

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3791930号
(P3791930)

(45) 発行日 平成18年6月28日(2006.6.28)

(24) 登録日 平成18年4月14日(2006.4.14)

(51) Int.C1.

F 1

GO 1 N 33/58 (2006.01)
GO 1 N 33/551 (2006.01)GO 1 N 33/58
GO 1 N 33/551

請求項の数 52 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願平9-531989
(86) (22) 出願日	平成9年3月5日(1997.3.5)
(65) 公表番号	特表2001-507787(P2001-507787A)
(43) 公表日	平成13年6月12日(2001.6.12)
(86) 國際出願番号	PCT/US1997/003653
(87) 國際公開番号	W01997/033176
(87) 國際公開日	平成9年9月12日(1997.9.12)
審査請求日	平成16年2月10日(2004.2.10)
(31) 優先権主張番号	08/611,347
(32) 優先日	平成8年3月6日(1996.3.6)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	メソ スケイル テクノロジーズ、エルエルシー
	アメリカ合衆国 メリーランド、ガイサズバーグ、ガイサーロード 9238
(74) 代理人	弁理士 浅村 眞
(74) 代理人	弁理士 浅村 肇
(74) 代理人	弁理士 池田 幸弘
(74) 代理人	弁理士 長沼 晉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ルミネセンスアッセイにおける黒鉛ナノチューブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ルミネセンスを発生するように誘導されることができるラベル化合物を含む物質が付着した黒鉛ナノチューブであって、該物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
- (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
- (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分、からなる群から選ばれる、上記黒鉛ナノチューブ。

【請求項 2】

前記ルミネセンスが電気化学ルミネセンスである、請求項 1 記載の黒鉛ナノチューブ。

10

【請求項 3】

前記成分が酵素バイオセンサーである、請求項 1 記載の黒鉛ナノチューブ。

【請求項 4】

サンプル中に存在する問題の分析物を検出すための組成物であって、

- (i) 官能基を含有する黒鉛ナノチューブと、

(ii) 前記官能基に結合した物質であって、分析物に結合することができるか、又は分析物の結合相手に結合することに関して分析物と競合することができる該物質とを含み、該物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、及び

(ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、

20

からなる群から選ばれる、上記組成物。

【請求項 5】

更に、分析物に結合したアッセイ実行物質を含み、前記アッセイ実行物質が、ルミネセントラベル化合物を含む、請求項 4 記載の組成物。

【請求項 6】

サンプル中に存在する問題の分析物に関して結合アッセイを実施する方法であって、該工程は下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
- (ii) ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物を含むアッセイ実行物質と、
- (iii) 第 2 の物質に結合した複数個の官能化黒鉛ナノチューブであって、該第 2 の物質は前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである、上記複数個の官能化黒鉛ナノチューブ、
とを含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記複数個の黒鉛ナノチューブの少なくとも 1 つと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；
- (c) 前記複合体を測定帯に収集する工程と；
- (d) 前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (e) 発生したルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程と

を含み、前記第 2 の物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
- (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
- (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分

からなる群から選ばれる、上記方法。

【請求項 7】

サンプル中に存在する問題の分析物に関して結合アッセイを実施する方法であって、該方法は下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
- (ii) ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物を含むアッセイ実行物質であって、前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである上記アッセイ実行物質、と
- (iii) 第 2 の物質に結合した複数個の官能化ナノチューブであって、該第 2 の物質は前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである、上記複数個の官能化黒鉛ナノチューブ、
とを含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記複数個の官能化黒鉛ナノチューブの少なくとも 1 つと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；
- (c) 前記複合体中の前記ラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (d) 発生したルミネセンスを測定して、前記サンプル中の前記問題の分析物を測定又は検出する工程と

を含み、該第 2 の物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
- (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
- (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分

からなる群から選ばれる、上記方法。

【請求項 8】

前記複合体が電極表面に収集される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

電極表面での電気化学ルミネセンスの測定に基づいて、サンプル中に存在する問題の分析物に関する結合アッセイを実施する方法であって、該方法は下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
 - (ii) 電気化学ルミネセンスを発生するように誘導されることができるラベル化合物を含むアッセイ実行物質であって、前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができる上記アッセイ実行物質、と
 - (iii) 第2の物質に結合した複数個の官能化黒鉛ナノチューブであって、該第2の物質は前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである上記複数個の官能化黒鉛ナノチューブ、と
- を含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記複数個の黒鉛ナノチューブの少なくとも1つと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；
- (c) 前記複合体を収集する工程と；
- (d) 前記収集された複合体を電極表面と接触させ、前記電極に電圧を印加することによって、前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (e) 電極表面において発生したルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程と

を含み、該第2の物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
 - (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
 - (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分
- からなる群から選ばれる、上記方法。

【請求項10】

電極表面での電気化学ルミネセンスの測定に基づいて、サンプル中に存在する問題の分析物に関する結合アッセイを実施する方法であって、該方法は下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
 - (ii) 電気化学ルミネセンスを発生するように誘導されることができるラベル化合物を含むアッセイ実行物質であって、前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができる上記アッセイ実行物質と、
 - (iii) 第2の物質に結合した複数個の磁気反応性の懸濁黒鉛ナノチューブであって、該第2の物質は前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである上記複数個の磁気反応性の懸濁黒鉛ナノチューブと
- を含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記複数個の黒鉛ナノチューブの少なくとも1つと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；
- (c) 前記黒鉛ナノチューブ上に磁界を印加することによって、前記複合体を収集する工程と；
- (d) 前記収集された複合体を電極表面と接触させ、前記電極に電圧を印加することによって、前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (e) 電極表面において発生したルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程と

を含み、該第2の物質は

- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
 - (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
 - (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分
- からなる群から選ばれる、上記方法。

【請求項11】

前記磁界の印加が前記複合体を前記電極の表面に収集させる、請求項10記載の方法。

【請求項12】

物質に結合した官能化黒鉛ナノチューブと、

下記成分：

- (a) 電解質；
- (b) E C L 部分を含有するラベル化合物；
- (c) 問題の分析物又は問題の分析物の類似体；
- (d) 問題の分析物の結合相手又はその類似体の結合相手；
- (e) (c) 又は (d) と反応することができる反応性成分；
- (f) 還元体；及び
- (g) 電気化学ルミネセンス発生反応強化剤、但し任意の試薬組成物中に含有される2種類の成分が、予定のアッセイにおけるそれらの機能を損なわないように、貯蔵中に相互に反応性でない。

から成る群から選択される少なくとも1種類の他の成分とを含む、微粒子に基づく結合アッセイに試薬として用いるための組成物であって、前記物質は
(i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
(ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
(iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分
 からなる群から選ばれる、上記組成物。

【請求項13】

磁気反応性黒鉛ナノチューブを含有する、請求項12記載の試薬。

【請求項14】

結合反応と電気化学ルミネセンス現象の測定に基づくアッセイのためのアッセイ試薬であって、該試薬は下記成分：

- (a) 電解質；
- (b) 第1の物質に結合した複数個の磁気反応性官能化黒鉛ナノチューブであって、該第1の物質は前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができるものである上記複数個の磁気反応性官能性黒鉛ナノチューブ；及び
- (c) 電気化学ルミネセンス特性を有する化学的部分を含むアッセイ実行物質であって、前記分析物に直接的又は間接的に結合することができるか、又は前記分析物と競合することができる上記アッセイ実行物質を含み、前記第1の物質は
- (i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、
- (ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び
- (iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分

からなる群から選ばれる、上記アッセイ試薬。

【請求項15】

サンプル中に存在する問題の分析物に関してアッセイを実施する方法であって、下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
- (ii) ルミネセンスを発生するように誘導される能够するラベル化合物に結合する成分に結合した官能化黒鉛ナノチューブであって、前記成分が問題の分析物の基質である前記ナノチューブと
を含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記分析物に前記成分を切断させる条件下で、前記組成物をインキュベートする工程と；
- (c) 前記黒鉛ナノチューブを前記組成物から分離する工程と；
- (d) ラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (e) 発生したルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程
とを含む上記方法。

【請求項16】

前記ラベル化合物が電気化学ルミネセンスラベルである請求項1記載の黒鉛ナノチューブ。

【請求項 17】

前記電気化学ルミネセンスラベルが希土類金属又は遷移金属を含む請求項16記載の黒鉛ナノチューブ。

【請求項 18】

前記電気化学ルミネセンスラベルが、ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子を含む請求項16記載の黒鉛ナノチューブ。

【請求項 19】

前記ラベル化合物が

(a) ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子、及び

(b) 窒素含有の、複素環状、芳香族多座金属リガンド

を含む請求項1記載の黒鉛ナノチューブ。

10

【請求項 20】

前記物質が、抗体、タンパク質レセプター、アビシン、ストレプタビシン、プロテインA、プロテインG、ビオチン又は核酸を含む請求項1記載の黒鉛ナノチューブ。

【請求項 21】

前記ナノチューブが磁気反応性である請求項1記載のナノチューブ。

【請求項 22】

ラベル化合物を含むアッセイ実行物質を更に含む請求項5記載の組成物。

【請求項 23】

前記ラベル化合物が電気化学ルミネセンスラベルである請求項22記載の組成物。

20

【請求項 24】

前記電気化学ルミネセンスラベルが希土類金属又は遷移金属を含む請求項23記載の組成物。

【請求項 25】

前記ラベル化合物が、ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子を含む請求項24記載の組成物。

【請求項 26】

前記ラベル化合物が

(a) ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子、及び

(b) 窒素含有の、複素環状、芳香族多座金属リガンド

30

を含む請求項22記載の組成物。

【請求項 27】

前記物質が、抗体、タンパク質レセプター、アビシン、ストレプタビシン、プロテインA、プロテインG、ビオチン又は核酸を含む請求項4記載の組成物。

【請求項 28】

前記アッセイ実行物質が

(i) 前記問題の分析物の特定の結合相手；及び

(ii) 追加された問題の分析物又は前記問題の分析物の結合相手に結合することに関する前記問題の分析物と競合する前記問題の分析物の追加された類似体

からなる群から選択される請求項22記載の組成物。

40

【請求項 29】

前記物質が前記官能基に共有結合的に結合している請求項4記載の組成物。

【請求項 30】

前記物質がビオチン-ストレプタビシン相互作用を含む結合を介して前記ナノチューブに結合している請求項4記載の組成物。

【請求項 31】

電気化学ルミネセンス結合アッセイを実施するためのアッセイ試薬であって、該アッセイ試薬は一つ又は複数の容器中に、

(a) 第1の物質に結合した黒鉛ナノチューブ；及び

(b) ラベル化合物を含むアッセイ実行物質

50

を含み、前記第1の物質は

(i) 追加された問題の分析物又は該分析物の追加された類似体、

(ii) 該分析物の結合相手又は該類似体の結合相手、及び

(iii) (i) 又は (ii) と結合することができる反応成分

からなる群から選ばれるものである、上記アッセイ試薬。

【請求項32】

前記ラベル化合物が電気化学ルミネセンスラベルである請求項31記載のアッセイ試薬。

【請求項33】

前記ラベル化合物が希土類金属原子又は遷移金属原子を含む請求項31記載のアッセイ試薬。 10

【請求項34】

前記ラベル化合物が、ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子を含む請求項31記載のアッセイ試薬。

【請求項35】

前記ラベル化合物が

(a) ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子、及び

(b) 窒素含有の、複素環状、芳香族多座金属リガンド

を含む請求項31記載のアッセイ試薬。

【請求項36】

前記第1の物質及び／又は前記アッセイ実行物質が、抗体、タンパク質レセプター、アビジン、ストレプタビシン、プロテインA、プロテインG、ビオチン又は核酸を含む請求項31記載のアッセイ試薬。 20

【請求項37】

前記第1の物質が前記ナノチューブに結合している、及び／又は前記アッセイ実行物質がビオチン・ストレプタビシン相互作用を含む結合を介して前記ラベル化合物に結合している請求項31記載のアッセイ試薬。

【請求項38】

前記ナノチューブが磁気反応性である請求項31記載のアッセイ試薬。

【請求項39】

前記アッセイ実行物質及び／又は前記第2の物質が

(i) 前記問題の分析物の特定の結合相手；及び

(ii) 追加された問題の分析物又は前記問題の分析物の結合相手に結合することに関して前記問題の分析物と競合する前記問題の分析物の追加された類似体からなる群から選択される請求項6記載の方法。 30

【請求項40】

前記ラベル化合物が電気化学ルミネセンスラベルである請求項6記載の方法。

【請求項41】

前記ラベル化合物が希土類金属原子又は遷移金属原子を含む請求項6記載の方法。

【請求項42】

前記ラベル化合物が、ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子を含む請求項6記載の方法。 40

【請求項43】

前記ラベル化合物が

(a) ルテニウム、オスミウム及びレニウムからなる群から選択される金属原子、及び

(b) 窒素含有の、複素環状、芳香族多座金属リガンド

を含む請求項6記載の方法。

【請求項44】

前記複合体を収集する工程を更に含む請求項6記載の方法。

【請求項45】

前記アッセイ実行物質及び／又は前記第2の物質が、抗体、タンパク質レセプター、アビ

50

ジン、ストレプタビシン、プロテインA、プロテインG、ビオチン又は核酸を含む請求項6記載の方法。

【請求項46】

前記アッセイ実行物質が前記ラベル化合物に結合している、及び／又は前記第2の物質がビオチン・ストレプタビシン相互作用を含む結合を介して前記ナノチューブに結合している請求項6記載の方法。

【請求項47】

電極表面で前記ナノチューブを収集する工程を更に含む請求項6記載の方法。

【請求項48】

前記問題の分析物が酵素であり、前記アッセイ実行物質及び／又は前記第2の物質が前記酵素の基質を含む請求項6記載の方法。 10

【請求項49】

前記酵素は前記ナノチューブから前記ラベル化合物を放出し、及び／又は前記ナノチューブから前記物質を放出するように前記基質を切断する請求項48記載の方法。

【請求項50】

前記ナノチューブが磁気反応性である請求項6記載の方法。

【請求項51】

(i) 電気化学ルミネセンスラベル；(ii) 酵素；及び(iii) 酵素コファクターからなる群から選択される少なくとも2種類の成分に結合した黒鉛ナノチューブ。 20

【請求項52】

酵素バイオセンサーに結合した黒鉛ナノチューブであって、前記酵素バイオセンサーが電気化学ルミネセンスを発生するように誘導することができるラベル化合物を含む上記黒鉛ナノチューブ。

【発明の詳細な説明】

本出願は、1994年11月30日に出願されたMasssey等の同時係属出願第08/346,832号の一部継続であり、これは1993年11月24日に出願された出願第08/158,193号の継続であり、これは1991年2月6日に出願された出願第07/652,427号の継続かつ、1988年11月3日に出願され、現在放棄されている「電気化学ルミネセンスアッセイ」なる名称の出願第7/266,882号の継続である、1990年6月18日に出願された出願第07/539,389号の一部継続である。 30 本出願はまた、1994年12月8日に出願されたFischer等の「官能化ナノチューブ」なる名称の同時係属出願第08/352,400号の一部継続である。これらの出願の内容は本明細書に援用される。

発明の分野

本出願は一般に、結合アッセイをおこなうための方法と装置、より詳しくは、アッセイ系の1つ以上の標識成分によって放出されるルミネセンスを測定することによって問題の分析物の存在を測定する結合アッセイに関する。さらに詳しくは、本発明は、ルミネセンス成分がアッセイ組成物中で濃縮され、検出系に集積されてから、電気化学ルミネセンスを生じる、改良された感度を有する、精密で、再現可能であり、正確な、均質又は不均質な特異的結合アッセイに関する。 40

発明の背景

生化学的及び生物学的物質中の問題の分析物を検出し、定量するために、非常に多くの方法と装置が開発されている。微量の微生物、薬剤、ホルモン、ウイルス、抗体、核酸及び他のタンパク質を測定することができる方法と装置は、研究者と臨床医にとって非常に貴重である。

当該技術分野の大部分は周知の結合反応、例えば、抗原・抗体反応、核酸ハイブリダイゼーション方法、及びタンパク質・リガンド系に基づいて開発されている。多くの生化学的及び生物学的結合系における高度な特異性は、研究及び診断において重要なアッセイ方法とアッセイ系をもたらしている。典型的に、問題の分析物の存在は、1種類以上の結合物質に付着した観察可能な“ラベル”的有無によって実証される。生化学的、化学的及び電

気化学的手段を通してルミネセンスを発するように形成することができるラベルが特に重要である。“フォトルミネセンス”は、物質が電磁線を吸収したときにルミネセンスを発するように物質を誘導するプロセスである。蛍光と燐光とはフォトルミネセンスの種類である。“化学ルミネセンス”プロセスはエネルギーの化学的転移によるルミネセンス発生種の形成を必然的に伴う。“電気化学ルミネセンス”はルミネセンス発生種の電気化学的形成を必然的に伴う。

問題の分析物を含有するサンプルに化学ルミネセンスラベルで標識した反応物を混合する化学ルミネセンスアッセイ方法が開発されている。反応混合物をインキュベートすると、標識反応物の一部が分析物に結合する。インキュベーション後に、混合物の結合部分と非結合部分とを分離し、いずれかの部分又は両方の部分中のラベルの濃度を化学ルミネセンス方法によって測定することができる。一方の部分又は両方の部分で測定された化学ルミネセンスレベルは、生物学的サンプル中の問題の分析物の量を表示する。
10

電気化学ルミネセンス(E C L)アッセイ方法は、化学ルミネセンス方法の改良である。電気化学ルミネセンスアッセイ方法は問題の分析物の存在と濃度の鋭敏で正確な測定を可能にする。このような方法では、ルミネセンスを誘発するためにボルタメトリック(volta metric)作用電極に、インキュベートしたサンプルを暴露させる。適当な化学的環境において、特定の時間に特定の方法で作用電極に印加された電圧によって、このような電気化学ルミネセンスが誘発される。ラベルによって発生された光は測定され、分析物の存在又は量を表示する。このような E C L 方法についてのさらに詳細な説明に関しては、P C T 公開出願 U S 8 5 / 0 1 2 5 3 (W O 8 5 / 0 2 7 3 4)、P C T 公開出願 U S 8 7 / 0 20 0 9 8 7 及び P C T 公開出願 U . S . 8 8 / 0 3 9 4 7 が参照される。上記出願の開示は参考することにより本明細書中に取り込まれる。

アッセイ操作中に分離工程を必要としないで電気化学ルミネセンスアッセイをおこない、正確で鋭敏な測定がなされうるように、分析物の種々な濃度におけるシグナル調節(signal modification)を最大にすることが望ましい。非分離アッセイの先行技術方法のなかに、アッセイサンプル中に懸濁した微粒状物質を用いて、アッセイの1種類以上の結合成分に結合させる方法がある。

米国出願第 5 3 9 , 3 8 9 号(P C T 公開出願 U . S . 8 9 / 0 4 9 1 9)は、不活性な微粒状物質がアッセイ系の結合性反応物質の1種類に特異的に結合する、ルミネセンス現象に基づく、鋭敏で、特異的な結合アッセイ方法を教示する。このアッセイ方法は不均質な(1つ以上の分離工程)アッセイフォーマットでおこなうことができるが、均質な(分離なし)アッセイフォーマットで最も有利におこなうことができる。
30

U . S . 8 9 / 0 4 9 1 9 は、ルミネセンス発生現象の測定のための結合反応に基づくアッセイ用組成物であって、アッセイ混合物の成分に結合することができる表面を有する複数個の懸濁粒子を包含する組成物に関する。他の態様では、これはこの発明のアッセイ組成物を用いてアッセイ方法をおこなうことができる、サンプル中の問題の分析物の検出及び定量系に関する。この系はアッセイ媒質中のラベル化合物を誘導してルミネセンスを発生させる手段と、このルミネセンスを測定して、サンプル中の分析物の存在を検出する手段とを包含する。

電気化学ルミネセンス発生部分が結合したアッセイ系の成分が懸濁した微粒状物質に結合することが、その成分に結合した電気化学ルミネセンス発生部分によって発生されるルミネセンスシグナルの強度を非常に調節し、それによってアッセイ系の特異的結合反応をモニターする手段を提供することが判明している。懸濁粒子は、これらの懸濁微粒状物質に結合しない状態で留まる系成分に結合した電気化学ルミネセンス発生部分によって発生されるルミネセンスシグナルの強度に殆ど又は全く影響しないことが発見されている。
40

したがって、U . S . 8 9 / 0 4 9 1 9 はサンプル中の問題の分析物の検出方法であって、(1)(a)問題の分析物を含有すると疑われるサンプルと、(b)(i)問題の分析物又は問題の分析物の類似体と、(ii)問題の分析物又はその前記類似体の結合対と、(iii)(i)又は(ii)と結合可能な反応成分とから成る群から選択されるアッセイ実行物質(assay-performance-substance)であって、その1種類が、ルミネセンスを発生する
50

ように誘導することができる化学的部分を有するラベル化合物に結合するアッセイ実行物質と、(c) (b)の(i)、(ii)及び(iii)において定義された分析物及び／又は物質と特異的に結合することができる複数個の懸濁粒子とを含む組成物を形成する工程と；(2)該組成物をインキュベートして、粒子と前記ラベル化合物とを含む複合体(complex)を形成する工程と；(3)ラベル化合物を誘導してルミネセンスを発生させる工程と；(4)該組成物によって発生されるルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を検出する工程とを包含する。同じ方法を用いて、アッセイ組成物のルミネセンスを、既知量の分析物を含有する組成物のルミネセンスと比較することによって、サンプル中の分析物の量を定量することができる。

天然物又は合成物のいずれでもよい、問題の分析物の類似体は、分析物に匹敵する結合性を有する化合物であるが、より高い又はより低い結合能力を有する化合物をも包含する。この発明に用いるために適した結合対は周知である。例は抗体、酵素、核酸、レクチン、補因子及び受容体である。分析物若しくはその類似体及び／又はそれらの結合対と結合可能な反応性成分は、二次抗体又は例えればプロテインA若しくはプロテインBのようなタンパク質でありうるか又はアビジン若しくはビオチン若しくは、結合反応に入ることが当該技術分野で知られた他の成分であることができる。

特異的結合対に結合しているか結合していないかに拘わらず、ラベル化合物をボルタメトリック作用電極に暴露させることによって誘導される電気化学ルミネセンス(ECL)から、ルミネセンスが生じることが有利である。ECL反応性混合物は、特定の時間に、特定の方法で作用電極に印加される電圧によって発光するように制御可能に誘発されて、光を発生する。可視光の発生が有利な特徴であるが、組成物又は系は他の種類の電磁線、X線、マイクロウェーブ等を発生することもできる。“電気化学ルミネセンス”、“電気化学ルミネセンスの”、“電気化学ルミネセンスを発生する(electrochemiluminescence)”、“ルミネセンス”、“ルミネセンスの”及び“ルミネセンスを発生する(luminesce)”なる用語の使用は、光及び他の形式の電磁線の発生を包含する。

U.S.89/04919に教示される方法は、研究及び臨床的設定においておこなわれる多様なアッセイにおける極度に少量の分析物の検出と定量を可能にする。しかし、研究者及び臨床医の要求は、これらの方針によっておこなわれるアッセイの検出限界を下げて、これらのアッセイの感度を高めること及びアッセイをおこなうことができる速度を高めることを絶対必要にする。標識種に測定工程を受けさせる前に、標識種を濃縮することによって標識種からのシグナルを高めるための種々な方法が当該技術分野で知られている。例えば、米国特許第4,652,333号では、蛍光ラベル、燐光ラベル又は原子蛍光ラベルで標識した粒子をミクロ濾過によって濃縮する。

測定前の標識免疫化学種を例えれば磁気反応性標識粒子を測定器の表面に引き出すことによって濃縮することも、当該技術分野で知られている。例えば、米国特許第4,731,337号、第4,777,145号及び第4,115,535号では、このような粒子は器壁に引き寄せられてから、照射されて、蛍光の発光を刺激する。

米国特許第4,945,045号では、粒子は磁気電極上に濃縮される。電気化学的反応が電極でおこなわれ、この反応は標識化学メディエーターによって促進される。免疫化学的結合反応は、結合がおこなわれるときに、調節されたシグナルを生じるメディエーターの効率を変化させる。

表面励起、例えれば電気化学ルミネセンスの如何なる機構的説明にも縛られる訳ではないが、固相複合体上のラベルが電極において酸化されなければならないと考えられる。これは、電子がラベルから電極に移動することを必要とする。電子がこの“ジャンプ”を、電子が空隙(そのポテンシャルエネルギーが非常に高い領域、例えれば溶液)を、ポテンシャルエネルギー・バリアーを飛び“越える”必要なく、通過するトンネリングとして知られる現象によっておこなうと考えられる。電子はエネルギー・バリアーを通り抜けることができるので、1つの分子から他の分子へ又は1つの分子から電極へ、付加的なエネルギー供給なしに、移動することができる。しかし、このトンネリング現象は非常に短い距離に対して作用することができるに過ぎない。2つの種の間の距離が増加するにつれて、トンネリン

10

20

30

40

50

グ現象の見込みは指数関数的に減衰する。この距離が 25 (2.5 nm) 未満であるならば、2つの種の間で生ずるトンネリング現象の確率はかなり高いが、この距離がこれより大きいならば、この確率はかなり低い。25 の距離は当業者によって用いられる経験によって割り出されるが、絶対的な限定ではない。

したがって、電極表面から 25 であるような ECL ラベルのみが ECL プロセスに関与すると期待されることがある。電極表面から 25 の範囲内である粒子の面積は通常、極度に小さい。

したがって、粒子表面からの ECL が如何なる有意な程度にも測定可能であるとは予想されない。さらに、ECL プロセスによって発生される光は光電子増倍管に達するために粒子を通過しなければならない。粒子は本質的に不透明性である（それらの濃縮懸濁液は黒色である）ので、ECL によってかなりの量の光が発生されたとしても、その光が粒子を通過して、光電子増倍管によって測定されることができるとは期待することができない。

1970 年代以降、黒鉛ナノチューブ(graphitic nanotube)とフィブリルは多様な用途のための重要な物質であると特定されている。1ミクロンより小さい黒鉛フィブリルは時には気相成長(vapor grown)炭素纖維と呼ばれる。炭素フィブリルは直径 1.0 μ 未満、好ましくは 0.5 μ 未満、さらにより好ましくは 0.2 μ 未満を有する蠕虫状炭素析出物(ermicular carbon deposit)である。これらは多様な形態で存在し、金属表面における種々な炭素含有ガスの触媒分解によって製造されている。このような蠕虫状炭素析出物は、ほぼ電子顕微鏡検査法の出現以来、観察されている。良好な以前の概観と参考は、Baker 10 と Harris の Chemistry and Physics of Carbon, Walker と Thrower 編集, 14巻, 1978, 83 頁に見い出され、これは参考することにより本明細書に取り込まれる。

Rodriguez, N. の J. Mater. Research, 8巻, 3233 頁(1993)も参考のこと、これは参考することにより本明細書に取り込まれる。

1976 年に、Endo 等(Obelin, A. と Endo, M., J. of Crystal Growth, 32巻(1976), 335~349 頁, 参照することにより本明細書に取り込まれる)は、このような炭素フィブリルが成長する基本的機構を解明している。これらは炭化水素含有ガスの存在下で炭素中に過飽和状態になる金属触媒粒子から生じるのが観察されている。円筒状の規則的な黒鉛コアが押し出されて、これは Endo 等によると、直ちに熱分解出黒鉛(pyrolytically deposited graphite)の外層によって被覆された状態になる。熱分解によるオーバーコートを有する、これらのフィブリルは典型的に 0.1 μ を超える直径、より典型的には 0.2~0.5 μ の直径を有する。

1983 年に、Tennant の米国特許第 4,663,230 号は、熱分解炭素によって汚染されない円筒状の規則的な黒鉛コアを成長させることに成功している。したがって、Tennant の発明はさらに小さい直径、典型的に 35~700 (0.0035~0.070 μ) のフィブリルと、“成長した状態で” 規則的な黒鉛表面へのアクセスを提供する。より不完全な構造であり、熱分解炭素の外層も有さないフィブリル状炭素も成長されている。

