

(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2006-503902

(P2006-503902A)

(43) 公表日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7C 49/784 (2006.01)</b>	CO7C 49/784 CSP	2G054
<b>CO7C 49/92 (2006.01)</b>	CO7C 49/92	4H006
<b>CO7C 65/36 (2006.01)</b>	CO7C 65/36	4H048
<b>CO7C 69/767 (2006.01)</b>	CO7C 69/767	4J002
<b>CO8K 5/49 (2006.01)</b>	CO8K 5/49	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-548421 (P2004-548421)	(71) 出願人	505153960
(86) (22) 出願日	平成15年10月23日 (2003.10.23)		アイデックス ラボラトリーズ インコーポレーティッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月22日 (2005.6.22)		アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブルック アイデックス ドライブ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/033518	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02004/040534		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成16年5月13日 (2004.5.13)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	10/280,330		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成14年10月25日 (2002.10.25)	(72) 発明者	マーシー ヤーラミリ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 アベックス オーク スチーム レーン 2212
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 金属キレートおよび、時間分解蛍光測定におけるその使用方法

## (57) 【要約】

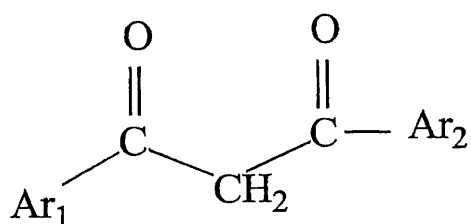
-ジケトン蛍光タグ、特に、近可視および可視スペクトルの励起エネルギーを利用できるような -ジケトン蛍光タグを開示する。場合によっては、これらのタグには、費用対効果の高い励起装置、たとえばLEDを使用することができる。この化合物は、ランタニド(III)希土類金属イオン(たとえば、Eu<sup>3+</sup>)と蛍光キレート(錯体)を形成する。蛍光錯体は、ラテックス微粒子、たとえばスチレンラテックス粒子に包含させることができる。錯体は、理想的には、360 nm以上の吸収極大を有し、化合物は、pKaが9.0未満であることを特徴とする。標的分子を検出するキットおよび方法(たとえば免疫測定法)も開示する。こうした方法およびキットでは、通常、標的分子に結合させるリガンドと、このリガンドに結合させた標識剤を使用する。上述の蛍光錯体は、このうち、少なくとも標識剤を構成する。サンプルから蛍光を検出する装置は、360 nm以上の照射エネルギーを生成する照射エネルギー源と、サンプルからの蛍光を検出するよう配置された検出装置と、照射エネルギー源で照射できる位置にサンプルを保持するサンプル・ホルダーとを備えている。照射エネルギー源としては、発光ダイオードを使用することが好ましい。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

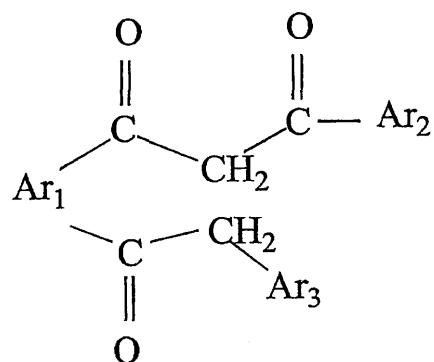
下記の式 A、B、または C：

式 A



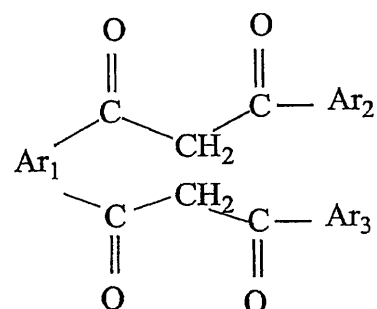
10

式 B



20

式 C



30

を有する  $\beta$ -ジケトン含有化合物

[式中、 $\text{Ar}_1$ は、置換芳香族基、複素環式芳香族基、または置換複素環式芳香族基であり、

$\text{Ar}_2$ および $\text{Ar}_3$ は、それぞれ独立に、単環アリール基、多環アリール基から選択されるものである。]

## 【請求項 2】

置換とは、C1-C5アルキル、C1-C5アルケニル、C1-C5アルキニル基、または置換C1-C5アルキル、C1-C5アルケニル、C1-C5アルキニル基によって置換されていることを意味するものである、請求項 1 記載の化合物。

40

## 【請求項 3】

$\text{Ar}_1$ が、ナフチル、アントラセニル、またはフェナントレニル基、または置換ナフチル、アントラセニル、またはフェナントレニル基である、請求項 1 記載の化合物。

## 【請求項 4】

$\text{Ar}_2$ が、置換フェニル基である、請求項 1 または 3 記載の化合物。

## 【請求項 5】

$\text{Ar}_2$ が、-F、-CF<sub>3</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>の 1 以上によって置換されたフェニル基である、請求項 4 記載の化合物。

## 【請求項 6】

50

$Ar_1$ もしくは $Ar_2$ またはその双方が、ジケトン置換基に対して2'の位置で、式：

O-CX-R

を有する部分によって置換される、請求項1記載の化合物

[式中、Xは、SまたはO、Rは、O-R1またはS-R1であり、R1は、C1-C5アルキル、C1-C5アルケニル、C1-C5アルキニル基、または置換C1-C5アルキル、C1-C5アルケニル、C1-C5アルキニル基である。]。

