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

特許第4672144号
(P4672144)

(45)発行日　平成23年4月20日(2011.4.20)　(24)登録日　平成23年1月28日(2011.1.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C07D 219/04	(2006.01)	C07D	219/04	
C07D 219/06	(2006.01)	C07D	219/06	
C07D 401/12	(2006.01)	C07D	401/12	
C09K 3/00	(2006.01)	C09K	3/00	U
C09K 11/07	(2006.01)	C09K	11/07	

請求項の数 18　(全 57 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-564941 (P2000-564941)
(86)(22)出願日	平成11年8月10日 (1999.8.10)
(65)公表番号	特表2002-522530 (P2002-522530A)
(43)公表日	平成14年7月23日 (2002.7.23)
(86)国際出願番号	PCT/US1999/018076
(87)国際公開番号	WO2000/009487
(87)国際公開日	平成12年2月24日 (2000.2.24)
審査請求日	平成18年5月25日 (2006.5.25)
(31)優先権主張番号	60/096,073
(32)優先日	平成10年8月11日 (1998.8.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　507269175
シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド
ＳＩＥＭＥＮＳ　ＨＥＡＬＴＨＣＡＲＥ　ＤＩＡＧＮＯＳＴＩＣＳ　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国、ニューヨーク　１０５９１、タリータウン、ベネディクト・アベニュー　５１１
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100116919
弁理士　齋藤　房幸
(74)代理人　100119079
弁理士　伊藤　佐保子

最終頁に続く

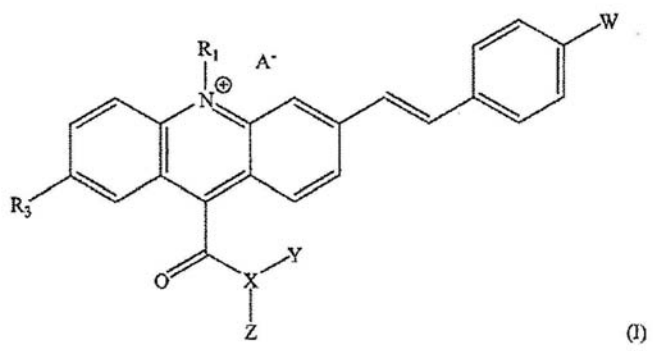
(54)【発明の名称】近赤外化学発光性アクリジニウム化合物およびその使用。

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

５９０ｎｍより長波長の波長極大を有する光を発光するアクリジニウム化合物であって、該化合物はアクリジニウム核上に官能基を付加することによって形成された拡張された同一平面上の共役系を含み、該系は発光の間同一平面性を維持し、該官能基は少なくとも１つの芳香環および１つの電子供与性基を含み、該アクリジニウム化合物は、式（Ｉ）の構造を有し：

【化１００】



(I)

R_1は、アルキル基またはスルホアルキル基であり；

R_3は、水素、Ｒ、置換アリール、非置換アリール、ハライド、アミノ、ヒドロキシル

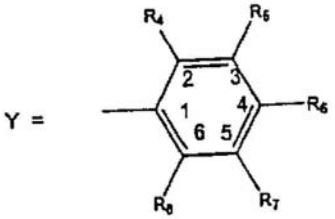
、ニトロ、スルホネート、－ＣＮ、－ＣＯＯＨ、－ＳＣＮ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＳＳＲ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ、および－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒからなる群から選択され、ここでＲは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、またはアラルキル、あるいは２０個までのヘテロ原子を有する、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、またはアラルキルであり；

Ｗは、－ＯＨ、－ＳＨまたは－ＮＲ’Ｒ’’からなる群から選択される、電子対を供与し得る電子供与性置換基であり、ここでＲ’、およびＲ’’は、水素または低級アルキルであり、そして全て同一であるか、または異なり得；

該アクリジニウム核の四級窒素と対形成する対イオンは、R_1の一部であっても基A^-であってもよく；

Ｘは窒素、酸素または硫黄であり、Ｘが酸素または硫黄である場合、Ｚは省略され、そしてＹは次式の多置換アリール部分であり：

【化２】



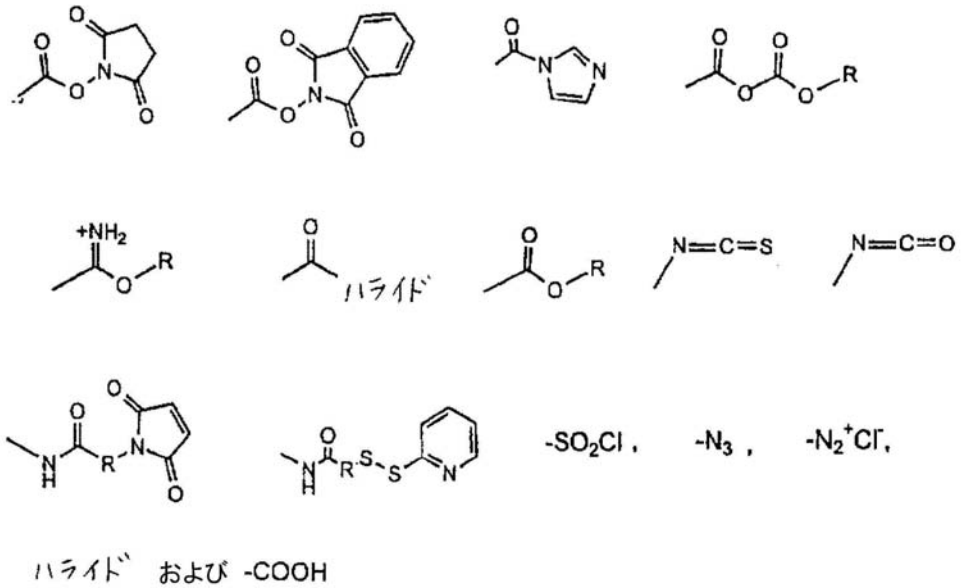
ここでR_4およびR_8はアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ（－ＯＲ）、またはアルキルチオール（－ＳＲ）であり；

R_5およびR_7は上記で定義のR_3のいずれかであり；

R_6は－R_9－R_{10}であり、ここでR_9は必須ではないが、必要に応じて、分枝鎖または直鎖のアルキル、置換または非置換のアリールまたはアラルキルであり得、必要に応じて２０個のまでのヘテロ原子を含み；そして

R_{10}は：

【化３】

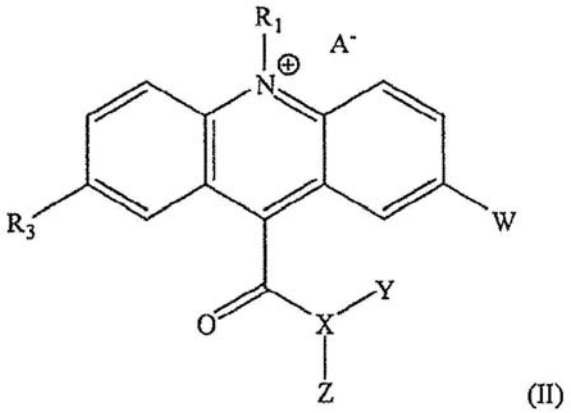


からなる群から選択され、そして、

Ｘが窒素の場合、Ｚは－SO_2－Ｙ’であり、Ｙ’は上記と同じ定義を有する多置換アリール部分であり、そしてＹは、上記で定義された多置換アリール部分であるか、または必要に応じて２０個までの炭素原子を含む、分枝鎖または直鎖の、ハロゲン化もしくは非ハロゲン化のアルキルである、

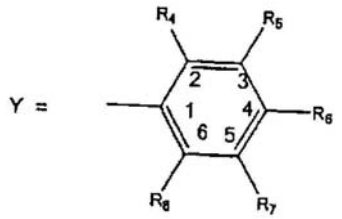
化合物。

【請求項２】
５９０ｎｍより長波長の波長極大を有する光を発光するアクリジニウム化合物であって、該化合物はアクリジニウム核上に官能基を付加することによって形成された拡張された同一平面上の共役系を含み、該系は発光の間同一平面性を維持し、該官能基は少なくとも１つの芳香環および１つの電子供与性基を含み、該アクリジニウム化合物は、式（ＩＩ）の構造を有し：
【化１０１】



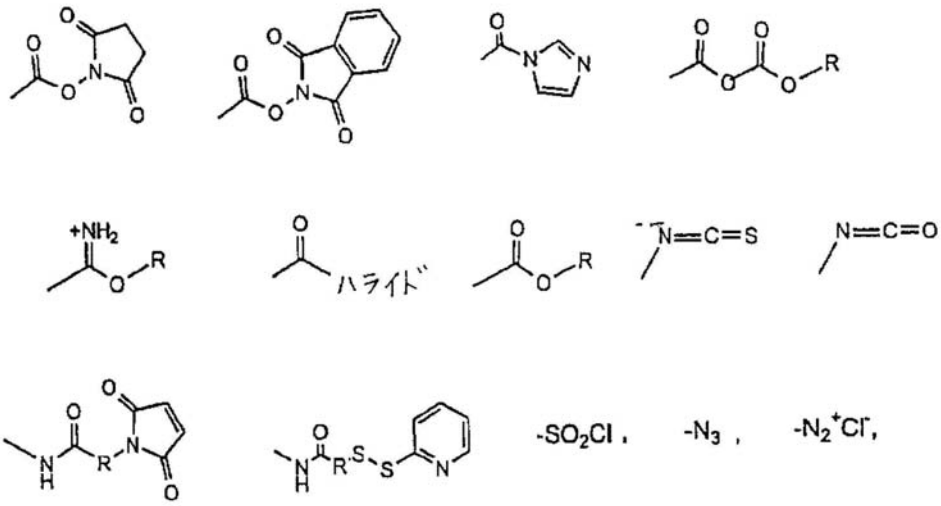
(II)

ここで
R_1は、アルキル基またはスルホアルキル基であり；
R_3は、水素、Ｒ、置換アリール、非置換のアリール、ハライド、アミノ、ヒドロキシル、ニトロ、スルホネート、－ＣＮ、－ＣＯＯＨ、－ＳＣＮ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＳＳＲ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ、および－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒからなる群から選択され、ここでＲは、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、あるいは２０個までのヘテロ原子を有する、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り；
Ｗは、－ＯＨ、－ＳＨまたはＮＲ’Ｒ’’からなる群から選択される、電子対を供与し得る電子供与性置換基であり、ここでＲ’およびＲ’’は水素または低級アルキルであり、そして全て同一または異なり得；
該アクリジニウム核の四級窒素と対形成する対イオンは、R_1の一部であっても基A^-であってもよく；
Ｘは窒素、酸素または硫黄であり、Ｘが酸素または硫黄である場合、Ｚは省略され、そしてＹは次式の多置換アリール部分であり：
【化５】



ここでR_4およびR_8はアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ（－ＯＲ）、またはアルキルチオール（－ＳＲ）であり；
R_5およびR_7は上記で定義のR_3のいずれかであり；
R_6は－R_9－R_{10}であり、ここでR_9は必須ではないが、必要に応じて、分枝鎖または直鎖のアルキル、置換または非置換のアリールまたはアラルキルであり得、必要に応じて２０個のまでのヘテロ原子を含み；そして
R_{10}は：

【化６】



からなる群から選択され、そして、

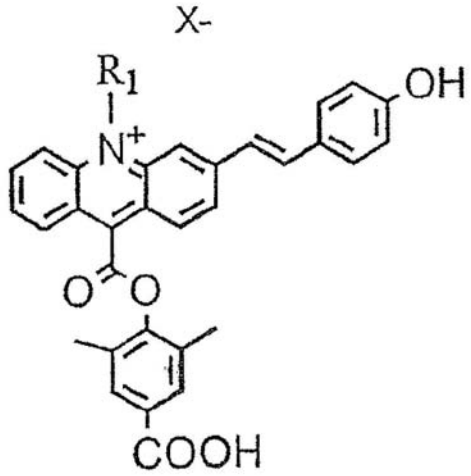
Ｘが窒素の場合、Ｚは－ＳＯ$_2$－Ｙ’であり、Ｙ’は上記と同じ定義を有する多置換アリール部分であり、そしてＹは、上記で定義された多置換アリール部分であるか、または必要に応じて２０個までの炭素原子を含む、分枝鎖または直鎖の、ハロゲン化もしくは非ハロゲン化のアルキルである、

化合物。

【請求項３】

前記化合物が、３－ＨＳ－ＤＭＡＥ、ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ、ＮＳＰ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ、ならびにこれらの対応のエステル、アミド、ハロゲン化カルボニル、および遊離カルボキシル基の無水物誘導体からなる群から選択され、該化合物が、

【化１０２】



の構造を有し、

３－ＨＳ－ＤＭＡＥにおいて、Ｒ$_1$はＣＨ$_3$であり；Ｘは対イオンであり；

ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥにおいて、Ｒ$_1$は（ＣＨ$_2$）$_4$－ＳＯ$_3$$^-$であり；Ｘは存在せず；

ＮＳＰ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥにおいて、Ｒ$_1$は（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3$$^-$であり；Ｘは存在しない；

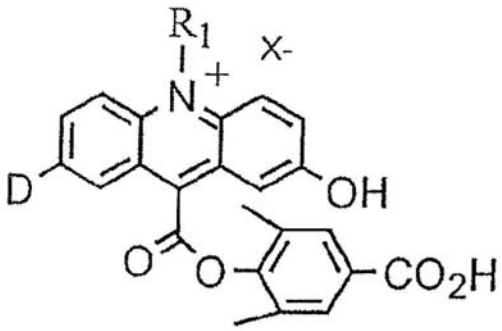
請求項１に記載の化合物。

【請求項４】

前記化合物が、２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥ、ＮＳＢ－２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥ、ＮＳ

Ｐ－２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥ、２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥ、ＮＳＢ－２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥ、およびＮＳＰ－２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥ、ならびにこれらの対応のエステル、アミド、ハロゲン化カルボニル、および遊離カルボキシル基の無水物誘導体からなる群から選択され、該化合物が、

【化１０３】



の構造を有し、

２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはＨであり；R_1はCH_3であり；Ｘは対イオンであり；

ＮＳＢ－２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはＨであり；R_1は$(CH_2)_4-SO_3^-$であり；Ｘは存在せず；

ＮＳＰ－２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはＨであり；R_1は$(CH_2)_3-SO_3^-$であり；Ｘは存在せず；

２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはOCH_3であり；R_1はCH_3であり；Ｘは対イオンであり；

ＮＳＢ－２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはOCH_3であり；R_1は$(CH_2)_4-SO_3^-$であり；Ｘは存在せず；そして

ＮＳＰ－２－ヒドロキシ－７－メトキシ－ＤＭＡＥにおいて、ＤはOCH_3であり；R_1は$(CH_2)_3-SO_3^-$であり；Ｘは存在しない、

請求項２に記載の化合物。

【請求項５】

前記光が、過酸化水素、過酸化ナトリウム、または２価の過酸化物塩との反応で発光する、請求項１または３に記載の化合物。

【請求項６】

前記光が、過酸化水素、過酸化ナトリウム、または２価の過酸化物塩との反応で発光する、請求項２または４に記載の化合物。

【請求項７】

小有機生体分子、巨大分子、ウイルス粒子、細胞下成分、または全細胞に結合した、請求項１または３に記載のアクリジニウム化合物であって、該結合が、該アクリジニウム化合物と該小有機生体分子、巨大分子、ウイルス粒子、全細胞、または細胞下成分との間の直接的共有結合によるもの、あるいはスペーサーを通じての間接的共有結合によるもののいずれかであり、

該巨大分子がタンパク質、ペプチド、不活性化タンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、多糖、オリゴ糖、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、レクチン、リポタンパク質、リポ多糖、ホルモン、トキシン、およびサイトカインからなる群から選択され；

該細胞下成分がリボソームであり、該全細胞が、細菌および真核生物の細胞からなる群から選択され；そして

該小有機生体分子が、ハプテン、リガンド、または生物学的活性分子である、化合物。

【請求項８】

小有機生体分子、巨大分子、ウイルス粒子、細胞下成分、または全細胞に結合した、請

求項２または４に記載のアクリジニウム化合物であって、該結合が、該アクリジニウム化合物と該小有機生体分子、巨大分子、ウイルス粒子、全細胞、または細胞下成分との間の直接的共有結合によるもの、あるいはスペーサーを通じての間接的共有結合によるもののいずれかであり、

該巨大分子がタンパク質、ペプチド、不活性化タンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、多糖、オリゴ糖、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、レクチン、リポタンパク質、リポ多糖、ホルモン、トキシン、およびサイトカインからなる群から選択され；

該細胞下成分がリボソームであり、該全細胞が、細菌および真核生物の細胞からなる群から選択され；そして

該小有機生体分子が、ハプテン、リガンド、または生物学的活性分子である、化合物。

【請求項９】

前記結合がスペーサを通じ、そして該スペーサーが二官能性架橋剤により提供される、請求項７に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１０】

前記結合がスペーサを通じ、そして該スペーサーが二官能性架橋剤により提供される、請求項８に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１１】

前記タンパク質が、抗体、抗体フラグメント、アビジン、ストレプトアビジン、アレルゲン、レセプタータンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質、ウイルス抗原、細菌抗原、真核生物抗原、免疫グロブリン結合タンパク質、および酵素からなる群から選択される、請求項７に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１２】

前記タンパク質が、抗体、抗体フラグメント、アビジン、ストレプトアビジン、アレルゲン、レセプタータンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質、ウイルス抗原、細菌抗原、真核生物抗原、免疫グロブリン結合タンパク質、および酵素からなる群から選択される、請求項８に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１３】

前記ハプテンが、甲状腺ホルモン、ステロイド、ビタミン、抗生物質、酵素補因子、治療薬、代謝産物、脂質、神経伝達物質、または制御された化学物質である、請求項７に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１４】

前記ハプテンが、甲状腺ホルモン、ステロイド、ビタミン、抗生物質、酵素補因子、治療薬、代謝産物、脂質、神経伝達物質、または制御された化学物質である、請求項８に記載のアクリジニウム化合物。

【請求項１５】

分析物の検出または定量化のためのアッセイにおける、請求項１から６に記載の化合物および請求項７から１４に記載の結合生物学的分子からなる群から選択される化合物の使用であって、該アッセイが、該分析物を該化合物で標識する工程を包含する、使用。

【請求項１６】

複数の分析物の同時検出のためのアッセイにおける、請求項１から６に記載のアクリジニウム化合物および請求項７から１４に記載の結合生物学的分子からなる群から選択される化合物の使用であって、該アッセイが、該複数の分析物のうちの少なくとも１つを該化合物で標識する工程を包含する、使用。

【請求項１７】

２つ以上の前記化合物が用いられ、そしてここで該化合物がそれらの波長または大きさ（ｍａｇｎｉｔｕｄｅ）の識別を可能とし、そしてここで該大きさの違いが存在する種々の該分析物の量に相関し得る、請求項１６に記載の使用。

【請求項１８】

２つの分析物を測定するための、請求項１６に記載の使用であって、ここで、２つ以上

の前記化合物が用いられ、そしてここで該化合物が２つの異なる波長極大で発光し、これがそれらのシグナルおよび大きさの識別を可能とし、これが存在する該２つの分析物の量に相関し得る、使用。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本出願は米国特許法第１１９条（ｅ）の下、仮特許出願番号０６／０９６，０７３（１９９８年８月１１日出願）に基づく優先権を主張する。この開示は本明細書中に参考として援用される。

【０００２】

（発明の分野）

本発明は新規な化学発光アクリジニウム化合物に関し、これは近赤外（ＮＩＲ）領域（＞５９０ｎｍ）の近く、あるいはその領域内に発光極大を有する。このような長波長発光のアクリジニウム化合物についての構造の必要条件が本明細書に開示される。これらの新規アクリジニウム化合物は短波長発光アクリジニウムエステル（発光極大が４５０ｎｍより下）と組み合わせて用いた場合、異なる標識間でのスペクトルの重なりが非常に小さいか、あるいは無視できるため、イムノアッセイまたは核酸アッセイにおいて、複数の標的分析物の同時検出のための非常に有用な標識であるはずである。異なる分析物に関連する２つ以上の特定のシグナルの正しくかつ有効な光学的分離は、光学フィルタを、任意の低レベルのクロストークの些細な補正のための単純なアルゴリズム操作と組み合わせて使用することによって容易に達成され得る。実際的な見地からは、スペクトルの重なりが最小限であることは、このように、異なる分析物の同時かつ正確な測定のために必要な鍵となる因子である。本明細書に記載に化合物のさらなる適用は、短波長（５００ｎｍ未満）において生物学的試料からの光学干渉がある状況においてである。これらの条件下では、これらの新規アクリジニウム化合物は有用な代替の標識であるはずであり、非標識関連発光を結合複合体から生じる特定の化学発光シグナルから光学的に分離することを可能とする。最後に、ＣＣＤカメラのような検出器と組み合わせて用いられる長波長アクリジニウム化合物は改良されたアッセイ感度の可能性を提供する。なぜなら、これらの検出器は長波長シグナルの読みとりにおいて顕著に有効だからである。

【０００３】

（発明の背景）

アクリジニウムエステル（ＡＥ）は非常に感度の高い検出方法を提供し、そして有用な化学発光シグナル分子であり、これは、標識として広くイムノアッセイおよび核酸アッセイに用いられている。米国特許第４，７４５，１８１号；４，９１８，１９２号；５，１１０，９３２号は最初に、加水分解に対して安定な多置換アリールアクリジニウムエステル（ＰＡＡＥ）を記載しており、これらは分析的測定に有用であり、そしてその顕著な安定性ゆえ、リガンド結合アッセイを商業化に要求される厳密な条件に適合させることを可能とする最初の化学発光アクリジニウム化合物となった。次に、米国特許第５，２４１，０７０号；５，５３８，９０１号：および５，６６３，０７４号は求核官能基を欠く多様な有機分子の直接標識化のために有用な求核ＰＡＡＥを記載した。ＰＡＡＥの有用性は官能化親水性ＰＡＡＥの出現（米国特許第５，６５６，４２６号）によりさらに高められた。これはＰＡＡＥの量子収率を高め、そしてＰＡＡＥ標識された結合パートナーの性能を、観察されるシグナル対ノイズ比および種々の結合アッセイの感度に関して向上させた。これは第一にアクリジニウム核における親水性基の導入に起因する。これは化合物の水溶性を高め、そしてまた予期し得ぬことに光の生成の量子収率を高めた。さらに、イオン化可能基をフェノキシ部分に導入することで親水性ＰＡＡＥの他のサブクラスが生成され（米国特許第５，２２７，４８９号；５，４４９，５５６号；および５，５９５，８７５号）、これは生体分子で官能化されたリポソーム内に多数被包され得、長期の貯蔵にわたって漏れが非常に少なかった。最後の適用はさらにＰＡＡＥの有用性を高めた。

【０００４】

Ｍ．Ｋａｗａｇｕｉｃｈｉら（Ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ａｎｄ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ、第９回国際シンポジウム１９９６の会報、Ｈａｓｔｉｎｇｓ，Ｋｒｉｃｋａおよび Ｓｔａｎｌｅｙ編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９７、４８０－４８４頁）は化学発光イムノアッセイのための安定化されたフェニルアクリジニウムエステルを記載している。さらなるメチル置換基をＣ－１に有する（これはアクリジニウム核のＣ－３で任意であり、フェノキシ部分のオルト位での一つまたは二つのメチル置換に適合する）ＡＥ誘導体は水溶液中で優れた安定性を有することを示した。

【０００５】

ＥＰ ０３２４，２０２ Ａ１およびそれに続くＥＰ ０６０９，８８５ Ａ１は両方とも、アクリジニウム核の窒素原子を置換する官能基を有するアクリジニウムエステルを記載する。後者の出願はさらに、フェニル基に対する可能な代替として、ビフェニルまたはナフチル部分のような別の置換基を記載する。これらのタイプのアクリジニウム化合物は４２０ｎｍに発光極大を有することが報告されている。

【０００６】

Ｍａｔｔｉｎｇｌｙら（米国特許第５，４６８，６４６号および５，５４３，５２４号）は化学発光性アクリジニウム塩、その調製方法、その抗体結合体、およびイムノアッセイにおけるその応用を記載する。これらのアクリジニウム塩はアクリジニウムスルホニルアミド（あるいはＮ－スルホニルアクリジニウムカルボキサミド）と称される別のクラスの化合物に属する。アクリジニウムスルホニルアミド（ＡＳ）は、ＰＡＡＥと適合可能な水性安定性を有する。ここで記載されるＡＳに関して発光極大が報告されていない。しかし、これらの両クラスの化合物からはその過酸化アルカリとの反応の間に同じアクリドン種が発生するため、アクリジニウムスルホニルアミドの発光極大は青色領域にあると予想される。