フィブリル、バッキーチューブ(buckytube)及びナノファイバー(nanofiber)は、補強剤として商業的に入手可能な連続炭素纖維とは区別される。大きいアスペクト比が望ましいが、不可避に限定されたアスペクト比を有するフィブリルとは対照的に、連続炭素纖維は少なくとも 10^4 、しばしば 10^6 又はそれ以上のアスペクト比(L/D)を有する。連続纖維の直径はフィブリルの直径よりもはるかに大きく、常に $> 1.0 \mu$ 、典型的に 5~7 μ である。

連続炭素纖維は有機先駆体纖維、通常はレーヨン、ポリアクリロニトリル(PAN)及びピッチの熱分解によって製造される。したがって、連続炭素纖維はそれらの構造内にヘテロ原子を包含する。“製造された状態で(as made)” 連続炭素纖維の黒鉛的性質は変化するが、次の黒鉛化工程を受けることができる。黒鉛面の黒鉛化度、配向及び結晶化度の差と、存在する場合の、ヘテロ原子の可能な存在及び基材直径の絶対差とのために

、連続纖維による経験からナノファイバー化学を良好に予測することができない。

Tennant の米国特許第 4,663,230 号は、連続した熱炭素(thermal carbon)オーバーコートを有さず、フィブリル軸に実質的に平行である多重黒鉛外層を有する炭素フィブリルを述べている。このようなものとして、これらのフィブリルはそれらの C - 軸、すなわちそれらの円筒軸に実質的に垂直な、黒鉛の弯曲層の接線に垂直である軸を有するものとして特徴付けられることができる。これらのフィブリルは一般に 0.1 μ 以下の直径と、少なくとも 5 の長さ対直径比とを有する。これらのフィブリルは連続した熱分解炭素オーバーコート、即ち、それらを製造するために用いられたガス供給材料の熱クラッキングから生ずる熱分解による析出炭素を実質的に有さないことが望ましい。

Tennant 等の米国特許第 5,171,560 号(参考することにより本明細書に取り込まれる)は熱オーバーコート(thermal overcoat)を有さず、フィブリル軸に実質的に平行な黒鉛層を有し、前記フィブリル軸上の前記層の突出が少なくともフィブリル直径の 2 倍の距離にわたって伸びるような炭素フィブリルを述べている。典型的に、このようなフィブリルは、実質的に一定直径を有する、実質的に円筒状のナノチューブであり、円筒状黒鉛シートを含み、この円筒状黒鉛シートの C - 軸はそれらの円筒軸に実質的に垂直である。これらのフィブリルは熱分解による析出炭素を実質的に含まず、0.1 μ 未満の直径と、5 より大きい長さ対直径比とを有する。これらのフィブリルはこの発明において最も重要である。

炭素フィブリル凝集体の形成に関するさらなる詳細は、Snyder 等、米国特許出願第 149,573 号(1988 年 1 月 28 日出願)と PCT 出願第 US89/00322 号(1989 年 1 月 28 日出願)(“炭素フィブリル”)WO89/07163 と、Moy 等、米国特許出願第 413,837 号(1989 年 9 月 28 日出願)と PCT 出願第 US90/05498 号(1990 年 9 月 27 日出願)(“フィブリル凝集体とその製造方法”)WO91/05089 との開示に見い出すことができる、これらの全ては本明細書の発明と同じ譲受人に譲渡され、参考することにより本明細書に取り込まれる。

Moy 等の USSN07/887,307(1992 年 5 月 22 日出願)(参考することにより本明細書に取り込まれる)は、種々な巨視的形態(走査電子顕微鏡検査法によって測定)を有する凝集体として製造されたフィブリルを述べている、これらの凝集体においてフィブリルは相互にランダムにからみあって、鳥の巣に類似したフィブリルのからみあつたボール(“BN”)を形成している; 又は実質的に同じ相対配向を有する、直鎖状からやや曲がった若しくはよじれたまでの炭素フィブリルの束から成る、例えばコーム状ヤーン(combed yarn)(“CY”)の外観を有する凝集体として、各フィブリル(個々の曲がり又はよじれに拘らず)の長軸は束の周囲フィブリルの方向と同じ方向に伸びている; 又は相互にゆるくからみあつた、直線状からやや曲がった若しくはよじれたまでのフィブリルの束から成る凝集体として、“目の粗いネット(open net)”(“ON”)構造を形成している。目の粗いネット構造では、フィブリルのからみあい度は、コーム状ヤーン凝集体(個々のフィブリルが実質的に同じ相対配向を有する)において観察されるからみあい度よりも大きいが、鳥の巣のからみあい度よりも小さい。CY 凝集体と ON 凝集体は BN よりも分散されやすく、このことがこれらの凝集体を、構造を通しての均質な性質が望ましい複合体の製造により有用なものにしている。

フィブリル軸上の黒鉛層の突出がフィブリル直径の 2 倍未満の距離にわたって伸びる場合には、黒鉛ナノファイバーの炭素面は、断面において、ヘリンボン外観を呈する。これらはフィッシュボーン(fishbone)フィブリルと名付けられる。Geus の米国特許第 4,855,091 号(参考することにより本明細書に取り込まれる)は、実質的に熱分解オーバーコートを実質的に有さないフィッシュボーンフィブリルの製造方法を提供する。これらの纖維は本発明の実施にも有用である。

上述した触媒的に成長したフィブリルと同様な形態の炭素ナノチューブが、高温炭素アーク中で成長されている(Iijima, Nature, 354, 56, 1991)。これらのアーク成長ナノファイバーは Tennant の以前に触媒的に成長したフィブリルと同じ形態を有する。アーク成長した炭素ナノファイバーも本発明に有用である。

10

20

30

40

50

発明の目的

それ故、有利に高度な発光を得るために、アッセイ実行物質を固定するための大きい表面積を有する粒子を用いるルミネセンスアッセイを提供することが、本発明の目的である。ルミネセンスを発生するように誘導することができる化合物で標識することができる黒鉛ナノチューブ(フィブリル)を用いる組成物とアッセイを提供することも、本発明の目的である。

このようなアッセイに用いるための官能化フィブリルを提供することが、さらなる目的である。

発明の説明用語の定義

“ECL部分”、“金属含有ECL部分”、“ラベル”、“ラベル化合物”及び“ラベル物質”なる用語は、互換可能に用いられる。“ECL部分”、“金属ECL部分”、“有機金属の”、“金属キレート”、“遷移金属キレート”、“稀土類金属キレート”、“ラベル化合物”、“ラベル物質”及び“ラベル”と呼ばれる種を、例えば分析物若しくはその類似体、及びこのような結合対のさらなる結合対又は、分析物、その類似体若しくは上述したような結合対と結合することができる反応性成分のような分子に結合させることができ、本発明の範囲に含まれる。上記種を1種以上の結合対及び/又は1種以上の反応性成分の組合せに結合させることもできる。さらに、結合対、反応性成分、又は1種以上の結合対及び/又は1種以上の反応性成分の組合せに結合した分析物若しくはその類似体に、上記種を結合させることもできる。また、複数種類の上記種を直接又は上述したような他の分子を介して、分析物若しくはその類似体に結合させることも、本発明の範囲内である。簡潔さのために、これらのリガンドをアッセイ実行物質と呼ぶ。

検出及び定量なる用語は“測定”と呼ばれ、定量は基準組成物の調製とキャリブレーションとを必要としうることが理解される。

複合体の収集及び濃縮なる用語は、アッセイ組成物中の複合体の濃縮と、例えば電極表面における複合体の収集とを表すために互換可能に用いられる。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の微粒子に基づく非分離及び分離分析をおこなうためのセルの概略図である。

図2は、図1のセルによって用いるための電圧制御装置の簡略線図である。

図3は、Ru(bpy)₃²⁺-標識ペプチドフィブリル上の特異的酵素加水分解部位を示す概略図である。

図4は、アビジン-フィブリルを用いるDNAプローブ分析の概略図である。

図5は、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-リシンの添加による二官能性フィブリルの製造の反応スキームの概略図である。

図6は、ECLに基づく二官能性バイオセンサーフィブリルを合成するための反応スキームの概略図である。

図7は、ECLに基づく二官能性バイオセンサーフィブリルの概略図である。

図8は、D-グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼによって触媒される反応の概略図である。

図9は、フィブリルに担持されるECLに基づくバイオセンサーを用いる、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼのECL検出を示すグラフである。

図10は、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)に基づくECLバイオセンサーの概略図である。

図11は、Dynamical M450ビーズに固定された(左)及びアルキルフィブリルに固定された(右)、ADHに基づくバイオセンサーの概略図である。

図12は、ビーズ及びフィブリルに固定された酵素バイオセンサーを用いるエタノールのECL検出を示すグラフである。

図13は、カルボキシフィブリルと、2種類の異なる方法によって製造されたPEG-修飾フィブリルとに結合するRu(bpy)₃²⁺の分析のグラフ表示である。

10

20

20

30

40

50

発明の簡単な説明

本発明は、その最も広い実施態様において、ルミネセンスを発生するように誘導されることができるラベル化合物に結合した成分が付着したナノチューブにある。特に、前記ナノチューブは黒鉛ナノチューブであり、前記ルミネセンスは電気化学ルミネセンスである。

1 実施態様において、前記成分は酵素バイオセンサーである。

本発明はまた、サンプル中に存在する問題の分析物を検出するための組成物であって、

(i) 官能基を有する黒鉛ナノチューブと、

(ii) 前記官能基に結合したアッセイ実行物質であって、該分析物に直接的又は間接的に結合することができる上記アッセイ実行物質と

を含む上記組成物にある。

10

1 実施態様では、前記官能基に結合するアッセイ実行物質は、次に分析物に結合する。組成物はさらに、分析物に結合する第2アッセイ実行物質であって、ルミネセンスを発生するように誘導されることができるラベル化合物に結合する前記第2アッセイ実行物質を含む。

アッセイ実行物質は、

(i) 添加された問題の分析物又は添加された前記分析物の類似体；

(ii) 前記分析物の結合対又は前記類似体の結合対；及び

(iii) (i) 又は(ii) と結合することができる反応性成分

から成る群から選択される少なくとも1種類の物質を含有する。

前記物質(i)、(ii) 又は(iii) のうちの1つは、ルミネセンスを発生するように誘導されることができる化学部分を有するラベル化合物に結合する。

20

おおざっぱにいうと、粒子は官能化フィブリル、即ち、その表面が1種類以上の物質と反応又は接触して、その表面上に異なる化学種を化学的置換又は物理的吸着するための活性部位を生じているフィブリルである。

McCarthy等の米国特許出願第351,967号(1989年5月15日出願)(参照することにより本明細書に取り込まれる)は、フィブリルの表面を酸化するために充分な反応条件(例えば、時間、温度及び圧力)下で、硫酸(H₂SO₄)及び塩素酸カリウム(KClO₃)を包含する酸化剤と、フィブリルを接触させることを含む、炭素フィブリルの表面の酸化方法を述べている。McCarthy等の方法によって酸化されたフィブリルは不均一に酸化されている、即ち、炭素原子がカルボキシル基、アルデヒド基、ケトン基、フェノール基、及び他のカルボニル基によって置換されている。

30

フィブリルは硝酸による処理によっても不均一に酸化されている。国際出願PCT/US94/10168は、官能基の混合物を含有する、酸化されたフィブリルの形成を開示している。Hoogenvad,M.S.等(“新規な炭素担体に担持された金属触媒”、1994年9月、Belgium,Brusselsでの不均質触媒の製造の化学的基礎に関する第6回国際会議で発表)も、フィブリル担持貴金属の製造において、フィブリル表面を硝酸によって最初に酸化することが有利であると発見している。酸によるこのような前処理は炭素担持貴金属触媒の製造における標準的工程であり、この場合に、このような炭素の通常の供給源を想定すると、この前処理は表面を官能化するためと同程度に、表面から望ましくない物質を除去するために役立つ。

40

発表された研究において、McCarthyとBening(Polymer Preprints ACS Div.of Polymer Chem.30(1)420(1990))は、表面が多様な酸化された基を含むことを実証するために、酸化されたフィブリルの誘導体を製造した。かれらが製造した化合物、フェニルヒドラゾン、ハロ芳香族エステル、タリウム(I)塩等は、それらの分析的有用性、例えば、光輝を放つて着色される、又は他の何らかの強くかつ容易に同定され、識別されるシグナルを有するために選択された。

粒子は好ましくは、おおざっぱに、式：

[C_nH_L] - R_m

を有する官能化フィブリルであり、

50

上記式中、nは整数であり、Lは0 . 1 n未満の数であり、mは0 . 5 n未満の数であり、

各Rは同じであり、SO₃H、COOH、NH₂、OH、CHO、CN、COC₁、ハライド、COSH、SH、COOR'、SR'、SiR'₃、Si-(OR')_y-R'_{3-y}、Si-(OSiR'₂)-OR'、R''、Li、AlR'₂、Hg-X、TiZ₂及びMg-Xから選択され、

yは3に等しいか又は3未満の整数であり、

R'はアルキル、アリール、シクロアルキル又はアラルキルであり、

R''はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキル、フルオロアラルキル又はシクロアリールであり、

Xはハライドであり、

Zはカルボキシレート又はトリフルオロアセテートである。

炭素原子、C_nは実質的に一定直径の、実質的に円筒状の、黒鉛ナノチューブの表面炭素である。これらのナノチューブは、5より大きい長さ対直径比と、0 . 5 μ未満、好ましくは0 . 1 μ未満の直径とを有するナノチューブを包含する。これらのナノチューブは、熱分解による析出炭素を実質的に含まない、実質的に円筒状の黒鉛ナノチューブ、より好ましくは、フィブリル直径の少なくとも2倍の距離にわたって伸びるフィブリル軸上の黒鉛層の突出を有することを特徴とするナノチューブ及び/又はそれらのC-軸がそれらの円筒軸に対して実質的に垂直である円筒状黒鉛シートを有するナノチューブであることができる。これらの組成物は、各Rが同一であることで、均一である。

粒子は不均一に置換されたナノチューブをも包含する。これらは式：

[C_nH_L] - R_m

[式中、n、L、m、R及びナノチューブ自体は上記で定義した通りである、但し、各Rは酸素を含有しない、又は各Rが酸素含有基である場合に、COOHは存在しない]で表される組成物を包含する。

式：[C_nH_L] - R_m

[式中、n、L、m、R及びR'は上記と同じ意味を有し、炭素原子は、5より大きい長さ対直径比を有するフィッシュボーンフィブリルの表面炭素原子である]で表される組成物も、本発明の範囲内の粒子として包含される。これらは均一に又は不均一に置換されることができる。好ましくは、ナノチューブは熱分解オーバーコートを含有せず、0 . 5 μ未満の直径を有する。

式：[C_nH_L] - R_m

[式中、n、L、m、R'及びRは上記と同じ意味を有する]

で示される官能化ナノチューブも、本発明の粒子として含まれる。炭素原子、C_nは実質的に一定直径の、実質的に円筒状の、黒鉛ナノチューブの表面炭素である。これらのナノチューブは、5より大きい長さ対直径比と、0 . 5 μ未満、好ましくは0 . 1 μ未満の直径とを有する。これらのナノチューブは、熱分解による析出炭素を実質的に含まないナノチューブでありうる。より好ましくは、ナノチューブは、フィブリル軸上の黒鉛層の突出がフィブリル直径の少なくとも2倍の距離にわたって伸びるようなナノチューブ及び/又はそれらのC-軸がそれらの円筒軸に対して実質的に垂直である円筒状黒鉛シートを有するナノチューブである。

均一に置換されたナノチューブと不均一に置換されたナノチューブの両方において、表面原子C_nは反応する。黒鉛フィブリルの表面層における大抵の炭素原子は、黒鉛におけると同様に、底面炭素である。底面炭素は化学的アタックに対して比較的不活性である。例えば、黒鉛面がフィブリルの周囲に完全に及ぶことができない欠陥部位には、黒鉛面のエッジ炭素原子に類似した炭素原子が存在する(エッジ及び底面炭素の考察に関しては、Urry, Elementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York, 1989を参照のこと)。

欠陥部位では、ナノチューブの下方の内部層のエッジ又は底面炭素が露出されることがある。表面炭素なる用語は、ナノチューブの最外部層の全ての炭素、底面及びエッジ炭素

と、最外部層の欠陥部位において露出されうる下層の炭素、底面及び／又はエッジの両方の炭素を包含する。エッジ炭素は反応性であり、炭素の原子価を満たすために幾らかのヘテロ原子又は基を含有しなければならない。

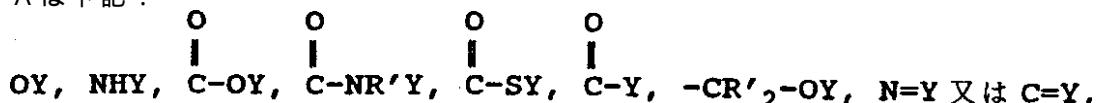
上記置換ナノチューブは有利にはさらに官能化ができる。このような組成物は式：



で示される組成物を包含する、

式中、炭素はナノチューブの表面炭素であり、n、L及びmは上記で定義した通りであり、

Aは下記：



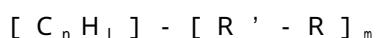
から選択され、

Yはタンパク質、ペプチド、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、若しくは酵素基質、酵素阻害剤或いは酵素基質の遷移状態類似体の適当な官能基であるか、又はR'-OH、R'-NH₂、R'-SH、R'-CHO、R'-CN、R'-X、R'-SiR'₃、R'-Si-(OR')_y-R'_{3-y}、R'-Si-(OSiR'₂)_w-OR'、R'-R''、R'-N-CO、(C₂H₄O)_w-H、-(C₃H₆O)_w-H、(C₂H₄O)_w-R'、-(C₃H₆O)_w-R'及びR'から選択される、及び

wは1より大きく、200より小さい整数である。

炭素原子、C_nは実質的に一定直径の、実質的に円筒状の、黒鉛ナノチューブの表面炭素である。これらのナノチューブは、5より大きい長さ対直径比と、0.1μ未満、好ましくは0.05μ未満の直径とを有するナノチューブを包含する。これらのナノチューブは、熱分解析出炭素を実質的に含まない、実質的に円筒状の黒鉛ナノチューブでありうる。より好ましくは、これらのナノチューブは、フィブリル直径の少なくとも2倍の距離にわたって伸びる、フィブリル軸上の黒鉛層の突出を有することを特徴とする及び／又はこれらのナノチューブは、それらのC-軸がそれらの円筒軸に対して実質的に垂直である円筒状黒鉛シートから構成される。好ましくは、これらのナノチューブは熱オーバーコートを有さず、0.5μ未満の直径を有する。

構造：



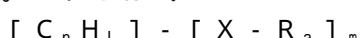
を有する官能性ナノチューブは、式：



[式中、n、L、m、R'及びAは上記で定義した通りである]

で示される組成物を製造するように官能化されることもできる。炭素原子、C_nは実質的に一定直径の、実質的に円筒状の、黒鉛ナノチューブの表面炭素である。これらのナノチューブは、5より大きい長さ対直径比と、0.5μ未満、好ましくは0.1μ未満の直径とを有するナノチューブを包含する。これらのナノチューブは、熱分解析出炭素を実質的に含まない、実質的に円筒状の黒鉛ナノチューブもありうる。より好ましくは、これらのナノチューブは、フィブリル直径の少なくとも2倍の距離にわたって伸びる、フィブリル軸上の黒鉛層の突出を有すること及び／又は、それらのC-軸がそれらの円筒軸に対して実質的に垂直である円筒状黒鉛シートを有することを特徴とする。好ましくは、これらのナノチューブは熱オーバーコートを有さず、0.5μ未満の直径を有する。

本発明の粒子は、その上部にある一定の環状化合物が吸着されるナノチューブも包含する。これらは式：



で示される物質の組成物を含有する、

式中、nは整数であり、Lは0.1n未満の数であり、mは0.5n未満であり、aは0又は10未満の数であり、Xは多核芳香族部分、多複素核(polyheteronuclear)芳香族部

10

20

30

40

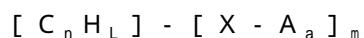
50

分又は金属多複素核(metallocopolyheteronuclear)芳香族部分であり、Rは上記で定義した通りである。炭素原子、C_nは実質的に一定直径の、実質的に円筒状の、黒鉛ナノチューブの表面炭素である。これらのナノチューブは、5より大きい長さ対直径比と、0.5μ未満、好ましくは0.1μ未満の直径とを有するナノチューブを包含する。これらのナノチューブは、熱分解析出炭素を実質的に含まない、実質的に円筒状の黒鉛ナノチューブ、より好ましくは、フィブリル直径の少なくとも2倍の距離にわたって伸びる、フィブリル軸上の黒鉛層の突出を有することを特徴とするナノチューブ及び/又は、それらのC-軸がそれらの円筒軸に対して実質的に垂直である円筒状黒鉛シートを有するナノチューブであることができる。好ましくは、これらのナノチューブは熱オーバーコートを有さず、0.5μ未満の直径を有する。

10

好ましい環状化合物は、CottonとWilkinsonのAdvanced Organic Chemistryの76頁に述べられている平面的な大環状化合物である。吸着のためにより好ましい環状化合物はポルフィリンとフタロシアニンである。

吸着された環状化合物は官能化されることができる。このような組成物は式：



[式中、m、n、L、a、X及びAは上記で定義した通りであり、炭素は上記で定義したような、実質的に円筒状の黒鉛ナノチューブの表面炭素である]
で示される成分を包含する。

上述したように官能化された炭素フィブリルをマトリックスに組み入れることができる。好ましくは、マトリックスは有機ポリマー（例えば、エポキシ、ビスマレイミド、ポリアミド若しくはポリエステル樹脂のような熱硬化性樹脂；反応射出成形樹脂；熱可塑性樹脂；又は例えば天然ゴム、スチレン-ブタジエンゴム又はシス-1,4-ポリブタジエンのようなエラストマー）；無機ポリマー（例えば、ガラスのようなポリマー無機酸化物）；金属（例えば、鉛若しくは銅）；又はセラミック物質（例えば、ポルトランドセメント）である。

20

特定の理論に縛られる訳ではないが、官能化フィブリルは、修飾された表面特性がポリマーとより大きく相容性であるため、又は修飾された官能基（特に、ヒドロキシル基若しくはアミン基）がポリマーに末端基として直接結合するために、ポリマー系中に良好に分散される。このようにして、例えばポリカーボネート、ポリウレタン、ポリエステル又はポリアミド/イミドのようなポリマー系はフィブリルに直接結合し、改良された付着性で、フィブリルを分散されやすくする。

30

炭素フィブリルを強い酸化剤と、前記フィブリルの表面を酸化させるために充分な時間接觸させることによって、さらに、酸化された表面に官能基を加えるために適した反応物と前記フィブリルを接觸させることによって、官能基が炭素フィブリルの表面に導入される。好ましくは、酸化剤は強酸中のアルカリ金属塩素酸塩の溶液から構成される。他の実施態様では、アルカリ金属塩素酸塩は塩素酸ナトリウム又は塩素酸カリウムである。好ましい実施態様では、用いる強酸は硫酸である。酸化のために充分な時間は約0.5時間から約24時間までである。

炭素フィブリルの表面を酸化させるために充分な時間、炭素フィブリルを酸化剤と接觸させ、表面酸化された炭素フィブリルを、炭素フィブリルの表面に官能基を加えるために適した反応物と接觸させ、表面官能化フィブリルを、炭素フィブリルの網状構造を製造するために有効な架橋剤とさらに接觸させることによって、炭素フィブリルの網状構造が製造される。好ましい架橋剤はポリオール、ポリアミン又はポリカルボン酸である。

40

官能化フィブリルは、フィブリルの硬質網状構造の形状でもありうる。酸-官能化フィブリルの良好に分散した、例えば、酸基（フィブリル間）をポリオール又はポリアミンによって架橋させて、硬質網状構造を形成することによって、三次元網状構造を安定化することができる。

フィブリル粒子は、本発明の官能化フィブリルを結合させることによって形成された三次元網状構造をも包含する。これらの複合体は、直接結合又は化学部分を含む1種類以上のリンクによって結合した少なくとも2本の官能化フィブリルを包含する。これらの網状

50

構造は、非常に均一な、等しい孔度の多孔質媒質を含む。

これらのフィブリル間の空隙は孔度と形状の両方において不規則であるが、これらの空隙は孔と見なされることができ、多孔質媒質を特徴付けるために用いる方法によって特徴付けることができる。このような網状構造における空隙のサイズは、フィブリルの分散系の濃度とレベル及び架橋剤の濃度と鎖長さによって制御することができる。

粒子を含む複合体は例えば電極表面に収集されて、そこで電極への電圧印加によって、励起され、ルミネセンスを発生するように誘導される。複合体を測定帯に、即ち、複合体にルミネセンスを発生させることができる表面に収集することによって、本発明を好ましく実施することができるが、本発明は複合体を測定帯に回収して、その後にその帶にルミネセンスを誘導し、測定するための手段をもたらすか又は他の工程を行う方法をも含む。10

複合体の回収は、重力沈降、濾過、延伸分離、又は複合体の一部を形成する磁気反応性粒子の磁気吸引(magnetic attraction)を含めた、幾つかの異なる方法によっておこなうことができる。幾つかの実施態様を以下でさらに詳しく説明する。

本発明はまた、サンプル中に存在する問題の分析物に関する結合アッセイを実施する方法であって、下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
- (ii) ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物に結合した成分を含有するアッセイ実行物質と、
- (iii) アッセイ実行物質に結合した複数個の官能化黒鉛ナノチューブと
を含有する組成物を形成する工程と；20
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記官能化黒鉛ナノチューブと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；
- (c) 前記複合体を測定帯に収集する工程と；
- (d) 表面選択性的励起によって、前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生する
ように誘導する工程と；
- (e) 発生されたルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する
工程と

を含む上記方法にある。

特に、前記複合体は、ルミネセンスを誘導し、前記ルミネセンスを測定するための手段の表面に収集される。30

この方法は有利には、前記複合体が電極表面に収集される、電気化学ルミネセンスの測定に基づく。

本発明はまた、電極表面での電気化学ルミネセンスの測定に基づいて、サンプル中に存在する問題の分析物に関する結合アッセイを実施する方法であって、下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、
- (ii) 電気化学ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物に結合した成分を含有するアッセイ実行物質と、
- (iii) アッセイ実行物質に結合した複数個の官能化黒鉛ナノチューブと
を含有する組成物を形成する工程と；
- (b) 前記組成物をインキュベートして、前記官能化黒鉛ナノチューブと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；40
- (c) 前記複合体を収集する工程と；
- (d) 前記収集された複合体を電極表面と接触させ、前記電極に電圧を印加することによ
って、前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；
- (e) 電極表面において発生されたルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物
の存在を測定する工程と

を含む上記方法にある。

本発明はさらに、電極表面での電気化学ルミネセンスの測定に基づいて、サンプル中に存在する問題の分析物に関する結合アッセイを実施する方法であって、下記工程：

- (a) (i) 前記サンプルと、50

(ii) 電気化学ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物に結合した成分を含有するアッセイ実行物質と、

(iii) アッセイ実行物質に結合した複数個の磁気反応性の懸濁(suspended)官能化黒鉛ナノチューブと

を含有する組成物を形成する工程と；

(b) 前記組成物をインキュベートして、黒鉛ナノチューブと前記ラベル化合物とを包含する複合体を形成する工程と；

(c) 前記黒鉛ナノチューブ上に磁界を印加することによって、前記複合体を収集する工程と；

(d) 前記収集された複合体を電極表面と接触させ、前記電極に電圧を印加することによって、前記複合体中のラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；