【請求項7】

A1が、2'ナフチル基である、請求項1記載の化合物。

【請求項8】

請求項1~7のいずれか一項に記載のJ-ジケトン化合物、および、非蛍光キレート剤を含む組成物。 10

【請求項9】

請求項1~7のいずれか一項に記載のJ-ジケトン化合物の、ランタニド(III)希土類金属イオンとの錯体。

【請求項10】

請求項9記載の錯体、および、非蛍光キレート剤を含む組成物。

【請求項11】

非蛍光キレート剤が、トリ-n-オクチル-ホスフェンオキシド(TOP0)または $NH_3$ である、請求項10記載の組成物。

【請求項12】

ランタニド(III)希土類金属イオンが、 $Eu^{3+}$ である、請求項9記載の錯体。 20

【請求項13】

請求項9記載の錯体を含む、ラテックス微粒子。

【請求項14】

ラテックスが、スチレンラテックスである、請求項13記載のラテックス微粒子。

【請求項15】

錯体のSでの吸収極大が、360 nm以上であることを特徴とする、請求項9記載の錯体。

【請求項16】

マルチケトン化合物が、 $pKa < 9.0$ であることを特徴とする、請求項9または15記載の錯体。 30

【請求項17】

錯体が、水溶性である、請求項9記載の錯体。

【請求項18】

金属イオンが、 $Eu^{3+}$ である、請求項17記載の錯体。

【請求項19】

錯体が、非蛍光キレート剤を含み、化学量論比が1:2:3(金属イオン:蛍光化合物:非蛍光キレート剤)のビスキレートである、請求項18記載の錯体。

【請求項20】

標的分子に対するリガンド、および、標識剤を含むキットであって、標識剤が請求項9記載の錯体を含む、キット。 40

【請求項21】

以下の検出を行う方法：

標的分子を、請求項9記載の錯体を含む標識剤と反応させることによる、標的分子の存在の検出；

360 nm以上のエネルギーで錯体を照射することによる錯体の検出；および  
標識錯体からの発光の検出。

【請求項22】

発光を時間分解蛍光として検出する、請求項21の方法。

【請求項23】

請求項9記載の錯体を含む混合物を形成し、ポリマーを混合物で被覆することによって 50

、ポリマーを標識する方法。

【請求項 2 4】

請求項9記載の錯体によって標識されたポリマー。

【請求項 2 5】

請求項24記載の標識ポリマーを含む特異的結合物質によって標識されたタンパク質。

【請求項 2 6】

結合性物質に結合された、請求項9記載の錯体を含む検出試薬。

【請求項 2 7】

担体分子または粒子に結合された、請求項26記載の検出試薬。

【請求項 2 8】

タンパク質またはポリマーに結合された、請求項9記載の錯体。

10

【請求項 2 9】

抗体または抗原に結合された、請求項9記載の錯体。

【請求項 3 0】

錯体が、タンパク質またはポリマーと共有結合されている、請求項9記載の錯体。

【請求項 3 1】

共有結合が、9-ジケトン含有化合物上の官能基によるものである、請求項30記載の錯体

【請求項 3 2】

共有結合された官能基が、カルボキシル基である、請求項31記載の錯体。

20

【請求項 3 3】

以下を含む、サンプルから蛍光を検出する装置：

360 nm以上の照射エネルギーを生成する照射エネルギー源；

サンプルから蛍光を検出するよう配置された検出装置；および

エネルギー源の照射を受ける場所でサンプルを保持するサンプル・ホルダー。

【請求項 3 4】

照射エネルギー源が、半導体光源である、請求項33記載の装置。

【請求項 3 5】

照射エネルギー源が、発光ダイオードである、請求項34記載の装置。

【請求項 3 6】

照射エネルギー源が、レーザーダイオードである、請求項34記載の装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術背景

本発明は、一般に、蛍光錯体の分野に関するものであり、より詳細には、キレート化金属イオンを有する蛍光錯体に関するものである。また、本発明は、合成の分野、およびキレート化合物および金属イオン錯体の使用、たとえば、測定時に、(機器等による)検出を可能とするタグとしての使用の分野に関するものである。

【背景技術】

40

【0002】

背景技術

化合物の存在を検出する際には、蛍光を利用するのが望ましいことが多い。たとえば、各種測定法(たとえば、免疫測定法)では、検出対象化合物に付随する蛍光タグが放出する蛍光エネルギーを検出することによって読みとりを行うことができる。蛍光タグは、比較的使用しやすく、放射性タグで必要とされるような各種の危険や操作を回避することができる。蛍光を利用した検出の用途としては、細胞のイメージング、フローサイトメトリー、免疫組織化学的分析、免疫測定法などを挙げることができるが、用途はこれらに限定されるものではない。従来より使用されている蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサス・レッドなどを挙げることができる。

50

## 【0003】

蛍光を利用した測定では、測定に使用するサンプルまたは試薬中のバックグラウンドの蛍光による干渉が問題となることが多い。こうしたバックグラウンドの蛍光は、半減期が極めて短く、ストークスシフトが低いことも多いので、ストークスシフトが大きいまたは半減期が長い蛍光タグを使用すると(時間分解蛍光測定)、バックグラウンドが高くて、少量のタグを検出することが可能となる。時間分解蛍光タグ標識法の一方法では、(有機キレート剤を使用して)キレート化したランタニド金属を使用する。(1~6)現在利用できるランタニド・キレート化錯体は、紫外線(たとえば、340 nm未満のものであることが多い(11~15))を用いて励起せねばならないので、複雑かつ相対的に高価な光源、たとえば窒素レーザーの使用が必要となる。ランタニド時間分解蛍光測定を利用した市販の製品としては、パーキンエルマーのDELFI A(登録商標)およびLANCE(商標)の製品(マサチューセッツ州ボストン、Perkin Elmer Bioproducts)2種を挙げることができる。Eu標識剤であるDELFI A(登録商標)は、Eu<sup>3+</sup>でキレート化したN1-(p-イソチオシアナトベンジル)-ジエチレントリアミン-N1,N2,N3,N4-テトラ酢酸(DTTA)から構成されている。DTTA基が、ユウロピウムとともに安定した錯体を形成し、イソシアネート基が、タンパク質上の遊離アミノ基と反応して、安定した共有チオ尿素結合を形成する。キレートの水溶性および安定性が高く、また、イソチオシアネート反応のカップリング条件が緩やかなので、10~20Eu/1gG以下の抗体を標識することができる。LANCE(商標)の製品も、イソシアネート(ITC)系のキレート製品である。

10

## 【0004】

文献では、もっと長波長で励起可能な他のキレートも報告されている。これらのキレートは、場合によっては、比較的低い量子収量および/または非効率的なキレート化合物から金属イオンへのエネルギー移動を示す。たとえば、Eu(III)シッフ塩基錯体は、吸収極大が長めの波長で生じる場合には、量子収量が比較的低い。(16)キレートによっては、蛍光が、実質的に有機溶媒に限定されており、生物学用途での魅力または実用性に欠ける。Martinusらには、極大が414 nmで生じる、Euのミヒラーケトン[4,4'-bis(N,N-ジメチルアミノ)ベンゾフェノン](「MK」)とのキレートが記載されている。この場合も、錯体の形成は、非配位性溶媒で生じ、水分子が、ランタニド配位部位をめぐってMKと競合する可能性がある。(17)

20

## 【0005】

Steeimersらは、ユウロピウムおよびテルビウムの一連のカリックス[4]アレーンとの錯体の製造に成功し、励起波長を少なくとも350 nmまで延ばすことができた。報告された量子収量は比較的低く、エネルギー移動は比較的効率である。これは、励起種の相当部分が、分子酸素によって捕捉され、発光に寄与することなく消光したためと考えられる。(18)Wertsらは、ランタニドと、フルオレキソン(4',5'ピス[N,Nピス(カルボキシメチル)アミノメチル]フルオレセイン)との錯体について記載しており、この錯体は、可視光で励起可能である。(19)しかし、これらのキレートの量子収量は、非放射性不活性化のために比較的低いことが報告されている(1.7~8.9×10<sup>-4</sup>)。

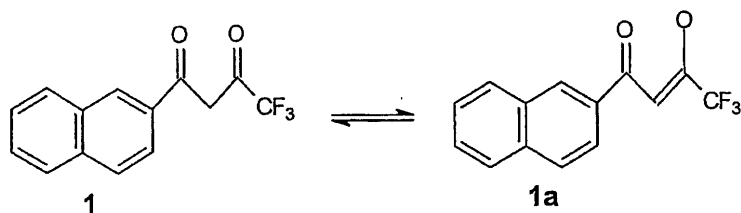
30

## 【0006】

芳香族1,3-ジケトンである2-ナフトイルトリフルオロアセトン(NTA、下記の化合物1)の陰イオン(下記の化合物1a)は、水性溶媒中で、相乗剤であるトリ-n-オクチル-ホスフィンオキシド(TOP0)の存在下で、高度に蛍光性のEuキレートを形成する。(20、21)