【０００７】

Ｍａｔｔｉｎｇｌｙらはさらに、同様の化学発光性フェナントリジニウム塩、その調製方法、その抗体結合体、およびイムノアッセイにおけるその応用を、米国特許第５，５４５，７３９号；５，５６５，５７０号；および５，６６９，８１９号に記載する。さらに、これらの特許において、アクリジニウムスルホニルアミドの一般構造が記載され、これはアクリジニウム核における可能な置換基のマーカッシュ群を示している。置換基に関する特定の利点は言及されていなかった。一般構造で示されるＡＳ誘導体はいずれも、本発明で記載される教示に適合しない。最後に、上記特許はアクリジニウムスルホニルアミドの発光の波長を延ばすための試みを記載せず、またこれがどのように達成され得るのかに関する構造活性原理を概論もしていない。

【０００８】

上記特許および文献に記載されているような従来のアクリジニウム化合物は、強アルカリ溶液中で過酸化水素と反応すると約４２８ｎｍに極大を有する光を発する。発光極大波長が５００ｎｍを越えるアクリジニウム化合物もまた、先行技術に記載されている。Ｌａｗらによる米国特許第５，３９５，７５２号；５，７０２，８８７号および５，８７９，８９４号は新規な長発光（ｌｏｎｇ－ｅｍｉｓｓｉｏｎ）アクリジニウムエステル（ＬＥＡＥ）を記載し、ここでは縮合したベンズアクリジニウム系を使用してアクリジニウムエステルの発光波長を延ばしている。Ｊｉａｎｇらの同時係属中のＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＩＢ９８／００８３１では、エネルギー移動の原理を用いることによりＰＡＡＥ発光極大をうまく６００～７００ｎｍの領域までさらに延ばしている。これは発光体をアクリジニウムエステルに共有結合することを包含する。これらの結合体の化学発光反応が過酸化アルカリによる処理によって開始されると、長波長で発光が観察され、ここで極大波長は発光体の構造に依存する。

【０００９】

ＢａｔｍａｎｇｈｅｌｉｃｈらのＥＰ ０ ４７８ ６２６ Ｂ１および米国特許第５，６５６，２０７号は、長波長発光アクリジニウムエステルと称されるものの構造の概略を示し、ここで置換されたカルボキシブタジエニル基をアクリジニウムエステルに付加する

ことによって拡張された（ｅｘｔｅｎｄｅｄ）共役系が得られる。しかし、米国特許出願番号０８／３０８，７７２号で既に指摘されているように、Ｂａｔｍａｎｇｈｅｌｉｃｈの特許においては、このアクリジニウムエステルの合成もその発光特性も、特許請求された極大発光５００～７００ｎｍを可能とし、かつ具体化できるように記載されていない。

【００１０】

安定な１，２－ジオキセタンに関連する、他の非アクリジニウムエステルベースの長発光化学発光性化合物はＢｒｏｎｓｔｅｉｎらによって米国特許第４，９３１，２２３号に記載されている。この特許は化学発光性１，２－ジオキセタンを開示し、これは酵素で切断可能な官能基と、異なる発光波長を有する発光性発蛍光団とから構成される。特に好適な実施態様は、アセトキシベンゾピラン置換された安定なジオキセタン（Ａ）、ホスホリルオキシ－ベンゾピラン置換された安定なジオキセタン（Ｂ）、およびβ－ガラクトシルオキシ－ベンゾチアゾリル－ベンゾピラン置換された安定なジオキセタン（Ｃ）を包含する。ジオキセタンＡのアセトキシ基がエステラーゼで切断される場合、ジオキセタンＡは極大波長４５０ｎｍの光を発光する。ジオキセタンＢのホスホリルオキシ基がホスファターゼで切断される場合、ジオキセタンＢは極大波長４８０ｎｍの光を発光し、他方ジオキセタンＣは酵素β－ガラクトシダーゼで処理すると極大波長５１５ｎｍの光を発光する。この特許は核酸プローブ同時アッセイにおけるＨＳＶ、ＣＭＶ、およびＨＰＶの同時検出のための３チャンネル分析の例を提供し、これは３つの狭帯域の光学フィルタを用いて上記ジオキセタンからの異なる色の発光を区別する。試料中に存在するＨＳＶ、ＣＭＶ、およびＨＰＶのレベルは対応の画像輝度に相関する。３つの発光極大が互いに非常に近いので、各発光スペクトルからの広がりのほとんどは狭帯域フィルタでカットオフされなければならず、重複する領域からのシグナルは除去される。この結果、各アッセイ成分についてのシグナルのうち使用できるのは非常に少量であり、アッセイの感度、そしておそらくは精度は大幅に制限される。

【００１１】

Ｅｄｗａｒｄｓら［Ｊ．Ｂｉｏｌｕｍｉｎ．＆Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎ．，５，１（１９９０）］は別の化学発光ジオキセタン、３－（２’－スピロアダマンタン）－４－メトキシ－４－（７’’－アセトキシ）ナフト－２’－イル－１，２－ジオキセタンを報告している。これは緑色光（極大５５０ｎｍ）を発光し、その６’’－アセトキシ置換異性体と比べて９０ｎｍの深色シフトである。これは、ジオキセタンの分解の引き金となる原因であるオキシドアニオン置換基を生じる酵素で切断可能なアセトキシ置換基の位置が異なることに帰せられる。いくつかの分析物の同時検出のための２つの異性体ジオキセタン化合物の同様の適用がこの論文において示唆された。

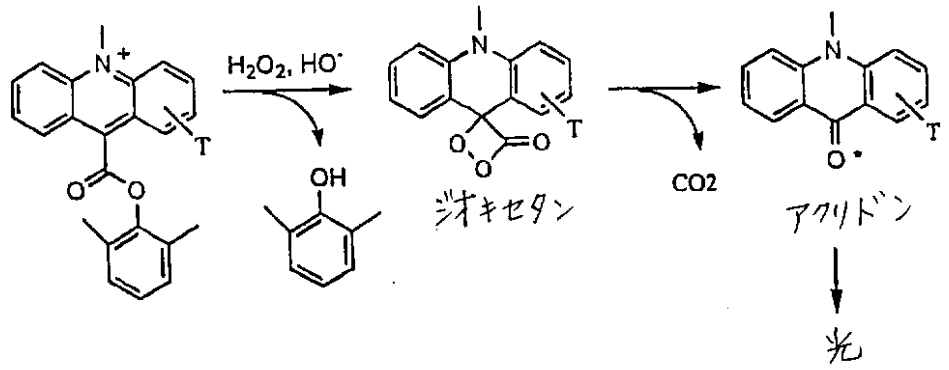
【００１２】

本発明において、本発明者らは新規アクリジニウム化合物の設計および合成を記載し、これは過酸化水素と反応すると極大波長＞５９０ｎｍで発光する。これらのアクリジニウム化合物は、長波長発光の観察にたいして不可欠な、いくつかの鍵となる構造の特徴を含む。これらの結果は、米国特許第５，３９５，７５２号に記載の本発明者らの初期の観察と共に、長波長発光アクリジニウム化合物の設計および合成についての堅固かつ実験的に証明されたルールを提供する。

【００１３】

ＮＩＲ化学発光シグナルの改良された測定のために、本発明者らはまた本発明において改変された半自動化ルミネセンス分析器を開示し、ここで赤色非感受性光電子増倍管が、光子計数モードで用いられる最新式の低ノイズ冷却ＣＣＤ検出器で置き換えられる。オリジナルの分析器および改変された分析器で得られる定量シグナルを比較することによって、本発明者らは、ＮＩＲアクリジニウム化合物の特異的活性が約４０倍向上することを証明した。冷却ＣＣＤカメラシステムを、１，２－ジオキセタン化合物から生じる短波長領域における化学発光シグナルのイメージングに用いることは、Ｍａｒｔｉｎらが Ｊ．Ｂｉｏｌｕｍｉｎ．Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎ．９（３），１４５，１９９４に記載された。このイメージング法に適合されるといわれる応用は、種々の核酸および免疫ブロッティング、Ｅ

ＬＩＳＡ法およびＤＮＡ配列決定システムを包含した。
【００１４】
（発明の要旨）
本発明は、アクリジニウム化合物からの長波長発光を観察するために必要かつ十分な２つのセットの基準を同定する：
セットＡ：
（ａ）適切な官能基をアクリジニウム核上に付加することによる拡張共役系の創製（電子的要件）。
（ｂ）付加した官能基とアクリドン部分とが、発光の間、同一平面上にあること（幾何学的要件）。
（ｃ）上記官能基は、少なくとも１つの芳香環と、ヘテロ原子が直接付加されるか、あるいは組み入れられる拡張されたπ系中に容易に非局在化し得る余分の電子対を有する１つの電子供与性原子または基とから構成されなければならず、そして発光性アクリドンの電子吸引性カルボニル部分との安定な拡張された共鳴を樹立しなければならない。アニオンの形態で存在するこのような電子供与性原子または基は、発光波長の深色シフトを促進する特に強力な効果を有する。
セットＢ：
（ａ）アクリジニウム核のＣ－２、Ｃ－４、Ｃ－５、またはＣ－７の１つ以上の位置への余分な電子対（単数または複数）を有する電子供与性原子または基の直接的付加。電子供与体は１つより多くの電子供与体が使用される場合には、同じであってもよく、異なっていてもよい。アニオンの形態で存在するこのような電子供与性原子または基は、発光波長の深色シフトを促進する特に強力な効果を有する。
【００１５】
上記の基準に適合する分子、例えばＬＥＡＥ、３－ＨＳ－ＤＭＡＥ、および２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥについて、５００ｎｍを越えてＮＩＲ領域に達する長波長発光が期待され、観察される。
【００１６】
好ましくは、従来のアクリジニウム化合物と匹敵するＮＩＲ－ＡＣの量子収率の有用性は、良好～優秀な検出効率のルミネセンス検出器の使用と相並ぶものである。効率的なＮＩＲシグナル検出を達成し、そして診断的アッセイの実行を促進するために、本発明のさらなる目的は、最新式の電荷結合素子（ＣＣＤ）検出器を従来の全自動または半自動化分析器（例えば、Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｔｉｃｓ、Ｗａｌｐｏｌｅ、ＭＡのＭＬＡ－ＩＩ）における赤色非感受性の光電子増倍管（ＰＭＴ）の代わりに用いる概念および具現化を進めることである。
【００１７】
（発明の詳細な説明）
ＰＡＡＥの化学発光反応は強アルカリ溶液中の過酸化水素が引き金となる（以下の図を参照のこと）。発光種はアクリドンであり、これはアクリジニウムエステルが、推定される高度に変形した不安定なジオキセタノン中間体を介して化学的に（ペルオキシド媒介で）分解する間に、電子的励起状態で形成される。（二価のペルオキシドを放出する任意の化学物質が用いられ得ることに留意のこと。例えば、過酸化ナトリウムまたは任意の二価過酸化物塩）。
【００１８】
発光は励起したアクリドンがその基底状態に復帰するときに生じる。発生する光のエネルギー（波長）は第一励起状態と基底状態との間のエネルギーの差に依存し、このエネルギー差は順に種々の官能基Ｔを有するアクリドンの特定の構造によって決定される。
【００１９】
【化７】



アクリジニウムエステルおよび誘導体（例えばアクリジニウムスルホニルアミド）からの長波長発光を観察するためには、対応のアクリドンの励起状態と基底状態との間のエネルギーギャップを小さくしなければならないのは明らかである。通常、拡張共役系は問題の分子のエネルギーギャップを減少させる。従って、アクリジニウム化合物の場合、これは適切な官能基をアクリジニウム核の重要な環位置に付加して、拡張共役系を創製することを必要とする。これは対応するアクリドンの発光特性を長波長側にシフトさせる結果となると予想される。

【００２０】

第２に、等しく重要な要件は、コンホメーション（ジオメトリ）に関連し、これは拡張共役系が常にアクリドンπ系と同一平面上になければならないということであり、その結果、発光種の全体としての平面構造が実際にこの分子の唯一の最もエネルギー的に有利なコンホメーションであるようにする。もしこのようなジオメトリがエネルギー的に不利であるか、あるいは分子が他の非平面のコンホメーションをも同様にとると仮定し得るならば、長波長発光は不可能であるか、あるいは得られる発光スペクトルは非常に広い範囲をカバーするので、この化合物の同時複数分析物アッセイにおける標識としての有用性は疑わしい。

【００２１】

アクリジニウム化合物の修飾のための最も便利であり、かつ重要な位置は、Ｃ－２（Ｃ－７）およびＣ－３（Ｃ－６）である。ＬＥＡＥにおいて、長波長発光の原因となる付加官能基は線状にＣ－２およびＣ－３の両方に縮合する芳香環である。そうすることによって、拡張π系の完全な平面性が保証され、そして分子は永続的に最低のエネルギーの平面コンホメーションに固定される。結果として、ＬＥＡＥは過酸化水素との化学発光反応において５２０ｎｍで発光し、これは従来のアクリジニウム化合物の発光極大から９２ｎｍ延長している。対照的に、カルボキシブタジエニル置換ＡＥはＢａｔｍａｎｇｈｅｌｉｃｈらが特許請求するように５１０ｎｍの発光極大を達成しない。これは明らかにこの分子がπ系全体にわたる有効な電子非局在化のための同一平面ルールを満たさないからである。その結果、３－カルボキシブタジエニルＡＥは４６４ｎｍに発光極大を示すのみであり、米国特許５，８７９，８９４号で示されるように、元のアクリジニウムエステルの発光極大からわずかに３６ｎｍ延長しただけである。延長した発光スペクトルの重なりは３－カルボキシブタジエニルＡＥと元のＡＥと間にあるままである。

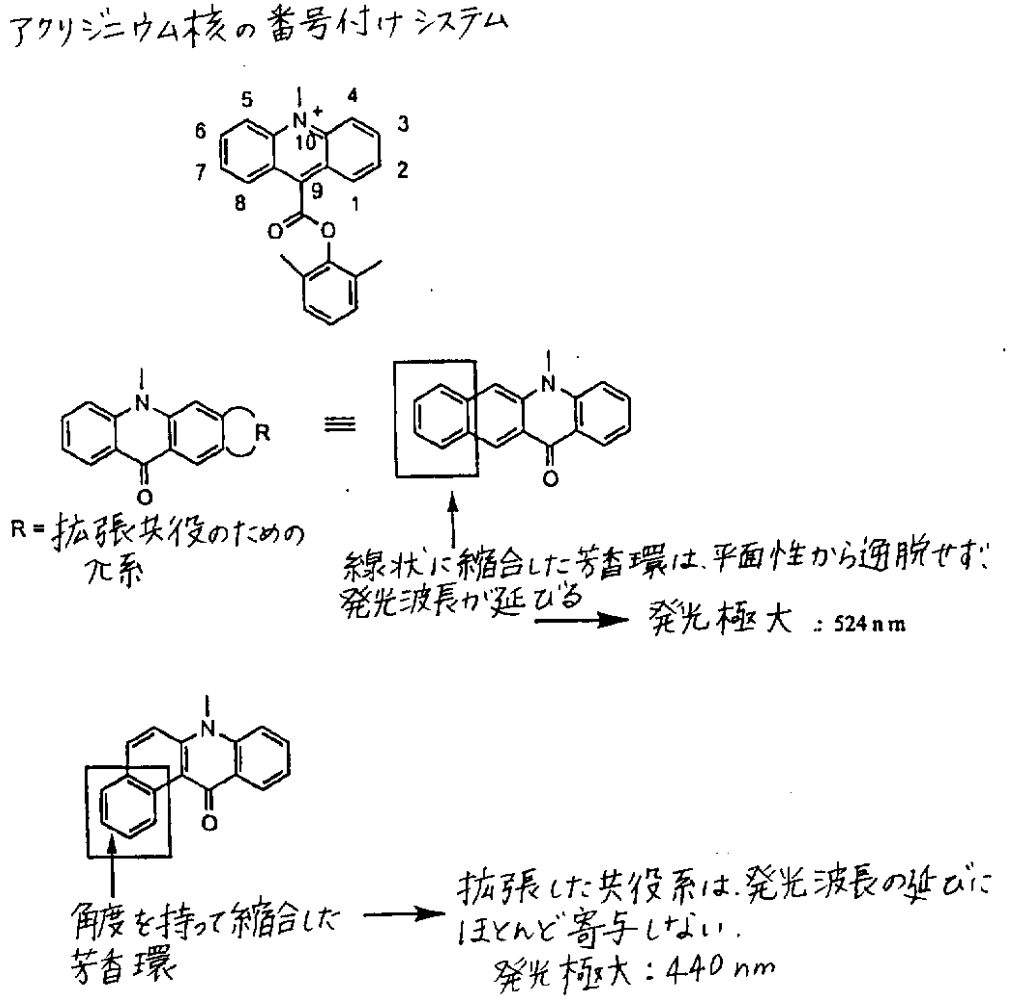
【００２２】

芳香族の環縮合アクリジニウムエステル系の場合、本発明者らはまた、発光極大の効果的な拡張のためにπ系全体の水平軸に沿う直線性の重要性を強調したい。ある角度をもってアクリジニウム核のＣ－１（Ｃ－８）およびＣ－２（Ｃ－７）位に縮合した芳香環は、例えば、発光極大を最小限、４２８ｎｍから４４０ｎｍまで延長するに過ぎず（米国特許第５，３９５，７５２号参照）、そのため角度をもつ芳香族環縮合ＰＡＡＥと親ＰＡＡＥとの間の発光スペクトルの差を認識することは、これらの化学発光が同じ管中で起こる場合

、非常に困難である。

【００２３】

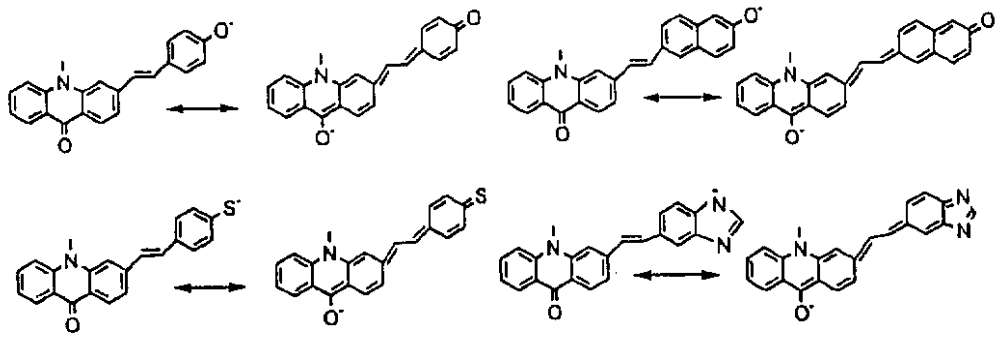
【化８】



本発明の拡張共役系を創製する代替の様式は、必須の官能基（Ｔ）がアクリジニウム核のペリ位（ｐｅｒｉ－ｐｏｓｉｔｉｏｎｓ）（Ｃ１－Ｃ４）のうちの１つに単一点で付加することを伴う。この官能基は、余分な電子対を有する少なくとも１つの電子供与性原子または基を有さなければならず、この電子対は電子供与性原子または基が直接付加する、または組み入れられるＡＥ核の拡張共役系に容易に非局在化し得る。電子供与性原子は、通常、遭遇する（ｅｎｃｏｕｎｔｅｒｅｄ）酸素、硫黄、および窒素を含むような構造配置を伴い、これは例えば、スチレニルオキシド、チオフェノキシド、ナフトキシド、インドール、ベンズイミダゾール、ベンゾトリアゾール、ベンゾチアゾール、および多数の、他の芳香族、複素環式系中に見いだされる。拡張された共役系における電子対の関与を示すためにいくつかの共鳴構造を以下に示す。

【００２４】

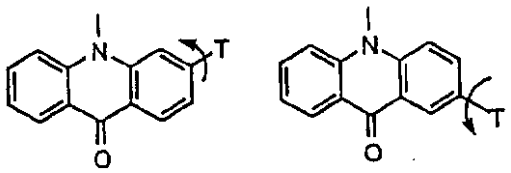
【化９】



Ｃ－２またはＣ－３のいずれかへのＴの単一点での付加が用いられる態様の場合、ＬＥＡＥの場合とは異なり、ここで、アクリドンに結合する結合の周囲での分子の回転が起こり得る。その結果、対応のアクリドンからの発光の波長は、アクリドンとＲとが同一平面上にあるか否かに依存する。

【００２５】

【化１０】

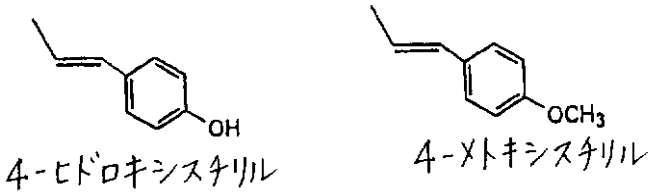


示した結合の周りの回転は、2つのπ系の平面性を破壊する

このような官能基をアクリジニウム核のペリ位（Ｃ１－Ｃ４）に付加することが長波長発光アクリジニウムエステルの創製のための現実性のあるアプローチであるかどうか決定するために、本発明らはＣ－２およびＣ－３の両方に４－ヒドロキシスチレニル（４－ＨＳ－）および４－メトキシスチレニル（４－ＭＳ－）基を含むアクリジニウムエステルを合成し、その発光特性を評価した（スキーム１および２）。Ｃ－３位はＣ－１およびＣ－３位の代表として選択した。これらの位置は両方ともＴの電子供与性原子または基がアクリドンのカルボニル部分との長距離共鳴に関与することを可能とする。同様に、Ｃ－２位はＣ－２およびＣ－４位の代表であり、これらの位置は両方ともこのことを可能としない。

【００２６】

【化１１】



4-ヒドロキシスチリル　　4-メトキシスチリル

これらの官能基は両方ともスチレニル部分の拡張共役系を含み、酸素原子が芳香環のパラ位に結合している。しかし、これらの２つの官能基は、酸素からスチレニルπ系に電子対が非局在化することを可能とする容易さが異なる。アルカリ性媒体中で、４－ＨＳ－基は、脱プロトン化の後、フェノキシドアニオンを形成し、これは強力に電子供与性であり、そしてその余分な電子対を、それに付加しているπ系中に容易に非局在化させ得る。４－ＭＳ－基の場合、エーテル酸素は脱プロトン化され得ないので、このような電子供与の機構は可能ではない。４－ＭＳ－基中のエーテル酸素でさえ、付加したπ系にｎ－電子対を供与する共鳴構造を描くことは可能であるが、これはエーテル酸素上に正の電荷を創出することを必然的に伴う。それゆえ、この共鳴の寄与は高エネルギーのものであることが予期され、従って、π系全体の電子的特性に対してはおそらく最小の寄与しか成さない。続いての研究の結果が、報告された３－カルボキシブタジエニルアクリジニウムエステルの発光特性に対して直接の関連をもつように、ならびにどんな必須の構造特徴が実際に５００～７００ｎｍ領域中にアクリジニウムエステルの発光極大を延長する原因となるのかに関する明白なプロトコルを提供するように、予想される。

【００２７】

Ｃ－２置換アナログの合成をスキーム２に示す。イサチンを２－（４－ブロモフェニル）－１，３－ジオキサランで米国特許出願第０８／３０８，７７２号に開示されるようにＮ－アルキル化した。Ｎ－アルキル化イサチンを、１０％ＫＯＨ中で還流することによって対応のアクリジン誘導体に転位させた［Ｚｏｍｅｒら、「アクリジニウムエステル標識化合物の合成、化学発光、および安定性」、Ｐｒａｃｔ．Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃ．１９９１，１２（Ｌｕｍｉｎ．Ｔｅｃｈ．Ｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ａｎａｌ．），５０５－２１］。ジオキサランの加水分解によって２－カルボキシアルデヒドが与えられ、これが４－ベンジルオキシベンジルホスホニウムクロリドまたは４－メトキシベンジルトリフェニルホスホニウムクロリドのいずれか由来のイリドと縮合した。どちらの場合でも、ウィッティッヒ（Ｗｉｔｔｉｇ）反応がＥおよびＺオレフィンの混合物を与える。Ｅオレフィンは各場合においてより安定であることが観察され、クロマトグラフィーの後、純粋なものとして単離され得た。しかし、純粋なＺ異性体は単離され得なかった。なぜなら、各場合において、化合物は精製の間に一部から全部が異性体化されたからである。その結果、各場合においてＥ異性体のみがさらに合成された。アクリジン窒素はメチルトリフルオロメタンスルホネート（４－ヒドロキシフェニルアナログ）または１，４－ブタンスルトン（４－メトキシフェニルアナログ）のいずれかによってアルキル化された。ベンジルエステルを除去して遊離酸を放出し、これを次にジシクロヘキシルカルボジイミドおよびＮ－ヒドロキシスクシンイミドを用いてＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルに転換した。

