(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3844358号
(P3844358)

(45)発行日　平成18年11月8日(2006.11.8)　(24)登録日　平成18年8月25日(2006.8.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07D 219/06	(2006.01)	C07D 219/06		
C07J 43/00	(2006.01)	C07J 43/00		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N 33/53	A	
G01N 33/532	(2006.01)	G01N 33/532	B	
G01N 33/569	(2006.01)	G01N 33/569	K	

請求項の数 13　(全 35 頁)

(21)出願番号	特願平7-526216
(86)(22)出願日	平成7年4月6日(1995.4.6)
(65)公表番号	特表平10-503169
(43)公表日	平成10年3月24日(1998.3.24)
(86)国際出願番号	PCT/IB1995/000244
(87)国際公開番号	WO1995/027702
(87)国際公開日	平成7年10月19日(1995.10.19)
審査請求日	平成14年4月8日(2002.4.8)
(31)優先権主張番号	08/225,165
(32)優先日	平成6年4月8日(1994.4.8)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
バイエル　コーポレーション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２０３２　イースト　ウォルポール　コウニー　ストリート　３３３
(74)代理人
弁理士　柳田　征史
(74)代理人
弁理士　佐久間　剛
(72)発明者　ロウ，セイ－ヨン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２０９０　ウェストウッド　フォーブスロード　１５

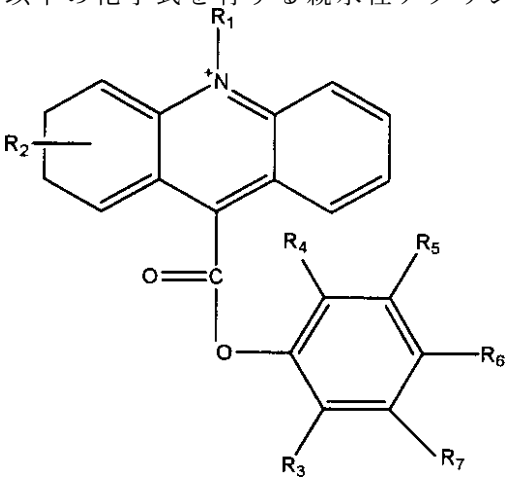
最終頁に続く

(54)【発明の名称】新しい官能化親水性アクリジニウムエステル

(57)【特許請求の範囲】

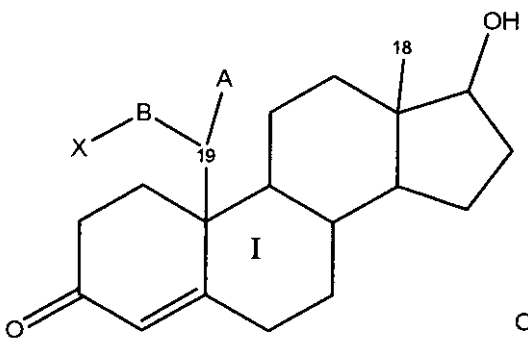
【請求項１】

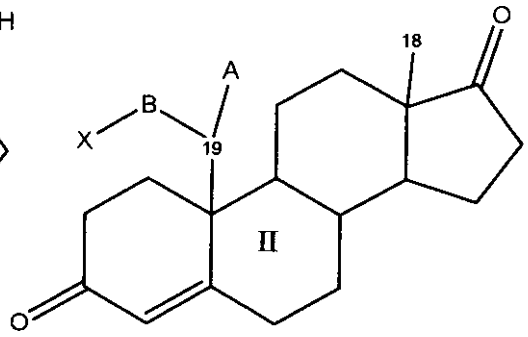
以下の化学式を有する親水性アクリジニウムエステルであって、

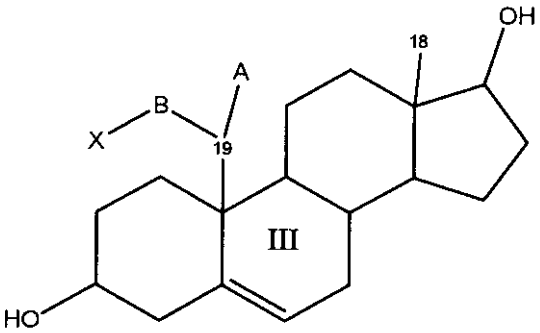


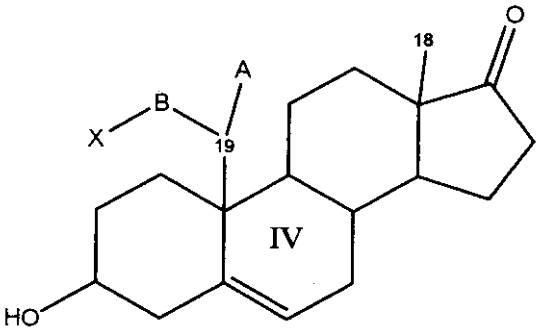
ここで、R_1がスルホプロピル基またはスルホエチル基であり；R_2が水素、メトキシ、エトキシ、ニトロまたはハロゲンであり；R_5およびR_7が水素であり；R_3およびR_4がそれぞれ独立してメチル、エチルまたはイソプロピル基であり；R_6がＮ－スクシンイミジルオキシカルボニルであり；さらに、フェノキシ環上のR_5、R_6およびR_7置換位置が相互

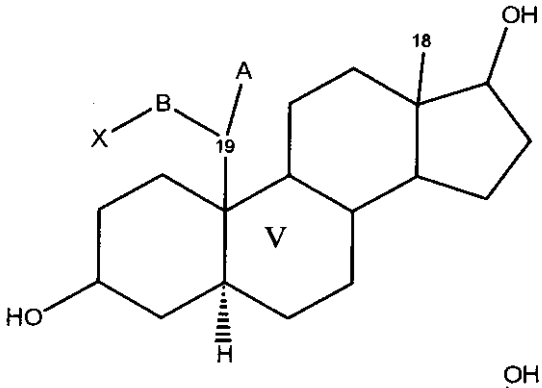
に交換可能であることを特徴とするアクリジニウムエステル。
【請求項２】
R_1がスルホプロピル基であり；R_2、R_5およびR_7が水素であり；R_3およびR_4がメチル基であることを特徴とする請求の範囲第１項記載のアクリジニウムエステル。
【請求項３】
直接的に、あるいはヘキシル－１，６－ジアミン、エチレンジアミンおよびアミノカプメン酸より成る群から選択される二官能性リンカーを介して、ホルモン、ハプテンおよび治療薬より成る群から選択される生体高分子または生物活性分子に共有結合した請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルを含むアクリジニウムエステル接合体。
【請求項４】
オリゴヌクレオチドが前記生体高分子に結合しており、さらに該生体高分子が多数のアクリジニウムエステルおよび必要に応じて多数の親水性ポリマーと結合していることを特徴とする請求の範囲第３項記載のアクリジニウムエステル接合体。
【請求項５】
前記オリゴヌクレオチドが遺伝子プローブであることを特徴とする請求の範囲第４項記載のアクリジニウムエステル接合体。
【請求項６】
前記生体高分子が、タンパク質、ペプチド、不活化タンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、神経伝達物質、ホルモン、ステロイドホルモン、ウイルス、細菌、トキシンおよびサイトカインよりなる群から選択され、あるいは前記生物活性分子がハプテンであることを特徴とする請求の範囲第３項記載のアクリジニウムエステル接合体。
【請求項７】
前記ウイルスが風疹ウイルスであり、あるいは前記タンパク質が、抗体、抗体断片、アビジン、ストレプトアビジン、アレルゲン、受容体タンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質、神経伝達物質、ウイルス抗原または細菌抗原であり、あるいは前記ハプテンがステロイドホルモンであることを特徴とする請求の範囲第６項記載のアクリジニウムエステル接合体。
【請求項８】
前記生物活性分子がステロイドホルモンであり：該ステロイドホルモンがテストステロンであり、かつ前記リンカーが、Ｃ－１９－Ｃ結合、オレフィンＣ－１９結合またはＣ１９－Ｏ結合により連結されているか；あるいは該ステロイドホルモンがテストステロンであり、かつ前記共有結合が、ヘキシル－１，６－ジアミン、エチレンジアミン、またはアミノカプロン酸を介して生じているか；あるいは該ステロイドホルモンが、下記の化学構造式より選択されるテストステロン誘導体であることを特徴とする請求の範囲第３項記載の接合体：

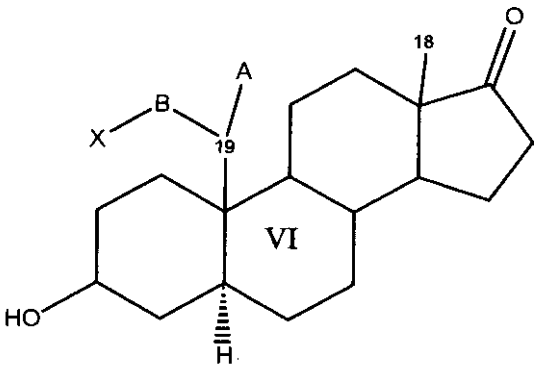


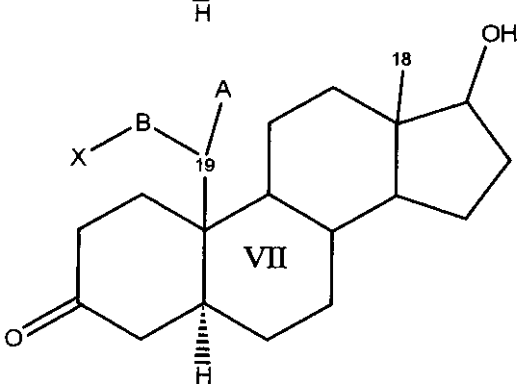












（ここで、Ａは、－ＯＨ、－Ｎ（R_{13}）$_2$、－ＮＨR_{13}、ニトロ、ハロゲン化物、－ＯR_{13}、－ＯＣＯR_{13}、－トシレート、－メシレート、－アジド、－イソシアネート、－チオイソシアネート、－ＳR_{13}、－ＳＨ、－ＳＳR_{13}、－ホスホネート、－スルホネート、－ＮＨＣＯＯR_{13}、－ＮＨＣＯR_{13}、－ＮＨＣＯＮH_2、ヒドラジン、シアン化物、および－R_{13}よりなる群から選択される官能基であり；ここで、R_{13}は、10までの炭素原子および５までの異種原子を有するアルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキルであり；Ｂは－（CH_2）$_n$であって、ここでｎは１から４の整数または－Ｃ＝であり；Ｂが－Ｃ＝である場合、Ａは省かれ；Ｘは、カルボキシレート、－ＣＯＯR_{12}、－ＣＯＮＨR_{12}（ここで、R_{12}は、15までの炭素原子および５までの異種原子を有するアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキルであり）、または、ハロゲン化物、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、およびイミダゾールより成る群から選択される脱離基が付けられたカルボ

ニルである。）
【請求項９】
試料中の分析物の濃度に直接的または間接的に比例する請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルにより発せられる信号を測定することを特徴とする、試料中の分析物の量を測定する方法。
【請求項１０】
ａ．請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルで標識した、必要に応じて２種類以上の分子単位の複合体である検出体分子と、試料とを接触させ；
ｂ．結合した検出体および分析物を隔離し；
ｃ．過剰の検出体を洗い流し；
ｄ．分析物結合検出体からの信号を測定する；工程を含み、必要に応じて放出剤が用いられることを特徴とする請求の範囲第９項記載の方法。
【請求項１１】
ａ．請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルで標識した競合トレーサ、および分析物の特異的結合体と、試料とを接触させ；
ｂ．前記特異的結合体を回収し；
ｃ．前記特異的結合体に結合したトレーサまたは非結合トレーサにより発せられる信号を測定する；工程を含み、必要に応じて放出剤が用いられることを特徴とする請求の範囲第９項記載の方法。
【請求項１２】
ａ．第１の特異的結合体、および請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルで標識した第２の特異的結合体と、試料とを接触させ；
ｂ．前記アクリジニウムエステルの信号を検出する；工程を含み、必要に応じて放出剤が用いられることを特徴とする請求の範囲第９項記載の方法。
【請求項１３】
ａ．請求の範囲第１項または第２項記載のアクリジニウムエステルで標識した検出体、および該検出体に対する競合結合体と、試料とを接触させ、
ｂ．前記競合結合体に結合した検出体を隔離し；
ｃ．過剰の検出体および検出体に結合した分析物を洗い流し；
ｄ．前記競合結合体に結合した検出体からの信号を測定する；工程を含み、必要に応じて放出剤が用いられることを特徴とする請求の範囲第９項記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の属する技術分野
本発明は分析物を検出する新しい方法に関するものである。本発明は、小胞からエステルを著しく漏らすことなく、リポソーム小胞内に包むことのできるアクリジニウムエステルを化学発光（chemiluminescent）マーカーとして用いた、分析物の検出に関するものである。本発明はまた、化学発光標識として有用で、驚くべきことに従来のアクリジニウムエステル化合物よりも多量の収量が得られる新しい官能化親水性アクリジニウムエステルの合成、並びにその使用に関するものである。本発明はまた、直接的および間接的の接合体を形成するのに使用する新しい親水性アクリジニウムエステルに関するものである。本発明はまた、そのような官能化親水性アクリジニウムエステル化合物から形成された新しい接合体に関するものである。本発明はさらに、これらの新しい官能化親水性アクリジニウムエステルおよびその接合体を用いたアッセイに関するものである。本発明は本発明の化合物を用いたイムノアッセイに関するものである。
発明の背景
臨床アッセイにおいて、アクリジニウムエステルを化学発光標識として使用することが知られている。例えば、ヨーロッパ特許出願第82 306 557.8号には、イムノアッセイにおいて、化学発光標識として、Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミジル部分により活性化されたアリールアクリジニウムエステルを使用することが記載されている。米国特許第4,745,181号、同第4,918,192号、および同第5,241,070号、並びに1994年1月26に出願された同時係

属出願である米国特許出願第08/032,947号および1993年3月17日に出願された同第08/032,085号には、イムノアッセイおよび核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて有用である多置換アリールアクリジニウムエステル（ＰＡＡＥ）が記載されている。米国特許第5,227,489号および本出願の親出願である、1993年3月17日に出願された同時係属の分割出願である米国特許出願第08/032,231号には、臨床アッセイ、特にリポソームを伴う臨床アッセイにおいて有用である、親水性多置換アリールアクリジニウムエステルおよびそのルミゾーム接合体が記載されている。

米国特許第4,745,181号に記載されているような、２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル－１０－メチル－９－アクリジンカルボキシレート　メチルスルフェート（ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）を合成する以前の方法には、中間体としてフェノキシ基の代わりにベンジルオキシカルボニル基を用いて、長い合成経路を経てアクリジンエステルを形成することが必要である。有用なアクリジニウムエステル標識を合成する、新しい効率的な方法を開発することが本発明の目的である。スクシンイミジル３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゾエートおよび４－ジメチルアミノピリジンの溶液を９－アクリジンカルボニルクロライドヒドロクロライドと組み合わせる単純な方法により、２′６－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル９－アクリジンカルボキシレート（ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ）を形成する予期せぬ能力は、同一の反応における２種類の反応性リービング（leaving）基、９－アクリジンカルボニルクロライドからの酸クロライドおよびスクシンイミジル３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゾエートからのスクシンイミジルエステルが共存する点から見て、容易に予期できなかった。例えば、Ｎ－スクシンイミジル３（４－ヒドロキシフェニル）－プロピオネートが上述したような９－アクリジンカルボニルクロライドと反応する場合、オルト位置に２つのメチル基がないために、穏やかな条件下（ほぼ室温）で縮合を行なうことができる。（例えば、反応物がオルト置換されたメチル基を含んでいない、米国特許第4,946,958号、コラム４－５を参照のこと。）一方、２つのメチル基が存在する場合、メチル基を原因とする立体障害のために、縮合反応が生じるためには非常に厳しい条件（100℃、２時間）が必要とされる。しかしながら、例えば、米国特許第4,745,181号に記載されているように、メチル基が存在することによる利点もある。すなわち、生成されたアクリジニウムエステルがさらに安定する。