40

## 【0007】



## 【発明の開示】

10

## 【0008】

## 概要

本発明は、以下の特徴、すなわち、長い寿命、細いバンド幅、大きなストークスシフト、高い量子収量、および光褪色または自己消光といった有害な現象の回避といった特徴の1以上を、所望の組み合わせで備えた蛍光タグに関するものである。本発明では、好ましくは、近可視および可視スペクトルの励起エネルギーの使用が可能となっており、その結果、発光ダイオードまたはダイオードレーザーのような費用対効果の高い励起装置を使用することが可能となり、商用利用での技術の実用性が改善されている。

## 【0009】

本発明は、概説すると、請求項1に記載した式A、B、またはCのいずれかを有する  $\beta$ -ジケトン化合物に関するものである。この  $\beta$ -ジケトン化合物は、好ましくは、ランタニド(III)希土類金属イオン(たとえば $\text{Eu}^{3+}$ )とともに蛍光キレートを形成するものであり、したがって、本発明は、 $\beta$ -ジケトン化合物のそうしたイオンとの錯体にも関するものである。本発明は、非蛍光キレート剤、たとえば、トリ-n-オクチル-ホスフィンオキシド(TOPO)または $\text{NH}_3$ を、組成物中で、上記の蛍光キレート剤とともに使用することにも関するものである。希土類金属イオンは、こうした組成物中に含有させておくことも、その後の工程で加えることもできる。

20

## 【0010】

一態様では、蛍光錯体を、微粒子、たとえばスチレン・ラテックス粒子またはコロイド状金粒子に包含させる。錯体は、360 nm以上の吸収極大を有するものとし、化合物は、 $\text{pK}_a < 9.0$ であるものとするのが好ましく、この場合、錯体は、生理的なpHで安定となる。

30

## 【0011】

この錯体は、標的分子を検出するタグとして特に有用であり、本発明は、こうした検出用のキットおよび方法も提供するものである。こうした方法およびキットでは、通常、標的分子結合用のリガンドと、リガンドに結合した標識物質を利用する。上述の蛍光錯体は、少なくとも、標識物質の一部を構成する。標的分子を、錯体で標識したリガンドと反応させ、標的の存在を、360 nm以上のエネルギーで照射し、標的分子の存在の指標となる蛍光錯体からの発光を検出することによって検出する。

## 【0012】

サンプルからの蛍光を検出する装置は、360 nm以上の照射エネルギーを生成する照射エネルギー源と、照射エネルギー源でサンプルを照射できるように、サンプルを所定位置に保持するサンプル・ホルダーと、サンプルからの蛍光を検出するように配置された検出装置と、蛍光を瞬時に、または時間分解して検出する検出回路とを備えている。本発明では、照射エネルギー源として、半導体光源、たとえば発光ダイオードまたはレーザーダイオードを使用することができる。

40

## 【0013】

請求項1の式の化合物として特に好ましい化合物は、式中で、

$\text{Ar}_1$ が、ナフチル、アントラセニル、またはフェナントレニル基、または置換ナフチル(たとえば、2'-ナフチル)、アントラセニル、またはフェナントレニル基であり、

50

Ar<sub>2</sub>およびAr<sub>3</sub>が、置換フェニル基、たとえば-F、-CF<sub>3</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>の1以上によって置換されたフェニル基であり、

置換基が、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニル基、または置換C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニル基をはじめとする置換基であるような化合物である。

【0014】

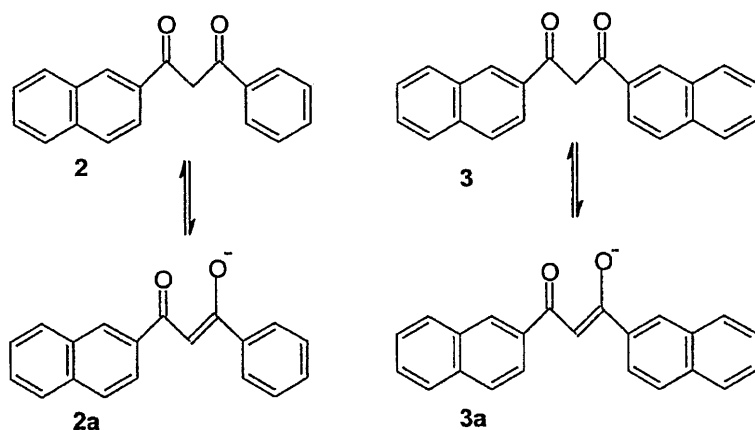
本発明の1以上の態様の詳細を、添付図面および以下の記載にて説明するが、本発明の他の特徴、目的、利点については、記載および図面、そして請求の範囲から明らかとなるはずである。

【0015】

詳細な説明

NTA(1)のトリフルオロメチル基を、フェニル環で置換したもの(フェニル-3-ナフチル-1,3-プロパンジオン、化合物2または「PNPD」と、ナフチル環で置換したもの(1,3-ジ-ナフチル-1,3-プロパンジオン、化合物3または「NNPD」)の2種の化合物を設計した。これらの化合物および対応するエノラートの構造を以下に示す。

【0016】



【0017】

1'-アセトナフトンから出発して化合物2および3を合成し、その構造を、下記のようにして調べた。塩化ユウロピウム(III)の蛍光キレートを用いて、0.1 Mのホウ酸緩衝液(pH9.0)中にて、TOP0の存在下で、2および3のそれぞれを用いて作製し、励起スペクトルおよび発光スペクトルを、パーキン・エルマーの蛍光分光装置(モデルLS 50)で記録し、NTA(化合物1)のスペクトルと比較した。スペクトルの結果(図2)からは、化合物2および3の励起波長のピークが、それぞれ、390 nmと400 nmとにあり、双方とも、化合物1のピークである330 nmから相当シフトしており、半導体光源で励起可能であることがわかる。化合物は、いずれも、類似した消光および蛍光強度を示す。これらの化合物は、量子収量が高く、酸素含有溶媒中で安定であり、配位子から金属への十分なエネルギー移動が生じたことが示唆された。

【0018】

これらの知見にもとづいて、化合物2の誘導体を製造した。その構造を図3に示し、合成および特性解析について、下記に記載する。

【0019】

図3に示す化合物は、いずれも、TOP0の存在下で、塩化ユウロピウム(III)と蛍光キレートを形成可能である。興味深いことに、環の置換基が異なり、たとえばフッ素、シアノ、メトキシ、カルボキシメチルで置換された誘導体では、PNPDのような、スペクトルの有意なシフトが観察されなかった。しかし、カルボニル基のpKaの有意な変化は観察された。上述したように、金属との錯体の形成を生じさせるためには、ジカルボニル化合物のエノ

10

20

30

40

50

ラートを形成することが必要である。非置換化合物2の場合には、エノール炭素のpKaは、約pH9.0なので、錯体を形成してその安定性を保つうえでは、こうした高いpHを維持することが必要となる。この点は、キレートと、後述のラテックス粒子に成功裏に担持させるうえでの制限となる。しかし、蛍光誘導体のpKaは、いずれもこれより有意に低いので、ある程度のpH範囲で作業を進めることができる。たとえば、化合物4のpKaは約4.2であり、この化合物を使用した場合には、pH4.5超で安定したキレートを形成することができた。生理学的な測定条件でキレートが安定であるためには、pHは、9.0未満とするのが(普遍的というわけではないが)通常は望ましい。

#### 【0020】

後述する方法でラテックス粒子に担持させた場合のPNPDのN,N-ジメチルアミノ誘導体(図3の化合物14)蛍光キレートの励起波長は、さらに可視スペクトル側にシフトし、極大は、約455 nmに位置していた。

