

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-524521

(P2004-524521A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/76	GO 1 N 21/76	2 G O 5 4
CO 8 G 69/08	CO 8 G 69/08	4 B O 6 3
CO 8 G 73/04	CO 8 G 73/04	4 J O O 1
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	4 J O 4 3
C 1 2 Q 1/34	C 1 2 Q 1/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 165 頁) 最終頁に続く		

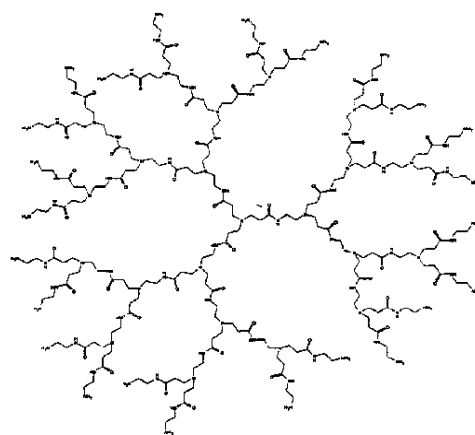
(21) 出願番号	特願2002-557779 (P2002-557779)	(71) 出願人	592250285 トロピックス・インコーポレーテッド TROP I X, I N C. アメリカ合衆国マサチューセッツ州017 30, ベッドフォード, ウィギンズ・アベ ニュー 47
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日(2002.1.8)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日(2003.7.8)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000022	(72) 発明者	スパークス, アリソン・エル アメリカ合衆国、マサチューセッツ 01 845、ノース・アンドーバー、ジョンソ ン・ストリート 325
(87) 国際公開番号	W02002/057745		
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		
(31) 優先権主張番号	60/259, 870		
(32) 優先日	平成13年1月8日(2001.1.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/286, 383		
(32) 優先日	平成13年4月26日(2001.4.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状化学発光基質

(57) 【要約】

dendリマー及び少なくとも1つの化学発光基質のコンジュゲートを含む、化学発光基質送達システムを提供する。基質送達システムはまた、化学発光エンハンサーも含むことが可能である。 dendリマー/化学発光基質コンジュゲートは、化学発光基質を活性化し、分解し発光する過酸化中間体を生成することができる酵素を含むキットに用いられる。 dendリマー/化学発光基質コンジュゲートは、サンプル中の検体(例えば、酵素、抗体、抗原又は核酸)の存在を検出するアッセイに用いられる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デンドリマー；及び

デンドリマーに結合した、少なくとも 1 つの、酵素活性化される化学発光基質を含む、化学発光基質送達システム。

【請求項 2】

化学発光基質が、ジオキセタン部分、ルミノール部分、イソルミノール部分、アクリジニウムエステル部分、アクリジニウムスルホニルアミド部分、ルシフェリン部分及びそれらの組み合わせからなる群より選択される部分を含む、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

10

【請求項 3】

複数の、酵素活性化される化学発光基質が、デンドリマーに結合している、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 4】

異なる少なくとも 2 つの、酵素活性化される化学発光基質が、デンドリマーに結合している、請求項 3 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 5】

基質送達システムが、以下の工程：

酵素活性化される化学発光部分を含む 1 つ以上の分子を、デンドリマーに共有結合で結合させる工程；又は

20

酵素活性化される化学発光部分のプレカーサーを含む 1 つ以上の分子を、デンドリマーに共有結合で結合させ、その後化学発光部分のプレカーサーを、化学発光部分に変換させる工程

を含む方法によって製造される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 6】

デンドリマーが、アミノ表面基を有するポリアミドアミンデンドリマー、カルボン酸表面基を有するポリアミドアミンデンドリマー、ヒドロキシル表面基を有するポリアミドアミンデンドリマー、及びアミノ表面基を有するポリプロピレンイミンデンドリマーからなる群より選択される、請求項 5 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 7】

化学発光基質が、

3 - (2 - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 - ホスホリルオキシ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン；

2 ナトリウム 3 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 - (5 - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1³ . 7] デカン] - 4 - イル) フェニルホスファートジオキセタン；及び

2 ナトリウム 2 - クロロ - 5 - (4 - メトキシスピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 - (5 - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1³ . 7] デカン] - 4 - イル) フェニルホスファート

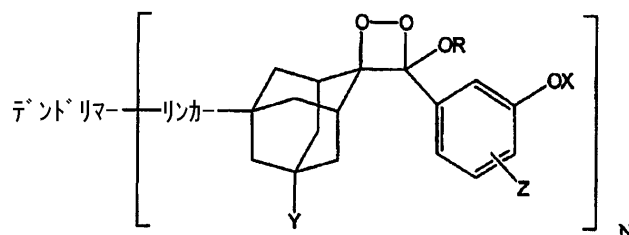
からなる群より選択されるジオキセタン部分を含む、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

40

【請求項 8】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ基質送達システムが、式：

【化 1】



10

20

30

40

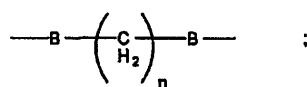
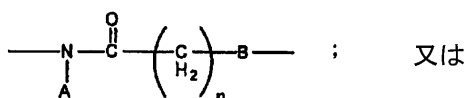
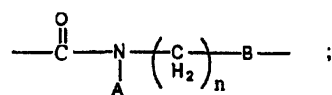
50

(式中、
「リンカー」は、リンカー部分を表し；
「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；
Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；
Yは、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；
Rは、C₁ ~ C₁₂ アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリール又はアラキルであり；
Xは、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 - D - グルコシド、 - D - グルコシド、 - D - グルクロニド、 - D - マンノシド、 - D - マンノシド、 - D - フルクトフラノシド、 - グルコシドウロナート、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンシルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンシルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；そして
Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基である)
で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 9】

リンカー部分が、式：

【化 2】



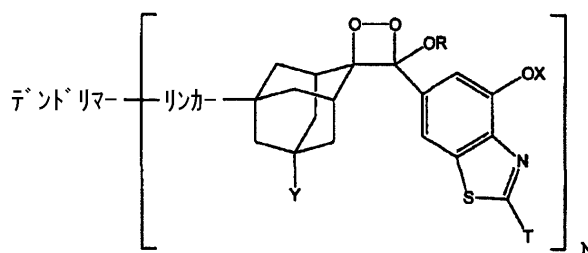
(式中、
nは、正の整数であり；
Aは、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして
Bは、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH₂である)

で表される、請求項 8 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 10】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 3】



10

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Y は、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

20

R は、C₁ ~ C₁₂ アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリール又はアラルキル基であり；

X は、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 - D - グルコシド、 - D - グルコシド、 - D - グルクロニド、 - D - マンノシド、 - D - マンノシド、 - D - フルクトフラノシド、 - グルコシドウロナート、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンスルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンスルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；そして

30

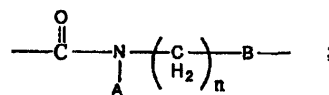
T は、H、電子供与性基、電子吸引性基、又は補助的な発蛍光団若しくは生物学的な部分に結合していてもよい有機リンカー基である)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

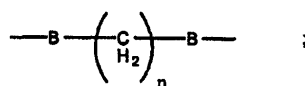
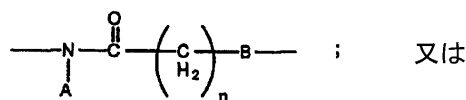
【請求項 11】

リンカー部分が、式：

【化 4】



40



50

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして

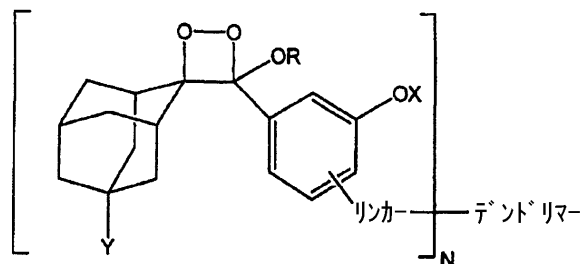
B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH₂である)

で表される、請求項10記載の化学発光基質送達システム。

【請求項12】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化5】



10

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの末端官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Y は、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

R は、C₁ ~ C₁₂ アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリール又はアラルキル基であり；そして

X は、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 - D - グルコシド、 - D - グルコシド、 - D - グルクロニド、 - D - マンノシド、 - D - マンノシド、 - D - フルクトフラノシド、 - グルコシドウロナート、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンスルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンスルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基である)

30

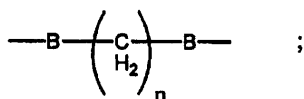
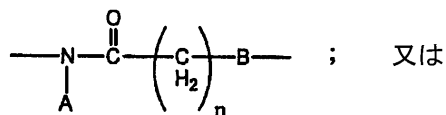
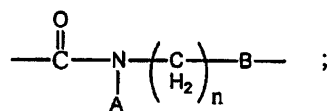
で表される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項13】

リンカー部分が、式：

40

【化 6】



10

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリアルであり；そして

B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH₂である)

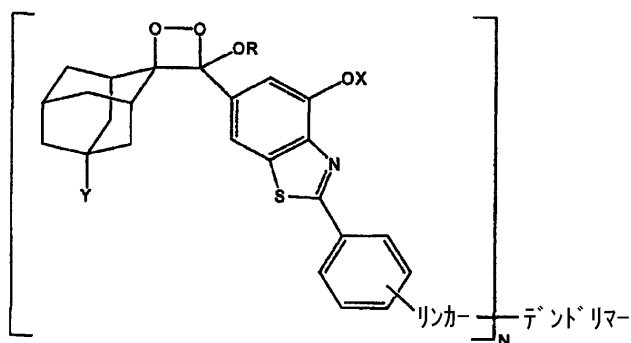
で表される、請求項 12 記載の化学発光基質送達システム。

20

【請求項 14】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 7】



30

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの末端官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Y は、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

40

R は、C₁ ~ C₁₂ アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリアル又はアラルキル基であり；そして

X は、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、- D - グルコシド、- D - グルコシド、- D - グルクロニド、- D - マンノシド、- D - マンノシド、- D - フルクトフラノシド、- グルコシドウロナート、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3, 5

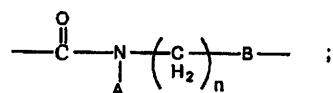
50

- ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンスルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンスルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基である)
で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

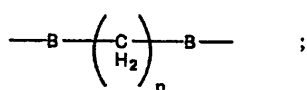
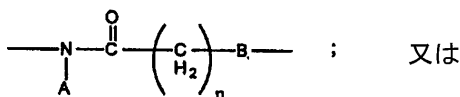
【請求項 15】

リンカー部分が、式：

【化 8】



10



20

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリアルであり；そして

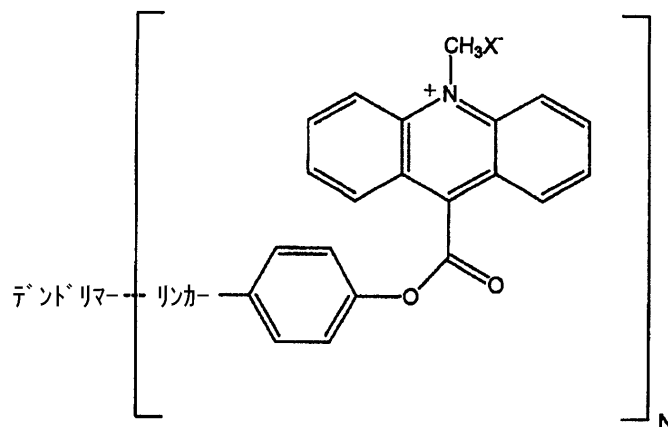
B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S 又は CH₂ である)

で表される、請求項 14 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 16】

化学発光基質が、イソルミノール部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 9】



30

40

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「 dendrimer 」は、 dendrimer の表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られる dendrimer 部分を表し；そして

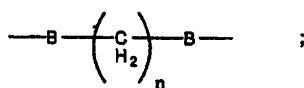
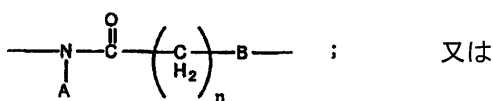
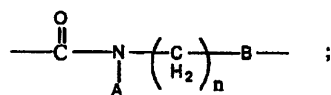
N は、 dendrimer 部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数である)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 17】

リンカー部分が、式：

【化 1 0】



10

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル基、トリハロアルキル基又はアリール基であり；そして

B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S 又は CH₂ である)

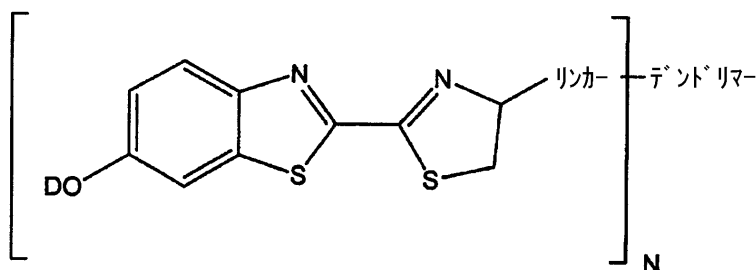
で表される、請求項 16 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 18】

化学発光基質が、ルシフェリン部分を含み、かつ送達システムが、式：

20

【化 1 1】



30

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；そして

D は、水素、又はホスファート、ガラクトシド、アセタート、1-ホスホノ-2,3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、

-D-グルコシド、

-D-グルコシド、

-D-グルクロニド、

-D-マンノシド、

-D-マンノシド、

-D-フルクトフラノシド、

-D-グルコシドウロナート、5-アセトアミド-3,5-

ジデオキシ-

-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシド、5-アセトアミド-3,5-

ジデオキシ-

-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p-トルエンシルホニル-L-アルギニンエステル、p-トルエンシルホニル-L-アルギニンアミド、及び PO₃H₂ 基からなる群より選択される、酵素不安定基である)

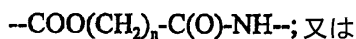
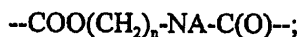
で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 19】

リンカー部分が、式：

40

【化 1 2】



(式中、

n は、正の整数であり；

A は、水素又はアルキル基であり；そして

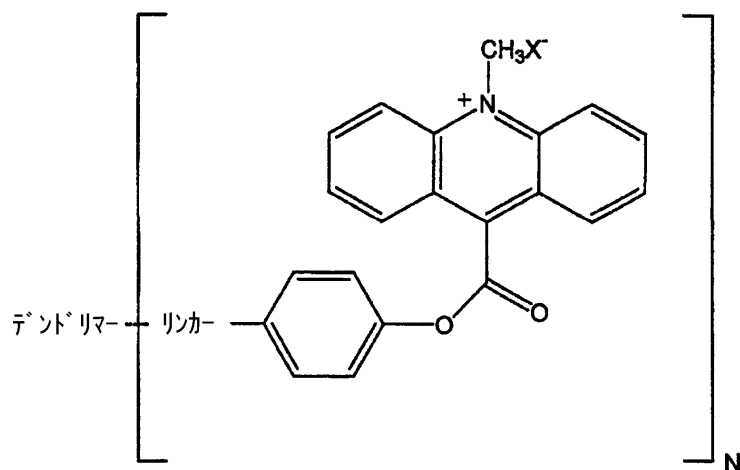
B は、N A、O、S 又は C H₂ である)

で表される、請求項 1 8 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 0】

化学発光基質が、アクリジニウムエステル部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 1 3】



(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；そして

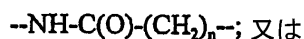
X は、対イオンである)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 1】

リンカー部分が、式：

【化 1 4】



(式中、

n は、正の整数であり；

A は、水素、アルキル基又はアリール基であり；そして

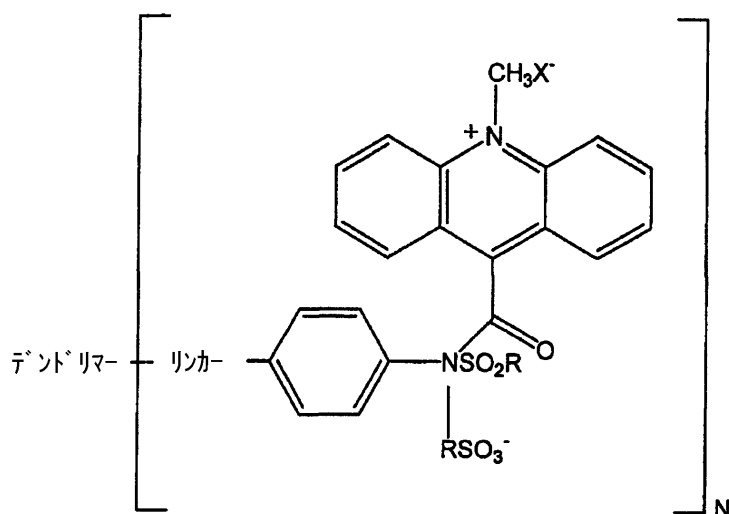
B は、N A、O、S 又は C H₂ である)

で表される、請求項 2 0 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 2】

化学発光基質が、アクリジニウムスルホニルアミド部分を含み、かつ送達システムが、式

【化 1 5】



10

(式中、

20

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Rは、アルキル又はアリール基であり；そして

Xは、対イオンである)

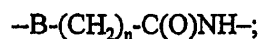
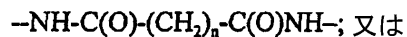
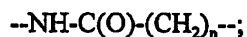
で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 3】

リンカー部分が、式：

【化 1 6】

30



40

(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、水素、アルキル基又はアリール基であり；そして

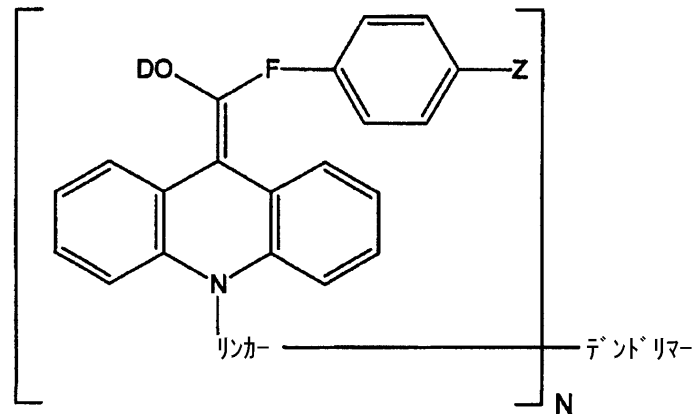
Bは、N A、O、S又はC H₂である)

で表される、請求項 2 2 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 4】

化学発光基質が、アクリダン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 17】



10

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Dは、 PO_3X_2 基、グリコシド又はスルファート(ここで、Xは、対イオンである)で 20

あり；

Fは、NA、S又はOであり；そして

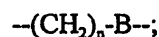
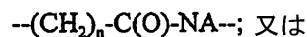
Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基である)

で表される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項25】

リンカー部分が、式：

【化18】



30

(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、水素又はアルキル基であり；そして

Bは、NA、O、S又は CH_2 である)

で表される、請求項24記載の化学発光基質送達システム。

【請求項26】

デンドリマーが、1つ以上の追加のデンドリマーと共有結合又はイオン結合で結合している、請求項1記載の化学発光基質送達システム。 40

【請求項27】

基質送達システムが、化学発光エンハンサー部分をさらに含む、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項28】

エンハンサー部分が、化学発光増強分子をデンドリマーの反応性部位に結合させることにより形成されるか、又はデンドリマーの反応性部位を増強部分に化学的修飾させることにより形成される、請求項27記載の化学発光基質送達システム。

【請求項29】

エンハンサー部分が、デンドリマーのアミノ基のペルアルキル化により、デンドリマーの 50

アミノ基のペルアルキルカルボニル化により、又は dendrimer のアミド基のアルキル化により形成される、請求項 28 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 30】

エンハンサー部分を、dendrimer のカルボキシラート基と、アミノ結合アンモニウム、ホスホニウム又はスルホニウム塩との反応により形成する、請求項 28 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 31】

第二の dendrimer をさらに含む、請求項 1 記載の化学発光基質送達システムであって、第二の dendrimer が、化学発光エンハンサー部分を含み、かつ第二の dendrimer が、少なくとも 1 つの酵素活性な化学発光基質部分に結合した dendrimer と共有結合又はイオン結合で結合している、送達システム。 10

【請求項 32】

化学発光基質及び/又は dendrimer が、1 つ以上の水可溶性基を含む、請求項 1 記載の化学発光性送達システム。

【請求項 33】

1 つ以上の水可溶性基が、カルボン酸、エステル、アルキル - オキシド、アリール - オキシド、アルキル - アミド、アリール - アミド、アラルキル - アミド、アルキル - ウレタン、アリール - ウレタン、アルキル - スルホンアミド、アリール - スルホンアミド、アルキル - スルホン酸、アリール - スルホン酸、第四級アンモニウム塩、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 32 記載の化学発光基質送達システム。 20

【請求項 34】

サンプル中の検体の存在又は濃度を測定するためのアッセイを実施するためのキットであって、

少なくとも 1 つの酵素活性な化学発光基質部分を含む dendrimer ; 及び化学発光基質を活性化して、発光分解する過酸化中間体を生成することができる酵素を含むキット。

【請求項 35】

酵素活性化される化学発光基質部分が、酵素不安定基を有するジオキセタンを含み、かつ酵素が、酵素不安定基を切断して、過酸化中間体を生成することができる、請求項 34 記載のキット。 30

【請求項 36】

化学発光増強物質をさらに含む、請求項 35 記載のキット。

【請求項 37】

アッセイが、免疫アッセイであり、かつ酵素が、検体に結合することができる薬剤との複合体を形成する、請求項 34 記載のキット。

【請求項 38】

アッセイが、DNA プロブアッセイであり、キットが、アッセイを実施することができる膜をさらに含む、請求項 34 記載のキット。

【請求項 39】

基質から得られる化学発光シグナルを増加させるための増強物質をさらに含む、請求項 38 記載のキット。 40

【請求項 40】

酵素が、薬剤との複合体を形成し、かつ薬剤が、検体との複合体を形成することができる、請求項 38 記載のキット。

【請求項 41】

アッセイが、DNA 配列分析アッセイであり、かつキットが、該配列分析アッセイを実施することができる膜をさらに含む、請求項 34 記載のキット。

【請求項 42】

キットが、化学発光増強物質をさらに含む、請求項 41 記載のキット。

【請求項 43】

酵素が、アッセイで配列を決定すべきDNAに対し酵素の付着を可能にする薬剤との複合体を形成する、請求項41記載のキット。

【請求項44】

酵素が、化学発光基質を酸化し、過酸化中間体を生成することができる、請求項34記載のキット。

【請求項45】

化学発光基質が、ルミノール部分、イソルミノール部分、アクリジニウムエステル部分、アクリジニウムスルホニルアミド部分又はルシフェリン部分からなる群より選択される部分を含む、請求項44記載のキット。

【請求項46】

サンプル中の検体の存在を検出する方法であって、以下の工程：
 酵素と、検体に結合しうる物質との間で、酵素複合体を形成する工程；
 酵素複合体を、サンプルに添加する工程；
 酵素複合体を、サンプル中に存在する検体と結合させる工程；
 サンプルに、化学発光送達システムを添加する工程；及び
 サンプルからの化学発光を測定する工程；
 を含み、ここで、化学発光送達システムが、 dendrimer 及び dendrimer と結合した、少なくとも1つの酵素活性な化学発光基質を含み、かつ測定された化学発光量が、サンプル中の検体の存在及び/又は濃度を示す方法。

10

【請求項47】

測定工程の前に、検体と結合していない酵素複合体を除去する工程をさらに含む、請求項46記載の方法。

20

【請求項48】

検体に結合しうる基質が、抗原、抗体又は核酸プローブである、請求項46記載の方法。

【請求項49】

アッセイを、固体支持体上で実施する、請求項46記載の方法。

【請求項50】

検体の存在が、固体支持体上のアレイに配置された複数のサンプルにおいて検出される、請求項49記載の方法。

【請求項51】

固体支持体に検体を結合させることをさらに含む、請求項49記載の方法。

30

【請求項52】

酵素が、グリコシダーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、オキシダーゼ、ペプチダーゼ及びホスファターゼからなる群より選択される、請求項46記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロスリファレンス

本出願は、2001年1月8日に出願した米国仮出願No. 60/259,870、及び2001年4月26日に出願した米国仮出願No. 60/286,383に基づく。

40

【0002】

発明の分野

本発明は、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート (conjugate)；樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートの合成；樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートを含む組成物；及び樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートの使用方法に関する。本発明はまた、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートと組み合わせたエンハンサー物質の使用に関する。複数 (すなわち、3 ~ 3072) の酵素活性化可能な化学発光基質を結合することにより、検出可能な化学発光を増幅する、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート及びエンハンサー樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートは、免疫アッセイ、化学的アッセイ及び核酸プローブアッセイにおいて、並びに合成ポリマー、タンパク質、核酸等を含む高分

50

子の微細構造を研究するための化学的 / 物理的プローブ処理において、化学的若しくは生物学的物質の存在の検出又は濃度の測定に有用である。

【 0 0 0 3 】

背景技術

樹状ポリマー（さもなければ、「デンドリマー」として知られている）は、一様なポリマーであり、中心核、内部樹状（高分岐）構造及び末端基による外部表面を有する高分岐デンドリマー、アルポロール、フラクタルポリマー及び星形デンドリマーとして、文献に色々な名前と言及されている。これらのポリマーは、形態及び機能の双方において、古典的な直鎖状ポリマーとは相違する。直鎖状ポリマーの化学的性質は、微視的なサイズから巨視的なサイズまでの生成物種の分布をもたらす、無秩序な、制御されていないプロセスに由来する。ポリマーの分子直線性は、分子量の増加と共に急激に増加する粘度、ランダムなコイル内に隠された部位のための平凡な化学的反応性及び可変若しくは平凡な溶解度といった巨視的な性質を規定するひどく絡み合った巨大分子集団をもたらす。対照的に、デンドリマーの化学的性質は、サイズ、形態トポロジー、フレキシビリティ及び表面基の厳密な制御により巨大分子を構築している。分岐合成として知られているところでは、これらの高分子は、イニシエーターの核を、高収率の相互反応配列で反応させることにより開始して、明確な表面基を有する核から放射状に広がる対称な分岐を構築する。あるいは、収束合成として知られているところでは、樹状の楔を、表面から中心部に向かって内側へ構築し、次いで数個の樹状の楔を、中心部で多官能性の核と結合させる。樹状合成は、世代として知られる同心性の層を形成し、各世代は分子量及び分岐末端での反応性基の数を倍加し、そのため最終的な世代のデンドリマーは、高純度で、広範な条件にわたって容易に溶解する一様な単分散の巨大分子である。以下に論ずる理由により、デンドリマーの分子量は 300 ~ 700, 000 ダルトンの範囲であり、表面基（例えば、結合のための反応性部位）の数は 3 ~ 3, 072 の範囲である。

10

20

【 0 0 0 4 】

デンドリマーが各世代と共に発展するに従って、分岐の密集による立体的な制約が、ポリマーの形状を、ヒト型分子から球状分子まで変化させる。例えば、星形ポリアミドアミン（「PAMAM」）デンドリマーに関して、0 ~ 3 世代は、ドーム型であり、4 世代は、扁球型を有する遷移世代であり、そして 5 世代以降は、中空の内部及び表面外皮を有するシンメトリックな球状である。（分岐末端での表面の密集を増加させることにより生じる）サイズの増加に伴う、ドーム型から球状への、この形状の変化は、樹状ポリマーの一般的な特徴である。

30

【 0 0 0 5 】

樹状の発展、形状及びトポロジーは、核、内部分岐構造及び表面基によって制御される。デンドリマーは、一定の末端表面基エリアを保持するように、シンメトリックに拡張する。例えば、星形デンドリマーに関して、表面基 - CO₂Me は、93 Å² / 基を要し、一方表面基 - NH₂ は、150 Å² / 基を要する。より大きな立体的なかさを有する末端基、例えば - NH₂ は、PAMAM で観察されたように表面の立体的な相互作用により、より大きな核中空の形成を促進する。対照的に、ポリエーテル星形デンドリマーは、3 世代以内に密集状態になり、非常にわずかな内部空洞しか有さない。一般に、樹状の発展は、表面の反応性部位の立体的な密集状態が、さらなる化学的な修飾を妨げるので、自己制約的となる；PAMAM 星形デンドリマーの場合、これが 9 ~ 10 世代で起こる。

40

【 0 0 0 6 】

本明細書で論じるように、樹状の表面は、表面の化学的性質として利用可能な、3 ~ 3, 072 個の末端基を持つことができる；末端基の数は、（立体の密集状態を規定する）デンドリマー構造の種類及びデンドリマーの世代による。アミノ（NH₂）末端化デンドリマーは、例えばマイケルアクセプター（CH₂=CHCO₂R）、 α -ハロエステル、エポキシド、アジリジン、活性化カルボン酸、酸クロリド、ハロゲン化ベンジル、カーボナート及びアルデヒドと反応する。ヒドロキシル（OH）末端化デンドリマーは、例えばハロスルホン酸エステル、活性化カルボン酸及び酸クロリドと反応する。エステル及び酸（

50

CO₂R、CO₂H)末端化 dendrimer は、例えばアミンと反応し、そしてハロゲン化物末端化 dendrimer は、例えばアミン並びにアルコキシド及びチオアルコキシドアニオンと反応する。他の反応性表面基は、特に、ハロゲン化カルボキシ、イミノ、イミド、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルアリアルアミノ、シアノ、スルホン酸エステル、ジチオピリジル及びスルフヒドリルを含む。通常 dendrimer 表面の化学反応は、表面に立体の密集状態がなければ、単一の有機分子と同様に速やかに、特異的かつ高収率で起こる。星形 PAMAM dendrimer (NH₂-末端化、OH-末端化及びCO₂R-末端化)及びアストラモール (Astramol) PEI dendrimer (NH₂-末端化)を含む、市販の dendrimer の構造は、図 1 A ~ 1 D に示されており、Aldrich Chemical Co.、Dendritech Inc. 及び DSM Fine Chemicals から入手可能である。加えて、反応性表面基を有する多くの他の樹状ポリマーが合成され、かつ論文に報告されている(総説として、例えば、“Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives,” G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vogtle, VCH Publishers, Inc. New York (1996) 及び最後に引用した参考文献を参照のこと)。

10

【0007】

近年、樹状ポリマーのサイズ、形状及び性質を、分子的に特定の末端の使用に適合するようにつらえることができることを見出された。樹状ポリマーは、従ってポリマー単位あたり、高濃度の担持物質の送達、制御された送達、標的送達及び/又は多種の送達あるいは使用の手段を提供することができるという、重要な利点を有する。

【0008】

米国特許第5,338,532号、第5,527,524号及び第5,714,166号は、薬剤、トキシン、金属イオン、放射性核種、信号発生剤 (signal generators)、信号反射剤 (signal reflectors)、キレート化金属、信号吸収剤 (signal absorbers)、抗体、ホルモン、生体応答調節剤、診断用乳濁剤、蛍光性部分及び除去剤を含む、様々な物資と結合した高密度星形ポリマー又は星形ポリマー; コンジュゲートの製造方法; コンジュゲートを含む組成物; 及びコンジュゲートの使用方法を開示している。

20

【0009】

米国特許第5,482,698号は、複数のアビジン又はビオチン結合部位を有するポリマーを含む病変を検出又は処理する方法であって; アビジン又はビオチンに検出剤又は治療剤を添加し; そして病変を検出又は処理する方法を開示している。

30

【0010】

米国特許第5,443,953号及び第5,635,603号は、グリコシル化抗体フラグメントを含む可溶性免疫コンジュゲート、並びに少なくとも1つの遊離のアミン基を有するポリマー担体及びポリマー担体に共有結合した検出可能な標識分子を含む中間体コンジュゲートを開示している。

【0011】

上記に引用した参考文献のいずれも、化学発光基質と樹状ポリマーとの結合を開示していない。

【0012】

1, 2 - ジオキセタン酵素基質は、様々なタイプの酵素アッセイに使用される、極めて有効な化学発光リポーター分子として確立されている。これらのアッセイは、放射性同位体、発蛍光団、複雑なカラーシフト、2次反応等に依存する通常のアッセイに代わる好ましい方法を提供する。この目的で開発されたジオキセタンは、米国特許第4,978,614号、第5,112,960号、第5,538,847号及び第5,582,980号、並びに米国特許出願第09/362,047号(係属中)に記載されたものである。米国特許第4,978,614号は、特に、PE社(NY)の登録商標である商品名AMP PD(登録商標)の下に、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) から市販されている3-(2-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3-ホスホリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタンを開示している。米国特許第5,112,960号、第5,538,847号及び第5,582,980号は、アダマンチル安定化環を、ヒドロキシ、ハロゲン等を含む様々な置換基で、いずれかの橋頭位置で置換し、別の状況

40

50

では静的な又は容易に化合しないアダマンチル安定化基を、ジオキセタン環の分解速度に係る活性基に変換する類似の化合物を開示している。このタイプの化合物は、多くの適用において、AMPD（登録商標）よりも急速かつ強いシグナルを与える。PE社（NY）の登録商標であるCSPD（登録商標）は、アダマンチル基に塩素置換基を有する第二世代のジオキセタンである。この物質はまた、アプライドバイオシステムズからも入手可能である。CSPD（登録商標）は、光強度及び検出感度の改善をもたらす。米国特許出願第09/362,047号は、酵素により切断可能な、化学発光1,2-ジオキセタンを開示しており、それは可視スペクトルの赤色又は緑色端に近接した波長で放射する。本段落で引用した各々の特許及び特許出願は、そのまま参照として本明細書に組み込まれる。

【0013】

化学発光を生ずる反応は、媒質が、メッセージでなくとも、伝達されたメッセージの強度を決定することができるという、さらに別の例を示す。化学発光化合物は、中程度の極性又は極性非プロトン性有機溶媒のような物質、例えばn-ブタノール、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド又はジメチルホルムアミド中での分解で、容易な検出及び定量に十分な強度の光を放射する発光団を生じるが、極性プロトン性の環境下、特に水性媒体中で分解した場合、かなり光強度が小さくなる。しかし、全ての生物学的系は、水性（実際、ヒトは約97%水である）であるゆえに、免疫アッセイ、核酸プローブアッセイ、化学的/物理的プローブ技術及び他のバイオアッセイにおいて、化学発光標識又は基質により生じる光強度を増強する必要があることは明らかである。そのような増強を提供する一つの方法は、高価な光学式又電子装置：シングルフォトンカウンター、照度計、シンチレーションカウンター等を使用することである。

