

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3647845号
(P3647845)

(45) 発行日 平成17年5月18日(2005.5.18)

(24) 登録日 平成17年2月18日(2005.2.18)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/543
CO 7 K 5/02
CO 7 K 7/02
CO 7 K 14/16
CO 7 K 19/00

GO 1 N 33/543 5 2 5 E
CO 7 K 5/02 Z N A
CO 7 K 7/02
CO 7 K 14/16
CO 7 K 19/00

請求項の数 7 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-530643 (P2002-530643)
(86) (22) 出願日 平成13年9月26日(2001.9.26)
(65) 公表番号 特表2004-510160 (P2004-510160A)
(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/011118
(87) 国際公開番号 W02002/027315
(87) 国際公開日 平成14年4月4日(2002.4.4)
審査請求日 平成15年4月7日(2003.4.7)
(31) 優先権主張番号 100 48 417.4
(32) 優先日 平成12年9月29日(2000.9.29)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 591003013
エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCH
E AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人 100095832
弁理士 細田 芳徳
(72) 発明者 アンドレス, ヘルベルト
ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
77 カペレンヴィーゼ 39
(72) 発明者 ヨーゼル, ハンス-ペーター
ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 823
62 ウルメンシュトラーセ 28
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分枝リンカーを有する化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複合体の作製のための、一般式(I)：

$$Z_n - Y - X_m \quad (I)$$

〔式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である〕

で表わされる化合物の使用。

【請求項2】

複合体の作製のための、一般式(I)：

$$Z_n - Y - X_m \quad (I)$$

〔式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である〕

で表わされる化合物の使用。

【請求項3】

一般式(I)

10

20

$Z_n - Y - X_m$

〔式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している少なくとも1つの反応性官能基であり（ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体を含む分枝リンカーである）、nは1～10の整数であり、mは1または2である〕
で表わされる化合物。

【請求項4】

一般式(I)

$Z_n - Y - X_m$

〔式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している少なくとも1つの反応性官能基であり（ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体および少なくとも1つの親水性基を含む分枝リンカーである）、nは1～10の整数であり、mは1または2である〕

10

で表わされる化合物。

【請求項5】

少なくとも1つの生物学的物質と、請求項3または4記載の一般式(I)の化合物の少なくとも1つとを含有してなる複合体。

【請求項6】

該生物学的物質が抗体もしくは抗体断片、核酸、ポリペプチド抗原、免疫学的に反応性のペプチドまたはハプテンである請求項5記載の複合体。

20

【請求項7】

免疫学的検出法または核酸ハイブリダイゼーション法における請求項3または4記載の化合物または請求項5または6記載の複合体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、診断法または治療法における適用のための複合体を作製するための新しいリンカーおよびその使用に関する。

【0002】

数個の結合性基または/およびエフェクター基、例えば、標識基または固相結合性基または毒素を含有してなる複合体は、しばしば診断法または治療法において使用される。かかる複合体は、直接結合させることにより、または先行技術で公知のブリッジ構造もしくはリンカー構造を用いることにより調製されうる。複合体パートナー間または他の成分間の分子内および分子間相互作用を妨害することは、しばしば、かかる複合体の性質にとって不利である。

30

【0003】

診断試験において、これらの望ましくない分子内および分子間相互作用は、しばしば、シグナル、信号対雑音比、測定範囲の幅、ブランク値、検出下限の力学的範囲などの重要なアッセイパラメータの欠陥をもたらす。したがって、アッセイの相当な欠陥をもたらす。治療手順において、該相互作用がさらに、有効性または標的特異性の減少をもたらす。

40

【0004】

発光金属複合体の複合体のための先行技術で公知のリンカーの使用（欧州特許公開公報第0178450A号、欧州特許公開公報第0580979A号、国際公開第87/06706号パンフレット）は、例えば、アッセイの力学的範囲の低下をもたらす。かかる複合体の他の欠点は、タンパク質に対する非常に高い非特異的結合性および非常に高いブランク値である。しかしながら、類似の問題は、他の標識基および固相結合性基でも生じる。

【0005】

国際公開第96/03409号パンフレットおよび国際公開第96/03410号パンフレットには、金属錯体の反応性結合性基を配位子の1つに連結するリンカー内への遊離の正または/および負の電荷担体の導入、またはこれらの発光金属錯体内への親水性基の導

50

入が、これらの錯体の複合体の非特異的吸収を低減し、したがって、免疫アッセイにおいて試験感度ならびに該複合体の安定性および回収率が向上することが開示されている。さらに、ある場合においては、総収量 (quantum yield) の増加を達成することが可能である。

【 0 0 0 6 】

B r e d e h o r s t , R . らの *A n a l B i o c h e m* 1 9 3 (1 9 9 1) 2 7 2 - 9 には、主鎖としてインスリン A 鎖分子の 2 1 個のアミノ酸残基を含有する三官能性ハプテン - 発蛍光団複合体が記載されている。このように発蛍光基とハプテン間のリンカーの働きをするインスリン A 鎖は、直鎖リンカーであり、分枝リンカーではない。

【 0 0 0 7 】

最近の研究において、国際公開第 9 6 / 0 3 4 0 9 号パンフレットまたは国際公開第 9 6 / 0 3 4 1 0 号パンフレットによる親水性または帯電リンカーの使用は、試験成績において相当な利益をもたらすことがわかったが、かかる複合体を用いた場合でも、ブランク値は該系ブランク値よりも相当高い。したがって、非特異的結合の低減により、ブランク値をさらに低下させることが望ましいと思われる。また、標識基と他の試験化合物間の非特異的な分子内および分子間相互作用は、シグナル生成量 (signal yield) および該標識基の接近性 (accessibility) に悪影響を及ぼすことなく低減されるべきである。

【 0 0 0 8 】

驚くべきことに、前記の欠点は、帯電担体または / および親水性基を特に側鎖に有する分枝リンカーを使用することにより排除されることがわかった。また、これらの分枝リンカーは、診断もしくは治療法において、またはスクリーニング目的のために使用される他の種類の複合体における改善をもたらす。

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の主題は、複合体作製のための、一般式 (I) :



式中、Z は少なくとも 1 つの反応性官能基または結合性基であり、X は、リンカー Y を介して Z に共有結合している反応性官能基であり (ここで、該リンカーは、1 0 0 0 D a 以上の分子量を有し、かつ少なくとも 1 つの電荷担体または / および少なくとも 1 つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、n は 1 ~ 1 0 の整数、好ましくは 1 ~ 4 の整数であり、m は 1 または 2、好ましくは 1 である、
の多官能性化合物の使用である。

【 0 0 1 0 】

Z 基は、1 回または数回生じ得、各場合において、独立して反応性官能基または結合性基でありうる。該結合性基の例は、標識基またはエフェクター基である。エフェクター基は、例えばバイオアフィン (bioaffine) 結合対の他方のパートナーと特異的に相互作用しうるバイオアフィン結合対のパートナーである。

【 0 0 1 1 】

標識基は、染料などの任意の検出可能な公知の基、化学発光基などの発光標識基、例えばアクリジニウムエステルもしくはジオキセタン、または蛍光染料、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レソルフィン (resorufin)、シアニンおよびその誘導体から選択されうる。標識基の他の例は、ルテニウム錯体もしくはユーロピウム錯体などの発光金属錯体または C E D I A (クローン化酵素ドナー免疫アッセイ (Cloned Enzyme Donor Immunoassay)、例えば欧州特許第 0 0 6 1 8 8 8 号) に使用されるような酵素、マイクロ粒子 (microparticles) またはナノ粒子 (nanoparticles)、例えばラテックス粒子もしくは金属ゾルならびに放射性同位体である。

【 0 0 1 2 】

好ましい態様において、標識基は発光金属錯体であり、該化合物は一般式 (I I) :



10

20

30

40

50

式中、

Mは、希土類金属イオンまたは遷移金属イオンから選ばれる二価または三価の金属カチオンであり、 L_1 、 L_2 および L_3 は、同じかまたは異なっており、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子を表し、かつ窒素原子を介して金属カチオンに結合しており、Xは、リンカー-Yを介して配位子 L_1 、 L_2 および L_3 の少なくとも1つに共有結合している反応性官能基であり、nは1~10の整数、好ましくは1~4の整数であり、mは1または2、好ましくは1であり、Aは電荷を一様にするために必要でありうる対イオンを表す、

の構造を有する。

【0013】

金属錯体は、好ましくは発光金属錯体、すなわち、適切な励起後に検出可能な発行反応を行なう金属錯体である。発光反応は、例えば、蛍光測定により、もしくは電気化学発光(electrochemiluminescence)測定により検出され得る。この錯体における金属カチオンは、例えば、遷移金属または希土類金属である。該金属は、好ましくは、ルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、クロムまたはタングステンである。ルテニウム、イリジウム、レニウム、クロムおよびオスミウムが特に好ましい。ルテニウムが最も好ましい。