10

#### 【0021】

混合物である(化合物2+TOP0)および(化合物2+塩化ユウロピウム)を、塩化ユウロピウム(III)とTOP0の標準溶液で、それぞれ滴定し、蛍光強度を測定した。結果から、金属、配位子、TOP0が化学量論比1:3:3となることで、蛍光キレートが形成されていることが示唆された。しかし、フェニル環が置換された化合物、たとえば化合物4または8(図3)の場合、化学量論比は1:2:3となった。特定の機構に拘束されることを望むものではないが、これらのキレートのいくつかは、水溶液中でTOP0またはNH<sub>3</sub>非蛍光キレート剤とともに、ビスキレート剤として作用するようである。すなわち、蛍光キレート形成分子2つが、金属イオン1つと、非蛍光キレート剤3つとともに、1:2:3のモル比で錯体を形成する。さらに、アリアル部分の1つを、ジケトン置換基に隣接して、さらに別のキレート部分で置換した場合には、水分子による水和を防止することもできる。具体的には、図4がこの可能性を图示しており、この場合、アリアル部分の一つが

20

O-CX-R

で置換されている。

(式中のXは、SまたはO、Rは、O-R<sub>1</sub>またはS-R<sub>1</sub>であり、ここで、R<sub>1</sub>は、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニル基、または置換C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニル基である。好ましくは、アリアル部分のさらなる置換基は、-CO-O-アルキル、たとえば-CO-OCH<sub>3</sub>である。図4では、Mは金属イオン、Pは非蛍光キレート剤であり、酸素分子を介してキレート化された有機キレート化分子の式を示す。H<sub>2</sub>Oは、錯体が水和していることを示す。

30

#### 【0022】

以上では、所望の特性を示す安定したキレートを作製したが、以下に記載するようにしてカルボキシ・ラテックスにキレートを担持する単純な方法を使用することにより、これらのキレートが、免疫測定法で蛍光プローブとしても用いるものであることも例証した。この新規な方法は、各種サイズ(34、60、104、190、200、300、および400 nm)および各種専有面積(7、50、90<sup>2</sup>/カルボキシル基、等)の各種カルボキシ・ラテックスならびに各種サイズの単味ポリスチレンに、各種のPNPD誘導体で形成したキレートを担持する際に、成功裏に使用することができた。カルボキシ・ラテックス粒子に担持することで、ユウロピウムキレートの光学特性には、励起極大が、10~20 nm長めの波長に移動したこと以外は、有意な変化は観察されなかった。後述するように、ピオチン標識BSAを、キレート(カルボキシ・ラテックス粒子がすでに担持されたキレート)に受動的に吸着させ、その後、NeutrAvidin(Pierce Biotechnology、ロックフォード、イリノイ州)を結合させた。

40

#### 【0023】

NeutrAvidinで被覆したキレート担持カルボキシ・ラテックスを使用して、イヌ糸状虫(HTWM)の不均一系でのサンドイッチ免疫測定法を実施した。測定での必須の過程は、以下とおりであった。すなわち、ポリスチレンのウェルをウサギ抗HTWM抗体で被覆し、その後、BSAでブロッキングして非特異的結合を防止し、HTWM抗原の血清による段階稀釈液を、これらのウェル(パネル番号10での最低濃度は、約0.03 ngr/ml)でインキュベートし、そ

50

の後、ビオチン標識ニワトリ抗HTWM抗体を加えた。その後、ウェルを洗浄し、最後に、neutrAvidine被覆蛍光カルボキシ・ラテックスとともにインキュベートした。結合しなかった粒子をよく洗浄除去した後、連続および時間分解モードで蛍光を読み取った。結果を図5に示す。

#### 【0024】

これらのneutrAvidine被覆キレート担持したカルボキシ・ラテックスを使用したネコ白血病(FeLV)抗原についての不均一系でのサンドイッチ免疫測定法も実施した。測定での必須の過程は、以下とおりであった。すなわち、ポリスチレンのウェルをモノクローナル抗FeLV抗体で被覆し、その後、BSAでブロックして非特異的結合を防止、FeLV抗原パネルの各希釈液をこれらのウェルでインキュベートした。その後、ビオチン標識したモノクローナル抗FeLV抗原を加えた。その後、ウェルを洗浄し、最後に、NeutrAvidin被覆蛍光カルボキシ・ラテックスとともにインキュベートした。結合しなかった粒子をよく洗浄除去した後、連続および時間分解モードで蛍光を読み取った。結果を図6に示す。

10

#### 【0025】

抗体/タンパク質被覆コロイド状金は、免疫学的診断、組織化学、細胞化学で広くプローブとして使用されている<sup>21</sup>。代表的な免疫測定法では、コロイド状金は、目視または定量的な測定を行う際の標識として利用されている<sup>22</sup>。蛍光コロイド状金粒子の概念を用いると、金粒子を、標的の(色の目視観察による)定性的検出ならびに(蛍光の測定による)定量的検出に利用できると推量した。こうした方向で、コロイド状金粒子をユウロピウム・キレートで成功裏に被覆することのできる方法をはじめて開発した。後述するように、PNPDのEuキレートおよびその蛍光類似体を、コロイド状金粒子に被覆し、得られた蛍光金粒子の光学特性を、図8に示すようにして調べた。また、蛍光金粒子を抗体で成功裏に被覆して、免疫測定用プローブとして利用することも示した。

20

#### 【0026】

図7に示すように、カルボキシル基を導入したPNPDの誘導体を、さらに3種成功裏に合成して、新規な配位子のタンパク質との直接の結合を可能とした。1-フェニル-3(6-カルボキシメトキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオン(17)を、方法に関して上述したようにして、2,6-ジメチル-ナフタレイン-ジカルボキシレートとアセトフェノンから合成した。対応するカルボン酸(18)を超音波条件下でメチルエステルを加水分解することによって得た。カルボン酸誘導体(20および21)も、同様の合成方法および適当な出発物質を使用することによって合成した。カルボン酸化合物のN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルは、タンパク質中のアミノ基と反応して、対応する結合物を形成することが知られている。1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオン(19)のNHSエステルを合成し、BSAおよびニワトリおよびウサギ HTWM抗体の双方に成功裏に結合して、配位子標識タンパク質を得た。標識タンパク質の吸収スペクトルは、新規配位子の十分に画定されたピーク特性を示し、極大は360 nmとなり、成功裏に結合したことが示された。標識タンパク質は、塩化ユウロピウムおよびTOP0溶液と混合すると、蛍光キレートを形成した。これらのキレート標識抗体を使用することにより、ラテックス粒子を使用せずに、サンドイッチ免疫測定法を実施することができた。可溶性キレート標識抗体は、ラテックス粒子に通常伴う拡散関連の問題を回避しうる可能性を有している。この技術の感度を増大させるために、後述するように、複数のアミノ基を持つポリマー、たとえばポリアリルアミンおよびリシン-アスパラギン酸ポリペプチドも成功裏に標識した。標識ポリマーをさらに抗体に結合すると、複数のキレート標識を持つ可溶性のタンパク質-ポリマー結合物を生じるはずである。同様の化学的過程により、1-(3,5-F<sub>2</sub>-フェニル)-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンのNHSエステルも合成し、このNHSエステルを使用することにより、タンパク質とポリマーの双方を成功裏に標識した。