(e) 電極表面において発生されたルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程と

を含む上記方法にある。

前記磁界の印加が前記電極の表面に前記複合体を収集させる。

さらに、本発明は、官能化黒鉛ナノチューブと、下記成分：

(a) 電解質；

(b) E C L部分を含有するラベル化合物；

(c) 問題の分析物又は問題の分析物の類似体；

(d) 問題の分析物の結合対又はその類似体の結合対；

(e) (c) 又は (d) と反応することができる反応性成分；

(f) 還元体；及び

(g) 電気化学ルミネセンス発生反応強化剤

から成る群から選択される少なくとも1種類の他の成分とを含む、微粒子に基づく結合アッセイに試薬として用いるための、物質の組成物であって、任意の試薬組成物中に含有される2種類の成分が、予定のアッセイにおけるそれらの機能を損なわないように、貯蔵中に相互と反応性でないという条件の組成物にある。

本発明はまた、結合反応と電気化学ルミネセンス現象に基づくアッセイのためのアッセイ試薬であって、下記成分：

(a) 電解質；

(b) アッセイ実行物質に結合した表面を有する、複数個の磁気反応化官能性黒鉛ナノチューブ；及び

(c) 結合特性を有するラベル物質

を含み、前記ラベル物質が電気化学ルミネセンス特性を有する化学的部分を包含する上記分析試薬にある。

本発明はさらに、サンプル中に存在する問題の分析物に関してアッセイを実施する方法であって、下記工程：

(a) (i) 前記サンプルと、

(ii) 電気化学ルミネセンスを発生するように誘導されることがあるラベル化合物に結合したアッセイ成分に結合した官能化黒鉛ナノチューブであって、前記成分が問題の分析物の基質である前記ナノチューブと

を含有する組成物を形成する工程と；

(b) 前記分析物に前記成分を切断させる条件下で、前記組成物をインキュベートする工程と；

(c) 前記官能化黒鉛ナノチューブを前記組成物から分離する工程と；

(d) 前記ラベル化合物をルミネセンスを発生するように誘導する工程と；

(e) 発生されたルミネセンスを測定して、サンプル中の問題の分析物の存在を測定する工程と

を含む上記方法にある。

バッチ式アッセイをおこなうことができるが、連続又は半連続分析をフローセルでおこな

10

20

30

40

50

うことができる。フローセルでは、固相は測定セル中に留まるが、溶液は流動して、セルを出る。固相（例えば、粒子）が水よりも高密度である、即ち、水の密度よりも大きい密度（1.0 g / m³より大きい）を有する場合には、粒子上の重力が粒子をセルの底部に落下させる。流体がセルを通って流れるにつれて、粒子が底部に沈降するよう、セルを構成することができる、又はサンプルの大部分が ECL 系の作用電極上の円柱状区画内でセル中に含まれるようにセルを構成することができる。ECL を誘導する前に、電極の表面上に粒子を沈降させるために、セル中の充分な滞留時間を与えなければならない。

本発明の他の実施態様では、粒子を測定帯に取り出して、そこで次に粒子を例えれば電極と接触させて、電気化学ルミネセンスを誘導させるために、又は粒子を遠心分離工程において直接電極と接触させるために、アッセイ組成物の残部よりも大きい密度を有する懸濁フィブリルを含むアッセイ組成物に遠心分離を受けさせることができる。
10

この実施態様では、測定セルにはサンプルを迅速に回転させる手段とサンプル密閉容器（enclosure）とを備える。遠心力はサンプル中のフィブリルをサンプル密閉容器の回転軸から外方に移動させ、サンプル密閉容器の外面に収集させる。

このようなサンプル密閉容器の外面は ECL 測定系の作用電極を構成することができる。第 3 実施態様では、フィブリルを濾過によってアッセイ組成物から取り出すことができる。この実施態様では、粒子はアッセイ組成物の残部よりも大きい密度を有する必要はない。フィブリルを溶液から分離して、溶液をフィルターに通すことによって、例えばポンピングして、フィルターの表面に粒子を収集することによって濃縮する。フィルターのこの表面を例えれば、ECL 検出系において作用電極として役立つことができる薄い金属フィルムで被覆する。
20

他の実施態様では、懸濁フィブリルは磁気反応性であり、例えば、これらは常磁性又は強磁性であり、粒子上の電界の印加によって、測定帯において、好ましくは電極表面に直接収集される。測定セルは磁石を備える。磁石の磁界は、粒子がバッチ式セルに存在するときに又は粒子がフローセルを通って流れると粒子に力を及ぼし、粒子を溶液の本体から磁石に最も接近したセルの表面上に分離させる。磁石を適当な配向で、ECL 検出系の作用電極に密接に接近させて配置するならば、粒子は作用電極の表面に濃縮される。

結合アッセイのための数種類の異なる不均質及び均質なフォーマットを上記方法を用いて実施して、複合体を電極表面に複合体を収集し、濃縮することができる。不均質な結合アッセイでは、複合体を組成物から分離してから、ラベルからのルミネセンスを測定する。均質なアッセイでは、（固相に）結合した標識試薬と結合しない標識試薬との分離をおこなわない。
30

均質なアッセイでは、複合体が作用電極の表面上で濃縮されるときに、ラベルからの測定シグナルは収集工程が存在しない場合よりも非常に大きい。これに反して、非複合体化標識試薬からのシグナルは変化しない。このため、測定セルに非複合体化標識試薬が存在するにも拘わらず、収集された複合体からのシグナルは、複合体を収集しないアッセイにおけるよりも強い。結合アッセイの検出限界は収集操作の結果として非常に改良される。

本発明の好ましい実施態様では、均質な結合アッセイ操作にその場での（in-situ）分離工程が含まれる。アッセイ組成物、即ち、サンプル、アッセイ実行物質及び粒子を測定セルに注入して、複合体が作用電極上に捕捉された後に、ラベル又は標識試薬を含まない第 2 流体をセルに通して注入することによって、アッセイ組成物の非結合成分からの複合体の in-situ 洗浄又は分離をおこなう。このアッセイ方法は技術的に不均質結合アッセイである。しかし、測定セル内で分離を実施できることは、付加的な分離装置を必要としない点で有利であり、この方法は一般に外部分離方法よりも非常に迅速である。
40

本発明を用いて、アッセイ組成物の成分を混合し、予め定められた長さの時間にわたってそれらを反応させることによって、不均質な結合アッセイを実施する。次に、アッセイ組成物に分離工程を受けさせ、溶液を粒子から分離する。次に、電気化学ルミネセンスを複合体から又は溶液から測定する。濃縮工程後の複合体からの ECL の測定は、濃縮なしで可能であるよりも良好な精度かつより低い検出限界での分析物の測定を可能にする。

典型的な実施例

本発明の1つの代表的な実施態様では、官能化フィブリルをアビジン（アッセイ実行物質）とさらに反応させて、それをE C L分析に用いるために用意する。このように修飾したフィブリルを次にビオチニル化オリゴヌクレオチド（アッセイ実行物質）と反応させて、D N Aプローブアッセイに用いるためのフィブリル-アビジン-ビオチン-オリゴヌクレオチド複合体を形成する。この複合体は問題のオリゴヌクレオチド分析物のプローブとして使用可能であり、この分析物は、E C L部分によって標識された前記問題の分析物に対して相補的である第2オリゴヌクレオチドの存在下でのサンドイッチアッセイにおいて前記プローブに相補的である。

発明の詳細な説明

本発明並びにそれの他の目的と特徴は、ある一定の好ましい実施態様の下記説明からより明白にかつ完全に理解されるであろう。 10

本発明は、結合反応に関与することができる問題の分析物に広範囲に適用可能である。これらの反応は例えば抗原-抗体、リガンド受容体、D N AとR N Aの相互作用、及び他の公知反応を包含する。本発明は、多成分サンプル中のこのような問題の分析物の存在を定性的かつ定量的に検出するための種々な方法とアッセイに関する。

サンプル

問題の分析物を含有することができ、固体、エマルジョン、懸濁液、液体、又はゲル形状であることができるサンプルは、例えば、細胞、細胞由来産物、水、食物、血液、血清、ヘア、汗、尿、糞便、組織、唾液、油、有機溶媒又は空気から得られることができる。サンプルはさらに、例えば、水、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、n-メチル-ピロリドン又はアルコール又はこれらの混合物を含むことができる。 20

分析物

典型的な問題の分析物は、サンプル中に存在する、全細胞若しくは表面抗原、細胞内(sub cellular)粒子、ウイルス、プリオン、ウイロイド、抗体、抗原、ハプテン、脂肪酸、核酸、タンパク質、リポタンパク質、多糖、リボ多糖、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、細胞代謝物、ホルモン、薬理学的作用剤、合成有機分子、有機金属分子、トランキライザー、バルビツレート、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、レクチン、組換えタンパク質若しくは誘導タンパク質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又は無機分子である。典型的に、問題の分析物は 10^{-3} モル又はそれ以下の濃度、例えば、 10^{-12} モル又はそれ以下程度の低い濃度で存在する。 30

アッセイ実行物質

問題の分析物を含有するサンプルと結合するアッセイ実行物質は、(i)上記で定義したような、添加された問題の分析物又はその類似体、(ii)問題の分析物又はその前記類似体の結合対、及び(iii)(i)又は(ii)と結合することができる、上記で定義したような反応性成分から成る群から選択された、少なくとも1種類の物質を含し、前記物質の1種類は化合物又は部分、例えば、ルミネセンスを発生するように誘導される能够するE C L部分に結合する。標識物質は、全細胞若しくは表面抗原、細胞内粒子、ウイルス、プリオン、ウイロイド、抗体、抗原、ハプテン、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タンパク質、リポタンパク質、リボ多糖、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、細胞代謝物、ホルモン、薬理学的作用剤、合成有機分子、トランキライザー、バルビツレート、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的ポリマー（好ましくは、溶解性）、レクチン、組換えタンパク質若しくは誘導タンパク質、合成有機分子、有機金属分子、無機分子、ビオチン、アビジン又はストレプトアビジンであることができる。1実施態様では、試薬は抗体、抗原、核酸、ハプテン、小ヌクレオチド配列、オリゴマー、リガンド、酵素、又はビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、又はこれらの複合体、又はタンパク質相互作用を通して第1結合対に結合することができる他の第2結合対である。 40

天然物又は合成物のいずれでもよい、問題の分析物の類似体は、典型的に、分析物に匹敵する結合特性を有する化合物であるが、これより高い若しくは低い結合能力を有する化合

物であることもできる。分析物若しくはその類似体と及び／又はそれらの結合対と結合することができ、それらを介して E C L 部分が分析物に結合することができる反応性成分は、適当には、第 2 抗体、又は例えばプロテイン A 若しくはプロテイン G のようなタンパク質、又はアビジン若しくはビオチン若しくは結合反応に関与することが当該技術分野で知られた他の成分である。

ラベル

有利には、E C L 部分は金属キレートである。このキレートの金属は適当には、金属キレートが問題の反応系に課せられる電気化学的条件下でルミネセンスを発生するような、任意の金属である。このような金属キレートの金属は、例えば、遷移金属（例えば、¹⁰ - ブロック遷移金属）又は稀土類金属である。金属は好ましくはルテニウム、オスミウム、ルニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、クロム又はタングステンである。ルテニウムとオスミウムが特に好ましい。このようなキレートにおいて金属と結合するリガンドは、通常、性質において複素環状又は有機であり、金属キレートが水性環境又は有機環境又は他の非水性環境に可溶性であるか否かの決定に役割を果たしている。リガンドは多座(polydentate)リガンドであることができ、置換されることができる。多座リガンドは芳香族リガンドと脂肪族リガントを包含する。適当な芳香族多座リガンドは、芳香族複素環状リガンドを包含する。好ましい芳香族複素環状リガンドは、例えば、ビピリジル、ビピラジル、ターピリジル、及びフェナントロリルのような、窒素含有リガンドである。適当な置換基は、例えば、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、カルボキシレート、カルボキサルデヒド、カルボキサミド、シアノ、アミノ、ヒドロキシ、イミノ、ヒドロキシカルボニル、アミノカルボニル、アミジン、グアニジウム、ウレイド、硫黄含有基、リン含有基、及び N - ヒドロキシ - スクシンイミドのカルボキシレートエステルを包含する。キレートは 1 つ以上の単座リガンドを有することができ、多様な多座リガンドが当該技術分野に公知である。適当な単座リガンドは、例えば、一酸化炭素、シアニド、イソシアニド、ハライド並びに脂肪族、芳香族及び複素環状ホスフィン、アミン、スチルベン及びアルシンを包含する。²⁰

適当なキレートの例は、ビス [(4 , 4 ' - カルボメトキシ) - 2 , 2 ' - ビピリジン] 2 - [3 - (4 - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン - 4 - イル) プロピル] - 1 , 3 - ジオキソランルテニウム (I I) ; ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) [4 - (ブタン - 1 - アール) - 4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン] ルテニウム (I I) ; ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) [4 - (4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン - 4 ' - イル) - 酪酸] ルテニウム (I I) ; トリス (2 , 2 ' - ビピリジン) ルテニウム (I I) ; (2 , 2 ' - ビピリジン) [ビス - ビス (1 , 2 - ジフェニルホスフィノ) エチレン] 2 - [3 - (4 - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン - 4 ' - イル) プロピル] - 1 , 3 - ジオキソランオスミウム (I I) ; ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) [4 - (4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン) - ブチルアミン] ルテニウム (I I) ; ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) [1 - プロモ - 4 (4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン - 4 - イル) ブタン] ルテニウム (I I) ; ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) マレイミドヘキサン酸 , 4 - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン - 4 ' - ブチルアミドルテニウム (I I) である。³⁰ 他の E C L 部分は共通に譲渡された P C T 公開出願 U S 8 7 / 0 0 9 8 7 と P C T 公開出願 8 8 / 0 3 9 4 とに述べられている。⁴⁰

E C L 部分の機能は、反応系に電気化学的エネルギーを導入する結果として電磁線を発生することである。これをするために、これらの E C L 部分は励起エネルギー状態にまで刺激されることができ、その励起状態からの下降時に、例えば光のフォトンのような電磁線を発生することもできなければならない。電気化学ルミネセンス発生反応に E C L 部分が関与する機構の理論的分析によって縛られることを望む訳ではないが、E C L 部分は反応系への電気化学的エネルギーの導入によって酸化され、次に、系中に存在する還元体との相互作用によって、励起状態に転化されると考えられる。この状態は比較的不安定であり、金属キレートは迅速に、より安定な状態に下降する。このようにするときに、キレート

は例えは、検出可能である、光のフォトンのような電磁線を放出する。

本発明によって組み入れられる、金属キレート又は金属含有ECL部分の量は、系毎に変化する。一般に、このような部分の使用量は、系の上記組成物から電磁エネルギーの検出可能な発生、必要な場合には、定量可能な発生を生じるために有効である量である。問題の分析物の検出及び／又は定量は、典型的に、問題の分析物とECL部分とを含有するサンプルからのルミネセンスを、既知量の問題の分析物とECL部分とによって作成されたキャリブレーション基準によって発生されるルミネセンスと比較することによっておこなわれる。これは均質なフォーマットを前提とする。不均質モードでは、既述したような分離をECL分析の前におこなう。

当業者によって理解されうるよう、金属含有ECL部分は優勢な条件に依存して系毎に変化する。適当な金属含有ECL部分と、望ましい結果を得るために充分なその量は、本明細書の教示をひと度与えられるならば、必要以上の実験なしに、当業者によって経験的に決定されることができる。

黒鉛ナノチューブ

ナノチューブは、分散状態、凝集体、マット又はフィルムとしてを含めた、種々な形状で分析用途に固体担体として、ビーズを含めたより大きい担体に取り付けて用いられるか、又は他の物質と混合して、複合体として例えば多孔質カラムに入れて用いられることができる。ナノチューブは主として、化学的に修飾可能な黒鉛炭素から成る。これらは一般に0.1 μm以下の直径と少なくとも5の長さ対直径比とを有する。典型的に、これらのナノチューブは0.01 μmの直径と1~10 μmの長さとを有する。

官能化ナノチューブ

有利には、フィブリルは官能化フィブリル、即ち、その表面がそれと結合した官能性化学部分を有するように均一に又は不均一に修飾されているフィブリルである。フィブリル表面は酸化性媒質又は他の化学媒質との反応によって官能化されることがある。フィブリル表面は化学反応によって、又はそれら自体が化学反応性を有する種を物理的に吸着することによって均一に修飾されることがある。フィブリル表面は例えば酸化によって修飾されることができ、他の官能基との反応によってさらに修飾されることがある。フィブリルが電気化学ルミネセンスアッセイにおける結合成分を含めた、多様な基質中の化学基に化学的に反応するか又は物理的に結合することができるように、フィブリル表面を多様な官能基によって修飾することができる。フィブリル上の官能基をある範囲のリンカーハイドロゲン化によって相互に結合させることによって、フィブリルの複雑な構造を得ることができる。

フィブリル表面を化学的に修飾する方法と、フィブリル表面に種を物理的に吸着させる方法は、各場合に、フィブリル表面と結合した官能性部分を生ずるように述べられている。

アッセイ実行物質に結合した官能化ナノチューブ

官能化フィブリルを種々なバイオ分子と反応させて、それらをECL分析に用いるために用意することができる。種々なアッセイ実行物質、例えば抗体、受容体又は他の結合性部分は官能化フィブリルと反応して、それらをECL分析に用いるために用意することができる。

粒子

黒鉛ナノチューブは、例えは粒子のような、より大きい固相に共有結合的又は非共有結合的に結合することができる。

粒子は有利には、0.05 μm~200 μm、好ましくは0.1 μm~100 μm、最も好ましくは0.5 μm~10 μmの直径を有する超微粒状物質と、分析物及び／又は、上記サブパラグラフ(b)(i), b(ii)又はb(iii)で定義した1種類以上の他の物質に結合することができる表面成分とを含む。例えは、超微粒状物質は架橋した澱粉、デキストラン、セルロース、タンパク質、有機ポリマー、スチレンポリマー、例えはスチレン／ブタジエンコポリマー、アクリロニトリル／ブタジエン／スチレンコポリマー、ビニルアセチルアクリレート、又は塩化ビニル／アクリレートコポリマー、不活性無機粒子、二酸化クロム、鉄の酸化物、シリカ、シリカ混合物、及びタンパク質に似た物質、又はこ

10

20

30

40

50

れらの混合物であることができる。粒子を E C L 系に懸濁させることが望ましい。

アッセイ媒質

電極が電気化学エネルギーを導入する系を操作するために、電極を浸漬するための、 E C L 部分を含有する電解質を用意することが必要である。電解質は、それを通して電荷がイオンによって運ばれる相である。一般に、電解質は液相に存在し、水中、有機液体中若しくは有機液体混合物中、又は水と 1 種類以上の有機液体との混合物中の 1 種類以上の塩の溶液である。しかし、他の形態の電解質も本発明のある一定の実施態様において有用である。例えば、電解質は流体 - - 例えば、液体、蒸気若しくは超臨界流体 - - 中の 1 種類以上の物質の分散系であることができる、又は固体、蒸気若しくは超臨界流体中の 1 種類以上の物質の溶液であることができる。

電解質は適当には水中の塩の溶液である。塩は好ましくはナトリウム塩又はカリウム塩であるが、他のカチオンの導入も、このカチオンが一連の電気化学ルミネセンス発生相互作用を妨害しない限り、ある一定の実施態様に適切である。塩のアニオンは例えばホスフェートであることができるが、他のアニオンの使用も、 - - この場合にも、選択されたアニオンが一連の電気化学ルミネセンス発生相互作用を妨害しない限り - - 、ある一定の実施態様に適切である。

組成物は非水性でもありうる。超臨界流体も場合によっては有利に用いることができるが、非水性組成物に有機液体を含む電解質を用いることがより一般的である。水性電解質と同様に、非水性電解質もそれを通して電荷がイオンによって運ばれる相である。通常は、これは、塩が有機液体媒質中に溶解していることを意味する。適当な有機液体の例は、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド (D M S O) 、ジメチルホルムアミド (D M F) 、メタノール、エタノール、及びこれらの 2 種類又はそれ以上の混合物である。実例として、有機液体に可溶性である、例えばテトラフルオロホウ酸テトラブチルアンモニウムのような、テトラアルキルアンモニウム塩を有機液体と共に用いて、非水性電解質を形成することができる。

電解質は、本発明のある一定の実施態様では、緩衝系である。リン酸塩緩衝剤がしばしば有利である。例はリン酸ナトリウム / 塩化ナトリウムの水溶液と、リン酸ナトリウム / フッ化ナトリウムの水溶液である。

他の分析成分

「アミン由来還元体を用いる電気化学ルミネセンス発生反応」なる名称の、共通に譲渡された P C T 公開出願 U . S . 8 9 / 0 4 8 5 9 (この開示は参考することにより本明細書に取り込まれる) が述べているように、酸化されて、自然に分解して、高度に還元性の種に転化する還元体、典型的には、アミン又はアミン部分 (大きい分子の) を含めることができる。反応系に導入される電気化学的エネルギーによって、アミン又はアミン部分も酸化されると考えられる。アミン又はアミン部分は 1 個の電子を失って、脱プロトン化し、又はそれ自体で転位して、強力な還元剤になる。この還元剤は酸化された金属含有 E C L 部分と相互作用して、これに上記励起状態を負わせる。この役割を果たすために、アミン又はアミン部分が、炭素中心ラジカルであって、このような炭素から与えられることができる電子と、還元体を形成するための脱プロトン化中にプロトンドナーとして作用することができる。炭素とを有する上記炭素中心ラジカルを有することが好ましい。アミン由来還元体は金属含有 E C L 部分をその励起状態に転化させるために必要な刺激を与え、この励起状態から検出可能な電磁線が放出される。

広範囲なアミンと対応アミン部分とを本発明の実施に用いることができる。一般に、アミン又はアミン部分は、電気化学ルミネセンスアッセイされる予定である系の pH に適合するように選択される。他の関連要素は、アミン又はアミン部分が、分析中にその内で機能しなければならない環境に適合する必要がある、即ち、場合によって、水性環境又は非水性環境に適合する必要があることである。さらに他の考察は、選択されたアミン又はアミン部分が、系の酸化された金属含有 E C L 部分を還元させるほど強い、優勢な条件下でアミン由来還元体を形成すべきであるということである。

本発明に有利に用いられるアミン (及びそれから誘導される対応部分) は、例えば第 1 級

10

20

30

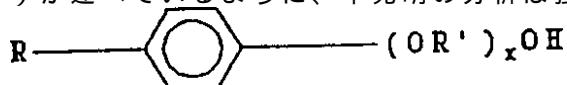
40

50

アミン、第2級アミン及び第3級アミンであり、各アミンのアルキル基は炭素数1～3である脂肪族アミン、並びに置換脂肪族アミンである。トリプロピルアミンが、比較していえば、特に高い強度の電磁線放出を生じて、それを用いる実施態様の検出及び定量の感度と精度を高めるので、特に好ましいアミンである。例えばヒドラジンのようなジアミンと、例えばポリ(エチレンイミン)のようなポリアミンも適切である。本発明の実施に適切な、他のアミンの例はトリエタノールアミン、トリエチルアミン、1,4-ジアザビシクロ-(2.2.2)-オクタン、1-ピペリジンエタノール、1,4-ピペラジン-ビス-(エタン-スルホン酸)、トリイソプロピルアミン及びポリ(エチレンイミン)である。

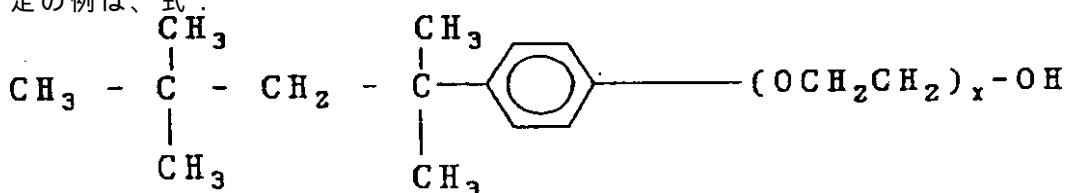
典型的に、本発明に用いられる金属含有ECL部分は反応限定要素である。したがって、アミン又はアミン部分がそれを基準にして化学量論的過剰で供給されることも通常おこなわれる。実例として、アミン又はアミン部分は50～150mMの濃度で用いられる。約7のpHで用いるためには、100mMの濃度がしばしば有利である。ある一定の実施態様では、アミン又はアミン部分の濃度の上限は、それが用いられる環境中、例えば水中のアミン又はアミン部分の最大溶解度によって決定される。一般に、アミン又はアミン部分の使用量は、酸化された金属含有ECL部分をルミネセンスが発生するようなその励起状態に変換させるために充分である量である。当業者は、本明細書の教示を与えられたならば、分析される特定の系に有利に用いられるアミン又はアミン部分の量を、必要以上の実験なしに、経験によって判定することができる。

「強化された電気化学ルミネセンス発生反応」なる名称の、共通に譲渡されたPCT公開出願U.S.89/04915(この内容は参考することにより本明細書に取り込まれる)が述べているように、本発明の分析は強化剤(enhaner)、典型的に、式：



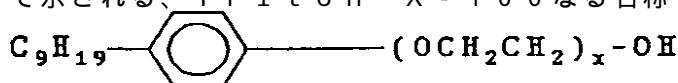
[式中、Rは水素又はC_nH_{2n+1}であり、R'はC_nH_{2n}であり、xは0～70であり、nは1～20である]

で示される化合物の存在下でおこなわれることが望ましい。特に、nは1～4である。特定の例は、式：



[式中、xは9～10である]

で示される、Triton X-100なる名称で商業的に入手可能な物質と、式：



[式中、xは40である]

で示される、Triton N-401(NPE-40)なる名称で商業的に入手可能な物質である。強化剤は一般に、その存在下で、電磁線の放出の望ましい増加が生ずるほどの充分な量で用いられる。典型的に、この量は0.01%～5.0%、特に0.1%～1.0%(v/v)である。この出願の内容は本明細書に援用される。

本発明によって組み入れられるECL部分は、それを励起状態に刺激することによって電磁線を放出するように誘導される。これは、ECL部分が組み入れられた系を電気化学的エネルギーに暴露させることによって達成される。ECL部分と強い還元体を形成する種との酸化が生ずる電位はそれらの正確な化学構造と、例えば系のpH及び電気化学的エネルギーの導入に用いられる電極の性質のような要素とに依存する。最適電位と電気化学ルミネセンス系の発光波長とを如何にして決定するかは、当業者に周知である。ECL系を刺激するある一定的好ましい方法は、共通に譲渡されたPCT公開出願U.S.89/0

10

20

30

40

50

1814(この内容は参照することにより本明細書に取込まれる)に開示されている。

電気化学ルミネセンスの測定装置

本発明の分析を実施するための装置は図1と2に示す。図1は有利なECL装置を開示するが、本発明の方法は装置10における適用に限定されず、ECL部分を電気化学ルミネセンスを発生するように誘発するために電気化学エネルギーを供給する作用電極又は他のトリガー面を含む他の型のECL装置にも適用可能である。本発明の方法は静止モード又はフロースルー(flow-through)モードで実施することができるが、装置10はフロースルーセルを含む、これは結合アッセイサンプルを含めた、多くの種類のサンプルに対して明らかな利点を生じる。本発明のECL分析を実施するための装置に関するさらなる詳細は、共通に譲渡されたPCT公開出願U.S.89/04854とU.S.90/01370に開示されている。10

装置10は電気化学セル12、有利には光電子増倍管(PMT)でありうる光検出/測定デバイス14、光ダイオード、荷電結合素子、写真フィルム若しくは乳剤等と、セル12へ、セル12を通して、セル12からの流体輸送を生じるための、有利には蠕動ポンプであるポンプ16とを包含する。或いは、容積移送式ポンプを用いることができる。セル12とPMT14との間にはシャッター機構18を備えて、ECL測定期間にPMT14をセル12に暴露させるためにだけ開放するように制御可能に操作する。このシャッター機構は例えばメインテナンス中は閉鎖することができる。図1に示されていないが、種々な成分をその中に入れるためと、ECL測定中に外部光からPMT14を遮蔽するための光線遮断ハウジングも装置10に含まれる。20