【0014】

ジオキセタンは、特定の適用において、 10^{-12} M程度の低濃度の検体の存在に関するアッセイにおける感度の増強のために、特に開発されたものであるが、 10^{-12} M以下の濃度の検体を検出するため、ジオキセタンは、エンハンサーと共に用いられる。天然及び合成の水溶性高分子を含む、これらの増強剤は、米国特許第5,145,772号に詳細に開示されている。好ましい増強剤は、水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩、並びにそれらのコポリマー及び/又は混合物、例えばポリ（ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド）（TMQ）、ポリ（ビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド）（TBQ）及びポリ（ビニルベンジルジメチルベンジルアンモニウムクロリド）（BDMQ）を含む。

【0015】

これらの増強剤は、ジオキセタンを隔離する疎水性の周囲環境を提供することによって、明らかにジオキセタンリポーター分子の化学発光シグナルを改善する。体液の使用のために大部分のアッセイにおいて不可避な水は、ジオキセタン化学発光の天然の「消光剤（quencher）」である。増強分子は、ジオキセタン分子、又は少なくとも励起状態のエミッター種が存在する微環境から、明らかに水を排除し、結果として化学発光の増強をもたらす。エンハンサー-ジオキセタン相互作用と関連するその他の効果もまた、化学発光増強に寄与することができる。

【0016】

ジオキセタンに加えて、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びルシフェリンが、バイオアッセイにおいて化学発光標識として用いられる（Schroeder et al., Anal. Chem., 50,1114 (1978); Arakawa et al., Anal. Biochem., 79,248 (1979); 及びArakawa et al., Clin. Chem., 31,430 (1985)。総説として：Kricka et al., Clinical and Biochemical Luminescence, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Chapter 8, Marcel Dekker, Inc., New York (1982); Kricka, Ligand-Binder Assays, Chapter 7, Marcel Dekker, Inc., New York, (1985); McCapra et al., Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. 1, K. Van Dyke (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1985), Chapter 2 (特に、第13頁、ジオキセタンの部を注目されたい); 及びBarnard et al., Ibid, Ch. 7を参照された

10

20

30

40

50

い)。酵素標識は、カラー又は蛍光顕色技術によって検出される。近年、化学発光酵素免疫アッセイは、ルミノール/過酸化水素、ピロガロール/過酸化水素、Pholas dactylus ルシフェリン、又はルミノールを用いてアルカリ条件下で評価されるペルオキシダーゼコンジュゲートに基づく (Kricka et al., Clinical and Biochemical Luminescence, Chapter 8, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York (1982))。

【0017】

背景として、酵素活性化される化学発光基質は、酵素不安定基をそこで切断する酵素に対する基質として作用することによって、リポーター分子として使用される。このように酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ) は、通常の抗原/抗体リガンド結合アッセイにおける抗原若しくは抗体のいずれかと、又は核酸アッセイにおける核酸プローブと共有結合又はその他の複合体形成をすることができる。抗原若しくは抗体又は核酸プローブを有する酵素は、次いで標的抗原、又は核酸配列を含有すると疑われる検体と、抗体/抗原又はプローブ/核酸配列の間で複合体形成又はハイブリッド形成が可能な条件下に混ぜる。全ての非複合化又は非ハイブリッド化原料を洗浄除去又は分離除去した後、化学発光基質を添加する。疑わしい検体が存在する場合、酵素は、酵素不安定基化学発光基質を切断し、分解する中間体を生じる。分解現象が、発光現象である。

10

【0018】

極めて低濃度 (例えば、約 10^{-12} M 以下) の検体を検出するため、化学発光基質リポーター分子のシグナル強度を改善することが望ましく、同時に、アッセイの総合的な感度を改善するように、非酵素処理由来の発光によるバックグラウンドノイズの増加を回避することが望ましい。このように、化学発光基質の使用においてさらなる改善が求められている。

20

【0019】

本開示に引用された全ての特許及び文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

【0020】

発明の概要

本発明の目的は、化学発光リポーターによって放出されるシグナルに依存する、機械の判読率、感度及びアッセイのパフォーマンス面を改善することを含む、化学発光基質のパフォーマンスを改善することである。

30

【0021】

本発明のもうひとつの目的は、臨床アッセイを自動化し、高密度アレイ (マイクロアレイ) でのハイスループットスクリーニングを提供するため、アッセイの総合的な感度を改善するように、化学発光基質のシグナルの強度及び分解能を改善し、同時に非酵素処理由来の発光によるバックグラウンドノイズの増加を回避することである。

【0022】

上記の目的は、1つ以上の酵素活性化可能な化学発光基質を樹状ポリマーに結合させることによって、光シグナルを増幅するような、新規の樹状ポリマー化学発光基質により満たされる。シグナルの分解能はまた、高分子量の樹状骨格の摩擦抗力、すなわち、増加した分子サイズ、形状、分岐及び/又は累積荷電効果のため鈍化した分子拡散により改善し、これが酵素標識により発光を基質活性化領域に制限している。

40

【0023】

本発明の化学発光基質は、複数の基質リポーター分子を樹状ポリマーの増強領域に結合させることにより、さらに増強させることができる。この方法では、水の消光から、より効果的な基質の隔離を実現することができる。いったん基質が発生すれば、効果的な化学発光増強のため、初期のリポーターは、すぐ近くの樹状ポリマーの疎水性増強領域に組み込むことができる。化学発光シグナルの増強は、結果として検出感度の増大をもたらす。

【0024】

上記の目的に関して、本発明は、水性及び混合媒質中での化学発光基質の分解により放出された (例えば、光学的に検出可能な) 電磁エネルギーの検出能における改善を提供する

50

。特に、本発明は、用いた化学発光基質の分解により放出された（例えば、光学的に検出可能な）電磁エネルギーの検出を増加させる手段を提供し、水性及び混合サンプル中での物質の存在を検出するか、あるいは濃度又は構造を測定する。本発明はさらに、用いた化学発光基質の分解により放出された電磁（例えば、光学的に検出可能な）エネルギーの検出能における改善を提供し、技術的に公認の免疫アッセイ、化学的アッセイ又は核酸プローブアッセイ技術により、化学的又は生物学的物質の存在を検出するか、あるいは濃度を測定する。本発明はまた、分子構造又は微細構造を研究するための、化学発光基質の分解により放出された電磁（例えば、光学的に検出可能な）エネルギーの検出能における改善を提供する。

【0025】

本発明はまた、樹状ポリマー化学発光基質及びそのための中間体を調製する方法に関する。例えば、樹状ポリマーと化学発光基質とのコンジュゲートを調製するための第1の工程は、化学発光基質と樹状ポリマーとの結合を促進する温度で、適切な溶媒中、樹状ポリマーを化学発光基質と反応させることを含む。このように樹状の表面を、リンカー部分に適切な反応性部位を有するジオキセタン、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びその他ルシフェリンのような分子で結合することにより修飾することができる。この工程のさらに完全な議論を、以下に提供する。

【0026】

従って、本発明は、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート、コンジュゲートの調製方法、コンジュゲートを含む組成物及びコンジュゲート及び組成物の使用方法に関する。

【0027】

これらの目的及び他の目的、並びに本発明の性質、範囲及び利用は、以下の詳細な説明、及び図面から、当業者には直ちに明らかになるであろう。

本発明は添付の図面を参照することでより理解されるであろう。これらの図は、例示に過ぎず、本発明の範囲を限定する意にとられるべきものではない。

【0028】

発明の詳細な説明

酵素によるアッセイの設計は、検出感度の増加と共に、シグナルを発生させる基質の酵素によるターンオーバーによって、有意なシグナル増幅を提供する。酵素基質は、通常、比色、蛍光又は化学発光性である。一般に、化学発光酵素基質は、低い固有ノイズ（例えば、光散乱及び自己蛍光）、及びより高い強度のシグナルアウトプットのため、より広範囲のダイナミックレンジの検出並びに感度の増加を提供する。化学発光性のアウトプットを検出するための機器類はまた、何ら励起源を必要としないため、蛍光検出に要するものよりも単純である。化学発光基質の例は、ジオキセタン（エステラーゼ、アルカリホスファターゼ及びグリコシダーゼ、例えば -ガラクトシダーゼ及び -グルクロニダーゼのような加水分解酵素により活性化される）、並びにルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びルシフェリン（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコース又はガラクト - スオキシダーゼ及びルシフェラーゼのような酸化酵素により活性化される）を含む。これらの基質は、酵素活性化され、発光を伴い分解する不安定な過酸化中間体を生成する。得られる化学発光シグナルの測定は、免疫アッセイ、リポーター遺伝子アッセイ、DNAプローブアッセイ及びアレイフォーマットにおける酵素標識の検出を可能にする。

【0029】

本発明の実施態様によれば、公知の樹状ポリマーの表面に結合した1つ以上のジオキセタン、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及び/又はルシフェリンを含有する樹状ポリマー化学発光基質を合成することができる。本発明の樹状ポリマー化学発光基質を合成するために使用されうるいくつかのデンドリマー出発原料の限定的でない例は、図1A~1Dに記載されている。図1Aは、NH₂の表面基を有するポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーを示す。図1Bは、カルボン酸の表面基を有するポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーを示す。図1C

10

20

30

40

50

は、ヒドロキシルの表面基を有するポリアミドアミン（PAMAM） dendrimer を示す。図1Dは、NH₂の表面基を有するポリプロピレンイミン（PEI） dendrimer を示す。

【0030】

本発明の樹状ポリマー化学発光基質を合成するために使用されうるプレカーサーを結合した化学発光基質を、図2A～2Lに示す。図2A～2Lにおいて、置換基は、以下のように定義される：

【0031】

Aは、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリアルであり；

【0032】

Bは、NA、NC(O)A、O、S又はCH₂（ここで、Aは、独立してH、アルキル、トリハロアルキル又はアリアルである）であり；

【0033】

Yは、独立してH、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換の低級アルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、ハロ低級アルキル基、フェニル基、ハロフェニル基、アルコキシフェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

【0034】

Rは、アルキル基（例えば、C₁～C₁₂アルキル基）、ハロアルキル基（例えば、モノ-、ジ-若しくはトリ-ハロアルキル）、アリアル基又はアラルキル基であり；

【0035】

Xは、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1-ホスホノ-2,3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-グルクロニド、-D-マンノシド、-D-フルクトフラノシド、-D-グルコシドウロナート；5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ- β -D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシド及びアルコキシ誘導体（例えば、4,7-ジ-O-メチル）、p-トルエンシルホニル-L-アルギニンエステル、並びにp-トルエンシルホニル-L-アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；

【0036】

Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基であり；そして

【0037】

Tは、H、電子供与性基、電子吸引性基、又は補助的な発蛍光団に若しくはいずれかの生物学的な部分に結合していてもよい有機リンカー基である。

【0038】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートの一般的な構造の例を、図3A～3Oに示す。図3A～3Lにおいて、置換基A、B、Y、R、X、Z及びTは、図2A～2Lに関して述べたのと同義である。Dendrimerに結合したジオキセタン部分の数を示すNは、正の整数である。本発明の好ましい態様によれば、図3A～3FにおけるNは、6～768である。

【0039】

本発明によれば、図3Mは、複数のジオキセタンと結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン（PAMAM）星形Dendrimerを示す。本発明の別の実施態様によれば、図3Nは、複数のジオキセタンと結合したアミノ末端基を有する、ポリアミドアミン（PAMAM）星形Dendrimerを示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図3Oは、複数のジオキセタンと結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン（PEI）星形Dendrimerを示す。

【0040】

図4A～4Fは、図3A～3Lに示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示す。図4A～4Fにおいて、置換基A、B、Y、R、X及びNは、上記と同義であ

10

20

30

40

50

る。「アクチベーター」は、混合無水物、NHSEステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。

【0041】

図4Aにおいて、「アリアル」置換基は、図3A又は3Gに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Bにおいて、「アリアル」置換基は、図3B又は3Hに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Cにおいて、「アリアル」置換基は、図3C又は3Iに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Dにおいて、「アリアル」置換基は、図3D又は3Jに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Eにおいて、「アリアル」置換基は、図3E又は3Kに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Fにおいて、「アリアル」置換基は、図3F又は3Lに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。

10

【0042】

樹状ポリマーコンジュゲートのさらなる例は、図5A~5I及び図6A~6Jに示される。図5A~5Cは、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。図5A~5Cにおいて、Nは、上記に述べたのと同義である。本発明の好ましい実施態様によれば、Nは、6~768である。図5Aにおいて、置換基Aは、水素又はアルキル基であってよい。図5Cにおいて、置換基A及びBは、上記に述べたのと同義である。

20

【0043】

本発明の実施態様によれば、図5Dは、複数のイソルミノール部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明の別の実施態様によれば、図5Eは、複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図5Fは、複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン(PEI)星形 dendrimer を示す。

【0044】

図5G~5Iは、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。図5G~5Iにおいて、Nは、上記に述べたのと同義である。図5Gにおいて、置換基Aは、水素又はアルキル基であってよい。図5G及び5Hにおいて、置換基Dは、H又は PO_3H_2 であってよい。図5Iにおいて、置換基Bは、独立して、NA、O、S又は CH_2 (ここで、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい)であってよい。

30

【0045】

図6A~6Cは、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。図6A~6Cにおいて、Nは、上記に述べたのと同義であり、Xは、ハロゲン化物又はトリフラートのような、対イオンである。図6Aにおいて、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい。図6Cにおいて、置換基Bは、NA、NH、O、S又は CH_2 (ここで、置換基Aは、アルキル又はアリアル基であってよい)であってよい。

【0046】

図6D~6Iは、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。図6D~6Iにおいて、Nは、上記に述べたのと同義であり、Xは、ハロゲン化物又はトリフラートのような、対イオンである。図6D及び6Gにおいて、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい。図6D、6E、6G及び6Hにおいて、置換基Rは、アルキル又はアリアル基であってよい。図6F及び6Iにおいて、置換基Bは、NA、NH、O、S又は CH_2 (ここで、置換基Aは、アルキル又はアリアル基であってよい)であってよい。

40

【0047】

本発明の実施態様によれば、図6Jは、複数のアクリジニウムエステル部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。

50

本発明の別の実施態様によれば、図6Kは、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明の別の実施態様によれば、図6Lは、複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明の別の実施態様によれば、図6Mは、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図6Nは、複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン(PEI)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図6Oは、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン(PEI)星形 dendrimer を示す。 10

【0048】

図6P~6Rは、本発明の dendrimer とアクリダン部分のコンジュゲートを示す。図6P~6Rにおいて、置換基Dは、 PO_3X_2 、グリコシド又はスルファート(ここで、Xは、ハロゲン化物又はアンモニウムのような対イオンである)であってよい。置換基Fは、NA、S又はO(ここで、Aは、H又はアルキル基であってよい)であってよい。置換基Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基であってよい。Nは、正の整数である。本発明の好ましい実施態様によれば、Nは、1~10の整数である。図6Rにおいて、置換基Bは、NA、O、S又は CH_2 (ここで、Aは、H又はアルキル基であってよい)であってよい。 20

【0049】

図7A~7Cは、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートの合成を示す。図7A~7Cにおいて、 dendrimer に結合した化学発光基質の数を示す「N」は、正の整数であり、「n」は、0又は正の整数である。図7A及び7Bにおいて、「アクチベーター」は、混合無水物、NHSEステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。図7Aにおいて、「A」は、H又はアルキル基であってよい。図7Cにおいて、「B」は、NH又はOであってよく、「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。本発明の好ましい実施態様によれば、図7A~7CにおけるNは、6~768の整数である。 30

【0050】

図8A~8Fは、いくつかの樹状ポリマーアクリジニウムコンジュゲートの合成を示す。図8A~8Cは、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステルコンジュゲートの合成を示し、図8D~8Fは、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホンアミドコンジュゲートの合成を示す。図8A~8Fにおいて：Xは、ハロゲン化物又はトリフラートのような対イオンであり； dendrimer に結合した化学発光基質の数を示す「N」は、正の整数であり；そして「n」は、0又は正の整数である。本発明の好ましい実施態様によれば、図8A~8FにおけるNは、6~768の整数である。 30

【0051】

図8A、8B、8D及び8Eにおいて、「アクチベーター」は、混合無水物、NHSEステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。図8A及び8Dにおいて、「A」は、H又はアルキル基であってよい。図8C及び8Fにおいて：「B」は、NH又はOであってよく；そして「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。図8D~8Fにおいて、置換基「R」は、アルキル又はアリール基であってよい。 40

【0052】

2つ以上の異なる化学発光基質を dendrimer 骨格に結合させることもまた望ましい。このように2つの酵素標識化学発光基質を有する樹状ポリマーの例は、図9A~9Cに示されている。本発明の実施態様によれば、図9Aは、ジオキセタン及びイソルミノール部分 50

と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図9Bは、ジオキセタン及びアクリジウムエステル部分と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図9Cは、ジオキセタン及びアクリジニウムスルホンアミド部分と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。

【0053】

図10は、ジオキセタン部分及び第四級アンモニウムエンハンサー部分に結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM) dendrimer を示す。図10に示したように、第四級アンモニウムエンハンサー部分は、ペルブチル化(perbutylated)アンモニウム部分である。

10

【0054】

本発明のさらなる実施態様によれば、図11は、ジオキセタン部分及びエンハンサー部分の双方に結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM) dendrimer を示す。本発明のエンハンサー部分は：アミノ末端化高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム又はスルホニウム塩；アミノ末端化第四級化Jeffamine類；アミノ末端化第四級化ポリエチレンイミン；又はアミノ末端化ポリ(2-、3-若しくは4-ビニルピリジニウム)塩であってもよい。

【0055】

「樹状ポリマー」は、規則的な樹状の分岐を示すポリマーであり、一連の又は世代ごとの分岐層を、核に又は核より付加することによって形成される。「樹状ポリマー」なる用語は、核、少なくとも1つの内部分岐層、及び表面分岐層によって特徴付けられる「dendrimer」を包含する(Petar R. Dvornic and Donald A. Tomalia in Chem. in Britain, 641-645, August 1994を参照のこと)。「デンドロン」は、核である、又は核に結合することができる中心部から放射する分岐を有する dendrimer の一種であって、直接的にか又は結合部分を介してかのいずれかで、dendrimer を形成する。多くの dendrimer は、共通の核に結合した2つ以上のデンドロンを含む。しかしながら、用語 dendrimer は、広く単一のデンドロンを含むことにも用いられる。

20

【0056】

樹状ポリマーは、対称及び非対称の分岐 dendrimer、カスケード分子、アルボロール等が含まれるが、これらに限定されず、最も好ましい樹状ポリマーは、高密度星形ポリマーである。本明細書に開示されている PAMAM 高密度星形 dendrimer は、分岐部分が、同じ長さからなる、対称性のものである。分岐は、前述の世代分岐上の末端-NH₂基の水素原子で起こる。

30

【0057】

規則的な一連の分岐層の付加によって形成されないとしても、高分岐ポリマー、例えば高分岐ポリオールは、分岐パターンが dendrimer のそれにほぼ等しい規則性の程度を示す場合、樹状ポリマーに相当するとしてもよい。

【0058】

サイズ及び形状制御領域を有するトポロジカルポリマーは、反応性末端基を介して(例としては、共有結合で架橋するか、又は後述のように他の結合を介して)互いに結合した dendrimer であり、架橋型 dendrimer (bridged dendrimer) と呼ばれている。2つ以上の高密度星形 dendrimer が互いに結合している場合、それらは「凝集」又は「高密度星形凝集」と呼ばれている。

40

【0059】

従って、樹状ポリマーは、架橋型 dendrimer 及び dendrimer 凝集を含む。樹状 dendrimer は、dendrimer の世代的な単分散及び世代的な多分散溶液を包含する。単分散溶液中の dendrimer は、均一のサイズ及び形状ゆえに、実質的に全て同一世代である。多分散溶液中の dendrimer は、異なる世代の dendrimer の分布を含む。

【0060】

樹状ポリマーはまた、表面修飾型 dendrimer も含む。例えば、PAMAM dendrimer

50

の表面を、アミノ酸（例えば、リシン又はアルギニン）の付加により修飾してもよい。

【0061】

数種の一般的な結合スキームは、化学発光基質プレカーサーを樹状ポリマーに結合させるのに用いられてもよい。第一の方法は、一級又は二級アミノ-結合化プレカーサー、例えばアルケン若しくはエノールエーテル（すなわち、ジオキセタン調製用）、ルミノール、イソルミノール又はアクリジニウムエステル若しくはアクリジニウムスルホニルアミドを、混合無水物若しくは活性化エステルとして活性化されているか、又はカルボジイミド、ホスホニウム若しくはアンモニウム塩のようなカップリング剤で活性化されているカルボキシラート末端化樹状ポリマーと反応させ、アミド結合を形成させることを含む。一方、アミノ末端化樹状ポリマーが、活性化エステル-結合化化学発光基質プレカーサーと反応し、アミド結合を形成することもできる。アミド結合形成反応のこれらのタイプは、ペプチド合成文献に詳細に報告されており、当業者によって容易に実施されうる。第二の方法は、化学発光基質プレカーサーのリンカー上の脱離基（例えば、ハロゲン化物又はスルホン酸エステル）の、樹状ポリマーのアミノ又はアルコキシ末端基による求核置換反応により、エーテル又はアミン結合を形成することを含む。同様に、同じタイプの結合を、樹状ポリマー表面の脱離基の、結合した化学発光基質プレカーサーを有するアミン-又はアルコキシド-末端化リンカーによる求核置換反応により、合成することができる。第三の方法は、染料化学の分野において公知であり、塩化シアヌルに対し1~2個の樹状ポリマー表面基を、化学発光基質プレカーサー上のアミノ-、スルフヒドリル-、ヒドロキシル-又はフェノキシ-末端化リンカーにより置換された塩化シアヌル上の残余の1~2個の反応性塩化物と結合させることを含む。第四の方法は、アビジン-若しくはストレプトアビジン-結合化化学発光基質プレカーサーを、ビオチン化 dendriマーに結合させるか、又は逆にビオチン化化学発光基質プレカーサーを、アビジン-若しくはストレプトアビジン-修飾型 dendriマーに結合させる。文献に記載されている標準的な結合方法を用いて結合した任意の公知のリンカーを、樹状ポリマーに化学発光基質プレカーサーを結合させるのに使用することができる：リンカーと上述の結合方法は、例示に過ぎない。当業者は、適切なカップリング剤及び条件を選択することができ、容易に調製することができる。

10

20

【0062】

樹状ポリマー及び化学発光基質プレカーサーを結合させた後、化学発光基質プレカーサーを修飾し、樹状ポリマー化学発光基質を形成することができる。例えば樹状ポリマージオキセタンの合成を完了するために、結合したプレカーサーエノールエーテルを対応するジオキセタンに光酸化し、酵素切断基の形成を完了するための任意の修飾、例えばリン酸トリエステルのリン酸モノエステルへの脱保護又は -ガラクトシドエーテルの脱アシル化が行われる。ジオキセタンの安定性及び/又は増強性を所望であれば、ジオキセタンに対する酸化処理前に、dendriマー-エノールエーテルコンジュゲートを、アリアルアルキル又はハロゲン化アルキルを用いて任意のアミノ部位でペルアルキル化してもよい。

30

【0063】

上記に述べた、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートは、光強度及び/又は感度の改善、並びにシグナル分解能の改善を示す。これらの基質コンジュゲートは、特に酵素アッセイに使用するために調製される。ここで、樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートの酵素不安定（例えば、X）置換基の加水分解酵素による除去（例えば、アルカリホスファターゼ、 -ガラクトシダーゼ又は -グルクロニダーゼによる）は、ジオキセタンの分解と化学発光を誘発する。一方、樹状ポリマールミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリン基質コンジュゲートの酸化（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコース若しくはガラクト-スオキシダーゼ又はルシフェラーゼによる）は、ジオキセタノンの分解と化学発光を誘発する。酵素は、サンプル中の対象検体であってもよく、あるいはプローブ、抗原若しくは抗体に結合したりポーター分子であってもよく、又は特異的結合対の他の構成の存在を検出するための、特異的結合対の任意の構成であってもよい。一般に、免疫アッセイ及びアレイフォーマットを含む、現存する広範な様々なアッセイ及びアッセイの形態は、樹状ポリマー

40

50

化学発光基質コンジュゲートの使用をすることができ、視覚的に検出可能な化学発光シグナルを用い、サンプル中の特定の物質の存在及び/又は濃度を示す。

【0064】

例えば、サンプル中の酵素を検出するために、サンプルを、検出されようとする酵素によって切断されうる基を有する樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートと接触させることができる。酵素は、ジオキセタンの酵素切断基を切断し、ジオキセタンに結合した負に荷電した置換基（例えば、酸素アニオン）を形成する。この負に荷電した置換基は次いでジオキセタンを不安定化し、ジオキセタンを分解させ、光を放出する化学発光発色団を形成させる。この光の放出が、酵素の存在の兆しとして検出される。発光の強度を測定することによって、サンプル中の酵素の濃度を測定することができる。

10

【0065】

一方で、サンプルを、オキシダーゼ標識によって酸化されうる樹状ポリマールミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリンコンジュゲートと接触させることができる。酵素は直接的にルミノール、イソルミノール、若しくはルシフェリンを酸化するか、又は非直接的にアクリジニウムエステル、若しくはアクリジニウムスルホニルアミドを酸化し、過酸化水素の生成を介して、発光分解する不安定な過酸化中間体となる。検出された発光は、酸化酵素の存在を示す。発光の強度を測定することによって、サンプル中の酵素の濃度を測定することもできる。

【0066】

水のようなプロトン性溶媒中で、過酸化化学発光基質が分解する場合、光消光反応が起こることが知られている。一般的にアッセイは、水性環境下に行われるため、光消光反応は、実質的に観察される化学発光強度を弱める。一般的にサイズにおいて巨大分子である、水溶性の天然及び合成物質が、水性及び混合（すなわち、水性及び非水性成分を有する）媒体中での化学発光化合物の分解によって生じる発光蛍光団の光強度を増やすことができることも知られている。これらの増強因子は化学発光基質の化学発光シグナルを、明らかに疎水性の環境を与えることによって改善する。水（体液又は生物学的物質の使用により、ほとんどのアッセイの不可避の側面である）は、天然の化学発光の「消光剤」である。増強分子は、明らかに励起状態のエミッター種が存在する微小環境から水を排除しており、結果として化学発光の増強をもたらす。エンハンサー - 化学発光基質と関連するその他の効果もまた、化学発光の増強にも寄与することができる。本明細書で論じているように、水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩、並びにそれらのコポリマー及び/又は混合物、例えばポリ（ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド）、ポリ（ビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド）、及びポリ（ビニルベンジルジメチルベンジルアンモニウムクロリド）を含む増強剤は、米国特許第5,145,772号に詳細に記載されており、アッセイの感度を増加させるために使用されうる。

20

30

【0067】

米国特許第5,145,772号に記載されているように、特定の水溶性の天然及び合成物質、一般的には天然の巨大分子、例えば疎水性領域を含む水溶性の球状タンパク質：ウシ血清アルブミン（BSA）及びヒト血清アルブミン（HSA）のような哺乳類の血清アルブミン、あるいは水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩：ポリ（ビニルベンジルトリメチル - アンモニウムクロリド）（TMQ）又はポリ[ビニルベンジル（ベンジルジメチル - アンモニウムクロリド）]（BDMQ）が、安定化を可能とし、それゆえ水性及び混合媒体中での化学発光化合物の分解によって生じる発光蛍光団の光強度を増やすことができる。このような化学発光化合物は、酵素処理により切断可能な1,2-ジオキセタンであり；このような化学発光化合物の、互いとの及び1つ以上の補助の発光団（例えば、フルオレセイン）との混合物は、化学発光化合物の分解によって生じるエネルギー放出発光団からのエネルギーを受け、次いで検出可能なエネルギーを放出する。有効量のエンハンサー物質の存在が、このように安定化された発光団により、水性媒体中で放出される光の強度を、このようなエンハンサーの不存在下で同量の発光団により放出される光の強度に比べて、有意に増加させる。

40

50

【0068】

従って、本発明の追加の実施態様は、エンハンサー分子を樹状ポリマーに結合させること、又は樹状ポリマーの残余の反応性表面基を、エンハンサー部位を包含するように修飾することを含む。樹状ポリマーが、(上述のように)化学発光基質プレカーサーと10~90%の反応性部位で結合されていれば、残余の反応性部位を、増強剤と結合することができるか、又は増強性の表面基となるよう化学的に修飾することができる。あるいは、合成上の制約により必要ならば、化学発光基質プレカーサーを、エンハンサー巨大分子を結合した後又はいくつかの樹状反応性基を修飾後に、樹状ポリマーの反応性部位に結合させることができる。第一のアプローチによれば、例えば、哺乳類の血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、プロテインA又は哺乳類のIgGのような天然由来の巨大分子を含む、エンハンサー分子を、ペプチド化学及び生物学的結合形成(bioconjugation; 例えば、ストレプトアビジン-ビオチン親和性により2つの薬剤の結合)に分野において公知の方法により、樹状ポリマー表面基に結合させることができる。第二のアプローチによれば、エンハンサー分子は、各々樹状ポリマー表面基に結合させることができる、反応性末端基又は反応性リンカーを有する合成巨大分子物質を含む。反応性リンカー又は反応性末端基で修飾されている利用可能な合成増強物質は、適切には、ポリ(ビニルアリール第四級アンモニウム)塩、ポリ-N-ビニルオキサゾリジノン、ポリビニルカルバマート、ポリヒドロキシアクリラート及びポリヒドロキシメタクリラート、第四級化アミン-含有オリゴマー(例えば、Jeffamine類)、合成ポリペプチド(ポリリシン及びナイロンを含む)、ポリビニルアルキルエーテル、ポリアクリルアミド及びポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ2-、3-若しくは4-ビニルピリジニウム塩、ポリビニルアルキルピロリジノン、ポリビニルアルキルオキサゾリドン、第四級化ポリエチレンイミン、ポリ-N-ビニルアミン、アルキル化若しくはアリール化ポリビニルピペリジン、ポリアクリロイル、ポリメタクリロイル若しくは4-ビニルベンゾイルアミンイミド、並びに同様の樹状又は高分岐類似体を含む。第三のアプローチによれば、樹状ポリマーの反応性の表面及び/又は内部基を、化学的に修飾し、エンハンサー部分を与える。化学発光の増大を可能とする樹状ポリマーの修飾の例は、末端及び/又は内部アミンのペルアルキル化、末端及び/又は内部アミドのアルキル化、及び末端活性エステルとアミノ-結合アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩との反応を含む。第四のアプローチによれば、樹状ポリマーの化学発光基質を、リンカーを介して樹状ポリマーのエンハンサーに結合し、架橋型デンドリマー構造を形成する。

【0069】

加えて、水-可溶性基(数は、1個以上)、すなわち水溶液中のジオキセタンの溶解度を向上させる置換基は、カルボン酸若しくはエステル、アルキル-若しくはアリールオキシド、アルキル-、アリール-若しくはアラキルアミド、アルキル-若しくはアリールウレタン、アルキル-若しくはアリールスルホンアミド、アルキル-若しくはアリールスルホン酸及び第四級アミノ塩を含み;最も好ましい可溶性置換基は、アルキル-若しくはアリールオキシド、アミド、及びスルホンアミドであり、これらを化学発光基質又はデンドリマーに付加し、一般的に性質において水性であるサンプル中の基質の溶解度を向上させることができる。選択された置換基が、水素であるか、又は電子活性であるかによって、その性質が、溶解度に加えて、分解反応の半減期($T_{1/2}$)、化学発光の収率、及びシグナル/ノイズの比(S/N)に影響を及ぼすかもしれない。ジオキセタン化学発光での適切な置換基及びその影響力は、フェノキシ置換ジオキセタンに関連して論じられ、米国特許第5,330,900号に開示かつクレームされており、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

【0070】

上述の樹状ポリマー化学発光基質を、許容可能な環境による、任意のリポーター分子に基づくアッセイに使用することができる。このようなアッセイの例は、抗体又は抗原を検出する免疫アッセイ、ウィルス(例えば、HTLV-III若しくはサイトメガロウィルス)、又は細菌(例えば、E. Coli)、及び特定の細胞機能(例えば、受容体結合部位)等を検

出する、例えば酵素アッセイ及び核酸アッセイを含む。

【0071】

抗体、抗原若しくは核酸のような物質を検出するために、ジオキセタンの酵素切断基を切断することができる酵素、あるいはルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリンを酸化することができる酵素は、好ましくは検出可能な物質に特異的親和性を有する物質（すなわち、検出可能な物質に特異的に結合する物質）、例えば、抗原、抗体、若しくは核酸プローブに結合させる。酵素の直接結合に加えて、リガンドを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合することもできる。次いでリガンドは、ジオキセタンの酵素切断基を切断することができる酵素、あるいはルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリンを酸化することができる酵素で標識された高親和性リガンド結合剤を用いて検出される。カルボジイミドカップリングのような通常の方法は、酵素を特異的親和性物質に結合するのに用いられ；結合は、好ましくはアミド結合を介している。

10

【0072】

一般に、アッセイは以下のように行われる。ある例では、検出可能な物質の混入が疑われるサンプルを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合した酵素を含む緩衝溶液と接触させる。得られた溶液を、インキュベートし、検出可能な物質を特異的親和性 - 酵素複合体の特異的親和性部分に結合させる。過剰の特異的親和性 - 酵素複合体を洗い流し、特異的親和性 - 酵素複合体の酵素標識により切断可能な基を有するか、又は特異的親和性 - 酵素複合体の酵素標識により酸化可能な基を有する樹状化学発光基質を加える。第二の例では、検出可能な物質の混入が疑われるサンプルを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合したリガンドを含む緩衝溶液と接触させる。得られた溶液を、インキュベートし、検出可能な物質を特異的親和性 - リガンド複合体に結合させる。過剰の特異的親和性 - リガンド複合体を洗い流し、酵素標識したリガンド結合剤を加え、インキュベートし、酵素標識したリガンド結合剤をリガンドに結合させる。次いで過剰の酵素標識したリガンド結合剤を洗い流し、酵素標識したリガンド結合剤の酵素部分により切断可能な基を有する樹状化学発光基質を加える。双方の例において、酵素活性化過酸化中間体が分解し、冷光を放つ。冷光を、キュベット、又はカメラ式照度計における光感応性フィルム、又はCCD、又は光電セル若しくは光電子増倍管を用いて検出し、サンプル中の検出可能な物質の存在及び濃度を測定する。

