

(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2007-528986  
(P2007-528986A)

(43) 公表日 平成19年10月18日(2007.10.18)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
<b>G01N 33/543 (2006.01)</b>	G01N 33/543 545D	4B063
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 M	4H050
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	G01N 33/53 U	
<b>C12Q 1/42 (2006.01)</b>	G01N 33/543 545S	
<b>C12Q 1/34 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-517725 (P2006-517725)	(71) 出願人	599075070 ベンタナ・メディカル・システムズ・イン コーポレーテッド アメリカ合衆国アリゾナ州85737トウ ーソン・イノベーションパークドライブ1 910
(86) (22) 出願日	平成16年6月24日 (2004.6.24)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月14日 (2005.12.14)	(72) 発明者	ビニニアーズ, クリストファー アメリカ合衆国アリゾナ州85718トウ ーソン・イーストカレシンコントロバーシ ア2462
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/020700		
(87) 國際公開番号	W02005/003777		
(87) 國際公開日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(31) 優先権主張番号	60/482,596		
(32) 優先日	平成15年6月24日 (2003.6.24)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫組織化学的エピトープおよび核酸配列のインサイチュ検出が向上するように酵素の触媒作用で金属を付着

## (57) 【要約】

本発明は、生物学的サンプルに入っている興味の持たれる免疫組織化学的エピトープまたは核酸配列をインサイチュ検出する新規な組成物および方法に向けたものであり、これは、酵素標識結合分子と前記興味の持たれるエピトープまたは配列を酸化還元に不活性な還元種および可溶金属イオンの存在下で結合させることで前記金属イオンから金属原子への還元が前記酵素がつなぎ止められている地点または付近で起こり易くすることを含んで成る。ホスファターゼと接触した時に活性化されて還元形態になることで金属イオンに還元を受けさせて不溶な金属にする新規なホスフェート誘導体である還元剤を記述する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的サンプルに入っている興味の持たれる免疫組織化学的エピトープまたは核酸配列をインサイチュ検出する方法であって、酵素標識結合分子と前記興味の持たれるエピトープまたは配列を酸化還元に不活性な還元種および可溶性金属イオンの存在下で結合させることで前記金属イオンから金属原子への還元が前記酵素がつなぎ止められている地点または付近で起こり易くすることを含んで成る方法。

## 【請求項 2】

前記酵素標識結合分子が抗体を含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記酵素標識結合分子がアビジンまたはストレプトアビジンを含んで成る請求項 1 記載の方法。10

## 【請求項 4】

前記酵素標識結合分子がヌクレオチド配列を含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記酸化還元に不活性な還元種が前記酵素標識結合分子用の基質である請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

前記酵素がアルカリ性ホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、アルファ - およびベータ - ガラクトシダーゼ、アルファ - およびベータ - グルコシダーゼ、一般的にエステラーゼおよびベータ - ラクタマーゼから成る群から選択される請求項 1 記載の方法。20

## 【請求項 7】

前記酵素がアルカリ性ホスファターゼでありそして前記基質がアスコルビン酸ホスフェートである請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記酵素がアルカリ性ホスファターゼでありそして前記基質がヒドロキノンホスフェート誘導体である請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 9】

前記酸化還元に不活性な還元種がヒドロキノンモノ - およびジ - ホスフェート、ナフトヒドロキノンモノ - およびジ - ホスフェートおよびアントラヒドロキノンモノ - およびジ - ホスフェートまたはこれらの誘導体から成る群から選択される請求項 1 記載の方法。30

## 【請求項 10】

前記酸化還元に不活性な還元種がセサモールホスフェート、オイゲノールホスフェートおよびアルファ - トコフェロールホスフェートまたはこれらの誘導体から成る群から選択される請求項 1 記載の方法。

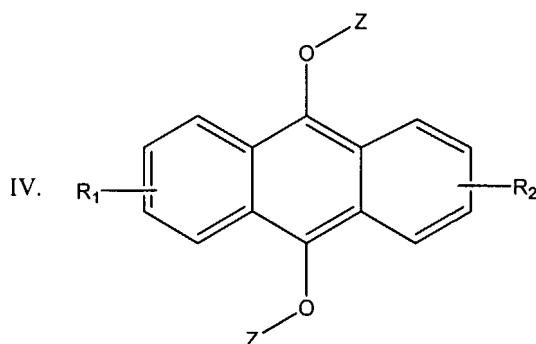
## 【請求項 11】

前記金属が銀および金から成る群から選択される請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

以下に示す一般構造 (IV)

## 【化 1】



40

50

[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、

$R_2$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

Z は、 $PO_3^{2-}$ 、H、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは - ラクタムであってもよいが、両方の Z が H であることはあり得ない】

で表される化合物。

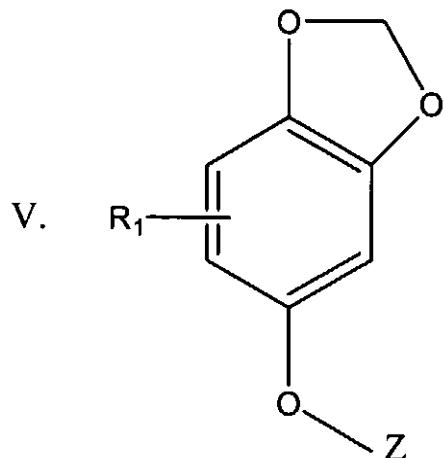
【請求項 13】

両方の Z が  $PO_3^{2-}$  である請求項 12 記載の化合物。

【請求項 14】

一般構造 (V) :

【化 2】



[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

Z は、 $PO_3^{2-}$ 、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは - ラクタムであってもよい】

で表される化合物。

【請求項 15】

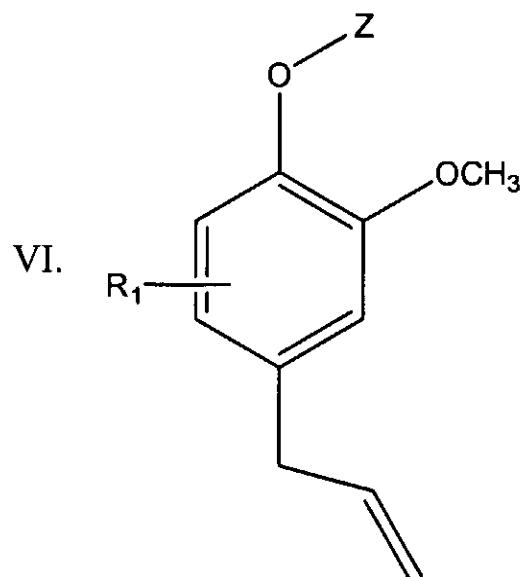
一般構造 (VI) :

10

20

30

【化3】



10

[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

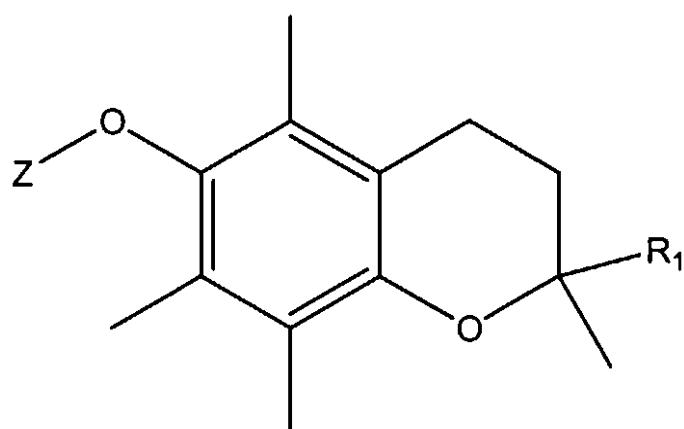
$Z$  は、 $PO_3^{2-}$ 、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよい]

で表される化合物。

【請求項16】

一般構造(VII)：

【化4】



30

[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

$Z$  は、 $PO_3^{2-}$ 、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよい]

で表される化合物。

【請求項17】

$R_1$  が  $CH_2 - (CH_2 - CH_2 - CH(CH_3) - CH_2)_3 - H$  である請求項16記載の化合物。

【請求項18】

40

50

生物学的サンプルに入っている興味の持たれるバイオマーカーを検出するためのキットであって、各容器が抗 - バイオマーカー結合分子、酸化還元に不活性な還元種、前記還元種を活性にする酵素および金属イオンを保持するに適する、1個以上の容器を含んで成るキット。

【請求項 19】

前記抗 - バイオマーカー結合分子が抗体である請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】

前記抗体にハプテン標識が付いている請求項 19 記載のキット。

【請求項 21】

前記抗 - バイオマーカー結合分子がオリゴヌクレオチド配列である請求項 18 記載のキット。  
10

【請求項 22】

前記オリゴヌクレオチド配列にハプテン標識が付いている請求項 21 記載のキット。

【請求項 23】

前記酵素標識がホスファターゼである請求項 18 記載のキット。

【請求項 24】

前記酸化還元に不活性な還元種がアスコルビン酸ホスフェートである請求項 18 記載の化合物。

【請求項 25】

興味の持たれるエピトープまたはヌクレオチド配列を有する生物学的サンプルをインサイチュ染色する方法であって、  
20

(a) 前記組織をハプテンを有する結合分子と接触させ、

(b) 前記ハプテンを標識酵素と結合しているハプテン結合パートナーと接触させ、そして

(c) 前記生物学的サンプルと前記標識酵素用の基質である酸化還元に不活性な還元種を金属イオンの存在下で接触させる、

段階を含んで成る方法。

【請求項 26】

前記結合分子が抗体、ヌクレオチド配列およびアフィニティーパートナーから成る群から選択される請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

前記ハプテンがフルオレセイン、ビオチン、ジゴキシゲニンおよびジニトロフェノールから成る群から選択される請求項 25 記載の方法。

【請求項 28】

前記酵素標識がホスファターゼである請求項 25 記載の方法。

【請求項 29】

前記金属が銀および金から成る群から選択される請求項 25 記載の方法。

【請求項 30】

銀金属の還元に先立って前記生物学的サンプルを金で前以て処理しておく段階を実施する請求項 25 記載の方法。

【請求項 31】

前記酸化還元に不活性が還元種をヒドロキノンモノ - および / またはジ - ホスフェート、ナフトヒドロキノンモノ - および / またはジ - ホスフェート、アントラヒドロキノンモノ - および / またはジ - ホスフェート、セサモールホスフェート、オイゲノールホスフェートおよびアルファ - トコフェロールホスフェートまたはこれらの誘導体から成る群から選択される請求項 25 記載の方法。

【請求項 32】

興味の持たれるエピトープまたはヌクレオチド配列を有する生物学的サンプルをインサイチュ染色する方法であって、

(a) 前記組織をビオチニル化一次抗体と接触させ、

10

20

30

40

50

(b) 前記ビオチニル化一次抗体と結合させた前記生物学的サンプルをストレプトアビジョン - アルカリ性ホスファターゼと接触させ、そして  
(c) 前記段階 (b) の生物学的サンプルとアスコルビン酸ホスフェートを銀イオンの存在下で 7 より高い pH で接触させる、  
段階を含んで成る方法。

