

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3975167号

(P3975167)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 21/76 (2006.01)

F I

G O 1 N 21/76

請求項の数 52 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2002-557779 (P2002-557779)	(73) 特許権者	502342071
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日(2002.1.8)		アプレーラ コーポレイション
(65) 公表番号	特表2004-524521 (P2004-524521A)		Applera Corporation
(43) 公表日	平成16年8月12日(2004.8.12)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000022		730 ベドフォード ウィギンス アヴ
(87) 国際公開番号	W02002/057745		ェニュー 35
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		35 Wiggins Avenue,
審査請求日	平成17年1月7日(2005.1.7)		Bedford, Massachuse
(31) 優先権主張番号	60/259,870		tts 01730, U. S. A.
(32) 優先日	平成13年1月8日(2001.1.8)	(74) 代理人	100078662
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	60/286,383	(72) 発明者	スパークス, アリソン・エル
(32) 優先日	平成13年4月26日(2001.4.26)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ 01
(33) 優先権主張国	米国 (US)		845、ノース・アンドーバー、ジョンソ
			ン・ストリート 325
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状化学発光基質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

デンドリマー；及び

デンドリマーに結合した、少なくとも1つの、酵素活性化される化学発光基質を含む、化学発光基質送達システム。

【請求項2】

化学発光基質が、ジオキセタン部分、ルミノール部分、イソルミノール部分、アクリジニウムエステル部分、アクリジニウムスルホニルアミド部分、ルシフェリン部分及びそれらの組み合わせからなる群より選択される部分を含む、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項3】

複数の、酵素活性化される化学発光基質が、デンドリマーに結合している、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項4】

異なる少なくとも2つの、酵素活性化される化学発光基質が、デンドリマーに結合している、請求項3記載の化学発光基質送達システム。

【請求項5】

基質送達システムが、以下の工程：

酵素活性化される化学発光部分を含む1つ以上の分子を、デンドリマーに共有結合で結合させる工程；又は

酵素活性化される化学発光部分のプレカーサーを含む1つ以上の分子を、 dendroliマーに共有結合で結合させ、その後化学発光部分のプレカーサーを、化学発光部分に変換させる工程

を含む方法によって製造される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項6】

dendroliマーが、アミノ表面基を有するポリアミドアミン dendroliマー、カルボン酸表面基を有するポリアミドアミン dendroliマー、ヒドロキシル表面基を有するポリアミドアミン dendroliマー、及びアミノ表面基を有するポリプロピレンイミン dendroliマーからなる群より選択される、請求項5記載の化学発光基質送達システム。

【請求項7】

化学発光基質が、

3-(2-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン;

2ナトリウム 3-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2-(5-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル)フェニルホスファートジオキセタン;及び

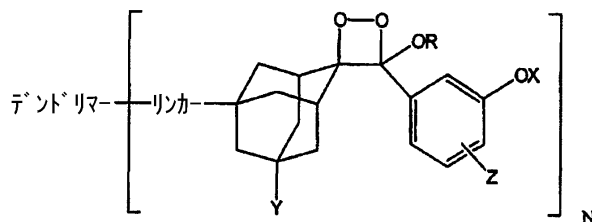
2ナトリウム 2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2-(5-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル)フェニルホスファート

からなる群より選択されるジオキセタン部分を含む、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項8】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ基質送達システムが、式:

【化1】



(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し;

「 dendroliマー」は、 dendroliマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られる dendroliマー部分を表し;

Nは、 dendroliマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり;

Yは、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり;

Rは、C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキル、モノ-、ジ-若しくはトリ-ハロアルキル、アリール又はアラルキルであり;

Xは、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1-ホスホノ-2,3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-グルクロニド、-D-マンノシド、-D-マンノシド、-D-フルクトフラノシド、-D-グルコシドウロナート、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシド、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシドのアルコキシ

10

20

30

40

50

誘導体、p-トルエンスルホニル-L-アルギニンエステル、及びp-トルエンスルホニル-L-アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；そして

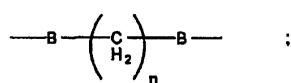
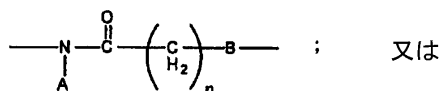
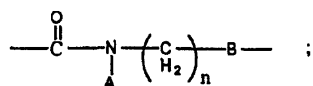
Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基である）

で表される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項9】

リンカー部分が、式：

【化2】



10

(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして

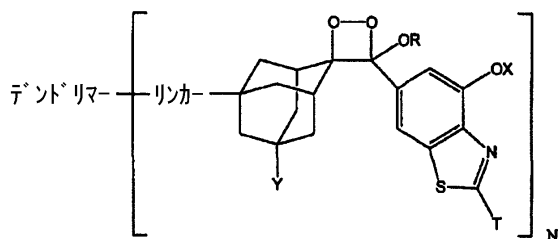
Bは、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH<sub>2</sub>である）

で表される、請求項8記載の化学発光基質送達システム。

【請求項10】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化3】



30

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Yは、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

40

Rは、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキル、モノ-、ジ-若しくはトリ-ハロアルキル、アリール又はアラルキル基であり；

Xは、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1-ホスホノ-2,3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-グルクロニド、-D-マンノシド、-D-マンノシド、-D-フルクトフラノシド、-グルコシドウロナート、5-アセトアミド-3,5-ジデオキ

50

シ - - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3 , 5 - ジデオキシ - - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンスルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンスルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；そして

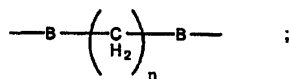
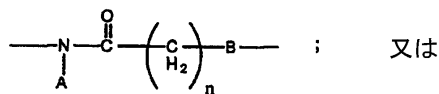
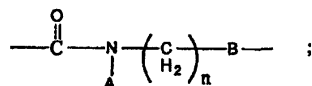
T は、H、電子供与性基、電子吸引性基、又は補助的な発蛍光団若しくは生物学的な部分に結合していてもよい有機リンカー基である)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 1 1】

リンカー部分が、式：

【化 4】



10

20

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして

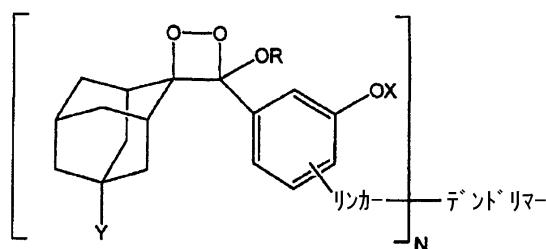
B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH<sub>2</sub>である)

で表される、請求項 1 0 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 1 2】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 5】



30

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの末端官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Y は、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

R は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリール又はアラキル基であり；そして

X は、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2 , 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホス

40

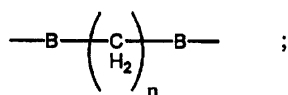
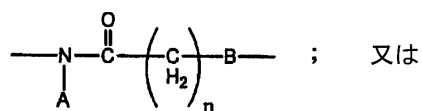
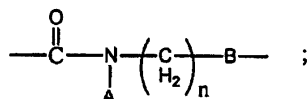
50

ファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 $\alpha$ -D-グルコシド、 $\beta$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -D-グルクロニド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -D-フルクトフラノシド、 $\alpha$ -D-グルコシドウロナート、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ- $\beta$ -D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシド、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ- $\beta$ -D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p-トルエンスルホニル-L-アルギニンエステル、及びp-トルエンスルホニル-L-アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基である)で表される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

【請求項13】

リンカー部分が、式：

【化6】



(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして

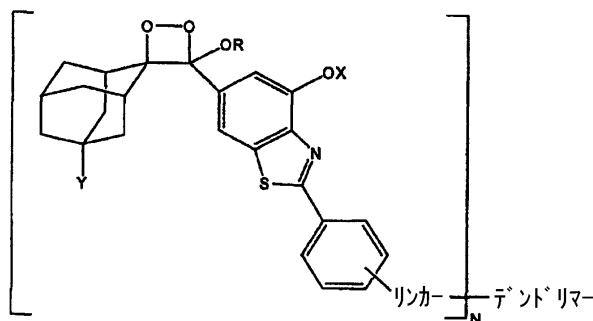
Bは、独立して、NA、NC(O)A、O、S又はCH<sub>2</sub>である)

で表される、請求項12記載の化学発光基質送達システム。

【請求項14】

化学発光基質が、ジオキセタン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化7】



(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの末端官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Yは、H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換アルキル基、ヒドロキシ置換アルキル基、ハロゲン置換アルキル基、フェニル基、ハロゲン化フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコ

10

20

30

40

50

キシ基又はカルボキシル基であり；

Rは、 $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル、アリール又はアラルキル基であり；そして

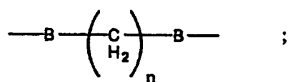
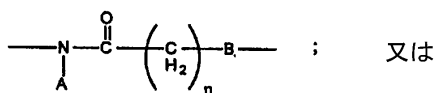
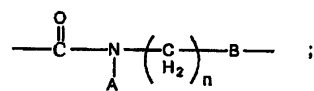
Xは、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 $\alpha$  - D - グルコシド、 $\beta$  - D - グルコシド、 $\alpha$  - D - グルクロニド、 $\beta$  - D - マンノシド、 $\alpha$  - D - マンノシド、 $\beta$  - D - フルクトフラノシド、 $\beta$  - D - グルコシドウロナート、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ -  $\beta$  - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ -  $\beta$  - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p - トルエンスルホニル - L - アルギニンエステル、及び p - トルエンスルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基である)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 15】

リンカー部分が、式：

【化 8】



(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；そして

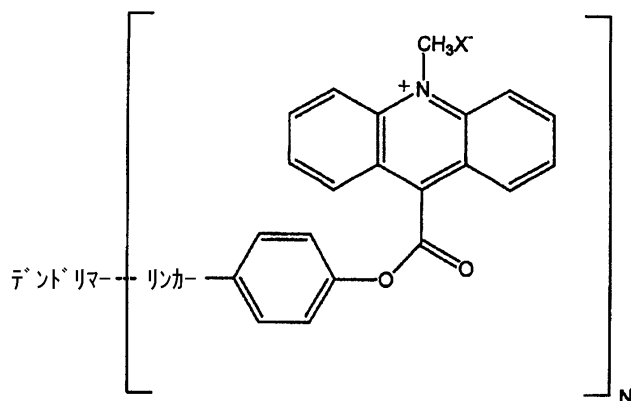
B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S 又は  $CH_2$  である)

で表される、請求項 14 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 16】

化学発光基質が、イソルミノール部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 9】



(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応か

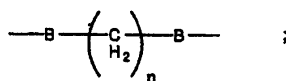
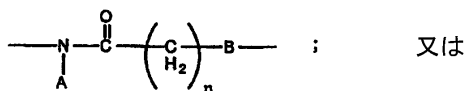
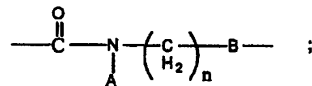
ら得られる dendriマー部分を表し；そして

N は、 dendriマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数である）  
で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 17】

リンカー部分が、式：

【化 10】



10

(式中、

n は、正の整数であり；

A は、H、アルキル基、トリハロアルキル基又はアリアル基であり；そして

B は、独立して、NA、NC(O)A、O、S 又は CH<sub>2</sub> である)

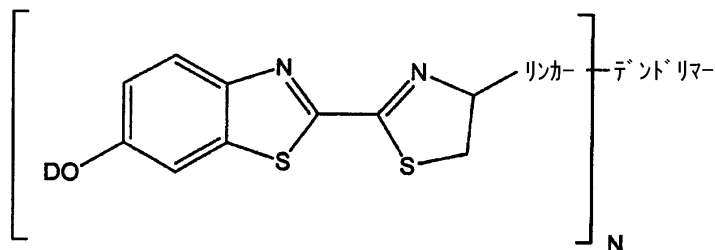
20

で表される、請求項 16 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 18】

化学発光基質が、ルシフェリン部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 11】



30

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「 dendriマー」は、 dendriマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られる dendriマー部分を表し；

N は、 dendriマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；そして

D は、水素、又はホスファート、ガラクトシド、アセタート、1-ホスホノ-2,3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-グルクロニド、-D-マンノシド、-D-マンノシド、-D-フルクトフラノシド、-D-グルコシドウロナート、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシド、5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシドのアルコキシ誘導体、p-トルエンシルホニル-L-アルギニンエステル、p-トルエンシルホニル-L-アルギニンアミド、及び PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 基からなる群より選択される、酵素不安定基である)

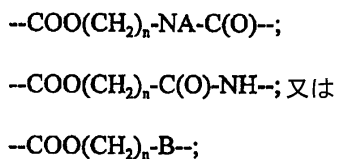
40

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 19】

50

リンカー部分が、式：  
【化 1 2】



(式中、

n は、正の整数であり；

A は、水素又はアルキル基であり；そして

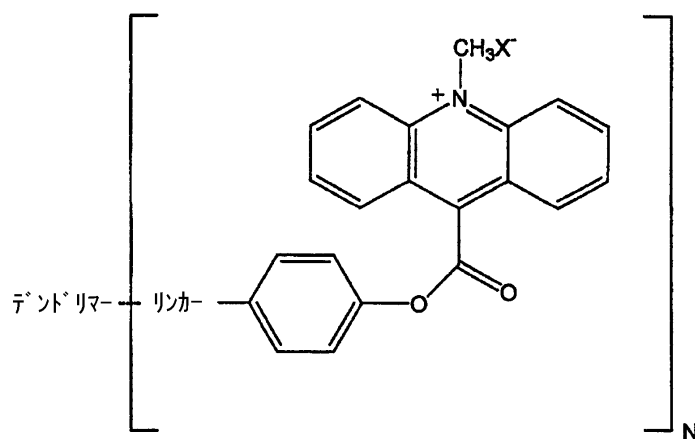
B は、N A、O、S 又は C H<sub>2</sub> である)