【００２８】

２－（３－ブロモフェニル）－１，３－ジオキサランをイサチンのアルキル化に用いたことを除いては、３－置換アナログの合成は同様のやり方（スキーム１）で達成された。これにより、カルボキシアルデヒドがアクリジン核のＣ－３に導入されることを確実にした。

【００２９】

アクリジニウムエステルのタンパク質結合体もまた実施例８～１３に記載のようにして調製した。

【００３０】

合成したアクリジニウムエステルおよびタンパク質結合体の化学発光スペクトルをスペクトラスキャン（Ｓｐｅｃｔｒａｓｃａｎ）カメラを用いて記録した。結果を図１に示す。これは規格化された発光強度を、評価した種々の化合物について、波長の関数で示す。

【００３１】

図１の結果は、種々の化合物について発光波長の劇的な差異を示す。３－ＨＳ－ＤＭＡＥは３－（４－ヒドロキシスチレニル）部分を含み、これは約６９０ｎｍに極大中心を有する長波長発光を示す。この分子がＢＳＡと結合すると、その発光極大は約６１０ｎｍまでシフトする。この発光極大の浅色シフトは溶媒効果に起因され得る。なぜなら遊離化合物

の発光スペクトルは完全な溶解度を確保するため約４２％の有機溶媒を含む媒体中で測定されたが、タンパク質結合体はタンパク質と有機溶媒が相溶性ではないので完全に水性の媒体中で測定された。同様に、ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥは、そのスペクトルを水中で記録した場合、ＤＭＦまたはアセトニトリルのいずれかとは反対に約６６ｎｍの浅色シフトを示した。同じ青色に発光するＮ－メチルアクリドンを生じるアクリジニウム化合物の発光極大の、用いた溶媒混合物の関数としての変化もまた記録された。ＭｃＣａｐｒａら［Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ Ｎｏ．４３，３１６７，（１９６４）およびＰｈｔｏｃｈｅｍ．＆Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌｏｇｙ，４，１１１１，（１９６５）］は、８０％水性アルコール中で多数のアクリジニウム塩について発光極大４４２ｎｍを報告し、他方、本発明者らは依然、ＤＭＡＥについて４２％ＤＭＦ中で４２６～４３０ｎｍの発光極大を観察した。溶媒によって影響される浅色シフトの他の例は、遊離Ｎ－スルホプロピル－ＤＭＡＥ（これは４２％ＤＭＦ中４２４ｎｍで発光する）対Ｎ－スルホプロピル－ＤＭＡＥ－ＢＳＡ結合体（これは完全水性媒体中で４２０ｎｍに極大発光を示す）の間で観察された。一般に、アクリジニウムエステル標識は、有機溶媒リッチな媒体を除去すると、水リッチ媒体または完全水性環境中よりもより長波長の発光極大を与える。観察される極大の差は短波長発光ＡＥの場合の約４～１２ｎｍから、提示したＮＩＲ－ＡＥの場合で示されるように約８０ｎｍまで変化し、これは溶媒効果に対してより鋭敏であると思われる。ＢＳＡとＮＩＲ－ＡＥの親水性バージョン（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥと名付ける）との同様の結合体はメチル基の代わりにＮ－スルホブチル置換基をアクリジニウム核の環窒素に有する。この結合体もまた６２０ｎｍで長波長発光を示す。結合アッセイにおける実際的な（ｐｒａｔｉｃａｌ）有用性のためには、唯一関連の発光極大は完全水性環境中で得られるものであることに留意のこと。

【００３２】

上記化合物および結合体とは明確に対照的に、ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥと名付けられたアクリジニウムエステル（これは３－（４－メトキシスチレニル）部分を含む）は、遊離標識またはタンパク質と結合した場合のいずれでも、より短波長（４５５～４６０ｎｍ）の発光を示す。

【００３３】

アクリジニウムエステルＮＳＢ－２－ＭＳ－ＤＭＡＥもまた３－アナログと同様に比較的短波長の発光を４５４ｎｍに示す。アクリジニウムエステル２－ＨＳ－ＤＭＡＥは３－異性体とは異なり、４５０～７００ｎｍの広範囲にわたる光を発することが見いだされた。この化合物をＢＳＡと結合した場合、その発光は比較的短波長（４８２ｎｍ）であった。

【００３４】

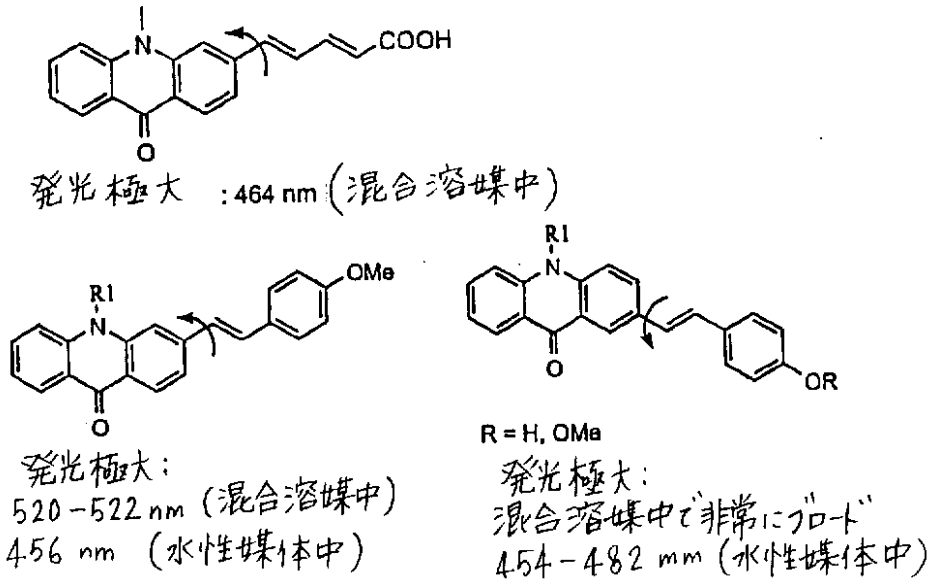
スチレニル置換アクリジニウム化合物に加えて、本発明者らは４－ヒドロキシフェニル部分がアクリジニウム核のＣ－３に直接付加したアクリジニウムエステルを調製した（スキーム３）。この化合物は３－ヒドロキシフェニル－ＤＭＡＥ（３－ＨＰ－ＤＭＡＥ）と名付けられ、これは５９４ｎｍに発光極大を有することが見いだされた。しかし、３－ＨＰ－ＤＭＡＥの発光スペクトルは複数の極大を有し、約４２０ｎｍから７８０ｎｍの広範囲をカバーすることが観察された。

【００３５】

図１の発光スペクトルは、アクリジニウムエステルのＣ－２またはＣ－３に適切な官能基を結合させることによって拡張共役系が創製されていることを明らかに示しており、これは、本来、長波長発光を得るために必要ではあるが十分な条件ではない。３－カルボキシブタジエニル－ＡＥ、およびＭＳ－ＤＭＡＥ誘導体の発光スペクトルで観察される比較的短波長は、２つのπ系（アクリドンおよび４－メトキシスチレニル）が同一平面上にないことを強力に示唆する。同様に、２－ＨＳ－ＤＭＡＥは、遊離標識が低エネルギーコンホメーションの範囲からの発光を示すように思われるが、タンパク質に結合したときのその発光スペクトルは２つのπ系が同一平面からかなり逸脱していることを示唆する。

【００３６】

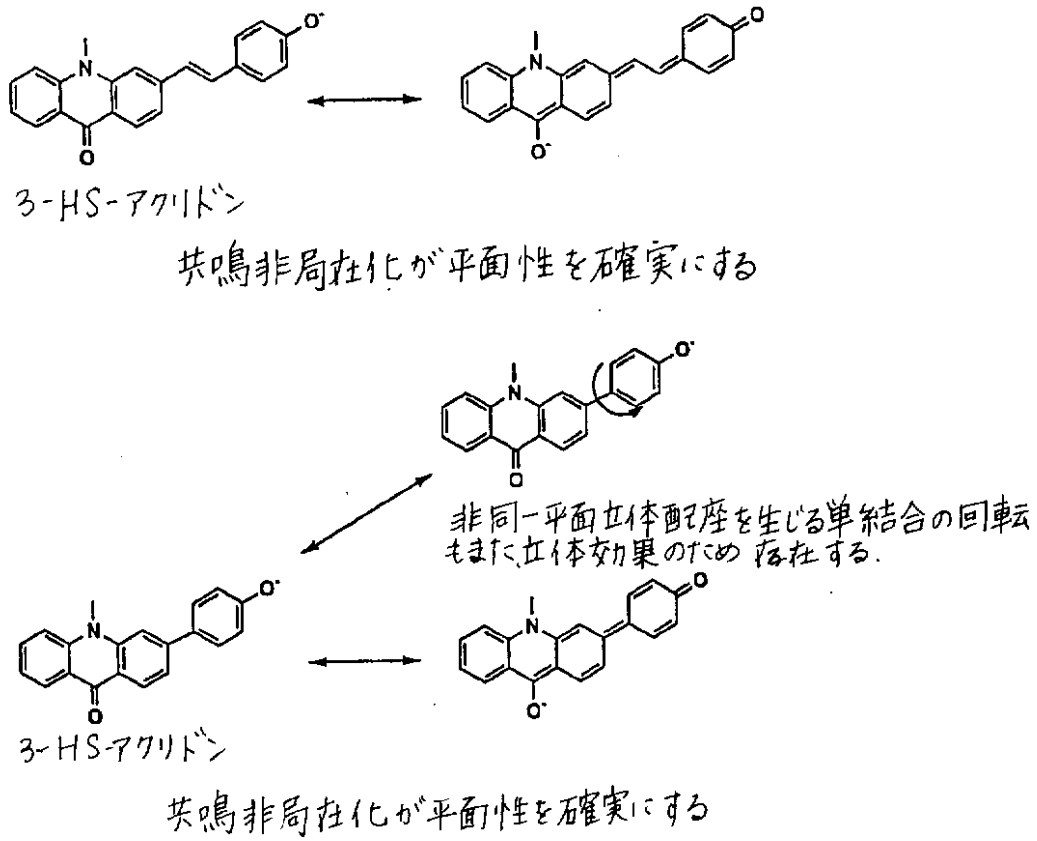
【化１２】



３－ＨＳ－ＤＭＡＥ誘導体のみが長波長での発光を示した。この化合物でも２つのπ系をつなぐ結合の周囲での回転は可能であるが、強アルカリｐＨにおいて、アクリドンの電子吸引性カルボニル部分へのフェノキシド負電荷の共鳴非局在化が、この化合物が発光の間、同一平面のままであることの強力な誘因を与える。結果として、拡張共役系が維持され、そして長波長発光が観察される。同様の機構はまた、３－ＨＰ－ＤＭＡＥについても働くが、ここではヒドロキシフェニル置換基がアクリジニウム核に対して同一平面にあるための立体的な要件は完全には満たされず、そのためこの化合物の発光は広範囲の波長で生じる。

【００３７】

【化１３】



Ｃ－３官能化アクリジニウム化合物について拡張π系のエネルギーの低下における余分の電子対の劇的な効果を観察したので、本発明者らは次に、電子供与性原子または基の代表としてヒドロキシル基のアクリジニウム核に対する直接的付加によるその発光特性に対する効果を試験した。アクリジニウム核のペリ位の２つの代替セットの中から、本発明者らは、再びＣ－２およびＣ－３での付加をグループＡ（Ｃ－２、Ｃ－４、Ｃ－５、およびＣ－７）およびグループＢ（Ｃ－１、Ｃ－３、Ｃ－６、およびＣ－８）の位置の代表として各々、選択した。各グループのメンバーは同様の発光特性を有することが期待される。なぜなら、これらはアクリジニウム核上の代替位置に付加したヒドロキシル基を有する異性体だからである。予期せぬことに、本発明者らは３－ヒドロキシ－ＤＭＡＥではなく２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥがまた、ヒドロキシ置換基とアクリジニウム核との間に拡張共役系が存在しないにもかかわらず、長波長発光（発光極大６０４ｎｍ）が可能であることを見いだした。

【００３８】

強アルカリ溶液中で、このヒドロキシル基は脱プロトン化することが予想される。それゆえ、この酸素に関連する負電荷が対応のアクリドンの基底状態と電子励起状態との間のエネルギーギャップを低減し、そして長波長の発光をもたらす。本発明者らは、それゆえ、ＮＩＲ領域で発光するアクリジニウムエステルの創製のための他の新規方法を開示する。２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥの構造は、加水分解に対して安定な化学発光ＰＡＡＥの１つとして、米国特許第４，９１８，１９２号および５，１１０，９３２号で特許請求される物質に包含される。２－ヒドロキシ－ＤＭＡＥの合成は本出願の実施例の節で示す。

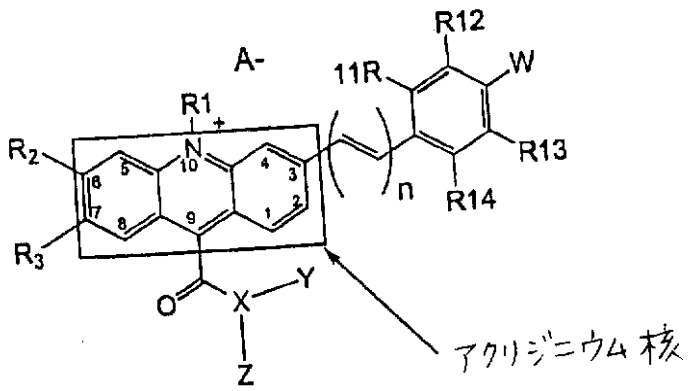
【００３９】

（好適な実施態様）

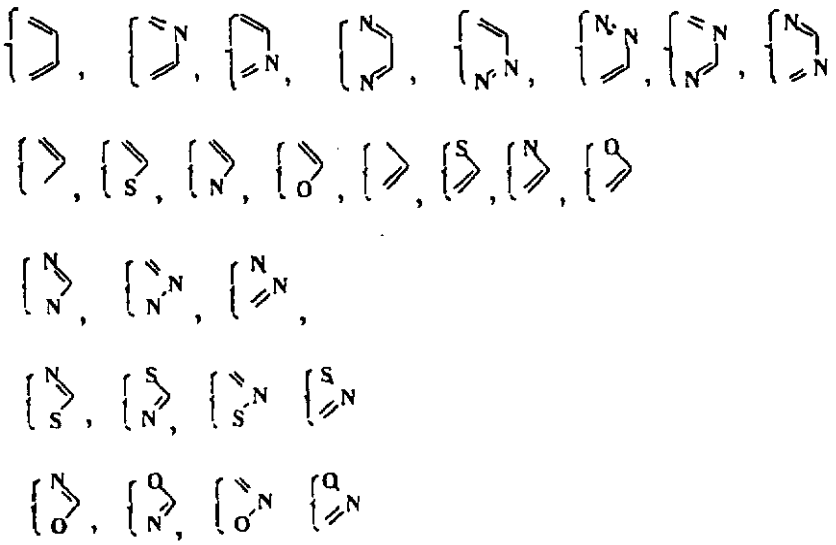
Ａ．化学発光性近赤外アクリジニウム化合物（ＮＩＲ－ＡＣ）の構造

本発明のセットＡの化学発光性ＮＩＲアクリジニウム化合物の一般構造は模式的に以下のように表され得る：

【００４０】
【化１４】



ここで、
R_1はアルキル、アルケニル、アルキニルまたはアラルキルであり、任意に２０個までのヘテロ原子を含む。好ましくはR_1はメチルまたはスルホアルキル基である。
【００４１】
R_2およびR_3は同一または異なり、水素、Ｒ、置換または非置換のアリール（ＡｒＲまたはＡｒ）、ハライド、アミノ、ヒドロキシル、ニトロ、スルホネート、－ＣＮ、－ＣＯＯＨ、－ＳＣＮ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＳＳＲ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ、または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒから選択される；
本出願を通じて、Ｒは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびアラルキルからなる群から選択され、任意に２０個までのヘテロ原子を含む；
あるいは、R_2およびR_3は連結していてもよく、あるいはこれらは以下の構造で例示されるように架橋していてもよく、付加したアクリジニウム核に縮合するさらなる芳香族または非芳香族環を形成する。（例えば、第２列の最初の構造を参照。このsp_2炭素（＝Ｃ－）がR_2およびR_3に結合するならば、５員の非芳香環が得られる。）環は複素環式または非複素環式のいずれであってもよく、従って、これらの得られる構造のうちのいくつかは環内ヘテロ原子（すなわち、環構造自体の一部であるヘテロ原子）を含むことに留意すべきである。
【００４２】
【化１５】



アクリジニウム核のC_2、C_4、C_5ペリ位置は任意に置換される。

【００４３】

ｎ＝１～４であり、好ましくはｎ＝１である；

Ｗは電子供与性基、好ましくは電子対を供与し得るイオン化可能な基、例えば、ＯＨ、ＳＨ、ＮＲ’Ｒ’’、－ＣＨ（ＥＷＧ）$_m$であり、ここでｍ＝１または２であり、そしてＥＷＧは電子吸引性基であり、これは限定されないが－NO_2、－ＮＯ、－ＣＮ、－ＣＨＯ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、$^+$ＮＲ’Ｒ’’Ｒ’’’、－ＣＯＯＲ、－ＣＯＯＨ、－Ｓ（Ｏ）Ｒ、－SO_2Ｒ、－SO_2ＯＲ、－SO_2ＮＨＲ、－SO_2ＮＲＲ’’、－SO_2ＯＨまたはＦを包含する。Ｒ’、Ｒ’’およびＲ’’’は水素または低級アルキルであり、そして全て同一であるか、または異なり得る；

好ましくは、Ｗ＝ＯＨ、ＳＨ、－ＮＲ’Ｒ’’である；

R_{11}、R_{12}、R_{13}およびR_{14}はR_2またはR_3と同一であり得る；あるいは、R_{11}およびR_{12}、またはR_{13}およびR_{14}のいずれかは連結して、先にR_2およびR_3で既に例示したように、付加したフェニル環に縮合したさらなる芳香族および／または複素環式環を形成し得る。

【００４４】

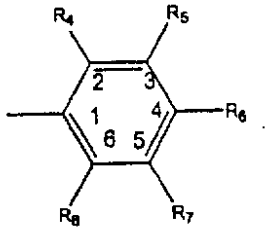
A^-は対イオンであり、これは合成の間のアルキル化剤の使用によるアクリジン環窒素の四級化、R_1の修飾、または反応混合物のワークアップと過剰量の他のアニオンを含む溶液または流体中での所望の化合物の精製との間に起こる交換機構の引き続く結果のいずれかとして導入されて、アクリジニウム核の四級窒素と対形成する。対イオンの例は、$CH_3SO_4^-$、FSO_3^-、$CF_3SO_4^-$、$C_4F_9SO_4^-$、$CH_3C_6H_4SO_3^-$、ハライド、CF_3COO^-、CH_3COO^-、およびNO_3^-を包含する；

Ｘは窒素、酸素または硫黄である；

Ｘが酸素または硫黄である場合、Ｚは省略され、そしてＹは次式の多置換アリール部分：

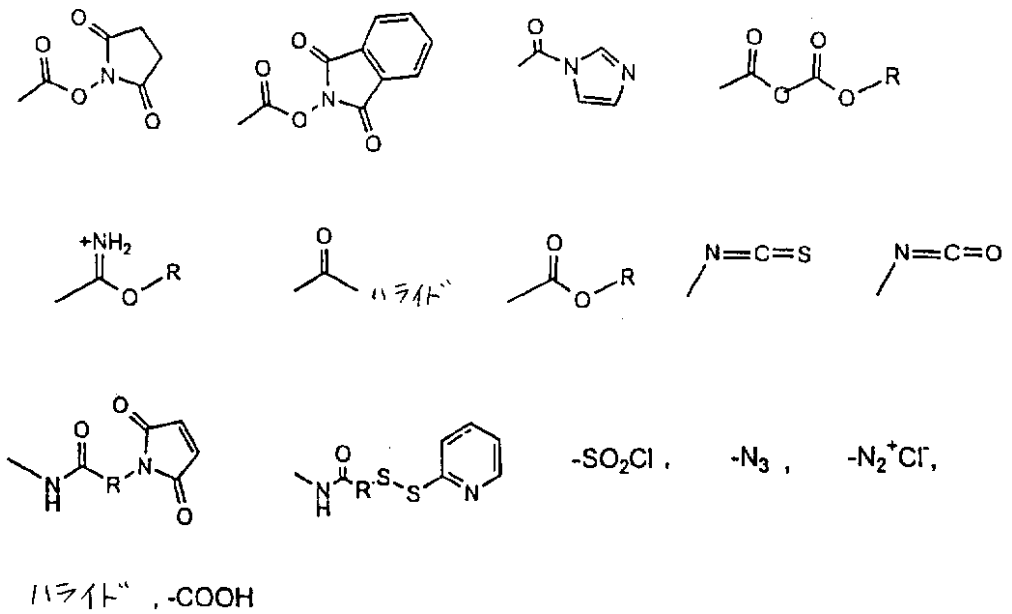
【００４５】

【化１６】

Y = 

であり、
ここでR_4およびR_8はアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ（－ＯＲ）、アルキルチオール（－ＳＲ）、またはアクリジニウム核とＹ部分との間の－ＣＯＸ－結合を立体効果および／または電子的効果を通じて安定化させる働きをする置換アミノ基である；好ましくはR_4およびR_8は低級アルキルであり、より好ましくはメチル基であり、あるいはこれらのうちの少なくとも１つは定義した通りであり、他方は水素であり、アクリジニウム核のC_1位またはC_8位が低級アルキル基で置換される場合、好ましくはまたメチルである；
R_5およびR_7は上記で定義のR_2およびR_3のいずれかであり；
R_6＝－R_9－R_{10}であり、これは目的の生物学的分子に結合するために必要な官能基を含む重要な置換基であり、
ここでR_9は必須ではないが、任意に分枝または直鎖のアルキル、置換または非置換のアリールまたはアラルキルであり得、任意に２０個のまでのヘテロ原子を含み、そしてR_{10}は脱離基、あるいは脱離基に結合した求電子官能基であり、限定されないが：

【００４６】
【化１７】



を包含する。R_{10}はまた－Ｑ－Ｒ－Ｎｕ、－Ｑ－Ｒ－（Ｉ）ｎＮｕ－、－Ｑ－Ｎｕ、－Ｒ－Ｎｕ、または－Ｎｕであり得、ここでｎは少なくとも１の数であり、Ｎｕは求核基であり、Ｑは機能的結合であり、Ｉはイオン性またはイオン化可能な基である。Ｎｕ、Ｑ、お

よびＩの詳細な定義は米国特許第５，２４１，０７０号、第３欄、第４５行から第３欄、第１６行に見いだされ得る。Ｎｕに対して意図される反応もまた同特許、第３欄、第４８行から第４欄、第１８行に記載された。

【００４７】

R_5およびR_6、ならびにR_6およびR_7は相互交換可能である；そして

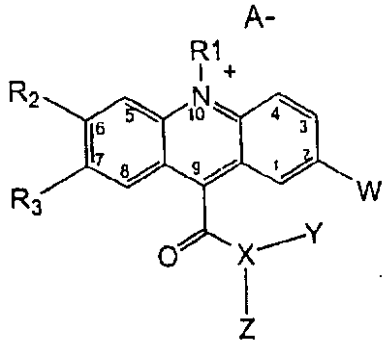
Ｘが窒素の場合、Ｚは－SO_2－Ｙ’であり、Ｙ’は上記のＹと同じ定義を有し、そして両方とも同じ、または相異なり得る。加えて、Ｙ自体は分枝または直鎖のアルキルであり得、任意に２０個までの炭素原子を含み、ハロゲン化または非ハロゲン化され、あるいは置換アリール、あるいは複素環式環系であり得る。

【００４８】

本発明のセットＢの化学発光ＮＩＲアクリジニウム化合物の一般構造は模式的に以下のように表され得る：

【００４９】

【化１８】



R_1、R_2、R_3、Ａ－、Ｗ、Ｘ、Ｙ、およびＺの定義はセットＡのＮＩＲ－ＡＣ一般構造におけるのと同様である。残りのC_3、C_4、C_5のアクリジニウム核のペリ位置は任意に置換される。R_3はまたＷと同じであり得、この場合アクリジニウムエステルは１つではなく２つの電子供与性基を有する。二置換化合物は一置換の対応化合物に比べてその発光極大においてさらに深色シフトを示すことが予想される。