【0014】

配位子 L_1 、 L_2 および L_3 は、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子である。ピピリジル、ピピラジル、テルピリジル(terpyridyl)およびフェナントリル(phenanthrolyl)などの芳香族複素環が好ましい。配位子 L_1 、 L_2 および L_3 は、特に好ましくは、ピピリジン環系およびフェナントロリン環系から選ばれる。

【0015】

該錯体は、電荷を一様にするための1つ、または数個の対イオンAをさらに含む。好適な負の帯電対イオンの例は、ハロゲン化物、 OH^- 基、カーボネート基、アルキルカルボキシレート基、例えばトリフルオロアセテート基、スルフェート基、ヘキサフルオロホスフェート基およびテトラフルオロボレート基である。ヘキサフルオロホスフェート基、トリフルオロアセテート基およびテトラフルオロボレート基が特に好ましい。好適な正の帯電対イオンの例は、アルカリ金属イオンおよびアンモニウムイオンなどの一価カチオンである。

【0016】

他方において、Z基は、結合パートナーと特異的に、好ましくは非共有結合的に相互作用するエフェクター基でありうる。好適な結合パートナーの例は、ハプテンまたは抗原/抗体、アミノピオチン、イミノピオチンまたはデスチオピオチンなどのピオチンまたはピオチンアナログ/アビジンまたはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸または核酸アナログ/相補核酸、レセプター/配位子、例えばステロイドホルモンレセプター/ステロイドホルモンであり、この場合、結合対の一方のパートナーはエフェクター基であり、したがって化合物(I)の成分である。

【0017】

さらに好ましい態様では、Zは治療上活性な物質、例えば毒素、またはプロ毒素、例えば抗腫瘍物質でもあり得る。

【0018】

複合体を調製するために、化合物(I)がリンカー分子として使用される。このプロセスにおいて、結合パートナー、特に上述のような結合パートナーを化合物(I)の少なくとも1つの遊離官能基に共有結合させる。

【0019】

得られる結合生成物は、分枝リンカー-Yを介して互いに連結された少なくとも2つの、好ましくは異なる結合性基を含有する。

10

20

30

40

50

【0020】

化合物(I)または錯体(II)の反応性官能基XまたはZは、生物学的物質に共有結合されうる反応性基である。X基は、好ましくは、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸無水物、カルボン酸ヒドラジド、カルボン酸アジドなどの活性化カルボン酸基、または活性エステル、例えばN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、イミダゾリルエステルもしくはN-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、アミン、マレイミド、チオールまたは光活性化性基、例えばアジドである。該化合物は、同じか異なりうる1つまたは数個の官能基XまたはZを含有しうる。XおよびZは、好ましくは異なっている。Zが官能基である場合、これは好ましくは1つだけで存在する。Zが結合性基である場合、それは、数個、例えば10個まで存在しうる。官能基または結合性基Zは、それぞれ同じか異なり得、任意に保護基によりブロックされている。しかしながら、X基とZ基を足した総数は、少なくとも2である、すなわち該化合物は、少なくとも二官能性化合物、好ましくは少なくともヘテロ二官能性化合物である。ヘテロ二官能性リンカーのための適切な活性基は、Aslam M., Dent A., Bioconjugation (1998) Mcmillan Reference Ltd., London, p216-363に記載されている。

10

【0021】

リンカーの分子量は、少なくとも1000Daである。これは、リンカーの利点が特に明白になるからである。リンカーの分子量は、好ましくは1000~50,000Daの範囲であり、特に1000~20,000Daの範囲であり、最も好ましくは1000~1

20

【0022】

化合物(I)および金属錯体(II)は、XとZ間のリンカーYが、少なくとも1つの電荷担体またはノおよび少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーであるという点で先行技術と異なる。本発明の文脈において、「電荷担体」という用語は、pH値が6~8の範囲で、主にイオン形態で存在する基を意味する。リンカーは、好ましくは70個まで、特に好ましくは1~40個、最も好ましくは2~20個の、かかる電荷単体を含有する。

【0023】

リンカーは、特に好ましくは少なくとも1つの負の電荷担体を含有する。好適な負の電荷担体の例は、ホスフェート基、ホスホネート基、スルフィネート基、スルホネート基、スルフェート基およびカルボキシレート基であり、カルボキシレート基およびホスフェート基が最も好ましい。

30

【0024】

正の電荷担体の例は、アミノ基および一アルキルアミノ基、二アルキルアミノ基もしくは三アルキルアミノ基(ここで、アルキル基は、炭素数が1~6である直鎖もしくは分枝アルキル残基、または炭素数が3~6である環状アルキル残基を表す)などの一置換アミノ基または多置換アミノ基である。正の電荷担体は特に好ましくは、リシンなどの塩基性アミノ酸、またはジエチルリシンもしくはジプロピルリシンなどの置換アミノ酸から選ばれる。アミンおよび置換アミンもまた、電気化学発光による金属錯体検出のための電子供与体として使用しうる。

40

【0025】

リンカーはまた、電荷担体の代替物として、または電荷担体に加えて非帯電親水性基を含みうる。非帯電親水性基の好ましい例は、エチレンオキシド基もしくは、好ましくは少なくとも3つのエチレンオキシド単位を有するポリエチレンオキシド基、スルホキシド基、スルホン基、カルボン酸アミド基、カルボン酸エステル基、ホスホン酸アミド基、ホスホン酸エステル基、リン酸アミド基、リン酸エステル基、スルホン酸アミド基、スルホン酸エステル基、硫酸アミド基および硫酸エステル基である。アミド基は好ましくは第一級アミド基であり、特に好ましくは、例えばアミノ酸アスパラギンおよびグルタミンの、アミノ酸側鎖基のカルボン酸アミド残基である。エステルは、好ましくは、親水性アルコール

50

、特にC₁ ~ C₃ アルコールまたはジオールまたはトリオールに由来するものである。

【0026】

本発明の文脈において、「分枝」という用語は、リンカーがZ基とX基との間に主鎖と、さらにこの主鎖を起点とする1つまたは数個の側鎖とを含有することを意味する。電荷担体および親水性基は、主鎖または/および側鎖に位置しうる。本発明のリンカーが数個のZ基およびX基を含有する場合、主鎖それ自体がすでに分枝でありうる。しかしながら、いずれの場合でもリンカーは、Z基およびX基を全く含有しない1つまたは数個の側鎖をさらに含有する。側鎖の数は、好ましくは1 ~ 10であり、特に好ましくは2 ~ 6であり、最も好ましくは2 ~ 4個である。

【0027】

本発明の好ましい態様では、リンカーは、上述のような非帯電親水性基、特にカルボン酸アミド基または/およびポリエチレングリコール基を1つまたは数個含有する主鎖を含有するとともに、1つまたは数個の側鎖に電荷担体が少なくとも1つ存在する。この場合、例えば、1つの側鎖あたり1 ~ 10個の電荷担体、特に1 ~ 5個の電荷担体が存在しうる。あるいはまた、リンカーは、主鎖に電荷担体を、1つまたは数個の側鎖に非帯電親水性基を含有しうる。また、さらなる態様では、主鎖および側鎖が、電荷担体とともに非帯電親水性基を含有することが想定されうる。

【0028】

分枝リンカーが、意図する結合化学的特性を妨害しうるXおよびZ以外の基、例えば、-COO⁻基または-NH₂基などを含有する場合、合成および/または結合の際に当業者に公知の適切な保護基を使用する。ペプチド側鎖内の末端-NH₂基は、好ましくは、例えば、アセチル化またはスクシニル化により不活性化する。

【0029】

リンカーの主鎖の長さは、好ましくは7 ~ 200原子であり、特に好ましくは7 ~ 100原子である。主鎖は、ヘテロ原子、例えばO原子、またはアミド基を含有させることにより修飾されたアルキレン鎖であり、少なくとも1つの分枝部を含有する。分枝部に形成される側鎖は、好ましくは4 ~ 100原子の長さを有する。

【0030】

電荷担体は、好ましくは、主鎖のアルキレン単位のH原子または/および側鎖内のH原子が電荷担体を含有する基、例えばNH₃⁺またはCO₂⁻で置換されるようにリンカー内に位置する。

【0031】

遊離の電荷担体または/および親水性基を含有する分枝リンカーは、好ましくは、少なくとも部分的に、ペプチド結合により互いに連結されたアミノカルボン酸単位から構成される。かかるリンカーにおいて、分枝点は多官能性アミノカルボン酸に由来し得、該多官能性アミノカルボン酸は、主鎖への導入後もなお1つの官能基が存在するような、少なくとも3つの官能基、例えばアミノ基もしくはカルボキシ基を含有し、かつ側鎖の合成の開始点として使用しうる。分枝は、特に好ましくは、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシンなどのジアミノカルボン酸を用いて作製する。

