be exemplified as follows:



During luciferase-mediated chemiluminescent light-generating reactions, one or more essential components of the reaction can be in a caged form. With all the reaction components present, utilizing the method of the invention for uncaging of a caged molecule induces the generation of light from the luciferase chemiluminescent reaction. Upon triggering the reaction by the method of the invention of electrical current pulse to trigger the reaction, a controlled release of the caged component or components occurs and the released active moieties will trigger the reaction and result in light generation. Modulating the current electrical pulse to release one or more of the caged components in a controlled way would result in light emission that can be monitored.

Normally, a luciferase-mediated chemiluminescent reaction results in the release of a burst of light which is difficult to measure and monitor as it lasts only a second at most. Several prior art patents have disclosed methods to alter the light output by adding one or more cofactors to the reaction. By utilizing the method of the invention, controlling the release of the caged compound controls the amount of released light and also simplifies the machinery needed to monitor the light emission. Several components of the chemiluminescent system of the luciferase enzyme are already commercially available in a caged form, such as the luciferase enzyme itself, luciferin, and ATP. Also, caged chelating agents can be utilized to cage Mg. Most of these are available from Molecular Probes (Eugene).

Example 2: Non-chemiluminescent light emitting reactions.

30 In fluorescent binding reactions, the sensitivity of binding assays is limited by the fluorescence of the medium where the reaction is carried out as well as the container. The

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-15-

high non-specific background signal limits the lower limit of detection of fluorescent assays. It has been suggested that bleaching the non-specific fluorescence of the reaction medium before stimulating the fluorescence of the specific signal would result in a lower background, thus lowering the lower limit of detection. Several caged fluorescent compounds have been developed for this purpose. Irradiating the medium where a caged fluorescent compound is present would result in bleaching of fluorescence of the medium and at the same time maintain the caged fluorescent compound without exhaustion. Uncaging fluorescent compounds using the method of the invention will then simplify the machinery needed to gather the emitted signal, since otherwise the caged compounds need to be irradiated with UV light and most of the stimulation spectra of the modern fluorescent compounds are in the visible range. Therefore, utilizing the method of the invention would simplify the optical components of various detection systems.

Example 3: Colour Enzymatic Reactions.

The method of the invention of unloading or uncaging caged compounds to release the active moiety through the utilization of a high energy electrical pulse can be employed in binding assays with enzyme-mediated color changes. Numerous binding reactions and binding assays utilize enzymes to result into a measurable colour changes that indicate the quantity of the chemical entity under study. In most of these reactions, an enzyme-catalyzed process results in the conversion of a substrate from one color to another. The amount of color change then indicates the quantity of the chemical entity. During such reactions, adding one or more components to the system trigger initiation of the reaction. Commonly, this step is carried out mechanically. Replacing the mechanical step with the method of the invention would result in simplifying the measuring machinery.

The method of the invention can also be utilized in binding assays where a caged compound can be released by an electrical pulse and when the measured property is not an electrical signal. In almost any biological system where the measured output is not an electrical signal, the method of the invention can be utilized to trigger the cleavage of the photolabile bonds of various caging compounds. For example, the method of the invention

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-16-

could be employed in cell mediated binding assays where a caged compound can be released by an electrical pulse. The list of applications in this area is very broad.

Experimental Results

5 The method of the invention was demonstrated by carrying out several chemiluminescent reaction experiments.

Experiment 1

In one experiment, in a total reaction volume of 10 μ L, all the components of a photoprotein chemiluminescence reaction were added in suitable electrical cell (Aequorin, native or recombinant, and recombinant Obelin were utilized in amounts varying from 0.5 – 6 micrograms). The reaction cell also contained Ca-caging compound loaded with Ca to such an extent that the level of free Ca does not trigger light emission. Specifically, the Ca-caging compound was DNMP saturated to an extent of 50% - 77% with Ca. Two spaced metal electrodes were connected to a suitable circuitry to deliver a DC electrical pulse. The electrical pulse characteristics were changed and the light emission from reaction was monitored. Various metals were used in the different experiments, namely silver, aluminum and steel, and various different shapes of electrode, cylindrical, U-shaped, etc were used. A variety of different buffered electrolyte solutions (to decrease changes in pH due to the released compounds), were employed. These included MOPS buffer with 80mM KCl (pH7.4 and 7.2), serum and plasma. All experiments were operated successfully. The following table summarizes the results.

