

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4684511号  
(P4684511)

(45) 発行日 平成23年5月18日(2011.5.18)

(24) 登録日 平成23年2月18日(2011.2.18)

(51) Int. Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/532 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/532 A
<b>C 1 2 P 11/00 (2006.01)</b>	C 1 2 P 11/00
<b>C 1 2 Q 1/42 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/42
<b>GO 1 N 33/58 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/58 Z
<b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/68

請求項の数 29 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-522086 (P2001-522086)	(73) 特許権者	398032751
(86) (22) 出願日	平成12年8月15日(2000.8.15)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(65) 公表番号	特表2003-508790 (P2003-508790A)		ィックス・プロダクツ・ゲーエムベーハー
(43) 公表日	平成15年3月4日(2003.3.4)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/022397		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02001/018548	(74) 代理人	100127926
(87) 国際公開日	平成13年3月15日(2001.3.15)		弁理士 結田 純次
審査請求日	平成19年8月7日(2007.8.7)	(74) 代理人	100091731
(31) 優先権主張番号	09/393,579		弁理士 高木 千嘉
(32) 優先日	平成11年9月9日(1999.9.9)	(74) 代理人	100080355
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西村 公佑
		(72) 発明者	スティーヴ・ドゥケツァー
			アメリカ合衆国カリフォルニア州9507
			0. サラトoga. ピアースロード1341
			5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的標識のための保護基

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中のホモシステインを検出およびその量を定量する方法に用いられるキットであって：ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基を有する保護されたアルキル化試薬を含み、上記ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基のカルボニルが保護された官能基で誘導体化されており、上記保護された官能基は、脱保護された場合にホモシステインを化学的に修飾して修飾ホモシステインを形成することができる、第一の試薬、上記の保護されたアルキル化試薬を脱保護できる活性化試薬を含む第二の試薬、および上記修飾ホモシステインに特異的に結合できる第三の試薬のそれぞれが、少なくとも1回のアッセイを実施するのに十分な量詰め合わされている、キット。

【請求項2】

上記第一の試薬はホスフェート保護基を有する保護されたハロケトンを含む請求項1記載のキット。

【請求項3】

上記第一の試薬はさらにホモシステインジスルフィド還元剤を含む請求項1記載のキット。

【請求項4】

上記第一の試薬はさらに修飾ホモシステインでコートされた固体マトリックスを含む請求項1記載のキット。

【請求項5】

10

20

上記固体マトリックスはラテックスまたはガラスビーズを含む請求項 4 記載のキット。

【請求項 6】

上述の保護されたハロケトンハ C A B A エノールホスフェートまたは B A B A エノールホスフェートである請求項 2 記載のキット。

【請求項 7】

上記第二の試薬は、さらにホスファターゼを含有する請求項 1 記載のキット。

【請求項 8】

上記ホスファターゼはアルカリホスファターゼである請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

サンプル中のホモシステインを検出およびその量を定量する方法に用いられるキットであって：ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基を有する保護されたアルキル化試薬を含み、上記ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基のカルボニルが保護された官能基で誘導体化されており、上記保護された官能基は、脱保護された場合にホモシステインを化学的に修飾して修飾ホモシステインを形成することができる、第一の試薬、ならびに、上記の保護されたアルキル化試薬を脱保護できる活性化試薬および修飾されたホモシステインに特異的に結合できる受容体でコートされた固体マトリックスを含む第二の試薬のそれぞれが、少なくとも 1 回のアッセイを実施するのに十分な量詰め合わされている、キット。

10

【請求項 10】

上記受容体は抗体または免疫学的に活性なそのフラグメントである請求項 9 記載のキット。

20

【請求項 11】

上記マトリックスはさらにそれに結合したシグナリング物質を包含する請求項 4 または 9 記載のキット。

【請求項 12】

上記シグナリング物質は化学ルミネセンス物質、蛍光物質または色素原物質を含む請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

ホモシステインの含有が疑われるサンプル中のホモシステインの量を定量する方法において、以下の工程：

30

( a ) 水性メジウム中に

( 1 ) 上記サンプル

( 2 ) ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基を有する保護されたアルキル化試薬を含み、上記ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基のカルボニルが保護された官能基で誘導体化されており、上記保護された官能基は、ホモシステインのスルフヒドリル基を化学的に修飾して修飾ホモシステインを形成するよう活性化させることができる、第一の試薬、および

( 3 ) 上記の修飾されたホモシステインに特異的に結合して免疫複合体を形成できるリガンドを含む第二の試薬、および

( 4 ) 上記の保護されたアルキル化試薬を活性化できる第三の試薬を加える工程、

40

( b ) 上記サンプル中のホモシステインの量に相関する上記免疫複合体の量を測定する工程、

を含む方法。

【請求項 14】

上記第一の試薬はさらにジスルフィド還元剤を含む請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

上記の保護されたアルキル化試薬はハロビニルエーテルまたはエステルである請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

50

上記ハロピニルエーテルまたはエステルは - ハロケトンエノールホスフェートである請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

上記 - ハロケトンエノールホスフェートは B A B A エノールホスフェートおよび C A B A エノールホスフェートからなる群より選択される請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

上記第三の試薬はホスファターゼである請求項 13 記載の方法。

【請求項 19】

上記ホスファターゼはアルカリホスファターゼである請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

上記第一の試薬はさらに h c y - A B A でコートされた固体マトリックスを含む請求項 13 記載の方法。

【請求項 21】

上記第一の試薬はさらに修飾されたホモシステインに結合できる受容体でコートされた固体マトリックスを含む請求項 13 記載の方法。

【請求項 22】

上記固体マトリックスはラテックスまたはガラスビーズを含む請求項 20 または 21 記載の方法。

【請求項 23】

上記固体マトリックスはマイクロタイタープレートを含む請求項 20 または 21 記載の方法。

【請求項 24】

上記受容体は抗体または抗体の免疫学的に活性なフラグメントである請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】

サンプル中のホモシステインの量を定量する方法において、上記ホモシステインの少なくとも一部はジスルフィド型であり、以下の工程：

( a ) メジウム中、

( 1 ) 上記サンプル

( 2 ) 上記ホモシステインをジスルフィド型から放出させる放出剤、

( 3 ) ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基を有し、上記ハロケトンまたは - ハロアルデヒド官能基のカルボニルが保護された官能基で誘導体化されており、上記保護された官能基は、ホモシステインのスルフィドリル基を化学的に修飾して修飾ホモシステインを形成するよう活性化させることができる、保護されたアルキル化試薬、および

( 4 ) 上記の修飾されたホモシステインに特異的に結合して免疫複合体を形成できる受容体、および

( 5 ) 上記の保護されたアルキル化試薬を脱保護できる活性化試薬を含む混合物を調製する工程、

( b ) 上記メジウムを、上記サンプル中のホモシステインの量に相関する上記免疫複合体の量について調べる工程、を含む方法。

【請求項 26】

ホモシステインが試薬によって修飾され、次いで修飾ホモシステインに特異的に結合できる試薬と合わされる、サンプル中のホモシステインの量を測定する方法において、上記サンプルとともに、以下の式：

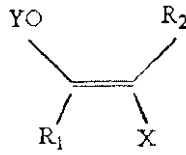
10

20

30

40

## 【化 8】



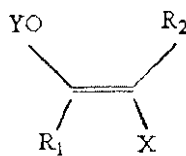
(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はアルキル、アリールまたは置換されたアルキルもしくはアリールであり、XはCl、BrまたはIであり、Yは酵素によって除去できる保護基である)を有するアルキル化試薬および上記アルキル化試薬の脱保護を触媒することができる酵素を提供することを含む改良された上記方法。

10

## 【請求項 27】

保護されたアルキル化試薬が、以下の式：

## 【化 10】



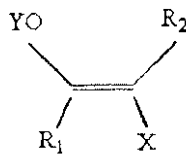
20

(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はアルキル、アリールまたは置換されたアルキルもしくはアリールであり、XはCl、BrまたはIであり、Yは酵素によって除去できる保護基である)を有する、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 28】

保護されたアルキル化試薬が、以下の式：

## 【化 11】



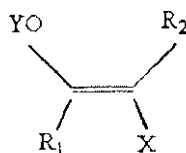
30

(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はアルキル、アリールまたは置換されたアルキルもしくはアリールであり、XはCl、BrまたはIであり、Yは酵素によって除去できる保護基である)を有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 29】

保護されたアルキル化試薬が、以下の式：

## 【化 12】



40

(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>はアルキル、アリールまたは置換されたアルキルもしくはアリールであり、XはCl、BrまたはIであり、Yは酵素によって除去できる保護基である)を有する、請求項 25 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【技術分野】

50

本発明は保護された  $\alpha$ -ハロケトンの長期間の保存を可能にし、さらに必要な水溶性を付与し、簡単な生物適合性のある除去が可能な保護基を開示する。

【0002】

【背景技術】

$\alpha$ -ハロケトンはたとえば、各種分子の他のスルフヒドリル含有分子へのカップリングを含む様々な関連で有用なアルキル化剤である。しかしながら、 $\alpha$ -ハロケトンは、このような方法に使用されるキットの成分と一緒におよび/または長期間保存する必要があるアッセイや反応に用いるためには問題があり、実用的ではない性質を有する。たとえば  $\alpha$ -ハロケトンは水、アルカリおよび有機塩基と自発的に反応し、したがって長期間水溶液中では、とくにタンパク質が存在する場合、生理学的 pH では保存することができない。

10

【0003】

$\alpha$ -ハロケトンは一般に、反応性が高すぎて、タンパク質と架橋を生じ、また他の加水分解に不安定なため、ほとんど使用されない。このような問題がなければ、それらの高い反応性は薬物誘導体のさらに低濃度での使用を可能にする筈である。一部の  $\alpha$ -ハロケトンはまた、このような関連で使用されるためには溶解性が不十分である。したがって、多くの診断および合成に有用な可能性があるにもかかわらず、 $\alpha$ -ハロケトンはこのような適用には不安定すぎると考えられることが多い。

【0004】

同様に、タンパク質は他のタンパク質にカップリングさせることがしばしばである。この場合、一方のタンパク質にはアルキル化基、他方にはスルフヒドリル基を結合させる。しかしながらこの方法では、一方または両方のタンパク質のメンバーの高濃度での使用および/または一方のタンパク質への多重もしくは単一アルキル化剤の結合を行わなければ定量的なカップリングは達成されない。さらに、アルキル化剤を結合させたタンパク質はスルフヒドリル基をもたないかまたはそのスルフヒドリル基を重合の回避のために保護しなければならない。高度に反応性のアルキル化剤を含有するタンパク質の製造および保存の困難性がなければ、この場合もさらに高い反応性の  $\alpha$ -ハロケトンを使用することによって問題を克服できる筈である。

20

【0005】

本発明は上述の問題に新規な解決法を提供し、これによりこのクラスのアシル化剤をとくに様々な診断および合成に有用なものとする。保護されたハロケトンからなる新規な化合物および組成物の開示に関連して、本発明はまた、様々な適用たとえばアッセイおよび接合反応に有用な保護されたハロケトンの製造および使用方法を開示する。

30

【0006】

後者の例としては一部の G6PDH 薬物接合体が、まず酵素を  $\alpha$ -ハロ酸とカップリングさせて  $\alpha$ -ハロアミドを形成させ、ついでこの接合体をスルフヒドリル標識薬物とカップリングさせることによって製造される。この方法は薬物が薬物の活性エステルによるカップリングを妨害する遊離のアミノ基を有する場合に、とくに有用である。

【0007】

【発明の開示】

したがって、本発明の一実施態様においては、保護された  $\alpha$ -ハロケトンの長期間の保存を可能にし、さらに必要な水溶性を付与し、簡単な生物適合性のある除去が可能な保護基が開示される。

40

すなわち一実施態様においては、本発明は保護されたアルキル化試薬からなり、その試薬の脱保護は酵素によって触媒される組成物を開示する。様々な好ましい実施態様においては、試薬にはホスフェート、エステル、炭水化物、核酸および脂質からなる群より選択される保護基が包含される。様々な好ましい実施態様ではまた、酵素はグリコシダーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、ヒドロキシラーゼおよびホスファターゼからなる群より選択される方法が開示される。

【0008】

本発明の別の実施態様においては、試薬は 2- $\alpha$ -ハロビニルエーテル、2- $\alpha$ -ハロビニルエス

50

テル、4 - ハロブタンジエニルエーテル、または4 - ハロブタンジエニルエステルである。様々な実施態様においては、2 - ハロビニルエーテルまたはエステルは2 - ハロビニルモノホスフェートである。他の実施態様においては、ビニル基は1または2個のアルキルまたはアリール基で置換され、アルキルまたはアリール基は置換または非置換である。

【0009】

本発明の様々な好ましい実施態様においては、ハロケトン は - ハロケトンである。好ましい - ハロケトンには - プロモアセチル安息香酸 ( B A B A ) および - クロロアセチル安息香酸 ( C A B A ) が包含される。本発明の組成物は、さらに親核性物質および/またはジスルフィド還元剤から構成される。有用なジスルフィド還元剤には、ホスフィンたとえばトリス ( カルボキシエチル ) ホスフィン ( T C E P ) が包含される。

10

【0010】

本発明では、様々なキットたとえばカップリング反応を実施するために使用されるキットが開示される。このようなキットはパッケージされた配合物中、第一の試薬として少なくとも1回の反応を実施するのに十分な量の保護されたアルキル化剤からなる。

一つの変形では、第一に試薬には、ホスフェートエステル、カルボン酸エステル、硫酸エステル、グリコシドおよびケタールからなる群より選択される保護基が包含される。他の変形においては、第一の試薬にはホスフェートおよび炭水化物からなる群より選択される保護基が包含される。各種の実施態様においては、第一の試薬は保護されたハロケトンでもよく、2 - ハロビニルエーテルまたはエステルからなる。2 - ハロビニルエステルの例は2 - ハロビニルモノホスフェートである。

20

【0011】

本発明の保護されたハロケトンは好ましくは - ハロケトンたとえば B A B A または C A B A からなる。また、第一の試薬は 4 - ハロブタンジエニルエーテルまたはエステルである。様々な実施態様においては、ビニル基は1または2個のアルキルまたはアリール基で置換されている。

キットはさらに、保護されたアルキル化試薬を脱保護できる触媒からなる第二の試薬により構成される。様々な実施態様においては、第一および第二の試薬は分離された容器内に包含される。

【0012】

開示されたキットの他の変形では、触媒は酵素からなる。開示された使用に適した酵素はグリコシダーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、ヒドロキシラーゼ、ホスファターゼ (たとえば、アルカリホスファターゼ) およびリボザイムからなる群より選択される。

30

本発明はまた、サンプル中のホモシステインを検出または定量的に測定する方法に使用されるキットにおいて、脱保護された場合に修飾されたホモシステインを形成する化学的にホモシステインを修飾できる保護されたアルキル化試薬からなる第一の試薬、保護されたアルキル化試薬を脱保護できる活性化試薬からなる第二の試薬、および修飾されたホモシステインに特異的に結合できる第三の試薬、それぞれ少なくとも1回のアッセイを実施するのに十分な量をパッケージした組み合わせからなるキットを開示する。

【0013】

本発明の様々なキットにおいては、第一の試薬はホスフェート保護基を有する保護されたハロケトンからなる。開示される様々な実施態様においては、キットに包含される保護されたハロケトンは C A B A または B A B A である。第一の試薬はさらにホモシステインジスルフィド還元剤から構成されていてもよい。それはさらに修飾されたホモシステインでコートされた固体マトリックスから構成されていてもよい。修飾されたホモシステインは、保護されたハロケトンの脱保護によって形成された産物であっても、脱保護されたハロケトンとサンプル中のホモシステインとの反応により形成された産物であってもよい。また、修飾されたホモシステインはホモシステインの 4 - カルボキシフェナシルチオエーテル ( h c y - A B A ) であってもよい。

40

【0014】

他の様々な実施態様においては、固体マトリックスは、ラテックスビーズ、ガラスビーズ

50

、マイクロタイタープレート、ニトロセルロース、アガロース、リボソーム等からなる。ホモシステインジスルフィド還元剤を包含する実施態様においては、その物質はホスフィンからなってもよい。本発明のキットに有用なホスフィンの一例はTCPEPである。

【0015】

本発明のキットの他の実施態様においては、第二の試薬はさらにホスファターゼからなる。一変形においては、ホスファターゼはアルカリホスファターゼである。他の変形には、さらに、第二の試薬が修飾されたホモシステインに特異的に結合できる受容体でコートされた固体マトリックスからなるキットを包含する。受容体は抗体または免疫学的に活性なそのフラグメントからなる。第二の試薬がさらに固体マトリックスからなる場合は、そのマトリックスはラテックスビーズ、ガラスビーズ、マイクロタイタープレート、ニトロセルロース、アガロース、リボソーム等からなる。

10

本発明の様々なキットにおいては、マトリックスはさらにそれに固定されたシグナリング物質を包含する。各種の有用なシグナリング物質には化学ルミネセンス物質、蛍光物質、色素原物質等を包含し、数種の例を挙げることができる。