【0032】

分枝リンカーの電荷担体は、好ましくは、多官能性アミノカルボン酸の遊離の正または/および負の帯電基に由来し得、該多官能性アミノカルボン酸は、リンカーへの導入および2つの帯電基の同時反応後もなお少なくとも1つの遊離の電荷担体が存在するような、総数が少なくとも3つの帯電基、例えば、アミノ基、カルボキシレート基もしくはホスフェート基を含有する。例えば、電荷担体は、(a) 1つのアミノ基および2つのカルボキシレート基、または(b) 2つのアミノ基および1つのカルボキシレート基を含有する三官能性アミノカルボン酸に由来しうる。かかる三官能性アミノカルボン酸の例は、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸、欧州特許公開公報第0618192号または米国特許第5,519,142号明細書に記載のような対称三官能性カルボン酸である。あるいはまた、三官能性アミノカルボン酸(a)内のカルボキ

10

20

30

40

50

シレート基の1つは、ホスフェート、スルホネートまたはスルフェート基で置換されうる。かかる三官能性アミノ酸の例は、ホスホセリンである。

【0033】

あるいはまた、分枝リンカーは、ホスフェート-糖単位、例えば、核酸塩基 (nucleobase) を有しないDNA主鎖から少なくとも部分的に構成され得るか、またはグリコペプチド構造から構成されうる。さらにまた、リンカーは、少なくとも部分的にサッカリド単位から構成されうる。いずれの場合においても、リンカーの側鎖は、好ましくは三官能性単位により構成される主鎖の分枝部に位置しており、側鎖の長さは、合成に使用される少なくとも2つの構成 (building) ブロック、例えば、天然もしくは合成のアミノ酸、またはエチレングリコールなどの他の成分である。

10

【0034】

好ましくは、分枝親水性リンカーは、非特異的結合により引き起こされる問題を低減するために、免疫学的手順において使用される。

【0035】

本発明のリンカー分子を構築するために、非天然のアミノ酸、および例えばジペプチドUEまたはUQのような非天然の配列モチーフを使用するのが有利であることがわかっている。これは、血清学的アッセイ、すなわち患者の血清中の抗体を検出するために設定されたアッセイにおいて特に有利であることが証明されている。非天然のアミノ酸を有するリンカーは、プロテアーゼに対して、例えば血清または血漿中のプロテアーゼに対してむしろ安定であることが証明されており、したがって、本発明のさらに好ましい態様を示す

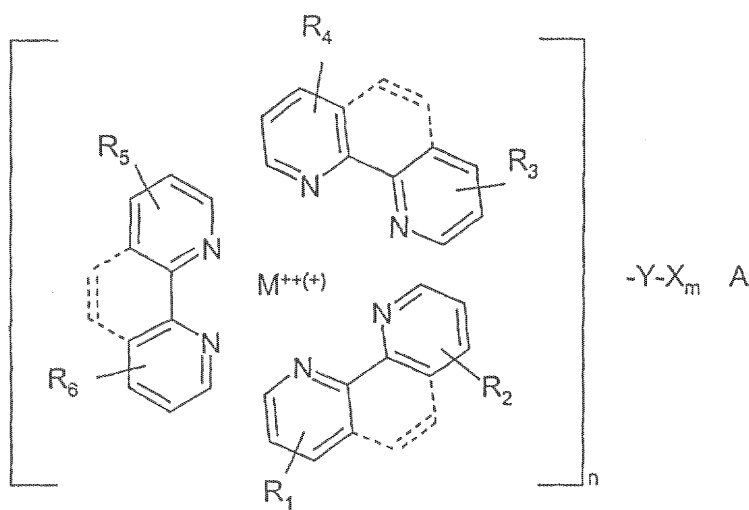
20

【0036】

本発明の一態様において、金属錯体を含有する分枝リンカーは、一般式 (III) :

【0037】

【化1】



30

40

【0038】

式中、M、X、A、nおよびmは先に定義した通りであり、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ およびR₆ は、同じかまたは異なっており、それぞれ、1つまたは数個の置換基を表すが、Xは、置換基R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ またはR₆ の1つおよびリンカーYを介して配位子の1つに結合している、
を有する。

【0039】

錯体の配位子は、点線で示された基が存在するかしないかに応じて、任意に置換されたフ

50

エナントロリン系またはピピリジン系である。

【0040】

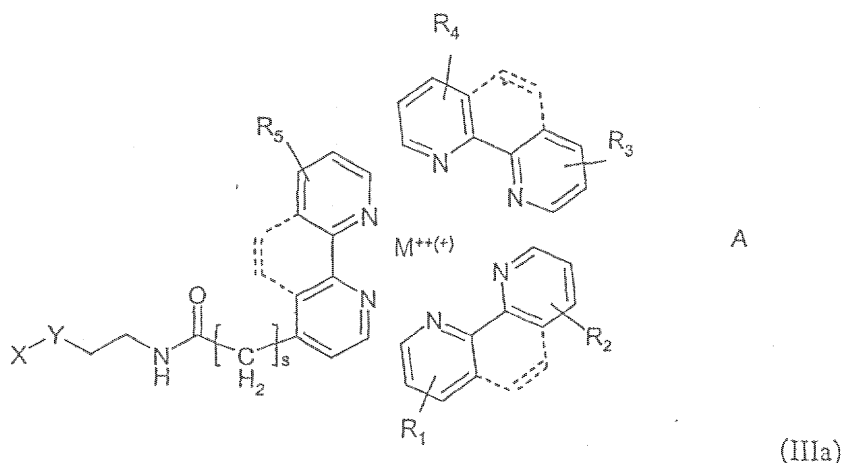
配位子上の置換基 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は、好ましくは水素、 $C_1 \sim C_5$ アルキル、特に $C_1 \sim C_3$ アルキル、フェニル、または上述のような親水性基であるが、これらは、リンカー Y を含有しないものとする。

【0041】

特に好ましい態様では、金属錯体を含有する分枝リンカーは、一般式 (IIIa) :

【0042】

【化2】



10

20

【0043】

式中、 M 、 X および A は先に定義した通りであり、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は先に定義した通りであり、 s は、 $0 \sim 6$ の整数、好ましくは $1 \sim 4$ の整数であり、 Y は遊離の電荷担体または \wedge および親水性基を有する分枝リンカーを表す、
を有する。

【0044】

標識基として金属錯体を有するか、またはエフェクター基としてビオチンを有し、反応性官能基としてリシンのアミノ側鎖基を有する、式 (I) の化合物の例を図 1 ~ 7 に示す。リンカーの分枝点は、2つのアミノ基および1つのカルボキシレート基を有する三官能性アミノ酸であるリシンにより形成される。リンカーの主鎖内ペプチド結合を形成するために1つのアミノ基および1つのカルボキシレート基が使用されるが、側鎖の合成のための開始点としては第2のアミノ基が使用される。遊離の電荷担体は、グルタミン酸側鎖から形成される。図 8 において、リシンアミノ基は、フェニルアセチル (Phac) によりブロックされる。リンカー内の1つまたは数個の反応性基の保護基、例えばフェニルアセチルまたは \wedge および全体の構造と適合性である他の保護基によるブロッキングはまた、不安定な結合基が化合物 (I) 内に導入されやすくする。

【0045】

反応性カルボキシレート基を、例えば、 N -ヒドロキシスクシンイミドまたはジスクシンイミジルスベレート (disuccinimidyl succinate) (DSS) との反応により活性エステルに変換しうる (図 12 参照のこと)。あるいはまた、第一級アミノ基を、マレイミドヘキサノイル- N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (MHS) との反応によりマレイミド基に変換しうる (図 9 ~ 11 参照のこと)。

【0046】

一例として金属錯体を用いた本発明の化合物の調製を以下に詳細に記載する。例えば、ビオチンまたはペプチド抗原をエフェクター基として含有する他の化合物は、同様にして調製しうる。

30

40

50

【0047】

金属錯体のN-複素環配位子などの標識基上または固相結合性基上の帯電した分枝リンカーの合成は、任意に部分的に保護されたアミノカルボン酸を、配位子の反応性基、例えばカルボン酸にカップリングさせることにより、溶液中でのカップリング反応として行なうことができる。この結合段階は、所望の長さの分枝リンカーが合成されるまで任意に繰り返し得る。このプロセスにおいて、1つまたは数個の帯電側鎖基を含有する少なくとも1つの多官能性アミノカルボン酸が導入される。

【0048】

続いて、反応性基Xが導入され、該アミノカルボン酸の側鎖基上に存在しうる保護基を除去する。溶液中で連続的にアミノ酸を結合することによる配位子の合成は、単一の配位子において起こり得るし、出発物質としての金属錯体にすでに結合している配位子でも起こり得る。好適な出発物質は、例えば、遊離のカルボキシレート基を含有する発光性金属錯体である。かかる金属錯体は、上述の文献から公知であり、また、例えばIgen Inc. Company, Rockville, MD, USAにより商品としても提供される。