【請求項 3 3】

前記 Z がホスフェートである請求項 1 4 記載の化合物。

【請求項 3 4】

前記 Z がホスフェートである請求項 1 5 記載の化合物。

【請求項 3 5】

前記 Z がホスフェートでありそして前記 R<sub>1</sub> がメチルである請求項 1 6 記載の化合物。

【請求項 3 6】

銀金属の還元に先立って前記生物学的サンプルを金で前以て処理しておく段階を実施する請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2003年6月24日付けで出願した仮米国出願 60/482,596（これの内容は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）の優先権を主張するものである。

【0 0 0 2】

本発明は、一般に、化学の分野に関し、詳細には、酵素が媒介する反応を用いて金属原子を局部的に付着させることで免疫組織化学的エピトープおよび核酸配列をインサイチュ検出する新規な方法に向けたものである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

現代の標準では、組織染色は百年以上さかのぼる古代技術である。最近では、いろいろな種類の化学品および生物化学的染色液を組織断片に加える手順を自動化する努力が成されている。この目的で創案された装置には、Ventana Medical Instrument 系列のデュアルカルーセルが基になった装置、例えば 320、ES（商標）、NextES（商標）、BENCHMARK（商標）および BENCHMARK（商標）XT などが含まれる。そのような装置が記述されている特許には特許文献 1、2、3 および 4（これらは全部引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）が含まれる。別の種類の自動染色装置は特許文献 5 および 6（これらは両方とも引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）に記述されている TechMate（商標）系列の染色装置である。

【0 0 0 4】

組織化学ではいろいろな手作業の検出化学が長年に渡って開発してきた。一般的には、興味の持たれる分子マーカーまたは標的を生体分子検定で同定した後、病理学者または他の医学専門家による解釈が可能のように、それを光顕微鏡で見ることができるようになる必要がある。1番目の検出段階は、抗 - 標的一次抗体にビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、または興味の持たれる生物学的標的の場所を確認する目的で用いられる他のハプテンなどによる標識を検出可能様式で付けることを伴う。次に、酵素または他のレポーター分子と結合させておいた抗 - ハプテン二次抗体を用いて前記一次抗体の場所を確認する。典型的な酵素系は通常の技術者に公知であり、それにはホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼが含まれる。その後、前記酵素が前記一次抗体 - 二次抗体複合体の直ぐ近隣で起こる発色性基質の沈澱に触媒作用を及ぼす。色原体、例えばニトロブルートラゾリウム（NBT / BCIP）；四塩酸 3,3' - ディアミノベンジデン（DAB）；および 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール（AEC）などは

10

20

30

40

50

良く知られている。別法として、酵素と基質の相互作用によって化学発光シグナルを生じさせて、それを写真フィルムで捕捉することも可能である。

#### 【0005】

他の標識には、二次抗体の<sup>1 2 5</sup>I 標識（これは写真フィルムで検出可能である）、フルオレセインイソチオシアネート標識付き二次抗体（これは紫外光で検出可能である）；<sup>1 2 5</sup>I 標識付き蛋白質 A（これは Ig G 分子の Fc 領域と結合することから二次抗体の代わりに使用可能である）、金標識付き二次抗体（これが二次抗体と一緒に一次抗体と結合すると赤色として直接見ることができる）、ビオチニル化二次抗体（これを当該二次抗体と一緒にインキュベートした後にビオチンと強力に結合する酵素結合アビジンと一緒にインキュベートするとシグナルが増強される、と言うのは、1 個の抗体分子に多数のビオチン分子が結合し得るからである）が含まれる。典型的に用いられる酵素にはアルカリ性ホスファターゼ（「AP」）またはホースラディッシュペルオキシダーゼ（「HRP」）が含まれる。

#### 【0006】

免疫組織化学的検出を金属で増強させることができ特許文献 7（引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）に教示されている。特許文献 7 は、生物学的サンプルに酸化触媒が存在するか否かを検出するための組成物および方法に向けたものである。その組成物は、発色性基質に酸化を触媒の存在下で 2 種以上の共沈還元金属と一緒に受けさせることで生じさせた沈澱物を含んで成る。強いシグナルが発生し、そのシグナルを用いて標的分子に局在する酸化触媒を検出する。標的分子は核酸、抗体または細胞表面抗原であり得る。特許文献 7 は、特に、酸化触媒の検出では発色性沈澱物および 2 種以上の金属に頼っている。酸化重合させた DAB をニッケルイオンで前以て処理しておくことで前記 DAB を銀で増感させることができ特許文献 1 に教示されている。

#### 【0007】

免疫組織化学的検出を金属で増強させる例（より最近の）には特許文献 8 が含まれる。特許文献 8 は、ゼロ酸化状態の金属を金属イオンから生じさせる方法に向けたものであり、その方法は、セシウム、周期律表の 1b、2a、4a および 8 族から選択される少なくとも 1 種の金属の金属イオン、酸素含有酸化剤、およびヒドロキノン、ヒドロキノン誘導体または没食子酸 n - プロピルの中の少なくとも 1 種から選択される還元剤を準備し、酸化還元酵素を準備し、前記酵素と前記金属イオンと酸化剤と還元剤と一緒にし、そして前記金属イオンの少なくともいくつかに還元を受けさせてゼロ酸化状態の金属を生じさせることを含んで成る。特に銀イオンはホースラディッシュペルオキシダーゼの近くで過酸化水素およびヒドロキノンと接触すると還元を受けて銀金属が生じることが教示されている。

#### 【0008】

興味の持たれる免疫組織化学的エピトープおよび DNA 標的を明視野光顕微鏡で可視的に同定するにより良好な生化学的技術の必要性が継続して存在する。

【特許文献 1】米国特許第 5 5 9 5 7 0 7 号

【特許文献 2】米国特許第 5 6 5 4 1 9 9 号

【特許文献 3】米国特許第 6 0 9 3 5 7 4 号

【特許文献 4】米国特許第 6 2 9 6 8 0 9 号

【特許文献 5】米国特許第 5 3 5 5 4 3 9 号

【特許文献 6】米国特許第 5 7 3 7 4 9 9 号

【特許文献 7】米国特許第 5 , 1 1 6 , 7 3 4 号 (Higgs 他)

【特許文献 8】米国特許第 6 , 6 7 0 , 1 1 3 号 (Hainfeld)

【非特許文献 1】Merchantaler 他、J. Histoch. And Cytochem. 37 : 10 1563 - 65 (1989)

【発明の開示】

【0009】

（発明の要約）

10

20

30

40

50

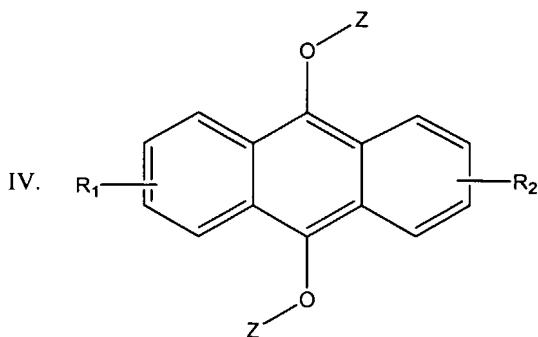
本発明は、生物学的サンプルに入っている興味の持たれる免疫組織化学的エピトープまたは核酸配列をインサイチュ検出する新規な組成物および方法に向けたものであり、これは、酵素標識結合分子と前記興味の持たれるエピトープまたは配列を酸化還元に不活性な還元種および可溶性金属イオンの存在下で結合させることで前記金属イオンから酸化状態がゼロの金属への還元に触媒作用が前記酵素がつなぎ止められている地点または付近で及ぶようにすることを含んで成る。ホスファターゼ酵素と接触した時に活性化されて還元形態になった時に金属イオンに還元を受けさせて酸化状態が0の不溶な金属粒子を生じさせる新規なホスフェート誘導体である還元剤を記述する。

## 【0010】

本発明は、また、以下に示す一般構造(IV) 10

## 【0011】

## 【化1】



10

20

30

## 【0012】

[ここで、

R<sub>1</sub>は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH-、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよ<sub>く</sub>、

R<sub>2</sub>は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH-、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよ<sub>く</sub>、そして

Zは、PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、H、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよいが、両方のZがHであることはあり得ない]

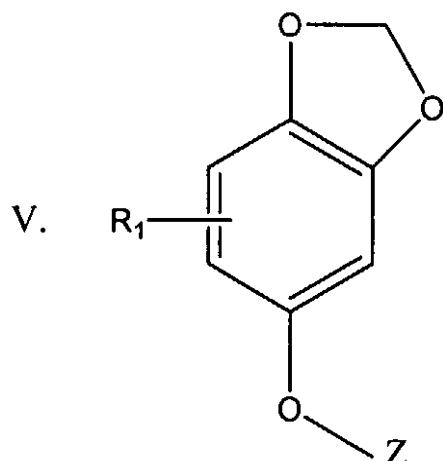
で表される化合物にも向けたものである。好適な化合物は両方のZ=ホスフェートである化合物である。

## 【0013】

本発明は、また、一般構造(V)：

## 【0014】

【化2】



10

【0015】

[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

$Z$  は、 $PO_3^{2-}$ 、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよい】

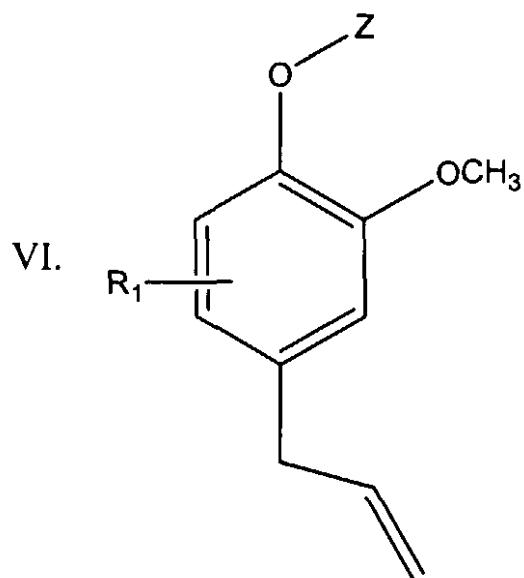
で表される化合物にも向けたものである。特に好適な化合物は  $Z = \text{ホスフェート}$  である化合物である。

【0016】

本発明は、また、一般構造(VI)：

【0017】

【化3】



30

40

【0018】

[ここで、

$R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $NH_2$ 、 $(CH_2)_n-COOH$ 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