Pulse voltage. (V)	Pulse duration. (S)	Peak current. (mA)	Number of pulses/ Light flashes
320	0.012	70	1
150	0.52	47	1
100	1.1	54	1
70	1.15	22.8	>5
63	1.1	19.5	15
60	0.52	29.6	11
50	2.4	17.6	>5
46	2.6	15.9	>8
24	2.4	40.9	>6

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-17-

12	2.2	30.1	3
5	3.3	5.7	3

5 In each of the previous experiments, altering the shape and/or material of the electrodes to deliver an electrical pulse of a certain voltage caused the characteristics of the light emission profile to change, but in all cases the experiment proceeded successfully. Replacing the electrolyte medium with pure water resulted in unsuccessful experiments.

10

Experiment 2

To confirm that the electrical pulse induces unloading of the photolabile Ca-caging compound and release of Ca, which triggers light emission of photoproteins, one of the reaction components was omitted from the reaction. When the photolabile
15 Ca-caging compound was omitted, no chemiluminescent light generation occurred. When the photoprotein (Aequorin or Obelin) was omitted from the reaction, no chemiluminescent light emission also occurred. However, adding the photoprotein after the electrical pulse of the caged Ca initiated chemiluminescent light generation. In these experiments, the total electrical energy used is 5.94J.

20

Experiment 3

Further, to confirm that this process is specific to unloading of the photolabile Ca-caging compound and release of Ca to trigger the chemiluminescent reaction, a non-photolabile Ca-chelating agent (EDTA), which has a higher affinity to Ca than
25 photoproteins, was added to the reaction cell that contains all the other reaction components. Under such condition, no light generation occurred as the released Ca is chelated by the non-photolabile Ca chelating agent. In this experiments, the electrical energy used was 5.94J.

30 Experiment 4

To confirm the specificity of the destruction of the photolabile compound to this form of energy, a magnetic field was generated from pulsed electromagnet through the same electric circuitry used to generate chemiluminescence. In case of the

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-18-

electromagnetic field pulse, no light generation occurred.

Experiment 5

The generation of light from a chemiluminescent reaction that employ the method
5 of the invention depends on the characteristics of the electrical pulse with regard to its
duration as well as amplitude. In order to demonstrate this dependency, a different
electrical circuitry was employed. An electrical circuit that relies on the fast discharge of
electrical capacitor was employed to generate light of a chemiluminescent reaction by the
10 method of the invention. Capacitors with voltage values between 100-330 Volts and
capacitances of between 1-220 μF were utilized. The shape of the electrical pulse of the
capacitor discharge determines the characteristics and frequency of the light flash or
emission. Further, another kind of electrical circuitry was employed to demonstrate the
method of the invention. A DC power supply source with an output voltage between 3 and
15 150V and a switching circuit to control the duration of the pulse at which a certain voltage
was applied was employed to trigger light generation of photoproteins Aequorin and
Obelin chemiluminescence. Applying different electric pulses with characteristics as listed
in the previous table resulted in triggering of light emission. Furthermore, applying a direct
current electrical pulse below the required characteristic generated no light from the same
reaction in the same electrical cell. Several pulses had to be applied before light emission.

20

Experiment 6:

The method of the invention was also employed for triggering light emission from
a chemiluminescence reaction that employs other caged reagents. Light emission of the
chemiluminescence reaction of the luciferase was utilized with various caged compounds
25 that are needed to trigger the reaction. A typical firefly luciferase chemiluminescent
reaction needs all the following essential components; Luciferase enzyme, Luciferin,
Magnesium and ATP, in the presence of oxygen to generate light according to the
following reaction:

30 Luciferase + D-Luciferin + ATP + Mg^{++} \longrightarrow Oxidized Luciferin + pyrophosphate +
CO₂ + Light.

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-19-

The utility of method of the invention was demonstrated by carrying out the previous luciferase chemiluminescent reactions with one of the components of the reaction being caged. Upon delivering the needed electrical pulse, the caged compound is uncaged causing an instantaneous release of an active compound and the triggering of light generation.

A caged ATP was utilized to demonstrate the method of the invention of controlling the trigger of light generation by a pulse of electric current. Caged ATP is not an active substrate of the luciferase chemiluminescence, however, functional ATP, which acts as a substrate for the luciferase reaction could be delivered by the method of the invention.

