(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-508532
(P2010-508532A)
(43)公表日　平成22年3月18日(2010.3.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	ZNAJ	4B024
G01N 33/547	***(2006.01)***	G01N	33/547		4C050
G01N 33/535	***(2006.01)***	G01N	33/535		4C072
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	47/48		4C076
A61K 39/385	***(2006.01)***	A61K	39/385		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 283 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-535326 (P2009-535326)
(86)(22)出願日　平成19年11月1日 (2007.11.1)
(85)翻訳文提出日　平成21年6月29日 (2009.6.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/023140
(87)国際公開番号　WO2008/063378
(87)国際公開日　平成20年5月29日 (2008.5.29)
(31)優先権主張番号　60/856,133
(32)優先日　平成18年11月1日 (2006.11.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

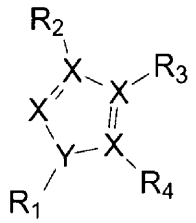
(71)出願人　599075070
ベンタナ・メデイカル・システムズ・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７３７　トウーソン　イー　イノベーシヨン　パーク　ドライブ　１９１０
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　コスメダー，ジエリー・ダブリユー
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７５０トウーソン・ノースモカシントレイル５５３０
(72)発明者　レフバー，マーク
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７４２トウーソン・ウエストカミノデラカテルバ２５４１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ハプテン、ハプテンコンジュゲート、その組成物ならびにそれらの製造および使用の方法

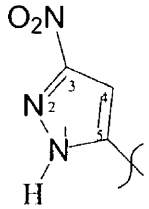
(57)【要約】
サンプルにおける２つもしくはそれ以上の異なる標的についてのような多重化診断アッセイを行うための方法が記述される。１つの態様は、２つもしくはそれ以上の異なる標的に特異的に結合する２つもしくはそれ以上の特異的結合部分とサンプルを接触させることを含んでなった。２つもしくはそれ以上の特異的結合部分は異なるハプテンにコンジュゲーションされ、そしてハプテンの少なくとも１つはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ジニトロフェニル以外のニトロアリール化合物、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロビアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンである。別個に検出することができる２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体とサンプルを接触させる。２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体は、異なる検出可能な標識にコンジュゲーションされることができる。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
２つもしくはそれ以上の異なる標的に特異的に結合する２つもしくはそれ以上の特異的結合部分とサンプルを接触させ、ここで、２つもしくはそれ以上の特異的結合部分は異なるハプテンにコンジュゲーションされ、ハプテンの少なくとも１つはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、ジニトロフェニル以外のニトロアリール、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロビアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンであり；そして
別個に検出することができる２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体とサンプルを接触させる
ことを含んでなる、サンプルにおける２つもしくはそれ以上の異なる標的について多重化診断アッセイを行う方法。
【請求項２】
２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体が異なる検出可能な標識にコンジュゲーションされる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体が異なる哺乳類種からのものである請求項１に記載の方法。
【請求項４】
２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体に特異的に結合する２つもしくはそれ以上の抗抗体と２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体を接触させることをさらに含んでなる請求項３に記載の方法。
【請求項５】
２つもしくはそれ以上の抗抗体が異なる検出可能な標識にコンジュゲーションされる請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ハプテンが以下の一般的化学式
【化１】



［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、Ｘは独立して窒素もしくは炭素であり、Ｙは酸素、硫黄もしくは窒素であり、そしてＹが酸素もしくは硫黄である場合、R_1基は存在せず、そしてＹが窒素である場合、少なくとも１個のR_1基が存在する］
を有するアゾールである請求項１に記載の方法。
【請求項７】
ハプテンがモノ－もしくはジ－ニトロピラゾールである請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ハプテンが以下の構造

【化２】

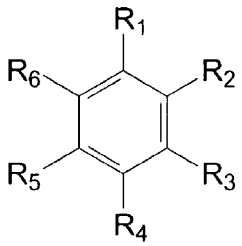


を有する請求項６に記載の方法。

【請求項９】

ハプテンが以下の一般的化学式

【化３】



［式中、Ｒ１～Ｒ６の少なくとも１つはニトロであり、そして残りのＲ１～Ｒ６環置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族　ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式（ｃｌｉｃ）、複素環式、シアノ、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、ケト、スルフヒドリル、スルホキシド、エキソメチレンから選択され、またはＲ１～Ｒ６置換基の２つもしくはそれ以上は環系における原子であり、そしてＲ１～Ｒ６置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくはリンカーへの連結に適当な反応性基である］

を有するニトロアリール化合物である請求項１に記載の方法。

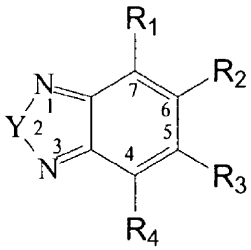
【請求項１０】

ハプテンがベンゾフラザンもしくはその誘導体である請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

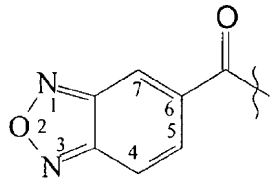
ハプテンが式

【化４】

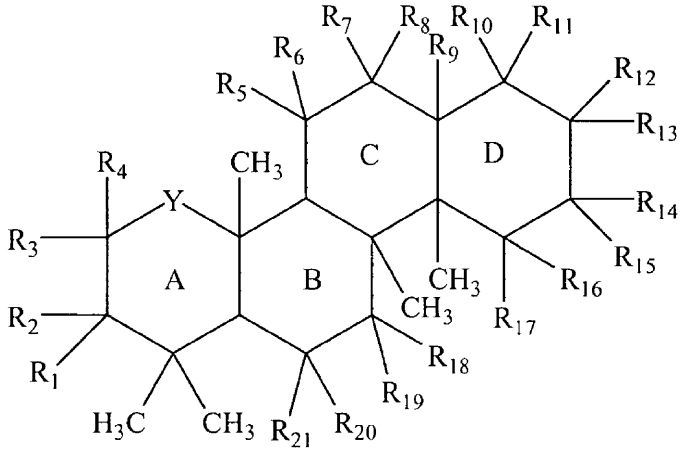


［式中、Ｒ１～Ｒ４置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わ

せから選択され、または、R_1～R_4置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、硫黄もしくはR_5およびR_6置換基を有する炭素原子であり、ここで、R_5およびR_6はR_1～R_4について記載したとおりである］
を有する請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
Ｙが酸素である請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
ハプテンが以下の化学構造
【化５】

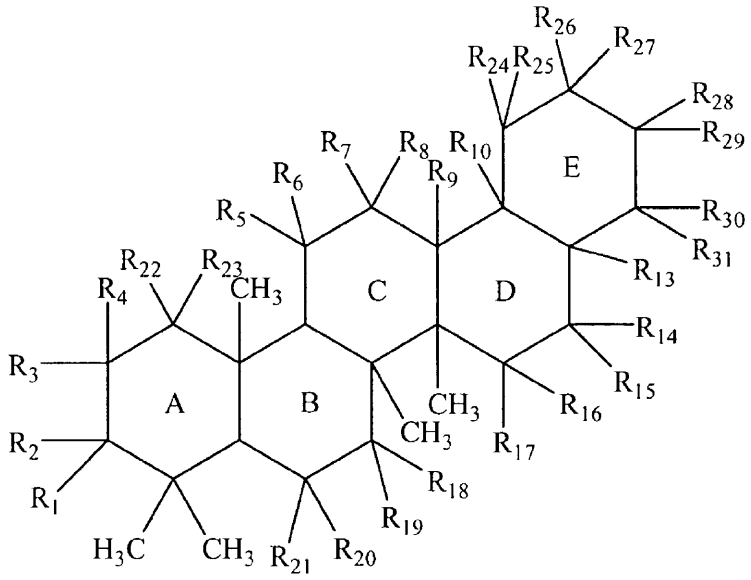


を有する請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
ハプテンが式
【化６】

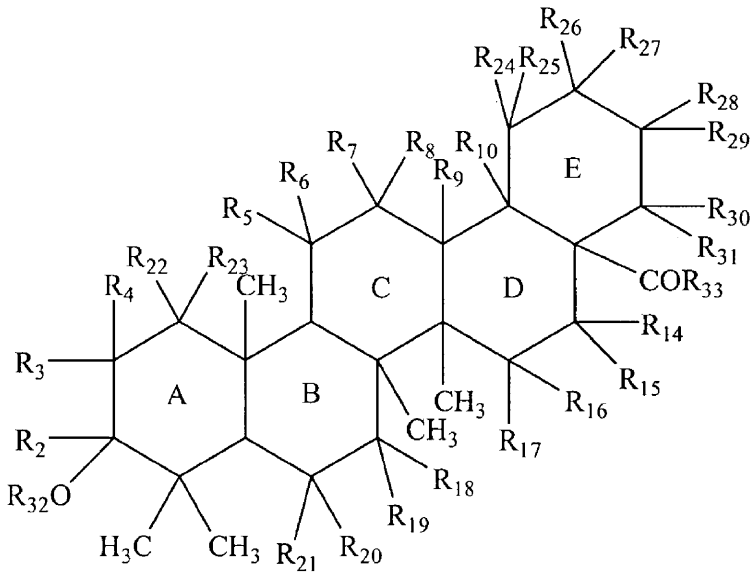


［式中、R_1～R_{21}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{21}置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、そしてR_1～R_{21}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、Ｙは結合であり、それにより５員環を定義するかもしくはR_{22}およびR_{23}置換基を有する炭素原子であり、ここで、R_{22}およびR_{23}はR_1～R_{21}について記載したとおりである］
を有する環式トリテルペンである請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
ハプテンが約５～約７個の原子を有するＥ環を含むトリテルペンであり、ハプテンが以

下の式
【化７】

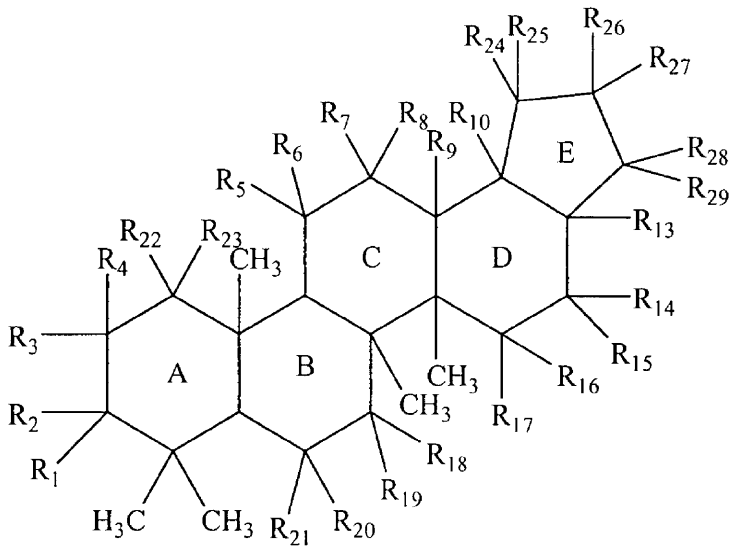


［式中、Ｒ１～Ｒ３１はＲ１～Ｒ２１に記載したとおりである］
を有する請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
ハプテンが以下の一般式
【化８】



［式中、Ｒ１３は水素、ヒドロキシル、－ＯＲ３４（ここで、Ｒ３４は脂肪族である）、アミドから選択されるＲ３３置換基を有するアシル基であり、Ｒ３２は水素もしくは脂肪族であり、そして残りのＲ置換基はＲ１～Ｒ２１について記載したとおりである］
を有するトリテルペンである請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
ハプテンが以下の一般式

【化９】

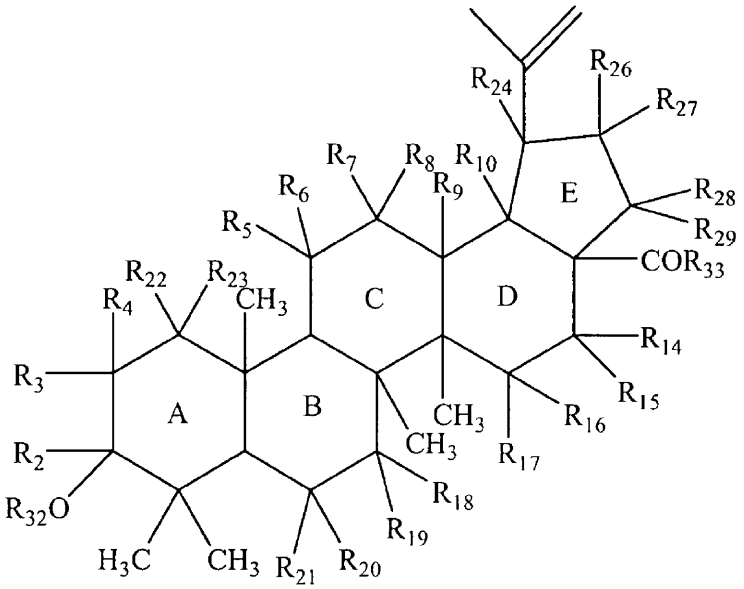


［式中、Ｒ基はＲ１～Ｒ２１について上記に記載したとおりである］を有するトリテルペンである請求項１４に記載の方法。

【請求項１８】

ハプテンが以下の一般式

【化１０】

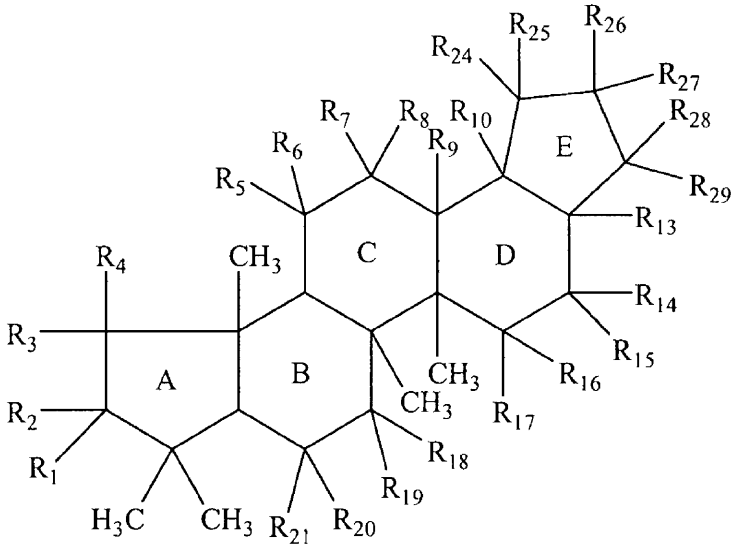


［式中、Ｒ基はＲ１～Ｒ２１について上記に記載したとおりである］を有するトリテルペンである請求項１４に記載の方法。

【請求項１９】

ハプテンが以下の式

【化１１】



［式中、R_1～R_{29}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{29}置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{29}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有するトリテルペンである請求項１４に記載の方法。

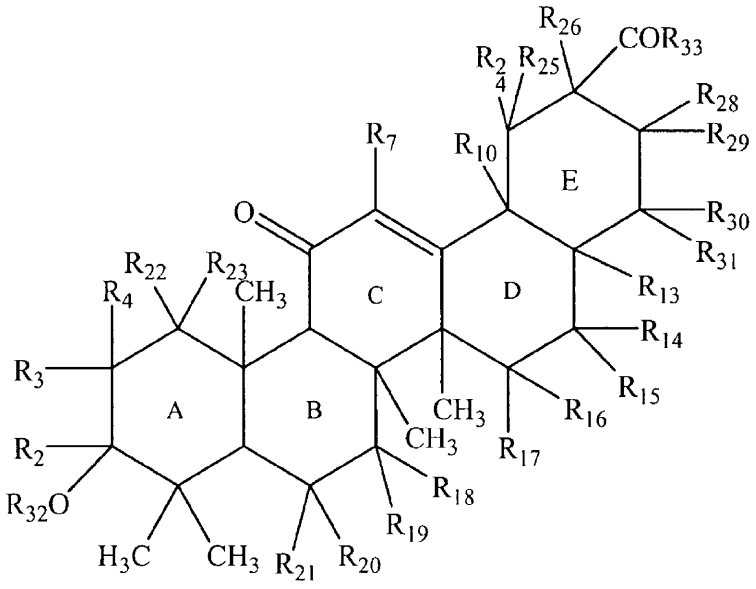
【請求項２０】

R_1がOR_{32}置換基（ここで、R_{32}は水素もしくは脂肪族である）であり、R_{13}が水素、ヒドロキシル、－OR_{34}（ここで、R_{34}は脂肪族である）もしくはアミドから選択されるR_{33}置換基を有するアシル基であり、そして残りのR基がR_1～R_{21}について上記に記載したとおりである請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

ハプテンが式

【化１２】



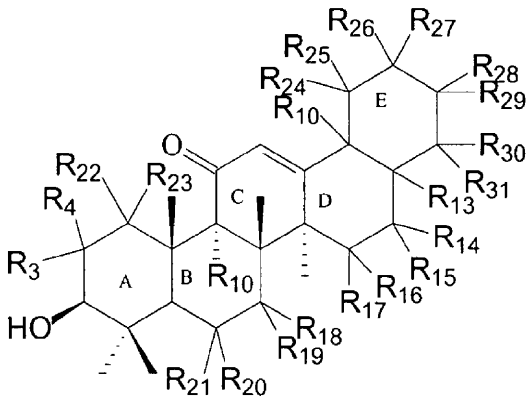
［式中、Ｒ１～Ｒ３３は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ３３置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ３３置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］

を有する請求項１４に記載の方法。

【請求項２２】

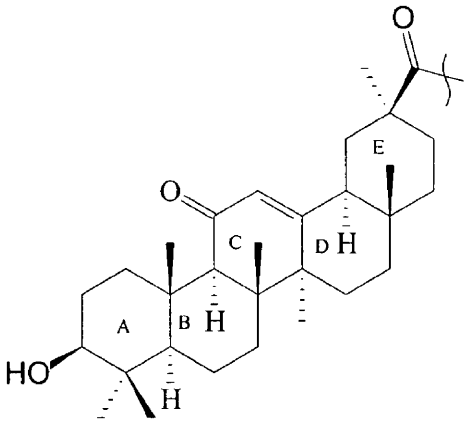
ハプテンが式

【化１３】

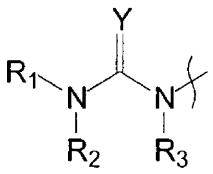


［式中、Ｒ１～Ｒ３１は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせか

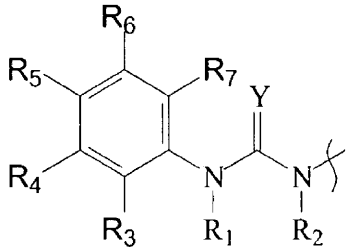
ら選択され、Ｒ１～Ｒ３３置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ３３置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有する請求項１４に記載の方法。
【請求項２３】
ハプテンが式
【化１４】



を有する請求項１４に記載の方法。
【請求項２４】
ハプテンが式
【化１５】

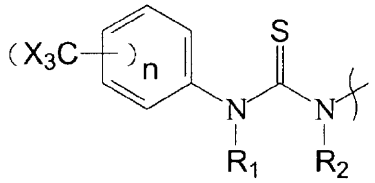


［式中、Ｒ１～Ｒ３は独立して水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールであり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する尿素もしくはチオ尿素である請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
ハプテンが式
【化１６】

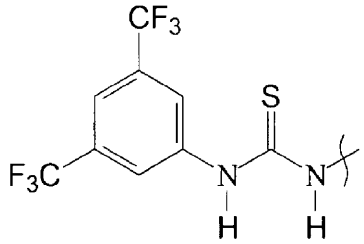


［式中、Ｒ１～Ｒ７は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミ

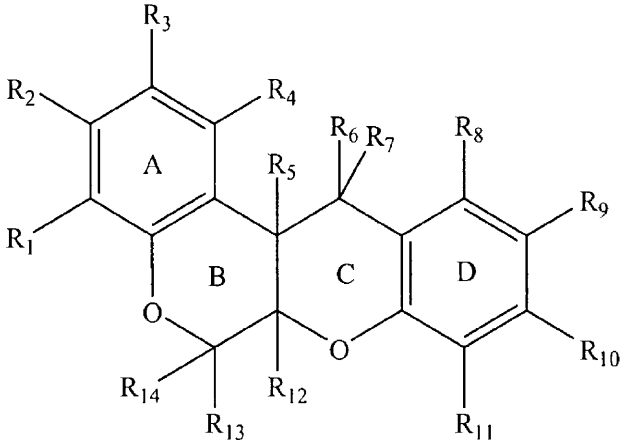
ン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから独立して選択され、R_1～R_7置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_7置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するアリール尿素もしくはチオ尿素である請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
ハプテンが式
【化１７】



［式中、ｎは１～５であり、R_1およびR_2は独立して水素もしくは低級アルキルであり、そしＸは独立してハロゲン化物である］
を有するチオ尿素である請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
ハプテンが式
【化１８】



を有する請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
ハプテンが式
【化１９】



［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、

エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］を有するロテノイドである請求項１に記載の方法。

【請求項２９】

R_6およびR_7が独立して水素、－OR_{15}（ここで、R_{15}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）、－NR_{21}（ここで、R_{21}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）もしくはＮ－Ｌ－ＲＧ（ここで、Ｌはリンカーでありもしくは／そしてＲＧは反応性基である）である請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

R_6およびR_7が二重結合を形成する請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

R_6およびR_7が酸素への二重結合を形成してカルボニルを形成する請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

Ｂ環が少なくとも１つのさらなる不飽和部位を含む請求項２８に記載の方法。

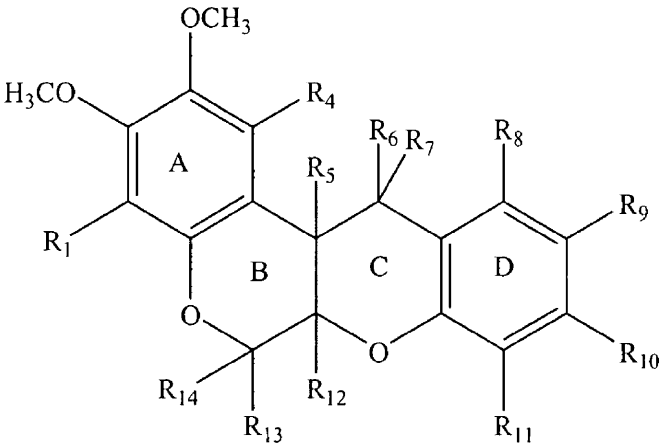
【請求項３３】

R_{10}およびR_{11}がピランもしくはフラン環を定義するように５もしくは６員環において連結される請求項２８に記載の方法。

【請求項３４】

ハプテンが式

【化２０】

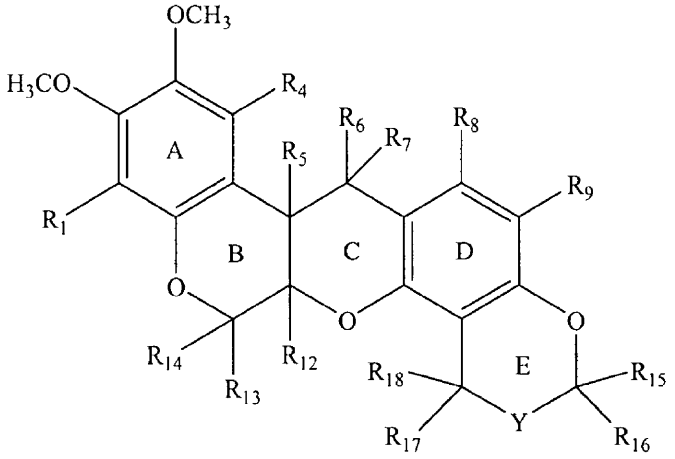


［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］を有するロテノイドである請求項２８に記載の方法。

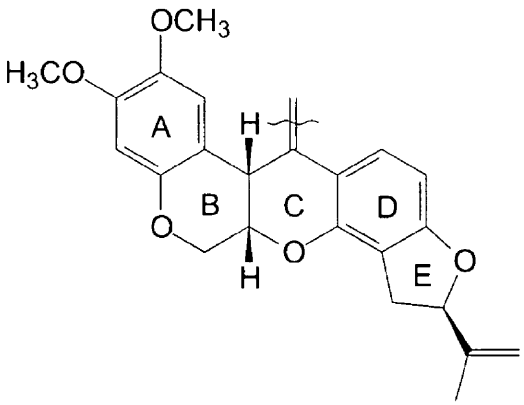
【請求項３５】

R_{10}およびR_{11}が以下の式

【化２１】

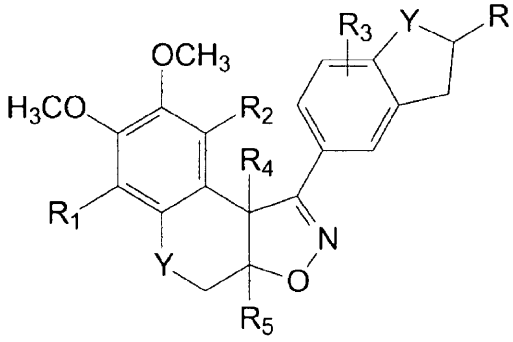


［式中、R_1～R_{18}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{18}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{18}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはR_{19}およびR_{20}置換基を有する６員環における炭素原子であり、ここで、R_{19}およびR_{20}置換基はR_1～R_{18}に記載したとおりである］
を有する５もしくは６員環において連結される請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
ハプテンが式
【化２２】



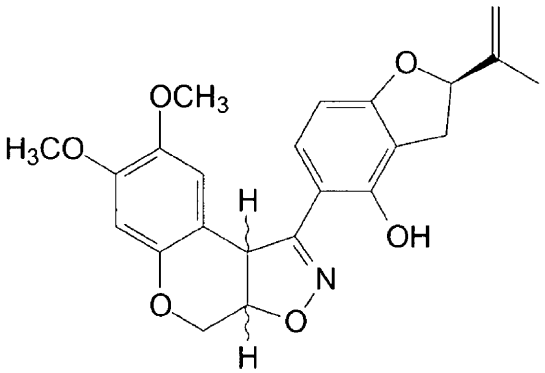
を有する請求項２８に記載の方法。
【請求項３７】
ハプテンが式

【化２３】



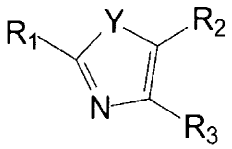
［式中、Ｒ～Ｒ５は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、イソプレンのような全ての分枝鎖状異性体および全ての立体異性体を包含する、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル、アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート、エステル、アルキルエステル、アシル、エーテル、環式、複素環式、アリール、アルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、およびその組み合わせであり、Ｒ～Ｒ５の少なくとも１つはリンカーにもしくは担体分子に結合され、そしてＹは酸素、窒素、もしくは硫黄である］
を有するロテノンイソオキサゾリンである請求項２８に記載の方法。

【請求項３８】
ハプテンが
【化２４】



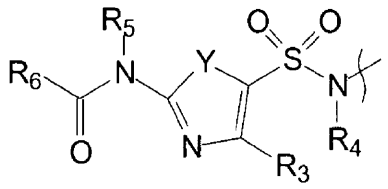
である請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】
ハプテンが式
【化２５】

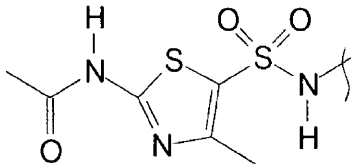


［式中、Ｒ１～Ｒ３は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エ

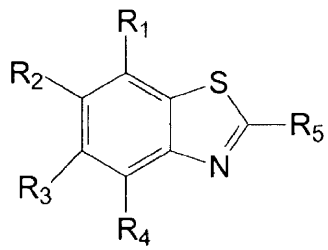
キソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_3置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_2～R_3置換基は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項１に記載の方法。
【請求項４０】
ハプテンが式
【化２６】



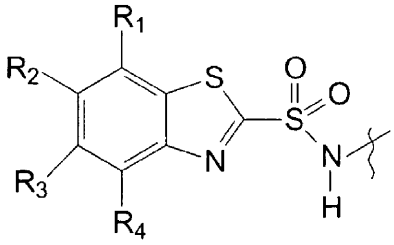
［式中、R_3～R_6は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
R_6がアルキルであり、そしてＹが硫黄である請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
ハプテンが以下の化学構造
【化２７】



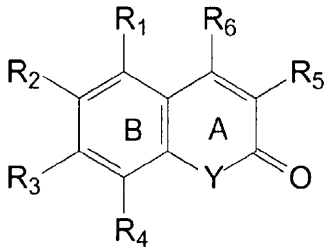
を有する請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
ハプテンが式
【化２８】



［式中、R_1～R_5は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項１に記載の方法。
【請求項４４】
ハプテンが以下の式
【化２９】

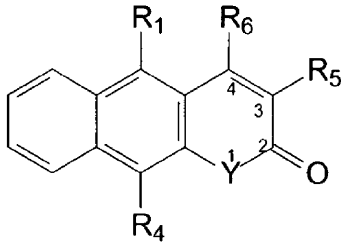


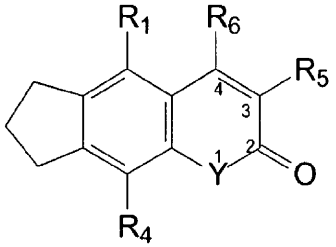
［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択される］
を有するスルホンアミドである請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
ハプテンが式
【化３０】

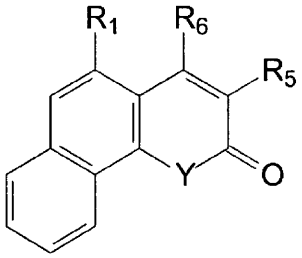


［式中、R_1～R_6は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるR_1～R_6置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄である］

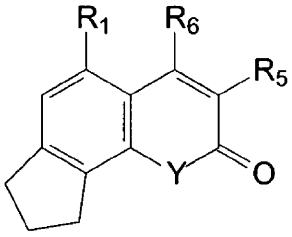
を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１に記載の方法。
【請求項４６】
ハプテンが式
【化３１】



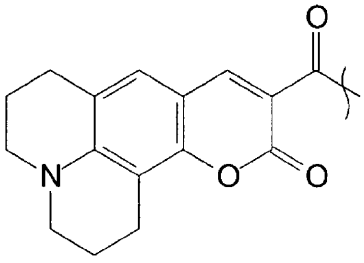




もしくは

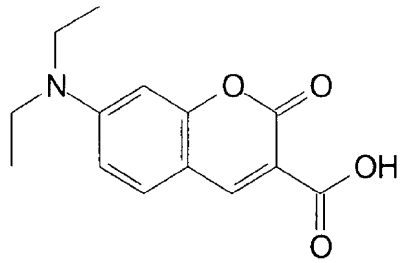


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
ハプテンが式
【化３２】

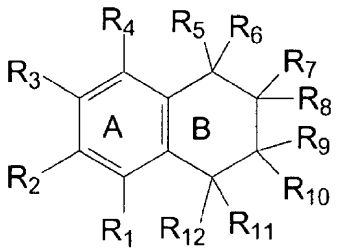


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１に記載の方法。

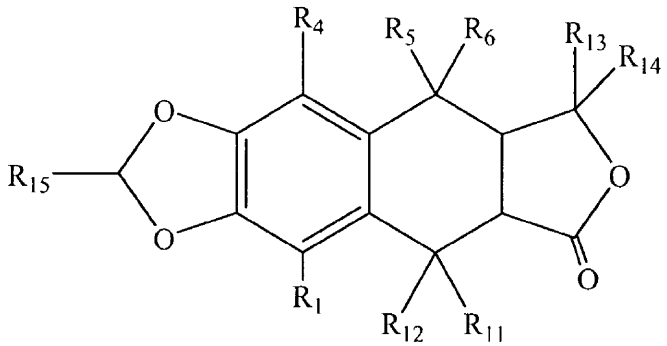
【請求項４８】
ハプテンが式
【化３３】



を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１に記載の方法。
【請求項４９】
ハプテンが式
【化３４】

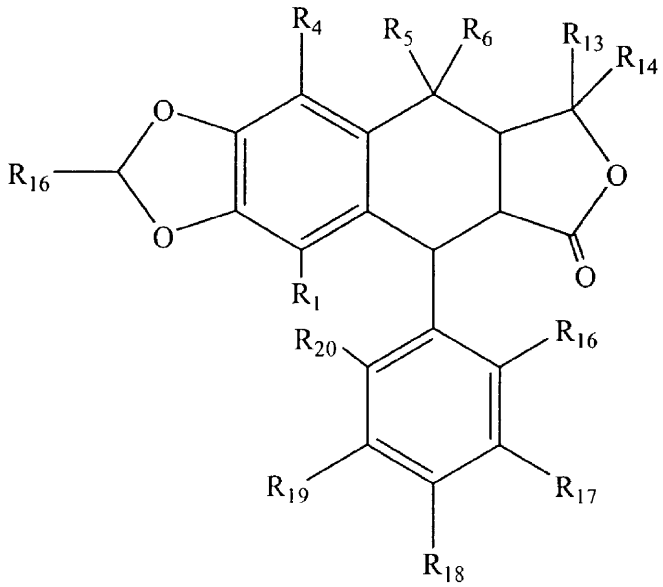


［式中、R_1～R_{12}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるR_1～R_{12}置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、R_1～R_{12}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項５０】
ハプテンが式
【化３５】



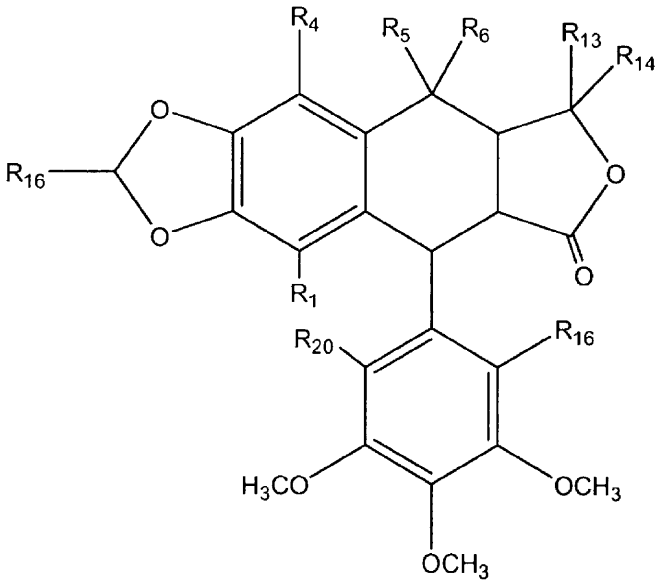
［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、ア

ミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項５１】
ハプテンが式
【化３６】



［式中、R_1～R_{20}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{20}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項５２】
R_{16}～R_{20}が水素もしくはアルコキシである請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
ハプテンが以下の式

【化３７】



［式中、Ｒ置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基である］
を有する請求項５２に記載の方法。

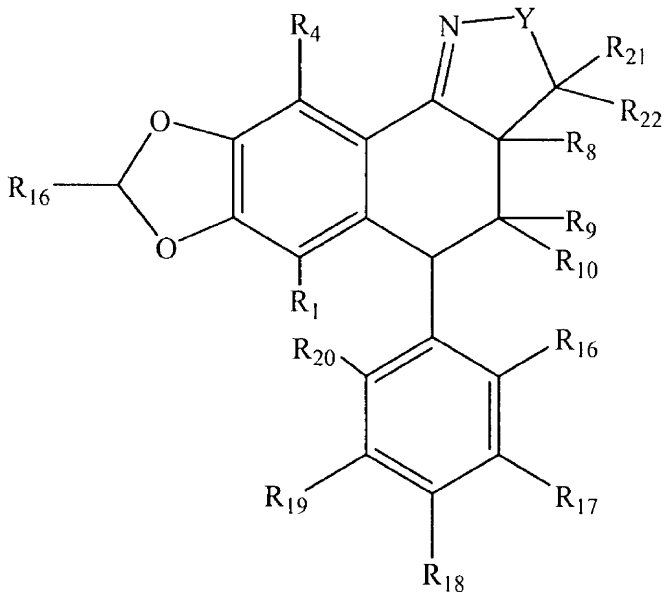
【請求項５４】

Ｒ$_5$およびＲ$_6$がカルボニル、イミンもしくはオキシムを形成する請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

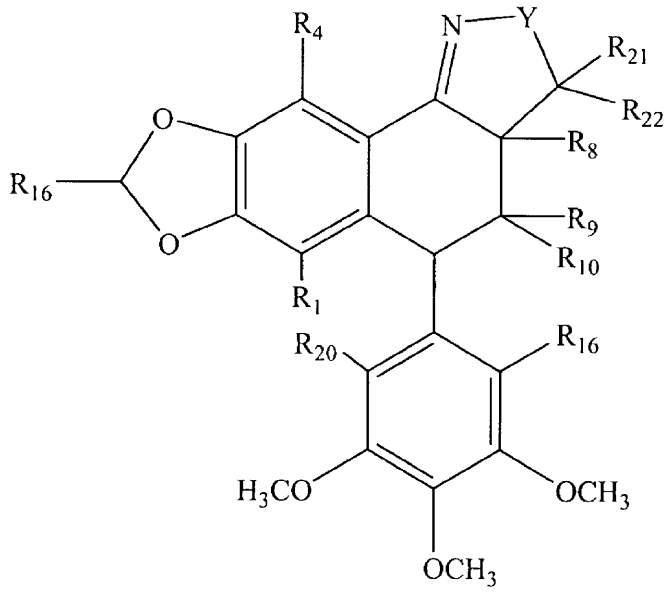
ハプテンが式

【化３８】

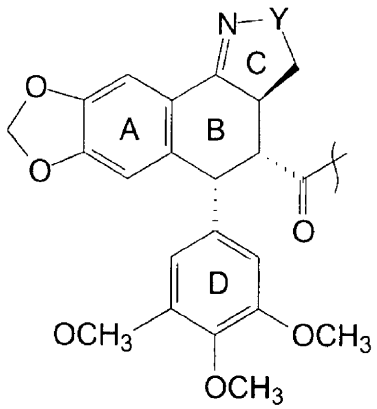


［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_{22}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせか

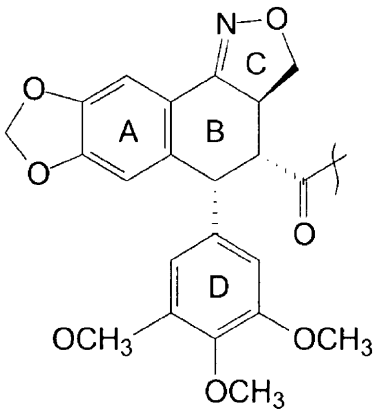
ら選択され、Ｒ１～Ｒ２２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
Ｒ１６～Ｒ２０が独立して水素およびアルコキシから選択される請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
ハプテンが式
【化３９】



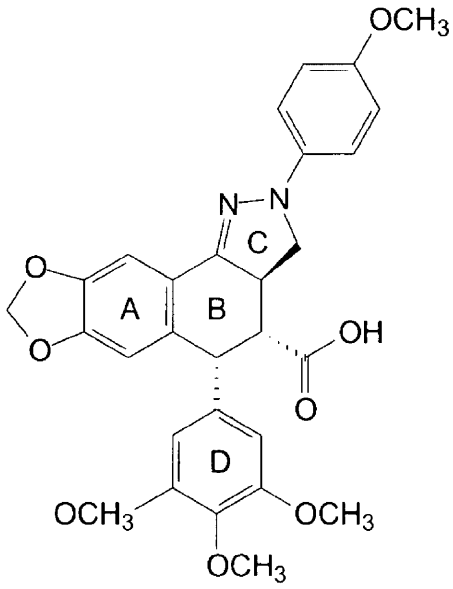
［式中、Ｒ１～Ｒ２２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ２２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
ハプテンが式
【化４０】



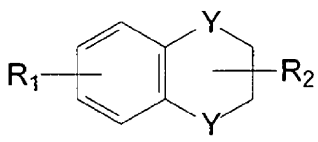
［式中、Ｙは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項５９】
ハプテンが式
【化４１】



を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項６０】
ハプテンが式
【化４２】

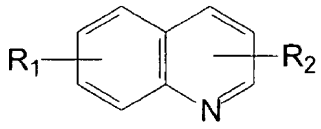


を有するシクロリグナンである請求項１に記載の方法。
【請求項６１】
ハプテンが式
【化４３】

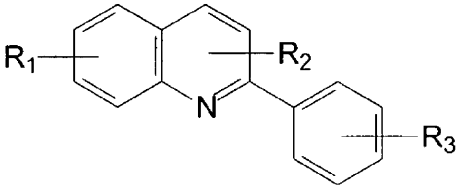


［式中、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{2}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、

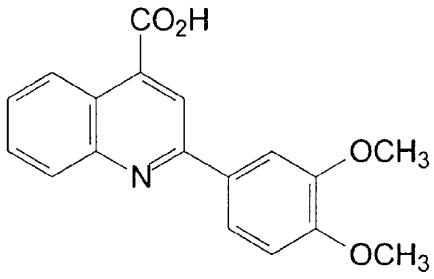
オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子から選択され、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄であり、ここで、Ｙが窒素である場合、該式はまた１個もしくはそれ以上の窒素原子への二重結合を含むこともできる］
を有するヘテロビアリール化合物である請求項１に記載の方法。
【請求項６２】
ハプテンが式
【化４４】



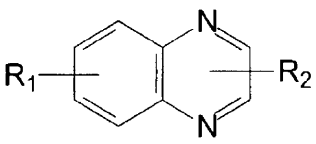
を有するフェニルキノリンである請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
ハプテンが式
【化４５】



を有する請求項６１に記載の方法。
【請求項６４】
ハプテンが２－（３，４－ジメトキシフェニル）キノリン－４－カルボン酸
【化４６】

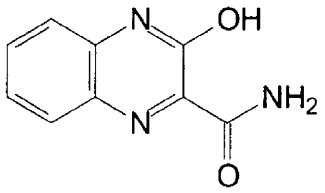


である請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
ハプテンが式
【化４７】

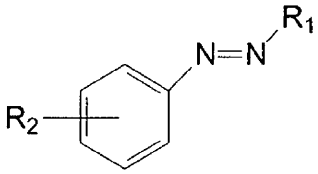


を有する請求項６１に記載の方法。

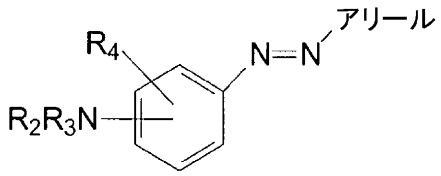
【請求項６６】
ハプテンが３－ヒドロキシ－２－キノキサリンカルバミド
【化４８】



である請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
ハプテンが式
【化４９】

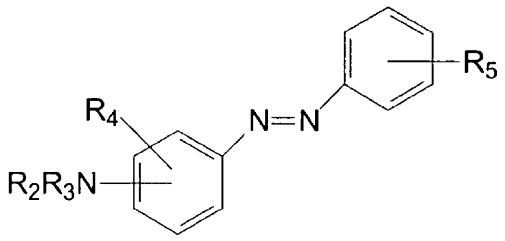


［式中、Ｒ１～Ｒ２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有するアゾアリール化合物である請求項１に記載の方法。
【請求項６８】
ハプテンが式
【化５０】

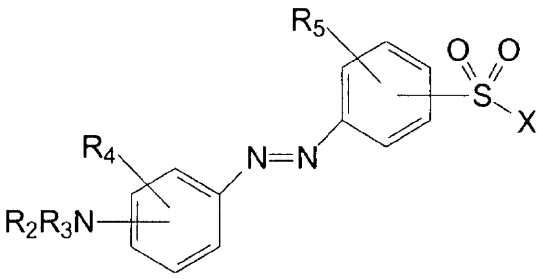


［式中、Ｒ２～Ｒ４は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
ハプテンが式

【化５１】

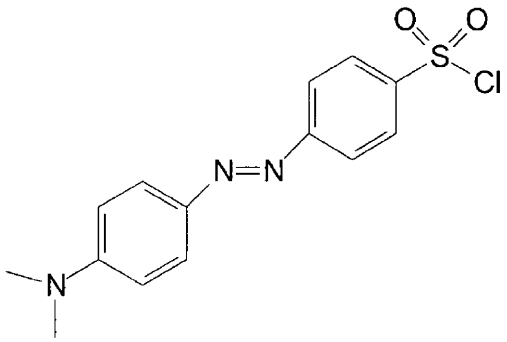


［式中、Ｒ２～Ｒ５は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項６７に記載の方法。
【請求項７０】
ハプテンが式
【化５２】



［式中、Ｒ２～Ｒ５は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＸはハロゲン化物である］
を有する請求項６７に記載の方法。
【請求項７１】
ハプテンが４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホニルクロリド

【化５３】

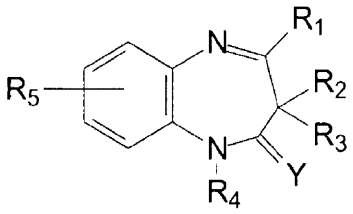


である請求項６７に記載の方法。

【請求項７２】

ハプテンが式

【化５４】



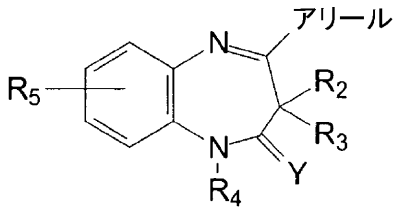
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］

を有するベンゾジアゼピンである請求項１に記載の方法。

【請求項７３】

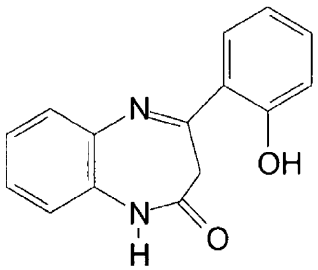
ハプテンが式

【化５５】

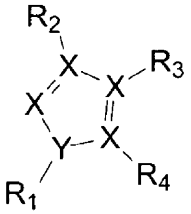


［式中、Ｒ$_2$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄

である］
を有する請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
ハプテンが４－（２－ヒドロキシフェニル）－１Ｈ－ベンゾ［ｂ］［１，４］ジアゼピン－２（３Ｈ）－オン
【化５６】

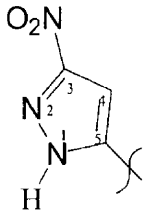


である請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（反応性基）$_o$（式中、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、もしくはその組み合わせであり、ｍは１～約１００であり、ｎは０～約１０であり、そしてｏは１～１００である）を有する化合物。
【請求項７６】
ｍが１～約１００であり、ｎが０～約５であり、そしてｏが約１～約５である請求項７５に記載の化合物。
【請求項７７】
ｍ、ｎおよびｏが１である請求項７５に記載の化合物。
【請求項７８】
ハプテンが以下の一般的化学式
【化５７】

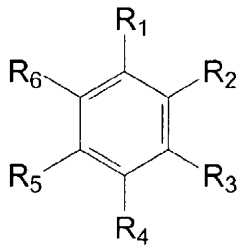


［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、Ｘは独立して窒素もしくは炭素であり、Ｙは酸素、硫黄もしくは窒素であり、そしてＹが酸素もしくは硫黄である場合、R_1基は存在せず、そしてＹが窒素である場合、少なくとも１個のR_1基が存在する］
を有するアゾールである請求項７５に記載の化合物。
【請求項７９】
R_1～R_4置換基の２つもしくはそれ以上が、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である請求項７８に記載の化合物。

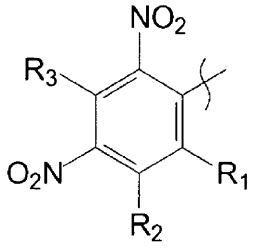
【請求項８０】
ハプテンがモノ－もしくはジニトロピラゾールである請求項７８に記載の化合物。
【請求項８１】
ハプテンが以下の構造
【化５８】



を有する請求項７８に記載の化合物。
【請求項８２】
ハプテンがニトロアリール化合物である請求項７５に記載の化合物。
【請求項８３】
ハプテンが以下の一般的化学式
【化５９】

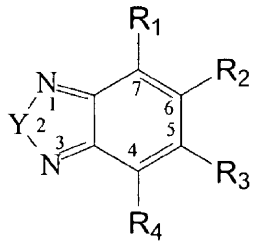


［式中、R_1～R_6の少なくとも１つはニトロであり、そして残りのR_1～R_6環置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式（ｃｌｉｃ）、複素環式、シアノ、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、ケト、スルフヒドリル、スルホキシド、エキソメチレンから選択され、またはR_1～R_6置換基の２つもしくはそれ以上は環系における原子であり、そしてR_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくはリンカーへの連結に適当な反応性基である］
を有する請求項７８に記載の化合物。
【請求項８４】
ハプテンがジニトロフェニル化合物である請求項８３に記載の化合物。
【請求項８５】
ハプテンが以下の式
【化６０】

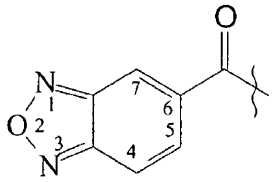


を有する２，４－ジニトロフェニル化合物である請求項８４に記載の化合物。

【請求項８６】
ハプテンがベンゾフラザンもしくはその誘導体である請求項８５に記載の化合物。
【請求項８７】
ハプテンが式
【化６１】

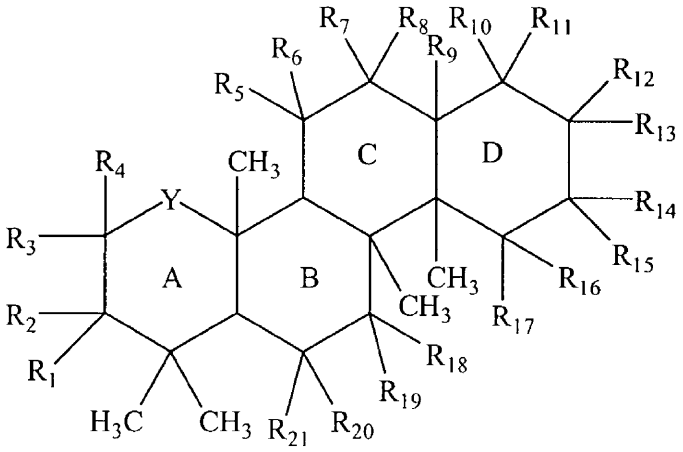


［式中、R_1～R_4置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはR_1～R_4置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、硫黄もしくはR_5およびR_6置換基を有する炭素原子であり、ここで、R_5およびR_6はR_1～R_4に記載したとおりである］
を有する請求項８６に記載の化合物。
【請求項８８】
Ｙが酸素である請求項８７に記載の化合物。
【請求項８９】
以下の化学構造
【化６２】



を有する請求項８７に記載の化合物。
【請求項９０】
ハプテンが式

【化６３】



［式中、Ｒ１～Ｒ２１は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ２１置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ２１置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、Ｙは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはＲ２２およびＲ２３置換基を有する炭素原子であり、ここで、これらのＲ基はＲ１～Ｒ２１に記載したとおりである］
を有する環式トリテルペンである請求項８５に記載の化合物。

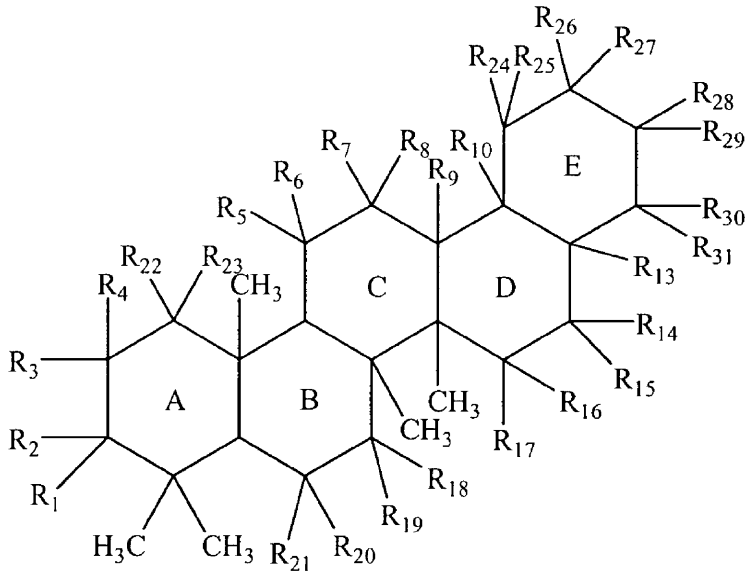
【請求項９１】

トリテルペンが約５～約７個の原子を有するＥ環を含む請求項９０に記載の化合物。

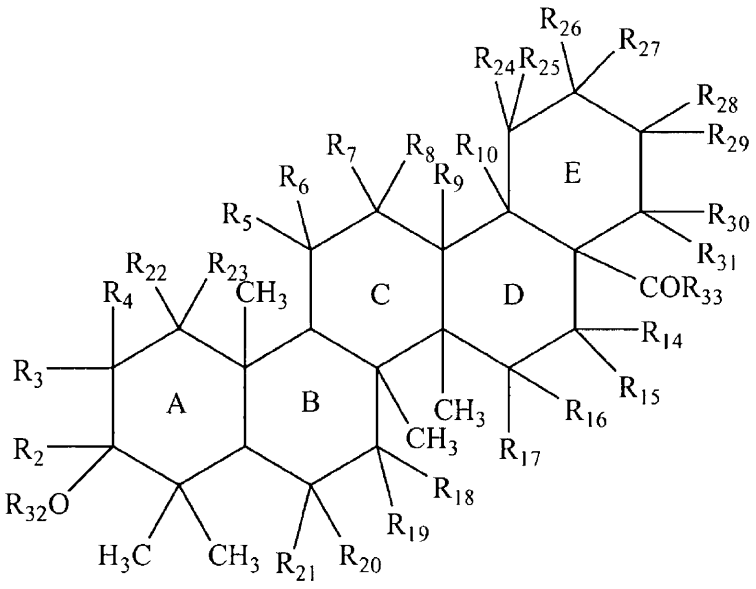
【請求項９２】

トリテルペンが以下の一般式

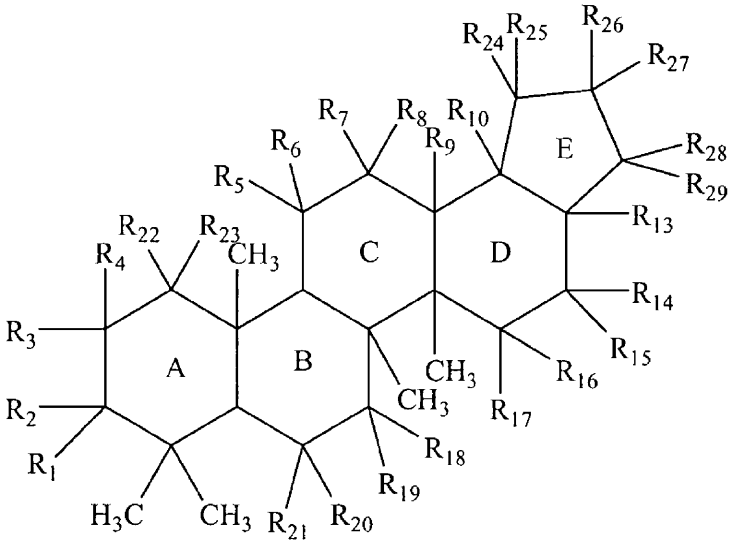
【化６４】



［式中、Ｒ１～Ｒ３１はＲ１～Ｒ２１について記載したとおりである］
を有する請求項９１に記載の化合物。
【請求項９３】
トリテルペンが以下の一般式
【化６５】

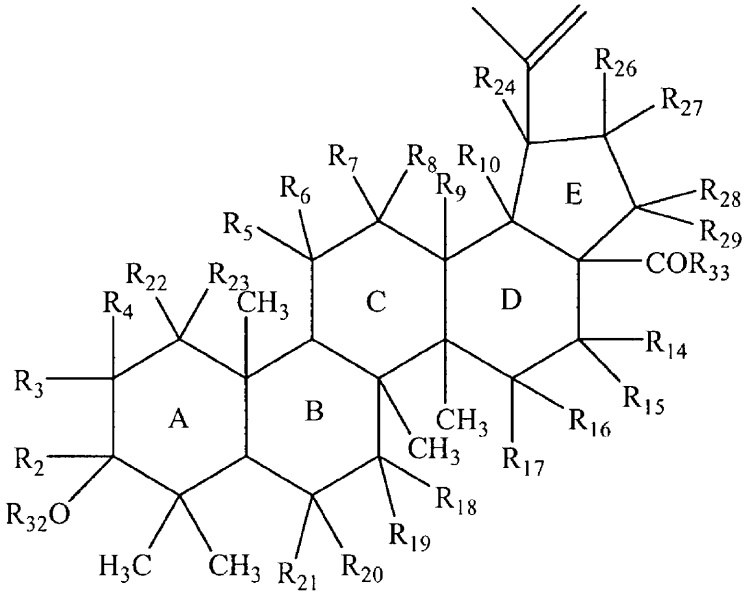


［式中、Ｒ１３は水素、ヒドロキシル、－ＯＲ３４（ここで、Ｒ３４は脂肪族である）、アミドから選択されるＲ３３置換基を有するアシル基であり、Ｒ３２は水素もしくは脂肪族であり、そして残りのＲ置換基はＲ１～Ｒ２１について記載したとおりである］
を有する請求項９１に記載の化合物。
【請求項９４】
Ｅ環が以下の式
【化６６】



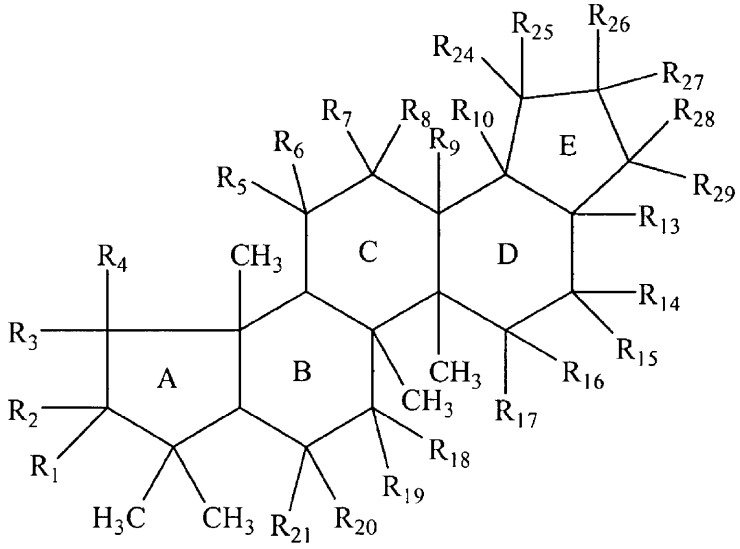
［式中、Ｒ基はＲ１～Ｒ２１について上記に記載したとおりである］
を有する５員環である請求項９１に記載の化合物。
【請求項９５】
Ｅ環が以下の式

【化６７】



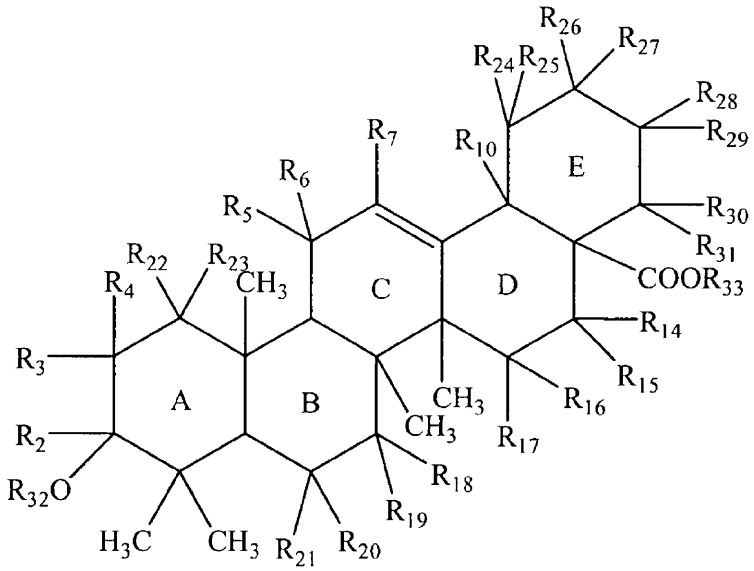
［式中、Ｒ基はＲ１～Ｒ２１について上記に記載したとおりである］
を有する５員環である請求項９１に記載の化合物。

【請求項９６】
ハプテンが以下の式
【化６８】



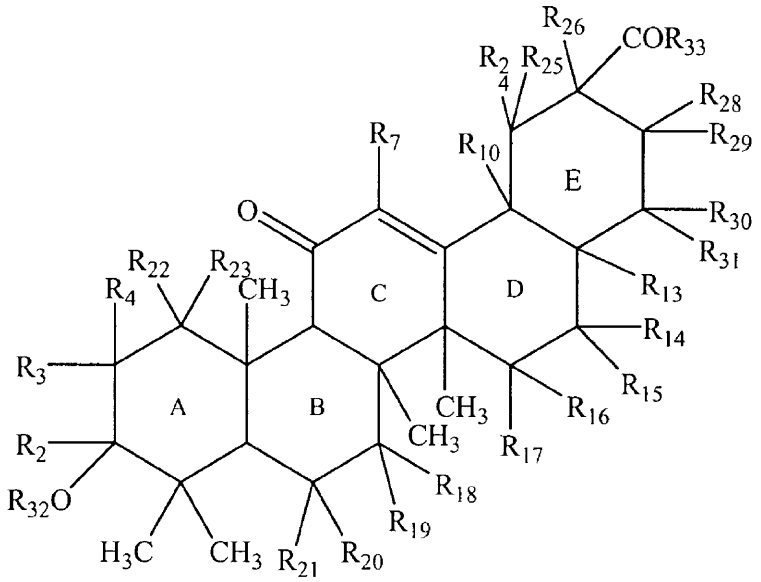
［式中、Ｒ１～Ｒ２９は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ２９置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ２９置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有するトリテルペンである請求項９０に記載の化合物。

【請求項９７】
Ｒ$_{1}$がＯＲ$_{32}$置換基（ここで、Ｒ$_{32}$は水素もしくは脂肪族である）であり、Ｒ$_{13}$が水素、ヒドロキシル、－ＯＲ$_{34}$（ここで、Ｒ$_{34}$は脂肪族である）もしくはアミドから選択されるＲ$_{33}$置換基を有するアシル基であり、そして残りのＲ基がＲ$_{1}$～Ｒ$_{21}$について上記に記載したとおりである請求項９６に記載の化合物。
【請求項９８】
式
【化６９】



［式中、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{33}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{33}$置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性官能基であり、そしてＲ$_{1}$～Ｒ$_{33}$置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有する請求項９１に記載の化合物。
【請求項９９】
ハプテンが式

【化７０】

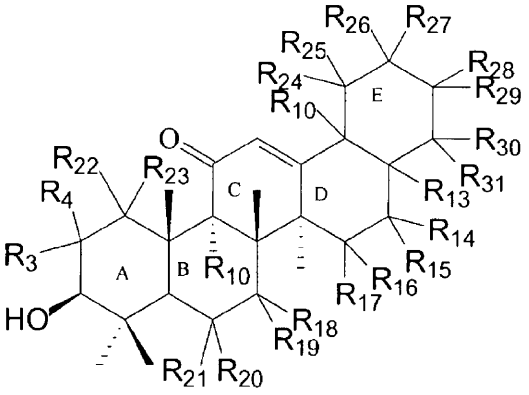


［式中、Ｒ１～Ｒ３３は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ３３置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ３３置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有する請求項９１に記載の化合物。

【請求項１００】

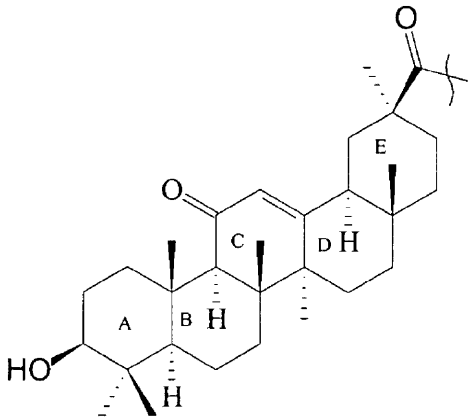
ハプテンが式

【化７１】

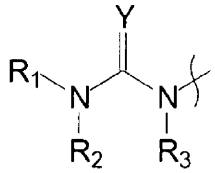


［式中、Ｒ１～Ｒ３１は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせか

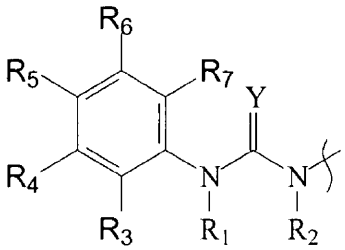
ら選択され、Ｒ１～Ｒ３３置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ３３置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有する請求項９１に記載の化合物。
【請求項１０１】
ハプテンが式
【化７２】



を有する請求項９１に記載の化合物。
【請求項１０２】
ハプテンが式
【化７３】

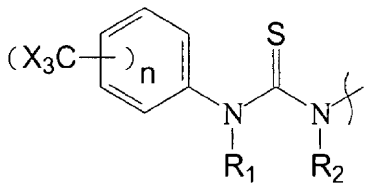


［式中、Ｒ１～Ｒ３は独立して水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールであり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する尿素もしくはチオ尿素である請求項８５に記載の化合物。
【請求項１０３】
ハプテンが式
【化７４】

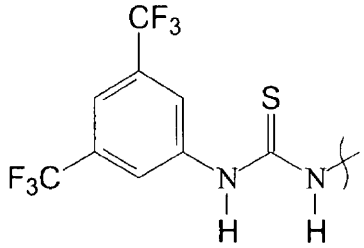


［式中、Ｒ１～Ｒ７は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから

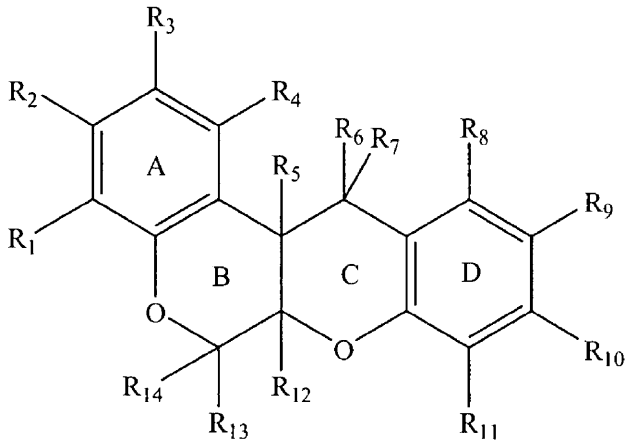
独立して選択され、R_1～R_7置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_7置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するアリール尿素もしくはチオ尿素である請求項１０２に記載の化合物。
【請求項１０４】
ハプテンが式
【化７５】



［式中、ｎは１～５であり、R_1およびR_2は独立して水素もしくは低級アルキルであり、そしてＸは独立してハロゲン化物である］
を有するチオ尿素である請求項１０２に記載の化合物。
【請求項１０５】
ハプテンが式
【化７６】



を有する請求項１０４に記載の化合物。
【請求項１０６】
ハプテンが式
【化７７】



［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルア

ミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］を有するロテノイドである請求項８５に記載の化合物。

【請求項１０７】

R_6およびR_7が独立して水素、OR_{15}（ここで、R_{15}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）、$-NR_{21}$（ここで、R_{21}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）もしくはN－L－RG（ここで、Lはリンカーでありもしくは／そしてRGは反応性基である）である請求項１０６に記載の化合物。

【請求項１０８】

R_6およびR_7が二重結合を形成する請求項１０７に記載の化合物。

【請求項１０９】

R_6およびR_7が酸素への二重結合を形成してカルボニルを形成する請求項１０７に記載の化合物。

【請求項１１０】

B環が少なくとも１つのさらなる不飽和部位を含む請求項１０７に記載の化合物。

【請求項１１１】

R_5およびR_{12}が二重結合を形成する請求項１１０に記載の化合物。

【請求項１１２】

R_{10}およびR_{11}が５もしくは６員環において連結される請求項１１０に記載の化合物。

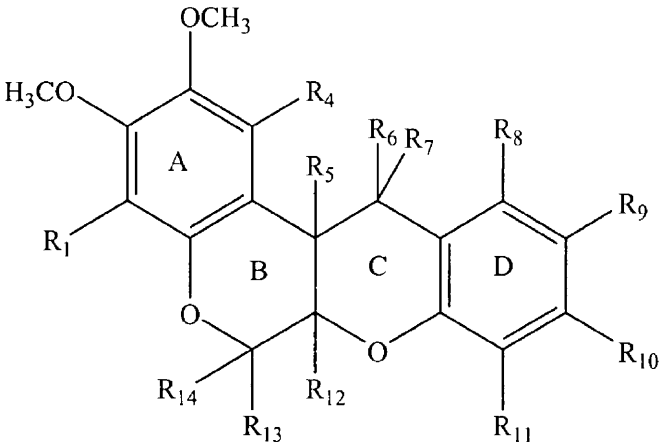
【請求項１１３】

R_{10}およびR_{11}がピランもしくはフラン環を定義するように５もしくは６員環において連結される請求項１１２に記載の化合物。

【請求項１１４】

ハプテンが式

【化７８】



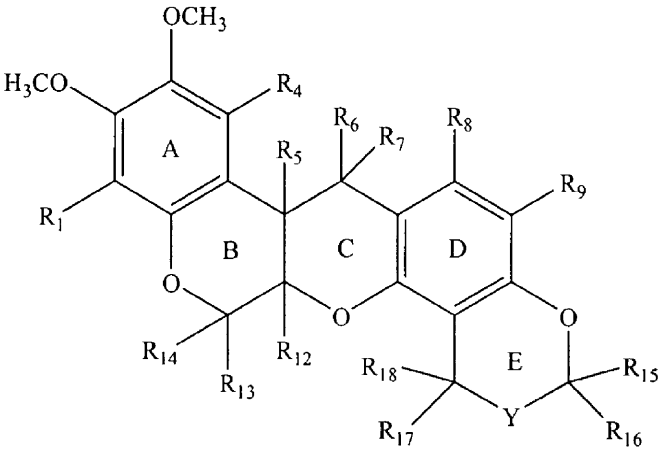
［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する

化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］を有するロテノイドである請求項８５に記載の化合物。

【請求項１１５】

R_{10}およびR_{11}が以下の式

【化７９】



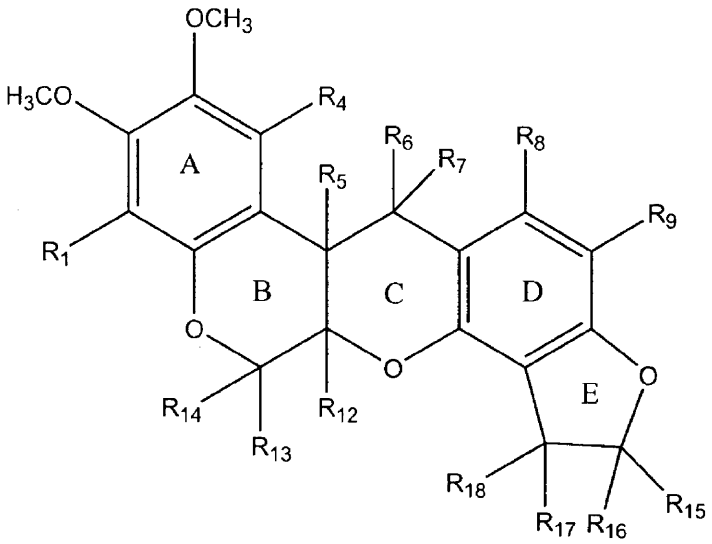
［式中、R_1～R_{18}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{18}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてここで、R_1～R_{18}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはR_{19}およびR_{20}置換基を有する６員環における炭素原子であり、ここで、R_{19}およびR_{20}置換基はR_1～R_{18}に記載したとおりである］

を有する５もしくは６員環において連結される請求項１１４に記載の化合物。

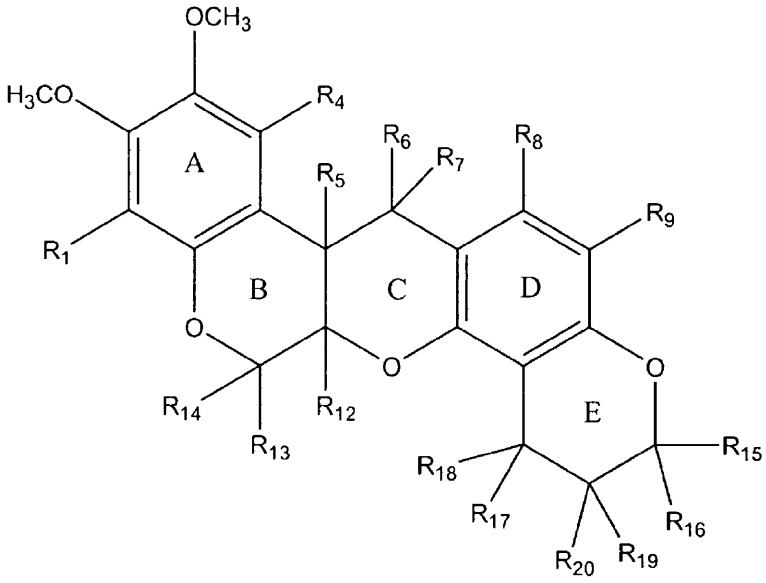
【請求項１１６】

ハプテンが式

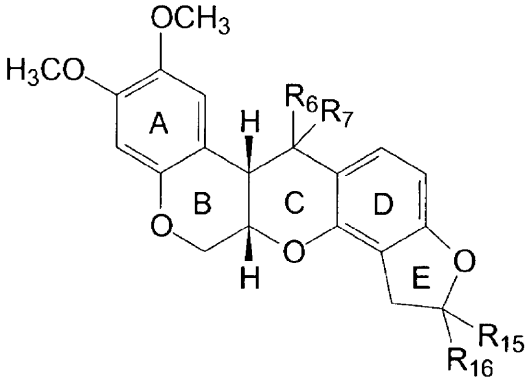
【化８０】



を有する請求項１１５に記載の化合物。
【請求項１１７】
ハプテンが式
【化８１】

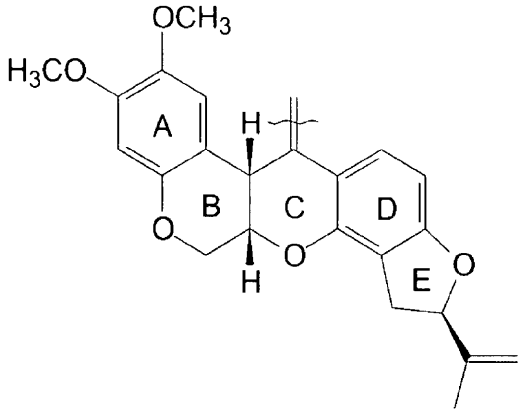


を有する請求項１１５に記載の化合物。
【請求項１１８】
ハプテンが式
【化８２】



［式中、R_6およびR_7は水素、アルキルであるか、もしくはカルボニルを形成するように酸素へのような二重結合を定義し、R_{15}およびR_{16}は独立して水素および脂肪族である］
を有する請求項１１５に記載の化合物。
【請求項１１９】
ハプテンが式

【化８３】

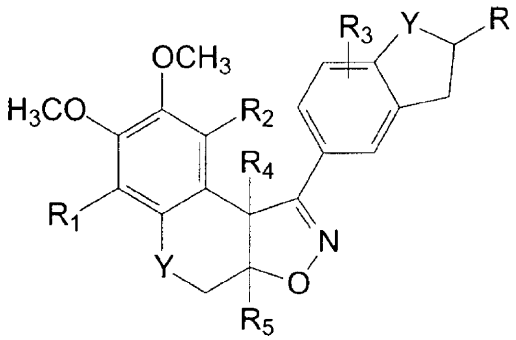


を有する請求項１１５に記載の化合物。

【請求項１２０】

ハプテンが式

【化８４】



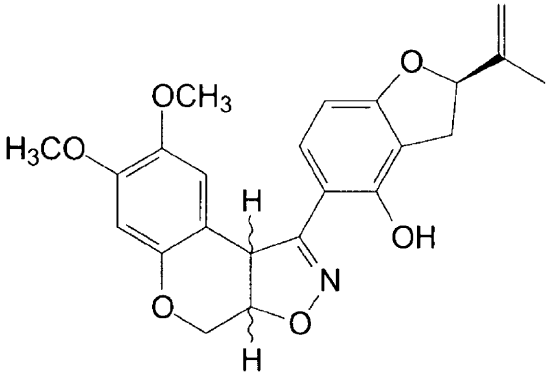
［式中、Ｒ～Ｒ$_5$は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、イソプレンのような全ての分枝鎖状異性体および全ての立体異性体を包含する、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル、アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート、エステル、アルキルエステル、アシル、エーテル、環式、複素環式、アリール、アルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、およびその組み合わせであり、Ｒ～Ｒ$_5$の少なくとも１つはリンカーにもしくは担体分子に結合され、そしてＹは酸素、窒素、もしくは硫黄である］

を有するロテノンイソオキサゾリンである請求項８５に記載の方法。

【請求項１２１】

ハプテンが

【化８５】

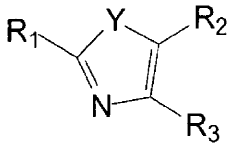


である請求項１２０に記載の方法。

【請求項１２２】

ハプテンが式

【化８６】



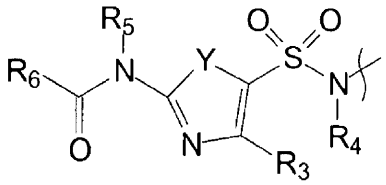
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ$_2$～Ｒ$_3$置換基は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］

を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項８５に記載の化合物。

【請求項１２３】

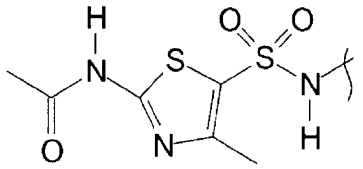
ハプテンが式

【化８７】

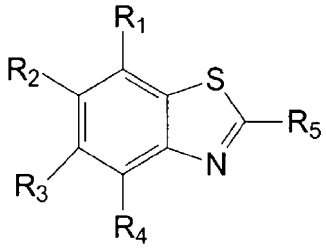


［式中、Ｒ$_3$～Ｒ$_6$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基

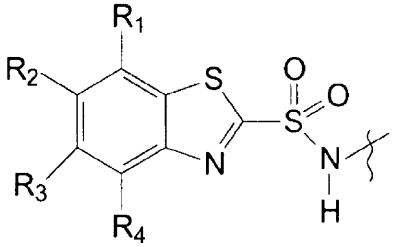
であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１２４】
Ｒ$_6$がアルキルであり、そしてＹが硫黄である請求項１２３に記載の化合物。
【請求項１２５】
ハプテンが以下の化学構造
【化８８】



を有する請求項１２４に記載の化合物。
【請求項１２６】
ハプテンが式
【化８９】

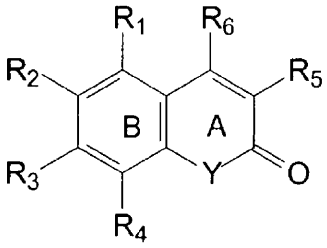


［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１２７】
ハプテンが以下の式
【化９０】



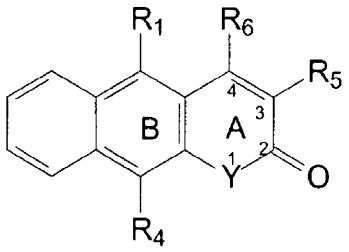
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、

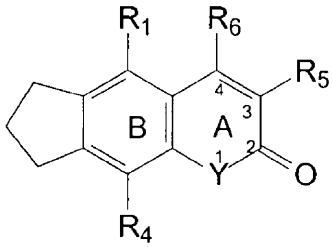
カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択される］
を有するスルホンアミドである請求項１２６に記載の化合物。
【請求項１２８】
ハプテンが式
【化９１】

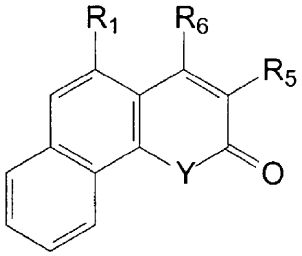


［式中、R_1～R_6は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるR_1～R_6置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄である］
を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項８５に記載の化合物。
【請求項１２９】
ハプテンが式

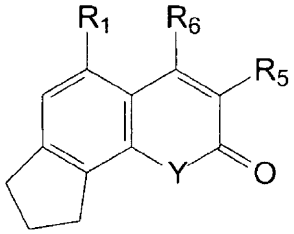
【化９２】







もしくは

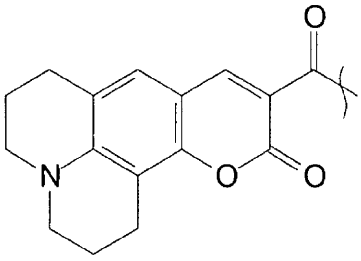


を有する請求項１２８に記載の化合物。

【請求項１３０】

ハプテンが式

【化９３】

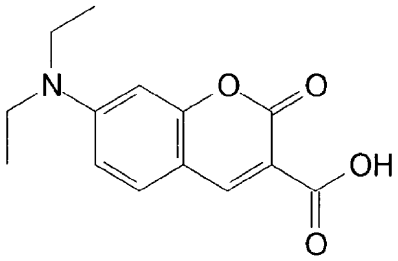


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項８５に記載の化合物。

【請求項１３１】

ハプテンが式

【化９４】

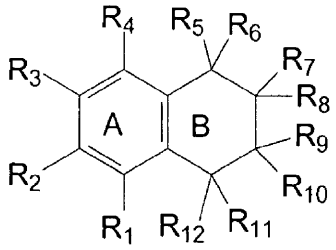


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項８５に記載の方法。

【請求項１３２】

ハプテンが式

【化９５】



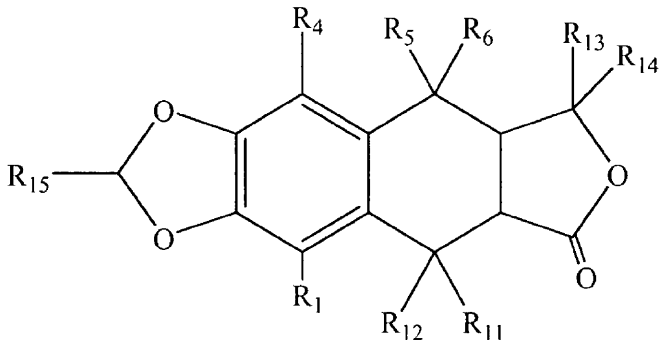
［式中、Ｒ１～Ｒ１２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるＲ１～Ｒ１２置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、Ｒ１～Ｒ１２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］

を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。

【請求項１３３】

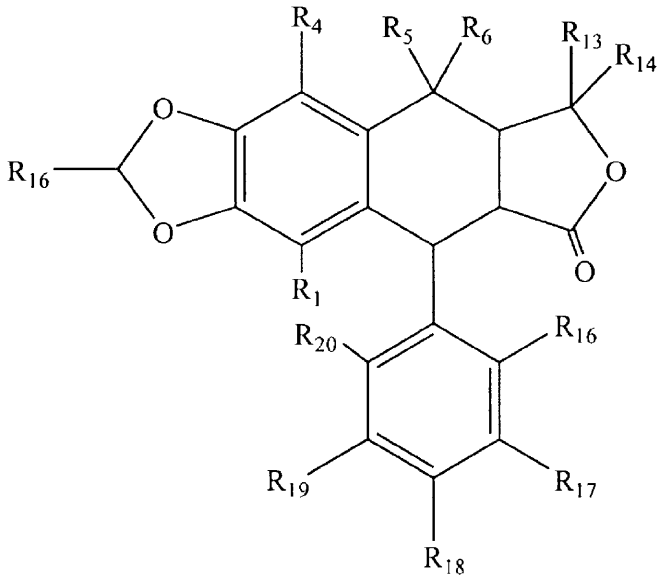
ハプテンが式

【化９６】



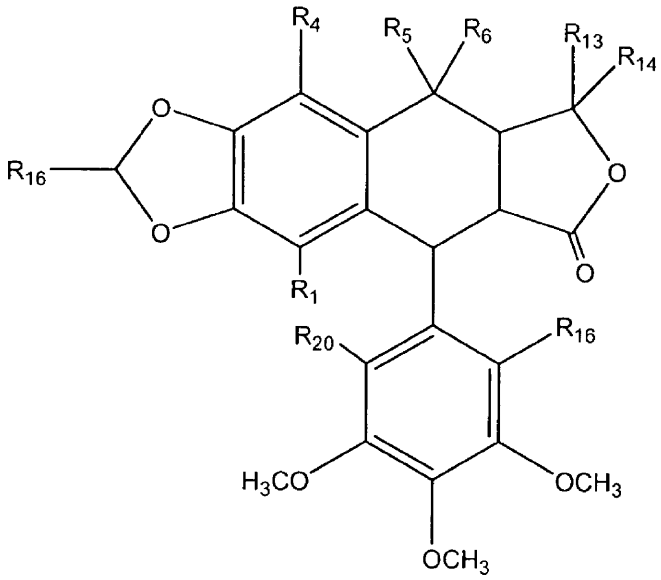
［式中、Ｒ１～Ｒ１４は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルア

ミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１３４】
ハプテンが式
【化９７】



［式中、R_1～R_{20}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{20}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１３５】
R_{16}～R_{20}が水素もしくはアルコキシである請求項１３４に記載の化合物。
【請求項１３６】
以下の式

【化９８】



［式中、Ｒ置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるか、もしくは反応性基である］
を有する請求項１３５に記載の化合物。

【請求項１３７】

Ｒ$_5$およびＲ$_6$が二重結合を形成する請求項１３６に記載の化合物。

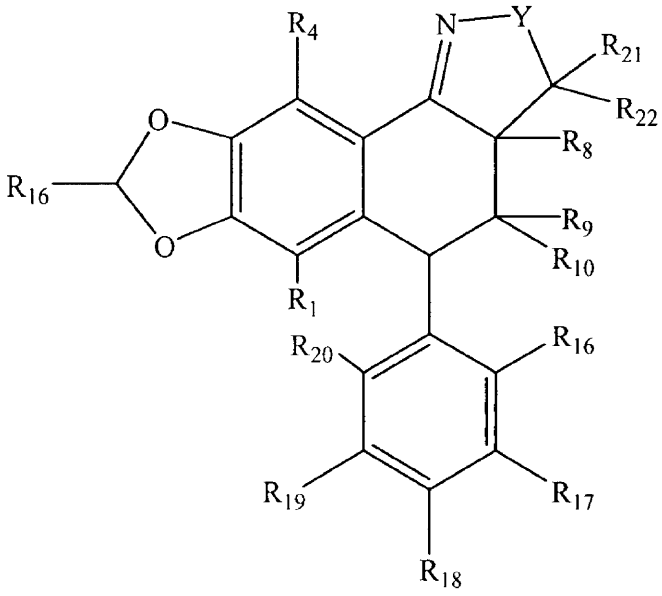
【請求項１３８】

Ｒ$_5$およびＲ$_6$がカルボニル、イミンもしくはオキシムを形成する請求項１３７に記載の化合物。

【請求項１３９】

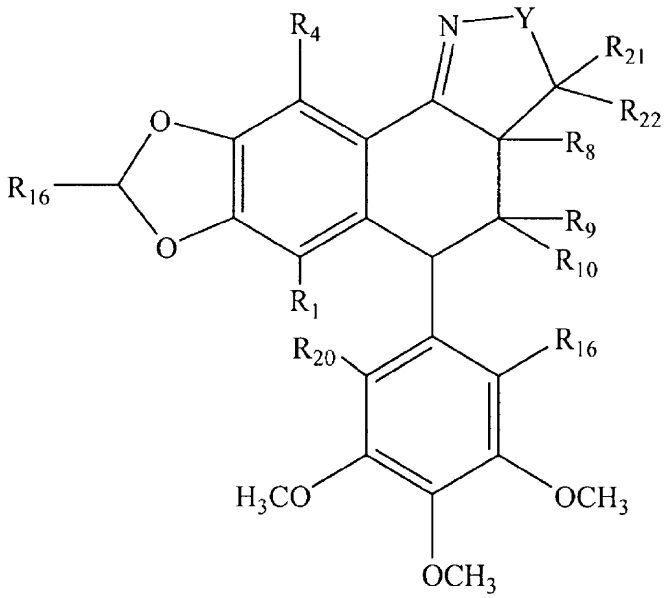
式

【化９９】



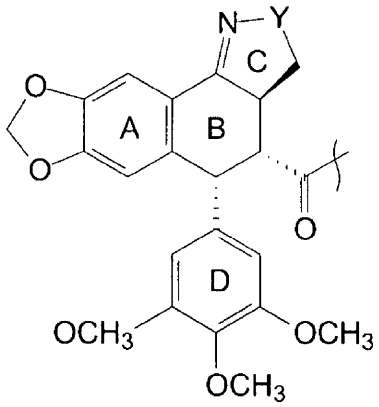
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_{22}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、

エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{22}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項１３８に記載の化合物。
【請求項１４０】
R_{16}～R_{20}が独立して水素およびアルコキシから選択される請求項１３９に記載の化合物。
【請求項１４１】
式
【化１００】

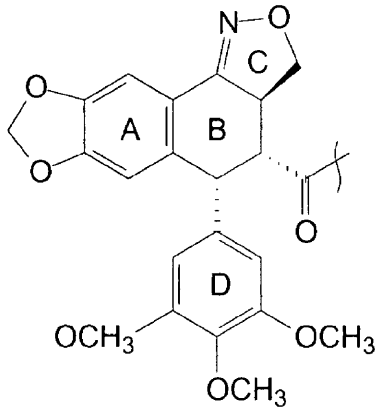


［式中、R_1～R_{22}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{22}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項１４０に記載の化合物。
【請求項１４２】
ハプテンが式

【化１０１】

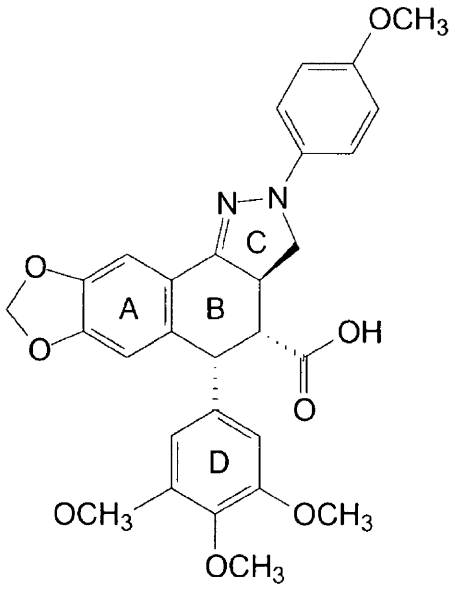


［式中、Ｙは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１４３】
ハプテンが式
【化１０２】



を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１４４】
ハプテンが式

【化１０３】

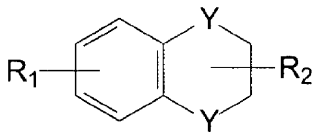


を有するシクロリグナンである請求項８５に記載の化合物。

【請求項１４５】

ハプテンが式

【化１０４】



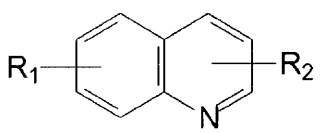
［式中、Ｒ１～Ｒ２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子から選択され、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄であり、ここで、Ｙが窒素である場合、該式はまた１個もしくはそれ以上の窒素原子への二重結合を含むこともできる］

を有するヘテロビアリール化合物である請求項８５に記載の化合物。

【請求項１４６】

ハプテンが式

【化１０５】

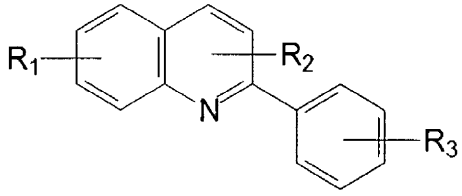


を有するフェニルキノリンである請求項１４５に記載の化合物。

【請求項１４７】

ハプテンが式

【化１０６】

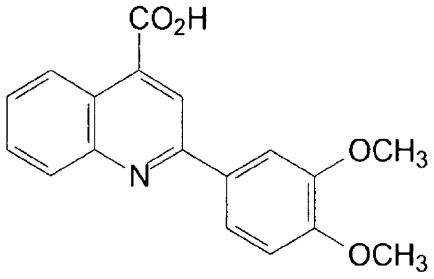


を有する請求項１４５に記載の化合物。

【請求項１４８】

ハプテンが２－（３，４－ジメトキシフェニル）キノリン－４－カルボン酸

【化１０７】

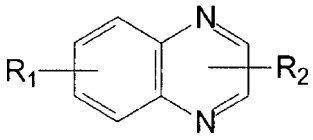


である請求項１４７に記載の化合物。

【請求項１４９】

ハプテンが式

【化１０８】

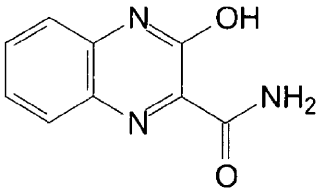


を有する請求項１４５に記載の化合物。

【請求項１５０】

ハプテンが３－ヒドロキシ－２－キノキサリンカルバミド

【化１０９】

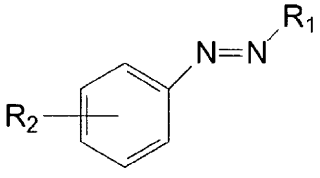


である請求項１４９に記載の化合物。

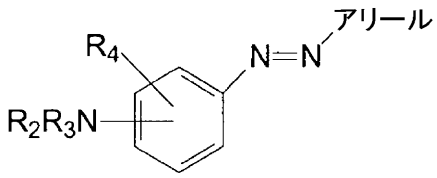
【請求項１５１】

ハプテンが式

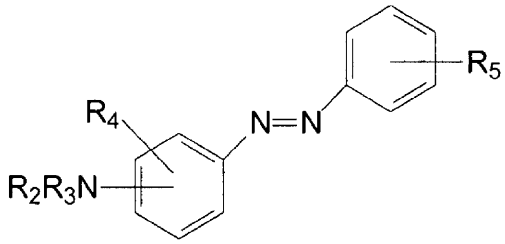
【化１１０】



［式中、R_1～R_2は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有するアゾアリール化合物である請求項８５に記載の化合物。
【請求項１５２】
ハプテンが式
【化１１１】

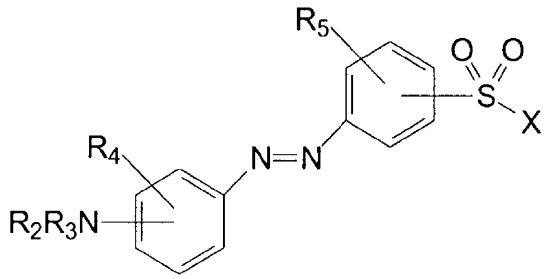


［式中、R_2～R_4は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項１５１に記載の化合物。
【請求項１５３】
ハプテンが式
【化１１２】



［式中、R_2～R_5は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項１５１に記載の化合物。
【請求項１５４】
ハプテンが式

【化１１３】

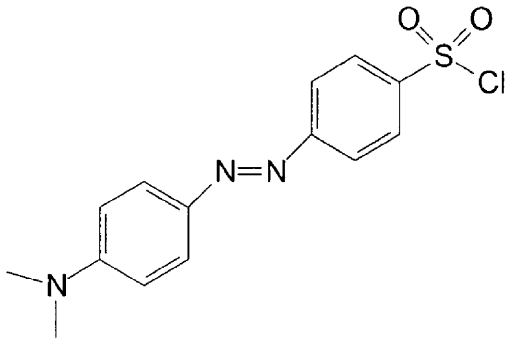


［式中、Ｒ２～Ｒ５は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＸはハロゲン化物である］
を有する請求項１５１に記載の化合物。