30

40

#### 【0027】

1-フェニル-3-ナフチル-1,3-プロパンジオン(2)の合成: 磁性の攪拌棒および冷却器が装着された250 ml入りの丸底フラスコ中で、9.5 gグラムのナトリウムアミドの50%スラリーを、100 mlの無水エーテルに懸濁した。この懸濁液に、10.2 grの固体アセトナフトン

50

を加え、室温にて5分間攪拌を続けた。5分後に、8.16 grの安息香酸メチルを1ロットで無溶媒液として加えた。この時点で、反応フラスコを、油浴に移し、浴温を上昇させて、内容物を、エーテル中にて3時間穏やかに還流させた。その後、内容物を、300 grの固体状氷に加え、攪拌しながら、濃HClでpHを7.0とした。エーテル層を分離し、水層を、150 mlずつのエーテルで2回抽出した。エーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウム床上で乾燥し、濃縮機 (Rotavaper) で約100 mlに濃縮し、室温に静置した。再結晶した固形物を濾別し、エーテルで乾燥し、10.6 grの固体状のジケトンを得た。

【0028】

1,3-ジナフチル-1,3-プロパンジオン(3)の合成: 磁性の攪拌棒および冷却器が装着された250 ml入りの丸底フラスコ中で、4.75 grのナトリウムアミドの50%スラリーを、150 mlの無水エーテルに懸濁した。この懸濁液に、5.1 grの固体アセトナフ톤を加え、室温にて5分間攪拌を続けた。5分後に、5.58 grのメチル-2-ナフトエートを1ロットで加えた。この時点で、反応フラスコを油浴に移し、浴温を上昇させて、内容物をエーテル中にて、3時間おだやかに還流させた。その後、内容物を、300 grの固体状の氷に加えた。濃HClで酸性としたところ、固体状生成物が析出した。この固体状生成物を濾別し、エーテル/メタノール混合物から再結晶させた。

10

【0029】

1-[(3,5-F<sub>2</sub>-フェニル)-3-ナフチル-1,3-プロパンジオン(4)の合成: 磁性の攪拌棒および冷却器が装着された100 ml入り丸底フラスコ中で、2.135 grのナトリウムアミドの50%スラリーを、50 mlの無水エーテルに懸濁した。この懸濁液に、4.936 grの固体アセトナフ톤を加え、室温にて5分間攪拌を続けた。5分後に、5 grの3,5-ジフルオロ安息香酸メチルを1ロットで加えた。この時点で、反応フラスコを油浴に移し、浴温を上昇させて、内容物をエーテル中にて、3時間おだやかに還流させた。その後、内容物を、100 gの固体状の氷に加え、攪拌しながら、濃HClで酸性とした。エーテル層を分離し、水層を、100 mlのエーテルで、2回抽出した。エーテル層を合わせて無水硫酸ナトリウム床上で乾燥させ、濃縮機で濃縮して、淡黄色の固形物を得た。この固形物を、最小量のエーテルに溶解し、濾過した。濾液を4 に保持して、結晶状生成物を得た。TLCを行ったところ、混入物のないきれいな単一のスポットが得られた。

20

【0030】

3,5-F<sub>2</sub>-PNPD-Euキレートの、104 nm のカルボキシ・ラテックスへの担持: 9.3 mgの3,5-F<sub>2</sub>-PNPDの30 mlのジオキサンへの溶液、17.415 mgのTOP0の45 mlのメタノールへの溶液、および15 mlの1 mM 塩化Eu(III)を、100 mlのメタノールと混合した。5分後、この混合物を100 mlの脱イオン水で希釈し、振盪機で30分間振盪して、キレート完全に形成させた。この間に、2 mlの104 nm CMLラテックス (Seradyne、固形分10%、lot番号C98 1838)を20 μlの6NのNaOH溶液および2 mlのメタノールと混合し、30分間インキュベートした。30分後、キレート溶液と粒子を80 μlの6N NaOHとともに混合し、室温にて4時間振盪機で振盪した。4時間後、混合物を、濃縮機で、減圧下にて45 で約47 mlに濃縮した。濃縮粒子溶液を、塩化ナトリウムの脱イオン水への10 mM溶液6 Lに対し、透析液を1日2回交換しながら3日間にわたり透析した。

30

【0031】

BSAのビオチン標識: 10%BSA溶液(3 gr/脱イオン水30 ml)を、0.2 μのフィルターで濾過し、4 Lの脱イオン水に対して透析した。1 mlの透析BSA (63.5 mg/ml)を、7 mlの50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で希釈し、NHS-X-ビオチン(Pierce Chemical Company)の無水DMFへの溶液(20 mg/ml)0.5 mlと混合し、攪拌しながら3時間反応を進行させた。3時間後、反応混合物を、6 Lの20 mM TRIS(pH7.4)に対して透析して、未反応のビオチンを除去した。

40

【0032】

蛍光粒子のビオチン-BSAによる被覆: ポリプロピレン製チューブ中で、3 mlの粒子(固形分0.4%)の、NaClの脱イオン水への10 mM溶液への懸濁液を、60 μlの1M TRIS(pH7.4)、および2.5 mlのビオチン/BSA(20mM TRIS(pH7.4)への7.15 mg/ml溶液)と混合し、4 で一

50

晩回転装置にかけた。翌朝、粒子を15K rpmで30分間遠心した。ペレットを、2 mlの20 mMのTRIS(pH7.4)に再懸濁し、再遠心した。この手順を2回繰り返した。

【0033】

最後に、粒子を、2 mlの20 mMのTRIS(pH7.4)に懸濁させた。

【0034】

ビオチン-BSA被覆粒子のNeutrAvidineによる被覆: 2 mlの上記ビオチン-BSA被覆粒子の20 mM TRIS(pH7.4)への懸濁液を、0.4 mlのneutrAvidineの同じ緩衝液への10 mg/ml溶液と混合し、4 で48時間回転装置にかけた。48時間後、未結合タンパク質を、ビオチン-BSA被覆過程と同様にして除去し、粒子を、最後に、20 mMのTRIS(pH7.4)に懸濁させた。

【0035】

neutrAvidine被覆蛍光粒子を使用したHTWM抗原の測定: ウサギ抗HTWM抗体で被覆したウェルを、100 mlのHTWM抗原のパネル0~10とともに、30分間インキュベートした。その後、ウェルを、市販のHTWMプレート洗浄液(IDEXX Laboratories, Inc., メイン州ウエストブルック)で3回洗浄し、さらに、ビオチン標識ニワトリ抗HTWM抗体のHTWM結合希釈液(IDEXXの製品)への5 pg/ml溶液とともに30分間インキュベートした。ウェルを7回洗浄し、その後neutrAvidine被覆蛍光粒子とともに1時間インキュベートした。1時間後に、ウェルを7回洗浄し、連続および時間分解モードで蛍光を読み取った。図5に、連続および時間分解蛍光を使用したこの測定の結果を示す。

10

【0036】

1-フェニル-3(6-カルボキシメトキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンの合成: ナトリウムアミド(トルエンへの50%懸濁液1.56 gr)の無水THFへの懸濁液に、無溶媒のアセトフェノン(2.88 gr)を加え、磁性の攪拌棒および冷却器が装着された500 ml入りの丸底フラスコ中にて、室温にて3分間攪拌した。3分後、固体状の2,6-ジメチル-ナフタレイン-ジカルボキシレートをフラスコに懸濁させ、油浴の温度を上昇させてTHFを乾留させた。4時間後、反応混合物を、過剰の氷冷水に加えて、生成物を沈殿させた。生成物を、濾別し、エタノールから再結晶させた。