で表される、請求項 1 8 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 0】

化学発光基質が、アクリジニウムエステル部分を含み、かつ送達システムが、式：

【化 1 3】



(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

N は、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；そして

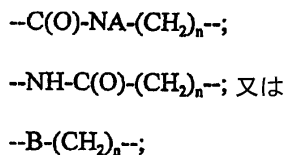
X は、対イオンである)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 2 1】

リンカー部分が、式：

【化 1 4】



(式中、

n は、正の整数であり；

A は、水素、アルキル基又はアリール基であり；そして

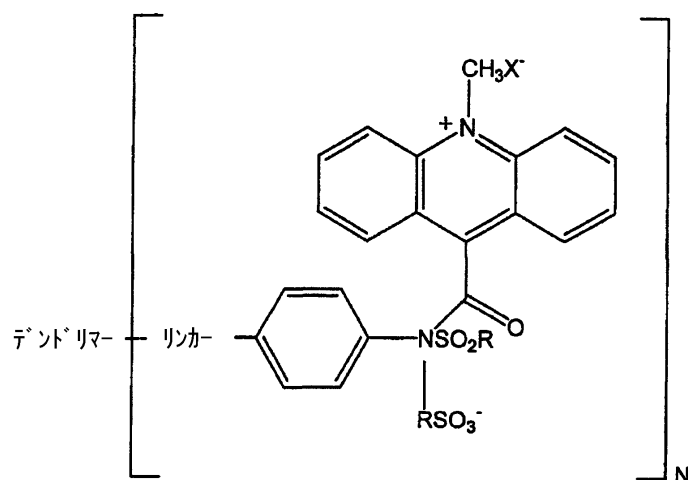
B は、N A、O、S 又は C H<sub>2</sub> である)

で表される、請求項 2 0 記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項 2 2】

化学発光基質が、アクリジニウムスルホニルアミド部分を含み、かつ送達システムが、式：

## 【化 1 5】



10

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Rは、アルキル又はアリアル基であり；そして

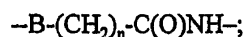
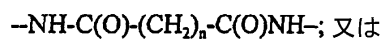
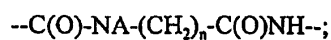
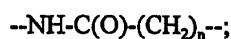
Xは、対イオンである)

で表される、請求項 1 記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項 2 3】

リンカー部分が、式：

## 【化 1 6】



30

(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、水素、アルキル基又はアリアル基であり；そして

Bは、NA、O、S又はCH<sub>2</sub>である)

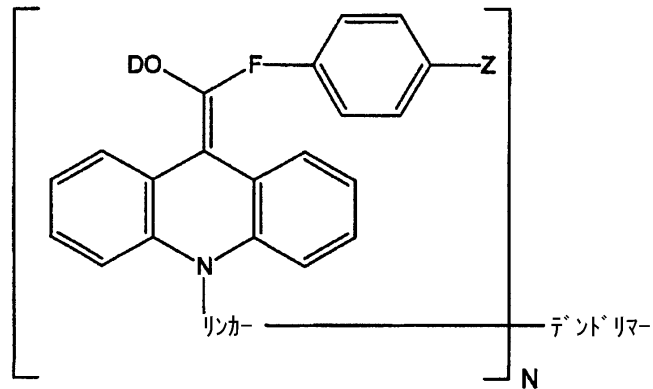
で表される、請求項 2 2 記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項 2 4】

化学発光基質が、アクリダン部分を含み、かつ送達システムが、式：

40

## 【化17】



10

(式中、

「リンカー」は、リンカー部分を表し；

「デンドリマー」は、デンドリマーの表面官能基と、リンカー部分の官能基との反応から得られるデンドリマー部分を表し；

Nは、デンドリマー部分に結合した化学発光基質の数を示す正の整数であり；

Dは、 $PO_3 X_2$ 基、グリコシド又はスルファート（ここで、Xは、対イオンである）であり；

20

Fは、NA、S又はOであり；そして

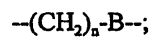
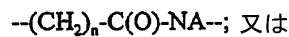
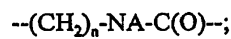
Zは、ハロ、アルコキシ又はアルキル基である）

で表される、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項25】

リンカー部分が、式：

## 【化18】



30

(式中、

nは、正の整数であり；

Aは、水素又はアルキル基であり；そして

Bは、NA、O、S又は $CH_2$ である）

で表される、請求項24記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項26】

デンドリマーが、1つ以上の追加のデンドリマーと共有結合又はイオン結合で結合している、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

40

## 【請求項27】

基質送達システムが、化学発光エンハンサー部分をさらに含む、請求項1記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項28】

エンハンサー部分が、化学発光増強分子をデンドリマーの反応性部位に結合させることにより形成されるか、又はデンドリマーの反応性部位を増強部分に化学的修飾させることにより形成される、請求項27記載の化学発光基質送達システム。

## 【請求項29】

エンハンサー部分が、デンドリマーのアミノ基のペルアルキル化により、デンドリマーのアミノ基のペルアルキルカルボニル化により、又はデンドリマーのアミド基のアルキル

50

化により形成される、請求項 2 7 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 3 0】

エンハンサー部分を、 dendriマーのカルボキシラート基と、アミノ結合アンモニウム、ホスホニウム又はスルホニウム塩との反応により形成する、請求項 2 8 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 3 1】

第二の dendriマーをさらに含む、請求項 1 記載の化学発光基質送達システムであって、第二の dendriマーが、化学発光エンハンサー部分を含み、かつ第二の dendriマーが、少なくとも 1 つの酵素活性な化学発光基質部分に結合した dendriマーと共有結合又はイオン結合で結合している、送達システム。

10

【請求項 3 2】

化学発光基質及び/又は dendriマーが、1 つ以上の水可溶性基を含む、請求項 1 記載の化学発光性送達システム。

【請求項 3 3】

1 つ以上の水可溶性基が、カルボン酸、エステル、アルキル - オキシド、アリアル - オキシド、アルキル - アミド、アリアル - アミド、アラルキル - アミド、アルキル - ウレタン、アリアル - ウレタン、アルキル - スルホンアミド、アリアル - スルホンアミド、アルキル - スルホン酸、アリアル - スルホン酸、第四級アンモニウム塩、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 3 2 記載の化学発光基質送達システム。

【請求項 3 4】

サンプル中の検体の存在又は濃度を測定するためのアッセイを実施するためのキットであって、

少なくとも 1 つの酵素活性な化学発光基質部分を含む dendriマー；及び

化学発光基質を活性化して、発光分解する過酸化中間体を生成することができる酵素を含むキット。

20

【請求項 3 5】

酵素活性化される化学発光基質部分が、酵素不安定基を有するジオキセタンを含み、かつ酵素が、酵素不安定基を切断して、過酸化中間体を生成することができる、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 3 6】

化学発光増強物質をさらに含む、請求項 3 5 記載のキット。

30

【請求項 3 7】

アッセイが、免疫アッセイであり、かつ酵素が、検体に結合することができる薬剤との複合体を形成する、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 3 8】

アッセイが、DNAプローブアッセイであり、キットが、アッセイを実施することができる膜をさらに含む、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 3 9】

基質から得られる化学発光シグナルを増加させるための増強物質をさらに含む、請求項 3 8 記載のキット。

40

【請求項 4 0】

酵素が、薬剤との複合体を形成し、かつ薬剤が、検体との複合体を形成することができる、請求項 3 8 記載のキット。

【請求項 4 1】

アッセイが、DNA配列分析アッセイであり、かつキットが、該配列分析アッセイを実施することができる膜をさらに含む、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 4 2】

キットが、化学発光増強物質をさらに含む、請求項 4 1 記載のキット。

【請求項 4 3】

酵素が、アッセイで配列を決定すべき DNA に対し酵素の付着を可能にする薬剤との複

50

合体を形成する、請求項 4 1 記載のキット。

【請求項 4 4】

酵素が、化学発光基質を酸化し、過酸化中間体を生成することができる、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 4 5】

化学発光基質が、ルミノール部分、イソルミノール部分、アクリジニウムエステル部分、アクリジニウムスルホニルアミド部分又はルシフェリン部分からなる群より選択される部分を含む、請求項 4 4 記載のキット。

【請求項 4 6】

サンプル中の検体の存在を検出する方法であって、以下の工程：

酵素と、検体に結合しうる物質との間で、酵素複合体を形成する工程；

酵素複合体を、サンプルに添加する工程；

酵素複合体を、サンプル中に存在する検体と結合させる工程；

サンプルに、化学発光送達システムを添加する工程；及び

サンプルからの化学発光を測定する工程；

を含み、ここで、化学発光送達システムが、 dendrimer 及び dendrimer と結合した、少なくとも 1 つの酵素活性な化学発光基質を含み、かつ測定された化学発光量が、サンプル中の検体の存在及び / 又は濃度を示す方法。

【請求項 4 7】

測定工程の前に、検体と結合していない酵素複合体を除去する工程をさらに含む、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

検体に結合しうる基質が、抗原、抗体又は核酸プローブである、請求項 4 6 記載の方法

。

【請求項 4 9】

アッセイを、固体支持体上で実施する、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 5 0】

検体の存在が、固体支持体上のアレイに配置された複数のサンプルにおいて検出される、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

固体支持体に検体を結合させることをさらに含む、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 2】

酵素が、グリコシダーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、オキシダーゼ、ペプチダーゼ及びホスファターゼからなる群より選択される、請求項 4 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロスリファレンス

本出願は、2001年1月8日に提出した米国仮出願No. 60/259,870、及び2001年4月26日に提出した米国仮出願No. 60/286,383に基づく。

【0002】

発明の分野

本発明は、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート (conjugate) ; 樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートの合成 ; 樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートを含む組成物 ; 及び樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートの使用方法に関する。本発明はまた、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートと組み合わせたエンハンサー物質の使用に関する。複数 (すなわち、3 ~ 3072) の酵素活性化可能な化学発光基質を結合することにより、検出可能な化学発光を増幅する、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート及びエンハンサー樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートは、免疫アッセイ、化学的アッセイ及び核酸プローブアッセイにおいて、並びに合成ポリマー、タンパク質、核酸等を含む高

10

20

30

40

50

分子の微細構造を研究するための化学的 / 物理的プローブ処理において、化学的若しくは生物学的物質の存在の検出又は濃度の測定に有用である。

#### 【 0 0 0 3 】

##### 背景技術

樹状ポリマー（さもなければ、「デンドリマー」として知られている）は、一様なポリマーであり、中心核、内部樹状（高分岐）構造及び末端基による外部表面を有する高分岐デンドリマー、アルボロール、フラクタルポリマー及び星形デンドリマーとして、文献に色々な名前で行きわたっている。これらのポリマーは、形態及び機能の双方において、古典的な直鎖状ポリマーとは相違する。直鎖状ポリマーの化学的性質は、微視的なサイズから巨視的なサイズまでの生成物種の分布をもたらす、無秩序な、制御されていないプロセスに由来する。ポリマーの分子直線性は、分子量の増加と共に急激に増加する粘度、ランダムなコイル内に隠された部位のための平凡な化学的反応性及び可変若しくは平凡な溶解度といった巨視的な性質を規定するほど絡み合った巨大分子集団をもたらす。対照的に、デンドリマーの化学的性質は、サイズ、形態トポロジー、フレキシビリティ及び表面基の厳密な制御により巨大分子を構築している。分岐合成として知られているところでは、これらの高分子は、イニシエーターの核を、高収率の相互反応配列で反応させることにより開始して、明確な表面基を有する核から放射状に広がる対称な分岐を構築する。あるいは、収束合成として知られているところでは、樹状の楔を、表面から中心部に向かって内側へ構築し、次いで数個の樹状の楔を、中心部で多官能性の核と結合させる。樹状合成は、世代として知られる同心性の層を形成し、各世代は分子量及び分岐末端での反応性基の数を倍加し、そのため最終的な世代のデンドリマーは、高純度で、広範な条件にわたって容易に溶解する一様な単分散の巨大分子である。以下に論ずる理由により、デンドリマーの分子量は 3 0 0 ~ 7 0 0 , 0 0 0 ダルトンの範囲であり、表面基（例えば、結合のための反応性部位）の数は 3 ~ 3 , 0 7 2 の範囲である。

10

20

#### 【 0 0 0 4 】

デンドリマーが各世代と共に発展するに従って、分岐の密集による立体的な制約が、ポリマーの形状を、ヒト型分子から球状分子まで変化させる。例えば、星形ポリアミドアミン（「PAMAM」）デンドリマーに関して、0 ~ 3 世代は、ドーム型であり、4 世代は、扁球型を有する遷移世代であり、そして5 世代以降は、中空の内部及び表面外皮を有するシンメトリックな球状である。（分岐末端での表面の密集を増加させることにより生じる）サイズの増加に伴う、ドーム型から球状への、この形状の変化は、樹状ポリマーの一般的な特徴である。