従来技術のアクリジニウムエステルおよび他の化学発光化合物の親油性の性質は、リポソームの壁を通して急速に漏れが生じるために、それらの物質をリポソーム内に封入するのに不適切にしてしまう。さらに、従来技術のアクリジニウムエステルおよび他の化学発光化合物の制限された水溶性は、リポソームの小胞当たりいくつかのマーカー分子のみを封入させ、増幅される信号が比較的小さくなってしまう。

本発明の新しい官能化親水性アクリジニウムエステルは、イムノアッセイにおいて有用であり、従来の方法よりも感度が優れた結果を生じ、危険な放射線標識、または有機酵素／基体を使用する必要がない。この種の化学発光標識を使用することにより、従来の方法を予期できぬほど改良でき、以前に実施できなかったかまたは不正確なアッセイ方法論を機能的に改良できる。本発明の親水性アクリジニウムエステルは、複合体の溶解度を減少させることなく、標識生物分子または化合物に直接使用することができるという新しい発見により、イムノアッセイの分野において多くの用途が検討されている。本発明の新しい化合物は、反応混合物中に過剰の試薬を使用する必要なく、イムノアッセイを感度の高いものとし、所望の特異的相互作用を干渉することなく、非特異的相互作用を減少するように設計されている。

アクリジニウム核の窒素原子での置換基として親和性部分を担持するＰＡＡＥを有することの別の予期せぬ効果は、同一の位置で置換されたアルキル基（米国特許第4,745,181号）またはカルボキシメチル基（G.Zomer等、1989、Anal. Chem. Acta 227:11-19）を単に有するアクリジニウムエステルのものに対して、化学発光量子収量が著しく改良されたことである。

イムノアッセイの分野はよく開発されており、本発明は、イムノアッセイの分野において

量子の発達に拍車をかける独特の標識付け系の発見である。イムノアッセイの分野において、低濃度のものに対して特異性が高く、感度が高く、測定のために、検出可能で区別できる信号を発することのできるアッセイを行なうことが望ましい。本発明は、溶解度を損なうことなく、低濃度で分析物を特異的に検出するものである。本発明は、低レベルの分析物を検出するのに使用できる多くの特異的標識付け物質を作成する手段を提供する。本発明はまた、当業者に、アッセイキットおよび試薬キットとして容易に自動化および商業化できるイムノアッセイを行なう新しく有用な手段を教示する。

アビジン、抗体、ＤＮＡ結合タンパク質、ヒストン、およびリボソームのような生物活性タンパク質との接合体における本発明の新しいアクリジニウムエステルの用途が、合成化合物の親水性により可能になる。これらの新しいアクリジニウムエステルはまた、単離されたかまたは無傷の、ＲＮＡ、ＤＮＡ、タンパク質、ペプチド、不活化タンパク質、神経伝達物質、ホルモン、ウイルス、ウイルス性抗原、細菌、細菌性抗原、トキシン、サイトカイン（cytokines）、抗体断片、受容体タンパク質、および体内と体外の両方における他の標的に標識付けるのに有用である。組織試料、血清試料または他の生物学的試料の採集、および迅速アッセイにおいて特定の分析物を測定するのに以前は困難であった検出が、本発明の組成物および方法により可能になる。

本発明のある特定の用途は、病原検出の分野におけるものである。風疹のようなウイルス性病原を検出するために多くのアッセイが開発されているが、本発明は、以前の化学発光方法よりも予期せぬほど優れた独特で感度の高いアッセイを提供する。本発明の方法は、感度が従来のアッセイに匹敵し、アッセイを行なうのに必要な時間がより効率的である。

本発明の別の用途は、生物学試料におけるホルモンまたはハプテンもしくは他の小さな生物学的活性分子の検出の分野にある。ホルモンまたはハプテンの含有量が少ない場合、そのような生物学試料中のホルモンまたはハプテンの感度の高い迅速な検査方法、およびその含有量の測定を行なうことが有用である。可能性のある実施例の１つ、テストステロンのようなステロイドホルモンのレベルの検出である。同種および異種ハプテン接合体を用いたテストステロンの検出が知られている。この方法学において、抗体はテストステロン免疫原の１つの形態に生成される。次いで、この抗体を用いて、試料中のテストステロンを検出し、免疫原とは違う形態の接合競合ハプテントレーサを加える。同種アッセイは、Ｃ４－テストステロン－Ｂ－ガル接合体ハプテン、およびＴ－３－Ｏ－ＣＭＯ－グルコアミラーゼ接合体を用いた場合のような、許容できない高交差反応性を負っている。１１ａ－置換ハプテン－ＨＲＰ、およびＴ－３－Ｏ－ＣＭＯハプテン－ペニシリナーゼに関しては、いくぶん低い交差反応性が達成された（Rao等、1992、Steroids 57:154-162）。本発明は、本発明の親水性アクリジニウムエステル標識が非特異的相互反応の減少に寄与するといった点で、以前の異種ハプテンアッセイよりも優れた検出法を提供する。

したがって、本発明の目的は、化学発光トレーサとして使用する、新しい官能化親水性アクリジニウムエステルおよびその接合体を提供することにある。本発明の目的はまた、官能化親水性アクリジニウムエステルおよびその接合体を用いた分析物を検出する新しい方法を提供することにある。アクリジンエステルを効率的に製造する新しい改良合成方法を提供することが本発明の目的である。

発明の概要

単体またはリポソーム中に含めたときのいずれかで、感度が改良された結合アッセイ（例えば、イムノアッセイおよび遺伝子プローブアッセイ）における化学発光物質として有用な新しいアクリジニウムエステルを開示する。さらに、これらのエステルの合成および分析物を検出するアッセイにおけるそれらの使用について記載する。特に、テストステロンおよび風疹ウイルスのアッセイを開示する。

【図面の簡単な説明】

第１図は、ＤＭＡＥ－ＮＨＳの改良合成を示す図である。

第２図は、ＤＭＡＥ－ＮＨＳの以前の合成方法を示す図である。

第３図は、本発明の化合物を用い、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－１９－ＨＣＭＴトレーサを用いたテストステロン化学発光イムノアッセイの標準曲線である。

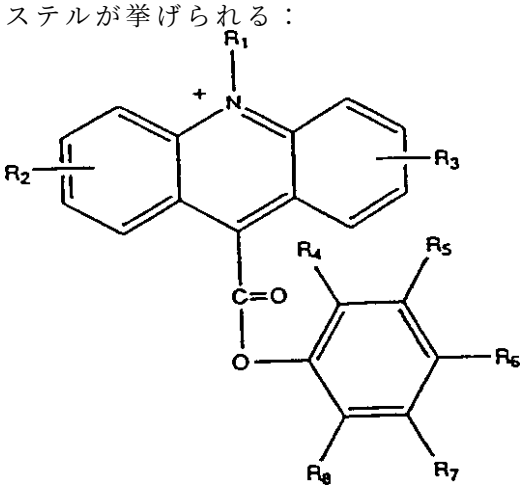
第４図は、本発明の化合物を用いたテストステロンの化学発光イムノアッセイにおいて異種および同種トレーサの結合曲線の比較を示した図である。この図面は、非親水性アクリジニウムエステルに対して親水性アクリジニウムエステルを用いた場合の比較も示している。
第５図は、ＤＰＣコート－ａ－カウントラジオイムノアッセイ（カリフォルニア州、ロサンゼルス、ダイアグノスティックプロダクツ社）とともに本発明の化合物を用いたＡＣＳテストステロンイムノアッセイからの結果の相関を示すプロットである。
第６図は、ＤＭＡＥ風疹アッセイと比較した本発明の化合物を用いたアッセイ結果の陰性に対する陽性の比率を比較した個体群研究を示す棒グラフである。
第７図は、チバコーニングＡＣＳ－180装置で行なった、ＡＣＳテストステロンアッセイのアッセイ構成を示す。
第８図は、チバコーニングＡＣＳ－180装置で行なった、ＡＣＳエストラジオールアッセイのアッセイ構成を示す。
第９図は、チバコーニングＡＣＳ－180装置で行なった、ＡＣＳ特異的ＩｇＥアッセイのアッセイ構成を示す。

発明の詳細な説明

明細書および請求の範囲で用いた以下の用語は、下記の意味を有するものとする：
分析物　－　モノまたはポリエピトープの、抗原の、またはハプテンのリガンドである、測定すべき化合物または組成物。分析物は１つのＤＮＡまたはＲＮＡであってもよい。分析物は、液体中または固体支持体上に見られる。
接合体　－　化学発光化合物と第２の化合物または分子の組合せ。このような接合体は、第２の化合物当たり多くの化学発光分子を有していても差支えない。
間接接合体　－　化学発光化合物と第２の化合物または分子との組合せ。第２の化合物または分子と組み合わされた化学発光化合物は次いで、第３の化合物または分子と組み合わせることができる。このような接合体は、複合体当たり多くの化学発光分子を有していても差支えない。
同種　－　同位置で同一のリンカーにより連結された同一の化合物。
異種　－　異なる位置で異なるリンカー、同位置で異なるリンカー、異なる位置で同一のリンカーにより連結された化合物。
リンカー　－　２つの化合物または分子間の物理的または化学的な橋、結付き、接続；二官能価または多官能価リンカー。ある化合物へのリンカーの結合により、反応部位をさらなる反応に利用できるようにできる。
ハプテン　－　それ自体では免疫応答を誘発できないが、別の分子に適切に付着されたときに、ハプテンを特異的に認識する抗体を製造できるようになる不完全抗原。
本発明により具体化され、本発明の方法において有用なアクリジニウムエステルは、親水性アクリジニウムエステル、そのような化合物の官能化された形態、またそれらの接合体、であり、化学発光信号を生じることのできるどのようなアクリジニウムエステルであっても差支えない。本発明の親水性ＰＡＡＥは、追加の求電子性またはリービング（leaving）基とともに、多くの標的に対する接合体として有用である。このようなＰＡＡＥの親水性部分（スルホネート、ホスホネート、スルフェート、ホスフェートのような高イオン化可能な基を担持するアルキルスペーサからなる）には、水溶解度を高める原因があり、それゆえ、トレーサ、特にＰＡＡＥを、ステロイド、治療薬、および他の制御された化学物質のような小さな有機生物分子と接合させることにより形成されたトレーサの疎水性の性質を減少させる。タンパク質、核酸、および多糖類のような巨大生物分子を標識付ける際に適応する場合、親水性ＰＡＡＥにより、溶解度の問題を生じることなく、取込み比率（１つの巨大成分分子に共有結合したＰＡＡＥ分子の数として定義される）が増大する。このように、トレーサの特異的活性および洗浄性の増大が、結合アッセイ感度および改良されたＳ／Ｎ比率を高める要因である。従来技術のアクリジニウムエステルおよび他の化学発光化合物の親油性の性質のために、トレーサ接合体の疎水性の性質により非特異的結合の量が著しいので、ある生物学的化合物に接合したときに、使用するのが難しい。した

がって、従来技術のアクリジニウムエステルおよび他の化学発光化合物は、検出に、非特異的結合に対して特異的結合からの信号間での微細な区別を必要とする場合、使用するのに効率的ではなく、誤った正の結果や、誤った負の結果を生じる危険性が高まってしまった。

好ましい官能化アクリジニウムエステルの例としては、以下の化学式のアクリジニウムエステルが挙げられる：



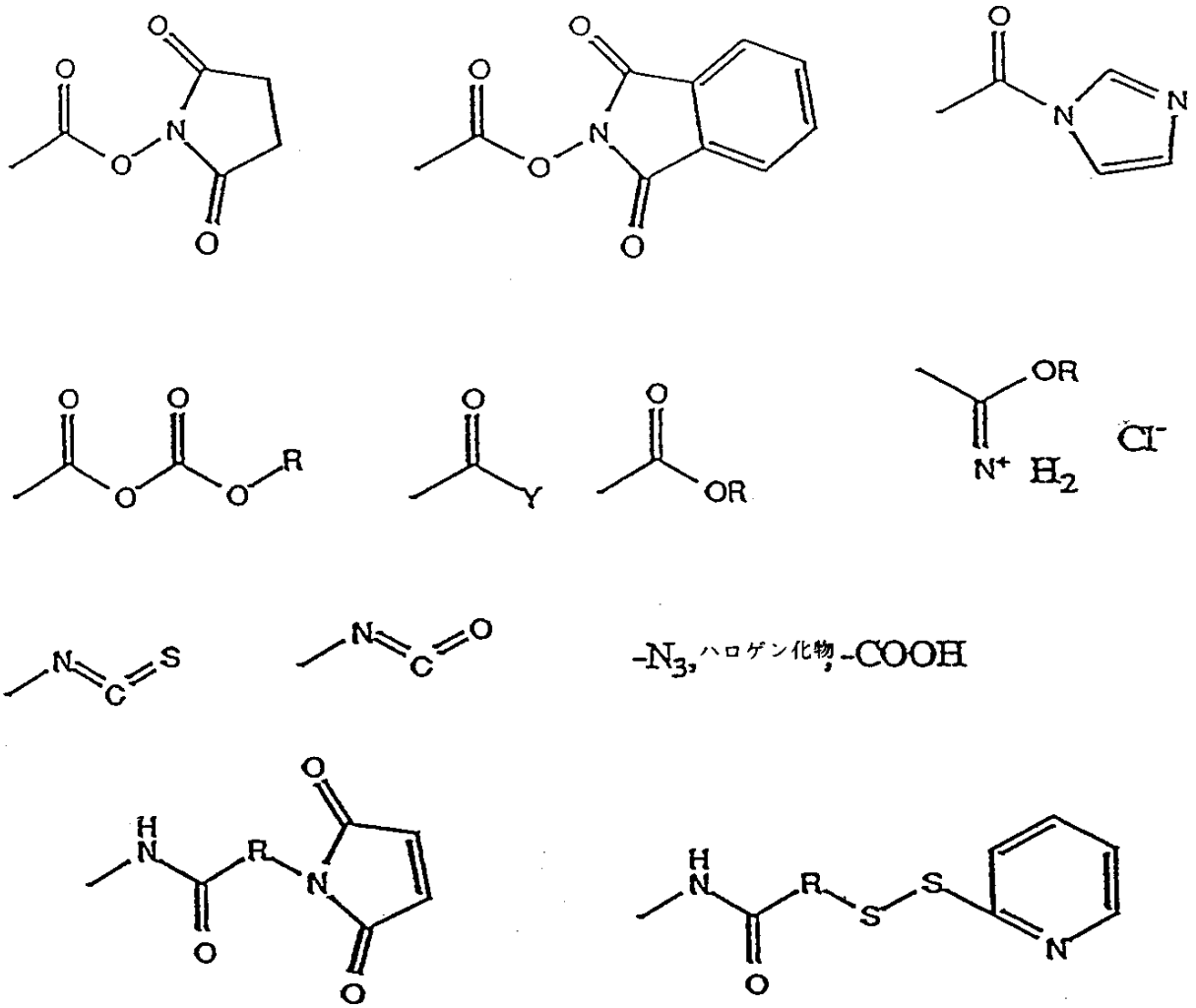
ここで、

R_1は、24までの炭素と、窒素、酸素、リンおよび硫黄からなる群より選択される20までの異種原子とを有する、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキルである；

R_2、R_3、R_5、およびR_7は、水素、アミノ、ヒドロキシル、ハロゲン化物、ニトロ、－ＣＮ、－SO_3H、－ＳＣＮ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＮＨＣＯＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＯＲ、または－ＣＯＮＨＲであり、ここで、Ｒは、24までの炭素と、窒素、酸素、リンおよび硫黄からなる群より選択される20までの異種原子とを有する、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキルである；

R_4およびR_8は、側鎖基が２より多い炭素を有する枝分れを有さない、８までの炭素を有する、アルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキルまたはアルコキシルである；

R_6は以下の置換基を示す：$R_6 = R_9 - R_{10}$ここで、R_9は、要求されないが、必要に応じて、リン、硫黄、窒素および酸素からなる群より選択される５までの異種原子を有する、アルキル基、またはアラルキル基であってよく、R_{10}は、以下の実施例に示すような、求電子体、リービング基またはこれら２種類の性質が組み合わされた基である：