【００５０】

Ｂ．ＮＩＲ－ＡＣで標識された生物学的分子

先に述べた化学的に反応性の官能基で官能化されたＮＩＲ－ＡＣおよびその自明な誘導体は、直接的または間接的に、インビトロまたはインビボで、スペーサーまたは架橋剤（先に米国特許第５，６５６，４２６号に記載され、本明細書中に参考として援用されるように）を介して：

（ａ）小さい有機生体分子、ハプテンまたはリガンド、例えば甲状腺ホルモン、ステロイド、ビタミン、抗生物質、酵素補因子、治療薬、代謝物、脂質、神経伝達物質、または制御された化学物質、

（ｂ）巨大分子、例えば、生物活性タンパク質（アビジン、抗体、ＤＮＡ結合タンパク質、酵素、ヒストンなどを包含する）、多糖、オリゴ糖、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、レクチン、リポタンパク質、リポ多糖、単離されたまたはインタクトなＲＮＡ、ＤＮＡ、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、不活性化タンパク質、ホルモン、ウイルス性抗原、細菌性抗原、真核抗原、免疫グロブリン結合タンパク質、トキシン、サイトカイン、抗体フラグメント、またはレセプタータンパク質、

（ｃ）高次の生物学的実体、例えば、ウイルス、細菌、真核細胞、およびリボソームのような非細胞成分、

と共有結合し得る。

【００５１】

得られる共有結合、例えば、アミド、ウレア、およびチオエーテルは当業者に最も普通に予期されるほんのわずかの例である。有機媒体中で形成され得る他の種類の可能な結合（例えば、エーテル、ケトン、エステル、アゾなど）または水性媒体中で形成され得る他の種類の可能な結合（例えば、ジスルフィド）、ならびに文献に詳細に記録されているものは、予期せぬ利点を実証することなく、自明であると考えられるべきである。

【００５２】

核酸、タンパク質、リガンドまたはハプテンのような生物学的分子がどのようにＮＩＲ－ＡＣに結合して、レセプター結合において、ならびに免疫および核酸診断試験のための有用なトレーサーを形成し得るかを例示するために、遊離ＮＩＲ－ＡＣのＮＩＲ発光特性がトレーサー中で保持され得ることの証拠を提供することが必要であった。この目的のために、抗－ＴＳＨ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ結合体、ならびに相補的な、２－ＯＨ－ＤＭＡＥに結合するバンコマイシンＡオリゴヌクレオチドプローブの合成が実施例セクションで記載される。核酸という用語は、インビトロで標準的な化学を用いて典型的に合成されるオリゴヌクレオチドを表し、そして天然に存在し得（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）、あるいは当該分野で公知の、合成アナログであり得る。このようなアナログはプローブとして使用するのに好適であり得る。なぜならアッセイ条件下で優れた安定性を有するからである。天然構造の修飾（骨格、糖または複素環式塩基における改変を含む）により、細胞内の安定性および結合親和性の向上が示された。骨格の化学における有用な変化は、とりわけ、ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート（ここで非結合酸素は両方とも硫黄で置換される）；ホスホルアミダイト（ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅ）；アルキルホスホトリエステルおよびボラノホスフェート（ｂｏｒａｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ）である。アキラルなホスフェート誘導体は３’－Ｏ’－５’－Ｓ－ホスホロチオエート、３’－Ｓ－５’－Ｏ－ホスホロチオエート、３’－ＣＨ２－５’－Ｏ－ホスホネートおよび３’－ＮＨ－５’－Ｏ－ホスホルアミダイト（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏａｍｉｄｉｔｅ）を含む。ペプチド核酸は、リボースホスホジエステル骨格全体をペプチド結合で置き換える。糖の修飾もまた、安定性および親和性を高めるために用いられる。デオキシリボースのａ－アノマーが用いられ得、ここで塩基が天然のｂ－アノマーに関して逆転している。リボース糖の２’－ＯＨは改変されて、２’－Ｏ－メチルまたは２’－Ｏ－アリル糖を形成し得、これが親和性を犠牲にすることなく分解に対する耐性を提供する。複素環式塩基の修飾は適切な塩基対形成を保持しなければならない。いくつかの有用な置換には、デオキシウリジンをジオキシチミジンの代わりに；５－メチル－２’－デオキシシチジンおよび５－ブロモ－２’－デオキシシチジンをデオキシシチジンの代わりに用いることが包含される。５－プロピニル－２’－デオキシウリジンおよび５－プロピニル－２’－デオキシシチジンは各々、デオキシチミジンおよびデオキシシチジンを置き換えた場合に、親和性および生物学的活性の向上を示した。

【００５３】

Ｃ．ＮＩＲ－ＡＣの応用

ＮＩＲ－ＡＣの応用および利点は多数である。最も広範囲な意味では、１つより多くの化学発光化合物の遊離分子として（例えば、ＡＥカプセル化リポソーム技術、米国特許第５，２２７，４８９号；同第５，４４９，５５６号；同第５，５９５，８７５号参照）、あるいはシグナリング目的のための結合標識としての（先に米国特許第５，３９５，７５２号；同第５，７０２，８８７号、同時係属中の米国特許第５，８７９，８９４号およびＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＩＢ９８／００８３１に記載され、そして本明細書中に参考として援用されるように）意図される同時使用を包含し得るがこれらに限定されない任意の応用的診断アッセイが、本発明から利益を得ることができる。ここで記載される化合物は、以前に記載されたＬＥＡＥおよびＥＴＣに比べて、その発光極大の識別性が高いこと、およびＥＴＣに比べて設計が単純であることにより、従来のＡＥに関してさらに改良される。ＥＴＣは同時係属中のＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＩＢ９８／００８３１に記載されているよ

うに、発蛍光団に共有結合したアクリジニウムエステルから構成される。これらの結合体は構造的に複雑であり、合成が難しい。さらに、生体分子との結合方法が常に明らかではない。本発明のＮＩＲ－ＡＣはＥＴＣよりも設計により構造的に単純であり、従って、同時多数分析物アッセイのために従来にアクリジニウム化合物（青色発光）およびＬＥＡＥ（緑色発光）と共に使用するための、ＥＴＣの有効な代替物を提供する。それゆえ、ＮＩＲ－ＡＣの発明はアクリジニウム化合物のファミリーに、より長波長の発光極大で特徴づけられる識別可能な他の一連のメンバーを付け加えた。さらに、本発明者らの以前の研究と組み合わせて、本発明は同時複数分析物診断試験をまず可能にし、そして次にその品質を向上させるための広範囲な概念を提供した。

【００５４】

光物理学における近年の進歩によって、ＮＩＲ－ＡＣは、電荷結合素子（ＣＣＤ）のような改良された光検出器と組み合わせて使用され得、これらの化合物の固有の高い量子収量が利用され得る。例えば、１３４０×７００ピクセルの背面光式薄型（ｂａｃｋｅｄ－ｉｌｌｕｍｉｎａｔｅｄ　ｔｈｉｎｎｅｄ）ＣＣＤ（これは種々の方法で冷却され得る）が現在市販されている（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，　Ｔｒｅｎｔｏｎ，　ＮＪ）。このＣＣＤはダークカウント（ｄａｒｋ　ｃｏｕｎｔ）およびリードアウトノイズ（ｒｅａｄ　ｏｕｔ　ｎｏｉｓｅ）が非常に低い一方で、４００－８００ｎｍの発光領域にわたって８０－９０％以上の高い検出効率を維持する。リードアウトノイズを低レベルに維持し、かつ同時に宇宙線に起因する問題を避けるために、いわゆるＣＣＤのビニング（ｂｉｎｎｉｎｇ）を適切に選択することが非常に重要である。ビニングはＣＣＤチップ上のピクセルの総数を細分化し、多くのピクセルを単一光子センシング／検出およびシグナルエクスポーティングユニット（スーパーピクセルとも呼ばれる）に、電子的接続およびソフトウエアプログラミングを通じて、グループ分けすることと定義される。従って、ビニングの結果、シグナルエクスポーティングユニットの数の大幅な減少（すなわち、ピクセル対スーパーピクセル）によって、リードアウトノイズが顕著に減少する。スーパーピクセルは一方で、遍在し、かつ低い秒数（ｌｏｗ　ｎｕｍｂｅｒ　ｏｆ　ｓｅｃｏｎｄｓ）の周波数で生じる宇宙線の激しい干渉に対向するために、十分な数で維持されるべきである。影響を受けたスーパーピクセルからのシグナルは、全シグナル出力の精度を大きく歪曲させないために、適切なソフトウエアプログラミングによって犠牲にされる。従って、十分な数のスーパーピクセルを維持することによって低レベルのリードアウトノイズを許容する、相殺する必要性があることが明らかである。精度をさらに高め、そして宇宙線に影響されたスーパーピクセル（単数または複数）の予想される実際のシグナルの損失を埋め合わせるために、測定下の発光試料に源を発する光子の数（これは該当の影響されたスーパーピクセル（単数または複数）にぶつかった）、従って該影響を受けたスーパーピクセルからの実際の発光のリードアウトは、宇宙線による影響を受けていない周囲のスーパーピクセルのリードアウトから誘導あるいは補外することによって再構成され得る。本発明者らの理論的計算ならびに実験結果は、１３４０×７００＝９３８，０００ピクセルを１６のスーパーピクセルにビニングすることが最適であることを示した。現在入手可能な光電子増倍管（ＰＭＴ）に基づく検出器は、５００－６５０ｎｍの範囲においては検出効率の急激な低下（１５％から＜１％まで）を示し、あるいはこの領域でこれらがより高感度であるように設計される場合（検出効率５０－１０％）には非常にノイズが高いことに留意のこと。ＣＣＤの性能の改良はアッセイの感度を、主として、ＮＩＲ－ＡＣの検出性が同時増強される同じ長波長領域における試料／バッファーマトリックスが寄与するバックグラウンドシグナルの大幅な低下によって増強することが期待される。その結果、先例のないアッセイ性能を有する診断の分野が提供される。ＣＣＤ用途の１つの実施態様は、現存する半自動化ルミノメーター（例えばＣｈｉｒｏｎ　ＤｉａｇｎｏｓｔｉｃｓのＭＬＡ－ＩＩ）をＰＭＴアセンブリをＣＣＤカメラで置き換えることによって改変することである。概念的には、ＣＣＤは試料チャンバの開口部に向かって配向し得、そして最も近い可能な近傍に導かれ得、アルカリ性過酸化水素によって化学発光が引き起こされたときに発生する光を検出する。光収集効率を向上させるために、高い透過効率（９５

％プラス）の適切な形状の光パイプが、チャンバ開口部とＣＣＤ検出ウインドウの間に取り付けられ得る。試作品のルミノメーターを改良するために、ＭＬＡ－ＩＩおよびＣＣＤシステムのインターフェースに対する一般的な機械的または電気的接続を使用または改変することは、光物理学および電気工学の当業者には自明である。本発明の別の目的は、従って、現在の光電子増倍管（ＰＭＴ）に基づく検出器をＣＣＤで置き換えてＮＩＲ－ＡＥの検出性を増強する方法を示すことにより、診断アッセイの感度を高めることである。

【００５５】

Ｄ．発光スペクトル

ＮＩＲ－ＡＣおよびそれより短い発光波長のアクリジニウムエステルの発光スペクトルは、Ｂｕｒｂａｎｋ，Ｃａｌｉｆ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．のＰｈｏｔｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｋｏｌｌｍｏｒｇｅｎ Ｃｏｒｐ の一部門）のＦａｓｔ Ｓｐｅｃｔｒａｌ Ｓｃａｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（ＦＳＳＳ）によって測定された。実験は暗室で行った。各化合物をアセトニトリルまたはＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドに溶解したが、ただしタンパク質標識結合体および親水性ＡＥ誘導体は溶解度のため、水溶液を用いた。得られた濃縮物を同じ溶媒で希釈して、作業溶液を形成し、これがアルカリ性過酸化水素と反応すると適切な強度の光を発した。典型的な実験では、１０～１００μｇの試料を１３×１００ｍｍホウケイ酸の試験管に入れた５００μｌの溶媒中で使用した。試験管は適切な高さに立ち上げた試験管立てに置いた。アルミニウム箔片を試験管の背面において、発光の検出性を高めた。ＦＳＳＳ光学ヘッドを、適切な距離１３０ｍｍで管の前に置き、そのレンズを管中の液体に焦点を合わせた。試料溶液を最初に、０．１ＮのHNO_3と０．１％のH_2O_2を含む、０．３５ｍｌのフラッシング試薬＃１（Ｃｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）で処理した。次に部屋を暗くし、そして０．２５ＮのＮａＯＨおよび０．２％のＡＲＱＵＡＤを含む０．３５ｍｌのフラッシング試薬＃２（Ｃｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を反応混合物に即時に加えた。（米国特許第４，９２７，７６９号参照。これは同一出願人に譲渡され、本明細書中に参考として援用される。）試薬＃２を加えた瞬間に発生した光をＦＳＳＳで試薬＃２を添加する約１秒前から始めて５秒間記録した。ＦＳＳＳ上で決定される種々の発光スペクトルを図１に示し、また表１にまとめる。

【００５６】

【表１】

表 1

番号	化合物	範囲 *^ (nm)	発光極大 (nm)	有機溶媒 (%)~
	NIR-AC			
1.	3-HS-DMAE	510 - 860	690	MeCN/DMF (42)
2.	3-HS-DMAE-BSA	500 - 800	610	0
3.	NSB-3-HS-DMAE-BSA	500 - 800	620	0
4.	2-OH-DMAE-Bz	500 - 800	604	MeCN/DMF (42)
5.	2-OH-DMAE-BSA	500 - 780	594	0
	より短いが、非常に広範な発光波長のAE			
6.	3-HP-DMAE	420 - 780	広範	MeCN/DMF (42)
7	NSB-3-MS-DMAE-Bz	420 - 700	520	MeCN/DMF (42)
8.	3-BS-DMAE-Bz	430 - 700	520	MeCN/DMF (42)
9.	NSB-3-MS-DMAE	420-720	522	DMF (42)
10.	NSB-3-MS-DMAE	420-700	522	MeCN (42)
11.	NSB-3-MS-DMAE	400-660	456	0
12.	NSB-2-BS-DMAE-Bz	450 - 680	520	MeCN/DMF (42)
13.	NSB-3-MS-DMAE-NHS	410 - 640	460	0
14.	NSB-3-MS-DMAE-BSA	410 - 610	456	0
15.	NSB-3-MS-DMAE-抗 -TSH	410 - 600	456	0
16.	2-HS-DMAE	420 - 850	広範	MeCN/DMF (42)
17.	2-HS-DMAE-BSA	420 - 620	482	0
18.	NSB-2-MS-DMAE-NHS	400 - 680	454	0
19.	DMAE	400 - 530	430	DMF (42)
20.	NSP-DMAE	390 - 530	424	DMF (42)
21.	NSP-DMAE-BSA	390 - 520	420	0
22.	LEAE-BZ	490 - 670	522	MeCN (42)

＊範囲はシグナル強度がピーク高の約５％のスペクトル領域に設定する。

【００５７】

＾ＦＳＳＳのスキャニング限界（３８０－７８０ｎｍ）を越える発光スペクトル範囲はカーブの近似トレンドに従って長波長端で補外する。

～フラッシュ試薬＃１および＃２を加えた後の最終混合物中の有機溶媒の割合

＋表中の略語は化合物を表し、この完全な命名は実施例のセクションに示される。ＮＳＰ、ＭｅＣＮおよびＤＭＦはＮ－スルホプロピル、アセトニトリル、およびジメチルホルム

アミドを各々、表す。

【００５８】

Ｅ．特異的活性

種々の化合物およびその結合体の化学発光特異的活性を表２に示す。これらの値を（ａ）ＢＧ－３８フィルタ（Ｃｏｒｉｏｎ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ，ＭＡ）（波長透過範囲約３２０から６５０ｎｍ、透過効率２０－９７％）を装着した、Ｂｅｒｔｈｏｌｄルミノメーター（ＭＬＡ－Ｉ、Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）；または（ｂ）新規装置の試作品、これは社内の半自動化ルミノメーター（ＭＬＡ－ＩＩ）をＰｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓの背面光式薄型液体窒素冷却ＣＣＤ検出器に組み込んだものから構成される、のいずれかで測定した。従って、特異的活性は用いた検出器および選択したアクセサリによって制限される。

【００５９】

典型的には、各試料をアセトニトリルまたはメタノール（標識なし）または水（結合体）中で調製した。これらのストック溶液をさらに１０ｍＭホスフェート（ｐＨ８）（１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．１％ＢＳＡ、０．０５％アジ化ナトリウムを含んでいた）で希釈した。２５μＬの試料溶液の化学発光は試薬１および２（Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）の添加によって開始された。典型的なストック溶液の希釈によって、２秒間の測定時間で０．５－５×10^6ＲＬＵの範囲のＲＬＵが全体として観察された。これらの測定から、標識の特異的活性を計算することができた。タンパク質結合体については、１タンパク質当たり１つより多くの標識を取り込むことが可能なので、各結合体はさらにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法で特徴付けされ、標識の取り込みを決定した。これは、非変性タンパク質（ｕｎｄｅｒｉｖａｔｉｚｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）および標識タンパク質の質量を記録することによって容易に達成された。観察された質量の差から、標識の取り込みを計算することができた。これらは実施例９－１４に記載される。オリゴヌクレオチド結合体については、出発オリゴヌクレオチドが５’末端でただ１つの反応性アルキルアミノ基（これはＮＨＳ化学で標識され得る）で合成されたので、この結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルは予期される１つの標識の取り込みを示した。

【００６０】

タンパク質濃度はマイクロ－ブラッドフォード（Ｂｒａｄｆｏｒｄ）アッセイ（ＢｉｏＲａｄ）で決定した。タンパク質濃度および１タンパク質当たりの標識の数の知見から、ルミノメーターで測定された標識の濃度が決定され得る。同様に、オリゴヌクレオチド－ＡＥ濃度と、それゆえアクリジニウムエステル濃度をＵＶ分光光度計で、２６０ｎｍにおける結合体の吸収を記録することによって決定した。オリゴヌクレオチドに比してアクリジニウムエステルの２６０ｎｍにおける吸収帯に対する寄与は無視できる。表２に示す全ての特異的活性は単独の標識のみについてである。

【００６１】

２つの化合物、３－ＨＳ－ＤＭＡＥおよび２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの化学発光特異的活性を上記の両方のルミノメーターで測定した。観察された特異的活性は、従来の光電子増倍管に基づく検出器（これにＭＡＬ－Ｉを装着した）と反対に、赤色においてＣＣＤの効率が高まったことを明らかに反映する。従って、３－ＨＳ－ＤＭＡＥはＣＣＤで約８倍高く検出され、他方２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳはＣＣＤカメラを備えたルミノメーターで、検出効率が４０倍も高く検出された。改変したルミノメーターの試作品のさらなる改良によって、特異的活性におけるさらなる向上が予期され得る。従って、ＮＩＲ－ＡＣをＣＣＤに基づく検出器と組み合わせると、アッセイにおける最大限の感度の可能性が提供される。なぜなら通常生物学的試料から赤色領域で観察されるバックグラウンドが無視でき、ＣＣＤの検出効率が顕著であり、そして少なくとも２－ＯＨ－ＤＭＡＥのようないくつかの化合物について量子収量が向上するからである。３－ＨＳ－ＤＭＡＥの場合ですら、この化合物がタンパク質に結合すると、その量子効率は２０倍より多く増加し、それによりこれもまた非常に有用なＮＩＲ－ＡＣとなることに留意すべきである。

【００６２】

表２．Ｈａｍａｍａｔｓｕ　Ｒ２６８　ＰＭＴ、およびＣｏｒｉｏｎ　ＢＧ３８光学フィルタを装着したＭＬＡ－Ｉ、および背面光式薄型液体N_2－冷却ＣＣＤ検出器を装着したＭＬＡ－ＩＩで測定したＮＩＲ－ＡＣの特異的活性（ＲＬＵ／ｍｏｌ）

【００６３】

【表２】

化合物／結合体＋	MW*	RLU /mol x 10^{-19}	
		MLA-I	MLA-II
3-HS-DMAE	504.6	0.075	0.62
3-BS-DMAE-Bz	685.8	3.8	
3-HS-DMAE-BSA		1.8	
NSB-3-HS-DMAE-BSA		1.3	
NSB-3-HS-DMAE-抗-TSH		3.6	
NSB-3-MS-DMAE-NHS	736.8	10	
2-HS-DMAE	504.6	0.012	
NSB-2-MS-DMAE-NHS	736.8	3.9	
2-OH-DMAE	402.4	0.49	20.2
2-OH-DMAE-オリゴヌクレオチド		0.45	
3-HP-DMAE	479.5	0.054	
DMAE-Bz	476.6	10	

＋表中の略語は化合物を表し、この完全な命名は実施例のセクションに示す。

【００６４】

＊標識の分子量（ＭＷ）は対イオンを含めずに計算した。

【００６５】

（実施例１）

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチルアクリジニウム－９－カルボキシレート（３－ＨＳ－ＤＭＡＥ）およびＮ－スクシンイミジルエステル（３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

（Ｎ－［３－（１，３－ジオキソリル）フェニル］イサチンの合成）

イサチン（３．２ｇ、０．０２１８ｍｏｌ）を無水ＤＭＦ（７５ｍＬ）に溶解し、窒素雰囲気下、氷浴中で冷却した。この冷溶液に、水素化ナトリウム（０．５７５ｇ、０．０２３９ｍｏｌ）を加え、そして反応を０℃で１．５時間攪拌した。この溶液を次に２－（３－ブロモフェニル）－１，３－ジオキソラン（５ｇ、１当量）で処理し、次にＣｕＩ（８．３ｇ、２当量）で処理した。得られた懸濁液を窒素下、油浴中で１３０－１４０℃で１６時間加熱した。次にこれを室温に冷却し、そして等量のクロロホルムで希釈した。この懸濁液を濾過し、そして濾液を減圧下濃縮した。粘性の褐色油状物を回収し、これをキシレン（１５０ｍＬ）中で懸濁し、そして蒸発乾固した。残渣をそのまま次の反応に用いた。ＴＬＣ（クロロホルム中５％メタノール）は完全な転化を示した；Ｒｆ（生成物）＝０．８６。

【００６６】

（２－（アクリジン－９－カルボキシル）－１，３－ジオキソランの合成）
上記の粗Ｎ－［３－（１，３－ジオキソリル）フェニル］イサチンを１０％ＫＯＨ（１５０ｍＬ）に懸濁し、そして得られた懸濁液を窒素下４．５時間還流した。次に反応を室温に冷却し、濾過した。濾液を氷で希釈し、そして２０－３０％ＨＣｌで弱酸性になるまで酸性化した。黄色の沈殿が分離し、これを濾過によって回収して風乾した。収率約５％の黄色の粘着性固体であり、これをそのまま次の反応に用いた。

【００６７】

（アクリジン－９－カルボン酸－３－カルボキシアルデヒドの合成）
粗２－（アクリジン－９－カルボキシル）－１，３－ジオキソラン（約５ｇ）を８０％水性酢酸（１００ｍＬ）中で懸濁した。この懸濁液を８０℃で窒素下１６時間加熱した。黄色の沈殿が反応系中に現れた。反応混合物を次に室温に冷却し、そして無水エーテル（約５００ｍＬ）で希釈した。沈殿固体を濾過により回収し、エーテルですすぎ、風乾した。これを次に丸底フラスコに移し、トルエン（５０ｍＬ）中で懸濁し、そして蒸発乾固した。このプロセスをもう一度繰り返した。明るい黄色の固体を回収した。収量＝１．７２ｇ（全体で３１％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　２５２．３実測値（２５１．２４計算値）。

【００６８】

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニルアクリジン－９－カルボキシレート－３－カルボキシアルデヒドの合成）
ピリジン（５０ｍＬ）中のアクリジン－９－カルボン酸－３－カルボキシアルデヒド（０．３ｇ、０．００１２ｍｏｌ）を窒素下、氷浴中で冷却し、そしてｐ－トルエンスルホニルクロリド（０．４５６ｇ、０．００２３９ｍｏｌ）で処理した。反応を０℃で１５分間攪拌し、そして次に２，６－ジメチル－４－ベンジオキシカルボニル（ｂｅｎｚｙｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ）－フェノール（０．３０６ｇ、１当量）を加えた。反応を室温まで加温し、そして４８時間、窒素下で攪拌し、そして次に減圧下濃縮した。残渣をクロロホルムに溶解し、これを次に水性重炭酸塩および水性塩化アンモニウムで洗浄した。有機層を分離し、硫酸マグネシウムで乾燥し、そして減圧下濃縮した。粗残渣（０．６ｇ）をシリカゲルの分取ＴＬＣで、クロロホルム中１０％酢酸エチルを用いて精製した；Ｒｆ（生成物）＝０．６。収量＝０．２４ｇ（４１％）；明黄色固体。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　４９０．７８実測値（４８９．５３計算値）。；

【００６９】

【数１】

^{1}H-NMR

(CDCl$_3$) 2.46 (s, 6H), 5.40 (s, 2H), 7.37-7.50 (m, 5H), 7.78 (m, 1H), 7.94 (m, 3H), 8.12 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 8.39 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.45 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.51 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.79 (s, 1H), 10.31 (s, 1H).