30

#### 【 0 0 0 5 】

樹状の発展、形状及びトポロジーは、核、内部分岐構造及び表面基によって制御される。デンドリマーは、一定の末端表面基エリアを保持するように、シンメトリックに拡張する。例えば、星形デンドリマーに関して、表面基 - C O <sub>2</sub> M e は、9 3 A <sup>2</sup> / 基を要し、一方表面基 - N H <sub>2</sub> は、1 5 0 A <sup>2</sup> / 基を要する。より大きな立体的なかさを有する末端基、例えば - N H <sub>2</sub> は、P A M A M で観察されたように表面の立体的な相互作用により、より大きな核中空の形成を促進する。対照的に、ポリエーテル星形デンドリマーは、3 世代以内に密集状態になり、非常にわずかな内部空洞しか有さない。一般に、樹状の発展は、表面の反応性部位の立体的な密集状態が、さらなる化学的な修飾を妨げるので、自己制約的となる；P A M A M 星形デンドリマーの場合、これが 9 ~ 1 0 世代で起こる。

40

#### 【 0 0 0 6 】

本明細書で論じるように、樹状の表面は、表面の化学的性質として利用可能な、3 ~ 3 , 0 7 2 個の末端基を持つことができる；末端基の数は、（立体の密集状態を規定する）デンドリマー構造の種類及びデンドリマーの世代による。アミノ（N H <sub>2</sub>）末端化デンドリマーは、例えばマイケルアクセプター（C H <sub>2</sub> = C H C O <sub>2</sub> R）、ハロエステル、エポキシド、アジリジン、活性化カルボン酸、酸クロリド、ハロゲン化ベンジル、カーボナート及びアルデヒドと反応する。ヒドロキシル（O H）末端化デンドリマーは、例えばハロスルホン酸エステル、活性化カルボン酸及び酸クロリドと反応する。エステル及び酸

50

(CO<sub>2</sub>R、CO<sub>2</sub>H)末端化 dendrimer は、例えばアミンと反応し、そしてハロゲン化物末端化 dendrimer は、例えばアミン並びにアルコキシド及びチオアルコキシドアニオンと反応する。他の反応性表面基は、特に、ハロゲン化カルボキシ、イミノ、イミド、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルアリアルアミノ、シアノ、スルホン酸エステル、ジチオピリジル及びスルフヒドリルを含む。通常 dendrimer 表面の化学反応は、表面に立体の密集状態がなければ、単一の有機分子と同様に速やかに、特異的かつ高収率で起こる。星形 PAMAM dendrimer (NH<sub>2</sub>-末端化、OH-末端化及びCO<sub>2</sub>R-末端化)及びアストラモール (Astramol) PEI dendrimer (NH<sub>2</sub>-末端化)を含む、市販の dendrimer の構造は、図 1A ~ 1D に示されており、Aldrich Chemical Co.、Dendritech Inc. 及び DSM Fine Chemicals から入手可能である。加えて、反応性表面基を有する多くの他の樹状ポリマーが合成され、かつ論文に報告されている (総説として、例えば、"Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives," G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vogtle, VCH Publishers, Inc. New York (1996) 及び最後に引用した参考文献を参照のこと)。

10

## 【0007】

近年、樹状ポリマーのサイズ、形状及び性質を、分子的に特定の末端の使用に適合するようにつらえることができることを見出された。樹状ポリマーは、従ってポリマー単位あたり、高濃度の担持物質の送達、制御された送達、標的送達及び/又は多種の送達あるいは使用の手段を提供することができるという、重要な利点を有する。

## 【0008】

20

米国特許第5,338,532号、第5,527,524号及び第5,714,166号は、薬剤、トキシン、金属イオン、放射性核種、信号発生剤 (signal generators)、信号反射剤 (signal reflectors)、キレート化金属、信号吸収剤 (signal absorbers)、抗体、ホルモン、生体応答調節剤、診断用乳濁剤、蛍光性部分及び除去剤を含む、様々な物資と結合した高密度星形ポリマー又は星形ポリマー；コンジュゲートの製造方法；コンジュゲートを含む組成物；及びコンジュゲートの使用方法を開示している。

## 【0009】

米国特許第5,482,698号は、複数のアビジン又はビオチン結合部位を有するポリマーを含む病変を検出又は処理する方法であって；アビジン又はビオチンに検出剤又は治療剤を添加し；そして病変を検出又は処理する方法を開示している。

30

## 【0010】

米国特許第5,443,953号及び第5,635,603号は、グリコシル化抗体フラグメントを含む可溶性免疫コンジュゲート、並びに少なくとも1つの遊離のアミノ基を有するポリマー担体及びポリマー担体に共有結合した検出可能な標識分子を含む中間体コンジュゲートを開示している。

## 【0011】

上記に引用した参考文献のいずれも、化学発光基質と樹状ポリマーとの結合を開示していない。

## 【0012】

1,2-ジオキセタン酵素基質は、様々なタイプの酵素アッセイに使用される、極めて有効な化学発光リポーター分子として確立されている。これらのアッセイは、放射性同位体、発蛍光団、複雑なカラーシフト、2次反応等に依存する通常のアッセイに代わる好ましい方法を提供する。この目的で開発されたジオキセタンは、米国特許第4,978,614号、第5,112,960号、第5,538,847号及び第5,582,980号、並びに米国特許出願第09/362,047号 (係属中) に記載されたものである。米国特許第4,978,614号は、特に、PE社 (NY) の登録商標である商品名 AMPPD (登録商標) の下に、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) から市販されている 3-(2-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタンを開示している。米国特許第5,112,960号、第5,538,847号及び第5,582,980号は、アダマンチル安定化環を、ヒドロキシ、ハロゲン等を含む様々な置換基で、いずれかの橋頭位置で置換し、別の

40

50

状況では静的な又は容易に化合しないアダマンチル安定化基を、ジオキセタン環の分解速度に係る活性基に変換する類似の化合物を開示している。このタイプの化合物は、多くの適用において、AMP PD (登録商標) よりも急速かつ強いシグナルを与える。PE社 (NY) の登録商標であるCSPD (登録商標) は、アダマンチル基に塩素置換基を有する第二世代のジオキセタンである。この物質はまた、アブライドバイオシステムズからも入手可能である。CSPD (登録商標) は、光強度及び検出感度の改善をもたらす。米国特許出願第09/362,047号は、酵素により切断可能な、化学発光1,2-ジオキセタンを開示しており、それは可視スペクトルの赤色又は緑色端に近接した波長で放射する。本段落で引用した各々の特許及び特許出願は、そのまま参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0013】

化学発光を生ずる反応は、媒質が、メッセージでなくとも、伝達されたメッセージの強度を決定することができるという、さらに別の例を示す。化学発光化合物は、中程度の極性又は極性非プロトン性有機溶媒のような物質、例えばn-ブタノール、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド又はジメチルホルムアミド中での分解で、容易な検出及び定量に十分な強度の光を放射する発光団を生じるが、極性プロトン性の環境下、特に水性媒体中で分解した場合、かなり光強度が小さくなる。しかし、全ての生物学的系は、水性(実際、ヒトは約97%水である)であるゆえに、免疫アッセイ、核酸プローブアッセイ、化学的/物理的プローブ技術及び他のバイオアッセイにおいて、化学発光標識又は基質により生じる光強度を増強する必要があることは明らかである。そのような増強を提供する一つの方法は、高価な光学式又電子装置: シングルフォトンカウンター、照度計、シンチレーションカウンター等を使用することである。

#### 【0014】

ジオキセタンは、特定の適用において、 $10^{-12}$  M程度の低濃度の検体の存在に関するアッセイにおける感度の増強のために、特に開発されたものであるが、 $10^{-12}$  M以下の濃度の検体を検出するため、ジオキセタンは、エンハンサーと共に用いられる。天然及び合成の水溶性高分子を含む、これらの増強剤は、米国特許第5,145,772号に詳細に開示されている。好ましい増強剤は、水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩、並びにそれらのコポリマー及び/又は混合物、例えばポリ(ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド)(TMQ)、ポリ(ビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド)(TBQ)及びポリ(ビニルベンジルジメチルベンジルアンモニウムクロリド)(BDMQ)を含む。

#### 【0015】

これらの増強剤は、ジオキセタンを隔離する疎水性の周囲環境を提供することによって、明らかにジオキセタンリポーター分子の化学発光シグナルを改善する。体液の使用のために大部分のアッセイにおいて不可避な水は、ジオキセタン化学発光の天然の「消光剤(quencher)」である。増強分子は、ジオキセタン分子、又は少なくとも励起状態のエミッター種が存在する微環境から、明らかに水を排除し、結果として化学発光の増強をもたらす。エンハンサー-ジオキセタン相互作用と関連するその他の効果もまた、化学発光増強に寄与することができる。

#### 【0016】

ジオキセタンに加えて、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びルシフェリンが、バイオアッセイにおいて化学発光標識として用いられる(Schroeder et al., Anal. Chem., 50,1114 (1978); Arakawa et al., Anal. Biochem., 79,248 (1979); 及びArakawa et al., Clin. Chem., 31,430 (1985)。総説として: Kricka et al., Clinical and Biochemical Luminescence, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Chapter 8, Marcel Dekker, Inc., New York (1982); Kricka, Ligand-Binder Assays, Chapter 7, Marcel Dekker, Inc., New York, (1985); McCapra et al., Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. I, K. Van Dyke (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1985), Chapter 2 (特に、第13頁、ジオキセタンの部を注目されたい); 及びBarnard et al., Ibid, Ch. 7を参照され

10

20

30

40

50

たい)。酵素標識は、カラー又は蛍光顕色技術によって検出される。近年、化学発光酵素免疫アッセイは、ルミノール/過酸化水素、ピロガロール/過酸化水素、Pholas dactylus ルシフェリン、又はルミノールを用いてアルカリ条件下で評価されるペルオキシダーゼ-コンジュゲートに基づく (Kricka et al., Clinical and Biochemical Luminescence, Chapter 8, L. J. Kricka and T. J. N. Carter (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York (1982))。

#### 【0017】

背景として、酵素活性化される化学発光基質は、酵素不安定基をそこで切断する酵素に対する基質として作用することによって、リポーター分子として使用される。このように酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ) は、通常の抗原/抗体リガンド結合アッセイにおける抗原若しくは抗体のいずれかと、又は核酸アッセイにおける核酸プローブと共有結合又はその他の複合体形成をすることができる。抗原若しくは抗体又は核酸プローブを有する酵素は、次いで標的抗原、又は核酸配列を含有すると疑われる検体と、抗体/抗原又はプローブ/核酸配列の間で複合体形成又はハイブリッド形成が可能な条件下に混ぜる。全ての非複合化又は非ハイブリッド化原料を洗浄除去又は分離除去した後、化学発光基質を添加する。疑わしい検体が存在する場合、酵素は、酵素不安定基化学発光基質を切断し、分解する中間体を生じる。分解現象が、発光現象である。

10

#### 【0018】

極めて低濃度 (例えば、約  $10^{-12}$  M 以下) の検体を検出するため、化学発光基質リポーター分子のシグナル強度を改善することが望ましく、同時に、アッセイの総合的な感度を改善するように、非酵素処理由来の発光によるバックグラウンドノイズの増加を回避することが望ましい。このように、化学発光基質の使用においてさらなる改善が求められている。

20

#### 【0019】

本開示に引用された全ての特許及び文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0020】

##### 発明の概要

本発明の目的は、化学発光リポーターによって放出されるシグナルに依存する、機械の判読率、感度及びアッセイのパフォーマンス面を改善することを含む、化学発光基質のパフォーマンスを改善することである。

30

#### 【0021】

本発明のもうひとつの目的は、臨床アッセイを自動化し、高密度アレイ (マイクロアレイ) でのハイスループットスクリーニングを提供するため、アッセイの総合的な感度を改善するように、化学発光基質のシグナルの強度及び分解能を改善し、同時に非酵素処理由来の発光によるバックグラウンドノイズの増加を回避することである。

#### 【0022】

上記の目的は、1つ以上の酵素活性化可能な化学発光基質を樹状ポリマーに結合させることによって、光シグナルを増幅するような、新規の樹状ポリマー化学発光基質により満たされる。シグナルの分解能はまた、高分子量の樹状骨格の摩擦抗力、すなわち、増加した分子サイズ、形状、分岐及び/又は累積荷電効果のため鈍化した分子拡散により改善し、これが酵素標識により発光を基質活性化領域に制限している。

40

#### 【0023】

本発明の化学発光基質は、複数の基質リポーター分子を樹状ポリマーの増強領域に結合させることにより、さらに増強させることができる。この方法では、水の消光から、より効果的な基質の隔離を実現することができる。いったん基質が発生すれば、効果的な化学発光増強のため、初期のリポーターは、すぐ近くの樹状ポリマーの疎水性増強領域に組み込むことができる。化学発光シグナルの増強は、結果として検出感度の増大をもたらす。

#### 【0024】

上記の目的に関して、本発明は、水性及び混合媒質中での化学発光基質の分解により放出された (例えば、光学的に検出可能な) 電磁エネルギーの検出能における改善を提供す

50

る。特に、本発明は、用いた化学発光基質の分解により放出された（例えば、光学的に検出可能な）電磁エネルギーの検出を増加させる手段を提供し、水性及び混合サンプル中での物質の存在を検出するか、あるいは濃度又は構造を測定する。本発明はさらに、用いた化学発光基質の分解により放出された電磁（例えば、光学的に検出可能な）エネルギーの検出能における改善を提供し、技術的に公認の免疫アッセイ、化学的アッセイ又は核酸プローブアッセイ技術により、化学的又は生物学的物質の存在を検出するか、あるいは濃度を測定する。本発明はまた、分子構造又は微細構造を研究するための、化学発光基質の分解により放出された電磁（例えば、光学的に検出可能な）エネルギーの検出能における改善を提供する。