【0016】

他の実施態様においては、本発明は以下の工程：

(a) 第一の分子を保護されたアルキル化試薬で標識し、

(b) 標識された第一の分子を、それに結合した1または2種以上の親核性の基を含有する第二の分子と混合し、

(c) 第一および第二の分子の混合物に酵素を添加してカップリング反応を開始させる各工程からなる分子接合体の製造方法を開示する。

20

【0017】

一変形においては、第一の試薬はアミノもしくはヒドロキシル基を包含する。第一の分子は小分子でも大分子（またはポリマー）であってもよい。

様々な実施態様においては、第二の分子はスルフヒドリル基を含有する。第一の分子のように、第二の分子は小分子（たとえば、脂質または修飾された脂質）でも大分子（またはポリマー）であってもよい。第二の分子が大分子またはポリマーからなる実施態様においては、大分子またはポリマーはタンパク質、グリコタンパク質、リボポリサッカライド、リボタンパク質、修飾されたサッカライドおよび修飾された核酸分子からなる群より選択される。

30

【0018】

本発明の方法に用いられる保護されたアルキル化試薬に関しては、その試薬は好ましくはハロケトンエノールホスフェートたとえばCABA（クロロアセチル安息香酸）エノールホスフェート、またはBABA（ブロモアセチル安息香酸）エノールホスフェートである。開示される方法の他の変形では、酵素はホスファターゼ、たとえばアルカリホスファターゼである。

【0019】

本発明はまた、ホモシステインの含有が疑われるサンプル中のホモシステインの量を定量する方法において、以下の工程：

(a) 水性メジウム中に

(1) サンプル

(2) ホモシステインのスルフヒドリル基を化学的に修飾して修飾されたホモシステインを形成する活性化可能な保護されたアルキル化試薬をからなる第一の試薬、および

(3) 修飾されたホモシステインに特異的に結合して免疫複合体を形成できるリガンドからなる第二の試薬、および

(4) 保護されたアルキル化試薬を活性化できる第三の試薬を一緒に取り、

(b) サンプル中のホモシステインの量に相関する免疫複合体の量を測定する工程からなる方法を開示する。

40

【0020】

一実施態様においては、第一の試薬はさらにホモシステインジスルフィド還元剤から構成

50

されていてもよい。他の変形においては、保護されたアルキル化試薬はハロビニルエーテルまたはエステルである。好ましい一実施態様においては、ハリビニルエーテルまたはエステルが - ハロケトンエノールホスフェートである場合が提供される。本発明による有用な - ハロケトンエノールホスフェートには B A B A エノールホスフェートおよび C A B A エノールホスフェートが包含される。

【 0 0 2 1 】

開示された他の変形においては、第三の試薬はホスファターゼ - たとえばアルカリホスファターゼである。その上、第一の試薬はさらに h c y - A B A でコートされた固体マトリックスおよび/または修飾されたホモシステインに結合できる受容体でコートされた固体マトリックスからなる。固体マトリックスを包含する実施態様においては、マトリックスはラテックスビーズ、ガラスビーズ、マイクロタイプレート、ニトロセルロース、リポソーム、アガロース等からなる。さらに他の実施態様では、受容体は抗体または抗体の免疫学的に活性化フラグメントからなる群より選択される場合が開示される。

10

【 0 0 2 2 】

他の実施態様においては、本発明は、サンプル中のホモシステインの量を定量する方法においてホモシステインの少なくとも一部はジスルフィド型であり、以下の工程：

( a ) 次の各物質：

( 1 ) サンプル

( 2 ) ホモシステインをジスルフィド型から放出させる放出剤、

( 3 ) ホモシステインのスルフヒドリル基を化学的に修飾して修飾されたホモシステインを形成して活性化することが可能な保護されたアルキル化試薬、および

20

( 4 ) 修飾されたホモシステインに特異的に結合して免疫複合体を形成できる受容体、および

( 5 ) 保護されたアルキル化試薬を脱保護できる活性化試薬からなる混合物を調製し、

( b ) サンプル中のホモシステインの量に相関する免疫複合体の量についてメジウムを調べる工程からなる方法を開示する。

【 0 0 2 3 】

開示された様々な実施態様によれば、放出剤はホスフィン（たとえば T C E P ）であり、保護されたアルキル化試薬はハロゲン化エノールホスフェートであり、受容体は抗体またはその免疫学的に活性化フラグメントであり、活性化試薬はホスファターゼからなる。

30

また、ハロケトンのリン酸化からなりその相当するエノールホスフェートを形成させる安定な保護されたハロケトンの製造方法も開示される。一実施態様においては、保護されたハロケトンは - ハロケトンであり、本発明に有用な保護されたハロケトンの例は B A B A および C A B A である。

【 0 0 2 4 】

本発明はさらにハロケトンエノールホスフェートの製造方法において、以下の工程：

( a ) 4 - アセチル安息香酸エチルエステルとハロゲン化合物を反応させて、ハロゲン化アセチル安息香酸エステルを製造し、

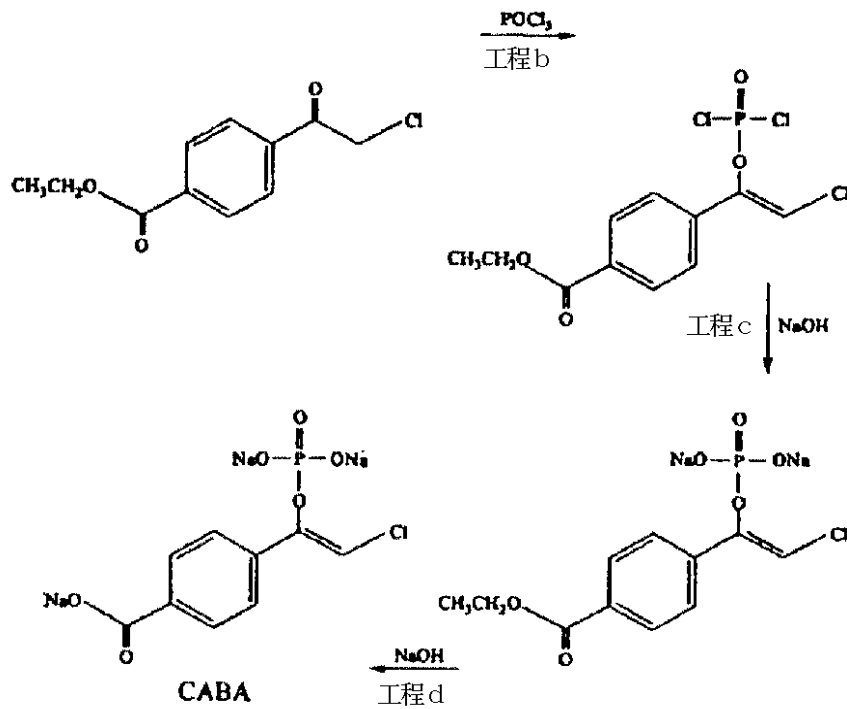
( b ) そのエステルをジイソプロピルエチルアミンの存在下に T H F 中でホスホリルクロリドによりリン酸化してエノールホスフェートを製造し、

40

( c ) エノールホスホリルエステルを水酸化ナトリウム水溶液で処理してエノールホスフェートエステルナトリウム塩を製造し、ついで

( d ) エノールホスフェートエステルナトリウム塩を水酸化ナトリウムで処理してハロビニルエノールホスフェート安息香酸ナトリウム塩を生成させる工程からなる方法を開示する。

【 化 2 】



10

20

## 【 0 0 2 5 】

一変形においては、ハロゲン化合物はスルフィドリルクロリドである。他の変法においては、ハロゲンはC1、BrおよびIからなる群より選択される。したがって、一実施態様においてはハロケトンエノールホスフェートはBABAエノールホスフェートであり、他の実施態様においてはハロケトンエノールホスフェートはCABAエノールホスフェートである。

本発明はまた、ホモシステインが試薬によって修飾されたサンプル中のホモシステインの量を定量する方法において、改良は試薬に対する前駆体および前駆体を試薬に変換できる酵素を提供することからなる方法を開示する。一変形においては、前駆体は保護されたアルキル化試薬であり、酵素は保護されたアルキル化試薬を脱保護できる。他の実施態様においては、試薬は - ハロケトンであり、前駆体は - ハロケトンのエノールエステルである。一変形では、エノールエステルはエノールホスフェートであり、酵素はホスファターゼである。

30

## 【 0 0 2 6 】

本発明はまた、アルキル化試薬を水性メジウム中に放出させる方法において、水性溶液中に - ハロケトンのエノールエーテル、 - ハロケトンのエノールエステル、 - ハロ - ， - 不飽和ケトンまたは - ハロ - ， - 不飽和ケトンのエノールエステル、およびエノールエーテルまたはエステルを加水分解することができる酵素を混合することからなる方法が開示される。

40

一変形では、エノールエステルはエノールホスフェートであり、酵素はホスファターゼである。他の実施態様においては、水性溶液はさらに、混合工程についてアルキル化される化合物からなる。

## 【 0 0 2 7 】

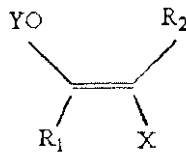
さらに、水性溶液中でメルカプタンをアルキル化する方法において、メルカプタンを - ハロケトンのエノールエーテルまたは - ハロ - ， - 不飽和ケトンエノールエステル、およびエノールエステルを加水分解することができる酵素を混合することからなる方法が開示される。

## 【 0 0 2 8 】

本発明はまた、以下の式：

50

## 【化3】



(式中、 $R_1$ および $R_2$ はアルキル、アリアルまたは置換されたアルキルもしくはアリアルであり、 $X$ はCl、BrまたはIであり、 $Y$ は酵素によって除去できる保護基である)で表される保護されたハロケトンを開示する。

10

## 【0029】

一実施態様においては、 $R_1$ は $-C_6H_4COOH$ であり、 $R_2$ はHであり、 $X$ はBrであり、 $Y$ は $-PO_3H_2$ である。他の実施態様はZがHまたは $NH_2$ である場合を開示する。また、Zはタンパク質、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリサッカライドおよび脂質からなる群より選択される。開示される実施態様の一変形においては、酵素はアルカリホスファターゼである。

## 【0030】

## 【発明の詳述】

- ハロケトンは今回、それらの相当するエノールホスフェートに変換することによって保護できることが示された。エノールホスフェートは水溶液中で安定であるが、ホスファターゼたとえばアルカリホスファターゼの添加によって迅速に遊離の - ハロケトンに変換することができる。 - ハロケトンエノールホスフェートは、他の場合には不飽和 - ハロケトンと反応する親核性試薬の存在下に保存できることが見いだされた。本発明の様々な実施態様のさらに詳細な説明を進める前に、一部の役に立つ定義を提供することは助けになるものと考えられる。以下は例示を意図するものであって、本発明を限定するものではない。

20

## 【0031】

## 定義

本明細書で使用される「アナライト」の語は検出される化合物または組成物を意味する。アナライトは、特異的結合ペア(「sbp」)のメンバーであり、1価(モノエピトピック)または多価(ポリエピトピック)のリガンドであり、通常、抗原性またはハプテン性であり、単一の化合物または少なくとも1つの共通のエピトープまたは決定部位を有する多重化合物である。

30

## 【0032】

本発明はとくに、アナライトの同族体も含有するサンプル中のアナライトを、アナライトおよびその同族体を化学的に修飾し、ついで修飾されたアナライトを検出する様々な方法に有用である。したがって、アナライトは、興味あるアナライトがサンプル中に存在する場合にのみその存在が検出される反応産物を検出することにより検出される(すなわち、「修飾された」アナライトがアッセイ中に検出される。アナライトは、たとえば宿主からの体液、たとえば尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、糞、痰、脳脊髄液、涙、粘液等のサンプル中好ましくは血清または血漿に直接見いだされる。サンプルは以下に述べるように前処理される。

40

## 【0033】

特異的結合ペアのメンバー(「sbp」メンバー): 本明細書に用いられるこれらの語は、その表面または腔部に他の分子と互いに結合する領域を有し、したがって他の分子の特定の空間的または極性的実態と相補性と定義される2つの異なる分子の一方を意味する。sbpのメンバーはリガンドおよび受容体(またはアンチリガンド)たとえば免疫学的ペアたとえば抗原-抗体のメンバーを意味することが可能で、またそれらはオペレーター: リプレッサー、ヌクレアーゼ: ヌクレオチド、ビオチン: アビジン、ホルモン: ホルモン受容体、核酸二重鎖、IgG: プロテインA、DNA-DNA、DNA-RNA等であっ

50

てもよい。

【0034】

本明細書で用いられる「リガンド」の語は、それに対する受容体が天然に存在するか、または調製できる任意の化合物を意味する。

本明細書で用いられる「受容体」の語は、分子の特定の空間的または極性的実態、すなわちエピトープまたは決定部位を認識することができる任意の化合物または組成物を意味する。相補性の s b p メンバーはたとえばリガンドとその相補性受容体のように互いに結合する。s b p メンバーは、たとえば抗原および抗体のように免疫学的ペアでも、アビジンとビオチンのような非免疫学的ペアでも、またオリゴヌクレオチドの相補性の鎖であってもよい。s b p メンバーはまた小分子または小分子の残基およびそれらの受容体であって 10

受容体の例には天然に存在する受容体（たとえば、サイロキシン結合グロブリン、抗体、酵素、F a b フラグメント、レクチン、核酸、リプレッサー、プロテクチン酵素、プロテイン A、DNA 結合タンパク質等）が包含される。

【0035】

「支持体」、「マトリックス」または「固相」の語は本明細書においては互いに同義に用いられ、多くの形状たとえばストリップ、ロッド、粒子、スラブ、スライド、様々の形状および外観を有するビーズ等、任意の非多孔性または多孔性表面を意図するものである。典型的な支持体表面にはガラスまたはプラスチックビーズ、ラテックスまたはセルロース粒子、ガラスまたはセルロースフィルターペーパー、ニトロセルロース膜、ポリスチレンプレート、磁性粒子、プラスチックチューブまたは容器等が包含される。マトリックスは 20

分子が非拡散性に結合可能で、リガンドのメジウムに溶解またはそれと不都合に反応しない慣用の材料で作成される。多くの場合支持体は、たとえばポリスチレン、ポリカルボネート、ポリアクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、テフロン等のプラスチックである。また、マトリックスは本質が金属でもよく、たとえばスチール、ニッケル、銅または金である。支持体はまた、たとえばガラス、石英等のようなセラミック材料から作成されてもよい。支持体またはマトリックスがビーズから構成される場合は、ビーズは一般に一定のほぼ均一なサイズを有し、好ましくは直径が約 0.2 ~ 2.5  $\mu\text{m}$  であり、適用に応じて粗いかまたは平滑な表面を有する。

【0036】

多くの好ましい実施態様においては、表面は好ましくは平滑である。ビーズは好ましくは 30

円形または楕円形であり、通常ほぼ球状で、表面は非特異的な結合を最小にする性質を有する。本発明のアッセイに用いられる場合、支持体は分子 - たとえばリガンド、受容体、またはより一般的には、特異的結合ペアのメンバーに結合している。適当な材料は本技術分野で周知であり、たとえば Ullman らの米国特許 5,185,243（たとえば 10 ~ 11 欄参照）に記載されている。したがって、上記特許の開示は引用により本明細書に導入される。同様に、支持体または表面への s b p メンバーの結合はよく知られた技術であって、一般的に文献から利用される。たとえば、Chibata, "Immobilized Enzyme," Halsted Press, New York, 1978 および Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245: 3059, 1970 参照。

【0037】

用いられた固体支持体のタイプに依存してその表面へのタンパク質、リガンドまたは受容体の結合を提供するために、タンパク質、リガンドまたは受容体の機能に干渉することなく、前処理が要求される。たとえば、アビジンまたはストレプトアビジンを 0.5 ~ 1.5  $\mu\text{m}$  の球状ガラスビーズに共有結合させて、ビオチン抗体の捕捉に使用することができる 40

【0038】

本明細書で使用される「イムノコンプレックス」または「免疫複合体」の語は抗原の抗体への免疫学的結合によって形成される複合体を意味する。

本明細書で使用されるシグナル産生システム（「s p s」）の語は 1 または 2 以上の成分からなり、その少なくとも一方の成分は結合および/または非結合標識の量に関係する検知可能なシグナルを発生す標識である成分を意味する。好ましくは、標識は、酵素活性、 50

ルミネセンス、蛍光、光の吸収、放射能またはある種の可視シグナルの観察によって検出される染料、フルオレッサー、放射性標識、酵素、化学ルミネサーまたはフォトセンシタイザーである。とくに有用なシステムは光活性化化学ルミネセンス標識を使用するシステムであり、これについては以下のC項でさらに詳細に説明する。しかしながら、本発明はここに記載された例示的なシステムに限定されるものではないことを理解すべきである。

【0039】

適当な標識には、限定ではなく例示的に、酵素たとえばアルカリホスファターゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ；レプリカーゼたとえばQBレプリカーゼの基質；プロモーター；染料；フルオレッサーたとえばフルオレセイン、ローダミン化合物、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒドおよびフルオレスカミン；補酵素；酵素基質；放射性標識たとえば<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>Pおよび<sup>35</sup>S；粒子たとえばラテックスまたは炭素粒子；金属ゾル；クリスタライト；リポソーム；細胞等が包含され、それらはそのままでもまたさらに染料、触媒もしくは他の検出可能な基等で標識されてもよい。適当な酵素および補酵素は、Litmanら、米国特許4,275,149, 19~28欄およびBoguslaskiら、米国特許4,318,980, 10~14欄に、適当なフルオレッサーおよび化学ルミネサーは、Litmanら、米国特許4,275,149, 30~31欄に開示されている。とくに有用な光活性化化学ルミネセンス標識ならびにそれらの製造および使用方法はUllmanらの米国特許5,340,716に開示されている（上述の開示は引用によりすべて本明細書に導入される）。