セル12自体は、有利にはステンレス鋼から構成されることができる、入口管22と出口管24とが貫通している第1マウンティングブロック20を含む。マウンティングブロック20はセル12のサンプル保持容積30の片側を画定する第1外面26と第2内面28を有し、セル12はこの中に装置10の対応操作中に洗浄溶液及び/又はコンディショニング(conditioning)溶液及び/又は測定溶液を保持する。入口管22と出口管24とはマウンティングブロック20を外面26から内面28まで貫通し、サンプル保持容積30中に開口する。有利には同様にステンレス鋼から構成される第2マウンティングブロック32は第1外面34と第2内面36を有する。第2マウンティングブロック32は第1マウンティングブロック20から、有利にはテフロン又は他の非汚染性材料から構成された、環状スペーサー38によって分離される。したがって、マウンティングブロック32の外面34は、サンプル保持容積30の第2側の一部を画定する。スペーサー38は外側部分40と中央開口部42を有し、中央開口部の内側縁44はサンプル保持容積30の側壁を画定する。外側部分40は第1マウンティングブロック20の内面28を第2マウンティングブロック32の外面34に対してシールして、溶液がサンプル保持容積30から2つの面28、34の間に漏出するのを防止する。マウンティングブロック32はさらに、中央開口部46を有し、ここにおいてウインドー48はシールフィットされ(seal-fitted)、サンプル保持容積30の第2側の残部を外面34の続きとして画定する。ウインドー48は、ECL部分によって放出される電気化学ルミネセンス光の波長において実質的に透明である。それ故、ウインドー48はガラス、プラスチック、石英等から有利に形成される。30

入口管22はサンプル保持容積30と、スペーサー38に隣接したその第1端部50において交差し、出口管24はサンプル保持容積30と、スペーサー38に隣接したその第2端部52において交差する。それによって、入口管22とサンプル保持容積30と出口管24との組合せは、セル12へ、セル12を通して、セル12からの溶液の狭い、実質的に層流の連続流路を形成する。40

第1マウンティングブロック20の内面28には、作用電極系54が取り付けられ、これは図示した実施態様では第1電極と第2電極56、58を含む。他の実施態様では、単一作用電極が有利に備えられることができる、又は電極56のみが作用電極でありうる。問題の電気化学的及びECL反応がおこなわれうる場合には、作用電極56、58が存在する。作用電極56、58は固体ボルタメトリック電極であるので、白金、金、炭素又はこ50

の目的のために有効である他の物質から構成されることがある。作用電極 56、58 にそれぞれ、結合したワイヤーコネクター 60、62 は第 1 マウンティングブロック 20 を通って出る。

コネクター 60、62 は両方とも、図 2 に示した電圧制御装置 66 の第 1 “作用電極” 端子 64 に接続する。電圧制御装置 66 は作用電極 56、58 に電圧シグナルを供給し、任意に ECL 測定中のそれらから流出する電流を測定するためのポテンシオスタットと同様に作動することが有利である。或いは、コネクター 60、62 は個別の操作のために電圧制御装置 66 の別々の端子に接続することができる。

電圧制御装置 66 のポテンシオスタット操作はさらに対極（カウンター電極）68 と、任意に、但し有利には、基準電極 70 とによっておこなわれる。図示した実施態様では、マウントィングブロック 32 はステンレス鋼製であり、対極 68 はマウントィングブロック 32 の露出面 72、74 に存在する。対極 72、74 と作用電極 56、58 はサンプル保持容積 30 内の溶液に電位を与えるためのインターフェースを形成し、この電位が化学反応にエネルギーを与え、サンプル中の電気化学ルミネセンスを誘発し、及び／又はセル 12 の表面を洗浄し、コンディショニングするためのエネルギーを与える。カウンター電極 72、74 はワイヤーコネクター 76 によって、電圧制御装置 66 の第 2 “対極” 端子 78 に接続される。

基準電極 70 は基準電圧を与え、作用電極 56、58 によって与えられる電圧は、例えば基準に対して +1.2 ボルトのように、これを基準にする。基準電極 70 は有利には出口管 24 内にセル 12 から間隔をおいた位置 80 に配置され、ワイヤーコネクター 82 によって、電圧制御装置 66 の第 3 “基準電極” 端子 84 に接続される。3 電極モードでは、電流は基準電極 70 を通って流れない。基準電極 70 は 3 電極操作モードで用いられて、平衡した(poised)既知の安定な電圧を与えることができるので、銀／塩化銀 (Ag / AgCl) から有利に構成されるか又は飽和カロメル電極 (SCE) である。電圧制御装置 66 は 2 電極操作モードで、作用電極 56 のみと、カウンター／基準電極としての電極 58 とを用いて操作可能である。この 2 電極操作モードでは、カウンター／基準電極 58 は電圧制御装置 66 の電圧制御端子 78 と 84 に電気的に接続する。この場合に、電圧制御装置 66 は本質的にバッテリーとして作動する。電圧制御装置 66 は作用電極とカウンター電極 56 と 58 に電圧シグナルを与えて、それぞれの電極から流れる電流を任意に測定する。或いは、基準電極 70 は白金、金、ステンレス鋼又は他の材料から構成された、いわゆる“準・基準(quasi-reference)”電極である可能性があり、あまり安定でない電圧であるが、接触する溶液を基準にしてまだ測定可能である電圧を与える。2 電極操作モードと 3 電極操作モードの両方において、基準電極 70 又は 58 は、作用電極 56 に印加される電圧を測定する基準を与える目的に役立つ。平衡した電圧基準(poised voltage reference)は現在、より有利であると考えられている。電圧制御装置 66 はそのポテンシオスタット操作において、作用電極 56、58 に基準電極 70 を基準にして既知電圧を与え、作用電極 56、58 とカウンター電極 72、74 の間の電流を測定することによって、種々な電圧を制御する。この目的のためのポテンシオスタットは周知であるので、電圧制御装置 66 の内部構造は、上記機能を生じ、本発明自体に関与しない、慣用的で、商業的に入手可能な、任意のポテンシオスタットに相当することができる。実際に、装置 10 は代替え的に内部電圧制御装置 66 なしに構成して、電極 56、58、72、74 及び 70 に必要な電圧シグナルを与えるために別に制御される外部ポテンシオスタットに接続するように適応させることもできる。以下で説明するように、特異的な方法で供給される、これらの電圧シグナルは作用電極 56、58 の表面に、有利には全体としてのセル 12 の表面に反復可能な初期条件を与え、これは ECL 測定の正確さの改良に顕著に寄与する特徴である。

ポンプ 16 は出口管 24 に有利に配置され、サンプル量から溶液を矢印 A の方向に入口管 22 中に“引き出す”。この溶液は入口管 22、サンプル保持容積 30 及び出口管 24 を通って流れ、基準電極 70 を通って矢印 B 方向に出る。或いは、ポンプ 16 は入口管 22 に配置され、装置 10 を通して溶液を“プッシュ”する。有利には、入口管 22、サンプ

10

20

30

40

50

ル保持容積 30 及び出口管 24 を通るこの同じ流路がセル 12 を通過する全ての溶液と流体に用いられるので、各流体はセル 12 からそれまでの流体を押し出すことで流体力学的な洗浄作用を果たす。ポンプ 16 は、セル 12 に特定の溶液を任意の時間保持するために、その操作を中断するように制御されることができる。

装置 10 のフロースルー構造は、作用電極に可変な電圧を印加する、又は作用電極 56、58（又はカウンター及び基準電極 72、74、70）を空気に暴露させずに、1種類以上の溶液に連続的に暴露させながら、操作前の電位に連続的に維持することを可能にする。基準電極 70 への回路を開くことになる空気への暴露は、未知のランダムな電圧変動を生じさせ、作用電極 56、58 の表面条件の再現性を破壊する。このフロースルー構造は、電極系 54 を洗浄し、コンディショニングする初期工程と、1つ以上の測定波形又はスイープ(sweep)が ECL を誘発する測定工程との間の迅速な変更を可能にする。本発明はまた、試薬組成物にも関する。おおざっぱにいうと、この試薬組成物は本発明のアッセイ系の任意のいずれかの成分、即ち、(a) 電解質、(b) ECL 部分含有ラベル化合物、(c) アッセイ実行物質が結合する官能化フィブリル、磁気反応性粒子を含めた、粒子に任意に結合する、(d) 問題の分析物、又は問題の分析物の類似体、(e) 問題の分析物又はその類似体の結合対、(f) (d) 又は(e) と反応可能な反応性成分、(g) 還元体、又は(h) 電気化学ルミネセンス反応強化剤であることができる。これらの試薬は、使用の便利さのために、相互に組合せることができる、即ち、2成分、3成分又はそれ以上の多成分混合物を、成分が貯蔵中に相互に反応して、予定のアッセイにおける彼らの機能を損なうことがないかぎり、調製することができる。試薬が、粒子と1種類以上の他の成分とを含有する2成分又は多成分混合物であることが望ましい。

本発明はまた、キットにも関する。キットは上記成分(a)～(h)の1種類以上を含有する容器を包含することができる、又はキットは、全て、本発明のアッセイ方法と系に用いるためのこれらの成分の混合物を含めて、上記1種類以上の試薬組成物を含有する容器を含むことができる。

フィブリルの官能化方法

本発明の官能化フィブリルは、スルホン化、脱酸素化したフィブリル表面への求電子性付加または金属化によって直接に製造することができる。アーク成長ナノファイバーを使用する場合、これらは官能化させる前に、過度の精製を必要とすることがある。Ebbeesen 等は、このような精製方法を開示している (Nature, 367, 519 (1994))。

好適には、カーボンフィブリルを官能化剤と接触させる前に、これらを処理する。このような処理は、フィブリルを溶媒中に分散させる処理を包含することができる。或る場合には、カーボンフィブリルを次いで、濾過し、次いで乾燥させた後にさらに触媒させる。

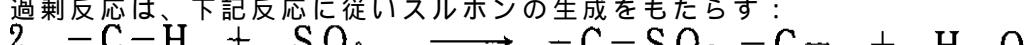
1. スルホン化

基礎技術は、March, J. P. による Advanced Organic Chemistry, 3版、Wiley, New York, 1985; House, H. による Modern Synthetic Reactions, 2版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1972 に記載されている。

活性化した C - H 結合（芳香族 C - H 結合を含む）は、20%までの SO₃ を含有する濃硫酸の溶液である発煙硫酸 [オレウム (oleum)] を用いてスルホン化することができる。慣用の方法は、オレウムを用いて T ~ 80 で液相による方法である；しかしながら、活性化した C - H 結合はまた、不活性非プロトン溶剤中で SO₃ を用いて、あるいは気相で SO₃ を用いてスルホン化することもできる。この反応は下記のとおりである：



過剰反応は、下記反応に従いスルホンの生成をもたらす：



製造例 A

硫酸を使用する C - H 結合の活性化

10

20

30

40

50

反応は結果に格別の差異を伴わずに、気相および溶液中で行われた。気相反応はリンドバーグ (Lindberg) 炉により加熱されている横式石英管反応器内で行った。濃H₂SO₄中20%SO₃を含有し、気体導入管/排出管を備えた多頸フラスコをSO₃供給源として使用した。

磁器ポート(舟型容器)内の重量計量したフィブリル試料(BNまたはCC)を、気体導入口を備えた1管を入れた;その排出口は濃H₂SO₄吹き込みトラップに接続した。この反応器に20分間、アルゴンを吹き込み、全部の空気を除去し、次いでこの試料を300に1時間加熱し、残留水分を除去した。乾燥後、温度をアルゴン雰囲気下に反応温度に調整した。

所望の温度に安定化された時点で、SO₃供給源を反応管に接続し、次いでアルゴン流を用いて、SO₃上記を石英管反応器に導入した。反応は、所望の温度で所望の時間かけて行い、その後、この反応器を流動アルゴン下に冷却させた。このフィブリルを次いで、5

Hg減圧で90において乾燥させ、乾燥重量利得を得た。0.100N NaOHとの反応および最終点としてpH6.0を用いる0.100N HClによる逆滴定によって、スルホン酸(-SO₃H)含有量を測定した。

液相反応は、温度計/温度制御機および磁気攪拌機を備えた多頸100ccフラスコで行った。このフラスコに、濃H₂SO₄(50)中のフィブリルスラリーを入れた。オレイム溶液(20cc)は、反応器に添加する前に、~60に予備加熱した。反応後、その酸スラリーを粉碎した氷上に注ぎ入れ、次いで直ちに、1リットルのDI水で稀釈した。固体物を濾別し、次いで洗浄流出液のpHが変化しなくなるまで、DI水で徹底的に洗浄した。フィブリルを5Hg減圧で100において乾燥させた。濾過の際の移送損失により、正確な重量利得を得ることはできなかった。結果を表Iに示す。

表 I

反応の要旨

例	実験番号	反応相	試料重量、フィブリル			時間	乾燥重量 利得	SO ₃ H 濃度 meg/g
			g	形態	T°C			
1A	118-60A	気相	0.20	CY	110	15分	9.3%	0.50
1B	118-61A	気相	0.20	BN	100	30分	8.5%	0.31
1C	118-61B	気相	0.20	BN	65	15分	4.2%	0.45
1D	118-56A	液相	1.2	CY	50	10分		0.33
1E	118-56B	液相	1.0	CY	25	20分		0.40

気相または液相における反応によるスルホン酸含有量に格別の差異はなかった。温度作用があった。反応温度が高いほど(気相)、スルホンの量は多くなった。118-61Bにおいて、4.2重量%の重量利得はスルホン酸含有量と一致した(理論値は0.51meq/gであった)。実験60Aおよび61Aは単にスルホン酸含有量によるものと説明できる、多すぎる重量利得を有した。従って、認識できる量のスルホンがまた生成されたものと推定された。

2. オキシドを含有していないフィブリル表面への付加

基礎技術は、Urry, G.によるElementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York, 1989に記載されている。

フィブリルの表面炭素は、グラファイトに類似して挙動する。すなわち、これらは底面炭素およびエッジ炭素の両方を含む六角形シートに配列されている。底面炭素は化学的衝撃に対して比較的不活性であり、一方エッジ炭素は反応性であり、かつまた或る種のヘテロ原子または基を含有して、炭素原子価を満たしていかなければならない。フィブリルはまた、基本的にエッジ炭素であり、ヘテロ原子または基を含有する表面欠落部位を有する。

10

20

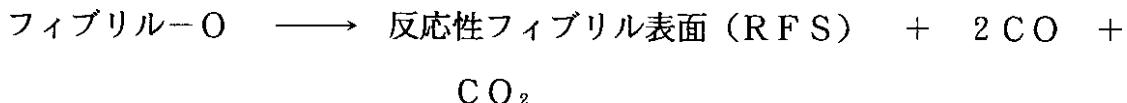
30

40

50

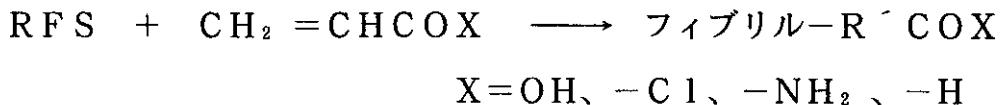
フィブリルの表面炭素に結合している最も普通のヘテロ原子は水素（これは製造中の主要気体状成分である）；酸素（これはその高い反応性により、およびその痕跡量は排除が非常に困難であることから存在する）；およびH₂O（これは触媒により常時存在する）である。減圧で~1000で熱分解させると、未知メカニズムに従うが、公知の化学理論に従い、複合した反応により表面は脱酸素化される。この生成物は2:1比のCOおよびCO₂である。生成するフィブリル表面は、活性化オレフィンに対して非常に反応性であるC₁~C₄配列で基を含有する。この表面は減圧下に、あるいは不活性気体の存在下に安定であるが、反応性気体にさらされるまで、その高い反応性を保有する。従って、フィブリルは減圧下に、あるいは不活性雰囲気中で、~1000で熱分解させることができ、これらと同一条件下に冷却させることができ、かつまたさらに低温で相当する分子と反応させて、安定な官能性基を付与することができる。代表例には下記の反応がある：

1000°C

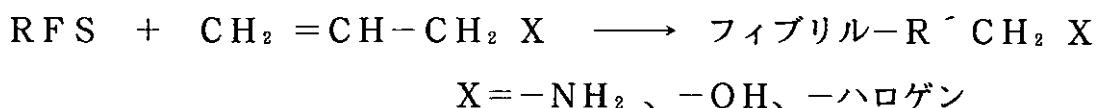
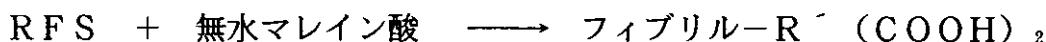


この反応に引き続き、下記の反応が生じる：

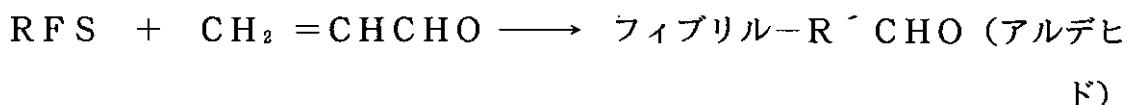
1000°C



20



30



上記式中、R'は炭化水素基（アルキル、シクロアルキル等）である。

製造例 B

アクリル酸とオキシドを含有しないフィブリル表面との反応により官能化したフィブリルの製造

磁器ポート中のBNフィブリル 1グラムを、熱電対を備えた横式1 石英管に入れ、リンドバーグ管炉内に配置する。その末端に気体導入口／排出口を用意する。この管を乾燥した脱酸素化アルゴンにより10分間浄化する。その後炉温度を300に高め、30分間維持する。その後、アルゴンの連続流下に、温度を100 づつ1000まで高め、16時間維持する。この時間の終了時点で、この管をアルゴン流下に、室温(RT)まで冷却させる。アルゴン流を次いで、迂回させ、50で純粋にまで精製したアクリル酸を含有し、気体導入口／排出口を備えた多頸フラスコに通す。このアクリル酸／アルゴン蒸気流入は室温で6時間継続する。この時間の終了時点で、先ずアルゴンで浄化し、次いで<5 減圧で100において減圧乾燥させることにより、残留する未反応アクリル酸を除去する。過剰の0.100N NaOHとの反応およびpH 7.5の最終点までの0.100N HClによる逆滴定によって、カルボン酸含有量を測定する。

40

50

製造例 C

アクリル酸とオキシドを含有しないフィブリル表面との反応により官能化したフィブリルの製造

熱分解および冷却を 10^{-4} トールの減圧で行う以外は、上記と同様の方法を反復する。精製したアクリル酸蒸気を、前記方法と同様にアルゴンで稀釈する。

製造例 D

マレイン酸とオキシドを含有しないフィブリル表面との反応により官能化したフィブリルの製造

室温における反応剤が精製無水マレイン酸 (MAN) である以外は、上記と同様の方法を反復する。MANは、80において融解MAN浴にアルゴン気体を通すことによって反応器に供給する。

製造例 E

アクリロイルクロリドとオキシドを含有しないフィブリル表面との反応により官能化したフィブリルの製造

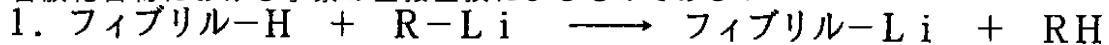
室温における反応剤が精製アクリロイルクロリドである以外は、製造例Bと同様の方法を反復する。アクリロイルクロリドは、25において純粋アクリロイルクロリド上にアルゴンを通すことによって反応器に供給する。過剰の0.100N NaOHとの反応および0.100N HClによる逆滴定によって、酸クロリド含有量を測定する。

減圧におけるフィブリルの熱分解は、フィブリル表面を脱酸素化させる。TGA装置において、減圧下にまたは精製Ar流下に1000で熱分解させると、BNフィブリルの3試料について、3%の平均重量損失が生じる。気体クロマトグラフィ分析では、COおよびCO₂のみが~2:1比で検出された。生成する表面は非常に反応性であり、アクリル酸、アクリロイルクロリド、アクリルアミド、アクロレイン、無水マレイン酸、アリルアミン、アリルアルコールまたはアリルハライドなどの活性化オレフィンは室温においてさえも反応し、活性化オレフィンに官能的に結合したもののみを含有するクリーンな生成物が生成される。従って、カルボン酸のみを含有する表面は、アクリル酸または無水マレイン酸との反応に利用することができる；この表面はアクリロイルクロリドとの反応によって酸クロリドのみを；アクロレインからはアルデヒドのみを；アリルアルコールからはヒドロキシルのみを；アリルアミンからはアミンのみを；そしてアリルハライドからはハライドのみを；含有する。

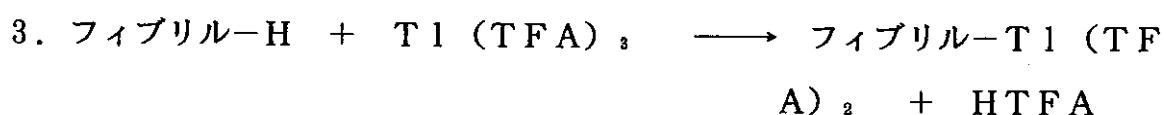
3. 金属化

基礎技術は、MarchによるAdvanced Organic Chemistry, 3版, 545頁に記載されている。

芳香族C-H結合は、種々の有機金属反応剤を用いて金属化させ、炭素-金属結合(C-M)を生成させることができる。Mは通常、Li、Be、Mg、AlまたはTlである。しかしながら、その他の金属もまた使用することができる。最も単純な反応は、活性化芳香族化合物における水素の直接置換によるものである：

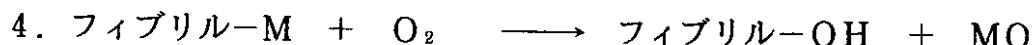


この反応には、強塩基、例えばカリウムt-ブトキシドまたはキレート形成性ジアミンがさらに必要であることがある。非プロトン溶剤が必要である(パラフィン類、ベンゼン)



TF A=トリフルオロアセテート、HTFA=トリフルオロ酢酸

この金属化誘導体は基本の一官能化フィブリルの例である。しかしながら、これらはさらに反応させて、他の基本の一官能化フィブリルを得ることもできる。中間体を単離することなく同一装置で、いくつかの反応を引き続いだり行うことができる。

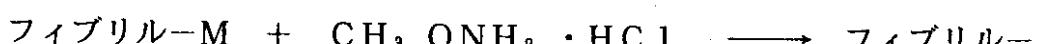


$M=L_i, Al$



$X=$ ハロゲン

触媒



エーテル

$NH_2 + MOCH_3$

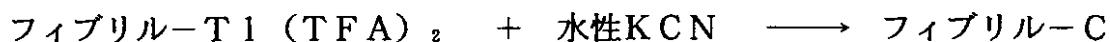
触媒



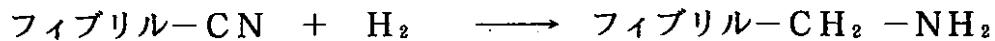
触媒



$H_2 + HTFA$



$N + TlTFA + KTFA$



製造例 F

フィブリル - L_i の製造

C C フィブリル 1 グラムを磁器ポートに入れ、1 石英管反応器に挿入し、この反応器をリンドバーグ管炉内に入る。この管の末端に気体導入口 / 排出口を用意する。 H_2 連続流下に、このフィブリルを 700 に 2 時間加熱し、全部の表面オキシゲネートを C - H 結合に変換する。この反応器を次いで、流動 H_2 下に室温まで冷却させる。

この水素添加したフィブリルを、乾燥した脱酸素化ヘプタンとともに (L_iAlH_4 とともに)、全部の空気を除去し、不活性雰囲気を維持するための精製アルゴン浄化装置、コンデンサー、磁気攪拌機および注射器により液体を添加することができるゴム栓を備えた 1 リットル多頸丸底フラスコに移す。アルゴン雰囲気下に、ヘプタン中のブチルリチウム 5 ミリモルを含有する 2 % 溶液を注射器により添加し、次いでこのスラリーを穏やかな還流下に 4 時間攪拌する。この時間の終了時点で、フィブリルをアルゴン雰囲気グローブボックスで重力濾過により分離し、次いでこのフィルター上で乾燥した脱酸素化ヘプタンにより数回洗浄する。止めコックを備えた 50cc 丸底フラスコにフィブリルを移し、 10^{-4} トールの減圧下に 50 で乾燥させる。フィブリル試料と D I 水中の過剰の 0.100 N HCl との反応および pH 5.0 の最終点までの 0.100 N NaOH を用いる逆滴定により、リチウム濃度を測定する。

製造例 G

フィブリル - Tl (TFA)₂ の製造

C C フィブリル 1 グラムを製造例 E と同様に水素添加し、乾燥アルゴンによる反復浄化により脱気されている HTFA とともに、多頸丸底フラスコに添加する。HTFA 中の $Tl(TFA)_3$ 5 ミリモルの 5 % 溶液を、ゴム栓を通してフラスコに添加し、このスラリーを穏やかな還流下に 6 時間攪拌する。反応後、フィブリルを採取し、次いで製造例 A と同様

10

20

30

40

50

に乾燥させる。

製造例 H

フィブリル-OH(OH官能基のみを有する酸素化誘導体)の製造

製造例 Fで製造されたリチウム化フィブリル 1 / 2 グラムを乾燥した脱酸素化ヘプタンとともに、アルゴン雰囲気グローブボックス内で止め栓および磁気搅拌棒を備えた 50cc 一頸フラスコに移す。このフラスコをグローブボックスから取り出し、次いで磁気搅拌棒で搅拌する。止め栓を次いで空気に対して開け、このスラリーを 24 時間搅拌する。この時間の終了時点で、フィブリルを濾過により分離し、水性 MeOH で洗浄し、次いで 5 減圧で 50 において乾燥させる。80 でジオキサン中無水酢酸の標準化溶液(0.252M)と反応させることにより OH 基をアセテートエステルに変換し、このようにして、反応させた無水酢酸 1 モルあたり 1 当量の酢酸を放出させることにより、OH 基濃度を測定する。総酸含有量、遊離酢酸および未反応無水酢酸を、pH 7.5 の最終点まで 0.100N NaOH を用いて滴定することにより測定する。10

製造例 I

フィブリル-NH₂の製造

タリウム化フィブリル 1 グラムを製造例 G と同様に製造する。このフィブリルをジオキサン中でスラリー化し、次いでジオキサン中に溶解したトリフェニルホスフィン 0.5g を添加する。このスラリーを 50 で数分間搅拌し、次いで 50 で 20 分間、気体状アンモニアを添加する。このフィブリルを次いで、濾過により分離し、ジオキサンで、次いで DI 水で洗浄し、次いで 5 減圧で 80 において乾燥させる。過剰の無水酢酸との反応および 0.100N NaOH を用いる遊離酢酸および未反応無水酢酸の逆滴定により、アミン濃度を測定する。20

4. 誘導体化多核芳香族化合物、多ヘテロ核芳香族化合物および平面状巨大環状化合物

フィブリルのグラファイト状(graphitic)表面は、芳香族化合物の物理的吸着を可能にする。この吸引はファンデルワールスの力学によるものである。これらの吸引力は多環状ヘテロ核芳香族化合物とグラファイト状表面の基底面炭素との間で際立っている。競合的表面吸着が可能である場合、または吸着物が高い溶解性を有する場合のような条件下では、脱着が生じことがある。

製造例 J

ポルフィリン化合物およびフタロシアニン化合物のフィブリル上への吸着

フィブリル上への物理的吸着に好適な化合物は、グラファイトまたはカーボンブラックに強力に吸着することが知られている誘導体化したポリフィリン化合物およびフタロシアニン化合物である。数種の化合物、例えばテトラカルボン酸ポルフィリン、コバルト(II)フタロシアニンまたはジリチウムフタロシアニンを利用することができる。後者の 2 種の化合物はカルボン酸形態に誘導体化することができる。

ポルフィリン化合物およびフタロシアニン化合物の積載能力は、これらを增量しながら添加した場合の溶液の脱色によって測定することができる。この溶液の深い色(MeOH 中のテトラカルボン酸ポルフィリンの場合の深桃色、アセトンまたはピリジン中のジリチウムフタロシアニンまたはコバルト(II)の場合の暗青色)は、この分子がフィブリルの黒色表面に吸着されることによって分離されることから消失する。30