$Z$  は、 $PO_3^{2-}$ 、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよい】

50

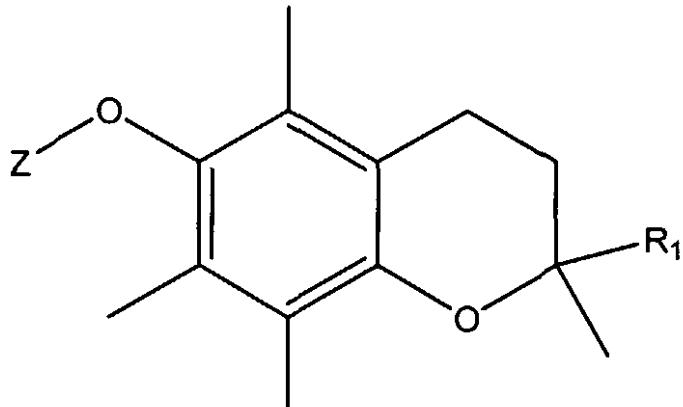
で表される化合物にも向けたものである。特に好適な化合物はZ = ホスフェートである化合物である。

## 【0019】

本発明は、また、一般構造(VII)：

## 【0020】

## 【化4】



10

20

30

40

50

## 【0021】

[ここで、

R<sub>1</sub>は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH-、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよく、そして

Zは、PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、-ガラクトース、-ガラクトース、-グルコース、-グルコース、エステルまたは-ラクタムであってもよい]

で表される化合物にも向けたものである。特に好適な2種類の化合物はR<sub>1</sub>=メチルまたはCH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-HおよびZ=ホスフェートである化合物である。

## 【0022】

本発明は、また、興味の持たれるエピトープまたはヌクレオチド配列を有する生物学的サンプルをインサイチュ染色する方法にも向けたものであり、この方法は、(a)前記組織をハプテンを有する結合分子と接触させ、(b)前記ハプテンを標識酵素と結合しているハプテン結合パートナー(hapten-binding partner)と接触させ、そして(c)前記生物学的サンプルと前記標識酵素用の基質である酸化還元に不活性な還元種を金属イオンの存在下で接触させる段階を含んで成る。

## 【0023】

本発明は、また、興味の持たれるエピトープまたはヌクレオチド配列を有する生物学的サンプルをインサイチュ染色する方法にも向けたものであり、この方法は、(a)前記組織をビオチニル化一次抗体と接触させ、(b)前記ビオチニル化一次抗体と結合させた前記生物学的サンプルをストレプトアビシン-アルカリ性ホスファターゼと接触させ、そして(c)前記段階(b)の生物学的サンプルとアスコルビン酸ホスフェートを銀イオンの存在下で7より高いpHで接触させる段階を含んで成る。また、銀の付着を向上させる目的で場合により金イオンによる予備処理段階を用いることも可能である。

(好適な態様の説明)

本発明は、最初に結合分子を興味の持たれるエピトープまたは配列と結合させることを通して興味の持たれる免疫組織化学的エピトープまたは核酸配列を検出する方法にも向けたものである。前記結合分子に、酸化還元に不活性な還元種から還元剤への変換に触媒作用を及ぼす酵素による標識を付けておくことで、発色で検出可能な金属の還元が前記酵素がつなぎ止められている地点または付近で起こるようにする。より具体的には、本発明は、酸化還元に不活性な酵素基質1種または2種以上、即ちアスコルビン酸ホスフェートの脱

磷酸化に触媒作用を及ぼし得るアルカリ性ホスファターゼおよび他の酵素、即ちグルコシダーゼ、エステラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなど（前記アスコルビン酸ホスフェートは酵素の触媒作用で脱磷酸化を受けた後に銀および／または金イオンに還元を受けさせて金属銀および／または金原子を生じさせる能力を有する極めて効率の良い還元剤になる）を標識として用いる新規な方法によるものである。前記還元は興味の持たれるエピトープまたはヌクレオチド配列の所または付近で起こることから、沈澱して来る酸化状態が0の金属である銀／金は前記エピトープもしくは配列の近くに蓄積し、それによって、顕微鏡による診断手順で前記エピトープを目で検出する度合が大きく向上する。

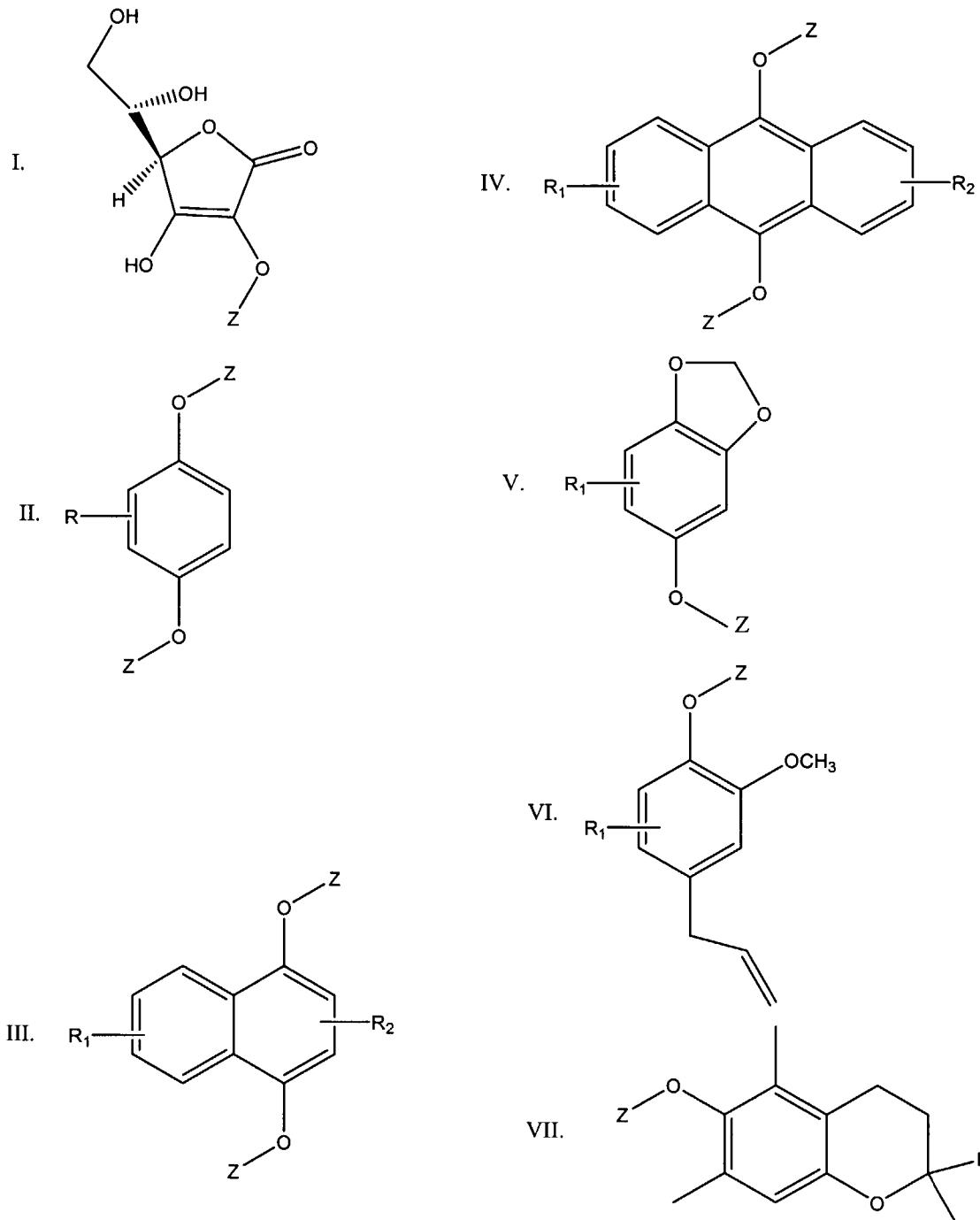
#### 【 0 0 2 4 】

本発明は、また、この上に示した方法で用いる目的で特別に合成した新規な化合物にも向けたものである。アスコルビン酸ホスフェート（Zが $\text{PO}_3^{2-}$ である一般式Iを参照）基質が最も好適であり、これは、これの酵素であるアルカリ性ホスファターゼによって脱磷酸化を受けると結果としてアスコルビン酸塩イオン、即ち銀および金カチオンの良好な還元剤になる。一般的には、以下に示す式(I)-(VII)で表される化合物が優れた基質である。

10

#### 【 0 0 2 5 】

## 【化5】



## 【0026】

一般構造 I - V I I の場合、Z は  $\text{PO}_3^{2-}$  、ガラクトシル、グルコシル、エステルまたはベータ - ラクタムであってもよい。一般構造 I I - I V の場合、2 個の Z の中の一方はまた H であってもよい。

## 【0027】

一般構造 I I - I V の場合、少なくとも 1 個の Z は  $\text{PO}_3^{2-}$  、ガラクトシル、グルコシル、エステルまたはベータ - ラクタムであるべきである。

## 【0028】

一般構造 I I の場合、R は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $\text{NH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよい。

## 【0029】

一般構造 I I I - V I I の場合、 $R_1$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カ

ルボキシアルキル、 $\text{NH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$  - 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよい。

### 【0030】

一般構造 I II - IV の場合、 $\text{R}_2$  は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $\text{NH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$  - 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよい。

### 【0031】

本明細書で用いる用語は本分野の通常の技術を持つ化学者に公知である。それにも拘らず、そのような用語に与えられる範囲および本明細書および請求の範囲の明確な一定した理解が得られるようにする目的で下記の定義を示す。

10

### 【0032】

インサイチュ検出は、組織または無傷の細胞標本の中に入っている興味の持たれる生物学的特徴を見る能够なようにすることを意味する。組織は、例えば固定されてパラフィンに埋め込まれた厚みが $4 - 8 \mu\text{m}$ の組織断片、例えば通常は顕微鏡用ガラススライドの上に置かれた組織断片であり、その後、それを調製して免疫組織化学の目的で染色するか、或はオリゴヌクレオチドプローブを用いてインサイチュハイブリッド形成を行う。無傷の細胞には、シトスピノン (cytospins)、ThinPreps (商標) (Cytotec, Inc., Buxborough, MA) および染色を受けさせる目的で他の方法で調製された無傷の細胞が含まれる。インサイチュは、また、組織群が顕微鏡用ガラススライドの上に置かれた状態も指し得る。

20

### 【0033】

色原体：通常は着色している検出可能な反応生成物をもたらす酵素基質。典型的な色原体の例には、Nuclear Fast Red、ニトロブルートラゾリウム (NBT / BCIP)；四塩酸3,3'-ジアミノベンジデン (DAB)；および3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) が含まれる。更に多くの色原体が知られていて、Pierce Chemical (Rockford, IL) などの如き供給業者を通して入手可能である。