10

【0049】

他方において、分枝リンカーは、固相ペプチド合成によっても調製しうる。固相合成の第1の態様では、アミノ酸を、そのカルボキシレート基により固相支持体に結合させ、次いで、さらにアミノ酸を連続的にカップリングさせることにより所望のリンカーを合成する。このプロセスでは、側鎖基として帯電基、例えばアミノ基またはカルボキシレート基を含有する少なくとも1つのアミノ酸、および分枝部となり、かつ任意に保護された形態である少なくとも1つのアミノ酸を用いて本発明のリンカーを調製する。所望のリンカー配列が完成した後、活性化された金属錯体、例えば活性エステルを、固相に結合したペプチドの遊離N-末端アミノ基に結合させうる。固相から切り離した後、反応性基Xをペプチドリンカーのカルボキシ末端に結合させることができ、存在しうる保護基を除去する。

20

【0050】

固相合成の別の様式においては、保護されたアミノ基およびカルボキシレート基を含有するアミノ酸-金属錯体複合体、例えばFmoc-Lys(-Ru(ピリジル)₃-OH)を、遊離カルボキシレート基により固相に固定させ得、ブロックされたアミノ基を切り離した後、ペプチドリンカーが合成されうる。所望のリンカー配列が完成した後、錯体を固相から切り離し、少なくとも元のカルボキシレートアンカー基を遊離の電荷担体として含有するリンカーを得る。得られたペプチドリンカーのアミノ末端に反応性基Xをカップリングさせうる。

30

【0051】

固相合成のさらなる手順において、電荷担体を有する分枝リンカー配列を、選択したペプチドエピトープ上で直接合成することもできる。

【0052】

また、上述の合成変形型の組み合わせを用いて本発明の化合物を調製することができる。帯電リンカーを有する本発明の錯体の固相合成に好適なアミノ酸-金属錯体複合体は、独
国特許44 30 998.8号に記載されている。これによりこの開示に対して言及が
なされる。

40

【0053】

本発明のさらなる主題は、上述のような一般式(I)の化合物である。

【0054】

本発明のさらなる主題は、少なくとも1つの本発明の化合物(I)がカップリングした少なくとも1つの生物学的物質を含有してなる複合体である。生物学的物質の例は、細胞、ウイルス、亜細胞粒子、タンパク質、リポ蛋白、糖蛋白、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ペプチド核酸(PNA)、オリゴ糖、多糖類、リポ多糖類、細胞代謝物、ハプテン、ホルモン、薬理的物質、アルカロイド類、ステロイド類、ビタミン類、アミノ酸および糖類である。

50

【 0 0 5 5 】

生物学的物質の官能基に共有結合しうる化合物の反応性官能基により、化合物を生物学的物質にカップリングさせる。官能基が活性エステルである場合、それは、例えば、生物学的物質の遊離アミノ基に結合しうる。官能基がマレイミド残基である場合、それは、例えば、生物学的物質の遊離 S H 基に結合しうる。

【 0 0 5 6 】

本発明の特に好ましい態様では、化合物は、好ましくは最大 5 0 個のアミノ酸長、特に好ましくは最大 3 0 個のアミノ酸を有するペプチドに結合する。これらのペプチドは、好ましくは、所望のアミノ酸配列のペプチドを固相上で合成することにより調製され、この間に、 a) 固相結合性基または / および標識基、例えば活性化された金属錯体、好ましくは金属錯体 - 活性エステル誘導体がペプチドの N - 末端アミノ基にカップリングする、または / および b) エフェクター基または / および標識基、例えばハプテンまたは金属錯体に共有結合したアミノ酸誘導体が、合成中にペプチドの少なくとも 1 つの位置に導入される。例えばペプチドの N - 末端アミノ酸へのエフェクター基または / および標識基のカップリングは、好ましくは、固相からペプチドを切り離す前、およびペプチド合成に使用されるアミノ酸誘導体の反応性側鎖基上の保護基を除去する前に行なわれる。

10

【 0 0 5 7 】

ペプチドは、好ましくは、 1 つまたは数個の免疫学的に反応性のエピトープ領域を含有する。これらのエピトープ領域は、好ましくは、病原性微生物、例えば細菌、ウイルスおよび原生動物、または自己免疫抗原に由来する。該エピトープ領域は、特に好ましくは、ウイルス抗原に由来し、 H I V I、 H I V I I、 H I V O または C 型肝炎ウイルス (H C V) のアミノ酸配列に相当する。

20

【 0 0 5 8 】

生物学的物質のさらに好ましい例は、ビオチン、毒素、プロ毒素 (p r o t o x i n)、核酸、抗体もしくは抗体断片、ポリペプチド抗原、すなわち免疫学的に反応性のポリペプチドまたはハプテンすなわち 1 5 0 ~ 2 0 0 0 の分子量を有する有機分子、特に、カルデノライド、カルデノライドグリコシド (例えば、ジゴキシン、ジゴキシゲニン)、ステロイドアルカロイド、性ホルモン (例えば、プロゲステロン)、グルココルチコイドなどのステロイド骨格を有する分子である。ハプテンの他の例は、プロスタグランジン、ロイコトレイン (l e u c o t r e i n e)、ロイコ - エン - ジイン (l e u c o - e n - d i

30

【 0 0 5 9 】

本発明のまたさらなる主題は、検出方法、例えば免疫学的検出方法または核酸ハイブリダイゼーション法、特に発光アッセイにおける、本発明の化合物または本発明の複合体の使用である。

【 0 0 6 0 】

金属錯体を標識基として使用する場合、それは、好ましくは、発光種が電極の表面上に電気化学的に発生する電気化学的発光により検出される。先行技術の金属錯体を用いる発光アッセイを行なうための例は、欧州特許公開公報第 0 5 8 0 9 7 9 号、国際公開公報第 9 0 / 0 5 3 0 1 号パンフレット、国際公開公報第 9 0 / 1 1 5 1 1 号パンフレットおよび国際公開公報第 9 2 / 1 4 1 3 8 1 号パンフレットにみられうる。これにより、これらに開示された方法および発光アッセイのための装置に対して言及がなされる。電気化学的発光アッセイは、好ましくはマイクロ粒子、特に、反応性コート、例えばストレプトアビジンが設けられた磁気マイクロ粒子からなる固相の存在下で行なわれる。このようにして、固相に結合した標識基として金属錯体を含有する、免疫複合体またはハイブリダイゼーション複合体を検出することが可能である。

40

【 0 0 6 1 】

電気化学的発光の測定は、好ましくは、金属錯体の還元剤、例えばアミンの存在下で行われる。脂肪族アミンが好ましく、特に、アルキル基の炭素数がそれぞれ 1 ~ 3 である第一級、第二級および第三級アルキルアミンが好ましい。トリプロピルアミンが特に好ましい

50

。しかしながら、アミンはまた、アニリンなどの芳香族アミンまたは複素環アミンでありうる。還元剤はすでに錯体の配位子球体内に一体化されうる。

【0062】

また、表面活性剤、例えば、エトキシ化フェノールなどの非イオン性剤が増幅剤として存在し得る。かかる物質は、例えば、Triton X100またはTriton N401の名称で商品として入手しうる。

【0063】

他方において、発光金属錯体はまた、蛍光または経時的 (time-resolved) 蛍光を測定することにより検出され得、ここでは、適切な波長の光を照射することにより金属キレートが励起され、生じた蛍光発散を測定する。蛍光アッセイを行なうための例は、欧州特許公開公報第0178450号および欧州特許公開公報第0255534号にみられる。これにより、この開示に対する言及がなされる。

10

【0064】

上記の詳細に記載した、分枝した帯電または親水性リンカーを有する金属錯体を用いることの原理は、他の標識基または/およびエフェクター基に同様に適用されうる。分枝リンカーが使用されうる他の好ましい試験形式は、均一系 (homogeneous) アッセイである。かかるアッセイは、例えば、CEDIAまたは経時的FRETなどのFRET (蛍光共鳴エネルギー移動、例えば、Pope, A. J.ら、Drug Discov Today 4 (1999) 350-362参照のこと) として知られる測定手順に基づくものである。

20

【0065】

本発明の分枝リンカーを用いることにより、公知の試験形式と比べてかなりの利点が達成されうる。したがって、例えば、正に帯電した発光金属錯体は、負に帯電した分枝リンカーを含有してなる複合体内で、より良好に取り扱われうる。改良された溶解性、したがって低下した非特異的結合特性は、一般に、分枝リンカーが疎水性の標識基または/および生物学的物質と組み合わせて用いられる場合に見られる。多くの場合において、これは、標識基の数を増加するため、したがって、シグナル生成量を増加させるために使用される。さらにまた、立体的に制約される (demanding) 分枝リンカーは、疎水性標識基と疎水性生物学的物質との間の相互作用を妨げ、これにより、標識基の接近性の改良が確実になる。