20

30

【0073】

別のタイプのアッセイでは、生物学的サンプル中の検出可能な物質に特異的親和性を有する物質を、場所的に明確に定義されたパターンで固体支持体上に配置する。平面若しくは非平面、多孔性若しくは非多孔性、立体若しくはビーズ状の形で、ガラス、プラスチック、シリコン、ポリマーのような固体支持体が用いられる。生物学的サンプル中の検出可能な物質は、核酸又はタンパク質であってよい。検出可能な物質を含有する生物学的サンプルを、固相アレイに接触させ、検出可能な物質の結合に最適な条件下で、インキュベートする。ある場合には、検出可能な物質を、化学的又は酵素的な手段により検出可能なリガンドで前標識し、続いて酵素標識したリガンド結合剤で検出する。別の場合には、結合した非標識物質を、結合した検出可能な物質に親和性を有する第二の酵素 - 又はリガンド - 標識した物質で生物学的サンプルから検出する。この標識した物質の結合は、アレイ上の検出可能な物質の捕捉前又は捕捉後であってもよい。検出が、リガンド標識した物質を含む場合、酵素標識したリガンド結合剤を用いた追加のインキュベーションを必要とする。適切な洗浄が、必要なインキュベーションの間に行われる。全ての場合における最終工程は、酵素標識した検出剤の酵素部分により切断可能な基を有するか、又は特異的な酵素標識した複合体の酵素部分により酸化可能な基を有する樹状化学発光基質の添加であろう。酵素活性化過酸化中間体が分解し、冷光を放つ。冷光を、電荷結合カメラ（CCD）、フィルム、又は他の光感応画像装置を用いて検出し、特定領域で測定される光強度を決定する。

40

50

【0074】

以下の例は、本発明をさらに説明するものであって、本発明の範囲に対する限定と解釈すべきものではない。

【実施例】

【0075】

活性化エステル dendrimer の合成

カルボキシル末端化 dendrimer (例えば、星形 P A M A M dendrimer、pH 7 に調節) 100 mg 及び N - ヒドロキシスクシンイミド (1.0 eq / カルボキシル末端基) の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC、1.0 eq / カルボン酸末端基) 又は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI、1.0 eq / カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物をろ過により又は (EDCI 副生物を) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗生成物をクロマトグラフィーにより精製した。

10

【0076】

図 4 A 又は 4 E に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、活性化エステル末端化 dendrimer 100 mg の CH_2Cl_2 15 ml の攪拌溶液に、1 級又は 2 級アミンで末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (1.01 eq エノールエーテル / 活性化エステル末端基; 例えば、アクチベーター = N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 CH_2Cl_2 で希釈し 75 ml とし、水 (3 x 30 ml) 及び飽和 Na_2CO_3 (3 x 30 ml) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 A 又は 4 E に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

20

【0077】

図 4 B 又は 4 F に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、アミノ末端化 dendrimer (例えば、星形 P A M A M dendrimer 又はポリプロピレンイミンテトラヘキサコンタアミン (polypropylenimine tetrahexacontaamine) dendrimer) 100 mg の CH_2Cl_2 15 ml の攪拌溶液に、活性化エステルで末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (1.01 eq エノールエーテル / NH_2 末端基; 例えば、アクチベーター = N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 CH_2Cl_2 で希釈し 75 ml とし、水 (3 x 30 ml) 及び飽和 Na_2CO_3 (3 x 30 ml) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 B 又は 4 F に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

30

【0078】

図 4 C 又は 4 D に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

合成スキーム 1 :

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、アミノ末端化 dendrimer (例えば、星形 P A M A M dendrimer 又はポリプロピレンイミンテトラヘキサコンタアミン dendrimer) 100 mg の CH_2Cl_2 15 ml の攪拌溶液に、ハロゲン化物 (例えば、I 若しくは Br) 又はスルホン酸エステル (例えば、メシラート、トシラート、ブロシラート (brosylate)) で末端化されたリンカーを有するエノールエーテルを加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 CH_2Cl_2 で希釈し 75 ml とし、水 (3 x 30 ml) 及び飽和 Na_2CO_3 (3 x 30 ml) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 C 又は 4 D に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

40

【0079】

合成スキーム 2 :

50

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、ブromo - 又はメシラート - 、トシラート - 若しくはブ
ロシラート - 末端化 dendriマー (例えば、脱離基で修飾された、星形 P A M A M - O H
) 100 mg の CH_2Cl_2 15 ml の攪拌溶液に、アミン又はヒドロキシル基で末端化さ
れたリンカーを有するエノールエーテルを加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 CH_2Cl_2
で希釈し 75 ml とし、水 (3 × 30 ml) 及び飽和 Na_2CO_3 (3 × 30 ml) で洗浄し
た。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 C 又は 4 D に記載された樹状
エノールエーテルコンジュゲートを得た。

【0080】

ジオキセタン - ポリアンモニウム及びジオキセタン - ポリビニルピペリジニウム dendri
マーの合成

カルボキシラート末端化 dendriマー (例えば、星形 P A M A M dendriマー、pH 7 に
調節) 100 mg、アミノ末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (0.5 eq / カ
ルボキシラート末端基) 及びアミノ末端化されたポリマー (0.5 eq / カルボキシラート
末端基、例えば、ポリエチレンイミン、ポリ - N - ビニルアミン又はポリビニルピペリジ
ン) の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、
例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 1.0 eq / カルボン酸末端基) 又は 1
- (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI, 1.
0 eq / カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物を
ろ過により又は (EDCI ウレア副生物を) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗
エノールエーテル - エンハンサー dendriマーをクロマトグラフィーにより精製した。ア
ミン部位をハロゲン化アルキル (例えば、ペルメチル化するためのヨードメタン又はペル
ブチル化するための臭化ブチル) との反応により、アンモニウム基にペルアルキル化し、
エノールエーテルを下記に記載のようにジオキセタンに酸化し、樹状ジオキセタン - ポリ
アンモニウム又は樹状のジオキセタン - ポリビニルピペリジニウム基質の合成を完了した
。

【0081】

ビオチン化星形 dendriマーの合成

トリス、ヘペス、リン酸、炭酸又はホウ酸緩衝液中の、アミノ末端化 dendriマー (例
えば、星形 P A M A M dendriマー又は星形 P E I dendriマー、pH 7 に調節) の 0.1
mol 溶液を、N - ヒドロキシスクシニイミドビオチン (0.1 ~ 1.0 mol) と周囲温度で 1
2 ~ 48 時間反応させた。ビオチン化 dendriマーを、透析、サイズ排除クロマトグラ
フィー (SEC) 又はイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

【0082】

アビジン - 又はストレプトアビジン - 結合型星形 dendriマー

DMF 中の、アミノ末端化 dendriマー (例えば、星形 P A M A M dendriマー又は星形
P E I dendriマー、pH 7 に調節) の 0.1 mol 溶液を、カップリング剤 (例えば、ジ
シクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 又は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3
- エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI)) の存在下にスクシニル - アビジン (Sigma
) 又はスクシニル - ストレプトアビジンと反応させた。反応を周囲温度で 2 ~ 24 時間攪
拌した。アビジン - 結合型 dendriマーを、限外ろ過又はセファデックス (Sephadex) カ
ラムクロマトグラフィーにより精製した。

【0083】

一方、カルボキシラート末端化 P A M A M dendriマー 100 mg の脱イオン水 15 ml の攪
拌溶液に、アビジン又はストレプトアビジン及びカップリング剤 1 - (3 - ジメチルアミ
ノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI) を加えた。pH 5 付近に溶
液を保ちながら、反応を室温で 8 ~ 24 時間攪拌した。反応溶液を、限外ろ過するか、又
はセファデックスカラムを通して溶出し、アビジン - 又はストレプトアビジン - 結合型デ
ndriマーを得た。

【0084】

イソルミノール - ウシ血清アルブミン dendriマーの合成

10

20

30

40

50

アビジン - 結合型 dendrimer 100 mg の pH 7 の水溶液を、ビオチン化アミノブチルエチルイソルミノール (A B E I) 及びビオチン化ウシ血清アルブミン (B S A) (1 : 1 のモル比で存在) の溶液に加え、周囲温度で 1 ~ 24 時間攪拌した。溶液を限外ろ過し、未反応のビオチン化剤を除去し、樹状イソルミノール - B S A 基質を得た。

【0085】

樹状ポリマー ジオキセタン コンジュゲートの合成

テトラフェニルポリフィン (T P P、 C H C l_3 5 ml 中、10 mg) を含む、dendrimer - エノールエーテル コンジュゲート (250 mg) の 10% MeOH / C H C l_3 (50 ml) 溶液を、5 分間、パストゥールピペットを介して酸素を散布しながら、氷浴中で冷却した。溶液を 400 ワットのナトリウム蒸気ランプで照射している間中、酸素の流入を続け、3.0 ml 厚のデュポンカプトンフィルム (DuPont Kapton film) でろ過した。光酸化が完了した後、反応から溶媒を除去し、水に溶解させ、1 インチの P L R P - S カラム (Polymer Laboratories) で、アセトニトリル / 水のグラジエントを用いて分取クロマトグラフに付した。生成物ピークを、前後で削り取り、中央のカットのみを回収した。溶離液を凍結乾燥し、白色固体として樹状ジオキセタン生成物を得た。

10

【0086】

樹状イソルミノール コンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、プロモ - 又は メシラート - 、トシラート - 若しくは プロシラート - 末端化 dendrimer (例えば、脱離基で修飾された、P A M A M - O H) 100 mg の $\text{C H}_2 \text{C l}_2$ 15 ml の攪拌溶液に、N - (4 - アミノブチル) - N - エチルイソルミノール (A B E I) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{C H}_2 \text{C l}_2$ で希釈し 75 ml とし、水 (3 x 30 ml) 及び飽和 $\text{N a}_2 \text{C O}_3$ (3 x 30 ml) で洗浄した。有機層を $\text{N a}_2 \text{S O}_4$ で乾燥させ、溶媒を除去し、樹状イソルミノール コンジュゲートを得た。

20

【0087】

樹状イソルミノール コンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、活性化エステル - 末端化 dendrimer (例えば、P A M A M - C O N H S) 100 mg の $\text{C H}_2 \text{C l}_2$ 15 ml の攪拌溶液に、N - (4 - アミノブチル) - N - エチルイソルミノール (A B E I、1.01 eq イソルミノール / 活性化エステル末端基) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{C H}_2 \text{C l}_2$ で希釈し 75 ml とし、水 (3 x 30 ml) 及び飽和 $\text{N a}_2 \text{C O}_3$ (3 x 30 ml) で洗浄した。有機層を $\text{N a}_2 \text{S O}_4$ で乾燥させ、溶媒を除去し、樹状イソルミノール コンジュゲートを得た。

30

【0088】

樹状アクリジニウムエステル コンジュゲートの合成

アミノ末端化 dendrimer (例えば、P A M A M - N H₂ 又は P E I 星形 dendrimer) 100 mg、及び活性化カルボキシラート末端化リンカーを有するアクリジニウムエステル 1 mol 当量の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C、1.0 eq / カルボン酸末端基) 又は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C I、1.0 eq / カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物をろ過により又は (E D C I ウレア副生物を) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗樹状アクリジニウムエステルをクロマトグラフィーにより精製した。

40

【0089】

樹状アクリジニウムスルホニルアミド コンジュゲートの合成

アミノ末端化 dendrimer (例えば、P A M A M - N H₂ 又は P E I 星形 dendrimer) 100 mg、及び活性化カルボキシラート末端化リンカーを有するアクリジニウムスルホニルアミド 1 mol 当量の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C、1.0 eq / カルボン酸末端基) 又は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C I、1.0 eq / カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物をろ過により又は (E D C I ウレア副生物を) 水洗により除去し、有機溶

50

媒を蒸発させ、粗樹状アクリジニウムスルホニルアミドをクロマトグラフィーにより精製した。

【0090】

脱リン酸化ジオキセタンの化学発光半減期の測定

樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(0.004 mM)の1 mlのアリコート、0.1 Mジエタノールアミン、1 mM $MgCl_2$ 、pH 10中で、30分間に平衡させた。アルカリホスファターゼを(1.05×10^{-9} Mの最終濃度で)試験管に加え、化学発光シグナルキネティクスを、ターナー(Turner)TD-20E照度計で、10~20分間測定した。半減期は、 $\log RLU$ 対時間のプロットから計算された。化学発光半減期はまたSapphire-II(商標)エンハンサー(0.1 Mジエタノールアミン、1 mM $MgCl_2$ 、10%ポリビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド qt 1 mg/ml)の存在下でも測定された。

10

【0091】

脱リン酸化ジオキセタンの最大光強度の測定

樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(0.004 mM)の0.5 mlのアリコート、0.1 Mジエタノールアミン、1 mM $MgCl_2$ 、pH 10中で、30分間に平衡させた。アルカリホスファターゼを(1.05×10^{-9} Mの最終濃度で)試験管に加え、化学発光シグナルを、ターナー(Turner)TD-20E照度計で、10~20分間測定した。最大光強度を記録した。最大光強度をまた、Sapphire-II(商標)エンハンサー(0.1 Mジエタノールアミン、1 mM $MgCl_2$ 、10%ポリビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド qt 1 mg/ml)の存在下でも測定した。

20

【0092】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、以下のようにTSHアッセイに用いてもよい。

【0093】

原料

マウスモノクローナル抗TSH抗体を、検体捕獲用1/8インチビーズをコートするのに用いた。マウスモノクローナル抗TSH抗体を、アルカリホスファターゼと結合させ、検出抗体として用いた。TSHは、Calbiochem(カタログNo. 609396)から得られ、BSA(タイプV-脂肪酸フリー)は、Sigma(カタログNo. A6003)から得られた。検体及びコンジュゲートに使用した緩衝溶液は、0.1 Mトリス-HCl、1 mM $MgCl_2$ 、及び2重量%のBSA(pH 7.5)を含有した。基質緩衝溶液は、0.1 Mトリス、0.1 mM $MgCl_2$ 、0.1重量%のBSA(pH 9.5)、及び化学発光化合物として樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(50 $\mu g/ml$)を含有することができた。

30

【0094】

プロトコール

TSHを含有する検体溶液15 μl を、コンジュゲート抗体溶液135 μl と混合した。上述のようにコートされた2つの1/8インチビーズを、溶液に加え、23分間で2時間インキュベートした。次いで、ビーズを0.1 Mトリス(pH 7.5)で4回洗浄し、反応チューブに移した。上述の基質緩衝溶液に用いられた同じ化学発光化合物200 μl をチューブに加えた。20分間のインキュベート後、Berthold Clinilumat Luminescence Analyzerを用いて10秒カウントとして発光を記録した。

40

【0095】

加えて、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、ヒトIgG、hCG、血清アルカリホスファターゼ、フェトプロテイン、TSH、又は評価される任意の物質に関するアッセイに、米国特許第4,978,614号に開示されたプロトコールに従って、用いてもよく、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

【0096】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、以下のような核酸ハイブリッド形成アッセイに用いてもよい。

50

【 0 0 9 7 】

サイトメガロウィルスの混入が疑われる脳脊髄液 (C S F) のサンプルを集め、ニトロセルロース膜上に配置した。次いでサンプルを、ウレア又はグアニジニウムイソチオシアナートで化学的に処理し細胞壁を破壊し、ウィルスDNAを除いた全ての細胞成分を分解した。このように得られたウィルスDNAのストランドを分離し、ニトロセルロースフィルターに接着させた。次いでウィルスDNAに特異的にかつアルカリホスファターゼで標識されたDNAプローブをフィルターに適用した。プローブは、相補的ウィルスDNAストランドとハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後、フィルターを0.2M NaCl及び0.1mM トリス - HCl (pH 8.10) を含有する水性緩衝溶液で洗浄し、過剰のプローブ分子を除去した。ホスファート含有樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを加え、ジオキセタンの酵素分解により得られた冷光を、照度計で測定するか、又は写真フィルムで検出した。

10

【 0 0 9 8 】

本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを、米国特許第4,978,614号に開示された任意のDNAプローブアッセイに用いてもよく、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

【 0 0 9 9 】

本発明の上記の議論は、主として好ましい実施態様及びその手段に関する。本明細書に記載されたコンセプトの現実の実施における、さらなる変更及び修飾は、本発明の意図及び範囲から逸脱することなく容易になされうることが、当業者には容易に明らかであろう。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 0 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendriマーの構造を示すが、ここで：図 1 A は、NH₂ の表面基を有するポリアミドアミン (P A M A M) dendriマーを示す。

【 図 1 B 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendriマーの構造を示すが、ここで：図 1 B は、カルボン酸の表面基を有するポリアミドアミン (P A M A M) dendriマーを示す。

【 図 1 C 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendriマーの構造を示すが、ここで：図 1 C は、ヒドロキシルの表面基を有するポリアミドアミン (P A M A M) dendriマーを示す。

30

【 図 1 D 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendriマーの構造を示すが、ここで：図 1 D は、NH₂ の表面基を有するポリプロピレンイミン (P E I) dendriマーを示す。

【 図 2 A 】 図 2 A は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 B 】 図 2 B は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 C 】 図 2 C は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 D 】 図 2 D は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 E 】 図 2 E は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 F 】 図 2 F は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 G 】 図 2 G は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 H 】 図 2 H は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

40

【 図 2 I 】 図 2 I は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 J 】 図 2 J は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 K 】 図 2 K は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 L 】 図 2 L は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 3 A 】 図 3 A は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 B 】 図 3 B は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 C 】 図 3 C は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 D 】 図 3 D は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 E 】 図 3 E は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 F 】 図 3 F は、本発明の樹状ポリマー-ジオキセタンコンジュゲートを示す。

50

- 【図 3 G】図 3 G は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 H】図 3 H は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 I】図 3 I は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 J】図 3 J は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 K】図 3 K は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 L】図 3 L は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 M】図 3 M は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 N】図 3 N は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 O】図 3 O は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 4 A】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 A は、図 3 A および図 3 G に対応する。 10
- 【図 4 B】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 B は、図 3 B および図 3 H に対応する。
- 【図 4 C】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 C は、図 3 C および図 3 I に対応する。
- 【図 4 D】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 D は、図 3 D および図 3 J に対応する。
- 【図 4 E】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 E は、図 3 E および図 3 K に対応する。
- 【図 4 F】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 F は、図 3 F および図 3 L に対応する。 20
- 【図 5 A】図 5 A は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 B】図 5 B は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 C】図 5 C は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 D】図 5 D は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。
- 【図 5 E】図 5 E は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。
- 【図 5 F】図 5 F は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (P E I) 星形 dendrimer を示す。 30
- 【図 5 G】図 5 G は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 5 H】図 5 H は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 5 I】図 5 I は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 A】図 6 A は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 B】図 6 B は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 C】図 6 C は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 D】図 6 D は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。 40
- 【図 6 E】図 6 E は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 F】図 6 F は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 G】図 6 G は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 H】図 6 H は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 I】図 6 I は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコン 50

ジュゲートを示す。

【図 6 J】図 6 J は、本発明の複数のアクリジニウムエステル部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 K】図 6 K は、本発明の複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 L】図 6 L は、本発明の複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 M】図 6 M は、本発明の複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 N】図 6 N は、本発明の複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (P E I) 星形 dendrimer を示す。 10

【図 6 O】図 6 O は、本発明の複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (P E I) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 P】図 6 P は、本発明の dendrimer とアクリダン部分のコンジュゲートを示す。

【図 6 Q】図 6 Q は、本発明の dendrimer とアクリダン部分のコンジュゲートを示す。

【図 6 R】図 6 R は、本発明の dendrimer とアクリダン部分のコンジュゲートを示す。

【図 7 A】図 7 A は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートの合成を示す。

。

【図 7 B】図 7 B は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートの合成を示す。

。

【図 7 C】図 7 C は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートの合成を示す。

。

【図 8 A】図 8 A は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステルコンジュゲートの合成を示す。

【図 8 B】図 8 B は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステルコンジュゲートの合成を示す。

【図 8 C】図 8 C は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステルコンジュゲートの合成を示す。

【図 8 D】図 8 D は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホンアミドコンジュゲートの合成を示す。 30

【図 8 E】図 8 E は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホンアミドコンジュゲートの合成を示す。

【図 8 F】図 8 F は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホンアミドコンジュゲートの合成を示す。

【図 9 A】図 9 A は、本発明のジオキセタン及びイソルミノール部分と結合した、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

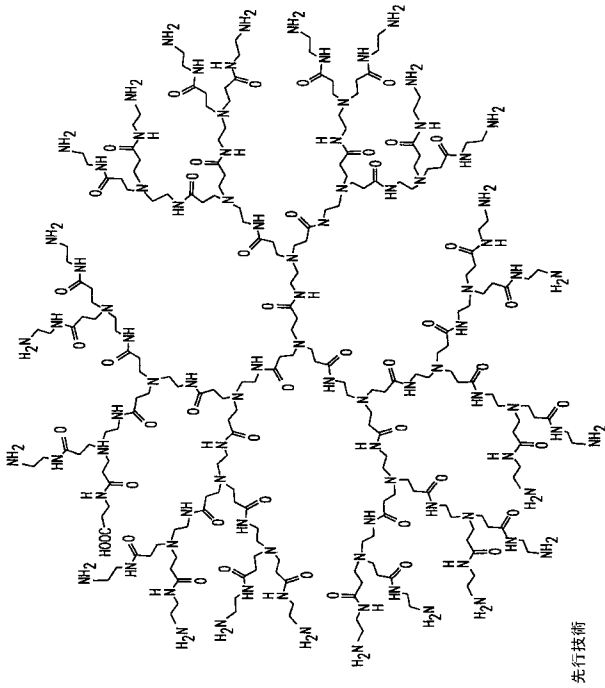
【図 9 B】図 9 B は、本発明のジオキセタン及びアクリジニウムエステル部分と結合した、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。

【図 9 C】図 9 C は、本発明のジオキセタン及びアクリジニウムスルホンアミド部分と結合した、ポリアミドアミン (P A M A M) 星形 dendrimer を示す。 40

【図 10】図 10 は、本発明の結合したジオキセタン及び第四級アミンエンハンサーを示す。

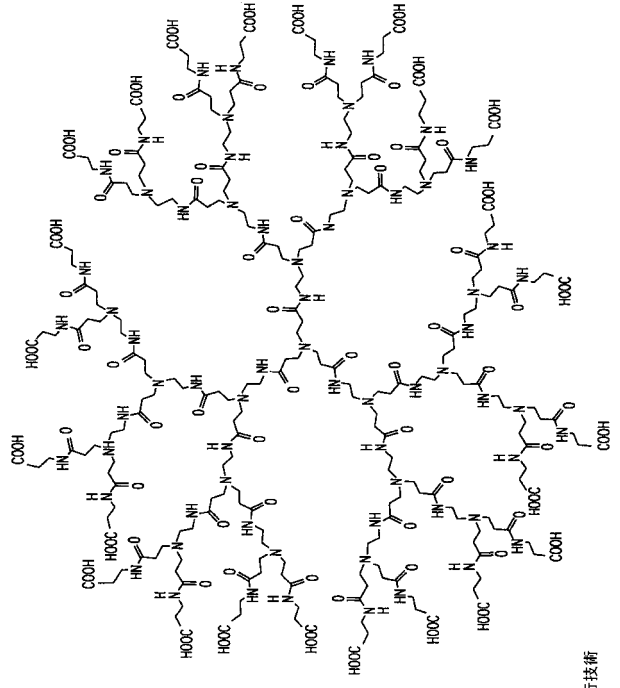
【図 11】図 11 は、本発明の樹状ジオキセタンエンハンサーハイブリッドを示す。