30

### 【0034】

結合分子：この相補的結合部位の近くに来た時に前記部位と結合する相補的結合部分を有する如何なる分子であってもよい。標的 RNA または DNA とハイブリッド形成し得る配列を有する RNA / DNA オリゴマーおよび抗体が結合分子の 2 例である。更に別の結合対はストレプトアビジン - ビオチン対であり、これを本明細書ではまた「アフィニティーパートナー」とも呼ぶ。その結合蛋白質ストレプトアビジンはビオチンに対して固有の親和性を示す。ビオチンは解剖病理学実験室の全体に渡ってストレプトアビジンの結合パートナーとして広く用いられている。商業的に入手可能な一次抗体のほとんど全部にビオチンが標識として付いており、その結果として、ストレプトアビジン結合体を用いてその一次抗体の場所を確認することができる。本発明では、ビオチン - ストレプトアビジン結合モチーフを用いてストレプトアビジンと AP を一緒に局在させる。ビオチン標識を付けておいた二次抗体は組織の中の結合部位を標的にし、そしてストレプトアビジン - AP 結合体は、ストレプトアビジンがビオチンと結合することで AP を同じ場所に運ぶ。

40

### 【0035】

キット：興味の持たれるバイオマーカーを検出するに必要な反応体を保持する 2 個以上の槽、容器、デバイスなどが包装されている組み合わせ。このキットには当該方法を実施するための取り扱い説明書が付いている。そのようなキットには AP 標識付き抗体、核酸、リガンドなどが入っている可能性がある。生物学的サンプルの中に入っている興味の持たれるバイオマーカーを検出するための本キットは、各容器が抗 - バイオマーカー結合分子、酸化還元に不活性な還元種、前記還元種を活性にする酵素および金属イオンを保持するに適する 1 個以上の容器を含んで成る。

### 【0036】

標識酵素は、抗体、核酸または結合蛋白質、例えばストレプトアビジンなどと結合して

50

いるアルカリ性ホスファターゼまたは他の酵素であり得る。そのような標識酵素が果たす機能は、酸化還元に活性な還元種が酸化還元に不活性な還元剤前駆体からもたらされる生成に触媒作用を及ぼす機能である。他の酵素はアルファ - およびベータ - ガラクトシダーゼ、アルファ - およびベータ - グルコシダーゼ、一般的にエステラーゼおよびベータ - ラクタマーゼ、特にセファロスポリナーゼおよびペニシリナーゼであり得る。

#### 【0037】

酸化還元に不活性な還元種は、還元種 / 還元剤、例えばアスコルビン酸塩またはヒドロキノンジアニオンなど [これは適切な条件下で可溶金属イオン、例えば銀 (+) または金 (+3) などに還元を受けさせて銀または金原子を生じさせ、その結果として、それを明視野光顕微鏡を用いて目で特定の点として見ることができるようになる] の前駆体である。本発明の好適な酸化還元に不活性な還元種はアスコルベートホスフェートであるが、本明細書では他の多くの還元種も教示する。

#### 【0038】

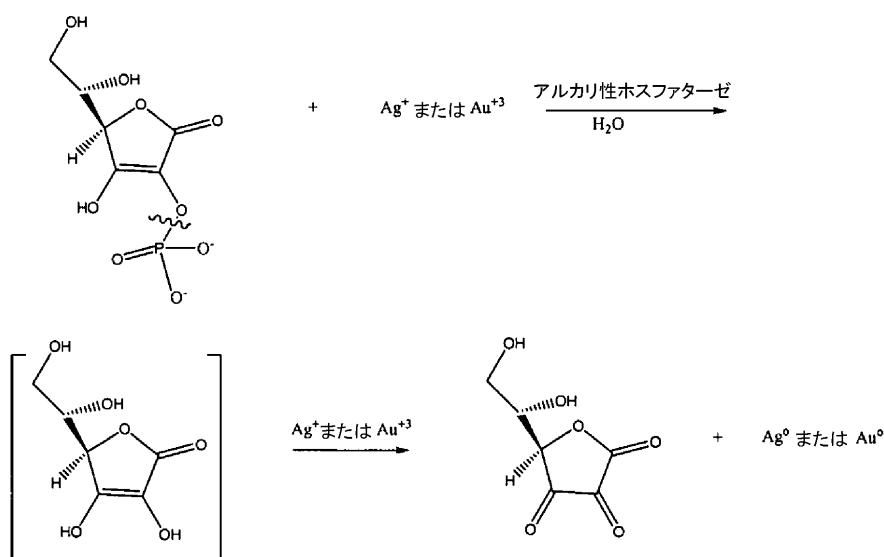
銀のシグナルを増幅させる目的で使用可能な他の還元剤はヒドロキノン、アスコルビン酸、2 - アミノフェノールおよび4 - アミノフェノールである。それらは、更に、金属イオンに還元を受けさせて金属の酸化状態をゼロにする作用も示し、それらを典型的には前記シグナルの補足または増幅の目的で用いる。他の還元剤も本分野の通常の技術者に良く知られており、それらを本明細書で教示する還元剤の代わりに用いることも可能である。

#### 【0039】

本明細書に開示する発明では、還元剤として完全に不活性ではあるが、アルカリ性ホスファターゼによる触媒作用によってホスフェート基が加水分解を受けた後に反応性を示すようになって金属イオンに還元を受けさせて金属の酸化状態 (0) にする能力を有するようになる新規な一連のホスフェートおよびジホスフェートおよび関連誘導体を利用する。以下の構造で示す不活性な還元剤前駆体はアスコルビン酸ホスフェート、即ち特に好適な様である。それはアルカリ性ホスファターゼの存在下で加水分解を受けて活性のある還元剤であるアスコルビン酸になり、これは金、銀および他の金属のカチオンに還元を受けさせて金属 (0) にする能力を有する：

#### 【0040】

#### 【化6】



#### 【0041】

更に別の新規な有機還元剤前駆体には、-トコフェロールホスフェート、セサモールホスフェートおよびオイゲノールホスフェートが含まれ、これは一般構造 V - VI [ここで、Z =  $\text{PO}_3^{2-}$  、そして R は、H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、 $\text{NH}_2$  、 $(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  - 、ニトロ、エーテル、チオエーテルまたはスルホネートであってもよい] で示される。

10

20

30

40

50

**【 0 0 4 2 】**

本発明でアルカリ性ホスファターゼを標識として用いかつアスコルベートホスフェートを基質として用いると下記のいくつかの利点が存在する：

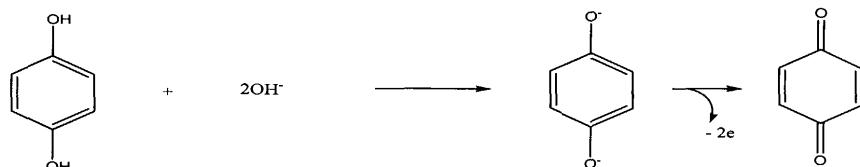
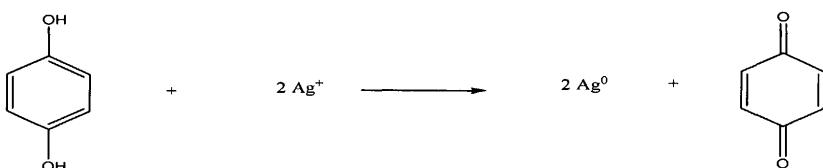
- (1) アルカリ性ホスファターゼは完全に発達した酵素の中の1つであり、そのK<sub>c a t</sub> / K<sub>m</sub>は $1 \times 10^9$  リットル／モル・秒の拡散律速限界に近い。
- (2) アルカリホスファターゼの最適pHは9-10であり、これは当該基質の脱磷酸化によって放出されるヒドロキノンの放出速度が最大の時の還元電位に一致する。
- (3) アリールおよびアルキルホスフェートおよびジホスフェートはかなり安価に合成可能である。
- (4) アリールおよびアルキルホスフェートおよびジホスフェートはアルカリ性ホスファターゼの優れた基質である。 10
- (5) アリールおよびアルキルホスフェートおよびジホスフェートは一般にかなり安定なことから長期間に渡って分解を起こさないように配合可能である。
- (6) アルカリ性ホスファターゼは大部分の酵素に比べて熱および化学品による劣化に耐える非常に安定な酵素である。
- (7) アルカリ性ホスファターゼはかなり小型であることから他の生物学的分子と結合させる方法が開発されている。
- (8) アスコルビン酸ホスフェートはAPの優れた基質でありかつアスコルベートは非常に高い還元電位を有する、即ちそれはAg<sup>+</sup>およびAu<sup>3+</sup>に還元を定量的かつ迅速に受けさせることに加えて副生成物はデヒドロアスコルベートのみである。 20

**【 0 0 4 3 】**

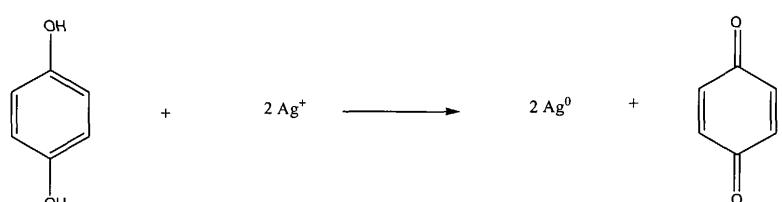
別の優れた還元剤はヒドロキノンジアニオンである。以下に示す構造は、銀カチオンの如き電子受容体の存在下でpHが9-10の時の平衡状態のヒドロキノン-ベンゾキノンの構造を示している。ヒドロキノンジアニオンが銀カチオンに還元を受けさせて不溶な金属を生じさせる責任を負っている実際の種である。pHが高いとヒドロキノンの生成が好都合になる：

**【 0 0 4 4 】**

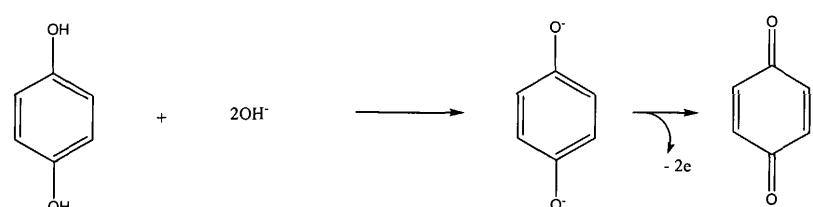
## 【化7】



10



20



30

40

## 【0045】

一般構造II - IVは、また本発明の主題でもある数種のヒドロキノン誘導体である。ヒドロキノンジホスフェート（両方のZ = ホスフェートである一般構造II）がアルカリ性ホスファターゼ酵素による脱磷酸化に好適な基質であり、これは、pHが7-11の時に脱磷酸化を受けてヒドロキノンジアニオン、即ち銀カチオン用の好適な還元剤になる。他のヒドロキノン様誘導体は一般構造V - VIIで表され、ナフトヒドロキノン（VII）およびアントラヒドロキノン（IV）である。それらは、示すように、アリール環内のいずれかの位置がR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>で置換されていてもよくそして酸素がZで置換されていてもよい。置換基R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、おおよそ、前記部位で反応が起こり得るがそれでも所望のpHでジアニオンが生じる能力が保持されるならば如何なる部分であってもよい。本明細書に含める有機置換基のリストは完全ではなく、妥当ないくつかの置換基には下記が含まれる：H、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH-、ニトロ、エーテル、チオエーテルおよびスルホネート。