【請求項１５５】

ハプテンが４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホニルクロリド

【化１１４】

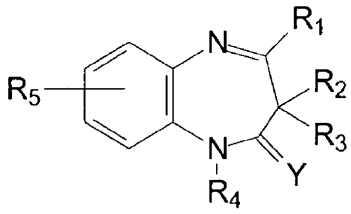


である請求項１５１に記載の化合物。

【請求項１５６】

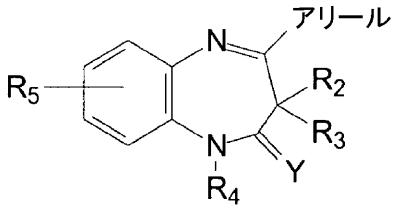
ハプテンが式

【化１１５】

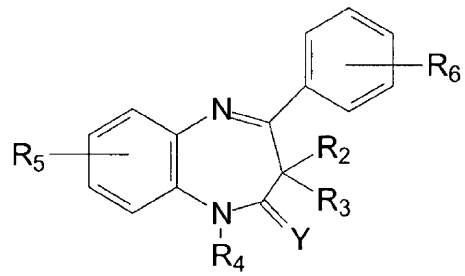


［式中、Ｒ１～Ｒ５は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、ス

ルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するベンゾジアゼピンである請求項８５に記載の化合物。
【請求項１５７】
ハプテンが式
【化１１６】

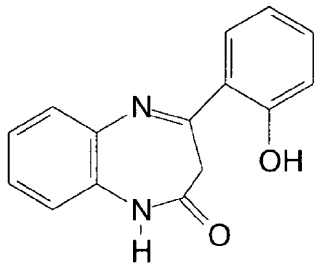


［式中、Ｒ$_2$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項１５６に記載の化合物。
【請求項１５８】
ハプテンが式
【化１１７】



［式中、Ｒ$_2$～Ｒ$_6$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項１５７に記載の化合物。
【請求項１５９】
ハプテンが４－（２－ヒドロキシフェニル）－１Ｈ－ベンゾ［ｂ］［１，４］ジアゼピン－２（３Ｈ）－オン

【化１１８】



である請求項１５８に記載の化合物。

【請求項１６０】

反応性基がアミン反応性基、チオール反応性基、カルボキシレート反応性基、ヒドロキシル反応性基、アルデヒドおよびケトン反応性基、水素反応性官能基、光反応性基、ならびにその組み合わせから選択される請求項８５に記載の化合物。

【請求項１６１】

アミン反応性基がイソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、ＮＨＳエステル、酸ハロゲン化物、アルデヒド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、カーボネート、アリール化剤、イミドエステル、カルボジイミド、無水物、およびその組み合わせから選択され；チオール反応性基がハロアセチル、ハロゲン化アルキル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリール化剤、チオール－ジスルフィド交換試薬、ジスルフィド還元剤、およびその組み合わせから選択され；カルボキシレート反応性基がジアゾアルカン、ジアゾアセチル化合物、カルボニルジイミダゾール化合物およびカルボンジイミド（ｃａｒｂｏｎｄｉｉｍｉｄｅｓ）から選択され；ヒドロキシル反応性基がエポキシド、オキシラン、カルボニルジイミダゾール、Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジルカーボネート、クロロギ酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル、過ヨウ素酸塩酸化化合物、酵素的酸化試薬、アルキルハロゲンおよびイソシアネートから選択され；アルデヒドおよびケトン反応性基がヒドラジン、ヒドラジド、シッフ塩基、還元的アミノ化生成物、マンニッヒ縮合生成物、およびその組み合わせから選択され；活性水素反応性化合物はジアゾニウム誘導体、マンニッヒ縮合生成物、ヨウ素化反応生成物、およびその組み合わせから選択され；光反応性化学官能基はアリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフォノン、ジアゾ化合物、ジアジリン誘導体、およびその組み合わせから選択される請求項１６０に記載の化合物。

【請求項１６２】

ｍおよびｏが１～約２０である請求項８５に記載の化合物。

【請求項１６３】

ｍおよびｏが１～約５である請求項８５に記載の化合物。

【請求項１６４】

ｍおよびｏが１である請求項８５に記載の化合物。

【請求項１６５】

リンカーが鎖に１～約３０個の炭素原子を有する請求項８５に記載の化合物。

【請求項１６６】

リンカーがヘテロ脂肪族である請求項１６５に記載の化合物。

【請求項１６７】

リンカーがアルキルもしくはアルキレンオキシドである請求項１６６に記載の化合物。

【請求項１６８】

リンカーがエチレングリコールである請求項１６７に記載の化合物。

【請求項１６９】

リンカーが１～約１５個のエチレングリコール単位を含んでなるポリマーである請求項１６８に記載の化合物。

【請求項１７０】

リンカーが４、８もしくは１２個のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールである請求項１６９に記載の化合物。

【請求項１７１】

ハプテンがオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、もしくはその組み合わせである、担体に連結されたハプテンを含んでなるハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７２】

式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（担体）$_p$（式中、ｍは１～約２００であり、ｎは０～約２００であり、そしてｐは１～約１０である）を有する請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７３】

ｍが１～約１００であり、ｎが１～１００であり、そしてｐが１～約５である請求項１７２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７４】

ｍ、ｎ、ｏおよびｐが１である請求項１７２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７５】

ニトロアリールハプテンがジニトロフェニル以外である請求項１７２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７６】

担体がタンパク質である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

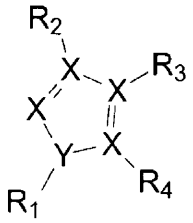
【請求項１７７】

担体がウシサイログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニンもしくはウシ血清アルブミンである請求項１７６のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７８】

ハプテンが以下の一般的化学式

【化１１９】



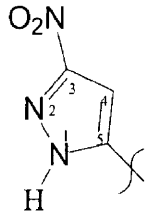
［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、Ｘは独立して窒素もしくは炭素であり、Ｙは酸素、硫黄もしくは窒素であり、そしてＹが酸素もしくは硫黄である場合、R_1基は存在せず、そしてＹが窒素である場合、少なくとも１個のR_1基が存在する］
を有するアゾールである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１７９】

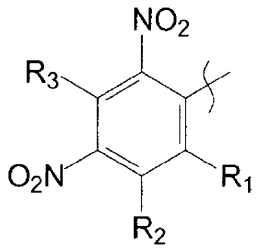
ハプテンがモノ－もしくはジニトロピラゾールである請求項１７８に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１８０】

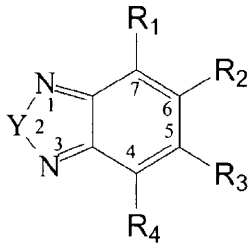
ハプテンが以下の構造
【化１２０】



を有する請求項１７９に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８１】
ハプテンがニトロアリール化合物である請求項１７８に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８２】
ハプテンが以下の式
【化１２１】

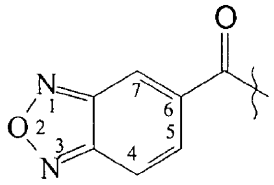


を有する２，４－ジニトロフェニル化合物である請求項１８１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８３】
ハプテンがベンゾフラザンもしくはその誘導体である請求項１７８に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８４】
ハプテンが式
【化１２２】

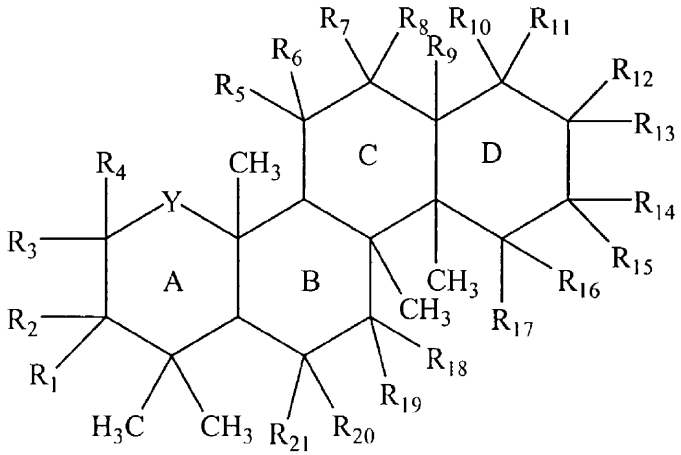


［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはＲ$_1$～Ｒ$_4$置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、硫黄もしくはＲ$_5$およびＲ$_6$置換基を有する炭素原子であり、ここで、Ｒ$_5$および

R_6はR_1～R_4に記載したとおりである］
を有する請求項１８３に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８５】
Ｙが酸素である請求項１８４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８６】
以下の化学構造
【化１２３】

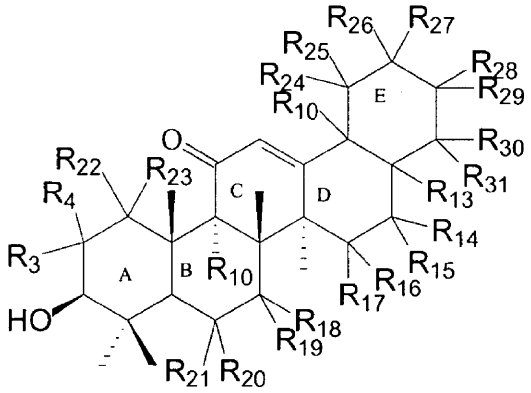


を有する請求項１８５に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８７】
ハプテンが式
【化１２４】

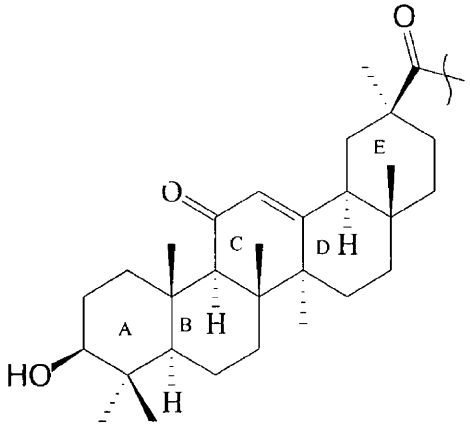


［式中、R_1～R_{21}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{21}置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、そしてR_1～R_{21}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、Ｙは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはR_{22}およびR_{23}置換基を有する炭素原子であり、ここで、これらのR基はR_1～R_{21}に記載したとおりである］
を有する環式トリテルペンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８８】
トリテルペンが約５～約７個の原子を有するＥ環を含む請求項１８７に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１８９】
ハプテンが式

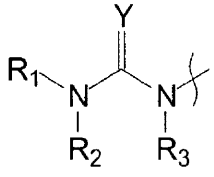
【化１２５】



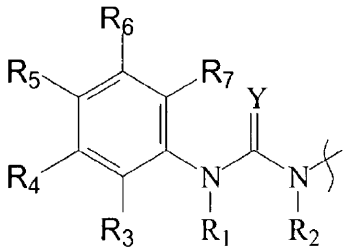
［式中、Ｒ１～Ｒ３１は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ３３置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ３３置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有する請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１９０】
ハプテンが式
【化１２６】



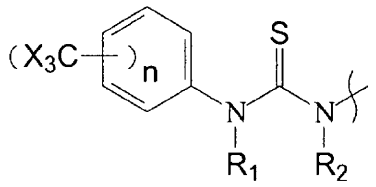
を有する請求項１８９に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１９１】
ハプテンが式
【化１２７】



［式中、R_1～R_3は独立して水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールであり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する尿素もしくはチオ尿素である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１９２】
ハプテンが式
【化１２８】

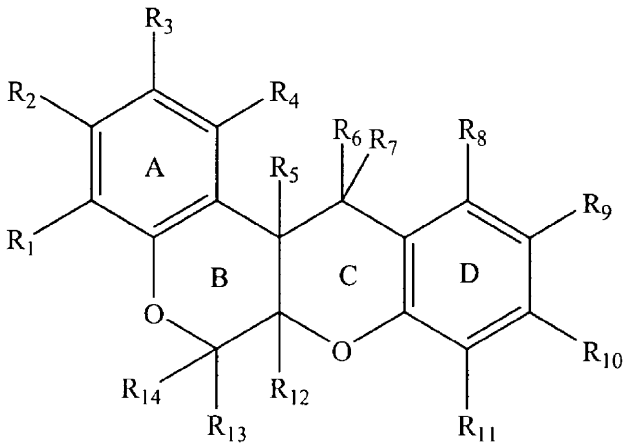


［式中、R_1～R_7は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから独立して選択され、R_1～R_7置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_7置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するアリール尿素もしくはチオ尿素である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１９３】
ハプテンが式
【化１２９】



［式中、ｎは１～５であり、R_1およびR_2は独立して水素もしくは低級アルキルであり、そしてＸは独立してハロゲン化物である］
を有するチオ尿素である請求項１９２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項１９４】
ハプテンが式

【化１３０】



［式中、R_1～R_{14}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてここで、R_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有するロテノイドである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１９５】
R_6およびR_7が独立して水素、OR_{15}（ここで、R_{15}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）、－NR_{21}（ここで、R_{21}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）もしくはＮ－Ｌ－ＲＧ（ここで、Ｌはリンカーでありもしくは／そしてＲＧは反応性基である）である請求項１９４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１９６】
R_6およびR_7が二重結合を形成する請求項１９５に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

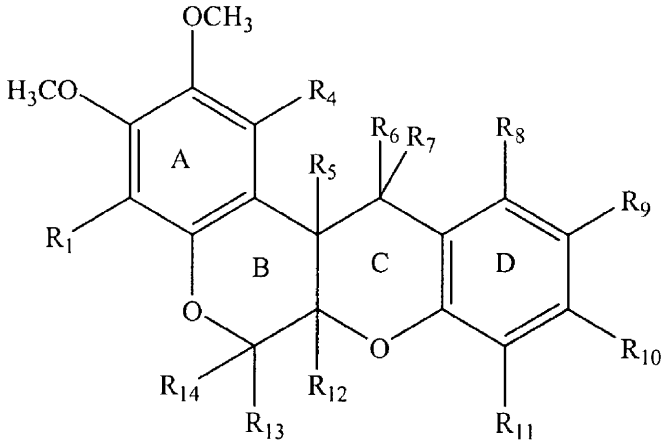
【請求項１９７】
R_6およびR_7がカルボニルを形成する請求項１９６に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１９８】
Ｂ環が少なくとも１つのさらなる不飽和部位を含む請求項１９４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項１９９】
R_{10}およびR_{11}がピランもしくはフラン環を定義するように５もしくは６員環において連結される請求項１９４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２００】
ハプテンが式

【化１３１】

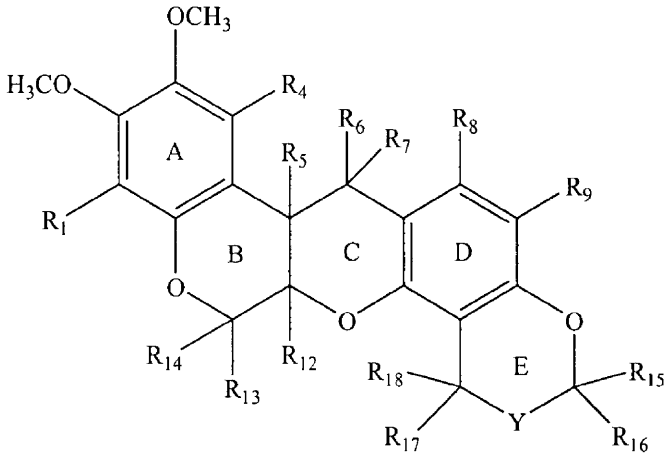


［式中、Ｒ１～Ｒ１４は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、Ｒ１～Ｒ１４置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ１４置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有するロテノイドである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２０１】

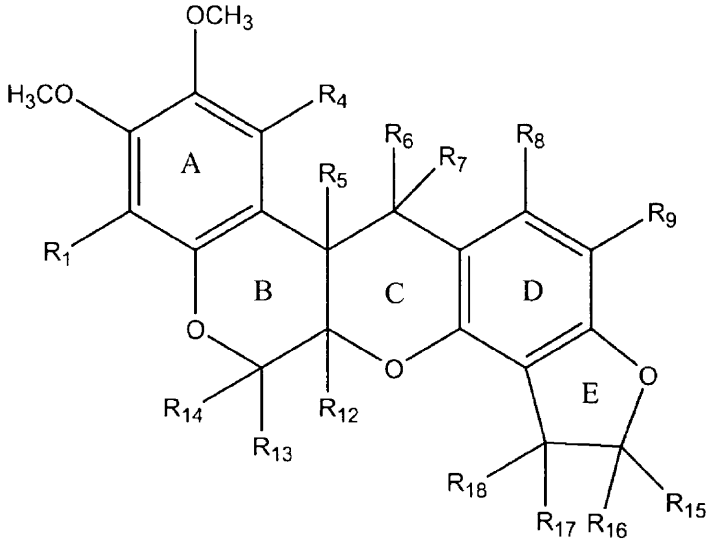
Ｒ１０およびＲ１１が以下の式

【化１３２】

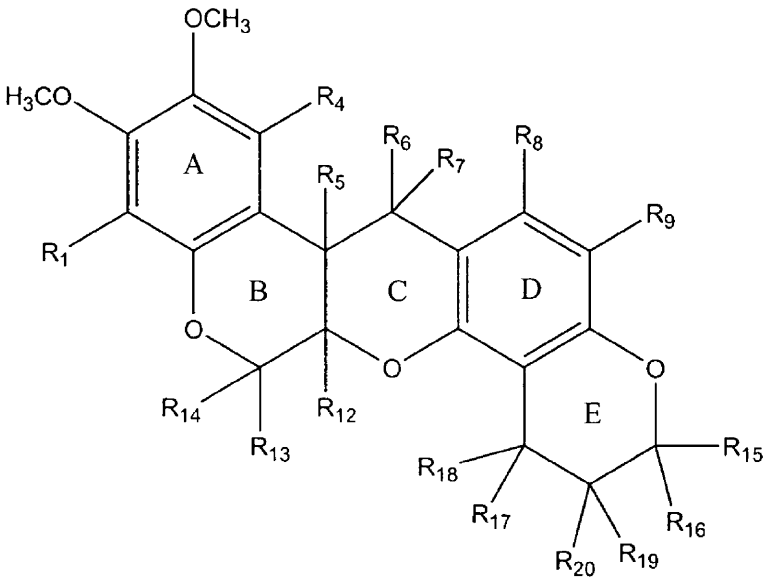


［式中、Ｒ１～Ｒ１８は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、Ｒ１～Ｒ１８置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ１８置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そし

てＹは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはＲ１９およびＲ２０置換基を有する６員環における炭素原子であり、ここで、Ｒ１９およびＲ２０置換基はＲ１～Ｒ１８に記載したとおりである］
を有する５もしくは６員環において連結される請求項２００に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０２】
ハプテンが式
【化１３３】

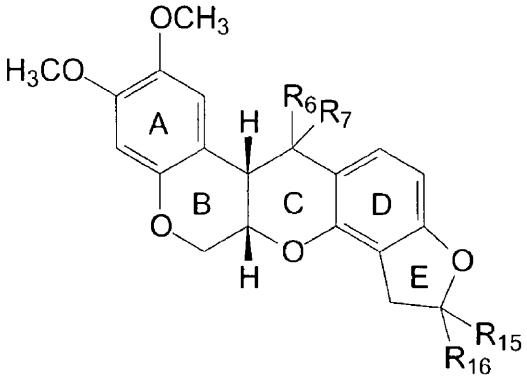


を有する請求項２０１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０３】
ハプテンが式
【化１３４】

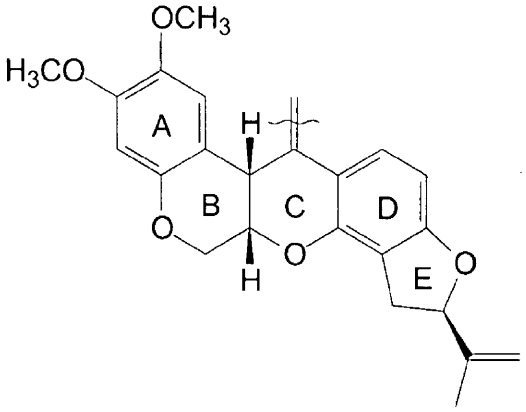


を有する請求項２０２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０４】
ハプテンが式

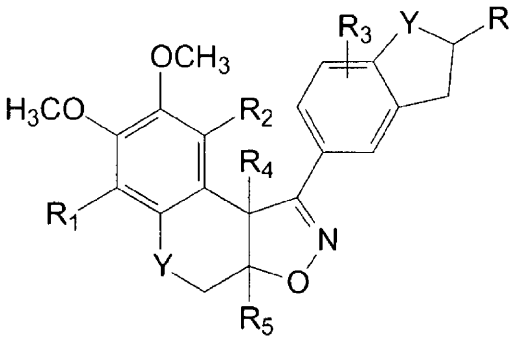
【化１３５】



［式中、Ｒ$_{6}$およびＲ$_{7}$は水素、アルキルであるか、もしくはカルボニルを形成するように酸素へのような二重結合を定義し、Ｒ$_{15}$およびＲ$_{16}$は独立して水素および脂肪族である］
を有する請求項２０１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０５】
ハプテンが式
【化１３６】

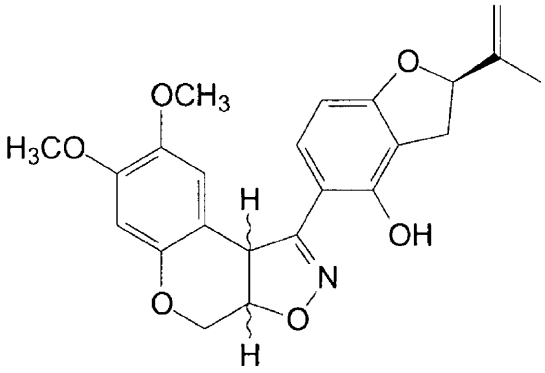


を有する請求項２０１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０６】
ハプテンが式
【化１３７】

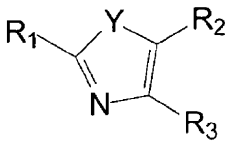


［式中、Ｒ～Ｒ$_{5}$は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、イソプレンのような全ての分枝鎖状異性体および全ての立体異性体を包含する、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル、アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、

スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート、エステル、アルキルエステル、アシル、エーテル、環式、複素環式、アリール、アルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、およびその組み合わせであり、Ｒ～Ｒ$_5$の少なくとも１つはリンカーにもしくは担体分子に結合され、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄である］
を有するロテノンイソオキサゾリンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０７】
ハプテンが
【化１３８】

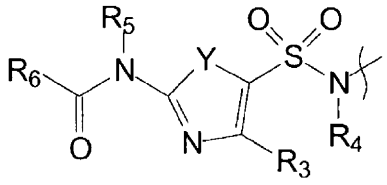


である請求項２０６に記載の方法。
【請求項２０８】
ハプテンが式
【化１３９】

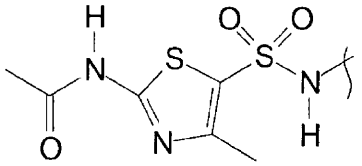


［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ$_2$～Ｒ$_3$置換基は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２０９】
ハプテンが式

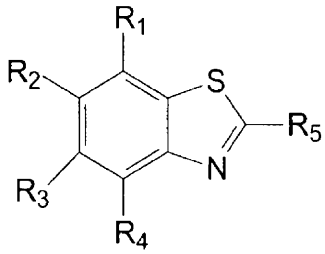
【化１４０】



［式中、Ｒ３～Ｒ６は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ６置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１０】
Ｒ６がアルキルであり、そしてＹが硫黄である請求項２０９に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１１】
ハプテンが以下の化学構造
【化１４１】

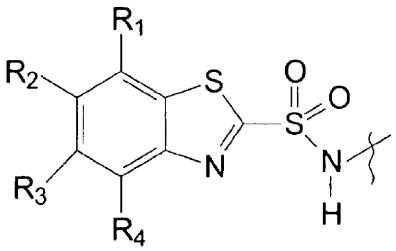


を有する請求項２１０に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１２】
ハプテンが式
【化１４２】

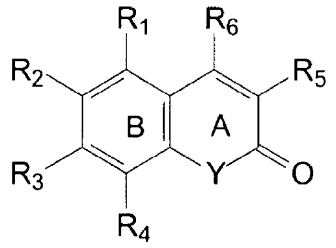


［式中、Ｒ１～Ｒ５は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ６置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するオキサゾールもしくはチアゾールスルホンアミドである請求項２１１に記載のハ

プテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１３】
ハプテンが以下の式
【化１４３】

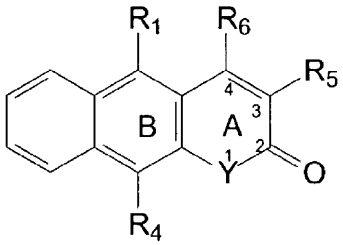


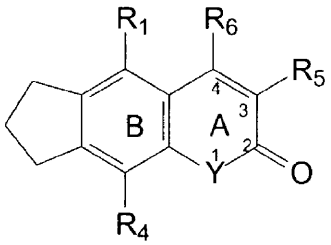
［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択される］
を有するスルホンアミドである請求項２１２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１４】
ハプテンが式
【化１４４】

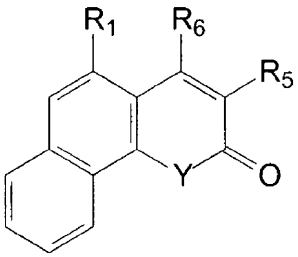


［式中、R_1～R_6は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるR_1～R_6置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄である］
を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２１５】
ハプテンが式

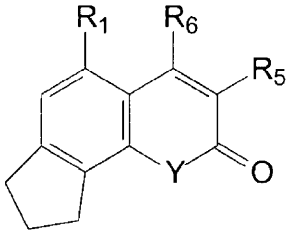
【化１４５】







もしくは

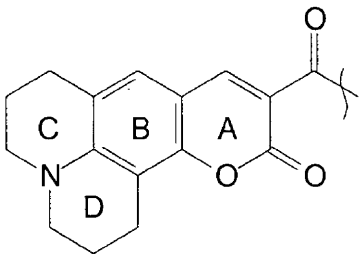


を有する請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２１６】

ハプテンが式

【化１４６】

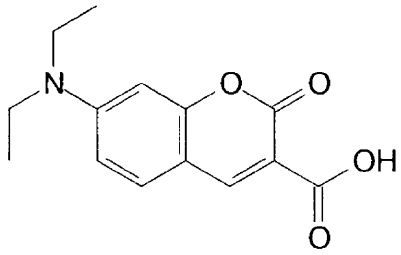


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２１７】

ハプテンが式

【化１４７】

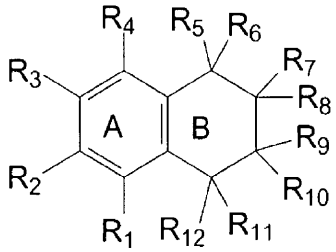


を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２１８】

ハプテンが式

【化１４８】



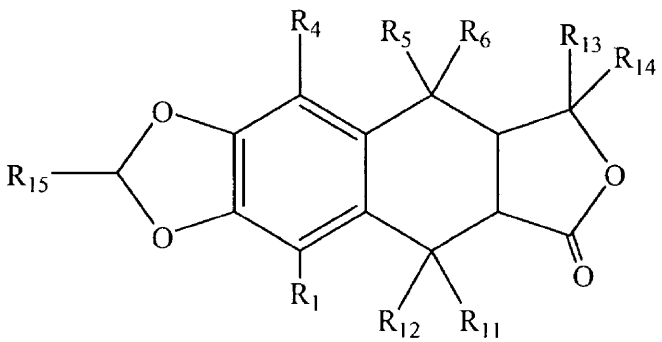
［式中、Ｒ１～Ｒ１２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるＲ１～Ｒ１２置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、Ｒ１～Ｒ１２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］

を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２１９】

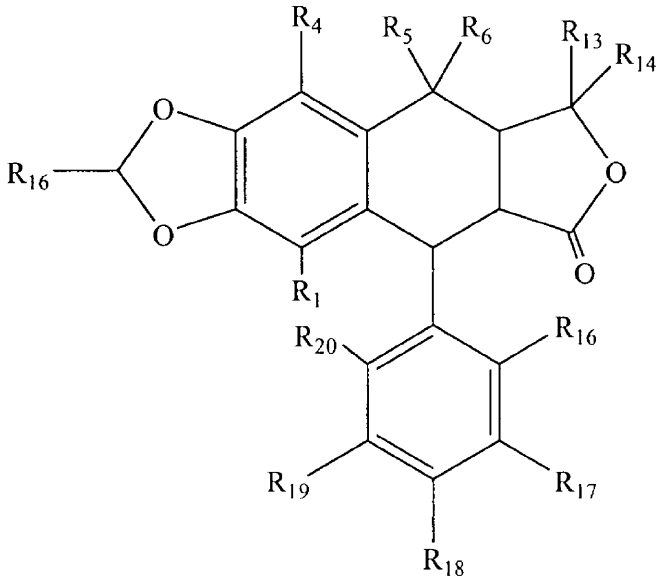
ハプテンが式

【化１４９】



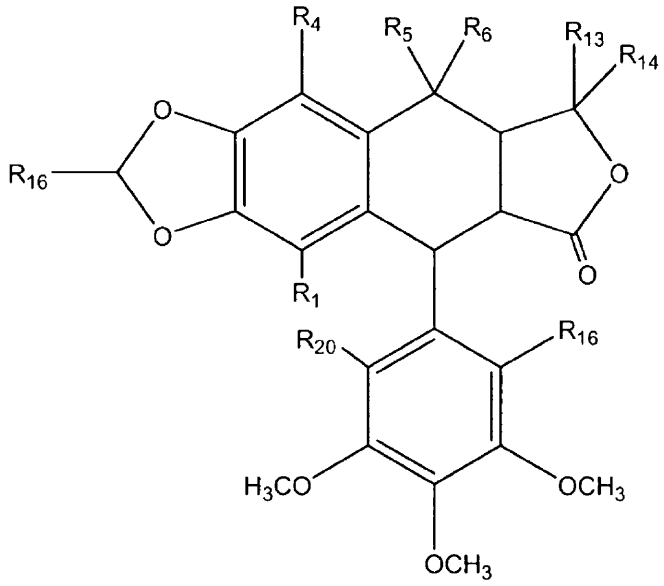
［式中、Ｒ１～Ｒ１４は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、

エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２０】
ハプテンが式
【化１５０】



［式中、R_1～R_{20}は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_{20}置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２１】
R_{16}～R_{20}が水素もしくはアルコキシである請求項２２０に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２２】
以下の式

【化１５１】



［式中、Ｒ置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基である］

を有する請求項２２１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

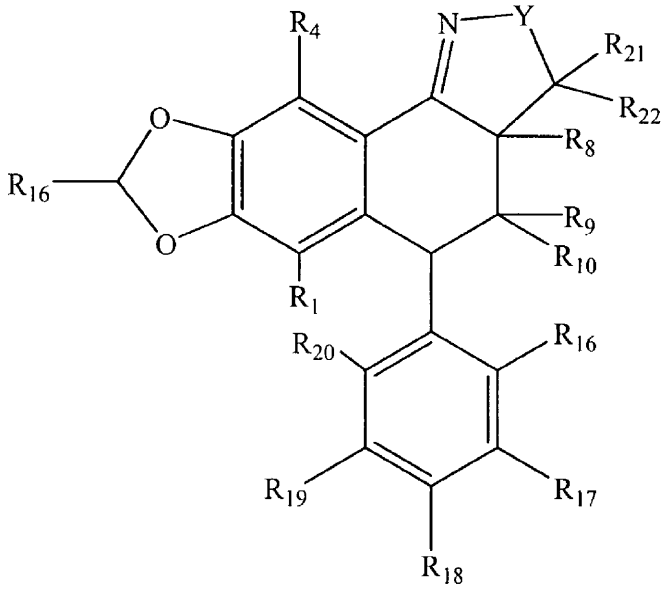
【請求項２２３】

Ｒ$_5$およびＲ$_6$がカルボニル、イミンもしくはオキシムを定義するように二重結合を形成する請求項２２２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２２４】

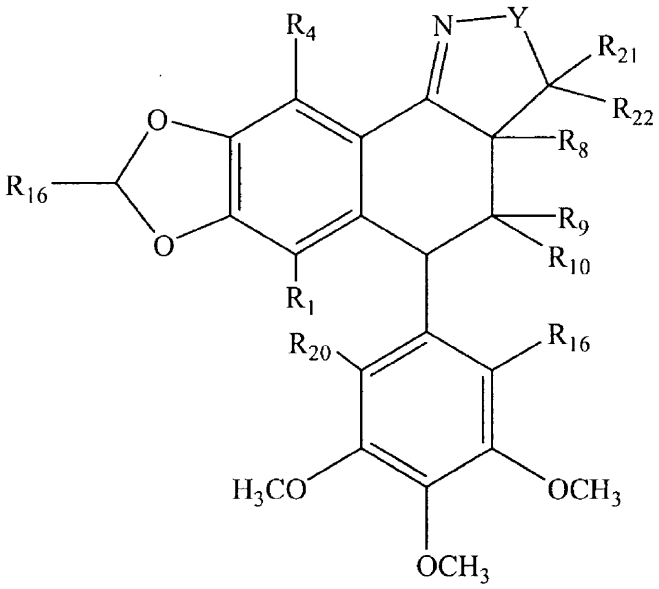
式

【化１５２】

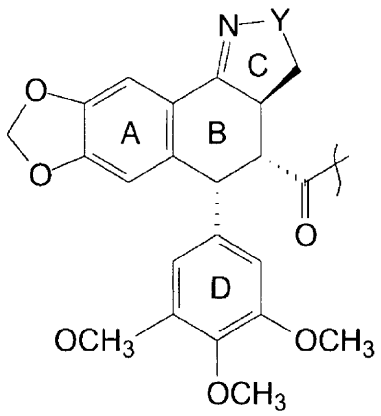


［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_{22}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせか

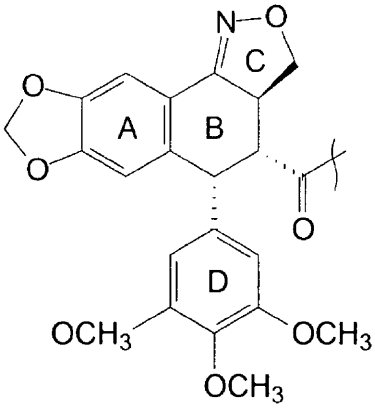
ら選択され、Ｒ１～Ｒ２２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項２２３に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２５】
Ｒ１６～Ｒ２０が独立して水素およびアルコキシから選択される請求項２２４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２６】
式
【化１５３】



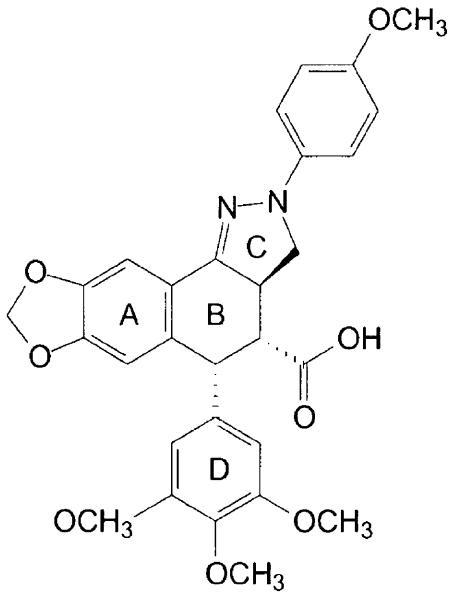
［式中、Ｒ１～Ｒ２２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ２２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項２２５に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２７】
ハプテンが式
【化１５４】



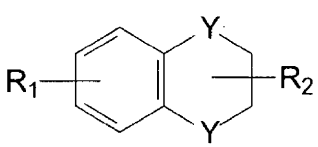
［式中、Ｙは窒素、酸素もしくは硫黄である］
を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２８】
ハプテンが式
【化１５５】



を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２２９】
ハプテンが式
【化１５６】

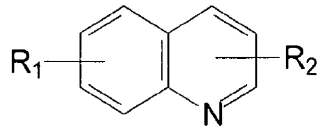


を有するシクロリグナンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３０】
ハプテンが式
【化１５７】

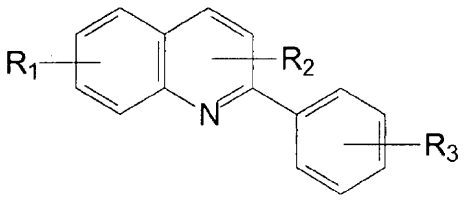


［式中、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{2}$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、

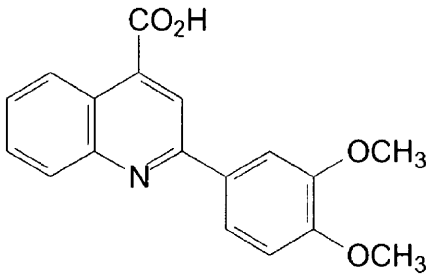
オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子から選択され、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄であり、ここで、Ｙが窒素である場合、該式はまた１個もしくはそれ以上の窒素原子への二重結合を含むこともできる］
を有するヘテロビアリール化合物である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３１】
ハプテンが式
【化１５８】



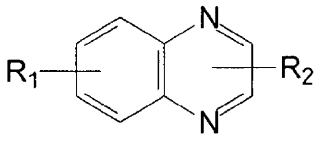
を有するフェニルキノリンである請求項２３０に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３２】
ハプテンが式
【化１５９】



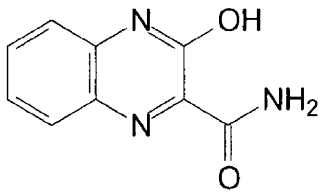
を有する請求項２３０に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３３】
ハプテンが２－（３，４－ジメトキシフェニル）キノリン－４－カルボン酸
【化１６０】



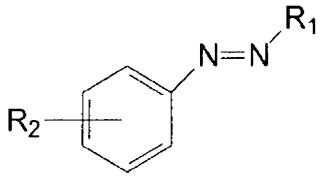
である請求項２３２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３４】
ハプテンが式
【化１６１】



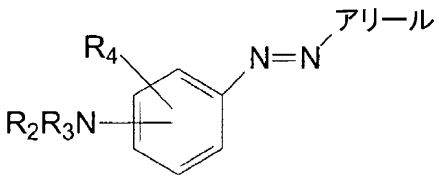
を有する請求項２３１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３５】
ハプテンが３－ヒドロキシ－２－キノキサリンカルバミド
【化１６２】



である請求項２３４に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３６】
ハプテンが式
【化１６３】

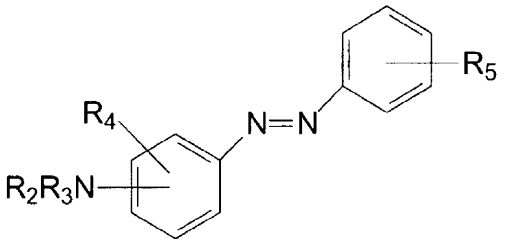


［式中、R_1～R_2は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート，環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有するアゾアリール化合物である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３７】
ハプテンが式
【化１６４】

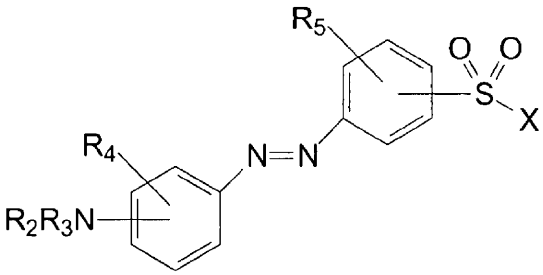


［式中、R_2～R_4は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項２３６に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３８】

ハプテンが式
【化１６５】

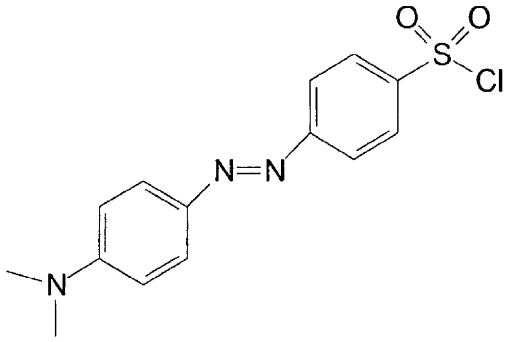


［式中、Ｒ２～Ｒ５は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子である］
を有する請求項２３７に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２３９】
ハプテンが式
【化１６６】



［式中、Ｒ２～Ｒ５は水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＸはハロゲン化物である］
を有する請求項２３６に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４０】
ハプテンが４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホニルクロリド

【化１６７】

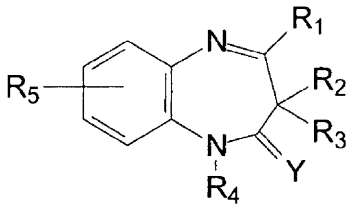


である請求項２３６に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２４１】

ハプテンが式

【化１６８】



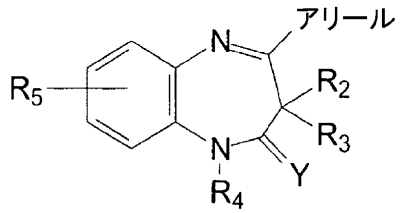
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］

を有するベンゾジアゼピンである請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２４２】

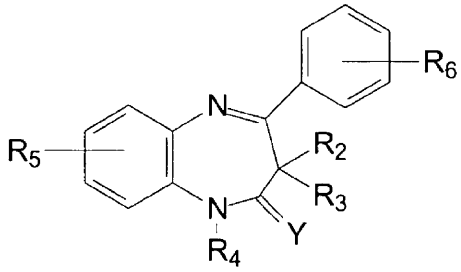
ハプテンが式

【化１６９】

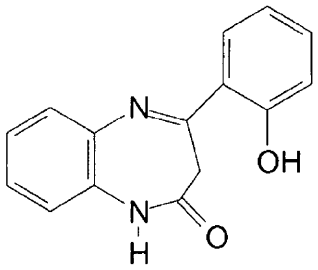


［式中、Ｒ$_2$～Ｒ$_5$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄

である］
を有する請求項２４１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４３】
ハプテンが式
【化１７０】



［式中、R_2～R_6は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、または示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する請求項２４２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４４】
ハプテンが４－（２－ヒドロキシフェニル）－１Ｈ－ベンゾ［ｂ］［１，４］ジアゼピン－２（３Ｈ）－オン
【化１７１】



である請求項２４２に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４５】
リンカーが鎖に１～約３０個の炭素原子を有する請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４６】
リンカーがヘテロ脂肪族である請求項２４５に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４７】
リンカーがアルキルもしくはアルキレンオキシドである請求項２４６に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４８】
リンカーがエチレングリコールである請求項２４７に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２４９】
リンカーが１～約１５個のエチレングリコール単位を含んでなるポリマーである請求項２４８に記載のハプテン－担体コンジュゲート。

【請求項２５０】
リンカーが約２～約４個のエチレングリコール単位を有する請求項２４９に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２５１】
担体が特異的結合担体である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２５２】
担体がタンパク質、核酸もしくは抗体である請求項２５１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２５３】
担体が免疫原性担体である請求項１７１に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２５４】
担体がポリマー担体もしくはタンパク質担体である請求項２５３に記載のハプテン－担体コンジュゲート。
【請求項２５５】
請求項１７１に記載の免疫原性ハプテン担体コンジュゲート。
【請求項２５６】
オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンから選択されるハプテンに特異的に結合する抗体。
【請求項２５７】
検出可能な標識に連結される請求項２５６に記載の抗体。
【請求項２５８】
検出可能な標識が酵素、発色団、量子ドット、もしくはその組み合わせである請求項２５６に記載の抗体。
【請求項２５９】
ハプテンがオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、もしくはその組み合わせである、担体に連結されるハプテンを含んでなるハプテン－担体コンジュゲートの診断的にもしくは治療的に有効な量を含んでなる製薬学的組成物。
【請求項２６０】
ハプテン－担体コンジュゲートが式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（反応性基）$_o$－（担体）$_p$（式中、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピン、またはその組み合わせであり、ｍは１～約１００であり、ｎは０もしくは１であり、そしてｏは１～１００である）を有する請求項２５９に記載の製薬学的組成物。
【請求項２６１】
オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせよりなる群から選択されるハプテンを含んでなる多重化アレイ。
【請求項２６２】
オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択されるハプテン；ならびに
抗ハプテン抗体
を含んでなる酵素免疫アッセイにおける使用のためのキット。
【請求項２６３】
ハプテンが、抗体を標識するための反応性ハプテンコンジュゲートを含んでなる請求項

２６２に記載のキット。
【請求項２６４】
抗ハプテン抗体が検出可能な標識にコンジュゲーションされる請求項２６２に記載のキット。
【請求項２６５】
検出可能な標識にコンジュゲーションした抗抗ハプテン抗体をさらに含んでなる請求項２６２に記載のキット。
【請求項２６６】
検出可能な標識が酵素、発色団、量子ドット、もしくはその組み合わせである請求項２６５に記載のキット。
【請求項２６７】
ＥＧＦ経路、ｍＴＯＲ経路もしくはＥＧＦ経路とｍＴＯＲ経路の両方におけるポリペプチドの発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方を検出する少なくとも２つの試薬を含んでなり、これらの試薬の少なくとも１つはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択されるハプテンを含んでなる、二重ｍＴＯＲ経路阻害剤およびＥＧＦ経路阻害剤治療で処置することができる哺乳類腫瘍を同定するかもしくはそれを受けることに対する個体における陽性反応を評価するためのキット。
【請求項２６８】
ハプテン－ｄＣＴＰコンジュゲート（ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択される）；および
抗ハプテン抗体
を含んでなるキット。
【請求項２６９】
抗ハプテン抗体が検出可能な標識にコンジュゲーションされる請求項２６８に記載のキット。
【請求項２７０】
検出可能な標識が酵素、発色団、量子ドット、もしくはその組み合わせである請求項２６９に記載のキット。
【請求項２７１】
免疫アッセイを行うために適当なハプテンコンジュゲートを準備し、ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択され；そして
免疫アッセイの少なくとも１つの段階においてハプテンコンジュゲートを使用する
ことを含んでなる免疫アッセイ方法。
【請求項２７２】
ハプテンコンジュゲートがハプテン－リンカーコンジュゲートである請求項２７１に記載の免疫アッセイ。
【請求項２７３】
ハプテンコンジュゲートがハプテン－担体コンジュゲートである請求項２７１に記載の免疫アッセイ。
【請求項２７４】
ハプテン－担体コンジュゲートの担体が免疫原性担体である請求項２７３に記載の免疫アッセイ。
【請求項２７５】
ハプテン－担体コンジュゲートの担体が特異的結合担体である請求項２７３に記載の免

疫アッセイ。
【請求項２７６】
酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）；タンパク質、ＰＮＡマイクロアレイアッセイ；フローサイトメトリーアッセイ；ブロットアッセイにおける標的検出、順相および逆相タンパク質マイクロアレイ；ならびに核酸マイクロアレイから選択される請求項２７３に記載の免疫アッセイ。
【請求項２７７】
ハプテンがオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択される、ハプテンコンジュゲートを用いて発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方のパターンを検出するために哺乳類腫瘍から得られるサンプルをアッセイすることを含んでなる哺乳類腫瘍の同定方法。
【請求項２７８】
薬物治療に個体をさらす前に個体から第一の組織もしくは細胞サンプルを得ること；
薬物治療に個体をさらした後に個体から第二の組織もしくは細胞サンプルを得ること；
第一のサンプルおよび第二のサンプルから治療により影響を受ける生化学生成物および／もしくは過程を検出すること、ここで、検出することは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択されるハプテンを含んでなるハプテンコンジュゲートを用いることを含んでなる；
第一のサンプルの結果を第二のものと比較すること；ならびに
薬物治療がプラス、マイナスもしくは無効果を有したかどうかを決定すること
を含んでなる個体における薬物治療への反応の評価方法。
【請求項２７９】
オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールおよびベンゾジアゼピンから選択されるハプテンを準備すること；ならびに
リンカーもしくは担体にハプテンを連結すること
を含んでなるハプテンコンジュゲートの製造方法。
【請求項２８０】
ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを用いてハプテンに連結される抗体もしくは核酸を含んでなるハプテン－抗体コンジュゲートもしくは核酸ハプテンコンジュゲートと生物学的サンプルを接触させ、ここで、ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、およびその組み合わせから選択され；そして
少なくとも１つの検出可能な標識を有する抗ハプテン抗体での処理後にハプテンコンジュゲートにより生成されるシグナルを検出する
ことを含んでなる生物学的サンプルにおける興味のある分子の検出方法。
【請求項２８１】
ハプテンがオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンである、検出可能な標識に連結される抗ハプテン抗体を含んでなる化合物。
【請求項２８２】
検出可能な標識が酵素、発色団、量子ドット、もしくはその組み合わせである請求項２８１に記載の化合物。
【請求項２８３】
ハプテンがアゾール、ベンゾザフラザンもしくはロテノイドであり、そして検出可能な

標識が量子ドットである請求項２８１に記載の化合物。
【請求項２８４】
ハプテンがオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンであるハプテン－デオキシシチジン３リン酸（ｄＣＴＰ）コンジュゲート。
【請求項２８５】
第一の分子標的に対する第一の一次抗体もしくは核酸プローブを選択し；
ハプテンに第一の一次抗体をコンジュゲーションし、ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリールもしくはベンゾジアゼピンであり；
第二の分子標的に対する第二の一次抗体もしくは核酸プローブを選択し；そして
ハプテンに第二の一次抗体をコンジュゲーションし、ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ビヘテロアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、ビオチンもしくはフルオレセインである
ことを含んでなる複数の標的用の多重化アッセイを開発する方法。
【発明の詳細な説明】
【関連出願へのクロスリファレンス】
【０００１】
本願は、２００６年１１月１日に出願された米国仮出願第６０／８５６，１３３号の利益を請求する。仮出願の全開示は以下の出願の開示の一部であると考えられ、そして引用することにより本明細書に組み込まれる。
【技術分野】
【０００２】
本開示は、ハプテン、ハプテンコンジュゲートならびにその診断用および治療用組成物に関する。さらに特に、本開示は、組織サンプルにおける多数のタンパク質および核酸標的のような、サンプルにおける複数の標的の同時同定、視覚化および／もしくは定量に様々な組み合わせで利用することができるハプテン、ハプテンコンジュゲートおよび抗ハプテン抗体コンジュゲートに関する。
【背景技術】
【０００３】
一般に、巨大分子、感染性因子および不溶性異物のみが動物において免疫反応を引き起こすことができる。しかしながら、小分子であるハプテンは、それらが免疫原を生成せしめるように巨大担体（タンパク質のような）に最初に連結される場合に、免疫反応を引き起こすように場合によっては誘導されることができる。免疫原に対して産生されそして単離される抗ハプテン抗体と組み合わせたハプテンは、特定の分子標的を検出するために有用である。例えば、一次抗体および核酸プローブのような特異的結合部分は、１つもしくはそれ以上のハプテン分子で標識することができ、そしていったんこれらの特異的結合分子がそれらの分子標的に結合されると酵素もしくは蛍光標識のような検出可能な標識を含む抗ハプテン抗体コンジュゲートを用いてそれらを検出することができる。サンプルへの検出可能な抗ハプテン抗体コンジュゲートの結合は、サンプルにおける標的の存在を示す。
【０００４】
二次代謝物としてジギタリス植物にのみ存在するジゴキシゲニンは、様々な分子アッセイにおいて利用されているハプテンの例である。「ジゴキシゲニン免疫原、抗体、標識コンジュゲートおよび関連誘導体（Ｄｉｇｏｘｉｇｅｎｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｓ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｌａｂｅｌ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ）」と題する特許文献１は、試験サンプルにおける薬剤への抗ジゴキ

シン抗体の特異的結合に基づいて血液サンプルにおけるジゴキシン濃度を決定するために免疫アッセイを用いることを開示する。「ジゴキシゲニン誘導体およびその使用（Ｄｉｇｏｘｉｇｅｎｉｎ　Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｔｈｅｒｅｏｆ）」と題する特許文献２は、免疫アッセイのような免疫学的試験において使用されている多数のさらなるジゴキシゲニン誘導体を記述する。

【０００５】

ビオチンおよびフルオレセインを包含する他のハプテンが分析方法用に開発されている。しかしながら、これらのハプテンの各々は特定の欠点を有し、それはジオキシゲニンを高感度免疫アッセイに最適なハプテンにしている。ビオチンの場合、ある生物学的サンプルは、バックグラウンド干渉をもたらし得る内因性ビオチンを含む。同様に、蛍光分子、フルオレセインは蛍光免疫アッセイにおいてバックグラウンド蛍光をもたらし得る。組織および細胞学的サンプルの免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイおよびインサイチューハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）アッセイのようなインサイチューアッセイ、特にそのようなサンプルの多重化アッセイには、特にサンプルは多数の標的の同時検出によって最も良く特性化できることが明らかになってきているので、さらなるアッセイ柔軟性を提供するために新規ハプテンおよび抗ハプテン抗体（およびそのコンジュゲート）を同定しそして開発することが非常に望ましい。

【０００６】

癌治療の主要目的は、正常細胞に悪影響を与えずに悪性細胞を選択的に殺すかもしくはその制御されない増殖を抑制することである。伝統的な化学療法薬は非常に細胞毒性であり、そして好ましくは正常細胞により悪性細胞に大きい親和性を有するが、それにもかかわらず典型的に正常細胞に悪影響を与える。細胞内および環境信号に反応して細胞増殖および代謝を調節する増殖因子および栄養経路を標的とする新規治療法が現在開発されている。これらのシグナル伝達経路は、癌において改変されるかもしくは調節不全にされることが多い。例えば、ある増殖因子（細胞成長、増殖および分化の変化をもたらすシグナル伝達カスケードを開始するためにタンパク質受容体チロシンキナーゼ（「ＲＴＫ」）活性を活性化する増殖因子、ＥＧＦのような）は、異なる癌の発症および進行に関与している。そのような経路および関連するシグナル伝達分子は、治療的介入のための魅力的な標的を提供するが、患者の異なる集団は異なる方法で調節不全にされるように思われる腫瘍を有することがますます明らかになってきている。例えば、特定の治療標的（もしくは治療標的の組み合わせ）は、患者のある集団からの腫瘍にのみ存在する可能性があり、従って、該標的（もしくは標的の組み合わせ）を有するそのようなある集団を同定することは、該標的（もしくは複数の標的）に対する治療法（もしくは治療法の組み合わせ）への潜在的非レスポンダーおよび潜在的非レスポンダーに患者を分類するために用いることができる。このように患者を分類するためのコンパニオン診断法の使用は、個々の患者における癌の処置を個別化することに向けての第一段階である。処置の増加した個性化は、確かに多数の治療標的の多重化アッセイを伴う。

【０００７】

残念ながら、近年、高度多重化アッセイを可能にするために高感度のそして特異的な抗体をそれに対して産生することができるハプテンのさらなるクラスを開発することに関する研究はほとんどない。そのような高度多重化アッセイは、既定の治療処方計画への個体の反応をモニターするためにそしてコンパニオン診断用途のために有用である。ハプテンのさらなるクラスならびに分析および治療用途におけるそれらの使用の方法を同定することは、本分野における最新技術を実質的に高める。

【先行技術文献】

【特許文献】

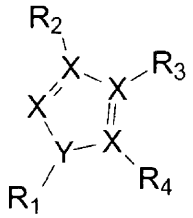
【０００８】

【特許文献１】米国特許第４，４６９，７９７号明細書

【特許文献２】米国特許第５，１９８，５３７号明細書

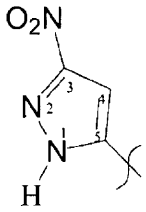
【発明の概要】

【０００９】
［発明の要約］
従って、上記のことに基づき、診断および／もしくは治療用途に有用であるさらなるハプテンおよびハプテンコンジュゲートの必要性が当該技術分野において存在する。従って、本発明のある開示される態様は、新規クラスのハプテン、ハプテンコンジュゲートおよびその組成物に関する。
【００１０】
サンプルにおける２つもしくはそれ以上の異なる標的についてのような多重化診断アッセイを行う方法の態様が記述される。１つの態様は、２つもしくはそれ以上の異なる標的に特異的に結合する２つもしくはそれ以上の特異的結合部分とサンプルを接触させることを含んでなった。２つもしくはそれ以上の特異的結合部分は異なるハプテンにコンジュゲーションされ、そしてハプテンの少なくとも１つはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール化合物、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリンもしくはシクロリグナンである。別個に検出することができる２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体とサンプルを接触させる。２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体は、異なる検出可能な標識にコンジュゲーションすることができる。ある態様において、２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体は異なる哺乳類種からである。該方法は、２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体に特異的に結合する２つもしくはそれ以上の抗抗体と２つもしくはそれ以上の異なる抗ハプテン抗体を接触させることをさらに含んでなることができる。そのような態様について、２つもしくはそれ以上の抗抗体は異なる検出可能な標識にコンジュゲーションすることができる。
【００１１】
ハプテンのある態様は、以下の一般的化学式
【００１２】
【化１】

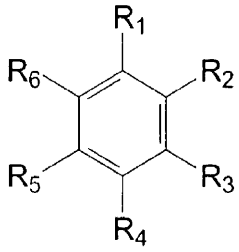


【００１３】
［式中、R_1～R_4は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、Ｘは独立して窒素もしくは炭素であり、Ｙは酸素、硫黄もしくは窒素であり、そしてＹが酸素もしくは硫黄である場合、R_1基は存在せず、そしてＹが窒素である場合、少なくとも１個のR_1基が存在する］
を有するアゾールである。そのようなハプテンの１つの具体例は、以下の構造を有する。
【００１４】

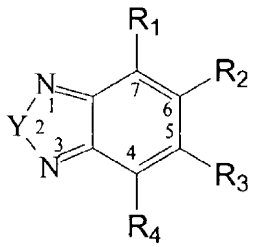
【化２】



【００１５】
別のクラスのハプテンは、以下の一般的化学式
【００１６】
【化３】



【００１７】
［式中、Ｒ１～Ｒ６の少なくとも１つはニトロであり、そして残りのＲ１～Ｒ６環置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式（ｃｌｉｃ）、複素環式、シアノ、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレンから選択され、またはＲ１～Ｒ６置換基の２つもしくはそれ以上は環系における原子であり、そしてＲ１～Ｒ６置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくはリンカーへの連結に適当な反応性基である］
を有するニトロアリール化合物である。
【００１８】
別のクラスのハプテンは、式
【００１９】
【化４】

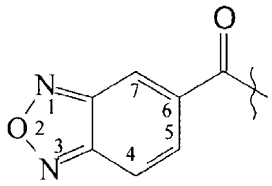


【００２０】
［式中、Ｒ１～Ｒ４置換基は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、および

その組み合わせから選択され、またはＲ１～Ｒ４置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であり、Ｒ１～Ｒ４置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、硫黄もしくはＲ５およびＲ６置換基を有する炭素原子であり、ここで、Ｒ５およびＲ６はＲ１～Ｒ４に記載したとおりである］
を有する化合物のような、ベンゾフラザンもしくはその誘導体である。そのようなハプテンの１つの具体例は、以下の構造を有する。

【００２１】

【化５】

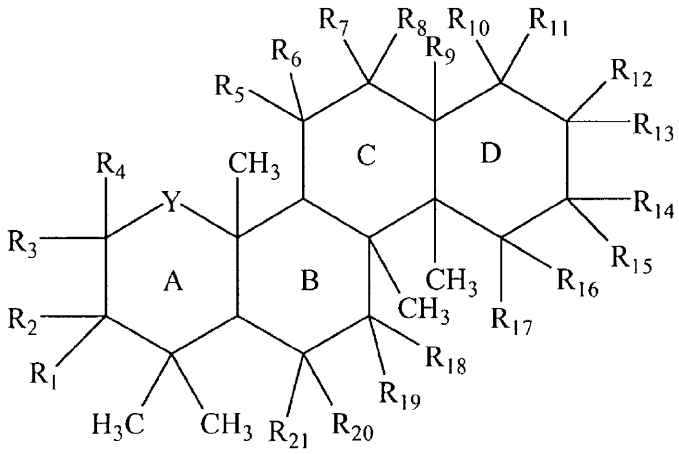


【００２２】

別のクラスのハプテンは、式

【００２３】

【化６】

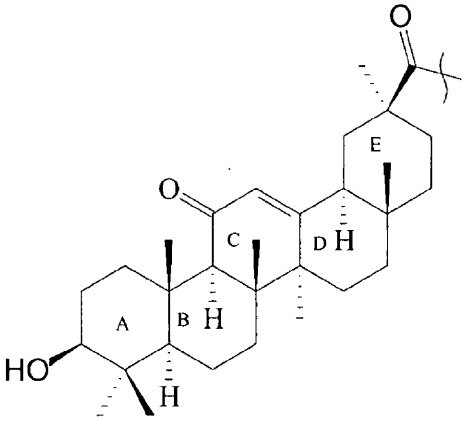


【００２４】

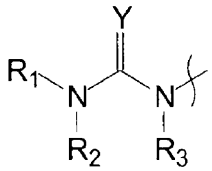
［式中、Ｒ１～Ｒ２１は独立して水素，アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ１～Ｒ２１置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ２１置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、Ｙは結合であり、それによって５員環を定義するか、もしくはＲ２２およびＲ２３置換基を有する炭素原子であり、ここで、Ｒ２２およびＲ２３はＲ１～Ｒ２１に記載したとおりである］
を有する環式テルペンである。そのようなハプテンの１つの具体例は、以下の構造を有する。

【００２５】

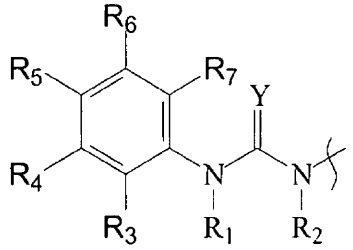
【化７】



【００２６】
別のクラスのハプテンは、式
【００２７】
【化８】

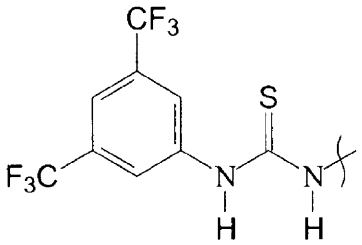


【００２８】
［式中、R_1～R_3は独立して水素、脂肪族、置換された脂肪族、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールであり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有する尿素およびチオ尿素である。尿素もしくはチオ尿素の特定の例は、式
【００２９】
【化９】

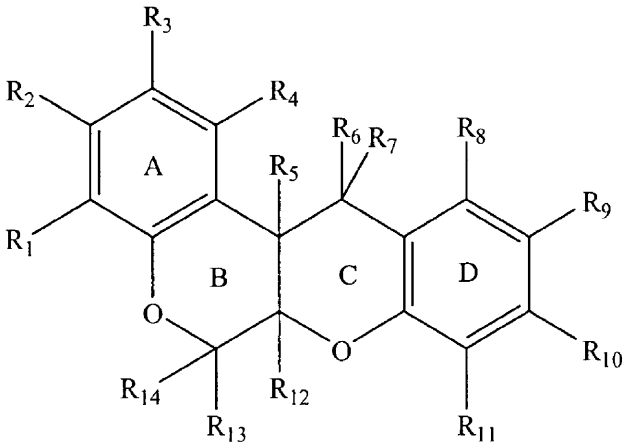


【００３０】
［式中、R_1～R_7は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから独立して選択され、R_1～R_7置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかもしくは反応性基であり、そしてR_1～R_7置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］
を有するアリール尿素およびチオ尿素である。そのようなバプテンの１つの具体例は、式

【００３１】
【化１０】

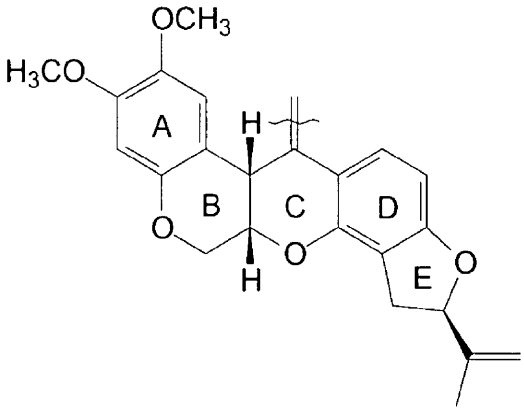


【００３２】
を有する。
【００３３】
別のクラスのハプテンは、式
【００３４】
【化１１】

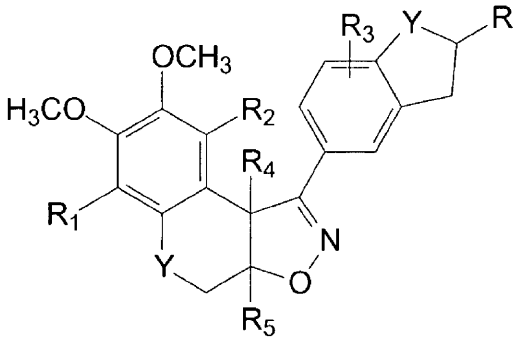


【００３５】
［式中、Ｒ１～Ｒ１４は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせであり、Ｒ１～Ｒ１４置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ１～Ｒ１４置換基の２つもしくはそれ以上は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができる］
を有するロテノイドである。そのようなハプテンの１つの具体例は、式
【００３６】

【化１２】



【００３７】
を有する。
【００３８】
ロテノンハプテンにはまた、典型的に式
【００３９】
【化１３】

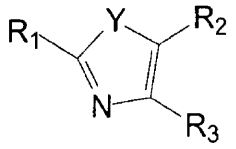


【００４０】
を有するロテノンイソオキサゾリンも包含される。ロテノンイソオキサゾリンに関して、Ｒ～Ｒ$_5$は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、イソプレンのような全ての分枝鎖状異性体および全ての立体異性体を包含する、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート（および第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩）、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環式、複素環式、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、ならびにその組み合わせである。Ｒ～Ｒ$_5$置換基の少なくとも１つはまた、リンカーにもしくは担体分子にも結合される。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄である。
【００４１】

別のクラスのハプテンは、式

【００４２】

【化１４】



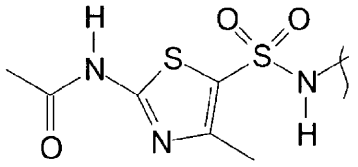
【００４３】

［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基であり、そしてＲ$_2$～Ｒ$_3$置換基は、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることができ、そしてＹは酸素もしくは硫黄である］

を有するオキサゾールもしくはチアゾールである。そのようなハプテンの具体例は、以下の化学構造を有する。

【００４４】

【化１５】

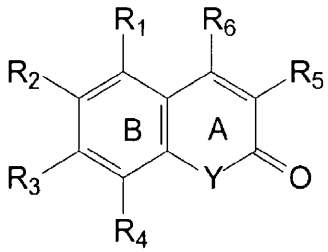


【００４５】

別のクラスのハプテンは、式

【００４６】

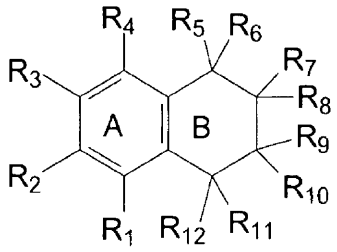
【化１６】



【００４７】

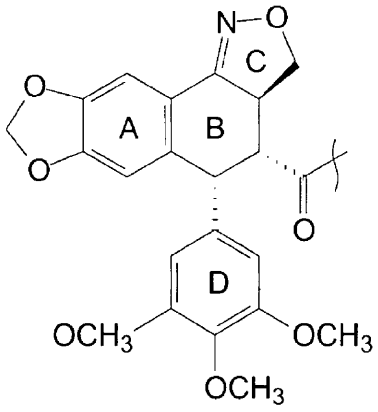
［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるＲ$_1$～Ｒ$_6$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合してい

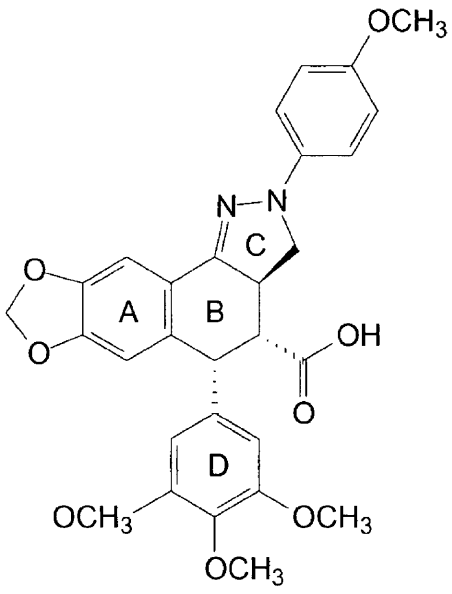
るかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、Ｒ１～Ｒ６置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されかもしくは反応性基であり、そしてＹは酸素、窒素もしくは硫黄である］
を有するクマリンもしくはクマリン誘導体である。
【００４８】
別のクラスのハプテンは、式
【００４９】
【化１７】



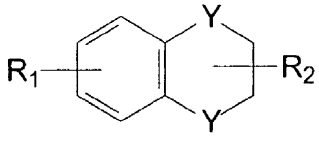
【００５０】
［式中、Ｒ１～Ｒ１２は独立して水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、およびその組み合わせから選択され、またはそのような化合物を形成するために利用可能であるＲ１～Ｒ１２置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子であることもでき、Ｒ１～Ｒ１２置換基の少なくとも１つはリンカーに連結されるかもしくは反応性基である］
を有するシクロリグナンである。シクロリグナンハプテンの具体例には、
【００５１】

【化１８】





【００５２】
が包含される。
【００５３】
本発明のハプテンの別の一般的クラスは、複素二環式／ビアリール化合物、典型的にはフェニルキノリンおよびキノキサリンである。複素二環式／ビアリール化合物は典型的に、以下のような第一の一般的化学式を有する。
【００５４】
【化１９】



【００５５】
Ｒ１～Ｒ２置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ３、ここで、

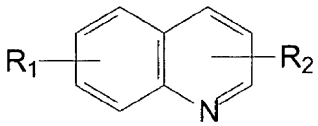
Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、メトキシおよびエトキシのようなアルコキシアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、およびその組み合わせから選択される。Ｒ$_1$～Ｒ$_2$置換基の２つもしくはそれ以上、最も典型的には複数のＲ$_1$置換基はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。Ｒ$_1$～Ｒ$_2$置換基の少なくとも１つはリンカーにもしくは直接担体に結合される。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄、典型的には窒素である。Ｙが窒素である場合、該式はまた１個もしくはそれ以上の窒素原子への二重結合を含むこともできる。

【００５６】

１個のヘテロ原子を有する化合物は、以下のように、フェニルキノリンにより例示される。

【００５７】

【化２０】

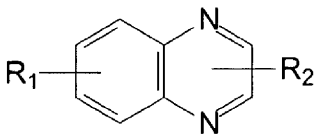


【００５８】

２個のヘテロ原子を有する化合物は、以下の一般式により示されるように、キノキサリンにより表される。

【００５９】

【化２１】

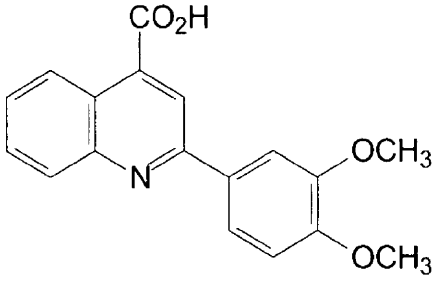


【００６０】

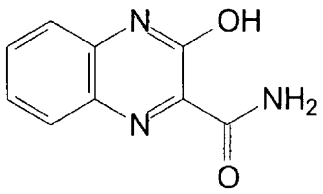
特定の例には、２－（３，４－ジメトキシフェニル）キノリン－４－カルボン酸）

【００６１】

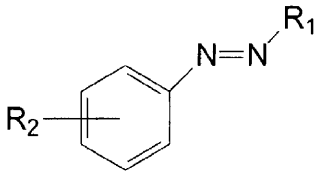
【化２２】



【００６２】
および３－ヒドロキシ－２－キノキサリンカルバミド
【００６３】
【化２３】

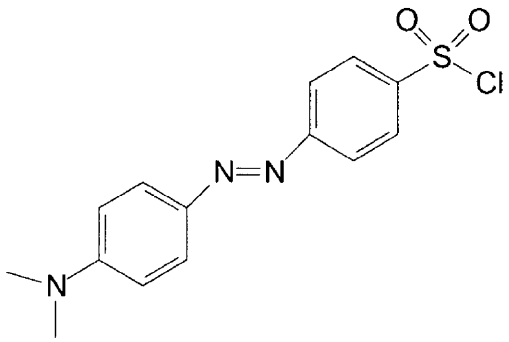


【００６４】
が包含される。
【００６５】
ハプテンの別の一般的クラスは、以下のような第一の一般的化学式を有する、アゾベンゼンのようなアゾアリール化合物である。
【００６６】
【化２４】

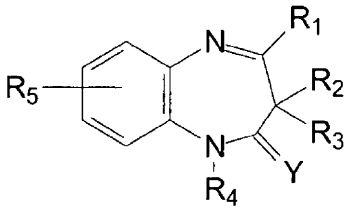


【００６７】
R_1～R_2置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、メトキシおよびエトキシのようなアルコキシアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、スルホニル、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。２個もしくはそれ以上のR_2置換基はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。例えば、２個のR_2置換基は縮合したフェニル環、または縮合した複素環式もしくはヘテロアリール構造を形成することができる。特定のアゾアリールハプテン、４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホニルクロリドは、以下に提供される式を有する。
【００６８】

【化２５】

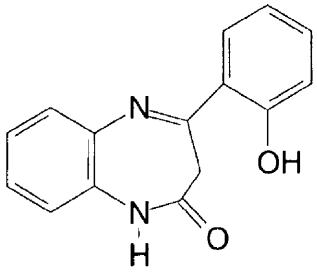


【００６９】
ハプテンの別のクラスは、以下に示されるような第一の一般式を有するベンゾジアゼピンである。
【００７０】
【化２６】



【００７１】
Ｒ$_1$～Ｒ$_5$は独立して：アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、水素、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、スルホニル、ならびにその組み合わせから選択される。Ｒ$_5$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。Ｒ$_1$～Ｒ$_5$位の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基により占められる。Ｒ$_1$～Ｒ$_5$は最も典型的には脂肪族、アリール、水素もしくはヒドロキシル、さらにより典型的にはアルキル、水素もしくはフェニルである。Ｙは酸素もしくは硫黄、最も典型的には酸素である。ベンゾジアゼピンハプテンの特定の例、－（２－ヒドロキシフェニル）－１Ｈ－ベンゾ［ｂ］［１，４］ジアゼピン－２（３Ｈ）－オンは、以下に提供される。
【００７２】

【化２７】



【００７３】

本開示はまた、式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（反応性基）$_o$（式中、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナンもしくはその組み合わせであり、ｍは１～約２００であり、ｎは０～約２００であり、そしてｏは１～２００である）を有する化合物の態様も提供する。ある態様において、ｍは１～約１００であり、ｎは０～約５であり、そしてｏは約１～約５であり、そして別の態様において、ｍ、ｎおよびｏは１である。

【００７４】

本開示はまた、担体に連結されたハプテンを含んでなるハプテン－担体コンジュゲートも記述し、ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナンもしくはその組み合わせである。そのようなコンジュゲートのある態様は、式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（担体）$_p$（式中、ｍは１～約２００であり、ｎは０～約２００であり、そしてｐは１～約１０である）を有する。別の態様では、ｍは１～約１００であり、ｎは１～１００であり、そしてｐは１～約５であり、そしてさらに別の態様では、ｍ、ｎ、ｏおよびｐは１である。ある態様では、リンカーはアルキルもしくはアルキレンオキシドのようなヘテロ脂肪族であり、１つの特定の態様は１～約１５個のエチレングリコール単位を有するエチレングリコールリンカーを含んでなる。担体は、タンパク質、核酸もしくは抗体のような特異的結合担体であることができる。担体はまた、免疫原性担体であることもできる。

【００７５】

本開示はまた、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリンもしくはシクロリグナンから選択されるハプテンに特異的に結合する抗体にも関する。

【００７６】

製薬学的組成物もまた記述される。製薬学的組成物の１つの態様は、担体に連結されたハプテンを含んでなるハプテン－担体コンジュゲートの診断的にもしくは治療的に有効な量を含んでなり、ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナンもしくはその組み合わせである。そのような組成物では、ハプテン－担体コンジュゲートは式（ハプテン）$_m$－（リンカー）$_n$－（反応性基）$_o$－（担体）$_p$（式中、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナンもしくはその組み合わせである）を有することができる。

【００７７】

多重化アレイもまた記述される。例えば、多重化アレイの開示される態様は、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択されるハプテンを含んでなった。

【００７８】

酵素免疫アッセイにおける使用のためのキットが開示される。あるキット態様は、ハプテンにコンジュゲーションした抗体もしくは核酸プローブにコンジュゲーションされたハプテンを含んでなり、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択される。そのようなキットはまた、典型的に、検出可能な標識にコンジュゲーションされた抗ハプテン抗体も含む。

【００７９】

免疫アッセイ方法の態様が記述される。例えば、免疫アッセイ方法は、免疫アッセイを行うために適当な反応性ハプテンコンジュゲートを準備すること含んでなることができ、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択される。次に、ハプテンコンジュゲートを免疫アッセイの少なくとも１つの段階において使用する。ハプテンコンジュゲートは、ハプテン－リンカーコンジュゲートであることができる。あるいはまた、ハプテンコンジュゲートはハプテン－担体コンジュゲートであることができ、ここで、担体は免疫原性担体もしくは特異的結合担体であってもよい。

【００８０】

哺乳類腫瘍を同定する方法が開示される。１つの態様は、ハプテンコンジュゲート（ここで、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択される）を用いて、発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方のパターンを検出するために哺乳類腫瘍から得られるサンプルをアッセイすることを含んでなる。

【００８１】

個体における薬物治療への反応を評価する方法もまた開示される。該方法の１つの態様は、個体を薬物治療にさらす前に個体から第一の組織もしくは細胞サンプルを得ることを含んでなった。第二の組織もしくは細胞サンプルは、薬物治療に個体をさらした後に個体から得られる。治療により影響を受ける生化学生成物および／もしくは過程は、第一のサンプルおよび第二のサンプルから検出され、ここで、検出することは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択されるハプテンを有するハプテンコンジュゲートを使用することを含んでなる。第一のサンプルの結果を第二のサンプルと比較して薬物治療がプラス、マイナスもしくは無効果を有したかどうかを決定する。

【００８２】

ハプテンを含んでなるコンジュゲートを製造する方法もまた開示される。該方法の１つの態様は、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナンおよびその組み合わせから選択されるハプテンを準備することを含んでなった。次に、ハプテンをリンカーもしくは担体に連結する。

【００８３】

生物学的サンプルにおける興味のある分子を検出する方法もまた開示される。該方法の１つの態様は、ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを用いてハプテンに連結された抗体を含んでなるハプテン－抗体コンジュゲートと生物学的サンプルを接触させることを含んでなり、ハプテンはオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、ポドフィロトキシンに基づく化合物、およびその組み合わせから選択される。ハプテン－抗体コンジュゲートにより生成されるシグナルは、少なくとも１つの検出可能な標識を有する抗ハプテン抗体での処理の後に検出される。

【００８４】

本発明の前述のそして他の目的、特徴および利点は、添付の図面に関連して進める、以下の詳細な記述からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００８５】

【図１】多重化インサイチューハイブリダイゼーション方法の１つの態様を例示する概略図である。

【図２】シグナル生成部分として酵素を用いる方法の１つの態様を例示する概略図である。

【図３】検出可能なシグナル生成標識を含んでなる一次抗体を用いる標的の直接検出を例示する概略図である。

【図４】検出シグナルを増幅する方法の１つの態様を例示する概略図である。

【図５】本発明のハプテン－量子ドット免疫組織化学検出の１つの態様を例示する概略図である。

【図６】本発明のハプテンのクラスの開示される態様にコンジュゲーションした一次抗体を用いる抗ハプテン抗体検出のＩＨＣ陽性染色を示す顕微鏡写真である。

【図７】本発明のハプテンのクラスの開示される態様にコンジュゲーションした一次抗体を用いる抗ハプテン抗体を用いるＩＨＣ陰性染色を示す顕微鏡写真である。

【図８】複数の異なる検出可能なシグナルを生成するために複数の異なるハプテンおよび複数の異なるシグナル生成部分を用いるサンプルにおける多数の標的の多重化検出のための開示される方法の１つの態様を例示する概略図である。

【図９】組織におけるタンパク質のようなサンプルの検出に多数のハプテンおよびそれに対する抗体、例えば抗ビオチンおよび抗ジニトロフェニルを用いることを示す顕微鏡写真である。

【図１０】標的の２つの異なるクラス、すなわち遺伝子およびタンパク質標的の多重化検出の１つの態様を図式的に例示する。

【図１１】抗ジニトロフェニル抗体を用いることによるような、タンパク質および２つの遺伝子の検出を示す顕微鏡写真である。

【図１２】開示されるベンゾフラザンハプテンの１つの態様に対するマウスＩｇＧモノクローナル抗体のハイブリドーマ融合産物ＥＬＩＳＡ結果を例示する。

【図１３】開示されるベンゾフラザンハプテンの１つの態様に対するマウスＩｇＧモノクローナル抗体のハイブリドーマ融合産物ＥＬＩＳＡ結果を例示する。

【図１４】開示されるベンゾフラザンハプテンの１つの態様に対するマウスＩｇＧモノクローナル抗体のハイブリドーマ融合産物ＥＬＩＳＡ結果を例示する。

【図１５】開示されるベンゾフラザンハプテンの１つの態様に対するマウスＩｇＧモノクローナル抗体のハイブリドーマ融合産物ＥＬＩＳＡ結果を例示する。

【図１６】開示されるベンゾフラザンハプテンの１つの態様に対するマウスＩｇＧモノクローナル抗体のハイブリドーマ融合産物ＥＬＩＳＡ結果を例示する。

【図１７】ＤＮＰ濃度に対するヌクレオチドパーセントのグラフである。

【図１８】標識されるヌクレオチドパーセントに対するサケＤＮＡ濃度のグラフである。

【図１９】正常扁桃腺組織上での抗ビオチンＨＲＰコンジュゲートでのＣＤ２０－ビオチン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。

【図２０】正常扁桃腺組織上での抗チアゾールスホンアミドＨＲＰコンジュゲートでのＣＤ４５チアゾールスルホンアミドに基づくハプテン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。

【図２１】正常扁桃腺組織上での抗ベンゾフラザンＨＲＰコンジュゲートでのＫｉ－６７ベンゾフラザンに基づくハプテン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。

【図２２】正常扁桃腺組織上での抗ニトロピラゾールＨＲＰコンジュゲートでのＣＤ３４ニトロピラゾールに基づくハプテン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。

【図２３】正常扁桃腺組織上での抗ジニトロフェニルＨＲＰコンジュゲートでのカッパジニトロフェニルに基づくハプテン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。

【図２４】正常扁桃腺組織上での抗ロテノンＨＲＰコンジュゲートでのラムダロテノンに基づくハプテン標識一次抗体の発色ＩＨＣ染色である。
【図２５】ビオチンに結合した抗ラムダを用いてそして抗ビオチン抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図２６】チアゾールスルホンアミドに基づくハプテンに結合した抗ラムダを用いてそして抗チアゾールスルホンアミド抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図２７】ベンゾフラザンに基づくハプテンに結合した抗ラムダを用いてそして抗ベンゾフラザン抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図２８】ジニトロフェニルに基づくハプテンに結合した抗ラムダを用いてそして抗ジニトロフェニル抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図２９】ニトロピラゾールに基づくハプテンに結合した抗ラムダを用いてそして抗ニトロピラゾール抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３０】ロテノンに基づくハプテンに結合した抗ラムダを用いてそして抗ロテノン抗体ＱＤｏｔコンジュゲートで検出される正常扁桃腺における蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３１】正常扁桃腺組織上でのビオチン標識ＣＤ２０一次抗体および抗ビオチンＱＤｏｔ５２５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３２】正常扁桃腺組織上でのチアゾールスルホンアミドに基づくハプテン標識ＣＤ４５一次抗体および抗チアゾールスルホンアミド抗体ＱＤｏｔ５６５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３３】正常扁桃腺組織上でのベンゾフラザンに基づくハプテン標識Ｋｉ６７一次抗体および抗ベンゾフラザン抗体ＱＤｏｔ５８５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３４】正常扁桃腺組織上でのジニトロフェニルに基づくハプテン標識カッパ一次抗体および抗ジニトロフェニル抗体ＱＤｏｔ６０５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３５】正常扁桃腺組織上でのニトロピラゾールに基づくハプテン標識ＣＤ３４一次抗体および抗ニトロピラゾール抗体ＱＤｏｔ６５５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３６】正常扁桃腺組織上でのロテノンに基づくハプテン標識ラムダ一次抗体および抗ロテノン抗体ＱＤｏｔ７０５コンジュゲートの蛍光ＩＨＣ染色である。
【図３７】図３１～３６にそして実施例３４に記載したとおり正常扁桃腺組織上で一次抗体－ハプテンコンジュゲートの混合物を用いてそして抗ハプテン抗体ＱＤｏｔコンジュゲートの混合物で逐次視覚化した多重染色複合物である。
【図３８】正常扁桃腺組織上での抗ＣＤ４５－チアゾールスルホンアミド－コンジュゲートおよびハプテン一次抗体および抗チアゾールスルホンアミド抗体ＱＤｏｔ５６５コンジュゲートを表す多重染色複合物から抽出した画像である。
【図３９】正常扁桃腺組織上でのＫｉ６７ベンゾフラザン－コンジュゲートおよびハプテン一次抗体および抗ベンゾフラザンに基づく抗体ＱＤｏｔ５８５コンジュゲートからの染色を表す図３７からの多重染色複合物より抽出した画像である。
【図４０】正常扁桃腺組織上での抗カッパ－ジニトロフェニル－コンジュゲートおよびハプテン一次抗体および抗ジニトロフェニルに基づくハプテン抗体ＱＤｏｔ６０５コンジュゲートを表す図３７からの多重染色複合物より抽出した画像である。
【図４１】正常扁桃腺組織上での抗ＣＤ３４ニトロピラゾール－コンジュゲートおよびハプテン一次抗体および抗ニトロピラゾールに基づくハプテン抗体ＱＤｏｔ６５５コンジュゲートでの図３７からの多重染色複合物より抽出した画像である。
【図４２】正常扁桃腺組織上での抗ＣＤ２０ビオチン一次抗体ＱＤｏｔ５２５コンジュゲートでの図３７からの多重染色複合物より抽出した画像である。
【図４３】正常扁桃腺組織上でのラムダ－ロテノン－コンジュゲートおよびハプテン一次

抗体および抗ロテノンに基づくハプテン抗体ＱＤｏｔ７０５コンジュゲートでの図３７からの多重染色複合物より抽出された画像である。
【図４４】図３７の多重染色合成物からの個々のＱＤｏｔシグナルを抽出するために用いられる波長を表し、そしてシグナルが扁桃腺組織の公称自己蛍光を上回ることを示す波長対相対蛍光のグラフである。
【００８６】
［発明の詳細な記述］
【００８７】
Ｉ．用語および序論
他に記載されない限り、技術用語は慣例的用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ ＶＩＩ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ出版，２０００（ＩＳＢＮ ０１９８７９２７６Ｘ）；Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ出版，１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）；およびＲｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，Ｗｉｌｅｙ，Ｊｏｈｎ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．出版，１９９５（ＩＳＢＮ ０４７１１８６３４１）；ならびに他の同様の参考文献に見出されることができる。
【００８８】
本明細書において用いる場合、「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」という単数形には、文脈が他に明らかに示さない限り複数の指示対象が包含される。同様に、「もしくは」という語には、文脈が他に明らかに示さない限り「および」を包含するものとする。また、本明細書において用いる場合、「含んでなる」という用語は「包含する」を意味する。従って、「ＡもしくはＢを含んでなること」はＡ、Ｂ、もしくはＡおよびＢを包含することを意味する。さらに、核酸もしくはポリペプチドもしくは他の化合物に示される、全てのヌクレオチドサイズもしくはアミノ酸サイズ、および全ての分子量もしくは分子質量値は概算であり、そして説明のために提供されることが理解されるべきである。本明細書に記述されるものと同様のもしくは同等の方法および材料は、本開示の実施もしくは試験において用いることができるが、適当な方法および材料が以下に記述される。本明細書に記載される全ての公開、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全部が引用することにより組み込まれる。矛盾する場合、用語の説明を含んで、本明細書が規制する。さらに、材料、方法および実施例は実例となるだけであり、そして限定しているものではない。
【００８９】
本開示の様々な例の概説を容易にするために、特定用語の以下の説明が提供される：
【００９０】
アジュバント：抗原に対する免疫反応を非特異的に高める物質。ヒトにおける使用のためのワクチンアジュバントの開発は、Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：１０７５－１０８１，１９９９）において概説され、これは、その公開時に、水酸化アルミニウム（Ａｍｐｈｏｇｅｌ，Ｗｙｅｔｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＮＪ）のようなアルミニウム塩およびＭＦ５９マイクロエマルジョンがヒト使用に認可された唯一のワクチンアジュバントであることを開示する。アルミニウムヒドロゲル（Ｂｒｅｎｔｇ Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒ，Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋから入手可能）は、別の一般的なアジュバントである。
【００９１】
１つの態様において、アジュバントには免疫活性化、例えばＴ細胞、Ｂ細胞、単球、樹状細胞およびナチュラルキラー細胞による自然免疫反応もしくは適応免疫反応を刺激するＤＮＡモチーフが包含される。免疫活性化を刺激するＤＮＡモチーフの特定の限定されない例には、米国特許第６，１９４，３８８号；第６，２０７，６４６号；第６，２１４，

８０６号；第６，２１８，３７１号；第６，２３９，１１６号；第６，３３９，０６８号；第６，４０６，７０５号；および第６，４２９，１９９号に記述されるようなＣｐＧオリゴデオキシヌクレオチドが包含される。

【００９２】

増幅：本発明のある態様は、特定の標的の同定および／もしくは定量を容易にするために、単一の標的が複数の視覚化複合体（ここで、複合体は同じもしくは異なることができる）を用いて検出されることを可能にする。

【００９３】

アナログ、誘導体もしくは模倣物：アナログは、親化合物と化学構造が異なる分子、例えばホモログ（アルキル鎖の長さの違いのような、化学構造における増分により異なる）、分子フラグメント、１つもしくはそれ以上の官能基によって異なる構造、イオン化における変化である。構造的アナログは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ（Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，第１９版（１９９５），第２８章）に開示されるもののような技術で、定量的構造活性相関（ＱＳＡＲ）を用いて見出されることが多い。誘導体は、基本構造由来の生物活性分子である。模倣物は、生物活性分子のような別の分子の活性を模倣する分子である。生物活性分子は、化合物の生物活性を模倣する化学構造を含むことができる。

【００９４】

動物：生きている多細胞脊椎動物、例えば哺乳類および鳥類を包含するカテゴリー。哺乳類という用語には、ヒトおよび非ヒト哺乳類の両方が包含される。同様に、「患者」という用語にはヒトおよび動物患者の両方、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマおよびウシが包含される。

【００９５】

抗体：「抗体」は集合的に免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン様分子（例としてそして限定されずに、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ、その組み合わせ、ならびに任意の脊椎動物において、例えばヒト、ヤギ、ウサギおよびマウスのような哺乳類において免疫反応中に生産される同様の分子を包含する）および他の分子への結合が実質的になく興味のある分子（もしくは興味のある一群の非常に類似した分子）に特異的に結合する抗体フラグメント（例えば、生物学的サンプルにおける他の分子に対する結合定数より少なくとも$10^3 M^{-1}$大きい、少なくとも$10^4 M^{-1}$大きいもしくは少なくとも$10^5 M^{-1}$大きい興味のある分子に対する結合定数を有する抗体および抗体フラグメント）をさす。

【００９６】

さらに特に、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識しそして結合する少なくとも１つの軽鎖もしくは重鎖免疫グロブリン可変領域を含んでなるポリペプチドリガンドをさす。抗体は重鎖および軽鎖からなり、これらの各々は可変重（V_H）領域および可変軽（V_L）領域と呼ばれる可変領域を有する。一緒になって、V_H領域およびV_L領域は抗体により認識される抗原を結合することに関与する。

【００９７】

これには、完全な免疫グロブリンならびに当該技術分野において周知であるそれらのバリアントおよび一部が包含される。抗体フラグメントには、タンパク質分解抗体フラグメント［当該技術分野において既知であるようなＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントおよびＦａｂフラグメントのような］、組換え抗体フラグメント（ｓＦｖフラグメント、ｄｓＦｖフラグメント、二重特異性ｓＦｖフラグメント、二重特異性ｄｓＦｖフラグメント、Ｆ（ａｂ）’$_2$フラグメント、一本鎖Ｆｖタンパク質（“ｓｃＦｖ”）、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（“ｄｓＦｖ”）、ジアボディ、およびトリアボディ（当該技術分野において既知であるような）、およびラクダ抗体（例えば、米国特許第６，０１５，６９５号；第６，００５，０７９号－第５，８７４，５４１号；第５，８４０，５２６号；第５，８００，９８８号；および第５，７５９，８０８号を参照））が包含される。ｓｃＦｖタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可

変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーにより結合される融合タンパク質であり、一方、ｄｓＦｖにおいて、鎖は鎖の会合を安定させるためにジスルフィド結合を導入するように突然変異されている。該用語にはまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（二重特異性抗体のような）のような遺伝子操作した形態も包含される。Ｐｉｅｒｃｅ Ｃａｔａｌｏｇ ａｎｄ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，１９９４－１９９５（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）；Ｋｕｂｙ，Ｊ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，第３版，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９７もまた参照。

【００９８】

典型的に、天然に存在する免疫グロブリンはジスルフィド結合により相互に連結される重（Ｈ）鎖および軽（Ｌ）鎖を有する。２つのタイプの軽鎖、ラムダ（λ）およびカッパ（κ）がある。抗体分子の機能活性を決定する５つの主要な重鎖クラス（もしくはアイソタイプ）：ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＥがある。

【００９９】

各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域を含有する（これらの領域ははまた、「ドメイン」としても知られている）。組み合わせて、重鎖および軽鎖可変領域は抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「ＣＤＲ」とも呼ばれる３つの超可変領域により遮られる「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびＣＤＲの範囲は特定されている（引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１を参照）。Ｋａｂａｔデータベースは、現在、オンラインで維持される。異なる軽鎖もしくは重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成する軽鎖および重鎖の組み合わされたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、３次元空間においてＣＤＲを配置しそして並べる働きをする。

【０１００】

ＣＤＲは、抗原のエピトープへの結合に主に関与する。各鎖のＣＤＲは、Ｎ末端から開始して順次番号が付され、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と典型的に呼ばれ、そしてまた特定のＣＤＲが位置する鎖によっても典型的に同定される。従って、V_HＣＤＲ３はそれが存在する抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方、V_LＣＤＲ１はそれが存在する抗体の軽鎖の可変ドメインからのＣＤＲ１である。ＲＥＴに結合する抗体は特定のV_H領域およびV_L領域配列、従って、特定のＣＤＲ配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なるＣＤＲを有する。抗体ごとに異なるのはＣＤＲであるが、ＣＤＲ内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。ＣＤＲ内のこれらの位置は、特異性決定残基（ＳＤＲ）と呼ばれる。

【０１０１】

抗原：抗体分子もしくはＴ細胞受容体のような、特定の体液性もしくは細胞性免疫の生成物により特異的に結合され得る化合物、組成物もしくは物質。抗原は、例えばハプテン、単純中間代謝物、糖（例えばオリゴ糖）、脂質およびホルモンならびに複合炭水化物（例えば多糖）、リン脂質、核酸およびタンパク質のような巨大分子を包含する任意のタイプの分子であることができる。抗原の一般的カテゴリーには、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原生動物および他の寄生虫抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患に関与する抗原、アレルギーおよび移植拒絶、毒素ならびに他の様々な抗原が包含されるがこれらに限定されるものではない。一例として、抗原はγＰＧＡのようなバチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）抗原である。