【0040】

本明細書で用いられる「粒子」の語は、直径少なくとも約20nmで約20μを越えず、通常少なくとも約40nmで約10μを越えず、好ましくは約0.10~2.0μ、通常は1ピコリットルの容積を有する。粒子は有機または無機の、膨潤性または非膨潤性、多孔性または非多孔性で、任意の密度を有するが、好ましくは水とほぼ等しい密度、一般的には約0.7~約1.5g/mlであり、好ましくは水中に懸濁が可能であり、透明、半透明または不透明な材料から構成される。粒子は荷電していてもしていなくてもよく、荷電している場合は陰性である。粒子は固体（たとえば、ポリマー、金属、ガラス、有機または無機物たとえばミネラル、塩および珪藻類）、油滴（たとえば炭化水素、フルオロカーボン、シリコン液体）または小胞（たとえば合成小胞たとえばリン脂質または天然の小胞たとえば細胞およびオルガネラ）である。粒子にはラテックスまたは合成もしくは天然の材料、有機または無機ポリマー；脂質二重層（たとえばリポソーム、リン脂質および非リン脂質小胞）；油滴、シリコン粒子；金属ゾル、細胞；および染料結晶が包含される。

【0041】

有機粒子は通常、ポリマー、アッセイメジウムに容易に分散する付加または縮合ポリマーのいずれかである。有機粒子はまた、それらの表面でsbpメンバーに直接または間接的に結合するように、およびそれらの表面で染料たとえばフルオレッサー、フォトセンシタイザー、または光化学的に活性化された化学ルミネサー化合物に結合するかまたはそれらの内部に導入される、好ましくは吸着可能または機能化可能な粒子である。

【0042】

粒子は天然に存在する材料、合成的に修飾された天然に存在する材料、および合成材料から誘導することができる。天然のまたは合成のアッセンプリーが好ましい。とくに興味がある有機ポリマーには、ポリサッカライド、とくに架橋したポリサッカライド、たとえばアガロース（Sepharoseとして入手可能）、デキストラン（SepadexおよびSephacrylとして入手可能）、セルロース、デンプン等；付加ポリマーたとえばポリスチレン、ポリアクリルアミド、アクリル酸およびメタクリル酸のホモポリマーおよびコポリマー、とくに遊離ヒドロキシル基を有するエステルおよびアミドたとえばヒドロゲル等がある。無機ポリマーには、シリコン、Biogelとして入手できるガラス等がある。ゾルには金、セレンおよび他の金属が包含される。粒子はまた、水不溶性染料たとえば、フォトセンシタイザーとしても作用するポルフィリン、フタロシアニン等に分散してもよい。粒子にはまた、珪藻類、細胞、ウイルス粒子、マグネトソーム、細胞核等が包含される。粒子が市販品を入手

できる場合には、粒子サイズは機械的手段、たとえば粉碎、超音波処理、攪乱等により大きな粒子を小さな粒子に破碎することによって変動させることができる。

【0043】

粒子は通常、多機能性もしくは多機能化可能であるか、またはs b pメンバー、フォトセンシタイザーまたは化学的に活性化可能な化学ルミネセンス化合物に特異的または非特異的な共有結合または非共有結合的相互作用によって結合できる。広範囲の官能基が利用または導入できる。官能基の例には、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基等が包含される。粒子へのs b pメンバー、化学ルミネセンス化合物またはフォトセンシタイザーの共有結合が用いられる場合は、連結様式は周知であり文献中に豊富に例示されている。たとえば、Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245: 3059, 1970 参照。架橋基の長さは、架橋される化合物の性質、粒子の性質、架橋される化合物とs b pメンバーおよびアナライト等の結合上の粒子との距離の効果に依存して広範囲に変動される。

10

【0044】

粒子および他のマトリックス材料はまた標識手段によってタグされてもよい。たとえば米国特許5,709,994(その開示は引用により、本明細書に導入される)には、フォトセンシタイザーおよび/または化学ルミネセンスおよび/またはエネルギーアクセプター化合物によりタグされた粒子の製造方法が記載されている(たとえば、米国特許5,709,994の実施例1~2参照)。

【0045】

標識に、外部手段たとえば可視的検査、電磁線照射、電気化学的検出、光音響分光法等によって検出できるシグナルを発生させることができる方法は多い。標識および他のs p sメンバーはまた、s b pメンバー、他の分子または支持体に結合させることができる。標識は直接シグナルを発生することが可能であり、したがってシグナルを発生するために付加的成分を要しない。多くの有機分子たとえばフルオレッサーは紫外線および可視光線を吸収することが可能で、この場合、光の吸収がこれらの分子へエネルギーを伝達し、それらを励起したエネルギー状態に上昇させる。この吸着されたエネルギーはついで第二の波長における光の放出によって消費される。直接シグナルを発生する他の標識には放射性同位元素および染料が包含される。

20

【0046】

また、標識はシグナルを発生するために他の成分を必要とし、そのs p sは、したがって測定可能なシグナルを発生するために要求されるすべての成分を包含することになる。これには基質、補酵素、エンハンサー、付加的な酵素、酵素産物と反応する物質、触媒、アクティベーター、コファクター、インヒビター、スカベンジャー、金属イオン、シグナル発生物質の結合に要求される物質等が包含される。適当なシグナル発生システムについての詳細な議論はUlmanらの米国特許5,185,243の11~13欄に見いだされる。これは引用により本明細書に導入される。

30

【0047】

標識は多くのs b pメンバー：修飾されたアナライトに結合する抗体；修飾されたアナライトに結合する抗体の受容体；修飾されたアナライトに結合する抗体に接合する小分子に結合できる受容体；またはリガンド、とくに修飾されたアナライトの同族体に共有結合により結合することができる。標識のs b pメンバーへの結合は標識の水素原子をs b pメンバーへの結合と置換する化学反応によって達成されるか、または標識とs b pメンバーの間の連結基を包含してもよい。他のs p sメンバーはまたs b pメンバーと共有結合により結合する。たとえば、2つのs p sメンバー、フルオレッサーおよびクエンチャーはそれぞれ、修飾されたアナライトの同族体およびその同族体と複合体を形成するアナライトの抗体に結合することができる。複合体の形成はフルオレッサーとクエンチャーをきわめて接近した位置にもってきて、クエンチャーのフルオレッサーとの相互作用を可能にし、シグナルが消光される。

40

【0048】

50

接合方法は本技術分野でよく知られている。たとえば、Rubensteinら、米国特許3,817,837参照。これは引用により本明細書に導入される。本発明はまた、抗体をシグナル発生システムの第一のメンバーおよびシグナル発生システムの第二のメンバーとしての検出可能な標識に結合させることを意図する。たとえば、検出可能な標識がアナライト同族体に結合した場合、抗体のその同族体への結合の程度を、シグナル発生システムのメンバーの相互作用によって発生するシグナルを検出することにより測定することができる。

#### 【0049】

補助材料：本発明の方法には、しばしば様々な保持材料が使用される。たとえば通常、緩衝液を通常アッセイメジウム中に存在させ、またアッセイメジウムおよびアッセイ成分の安定化のために安定剤を存在させる。これらの添加物に加えて、多くの場合、タンパク質たとえばアルブミン、有機溶媒たとえばホルムアミド、四級アンモニウム塩、ポリカチオンたとえばデキストラン硫酸、または界面活性剤とくに非イオン界面活性剤、結合エンハンサーたとえばポリアルキレングリコール等が包含される。

10

#### 【0050】

本明細書で使用されるアルキル化試薬には、 $\text{-ハロケトン}$ 、 $\text{-ハロアルデヒド}$ 、 $\text{-ハロ-}$ 、 $\text{-不飽和ケトン}$ および $\text{-ハロ-}$ 、 $\text{-不飽和}$ 、 $\text{-ハロアルデヒド}$ が包含される。これらの試薬はスルフィドリル、アミノ、およびヒドロキシル基と反応することができる。ホモシステイン(hcy)のために使用されるアルキル化試薬はhcyのスルフィドリル基と反応する。本発明のアルキル化試薬はまた、式： $\text{YR}_1\text{C}(\text{CR}_3=\text{CR}_4)_n-\text{COR}_2$  (式中、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ または $\text{R}_4$ は独立に水素(H)、アルキルまたはアリー

20

#### 【0051】

本明細書で使用されるアルキルは、脂肪族炭化水素からH原子1個を除去して誘導される1価の分岐状または非分岐状のラジカルを意味し、低級アルキルおよび高級アルキルの両者を包含する。

本明細書で使用される低級アルキルは、1~5個の炭素原子を含有するアルキルを意味し、たとえばメチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、イソブチル、ペンチル、イソペンチル等である。

#### 【0052】

本明細書で使用される高級アルキルは6個以上の炭素原子、通常は6~20個の炭素原子を含有するアルキルを意味し、たとえばヘキシル、ヘプチル、オクチル等である。

本明細書で用いられるアリールは、芳香族炭化水素から1個の原子を除去して誘導される有機ラジカルであり、1個または2個以上の芳香環、通常は1~4個の芳香環、たとえばフェニル(ベンゼンから)、ナフチル(ナフタレンから)を含有する。

30

#### 【0053】

本明細書で用いられるアラールキルは、アリール基が結合したアルキル基を有する有機ラジカル、たとえばベンジル、フェナチル、3-フェニルプロピル、1-ナフチルエチル等である。

本明細書で用いられる置換の語は、分子の水素原子が単一の原子であるたとえばハロゲン等のような他の原子、または機能性を形成する原子群の部分、たとえば原子は炭素、酸素、窒素、硫黄およびリンからなる群より独立に選択され、また1または2個以上の金属原子に結合していてもよい、1~5000個の原子(このような原子の原子価を満たすのに必要な必須水素原子以外の)を有する置換基によって置き換えられていることを意味する。

40

#### 【0054】

「小分子」、また本明細書において小有機分子(すなわちそれらが有機または有機金属基を含む場合)、アナライトまたはハプテンとして同定される分子は、分子量、約2,000未満、さらに好ましくは約1,500まで、さらに好ましくは約1,000までを有するものである。様々な好ましい実施態様においては、小分子は少なくとも約100、好まし

50

くは200以上、さらに好ましくは250またはそれ以上の分子量を有する。

【0055】

本明細書に開示される有用な多くの小分子は、分子量100~2000、好ましくは150~1000を有し、相当する小分子に特異的な受容体が存在するかまたは調製できる。小分子の例にはビオチン誘導体、リゼルギン酸、フルオレセインまたはフルオレセイン誘導体およびビタミンB<sub>12</sub>が包含され、それぞれの相当する受容体はアビジンまたはストレプトアビジン、抗リゼルギン酸、抗フルオレセインおよび内因子である。小分子に対する抗体は小分子を免疫原性担体に連結することによって製造できる。本明細書において使用される「小分子」の語には、米国特許5,340,176および5,709,994にたとえば記載および例示された薬物、代謝物、殺虫剤、汚染物等が包含される。この開示は引用により本明細書

10

【0056】

「ポリマー」または本明細書において「大分子」または「高分子量(HMW)分子」と同定される分子には、様々な分子たとえばタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、炭水化物、リポポリサッカライド、グリコタンパク質等が包含される。ポリマーたとえば受容体アナライトの分子量は一般に約10,000~2×10<sup>8</sup>の範囲、さらに通常には約10,000~10<sup>6</sup>の範囲である。免疫グロブリン、たとえばIgA、IgG、IgEおよびIgMでは分子量は一般に約160,000から10<sup>6</sup>の範囲を変動する。酵素の分子量は一般に約10,000~1,000,000であるが、10,000未満または1,000,000の分子量を越える酵素も稀ではない。天然の受容体および結合分子の分子量はそれらの合成バージョンおよび模倣体と同様きわめて広範囲に変動し、一般にそれらの範囲は約25,000~10<sup>6</sup>およびそれ以上である。受容体/結合分子たとえばアビジン、DNA、RNA、サイロキシン、結合グロブリン、サイロキシン結合プレアルブミン、トランスコルチン、レクチン、プロテインA、補体成分等にはこのようなHMWの少ない例である。

20

【0057】

水溶液中で2つの分子をカップリングさせるために有用なアルキル化試薬は、試薬を興味ある分子の一つに接合させるのに適当な基をもたなければならない。他の分子は親核性の基、たとえばOH、SHもしくはアミンを有するか、またはこのような基を包含するように修飾されなければならない。2つの分子は、試薬に接合させる分子、親核性の基を有する分子および活性化物質を混合することによってカップリングさせる。

30

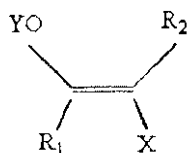
【0058】

本明細書において使用される「活性化試薬」の語は、触媒、通常は生物触媒、好ましくは酵素、リボザイムまたは触媒性抗体を意味する。様々な実施態様においては、好ましい活性化試薬には酵素たとえばヒドロラーゼが包含され、ホスファターゼ、ホスホジエステラーゼ、グリコシダーゼおよび他のエステラーゼが含まれる。

【0059】

以下の式

【化4】

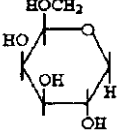


40

によって構成される保護されたアルキル化試薬を以下に例示する。このような保護されたアルキル化試薬の脱保護に有用な活性化試薬または酵素はまた、以下のチャートに掲げる。

【0060】

【表1】

$R_2$	$R_1$	X	Y	活性化試薬 (酵素)
H	$-C_6H_4COOH$	Br	$-PO_3H_2$	アルカリホスファターゼ
H	$-C_6H_4CONHZ^*$	Cl	$-PO_3H_2$	アルカリホスファターゼ
H	$-CH_2CH_2OZ$	I		$\beta$ -ガラクトシダーゼ
$C_6H_5$	$-CH_2N^+(CH_3)_3$	Cl	$-COCH_3$	アセチルコリンエステラーゼ
H	$-COOH$	Br	$-SO_3H$	スルファターゼ
$-CH_2CH_2CH_2-$		I	$-CON(CH_3)_2$	触媒性モノクローナル抗体

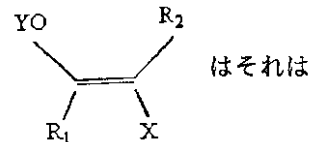
( $R_1$ と $R_2$ は環を形成)\*\*

10

\* Z = Hまたは有機分子または $NH_2$ 。Zはバイオポリマーたとえばタンパク質、ポリペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、ポリサッカライド等。

20

\*\* Xおよび $R_2$ が位置を交換しなければ不能であり、すなわち、同等に有用である。



## 【 0 0 6 1 】

## 【 詳細な記述 】

## A . 保護試薬の調製

前述のように、多数の保護基が本発明に使用される保護された試薬の調製に有用である。たとえば、適当な保護基には、カルボン酸、炭水化物、核酸、脂質、ホスフェート等のエステルもしくはエーテルが包含される。このような保護基の除去に有用な酵素としては、したがって、エステラーゼ、グリコシダーゼ、ヌクレアーゼ、リボザイム、リパーゼ、ヒドロキシラーゼおよびホスファターゼが包含される。

30

## 【 0 0 6 2 】

有用な保護基には、エステル、好ましくは緩和な条件下に - たとえば酵素を用いて - 容易に除去できるエステルを使用することができる。エステル保護基の例には、ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、置換アセテート、プロピオネート、イソブチレート、レプリネート、クロトネート、ベンゾエート、ナフトエート、および多くの他のエステルが包含される (たとえば、Greene, T.W., Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1981参照)。同様に広範囲の炭水化物が単純な糖からポリサッカライドまで、適当な酵素の使用を介して特異的に除去できる保護基として用いることができる。本技術分野の熟練者には、修飾された保護基 - たとえばエステル、炭水化物等ならびに他の残基からなる分子もまた本発明の関係する範囲内で保護基として使用できることは自明の通りである。

40

## 【 0 0 6 3 】

すなわち、ホスフェート基はここに保護基の例として記載したが、それらは正確には本発明の関係内で有用な分子の例であることを理解すべきである。本発明の一変形においては、B A B AおよびC A B Aのエノールホスフェート誘導体が小分子および大分子の接合、ならびにアッセイの関連で様々なアナライトの検出を含む様々な適用にとくに有用である

50

ことが見いだされている。後者の例には、ホモシステイン (hcy) のアッセイがある。

【0064】

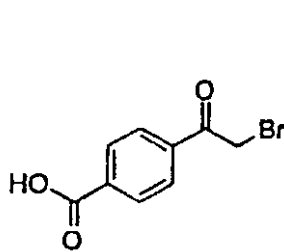
たとえば、BABAは血清および血漿ホモシステインの識別および抗体認識のためのアルキル化試薬として使用されることが多い。ホモシステインは栄養評価、心脈管系の危険および新生児ホモシステイン尿症のマーカである。BABA-ホスフェート、「pro-BABA」はBABAに比較していくつかの利点がある。BABAは生理学的pH以上で保存した場合、安定性に限界があり、低いpHでは溶解度に限界がある。BABA-ホスフェートは高いpHで有意に高い安定性を有し、広いpH範囲で溶解度が高い。それは2成分系において試薬との適合性の可能性を有するという付加的な利点がある。CABAホスフェートも同様に挙動し、製造が容易である。CABAホスフェートおよびBABAホスフェートはアルカリホスファターゼによって容易に脱保護される。