30

【0066】

本発明の分枝リンカーは、例えば、ブランク値を低下させること、試験の力学的範囲を改良すること、検出限界を低下させること、試験範囲を広げること、または/および信号対雑音比を改良することにより、診断方法において非常に有利でありうる。活性物質の用量の低減、または/および副作用の低下が治療適用において達成されうる。

【0067】

本発明のまたさらなる局面は、1つまたは数個の電荷担体または/および1つまたは数個の上述したような親水性基を保有するリンカーが、ゲル電気泳動、例えば、アガロースゲル電気泳動、SDSゲル電気泳動、ゲル濾過、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法において見掛け分子量の大きなシフトを引き起こすことである。この効果は、本明細書に記載された分枝リンカーを用いて、および国際公開第96/03409号パンフレットに記載された線状リンカーを用いると生じる。見掛け分子量におけるこのシフトの結果、すなわち、リンカーが実際の場合よりも大きな分子量を有するように見える結果、それらを用いて、規定の化学量論および均一な組成を有する複合体を調製することができる。例えば、規定の数の標識基またはエフェクター基を保有するリンカーが結合性基、例えば、生体分子にカップリングされた後、調製の反応生成物は、別個の画分として、その化学量論にしたがって (例えば、1つの結合性基あたり1分子のリンカー、1つの結合性基あたり2分子のリンカー、1つの結合性基あたり3分子のリンカーなど)、クロマトグラフィー法により簡単に得られうる。

40

【0068】

50

特定の複合体を調製するために使用されるリンカーは、この場合、同じクロマトグラフィー分離系における結合性基の見掛け分子量の好ましくは20%以上、特に好ましくは30%以上、最も好ましくは40%以上の見掛け分子量を有するはずである。

【0069】

さらにまた、試薬キット（リンカー + (1つまたは複数の) 標識基または (1つまたは複数の) エフェクター基 + 結合性基、例えば、標識対象の生体分子)、システム（それぞれの標識基を検出するための測定装置を含む）および規定の化学量論および官能性の試薬を含有する組成物が提供される。

【0070】

規定の化学量論を有するかかる複合体の好ましい例は、モノジゴキシゲニル化 Fab' 抗体断片複合体である。 10

【0071】

以下の実施例および図面により本発明をさらに明らかにする。

【0072】

以下の実施例、参考文献、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供され、その真の範囲は特許請求の範囲に記載される。本発明の精神から逸脱することなく、記載された手順において変形がなされることが理解される。

【0073】

実施例1：固相ペプチド合成による分枝リンカーの調製

例えばApplied Biosystems A433のバッチペプチド合成機でのフルオレニルメチルオキシカルボニル-(Fmoc)-固相ペプチド合成により、分枝リンカーを合成した。各場合において、表1に示される4.0当量のアミノ酸誘導体をこのために使用した。 20

【0074】

【表1】

表 1:

A	Fmoc-Ala-OH	
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	
gE	Fmoc-Glu-OtBu	
F	Fmoc-Phe-OH	
G	Fmoc-Gly-OH	10
H	Fmoc-His(Trt)-OH	
I	Fmoc-Ile-OH	
K1	Fmoc-Lys(Boc)-OH	
K2	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	
K3	Fmoc-Lys(Dde)-OH	
K4	Fmoc-Lys(Alloc)-OH	
K5	Fmoc-Lys(PhAc)-OH	
K6	Fmoc-Lys-(標識)-OH	20
K7	Boc-Lys(Fmoc)-OH	
L	Fmoc-Leu-OH	
M	Fmoc-Met-OH	
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	
P	Fmoc-Pro-OH	
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	30
T	Fmoc-Thr(tBU)-OH	
U	Fmoc-β-アラニン-OH	
V	Fmoc-Val-OH	
W	Fmoc-Trp-OH	
Y	Fmoc-Tyr(tBU)-OH	
Z	Fmoc-ε-アミノカプロン酸	
Ps	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	
Cs	Fmoc-Cys(SO ₃ H)-OH	40
M _{tt} -U	Mtt-β-アラニン-OH	

【 0 0 7 5 】

アミノ酸およびアミノ酸誘導体を、N-メチル-ピロリドンに溶解した。ペプチドをWang樹脂上で合成する(Wang, S.S.、J Am Chem Soc 95 (1973) 1328-33)。樹脂を0.2 ~ 0.4mMol/gで充填する。反応媒体としてのジメチルホルムアミド中のF-moc-アミノ酸誘導体に対して、ジメチルホルムアミド中4当量のジシクロヘキシルカルボジイミドおよび4当量の

N-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いてカップリング反応を20分間行なった。合成の各工程の後、ジメチルホルムアミド中20%ピペリジンを用いて20分間F-moc基を切断した。最後の分枝後、アミノ基に対して4当量のFmoc-アミノ酸が用いられるように、樹脂の量を選択した。分枝および続く2つの同一のアームの合成のためにFmoc-Lys(Fmoc)-OHを使用する。非対称な分枝を、Fmoc-Lys(Dde) またはFmoc-Lys(Alloc) などの直交する側鎖保護基を有するアミノ酸誘導体により得る。文献中の公知の方法により (Bycroft, B. W. ら、J. Chem. Soc., Chem. Commun. 9 (1993) 778-9; Merzouk, A. ら、Tetrahedron Letters 33(1992)477-80)、樹脂上でこれらの直交する保護基を切断する。固相上の末端アミノ基を、任意に無水酢酸または無水コハク酸を用いてアセチル化またはスクシニル化する。

【0076】

ハプテン、標識または官能基を、対応するアミノ酸誘導体が固相合成の間に安定である場合、樹脂上、例えばペプチドのN-末端アミノ酸上にすでに導入しておいた。

【0077】

担体結合ペプチドの遊離のN-末端アミノ基に、適切な活性エステル誘導体を介して、例えば金属キレート標識の導入を行なった。このために、遊離の第1級アミノ官能基当たり4当量のルテニウム(ピピリジル)₃錯体(BPRu)をN-ヒドロキシベンゾトリアゾール/ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて活性化して少量のDMSOに溶解し、これを滴下して室温で2時間攪拌した。

【0078】

例えば、金属キレートまたはビオチン結合アミノ酸誘導体の直接取込みにより、ハプテンまたは標識を、固相合成の間にすでにC-末端に導入しうる(W096/03409に記載されている)。

【0079】

ペプチドを支持体から放出させ、トリフルオロ酢酸20ml、エタンジオール0.5ml、チオアニソール1ml、フェノール1.5gおよび水1mlを用いて、酸不安定性保護基を40分間室温で切断する。使用されるアミノ酸誘導体に依存して、少しのラジカルトラップを含むカクテルを使用することも可能である。次に、冷ジソプロピルエーテル300mlを反応溶液に添加して、ペプチドを完全に沈澱させるために0で40分間保った。沈澱物を濾過し、ジソプロピルエーテルを用いて洗浄し、少量の50%酢酸に溶解させ、凍結乾燥させた。適切なグラジエント(溶離剤A:水、0.1%トリフルオロ酢酸、溶離剤B:アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸)をかけるデルタ-PAK RP C18(カラム50×300mm; 100 ; 15μ)上の調製用HPLCによって、得られた粗物質を約120分で精製した。質量分析によって、溶出した物質を同定した。

【0080】

固相合成により調製されたかかる化合物の例を、図1~7および図16に示す。

【0081】

代替的には、標識基(標識)、エフェクター基(ハプテン)または官能基はまた、樹脂からの切断後に導入されうる。このために、固相ペプチド合成の間ならびに切断の間に安定である保護基(例えば、フェニルアセチル(Phac))を用いて、誘導体化されない他の基をブロックする必要がある。保護基は、PenGアミダーゼを用いて酵素的に除去されうる(PCT/EP95/02921に記載されている)。

【0082】

Phacを用いて保護された化合物の例を、図8に示す。

【0083】

実施例2:分枝ペプチドリンカーへのマレインイミド官能基の導入

マレインイミド官能基を導入するために、実施例1のペプチドを、0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0に溶解し、DMSO中1当量のマレインイミドヘキサノイルN-ヒドロキシスクシニイミドエステル(MH=マレインイミドヘキサノイル)と混合して、25で16時間攪拌した。調製物を調製用HPLC(上記を参照のこと)により精製した。溶出した物質の同一性を、質量分析によって確認した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

図 9 ~ 1 1 および図 1 7 に示される化合物を調製した。

【 0 0 8 5 】

実施例 3 : 分枝ペプチドリンカーへのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基の導入実験を、W096/03409の実施例 6 と類似のように行なった。