（４－ベンジルオキシベンジルトリフェニルホスホニウムクロリドの合成）
無水トルエン（２０ｍＬ）中の４－ベンジルオキシベンジルクロリド（１ｇ、０．００４３ｍｏｌ）およびトリフェニルホスフィン（１．１２７ｇ、１当量）を窒素下で約８－１０時間還流した。白色沈殿が反応混合物中に現れた。反応混合物を室温まで冷却し、そしてエーテル（１００ｍＬ）を加えた。沈殿したホスホニウム塩を濾過により回収し、エーテルですすぎ、風乾した。収量＝０．５５ｇ（２５％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　４５９．５１実測値（４５９．５４計算値）。

【００７０】

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレートの合成）

４－ベンジルオキシベンジルトリフェニルホスホニウムクロリド（０．４７５ｇ、０．０００９６ｍｏｌ）を無水ＴＨＦ（１０ｍＬ）中に懸濁し、そして窒素下でアセトン－ドライアイス浴中、－７８％に冷却した。ｎ－ブチルリチウム（１．６Ｍ溶液０．６ｍＬ、１当量）を滴下した。赤みがかった燈色がすぐに現れた。反応を－７８℃で１時間攪拌し、そして次に２’，６’－ジメチル－４’－ベンジオキシカルボニルフェニルアクリジン－９－カルボキシレート－３－カルボキシアルデヒド（０．４６９ｇ、０．０００９６ｍｏｌ）の溶液を乾燥ＴＨＦ（１５ｍＬ）中、滴下した。反応を３時間、－７８℃で攪拌し、そして次に酢酸エチルおよび水性塩化アンモニウムで希釈した。有機層を分離し、食塩水で一度洗浄した。次にこれを硫酸マグネシウムで乾燥し、そして減圧下濃縮した。残渣のＴＬＣ（４５％クロロホルム、５０％ヘキサン、５％酢酸エチル）はＥ異性体とＺ異性体の約１：１比の混合物を示した。Ｒｆ＝０．４３および０．３１。シリカゲルで、７％酢酸エチル、２３％クロロホルム、７０％ヘキサンを用いたフラッシュクロマトグラフィーによる精製の結果、ただ一つの異性体（Ｅ）への完全な異性化がもたらされた。フラッシュした画分の蒸発により、黄みがかった燈色の固体が得られた。収量＝０．２５ｇ（３９％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６７１．２実測値（６７０．７８計算値）。；

【００７１】

【数２】

^{1}H-NMR

(CDCl$_3$) 2.48 (s, 6H), 5.12 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 7.03 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.23 (d, 1H, J = 18 Hz, E-オレフィン), 7.35-7.49 (m, 11H), 7.56 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.65 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.93 (m, 3H), 8.25 (s, 1H), 8.30 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.37 (d, 1H), 8.40 (d, 1H).

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－１０－メチルアクリジニウム－９－カルボキシレートトリフルオロメタンスルホネート（３－ＢＳ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－アクリジン９－カルボキシレート（５０ｍｇ、７５μｍｏｌ）のジクロロメタン（５ｍＬ）溶液をメチルトリフラート（１２５μＬ、１５当量）で処理した。反応系を室温で攪拌した。２４時間後、Ｃ１８カラム（３．９×３００ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、流速１ｍｌ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝２９分、Ｒｔ（出発物質）＝３２分（約７４％転化）を示した。反応を減圧下濃縮し、そして残渣を酢酸エチル中に懸濁し、そして蒸発乾固して紫色の粘着性固体を得た。この物質をそのまま次の反応に用いた。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６８５．１実測値（６８５．８１計算値）。

【００７２】

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３－ＨＳ－ＤＭＡＥ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（１１ｍｇ）をジメチルスルフィド（２ｍＬ）および３０％ＨＢｒの酢酸（１ｍＬ）中での混合物中で攪拌した。室温で４時間後、エーテル＋ヘキサン（２０ｍＬ、１：１）を加え、そして沈殿した固体を濾過により回収し、エーテルですすいだ。残渣をメタノールに溶解し、そして減圧下濃縮した。上記のＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１７分を示した。生成物を分取ＨＰＬＣで２０×３００ｍｍカラムを用いて単離した。生成物を含むＨＰＬＣ画分を蒸

発乾固して、紫色固体を得た。収量＝５ｍｇ（６３％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　５０４．９８実測値（５０４．５６計算値）。

【００７３】

（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３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（５ｍｇ）のＤＭＦ（１０ｍＬ）溶液をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（８．８ｍｇ、１０当量）およびジクロロヘキシルカルボジイミド（１５．７ｍｇ、１０当量）で処理した。反応系を室温で１６時間攪拌した。上記のＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝２１分を示した。生成物を分取ＨＰＬＣで２０×３００ｍｍカラムを用いて精製し、そして生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥した。収量＝９．４ｍｇ（定量的）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６０１．６３実測値（６０１．６４計算値）。

【００７４】

（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３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＢＳ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－ベンジオキシカルボニルフェニル３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレート（２４ｍｇ）および１，４－ブタンスルトン（２ｍＬ）を油浴中、約１５０℃で窒素下、１６時間加熱した。これを次に室温に冷却し、そしてエーテル（２５ｍＬ）を加えて生成物を沈殿させ、これを濾過によって回収して、紫色固体を得た。Ｃ１８カラム（３．９×３００ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、流速１ｍｌ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝２９分；Ｒｔ（出発物質）＝３２分（４０％転化）を示した。粗物質（３０－４０ｍｇ）をそのまま次の反応に用いた。

【００７５】

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３ＨＳ－ＤＭＡＥ）の合成）

粗２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル－３－（４－ベンジルオキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３０－４０ｍｇ）をジメチルスルフィド（２ｍＬ）および酢酸（５ｍＬ）中の３０％ＨＢｒの混合物中で４時間混合した。エーテル（７５ｍＬ）を加えると、暗紫色固体が分離した。エーテルをデカントし、そして残渣をエーテルですすぎ、風乾した。粗収量＝３０ｍｇ。上記のＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝１６分を示した。この物質をそのまま次の反応に用いた。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６２７．３９実測値（６２５．７計算値）。

【００７６】

（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３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

粗２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－スルホブチル－９－アクリジニウムカルボキシレート（約１５ｍｇ）をＭｅＣＮ（２ｍＬ）とＤＭＦ（１ｍＬ）との混合物中に溶解した。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（８．５ｍｇ、７３．９μｍｏｌ）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（１１ｍｇ、

５３．４μｍｏｌ）を加え、そして反応を室温で１６時間攪拌した。上記のＨＰＬＣ分はＲｔ（生成物）＝１９分を示した。生成物を分取ＨＰＬＣで１０×２５０ｍｍカラムを用いて、溶媒流速４ｍＬ／分で精製した。生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥して、紫色粉末を得た。収量＝５．６ｍｇ（全体で４２％、３工程）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　７２４．６６実測値（７２２．７７計算値）。

【００７７】

（実施例３）

（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３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

（４－メトキシベンジルトリフェニルホスホニウムクロリドの合成）

４－メトキシベンジルクロリド（１．１５３ｇ、０．００７４ｍｏｌ）の無水トルエン（１０ｍＬ）溶液をトリフェニルホスフィン（１．９３ｇ、１当量）で処理した。得られた溶液を窒素下で還流した。８－１０時間後、反応系を室温まで冷却し、そしてエーテルで希釈した。ホスホニウム塩を濾過により回収した。収量＝１．５ｇ（５３％）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　３８３．９実測値（３８３．４５計算値）。

【００７８】

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレートの合成）

４－メトキシベンジルトリフェニルホスホニウムクロリド（０．１１ｇ、０．２５ｍｍｏｌ）の無水ＴＨＦ（５ｍＬ）懸濁液を－７８℃にアセトン－ドライアイス浴中、窒素下で冷却し、ｎ－ブチルリチウム（１．６Ｍの０．２５ｍＬ、１．３当量）で処理した。燈赤色が現れた。反応系を－７８℃で０．５時間攪拌し、そして次に無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中の２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシベンジルフェニルアクリジン－９－カルボキシレート－３－カルボキシアルデヒド（０．１ｇ、０．２ｍｍｏｌ）の溶液を滴下した。得られた溶液をアセトン－ドライアイス浴中で０．５時間攪拌し、そして次に０．５時間かけて室温まで加温した。次にこれを酢酸エチル（４０ｍＬ）で希釈し、得られた溶液を水性塩化アンモニウムで２回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。ＴＬＣ（５：３：２、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル）はＥおよびＺオレインの混合物を示した；Ｒｆ（Ｅ異性体）＝０．５４、Ｒｆ（Ｚ異性体）＝０．６９。生成物をシリカゲルの分取ＴＬＣで単離した。Ｚ異性体のＥ異性体への部分異性化が精製の間に観察された。収量３１ｍｇ（Ｅ）、４３ｍｇ（Ｅ＋Ｚ）、総収量＝７４ｍｇ（６１％）、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ（Ｅ異性体）　５９４．７実測値（５９４．７計算値）；

【００７９】

【数３】

^{1}H-NMR ($CDCl_3$)

2.48 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.40 (s, 2H), 6.95 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.24 (d, 1H, J = 17 Hz, E-オレフィン), 7.34-7.50 (m, 6H), 7.56 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.65 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.95 (m, 3H), 8.26 (s, 1H), 8.31 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.37 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.39 (d, 1H, J = 8.7 Hz).

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレート（１０ｍｇ、Ｅ異性体）を１，４－ブタ

ンスルトン（約１ｍＬ）と混合し、この混合物を油浴中１４０℃で窒素下、１６時間加熱した。次に反応系を室温まで冷却し、酢酸エチルを加えた。沈殿した固体を濾過によって回収し、そしてＤＭＦ＋ＭｅＣＮ中に溶解した。これを減圧下濃縮して、粘着性の固体を得、これをそのまま精製せずに次の反応に用いた。Ｃ１８カラム（３．９×３００ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、流速１ｍｌ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝２４．８分を示した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　７３１．７実測値（７２９．９計算値）。

【００８０】

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウムカルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ）の合成）

上記の２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（粗）を、ジメチルスルフィドと酢酸（１．５ｍＬ）中の３０％ＨＢｒとの２：１混合物中で攪拌した。約３時間後、エーテルを加え、沈殿した固体を濾過によって回収し、そしてエーテルですすいだ。残渣をメタノール中に溶解し、そして減圧下濃縮した。上記のプロトコルを用いたＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１７分を示した。収量＝５．６ｍｇ（６４％、２工程）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６４１．２５実測値（６３９．７計算値）。

【００８１】

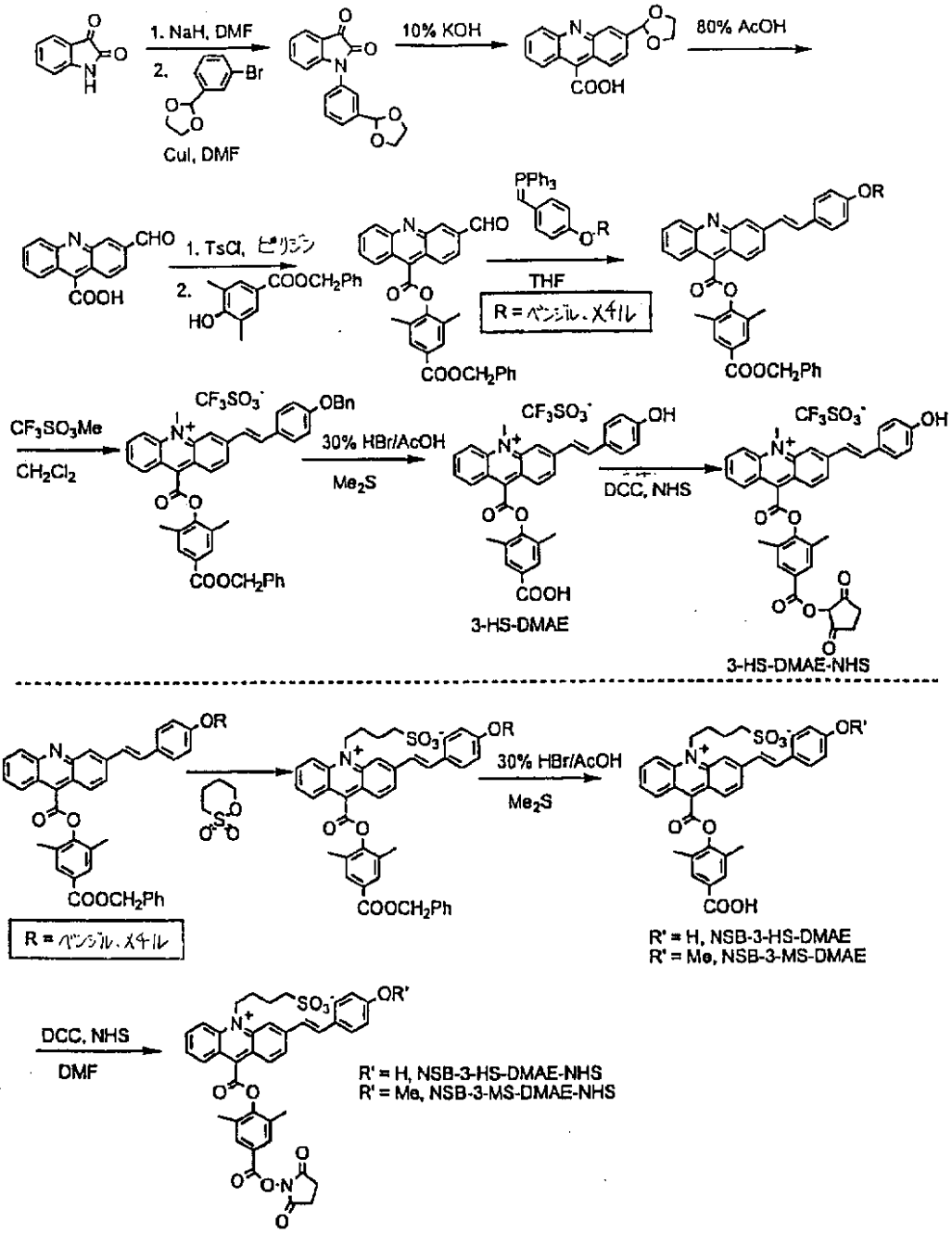
（２’，６’－ジメチル－４’－Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニルフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル３－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（５．６ｍｇ、８．７５μｍｏｌ）をＤＭＦ（１ｍＬ）中に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（５ｍｇ、４３．５μｍｏｌ）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（５３．４μｍｏｌ）で処理した。反応を室温で１６時間攪拌した。上記のＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝２０分を示した。これを分取ＨＰＬＣで１０×２５０ｍｍカラムで単離した。生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥した。収量＝２ｍｇ（３１％）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　７３７．８実測値（７３６．８計算値）。

【００８２】

【化１９】

スキーム1.3置換AE誘導体の合成



（実施例４）

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル２－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＨＳ－ＤＭＡＥ）の合成）

（２－（４－ブロモフェニル）－１，３－ジオキソランの合成）

ベンゼン（６０ｍＬ）中の４－ブロモベンズアルデヒド（３ｇ、０．０１６２ｍｏｌ）をｐ－トルエンスルホン酸一水和物（０．１５ｇ、０．７９ｍｍｏｌ）およびエチレングリコール（５ｍＬ、０．０８９６ｍｏｌ）で処理した。反応物を窒素下、水を共沸除去しながら還流した。３時間後、反応物を室温まで冷却し、等量の酢酸エチルで希釈した。この溶液を水性重炭酸塩で２回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。無色の油状物が回収された。収率＝２．８３ｇ（９２％）、ＴＬＣ（ヘキサン中の５％酢酸エ

チル）は純粋な生成物を示した。Ｒｆ＝０．１７。
【００８３】
（Ｎ－［４－（１，３－ジオキソリル）フェニル］イサチンの合成）
無水ＤＭＦ（１００ｍＬ）に入れたイサチン（１．８８ｇ、０．０１２８ｍｏｌ）を氷浴中、窒素下で冷却し、そして水素化ナトリウム（０．３ｇ、１当量）で処理した。反応物を室温まで加温し、１時間攪拌した。次にこれを２－（４－ブロモフェニル）－１，３－ジオキサラン（２．８３ｇ、０．０１２４ｍｏｌ）で処理し、次いでＣｕＩ（４．７１ｇ、２当量）で処理した。この懸濁液を油浴中、窒素下、１３５℃で１６時間加熱した。次にこれを室温まで冷却し、等量のクロロホルムで希釈した。得られた懸濁液を濾過し、そして濾液を減圧下で濃縮した。残渣をキシレン（１００ｍＬ）中に懸濁し、そして乾固するまでエバポレートした。濃い粘性の油状物が回収され、これをそのまま次の反応に用いた。ＴＬＣ（クロロホルム中５％メタノール）は完全な転化を示した。Ｒｆ（生成物）＝０．９１。
【００８４】
（２－（アクリジン－９－カルボキシル）－１，３－ジオキソランの合成）
上記の粗生成物、Ｎ－［４－（１，３－ジオキソリル）フェニル］イサチンを１０％ＫＯＨ（１００ｍＬ）中に懸濁し、そして懸濁液を窒素下４～５時間還流した。次に反応物を室温まで冷却し、濾過した。濾液を氷中で冷やし、そして氷冷濃ＨＣｌで酸性化した。濃厚な黄色沈殿物が現れ、これを濾過によって収集し、風乾した。収率＝２ｇ。この粗生成物をそのまま次の反応に用いた。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　２９５．３１実測値（２９５．２９計算値）。
【００８５】
（アクリジン－９－カルボン酸－２－カルボキシアルデヒドの合成）
粗２－（アクリジン－９－カルボキシル）－１，３－ジオキソラン（２ｇ）を８０％水性酢酸（１００ｍＬ）中に懸濁し、そして７５～８０℃で油浴中、窒素下、１６時間加熱した。次に反応物を室温まで冷却し、そしてエーテル（３００ｍＬ）中に注いだ。明黄色固体が分離し、これを濾過によって収集し、そしてエーテルですすいだ。生成物を丸底フラスコに移し、そしてトルエン（５０ｍＬ）中で懸濁し、蒸発乾固して、黄色粉末を得た。収率＝１．５ｇ（４７％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　２５１．１実測値（２５１．２４計算値）。
【００８６】
（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル－アクリジン－９－カルボキシレート－２－カルボキシアルデヒドの合成）
アクリジン－９－カルボン酸－２－カルボキシアルデヒド（０．３ｇ、０．００１２ｍｏｌ）をピリジン（５０ｍＬ）に入れた溶液を氷浴中、窒素下で冷却し、そしてｐ－トルエンスルホニルクロリド（０．４５５ｇ、２当量）で処理した。反応物を０℃で１０分間攪拌し、そして次に２，６－ジメチル－４－ベンジルオキシカルボニルフェノール（０．３０６ｇ、１当量）を加えた。反応物を室温まで加温し、そして４８時間攪拌した。次に反応物混合物を減圧下で濃縮し、そして残渣をクロロホルム中に溶解した。クロロホルム溶液を水性重炭酸塩および水性塩化アンモニウムで洗浄した。有機層を次に硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。粗残渣（０．６ｇ）をシリカゲルの分取ＴＬＣでクロロホルム中１０％酢酸エチルを用いて精製した；Ｒｆ（生成物）＝０．５７。収率＝０．２４ｇ（４１％）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　４８９．１実測値（４８９．５３計算値）；
【００８７】
【数４】

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) 2.50 (s, 6H), 5.40 (s, 6H), 7.42 (m, 5H), 7.77 (dd, 1H), 7.97 (m, 3H), 8.32 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 8.42-8.49 (m, 3H), 8.99 (s, 1H), 10.23 (s, 1H).

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル－２－（４－ベンジルオキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレートの合成）
無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中に入れた４－ベンジルオキシホスホニウムクロリド（０．１ｇ、０．２ｍｍｏｌ）をアセトン－ドライアイス浴中で窒素下－７８℃まで冷却し、そしてｎ－ブチルリチウム（１．６Ｍの０．１５ｍＬ、１．３当量）で処理した。淡燈色が現れた。反応物を－７８℃で１時間攪拌し、そして次に２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　アクリジン－９－カルボキシレート－２－カルボキシアルデヒド（９０ｍｇ、０．９当量）を無水ＴＨＦ（５ｍＬ）溶液として滴下した。反応物を－７８℃で０．５時間攪拌し、そして次に室温まで０．５時間かけて加温した。次に反応物を酢酸エチル（５０ｍＬ）および水性塩化アンモニウム（２００ｍＬ）で希釈した。有機層を分離し、硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮により粗生成物（０．１７ｇ）が得られ、これはＴＬＣ（６：３：１のヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル）によってＺ（Ｒｆ＝０．６３）およびＥ（Ｒｆ＝０．７５）オレフィンの混合物であることが示された。この２つの異性体をシリカゲルの分取ＴＬＣで分離した。先に観察されたように、Ｚ異性体からＥおよびＺ異性体の混合物への部分異性化が観察された。収率＝１００ｍｇ（合わせての収率、８１％）；Ｅ＝４４ｍｇ、Ｅ＋Ｚ＝５６ｍｇ。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ（Ｅ－オレフィン）　６７１．３７実測値（６７０．７８計算値）；
【００８８】
【数５】

^{1}H-NMR ($CDCl_3$)

2.51 (s, 6H), 5.12 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 7.01 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.16 (d, 1H. J = 16.3 Hz), 7.32-7.52 (m, 11H), 7.67 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.96 (s, 2H0, 8.14 (d, 1H. J = 9.2 Hz), 8.32 (m, 3H), 8.41 (d, 1H, J = 8.7 Hz).