10

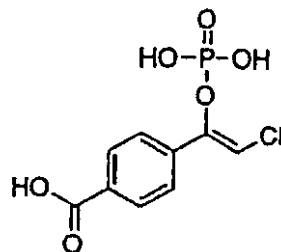
【0065】

BABAの化学的構造およびそれと密接な関係があるホスフェート保護型の構造を以下に例示する。第一の構造におけるBrをClで置換するとCABAの構造が産生され、同様に第二の構造のClをBrに置換するとBABAホスフェートの構造が産生される。

【化5】



BABA



CABA-ホスフェート

20

【0066】

CABAおよびBABAはシステイン (cys) およびホモシステインのスルフヒドリル基をアルキル化する。アルキル化システインのアミノ基はCABAまたはBABAによって導入されるケトンと内部で反応して環状構造を与えるが、アルキル化されたホモシステインでは反応しない。BABAおよびCABAの製造方法は本技術分野で入手できる。たとえば、米国特許5,478,729 (たとえば、21~22欄) 参照。その関連する開示は引用により本明細書に導入される。

30

【0067】

アルキル化されたホモシステインに対する抗体 (hcy-ABA) は環状アルキル化システイン (cys-ABA) からhcy-ABAを識別するので、これらの抗体を用いるhcyのイムノアッセイはシステインの存在下にも正確な結果を与える。これに反し、前もってアルキル化を行わないで、hcyに対する抗体を用いるhcyのイムノアッセイではこれらの2つの同族アミノ酸は識別できない。

【0068】

BABAおよびCABAには維持が重要な各種機能性の設計を導入する。たとえば、以下の機能が重要である。1) ハロアシル基はチオールと速い反応速度を有する；2) フェニル環は免疫システムに提供された場合、高度に免疫原性の残基を提供する；3) カルボキシレートはある程度の水溶性ならびに免疫原の調製のための担体タンパク質への慣用の結合点を提供する；および4) ハロアセチル基のカルボニルはシステインおよびホモシステイン付加物の間を識別する慣用の手段を提供する。

40

【0069】

安定性および溶解度を上昇させる一方、上述の性質のすべてを維持するためには、保護された型のBABAおよびCABA (たとえば、「pro-BABAおよび「pro-CABA」) は本発明の態様である。BABAおよびCABAのエノールホスフェート誘導体

50

(*pro*-BABAおよび*pro*-CABA)の使用はこれらの利益を提供し、これらの誘導体はアッセイの実施の過程においてアルカリホスファターゼによって容易に脱保護されてBABAおよびCABAを与える。

【0070】

*pro*-BABAまたは*pro*-CABAの使用は、更なる利点、他の場合には不適合性の試薬を混合する能力を提供し、したがって、わずかな付加工程によりアッセイの実施を可能にする。たとえば、保護されていないBABAでのアッセイはサンプルを放出剤と混合してhcyジスルフィドの還元を要求する。BABAをついで、抗原試薬および抗体試薬と一緒に添加する。*pro*-BABAまたは*pro*-CABAを使用する場合は、放出剤および*pro*-BABAまたは*pro*-CABAは第一の試薬としての抗原と混合し、アルカリホスファターゼは第二の試薬としての抗体とともに混合することができる。これにより、アッセイ試薬の数を3から2に減じることができる。

10

【0071】

エノールホスフェートは合成が難しいと報告されてきたが(たとえばKearney & Valentin o, Pharm. Res. 9: 3789, 1992 参照)、本発明者はそれらをきわめて成功裡に合成することができた。たとえばCABA-ホスフェートは40gのスケールにおいて良好な総収率で成功裡に調製される。以下の合成スキーム(スキームA参照)を参照しながら説明すれば(本文中のボールド体の数はスキーム中に示す構造に相当する)、市販品を入手できるの4-アセチル安息香酸エチルエステル(1, 197mmol)を選択的にモノクロル化する(たとえばRogicら, J.Org. Chem. 46: 4486-9, 1981参照)と、78%の収率において99%の純度(核磁気共鳴(NMR)分析を使用して定量:スキームA参照)の生成物が得られる。BABAのビニルプロミドのエノールホスフェート同族体を得るためにブロム化を使用する場合は、リン酸化工程の間に臭素の塩素による部分的もしくは完全な置換を行う。塩素誘導体は光活性化化学ルミネセンス標識を用いるアッセイにおいて臭素誘導体と同様に効率的な誘導体を提供する。塩素誘導体に基づく合成は明らかに、より再現性がある。

20

【0072】

1. 材料

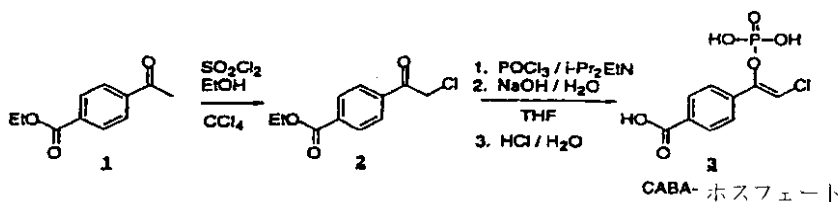
すべての試薬は試薬特級で、使用前ナトリウムから新たに蒸留したTHFおよび3のシープ上で乾燥したジイソプロピルエチルアミンを除いて、さらに精製することなく使用する。シリカゲル250分析用プレートはAnaltech(Newark, DE)から入手する。<sup>1</sup>H-NMRはAldrich(Milwaukee, WI)から入手した重水素化溶媒を用いて、Bruker 250 MHzスペクトロメーターで記録する。UVスペクトルはPackard 8452型ダイオードアレイスペクトロフォトメーターで測定する。すべての反応はアルゴン雰囲気下で行う。元素分析、マススペクトル、およびNMRスペクトル(<sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P)は実験室内または業者-たとえばBerkeley Labsで実施する。

30

【0073】

【化6】

スキームA: 合成

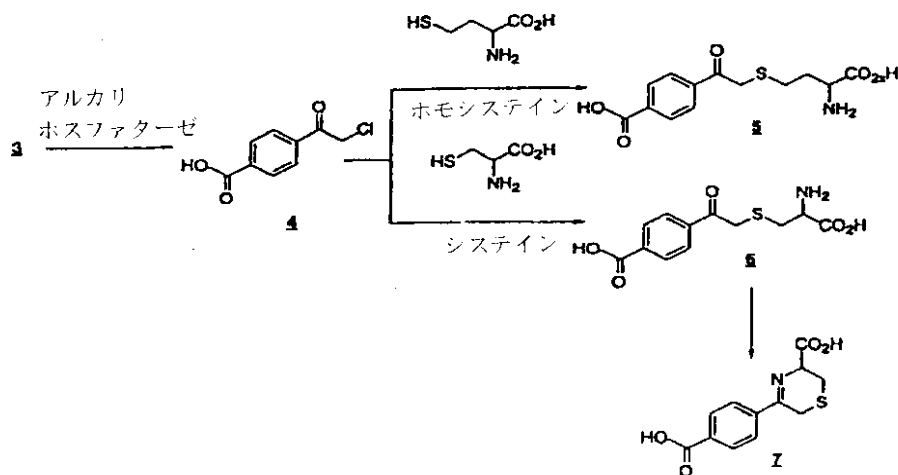


40

【0074】

【化7】

## スキーム B : アッセイ



10

## 【 0 0 7 5 】

2. 合成 (スキーム A : 合成参照)a. 4 - (クロロアセチル) 安息香酸エチルエステル (2) の調製

4 - アセチル安息香酸エチルエステル (Aldrich 99%, 37.87 g, 197 mmol) を 350 mL の  $\text{CCl}_4$  に溶解し、これに 11.3 mL (197 mmol) の無水エタノールを加える。50 mL の  $\text{CCl}_4$  中スルフリルクロリド (20 mL, 236 mol) を 20 分を要して滴下する。30 分後、発泡が止んだならば、反応を NMR および薄層クロマトグラフィー (TLC) でチェックする (NMR による置換比は 2% ジクロロ : 74% モノクロロ : 24% (1) である。さらに 20 分間 50 に加熱しても、比は変化しなかった。TLC : 5 × 20  $\text{SiO}_2$  : (1 : 3) 4% MeOH /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - ヘキサン)。

20

## 【 0 0 7 6 】

さらに 20 mL の  $\text{CCl}_4$  中スルフリルクロリド (6.0 mL, 71 mol) を滴下する。20 分後発泡は停止する (NMR 比は 7.5% ジクロロ : 92% モノクロロ : 0.5% (1) である。さらに 15 分後、反応液を 500 mL のよく攪拌した飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液中に徐々に注ぎ、100 mL の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で濯いだ (未成熟な結晶化を防止するため)。反応液を発泡が停止するまで攪拌する (pH = 8)。相を分離し、有機相を 1 回 500 mL の水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥し、濃縮乾固する。

30

## 【 0 0 7 7 】

固体を 200 mL の無水エタノールに 80 で再溶解する (後処理生成物の結晶化前の NMR 比は 8.0% ジクロロ : 92% モノクロロ : 0.0% (1, スキーム A) である)。3 時間常温で結晶化させたのち、生成物をろ過し、50 mL のフリーザーで冷却したエタノールで洗浄し、乾燥 (0.1 mmHg) すると、25.5 g の第一の結晶が生成する。ろ液を約 100 mL に濃縮し、フリーザー中で 2 時間冷却する。第二の結晶を 2 回、25 mL 部のフリーザーで冷却したエタノールで洗浄し、乾燥する (1 mmHg) と、7.4 g の第二の結晶が得られる。

40

合わせた結晶 (NMR により 99% 純度のモノクロロ生成物) をそのまま次の工程に使用する。第三の結晶 (1.9 g, TCR により純粋) も収集される。3 つの結晶 (34.8 g, 154 mmol) を合わせた収率は 78% である。

## 【 0 0 7 8 】

b. 4 - (クロロアセチル) 安息香酸エチルホスフェートナトリウム塩 (3, スキーム A) (CABA - ホスフェート) の調製

4 - (クロロアセチル) 安息香酸エチルエステル (2, スキーム A) (32.15 g, 141.8 mmol) を 400 mL の THF に溶解する。この無色澄明な溶液にジイソプロピルエチルアミン (86 mL, 496 mmol) を加える。得られた澄明な淡い帯緑黄色の溶液にアルゴ

50

ンを2分間通じ、氷浴中で内部温度が10 未満になるまで攪拌する。THF 50 mLに溶解したPOCl<sub>3</sub> (3.3 mL, 35.5 mmol) を温度が10 を越えないような速度で滴下して加える(1.5時間)。反応液を一夜放置して常温まで加温する。白色結晶(アミン塩酸塩)をろ過して除き、ろ液中にTHF 100 mLで洗浄する(結晶を乾燥し秤量する。純粋なアミン-HCl塩の重量(18.71 g)を使用して、加水分解工程において加えるNaOH量の計算を調整する)。

## 【0079】

澄明な橙色のろ液を720 mLの氷浴で冷却し、アルゴンで洗浄した2.50 NのNaOH (1800 mmol) 水溶液に反応温度が15 を越えないような速度で(1.5時間)滴下して加える(NaOHの量は、用いた5 × 35.5 mmol POCl<sub>3</sub> + 加水分解のための14.2 mmolエステル-ろ過によって除去された11.3 mmol アミン-HCl塩に基づいている)。反応液を放置して一夜、常温まで加温する。ろ過によって除去した無機塩を、ろ液中にTHF 100 mL部で2回洗浄する(これらの塩は標準とUVで比較してわずかに痕跡量の生成物を含む)。2相のろ液を分離し、水相を150 mL部のTHFで抽出する。合わせたTHF相は捨てる(この有機相は濃縮固体のNMR分析により1 g未満の生成物を含むと計算される)。

## 【0080】

水相のpHを2.5 mLの2.5 N NaOHで10.9 ~ 12.5に調整し、残ったエステルを加水分解するために、この溶液を一夜攪拌する(非加水分解エステルの量はNMRにより24%と評価される)。淡黄色の溶液(pH 11.8)を40 で濃縮乾固し、残った有機溶媒およびジイソプロピルエチルアミンの痕跡を除去する。残留物(110 g)を50 で水170 mLに再溶解し、常温に冷却し、90 mLの3 N HClを滴下して加えてpHを3.0に調整する。クリーム状の白色懸濁液を2時間冷蔵庫に入れ、ろ過する。ろ塊を2回100 mL部の氷水で洗浄し、一定の重量になるまで乾燥する(0.1 mmHg)。このpHでは沈殿はまだかなり水溶性であるので、使用する水は最小限に保持しなければならない。標記生成物は乾燥し、粉末状の生成物として40.7 gである。実用的分子量は内部標準(以下の2パラグラフに記載)を用いて250 MHz <sup>1</sup>H NMRにより351 mg / mmolと計算され、これは元素分析から得られた値(360 mg / mmol)とよく一致する。

## 【0081】

ジオキサン(10.0 μL / 10.00 mL D<sub>2</sub>O, 0.00822 mmol / 0.70 mL NMR溶液, 8 <sup>1</sup>H s 3.7, 1.954 インテグレーション単位)を内部標準に使用した。CABA-ホスフェート(25.4 mg / 0.70 mL NMR溶液)ピニルプロトンE / Zアイソマーインテグレーション単位(<sup>1</sup>H d 6.5, 2.152 インテグレーション単位)をともに加える(アッセイ条件下に脱リン酸化する場合、両アイソマーともに同じ生成物を与える)。

計算:

$$8 \times 2.15 \text{ ピニル } ^1\text{H} \times 0.00822 = 0.0724 \text{ mmol CABA-ホスフェート}$$

$$1.954 \text{ ジオキサン } ^1\text{H}$$

$$25.4 \text{ mg} / 0.0724 \text{ mmol} = 351 \text{ mg} / \text{mmol}$$

## 【0082】

完全にプロトン化されたCABA-ホスフェートの分子量は278 mg / mmolである。実用的な分子量には、生成物中のナトリウム対イオン、水和水および残留塩化ナトリウムの重量を考慮する必要がある。この分子量を用いて40.7 gは116 mmol CABA-ホスフェートまたは約82%の収率を表す。

## 【0083】

生成物はまたE / Zアイソマーの比および有機ホスフェートとしての純度のために400 MHz <sup>1</sup>Hおよび<sup>31</sup>P NMRにより分析する(データは示していない)。マスペクトルは陰イオンモードで親イオン(277 M - 1)および(299 M - 2 + Na)を示す。元素分析(理論値%: C 30.00, H 3.08, Cl 14.39, P 8.61, Na 8.69; 分析値%: C 30.04, H 2.93, Cl 14.36, P 8.62, Na 8.64)は、7.5重量%のNaCl

を含むC A B A - ホスフェートのモノナトリウム塩の二水和物に一致する。このバッチの元素分析の基礎となった計算は、 $0.9 \text{ eq Na}^+$  対イオン、 $2 \text{ eq}$  水和水および $7.5\% \text{ NaCl}$ と一致する。残留塩化ナトリウム%は沈殿した生成物の付加的な冷水洗浄によりさらに低下させることができるが、同時に生成物の収率は低下する。

【0084】

#### c. 2 - ハロビニルグリコシドの製造

ハロビニルグリコシドおよび他のハロビニルグリコシドは本発明においてはハロビニルホスフェートの有用な代替物である。酵素加水分解は2 - クロロアセトアルデヒドを放出し、ここに様々な実施例で用いられるフェナシルクロリドのように、システインと同じ環化反応を受ける。たとえば、とくに好ましい化合物は2 - クロロビニル - ガラクトシドである。ガラクトシドはガラクトシダーゼの商業利用性、その高い触媒活性およびその良好な安定性から望ましい。

10

【0085】

アシル化された糖およびエトキシエチレンからのビニルグリコシドの製造およびその酵素的加水分解によるアセトアルデヒドの製造はHeisei JP 05039241またはKitazawara, Chem. Lett. 6: 569-72, 1975に記載されている。これらの開示は引用により本明細書に導入される。類似の操作によって、2 - ハロビニルグリコシドはエトキシエチレンの代わりに1 - クロロ - 2 - エトキシエチレンを用いて製造することができる。

【0086】

各種グリコシド - たとえば、ビニルグリコシドおよび1 - エトキシエチルグリコシドのグリコシダーゼの基質としての有用性はDettingerら, Carbohydr. Res. 87(1): 63-70, 1980に記載されている。この開示は引用により本明細書に導入される。したがって、本発明はさらにハロビニルグリコシドおよび他のハロビニルグリコシドのハロビニルホスフェートの代替物としての使用を提供する。酵素的加水分解は2 - ハロアセトアルデヒドを放出させ、これは以下の実施例に記載するようなアッセイにおけるフェナシルクロリドのようにシステインとの同じ環化反応を受けることが期待される。

20

【0087】

#### B. アッセイ方法の例

##### 1. 一般的総説

本発明による方法を実施するためには、適当な反応条件が選択される。以下の記載は適当な条件を掲げるが、これらは特定の適用のために選択された特異的な試薬およびアッセイプロトコールに応じて本技術分野の熟練者により修飾されるものである。たとえば、本発明の方法は、不均一系、均一系、競合または直接アッセイのような多くのタイプのアッセイに適用することが可能であり、その条件および試薬はそれらに応じて選択されることになる。

30

【0088】

サンプルは、好ましくは適当なメジウム中で直接調べることができるが、またサンプルをアッセイメジウム中に加える前に前処理することもできる。前処理は1または2以上のアッセイ試薬に対してアナライトが容易に利用されるようにし、また望ましくない物質を除去してアッセイにおける干渉を低下させることにより検出を容易にする。サンプルは、細胞を分離または溶解し；タンパク質を沈殿、加水分解または変性させ；脂質を加水分解し；アナライトを可溶化するために前処理される。このような前処理には、それらに限定されるものではないが、遠心分離；サンプルの有機溶媒（たとえば、アルコール好ましくは約8個未満の炭素原子を有するアルコール、たとえばメタノール）による処理；および界面活性剤による処理；還元剤を含む放出剤による処理が包含される。