【０１０２】

アビジン：生物学的サンプルに存在し得る他の小分子では実質的になくビオチンに特異的に結合する任意のタイプのタンパク質。アビジンの例には、卵白、脂肪種子タンパク質（例えばダイズミール）および穀物（例えばトウモロコシ（ｃｏｒｎ／ｍａｉｚｅ）に天

然で存在するアビジンならびに細菌由来のタンパク質であるストレプトアビジンが包含される。

【０１０３】

結合親和性：特異的結合対のあるメンバーの特異的結合対の別のメンバーに対する傾向のような、別の分子と結合する（典型的には非共有結合的に）ある分子の傾向。結合親和性は結合定数として測定することができ、特異的結合対（抗体／抗原対もしくは核酸プローブ／核酸配列対のような）のこの結合親和性は、少なくとも１ｘ１０^{6}Ｍ$^{-1}$、少なくとも１ｘ１０^{7}Ｍ$^{-1}$もしくは少なくとも１ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$のような少なくとも１ｘ１０^{5}Ｍ$^{-1}$であることができる。１つの態様において、結合親和性はＦｒａｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６：１０１－１０６，１９７９により記述されるスキャッチャード法の改変により計算される。別の態様において、結合親和性は抗原／抗体解離速度により測定される。さらに別の態様において、高い結合親和性は競合ラジオイムノアッセイにより測定される。いくつかの例において、抗体／抗原対の高い結合親和性は少なくとも約１ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$である。別の態様において、高い結合親和性は少なくとも約１．５ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約２．０ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約２．５ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約３．０ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約３．５ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約４．０ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$、少なくとも約４．５ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$もしくは少なくとも約５．０ｘ１０^{8}Ｍ$^{-1}$である。

【０１０４】

担体：ハプテンもしくは抗原をそれに結合することができる分子。担体分子には、免疫原性担体および特異的結合担体が包含される。免疫原性担体に結合する場合、結合した分子は免疫原性になることができる。免疫原性担体は、結合した分子の免疫原性を上げるためにそして／または診断的に、分析的に、そして／もしくは治療的に有益である担体に対する抗体を生じさせるために選択することができる。担体への分子の共有結合は、強化された免疫原性およびＴ細胞依存性を与えることができる（Ｐｏｚｓｇａｙ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９６：５１９４－９７，１９９９；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１６：１７１１－１８，１９７６；Ｄｉｎｔｚｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ７３：３６７１－７５，１９７６）。有用な担体には、反応物部分を結合することができる１つもしくはそれ以上の官能基を含有する天然（例えば、細菌もしくはウイルスからのタンパク質）、半合成もしくは合成物質であることができるポリマー担体が包含される。特異的結合担体は、抗体、核酸、アビジン、タンパク質－核酸を包含する任意のタイプの特異的結合部分であることができる。

【０１０５】

適当な免疫原性担体の例は、ハプテンの免疫原性を上げそして／または診断的に、分析的にそして／もしくは治療的に有益であるハプテンに対する抗体を生じさせるのに役立つことができるものである。有用な担体には、反応物部分を結合することができる１つもしくはそれ以上の官能基、例えば第一級および／もしくは第二級アミノ基、アジド基、ヒドロキシル基もしくはカルボキシル基を含有する天然であるか（オボアルブミンもしくはキーホールリンペットヘモシアニンのようなタンパク質のような）または任意の生物（ウイルスを包含する）から単離される天然ポリマー、半合成もしくは合成物質由来であることができるポリマー担体が包含される。担体は水溶性もしくは不溶性であることができ、そしてある態様においてタンパク質もしくはポリペプチドである。これらの基準を満たす担体は、当該技術分野において一般に既知である（例えば、Ｆａｔｔｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５８：２３０９－１２，１９９０；Ｄｅｖｉ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ８８：７１７５－７９，１９９１；Ｓｚｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５９：４５５５－６１，１９９１；Ｓｚｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６６：１５１０－２４，１９８７；およびＰａｖｌｉａｋｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６８：２１６１－６６，２０００を参照）。

【０１０６】

免疫原性担体は、ロタウイルスのもしくはロタウイルス以外のウイルスのポリペプチド

のようなポリペプチドであることができる。そのような他のウイルスの限定されないそして決して包括的ではないリストには、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、鳥類伝染性気管支炎ウイルス、バキュロウイルス、水疱瘡、コロナウイルス、サイトメガロウイルス、ジステンパー、エンテロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ネコ白血病ウイルス、フラビウイルス、口蹄疫ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、ヘルペス種、単純ヘルペス、インフルエンザウイルス、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＨＴＬＶ　１、インフルエンザＡおよびＢ、クンジンウイルス、ラッサ熱ウイルス、ＬＣＭＶ（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）、レンチウイルス、麻疹、メンゴウイルス、麻疹ウイルス属、ミクソウイルス、パピローマウイルス、パロウイルス、パラインフルエンザウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ポコウイルス（Ｐｏｋｏ　ｖｉｒｕｓ）、ポリオウイルス、ポリオーマ腫瘍ウイルス、仮性狂犬病、狂犬病ウイルス、レオウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レトロウイルス、ライノウイルス、牛疫、ロタウイルス、セムリキ森林ウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス４０、シンドビスウイルス、ＳＶ５、ダニ媒介性脳炎ウイルス、トガウイルス（風疹、黄熱病、デング熱）、ワクシニアウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎、水疱性口内炎ウイルス、メタ肺炎ウイルス、ノロウイルス、ＳＡＲＳウイルス、天然痘ウイルス、ピコルナウイルス、水痘帯状ヘルペスおよびウェストナイルウイルスが包含される。

【０１０７】

あるいはまた、免疫原性担体ポリペプチドは、細菌もしくは他の病原性生物のものであることができる。典型的な細菌ポリペプチドには、アクロモバクター・キシロソキシダンス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ　ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）、アシネトバクター・カルコアセティクス（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｃａｌｃｏａｃｅｔｉｃｕｓ）、好ましくはアシネトバクター・アニトラタス（Ａ．ａｎｉｔｒａｔｕｓ）、アシネトバクター・ヘモリチカス（Ａ．ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、アシネトバクター・アルカリゲネス（Ａ．ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）およびアシネトバクター・ルヴォフィイ（Ａ．ｌｗｏｆｆｉｉ）、アクチノマイセス・イスラエリイ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ　ｉｓｒａｅｌｉｉ）、アエロモナス・ハイドロフィリア（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ　ｈｙｄｒｏｐｈｉｌｉａ）、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）種、好ましくはアルカリゲネス・フェカリス（Ａ．ｆａｅｃａｌｉｓ）、アルカリゲネス・オドランス（Ａ．ｏｄｏｒａｎｓ）およびアルカリゲネス・デニトリフィカンス（Ａ．ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ）、アリゾナ・ヒンシャウイ（Ａｒｉｚｏｎａ　ｈｉｎｓｈａｗｉｉ）、バチルス・アントラシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、バチルス・セレウス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｅｒｅｕｓ）、バクテロイデス・フラジリス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｆｒａｇｉｌｉｓ）、バクテロイデス・メラニノゲニカス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｍｅｌａｎｉｎｏｇｅｎｉｃｕｓ）、ボルデテラ・ペルツッシス（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ　ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ　ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、ボレリア・レクレンティス（Ｂｏｒｒｅｌｉａ　ｒｅｃｕｒｒｅｎｔｉｓ）、ブルセラ（Ｂｒｕｃｅｌｌａ）種、好ましくはブルセラ・アボルタス（Ｂ．ａｂｏｒｔｕｓ）、ブルセラ・スイス（Ｂ．ｓｕｉｓ）、ブルセラ・メリテンシス（Ｂ．ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ）およびブルセラ・カニス（Ｂ．ｃａｎｉｓ）、カリマトバクテリウム・グラヌロマティス（Ｃａｌｙｍｍａｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇｒａｎｕｌｏｍａｔｉｓ）、カンピロバクター・コリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｃｏｌｉ）（例えばＣｊａＡポリペプチド）、カンピロバクター・フェタスｓｓｐ．インテスティナリス（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｆｅｔｕｓ　ｓｓｐ．ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌｉｓ）、カンピロバクター・フェタスｓｓｐ．ジュジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｆｅｔｕｓ　ｓｓｐ．ｊｅｊｕｎｉ）、クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ）種、好ましくはクラミジア・シタッシ（Ｃ．ｐｓｉｔｔａｃｉ）およびクラミジア・トラコマティス（Ｃ．ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クロモバクテリウム・ビオラセウム（Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍ）、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）種、好ましくはシトロバクター・フロインディ（Ｃ．ｆｒｅｕｎｄｉｉ）およびシトロバクター・ディバーサス（Ｃ．ｄｉｖｅｒ

ｓｕｓ）、クロストリジウム・ボツリヌム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、クロストリジウム・ペルフリンゲンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、クロストリジウム・ジフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、クロストリジウム・テタニ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、コリネバクテリウム・ジフテリエ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、好ましくはコリネバクテリウム・ウルセランス（Ｃ．ｕｌｃｅｒａｎｓ）、コリネバクテリウム・ヘモリチカム（Ｃ．ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｍ）およびコリネバクテリウム・シュードツベルクローシス（Ｃ．ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、コキシエラ・ブルネティ（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、エドワージエラ・タルダ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ ｔａｒｄａ）、エイケネラ・コロデンス（Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ ｃｏｒｒｏｄｅｎｓ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、好ましくはエンテロバクター・クロアカエ（Ｅ．ｃｌｏａｃａｅ）、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅ．ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）、エンテロバクター・ハフニエ（Ｅ．ｈａｆｎｉａｅ）（ハフニア・アルベイ（Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉ）とも呼ばれる）およびエンテロバクター・アグロメランス（Ｅ．ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）、エリシペロスリクス・ルシオパシエ（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ ｒｈｕｓｉｏｐａｔｈｉａｅ）、エシェリキア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ）、フランシセラ・ツラレンシス（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、フゾバクテリウム・ヌクレアタム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）、ガードネレラ・バギナリス（Ｇａｒｄｎｅｒｅｌｌａ ｖａｇｉｎａｌｉｓ）、ヘモフィルス・デュクレイ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒｅｙｉ）、ヘモフィルス・インフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ヘリコバクター（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ）種（例えばヘリコバクター・ピロリ（Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ）のＵｒｅＢポリペプチド）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）種、好ましくはクレブシエラ・ニューモニエ（Ｋ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クレブシエラ・オザエナエ（Ｋ．ｏｚａｅｎａｅ）もしくはクレブシエラ・リノスクレロマティス（Ｋ．ｒｈｉｎｏｓｃｌｅｒｏｍａｔｉｓ）、レジオネラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）種、レプトスピラ・インテロガンス（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎｔｅｒｒｏｇａｎｓ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、モラクセラ（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ）種、好ましくはモラクセラ・ラクナタ（Ｍ．ｌａｃｕｎａｔａ）およびモラクセラ・オスロエンシス（Ｍ．ｏｓｌｏｅｎｓｉｓ）、マイコバクテリウム・ボビス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ）、マイコバクテリウム・レプラエ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）（例えばＣＦＰ１０ポリペプチド）、マイコプラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）種、好ましくはマイコプラズマ・ニューモニエ（Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ノカルジア（Ｎｏｃａｒｄｉａ）種、好ましくはノカルジア・アステロイデス（Ｎ．ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ）およびノカルジア・ブラジリエンシス（Ｎ．ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）、パスツレラ・ヘモリチカ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ）、パスツレラ・マルトシダ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、ペプトコッカス・マグナス（Ｐｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍａｇｎｕｓ）、プレシオモナス・シゲロイデス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ）、ニューモコッカス（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｉ）、プロテウス（Ｐｒｏｔｅｕｓ）種、好ましくはプロテウス・ミラビリス（Ｐ．ｍｉｒａｂｉｌｉｓ）、プロテウス・ブルガリス（Ｐ．ｖｕｌｇａｒｉｓ）、プロテウス・レットゲリ（Ｐ．ｒｅｔｔｇｅｒｉ）およびプロテウス・モルガニー（Ｐ．ｍｏｒｇａｎｉｉ）（それぞれプロビデンシア・レットゲリ（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｒｅｔｔｇｅｒｉ）およびモルガネラ・モルガニー（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ ｍｏｒｇａｎｉｉ）とも呼ばれる）、プロビデンシ

ア（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ）種、好ましくはプロビデンシア・アルカリファシエンス（Ｐ．ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ）、プロビデンシア・スチュアルティイ（Ｐ．ｓｔｕａｒｔｉｉ）およびプロビデンシア・レットゲリ（Ｐ．ｒｅｔｔｇｅｒｉ）（プロテウス・レットゲリ（Ｐｒｏｔｅｕｓ　ｒｅｔｔｇｅｒｉ）とも呼ばれる）、シュードモナス・アエルギノーザ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、シュードモナス・マレイ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｍａｌｌｅｉ）、シュードモナス・シュードマレイ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ）、リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）、ロシャリメア・ヘンセレ（Ｒｏｃｈａｌｉｍａｉａ　ｈｅｎｓｅｌａｅ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）種、好ましくはサルモネラ・エンテリディス（Ｓ．ｅｎｔｅｒｉｄｉｓ）、サルモネラ・チフィ（Ｓ．ｔｙｐｈｉ）およびサルモネラ・デルビー（Ｓ．ｄｅｒｂｙ）、そして最も好ましくはサルモネラＤＴ１０４タイプのサルモネラ種、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）種、好ましくはセラチア・マルセッセンス（Ｓ．ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）、シゲラ・ディセンテリエ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）、シゲラ・フレクスネリ（Ｓ．ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、シゲラ・ボイディ（Ｓ．ｂｏｙｄｉｉ）およびシゲラ・ソンネイ（Ｓ．ｓｏｎｎｅｉ）、スピリルム・マイナー（Ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ　ｍｉｎｏｒ）、スタヒロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）、スタヒロコッカス・エピデルミディス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）、スタヒロコッカス・サプロフィチカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｓａｐｒｏｐｈｙｔｉｃｕｓ）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓ）、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、好ましくはストレプトコッカス・フェカリス（Ｓ．ｆａｅｃａｌｉｓ）、ストレプトコッカス・フェシウム（Ｓ．ｆａｅｃｉｕｍ）およびストレプトコッカス・デュランス（Ｓ．ｄｕｒａｎｓ）、ストレプトコッカス・アガラクチエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（例えばＳｆｂ１ポリペプチド）、トレポネーマ・カラテウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｃａｒａｔｅｕｍ）、トレポネーマ・パリダム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｐａｌｌｉｄｕｍ）、トレポネーマ・ペルテヌエ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｐｅｒｔｅｎｕｅ）、好ましくはトレポネーマ・パリダム（Ｔ．ｐａｌｌｉｄｕｍ）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ　ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）、ビブリオ・コレラ（Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ビブリオ・パラヘモリチカス（Ｖｉｂｒｉｏ　ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、エルジニア・エンテロコリチカ（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）およびエルジニア・ペスティス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｅｓｔｉｓ）のものが包含される。

【０１０８】

寄生虫免疫原性担体は、例えば、マラリア（Ｍａｌａｒｉａ）（プラスモジウム・ファルシパルム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、プラスモジウム・ビバックス（Ｐ．ｖｉｖａｘ）、プラスモジウム・マラリエ（Ｐ．ｍａｌａｒｉａｅ））、シストソーマ（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍｅｓ）、トリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍｅｓ）、リーシュマニア（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ）、フィラリア・ネマトデス（Ｆｉｌａｒｉａｌ　ｎｅｍａｔｏｄｅｓ）、トリコモナス症、肉胞子虫症、テニア（Ｔａｅｎｉａ）（テニア・サギナタ（Ｔ．ｓａｇｉｎａｔａ）、テニア・ソリウム（Ｔ．ｓｏｌｉｕｍ））、リーシュマニア（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ）、トキソプラズマ・ゴンジイ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ　ｇｏｎｄｉｉ）、旋毛虫症（トリキネラ・スピラリス（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ　ｓｐｉｒａｌｉｓ））もしくはコクシジウム症（アイメリア（Ｅｉｍｅｒｉａ）種）から単離されそして／もしくは得られることができる。

【０１０９】

実例となる真菌免疫原性担体は、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）、アスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉ

ｇａｔｕｓ）およびコクシジオイデス症から選択される真菌より単離されそして／もしくは得られることができる。

【０１１０】

水溶性ポリペプチド免疫原性担体の特定の限定されない例には、細菌もしくはウイルスからの天然、半合成もしくは合成ポリペプチドもしくはタンパク質が包含されるがこれらに限定されるものではない。１つの態様において、担体としての使用のための細菌生成物には、細菌壁タンパク質および他の生成物（例えば、ストレプトコッカスもしくはスタヒロコッカス細胞壁）、ならびに細菌の可溶性抗原が包含される。別の態様において、担体としての使用のための細菌生成物には細菌毒素が包含される。細菌毒素には、感受性宿主において有毒作用、炎症反応、ストレス、ショック、慢性後遺症もしくは死亡を媒介する細菌生成物が包含される。

【０１１１】

水不溶性ポリマー担体の特定の限定されない例には、反応性部分をそれに結合することができる、アミノアルキルアガロース（例えば、アミノプロピルもしくはアミノヘキシルセファロース；Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、アミノプロピルガラス、架橋デキストランなどが包含されるがこれらに限定されるものではない。他の担体は、反応性基を共有結合するために官能基が利用可能であるならば、用いることができる。

【０１１２】

キメラ抗体：ヒトのようなある種からのフレームワーク残基およびＲＥＴに特異的に結合するマウス抗体のような別の種からのＣＤＲ（これは一般に抗原結合を与える）を有する抗体。

【０１１３】

コンジュゲーションすること、連結すること、結合することもしくはつなぐこと：より大きい分子を製造するためにある分子を別の分子に共有結合すること。例えば、２つのポリペプチドを１つの連続したポリペプチド分子にすること、またはｓｃＦｖ抗体のような、ポリペプチドにハプテンもしくは他の分子を共有結合すること。特定の文脈において、該用語は、エフェクター分子（「ＥＭ」）に抗体部分のようなリガンドを連結することへの言及を含む。該連結は、化学的もしくは組換え手段によるいずれかであることができる。「化学的手段」は、１つの分子を生成せしめるために２つの分子間で形成される共有結合があるような抗体部分とエフェクター分子との間の反応をさす。

【０１１４】

連結された：第一の原子もしくは分子に適用する場合に第二の原子もしくは分子に「連結される」ことは、直接連結されるそして間接的に連結されるの両方であることができる。二次抗体は、間接的連結の例を提供する。間接的連結の１つの具体例はウサギ抗ハプテン一次抗体であり、それはマウス抗ウサギＩｇＧ抗体により結合され、それは次に検出可能な標識に共有結合されているヤギ抗マウスＩｇＧ抗体により結合される。

【０１１５】

エピトープ：抗原決定基。これらは抗原性である、すなわち、特異的免疫反応を引き起こす分子上の特定の化学基または連続的もしくは非連続的ペプチド配列である。抗体は、特定の抗原性エピトープに結合する。

【０１１６】

ハプテン：抗体と特異的に結合することができるが、典型的には担体分子との組み合わせを除いて免疫原性であることが実質的にできない分子、典型的には小分子。

【０１１７】

ホモポリマー：この用語は、単一モノマー（例えばアミノ酸）のような単一タイプの分子種の多数の単位を一緒に結合することにより形成されるポリマーをさす。

【０１１８】

ヒト化抗体：ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含んでなる抗体。ヒト化抗体は、ＣＤＲを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンもしく

は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから取り込まれたアミノ酸での限られた数の置換を有し得る。ヒト化もしくは他のモノクローナル抗体は、抗原結合もしくは他の免疫グロブリン機能への影響を実質的に有さないさらなる保存的アミノ酸置換を有することができる。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学を用いて構築することができる（例えば、米国特許第５，５８５，０８９号を参照）。

【０１１９】

ヒト化免疫グロブリン：ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラットもしくは合成）免疫グロブリンからの１つもしくはそれ以上のＣＤＲを含む免疫グロブリン。ＣＤＲを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、そしてフレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。１つの態様において、全てのＣＤＲはヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンからである。定常領域は存在する必要はないが、それらが存在する場合、それらはヒト免疫グロブリン定常領域に実質的に同一、すなわち、少なくとも約８５～９０％、例えば約９５％もしくはそれ以上同一でなければならない。従って、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、場合によりＣＤＲを除いて、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分に実質的に同一である。

【０１２０】

免疫反応：刺激に対する、Ｂ細胞、Ｔ細胞、マクロファージもしくは多形核細胞のような免疫系の細胞の反応。免疫反応は、宿主防御反応に関与する体の任意の細胞、例えば、インターフェロンもしくはサイトカインを分泌する上皮細胞を含むことができる。免疫反応には、先天性免疫反応もしくは炎症が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【０１２１】

免疫原性コンジュゲートもしくは組成物：脊椎動物において特異的免疫反応（もしくは免疫原性反応）を刺激するかもしくは引き起こすために有用な組成物を意味するために本明細書において用いられる用語。ある態様において、免疫原性反応は、免疫原性組成物が向けられる生物からの感染もしくは疾患進行に脊椎動物がより良く抵抗することをそれが可能にする点において、防御的であるかもしくは防御免疫を与える。免疫原性組成物のタイプの１つの具体例はワクチンである。

【０１２２】

免疫原：動物に注射されるかもしくは吸収される組成物を包含する、動物において、適切な条件下で、抗体の生産もしくはＴ細胞反応を刺激することができる化合物、組成物もしくは物質。

【０１２３】

免疫学的に有効な用量：本開示の開示されるコンジュゲートの免疫学的に有効な用量は治療的に有効であり、そして疾患もしくは症状の重症度、程度もしくは期間を抑えるか、処置するか、減少させるかもしくは軽減する。

【０１２４】

免疫学的に反応性の条件：実質的に全ての他のエピトープへの結合よりも検出可能に大きい程度にそして／もしくはそれが実質的になく、特定のエピトープに対して産生される抗体がそのエピトープに結合することを可能にする条件への言及を含む。免疫学的に反応性の条件は、抗体結合反応の形態により決まり、そして典型的には免疫アッセイプロトコルにおいて利用されるものもしくはインビボで遭遇する条件である。免疫アッセイ形態および条件の記述については、Ｈａｒｌｏｗ　＆　Ｌａｎｅ、上記を参照。これらの方法において用いられる免疫学的に反応性の条件は、生きている哺乳類もしくは哺乳類細胞の内部で典型的である条件（温度、浸透圧、ｐＨのような）への言及を含む「生理的条件」である。ある器官は極限条件にさらされていることが認識されるが、生物内および細胞内環境は通常は約ｐＨ７辺りにあり（すなわち、ｐＨ６．０～ｐＨ８．０、より典型的にはｐＨ６．５～７．５）、主要溶媒として水を含有し、そして０℃より上で５０℃より下の温度で存在する。浸透圧は、細胞生存および増殖を支援する範囲内である。

【０１２５】

疾患を抑制することもしくは処置すること：例えば、炭疽病のような疾患の危険性がある患者において、疾患もしくは症状の完全な発症を抑制すること。「処置」は、それが発症し始めた後に疾患もしくは病状の兆候もしくは症状を改善する治療的介入をさす。本明細書において用いる場合、疾患、病状もしくは症状と関連した「改善すること」という用語は、処置の任意の観察可能な有益な効果をさす。有益な効果は、例えば、感受性患者における疾患の臨床症状の遅延発症、疾患のいくつかのもしくは全ての臨床症状の重症度の減少、疾患のより遅い進行、疾患の再発の数の減少、患者の全般的健康（ｈｅａｌｔｈ）もしくは健康（ｗｅｌｌ－ｂｅｉｎｇ）の改善により、または特定の疾患に特有である当該技術分野において周知である他のパラメーターにより証明することができる。

【０１２６】

単離された：「単離された」微生物（ウイルス、細菌、真菌もしくは原生動物のような）は、異なるタイプ、株もしくは種の微生物から離れて実質的に分離されるかもしくは精製されている。微生物は、連続希釈および培養を包含する様々な技術により単離することができる。

【０１２７】

「単離された」生物学的成分（核酸分子、タンパク質もしくは細胞小器官のような）は、他の染色体および染色体外ＤＮＡおよびＲＮＡ、タンパク質ならびに細胞小器官のような、該成分が天然で存在する生物の細胞における他の生物学的成分から離れて実質的に分離されるかもしくは精製されている。「単離されている」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法により精製された核酸およびタンパク質が包含される。該用語にはまた、宿主細胞における組換え発現により製造される核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸もしくはタンパク質、またはそのフラグメントも包含される。

【０１２８】

検出可能な標識：その分子の検出を容易にするために、抗体もしくはタンパク質のような別の分子に直接もしくは間接的に結合される検出可能な化合物もしくは組成物。標識の特定の限定されない例には、蛍光タグ、酵素および放射性同位体が包含される。

【０１２９】

リンカーペプチド：可変軽鎖に可変重鎖を間接的に結合する働きをする抗体結合フラグメント（Ｆｖフラグメントのような）内のペプチド。「リンカー」はまた、細胞毒素もしくは検出可能な標識のようなエフェクター分子にｓｃＦｖのようなターゲッティング部分を連結する働きをするペプチドをさすこともできる。

【０１３０】

哺乳類：この用語には、ヒトおよび非ヒト哺乳類の両方が包含される。同様に、「患者」という用語にはヒトおよび動物患者の両方が包含される。

【０１３１】

興味のある分子もしくは標的：その存在、位置および／もしくは濃度が決定されるべき分子。興味のある分子の例には、ハプテンで標識されるタンパク質および核酸配列が包含される。

【０１３２】

モノクローナル抗体：Ｂリンパ球の単一クローンによりもしくは単一抗体の軽鎖および重鎖遺伝子がトランスフェクションされている細胞により生産される抗体。モノクローナル抗体は、当業者に既知である方法により、例えば免疫脾臓細胞と骨髄腫細胞との融合からハイブリッド抗体産生細胞を作ることにより製造される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が包含される。

【０１３３】

多重化する、多重化した、多重化すること：本発明の態様は、サンプルにおける多数の標的が、複数の異なるコンジュゲートを用いて、所望に応じて、実質的に同時にもしくは順次検出されることを可能にする。多重化することには、個々にそしてありとあらゆる組み合わせの両方で、一般的に核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ペプチド、タンパク質を同定することおよび／もしくは定量することを包含することができる。多重化することにはまた、そ

の解剖学的関連で細胞における遺伝子、メッセンジャーおよびタンパク質の２つもしくはそれ以上を検出することを包含することもできる。

【０１３４】

ナノ粒子：ナノメートル単位で測定されるサイズを有するナノスケール粒子、例えば、約１００ｎｍ未満の少なくとも１つの寸法を有するナノスケール粒子。ナノ粒子の例には、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様物質、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートでのような）、ナノ繊維、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープおよび量子ドットが包含される。ナノ粒子は、例えば、光子（高周波および可視光子を包含する）の吸収および／もしくは放出ならびにプラズモン共鳴によって検出可能なシグナルを生成することができる。

【０１３５】

新生組織形成および腫瘍：細胞の異常なそして制御されない増殖の過程。新生組織形成は、増殖性疾患の一例である。

【０１３６】

新生組織形成の産物は新生物（腫瘍）であり、それは過剰な細胞分裂に起因する組織の異常な増殖である。転移しない腫瘍は、「良性」と呼ばれる。周囲組織に浸潤しそして／もしくは転移することができる腫瘍は、「悪性」と呼ばれる。血液学的腫瘍の例には、急性白血病（急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｃｙｔｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ）、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ ｌｅｕｋｅｍｉａ）ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病のような）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ球性白血病のような）を包含する白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低悪性度および高悪性度型）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、有毛細胞白血病および骨髄異形成が包含される。

【０１３７】

肉腫および癌腫のような充実性腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫および他の肉腫、滑液肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、セミノーマ、膀胱癌およびＣＮＳ腫瘍（神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫のような）が包含される。

【０１３８】

製薬学的に許容しうる担体：本開示において有用な製薬学的に許容しうる担体（賦形剤）は、従来通りである。Ｅ．Ｗ．ＭａｒｔｉｎによるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，第１５版（１９７５）は、１つもしくはそれ以上のＳＡＲＳ－ＣｏＶ核酸分子、タンパク質もしくはこれらのタンパク質に結合する抗体のような１つもしくはそれ以上の治療化合物もしくは分子、および追加の製薬学的薬剤の製薬学的送達に適当な組成物および製剤を記述する。「製薬学的に許容しうる担体」という用語は、ハプテン／担体コンジュゲートもしくは抗原／担体コンジュゲートと関連して上に記述されるような「担体」と区別されるべきである。

【０１３９】

一般に、担体の性質は、用いられている特定の投与形態により決まる。例えば、非経口製剤は賦形剤として水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどのような製薬学的にそして生理学的に許容しうる液体が包含される注入可能な液体を通常は含んでなる。固形組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤もしくはカプセル剤形態）で

は、通常の無毒の固形担体には、例えば、製薬等級のマンニトール、ラクトース、澱粉もしくはステアリン酸マグネシウムを包含することができる。生物学的に中性の（ｎｅｕｔｒａｌ）担体に加えて、投与される製薬学的組成物は湿潤剤もしくは乳化剤、防腐剤およびｐＨ緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウムもしくはソルビタンモノラウレートのような少量の無毒の補助物質を含有することができる。

【０１４０】

ポリペプチド：モノマーが、アミド結合によって一緒に連結されるアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がアルファ－アミノ酸である場合、Ｌ－光学異性体もしくはＤ－光学異性体のいずれかを用いることができる。「ポリペプチド」もしくは「タンパク質」という用語には、本明細書において用いる場合、任意のアミノ酸配列が包含されそして糖タンパク質のような修飾された配列が包含されるものとする。「ポリペプチド」という用語は、特に、天然に存在するタンパク質ならびに組換え的にもしくは合成的に製造されるものを含むものとする。

【０１４１】

「残基」もしくは「アミノ酸残基」という用語には、タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドに取り込まれるアミノ酸への言及が包含される。

【０１４２】

タンパク質：アミノ酸を含んでなる分子、特にポリペプチド。

【０１４３】

精製された：「精製された」という用語は絶対的純度を必要とせず；むしろ、それは相対的用語として意図される。従って、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、コンジュゲートもしくは他の活性化合物は、タンパク質もしくは他の汚染物質から全体的にもしくは部分的に単離されるものである。一般的に、本開示内の使用のための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、コンジュゲートもしくは他の活性化合物は、治療投与のための完全な製薬学的製剤において製薬学的担体、賦形剤、バッファー、吸収促進剤、安定剤、防腐剤、アジュバントもしくは他の共成分（ｃｏ－ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔ）とペプチド、タンパク質、コンジュゲートもしくは他の活性化合物との混合もしくは調合の前に製剤に存在する全ての高分子種の８０％より多くを含んでなる。より典型的には、ペプチド、タンパク質、コンジュゲートもしくは他の活性化合物は、他の製剤成分との混合の前に精製された製剤に存在する全ての高分子種の９０％より多く、しばしば９５％より多くに相当するように精製される。他の場合において、精製された製剤は本質的に均質であることができ、ここで、他の高分子種は通常の技術により検出可能でない。

【０１４４】

量子ドット：量子閉じ込めによってサイズに依存する電子および光学特性を示すナノスケール粒子。量子ドットは、例えば、半導体材料（例えばセレン化カドミウムおよび硫化鉛）そして結晶（分子線エピタキシーによって成長させる）などから構築されている。様々な界面化学および蛍光特性を有する様々な量子ドットが、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲから市販されている（例えば、米国特許第６，８１５，０６４号、第６，６８２，５９６号および第６，６４９，１３８号を参照、これらの特許の各々は本明細書に引用することにより組み込まれる）。量子ドットはまた、Ｅｖｉｄｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｔｒｏｙ，ＮＹ）からも市販されている。他の量子ドットには、ＺｎＳＳｅ、ＺｎＳｅＴｅ、ＺｎＳＴｅ、ＣｄＳＳｅ、ＣｄＳｅＴｅ、ＳｃＳＴｅ、ＨｇＳＳｅ、ＨｇＳｅＴｅ、ＨｇＳＴｅ、ＺｎＣｄＳ、ＺｎＣｄＳｅ、ＺｎＣｄＴｅ、ＺｎＨｇＳ、ＺｎＨｇＳｅ、ＺｎＨｇＴｅ、ＣｄＨｇＳ、ＣｄＨｇＳｅ、ＣｄＨｇＴｅ、ＺｎＣｄＳＳｅ、ＺｎＨｇＳＳｅ、ＺｎＣｄＳｅＴｅ、ＺｎＨｇＳｅＴｅ、ＣｄＨｇＳＳｅ、ＣｄＨｇＳｅＴｅ、ＩｎＧａＡｓ、ＧａＡｌＡｓおよびＩｎＧａＮ量子ドットのような合金量子ドットが包含される（合金量子ドットおよびそれらを製造する方法は、例えば、米国出願公開第２００５／００１２１８２号およびＰＣＴ公開ＷＯ２００５／００１８８９に開示される）。

【０１４５】

反応性基：本願の全体にわたる式（ｆｏｒｍｕｌａｓ）は、本明細書に記載の通り第一の単位を第二の単位に連結するために適当な様々な基のいずれかであることができる「反応性基」をさす。例えば、反応性基はアミン反応性基、例えばイソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、ＮＨＳエステル、酸塩化物、例えばスルホニルクロリド、アルデヒドおよびグリオキサール、エポキシドおよびオキシラン、カーボネート、アリール化剤、イミドエステル、カルボジイミド、無水物、およびその組み合わせであってもよい。適当なチオール反応性官能基には、ハロアセチルおよびアルキルハロゲン化物、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリール化剤、チオール－ジスルフィド交換試薬、例えばピリジルジスルフィド、ＴＮＢ－チオール、およびジスルフィド還元剤、ならびにその組み合わせが包含される。適当なカルボキシレート反応性官能基には、ジアゾアルカン、ジアゾアセチル化合物、カルボニルジイミダゾール化合物およびカルボジイミドが包含される。適当なヒドロキシル反応性官能基には、エポキシドおよびオキシラン、カルボニルジイミダゾール、Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジルカーボネートもしくはクロロギ酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル、過ヨウ素酸塩酸化化合物、酵素的酸化、アルキルハロゲンおよびイソシアネートが包含される。アルデヒドおよびケトン反応性官能基には、ヒドラジン、シッフ塩基、還元的アミノ化生成物、マンニッヒ縮合生成物、およびその組み合わせが包含される。活性水素反応性化合物には、ジアゾニウム誘導体、マンニッヒ縮合生成物、ヨウ素化反応生成物、およびその組み合わせが包含される。光反応性化学官能基には、アリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフォノン、ジアゾ化合物、ジアジリン誘導体、およびその組み合わせが包含される。

【０１４６】

サンプル：患者から得られる、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ（ｍＲＮＡを包含する）、タンパク質、もしくはその組み合わせを含有する生物学的試料。例には、末梢血、尿、唾液、組織生検、外科標本、羊水穿刺サンプルおよび剖検材料が包含されるがこれらに限定されるものではない。一例として、サンプルには腺癌の生検、非癌性組織のサンプル、正常組織のサンプル（既知の疾患もしくは障害に罹患していない患者から）が包含される。

【０１４７】

特異的結合部分：特異的結合対のメンバー。特異的結合対は、それらが他の分子への結合が実質的になく相互に結合することを特徴とする分子の対である（例えば、特異的結合対は、生物学的サンプルにおける他の分子と結合対の２つのメンバーとのいずれかとの結合定数より少なくとも$10^3 M^{-1}$大きい、$10^4 M^{-1}$大きいもしくは$10^5 M^{-1}$大きい結合定数を有することができる）。特異的結合部分の特定の例には、特異的結合タンパク質（例えば、抗体、レクチン、ストレプトアビジンのようなアビジン、およびプロテインＡ）、核酸配列およびタンパク質－核酸が包含される。特異的結合部分にはまた、そのような特異的結合タンパク質により特異的に結合される分子（もしくはその一部）を包含することもできる。

【０１４８】

治療的に有効な量：その薬剤で処置されている患者において所望の効果を得るために十分な特定の薬剤の量。例えば、これは、感染および疾患に対する抵抗性を増すこと、それらを防ぐこと、改善することそして／もしくは処置することにおいて有用なコンジュゲートの量であることができる。理想的には、薬剤の治療的に有効な量は、感染に対する抵抗性を増し、それを防ぎ、改善し、そして／もしくは処置するために十分なそして患者における実質的な細胞毒性効果を引き起こすことのない量である。患者における感染および疾患に対する抵抗性を増し、それを防ぎ、改善し、そして／もしくは処置するために有用な薬剤の有効量は、処置されている患者、苦痛の重度および治療組成物の投与の方法により決まる。

【０１４９】

ワクチン：ワクチンは、患者において予防もしくは治療免疫反応を引き出す製薬学的組成物である。ある場合において、免疫反応は防御反応である。典型的に、ワクチンは病原体、例えば細菌もしくはウイルス病原体の抗原に対して、または病状と相関している細胞

成分に対して抗原特異的免疫反応を引き出す。ワクチンには、ポリヌクレオチド、ペプチドもしくはポリペプチド、多糖、ウイルス、細菌、細胞または１つもしくはそれ以上の細胞成分を包含することができる。ある場合において、ウイルス、細菌もしくは細胞は、ワクチン成分の免疫原性を保ちながら、感染の可能性を防ぐかもしくは減らすために不活性化されるかもしくは弱毒化されることができる。

【０１５０】

抗原性ポリペプチドは、ロタウイルスの、もしくはロタウイルス以外のウイルスものであることができる。そのような他のウイルスの限定されないそして決して包括的ではないリストには、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、鳥類伝染性気管支炎ウイルス、バキュロウイルス、水疱瘡、コロナウイルス、サイトメガロウイルス、ジステンパー、エンテロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ネコ白血病ウイルス、フラビウイルス、口蹄疫ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、ヘルペス種、単純ヘルペス、インフルエンザウイルス、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＨＴＬＶ　１、インフルエンザＡおよびＢ、クンジンウイルス、ラッサ熱ウイルス、ＬＣＭＶ（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）、レンチウイルス、麻疹、メンゴウイルス、麻疹ウイルス属、ミクソウイルス、パピローマウイルス、パロウイルス、パラインフルエンザウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ポコウイルス、ポリオウイルス、ポリオーマ腫瘍ウイルス、仮性狂犬病、狂犬病ウイルス、レオウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レトロウイルス、ライノウイルス、牛疫、ロタウイルス、セムリキ森林ウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス４０、シンドビスウイルス、ＳＶ５、ダニ媒介性脳炎ウイルス、トガウイルス（風疹、黄熱病、デング熱）、ワクシニアウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎、水疱性口内炎ウイルス、メタ肺炎ウイルス、ノロウイルス、ＳＡＲＳウイルス、天然痘ウイルス、ピコルナウイルス、水痘帯状ヘルペスおよびウェストナイルウイルスが包含される。

【０１５１】

あるいはまた、抗原性ポリペプチドは、細菌もしくは他の病原性生物のものであることができる。典型的な細菌ポリペプチドには、アクロモバクター・キシロソキシダンス、アシネトバクター・カルコアセティクス、好ましくはアシネトバクター・アニトラタス、アシネトバクター・ヘモリチカス、アシネトバクター・アルカリゲネスおよびアシネトバクター・ルヴォフィイ、アクチノマイセス・イスラエリイ、アエロモナス・ハイドロフィリア、アルカリゲネス種、好ましくはアルカリゲネス・フェカリス、アルカリゲネス・オドランスおよびアルカリゲネス・デニトリフィカンス、アリゾナ・ヒンシャウイ、バチルス・アントラシス、バチルス・セレウス、バクテロイデス・フラジリス、バクテロイデス・メラニノゲニカス、ボルデテラ・ペルツッシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・レクレンティス、ブルセラ種、好ましくはブルセラ・アボルタス、ブルセラ・スイス、ブルセラ・メリテンシスおよびブルセラ・カニス、カリマトバクテリウム・グラヌロマティス、カンピロバクター・コリ（例えばＣｊａＡポリペプチド）、カンピロバクター・フェタスｓｓｐ．インテスティナリス、カンピロバクター・フェタスｓｓｐ．ジュジュニ、クラミジア種、好ましくはクラミジア・シタッシおよびクラミジア・トラコマティス、クロモバクテリウム・ビオラセウム、シトロバクター種、好ましくはシトロバクター・フロインディおよびシトロバクター・ディバーサス、クロストリジウム・ボツリヌム、クロストリジウム・ペルフリンゲンス、クロストリジウム・ジフィシル、クロストリジウム・テタニ、コリネバクテリウム・ジフテリエ、コリネバクテリウム、好ましくはコリネバクテリウム・ウルセランス、コリネバクテリウム・ヘモリチカムおよびコリネバクテリウム・シュードツベルクローシス、コキシエラ・ブルネティ、エドワージエラ・タルダ、エイケネラ・コロデンス、エンテロバクター、好ましくはエンテロバクター・クロアカエ、エンテロバクター・アエロゲネス、エンテロバクター・ハフニエ（ハフニア・アルベイとも呼ばれる）およびエンテロバクター・アグロメランス、エリシペロスリクス・ルシオパシエ、エシェリキア・コリ、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム、フランシセラ・ツラレンシス、フゾバクテリウム・ヌクレアタム、ガードネレラ・バギナリス、ヘモフィルス

・デュクレイ、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘリコバクター種（例えばヘリコバクター・ピロリのＵｒｅＢポリペプチド）、クレブシエラ種、好ましくはクレブシエラ・ニューモニエ、クレブシエラ・オザエナエもしくはクレブシエラ・リノスクレロマティス、レジオネラ種、レプトスピラ・インテロガンス、リステリア・モノサイトゲネス、モラクセラ種、好ましくはモラクセラ・ラクナタおよびモラクセラ・オスロエンシス、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・レプラエ、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（例えばＣＦＰ１０ポリペプチド）、マイコプラズマ種、好ましくはマイコプラズマ・ニューモニエ、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギティディス、ノカルジア種、好ましくはノカルジア・アステロイデスおよびノカルジア・ブラシリエンシス、パスツレラ・ヘモリチカ、パスツレラ・マルトシダ、ペプトコッカス・マグナス、プレシオモナス・シゲロイデス、ニューモコッカス、プロテウス種、好ましくはプロテウス・ミラビリス、プロテウス・ブルガリス、プロテウス・レットゲリおよびプロテウス・モルガニー（それぞれプロビデンシア・レットゲリおよびモルガネラ・モルガニーとも呼ばれる）、プロビデンシア種、好ましくはプロビデンシア・アルカリファシエンス、プロビデンシア・スチュアルティイおよびプロビデンシア・レットゲリ（プロテウス・レットゲリとも呼ばれる）、シュードモナス・アエルギノーザ、シュードモナス・マレイ、シュードモナス・シュードマレイ、リケッチア、ロシャリメア・ヘンセレ、サルモネラ種、好ましくはサルモネラ・エンテリディス、サルモネラ・チフィおよびサルモネラ・デルビー、そして最も好ましくはサルモネラＤＴ１０４タイプのサルモネラ種、セラチア種、好ましくはセラチア・マルセッセンス、シゲラ・ディセンテリエ、シゲラ・フレクスネリ、シゲラ・ボイディおよびシゲラ・ソンネイ、スピリルム・マイナー、スタヒロコッカス・アウレウス、スタヒロコッカス・エピデルミディス、スタヒロコッカス・サプロフィチカス、ストレプトバチルス・モニリフォルミス、ストレプトコッカス、好ましくはストレプトコッカス・フェカリス、ストレプトコッカス・フェシウムおよびストレプトコッカス・デュランス、ストレプトコッカス・アガラクチエ、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・ピオゲネス　（例えばＳｆｂ１ポリペプチド）、トレポネーマ・カラテウム、トレポネーマ・パリダム、トレポネーマ・ペルテヌエ、好ましくはトレポネーマ・パリダム、ウレアプラズマ・ウレアリチカム、ビブリオ・コレラ、ビブリオ・パラヘモリチカス、エルジニア・エンテロコリチカおよびエルジニア・ペスティスのものが包含される。

【０１５２】

寄生虫ハプテンもしくは抗原は、例えば、マラリア（プラスモジウム・ファルシパルム、プラスモジウム・ビバックス、プラスモジウム・マラリエ）、シストソーマ、トリパノソーマ、リーシュマニア、フィラリア・ネマトデス、トリコモナス症、肉胞子虫症、テニア（テニア・サギナタ、テニア・ソリウム）、リーシュマニア、トキソプラズマ・ゴンジイ、旋毛虫症（トリキネラ・スピラリス）もしくはコクシジウム症（アイメリア種）から選択することができる。

【０１５３】

実例となる真菌ハプテンもしくは抗原は、クリプトコックス・ネオフォルマンス、カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガーツスおよびコクシジオイデス症から選択される真菌由来であることができる。

【０１５４】

ハプテンもしくは抗原はまた、例えば脊椎動物を包含する任意の動物由来であることもできる。例えば、ハプテンもしくは抗原は、オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニンおよびマッコウクジラミオグロブリン由来の成分を含んでなることができる。

【０１５５】

適当な担体の例は、コンジュゲートの免疫原性を増しそして／または診断的に、分析的にそして／もしくは治療的に有益である担体に対する抗体を引き出すことができるものである。有用な担体には、反応物部分をそれに結合することができる１つもしくはそれ以上の官能基、例えば第一級および／もしくは第二級アミノ基、アジド基、ヒドロキシル基もしくはカルボキシル基を含有する天然、半合成もしくは合成材料であることができるポリ

マー担体が包含される。担体は水溶性もしくは不溶性であることができ、そしてある態様においてタンパク質もしくはポリペプチドである。これらの基準を満たす担体は、当該技術分野において一般に既知である（例えば、Ｆａｔｔｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５８：２３０９－１２，１９９０；Ｄｅｖｉ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ８８：７１７５－７９，１９９１；Ｓｚｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５９：４５５５－６１，１９９１；Ｓｚｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６６：１５１０－２４，１９８７；およびＰａｖｌｉａｋｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６８：２１６１－６６，２０００を参照）。担体は、たとえそれが誘導する抗体がそれだけで有益でなくても有用であることができる。

【０１５６】

水溶性ポリペプチド担体の特定の限定されない例には、細菌もしくはウイルスからの天然、半合成もしくは合成ポリペプチドもしくはタンパク質が包含されるがこれらに限定されるものではない。１つの態様において、担体としての使用のための細菌生成物には、細菌壁タンパク質および他の生成物（例えばストレプトコッカスもしくはスタヒロコッカス細胞壁）、ならびに細菌の可溶性抗原が包含される。別の態様において、担体としての使用のための細菌生成物には細菌毒素が包含される。細菌毒素には、感受性宿主において有毒作用、炎症反応、ストレス、ショック、慢性後遺症もしくは死亡を媒介する細菌生成物が包含される。

【０１５７】

水不溶性担体の特定の限定されない例には、反応性部分をそれに結合することができる、アミノアルキルアガロース（例えば、アミノプロピルもしくはアミノヘキシルセファロース；Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、アミノプロピルガラス、架橋デキストランなどが包含されるがこれらに限定されるものではない。他の担体は、反応性基を共有結合するために官能基が利用可能であるならば、用いることができる。

【０１５８】

ＩＩ．ハプテン

そのようなハプテンの開示される態様には、ピラゾール、特にニトロピラゾール；ニトロフェニル化合物；ベンゾフラザン；トリテルペン；尿素およびチオ尿素、特にフェニル尿素、そしてなおさらに特にフェニルチオ尿素；ロテノイドとも本明細書において呼ばれる、ロテノンおよびロテノン誘導体；オキサゾールおよびチアゾール、特にオキサゾールおよびチアゾールスルホンアミド；クマリンおよびクマリン誘導体；ポドフィロトキシンおよびポドフィロトキシン誘導体により例示されるシクロリグナン；ならびにその組み合わせが包含される。

【０１５９】

以下に提供される一般式について、置換基が示されない場合、置換基は水素であることを当業者は認識する。例えば、環系の内部に伸びる、原子に連結されないが示される結合は、そのような置換基の位置が可変であることを示す。結合を通って引かれた曲線は、ある追加の構造がその位置に結合されること、典型的には担体にハプテンを連結するために使用されるリンカーまたは官能基もしくは部分を示す。さらに、１つもしくはそれ以上のキラル中心を有する化合物に立体化学が示されない場合、全ての鏡像異性体およびジアステレオマーが包含される。同様に、脂肪族もしくはアルキル基の詳述について、その全ての構造異性体もまた包含される。

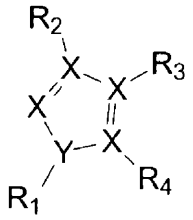
【０１６０】

１．アゾール

本発明のハプテンの第一の一般的クラスは、以下の一般的化学式を有するアゾール、典型的にはオキサゾールおよびピラゾール、さらに典型的にはニトロオキサゾールおよびニトロピラゾールである。

【０１６１】

【化２８】



【０１６２】

この一般式に関して、ｎは０～２、最も典型的には０もしくは１である。Ｒ$_1$～Ｒ$_4$は、ハプテンとしての機能を妨げずそして潜在的に促進する任意の有機基であることができる。さらに特に、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、ならびにその組み合わせから選択される。これらのＲ$_1$～Ｒ$_4$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。Ｒ$_1$～Ｒ$_4$置換基の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基である。Ｒ$_1$～Ｒ$_4$は最も典型的には脂肪族、水素もしくはニトロ基、さらにより典型的にはアルキル、水素もしくはニトロ、そしてなおさらにより典型的には低級（１０個以下の炭素原子）アルキル、水素、ニトロ、またはその組み合わせである。ニトロ基の数は異なることができるが、最も典型的には１もしくは２個のニトロ基がある。Ｘは独立して窒素もしくは炭素である。Ｙは酸素、硫黄もしくは窒素である。Ｙが酸素もしくは硫黄である場合、Ｒ$_1$基は存在せず、そしてｎ＝０。Ｙが窒素である場合、少なくとも１個のＲ$_1$基が存在する。

【０１６３】

２個もしくはそれ以上のＷ基を有する化合物について、その相対位置は可変であることを当業者は認識する。例えば、ジアゾールは１および２位もしくは１および３位で窒素原子を有することができる。さらに、トリアジンでのような、２個より多いヘテロ原子もまた可能である。

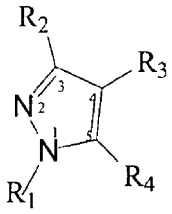
【０１６４】

これらのアゾール化合物のＲ$_1$～Ｒ$_4$の少なくとも１つは、ある他の基に結合されるかもしくは可変官能基である。例えば、例示される化合物は、アゾール環に関して適当な位置のいずれかで担体にもしくはリンカーに直接連結することができる。

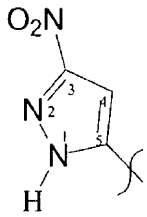
【０１６５】

実用的態様は典型的に、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$の少なくとも１つがニトロ基であり、そして場合によりＲ$_1$～Ｒ$_4$の２つがニトロ基であり、残りのＲ$_1$～Ｒ$_4$がリンカーもしくは担体にハプテンを連結するために用いられるように、モノ－もしくはジニトロピラゾール誘導体で

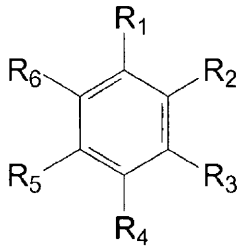
あった。
【０１６６】
【化２９】



【０１６７】
１つの特定の化合物は、以下の構造を有した。
【０１６８】
【化３０】



【０１６９】
２．ニトロアリール
本発明のハプテンの第二の一般的クラスはニトロアリール化合物である。典型的なニトロアリール化合物には、以下の一般的化学式を有する、ニトロフェニル、ニトロビフェニル、ニトロトリフェニルなどおよびありとあらゆるヘテロアリール対応物が包含されるがこれらに限定されるものではない。
【０１７０】
【化３１】



【０１７１】
この一般式に関して、そのような化合物は少なくとも１個のそして場合により複数のニトロ基を有する。従って、R_1～R_6の少なくとも１つはニトロである。R_1～R_6の１つより多くがニトロである場合、複数のニトロ置換基もしくは他の環置換基に対するニトロ置換基の相対的環位置の全ての組み合わせが、開示されるハプテンのこのクラス内に包含される。ジニトロアリール化合物は、最も典型的である。ニトロ基の数が増加するにつれて、一般式における残りの環置換基の数は減少することを当業者は認識する。これらの置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の炭素原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置

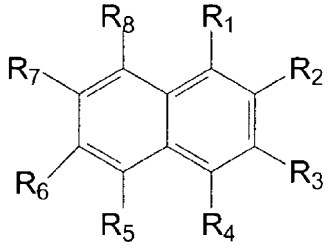
換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、$CH_3-O-N=$）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。R_1～R_6置換基の少なくとも１つはリンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基である。

【０１７２】

R_1～R_6置換基の２つもしくはそれ以上はまた、ナフタレン（以下に示される）もしくはアントラセンタイプ誘導体のような、環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。縮合６－５環系のような、６員環系以外の環系を形成することができる。

【０１７３】

【化３２】



【０１７４】

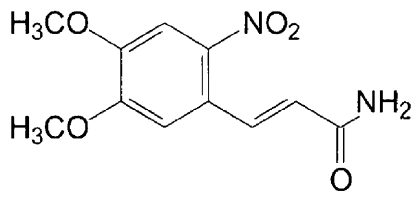
この場合もやはり、R_1～R_8により占められる環位置の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかもしくは担体分子への共有結合によるような連結に適当な可変官能基である。例えば、本発明のニトロアリール化合物は、様々な任意の環位置で、担体へのもしくはリンカーへの連結のための官能基を含むことができる。

【０１７５】

実用的態様は、ニトロフェニル化合物により例示される。単に例として、モノニトロアリール化合物はニトロシンナミド化合物により例示される。ニトロシンナミドに基づく化合物の１つの態様は、以下に示される４，５－ジメトキシ－２－ニトロシンナミドにより例示される。

【０１７６】

【化３３】

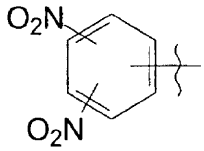


【０１７７】

化合物のニトロフェニルクラスはまた、ジニトロフェニル化合物によっても表される。ニトロ基を有さない環位置の残りの炭素原子の少なくとも１つは官能基に、リンカーにもしくは直接担体に結合される。これらの基の相対位置のありとあらゆる組み合わせは、開示されるハプテンのクラス内に包含される。

【０１７８】

【化３４】

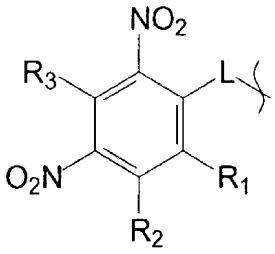


【０１７９】

実用的態様は、以下に例示されるように、リンカーに連結される２，４－ジニトロフェニル化合物によりさらに特に例示される。

【０１８０】

【化３５】



【０１８１】

R_1～R_3は上記のとおりである。

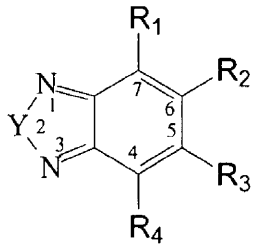
【０１８２】

３．ベンゾフラザン

ベンゾフラザンおよびその誘導体は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。ベンゾフラザンタイプ化合物の一般式は、以下に提供される。

【０１８３】

【化３６】



【０１８４】

R_1～R_4置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホ

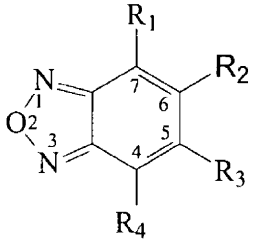
ニル、スルホキシド、エキソメチレン、およびその組み合わせから選択される。これらのＲ$_1$～Ｒ$_4$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。Ｒ$_1$～Ｒ$_4$置換基の少なくとも１つは、リンカーにもしくは直接担体に結合される。Ｙは、Ｒ$_5$およびＲ$_6$置換基を有する炭素原子（ここで、Ｒ$_5$およびＲ$_6$はＲ$_1$～Ｒ$_4$に記載したとおりである）、酸素もしくは硫黄、典型的には酸素である。

【０１８５】

Ｙが酸素である化合物は、以下の構造を有する化合物によりさらに特に例示され、ここで、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$は上記のとおりであり、そして最も典型的には独立して水素および低級アルキルである。

【０１８６】

【化３７】

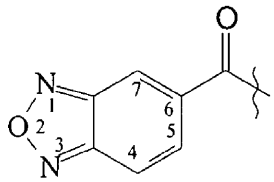


【０１８７】

ハプテンのこのクラスの化合物の１つの実用的態様は、以下の化学構造を有した。

【０１８８】

【化３８】



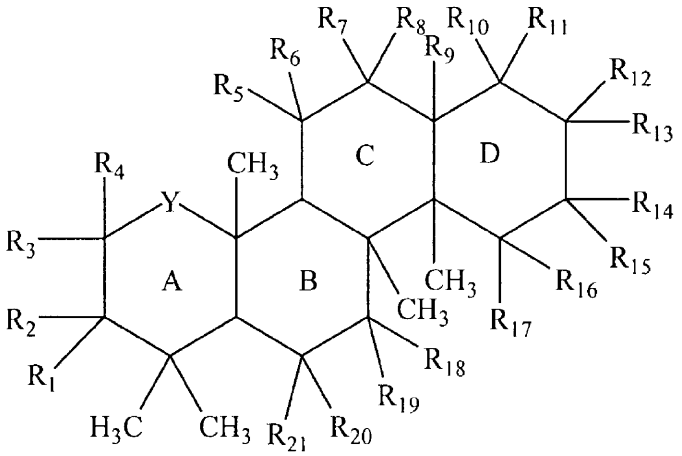
【０１８９】

４．トリテルペン

トリテルペンは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。環式トリテルペンに共通している基本環構造は、以下に示されるように、４つの６員縮合環、Ａ～Ｄを有する。

【０１９０】

【化３９】

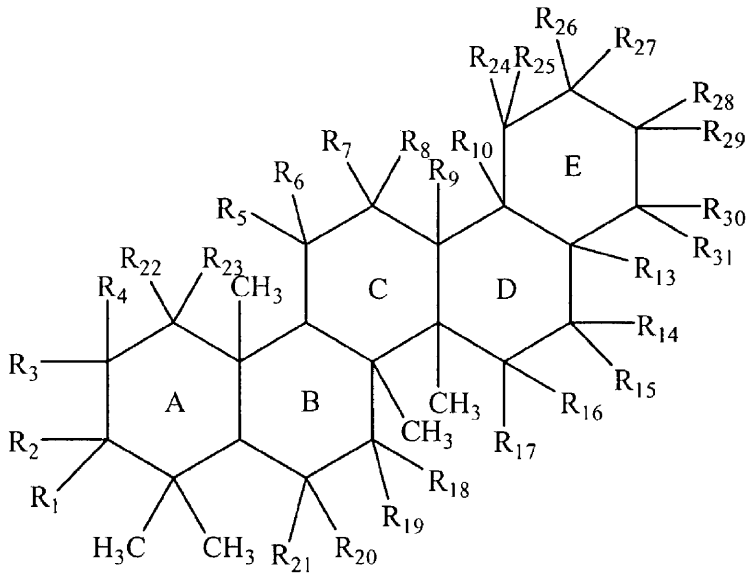


【０１９１】
Ｊ．Ｃ．Ｃｏｎｎｏｌｌｙ ａｎｄ Ｒ．Ａ．Ｈｉｌｌ，Ｔｒｉｔｅｒｐｅｎｏｉｄｓ，Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．Ｒｅｐ．，１９，４９４－５１３（２００２）；Ｂａｇｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｎａｔｕｒａｌ ａｎｄ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｂｅｃｕｌｉｎｉｃ，Ｕｒｓｏｌｉｃ ａｎｄ Ｅｃｈｉｎｏｃｙｓｔｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ａｓ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ａｎｄ Ａｎｔｉ－ＨＩＶ Ａｇｅｎｔｓ，Ｍｉｎｉ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３，５２５－５３９；Ｗ．Ｎ．ａｎｄ Ｍ．Ｃ．Ｓｅｔｚｅｒ，Ｐｌａｎｔ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｔｒｉｔｅｒｐｅｎｏｉｄｓ ａｓ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ，Ｍｉｎｉ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３，５４０－５５６（２００３）；およびＢａｌｔｉｎａ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｌｙｃｙｒｒｈｉｚｉｃ Ａｃｉｄ ａｓ ａ Ｒｏｕｔｅ ｔｏ Ｎｅｗ Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０，１５５－１７１ ９２００３）；（これらの各々は、引用することにより本明細書に組み込まれる）を包含する多数の公開が、本発明を実施するために有用なトリテルペンの属内の天然に存在する、半合成および合成トリテルペン種を説明する。本開示およびその実用的態様、ならびにこれらの先行公開により提供される開示に基づき、そしてこの第一の一般式に関して、$Ｒ_{1}$～$Ｒ_{21}$は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－$ＣＸ_{3}$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、$ＣＨ_{3}$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。これらの$Ｒ_{1}$～$Ｒ_{21}$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。$Ｒ_{1}$～$Ｒ_{21}$置換基の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基である。Ｙはそれによって５員環を定義する結合であるか、もしくは$Ｒ_{22}$および$Ｒ_{23}$置換基を有する炭素原子であり、ここで、これらのＲ基は上記のとおりである。

【０１９２】
ハプテンのこのクラスを例示するトリテルペンの開示される態様にはまた、Ｅ環を包含することもでき、そしてこのＥ環は様々な環サイズのもの、特に環に５～７個の原子、典型的には炭素原子を有する環であることができる。例えば、Ｅ環は、以下の一般式により示されるように、６員環であってもよく、ここで、$Ｒ_{1}$～$Ｒ_{31}$は$Ｒ_{1}$～$Ｒ_{21}$についての上記のとおりである。

【０１９３】

【化４０】

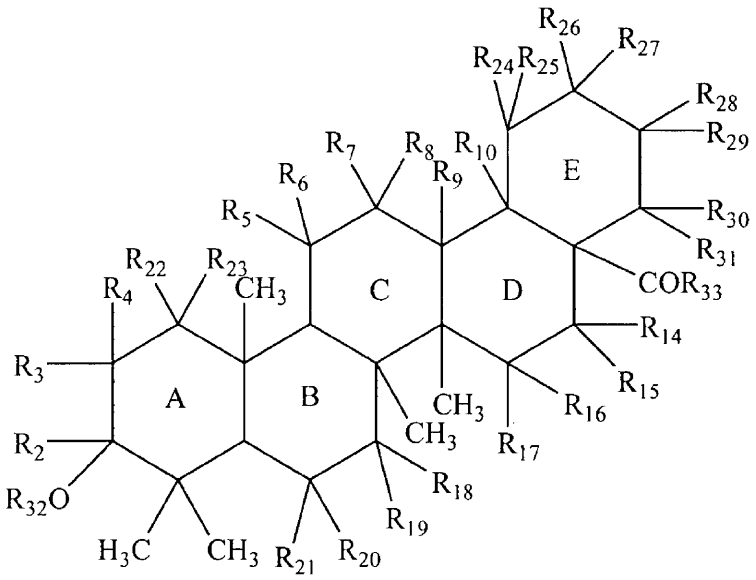


【０１９４】

以下の一般式は、Ｒ１３置換基が、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち、－ＯＲ３４（ここで、Ｒ３４は脂肪族、典型的にはアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）、第一級アミド（－ＮＨ２）、第二級アミド（－ＮＨＲ３５）および第三級アミド（－ＮＲ３５Ｒ３６）（ここで、Ｒ３５およびＲ３６は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルもしくは置換された低級アルキルである）を包含するアミドから選択されるＲ３３置換基を有するアシル基であることができることを示す。この一般式はまた、Ｒ１置換基がＯＲ３２置換基、（ここで、Ｒ３２は水素もしくは脂肪族、より典型的にはアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）であることが多いことも示す。残りのＲ基は、第一の一般式に関して上に記載したとおりである。

【０１９５】

【化４１】

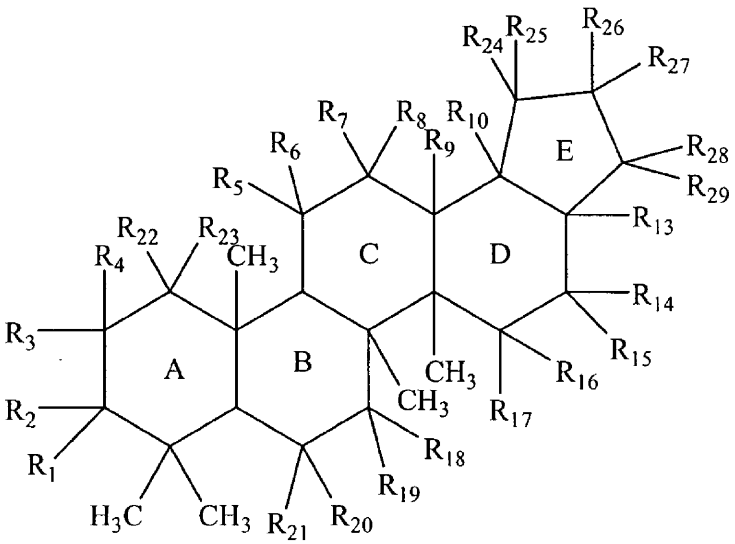


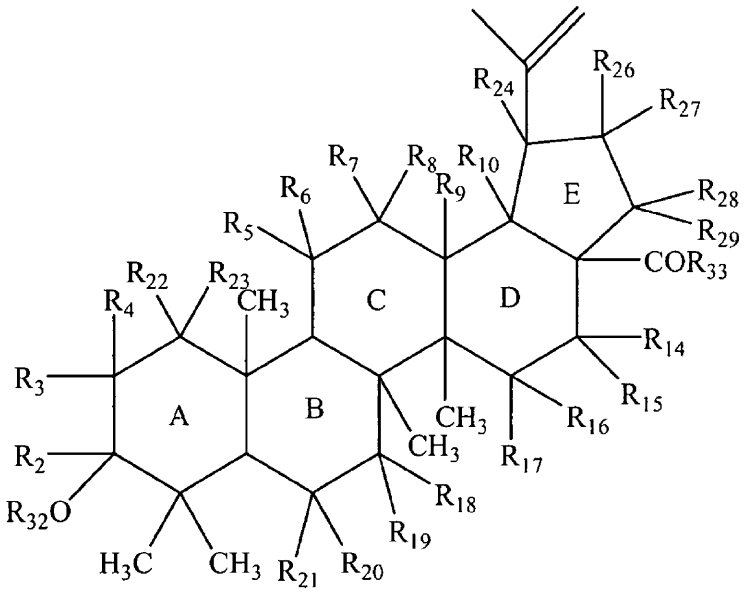
【０１９６】

Ｅ環はまた、以下の式により示されるように、５員環であることもでき、ここで、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{29}$基はＲ$_{1}$～Ｒ$_{21}$についての上記のとおりである。

【０１９７】

【化４２】





【０１９８】

これらの一般式に関して、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{29}$基はＲ$_{1}$～Ｒ$_{21}$についての上記のとおりである。

【０１９９】

Ｅ環が６員環である典型的な化合物のように、Ｅ環が５員環である化合物もまた上記に説明したようにＲ$_{1}$およびＲ$_{13}$で置換基を含むことができる。特に、この一般式は、Ｒ$_{13}$置換基が、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち、－ＯＲ$_{34}$（ここで、Ｒ$_{34}$は脂肪族、典型的にはアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）、第一級アミド（－ＮＨ$_{2}$）、第二級アミド（－ＮＨＲ$_{35}$）および第三級アミド（－ＮＲ$_{35}$Ｒ$_{36}$）（ここで、Ｒ$_{35}$およびＲ$_{36}$は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルもしくは置換された低級アルキルである）を包含するアミドから選択されるＲ$_{33}$置換基を保有するアシル基であることができることを示す。この一般式はまた、Ｒ$_{1}$置換基がＯＲ$_{32}$置換基（ここで、Ｒ$_{32}$は水素もしくは脂肪族、より典型的に

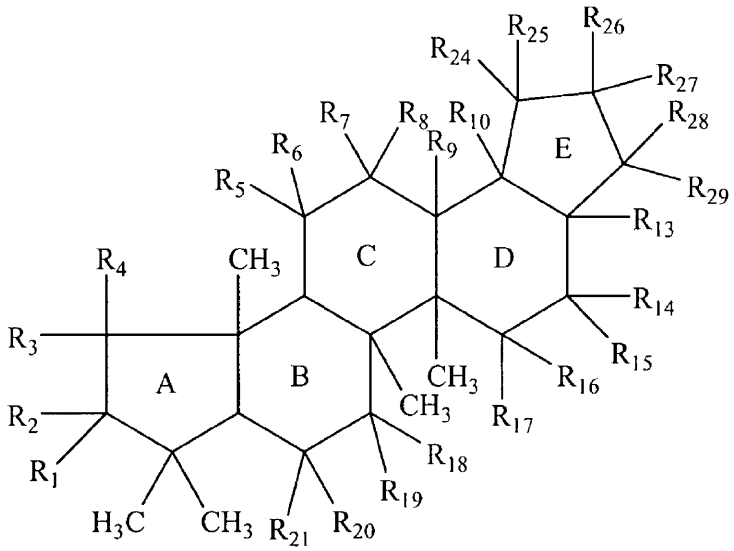
はアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）であることが多いことも示す。

【０２００】

典型的な化合物はまた、ＡおよびＥ環の両方として５員環も含む。そのような典型的な化合物の一般式は以下に提供され、ここで、R_1～R_{29}置換基は上記のとおりである。

【０２０１】

【化４３】

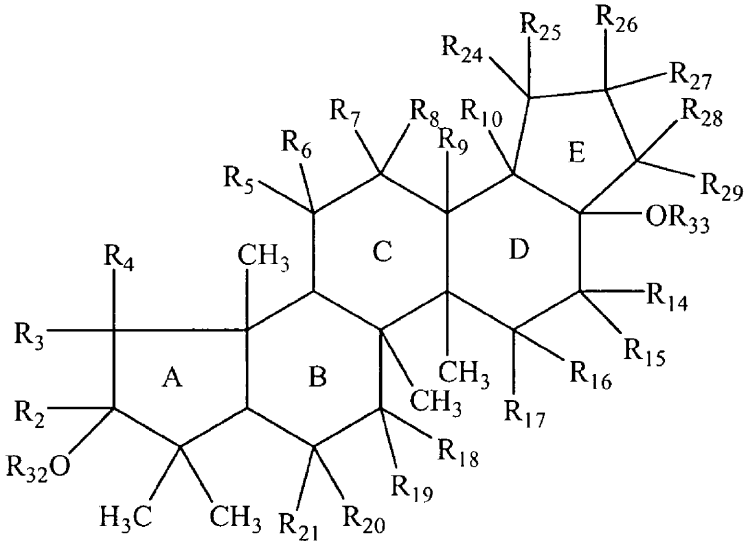


【０２０２】

この場合もやはり、R_1およびR_{13}置換基は酸素に基づく官能基であることができる。R_{13}置換基は、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち、－OR_{34}（ここで、R_{34}は脂肪族、典型的にはアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）、第一級アミド（－NH_2）、第二級アミド（－NHR_{35}）および第三級アミド（－$NR_{35}R_{36}$）（ここで、R_{35}およびR_{36}は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルもしくは置換された低級アルキルである）を包含するアミドから選択されるR_{33}置換基を有するアシル基であることができる。この一般式はまた、R_1置換基がOR_{32}置換基（ここで、R_{32}は水素もしくは脂肪族、より典型的にはアルキルもしくは置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルである）であることが多いことも示す。

【０２０３】

【化４４】

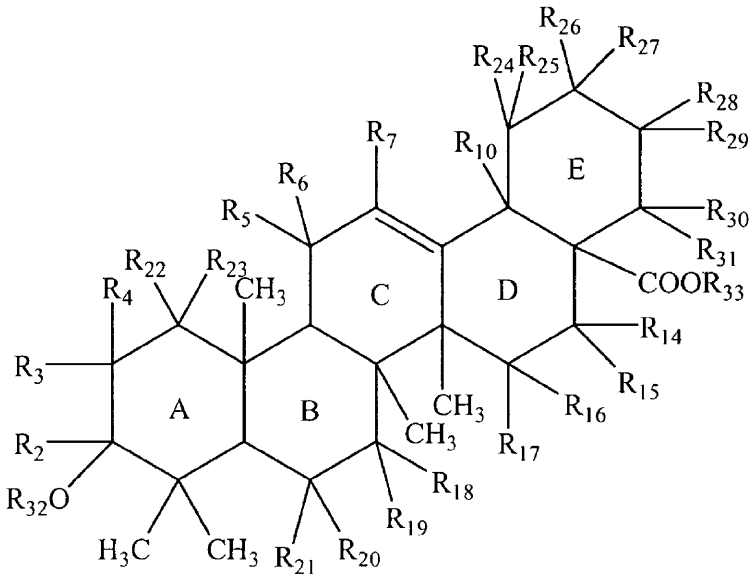


【０２０４】

本発明の典型的なトリテルペンはまた、Ａ～Ｅ環の１つもしくはそれ以上において１つもしくはそれ以上の不飽和部位を含むこともできる。典型的な化合物は、以下に示されるようなＣ環における二重結合のようなＣ環における少なくとも１つの不飽和部位を有することが多い。

【０２０５】

【化４５】

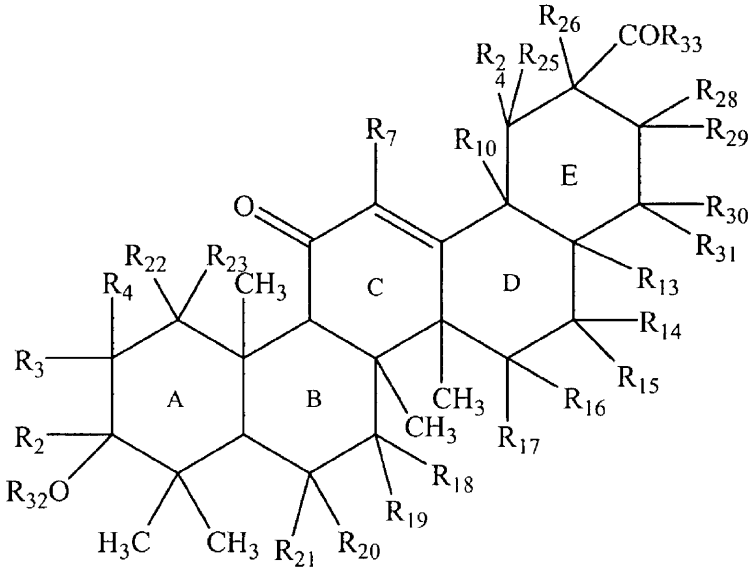


【０２０６】

不飽和部位は、Ｃ環について以下に例示されるようなアルファ、ベータ不飽和ケトンであることができる。

【０２０７】

【化４６】



【０２０８】

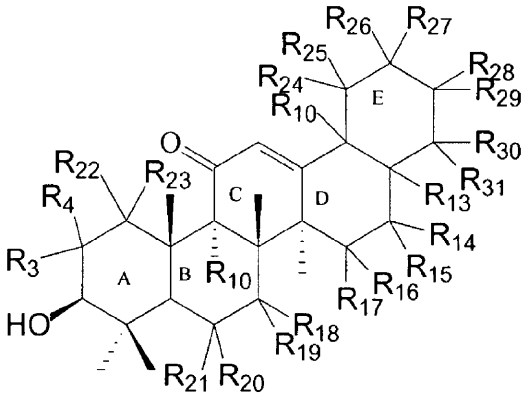
トリテルペンはまた、多数のステレオジェン炭素原子も有する。特定の鏡像異性体は天然に存在する可能性が最も高いことを当業者は認識する。天然に存在する鏡像異性体は最も利用可能でありそして／もしくは有効であり得るが、開示される態様を実施するために、全ての他の可能な立体異性体が本発明の範囲内である。さらに、他の天然に存在するトリテルペンもしくはその合成誘導体もしくは完全に合成の化合物は、（１）異なる立体化学、（２）異なる置換基を有することができ、そしてさらに天然に存在する化合物において置換されない位置で置換されることができる。上記に提供される一般式は、キラル中心での立体化学を示さない。これは、各キラル中心での両方の鏡像異性体およびその全てのジアステレオマー異性体の組み合わせが本発明の範囲内であることを表すためである。

【０２０９】

本発明の特定の実用的態様は以下の一般式により例示され、ここで、置換基は上記のとおりである。

【０２１０】

【化４７】

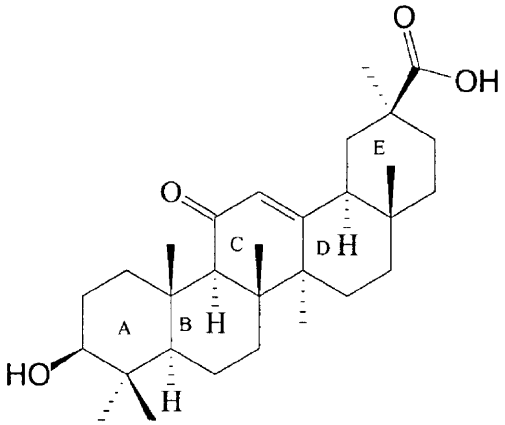


【０２１１】

本発明を実施するためにハプテンとして有用な天然に存在するトリテルペンの立体化学および置換基を以下に示す。

【０２１２】

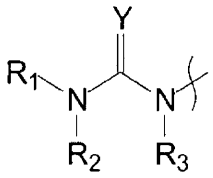
【化４８】



【０２１３】
Ａ環におけるヒドロキシル基は、典型的には、実用的態様においてカルボニル官能基に酸化される。結果として、カルボニル基を保有する炭素原子は、もはやキラル中心ではない。

【０２１４】
５．尿素およびチオ尿素
尿素およびチオ尿素、特にアリールおよびヘテロアリール尿素およびチオ尿素は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。本発明の尿素に基づくハプテンの一般式は、以下に提供される。

【０２１５】
【化４９】

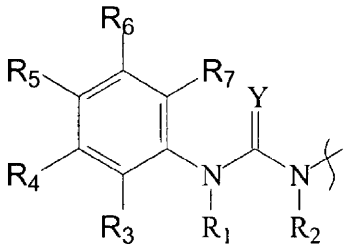


【０２１６】
この一般式に関して、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は独立して水素、脂肪族、置換された脂肪族、典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルおよび置換された低級アルキル、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである。さらに特に、Ｒ$_1$は典型的には、発色活性を促進するために少なくとも１つの不飽和部位を有することが多い、アリールもしくは脂肪族である。Ｒ$_2$およびＲ$_3$は最も典型的には独立して水素および低級アルキルである。Ｙは酸素（尿素誘導体）もしくは硫黄（チオ尿素）である。

【０２１７】
アリール誘導体は典型的に以下の式を有する。

【０２１８】

【化５０】



【０２１９】

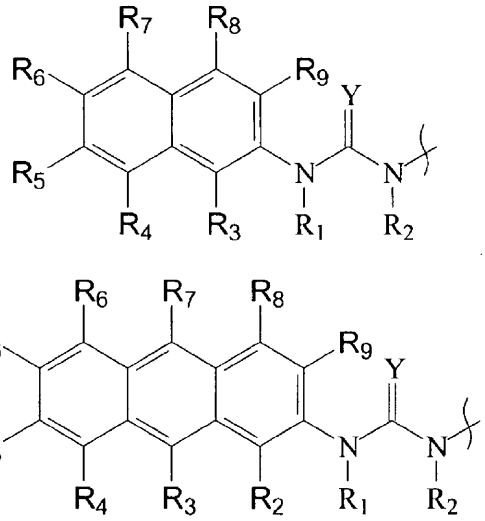
Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{7}$は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_{3}$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_{3}$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。Ｒ$_{3}$～Ｒ$_{7}$置換基の少なくとも１つはまた、リンカーにもしくは担体分子に結合される。そのような結合に利用可能であるこれらのＲ$_{3}$～Ｒ$_{7}$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。

【０２２０】

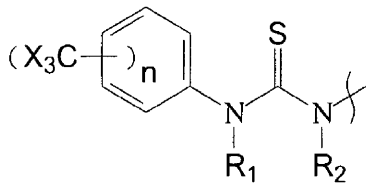
以下に提供される典型的構造により示されるように、さらなる環が存在することもできる。Ｒ基はＲ$_{1}$～Ｒ$_{7}$についての上記のとおりであり、そしてＹは酸素もしくは硫黄である。

【０２２１】

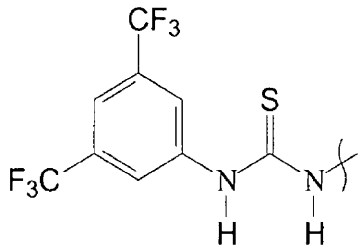
【化５１】



【０２２２】
チオ尿素の特定のサブクラスは、以下に表される。
【０２２３】
【化５２】

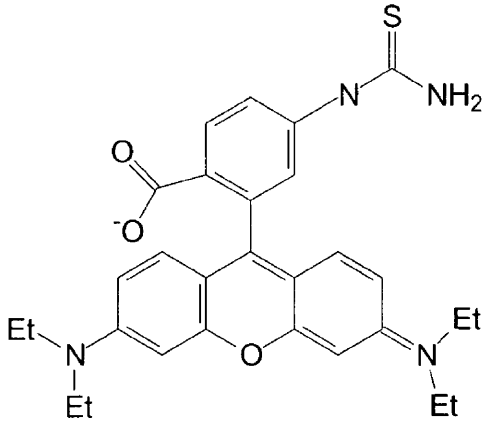


【０２２４】
この一般式に関して、ｎは１～５、典型的には１～２であり、Ｒ$_1$およびＲ$_2$は独立して水素もしくは低級アルキルであり、そしてＸは独立してハロゲン化物もしくは異なるハロゲン化物の組み合わせである。
【０２２５】
フェニルチオ尿素の実用的態様の一例は、以下に提供される。
【０２２６】
【化５３】



【０２２７】
トリフルオロメチル基は、チオ尿素部分に対して２および４位において示される。２，３のような、ジ置換された化合物の全ての相対的位置を有する化合物、およびそのような複数のトリハロアルキル置換基の全ての可能な相対位置で、２つより多くのトリハロアルキル置換基を有する化合物もまた、本発明の範囲内であることを当業者は認識する。ローダミンチオ尿素ハプテンの特定の例は、以下の式を有する。
【０２２８】

【化５４】



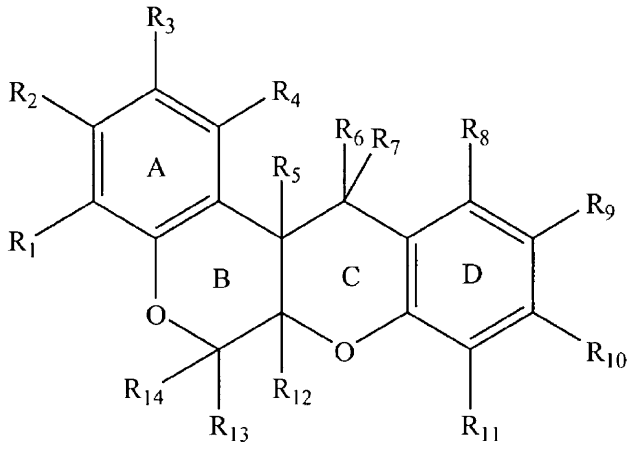
【０２２９】

６．ロテノン

まとめてロテノイドと呼ばれる、ロテノンおよびロテノンに基づくハプテンは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。ロテノンおよびロテノンに基づくハプテンの第一の一般式は、以下に提供される。

【０２３０】

【化５５】



【０２３１】

Ｌｅｓｌｉｅ Ｃｒｏｍｂｉｅ ａｎｄ Ｄｏｎａｌｄ Ｗｈｉｔｉｎｇ，Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｒｏｔｅｎｏｉｄｓ Ｇｒｏｕｐ ｏｆ Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｓｏｔｏｐｅ Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ，Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４９，１４７９－１５０７（１９９８）；およびＮｉａｎｂａｉ Ｆａｎｇ，ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｃａｓｉｄａ，Ｃｕｂｅ Ｒｅｓｉｎ Ｉｎｓｅｃｔｉｃｉｄｅ：Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｂｉｏｌｇｏｉｃａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ２９ Ｒｏｔｅｎｏｉｄ Ｃｏｎｓｔｉｔｕｅｎｔｓ；（これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる）を包含する多数の公開は、本発明を実施するために有用なロテノイドの属を記述するために有用である天然に存在する、半合成および合成ロテノイドを説明する。本開示および実用的態様、ならびにこれらの先行公開により提供される開示に基づき、そしてこの第一の一般式に関して、R_1～R_{14}は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、

Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート（および第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩）、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環式、複素環式、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、ならびにその組み合わせである。これらのR_1～R_{14}置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。R_1～R_{14}置換基の少なくとも１つはまた、リンカーにもしくは担体分子に結合される。

【０２３２】

R_6およびR_7は上記のとおりであることができるが、そのような置換基はより典型的には独立して水素、OR_{15}（ここで、R_{15}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルおよび置換された低級アルキル、例えばハロゲン化低級アルキル、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）、$-NR_{21}$（ここで、R_{21}は水素、脂肪族、置換された脂肪族、典型的にはアルキル、置換されたアルキル、そしてさらにより典型的には低級アルキルおよび置換された低級アルキル、例えばハロゲン化低級アルキル、環式、複素環式、アリールおよびヘテロアリールである）もしくはＮ－Ｌ－ＲＧ（ここで、Ｌは、本明細書においてより詳細に説明されるように、リンカーもしくは反応性基、例えばアミンである）である。

【０２３３】

R_6およびR_7はまた、カルボニルを形成するための酸素への二重結合のような二重結合を形成することもできる。R_6および／もしくはR_7が－Ｌ－ＲＧでない場合、Ｒ置換基の少なくとも１つはリンカーにもしくは担体分子に結合される。

【０２３４】

Ｂ環はまた、少なくとも１つのさらなる不飽和部位を含むこともできる。例えば、R_5およびR_{12}は二重結合を形成することができる。

【０２３５】

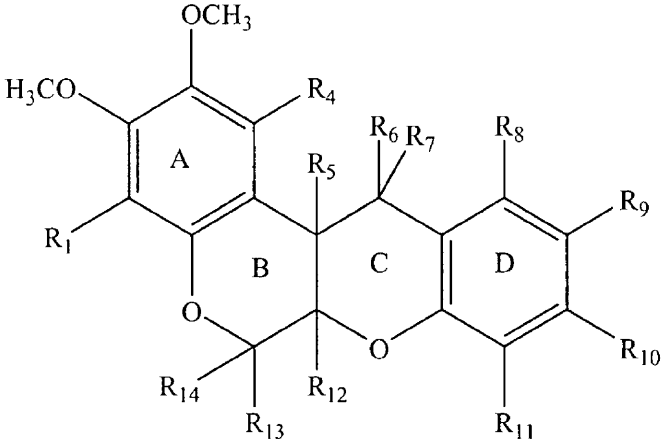
R_{10}およびR_{11}は、５もしくは６員環において連結されることができる。例えば、R_{10}およびR_{11}はピランもしくはフラン環を定義することができ、そしてさらに特に置換されたそして／もしくは不飽和のピランもしくはフラン環である。

【０２３６】

本発明のある典型的なロテノンに基づくハプテンはまた、典型的に以下の第二の一般式も満たす。

【０２３７】

【化５６】



【０２３８】

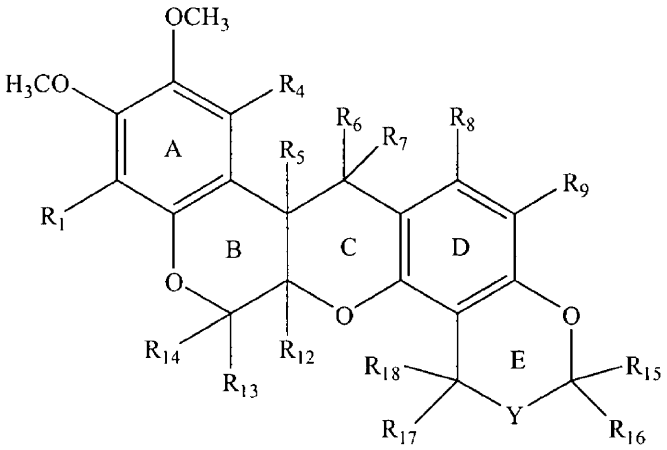
この第二の一般式に関して、Ｒ置換基は上記のとおりである。Ｒ$_{6}$もしくはＲ$_{7}$が－Ｌ－ＲＧでない場合、残りのＲ基の少なくとも１つはリンカーにもしくは担体に結合される。

【０２３９】

Ｒ$_{10}$およびＲ$_{11}$は、ピランもしくフランのような５もしくは６員環、そしてさらに特に置換されたそして／もしくは不飽和のピランもしくはフラン環において連結されることができる。従って、本発明のあるロテノンに基づくハプテンを表すために有用な第三の一般式は以下に提供され、ここで、Ｒ置換基は上記のとおりである。

【０２４０】

【化５７】

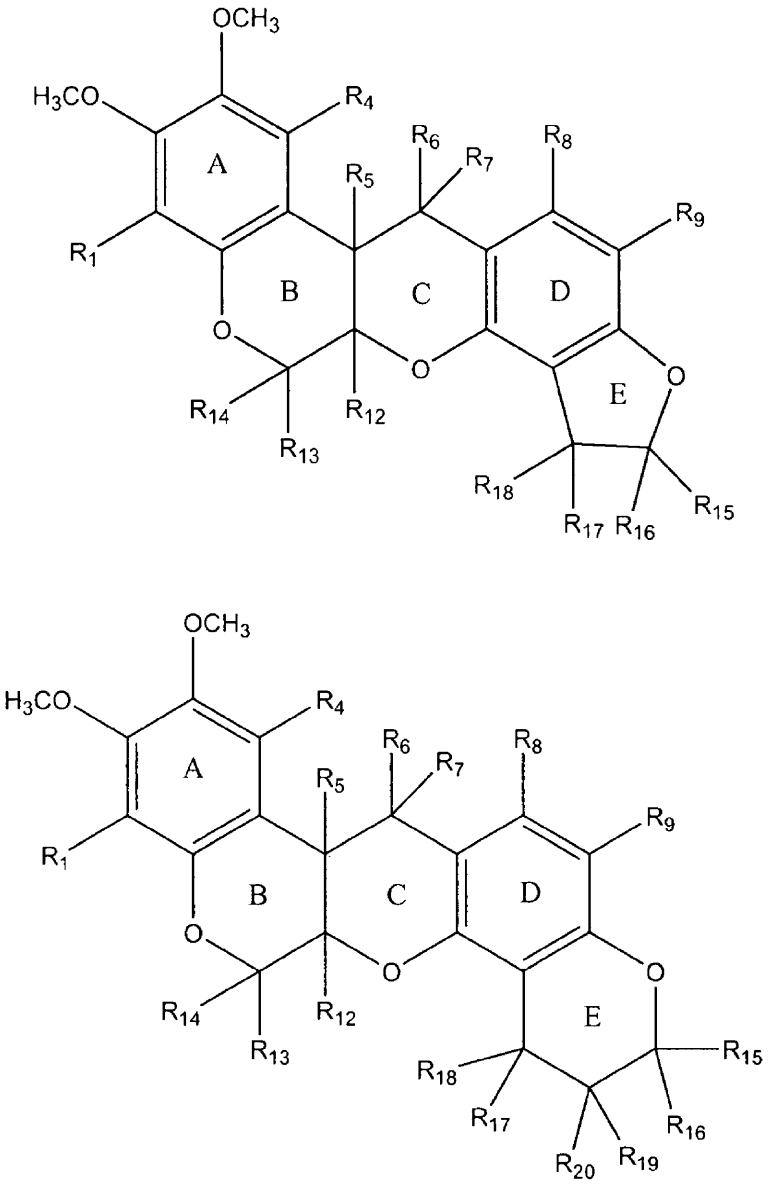


【０２４１】

Ｙは、以下に示されるように、それによって５員環を定義する結合であるか、もしくはＲ$_{19}$およびＲ$_{20}$置換基を保有する６員環における炭素原子であり、ここで、これらのＲ置換基は上記のとおりである。

【０２４２】

【化５８】



【０２４３】

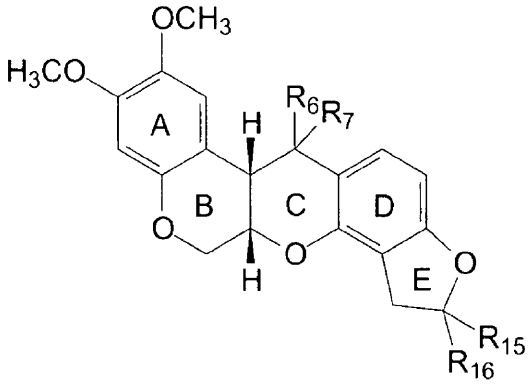
環連結でのＲ５およびＲ１２は、特定の立体化学を表さずに示される。天然に存在する化合物はシス環連結を有するが、ラセミ混合物もまた本発明を実施するために有用である。また、トランス立体異性体は迅速に平衡化してラセミ混合物を生成せしめるようである。

【０２４４】

このクラス内の化合物の実用的態様は、より典型的には以下の第三の一般式を満たす。

【０２４５】

【化５９】

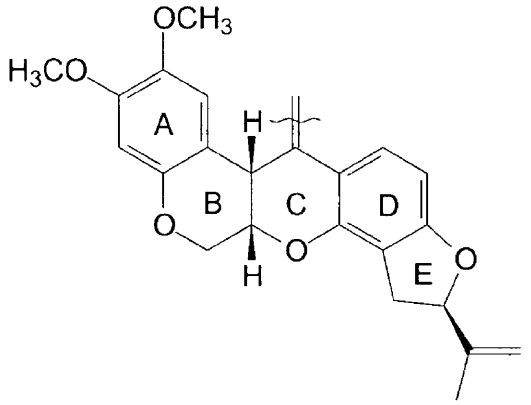


【０２４６】

この一般式に関して、Ｒ$_{6}$およびＲ$_{7}$は水素、アルキルであるか、もしくはカルボニルを形成するための酸素へのような二重結合を定義する。Ｒ$_{15}$およびＲ$_{16}$は独立して水素および脂肪族、典型的には低級脂肪族、例えばアルケニルであり、その一例は、以下に示されるように、イソプレンである。

【０２４７】

【化６０】



【０２４８】

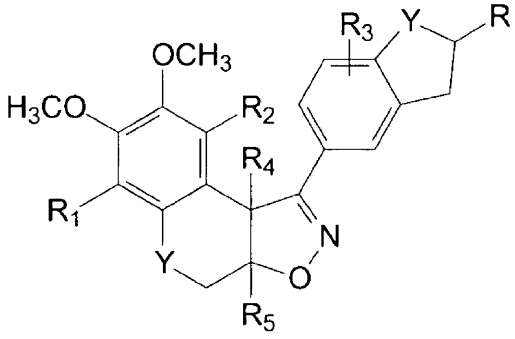
この場合もやはり、特定の鏡像異性体が上記の式において示されるが、本発明の範囲は示される特定の鏡像異性体に限定されないことを当業者は認識する。代わりに、ハプテンとして働く全ての立体異性体もまた本開示の範囲内である。このクラスの化合物について上記に説明される全ての置換は、この特定の化合物に適用される。他の置換もまた、当業者に容易に明らかである。例えば、Ａ環上のメトキシ基は任意のアルコキシ化合物、特に低級アルコキシ基であることができる。イソプレン単位はまた、おそらくはリンカーもしくは担体分子にハプテンを連結するための代替位置もしくは少なくとも第二の位置を提供するために、合成的に改変することができるオレフィンも提供する。例えば、オレフィンはヒドロホウ素化によりアルコールに転化することができる。それはまた、ハプテンとしてもしくはさらなる転化に有用な中間体としての使用のためのハロゲン化物もしくはエポキシドに転化することもできる。