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－（４－ベンジルオキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＢＳ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）
２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシベンジルフェニル－２－（４－ベンジルオキシフェニル）－アクリジン－９－カルボキシレート（１３．５ｍｇ、２０μｍｏｌ）のジクロロメタン（１．５ｍＬ）溶液をメチルトリフルオロメタンスルホネート（１１６μＬ、５０当量）で処理した。反応物を室温で１６時間攪拌した。Ｃ１８カラム（３．９×３０ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、流速１ｍＬ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝２４．５分を示した。反応混合物を濃縮し、粗混合物を直接次の反応に用いた。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６８５．６７実測値（６８５．８１計算値）。
【００８９】
（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－（４－ヒドロキシスチレニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＨＳ－ＤＭＡＥ）の合成）

上記の粗生成物混合物を酢酸（０．５ｍＬ）中の３０％ＨＢｒとジメチルスルフィド（１ｍＬ）との混合物中、室温で攪拌した。４時間後、エーテル（５０ｍＬ）を加え、そして沈殿した固体を濾過によって収集した。固体をＭｅＯＨ＋ＭｅＣＮ中で溶解し、そして濃縮した。上記のプロトコルを用いたＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１７分を示した。生成物を２０×３００ｍｍカラムを用いる分取ＨＰＬＣで精製した。生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥して乾固させ、暗紫色固体を得た。収率＝７．６ｍｇ（７６％、２工程）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　５０４．９実測値（５０４．６計算値）。

【００９０】

（実施例５）

（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　２－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－２－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－（４－メトキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレートの合成）

４－メトキシベンジルトリフェニルアンモニウムクロリド（８５ｍｇ、０．０００２ｍｏｌ）をＴＨＦ（５ｍＬ）中に懸濁し、アセトン－ドライアイス浴中、窒素下で－７８℃まで冷却した。Ｎ－ブチルリチウム（１．６Ｍの０．１５ｍＬ、１．２当量）を加え、そして反応物を窒素下でさらに３０分間－７８℃で攪拌した。これに、２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　アクリジン－９－カルボキシレート－２－カルボキシアルデヒド（７５ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）無水ＴＨＦ（５ｍＬ）溶液を加えた。反応物を－７８℃で３０分間攪拌し、そして次に室温まで３０分かけて加温した。次に反応物を酢酸エチル（４０ｍＬ）で希釈し、得られた溶液を水性塩化アンモニウムで２回洗浄した。有機層を分離し、硫酸マグネシウムで乾燥した。次にこれを減圧下で濃縮した。ＴＬＣ（５：３：２のヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル）はＥ（Ｒｆ＝０．５９）およびＺ（Ｒｆ＝０．６５）オレフィンの混合物を示した。２つの生成物を分取ＴＬＣで精製した。合計収率＝６１ｍｇ（６７％）；Ｅ＝２４ｍｇ；Ｅ＋Ｚ＝３７ｍｇ（ＺからＥへの異性化が精製の間に観察された）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ（Ｅ異性体）　５９５．６実測値（５９４．７計算値）；

【００９１】

【数６】

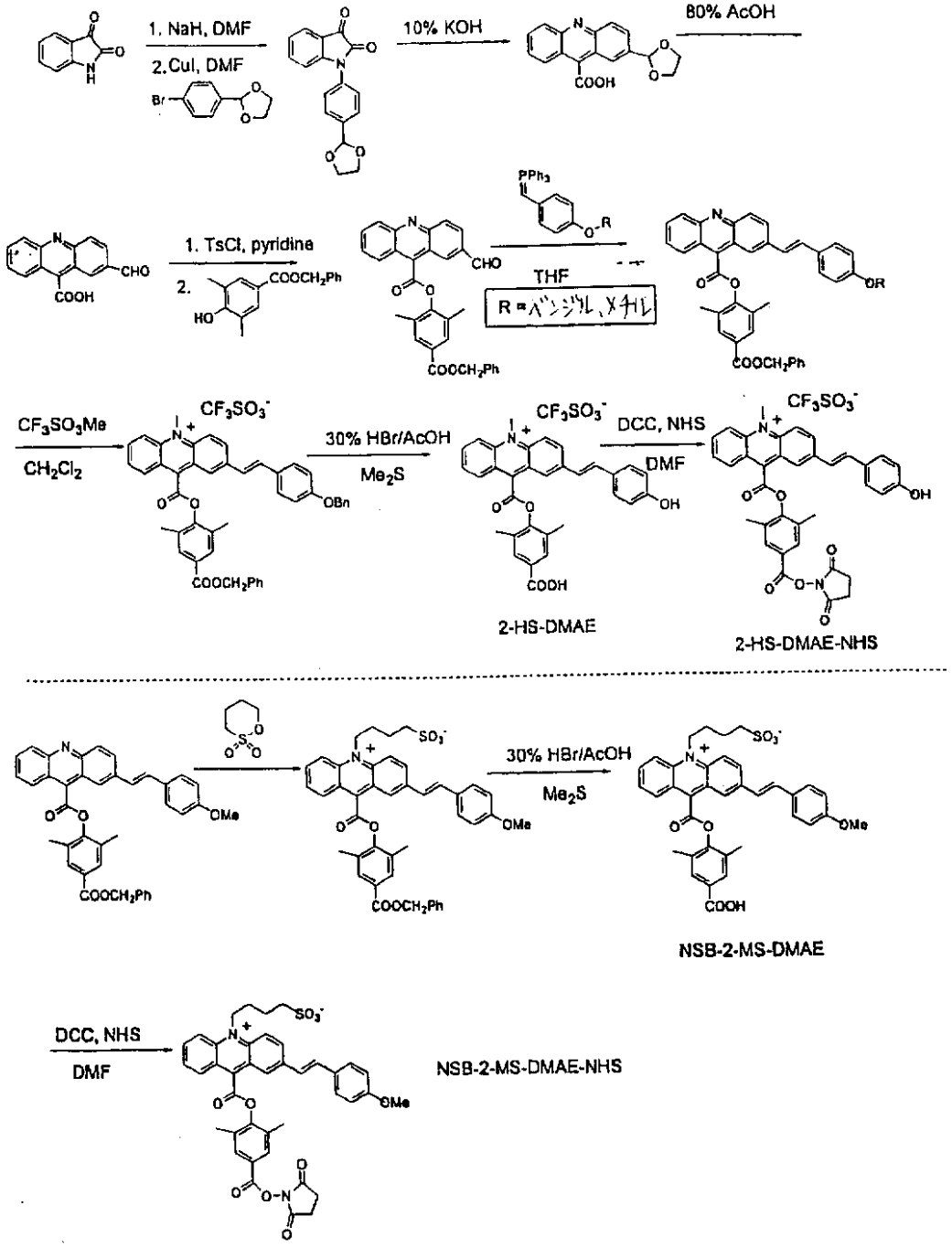
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) 2.51 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.40 (s, 2H), 6.94 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.15 (d, 1H. J = 16.2 Hz), 7.32-7.53 (m, 6H), 7.67 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.96 (s, 2H), 8.14 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.31 (m, 3H), 8.41 (d, 1H, J = 8.6 Hz).

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル－２－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－２－ＭＳ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）

２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－（４－メトキシスチレニル）－アクリジン－９－カルボキシレート（１９ｍｇ、３２μｍｏｌ）を１，４－ブタンスルトン（３～４ｍＬ）と混合し、この混合物を油浴中、窒素下で１６時間、１４０℃で加熱した。次に反応物を室温まで冷却し、酢酸エチル（４０ｍＬ）で希釈した。沈殿した固体を濾過によって収集した。これをＤＭＦ中に溶解し、そして減圧下で濃縮した。暗紫色固体が回収され、これを直接次に反応に用いた。Ｃ１８カラムを用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、１ｍｌ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は、Ｒｔ（生成物）＝２５分を示した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－２－ＭＳ－ＤＭＡＥ）の合成）
上記の粗物質を酢酸（０．５ｍＬ）中の３０％ＨＢｒとジメチルスルフィド（１ｍＬ）との混合物中で４時間、室温で攪拌した。エーテル（５０ｍＬ）を加え、そして沈殿した固体を濾過によって収集した。残渣をＤＭＦ中に溶解し、減圧下で濃縮した。回収された残渣をトルエン中に懸濁し、乾固するまでエバポレートした。粗収率＝４．５ｍｇ（～２２％）。上記プロトコルを用いたＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１５分を示した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ
（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　２－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＮＳＢ－２－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＦＳ）の合成）
２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－（４－メトキシスチレニル）－１０－スルホブチル－９－アクリジニウム－カルボキシレート（５．６ｍｇ）をＤＭＦ（１ｍＬ）中に溶解し、そしてＮ－ヒドロキシスクシンイミド（５ｍｇ、４３．５μｍｏｌ）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（１０ｍｇ、４８．５μｍｏｌ）で処理した。反応物を室温で１６時間攪拌した。上記同様のＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１９分を示した。生成物を１０×２５０ｍｍカラムを用いる分取ＨＰＬＣで単離し、生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥し乾固させた。紫色の粉末状固体が回収された。収率＝０．６ｍｇ（１２％）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　７３８．９実測値（７３６．８計算値）。
【００９２】
【化２０】

スキーム2：2置換AE誘導体の合成



（実施例６）

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－（４－ヒドロキシフェニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＨＰ－ＤＭＡＥ）の合成）

（Ｎ－［３－（４－ベンジルオキシフェニル）フェニル］イサチンの合成）

無水ＤＭＦ（３０ｍＬ）中のイサチン（０．１２ｇ、０．８１ｍｍｏｌ）を氷浴中、窒素下で冷却し、そして水素化ナトリウム（２１ｍｇ、１．１当量）で処理した。反応物を氷中で０．５時間撹拌し、そして次に室温まで加温した。この溶液を次に４－（３－ブロモフェニル）フェノールベンジルエーテル（Ｈａｊｄｕｋら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１９９７、１１９、５８１８－５８２７）（０．１６ｇ、０．４７ｍｍｏｌ）で処理し

、次いでヨウ化銅（０．３２ｇ、１．６８ｍｍｏｌ）で処理した。反応物を油浴中１４０℃で加熱した。約１６時間の後、反応物を室温まで冷却し、そして減圧下で濃縮した。残渣を酢酸エチル（～７５ｍＬ）中に溶解し、濾過した。濾液を減圧下で濃縮して、粘着性の褐色固体を得、これをシリカゲルの分取ＴＬＣでヘキサン中の２５パーセント酢酸エチルを展開溶媒として用いて精製した。Ｒｆ（生成物）＝０．３８。収率＝４７ｍｇ（２５％）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　４０７．０２実測値（４０５．５計算値）；

【００９３】

【数７】

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) 5.12 (s, 2H), 6.95 (d, 1H, J = 8 Hz), 7.06 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.18 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 7.33-7.47 (m, 7H), 7.53 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.57-7.60 (m, 2H), 7.71 (d, 1H, J = 7.5 Hz).

（３－（４－ベンジルオキシフェニル）－９－カルボキシアクリジンの合成）

上記のアルキル化イサチン（４７ｍｇ）を２５ｍＬの１０％ＫＯＨ中に懸濁し、そして窒素下で３時間還流した。次に反応物を室温まで冷却し、等量の氷水で希釈した。これを約１０％ＨＣｌでｐＨ２まで酸性化した。分離した黄色固体を濾過によって収集し、そして氷水（３×５ｍＬ）ですすいだ。よく風乾した後、黄色固体をメタノールに溶解し、そして溶液を乾固するまでエバポレートした。残渣をトルエン中に懸濁し、得られた懸濁液を乾固するまでエバポレートした。収率＝４４ｍｇ（９４％）。この物質をそのまま次の反応に用いた。

【００９４】

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　３－（４－ベンジルオキシフェニル）－アクリジン－９－カルボキシレート（３－ＢｚＰ－ＤＭＡｅＥ－Ｂｚ）の合成）

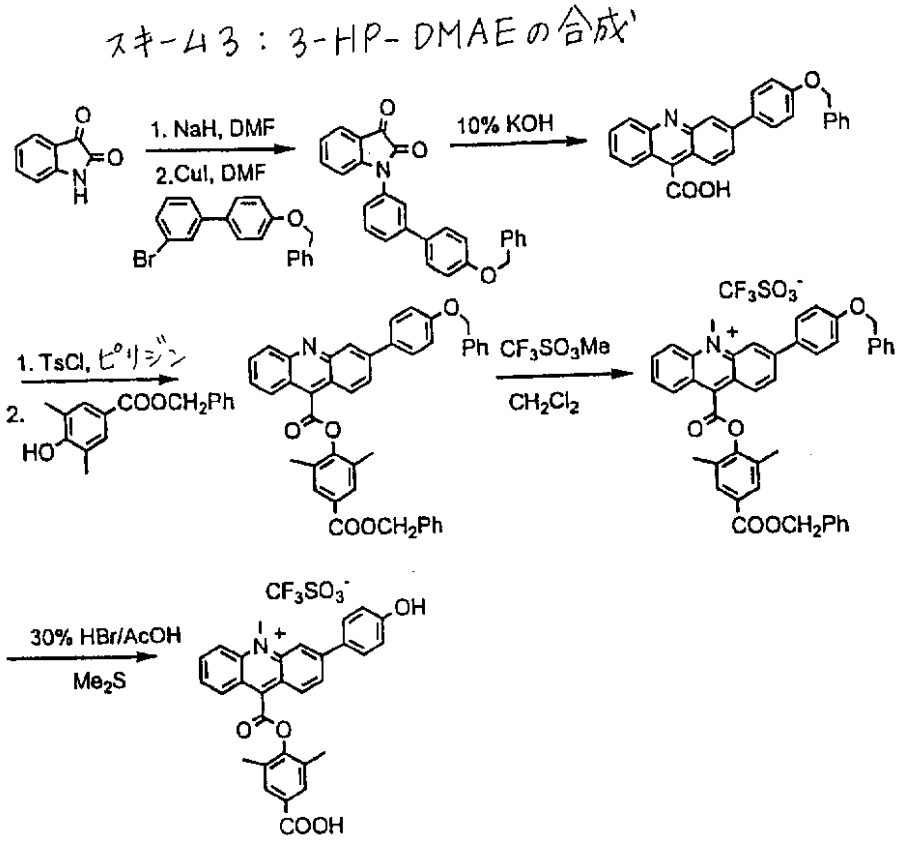
無水ピリジン（２０ｍＬ）中の３－（４－ベンジルオキシフェニル）－９－カルボキシアクリジン（４４ｍｇ、０．１０８ｍｍｏｌ）を氷浴中、窒素下で冷却し、そして４－カルボキシベンジル－２，６－ジメチルフェノール（３３．３ｍｇ、１．２当量）およびｐ－トルエンスルホニルクロリド（４１ｍｇ、２当量）で処理した。反応物を室温まで加温し、そして窒素下１６時間攪拌した。次にこれを減圧下で濃縮し、そして残渣をトルエン（約２５ｍＬ）中に懸濁し、乾固するまでエバポレートした。回収された物質をクロロホルム（約２ｍＬ）中に溶解し、そして生成物をシリカゲルの分取ＴＬＣでヘキサン中の２５％酢酸エチルを展開溶媒として用いて単離した。収率＝２２ｍｇ（３１％）、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６４５．５２実測値（６４５．７５計算値）。

【００９５】

（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　３－（４－ベンジルオキシフェニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３－ＢｚＰ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ）の合成）

上記エステル（２１ｍｇ、０．０３３ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１．５ｍＬ）中に溶解し、そしてトリフルオロメタンスルホン酸メチル（１００μＬ、０．８８ｍｍｏｌ）で処理した。反応物を室温で１６時間攪拌した。次に溶媒を減圧下で除去し、そして残渣をＭｅＣＮ（２ｍＬ）中に溶解した。Ｃ１８カラム（３．９×３００ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、流速１．０ｍＬ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は、２０、２４、２５および２９．５分に溶出する生成物を示した。これらを２０×３００ｍｍカラムを用いる分取ＨＰＬＣで単離し、そして画分をｍＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳで分析した。２４分で溶出する主生成物は６５９．５７ａｍｕ（６６０．７８計算値）で正しい分子イオンを得た。この生成物を含むＨＰＬＣ画分は暗赤色であり、これを乾固するまでエバポレートした。収

率＝１４ｍｇ（６５％）。
【００９６】
（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　３－（４－ヒドロキシフェニル）－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３－ＨＰ－ＤＭＡＥ）の合成）
上記ベンジル保護アクリジニウムエステル（１４ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ）を酢酸中の３０％ＨＢｒとメチルスルフィドの１：１混合物中、室温で３．５時間攪拌した。次にエーテルを加えて生成物を沈殿させ、これを濾過によって収集し、そしてエーテルですすいだ。赤色生成物をメタノールに溶解した。上記同様のＨＰＬＣ分析は１６分で溶出する純粋生成物を示した。これを分取ＨＰＬＣで単離し、そしてＨＰＬＣ画分を乾固するまでエバポレートした。収率＝２．６ｍｇ（２６％）；ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　４７９．１３実測値（４７９．５２計算値）。
【００９７】
【化２１】



（実施例７）
（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＯＨ－ＤＭＡＥ）の合成）
（４－メトキシエトキシメトキシ－ヨードベンゼンの合成）
４－ヨードフェノール（１０ｇ、４５．４５ｍｍｏｌ）を２００ｍｌの無水テトラヒドロフランに入れた溶液を０℃で水素化ナトリウム（２．３６ｇ、６０％分散体、５９．０９ｍｍｏｌ）で５分間処理した。得られた混合物に５分間かけてメトキシエトキシメチルクロリド（８．３ｍｌ、７２．７３ｍｍｏｌ）をゆっくり加えた。混合物を０℃で３０分間攪拌し、室温まで加温し、そして窒素下で２４時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。残渣を５００ｍｌのエーテル中に溶解し、２００ｍｌの５％水酸化ナトリウム（４×２００ｍｌ）、水（４×２００ｍｌ）、飽和塩化ナトリウム（１×２００ｍｌ）で洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下でエバポレートさせて、１４．１ｇの油状

生成物を得た。ＴＬＣ（シリカゲル、エーテル）：Ｒｆ０．５。
【００９８】
（Ｎ－（４－メトキシエトキシメトキシ）フェニルイサチン）
２００ｍｌの無水Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアルデヒド中のイサチン（４．０ｇ、２７．２ｍｍｏｌ）の溶液を室温で水素化ナトリウム（１．０３６ｇ、６０％分散体、３２．６４ｍｍｏｌ）で０．５時間処理し、次いで４－メトキシエトキシメトキシ－ヨードベンゼン（１２．５７ｇ、４０．８ｍｍｏｌ）およびヨウ化銅（Ｉ）（１０．３４ｇ、５４．４ｍｍｏｌ）を加えた。得られた混合物を－１６０℃で窒素下、１７時間攪拌した。これを室温まで冷却し、４００ｍｌのクロロホルムで希釈した。得られた混合物を濾過して無機物質を除去した。減圧下で濾液をエバポレートさせて、Ｎ－（４－メトキシエトキシメトキシ）フェニルイサチンを含む粗混合物を主生成物として得た。ＴＬＣ（シリカゲル、エーテル）：Ｒｆ０．８。
【００９９】
（２－メトキシエトキシメトキシ－アクリジン－９－カルボン酸）
上記粗４－メトキシエトキシメトキシフェニルイサチンを精製することなく、１２０ｍｌの１０％水酸化カリウム中に懸濁した。懸濁液を１５０℃で５時間還流した。室温まで冷却した後、混合物を濾過して有機不純物を除去した。濾液を氷水浴中、濃塩酸でｐＨ２に酸性化した。得られた黄色沈殿を収集し、水（４×５０ｍｌ）で洗浄し、そして風乾した。乾燥した物質をさらにエーテル（６×５０ｍｌ）で洗浄して所望の生成物を６．７ｇ得た。ＴＬＣ（シリカゲル、３０％メタノール／クロロホルム）：Ｒｆ０．５。
【０１００】
（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－メトキシエトキシメトキシ－アクリジン－９－カルボキシレート（２－ＭＥＭ－ＤＭＡｅＥ－Ｂｚ））
１５０ｍｌの無水ピリジン中の２－メトキシエトキシメトキシ－アクリジン－９－カルボン酸（３．６ｇ、１１ｍｍｏｌ）の懸濁液をｐ－トルエンスルホニルクロリド（４．１８３ｇ、２２ｍｍｏｌ）で０℃で５分間処理して、均一な褐色溶液を形成した。次に、ベンジル３，５－ジメチル－４－ヒドロキシベンゾエート（２．８１８ｇ、１１ｍｍｏｌ）を加えた。溶液を室温で窒素下、２０時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。残渣をヘキサンを充填したシリカフラッシュクロマトグラフィーカラムで分離した。これを５０％エーテル／ヘキサン（１Ｌ）で溶出し、次いで７０％エーテル／ヘキサン（３Ｌ）で溶出した。生成物の画分を７０％エーテル／ヘキサンの溶出液から得た。溶媒を減圧下でエバポレートさせて、３．７４ｇの所望の生成物を得た。ＴＬＣ（シリカゲル、エーテル）：Ｒｆ０．８。
【０１０１】
（２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートトリフルオロメタンスルホネート（２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－Ｂｚ））
２０ｍｌの無水塩化メチレン中の２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－メトキシエトキシメトキシ－アクリジン－９－カルボキシレート（４００ｍｇ、０．７０８ｍｍｏｌ）の淡黄色溶液をトリフルオロメタンスルホン酸メチル（０．４ｍｌ、３．５４ｍｍｏｌ）で室温で窒素下、攪拌しながら１４時間、処理した。得られた混合物を無水エーテル（２０ｍｌ）で処理した。沈殿物を収集し、エーテル（４×２０ｍｌ）で洗浄して、３２５ｍｇの生成物を得た。
【０１０２】
【数８】
ｐ．４９、１７～２１行目

MS:

(ESI): m/z 492.6 (M^+). ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD-d_4/$CDCl_3$): δ 2.52 (6H, s), 5.01 (3H, s), 5.42 (2H, s), 7/37 – 7.51 (5H, m), 7.81 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7.97 (2H, s), 8.10 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.16 (1H, dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 2.6 Hz), 8.42 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.60 (1H, d, J = 8.8 Hz), and 8.73 (2H, 2本の重なった2重線 , J ~ 8.0 Hz).

（２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル　２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートブロミド（２－ＯＨ－ＤＭＡＥ））
２’，６’－ジメチル－４’－ベンジルオキシカルボニルフェニル　２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートトリフルオロメタンスルホネート（１００ｍｇ）を４ｍｌの酢酸中の３０％臭化水素に入れた溶液を５５℃で窒素下、１時間撹拌し、そして次に１０ｍｌの無水エーテルで処理した。得られた沈殿を収集し、そしてエーテル（４×１０ｍｌ）で洗浄して、８０ｍｇの（４－カルボキシル－２，６－ジメチル）フェニル２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートブロミドを得た。

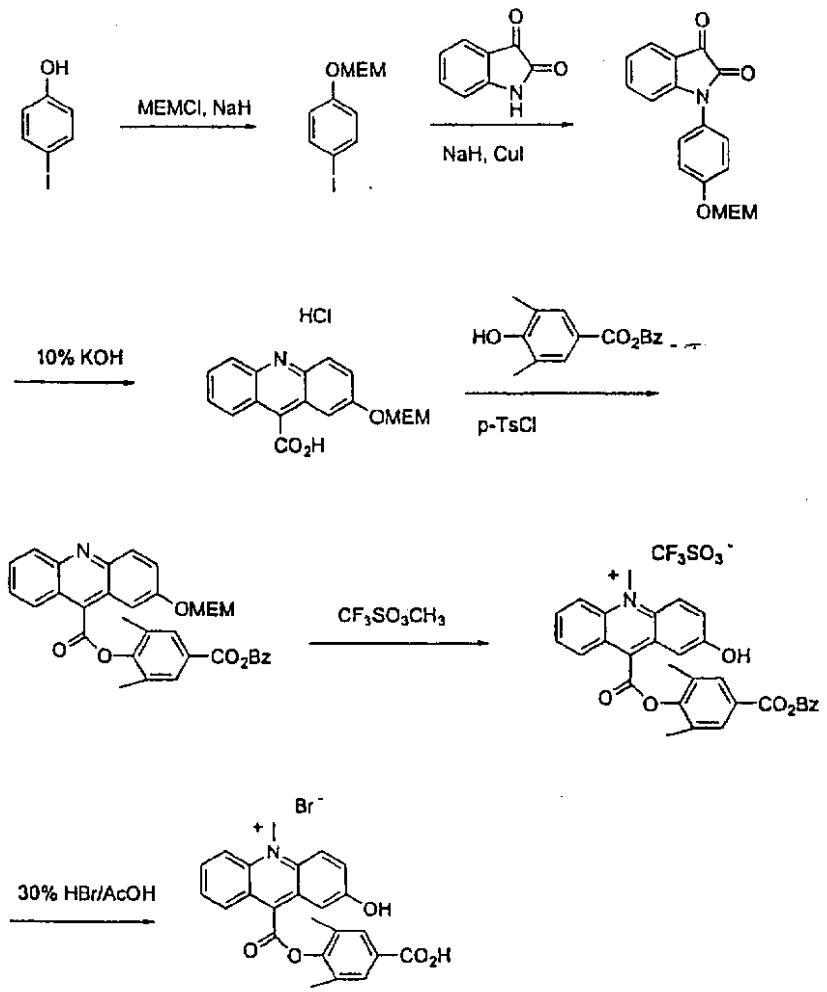
【０１０３】
【数９】

MS (ESI): m/z 402.7 (M^+).

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN/MeOD-d_4): δ 2.52 (6H, s), 4.95 (3H, s), 7.78 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.76 (2H, s), 8.10 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.13 (1H, dd, J_1 = 9.9 Hz, $J_{3=2}$ = 2.7 Hz), 8.40 (1H, d t, J_1 = 2.7 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 8.62 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.77 (1H, d, J = 9.2 Hz), and 8.78 (1H, d, J = 9.9 Hz).