In a total reaction volume of 12 μL , the following are mixed in a suitable electric reaction cell: Luciferase/D-Luciferin solution mix (6 μL), 5mM Mg Citrate in PBS (3 μL), caged ATP solution (3 μL). The electrodes were connected to a power supply circuitry and an electric pulse was triggered to uncage ATP and initiate light generation. Various voltages and pulse durations were utilized. Under these experimental conditions, employing the method of the invention resulted in the generation of light from the luciferase chemiluminescence reaction.

Also, in order to demonstrate that the method of the invention can be employed with various caging compound, as long as the electrical pulse shape is altered, another caged compound employed in luciferase chemiluminescence reaction was utilized. In this experiment, caged D-Luciferin was utilized to control the reaction kinetics. Functional D-Luciferin was delivered to the reaction from caged D-Luciferin upon exposure of the reaction components to an electric pulse.

In a total reaction volume of 25 μL , the following components were added as solutions to a suitable electric cell: Luciferase solution (10 μL), 5mM Mg Citrate in PBS (5 μL), 1mM ATP solution (5 μL) and Caged D-Luciferin solution (5 μL). A suitable electrical circuitry was connected to the cell and an electric pulse was delivered. Upon

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-20-

delivery of the electric pulse, the caged compound released the active component needed to trigger light generation of the luciferase chemiluminescence reaction. The experimental results of both the luciferase chemiluminescence reactions with the two caged compounds; caged ATP and caged Luciferin are summarized as follows:

5

Pulse voltage (V)	Pulse duration (S)	Peak current (mA)	Number of pulses/Light flashes
350	0.184	40.9	1
100	0.300	32.2	1
50	1.1	29.3	1

10

In these experiments of the luciferase chemiluminescence, an electrical circuit that relies on discharge of an electrical capacitor at various voltages was employed. Capacitors of a voltage value between 50-350 volts and capacitances of between 10-150 uF were utilized to alter the shape of the electric pulse. It was observed that a time lag of about 0.5 second is needed before light emission start from the reaction. It was assumed that light generation start immediately, however the amounts of released active trigger compound from the caged compound need to accumulate before substantial enzyme-activated reaction and therefore light emission could be observed.

15

20

Reagents:

- DM-EDTA (1-(4,5-Dimethoxy-2nitrophenyl)-1,2-diaminoethane-N,N,N,N tetra acetic acid), Molecular Probes, Eugene, OR, USA (catalog # D-6814).
- Recombinant Aequorin, Aqualite, Molecular Probes, Eugene, OR, USA (Catalog # A-6785).
- Native Aequorin, Friday Harbor Photoproteins, Friday Harbor, WA, USA.
- Recombinant Obelin, curtsey of Dr. Eugene Vysotski, Dept. of Biochemistry, University of Georgia, Georgia, USA.
- A lyophilized mix of Luciferase/D-Luciferin is dissolved in Tricine reconstitution buffer [50 mM N-Tris(hydroxymethyl) methylglycine, adjusted with NaOH to pH 7.8, Lot 1418], both supplied by Kikkoman as assay kit (CheckLite HS Plus, Catalog # 60342).
- Luciferase enzyme dissolved in Tricine buffer pH 7.8 [(50 mM N-Tris (hydroxymethyl) methylglycine] adjusted with NaOH, supplied by Kikkoman Catalog LUC T).
- 5 mM Mg Citrate solution in Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4).
- Caged ATP in methanol, 5mg in 300 µL (Molecular Probes, Eugene, OR, USA Catalog # A-1049).

25

30

35

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-21-

- Caged D-Luciferin 5mg dissolved in 300 μ L of Dimethylsulfoxide (DMSO) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, Catalog # L-7085)
- 100mM ATP solution, pH 7.5 (Amersham Pharmacia, Catalog # 272056).