ここで、Ｙはハロゲン化物であり、Ｒはアルキル、アリール、アラルキル基であり；
フェノキシ環上のR_5、R_6、およびR_7置換基の位置は相互に交換可能である。
最も好ましくは、R_1はスルホプロピルまたはスルホエチル基であり；R_2は水素、メトキシ、エトキシ、ニトロまたはハロゲンであり；R_3、R_5、およびR_7は水素であり、R_4およびR_8はメチル、エチルまたはイソプロピル基であり；R_6はＮ－スクシンイミジルオキシカルボニル、Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニルアルキル、またはカルボキシレートである。
置換された親水性部位を有するＲＡＡＥ（例えば、２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル１０－（３′－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ））が、単に同位置でアルキル置換を行なった対応するＰＡＡＥ（例えば、２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル１０－メチル－９－アクリジンカルボキシレート　メチルスルフェート（ＤＭＡＥ－ＮＨＳ））と比較して、約1.5倍も大きい化学発光量子収量を生成できることが予期せぬことに分った。（表Ｉ参照）。ＰＡＡＥの化学発光量子収量の増大は、化学発光トレーサのＳ／Ｎ比および化学発光結合アッセイと検出方法の感度を改良するのに、非常に望ましく、必須の要因である。特に、タンパク質のようなリガンド／キャリヤ生物分子の接合体の多重ＰＡＡＥ標識付けにより、トレーサの信号増大を成立させる場合、ＰＡＡＥ化学発光量子収量において1.5倍以上改良されたことは、同様の信号増幅を達成するのにより少量のＰＡＡＥしか結合させる必要がないことを意味する。また、キャリヤ接合体にＰＡＡＥを同一レベルで結合させる場合、より低濃度の分析物を検出することができるかもしれない。

表１

DMAE-NHS対NSP-DMAE-NHSの相対定量収量

AE型比率	分子量	RLU/4.2 fmol AE	ＲＬＵ
DMAE-NHS	595	690,187	1.0
		644,587	
		743,587	
	平均	692,787	
	SD	49,551	
	% C.V.		7.2
NSP-DMAE-NHS	591	1,122,017	1.7
		1,204,017	
		1,122,017	
	平均	1,149,350	
	SD	47,343	
	% C.V.		4.1

表Ｉにおいて、ＤＭＡＥ－ＮＨＳをアセトニトリル中に溶解させ、一方ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳを50%（容積／容積）のアセトニトリル水溶液中に溶解させ、1.0ｍｇ／ｍｌの原液を調製した。緩衝液（10ｍＭのリン酸塩、150ｍＭのＮａＣｌ、0.1%のＢＳＡ、0.05%のNaN_3、ｐＨ8.0）希釈液により、10^{-7}まで連続希釈を行なった。希釈方法は、50ｕＬの移送容積を用いた３回の100倍希釈工程と、100ｕＬの移送容積を用いた１回の10倍希釈工程とからなる。試料の発光は、25ｕＬの10^{-7}希釈溶液を用いて、標準条件下（２秒の光集積時間）でチバコーニングダイアグノスティクス社のＭＬＡ１アナライザーで測定した。

本発明の範囲内には当業者が認識する多くの変更例がある。アクリジニウム核で親水性基を窒素原子に容易に連結する多くのスペーサを取り付けても、親水性ＰＡＡＥを他の化合物または生物分子に容易に共有結合させる求電子体またはリービング基を取り付けても差支えない。

本発明の新しいアクリジニウムエステルは、水に非常に溶けやすく、高濃度でリポソーム内に封入することができる。いったん高濃度でリポソーム内に封入されると、この新しいアクリジニウムエステルは、長期間に亘り封入されたままとなり、感知できるほどには漏れない。

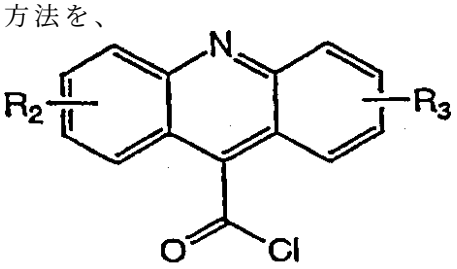
本発明の新しいアクリジニウムエステルはリポソーム内への封入に有用であるが、本発明の新しいアクリジニウムエステルはまた、リガンドまたは分析物（抗原のような）の標識付け；リガンドまたは分析物の特定の結合パートナー（対応する抗体のような）の標識付け；または、核酸および核酸を含む分子の標識付けのような、アクリジニウムエステルを利用できる他の用途においても有用である。

特に、本発明の新しい官能化親水性アクリジニウムエステルは、トレーサの生物学的物質への非特異的結合を減少させることが望ましい化学発光アッセイにおける生物学的物質への標識付けに有用である。本発明の新しい官能化親水性アクリジニウムエステルのために、本発明の新しい化合物の親水性特性は、他の化学発光化合物と比較して、非特異的相互

作用を行なう傾向が少ないので、信号／ノイズ（Ｓ／Ｎ比）干渉を減少させることができる。このことにより、測定を行なう精度が高くなり、診断アッセイを行なうことができる。

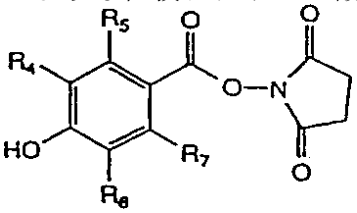
アクリジニウムエステルの合成が米国特許第4,745,181号に記載されており、その工程を第２図に示す。この方法には、ベンジルオキシカルボニル基で置換されたフェノキシ基を用いてアクリジンエステルを形成することが含まれている。ベンジル保護基を除去して、ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下でＮ－ヒドロキシスクシンジイミドと生成物との縮合により、所望のスクシンイミジルオキシカルボニルを導入した。

さらに、本発明は新しい改良合成方法を提供する。この方法は、適切に選択した条件下で、問題なく、スクシンイミジルカルボニルを担持するフェノキシ基とアクリジン核を直接縮合できるという予期せぬ発見を利用したものである。これを第１図に示す。この新しくより単純な工程を用いることにより、適切な求電子性またはリービング基を有する親水性ＰＡＡＥを調製に関して、従来の工程の２つの合成段階を省いた。第１図の一般的な反応方法を、



14

のような置換アクリジン酸クロライド、および



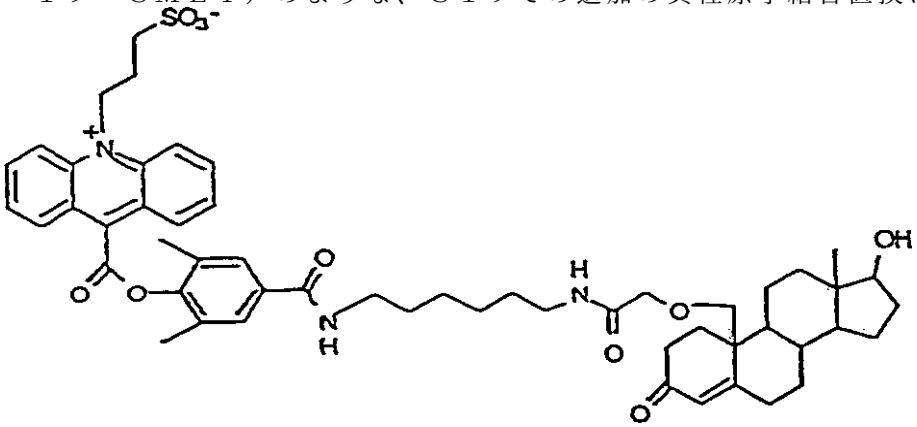
のような置換ｐ－ヒドロキシベンゾエートのＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルの調製に適用する：ここで、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ５、Ｒ７は水素、ハロゲン化物、ニトロ、－Ｒ、－ＯＲ、－ＣＮ、－ＮＨＣＯＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＯＲ、または－ＣＯＮＨＲであり；ここでＲはアルキル、アルケニル、アルキニル、たはアラルキルであり、Ｒ４およびＲ８はＲであり、Ｒは上記に定義したものである。

このように、本発明は、追加に求電子性またはリービング基を有する親水性ＰＡＡＥを提供する。これらの基は、モノ－またはポリ－求核性化合物または生物分子との接合に有用である。本発明は、官能化親水性ＰＡＡＥにヘキシル－１，６－ジアミン、エチレンジアミン、およびアミノカプロン酸のような求核性化合物を共有結合させるものである。本発明はまた、官能化親水性ＰＡＡＥに、アミノグリコシド、タンパク質、ウイルス性抗原、ペプチド、およびアミノアルキル－官能化オリゴヌクレオチドのような生物分子を共有結合させるものである。これらの接合体は、高感度のイムノアッセイおよび核酸結合アッセイに有用である。さらに、本発明の特性の全ては、限定されるものではないが、同時係属出願である米国特許出願第08/035,130の請求範囲のような、ベンズアクリジニウムエステルを含む関連アクリジニウム化合物にも同様に適用できるものである。

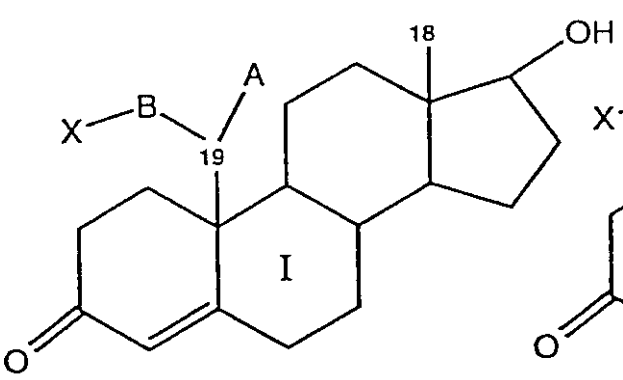
本発明の化合物および接合体を用いた有用な高感度の化学発光イムノアッセイの実施例として、血清試料中の特定のステロイドホルモンを検出できるアッセイがある。本発明の接合体および方法を用いた改良アッセイは、テストステロンの迅速なアッセイである。このアッセイは、テストステロンに対する高特異的抗体、および新しいＣ１９－モノ－またはＣ１９－ビ－置換テストステロンに官能化親水性ＰＡＡＥを接合することにより形成した異種トレーサの使用を組み合わせている。異種化学発光トレーサを用いることの利点が、

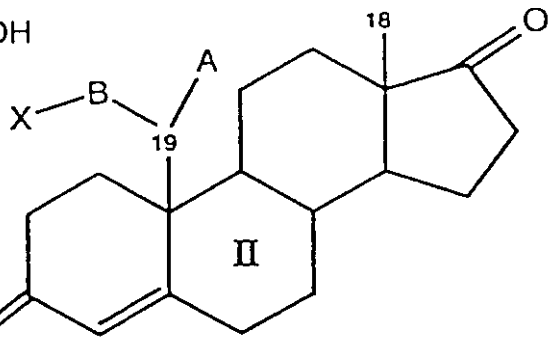
0.1ｎｇ／ｍＬまでテストステロンアッセイの感度が改良されたことにより観察される。このような感度は、対応する同種トレーサ、または疎水性ＰＡＡＥを用いた場合には、迅速には（すなわち、約５分）達成できない。

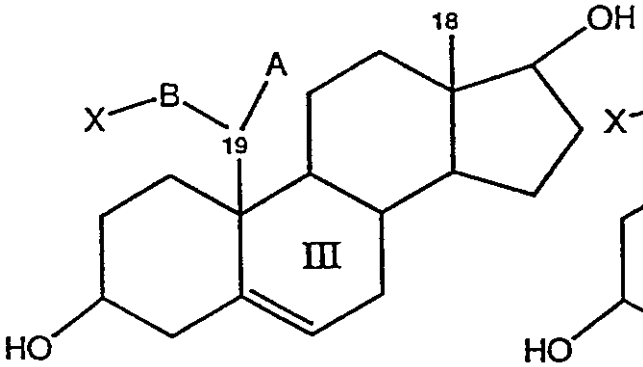
本発明はまた、テストステロンを誘導した新しいＣ１９－Ｃ－結合型（以下の実施例に記載するような）により接合体として形成された官能化親水性ＰＡＡＥを利用するものである。これらの新しい異種トレーサは、必要に応じて、Ｃ１９でのオレフィン連結によるか、または以下のようなテストステロンのＣ１９－Ｏ結合誘導体（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＭＥＴ）のような、Ｃ１９での追加の異種原子結合置換により形成できる。

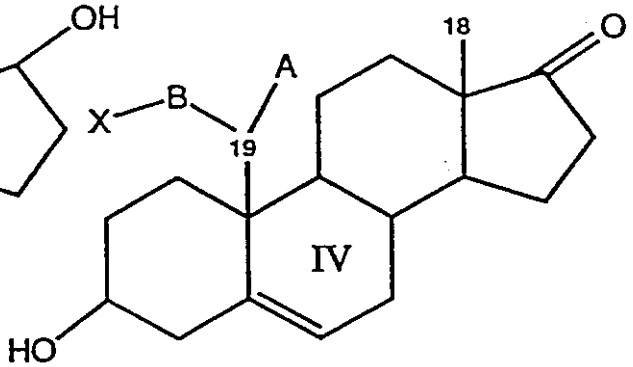


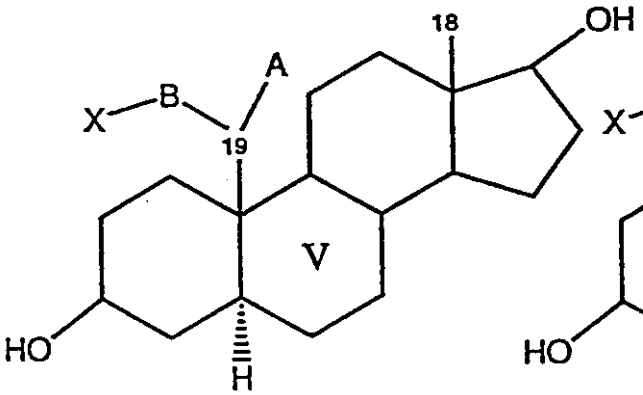
本発明はまた、以下の構造のテストステロン誘導体を提供する。（以下に、命名法に用いる番号付け方法と同一のテンプレートとともに、７種類の実施例を示す。）

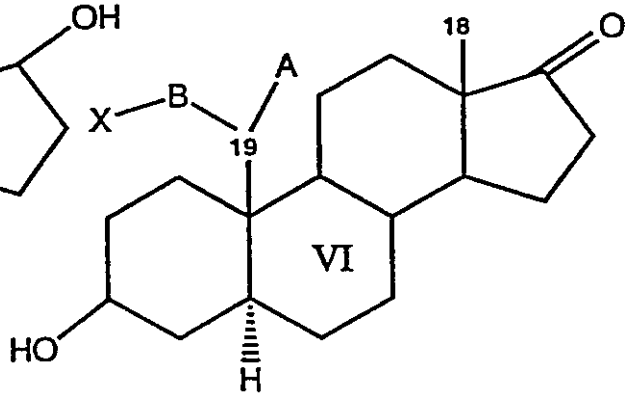


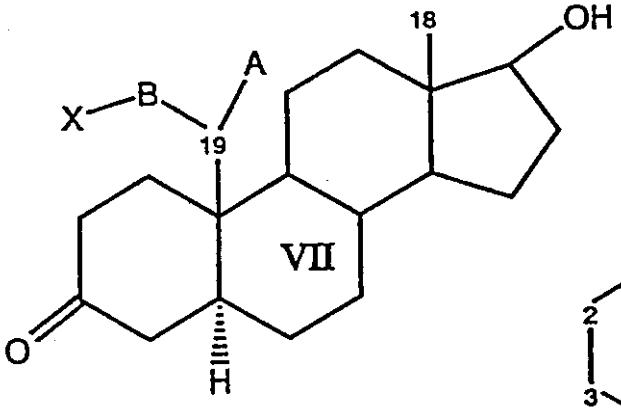


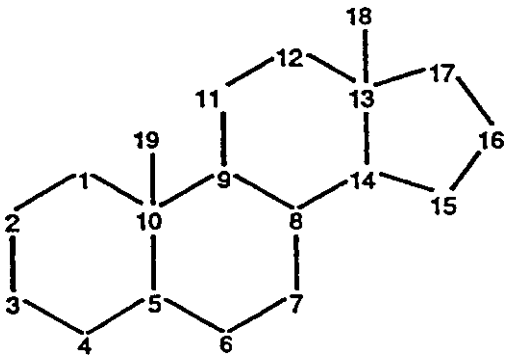












ここで、Ａは、－ＯＨ、－Ｎ（R_1）$_2$、－ＮＨR_1、ニトロ、ハロゲン化物、－ＯR_1、－ＯＣＯR_1、－トシレート、－メシレート、－アジド、－イソシアネート、－チオイソシアネート、－ＳR_1、ニトロ、－ＳＨ、－ＳＳR_1、－ホスホネート、－スルホネート、－ＮＨＣＯＯR_1、－ＮＨＣＯR_1、－ＮＨＣＯR_1、－ＮＨＣＯＮＨ$_2$、ヒドラジン、シアン化物、および－R_1からなる群から選択される官能化基であり；ここで、Ｒ１は、10までの炭素および５までの異種原子を含有するアルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキ

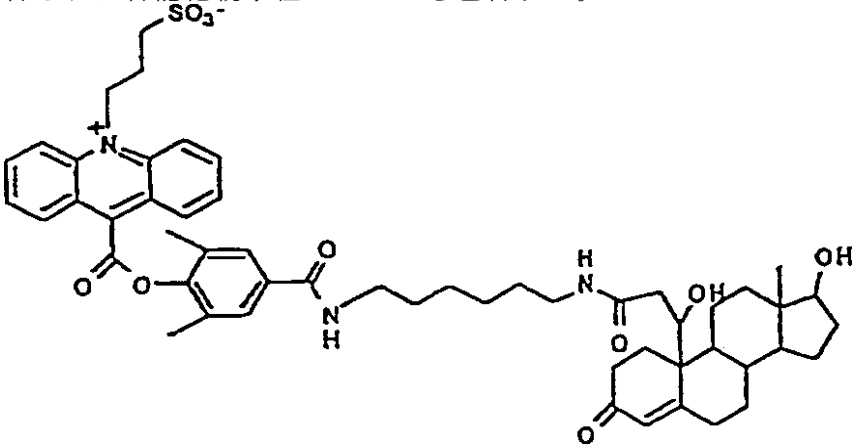
ルであり；ここで、Ｂは、ｎ＝１－４である－（ＣＨ$_2$）ｎまたは－Ｃ＝であり；Ｂが－Ｃ＝である場合には、Ａは省略され；Ｘは、カルボキシレート、－ＣＯＯＲ$_2$－、－ＣＯＮＨＲ$_2$、（ここで、Ｒ$_2$は、15までの炭素および５までの異種原子を含有するアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキルである）、または、限定されるものではないが、ハロゲン化物、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、およびイミダゾールを含む、適切なリービング基が付着したカルボニルである。

治療薬またはテストステロンのようなホルモンのイムノアッセイにおいて本発明の親水性ＰＡＡＥを進歩的に利用することにより、この明細書に具体化した本発明のある形態を説明する。特に、Ｃ１９－Ｂ結合橋（上述した化学式に示す）がＣ１９－Ｃであるテストステロン誘導体の使用および本発明の化合物の効果的な使用に対する重要な要因。Ｃ１９－Ｃ結合を使用することにより、特異的抗－テストステロン抗体に対するトレーサ結合の減少と、競合する試料テストステロンによる抗体からの置換えを容易にすることとを釣り合わせることが分った。

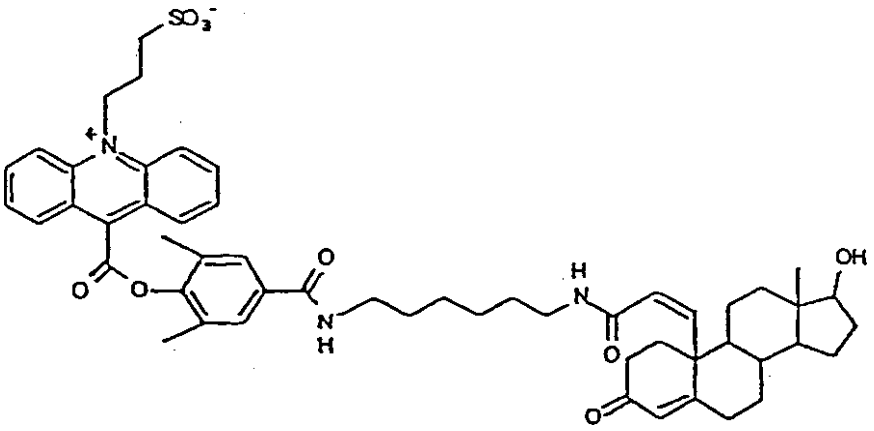
二官能架橋剤により、官能化親水性ＰＡＡＥへの接合する使用すべき本発明のテストステロントレーサの好ましい実施の形態は、上述した化学式Ｉが示す形態を包含するものである。より詳しくは、Ａがヒドロキシであり、Ｂが－ＣＨ$_2$－であり、Ｘがカルボキシレートであることが好ましい。

これらの化合物は新規であり、従来技術において知られているものとは区別されるものである。例えば、Rao（米国特許第4,197,286号）に記載された化合物は、Ｃ１９－Ｏ（すなわち、酸素に対するＣ１９）結合を含む。

この明細書の教示を用いて、当業者には接合体の二官能結合体を使用することが分る。好ましい実施の形態は、以下の示したような（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴ）、アミド結合の形成により一端でｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンに結合し、他方の橋部で別のアミド結合の形成によりテストステロン誘導体のような、標的生物分子に続いて結合された官能化親水性ＰＡＡＥを包含する。



テストステロントレーサの別の好ましい実施の形態は、以下に示すような（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＶＮＴ）、Ａが省かれ、ＢがＣ１９とオレフィン結合を形成する－ＣＨ＝であり、Ｘがカルボキシレートである、上述した化学式Ｉの形態である。



本発明のさらなる形態は、様々な感染病の化学発光イムノアッセイに用いられているウイルス性抗原に標識付けするために官能化親水性ＰＡＡＥを用いた予期せぬ改良結果を包含するものである。例えば、マウス抗ヒトＩｇＧＦｃ固定化固相およびウイルス性抗原トレーサが血清試料中の抗ウイルス性抗体をアッセイするのに用いる試薬である、ＩｇＧ捕捉アッセイ方式において、ウイルス性抗原トレーサを調製するのに、従来のＤＭＡＥ－ＮＨＳの代わりに、官能化親水性ＰＡＡＥを用いた場合、アッセイのＳ／Ｎ比が著しく改良できたことが分った。これらの結果は、トレーサと標的抗体との間の改善された免疫複合体形成となる良好な結合活性、および親水性アクリジニウムエステル標的を使用したことによる非特異的結合が低下したことにより生じるようである。

このように、当業者は、本発明の教示を理解し、それらの教示を様々な感染性物質または病原の検出に適用できる。風疹、様々な分類および亜型の肝炎、トキソプラズマ、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ＨＩＶ、数種類にしか名前が付けられていないクラミジアのような感染性物質が、高感度および偽陽性の低発生のアッセイを必要とする早期の検出の標的である。

限定するものではないが、このようなアッセイの典型的な構成は、三構成要素、すなわち、トレーサ、分析物を含有する試料、および未結合の分析物から結合した分析物を分ける手段からなる。例えば、このようなアッセイでは、官能化親水性ＰＡＡＥを、分析物の適切な抗原またはその特異的結合体と組み合わせてトレーサを形成し、生物学的試料（分析物を含有する）と保温し、固相に固定化された抗体によりトレーサを捕捉することができる。本発明の他の構成は、本発明の教示の適用により実際的になり、バイオアッセイの当業者には容易に明白である。

本発明は、アレルゲンイムノアッセイのために、本発明の組成物および方法を使用することを包含するものである。本発明の親水性ＰＡＡＥは、特定のアレルゲンに対する特異的ＩｇＥ　Ａｂの検出に有用である。この用途において、親水性ＰＡＡＥは、ストレプトアビジンに結合されており、アレルゲンに対する特異的抗体に結合した特異的アレルゲン－ビオチン分子を検出するのに用いることができる。（ＡＣＳ特異的ＩｇＥアッセイの構成の実施例を参照のこと、第９図。）

本発明は、分析物含有試料の量を測定し、試料中においてこの分析物を特異的に、その濃度に比例して検出し、試料中の分析物の濃度に直接的また間接的である親水性アクリジニウムエステル化学発光標識により発生された信号を測定する方法を包含する。

試料中の分析物を検出するそのような方法は、試料を親水性アクリジニウムエステル標識付け検出体分子と接触させ、結合した検出体および分析物を隔離し、過剰の検出体を洗い流し、分析物と結合した検出体からの信号を測定する各工程からなる。

さらに、試料中の分析物を検出する方法は、試料を親水性アクリジニウムエステル標識付け競合トレーサと、分析物の特異的結合体とに接触させ、特異的結合体を回収し、結合したトレーサが発生した信号を測定する各工程からなる。（ＡＣＳテストステロンアッセイのアッセイ構成の実施例を参照のこと、第７図。）また、試料を親水性アクリジニウムエステル標識付け競合トレーサと、分析物の特異的結合体とに接触させ、特異的結合体を回収し、未結合トレーサが発生した信号を測定する各工程からなる、試料中の分析物を検出

する方法も包含する。
本発明は、試料を、第１の特異的結合体、および第２の親水性アクリジニウムエステル標識付け特異的結合体と接触させ、信号を検出する各工程からなる、試料中の分析物を検出する方法を含む。これらのアッセイの構成は、サンドイッチアッセイまたは第２の結合体（または抗体）が第１の結合体と反応性であるアッセイの形態のいずれであっても差支えない。これらの構成の変更例が当業者に明白である。
本発明は、試料中の分析物を検出する方法であって、試料を、親水性アクリジニウムエステル標識付け検出体および検出体に対する競合結合体と接触させ、過剰の検出体および検出体に結合した分析物を洗い流し、競合結合体に結合した検出体からの信号を測定する各工程からなる方法を包含する。（ＡＣＳエストラジオールアッセイのアッセイ構成の実施例を参照、第８図。）
本発明の方法は、信号検出前の放出剤（releasing agent）の添加、または発生した信号を増幅する他の物質の添加にかかわらず、実施することができる。
本発明のさらなる形態は、遺伝子プローブアッセイに本発明の組成物および方法を使用することを含むものである。例えば、低濃度の標的核酸（分析物）は、多数の親水性ＰＡＡＥおよび必要に応じてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）のような親水性ポリマーにより標識付けられた、ウシ血清アルブミン、糖タンパク質等のような、高分子キャリヤと接合された第１の核酸プローブとハイブリダイゼーションさせ、常磁性粒子のような固相上に固定化された、第２の核酸プローブにより捕捉させる各工程により検出することができる。２種類の核酸プローブは、ハイブリダイゼーション工程の後であるが、分離工程（上澄中に残留する水結合プローブトレーサを除去する）の前に、優先的にリガーゼに結さつすることができる。親水性の性質によりトレーサ中に含まれる多数のＰＡＡＥのために、良好な溶解度が維持される。このような核酸の検出は、当業者が考えられるいくつかの方式を用いて、そして、本発明の教示を用いて、高感度の検出のための適切な親水性ＰＡＡＥトレーサを開発することにより、実施することができる。
以下の実施例は、本発明を説明するために記載したものであり、本発明の範囲をいかなるようにも限定することを意図するものではない。
実施例１Ａ
２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル９－アクリジンカルボキシレート　（ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ、ＤＭＡＥ－ＮＨＳおよびＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの前駆体）の改良合成
スクシンイミジル３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゾエート
400ｍＬの無水テトラヒドロフランおよび200ｍＬの無水Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド中３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゼン酸（12.0ｇ、72.21ｍモル）の溶液を氷水浴中で冷却し、15分間に亘り撹拌しながらＮ－ヒドロキシスクシンイミド（8.31ｇ、72.21ｍモル）で処理し、次いで、ジシクロヘキシルカルボジイミド（17.88ｇ、86.65ｍモル）を加えた。窒素雰囲気下において25℃で16時間に亘り撹拌した後、混合物を濾過した。湿ったケークを10ｍＬの無水Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドにより洗浄した。混合濾液を減圧下で乾燥するまで蒸発させた。残留物を、無水ジエチルエーテル（２×50ｍＬ）により洗浄した後、５分間に亘り80ｍＬの沸騰酢酸エチル中に懸濁させた。この懸濁液を25℃まで冷却して、11.95ｇ（63％の収率）のオフホワイトの生成物を得た。これは、ＴＬＣ（Ｒｆ0.6；シリカゲル、エーテル）上で均質であった。
９－アクリジンカルボニルクロライドヒドロクロライド
80ｍＬの塩化チオニル中の９－アクリジンカルボン酸水和物（10.0ｇ、44.80ｍモル）の混合物を２時間に亘り窒素雰囲気下の100℃で還流し、次いで、25℃まで冷却した。得られた溶液を減圧下で元の容積の約半分まで減少させ、500ｍＬの無水ジエチルエーテル中に注ぎ入れた。黄色の沈殿物を採集し、エーテル（３×100ｍＬ）で洗浄し、２時間に亘り減圧下で乾燥させ、12.95ｇ（約100％の収率）の生成物を得た。これを直ちに次の反応に用いた。
２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル９－

アクリジンカルボキシレート（ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ）

200ｍＬの無水ピリジン中のスクシンイミジル３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゾエート（11.29ｇ、42.88ｍモル）および４－ジメチルアミノピリジン（2.19ｇ、17.93ｍモル）の溶液を氷水浴中で冷却し、続いて、９－アクリジンカルボニルクロライドヒドロクロライド（12.95ｇ、44.80ｍモル）を加えた。この溶液を、２時間に亘り100℃で窒素雰囲気下で撹拌しながら加熱し、次いで16時間に亘り25℃に保持した。減圧下で溶媒を除去した後、残留物を、50％のジエチルエーテル／ヘキサンが充填されたシリカゲルカラム（ベーカーシリカゲル、カタログ番号7024-1；Ｆ７－50ｃｍ）でフラッシュクロマトグラフを行ない、75％のジエチルエーテル／ヘキサン（2.5Ｌ）、ジエチルエーテル（２Ｌ）、５％の酢酸エチル／ジエチルエーテル（３Ｌ）および25％の酢酸エチル／塩化メチレン（５Ｌ）で溶離した。25％の酢酸エチル／塩化メチレン溶離液から採集した、生成物を含有する分画（Ｒｆ0.4；シリカゲルＴＬＣプレート、エーテル）を混合し、減圧下で乾燥するまで蒸発させて、10.03ｇ（９－アクリジンカルボン酸水和物から50％の収率）の淡黄色の生成物（ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ）を採集した。

実施例１Ｂ

溶剤としてトルエンを用いた、２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル１０－メチル－９－アクリジンカルボキシレートメチルスルフェート　（ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の改良合成

この方法では、ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳのメチル化に溶剤としてトルエンを用い、オゾン消耗試薬である１，１，１－トリクロロエタンを置き換えている。この試薬は以前には、米国特許第4,745,181号に記載されているようなメチル化工程において溶剤として用いられた。

50ｍＬの無水トルエン中のＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ（1.0ｇ、2.13ｍモル）の懸濁液を110℃まで加熱して、均質な溶液を調製した。この溶液を室温まで冷却し、続いて、11.0ｍＬ（116.25ｍモル）の蒸留した硫酸ジメチルを加えた。窒素雰囲気下110℃で20時間に亘り撹拌した後、この溶液を室温まで冷却し、１時間に亘り４℃に維持した。混合物を濾過し、黄色の湿ったケークをトルエン（２×５ｍＬ）で、続いて無水塩化メチレンで洗浄し、２－３分間沸騰させ、濾過した。濾液の容積がホットプレート上で約50ｍＬまで減少した。濃縮物を室温まで冷却して、黄色の結晶を得た。この結晶を採集し、ジエチルエーテル（３×20ｍＬ）で洗浄し、500ｍｇ（39％）の純粋な生成物を得た。ＦＡＢ／ＭＳ（483、Ｍ＋）。