【０１０４】
【化２２】

スキーム４：２-OH-DMAEの合成



（実施例８）

（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＢＳＡ結合体の合成）

ｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（０．９ｍＬ）中のＢＳＡ（０．５ｍｇ、０．００７５μｍｏｌ）をＤＭＦ（０．１ｍＬ）中のＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（０．２５ｍｇ、０．３５μｍｏｌ）の溶液で一滴ずつ処理した。透明な溶液が得られ、これを室温で約１６時間攪拌した。標識されたタンパク質をＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５のカラムクロマトグラフィーで溶出液として水を用いて単離した。空隙容量で溶出されるタンパク質画分を収集し、アミコン（ａｍｉｃｏｎ）フィルタ（ＭＷ３０，０００カットオフ）を用いて濃縮した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析は質量が１１８０単位増加したことを示し、これは１個のＢＳＡ当たりおよそ２つの標識ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥを取り込んだことに対応する。

【０１０５】

（実施例９）

（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＳＨ結合体の合成）

ｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（０．４５ｍＬ）中のＴＳＨ抗体（０．５ｍｇ、３．３３ｎｍｏｌ）をＤＭＦ（６０μＬ）中のＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（１２０μｇ、５０当量）の溶液で処理した。反応物を室温で２時間攪拌し、そして次に標識タンパク質を上記のように単離した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳ分析は質量が１７９６単位増加したことを示し、これは抗ＴＳＨの１分子当たりおよそ３つの標識を取り込んだことに対応する。

【０１０６】

（実施例１０）
（３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＢＳＡ結合体の合成）
ｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（４００μＬ）中のＢＳＡ（２ｍｇ、０．０３μｍｏｌ）をＤＭＦ（１００μＬ）中の３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（０．４５ｍｇ、２５当量）の溶液で処理した。反応物はわずかに濁っており、これを４℃で１６時間攪拌した。結合体を上記のように単離した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳ分析は質量が４１５単位増加したことを示し、これは１個のＢＳＡ当たりおよそ１つの標識を取り込んだことに対応する。

【０１０７】
（実施例１１）
（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＢＳＡ結合体の合成）
ｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（４００μＬ）中のＢＳＡ（０．５ｍｇ、０．００７５μｍｏｌ）をＤＭＦ（１４０μＬ）中のＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（１４０μｇ、約２５当量）の溶液で処理した。反応物を室温で１６時間攪拌し、次に結合体を上記のように単離した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析は質量が３２５０単位増加したことを示し、これは１個のＢＳＡ当たりおよそ５個の標識を取り込んだことに対応する。

【０１０８】
（実施例１２）
（ＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＳＨ結合体の合成）
ｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（４００μＬ）中のＴＳＨ抗体（０．５ｍｇ、３．３３ｎｍｏｌ）をＤＭＦ（１２０μＬ）中のＮＳＢ－３－ＭＳ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（１２０μｇ、約５０当量）の溶液で処理した。反応物を室温で１６時間攪拌し、次に結合体を上記のように単離した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析は質量が６０７４単位増加したことを示し、これは１個のＴＳＨ抗体当たりおよそ１０個の標識を取り込んだことに対応する。

【０１０９】
（実施例１３）
（２－ＨＳ－ＤＭＡＥ－ＢＳＡ結合体の合成）
ＭｅＣＮ（０．６５ｍＬ）＋ＤＭＦ（０．１ｍＬ）中の２－ＨＳ－ＤＭＡＥ（１．３ｍｇ、２μｍｏｌ）をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（１．４ｍｇ、１２μｍｏｌ）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（３ｍｇ、１４．６μｍｏｌ）で処理した。反応物を室温で混合した。２～３時間後、Ｃ１８カラム（３．９×３００ｍｍ）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分グラジエントで、１ｍＬ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析はＲｔ（生成物）＝１８．２分（＞８０％）、Ｒｔ（ｓｍ）＝１７分を示した。反応物をさらに１時間攪拌し、次にＭｅＣＮを減圧下で除去した。残りをｐＨ９の０．１Ｍカーボネート（０．５ｍＬ）に入ったＢＳＡの溶液（５ｍｇ、０．０７５μｍｏｌ）の溶液に滴下し、次に追加のＤＭＦ（０．２ｍＬ）を加えた。反応物を１時間室温で攪拌し、そして次に不溶性物質を除去するために遠心分離にかけた。濾液を、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５で水を溶出液として用いてカラムクロマトグラフィーによって精製した。空隙容量で溶出した標識化タンパク質を収集し、アミコン濾過（ＭＷ３０，０００カットオフフィルタ）によって濃縮した。結合体のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析は質量が２８２２単位増加したことを示し、これは１個のＢＳＡ当たりおよそ６個の標識を取り込んだことに対応する。

【０１１０】
（実施例１４）
（トレーサー標識としてのＤＭＡＥとＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥのＴＳＨアッセイ比較）
診断アッセイの適用性についての結合体結合的機能性を、血清中のＴＳＨの臨床的定量のために処方された二価のサンドイッチイムノアッセイを用いて評価した。このアッセイにおいて、ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＨＳＨ結合体（以下トレーサーと呼ぶ）は、

患者のサンプルまたはＴＳＨ含有標準（Ｃｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ．，Ｗａｌｐｏｌｅ，ＭＡ）の中に存在する選択された分析物であるＴＳＨに対して特異的に結合して、非共有的に結合した抗体－抗原複合体を形成する。得られたトレーサー－分析物複合体は次に、常磁性粒子固相に共有結合した第２のポリクローナルヒツジ抗ＴＳＨ抗体によって捕捉される。化学発光シグナルは固相に結合した結合体を未結合の結合体から磁気的に分離することによって決定される。トレーサーの適格性は２つの関連する方法によって評価される。すなわち、第一に、問題の結合体およびまた既に有用性が確立されたＤＭＡＥ－抗ＴＳＨトレーサーの両方から生成される規格化標準曲線データの比較である。標準曲線データを用いていくつかのコントロール試料のＴＳＨ濃度を計算した。ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＳＨ濃度を、ＡＣＳ™ＴＳＨ３ Ｌｉｔｅ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｃｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ．，Ｗａｌｐｏｌｅ，ＭＡ）中での２．４μＭからＣｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ ＴＨＳ３アッセイキットで供給される参照のＤＭＡＥ－抗ＴＳＨトレーサーの濃度である２．１５ｎＭまで、８．９６×１０$^{-4}$倍希釈した。ＴＳＨアッセイを、１００μＬの新規ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＳＨトレーサーと１００μＬの参照のＤＭＡＥ－抗ＴＳＨキットトレーサーを別々に、２００μＬのＴＳＨ標準またはコントロールのいずれかと混合して開始した。１０個のＴＳＨ標準を用い、これはＴＳＨを０．０００、０．１２０、０．７４０、１．９２、３．８６、８．９９、１９．９、４９．６、９７．１および１８３μＩ．Ｕ．／ｍＬ（Ｃｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ．，Ｗａｌｐｏｌｅ，ＭＡ）の濃度で含んでいた。６つのコントロールもまたアッセイした。これらはＣｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓのリガンド１、２および３（これらはＴＳＨを平均濃度で各々０．６００、４．９０および１７．０μＩ．Ｕ．／ｍＬ含む）、ならびにＢｉｏ－Ｒａｄ ＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓのＬｙｐｈｏｃｈｅｋ（登録商標）Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｓｅｒｕｍｕｓ１、２および３（これらはＴＳＨを各々、２．９４、１１．５、および４０．６μＩ．Ｕ．／ｍＬ含む）であった。混合物を一緒にボルテックスに３回、５秒間、Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｉｎｃ．４０１０型Ｍｕｌｔｉ－Ｔｕｂｅ Ｖｏｒｔｅｘｅｒの設定Ｎｏ．５でかけた。データ点を三つ組で取得した。アッセイ混合物を次に室温で２０分間インキュベートし、その後、２００μＬのＡＣＳ™ＴＳＨ３ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ（約６７μｇ）を各アッセイに加えた。アッセイ混合物を上記のように３回ボルテックスにかけ、そして室温で３０分間インキュベートした。固相を、Ｃｉｂａ－Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｍａｇｉｃ Ｌｉｔｅ Ａｓｓａｙ Ｒａｃｋ中で永久磁石のアレイを３分間適用することによって、磁気的に上清から分離した。上清を固相からデカントした。残った上清を３分間ブロッティングで除去し、そして再び１分間ブロッティングで除去した。

【０１１１】

固相を２回の別々の１．０ｍｌ容量のＣｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ ＡＣＳ™：ＮＧ Ｗａｓｈ Ｂｕｆｆｅｒで洗浄し、そして１００μｌの試薬グレードの水に懸濁させた。化学発光反応は、各３００μＬのＣｈｉｒｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ ＭＬＡ Ｒｅａｇｅｎｔ １（０．１ＮのＨＮＯ$_3$、０．５％Ｈ$_2$Ｏ$_2$）およびＲｅａｇｅｎｔ ２（０．２５ＮのＮａＯＨ、０．０５％のＣＴＡＣ）をＣｏｒｉｏｎ ＢＧ３８光学フィルタを備えたＣｉｂａ－Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｍａｇｉｃ Ｌｉｔｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ上に系列的に添加することで開始された。化学発光データはＭａｇｉｃ Ｌｉｔｅ Ａｎａｌｙｚｅｒで検出される光子として収集され、そして相対光ユニット（ＲＬＵ）で表された。

【０１１２】

（サンドイッチアッセイパラメータの計算方法）

特定の分析物濃度（ここでμで表される）の結果得られるＲＬＵの算術平均を３つ組から計算した。非トレーサーアッセイ試薬もまた、小さいけれどもときには有意な数のＲＬＵに寄与する。それゆえ、全てのアッセイ試薬を含むがトレーサーを含まないコントロール反応を平行して行い、非トレーサー試薬バックグラウンド（ここでｎで表される）を決定

した。算術平均ＲＬＵ、μ、をトレーサーのみから得られるＲＴＵ（ここでＢで表される）を表すように補正し、ここでＢ＝μ－ｎである。分析物濃度が最も高いときに、この点についての、補正された算術平均ＲＬＵ値はB_{max}として表される。標準中に存在する分析物濃度と検出されるＲＬＵとの間には直接的ではあるが非線形的な相関関係が存在する。その結果、同じ直線的なＳ字状の相関がまた、分析物濃度を得られた％Ｂ／B_{max}に対して関連づけ、そして正確には実験的線形フォームで

【０１１３】

【数１０】

$$y = y_0 + \frac{(y_\infty - y_0)}{(1 + 10^{-m\log x - b})}$$

として表され得る。ここでｘは分析物濃度であり、そしてｙは観察されたシグナルであり、％Ｂ／B_{max}またはＲＬＵのいずれかで生成する（Ａ、Ｂ、Ｃ参照）。

【０１１４】

【数１１】

A. Rodbard, David; Ligand Analysis; (1981); Langon, J.; Clapp, J. (編.); Masson Publishing, Inc., New York; 45 - 101.頁

B. Nix, Barry; The Immunoassay Handbook; (1994); Wild, David (編); Stockton Press, Inc., New York; 117 - 123.頁

C. Peterman, Jeffrey H.; Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay; (1991); Butler, J. (編); CRC Press, Inc., Boca Raton; 47 - 65頁

さらに、４つのさらなるパラメータがある。すなわち、回帰定数ｂ、回帰係数ｍ、ゼロ用量（分析物濃度）での漸近的非特異的結合（ＮＳＢ）y_0、および無限に高い用量に関する漸近的無限限界応答y_∞である。これらのパラメータのうち最後の３つはＤＯＳＥＣＡＬＣ．ＥＸＥ　Ｒｅｖ．１．７３プログラム（Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｃｏｒｐ．，Ｗａｌｐｏｌｅ，ＭＡ）の反復、加重、４パラメータのロジスティック（４ＰＬ－ＷＴＤ）分析機能を用いて直接計算された。回帰定数ｂの算術平均は、

【０１１５】

【数１２】

$$b = -\log\frac{y_\infty - y}{y - y_0} - m\log x.$$

として書き直される用量応答式から計算して、分析物濃度の全範囲にわたって決定された。次に未知の分析物濃度は

【０１１６】

【数１３】

$$x = 10^{\frac{\log[(y_\infty - y)/(y - y_0)] + b}{-m}}.$$

としてアレンジされる用量応答等式から計算された。

【０１１７】

（ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥおよびＤＭＡＥをトレーサー標識として用いるＴＳＨアッセイ標準曲線）

％Ｂ／B_{max}対ＴＳＨ濃度の両対数プロット（図３参照）は、ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ－抗ＴＳＨおよびＤＭＡＥ－抗ＴＳＨ結合体によって生成する規格化標準曲線の形状の密な類似性を例示する。従って、ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥ標識および他の長発光波長アクリジニウムエステル標識は、４桁または５桁のオーダーの大きさの分析物濃度にわたってイムノアッセイトレーサーとして有用性を有することが示される。この場合、ＴＳＨ濃度をその臨床的に関連性のある範囲全体にわたって決定するのに十分である。

【０１１８】

（ＴＳＨ濃度決定におけるアッセイの精度）

ＴＳＨ濃度をＣｉｂａ－Ｃｏｒｎｉｎｇリガンド１、２および３、ならびにＢｉｏ－Ｒａｄ対照血清１、２および３について、加重４ＰＬ関数を用いて計算した。計算された値を関連の生成物の文献に記述された、確立された値の範囲と比較した。全ての場合において、ＮＳＢ－３－ＨＳ－ＤＭＡＥは示した対照中のＴＳＨ濃度の正確な決定のためのトレーサー標識としての明白な有用性を示した。結果はＤＭＡＥ標識に関するものに匹敵した。ＮＩＲアクリジニウムエステルはイムノアッセイにおけるトレーサー標識として実用的な有用性を有する。

【０１１９】

【表３】

TSH対照に対しての予想対測定TSH濃度

TSH 濃度 (uI.U./ml)	Ciba-Corning 診断リガンド			Bio-Rad Laboratories 対照血清		
レベル	1	2	3	1	2	3
予想される範囲	0.50 - 0.70	4.20 - 5.60	14.0 - 20.0	2.34 - 3.54	9.10 - 13.9	35.6 - 45.6
測定						
DMAE標識使用	0.607	4.48	17.5	2.84	10.8	35.9
NSB-3-HS-DMAE標識使用	0.688	4.95	19.3	3.32	12.0	41.1

（実施例１５）

（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２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）の合成）

無水ＤＭＦ（０．５ｍＬ）中の２’，６’－ジメチル－４’－カルボキシフェニル２－ヒドロキシ－１０－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレート（３．５ｍｇ、６．３５μモル）の溶液をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（３．７ｍｇ、５当量）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（６．５ｍｇ、５当量）で処理した。反応系を室温で攪拌した

。５－６時間後、Ｃ１８カラム（３．９×３００mm）を用い、１０→１００％ＭｅＣＮ／水（各々０．０５％ＴＦＡを含む）の３０分勾配で、流速１．０ｍＬ／分、２６０ｎｍでのＵＶ検出を用いたＨＰＬＣ分析は完全な転化を示した；Ｒｔ（生成物）＝１５分、Ｒｔ（出発酸）＝１４分。生成物を２０×３００mmカラムを用いる分取用ＨＰＬＣで単離し、生成物を含むＨＰＬＣ画分を凍結乾燥した。収量＝３ｍｇ（７５％）。この物質をそのまま次の標識化反応に用いた。

【０１２０】

（実施例１６）

（デュアルアクリジニウムエステル標識ハイブリダイゼーションアッセイ）

Ａ．オリゴヌクレオチド標識化

２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－ＶａｎｃｏＡプローブ５２６．２０（配列番号１）

以下のバンコマイシンＡプローブ配列５’－ＸＣＧ　ＣＡＡ　ＧＧＴ　ＴＴＴＣＧ　ＣＡＣ　ＡＴＴ（配列番号７）を含む２０マーの合成オリゴヌクレオチドを標準のホスホルアミダイト化学を用いて合成した。Ｃｌｏｎｔｅｃｈの「Ｕｎｉｌｉｎｋ」アミノ修飾剤を用いてアミノ基を５’末端に導入した（上記配列におけるＸ）。０．３ｍＬの０．１Ｍ重炭酸ナトリウム（ｐＨ８．５）中のこのオリゴヌクレオチド１０ｎモルを氷中で冷却し、そして各７０μＬの３つの等しい部分の上記ＮＨＳエステル（３×５００ｎモル、全部で１ｍｇ）のＤＭＦ溶液で、処理した。反応系を室温で１６時間攪拌し、次に標識されたＤＮＡをＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５カラムでゲル濾過によって遊離標識から分離した。カラムの空隙容量で溶出した標識化ＤＮＡを収集し、そしてさらに分取用ＨＰＬＣによって、Ｃ１８カラム（３．９×３００mm）で、０．１Ｍ酢酸トリメチルアンモニウム（ｐＨ７．３）中のＭｅＣＮの２０分間で８→２０％の勾配、次いで２０分間で２０→６０％の勾配で精製した。結合体は１６分で溶出し、これを収集し、そして凍結乾燥した。収量＝１．７３ｎモル（１７％）、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ　６６７８．５（実測値）（未修飾オリゴヌクレオチド６２９２．７）は予想された１つの標識の取り込みを示す。標識の特異的活性は０．４５×10^{19}ＲＬＵ／モルで、遊離標識の場合と変わらないことが見い出された。

ＤＭＡＥ－ＶａｎｃｏＢプローブ４９５．２３（配列番号２）

アミノ連結Ｖａｎ　Ｂプローブ配列の合成およびＤＭＡＥ標識化を先の段落と同様の方法で行った。

Ｂ．オリゴ－デオキシリボヌクレオチドのアミノＰＭＰ上への固定化

全ての反応は他に指示のない限り室温で行われた。アミノエチルアミノプロピルシロキサンポリマーで被覆されたＰＭＰ（アミノ－ＰＭＰ、５０．８ｍｇ／ｍＬの０．５９ｍＬ、３０ｍｇ）を強力な永久磁石を適用して（１０分間、Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍａｇｎｅｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．５Ｃ３８９４型）その貯蔵緩衝液から磁気的に分離した。貯蔵緩衝液を吸引により除去した。アミノ－ＰＭＰを４つの個別の容量（１０ｍＬ）の１０ｍＭピリジンで混合（１０分間、Ｃｏｒｎｉｎｇ，　Ｉｎｃ．４０１０型Ｍｕｌｔｉ－Ｔｕｂｅ　Ｖｏｒｔｅｘｅｒの設定５）により連続的に洗浄し、そして各洗浄サイクルごとに磁気的に分離（１０分間）した。グルタルアルデヒド（１０ｍＭピリジン中５％（ｗ／ｖ）、１０ｍＬ）をアミノ－ＰＭＰ懸濁液と混合（設定３、３時間）した。未反応のグルタルアルデヒドを１０ｍＭピリジンの４回の洗浄サイクル（全部で４０ｍｌ）で除去した。３０Ｏ．Ｄ．の５’－アミノ結合オリゴマーを４１５μＬの１０ｍＭピリジン中でカップリングした。反応混合物を倒立型（ｅｎｄ－ｏｖｅｒ－ｅｎｄ）振盪機（Ｌａｂ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．４００－１００型）中で１６時間混合した。上清を除去し、そしてオリゴ－ＰＭＰを１０ｍＬの１００ｍＭシアノ水素化ホウ素ナトリウムで４時間処理した。オリゴ－ＰＭＰを１．０ｍＬの水で５回洗浄し、そして次に２．０ｍＬの濃水酸化アンモニウムで５５℃で１６時間、脱保護した。上清を除去し、そしてオリゴ－ＰＭＰを１．０ｍＬの水で洗浄し、そして１．０ｍＬの水中に再懸濁した。（Ｖａｎｃｏ－Ａ　ＰＭＰプローブ５５７．２２は配列番号３で示される。ＶａｎｃｏＢ　ＰＭＰ－プローブ４９６．２０は配列番号４で示される）。

Ｃ．デュアル分析物プローブアッセイ：
アッセイのセットアップ：
アッセイの準備において、いくつかの緩衝液を調製した：ハイブリダイゼーション緩衝液（０．６０Ｍ塩化ナトリウム、６０ｍＭクエン酸、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１０％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン、０．０２０％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０、０．０２０％（ｗ／ｖ）アジ化ナトリウム、１．０％（ｗ／ｖ）硫酸デキストラン、ｐＨ８．０）、プローブ希釈剤（５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０）、洗浄溶液（０．３０Ｍ塩化ナトリウム、３０ｍＭクエン酸、０．１０％（ｗ／ｖ）ドデシル硫酸ナトリウム、ｐＨ７．７）およびＤＮａｓｅ　Ｉ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ塩化マグネシウム、３．３μｇ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ　Ｉ、ｐＨ８．０）。固相および合成標的をハイブリダイゼーション緩衝液で指示された作用濃度に希釈し、他方、プローブはプローブ希釈剤で希釈した。ハイブリダイゼーション反応混合物をセットアップ（図４参照）し、１２．５μＬの８０ｎＭ　２－ＯＨ－ＤＭＡＥ－Ｖａｎｃｏ　Ａ－プローブ５２６．２０（１．０ｐモル）（配列番号１）、１２．５μＬの１．６ｎＭ　ＤＭＡＥ－Ｖａｎｃｏ　Ｂ－プローブ４５９．２３（０．１０ｐモル）（配列番号２）、１００μＬの２．０ｍｇ／ｍＬ　Ｖａｎｃｏ－Ａ　ＰＭＰプローブ５５７．２２固相（０．２０ｍｇ）（配列番号３）、１００μＬの０．２０ｍｇ／ｍＬ　ＶａｎｃｏＢ　ＰＭＰ－プローブ４９６．２０（２０μｇ）（配列番号４）、７５μＬのＶａｎｃｏ　Ａ　５２６．５３（配列番号５）およびＶａｎｃｏ　Ｂ４５９．５７（配列番号６）の両方の合成標的を10^{-8}、5×10^{-9}、10^{-9}、5×10^{-10}、10^{-10}および０Ｍの濃度で含むようにした。（Ｖａｎｃｏはまた本明細書中でＶａｎとも称することに注意。）ここで、各試験の標的の質量は７５０，３７５、７５、３７．５、７．５および０．０００ｆモルのいずれかであり、他に4.5×10^{11}、2.3×10^{11}、4.5×10^{10}、2.3×10^{10}、4.5×10^{9}、および０分子とも表される。同時アッセイ反応は上記のように構成されたが、各分析物についての個々のアッセイは相補的プローブのみを含み、他はプローブ希釈剤で置換された。アッセイ混合物を３回、５秒間、Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｉｎｃ．４０１０型Ｍｕｌｔｉ－Ｔｕｂｅ　Ｖｏｒｔｅｘｅｒの設定番号５でボルテックスした。反応混合物を４５℃で３０分間インキュベートした。固相を、Ｃｉｂａ　Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｍａｇｉｃ　Ｌｉｔｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒａｃｋ中で永久磁石のアレイを３分間適用することによって、上清から磁気的に分離した。上清を固相からデカントした。残った上清を吸い取り紙で３分間吸い取り、そして次に再び１分間吸い取って、除去した。固相を２つの別の１．０ｍＬ容量の洗浄溶液で洗浄して、未結合のプローブを除去し、次に３００μＬのＤＮａｓｅ　Ｉ溶液中に懸濁させて、プローブを固相表面から脱離させた。化学発光反応を、デュアルＰＭＴルミノメーターの制御下、連続的に３００μＬのＣｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＡＣＳ試薬　１（０．１Ｎ硝酸、０．５％（ｗ／ｖ）過酸化水素）、次いで０．１秒後に３００μＬのＡＣＳ試薬２（０．２５Ｎ水酸化ナトリウム、０．５％（ｗ／ｖ）Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎ－ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド界面活性剤）を添加することによって開始させた。化学発光データをデュアルＰＭＴ固定器（Ｆｉｘｔｕｒｅ）によって検出される量子として２．０秒間、試薬２の添加直後に収集し、これを相対光単位（ＲＬＵ）で表した。（図４に示す標的およびプローブ配列は化合物全体の構造を示さない。詳細には、核酸配列と標識（またはＰＭＰ）との間の架橋は省略されている。上記記載は架橋に関する詳細な情報を提供する）。
装置：
デュアル－ＰＭＴルミノメータは米国特許第５，３９５，７５２号および５，４４７，６８７号に記載されている。本出願については、デュアルＰＭＴルミノメータ上の２つの光電子増倍管（ＰＭＴ）は各々独立した異なる光学フィルタを備えていた。クロストーク値は各プローブ溶液２５μｌから決定された。５回の相加平均を両ＰＭＴから総計した（ここでＴ＝（ＰＭＴ１からの平均ＲＬＵ）＋（ＰＭＴ２からの平均ＲＬＵ））。ＰＭＴ１上の２－ＨＯ－ＤＭＡＥ化学発光のクロストークは（２－ＨＯ－ＤＭＡＥ－ＶａｎＡからのＰＭＴ１　ＲＬＵ）×１００／Ｔとして計算された。ＰＭＴ２上のＤＭＡＥ化学発光のク