【 0 0 8 6 】

図 1 2 に示す化合物を調製した。

【 0 0 8 7 】

実施例 4 : 免疫学試験における分枝および帯電リンカーを有する金属錯体 - 抗原複合体の使用

HIV に対する特異的抗体を検出するために、二抗原架橋試験(double antigen bridge test)を行なった。この方法において、測定対象の抗体に対するルテニウム標識抗原およびビオチン標識抗原と共に試料液体を、ストレプトアビジン被覆固相の存在下でインキュベートした。Elecys (登録商標)システムを用いる電気化学発光によって固相上の標識を測定することにより、試料液体中の抗HIV抗体の存在を決定する。HIV2のgp36タンパク質の一部の配列(配列番号: 1)が、患者血清中の重要な抗体により認識される抗原性エピトープを含有することが公知である。

【 0 0 8 8 】

SH官能基リンカーを有し、N末端で伸長した配列番号: 1を含有するペプチド(配列番号: 2および図13)を、W096/03652に記載されているように調製した。図13の2つのシステム(C)の間の実線は、-SS-シスチン架橋を示す。

【 0 0 8 9 】

マレインイミド - 活性化ルテニウム錯体を有するHIVペプチドを誘導するために、0.1mol/lリン酸カリウム緩衝液pH7.0中で2時間室温にて、配列番号: 2のペプチド(図13)を、それぞれマレインイミド活性化ルテニウムリンカーと複合体化した。調製用HPLCまたはゲルクロマトグラフィーのいずれかにより、非反応成分を分離した。精製産物を凍結乾燥した。

【 0 0 9 0 】

化合物 A : gp36抗原を有する図 9 由来のBPRuリンカー

【 0 0 9 1 】

化合物 B : gp36抗原を有する図 10由来のBPRuリンカー

【 0 0 9 2 】

化合物 C : gp36抗原を有する図 11由来のBPRuリンカー

【 0 0 9 3 】

化合物 D : gp36抗原を有する図 17由来のBPRuリンカー

【 0 0 9 4 】

配列番号: 2および種々のリンカーバリエーション(化合物A~D)の1つを含有する複合体を、上記試験フォーマットを用いて評価した。同一の配列番号: 1のgp36エピトープを含有する同じビオチン標識ペプチド(図14)を用いて、同じ濃度で、全評価を行なった。ビオチン標識捕捉抗原に対して等モルの濃度で標識検出抗原を使用した。

【 0 0 9 5 】

図15に示される複合体を、PCT/EP95/02921に記載のようにして調製し、先行技術の標識参照抗原として使用した(表2~4における比較)。本発明の抗原を先行技術の抗原に対して等モル量で使用した。濃度は、0.018nmol/lであった。

【 0 0 9 6 】

図15の化合物と比較した複合体AおよびCを用いた実験の結果を、表2にECLカウントで示す。一定の陽性シグナルを有するかなり低いブランク値が、本発明のリンカーを使用することによってのみ得られ、それは、したがって、陽性シグナルと陰性シグナルの間の良好な区別を生じることが、見出されうる。これらの改善された信号対雑音比は、測定範囲の改善をもたらす。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

【 表 2 】

表 2:

実験	比較	A	C
陰性試料	6014	2044	1975
陽性試料	345247	484681	391007
陽性/陰性比	57.5	237.1	198

10

【 0 0 9 8 】

図15の化合物と比較した複合体 B を用いた実験の結果を、表 3 に ECL カウントで示す。分枝リンカーの有利な効果がまた、ブランク値の有意な増加なしに数個の標識の導入を可能にすることが見出されうる。陽性シグナルは消えず、測定カウントにおける増加さえ観察されることもまた、驚くべきことである。

【 0 0 9 9 】

【 表 3 】

表 3:

実験	比較	B
陰性試料	6096	2366
陽性試料	393197	765298
陽性/陰性比	64.5	323.5

20

30

【 0 1 0 0 】

表 4 は、図15の化合物と比較した複合体 D を用いた実験からの結果を ECL カウントで示す。驚くべきことに、非帯電分枝親水性リンカーもまた、ブランク値に対して正の効果を有する。信号対雑音比が改善される。

【 0 1 0 1 】

【 表 4 】

40

表 4:

実験	比較	D
陰性試料	6718	2015
陽性試料	553816	759947
陽性/陰性比	82.4	377.1

10

【 0 1 0 2 】

実施例 5 : 抗体断片複合体の調製

1 . 手順の説明

IgG 由来の Fab' の調製

モノクローナル抗 Dig 抗体をペプシンにより切断し、 $F(ab')_2$ -断片を形成した。定量的な切断後、pHを上げてペプスタチンを添加することによりペプシンを不活性化した。予め精製することなく、システアミンにより $F(ab')_2$ をFab'に分解した(reduced)。システアミンは、ほとんど選択的にヒンジ領域のジスルフィド架橋を切断する。次に、それを透析した。これにより、ペプシンにより生じたFc切断産物のほとんどは、それらが透析チューブの孔を通過するのに十分小さいので(>10,000 ダルトン)、除去される。

20

【 0 1 0 3 】

Fab'-BPRU リンカー複合体

過剰のBPRU- リンカー-MH とFab'を反応させることにより、複合体合成を行なった。このプロセスにおいて、ヒンジ領域のSH基が主に変換した。軽鎖およびFd鎖の分解した分子内ジスルフィド架橋の結果最も起こりやすい副反応として、少量の多ルテニウム標識(polyruthenylated) Fab' を形成した。

30

【 0 1 0 4 】

粗複合体の精製

粗複合体を分子ふるいによって精製した。このプロセスにおいて、一ルテニウム標識物質を多ルテニウム標識物質から分離した。

【 0 1 0 5 】

2 . 手順

 $F(ab')_2$ を形成するための抗体の切断

モノクローナル抗体抗-DIG-M19.11 IgG の凍結乾燥物(lyophilisate)を、20mg/ml の濃度を得るために、 H_2O を用いて再構築した。溶液1ml 当たり20 μ l の1Mクエン酸塩pH3.5 を添加した(クエン酸塩の最終濃度 = 20mM)。pHをHCl を用いて3.60に調整した。それを0.45 μ m フィルターを通して濾過した。濃度をOD 280nmで決定した($1 OD_{280nm} = 1.4mg/ml$)。それを、20mMクエン酸塩pH3.60を用いて10mg/ml に調整した。溶液を水浴中で37 に加熱した。抗体溶液1ml 当たり100 μ l ペプシン溶液(3mg/ml)を添加し、水浴中で37 にてインキュベートした。完全な切断後、pH値を上げ、ペプスタチンを添加することにより、反応を停止した。

40

【 0 1 0 6 】

Fab'への分解

切断混合物1ml 当たり52.6 μ l の0.1Mジチオトレイトール(DTT) を添加し、水浴中で25 にて30分間インキュベートした。0.1M $NaH_2PO_4/NaOH$ pH6.5、30mM NaCl、2mM EDTAに対

50

して、Fab'を透析した。

【0107】

Fab'-BPRu-リンカー複合体の合成

BPRu-リンカー-MHをDMSO中に溶解した。化学量論的Fab':BPRu-リンカー-MHは、1:3(モル/モル)であった。混合物におけるFab'の最終濃度は、3.9mg/mlであった。混合物におけるDMSOの最大濃度は、10%であった。反応時間は、室温にて1時間であった。

【0108】

精製

粗複合体を、AMICON PM 10を使用して2~3倍濃縮し、Superdex 200によって精製した(緩衝液:25mM MOPS/NaOH pH6.5, 50mM NaCl, 10% DMSO、適用量:ゲル床の最大1.5%、画

10

分:ゲル床の0.5%)。Fab'-BPRu-リンカー複合体を含む画分をプールした。

【0109】

実施例6:免疫学試験における分枝および帯電リンカーを有する金属錯体-抗体断片複合体の使用

HIVに対する特異的抗体を検出するために、二抗原ブリッジ試験を行なった。この方法において、測定対象の抗体に対するピオチン標識抗原およびジゴキシゲニン標識抗原と共に試料液体を、ストレプトアビジン被覆固相および抗-Dig-BPRu抗体の存在下でインキュベートした。Elecsys(登録商標)システムを用いる電気化学発光によって固相への二抗原ブリッジを介して結合した標識を測定することにより、試料液体中の抗HIV抗体の存在を決定した。

20

【0110】

HIV1のgp41領域由来のHIVペプチド(配列番号:3)をN末端で標識し、抗原として用いた。ピオチン標識抗原およびジゴキシゲニン標識抗原の調製は、PCT/EP95/02921に記載されている。2つの抗-Dig-BPRu複合体を、ルテニウム標識gp41ペプチドの検出に使用した。