## 【0046】

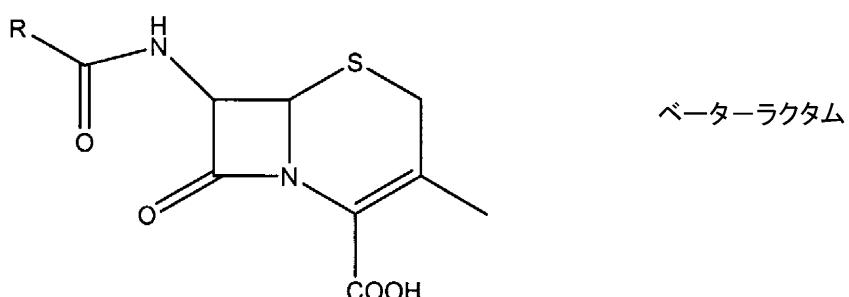
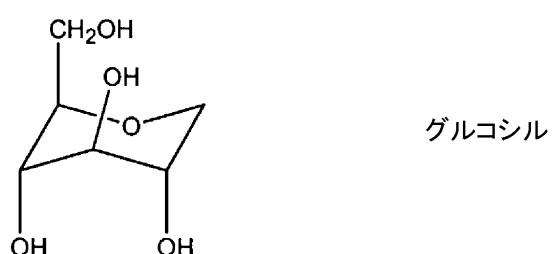
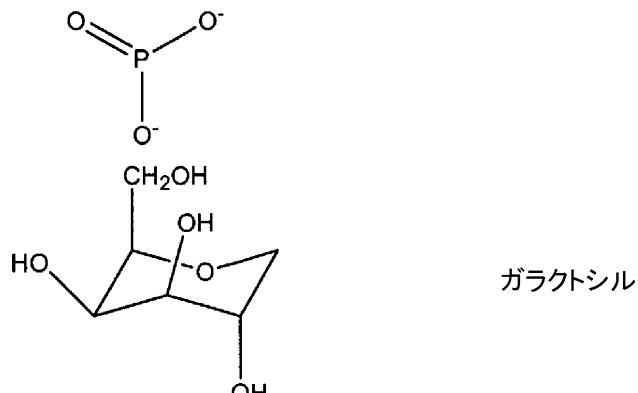
本発明では、以下の構造に示すように、選択した標識-基質対に応じて、いろいろな酵素標識を用いることができる。例えば、エステラーゼをモノ-およびジエステルと協力させて用いてもよい。また、基質であるモノ-およびジ-ガラクトシドおよびモノ-およびジグルコシドに脱保護を受けさせようとする場合には、また、ガラクトシダーゼおよびグルコシダーゼも使用可能である。以下に示す「Z」基には、ホスフェート、ガラクトシル、グルコシル、エステルおよびベータ-ラクタムが含まれる。好適なベータ-ラクタムはセファロスボリンである。本発明の範囲内に入る糖には、当該還元種の酸素と結合する還元末端部を有するいずれも含まれる。R基はH、アルキル、アリール、カルボキシル、カルボキシアルキル、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH-、ニトロ、エーテル、チオエーテル

50

ルまたはスルホネートであってもよい。

【0047】

【化8】



【0048】

最後に示した構造物、即ちC3' - ベータ - ラクタム（即ちセファロスボリン）もまた酵素標識としてのベータ - ラクタマーゼと協力させて使用可能である。前記ベータ - ラクタムのR基はアルキル、アリール、即ちチオフェン、メチルまたはベンジルであってもよい。

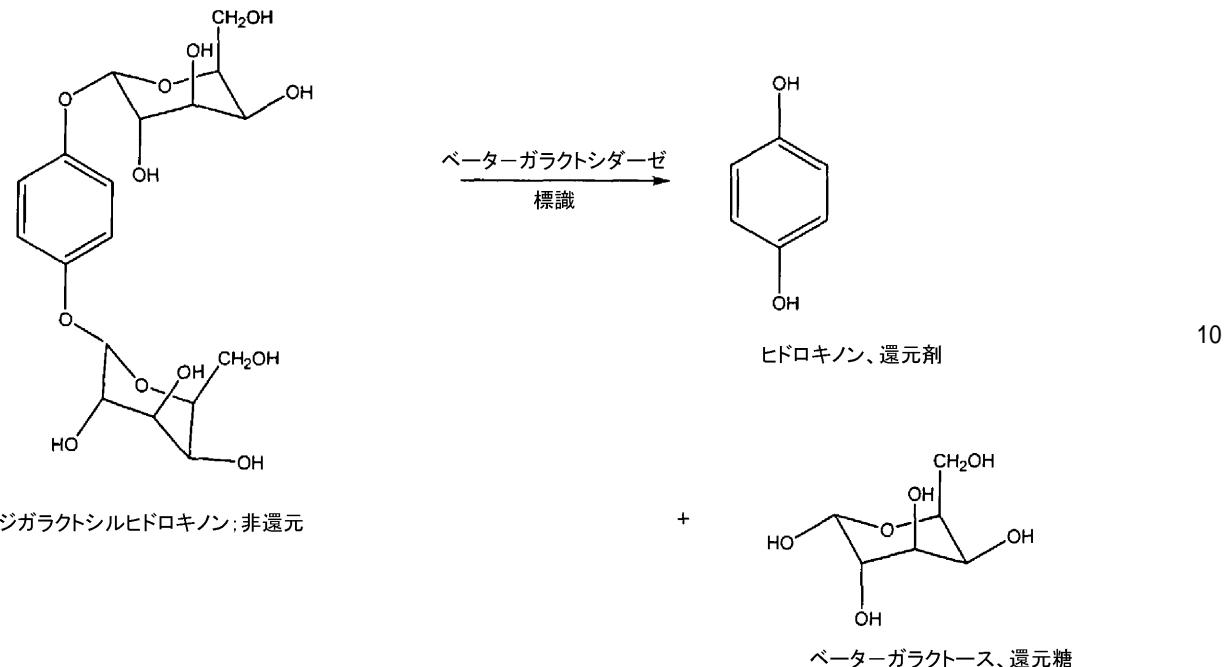
40

【0049】

ガラクトシル、グルコシルおよび他の糖のヒドロキノンおよびアスコルベート誘導体が、不活性な基質の酵素代謝回転によってTWO還元剤、即ちヒドロキノンまたはアスコルベートおよび炭水化物（銀イオンに還元を受けさせて金属銀を生じさせる能力も有する還元末端部を有する）をもたらす点で特に価値がありかつ興味の持たれるものである：

【0050】

## 【化9】



## 【0051】

20

アルカリ性ホスファターゼに加えて、また、酸性ホスファターゼも標識として使用可能であり、この場合には、当該基質が有するホスフェート基の脱保護を pH < 7 で起こさるべきである。そのような反応で放出されたアスコルビン酸はそれでも pH < 7 で優れた還元能力を保持している。

## 【0052】

30

銀金属が核形成部位、例えば金粒子などに付着すると言った良く知られた傾向（「金属組織学」）を利用して、金による前処理段階を設けることで、固定されているアルカリ性ホスファターゼの直ぐ隣接する領域に「種を植え付ける（seed）」ことも可能である。本明細書の実施例に示すように、S A - A P 結合体をビオチニル化結合分子と結合させた後、金イオンを AuCl<sub>3</sub> の形態でアスコルベートホスフェートと一緒に付着させた。前記アスコルベートホスフェートが A P によって脱磷酸化を受けると結果として還元剤であるアスコルベートが生じ、その後、それが金イオンに還元を受けさせて金属金を生じさせる。次に、金属金が核形成部位として働くことで、銀イオンが還元を受けて銀金属になることによるシグナルが更に増幅される。

## 【0053】

本発明の特定の面を説明する目的で以下の実施例を含めるが、限定として解釈されるべきではない。

## 実施例

## 【実施例1】

40

## 【0054】

## 銀（I）にアルカリ性ホスファターゼ媒介還元を受けさせるためのホスフェート

ミクロタイタープレート（図1参照）の穴に硝酸銀を一定分量（50 mM の AgNO<sub>3</sub> を 100 μL）で入れた。前記銀溶液にアスコルビン酸-2-ホスフェート（穴A1、B1）、セサモールホスフェート（穴A2、B2）、ヒドロキノン-1,4-ジホスフェート（穴A3、B3）または2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノールホスフェート（穴A4、B4）のいずれかの 50 mM 溶液を 100 μL 添加したが、全く反応が現れなかった。ウシの腸のアルカリ性ホスファターゼ（0.2 mg / mL を 5 μL）を縦列 B の穴に加えると、各溶液から金属銀（0）が微細な黒色沈澱物として生じるか或は容器の壁が銀で被覆された。

A : 50 mM の AgNO<sub>3</sub> を 100 μL と 50 mM の基質ホスフェートを 100 μL

50

B : 50 mMのAgNO<sub>3</sub>を100 μLと50 mMの基質ホスフェートを100 μLと100 mMのトリス(pH 7.0)中0.2 mg/mLのウシ腸アルカリ性ホスファターゼ(Pierce Chemical、Rockford、IL)を5 μL。

#### 【実施例2】

##### 【0055】

ニトロセルロース上のアルカリ性ホスファターゼ、硝酸銀および基質ホスフェート

ニトロセルロース紙にアルカリ性ホスファターゼ(0.2 mg/mLを5 μL)を加えた後、乾燥させた(図2を参照)。前記ホスフェートの各々の斑点をニトロセルロース上に0.1 Mのトリス(pH 9)中0.05 Mの溶液5 μLとして付けた。各斑点を乾燥させた後、それに0.05 MのAgNO<sub>3</sub>を5 μL加えた時に黒色の沈澱を観察したのはアルカリ性ホスファターゼを加えた斑点のみであった。

10

#### 【実施例3】

##### 【0056】

AP-SA結合体を高いpHで用いてAgのナノ粒子を扁桃腺上にオフラインで発生

Ventana Benchmark(商標)自動染色装置(Ventana Medical Systems, Inc.、Tucson、AZ)を用いて分析用スライドの調製を実施した。手作業でシグナルを発生させる目的で前記スライドを取り出した。本実施例の範囲内で用いる用語「緩衝液」は、氷酢酸(Sigma-Aldrich)を用いてpHを9にしておいた脱イオン(dI)H<sub>2</sub>O中0.1 Mのトリス緩衝液[Trizmaベース(Sigma-Aldrich)]を指す。下記が前記装置で採用した手順である:パラフィン被覆組織をスライド上で75に4分間加熱しそしてEZ Prep(商標)(Ventana、Tucson、AZ)を体積を調整して用いて75で2回処理した後、液体カバースリップ(liquid cover slip)と一緒にEZ Prepを体積を調整して加える。75で4分後にスライドを濯ぎ、そして自動脱パラフィン(automatic deparaffinization)を体積を調整して液体カバースリップと一緒に加えることで前記組織からパラフィンを76で4分間かけて除去した。そのスライドを40に冷却して3回濯いだ後、ANTI-CD20抗体(クローネル26、Ventana、Tucson、AZ)の添加に続いて液体カバースリップそしてインキュベーションを40で16分間行う。そのスライドを濯いだ後、前記組織をビオチニル化万能二次抗体(Universal Secondary Antibody)(Ventana Medical Systems、パート#760-4205)で処理することで、ビオチンと抗-CD20抗体が同一場所に位置するようにした後、液体カバースリップそしてインキュベーションを40で8分間行う。そのスライドを2回濯いだ後、前記装置から取り出して、それらに現像を受けさせる準備が出来るまで、1Xの反応用緩衝液(Ventana、Tucson、AZ)に入れて貯蔵した。