ロストークは、（ＤＭＡＥ－ＶａｎＢからのＰＭＴ２　ＲＬＵ）×１００／Ｔとして計算された。短波長チャンネル（ここではＰＭＴ１と称する）にＣｏｒｉｏｎ，Ｉｎｃ．ＢＧ－１２－Ｓ－Ｏ９３９－４Ｍ２２９光学フィルタを取り付け、これを通って、３５０ｎｍから４７５ｎｍまでの波長が入射光の２０％より多く透過する。従って、ＢＧ－１２－Ｓ－Ｏ９３９－４Ｍ２２９フィルタは２－ＨＯ－ＤＭＡＥ－ＶａｎＡプローブによって発せられる光全体の３．５％（クロストーク）のみを透過する。従って、ＤＭＡＥからの化学発光シグナルはＰＭＴ１によって優先的に検出される。長波長チャンネル（ここではＰＭＴ２と称する）にＣｏｒｉｏｎ，Ｉｎｃｃ．ＬＬ－５５０－Ｆ－９５０Ｂ光学フィルタを取り付け、これは５６０ｎｍ以上の波長の光を入射光のおよそ９０％透過する。その結果、ＬＬ－５５０－Ｆ－９５０ＢフィルタはＤＭＡＥ－ＶａｎＶプローブによって発せられる光全体の１．１％（クロストーク）のみを透過する。従って、２－ＨＯ－ＤＭＡＥからの化学発光シグナルはＰＭＴ２によって優先的に検出される。低いクロストークのパーセンテージから証明されるように、これらの光学フィルタを備えたデュアルＰＭＴルミノメータはＤＭＡＥ－および２－ＨＯ－ＤＭＡＥ－標識プローブの試料を合わせたものからの別々の化学発光シグナルの良好な識別を提供する。結果：

ＡＥ－標識プローブ以外に他のアッセイ試薬もまた、時折ではあるが少数の有意なＲＬＵに寄与する。それゆえ、プローブ以外の全てのアッセイ試薬を含む対照反応を平行して行って、非プローブ試薬のバックグラウンドを決定し、ここでｎと表す。３ツ組からの平均ＲＬＵ、μ、を補正して、プローブのみから得られるＲＬＵを表し、これをここでＢで表す。ここでＢ＝μ－ｎである。結果を表にまとめ以下に示す。両対数プロットを、バックグラウンド補正したＲＬＵ対標的数について作製した。以下の２つのグラフ（図５および６参照）に示すように、２－ＨＯ－ＤＭＡＥ標識ＶａｎＡプローブによって発生する化学発光を用いる独立したＶａｎＡアッセイと同時ＶａｎＡおよびＢアッセイの両方に関して、標準曲線は同一である。同様に、ＤＭＡＥ標識ＶａｎＢプローブによって発生する化学発光を用いる独立したＶａｎＢアッセイと同時ＶａｎＡおよびＢアッセイの両方に関して、標準曲線はまた同一である。個別およびデュアル分析物アッセイの両方で標準曲線の形が同一であることは、混合ＤＭＡＥ－および２－ＨＯ－ＤＭＡＥ－標識プローブが独立してそれぞれの標的配列にハイブリダイズし、非関連のデュアルアッセイ成分の存在によって乱されないことを示す。これらの結果、ならびにデュアルＰＭＴルミノメータ上で短波長と長波長の化学発光シグナルを良好に識別することは、光学的に識別可能な化学発光極大を有する２つのＡＥ－標識プローブを用いて、同じ試料中の２つの異なる分析物を同時定量することの実用性を実証する。

【０１２１】

【表４】

2-HO-DMAE標識プローブを用いた、バイコマイシンA耐性遺伝子についての個別および同時ハイブリダゼーション

標識数	量子 (RLUs)	
	個別	同時
0	93	89
4,500,000,000	453	563
23,000,000,000	1,981	2,491
45,000,000,000	4,502	4,820
230,000,000,000	22,208	25,209
450,000,000,000	37,171	40,239

【０１２２】
【表５】

DMAE標識プローブを用いたバイコマイシンB耐性遺伝子についての個別および同時ハイブリダゼーションアッセイ

標識数	量子 (RLUs)	
	個別	同時
0	339	468
4,500,000,000	5,663	4,449
23,000,000,000	13,743	13,970
45,000,000,000	18,815	19,875
230,000,000,000	32,065	30,396
450,000,000,000	38,591	38,771

【図面の簡単な説明】
【図１Ａ】　図１Ａは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｂ】　図１Ｂは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｃ】　図１Ｃは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｄ】　図１Ｄは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｅ】　図１Ｅは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｆ】　図１Ｆは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波

長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）図１Ｆの目盛りは少し異なって標識されるが、なお同じように解釈されるべきである。
【図１Ｇ】　図１Ｇは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｈ】　図１Ｈは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｉ】　図１Ｉは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｊ】　図１Ｊは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｋ】　図１Ｋは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｌ】　図１Ｌは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｍ】　図１Ｍは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｎ】　図１Ｎは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｏ】　図１Ｏは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）
【図１Ｐ】　図１Ｐは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１０

０μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）

【図１Ｑ】　図１Ｑは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）

【図１Ｒ】　図１Ｒは、評価された種々の化合物のういちのいくつかについて、規格化された発光強度（ここで各スペクトルについての極大応答を１００％として表す）を波長（ｎｍ）の関数として表す。（注：各分析において評価された化合物の量は約１０から１００μｇの範囲である。発光強度は存在する化合物の量の関数であり、これは調査された波長範囲におけるピークでの極大強度が１００となるように規格化された。）

【図２】　図２は、本特許において言及される選択された化合物の構造を示す。

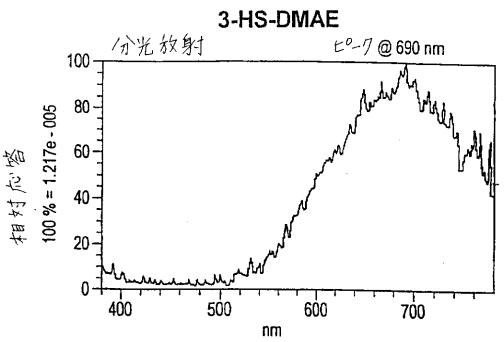
【図３】　図３は、実施例１４で論じられるＴＳＨアッセイの結果を示す。

【図４】　図４は、実施例１６で記載されデュアル分析物プローブアッセイの模式図を示す。

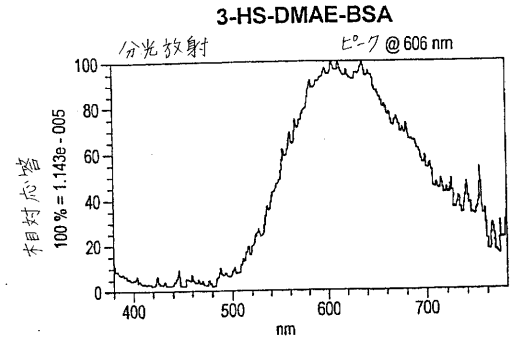
【図５】　図５は、実施例１６で論じられるバンコマイシンＡ耐性遺伝子のハイブリダイゼーションアッセイの結果を示す。

【図６】　図６は、実施例１６で論じられるバンコマイシンＢ耐性遺伝子のハイブリダイゼーションアッセイの結果を示す。

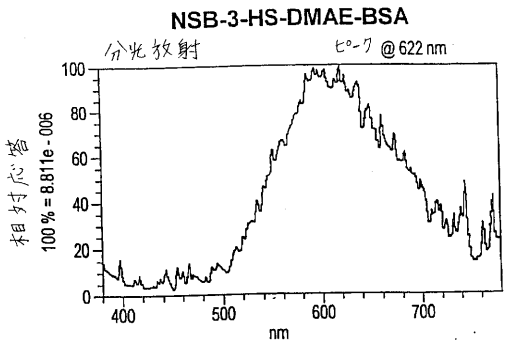
【図１Ａ】



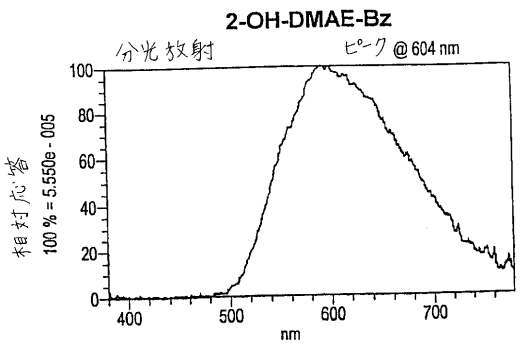
【図１Ｂ】



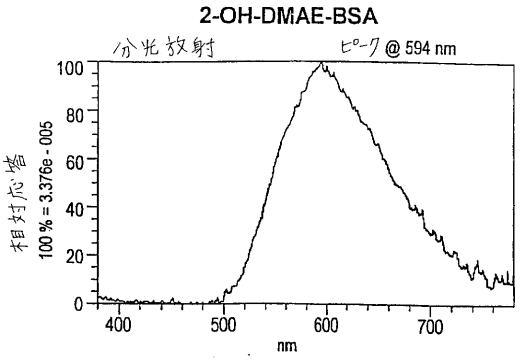
【図１Ｃ】



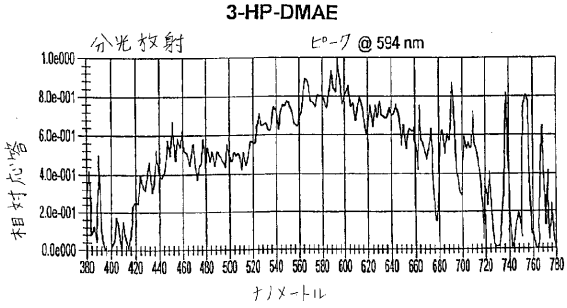
【図１Ｄ】



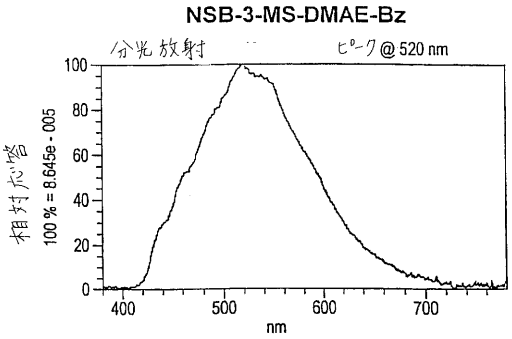
【図１Ｅ】



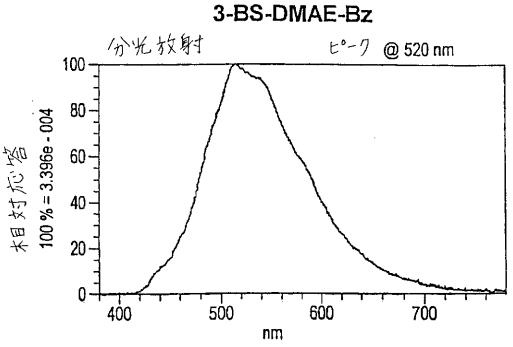
【図１Ｆ】



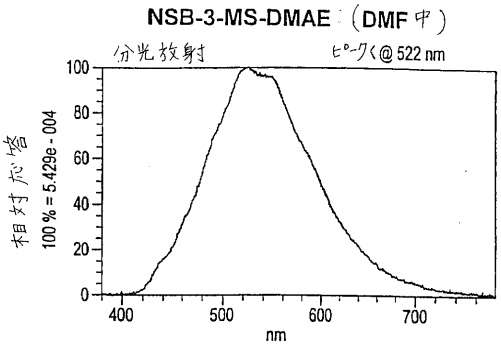
【図１Ｇ】



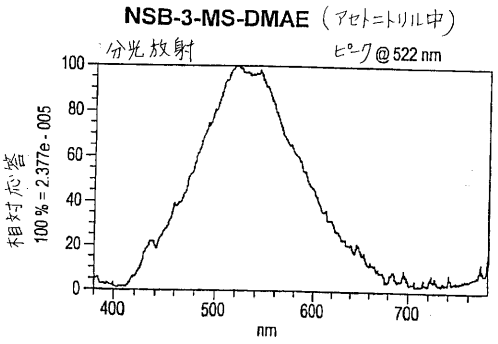
【図１Ｈ】



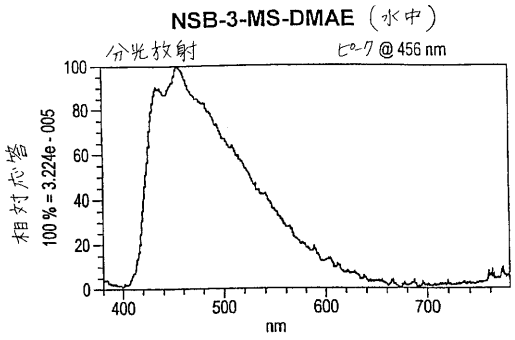
【図１Ｉ】



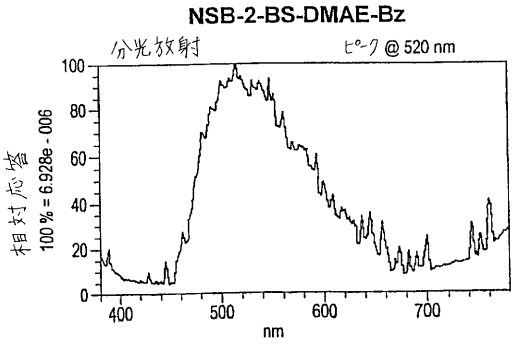
【図１Ｊ】



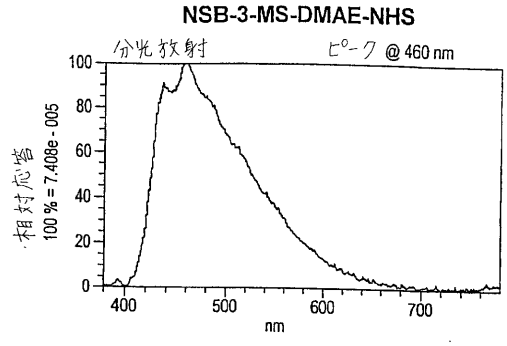
【図１Ｋ】



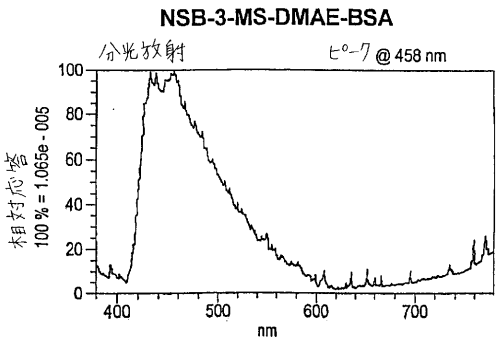
【図１Ｌ】



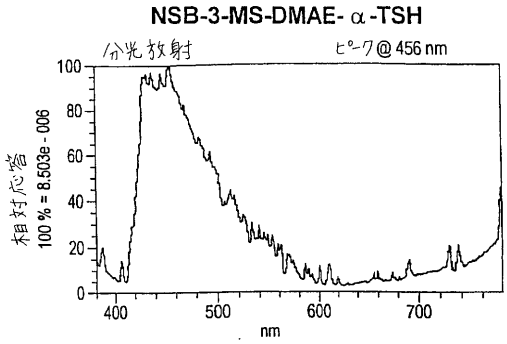
【図１Ｍ】



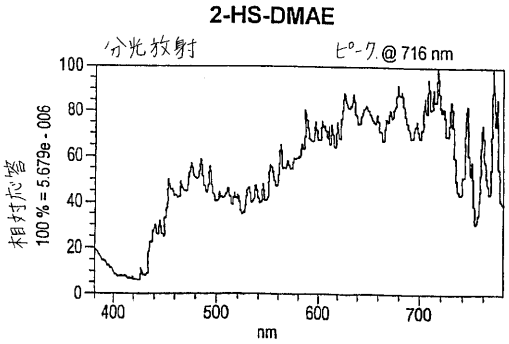
【図１Ｎ】



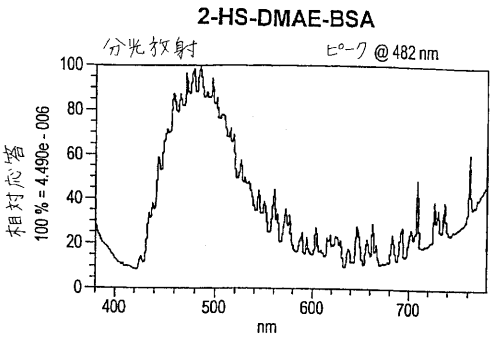
【図１Ｏ】



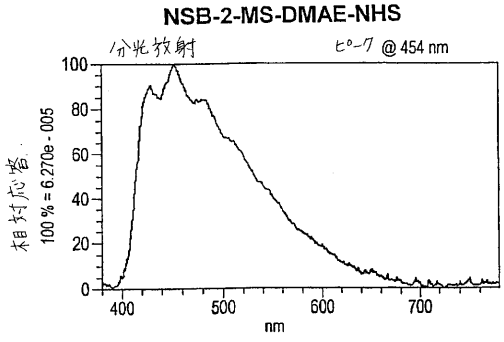
【図１Ｐ】



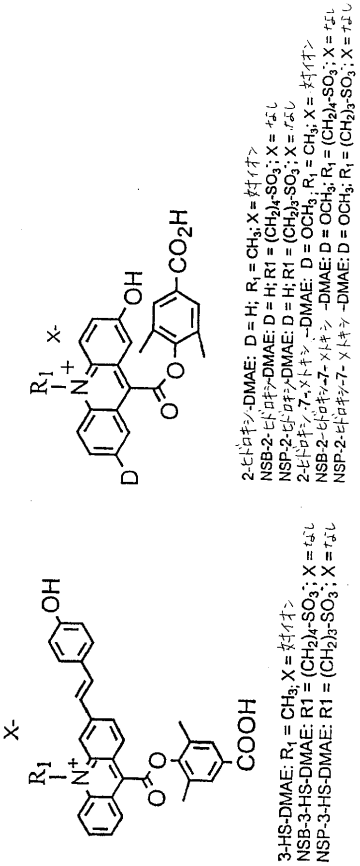
【図１Ｑ】



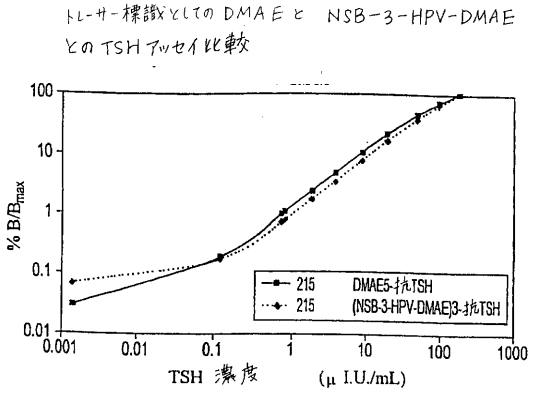
【図１Ｒ】



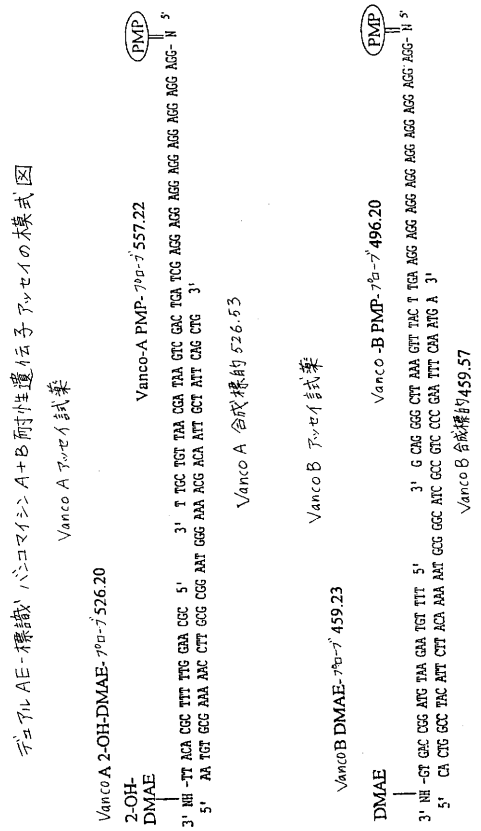
【図２】



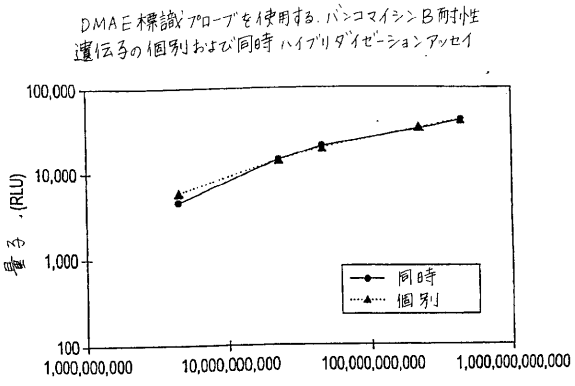
【図３】


トレーサー標識としてのDMAEとNSB-3-HPV-DMAEとのTSHアッセイ比較
% B/Bmax
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
TSH 濃度 (μ I.U./mL)
215 DMAE5-抗TSH
215 (NSB-3-HPV-DMAE)3-抗TSH

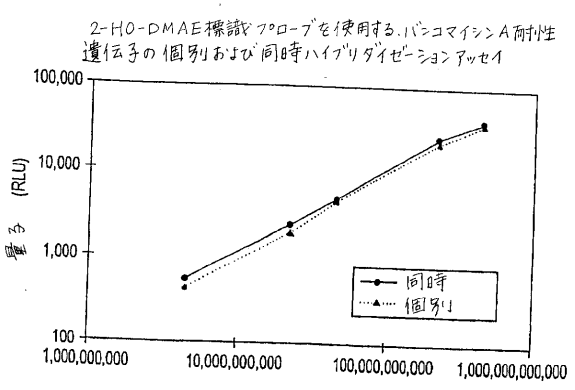
【図４】


デュアルAE-標識バンコマイシンA+B耐性遺伝子アッセイの模式図
Vanco A アッセイ試薬
Vanco A 2-OH-DMAE-プローブ526.20
2-OH-DMAE
PMP
Vanco-A PMP-プローブ557.22
3' NH -TT ACA CGC TTT TTG GAA CGC 5'
5' AA TGT GCG AAA AAC CTT GCG CGG AAT GGG AAA ACG ACA AAT GCT AAT CAG CTG 3'
Vanco A 合成標的526.53
Vanco B アッセイ試薬
Vanco B DMAE-プローブ459.23
DMAE
PMP
Vanco-B PMP-プローブ496.20
3' NH -GT GAC CGG ATG TAA GAA TGT TTT 5'
5' CA CTG GCC TAC ATT CTT ACA AAA AAT GCG GGC ATC CCC GTC CCC GAA TTT CAA ATG A 3'
3' G CAG GGG CTT AAA GAT TAC T TGA AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG- N 5'
Vanco B 合成標的459.57

【図５】


DMAE標識プローブを使用する、バンコマイシンB耐性遺伝子の個別および同時ハイブリダイゼーションアッセイ
量子 (RLU)
100,000
10,000
1,000
100
1,000,000,000
10,000,000,000
100,000,000,000
1,000,000,000,000
同時
個別

【図６】


2-HO-DMAE標識プローブを使用する、バンコマイシンA耐性遺伝子の個別および同時ハイブリダイゼーションアッセイ
量子 (RLU)
100,000
10,000
1,000
100
1,000,000,000
10,000,000,000
100,000,000,000
1,000,000,000,000
同時
個別

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***15/09***	***(2006.01)***	C12N	15/00	ZNAA
C12Q	***1/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A
G01N	***21/76***	***(2006.01)***	G01N	21/76	
G01N	***33/58***	***(2006.01)***	G01N	33/58	Z
C07K	*14/765*	*(2006.01)*	C07K	14/765	
C07K	*16/26*	*(2006.01)*	C07K	16/26	
G01N	*33/532*	*(2006.01)*	G01N	33/532	B

(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 ０３１０４, マンチェスター, マデリン ロード ７７
(72)発明者 ジアン, キンピン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１５３２, ノースボロー, ストラットン ウェイ １４
(72)発明者 シャープ, デイビッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０３５, フォックスボロー, クロス ストリート ６１
(72)発明者 ロウ, セイ－ジョン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０９０, ウエストウッド, フォーブズ ロード １５

審査官 福井 悟

(56)参考文献 特開昭６３－１０１３６８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07D 215/00-227/12
C07D 401/12
CA/REGISTRY(STN)