【0111】

化合物E:リンカー無しの抗-Dig-IgG-BPRu

【0112】

化合物F:図9のリンカーを有する抗-Dig-Fab'-BPRu

【0113】

抗原を20ng/mlの濃度の等モル量で使用した。

【0114】

化合物Fと比較した化合物Eを用いた実験の結果を、表5に示す。ジゴキシゲニン標識抗原および抗体複合体(濃度180ng/ml)をプレインキュベートした。本発明のリンカーの使用により、陽性シグナルと陰性シグナルの間の良好な区別に関連するかなり低いブランク値を生じることが見出されうる。これは、正規化された値から容易に見出される(表5/2)。

30

【0115】

【表5】

表 5:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	441	2117	582
陽性試料 1	437	1215275	668410
陽性試料 2	453	49187	25819

10

表 5/2:

実験 (陰性試料に対して 正規化)	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	1.0	1.0	1.0
陽性試料 1	0.99	574.1	1148.5
陽性試料 2	1.03	23.1	44.4

20

【 0 1 1 6 】

表 6 では、抗体複合体（濃度 600ng/ml）を添加する前に、結合した免疫錯体を有する磁気ビーズを洗浄するように試験手順を変更した。この場合もまた、ブランク値はかなり低く、このことは、改善された区別に関連した。改善された信号対雑音比は、特に表 6/2 から明らかであり、この値は、陰性試料を用いて測定したシステムブランクに対して正規化されている。

30

【 0 1 1 7 】

【 表 6 】

表 6:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	464	2771	758
陽性試料 1	453	1503690	686607
陽性試料 2	480	47040	27133

40

50

表 6/2:

実験 陽性/陰性血清	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	1.0	1.0	1.0
陽性試料 1	0.98	592.6	905.8
陽性試料 2	1.03	17.0	35.8

10

【 0 1 1 8 】

表 7 は、ストレプトアビジン固相への抗体複体の非特異的結合を示す。この「試験手順」において、緩衝液のみを使用し、ビオチン標識抗原もジゴキシゲニン標識抗原も使用しなかった。ルテニウム標識抗体複体の濃度は、600ng/mlであった。本発明のリンカーはまた、改善されたブランク値を示す。

【 0 1 1 9 】

20

【 表 7 】

表 7:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	333	3188	566
緩衝液	329	983	436

30

【 0 1 2 0 】

実施例 7 : さらなる複体の調製

1 . テストステロン誘導体 (図 18) の合成

約 2ml のリン酸緩衝液 pH8.5 に、8.5mg の BPRu-リンカー-NH₂ (図 1) を溶解し、ジオキササン 2ml に溶解した 1.8mg の活性化テストステロン誘導体 (テストステロン-3-ジメチル-カルボキシオキシム-NHS) を滴下した。それを光を遮断して 6 時間室温で攪拌した。

【 0 1 2 1 】

40

調製用 HPLC により、粗生成物を精製する。分子量を、質量分析 (MALDI) により 3180 と確認した。

【 0 1 2 2 】

2 . T3 誘導体 (図 19) の合成

7.1. と同様に合成を行なった。MS-MALDI は、予期される分子量に対応した。

【 0 1 2 3 】

3 . PEG-Lys-MP-gp36 誘導体 (図 20) の合成

ルテニウム錯体のリジン誘導体で開始し、マレインイミド-プロピオン酸-(MP)-NHS エステルを用いる従来法により、第一段階でリジンの遊離の - アミノ基を反応させた。次に、カルボン酸を、標準法により活性化させた。

50

【 0 1 2 4 】

次の工程では、3.64mgの活性エステルを25.5mgのアミノ修飾ポリエチレングリコールH₂N-PEG-OCH₃-5000(Shearwater)と20mlアセトニトリル中室温で反応させた。生成物の混合物を、ロータリーエバポレートし、ゲルクロマトグラフィーにより精製した(MALDIは、予期した分子量に対応した)。

【 0 1 2 5 】

すでに記載した方法と同様にして、gp36-ペプチドへのマレインイミドのさらなる結合を行なった。質量分析を用いて決定した分子量は、予期した分子量6990に対応した。

【 0 1 2 6 】

4. 蛍光染料標識分枝リンカー(図23)の合成

Mtt-保護分枝ペプチドリナー(図21)を、標準手順により合成する。

【 0 1 2 7 】

具体的にはAletras A.ら、Int. J. Peptide Res.(1995)45, 488に記載の方法により、Mtt保護基を切断し、固相に結合した図22のリンカーを得た。

【 0 1 2 8 】

単一の非保護N末端アミノ基を有する分枝リンカー分子(図22)を結合した固相50mgを4mlのDMFに懸濁させた。その後、10μlのトリエチルアミンおよび活性化蛍光標識(16mg)を添加し、固相結合リンカーに複合体化させた(活性化標識であるローダミン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成は、DE4137934に記載されている)。反応混合物を12時間室温で攪拌した。

【 0 1 2 9 】

標準条件下での固相からの切断後(トリフルオロ酢酸95%)、調製用HPLCを用いて精製を行なった。

【 0 1 3 0 】

21μlのトリエチルアミンを含む10mlのDMF中での16mgの中間体と18.5mgのジスクシンイミジルスベレート(DSS)との5時間の反応および標準的な精製は、7mgの生成物(図23に示されるNHS-活性化ローダミン標識分枝リンカー)をもたらしした。これをMALDI-TOFにより解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

【 0 1 3 1 】

実施例8: アクリジニウム標識分枝リンカー構造

1. アクリジニウムエステル標識分枝リンカー

4mlのDMFに溶解した50mgの固相結合リンカー(図22を参照)に、13mgのアクリジニウムエステル誘導体(EP 82636に従って合成)を添加し、実施例7.4に記載のように反応させた。

【 0 1 3 2 】

アクリジニウム標識リンカーを調製用HPLCにより精製し、凍結乾燥させた。

【 0 1 3 3 】

生成物の収量が7mgであることを見出した。

【 0 1 3 4 】

生成物(図24を参照)をMALDI-TOFにより解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

【 0 1 3 5 】

2. アクリジニウムスルホニル標識分枝リンカーの合成

アクリジニウム標識分枝固相結合化合物を、実施例7.4に記載のように合成する(アクリジニウムスルホンアミドの合成は、US 5,543,524を参照)。固相からの切断および精製の後(上記参照)、1mlのDMF中でペプチドリナー(4mgのリンカー)の遊離のC末端アミノ基を、0.7mgのマレイミドプロピオニル-オキシスクシンイミドエステル(MPS)と反応させ(室温、150時間)、調製用HPLCにより精製する。

【 0 1 3 6 】

生成物の収量が2mgであることを見出した。

10

20

30

40

50

【0137】

生成物（図25を参照）をMALDI-TOFにより解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

【0138】

MPS-活性化アクリジニウムスルホンアミド標識リンカーをSH基に複合体化する。この実施例において、TSH（甲状腺刺激ホルモン）を使用し、標準プロトコルに従ってカップリングを行なった（Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, p.456 ff を参照）。

【0139】

TSHに対する二段免疫アッセイ(two step immunoassay)を用いる比較研究において（第1抗体と試料のインキュベーション後に洗浄工程を有する）、本実施例のTSH-複合体をリンカー無しのTSH-複合体と比較した。表8においてTSH濃度を μ IU/mlとして示す。Cal 1およびCal 2は市販品のRoche Diagnostics 発注番号TSH Cal Set: Id. Nr: 1731483であり、Tris（100mM Tris、1%BSA、0.1%Thesit、0.1%Oxaban、pH7.4）で示される試料は、1ml当たりそれぞれ0および50 μ IU TSHを含有する。

【0140】

【表8】

表8:

	TSH μ IU/ml	信号対雑音比 (リンカー無し)	信号対雑音比 (リンカー有り)
Cal1	0		
Cal2	1.43	2	7
Tris 0	0		
Tris 50	50	17	127

【0141】

表8から、本発明の分枝リンカーを含有するTSH-複合体は、かかるリンカー無しの複合体と比較して信号対雑音比に関して有意な改善を示す。

【0142】

参考文献の表

- Aletras A ろ, Int. J. Peptide Res. (1995) 45, 488
 Aslam M., Dent A., Bioconjugation (1998) Mcmillan Reference Ltd., London, p 95 ff
 Bredehorst, R. ろ, Anal Biochem 193 (1991)272-9
 Bycroft, B.W. ろ, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 9 (1993) 778-9
 Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, p. 456 ff
 Merzouk, A. ろ, Tetrahedron Letters 33 (1992) 477-80
 Pope, A. J. ろ, Drug Discov Today 4 (1999) 350-362
 Wang, S.S., J Am Chem Soc 95 (1973) 1328-33