【 図 1 A 】



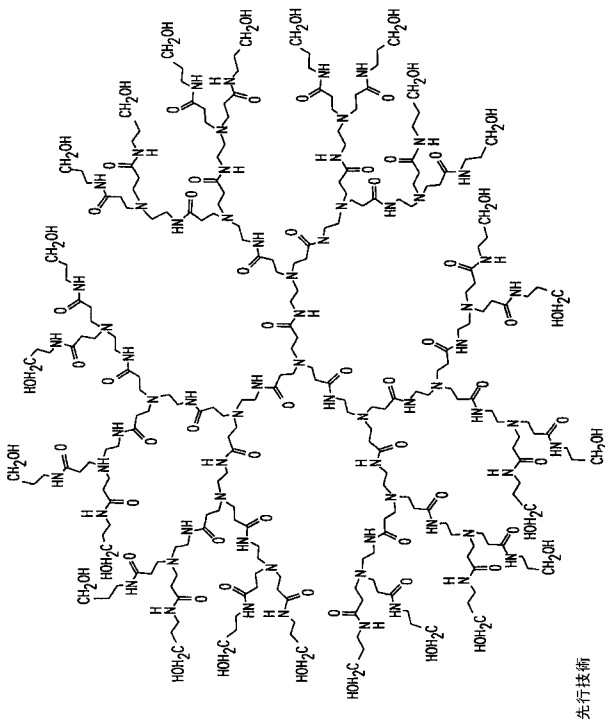
先行技術

【 図 1 B 】



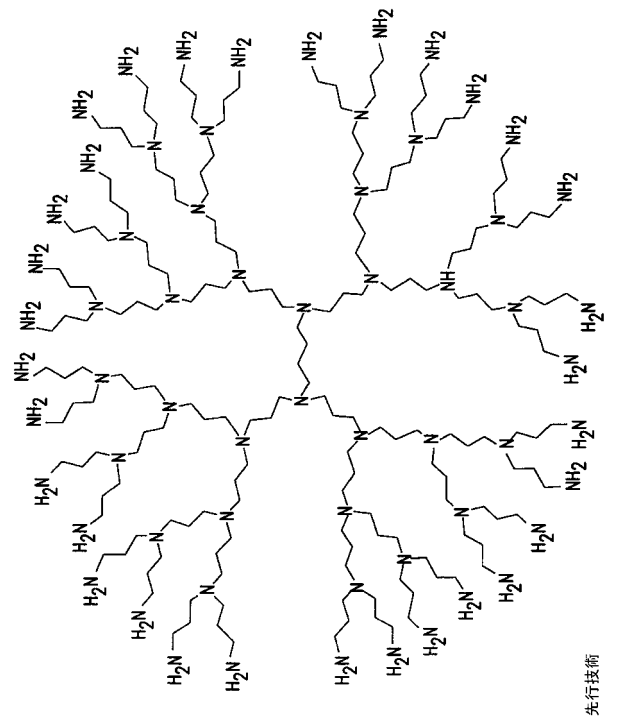
先行技術

【 図 1 C 】



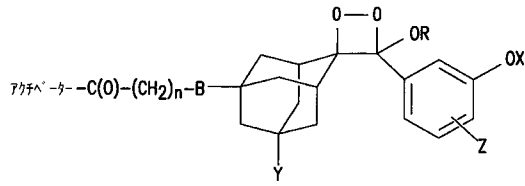
先行技術

【 図 1 D 】

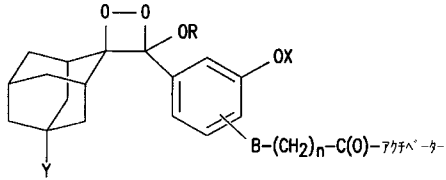


先行技術

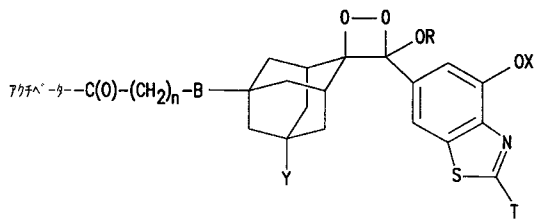
【 図 2 B 】



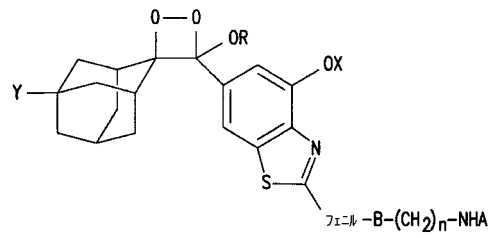
【 図 2 E 】



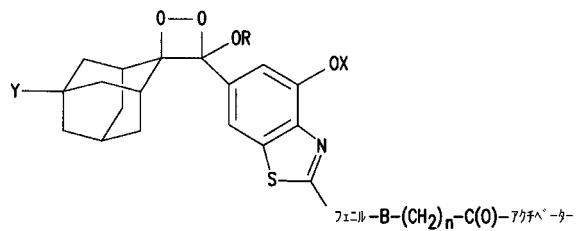
【 図 2 H 】



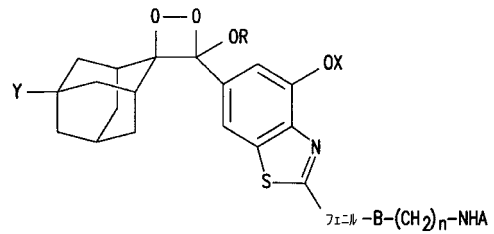
【 図 2 J 】



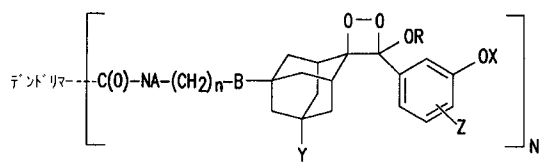
【 図 2 K 】



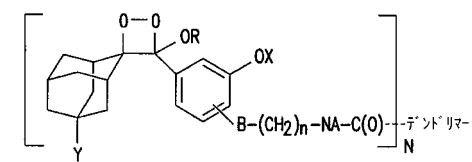
【 図 2 L 】



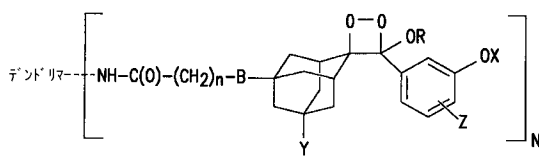
【 図 3 A 】



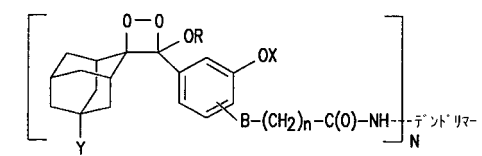
【 図 3 E 】



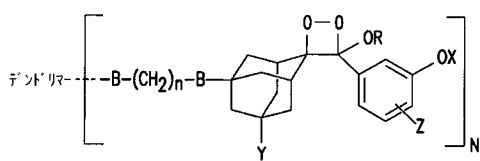
【 図 3 B 】



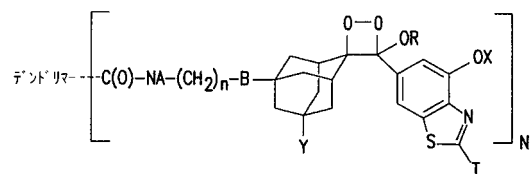
【 図 3 F 】



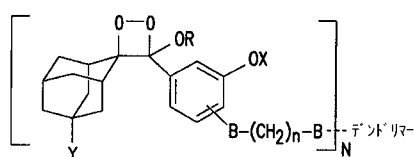
【 図 3 C 】



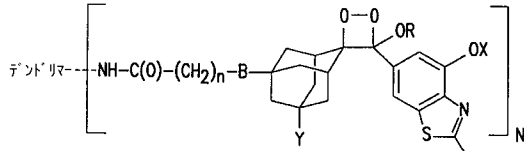
【 図 3 G 】



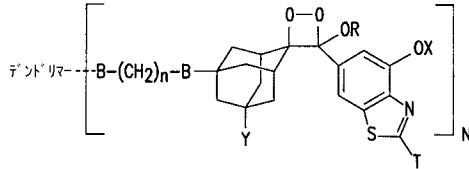
【 図 3 D 】



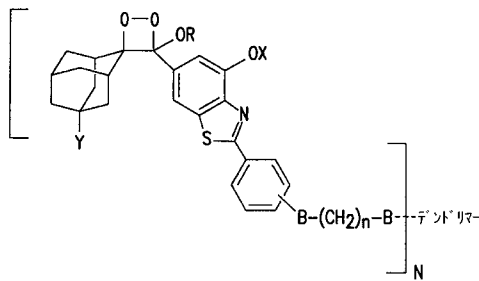
【 図 3 H 】



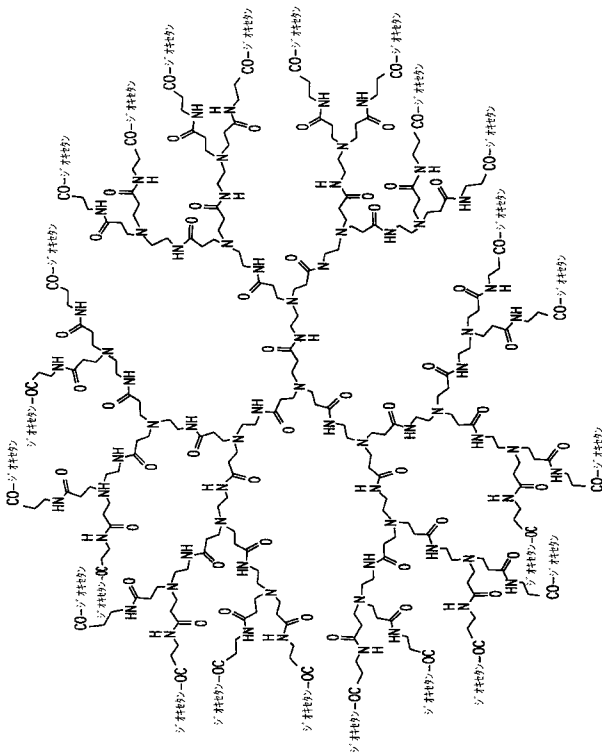
【 図 3 I 】



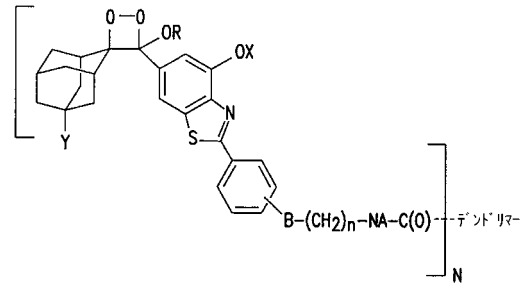
【 図 3 J 】



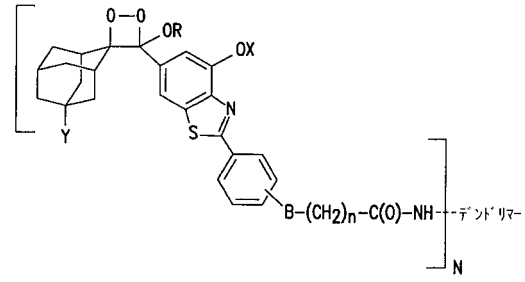
【 図 3 M 】



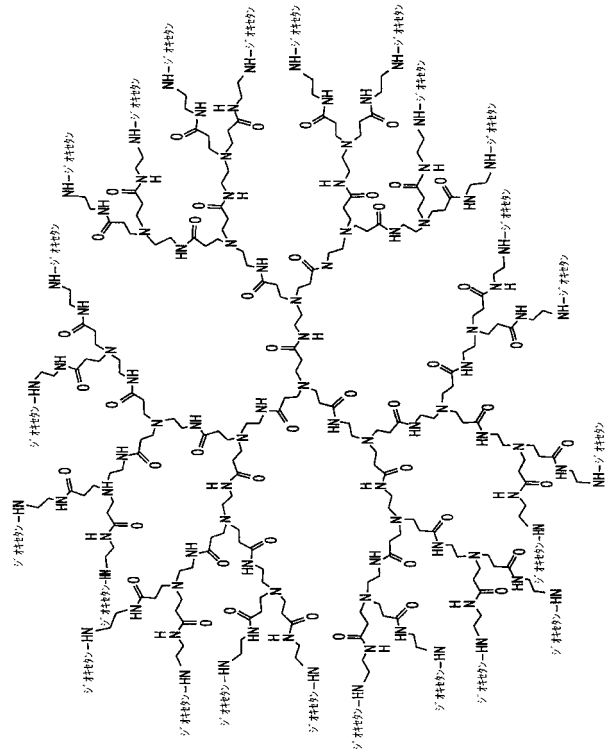
【 図 3 K 】



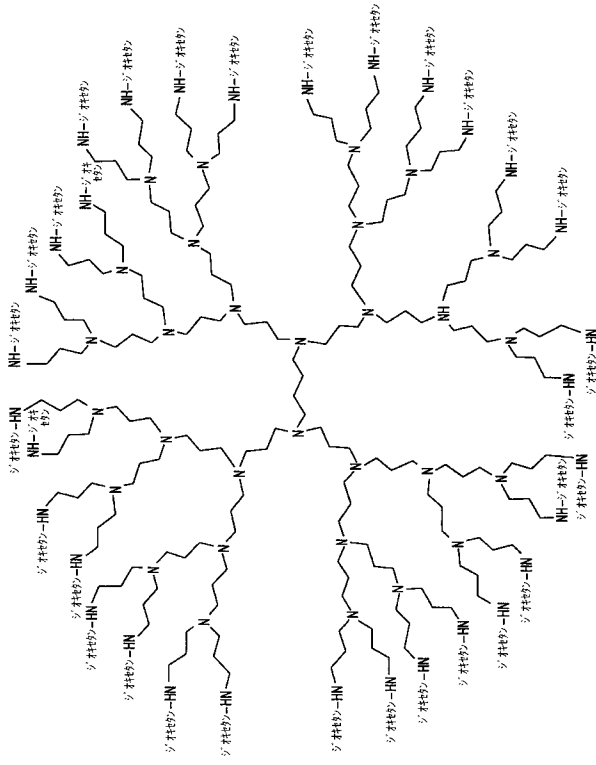
【 図 3 L 】



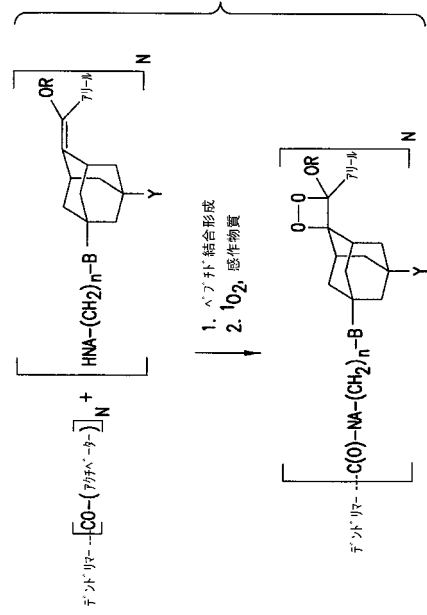
【 図 3 N 】



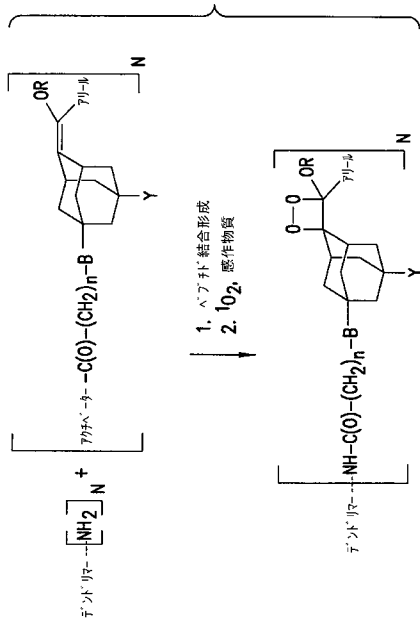
【 図 30 】



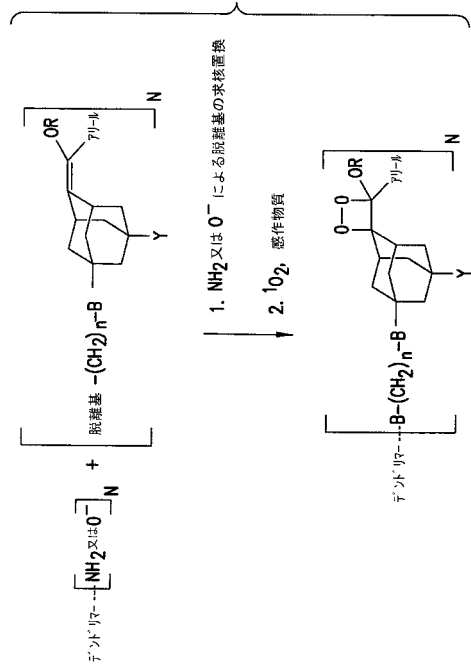
【 図 4 A 】



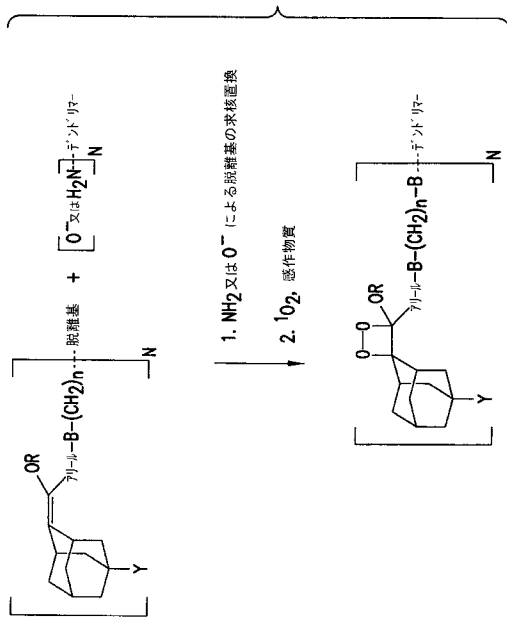
【 図 4 B 】



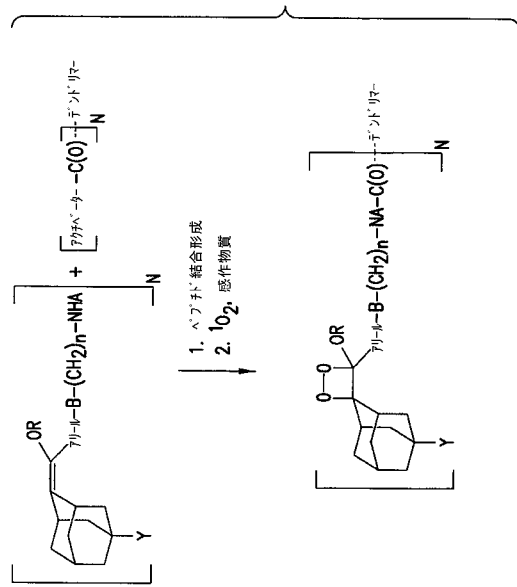
【 図 4 C 】



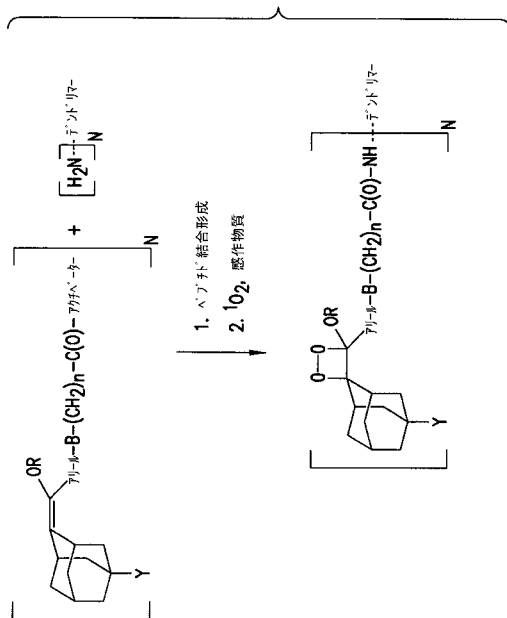
【 図 4 D 】



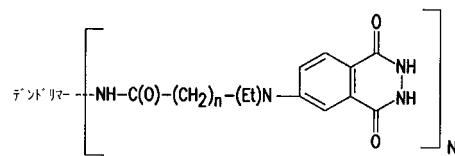
【 図 4 E 】



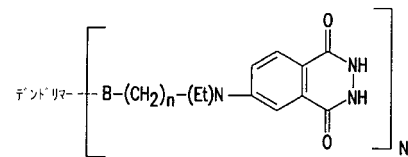
【 図 4 F 】



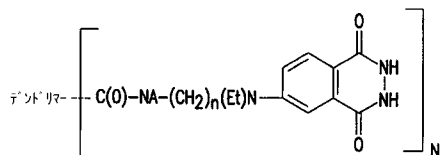
【 図 5 B 】



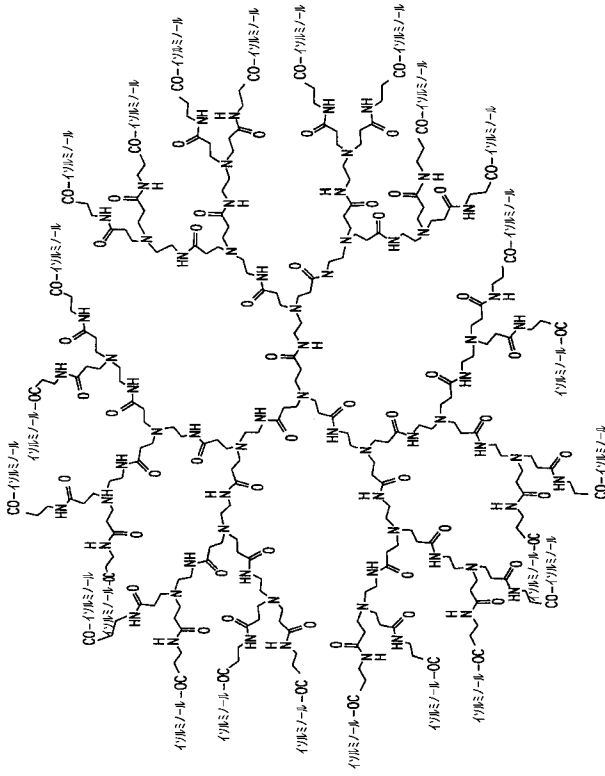
【 図 5 C 】



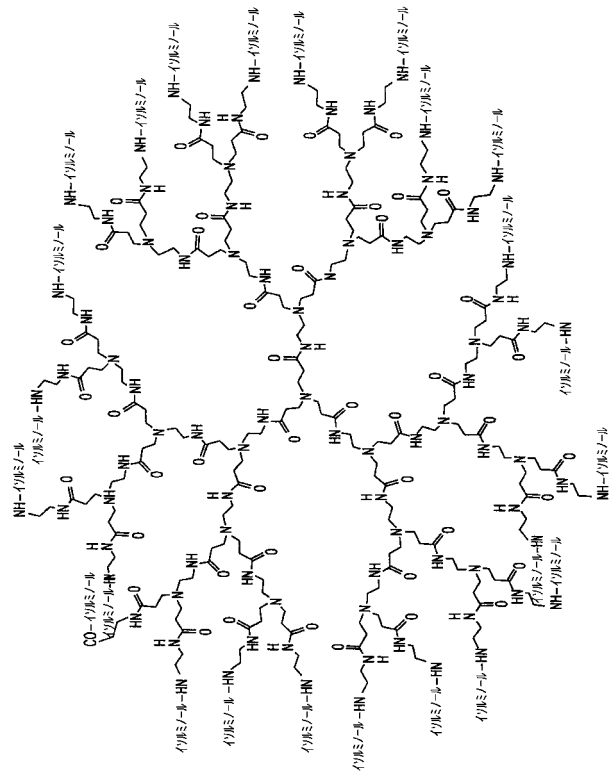
【 図 5 A 】



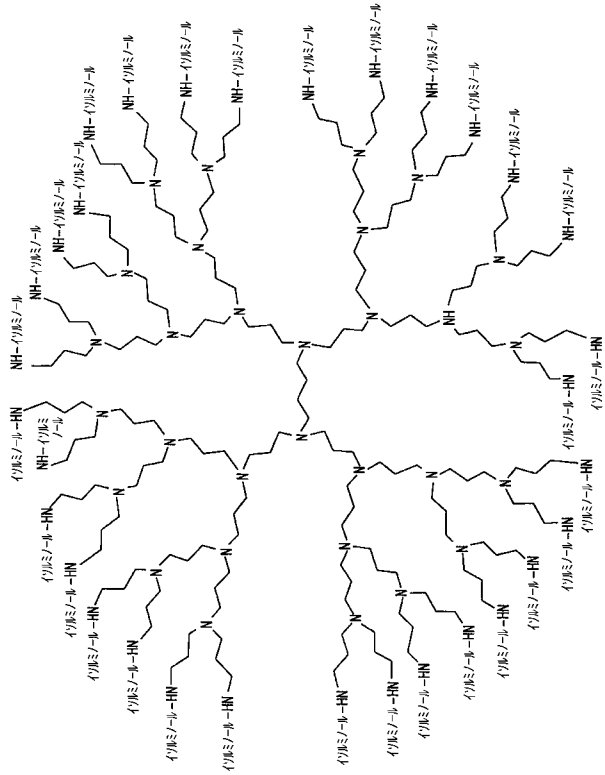
【 図 5 D 】



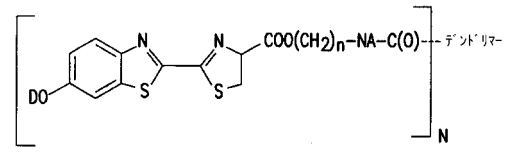
【 図 5 E 】



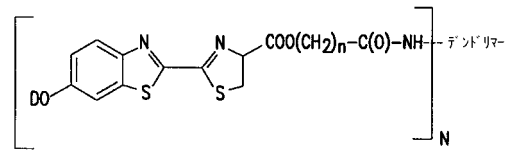
【 図 5 F 】



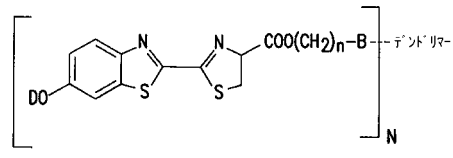
【 図 5 G 】



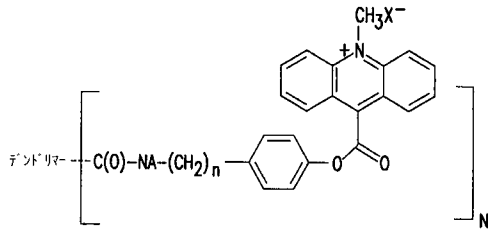
【 図 5 H 】



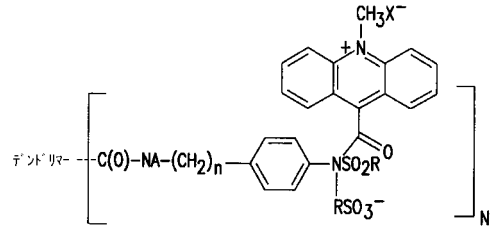
【 図 5 I 】



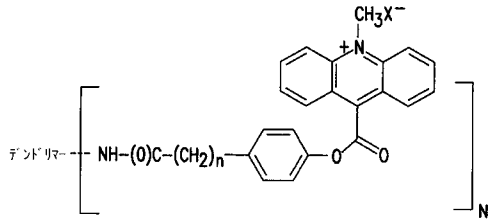
【 図 6 A 】



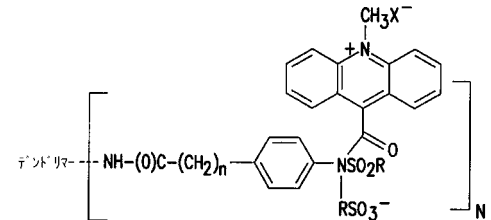
【 図 6 D 】



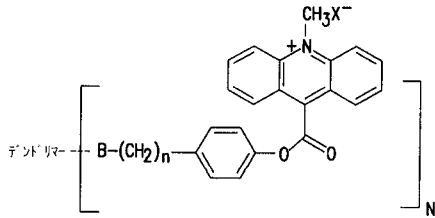
【 図 6 B 】



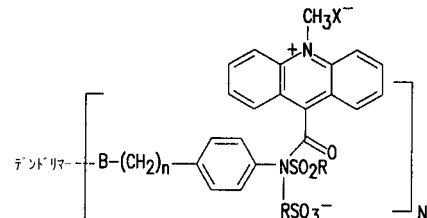
【 図 6 E 】



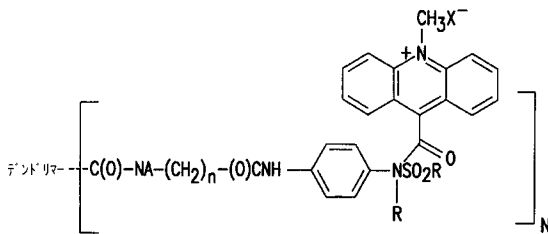
【 図 6 C 】



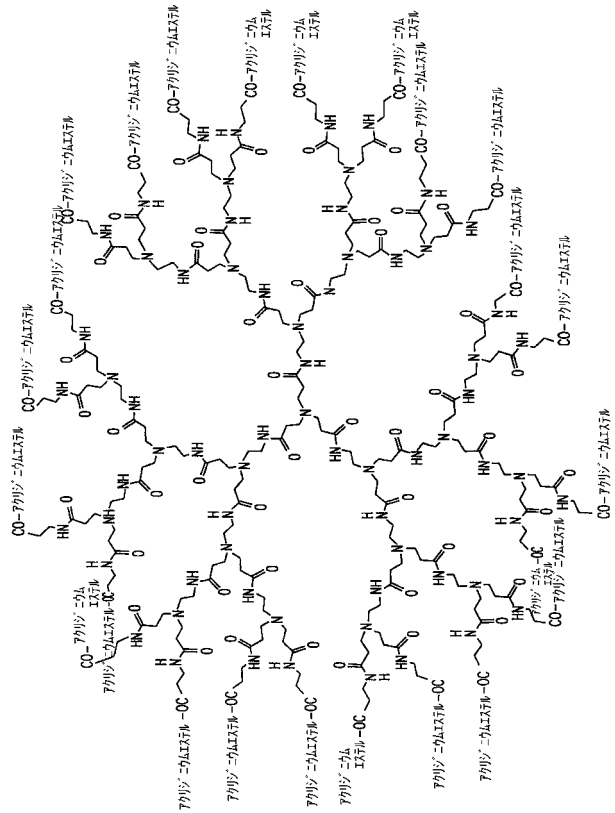
【 図 6 F 】



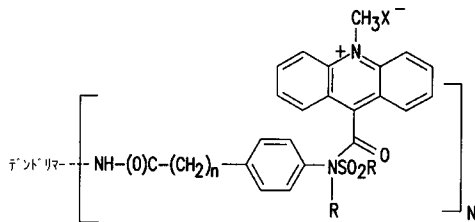
【 図 6 G 】



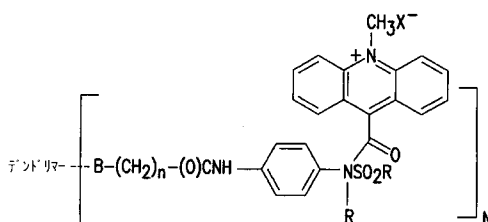
【 図 6 J 】



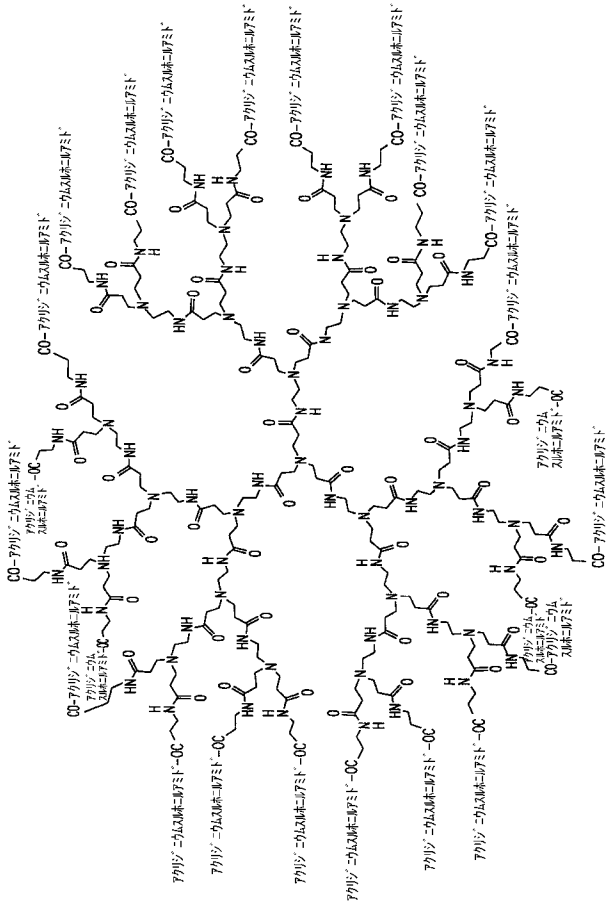
【 図 6 H 】



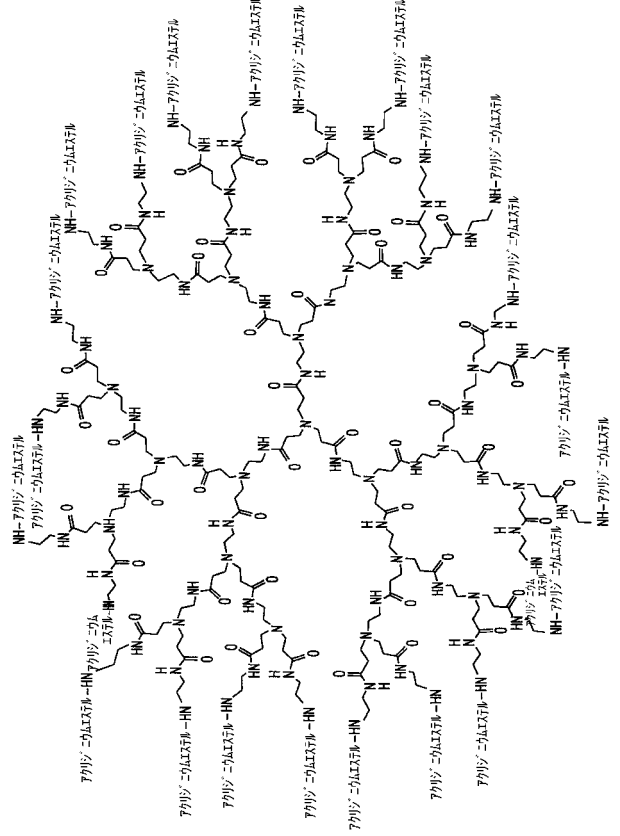
【 図 6 I 】



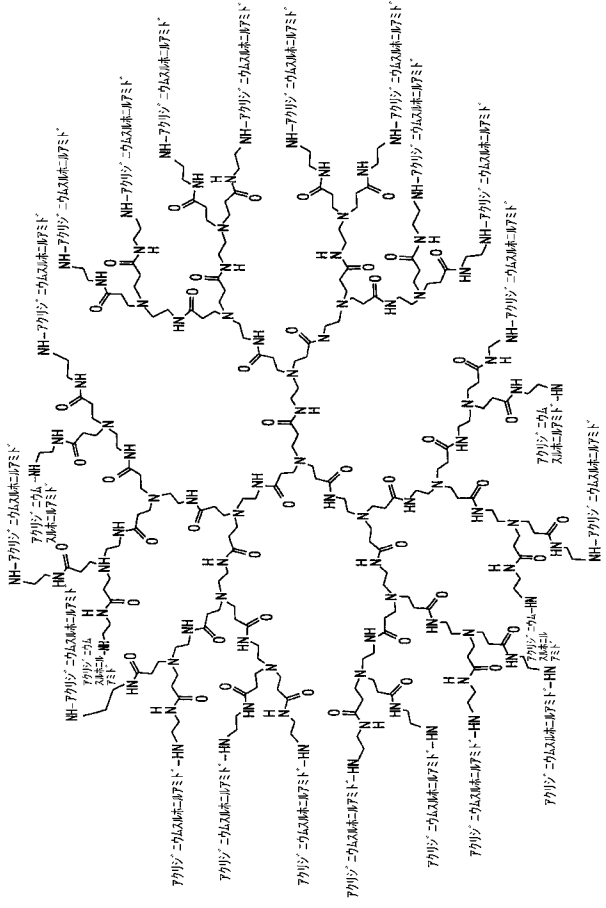
【 6 K 】



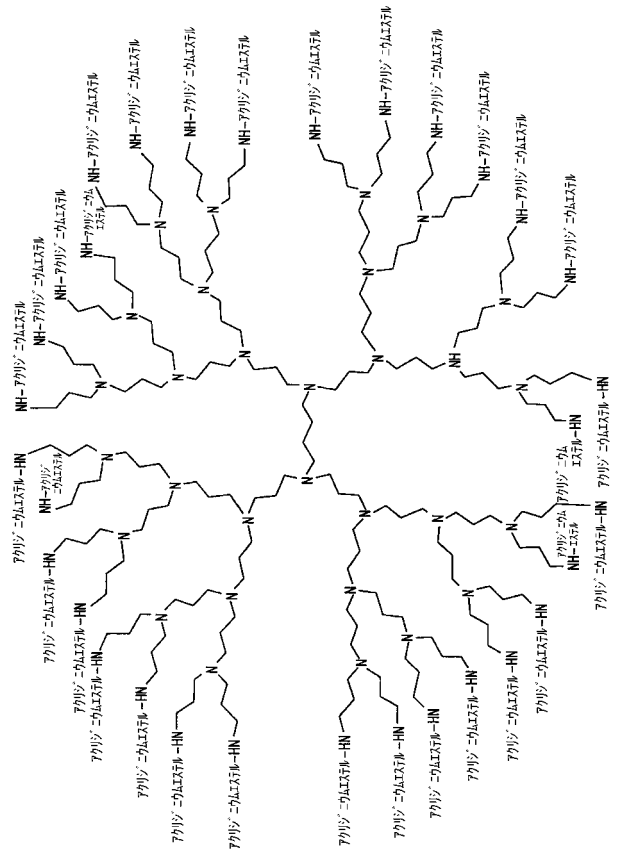
【 6 L 】



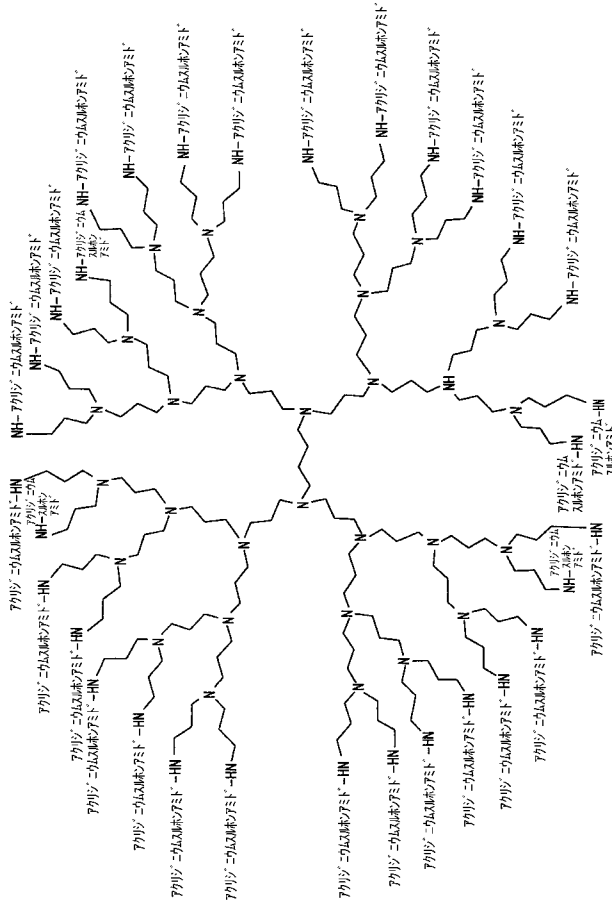
【 6 M 】



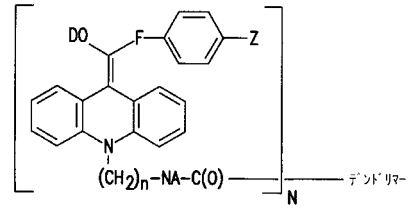
【 6 N 】



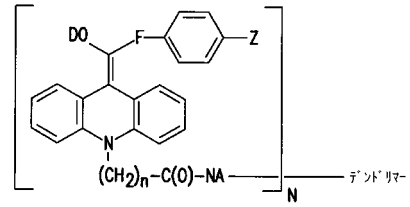
【 図 6 O 】



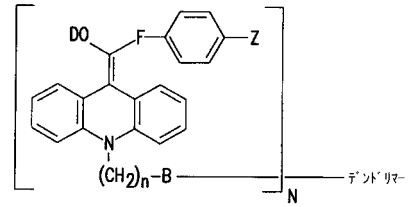
【 図 6 P 】



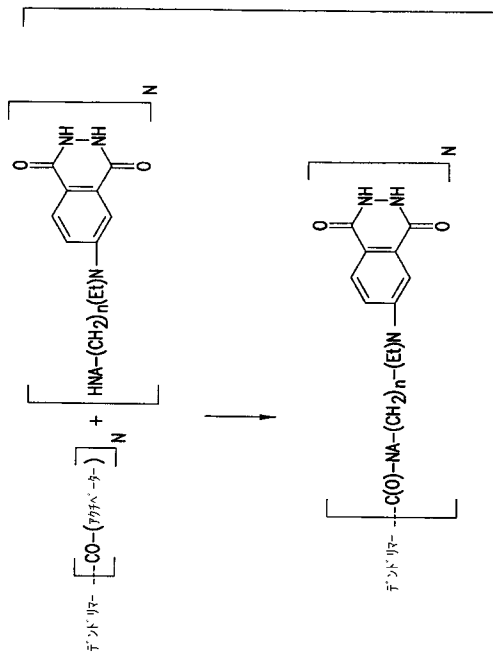
【 図 6 Q 】



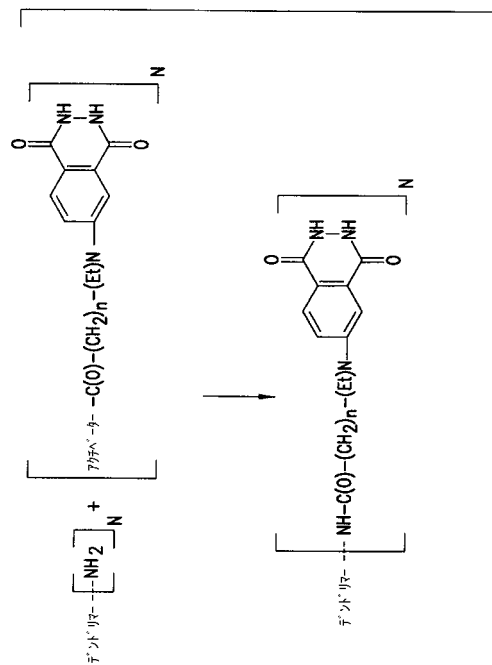
【 図 6 R 】



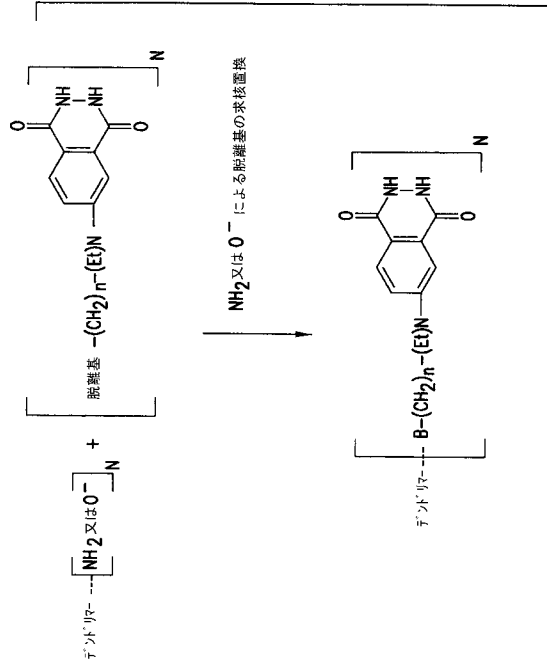
【 図 7 A 】



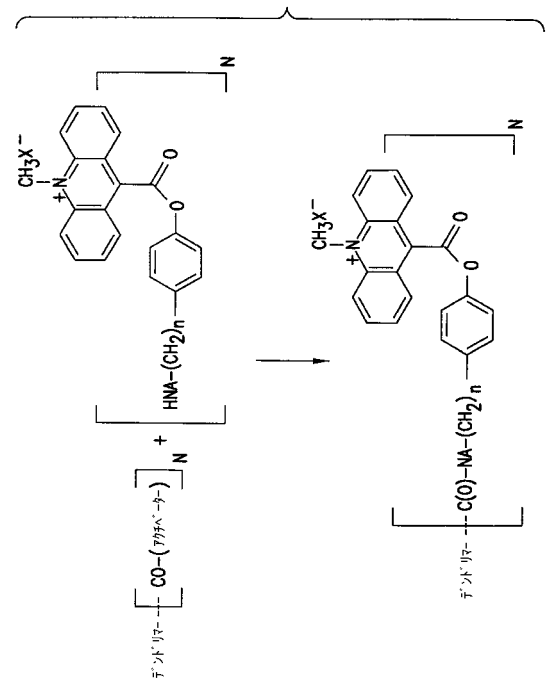
【 図 7 B 】



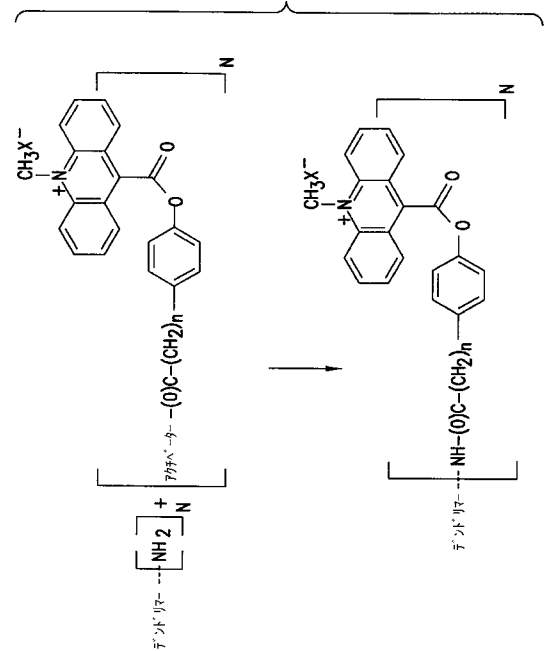
【図7C】



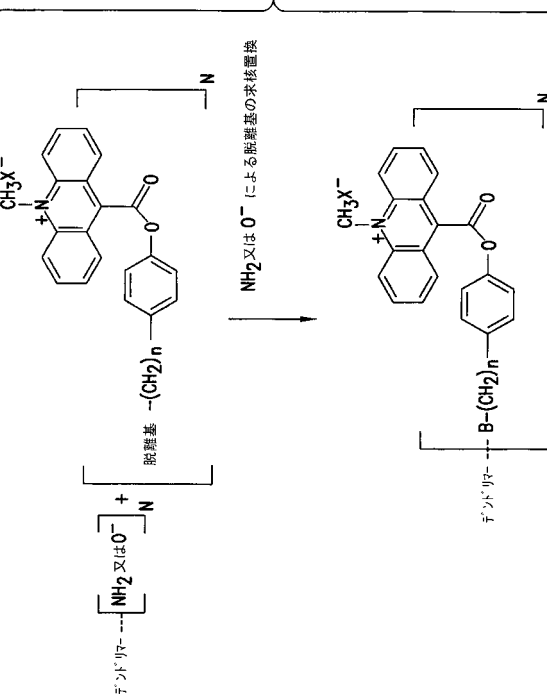
【図8A】



【図8B】



【図8C】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057745 A2

- (51) International Patent Classification: G01N (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/00022
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/259,870 8 January 2001 (08.01.2001) US
60/286,383 26 April 2001 (26.04.2001) US
- (71) Applicant: TROPIX, INC. [US/US]; 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

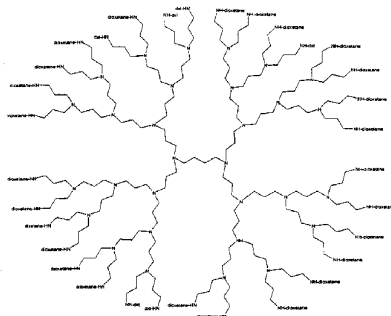
(72) Inventor: SPARKS, Alison, L.; 325 Johnson Street, North Andover, MA 01845 (US).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

(74) Agents: KELBER, Steven, B. et al.; Piper Marbury Rudnick & Wolfe LLP, 1200 Nineteenth Street, N.W., Washington, DC 20036 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DENDRITIC CHEMILUMINESCENT SUBSTRATES



(57) Abstract: Chemiluminescent substrate delivery systems comprising a conjugate a dendrimer and at least one chemiluminescent substrate are provided. The substrate delivery systems can also include a chemiluminescence enhancer. The dendrimer/chemiluminescent substrate conjugates can be used in kits including an enzyme capable of activating the chemiluminescent substrate to produce a peroxygenated intermediate that decomposes to produce light. The dendrimer/chemiluminescent substrate conjugates can be used in assays to detect the presence of an analyte (e.g., an enzyme, an antibody, an antigen or a nucleic acid) in a sample.