【０２４９】

本発明のロテノンに基づくハプテンを表す第四の一般式は、特に、以下に提供されるように、ロテノンイソオキサゾリンに関する。

【０２５０】

【化６１】



【０２５１】

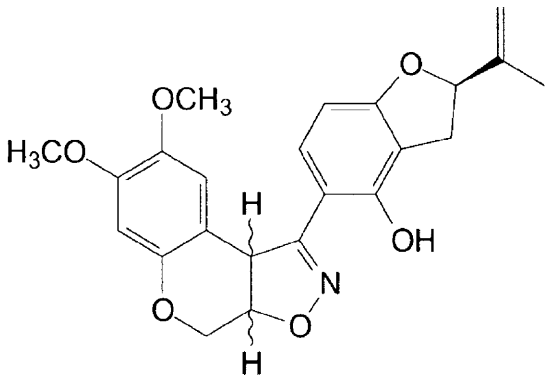
Ｒ～Ｒ$_5$は独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、イソプレンのような全ての分枝鎖状異性体および全ての立体異性体を包含する、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート（および第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩）、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環式、複素環式、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、ならびにその組み合わせである。Ｒ～Ｒ$_5$置換基の少なくとも１つはまた、リンカーにもしくは担体分子に結合される。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄である。

【０２５２】

この第四の一般式を満たすロテノンに基づくハプテンの特定の実用的態様は、以下に提供される。

【０２５３】

【化６２】



【０２５４】

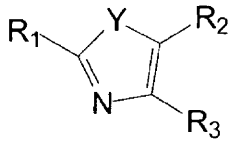
７．オキサゾールおよびチアゾール

オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドの一般式は、以下に提供

される。

【０２５５】

【化６３】



【０２５６】

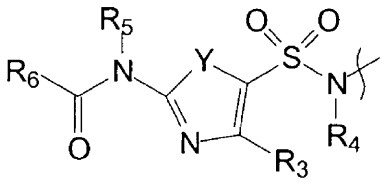
この第一の一般式に関して、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。これらのＲ$_1$～Ｒ$_3$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。Ｒ$_1$～Ｒ$_3$置換基の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基である。Ｙは酸素もしくは硫黄、典型的には硫黄である。

【０２５７】

ある典型的な実用的態様について、Ｒ$_1$は以下に示されるアミド誘導体のようなアミドであった。Ｒ$_1$およびＲ$_2$により示される位置もまた、リンカーおよび／もしくは担体分子への連結のための代替もしくは追加の位置を提供するが、Ｒ$_2$はリンカーへのもしくは担体分子への連結のための位置を提供する。Ｒ$_2$は、ある実用的態様について、－ＳＯ$_2$であり、そしてスルホンアミドを形成することによりリンカーを連結するために用いられている。従って、このクラスのハプテンを例示するハプテンの実用的態様の第二の一般式は以下に示され、ここで、Ｒ$_3$～Ｒ$_6$置換基およびＹは上記のとおりである。

【０２５８】

【化６４】



【０２５９】

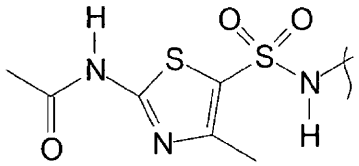
ある実用的態様について、Ｒ$_6$はアルキル、特に低級アルキル、例えばメチルであり、そしてＹは硫黄であった。

【０２６０】

このクラスのハプテンの化合物の１つの実用的態様は、以下の化学構造を有した。

【０２６１】

【化６５】

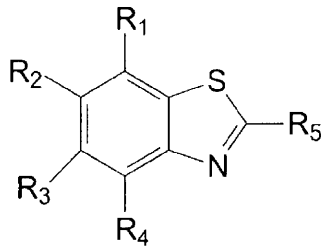


【０２６２】

チアゾールもしくはオキサゾールはまた、より大きい環系の一部であってもよい。例えば、５員のオキサゾールもしくはチアゾールは、以下に示されるように、フェニル環のような少なくとも１つのさらなる環に連結されていてもよい。

【０２６３】

【化６６】

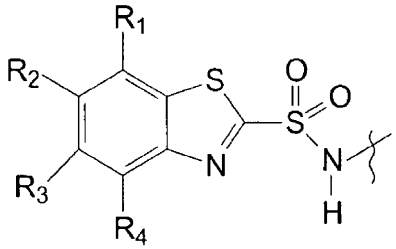


【０２６４】

Ｒ$_1$～Ｒ$_5$基は一般に上記のとおりであることができるが、そのような化合物はまた、Ｒ$_5$のような、リンカーへのそして／もしくは担体分子への連結のための位置も提供する。１つの可能なスルホンアミド誘導体は、以下に提供される。

【０２６５】

【化６７】



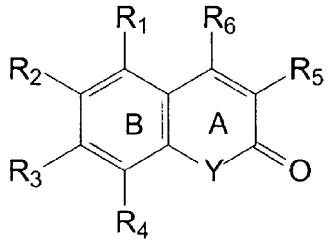
【０２６６】

８．クマリン

クマリンおよびクマリン誘導体は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。クマリンおよびクマリン誘導体の一般式は、以下に提供される。

【０２６７】

【化６８】

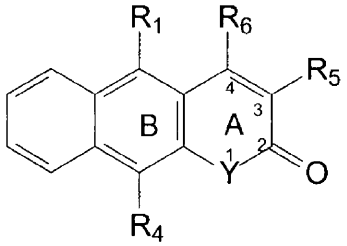


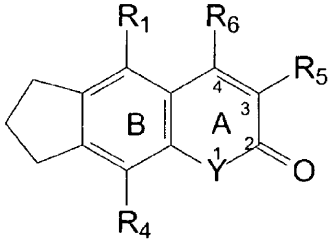
【０２６８】

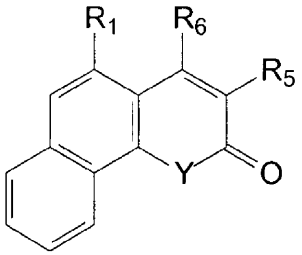
この一般式に関して、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－ＣＸ$_3$、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、ＣＨ$_3$－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。Ｒ$_1$～Ｒ$_6$置換基の少なくとも１つはまた、典型的にはリンカーもしくは担体分子に結合される。ある実用的態様は、リンカーもしくは担体分子への連結にＲ$_5$置換基を有するとして示される位置を使用している。これらの化合物を検出するために蛍光が使用される場合、４位は重要であり得る。４位で水素以外の置換基は、そのような誘導体はなお発色団であり得るが、蛍光をクエンチすると考えられる。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄である。そのような化合物を形成するために利用可能であるＲ$_1$～Ｒ$_6$置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。これらのタイプの化合物の典型的態様は、以下に提供される。

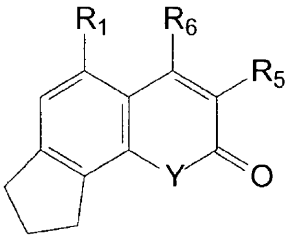
【０２６９】

【化６９】









【０２７０】

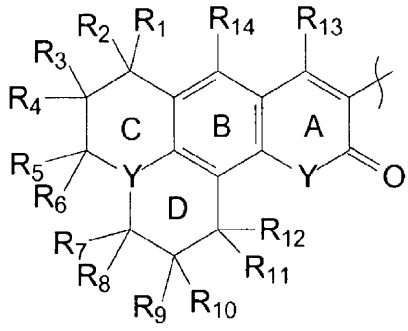
これらの環はまた複素環式および／もしくはヘテロアリールであることもできることを当業者は認識する。

【０２７１】

実用的態様は典型的には少なくとも１つの担体分子連結位置を有する縮合Ａ～Ｄ環系であり、１つの可能な連結位置は以下に示される。

【０２７２】

【化７０】

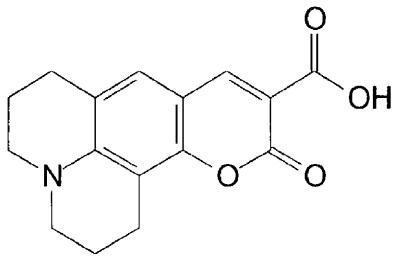


【０２７３】

この一般式に関して、ＲおよびＹ変記号基は上記のとおりである。最も典型的には、Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{14}$は独立して水素もしくは低級アルキルである。クマリンに基づくハプテンの特定の態様には、２，３，６，７－テトラヒドロ－１１－オキソ－１Ｈ，５Ｈ，１１Ｈ－［１］ベンゾピラノ［６，７，８－ｉｊ］キノリジン－１０－カルボン酸

【０２７４】

【化７１】

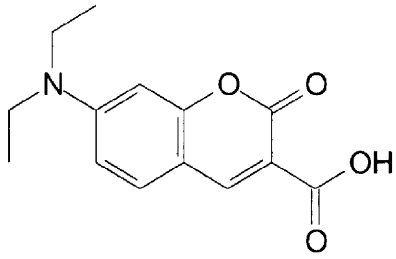


【０２７５】

およびジエチルクマリン

【０２７６】

【化７２】



【０２７７】

が包含される。

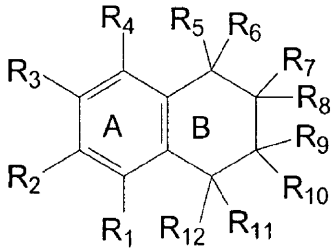
【０２７８】

９．シクロリグナン

リグニンに基づく化合物、特にシクロリグナン、例えばポドフィロトキシンおよびその誘導体は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。これらのシクロリグニンに基づく誘導体の第一の一般式は、以下に提供される。

【０２７９】

【化７３】



【０２８０】

Ｓｔｅｐｈａｎｉｅ Ｄｅｓｂｅｎｅ ａｎｄ Ｓｙｌｖｉａｎｅ Ｇｉｏｒｇｉ－Ｒｅｎａｕｌｔ，Ｄｒｕｇｓ ｔｈａｔ Ｉｎｈｉｂｉｔ Ｔｕｂｕｌｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ｔｈｅ Ｐａｒｔｉｃｕａｒ Ｃａｓｅ ｏｆ Ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ，Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．－Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ａｇｅｎｔｓ，２，７１－９０（２００２）；Ｍ．Ｇｏｒｄａｌｉｚａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ：Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ，Ｓｏｕ

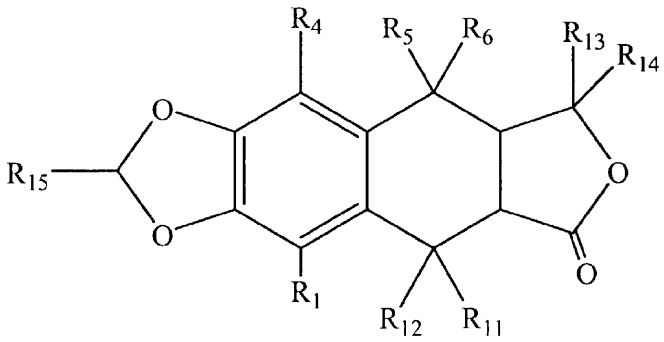
rces, Applications and New Cytotoxic Derivatives, Toxicon, 44, 441－459（2004）；Phillipe Meresse et al., Etoposide：Discovery and Medicinal Chemistry, Current Medicinal Chemistry, 11, 2443－2466（2004）；M. Pujol et al., Synthesis and Biological Activity of New Class of Dioxygenated Anticancer Agents, Curr. Med. Chem. －Anti－Cancer Agents, 5, 215－237（2005）；およびYoungjae You, Podophyllotoxin Derivatives：Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents、Current Pharmaceutical Design、11, 1695－1717（2005）；（これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる）を包含する多数の公開は、本発明を実施するために有用なシクロリグナンの属を記述するために有用である天然に存在する、半合成および合成シクロリグナンを説明する。本開示および実用的態様、ならびにこれらの先行公開により提供される開示に基づいて、そしてこの第一の一般式に関して、R_1～R_{12}は典型的には水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、例えばイソプレン、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（－ＣＮ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート（および第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩）、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環式、複素環式、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、ならびにその組み合わせから選択される。R_1～R_{12}の少なくとも１つは、リンカーにもしくは担体分子に化合物を連結するための位置を提供する。さらに、Ｒ基のあるものは環系における原子であることができる。例えば、R_2およびR_3、ならびにR_7～R_{10}の２つは環系において一緒に連結されることができる。R_{12}およびR_{11}の少なくとも１つは、ベンゼン環もしくは置換されたベンゼン環のようなアリール基であることも多い。

【０２８１】

ある実用的態様はまた以下の第二の一般式も満たし、ここで、Ｒ置換基は上記のとおりである。

【０２８２】

【化７４】

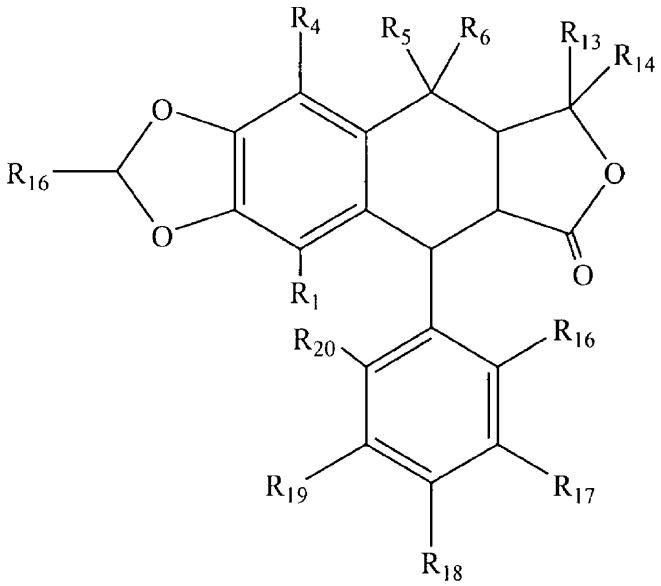


【０２８３】

Ｒ１１およびＲ１２の少なくとも１つがアリール基である典型的な化合物は以下の一般式を有し、ここで、Ｒ置換基は上記のとおりである。

【０２８４】

【化７５】

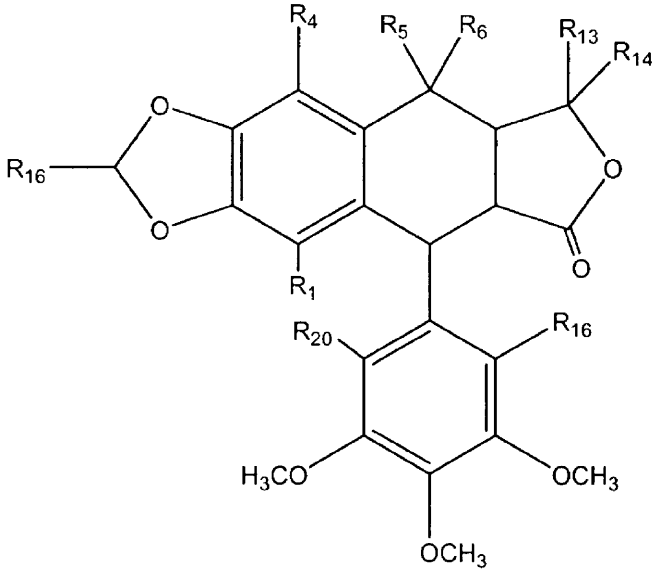


【０２８５】

Ｒ１６～Ｒ２０は一般に上記のとおりであるが、より典型的には独立して水素もしくはアルコキシ、典型的には以下に示されるようにメトキシのような低級アルコキシである。

【０２８６】

【化７６】



【０２８７】

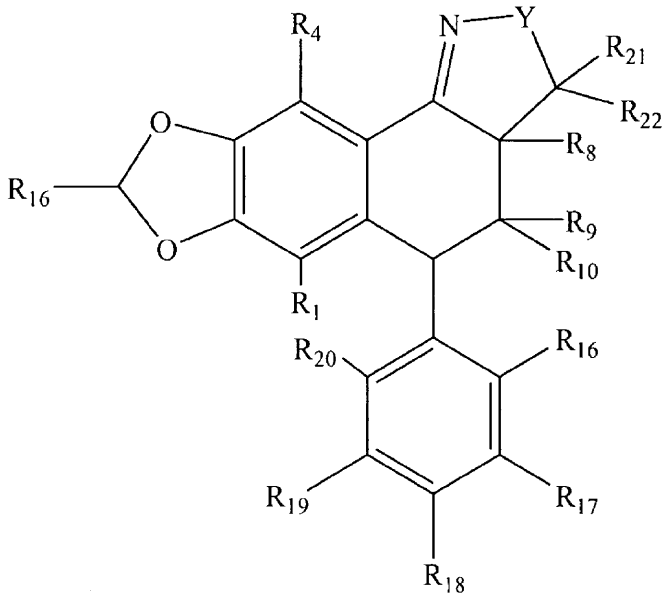
Ｒ置換基の少なくとも１つは典型的にはリンカーに結合されるか、リンカーと反応することができる反応性官能基であるか、もしくは－Ｌ－ＲＧである。例えば、Ｒ$_5$は－Ｌ－ＲＧであることが多い。

【０２８８】

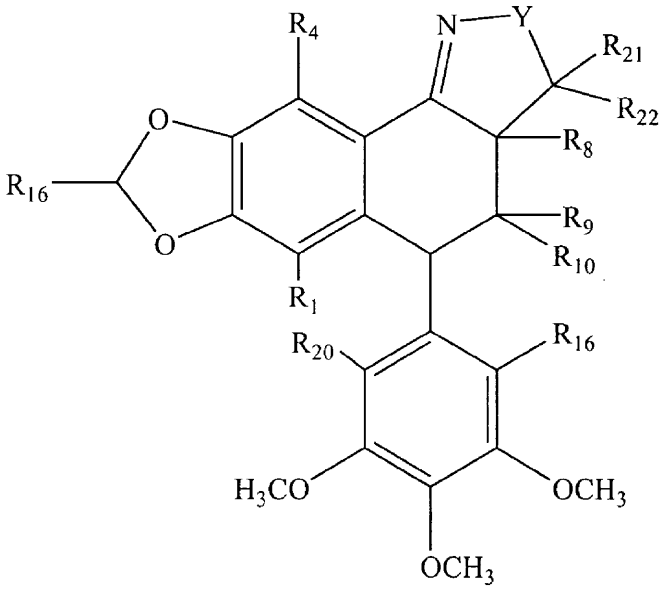
Ｒ$_5$およびＲ$_6$はまた、カルボニル官能基を形成するための酸素への二重結合もしくはイミンを形成するための窒素原子への二重結合のような二重結合を形成することもできる。Ｒ$_5$およびＲ$_6$が二重結合を形成するある典型的な化合物は以下の一般式を有し、ここで、残りのＲ置換基は上記のとおりである。Ｙは窒素、酸素もしくは硫黄から選択される。Ｙが窒素である場合、該窒素原子はそれに水素、または水素以外のある原子、官能基もしくは化学部分をさらに結合していることができる。例えば、窒素はアルキル基のような脂肪族置換基、アリールもしくはヘテロアリール置換基、またはアルキルおよび／もしくはアルコキシ置換されたアリールもしくはヘテロアリール置換基のような置換されたアリールもしくはヘテロアリール置換基を有することができる。

【０２８９】

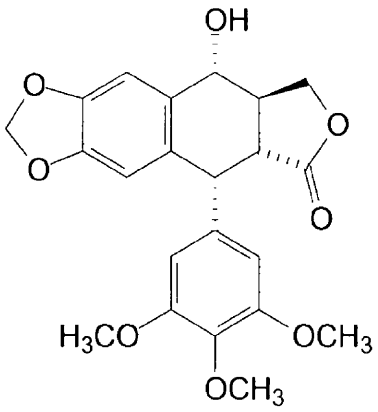
【化７７】



【０２９０】
Ｒ１６～Ｒ２０は独立して水素およびアルコキシ、より典型的には以下に示されるようにメトキシのような低級アルコキシから選択される。
【０２９１】
【化７８】

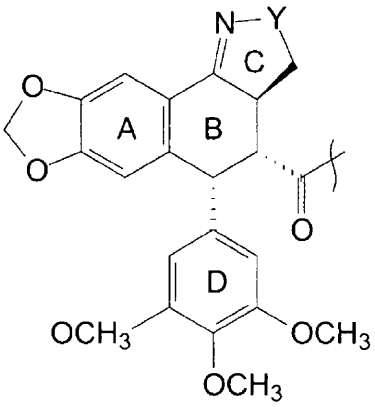


【０２９２】
本発明の全てのハプテンコンジュゲートのように、Ｒ置換基の少なくとも１つは典型的にはリンカーに結合されるか、リンカーと反応することができる反応性官能基であるか、－Ｌ－ＲＧであるか、もしくは担体に直接結合される。例えば、Ｒ９は－Ｌ－ＲＧであることが多い。
【０２９３】
ハプテンのこのシクロリグナンクラスを例示する化合物、ポドフィロトキシンの化学構造は、以下に提供される。
【０２９４】
【化７９】

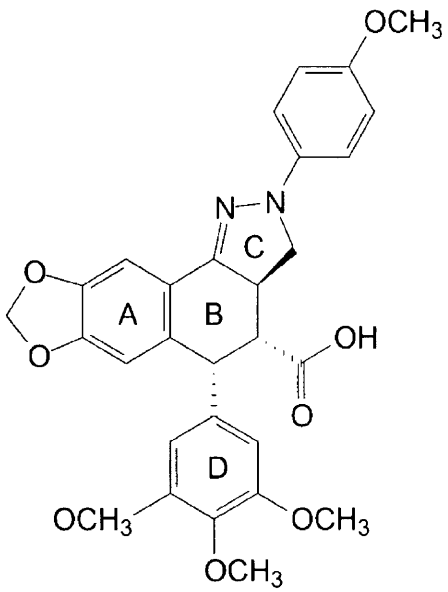


【０２９５】
ポドフィロックスとも呼ばれるポドフィロトキシンは、４１４．４０の分子量およびＣ２２Ｈ２２Ｏ８の組成式を有する非アルカロイド毒素である。ポドフィロトキシンは、アメリカメイアップル（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｍａｙａｐｐｌｅ）ポドフィルム・ペルタツム（Ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｕｍ　ｐｅｌｔａｔｕｍ）の根茎において０．３～１．０質量％の濃度で存在する。ポドフィロトキシンの融点は、１８３．３～１８４．０℃である。

【０２９６】
従って、ポドフィロトキシン構造に実質的に基づく本発明のシクロリグナンは以下の一般式を有し、ここで、Ｙは窒素、酸素もしくは硫黄から選択される。
【０２９７】
【化８０】

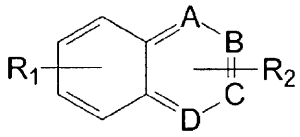


【０２９８】
本発明のシクロリグナンハプテンの具体例は、以下に示される。
【０２９９】
【化８１】



【０３００】
この化合物は、ポドフィロトキシンから出発して製造された。ポドフィロトキシンのヒドロキシル基は、ケトンに酸化された。次に、ケトンを置換されたヒドラジンと反応させて上記に示される化合物を生成せしめた。ヒドラジン試薬は、脂肪族およびアリール置換基を含めて、所望に応じて置換されることができる。
【０３０１】
１０．ヘテロビアリール
本発明のハプテンの別の一般的クラスはヘテロビアリール化合物、典型的にはフェニルキノリンおよびキノキサリンである。開示されるヘテロビアリール化合物は、以下のような第一の一般的化学式を有する。
【０３０２】

【化８２】



【０３０３】

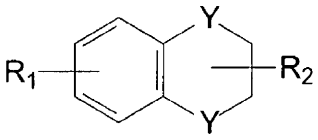
この一般式に関連して、Ａ～Ｄは炭素、窒素、酸素および硫黄、ならびにそのありとあらゆる組み合わせから選択される。最も典型的には、Ａ～Ｄは炭素もしくは窒素である。R_1～R_2置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、メトキシおよびエトキシのようなアルコキシアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。R_1～R_2置換基の２つもしくはそれ以上、最も典型的には複数のR_1置換基はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。R_1～R_2置換基の少なくとも１つは典型的には、リンカーにもしくは直接担体に結合される。

【０３０４】

ヘテロビアリール化合物の特定の態様は、以下の式を有する。

【０３０５】

【化８３】



【０３０６】

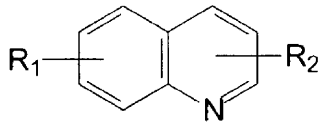
R_1およびR_2は第一の一般式についての上記のとおりである。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄、典型的には窒素である。Ｙが窒素である場合、該式はまた１個もしくはそれ以上の窒素原子への二重結合を含むこともできる。

【０３０７】

単一のヘテロ原子を有する化合物は、下記のようなフェニルキノリンにより例示される。

【０３０８】

【化８４】

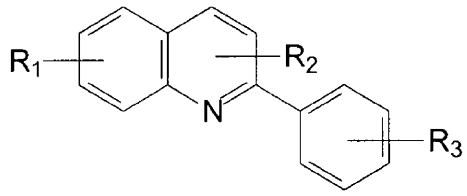


【０３０９】

さらに特定の態様には、以下の一般式により例示されるアリール置換されたハプテンが包含される。

【０３１０】

【化８５】

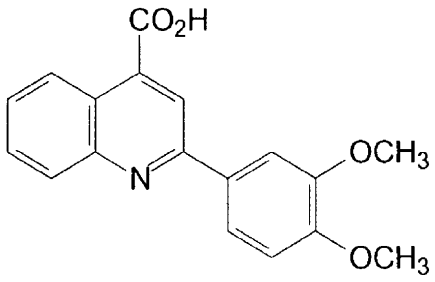


【０３１１】

この一般式に関して、R_1～R_3は上記に示したとおりである。より典型的には、R_1は水素であり、R_2はアシルであり、そしてR_3はアルコキシである。特定の例、２－（３，４－ジメトキシフェニル）キノリン－４－カルボン酸は、以下に提供される。

【０３１２】

【化８６】

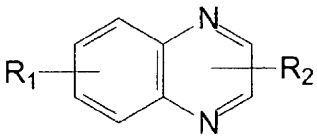


【０３１３】

２個のヘテロ原子を有する化合物は、以下の一般式により示されるように、キノキサリンにより表される。

【０３１４】

【化８７】

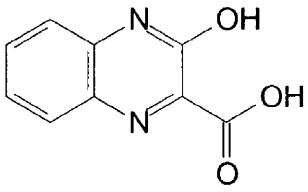


【０３１５】

本発明のビアリール－ジヘテロ原子ハプテンの特定の例は、以下に、３－ヒドロキシ－２－キノキサリンカルバミドにより例示される。この場合もやはり、R_1およびR_2置換基は、ハプテンのこのクラスに関する上記のとおりである。

【０３１６】

【化８８】



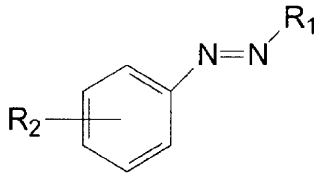
【０３１７】

１１．アゾアリール

本発明のハプテンの別の一般的クラスは、以下のような第一の一般的化学式を有する、アゾベンゼンのようなアゾアリール化合物である。

【０３１８】

【化８９】



【０３１９】

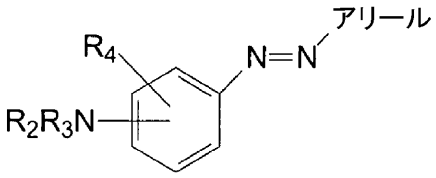
R_1～R_2置換基は独立して：水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、メトキシおよびエトキシのようなアルコキシアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、複素環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、スルホニル、エキソメチレン、ならびにその組み合わせから選択される。２つもしくはそれ以上のR_2置換基はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。例えば、２つのR_2置換基は縮合フェニル環または縮合複素環式もしくはヘテロアリール構造を形成することができる。

【０３２０】

ある開示されるアゾアリール化合物は、第一のアミン置換基および第二のアリール置換基を有する。これらの化合物は典型的に以下の式を有する。

【０３２１】

【化９０】



【０３２２】

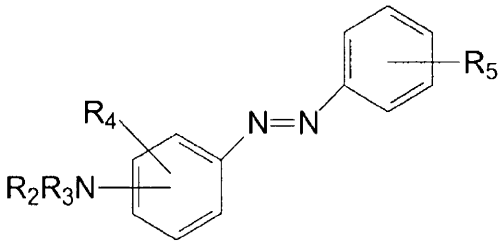
この一般式に関して、Ｒ$_2$～Ｒ$_4$はこのクラスのハプテンに関する上記のとおりであり、特定の態様はＲ$_2$～Ｒ$_3$脂肪族、特にアルキル、さらに特に低級アルキルおよびＲ$_4$水素を有する。

【０３２３】

アゾアリール化合物を表す第三の一般式は、以下に提供される。

【０３２４】

【化９１】

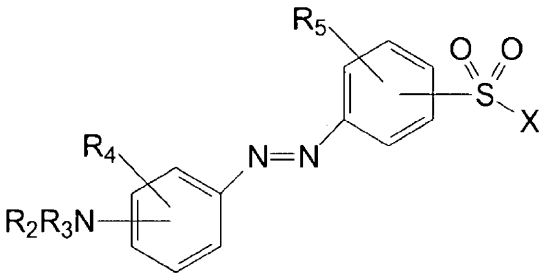


【０３２５】

Ｒ$_2$～Ｒ$_5$は、ハプテンのこの特定のクラスについての上記のとおりである。Ｒ$_2$～Ｒ$_5$の少なくとも１つは、コンジュゲートを形成するためにアゾアリールハプテンにリンカーもしくは担体を連結するための位置を定義する。例えば、Ｒ$_5$はハロゲン化スルホニル官能基であることができる。以下に示されるもののようなハロゲン化スルホニルは、アゾアリールハプテンにリンカーを連結するための有用な官能基である。

【０３２６】

【化９２】

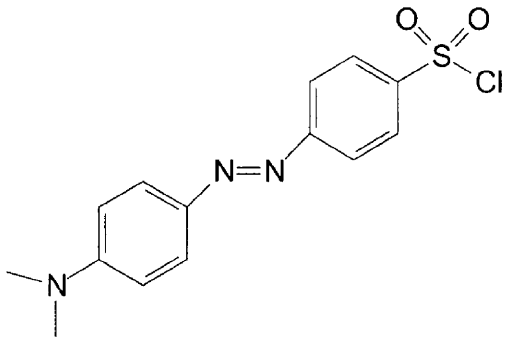


【０３２７】

この式に関して、Ｒ$_2$～Ｒ$_5$は上記のとおりである。Ｘはハロゲン化物である。これらのアゾアリールハプテンの特定の態様、４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホニルクロリドは、以下に提供される式を有する。

【０３２８】

【化９３】



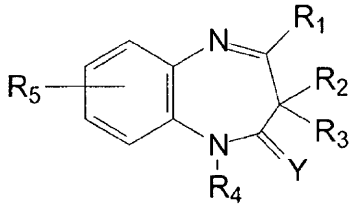
【０３２９】

１２．ベンゾジアゼピン

本発明のハプテンの別のクラスは、以下に示されるような第一の一般式を有するベンゾジアゼピンハプテンである。

【０３３０】

【化９４】



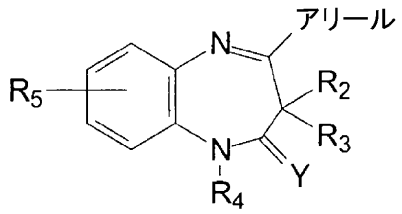
【０３３１】

R_1～R_5は独立して：アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族、置換された脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えば、酸素、窒素、硫黄のようなヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に２０個以下の炭素原子を有するアルキル、そしてさらにより典型的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチルのような１０個以下の原子を有する低級アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CX_3、ここで、Ｘは鎖中のもしくはそれに結合している、ハロゲン化物およびその組み合わせである）のような置換されたアルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH_3－Ｏ－Ｎ＝）、アルコール（すなわち、脂肪族もしくはアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル）、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジルのようなアルキルアリール、炭水化物、グルコースおよびフルクトースのような単糖、ショ糖およびラクトースのような二糖、オリゴ糖および多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート（第Ｉ族金属もしくはアンモニウムイオンカルボキシレートのようなその塩を包含する）、環式、シアノ（－ＣＮ）、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環式、水素、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ＨＯ－Ｎ＝）、脂肪族ケトンのようなケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、ならびにその組み合わせから選択される。R_5置換基の２つもしくはそれ以上はまた、示される一般式を有する化合物に結合しているかもしくは縮合している環系における原子、典型的には炭素原子であることもできる。R_1～R_5位置の少なくとも１つは、リンカーに結合されるかまたはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基により占められる。R_1～R_5は最も典型的には脂肪族、アリール、水素もしくはヒドロキシル、さらにより典型的にはアルキル、水素もしくはフェニルである。Ｙは酸素もしくは硫黄、最も典型的には酸素である。

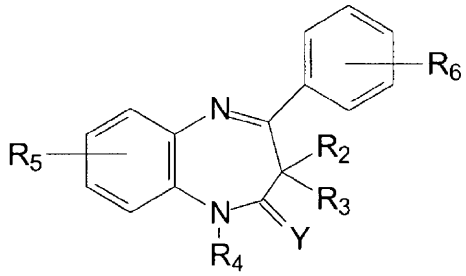
【０３３２】

ベンゾジアゼピンハプテンの特定の態様は、以下に示されるように、R_1アリールを有する。

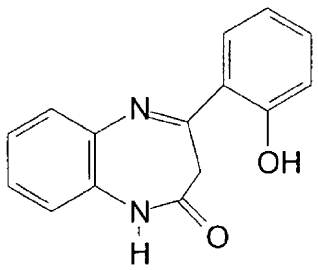
【０３３３】
【化９５】



【０３３４】
これらの態様について、Ｒ$_2$～Ｒ$_5$はこのクラスのハプテンについての上記のとおりであり、より典型的にはそのような置換基は独立して脂肪族、特にアルキル、水素およびヒドロキシルから選択される。ある開示される態様は、以下に示されるように、フェニル化合物である。
【０３３５】
【化９６】

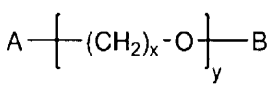


【０３３６】
この場合もやはり、Ｒ$_2$～Ｒ$_6$は上記のとおりであるが、より典型的にはそのような置換基は独立して脂肪族、特にアルキル、水素およびヒドロキシルから選択される。ある開示される態様は、以下に示されるように、フェニル化合物である。特定の態様、４－（２－ヒドロキシフェニル）－１Ｈ－ベンゾ［ｂ］［１，４］ジアゼピン－２（３Ｈ）－オンは、以下に提供される。
【０３３７】
【化９７】



【０３３８】
ＩＩＩ．リンカー
【０３３９】
Ｉ．概要
一般式ハプテン－任意のリンカー－担体により示されるように、本発明のコンジュゲートはリンカーを含むことができる。この目的のために現在既知であるかもしくは将来に開発される任意のリンカーは、本明細書に開示されるハプテンに連結することにより本発明のコンジュゲートを形成するために用いることができる。有用なリンカーはホモ－もしくはヘテロ二官能性のいずれかであることができるが、より典型的にはヘテロ二官能性である。

【０３４０】
２．脂肪族
単に例としてそして限定せずに、開示されるハプテンコンジュゲートを形成するために適当なリンカーの第一のクラスは、１つもしくはそれ以上の不飽和部位を有する脂肪族炭化水素鎖もしくはアルキル鎖のような脂肪族化合物である。脂肪族鎖はまた典型的に、特異的結合部分のような、ハプテンおよび他の所望の化合物への連結を容易にする、例としてそして限定せずに、カルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基もしくは光反応性基を包含する末端官能基も含む。鎖の長さは異なることができるが、典型的には約３０個の原子の実用上限を有する。約３０個の炭素原子より大きい鎖連結は、より小さい鎖連結を有する化合物より効果が低いことが判明している。従って、脂肪族鎖リンカーは典型的に約１個の炭素原子～約３０個の炭素原子の鎖長を有する。しかしながら、特定のリンカーが３０個より多くの原子を有し、そして担体分子連結単位にハプテンを連結するためになお効率よく働き、そしてコンジュゲートが所望のようになお機能する場合、そのような鎖連結はなお本発明の範囲内であることを当業者は認識する。
【０３４１】
３．アルキレンオキシド
本発明を実施するために有用なリンカーの第二のクラスは、アルキレンオキシドである。アルキレンオキシドは、エチレングリコールのようなグリコールを参考にして本明細書に表される。本発明のハプテンコンジュゲートは、リンカーの親水性がそれらの炭化水素鎖に対して増加される場合に特に有用であると判明している。結果として、グリコールのようなアルキレンオキシドは本発明を実施するために有用であると判明している。酸素原子の数が増加するにつれて、化合物の親水性もまた増加し得ることを当業者は認識する。従って、本発明のリンカーは、典型的に（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－）$_n$（式中、ｎは約２～約１５であるが、さらに特に約２～約８である）の式を有する。
【０３４２】
本発明のある開示される態様を実施するために有用なヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、“Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”２００６年４月２８日に出願された米国特許出願第１１／４１３，７７８号；“Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”２００６年４月２７日に出願された米国出願第１１／４１３，４１５号；および“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”２００５年１１月２３日に出願された米国仮特許出願第６０／７３９，７９４号；（これらの出願の全ては引用することにより本明細書に組み込まれる）を包含する、譲受人の同時係属出願に記述される。これらの出願において開示されるリンカーは、特異的結合部分、シグナル生成部分およびハプテンをありとあらゆる所望の組み合わせで連結するために使用できることを当業者は認識する。ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは以下に開示され、そしてそれらの使用はハプテンおよび検出可能な標識に抗体および核酸のような特異的結合部分を連結することを参考にして例示される。特に、抗ハプテン抗体と検出可能な標識のコンジュゲートおよびハプテンと一次抗体もしくは核酸とのコンジュゲートは、以下に例示される。
【０３４３】
開示されるコンジュゲートでの使用のためのリンカーの１つの特定の態様は、以下に示される一般構造を有するヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーである：
【０３４４】
【化９８】



【０３４５】
ここで、ＡおよびＢは異なる反応性基を含み、ｘは２～１０の整数（２、３もしくは４のような）であり、そしてＹは１～５０、例えば３～２０もしくは４～１２のような２～

３０の整数である。１個もしくはそれ以上の水素原子は、ヒドロキシル基、アルコキシ基（メトキシおよびエトキシのような）、ハロゲン原子（Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ）、スルファト基およびアミノ基（ジアルキルアミノ基のようなモノ－およびジ－置換されたアミノ基を包含する）のようなさらなる官能基に置換されることができる。

【０３４６】

リンカーのＡおよびＢは独立してカルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基もしくは光反応性基を含むことができるが、同じものではない。カルボニル反応性基の例には、ヒドラジン誘導体およびアミンのようなアルデヒドおよびケトン反応性基が包含される。アミン反応性基の例には、活性エステル、例えばＮＨＳもしくはスルホ－ＮＨＳ、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、スルホニルクロリド、アルデヒド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、カーボネート、ハロゲン化アリール、イミドエステル、無水物などが包含される。チオール反応性基の例には非重合性マイケルアクセプター、ハロアセチル基（ヨードアセチルのような）、ハロゲン化アルキル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル基、ビニルスルホン、ベンゾキノン、フルオロベンゼン基（テトラおよびペンタフルオロベンゼン基のような）のような求核置換を受けることができる芳香族基、ならびにジスルフィド基、例えばピリジルジスルフィド基およびエルマン試薬で活性化されるチオールが包含される。光反応性基の例には、アリールアジドおよびハロゲン化アリールアジドが包含される。あるいはまた、Ａおよび／もしくはＢは反応性基の特定のタイプと反応する官能基であることができる。例えば、Ａおよび／もしくはＢは、ハプテンおよび／もしくは担体上に導入されているかもしくはそうでなければ存在する対応する反応性基（それぞれ、アミン反応性基、チオール反応性基もしくはカルボニル反応性基のような）と反応するアミン基、チオール基もしくはカルボニル含有基であることができる。これらのタイプの基の各々のさらなる例は、当業者に明らかである。あるタイプの反応性基を別のものに交換するための反応条件および方法に関するさらなる例および情報は、本明細書に引用することにより組み込まれる、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，“Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，”Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，１９９６に提供される。特定の態様において、チオール反応性基はビニルスルホン以外である。

【０３４７】

ある態様において、ヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は特異的結合部分に共有結合しており、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基はハプテン誘導体（ＳＭＣＣとカルボン酸基を反応させることにより形成される活性化エステルのような）、ナノ粒子のアミン反応性基に共有結合しており、もしくはその逆である。例えば、ヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は特異的結合部分のシステイン残基（シスチン架橋の還元後のような）に共有結合していることができもしくはヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は特異的結合部分に導入されるチオール基に共有結合していることができ、そしてアミン反応性基は活性化エステルのようなアミン反応性基を有する活性化ハプテン誘導体に結合している。コンジュゲートが検出可能な標識にコンジュゲーションされた抗ハプテン抗体を含む場合、ヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は抗体に共有結合していることができ、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基は抗体に共有結合していることができ、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基は検出可能な標識に共有結合していることができ、もしくはその逆である。

【０３４８】

あるいはまた、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は特異的結合部分に共有結合していることができ、そしてリンカーの官能基もしくは異なる反応性基のいずれかはハプテンに結合している。特異的結合部分が抗ハプテン抗体であり、そして抗体が検出可能な標識にコンジュゲーションされる場合、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は抗体に共有結合していることができ、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基は検出可能な標識に共有結合していることができ、もしくはその逆である。特定の態様において、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は抗ハプテン抗体のグリコシル

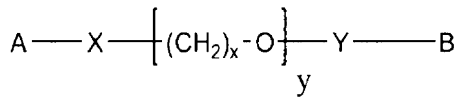
化部分上に形成されるアルデヒドに共有結合していることができ、そしてリンカーのアミン反応性基は検出可能な標識に結合している。さらに別の態様において、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は抗ハプテン抗体に共有結合しており、そしてヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は検出可能な標識に結合しており、もしくはその逆である。さらに別の態様において、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は特異的結合部分に共有結合しており、そしてヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基はナノ粒子に結合しており、もしくはその逆である。

【０３４９】

ある態様において、ヘテロ二官能性リンカーは式：

【０３５０】

【化９９】



【０３５１】

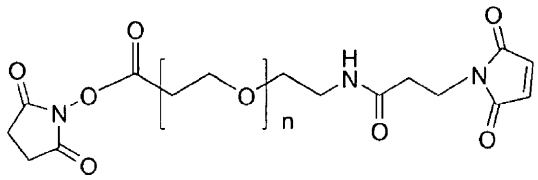
を有し、ここで、ＡおよびＢは異なる反応性基であり、そして上記のとおりであり；ｘおよびｙは上記のとおりであり、そしてＸおよびＹはさらなるスペーサー基、例えば、１～６個の間の炭素もしくは１～４個の間の炭素のような１～１０個の間の炭素を有しそして場合により１つもしくはそれ以上のアミド結合、エーテル結合、エステル結合などを含有していてもよいスペーサー基である。スペーサーＸおよびＹは同じかもしくは異なることができ、そして直鎖状、分枝鎖状もしくは環状（例えば、脂肪族もしくは芳香族環状構造）であることができ、そして非置換であるかもしくは置換されることができる。スペーサー上の置換基であることができる官能基には、カルボニル基、ヒドロキシル基、ハロゲン（Ｆ、Ｃｌ、ＢｒおよびＩ）原子、アルコキシ基（メトキシおよびエトキシのような）、ニトロ基および硫酸基が包含される。

【０３５２】

特定の態様において、ヘテロ二官能性リンカーは式：

【０３５３】

【化１００】



【０３５４】

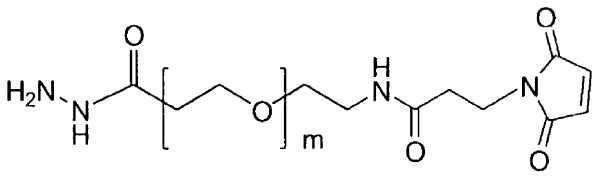
を有するヘテロ二官能性ポリエチレングリコールリンカーを含んでなり、ここで、ｎ＝１～５０、例えば、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のようなｎ＝２～３０。さらに特定の態様において、このリンカーのスクシンイミド基のカルボニルは検出可能な標識上のアミン基に共有結合しており、そしてリンカーのマレイミド基は抗ハプテン抗体のチオール基に共有結合しており、もしくはその逆である。他のさらに特定の態様において、平均約１～約１０の間の特異的結合部分が半導体ナノ粒子（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲから入手される量子ドットのような；例えば、米国特許第６，８１５，０６４号、第６，６８２，５９６号および第６，６４９，１３８号を参照、これらの特許の各々は本明細書に引用することにより組み込まれる）、常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子および超常磁性ナノ粒子のようなナノ粒子に共有結合している。

【０３５５】

他の特定の態様において、ヘテロ二官能性リンカーは式：

【０３５６】

【化１０１】



【０３５７】

を有するヘテロ二官能性ポリエチレングリコールリンカーを含んでなり、ここで、ｍ＝１～５０、例えば、ｍ＝３～２０もしくはｍ＝４～１２のようなｍ＝２～３０。さらに特定の態様において、リンカーのヒドラジド基は抗ハプテン抗体のアルデヒド基と共有結合しており、そしてリンカーのマレイミド基は検出可能な標識のチオール基と共有結合しており、もしくはその逆である。なおさらに特定の態様において、特異的結合部分のアルデヒド基は、抗体のＦｃ部分のグリコシル化領域の酸化により抗ハプテン抗体のＦｃ部分において形成されるアルデヒド基である。他のなおさらに特定の態様において、平均約１～約１０の間の抗ハプテン抗体がナノ粒子に共有結合している。簡潔に言えば、上記の式のマレイミド／ヒドラジドＰＥＧ－リンカーは、保護されたヒドラジン誘導体（Ｂｏｃで保護されたヒドラジンのような）での処理、続いて酸での処理により対応するマレイミド／活性エステルＰＥＧリンカー（これは、例えば、Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ，Ｐｏｗｅｌｌ，ＯＨから市販されている）から合成することができる。

【０３５８】

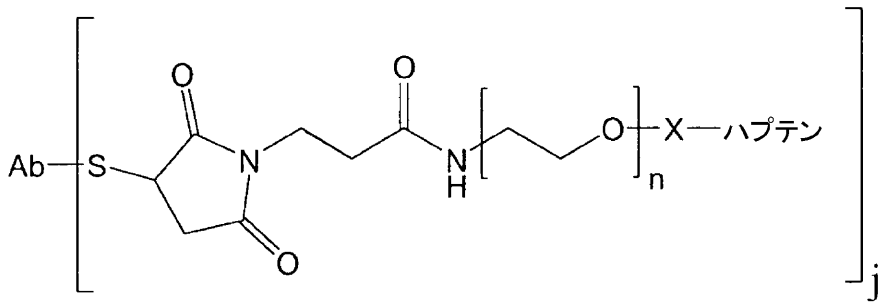
特異的結合部分（ＳＢＭ）と開示されるハプテンの１つもしくはそれ以上のコンジュゲートが提供される。これらのコンジュゲートにおけるＳＢＭは、例えば、抗体、核酸、レクチンもしくはステレプトアビジンのようなアビジンを含むことができる。ＳＢＭが抗体を含む場合、抗体は任意の特定の分子もしくは非常に類似した分子の特定の群に特異的に結合することができ、例えば、サンプルに存在し得る特定のタンパク質に特異的に結合する抗体。あるいはまた、抗体は免疫アッセイにおいて二次抗体として使用することができる抗抗体抗体であることができる。例えば、抗体は、抗マウスＩｇＧ抗体、抗ウサギＩｇＧ抗体もしくは抗ヤギＩｇＧ抗体のような抗ＩｇＧ抗体を含んでなることができる。

【０３５９】

特定の態様において、開示される抗体コンジュゲートは式：

【０３６０】

【化１０２】



【０３６１】

を有し、ここで、Ａｂは抗体であり、ｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｊ＝１～１０（ｊ＝２～６もしくはｊ＝３～４のような）。Ｘはハプテンをコンジュゲートの残りの部分から間隔をあけて配置しそしてハプテンがコンジュゲートの残りの部分に連結されることを可能にするために適当なスペーサー基である。例えば、スペーサー基は脂肪族もしくは芳香族基、典型的には脂肪族基、そしてさらにより典型的には１～６個の間の炭素もしくは１～４個の間の炭素のような約１～

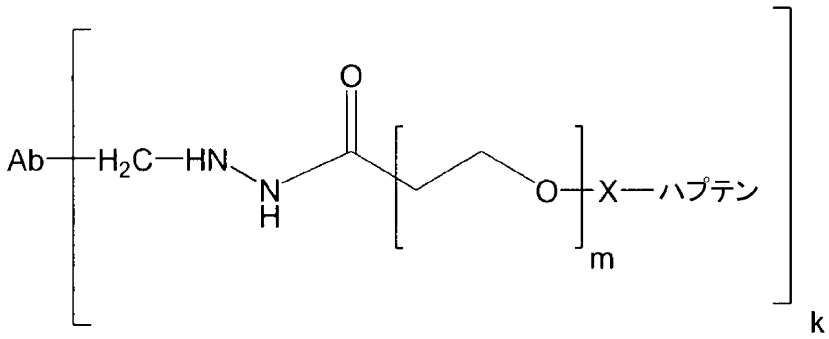
約１０個の炭素原子を有するアルキルもしくは置換されたアルキル基であることができる。スペーサーはまた、ハロゲン化物、窒素、酸素、硫黄、およびその組み合わせが包含されるがこれらに限定されるものではない、ヘテロ原子のような、炭素以外の原子を含むこともできる。そのようなさらなる原子は、官能基を定義することができる。例えば、スペーサー基は場合により１つもしくはそれ以上のアミド結合、エーテル結合、エステル結合、アミン結合などを含んでもよい。スペーサーの構造は、リンカーにハプテンを連結するために用いられる化学によって決まり、そしてそのような結合の具体例は特に開示されるハプテンに関して後で説明されるが、一般に、基Ｘは例えばハプテンに付加されたアミン反応性基とリンカー上のアミン（もしくはその逆）もしくはハプテンに付加されたカルボニル反応性基とリンカー上のカルボニル（もしくはその逆）を反応させることにより形成されることができる。

【０３６２】

あるいはまた、開示されるハプテンの１つもしくはそれ以上と抗体とのコンジュゲートは以下の式：

【０３６３】

【化１０３】



【０３６４】

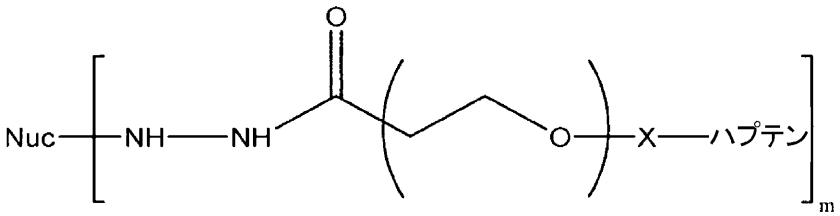
を有することができ、ここで、Ａｂは抗体であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｋ＝１～１０（ｋ＝２～６もしくはｋｊ＝３～４のような）、そしてＸはこの場合もやはりスペーサー基、例えば、１～６個の間の炭素もしくは１～４個の間の炭素のような１～１０個の炭素原子を有しそして場合により１つもしくはそれ以上のアミド結合、エーテル結合、エステル結合、アミン結合などを含有していてもよいスペーサー基である。

【０３６５】

他の態様において、１つもしくはそれ以上のハプテンに連結される特異的結合部分は核酸である。特定の態様において、そのようなコンジュゲートは式：

【０３６６】

【化１０４】



【０３６７】

を有することができ、ここで、Ｎｕｃはヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオチドリン酸（ヌクレオチド３リン酸のような）、オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを包含する任意の核酸塩基含有化合物であり、そしてｍは例えば約１～５００（ｍ＝１～１００もしくはｍ＝１～５０のような）であることができ、そしてＸはさらにこの場合もス

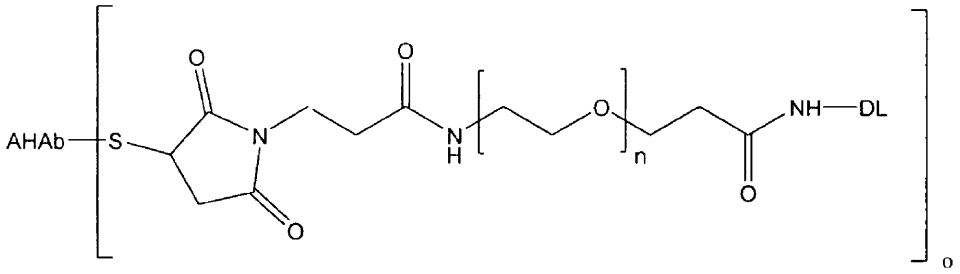
ペーサー基、例えば、１～６個の間の炭素もしくは１～４個の間の炭素のような１～１０個の間の炭素原子を有しそして場合により１つもしくはそれ以上のアミド結合、エーテル結合、エステル結合、アミン結合などを含有していてもよいスペーサー基である。

【０３６８】

また提供されるのは、開示されるハプテンに特異的に結合する抗体のコンジュゲートである。特定の態様において、そのようなコンジュゲートは以下の式

【０３６９】

【化１０５】

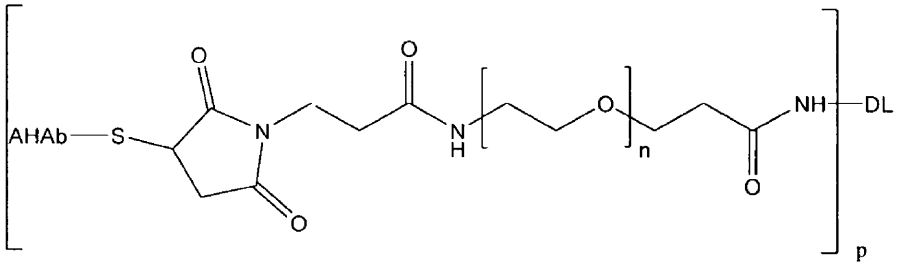


【０３７０】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬは酵素のような検出可能な標識であり、ｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｏ＝１～１０（ｏ＝２～６もしくはｏ＝３～４のような）；もしくは

【０３７１】

【化１０６】



【０３７２】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬはナノ粒子のような検出可能な標識であり、ｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｐ＝１～１０（ｐ＝２～６もしくはｐ＝３～４のような）］

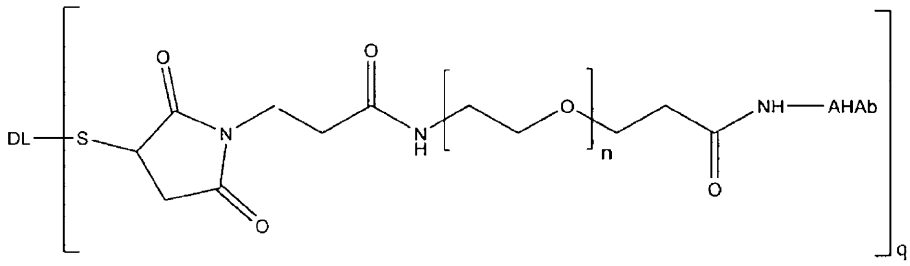
を有することができる。

【０３７３】

さらに別の特定の態様において、開示されるコンジュゲートは式：

【０３７４】

【化１０７】



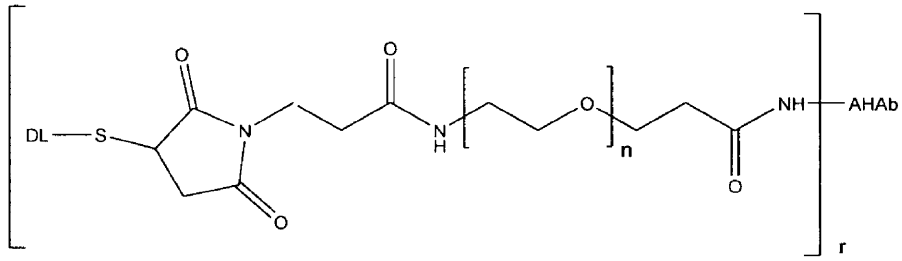
【０３７５】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬはナノ粒子のような検出可能な標識で

あり、ｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｑ＝１～１０（ｑ＝２～６もしくはｑ＝３～４のような）；もしくは

【０３７６】

【化１０８】



【０３７７】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬは酵素のような検出可能な標識であり、そしてｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝２～２０もしくはｎ＝４～１２のような）、そしてｒ＝１～１０（ｒ＝２～６もしくはｒ＝３～４のような）］

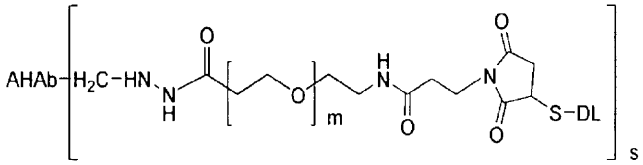
を有するコンジュゲートを含んでなる。

【０３７８】

さらに別の特定の態様において、ヘテロ二官能性ＰＥＧ連結特異的結合分子－ナノ粒子コンジュゲートは式：

【０３７９】

【化１０９】

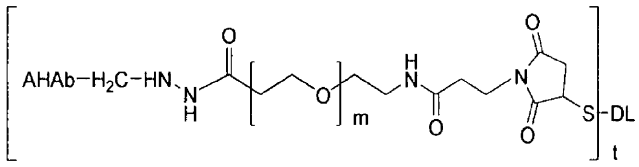


【０３８０】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬ酵素のような検出可能な標識であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝３～２０もしくはｍ＝４～１２のような）、そしてｓ＝１～１０（ｓ＝２～６もしくはｓ＝３～４のような）；もしくは

【０３８１】

【化１１０】



【０３８２】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬはナノ粒子のような検出可能な標識であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、２～２０もしくは４～１２のような）、そしてｔ＝１～１０（ｔ＝２～６もしくはｔ＝３～４のような）］

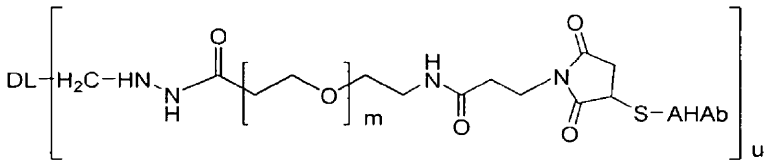
を有するコンジュゲートを含んでなる。

【０３８３】

なおさらなる特定の態様において、ヘテロ二官能性ＰＥＧ連結特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲートは、式：

【０３８４】

【化１１１】



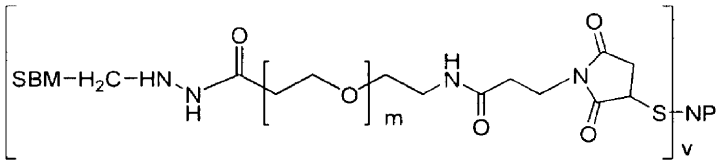
【０３８５】

［式中、ＡＨＡｂは抗ハプテン抗体であり、ＤＬは検出可能な標識であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝３～２０もしくはｍ＝４～１２のような）、そしてｕ＝１～１０（ｕ＝２～６もしくはｕ＝３～４のような）］；

もしくは

【０３８６】

【化１１２】



【０３８７】

［式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝２～２０もしくはｍ＝４～１２のような）、そしてｖ＝１～１０（ｖ＝２～６もしくはｖ＝３～４のような）］

を有するコンジュゲートを含んでなる。

【０３８８】

開示されるコンジュゲートは、免疫組織化学アッセイおよびインサイチューハイブリダイゼーションアッセイを包含する任意のタイプのアッセイにおいて生物学的サンプル中の興味のある１つもしくはそれ以上分子を検出するために利用することができる。１つの態様において、開示されるコンジュゲートは免疫アッセイにおいてハプテン標識抗体、例えば、特定の分子に対するハプテン標識一次抗体として用いられ、それは次に検出可能な標識を含む抗ハプテン抗体コンジュゲートと接触させる。あるいはまた、標的核酸に結合しているハプテン標識核酸プローブは、次に、検出可能な標識を含む抗ハプテン抗体コンジュゲートと接触させる。生物学的サンプルは生体分子（タンパク質、核酸、脂質、ホルモンなど）を含有する任意のサンプルであることができるが、特定の態様において、生物学的サンプルには組織切片（生検により得られるような）もしくは細胞学サンプル（Ｐａｐ塗抹標本もしくは血液塗抹標本のような）が包含される。開示されるコンジュゲートを使用することができるアッセイの他のタイプは当業者に容易に明らかであり、そして特定の例は以下に説明される。

【０３８９】

別の態様において、特異的結合部分－ハプテンコンジュゲートを製造する方法が開示され、該方法は特異的結合部分からチオール化特異的結合部分を形成すること；アミン基を有するハプテンをマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて活性化ハプテンを形成すること；およびチオール化特異的結合部分を活性化ハプテンと反応させて特異的結合部分－ハプテンコンジュゲートを形成することを含む。

【０３９０】

チオール化特異的結合部分は、チオール化特異的結合部分を形成するように特異的結合部分を還元剤と反応させることにより、例えば、約１～約１０の間の特異的結合部分当たりのチオールの平均数を有するチオール化特異的結合部分を形成するように特異的結合部分を還元剤と反応させることにより形成することができる。特異的結合部分当たりのチオ

ールの平均数は、滴定により決定することができる。還元剤の例には、２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰ、ならびにその組み合わせよりなる群から選択される還元剤が包含される。特定の態様において、還元剤はＤＴＴおよびＤＴＥ、ならびにその組み合わせよりなる群から選択され、そして約１ｍＭ～約４０ｍＭの間の濃度で使用される。

【０３９１】

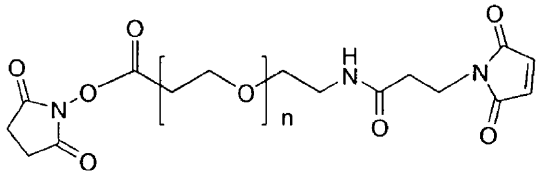
あるいはまた、チオール化特異的結合部分を形成することは、特異的結合部分にチオール基を導入することを含む。例えば、チオール基は、２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミン、ならびにその組み合わせよりなる群から選択される試薬との反応により特異的結合部分に導入することができる（例えば、本明細書に引用することにより組み込まれる、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，“Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，”Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，１９９６を参照）。さらに特定の態様において、特異的結合部分にチオール基を導入することは、特異的結合部分を酸化剤（過ヨウ素酸塩のような）と反応させて特異的結合部分の糖部分（抗体のグリコシル化部分のような）をアルデヒド基に転化しそして次にアルデヒド基をシスタミンと反応させることを含む。別のさらに特定の態様において、特異的結合部分はストレプトアビジンを含み、そしてチオール基を導入することはストレプトアビジンを２－イミノチオラン（トラウト試薬）と反応させることを含んでなる。

【０３９２】

別の特定の態様において、ハプテンをマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて活性化ナノ粒子を形成することは、ハプテンを式：

【０３９３】

【化１１３】



【０３９４】

［式中、ｎ＝１～５０、例えば、ｎ＝３～２０もしくはｎ＝４～１２のようなｎ＝２～３０］

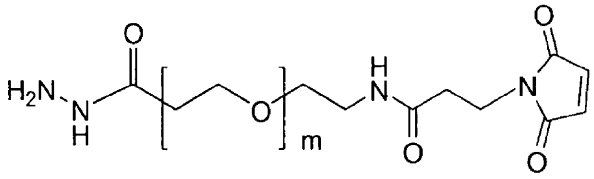
を有するＰＥＧマレイミド／活性エステルと反応させることを含む。

【０３９５】

さらなる態様において、特異的結合部分を酸化剤と反応させてアルデヒドを保有する特異的結合部分を形成すること；アルデヒドを保有する特異的結合部分をマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させてチオール反応性特異的結合部分を形成すること；およびチオール反応性特異的結合部分をチオール化ハプテンと反応させて特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲートを形成することを含む特異的結合部分－ハプテンコンジュゲート組成物を製造する方法が開示される。特定の態様において、特異的結合部分は抗体であり、そして特異的結合部分を酸化剤と反応させてアルデヒドを保有する特異的結合部分を形成することは、抗体のグリコシル化領域を酸化して（過ヨウ素酸塩、I_2、Br_2もしくはその組み合わせ、またはノイラミダーゼ（ｎｅｕｒａｍｉｄａｓｅ）／ガラクトース酸化酵素でのような）アルデヒドを保有する抗体を生成せしめることを含む。さらに特定の態様において、抗体を酸化剤と反応させてアルデヒドを保有する抗体を生成せしめることは、抗体当たり平均約１～約１０個の間のアルデヒド基を導入することを含む。さらに特定の態様において、マレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーは、式：

【０３９６】

【化１１４】



【０３９７】

［式中、ｍ＝１～５０、例えば、ｍ＝３～２０もしくはｍ＝４～１２のようなｍ＝２～３０］

を有する。チオール化ハプテンは、チオール基をハプテンに導入することにより（例えば、２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミン、ならびにその組み合わせよりなる群から選択される試薬とハプテンを反応させることにより）ハプテンから形成することができる。

【０３９８】

別の態様において、ヒドラジド反応性基を有するハプテン－リンカーコンジュゲートを抗体上に形成されるアルデヒドのカルボニル基と反応させてハプテン－リンカー－抗体コンジュゲートを生成せしめる。ヒドラジド反応性基を有するハプテン－リンカーコンジュゲートは、以下にさらに説明される。

【０３９９】

４．市販されているリンカー

さらなるリンカーはまた、市販されている。Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩｌｌｉｎｏｉｓのＰｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ．は、本発明を実施するために有用なある種のリンカーを提供する。例えば、Ｐｉｅｒｃｅはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）を提供する。Ｐｉｅｒｃｅはまた、ＳＭＣＣと呼ばれる、スルホ基のないスルホンアミジル化合物も販売し、それもまた有用なリンカーである。スルホ－ＳＭＣＣは水溶性の非切断性膜不浸透性架橋剤である。この化合物のＮＨエステルは、ｐＨ７～９で第一級アミンと容易に反応して安定なアミド結合を形成することができる。マレイミドは約６～８の間、より典型的には約６．５～約７．５のｐＨでスルフヒドリル基と反応して、安定なチオエーテル結合を形成する。遊離アミンを含んでなる担体にハプテンを連結することにおける使用には、スルホ－ＳＭＣＣを担体の遊離アミンと反応させてマレイミド活性化担体を生成せしめることができる。次に、担体タイプ化合物をハプテン、例えば遊離スルフヒドリル基もしくはヒドロキシル基を有するハプテンと反応させて、本発明のコンジュゲートを生成せしめることができる。

【０４００】

Ｐｉｅｒｃｅはまた、さらなる典型的なリンカーならびに実用的用途に潜在的に適当な各々の長さに関するさらなる情報も提供する。例えば、アミンと反応性の官能基について、Ｐｉｅｒｃｅは以下の化合物を提供する：ＥＧＳ（エチレングリコールビス［コハク酸スクシンイミジル］）；スルホ－ＥＧＳ（エチレングリコールビス［コハク酸スルホスクシンイミジル］）；ＤＴＳＳＰ（３，３’－ジチオビス［プロピオン酸スルホスクシンイミジル］）；ＤＳＳ（スベリン酸ジスクシンイミジル）；ＢＳ（スベリン酸ビス［スルホスクシンイミジル］）；ＤＳＧ（グルタル酸ジスクシンイミジル）；およびＭＳＡ（アジピン酸メチルＮ－スクシンイミジル（ｍｅｔｈｙｌ　Ｎ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ａｄｉｐａｔｅ））。スルフヒドリル反応性リンカーの例には、ＤＰＤＰＢ（１，４－ジ－［３’－（２’－ピリジルジチオ）－プロピオンアミド］ブタン）；ＢＭ［ＰＥＯ］$_3$（１，１１－ビス－マレイミドトリエチレングリコール）；ＢＭＨ（ビス－マレイミドヘキサン）；ＢＭ［ＰＥＯ］$_2$（１，８－ビス－マレイミドジエチレングリコール）；ＨＢＶＳ（１，６－ヘキサン－ビス－ビニルスルホン）；ＤＴＭＥ（ジチオ－ビス－マレイミドエタン）；ＢＭＤＢ（１，４－ビス－マレイミジル－２，３－ジヒドロキシブタン）；Ｂ

ＭＢ（１，４－ビス－マレイミドブタン；およびＢＭＯＥ（ビス－マレイミドエタン）が包含される。ＢＡＳＥＤ（ビス－［ｂ－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド）およびＡＰＧ（ｐ－アジドフェニルグリオキサール１水和物）を包含する、光反応性化合物もまたＰｉｅｒｃｅから入手可能である。

【０４０１】

５．カルボジイミド連結

カルボジイミド［Ｒ－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ$_1$］は、アミノ酸、タンパク質、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを包含する標的分子に直接ハプテンを連結するために用いることができる。例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｎｅｗ Ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｕｔｉｌｉｚｉｎｇ Ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍｓ Ｓｅｒｉｅｓ，Ｎｏ．３４，６９－７０（１９９５）を参照。あるいはまた、カルボジイミド官能基は、ハプテン－リンカーコンジュゲートを形成するために上記に説明したようなリンカーに導入するかもしくは連結することができる。ハプテン－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミドを製造するための一般的な合成スキームは、実用的実施例において以下に提供される。この一般的な合成スキームを用いて、ニトロピラゾール－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミド、ベンゾフラザン－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミド、ジニトロフェニル－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミド、チアゾールスルホンアミド－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミドおよびロテノイド－ｄＰＥＧｘ－カルボジイミドを包含する、ハプテン－カルボジイミドのいくつかの実用的態様が製造されている。

【０４０２】

ＩＶ．ハプテン－リンカーコンジュゲート

コンジュゲートとも呼ばれる本発明の化合物は、典型的にリンカーに連結されたハプテンを典型的に含んでなる。ハプテンコンジュゲートはまた、ハプテンに直接連結されるかもしくはリンカーに連結されるいずれかの、ポリペプチド、タンパク質、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドもしくは核酸（１つもしくは複数）のような担体を含むこともできる。担体の特定の例には、免疫原性担体、抗体および核酸プローブが包含される。ハプテン、担体および／もしくはリンカーは１つもしくはそれ以上の官能基もしくは部分、典型的には、直接もしくはリンカーを介して間接的に、担体にハプテンを連結するために有用な求電子物質および求電子物質／求核物質対を含むことができる。従って、本開示のある態様を表す第一の一般式はハプテン－担体である。そのような化合物はまた、場合によりそして最も典型的にはリンカーも含む。リンカーを有する態様は、式ハプテン－リンカー－担体を満たす。従って、組み合わされた式は（ハプテン）$_k$－（リンカー）$_m$－担体$_n$であり、ここで、ｋは１であり、ｍおよびｎは０もしくは１であり、そしてｍもしくはｎの少なくとも１つは１である。該一般式について、ｋ＝１、ｍ＝１もしくはｎ＝１はハプテン、リンカーもしくは担体の数もしくは構造に制約がないことを意味することを当業者は理解する。例えば、組み合わされた式のコンジュゲートを提供するために担体は結合している多数のリンカーを有することができそして多数のリンカーは多数のハプテンに結合していることができる。さらに、リンカーは複数のサブユニットを含むかもしくは様々なサブコンポーネントから形成されることができる。例えば、担体およびハプテンは両方とも結合しているリンカーを含むことができ、ここで、これらのリンカーは次にハプテンおよび担体を一緒に連結するために反応させることができる。

【０４０３】

特定の態様において、本開示のコンジュゲートは一般構造（特異的結合部分）－リンカー－ハプテン、そしてさらに特に（特異的結合部分）－（リンカー－ハプテン）$_p$を有し、ここで、ｐ＝１～２００、例えばｐ＝１～１０のような１～５０。一例において、リンカーはＰＥＧリンカーを含んでなる。さらに特定の態様において、特異的結合部分は抗体もしくは核酸である。別の例において、特異的結合部分は抗体であり、そしてリンカーは抗体のＦｃ領域の酸化された糖部分のアルデヒド基に共有結合しているカルボニル反応性

基を含む。さらに別の例において、特異的結合部分は抗体であり、そしてリンカーは抗体のチオール基に共有結合しているスルフヒドリル反応性基を含み、ここで、チオール基は、抗体におけるジスルフィド結合を還元することにより生成される。さらに別の例において、特異的結合部分は核酸であり、そしてリンカーは核酸のシトシン残基に共有結合しているカルボニル反応性基を含む。

【０４０４】

別の特定の態様において、本開示のコンジュゲートは一般構造ハプテン－リンカー－ＲＧを有し、ここで、ＲＧはカルボニル反応性基、チオール反応性基もしくはアミン反応性基のような反応性基をさす。典型的には１つのハプテンは反応性基を保有する１つのリンカーに連結されるが、反応性基を有する１つのリンカーに多数のハプテンを結合させることもしくは１つのハプテンに反応性基を有する多数のリンカーを結合させることが可能である。これらのようなハプテンリンカーコンジュゲートは、ハプテンを抗体に結合させるために（前段落において説明したような）そしてまたハプテンをＫＬＨのような免疫原性担体に結合させてハプテンに特異的に結合する抗体を生産するように動物を刺激するために用いることができる免疫原を生成せしめるためにも特に有用である。従って、ハプテンに特異的に結合する抗体は本開示の態様である。

【０４０５】

さらに別の態様において、抗ハプテン抗体（開示される免疫原を用いて製造することができるような）および検出可能な標識（量子ドットもしくは酵素のような）を含むコンジュゲートが開示される。従って、このタイプのコンジュゲートの一般式は（抗ハプテン抗体）$_t$－（検出可能な標識）$_s$であり、ここで、ｔおよびｓは各々独立して１～１００であることができるが、より典型的には、ｔ＝１そしてｓ＝１～１０。検出可能な標識と抗ハプテン抗体とのコンジュゲートは、単一のサンプルにおける多数の標的の多重化アッセイを可能にするために他のハプテン－担体コンジュゲート（標的ゲノム配列用のハプテン標識核酸プローブおよび標的タンパク質に特異的に結合するハプテン標識一次抗体のような）と併せて用いることができる。

【０４０６】

本発明のコンジュゲートは、開示される典型的なリンカーもしくは複数のリンカーを開示されるハプテンもしくは複数のハプテンに連結することにより形成されることができる。ハプテンの多くは、リンカーをそれに連結することができる複数の位置を有する。開示されるハプテンに提供される一般式に関して適当なリンカー位置は、ハプテン－リンカーコンジュゲートの一般式がそうであるように、以下に示される。特定のハプテン－リンカーコンジュゲートは、これらの化合物を合成するためのプロトコルがそうであるように、ＰＥＧリンカーを参考にして提供される。

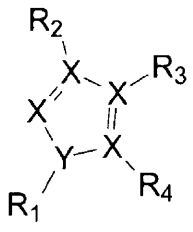
【０４０７】

１．オキサゾールおよびピラゾール

本発明のハプテンの第一の一般的クラスは、本明細書においてさらに詳細に説明されるように、以下の一般的化学式を有するオキサゾールおよびピラゾール、最も典型的にはニトロオキサゾールおよびニトロピラゾールである。

【０４０８】

【化１１５】



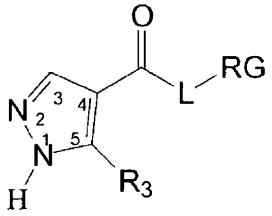
【０４０９】

Ｒ$_1$～Ｒ$_4$位置の任意の１つもしくはそれ以上は、リンカーに連結されることができる

。R_2置換基により占められる位置は、以下に示されるように、このクラスのハプテンにリンカーを連結するために非常に適当であり、ここで、Ｌはリンカーであり、そしてＲＧは反応性官能基である。

【０４１０】

【化１１６】

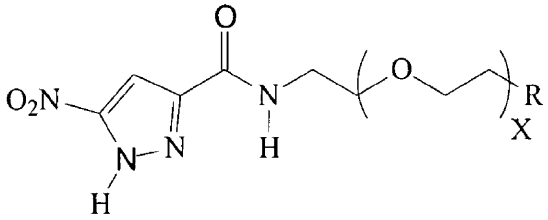


【０４１１】

ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例、５－ニトロ－３－ピラゾールカルバミドを以下に示す。このおよび次の態様について、Ｘは約２～約２４である。

【０４１２】

【化１１７】

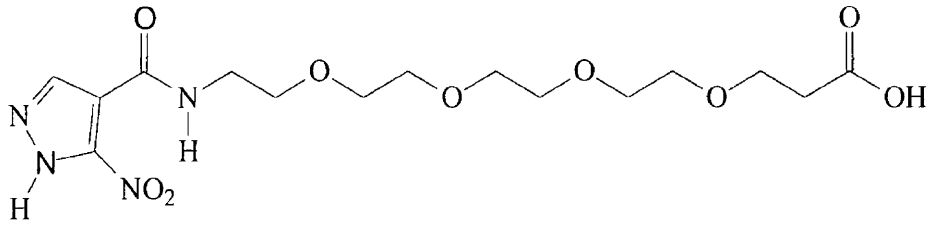


【０４１３】

Ｘが４である特定の態様は、以下に提供される。

【０４１４】

【化１１８】

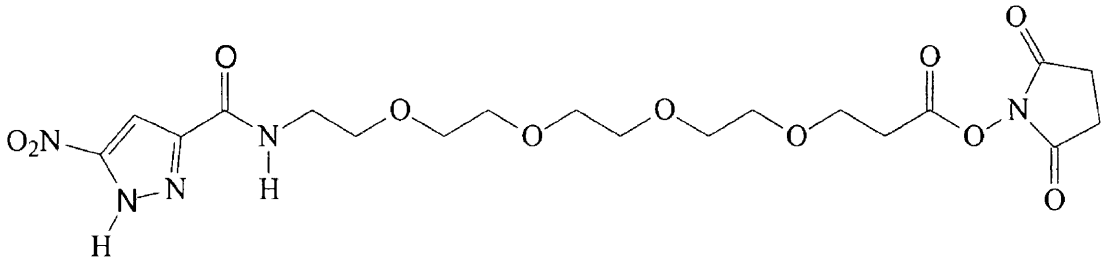


【０４１５】

この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ４（４個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、実用的態様において他の反応性官能基に転化されている。例えば、カルボン酸官能基は、以下に示されるように、ＮＨＳエステルのような活性化エステルに転化されることができる。

【０４１６】

【化１１９】

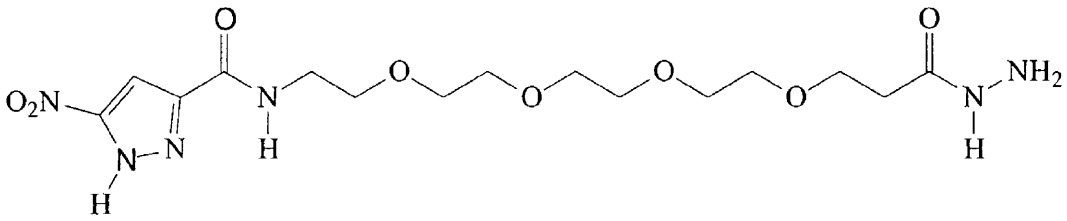


【０４１７】

そして、活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。

【０４１８】

【化１２０】



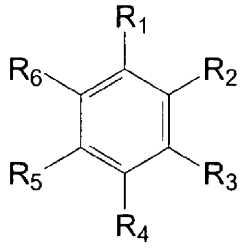
【０４１９】

２．ニトロアリール

本発明のハプテンの第二の一般的クラスは、以下の一般的化学式を有するニトロアリール化合物である。

【０４２０】

【化１２１】

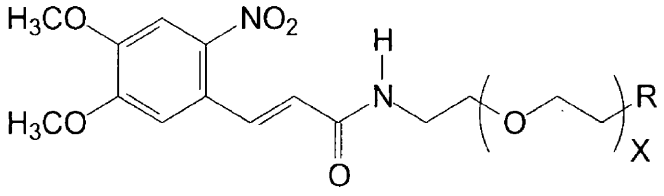


【０４２１】

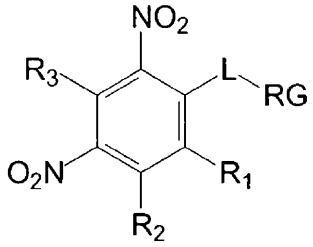
そのような化合物は、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$の少なくとも１つがニトロであるように少なくとも１つの、そして場合により複数のニトロ基を有する。ニトロ基に連結されないＲ$_1$～Ｒ$_6$位置のいずれかは、アリール環にリンカーを連結するための潜在的位置である。モノニトロフェニル化合物は、以下に例示されるようなニトロシンナミドハプテンコンジュゲートにより表される。

【０４２２】

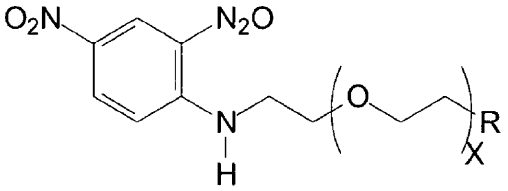
【化１２２】



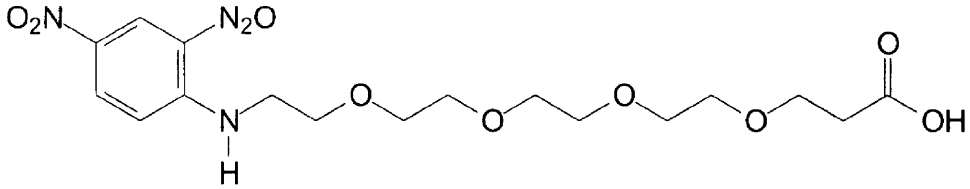
【０４２３】
実用的態様はまた、２，４－ジニトロフェニル化合物によっても例示される。このクラスの典型的なハプテンコンジュゲートは以下に例示され、ここで、Ｒ$_1$～Ｒ$_3$は上記のとおりである。
【０４２４】
【化１２３】



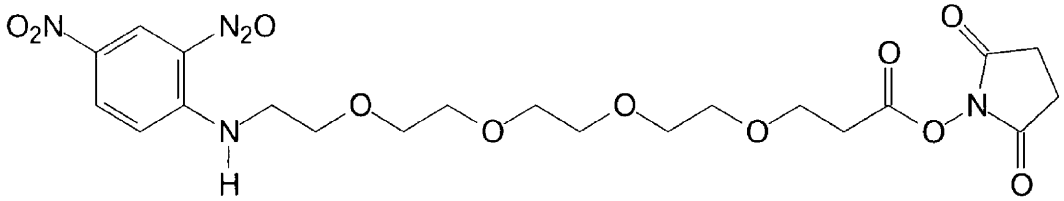
【０４２５】
ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例を以下に示す。
【０４２６】
【化１２４】



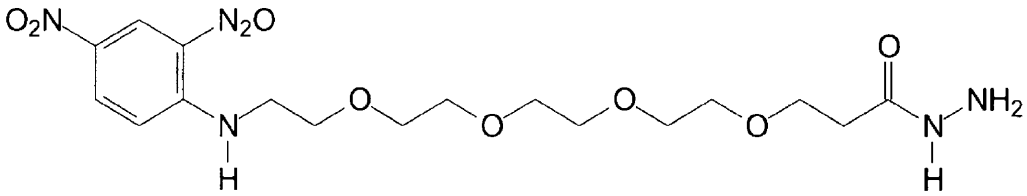
【０４２７】
特定の態様は、以下の構造を有した。
【０４２８】
【化１２５】



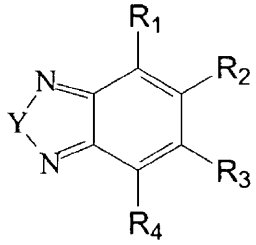
【０４２９】
従って、この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ４（４個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、実用的態様において他の反応性官能基に転化されている。例えば、カルボン酸官能基は、以下に示されるように、ＮＨＳエステルのような活性化エステルに転化されることができる。
【０４３０】
【化１２６】



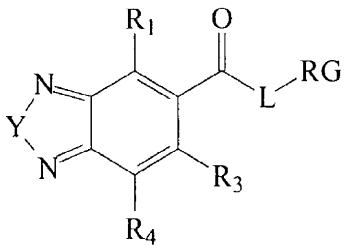
【０４３１】
活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。
【０４３２】
【化１２７】



【０４３３】
３．ベンゾフラザンおよび関連化合物
ベンゾフラザンおよびその誘導体は、本発明のハプテンの別のクラスである。ベンゾフラザンタイプ化合物の一般式は、以下に提供される。
【０４３４】
【化１２８】

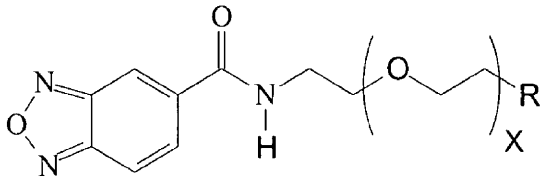


【０４３５】
R_1～R_4およびＹ置換基は上記のとおりである。R_1～R_4置換基の少なくとも１つはリンカーに、担体に結合されるか、またはリンカーもしくは担体への連結に適当な官能基である。R_2およびR_3位置は、このクラスのハプテンにリンカーを連結するために用いられる可能性が最も高い（R_2およびR_3は、特にR_1およびR_4が同じである場合、反応性に関して実質的に同一であり得る）。そのようなハプテンコンジュゲートは、以下に提供される一般式により例示される。
【０４３６】
【化１２９】

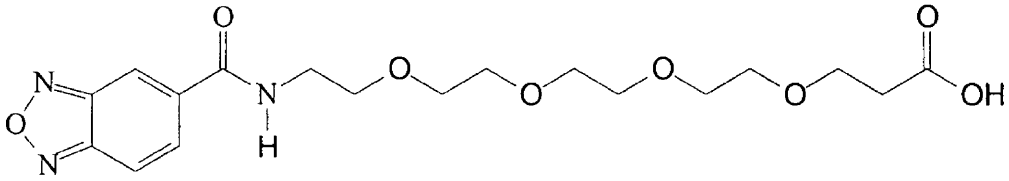


【０４３７】
ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例、２，１，３－ベンゾキサジアゾール－５－カルバミドを以下に示す。
【０４３８】

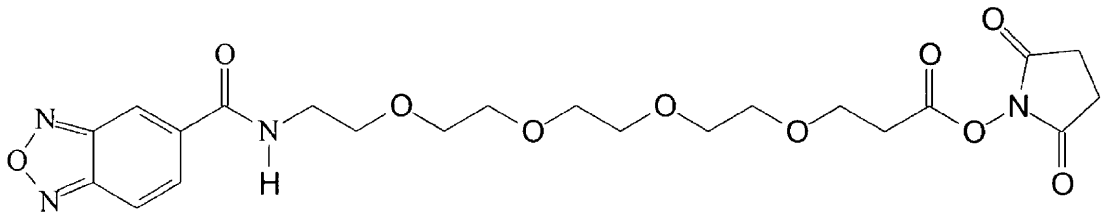
【化１３０】



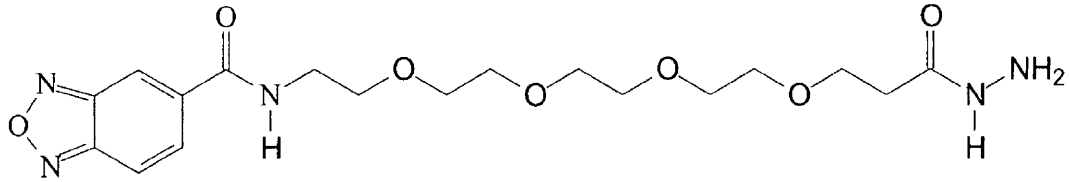
【０４３９】
特定の態様は、以下の式を有した。
【０４４０】
【化１３１】



【０４４１】
この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ４（４個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、実用的態様において他の反応性官能基に転化されている。例えば、カルボン酸官能基は、以下に示されるように、ＮＨＳエステルのような活性化エステルに転化されることができる。
【０４４２】
【化１３２】

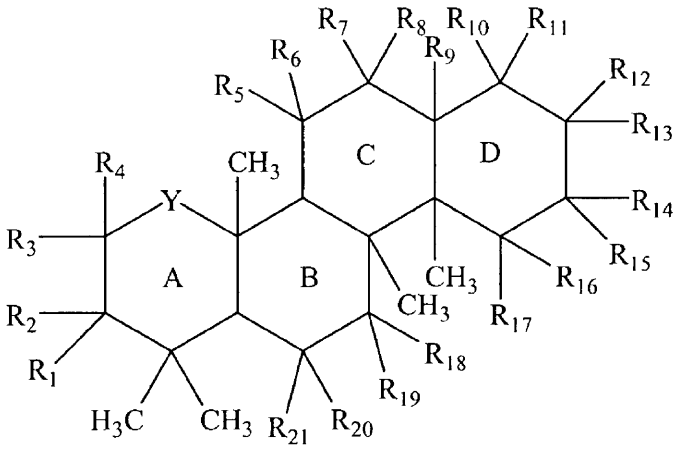


【０４４３】
活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。
【０４４４】
【化１３３】



【０４４５】
４．トリテルペン
トリテルペンは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。トリテルペンに共通している基本環構造は、以下に示されるように、４個の６員縮合環、Ａ～Ｄを有し、ここで、R_1～R_{21}およびＹ置換基は上記のとおりである。
【０４４６】

【化１３４】

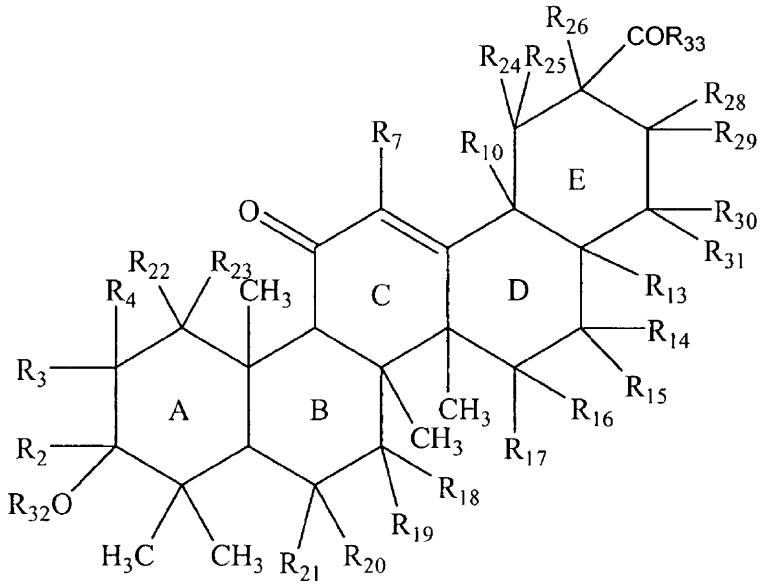


【０４４７】

このクラスのハプテンを例示するトリテルペンの開示される態様はまた、Ｅ環を含むこともでき、それは様々な環サイズのものであることができる。例えば、Ｅ環は５もしくは６員環であってもよい。これらの化合物は、Ｃ環について以下に例示されるような、アルファ－ベータ不飽和ケトンを含むことが非常に多い。

【０４４８】

【化１３５】

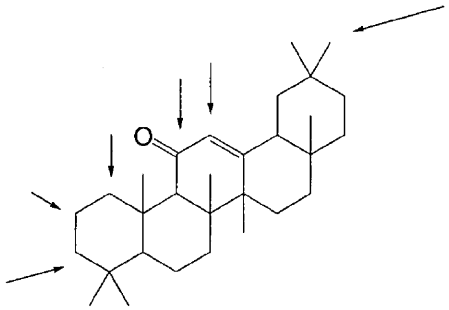


【０４４９】

これらの一般式においてＲ基により占められる位置の多くは、反応性コンジュゲートを形成するためにハプテンをリンカーに連結するのに有用であり得ることを当業者は認識する。アルファ－ベータ不飽和化合物に関して、特定のリンカー位置を以下に矢印を用いて示す。

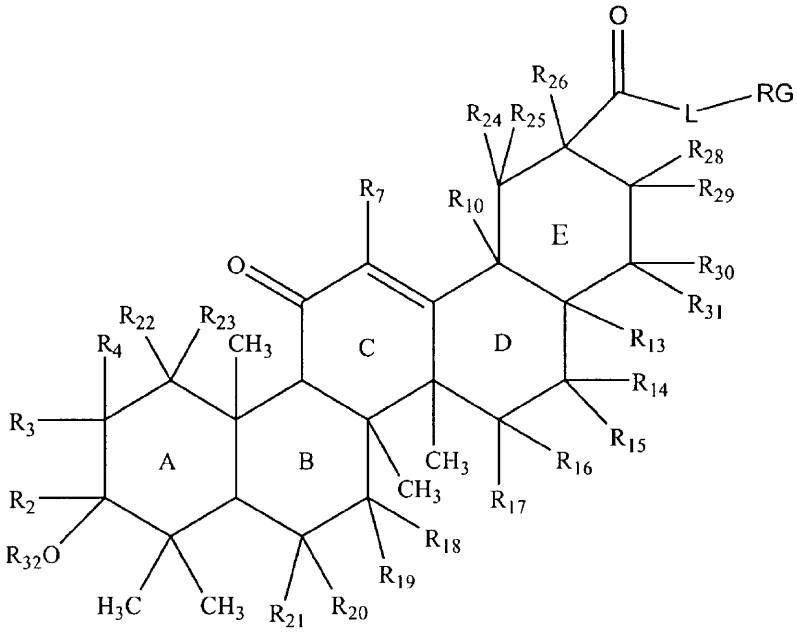
【０４５０】

【化１３６】



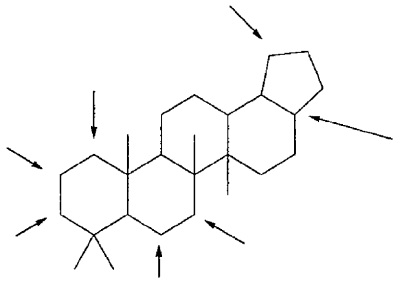
【０４５１】
例えば、本発明のハプテンコンジュゲート、このクラスの特定の反応性コンジュゲートは以下の式を有する。