10

PCT/EP95/02921

DE 4137934

DE 44 30 998.8

EP 0 061 888

EP 0 178 450

EP 0 255 534

EP 0 580 979

EP 0 618 192

US 5,519,142

WO 87/06706

20

WO 90/05301

WO 90/11511

WO 92/14138

WO 96/03409

WO 96/03410

WO 96/03652

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明の化合物を示す。

30

【図 2】 図 2 は、本発明の化合物を示す。

【図 3】 図 3 は、本発明の化合物を示す。

【図 4】 図 4 は、本発明の化合物を示す。

【図 5】 図 5 は、本発明の化合物を示す。

【図 6】 図 6 は、本発明の化合物を示す。

【図 7】 図 7 は、本発明の化合物を示す。

【図 8】 図 8 は、本発明の化合物を示す。

【図 9】 図 9 は、本発明の化合物を示す。

【図 10】 図 10 は、本発明の化合物を示す。

【図 11】 図 11 は、本発明の化合物を示す。

40

【図 12】 図 12 は、本発明の化合物を示す。

【図 13】 図 13 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 14】 図 14 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 15】 図 15 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 16】 図 16 は、本発明の化合物を示す。

【図 17】 図 17 は、本発明の化合物を示す。

【図 18】 図 18 は、本発明の化合物を示す。

【図 19】 図 19 は、本発明の化合物を示す。

【図 20】 図 20 は、本発明の化合物を示す。

【図 21】 図 21 は、図 23 ~ 25 の複合体を作製するのに使用した固相結合分枝リン

50

カー（Mtt-保護基有りおよびアミノ酸側鎖上に保護基有り）を示す。

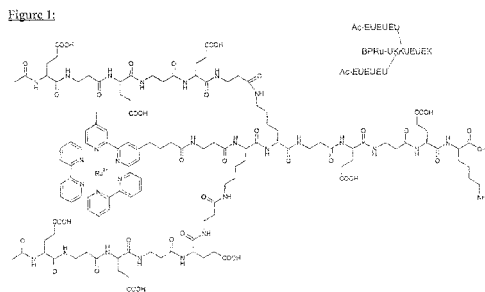
【図22】 図22は、図23～25の複合体を作製するのに使用した固相結合分枝リンカー（Mtt-保護基無しおよびアミノ酸側鎖上に保護基有り）を示す。

【図23】 図23は、本発明の化合物を示す。

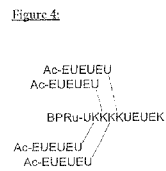
【図24】 図24は、本発明の化合物を示す。

【図25】 図25は、本発明の化合物を示す。

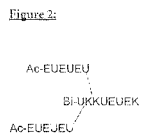
【図1】



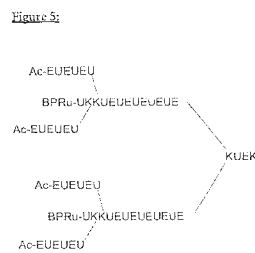
【図4】



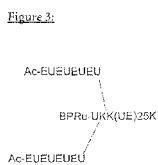
【図2】



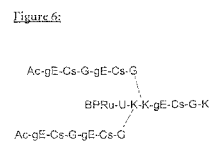
【図5】



【図3】

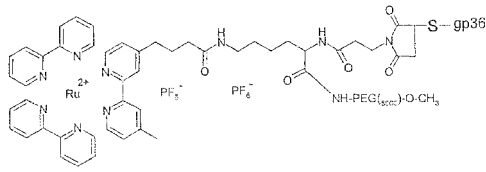


【図6】



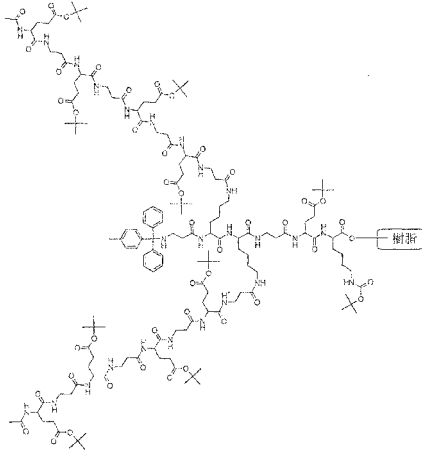
【 図 2 0 】

Figure 20: ルテニウム²⁺および gp36-標識親水性(PEG5000)リンカー



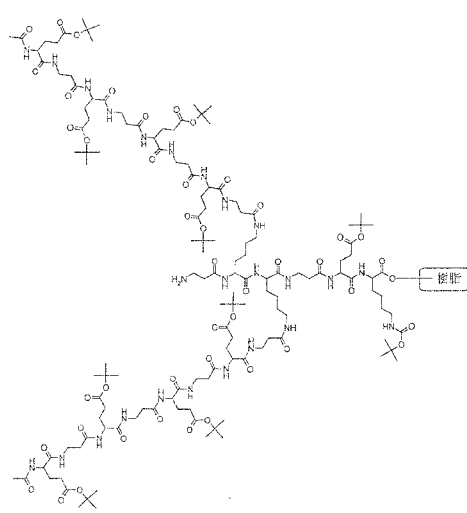
【 図 2 1 】

Figure 21: 固相結合分枝リンカー(保護基を有する)



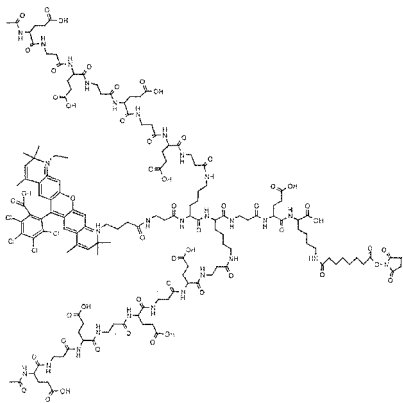
【 図 2 2 】

Figure 22: 保護アミノ酸側鎖およびリシンの非保護ε-アミノ基を有する分枝リンカー



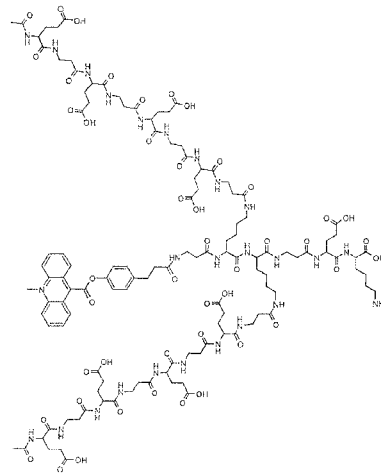
【 図 2 3 】

Figure 23: NHS 活性化ローザミン標識分枝リンカー



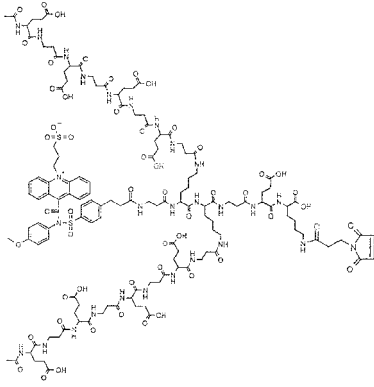
【 図 2 4 】

Figure 24: アクリロニウムエステルで標識された分枝リンカー



【 図 2 5 】

Figure 25: 標識モノアクリジニウムスルホン基を有するMPS活性化分枝リンカー



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/547	
G 0 1 N 33/547	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/58	C 1 2 N 15/00	A
// C 0 7 F 15/00	C 0 7 F 15/00	A

(72)発明者 ヘス, エーファ
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4 7 6 ツイツェルスベルガーシュトラッセ 13アー

(72)発明者 ヘルマン, ルーベルト
ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 イン デル アウ 2 3

(72)発明者 フォン デル エルツ, ヘルベルト
ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 イン デル アウ 2 1

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平11-311607(JP, A)
特開平8-327548(JP, A)
特表平10-503485(JP, A)
特表平8-509995(JP, A)
特表2002-512265(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/48-98

C12Q

专利名称(译)	具有支链接头的化合物		
公开(公告)号	JP3647845B2	公开(公告)日	2005-05-18
申请号	JP2002530643	申请日	2001-09-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	アンドレスヘルベルト ヨーゼルハンスペーター ヘスエーファ ヘルマンルーベルト フォンデルエルツヘルベルト		
发明人	アンドレス,ヘルベルト ヨーゼル,ハンス-ペーター ヘス,エーファ ヘルマン,ルーベルト フォン デル エルツ,ヘルベルト		
IPC分类号	G01N33/543 C07F15/00 C07K1/107 C07K5/02 C07K7/02 C07K14/00 C07K14/16 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/547 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6845 C07K1/1075 C07K1/1077 C07K14/001 G01N33/5306 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/543.525.E C07K5/02.ZNA C07K7/02 C07K14/16 C07K19/00 C12Q1/68.A G01N33/547 G01N33/58.Z C12N15/00.A C07F15/00.A		
优先权	10048417 2000-09-29 DE		
其他公开文献	JP2004510160A5 JP2004510160A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种新化合物，其包含用于制备用于诊断方法或疗法的缀合物的支链接头，及其用途。