積載能力はこの方法により推定し、またこれらの誘導体のフットプリントはそれらの大体の測定値から計算した(~140sq. オングストローム)。250 m² / g のフィブリルの平均表面積の場合の最大積載量は ~0.3 ミリモル / g であるものと見做される。

テトラカルボン酸ポルフィリンは滴定により分析した。この吸着の完全性は、室温および高められた温度における水性系中での色放出により試験した。

フィブリルスラリーを先ず、混合し [ワーリング(Warling)ブレンダー]、次いで装填中は搅拌した。色はもはや消失しないが、効果が無くなった後に、スラリーの一部を超音波処理に付した。

装填後に、実験 169-11、-12、-14 および -19-1 (表 II 参照) では、同一溶剤中で洗浄し、吸蔵されている染料を分離した。洗浄流出液は全部が連續する淡い色40

合いを示し、従って正確な飽和点の測定は困難であった。実験 168-18 および - 19 - 2 は添加顔料の量の計算に使用し、添加後に、非常に軽くのみ洗浄した。

さらに特徴を確認するために、テトラカルボン酸ポルフィリン（アセトンから）および Co フタロシアニン（ピリジンから）を、フィブリル上に積載した（それぞれ実験 169-18 および - 19-2）。

テトラカルボン酸ポルフィリンの分析

過剰の塩基（pH 11 ~ 12）を添加すると、滴定用スラリーは直ちにピンク色に発色した。これは滴定を干渉しなかったが、高 pH ではポルフィリンの脱着を示した。カルボン酸濃度は、pH 7.5 の終末点を使用して過剰の NaOH の逆滴定により測定した。この滴定により、1.10 meq / 酸 g の装填量が得られた。これは 0.275 meq / ポルフィリン g に等しい。
10

コバルトまたはジリチウムフタロシアニンの分析

これらの吸着物の濃度は脱色実験のみから推定した。30分後に青 - 緑色が薄れなかった点を飽和点とした。

多くの置換多核芳香族化合物または多ヘテロ核芳香族化合物をフィブリル表面上に吸着させた。付着の場合、芳香族環の数は環 / 側鎖官能性基あたりで 2 個よりも多くなければならない。すなわち、3 個の縮合環を有する置換アントラキノン化合物、フェナントレン化合物など、あるいは 4 個または 5 個以上の縮合環を有する多官能性誘導体を、ポルフィリンまたはフタロシアニン誘導体の代わりに使用することができる。同様に、キノリンなどの置換芳香族ヘテロ環状化合物または 4 個または 5 個以上の環を有する多置換ヘテロ芳香族化合物を使用することもできる。
20

表 I I に、3種のポルフィリン / フタロシアニン誘導体にかかる積載実験の結果をまとめて示す。

表 I I

吸着実験の要旨

例	実験番号	吸着物	フィブリル		充填量 g/g	meq/g 滴定
			重量, g	溶媒		
10A	169-11	TCA Porph	19.6 mg	アセトン	0.18 g/g 酸	na
10B	169-12	TCA Porph	33.3 mg	H ₂ O	0.11 Na 塩	na
10C	169-14	Dilipht	119.0 mg	アセトン	0.170 Li	na
10D	169-19-1	CoPht	250.0 mg	ピリジン	0.187 Co	0.335(cal)
10E	169-18	TCA Porph	1.00 g	アセトン	0.205 酸	1.10(T)
10F	169-19-2	CoPht	1.40 g	ピリジン	0.172 Co	0.303(cal)

T C A P o r p h = テトラカルボン酸ポルフィリン、(cal) = 計算値
40

D i l i P h t h = ジリチウムフタロシアニン、(T) = 滴定、

C o P h t h = コバルト (I I) フタロシアニン

5. 塩素酸塩または硝酸酸化

濃硫酸中の塩素酸カリウムまたは硝酸などの強酸化剤によるグラファイトの酸化にかかる刊行物には、R. N. Smith による Quarterly Review 13, 287 (1959); M. J. D. Low による Chem. Rev., 60, 267 (1960) が含まれる。一般に、エッジ炭素（欠落部位を含む）は攻撃されて、カルボン酸、フェノールおよびその他の酸化基の混合物を生成する。このメカニズムはラディカ
50

ル反応を包含して複雑である。

製造例 K

塩素酸塩を用いるカルボン酸官能化フィブリルの製造

C C フィブリルの試料を濃 H₂SO₄ 中で、スパチュラを用いて混合することによってスラリー化し、次いで気体導入口 / 排出口およびオーバーヘッド攪拌機を備えた反応フラスコに移した。攪拌しながら、かつまたアルゴンの穏やかな流通下に、実験の継続時間の全体にわたり室温で、NaClO₃ 添加物を少しづつ添加した。この実験の全体を通して、塩素蒸気が発生し、この塩素蒸気は水性 NaOH トランプ中に反応器から排除した。この実験の終了時点で、このフィブリルスラリーを粉碎した氷上に注ぎ入れ、次いで減圧濾過した。このフィルターケーキを次いで、ソックスレー チンブルに移し、次いでソックスレー抽出器で DI 水により洗浄し、この際に数時間毎に新鮮な水と交換した。洗浄は、新鮮な DI 水に添加した場合、フィブリル試料がこの水の pH を変えなくなるまで継続した。このフィブリルを次いで、濾過により分離し、次いで 5 減圧で 100 において一夜かけて乾燥させた。
10

カルボン酸含有量は、試料を過剰の 0.100 N NaOH と反応させ、次いで pH 7.5 の終末点まで 0.100 n HCl で逆滴定することによって測定した。この結果を表 I II にまとめて示す。

表 III

直接酸化実験の要旨

20

例	実験番号	成 分 g			時間	洗剤	pH	反応 酸	
		フィブリル	NaClO ₃ , cc	H ₂ SO ₄				wt	meq/g
11A	168-30	10.0	8.68	450	24		5.7	10.0	0.78
11B	168-36	12.0	13.9	600	24		5.9	13.7	0.75

製造例 L

硝酸を用いるカルボン酸官能化フィブリルの製造

重量計量したフィブリルの試料を、オーバーヘッド攪拌機および水コンデンサーを備えた丸底多頸の刻み目付き反応フラスコ中で相当する濃度の硝酸を用いてスラリー化した。絶えず攪拌しながら、温度を調節し、反応を特定の時間行った。酸強度に関係なく、温度が 70 を超えた後に、茶色の煙が短時間放出された。反応後、このスラリーを粉碎した氷上に注ぎ入れ、次いで DI 水で稀釈した。このスラリーを濾過し、次いでスラリー化した試料が DI 水から pH に変化を与えるまで、ソックスレー抽出器中で洗浄することによって、過剰の酸を除去し、この際に貯蔵槽は数時間毎に新鮮な水で置き換えた。このフィブリルを 5 の減圧で 100 において一夜かけて乾燥させた。一定重量のフィブリルのカルボン酸含有量を、標準 0.100 N NaOH との反応および 0.100 N HCl による逆滴定により測定した。表面酸素含有量は XPS により測定した。水中分散性を 0.1 重量 % において、ワーリングブレンダーで 2 分間高速混合することによって試験した。結果を表 IV にまとめて示す。
30
40

表 I V

直接酸化実験の要旨

例	成 分			温度 °C	時間	重量 損失	COOH meq/g	ESCA, C	att O	Disp H2O
	Gms. フィブリル	CC 酸	酸 濃度							
12A	1(BN)	300	70t	RT	24 時間	0	<0.1	98	2	P
12B	1(BN)	300	15	rflux	48	<5%	<0.1	非 分析	非 分析	P
12C	20(BN)	1.0 l	70	rflux	7	25%	0.8	非 分析	非 分析	G
12D	48(BN)	1.0 l	70	rflux	7	20%	0.9	非 分析	非 分析	G

P = 不良 ; G = 良好

6. 官能化フィブリルの二次誘導体

カルボン酸 - 官能化フィブリル

カルボン酸そのものから製造することができる二次誘導体の数は基本的に制限される。アルコール類またはアミン類は酸に容易に結合して、安定なエステルまたはアミドを生成する。アルコールまたはアミンが二官能性または多官能性分子の一部である場合、O - または N H - を経る結合は側鎖基として別の官能性をもたらす。二次反応剤の代表例を下記に示す :

<u>一般式</u>	<u>側鎖基</u>	<u>例</u>	
$\text{HO}-\text{R}$ 、 $\text{R}=\text{アルキル}$ 、 アラルキル 、 アリール 、 フルオロエタノール 、 ポリマー 、 SiR_3	$\text{R}-$	メタノール、フェノール、三フッ化 炭素、 $\text{OH}-$ 末端ポリエステル、 シラノール	
$\text{H}_2\text{N}-\text{R}$ 、 $\text{R}=\text{上記と同一}$	$\text{R}-$	アミン、アニリン、フッ素化アミン、 シリルアミン、アミン末端ポリアミド	10
Cl-SiR_3	SiR_3-	クロロシラン	
$\text{HO}-\text{R}-\text{OH}$ 、 $\text{R}=\text{アルキル}$ 、 アラルキル 、 $\text{CH}_2\text{O}-$	$\text{HO}-$	エチレングリコール、PEG、ペンタエリスリトール、ビスフェノールA	20
$\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{H}_2\text{N}$ $\text{R}=\text{アルキル}$ 、 アラルキル	$\text{H}_2\text{N}-$	エチレンジアミン、ポリエチレンアミン	
$\text{X}-\text{R}-\text{Y}$ 、 $\text{R}=\text{アルキルなど}$ ； $\text{X}=\text{OH}$ または NH_2 ； $\text{Y}=\text{SH}$ 、 CN 、 C=O 、 CHO 、 アルケン 、 アルキン 、 芳香族 、 ヘテロ環	$\text{Y}-$	ポリアミン、アミド、メルカプトエタノール	30

これらの反応は、カルボン酸のアルコールまたはアミンによるエステル化またはアミン化用に開発された方法のいずれかを用いて行うことができる。これらの中で、エステルまたはアミド用のアシル化剤として $\text{N}, \text{N}'-\text{カルボニルジイミダゾール}$ を使用する H. A. Staab による Angew. Chem. Internat. Edit., (i), 351 (1962) の方法およびアミド化用カルボン酸の活性化に $\text{N}-\text{ヒドロキシスクシンイミド}$ (NHS) を使用する G. W. Anderson による J. Amer. Chem. Soc., 86, 1839 (1964) の方法を使用した。

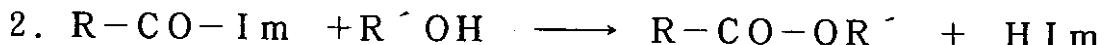
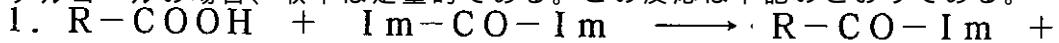
製造例 M

官能化フィブリルの二次誘導体の製造

$\text{N}, \text{N}'-\text{カルボニルジイミダゾール}$

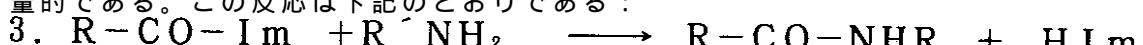
この方法には、清明な乾燥した非プロトン溶剤（例えば、トルエンまたはジオキサン）が必要である。化学量論的量の反応剤で充分である。エステルの場合、カルボン酸化合物は不活性雰囲気（アルゴン）下にトルエン中で、室温において 2 時間、トルエンに溶解した化学量論量の CDI と反応させる。この時間中に、 CO_2 が発生する。2 時間後に、触媒量の Na エトキシドとともにアルコールを添加し、反応を 80 度で 4 時間継続する。規定

アルコールの場合、収率は定量的である。この反応は下記のとおりである。



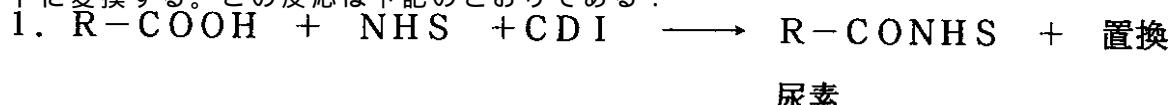
$Im=$ イミダゾリド、 $HIM=$ イミダゾール

アミンのアミド化は室温で触媒なしで生じる。この方法の第一段階は同一である。 CO_2 の発生後に、化学量論量のアミンを室温で添加し、1~2時間反応させる。この反応は定量的である。この反応は下記のとおりである：



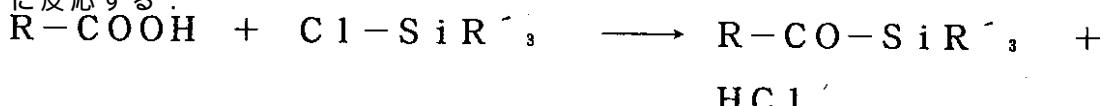
N-ヒドロキシスクシンイミド

一級アミンによるアミノ化のためのカルボン酸の活性化は、N-ヒドロキシスクシンアミルエステルを経て生じる；置換尿素として放出される水を結合するためにカルボジイミドを使用する。このNHSエステルを次いで、室温で一級アミンとの反応によって、アミドに変換する。この反応は下記のとおりである：



シリル化

トリアルキルシリルクロリドまたはトリアルキルシラノールは、下記式に従い酸Hと直ちに反応する：



少量のジアザ-1,1,1-ビシクロオクタン(DABCO)を触媒として使用する。適当な溶媒はジオキサンまたはトルエンである。

製造例N

カルボン酸-官能化フィブリルからのエスチル/アルコール誘導体の製造

カルボン酸-官能化フィブリルは、製造例Kと同様に製造した。カルボン酸含有量は0.75 meq/gであった。フィブリルは、不活性雰囲気下で溶媒としてトルエンを用い室温において、 CO_2 の発生が止むまで、化学量論量のCDIと反応させた。その後に、このスラリーを、80で10倍モル過剰のポリエチレングリコール(分子量600)および触媒として少量のNaOEtと反応させた。2時間の反応後に、このフィブリルを濾過により分離し、トルエンで洗浄し、次いで100で乾燥させた。

製造例O

カルボン酸-官能化フィブリルからのアミド/アミン誘導体の製造

(177-041-1)

塩素演算-酸化フィブリル0.242g(0.62 meq/g)を、セラム(serum)ストッパーを備えた100ml丸底フラスコ中で攪拌しながら、無水ジオキサン20ml中に懸濁した。20倍モル過剰のN-ヒドロキシスクシンイミド(0.299g)を添加し、次いで溶解させた。ここに引き続いて、20倍モル過剰の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDAC)(0.510g)を添加し、攪拌を室温で2時間継続した。この時間の終了時点で、攪拌を止め、上清を吸引除去し、固形物を無水ジオキサンおよびMeOHにより洗浄し、次いで0.45ミクロンのポリスルホン膜上で濾過した。この固形物をフィルター膜上で追加のMeOHにより洗浄し、次い

10

20

40

50

で重量の減少がもはや見られなくなるまで減圧乾燥させた。NHS - 活性化した酸化フィブリルの収率は、見出された6%の重量利得に基づき100%であった。

エチレンジアミン(en)100μlを、0.2M NaHCO₃緩衝液10mlに添加した。当量の酢酸(HOAc)を添加し、pHを8付近に維持した。NHS - 活性化した酸化フィブリル(0.310g)を、激しく攪拌しながら添加し、次いで1時間反応させた。追加の300μlのenおよび300μlのHOAcをさらに10分間かけて添加した。この溶液を0.45ミクロンのポリスルホン膜上で濾過し、次いでNaHCO₃緩衝液、1%HCl、DI水およびEtOHにより順次洗浄した。この固体物を一夜かけて減圧乾燥させた。引き続く分析および反応用に、このHCl塩をNaOHとの反応により遊離アミノに逆変換した(177-046-1)。

ESCAを行い、このアミン化フィブリル上に存在するNの量を定量した(GF/NH₂)。177-046-1のESCA分析は、0.90at%Nを示した(177-059)。このNのうちのどのくらいが、利用できるアミン基および反応性アミン基の両方として存在するかをさらに分析するため、相当する利用できる一级アミン基とのシップ塩基結合を生成させるためにペントフルオロベンズアルデヒドと気相反応させることにより誘導体を製造した。ESCA分析は依然として、予想されたとおりに0.91at%Nおよび1.68at%Fを示した。これは、アミノ化フィブリル上の反応性一级アミンとして存在するNの0.34at%に相当する(5F/ペントフルオロベンズアルデヒド分子)。0.45at%Nのレベルは各Nの遊離末端との推定される完全反応を予想させた。見出されたレベルは、NとNHS - 活性化フィブリルとの反応からの非常に高い収率を示し、利用できる遊離アミン基の反応性を確認させる。

ESCAデータから計算された遊離アミンとして存在する0.34at%のNレベルにおいて、フィブリルは遊離アミン基によりほとんど完全に覆われ、これにより別種の物質のカプリングが可能にされる。

製造例 P

カルボン酸 - 官能化フィブリルからのシリル誘導体の製造

製造例Kと同様に製造された酸 - 官能化フィブリルを不活性雰囲気下にジオキサン中でスラリー化した。攪拌しながら、化学量論量のクロロトリエチルシランを添加し、0.5時間反応させ、次いで数滴のジオキサン中DABC₀5%溶液を添加した。この反応系をさらに1時間反応させ、その後、このフィブリルを濾過により採取し、ジオキサン中で洗浄した。このフィブリルをV減圧で100において一夜かけて乾燥させた。

表Vは二次誘導体製造例をまとめて示すものである。これらの生成物は、C、O、N、S IおよびF表面含有量について、ESCAにより分析した。

表 V

二次誘導体製造の要約

反応剤	側鎖基	分析値，原子%				
		S	C	N	O	Si
成長時	---	—	98.5	—	1.5	—
塩素酸 塩酸化	-COOH, C=O, C-OH	—	92.4	—	7.6	—
H ₂ N-C ₂ H ₄ -NH ₂	-CONHC ₂ H ₄ NH ₂	—	99.10	0.90	—	—
	-CONHC ₂ H ₄ N=OC ₆ F ₅	—	97.41	0.91	—	1.68

製造例 Q

カルボン酸 - 官能化フィブリルからのシリル誘導体の製造

製造例Kと同様に製造された酸官能化フィブリルを、不活性雰囲気下にジオキサン中でスラリー化する。攪拌しながら、化学量論量のクロロトリエチルシランを添加し、0.5時

10

20

30

40

50

間反応させ、次いで数滴のジオキサン中 D A B C O 5 % 溶液を添加する。この反応系をさらに 1 時間反応させ、その後、フィブリルを濾過により採取し、次いでジオキサン中で洗浄する。このフィブリルを 5 減圧で 100 において一夜かけて乾燥させる。

表 V I に、この二次誘導体製造をまとめて示す。生成物は E S C A により分析する。この分析により所望の側鎖基の導入が確認される。この生成物を、 E S C A により C、O、N、S i および F 表面含有量について分析する。

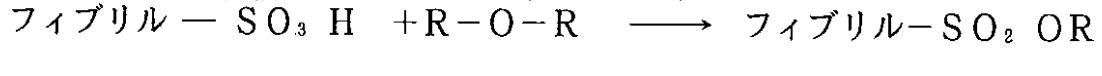
表 V I

二次誘導体製造の要旨

反応剤	側鎖基	分析値、原子%					
		S	C	N	O	Si	F
CF ₃ CH ₂ OH	-COOCH ₂ CF ₃					非分析	
PolyEG-600	-CO-(OC ₂ H ₄ O) _n					非分析	
HO-C ₂ H ₄ -SH	-COOC ₂ H ₄ SH						
Cl-SiEt ₃	-COSiEt ₃						

スルホン酸 - 官能化フィブリル

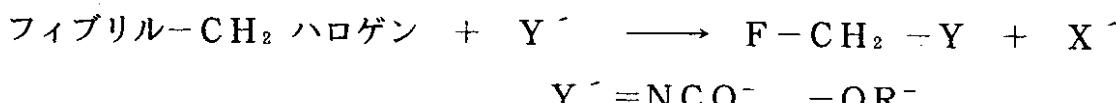
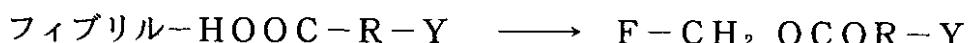
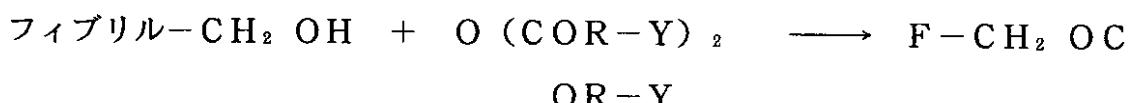
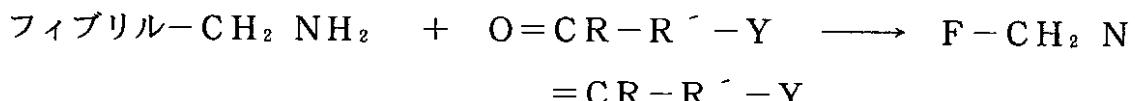
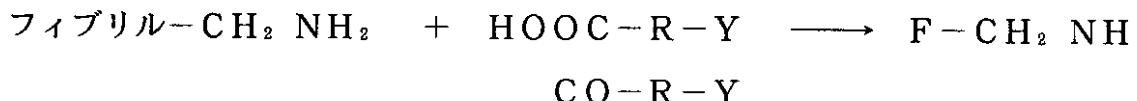
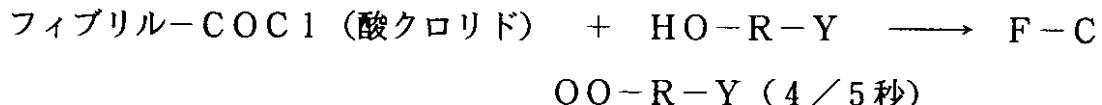
製造例 A と同様に製造されたアリールスルホン酸をさらに反応させて、二次誘導体を生成させることができる。スルホン酸は、 LiAlH₄ またはトリフェニルホスフィンとヨウ素との組合せによりメルカプタンに還元することができる (March, J. F., 1107 頁)。これらの化合物はまた、ジアルキルエーテル化合物との反応によってスルホネートエステルに変換することができる、すなわち、



酸素を含有しないフィブリル表面への求電子性付加によりまたは金属化により官能化されたフィブリル

酸素を含有していないフィブリル表面への活性化求電子性基の付加により得られる一次生成物は、側鎖基 - COOH、- COCl、- CN、- CH₂NH₂、- CH₂OH、- CH₂ハロゲン、または HC=O を有する。これらは下記のとおりに二次誘導体に変換することができる：

フィブリル-COOH → 上記参照



多核芳香族化合物または多ヘテロ核芳香族化合物または平面状巨大環状化合物の吸着により官能化されたフィブリル

ジリチウムフタロシアニン： 一般に、2個のLi⁺イオンは、大部分の金属（特に多価）錯体によりフタロシアニン（Pc）基から置き換えられる。従って、非移動性リガンドと結合した金属イオンによるLi⁺イオンの置換は、フィブリル表面上に安定な官能性基を配置する方法である。ほとんど全部の遷移金属錯体は、PcからLi⁺を置き換え、安定で非移動性のキレートを形成する。この金属は、この部位で適当なリガンドとカプリングする。

コバルト（II）フタロシアニン

コバルト（II）錯体はこの目的に特に適している。Co⁺⁺イオンは2個のLi⁺イオンと置き換えることができ、これにより非常に安定なキレートが生成される。Co⁺⁺イオンは次いで、ニコチン酸などのリガンドに配位結合する。ニコチン酸は側鎖カルボン酸基を有するピリジン環を含有し、かつまたピリジン基に優先的に結合することが知られている。過剰のニコチン酸の存在下に、Co(II)PcはCo(III)Pcに電気化学的に酸化させることができ、ニコチン酸のピリジン分子と非移動性の錯体を形成する。従って、ニコチン酸リガンドの遊離カルボン酸基はフィブリル表面に堅古に結合する。

別種の適当なリガンドは、一末端にアミノ-またはピリジル-分子のどちらかを有し、もう一方の末端にいずれか所望の官能性基を有するアミノピリジン類またはエチレンジアミン（側鎖NH₂）、メルカプトピリジン（SH）またはその他の多官能性リガンドである。

7.3 - 次元構造体

酸化フィブリルは未酸化フィブリルに比較して、水性媒質中に容易に分散する。メソ-およびマクロ孔を有する(>2nm孔)、安定な有孔3次元構造体は、触媒またはクロマトグラフィ支持体として非常に有用である。フィブリルは個別化して分散させることができることから、架橋結合により安定化される良好に分散されている試料は、このような支持体の構築を可能にする。官能化フィブリルは水性媒質および極性媒質中に容易に分散し、

10

20

30

40

50

その官能性基が架橋結合部位を提供することから、これらはこの用途にとって理想的である。さらにまた、この官能性基は触媒部位またはクロマトグラフィ用部位を支持する場所を提供する。この結果として、その総表面積を、その上に活性剤を支持するための官能性部位として利用できる、堅古な3次元構造体が得られる。

触媒における、これらの支持体の代表的用途には浸漬により配置される金属触媒用の、例えば貴金属水素添加触媒用の多孔質支持体としてのそれらの使用が含まれる。さらによくまた、この構造体の非常に高い有孔性と組み合わされている官能性基を介する支持体への結合により分子状触媒を固定する能力は、均質反応を不均質相で実施することを可能にする。結合した分子状触媒は基本的に、均質反応器に対するものと同様の連続液相における懸垂（ダングリング（dangling））であり、これは均質反応に付随する選択性および速度における利点を利用することを可能にする。しかしながら、固体支持体への結合は活性成分およびかなりの場合に非常に高価な触媒の容易な分離および採取を可能にする。

これらの安定で堅固な構造体はまた、従来非常に困難であった反応、例えば不斉合成または適当なエナンチオマー触媒または選択性基質を支持体に結合させることによるアフィニティクロマトグラフィの実施を可能にする。メタロ（Metallo）-Pcまたはメタロ-ポルフィリン錯体を経る誘導体化はまた、金属イオンに結合したリガンドの回復を可能にし、さらにまたこの二次誘導体を経て、全部の分子をリガンドに結合させることを可能にする。一例として、官能化フィブリルの3次元構造体が電極である場合、あるいは電極の一部である場合、およびまたこの官能化がCo(II)Pcの吸着の結果である場合、ニコチン酸の存在におけるCo(II)からCo(III)への酸化が、側鎖基としてカルボン酸を有する非移動性のCo(III)-ピリジル錯体を生成させる。適当な抗原、抗体、触媒性抗体、またはその他の部位-特異性捕獲剤の結合は、別段では達成が非常に困難である分子の選択的分離（アフィニティクロマトグラフィ）を可能にする。この電極を洗浄して、封入されている物質を除去した後に、標的分子を含有するCo(III)錯体を電気的に還元し、移動性Co(II)錯体を採取することができる。標的分子を含有するCo(II)上のリカンドは次いで、移動性Co(II)リカンドの質量作用置換により採取することができ、これにより別段では実施が非常に困難であるか、または高価である分子（例えば、キラル医薬）の分離および採取を行うことができる。

3次元構造体のもう一つの例にはフィブリル-セラミック複合体がある。

製造例 R

アルミナ-フィブリル複合体の製造（185-02-01）

硝酸酸化したフィブリル1g（185-01-02）をD1水100cc中にU/S崩壊剤を用いて、高度に分散させた。このフィブリルスラリーを90℃に加熱し、次いでプロパノール20ccに溶解したアルミニウムトリプトキシド0.04モルの溶液をゆっくり添加した。還流を4時間継続し、その後コンデンサーを取り除き、アルコールを追い出した。30分後に、コンデンサーを再度取り付け、このスラリーを100℃で一夜かけて還流させた。均一な外観を有する黒色溶液が得られた。この溶液を室温で冷却させ、1週間後に、滑らかな表面を有する黒色ゲルを生成した。このゲルを空气中で300℃に12時間加熱した。