20

30

30

##### 【0057】

そのスライドを1Xの反応用緩衝液から取り出して、緩衝液で10回濯いだ後、そのスライドに緩衝液を300 μL添加することに加えてAP-SA結合体(緩衝液中0.14 mg/mL、Sigma-Aldrich)を100 μL添加する。そのスライドを37で15分間インキュベートした後、緩衝液で10回濯いだ。そのスライドを300 μLの緩衝液に続いて50 μLのAuc1<sub>3</sub>(Sigma-Aldrich)(緩衝液中2.5 μg/mL)そして50 μLのアスコルビン酸ホスフェート(Sigma-Aldrich)(緩衝液中0.1 M)で処理した。そのスライドを37で20分間インキュベートした後、緩衝液で10回濯いだ。そのスライドを300 μLの緩衝液に続いて50 μLの酢酸銀(Sigma-Aldrich)(緩衝液中0.1 M)そして50 μLのアスコルビン酸ホスフェート溶液で処理した後、37で20分間インキュベートした。そのスライドを再び緩衝液で10回濯いだ後、ISH赤色対比染料(Ventana、Tucson、AZ)を対比染料として加えた。そのスライドを前記対比染料と一緒に3分間インキュベートした後、緩衝液で濯いだ。そのスライドにエタノールとキシレンを用いた脱水を受けさせた後、カバースリップを取り付け、その後にスライドを顕微鏡で見た。

40

50

50

**【 0 0 5 8 】**

図3に示したグレースケール写真で分かるように、正常な扁桃腺では正常なB細胞の細胞膜および細胞質領域に染色部が存在する。染色強度はEnhanced V-Red Detectionキット(Ventana、Tuscon、AZ)を用いて検出した正対照(図5)のそれに匹敵している。

**【実施例4】****【 0 0 5 9 】**

AP-SA結合体を高いpHで用いてAgのナノ粒子を扁桃腺上にオンラインで発生

この実施例と実施例3の間の主な差は、実施例3ではスライドをAP-SAを用いた現像を行う前に装置から取り出したが、この実施例では染色段階の完全な自動化を示す点にある。Ventana Benchmark装置を用いて分析用スライドの調製を実施した。本実施例の範囲内で用いる用語「緩衝液」は、氷酢酸(Sigma-Aldrich)を用いてpHを9にしておいた脱イオンH<sub>2</sub>O中0.1Mのトリス緩衝液[Trizmaベース-Sigma-Aldrich]を指す。下記が前記装置で採用した手順である：パラフィン被覆組織をスライド上で75に4分間加熱しそしてEZ Prepを体積を調整して用いて75で2回処理した後、液体カバースリップと一緒にEZ Prepを体積を調整して加える。75で4分後にスライドを灌ぎ、そして自動脱パラフィンを体積を調整して液体カバースリップと一緒に加えることで前記組織からパラフィンを76で4分間かけて除去した。そのスライドを40に冷却して3回灌いだ後、ANTI-CD20抗体(クローンL26、Ventana、Tuscon、AZ)の添加に続いて液体カバースリップそしてインキュベーションを40で16分間行う。そのスライドを灌いだ後、前記組織をビオチニル化万能二次抗体(Ventana Medical Systems、パート#760-4205)で処理することで、ビオチンと抗-CD20抗体が同一場所に位置するようにした後、液体カバースリップそしてインキュベーションを40で8分間行う。そのスライドを緩衝液で2回灌いだ後、液体カバースリップを取り付けそしてAP-SA結合体(Sigma-Aldrich、緩衝液中0.14mg/mLを100μL)を加えた後、インキュベーションを70で16分間行う。そのスライドを緩衝液で灌ぎ、液体カバースリップを取り付けた後、AuCl<sub>3</sub>(Sigma-Aldrich)(1.25μg/mL)とアスコルビン酸ホスフェート(Sigma-Aldrich)(0.05M)を1:1で緩衝液に入れることで生じさせた溶液を100μL加えた。そのスライドを37で20分間インキュベートし、緩衝液で灌いだ後、液体カバースリップで覆った。そのスライドに酢酸銀(Sigma-Aldrich)(0.05M)とアスコルビン酸ホスフェート(0.05M)が1:1の溶液を全体で100μL加えた後、そのスライドを37で20分間インキュベートした。そのスライドを緩衝液で3回灌ぎ、洗浄剤が洗い流されるまで処理した後、それにエタノールとキシレンを用いた脱水を受けさせ、次にカバースリップを前記スライドに取り付けた後、そのスライドを顕微鏡で見た。

**【 0 0 6 0 】**

図4に示したグレースケール写真で分かるように、正常な扁桃腺では正常なB細胞の細胞膜および細胞質領域に染色部が存在する。染色強度はEnhanced V-Red Detectionキット(Ventana、Tuscon、AZ)を用いて検出した正対照(図5)のそれに匹敵している。

**【実施例5】****【 0 0 6 1 】**

骨格筋上の抗-デスミン

ホルマリンで固定してパラフィンに埋め込んだ骨格筋を切断した後、光顯微鏡用ガラススライドの上に置いた。Ventana Medical SystemのBenchmark Slide染色装置を用いて断片からパラフィンを除去した。その断片をBenchmark Markの上に置いたままプロテアーゼ1(Ventana)で4分間処理した。次に、断片を抗-デスミン(Ventana、カタログ番号760-2513)モノクローナル

10

20

30

40

50

抗体と一緒にして37で16分間インキュベートした。前記装置上で反応用緩衝液を用いた洗浄を行った後、ウサギ抗-マウス抗体を37で8分間インキュベートした。次に、断片を反応用緩衝液で灌いだ後、マウス抗-ウサギ抗体と一緒にして37で8分間インキュベートした(Amplification Kit、Ventana、カタログ番号760-080)。次に、その断片を反応用緩衝液で灌いだ後、ビオチニル化二次抗体であるビオチニル化万能二次抗体(Ventana Medical Systems、パート#760-4205)の混合物と一緒にして37で8分間インキュベートした。その断片を灌いだ後、ストレプトアビシン-アルカリ性ホスファターゼの溶液(Enhanced SA-/Alk Phos/VR red Ventana、カタログ番号253-2181)を37で16分間インキュベートした。次に、その断片をBenchmark Slides染色装置から取り出した。次に、そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで洗浄した後、2.5 μg/mlの水素テトラブロモ金酸塩(III)水化物(Alidrich、カタログ番号44,212)(500 μl)と一緒にして37で4分間インキュベートした。その溶液を脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、各断片に0.5Mのトリス緩衝液(pH 9.0)中50 mMのAgNO<sub>3</sub>(Sigma #S-0139)を250 μlおよびPVA(平均分子量70,000から100,000、Sigma #P-1763)が5%入っている0.5MのDEA緩衝液(pH 10.0)中100 mMのアスコルビン酸ホスフェート(Sigma A-8960)を250 μl加えた。そのスライドを37で20分間インキュベートした。そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、対比染色無しにカバースリップで覆った。結果を図6に示す。

10

20

30

40

## 【実施例6】

## 【0062】

## 脳上の抗-S100

ホルマリンで固定してパラフィンに埋め込んだ脳組織を切断した後、光顕微鏡用ガラススライドの上に置いた。VentanaのBenchmark Slides染色装置を用いて断片からパラフィンを除去した。次に、断片を抗-S100ポリクローナル抗体(Ventana、カタログ番号760-2523)と一緒にして37で16分間インキュベートした。次に、その断片を反応用緩衝液で灌いだ後、ビオチニル化二次抗体であるビオチニル化万能二次抗体(Ventana Medical Systems、パート#760-4205)の混合物と一緒にして37で8分間インキュベートした。その断片を灌いだ後、ストレプトアビシン-アルカリ性ホスファターゼの溶液(Enhanced SA-/Alk Phos/VR red Ventana、カタログ番号253-2181)を37で16分間インキュベートした。次に、その断片をBenchmark Slides染色装置から取り出した。次に、そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで洗浄した後、2.5 μg/mlの水素テトラブロモ金酸塩(III)水化物(Alidrich、カタログ番号44,212)(500 μl)と一緒にして37で4分間インキュベートした。その溶液を脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、各断片に0.5Mのトリス緩衝液(pH 9.0)中50 mMのAgNO<sub>3</sub>(Sigma #S-0139)を250 μlおよびPVA(平均分子量70,000から100,000、Sigma #P-1763)が5%入っている0.5MのDEA緩衝液(pH 10.0)中100 mMのアスコルビン酸ホスフェート(Sigma A-8960)を250 μl加えた。そのスライドを37で20分間インキュベートした。そのスライドにNuclear Fast Redによる対比染色を受けさせた後、カバースリップで覆った。結果を図7に示す。

50

## 【実施例7】

## 【0063】

## 脳上のウサギ負対照

ホルマリンで固定してパラフィンに埋め込んだ脳を切断した後、光顕微鏡用ガラススライドの上に置いた。VentanaのBenchmark Slides染色装置を用いて断片からパラフィンを除去した。次に、断片をウサギ負対照(Ventana、カタログ番号760-2023)と一緒にして37で16分間インキュベートした。次に、その断片

を反応用緩衝液で灌いだ後、ビオチニル化二次抗体であるビオチニル化万能二次抗体（Ventana Medical Systems、パート#760-4205）の混合物と一緒にして37で8分間インキュベートした。その断片を灌いだ後、ストレプトアビジン・アルカリ性ホスファターゼの溶液（Enhanced SA-/ALK Phos/VR red Ventana、カタログ番号253-2181）を37で16分間インキュベートした。次に、その断片をBenchmarkスライド染色装置から取り出した。次に、そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで洗浄した後、2.5 μg/mlの水素テトラブロモ金酸塩（III）水化物（Aldrich、カタログ番号44,212）（500 μl）と一緒にして37で4分間インキュベートした。その溶液を脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、各断片に0.5Mのトリス緩衝液（pH9.0）中50mMのAgNO<sub>3</sub>（Sigma #S-0139）を250 μlおよびPVA（平均分子量70,000から100,000、Sigma #P-1763）が5%入っている0.5MのDEA緩衝液（pH10.0）中100mMのアスコルビン酸ホスフェート（Sigma A-8960）を250 μl加えた。そのスライドを37で20分間インキュベートした。そのスライドにNuclear Fast Redによる対比染色を受けさせた後、カバースリップで覆った。結果を図8に示す。