40

【0089】

アッセイされる化合物の濃度は一般に約 $10^{-4} \sim 10^{-15} \text{ M}$ 、さらに通常は $10^{-5} \sim 10^{-12} \text{ M}$ を変動する。さらに特定すれば、hcyアナライトの場合、濃度は一般に約 $10^{-4} \sim 10^{-8} \text{ M}$ 、さらに通常は $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{ M}$ を変動する。アッセイが定性的、半定量的または定量的かの考慮、特定の検出技術およびアナライトの濃度が通常、他の試薬の濃度を決

50

定する。さらに、各試薬の最終濃度は通常、興味ある範囲にわたるアッセイの感度を最適化するように経験的に決定される。

【0090】

アッセイに使用され、また以下に述べるキットにパッケージされる各種試薬の相対量は、本発明の方法の間に起こる必要がある反応を実質的に最適化するようなまたさらに実施されるアッセイの感度を実質的に最適化する試薬濃度を提供するように広範囲に変動させることができる。アッセイメジウム中の抗体の濃度はアッセイのタイプに依存する（たとえば、不均一系もしくは均一系、競合または直接等）。通常、抗-修飾アナライト抗体はアッセイメジウム中に修飾アナライトの約半分から $10^7$ 倍までの濃度、より通常には修飾されたアナライトにほぼ等量から $10^3$ 倍までの濃度で存在させる。

10

【0091】

本発明の方法の実施には好ましくは水性メジウムが使用される。他の極性共溶媒、通常1~6個さらに通常には1~4個の炭素原子を有する酸素化有機溶媒、たとえばアルコール、エーテル等もメジウム中に使用できる。通常、これらの共溶媒は約70重量%未満、より頻繁には約30重量%未満の量を存在させる。

【0092】

本発明によるアッセイにおいては、メジウムのpHは通常約5~10の範囲であり、約7~9の範囲がより好ましい。pHはsbpメンバー間の結合の有意なレベルを維持するように、一方ではシグナル産生効率を最適化するように選択される。場合により、この2つの間には矛盾がある。さらに、pHは特定の構造コンフォーメーションたとえば環化を維持するように選択される。様々な緩衝液が所望のpHを達成し、定量時にそのpHを維持するために使用される。緩衝液の例としては、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス、バルピタール等が包含される。使用される特定の緩衝液は本発明に重要ではないが、個々のアッセイにおいて、ある緩衝液が他より好ましいことはある。

20

【0093】

本発明の方法を実施するに際しては、通常、中等度の温度が用いられる。温度は行われる工程によって変動させることができる。しかしながら、典型的には、関連時間中、一定の温度が維持される。温度は一般的に約10~約50であり、通常は約15~約40である。

各種試薬の添加順序は広範囲に変化させることが可能であるが、使用される特定のアッセイフォーマットの性質によりある程度好ましい順序がある。試薬およびサンプルは同時にまたは完全にもしくは部分的に順序立てて混合することができる。ここに使用した「完全にもしくは部分的に順序立てて」の語は、サンプルおよび本発明に用いられる各種試薬は、一緒に（同時に）、1もしくは2以上の試薬を順次単独に、または他の試薬と一緒に混合することを意味する。たとえば、アナライトおよび還元剤は、ジスルフィド結合があればその還元を可能にするようにまず混合し、ついで残った試薬を同時にまたは段階的に添加する。

30

【0094】

それぞれの試薬を添加したのちに、1または2以上のインキュベーション工程、一般に約30秒~6時間、より通常には2分~1時間を任意に行うことができる。工程にはより便利な順序があり、用いられる特定の順序の選択は試薬およびアッセイフォーマットの選択に依存するが、それは本発明には重要ではない。イムノアッセイの最終工程は、サンプル中のアナライトの存在または量に比例する修飾されたアナライトと抗体との間の結合の程度の測定である。結合の程度を測定するには多くの方法があり、本技術分野において周知である。これらの方法はアッセイの性質-すなわちアッセイが競合的、均一系、不均一系であるか等に依存して異なる傾向がある。

40

【0095】

修飾されたアナライトと抗体の間の結合の程度を測定する一方法は、標識された修飾アナライト、すなわち検出可能な標識されたアナライト同族体を加え、標識されたアナライトの結合と競合する標識された修飾アナライトと抗体の結合によって産生するシグナルを検

50

出すことにより達成することができる。たとえば、均一系アッセイにおいては、検出可能な標識は酵素であり、最終工程は基質の添加による酵素標識の活性化とすることができる。産生されたシグナルは標識された修飾アナライトと抗体の間の結合の程度に比例する。したがって、シグナルの存在または量はサンプル中のアナライトの存在または量に比例する。

#### 【0096】

競合的均一系アッセイにおける他の測定では、結合の程度はフルオレッサーで標識された修飾アナライトとクエンチャーで標識された抗体の使用によって定量できる。この場合も、シグナルは結合の程度に比例し、これはサンプル中に存在するアナライトの量に逆比例する。別法として、フルオレッサーで修飾されたアナライトを別個の試薬として加えないで、フルオレッサーで修飾された修飾試薬とアナライトの反応によって形成させる均一系の非競合的アッセイを使用することもできる。この場合も、シグナルは、結合の程度に比例し、これはサンプル中に存在するアナライトの量に正比例する。

10

#### 【0097】

不均一系アッセイにおいては、標識されていない抗 - (修飾アナライト) 抗体が支持体に結合される。支持体を修飾されたアナライトおよび標識された修飾アナライトとインキュベーションしたのち、支持体を液相から分離し、ついで固相または液相からのシグナルの量を定量する。これは修飾されたアナライトと抗体の結合程度、すなわちサンプル中のアナライトの量を指示する。上述のイムノアッセイ技術およびここに開示される有用な他の技術のさらに詳細な説明はたとえばMaggio, Edward T., "Enzyme-Immunoassay," CRC Press, Inc., Boca Ration, FL, 1980 を参照されたい。

20

#### 【0098】

##### 2. h c y アッセイの例

例示的な目的で、以下のアッセイプロトコールを使用できる。これらの例示は本発明の範囲の限定として解釈すべきではなく、それらは本発明の方法をサンプル中の h c y および c y s の定量に使用できる定性的、半定量的および定量的アッセイプロトコールの単なる例示である。これらの方法で検出されるシグナルは既知の h c y 濃度を有する標準または対照と比較する。

#### 【0099】

アルキル化剤を使用する h c y のアッセイでは、修飾された h c y に特異的に結合するモノクローナル抗体 - 修飾された c y s ではない - の使用が好ましい。h c y および c y s の含有が疑われるサンプルを適当なメジウム中で保護されたアルキル化試薬と混合する。活性化試薬の添加により、保護されたアルキル化試薬は脱保護され、ついで以下の反応が起こる：アルキル化試薬 + h c y 修飾された h c y およびアルキル化試薬 + c y s 修飾された c y s である。グルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼに接合した修飾 h c y の同族体および G 6 P D H に接合した修飾 h c y に対する結合は酵素の阻害を生じる。30分インキュベートしたのちにグルコース - 6 - ホスフェートを加える。産生するシグナルはサンプル中の h c y の量に正比例する。

30

#### 【0100】

前述のようにサンプルのアッセイには、好ましくは修飾された h c y (修飾された c y s ではない) に特異的なモノクローナル抗体が使用され、ガラスビーズに結合される。血清サンプルはまずジチオスレイトール (D D T) で処理して、ジスルフィドとして結合している h c y を還元的に遊離させる。過剰の D D T をヒ酸ナトリウムで処理して隔離する。前処理されたサンプルをついで保護されたアルキル化試薬 (これは<sup>3</sup>Hで標識されている) と混合し、ついで抗体および活性化試薬と混合する。メジウムを10分間インキュベートし、ビーズを分離して洗浄する。ビーズの放射能をついで測定する。産生されたシグナルはサンプル中における h c y の量と正比例する。

40

#### 【0101】

保護されたアルキル化試薬を使用する h c y の例示的アッセイでは修飾された h c y (修飾された c y s ではない) に特異的に結合するモノクローナル抗体が支持体に結合される

50

。西洋ワサビペルオキシダーゼに接合された修飾 h c y の同族体も使用できる。h c y および c y s の含有が疑われるサンプルを T C E P、トリス(カルボキシエチル)ホスフィンおよび保護されたアルキル化試薬を適当なメジウム中に混合する。T C E P は血清サンプル中のジスルフィド型のホモシステインを還元するために使用される。ジスルフィドの還元が起こるのに十分な時間が経過したのち、ついで抗 - 修飾 h c y - 支持体接合体、活性化試薬および修飾された h c y - H R P 接合体をメジウムに加える。懸濁液を 30 分間インキュベートしたのち、液相および固相を分離し、固相を洗浄する。基質を加えた水性メジウムをついで固相に加えると、産生されたシグナルはサンプル中の h c y 量に逆比例する。

#### 【 0 1 0 2 】

有用な保護されたアルキル化試薬は、4 - ( - クロロアセチル)安息香酸のエノールホスフェート、C A B A - ホスフェートである。この化合物は保護されていないアルキル化試薬と異なり、T C E P の存在下でも安定であることが見いだされた。エノールホスフェート保護基のみに使用により、これらの他の場合には不適合的な試薬と一緒に保存ことが可能になり、したがって、わずか 2 種の試薬を用いてアッセイを実施できる。第一の試薬は T C E P、C A B A のエノールホスフェート、およびアルキル化ホモシステインと C A B A によって形成された生成物 ( h c y - C A B A ) でコートされた染料粒子を含有した。この混合した試薬をサンプルと混合すると、ホモシステインジスルフィドの還元を生じる。第二の試薬はアルカリホスファターゼおよび h c y - A B A に対する抗体でコートされた化学ルミネサービーズを含有した ( 一般に化学ルミネサービーズは一重項酸素で活性化可能な化学ルミネセンス標識を導入したラテックス粒子である。センシタイザービーズはセンシタイザー染料が導入された粒子またはビーズである )。この第二の試薬を添加すると、エノールホスフェートがまず加水分解される。得られた遊離の C A B A をついでホモシステインと反応させると、形成された h c y - A B A が化学ルミネサービーズに結合する。依然として遊離の抗体を有する化学ルミネサービーズはセンシタイザービーズに結合する。得られたビーズペアは照射により検出され、化学ルミネサー光の発生が確認される。

#### 【 0 1 0 3 】

C A B A エノールホスフェートおよび B A B A エノールホスフェートはとくに有用であることを説明するが、それらは例として記載されたものであり、本発明を限定するものではないことを理解すべきである。他の - エノールホスフェートも同様に調製され、様々なハロビニルグリコシドとして本明細書に開示されたように使用することができる。

#### 【 0 1 0 4 】

##### C . 一重項酸素で活性化可能な化学ルミネセンス標識および方法

一重項酸素で活性化可能な化学ルミネセンス標識、ならびにその製造および使用方法はとくに本発明の方法および組成物に有用である。しかしながら、このような標識、方法および関連組成物 (たとえば、標識粒子) は本発明を実施する唯一の手段ではないことを理解すべきである。

#### 【 0 1 0 5 】

すなわち、本発明の様々な態様においては、米国特許 5,709,994, 5,340,716 および 5,478,729 - これらの開示は引用により本明細書に導入される - に記載された標識、粒子および他の組成物は、本明細書に開示されたようにとくに有用である。たとえば本発明は化学ルミネセンスおよび / またはセンシタイザー粒子で標識されたビーズ (または他の材料)、化合物、組成物または分子の使用を記載する。このような化学ルミネセンス粒子の製造は上述の米国特許、たとえば米国特許 5,709,994 の 25 ~ 33 欄および 41 ~ 43 欄または米国特許 5,340,716 の 21 ~ 22 欄に記載されている。

#### 【 0 1 0 6 】

有用な光センシタイザーおよび化学ルミネセンス材料はまた、マトリックスが固体 (たとえば、粒子) でも、さらに「流体」もしくは「流体 / 固体」の性質をもっている (たとえば、油滴またはリポソーム)、マトリックスにそれらの材料を結合させる方法として上

10

20

30

40

50

述の特許に詳細に開示されている。適当なシグナル産生システムの優れた論述はまた、Ullmanらの米国特許5,185,243に見いだすことができる。この開示は引用により本明細書に導入される。

【0107】

#### D. 有用な抗体の製造方法

本発明の方法にはさらに、免疫学的に識別されるアナライト、すなわち「修飾された」アナライトと相同の免疫原に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の製造が包含される。本発明の方法に有用な抗体を得るために使用される免疫原は、アッセイされる化合物を選ばれた修飾試薬と反応させて得られる修飾されたアナライトである。免疫原の調製には、典型的には、修飾試薬の可溶化基を、免疫原を有するタンパク質への試薬の結合のためにまず使用する。通常、これらの結合基はまず活性化され、ついで試薬を担体タンパク質へカップリングさせる。得られた試薬-タンパク質接合体はアナライトと反応させ、精製し、免疫原として用いられる。

10

【0108】

本発明は、第二の化合物が第一の化合物の同族体である場合を含めて、第二の化合物の存在下に第一の化合物を検出するのに有用な試薬、キットおよび方法を包含する。すなわち上述の抗体は修飾された試薬と第一の化合物（アナライト）または第二の化合物のいずれかの反応生成物と特異的に反応するそれらの能力、すなわち修飾されたアナライトまたは修飾された第二の化合物のいずれかに結合するそれらの能力についてスクリーニングされる。たとえば、hcyのアッセイにおいては、免疫原は免疫原性担体タンパク質に連結して誘導体化されたhcyである。すなわち、得られた抗体は修飾されたhcyアナライトを特異的に認識し、修飾されたcysを認識しない。

20

【0109】

修飾された試薬をタンパク質担体に結合させることができる様々な残基は、たとえばアルデヒド、ケトン、ジアゾニウム塩、アルキル化剤等を含めて使用することができる。便宜的には、カルボン酸またはスルホン酸が接合のために活性化エステルまたは酸ハライドに変換される。担体タンパク質は任意のタンパク質であり、好ましくは免疫処置される宿主動物に異種のタンパク質、動物がたとえばマウス、ウサギ、ヒツジまたはヤギである場合は、たとえばキーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミンである。

【0110】

本発明の方法に有用な抗体の調製は本技術分野で周知の方法を用いて達成される。たとえばモノクローナル抗体は本質的に、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497, 1975に記載された方法と類似の方法によって得られる。MilsteinとKohlerの方法は十分に確立されている。一般にこの方法は、宿主通常はマウスまたは他の適当な動物への免疫原の注射を包含する。ついで宿主動物の脾臓から細胞を採取する。別法として、宿主は非感作脾臓細胞からなり、これをインビトロで免疫原で感作する。得られた細胞をついで骨髓腫細胞と融合する。得られた結果はハイブリド細胞であり、「ハイブリドーマ」とも呼ばれ、インビトロで培養することができる。ハイブリドーマの集団をスクリーニングして個々のクローンが単離されるように操作すると、それぞれのクローンは抗原に対して単一の抗体を分泌する。

30

40

【0111】

免疫原を宿主に導入する場合には、宿主の免疫系はその免疫原を様々な部位で認識できる各種抗体を産生することによって応答する。これらの多くの抗体は異なる親和性および特異性を有する。用いられる特定のアッセイ方法に望ましい親和性および特異性形質を有する抗体を得るには、異なるハイブリドーマ細胞系を、所望の特性を有する抗体が同定されるまでスクリーニングする。

【0112】

#### E. 接合体の調製

上述の方法の他の適用には接合体の調製が包含される。たとえば、スルフヒドリル基を有するタンパク質を、タンパク質1分子あたり1個のCABAエノールホスフェートで標識

50

する。C A B A ホスフェートはアルキル化剤ではないので、この接合体は安定である。この標識材料をついで過剰のスルフヒドリル含有タンパク質と混合する。アルカリホスファターゼを加えるとカップリング反応が始まり、この反応はC A B A の高い反応性のためにほぼ定量的である。

すなわち、1 : 1 タンパク質接合体の合理的な収率がC A B A 標識タンパク質の重合を妨害することなく容易に達成される。同様に、薬物接合体が上述と類似の方法により調製され、たとえばスルフヒドリル含有薬物がスルフヒドリルタンパク質の代わりに使用される。

#### 【 0 1 1 3 】

##### F . キット

便宜上、本発明に使用するための試薬は、アッセイ法、一つの分子を他の分子に接合させる方法（たとえばタンパク質接合体）、または本発明の任意の実際的適用に使用するためのキットとして提供することができる。h c y を検出するための方法に用いられる典型的なキットには、活性化するとh c y およびc y s を化学的に修飾して修飾されたh c y およびc y s を形成できる保護されたアルキル化試薬、修飾されたh c y に特異的に結合できるが修飾されたc y s には結合しない抗体、および活性化試薬をパッケージした組み合わせからなる。キットはさらに修飾されたh c y の標識類縁体からなる。

#### 【 0 1 1 4 】

本明細書に別に記載されたように、修飾されたh c y はアルキル化試薬とサンプル中のホモシステインの相互作用によって形成される生成物 - たとえば、スルフヒドリル基の修飾が起こった生成物から構成される。一変形においては、修飾されたホモシステインは、ホモシステインのカルボキシフェナシルチオエーテル ( h c y - A B A ) である。