このアルミナ-フィブリル複合体を、SEMにより試験した。碎いた表面の顕微鏡写真はゲル中のフィブリルの均一な分散を示した。

製造例 S

シリカ-フィブリル複合体の製造（173-85-03）

硝酸酸化したフィブリル2g（173-83-03）をエタノール200cc中に超音波処理を用いて高度に分散させた。このスラリーに室温において、エタノール50ccに溶解したテトラエトキシシラン0.1モルの溶液をゆっくり添加し、次いで濃HCl 3ccを添加した。この混合物を85℃に加熱し、容積が100ccに減少するまで、この温度に維持した。この混合物を冷却させ、黒色固形ゲルが生成されるまで放置した。

このシリカ-フィブリル複合体をSEMにより試験した。碎いた表面の顕微鏡写真はゲル

10

20

30

40

50

中のフィブリルの均一な分散を示した。

ジルコニア、チタニア、稀土類オキシドおよびまたターナリーオキシドなどのその他のセラミックを用いて類似の調製物を製造することができる。

前記説明および例により例示されているように、本発明は広く種々の官能化ナノチューブの形成に用途を有する。

使用されている用語および表現は、説明の用語として使用されており、制限しようとするものではない。これらの用語または表現の使用は、その一部として示され、説明されている特徴に均等なものの全部を排除しようとするものではない。種々の修正が本発明の範囲内で可能であるものと認識される。

発明の好適態様の説明

10

本発明の分析法には、広く種々のナノチューブを使用することができるが、一般にナノチューブは $1.0 \sim 5.0 \text{ g / m}^1$ の密度を有し、好ましくは $1.1 \sim 3 \text{ g / m}^1$ の密度を有する。最適密度は当業者の範囲内にあり、重力・駆動分析法における沈降速度は、本分析の速度と電極表面上の錯体の均一層を生成させたいという希望との間の駆け引きである。

広範囲の平均径を有するナノチューブをまた採用することができる。 $0.001 \sim 100 \mu\text{m}$ の平均径を有する粒子を使用することができ、好ましくは、この粒子は $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ の平均径を有する。このナノチューブの長さは、この径の少なくとも5倍である。アッセイ組成物中の粒子の濃度は広範囲にわたり使用することができる。一例として、この濃度は、 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g / m}^1$ 、好ましくは $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ g / m}^1$ の範囲であることができる。好ましくは、この粒子の密度、それらのサイズおよびそれらの濃度は、粒子が少なくとも 0.5 mm / 分 の速度で、好ましくはさらに早い速度で沈降するように選択する。

20

本発明の実施における濾過方式において、濾過手段は好ましくは、平均径として測定して、広くは粒子の平均径の $0.01 \sim 90\%$ 、好ましくは粒子の平均径の $10 \sim 90\%$ である孔サイズを有する。

ナノチューブは、常磁性または強磁性であることができ、かつまた当該磁性粒子を分析に使用できるように、結合性化合物がカップリングする種々の物質で被覆することもできる。好ましくは、本発明で使用される磁性ナノチューブは、少なくとも 0.001 cqs 単位の感受性、好ましくは少なくとも 0.001 cqs 単位の感受性を有する。磁性ナノチューブは、広範囲の密度を有することができる。すなわち、水の比重よりも実質的に小さい比重、 $0.01 \sim 5 \text{ g / m}^1$ 、好ましくは $0.5 \sim 2 \text{ g / m}^1$ の比重を有する。これらの粒子サイズは $0.001 \sim 100 \mu\text{m}$ 、好ましくは $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲であることができる。粒子の濃度は、広くは $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g / m}^1$ 、好ましくは $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ g / m}^1$ の範囲であることができる。

30

好ましくは、使用される磁性ナノチューブは、例えばE P O , 1 8 0 , 3 8 4 に記載されているように、低い磁気共鳴性を備え、従って、磁場が電極表面から取り除かれた後に、このナノチューブは脱磁性化し、分析セルから排除することができる。好ましくは、磁性ナノチューブの比重、濃度およびサイズは、沈降時間が少なくとも 0.5 mm / 分 であり、好ましくはこの速度以上であるように選択する。磁性セルの操作では、光電子増倍管の動作を干渉させないために、電気化学的発光を誘発させる前に、電極表面から磁気手段を取り除くことがしばしば望ましい。

40

分析

本発明の方法を使用して、種々の分析を行うことができる。分析は、官能化カーボンナノチューブを用いて行うことができる。分析には、カーボンナノチューブを使用する加水分解性酵素のE C L分析が含まれる。カーボンナノチューブ(フィブリル)は加水分解性酵素の基質により化学的に修飾される。フィブリルから最も遠い基質の末端をR u (b p y)₃²⁺の誘導体に結合させた。この固体相の一般構造は、次のとおりである：フィブリル - 基質(分裂し易い結合) - R u (b p y)₃²⁺。分裂し易い結合を分裂させる酵素が存在する場合、この基質のR u (b p y)₃²⁺末端が酵素の作用により溶液中に放出され

50

る。引き続く混合および酵素とのフィブリルのインキュベート後に、このフィブリルを溶液から取り出す（濾過または遠心分離による）。残留する溶液の E C L を測定する。酵素が存在する場合、基質の Ru (b p y)₃²⁺ 末端は溶液中に存在し、光を発生する。従って、特定の酵素の存在は、この混合物の溶液相からの発光をもたらす。この分析は、抗体を包含しないことからプロテアーゼ用の新規 E C L 分析法である（イムノアッセイではない）。従って、この方法は酵素の存在による分析法というよりはむしろ、酵素活性による分析法であるという利点を有する。さらにまた、この分析法は、固体支持体としてフィブリルを使用する。フィブリルは、それらの広い表面積を有し、かつ酵素基質などの生体分子の結合に対する従順性を有することから、魅力的である。さらにまた、官能化フィブリルは流動性膜（m a t）に形成することができる。酵素混合物を急速に流動させ、Ru (b p y)₃²⁺ を放出させることができ、これにより分析は迅速にかつまた容易にされる。
10 フィブリルおよび E C L を用いる D N A プローブ分析を行った。カーボンナノチューブ（フィブリル）は、生物学的液体および添加試薬を含有することができる複合混合物からアナライトを分離するための分離手段としての D N A プローブ分析において固体支持体として使用した。フィブリルは共有結合により（N H S エステルを介する）、またはアルキルフィブリルへの吸着により、アビジン（a v i d i n）[またはストレプトアビジン（s t r e p t a v i d i n）]により修飾した。このアビジンフィブリルにビオチニル化（b i o t i n y l a t e d）s s D N A（これはアナライトである）を結合させ、次いで Ru (b p y)₃²⁺ で標識した補足一重鎖オリゴヌクレオチドの E C L によって検出した。
20

天然（非ビオチニル化）D N A 断片を検出するための方式の一つに、競合方式があり、この方式では、Ru (b p y)₃²⁺ - 標識したオリゴを天然 D N A または導入されたビオチニル化 D N A のどちらかに結合させることができる。従って、存在するアナライトが多いほど、ビオチニル化 D N A に結合するために残留する標識したオリゴは少なくなる。ビオチニル化 D N A はアビジンフィブリル上に捕獲されると、E C L シグナルを発する。これは D N A 分析に使用された最初のカーボンナノチューブである。その利点には、（1）カーボンナノチューブは非常に大きい表面積を有し、これは必要な固体支持体の量が別種の固体支持体よりも少ないことを意味する。（2）フィブリルは電導性であり。これは E C L 用途における固体支持体として魅力的な性質であり、この場合、固体支持体は電極に支持される。電導性である場合、電導性ではない別種の支持体に比較して、表面積が大きいほど、電気化学的容量は大きくなる。
30

カーボンナノチューブ（フィブリル）に不動化した抗体を使用する E C L に基づくイムノアッセイは有利である。抗体フィブリルは競合性イムノアッセイ方式（この場合、アナライトと Ru (b p y)₃²⁺ - 標識したアナライトとの間に、抗体フィブリルへの結合にかかわり競合が生じる）、あるいはサンドイッチ方式（この場合、Ru (b p y)₃²⁺ - 標識した二次抗体は抗体フィブリル - アナライト複合体に結合する）において、E C L 用途に使用することができる。両方の場合に、E C L 発光は対象のアナライトの存在または不存在にかかわる信号を発生する。抗体は数種の相違する方法によって、共有手段または非共有手段によって、フィブリル上に不動化することができる。非共有不動化の場合、抗体は未修飾フィブリル上に、または吸着特性を増大させるために修飾されているフィブリル上に吸着させる。このような修飾フィブリルは疎水性の付加基（アルキル鎖またはフェニル - アルキル鎖）を有する。フィブリル上への抗体の共有不動化は、3種の相違する方法により達成することができる：すなわちカルボキシル化フィブリルのN H S エステル活性化により、抗体炭水化物基の還元的アミノ化により、および還元された抗体またはマレイミド - 修飾された抗体と反応するスルフヒドリル / マレイミドフィブリルにより達成することができる。カーボンフィブリル上への抗体の不動化は有利である。抗体フィブリルは抗体用の別種の固体支持体に比較して、多くの特異な性質を有する。これらの利点には、大きい表面積 / 重量、電導性（特に E C L 用途において）、ならびに化学的および物理的安定性が含まれる。
40

カーボンナノチューブを E C L に基づくバイオセンサーとして使用した。二官能性フィブ

リルを製造した。この場合、酵素補因子NAD⁺の誘導体を一方の官能性基に結合させ、かつまたRu(bpy)₃²⁺の誘導体をもう一方の官能性基(COOH)に結合させた。このバイオセンサーフィブリルを、アナライト(この場合、デヒドログナーゼ、G6PDH)含有溶液と混合し、次いでこのデヒドログナーゼの基質(この場合、グルコース-6-ホスフェート)を添加した。その基質との反応およびフィブリル上のNAD⁺のNADHへの変換に適する時間の後に、このフィブリルのECLをECL装置で測定した。バイオセンサーフィブリルのECL性質における変化は、酵素、G6PDH、の存在を示した。次の利点が見出された：(1)共反応剤であるNAD⁺とRu(bpy)₃²⁺との密接な近似関係は分子外ECL反応をもたらし、これは分子内ECL反応に比較して効果的である。(2)ECL活性試薬(NAD⁺およびRu(bpy)₃²⁺共反応剤)はフィブリル上に不動化され、これによりECL電極に磁性により引きつけられるか、または沈降することが可能になり、際立った発光が得られる。(3)フィブリルは格別に大きい表面積を有しており、従って大量の共反応剤(NAD⁺およびRu(bpy)₃²⁺)を不動化させることができ、これにより理論的には、デヒドログナーゼ検出中の光発生量が増加される。(4)フィブリルは電気的に伝導性であり、バイオセンサーが電極に達すると、電極と実際には接触していないそれらの表面積のより広い部分が電圧を受けることができ、特にECL反応においてそうである。(5)バイオセンサーを、補因子としてNAD⁺またはRu(bpy)₃²⁺のどちらかを用いるデヒドログナーゼ検出用にデザインすることができる。これらの酵素のかなりが存在し、本発明を用いて検出できた。

カーボンフィブリルを酵素バイオセンサー用の固体支持体として使用した。この酵素バイオセンサーは溶解性であることから、不動化しない限り1回でのみ使用することができる(不動化はアナライト溶液からの回収を可能にする)。米国出願Serial No. 08/467,712は、固体支持体への、および(固体)電極への不動化を開示し、特許請求している。この出願は、固体支持体としてのカーボンフィブリルの使用を示している。この酵素バイオセンサーは、吸着によりフィブリルに結合させることができる。このフィブリルは未修飾フィブリルであるか、あるいは好ましくは化学的に修飾されたフィブリルである。このフィブリルの化学的修飾は好ましくは、アルキル化である。バイオセンサーの吸着は、酵素バイオセンサーとアルキル化フィブリルとを混合しながらインキュベートすることによって行われる。固体支持体としてのフィブリルは新規であり、かつまた次の利点を有する：(1)これらは強力な多大な発光をもたらす不動化された大きい表面積を有する；(2)バイオセンサーなどの蛋白質は、共有化学性によることなく、共有的に吸着される；(3)フィブリルは電導性であり、電極と接触させると、ECLを際立たせることができる；(4)フィブリルそれ自体を電極に形成することができ、この場合、電極それ自体がバイオセンサー支持体になる。

磁気感受性粒子は、分離用デバイスとして有用である。例えば、複合混合物からの特定のアナライトの分離は、血液などのようにアナライトが複合した混合物中に存在する診断分野で有用である。この複合混合物はアナライトの分析を干渉することがあることから、固体表面にアナライトを結合させ、これにより複合混合物をアナライトから洗出することができ、その測定が可能にされることは望ましいことである。所望のアナライトを磁気感受性粒子に特異的に結合させることができる場合、この粒子は磁気により保持することができ、従って複合混合物からのアナライトの洗出が可能になり、このアナライトを次いで、検出することができる。フィブリルは生体分子を特異的に、かつまた効果的に結合することができる粒子であることから、磁気感受性フィブリルは、特にECL分析における固体相分離デバイスとして有利に使用される。フィブリルは予備処理により、例えば化学反応またはこれらを懸濁する溶媒の変更により(例えば、水からDMFに)、磁気感受性にすることができる。)このような操作は多数のフィブリルの物理的凝集における変化を生じさせるものと考えられる。フィブリルはそれらの中に、若干(約0.5重量%)の鉄を含有し、一旦凝集すると、実質的に磁気感受性になる。フィブリルの磁気感受性を増大させる数種の処理を行った。これらの処理は、フィブリルの凝集性に変化を生じさせ、この変化は次いで、磁気への効果的な吸引を生じせるものと推定される。磁気感受性フィブリルを製造した。この場合、酵素補因子NAD⁺の誘導体を一方の官能性基に結合させ、かつまたRu(bpy)₃²⁺の誘導体をもう一方の官能性基(COOH)に結合させた。このバイオセンサーフィブリルを、アナライト(この場合、デヒドログナーゼ、G6PDH)含有溶液と混合し、次いでこのデヒドログナーゼの基質(この場合、グルコース-6-ホスフェート)を添加した。その基質との反応およびフィブリル上のNAD⁺のNADHへの変換に適する時間の後に、このフィブリルのECLをECL装置で測定した。バイオセンサーフィブリルのECL性質における変化は、酵素、G6PDH、の存在を示した。次の利点が見出された：(1)共反応剤であるNAD⁺とRu(bpy)₃²⁺との密接な近似関係は分子外ECL反応をもたらし、これは分子内ECL反応に比較して効果的である。(2)ECL活性試薬(NAD⁺およびRu(bpy)₃²⁺共反応剤)はフィブリル上に不動化され、これによりECL電極に磁性により引きつけられるか、または沈降することが可能になり、際立った発光が得られる。(3)フィブリルは格別に大きい表面積を有しており、従って大量の共反応剤(NAD⁺およびRu(bpy)₃²⁺)を不動化させることができ、これにより理論的には、デヒドログナーゼ検出中の光発生量が増加される。(4)フィブリルは電導性であり、バイオセンサーが電極に達すると、電極と実際には接触していないそれらの表面積のより広い部分が電圧を受けることができ、特にECL反応においてそうである。(5)バイオセンサーを、補因子としてNAD⁺またはRu(bpy)₃²⁺のどちらかを用いるデヒドログナーゼ検出用にデザインすることができる。これらの酵素のかなりが存在し、本発明を用いて検出できた。

カーボンフィブリルを酵素バイオセンサー用の固体支持体として使用した。この酵素バイオセンサーは溶解性であることから、不動化しない限り1回でのみ使用することができる(不動化はアナライト溶液からの回収を可能にする)。米国出願Serial No. 08/467,712は、固体支持体への、および(固体)電極への不動化を開示し、特許請求している。この出願は、固体支持体としてのカーボンフィブリルの使用を示している。この酵素バイオセンサーは、吸着によりフィブリルに結合させることができる。このフィブリルは未修飾フィブリルであるか、あるいは好ましくは化学的に修飾されたフィブリルである。このフィブリルの化学的修飾は好ましくは、アルキル化である。バイオセンサーの吸着は、酵素バイオセンサーとアルキル化フィブリルとを混合しながらインキュベートすることによって行われる。固体支持体としてのフィブリルは新規であり、かつまた次の利点を有する：(1)これらは強力な多大な発光をもたらす不動化された大きい表面積を有する；(2)バイオセンサーなどの蛋白質は、共有化学性によることなく、共有的に吸着される；(3)フィブリルは電導性であり、電極と接触させると、ECLを際立たせることができる；(4)フィブリルそれ自体を電極に形成することができ、この場合、電極それ自体がバイオセンサー支持体になる。

磁気感受性粒子は、分離用デバイスとして有用である。例えば、複合混合物からの特定のアナライトの分離は、血液などのようにアナライトが複合した混合物中に存在する診断分野で有用である。この複合混合物はアナライトの分析を干渉することがあることから、固体表面にアナライトを結合させ、これにより複合混合物をアナライトから洗出することができ、その測定が可能にされることは望ましいことである。所望のアナライトを磁気感受性粒子に特異的に結合させることができる場合、この粒子は磁気により保持することができ、従って複合混合物からのアナライトの洗出が可能になり、このアナライトを次いで、検出することができる。フィブリルは生体分子を特異的に、かつまた効果的に結合することができる粒子であることから、磁気感受性フィブリルは、特にECL分析における固体相分離デバイスとして有利に使用される。フィブリルは予備処理により、例えば化学反応またはこれらを懸濁する溶媒の変更により(例えば、水からDMFに)、磁気感受性にすることができる。)このような操作は多数のフィブリルの物理的凝集における変化を生じさせるものと考えられる。フィブリルはそれらの中に、若干(約0.5重量%)の鉄を含有し、一旦凝集すると、実質的に磁気感受性になる。フィブリルの磁気感受性を増大させる数種の処理を行った。これらの処理は、フィブリルの凝集性に変化を生じさせ、この変化は次いで、磁気への効果的な吸引を生じせるものと推定される。磁気感受性フィブリ

ルは、少なくとも二つの特異な利点を有する。すなわち、少ない必要量リフィブリルを使用して、同一結果が得られる[例えば、ダイナル(Dynal)ビーズに比較して]。第二に、これらは磁気感受性粒子を電極に保持するECLなどの用途において利点を有する。すなわち、電導性であることから、これらは実際に、電極の一部になり、これにより光発生量が増大される。

例

(1) 装置

図1および2に記載されているような3個の電極を使用する一貫生産装置(flow-through apparatus)を使用した。

作用電極 - - Audiディスク、3mm径

10

対極 - - Audiディスク、3mm径

基準電極 - - Ag / AgCl

テフロン(Teflon)ガスケット(0.15厚さ)

ブレキシガラスフェースプレート

導入管 = 0.042 id ポリプロピレン

吸引速度: 0.01ml/分から5ml/分まで可変性

ポテンショスタット:マイクロプロセッサー制御

ハママツ(Hamamatsu)R374PMT(低ゲイン赤色感受性管)を使用する輝度測定計; PWT電圧: 0~1400Vで可変性

(2) ECL測定回路(3電極セル操作)

20

ECL測定回路は3段階からなる:

(1) 予備コンディショニング; (2) 測定; および(3)クリーニング。

予備コンディショニング工程は2.0V/秒において、0.0V - +2.2V - - 1.0V - +0.6Vの電圧三点波形(voltage triangle wave)の印加を包含する。測定工程は、1.0V/秒において、+0.6V - +2.8V - +2.0Vの三点波形の印加を包含する。クリーニング工程は、+0.0Vから+3.0V - - 0.5V - 0.0Vの電圧四点波形(voltage square wave)の印加を包含する。全部の電圧は、Ag / AgCl基準電極に対するものである。

例1

30

ルテニウムタグペプチドフィブリルの合成

本例は、ECLアナライザーにおける酵素検出試薬の合成を示している。

ルテニウムペプチドフィブリルの合成:

Fmoc NH-Gly-Lys(N-CBZ)-Phe-Gly-COOHのテトラペプチドを慣用の溶液相方法により合成し、このペプチド(71mg、0.093mmol)を、Ru(bpy)₃²⁺(I GEN, Inc., Gaithersburg, MD)(73mg、0.078mmol)の一級アミン誘導体化合物と反応させ、EDC(17.8mg、0.093mmol)を活性化試薬として使用し、そしてHOBT(12.58mg、0.093mmol)を触媒として使用した。生成物、Fmoc NH-Gly-Lys(N-CBZ)-Phe-Gly-CO-NHタグ(170mg、0.223mmol)をピペリジン(96ml)およびメチレンクロリド(1.1ml)により脱保護化した。このテトラペプチド-Ru(bpy)₃²⁺化合物の構造は、¹H-NMRにより確認した。このテトラペプチド-Ru(bpy)₃²⁺(5mg、0.003mmol)のメチレンクロリド(2ml)溶液に、カルボキシリルフィブリル(54mg)を添加した。次いで、EDC(5.8mg、0.03mmol)およびHOBT(4mg、0.03mmol)を添加した。この反応混合物を一夜にわたり攪拌した。このフィブリルを水、メタノール、アセトニトリルおよびメチレンクロリドにより徹底的に洗浄した。生成したフィブリルを40℃で3時間、アセトニトリル(4ml)中のトリメチルシリルヨウダイド(TMSI、1ml)で処理した。この最終生成フィブリルを水、メタノール、アセトニトリル、I GEN標準ECL分析用緩衝液(I GEN, Inc., Gaithersbur

40

50

g, M D) およびメチレンクロリドにより徹底的に洗浄した。

例 2

R u (b p y)₃²⁺ - 標識したペプチドフィブリルを用いるトリプシンおよびキモトリプシン活性の E C L 分析

R u (b p y)₃²⁺ - 標識したテトラペプチド (N H₂ - G l y - L y s - P h e - G l y - R u (b p y)₃²⁺) を、例 1 に記載のとおりにカルボキシル化フィブリルに結合させた。この R u (b p y)₃²⁺ - 標識したペプチドフィブリル (R P F) を使用して、加水分解性酵素トリプシンおよびキモトリプシンの活性を検出した。簡単に説明すると、これらの酵素のどちらか、または両方を含有する水性溶液に R P F を添加した。このペプチドはトリプシンおよびキモトリプシンの両方に対する特異的分裂部位を含有するようにデザインされていることから (図 3) 、およびまたこのフィブリルは固体であることから、酵素の作用は、 P h e - G l y - R u (b p y)₃²⁺ (トリプシン) または G l y - R u (b p y)₃²⁺ (キモトリプシン) のどちらかを溶液中に遊離させる。この固体相ペプチドを酵素が分裂させるのに適するインキュベーション時間の後に、遠心分離、濾過または磁気によるフィブリルの分離などの標準的手段により、フィブリルから水性溶液を分離した。この水性溶液中に遊離した P h e - G l y - R u (b p y)₃²⁺ または G l y - R u (b p y)₃²⁺ を次いで、 E C L により検出した。

トリプシンおよびキモトリプシンの分析をここで説明したが、その他の加水分解性酵素を、相当する R u (b p y)₃²⁺ - 標識した酵素基質に結合させたフィブリルを用いて検出することができた。このような酵素 (および修飾フィブリル) には下記のものが含まれる : ヌクレアーゼ (R u (b p y)₃²⁺ - 標識した R N A 、一重鎖 D N A 、または二重鎖 D N A に結合させたフィブリルを使用する) 、グリコシダーゼ (R u (b p y)₃²⁺ - 標識した糖、オリゴサッカライド、またはポリサッカライドに結合させたフィブリルを使用する) 、あるいはリパーゼ (R u (b p y)₃²⁺ - 標識した脂質に結合させたフィブリルを使用する) 。

例 3

フィブリルを使用するトリプシンの E C L 検出

標準 E C L 分析用緩衝液 (I G E N , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) 中の R P F (フィブリル - G l y - L y s - P h e - G l y - R u (b p y)₃²⁺) の懸濁液 (2 . 2 m g / m l) 2 . 9 7 m l に、 1 m M H C l 中の 5 8 . 9 μ M トリプシン (最終濃度 = 0 . 5 9 μ M) 3 0 μ L または 1 m M H C l 3 0 μ L のどちらかを添加した。これら 2 つの懸濁液を次いで、室温で回転させた。定期的に回転を止め、懸濁液を迅速に遠心分離し、次いでこの水性上清の E C L を測定した。3 0 分のインキュベーション後の E C L 結果は、試料の E C L 比 (トリプシン含有 E C L / トリプシン非含有 E C L) は 1 . 2 9 であったことを示した。4 4 時間後、この E C L 比は 2 . 0 5 であった。これらの結果は、フィブリルからの電気化学ルミネセンスのルテニウム標識の加水分解的遊離に対するその能力によって、トリプシンを検出できたことを証明している。

例 4

フィブリルを使用するキモトリプシンの E C L 検出

標準 E C L 分析用緩衝液 (I G E N , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) 中の R P F (フィブリル - G l y - L y s - P h e - G l y - R u (b p y)₃²⁺) の懸濁液 (0 . 1 5 m g / m l) 2 . 9 7 m l に、 1 m M H C l 中の 3 4 . 2 μ M キモトリプシン (最終濃度 = 0 . 3 4 μ M) 3 0 μ l または 1 m M H C l 3 0 μ l のどちらかを添加した。これら 2 つの懸濁液を室温で回転させた。定期的に回転を止め、懸濁液を迅速に遠心分離し、次いでこの水性上清の E C L を測定した。試料の初期 (時間 = 0) E C L 比 (キモトリプシン含有 E C L / キモトリプシン非含有 E C L) は 1 . 0 6 であったことを示した。3 0 分のインキュベーション後に、この比は 1 . 2 5 に上昇し、そして 2 3 時間のインキュベーション後に、この比は 1 . 8 5 に上昇した。これらのデータは、フィブリル固体支持体から電気化学ルミネセンスの標識、 R u (b p y)₃²⁺ 、を遊離させるこの酵素の能力によって、キモトリプシン活性を検出できたことを示している。

10

20

30

40

50

例 5N H S エステルを経るフィブリルへの蛋白質の共有結合

蛋白質がN H S エステルを介してフィブリルに共有結合することができることを証明するために、フィブリルに、ストレプトアビジン、アビジンおよびトリプシンを結合させた。N H S - エステルフィブリル 0 . 5 m g を、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) で 5 回洗浄し、その上清は廃棄した。このフィブリルに、2 0 0 μ l ストレプトアビジン溶液 (同一緩衝液中の 1 . 5 m g) を添加し、この混合物を室温で 5 . 5 時間回転させた。このフィブリルを次いで、下記緩衝液 1 m l により順次洗浄した：5 mM リン酸ナトリウム (p H = 7 . 1) 、P B S (0 . 1 M リン酸ナトリウム、0 . 1 5 M N a C l 、p H = 7 . 4) 、O R I G E N 分析用緩衝液 (I G E N , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) および P B S 。このストレプトアビジンフィブリルは、さらに使用するために P B S 緩衝液中で保存した。

N H S - エステルフィブリル 2 . 2 5 m g を、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) 5 0 0 μ l 中で 4 0 分間、音波処理し、その上清は廃棄した。このフィブリルを、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) 5 0 0 μ l 中に懸濁し、次いで同一緩衝液中にアビジン 2 m g (S i g m a , A - 9 3 9 0) を含有するアビジン溶液 3 0 0 μ l を添加した。この混合物を室温で 2 時間回転させ、4 度一夜保存し、次いで室温でさらに 1 時間回転させた。このフィブリルを、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) 1 m l で 4 回および P B S 緩衝液 1 m l で 2 回、洗浄した。このアビジンフィブリルを P B S 緩衝液 2 0 0 μ l 中に懸濁し、保存した。

トリプシンフィブリルは、N H S - エステルフィブリル 1 . 1 m g (アビジンフィブリルの場合と同様に処理した) および 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) 中の 1 . 0 6 mM トリプシン溶液 2 0 0 μ l を混合し、次いで室温で 6 . 5 時間回転させることによって製造した。このトリプシンフィブリルを次いで、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) 1 m l で 3 回洗浄し、同一緩衝液 4 0 0 μ l 中に懸濁して保存した。

例 6E C L アナライザーを用いるD N A プローブ分析

E C L 分析法において、ストレプトアビジン (またはアビジン) 結合フィブリルに対するアナライトの非特異的結合を排除するために、これらのフィブリルを 4 m g / m l の B S A (ウシ血清アルブミン) 溶液により室温で 6 時間、次いで 4 度一夜かけてブロックした。