【０４５２】
【化１３７】



【０４５３】
他の典型的なトリテルペン構造および潜在的リンカー連結位置は、以下に提供される。

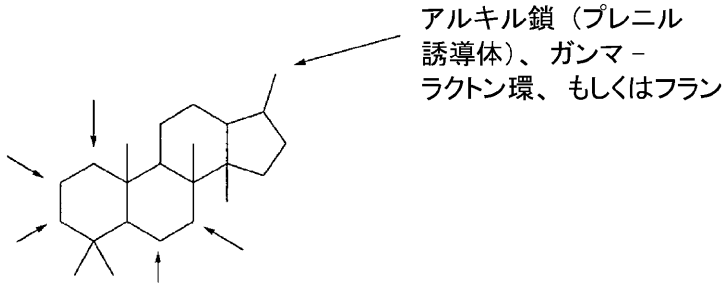
【０４５４】
【化１３８】



【０４５５】
ベツリン酸、ウルソル酸およびエチノシスチン酸コア構造

【０４５６】

【化１３９】



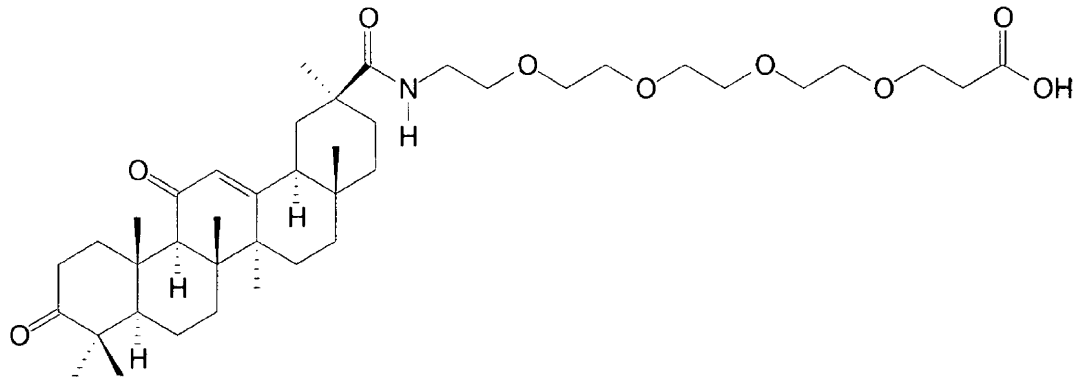
ククルビタシンコア

【０４５７】

ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例を以下に示す。

【０４５８】

【化１４０】

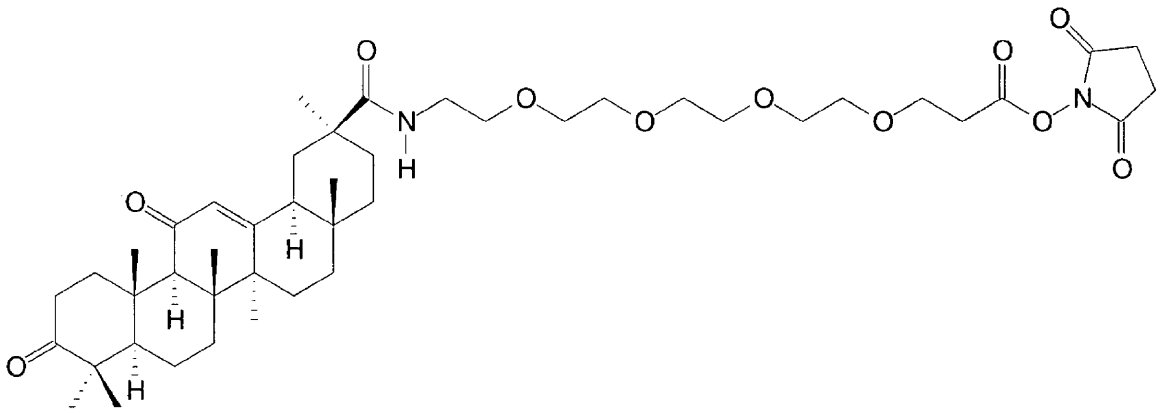


【０４５９】

従って、この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ４（４個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるように、ＮＨＳエステルのような活性化エステルに転化されることができる。

【０４６０】

【化１４１】



【０４６１】

例示される活性化エステルは、タンパク質担体に直接連結されている。あるいはまた、活性化エステルは、所望に応じて、保護された、例えばＢＯＣで保護されたヒドラジン試

薬での処理によりヒドラジドのような異なる反応性官能基に転化されることができる。

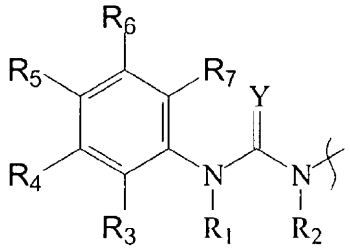
【０４６２】

５．尿素およびチオ尿素

尿素／チオ尿素、特にアリールおよびヘテロアリール尿素およびチオ尿素は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。アリール誘導体は、典型的に以下の式を有する。

【０４６３】

【化１４２】

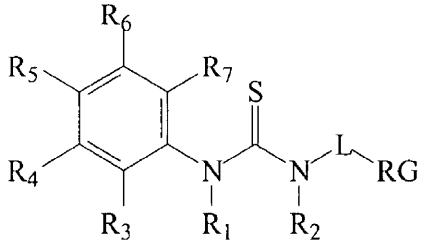


【０４６４】

R_3～R_7置換基の少なくとも１つはまたリンカーに、担体に結合されることもでき、またはリンカーへのそして／もしくは担体分子への連結に適当な官能基である。あるいはまた、尿素／チオ尿素官能基は、開示されるハプテンのこのクラスにリンカーを連結するために用いることができる。特にチオ尿素に関して、典型的なハプテンコンジュゲートが以下に提供される。

【０４６５】

【化１４３】

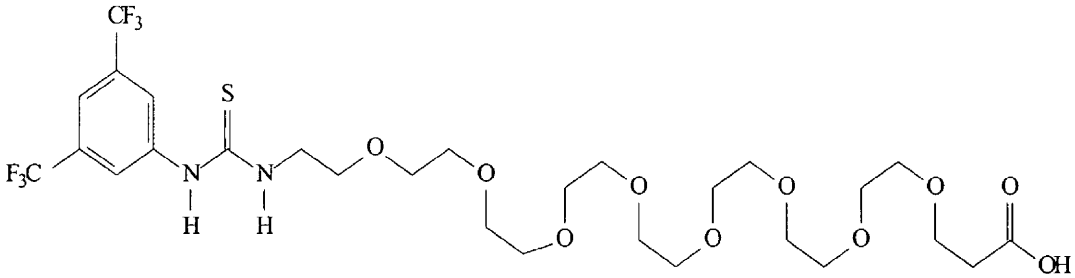


【０４６６】

ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例を以下に示す。

【０４６７】

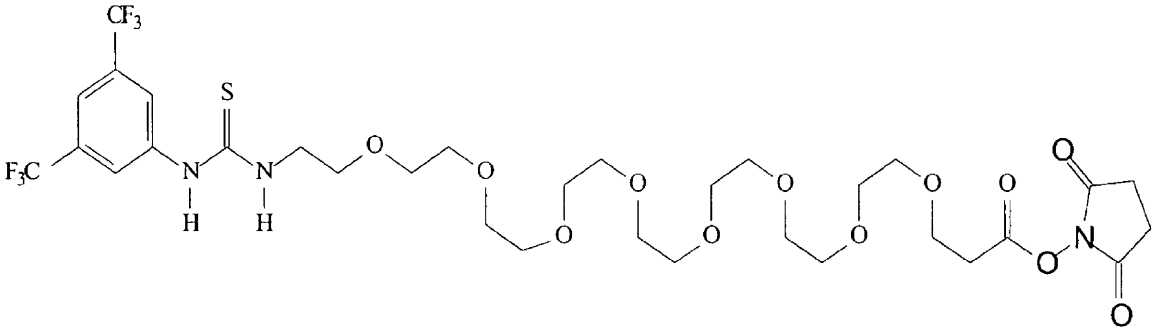
【化１４４】



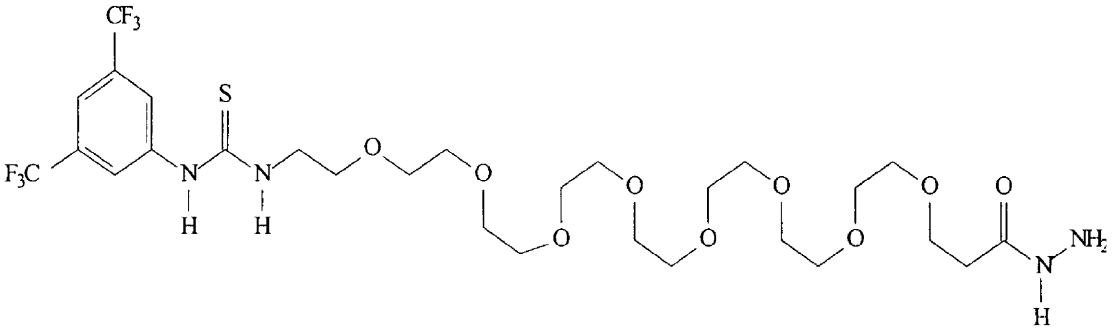
【０４６８】

従って、この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ８（８個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるように、ＮＨＳエステルのような活性化エステルに転化されることができる。

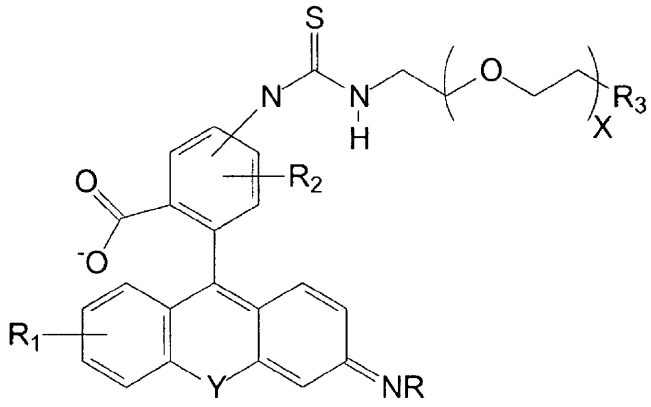
【０４６９】
【化１４５】



【０４７０】
活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。
【０４７１】
【化１４６】



【０４７２】
本発明のローダミンチオ尿素ハプテンコンジュゲートは、典型的に以下の式を有する。
【０４７３】
【化１４７】

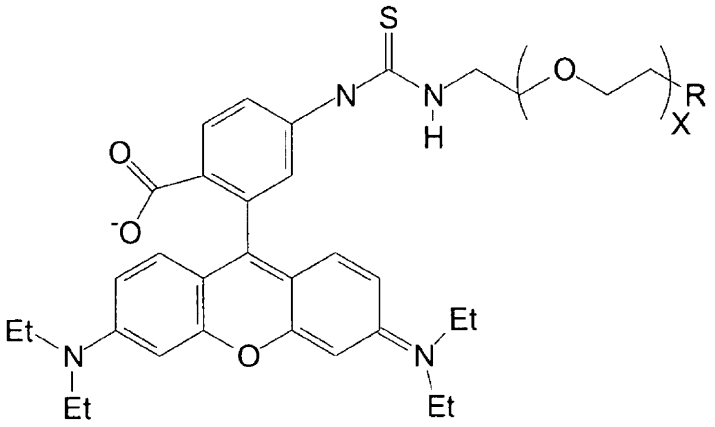


【０４７４】
この式に関して、Ｒは典型的に独立して水素、脂肪族、特にアルキル、ヘテロ脂肪族、ハロゲン化アルキルのような置換された脂肪族、アリール、ヘテロアリール、およびその組み合わせから選択される。Ｒ$_1$は典型的に独立して水素、脂肪族、特にアルキル、ヘテロ脂肪族、ハロゲン化アルキルのような置換された脂肪族、アルコール、アミン、低級アルキルアミンのような置換されたアミン（一例はジエチルアミンである）、アリール、ヘテロアリール、ハロゲン、ヒドロキシル、およびその組み合わせから選択される。Ｒ$_2$は

典型的に独立して水素、脂肪族、特にアルキル、ヘテロ脂肪族、ハロゲン化アルキルのような置換された脂肪族、アルコール、アミン、置換されたアミン、アリール、ヘテロアリール、ハロゲン、ヒドロキシル、およびその組み合わせから選択される。Ｙは酸素、窒素もしくは硫黄である。ローダミンＢチオ尿素の特定の態様は、以下の式を有した。

【０４７５】

【化１４８】



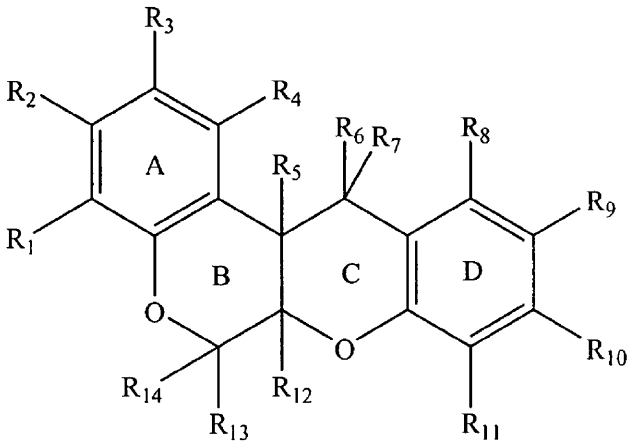
【０４７６】

６．ロテノンおよびロテノンに基づくハプテン

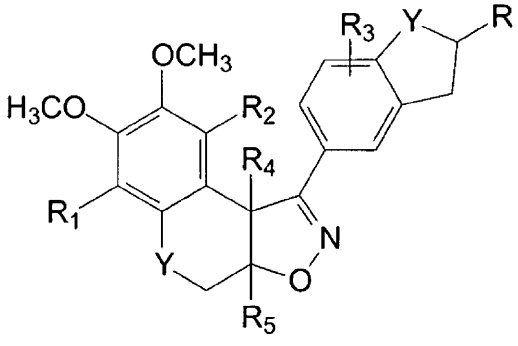
ロテノンおよびロテノンに基づくハプテンは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを定義する。ロテノンおよびロテノンに基づくハプテンの一般式は、以下に提供される。

【０４７７】

【化１４９】

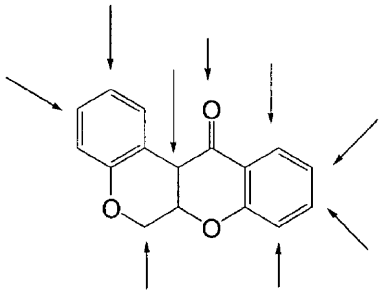


式1

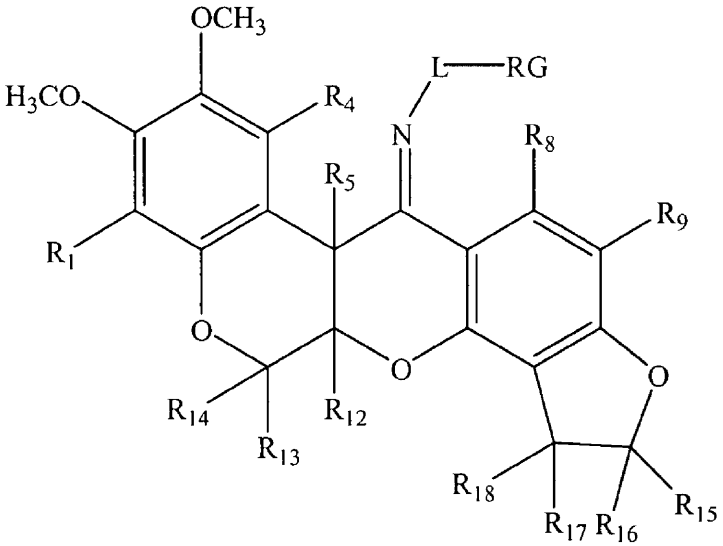


式2

【０４７８】
Ｒ$_{1}$～Ｒ$_{14}$位置のいずれかは、このクラスのハプテンにリンカーを連結するために用いることができる。式１のある特定の化合物は、カルボニルを形成するための酸素への二重結合もしくはイミンを形成するための窒素への二重結合のような二重結合をＲ$_{6}$およびＲ$_{7}$に形成させる。これらのハプテンコンジュゲートに関して特定の典型的なリンカー連結位置は、以下に提供される。
【０４７９】
【化１５０】

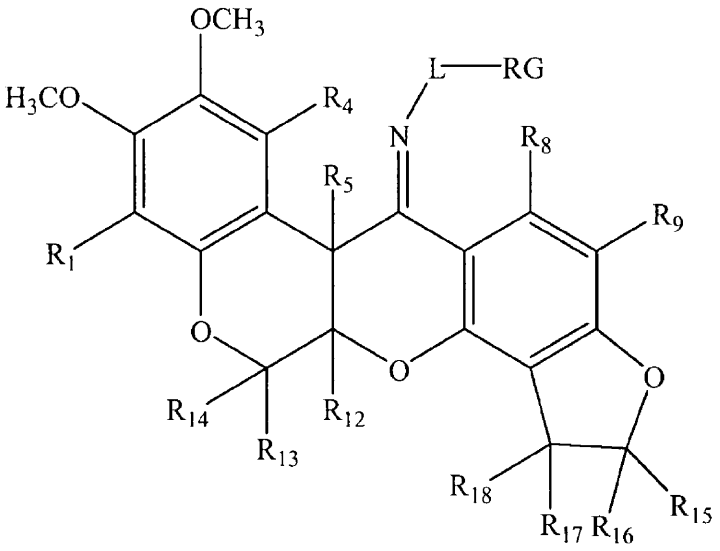


【０４８０】
リンカーに結合するためにカルボニル化合物を使用できることを当業者は認識する。このクラスの典型的なハプテンコンジュゲートは、以下に提供される一般式
【０４８１】
【化１５１】

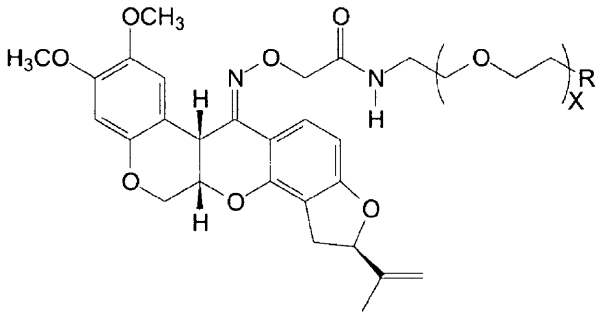


【０４８２】
以下に提供される一般式
【０４８３】

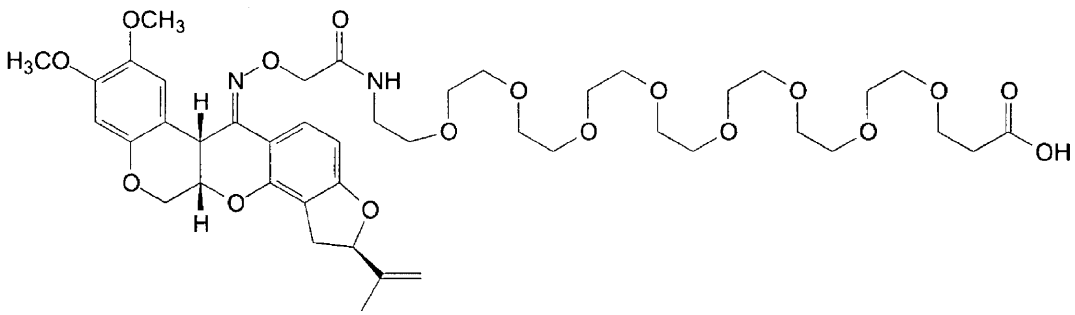
【化１５２】



【０４８４】
により例示される。
【０４８５】
ＰＥＧに基づくリンカーを有するハプテン－リンカーコンジュゲートの一例を以下に示す。
【０４８６】
【化１５３】



【０４８７】
特定の態様は、以下の式を有した。
【０４８８】
【化１５４】

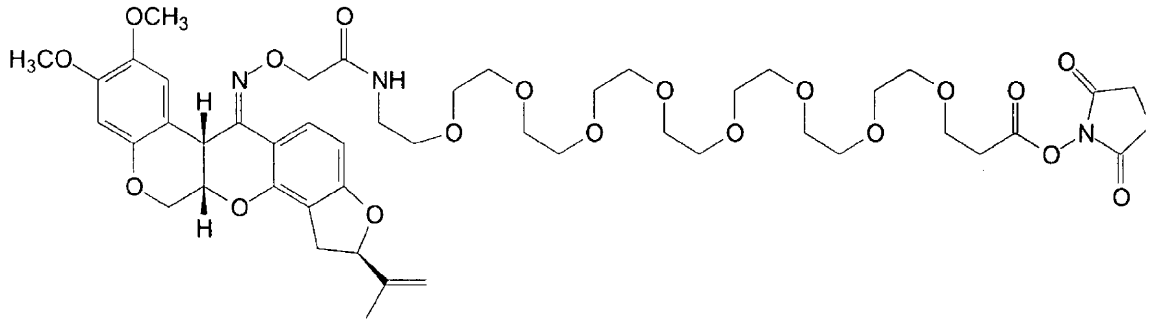


【０４８９】
この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ８（８個のエチレンオキ

シ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるＮＨＳエステルを包含する活性化エステルのような所望に応じて異なる反応性官能基に転化されることができる。

【０４９０】

【化１５５】

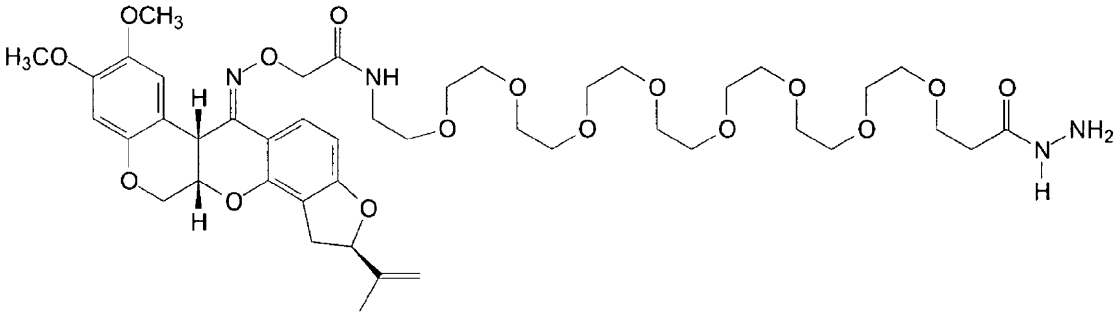


【０４９１】

活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。

【０４９２】

【化１５６】

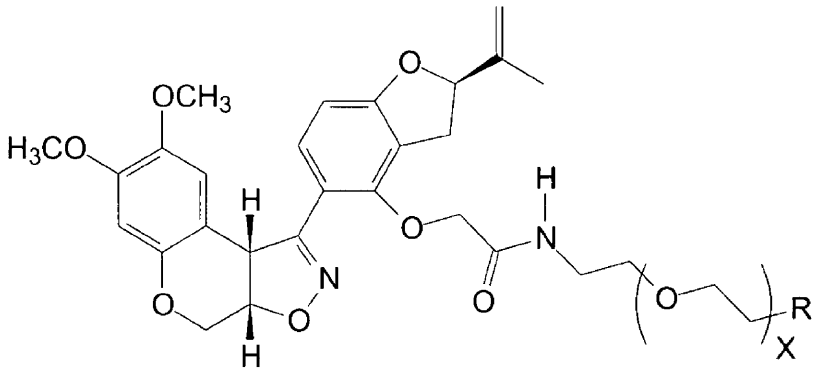


【０４９３】

ロテノンイソオキサゾリンについて、典型的なハプテン－リンカーコンジュゲートは以下の式を有した。

【０４９４】

【化１５７】



【０４９５】

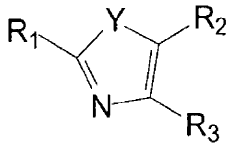
７．オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミド

オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドの一般式は、以下に提供

される。

【０４９６】

【化１５８】

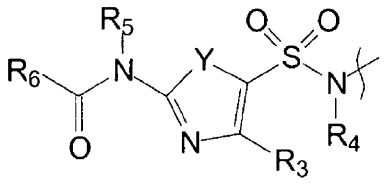


【０４９７】

Ｒ$_1$～Ｒ$_3$位置の任意の１つもしくはそれ以上は、ハプテンコンジュゲートを形成するようにこのクラスのハプテンにリンカーもしくは担体を連結するために用いることができる。ある典型的な実用的態様について、Ｒ$_1$は以下に示されるアミド誘導体のようなアミドであった。これらの化合物について、Ｒ$_2$およびＲ$_3$位置はリンカーへの連結に適当である。ある実用的態様について、Ｒ$_2$は－ＳＯ$_2$であり、そしてスルホンアミドを形成することによりリンカーを連結するために用いられている。従って、このクラスのハプテンを例示するハプテンの実用的態様の第二の一般式を以下に示す。

【０４９８】

【化１５９】

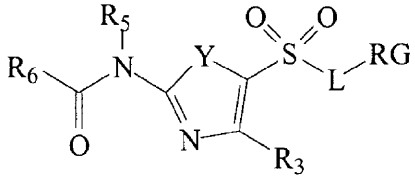


【０４９９】

この一般式に基づく典型的なハプテンコンジュゲートには、以下の式を有するものが包含される。

【０５００】

【化１６０】

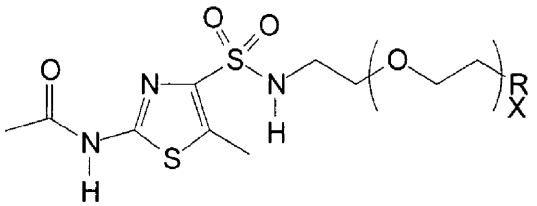


【０５０１】

ハプテン－リンカーコンジュゲートは、ＰＥＧに基づくリンカーを用いて形成されている。そのような化合物の一例、２－アセトアミド－４－メチル－５－チアゾールスルホンアミドを以下に示す。

【０５０２】

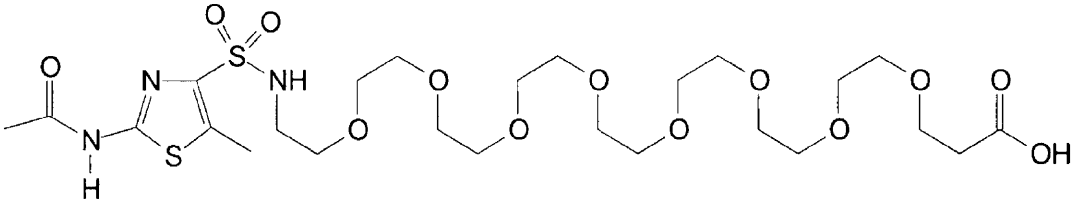
【化１６１】



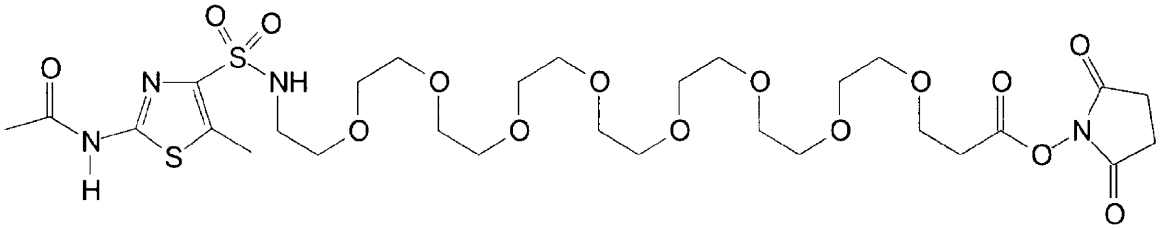
【０５０３】

特定の態様は、以下の構造を有した。

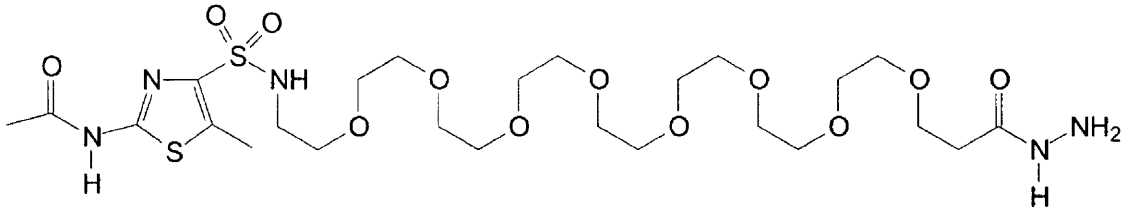
【０５０４】
【化１６２】



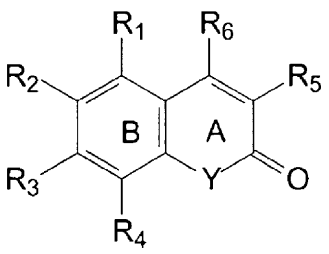
【０５０５】
この例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧ８（８個のエチレンオキシ単位）であり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるＮＨＳエステルを包含する活性化エステルのような所望に応じて異なる反応性官能基に転化されることができる。
【０５０６】
【化１６３】



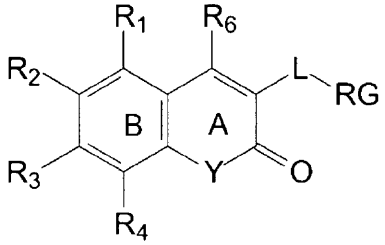
【０５０７】
活性化エステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。
【０５０８】
【化１６４】



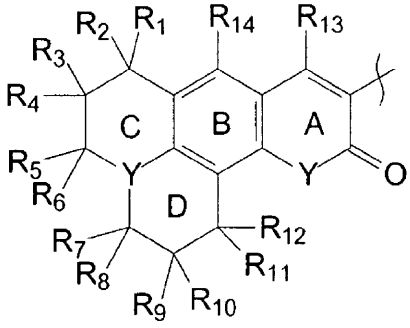
【０５０９】
８．クマリン
クマリンおよびクマリン誘導体は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。クマリンおよびクマリン誘導体の一般式は、以下に提供される。
【０５１０】
【化１６５】



【０５１１】
Ｒ$_1$～Ｒ$_6$位置のいずれかはまた典型的にリンカーに、担体に結合されるか、またはリンカーもしくは担体分子への連結に適当な官能基である。ある実用的態様は、リンカーへの連結にＲ$_5$置換基を有するとして示される位置を使用している。Ｒ$_6$置換基により占められる位置は、これらの化合物を検出するために蛍光が用いられる場合に重要であることができる。一般式においてＲ$_6$により占められる位置での水素以外の置換基は、そのような誘導体はなお発色団であり得るが、蛍光をクエンチすると考えられる。この式を用いて製造される典型的なハプテンコンジュゲートは、以下の一般式を有する。
【０５１２】
【化１６６】

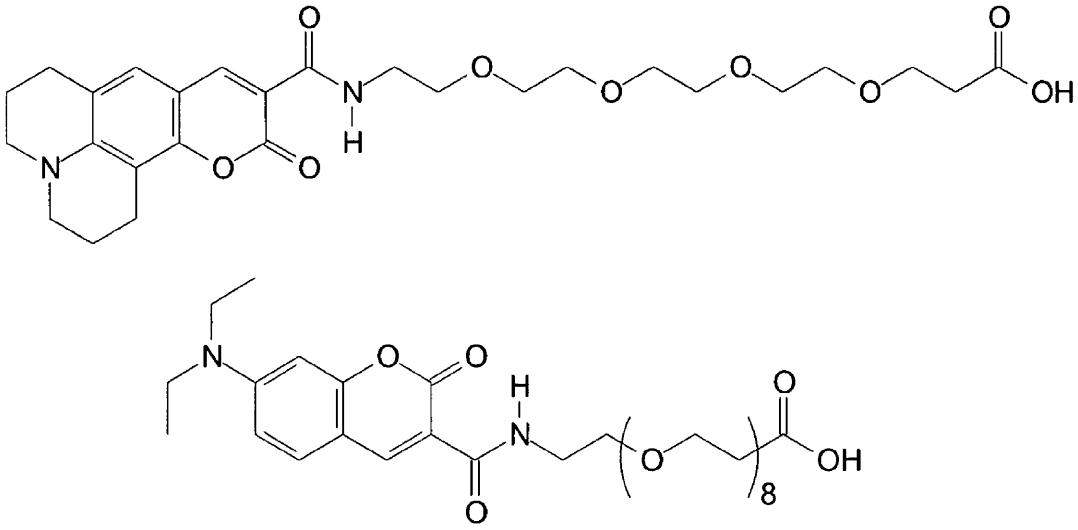


【０５１３】
実用的態様は典型的に、以下に示されるように、縮合Ａ～Ｄ環系であった。
【０５１４】
【化１６７】



【０５１５】
このクラスを例示するハプテンコンジュゲートは、以下に提供される。
【０５１６】

【化１６８】

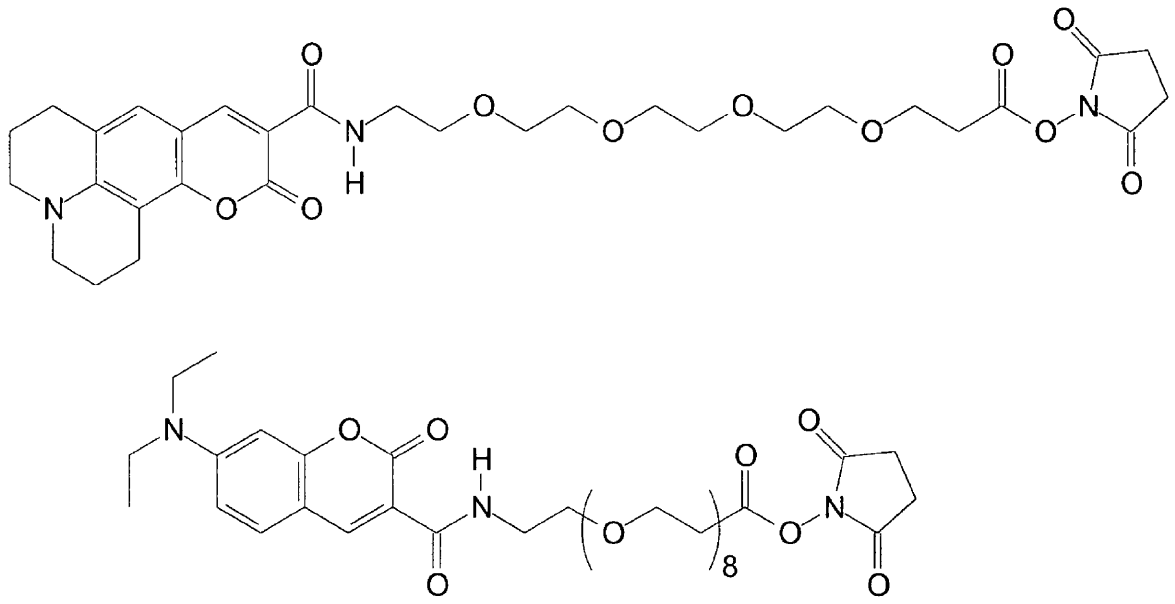


【０５１７】

これらの例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧリンカーであり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるＮＨＳエステルを包含する活性化エステルのような所望に応じて異なる反応性官能基に転化することができる。

【０５１８】

【化１６９】

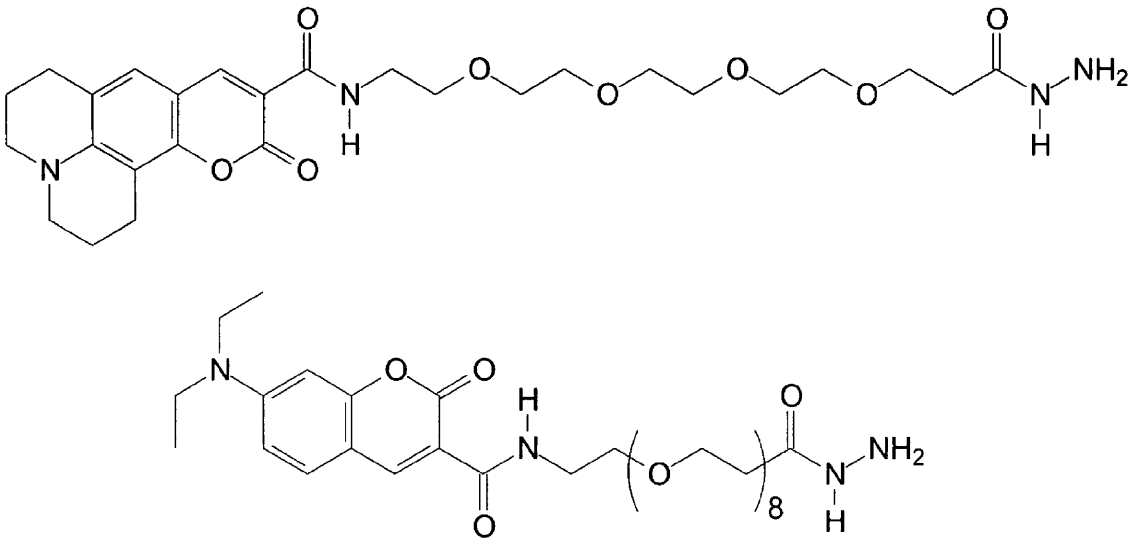


【０５１９】

ＮＨＳエステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。

【０５２０】

【化１７０】



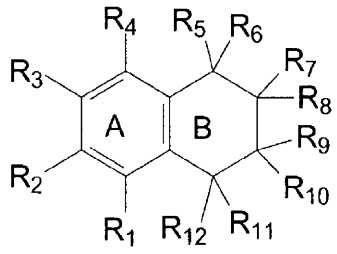
【０５２１】

９．シクロリグナン

シクロリグナンは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。本明細書において詳細に説明される第一の一般式は、以下に提供される。

【０５２２】

【化１７１】

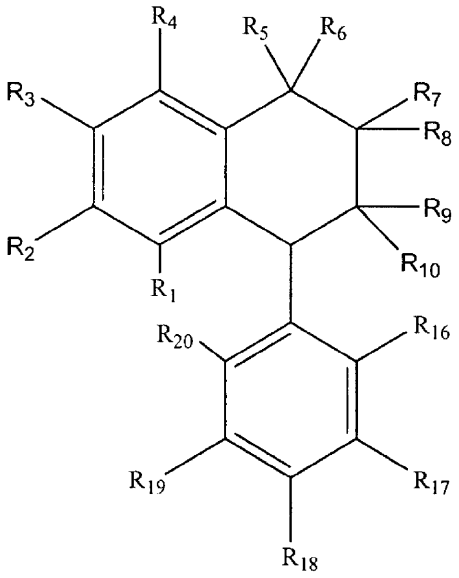


【０５２３】

Ｒ１～Ｒ１２置換基の少なくとも１つは典型的にリンカーにもしくは担体に結合されるか、またはリンカーもしくは担体と反応することができる反応性官能基である。Ｒ１２およびＲ１１の少なくとも１つはまた、ベンゼン環もしくは置換されたベンゼン環のようなアリール基であることも多い。Ｒ１１およびＲ１２の少なくとも１つがアリール基である典型的な化合物は典型的に以下の一般式を有し、ここで、Ｒ置換基は上記のとおりである。

【０５２４】

【化１７２】

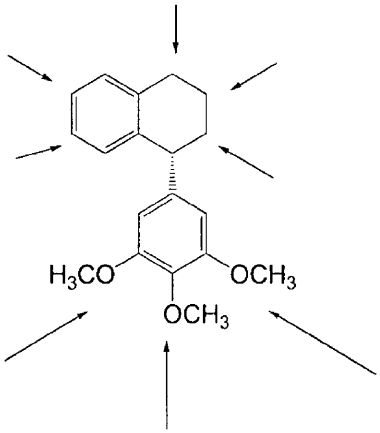


【０５２５】

Ｒ９は－Ｌ－ＲＧであることが多く、そしてＲ１６～Ｒ２０は独立して水素およびアルコキシ、典型的には以下に示されるようにメトキシのような低級アルコキシである。以下の一般的分子式は、このクラスのハプテンにリンカーを連結するための適当な位置を示す。

【０５２６】

【化１７３】

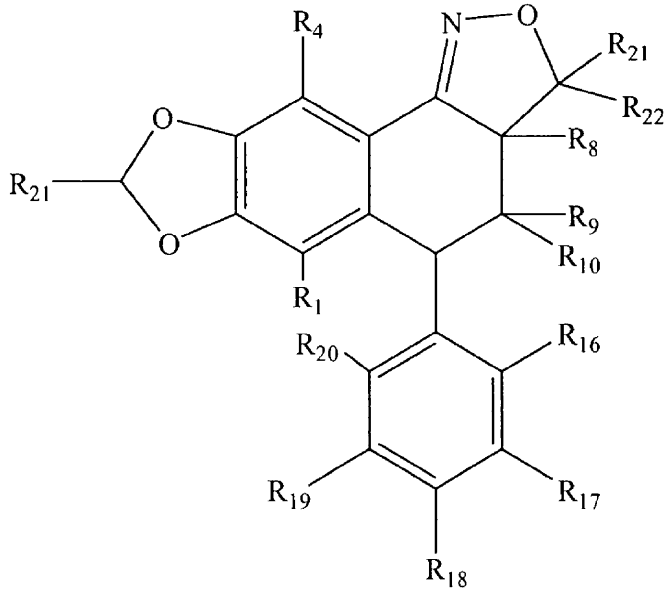


【０５２７】

このクラス内の化合物の種を表すために有用な別の一般式は、下記のとおりである。

【０５２８】

【化１７４】

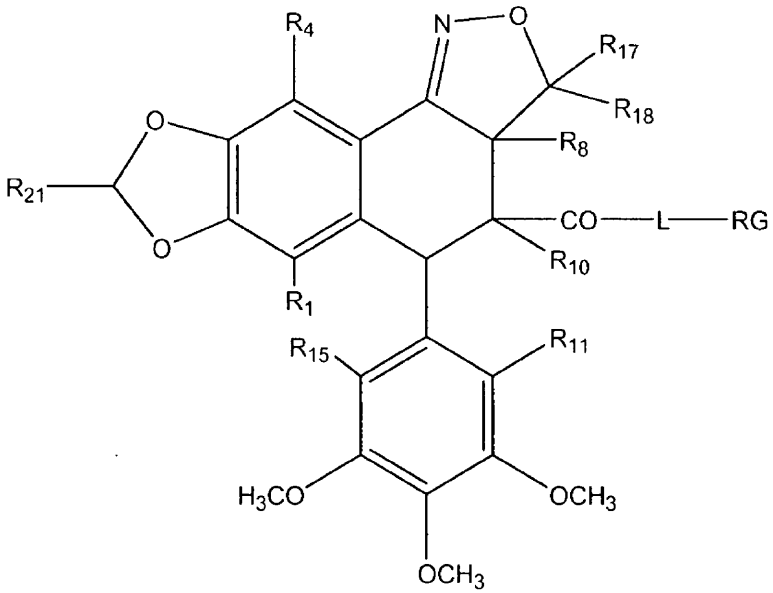


【０５２９】

本発明の全てのハプテンコンジュゲートのように、Ｒ置換基の少なくとも１つは典型的にリンカーに結合されるか、リンカーと反応することができる反応性官能基であるか、もしくは－Ｌ－ＲＧである。例えば、Ｒ９は以下に示されるように、－Ｌ－ＲＧであることが多い。

【０５３０】

【化１７５】

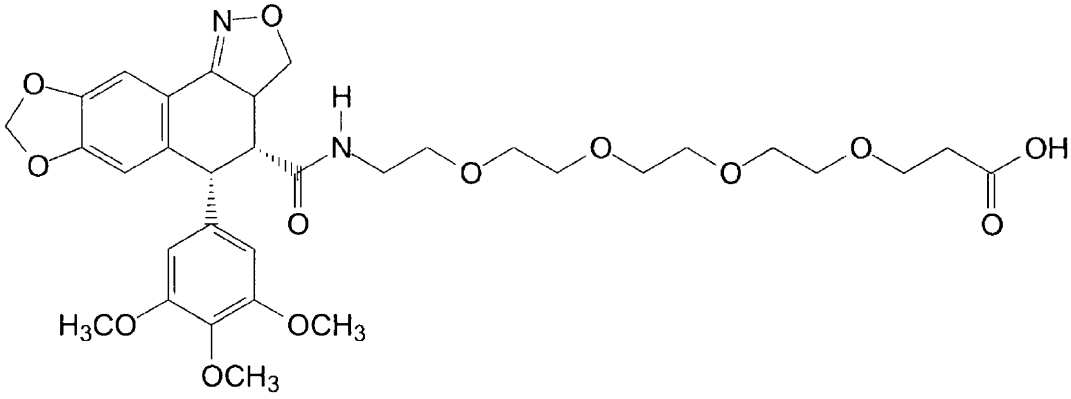


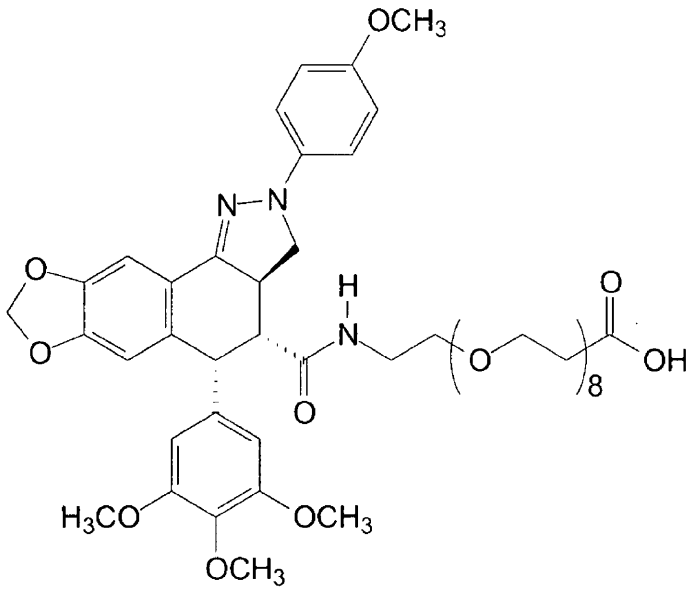
【０５３１】

このクラスを例示するハプテン－Ｌ－ＲＧコンジュゲートは、以下に提供される。

【０５３２】

【化１７６】



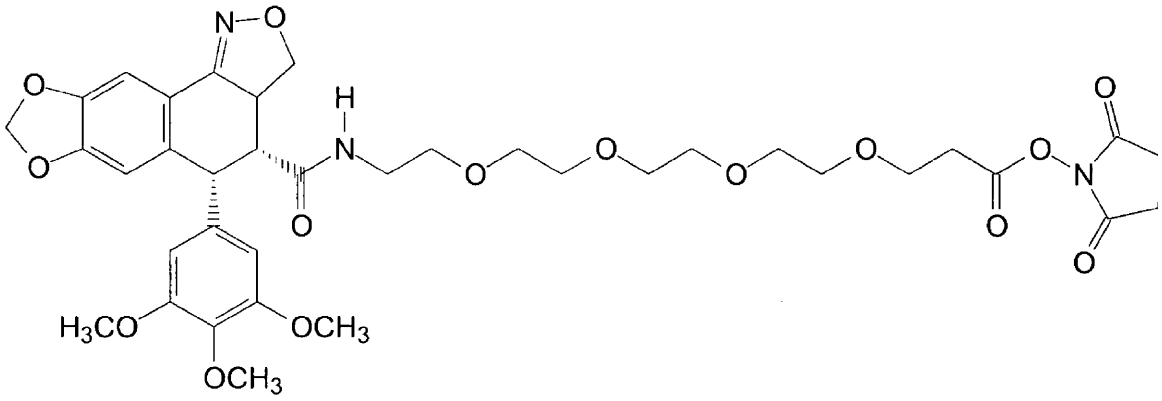


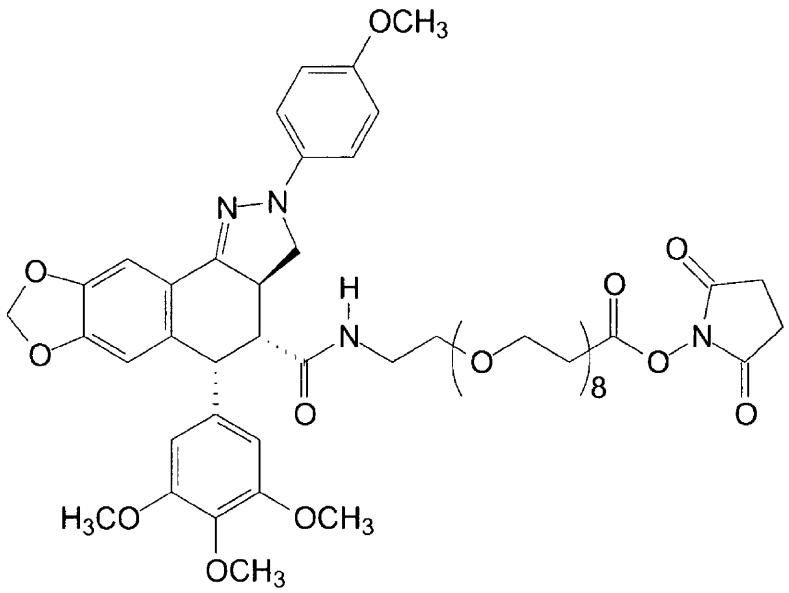
【０５３３】

これらの例は式ハプテン－Ｌ－ＲＧを満たし、ここで、ＬはＰＥＧリンカーであり、そして反応性基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、以下に示されるＮＨＳエステルを包含する活性化エステルのような所望に応じて異なる反応性官能基に転化されることができる。

【０５３４】

【化１７７】



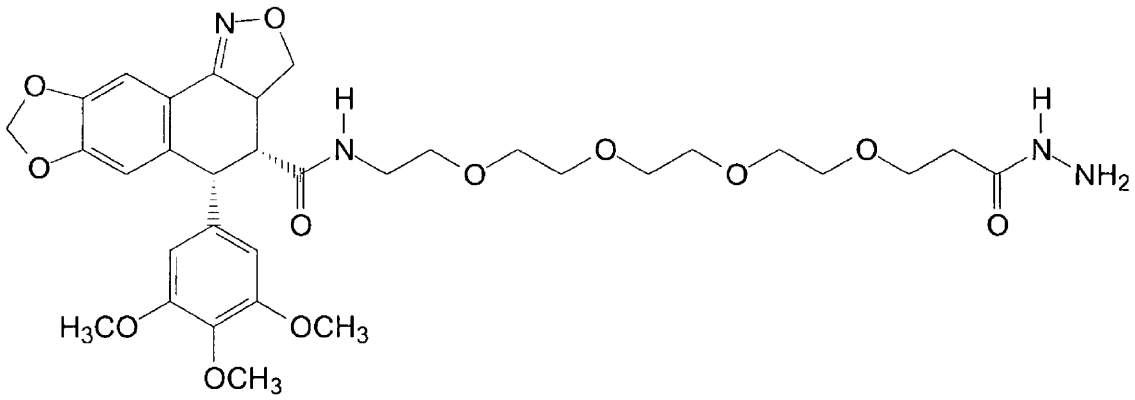


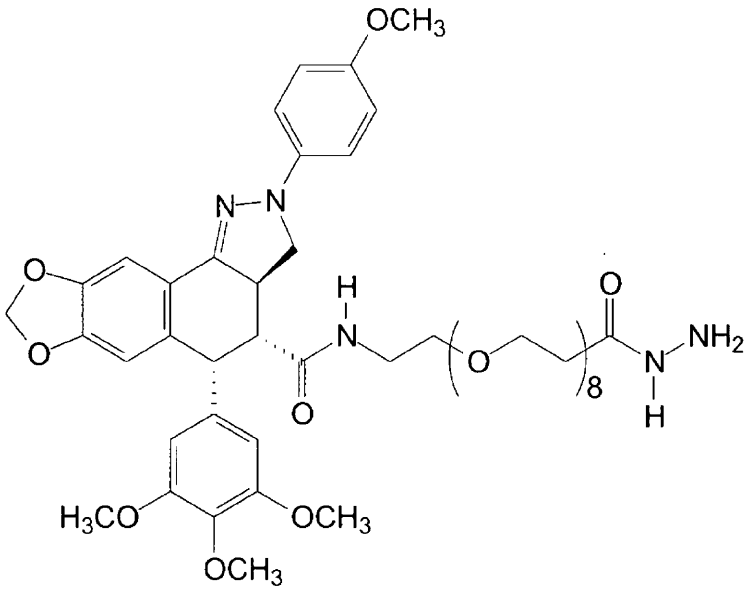
【０５３５】

ＮＨＳエステルは、以下に例示されるように、ヒドラジドのような他の有用な反応性官能基に転化されることができる。

【０５３６】

【化１７８】





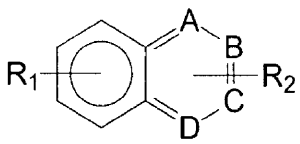
【０５３７】

１０．ヘテロビアリールハプテンコンジュゲート

ヘテロビアリールハプテンコンジュゲートは、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスを提供する。ハプテンのこの一般的クラスは、以下のような第一の一般的化学式を有する。

【０５３８】

【化１７９】

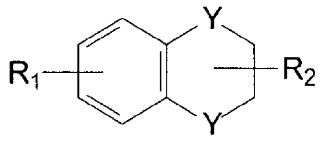


【０５３９】

この一般式に関して、Ａ～Ｄは炭素、窒素、酸素および硫黄から選択され、そして最も典型的には炭素もしくは窒素である。

【０５４０】

【化１８０】



【０５４１】

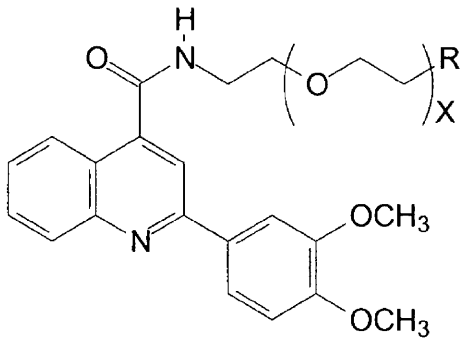
Ｒ１～Ｒ２置換基の少なくとも１つは典型的にリンカーにもしくは担体に結合されるか、またはリンカーもしくは担体と反応することができる反応性官能基である。

【０５４２】

モノヘテロ原子ビアリールハプテンコンジュゲートの特定の例を以下に例示する。Ｒは典型的にはヒドロキシルもしくはカルボキシルである。ヒドロキシルコンジュゲートでは、ヒドロキシル基をハロゲン化物に転化し、そして次にアミノカルボジイミドを用いて置換して生体分子を直接標識するために適当なカルボジイミド化合物を生成せしめることができる。カルボキシル基は、保護されたヒドラジドとのようなさらなる反応のための酸ハロゲン化物もしくはＮＨＳエステルの形成によるように、活性化することができる。これらの化合物の合成は、下記にさらに詳細に記述される。

【０５４３】

【化１８１】

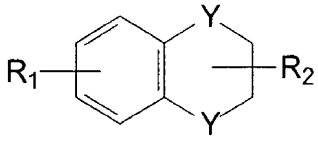


【０５４４】

本発明のハプテンの別の一般的なクラスは、以下のような第一の一般的化学式を有する複素二環式／ビアリール化合物、典型的にはフェニルキノリンおよびキノキサリンである。

【０５４５】

【化１８２】

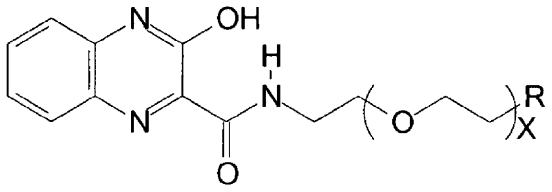


【０５４６】

Ｒ１～Ｒ２置換基は、このクラスのハプテンについての上記のとおりである。ジヘテロ原子ビアリールハプテンコンジュゲートの特定の例を以下に例示する。

【０５４７】

【化１８３】



【０５４８】

モノヘテロ原子誘導体のように、Ｒは典型的にはヒドロキシルもしくはカルボキシルである。これらの官能基は、本明細書に開示されるようなさらなるコンジュゲートを形成するために用いることができる。Ｒは典型的にはヒドロキシルもしくはカルボキシルである。ヒドロキシルコンジュゲートでは、ヒドロキシル基をハロゲン化物に転化し、そして次にアミノカルボジイミドを用いて置換して生体分子を直接標識するために適当なカルボジイミド化合物を生成せしめることができる。カルボキシル基は、保護されたヒドラジドとのようなさらなる反応のための酸ハロゲン化物もしくはＮＨＳエステルの形成によるように、活性化することができる。これらの化合物の合成は、以下にさらに詳細に記述される。

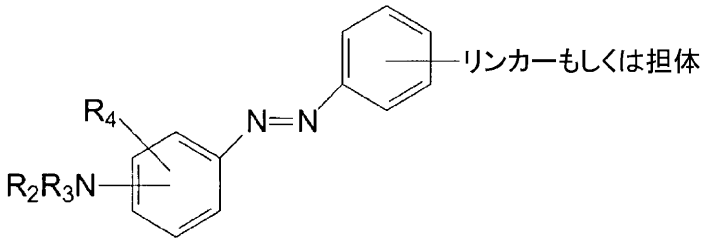
【０５４９】

１１．アゾアリールコンジュゲート

アゾアリールハプテンコンジュゲートのある開示される態様は、以下に提供されるような式を有した。

【０５５０】

【化１８４】

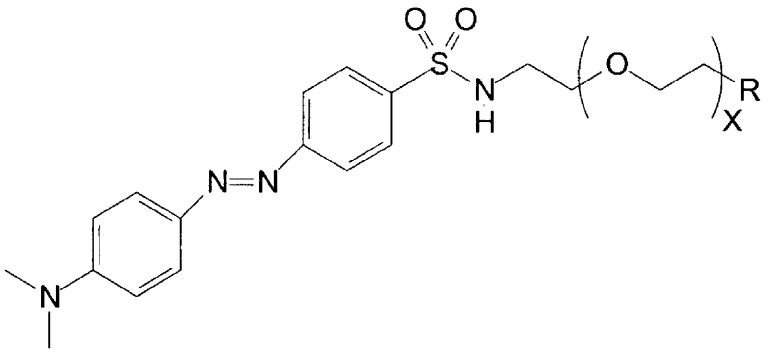


【０５５１】

Ｒ$_2$～Ｒ$_4$は上記のとおりである。リンカーもしくは担体は、例えば、ハロゲン化スルホニルとの反応によりアゾアリールハプテンに連結されることができる。そのようなコンジュゲートの１つの態様、４－（ジメチルアミノ）アゾベンゼン－４’－スルホンアミドは、以下に提供される式を有する。

【０５５２】

【化１８５】



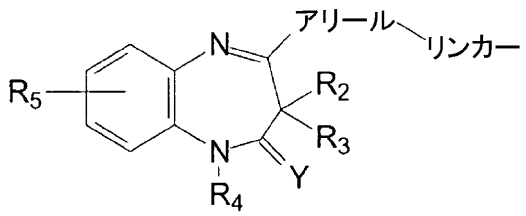
【０５５３】

１２．ベンゾジアゼピンコンジュゲート

ベンゾジアゼピンハプテンの特定の態様は、以下に示されるように、R_1アリールを有し、ここで、リンカーもしくは担体はアリール基に連結される。例えば、ベンゾジアゼピンハプテンリンカーコンジュゲートは以下に示されるような式を有する。

【０５５４】

【化１８６】

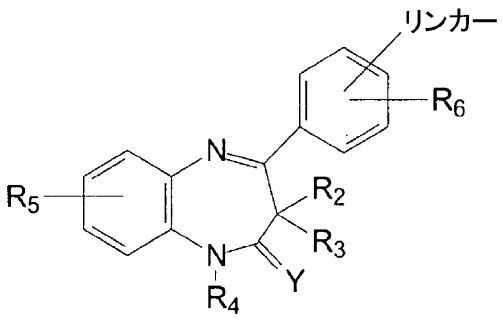


【０５５５】

R_2～R_5は上記のとおりである。より典型的には、そのような置換基は独立して脂肪族、特にアルキル、水素およびヒドロキシルから選択される。ある開示される態様は、以下に例示されるように、フェニル化合物である。

【０５５６】

【化１８７】

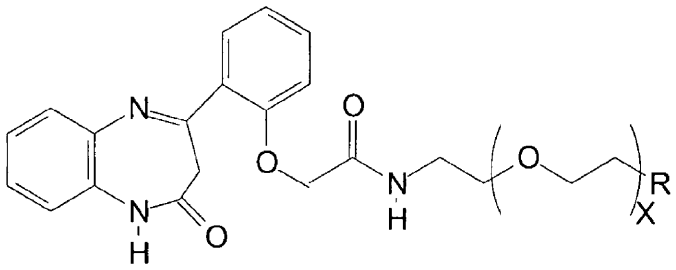


【０５５７】

この場合もやはり、R_2～R_6は上記のとおりである。特定の態様、（Ｅ）－２－（２（２－オキソ－２，３－ジヒドロ（ｄｉｈｙｄｒｏｒ）－１Ｈ－ベンゾ（ｂｅｎｘｏ）［ｂ］［１，４］ジアゼピン－４イル）フェノキシ）アセトアミドは、以下に提供される。

【０５５８】

【化１８８】



【０５５９】

Ｒは典型的にはヒドロキシルもしくはカルボキシルである。これらの官能基は、本明細書に開示されるようなさらなるコンジュゲートを形成するために用いることができる。Ｒは典型的にはヒドロキシルもしくはカルボキシルである。ヒドロキシルコンジュゲートでは、ヒドロキシル基をハロゲン化物に転化し、そして次にアミノカルボジイミドを用いて置換して生体分子を直接標識するために適当なカルボジイミド化合物を生成せしめることができる。カルボキシル基は、保護されたヒドラジドとのようなさらなる反応のための酸ハロゲン化物もしくはＮＨＳエステルの形成によるように、活性化することができる。こ

れらの化合物の合成は、以下にさらに詳細に記述される。

【０５６０】

Ｖ．担体

本願のハプテンリンカーコンジュゲートはまた、適当な官能基によりハプテンもしくはハプテンリンカーに連結される担体を含むこともできることを当業者は認識する。担体は、例としてそして限定せずに、アミノ酸、ポリペプチド、タンパク質、およびその一部；ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオチド鎖、核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡなど；ならびにその組み合わせであることができる。典型的には、担体分子はタンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、もしくはその組み合わせである。

【０５６１】

適当な担体はまた、公開特許文献にも開示される。例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｗａｇｇｏｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許出願第２００４／００５７９５８号は、さらなる適当な担体を開示する。担体はハプテン、または担体と会合していない場合に免疫原性、非免疫原性もしくは弱く免疫原性である任意の他の抗原性化合物の免疫原性を高めるために用いることができる。非免疫原性、非アレルギー性、非抗原性であること、代謝可能であること、分子量、特に例えばリン酸緩衝食塩水のような水性生理溶液における溶解性、および抗原性化合物とコンジュゲーションする（例えば共有結合する）かもしくは会合する（例えば一緒に混合するかもしくは電荷－電荷相互作用によって会合する）ことができることを包含する生理化学的性質のような、潜在的担体のある特性もまた特定の担体を選択する場合に考慮することができる。

【０５６２】

単一の担体ならびに異なる担体の混合物を用いることができる。異なる担体には、例えば２つもしくはそれ以上の異なる長さのホモポリマーのような異なる長さのポリマー、ならびに本発明の２つもしくはそれ以上の異なる担体もしくはポリマーの混合物が包含される。単一の担体を使用することは１つのみの担体－ハプテン複合体を製造することを必要とし、一方、多数の担体を使用することは明らかにより難しい。１つより多くの担体を使用することは、特定のハプテンもしくはエピトープに対して生じる免疫反応が、使用する特定の担体により、例えば、大きさもしくは特異性においてのように、異なりそして最適な担体が既知でないかもしくはまだ実験的に決定されていない場合に好都合であり得る。

【０５６３】

担体は合成もしくは天然ポリマー、実質的に抗原性、実質的に非抗原性もしくは生物分解性、または両方であることができる。担体として有用な適当なポリマーの例には、ポリ（ジエン）、ポリ（アルケン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（ビニルエーテル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルケトン）、ポリ（ハロゲン化ビニル）、ポリ（ビニルニトリル）、ポリ（ビニルエステル）、ポリ（スチレン）、ポリ（カーボネート）、ポリ（エステル）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（エステルアミド）、ポリ（無水物）、ポリ（ウレタン）、ポリ（アミド）、セルロースエーテル、セルロースエステル、ポリ（サッカリド）、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）、ポリ（ラクチド）、ポリ（グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリ（ラクチド－コ－カプロラクトン）、ポリ（エステルアミド）、ポリオルトエステル、ポリ（ａ－ヒドロキシ酪酸）、ポリ無水物もしくはその混合物が包含されるがこれらに限定されるものではない。別の態様において、ポリマーは、アルファヒドロキシカルボン酸もしくは複数の酸（例えば、アルファヒドロキシカルボン酸はグリコール酸、乳酸、ａ－ヒドロキシ酪酸、ａ－ヒドロキシイソ酪酸、ａ－ヒドロキシ吉草酸、ａ－ヒドロキシイソ吉草酸、ａ－ヒドロキシカプロン酸、ａ－ヒドロキシ－ａ－エチル酪酸、ａ－ヒドロキシイソカプロン酸、ａ－ヒドロキシ－３－メチル吉草酸、ａ－ヒドロキシヘプタン酸、ａ－ヒドロキシオクタン酸、ａ－ヒドロキシデカン酸、ａ－ヒドロキシミリスチン酸、ａ－ヒドロキシステアリン酸、ａ－ヒドロキシリグノセリン酸（ａ－ｈｙｄｒｏｘｙｌｉｇｏｃｅｒｉｃ　ａｃｉｄ）を含んでなる）、ラクトン（３－プロピオラクトン、テトラメチレングリコリド、ｂ－ブチロラクトン、４－ブチロラクトン、ピバラクトン）、ジエン、アルケン、アク

リレート、メタクリレート、ビニルエーテル、ビニルアルコール、ビニルケトン、ハロゲン化ビニル、ビニルニトリル、ビニルエステル、スチレン、カーボネート、エステル、オルトエステル、エステルアミド、無水物、ウレタン、アミド、セルロースエーテル、セルロースエステル、糖、アルファヒドロキシカルボン酸、ラクトン、エステルアミド、もしくはその混合物から選択される少なくとも１つのモノマーの重合もしくはオリゴマー化から得られるポリマーもしくはオリゴマーであることができる。

【０５６４】

ポリマーは、そのホモポリマーおよびヘテロポリマーの両方を包含する、１つもしくはそれ以上のアミノ酸由来であることができる。例えば、Ｌ－グルタミン酸、Ｄ－グルタミン酸もしくはこれらのＬおよびＤ異性体の混合物、例えばラセミ化合物由来のポリグルタメートが用いられる。Ｌおよび／もしくはＤグルタニル、アスパルチル、グリシル、セリル、トレオニルおよびシステイニルは全て用いることができるアミノ酸の例である。ポリマーはまた、ブロック、グラフトもしくはランダムコポリマーであることもできる。これらには、例えば、少なくとも１つの他のアミノ酸、例えばアスパラギン酸、セリン、チロシン、グリシン、エチレングリコール、エチレンオキシド、（またはこれらのいずれかのオリゴマーもしくはポリマー）もしくはポリビニルアルコールを含有するコポリマーが包含される。グルタミン酸は、もちろん、１つもしくはそれ以上の置換基を保有することができ、そしてポリマーには、グルタミン酸モノマーの一部もしくは全部が置換されるものが包含される。特定のポリマー例には、ポリ（ｌ－グルタミン酸）、ポリ（ｄ－グルタミン酸）、ポリ（ｄｌ－グルタミン酸）、ポリ（ｌ－アスパラギン酸）、ポリ（ｄ－アスパラギン酸）、ポリ（ｄｌ－アスパラギン酸）、ポリ（ｌ－セリン）、ポリ（ｄ－セリン）、ポリ（ｄｌ－セリン）、ポリ（ｌ－チロシン）、ポリ（ｄ－チロシン）、ポリ（ｄｌ－チロシン）、ポリ（ｌ－グリシン）、ポリ（ｄ－グリシン）、ポリ（ｄｌ－グリシン）、ポリ（ｌ－トレオニン）、ポリ（ｄ－トレオニン）、ポリ（ｄｌ－トレオニン）、ポリ（ｄ－システイン）、ポリ（ｌ－システイン）およびポリ（ｄｌ－システイン）が包含されるがこれらに限定されるものではない。さらなる態様において、ポリマーは、ポリエチレングリコール、ポリカプロラクトン、ポリグリコール酸およびポリ乳酸、ならびにポリ（２－ヒドロキシエチル１－グルタミン）、キトサン、カルボキシメチルデキストラン、ヒアルロン酸、ヒト血清アルブミンおよびアルギニン酸と上記のポリ（アミノ酸）とのブロック、グラフトもしくはランダムコポリマーのようなコポリマーであり、ポリグルタミン酸が特に好ましい。

【０５６５】

適当なポリマーの分子量は異なり得る。しかしながら、典型的には、分子量は約１，０００キロダルトン分子量～１０，０００，０００キロダルトン未満である。

【０５６６】

タンパク質担体を例示する実用的態様には、ウシサイログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニンもしくはウシ血清アルブミンが包含された。

【０５６７】

本願のハプテンコンジュゲートは、ハプテン－リンカー化合物を形成するために担体にハプテンをもしくはリンカーにハプテンを連結するための反応性官能基を含む。タンパク質連結のために、タンパク質はハプテンコンジュゲートを形成するために適当な求電子性官能基に連結することができる様々な官能基、典型的には求核物質を含む。例えば、遊離アミン（－NH_2）もしくは第二級アミンは、酸ハロゲン化物（－ＣＯ）、スクシンイミドエステルなどのようなカルボン酸もしくはカルボン酸誘導体との反応によりハプテンもしくはハプテン－リンカー化合物にタンパク質を連結してアミドを形成するために用いることができ；ハロゲン化アルキルはアミンを形成するために用いることができ；ケトンおよびアルデヒドのようなカルボニル化合物はイミンを形成するために用いることができ；そしてその組み合わせ。あるアミノ酸は、反応性ヒドロキシルおよび／もしくはスルフヒドリル基を包含する、ハプテンに担体を連結するために適当な他の反応性官能基を含む。典型的な連結には、カルボン酸もしくはカルボン酸誘導体との反応によるエステルおよび

ラクトン形成；エーテル形成；およびその組み合わせが包含される。

【０５６８】

ＶＩ．シグナル生成部分

特異的結合部分およびシグナル生成部分のコンジュゲートのようなシグナル生成部分を含んでなるコンジュゲートは、生物学的サンプルにおける特定の標的部分を検出するためのアッセイにおいて用いることができる。シグナル生成部分は、標的の存在および／もしくは位置を示す検出可能なシグナルを与えるために利用される。シグナル生成部分の例には、例としてそして限定せずに以下のものが包含される：西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼもしくはβ－ラクタマーゼのような酵素。西洋ワサビペルオキシダーゼは、ＥＬＩＳＡ、免疫ブロッティングおよび免疫組織化学を包含する多数の異なる免疫化学用途において免疫グロブリンの標識として広く用いられる。他の可能な開示される態様に加えて、ＨＲＰはグルタルアルデヒド、過ヨウ素酸塩酸化、ジスルフィド結合によって、そしてまたアミノおよびチオール特異的架橋剤を介してを包含するいくつかの異なる方法により抗体にコンジュゲーションすることができる。ＨＲＰは３つの最も一般的な酵素標識（ＨＲＰ、アルカリホスファターゼおよびＢ－ガラクトシダーゼ）のうち最も小さくそして最も安定であり、そしてそのグリコシル化はより低い非特異的結合をもたらす；蛍光分子（フルオレセイン、クマリン、ＢＯＤＩＰＹ色素、レゾルフィン、ローダミンのような；さらなる例は、Ｔｈｅ Ｈａｎｄｂｏｏｋ-Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲに見出されることができる）、検出可能な構築物（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲから入手することができる、量子ドットのような蛍光構築物のような；例えば、米国特許第６，８１５，０６４号、第６，６８２，５９６号および第６，６４９，１３８号を参照、これらの特許の各々は本明細書に引用することにより組み込まれる）、金属キレート（Gd^{3+}のような放射性もしくは常磁性金属イオンのＤＯＴＡおよびＤＰＴＡキレートのような）およびリポソーム（蛍光分子を封鎖するリポソームのような）。

【０５６９】

シグナル生成部分が酵素を含む場合、検出可能なシグナルを生成するために発色性化合物、蛍光性化合物もしくは発光性化合物を用いることができる（多種多様なそのような化合物は、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｅｕｇｅｎｅ ＯＲから利用可能である）。発色性化合物の特定の例には、ジ－アミノベンジジン（ＤＡＢ）、リン酸４－ニトロフェニル（ｐＮＰＰ）、ファストレッド、リン酸ブロモクロロインドリル（ＢＣＩＰ）、ニトロブルーテトラゾリウム（ＮＢＴ）、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ、ファストレッド、ＡＰオレンジ、ＡＰブルー、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、２，２’－アジノ－ジ－［３－エチルベンゾチアゾリンスルホネート］（ＡＢＴＳ）、ｏ－ジアニシジン、４－クロロナフトール（４－ＣＮ）、ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＯＮＰＧ）、ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－ガラクトピラノシド（Ｘ－Ｇａｌ）、メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＭＵ－Ｇａｌ）、ｐ－ニトロフェニル－α－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＰＮＰ）、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルクロニド（Ｘ－Ｇｌｕｃ）、３－アミノ－９－エチルカルバゾール（ＡＥＣ）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（ＩＮＴ）、テトラゾリウムブルーおよびテトラゾリウムバイオレットが包含される。

【０５７０】

標識された二次抗体は、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｏ．のようなしかしこれに限定されるものではない多数の供給業者から購入することができる。ＡｍｅｒｓｈａｍおよびＥｖｉｄｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓは、広範囲のコンジュゲーションした抗体可能性を提供する。ＣｙＤｙｅ、ＥｖｉＴａｇ量子ドット、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）およびローダミンを利用することができる。これらのコンジュゲートは様々な適用、色および発光範囲に

およぶ。Ｅｖｉｄｅｎｔ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのＥｖｉＴａｇ量子ドットは、改善された光安定性、色多重化および単一源励起の有機フルオロフォアに対する利点を有して、様々な波長における光安定性および多色蛍光を与える。各Ｅｖｉｔａｇは、それらを無傷細胞環境における多重化に理想的にする鋭い発光波長を生成する。

【０５７１】

Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＣｙＤｙｅは、広範囲のｐＨ値にわたって優れた光安定性を与える。標識の化学構造とともに、蛍光マーカーに関する指導書については：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｈｍｄｓ．ｏｒｇ．ｕｋ／ｆｌｕｏｒｏｃｈｒｏｍｅ．ｈｔｍｌを参照。ハプテンで標識化する方法に関する以下のリンクを参照：ｈｔｔｐ：／／ｐｒｏｂｅｓ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｈａｎｄｂｏｏｋ／ｂｏｘｅｓ／２０２０．ｈｔｍｌ

【０５７２】

検出可能なコンジュゲートの１つのタイプは、抗体およびフルオロフォアの共有結合コンジュゲートである。フルオロフォアにより吸収される波長のものである光子をコンジュゲートに向けることは、検出しそして抗体を定性化し、定量化しそして／もしくは特定するために用いることができる蛍光を刺激する。フルオロフォアとして用いられる蛍光部分の大部分は、共役パイ電子系を有する有機分子である。そのような有機フルオロフォアは強い蛍光シグナルを与えることができるが、それらは特に多重化アッセイにおいてそして記録保管試験結果が必要とされる場合に、それらの有効性を限定する多数の特性を示す。

【０５７３】

有機フルオロフォアは、励起源での長期照明により光退色する可能性があり、それは最大のそして／もしくは検出可能なシグナルをサンプルから引き出すことができる期間を制限する。長期照明および／もしくは酸素への長期暴露は、有機フルオロフォアを非蛍光分子に永久的に転化し得る。従って、蛍光検出は、記録保管サンプルが必要とされる場合に日常的に用いられていない。

【０５７４】

量子ドットと呼ばれることも多い、発色性および／もしくは蛍光性半導体ナノ結晶は、複合体を同定するために用いることができる。ナノ結晶性量子ドットは半導体ナノ結晶性粒子であり、そして特定サイズの粒子発光体で使用することに本発明を限定することなしに、典型的には２～１０ｎｍのサイズである（おおよそ典型的なタンパク質のサイズ）。量子ドットは典型的に安定なフルオロフォアであり、光退色に耐性であることが多く、そして広範囲の励起、波長および狭い発光スペクトルを有する。特定の波長での発光のような特定の発光特性を有する量子ドットは、複数の異なる標的を同定するために複数の異なる発光特性を有する複数の異なる量子ドットを使用することができるように選択することができる。定量ドットバイオコンジュゲートは、利用可能である最も明るい伝統的な色素に匹敵する量子収率を特徴とする。さらに、これらの量子ドットに基づくフルオロフォアは伝統的な色素より１０～１０００倍多い光を吸収する。量子ドットからの発光は狭くそして対称的であり、それは他の色との重複が最小限に抑えられることを意味し、さらに多くの色を同時に使用できることにもかかわらず、隣接する検出チャンネルへの最小限のブリードスルーおよび弱められたクロストークをもたらす。対称的なそして調節可能な発光スペクトルは、粒子のサイズおよび物質組成に従って変えることができ、それは実質的なスペクトルの重複なしに異なる量子ドットの柔軟なそして近い間隔を可能にする。さらに、それらの吸収スペクトルは広く、それは単一の励起波長を用いて同時に全ての量子ドット色バリアントを励起することを可能にし、それによってサンプル自己蛍光を最小限に抑える。

【０５７５】

さらに、量子ドットコンジット（ｃｏｎｄｕｉｔ）上へのポリエチレングリコールの導入、ＰＥＧ化は、非特異的なタンパク質：量子ドット相互作用を実質的に減少できることが見出されている。ある種の量子ドットは、例えばＨａｙｗａｒｄ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＱｕａｎｔｕｍ　Ｄｏｔ　Ｃｏｒｐ．およびＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている。

【０５７６】
標準的な蛍光顕微鏡は、量子ドットバイオコンジュゲートの検出のための安価な道具である。定量ドットコンジュゲートは実質的に光安定性であるので、興味のある領域を見出しそしてサンプルに適切に焦点を合わせるために顕微鏡で時間をかけることができる。量子ドットコンジュゲートは、明るい光安定性発光が必要とされるときはいつでも有用であり、そして１つのみの励起源／フィルターが利用可能でありそして色間の最小限のクロストークが必要とされる多色用途において特に有用である。例えば、量子ドットは、ストレプトアビジンとＩｇＧのコンジュゲートを形成して細胞表面マーカーおよび核抗原を標識するためにそして微小管およびアクチンを染色するために使用されている（Ｗｕ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．（２００３）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１，４１－４６）。

【０５７７】
一例として、蛍光はマルチスペクトルイメージングシステムＮｕａｎｃｅ™（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　＆　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ，Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）で測定することができる。別の例として、蛍光はスペクトルイメージングシステムＳｐｅｃｔｒＶｉｅｗ™（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｐｅｃｔｒａｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ，Ｖｉｓｔａ，ＣＡ）で測定することができる。マルチスペクトルイメージングは、画像の各画素での分光学的情報が集められそして得られるデータがスペクトル画像処理ソフトウェアで分析される技術である。例えば、Ｎｕａｎｃｅシステムは、電子的にそして継続的に選択可能でありそして次にそのようなデータを処理するために考案された分析プログラムで利用される異なる波長での一連の画像を撮ることができる。Ｎｕａｎｃｅシステムは、スペクトル曲線が異なるならば、たとえ色素のスペクトルが非常に重複している場合でさえまたはそれらが共局在化しているかもしくはサンプルにおける同じ地点で存在している場合でさえ、同時に多数の色素から定量的情報を得ることができる。多数の生物学的材料は自己蛍光を発するか、もしくはより高いエネルギー光により励起される場合により低いエネルギー光を出す。このシグナルは、より低いコントラストの画像およびデータをもたらし得る。マルチスペクトルイメージング能力のない高感度カメラは、蛍光シグナルと一緒に自己蛍光シグナルを増加するだけである。マルチスペクトルイメージングは組織からの自己蛍光を混合しないかもしくは分離することができ、従って、達成可能なシグナル対ノイズ比を増加する。

【０５７８】
ハプテンを量子ドットにコンジュゲーションすることができ、そして例えば低波長光が量子ドット蛍光を刺激する蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を用いることにより、量子ドット蛍光を刺激することができる。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎは、ビオチンにコンジュゲーションした量子ドットが抗ビオチンＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒよりビオチン誘導体ビオシチンについて１００倍低い検出限界を有したことを決定している。完全にビオチニル化した量子ドットは、２５パーセントのビオチン被覆を有する量子ドットより１０倍感度が低かった。

【０５７９】
量子ドット使用は、それらの生体適合性の欠如によりこれまで限定されていた。しかしながら、表面コーティング化学における新たな進歩は、これらの問題を克服するのに役立っている。例えば、Ｗｕ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　ｌａｂｅｌｉｎｇ　ｏｆ　ｃａｎｃｅｒ　ｍａｒｋｅｒ　Ｈｅｒ２　ａｎｄ　ｏｔｈｅｒ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔａｒｇｅｔｓ　ｗｉｔｈ　ｓｅｍｉｃｏｎｄｕｃｔｏｒ　ｑｕａｎｔｕｍ　ｄｏｔｓ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１，４１－４６（２００３）；Ｊａｉｓｗａｌ，Ｊ．Ｋ．，Ｍａｔｔｏｕｓｓｉ，Ｈ．，Ｍａｕｒｏ，Ｊ．Ｍ．＆　Ｓｉｍｏｎ，Ｓ．Ｍ．Ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ　ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｃｏｌｏｒ　ｉｍａｇｉｎｇ　ｏｆ　ｌｉｖｅ　ｃｅｌｌｓ　ｕｓｉｎｇ　ｑｕａｎｔｕｍ　ｄｏｔ　ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１，４７－５１（２００３）；およびＤｕｂｅｒｔｒｅｔ，Ｂ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｉｍａｇｉｎｇ　ｏｆ　ｑｕａｎｔｕｍ　ｄｏｔｓ　ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅｄ　ｉｎ　ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐ

ｉｄ ｍｉｃｅｌｌｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９８，１７５９－１７６２（２００２）を参照。

【０５８０】

量子ドットはまた、ストレプトアビジンのような生体認識分子（同文献）にもコンジュゲーションされている。これらのコンジュゲートは、固定された細胞および組織切片の両方上で使用されている。さらに、細胞表面タンパク質および生細胞の細胞内区画は量子ドットバイオコンジュゲートで標識されている。

【０５８１】

蛍光タンパク質もまた、視覚化を容易にするために、担体として使用することができ、もしくは担体に連結することができる。例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）は、最初にクラゲ エクオレア・ビクトリア（Ａｅｑｕｏｒｅａ ｖｉｃｔｏｒｉａ）の発光器官から単離された。キメラＧＦＰ融合物は、細胞への遺伝子導入によりインサイチューで発現させることができ、そして適切なターゲッティングシグナルにより細胞内の特定の部位に局在化させることができる。青色、青緑色および黄色がかった緑色の発光を有するスペクトルバリアントがエクオレアＧＦＰから成功裏に作製されているが、いずれも５２９ｎｍより長い発光極大を示さない。ＧＦＰ様タンパク質はアントゾア（Ａｎｔｈｏｚｏａ）（サンゴ動物）から単離されており、それは生物学的用途に利用可能な色の範囲を有意に広げた。現在配列データベースに寄託される「ＧＦＰ様タンパク質」のファミリーは、約３０の有意に異なるメンバーを含む。蛍光タンパク質は、発色団の自己触媒合成によって自発的に蛍光を発するようになることができるタンパク質をさす。

【０５８２】

赤色もしくは遠赤色波長で蛍光を発するタンパク質（赤色蛍光タンパク質もしくはＲＦＰ）は既知である。ＲＦＰは、多色標識および蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）実験の両方に、より短い波長で蛍光を発する他の蛍光タンパク質と組み合わせて用いることができる。市販されているＲＦＰは、２つの野生型ＧＦＰ様タンパク質由来である。ＤｓＲｅｄ（ｄｒＦＰ５８３）は、それぞれ、５５８ｎｍおよび５８３ｎｍで励起および発光極大を有する。遠赤色蛍光タンパク質は、５７１ｎｍで吸収する色素タンパク質の突然変異誘発により作製された。ＨｃＲｅｄ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）は、それぞれ、５８８ｎｍおよび６１８ｎｍで励起および発光極大を有する。最も長い波長で蛍光を発する蛍光タンパク質（導入されている任意の突然変異のない）は、イソギンチャク エンタクマエア・クアドリカラー（Ｅｎｔａｃｍａｅａ ｑｕａｄｒｉｃｏｌｏｒ）からクローン化されたｅｑＦＰ６１１である。このタンパク質は５５９ｎｍで吸収し、そして６１１ｎｍで発光する。多数のスペクトルバリアントが出現するにつれて、より多くの研究者が多数のフルオロフォアおよび／もしくはＦＲＥＴシグナルの同時イメージングに興味をもつようになっている。

【０５８３】

融合タンパク質もまた、本発明のハプテンコンジュゲートを形成するために用いることができる。機能性蛍光タンパク質を作り出す場合に考慮すべき少なくとも３つの点がある：蛍光タンパク質は蛍光を発するために正しくフォールディングしなければならず；宿主タンパク質は機能性であるために正しくフォールディングしなければならず；そしてキメラタンパク質の完全性は維持されなければならない。

【０５８４】

蛍光タンパク質と宿主タンパク質との間の任意のリンカーの長さおよび配列は、各々の特定の用途のために最適化されるべきである。最も広く使用されるリンカー設計は、主にグリシン（Ｇｌｙ）およびセリン（Ｓｅｒ）ストレッチからなる配列を有し、Ｓｅｒ残基はポリＧｌｙストレッチの溶解性を向上するために散在している。

【０５８５】

蛍光タンパク質をタンパク質のアミノもしくはカルボキシル末端に融合するかどうかの決定は、タンパク質の特性により決まる。例えば、特定の末端は、適切なタンパク質機能を保持するためにもしくは正確な局在化を保証するために保存される必要があり得る。こ

の決定はまた、特定の蛍光タンパク質の構造的特徴に基づいて行われる可能性もある。例えば、エクオレアＧＦＰは、約１０個のアミノ酸の柔軟なカルボキシル末端尾部を有し、それはリンカーの付加なしに他のタンパク質のアミノ末端へのその融合を可能にする。対照的に、ＤｓＲｅｄは、アミノ末端がＤｓＲｅｄのテトラマー複合体から完全に突出するので、興味のあるタンパク質のカルボキシル末端により成功裏に融合される。宿主タンパク質のいずれの末端も改変することができない場合、タンパク質の中央に蛍光タンパク質を挿入することが可能である。

【０５８６】

効率よく成熟するＧＦＰの黄色発光突然変異体（ＹＦＰ）の２つの明るいバージョン、ＣｉｔｒｉｎｅおよびＶｅｎｕｓが最近開発された。

【０５８７】

Ｔ１およびＥ５７として知られいてる、ＤｓＲｅｄの２つの最近開発された種類は改善された成熟を示し、それらを二色実験における使用に好ましくする。

【０５８８】

あるＧＦＰバリアントの蛍光は特定の照明により「光活性化」することができ、それは選択した時間点で蛍光を出すことができるという利点を提供する。発色団においてもしくはその近くで光化学修飾を受ける３つの蛍光タンパク質、ＰＡ－ＧＦＰ、ＫａｅｄｅおよびＫＦＰ１が開発されており、それらは特定の照明後に蛍光シグナルの選択的活性化を可能にし、そして個々の細胞、細胞小器官もしくはタンパク質を蛍光的に印付けするために用いることができる。

【０５８９】

表１は、シグナル生成部分およびそのような部分を含んでなるコンジュゲートのさらなる例を提供する。

【０５９０】

【表１】

表1

典型的な抗体－検出可能な標識コンジュゲート

抗体コンジュゲート標識	推奨対象	発光色	標識励起（nm）	標識発光（nm）
レイクプラシッドブルー（EviTag™量子ドット）	フローサイトメトリー、免疫ブロットおよび蛍光顕微鏡検査	◇	<450	490
フルオレセイン（すなわち、FITC）	BD FACSシステムおよびGuavaシステムを包含するフローサイトメトリー、ならびに蛍光顕微鏡検査	◇	494	518
アジロンダックグリーン（EviTag™ 量子ドット）	フローサイトメトリー、免疫ブロットおよび蛍光顕微鏡検査	◇	<450	520
ローダミングリーン	蛍光顕微鏡検査	◇	502	527
キャッツキルグリーン（EviTag™ 量子ドット）	蛍光顕微鏡検査	◇	<450	540
ローダミン6G	フローサイトメトリー、免疫ブロットおよび蛍光顕微鏡検査	◇	525	555
ホップイエロー（EviTag™ 量子ドット）	フローサイトメトリー、免疫ブロットおよび蛍光顕微鏡検査	◇	<450	560
アマシャムCy3	蛍光顕微鏡検査	◇	550	565
R－フィコエリトリン（PE）	フローサイトメトリー、Luminex®およびGuavaシステム、FRETアッセイ、ならびにキャピラリー電気泳動；二重標識のためのFITCとの使用	◇	(495)565	575
ローダミンレッド	フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡検査	◇	560	580
バーチイエロー（EviTag™ 量子ドット）	蛍光顕微鏡検査	◇	<450	580
アマシャムCy3．5	蛍光顕微鏡検査	◇	581	596
フォートオレンジ（EviTag™ 量子ドット）	フローサイトメトリー、免疫ブロットおよび蛍光顕微鏡検査	◇	<450	600
スルホローダミン（Aliasテキサスレッド®）	フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡検査	◇	596	615

【０５９１】

【表２】

アマシャムCy5	アマシャムタイフーンシステムを包含する免疫ブロット、および免疫蛍光用途		650	670
アロフィコシアニン（APC）	FRETアッセイおよびHTRFアッセイ		652	670
アマシャムCy5．５	免疫ブロット、特にLI－CORODysseyシステム		675	694
ビオチン	フローサイトメトリーおよび他の蛍光用途		－	

これらの標識の多くは、カスタム多重化アッセイを生み出すために交差反応しない多数の抗体で使用することができる。

【０５９２】

ＶＩＩ．ハプテンコンジュゲートを形成する方法－反応スキーム

以下のスキームは、本発明のコンジュゲートを製造するために有用な方法の典型的な態様を提供する。他の合成方法論もまたそのようなコンジュゲートを製造するために有用であり、そして以下のスキームは、示される特定の合成方法論に方法を限定すると解釈されるべきではない。

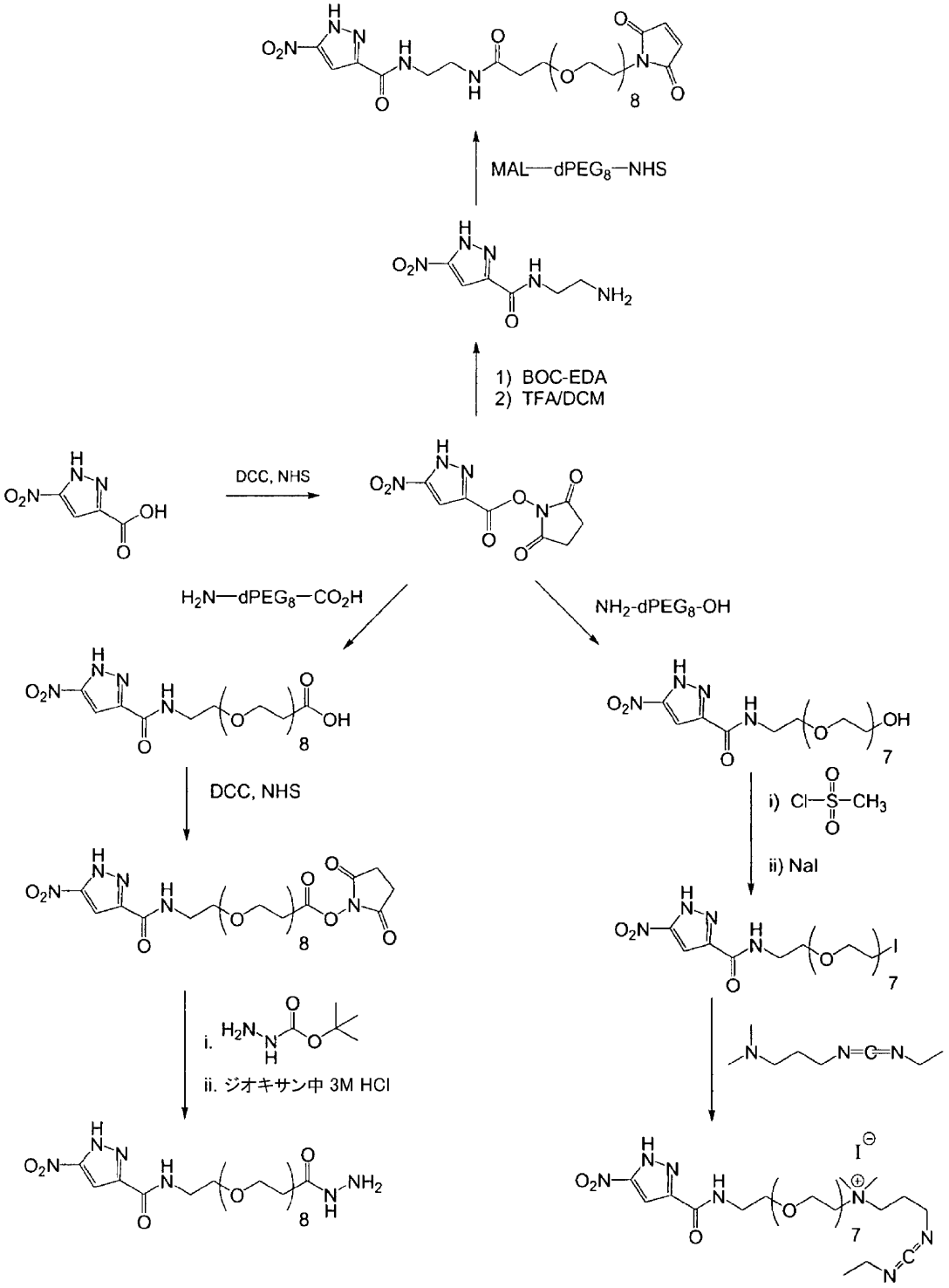
【０５９３】

１．ニトロピラゾールコンジュゲート

スキーム１は、典型的なニトロピラゾールハプテンをアルキレンオキシドリンカーにそして次にタンパク質担体に連結するために適当な１つの方法を例示する。

【０５９４】

【化１８９】



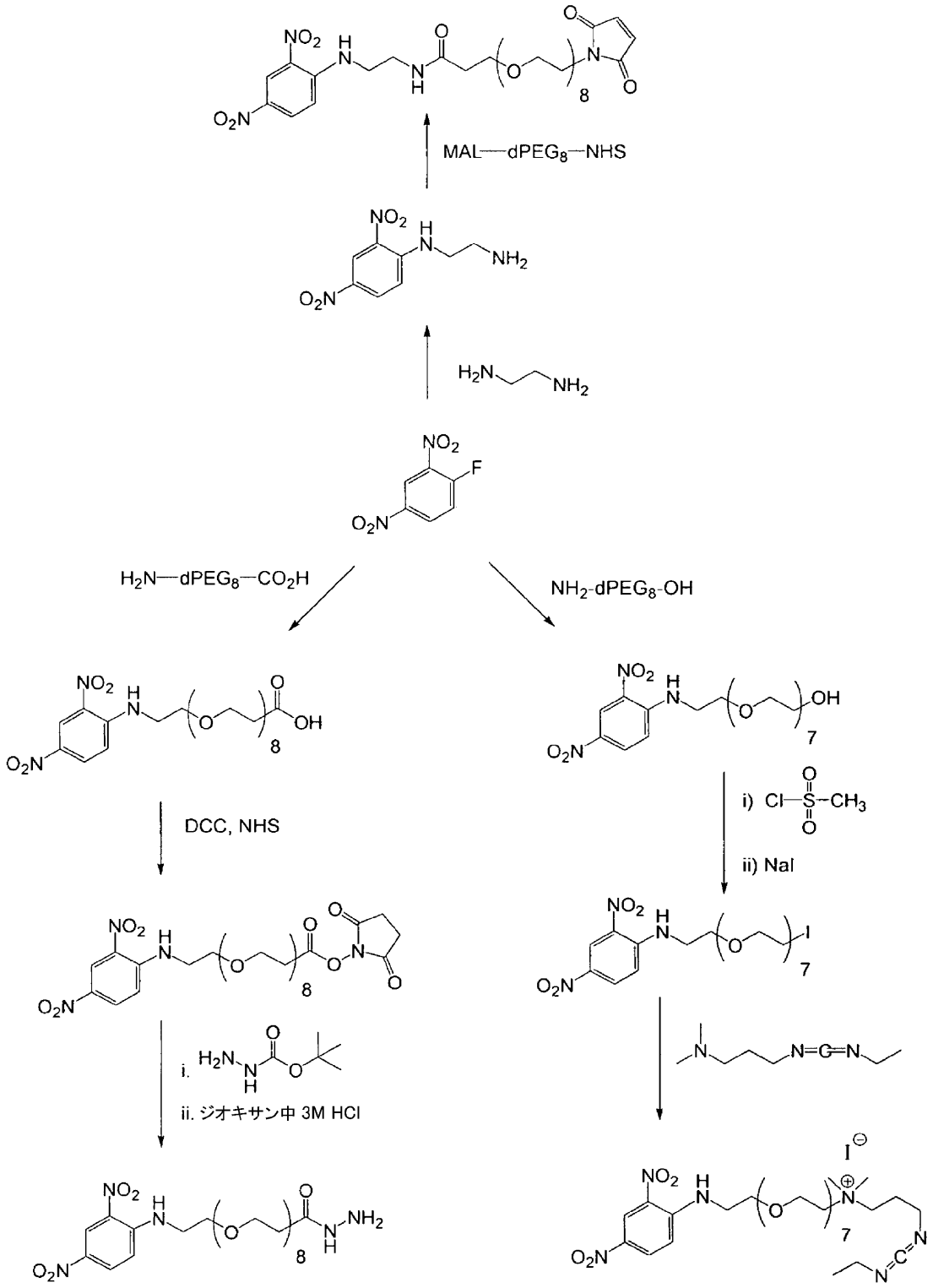
スキーム1

【０５９５】

スキーム１は、典型的なニトロピラゾールハプテンを連結することがペンデント（ｐｅｎｄｅｎｔ）カルボン酸官能基を介して典型的なエチレングリコールリンカーにであることを例示する。第一段階は、ニトロピラゾールからＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステルを形成することである。これは、求核物質とのその後の反応のためにエステルを「活性化する」。ＮＨＳエステルの形成は、カップリング試薬としてジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）を用いて実用的態様において成し遂げられた。ジクロロメタンを溶媒として使用し、そしてトリエチルアミンを塩基として加えた。ＮＨＳエステルは、次に求核物質に連結する準備ができている。