#### 【0025】

本発明はまた、樹状ポリマー化学発光基質及びそのための中間体を調製する方法に関する。例えば、樹状ポリマーと化学発光基質とのコンジュゲートを調製するための第1の工程は、化学発光基質と樹状ポリマーとの結合を促進する温度で、適切な溶媒中、樹状ポリマーを化学発光基質と反応させることを含む。このように樹状の表面を、リンカー部分に適切な反応性部位を有するジオキセタン、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びその他ルシフェリンのような分子で結合することにより修飾することができる。この工程のさらに完全な議論を、以下に提供する。

#### 【0026】

従って、本発明は、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲート、コンジュゲートの調製方法、コンジュゲートを含む組成物及びコンジュゲート及び組成物の使用方法に関する。

#### 【0027】

これらの目的及び他の目的、並びに本発明の性質、範囲及び利用は、以下の詳細な説明、及び図面から、当業者には直ちに明らかになるであろう。

本発明は添付の図面を参照することでより理解されるであろう。これらの図は、例示に過ぎず、本発明の範囲を限定する意にとられるべきものではない。

#### 【0028】

##### 発明の詳細な説明

酵素によるアッセイの設計は、検出感度の増加と共に、シグナルを発生させる基質の酵素によるターンオーバーによって、有意なシグナル増幅を提供する。酵素基質は、通常、比色、蛍光又は化学発光性である。一般に、化学発光酵素基質は、低い固有ノイズ（例えば、光散乱及び自己蛍光）、及びより高い強度のシグナルアウトプットのため、より広範囲のダイナミックレンジの検出並びに感度の増加を提供する。化学発光性のアウトプットを検出するための機器類はまた、何ら励起源を必要としないため、蛍光検出に要するものよりも単純である。化学発光基質の例は、ジオキセタン（エステラーゼ、アルカリホスファターゼ及びグリコシダーゼ、例えば - ガラクトシダーゼ及び - グルクロニダーゼのような加水分解酵素により活性化される）、並びにルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及びルシフェリン（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコース又はガラクト - スオキシダーゼ及びルシフェラーゼのような酸化酵素により活性化される）を含む。これらの基質は、酵素活性化され、発光を伴い分解する不安定な過酸化中間体を生成する。得られる化学発光シグナルの測定は、免疫アッセイ、リポーター遺伝子アッセイ、DNAプローブアッセイ及びアレイフォーマットにおける酵素標識の検出を可能にする。

#### 【0029】

本発明の実施態様によれば、公知の樹状ポリマーの表面に結合した1つ以上のジオキセタン、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド及び/又はルシフェリンを含有する樹状ポリマー化学発光基質を合成することができる。本発明の樹状ポリマー化学発光基質を合成するために使用されうるいくつかのデンドリマー出発原料の限定的でない例は、図1A~1Dに記載されている。図1Aは、NH<sub>2</sub>の表面基を有するポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーを示す。図1Bは、

10

20

30

40

50

カルボン酸の表面基を有するポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーを示す。図 1 C は、ヒドロキシルの表面基を有するポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーを示す。図 1 D は、 $\text{NH}_2$  の表面基を有するポリプロピレンイミン (PEI) デンドリマーを示す。

【0030】

本発明の樹状ポリマー化学発光基質を合成するために使用されうるプレカーサーを結合した化学発光基質を、図 2 A ~ 2 L に示す。図 2 A ~ 2 L において、置換基は、以下のように定義される：

【0031】

A は、H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールであり；

10

【0032】

B は、NA、 $\text{NC(O)A}$ 、O、S 又は  $\text{CH}_2$  (ここで、A は、独立して H、アルキル、トリハロアルキル又はアリールである) であり；

【0033】

Y は、独立して H、ヒドロキシル基、ハロゲン、非置換の低級アルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、ハロ低級アルキル基、フェニル基、ハロフェニル基、アルコキシフェニル基、アルコキシフェノキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、シアノ基、アミド基、アルコキシ基又はカルボキシル基であり；

【0034】

R は、アルキル基 (例えば、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$  アルキル基)、ハロアルキル基 (例えば、モノ -、ジ - 若しくはトリ - ハロアルキル)、アリール基又はアラルキル基であり；

20

【0035】

X は、ホスファート、ガラクトシド、アセタート、1 - ホスホノ - 2, 3 - ジアシルグリセリド、1 - チオ - D - グルコシド、アデノシントリホスファート、アデノシンジホスファート、アデノシンモノホスファート、アデノシン、 $\alpha$  - D - グルコシド、 $\beta$  - D - グルコシド、 $\alpha$  - D - グルクロニド、 $\beta$  - D - マンノシド、 $\alpha$  - D - フルクトフラノシド、 $\beta$  - D - グルコシドウロナート；5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ -  $\alpha$  - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシド及びアルコキシ誘導体 (例えば、4, 7 - ジ - O - メチル)、p - トルエンシルホニル - L - アルギニンエステル、並びに p - トルエンシルホニル - L - アルギニンアミドからなる群より選択される、酵素不安定基であり；

30

【0036】

Z は、ハロ、アルコキシ又はアルキル基であり；そして

【0037】

T は、H、電子供与性基、電子吸引性基、又は補助的な発光団に若しくはいずれかの生物学的な部分に結合していてもよい有機リンカー基である。

【0038】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートの一般的な構造の例を、図 3 A ~ 3 O に示す。図 3 A ~ 3 L において、置換基 A、B、Y、R、X、Z 及び T は、図 2 A ~ 2 L に関して述べたのと同義である。デンドリマーに結合したジオキセタン部分の数を示す N は、正の整数である。本発明の好ましい態様によれば、図 3 A ~ 3 F における N は、6 ~ 768 である。

40

【0039】

本発明によれば、図 3 M は、複数のジオキセタンと結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形デンドリマーを示す。本発明の別の実施態様によれば、図 3 N は、複数のジオキセタンと結合したアミノ末端基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形デンドリマーを示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図 3 O は、複数のジオキセタンと結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (PEI) 星形デンドリマーを示す。

【0040】

図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキ

50

ームを示す。図4A～4Fにおいて、置換基A、B、Y、R、X及びNは、上記と同義である。「アクチベーター」は、混合無水物、NHSエステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。

#### 【0041】

図4Aにおいて、「アリアル」置換基は、図3A又は3Gに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Bにおいて、「アリアル」置換基は、図3B又は3Hに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Cにおいて、「アリアル」置換基は、図3C又は3Iに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Dにおいて、「アリアル」置換基は、図3D又は3Jに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Eにおいて、「アリアル」置換基は、図3E又は3Kに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。図4Fにおいて、「アリアル」置換基は、図3F又は3Lに記載されたようにフェニル基又はベンゾチアゾールであってよい。

10

#### 【0042】

樹状ポリマーコンジュゲートのさらなる例は、図5A～5I及び図6A～6Jに示される。図5A～5Cは、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。図5A～5Cにおいて、Nは、上記に述べたのと同義である。本発明の好ましい実施態様によれば、Nは、6～768である。図5Aにおいて、置換基Aは、水素又はアルキル基であってよい。図5Cにおいて、置換基A及びBは、上記に述べたのと同義である。

20

#### 【0043】

本発明の実施態様によれば、図5Dは、複数のイソルミノール部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明の別の実施態様によれば、図5Eは、複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図5Fは、複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン(PEI)星形 dendrimer を示す。

#### 【0044】

図5G～5Iは、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。図5G～5Iにおいて、Nは、上記に述べたのと同義である。図5Gにおいて、置換基Aは、水素又はアルキル基であってよい。図5G及び5Hにおいて、置換基Dは、H又は $\text{PO}_3\text{H}_2$ であってよい。図5Iにおいて、置換基Bは、独立して、NA、O、S又は $\text{CH}_2$ （ここで、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい）であってよい。

30

#### 【0045】

図6A～6Cは、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。図6A～6Cにおいて、Nは、上記に述べたのと同義であり、Xは、ハロゲン化物又はトリフラートのような、対イオンである。図6Aにおいて、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい。図6Cにおいて、置換基Bは、NA、NH、O、S又は $\text{CH}_2$ （ここで、置換基Aは、アルキル又はアリアル基であってよい）であってよい。

40

#### 【0046】

図6D～6Iは、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。図6D～6Iにおいて、Nは、上記に述べたのと同義であり、Xは、ハロゲン化物又はトリフラートのような、対イオンである。図6D及び6Gにおいて、置換基Aは、H又はアルキル基であってよい。図6D、6E、6G及び6Hにおいて、置換基Rは、アルキル又はアリアル基であってよい。図6F及び6Iにおいて、置換基Bは、NA、NH、O、S又は $\text{CH}_2$ （ここで、置換基Aは、アルキル又はアリアル基であってよい）であってよい。

#### 【0047】

本発明の実施態様によれば、図6Jは、複数のアクリジニウムエステル部分と結合した

50

カルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン ( P A M A M ) 星形 dendriマーを示す。本発明の別の実施態様によれば、図 6 K は、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン ( P A M A M ) 星形 dendriマーを示す。本発明の別の実施態様によれば、図 6 L は、複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン ( P A M A M ) 星形 dendriマーを示す。本発明の別の実施態様によれば、図 6 M は、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン ( P A M A M ) 星形 dendriマーを示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図 6 N は、複数のアクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン ( P E I ) 星形 dendriマーを示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図 6 O は、複数のアクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン ( P E I ) 星形 dendriマーを示す。

10

## 【 0 0 4 8 】

図 6 P ~ 6 R は、本発明の dendriマーとアクリダン部分のコンジュゲートを示す。図 6 P ~ 6 R において、置換基 D は、 $P O_3 X_2$ 、グリコシド又はスルファート (ここで、X は、ハロゲン化物又はアンモニウムのような対イオンである) であってよい。置換基 F は、N A、S 又は O (ここで、A は、H 又はアルキル基であってよい) であってよい。置換基 Z は、ハロ、アルコキシ又はアルキル基であってよい。N は、正の整数である。本発明の好ましい実施態様によれば、N は、1 ~ 10 の整数である。図 6 R において、置換基 B は、N A、O、S 又は  $C H_2$  (ここで、A は、H 又はアルキル基であってよい) であってよい。

20

## 【 0 0 4 9 】

図 7 A ~ 7 C は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートの合成を示す。図 7 A ~ 7 C において、dendriマーに結合した化学発光基質の数を示す「N」は、正の整数であり、「n」は、0 又は正の整数である。図 7 A 及び 7 B において、「アクチベーター」は、混合無水物、N H S エステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。図 7 A において、「A」は、H 又はアルキル基であってよい。図 7 C において、「B」は、N H 又は O であってよく、「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。本発明の好ましい実施態様によれば、図 7 A ~ 7 C における N は、6 ~ 768 の整数である。

30

## 【 0 0 5 0 】

図 8 A ~ 8 F は、いくつかの樹状ポリマーアクリジニウムコンジュゲートの合成を示す。図 8 A ~ 8 C は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステルコンジュゲートの合成を示し、図 8 D ~ 8 F は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホニルアミドコンジュゲートの合成を示す。図 8 A ~ 8 F において：X は、ハロゲン化物又はトリフラートのような対イオンであり；dendriマーに結合した化学発光基質の数を示す「N」は、正の整数であり；そして「n」は、0 又は正の整数である。本発明の好ましい実施態様によれば、図 8 A ~ 8 F における N は、6 ~ 768 の整数である。

## 【 0 0 5 1 】

図 8 A、8 B、8 D 及び 8 E において、「アクチベーター」は、混合無水物、N H S エステル、又はペプチド結合形成を促進するためにペプチド化学で使用されるその他の標準的な官能性であってよい。図 8 A 及び 8 D において、「A」は、H 又はアルキル基であってよい。図 8 C 及び 8 F において：「B」は、N H 又は O であってよく；そして「脱離基」は、ハロゲン又はメシラート、トシラート若しくはトリフラートのようなスルホン酸エステルであってよい。図 8 D ~ 8 F において、置換基「R」は、アルキル又はアリール基であってよい。

40

## 【 0 0 5 2 】

2 つ以上の異なる化学発光基質を dendriマー骨格に結合させることもまた望ましい。このように 2 つの酵素標識化学発光基質を有する樹状ポリマーの例は、図 9 A ~ 9 C に示

50

されている。本発明の実施態様によれば、図9Aは、ジオキセタン及びイソルミノール部分と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図9Bは、ジオキセタン及びアクリジウムエステル部分と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。本発明のさらなる実施態様によれば、図9Cは、ジオキセタン及びアクリジニウムスルホンアミド部分と結合した、ポリアミドアミン(PAMAM)星形 dendrimer を示す。

【0053】

図10は、ジオキセタン部分及び第四級アンモニウムエンハンサー部分に結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM) dendrimer を示す。図10に示したように、第四級アンモニウムエンハンサー部分は、ペルブチル化(perbutylated)アンモニウム部分である。

10

【0054】

本発明のさらなる実施態様によれば、図11は、ジオキセタン部分及びエンハンサー部分の双方に結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン(PAMAM) dendrimer を示す。本発明のエンハンサー部分は：アミノ末端化高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム又はスルホニウム塩；アミノ末端化第四級化Jeffamine類；アミノ末端化第四級化ポリエチレンイミン；又はアミノ末端化ポリ(2-、3-若しくは4-ビニルピリジニウム)塩であってもよい。