WO 02/057745 A2

WO 02/057745

PCT/US02/00022

TITLE OF THE INVENTION**DENDRITIC CHEMILUMINESCENT SUBSTRATES****CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS**

5 This application is based on U.S. Provisional Application No. 60/259,870, filed January 8, 2001, and U.S. Provisional Application No. 60/286,383, filed April 26, 2001.

BACKGROUND OF THE INVENTION**Field of the Invention**

10 The present invention concerns dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates; synthesis of dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates; compositions containing dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates; and methods of using dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates. The invention also concerns the use of enhancer substances in
15 combination with the dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates. The dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates and enhancer dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates, which amplify the detectable chemiluminescent signal by coupling multiple (i.e., from 3 to 3072) enzyme activable chemiluminescent substrates, are useful in detecting the presence
20 or determining the concentration of chemical or biological substances in immunoassays, chemical assays and nucleic acid probe assays, and in

WO 02/057745

PCT/US02/00022

chemical/physical probe procedures for studying the microstructures of macromolecules, including synthetic polymers, proteins, nucleic acids and the like.

Background of the Technology

Dendritic polymers (otherwise known as "dendrimers") are uniform
5 polymers, variously referred to in the literature as hyperbranched dendrimers, arborols, fractal polymers and starburst dendrimers, having a central core, an interior dendritic (hyperbranched) structure and an exterior surface with end groups. These polymers differ from the classical linear polymers both in form and function. Linear polymer chemistry results from chaotic, uncontrolled processes
10 that yield a distribution of product species from microscopic to macroscopic size. The molecular linearity of the polymers produces a heavily entangled macromolecular population that defines macroscopic behavior such as sharply increasing viscosity with increased molecular weight, mediocre chemical reactivity due to hidden sites in random coils and variable or mediocre solubility. In contrast,
15 dendrimer chemistry constructs macromolecules with tight control of size, shape topology, flexibility and surface groups. In what is known as divergent synthesis, these macromolecules start by reacting an initiator core in high-yield iterative reaction sequences to build symmetrical branches radiating from the core with well-defined surface groups. Alternatively, in what is known as convergent
20 synthesis, dendritic wedges are constructed from the periphery inwards towards a focal point and then several dendritic wedges are coupled at the focal points with a polyfunctional core. Dendritic syntheses form concentric layers, known as generations, with each generation doubling the molecular mass and the number of

WO 02/057745

PCT/US02/00022

reactive groups at the branch ends so that the end generation dendrimer is a highly pure, uniform monodisperse macromolecule that solubilizes readily over a range of conditions. For the reasons discussed below, dendrimer molecular weights range from 300 to 700,000 daltons and the number of surface groups (e.g., reactive sites for coupling) range from 3 to 3072.

As dendrimers grow with each generation, the steric constraints from congestion of the branches force the polymer shape to change from a starfish-shaped molecule to a globular molecule. For example, with starburst polyamidoamine ("PAMAM") dendrimers, generations 0-3 are dome-shaped, generation 4 is a transition generation with an oblate spheroid shape, and generations 5 and greater are symmetrically spherical with a hollow interior and a surface skin. This change of shape, from domes to spheres, with increasing size (caused by increasing surface congestion at the branch ends) is a general feature of dendritic polymers.

Dendritic growth, shape and topology are controlled by the core, the interior branch structure and the surface groups. Dendrimers expand symmetrically in a way that maintains a constant terminal surface group area. For example, with starburst dendrimers the surface group $-\text{CO}_2\text{Me}$ requires $93 \text{ \AA}^2/\text{group}$ whereas the surface group $-\text{NH}_2$ requires $150 \text{ \AA}^2/\text{group}$. Terminal groups with greater steric bulk, such as NH_2 , promote greater core hollowness by surface steric interaction as observed with the PAMAMs. In contrast, polyether starburst dendrimers become congested within 3 generations with very little internal cavity. In general, dendritic growth becomes self-limiting as steric congestion of the surface reactive sites

WO 02/057745

PCT/US02/00022

precludes further chemical modification; for PAMAM starburst dendrimers this occurs at generations 9 - 10.

As discussed herein, dendritic surfaces can have from 3 to 3072 end groups available for surface chemistry; the number of end groups depending on the type of dendrimer structure (which defines steric congestion) and the dendrimer generation. Amino (NH_2) terminated dendrimers react with, e.g., Michael acceptors ($\text{CH}_2=\text{CHCO}_2\text{R}$), α -haloesters, epoxides, aziridines, activated carboxylic acids, acid chlorides, benzyl halides, carbonates and aldehydes. Hydroxyl (OH) terminated dendrimers react with, e.g., halosulfonic esters, activated carboxylic acids and acid chlorides. Ester and acid (CO_2R , CO_2H) terminated dendrimers react with, e.g., amines and halide terminated dendrimers react with, e.g., amines and alkoxide and thioalkoxide anions. Other reactive surface groups include carboxyhalide, imino, imido, alkylamino, dialkylamino, alkylarylamino, cyano, sulfonic esters, dithiopyridyl and sulfhydryl, among others. Chemical reactions on the dendrimer surface usually occur as readily as with single organic molecules, with high specificity and high yields, as long as there is no steric congestion on the surface. Structures of commercially available dendrimers, which include the Starburst PAMAM dendrimers (NH_2 -terminated, OH-terminated and CO_2R -terminated) and Astramol PEI dendrimers (NH_2 -terminated), which are shown in Figures 1A to 1D are available from Aldrich Chemical Co., Dendritech Inc. and DSM Fine Chemicals. In addition, many other dendritic polymers with reactive surface groups have been synthesized and reported in the literature (for a review, see, for example, "Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives," G.R.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Newkome, C.N. Moorefield, F. Vogtle, VCH Publishers, Inc. New York (1996) and references cited at the end of this application).

In recent years, it has been found that the size, shape and properties of dendritic polymers can be molecularly tailored to meet specialized end uses.

5 Dendritic polymers thus have significant advantages which can provide a means for the delivery of high concentrations of carried material per unit of polymer, controlled delivery, targeted delivery and/or multiple species delivery or use.

U.S. Patents Nos. 5,338,532; 5,527,524 and 5,714,166 disclose dense star polymers or starburst polymers associated with a variety of materials, including
10 drugs, toxins, metal ions, radionuclides, signal generators, signal reflectors, chelated metal, signal absorbers, antibodies, hormones, biological response modifiers, diagnostic opacifiers, fluorescent moieties and scavenging agents; processes for preparing the conjugates; compositions containing the conjugates; and methods of using the conjugates.

15 U.S. Patent No. 5,482,698 discloses methods for detecting or treating lesions that includes a polymer comprising multiple avidin or biotin binding sites; adding a detection or therapeutic agent to the avidin or biotin; and detecting or treating the lesion.

U.S. Patents Nos. 5,443,953 and 5,635,603 disclose a soluble
20 immunoconjugate that includes a glycosylated antibody fragment, and an intermediate conjugate comprising a polymer carrier having at least one free amine group and a detectable label molecule covalently bound to the polymer carrier.

None of the references cited above disclose the association of dendritic polymers with chemiluminescent substrates.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

1,2-dioxetane enzyme substrates have been well established as highly efficient chemiluminescent reporter molecules for use in enzyme assays of a wide variety of types. These assays provide a preferred alternative to conventional assays that rely on radioisotopes, fluorophores, complicated color shifting, secondary reactions and the like. Dioxetanes developed for this purpose include those disclosed in U.S. Patent Nos. 4,978,614; 5,112,960; 5,538,847 and 5,582,980, as well as U.S. Application Serial No. 09/362,047 (pending). U.S. Patent No. 4,978,614 discloses, among others, 3-(2'-spiroadamantane)4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane, which is commercially available from Applied Biosystems under the trade name AMPPD[®], which is a registered trademark of PE Corporation (NY). U.S. Patent Nos. 5,112,960; 5,538,847 and 5,582,980 disclose similar compounds, wherein the adamantyl stabilizing ring is substituted, at either bridgehead position, with a variety of substituents, including hydroxy, halogen, and the like, which convert the otherwise static or passive adamantyl stabilizing group into an active group involved in the kinetics of decomposition of the dioxetane ring. Compounds of this type give a faster and stronger signal than AMPPD[®] in many applications. CSPD[®], which is a registered trademark of PE Corporation (NY), is a second-generation dioxetane with a chlorine substituent on the adamantyl group. This material is also available from Applied Biosystems. CSPD[®] gives improved light intensity and detection sensitivity. U.S. Application Serial No. 09/362,047 discloses enzymatically cleavable chemiluminescent 1, 2-dioxetanes that emit in wavelengths close to the red or green end of the visible spectrum. Each of the patents and applications cited in this paragraph are incorporated herein by reference in their entirety.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Reactions that produce chemiluminescence exemplify yet another instance in which the medium, although not the message, can determine the intensity of the message transmitted. Chemiluminescent compounds that, upon decomposition in substances such as moderately polar or polar aprotic organic solvents, e.g.,

5 n-butanol, acetonitrile, dimethylsulfoxide or dimethylformamide, produce fluorophores that in turn emit light of adequate intensity for easy detection and quantitation, will produce light of considerably lessened intensity when decomposed in a polar protic environment, and especially in aqueous media. But since all biological systems are aqueous - indeed, humans are approximately 97%

10 water - the need to enhance the intensity of light produced by chemiluminescent labels or substrates in immunoassays, nucleic acid probe assays, chemical/physical probe techniques and other bioassays is obvious. One way to provide such enhancement is to use expensive optical or electronic equipment: single photon counters, luminometers, scintillation counters, etc.

15 Although dioxetanes have been particularly developed for enhanced sensitivity in assays for the presence of analytes in concentrations as low as 10^{-12} M, in certain applications, dioxetanes are used in conjunction with enhancers to detect analytes in concentrations of 10^{-12} M or lower. These enhancement agents, which include natural and synthetic water-soluble macromolecules, are disclosed in

20 detail in U.S. Patent No. 5,145,772. Preferred enhancement agents include water-soluble polymeric quaternary ammonium, phosphonium or sulfonium salts, and copolymers and/or mixtures thereof, such as poly(vinylbenzyltrimethylammonium chloride) (TMQ), poly(vinylbenzyltributylammonium chloride) (TBQ) and poly(vinylbenzyl dimethylbenzylammonium chloride) (BDMQ).

WO 02/057745

PCT/US02/00022

These enhancement agents improve the chemiluminescent signal of the dioxetane reporter molecules, apparently by providing a hydrophobic environment in which the dioxetane is sequestered. Water, unavoidable in most assays due to the use of body fluids, is a natural "quencher" of the dioxetane chemiluminescence.

5 The enhancement molecules apparently exclude water from the microenvironment in which the dioxetane molecules, or at least the excited state emitter species reside, resulting in enhanced chemiluminescence. Other effects associated with the enhancer-dioxetane interaction could also contribute to the chemiluminescence enhancement.

10 In addition to dioxetane, luminol derivatives, acridinium esters, acridinium sulfonylamides and luciferin have been employed as chemiluminescent labels in bioassays (Schroeder et al., *Anal. Chem.*, 50, 1114 (1978); Arakawa et al., *Anal. Biochem.*, 79, 248 (1979); and Arakawa et al., *Clin. Chem.*, 31, 430 (1985). For reviews, see: Kricka et al., *Clinical and Biochemical Luminescence*, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Chapter 8, Marcel Dekker, Inc., New York (1982);

15 Kricka, *Ligand-Binder Assays*, Chapter 7, Marcel Dekker, Inc., New York, (1985); McCcapra et al., *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*, Vol. I, K. Van Dyke (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1985), Chapter 2 (note, in particular, the section on dioxetanes, page 13); and

20 Barnard et al., *Ibid*, Ch. 7). The enzyme labels have been detected by color or fluorescence development techniques. More recently, chemiluminescent enzyme immunoassays have been based on peroxidase conjugates assayed with luminol/hydrogen peroxide, pyrogallol/hydrogen peroxide, Pholas dactylus luciferin, or luminol under alkaline conditions (Kricka et al., *Clinical and*

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Biochemical Luminescence, Chapter 8, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York (1982)).

By way of background, the enzymatically-activated chemiluminescent substrates are used as reporter molecules by acting as substrates for enzymes which
5 cleave an enzyme-labile group thereon. Thus, the enzyme (e.g., alkaline phosphatase) can be covalently linked or otherwise complexed with either an antigen or antibody, in conventional antigen/antibody ligand binding assays, or a nucleic acid probe in nucleic acid assays. The enzyme-bearing antigen or antibody, or nucleic acid probe, is then admixed with the analyte suspected of containing the
10 target antigen, or nucleic acid sequence, under conditions which permit complexing or hybridization between the antigen/antibody or probe/nucleic acid sequence. After washing away or separating off all noncomplexed or nonhybridized material, the chemiluminescent substrate is added. If the suspected analyte is present, the enzyme will cleave the enzyme-labile group chemiluminescent substrate, yielding
15 an intermediate that decomposes. The decomposition event is the light-releasing event.

To detect analytes in extremely low concentrations (below, e.g., about 10^{-12} M) it is desirable to improve the intensity of the signal of the chemiluminescent substrate reporter molecule, and it is simultaneously desirable to
20 avoid increasing the background noise due to nonenzymatically-induced light release, so as to improve the overall sensitivity of the assay. Thus, further improvements in the use of chemiluminescent substrates are sought.

All patents and literature that are cited in this disclosure are incorporated herein by reference.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to improve the performance of chemiluminescent substrates, including improving the machine readability, sensitivity and performance aspects of the assays, which, in turn, are dependent on the signal released by the chemiluminescent reporter.

It is another object of the invention to improve the intensity and resolution of the signal of the chemiluminescent substrates, and to simultaneously avoid increasing the background noise due to nonenzymatically-induced light release, so as to improve the overall sensitivity of the assay in order to automate clinical assays and to provide for high throughput screening on high density arrays (microarrays).

The above goals are met by a new class of dendritic polymer chemiluminescent substrates, in which the light signal is amplified by coupling one or more enzyme-activatable chemiluminescent substrates to a dendritic polymer. Signal resolution may also improve due to the frictional drag of the high molecular weight dendritic backbone, i.e., slowed molecular diffusion due to increased molecular size, shape, branching and/or cumulative charge effects, which would confine light emission to the region of substrate activation by an enzyme label.

The chemiluminescent substrates according to the invention can be further enhanced by linking multiple substrate reporter molecules to an enhancing region of the dendritic polymer. In this manner, more efficient sequestration of the substrate from aqueous quenching can be realized. Once the substrate is generated, the incipient reporter can fold into the proximate hydrophobic enhancing region of the dendritic polymer for efficient enhanced chemiluminescence. The enhanced chemiluminescent signal results in increased detection sensitivity.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

In accordance with the above objects, the invention provides improvements in the detectability of electromagnetic (e.g., optically detectable) energy released by the decomposition of the chemiluminescent substrates in aqueous and mixed media. In particular, the invention provides means for enhanced detection of

5 electromagnetic (e.g., optically detectable) energy released by the decomposition of chemiluminescent substrates used to detect the presence or determine the concentration or structure of a substance in an aqueous and mixed sample. The invention further provides improvements in the detectability of electromagnetic (e.g., optically detectable) energy released by the decomposition of

10 chemiluminescent substrates used to detect the presence or determine the concentration of chemical or biological substances by art-recognized immunoassay, chemical assay or nucleic acid probe assay techniques. The invention also provides improvements in the detectability of electromagnetic (e.g., optically detectable) energy released by the decomposition of chemiluminescent substrates for studying

15 molecular structures or microstructures.

The invention also provides methods of preparing dendritic polymer chemiluminescent substrates and intermediates therefor. For example, a first process for preparing a conjugate of a dendritic polymer and a chemiluminescent substrate comprises reacting the dendritic polymer with the chemiluminescent

20 substrate in a suitable solvent at a temperature which facilitates the association of the chemiluminescent substrate and the dendritic polymer. Thus, the dendritic surface can be modified by coupling with molecules, such as dioxetanes, luminols, isoluminols, acridinium esters, acridinium sulfonylamides and other luciferins, that

WO 02/057745

PCT/US02/00022

have an appropriate reactive site on a linker moiety. A more complete discussion of the process is provided below.

The present invention is thus directed to dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates, processes for preparing the conjugates, compositions containing the conjugates and methods of using the conjugates and compositions.

These and other objects, as well as the nature, scope and utilization of this invention, will become readily apparent to those skilled in the art from the following description, and drawings.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The present invention may be better understood with reference to the accompanying drawings in which:

FIGS. 1A - 1D show the structures of a number of commercially available dendrimers wherein: FIG. 1A shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with NH_2 surface groups; FIG. 1B shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with carboxylic acid surface groups; FIG. 1C shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with hydroxyl surface groups; and FIG. 1D shows a polypropyleneimine (PEI) dendrimer with NH_2 surface groups;

FIGS. 2A - 2L show dioxetane coupling precursors according to the invention;

FIGS. 3A - 3O show dendritic polymer dioxetane conjugates according to the invention;

WO 02/057745

PCT/US02/00022

FIGS. 4A - 4F show the synthesis scheme for the dendritic polymer conjugates shown in FIGS. 3A - 3L wherein: FIG. 4A corresponds to FIG. 3A and FIG. 3G; FIG. 4B corresponds to FIG. 3B and FIG. 3H; FIG. 4C corresponds to FIG. 3C and FIG. 3I; FIG. 4D corresponds to FIG. 3D and FIG. 3J; FIG. 4E corresponds to FIG. 3E and FIG. 3K; and FIG. 4F corresponds to FIG. 3F and FIG. 3L;

FIGS. 5A - 5I and FIGS. 6A - 6R show dendritic polymer isoluminol, acridinium ester, acridan, acridinium sulfonylamide, and luciferin conjugates according to the invention;

FIG. 7A - 7C show the synthesis of dendritic polymer isoluminol conjugates according to the invention;

FIG. 8A - 8F show synthesis of dendritic polymer acridinium ester and acridinium sulfonylamide conjugates according to the invention;

FIG. 9A - 9C show dendritic polymer dioxetane and isoluminol, dioxetane and acridinium ester, and dioxetane and acridinium sulfonylamide conjugates according to the invention;

FIG. 10 shows linked dioxetanes and quarternary amino enhancers according to the invention; and

FIG. 11 shows dendritic dioxetane enhancer hybrids according to the invention.

The above figures are merely illustrative and are not to be construed as limiting the scope of the invention.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Enzymatic assay design provides significant signal amplification by enzymatic turnover of substrate to generate a signal with increased detection sensitivity. The enzyme substrates are usually colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent. In general, chemiluminescent enzyme substrates provide a wider dynamic range of detection as well as increased sensitivity, due to lower intrinsic noise (such as light scattering and autofluorescence), and higher intensity signal output. The instrumentation for detecting chemiluminescent output is also simpler than that required for fluorescence detection, since no excitation source is needed. Examples of chemiluminescent substrates include dioxetanes (activated by hydrolytic enzymes such as esterases, alkaline phosphatases and glycosidases such as β -galactosidase and β -glucuronidase), and luminols, isoluminols, acridinium esters, acridinium sulfonylamides and luciferins (activated by oxidative enzymes such as horseradish peroxidase, glucose or galactose oxidase and luciferase). These substrates are enzyme-activated to produce destabilized peroxygenated intermediates that decompose with light emission. Measurement of the resulting chemiluminescent signal allows detection of enzyme labels in immunoassay, reporter gene assay, DNA probe assay and array formats.

According to an embodiment of the invention, dendritic polymer chemiluminescent substrates containing one or more dioxetanes, luminols, isoluminols, acridinium esters, acridinium sulfonylamides and/or luciferins coupled to the surface of known dendrimer polymers can be synthesized. Non-limiting examples of some dendrimer starting materials that may be employed to synthesize the dendritic polymer chemiluminescent substrates of the invention are depicted in

WO 02/057745

PCT/US02/00022

FIGS. 1A - 1D. FIG. 1A shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with NH₂ surface groups. FIG. 1B shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with carboxylic acid surface groups. FIG. 1C shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with hydroxyl surface groups. FIG. 1D shows a polypropyleneimine (PEI) dendrimer with NH₂ surface groups.

5

Chemiluminescent substrate coupling precursors that may be employed to synthesize the dendritic polymer chemiluminescent substrates of the invention are shown in FIGS. 2A - 2L. In FIGS. 2A - 2L, the substituents are defined as follows:

A is H, alkyl, trihaloalkyl or aryl;

10

B is NA, NC(O)A, O, S or CH₂ wherein A is independently H, alkyl, trihaloalkyl or aryl;

Y is independently H, a hydroxyl group, a halogen, an unsubstituted lower alkyl group, a hydroxy lower alkyl group, a halo lower alkyl group, a phenyl group, a halo phenyl group, an alkoxy phenyl group, an alkoxy phenoxy group, a hydroxy alkoxy group, a cyano group, an amide group, an alkoxy group or a carboxyl group;

15

R is an alkyl group (e.g., a C₁ - C₁₂ alkyl group), a haloalkyl group (e.g., a mono-, di-, or trihaloalkyl), an aryl group or an aralkyl group;

X is an enzyme-labile group selected from the group consisting of a phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside, adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate, adenosine, α-D-glucoside, β-D-glucoside, β-D-glucuronide, β-D-mannoside, β-D-fructofuranoside, β-glucosiduronate; 5-acetamido-3-5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside and alkoxy derivatives (e.g., 4,7-di-O-methyl), p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide;

20

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Z is a halo, alkoxy or alkyl group; and

T is H, an electron donating group, an electron withdrawing group, or an organic linker group which may be attached to an ancillary fluorophore or to any biological moiety.

5 Examples of general structures of dendritic polymer dioxetane conjugates according to the invention are shown in FIGS. 3A - 3O. In FIGS. 3A - 3L, the substituents A, B, Y, R, X, Z and T are defined as set forth above with respect to FIGS. 2A - 2L. N, which represents the number of dioxetane moieties conjugated to the dendrimer, is a positive integer. According to a preferred embodiment of the
10 invention, N in FIGS. 3A - 3F is from 6 to 768.

 FIG. 3M shows a polyamidoamine (PAMAM) Starburst Dendrimer having carboxylic acid surface groups conjugated with a plurality of dioxetanes according to the invention. FIG. 3N shows a polyamidoamine (PAMAM) Starburst
15 Dendrimer having amino terminal groups conjugated with a plurality of dioxetanes according to another embodiment of the invention. FIG. 3O shows a polypropyleneimine (PEI) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of dioxetanes according to a further embodiment of the invention.

 Figures 4A - 4F shows synthesis schemes for the dendritic polymer
20 conjugates shown in FIGS. 3A - 3L. In FIGS. 4A - 4F, the substituents A, B, Y, R, X and N are as defined above. The "activator" can be a mixed anhydride, an NHS ester, or another standard functionality used in peptide chemistry to facilitate peptide bond formation. The "leaving group" can be a halogen or a sulfonic ester such as mesylate, tosylate or triflate.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

In FIG. 4A, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3A or 3G. In FIG. 4B, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3B or 3H. In FIG. 4C, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3C or 3I.

5 In FIG. 4D, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3D or 3J. In FIG. 4E, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3E or 3K. In FIG. 4F, the "Aryl" substituent can be a phenyl group or a benzothiazole as defined in FIGS. 3F or 3L.

Further examples of dendritic polymer conjugates are shown in FIGS. 5A - 5I and in FIGS. 6A - 6J. FIGS. 5A - 5C show dendritic polymer isoluminol conjugates according to the invention. In FIGS. 5A - 5C, the substituent N is defined as set forth above. According to a preferred embodiment of the invention, N is from 6 to 768. In FIG. 5A, the substituent A can be hydrogen or an alkyl group. In FIG. 5C, the substituents A and B are defined as set forth above.

15 FIG. 5D shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer having carboxylic acid surface groups conjugated with a plurality of isoluminol moieties according to an embodiment of the invention. FIG. 5E shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of isoluminol moieties according to another embodiment of the invention.

20 FIG. 5F shows a polypropyleneimine (PEI) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of isoluminol moieties according to a further embodiment of the invention.

FIGS. 5G - 5I show conjugates of dendrimers and luciferins according to the invention. In FIGS. 5G - 5I, N is defined as set forth above. In FIG. 5G, the

WO 02/057745

PCT/US02/00022

substituent A can be H or an alkyl group. In FIGS. 5G and 5H, the substituent D can be H or PO_3H_2 . In FIG 5I, the substituent B can be independently NA, O, S or CH_2 wherein the substituent A can be H or an alkyl group.

FIGS. 6A - 6C show conjugates of dendrimers and acridinium esters according to the invention. In FIGS. 6A - 6C, N is defined as set forth above and X is a counterion such as a halide or a triflate. In FIG. 6A, the substituent A can be H or an alkyl group. In FIG 6C, the substituent B can be NA, NH, O, S or CH_2 wherein the substituent A can an alkyl or an aryl group.

FIGS. 6D - 6I show conjugates of dendrimers and acridinium sulfonfylamides according to the invention. In FIGS. 6D - 6I, N is defined as set forth above and X is a counterion such as a halide or a triflate. In FIGS. 6D and 6G, the substituent A can be H or an alkyl group. In FIGS. 6D, 6E, 6G and 6H, the substituent R can be an alkyl or an aryl group. In FIGS. 6F and 6I, the substituent B can be NA, NH, O, S or CH_2 wherein the substituent A can an alkyl or an aryl group.

FIG. 6J shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer having carboxylic acid surface groups conjugated with a plurality of acridinium ester moieties according to an embodiment of the invention. FIG. 6K shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer having carboxylic acid surface groups conjugated with a plurality of acridinium sulfonamide moieties according to another embodiment of the invention. FIG. 6L shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of acridinium ester moieties according to another embodiment of the invention. FIG. 6M shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer

WO 02/057745

PCT/US02/00022

having amino surface groups conjugated with a plurality of acridinium sulfonamide moieties according to another embodiment of the invention. FIG. 6N shows a polypropyleneimine (PEI) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of acridinium ester moieties according to a further embodiment of the invention. FIG. 6O shows a polypropyleneimine (PEI) starburst dendrimer having amino surface groups conjugated with a plurality of acridinium sulfonamide moieties according to a further embodiment of the invention.

FIGS. 6P - 6R show conjugates of dendrimers and acridan moieties according to the invention. In FIGS. 6P - 6R, the substituent D can be PO_2X_2 , a glycoside or a sulfate wherein X is a counterion such as a halide or ammonium. The substituent F can be NA, S or O wherein A can be H or an alkyl group. The substituent Z can be a halo, alkoxy or alkyl group. N is a positive integer. According to a preferred embodiment of the invention, N is an integer from 1 to 10. In FIG. 6R, the substituent B can be NA, O, S or CH_2 wherein A can be H or an alkyl group.

FIGS. 7A - 7C show the synthesis of dendritic polymer isoluminol conjugates according to the invention. In FIGS. 7A - 7C, "N", which represents the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer, is a positive integer and "n" is 0 or a positive integer. In FIGS. 7A and 7B, "activator" can be a mixed anhydride, an NHS ester or another standard functionality used in peptide chemistry to facilitate peptide bond formation. In FIG. 7A, "A" can be H or an alkyl group. In FIG. 7C, "B" can be NH or O, and "leaving group" can be a halogen or sulfonic acid ester such as a mesylate, a tosylate or a triflate. According

WO 02/057745

PCT/US02/00022

to a preferred embodiment of the invention, N in FIGS. 7A - 7C is an integer from 6 to 768.

FIGS. 8A - 8F show synthesis schemes for a number of dendritic polymer acridinium conjugates. FIGS. 8A - 8C show the synthesis of dendritic polymer acridinium ester conjugates according to the invention and FIGS. 8D - 8F show the synthesis of dendritic polymer acridinium sulfonamide conjugates according to the invention. In FIGS. 8A - 8F: X represents a counterion such as a halide or a triflate; "N", which represents the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer, is a positive integer; and "n" is 0 or a positive integer. According to a preferred embodiment of the invention, N in FIGS. 8A - 8F is an integer from 6 to 768.

In FIGS. 8A, 8B, 8D and 8E, "activator" can be a mixed anhydride, an NHS ester or another standard functionality used in peptide chemistry to facilitate peptide bond formation. In FIGS. 8A and 8D, "A" can be H or an alkyl group. In FIGS. 8C and 8F: "B" can be NH or O; and "leaving group" can represent a halogen or sulfonic acid ester such as a mesylate, a tosylate or a triflate. In FIGS. 8D - 8F, the substituent "R" can be an alkyl or an aryl group.

It may also be desirable to couple two or more different chemiluminescent substrates to a dendrimer backbone. Examples of such dendritic polymer dual enzyme label chemiluminescent substrates are shown in FIGS. 9A - 9C. FIG. 9A shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer conjugated with dioxetane and isoluminol moieties according to an embodiment of the invention. FIG. 9B shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer conjugated with dioxetane and acridinium ester moieties according to a further embodiment of the invention.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

FIG. 9C shows a polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimer conjugated with dioxetane and acridinium sulfonamide moieties according to a further embodiment of the invention.

5 FIG. 10 shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer having amino surface groups conjugated to dioxetane moieties and quarternary ammonium enhancer moieties according to an embodiment of the invention. As shown in FIG. 10, the quarternary ammonium enhancer moieties are perbutylated ammonium moieties.

10 FIG. 11 shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer having carboxylic acid surface groups conjugated to both dioxetane moieties and enhancer moieties according to a further embodiment of the invention. The enhancer moieties according to the invention can be: amino terminated polymeric quaternary ammonium, phosphonium or sulfonium salts; amino terminated quaternized Jeffamines; amino terminated quaternized polyethyleneimines; or amino terminated
15 poly (2-, 3-, or 4-vinylpyridinium) salts.

A "dendritic polymer" is a polymer exhibiting regular dendritic branching, formed by the sequential or generational addition of branched layers to or from a core. The term dendritic polymer encompasses "dendrimers," which are characterized by a core, at least one interior branched layer, and a surface branched
20 layer. (See Petar R. Dvornic and Donald A. Tomalia in Chem. in Britain, 641-645, August 1994.) A "dendron" is a species of dendrimer having branches emanating from a focal point which is or can be joined to a core, either directly or through a

WO 02/057745

PCT/US02/00022

linking moiety to form a dendrimer. Many dendrimers comprise two or more dendrons joined to a common core. However, the term dendrimer is used broadly to encompass a single dendron.

5 Dendritic polymers include, but are not limited to, symmetrical and unsymmetrical branching dendrimers, cascade molecules, arborols, and the like, though the most preferred dendritic polymers are dense star polymers. The PAMAM dense star dendrimers disclosed herein are symmetric, in that the branch arms are of equal length. The branching occurs at the hydrogen atoms of a terminal -NH₂ group on a preceding generation branch.

10 Even though not formed by regular sequential addition of branched layers, hyperbranched polymers, e.g., hyperbranched polyols, may be equivalent to a dendritic polymer where the branching pattern exhibits a degree of regularity approaching that of a dendrimer.

15 Topological polymers, with size and shape controlled domains, are dendrimers that are associated with each other (as an example covalently bridged or through other association as defined hereafter) through their reactive terminal groups, which are referred to as "bridged dendrimers." When more than two dense star dendrimers are associated together, they are referred to as "aggregates" or "dense star aggregates."

20 Therefore, dendritic polymers include bridged dendrimers and dendrimer aggregates. Dendritic polymers encompass both generationally monodisperse and generationally polydisperse solutions of dendrimers. The dendrimers in a

WO 02/057745

PCT/US02/00022

monodisperse solution are substantially all of the same generation, and hence of uniform size and shape. The dendrimers in a polydisperse solution comprise a distribution of different generation dendrimers.