20

【0037】

1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンの合成: 1 gの1-フェニル-3(6-カルボキシメトキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンを、40 mlの1N NaOHに懸濁し、プローブ超音波処理装置で、10回(30秒のパルス)、超音波処理した。不溶の固形分を濾別し、さらなる超音波サイクルに使用した。透明な濾液を濃HClで酸性として、カルボン酸生成物を沈殿させた。生成沈殿物を、凍結乾燥器に一晩連結することによって乾燥した。TLCおよび質量スペクトル分析で、カルボン酸が生成していることを確認した。

30

【0038】

1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンのNHSエステルの合成: 1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオン(29.26 mg)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(59.95 mg)、およびN-ヒドロキシスクシンイミド(31.77 mg)を、一緒に、磁性の攪拌棒が装着された暗色のガラス製バイアル中で、1 mlの無水DMFに懸濁し、室温にて一晩攪拌した。翌朝、不溶の沈殿物を濾別し、生成したNHS-エステルのDMF溶液を、窒素を充填した暗色のガラス製バイアルで貯蔵し、さらなる精製を行うことなく、タンパク質との結合に使用した。

40

【0039】

BSAの、1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンのNHSエステルとの結合: 小型磁性ペレット入りのガラス製バイアル中で、BSAの50 mM SPB(pH8.0)への7.82 gr/mlの溶液2 mlを、上記のストックNHSエステル溶液3 μlの2部分と混合し、室温にて75分間攪拌した。75分後、反応混合物を、50 mMのホウ酸緩衝液(pH9.0)で平衡化したサイズ排除カラムに通し、280 nmでの吸収にしたがって、タンパク質分画を集めた。

【0040】

ニワトリ HTWM抗体およびウサギ HTWM抗体の、1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンのNHSエステルとの結合: 小型磁性ペレット入りのガラス製バイアル

50

ル中で、抗体の50 mM SPB(pH8.0)への6 mg/mlの溶液1 mlを、6  $\mu$ lのNHSエステルストック溶液のDMF溶液と混合し、室温にて75分間攪拌した。75分後、反応混合物を、50 mMのホウ酸緩衝液(pH9.0)で平衡化したサイズ排除カラムに通し、280 nmでの吸収にしたがって、タンパク質分画を集めた。

【0041】

ポリアリルアミンの、1-フェニル-3(6-カルボキシ-ナフチル)-1,3-プロパンジオンのNHSEエステルとの結合： 小型磁性ペレット入りの暗色ガラス製バイアル中で、ポリアリルアミンの50 mM SPB(pH8.0)への6 mg/mlの溶液2 mlを、ストックNHSエステル溶液のDMFへの溶液20  $\mu$ lで処理し、室温にて75分間攪拌した。75分後、反応混合物を、サイズ排除カラムに通し、非結合リガンドを分離した。

10

【0042】

Eu-PNPDキレート被覆コロイド状金： 10 mlのコロイド状金溶液(BB International Gold Colloidal、40 nm、CAT番号EM. GC 40、バッチ番号2862)を、800 rpmで15分間遠心し、ペレットを回収した。次に、この金ペレットを、50 ml入りのガラス製三角フラスコに入った20 mlの0.1 Mホウ酸緩衝液(pH9.0)に溶かした。このコロイド状金溶液に、10% Tween 20の脱イオン水溶液、そしてその後、1 mM PNPD溶液を400 mlずつ加えた。混合物を、振盪機で10分間振盪した。10分後、1 mM TOPO溶液、そして次に塩化コウロピウムを400 mlずつ加えた。最後に、混合物を一晩振盪機で振盪した。翌日、溶液を、8000 rpmで20分間遠心し、ペレットを回収した。ペレットを、20 mlのホウ酸緩衝液に再度溶解し、8K rpmで20分間遠心した。最後に、ペレットを2 mlのホウ酸緩衝液に溶解して、蛍光コロイド状金溶液を得た。

20

【0043】

Eu-3,5-F2-PNPDキレート被覆コロイド状金： ホウ酸緩衝液のかわりに脱イオン水を使用した以外は、Eu-PNPDキレートと同じ手順を繰り返した。

【0044】

ウサギ HTWM抗体のキレート被覆コロイド状金への結合： 119  $\mu$ lの4.5 mg/mlウサギHTWM溶液を、881  $\mu$ lのキレート被覆コロイド状金溶液と混合し、室温で15分間インキュベートした。15分後に、内容物を、8000 rpmで12分間遠心した。ペレットを、1 mlの0.1 Mホウ酸塩(pH9.0)に溶解し、8000 rpmでさらに12分間遠心した。金ペレットを最終的に1 mlの0.1 Mホウ酸塩(pH9.0)に溶解した。上清中の抗体を測定し、タンパク質がキレート被覆金と結合したことを確認した。以上では、本発明のいくつかの態様について記載してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、各種の変更を加えることが理解されるはずである。キレート系のさらなる結合を行うこともできる。化合物2の陰イオン形態(2a)の場合には、さらに3つのフェニル環の二重結合によって結合を拡張することができる。化合物3aの陰イオン形態の場合には、5つのナフチル環の二重結合によって結合を拡張することができる。たとえば、本発明にしたがって、いくつもの他の潜在的キレート化合物を評価することができる。具体的には、上述したように、可視または近可視スペクトルに吸収極大のある化合物が好適である。水溶性とすることも、好適である。置換基は、pKa値が9.0未満となるよう選択することが、特にラテックス粒子を使用する場合には好適である。

30

40

【0045】

ランタニド系の金属のみならず、Tr、Se、およびRu、特に後者をはじめとして、他の遷移金属を使用することもできる。

【0046】

本発明の蛍光化合物を使用することによって、他の免疫測定法も実施することができる。こうした免疫測定法としては、HIV、FIV、肝炎、エールリヒア症、ボレリア・ブルグドルフェリ(ライム病)、パルボウイルス、リーシュマニア、hCG、インスリン、c-ペプチドおよびT4について調べる測定法を挙げることができる。