D N A プローブ分析法は図 4 に示されている。この実験は B S A ブロックしたアビジン - フィブリルおよびストレプトアビジン - フィブリル (例 5 から) 1 1 5 μ l を 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H = 7 . 1) で 2 回洗浄することから開始した。各フィブリルを同一緩衝液 1 0 0 μ l 中の ~ 5 7 μ g で、2 本の管に適量分割した。(ストレプト) アビジンフィブリルの 1 本の管は、ルテニウムタグで標識したオリゴマーに結合させた 4 n M ピオチニル化 D N A (7 0 ヌクレオチド) 4 μ l と混合した。もう 1 本の管には、対照分析用に、ルテニウムタグで標識したオリゴマー (ピオチニル化 D N A 試料と同一濃度) 4 μ l を添加した。これらの反応混合物を室温で 1 5 分間インキュベートし、次いで O R I G E N 分析用緩衝液 (I G E N , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) 3 0 0 μ l で 7 回洗浄した。このフィブリルを次いで、O R I G E N 分析用緩衝液 6 0 0 μ l 中に懸濁し、フィブリルの重力捕獲を用いて 2 本の管に等量分割し、デュプリケート E C L 計測した。E C L 分析結果を下記にまとめて示す：

試料

EDL計測値

アビジンフィブリル (対照)	161
アビジンフィブリル (DNAプローブ)	2212
ストレプトアビジンフィブリル (対照)	885
ストレプトアビジンフィブリル (DNAプローブ)	4248

アビジンフィブリルの同一分析をまた、フィブリルの磁気捕獲を用いて行った。この実験方法は、DNAをフィブリルに結合させた後に洗浄しないことを除いて、上記と同一であった。この試料をプログラムされた工程に従いECLアナライザーで洗浄した。ECL計測値は、アビジンフィブリルDNAプローブについて、3835であったのに対して、対照では205であった。

C8 - フィブリル上に吸着したアビジンをまた、上記フィブリルの磁気捕獲を用いるDNAプローブ分析法により試験した。ECL計測値は、アビジンフィブリルDNAプローブについて、15,792であったのに対して、対照では205であった。

例7

カーボンナノチューブ上への抗体の共有不動化

本例の目的は、カーボンナノチューブの表面上に抗体を不動化することにある。このような抗体 - 修飾したナノチューブは特定のアナライトのイムノアッセイ検出および生体特異性アフィニティ分離を包含する種々の用途で使用することができる。イムノアッセイは、抗体 - 修飾したナノチューブを固体支持体として使用して行うことができる。固体支持体が固定されているか、あるいは別の手段で溶液相から分離されている（例えば、濾過、遠心分離または磁化による）場合、固体支持体の使用は洗浄工程を可能にする。洗浄工程の使用は、かなりの型式の電気化学的発光に基づくイムノアッセイにおける抗体 - 修飾ナノチューブの使用を可能にする。この抗体 - 修飾ナノチューブは常用されている磁性ビーズの代わりに使用することができ、あるいは濾過により捕獲することができる感受性支持体としてまたは永久固定支持体イオンの廃棄できるカートリッジとして使用することができる。

一級アミン基とカルボキシル基との間のフィブリル - 抗体カプリング

NHSエステルフィブリルの生成

CH_2Cl_2 / ジオキサン混合物中のカーボンフィブリル (Hyperion Catalyst International, Cambridge, MA) 148.4 mg の懸濁液を、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 239 mg および EDC 399 mg と混合し、反応を 4 時間進行させた。生成する NHS エステル - 修飾フィブリル (NHS - フィブリル) の収量は 214.7 mg であった。

抗体 - 修飾フィブリルの生成

NHS エステルフィブリル (84.5 mg) を、カプリング用懸濁液 (0.2 M NaHCO₃、pH 8.1) 1.0 ml で予備処理し、次いで追加の 1.0 ml のカプリング用懸濁液 (0.1 M リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、pH 7.5) に懸濁した。このフィブリルに、モノクローナル抗体 (抗 - グルコースオキシダーゼ) (カプリング用懸濁液 2 ml 中の 1.5 mg) を添加し、この懸濁液を 1 時間回転させ、NHS フィブリルを抗体と (主として、抗体のリジン側鎖基と) 反応させた。生成するフィブリルを濾過し、次いでカプリング用懸濁液で反復洗浄した。

抗体 - 修飾フィブリルへのグルコースオキシダーゼの結合

抗体 - 修飾フィブリルの未抗体被覆部位を、リン酸塩緩衝塩類溶液 (pH 6.0) 中に溶解した 1% BSA とともに 10 分間回転させることによってブロックした。グルコースオキシダーゼは BSA 溶液に溶解し、この溶液を 1.5 時間、フィブリルと混合した。最後に、このフィブリルを、280 nm における流出液の電気化学的追跡によって蛋白質の流出が見られなくなるまで、中性 pH リン酸塩緩衝液により洗浄した。

10

20

30

40

50

抗体 - 修飾フィブリル上の抗体の検出

フィブリル上の官能性抗体分子は、結合した抗原、グルコースオキシダーゼの触媒的活性により量的に測定した。グルコースオキシダーゼ活性は、酵素試料（遊離の酵素または抗体 - 修飾フィブリルに特異的に結合した酵素）を、0.1Mリン酸ナトリウム（pH 6.0）、20 μMグルコース、183 nMホースラディッシュペルオキシダーゼ、および30 μM 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)を含有するキュベットに添加することによって分光光度を測定した。グルコースオキシダーゼ活性は、25℃で414 nmにおける吸光率の増加（緑色の発現）を分光光度測定によって測定した。結合酵素の定量は、フィブリル1グラムあたり1.52 μmol eの官能性抗体の存在を示した。

10

一級アミン基と炭化水素基との間のフィブリル - 抗体カプリング

アミノフィブリルの生成

新しく調製した0.2M NaHCO₃(pH 8.1)中のNHS-フィブリル(214.7 mg)の懸濁液を、室温で1,2-ジアミノエタン(100 μL)と混合した。この懸濁液を、約5時間攪拌した。この混合物を次いで、ブックナー(Buchner)ロトで吸引濾過し、次いで水(3×10 ml)およびメタノール(3×10 ml)で洗浄し、次いで減圧で一夜かけて乾燥させた。アミノフィブリルの収量は144 mgであった。ニンヒドリン試験は、ジアミノエタン(未結合)が依然としてフィブリルに吸着されていることを示した。フィブリルを水中に再懸濁し、90分間音波処理した。ニンヒドリン試験は、フィブリルが未 - 共有結合アミンを実質的に含有していないことを示した。

20

抗体 - 修飾フィブリルの生成

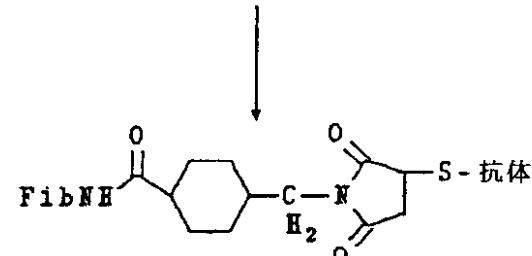
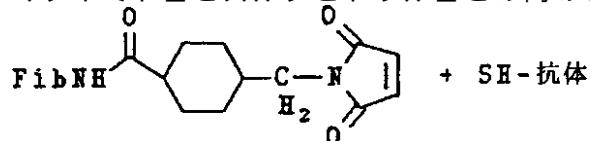
NAP-5カラムを100 mMアセテート(pH 5.5)で平衡化し、次いでモノクローナル抗体（抗 - グルコースオキシダーゼ、緩衝液300 μl中の1.5 mg）を添加し、次いで緩衝液で溶離した。この溶液を室温で2時間、20 mM NaIO₄ 50 μlと反応させた（最終NaIO₄濃度=1 mM）。予め平衡化したNAP-10(0.15 M KH₂PO₄、pH 6.0)に添加することによって反応を中断させ、次いで同一緩衝液で溶離した。この溶離液をアミノフィブリル含有10-ml管内に採取し、この懸濁液を2~3時間反応させた。このフィブリルを次いで、反応緩衝液で洗浄し、次いで5 ml KH₂PO₄、(pH 5.5)中で保存した。

30

抗体 - 修飾フィブリル上の抗体の検出

フィブリル上の官能性抗体分子を、上記のとおりに、結合した抗原、グルコースオキシダーゼの触媒活性により定量した。結合した酵素の定量は、フィブリル1グラムあたり0.36 μmol eの官能性抗体の存在を示した。

マレイミド基とスルフヒドリル基との間のフィブリル - 抗体カプリング



40

マウスモノクローナル抗体の還元

抗体溶液(2.8 ml中の24.7 mg)に、ジチオスレイトール(DTT、25 mg、0.16 mmol)を添加し、次いでこの混合物を室温で1時間インキュベートした。この還元された抗体を、PD-10廃棄性ゲル濾過カラム(Pharmacia)を用いて精製した。

50

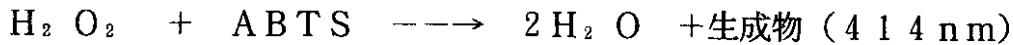
抗体とマレイミドフィブリルとの共有力プリング

マレイミドフィブリル(0.18 mg)および生のフィブリル(0.15 mg)を室温で15分間、音波処理し、次いで40℃で30分間インキュベートした。このフィブリルを次いで、遠心分離し、この上清は除去した。このフィブリルを次いで、リン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.2、1.1ml)中の還元抗体(12.4 mg)とともに室温で4時間インキュベートした。

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)-標識したヤギ抗-マウス抗体を用いる抗体フィブリル上の抗体の定量

マウス抗体フィブリルは、リン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.5、1ml)中の0.1%PEGとともに40℃で30分間、予備インキュベートした。これらを次いで、遠心分離し、上清は除去した。マウス抗体フィブリル(0.01 mg)を、0.1%PEGを含有するリン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.5、500 ml)中のHRP-標識したヤギ抗-マウス抗体(0.01 mg)とともに、室温で2時間インキュベートした。このフィブリルを次いで、リン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.5、1ml)中の0.1%PEGで5回洗浄した。結合したHRPの量は、結合した酵素の触媒活性を分光光度測定により測定した。この酵素反応を下記に示す：

HRP



この結果は、フィブリル上のマウス抗体の密度が1.84 mg抗体/1 gフィブリルであり、そして生の(対照)フィブリル上のマウス抗体の密度が0.48 mg抗体/1 gフィブリルであることを示した(非特異性結合の程度は約26%であった)。

例 8

リジンの付加による二官能性フィブリルの製造

N - C B Z - L - リジンベンジルエステルの合成

この反応順序は、図5に示されている。N - (tert-ブトキシカルボニル) - L - リジン(2g、8.12 mmol)を、メタノール(40 ml)および水(40 ml)に溶解し、次いでトリエチルアミンによりpH 8に調整した。上記混合物に、ジオキサン中のN - (ベンジルオキシカルボニル-オキシ)スクシンイミドの溶液(2.4 g、2.0 ml中の9.7 mmol)を添加し、次いでトリエチルアミンによりpHを8~9に維持した。この反応混合物を一夜にわたり攪拌した。溶媒をロータリエバボレーターにより除去し、粗製N - C B Z - N - (tert-ブトキシカルボニル) - L - リジンを得た。このN - C B Z - N - (tert-ブトキシカルボニル) - L - リジンを、0.2 M炭酸カルシウム(4 ml)で処理し、次いでその水性層を除去し、白色固体を得た。この固体をN,N-ジメチルホルムアミド(40 ml)およびベンジルプロマイド(1.16 ml)中に再懸濁した。この反応混合物を室温で一夜にわたり攪拌した。この反応混合物を酢酸エチルおよび水を用いて仕上げ処理し、その有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させた。溶媒を分離し、粗製N - C B Z - N - (tert-ブトキシカルボニル) - L - リジンベンジルエステルを得た。この生成物はシリカゲルクロマトグラフィにより、酢酸エチル中25%ヘキサンを溶剤として使用して精製した。メチレンクロリド(10 ml)中のN - C B Z - N - (tert-ブトキシカルボニル) - L - リジンベンジルエステル(1 g、2.2 mmol)に、0℃で三フッ素化酢酸を添加した。この反応混合物を0℃で10分間攪拌し、次いで室温でさらに2.5時間攪拌した。溶剤を除去し、粗製生成物を得た。純粋なN - C B Z - L - リジンベンジルエステルを、シリカゲルクロマトグラフィにより得た。

N - C B Z - L - リジンベンジルエステルフィブリルの合成

メチレンクロリド(18 ml)中のカルボキシルフィブリル(300 mg)の懸濁液に、N - C B Z - L - リジンベンジルエステルの溶液(メチレンクロリド20 mlおよびトリエチルアミン176 μl中の148 mg、0.32 mmol)を添加した。次いで、HOBT(43.3 mg、0.32 mmol)およびEDC(61.3 mg、0.32 mmol)

10

20

30

40

50

o 1)を添加した。この反応混合物を室温で一夜にわたり攪拌し、粗製生成物を得た。生成フィブリルを、メタノール、メチレンクロリドおよび水により徹底的に洗浄し、次いで減圧乾燥させた。

二官能性フィブリル F i b - L y s (C O O H) N H₂ の合成

メタノール (4 m l) 中の N - C B Z - L - リジンベンジルエステルフィブリル (1 1 3 m g) に、水酸化ナトリウム (1 N 、 4 m l) を添加し、この反応混合物を一夜にわたり攪拌した。生成物 N - C B Z - L - リジンフィブリルを、水およびメタノールで徹底的に洗浄し、このフィブリルを減圧乾燥させた。アセトニトリル (4 m l) 中の N - C B Z - L - リジンフィブリル (5 0 m g) の懸濁液に、トリメチルシリルヨウダイド (1 m l) を添加した。この混合物を 4 0 °で 3 時間攪拌した。最終二官能性フィブリルを水、メタノール、0 . 5 N 水酸化ナトリウム、アセトニトリルおよびメチレンクロリドで徹底的に洗浄した。アミノ酸分析は、フィブリル 1 グラムあたりリジン 0 . 3 μ m o l を示した。

本明細書に記載の方法と同様の方法により、セリン、スレオニンまたはチロシンを使用して、ヒドロキシルおよびカルボキシル（またはアミノ）二官能性フィブリルを製造することができる。チオール化したカルボキシル（またはアミノ）二官能性フィブリルは、システインを用いて製造することができる。カルボキシルおよびアミノ二官能性フィブリルは、アスパラギン酸またはグルタミン酸を使用して製造することができる。

例 9

E C L に基づくバイオセンサーとしてのカーボンナノチューブ

メチレンクロリド (8 m l) 中の二官能性フィブリル (1 1 3 m g) の懸濁液に、4 - (ジメチルアミノピリジン (D M A P 、 1 9 . 5 m g 、 0 . 1 6 m m o l) および 1 , 3 - デシクロヘキシルカルボジイミド (D C C 、 3 3 m g 、 0 . 1 6 m m o l) を添加した（図 6 ）。この混合物を 5 分間攪拌し、次いで 4 - メチル - 4 - (8 - ヒドロキシオクチル) - 2 , 2 - ピピリジン (4 7 m g 、 0 . 1 6 m m o l) を添加した。この反応混合物を室温で一夜にわたり攪拌した。生成する生成物フィブリルを、D M F 、 5 0 % 水中ジオキサン、メタノールおよび水で徹底的に順次洗浄した。このフィブリルを、エタノール (4 m l) と水 (4 m l) との混合物中に懸濁し、次いでシス - ジクロロビス (2 , 2 - ピピリジン) ルテニウム (I I) ジハイドレート (4 5 . 2 m g 、 0 . 0 8 7 m m o l) を添加した。この混合物を 1 1 0 °で 5 . 5 時間還流させた。このルテニウム錯体 - 修飾したフィブリルを、水、飽和 E C L 分析用緩衝液 (I G E N , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) 、トルエン、 5 0 % 水中ジオキサンにより徹底的に洗浄し、次いでアセトニトリル、エチレングリコールおよびメタノール中で順次還流させた。このルテニウム錯体 - 修飾フィブリルを、4 0 °で 4 時間、アセトニトリル (4 m l) 中の T M S I (4 m l) と反応させ、C B Z 基を脱保護化し、次いでメタノール、水および水酸化ナトリウム (1 N) により洗浄した。最終生成物は減圧乾燥させた。このフィブリルを次いで、メチレンクロリド (5 m l) 中に懸濁し、次いでトリエチルアミン (5 滴) を添加した。この懸濁液に、無水コハク酸 (4 0 m g) を添加した。この反応混合物を室温で一夜にわたり攪拌し、次いで生成物をメチレンクロリド、メタノールおよび水で洗浄し、次いで減圧乾燥させた。このカルボン酸 / ルテニウム錯体 - 修飾フィブリルをジオキサン (5 m l) 中に再懸濁し、次いで N - ヒドロキシスクシンイミド (1 0 0 m g) および E D C (1 6 7 m g) を添加した。この反応混合物を、室温で 4 時間攪拌した。生成する N H S エステル / ルテニウム錯体 - 修飾フィブリルを、ジオキサンおよびメタノールで洗浄した。この N H S エステル / ルテニウム錯体 - 修飾フィブリルを、ジオキサン (2 m l) 中に再懸濁し、次いで重炭酸ナトリウム中の N A D アナログの溶液 (0 . 2 M 、 p H 8 . 6 N a H C O₃ 、 2 m l 中の 7 5 m l) を添加した。この反応混合物を室温で一夜にわたり攪拌した。このフィブリルを次いで、水、重炭酸ナトリウム (0 . 2 M) およびメタノールにより徹底的に洗浄し、次いで減圧乾燥させ、バイオセンサーフィブリルを得た。

例 1 0

E C L に基づくバイオセンサーとしてのカーボンナノチューブの使用

20

30

40

50

ECLに基づくバイオセンサーは、フィブリルの化学的修飾によって製造した。この修飾フィブリルは、NH₂/COOH二官能性フィブリル(例8)を用いて製造した。1個の官能性基(NH₂)に、NAD⁺アナログを付加し、そしてもう1個の官能性基(COOH)に、Ru(bpy)₃²⁺の誘導体を付加した。このバイオセンサーフィブリルの構造を図7に示す。

このバイオセンサーは、補因子としてNAD(P)⁺/NAD(P)Hを受け入れるデヒドロゲナーゼ酵素および補因子としてNAD(P)⁺/NAD(P)Hを受け入れるデヒドロゲナーゼ酵素の基質の検出を際立たせるようにデザインした。NAD(P)⁺およびNAD(P)Hが、Ru(bpy)₃²⁺ECLを促進させる能力について劇的に相違する能力を有することは知られている(E.Jameison等によるAnalytical 10 Chemistry,印刷中)。すなわち、デヒドロゲナーゼの活性は、そのNAD(P)⁺/NAD(P)Hを還元/酸化する能力により検出することができ、この検出はRu(bpy)₃²⁺電気化学ルミネンスを生じさせるNAD(P)⁺およびNAD(P)Hの能力の差異によって見出すことができる(図8)。同様に、デヒドロゲナーゼのそれらの基質に対する作用は、NAD(P)⁺のNAD(P)Hへの変換またはNAD(P)HのNAD(P)⁺への変換によって化学量論的に行われることから、それらの基質の存在がまた、電気化学的発光によって検出できる。

フィブリル支持されているECLに基づくバイオセンサーを使用するためには、このバイオセンサーを、デヒドロゲナーゼおよび未知量のデヒドロゲナーゼ基質(この基質はアナライトである)を含有する水性溶液、またはデヒドロゲナーゼ基質および未知量のデヒドロゲナーゼ(このデヒドロゲナーゼはアナライトである)を含有する水性溶液と混合する。酵素反応を進行させ、フィブリル上に不動化されているNAD(P)⁺またはNAD(P)Hを還元または酸化させるのに適当なインキュベーション時間の後に、このフィブリルをECL装置に採取し、次いでフィブリルのECLを測定する。ECL測定は、相当する濃度のトリプロピルアミンを含有していない緩衝液中で行う(これは、NAD(P)⁺/NAD(P)Hが本発明においてトリプロピルアミン置換体であることによる)。

このECLに基づくバイオセンサーは次の利点を有する:電気化学的ECLメカニズムにおける電子移動効率を増大させるフィブリル上の同一二官能性基上のNAD(P)⁺/NAD(P)HとRu(bpy)₃²⁺とは密接した近似性を有する(分子外電子移動は分子内電子移動に比較して、効率が高い);ECL活性試薬、NAD(P)⁺/NAD(P)HおよびRu(bpy)₃²⁺は両方ともに、ECL装置の電極上に磁気的に保持することができるフィブリル上に支持されており、これにより発光する光量が増加される;フィブリルは格別に大きい表面積を有しており、これにより高密度(重量あたり)のNAD(P)⁺/NAD(P)HおよびRu(bpy)₃²⁺を不動化させることが可能になり、これは発光させる光を増加させる;このバイオセンサーは、多くの種々のアナライト(補因子としてのNAD(P)⁺/NAD(P)H、またはこれらの基質を受け入れる全部のデヒドロゲナーゼ)の検出を可能にする。

例11

フィブリル支持されたECLに基づくバイオセンサーを用いるグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(G6PDH)の検出

二官能性付加物(ECLバイオセンサーフィブリル)に共有結合されているNAD⁺アナログおよびRu(bpy)₃²⁺アナログの両方で修飾されたフィブリルを、酵素グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼの検出に使用した。ECLバイオセンサーフィブリル(860 μg/ml)を、約50 μMグルコース-6-ホスフェートを含有する中性pH緩衝液と混合した。1本の管には、G6PDHを3.6 μMの濃度まで添加した。第二の対照管には、脱イオン水を添加した。直ちに、このフィブリルのECLを測定した。図9には、時間ゼロにおけるG6PDHを有する(DH+)または有していない(DH-)フィブリルのECLが類似レベルであったことを示している。分析用緩衝液(フィブリルは存在しない)から得られるバックグラウンドECLがまた示されている(A.B.)。42時間のインキュベーション後(室温で回転させる)、より多くのフィブリルが採

20

30

40

50

取され、そのECLを再測定した。図9に示されているように、分析用緩衝液のECL(A.B.)およびG6PDHを含有していないフィブリル(DH-)は、ゼロ時間で類似のECLを示した。しかしながら、G6PDHを含有する試料(DH+)のECLは、ゼロ時間で実質的に低かった。これらの結果は、G6PDH活性をフィブリル支持ECLバイオセンサーを用いて検出することができる事を示している。ここで使用された特定のNAD⁺アナログ(非不動化)およびRu(bpy)₃²⁺アナログ(非不動化)を、フィブリルの不存在において用いた別の実験により、NAD⁺アナログの還元体(NADH)が酸化体(NAD⁺)に比較して、Ru(bpy)₃²⁺の電気化学ルミネンスに関して、効率が低いことが確認された。

例12

10

ECLに基づくバイオセンサー用支持体としてのカーボンナノチューブの使用

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)酵素補因子のアナログおよびルテニウム(II)トリスピピリジン(Ru(bpy)₃²⁺)のアナログの両方を結合させたデヒドロゲナーゼ酵素含有酵素バイオセンサーを製造した。このNAD⁺アナログは、結合すると自然に挙動するように酵素の補因子結合部位に結合させることができる(すなわち、酵素の天然基質の存在下に、正常な化学メカニズムにより酵素により還元される能够性を有する)。さらにまた、Ru(bpy)₃²⁺アナログは、NAD⁺と物理的に接触する能够性を有する(図10)。IGENオリジン(Origenne)(登録商品名)アライザー(IGEN、Inc., Gaithersburg, MD)などのECL装置において、NAD⁺およびその還元体であるNADHは、Ru(bpy)₃²⁺の電気化学的ルミネンスを相違する程度で促進させる。従って、光発現量に基づいて、NAD⁺、NADHまたはこれら2種の或る種の混合物が溶液中に存在するか否かを測定する能够性を有する(F.Jameison等によるAnalytical Chemistry, 印刷中)。すなわち、このバイオセンサーは、NAD⁺の還元程度の検出にかかるRu(bpy)₃²⁺のECL反応の効率と酵素の基質の存在との間の差異を使用するものである。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼは下記の反応を触媒する:



20

30

アルコールデヒドロゲナーゼに基づくECLバイオセンサーは、エタノールをアセトアルデヒドに変換する能够性を有する。付隨的にNAD⁺をNADHに変換する。バイオセンサー上に不動化されたRu(bpy)₃²⁺のECL性質は、NAD⁺が不動化されているか、またはNADHが不動化されているかに依存することから、酵素バイオセンサーのECLはエタノールの存在下に報告する能够性を有する。このバイオセンサーの魅力的特徴は、ECL反応中に、補因子のNADH形態がNAD⁺形態に再-酸化されることによって、このバイオセンサー分子の一つを、アナライトの複数の分子の検出に反復使用する能够性を有する。

このバイオセンサーは可溶性酵素(デヒドロゲナーゼ)に由来するものであり、かつまたアナライト(例えば、エタノール)はまた可溶性であることから、消費されたアナライト含有溶液を洗出することなく、相違するアナライトを含有する試料の分析に反復使用できるようにバイオセンサーを不動化することは有利なことである。このような不動化を、アルコールデヒドロゲナーゼに由来するECLバイオセンサーを用いて行った(図10に図解式に示されている)。図11には、ADH由来バイオセンサーのダイナル(Dynal)M450ビーズ(Lake Success, NY)上への不動化(左側)およびアルキルフィブリル上への不動化(右側)が示されている。どちらの図解図も、バイオセンサー分子が固体支持体の大きさに対して実際に小さいような大きさでは描かれていない。アルキルフィブリルは、酸化フィブリル(COOH基を有する)と1-アミノオクタンとの反応により製造した。両方の場合(フィダリルおよびビーズ)、酵素バイオセンサーは、緩衝水性溶液中における非共有吸着によって不動化させた。

40

50

エタノールは、ビーズ - およびフィブリル - 不動化 E C L A D H 由来バイオセンサーの両方を用いて検出した。ビーズ - またはフィブリルに吸着された酵素バイオセンサーの量は、溶液中に残留する（非吸着）蛋白質の量を 280 nm における紫外線吸収により測定することによって決定した（この 280 nm における吸収は溶液中の蛋白質の量を示す）。この結果は、フィブリル 1 mgあたりの結合 A D H バイオセンサーの量が 0.308 mg であるのに対して、ビーズ 1 mgあたりの結合 A D H バイオセンサーの量は 0.015 mg であることを示している。すなわち、固体支持体の単位重量あたりのフィブリルの吸着能力は、ダイナルビーズの吸着能力の 20.5 倍を越えた。

エタノールの E C L 検出は、A D H バイオセンサー吸着ビーズ（0.50 ~ 1.25 mg）または A D H バイオセンサー吸着フィブリル（0.04 ~ 0.10 mg）を、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）、12 mM セミカルバジドを含有する溶液と混合することによって行った。若干の試料にはまた、アナライトであるエタノール 0.5 mM を含有させた。このバイオセンサーを被覆した固体支持体を、I G E N オリジン（O r i g e n e）（登録商品名）アナライザ（I G E N、I n c . , G a i t h e r s b u r g, M D）に導入し、E C L を測定した。このような実験の一つの結果を図 12 に示す。ビーズおよびフィブリルは両方ともに、酵素バイオセンサーの E C L 信号をエタノールの存在下に減少した。この結果は、R u (b p y)₃²⁺ 電気化学ルミネセンスについての、この酸化 / 還元状態の N A D⁺ アナログの効果にかかる溶液試験（非不動化 N A D⁺ / N A D H および非不動化 R u (b p y)₃²⁺ を使用する）で得られた結果と一致する。これらの結果は、フィブリルを、例えば E C L における支持体として、特に酵素に基づく E C L バイオセンサー用の支持体として使用できることを示している。これらの結果がフィブリルを 20 倍少ない量で使用した場合でも、ダイナルビーズを用いて見出された結果と同様であることにもまた留意されるべきである。