実施例２

２′，６′－ジメチル－４′－（Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）フェニル１０－（３′－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキシレート　（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成

密封管内で、ＤＭＡｅＥ－ＮＨＳ（500ｍｇ、1.07ｍモル）および１，３－プロパンスルトン（6.5ｇ、53.3ｍモル）を20時間に亘り窒素雰囲気下150℃で加熱した。冷却後、過剰の１，３－プロパンスルトンを、トルエン（３×５）による倍散（trituration）により除去した。粗生成物を、Ｃ18、30×500ｍｍ、10μｍ、分取カラム（preparative column）を用いてＲＰ－ＨＰＬＣにより精製し、65％の溶剤Ａおよび35％の溶剤Ｂの混合物により溶離した。条件：溶剤Ａ：0.05％（容積／容積）のＴＦＡ／H_2O、溶剤Ｂ：0.05％（容積／容積）ＴＦＡ／CH_3CN；流速25ｍＬ／分；260ｎｍでのＵＶ検出。生成物を26.8分で溶離した。収量：26ｍｇ（25％）；ＦＡＢ／ＭＳ（591、Ｍ＋Ｈ）。

実施例３

１９－カルボキシメチル－１７β，１９－ジヒドロキシ－４－アンドロステン－３－ワン　（１９－ヒドロキシ－１９－カルボキシメチル－テストステロン、１９－ＨＣＭＴ）の合成

３，１７－ビス（エチレンジオキシ）－１９－エトキシカルボニルメチル－１９－ヒドロキシ－５－アンドロステン

ゴム製隔膜、撹拌用磁石棒およびN_2の入口を備えた50ｍＬの二首フラスコにリチウムビ

ス（トリメチルシリル）アミド（12.9ｍＬの1.0M溶液、12.9ｍモル）を充填した。この溶液を窒素雰囲気下において乾燥氷アセトン浴中で－78℃まで冷却し、無水酢酸エチル（1.2ｍＬ、12.9ｍモル）をシリンジから滴状に加えた。反応液を30分間に亘り－78℃で撹拌し、次いで、無水テトラヒドロフラン（15ｍＬ）中の３，１７－ビス（エチレンジオキシ）－５－アンドロステン－１９－アル（１ｇ、2.58ｍモル）（Lovett,J.A.等、1984、J.Med.Chem.27:734-740）をエノラートの溶液に滴状に加えた。添加を完了した後、反応液をさらに1.5時間に亘り、乾燥氷アセトン浴中の窒素雰囲気下で撹拌した。次いで、反応液を飽和塩化アンモニウム溶液（約30ｍＬ）を加えて、急冷し、生成した懸濁液を酢酸エチルで３回（３×25ｍＬ）抽出した。混合酢酸エチル抽出液をブライン（約30ｍＬ）で一度洗浄し、次いで、硫酸マグネシウム上で乾燥させた。濾過後、溶剤を減圧下で除去して、油を生成した。この油を次の反応に用いた：収量1.67ｇ　（粗生成物）；質量スペクトル（化学的イオン化）ｍ／ｚ477（Ｍ＋Ｈ＋）。

３，１７－ジオキソ－１９－エトキシカルボニルメチル－１９－ヒドロキシ－５－アンドロステン

上述した粗製ビスケタル（bisketal）（1.67ｇ）をテトラヒドロフラン（20ｍＬ）中に溶解させ、３Ｎの過塩素酸（10ｍＬ）を加えた。反応液を３時間に亘り室温で撹拌し、次いで、水（40ｍＬ）で希釈した。生成した懸濁液を酢酸エチル（２×40ｍＬ）で二度抽出した。混合酢酸エチル抽出液を水（約40ｍＬ）で一度洗浄し、次いで、硫酸マグネシウム上で乾燥させた。濾過後、減圧下で溶剤を除去し、粗生成物を得た。この生成物を、溶離液として１：１酢酸エチル／ヘキサンを用いて分取ＴＬＣにより精製した（Ｒｆ＝0.17）：収量0.46ｇ（46％２工程）白色の泡；質量スペクトル（化学的イオン化）ｍ／ｚ389（Ｍ＋Ｈ＋）。

１９－エトキシカルボニル－１７β，１９－ジヒドロキシ－４－アンドロステン－３－ワン

撹拌磁石棒および窒素の入口を備えた50ｍＬの丸底フラスコ内に、３，１７－ジオキソ－１９－エトキシカルボニルメチル－１９－ヒドロキシ－５－アンドロステン（50ｍｇ、0.129ｍモル）および無水メタノール（５ｍＬ）を入れた。ステロイドの溶液を窒素雰囲気下で氷中で撹拌して冷却し、水素化ホウ素ナトリウム（6.4ｍｇ、0.168ｍモル）をメタノール溶液（１ｍＬ）として加えた。反応液を８分間に亘り氷中で撹拌し、次いで、アセトン（１ｍＬ）および酢酸（２ｍＬ）を加えて急冷した。次いで、反応混合物を水（約25ｍＬ）で希釈し、得られた懸濁液を酢酸エチル（約35ｍＬ）で抽出した。酢酸エチル抽出物を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、次いで、減圧下で濃縮し、白色の粉末を得た：収量51ｍｇ（定量）これは、ＴＬＣ（１：19、ＭｅＯＨ／$CHCI_3$）（Ｒｆ＝0.26）で均質であった。この物質を次の反応に用いた。

１９－カルボキシメチル－１７ｂ，１９－ジヒドロキシ－４－アンドロステン－３－ワン　（１９－ＨＣＭＴ）

上述したエチルエステル（51ｍｇ、0.129ｍモル）をメタノール（５ｍＬ）中に溶解させ、ＫＯＨ（0.25ｇ）で処理した。反応液を１時間に亘り室温で撹拌し、次いで、溶液のｐＨが６に調節されるまで、水（25ｍＬ）および酢酸を加えて急冷した。得られた混合物に、0.5ＮのＨＣｌ（１ｍＬ）を加えて、さらに酸性にし、得られた懸濁液を酢酸エチル（３×15ｍＬ）で三度抽出した。混合酢酸エチル抽出液を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗酸を、溶離液として酢酸エチル中の２％酢酸を用いて分取ＴＬＣにより精製し（Ｒｆ＝0.4）、白色粉末として単離した。収量：10ｍｇ（22％）；質量スペクトル（化学的イオン化）363（Ｍ＋Ｈ＋）。

実施例４

１０－カルボキシビニル－１７β－ヒドロキシ－１９－ノル－４－アンドロステン－３ワン　（１９－カルボキシビニル－ノル－テストステロン；１９－ＣＶＮＴ）の合成

３，１７－ビス（エチレンジオキシ）－１０－エトキシカルボニルビニル－１９－ノル－５－アンドロステン

撹拌磁石棒、窒素の入口を有する還流冷却器およびゴム製隔膜を備えた50ｍＬの二首フラ

スコにトリエチルホスホノアセテート（0.35ｇ、1.7mモル）および無水テトラヒドロフラン（５ｍＬ）を充填した。この溶液を窒素雰囲気下の氷塩浴中で約－10℃まで冷却し、ｎ－ブチルリチウム（1.24ｍＬの1.6M溶液、1.7mモル）を加えた。反応液を30分間に亘り－10℃で撹拌し、次いで、無水テトラヒドロフラン（５ｍＬ）中の３，１７－ビス（エチレンジオキシ）－５－アンドロステン－１９－アル（0.22ｇ、0.57mモル）の溶液をシリンジから滴状に加えた。次いで、反応液を室温まで暖め、24時間に亘り窒素雰囲気下で還流した。室温まで冷却した後、反応混合物を水と酢酸エチルとの１：１の混合物の間で分配した。酢酸エチル層を分離し、ブラインで洗浄した。次いで、これを硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残留物を、溶離液として２：３の酢酸エチル／ヘキサンを用いて分取ＴＬＣにより精製し（Ｒｆ＝0.34）、白色のふわふわした固体として単離した：収量0.11ｇ（43%）；質量スペクトル　（化学的イオン化）459（Ｍ＋Ｈ＋）。

３，１７－ジオキソ－１０－エトキシカルボニルビニル－１９－ノル－４－アンドロステン

上述した物質のアセトン（10ｍＬ）中からビスケタル（0.11ｇ）の溶液を、ｐ－トルエンスルホン酸（20ｍｇ）で処理した。反応液を16時間に亘り室温で撹拌し、減圧下で濃縮した。得られた残留物を酢酸エチルおよび水の間で分配した。酢酸エチル層を分離し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。生成物を溶離液としして１：１の酢酸エチル／ヘキサンを用いて分取ＴＬＣにより精製し（Ｒｆ＝0.51）、白色粉末として収量20ｍｇ（23%）として単離した。この物質を次の反応に用いた。

１０－エトキシカルボニルビニル－１７β－ヒドロキシ－１９－ノル－４－アンドロステン－３－ワン

メタノール（３ｍＬ）中の３，１７－ジオキソ－１０－エトキシカルボニルビニル－１９－ノル－４－アンドロステン（19.5ｍｇ、0.053mモル）の溶液を窒素雰囲気下で氷中で冷却し、水素化ホウ素ナトリウム（2.7ｍｇ）で処理した。この反応液を30分間に亘り窒素雰囲気下の氷中で撹拌し、アセトン（１ｍＬ）および酢酸（１ｍＬ）を加えて急冷した。生成した溶液を濃縮し、残留物を酢酸エチルおよび水の間で分配した。酢酸エチル層を分離し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、次いで、減圧下で濃縮した。得られた残留物（19ｍｇ）を無水クロロホルム（５ｍＬ）中に溶解させ、活性MnO_2（100ｍｇ）で処理した。黒い懸濁液を30分間に亘り窒素雰囲気下の室温で撹拌し、次いで、酢酸エチルで希釈し、濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、白色の粉末を得た。これは、ＴＬＣ上で均質であった（１：19、メタノール／クロロホルム、Ｒｆ＝0.28）：収量18.2ｍｇ（92%）。

１０－カルボキシビニル－１７β－ヒドロキシ－１９－ノル－４－アンドロステン－３－ワン　（１９－カルボキシビニル－ノル－テストステロン；１９－ＣＶＮＴ）

メタノール（３ｍＬ）中の１０－エトキシカルボニルビニル－１７β－ヒドロキシ－１９－ノル－４－アンドロステン－３－ワン（17ｍｇ）の溶液を５％のＫＯＨ（２ｍＬ）で処理した。反応液を30分間に亘り室温で撹拌して、次いで１ＮのＨＣｌで酸性にした。得られた懸濁液を酢酸エチル（２×25ｍＬ）により二度抽出した。混合酢酸エチル抽出物を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、白色粉末を得た。これはＴＬＣ（酢酸エチル中で２％の酢酸、Ｒｆ＝0.25）上で均質であった：収量15.2ｍｇ（97%）；質量スペクトル（化学的イオン化）345（Ｍ＋Ｈ＋）。

実施例５

ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンと架橋したＮＳＰ－ＤＭＡＥ／１９－ＨＣＭＴ接合体（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴ）の合成

最初に、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳをｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンと架橋させ、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤを生成した。このように、ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンを無水ＤＭＦ／CH_3OH（１：４、10ｍＬ）中のＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（60ｍｇ、0.1mモル）の黄色溶液に加えた。生成した無色の溶液を15時間に亘り窒素雰囲気下で撹拌し、約１ｍＬまで濃縮した。粗生成物を、$CHCl_3$／CH_3OH／H_2O（55／40／５）により展

開した分取シリカゲルプレート（2000μｍ、20×20ｃｍ）を用いてＴＬＣにより精製した。生成物は、Ｒｆ＝0.5；収量：50.2ｍｇ（84%）；ＦＡＢ／ＭＳ（593、Ｍ＋Ｈ）。
続いて、無水ＤＭＦ（0.1ｍＬ）中の１９－ヒドロキシ－１９－カルボキシルメチル－テストステロン（１９－ＨＣＭＴ、４ｍｇ、0.011mモル）の溶液を無水$CHCl_3$（0.4ｍＬ）で希釈し、氷浴中で冷却し、無水$CHCl_3$（0.1ｍＬ）中のＤＣＣ（2.7ｍｇ、0.013mモル）の溶液で活性化させた。反応混合物を10分間に亘り０℃で撹拌し、続いて、無水ＤＭＦ（0.2ｍＬ）中のＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ（６ｍｇ、0.01mモル）を添加し、新しい反応混合物を15時間に亘り室温で撹拌した。粗生成物を、Ｃ１８、7.8×300ｍｍ、10μＭ、半分取カラム、溶剤Ａ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／H_2O、溶剤Ｂ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／CH_3CN、流速：2.5ｍＬ／分、260ｎｍでのＵＶ検出を用いて、ＲＰ－ＨＰＬＣにより精製した。最初に15分間に亘り30%の溶剤Ｂを用い、直線勾配により５分以内に50%の溶剤Ｂにした。生成物を24.5分で溶離した；収量：2.3ｍｇ（25%）；ＦＡＢ／ＭＳ（936、Ｍ＋Ｈ）。
実施例６
ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンと架橋したＮＳＰ－ＤＭＡＥ／１９－ＣＶＮＴ接合体（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＶＮＴ）の合成
実施例５に記載したように、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＶＮＴを、１９－ＣＶＮＴ（２ｍｇ、0.006mモル）およびＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ（３ｍｇ、0.005mモル）から調製した。粗生成物を、Ｃ１８、10μｍ、7.8×300ｍｍ半分取カラムを用いてＲＰ－ＨＰＬＣにより精製した。最初に、30%の溶剤Ｂを15分間に亘り用い、続いて、５分以内で直線勾配で60%の溶剤Ｂにした。ここで、溶剤Ａ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／H_2Oおよび溶剤Ｂ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／CH_3CN；流速2.5ｍＬ／分；260ｎｍでのＵＶ検出。生成物を23.2分で溶離した。生成物の収量：0.72ｍｇ（16%）；ＦＡＢ／ＭＳ（918、Ｍ＋Ｈ）。
実施例７
ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンと架橋したＮＳＰ－ＤＭＡＥ／テストステロン－１９－ＣＭＥ接合体（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＭＥＴ）の合成
実施例５に記載したように、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＭＥＴをテストステロン－１９－ＣＭＥ（４ｍｇ、0.011mモル）およびＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ（３ｍｇ、0.005mモル）から調製した。粗反応混合物を最初に分取ＴＬＣプレート（シリカゲル、1000μｍ、20%ＭｅＯＨ／CH_2CL_2）上で分離した。Ｒｆ0.2およびＲｆ0.3の２種類のバンドを採集し、混合し、Ｃ１８、10μｍ、7.8×300ｍｍ半分取カラムを用いてＲＰ－ＨＰＬＣによりさらに精製した。最初に、30%の溶剤Ｂを15分間に亘り用い、続いて、５分以内で直線勾配で60%の溶剤Ｂにした。ここで、溶剤Ａ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／H_2Oおよび溶剤Ｂ：0.05%（容積／容積）ＴＦＡ／CH_3CN；流速2.5ｍＬ／分；260ｎｍでのＵＶ検出。生成物を24.1分で溶離した。生成物の収量：0.3ｍｇ（6.4%）；ＦＡＢ／ＭＳ（936、Ｍ＋Ｈ）。
実施例８
ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミンと架橋したＤＭＡＥ／１９－ＨＣＭＴ接合体　（ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴ）の合成
最初に、実施例５に記載したように、ＤＭＡＥ－ＮＨＳをｎ－ヘキシル１，６－ジアミンにより誘導し、ＤＭＡＥ－ＨＤを精製した。したがって、無水ＤＭＦ／CH_3OH（１：４、10ｍＬ）中のＤＭＡＥ－ＮＨＳ（50ｍｇ、0.084mモル）の黄色溶液に、ｎ－ヘキシル－１，６－ジアミン（98ｍｇ、0.84mモル）を加えた。生成した溶液を約４時間に亘り窒素雰囲気下の室温で撹拌し、蒸発させた。粗生成物を、$CHCl_3$／CH_3OH／H_2O（65／25／４）により展開した分取シリカゲルプレート（2000μｍ、20×20ｃｍ）を用いてＴＬＣにより精製した。Ｒｆ＝0.4での生成物バンドを取り外して、同一の溶剤系で溶離した。溶離液を残留物が得られるまで蒸発させた。この残留物を、クロロホルムで倍散し、濾過し、濾液を蒸発させて、精製ＤＭＡＥ－ＨＤ（20ｍｇ、41%）を得た。
実施例５に記載したように、ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴを１９－ＨＣＭＴ（4.75m