【0055】

「樹状ポリマー」は、規則的な樹状の分岐を示すポリマーであり、一連の又は世代ごとの分岐層を、核に又は核より付加することによって形成される。「樹状ポリマー」なる用語は、核、少なくとも1つの内部分岐層、及び表面分岐層によって特徴付けられる「dendrimer」を包含する(Petar R. Dvornic and Donald A. Tomalia in Chem. in Britain, 641-645, August 1994を参照のこと)。「dendron」は、核である、又は核に結合することができる中心部から放射する分岐を有する dendrimer の一種であって、直接的にか又は結合部分を介してかのいずれかで、dendrimer を形成する。多くの dendrimer は、共通の核に結合した2つ以上の dendron を含む。しかしながら、用語 dendrimer は、広く単一の dendron を含むことにも用いられる。

20

【0056】

樹状ポリマーは、対称及び非対称の分岐 dendrimer、カスケード分子、アルボロール等が含まれるが、これらに限定されず、最も好ましい樹状ポリマーは、高密度星形ポリマーである。本明細書に開示されている PAMAM 高密度星形 dendrimer は、分岐部分が、同じ長さからなる、対称性のものである。分岐は、前述の世代分岐上の末端-NH<sub>2</sub>基の水素原子で起こる。

30

【0057】

規則的な一連の分岐層の付加によって形成されないとしても、高分岐ポリマー、例えば高分岐ポリオールは、分岐パターンが dendrimer のそれにほぼ等しい規則性の程度を示す場合、樹状ポリマーに相当するとしてもよい。

【0058】

サイズ及び形状制御領域を有するトポロジカルポリマーは、反応性末端基を介して(例としては、共有結合で架橋するか、又は後述のように他の結合を介して)互いに結合した dendrimer であり、架橋型 dendrimer (bridged dendrimer) と呼ばれている。2つ以上の高密度星形 dendrimer が互いに結合している場合、それらは「凝集」又は「高密度星形凝集」と呼ばれている。

40

【0059】

従って、樹状ポリマーは、架橋型 dendrimer 及び dendrimer 凝集を含む。樹状 dendrimer は、dendrimer の世代的な単分散及び世代的な多分散溶液を包含する。単分散溶液中の dendrimer は、均一のサイズ及び形状ゆえに、実質的に全て同一世代である。多分散溶液中の dendrimer は、異なる世代の dendrimer の分布を含む。

【0060】

50

樹状ポリマーはまた、表面修飾型 dendrimer も含む。例えば、PAMAM dendrimer の表面を、アミノ酸（例えば、リシン又はアルギニン）の付加により修飾してもよい。

#### 【0061】

数種の一般的な結合スキームは、化学発光基質プレカーサーを樹状ポリマーに結合させるのに用いられてもよい。第一の方法は、一級又は二級アミノ-結合化プレカーサー、例えばアルケン若しくはエノールエーテル（すなわち、ジオキセタン調製用）、ルミノール、イソルミノール又はアクリジニウムエステル若しくはアクリジニウムスルホニルアミドを、混合無水物若しくは活性化エステルとして活性化されているか、又はカルボジイミド、ホスホニウム若しくはアンモニウム塩のようなカップリング剤で活性化されているカルボキシラート末端化樹状ポリマーと反応させ、アミド結合を形成させることを含む。一方、アミノ末端化樹状ポリマーが、活性化エステル-結合化化学発光基質プレカーサーと反応し、アミド結合を形成することもできる。アミド結合形成反応のこれらのタイプは、ペプチド合成文献に詳細に報告されており、当業者によって容易に実施されうる。第二の方法は、化学発光基質プレカーサーのリンカー上の脱離基（例えば、ハロゲン化物又はスルホン酸エステル）の、樹状ポリマーのアミノ又はアルコキシ末端基による求核置換反応により、エーテル又はアミン結合を形成することを含む。同様に、同じタイプの結合を、樹状ポリマー表面の脱離基の、結合した化学発光基質プレカーサーを有するアミン-又はアルコキシド-末端化リンカーによる求核置換反応により、合成することができる。第三の方法は、染料化学の分野において公知であり、塩化シアヌルに対し1~2個の樹状ポリマー表面基を、化学発光基質プレカーサー上のアミノ-、スルフヒドリル-、ヒドロキシル-又はフェノキシ-末端化リンカーにより置換された塩化シアヌル上の残余の1~2個の反応性塩化物と結合させることを含む。第四の方法は、アビジン-若しくはストレプトアビジン-結合化化学発光基質プレカーサーを、ビオチン化 dendrimer に結合させるか、又は逆にビオチン化化学発光基質プレカーサーを、アビジン-若しくはストレプトアビジン-修飾型 dendrimer に結合させる。文献に記載されている標準的な結合方法を用いて結合した任意の公知のリンカーを、樹状ポリマーに化学発光基質プレカーサーを結合させるのに使用することができる：リンカーと上述の結合方法は、例示に過ぎない。当業者は、適切なカップリング剤及び条件を選択することができ、容易に調製することができる。

#### 【0062】

樹状ポリマー及び化学発光基質プレカーサーを結合させた後、化学発光基質プレカーサーを修飾し、樹状ポリマー化学発光基質を形成することができる。例えば樹状ポリマー ジオキセタンの合成を完了するために、結合したプレカーサーエノールエーテルを対応するジオキセタンに光酸化し、酵素切断基の形成を完了するための任意の修飾、例えばリン酸トリエステルのリン酸モノエステルへの脱保護又は -ガラクトシドエーテルの脱アシル化が行われる。ジオキセタンの安定性及び/又は増強性を所望であれば、ジオキセタンに対する酸化処理前に、dendrimer-エノールエーテルコンジュゲートを、アリアルアルキル又はハロゲン化アルキルを用いて任意のアミノ部位でペルアルキル化してもよい。

#### 【0063】

上記に述べた、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートは、光強度及び/又は感度の改善、並びにシグナル分解能の改善を示す。これらの基質コンジュゲートは、特に酵素アッセイに使用するために調製される。ここで、樹状ポリマー ジオキセタンコンジュゲートの酵素不安定（例えば、X）置換基の加水分解酵素による除去（例えば、アルカリホスファターゼ、 -ガラクトシダーゼ又は -グルクロニダーゼによる）は、ジオキセタンの分解と化学発光を誘発する。一方、樹状ポリマールミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリン基質コンジュゲートの酸化（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコース若しくはガラクト-スオキシダーゼ又はルシフェラーゼによる）は、ジオキセタンの分解と化学発光を誘発する。酵素は、サンプル中の対象検体であってもよく、あるいはプローブ、抗原若しくは抗体に結合したり reporter 分子であってもよく、又は特異的結合対の他の構成の存在を検出するための、特異的結合対の任意の構成であってもよい。一般に、免疫アッセイ及びアレイ

10

20

30

40

50

フォーマットを含む、現存する広範な様々なアッセイ及びアッセイの形態は、樹状ポリマー化学発光基質コンジュゲートの使用をすることができ、視覚的に検出可能な化学発光シグナルを用い、サンプル中の特定の物質の存在及び/又は濃度を示す。

【0064】

例えば、サンプル中の酵素を検出するために、サンプルを、検出されようとする酵素によって切断されうる基を有する樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートと接触させることができる。酵素は、ジオキセタンの酵素切断基を切断し、ジオキセタンに結合した負に荷電した置換基（例えば、酸素アニオン）を形成する。この負に荷電した置換基は次いでジオキセタンを不安定化し、ジオキセタンを分解させ、光を放出する化学発光発色団を形成させる。この光の放出が、酵素の存在の兆しとして検出される。発光の強度を測定することによって、サンプル中の酵素の濃度を測定することができる。

10

【0065】

一方で、サンプルを、オキシダーゼ標識によって酸化されうる樹状ポリマールミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリンコンジュゲートと接触させることができる。酵素は直接的にルミノール、イソルミノール、若しくはルシフェリンを酸化するか、又は非直接的にアクリジニウムエステル、若しくはアクリジニウムスルホニルアミドを酸化し、過酸化水素の生成を介して、発光分解する不安定な過酸化中間体となる。検出された発光は、酸化酵素の存在を示す。発光の強度を測定することによって、サンプル中の酵素の濃度を測定することもできる。

【0066】

水のようなプロトン性溶媒中で、過酸化化学発光基質が分解する場合、光消光反応が起こることが知られている。一般的にアッセイは、水性環境下に行われるため、光消光反応は、実質的に観察される化学発光強度を弱める。一般的にサイズにおいて巨大分子である、水溶性の天然及び合成物質が、水性及び混合（すなわち、水性及び非水性成分を有する）媒体中での化学発光化合物の分解によって生じる発光蛍光団の光強度を増やすことができることも知られている。これらの増強因子は化学発光基質の化学発光シグナルを、明らかに疎水性の環境を与えることによって改善する。水（体液又は生物学的物質の使用により、ほとんどのアッセイの不可避の側面である）は、天然の化学発光の「消光剤」である。増強分子は、明らかに励起状態のエミッター種が存在する微小環境から水を排除しており、結果として化学発光の増強をもたらす。エンハンサー - 化学発光基質と関連するその他の効果もまた、化学発光の増強にも寄与することができる。本明細書で論じているように、水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩、並びにそれらのコポリマー及び/又は混合物、例えばポリ（ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド）、ポリ（ビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド）、及びポリ（ビニルベンジルジメチルベンジルアンモニウムクロリド）を含む増強剤は、米国特許第5,145,772号に詳細に記載されており、アッセイの感度を増加させるために使用されうる。

20

30

【0067】

米国特許第5,145,772号に記載されているように、特定の水溶性の天然及び合成物質、一般的には天然の巨大分子、例えば疎水性領域を含む水溶性の球状タンパク質：ウシ血清アルブミン（BSA）及びヒト血清アルブミン（HSA）のような哺乳類の血清アルブミン、あるいは水溶性の高分子第四級アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩：ポリ（ビニルベンジルトリメチル - アンモニウムクロリド）（TMQ）又はポリ〔ビニルベンジル（ベンジルジメチル - アンモニウムクロリド）〕（BDMQ）が、安定化を可能とし、それゆえ水性及び混合媒体中での化学発光化合物の分解によって生じる発光蛍光団の光強度を増やすことができる。このような化学発光化合物は、酵素処理により切断可能な1,2 - ジオキセタンであり；このような化学発光化合物の、互いの及び1つ以上の補助の発光蛍光団（例えば、フルオレセイン）との混合物は、化学発光化合物の分解によって生じるエネルギー放出発光蛍光団からのエネルギーを受け、次いで検出可能なエネルギーを放出する。有効量のエンハンサー物質の存在が、このように安定化された発光蛍光団により、水性媒体中で放出される光の強度を、このようなエンハンサーの不存在下で同量の

40

50

発蛍光団により放出される光の強度に比べて、有意に増加させる。

【 0 0 6 8 】

従って、本発明の追加の実施態様は、エンハンサー分子を樹状ポリマーに結合させること、又は樹状ポリマーの残余の反応性表面基を、エンハンサー部位を包含するように修飾することを含む。樹状ポリマーが、(上述のように)化学発光基質プレカーサーと10~90%の反応性部位で結合されていれば、残余の反応性部位を、増強剤と結合することができるか、又は増強性の表面基となるよう化学的に修飾することができる。あるいは、合成上の制約により必要ならば、化学発光基質プレカーサーを、エンハンサー巨大分子を結合した後又はいくつかの樹状反応性基を修飾後に、樹状ポリマーの反応性部位に結合させることができる。第一のアプローチによれば、例えば、哺乳類の血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、プロテインA又は哺乳類のIgGのような天然由来の巨大分子を含む、エンハンサー分子を、ペプチド化学及び生物学的結合形成(bioconjugation; 例えば、ストレプトアビジン-ビオチン親和性により2つの薬剤の結合)に分野において公知の方法により、樹状ポリマー表面基に結合させることができる。第二のアプローチによれば、エンハンサー分子は、各々樹状ポリマー表面基に結合させることができる、反応性末端基又は反応性リンカーを有する合成巨大分子物質を含む。反応性リンカー又は反応性末端基で修飾されている利用可能な合成増強物質は、適切には、ポリ(ビニルアリール第四級アンモニウム)塩、ポリ-N-ビニルオキサゾリジノン、ポリビニルカルバマート、ポリヒドロキシアクリラート及びポリヒドロキシメタクリラート、第四級化アミン-含有オリゴマー(例えば、Jeffamine類)、合成ポリペプチド(ポリリシン及びナイロンを含む)、ポリビニルアルキルエーテル、ポリアクリルアミド及びポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ2-、3-若しくは4-ビニルピリジニウム塩、ポリビニルアルキルピロリジノン、ポリビニルアルキルオキサゾリドン、第四級化ポリエチレンイミン、ポリ-N-ビニルアミン、アルキル化若しくはアリール化ポリビニルピペリジン、ポリアクリロイル、ポリメタクリロイル若しくは4-ビニルベンゾイルアミンイミド、並びに同様の樹状又は高分岐類似体を含む。第三のアプローチによれば、樹状ポリマーの反応性の表面及び/又は内部基を、化学的に修飾し、エンハンサー部分を与える。化学発光の増大を可能とする樹状ポリマーの修飾の例は、末端及び/又は内部アミンのペルアルキル化、末端及び/又は内部アミドのアルキル化、及び末端活性エステルとアミノ-結合アンモニウム、ホスホニウム若しくはスルホニウム塩との反応を含む。第四のアプローチによれば、樹状ポリマーの化学発光基質を、リンカーを介して樹状ポリマーのエンハンサーに結合し、架橋型 dendrimer 構造を形成する。