#### 【 0 1 1 5 】

キットはまた放出剤からなることもできる。h c y およびc y s 硫黄化合物を血清タンパク質から遊離させることができる適当な放出剤は本技術分野でよく知られていて、それらに限定されるものではないが、還元剤、たとえば水素化ホウ素ナトリウムおよびカリウム ; ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2 - メルカプトエタノール、チオグルコール酸およびグルタチオンのようなチオール ; ならびにホスフィンおよびトリアルキルホスフィン、たとえばトリブチルホスフィンおよびトリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィンが包含される。とくに適当な還元剤はジチオスレイトールおよびトリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン ( T C E P ) であり、後者は Burnsら, J.Org. Chem. 56 (8): 2648-2650, 1991 に記載され、ジスルフィド型のh c y を放出させるのに適している。水性メジウム中で2つの分子をカップリングさせるためのキットは好ましくは、結合基と活性化試薬を分離された容器中に包含する。

#### 【 0 1 1 6 】

適当な環境下では、キット中の1または2以上の試薬は溶液中にまたは乾燥粉末として提供され、通常は賦形剤を含めて凍結乾燥され、それを溶解すると本発明の方法およびアッセイを実施するのに適当な濃度を有する試薬溶液が提供される。本発明の多機能性を増大させるため、試薬は、同じまたは別個の容器中に、その方法およびアッセイの実質的に至適化を与える試薬の比でパッケージされた組み合わせとして提供される。試薬の交差反応性および安定性に依存して、試薬はそれぞれ別個の容器にまたは各種の試薬を1または2個以上の容器に入れる。本発明に用いられる試薬は、便宜上、予め定められた量で提供されることが好ましい。キットには試薬の使用法および/または特定のアッセイの実施方法についての説明書を、たとえばパッケージ挿入物の形で含有させる。

本明細書に記載された実施態様の様々な組み合わせは本発明の範囲内に包含されるものであることを理解すべきである。本発明の他の特徴および利点は以上の説明、以下の実施例、および特許請求の範囲から明らかになるものと確信する。

#### 【 0 1 1 7 】

##### 略号

トリスHCl : トリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタン - HCl ( 10 × 溶液 ) , BioW

10

20

30

40

50

hittaker, Walkersville, MD より

D T T : ジチオスレートール, Sigma Chemical Company, St. Louis, MOより H P L C

: 高速液体クロマトグラフィー

D P P : 4, 7 - ジフェニルフェナンスロリン, Aldrich Chemical Company, Milwaukee W I より

B S A : ウシ血清アルブミン, Sigma Chemical Company, St. Louis, MOより E L I S

A : 固相酵素免疫測定法, "Enzyme-Immunoassay," Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raten, Florida, 1980 に記載されている

g : グラム

mmol : ミリモル

D M F : ジメチルホルムアミド

T H F : テトラヒドロフラン

M S : マススペクトロスコピー

N M R : 核磁気共鳴スペクトロスコピー

T M S C I : トリメチルシリルクロリド

E D A C : 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - カルボジイミド塩酸塩

M E S : 2 - ( N - モルホリノ ) エタンスルホン酸

S P D P : N - スクシンイミジル 3 - ( 2 - ピリジルチオ ) - プロピオネート

Sulfo-S M C C : 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート

T C E P : トリス-カルボキシエチルホスフィン

【 0 1 1 8 】

【 実施例 】

以下の実施例は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものではない。

#### 実施例 1

##### アルキル化基の脱保護の証明

##### 1 . アルカリホスファターゼによるホスフェート保護基の脱保護

p H 8 ~ 9 の N a O D / D<sub>2</sub>O 1 mL 中 B A B A - ホスフェートおよび C B A B - ホスフェート ( B A B A - ホスフェートの製法により生じる ) の混合物 5 mg をアルカリホスファターゼ ( Sigma, ヒト胎盤 ) 1 mg ( 1 5 単位 ) によって室温で 1 5 分間処理する。 2 0 % H<sub>2</sub>O / A C N を使用する薄層クロマトグラフィー ( 2 5 0 μ S i O<sub>2</sub>, Analtech Uniplate ) は、保護されたアルキル化試薬のホスフェート基がアルカリホスファターゼ処理により除去されるが、非処理の保護アルキル化試薬は無傷に維持されることを示す。これはさらにビニルプロトンピーク ( 通常はエノールホスフェートについては 6 . 3 ppm に見いだされる ) の消失を示す N M R ( D<sub>2</sub>O ) 分析により確認される。

【 0 1 1 9 】

保護基の効率的な除去の更なる証明は脱保護されたアルキル化試薬とシステインの反応の T L C ( 上述 ) 分析によって示される。アルカリホスファターゼとの反応の粗製生成物をシステインと約 1 0 分間反応させると、第一の生成物、脱保護アルキル化試薬の消失と、さらに極性の生成物の出現を生じた。後者はアルキル化試薬とシステインの付加物と推測される。

【 0 1 2 0 】

##### 2 . 還元剤の存在下にける保護されたアルキル化試薬の安定性

C B A B - ホスフェート ( 保護されたアルキル化試薬と還元剤 ( トリス - カルボキシエチルホスフィンまたは T C E P ) の混合物の安定性は B A B A 、 C A B A ホスフェートおよび T C E P を標準として使用し、上述のように T L C 分析で証明する。 B A B A と T C E P ( リン酸緩衝液 p H 7 . 0 中それぞれ 5 mM ) の混合物の分析では、アルキル化試薬と還元剤の反応は、室温で 3 0 分間混合物をインキュベートしたのちにほぼ完全である。遊離のアルキル化試薬と異なり、保護されたアルキル化試薬 ( C A B A ホスフェート ) は 2 つの試薬 ( リン酸緩衝液 p H 7 中それぞれ 5 mM ) の混合物の室温における 1 6 時間のインキュベーション後、 T C E P に対し抵抗性であることが見いだされた。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 1 】

## 実施例 2

L O C I を用いるホモシステインアッセイ (ルミネセンス酸素チャネリングイムノアッセイ)

様々なアッセイ方法および組成物が生物学的サンプル中 - たとえば血清サンプル中の化合物および組成物の検出に有用である。本明細書に記載の組成物および方法を用いる有用なアッセイの一つは本明細書では L O C I と呼ばれる (米国特許 5,709,994, 5,340,716 および 5,478,729 - これらの開示は引用により本明細書に導入される - にはルミネセンス酸素チャネリングイムノアッセイに関してさらに詳細に記載されている)。

## 【 0 1 2 2 】

h c y は血漿中に様々な形態 - たとえば、わずかな比率の遊離型小分子、一部はそれ自体およびシステインとのジスルフィド、一部はアルブミンとのジスルフィド (約 70%) として存在する。総 h c y は臨床的に関連のある測定値であるが、絶食対象では約 5 ~ 15 μmol / L の標準値が示されている。ホモシステイン血症といわれる血漿 h c y の中程度の上昇でも、一般集団においては未成熟心臓系疾患の危険因子と考えられている。

## 【 0 1 2 3 】

抗体ベースのアッセイはポピュラーなフォーマットであり、サンプルの前処理の問題 - とくにオフラインのサンプル前処理が解決されれば、高いスループットの自動化形態に容易に適合される。したがってホモシステイン (h c y) および / または他の分子ならびに組成物の迅速な、完全に自動化された検出は、開示された方法および組成物内での使用を容易に証明する価値あるツールである。

## 【 0 1 2 4 】

本質的に、このようなアッセイの工程は、(1) たとえばトリス - (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩還元剤による h c y ジスルフィドの遊離 h c y への変換; (2) プロモアセチル安息香酸 (B A B A) または B A B A のエノールホスフェート誘導体による h c y の誘導体化による h c y - A B A の形成; および (3) h c y - B A B の L O C I による検出および定量を包含する。このアッセイは、これらの誘導体化剤が保護されていない形態より広い pH 範囲にわたりより良好な溶解性とより長い貯蔵寿命を有するので、保護されたハロケトンたとえば B A B A または C A B A のエノールホスフェート誘導体の使用を介してさらに増強される。さらに、このような保護されたハロケトンは単純性の付加的な利点を有し、それは自動化関連においても 2 - 試薬プロトコールの使用を可能にする。

## 【 0 1 2 5 】

例示の目的で、自動化アッセイ方法をここに記載する。非自動化アッセイならびに異なる成分および工程を使用するアッセイはまた、本発明の組成物の使用を意図し、したがって本発明の範囲内に包含される。

## A . 材料

以下に記載する様々な方法に使用される以下の試薬は、指定された商業的ソースから購入することができるが、広範囲な他のソースからも容易に入手できる。ウシ血清アルブミン (B S A ; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) ; ウシ小腸アルカリホスファターゼ (C I A P ; Pierce Chemicals, Rockford, IL) ; スルホスクシンイミジル 6 - (ピオチンアミド)ヘキサノエート (N H C - L C - ピオチン ; Pierce, Rockford, IL) ; L - ホモシステイン、システインおよびメチオニン (Sigma, St.Louis, MO) ; L - ホモシステインチオラクトン (H C T L ; Fluka, Milwaukee, WI) ; トリス - (2 - カルボキシエチル) ホスフィン、塩酸塩 (T C E P ; Molecular Probes, Eugene, OR) ; デキストラン T - 500 (PharmaciaCo., Piscataway, NJ) ; H B R - 1 (Heterophilic Blocking Reagent 2; Scantibodies Lab. Inc., Santee, CA)。他に特定されなければ、本発明で使用された他のすべての化学品は試薬特級である。

## 【 0 1 2 6 】

以下の試薬は発明者らの実験室で調製された : プロモアセチル安息香酸 (B A B A) ; ホモアセチル安息香酸 N - ヒドロキシスクシンアミドエステル (B A B A - N H S) ; 「 p

10

20

30

40

50

r o - C A B A」またはC A B Aホスフェート（C A B Aのエノールホスフェート誘導体）；ならびにホモシステイン - アセチル安息香酸（h c y - A B A）である。抗 - h c y - A B Aモノクローナル抗体（たとえば、S y v aのモノクローナルグループからのh c y - A B A - A B A接合体へのクローンI 5 C 1 2）が、以下に記載のように使用される。他の均等体、有用なモノクローナルおよびポリクローナル抗体は本技術分野の熟練者に周知の技術により容易に独立して発生させることができる（たとえば、上記D項参照）。

#### 【0127】

血清カリブレターは、正常個体の血清をプールした血清サンプルに既知量のホモシステインを注入して調製する。このプール中のホモシステインレベルは、標準技術に従いH P L Cで定量した。たとえば、多くの臨床検査室 - たとえば、Cleveland, OH - がこのようなプロトコールを実施するために準備される。

10

#### 【0128】

固体マトリックス、好ましくはビーズ型のマトリックスを抗 - h c y - A B Aモノクローナル抗体（m A b）で標識し、本発明者らは「A b - アクセプタービーズ」と呼ぶマトリックスをほぼ以下のように調製する。ポリスチレンビーズをまず、アクセプター染料（たとえば、C - 2 8 チオキセン、D D P / E u（T T A）3）で染色し、ついでデキストランでコートする。

#### 【0129】

C - 2 8 チオキセンは次のように調製する。すなわち、乾燥T H F（2 0 0 mL）中4 - プロモアニリン（3 0 g， 1 7 4 mmol）の溶液に1 - プロモテトラデカン（8 9 . 3 mL， 3 6 6 mmol）およびN, N - ジイソプロピルエチルアミン（6 2 . 2 mL， 3 5 7 mmol）を加えた。この反応溶液をアルゴン下、9 0 °Cに1 6時間加熱したのち、室温に冷却した。この反応溶液に再び、1 - プロモテトラデカン（4 5 mL， 1 8 4 mmol）ならびにN, N - ジイソプロピルエチルアミン（3 1 mL， 1 7 8 mmol）を加え、反応混合物をさらに1 5時間9 0 °Cに加熱した。冷却したのち、反応溶液を真空中で濃縮し、残留物をC H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>（4 0 0 mL）で希釈した。C H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>溶液を1 N N a O H（2 x）、水および食塩水で洗浄し、N a<sub>2</sub>S O<sub>4</sub>上で乾燥し、真空中で濃縮すると、暗褐色の油状物（約1 1 0 g）が得られた。Waters 500 Prep LC システムによりシリカゲル上プレパラティブカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサンで溶出すると主として生成物（4 - プロモ - N, N - ジ - (C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>) - アニリン）を含有する黄色の油状物が、少量の1 - プロモテトラデカンとともに得られた。後者の化合物は真空蒸留（沸点1 0 5 ~ 1 1 0 °C， 0 . 6 mm）によって混合物から除去すると、生成物が褐色の油状物 5 0 . 2 g（5 1 %）として残留した。乾燥T H F（3 0 mL）中アルゴン下にマグネシウム屑（9 . 6 0 g， 3 9 5 mmol）の混合物に、上述の置換アニリン生成物（4 4 . 7 g， 7 9 mmol）のT H F（2 5 0 mL）中溶液を滴下して加えた。ヨウ素の結晶数個を加えて、グリニヤール試薬の形成を開始させた。

20

30

#### 【0130】

反応混合物が温かくなり還流を開始したならば、添加速度を穏やかな還流が維持されるように調整した。添加完了後、混合物をさらに1時間還流加熱した。冷却した上清溶液をカニューレによって添加フラスコに移し、T H F（3 0 0 mL）中フェニルグリオキザール（1 1 . 7 g， 8 7 mmol）の溶液にアルゴン下 - 3 0 °Cで滴下して加えた（2 . 5時間以上）。反応混合物を徐々に1時間を要して0 °Cに加温し、さらに3 0分間攪拌した。得られた混合物を、氷水（8 0 0 mL）および酢酸エチル（2 5 0 mL）の混合物中に注いだ。有機相を分離し、水相は酢酸エチル（3 x）で抽出した。有機相を合わせてH<sub>2</sub>O（2 x）、食塩水で洗浄し、M g S O<sub>4</sub>上で乾燥した。溶媒を蒸発させると、4 8 . 8 gの粗製濃縮生成物が暗緑色の油状の液体として得られた。この液体をフラッシュカラムクロマトグラフィーに付すと（ヘキサン勾配で溶出、1 . 5 : 9 8 . 5， 3 : 9 7， 5 : 9 5 酢酸エチル : ヘキサン）、ベンゾイン生成物 2 4 . 7 g（5 0 %）が得られた。M S（C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>N O<sub>2</sub>）：[M - H]<sup>+</sup> + 6 1 8 . 6。

40

#### 【0131】

<sup>1</sup>H N M R（2 5 0 M H z， C D C l<sub>3</sub>）は期待されたベンゾイン生成物と一致した。乾燥

50

トルエン (500 mL) 中上記ベンゾイン生成物 (24.7 g, 40 mmol) の溶液に、2-メルカプトエタノール (25 g, 320 mmol) と TMSCl (100 mL, 788 mmol) を順次加えた。反応溶液をアルゴン下に23時間還流加熱したのち、室温に冷却した。これに付加的な TMSCl (50 mL, 320 mmol) を加え、反応溶液をさらに3時間還流加熱した。得られた溶液を冷却させ、冷2.5 N NaOH水溶液で塩基性として  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×) で抽出した。有機層を合わせて、飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (3×) および食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、真空中で濃縮すると褐色の油状の液体が得られた。Waters 500 Prep LC システムを用いてシリカゲル上プレパラティブカラムクロマトグラフィーに付して、ヘキサン勾配 (1:99, 2:98 酢酸エチル:ヘキサン) で溶出すると 15.5 g (60%) の C-28 チオキセンが橙黄色の油状物として得られた。MS ( $\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{NO}_5$ ): [M-H]<sup>+</sup> 661.6, <sup>1</sup>H NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) は期待された C-28 チオキセン生成物 2-(4-(N,N-ジ-( $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ )-アニリノ)-3-フェニルチオキセンと一致した。

#### 【0132】

DDP/Eu(TTA)<sub>3</sub> は次のように調製した。すなわち Eu(TAA)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O (8.69 g, 10 mmol, Kodak Chemical Company, Rochester, NY) および 1,10-フェナンスロリン (1.8 g, 10 mmol, Aldrich) を 50 mL の乾燥トルエン中に混合し、油浴中 95 に1時間加熱した。トルエンを減圧下に除去した。10 mL のトルエンから灰色の固体が結晶化して、10 g の DDP/Eu(TAA)<sub>3</sub> が生成した。吸収スペクトル: 270 nm (20,000), 340 nm (60,000) (トルエン); I.R. (KBr):  $\text{cm}^{-1}$ : 3440 (s), 1600 (s), 1540 (s), 1400 (s), 1300 (s)。

#### 【0133】

カルボキシラクセプタービーズは次のように調製した。すなわち、出発材料のビーズは Seradyn Particle Technology, Indianapolis, IN から購入したカルボキシレート修飾ラテックスとした。洗浄した 175 nm のカルボキシレート修飾ラテックス (400 mg) の 10% 懸濁液 4 mL を、攪拌棒を装着した 25 mL の丸底 (R.B.) フラスコ中、3 mL のエトキシエタノールで希釈した。R.B. フラスコをついで 150 の油浴中に置き、10分間攪拌した。ついで、ベンジルアルコール中 3.3 mM の C-28 チオキセンおよび 15.5 mM の Eu(TAA)<sub>3</sub> DDP を加えた。ビーズを5分間以上攪拌した。