ｇ、0.013mモル）およびＤＭＡＥ－ＨＤ（７ｍｇ、0.012mモル）から調製した。粗生成物の三分の一をＣ１８、10μｍ、7.8×300ｍｍ半分取カラムを用いてＲＰ－ＨＰＬＣにより精製した。最初に、30%の溶剤Ｂを15分間に亘り用い、続いて、５分以内で直線勾配で60%の溶剤Ｂにした。ここで、溶剤Ａ：0.1%（容積／容積）ＴＦＡ／H_2Oおよび溶剤Ｂ：0.1%（容積／容積）ＴＦＡ／CH_3CN；流速2.3mＬ／分；260ｎｍでのＵＶ検出。生成物を23分で溶離した。生成物の収量：1.5ｍｇ（45%）；ＦＡＢ／ＭＳ（828.5、M^+）。

実施例９

テストステロンのアッセイ

この実施例は、架橋部分で抗体免疫原に対して異種である、親水性ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴトレーサを用いたテストステロンの高感度で迅速な競合化学発光イムノアッセイを教示するものである。データは、迅速で高感度のテストステロンアッセイを開発することにより、従来の疎水性ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴトレーサと比較して、この新しい親水性トレーサの明白な利点を示している。

Ａ）　ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生および特徴付け

抗－テストステロン－１９－ｏ－カルボキシメチルエーテル－ヒト血清アルブミン（ＲＡＴ－１９）である市販のウサギポリクローナル抗体をＯＥＭ（ニュージャージー州、トムズリバー）から購入した。この抗体の産生は、Rao（米国特許第4,197,286号）に以前に記載されたものである。KohlerおよびMilsteinにより記載された技術（Nature(London)256, 495-497(1975)）の変更例によりウサギＩｇＧに対するマウスモノクローナル抗体を産生した。マウスを精製ウサギＩｇＧで免疫化して、マウスモノクローナル抗－ウサギＩｇＧ（ＭＡＲ－ＩｇＧ）を産生した。標準抗体スクリーニング技術を用いて、ウサギＩｇＧに関して高特異性を有するハイブリドーマを選択した。クローンＨＭＦ１－１１Ｂ５－３Ｆ１－５Ｈ７を用いて腹水（ascites）を産生した。タンパク質Ａ－セファロース（ニュージャージー州、ピツキャタウェイ、ファーマシアファインケミカルス）親和性クロマトグラフィーを用いて、ＭＡＲ－ＩｇＧ抗体を腹水から精製した。

Ｂ）　テストステロン化学発光イムノアッセイの開発

迅速テストステロン化学発光アッセイの最適アッセイ性能を、トレーサとしてＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴを用い、固相に共有結合し、ＲＡＴ－１９抗体とともに保温したＭＡＲ－ＩｇＧ（上述）により達成した。このアッセイでは、固相として常磁性粒子（ＰＭＰ）（マサチューセッツ州、ケンブリッジ、アドバンストマグネティクス社）を用いた。

0.1Nのリン酸ナトリウム中の0.5%のグルタルアルデヒドによるＰＭＰの活性化後、0.1Mのリン酸ナトリウム、ｐＨ7.4中のＭＡＲ－ＩｇＧ（ＰＭＰ１ｇ当たり160ｍｇ）をＰＭＰに共有結合させた（Groman等の1985、BioTechniques 3,156-160を改良した方法）。この後に、ＲＡＴ－１９とともに保温した。反応混合物をリン酸塩緩衝液により洗浄して、過剰のＲＡＴ－１９を除去した。

25マイクロリットル（μＬ）の血清試料またはテストステロン標準物（0.1－24ｎｇ／ｍＬまたは2.5－600ｐｇ／管）、50μＬのＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴトレーサ（6×10^6相対光単位／試験）および300μＬのＭＡＲ－ＩｇＧ／ＲＡＴ－１９抗体－固相を同時に加え、５分間に亘り37℃で保温し、洗浄し、ＡＣＳ：180（マサチューセッツ州、ミッドフィールド、チバコーニングダイアグノスティクス）自動化学発光イムノアッセイ装置で化学発光を測定した。化学発光信号（相対光単位：relative light units）がテストステロン濃度に対して逆比例している。アッセイの標準物は、ステロイドを含まない炭で逆抽出したヒト血漿中の純粋なテストステロンからなるものであった。上述したアッセイのテストステロン標準結合曲線（ゼロ標準のＲＬＵに対する標準物のＲＬＵのパーセント）が第３図に示されている。血清試料からのテストステロン量が、マスターカーブから外れた２点検定を用いてＡＣＳ：180により作られた。標準結合曲線の50%最大結合（ＥＤ50）および結合曲線への影響に関して、同様のアッセイ様式で他の３種類のテストステロントレーサ、すなわち、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＶＮＴ（抗体免疫原に

対して異種）、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＭＥＴ（抗体免疫原に対して同種）、およびＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴ（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴの非親水性のもの）を評価した。ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴトーサを評価して、疎水性ＰＡＡＴタグ（ＤＭＡＥ）に対する親水性ＰＡＡＥ（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ）を用いた利点を示した。

Ｃ）　テストステロンの従来のラジオイムノアッセイ

選択した男性および女性の血清試料において、異種テストステロントレーサ、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴを用いたＡＣＳ：180化学発光アッセイにより、従来のテストステロンラジオイムノアッセイ（^{125}ヨウ素）の結果（Ｎ＝145）を比較した。コート－Ａ－カウント合計テストステロン（カリフォルニア州、ロサンジェルス、ＤＰＣ）の市販の装置を用いた。このアッセイでは、50μＬ試料サイズに関して３時間の保温時間がある。報告された最小の検出可能用量は、1992年1月27日の製造社の包装挿入物Ｖ116から計算して管当たり約２ピコグラムである。製造社の指示にしたがってこのアッセイを行なった。

Ｄ）　競合化学発光アッセイ

異種テストステロントレーサＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴを用いた迅速自動テストステロンイムノアッセイの最小検出可能量（Rodbard,1978 Anal.Biochem.90,1-12）は、上述した従来の３時間のラジオイムノアッセイ方法より1.6倍増大した、1.25ｐｇ／管である。第５図に示したように、化学発光アッセイに関する患者の試料の結果は、ラジオイムノアッセイのものと非常に良好な相関関係にある。このアッセイの交差反応性プロファイルを表２に示す。これらのデータは、新しい化学発光アッセイが、ヒト血清試料中のテストステロンの分析測定において有用であることを示唆している。

表２

NSP-DMAE-HD-19-HCMT トレーサを用いたACSテストステロン

化学発光イムノアッセイの特異性

交差反応体の明細%	用量	%	交差反応性
アンドロステンジオン	100 ng/mL	1.55	＜1
アンドロステロン	1 ug/mL	0.03	＜0.1
コルチゾル	1 ug/mL	0.03	＜0.1
コルチコステロン	1 ug/mL	0.02	＜0.1
11ーデオキシコルチゾル	1 ug/mL	0.05	＜0.1
5aージヒドロテストステロン	100 ng/mL	8.3	＜15
エストラジオールー17B	100 ng/mL	0.12	＜0.1
エストロン	100 ng/mL	0.07	＜0.1
プロゲステロン	1 ug/mL	0.09	＜0.1
ダナゾール	1 ug/mL	0.06	＜0.1
デキサメタゾン	1 ug/mL	0.01	＜0.1

同一条件下での各々の化学発光トレーサの計算したＥＤ50および標準結合曲線の比較を第４図に示す。最高のＥＤ50は、抗体免疫原と同種のＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＭＥＴトレーサについてである。異種トレーサである、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＣＶＮＴおよびＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴの両方のＥＤ50は、同種トレーサ

のものよりも小さく、異種トレーサが同種トレーサよりも、テストステロンにより容易に置き換えられることを示している。疎水性ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴトレーサに関してはほとんど置換えが見られず、テストステロンイムノアッセイにおいて、トレーサの親水性ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＨＤ－１９－ＨＣＭＴの明白な利点を示している。

実施例１０

風疹ＩｇＧ捕捉アッセイ

風疹ＩｇＧ捕捉アッセイを用いて、風疹の直接の標識付けの試薬としてのＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳおよびＤＭＡＥ－ＮＨＳを評価した。無傷の風疹ウイルスを、以下に記載するように、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳまたはＤＭＡＥ－ＮＨＳのいずれかにより標識付けた。これらトレーサ調製物の両方に、滴定研究および個体群研究を行なった。各々の風疹トレーサの性能は、所定の試料個体群に関して各々のトレーサが生じる陽性試料／陰性試料の比率を分析することにより測定できる。この風疹ＩｇＧ捕捉アッセイにおいて、陽性信号／陰性信号（Ｐ／Ｎ）比もまた、風疹特異的ＩｇＧのレベルの小さな差を正確に識別する能力に影響を及ぼす。好ましい風疹トレーサは、幅広いＩＵ／ｍＬレベルに及ぶ試料のＰ／Ｎ比において認識できる差を生じるものである。これは、風疹特異的ＩｇＧ検出において感度がより高くなるからである。

Ａ）　風疹ウイルストレーサの調製

ウイラルアンチゲンス社（テネシー州、メンフィス）から購入した風疹ウイルス（IV級、0.5ｍｇ／ｍＬで１ｍＬ）を、セントリコン－３０マイクロコンセントレータ（マサチューセッツ州、ダンバー、アミコン）を用いて、標識付け緩衝液（10ｍＭのリン酸塩、0.125ＮのＮａＣｌ、ｐＨ８）中に透析した。ウイルス試料を標識付け緩衝液中で２ｍＬの容積に調製して、30分間に亘り2600ｒｐｍで卓上遠心分離機内でセントリコン－３０を回転させることにより、10倍に濃縮した。この濃縮物を再度標識付け緩衝液により２ｍＬに調製した。このような濃縮および再構成工程を３回繰り返した。

各々の風疹ウイルスアリコート（１ｍＬの緩衝液中に0.25ｍｇ）に、別々にＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（25μＬのジメチルホルムアミド中に50μｇ）溶液またはＤＭＡＥ－ＮＨＳ（25μＬのジメチルホルムアミド中に50μｇ）溶液を加えた。標識付け反応混合物を短時間掻き混ぜ、15分間に亘り室温で保温し、50μＬの水中の５ｍｇのリシン（ミズーリ州、セントルイス、シグマ）を加えることにより停止した。この反応混合物を短時間掻き混ぜ、さらに５分間に亘り室温で保温し、これに以下の精製工程を行なった。

反応混合物を最初に、予め平衡にしたＰＤ10セファデックスＧ25Ｍサイジングカラム（ニュージャージー州、ピスキャタウェイ、ファーマシア）により精製し、0.1％のＢＳＡを含有する標識付け緩衝液により溶離した。溶離の流速は、１ｍＬ／分に維持し、20×0.8分の分画を採集した。最初のＲＬＵピークとして溶媒容積中に現れたトレーサは、各々の分画から10μＬの試料を採集して、これを標識付け緩衝液で200倍に希釈し、ＭＬＡ　ＩＩルミノメータ（マサチューセッツ州、ミッドフィールド、チバコーニングダイアグノスティクス）で10μＬの希釈試料をカウントすることにより位置付けた。所望のものが集まった分画は、セントリコン－３０により約300μＬまで濃縮した。濃縮物にさらなるＨＰＬＣゲル濾過を行なった。

プロテインパック300 ＳＷ　ＨＰＬＣゲル濾過カラム（ウォーターズ11787）が取り付けられたウォーターズＨＰＬＣ（マサチューセッツ州、ミルフォールド、ウォーターズアソシエイト）を最初に、50ｍＭのトリス　ｐＨ８、0.25ＭのＭｇＣｌ$_2$、0.1％のＢＳＡ、および0.01％のトリトンＸ－100を含有するＨＰＬＣカラム緩衝液で平衡にした。ＰＤ10カラムからの標識付けたウイルス濃縮物を300 ＳＷカラムに装填した。溶離を0.5ｍＬ／分の流速に維持し、40×0.25ｍＬの分画を、試料を注入してから11分後より採集した。標識付けたウイルスのピークを、採集した分画の試料をカウントすることにより第１のＲＬＵピークを探すことにより、上述したのと同様な方法で再度同定した。第１のＲＬＵピークを含有する分画を集め、精製した標識付けウイルストレーサを表した。

Ｂ）　抗ヒトＩｇＧ固相の調製

マウス抗体ヒトＩｇＧＦｃモノクローナル抗体をグルタルアルデヒド（20ｍＭのリン酸ナ

トリウム、ｐＨ７）によりＰＭＰに共有結合させた。これは、BioTechniques 3,156(1985)に記載された方法の変更例である。

Ｃ）　モノクローナル抗ヒトＩｇＧＦｃ（クローン157.8D6.5D3）の調製

融合方法：この方法ではポリエチレングリコールを用いて、ＳＰ２／０　Ａｇ４－１マウス骨髄腫細胞で免疫化した供与体からの単離マウス脾臓細胞を融合する（GalfrieおよびMilstein、(1981),Methods in Enzymology 73:3）。

スクリーニング方法：アクリジニウムエステル標識付けヒトＩｇＧを常磁性粒子に固定化されたヒトＩｇＧに結合させる細胞上澄の能力により、特異的抗体の分泌を検査した。モノクローナル抗体は、ウエスタンブロットにより試験したときに、ヒトＩｇＧＦｃに特異的であり、ヒトＩｇＧ　ＦａｂおよびＦａｂ$_2$断片、ヒトＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、およびＩｇＤに対しては非反応性であることが示された（Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.,76:4350(1979)による）。

抗体アイソタイプ：抗体アイソタイプは、ザイムドMonoAb ID EIAキット（カルフォルニア州、サンフランシスコ、ザイムドラボ社）を用いることにより、ＩｇＧ１であると同定される。

Ｄ）　モノクローナル抗風疹抗体（クローンＭＬ109.10Ｅ7.4 Ａ3）の調製

融合方法：上述したものと同様。

スクリーニング方法：風疹ウイルスに結合する細胞上澄の能力により、特異的抗体の分泌を検査した。抗原に対するモノクローナル結合は、ＥＬＩＳＡにより検出した（J.E. Coligan,Current Protocols in Immunology Vol.1(1991)セクション2.1.3による）。未感染培養対照への非反応性によりクローンは特異的であることが示された。

Ｅ）　風疹ＩｇＧ捕捉化学発光イムノアッセイ

異なる風疹ウイルストレーサの性能を、手動のマジックライト（登録商標）（マサチューセッツ州、ミッドフィールド、チバコーニングダイアグノスティクス）アッセイ様式で三重に評価した。全ての血清試料を、50%のウシ血清、１％のトリトンＸ－100、１％の正常マウス血清、および0.1%のアジドナトリウムを含有する希釈液（メアリーランド州、ウォーカースビル、バイオウィタカー、１×ＤＰＢＳ）により５倍に希釈した。サーステットポリスチレン管（ノースカロライナ州、ニュートン）内において37℃で7.5分間に亘り、希釈試料（50μＬ）、抗ヒトＩｇＧ固相（250μＬ中80μｇ）、および希釈風疹ウイルストレーサ（100μＬ）を互いに保温した。反応混合物を分離して、吸引し、１ｍＬの１×ＤＰＢＳ（メアリーランド州、ウォーカースビル、バイオウィタカー）により２回洗浄した。最終ペレットを100μＬの水で再構成し、その化学発光をＭＬＡ－ＩＩルミノメータ（マサチューセッツ州、ミッドフィールド、チバコーニングダイアグノスティクス）で測定した。２種類の風疹ウイルストレーサ（上述したように調製した）は特異的化学発光活性が異なっていたので、表３に示すように９種類の風疹ＩｇＧ試料を用いて、異なる範囲の入力カウントに亘り滴定研究を行なった。