【０５９６】
第一の可能な合成経路は、活性化エステルをジアミンと反応させて末端アミンを有するアミドを生成せしめることである。ジアミンは、ＢＯＣ－エチレンジアミン化合物が使用されるスキーム１において例示されるように、保護されたジアミンであることができる。次に、ＢＯＣで保護されたアミドはジクロロメタン中トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を用いて脱保護される。次に、脱保護された化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてハプテンにリンカーを連結することができる。リンカーはまた、終端に反応性官能基も含む。
【０５９７】
別の選択肢として、活性化エステルを有するハプテンをリンカーに連結して末端カルボン酸官能基もしくは末端ヒドロキシル基のいずれかを有するアミドを形成することができる。第二のＤＣＣカップリング反応を行って再びカルボン酸官能基を活性化することができ、それを例示される保護されたヒドラジン試薬と反応させる。塩酸における脱保護により例示されるヒドラジドを生成せしめた。あるいはまた、活性化エステルペンデント官能基を有するニトロピラゾールハプテン－ＰＥＧリンカーは、免疫原を形成するために担体タンパク質と反応させるのに適している。
【０５９８】
別の代替合成経路は、末端ヒドロキシル基を有するハプテン－ＰＥＧリンカーを用いて例示される。ヒドロキシル終端化合物を塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物と反応させてヨード置換された誘導体を提供することができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。
【０５９９】
２．ニトロフェニルコンジュゲート
スキーム２は、アルキレンオキシド（ＰＥＧ）リンカーに連結される典型的なジニトロフェニルハプテンを例示する。次に、これらのハプテン－リンカーコンジュゲートは、所望に応じて誘導体化されるかもしくは担体に直接連結することができる。
【０６００】

【化１９０】



スキーム2

【０６０１】

典型的なジニトロフェニルハプテンをアルキルレンオキシドリンカー、すなわち、ペンデント遊離酸およびアミンの両方を有する二官能性ポリエチレングリコールに連結した。第一の方法において、ジニトロフェニルハプテンを置換によってエチレンジアミンに連結し、フッ素により占められる環位置は、オルトおよびパラニトロ基の存在により求核置換のために活性化された。得られる化合物は、マレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルへの連結のための末端求核性アミンを含む。

【０６０２】
あるいはまた、ジニトロフェニルハプテンは、末端カルボン酸もしくはヒドロキシル基のいずれかを有するアミノ－ＰＥＧ化合物と反応させることができる。カルボン酸誘導体に関して、この化合物をジニトロフェニルハプテンと反応させてフッ素を置換した。次に、ＮＨＳエステルをジクロロメタン中ＤＣＣを用いて形成した。活性化エステルは、例えば例示される保護されたヒドラジン試薬との反応、続いて塩酸もしくはトリフルオロ酢酸のような酸を用いる脱保護により、所望に応じて誘導体化するのに適している。あるいはまた、活性化エステルは、免疫原を形成するために担体タンパク質に連結するのに適している。

【０６０３】
さらに別の選択肢として、ジニトロフェニルハプテンをアミノ－ＰＥＧリンカーと反応させて末端ヒドロキシル基を有する化合物を生成せしめることができる。ヒドロキシル終端化合物を塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物と反応させてヨード置換された誘導体を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

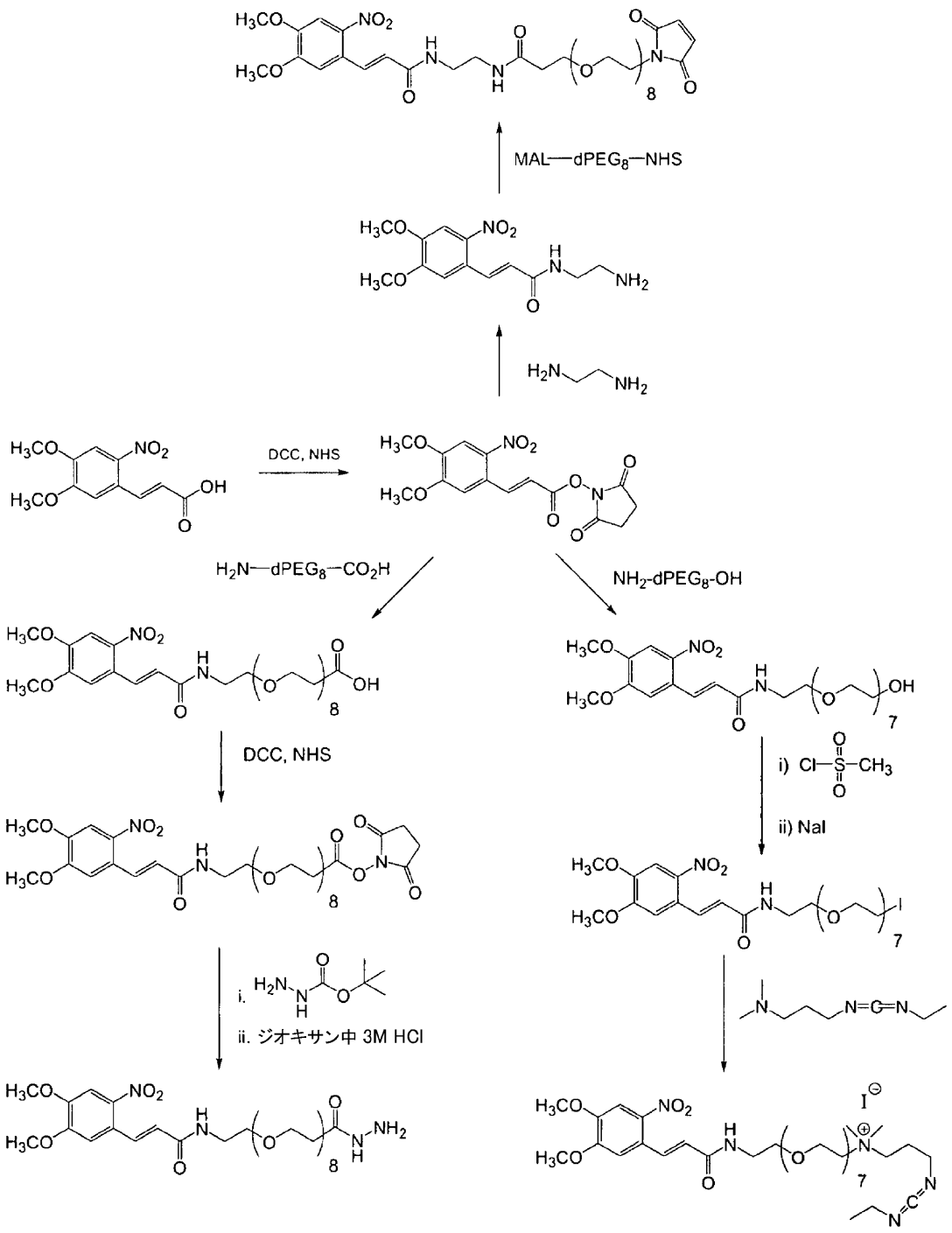
【０６０４】
シンナミドに基づくコンジュゲートを製造するための合成経路の第二の例をスキーム３において以下に提供する。典型的なニトロフェニルハプテンをＤＣＣを用いて対応するＮＨＳエステルに転化した。ＮＨＳエステルをエチレンジアミンと反応させた。得られる化合物は、マレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルに連結するための末端求核性アミンを含む。

【０６０５】
あるいはまた、ニトロフェニルハプテンは、末端カルボン酸もしくはヒドロキシル基のいずれかを有するアミノ－ＰＥＧ化合物と反応させることができる。カルボン酸誘導体に関して、この化合物をニトロフェニルと反応させた。次に、ＮＨＳエステルをジクロロメタン中ＤＣＣを用いて形成した。活性化エステルは、例えば例示される保護されたヒドラジン試薬との反応、続いて塩酸における脱保護により、所望に応じて誘導体化するのに適している。あるいはまた、活性化エステルは免疫原を形成するために担体タンパク質に連結するのに適している。

【０６０６】
さらに別の選択肢として、ニトロフェニルハプテンをアミノ－ＰＥＧリンカーと反応させて末端ヒドロキシル基を有する化合物を生成せしめることができる。ヒドロキシル終端化合物を塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物と反応させてヨード置換された誘導体を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

【０６０７】

【化１９１】



スキーム3

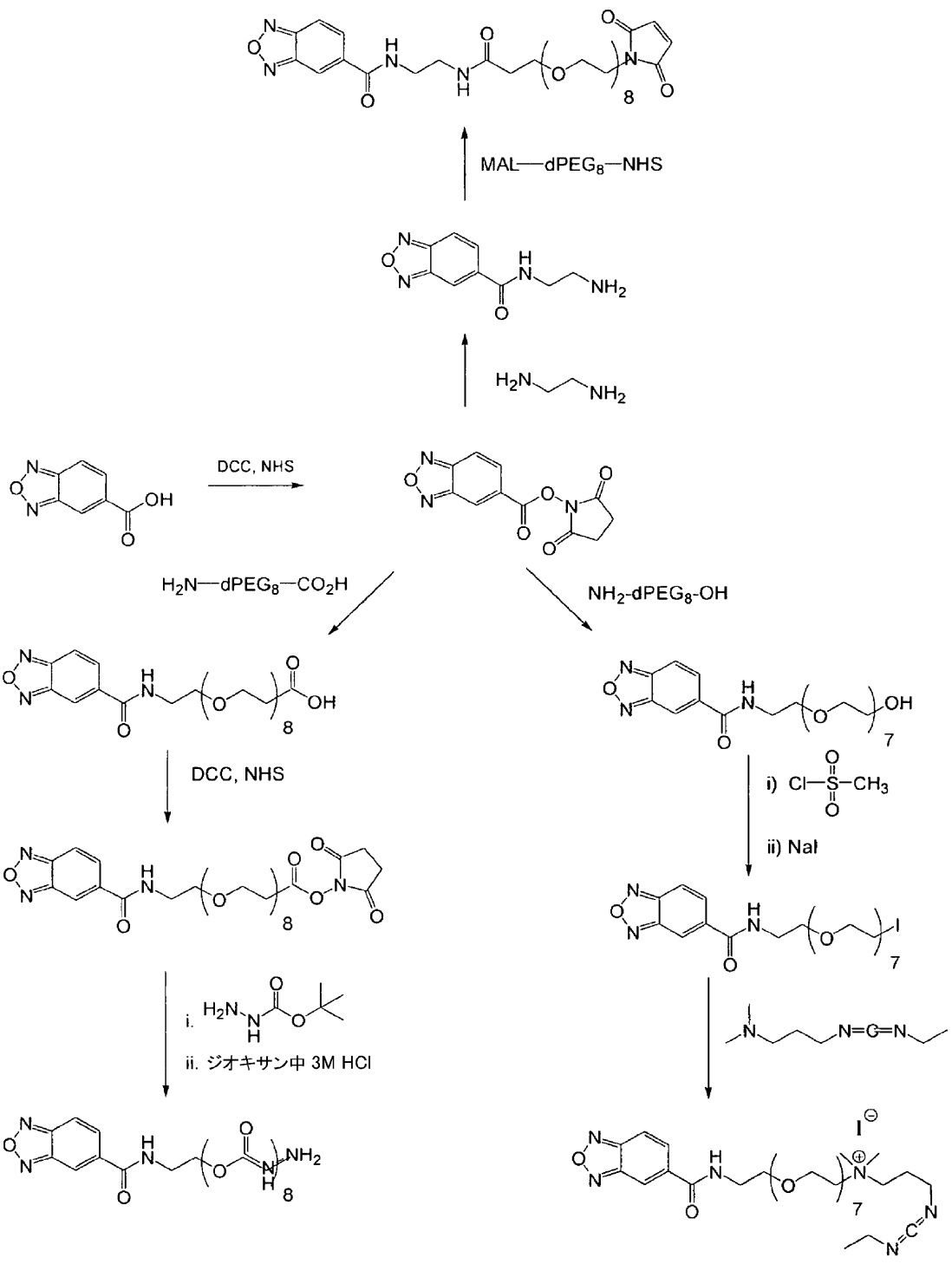
【０６０８】

３．ベンゾフラザンコンジュゲート

スキーム４は、典型的なベンゾフラザンハプテンをアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な合成方法論を例示する。

【０６０９】

【化１９２】



スキーム4

【０６１０】

スキーム４に関して、典型的なベンゾフラザンハプテンはカルボン酸官能基を含む。第一段階は、活性化エステルを形成するためにカップリング剤としてＤＣＣを用いるＮＨＳとの反応によるかもしくは酸塩化物の形成によるカルボン酸官能基の活性化である。第一の選択肢として、活性化エステルをジアミンと反応させて末端アミンを生成せしめることができる。ある態様において、ジアミンはスキーム５において以下に例示されるように、ＢＯＣで保護されたジアミンのような保護されたジアミンである。カップリング反応後に、ＢＯＣ保護基はトリフルオロ酢酸のような酸において取り除くことができる。次に、脱保護された化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてリンカーをハプテ

ンに連結する。

【０６１１】

スキーム４により例示される第二の選択肢として、活性化エステルはここで典型的な二官能性アルキレンオキシドリンカー、すなわちＰＥＧリンカーのような、所望に応じて、リンカーと連結する準備ができている。典型的なＰＥＧリンカーは、アミンおよびカルボン酸基もしくはアミンおよびヒドロキシル基の両方を有することができる。リンカーと活性化エステル化合物との反応は、カルボン酸終端化合物もしくはヒドロキシル基終端化合物のいずれかを生成せしめる。カルボン酸は、カップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳとの反応により活性化エステルに転化することができる。この活性化エステルは、例示される保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いて塩酸において脱保護することができる。

【０６１２】

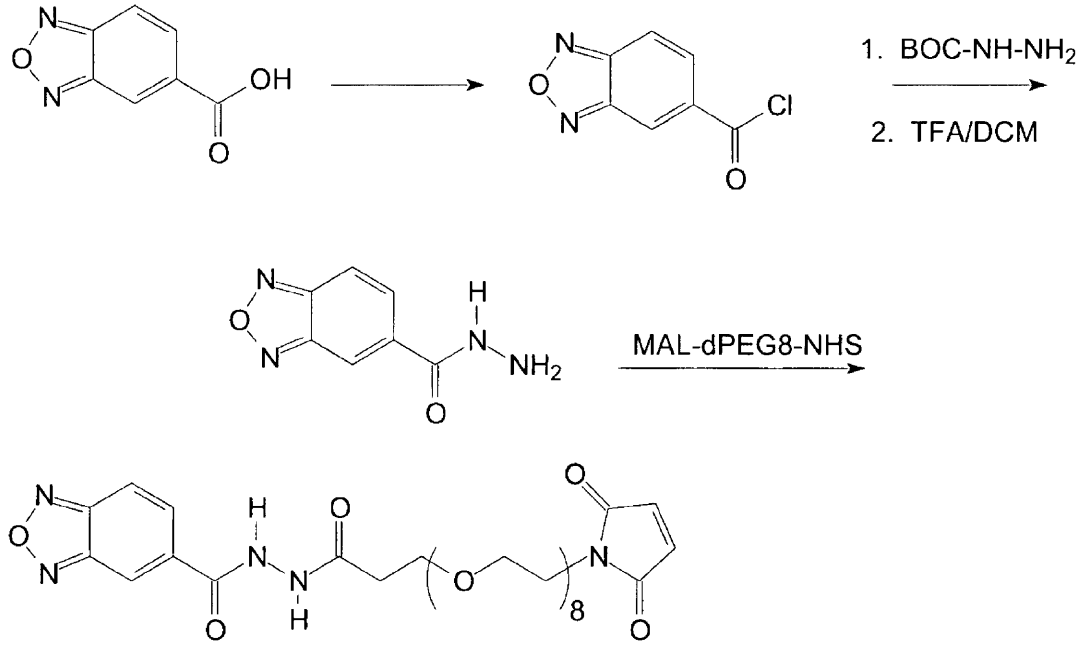
あるいはまた、ヒドロキシル終端化合物を塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物と反応させてヨード置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

【０６１３】

マレイミド－ｄＰＥＧ$_8$コンジュゲートを製造するために別の代替合成経路をスキーム５において以下に提供する。酸塩化物を次にＢＯＣで保護されたヒドラジドと反応させ、続いてトリフルオロ酢酸を用いて脱保護する。次に、ヒドラジドをマレイミド－ｄＰＥＧ８－ＮＨＳと反応させて例示されるコンジュゲートを生成せしめる。

【０６１４】

【化１９３】



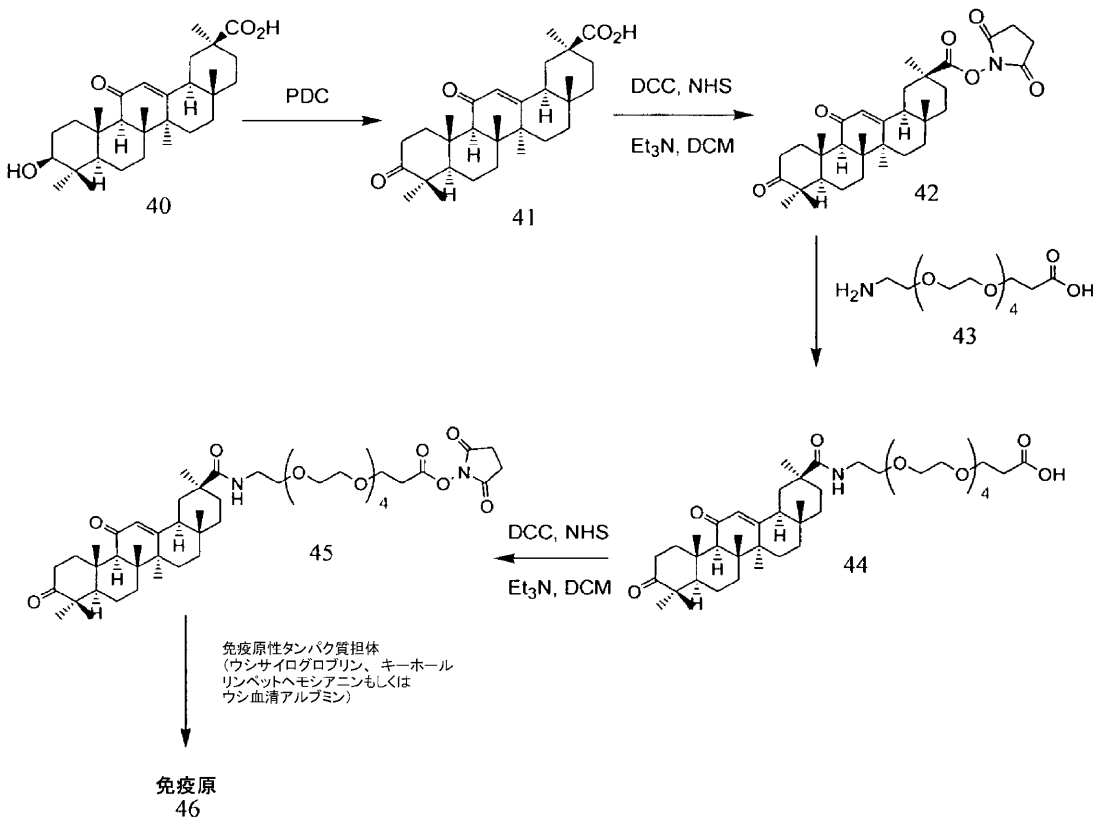
スキーム５

【０６１５】

４．トリテルペン－リンカーコンジュゲートおよびトリテルペン免疫原

スキーム６は、ハプテン－リンカーコンジュゲートを形成するために典型的なトリテルペンハプテンをアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。ハプテン－リンカーコンジュゲートは、所望に応じてさらに誘導体化することができ、もしくはタンパク質担体分子に直接連結することができる。

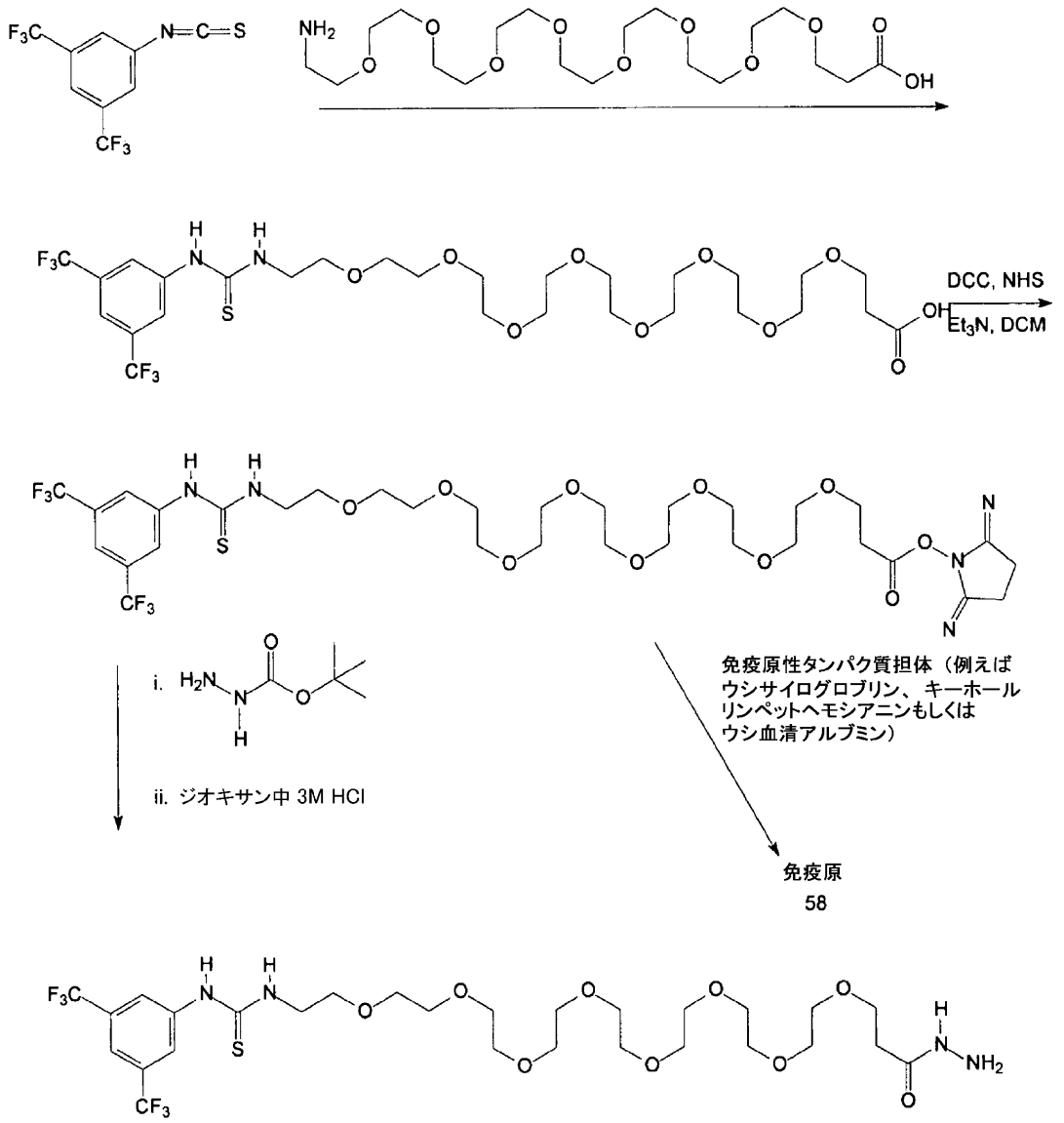
【０６１６】
【化１９４】



スキーム6

【０６１７】
スキーム６に関して、二クロム酸ピリジニウム（ＰＤＣ）を用いて出発化合物４０をケトン４１に酸化した。次に、ＮＨＳ活性化エステル４２をジクロロメタンにおいてＤＣＣカップリングを用いて形成した。次に、活性化エステル４２をアミンおよびカルボン酸官能基の両方を含んでなる二官能性ＰＥＧ－４リンカー４３と反応させてアミド４４を形成した。化合物４４のカルボン酸官能基を再びＮＨＳおよびＤＣＣを用いて活性化エステル４５に転化した。次に、活性化エステル４５を免疫原性タンパク質担体に連結して免疫原４６を形成した。
【０６１８】
５．尿素およびチオ尿素に基づくハプテン－リンカーコンジュゲートおよび免疫原
スキーム７は、典型的な尿素およびチオ尿素に基づくハプテンをアルキレンオキシドリンカーに、そして次にタンパク質担体分子に連結するために適当な１つの方法を例示する。
【０６１９】

【化１９５】



スキーム7

【０６２０】

スキーム７に関して、出発イソチオシアネート化合物５１をアミンおよびカルボン酸官能基の両方を含んでなるＰＥＧ－４リンカー５２と反応させてチオ尿素５３を形成した。化合物５３のカルボン酸官能基をＮＨＳおよびＤＣＣを用いて活性化エステル５４に転化した。次に、活性化エステル５４を保護されたヒドラジン試薬５５に連結し、続いて３Ｍ塩酸において脱保護して、化合物５６を形成した。あるいはまた、活性化エステル５４を担体に連結して免疫原５８を形成することができる。

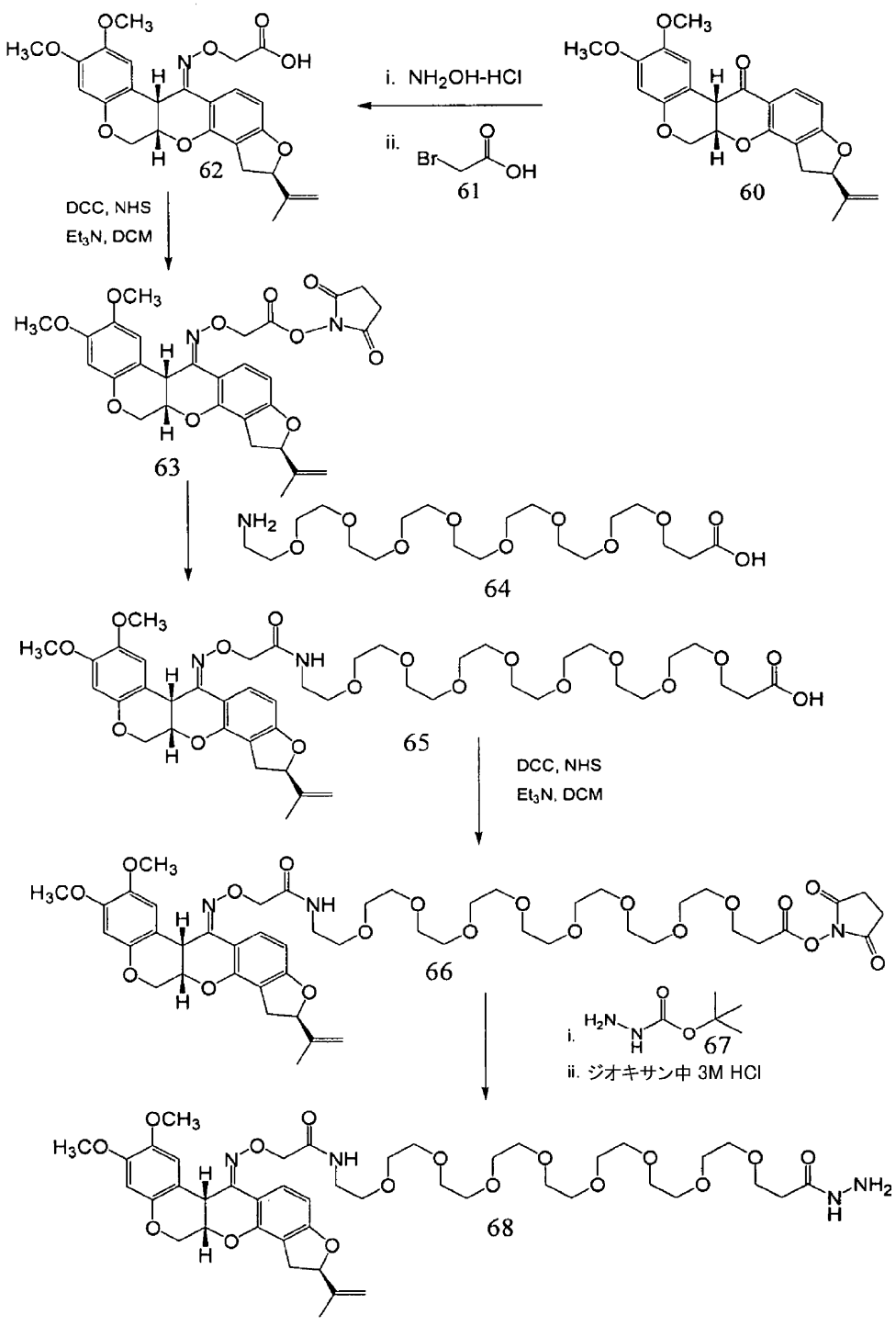
【０６２１】

６．ロテノンに基づくハプテン－リンカーコンジュゲートおよび免疫原

スキーム８は、典型的なロテノンに基づくハプテンをアルキレンオキシドリンカーに、そして次にタンパク質担体分子に連結するために適当な１つの方法を例示する。

【０６２２】

【化１９６】



スキーム8

【０６２３】

出発化合物６０をＮＨ$_2$ＯＨ－ＨＣｌで処理して中間体オキシムを形成し、それを次にアルファブロモ酢酸、化合物６１と反応させてオキシム６２を形成した。ＤＣＣを用いて化合物６２のカルボン酸官能基をＮＨＳエステルに転化して化合物６３を形成した。次に、化合物６３をアミンおよびカルボン酸官能基の両方を有する典型的なＰＥＧ－４リンカー６４に連結して、化合物６５を生成せしめた。化合物６５のカルボン酸官能基をカップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳとの反応によりＮＨＳエステル６６に転化した。次に、化合物６６をＢＯＣで保護されたヒドラジン化合物６７で処理し、そして次にジオキサン中３Ｍの塩酸を用いて脱保護して、化合物６８を生成せしめた。化合物６６はまた、免疫原を形成するために本明細書に開示されるように、タンパク質担体のような担体に連

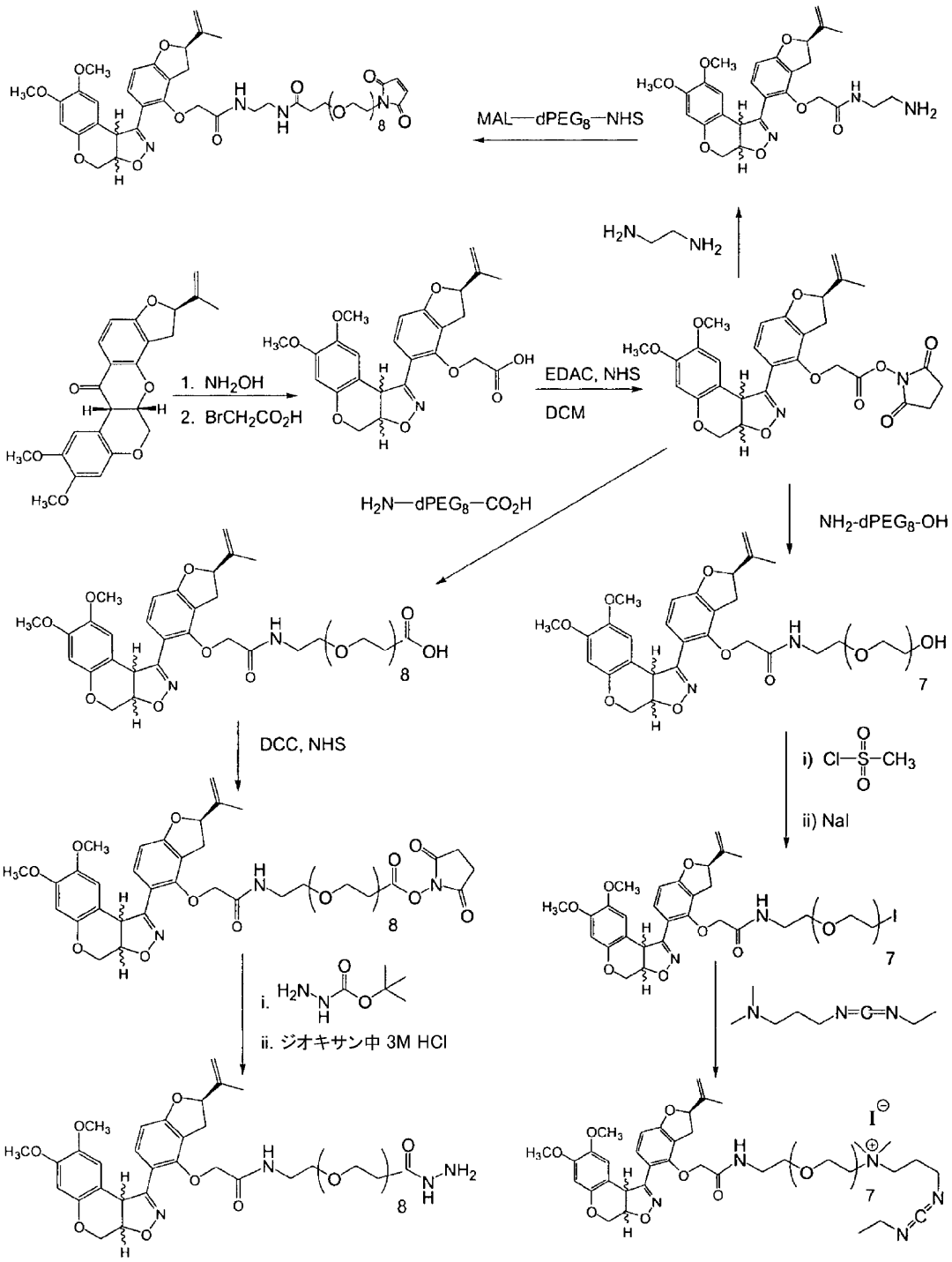
結することもできることを当業者は認識する。

【０６２４】

スキーム９は、ロテノンイソオキサゾリンで用いられる合成経路を例示する。

【０６２５】

【化１９７】



スキーム９

【０６２６】

スキーム９は、出発化合物を水酸化アンモニウム、続いてブロモ酢酸で逐次処理することによりロテノンイソオキサゾリンコンジュゲートを製造することを例示する。これは環転位をもたらして末端カルボン酸官能基を有するロテノンイソオキサゾリンを生成せしめる。Ｎ－３－ジメチルアミノプロピル－Ｎ’－エチルカルボジイミド（ＥＤＡＣ）を用いてＮＨＳエステルを製造した。第一の選択肢として、ＮＨＳエステルをジアミンと反応さ

せて末端アミンを有するアミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させて反応性末端を有するＰＥＧリンカーをハプテンに連結することができる。

【０６２７】

スキーム９により例示される第二の選択肢として、ＮＨＳエステルは典型的な二官能性アルキレンオキシドリンカー、すなわちＰＥＧリンカーのような、所望に応じて、リンカーと連結する準備ができている。これらの典型的なＰＥＧリンカーは、アミンおよびカルボン酸基もしくはアミンおよびヒドロキシル基のような複数の反応性官能基を有する。ＮＨＳエステルをリンカーと反応させることによりカルボン酸終端化合物もしくはヒドロキシル基終端化合物のいずれかを生成せしめる。カルボン酸は、カップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳエステルに転化することができる。ＮＨＳエステルを例示される保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いて塩酸において脱保護して、アミノ終端アミドを生成せしめることができる。

【０６２８】

あるいはまた、ヒドロキシル終端化合物を塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

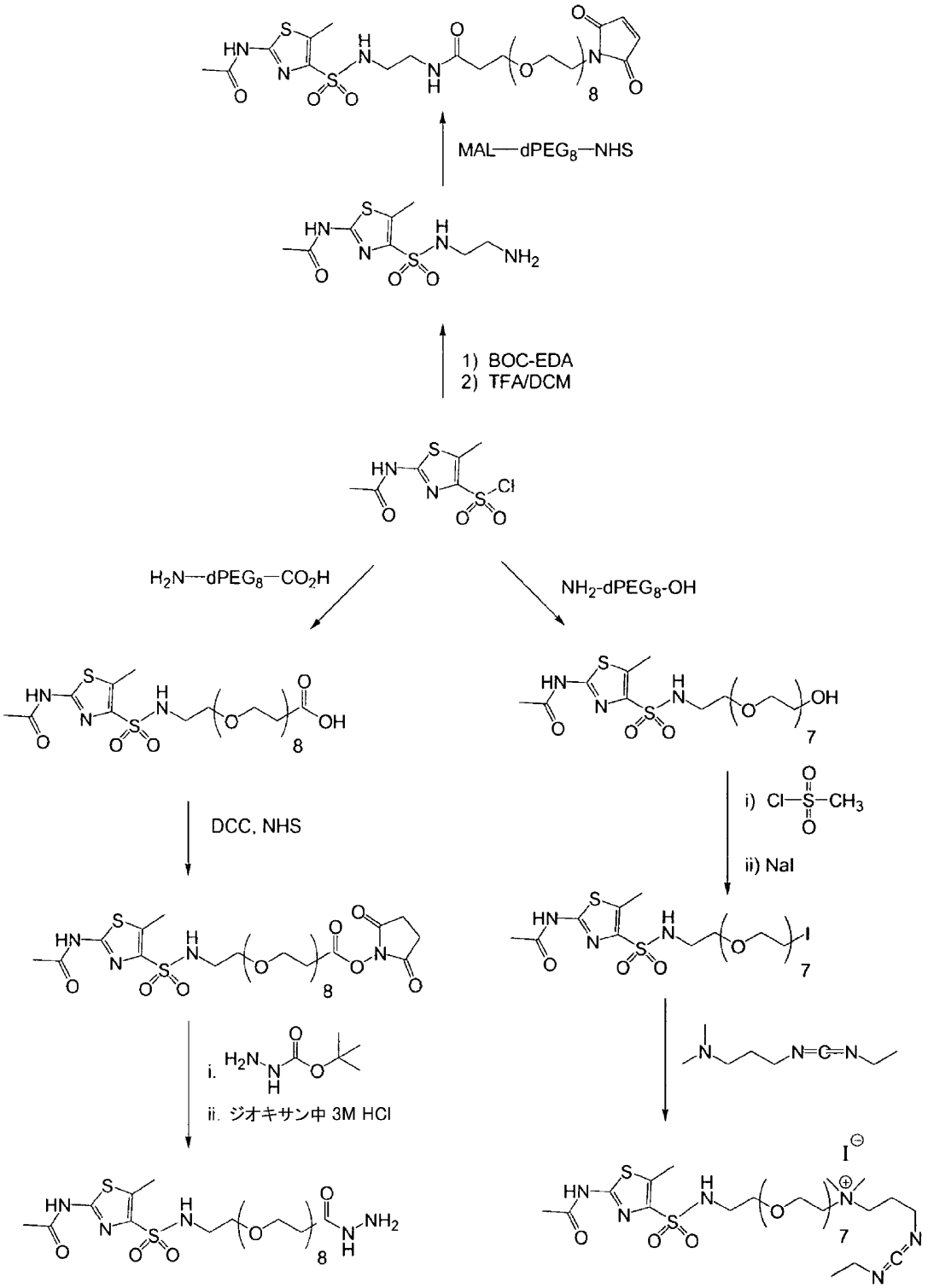
【０６２９】

７．オキサゾールおよびチアゾールに基づくコンジュゲート

スキーム１０は、典型的なオキサゾールおよびチアゾールに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。次に、ハプテン－リンカーコンジュゲートを所望に応じて誘導体化することができ、もしくは免疫原を形成するためにタンパク質担体分子に直接連結することができる。

【０６３０】

【化１９８】



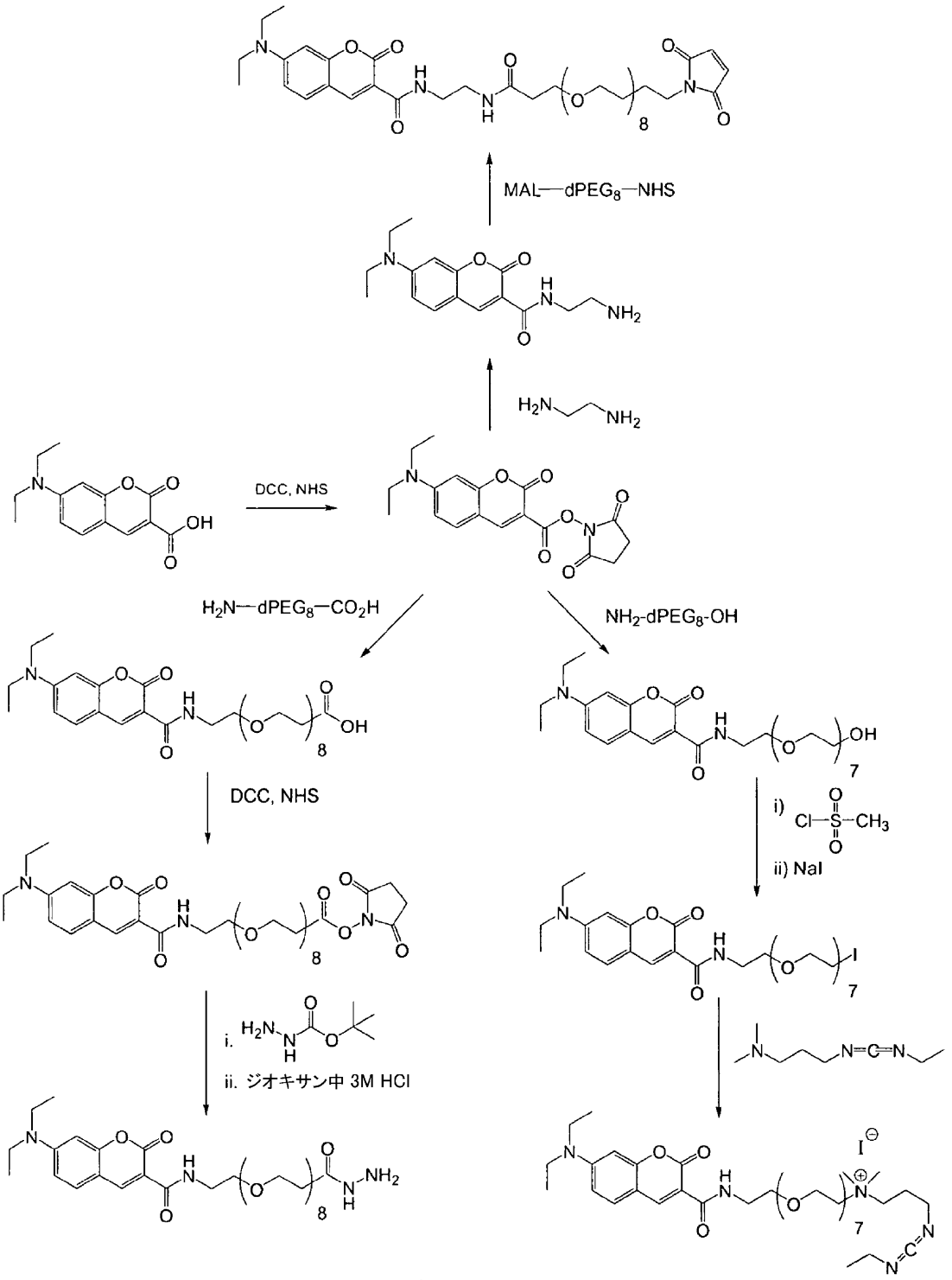
スキーム 10

【０６３１】

スキーム１０に関して、反応性スルホニルクロリド官能基を有する典型的なチアゾールハプテンをエチレンジアミンもしくは典型的な二官能性ＰＥＧ$_8$リンカーのいずれかと反応させた。第一の選択肢として、チアゾールをＢＯＣで保護されたエチレンジアミンと反応させ、続いてＴＦＡを用いて脱保護して、末端アミンを有するアミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてハプテンにリンカーを連結することができる。あるいはまた、化合物を担体タンパク質に直接連結して免疫原を形成することができる。

【０６３２】
あるいはまた、チアゾールハプテンを末端ヒドロキシル基もしくは末端カルボン酸基のいずれかを有するアミノ－ｄＰＥＧリンカーと反応させることができる。カルボン酸終端リンカーは、ＤＣＣを用いてＮＨＳエステルに転化し、続いてＢＯＣで保護されたヒドラジドと反応させることができる。ＢＯＣ基を３Ｍ　ＨＣｌのような酸を用いて取り除いて、ヒドラジド終端コンジュゲートを形成することができる。
【０６３３】
ヒドロキシル終端チアゾールスルホンアミドＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。
【０６３４】
８．クマリンに基づくハプテン－リンカーコンジュゲートおよび免疫原
スキーム１１は、典型的なクマリンに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。得られるハプテン－リンカーコンジュゲートは、所望に応じてさらに誘導体化することができ、もしくはタンパク質担体のような担体に連結して免疫原を形成することができる。
【０６３５】

【化１９９】



スキーム 11

【０６３６】

スキーム１１に関して、出発化合物はカルボン酸官能基を含み、それをカップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳに転化した。第一の選択肢として、ＮＨＳエステルをエチレンジアミンと反応させて末端アミンを有するアミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させて反応性末端官能基を有するリンカーをハプテンに連結することができる。

【０６３７】

あるいはまた、ＮＨＳエステルを典型的な二官能性PEG_8と連結して末端カルボン酸もしくはヒドロキシル官能基のいずれかを有するアミドを生成せしめることができる。カ

ルボン酸官能基は、カップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳエステルに転化することができる。次に、ＮＨＳエステルを保護されたヒドラジン化合物と反応させ、続いてジオキサン中３Ｍの塩酸において脱保護して、ヒドラジドを生成せしめた。あるいはまた、ＮＨＳエステルを免疫原性タンパク質に連結して免疫原を生成せしめることができる。

【０６３８】

ヒドロキシル終端クマリンＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

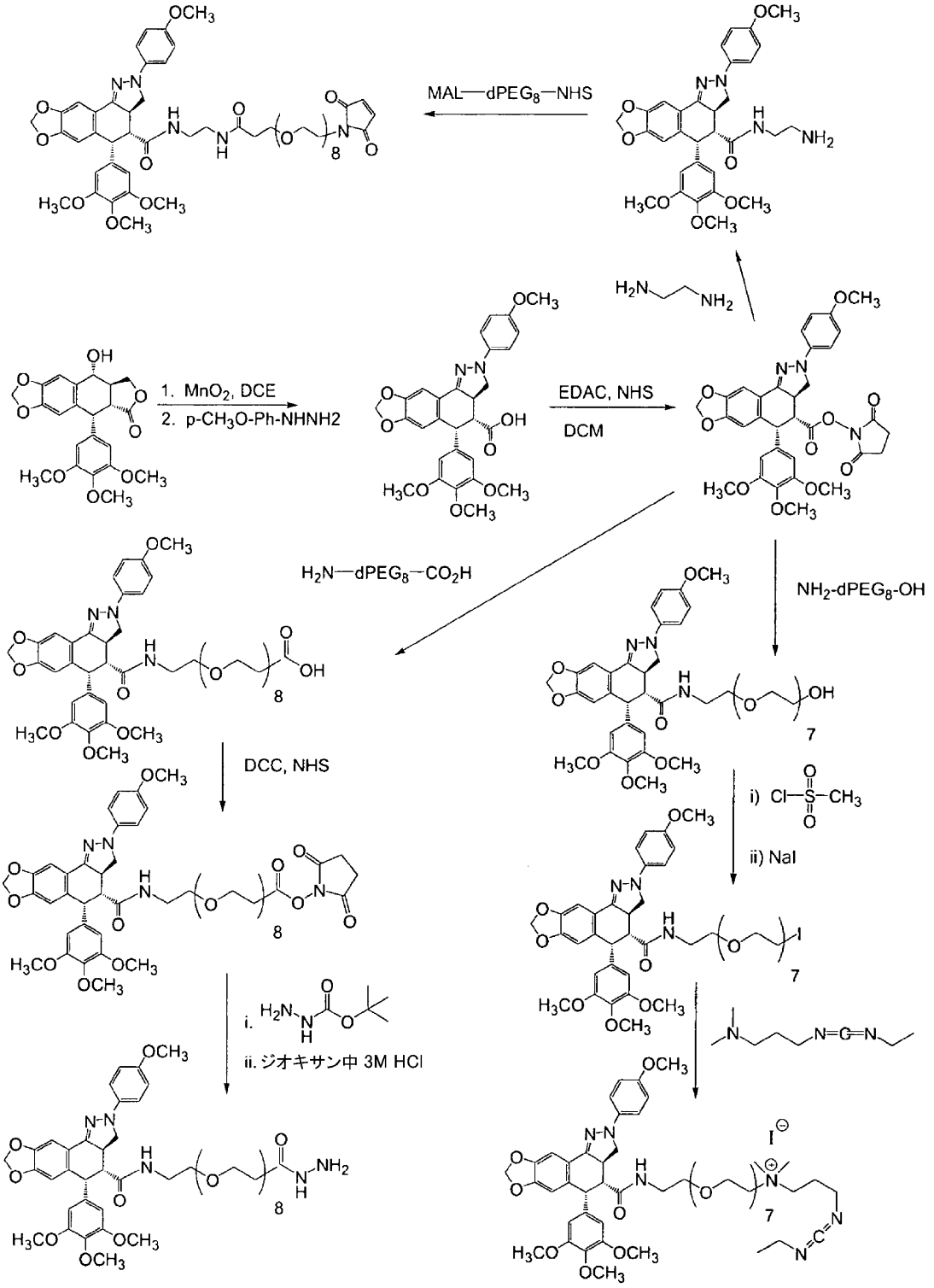
【０６３９】

９．シクロリグナン－リンカーコンジュゲートおよび免疫原

スキーム１２は、典型的なポドフィロトキシンに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。次に、ハプテン－リンカーコンジュゲートを所望に応じてさらに誘導体化することができ、もしくはタンパク質担体分子のような担体分子に直接連結することができる。

【０６４０】

【化２００】



スキーム 12

【０６４１】

スキーム１２に関して、出発アルコールをジクロロエタン中で二酸化マンガン酸化を用いて対応するケトンに酸化した。次に、ケトンを中間体オキシム（示されない）に転化し、続いて５員複素環に環転位し、その結果、ラクトンの開環によりカルボン酸官能基を有する化合物を生成せしめた。この化合物をＤＣＣもしくはＥＤＡＣのいずれかを用いてＮＨＳエステルに転化した。第一の選択肢として、ＮＨＳエステルをエチレンジアミンと反応させて末端アミンを有するアミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてリンカーをハプテンに連結することがで

きる。

【０６４２】

あるいはまた、ＮＨＳエステルをＰＥＧ$_8$リンカーと連結して末端カルボン酸もしくはヒドロキシル官能基のいずれかを有するアミドを生成せしめた。アミドのカルボン酸官能基をＮＨＳエステルに転化した。次に、この化合物をタンパク質担体に連結して免疫原を生成せしめた。あるいはまた、ＮＨＳエステルをＢＯＣで保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いてジオキサン中３Ｍの塩酸において脱保護して、ヒドラジドを生成せしめた。

【０６４３】

ヒドロキシル終端ＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

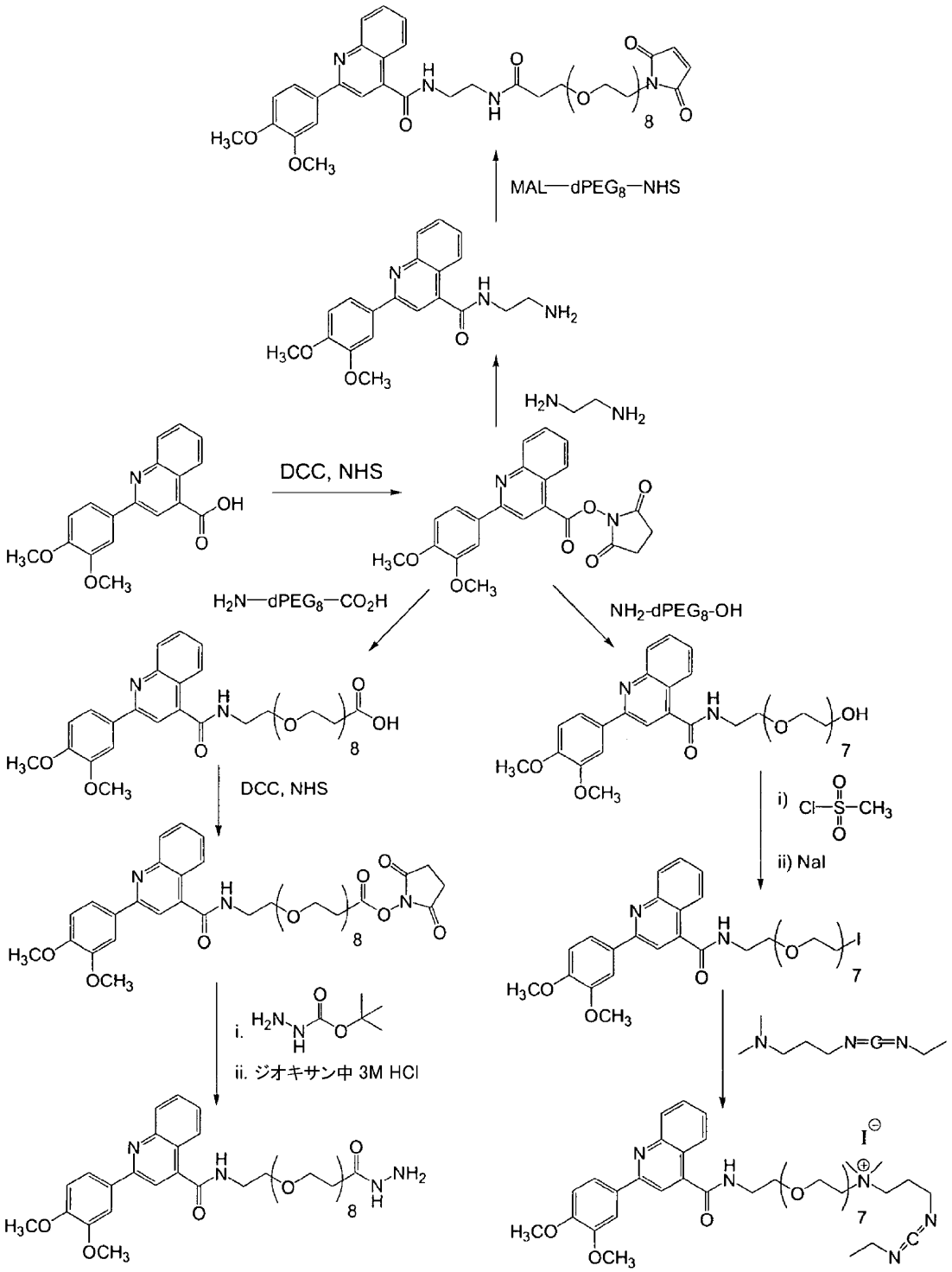
【０６４４】

１０．ヘテロアリールコンジュゲート

スキーム１３および１４は、典型的なヘテロアリールに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。次に、ハプテン－リンカーコンジュゲートを所望に応じてさらに誘導体化することができ、もしくはタンパク質担体分子のような担体分子に直接連結することができる。

【０６４５】

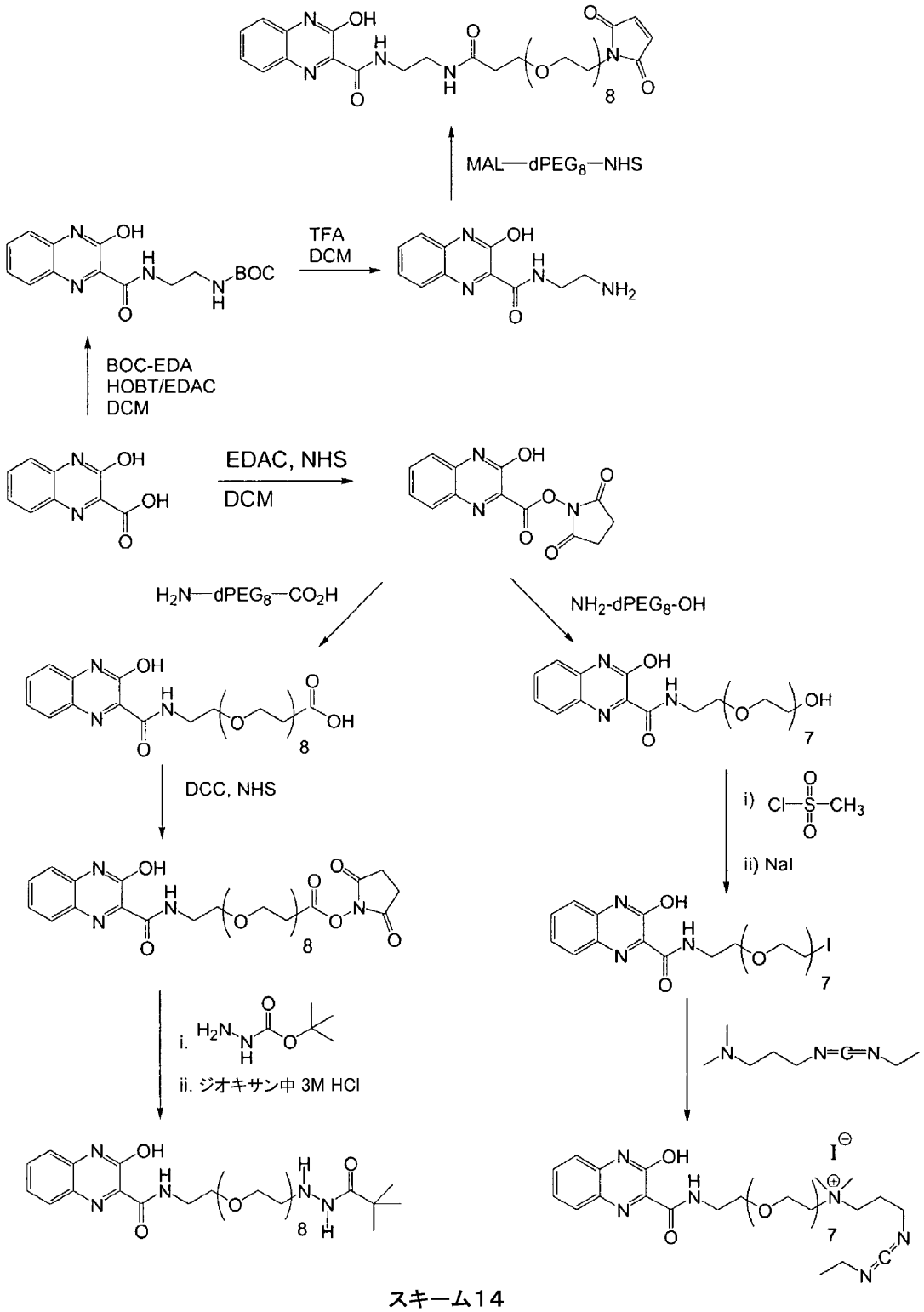
【化２０１】



スキーム 13

【０６４６】

【化２０２】



スキーム14

【０６４７】

スキーム１３および１４に関して、出発化合物は各々カルボン酸官能基を含む。第一の方法において、カルボン酸はＨＯＢＴ／ＥＤＡＣを用いてＢＯＣで保護されたエチレンジアミンとの反応によりエチレンアミノアミドに転化することができる。ＢＯＣ保護基は、ジクロロメタン中ＴＦＡのような酸を用いて取り除かれる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてリンカーをハプテンに連結することができる。

【０６４８】

あるいはまた、ＮＨＳエステルをPEG_8リンカーに連結して末端カルボン酸もしくは

ヒドロキシル官能基のいずれかを有するアミドを生成せしめることができる。アミドのカルボン酸官能基は、カップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳエステルに転化することができる。次に、ＮＨＳエステルをＢＯＣで保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いてジオキサン中３Ｍの塩酸において脱保護して、ヒドラジドを生成せしめた。あるいはまた、ＮＨＳエステルをタンパク質担体に連結して免疫原を生成せしめることができる。

【０６４９】

ヒドロキシル終端ＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

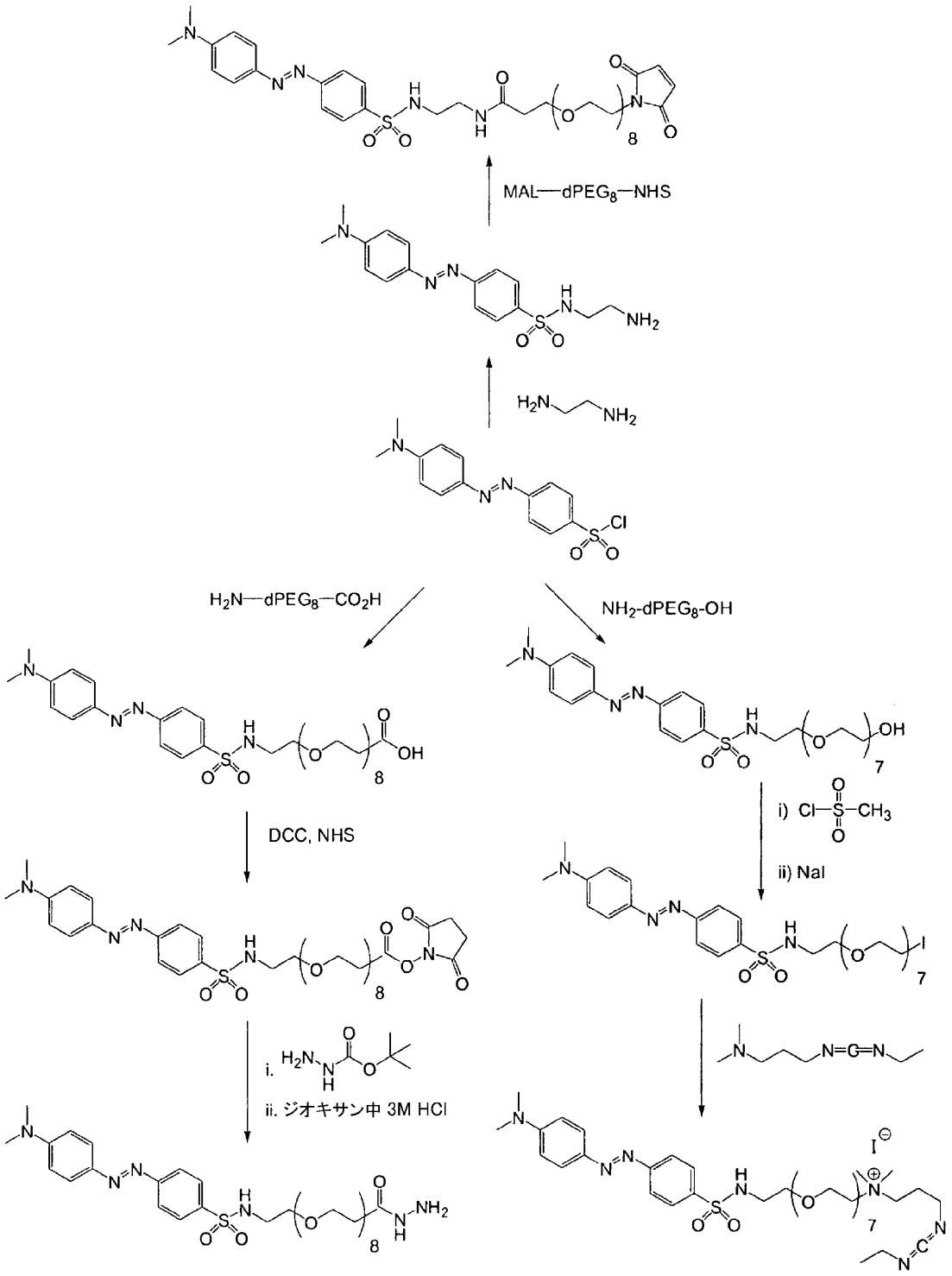
【０６５０】

１１．アゾアリールコンジュゲート

スキーム１５は、典型的なアゾアリールに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。次に、ハプテン－リンカーコンジュゲートを所望に応じてさらに誘導体化することができ、もしくはタンパク質担体分子のような担体分子に連結することができる。

【０６５１】

【化２０３】



スキーム15

【０６５２】

スキーム１５に関して、反応性スルホニルクロリド官能基を有する典型的なアゾアリールハプテンをエチレンジアミンもしくは典型的な二官能性ＰＥＧ$_8$リンカーのいずれかと反応させた。第一の選択肢として、アゾアリール化合物をエチレンジアミンと反応させて末端アミンを有するスルファミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させて反応性末端官能基を有するリンカーをハプテンに連結することができる。

【０６５３】

あるいはまた、反応性スルホニルクロリドをＰＥＧ$_8$リンカーと反応させて末端カルボ

ン酸もしくはヒドロキシル官能基のいずれかを有するスルファミドを生成せしめることができる。アミドのカルボン酸官能基は、カップリング剤としてＤＣＣを用いてＮＨＳエステルに転化することができる。ＮＨＳエステルをＢＯＣで保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いてジオキサン中３Ｍの塩酸において脱保護して、ヒドラジドを生成せしめた。あるいはまた、ＮＨＳエステルをタンパク質担体に連結して免疫原を生成せしめることができる。

【０６５４】

ヒドロキシル終端ＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

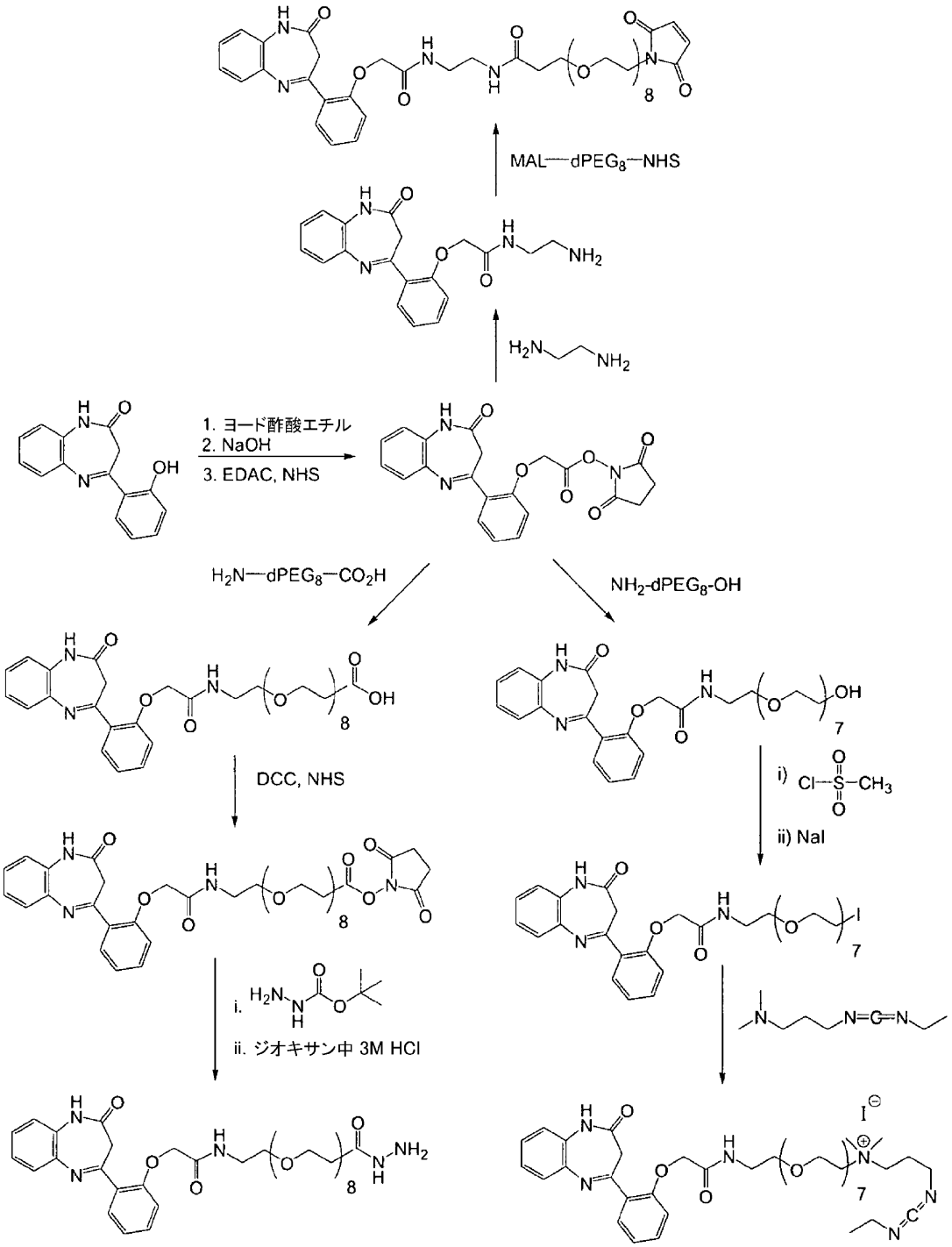
【０６５５】

１２．ベンゾジアゼピンコンジュゲート

スキーム１６は、典型的なベンゾジアゼピンに基づくハプテンを典型的なアルキレンオキシドリンカーに連結するために適当な１つの方法を例示する。次に、ハプテン－リンカーコンジュゲートを所望に応じてさらに誘導体化するか、もしくはタンパク質担体分子のような担体分子に直接連結することができる。

【０６５６】

【化２０４】



スキーム16

【０６５７】

スキーム１６に関して、典型的なベンゾジアゼピンハプテンはヒドロキシル基を含む。この基をヨード酢酸エチルと反応させ、続いて水酸化ナトリウムで処理して末端カルボン酸官能基を有する化合物を生成せしめた。カップリング剤としてＥＤＡＣを用いてカルボン酸をＮＨＳエステルに転化した。ＮＨＳエステルをエチレンジアミンもしくは典型的な二官能性ＰＥＧ$_8$リンカーのいずれかと反応させた。第一の選択肢として、アゾアリール化合物をエチレンジアミンと反応させて末端アミンを有するアミドを生成せしめることができる。次に、この化合物をマレイミド－ＰＥＧ－ＮＨＳエステルと反応させてリンカーをハプテンに連結することができる。

【０６５８】

あるいはまた、反応性ＮＨＳエステルをＰＥＧ$_8$リンカーと反応させて末端カルボン酸もしくはヒドロキシル官能基のいずれかを有するアミドを生成せしめることができる。カップリング剤としてＤＣＣを用いてアミドのカルボン酸官能基をＮＨＳエステルに転化することができる。ＮＨＳエステルをＢＯＣで保護されたヒドラジン試薬と反応させ、続いてジオキサン中３Ｍの塩酸において脱保護して、ヒドラジドを生成せしめた。あるいはまた、ＮＨＳエステルをタンパク質担体に連結して免疫原を生成せしめることができる。

【０６５９】

ヒドロキシル終端ＰＥＧコンジュゲートを塩化メシルと反応させ、続いてヨウ化物のようなハロゲン化物と反応させて、ハロゲン化物で置換された化合物を生成せしめることができる。この化合物を例示されるジメチルアミンカルボジイミドと反応させて生体分子の直接標識に有用な化合物を生成せしめることができる。

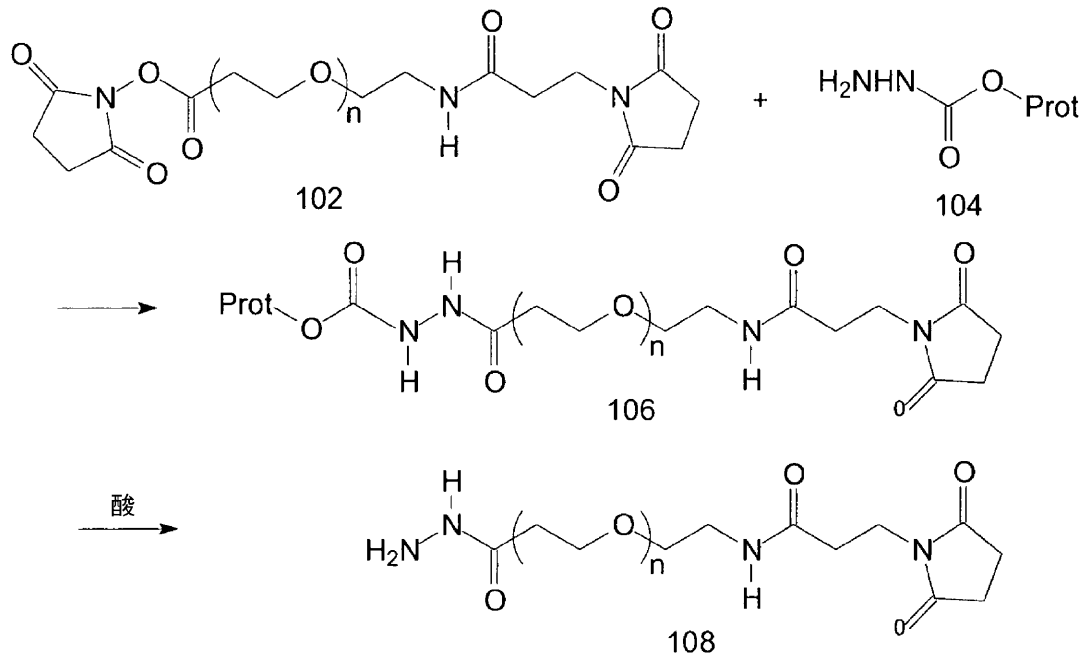
【０６６０】

１３．マレイミド／ヒドラジドＰＥＧ－リンカー合成

スキーム１７は、マレイミド／ヒドラジドヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを製造するための一般的方法を示す。簡潔に言えば、マレイミド／活性エステルＰＥＧリンカー１０２（Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎから入手されるような）を保護されたヒドラジン誘導体１０４と反応させて化合物１０６を生成せしめる。次に、化合物１０６を酸で脱保護してマレイミド／ヒドラジドＰＥＧリンカー１０８を生成せしめた。

【０６６１】

【化２０５】



スキーム17

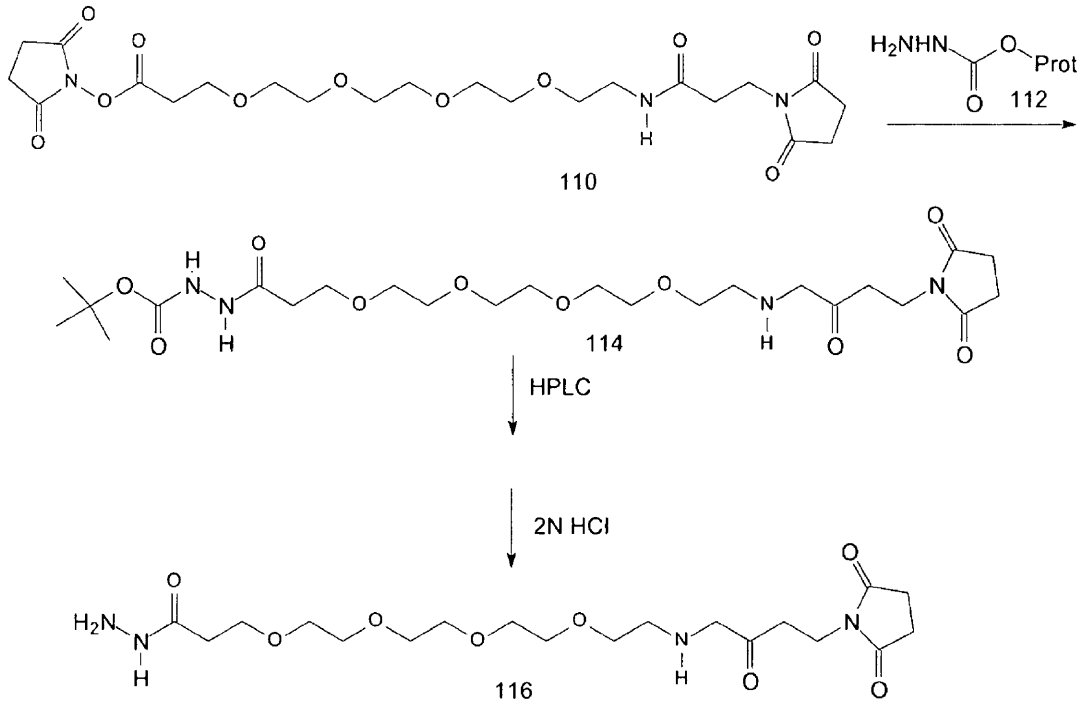
【０６６２】

マレイミド／ヒドラジドＰＥＧ$_4$リンカーの特定の合成を以下にスキーム１６において概説する。５ｍｌの乾式ジオキサン中の活性エステル１１０（１１６ｍｇ、１．０ｅｑ）に５ｍｌの乾式ジオキサン中３０ｍｇ（１．０ｅｑ．）のＢｏｃで保護されたヒドラジン１１２を１時間にわたって加えた。次に、反応物を乾燥窒素下で周囲温度で１６時間攪拌した。２９９６光ダイオードアレイ検出器およびＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ｌｕｎａ　１０μ、Ｃ１８（２）、１００Ａ、２５０ｘ３０ｍｍカラムを装着したＷａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔａ　６００　ＨＰＬＣを利用してＨＰＬＣにより反応混合物を分画した。カラムを１２ｍＬ／分の流速で３０分にわたって３０～６０％ＡＣＮ／水で溶出した。所望のＢｏｃで

保護された－ＰＥＧ$_4$－マレイミド１１４は３８分で溶出し、高真空下で乾燥した後に５０ｍｇの高粘度の黄色の油を生成せしめた。次に、残留物を６ｍｌの無水２Ｎ　ＨＣｌ／ジオキサンで乾燥窒素下で４５分間攪拌することにより最終的な脱保護されたヒドラジド１１６が得られた。次に、回転蒸発によって濃縮して５５ｍｇのヒドラジド－ＰＥＧ$_4$－マレイミドＨＣＬ塩を生成せしめた。

【０６６３】

【化２０６】



スキーム18

【０６６４】

１４．リンカー－検出可能な標識コンジュゲート

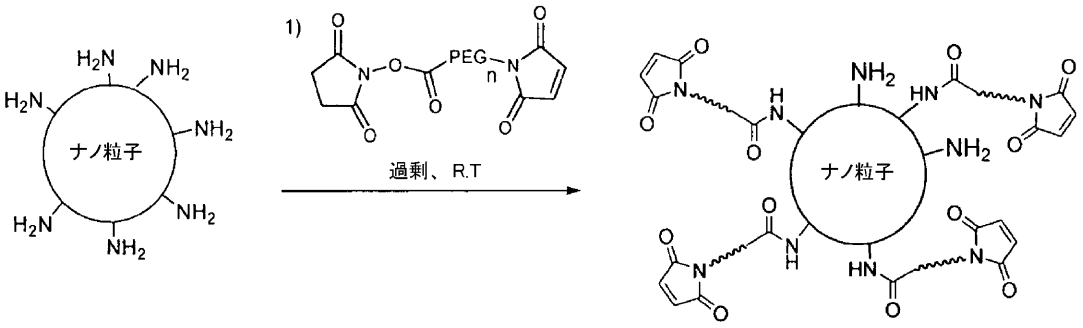
本発明のある態様は、リンカーを用いてコンジュゲートを形成することに関する。以下の限定されない例は、方法を例示するためにマレイミドＰＥＧ活性エステルを用いて検出可能な標識コンジュゲートを形成する態様を参考にして方法の態様を例示するために提供される。例示される態様は、本明細書に開示されるようなコンジュゲートの他のタイプを形成するために使用できることを当業者は認識する。

【０６６５】

１つの態様において、開示される特異的結合部分ナノ粒子コンジュゲートは、以下のスキーム１９～２２に記述される方法に従って製造され、ここで、ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、アミン反応性基（活性エステル）およびチオール反応性基（マレイミド）を有するポリエチレングリコールリンカーである。スキーム１９に示されるように、１つもしくはそれ以上の利用可能なアミン基を有するナノ粒子（量子ドットのような）を過剰のリンカーと反応させて活性化ナノ粒子を形成する。

【０６６６】

【化２０７】



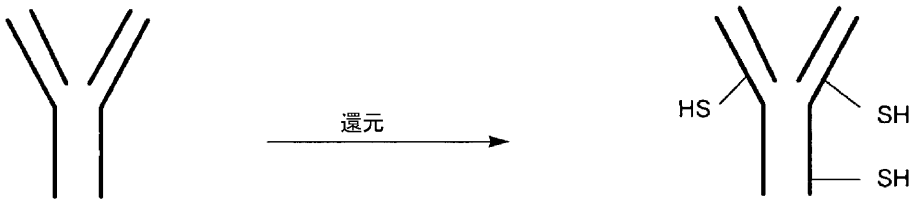
スキーム19

【０６６７】

チオール基は、スキーム２０に示されるようにＤＴＴのような還元剤と抗体を反応させることにより抗体に導入することができる。ＤＴＥもしくはＤＴＴのような穏やかな還元剤では、抗体を完全に保ちながら（これはサイズ排除クロマトグラフィーにより決定することができる）抗体に限られた数のチオール（約２～約６の間のような）を導入するために約１ｍＭ～約４０ｍＭの間の濃度、例えば、約５ｍＭ～約３０ｍＭの間そしてより典型的には約１５ｍＭ～約２５ｍＭの間の濃度が利用される。特定の濃度の溶液との反応の時間の適当な量は、既定量の時間において生成されるチオールの数を滴定することにより容易に決定することができるが、反応は典型的に１０分～約１日、例えば約１５分～約２時間の間、例えば約２０分～約６０分の間進めてもよい。

【０６６８】

【化２０８】



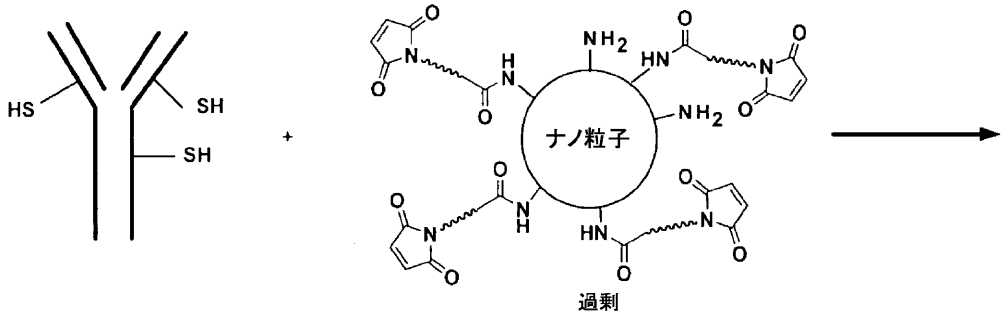
スキーム20

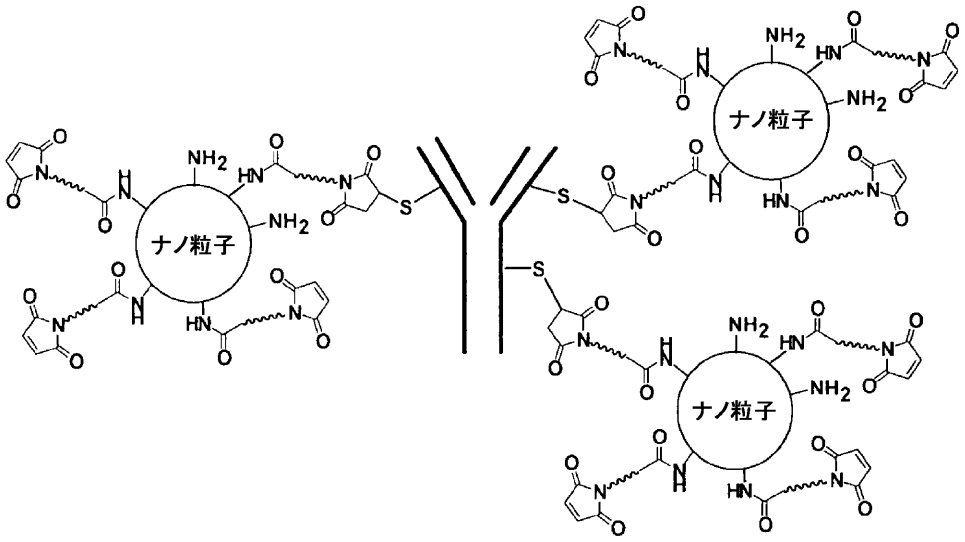
【０６６９】

次に、スキーム１９および２０に従って生成される成分を合わせてスキーム２１に示されるようなコンジュゲートを生成せしめる。

【０６７０】

【化２０９】





スキーム21

【０６７１】

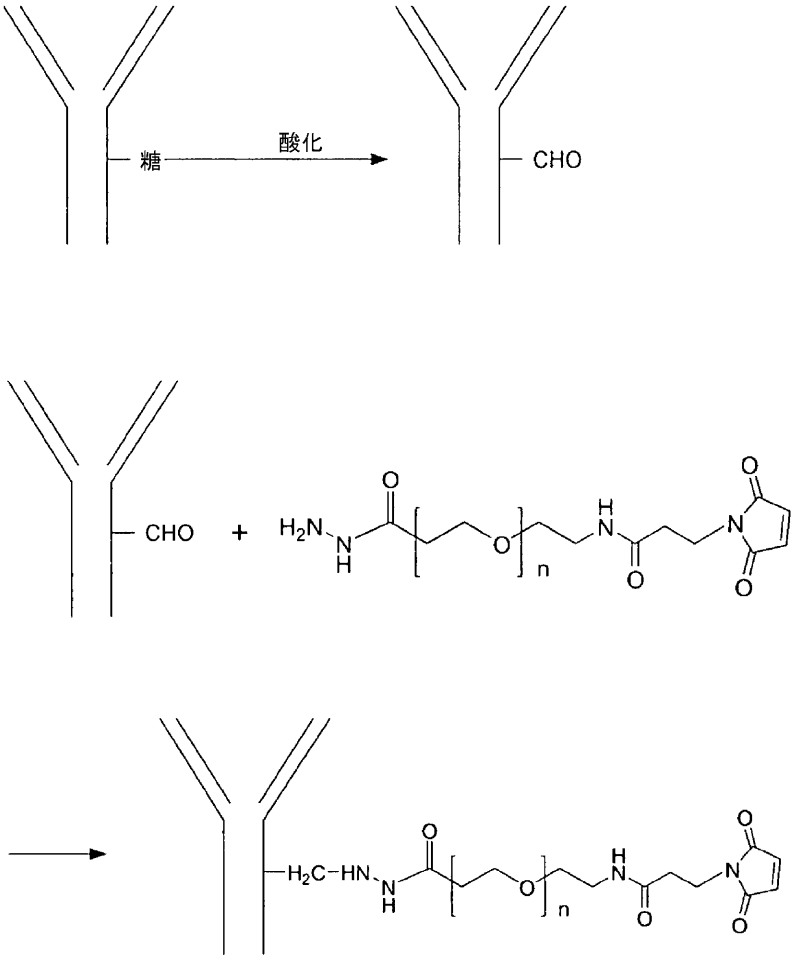
スキーム１９～２１はマレイミドＰＥＧ活性エステルの最適な方法を例示し、ここで、ナノ粒子はアミン基（１つもしくは複数）をリンカーの活性エステルと反応させることにより最初に活性化されて活性化ナノ粒子を形成するが、抗体上のアミン（１つもしくは複数）もしくはチオール（１つもしくは複数）のいずれかをリンカーと反応させることにより抗体を最初に活性化し、そして次に活性化抗体をナノ粒子［適切な場合にリンカー上の残りの反応性基と反応するためにチオール（１つもしくは複数）もしくはアミン（１つもしくは複数）のいずれかを有する］と反応させることもまた可能である。

【０６７２】

従って、代替態様において、以下のスキーム２２および２３に示されるように抗体をコンジュゲーション用に活性化しそして次にナノ粒子にコンジュゲーションする。スキーム２３において、抗体はスキーム１９に示されたようにナノ粒子の代わりに活性化される。スキーム２２の特定の態様において、糖部分（抗体のＦｃ部分のグリコシル化領域に位置するような）を最初に酸化してアルデヒド基を生成せしめ、それを次にリンカーのアルデヒド反応性基（例示されるマレイミド／ヒドラジドＰＥＧリンカーのヒドラジド基のような）と反応させる。

【０６７３】

【化２１０】



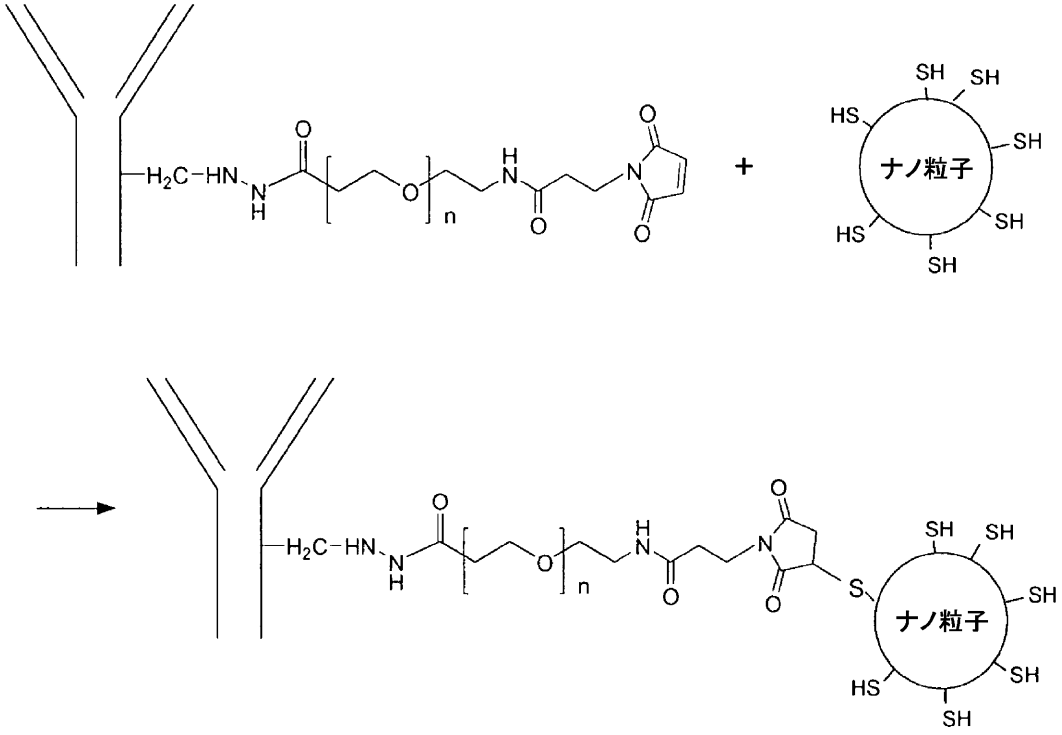
スキーム22

【０６７４】

次に、スキーム２３に示されるように、活性化抗体のリンカー部分のチオール反応性基（例示されるようなマレイミド基のような）を次にナノ粒子上のチオール基と反応させる。この場合もやはり、方法を逆にすることができ、ここで、リンカーを最初にナノ粒子上のアルデヒド基（例えば、糖部分の酸化により形成される）と反応させて活性化ナノ粒子を形成し、そして次に活性化ナノ粒子を抗体上のチオール基と反応させることができる。

【０６７５】

【化２１１】



スキーム23

【０６７６】

上記のスキーム１７－２およびその後の２２は例示目的のためにコンジュゲートの特定の例を示すが、開示されるコンジュゲートにおける特異的結合部分（この場合、抗体）：ナノ粒子の比率はナノ粒子当たり多数（５、１０、２０もしくはそれ以上のような）の特異的結合部分から特異的結合部分当たり多数のナノ粒子（５、１０、２０もしくはそれ以上のような）まで異なることができる。

【０６７７】

１５．抗体へのチオールの導入

コンジュゲーション用に抗体を活性化するために、例えば、抗マウスＩｇＧもしくは抗ウサギＩｇＧ抗体、抗体を周囲温度（２３～２５℃）で約２５分間２５ｍｍｏｌのＤＴＴとインキュベーションすることができる。ＰＤ－１０　ＳＥカラムを通した精製後に、典型的には２～６個の遊離チオールを有する、ＤＴＴを含まない抗体が得られる（スキーム２）。ヤギ抗マウスＩｇＧチオールを製造するために概説される典型的な方法は、一般に他の抗体に適用可能である。抗体当たりのチオールの数は滴定により、例えば２００５年４月２８日に出願された米国仮特許出願第６０／６７５７５９号（この出願は本明細書に引用することにより組み込まれる）に記述されるチオールアッセイを用いることにより決定することができる。

【０６７８】

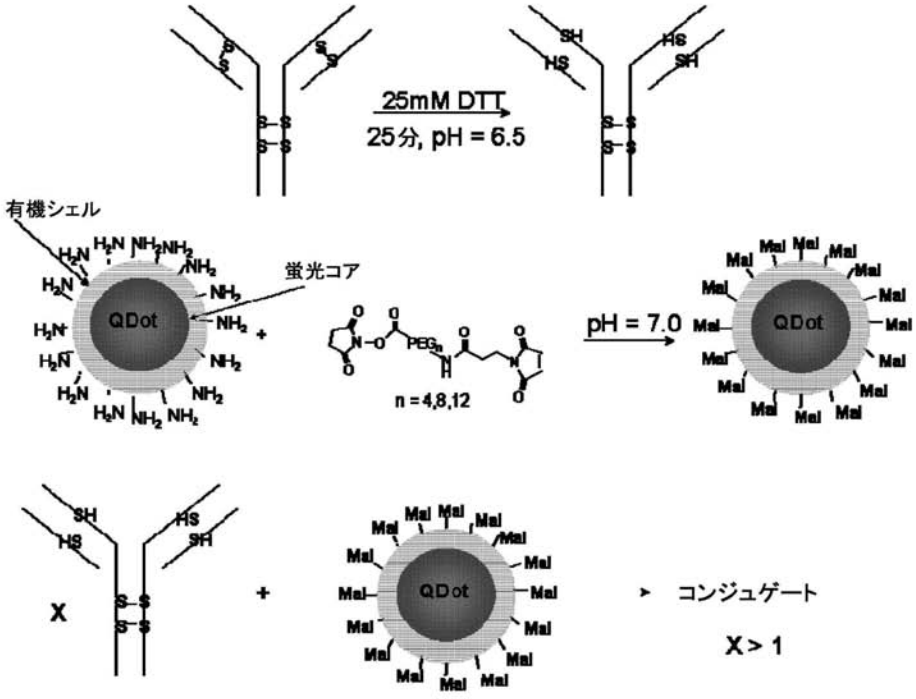
１６．組織サンプルにおける超高感度（および多重化）免疫組織化学およびインサイチューハイブリダイゼーション検出のためのＣｄＳｅ／ＺｎＳ量子ドットと免疫グロブリンおよびステレプトアビジンのコンジュゲート