#### 【0134】

この時点で、0.1 N NaOH 1.0 mL を5分間を要して徐々に添加した。添加時には油浴温度をずっと 150 に維持した。油浴温度を徐々に2時間を要して、室温まで低下させた。冷却後、混合物を 20 mL のエタノールで希釈して遠心分離した (12,500 rpm, 30分間)。上清を捨て、ペレットを超音波処理によりエタノールに再懸濁した。遠心分離を反復し、ペレットを水に再懸濁し、遠心分離を反復した。ペレットを 5 mL のエタノール水溶液に再懸濁し、最終容量を 40 mL にした。

#### 【0135】

アミノデキストランの調製:

ヒドロキシプロピルアミノデキストラン: (1NH<sub>2</sub>/7 グルコース) はデキストラン T-500 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 50 mg を、機械攪拌機および滴下ろ斗を装着した 3 頸丸底フラスコ中、150 mL の H<sub>2</sub>O に溶解して調製した。上記溶液に 18.8 g の Zn(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> を加え、温度を熱水浴で 87 に調整した。エピクロロヒドリン (350 mL) を約 30 分を要して攪拌しながら滴下して加え、この間、温度は 87 ~ 88 に維持した。混合物を 4 時間攪拌し、この間、温度は 80 ~ 95 に維持し、ついで混合物を室温に冷却した。激しく攪拌しながら 3 L のメタノール中に徐々に注いでクロロデキストラン生成物を沈殿させ、ろ過して回収し、真空オーブン中で一夜乾燥させた。

#### 【0136】

クロロデキストラン生成物を 200 mL の水に溶解し、2 L の濃 (36%) アンモニア水に加えた。この溶液を室温で 4 日間攪拌し、ついでロータリーエバポレーターで約 190 mL に濃縮した。この濃縮液を 2 つの等しいバッチに分け、それぞれを急速に攪拌した 2 L の

10

20

30

40

50

メタノール中に徐々に注いで沈殿させた。最終生成物をろ過により回収し、真空下に乾燥させた。

【0137】

上に調製したヒドロキシプロピルアミノデキストラン(1NH<sub>2</sub>/7グルコース)をpH 7.2の50mM MOPSに12.5mg/mLで溶解させた。この溶液を室温で8時間攪拌し、冷蔵庫に保存し、使用の直前に痕跡の固体物質を除去するために Sorvall RC-5B 遠心分離機により15,000rpmで45分間遠心分離した。この溶液10mLに1mLの水中23.1gのSulfo-SMCCを加えた。この混合物を室温で1時間インキュベートし、さらに精製することなく使用した。

【0138】

マレイミドアミノデキストランは次のように調製した。すなわち、0.5mLの蒸留水にSulfo-SMCC(11.55mg)を溶解した。徐々に、10秒間で上記溶液を、上述のように製造したアミノデキストラン溶液5mL(50mM MOPS, pH 7.2中12.5mg/mL)に攪拌しながら加えた。混合物を室温で1時間インキュベートした。

【0139】

上記攪拌溶液に[0151]で調製したセンシタイザービーズの蒸留水中20mg/mLの5mL(100mL)を加えた。ついで、200mg/mL NHS(50mM MES中に新たに調製、pHを6N NaOHにより6.0に調整)1mLを加えた。蒸留水1mLに200mLのEDTAを溶解し、この溶液を攪拌しながらセンシタイザービーズに徐々に加えた。pHを1NHCl 450μLを加えて6.0に調整し、混合物を一夜暗所でインキュベートした。0.5mLのDMSO中100mgの無水コハク酸の溶液をセンシタイザービーズに加え、混合物を暗所で室温においてインキュベートした。この混合物に0.13mLの10%Tween-20を加え、Tween-20の最終濃度を0.1%にした。ビーズを上述のように15,000rpmで45分間遠心分離した。上清を捨て、ビーズを10mLの緩衝液(50mM MOPS, 50mM EDTAおよび0.2%Tween-20, pH 7.2)に再懸濁した。ビーズを上述のように30分間遠心分離し、上清を捨て、ビーズを再懸濁した。この操作を計3回反復した。ついで、ビーズを上記緩衝液2.5mL中40mg/mLに再懸濁し、アルゴンを飽和させ、Tween-20を加えて最終濃度を0.1%にした。ビーズは4で保存した。

【0140】

MADでコートされたアクセプタービーズは次のように調製した。すなわち、上に調製したカルボキシルアクセプタービーズ(4.5mLの水中99mg)を上述のMAD(マレイミドアミノデキストラン)5.5mLにボルテックス攪拌しながら徐々に添加し、ついで50mM MES, pH 6中200mg/mLのNHS 1mL, 水中200mg/mLのEDTA 1mLおよび450μLの1M HCl, 最終pH 6を加える。混合物を一夜暗所室温でインキュベートし、ついで0.5mLのDMSO中200mgの無水コハク酸と室温で30分間反応させた。新たに開封した界面活性剤-Amps Tween-20(Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois)を加え、ビーズをSorvall RC-5B 遠心分離機にて15,000rpmで30分間遠心分離し、10mL部の50mM MOPS, 50mM EDTA, 0.1%界面活性剤-Amps Tween-20(Pierce Chemical Company), pH 7.2と3回遠心分離して洗浄し、この同じ緩衝液3mLに再懸濁した。

【0141】

抗体コートアクセプタービーズは次のように調製した。すなわちモノクロナール抗-hcy-ABA Abは、622μL(4.28mg)を10.2μLのSATA(エタノール中1.25mg/mL, 2eq.)と混合し、室温で1時間インキュベートし、ついで2×2Lの150mM NaCl, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA, pH 7.0に対して透析することによってチオール化した。チオアセチル化された抗体をヒドロキシルアミン(1M H<sub>2</sub>NOH, 50mM MOPS, 50mM EDTA, pH 7)62.2μLを加え、アルゴンを通し、室温で1時間インキュベートすることにより脱アセチル化した。生成物をPharmacia PD-10 カラムに適用し、アルゴンを通した50mM MOPS, 50mM EDTA, pH 7.2で溶出した。2.5mLを流したのち、3つの1mL分画を集めて合わせた。抗体の回収

10

20

30

40

50

はA 2 8 0により3.66 mgまたは8.6%であった。界面活性剤 - Amps Tween-20 (10%)を加え、最終濃度0.2%とした。

【0142】

上記チオール化抗体の1.4 mLアリコート(1.71 mg抗体)を上述のように調製されたマレイミド化ビーズ300  $\mu$ L(10 mg)および混合物中の最終濃度が0.2%になるのに十分な10% Tween-20を加えた。試験管をアルゴンで浄化し、室温暗所で一夜インキュベートした。上記に、水中1 MのH S C H<sub>2</sub> C O O H 3.4  $\mu$ Lを加えた。30分間室温に置いたのち、6.8  $\mu$ LのI C H<sub>2</sub> C O O H(水中1 M)を添加した。30分後、3.5 mLの0.17 M グリシン、0.1 M N a C l, 0.1% (v/v) Tween-20, 10 mg/mL B S A, pH 9.2を加え、ビーズを遠心分離し(30分間, 12,500 rpm)、5 mLの同じ緩衝液中で3時間インキュベートし、緩衝液C 5 mL部で3回遠心分離して洗浄し、緩衝液C 5 mLに再懸濁し、冷蔵庫に保存した。ビーズのサイズは緩衝液C中で測定して、301  $\pm$  56 nmであった。

【0143】

本明細書において「センシタイザー」と命名されたビーズはh c y - A B Aで標識された(h c y - センシタイザービーズ)。センシタイザー染料(たとえば、シリコンテトラ - t - ブチルフタロシアニン)で染色されたポリスチレンビーズの製造はほぼ次のように実施される。

【0144】

シリコンテトラ - t - ブチルフタロシアニン:

新たに切り出したナトリウム金属(5.0 g, 208 mmol)を磁気攪拌機、還流冷却機、乾燥管および気体バブラーを装着した2 Lの3頸フラスコ中、300 mLの無水メタノールに加えた。ナトリウムが完全に溶消したのち、4 - t - ブチル - 1, 2 - ジシクロベンゼン(38.64 g, 210 mmol; TCI Chemicals, Portland, OR)をろ斗を用いて加えた。混合物は澄明になり、温度は約50 に上昇した。この時点で、無水アンモニアガスを気体バブラーを通して反応混合物に1時間導入した。ついで反応混合物を4時間還流下に加熱し、この間、アンモニアガスの導入は継続した。反応の経過時に、固体が沈殿を開始した。得られた懸濁液を蒸発乾固させて(実験室内真空)、残留物を水(400 mL)に懸濁し、ろ過した。固体を乾燥した(60 , 実験室内真空, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)。生成物(1, 3 - イミノイソインドリン, 42.2 g)の収率はほぼ定量的であった。この物質は次工程にさらに精製することなく使用した。冷却機および乾燥管を装着した1 Lの3頸フラスコに上記生成物(18 g, 89 mmol)とキノリン(200 mL, Aldrich Chemical Company, St. Louis MO)を加えた。シリコンテトラクロリド(11 mL, 95 mmol, Aldrich Chemical Company)を攪拌した溶液に10分間を要してシリンジで加えた。添加完了後、反応混合物を油浴中180 ~ 185 に1時間加熱した。反応混合物を室温まで冷却し、濃塩酸を注意深く加え、反応混合物を酸性(pH 5 ~ 6)にした。暗褐色の反応混合物を冷却して、ろ過した。

【0145】

固体を100 mLの水で洗浄し、乾燥した(実験室内真空, 60 , P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)。固体物質を1 Lの丸底フラスコに取り、濃硫酸(500 mL)を攪拌しながら加えた。混合物を60 で4時間攪拌し、注意深く砕氷(2000 g)で希釈した。得られた混合物をろ過し、固体を100 mLの水で洗浄し、乾燥した。暗青色の固体を1 Lの丸底フラスコに移し、濃アンモニア水(500 mL)を加え、混合物を還流下に2時間加熱、攪拌し、室温に冷却し、ろ過した。固体を50 mLの水で洗浄し、真空中で乾燥(実験室内真空, 60 , P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)すると、12 gの生成物、シリコンテトラ - t - ブチルフタロシアニンが、暗青色の固体として得られた。3 - ピコリン(12 g, Aldrich Chemical Company)、トリ - n - ブチルアミン(無水, 40 mL)およびトリ - n - ヘキシルクロロシラン(11.5 g)を、磁気攪拌機および還流冷却機を装着した1 Lの3頸フラスコ中で上記生成物12 gに加えた。混合物を還流下に1.5時間加熱し、ついで室温に冷却した。ピコリンを高真空(オイルポンプ、約1 mmHg)下において蒸留乾固して除去した。残留物をC H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>に溶解し、

シリカゲルカラム（ヘキサン）を用い精製すると10gの純粋な生成物、ジ-（トリ-n-ヘキシルシリル）-シリコンテトラ-t-ブチルフタロシアニンが暗青色の固体として得られた。LSIMS： $[M-H]^+$  1364.2，吸収スペクトル：メタノール：674 nm（180,000），トルエン 678 nm， $^1H$  NMR（250 MHz， $CDCl_3$ ）：-2.4（m，12H），-1.3（m，12H），0.2-0.9（m，54H），1.8（s，36H），8.3（d，4H）および9.6（m，8H）は上述の期待された生成物と一致した。

#### 【0146】

センシタイザー染料ビーズの製造：

磁気攪拌機、1つの頸にガラス栓に結合した温度計、および反対の頸にろ斗を装着した3頸フラスコ中に、10%の固体カルボキシ修飾ビーズ（Seradyn）600mLを取り調製した。フラスコを $94 \pm 1$  に保持した油浴に浸漬した。ビーズは頸のろ斗を通してフラスコに加え、ビーズ容器は830mLのエトキシエタノール、1700mLのエチレングリコールおよび60mLの0.1N NaOHで濯ぎ、濯いだ液はろ斗を通してフラスコに加えた。フラスコに24~40の隔壁を設けた。ビーズは $94 \pm 1$  の温度で40分間765rpmで攪拌した。

#### 【0147】

シリコンテトラ-t-ブチルフタロシアニン（10.0g）を $60 \pm 1$  でベンジルアルコール300mLに溶解し、上記丸底フラスコに、 $120 \pm 10$  に加熱したシリンジを用いて3mL/分の速度で隔壁を通して加えた。15分後、900mLの脱イオン水および75mLの0.1N NaOHを、40分を要して滴下して加えた。油浴の温度を徐々に $40 \pm 10$  に低下させ、攪拌を停止した。ついで、ビーズを43ミクロンのポリエステルフィルターを通してろ過し、エタノール：水，100：0~10：90を用いてMicrogen接線流る過装置（Microgen Inc., Laguna Hills, CA）に付した。

#### 【0148】

hcy-ABAセンシタイザービーズの調製：

hcy-ABAの粒子上への固定化 - たとえばセンシタイザービーズ上への固定化はほぼ次のように実施される（米国特許5,478,729も参照。この開示は引用により本明細書に導入される）。まず、カルボキシ-センシタイザービーズを以下のプロトコールに従ってアミノデキストラン-コートセンシタイザービーズに変換する。135mgのアミノデキストランを1.35mLの0.2M MES，pH 6.0に攪拌しながら溶解した。ついで、3mg/mLで9.0mLのカルボキシ-センシタイザービーズを遠心分離し、1.35mLの脱イオン水にそれぞれ再懸濁した。アミノデキストラン溶液に、攪拌しながらビーズを滴下して加え、続いて177.2 $\mu$ Lの80mg/mL脱イオン水を加え、混合物を室温（r.t.）暗所で一夜インキュベートした。次に、5N NaClを加え、最終濃度0.5Nにし、混合物をr.t.で30分間インキュベートした。最後に、ビーズ懸濁液を遠心分離し、0.1N NaClおよび10nM EDTAを含む4 $\times$ 5mL 0.1Mリン酸塩緩衝液 pH 7.0で洗浄し、同じ緩衝液中に24mgビーズ/mLで保存した。

#### 【0149】

次に、BABA-NHSと以下の反応を実施した。（1）1.0mLのアミノデキストランビーズ（24mg/mL）を遠心分離し、1.0N NaClを含む0.1Mリン酸塩，pH 7.0に再懸濁した。（2）28mgのBABA-NHSを1.0mLのDMSOに溶解し、250 $\mu$ Lをそれぞれのアミノデキストラン-コートビーズ懸濁液に加え、ついで250 $\mu$ Lの0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.0を加えた。反応混合物を1.5時間室温でインキュベートした。（3）0.1Mリン酸緩衝液，pH 7.0を0.5mL加え、反応混合物をさらに1時間インキュベートした。（4）ビーズを遠心分離し、4 $\times$ 6mLの0.1Mリン酸塩（pH 7.0）で洗浄し、1.0mLの同じ緩衝液中に再懸濁した。

#### 【0150】

上記ビーズをついでホモシステインチオラクトン塩酸塩（HCTL）と以下のように反応させた。すなわち、92.5mgのHCTLを1.0N NaOH 1.25mLに溶解し、10分間37 でインキュベートした。5mLの0.5Mリン酸塩緩衝液，pH 7.0を加えた

(pHを7.0にする)。反応混合物を窒素ガスで浄化し、前のパラグラフにおける工程(4)からの脱気したビーズ懸濁液1.0mLに2つのアリコートで1.0mLのHCTL溶液を加えた。反応混合物を37で4時間インキュベートし、ビーズを5mLの0.17Mグリシン、0.1M NaCl, 10mMのEDTA pH 9.2の緩衝液によってr.t.で1時間ブロックした。ビーズの懸濁液を0.17Mグリシン、0.1M NaCl, 10mg/mL BSA, 10mM EDTA pH 9.2の1×5mL緩衝液、ついで4×5mL LOCI緩衝液で洗浄し、5mLのLOCI緩衝液5.0mL中に4で保存した。

#### 【0151】

「LOCI緩衝液」とも同定される、この場合用いられる一般的なアッセイ緩衝液は、0.1Mトリス塩基, 0.3M NaCl, 25mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1%デキストランT-500, 0.05% Kathon, 0.01%ゲンタマイシン, 0.1% Zwittergent 3-14およびHBR-1@1/320を包含する。濃塩酸(この緩衝液の調製にはmilli-Q水を使用した)でpH 8.2に調整した。

10

#### 【0152】

関連緩衝液は次のように調製される。LOCIプレストレス緩衝液: LOCI緩衝液は10mMピス-トリスを含有し、pH 9.0に調整する。LOCI-hcy-アッセイ緩衝液(Assay Buffer): 50mM ホウ酸塩緩衝液, 0.3M NaCl, 0.1%デキストランT-500, 0.05% Kathon, 0.01%ゲンタマイシン, 0.1% Tween-20およびHBR-1, 保存溶液の1/50希釈。pHを9.2に調整。

#### 【0153】

反応混合物を37で4時間インキュベートし、ビーズを5mLの0.17Mグリシン、0.1M NaCl, 10mg/mLのBSA, 10mMのEDTA pH 9.2の緩衝液によりr.t.で1時間ブロックし、ビーズ懸濁液を1×5mLの0.17Mグリシン、0.1M NaCl, 10mg/mLのBSA, 10mMのEDTA pH 9.2ついで4×5mLのLOCIで洗浄し、5.0mLのLOCI緩衝液に4で保存した。