【 0 0 6 9 】

加えて、水-可溶性基(数は、1個以上)、すなわち水溶液中のジオキセタンの溶解度を向上させる置換基は、カルボン酸若しくはエステル、アルキル-若しくはアリールオキシド、アルキル-、アリール-若しくはアラルキルアミド、アルキル-若しくはアリールウレタン、アルキル-若しくはアリールスルホンアミド、アルキル-若しくはアリールスルホン酸及び第四級アミノ塩を含み;最も好ましい可溶性置換基は、アルキル-若しくはアリールオキシド、アミド、及びスルホンアミドであり、これらを化学発光基質又は dendrimer に付加し、一般的に性質において水性であるサンプル中の基質の溶解度を向上させることができる。選択された置換基が、水素であるか、又は電子活性であるかによって、その性質が、溶解度に加えて、分解反応の半減期( $T_{1/2}$ )、化学発光の収率、及びシグナル/ノイズの比( $S/N$ )に影響を及ぼすかもしれない。ジオキセタン化学発光での適切な置換基及びその影響力は、フェノキシ置換ジオキセタンに関連して論じられ、米国特許第5,330,900号に開示かつクレームされており、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

【 0 0 7 0 】

上述の樹状ポリマー化学発光基質を、許容可能な環境による、任意のリポーター分子に基づくアッセイに使用することができる。このようなアッセイの例は、抗体又は抗原を検出する免疫アッセイ、ウィルス(例えば、HTLVIII若しくはサイトメガロウィルス)

10

20

30

40

50

、又は細菌（例えば、E. Coli）、及び特定の細胞機能（例えば、受容体結合部位）等を検出する、例えば酵素アッセイ及び核酸アッセイを含む。

【 0 0 7 1 】

抗体、抗原若しくは核酸のような物質を検出するために、ジオキセタンの酵素切断基を切断することができる酵素、あるいはルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルアミド又はルシフェリンを酸化することができる酵素は、好ましくは検出可能な物質に特異的親和性を有する物質（すなわち、検出可能な物質に特異的に結合する物質）、例えば、抗原、抗体、若しくは核酸プローブに結合させる。酵素の直接結合に加えて、リガンドを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合することもできる。次いでリガンドは、ジオキセタンの酵素切断基を切断することができ

10

【 0 0 7 2 】

一般に、アッセイは以下のように行われる。ある例では、検出可能な物質の混入が疑われるサンプルを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合した酵素を含む緩衝溶液と接触させる。得られた溶液を、インキュベートし、検出可能な物質を特異的親和性 - 酵素複合体の特異的親和性部分に結合させる。過剰の特異的親和性 - 酵素複合体を洗い流し、特異的親和性 - 酵素複合体の酵素標識により切断可能な基を有するか、又は特異的親和性 - 酵素複合体の酵素標識により酸化可能な基を有する樹状化学発光基質を加える。第二の例では、検出可能な物質の混入が疑われるサンプルを、検出可能な物質に特異的親和性を有する物質に結合したリガンドを含む緩衝溶液と接触させる。得られた溶液を、インキュベートし、検出可能な物質を特異的親和性 - リガンド複合体に結合させる。過剰の特異的親和性 - リガンド複合体を洗い流し、酵素標識したリガンド結合剤を加え、インキュベートし、酵素標識したリガンド結合剤をリガンドに結合させる。次いで過剰の酵素標識したリガンド結合剤を洗い流し、酵素標識したリガンド結合剤の酵素部分により切断可能な基を有する樹状化学発光基質を加える。双方の例において、酵素活性化過酸化中間体が分解し、冷光を放つ。冷光を、キュベット、又はカメラ式照度計における光感応性フィルム、又はCCD、又は光電セル若しくは光電子増倍管を用いて検出し、サンプル中の検出可能な物質の存在及び濃度を測定する。

20

30

【 0 0 7 3 】

別のタイプのアッセイでは、生物学的サンプル中の検出可能な物質に特異的親和性を有する物質を、場所的に明確に定義されたパターンで固体支持体上に配置する。平面若しくは非平面、多孔性若しくは非多孔性、立体若しくはビーズ状の形で、ガラス、プラスチック、シリコン、ポリマーのような固体支持体が用いられる。生物学的サンプル中の検出可能な物質は、核酸又はタンパク質であってよい。検出可能な物質を含有する生物学的サンプルを、固相アレイに接触させ、検出可能な物質の結合に最適な条件下で、インキュベートする。ある場合には、検出可能な物質を、化学的又は酵素的な手段により検出可能なリガンドで前標識し、続いて酵素標識したリガンド結合剤で検出する。別の場合には、結合した非標識物質を、結合した検出可能な物質に親和性を有する第二の酵素 - 又はリガンド - 標識した物質で生物学的サンプルから検出する。この標識した物質の結合は、アレイ上の検出可能な物質の捕捉前又は捕捉後であってもよい。検出が、リガンド標識した物質を含む場合、酵素標識したリガンド結合剤を用いた追加のインキュベーションを必要とする。適切な洗浄が、必要なインキュベーションの間に行われる。全ての場合における最終工程は、酵素標識した検出剤の酵素部分により切断可能な基を有するか、又は特異的な酵素標識した複合体の酵素部分により酸化可能な基を有する樹状化学発光基質の添加であろう。酵素活性化過酸化中間体が分解し、冷光を放つ。冷光を、電荷結合カメラ（CCD）、フィルム、又は他の光感応画像装置を用いて検出し、特定領域で測定される光強度を決定

40

50

する。

【0074】

以下の例は、本発明をさらに説明するものであって、本発明の範囲に対する限定と解釈すべきものではない。

【実施例】

【0075】

活性化エステル dendrimer の合成

カルボキシラート末端化 dendrimer (例えば、星形 PAMAM dendrimer、pH 7 に調節) 100 mg 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (1.0 eq/カルボキシラート末端基) の無水 1,2-ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC、1.0 eq/カルボン酸末端基) 又は 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI、1.0 eq/カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物をろ過により又は (EDCI 副生物を) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗生成物をクロマトグラフィーにより精製した。

10

【0076】

図 4 A 又は 4 E に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、活性化エステル末端化 dendrimer 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、1 級又は 2 級アミンで末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (1.01 eq エノールエーテル/活性化エステル末端基; 例えば、アクチベーター = N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し 75 ml とし、水 (3 × 30 ml) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 × 30 ml) で洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 A 又は 4 E に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

20

【0077】

図 4 B 又は 4 F に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、アミノ末端化 dendrimer (例えば、星形 PAMAM dendrimer 又はポリプロピレンイミンテトラヘキサコンタアミン (polypropylenimine tetrahexacontaamine) dendrimer) 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、活性化エステルで末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (1.01 eq エノールエーテル/ $\text{NH}_2$  末端基; 例えば、アクチベーター = N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し 75 ml とし、水 (3 × 30 ml) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 × 30 ml) で洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 B 又は 4 F に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

30

【0078】

図 4 C 又は 4 D に記載された一般構造を有する樹状ポリマーエノールエーテルコンジュゲートの合成

合成スキーム 1:

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、アミノ末端化 dendrimer (例えば、星形 PAMAM dendrimer 又はポリプロピレンイミンテトラヘキサコンタアミン dendrimer) 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、ハロゲン化物 (例えば、I 若しくは Br) 又はスルホン酸エステル (例えば、メシラート、トシラート、ブロシラート (brosylate)) で末端化されたリンカーを有するエノールエーテルを加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し 75 ml とし、水 (3 × 30 ml) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 × 30 ml) で洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 C 又は 4 D に記載された樹状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

40

【0079】

50

合成スキーム 2 :

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、ブロモ - 又はメシラート - 、トシラート - 若しくは  
 プロシラート - 末端化 dendrimer (例えば、脱離基で修飾された、星形 PAMAM - O  
 H) 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、アミン又はヒドロキシル基で末端化  
 されたリンカーを有するエノールエーテルを加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 で希釈し 75 ml とし、水 (3 × 30 ml) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 × 30 ml) で洗浄  
 した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、図 4 C 又は 4 D に記載された樹  
 状エノールエーテルコンジュゲートを得た。

【0080】

ジオキセタン - ポリアンモニウム及びジオキセタン - ポリビニルピペリジニウム dendri- 10  
 mer の合成

カルボキシラート末端化 dendrimer (例えば、星形 PAMAM dendrimer、pH 7  
 に調節) 100 mg、アミノ末端化されたリンカーを有するエノールエーテル (0.5 eq/  
 カルボキシラート末端基) 及びアミノ末端化されたポリマー (0.5 eq/カルボキシラ  
 ート末端基、例えば、ポリエチレンジアミン、ポリ-N-ビニルアミン又はポリビニルピペリ  
 ジン) の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤  
 、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC、1.0 eq/カルボン酸末端基) 又は  
 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI、1  
 .0 eq/カルボン酸末端基) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物  
 をろ過により又は (EDCI ウレア副生物を) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、 20  
 粗エノールエーテル - エンハンサー dendrimer をクロマトグラフィーにより精製した。  
 アミン部位をハロゲン化アルキル (例えば、ペルメチル化するためのヨードメタン又はペ  
 ルブチル化するための臭化ブチル) との反応により、アンモニウム基にペルアルキル化し  
 、エノールエーテルを下記に記載のようにジオキセタンに酸化し、樹状ジオキセタン - ポ  
 リアンモニウム又は樹状のジオキセタン - ポリビニルピペリジニウム基質の合成を完了し  
 た。

【0081】

ビオチン化星形 dendrimer の合成

トリス、ヘペス、リン酸、炭酸又はホウ酸緩衝液中の、アミノ末端化 dendrimer (例  
 えば、星形 PAMAM dendrimer 又は星形 PEI dendrimer、pH 7 に調節) の 0. 30  
 1 mol 溶液を、N - ヒドロキシスクシンイミドビオチン (0.1 ~ 1.0 mol) と周囲温度で  
 12 ~ 48 時間反応させた。ビオチン化 dendrimer を、透析、サイズ排除クロマトグラ  
 フィー (SEC) 又はイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

【0082】

アビジン - 又はストレプトアビジン - 結合型星形 dendrimer

DMF 中の、アミノ末端化 dendrimer (例えば、星形 PAMAM dendrimer 又は星  
 形 PEI dendrimer、pH 7 に調節) の 0.1 mol 溶液を、カップリング剤 (例えば、  
 ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 又は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) -  
 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI)) の存在下にスクシニル - アビジン (Sigm 40  
 a) 又はスクシニル - ストレプトアビジンと反応させた。反応を周囲温度で 2 ~ 24 時間  
 攪拌した。アビジン - 結合型 dendrimer を、限外ろ過又はセファデックス (Sephadex)  
 カラムクロマトグラフィーにより精製した。

【0083】

一方、カルボキシラート末端化 PAMAM dendrimer 100 mg の脱イオン水 15 ml の  
 攪拌溶液に、アビジン又はストレプトアビジン及びカップリング剤 1 - (3 - ジメチルア  
 ミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI) を加えた。pH 5 付近に  
 溶液を保ちながら、反応を室温で 8 ~ 24 時間攪拌した。反応溶液を、限外ろ過するか、  
 又はセファデックスカラムを通して溶出し、アビジン - 又はストレプトアビジン - 結合型  
 dendrimer を得た。

【0084】

### イソルミノール - ウシ血清アルブミン dendriマーの合成

アビジン - 結合型 dendriマー 100 mg の pH 7 の水溶液を、ビオチン化アミノブチルエチルイソルミノール ( A B E I ) 及びビオチン化ウシ血清アルブミン ( B S A ) ( 1 : 1 のモル比で存在 ) の溶液に加え、周囲温度で 1 ~ 2 4 時間攪拌した。溶液を限外ろ過し、未反応のビオチン化剤を除去し、樹状イソルミノール - B S A 基質を得た。

#### 【 0 0 8 5 】

### 樹状ポリマー ジオキセタン コンジュゲートの合成

テトラフェニルポルフィン ( T P P 、  $\text{CHCl}_3$  5 ml 中、10 mg ) を含む、 dendriマー - エノールエーテル コンジュゲート ( 250 mg ) の 10 %  $\text{MeOH} / \text{CHCl}_3$  ( 50 ml ) 溶液を、5 分間、パストゥールピペットを介して酸素を散布しながら、氷浴中で冷却した。溶液を 400 ワットのナトリウム蒸気ランプで照射している間中、酸素の流入を続け、3.0 ml 厚のデュポンカプトンフィルム ( DuPont Kapton film ) でろ過した。光酸化が完了した後、反応から溶媒を除去し、水に溶解させ、1 インチの P L R P - S カラム ( Polymer Laboratories ) で、アセトニトリル / 水のグラジエントを用いて分取クロマトグラフに付した。生成物ピークを、前後で削り取り、中央のカットのみを回収した。溶離液を凍結乾燥し、白色固体として樹状ジオキセタン生成物を得た。

10

#### 【 0 0 8 6 】

### 樹状イソルミノール コンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、プロモ - 又はメシラート - 、トシラート - 若しくはプロシラート - 末端化 dendriマー ( 例えば、脱離基で修飾された、P A M A M - O H ) 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、N - ( 4 - アミノブチル ) - N - エチルイソルミノール ( A B E I ) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し 75 ml とし、水 ( 3 x 30 ml ) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( 3 x 30 ml ) で洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、樹状イソルミノール コンジュゲートを得た。