量子ドットシェルに免疫グロブリンを導入する方法の１つの態様は、本実施例において記述される。この態様は：１）適当なヘテロ二官能性ＮＨＳエステル－（ＰＥＧ）ｘ－マレイミド（ｘ＝４、８、１２）でのアミン終端量子ドットキャッピング基の機能化；２）ジチオスレイトール（ＤＴＴ）での処理による天然ジスルフィドの還元；３）これらのチオール化免疫グロブリンでマレイミド終端量子ドットを誘導体化すること；および４）サ

イズ排除クロマトグラフィーのような適当な技術を用いてコンジュゲートを精製することを含む。方法をスキーム２４に示す。

【０６７９】

【化２１２】



スキーム24

【０６８０】

ストレプトアビジンコンジュゲートは、該方法においてチオール化免疫グロブリンの代わりにチオール化ストレプトアビジンを使用することにより製造することができる。例えば、２－イミノチオランで処理したストレプトアビジン分子。

【０６８１】

本実施例において使用する量子ドットは、トリオクチルホスフィンオキシド（ＴＯＰＯ）の静電的に結合したシェルおよび水溶性をもたらすために挿入両親媒性ポリマー（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｉｎｇ ａｍｐｈｉｐｈｉｌｉｃ ｐｏｌｙｍｅｒ）により保護された。このポリマーは、さらなる機能化のために約３０の末端アミン基を有する。Ｅ．Ｗ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ，ｅｔ．ａｌ．“Ｓｕｒｆａｃｅ－Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｓｅｍｉｃｏｎｄｕｃｔｉｖｅ ａｎｄ Ｍｅｔａｌｌｉｃ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ Ｈａｖｉｎｇ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｄｉｓｐｅｒｓｉｂｉｌｉｔｙ ｉｎ Ａｑｕｅｏｕｓ Ｍｅｄｉａ”，米国特許第６，６４９，１３８号（本明細書に引用することにより組み込まれる）を参照。高感度量子ドットコンジュゲートを形成するために、抗体を様々な比率で量子ドットに結合させた。化学は、本明細書に引用することにより組み込まれる、２００５年４月２８日に出願された米国仮特許出願第６０／６７５７５９号に記述されるものと同様である。

【０６８２】

この方法論は、天然ジスルフィドを使用するのでわずかな試薬の必要性のために好都合である。さらに、抗体は分離したままであり、そしてフラグメントを形成しない。これは各々の繋留抗体から２つの結合部位を可能にする。さらに、非常に安定なそして明るいコンジュゲートが生成される。明るさは、同じ組織上で市販されているストレプトアビジン－ＱＤコンジュゲート（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）を上回る。異なる発光波長の量子ドットにコンジュゲーションしたヤギ抗ビオチ

ンおよびウサギ抗ＤＮＰ抗体を製造し、それにより多重化アッセイを可能にした。ＦＩＳＨによるＨＰＶ検出が、開示される量子ドッコンジュゲートで示された。

【０６８３】

ＶＩＩＩ．開示されるハプテン、ハプテンコンジュゲートおよびその組成物を使用する方法の態様

【０６８４】

Ａ．インサイチューハイブリダイゼーション

本発明のある典型的な態様は、添付の図面に関連して本明細書に開示される。図１は、開示されるハプテンの様々な態様で実施することができるインサイチューハイブリダイゼーションスキーム１０の１つの態様を例示する。タンパク質のような標的１２を有するサンプルが選択される。抗体のような標的１２を検出するために有用なプローブ１４もまた選択される。本明細書に開示されるハプテンのクラスの少なくとも１つのハプテン１６をプローブ１４にコンジュゲーションする。任意の適当な手段を用いて視覚化することができる複合体を形成するのに有効な方法でハプテン１６にコンジュゲーションしたプローブ１４で標的１２を処理する。図１は、プローブ－ハプテンコンジュゲートと複合体を形成した標的１２を検出可能な標識２０を有する抗ハプテン抗体１８で処理することを示す。検出可能な標識２０は、酵素、有機発色団、例えばフルオロフォア、発色性ナノ粒子、例えば蛍光量子ドットなどのような、本明細書に開示される様々なシグナル生成部分のいずれかもしくは当業者に既知であるもの、またはその組み合わせであることができることを当業者は認識する。検出可能な標識２０は、複合体を視覚化するために用いられる。例えば、検出可能な標識２０が酵素である場合、酵素の基質が与えられ、それにより着色沈殿物のような特異的に同定可能な沈殿物を生成せしめる。

【０６８５】

図１はまた、少なくとも１つのそして典型的には複数のプローブを使用することも例示し、ここで、プローブもしくは複数のプローブは、サンプルにおける多数の標的を同時に視覚化するために、少なくとも１つのハプテン、そして潜在的に複数の異なるハプテンにコンジュゲーションされる。図１は、プローブ２４により認識される特定の標的２２を有するサンプルを例示する。ハプテン２６はプローブ２４にコンジュゲーションされる。ハプテン２６は、ハプテン１６と同じかもしくは異なることができる。次に、サンプルを検出可能な標識３０にコンジュゲーションした抗ハプテン抗体２８で処理する。この方法は、標的３２および４２について例示されるように、継続することができる。

【０６８６】

図１に例示されるようなシグナル生成部分２０、３０、４０および５０は、酵素のような同じ標識であることができる。この状況において、該方法は抗ハプテン抗体１８、２８、３８および４８を逐次加えることを含んでなることができる。各適用後に異なる基質を加えることにより異なる沈殿物が形成される。前の視覚化反応に使用した基質は、第二のおよびその後の基質を加える前にサンプルから洗い流される。

【０６８７】

図２は、酵素６２のような検出可能な標識に連結された抗体６０を例示する。酵素基質６４を加えて検出可能な酵素生成物６６を生成せしめる。この方法の１つの特定の態様は、銀インサイチューハイブリダイゼーション（ＳＩＳＨ）である。ＳＩＳＨ用の１つの適当な酵素６２は、基質として銀イオンおよび過酸化水素を用いる、西洋ワサビペルオキシダーゼである。検出可能な生成物６６は、元素銀粒子である。

【０６８８】

別の例として、酵素６２はアルカリホスファターゼであってもよい。基質６４は、銀イオン源およびリン酸塩で保護された還元剤である。この場合にもやはり、視覚的に検出可能な生成物６６は元素の銀である。銀は、明視野顕微鏡検査を包含する任意の適当な手段により検出することができる。

【０６８９】

図２に例示される態様はまた、発色性インサイチューハイブリダイゼーションを行うた

めに用いることもできる。この方法において、酵素６２が再び選択され、適当な例には本明細書に開示されるかもしくはそうでなければ当業者に既知であるものが包含され、特定の態様を例示するために西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが用いられる。次に、明視野顕微鏡検査を包含する当該技術分野において既知である技術を用いて検出することができる着色沈殿物生成物６６を生成せしめるために適当な基質が選択される。発色性化合物は、蛍光性であることができる。適当な蛍光性化合物は、様々な供給業者から市販されている。例えば、ベーターラクタマーゼおよび蛍光性ベーターラクタマーゼ基質は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎから入手可能である。基質は酵素作用により蛍光性にすることができ、もしくは蛍光性基質を非蛍光性にすることができる。免疫組織化学相互作用も視覚化するために量子ドットを使用することもできる。蛍光プローブおよび量子ドットは、典型的に、蛍光顕微鏡を用いてモニターされる。

【０６９０】

図３は、直接検出方法の１つの態様を例示する。この方法のために、一次抗体７０が特定の標的に選択される。例えば、一次抗体７０はマウスモノクローナルＩｇＧ抗体のようなモノクローナル抗体であってもよい。一次抗体７０はまた典型的に、上記に説明したように、検出可能な標識７２も含む。

【０６９１】

あるいはまた、図４に図式的に例示されるように、増幅方法を用いることができる。この態様はまた、診断試験に用いることもできる。標的が選択される。標的と一次抗体の複合体形成を可能にする方法で一次抗体８０がサンプルに加えられる。一次抗体８０に対する二次抗体８２がサンプルに加えられる。抗体８２は、本明細書に説明されるように、基質を用いて複合体形成した標的を特に視覚的にもしくは視覚的手段、例えば顕微鏡検査により同定するために用いることができる検出可能な標識を含む。抗体８２は、例としてそして限定せずに標識ウサギ抗マウスＩｇＧ抗体を包含する任意の適当な抗体であることができる。さらに、一次抗体８０に対する二次抗体８６もまたサンプルに加えることができる。抗体８６は、異なる種からの抗体のような、一次抗体に対する任意の適当な抗体であることができる。例えば、抗体８６は、例としてそして限定せずに、マウスＩｇＧ抗体のような一次抗体に対して産生されるヤギ抗体であってもよい。図４は、検出される標的により生成されるシグナルを増幅するためにサンプルに検出可能な標識９０を有する少なくとも１つのさらなる抗抗体８８を加えることを例示する。この典型的な方法において、抗体８８は標識ウサギ抗ヤギＩｇＧ抗体であってもよい。抗体８８は、標識抗体８４と同様に、同時にもしくは後に加えることができる。

【０６９２】

本発明のある態様は、抗ハプテンモノクローナル抗体を用ることにより促進される。図５は、ハイブリドーマスクリーニングに有用な本発明の１つの態様を図式的に表す。前の実施例のように、特定の標的が選択される。例えば、例示されるラムダエピトープ１０２のような、組織１００に位置している標的が同定される。標的１０２に対する一次抗体１０４は、抗体が標的を認識するのに有効な方法で投与される。例示される系の適当な一次抗体１０４の一例は、抗ラムダウサギ抗体である。図５に示されるように、抗体１０４は、例示される態様のように、それにコンジュゲーションした少なくとも１つのそして潜在的に複数のハプテン１０６を有する。抗体にコンジュゲーションするハプテンの数は異なることができるが、この数は典型的には１～約５個のハプテンであるが、より典型的には２～３であることを当業者は第一に認識する。さらに、一次抗体にコンジュゲーションするハプテンは同じかもしくは異なり得ることを当業者は認識する。

【０６９３】

組織サンプル１００を抗ハプテン抗体１０８で処理する。例えば、図５に例示される態様において、一次抗体１０４に連結された、ハプテン１０６は、次に、ハイブリドーママウスモノクローナル抗体から提供され得るような、抗ハプテン抗体１０８に効果的に連結されるようになる。従って、一次抗体１０４に連結された各ハプテン１０６について、二次抗体１０８が存在する。マウスモノクローナル抗体のような抗ハプテン抗体１０８によ

り形成される複合体は、次に同定されなければならない。１つの方法は、ここで、ヤギ抗体のようなマウス抗体を認識する抗体で組成物を処理することである。図５の例示される態様において、ヤギ抗体１１０は、例示される西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）酵素１１２を包含する酵素のような、検出可能な標識にコンジュゲーションされる。次に、検出可能な、例えば着色した沈殿物を形成するために、当業者に既知であるように、この複合体をＨＲＰ基質とインキュベーションする。この方法は、ハイブリドーマスクリーニングのようなスクリーニングに用いることができる。

【０６９４】

抗ハプテンモノクローナル抗体についてスクリーニングするために、正常ヒト扁桃腺組織のような組織サンプルが得られる。サンプルをパラフィンに包埋することができ、そしてその場合、組織サンプルは、例えばＶＭＳＩ　ＥＺＰｒｅｐ溶液を用いることにより、脱パラフィン処理される。次に、ＶＭＳＩ　ＣＣ１を用いて細胞コンディショニングおよび抗原回復を行う。ヒト抗ラムダ（Ｄａｋｏから入手可能）のような一次ポリクローナル抗体を本願に開示されるハプテンの態様にコンジュゲーションした。コンジュゲーションは、典型的に、抗体のＦｃ領域で起こった。Ｆｃ領域にコンジュゲーションすることは、結合が抗体特異性に影響を及ぼす可能性を減らす。有効量の一次抗体を含んでなる溶液を有効な期間にわたって組織に適用する。実用的態様のために有効濃度は約１０μｇ／ｍｌの一次抗体であり、そして有効な期間は約６０分であった。次に、組織サンプルを洗浄する。その後で、潜在的抗ハプテン抗体（例えば、ＫＬＨ－ＣＧＴ１－１．１＋５－２７Ｆ０９－０２Ｅ０１）を組織サンプルに約６０分のような有効な期間にわたって適用する。次に、ＶＭＳＩ　Ｏｍｎｉ　Ｍａｐ　ＤＡＢ染色のような任意の適当な手段を用いて抗体を検出する。

【０６９５】

潜在的抗ハプテン抗体の自動免疫組織化学（ＩＨＣ）スクリーニングをＶＭＳＩ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＸＴおよびガラススライド上のホルマリン固定パラフィン包埋ヒト扁桃腺組織を用いて行った。組織サンプルは最初に脱パラフィン処理、抗原回復を受け、続いて興味のあるハプテンに連結された一次抗体、潜在的抗ハプテン抗体および検出抗体を加える。検出抗体は、ＶＭＳＩからの色素原検出試薬を用いて視覚化される。染色されたスライドを顕微鏡下で手動でスクリーニングした。正しい一次抗体染色パターンを有するサンプルを潜在的抗ハプテン候補として選択した。選択性および特異性を試験するために、候補抗ハプテン細胞融合産物を上記に詳述した同じ染色方法下で異なる化学クラスのハプテンにコンジュゲーションした一次抗体を用いてさらにスクリーニングする。

【０６９６】

図６は、本発明のニトロピラゾールハプテンの開示される態様にコンジュゲーションした一次抗体を用いる抗ハプテン抗体検出のＩＨＣ陽性染色を示す顕微鏡写真である。図６は、検出可能な標識に連結された本発明のハプテンを用いたサンプルにおける標的の視覚化を明白に示す。

【０６９７】

図７は、抗ニトロピラゾール抗体のような抗ハプテン抗体およびフェニルチオ尿素のような本発明のハプテンのクラスの開示される態様にコンジュゲーションした一次抗体を用いるＩＨＣ陰性染色を示す顕微鏡写真である。図７は、検出可能な標識に連結された本発明のハプテンを用いたサンプルにおける標的の視覚化を明白に示す。

【０６９８】

本発明の態様は多重化、すなわち、サンプルにおける多数の標的の同時検出に有用である。この方法の１つの態様を図８に図式的に例示する。図８は、組織サンプル１２０のようなサンプルは：Ｋｉ－６７（１２２）［Ｇ１期から有糸分裂まで蓄積するタンパク質抗原、そこでそれはその最高含有量で見出される。中間期の間、Ｋｉ－６７タンパク質は主に核小体と会合している。有糸分裂中に、それは染色体との密接な会合を示す。Ｋｉ－６７は増殖する（Ｇ１、Ｓ、Ｇ２期および有糸分裂）細胞の核に存在するが、静止もしくは休止細胞（Ｇ０期）の核には存在しない。最近、Ｋｉ－６７タンパク質はＭＰＭ－２抗原

のファミリーに属することおよび有糸分裂中のＫｉ－６７タンパク質のリン酸化は染色体の凝縮および姉妹染色分体の分離と関連していることが示された。Ｋｉ－６７タンパク質のＣ末端ドメインはインビトロおよびインビボで哺乳類ヘテロクロマチンタンパク質１（ＨＰ１）ファミリーの全ての３つのメンバーに結合することができ、高次クロマチン構造の制御におけるＫｉ－６７タンパク質の役割を示唆する］；ＣＤ３抗原（１２４）［ＣＤ３は、Ｔリンパ球における活性化シグナルを生成するためにＴ細胞受容体（ＴＣＲ）と会合する、哺乳類における３つの別個の鎖（ＣＤ３γ、ＣＤ３δおよびＣＤ３ε）からなるタンパク質複合体である。ＴＣＲ、ζ鎖およびＣＤ３分子は一緒になってＴＣＲ複合体を含んでなる。ＣＤ３γ、ＣＤ３δおよびＣＤ３ε鎖は、非常に近縁の細胞表面タンパク質である］；カッパタンパク質（１２６）；ＣＤ２０（１２８）［Ｂ細胞活性化中に受容体として機能すると考えられる正常および悪性ヒトＢ細胞上に発現される抗原］；ＣＤ－６８抗原（１３０）［主にリソソームに位置する１１０ｋＤａの高度にグリコシル化された膜貫通タンパク質］；およびラムダタンパク質（１３２）を包含する多数の標的を有し得ることを例示する。次に、標的１２２、１２４、１２６、１２８、１３０および１３２の各々の抗体が選択され、そして標的の抗体認識を可能にするのに有効な方法で組織サンプル１２０に加えられる。例えば、Ｋｉ－６７（１２２）は、ＢＦハプテン１３６にコンジュゲーションした一次抗体１３４により認識されることができる。次に、抗ＢＦ抗体１３８によるＢＦハプテンの認識を可能にするのに有効な方法で抗ＢＦモノクローナル抗体１３８がサンプルに加えられる。抗ＢＦモノクローナル抗体１３８は、Ｑｄｏｔ５８５のような検出可能な標識１４０を含む。様々なＱｄｏｔの発光スペクトルは、ｗｗｗ．ｎｉａｉｄ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｖｒｃ／ｐｄｆ／ｆｉｇ３＿ｑｄｏｔ＿ｓｐｅｃｔｒａ．ｐｄｆで提供される。Ｑｄｏｔ５８５は、黄色－橙色の光を生成する。この方法は、記述されるものから変更できることを当業者は認識する。例えば、ハプテン１３６はＢＲである必要はなく、また検出可能な標識１４０はＱｄｏｔ５８５、さらにはＱｄｏｔである必要はない。むしろ、本明細書に記述されるようなそして当業者に既知であるようなハプテンおよびシグナル生成部分の全ての様々な組み合わせを本発明を実施するために用いることができる。

【０６９９】

引き続き図７に関して、ＣＤ３（１２４）は、ビオチン１４４にコンジュゲーションした一次抗体１４２により認識されることができる。この特徴は、ビオチンのような既知の薬剤をハプテン、ハプテンコンジュゲートおよびその組成物の開示される態様と組み合わせて使用することができる本発明の別の態様を例示する。次に、抗ビオチン抗体１４６によるビオチンの認識を可能にするのに有効な方法で抗ビオチンモノクローナル抗体１４６がサンプルに加えられる。抗ビオチンモノクローナル抗体１４６は、青みがかった緑色を生成するＱｄｏｔ５２５のような検出可能な標識１４８を含む。

【０７００】

カッパ（１２６）は、ジニトロフェニルハプテン１５２にコンジュゲーションした一次抗体１５０により認識されることができる。次に、抗ＤＮＰ抗体１５４によるＤＮＰハプテンの認識を可能するのに有効な方法で抗ＤＮＰモノクローナル抗体１５４がサンプルに加えられる。抗ビオチンモノクローナル抗体１５４は、橙色を生成するＱｄｏｔ６０５のような検出可能な標識１５６を含む。

【０７０１】

ＣＤ２０（１２８）は、ニトロフェニルハプテン１６０にコンジュゲーションした一次抗体１５８により認識されることができる。次に、抗ＮＰ抗体１６２によるＮＰ１６０の認識を可能するのに有効な方法で抗ＮＰモノクローナル二次抗体１６２がサンプルに加えられる。抗ＮＰモノクローナル抗体１６２は、薄赤色を生成するＱｄｏｔ６５５のような検出可能な標識１６４を含む。

【０７０２】

ＣＤ－６８（１３０）は、ＴＳハプテン１６８にコンジュゲーションした一次抗体１６６により認識されることができる。次に、抗ＴＳ抗体１７０によるＴＳ１６８の認識を可

能するのに有効な方法で抗ＴＳモノクローナル二次抗体１７０がサンプルに加えられる。抗ＴＳモノクローナル抗体１７０は、薄緑色を生成するＱｄｏｔ５６５のような検出可能な標識１７２を含む。

【０７０３】

ラムダ（１３２）は、ロテノンハプテン１７６にコンジュゲーションした一次抗体１７４により認識されることができる。次に、抗Ｒｏｔ抗体１７８によるＲｏｔ１７６の認識を可能するのに有効な方法で抗Ｒｏｔモノクローナル二次抗体１７８がサンプルに加えられる。抗Ｒｏｔモノクローナル抗体１７８は、暗赤色を生成するＱｄｏｔ７０５のような検出可能な標識１８０を含む。従って、異なるシグナル生成部分を使用することにより、所望され得るように、いくつかの異なるサンプル標的を実質的に同時にもしくは逐次視覚化することができる。

【０７０４】

実用的態様は、検出可能な標的を視覚化するために、多数の異なるハプテンおよびそれに対する抗体を使用している。図９は、そのような方法の結果を例示する。図９は、多数のハプテンおよびそれに対する抗体を用いて生成される染色画像である。図９は、タンパク質の視覚化を明白に示す。

【０７０５】

本発明の態様はまた、異なるタイプの多重化、すなわち、サンプルにおけるタンパク質および核酸標的のような標的の多数の異なるタイプの同時検出を実施するためにも有用である。これは、Ｈｅｒ２（ヒト上皮増殖因子受容体２）に関して図１０に図式的に例示される。Ｈｅｒ２は、細胞が増殖し、分裂しそしてそれら自身を修復する方法を制御するのに役立つ遺伝子である。Ｈｅｒ２癌原遺伝子は、固有のチロシンキナーゼ活性を有する１８５ｋＤａの膜貫通糖タンパク質をコードする。Ｈｅｒ２遺伝子の増幅およびその産物の過剰発現は、細胞トランスフォーメーションを引き起こす。ヒト乳房腫瘍の１０％～４０％において過剰発現される、ｐ１８５（Ｈｅｒ２）の予後関連性が多数の研究により示されている。

【０７０６】

図１０は、蛍光イメージングを例示する。図１０に例示されるように、プローブがＨｅｒ２遺伝子と複合体形成することを可能にするのに有効な方法でハプテン標識Ｈｅｒ２プローブ２００がサンプルに加えられる。プローブ２００は、本明細書に開示されるハプテンの態様を包含する任意の既知のハプテンであることができるハプテン２０２を含む。図１０は、ジニトロフェニルハプテン２０２を用いることを例示する。次に、複合体形成した遺伝子を抗ハプテン抗体２０４で処理する。抗ハプテン抗体２０４は、Ｑｄｏｔ５６５のような検出可能な標識２０６を含む。

【０７０７】

Ｈｅｒ２タンパク質の認識を可能にするのに有効な方法で抗ｈｅｒ２　４Ｂ５ウサギ抗体のような抗Ｈｅｒ２タンパク質抗体２０８がサンプルに加えられる。抗Ｈｅｒ２抗体２０８は、少なくとも１つのハプテン２１０および潜在的に複数のハプテン２１０を含み、それらは同じかもしくは異なることができる。図１０に例示される態様は、ビオチンを用いる方法を例示する。次に、二次抗体２１２とハプテン（１つもしくは複数）２１０の複合体形成を可能にするのに有効な方法で抗ハプテン二次抗体２１２がサンプルに加えられる。抗ハプテン二次抗体２１２は、Ｑｄｏｔ６５５のような検出可能な標識２１４を含む。従って、図１０に例示される態様は、遺伝子および遺伝子産物の多重化検出を可能にする。

【０７０８】

図１１は、そのような多重化発色検出の結果を例示する。図１１は、抗ビオチンおよび抗ジニトロフェニル抗体を用いることによるような、タンパク質および２つの遺伝子の検出を示す染色画像である。

【０７０９】

ＩＸ．試験キット

本発明の開示される態様は、１つには、本発明の方法の様々な態様を実施するためのキットを提供する。そのようなキットの例には、コレステロール分析に有用なもの、妊娠キット、癌診断キットなどが包含される。本発明の試験キットは、典型的に、ハプテン－抗体コンジュゲートおよび／もしくはハプテン－核酸プローブコンジュゲートを包含する少なくとも１つのハプテン－特異的結合分子コンジュゲートのような本発明のハプテンコンジュゲート、ならびに抗ハプテン抗体、特に検出可能な標識にコンジュゲーションした抗ハプテン抗体を有する。

【０７１０】

具体例として、キットは阻害剤のような薬物治療に対する哺乳類腫瘍の反応性を特性化するために提供される。特定の例には、ｍＴＯＲ経路の阻害剤またはＥＧＦ経路、ｍＴＯＲ経路もしくは両方におけるポリペプチドの発現、リン酸化もしくは両方を検出することができる少なくとも２つの試薬、好ましくは抗体を含んでなる二重ｍＴＯＲ経路阻害剤およびＥＧＲ経路阻害剤が包含されるがこれらに限定されるものではない。例えば、キットは、ＥＲＫのリン酸化形態に結合するか、ＭＥＫのリン酸化形態に結合するか、ＨＩＦ－１αに結合するか、もしくはｍＴＯＲに結合する少なくとも２、３、もしくは４つの試薬を含有することができる。さらに、キットは、さらなる抗体が包含されるがこれらに限定されるものではない、上記に同定される試薬以外のさらなる成分を含むことができる。そのようなキットは、例えば、特定の患者に適切な治療を選択することに補助として臨床医もしくは医師により使用されることができる。

【０７１１】

Ｘ．自動化態様

ハプテンコンジュゲートを使用するための本明細書に開示される方法の態様は自動化できることを当業者は認識する。Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．は、米国特許第５，６５０，３２７号、第５，６５４，２００号、第６，２９６，８０９号、第６，３５２，８６１号、第６，８２７，９０１号および第６，９４３，０２９号、ならびに米国公開出願第２００３０２１１６３０号および第２００４００５２６８５号を包含する、自動分析を行うための系および方法を開示する多数の米国特許の譲受人であり、これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる。

【０７１２】

ハプテン染色方法の特定の態様は、様々な自動化方法を用いて行われた。典型的な実用的態様に関するさらなる詳細は、実用的実施例に提供される。

【０７１３】

ＸＩ．実用的実施例

以下の実施例は、実用的態様のある特定の特徴を例示するために提供される。本発明の範囲は、以下の実施例により例示される特徴に限定されない。

【０７１４】

材料

ＤＴＴはＡｌｄｒｉｃｈから購入し、そして量子ドットはＱｕａｎｔｕｍ Ｄｏｔ，Ｃｏ．から購入し、そして受け取ったままで使用した。NH_2－ｄＰＥＧ$_8$－CO_2H、NH_2－ｄＰＥＧ$_8$－ＯＨ、ＮＨＳ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＭＡＬおよびＮＨＳ－ｄＰＥＧ$_4$－ＭＡＬは、Ｑｕａｎｔａ ＢｉｏＤｅｓｉｇｎから購入した。ヤギ抗ビオチンは、Ｓｉｇｍａから凍結乾燥して受け取った。抗体濃度は、ε_{280}＝１．４ｍｌｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を用いて計算した。量子ドット濃度は、６０５ｎｍ発光量子ドット（ＱＤ$_{605}$）には$\varepsilon_{601(\pm3)}$＝６５００００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$そしてＱＤ６５５には$\varepsilon_{645(\pm3)}$＝７０００００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を用いて決定した。１８．２ＭΩの抵抗に達するために脱イオン水をＭｉｌｌｉ－Ｑ Ｂｉｏｃｅｌシステムに通した。バッファー交換は、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で行った。サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、既知の分子量のタンパク質基準で標準化したＡｋｔａ ｐｕｒｉｆｉｅｒｓ（ＧＥ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で行った。流速は、ＰＢＳ、ｐＨ７．５を流すＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ ＧＬ １０／３００（ＧＥ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で０．

９ｍｌ／分であった。

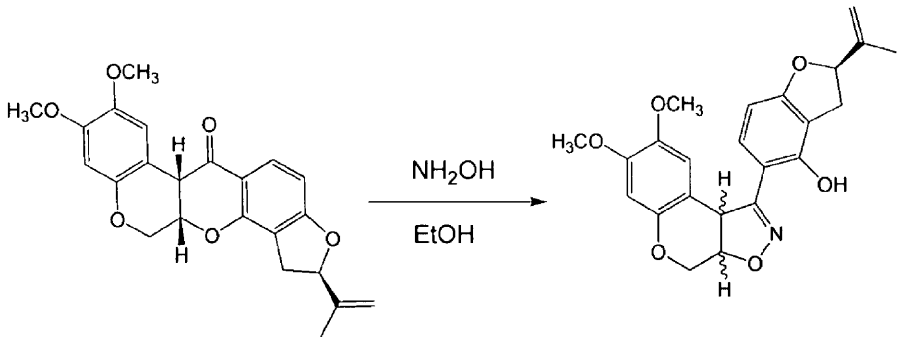
【実施例１】

【０７１５】

本実施例は、ロテノンイソオキサゾリンの合成に関する。

【０７１６】

【化２１３】



【０７１７】

ロテノン（２０．００ｇ、５０．７ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）およびヒドロキシルアミン塩酸塩（３５．２０ｇ、５０７ｍｍｏｌ、１０．０ｅｑ．）を無水エタノール（６００ｍＬ）に懸濁／溶解した。水（１２０ｍＬ）中の水酸化ナトリウム（２４．３０ｇ、６０８ｍｍｏｌ、１２ｅｑ．）の溶液を撹拌懸濁液に加え、そして３時間還流させた。反応物を室温まで冷却した後に、溶液を濾過し、そして濾液を約１５０ｍＬの容量まで真空中で減らした。減らした濾液を水（２００ｍＬ）で希釈し、そして塩化メチレン（各２００ｍＬ）で３回抽出した。塩化メチレン洗浄液を合わせ、無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、そして溶媒を真空下で除いた。得られる物質（２０ｇ）を塩化メチレン（１０ｍＬ）に溶解し、そして３３０グラムのカラムを使用しそして塩化メチレン～２０％メタノール／塩化メチレン勾配を用いて溶出するフラッシュクロマトグラフィー（Ｉｓｃｏ Ｃｏｍｂｉｆｌａｓｈ）により精製した。所望の化合物（６．１７ｇ、３０％）を前の溶出画分として単離した。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

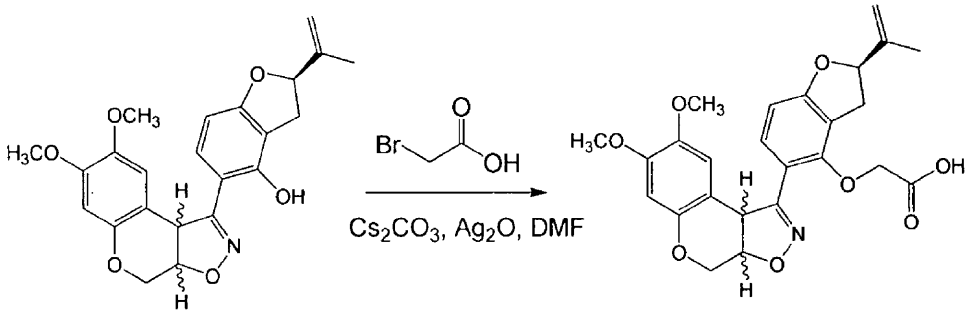
【実施例２】

【０７１８】

本実施例は、ロテノンイソオキサゾリン酢酸の合成に関する。

【０７１９】

【化２１４】



【０７２０】

ロテノンイソオキサゾリン（３．５３ｇ、８．６２ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を無水ジメチルホルムアミド（８０ｍＬ）において撹拌／懸濁した。ブロモ酢酸（２８．１０ｇ、８６．２ｍｍｏｌ、１０．０ｅｑ．）を窒素下で加えた。炭酸セシウム（２８．１ｇ、８６．２ｍｍｏｌ、１０．０ｅｑ．）および酸化銀（２．９９ｇ、１２．９ｍｍｏｌ、１．

５ｅｑ．）を加え、そして反応物を窒素下で周囲温度で２１時間攪拌した。反応混合物を塩化メチレン（１２０ｍＬ）で希釈し、濾過し、そして溶媒を真空中で除いた。残留物を塩化メチレン（１５ｍＬ）に溶解し、そして塩化メチレン中０～１０％メタノールの勾配で１２０グラムのＲｅｄｉｓｅｐカラムを用いてクロマトグラフィーにかけた（Ｉｓｃｏ　ＣｏｍｂｉＦｌａｓｈ）。所望の化合物を含有する画分を合わせ、そして真空下で濃縮して２．９８ｇ（７４％）を生成せしめた。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

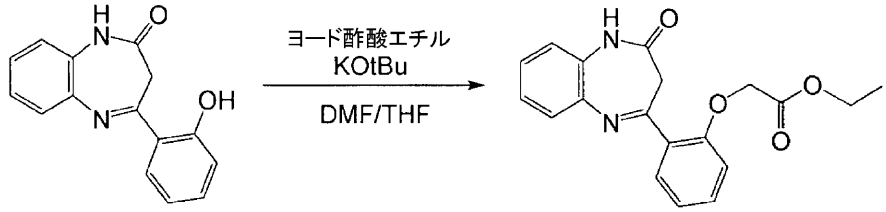
【実施例３】

【０７２１】

本実施例は、ジアザピノンエステルの合成に関する。

【０７２２】

【化２１５】



【０７２３】

１，３－ジヒドロ－４－（２－ヒドロキシフェニル）－２Ｈ－１，５－ベンゾジアザピン－２－オン（２．８３７ｇ、１１．２ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ）を４０ｍＬのＤＭＦにおいて攪拌－懸濁し、３４ｍＬ（３４ｍｍｏｌ、３．０ｅｑ）のカリウムｔｅｒｔ－ブトキシドの１．０Ｍ（ＴＨＦ中）溶液を加え、１．６ｍＬ（１３．５ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ）のヨード酢酸エチルを加え、そして反応物をN_2下で３時間攪拌した。次に、さらに１．６ｍＬ（１３．５ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ）のヨード酢酸エチルを加え、そして攪拌を２時間続けた。次に、反応物を１００ｍＬの水に注ぎ込み、そしてＥｔＯＡｃ（３ｘ１００ｍＬ）で抽出した。ＥｔＯＡｃ抽出物を合わせ、$MgSO_4$上で乾燥させ、溶媒を真空中で除き、そして得られる油をＥｔＯＡｃ／ヘキサン（２０／８０）で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。８０６ｍｇ（２１％の収率）が得られた。純度はＨＰＬＣにより、そして構造はＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

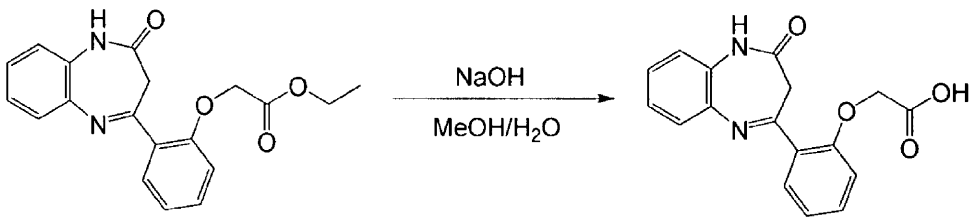
【実施例４】

【０７２４】

本実施例は、ジアザピノン酸の合成に関する。

【０７２５】

【化２１６】



【０７２６】

ジアザピンエステル（９９９ｍｇ、２．９５ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ）を３０ｍＬのＭｅＯＨに溶解し、１５ｍＬの水に溶解した９４４ｍｇ（２３．６ｍｍｏｌ、８．０ｅｑ）の水酸化ナトリウムを加え、そして反応物を４０分間攪拌した。次に、反応物を７５ｍＬの水で希釈し、６Ｍ　ＨＣｌでｐＨを４未満に調整し、そしてＥｔＯＡｃ（３ｘ７５ｍＬ）で抽出した。ＥｔＯＡｃ抽出物を合わせ、$MgSO_4$上で乾燥させ、そして溶媒を真空中で除いた。８６５ｍｇ（９４％の収率）が得られた。純度はＨＰＬＣにより、そして構造

はＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

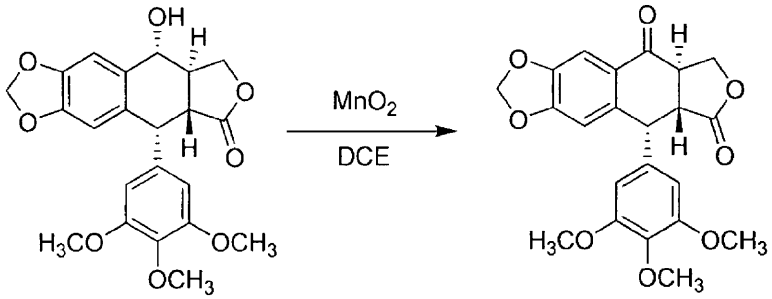
【実施例５】

【０７２７】

本実施例は、ポドフィロトキシンからのオキソポドフィロトキシンの合成に関する。

【０７２８】

【化２１７】



【０７２９】

ポドフィロトキシン（３．１５ｇ、７．６１ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ）を５０ｍＬのＤＣＥに溶解し、酸化マンガン（ＩＶ）（６．６ｇ、７６ｍｍｏｌ、１０ｅｑ．）を加え、そして反応混合物を１時間還流させた。追加の酸化マンガン（ＩＶ）（６．６ｇ、７６ｍｍｏｌ、１０ｅｑ．）を加え、そして還流をさらに５時間続け、次に反応物を室温で６０時間攪拌した。次に、反応物をセライトを通して濾過して赤色－褐色の溶液を生成せしめ、濾液溶媒を真空中で除き、そして得られる残留物をＥｔＯＨから再結晶化した。１．９６８ｇ（６３％の収率）が得られた。純度はＨＰＬＣにより、そして構造はＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

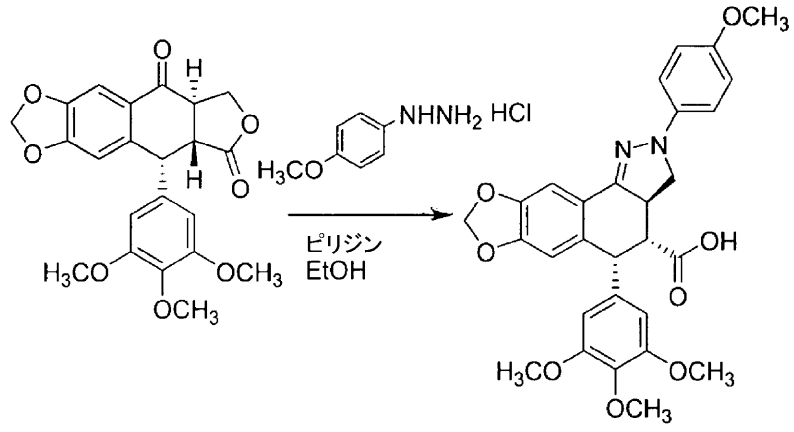
【実施例６】

【０７３０】

本実施例は、ピラゾポドフィリン酸（ｐｙｒａｚｏｐｏｄｏｐｈｙｌｌｉｃ　ａｃｉｄ）の合成に関する。

【０７３１】

【化２１８】



【０７３２】

オキソポドフィロトキシン（２００ｍｇ、０．４８５ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ）を１０ｍＬのＥｔＯＨにおいて攪拌－懸濁した。メトキシフェニルヒドラジン塩酸塩（１１０ｍｇ、０．６３１ｍｍｏｌ、１．３ｅｑ）を加え、ピリジン（０．３００ｍＬ、３．７１ｍｍｏｌ、７．６ｅｑ）を加え、そして反応混合物をN_2下で９５℃で１８時間攪拌した。次に反応物を冷却させ、２０ｍＬの飽和重炭酸ナトリウムに注ぎ込み、そしてＥｔＯＡｃ（３ｘ２０ｍＬ）で抽出した。ＥｔＯＡｃ抽出物を合わせ、$MgSO_4$上で乾燥させ、溶媒

を真空中で除き、そして得られる残留物をＤＣＭ／ＭｅＯＨ（９８／２）で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。１２１ｍｇ（４７％の収率）が得られた。純度はＨＰＬＣにより、そして構造はＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

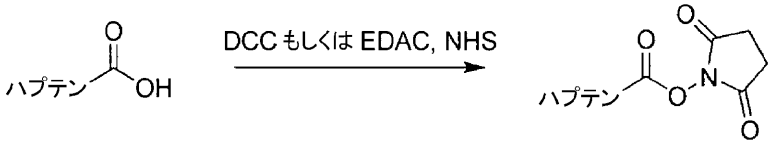
【実施例７】

【０７３３】

本実施例は、ハプテンカルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルの典型的な合成に関する。

【０７３４】

【化２１９】



【０７３５】

ハプテンカルボン酸（５．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を５０ｍｌの丸底フラスコにおいて１０ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解した。溶液を乾燥窒素で覆い（ｂｌａｎｋｅｔｅｄ）、そしてＮＨＳ（５．５ｍｍｏｌ、１．１ｅｑ．）、続いてＤＣＭ（６．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）中１．０ＭのＤＣＣおよびトリエチルアミン（６．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）を加えた。反応物を乾燥窒素下で室温で１６時間攪拌させ、この時点で溶媒を真空下で除いた。残留物を２ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解し、そして濾過して尿素副産物を除いた。次に、フィルターケーキを０．５ｍｌの乾式ＤＣＭで２回洗浄した。次に、合わせたＤＣＭ部分を真空下で乾燥させてハプテンＮＨＳエステルを生成せしめ、それをさらに精製せずに使用した。

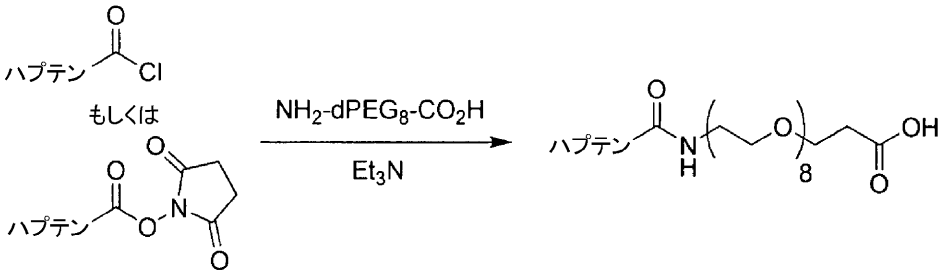
【実施例８】

【０７３６】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸の典型的な合成に関する。

【０７３７】

【化２２０】

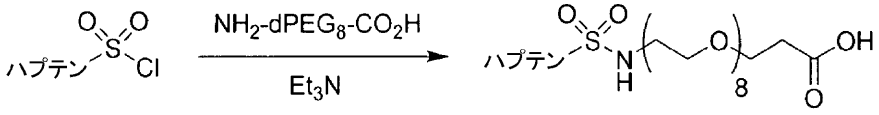


【０７３８】

ハプテンＮＨＳエステルもしくはハプテンアシルクロリド（５．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を５０ｍｌの丸底フラスコにおいて１０ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解した。溶液を乾燥窒素で覆い、そしてアミノ－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸（５．５ｍｍｏｌ、１．１ｅｑ．）、続いてトリエチルアミン（６．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）を加えた。反応物を乾燥窒素下で室温で１６時間攪拌させ、この時点で溶媒を真空下で除いた。残留物を最小量のメタノールに溶解し、そして分取ＨＰＬＣにより精製した。次に、適切な画分をプールし、そして高真空下で乾燥させて純粋なハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－酸を生成せしめた。

【０７３９】

【化２２１】



【０７４０】

あるいはまた、スキーム１０におけるチアゾールに基づくハプテンおよびスキーム１５におけるアゾアリールに基づくハプテンのような、スルホニルクロリド部分を有するハプテンを同じ化学量論および反応条件下でアミノ－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸に直接連結してハプテンスルファミド－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸を生成せしめることができた。

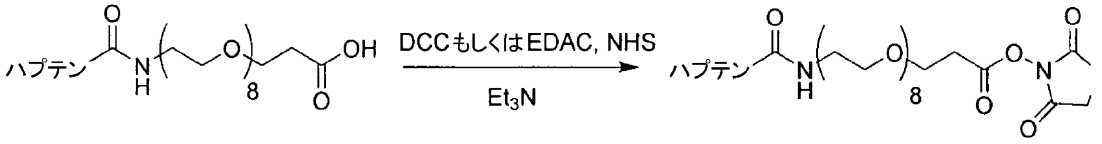
【実施例９】

【０７４１】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルの典型的な合成に関する。

【０７４２】

【化２２２】



【０７４３】

ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－カルボン酸（５．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を５０ｍｌの丸底フラスコにおいて１０ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解した。溶液を乾燥窒素で覆い、そしてＮＨＳ（５．５ｍｍｏｌ、１．１ｅｑ．）、続いてＤＣＭ（６．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）中１．０ＭのＤＣＣおよびトリエチルアミン（６．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）を加えた。反応物を乾燥窒素下で室温で１６時間攪拌させ、この時点で溶媒を真空下で除いた。残留物を２ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解し、そして濾過して尿素副産物を除いた。次に、フィルターケーキを０．５ｍｌの乾式ＤＣＭで２回洗浄した。次に、合わせたＤＣＭ部分を真空下で乾燥させてハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳエステルを生成せしめ、それをさらに精製せずに使用した。

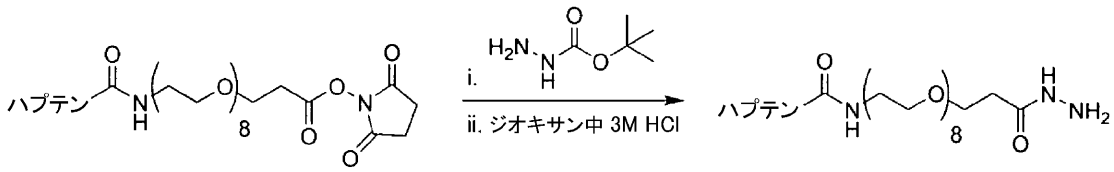
【実施例１０】

【０７４４】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ヒドラジドの典型的な合成に関する。

【０７４５】

【化２２３】



【０７４６】

ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳエステル（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を２５ｍｌの丸底フラスコにおいて５ｍｌの乾式ＤＣＭに溶解した。溶液を乾燥窒素で覆い、そしてＢＯＣヒドラジド（１．２ｍｍｏｌ、１．２ｅｑ．）を加えた。反応物を乾燥窒素下で室温で１６時間攪拌させ、この時点で溶媒を真空下で除いた。次に、残留物を１０ｍｌのジオキサン中４Ｎ　ＨＣｌに溶解し、そして室温で３時間攪拌した。次に、溶媒を真空下で除き、そして残留物を分取ＨＰＬＣにより精製して純粋なハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ヒドラ

ジドを生成せしめた。

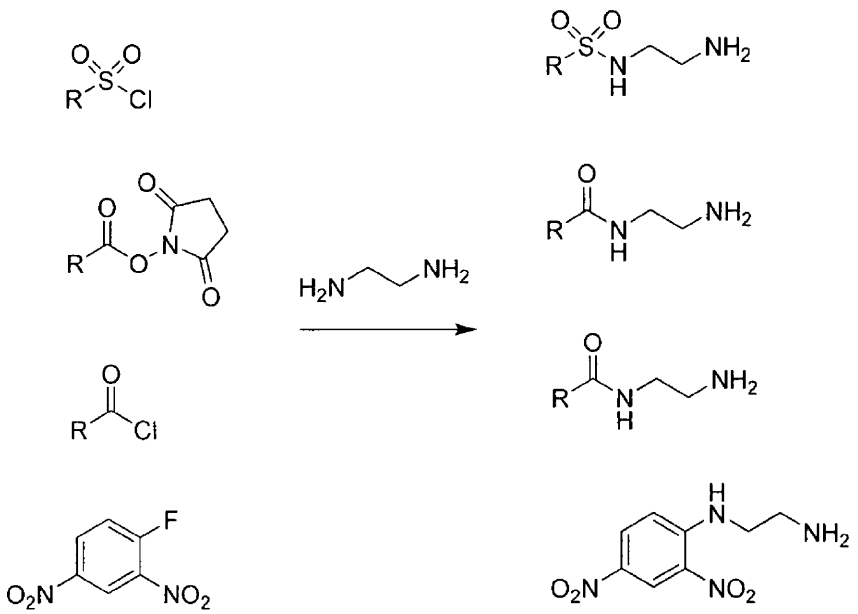
【実施例１１】

【０７４７】

以下の実施例は、エチレンジアミンをハプテン－ＮＨＳ、－スルホニルクロリド、－酸クロリドもしくは１－フルオロ－２，４－ジニトロベンゼンと反応させることによるハプテン－エチルアミンの典型的な合成に関する。

【０７４８】

【化２２４】



【０７４９】

ハプテン－ＮＨＳエステル、ハプテン－スルホニルクロリド、ハプテン－酸クロリドもしくは１－フルオロ－２，４－ジニトロベンゼン（１ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を無水塩化メチレン（１０ｍＬ）に溶解し、そして窒素および周囲条件下で無水塩化メチレン（１０ｍＬ）中のエチレンジアミン（２０ｍｍｏｌ、２０ｅｑ．）の溶液に滴下して加えた。反応混合物を１時間攪拌し、そして溶媒を真空中で除いた。残留物を適切な溶媒に溶解し、そしてフラッシュシリカゲル上でもしくは分取ＨＰＬＣによりクロマトグラフィーにかけた。典型的な収率は、３０～６０％であった。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

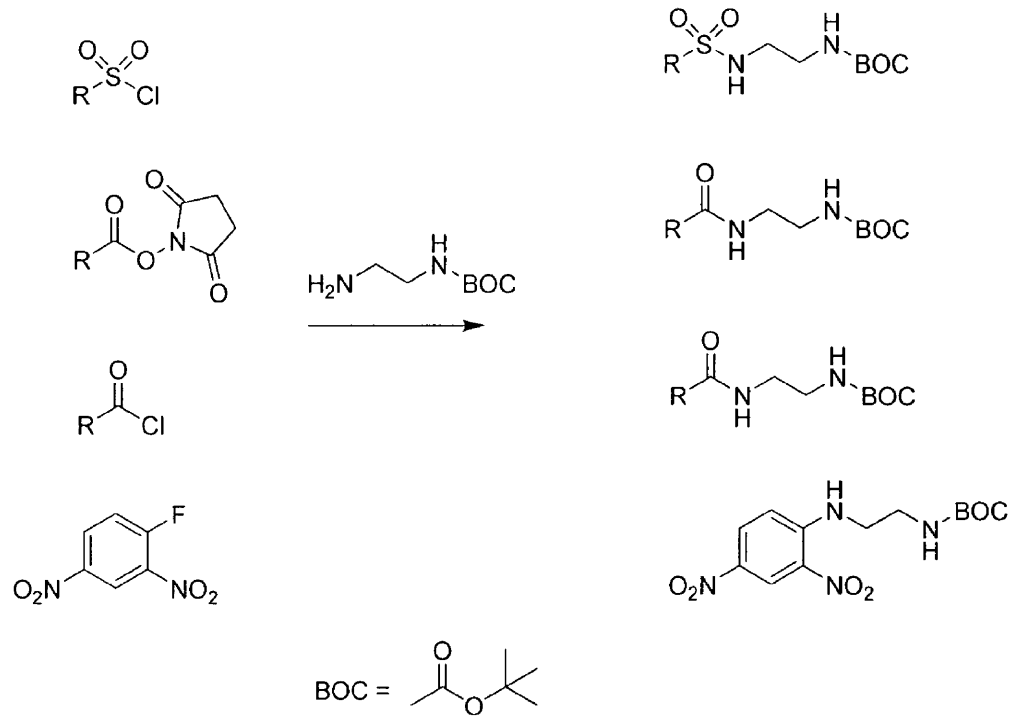
【実施例１２】

【０７５０】

本実施例は、Ｎ－ブトキシカルボニルエチレンジアミンをハプテン－ＮＨＳエステル、－スルホニルクロリド、－酸クロリドもしくは１－フルオロ－２，４－ジニトロベンゼンと反応させることに関する。

【０７５１】

【化２２５】



【０７５２】

ハプテン－ＮＨＳエステル、ハプテン－スルホニルクロリド、ハプテン－酸クロリドもしくは１－フルオロ－２，４－ジニトロベンゼン（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を無水塩化メチレン（１０ｍＬ）に溶解し、そして窒素および周囲条件下で無水塩化メチレン（１０ｍＬ）中のＮ－ブトキシカルボニルエチレンジアミン（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）の溶液に滴下して加えた。反応混合物を２時間攪拌し、そして溶媒を真空中で除いた。残留物を適切な溶媒に溶解し、そしてフラッシュシリカゲル上でもしくは分取ＨＰＬＣによりクロマトグラフィーにかけた。典型的な収率は、２０～４０％であった。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

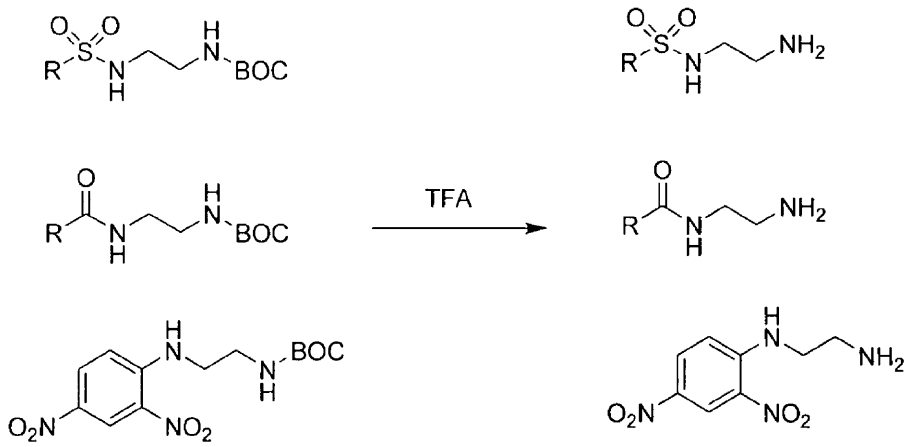
【実施例１３】

【０７５３】

本実施例は、ハプテン－ＢＯＣ－エチレンジアミン化合物を脱保護することに関する。

【０７５４】

【化２２６】



【０７５５】

ハプテン－ＢＯＣ－エチレンジアミン（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を無水塩化メチレン（２．０ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（２．０ｍＬ）を周囲条件下で加え、そして３０分間攪拌した。溶媒を一定重量まで真空下で除き、そして物質を精製せずに使用した。典型的な収率は、９０～９５％であった。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

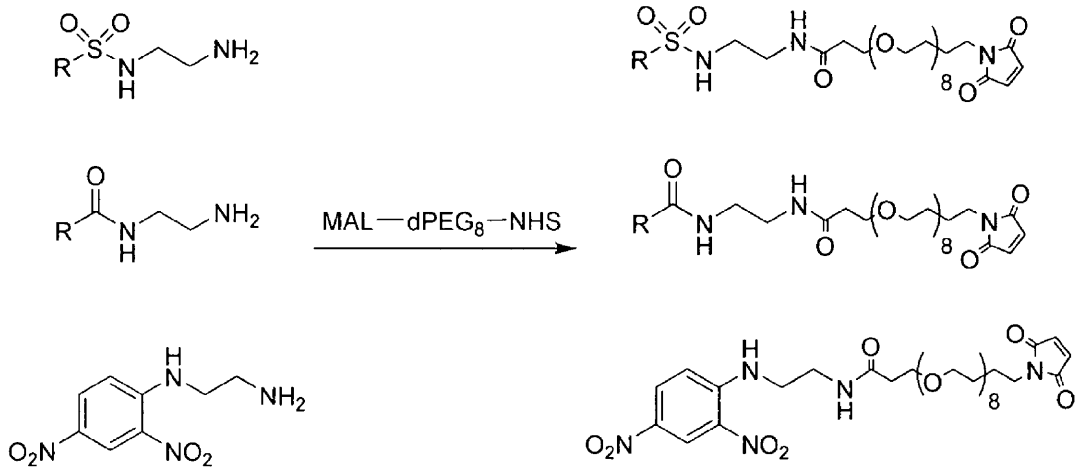
【実施例１４】

【０７５６】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_{8}$－マレイミドの典型的な合成に関する。

【０７５７】

【化２２７】



【０７５８】

ハプテン－エチレンジアミン誘導体（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．）を無水ジメチルホルムアミド（５．０ｍＬ）に溶解し、そしてトリエチルアミン（４．０ｍｍｏｌ、４．０ｅｑ．）を加え、そして窒素下で周囲条件で攪拌した。ＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_{8}$－ＮＨＳ（１．０ｍｍｏｌ、１．０ｅｑ．、Ｑｕａｎｔａ　ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ）を無水ジメチルホルムアミド（５．０ｍＬ）に溶解し、そしてハプテン－エチレンジアミン溶液に加えた。反応物を窒素下で周囲条件で一晩攪拌した。溶媒を真空下で除き、そして分取ＨＰＬＣにより精製した。典型的な収率は、７０～９０％であった。純度はＨＰＬＣにより、そして構造は^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより決定した。

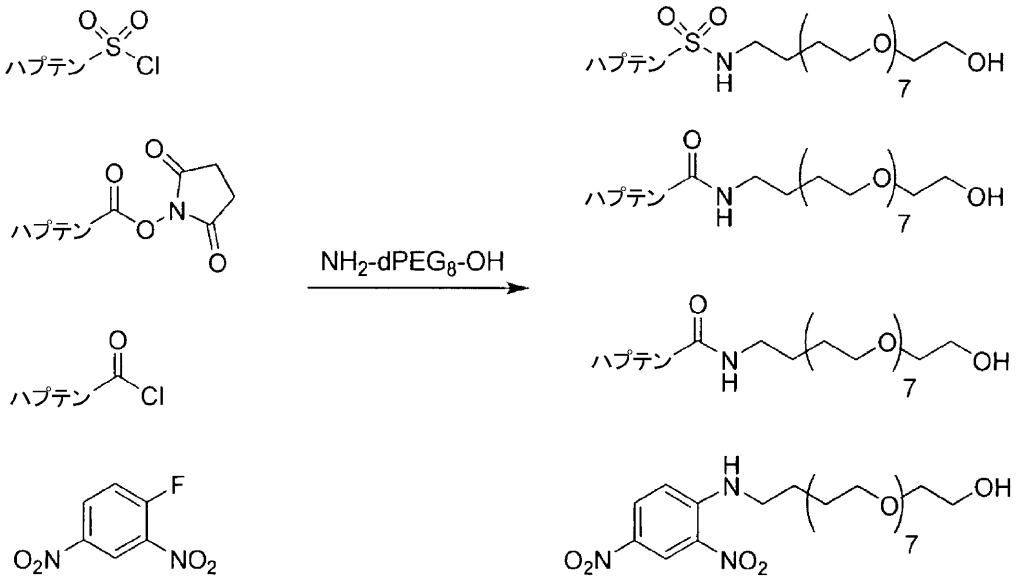
【実施例１５】

【０７５９】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_{7}$－アルコールの典型的な合成に関する。

【０７６０】

【化２２８】



【０７６１】

２５ｍｌのＲＢフラスコにおいて、ハプテン－ＮＨＳエステル、ハプテン－スルホニルクロリド、ハプテン－酸クロリドもしくは１－フルオロ－２，４－ジニトロベンゼン（１．０ｅｑ．、２．７ｍｍｏｌ）を５ｍｌの乾式ＤＭＦ中でアミノ－ｄＰＥＧ$_7$－アルコール（１．０ｅｑ．、２．７ｍｍｏｌ、Ｑｕａｎｔａ　ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ）と反応させる。次に、反応物を乾燥窒素で覆い、そして室温で１６時間攪拌する。溶媒を真空下で除き、そして目的アルコールをシリカゲルクロマトグラフィーもしくは分取ＨＰＬＣのいずれかにより精製する。生成物純度および同一性は、ＨＰＬＣ、ＭＳおよび^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲにより決定した。

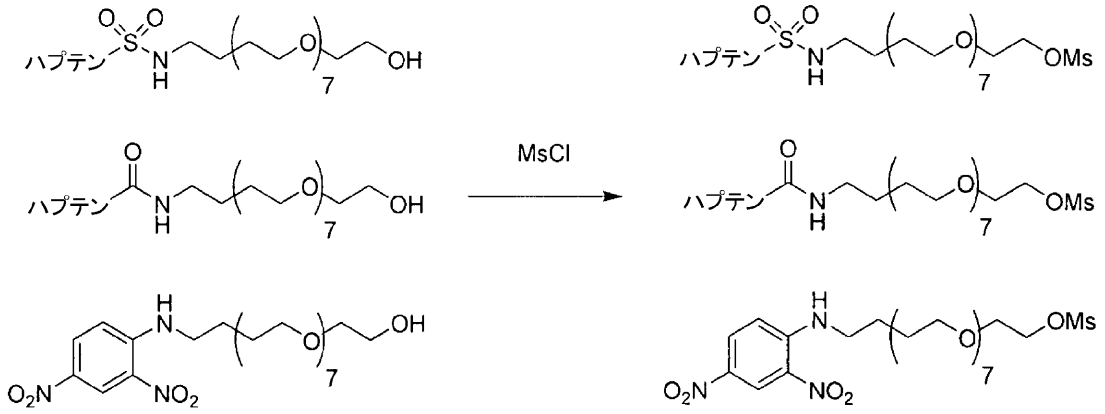
【実施例１６】

【０７６２】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_7$－メシレートの典型的な方法に関する。

【０７６３】

【化２２９】



【０７６４】

ハプテン－ｄＰＥＧ$_7$－アルコールを２５ｍｌのＲＢフラスコにおいて無水ＤＭＦ（７ｍＬ）に溶解した。フラスコを乾燥窒素でパージし、そして塩化メシル（１．１ｅｑ．）をシリンジによって加えた。溶液を室温で２分間攪拌し、その後で無水トリエチルアミン（２．２ｅｑ．）を約２０分にわたって加えた。反応物を室温で１６時間攪拌し、その後で溶媒を真空下で除いた。残留物を乾式ＤＣＭに溶解し、そしてシリカゲルクロマトグラ

フィーによって精製して溶媒を真空下で除いた後にメシレートを生成せしめた。生成物純度および同一性は、ＨＰＬＣ、ＭＳおよび^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲにより決定した。

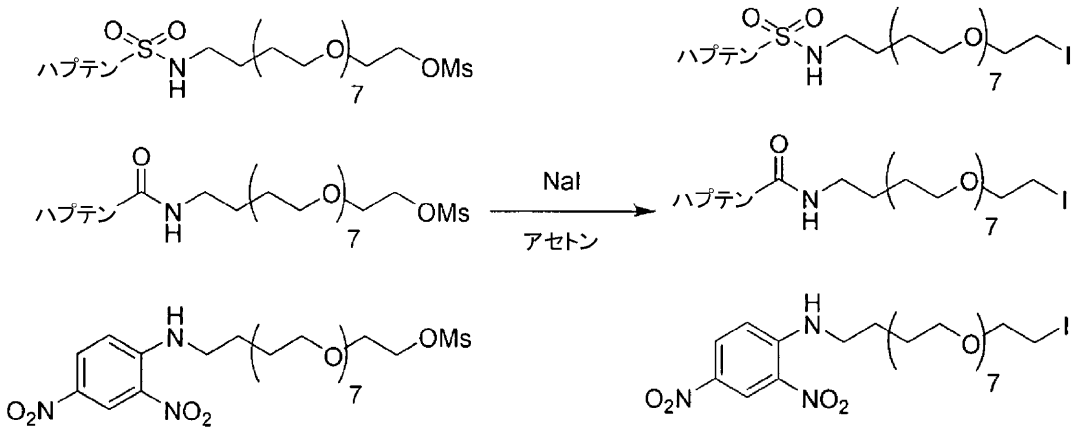
【実施例１７】

【０７６５】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_{7}$－ヨージドの典型的な方法に関する。

【０７６６】

【化２３０】



【０７６７】

ハプテン－ｄＰＥＧ$_{7}$－メシレートを乾式アセトン（１０ｍＬ）に溶解し、そしてヨウ化ナトリウム（１０ｅｑ．）の存在下で３時間還流させることによりヨウ化物に転化した。純粋なヨウ化物がシリカゲルクロマトグラフィー後に得られた。生成物純度および同一性は、ＨＰＬＣ、ＭＳおよび^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲにより決定した。

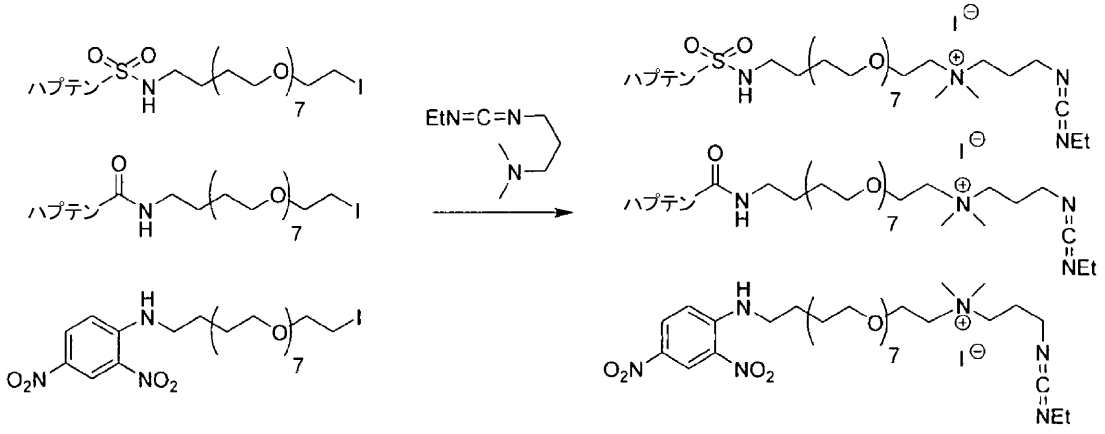
【実施例１８】

【０７６８】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_{7}$－カルボジイミドの典型的な方法に関する。

【０７６９】

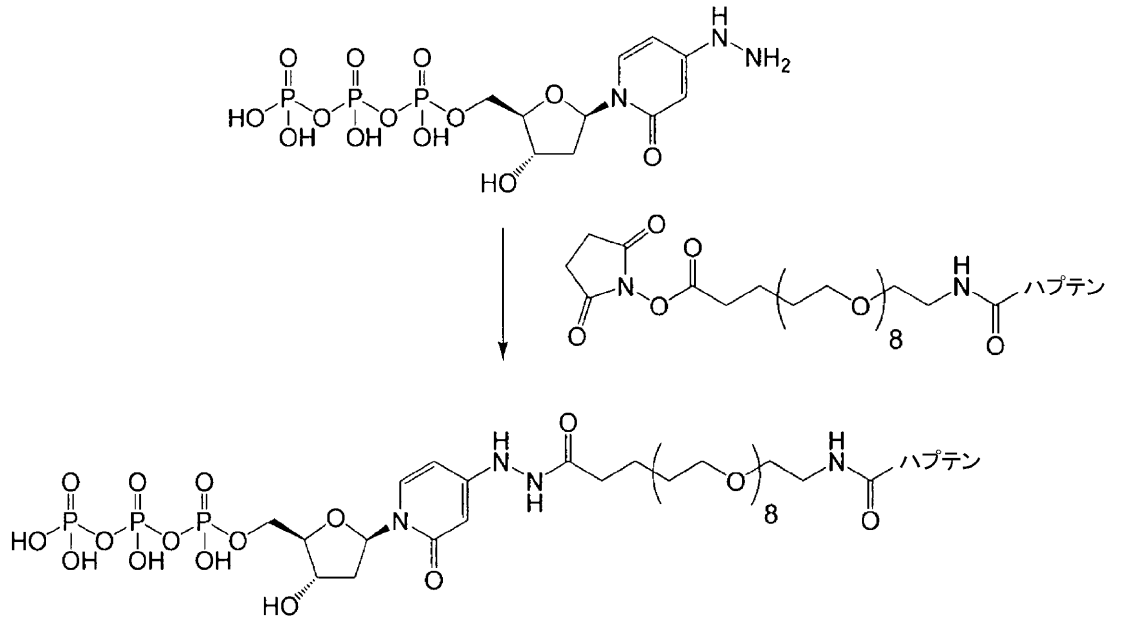
【化２３１】



【０７７０】

ハプテン－ｄＰＥＧ$_{7}$－ヨージドを乾式ＤＭＦ（１０ｍＬ）に溶解し、そして窒素下でエチル－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルカルボジイミド（１０ｅｑ．）で処理した。乾燥窒素下で室温で１６時間攪拌した後に、溶媒を真空下で除いて所望のカルボジイミドおよび過剰のエチル－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルカルボジイミドからなる二相系を生成せしめた。後者をデカンテーションして分離し、そして所望の生成物を高真空下で乾燥させた。生成物純度および同一性は、ＨＰＬＣ、ＭＳおよび^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲにより決定した。

【実施例１９】
【０７７１】
本実施例は、４－アミノ－デオキシシチジン３リン酸－ｄＰＥＧ$_8$－ハプテンを製造する典型的な方法に関する。
【０７７２】
【化２３２】



【０７７３】
４－アミノ－デオキシシチジン３リン酸（１．０ｅｑ．トリエチルアンモニウム塩として）を無水ＤＭＳＯに溶解して０．０１Ｍ溶液を生成せしめた。無水ＤＭＳＯ中のハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳ（１．１ｅｑ）の溶液を４－アミノ－デオキシシチジン３リン酸に加え、そして窒素下で１６～２４時間攪拌した。Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｕｎｆｉｒｅ　ＯＢＤ分取カラム（１０μｍ、Ｃ１８、５０ｘ２５０ｍｍ）を使用しそしてアセトニトリル：水：０．８Ｍ炭酸トリエチルアンモニウムの勾配（３０分にわたって１：８３：１６～２５：５９：１６）で溶出する分取ＨＰＬＣにより４－アミノ－デオキシシチジン３リン酸－ｄＰＥＧ$_8$－ハプテンを精製した。純粋画分を合わせ、凍結乾燥させ、そして最小量のＤＩ水に再溶解した。水溶液をナトリウムイオン交換カラム（ＳＰセファデックスＣ－２５、ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）に通した。４－アミノ－デオキシシチジン３リン酸－ｄＰＥＧ$_8$－ハプテンのナトリウム塩を一定重量まで凍結乾燥させ、そしてＨＰＬＣ、^{1}Ｈ／^{13}Ｃ－ＮＭＲおよびＭＳにより特性化した。
【実施例２０】
【０７７４】
本実施例は、免疫原性担体タンパク質およびハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳで免疫原を製造する典型的な方法に関する。キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、ウシサイログロブリン（ＢｔＧ）もしくはウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）のような凍結乾燥した免疫原性担体タンパク質を１．０ｍＬのＰＢＳ、ｐＨ７．２において再構成して約１０ｍｇ／ｍＬのタンパク質溶液を生成せしめた。ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳ（ＫＬＨには３００ｅｑ．、ＢｔＧには１５０ｅｑ．もしくはＢＳＡには６０ｅｑ．）を１００μＬのＤＭＦに溶解し、タンパク質溶液に加え、そして室温で一晩回転させた。反応物を０．２μｍのＧＨＰシリンジフィルターに通し、そしてＰＢＳ、ｐＨ７．２でＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１０／３００　ＧＬカラム上で０．９ｍｌ／分で実行するＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。モノマー免疫原性タンパク質に対応する画分をプールし、そして集めた。ハプテン標識タンパク質は、タンパク質濃度についてはＢＣＡタンパク質アッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ

）、そしてハプテン負荷についてはフルオレスカミンリシンアッセイ（Ｂｉｏ－Ｔｅｋ）により特性化した。

【実施例２１】

【０７７５】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳと一次抗体をコンジュゲーションする典型的な方法に関する。ＰＢＳ、ｐＨ７．０～７．５中のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を無水ＤＭＳＯ中のハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳ（２０ｅｑ．）の溶液で処理して１０％ｖ／ｖを上回らないように最終ＤＭＳＯ濃度を与えた。反応物を室温でアンバーバイアルにおいて１８時間回転させ、そして濾過し（０．２μｍのＧＨＰシリンジフィルター）、その後でＰＢＳ、ｐＨ７．２でＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。典型的な収率は、抗体当たり４～６個のハプテンのハプテン被覆率で７０～８０％であった。

【実施例２２】

【０７７６】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳで一次抗体上のＦｃ領域にコンジュゲーションする典型的な方法に関する。ＰＢＳ、ｐＨ７．０～７．５中のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を１００ｍＭの過ヨウ素酸ナトリウムの非緩衝水溶液で処理して２０ｍＭの過ヨウ素酸塩の最終濃度を与えた。溶液を室温でアンバーバイアルにおいて２時間回転させた。ＡＢＳ（０．１Ｍアセテート、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ５．５）でセファデックスＧ－２５カラム（ＰＤ－１０、ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）に通すことにより抗体を脱塩しそしてバッファーを交換した。酸化された抗体溶液をポリアクリルアミドヒドラジド（５０ｅｑ）の非緩衝水溶液と反応させ（ポリアクリルアミドヒドラジドを使用することに関するさらなる詳細は、２００７年５月２３日に出願されそして引用することにより本明細書に組み込まれる、譲受人の同時係属出願第６０／９３１，５４６号により提供される）、そして周囲温度で１時間インキュベーションした。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（１００ｅｑ．）を加え、そして反応物を一晩回転させた。ＰＡＨ－Ａｂコンジュゲートを ＡＢＳ、ｐＨ５．５でＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。無水ＤＭＳＯ中のハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳ（２０ｅｑ．）を加えて１０％ｖ／ｖを上回らないように最終ＤＭＳＯ濃度を与えた。ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＰＡＨ－Ａｂコンジュゲートを ＰＢＳ、ｐＨ７．２でＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。

【実施例２３】

【０７７７】

本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ヒドラジドで一次抗体上のＦｃ領域にコンジュゲーションする典型的な方法に関する。ＰＢＳ、ｐＨ７．０～７．５中のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を１００ｍＭの過ヨウ素酸ナトリウムの非緩衝水溶液で処理して２０ｍＭの過ヨウ素酸塩の最終濃度を与えた。溶液を室温でアンバーバイアルにおいて２時間回転させた。ＡＢＳ（０．１Ｍアセテート、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ５．５）でセファデックスＧ－２５カラム（ＰＤ－１０、ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）に通すことにより抗体を脱塩しそしてバッファーを交換した。酸化された抗体溶液を、ＤＭＳＯの最終濃度が１０％ｖ／ｖを上回らないように、ＤＭＳＯ中のハプテン－ｄＰＥＧ－ヒドラジド（２０ｅｑ．）の溶液と室温で１時間反応させた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（１００ｅｑ．）を加え、そして反応物を一晩回転させた。ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－Ａｂコンジュゲートを ＰＢＳ、ｐＨ７．２でＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。

【実施例２４】
【０７７８】
本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－マレイミドと一次抗体をコンジュゲーションする典型的な方法に関する。１００ｍＭリン酸塩、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５バッファー中のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体の溶液にＤＴＴを２５ｍＭの最終濃度で加えた。この混合物を正確に２５分間回転させ、その後で１００ｍＭリン酸塩、１ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ６．５バッファーにおいてセファデックスＧ２５（ＰＤ－１０、ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で脱塩した。ＤＭＦの最終濃度が１０％ｖ／ｖを上回らないように、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－マレイミド（５０ｅｑ．）をＤＭＦ溶液として加えた。反応混合物を周囲条件下でアンバーバイアルにおいて一晩回転させた。ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＡｂコンジュゲートをＰＢＳ、ｐＨ７．５でＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１０／３００　ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。
【実施例２５】
【０７７９】
本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－カルボジイミドと一本鎖ＤＮＡをコンジュゲーションする典型的な方法に関する。ＤＮＡ（１００μｇ）をチューブにおいて１ｍｇ／ｍｌでＴＥバッファーに溶解し、そして９８℃に１分間加熱した。反応混合物をドライアイス－エタノールにおいて凍結させ、そして１００μＬの０．５Ｍホウ酸塩バッファー、ｐＨ９．５を加えた。反応混合物を室温まで温め、そしてハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－ＥＤＣ（１００μＬのＤＭＳＯ中１．０ｍＭ）を加えた。混合物を６０℃で１時間インキュベーションし、次に塩を加え、そしてイソプロパノールで沈殿させた。沈殿物を８０％ＥｔＯＨで３回洗浄した。
【０７８０】
ＤＮＰ－ｄＰＥＧ$_8$－ＥＤＣでのｓｓＤＮＡ標識の結果は、図１７および１８に提供される。図１７は、ヌクレオチド標識のパーセントが、ハプテンコンジュゲートの増加に伴って実質的に直線的に増加することを示す。図１７は、標識ヌクレオチドパーセントがＤＮＡストック濃度の増加に伴って減少したことを示す。
【実施例２６】
【０７８１】
本実施例は、ハプテン－ｄＰＥＧ$_8$－アミノ－ｄＣＴＰでＤＮＡを標識する典型的な方法に関する。ＤＮＡ上へのハプテン標識の導入は、Ｒｉｇｂｙ，ＰＷ；Ｄｉｅｃｋｍａｎｎ，Ｍ；Ｒｈｏｄｅｓ，Ｃ．ａｎｄ　Ｂｅｒｇ，Ｐ．，“Ｌａｂｅｌｉｎｇ　ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ｔｏ　ｈｉｇｈ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｂｙ　ｎｉｃｋ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｉ”，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖ１１３：２３７－２５１，１９７７に記述されるニックトランスレーション法により成し遂げられた。標識効率は、ＤＮＡの２６０ｎｍ吸光度ならびに特定のハプテンのλ_{max}およびε（消衰係数）の比較に基づき２～６％であった。
【実施例２７】
【０７８２】
本実施例は、抗ハプテンハイブリドーマをスクリーニングする典型的な方法に関する。ベンゾフラザン－ｄＰＥＧ$_8$－ＢＳＡ（ＶＭＳＩ－１３５７－９８）をマイクロプレート上に被覆した。使用した希釈バッファーは、０．１５モルリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）であった。ベンゾフラザン－ｄＰＥＧ$_8$－ＢＳＡの濃度は２μｇ／ｍｌであり、そしてウェル濃度は５０μＬであった。これらのサンプルを４℃で一晩インキュベーションした。１％脱脂粉乳（ＮＦＤＭ）（１０ｍｇ／ｍＬ、３００μＬ／ウェル）をブロッキング試薬として使用し、続いて３７℃で１２０分間インキュベーションした。必要と思われる場合、０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０を含んでなる０．１５Ｍ　ＰＢＳを用いてプレートを洗浄した。次に、各々の試験したハプテンを用いてマウス抗血清を製造した。０．１５Ｍ　Ｐ

ＢＳ中１％のＮＦＤＭで希釈したウェル当たり８０μＬの総濃度のマウス抗血清を希釈物を用いて準備し、そしてプレート設計プロトコルを表６において以下に示す。次に、プレートを３７℃で１５０分間インキュベーションした。ヤギ抗マウス－西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート（Ｇｔ－α－Ｍｕ－ＨＲＰ、Ｐｉｅｒｃｅ）を０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０を有する０．１５Ｍ　ＰＢＳにおいて１：１０，０００の濃度で二次抗体として使用して５０μＬ／ウェルの総ウェル容量を与えた。次に、プレートを３７℃で６０分間インキュベーションした。ＥＬＩＳＡを設定し、そして結果を表２において以下に要約する。

【０７８３】

【表３】

表2

ELISA 結果

受託：		カスタマー：						試験したサンプル：		マウス抗血清			
500421		Ventana											
アッセイパラメーター：													
工程		試薬		連続希釈		希釈バッファー		濃度		容量 / ウェル		インキュベーション	
Ag コーティング		VMSI-1357-98		-		0.15M PBS		2 μg/mL		50 μL		4℃で ON	
ブロッキング		1% NFDM		-		0.15M PBS		10 mg/mL		300 μL		37℃で 2hr	
サンプル希釈		以下参照		5X		0.15M PBS 中 1%NFDM		1:50 で開始する		80μL		37℃で 2.5hr	
二次 Ab		Gt-α-Mu-HRP		-		0.05%Tween20 を有する 0.15M PBS		1:10000		50 μL		37℃で 1hr	
		プレート設計：											
サンプル希釈	->	1:50		1:250		1:1250		1:6250		1:31250		1:156250	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mu #1	A	1.89	0.01	1.81	0.00	1.82	0.00	1.60	0.00	1.06	0.00	0.56	0.00
Mu #2	B	1.76	0.01	1.87	0.00	1.73	0.00	1.25	0.00	0.60	0.00	0.25	0.00
Mu #3	C	1.70	0.01	1.83	0.00	1.87	0.00	1.50	0.00	0.95	0.01	0.37	0.00
Mu #4	D	1.75	0.01	1.73	0.02	1.83	0.00	1.49	0.01	0.98	0.00	0.42	0.00
Mu #5	E	1.62	0.01	1.58	0.00	1.72	0.00	1.35	0.00	0.74	0.00	0.33	0.00
前採血プール	F	0.06	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			X		X		X		X		X		X
抗原：		VMSI-1357-98 ロット #C05081610						X = ブランク（抗原なし）					
洗浄バッファー：		0.05%Tween20 を有する 0.15M PBS						NFDM = 脱脂粉乳					
二次 Ab：		HRP- ヤギ - α -mu IgG Fc 特異的min. X-react #60312						採血日：				9/12/2005	
基質：		TMB ロット #P502807						アッセイ日：				9/13/2005	

【０７８４】

表２に示される結果は、試験したマウスの各々が抗体反応をもたらすために適当であること、そしてさらに反応を確かめるためにそのようなハプテンを視覚化できることを示す。試験した特定のハプテンに関して、マウス番号１は試験した全ての希釈物わたって最良の反応を与えるように思われる。

【実施例２８】

【０７８５】

本実施例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）への抗ハプテン抗体のコンジュゲーションの典型的な方法に関する。そのようなコンジュゲートを用いて生成される画像は、図１９～２４により提供される。

【０７８６】

ＨＲＰの活性化

４ｍＬのアンバーバイアルに７８．８ｍｇ（１００ｅｑ．）のＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_4$™ ＮＨＳエステル（Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ、Ｐｏｗｅｌｌ、ＯＨ、Ｆ．Ｗ．＝５１３．５０）、続いて２．４６ｍＬ（６１．５ｍｇ、１．５３μＭ）のＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ　ロットＦＪ９２５９０１）を０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５における２５ｍｇ／ｍＬ溶液として加えた

。次に、バイアルを周囲温度（２３～２５℃）で暗所で自動回転子上に置き、そしてアミド結合形成反応を１時間進行させた。次に、４００μｌのアリコートを精製用に取り除き、そして溶液の残りを４℃で一時的に保存した。次に、１．０ｍＬ／分で０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５で溶出するＳｕｐｅｒｄｅｘ １０／３００カラム（ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）を装着したＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でサンプルを分画することにより純粋なＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミドが得られた。ＨＲＰ含有画分をプールして６．５２の１％溶液（ｐＨ６．５）の２８０ｎｍでの消衰係数を用いてＵＶ／ＶＩＳ分光光度法により測定した場合に２．０ｍｌの４．５２ｍｇ／ｍＬ溶液のＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミド（９０％の回収）を生成せしめた。

【０７８７】

抗体へのチオールの導入

８ｍＬのアンバーバイアルに３．０ｍＬのマウス抗ハプテンモノクローナル抗体を０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５における２．１ｍｇ／ｍＬ溶液として加えた。次に、この溶液に、還元剤ＤＴＴ（１，４－ジチオスレイトール、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）の２１６μＬの新たに調製した５００ｍＭ溶液を加えた。バイアルを自動回転子上に暗所で置き、そしてジスルフィド還元を２５分間進行させた。反応溶液を４つの等しい容量に分け（使用した脱塩カラムの限られた容積のために）、そして０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５で溶出するＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）に画分の各々を通すことにより過剰のＤＴＴを除いた。抗体含有画分を合わせて１４のｐＨ６．５で１％溶液の２８０ｎｍでの消衰係数を用いてＵＶ／ＶＩＳ分光光度法により測定した場合に８．０ｍＬの０．８ｍｇ／ｍＬ溶液の還元されたマウス抗ハプテン抗体（７１％の回収）を生成せしめた。

【０７８８】

ＨＲＰ－抗体コンジュゲーション

還元された抗体（マウス抗ニトロピラゾールモノクローナル抗体のような）に３倍モル過剰のＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミドを加える。次に、反応物を周囲温度（２３～２５℃）で１６時間インキュベーションする。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬ

ＳＥカラムを通した精製後に、典型的には抗体当たり平均２もしくは３個のＨＲＰを有するコンジュゲートが得られる。抗体当たりのＨＲＰの数は、コンジュゲートの２８０ｎｍ／４０３ｎｍでの吸光度の比率を測定することにより決定された。次に、コンジュゲートを使用するまで４℃でコールドルームにおいて保存した。

【実施例２９】

【０７８９】

本実施例は、量子ドット（ＱＤ）への抗ハプテン抗体のコンジュゲーションの典型的な方法に関する。

【０７９０】

抗体上の鎖間ジスルフィドの還元

１００ｍＭリン酸塩、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５バッファー中のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体の溶液に、ＤＴＴを２５ｍＭの最終濃度で加えた。この混合物を正確に２５分間回転させ、その後で１００ｍＭリン酸塩、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５バッファーにおいてＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５（ＰＤ－１０、ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で脱塩した。

【０７９１】

ＱＤ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＭＡＬの合成

量子ドットの溶液（５０ｍＭホウ酸塩バッファー、ｐＨ８．０中８～９μＭ）にＮＨＳ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＭＡＬ（５０ｅｑ．）を加え、そして２時間回転させた。マレイミド機能化量子ドット（ＱＤ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＭＡＬ）を０．１Ｍリン酸塩、０．１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０バッファーにおいてＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５カラム（ＰＤ－１０、ＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で脱塩することにより精製した。

【０７９２】
ＱＤ－ＭＡＬ－抗体コンジュゲートの合成
精製されたＱＤ－マレイミドを精製されたチオール化抗体と４：１の抗体：ＱＤのモル比で合わせ、そして１６時間の期間にわたって回転させた。ＱＤ－Ａｂコンジュゲートを５０ｍＭホウ酸塩バッファー、ｐＨ８．０でＧＥ Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム上で０．９ｍＬ／分で実行するＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ上でのＳＥＣクロマトグラフィーにより精製した。
【実施例３０】
【０７９３】
本実施例は、発色免疫組織化学（ＩＨＣ）により視覚化される一次抗体－ハプテンコンジュゲートの能力を示す。この方法の代表的な染色は、図１９～２４により提供される。図６もまたこの方法の代表的な染色であり、ここで、一次抗体をハプテンとコンジュゲーションする方法は実施例２１～２４に記述される。図７は、組織が適切な抗ハプテン抗体以外の抗体で処理されるコントロールである。図７は、適切な抗ハプテン抗体が使用されない場合に視覚化が起こらないので方法の特異性を確立する。
【０７９４】
扁桃腺組織切片を実施英２１、２２、２３もしくは２４における方法によりハプテンとコンジュゲーションした抗ラムダポリクローナル抗体（Ｄａｋｏ）で処理した。自動染色装置（ＢｅｎｃｈＭａｒｋ（Ｒ） ＸＴ、Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ、Ｔｕｃｓｏｎ、ＡＺ）上でＨＲＰシグナル生成（ＤＡＢの添加による）の標準的なプロトコルを用いてスライドを発色させた。典型的な自動化プロトコルは、脱パラフィン処理、数回のすすぎ工程、反応バッファーの添加、一次抗体（抗ラムダ：ハプテンコンジュゲート）の添加、二次抗体（抗ハプテン：ＨＲＰコンジュゲート）の添加、ＤＡＢおよび過酸化水素の添加、ならびに対比染色液の添加を含む。
【０７９５】
手動評点は、有資格病理学者により行われた。染色強度、反応性細胞のパーセンテージおよび細胞局在化が記録された。定性的染色強度については、０は最も陰性であり、そして３＋は最も陽性である。光学イメージングによる定量の前にスライドは病理学者により評価されそして評点された。
【０７９６】
光学イメージングでは、数値スコアに転化される染色の強度（平均光学密度もしくはａｖｇ．ＯＤとして表される）に基づく画像定量でのデジタルアプリケーション（ＶＭＳＩ）を利用した。高分解能画像を各サンプルについて捕え、そして陽性染色細胞の形状および色範囲の特異的分類に基づいてＯＤ値を決定した。標本当たり少なくとも３つの異なる領域を２０ｘもしくは４０ｘ対物レンズのいずれかを用いて捕えた。ある場合において、以下の式：組み合わせたスコア＝（％陽性）Ｘ（光学密度スコア）に従って陽性細胞のパーセンテージと染色強度の両方を含む「組み合わせたスコア」もしくは相乗指数（ｍｕｌｔｉｐｌｉｃａｔｉｖｅ ｉｎｄｅｘ）が得られた。
【実施例３１】
【０７９７】
本実施例は、蛍光（量子ドット）免疫組織化学（ＩＨＣ）により視覚化される一次抗体－ハプテンコンジュゲートの能力を示す。
【０７９８】
扁桃腺組織切片を実施例２１、２２、２３もしくは２４における方法によりハプテンとコンジュゲーションした抗カッパポリクローナル抗体（Ｄａｋｏ）で処理した。スライドを自動染色装置（ＢｅｎｃｈＭａｒｋ（Ｒ）ＸＴ、Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ、Ｔｕｃｓｏｎ、ＡＺ）の標準的なプロトコルを用いて発色させた。典型的な自動化プロトコルは下記のとおりである：スライド上のパラフィン被覆組織を７５℃に８分間加熱し、そしてＥＺＰｒｅｐ（ＶＭＳＩ）で２回処理し、７５℃で容量を調整し、その後で液体カバースリップ（Ｌｉｑｕｉｄ Ｃｏｖｅｒ Ｓｌｉｐ）もしくは

ＬＣＳ（ＶＭＳＩ）を適用する。７５℃で２回の８分のインキュベーション期間の後に、スライドをすすぎ、そしてＥＺＰｒｅｐ容量を調整し、その後にＬＣＳを続けて組織を脱パラフィン処理した。スライドを３７℃まで冷却し、２分間インキュベーションし、そして反応バッファー（Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）（ＶＭＳＩ）で１回すすいだ。スライドを細胞調整剤（Ｃｅｌｌ　Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｅｒ）（ＶＭＳＩ）で２回、続いてＬＣＳで処理した。スライドを９５℃に８分間加熱し、その後にＬＣＳを続け、そして１００℃に４分間加熱し、その後にＬＣＳを続けた。細胞調整剤、４分間インキュベーションし、ＬＣＳを適用する、細胞調整剤でのこのインキュベーション工程を１００℃で９回繰り返した。スライドを８分間冷却させ、反応バッファーですすぎ、容量を調整し、続いてＬＣＳをもう一度施した。スライドを３７℃に２分間加熱し、そして２回すすぎ、その後で抗カッパ：ハプテンコンジュゲート（１．０ｍｇ／ｍＬで１００μＬ）、続いてＬＣＳを加え、そして３７℃で３２分間インキュベーションした。スライドを反応バッファーで２回すすぎ、続いて液体カバースリップを適用し、そしてＱＤｏｔ：抗ハプテンコンジュゲート（１００μＬ、２０～５０ｎｍｏｌ）を加え、そして３７℃で３２分間インキュベーションした。スライドを２回バッファーですすぎ、その後にＬＣＳを続けた。スライドを装置から取り除き、そして洗剤洗浄を施し、その後でカバースリップを手動で適用した。結果は光学顕微鏡を用いて解釈され、そして特定の抗原と関連し得るかもしくはそうでない、病態生理学過程の鑑別診断に役立つ。

【実施例３２】

【０７９９】

本実施例は、発色性インサイチューハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）により視覚化されるハプテン標識ＤＮＡの能力を示す。ＨＥＲ２遺伝子コピー数の検出のための自動銀もしくはジアミノベンジジン（ＤＡＢ）インサイチューハイブリダイゼーションプロトコルは、Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｅｎｃｈｍａｒｋ　ＸＴ装置上で開発された。染色は、９時間以内にガラススライド上のホルマリン固定パラフィン包埋組織上で完了される。方法の工程は以下のとおりである：脱パラフィン処理、ＶＭＳＩプロテアーゼ３を用いる細胞コンディショニング、ハプテン標識ＨＥＲ２　ＤＮＡプローブ（実施例２６から）の添加、組織およびプローブ変性、４時間のハイブリダイゼーションおよびＨＲＰにより触媒される発色性銀での検出。特に、ニトロピラゾール標識ＨＥＲ２プローブをホルマリン固定乳房組織上で自動化された方法でハイブリダイゼーションさせ、続いて抗ニトロピラゾールＡｂ－ＨＲＰコンジュゲートで検出した。検出は、ＵｌｔｒａＶｉｅｗ検出キット（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）の使用によりもしくはＨＥＲ２　ＳＩＳＨ（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）自動化プロトコルを用いる銀沈着によって成し遂げることができる。結果は光学顕微鏡を用いて解釈され、そして特定の抗原と関連し得るかもしくはそうでない、病態生理学過程の鑑別診断に役立つ。

【実施例３３】

【０８００】

本実施例は、蛍光（量子ドット）インサイチューハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）により視覚化されるハプテン標識ＤＮＡの能力を示す。ＨＥＲ２遺伝子コピー数の検出のための自動蛍光（量子ドットによる）インサイチューハイブリダイゼーションプロトコルは、Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｅｎｃｈｍａｒｋ　ＸＴ装置上で開発された。染色は、９時間以内にガラススライド上のホルマリン固定パラフィン包埋組織上で完了される。方法の工程は以下のとおりである：脱パラフィン処理、ＶＭＳＩプロテアーゼ３を用いる細胞コンディショニング、ハプテン標識ＨＥＲ２　ＤＮＡプローブ（実施例２６から）の添加、組織およびプローブ変性、４時間のハイブリダイゼーションおよび抗ハプテンＡｂ：量子ドットコンジュゲート（実施例２９から）での検出。特に、ベンゾフラザン標識ＨＥＲ２プローブを自動化された方法でハイブリダイゼーションさせ、続いて抗ベンゾフラザンＡｂ－量子ドット６５５コンジュゲートで検出した。イメージングはＮｉｋｏｎ蛍光顕微鏡上で行った。