20

#### 【0154】

関連緩衝液は次のように調製される。LOCIプレストレス緩衝液: LOCI緩衝液は10mMピス-トリスを含有し、pH 9.0に調整する。LOCI-hcy-アッセイ緩衝液(Assay Buffer): 50mM ホウ酸塩緩衝液, 0.3M NaCl, 0.1%デキストランT-500, 0.05% Kathon, 0.01%ゲンタマイシン, 0.1% Tween-20およびHBR-1, 保存溶液の1/50希釈。pHを9.2に調整。

30

#### 【0155】

以下のアッセイプロトコールは、好ましくは自動化装置(たとえば、自動化されたTecan-1装置)で実施されるが、また他の自動化装置での使用または非自動化での使用に適合されてもよい。関連技術の熟練者は以下のプロトコールを然るべく修飾することができる。

#### 【0156】

##### B.3 - 試薬プロトコール

hcy-ABA-センシタイザービーズ(0.1mg/mL)および2mM TCPEPの混合物50μLを反応キューベット中5μL hcy血清カルビレーターに加え、ついで50μLのアッセイ緩衝液を加える。混合物を417秒間インキュベートする。ついで、50μLの5mM BABA、ついで45μLのアッセイ緩衝液を加える。157秒間インキュベートしたのち、50μLのAb-コートアクセプタービーズを加える(0.25~0.5mg/mLにおいて)。154秒のインキュベーション後、サンプルを読む。

40

#### 【0157】

##### C.2 - 試薬プロトコール

プロモアセチル安息香酸(BABA)の他の試薬との不適合性、ならびにその限られた溶解性および安定性によって、CABAのエノールホスフェート誘導体(CABA-ホスフェート)、pro-CABA化合物についても検討する。誘導体化物質としてハロケトンのエノールホスフェート誘導体の使用の更なる利点は、自動化LOCIアッセイに使用されるような自動化装置で2-試薬プロトコールを使用できる可能性である。

50

## 【0158】

50  $\mu$ Lのhcy - ABA - センシタイザービーズ (0.1 mg/mL) および2 mM TCEPの混合物50  $\mu$ Lを反応キューベット中5  $\mu$ L hcy 血清カルビレーターに加え、ついで100  $\mu$ Lのアッセイ緩衝液を加える。混合物を417秒間インキュベートする。ついで、50  $\mu$ LのAb - コートアクセプタービーズ (0.5 mg/mL) およびアルカリホスファターゼ (1 mg/mL)、ついで45  $\mu$ Lのアッセイ緩衝液を加える。157秒間インキュベートしたのち、3 - 試薬標準プロトコールの場合と同様にサンプルを読む。

## 【0159】

## D. BABAによる3 - 試薬プロトコールの実施：

いわゆる3 - 試薬プロトコールアッセイフォーマットにおいて、TCEPと混合したhcy - センシタイザービーズを第一の試薬として使用する。Ab - コートアクセプタービーズはサンプル誘導体化工程後に加えられる第三の試薬として用いた。これは、可溶性ビーズおよび第三工程におけるアクセプタービーズ上のAbに対するビーズ結合hcy - ABAの間の均一な競合を生じる。特異的なビーズ凝集により最大のシグナルは血清中にhcyが存在しない場合に生じる。このビーズ凝集は血清サンプル中のhcyによって阻害されるので、シグナルは血清中のhcyの量と逆比例する。緩衝液中のホモシステインはカリブレーターとして使用される。

10

## 【0160】

LOCIホモシステインアッセイは自動化LOCI Tecan装置により実施される。試薬および血清サンプルをこの装置上4 に保持するが、アッセイ緩衝液および反応キューベットは37 に保持する。アッセイは37で行われ、ここに記載されるように3 - 試薬プロトコールが用いられるが、別の誘導体化試薬としてCABA - ホスフェートとともに、以下の作業では2 - 試薬プロトコールも用いられる。

20

## 【0161】

ホモシステインの標準曲線は、HPLCによって定量されたプール血清中にホモシステインをスパイクして調製された6つのカリブレーターを用いて構築される。60%以上のシグナル修飾が2%血清サンプルを用いて得られる(データは示していない)。各種工程における反応混合物の容量は、この工程がアルキル化工程よりも遅いので、還元剤の最大濃度のために至適化する。使用したTCEPの最終量はアルキル化剤よりも少なかった。

30

## 【0162】

イントラ - アッセイCVはレプリケート(同じサンプルを用いて)でのカリブレーターの測定によって得られる。シグナル測定および濃度定量のCVは表1に示す。表1には、3 - 試薬アッセイプロトコールおよび上述のように2 - 試薬アッセイプロトコールが使用される。

## 【0163】

BABAの安定性は、表2に示すように3つの異なるpHにおいて試験する。表2においては、3 - 試薬アッセイプロトコールを前述のように使用し、5 mMのBABAは異なるpHの緩衝液にR - 2(試薬2)として保存する。

BABAの活性は、3 - 試薬プロトコールを用いるLOCIによって得られる総アッセイシグナル修飾の量によりモニターする。BABAのわずかに限られた安定性はpH 6.0の至適条件でも得られる。

40

## 【0164】

## E. 誘導体物質としてのCABA - ホスフェートの実施：

CABAのエノールホスフェート誘導体を合成する。CABA - ホスフェートは広いpH範囲にわたって容易に溶解し、酵素によって誘発されるまでは不活性であり、酵素はアッセイの定められた工程で添加される。したがってそれは2 - 成分アッセイの可能性を有する。2 - 試薬プロトコールでは、試薬 - 1(R1)は、50  $\mu$ g/mLでのhcy標識センシタイザービーズ、2 mM TCEP, および5 mM CABA - ホスフェートのアッセイ緩衝液中の混合物であり、試薬 - 2(R - 2)は、0.1 mg/mLのAb - コートアクセプタービーズのアッセイ緩衝液中0.1 mg/mLのアルカリホスファターゼとの混合物である。

50

このプロトコールにおいては、50 µLのR1、5～10 µLのサンプルおよび50 µLのアッセイ緩衝液を混合し、37℃で7分間インキュベートし(工程1)、ついで50 µLのR2および100 µLのアッセイ緩衝液を加える。反応混合物をさらに3分間インキュベートする。LOCIの読みは上述のように行う。CABA-ホスフェートを誘導体化合物として用いるhcy血清カリブレターの標準曲線および2-試薬プロトコールを決定する(データは示していない)。60%以上のシグナル修飾が2%血清サンプルを用いて得られる

【0165】

誘導体化合物としてCABA-ホスフェートを使用する3-試薬アッセイプロトコールも評価する。BABAを用い3-試薬プロトコールでhcy血清カリブレターにより類似の結果が得られる(データは示していない)。CABAの安定性についても検討する。CABA-ホスフェートの誘導体化合物としての安定性は、3-試薬プロトコールを用いるLOCIによって得られる総アッセイシグナル修飾の量によりモニターする。それは表3に示すように、BABAよりはるかに長い貯蔵寿命を有する。表3には、3-試薬アッセイプロトコールを、R-2としてpH 9.0において2つの温度で保存したCABA; R-1として混合hcy-センシタイザービーズおよびTCEP; R-3として混合Ab-アクセプタービーズおよびアルカリフォスファターゼにより使用する。

10

【0166】

F. 相関試験:

この相関試験では、BABAを用いる同じ3-試薬プロトコール、ならびに誘導体化合物としてCABA-ホスフェートを用いる同じ3-試薬プロトコールを使用する。結果は表4-aに示す。誘導体化合物としてBABAまたはCABA-ホスフェートいずれでも、表4-aに示すようにLOCIによる3-試薬プロトコールを用いて類似の結果が得られる。2-試薬プロトコールを用いるLOCI vs. HPLCの相関は表4-bに示す。2-試薬プロトコールは3-試薬プロトコールよりもHPLCと若干よい相関を生じる。この結果は、自動化装置でも、3-試薬プロトコールより2-試薬プロトコールにける良好なアッセイの正確さを指示するものと思われる。したがって、hcy定量のための迅速な-完全に自動化される抗体-ビーズアッセイの可能性が証明される。

20

【0167】

【表2】

30

表1

## イントラアッセイの精度

(1) 3-試薬プロトコールにおいてBABAによる

血清中 hcy ( $\mu\text{M}$ )	5 レプリケートのCV シグナル (%)	5 レプリケートのCV hcy 濃度 (%)
10	3.19	8.29
30	2.85	4.71
60	2.68	3.87

10

(2) 2-試薬プロトコールにおいてBABAホスフェートによる

20

血清中 hcy ( $\mu\text{M}$ )	5 レプリケートのCV シグナル (%)	5 レプリケートのCV hcy 濃度 (%)
10	1.98	5.95
30	1.07	2.68
60	1.41	3.39

30

【0168】

【表3】

表 2

異なる pH 緩衝液に保存した B A B A (5 mM) の安定性  
(血清中 2% のホモシステインの検出)

(1) 4°C

p H	新鮮溶液 %シグナル Mod	3週溶液 %シグナル Mod	4週溶液 %シグナル Mod	7週溶液 %シグナル Mod
5	59	58	53	41
6	60	58	55	50
7	60	58	55	47

10

(2) R. T.

p H	3週溶液 %シグナル Mod	4週溶液 %シグナル Mod	7週溶液 %シグナル Mod
5	44	31	11
6	58	50	40
7	57	49	37

20

30

(3) 37°C

p H	3週溶液 %シグナル修飾
5	7
6	41
7	38

40

【 0 1 6 9 】

【 表 4 】

表 3

2種の温度で保存したCABAホスフェートの安定性

(50mMホウ酸塩緩衝液 pH 9.0 中 5mM)

(1) 4°Cで保存

時点	0/n	1週	2週	5週	7週	10週	13週
Bo (x e5)	5.577	5.682	5.587	5.569	5.999	6.047	5.87
%修飾 (0~60 μM)	57	54	56	55	54	51	45

10

20

(2) 37°Cで保存

時点	0/n	1週	2週	5週	7週	10週	13週
Bo (x e5)	5.987	5.287	5.945	6.102	6.073	6.699	6.98
%修飾 (0~60 μM)	55	45	51	50	51	44	35

30

【 0 1 7 0 】

【 表 5 】

表4

## アッセイ相関試験

## a. 3-試薬プロトコール

方法	ナンバリング サンプル (2%)	傾斜	r 値
LOCI vs. HPLC (BABA 3試薬プロトコール)	50	1.009	0.993
LOCI vs. HPLC (CABA-ホスフェート 3試薬プロトコール)	50	1.050	0.910

10

20

## b. 2-試薬プロトコール

方法	ナンバリング サンプル (2%)	傾斜	r 値
LOCI vs. HPLC (CABA-ホスフェート 2試薬プロトコール)	50	1.239	0.960

30

## 【0171】

## 実施例3

## 血清/血漿中ホモシステインの定量のためのEIA

## A. 材料

ホモシステイン (hcy) の酵素イムノアッセイ (EIA) は、標準操作に従い、典型的には次のように実施する。以下の成分、すなわち非コートチューブ；ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート；水中還元剤（たとえばTCEP）；CABA-ホスフェート；アルカリホスファターゼ溶液；ビオチンに結合した抗-ホモシステイン-ABAモノクローナル抗体；西洋ワサビペルオキシダーゼに接合したホモシステイン-ABA (HRP) の溶液；HRP基質溶液；および洗浄緩衝液である。ホモシステインカリブレーターは、好ましくは標準プロトコールによって血清または血漿プールの既知濃度をスパイクして調製する。

40

## 【0172】

## B. 操作

50

最初に、サンプル調製チューブ中、5  $\mu$ Lの血清、血漿サンプルまたはカリブレーター対照を水中10  $\mu$ Lの10mM TCPEと混合する。混合物を10分間37 でインキュベートする。次に、50  $\mu$ Lの8mM CABA - ホスフェート (0.1Mリン酸塩緩衝液, pH 7.5)、および50  $\mu$ Lのアルカリホスファターゼ溶液 (1mg/mL, ホウ酸塩緩衝液, pH 9.2)を混合し、混合物を5分間37 でインキュベートする。

【0173】

350  $\mu$ Lのホウ酸塩緩衝液 (pH 9.0) をついで反応混合物に加え、この希釈された反応混合物をストレプトアビジンでコートされたマイクロタイターウエルに加える。次に、25  $\mu$ Lのビオチン標識抗 - ホモシステイン - ABAモノクローナル抗体 (2ピコモルの抗体含有) を各マイクロタイターウエルに加え、混合物を室温で振盪しながら20分間インキュベートする。

10

【0174】

25  $\mu$ LのHRP - ABA - ホモシステイン接合体 (0.15  $\mu$ gの酵素接合体を含有する) を各反応混合物に加え、この混合物をさらに10分間室温で振盪しながらインキュベートする。ついで、反応混合物を吸引して、マイクロタイターウエルを0.05% Tween-20を含むリン酸塩緩衝液で洗浄する。

【0175】

HRP基質溶液 (たとえば、ELISA Tech. からのK-Blue) を洗浄したウエルに加え、室温で10~30分インキュベーションしたのち、色の発生をマイクロタイタープレートリーダーを用いて読む。発色は抗体との相互作用によってマイクロタイターウエルに結合した酵素接合体の量に正比例する。結合した酵素接合体の量はサンプル中のホモシステインの定量はカリブレーターの定量によって生じた標準曲線から計算する (下記参照)。

20

【0176】

HRP - ABA - ホモシステイン接合体はABA - ホモシステインの固体表面への固定化についての記載と同様にして調製する。ビオチン - 標識モノクローナル抗体は関連技術の熟練者には周知の方法で調製される。

ビオチン化抗体: 抗 - ホモシステイン - ABAモノクローナル抗体 (たとえば、15C12, Dade Behring, Deerfield, IL) または任意の他の適当な抗 - hcy - ABA抗体はほぼ次のようにしてビオチン化される。すなわち、7.5mg (9.75mL) のアリコートの一部を、2 x 2Lの0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.0) に対し冷却条件下に透析し、Centriprep 30で4.65mLに濃縮する。濃度はUV (1.1mg/mL) で定量して、5.13mgの回収を与える。ゲル電気泳動 (たとえば、Paragonゲル電気泳動) を用いて単一のバンドの存在を確認する。

30

【0177】

次に、N - ヒドロキシスクシンイミドビオチンアミドカプロン酸エステルを13mMでDSMOに溶解し、ついで抗体溶液を加えて、5:1, 10:1および25:1のモル比を得る。1.5mgのAbを各プレパレーションに使用する。室温で2時間、暗所に置いたのちに、反応混合物を冷却条件において2 x 2Lのリン酸塩緩衝食塩水 (PBS; 10mM NaHPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, pH 7.4) に対して透析する。濃度はUVで定量する。生成物は0.05%のナトリウムアジドとともに冷蔵庫に保存する。

40

【0178】

血清カリブレーター: 血清カリブレーション曲線は、個体 (たとえば、38例の正常個体) からの血清をプールして発生させた血清サンプルにスパイクした既知量のホモシステインによって発生させる。血清カリブレーターは枯渇させたプール血清または非処理プール血清のいずれかから調製する。ホモシステイン濃度はHPLCによる処置の前後に、たとえば参考実験室で確認する。

【0179】

特定の実施態様および実施例を含む以上の説明は、本発明を例示するものであり、本発明の限定を意図するものではない。本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、多くの改変および修飾が可能である。

50

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 イエン・ピン・リウ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 1 4 . クーパーティノ . サンセットスプリングコート1  
1 5 2 5

(72)発明者 ダリウシュ・ダーヴァリアン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 4 . サンノゼ . ロムフォードドライブ5 3 6 3

(72)発明者 ヌーリス・クーン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 6 . パロアルト . ラモーナストリート2 8 7 6

(72)発明者 エドウィン・エフ・ウルマン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 7 . アサートン . セルビーレーン1 3 5

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 米国特許第0 5 7 1 4 3 6 1 ( U S , A )  
特表平0 9 - 5 1 2 6 3 4 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G01N 33/53-33/68

专利名称(译)	生物标签保护组		
公开(公告)号	<a href="#">JP4684511B2</a>	公开(公告)日	2011-05-18
申请号	JP2001522086	申请日	2000-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	日德白令maru堡ゲゼルシヤフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡, Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品有限公司		
[标]发明人	スティーヴドゥケツァー イエンピンリウー ダリウシュダーヴァリアン ヌーリスクーン エドウィンエフウルマン		
发明人	スティーヴ・ドゥケツァー イエン・ピン・リウー ダリウシュ・ダーヴァリアン ヌーリス・クーン エドウィン・エフ・ウルマン		
IPC分类号	G01N33/532 C12P11/00 C12Q1/42 G01N33/58 G01N33/68 G01N33/53 C07F9/113 C07H15/10		
CPC分类号	G01N33/6842 C07F9/113 C07H15/10 C12Q1/42 G01N33/6815 Y02P20/55 Y10S435/975 Y10S436/815 Y10S436/825		
FI分类号	G01N33/532.A C12P11/00 C12Q1/42 G01N33/58.Z G01N33/68 G01N33/53.D		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	09/393579 1999-09-09 US		
其他公开文献	JP2003508790A JP2003508790A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

$\alpha$ -卤代酮是有用的烷基化剂，用于偶联含巯基的生物分子。然而，它们与水，碱和有机碱自发反应，因此不能在水溶液中长时间储存，特别是在生理pH下的蛋白质存在下。然而，本发明提供了这些问题的新颖解决方案，因为本文公开了包含受保护的卤代酮的新化合物和组合物。本文还公开了制备和使用可用于多种应用的受保护的卤代酮的方法，例如在测定和缀合反应中。