【0047】

したがって、請求の範囲の範囲には、他の態様も含まれるものである。

50

【 0 0 4 8 】

## 参考文献

1. Prat, O., Lopez, E., Mathis, G., *Anal Biochem.* 1991,195,283.
2. Oser, A., Roth, W. K., Valet, G., *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, 1181.
3. Seveus, L., Vaisala, M., Syrjanen, S., Sandberg, M., Kuusisto, A., Harju, R., Salo, J., Hemmila, I., Kojola, H., Soini, E., *Cytometry*, 1992, 13,329.
4. Morton, R., Diamandis, E. P., *Anal. Chem.*, 1990,62, 1841.
5. Can&A., Baily, M. P., Rocks, B.. F., *Analyst*, 1989, 114,1908. 10
6. Seveus, L., Vaisala, M., Hemmila, I., Kojola, H., Roomans, G. M., Harju, R., Salo, J., Soini, E., *Microsc. Res. Tech.* 1994,28, 149.
7. Gudgin Dickson, EF., Pollak, A., Diamandis, EP., *J. Photochem Photobiol.*, 1995, 27, 3-1.9.
8. Belyukova, SV., Egorova, AV., *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18,267-70.
9. Roberts, I. M., Jones, S. L., Premier, R. R., Cox, J. C. *J Immunol Methods.*, 199 1, 143, 49-56. 20
10. Soini, E., Lovgren, T., *CRC Critical Reviews In Analytical Chemistry*, 1987, 18, 105 154.
11. Scorilas, A., Bjartell, A., Hans, L., Moller, C., Diamandis, E. P., *Chin Chem.*, 2000, 46, 1450-1455 and references cited therein.
12. Scorilas, A., Diamandis, E. P., *CZin Biochem.*, 2000,33,345-350 and references cited therein.
13. Diamandis, E. P., U. S. Patent 5,854,008, Dec. 29, 1998. 30
14. Evangelista, R. A., Pollak, A., US, Patent 4,772,563, Sep. 20, 1988.
15. Diamandis, E. P., Lowden, A., US. Patent 5,089,423, Feb. 18, 1992.
16. Archer, R. D., Chen, H., *Inorg. Chem.*, 1998,37,2089-2095.
17. Werts, M. H. V., Duin, M. A., Hofstraat, J. W., Verhoeven, J. W., *Chem. Commun.*, 1999,799-800.
18. Steemers, F. J., Verboom, W., Reinhoudt, D. N., Van der Tol, E. B., Verhoeven, J. W., *J. Am. Chem. Sot.*, 1995,117,9408-9414.
19. Werts, M. H. V., Verhoeven, J. W., Hofstraat, J. W., *J. Chem. Sot., Perkin Trans.*, 2000, 32,433-439. 40
20. Harma, H., Soukka, T., and Lovgren, T., *Clinical Chem.*, 2001, 47:3, 561-568.
21. Gerber, H., Horisberger, M. and Bauer, H., *Infect Immun*, 1973, 7, 487.
22. Afshar, A., Dubuc, C., Dulac, G.C., Thomas, F.C., Nielsen, K. and Henning, D., *J. Virological Methods.*,1991, 31, 105-112.

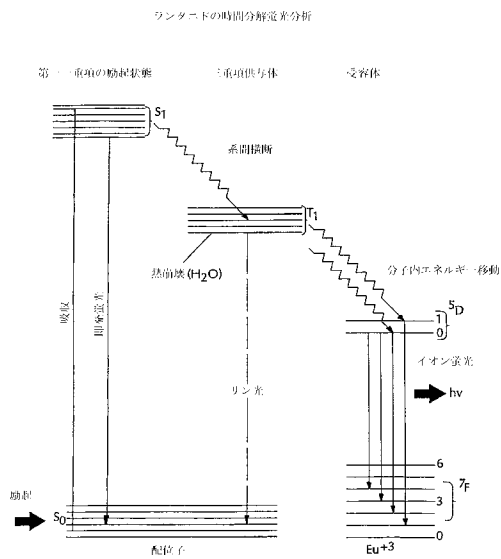
【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 9 】

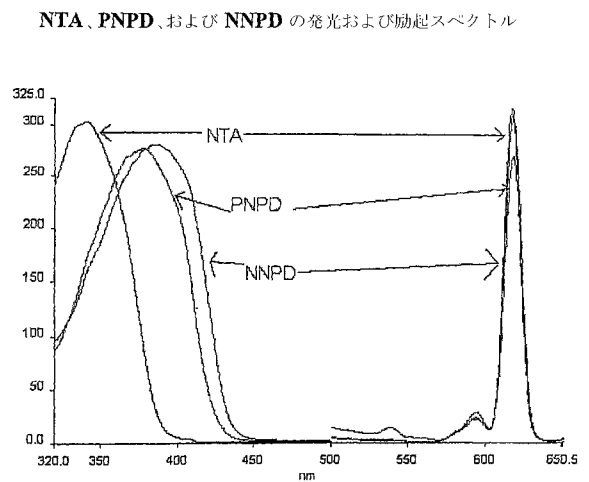
50

- 【図1】Eu<sup>3+</sup>キレート錯体の放射プロセスの模式図である。
- 【図2】NTA、PNPD、およびNNPDの励起および発光スペクトルを示す。
- 【図3】化合物2の各種の誘導体の構造を示す。
- 【図4】特定の化合物を配位した金属(M<sup>+</sup>)の図である。
- 【図5】上述した時間分解蛍光分析と連続蛍光分析の比較である。
- 【図6】ネコ白血球ウイルスに対する免疫測定法の結果を示す。
- 【図7】カルボキシ基を導入したPNPD誘導体を合成し、この誘導体をタンパク質と結合するスキームである。
- 【図8】Eu-PNPDキレート被覆コロイド状金の励起および発光スペクトルである。

【図1】

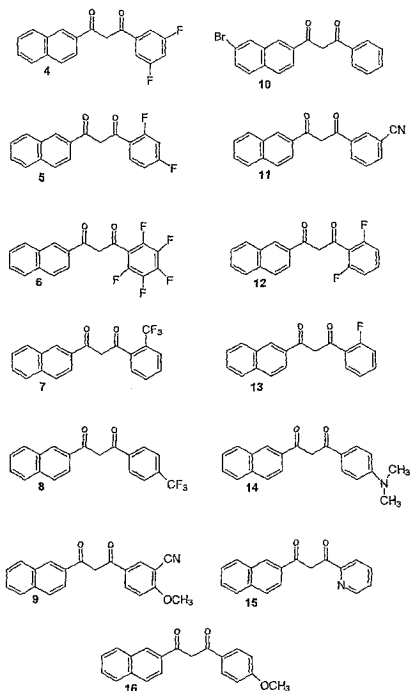


【図2】



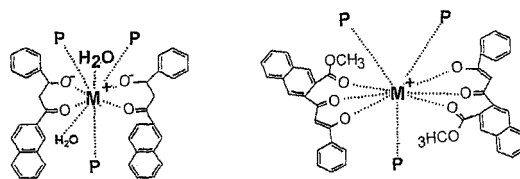
【 図 3 】

各種配位子の構造



【 図 4 】

配位子の金属 (M+) との配位

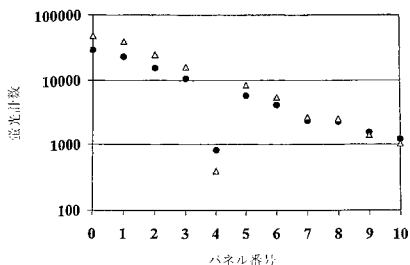


【 図 5 】

連続対時間分解蛍光 HITWM 免疫測定

パネル番号	連続	時間分解
0	28644	48519
1	23122	39574
2	15485	24791
3	10505	15845
4	835	400
5	5877	8302
6	4114	5430
7	2324	2646
8	2274	2498
9	1588	1405
10	1257	1037
空のウェル	760	30