【実施例３４】
【０８０１】
本実施例は、一次抗体－ハプテンコンジュゲートを多重化しそして多重蛍光（量子ドット）免疫組織化学（ＩＨＣ）により検出する能力を示す。この方法は図８に図式的に例示される。扁桃腺組織切片を一次抗体－ハプテンコンジュゲートの混合物：抗ＣＤ２０Ａｂ－ビオチン、抗ＣＤ３４Ａｂ－ニトロピラゾール、抗ＣＤ４５Ａｂ－チアゾールスルホンアミド、抗カッパＡｂ－ジニトロフェニル、抗ラムダＡｂ－ロテノンおよび抗Ｋｉ６７Ａｂ－ベンゾフラザンで処理した。抗ＣＤ２０－ビオチンコンジュゲートは、２０倍過剰で使用するマレイミド－ｄＰＥＧ１１－ビオチンに抗体チオール官能基を連結することにより製造した（実施例２４に記述される）。抗ＣＤ３４－ニトロピラゾールコンジュゲートは、ポリアクリルアミドヒドラジドおよび２０倍過剰のＮＨＳ－ｄＰＥＧ８－ＮＰを用いて抗体のＦｃ部分に連結することにより形成された（実施例２２に記述される）。これは、抗体当たり１２個のニトロピラゾールハプテンをもたらした。抗ＣＤ４５－チアゾールスルホンアミドコンジュゲートは、抗体リシンを２０倍過剰のＮＨＳ－ｄＰＥＧ８－ＴＳと反応させることにより製造した（実施例２１に記述される）。これは、抗体当たり１０個のチアゾールスルホンアミドハプテンをもたらした。カッパ－ジニトロフェニルコンジュゲートは、ポリアクリルアミドヒドラジドおよび１００倍過剰のＮＨＳ－ｄＰＥＧ８－ＤＮＰを用いて抗体のＦｃ部分に連結することにより形成された（実施例２２に記述される）。これは、抗体当たり６２個のジニトロフェニルハプテンをもたらした。ラムダロテノンコンジュゲートおよびＫｉ６７ベンゾフラザンコンジュゲートは両方とも、それぞれＮＨＳ－ｄＰＥＧ８－ＲＯＴおよびＮＨＳ－ｄＰＥＧ８－ＢＦに抗体リシンを反応させることにより製造した（実施例２１に記述される）。これは、抗体当たり０．３個のロテノンハプテンおよび抗体当たり２個のベンゾフラザンハプテンをもたらした。次に、扁桃腺切片を実施例２９における方法を用いて合成された二次抗体のカクテルで処理した：Ｇｔα－ビオチンポリＡｂ：ＱＤ５２５（３００ｎＭ）；Ｍｓ　α-ＮＰｍＡｂ：ＱＤ６５５（５０ｎＭ）；Ｍｓ　α-ＴＳｍＡｂ：ＱＤ５６５（３００ｎＭ）；Ｒｂ　α－ＤＮＰポリＡＢ：ＱＤ６０５（１００ｎＭ）；Ｍｓ　α－ＲＯＴｍＡｂ：ＱＤ７０５（２００ｎＭ）；およびＭｓ　αＢＦｍＡｂ：ＱＤ５８５（３００ｎＭ）。
【０８０２】
蛍光顕微鏡検査
イメージングは、Ｎｉｋｏｎ蛍光顕微鏡上で行われた。蛍光スペクトルの分離は、ＣＲｉカメラを利用して成し遂げられた。ＤＡＰＩは、多重化扁桃腺切片の対比染色に使用した。
【０８０３】
図３７は、一次抗体－ハプテンコンジュゲートの混合物を用いて生成されそして図３１～３６にそして本実施例３４に記載されるような抗ハプテン抗体ＱＤｏｔコンジュゲートの混合物で逐次視覚化された多重染色複合物（ｃｏｍｐｏｓｉｔｅ）である。
【０８０４】
図３８～４３は、図３７の多重染色から抽出された画像である。図４４は、図３７の多重染色合成物から個々のＱＤｏｔシグナルを抽出するために使用される波長を表す波長対相対蛍光のグラフである。図４４はまた、蛍光シグナルが扁桃腺組織の公称自己蛍光を上回ることも立証する。
【０８０５】
ＶＩＩＩ．１つもしくはそれ以上のハプテンおよび／もしくはハプテンコンジュゲートを含んでなる組成物
本明細書に開示されるコンジュゲートは、典型的には１つもしくはそれ以上の製薬学的に許容しうる賦形剤および場合により他の治療成分（例えば、抗生物質もしくは抗炎症薬）と一緒に組み合わせて、診断および／もしくは製薬学的組成物（治療および予防製剤を包含する）に含まれることができる。
【０８０６】

そのような製薬学的組成物は、経口、直腸、鼻腔内、肺内もしくは経皮送達によるか、または他の表面への局所送達によってを包含する、粘膜投与形態のような様々な方法により患者に投与することができる。場合により、コンジュゲートは筋肉内、皮下、静脈内、心房内、関節内、腹腔内もしくは非経口経路によってを包含する非粘膜経路により投与してもよい。他の代替態様において、コンジュゲートは患者由来の細胞、組織もしくは器官への直接暴露によりエクスビボで投与することができる。

【０８０７】

製薬学的組成物を調合するために、コンジュゲートを様々な製薬学的に許容しうる添加剤ならびにコンジュゲートの分散用のベースもしくは賦形剤と組み合わせることができる。所望の添加剤には、アルギニン、水酸化ナトリウム、グリシン、塩酸、クエン酸などのようなｐＨ制御剤が包含されるがこれらに限定されるものではない。さらに、局所麻酔薬（例えば、ベンジルアルコール）、等張剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール）、吸着阻害剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ　８０）、溶解促進剤（例えば、シクロデキストリンおよびその誘導体）、安定剤（例えば、血清アルブミン）および還元剤（例えば、グルタチオン）を含むことができる。当該技術分野において周知である多数の他の適当な添加剤の中で、水酸化アルミニウム（例えば、Ａｍｐｈｏｇｅｌ、Ｗｙｅｔｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＮＪ）、フロイントアジュバント、ＭＰＬ^{TM}（３－Ｏ－脱アシル化モノホスホリル脂質Ａ；Ｃｏｒｉｘａ、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　ＩＮ）およびＩＬ－１２（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＭＡ）のような添加剤を組成物に含むことができる。

【０８０８】

コンジュゲートは、コンジュゲートを分散させる能力を有する親水性化合物および任意の所望の添加剤を含むことができる、ベースもしくは賦形剤に分散させることができる。ベースは、他のモノマー（例えば、（メト）アクリル酸メチル、アクリル酸など）とポリカルボン酸もしくはその塩、無水カルボン酸（例えば無水マレイン酸）とのコポリマー、ポリビニルアセテート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような親水性ビニルポリマー、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどのようなセルロース誘導体、ならびにキトサン、コラーゲン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、ヒアルロン酸、およびその無毒の金属塩のような天然ポリマーが包含されるがこれらに限定されるものではない広範囲の適当な化合物から選択することができる。生物分解性ポリマーはベースもしくは賦形剤として選択されることが多く、例えば、ポリ乳酸、ポリ（乳酸－グリコール酸）コポリマー、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ（ヒドロキシ酪酸－グリコール酸）コポリマーおよびその混合物。あるいはまたもしくはさらに、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルなどのような合成脂肪酸エステルを賦形剤として用いることができる。親水性ポリマーおよび他の賦形剤は単独でもしくは組み合わせて用いることができ、そして増強された構造的完全性は部分結晶化、イオン結合、架橋などにより賦形剤に与えることができる。賦形剤は、粘膜表面への直接適用のための流動性もしくは粘性溶液、ゲル、ペースト、粉末、ミクロスフェアおよびフィルムを包含する様々な形態で提供することができる。

【０８０９】

コンジュゲートは、様々な方法に従ってベースもしくは賦形剤と組み合わせることができ、そしてコンジュゲートの放出は、拡散、賦形剤の崩壊もしくは水路の付随形成（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｗａｔｅｒ　ｃｈａｎｎｅｌｓ）によってであることができる。ある状況において、コンジュゲートは適当なポリマー、例えば、２－シアノアクリル酸イソブチル（例えば、Ｍｉｃｈａｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｙ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４３：１－５，１９９１を参照）から製造されるマイクロカプセル（ミクロスフェア）もしくはナノカプセル（ナノスフェア）に分散され、そして生体適合性分散媒質に分散され、それは長期間にわたって徐放および生物学的活性をもたらす。

【０８１０】

あるいはまた、本開示の組成物は、ｐＨ調整および緩衝剤、張度調整剤、湿潤剤などのような、生理的条件に近づけるために必要とされるような製薬学的に許容しうる賦形剤物質として、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレートおよびオレイン酸トリエタノールアミンを含有することができる。固形組成物では、例えば、製薬学的等級のマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウムなどを含む通常の無毒の製薬学的に許容しうる賦形剤を用いることができる。

【０８１１】

コンジュゲートを投与するための製薬学的組成物はまた、溶液、マイクロエマルジョンもしくは高濃度の有効成分に適当な他の規則構造として調合することもできる。賦形剤は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）、およびその適当な混合物を含有する溶媒もしくは分散媒質であることができる。溶液の適切な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングの使用により、分散可能な製剤の場合には所望の粒径の維持により、そして界面活性剤の使用により保つことができる。多くの場合において、組成物に等張剤、例えば、糖、マンニトールおよびソルビトールのようなポリアルコールもしくは塩化ナトリウムを含むことが望ましい。コンジュゲートの持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含むことによりもたらすことができる。

【０８１２】

ある態様において、コンジュゲートは持続放出製剤において、例えば持続放出ポリマーを含む組成物において投与することができる。これらの組成物は、迅速な放出から守る賦形剤、例えば制御放出賦形剤、例えばポリマー、マイクロカプセル封入送達系もしくは生体接着性ゲルで製造することができる。本開示の様々な組成物における持続送達は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムヒドロゲルおよびゼラチンを組成物に含むことによりもたらすことができる。制御放出製剤が所望される場合、本開示の使用に適当な制御放出結合剤には、有効成分に対して不活性でありそしてコンジュゲートおよび／もしくは他の生物活性薬剤を導入することができる任意の生体適合性制御放出物質が包含される。多数のそのような物質は、当該技術分野において既知である。有用な制御放出結合剤は、それらの送達後に生理的条件下で（例えば、粘膜表面でもしくは体液の存在下で）ゆっくりと代謝される物質である。適切な結合剤には、持続放出製剤における使用について当該技術分野において周知である生体適合性ポリマーおよびコポリマーが包含されるがこれらに限定されるものではない。そのような生体適合性化合物は周囲組織に対して無毒でそして不活性であり、そして鼻の炎症、免疫反応、炎症などのような重篤な有害副作用を引き起こさない。それらは、同様に生体適合性でありそして体から容易に排出される代謝産物に代謝される。

【０８１３】

本開示における使用のための典型的なポリマー材料には、加水分解可能なエステル結合を有するコポリマーおよびホモポリマーポリエステル由来のポリマーマトリックスが包含されるがこれらに限定されるものではない。これらの多数は、生物分解性であることそして毒性がないかもしくは低い毒性を有する分解産物をもたらすことが当該技術分野において既知である。典型的なポリマーには、ポリグリコール酸およびポリ乳酸、ポリ（ＤＬ－乳酸－コ－グリコール酸）、ポリ（Ｄ－乳酸－コ－グリコール酸）およびポリ（Ｌ－乳酸－コ－グリコール酸）が包含される。他の有用な生物分解性もしくは生体浸食性（ｂｉｏｅｒｏｄａｂｌｅ）ポリマーには、ポリ（イプシロン－カプロラクトン）、ポリ（イプシロン－アプロラクトン－ＣＯ－乳酸）、ポリ（イプシロン－アプロラクトン－ＣＯ－グリコール酸）、ポリ（ベーター－ヒドロキシ酪酸）、ポリ（アルキル－２－シアノアクリレート）、ヒドロゲル、例えばポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリアミド、ポリ（アミノ酸）（例えば、Ｌ－ロイシン、グルタミン酸、Ｌ－アスパラギン酸など）、ポリ（エステル尿素）、ポリ（２－ヒドロキシエチルＤＬ－アスパルトアミド）、ポリアセタ

ールポリマー、ポリオルトエステル、ポリカーボネート、ポリマレアミド、多糖、およびそのコポリマーのようなポリマーが包含されるがこれらに限定されるものではない。そのような製剤を製造する多数の方法が当業者に周知である（例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７８を参照）。他の有用な製剤には、制御放出マイクロカプセル（米国特許第４，６５２，４４１号および第４，９１７，８９３号）、マイクロカプセルおよび他の製剤を製造することにおいて有用な乳酸－グリコール酸コポリマー（米国特許第４，６７７，１９１号および第４，７２８，７２１号）ならびに水溶性ポリペプチド用の持続放出組成物（米国特許第４，６７５，１８９号）が包含される。

【０８１４】

本開示の製薬学的組成物は典型的に無菌であり、そして製造、貯蔵および使用の条件下で安定である。無菌溶液は、必要に応じて、本明細書に列挙される成分の１つもしくは組み合わせと共に適切な溶媒に必要とされる量のコンジュゲートを導入し、続いて濾過滅菌により製造することができる。一般に、分散液は、基本分散媒質および本明細書に列挙されるものからの必要な他の成分を含有する無菌賦形剤にコンジュゲートおよび／もしくは他の生物活性薬剤を導入することにより製造される。無菌粉末の場合、製造の方法には、前に無菌濾過したその溶液からコンジュゲートに加えての任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥が包含される。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどにより成し遂げることができる。

【０８１５】

本開示の様々な処置方法に従って、コンジュゲートは、処置もしくは予防が求められる障害の管理と関連する通常の方法論と一致する方法で患者に送達することができる。本明細書における開示に従って、予防的にもしくは治療的に有効な量のコンジュゲートおよび／もしくは他の生物活性薬剤は、選択疾患（例えば炭疽病）もしくは症状またはその１つもしくはそれ以上の症候を防ぎ、抑制し、そして／もしくは改善するために十分な期間にわたってそして条件下でそのような処置を必要とする患者に投与される。

【０８１６】

ＶＩＩＩ．薬剤開発および薬物治療態様

ハプテン、ハプテンコンジュゲートおよびその組成物の開示される態様は、疾患と関連する生物学的マーカーの発現もしくは活性化、治療効能、癌患者からの細胞および組織サンプルにおける腫瘍形成などを同定しそして検出するために有用な試薬として用いることができる。本明細書において提供される方法は、特定の処置処方計画への個々の患者の反応を予測するかもしくは評価するために有用である。これらの態様は、癌および癌処置を参考にして本明細書に特に例示されるが、当業者は、本発明の範囲が癌診断および処置に限定されず、代わりに他の疾患、薬剤開発および薬物治療にも適用できることを認識する。

【０８１７】

方法の１つの態様は、治療法を最初に選択することを含んでなる。少なくとも１つのハプテンを薬剤にコンジュゲーションし、それを次に患者に投与する。次に、ハプテン－治療コンジュゲートを追跡することにより、例えば検出可能な標識を有する抗ハプテン抗体を用いることにより、薬剤分布、代謝物生産などをモニターすることができる。

【０８１８】

方法の１つの態様は、哺乳類腫瘍から得られるサンプルをアッセイすることにより哺乳類腫瘍を同定することを含む。例えば、サンプルは、ｍＴＯＲ経路阻害剤、ＥＧＦ経路阻害剤もしくは二重阻害剤のような経路の阻害剤についてアッセイすることができる。該方法は、発現もしくは過剰発現されている遺伝子、そのような遺伝子から生産されるタンパク質、発現のパターン、リン酸化のような細胞過程、またはその組み合わせを検出するために哺乳類から得られるサンプルをアッセイすることを含んでなることができる。「細胞

もしくは組織サンプル」は、本文脈において使用する場合に、塗抹標本、唾液、生検、分泌物、脳脊髄液、胆汁、血液、リンパ液、尿および糞便、もしくは乳房、肺、腸、皮膚、頸部、前立腺および胃のような器官から取り除かれた組織のようなしかしこれらに限定されるものではない体サンプルから単離される、細胞、しばしば腫瘍細胞を含んでなる生物学的サンプルを意味する。例えば、組織サンプルは機能的に関連する細胞もしくは隣接細胞の領域を含んでなることができる。

【０８１９】

哺乳類の癌に関する典型的態様について、発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方のパターンを用いることができる。例えば、本発明の開示される態様は：

（ａ）ＥＧＦ経路の少なくとも１つのポリペプチドおよび

（ｂ）ｍＴＯＲ経路の少なくとも１つのポリペプチド

からなる２つもしくはそれ以上のポリペプチドのパネルを分析するために用いることができる。発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方の検出されるパターンは、二重ｍＴＯＲ経路阻害剤およびＥＧＦ経路阻害剤治療を必要とする哺乳類腫瘍を同定する。ある態様において、ＥＧＦ経路の少なくとも１つのポリペプチドにはリン酸化ＥＲＫポリペプチド；リン酸化ＭＥＫポリペプチド、もしくはリン酸化ＥＲＫポリペプチドとリン酸化ＭＥＫポリペプチドの両方が包含される。別の態様において、ｍＴＯＲ経路の少なくとも１つのポリペプチドは、ＨＩＦ－１αポリペプチド、ｍＴＯＲポリペプチド、もしくはＨＩＦ－１αとｍＴＯＲポリペプチドの両方を含んでなる。

【０８２０】

ある態様において、発現、発現されるタンパク質、リン酸化のような細胞過程、およびその組み合わせのパターンは、コントロールにおいて決定することができる。検出されるパターンおよび／もしくは生成物は、患者におけるものと比較することができる。例えば、ポリペプチドのパネルの発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方の検出されるパターンは、コントロールにおけるポリペプチドのパネルの発現、リン酸化もしくは発現とリン酸化の両方のパターンと比較される。コントロールにおけるポリペプチドのパネルのレベルと比較した場合のサンプルにおけるポリペプチドのパネルの増加したレベルは、哺乳類腫瘍が二重ｍＴＯＲ経路阻害剤およびＥＧＦ経路阻害剤治療を必要とすることを示す。

【０８２１】

本発明のある態様は、癌治療に対する癌患者のような、処置処方計画に対する患者における反応を予測する方法を提供する。予測バイオマーカーは、二重阻害剤治療を包含する、特定の治療薬を投与することが最も有効である患者において同定することができる。例えば、予測バイオマーカーは、ＥＧＦ経路もしくはｍＴＯＲ経路のメンバーを標的とする二重治療薬の効能を評価するかもしくはモニターするために同定することができる。

【０８２２】

処置処方計画に反応しない患者の適時の同定は、臨床医が、処置の不要な副作用に癌患者をさらすことを限定しそして代替処置を始めることを可能にする。残念ながら、組織学的検査を包含する当該技術分野に存在する方法は、そのような適時のそして正確な同定には不十分である。本発明は、有効な結果（すなわち、腫瘍の減少もしくは除去）の増加した可能性を有して患者に投与することができる治療のより情報に基づきそして有効な処方計画を開発する方法の態様を提供する。

【０８２３】

診断、疾患の初期診断および疾患経過（処置の前、間もしくは後）のその後のモニタリングの両方は、患者から取り除かれた細胞もしくは組織サンプルの組織学的検査を用いて確かめられることが多い。腫瘍について、臨床病理学者はそのようなサンプルが良性もしくは悪性であるかどうか正確に決定することそして悪性であると思われる腫瘍サンプルの悪性度を分類することができる必要がある。これらの決定は、患者処置の適当なコースを選択するための基礎をなすことが多い。同様に、病理学者は、特に処置、最も特に化学療法もしくは生物学的薬剤での処置の結果としてもしくはそれによって、癌が増殖している

かもしくは寛解に入っている程度を検出することができる必要がある。

【０８２４】

組織学的検査は、本明細書に開示されるような組織染色方法を単独でもしくは光学顕微鏡下のような、サンプルの形態学的特徴が容易に観察されることを可能にする他の既知の技術と組み合わせて含む。病理学者は、染色されたサンプルを調べた後に、典型的には腫瘍サンプルが悪性であるかどうかの定性的決定を行う。単に組織学的検査により腫瘍の悪性度を確定することは難しい。腫瘍の悪性度は、サンプル形態によって反映され得るかもしくはそうでない、タンパク質発現、抑制および／もしくはタンパク質リン酸化のような腫瘍内の細胞の生化学の結果であることが多い。本発明の開示される態様を単独でそして場合により他の既知の技術と組み合わせて用いて腫瘍サンプル内の細胞の生化学を評価することは、腫瘍関連遺伝子もしくはタンパク質、またはさらに特に腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分の遺伝子発現およびタンパク質リン酸化の両方を観察しそして潜在的に定量しているので、望ましい。

【０８２５】

癌治療は、単にそれらの組織学もしくは疾患の部位よりむしろ腫瘍の分子プロファイリングに基づくことができる。腫瘍組織における標的治療の生物学的効果を解明することおよびこれらの効果を臨床反応と相関させることは、腫瘍において働いている主な増殖および生存経路を同定するのに役立ち、それによって見込みのあるレスポンダーのパターンを確立し、そして逆に抵抗性を克服するために戦略を考案するための論理的根拠を提供する。増殖因子受容体の成功した診断ターゲティングは、腫瘍増殖もしくは生存が標的受容体もしくは受容体ファミリーにより、治療により標的とされない他の受容体により推進されるているかどうか、そして別の癌遺伝子経路が関与することを下流シグナル伝達が示唆するかどうかを決定する。さらに、１つより多くのシグナル経路が関与する場合、これらのシグナル経路のメンバーは、二重阻害剤治療が有効になるかもしくは有効であるかどうかを決定するために診断標的として用いることができる。

【０８２６】

有効な化学療法薬は腫瘍細胞を破壊し、そして隣接する正常細胞を破壊しない。これは、癌細胞に主に存在するが正常細胞には存在しない細胞活性に影響を与える薬剤を用いて成し遂げられる。正常細胞と腫瘍細胞の１つの違いは、細胞における酸素の量である。多数の腫瘍細胞は「低酸素」、すなわち酸素欠乏である。

【０８２７】

哺乳類細胞は、エネルギー基質としての酸素の要求と細胞巨大分子への酸化的損傷の固有の危険性のバランスをとるために一連の反応を有する。酸素恒常性の様々な細胞および全身機序の分子的機序は同定されており、そしてこれらの機序は遺伝子転写、タンパク質翻訳、翻訳後修飾および細胞局在化を包含するあらゆる調節レベルで起こることが見いだされている（Ｈａｒｒｉｓ，２００２，Ｎａｔ　Ｒｅｖ．２：３８-４７）。

【０８２８】

本発明の態様は、これらの産物および／もしくは過程を分析するために用いることができる。１つの開示される態様は、最初に腫瘍を同定することを含んでなる。各腫瘍の診断のパネルは、各治療の適当なそして好ましくは最良の候補を見出すために用いられる。例えば、ラパマイシンもしくはＰＸ－４７８のようなｍＴＯＲ経路を標的とする治療による処置は、ＥＧＦ経路阻害剤が組み合わせて用いられない場合に有効でない可能性がある。ｐＥＲＫおよびｐＭＥＫのようなＥＧＦ経路成分の高い発現レベルがある場合、ｍＴＯＲ経路を標的とする治療は有効でない。本発明の開示される態様は、臨床医が標的治療のより有効な組み合わせを同定することを可能にする。

【０８２９】

当該技術分野において既知である自動（コンピューター支援）画像解析システムは、腫瘍サンプルの目視検査を増強することができる。代表的な態様において、細胞もしくは組織サンプルは、検出可能な標識を有するか、もしくは検出可能な標識を有する抗ハプテン抗体により認識される、少なくとも１つの開示されるハプテン、ハプテン－抗体コンジュ

ゲートのようなハプテンコンジュゲート、もしくはその組成物にさらされる。これらのハプテンに基づく試薬および方法は、本明細書に開示されるもののような特定の生物学的マーカーに特異的であることができる。次に、サンプルの画像、典型的には拡大画像は、典型的には電荷結合素子（ＣＣＤ）もしくはテレビカメラのようなカメラから、画像を受け取るコンピューターにより処理される。そのようなシステムは、例えば、サンプルにおけるＨＩＦ－１α、ｐＭＥＫ、ｐＥＲＫ、ｍＴＯＲ、ｐｍＴＯＲ、ｐＡＫＴ、ｐＴＳＣ２、ｐＳ６およびｐ４ＥＢＰ１のような所望の標的、もしくは任意のさらなる診断バイオマーカーの発現および活性化レベルを検出しそして測定するために用いることができる。従って、本発明の開示される態様は、最も特に腫瘍マーカー遺伝子もしくは特定の癌タイプおよびサブタイプ（例えば、異なる悪性度を有する）において発現されることが既知である遺伝子の発現に関して、組織学的に同定された癌細胞におけるより正確な癌診断および遺伝子発現のより優れた特性化を提供する。この情報は、臨床医がより有効な治療処方計画を決定すること、そして実施された治療処方計画の結果をモニターすることを可能にする。例えば、ある腫瘍タイプもしくはサブタイプに臨床効能を有する薬剤は、その細胞がそのように同定される患者に投与することができる。

【０８３０】

従来の治療の別の欠点は、個々のヒト患者において特定の疾患を処置することにおける特定の治療薬の効能が予測できないことである。この予測が不可能であることは、これまで、１つもしくはそれ以上の選択薬剤が有効であるかどうかまたは個々の患者において正確な予後もしくは処置経過を提供することを治療を開始する前に決定することを実質的に不可能にしている。特定の疾患は、どの処方計画が特定の個体に最も有効であるかを評価する現時点での方法なしに、処置処方計画の選択を臨床医に提起するので、これは特に重要である。本発明の開示される態様は、個々の患者における提示治療薬（もしくは薬剤の組み合わせ）の予想される効能をより良く評価することができる。開示される態様は、化学療法処方計画の効能を評価することにおいて時間および費用の両方の効率が高くそして癌患者に対して低外傷性であるというさらなる理由で好都合である。

【０８３１】

結果として、本発明の方法の開示される態様は、ｍＴＯＲ経路阻害剤もしくは二重ｍＴＯＲ経路阻害剤およびＥＧＦ経路阻害剤治療のような特定の阻害剤に反応する哺乳類腫瘍のような提示処置に反応する疾患を同定するために用いることができる。さらに、本発明の開示される態様は、特定の処置に患者を選択するために用いることができ、もしくは指示治療に反応しない疾患を同定するために用いることができる。さらに、本発明の方法は、提示処置に反応する可能性が低い患者を選択するために用いることができる。

【０８３２】

発現、もしくは他の細胞過程、例えばリン酸化、細胞生成物などのパターンは、本発明の開示される態様を用いて検出されそして場合により定量される。例えば、ポリペプチドの発現および／もしくはリン酸化パターンは、ポリペプチドに特異的なバイオ検出試薬を用いて検出することができる。典型的なバイオ検出試薬には、抗体および核酸プローブ、典型的にはサンプルへのそのハイブリダイゼーションを検出することができる１つもしくはそれ以上の核酸フラグメントの一群が包含される。抗体およびプローブは、非標識であるかまたは標的もしくはサンプルへのその結合を検出することができるように標識されることができる。例えば、抗体もしくはプローブは、単独でまたは他の開示されるかもしくは既知のハプテンと組み合わせて、少なくとも１つの開示されるハプテンにコンジュゲーションされていてもよい。検出可能な標識を有する抗ハプテン抗体は、抗ハプテン抗体がハプテンと複合体形成することを可能にするのに有効な方法でサンプルに投与することができる。次に、複合体を視覚化する。

【０８３３】

核酸プローブは、ゲノムの１つもしくはそれ以上の特定の（あらかじめ選択された）部分からの核酸源、例えば、１つもしくはそれ以上のクローン、単離された全染色体もしくは染色体フラグメント、または一群のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅産物からであ

ることができる。核酸プローブはまた、アレイにおけるように、固体表面（例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、石英ガラススライド）上に固定化した単離された核酸であることもできる。プローブは、例えばＷＯ９６／１７９５８に記述されるような核酸のアレイのメンバーであることができる。高密度アレイを製造することができる技術もまた、この目的のために用いることができる（例えば、Ｆｏｄｏｒ（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ７６７－７７３；Ｊｏｈｎｓｔｏｎ（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．８：Ｒ１７１－Ｒ１７４；Ｓｃｈｕｍｍｅｒ（１９９７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３：１０８７－１０９２；Ｋｅｒｎ（１９９７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３：１２０－１２４；米国特許第５，１４３，８５４号を参照）。

【０８３４】

特定のプローブの正確な配列は、「実質的に同一である」がそれらが由来するプローブと同じ標的もしくはサンプルに特異的に結合する（すなわち、特異的にハイブリダイズする）能力を保持するプローブを製造するためにある程度まで改変できることを当業者は認識する。「核酸」という用語は、一本鎖もしくは二本鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドをさす。該用語には、所望の目的のために、基準核酸と同様のもしくは向上した結合特性を有する天然ヌクレオチドの既知のアナログを含有する、核酸、すなわちオリゴヌクレオチドが包含される。該用語にはまた、天然に存在するヌクレオチドと同様にもしくは所望の目的のために改善される速度で代謝される核酸も包含される。該用語にはまた、合成バックボーンを有する核酸様構造も包含される。結腸癌細胞のスクリーニングに関して、例えば、米国特許６，３２６，１４８を参考にしてサンプルにおける癌細胞のスクリーニングに核酸プローブを使用する方法を当業者は認識する。

【０８３５】

癌と関連するポリペプチドは、直接または適切な二次抗体（マウス一次抗体を使用する場合にはウサギ抗マウスＩｇＧのような）および／もしくは第三級アビジン（もしくはストレプトアビジン）ビオチン複合体（「ＡＢＣ」）を用いて検出される、ＨＩＦ－１α、ｐＭＥＫ、ｐＥＲＫ、ｍＴＯＲ、ｐｍＴＯＲ、ｐＡＫＴ、ｐＴＳＣ２、ｐＳ６およびｐ４ＥＢＰ１が包含されるがこれらに限定されるものではないバイオマーカーに対する適当な一次抗体を用いて画像解析により定量することができる。

【０８３６】

本明細書に例示されるような本発明の方法の実施において有用な試薬の例には、Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ）から得られる、マウスモノクローナル抗体ＶＭＳＩ ７６０－４２８５が包含されるがこれに限定されるものではない、ＨＩＦ－１αに特異的な抗体が包含される。本発明の方法の実施において有用な他の試薬には、ｍＴＯＲに特異的なウサギポリクローナル抗体Ａｂｃａｍ２７３２、ｐｍＴＯＲに特異的なウサギポリクローナル抗体ＣＳＴ２９７１、ｍＴＳＣ２に特異的なウサギポリクローナル抗体ＣＳＴ３６１４、ｐＳ６に特異的なウサギポリクローナル抗体ＣＳＴ２２１１、ｐＡＫＴに特異的なウサギモノクローナル抗体ＣＳＴ３７８７、ｐＭＥＫに特異的なウサギポリクローナル抗体ＣＳＴ９１２１、ｍＥＲＫ（ｐ４４／ｐ４２）に特異的なウサギポリクローナル抗体ＶＭＳＩ７６０－４２２８およびｍ４ＥＢＰ１に特異的なウサギポリクローナル抗体ＣＳＴ９４５５が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【０８３７】

さらに、ペプチドもしくはそのリン酸化のような予測パターンもしくは生成物は、非腫瘍組織もしくは細胞サンプルのような処置を受けていないサンプルと比較することができる。非腫瘍組織もしくは細胞サンプルは、同じ個体からの非腫瘍組織もしくは細胞サンプル、あるいはまた異なる個体からの非腫瘍組織もしくは細胞サンプルより得られることができる。非腫瘍組織もしくは細胞サンプルと比較した場合により少ないポリペプチドが検出される場合には、ポリペプチドの検出されるパターンは、哺乳類腫瘍、組織もしくは細胞サンプルにおいて減少していると言われる。非腫瘍組織もしくは細胞サンプルと比較し

た場合により多くのポリペプチドが検出される場合には、ポリペプチドの検出されるパターンは、哺乳類腫瘍、組織もしくは細胞サンプルにおいて増加していると言われる。非腫瘍組織もしくは細胞サンプルと比較した場合に同じかもしくはほぼ同じポリペプチドが検出される場合には、ポリペプチドの検出されるパターンは、哺乳類腫瘍、組織もしくは細胞サンプルにおいて正常であると言われる。

【０８３８】

標的タンパク質の量は、染色された抗原の平均光学密度を測定することにより定量することができる。同時に、染色される全組織領域の割合もしくはパーセンテージは、例えば第二の画像におけるコントロールレベル（抗体閾値レベルのような）を上回って染色される領域として、容易に計算することができる。バイオマーカーを含有する核の視覚化の後に、処置後の患者由来の組織におけるそのような細胞のパーセンテージもしくは量を未処置の組織におけるそのような細胞のパーセンテージもしくは量と比較する。本発明の目的のために、ポリペプチドの発現、リン酸化、もしくは発現とリン酸化の両方のパターンを「決定すること」は、直接検査によってもしくは例えば契約診断サービスから間接的に、そのようなポリペプチド（１つもしくは複数）に関する発現レベル情報を単に得ることを意味すると広く理解される。

【０８３９】

ＩＸ．様々な用途

本発明を例示するために本明細書に提示される例は主に免疫組織化学アッセイに関するが、開示されるハプテン、開示されるハプテン標識プローブおよび開示される検出方法は、任意のタイプの免疫アッセイ、核酸に基づくアッセイもしくはペプチド核酸（ＰＮＡ）に基づくアッセイに適用することができる。例えば、開示されるハプテンは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）；タンパク質、核酸およびＰＮＡマイクロアレイアッセイ；およびフローサイトメトリーアッセイの検出スキームの成分を成すことができる。さらに、本明細書に特に詳述されるもののような免疫組織化学アッセイはまた、組織アレイにおける標的分子の検出に適用することもできる。

【０８４０】

開示されるハプテン、ハプテンにコンジュゲーションした抗体および検出方法は、標準（間接的）サンドイッチおよび競合形態ＥＬＩＳＡアッセイにおける標的分子の検出に利用することができる。標準形態ＥＬＩＳＡにおいて、標的分子は基質（ニトロセルロース基質のような）に非特異的に付着され、そして次に所望の標的もしくは複数の標的に特異的に結合する１つもしくはそれ以上の一次抗体により検出される。１つの態様において、一次抗体は本明細書に開示されるような異なるハプテンで標識され、そして次に検出可能な標識（さらに特に、ＥＬＩＳＡにおける酵素、しかし、量子ドットのような他の検出可能な標識を代用することができる）にコンジュゲーションした開示される抗ハプテン抗体を基質に付着した標的分子の存在の視覚化のために加える。あるいはまた、サンドイッチ形態において、１つもしくはそれ以上の標的分子に特異的な捕捉抗体を基質に付着させ（共有結合的もしくは非共有結合的）、そしてサンプルを加え、存在する任意の標的分子もまた捕捉抗体との相互作用によって基質に付着されるようになることを可能にする。基質に非特異的に結合している非標的分子を除くために洗浄した後に、捕捉抗体と異なる部位で所望の標的に結合する１つもしくはそれ以上の検出抗体を加える。１つの態様において、検出抗体もしくは複数の抗体を１つもしくはそれ以上の開示されるハプテンで標識し、そして次に同じもしくは異なる検出可能な標識にコンジュゲーションした１つもしくはそれ以上の開示される抗ハプテン抗体を基質に付着した標的のその後の視覚化のために加える。任意の形態において、視覚化シグナルの増幅は、種特異的抗抗体のようなさらなる中間抗体を利用して可能である。

【０８４１】

１つの態様において、開示されるハプテン、開示されるハプテン標識抗体およびハプテン標識核酸、ならびに開示される検出方法はブロットアッセイにおける標的検出に用いることができ、ここで、電気泳動により分離されるタンパク質もしくは核酸は基質に非特異

的にブロッティングされ、その基質は次に特定の核酸配列もしくはタンパク質の存在について検索される。例えば、サザンブロットアッセイにおいて、核酸はアガロースゲル電気泳動により分離され、そしてニトロセルロースフィルター上に相互に相対的位置でゲルからブロッティングされ、次にそのフィルターをハプテン標識核酸プローブで調べることができ、それを次に検出可能な標識にコンジュゲーションした開示される抗ハプテン抗体を利用することにより検出することができる。ノーザン（ＲＮＡ）およびウェスタン（タンパク質）ブロットにおける標的の検出もまた、開示されるハプテンを利用して可能である。

【０８４２】

開示されるハプテン、ハプテン標識プローブおよび検出方法はまた、順相および逆相タンパク質マイクロアレイならびに核酸マイクロアレイ（ｃＤＮＡおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイを包含する）のようなマイクロアレイを用いる標的検出スキームにおいて利用することもできる。例えば、逆相タンパク質マイクロアレイにおいて、サンプルを基質上に個々にスポットし、そこでサンプル中のタンパク質は基質に非特異的に結合するようになる。次に、多数の異なる抗体（開示される抗体－ハプテンコンジュゲートのような）を用いて特定のタンパク質の存在についてスポットを調べる。各スポットは同時に複数の異なるタンパク質について調べることができ、あるいはまた、各スポットを異なるタンパク質について調べることができ、もしくは各スポットを同じタンパク質について調べることができる（各スポットが、例えば、患者への薬剤の投与後に、異なる時間で患者から採取された異なるサンプルからである場合のような）。核酸マイクロアレイの場合、開示されるハプテン標識プローブを検出スキームにおいて利用することができる。

【０８４３】

組織マイクロアレイは、均一な染色および評点条件下で多数の組織サンプルを迅速にスクリーニングする目的で、本発明の開示される態様を実施するために都合よく用いられる（Ｈｏｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ａｍ　Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ．１５８：１２４５－５１）。染色されたアレイの評点は、標準的な０～３＋尺度を用いて手動で、もしくは観察される染色を正確に定量する自動システムにより成し遂げることができる。例えば、開示される薬物治療態様で、この分析は処置後の患者結果を最も良く予測するバイオマーカーを同定するために用いることができる。０～１００パーセントの間の患者「反応可能性」は、小セットのリガンド、受容体、シグナル伝達タンパク質もしくはその予測組み合わせの発現、リン酸化もしくは両方に基づいて予測することができる。癌患者からのさらなるサンプルは、組織マイクロアレイ結果の代替物としてもしくはそれに加えて分析することができる。例えば、乳癌患者からのサンプルの分析は、患者の反応が受容体発現および／もしくは下流シグナル伝達の特定のパターンと相関する場合に、組織アレイからの結果を裏付けることができる。

【０８４４】

開示されるハプテン、ハプテン標識プローブおよび検出方法はまたフローサイトメトリーにおいても有用性を見出し、ここで、細胞は１つもしくはそれ以上の標的分子（例えば、特定のタンパク質もしくは核酸配列）の存在について調べられ、そして場合により１つもしくはそれ以上の標的分子の存在もしくは不在に従って分類される（蛍光支援（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ａｓｓｉｓｔｅｄ）細胞分類、ＦＡＣＳのような）。１つの態様において、１つもしくはそれ以上の開示されるハプテン標識抗体もしくはハプテン標識核酸プローブを複数の細胞に接触させ、そして次に１つもしくはそれ以上の別個に検出可能な標識にコンジュゲーションされる１つもしくはそれ以上の抗ハプテン抗体と細胞を接触させる。

【０８４５】

Ｘ．抗原／抗体認識および一般的に標的

興味のあるハプテンに特異的に結合する任意の抗体、もしくは興味のある抗原からのエピトープは、本明細書に開示される方法において用いることができる。一例において、興味のある抗原に特異的に結合する抗体の各々の相補性決定領域（ＣＤＲ）の特異性決定領

域の配列が決定される。特異性決定領域（ＳＤＲ、非リガンド接触部位）の外側の残基は置換することができる。例えば、最高でも１、２もしくは３個のアミノ酸を置換することができる。ある抗体からのフレームワーク領域および異なる抗体からのＣＤＲを含むキメラ抗体の製造は、当該技術分野において周知である。例えば、ヒト化抗体は日常的に製造することができる。抗体もしくは抗体フラグメントは、興味のある抗原に特異的に結合するドナーモノクローナル抗体からの相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒトアクセプター免疫グロブリン重鎖および軽鎖フレームワークからの免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域フレームワークを有するヒト化免疫グロブリンであることができる。一般に、ヒト化免疫グロブリンは、少なくとも$10^{8}M^{-1}$、少なくとも$5x10^{8}M^{-1}$もしくは少なくとも$10^{9}M^{-1}$のような少なくとも$10^{7}M^{-1}$の親和性定数でＲＥＴに特異的に結合する。

【０８４６】

ヒト化モノクローナル抗体は、ドナーマウス免疫グロブリンの重鎖および軽可変鎖からのドナー相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒト可変ドメインに導入し、そして次に親和性を保持するために必要とされる場合にはフレームワーク領域におけるヒト残基を置換することにより製造することができる。ヒト化モノクローナル抗体由来の抗体成分の使用は、ドナー抗体の定常領域の免疫原性と関連する潜在的問題を取り除く。ヒト化モノクローナル抗体を製造する技術は、例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２，１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３，１９８８；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４，１９８８；Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：４２８５，１９９２；Ｓａｎｄｈｕ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１２：４３７，１９９２；およびＳｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：２８４４，１９９３に記述される。抗体は任意のアイソタイプのものであることができるが、いくつかの態様において抗体はIgG_{1}、IgG_{2}、IgG_{3}およびIgG_{4}が包含されるがこれらに限定されるものではないＩｇＧである。

【０８４７】

１つの態様において、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列に少なくとも約６５％同一であることができる。従って、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列に少なくとも約７５％、少なくとも約８５％、少なくとも約９９％もしくは少なくとも約９５％同一であることができる。ヒトフレームワーク領域、およびヒト化抗体フレームワーク領域において製造することができる突然変異は、当該技術分野において既知である（例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、米国特許第５，５８５，０８９号を参照）。

【０８４８】

典型的なヒト抗体は、ＬＥＮおよび２１／２８ＣＬである。これらは、腫瘍マーカーに結合する様々な抗体において使用されるフレームワーク領域である。他のものを使用できること、およびこれらの領域は例となるだけであることを当業者は認識する。重鎖および軽鎖フレームワークの配列は、当該技術分野において既知である。

【０８４９】

マウスモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体のような抗体には、全長分子およびそのフラグメント、例えば、重鎖および軽鎖可変領域を含みそしてエピトープ決定基に結合することができるＦａｂ、$F(ab')_{2}$およびＦｖが包含される。これらの抗体フラグメントは、それらの抗原もしくは受容体と選択的に結合するいくらかの能力を保持する。これらのフラグメントには、下記のものが包含される：

（１）Ｆａｂ、抗体分子の１価の抗原結合フラグメントを含有するフラグメントは、酵素パパインでの全抗体の消化により製造することができ、完全な軽鎖および１つの重鎖の一部をもたらす；

（２）Ｆａｂ’、抗体分子のフラグメントは、ペプシンで全抗体を処理し、続いて還元

することにより得ることができ、完全な軽鎖および重鎖の一部をもたらす；２本のＦａｂ’フラグメントが抗体分子当たり得られる；

（３）$(Fab')_2$、その後の還元なしに酵素ペプシンで全抗体を処理することにより得ることができる抗体のフラグメント；Ｆ$(ab')_2$は、２本のジスルフィド結合により一緒に保持される２本のＦａｂ’フラグメントのダイマーである；

（４）Ｆｖ、２本の鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメント；および

（５）遺伝子的に融合された一本鎖分子として適当なポリペプチドリンカーにより連結される、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子として定義される一本鎖抗体（ｓｃＦｖのような）。

【０８５０】

これらのフラグメントを製造する方法は、当該技術分野において既知である（例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８を参照）。これらの抗体を製造するために、V_HおよびV_Lを宿主細胞において２つの個々の核酸構築物から発現させることができる。V_HおよびV_Lが非連続的に発現される場合、Ｆｖ抗体の鎖は典型的には非共有結合相互作用により一緒に保持される。しかしながら、これらの鎖は希釈の際に解離する傾向があり、従って、グルタルアルデヒド、分子間ジスルフィドもしくはペプチドリンカーによって鎖を架橋するために方法が開発されている。従って、一例において、ＦｖはジスルフィドＦｖ（ｄｓＦｖ）であることができ、ここで、重鎖可変領域および軽鎖可変領域はジスルフィド結合により化学的に連結される。

【０８５１】

さらなる例において、Ｆｖフラグメントはペプチドリンカーにより連結されるV_HおよびV_L鎖を含んでなる。これらの一本鎖抗原結合タンパク質（ｓｃＦｖ）は、オリゴヌクレオチドにより連結されるV_HおよびV_LドメインをコードするＤＮＡ配列を含んでなる構造遺伝子を構築することにより製造される。構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、それは次にエシェリキア・コリのような宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞は、２つのＶドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖を合成する。ｓｃＦｖを製造する方法は、当該技術分野において既知である（Ｗｈｉｔｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２，ｐａｇｅ ９７，１９９１；Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３，１９８８；米国特許第４，９４６，７７８号；Ｐａｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １１：１２７１，１９９３；およびＳａｎｄｈｕ，上記を参照）。

【０８５２】

抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解加水分解によりもしくはフラグメントをコードするＤＮＡのエシェリキア・コリにおける発現により製造することができる。抗体フラグメントは、常法による全抗体のペプシンもしくはパパイン消化により得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、ペプシンでの抗体の酵素切断により製造することができ、Ｆ$(ab')_2$と表される５Ｓフラグメントを生成せしめる。このフラグメントをチオール還元剤、および場合によりジスルフィド結合の切断に起因するスルフヒドリル基のブロッキング基を用いてさらに切断して、３．５Ｓ Ｆａｂ’１価フラグメントを生成せしめることができる。あるいはまた、ペプシンを用いる酵素切断は２本の１価のＦａｂ’フラグメントおよびＦｃフラグメントを直接生成せしめる（米国特許第４，０３６，９４５号および米国特許第４，３３１，６４７号、ならびにその中に含まれる参考文献；Ｎｉｓｏｎｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．８９：２３０，１９６０；Ｐｏｒｔｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．７３：１１９，１９５９；Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，４２２頁，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９６７；ならびにＣｏｌｉｇａｎ ｅｔ

ａｌ．２．８．１－２．８．１０および２．１０．１－２．１０．４章を参照）。

【０８５３】

フラグメントが完全な抗体により認識される抗原に結合する限り、抗体を切断する他の方法、例えば１価の軽鎖－重鎖フラグメントを生成せしめるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝子的技術もまた用いることができる。

【０８５４】

抗体の保存的バリアントを製造できることを当業者は認識する。ｄｓＦｖフラグメントもしくはｓｃＦｖフラグメントにおけるような抗体フラグメントにおいて用いられるそのような保存的バリアントは、正確なフォールディングおよびV_HとV_L領域間を安定させるために必要な重要なアミノ酸残基を保持し、そして分子の低いｐＩおよび低い毒性を維持するために残基の電荷特性を保持する。収率を上げるためにアミノ酸置換（最大で１個、最大で２個、最大で３個、最大で４個もしくは最大で５個のアミノ酸置換のような）をV_HおよびV_L領域において行うことができる。機能的に同様のアミノ酸を与える保存的アミノ酸置換表は、当業者に周知である。以下の６つのグループは、相互に保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である：

１）アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；

２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；

３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；

４）アルギニン（Ｒ）、リシン（Ｋ）；

５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；および

６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）。

【０８５５】

従って、当業者は配列番号：１～２および５～１０を容易に検討し、上記の簡潔な表におけるアミノ酸の１つもしくはそれ以上を決め、保存的置換を同定し、そして周知の分子技術を用いて保存的バリアントを製造することができる。

【０８５６】

治療、診断もしくは検出部分のようなエフェクター分子は、当業者に既知である手段をいくつでも用いて、興味のある抗原に特異的に結合する抗体に連結することができる。共有結合および非共有結合手段の両方を用いることができる。抗体にエフェクター分子を結合する方法は、エフェクターの化学構造によって異なる。ポリペプチドは典型的に、エフェクター分子の結合をもたらすために抗体上の適当な官能基との反応に利用可能である、カルボン酸（ＣＯＯＨ）、遊離アミン（－NH_2）もしくはスルフヒドリル（－ＳＨ）基のような様々な官能基を含有する。あるいはまた、抗体はさらなる反応性官能基をさらすかもしくは付けるために誘導体化される。誘導体化は、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬから入手可能なもののような多数のリンカー分子のいずれかの結合を含むことができる。リンカーは、エフェクター分子に抗体を連結するために用いられる任意の分子であることができる。リンカーは、抗体およびエフェクター分子の両方に共有結合を形成することができる。適当なリンカーは当業者に周知であり、そして直鎖状もしくは分枝鎖状炭素リンカー、複素環式炭素リンカーまたはペプチドリンカーが包含されるがこれらに限定されるものではない。抗体およびエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーは構成アミノ酸にそれらの側基を介して（システインへのジスルフィド結合を介してのような）もしくは末端アミノ酸のアルファ炭素アミノおよびカルボキシル基に連結することができる。

【０８５７】

抗体に様々な放射性診断化合物、放射性治療化合物、標識（酵素もしくは蛍光分子のような）薬剤、毒素および他の薬剤を結合するために報告されている多数の方法に関して、当業者は抗体もしくは他のポリペプチドに既定の薬剤を結合するための適当な方法を決定することができる。

【０８５８】

ＸＩ．一般にＤＮＡを用いて抗体を製造する方法

興味のある抗原に特異的に結合する抗体をコードする配列をコードする典型的な核酸は、クローニング技術により製造することができる。適切なクローニングおよびシークエンシング技術の例、ならびに多数のクローニングの実行を通して当業者を指導するために十分な使用説明書は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，上記、Ｂｅｒｇｅｒ ａｎｄ Ｋｉｍｍｅｌ（ｅｄｓ．）、上記およびＡｕｓｕｂｅｌ，上記に見出される。生物学的試薬および実験装置の製造業者からの製品情報もまた、有用な情報を提供する。そのような製造業者には、ＳＩＧＭＡ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ａｍｅｒｓｈａｍ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）、ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）、Ｃｈｅｍ Ｇｅｎｅｓ Ｃｏｒｐ．，Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）、Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．、ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）、Ｆｌｕｋａ Ｃｈｅｍｉｃａ－Ｂｉｏｃｈｅｍｉｋａ Ａｎａｌｙｔｉｋａ（Ｆｌｕｋａ Ｃｈｅｍｉｅ ＡＧ，Ｂｕｃｈｓ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）およびＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）ならびに当業者に既知である多数の他の商業的供給源が包含される。

【０８５９】

核酸はまた、増幅方法により製造することもできる。増幅方法にはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、転写に基づく増幅系（ＴＡＳ）、自律配列複製系（３ＳＲ）が包含される。多種多様なクローニング方法、宿主細胞およびインビトロ増幅方法論が当業者に周知である。

【０８６０】

一例において、有用な抗体は、ベクターに興味にある抗原に特異的に結合する抗体からの可変領域をコードするｃＤＮＡを挿入することにより製造される。

【０８６１】

いったん抗体もしくはそのフラグメントをコードする核酸が単離されそしてクローン化されると、タンパク質を細菌、植物、酵母、昆虫および哺乳類細胞のような組換え技術で作られた細胞において発現させることができる。抗体もしくはそのフラグメントをコードする１つもしくはそれ以上のＤＮＡ配列は、適当な宿主細胞へのＤＮＡ導入によりインビトロで発現させることができる。細胞は原核生物もしくは真核生物であることができる。該用語にはまた、対象宿主細胞の任意の子孫も包含される。複製中に起こる突然変異があり得るので全ての子孫が親細胞と同一とは限らない可能性があることが理解される。外来ＤＮＡが宿主において継続的に維持されることを意味する、安定な導入の方法は、当該技術分野において既知である。

【０８６２】

抗体もしくはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列は、発現制御配列に操作可能に連結することができる。コーディング配列に操作可能に連結される発現制御配列は、コーディング配列の発現が発現制御配列と適合する条件下で行われるように連結される。発現制御配列には、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質をコードする遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ＡＴＧ）、イントロンのスプライシングシグナル、ｍＲＮＡの正確な翻訳を可能にするためのその遺伝子の正しい読み枠の維持、および終止コドンが包含されるがこれらに限定されるものではない。

【０８６３】

抗体もしくはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列は、配列の挿入もしくは導入を可能にするように操作することができそして原核生物もしくは真核生物のいずれかにおいて発現させることができるプラスミド、ウイルスもしくは他の媒体が包含されるがこれらに限定されるものではない発現ベクターに挿入することができる。宿主には微生物、酵母、昆虫および哺乳類生物を包含することができる。原核生物において真核生物

もしくはウイルス配列を有するＤＮＡ配列を発現させる方法は、当該技術分野において周知である。宿主において発現および複製ができる生物学的に機能性のウイルスおよびプラスミドＤＮＡベクターは、当該技術分野において既知である。

【０８６４】

組換えＤＮＡでの宿主細胞の形質転換は、当業者に周知であるような通常の技術により実施することができる。宿主がエシェリキア・コリのような原核生物である場合、指数増殖期の後に採取しそして次に当該技術分野において周知である方法を用いて$CaCl_2$法により処理した細胞からＤＮＡの取り込みが可能であるコンピテント細胞を調製することができる。あるいはまた、$MgCl_2$もしくはＲｂＣｌを用いることができる。形質転換はまた、所望に応じて宿主細胞のプロトプラストを形成した後に、もしくは電気穿孔により行うこともできる。

【０８６５】

宿主が真核生物である場合、リン酸カルシウム共沈のようなＤＮＡのトランスフェクションの方法、通常の機械的方法、例えば微量注入、電気穿孔、リポソームに入れられたプラスミドの挿入、もしくはウイルスベクターを用いることができる。真核細胞はまた、抗体もしくはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列および単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子のような選択可能な表現型をコードする第二の外来ＤＮＡ分子で共形質転換することもできる。別の方法は、真核細胞に一時的に感染するかもしくはそれを形質転換しそしてタンパク質を発現させるために、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）もしくはウシパピローマウイルスのような真核生物ウイルスベクターを使用することである（例えば、Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｇｌｕｚｍａｎ ｅｄ．，１９８２を参照）。当業者は、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＨｅＬａおよび骨髄腫細胞系のような高等真核細胞を包含する細胞においてタンパク質を製造するのに有用なプラスミドおよびベクターのような発現系を容易に使用することができる。

【０８６６】

組換えで発現されたポリペプチドの単離および精製は、分取クロマトグラフィーおよび免疫学的分離を包含する常法により実施することができる。いったん発現されると、組換え抗体は硫酸アンモニウム沈殿、親和性カラム、カラムクロマトグラフィーなどを包含する当該技術分野の標準的な方法に従って精製することができる（一般に、Ｒ．Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．，１９８２を参照）。少なくとも約９０～９５％の均一性の実質的に純粋な組成物が本明細書において開示され、そして９８％～９９％もしくはそれ以上の均一性は製薬学的目的のために使用することができる。いったん部分的にもしくは均質まで所望に応じて精製されると、治療的に使用される場合には、ポリペプチドは内毒素を実質的に含まないべきである。

【０８６７】

エシェリキア・コリのような細菌からの、一本鎖抗体を包含する、一本鎖抗体の発現および／もしくは適切な活性形態へのリフォールディングの方法は記述されており、そして周知であり、そして本明細書に開示される抗体に適用可能である。全て本明細書に引用することにより組み込まれる、Ｂｕｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０５：２６３－２７０，１９９２；Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：５４５，１９９１；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５，１９８９およびＷａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４，１９８９を参照。

【０８６８】

しばしば、エシェリキア・コリもしくは他の細菌からの機能性異種タンパク質は封入体から単離され、そして強い変性剤を用いる可溶化およびその後のリフォールディングを必要とする。可溶化工程中に、当該技術分野において周知であるように、ジスルフィド結合を分離するために還元剤が存在しなければならない。還元剤を有する典型的なバッファー

は：０．１Ｍ Ｔｒｉｓ ｐＨ ８、６Ｍグアニジン、２ｍＭ ＥＤＴＡ、０．３Ｍ ＤＴＥ（ジチオエリスリトール）である。ジスルフィド結合の再酸化は、本明細書に引用することにより組み込まれるＳａｘｅｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ９：５０１５－５０２１，１９７０に記述されるように、そして特にＢｕｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．、上記により記述されるように、還元および酸化形態の低分子量チオール試薬の存在下で起こることができる。

【０８６９】

再生は、典型的にはリフォールディングバッファーへの変性されそして還元されたタンパク質の希釈（例えば１００倍）により成し遂げられる。典型的なバッファーは、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、０．５Ｍ ｌ－アルギニン、８ｍＭ酸化グルタチオン（ＧＳＳＧ）および２ｍＭ ＥＤＴＡである。

【０８７０】

二本鎖抗体精製プロトコルへの改変として、重鎖および軽鎖領域は別個に可溶化されそして還元され、そして次にリフォールディング溶液において合わせられる。典型的な収率は、もう一方に対する一方のタンパク質の５倍モル過剰を超えないようなモル比でこれら２つのタンパク質が混合される場合に得られる。酸化還元シャッフリングが完了した後にリフォールデンング溶液に過剰の酸化グルタチオンもしくは他の酸化低分子量化合物を加えることが望ましい。

【０８７１】

組換え法に加えて、本明細書に開示される抗体はまた、標準的なペプチド合成を用いて全部もしくは部分的に構築することもできる。約５０アミノ酸未満の長さのポリペプチドの固相合成は、不溶性担体に配列のＣ末端アミノ酸を結合させ、続いて配列における残りのアミノ酸を逐次付加することにより成し遂げることができる。固相合成の技術は、Ｂａｒａｎｙ ＆ Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ．Ｖｏｌ．２：Ｓｐｅｃｉａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｐａｒｔ Ａ．ｐｐ．３－２８４；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５６，１９６３およびＳｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，第２版，Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍ． Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．，１９８４により記述される。より長い長さのタンパク質は、より短いフラグメントのアミノおよびカルボキシル末端の縮合により合成することができる。カルボキシル終端の活性化によりペプチド結合を形成する方法（カップリング試薬Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミドの使用によるような）は、当該技術分野において周知である。

【０８７２】

ＸＩＩ．抗原

興味のある典型的な抗原には、以下に記載するものが包含される：

【０８７３】

【表４】

表1

興味のある典型的な抗原（標的抗原）

ウイルス標的抗原	**標的抗原からの典型的な標的抗原配列**	**配列番号:**
BK	TLYKKMEQDVKVAHQ GNLPLMRKAYLRKCK TFSRMKYNICMGKCI	1 22 23
JC	SITEVECFL	2
エプスタイン・バー(EBV)	QPRAPIRPI	3
サイトメガロウイルス(CMV)	NLVPMVATV	4
HPV	YMLDLQPET(T)	5
インフルエンザ A	GILGFVFTL	6
腫瘍標的抗原およびそれらの誘導体ペプチド		
PRAME	LYVDSLFFL	7
WT1	RMFPNAPYL	8
スルビビン	ELTLGEFLKL	9
AFP	GVALQTMKQ	10
ELF2M	ETVSEQSNV	11
プロテイナーゼ3およびそのペプチドPR1	VLQELNVTV	12
好中球エラスターゼ	VLQELNVTV	13
MAGE	EADPTGHSY	14
MART	AAGIGILTV	15
チロシナーゼ	RHRPLQEVYPEANAPIGHNRE	16
GP100	WNRQLYPEWTEAQRLD	17
NY-Eso-1	VLLKEFTVSG	18
ハーセプチン	KIFGSLAFL	19
癌胎児性抗原（CEA）	HLFGYSWYK	20
PSA	FLTPKKLQCV	21
真菌標的抗原		
ブラストミセス・デルマティティディス（Blastomyces dermatitidis）	CELDNSHEDYNWNLWFKWCSGHGR TGHGKHFYDCDWDPSHGDYSWYLW DPSHGDYSWYLWDYLCGNGHHPYD DYLCGNGHHPYDCELDNSHEDYSW DPYNCDWDPYHEKYDWDLWNKWCN KYDWDLWNKWCNKDPYNCDWDPYH	24 25 26 27 28 29

【０８７４】

【表５】

表2

典型的な腫瘍およびそれらの腫瘍抗原

腫瘍	腫瘍関連標的抗原
急性骨髄性白血病	ウィルムス腫瘍1(WT1)、黒色腫の優先的に発現される抗原(PRAME)、PR1、プロテイナーゼ3、エラスターゼ、カテプシンG
慢性骨髄性白血病	WT1、PRAME、PR1、プロテイナーゼ3、エラスターゼ、カテプシンG
骨髄異形成症候群	WT1、PRAME、PR1、プロテイナーゼ3、エラスターゼ、カテプシンG
急性リンパ芽球性白血病	PRAME
慢性リンパ球性白血病	Surviving
非ホジキンリンパ腫	Surviving
多発性骨髄腫	New York esophageous 1 (NY-Eso1)
悪性黒色腫	MAGE、MART、チロシナーゼ、PRAME GP100
乳癌	WT1、ハーセプチン
肺癌	WT1
前立腺癌	前立腺特異抗原(PSA)
結腸癌	癌胎児性抗原(CEA)
腎細胞癌(RCC)	線維芽細胞増殖因子5(FGF-5)

【０８７５】

興味のある抗原からの任意の抗原性ペプチド（免疫原性フラグメントのような）は、興味のあるその抗原に特異的なＴ細胞の集団を生成するために用いることができる。ウイルスおよび腫瘍抗原のような、多数のそのような抗原性ペプチドは当該技術分野において既知である。本開示は、特定の抗原ペプチドを使用することに限定されない。興味のある抗原からの抗原性ペプチドの特定の例には、表１に示されるもののような、ウイルス、真菌および腫瘍に関連する抗原が包含されるがこれらに限定されるものではない。さらなる抗原性ペプチドは当該技術分野において既知である（例えば、両方とも引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｎｏｖｅｌｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５４（３）：１８７－２０７，２００５およびＣｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｐｙ，４：４１－８，２００２を参照）。

【０８７６】

表１は興味のある全長抗原の特定のフラグメントを開示するが、他のフラグメントもしくは全長タンパク質もまた本明細書に開示される方法において使用できることを当業者は認識する。一例において、興味のある抗原は全長抗原配列の「免疫原性フラグメント」である。「免疫原性フラグメント」は、抗体の生産のような、Ｂ細胞反応のような免疫反応を誘導するために用いることができるタンパク質の部分をさす。もちろんより長いフラグメントもまた使用することができるが、典型的には、そのようなフラグメントは全長抗原の８～１２個の連続するアミノ酸である。特定の例において、免疫原性フラグメントは、全長標的抗原配列からの８～５０個のアミノ酸、８～２０個のアミノ酸または１０、２０、３０、４０、５０、１００もしくは２００個の連続するアミノ酸のような、全長標的抗原配列からの８～１００個の連続するアミノ酸である。

【０８７７】

単一アミノ酸置換された抗原アナログの研究および内因的に結合した天然でプロセシングされたペプチドのシークエンシングによって、抗原性分子を製造するために必要なモチ

ーフに対応する重要な残基が同定されている（例えば、Ｓｏｕｔｈｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０：３３６３，１９９８；Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ４１：１７８，１９９５；Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：４７８，１９９８；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：１３，１９９４；Ｓｅｔｔｅ ａｎｄ Ｇｒｅｙ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：７９，１９９２を参照）。

【０８７８】

開示される発明の原理を適用することができる多数の可能な態様に関して、例示される態様は本発明の好ましい例にすぎず、そして本発明の範囲を限定すると考えられるべきではないことが認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は以下の請求項により定義される。従って、これらの請求項の範囲および精神の範囲内に入る全てを我々の発明として請求する。

【図１】

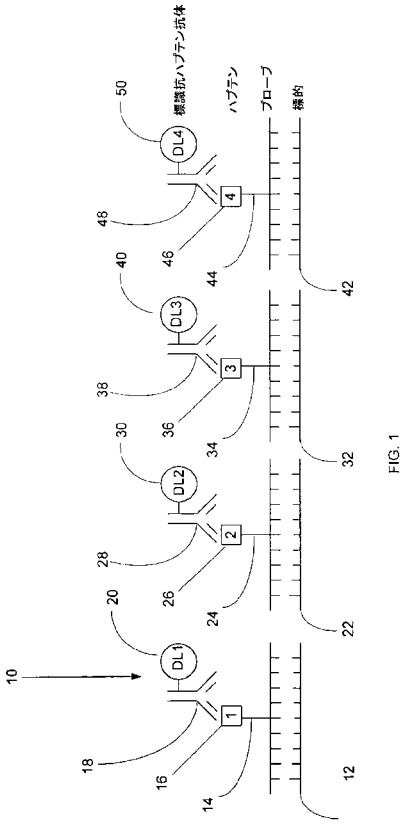


FIG. 1

【図２】

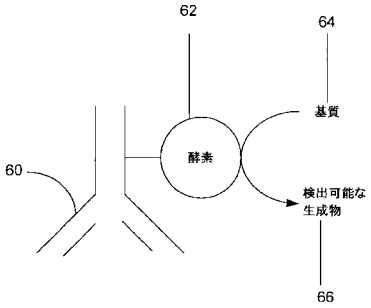


FIG. 2

【図３】

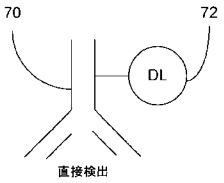
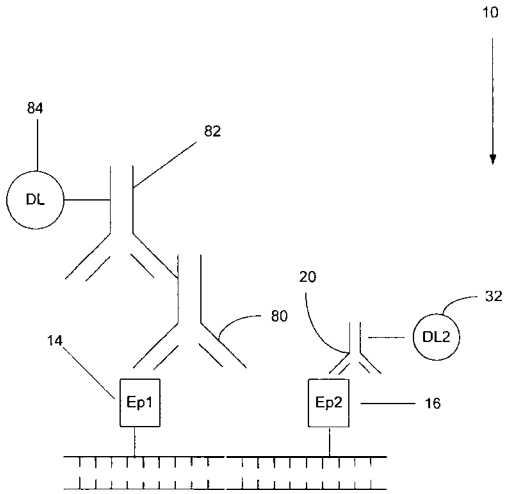


FIG. 3

【図４】

FIG. 4



【図５】

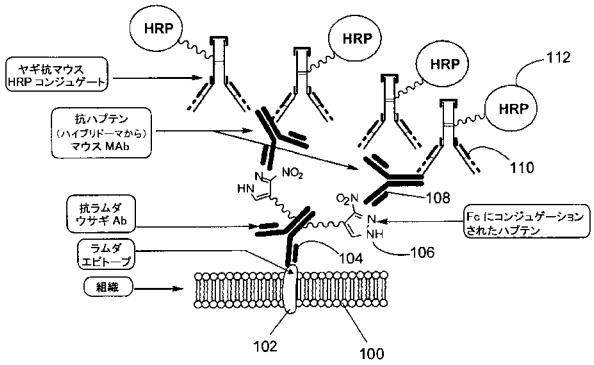


FIG. 5

【図６】

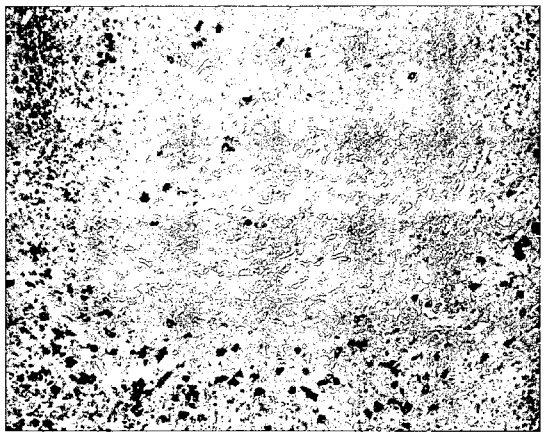


FIG. 6

【図７】

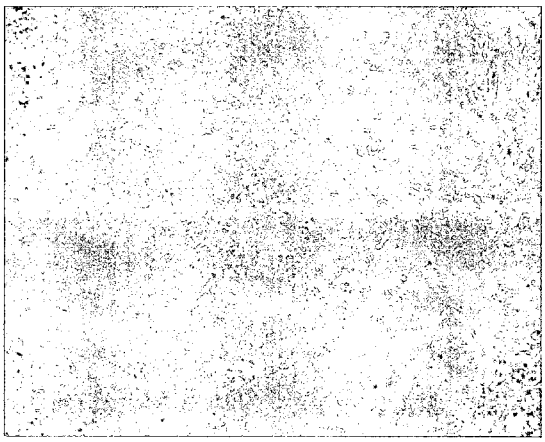


FIG. 7

【図８】

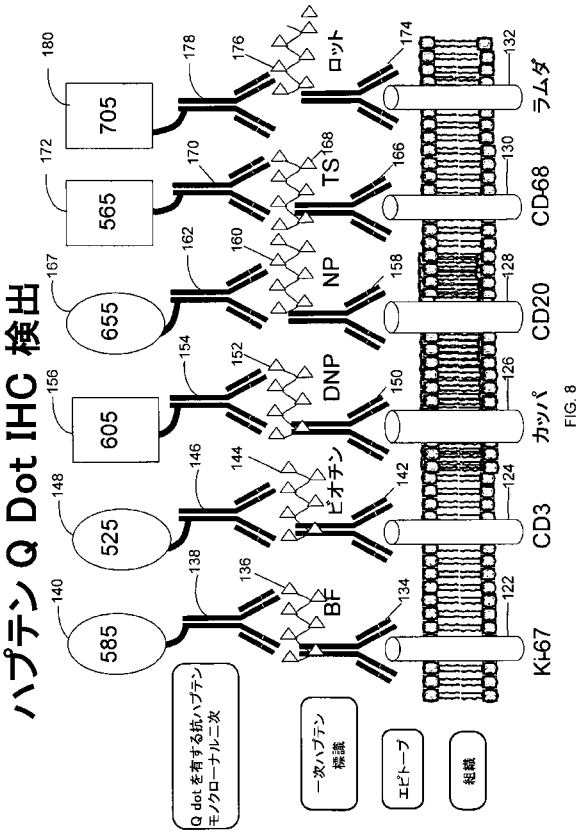


FIG. 8

【図９】

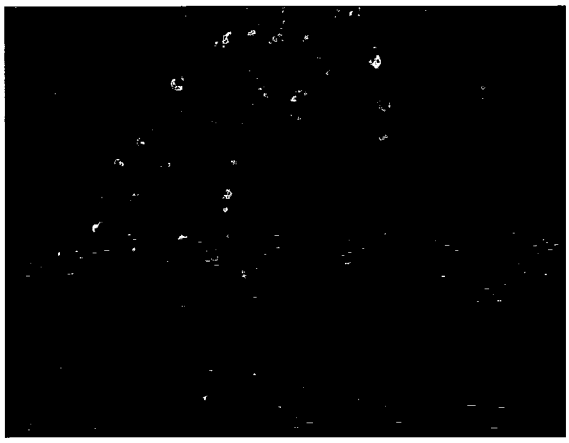


FIG. 9

【図１０】

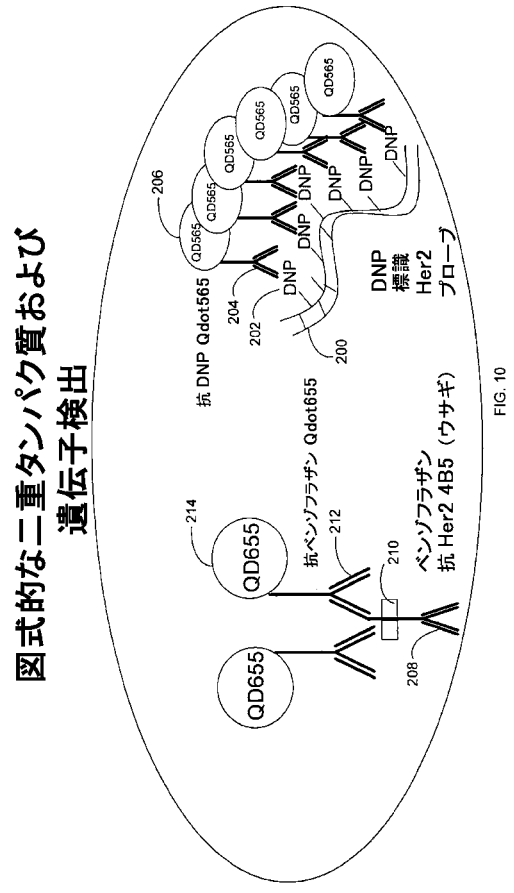


FIG. 10

【図１１】

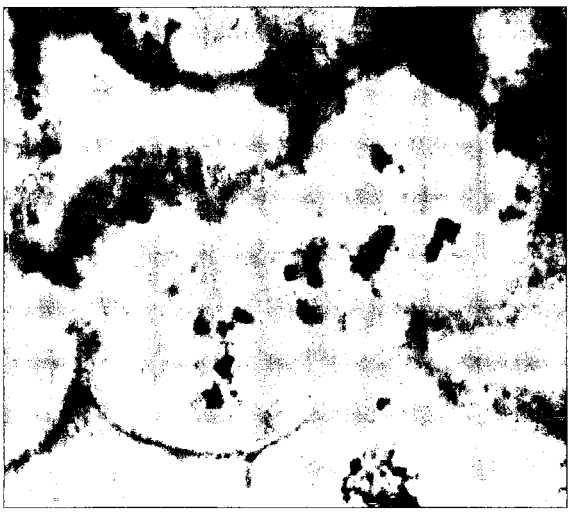


FIG. 11

【図１２】

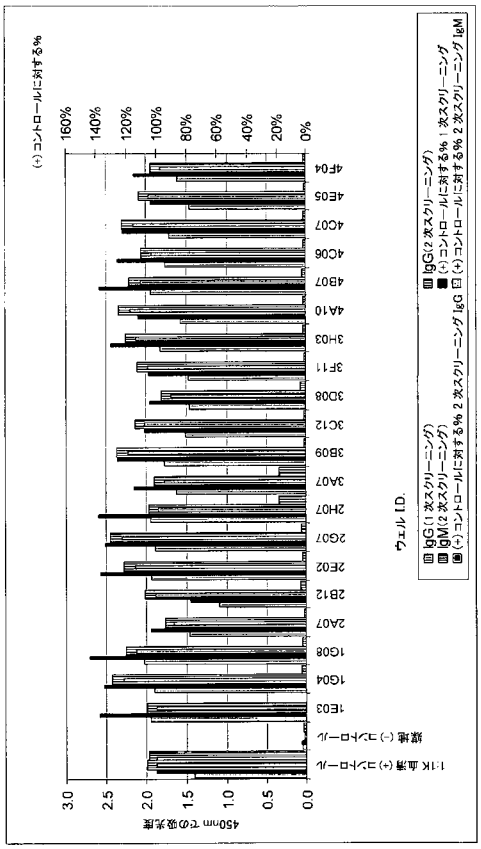


FIG. 12

【図１３】

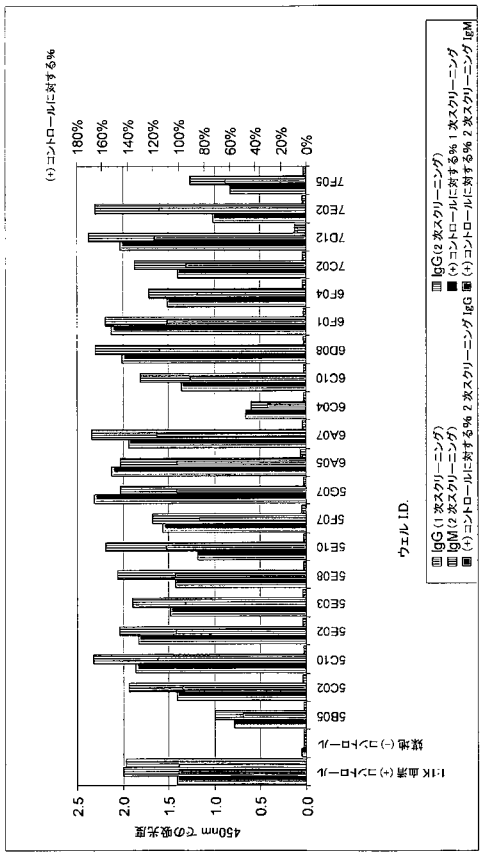


FIG. 13

【図１４】

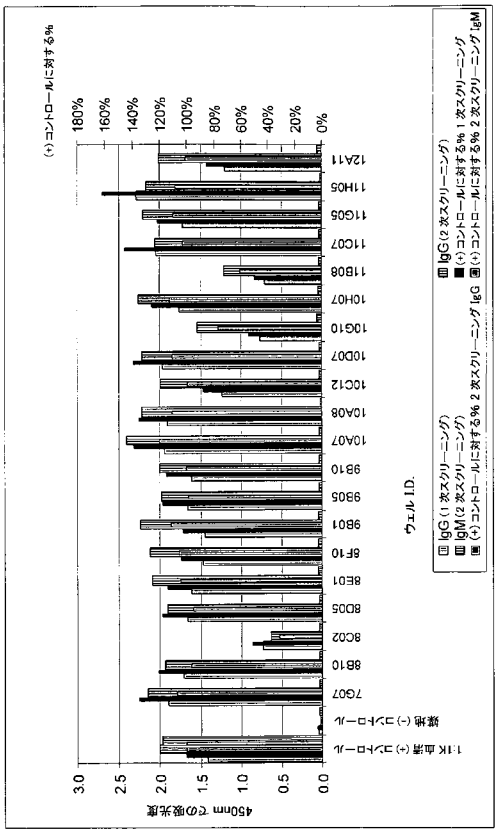


FIG. 14

【図１５】

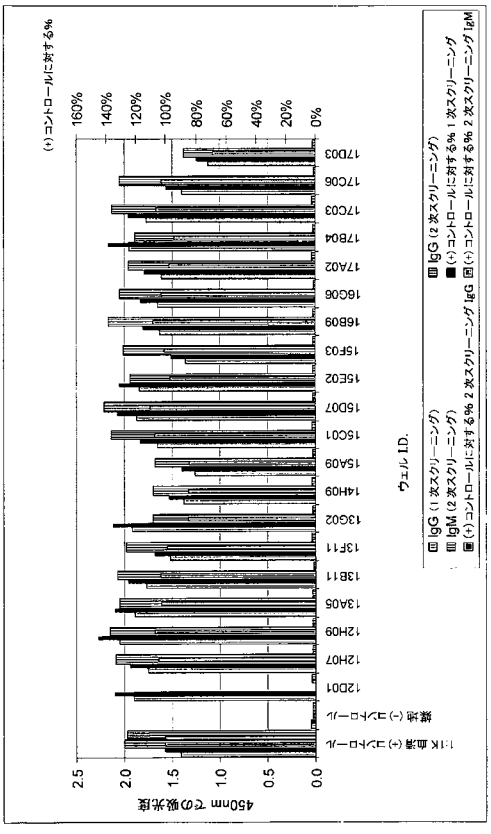


FIG. 15

【図１６】

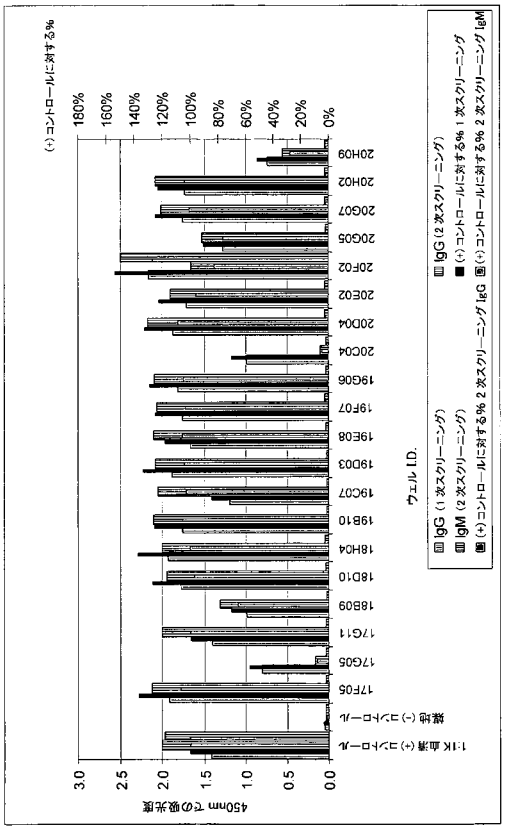


FIG. 16

【図１７】

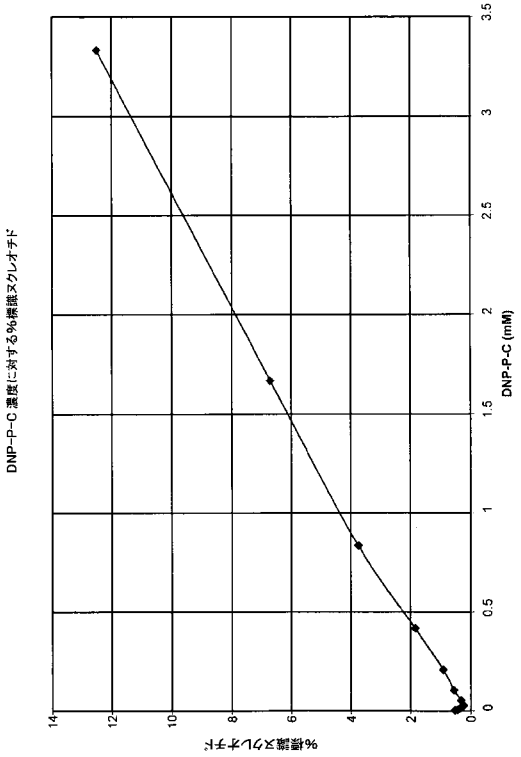


FIG. 17

【図１８】

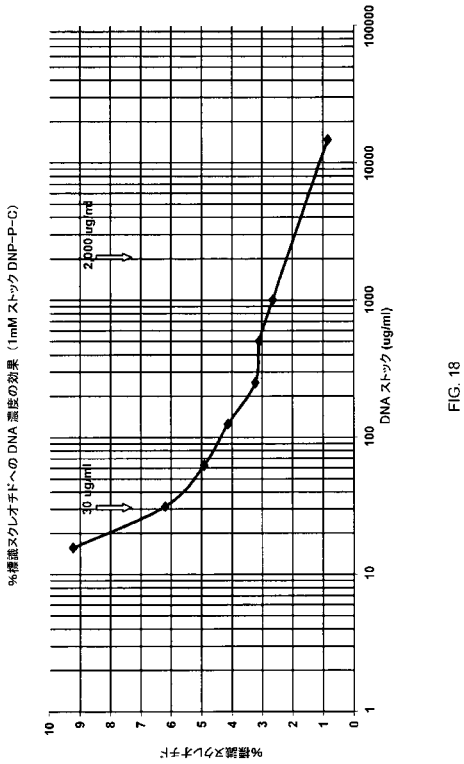


FIG. 18

【図１９】

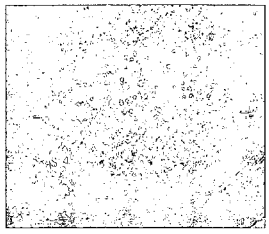


FIG. 19

【図２０】

FIG. 20

【図２１】

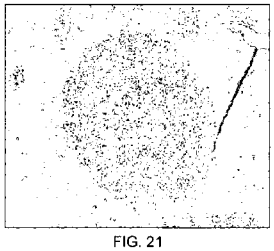


FIG. 21

【図２２】

FIG. 22

【図２３】

FIG. 23

【図２４】

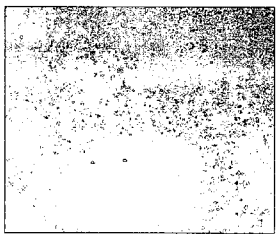


FIG. 24

【図２５】

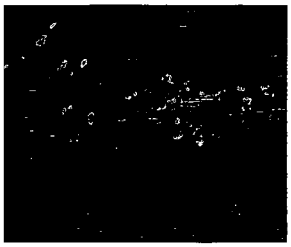


FIG. 25

【図２６】

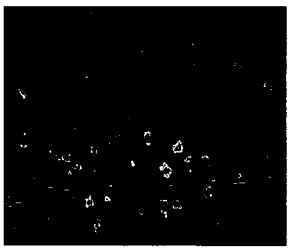


FIG. 26

【図２７】

FIG. 27

【図２８】

FIG. 28

【図２９】

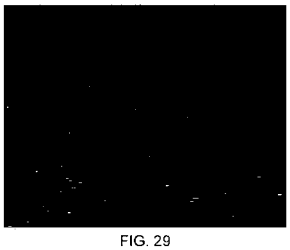


FIG. 29

【図３０】

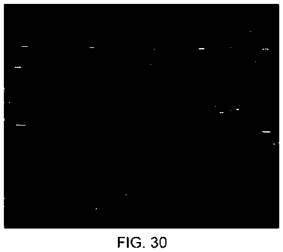


FIG. 30

【図３１】

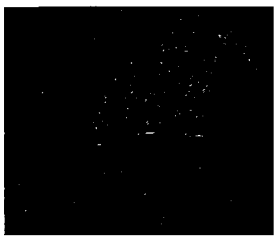


FIG. 31

【図３２】

FIG. 32

【図３３】

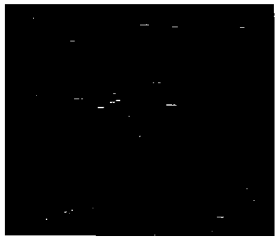


FIG. 33

【図３４】

FIG. 34

【図３５】

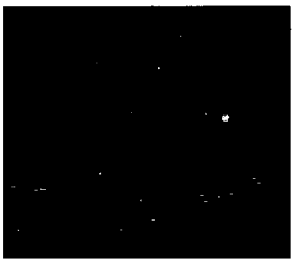


FIG. 35

【図３６】

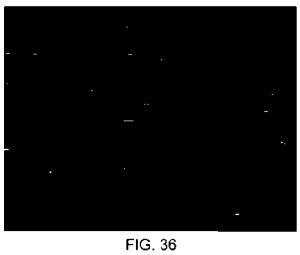


FIG. 36

【図３７】

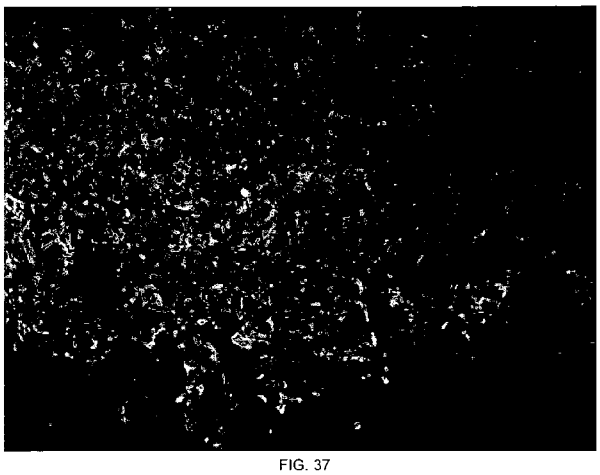


FIG. 37

【図３８】

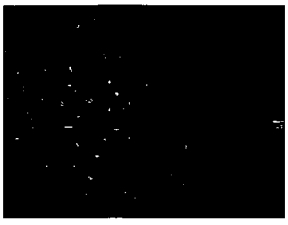


FIG. 38

【図３９】

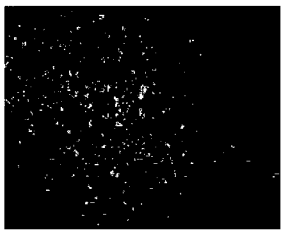


FIG. 39

【図４０】

FIG. 40

【図４１】

FIG. 41

【図４２】

FIG. 42

【図４３】

FIG. 43

【図４４】

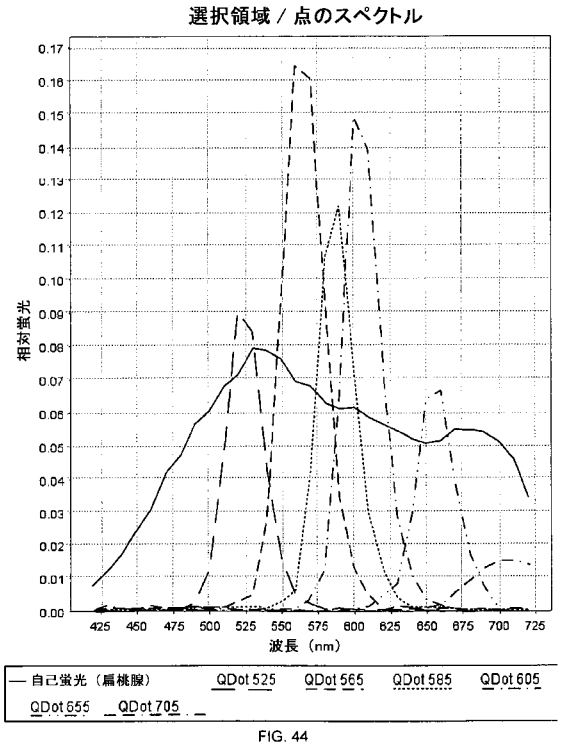


FIG. 44

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/23140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **G01N 33/53**(2006.01),**33/535**(2006.01),**33/533**(2006.01);**C07K 1/10**(2006.01),**1/13**(2006.01)

USPC: 435/7.1,7.9,7.93,7.94,7.95;436/546,815;530/402,403
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/7.1,7.9,7.93,7.94,7.95; 436/546,815; 530/402,403

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,230,683 (Decker et al) 23 October 1980.	1-5
A	US 4,490,473 (Brunhouse et al) 25 December 1984	1-5
A	US 4,495,296 (Neurath et al) 22 January 1985	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 September 2008 (02.09.2008)	23 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer SHAFIQUL HAQ Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/23140

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5 and 28-38

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/23140

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I, claims 1-74, drawn to a method for multiplex diagnostic assay utilizing binding moiety conjugated to enormous number of strcutually distinct haptens.
Group II, claims 75-170, drawn to enormous number of structurally distinct compounds.
Group III, claims 171-255, drawn to enormous number of structurally distinct hapten-carrier conjugates.
Group IV, claims 256-258, drawn to antibodies.
Group V, claims 259-260, drawn to a pharmaceutical composition.
Group VI, claim 261, drawn to an array.
Group VII, claims 262-266, drawn to a kit for enzyme immunoassay.
Group VIII, claim 267, drawn to a kit for identifying mammalian tumor.
Group IX, claim 268-270 and 284, drawn to a kit.
Group X, claim 271-276, drawn to an immunoassay process.
Group XI, claim 277, drawn to a method for identifying a mammalian tumor
Group XII, claim 278. drawn to a
Group XIII, claim 279, drawn to a method of making a hapten conjugate.
Group XIV, claim 280, drawn to a method for detecting a molecule of interest.
Group XV, claims 281-283, drawn to an anti-hapten antibody coupled to a detectable label.
Group XVI, claim 285 drawn to a method of developing multiplex assay.

The inventions listed in groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features common to all groups for the following reason: The method of group I requires two or more specific binding moieties conjugated to different haptens as special technical features whereas the compound of group II is not bound to any specific binding moieties. The hapten carrier conjugate comprising a hapten coupled to a carrier is not a special technical feature as required by the method of group I. Further the kit of claim 262 (group VIII) requires a happen not conjugated to a specific binding moiety and thus not have the special technical features as required by group I and thus the invention groups XVI do not share the same special technical feature and thus are not so linked as to form a single general inventive concept. Therefore, there in no single inventive concept under PCT Rule 13.1 and the lack of unity requirement is proper.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. The species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Therefore, an election of a single hapten is required from the following group:

1. Oxazole
2. Pyrazole
3. Thiozole
4. Benzofurazan
5. Triterpene
6. Nitroaryl
7. Urea
8. Thiourea.
9. Rotenoid.
10. Coumarin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/23140

11. Cyclolignan
12 Heterobiaryl
13. Azoaryl
14. Benzodiazepine.

Furthermore, each of the above group encompasses a large number of structurally and functionally diverse compounds when substituted with structurally divergent substitution groups and therefore, upon election of a single group from 1-14, applicant are required to elect a single species for the elected group including an exact definition of each substitution on the base molecule, wherein a single member at each substituent group or moiety is selected.

The species are independent or distinct because claims to the different species recite the mutually exclusive characteristics of such species. In addition, these species are not obvious variants of each other based on the current record. The species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Chemical structures, which are similar, are presumed to function similarly, whereas chemical structures that are not similar are not presumed to function similarly. The presumption even for similar chemical structures though is not irrefutable, but may be overcome by scientific reasoning or evidence showing that the structure of the prior art would not have been expected to function as the structure of the claimed invention. Note that in accordance with the holding of Application of Papesch, 50 CCPA 1084, 315 F.2d 381, 137 USPQ 43 (CCPA 1963) and In re Lalu, 223 USPQ 1257 (Fed. Cir. 1984), chemical structures are patentably distinct where the structures are either not structurally similar, or the prior art fails to suggest a function of a claimed compound would have been expected from a similar structure.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
APS, CAPLUS, STN structure search, GOOLGE
Search term: rotenoid, anti-rotenoid antibody, rotenoid conjugate, rotenoid hapten, anti-hapten antibody, hapten conjugate, immunoassays.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｄ 498/04	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	498/04	１０１	４Ｃ０８６
Ｃ０７Ｄ 243/12	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	243/12		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｄ 491/056	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	491/056		
Ａ６１Ｋ　39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｋ　38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ　31/7088	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｖ	
Ｃ０７Ｋ　14/765	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ｃ０７Ｋ　14/435	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/765		
Ｃ０７Ｋ　16/00	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/435		
Ｃ１２Ｎ　15/09	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		
		Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　ジヨンソン，ドナルド
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７５５トウーソン・ウエストブルークレストドライブ１００４
(72)発明者　フアレル，マイケル
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７０４トウーソン・プラシタデルカルド８６６２
(72)発明者　ジリナ，ザナ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７３７オロバリー・ナンバー３３０３・ノースオラクル９０９５
(72)発明者　ビーニアーツ，クリストフアー
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１８トウーソン・イーストクワイエトキヤニオンドライブ２２６３

Ｆターム(参考)　4B024 AA11 BA53 CA04 DA01 DA02 DA05 DA12 EA04 FA02 FA06
FA07 GA11 HA03 HA11
4C050 AA01 AA08 BB05 CC17 DD10 EE02 FF05 FF10 GG01 HH01
4C072 AA01 AA06 BB02 BB06 CC01 CC12 DD10 EE02 FF15 GG01
GG07 HH05 UU01
4C076 AA95 CC29 CC41 DD59 DD60 EE23 FF31
4C084 AA02 AA07 BA32 BA42 CA59 MA05 NA13 ZB26
4C085 AA13 BB24 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA07 NA13 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA50 BA51 BA55 CA40 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	半抗原，半抗原缀合物，其组合物及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2010508532A	公开(公告)日	2010-03-18
申请号	JP2009535326	申请日	2007-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	每次塔纳Medeikaru系统公司的Rete		
[标]发明人	コスメダージエリーダブリユー レフバーマーク ジヨンソンドナルド フアレルマイケル ジリナザナ ビーニアーツクリストフアー		
发明人	コスメダー,ジエリー·ダブリユー レフバー,マーク ジヨンソン,ドナルド フアレル,マイケル ジリナ,ザナ ビーニアーツ,クリストフアー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/547 G01N33/535 A61K47/48 A61K39/385 A61P35/00 C07D498/04 C07D243/12 C07D491/056 A61K39/395 A61K38/00 A61K31/7088 C07K14/765 C07K14/435 C07K16/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/04 C07D215/52 C07D231/16 C07D241/44 C07D243/12 C07D271/08 C07D271/12 C07D277/48 C07D277/76 C07D311/12 C07D417/12 C07D491/052 C07D491/056 C07D491/147 C07D493/04 C07D493/14 C07D495/04 C07D498/04 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/58 G01N33/582 G01N33/583 Y10S435/961 Y10S530/807 C12Q1/6804 C12Q1/6841 C12Q1/6886 G01N33/5308		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.J G01N33/547 G01N33/535 A61K47/48 A61K39/385 A61P35/00 C07D498/04.101 C07D243/12 C07D491/056 A61K39/395.D A61K37/02 A61K39/395.V A61K31/7088 C07K14/765 C07K14/435 C07K16/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4C050/AA01 4C050/AA08 4C050/BB05 4C050/CC17 4C050/DD10 4C050/EE02 4C050/FF05 4C050/FF10 4C050/GG01 4C050/HH01 4C072/AA01 4C072/AA06 4C072/BB02 4C072/BB06 4C072/CC01 4C072/CC12 4C072/DD10 4C072/EE02 4C072/FF15 4C072/GG01 4C072/GG07 4C072/HH05 4C072/UU01 4C076/AA95 4C076/CC29 4C076/CC41 4C076/DD59 4C076/DD60 4C076/EE23 4C076/FF31 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA32 4C084/BA42 4C084/CA59 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/BB24 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA07 4C086/NA13 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/BA51 4H045/BA55 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/856133 2006-11-01 US		
其他公开文献	JP5576120B2 JP2010508532A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于进行多重诊断测定的方法，例如用于样品中的两种或更多种不同靶标的方法。一个实施方案包括使样品与两个或更多个特异性结合两个或更多个不同靶标的特异性结合部分接触。两个或更多个特异性结合部分与不同的半抗原缀合，并且至少一个半抗

原是恶唑，吡唑，噻唑，除二硝基苯以外的硝基芳基化合物，苯并呋咱，三萜，尿素，硫脲，类胡萝卜素，香豆素，环木脂素，杂二芳基，偶氮芳基或苯并二氮杂卓。使样品与两种或更多种可以单独检测的不同抗半抗原抗体接触。两种或更多种不同的抗半抗原抗体可以与不同的可检测标记缀合。