20

#### 【 0 0 8 7 】

### 樹状イソルミノール コンジュゲートの合成

トリエチルアミン 0.1 ml を含む、活性化エステル - 末端化 dendriマー ( 例えば、P A M A M - C O N H S ) 100 mg の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15 ml の攪拌溶液に、N - ( 4 - アミノブチル ) - N - エチルイソルミノール ( A B E I 、 1.01 eq イソルミノール / 活性化エステル末端基 ) を加えた。反応を室温で一晩攪拌し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し 75 ml とし、水 ( 3 x 30 ml ) 及び飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( 3 x 30 ml ) で洗浄した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を除去し、樹状イソルミノール コンジュゲートを得た。

30

#### 【 0 0 8 8 】

### 樹状アクリジニウムエステル コンジュゲートの合成

アミノ末端化 dendriマー ( 例えば、P A M A M - N H <sub>2</sub> 又は P E I 星形 dendriマー ) 100 mg、及び活性化カルボキシラート末端化リンカーを有するアクリジニウムエステル 1 mol 当量の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド ( D C C 、 1.0 eq / カルボン酸末端基 ) 又は 1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 ( E D C I 、 1.0 eq / カルボン酸末端基 ) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵した。ウレア副生物をろ過により又は ( E D C I ウレア副生物を ) 水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗樹状アクリジニウムエステルをクロマトグラフィーにより精製した。

40

#### 【 0 0 8 9 】

### 樹状アクリジニウムスルホニルアミド コンジュゲートの合成

アミノ末端化 dendriマー ( 例えば、P A M A M - N H <sub>2</sub> 又は P E I 星形 dendriマー ) 100 mg、及び活性化カルボキシラート末端化リンカーを有するアクリジニウムスルホニルアミド 1 mol 当量の無水 1, 2 - ジメトキシメタン 20 ml 溶液を、0 で攪拌した。カップリング剤、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド ( D C C 、 1.0 eq / カルボン酸末端基 ) 又は 1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 ( E D C I 、 1.0 eq / カルボン酸末端基 ) を 0 で加え、溶液を冷蔵庫に一晩貯蔵し

50

た。ウレア副生物をろ過により又は(EDCIウレア副生物を)水洗により除去し、有機溶媒を蒸発させ、粗樹状アクリジニウムスルホニルアミドをクロマトグラフィーにより精製した。

#### 【0090】

脱リン酸化ジオキセタンの化学発光半減期の測定

樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(0.004 mM)の1 mlのアリコート、0.1 Mジエタノールアミン、1 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 10中で、30 に平衡させた。アルカリホスファターゼを(1.05 × 10<sup>-9</sup> Mの最終濃度で)試験管に加え、化学発光シグナルキネティクスを、ターナー(Turner)TD-20E照度計で、10~20分間測定した。半減期は、log RLU対時間のプロットから計算された。化学発光半減期はまたSapphire-II(商標)エンハンサー(0.1 Mジエタノールアミン、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10%ポリビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド qt 1 mg/ml)の存在下でも測定された。

10

#### 【0091】

脱リン酸化ジオキセタンの最大光強度の測定

樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(0.004 mM)の0.5 mlのアリコートを、0.1 Mジエタノールアミン、1 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 10中で、30 に平衡させた。アルカリホスファターゼを(1.05 × 10<sup>-9</sup> Mの最終濃度で)試験管に加え、化学発光シグナルを、ターナー(Turner)TD-20E照度計で、10~20分間測定した。最大光強度を記録した。最大光強度をまた、Sapphire-II(商標)エンハンサー(0.1 Mジエタノールアミン、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10%ポリビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロリド qt 1 mg/ml)の存在下でも測定した。

20

#### 【0092】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、以下のようにTSHアッセイに用いてもよい。

#### 【0093】

原料

マウスモノクローナル抗TSH抗体を、検体捕獲用1/8インチビーズをコートするのに用いた。マウスモノクローナル抗TSH抗体を、アルカリホスファターゼと結合させ、検出抗体として用いた。TSHは、Calbiochem(カタログNo. 609396)から得られ、BSA(タイプV-脂肪酸フリー)は、Sigma(カタログNo. A6003)から得られた。検体及びコンジュゲートに使用した緩衝溶液は、0.1 Mトリス-HCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、及び2重量%のBSA(pH 7.5)を含有した。基質緩衝溶液は、0.1 Mトリス、0.1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1重量%のBSA(pH 9.5)、及び化学発光化合物として樹状ポリマージオキセタンコンジュゲート(50 µg/ml)を含有することができた。

30

#### 【0094】

プロトコール

TSHを含有する検体溶液15 µlを、コンジュゲート抗体溶液135 µlと混合した。上述のようにコートされた2つの1/8インチビーズを、溶液に加え、23 で2時間インキュベートした。次いで、ビーズを0.1 Mトリス(pH 7.5)で4回洗浄し、反応チューブに移した。上述の基質緩衝溶液に用いられた同じ化学発光化合物200 µlをチューブに加えた。20分間のインキュベート後、Berthold Clinilumat Luminescence Analyzerを用いて10秒カウントとして発光を記録した。

40

#### 【0095】

加えて、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、ヒトIgG、hCG、血清アルカリホスファターゼ、フェトプロテイン、TSH、又は評価される任意の物質に関するアッセイに、米国特許第4,978,614号に開示されたプロトコールに従って、用いてもよく、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

#### 【0096】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、以下のような核酸ハイブリッド

50

形成アッセイに用いてもよい。

【 0 0 9 7 】

サイトメガロウィルスの混入が疑われる脳脊髄液 ( C S F ) のサンプルを集め、ニトロセルロース膜上に配置した。次いでサンプルを、ウレア又はグアニジニウムイソチオシアナートで化学的に処理し細胞壁を破壊し、ウィルスDNAを除いた全ての細胞成分を分解した。このように得られたウィルスDNAのストランドを分離し、ニトロセルロースフィルターに接着させた。次いでウィルスDNAに特異的にかつアルカリホスファターゼで標識されたDNAプローブをフィルターに適用した。プローブは、相補的ウィルスDNAストランドとハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後、フィルターを0.2M NaCl及び0.1mMトリス-HCl ( pH 8.10 ) を含有する水性緩衝溶液で洗浄し、過剰の

10

【 0 0 9 8 】

本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを、米国特許第4,978,614号に開示された任意のDNAプローブアッセイに用いてもよく、その全内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

【 0 0 9 9 】

本発明の上記の議論は、主として好ましい実施態様及びその手段に関する。本明細書に記載されたコンセプトの現実の実施における、さらなる変更及び修飾は、本発明の意図及び範囲から逸脱することなく容易になされうることが、当業者には容易に明らかである。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 0 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendrimer の構造を示すが、ここで：図 1 A は、NH<sub>2</sub> の表面基を有するポリアミドアミン ( P A M A M ) dendrimer を示す。

【 図 1 B 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendrimer の構造を示すが、ここで：図 1 B は、カルボン酸の表面基を有するポリアミドアミン ( P A M A M ) dendrimer を示す。

【 図 1 C 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendrimer の構造を示すが、ここで：図 1 C は、ヒドロキシルの表面基を有するポリアミドアミン ( P A M A M ) dendrimer を示す。

30

【 図 1 D 】 図 1 A ~ 1 D は、いくつかの市販の dendrimer の構造を示すが、ここで：図 1 D は、NH<sub>2</sub> の表面基を有するポリプロピレンイミン ( P E I ) dendrimer を示す。

【 図 2 A 】 図 2 A は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 B 】 図 2 B は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 C 】 図 2 C は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 D 】 図 2 D は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 E 】 図 2 E は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 F 】 図 2 F は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

40

【 図 2 G 】 図 2 G は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 H 】 図 2 H は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 I 】 図 2 I は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 J 】 図 2 J は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 K 】 図 2 K は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 2 L 】 図 2 L は、本発明のプレカーサーを結合させたジオキセタンを示す。

【 図 3 A 】 図 3 A は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 B 】 図 3 B は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 C 】 図 3 C は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。

【 図 3 D 】 図 3 D は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。

50

- 【図 3 E】図 3 E は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 F】図 3 F は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 G】図 3 G は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 H】図 3 H は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 I】図 3 I は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 J】図 3 J は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 K】図 3 K は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 L】図 3 L は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 M】図 3 M は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 3 N】図 3 N は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。 10
- 【図 3 O】図 3 O は、本発明の樹状ポリマージオキセタンコンジュゲートを示す。
- 【図 4 A】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 A は、図 3 A および図 3 G に対応する。
- 【図 4 B】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 B は、図 3 B および図 3 H に対応する。
- 【図 4 C】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 C は、図 3 C および図 3 I に対応する。
- 【図 4 D】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 D は、図 3 D および図 3 J に対応する。
- 【図 4 E】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 E は、図 3 E および図 3 K に対応する。 20
- 【図 4 F】図 4 A ~ 4 F は、図 3 A ~ 3 L に示した樹状ポリマーコンジュゲートに関する合成スキームを示すが、ここで図 4 F は、図 3 F および図 3 L に対応する。
- 【図 5 A】図 5 A は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 B】図 5 B は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 C】図 5 C は、本発明の樹状ポリマーイソルミノールコンジュゲートを示す。
- 【図 5 D】図 5 D は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。
- 【図 5 E】図 5 E は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。 30
- 【図 5 F】図 5 F は、本発明の複数のイソルミノール部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (PEI) 星形 dendrimer を示す。
- 【図 5 G】図 5 G は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 5 H】図 5 H は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 5 I】図 5 I は、本発明の dendrimer とルシフェリンとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 A】図 6 A は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 B】図 6 B は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 C】図 6 C は、本発明の dendrimer とアクリジニウムエステルとのコンジュゲートを示す。 40
- 【図 6 D】図 6 D は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 E】図 6 E は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 F】図 6 F は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 G】図 6 G は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコンジュゲートを示す。
- 【図 6 H】図 6 H は、本発明の dendrimer とアクリジニウムスルホニルアミドとのコン 50

ジュゲートを示す。

【図 6 I】図 6 I は、本発明の dendrimer と アクリジニウムスルホニルアミドとの conjugate を示す。

【図 6 J】図 6 J は、本発明の複数の アクリジニウムエステル部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 K】図 6 K は、本発明の複数の アクリジニウムスルホンアミド部分と結合したカルボン酸の表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 L】図 6 L は、本発明の複数の アクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 M】図 6 M は、本発明の複数の アクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

10

【図 6 N】図 6 N は、本発明の複数の アクリジニウムエステル部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (PEI) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 O】図 6 O は、本発明の複数の アクリジニウムスルホンアミド部分と結合したアミノ表面基を有する、ポリプロピレンイミン (PEI) 星形 dendrimer を示す。

【図 6 P】図 6 P は、本発明の dendrimer と アクリダン部分の conjugate を示す。

【図 6 Q】図 6 Q は、本発明の dendrimer と アクリダン部分の conjugate を示す。

【図 6 R】図 6 R は、本発明の dendrimer と アクリダン部分の conjugate を示す。

【図 7 A】図 7 A は、本発明の樹状ポリマーイソルミノール conjugate の合成を示す。

20

【図 7 B】図 7 B は、本発明の樹状ポリマーイソルミノール conjugate の合成を示す。

【図 7 C】図 7 C は、本発明の樹状ポリマーイソルミノール conjugate の合成を示す。

【図 8 A】図 8 A は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステル conjugate の合成を示す。

【図 8 B】図 8 B は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステル conjugate の合成を示す。

【図 8 C】図 8 C は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムエステル conjugate の合成を示す。

30

【図 8 D】図 8 D は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホニルアミド conjugate の合成を示す。

【図 8 E】図 8 E は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホニルアミド conjugate の合成を示す。

【図 8 F】図 8 F は、本発明の樹状ポリマーアクリジニウムスルホニルアミド conjugate の合成を示す。

【図 9 A】図 9 A は、本発明のジオキセタン及びイソルミノール部分と結合した、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

【図 9 B】図 9 B は、本発明のジオキセタン及びアクリジニウムエステル部分と結合した、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

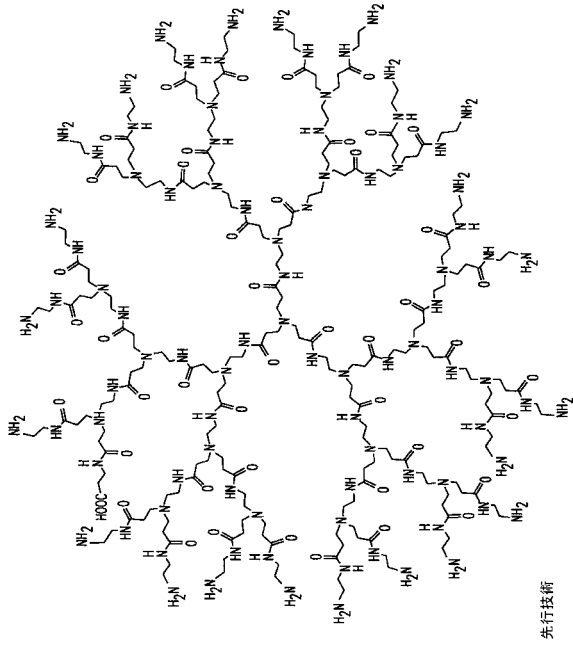
40

【図 9 C】図 9 C は、本発明のジオキセタン及びアクリジニウムスルホンアミド部分と結合した、ポリアミドアミン (PAMAM) 星形 dendrimer を示す。