Dendritic polymers also encompass surface modified dendrimers. For example, the surface of a PAMAM dendrimer may be modified by the addition of an amino acid (e.g., lysine or arginine).

Several general coupling schemes may be employed to link chemiluminescent substrate precursors to dendritic polymers. A first method involves reacting primary or secondary amino-linked precursors such as alkenes or enol ethers (i.e., for the preparation of dioxetanes), luminols, isoluminols or acridinium esters or acridinium sulfonylamides with a carboxylate-terminated dendritic polymer that is activated as a mixed anhydride or an activated ester, or activated with a coupling agent such as carbodiimides, phosphonium or ammonium salts, to form an amide bond. Alternatively, an amino-terminated dendritic polymer can react with activated ester-linked chemiluminescent substrate precursor to form amide bonds. These types of amide bond forming reactions are well documented in the peptide synthetic literature and can be readily carried out by one skilled in the art. A second method involves forming ether or amine linkages by nucleophilic displacement of a leaving group, such as a halide or a sulfonic ester, on the chemiluminescent substrate precursor linker by dendritic polymer amino or alkoxide end groups. Similarly, the same type of linkage can be synthesized by nucleophilic displacement of leaving groups on the dendritic polymer surface by amine- or alkoxide-terminated linkers having attached chemiluminescent substrate precursors. A third method, well known in dye chemistry, involves coupling 1-2 dendritic

WO 02/057745

PCT/US02/00022

polymer surface groups to cyanuric chloride, with the remaining 1-2 reactive chlorides on cyanuric chloride displaced by an amino-, sulfhydryl-, hydroxyl- or phenoxy-terminated linker on the chemiluminescent substrate precursor. A fourth method conjugates avidin- or streptavidin-linked chemiluminescent substrate precursors to biotinylated dendrimers, or conversely, conjugates biotinylated chemiluminescent substrate precursors to avidin- or streptavidin-modified dendrimers. Any known linker attached with standard coupling methods described in the literature can be used to couple chemiluminescent substrate precursors to dendritic polymers; the linkers and coupling methods described above serve only as examples. Appropriate coupling agents and conditions can be chosen and readily prepared by one skilled in the art.

After the dendritic polymer and chemiluminescent substrate precursors have been coupled, the chemiluminescent substrate precursors can be modified to form the dendritic polymer chemiluminescent substrates. For example, to complete the synthesis of dendritic polymer dioxetane, the linked precursor enol ethers are photooxygenated to the corresponding dioxetanes and any modifications to complete formation of the enzyme-cleavable groups, such as deprotection of triester phosphates to monoester phosphates or deacylation to the β -galactoside ethers, are carried out. If desired for dioxetane stability and/or enhanceability, the dendrimer-enol ether conjugates may be peralkylated with an arylalkyl or alkylhalide at any amino sites before proceeding with oxidation to the dioxetane.

The dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates described above show improved light intensity and/or sensitivity, as well as improved signal resolution. These substrate conjugates are specifically prepared for use in

WO 02/057745

PCT/US02/00022

enzymatic assays, where hydrolytic enzymatic removal of enzyme labile (e.g., X) substituent on the dendritic polymer dioxetane conjugates (e.g., by alkaline phosphatase, β -galactosidase or β -glucuronidase), induces dioxetane decomposition and chemiluminescence. Alternatively, oxidation (e.g., by horseradish peroxidase, 5 glucose, galactose oxidase or luciferase) of the dendritic polymer luminol, isoluminol, acridinium ester, acridinium sulfonamide or luciferin substrate conjugates induces dioxetane decomposition and chemiluminescence. The enzyme may be the target analyte in the sample, or may be a reporter molecule attached to a probe, an antigen or an antibody, or any member of a specific binding 10 pair, to detect the presence of the other member of the specific binding pair. Generally there are a wide variety of assays and assay formats that exist, including immunoassay and array formats, which can make use of the dendritic polymer chemiluminescent substrate conjugates, all employing a visually detectable chemiluminescent signal to indicate the presence and/or concentration of a 15 particular substance in a sample.

For example, to detect an enzyme in a sample, the sample can be contacted with dendritic polymer dioxetane conjugates bearing a group capable of being cleaved by the enzyme being detected. The enzyme cleaves the dioxetane's enzyme cleavable group to form a negatively charged substituent (e.g., an oxygen anion) 20 bonded to the dioxetane. This negatively charged substituent in turn destabilizes the dioxetane, causing the dioxetane to decompose to form a chemiluminescent chromophore that emits light. It is this light emission that is detected as an indication of the presence of the enzyme. By measuring the intensity of luminescence, the concentration of the enzyme in the sample can be determined.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Alternatively, the sample can be contacted with dendritic polymer luminol, isoluminol, acridinium ester, acridinium sulfonylamide or luciferin conjugates capable of being oxidized by an oxidase label. The enzyme directly oxidizes the luminol, isoluminol, or luciferin, or indirectly oxidizes the acridinium ester, or
5 acridinium sulfonylamide via hydrogen peroxide generation to an unstable peroxygenated intermediate that decomposes to emit light. The detected light emission indicates the presence of the oxidative enzyme. By measuring the intensity of luminescence, the concentration of the enzyme in the sample can also be determined.

10 It is well known that light quenching reactions occur if the peroxygenated chemiluminescent substrate decomposes in protic solvent such as water. Since assays generally take place in an aqueous environment, the light-quenching reactions may substantially reduce the chemiluminescence intensity observed. It is also known that water-soluble naturally-occurring and synthetic substances, that are
15 generally macromolecular in size, can increase the light intensity of light-emitting fluorophores produced by the decomposition of chemiluminescent chemical compounds in aqueous and mixed, i.e., having an aqueous and a non-aqueous component, media. These enhancement agents improve the chemiluminescent signal of chemiluminescent substrates, apparently by providing a hydrophobic
20 environment. Water, an unavoidable aspect of most assays due to the use of body fluids or biological agents, is a natural "quencher" of the chemiluminescence. The enhancement molecules apparently exclude water from the microenvironment in which the excited state emitter species reside, resulting in enhanced chemiluminescence. Other effects associated with the enhancer-chemiluminescent

WO 02/057745

PCT/US02/00022

substrate could also contribute to the chemiluminescence enhancement. As discussed herein, enhancement agents, including water-soluble polymeric quaternary ammonium, phosphonium or sulfonium salts, and copolymers and/or mixtures thereof such as poly(vinylbenzyltrimethylammonium chloride), poly(vinylbenzyltributylammonium chloride), and poly(vinylbenzyltrimethylbenzylammonium chloride), which are disclosed in detail in U.S. Patent No. 5,145,772, can be employed to increase the sensitivity of the assay.

As disclosed in U.S. Patent No. 5,145,772, certain water soluble naturally-occurring and synthetic substances, generally macromolecular in nature, for example water soluble globular proteins that include hydrophobic regions: mammalian serum albumins such as bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA), or water soluble polymeric quaternary ammonium, phosphonium or sulfonium salts: poly(vinylbenzyltrimethyl-ammonium chloride) (TMQ) or poly[vinylbenzyl(benzyltrimethyl-ammonium chloride)] (BDMQ), permit the stabilization, and hence increase the light intensity, of light-emitting fluorophores produced by the decomposition of chemiluminescent chemical compounds in aqueous and mixed media. Such chemiluminescent compounds are enzymatically cleavable 1,2-dioxetanes; and mixtures of such chemiluminescent compounds with each other and with one or more auxiliary fluorophores, e.g., fluorescein, that accept energy from energy-emitting fluorophores produced by the decomposition of chemiluminescent compounds and in turn emit detectable energy. By virtue of the presence of effective amounts of an enhancer substance or substances the intensity of the light emitted in aqueous medium by the thus-stabilized fluorophores is increased significantly as compared to the intensity of

WO 02/057745

PCT/US02/00022

light emitted by the same quantities of fluorophores in the absence of such enhancers.

An additional embodiment of the invention thus involves coupling enhancer molecules to the dendritic polymer, or modifying residual reactive surface groups on the dendritic polymer to contain enhancer sites. Once the dendritic polymer has been coupled to the chemiluminescent substrate precursor (as described above) at 10-90% of the reactive sites, the remaining reactive sites can be coupled to an enhancing agent or can be chemically modified to become an enhancing surface group. Or, if required by synthetic constraints, the chemiluminescent substrate precursors can be linked to reactive dendritic polymer sites after the enhancer macromolecules are coupled or after some of the dendritic reactive groups are modified. According to a first approach, the enhancer molecules, including, e.g., naturally-occurring macromolecular substances such as mammalian serum albumin, bovine serum albumin, human serum albumin, Protein A or mammalian IgG, can be coupled to dendritic polymer surface groups through methods well known in the art of peptide chemistry and bioconjugation (e.g., coupling of two agents through a streptavidin-biotin affinity). According to a second approach, the enhancer molecules include synthetic macromolecular substances with a reactive terminal group or a reactive linker each of which can be coupled to dendritic polymer surface groups. Possible synthetic enhancing substances, appropriately modified with a reactive linker or reactive terminal group, include poly(vinylarylquaternaryammonium) salts, poly-N-vinylloxazolidinones, polyvinylcarbamates, polyhydroxyacrylates and polyhydroxymethacrylates, quaternized amine-containing oligomers (e.g., Jeffamines), synthetic polypeptides

WO 02/057745

PCT/US02/00022

(including polylysine and nylons), polyvinylalkylethers, polyacrylamides and polymethacrylamides, polyvinyl alcohols, poly 2-, 3-, or 4-vinylpyridinium salts, polyvinylalkylpyrrolidinones, polyvinylalkyloxazolidones, quaternized polyethyleneimines, poly-N-vinylamines, alkylated or arylated polyvinylpiperidine, 5 polyacryloyl, polymethacryloyl, or 4-vinylbenzoylaminimides, and dendritic or hyperbranched analogues of the same. According to a third approach, reactive surfaces and/or interior groups on the dendritic polymer are chemically modified to provide enhancer moieties. Examples of dendritic polymer modification to enable chemiluminescence enhancement include peralkylation of terminal and/or interior 10 amines, alkylation of terminal and/or interior amides, and reaction of terminal active esters with amino-linked ammonium, phosphonium or sulfonium salts. According to a fourth approach, a dendritic polymeric chemiluminescent substrate is attached to a dendritic polymeric enhancer through a linker to form a bridged dendrimer structure.

15 In addition, a water-solubilizing group (one or more in number), i.e., a substituent which enhances the solubility of the dioxetane in aqueous solution, including carboxylic acids or esters, alkyl- or aryloxides, alkyl-, aryl- or aralkylamides, alkyl- or arylurethanes, alkyl- or arylsulfonamides, alkyl- or arylsulfonic acids and quaternary amino salts; the most preferred solubilizing 20 substituents are alkyl- or aryloxides, amides, and sulfonamides can be added to the chemiluminescent substrate or the dendrimer to enhance the substrate's solubility in the sample, which is generally aqueous in nature. Depending on whether the substituent selected is hydrogen or electron active, the identity may affect, in addition to solubility, half-life ($T_{1/2}$) of the decomposition reaction,

WO 02/057745

PCT/US02/00022

chemiluminescent yield, and signal to noise ratio (S/N). Suitable substituents and their impact on the dioxetane chemiluminescence, are discussed in connection with phenoxy-substituted dioxetanes and disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,330,900, the entire contents of which are incorporated by reference herein.

5 The above-described dendritic polymer chemiluminescent substrates can be used in any reporter molecule-based assay with an acceptable environment. Examples of such assays include immunoassays to detect antibodies or antigens, e.g., enzyme assays and nucleic acid assays to detect, e.g., viruses (e.g., HTLV III or cytomegalovirus), or bacteria (e.g., *E. Coli*), and certain cell functions (e.g., receptor
10 binding sites).

To detect a substance such as an antibody, an antigen or a nucleic acid, the enzyme capable of cleaving the enzyme cleavable group of the dioxetane, or the enzyme capable of oxidizing the luminol, isoluminol, acridinium ester, acridinium sulfonylamide or luciferin, is preferably bonded to a substance having a specific
15 affinity for the detectable substance (i.e., a substance that binds specifically to the detectable substance), e.g., the antigen, the antibody or the nucleic acid probe. In addition to the direct attachment of an enzyme, a ligand can be attached to the substance having a specific affinity to the detectable substance. The ligand is then detected with a high affinity ligand-binding agent labeled with an enzyme capable
20 of cleaving the enzyme cleavable group of the dioxetane, or oxidizing luminol, isoluminol, acridinium ester, acridinium sulfonamide or luciferin. Conventional methods, e.g., carbodiimide coupling, are used to bond the enzyme to the specific affinity substance; bonding is preferably through an amide linkage.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

In general, assays are performed as follows. In one example, a sample suspected of containing a detectable substance is contacted with a buffered solution containing an enzyme bonded to a substance having a specific affinity for the detectable substance. The resulting solution is incubated to allow the detectable substance to bind to the specific affinity portion of the specific affinity-enzyme complex. Excess specific affinity-enzyme complex is washed away, and a dendritic chemiluminescent substrate having a group cleavable by the enzyme label of the specific affinity-enzyme complex, or having a group oxidizable by the enzyme label of the specific affinity-enzyme complex, is added. In a second example, a sample suspected of containing a detectable substance is contacted with a buffered solution containing a ligand bonded to a substance having specific affinity for the detectable substance. The resulting solution is incubated to allow the detectable substance to bind to specific affinity-ligand complex. Excess specific affinity-ligand complex is washed away, and an enzyme-labeled ligand binding agent is added and incubated to allow the enzyme-labeled ligand binding agent to bind to the ligand. Excess enzyme-labeled ligand binding agent is then washed away, and a dendritic chemiluminescent substrate having a group cleavable by the enzyme portion of the enzyme-labeled ligand binding agent is added. In both examples, the enzyme-activated peroxygenated intermediate decomposes and luminesces. Luminescence is detected using, e.g., a cuvette, or a light-sensitive film in a camera luminometer, or CCD, or a photoelectric cell or photomultiplier tube, to measure the presence and concentration of the detectable substance in the same.

In another type of assay, substances with specific affinity for detectable substances in biological samples are arrayed on solid supports in spacially well-

WO 02/057745

PCT/US02/00022

defined patterns. Solid supports such as glass, plastic, silicon, polymer in planar or nonplanar, porous or nonporous, solid or beaded formats are used. The detectable substances in biological samples may be nucleic acids or proteins. The biological sample containing the detectable substance(s) is contacted with the solid phase array and incubated under conditions optimized for the binding of the detectable substance(s). In one case, the detectable substance(s) are pre-labeled with detectable ligands by chemical or enzymatic means and subsequently detected with enzyme-labeled ligand binding agents. In another case, the bound unlabeled substance is detected with a second enzyme- or ligand-labeled substance that also has affinity for the bound detectable substance from the biological sample. This binding of the labeled substance can be prior to capture of the detectable substance on the array or after capture. If the detection involves a ligand-labeled substance, an additional incubation with an enzyme-labeled ligand binding agent is required. Suitable washes are performed between incubations as required. The final step in all cases will be the addition of a dendritic chemiluminescent substrate having a group cleavable by the enzyme portion of the enzyme-labeled detection agent, or having a group oxidizable by the enzyme portion of the specific enzyme labeled complex. The enzyme-activated peroxygenated intermediate decomposes and luminesces. Luminescence is detected using a charge-coupled camera (CCD), film or other light sensitive imaging device and the intensity of the light measured in specific areas is determined.

The following examples further illustrate the invention but are not to be construed as a limitation to the scope of the invention.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Examples**Synthesis of Activated Ester Dendrimers**

A solution of 100 mg carboxylate-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer, adjusted to pH 7) and N-hydroxysuccinimide (1.0 eq per carboxylate end group) in 20 ml dry 1,2-dimethoxymethane is stirred at 0° C. A coupling agent, e.g., dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 eq per carboxylic acid end group) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI, 1.0 eq per carboxylic acid end group), is added at 0° C and the solution is stored in the refrigerator overnight. The urea byproduct is removed by filtration or by an aqueous wash (EDCI byproduct), the organic solvent is evaporated, and the crude product is purified by chromatography.

Synthesis of Dendritic Polymer Enol Ether Conjugates having the General Structure depicted in FIG. 4A or 4E

To a stirred solution of 100 mg activated ester-terminated dendrimer in 15 ml CH₂Cl₂ with 0.1 ml triethylamine is added enol ether with a linker terminated with a primary or secondary amine (1.01 eq enol ether per activated ester end group; e.g., activator = N-hydroxysuccinimide ester). The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH₂Cl₂ to 75 ml and washed with water (3 X 30 ml) and saturated Na₂CO₃ (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na₂SO₄ and stripped of solvent to yield the dendritic enol ether conjugate depicted in FIG. 4A or 4E.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Synthesis of Dendritic Polymer Enol Ether Conjugates having the General Structure depicted in FIG. 4B or 4F

To a stirred solution of 100 mg amino-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer or polypropylenimine tetrahexacontaamine dendrimer) in 15 ml CH_2Cl_2 with 0.1 ml triethylamine is added enol ether with a linker terminated with an activated ester (1.01 eq enol ether per NH_2 end group; e.g., activator = N-hydroxysuccinimide ester). The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH_2Cl_2 to 75 ml and washed with water (3 X 30 ml) and saturated Na_2CO_3 (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na_2SO_4 and stripped of solvent to yield the dendritic enol ether conjugate depicted in FIG. 4B or 4F.

Synthesis of Dendritic Polymer Enol Ether Conjugates having the General Structure depicted in FIG. 4C or 4D

Synthesis Scheme 1:

To a stirred solution of 100 mg amino-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer or polypropylenimine tetrahexacontaamine dendrimer) in 15 ml CH_2Cl_2 with 0.1 ml triethylamine is added enol ether with a linker terminated with a halide (e.g., I or Br) or sulfonic ester (e.g., mesylate, tosylate, brosylate). The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH_2Cl_2 to 75 ml and washed with water (3 X 30 ml) and saturated Na_2CO_3 (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na_2SO_4 and stripped of solvent to yield the dendritic enol ether conjugate depicted in FIG. 4C or 4D.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Synthesis Scheme 2:

To a stirred solution of 100 mg bromo- or mesylate- or tosylate- or brosylate-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM-OH modified with a leaving group) in 15 ml CH_2Cl_2 with 0.1 ml triethylamine is added enol ether with a linker terminated with an amine or hydroxyl group. The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH_2Cl_2 to 75 ml and washed with water (3 X 30 ml) and saturated Na_2CO_3 (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na_2SO_4 and stripped of solvent to yield the dendritic enol ether conjugate depicted in FIG. 4C or 4D.

10 **Synthesis of Dioxetane-Polyammonium and Dioxetane-Polyvinylpiperidinium Dendrimer**

A solution of 100 mg carboxylate-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer, adjusted to pH 7), an enol ether with an amino-terminated linker (0.5 eq per carboxylate end group) and amino-terminated polymer (0.5 eq per carboxylate end group, e.g., polyethylenimine, poly-N-vinylamine or polyvinylpiperidine) in 20 ml dry 1, 2- dimethoxymethane is stirred at 0° C. A coupling agent, e.g., dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 eq per carboxylic acid end group) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI, 1.0 eq per carboxylic acid end group), is added at 0° C and the solution is stored in the refrigerator overnight. The urea byproduct is removed by filtration or by an aqueous wash (EDCI urea byproduct), the organic solvent is evaporated, and the crude enol ether-enhancer dendrimer is purified by chromatography. The amine sites are peralkylated to ammonium groups by reaction with an alkylhalide (e.g.,

WO 02/057745

PCT/US02/00022

iodomethane to permethylate or butylbromide to perbutylate), and the enol ether is oxygenated to the dioxetane as described below to complete the synthesis of a dendritic dioxetane-polyammonium or dendritic dioxetane-polyvinylpiperidinium substrate.

5 **Synthesis of Biotinylated Starburst Dendrimers**

A 0.1 mol solution of amino-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer or Starburst PEI dendrimer, adjusted to pH 7) in tris, hepes, phosphate, carbonate or borate buffer is reacted with N-hydroxysuccinimidobiotin (0.1-10 mol) at ambient temperature 12-48 hrs. The biotinylated dendrimer is purified by

10 dialysis, size-exclusion chromatography (SEC) or ion-exchange chromatography.

Synthesis of Avidin- or Streptavidin-Conjugated Starburst Dendrimers

A 0.1 mol solution of amino-terminated dendrimer (e.g., Starburst PAMAM dendrimer or Starburst PEI dendrimer, adjusted to pH 7) in DMF is reacted with succinyl-avidin (Sigma) or succinyl-streptavidin in the presence of a coupling agent

15 (e.g., dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI). The reaction is stirred at ambient temperature for 2-24 hours. The avidin-conjugated dendrimer is purified by ultrafiltration or Sephadex column chromatography.

Alternatively, to a stirred solution of 100 mg carboxylate-terminated

20 PAMAM dendrimer in 15 ml deionized water is added avidin or streptavidin and the coupling agent 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI). The reaction is stirred at room temperature for 8 - 24 hrs while maintaining

WO 02/057745

PCT/US02/00022

the solution at or near pH 5. The reaction solution is ultrafiltered or eluted through a Sephadex column to yield the avidin- or streptavidin- conjugated dendrimer.

Synthesis of Isoluminol-Bovine Serum Albumin Dendrimer

5 An aqueous pH 7 solution of 100 mg avidin-conjugated dendrimer is added to a solution of biotinylated aminobutylethylisoluminol (ABEI) and biotinylated bovine serum albumin (BSA) (present in a 1:1 molar ratio) and stirred at ambient temperature for 1-24 hrs. The solution is ultrafiltered to remove unreacted biotinylated agents to yield dendritic isoluminol-BSA substrate.

Synthesis of Dendritic Polymer Dioxetane Conjugates

10 A 10% MeOH/CHCl₃ solution (50 ml) of dendrimer-enol ether conjugate (250 mg), with tetraphenylporphine (TPP, 10 mg in 5 ml CHCl₃), is cooled in an ice bath while sparging with oxygen through a Pasteur pipette for 5 minutes. The oxygen flow is continued while the solution is irradiated with a 400 watt sodium vapor lamp, which is filtered with a 3.0 ml thickness of DuPont Kapton film. When
15 the photooxidation is complete, the reaction is stripped of solvents, dissolved in water and preparatively chromatographed on a one inch PLRP-S column (Polymer Laboratories) using an acetonitrile/water gradient. The product peak is shaved on the front and back, collecting only the middle cut. The eluent is freeze-dried to obtain the dendritic dioxetane product as a white solid.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

Synthesis of Dendritic Isoluminol Conjugates

To a stirred solution of 100 mg bromo- or mesylate- or tosylate- or brosylate- terminated dendrimer (e.g., PAMAM-OH modified with a leaving group) in 15 ml CH_2Cl_2 with 0.1 ml triethylamine is added N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI). The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH_2Cl_2 to 75 ml and washed with water (3 x 30 ml) and saturated Na_2CO_3 (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na_2SO_4 and stripped of solvent to yield the dendritic isoluminol conjugate.

Synthesis of Dendritic Isoluminol Conjugates

To a stirred solution of 100 mg activated ester-terminated dendrimer (e.g., PAMAM-CONHS) in 15 ml CH_2Cl_2 with 0.1 ml triethylamine is added N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI, 1.01 eq isoluminol per activated ester end group). The reaction is stirred overnight at room temperature, diluted with CH_2Cl_2 to 75 ml and washed with water (3 x 30 ml) and saturated Na_2CO_3 (3 x 30 ml). The organic layer is dried over Na_2SO_4 and stripped of solvent to yield the dendritic isoluminol conjugate.

Synthesis of Dendritic Acridinium Ester Conjugates

A solution of 100 mg amine-terminated dendrimer (e.g., PAMAM- NH_2 or PEI Starburst Dendrimer), and 1 mol equivalent of acridinium ester with an activated carboxylate-terminated linker in 20 ml dry 1, 2-dimethoxymethane is stirred at 0° C. A coupling agent, e.g., dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 eq per carboxylic acid end group) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide

WO 02/057745

PCT/US02/00022

hydrochloride (EDCI, 1.0 eq per carboxylic acid end group), is added at 0° C and the solution is stored in the refrigerator overnight. The urea byproduct is removed by filtration or by an aqueous wash (EDCI urea byproduct), the organic solvent is evaporated, and the crude dendritic acridinium ester is purified by chromatography.

5 **Synthesis of Dendritic Acridinium Sulfonylamide Conjugates**

A solution of 100 mg amine-terminated dendrimer (e.g., PAMAM-NH₂ or PEI Starburst Dendrimer), and 1 mol equivalent of acridinium sulfonylamide with an activated carboxylate-terminated linker in 20 ml dry 1, 2-dimethoxyethane is stirred at 0° C. A coupling agent, e.g., dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 eq per carboxylic acid end group) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI, 1.0 eq per carboxylic acid end group), is added at 0° C and the solution is stored in the refrigerator overnight. The urea byproduct is removed by filtration or by an aqueous wash (EDCI urea byproduct), the organic solvent is evaporated, and the crude dendritic acridinium sulfonylamide is purified by chromatography.

Determination of the Chemiluminescence Half-Life of Dephosphorylated Dioxetane

A 1 mL aliquot of dendritic polymer dioxetane conjugate (0.004 mM) is equilibrated to 30° C in 0.1M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, pH 10. Alkaline phosphatase (at final concentration of 1.05 x 10⁻⁹ M) is added to the test tube and the chemiluminescent signal kinetics is measured in a Turner TD-20E luminometer for 10 to 20 minutes. The half-life is calculated from the plot of log RLU versus

WO 02/057745

PCT/US02/00022

time. The chemiluminescence half-life is also determined in the presence of Sapphire-II™ enhancer (in 0.1M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 10% polyvinylbenzyltributyl ammonium chloride qt 1 mg/mL).

Determination of the Peak Light Intensity of Dephosphorylated Dioxetanes

5 A 0.5 mL aliquot of dendritic polymer dioxetane conjugate (0.004 mM) is equilibrated to 30° C in 0.1M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, pH 10. Alkaline phosphatase (final concentration of 1.05×10^{-6} M) is added to the tube and the chemiluminescent signal is measured in a Turner TD-20E luminometer for 10 to 20 minutes. The peak light intensity is recorded. The peak light intensity is also
10 determined in the presence of Sapphire-II™ enhancer (in 0.1M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 10% polyvinylbenzyltributyl ammonium chloride qt 1 mg/mL).

A dendritic polymer dioxetane conjugate of the invention may be employed in a TSH assay as follows:

Materials

15 Mouse monoclonal anti-TSH-β antibody can be used to coat 1/8 inch beads for analyte capture. Mouse monoclonal anti-TSH antibody can be conjugated with alkaline phosphatase and used as a detection antibody. TSH can be obtained from Calbiochem, Catalog No. 609396, and BSA (type V--fatty acid free) can be obtained from Sigma, Catalog No. A6003.
20 The buffer solution used for the analyte and conjugate can contain 0.1M Tris-HCl, 1mM MgCl₂, and 2% by weight BSA (pH=7.5) The substrate buffer solution can contain 0.1M Tris, 0.1 mM MgCl₂, 0.1% by weight BSA

WO 02/057745

PCT/US02/00022

(pH=9.5), and a dendritic polymer dioxetane conjugate as the chemiluminescent compound. (50 µg/ml).

Protocol

15 µl of a TSH-containing analyte solution is mixed with 135 µl of conjugate antibody solution. Two 1/8 inch beads coated as described above are added to the solution and incubated for 2 hours at 23° C. The beads are then washed four times with 0.1M Tris (pH=7.5) and transferred to a reaction tube. 200 µl of the same chemiluminescent compound used in the substrate buffer solution described above is added to the tube. Following an incubation period of 20 minutes, light emission is recorded as ten second counts using a Berthold Clinilumat Luminescence Analyzer.

In addition, a dendritic polymer dioxetane conjugate of the invention may be employed in an assay for human IgG, for hCG, for serum alkaline phosphatase, for alpha fetoprotein, for TSH, or for any of the substances assayed for and in accordance with the protocols disclosed in U.S. Patent No. 4,978,614, the entire contents of which are incorporated herein by reference.

The dendritic polymer dioxetane conjugates of the invention may be employed in a nucleic acid hybridization assay as follows:

A sample of cerebrospinal fluid (CSF) suspected of containing cytomegalovirus is collected and placed on a nitrocellulose membrane. The sample is then chemically treated with urea or guanidinium isothiocyanate to break the cell walls and to degrade all cellular components except the viral DNA. The strands of the viral DNA thus produced are separated and attached to the nitrocellulose filter.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

A DNA probe specific to the viral DNA and labeled with alkaline phosphatase is then applied to the filter; the probe hybridizes with the complementary viral DNA strands. After hybridization, the filter is washed with an aqueous buffer solution containing 0.2 M NaCl and 0.1 mM Tris-HCl (pH = 8.10) to remove excess probe
5 molecules. A phosphate-containing dendritic polymer dioxetane conjugate is added and the resulting luminescence from the enzymatic degradation of the dioxetane is measured in a luminometer or detected with photographic film.

The dendritic polymer dioxetane conjugates of the invention may also be employed in any of the DNA probe assays disclosed in U.S. Patent No. 4,978,614,
10 the entire contents of which are incorporated by reference herein.

The above discussion of this invention is directed primarily to preferred embodiments and practices thereof. It will be readily apparent to those skilled in the art that further changes and modifications in the actual implementation of the concepts described herein can easily be made without departing from the spirit and
15 scope of the invention.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A chemiluminescent substrate delivery system comprising:
a dendrimer; and
at least one enzymatically activated chemiluminescent substrate conjugated
5 to the dendrimer.
2. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the
chemiluminescent substrate comprises a moiety selected from the group consisting
of a dioxetane moiety, a luminol moiety, an isoluminol moiety, an acridinium ester
moiety, an acridinium sulfonamide moiety, a luciferin moiety and combinations
10 thereof.
3. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein a
plurality of enzymatically activated chemiluminescent substrates are conjugated to
the dendrimer.
4. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 3, wherein at
15 least two different enzymatically activated chemiluminescent substrates are
conjugated to the dendrimer.
5. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the
substrate delivery system is made by a method comprising:
covalently bonding one or more molecules comprising an enzymatically
20 activated chemiluminescent moiety to the dendrimer; or
covalently bonding one or more molecules comprising an enzymatically
activated chemiluminescent moiety precursor to the dendrimer and thereafter
converting the chemiluminescent moiety precursor to a chemiluminescent moiety.

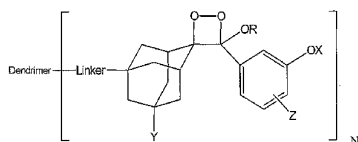
WO 02/057745

PCT/US02/00022

6. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 5, wherein the dendrimer is selected from the group consisting of polyamidoamine dendrimers with amino surface groups, polyamidoamine dendrimers with carboxylic acid surface groups, polyamidoamine dendrimers with hydroxyl surface groups, and polypropyleneimine dendrimers with amino surface groups.

7. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the chemiluminescent substrate comprises a dioxetane moiety selected from the group consisting of: 3-(2'-spiroadamantane) 4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane; disodium 3(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{2,7}]decan]-4-yl)phenyl phosphate dioxetane; and disodium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'(5'-chloro-)tricyclo-{3.3.1.1^{2,7}]-decan]-4-yl)-phenyl phosphate.

8. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the chemiluminescent substrate comprises a dioxetane moiety and wherein the substrate delivery system is represented by the formula:



wherein:

"Linker" represents a linker moiety;

20 "Dendrimer" represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker moiety;

WO 02/057745

PCT/US02/00022

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer moiety;

Y is H, a hydroxyl group, a halogen, an unsubstituted alkyl group, a hydroxy substituted alkyl group, a halogen substituted alkyl group, a phenyl group, a halogenated phenyl group, an alkoxy substituted phenyl group, an alkoxy phenoxy group, a hydroxy alkoxy group, a cyano group, an amide group, an alkoxy group or a carboxyl group;

R is a C₁ - C₁₂ alkyl, mono-, di-, or trihaloalkyl, an aryl or an aralkyl;

X is an enzyme-labile group selected from the group consisting of a phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside, adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate, adenosine, α -D-glucoside, β -D-glucoside, β -D-glucuronide, β -D-mannoside, β -D-mannoside, β -D-fructofuranoside, β -glucosiduronate, 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, alkoxy derivatives of 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide; and

Z is a halo, alkoxy or alkyl group.

9. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 8, wherein the linker moiety is represented by the formula:

20

WO 02/057745

PCT/US02/00022

wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

“Dendrimer” represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker

5 moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer moiety;

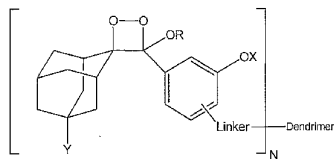
Y is H, a hydroxyl group, a halogen, an unsubstituted alkyl group, a hydroxy substituted alkyl group, a halogen substituted alkyl group, a phenyl group, a
10 halogenated phenyl group, an alkoxy substituted phenyl group, an alkoxy phenoxy group, a hydroxy alkoxy group, a cyano group, an amide group, an alkoxy group or a carboxyl group;

R is a C₁ - C₁₂ alkyl, a mono-, di-, or trihaloalkyl, an aryl group or an aralkyl group; and

15 X is an enzyme-labile group selected from the group consisting of a phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside, adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate, adenosine, α -D-glucoside, β -D-glucoside, β -D-glucuronide, β -D-mannoside, β -D-mannoside, β -D-fructofuranoside, β -glucosiduronate, 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -
20 D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, alkoxy derivatives of 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide; and

WO 02/057745

PCT/US02/00022



wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

“Dendrimer” represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a
 5 terminal functional group on the dendrimer with a functional group on the linker
 moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent
 substrates conjugated to the dendrimer moiety;

Y is H, a hydroxyl group, a halogen, an unsubstituted alkyl group, a hydroxy
 10 substituted alkyl group, a halogen substituted alkyl group, a phenyl group, a
 halogenated phenyl group, an alkoxy substituted phenyl group, an alkoxy phenoxy
 group, a hydroxy alkoxy group, a cyano group, an amide group, an alkoxy group or
 a carboxyl group;

R is a C₁ - C₁₂ alkyl, mono-, di-, or trihaloalkyl, an aryl or an aralkyl; and

15 X is an enzyme-labile group selected from the group consisting of a
 phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside,
 adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate,
 adenosine, α-D-glucoside, β-D-glucoside, β-D-glucuronide, β-D-mannoside, β-D-
 mannoside, β-D-fructofuranoside, β-glucosiduronate, 5-acetamido-3-5-dideoxy-α-
 20 D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, alkoxy derivatives of 5-acetamido-3,5-

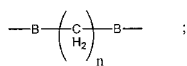
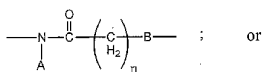
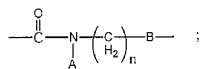
WO 02/057745

PCT/US02/00022

dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide.

13. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 12, wherein the linker moiety is represented by the formula:

5



wherein:

n is a positive integer;

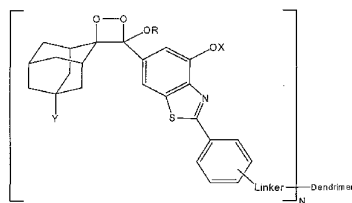
10 A is H, alkyl, trihaloalkyl or aryl; and

B is independently NA, NC(O)A, O, S or CH₂.

14. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the chemiluminescent substrate comprises a dioxetane moiety and the delivery system is represented by the formula:

WO 02/057745

PCT/US02/00022



wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

“Dendrimer” represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a
 5 terminal functional group on the dendrimer with a functional group on the linker
 moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent
 substrates conjugated to the dendrimer moiety;

Y is H, a hydroxyl group, a halogen, an unsubstituted alkyl group, a hydroxy
 10 substituted alkyl group, a halogen substituted alkyl group, a phenyl group, a
 halogenated phenyl group, an alkoxy substituted phenyl group, an alkoxy phenoxy
 group, a hydroxy alkoxy group, a cyano group, an amide group, an alkoxy group or
 a carboxyl group;

R is a C₁ - C₁₂ alkyl, mono-, di-, or trihaloalkyl, an aryl or an aralkyl; and

15 X is an enzyme-labile group selected from the group consisting of a
 phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside,
 adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate,
 adenosine, α-D-glucoside, β-D-glucoside, β-D-glucuronide, β-D-mannoside, β-D-
 mannoside, β-D-fructofuranoside, β-glucosiduronate, 5-acetamido-3,5-dideoxy-α-

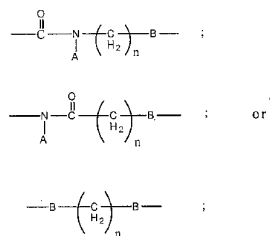
WO 02/057745

PCT/US02/00022

D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, alkoxy derivatives of 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide.

15. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 14, wherein

5 the linker moiety is represented by the formula:



wherein:

10 n is a positive integer;

A is H, alkyl, trihaloalkyl or aryl; and

B is independently NA, NC(O)A, O, S or CH₂.

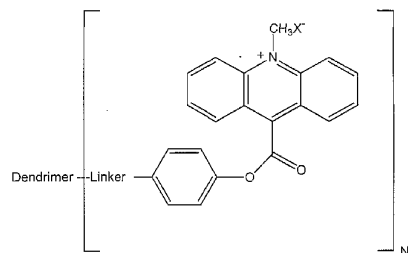
16. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein

the chemiluminescent substrate comprises an isoluminol moiety and the delivery

15 system is represented by the formula:

WO 02/057745

PCT/US02/00022



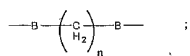
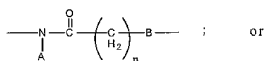
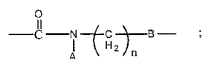
wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

“Dendrimer” represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a
 5 surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker
 moiety; and

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent
 substrates conjugated to the dendrimer moiety.

17. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 16, wherein
 10 the linker moiety is represented by the formula:



WO 02/057745

PCT/US02/00022

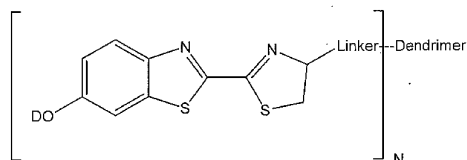
wherein:

n is a positive integer;

A is H, an alkyl group, a trihaloalkyl group or an aryl group; and

B is independently NA, NC(O)A, O, S or CH₂.

- 5 18. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the chemiluminescent substrate comprises luciferin moiety and the delivery system is represented by the formula:



wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

- 10 “Dendrimer” represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer moiety; and

- 15 D is hydrogen or an enzyme-labile group selected from the group consisting of phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, 1-thio-D-glucoside, adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate, adenosine, α -D-glucoside, β -D-glucoside, β -D-glucuronide, β -D-mannoside, β -D-mannoside, β -D-fructofuranoside, β -glucosiduronate, 5-acetamido-

WO 02/057745

PCT/US02/00022

3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, alkoxy derivatives of 5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranoside, p-toluenesulfonyl-L-arginine ester, and p-toluenesulfonyl-L-arginine amide a PO_3H_2 group.

5 19. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 18, wherein the linker moiety is represented by:

-- $\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{-NA-C(O)-}$;

-- $\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{-C(O)-NH-}$; or

-- $\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{-B-}$;

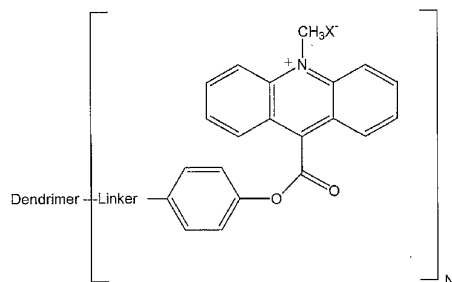
10 wherein:

n is a positive integer;

A is hydrogen or an alkyl group; and

B is NA, O, S or CH_2 .

20. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein
15 the chemiluminescent substrate comprises an acridinium ester moiety and the delivery system is represented by the formula:



WO 02/057745

PCT/US02/00022

wherein:

“Linker” represents a linker moiety;

“Dendrimer” represents a dendrimer residue resulting from the reaction of a surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker

5 moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer moiety; and

X is a counterion.

21. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 20, wherein

10 the linker moiety is represented by:

--C(O)-NA-(CH₂)_n--;

--NH-C(O)-(CH₂)_n--; or

--B-(CH₂)_n--;

wherein:

15 n is a positive integer;

A is hydrogen, an alkyl group or an aryl group; and

B is NA, O, S or CH₂.

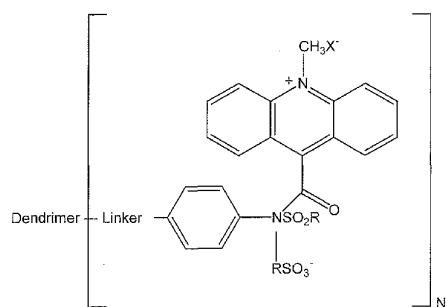
22. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein

the chemiluminescent substrate comprises an acridinium sulfonylamide moiety and

20 the delivery system is represented by the formula:

WO 02/057745

PCT/US02/00022



wherein:

"Linker" represents a linker moiety;

5 "Dendrimer" represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker moiety;

N is a positive integer representing the number of chemiluminescent substrates conjugated to the dendrimer moiety;

10 R is an alkyl or an aryl group; and

X is a counterion.

23. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 22, wherein the linker moiety is represented by:

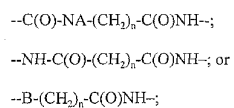
--C(O)-NA-(CH₂)_n--;

15 --NH-C(O)-(CH₂)_n--;

--B-(CH₂)_n--;

WO 02/057745

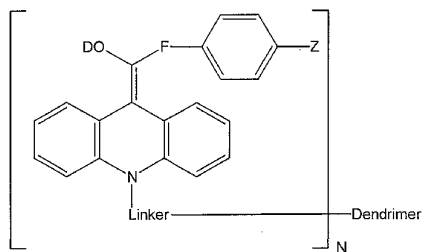
PCT/US02/00022



wherein:

- 5 n is a positive integer;
A is hydrogen, an alkyl group or an aryl group; and
B is NA, O, S or CH₂.

24. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein
the chemiluminescent substrate comprises an acridan moiety and the delivery
10 system is represented by the formula:



wherein:

- 15 "Linker" represents a linker moiety;
"Dendrimer" represents a dendrimer moiety resulting from the reaction of a
surface functional group on the dendrimer with a functional group on the linker
moiety;
N is a positive integer representing the number of chemiluminescent
20 substrates conjugated to the dendrimer moiety;

WO 02/057745

PCT/US02/00022

D is a PO_3X_2 group, a glycoside or a sulfate wherein X is a counterion;

F is NA, S or O; and

Z is a halo, alkoxy or alkyl group.

25. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 24, wherein
5 the linker moiety is represented by:

--(CH₂)_n-NA-C(O)--;

--(CH₂)_n-C(O)-NA--; or

--(CH₂)_n-B--;

wherein:

10 n is a positive integer;

A is hydrogen or an alkyl group; and

B is NA, O, S or CH₂.

26. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein
the dendrimer is covalently or ionically associated with one or more additional
15 dendrimers.

27. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein
the substrate delivery system further comprises a chemiluminescence enhancer
moiety.

28. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 27, wherein
20 the enhancer moiety is formed by coupling a chemiluminescent enhancing molecule
to a reactive site on the dendrimer or by chemically modifying a reactive site on the
dendrimer to an enhancing moiety.

29. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 28, wherein
the enhancer moiety is formed by peralkylation of amino groups on the dendrimer or

WO 02/057745

PCT/US02/00022

by peralkylcarbonylation of amino groups on the dendrimer by alkylation of amide groups on the dendrimer.

30. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 28, wherein the enhancer moiety is formed by reaction of carboxylate groups on the dendrimer
5 with an amino linked ammonium, phosphonium or sulfonium salt.

31. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, further comprising a second dendrimer, wherein the second dendrimer comprises a chemiluminescence enhancer moiety and wherein the second dendrimer is covalently or ionically associated with the dendrimer conjugated to the at least one
10 enzymatically active chemiluminescent substrate moiety.

32. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 1, wherein the chemiluminescent substrate and/or the dendrimer comprises one or more water solubilizing groups.

33. The chemiluminescent substrate delivery system of Claim 32, wherein
15 the one or more water solubilizing groups are selected from the group consisting of carboxylic acids, esters, alkyl-oxides, aryl-oxides, alkyl-amides, aryl-amides, aralkyl-amides, alkyl-urethanes, aryl-urethanes, alkyl-sulfonamides, aryl-sulfonamides, alkyl-sulfonic acids, aryl-sulfonic acids, quaternary ammonium salts, and combinations thereof.

34. A kit for conducting an assay to determine the presence or concentration
20 of an analyte in a sample, wherein the kit comprises:

a dendrimer comprising at least one enzymatically active chemiluminescent substrate moiety; and

WO 02/057745

PCT/US02/00022

an enzyme capable of activating the chemiluminescent substrate to produce a peroxygenated intermediate that decomposes to produce light.

35. The kit of Claim 34, wherein the enzymatically activated chemiluminescent substrate moiety comprises a dioxetane having an enzyme labile group and wherein the enzyme is capable of cleaving the enzyme labile group to produce the peroxygenated intermediate.

36. The kit of Claim 35, further comprising a chemiluminescent enhancement substance.

37. The kit of Claim 34, wherein the assay is an immunoassay and the enzyme is complexed with an agent capable of binding to the analyte.

38. The kit of Claim 34, wherein the assay is a DNA probe assay, the kit further comprising a membrane on which the assay can be conducted.

39. The kit of Claim 38, further comprising an enhancement substance for increasing the chemiluminescent signal obtained from the substrate.

40. The kit of Claim 38, wherein the enzyme is complexed with an agent and wherein the agent can form a complex with the analyte.

41. The kit of Claim 34, wherein the assay is a DNA sequence analysis assay and the kit further comprises a membrane on which said sequence analysis assay can be conducted.

42. The kit of Claim 41, wherein the kit further comprises a chemiluminescent enhancement substance.

43. The kit of Claim 41, wherein the enzyme is complexed with an agent permitting attachment of the enzyme to the DNA to be sequenced in the assay.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

44. The kit of Claim 34, wherein the enzyme is capable of oxidizing the chemiluminescent substrate to produce the peroxygenated intermediate.
45. The kit of Claim 44, wherein the chemiluminescent substrate comprises a moiety selected from the group consisting of a luminol moiety, an isoluminol moiety, an acridinium ester moiety, an acridinium sulfonylamide moiety or a luciferin moiety.
46. A method for detecting the presence of an analyte in a sample comprising:
- forming an enzyme complex between an enzyme and a substance capable of binding to the analyte;
 - adding the enzyme complex to the sample;
 - allowing the enzyme complex to bind with analyte present in the sample;
 - adding a chemiluminescent delivery system to the sample; and
 - measuring chemiluminescent emissions from the sample;
- wherein the chemiluminescent delivery system comprises a dendrimer and at least one enzymatically active chemiluminescent substrate conjugated to the dendrimer and wherein the amount of chemiluminescent emissions measured indicates the presence and/or the concentration of the analyte in the sample.
47. The method of Claim 46, further comprising a step of removing enzyme complex which did not bind with the analyte prior to the measuring step.
48. The method of Claim 46, wherein the substance capable of binding to the analyte is an antigen, an antibody or a nucleic acid probe.
49. The method of Claim 46, wherein the assay is conducted on a solid support.

WO 02/057745

PCT/US02/00022

50. The method of Claim 49, wherein the presence of an analyte is detected in a plurality of samples arranged in an array on the solid support.
51. The method of Claim 49, further comprising binding the analyte to the solid support.
- 5 52. The method of Claim 46, wherein the enzyme is selected from the group consisting of glycosidases, esterases, proteases, oxidases, peptidases and phosphatases.

PRIOR ART

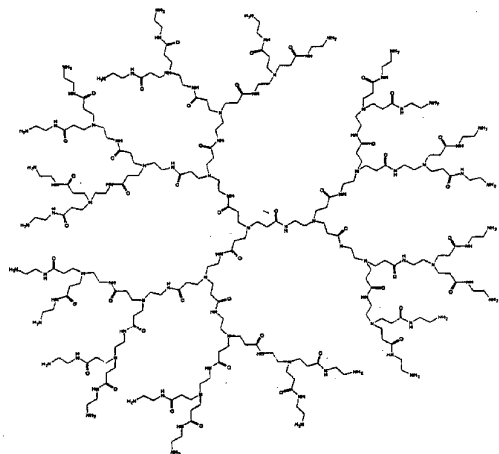


FIG. 1A

PRIOR ART

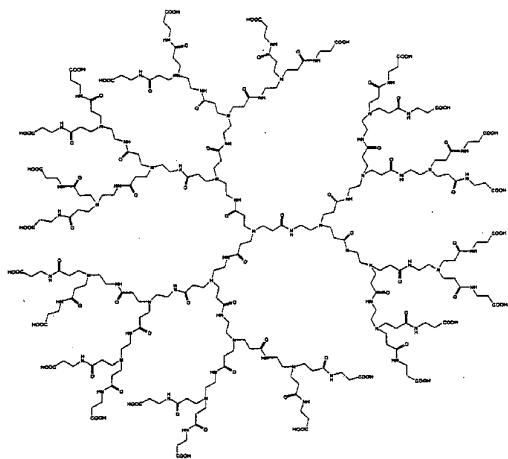


FIG. 1B

PRIOR ART

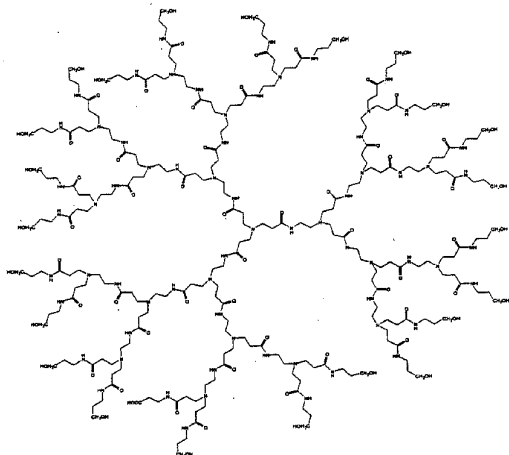


FIG. 1C

PRIOR ART

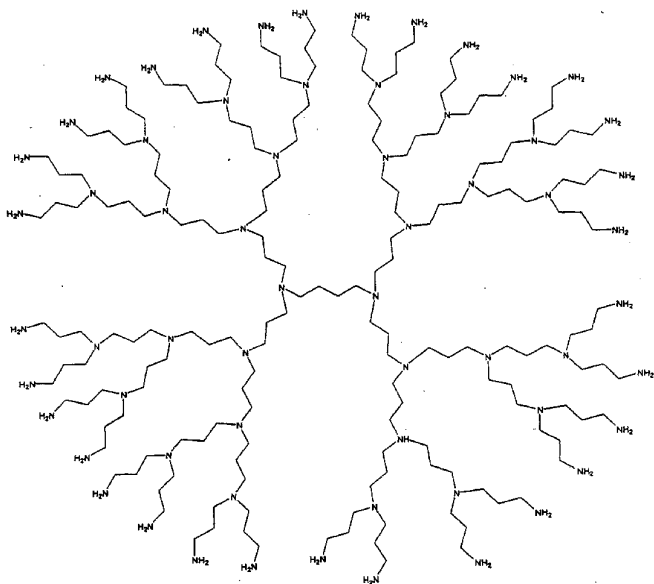


FIG. 1D

WO 02/057745

PCT/US02/00022

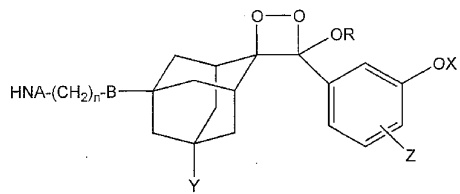


FIG. 2A

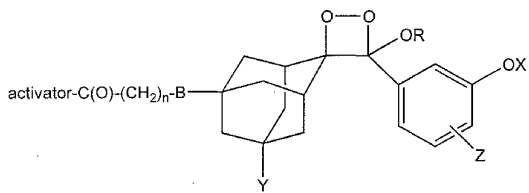


FIG. 2B

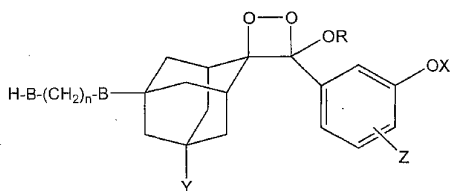


FIG. 2C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

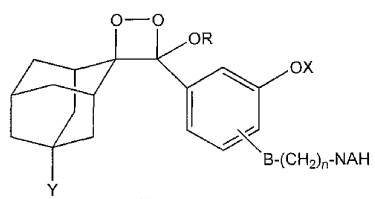


FIG. 2D

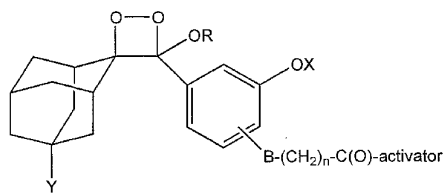


FIG. 2E

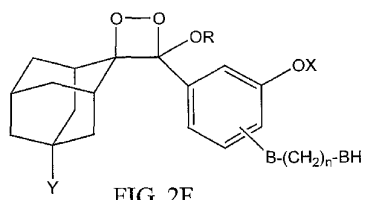


FIG. 2F

WO 02/057745

PCT/US02/00022

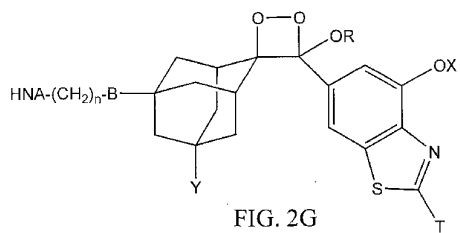


FIG. 2G

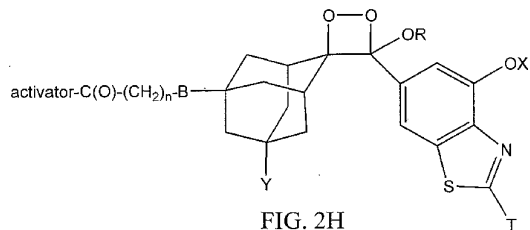


FIG. 2H

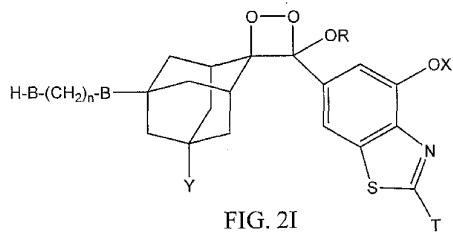
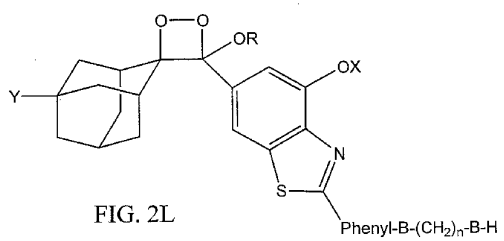
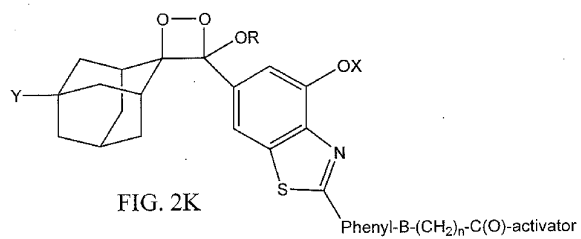
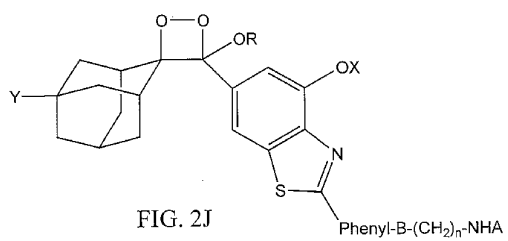


FIG. 2I

WO 02/057745

PCT/US02/00022



WO 02/057745

PCT/US02/00022

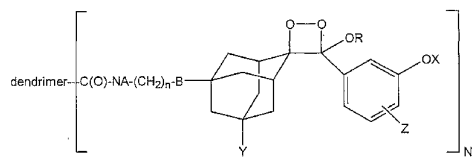


FIG. 3A

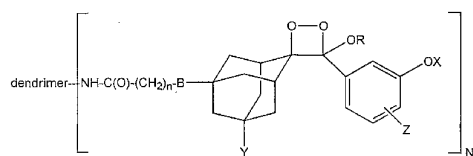


FIG. 3B

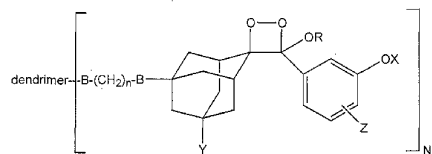


FIG. 3C

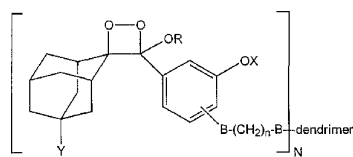


FIG. 3D

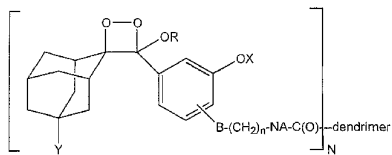


FIG. 3E

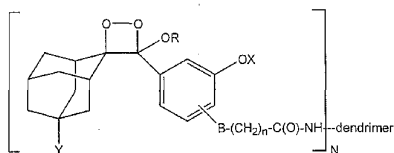


FIG. 3F

WO 02/057745

PCT/US02/00022

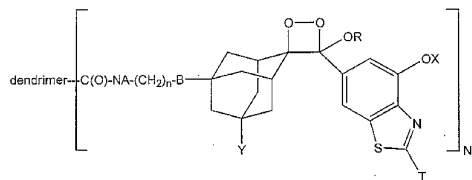


FIG. 3G

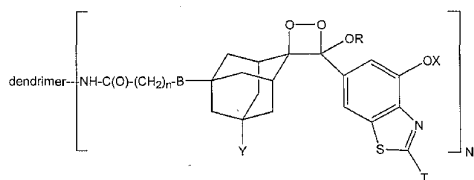


FIG. 3H

WO 02/057745

PCT/US02/00022

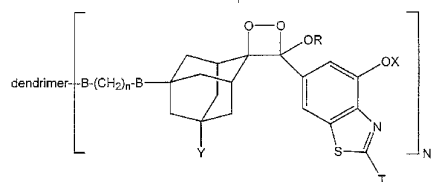


FIG. 3I

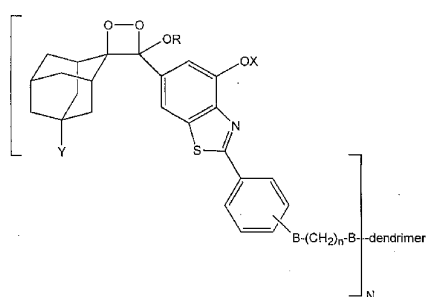
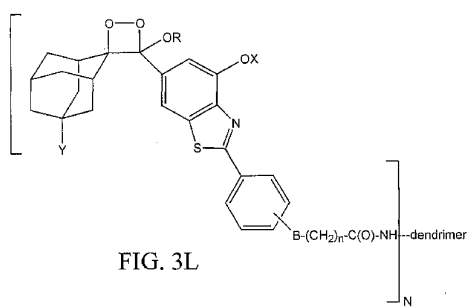
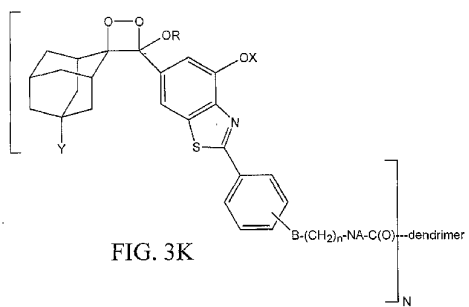