表３
NSP-DMAE 風疹滴定研究の風疹IgG補足アッセイ結果

試料	NSP-DMAE 風疹 (RLU, %CV, P/N)					
	1×10^6	5.95×10^6	11.1×10^6	13.3×10^6	24.3×10^6	46.1×10^6
希釈液	1233	1793	2473	2757	4253	9360
%CV	1.9	2.6	9.4	3.3	5.5	17.2
P/N	1.0	0.9	1.0	0.8	1.1	1.6
陰性						
RAB 17	1233	2037	2447	3367	4023	5987
%CV	3.3	20.1	3.9	23	8.5	7.5
P/N	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
RAB 36	1383	1897	2587	2880	6357	8357
%CV	13.3	13.2	4.7	0.9	16.3	21.7
P/N	1.1	0.9	1.1	0.9	1.6	1.4
低＋						
CAP 10	1393	2903	4247	5613	8100	14830
%CV	2.7	6.1	2.4	6.4	9.1	7.6
P/N	1.1	1.4	2.2	2.1	2.6	3.3
CAP 15	1473	3170	5283	7003	10263	19737
%CV	2.7	3	3.2	2.7	6.3	7.9
P/N	1.2	1.6	2.2	2.1	2.6	3.3
中－高＋						
TSI 3156	3547	14420	32143	40403	66857	142657
%CV	3.8	3.3	4	3.2	1.3	1
P/N	2.9	7.1	13.1	12.0	16.6	23.8
RAB 67	10970	52003	120987	151000	262317	536050
%CV	2.7	6.4	5	2.4	1.06	2.3
P/N	8.9	25.5	49.4	44.8	65.2	89.5
TSI 3167	7357	35337	75027	94530	167653	342447
%CV	1.9	1.9	8	3.4	4.6	3.5
P/N	6.0	17.3	30.7	28.1	41.7	57.2
TSI 3163	11270	56443	111327	142290	249450	514440
%CV	2.2	3.3	4.9	1.7	2.2	10.6
P/N	9.1	27.7	45.5	42.3	62.0	85.9
DL1-3150-388	11477	55093	113783	146473	263267	542483
%CV	1.4	6.5	12.3	3.2	3.2	3.4
P/N	9.3	27.0	46.5	43.5	65.4	90.6

ＮＳＰ－ＤＭＡＥと比較して、ＤＭＡＥの標識付けウイルストレーサ中への取込みが４－５倍大きいために、ＤＭＡＥ標識付けウイルストレーサを広範囲に亘り滴定した。比較できる質量の風疹トレーサを用いてアッセイ条件を比較するために、ＤＭＡＥ風疹トレーサ合計入力範囲は、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹条件のものよりも数倍大きくなければならない。滴定研究の結果は、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサのレベルが増加したときに改良されたＰ／Ｎ比を示したが、ＤＭＡＥ風疹トレーサにより精製されたＰ／Ｎ比は10×10^6ＲＬＵ／試験で安定状態となった。ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサの最適入力レベルとして24×10^6ＲＬＵ／試験の選択は、対照希釈液による非特異的結合を低く維持する一方で、より

高いＰ／Ｎ比の結果に基づく。ＤＭＡＥ風疹トレーサ用いた比較できるアッセイ条件は、125×10^6ＲＬＵ／試験である。これらの２種類の条件を比較する場合、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサが、ＤＭＡＥ風疹トレーサにより生じたＰ／Ｎ比よりも２から４倍大きい範囲のＰ／Ｎ比を有する優れた試薬であることが明白である。

これら２種類の風疹トレーサの検査を、20の風疹ＩｇＧ試料（0.3－500ＩＵ／ｍＬに亘る）および４の潜在的な交差反応性試料（全てが、ルバザイム（Rubazyme）アッセイ（イリノイ州、シカゴ、アボットラボラトリーズ）により風疹ＩｇＧ陰性として同定される）の個体群に発展させた（表４Ａ）。この研究は、各々の試薬に関して、以下の合計入力；ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサ（24×10^6ＲＬＵ／試験）およびＤＭＡＥ風疹トレーサ（125×10^6ＲＬＵ／試験）を用いて行なった。個体群のデータは、風疹ＩｇＧ捕捉アッセイの感度が、ウイルスを直接標識付けるのに利用したＰＡＡＥの級に著しく影響を受けることを示唆した。ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサを用いることにより生じたＰ／Ｎ（陰性結果に対する陽性結果）比は、ＤＭＡＥ風疹トレーサにより生じたものより著しく大きい（第６図）。これらの結果は、親水性ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサにより行なわれるアッセイの能力を反映し、従来のＤＭＡＥトレーサよりも、陽性試料を陰性試料からより明確に区別する。このことは、診断的に重大な低陽性個体群において特に重要である。

親水性ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサの潜在的に交差反応性である試料の特異性への影響を評価した。ＣＡＰ１０試料に対応するＰ／Ｎ比のカットオフ（cutoff）を用いた場合、結果は、これらの種類の試料に関して風疹トレーサを使用したことにより生じた偽陽性同定を示さない（表４Ｂ）。

これら両方の研究の結果は明白に、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳは風疹ウイルスの直接の標識付けに関して優れた試薬であることを示唆している。この試薬により、広範囲の風疹ＩｇＧレベルに特異的に結合して、風疹ＩｇＧ陰性個体群のものとは明白に区別できる特異的ＲＬＵ値を生じる風疹調製物が得られる。さらに、これらの条件は、潜在的な交差反応性の試料に関して、偽陽性結果を生じることなく存在する。

表４Ａ

NSP-DMAE 風疹およびDMAE風疹トレーサを用いた個体群研究

風疹IgG補足アッセイ（P/N比）

試料	NSP-DMAE 風疹	DMAE 風疹
RAB 17	1.0	1.1
AP05874-4	1.0	1.0
AS04912-9	1.1	1.1
RAB 36	1.1	1.2
AS14837-8	1.3	1.0
CAP 10	1.8	1.2
AS01721-3	2.1	1.0
AP27771-3	2.4	1.0
AR99860-4	2.5	0.8
CAP 15	2.5	1.0
TSI 3164	5.8	1.8
AS06137-4	8.0	1.3
GP1-27	23.9	2.8
AP41719-0	24.9	3.5
GP2-9	26.2	3.1
GP2-18	27.7	3.4
AR86731-7	51.1	5.6
AR96863-2	58.7	5.9
AS15178-2	68.5	6.9
AR74744-4	88.9	9.8

表４Ｂ

干渉試料	風疹アッセイ（P/N 比）		
ルバザイム（指数）			
（全て風疹 IgG -）	NSP-DMAE	DMAE	>=1.0 is +
EBV+E9-3204-467	1.5	1.1	0.725
EBV+E8-2405-99	1.01	0.98	0.171
VZV+E02606-135	1.4	1.1	0.183
ANA+12615M-910513	1.7	1.1	0.793

Ｆ）　チバコーニングマジックライト（登録商標）対照アッセイとアボットＩＭｘアッセイとの比較

ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサの評価をさらに拡張して、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサを用いたこのマジックライト風疹ＩｇＧアッセイがどのように、(1)チバコーニングダイアグノスティクスマジックライトアッセイ（標識が付けられていない風疹およびＮＳＰ－ＤＭＡＥ標識付け抗風疹モノクローナル抗体１０Ｅ７の複合体を用いる）および(2)ＩＭｘ風疹ＩｇＧ（イリノイ州、シカゴ、アボット）に匹敵するかの研究を含む。両方のマジックライトアッセイにより検査した試料個体群には、ＩＭｘにより風疹特異的ＩｇＧに関して陽性または陰性として同定される39の風疹ＩｇＧ試料が含まれる（表５）。興味を引くことには、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサにより生じた陽性結果／陰性結果（Ｐ／Ｎ）比は、マジックライト対照アッセイ様式に関して見られたよりも著しく大きい。このことは、風疹ＩｇＧ高陽性試料において特に明確であり、標識付けられていない風疹ウイルスへの結合部位に関して風疹特異的ＩｇＧおよびＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＭＡｂ１０Ｅ７との間の条件を示すかもしれない。ＣＡＰ１０試料に対応するＰ／Ｎ比のカットオフに基づく場合、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ風疹トレーサを用いたマジックライト風疹ＩｇＧアッセイは、マジックライト風疹対照アッセイと97.4%の一致を、ＩＭｘ風疹ＩｇＧと92.3%の一致を示した。

表５

NSP-DMAE 風疹トレーサを用いた拡張個体群研究

試料	NSP-DMAE 風疹	風疹＋ NSP-DMAE10E7	IMx
RAB 17	1.0	1.0	陰性
AP05874-4	1.0	0.9	陰性
AS04912-9	1.1	0.9	陰性
RAB 36	1.1	1.0	陰性
AS14837-8	1.3	0.9	陰性
CAP 10	1.8	1.1	陽性
AS01721-3	2.1	1.05	陰性
AP27771-3	2.4	1.1	陰性
AR99860-4	2.5	1.1	陰性
CAP 15	2.5	1.2	陽性
AS00541-9	2.8	1.2	陽性
AR97400-3	3.2	1.3	陽性
AP41598-1	4.0	1.5	陽性
TSI 3164	5.8	2.0	陽性
AS06137-4	8.0	1.7	陽性
AS00407-3	9.9	2.4	陽性
TSI 3156	13.6	3.0	陽性
GP2-3	23.4	3.7	陽性
GP1-27	23.9	3.6	陽性
AP41719-0	24.9	2.6	陽性
GP2-9	26.2	3.9	陽性
GP1-1	26.3	3.7	陽性
GP2-11	26.9	4.1	陽性
GP2-18	27.7	4.1	陽性
GP2-4	28.1	4.4	陽性
TSI 3167	33.4	6.2	陽性
GP2-22	39.7	5.4	陽性
GP2-14	42.0	4.1	陽性
GP1-17	43.3	7.4	陽性
GP2-35	44.6	7.8	陽性
TSI 3163	48.7	13.1	陽性
AS15788-7	49.3	5.3	陽性
DL1-3510-388	51.0	11.6	陽性
AR86731-7	51.1	9.6	陽性
AR96863-2	58.7	10.6	陽性
AP35925-6	62.0	7.9	陽性
HG68085-5	63.8	16.5	陽性
AS15758-2	68.5	11.3	陽性
AR74744-4	88.9	27.9	陽性

実施例１１

タンパク質のＤＭＡＥおよびＮＳＰ－ＤＭＡＥ標識付け

この実施例は、多量のＮＳＰ－ＤＭＡＥが、ＮＳＰ－ＤＭＡＥの親水性の性質のために、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）のようなタンパク質に共有結合できることを示す。0.1mの炭酸塩緩衝液、ｐＨ９、（2.7ｍＬ）中のＢＳＡ（10ｍｇ、150ｎモル）の溶液を、ＤＭ

Ｆ（300μＬ）中のＤＭＡＥ－ＮＨＳエステルまたはＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳエステル（各々4.5ｍｇ、7.5μモル）のいずれかの50当量の溶液で処理した。ＤＭＡＥ－ＮＨＳを用いた反応はやや濁っていたが、ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳによる反応は、反応中ずっと完全に透明のままであった。反応物を24時間に亘り室温で撹拌し、標識付けたタンパク質をセファデックスＧ－25カラム（3.7×42ｃｍ）のゲル濾過クロマトグラフィーにより単離して、、10ｍＭのリン酸塩緩衝液ｐＨ８により溶離した。タンパク質分画を各々の場合で採集し、濃縮し、同様のセファデックスＧ－25カラムで再精製した。２回の濃縮の後、各々の反応から回収した標識付けタンパク質の量およびアクリジニウムエステル（ＡＥ）標識付けの程度を、それぞれ、タンパク質分析（バイオラドタンパク質アッセイ）を行なうことにより、そして標識付けタンパク質の化学発光活性を測定することにより、評価した。これらの測定から、このタンパク質は、約14分子のＤＭＡＥおよび24分子のＮＳＰ－ＤＭＡＥにより標識付けられたことが分かった。

実施例１２

ＮＳＰ－ＤＭＡＥ標識付けＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）の５′－３２Ｐ－標識付け５０８．ＣＰ－３′－マレイミドへの接合

この実施例は、複数のＮＳＰ－ＤＭＡＥにより予め標識付けられたタンパク質キャリヤをどのように、我々が５０８．ＣＦ－ＮＨ２と称している２４－ｍｅｒオリゴヌクレオチドに共有結合できるかを示す。オリゴヌクレオチドを最初に、当業者に通常知られている従来の放射線標識付け技術を用いて５′－末端リン酸塩で３２－Ｐに放射線標識付けした。オリゴヌクレオチドの３２Ｐ－標識付けの目的は、タンパク質キャリヤに一度接合したオリゴヌクレオチドを定量するハンドルを提供することにある。オリゴヌクレオチドの３′末端は、アミノアルキル基を担持し、スルホヒドリル反応性マレイミド基に結合できるように、以下に記載するように二官能性架橋体との反応を行なわせる。３′末端にアミノアルキル基を有するオリゴヌクレオチドを調製する方法がよく知られている（DNA Modification Reagents for Use in Automated DNA Synthresisのユーザーズマニュアル、Doc. No. PB022789-1、1989、カリフォルニア州、パロアルト、クロンテックラボラトリーズ社、を参照のこと）。

３２Ｐ－標識付け５０８．ＣＦ－マレイミドの調製：

50ｍＭの炭酸塩（600μＬ、ｐＨ8.4）中の３２Ｐ－５０８．ＣＦ－ＮＨ２（40ｎモル）の溶液を、スルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ、10ｍｇ、22.9μモル）で処理した。反応液を30分間に亘り室温で撹拌し、続いて、生成物を、2.3ｍＬ／分の流速で、20分以上に亘り0.1Ｍの酢酸トリエチレンアンモニウム緩衝液、ｐＨ7.0中の８％から20％までのアセトニトリル勾配を用いて、Ｃ８カラム（0.7×25ｃｍ）の分取ＨＰＬＣにより直接的に精製し、260ｎｍでＵＶ検出した（ｔＲ＝14.8分、生成物；ｔＲ＝12.7分、出発材料）。生成物を含有するＨＰＬＣの溶離物を乾燥するまで凍結乾燥した：収量25ｎモル（60％）。

ＮＳＰ－ＤＭＡＥ標識付けＢＳＡの３２Ｐ－５０８．ＣＦ－マレイミドへの接合：

上述したようにＢＳＡを30当量のＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳと反応させることにより、（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ）２１－ＢＳＡを調製した。５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８を含有する100ｍＭのリン酸塩緩衝液中の標識付けタンパク質（６ｍｇ、90ｎモル）を、２－イミノチオラン（50当量、0.6ｍｇ、イリノイ州、ロックフォード、ピアーズ）で処理した。反応液を１時間に亘り室温で窒素雰囲気下で撹拌した。チオール化タンパク質を、溶離液として20ｍＭのリン酸塩、１ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ6.8用いたセファデックスＧ－25のカラム（3.7×42ｃｍ）でゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。このカラムから除かれたタンパク質分画を、スピード－ｖａｃ内で約２ｍＬの容積まで濃縮した。次いで、タンパク質溶液を５′－３２Ｐ－標識付け５０８．ＣＦ－３′－マレイミド（8.9ｎモル）と混合し、得られた溶液を16時間に亘り窒素雰囲気下で撹拌した。次いで、反応液を600ｎモルのブロム酢酸を加えることにより、急冷した。室温でさらに２時間に亘り撹拌した後、反応混合物を、遠心性限外濾過により約0.5ｍＬの容積まで濃縮した。接合体と未接合タンパク質の混合物を、ＴＢＥ緩衝液、ｐＨ８中の7.5％の密度のゲル（３％架橋）上におい