5

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-22-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process of releasing an active moiety from a caged compound in which
5 said moiety is held in inactive form, which comprises subjecting the caged
compound to a pulse of high energy electric current.
2. The process of claim 1 wherein the caged compound is dissolved or
suspended in an electrolyte medium also containing at least one reagent
which is chemically reactive towards said active moiety, at the time of
10 subjection of the caged compound to said pulse of high energy electric
current
3. The process of claim 2 wherein said active chemical moiety and said at
least one reagent are chosen so that their chemical reaction results in a
measurable signal
- 15 4. The process of claim 3 wherein the measurable signal is the emission of
light.
5. The process of any of claims 1 - 4 wherein the electric current is DC
current.
6. The process of claim 5 wherein the DC electric current pulse supplies from
20 about 0.01 m-joules to about 15 joules total energy.
7. The process of any of the preceding claims wherein the caged compound
has aromatic ring-containing protective groups.
8. The process of claim 7 wherein the caged compound comprises a 2-
nitrobenzyl group linked to the active moiety through a hetero atom.

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-23-

9. The process of any preceding claim wherein the active moiety is a compound needed to trigger a chemical reaction with a measurable outcome.
10. The process of claim 9 wherein the active moiety is a calcium ion, ATP, GTP, fluorescein, biotin or streptavidin.
11. A process of conducting a biochemical binding assay for an analyte of interest, which comprises preparing a mixture comprising a medium containing or suspected to contain said analyte, at least one specific binding partner for said analyte, and other components of a signal generating system where one of the components is caged, releasing the active moiety from the caged compound in an active form by subjecting the caged compound to a high energy electrical pulse, and measuring the signal generated by the signal generating system.
12. The process of claim 11 wherein said signal is light emission.
13. The process of claim 11 or claim 12 wherein the electric current is DC current.
14. The process of claim 13 wherein the DC electric current pulse supplies from about 0.01 m-joules to about 15 joules total energy.
15. The process of any of claims 11 - 14 wherein the analyte is linked to or conjugated with a photoprotein reactable with luciferin in the presence of a catalyst to emit chemiluminescence.
16. The process of claim 15 wherein the catalyst is caged in the caged compound.
17. The process of claim 15 or claim 16 wherein the catalyst is calcium.

WO 03/008969

PCT/CA02/01077

-24-

18. The process of any of claims 15 - 17 wherein the photoprotein is aequorin, obelin, mnemiopsin, berovin, phosalin, luciferase of ostracods or cypridina.
19. The process of claim 18 wherein the analyte is linked to or conjugated with luciferase enzyme for generating a measurable outcome.
- 5 20. The process of claim 19 wherein the caged compound is catalytic caged ATP.
21. The process of any of claims 15 - 20, wherein the caged compound is caged luciferin.
22. A process of conducting a binding assay for an analyte of interest where the signaling mechanism of the binding assay once activated results in the emission of light, said process including the steps of preparing, in an electrolyte medium, a mixture of a fluid containing or suspected of containing the said analyte, one or more specific binding partners for said analyte and other essential components of a light-generating signaling mechanism wherein one or more of said components is caged, releasing the active moiety from the caged compound, in active form, by subjecting the medium to a high energy electrical pulse which results in uncaging of the active moiety from the caged compound and thereby initiating the light generating reaction, and measuring the emitted light signal of the signaling mechanism.
- 10 15 20
23. The process of claim 22 wherein the signaling mechanism is light generation by a photoprotein chemiluminescent reaction.
24. The process of claim 22 wherein the signaling mechanism is light generation by a luciferase chemiluminescent reaction.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/01077
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 G01N33/531 C12Q1/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.D. HODNELAND & M. MRKSICH: "Biomolecular surfaces that release ligands under electrochemical control" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 122, 2000, pages 4235-4236, XP002214886 the whole document ---	1-3,7,9, 10
X	US 6 136 268 A (JUHALA PENTTI ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) column 1, line 57 -column 2, line 60 column 5, line 38-67 column 7, line 13-52; figures 3,4 --- -/--	1,2,7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2002		Date of mailing of the international search report 22/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		1 ional Application No ... CA 02/01077
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 451 683 A (PIRRUNG MICHAEL C ET AL) 19 September 1995 (1995-09-19) abstract column 14, line 43-63	1-4, 7-12,22
Y	column 20, line 17-19 column 21, line 1-20 column 22, line 50 -column 24, line 20; figures 5,6; table 3	5,6, 13-21, 23,24
Y	US 5 942 407 A (HARLACHER TABITHA ET AL) 24 August 1999 (1999-08-24) abstract page 6, line 10 -page 9, line 31; claims 1-28	5,6, 13-21, 23,24
A	WO 00 79276 A (GAWAD YAHIA ;CARDIOGENICS INC (CA)) 28 December 2000 (2000-12-28) cited in the application abstract column 2, line 25 -column 3, line 7 column 4, line 24 -column 5, line 36	1-24
P,X	W-S. YEO, C.D. HODNELAND & M. HRKSICH: "Electroactive monolayer substrates that selectively release adherent cells" CHEMBIOCHEM, no. 7/8, 2001 - 27 July 2001 (2001-07-27), pages 590-593, XP002214887 the whole document	1-3,7,9, 10
P,A	WO 02 48393 A (GAWAD YAHIA A ;CARDIOGENICS INC (CA)) 20 June 2002 (2002-06-20) the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