連続 (●) 対時間分解 (△) 蛍光:  
HITWM 免疫測定

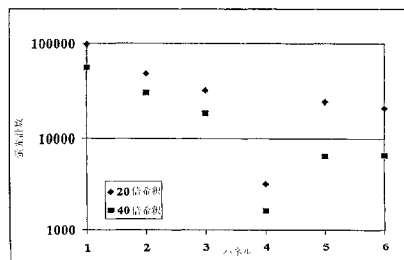


【 図 6 】

ネコ白血病ウイルスの免疫測定

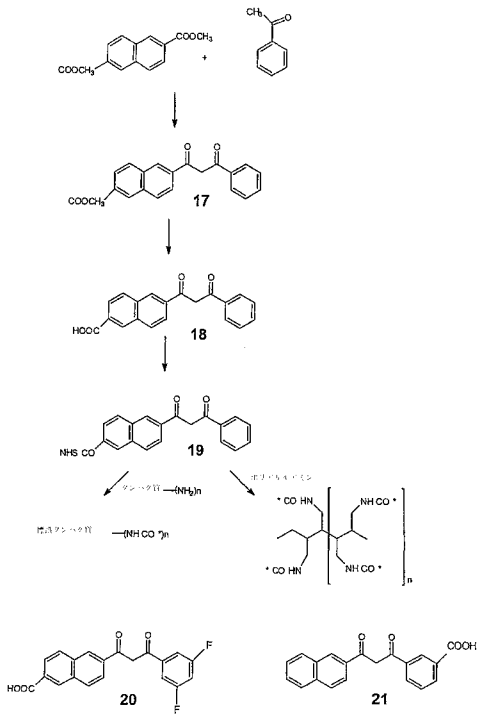
- 100  $\mu$ l のパネル 1 ~ 6 とともに 30 分間インキュベートし、3 回洗浄
- 100  $\mu$ l のビオチン-FeLV-G3 とともに 30 分間インキュベートし、7 回洗浄
- 20/40 倍に希釈した粒子の 2 mg/ml BSA の PBS ストック溶液とともに 30 分間インキュベートし、7 回洗浄
- 時間分解モードで蛍光を読み取り
- 検出し、波長が 380 nm の Nichia LED とし、読み取り時間を 50  $\mu$  秒、測定時間を  $\mu$  秒とする

パネル番号	20 倍希釈	40 倍希釈
1	97912	53886
2	47807	29275
3	31467	17694
4	3226	1633
5	24090	6482
6	20540	6567



【 図 7 】

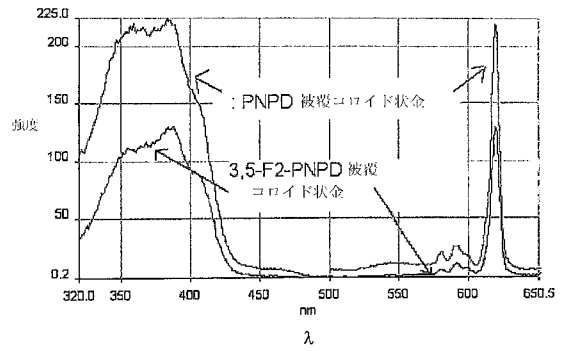
官能基を導入した配位子の合成と、そのタンパク質  
およびポリマーへの結合



【 図 8 】

PNPD および 3,5-F2-PNPD 被覆コロイド状金の  
の励起および発光スペクトル

スペクトルは、Perkin Elmer の LS 50B 発光分光計を使用して記録した



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/33518	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>			
IPC(7) : C07C 49/115; G01N 33/543; A61K 31/74; B01J 10/00 US CL : 568/326, 328, 333; 436/518; 435/7.91; 424/78.01; 422/189			
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) U.S. : 568/326, 328, 333; 436/518; 435/7.91; 424/78.01; 422/189			
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	Romanelli et al. Efficient Deprotection of Phenol Methoxymethyl Ethers Using a Solid Acid Catalyst with Wells-Dawson Structure. <i>Molecules</i> . 2001, vol. 6, pages 1006-1011, especially page 1008.	1, 3, 4 and 7	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 February 2004 (12.02.2004)		Date of mailing of the international search report 28 JUN 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Sikari Witherspoon <i>Jamie Ford</i> Telephone No. 571-272-1600	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/33518

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
**REGISTRY, CAPLUS, STNGUIDE**  
search terms: diketone, fluorescent, chelate, lanthanide, latex, polymer labeling, protein

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
<b>C 0 8 K</b>	<b>5/56</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 8 K	5/56	
<b>C 0 8 L</b>	<b>25/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 8 L	25/06	
<b>C 0 9 K</b>	<b>11/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 9 K	11/06	
<b>G 0 1 N</b>	<b>21/78</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	21/78	C
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/543	5 4 1 Z
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/545</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/545	A
<b>C 0 7 F</b>	<b>5/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 F	5/00	D

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, 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 スバ ロバート エイチ .

アメリカ合衆国 メイン州 ウィンダム ポープ ロード 215

Fターム(参考) 2G054 AB04 CA20 CA23 CE02 EA01 EA03 EB01 FA32 GA04 GA05  
 GE01  
 4H006 AA01 AA03 AB92  
 4H048 AA01 AA03 AB92 VA70 VB10  
 4J002 BC031 EZ006 GD00 HA07

专利名称(译)	金属螯合物及其在时间分辨荧光测量中的应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006503902A</a>	公开(公告)日	2006-02-02
申请号	JP2004548421	申请日	2003-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	IDEXX实验室股份有限公司Retiddo		
申请(专利权)人(译)	IDEXX实验室股份有限公司Retiddo		
[标]发明人	マーシーヤラミリ スバロバートエイチ		
发明人	マーシー ヤーラミリ スバ ロバート エイチ.		
IPC分类号	C07C49/784 C07C49/92 C07C65/36 C07C69/767 C08K5/49 C08K5/56 C08L25/06 C09K11/06 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 C07F5/00 C07C45/45 C07C49/788 C07C49/813 C07C49/84 C07C51/44 C07C225/22 C07C255/56 C07D213/50 C07F9/53		
CPC分类号	C07C49/84 C07C45/455 C07C49/788 C07C49/813 C07C49/92 C07C51/44 C07C225/22 C07C255/56 C07D213/50 C07F9/5345		
FI分类号	C07C49/784.CSP C07C49/92 C07C65/36 C07C69/767 C08K5/49 C08K5/56 C08L25/06 C09K11/06 G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/543.541.Z G01N33/545.A C07F5/00.D		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/CA20 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/FA32 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GE01 4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB92 4H048/AA01 4H048/AA03 4H048/AB92 4H048/VA70 4H048/VB10 4J002/BC031 4J002/EZ006 4J002/GD00 4J002/HA07		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/280330 2002-10-25 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

β-二酮荧光标签，特别是公开了可以使用近可见光和可见光谱的激发能量的β-二酮荧光标签。有时，这些标记可用于高励磁装置具有成本效益，例如，发光二极管。这种化合物，镧系元素(III)的稀土金属离子(例如，铈<sup>3+</sup>)以形成荧光螯合物(络合物)。荧光复合物可掺入胶乳微粒，如苯乙烯胶乳颗粒。复杂的，理想情况下，它具有高于360纳米，化合物，pKa值9最大吸收λ。其特征在于它是小于0。用于检测目标分子(例如免疫测定)试剂盒和方法也被公开。在这样的方法和试剂盒，典型地，配体结合到目标分子，使用结合于配体的标记试剂。如上所述的荧光复合物，其中，构成至少一个标记试剂。用于从样品中检测荧光，保持用于生成布置以从样品检测荧光的检测装置的辐射能量源装置中，在该位置的样品可通过辐射能量源360纳米以上照射能量λ被照射和样品持有人。的照射能量源时，优选使用发光二极管。