#### 【0064】

図7には灰-黒色染色が観察されたが、これを図8には灰-黒色染色が観察されないことと比較することによって、図7に示されている染色パターンは抗原に特異的であることが分かる、と言うのは、図8は負のウサギ対照を用いて実施した時の図であるからである。図9は、抗-S100を用いて脳組織に関して実施したケースと同じではあるが、VentanaのEnhanced V-Red Detection Kitを用いて検出した図である。染色パターンは図7に見られるそれと同じであることが観察されるであろう。

#### 【実施例8】

#### 【0065】

#### 非酵素的増幅を用いた骨格筋上の抗-デスミン

この実施例では、銀シグナルの化学的増幅を用いることで元々の銀付着量をアスコルベートによる還元の関数として増加させることができることを示す。ホルマリンで固定してパラフィンに埋め込んだ骨格筋を切断した後、光顯微鏡用ガラススライドの上に置いた。VentanaのBenchmarkスライド染色装置を用いて断片からパラフィンを除去した。その断片をBenchmarkの上に置いたままプロテアーゼ1（Ventana）で4分間処理した。次に、断片を抗-デスミン（Ventana、カタログ番号760-2513）モノクローナル抗体と一緒にして37で16分間インキュベートした。前記装置上で反応用緩衝液を用いた洗浄を行った後、ウサギ抗-マウス抗体を37で8分間インキュベートした。次に、断片を反応用緩衝液で灌いだ後、マウス抗-ウサギ抗体と一緒にして37で8分間インキュベートした（Amplification Kit、Ventana、カタログ番号760-080）。次に、その断片を反応用緩衝液で灌いだ後、ビオチニル化二次抗体であるビオチニル化万能二次抗体（Ventana Medical Systems、パート#760-4205）の混合物と一緒にして37で8分間インキュベートした。その断片を灌いだ後、ストレプトアビジン・アルカリ性ホスファターゼの溶液（Enhanced SA-/ALK Phos/VR red Ventana、カタログ番号253-2181）を37で16分間インキュベートした。次に、その断片をBenchmarkスライド染色装置から取り出した。次に、そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで洗浄した後、2.5 μg/mlの水素テトラブロモ金酸塩（III）水化物（Aldrich、カタログ番号44,212）（500 μl）と一緒にして37で4分間インキュベートした。その溶液を脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、各断片に0.5Mのトリス緩衝液（pH9.0）中50mMのAgNO<sub>3</sub>（Sigma #S-0139）を250 μlおよびPVA（平均分子量70,000から100,000、Sigma #P-1763）が5%入っている0.5MのDEA緩衝液（pH10.0）中100mMのアスコルビン酸ホスフェート（Sigma A-8960）を250 μl加えた。そのスライドを37で20分間インキュベートした。そのスライドにNuclear Fast Redによる対比染色を受けさせた後、カバースリップで覆った。結果を図8に示す。

10

20

30

40

50

0 mMのアスコルビン酸ホスフェート(Sigma A-8960)を250 μl加えた。そのスライドを37℃で20分間インキュベートした。そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ。次に、それを0.1Mのクエン酸緩衝液(pH 3.8)中25mMの4-メチルアミノフェノール(Aldrich #129720)と12mMのAgNO<sub>3</sub>溶液に入れて37℃で10分間インキュベートすることでシグナルを増幅させた。図10に、増幅させたシグナルを非酵素的増幅を受けさせていない実施例9(図11)のそれと比較して示す。

#### 【実施例9】

#### 【0066】

#### 非酵素的増幅を用いた骨格筋上の抗-デスミン

ホルマリンで固定してパラフィンに埋め込んだ骨格筋を切断した後、光顕微鏡用ガラススライドの上に置いた。Ventana Medical SystemsのBenchMarkスライド染色装置を用いて断片からパラフィンを除去した。その断片をBenchMarkの上に置いたままプロテアーゼ1で4分間処理した。次に、断片を抗-デスミンモノクローナル抗体と一緒にして37℃で16分間インキュベートした。前記装置上で反応用緩衝液を用いた洗浄を行った後、ウサギ抗-マウス抗体を37℃で8分間インキュベートした。次に、断片を反応用緩衝液で灌いだ後、マウス抗-ウサギ抗体と一緒にして37℃で8分間インキュベートした。次に、その断片を反応用緩衝液で灌いだ後、ビオチニル化二次抗体の混合物と一緒にしてインキュベートした。その断片を灌いだ後、ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼの溶液を16分間インキュベートした。次に、その断片をBenchMark自動スライド染色装置から取り出した。次に、そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで洗浄した後、2.5 μg/mlの水素テトラプロモ金酸塩(III)水化物(500 μl)と一緒にして37℃で4分間インキュベートした。その溶液を脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ後、各断片に0.5Mのトリス緩衝液(pH 9.0)中50mMのAgNO<sub>3</sub>を250 μlおよびPVA(平均分子量70,000から100,000)が5%入っている0.5MのDEA緩衝液(pH 10.0)中100mMのアスコルビン酸ホスフェートを250 μl加えた。そのスライドを37℃で10分間インキュベートした。そのスライドを脱イオンH<sub>2</sub>Oで灌いだ。図11に、増幅無しシグナルを実施例8(図10)のそれと比較して示す。

#### 【実施例10】

#### 【0067】

#### ヒドロキノン-1,4-ジホスフェートの合成

ヒドロキノンと2当量のオキシ塩化燐と2当量の無水ピリジンを無水トルエン(0.1Mになるように)に入れて30分間反応させた。その混合物を更に30分間還流させた後、周囲温度になるまで冷却した。ケイソウ土の詰め物に通す濾過で塩化ピリジニウムを除去した後、少量の乾燥トルエンで灌いだ。その濾液に濃縮を真空下40℃で受けさせた後、その残留物に炭酸アンモニウム水溶液による加水分解をpHが7になるまで受けさせた。その生成物をフラッシュC18シリカゲル使用逆相分離で精製することで所望の生成物を得て、それをMS、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRで確認した。

#### 【実施例11】

#### 【0068】

#### アントラヒドロキノン-1,4-ジホスフェートおよびナフトヒドロキノン-1,4-ジホスフェートの合成

アントラヒドロキノンまたはナフトヒドロキノンを出発材料として用いる以外は実施例10の手順を実施する。

#### 【実施例12】

#### 【0069】

#### 基質であるホスフェートの一般的合成：セサモールホスフェートの合成

乾燥させておいた500mlの丸底フラスコに窒素雰囲気下でPOCl<sub>3</sub>(89.5ミリモル)を移した。200mLの乾燥ジクロロメタンにセサモール(35.8ミリモル、

10

20

30

40

50

1当量)とトリエチルアミン(71.7ミリモル)を入れることで生じさせた溶液を前記POCl<sub>3</sub>溶液に4時間かけて滴下した。搅拌を周囲温度で一晩行った後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。その残留物を100mLのジクロロメタンに溶解させた後、セライトに通す濾過で塩を除去した。その生成物に100mLの飽和炭酸アンモニウムによるクエンチを受けさせる(queenching)ことで分離を起こさせて生成物を水の中に入り込ませた。その有機層を廃棄した後、ロータリーエバポレーターを用いて水相を乾燥することで所望ホスフェートを8.2グラム(90%の収率)得た。生成物の同定をMSで立証し、そしてHPLCを214nmで用いた分析で生成物の純度は99%を超えることが分かった。

#### 【実施例13】

10

#### 【0070】

基質であるホスフェートの一般的合成：オイゲノールホスフェートおよびP MCPホスフェート合成

オイゲノールまたはP MCP(2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール)を出発材料として用いる以外は実施例12の手順を繰り返す。

#### 【0071】

本発明の方法および組成物は多様な態様の形態で取り入れ可能であるが、本明細書に説明かつ記述したのはそれの中の少しのみであることは理解されるであろう。本発明の精神からも必須特徴からも逸脱しない限り本発明は他の具体的形態で具体化可能である。記述した態様はあらゆる面で単に説明として解釈されるべきであり、制限として解釈されるべきではない。従って、この上に行った説明ではなく添付請求の範囲で本発明の範囲を示す。本請求の範囲の意味および相当物の範囲内に入るあらゆる変形は本発明の範囲内に含まれるべきである。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0072】

30

【図1】図1は、4個の穴が2つの縦列に配列している8個のミクロタイター穴の写真である。縦列Aは、100mMのトリス(pH9.0)に50mMの硝酸銀が100μLと50mMのホスフェート基質が100μL入っている対照縦列である。縦列Bに入っている成分も同じではあるが、これには、100mMのトリス(pH7.0)中0.2mg/mLのウシ腸アルカリ性ホスファターゼ(Pierce)が5μL添加されている。縦列Bは、アルカリ性ホスファターゼの媒介で還元基質が放出され(即ちアスコルビン酸-2-ホスフェートからアスコルビン酸)そして放出された還元基質によって硝酸銀から銀金属粒子への還元が付随して起こる作用を示している。

30

【図2】図2は、100mMのトリス(pH7.0)中0.2mg/mLのウシ腸アルカリ性ホスファターゼ(Pierce)を5μLと100mMのトリス(pH9.0)中50mMのホスフェート(実施例1で得た)溶液を5μLと50mMの硝酸銀を5μL用いて処理したニトロセルロース紙上の4斑点の写真である。アスコルビン酸-2-ホスフェート(AAP)、セサモールホスフェート(SP)、ヒドロキノン-1,4-ジホスフェート(HQP)、2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノールホスフェート(P MCP)。

40

【図3】図3は、AAP-SA結合体、金前処理そしてアスコルビン酸ホスフェート(AA P)使用銀還元を用いて染色した正常な扁桃腺組織のグレースケール顕微鏡写真である。

【図4】図4は、AAP-SA結合体、金前処理そしてAAP使用銀還元を用いて染色した正常な扁桃腺組織のグレースケール顕微鏡写真(ただ1つの差は銀シグナルをオンラインで完全に生じさせた点のみである)である。

【図5】図5は、図3-4のための正対照のグレースケール顕微鏡写真である。

【図6】図6は、金前処理、AAPおよびAgNO<sub>3</sub>を用いてインキュベーションを20分間行うことで検出した骨格筋上の抗-デスミン抗体の顕微鏡写真である。

【図7】図7は、金前処理、AAPおよびAgNO<sub>3</sub>を用いてインキュベーションを20分間行うことで検出した脳上の抗-S100の顕微鏡写真である。

50

【図8】図8は、金前処理、AAPおよびAgNO<sub>3</sub>を用いてインキュベーションを20分間行うことで検出した脳上のウサギ負対照の顕微鏡写真である。

【図9】図9は、Ventana V Red検出を用いた脳組織上の抗-S100抗体の顕微鏡写真である。

【図10】図10は、金前処理、AAPおよびAgNO<sub>3</sub>を用いてインキュベーションを10分間行いそして4-メチルアミノフェノール増幅を10分間行った時の骨格筋上の抗-デスミン抗体の顕微鏡写真である。