International Application No
 PCT/CA 02/01077

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6136268	A	24-10-2000	AU 6573700 A 13-03-2001
			EP 1204858 A2 15-05-2002
			WO 0113095 A1 22-02-2001
US 5451683	A	19-09-1995	US 5252743 A 12-10-1993
			US 5482867 A 09-01-1996
			AU 6886791 A 13-06-1991
			EP 0502060 A1 09-09-1992
			JP 5501611 T 25-03-1993
			WO 9107087 A1 30-05-1991
US 5942407	A	24-08-1999	NONE
WO 0079276	A	28-12-2000	AU 5382800 A 09-01-2001
			WO 0079276 A1 28-12-2000
			EP 1194781 A1 10-04-2002
WO 0248393	A	20-06-2002	AU 1576502 A 24-06-2002
			WO 0248393 A2 20-06-2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100091889

弁理士 藤野 育男

(74)代理人 100101498

弁理士 越智 隆夫

(74)代理人 100096688

弁理士 本宮 照久

(74)代理人 100102808

弁理士 高梨 憲通

(74)代理人 100104352

弁理士 朝日 伸光

(74)代理人 100107401

弁理士 高橋 誠一郎

(74)代理人 100106183

弁理士 吉澤 弘司

(74)代理人 100120064

弁理士 松井 孝夫

(72)発明者 ガワド, ヤヒア, エー .

カナダ エル4ダヴリュ 2エックス3 オンタリオ, ミシソーガ, ラスパーン ロード イー
スト 2121, アpartment 1110

Fターム(参考) 2G054 AB03 EA01

专利名称(译)	裂纹化合物裂解方法		
公开(公告)号	JP2004535584A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003514259	申请日	2002-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	心迪公司尼克斯		
申请(专利权)人(译)	心迪公司尼克斯		
[标]发明人	ガワドヤヒアエー		
发明人	ガワド,ヤヒア,エー.		
IPC分类号	G01N21/76 C12Q1/66 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 C12Q1/66 G01N33/5306 G01N2458/30		
FI分类号	G01N21/76		
F-TERM分类号	2G054/AB03 2G054/EA01		
代理人(译)	白井伸一 藤野郁夫 朝日 伸光 高桥诚一郎 吉泽博 松井 孝夫		
优先权	2353120 2001-07-16 CA		
其他公开文献	JP2004535584A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 解决方案：笼状化合物（即通常通过光解控制其化学活性或生物化学活性以释放与化学反应或生物化学反应有关的活性部分的合成化合物）暴露于电流而不是光中。释放活性部分。该方法避免了引起反应的输入能量和用于测量目的的光输出之间的混淆，因此必须测量光输出以量化被测分析物。特别地，它在化学发光生物化学活性中特别有用。

		(P2004-5355 (43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11
(51) Int. Cl. ⁷ G01N 21/76	FI G01N 21/76	テーマコード(参考) 2G054
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43)
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2003-514259 (P2003-514259) 平成14年7月15日(2002.7.15) 平成16年1月15日(2004.1.15) PCT/CA2002/001077 W02003/008969 平成15年1月30日(2003.1.30) 2,353,120 平成13年7月16日(2001.7.16) カナダ(CA)	(71) 出願人 504018150 カーディオジニクス インコーポレー ド カナダ エム9ダヴリュ 4ワイ9 タリオ, トロント, スカイウェイ ア ニユー 96 (74) 代理人 100064447 弁理士 岡部 正夫 100085176 (74) 代理人 弁理士 加藤 伸晃 100106703 (74) 代理人 弁理士 産形 和央 100096943 (74) 代理人 弁理士 白井 伸一
		最終頁に続
(54) 【発明の名称】 ケージド化合物の開裂方法		