て、４℃、10ｍＡの一定の電流で運転した天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）により未反応５０８．ＣＦ－マレイミドから分離した。接合体および未接合タンパク質の混合物を、ＰＢＳ緩衝液（138ｍＭのＮａＣｌ、8.1ｍＭのＮａ２ＨＰＯ４、2.7ｍＭのＫＣｌ、1.2ｍＭのＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ7.4）中において破砕および浸漬方法によりゲルマトリックスから溶離した。

さらにオリゴヌクレオチドを含む接合体を未接合タンパク質から分離するために、親和性精製を行なう。オリゴヌクレオチドを含む接合体を、汚染未接合タンパク質から分離する一般的な実施例は、相補的オリゴヌクレオチドに固定化された固相（例えば、官能化ポリエステルまたは制御された多孔ガラス）の利用である。ハイブリダイゼーション、分離、および洗浄の工程を行なうことにより、固相上の所望の接合体を捕捉し、未接合タンパク質を洗浄し、固相から精製した接合体を回収する放出工程を続けることができる。このような精製／集積工程は、核酸ハイブリダイゼーションを行なう当業者が容易に行なうことができる。

実施例１３

抗体－ＤＮＡ（抗－ＴＳＨ－５０８．ＣＦ）接合体の調製

この実施例はさらに、本発明の化合物の使用範囲を示すものである。この実施例において、多数の化学発光標識を担持するのに適した抗体－ＤＮＡ接合体を生成する。この接合体は、別のチオール－マレイミド結合化学を用いて三工程で調製することができる。

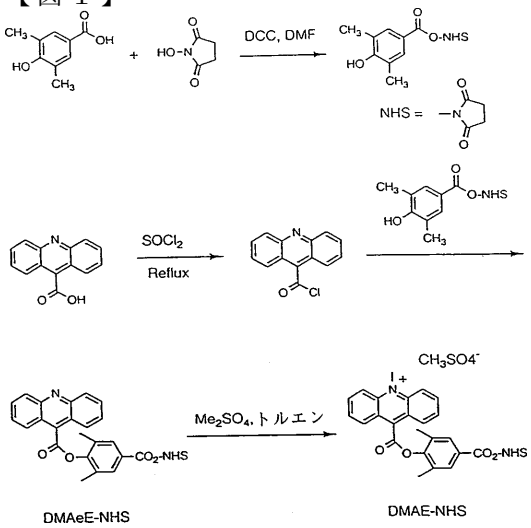
チオール化抗－ＴＳＨの調製およびマレイミド－５０８．ＣＦへの接合：150ｍＭのＮａＣｌおよび５ｍＭのＥＤＴＡを含有する0.2Ｍのリン酸塩緩衝液、ｐＨ８の２ｍＬ中の抗－ＴＳＨ（20ｍｇ、133ｎモル）の溶液を、窒素雰囲気下で２－イミノチオラン（トラウトの試薬、0.37ｇ、20当量）により処理した。反応液を窒素雰囲気下で１時間に亘り室温で撹拌し、チオール化タンパク質を、溶離液として0.5ｍＭのＥＤＴＡを含有する10ｍＭのリン酸塩、ｐＨ6.8を用いてセファデックスＧ－25のカラム（3.7×42ｃｍ）のゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。カラムから除いたタンパク質分画（収量17ｍｇ、113ｎモル）をスピード－ｖａｃ内の減圧下で約２ｍＬの容積まで濃縮した。次いで、この溶液をマレイミド－５０８．ＣＦ（12ｎモル）と混合した。この反応液を窒素雰囲気下で24時間に亘り室温で撹拌した。このときまでに、この溶液はやや濁った。

次いで、反応混合物を、20ｍＭのリン酸塩、ｐＨ７により平衡にしたＤＥＡＥ－セルロースのカラム（１×15ｃｍ）に装填した。このカラムを20ｍＭのリン酸塩、ｐＨ７中の０から200ｍＭのＮａＣｌの勾配により溶離し、続いて、20ｍＭのリン酸塩、ｐＨ７中の200ｍＭのＮａＣｌにより溶離し、過剰の未反応タンパク質を溶離した。同様の緩衝液中の500ｍＭのＮａＣｌにより溶離を行ない、接合体と未反応ＤＮＡとの混合物を溶離した。限外濾過によりイオン交換カラムから除いて高塩分画の濃縮後、溶離液として水を用いて、0.5ｍＬ／分でセファデックスＧ－75のカラム（1.5×40ｃｍ）のゲル濾過クロマトグラフィーにより、未反応ＤＮＡから接合体を分離した。この方法により単離した接合体の溶液を乾燥するまで凍結乾燥した。

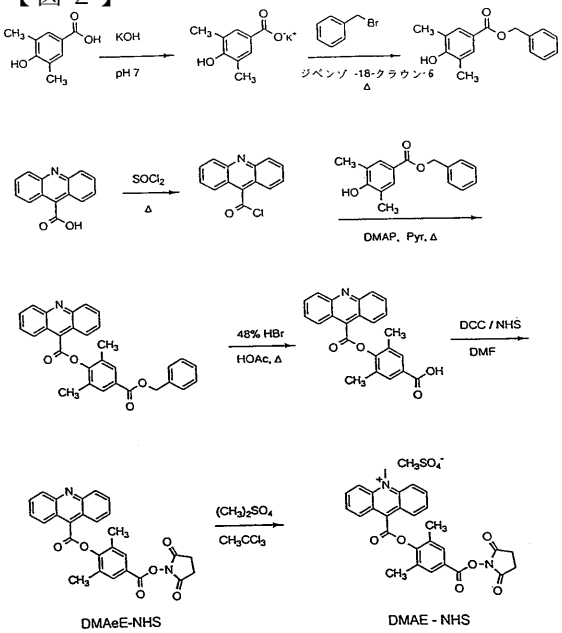
接合体の特徴付けおよび接合体の収量の計算を、ＵＶ分光光度計により行なった。上述した方法により単離した接合体のＵＶスペクトルは、５０８．ＣＦおよび抗－ＴＳＨの１：１の混合物のものと外観が同一であった。このＵＶスペクトルは、約270ｎｍでの吸収最大値およびA_{260}値とA_{280}値との間の１：１の対応により特徴付けられた。接合体のＵＶスペクトルにおけるA_{260}およびA_{280}の値は、ＤＮＡ単体およびタンパク質単体のそれぞれと比較して1.5倍増加した。この結果から、５０８．ＣＦと抗－ＴＳＨとの１：１の接合体の収量は、1.6ｎモルであると計算された（マレイミド５０８．ＣＦ全体から13％）。

このように作成した接合体を、中でも、前述した方法によりＮＨＳ－ＤＭＡＥ化学発光標識に共有結合させることができる。

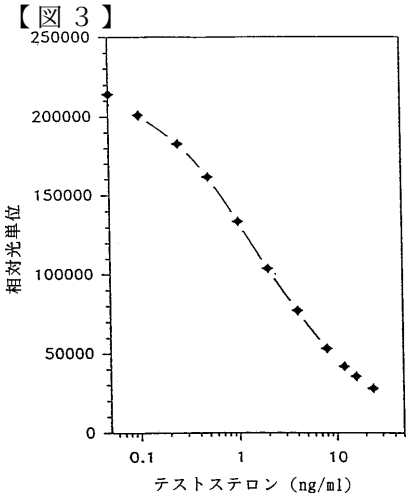
【図１】


DCC, DMF
NHS =
SOCl2
Reflux
Me2SO4, トルエン
CH3SO4-
DMAeE-NHS
DMAE-NHS

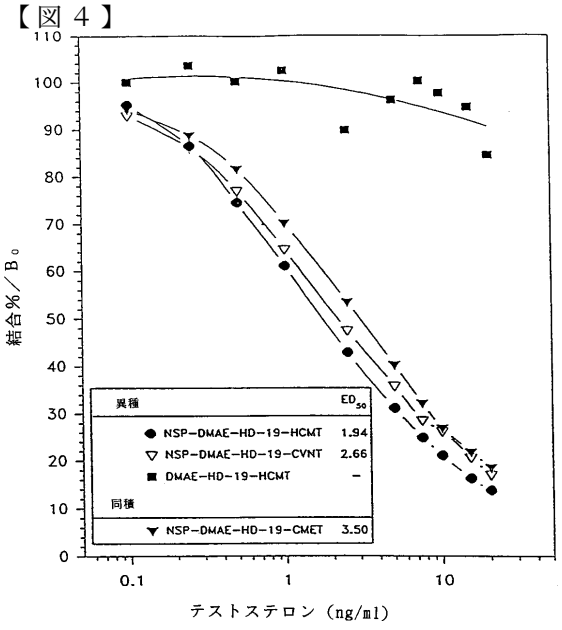
【図２】


KOH
pH 7
ジベンゾ -18-クラウン-6
SOCl2
DMAP, Pyr, Δ
48% HBr
HOAc, Δ
DCC / NHS
DMF
(CH3)2SO4
CH3CCl3
DMAeE-NHS
DMAE - NHS

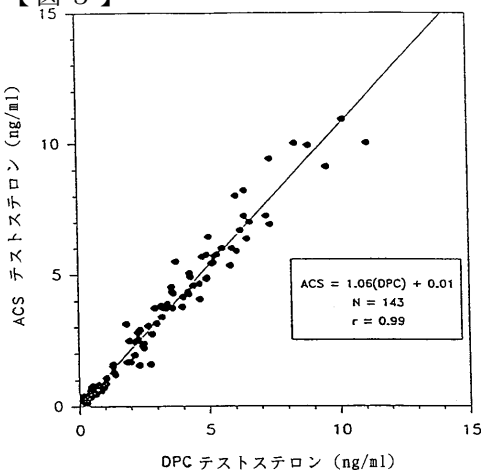
【図３】


相対光単位
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.1
1
10
テストステロン（ng/ml）

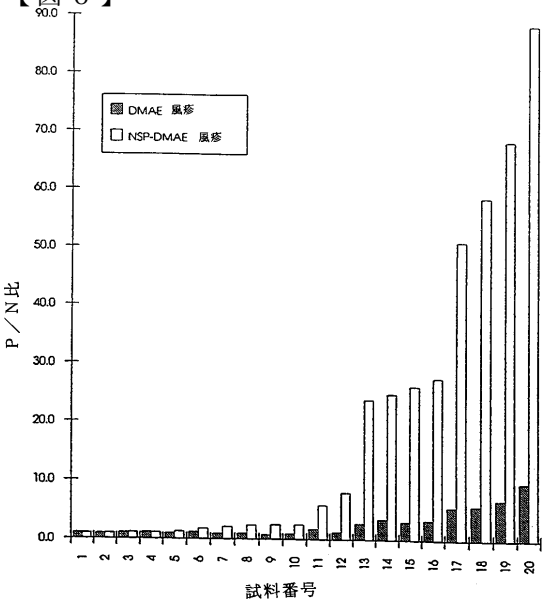
【図４】


結合％／Bo
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
テストステロン（ng/ml）
異種
ED50
NSP-DMAE-HD-19-HCMT 1.94
NSP-DMAE-HD-19-CVNT 2.66
DMAE-HD-19-HCMT -
同種
NSP-DMAE-HD-19-CMET 3.50

【図５】

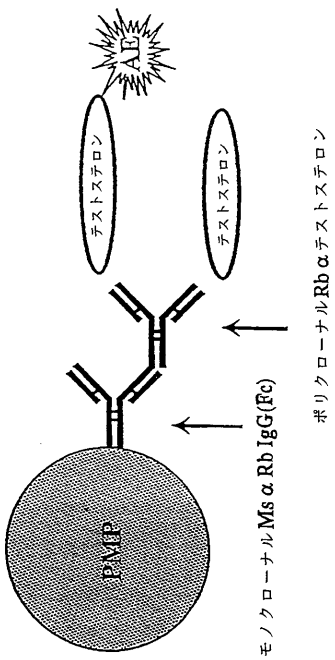


【図６】



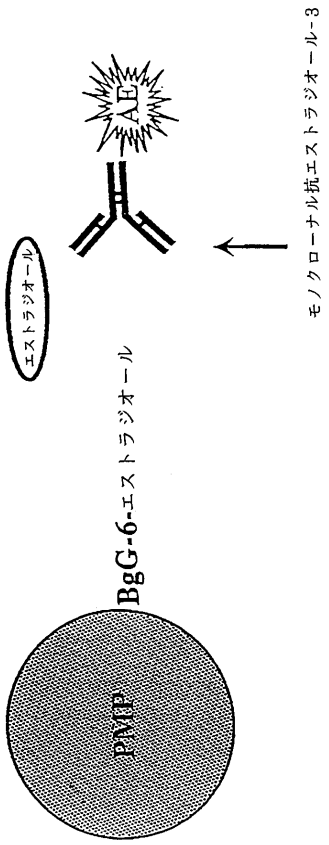
【図７】

第２抗体固相：競合

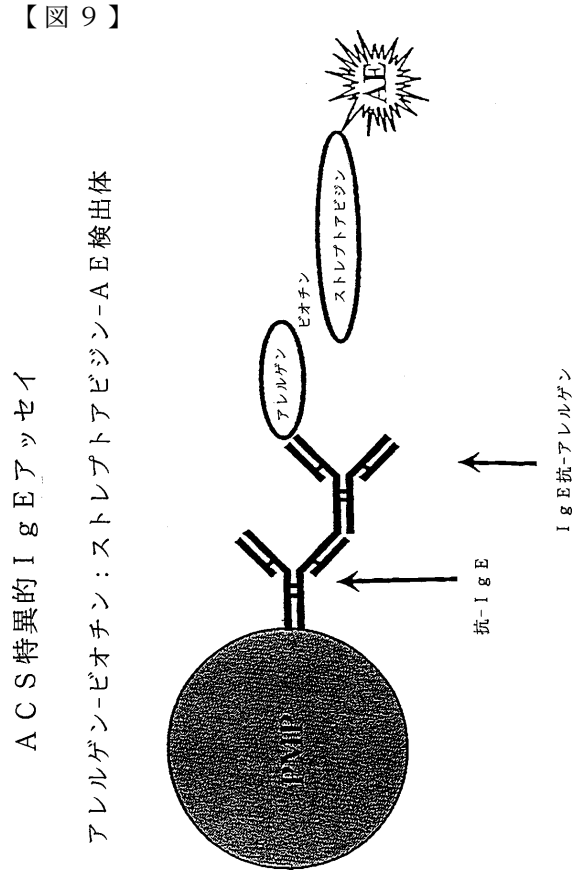


【図８】

競合ハプテン固相様式



【図９】


ＡＣＳ特異的ＩｇＥアッセイ
アレルゲン-ビオチン：ストレプトアビジン-ＡＥ検出体
AE
ストレプトアビジン
ビオチン
アレルゲン
ＩｇＥ抗-アレルゲン
抗-ＩｇＥ
PVDF

フロントページの続き

(72)発明者 ソティリオウリヴェンティス，チャリクリア
アメリカ合衆国 ミズーリー州 ６５４０１ ローラ マックカッチェン ドライヴ １６０４
(72)発明者 ナトラジャン，アナンド
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 ０３１０４ マンチェスター メイドライン ロード ７７
(72)発明者 ヤン，キンピン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１５３２ ノースボロウ ストラトン ウェイ １４
(72)発明者 コノリー，ピーター ビー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２０８１ ウォルポール ハイランド ストリート ４０
(72)発明者 キルロイ，ジョン ピー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１６ ボストン ウォレン アヴェニュー ナンバー２０２ ７８
(72)発明者 マックデン，コンスタンス アール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４６ ブルックリン チスウィック ロード ４ ユニット ２６
(72)発明者 ティレル，ステファン エム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２０３８ フランクリン プロスペクト ストリート １７０エイ

審査官 新留 素子

(56)参考文献 特開昭６３－１０１３６８（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－０９６５６７（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－２１９９９８（ＪＰ，Ａ）
特表平０３－５０１７７２（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－００９５６６（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－１３３４６９（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－２２８１０２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07D219/06
C07J 43/00
G01N 33/53
G01N 33/532
G01N 33/569
CA(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)