例 13

ビオチニル化フィブリルおよび二官能性ビオチニル化アルキルフィブリル

フィブリル表面はビオチニル化することができ、あるいはアルキル化およびビオチニル化の両方をすることができる事が見出された。このような修飾を含むフィブリルは次いで、全てのストレプトアビジン結合材料、例えばストレプトアビジンビーズおよびストレプトアビジン酵素を結合することができる。

フィブリルは、それらの大きい表面積から、固体担体として格別の利益を提供する。強磁性にできるビーズは、分離分析に格別に有用である。本明細書に記載されているビオチニル化フィブリルは、フィブリルとビーズとの両方の利点を組合せて有する。ビオチニル化アルキルフィブリルは、同一概念を拡大するものであるが、アルキルフィブリルの追加の蛋白質吸着物性を示す。

ストレプトアビジン - およびビオチン - 被覆したフィブリルは、診断に使用することができ、そしてまた電気化学的ルミネセンスアッセイ用の捕獲剤として使用することができる。

本発明の新規特徴は、一つのフィブリル上に二つの固体担体を組合せ、二官能性フィブリルを創造したことにある。さらにまた、開示されている方法はビーズの表面積を拡大し、かつまたフィブリルの磁化性を倍増させる。

ビオチニル化フィブリルの製造

ビオチニル化フィブリルは、基本的に製造例 0 に記載されているとおりに製造されたアミノフィブリル 2.4 mg を、pH 8.15 で緩衝液 0.2 M Na H C O₃ 中で、N H S エステル長鎖状ビオチン 9 mg と混合することによって製造した。この混合物を室温で 4 時間回転させ、次いで同一緩衝液で 2 回洗浄した。ビオチニル化アルキルフィブリルの製造

ビオチニル化アルキルフィブリルは、二段階反応によって製造した。最初に、二官能性フィブリル 4.25 mg（これはアミノおよびカルボキシルの両方を含有する）および N H S エステル長鎖状ビオチン 2.5 mg を混合した。このフィブリルを洗浄し、次いで減圧で乾燥させた。

10

20

40

50

第二反応は、このビオチニル化二官能性フィブリル 4 mg を、 E D C (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (11 mg, D M A P (4 - ジメチルアミノピリジン) 7 . 5 mg および D M F 0 . 5 ml 中の N H _ 2 (C H _ 2) _ 7 C H _ 3 10 μl と混合することによって行った。この混合物を室温で一夜かけて攪拌した。最終ビオチニル化アルキルフィブリルを C H _ 2 C l _ 2 、 M e O H 、 および d H _ 2 O により洗浄した。

例 1 4

E C L 分析における固体支持体としてのビオチニル化フィブリル

ビオチニル化フィブリルは、ストレプトアビシン - ビオチンまたはアビシン - ビオチン相互反応を必要とする方式を包含する E C L 分析で使用することができる。例えば、ビオチニル化フィブリルは、ストレプトアビシンによりさらに誘導体化することができる。フィブリルに共有結合したビオチン（例 1 3 参照）は、ストレプトアビシンと強力な非共有結合性相互反応を行うことができた。ストレプトアビシンは、4 つの均等な結合性部位を有するテトラマー蛋白質であるから、ビオチニル化フィブリルに結合したストレプトアビシンは、ほとんど確実に未占領結合部位を有し、この部位に追加のビオチニル化試薬を結合させることができた。このようにして、ビオチニル化フィブリルをストレプトアビシン被覆フィブリルに変換することができる。

このようなフィブリル - ビオチン - ストレプトアビシン (F B S) 支持体を用いて、多くの分析試験法を実施することができる。一例として、ビオチニル化抗 - アナライト抗体を、 F B S 支持体上に捕獲することができた（抗体がアナライトに複合する前または後に）。ビオチニル化抗 - アナライト抗体を用いるアッセイは充分に確立されている。このようなアッセイには、対象アナライトが導入された R u (b p y) _ 3 ^ { 2 + } - 標識したアナライトと、抗 - アナライト抗体への結合に関して競合する競合性アッセイが含まれる。遊離の（未結合）アナライトおよび遊離の（未結合） R u (b p y) _ 3 ^ { 2 + } - 標識したアナライトは、フィブリル不動化抗体から洗出することができる。この洗浄工程は、フィブリルが遠心分離、濾過を包含する慣用の実施方法により溶液相から物理的に分離されるか、または磁気による吸引により溶液相から物理的に分離されるかに依存する。

競合性アッセイ以外に、サンドイッチ方式イムノアッセイを F B S 支持体上で行うことができる。サンドイッチ方式イムノアッセイは診断の分野で一般に、およびまた特に E C L 検出において周知である。このような分析法は、2 種の抗体によるアナライトの同時的結合を包含する；すなわち、例えばビオチンで標識することによって固体表面上に捕獲される最初の「第一」抗体および固体表面によって捕獲されないが、 E C L 用途における R u (b p y) _ 3 ^ { 2 + } のようなリポーター基で標識されている「第二」抗体。このようなサンドイッチ方式アッセイを、固体捕獲性支持体としてフィブリルを用いて行うことができる。この場合、フィブリルは前項に記載されているように捕獲される。一方、このようなアッセイでは、フィブリルはそこに共有結合したビオチンを有する。このビオチンはストレプトアビシンに結合し、次いで順に、ビオチニル化第一抗体に結合し、次いでアナライトに結合し（アナライトが存在する場合）、次いで R u (b p y) _ 3 ^ { 2 + } - 標識した第二抗体に結合する。

同様に、 D N A プローブアッセイは、 F B S 支持体を用いて行うことができた。ビオチニル化一重鎖 D N A は F B S 支持体に結合させることができ、競合性ハイブリッド形成を、補足一重鎖アナライト D N A 分子と補足 R u (b p y) _ 3 ^ { 2 + } - 標識したオリゴヌクレオチドとの間で生じさせることができる。

もう一つの種類のビオチニル化フィブリル、すなわちビオチニル化アルキル化フィブリルは、イムノアッセイおよび D N A プローブアッセイで使用することができる。例 1 3 に記載されているように、二官能性フィブリルは、1 種の官能性基に対するビオチンの共有結合および他の 1 種の官能性基に対するアルキル鎖の共有結合によって修飾することができる。生成したアルキル化され、ビオチニル化されたフィブリルは、ストレプトアビシンまたはアビシンとの特異的結合（ビオチンを介する）および蛋白質の吸着（アルキル鎖を介する）の両方を用いることができる。

アルキルフィブリルは別の固体支持体、例えばダイナル磁性ビーズを包含するストレプト

10

20

20

30

40

50

アビジン被覆した磁性ビーズとの結合に使用することができた。このようなビーズに優るフィブリルの利点は、これらがより広い表面積（単位重量あたり）を有する点にある。従って、フィブリルを磁性ビーズの外側表面に付着させることができた場合には、これは表面積を劇的に改善し、従ってビーズの結合能力を劇的に改善する。アルキル化され、ビオチニル化されたフィブリルは、ストレプトアビジン被覆ビーズと混合することができ、これにより高親和性のストレプトアビジン（ビーズ）-ビオチン（フィブリル）相互反応が得られ、従って格別に広い表面積を有するフィブリル被覆ビーズが得られる。アルキルフィブリルは吸着により蛋白質を結合させることができるから、フィブリル被覆ビーズは、ストレプトアビジンおよび抗体を包含する吸着蛋白質によりさらに誘導体化させることができる。前記したように、ストレプトアビジンまたは抗体被覆したフィブリルは、イムノアッセイおよびDNAプローブ分析法で使用することができる。すなわち、フィブリル被覆ビーズは、それらの表面積を劇的に増大させることによってビーズの物性を改良することができ、同一の結果を得るために指定の分析法で要求されるビーズの数を減少させる。

例 15磁気感受性カーボンナノチューブ

フィブリルは磁性物性を有することができる。フィブリルを磁性または非磁性にすることができる程度は、フィブリル製造方法の結果としてフィブリル中に存在する触媒の量により制御される。このような方法は、米国特許4,663,230、5,165,909および5,171,560に記載されている。

フィブリルの磁性物性は、フィブリルを官能化した後に、すなわちアルキルフィブリル、蛋白質結合フィブリルなどに見出される。或る反応（例えば、アルキル化）の後のフィブリルは、その反応の前よりも顕著に早く磁石に移動する。この現象の仮説の一つは、或る種の凝集または溶媒和現象が反応プロセス中に生じることがあるというものである。しかしながら、真のメカニズムは現在、未決定である。

例 16PEG修飾したフィブリルとRu(Bpy)₃との非特異的結合の還元

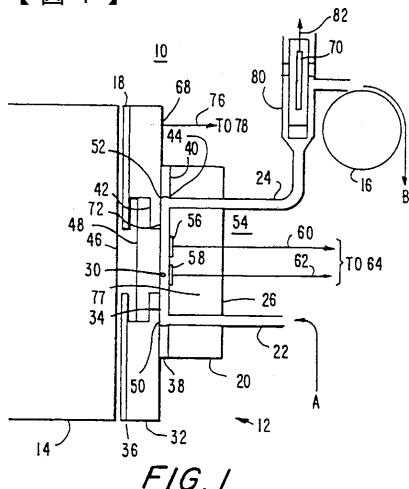
塩素酸塩酸化フィブリル、ベンゾイルペルオキシドを用いてPEGで修飾されたフィブリルおよびNHSエステルカプリングによりPEGで修飾されたフィブリルの原料分散液を、音波処理を用いて、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中の1.0mg/mlとして製造した。それぞれの一連の10倍稀釀液2mlを5本のポリプロピレン管にそれぞれ入れた。同一緩衝液中のRu(Bpy)₃の原料溶液（約10μM）50μlを各管におよび3本の緩衝液プランクに添加した。3本のRu(Bpy)₃を含有していない緩衝液管をまた調製した。全部の管をボーテックスミキサーで混合し、次いで一夜かけてインキュベートした。全部の管を遠心分離に付し、フィブリルを分離し、上清各0.1mlを新しい管に移し、オリジン（Origin）（登録商品名）分析用緩衝液（IGEN, Inc., Gaithersburg, MD）1.0mlにより稀釀し、次いでマグナライザー（Magnalyzer）（登録商品名）（IGEN, Inc., Gaithersburg, MD）を用いてECLによりRu(Bpy)₃について分析した。上清中に残留するRu(Bpy)₃のレベルは、フィブリルに非特異的に結合した量の間接的尺度であった（図13）。両方のPEG修飾フィブリル物質について、0.1mg/mlまでのフィブリルレベルで、実質的に全部のRu(Bpy)₃が上清中に残留していた。これらのフィブリル1.0mg/mlにおいて、上清中のRu(Bpy)₃の20~30%の減少が見られた。これに対して、塩素塩酸化したフィブリルの場合、1.0mg/mlにおいてRu(Bpy)₃は上清中にほとんど存在しておらず、かつまたPEG修飾されていないこれらのフィブリルの0.1mg/mlにおいて、上清中のRu(Bpy)₃に20~30%の減少が見られた。

参考文献

1. Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites, a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 1982; 22:1859-62.
2. Shibata DK, Arnheim N, Martin JW. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167:225-30. 10
3. Yanofsky, C. et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 24, 6647-6668.
4. Updyke TV, Nicolson GL. Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin-agarose. *Methods Enzymol* 1986; 121:717-25.
5. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik DC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:8790-4. 20
6. Ngo TT. Procedure for activating polymers with primary and or secondary hydroxyl groups. *Makromol Chem Macromol Symp* 1988; 17:224-39.
7. Coutlee F, Bobo L, Mayur K, Yoken RH, Viscidi RP. Immunodetection of DNA with biotinylated RNA probes: A study of reactivity of a monoclonal antibody to DNA-RNA hybrids. *Anal Biochem* 1989; 181:96-105. 30
8. Casadei J, Powell MJ, Kenten JH. Expression and secretion of aequorin as a chimeric antibody using a mammalian expression vector. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:2047-51.
9. Molecular cloning, a laboratory manual 2nd Ed Sambrook, J. Cold Spring Harbor Laboratory New York.
10. Heney, G. and Orr, G.A. (1981) *Anal Biochem*. 114, 92-96. 40
11. Mullis KB, Falcoona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

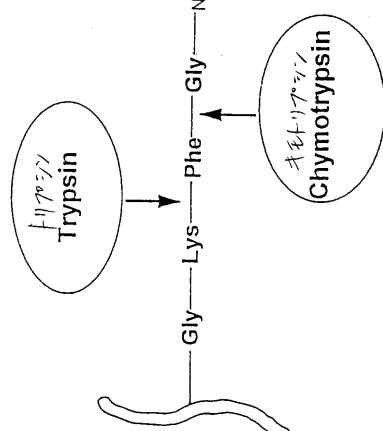
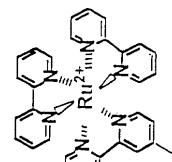
12. Lyons J, Janssen JWG, Bartram C, Layton M, Mufti GJ. Mutation of Ki-ras and N-ras oncogenes in myelodysplastic syndromes. Blood 1988; 71:1707-12.
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487-91.
14. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and Expression of Human Papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. Am J Pathol 1985; 119:361-6. 10
15. Reddy EP, Reynolds RK, Santo E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of the transforming properties by the T24 humanbladder carcinoma oncogene. Nature 1982; 300:149-52.
16. Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol 3, 208. 20

【図1】



【図3】

FIG. 3



【図2】

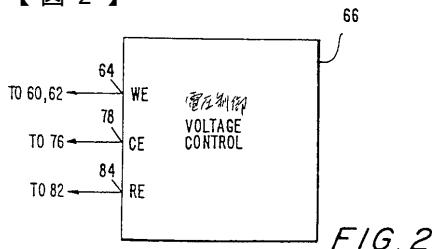
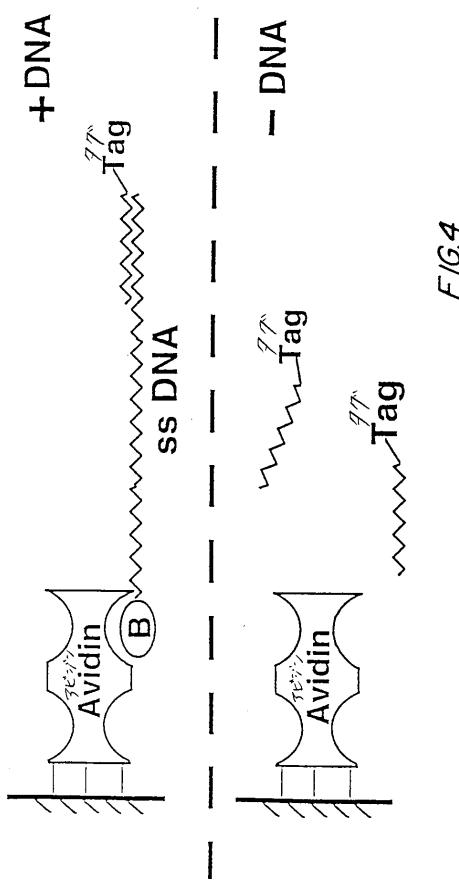
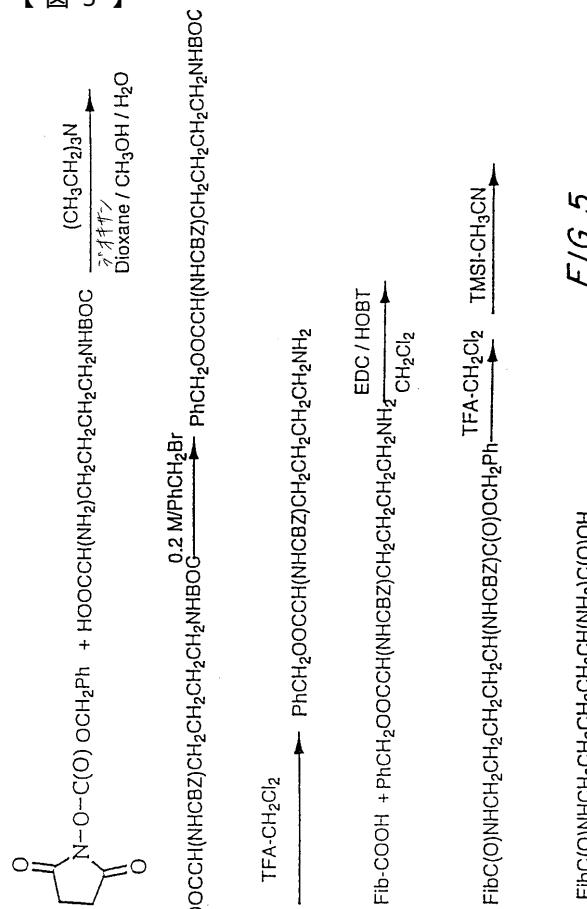


FIG. 2

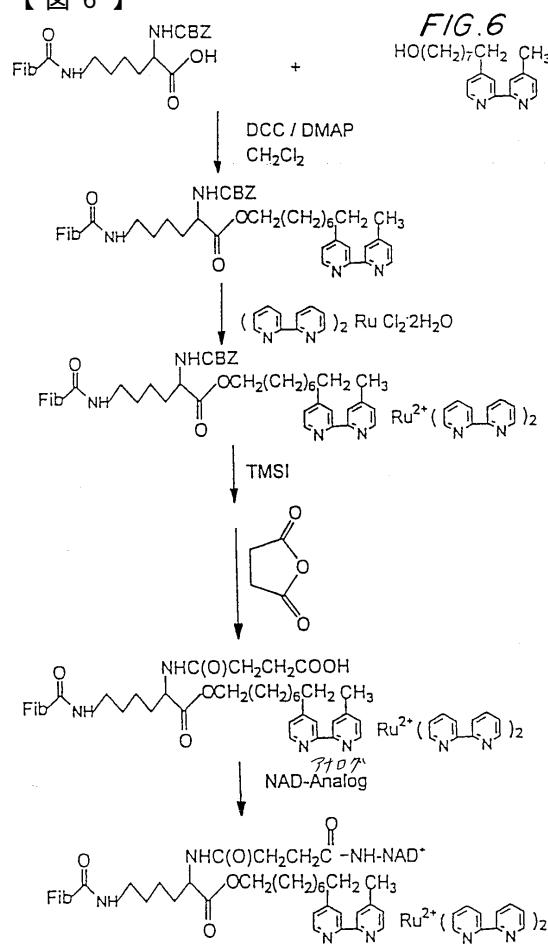
【図4】



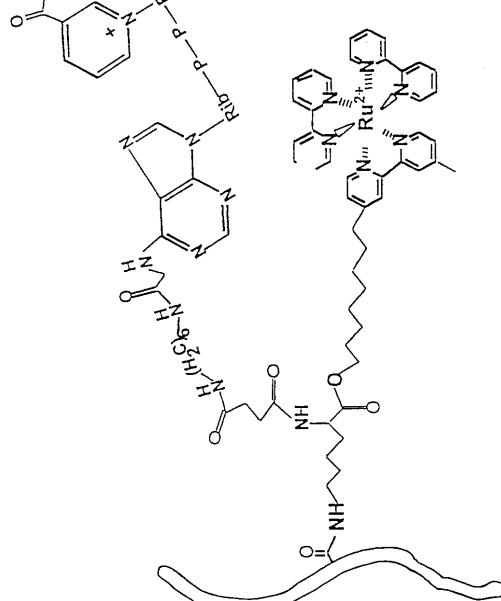
【図5】



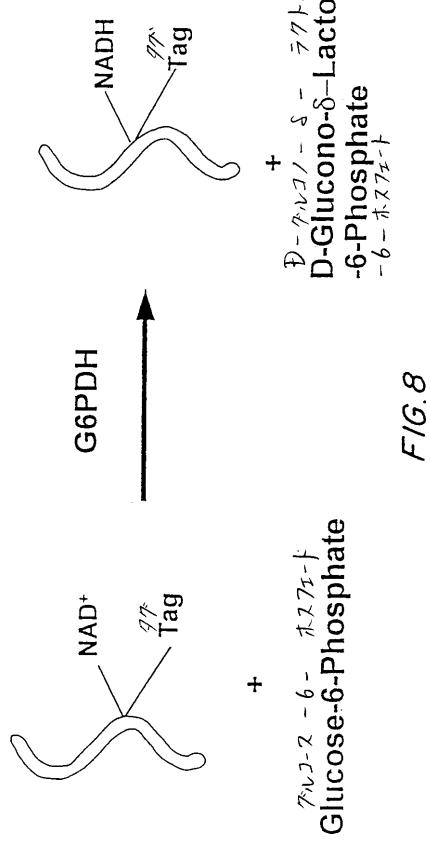
【図6】



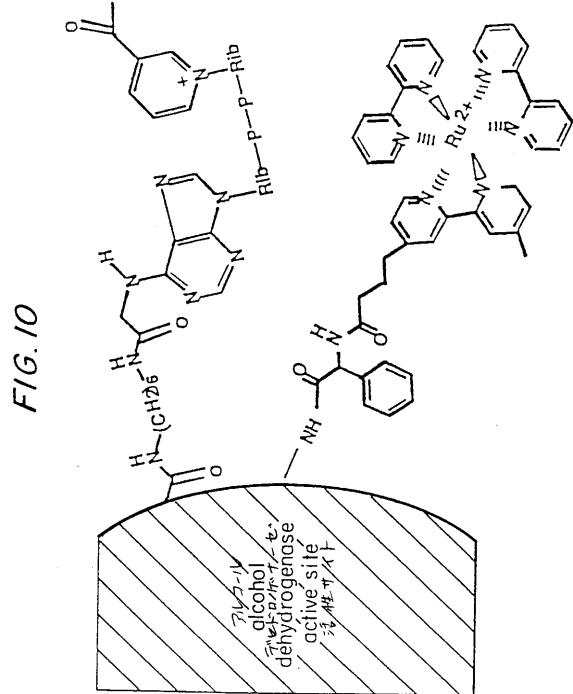
【図7】



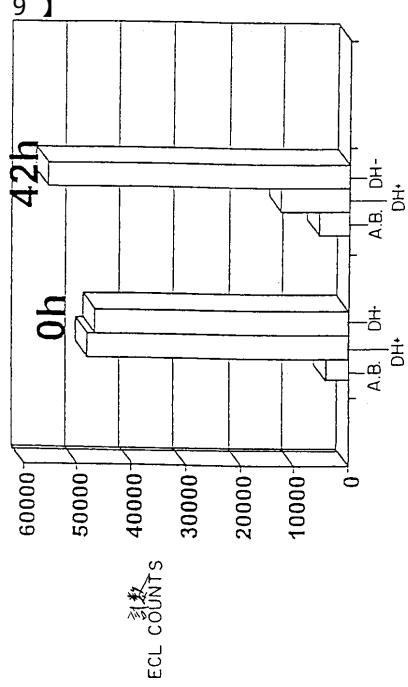
【図 8】



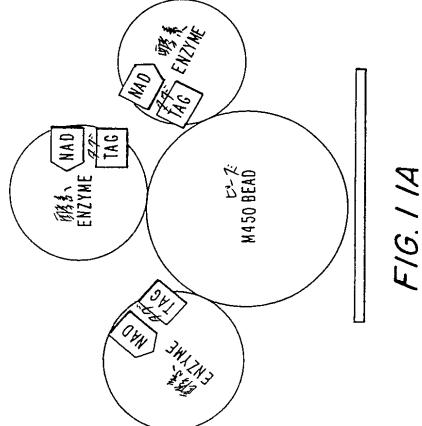
【図 10】



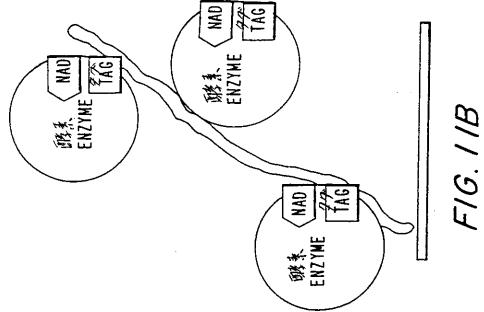
【図 9】



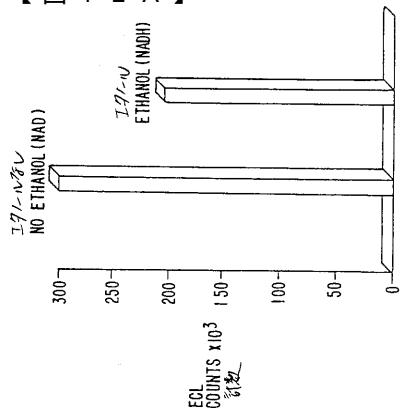
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 12 A】



【図 12 B】

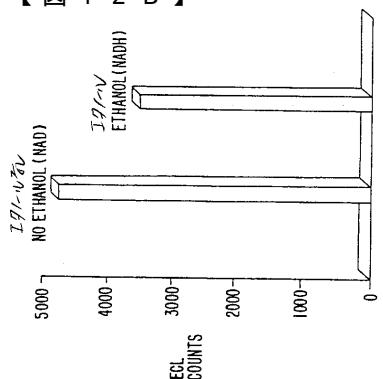


FIG. 12B

FIG. 12A

【図 1

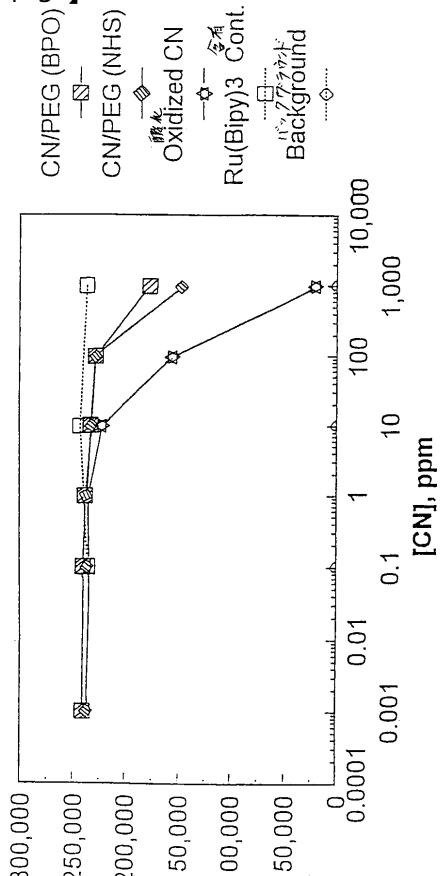


FIG. 13

フロントページの続き

- (72)発明者 マッセイ , リチャード , ジェイ .
アメリカ合衆国2 0 8 5 2 マサチューセッツ州ロックビル , バレリアン コート 5
- (72)発明者 マーチン , マーク , ティ .
アメリカ合衆国2 0 8 5 2 メリーランド州ノース ベセスダ , オールド ファーム コート 6
5 1 6
- (72)発明者 ドン , リウェン
アメリカ合衆国2 0 8 5 0 メリーランド州ロックビル , ポトマック オークス ドライブ 1 1
4 1 1
- (72)発明者 ルー , ミン
アメリカ合衆国2 0 7 0 6 メリーランド州ランハム , ダールグリーン コート 6 4 1 1
- (72)発明者 フィッシュナー , アラン
アメリカ合衆国0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ , アントリウム ストリート 8 0
- (72)発明者 ジャメイソン , ファビアン
アメリカ合衆国2 0 8 7 9 メリーランド州ガイザースバーグ , ウォーカーズ チョイス ロード
ナンバー4 1 8 8 1 0
- (72)発明者 リアン , パム
アメリカ合衆国2 1 2 1 8 メリーランド州バルチモア , イー . サーティサード ストリート ナ
ンバー3 0 1 1 2
- (72)発明者 ホック , ロバート
アメリカ合衆国1 2 4 3 9 ニューヨーク州ヘンソンビル , アール . アール . 1 , ボックス 4 2
2
- (72)発明者 ルランド , ジョナサン , ケイ .
アメリカ合衆国2 0 7 0 7 メリーランド州ローレル , チェストナット コート 1 4 0 0 2

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平0 8 - 0 1 2 3 1 0 (JP , A)
国際公開第9 4 / 0 1 7 4 4 7 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 98