【図11】図11は、非酵素的増幅を行なわない時の骨格筋上の抗-デスミン抗体の顕微鏡写真である。増幅段階を設けない以外は図9に示した条件と同じ。

【図1】

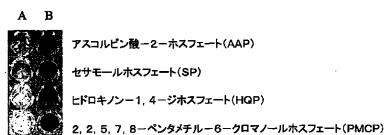


Fig. 1

【図2】

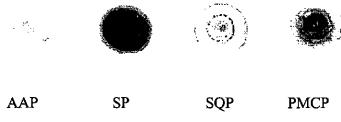


Fig. 2

【図3】

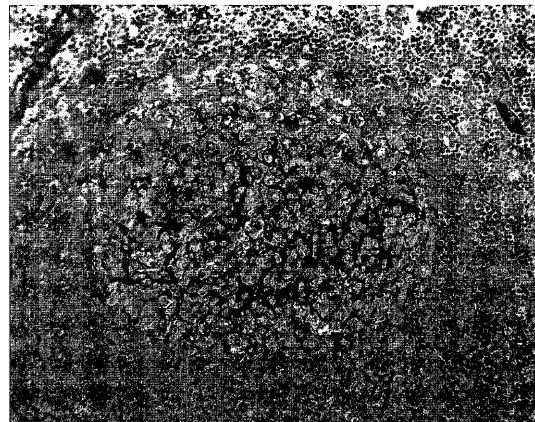


Fig. 3

【図4】

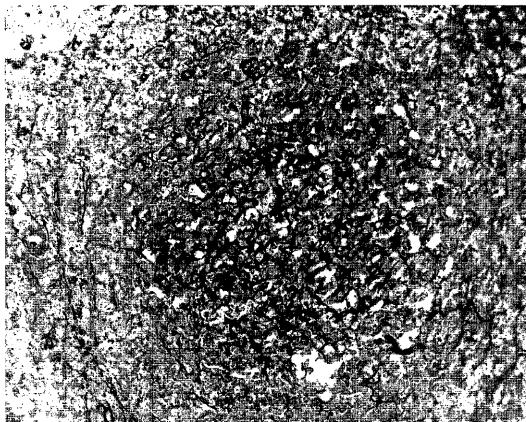


Fig. 4

【図5】

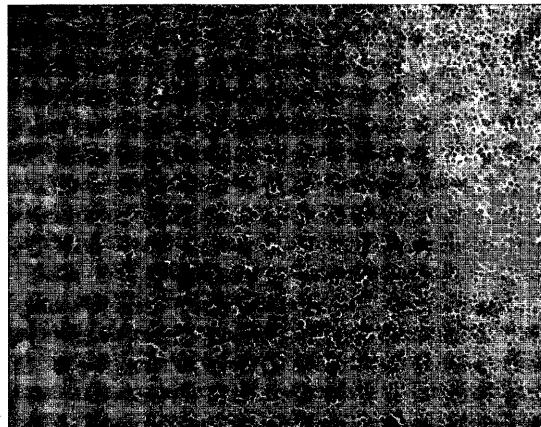


Fig. 5

【図6】

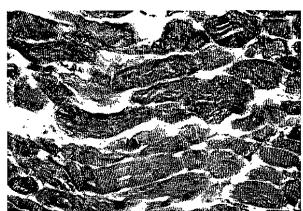


Fig. 6

【図8】

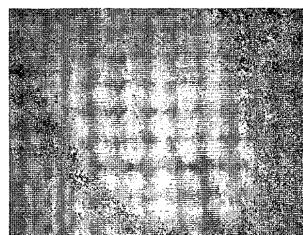


Fig. 8

【図7】

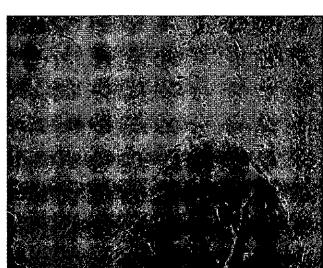


Fig. 7

【図9】

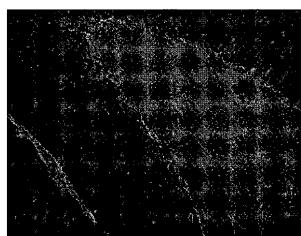


Fig. 9

【図10】

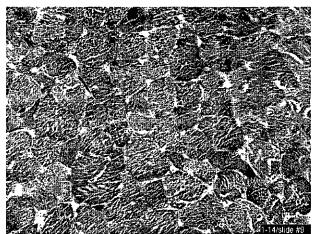


Fig. 10

【図11】



Fig. 11

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

						International Application No PCT/US2004/020700
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/58 C07C69/017 C07F9/12 C07H15/20 C07H15/24 C07H15/26						
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07C C07F C07H						
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, BIOSIS, EMBASE, PAJ						
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>						
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.	
A	US 2002/142411 A1 (HAINFELD JAMES F) 3 October 2002 (2002-10-03) cited in the application the whole document				1-11, 18-32,36	
A	US 5 116 734 A (HIGGS THOMAS W ET AL) 26 May 1992 (1992-05-26) cited in the application the whole document				1-11, 18-32,36	
A	WO 03/035900 A (BURTON MICHAEL) 1 May 2003 (2003-05-01) the whole document				1-11, 18-32,36	
A	US 5 073 483 A (LEBACQ PHILIPPE) 17 December 1991 (1991-12-17) the whole document				1-11, 18-32,36	
					-/-	
<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 "Y" 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 "&" document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report			
19 November 2004			22.03.05			
Name and mailing address of the ISA			Authorized officer			
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016			Döpfer, K-P			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/020700

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATTON W F: "Detection technologies in proteome analysis"  JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES &amp; APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 771, no. 1-2, 5 May 2002 (2002-05-05), pages 3-31, XP004350527  ISSN: 1570-0232  page 4, right-hand column, line 1 - page 5, left-hand column, last line</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS [Online]  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983.  MEUR S K ET AL: "A NEW TECHNIQUE FOR LOCALIZATION OF CELLULASE IN-SITU USING SILVER NITRATE"  XP002305553  Database accession no. PREV198477046809  abstract  &amp; STAIN TECHNOLOGY,  vol. 58, no. 2, 1983, pages 97-100,  ISSN: 0038-9153</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS [Online]  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984,  PARTANEN S: "A DIRECT COLORING METAL PRECIPITATION METHOD FOR THE DEMONSTRATION OF ARYL SULFATASE A AND ARYL SULFATASE B"  XP002305554  Database accession no. PREV198478052564  abstract  &amp; HISTOCHEMICAL JOURNAL,  vol. 16, no. 5, 1984, pages 501-506,  ISSN: 0018-2214</p> <p>-----</p>	1-11, 18-32, 36
A		1-11
A		1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Inte	lational application No.
PCT/US2004/020700	

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11, 18-32, 36

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/020700

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11,18-32,36

Method for detecting *in situ* an immunohistochemical epitope or for *in situ* staining a biological sample having an epitope or nucleotide sequence of interest; kit for performing said method  
---

2. claims: 14,33

Sesamol phosphate esters and sesamol glycosides;  
O-(beta-lactamyl)-sesamol compounds  
---

3. claims: 16,17

chromanol glycosides ; chromanol phosphate esters;  
O-(beta-lactamyl)-chromanol compounds  
---

4. claims: 15,34,35

Eugenol phosphate esters; eugenol glucosides; eugenol galactosides; O-(beta-lactamyl)-eugenol compounds  
---

5. claims: 12,13

anthrahydroquinone phosphate esters, anthrahydroquinone glucosides and galactosides;O-(beta-lactamyl)- anthrahydroquinone compounds  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/US2004/020700
---

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2002142411	A1	03-10-2002	NONE			
US 5116734	A	26-05-1992	AU WO	6295890 A 9103718 A1	08-04-1991 21-03-1991	
WO 03035900	A	01-05-2003	EP WO US	1438423 A1 03035900 A1 2004235081 A1	21-07-2004 01-05-2003 25-11-2004	
US 5073483	A	17-12-1991	FR FR AT DE DE EP JP	2629100 A1 2680374 A1 77654 T 68901878 D1 68901878 T2 0334756 A1 2009400 A	29-09-1989 19-02-1993 15-07-1992 30-07-1992 17-12-1992 27-09-1989 12-01-1990	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 12 Q 1/44 (2006.01)	C 12 Q 1/42	
C 07 F 9/12 (2006.01)	C 12 Q 1/34	
C 07 F 9/655 (2006.01)	C 12 Q 1/44	
	C 07 F 9/12 C S P	
	C 07 F 9/655	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CZ,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,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,M,A,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カーナグ , ケイシー・エイ

アメリカ合衆国アリゾナ州85713トウーソン・ナンバービー-10・セントジョーンズブルバード1765

(72)発明者 コスメダー , ジエローム・ダブリュー

アメリカ合衆国アリゾナ州85750トウーソン・ノースモカシントレイル5530

(72)発明者 ロジヤーズ , ポーラ・エム

アメリカ合衆国アリゾナ州85711トウーソン・イーストホイットマンストリート4338

(72)発明者 ワング , ジエニファー

アメリカ合衆国アリゾナ州85719トウーソン・イーストドラシュマン1019

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR10 QR13 QR15 QR32 QR41 QR56

QR66 QR77 QS03 QS20 QS28 QS36 QX01

4H050 AA01 AA03 AB81

专利名称(译)	连接酶催化的金属以改善免疫组织化学表位和核酸序列的原位检测		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007528986A</a>	公开(公告)日	2007-10-18
申请号	JP2006517725	申请日	2004-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	每次塔纳Medeikaru系统公司的Rete		
[标]发明人	ビーニアーズクリストファー カーナグケイシーエイ コスメダージエロームダブリュー ロジヤーズポーラエム ワングジエニファー		
发明人	ビーニアーズ,クリストファー カーナグ,ケイシー·エイ コスメダー,ジエローム·ダブリュー ロジヤーズ,ポーラ·エム ワング,ジエニファー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/42 C12Q1/34 C12Q1/44 C07F9/12 C07F9/655 C07F9/09 C07H15/20 C07H15/24 C07H15/26 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/581 C07F9/093 C07F9/65517 C07F9/65522 C07H15/20 C07H15/24 C07H15/26		
FI分类号	G01N33/543.545.D G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/543.545.S C12Q1/68.A C12Q1/42 C12Q1/34 C12Q1/44 C07F9/12.CSP C07F9/655		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR10 4B063/QR13 4B063/QR15 4B063 /QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS20 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4H050/AA01 4H050/AA03 4H050/AB81		
优先权	60/482596 2003-06-24 US		
其他公开文献	<a href="#">JP4648902B2</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及用于原位检测包含在生物样品中的感兴趣的免疫组织化学表位或核酸序列的新型组合物和方法，所述生物样品包含酶标记的结合分子和感兴趣的表位或序列在对氧化还原和可溶性金属离子惰性的还原物质的存在下结合因此，所述金属离子向金属原子的还原可能发生在所述酶被拴系的点处或附近。描述还原剂是一种新颖的磷酸盐衍生物，以活化进行还原到金属离子成为与磷酸酶接触在不溶性金属的还原形式。