FIG. 3J

WO 02/057745

PCT/US02/00022



WO 02/057745

PCT/US02/00022

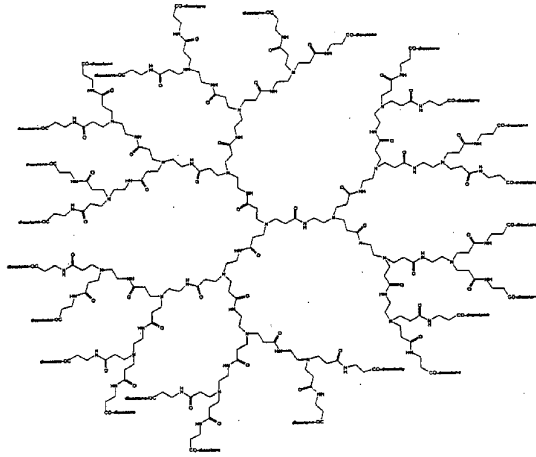


FIG. 3M

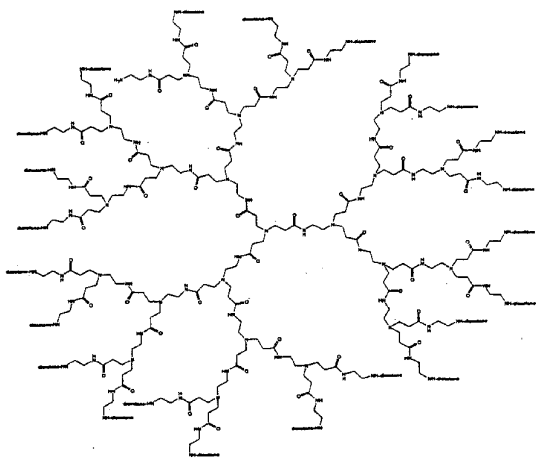


FIG. 3N

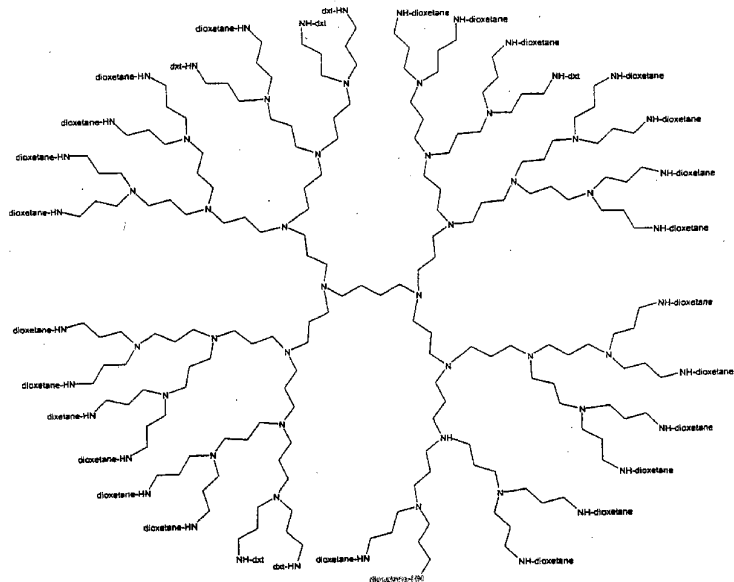


FIG. 30

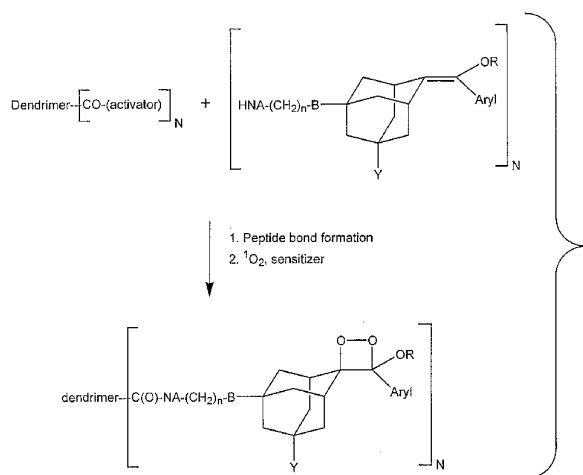


FIG. 4A

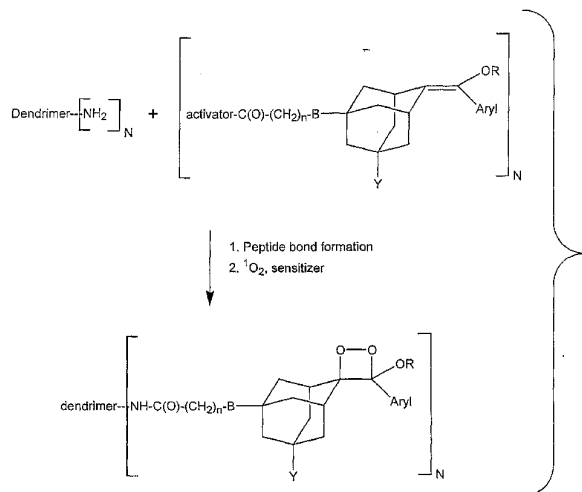


FIG. 4B

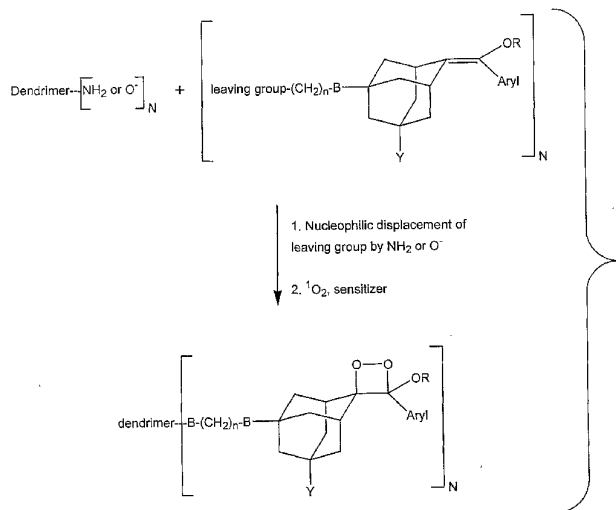


FIG. 4C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

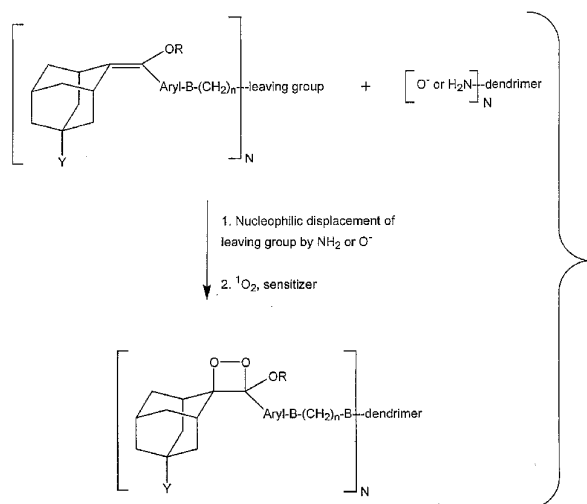


FIG. 4D

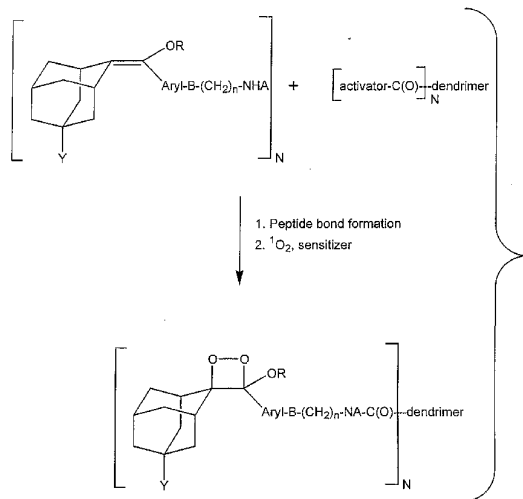


FIG. 4E

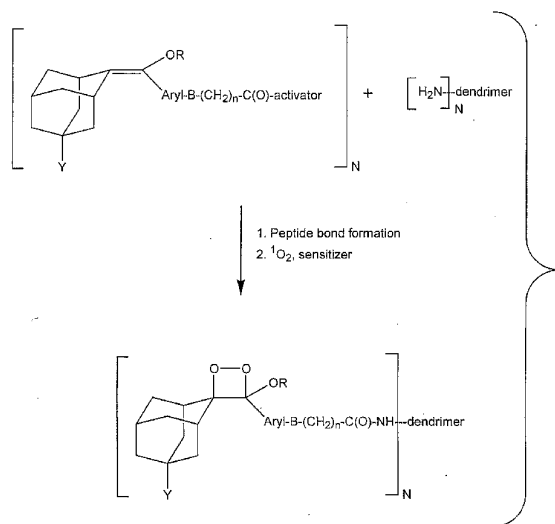


FIG. 4F

WO 02/057745

PCT/US02/00022

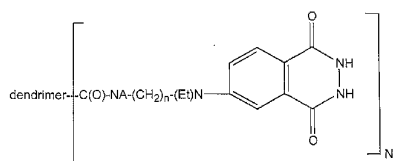


FIG. 5A

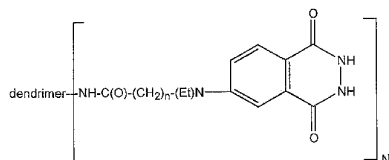


FIG. 5B

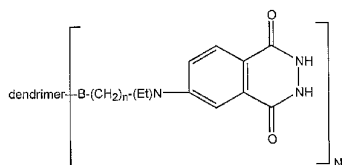


FIG. 5C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

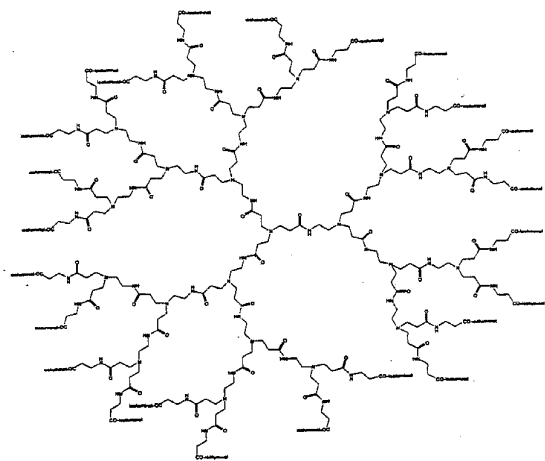


FIG. 5D

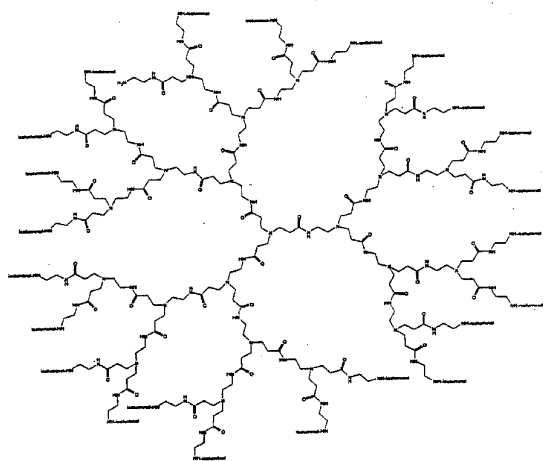


FIG. 5E

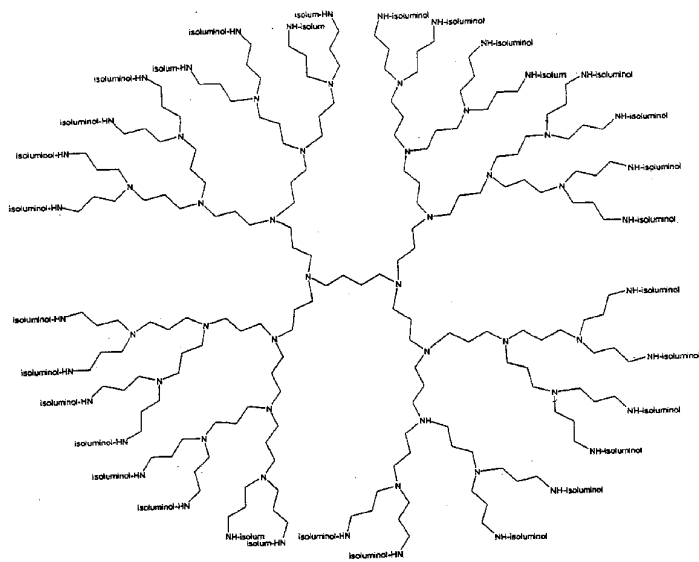


FIG. 5F

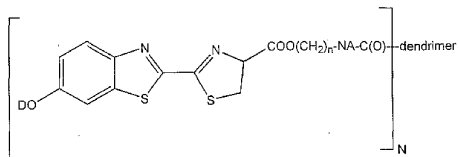


FIG. 5G

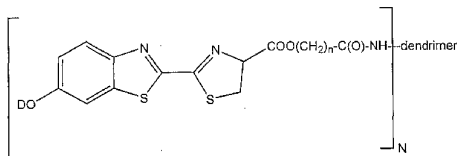


FIG. 5H

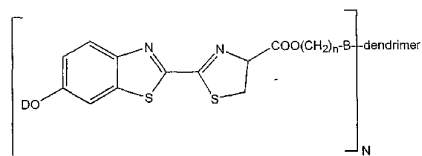


FIG. 5I

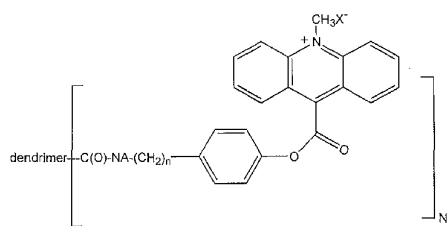


FIG. 6A

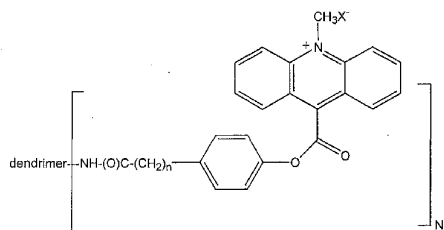


FIG. 6B

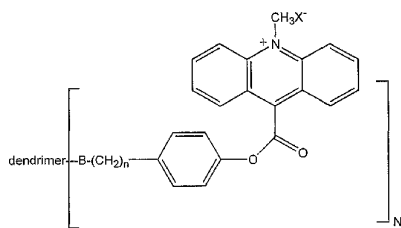


FIG. 6C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

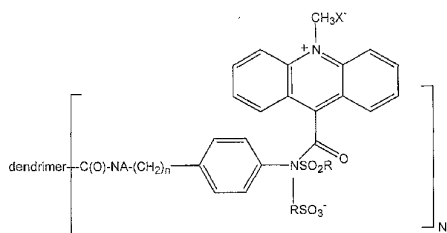


FIG. 6D

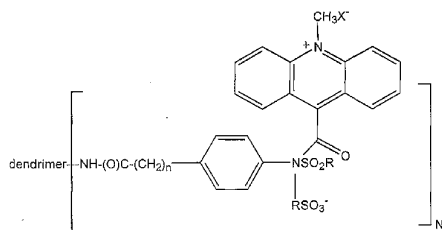


FIG. 6E

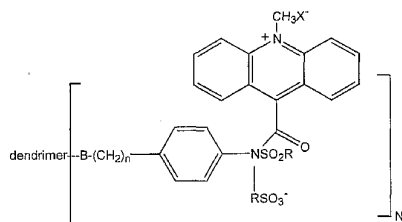


FIG. 6F

WO 02/057745

PCT/US02/00022

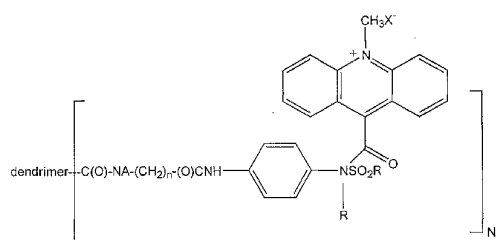


FIG. 6G

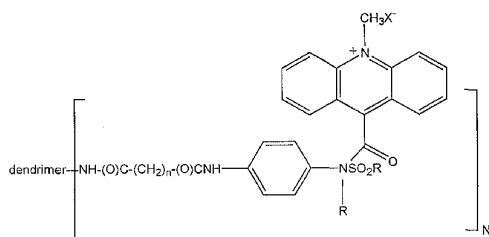


FIG. 6H

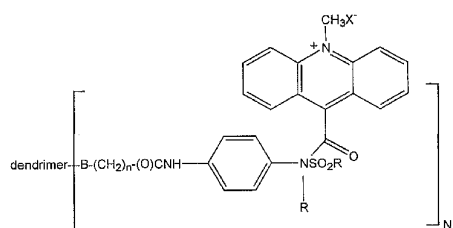


FIG. 6I

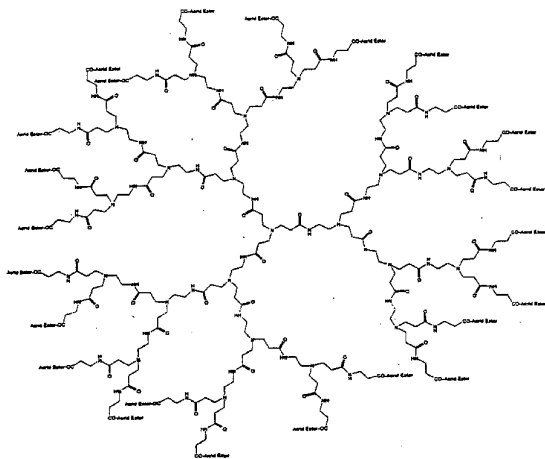


FIG. 6J

WO 02/057745

PCT/US02/00022

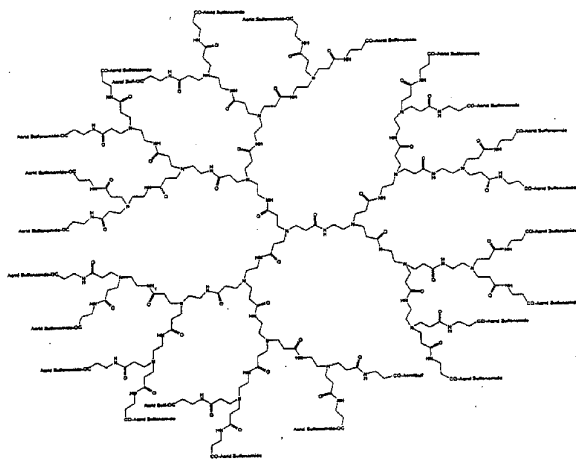


FIG. 6K

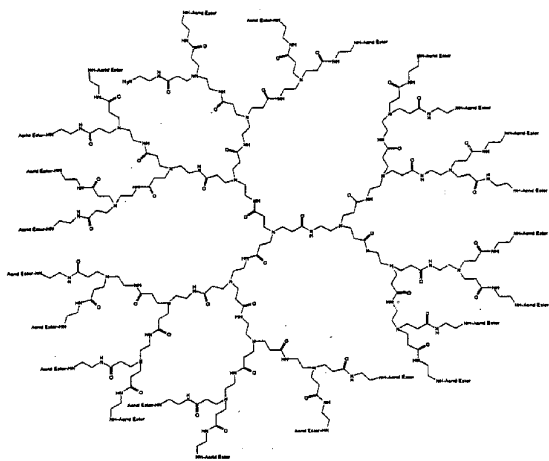


FIG. 6L

WO 02/057745

PCT/US02/00022

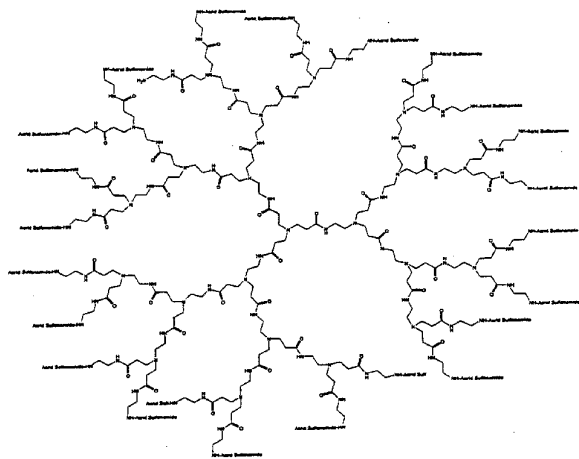


FIG. 6M

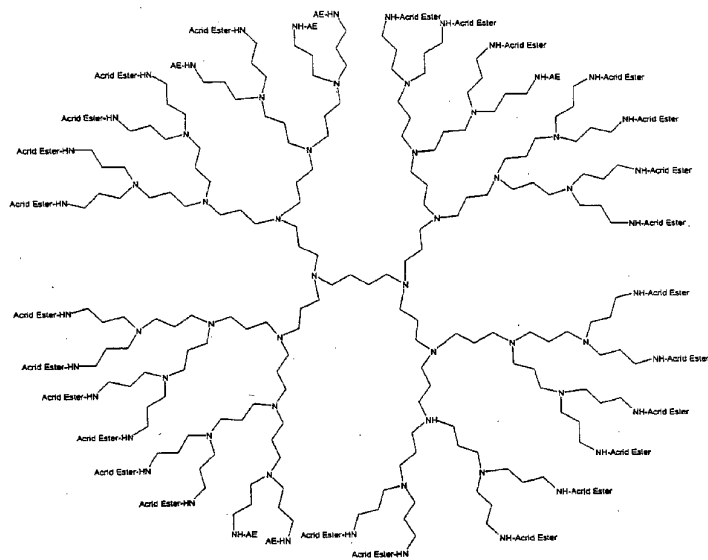


FIG. 6N

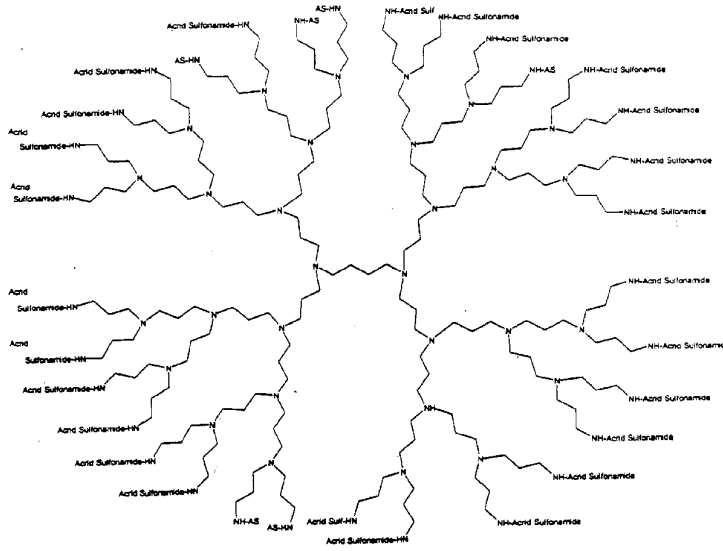


FIG. 60

WO 02/057745

PCT/US02/00022

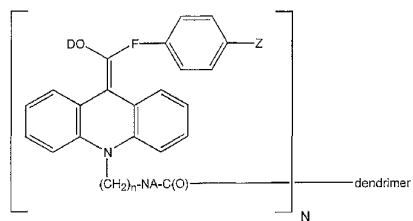


FIG. 6P

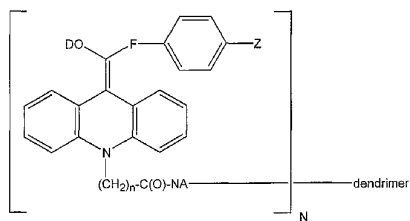


FIG. 6Q

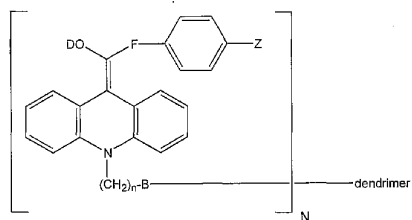


FIG. 6R

WO 02/057745

PCT/US02/00022

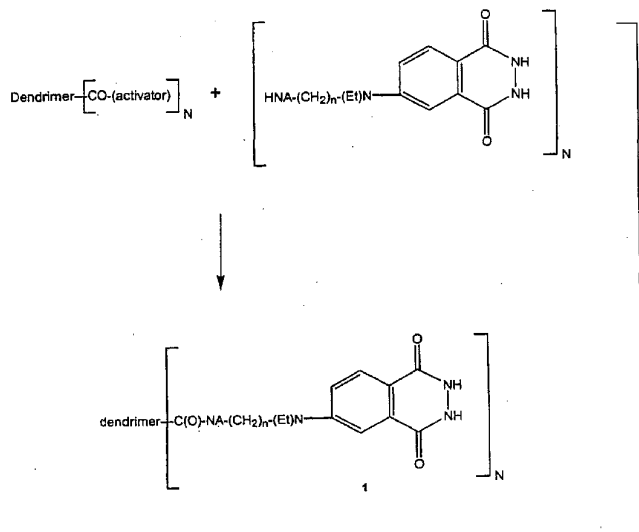


FIG. 7A

WO 02/057745

PCT/US02/00022

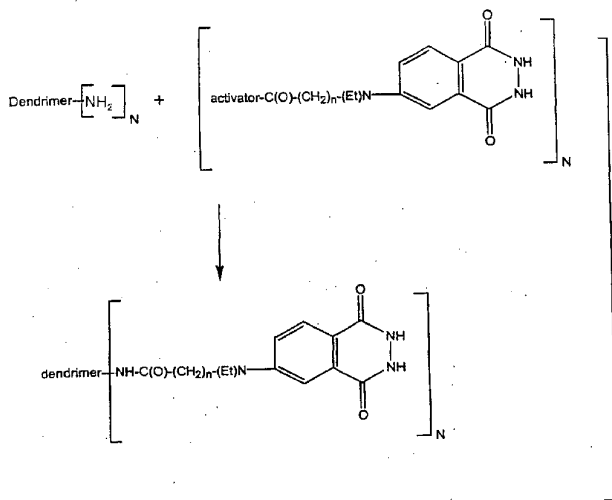


FIG. 7B

WO 02/057745

PCT/US02/00022

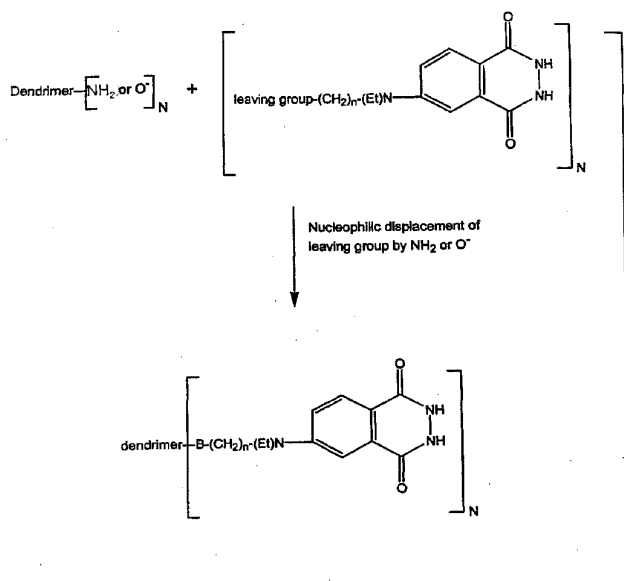


FIG. 7C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

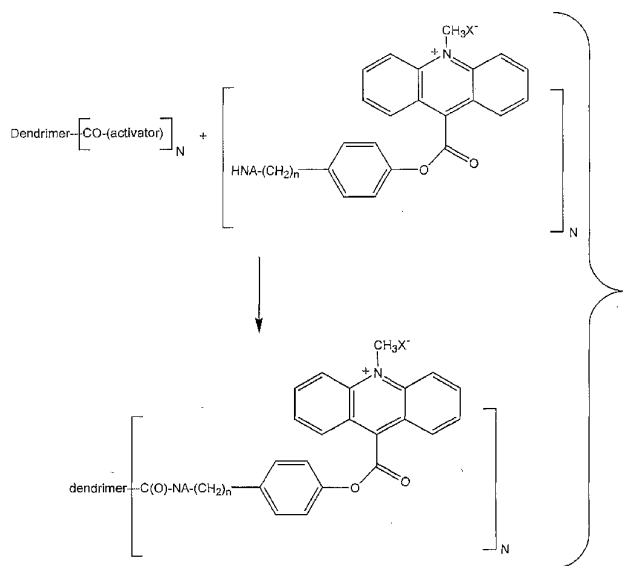


FIG. 8A

WO 02/057745

PCT/US02/00022

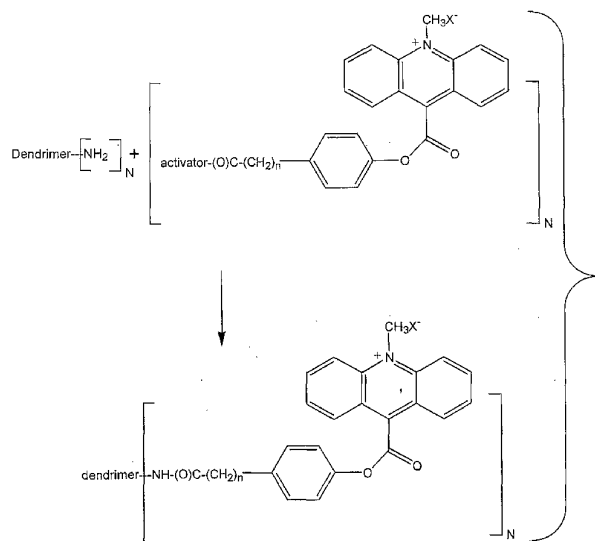


FIG. 8B

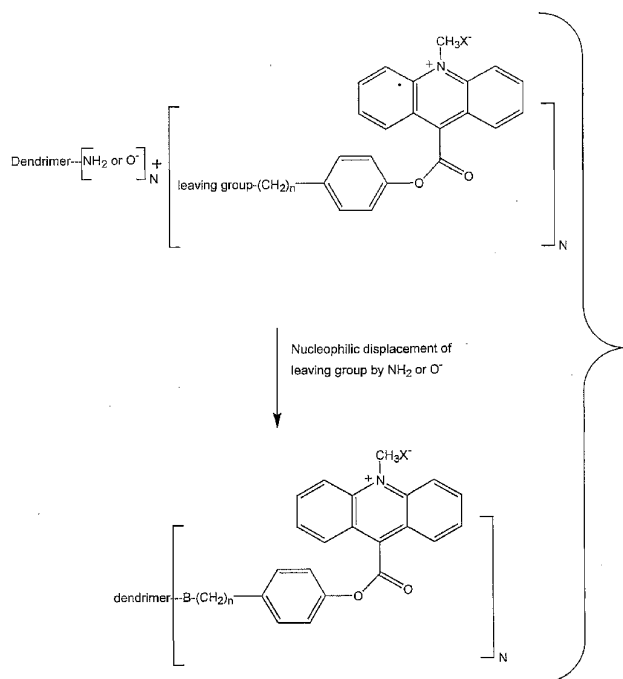


FIG. 8C

WO 02/057745

PCT/US02/00022

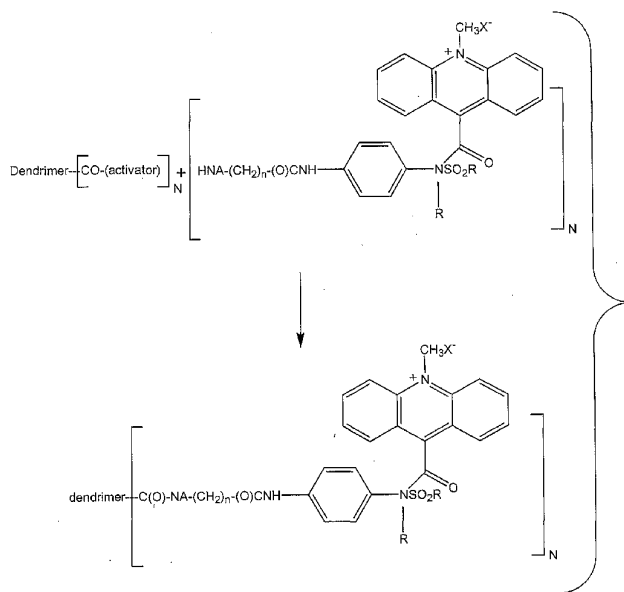


FIG. 8D

WO 02/057745

PCT/US02/00022

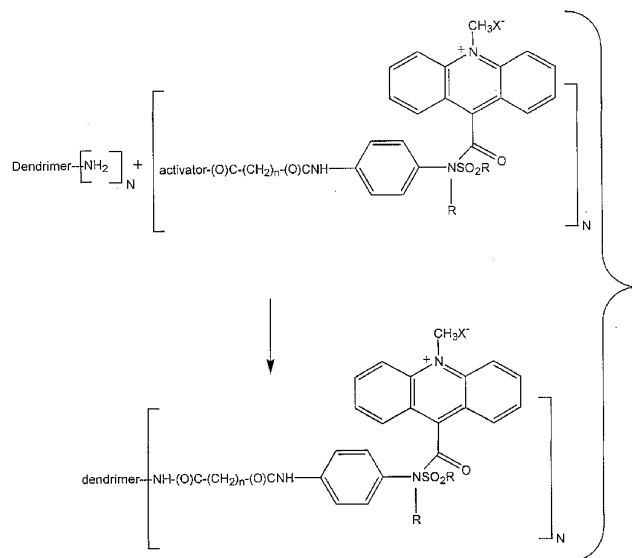


FIG. 8E

WO 02/057745

PCT/US02/00022

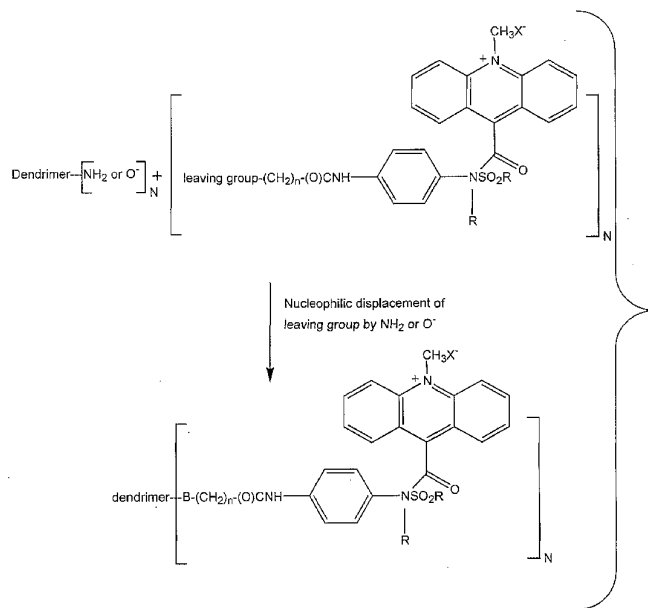


FIG. 8F

WO 02/057745

PCT/US02/00022

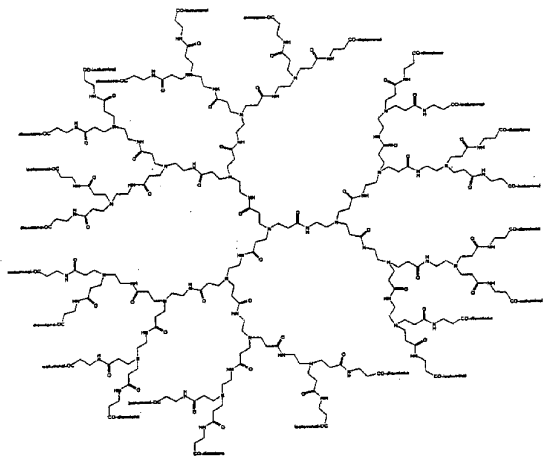


FIG. 9A

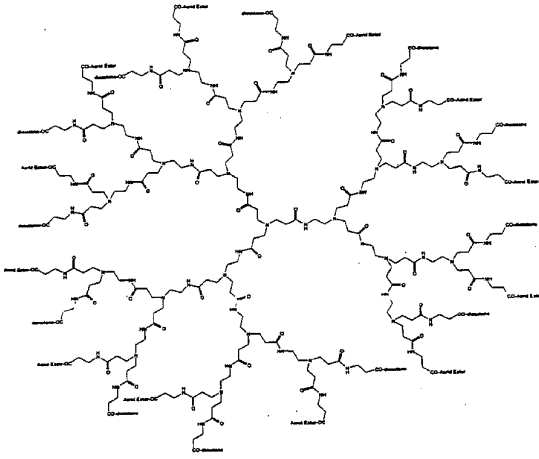


FIG. 9B

WO 02/057745

PCT/US02/00022

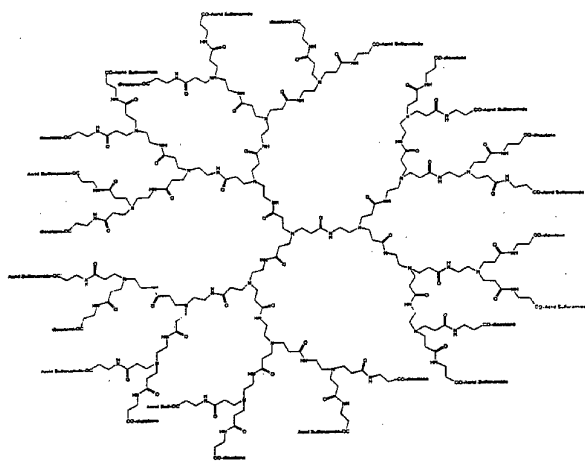


FIG. 9C

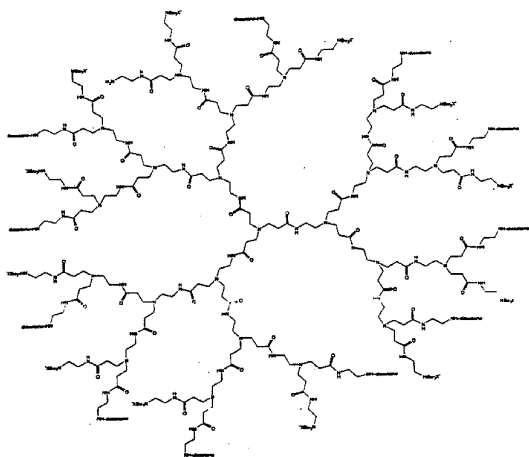


FIG. 10

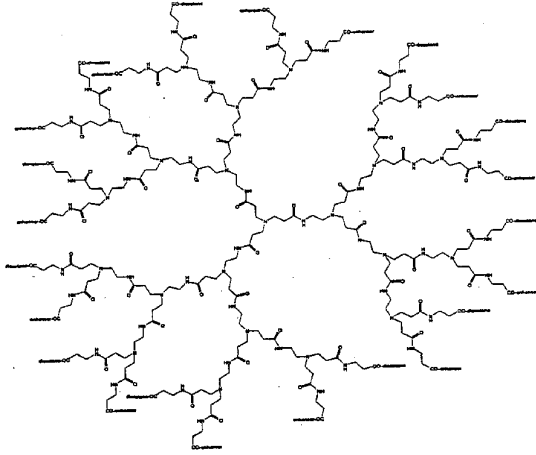


FIG. 11

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

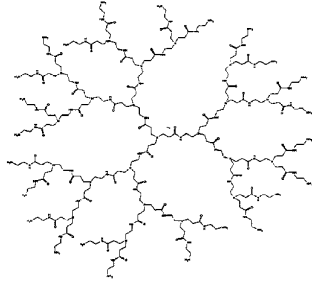
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057745 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/44, 1/42, 1/37, 1/66, 1/00, G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US0200022
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/259,870 8 January 2001 (08.01.2001) US
60/286,383 26 April 2001 (26.04.2001) US
- (71) Applicant: TROPIC, INC. [US/US]; 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730 (US).
- (72) Inventor: SPARKS, Alison, L.; 325 Johnson Street, North Andover, MA 01845 (US).
- (74) Agents: KELBER, Steven, B. et al.; Piper Marbury Rudnick & Wolfe LLP, 1200 Nineteenth Street, N.W., Washington, DC 20036 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HT, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, P1, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003

[Continued on next page]

(54) Title: DENDRITIC CHEMILUMINESCENT SUBSTRATES



(57) Abstract: Chemiluminescent substrate delivery systems comprising a conjugate a dendrimer and at least one chemiluminescent substrate are provided. The substrate delivery system can also include a chemiluminescence enhancer. The dendrimer/chemiluminescent substrate conjugates can be used in kits including an enzyme capable of activating the chemiluminescent substrate to produce a peroxygenated intermediate that decomposes to produce light. The dendrimer/chemiluminescent substrate conjugates can be used in assays to detect the presence of an analyte (e.g., an enzyme, an antibody, an antigen or a nucleic acid) in a sample. Figure (1A) shows a polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with NH₂ surface groups.

WO 02/057745 A3

WO 02/057745 A3 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/00022
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q1/48, 1/49, 1/57, 1/66, 1/00; G01N 33/53 US CL : 435/19, 21, 23, 24, 8, 4, 968, 975 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/19, 21, 23, 24, 8, 4, 968, 975 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) WEST: dendrimer, enzyme, chemiluminescence		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,083,708 A (SINGH et al) 04 July 2000, see col. 2, lines 14-68, and col. 26-30,	1-52
<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 "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "a" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 JULY 2002		Date of mailing of the international search report 06 AUG 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-8230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> LOUISE LEARY Telephone No. (703) 305-1233

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 2G054 AA02 AA06 AB04 BA02 CE03 EA01 GA09
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ61 QR03 QR10 QR12 QR15 QR16 QR32
 QR41 QR48 QR50 QR56 QR66 QS03 QS24 QS33 QS34 QS36
 QS39 QX01
 4J001 DA01 DB01 DB08 DC06 DC12 DD14 DD15 EA12 EA23 EA25
 FA03 GB14 GE02 GE04 GE06 JA20 JB31
 4J043 PA13 PB08 QB06 QB07 RA05 SA06 SA62 SB01 TA11 TA12
 TA53 TA54 TB01 UB011 UB221 UB241 YB08 YB17 YB21 YB37
 ZA60 ZB60

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004524521A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2002557779	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	特比克斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	热带公司		
[标]发明人	スパークスアリソンエル		
发明人	スパークス,アリソン・エル		
IPC分类号	G01N21/76 C08G69/08 C08G73/04 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/37 C12Q1/44 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/582 Y10S436/805		
FI分类号	G01N21/76 C08G69/08 C08G73/04 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/37 C12Q1/44 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G054/AA02 2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/BA02 2G054/CE03 2G054/EA01 2G054/GA09 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ61 4B063/QR03 4B063/QR10 4B063/QR12 4B063/QR15 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QS03 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4J001/DA01 4J001/DB01 4J001/DB08 4J001/DC06 4J001/DC12 4J001/DD14 4J001/DD15 4J001/EA12 4J001/EA23 4J001/EA25 4J001/FA03 4J001/GB14 4J001/GE02 4J001/GE04 4J001/GE06 4J001/JA20 4J001/JB31 4J043/PA13 4J043/PB08 4J043/QB06 4J043/QB07 4J043/RA05 4J043/SA06 4J043/SA62 4J043/SB01 4J043/TA11 4J043/TA12 4J043/TA53 4J043/TA54 4J043/TB01 4J043/UB011 4J043/UB221 4J043/UB241 4J043/YB08 4J043/YB17 4J043/YB21 4J043/YB37 4J043/ZA60 4J043/ZB60		
代理人(译)	津国 肇 彼田文雄		
优先权	60/259870 2001-01-08 US 60/286383 2001-04-26 US		
其他公开文献	JP2004524521A JP3975167B2		

摘要(译)

化学发光底物递送系统，其包含树枝状大分子和至少一种化学发光底物的缀合物。底物递送系统还可包括化学发光增强剂。树枝状大分子/化学发光底物缀合物用于含有酶的试剂盒中，所述酶可活化化学发光底物并产生降解和发光的过氧化物中间体。树枝状聚合物/化学发光底物缀合物用于测定中以检测样品中分析物（例如，酶，抗体，抗原或核酸）的存在。