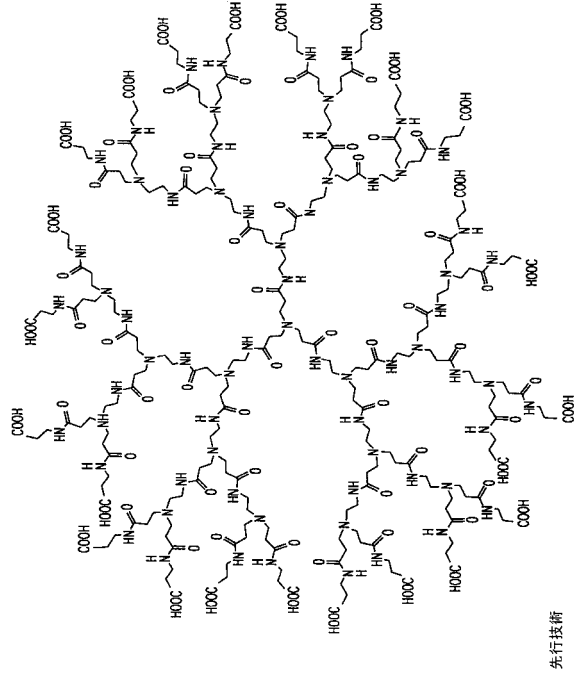
【図 10】図 10 は、本発明の結合したジオキセタン及び第四級アミンエンハンサーを示す。

【図 11】図 11 は、本発明の樹状ジオキセタンエンハンサーハイブリッドを示す。

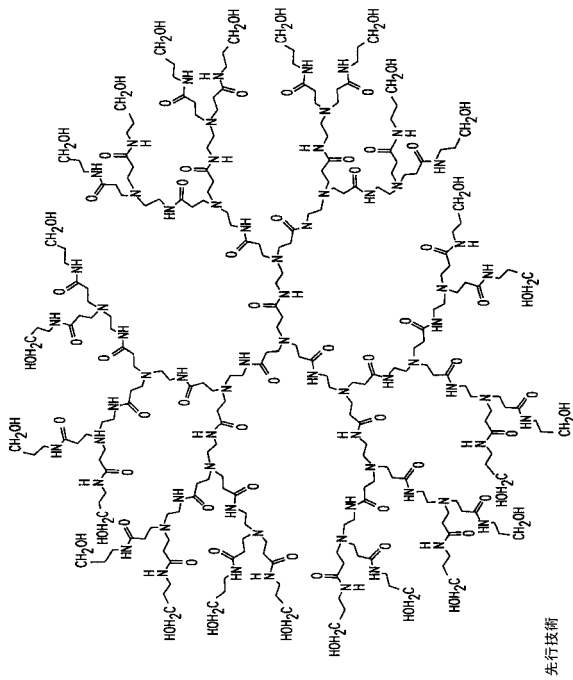
【 図 1 A 】



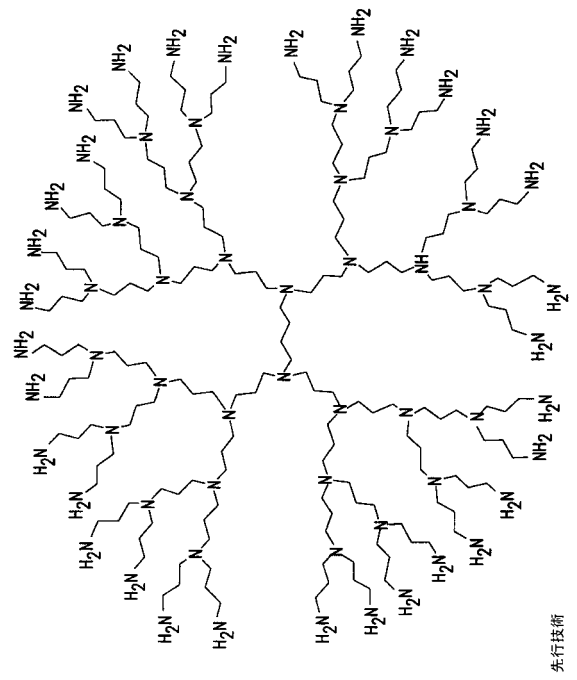
【 図 1 B 】



【 図 1 C 】



【 図 1 D 】



【 図 2 A 】

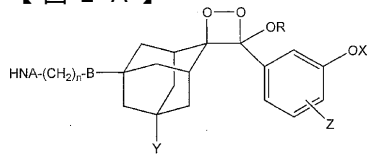
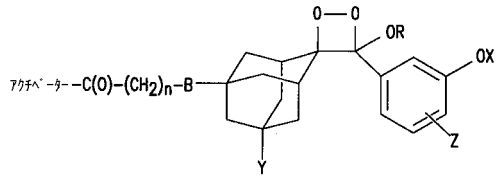


FIG. 2A

【 図 2 B 】



【 図 2 C 】

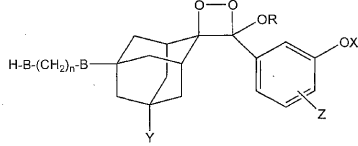


FIG. 2C

【 図 2 D 】

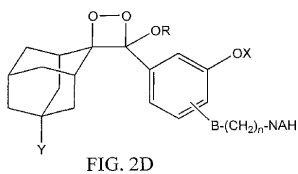
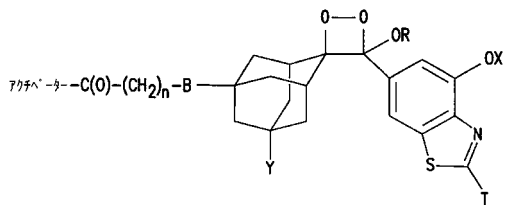


FIG. 2D

【 図 2 H 】



【 図 2 I 】

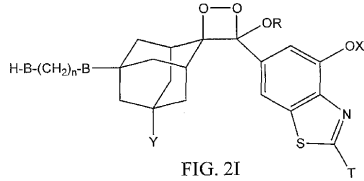
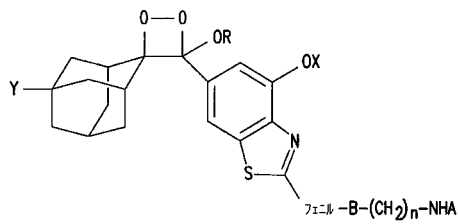
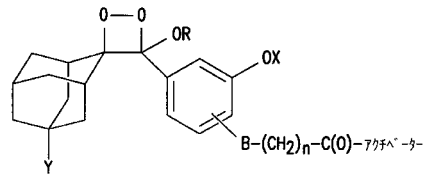


FIG. 2I

【 図 2 J 】



【 図 2 E 】



【 図 2 F 】

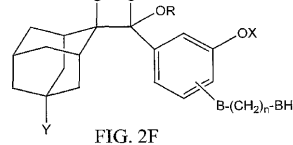


FIG. 2F

【 図 2 G 】

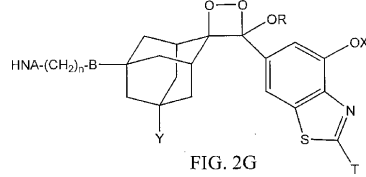
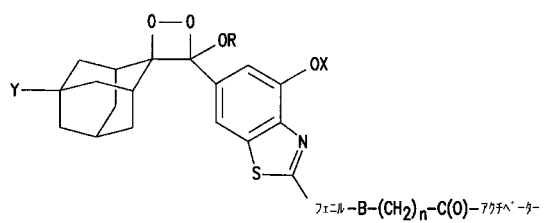
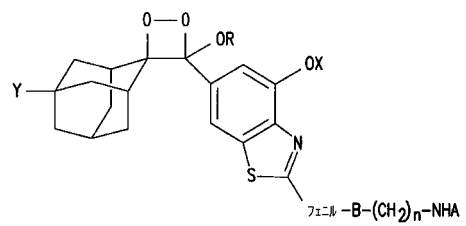


FIG. 2G

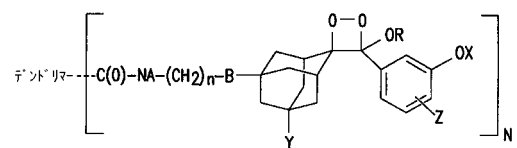
【 図 2 K 】



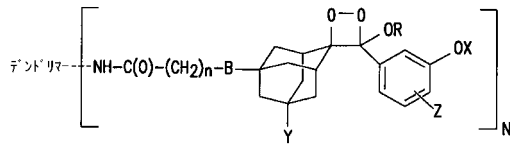
【 図 2 L 】



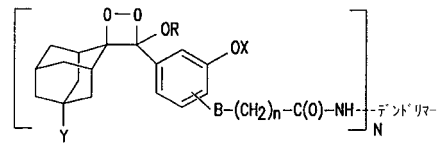
【 図 3 A 】



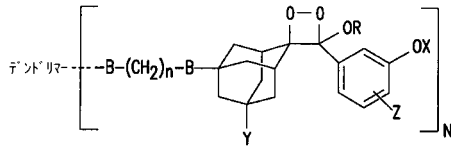
【 図 3 B 】



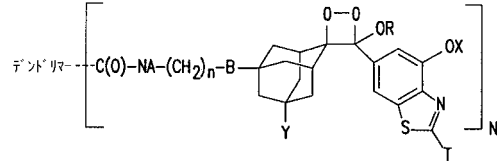
【 図 3 F 】



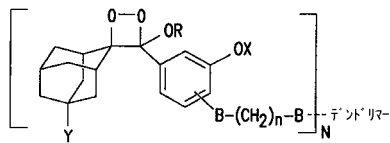
【 図 3 C 】



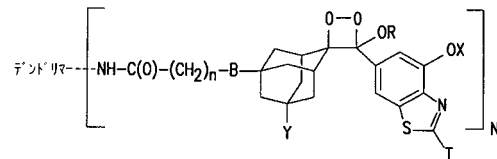
【 図 3 G 】



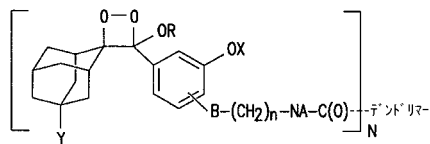
【 図 3 D 】



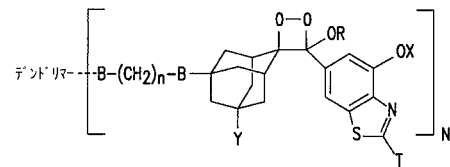
【 図 3 H 】



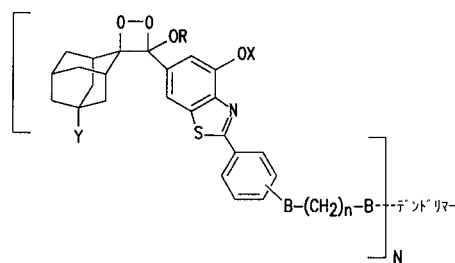
【 図 3 E 】



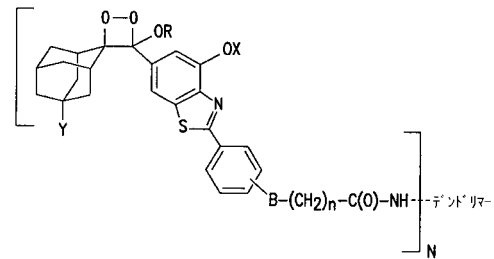
【 図 3 I 】



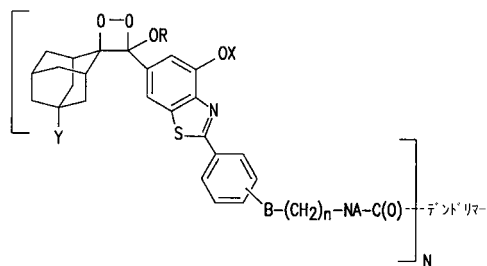
【 図 3 J 】



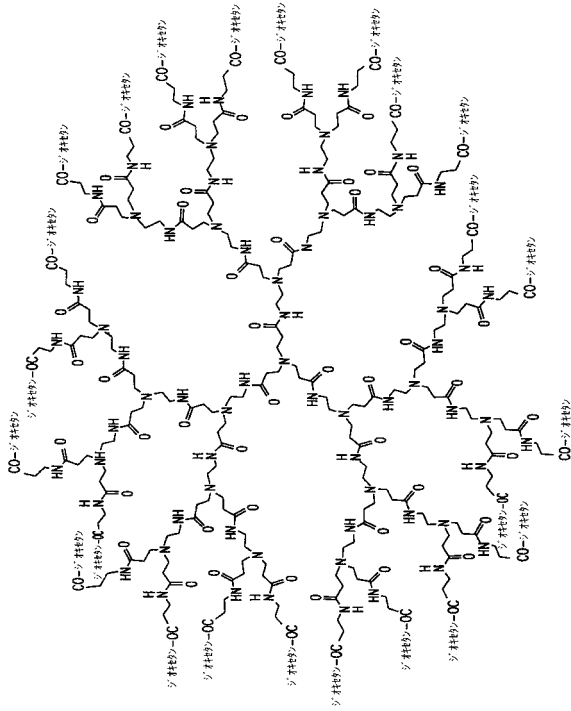
【 図 3 L 】



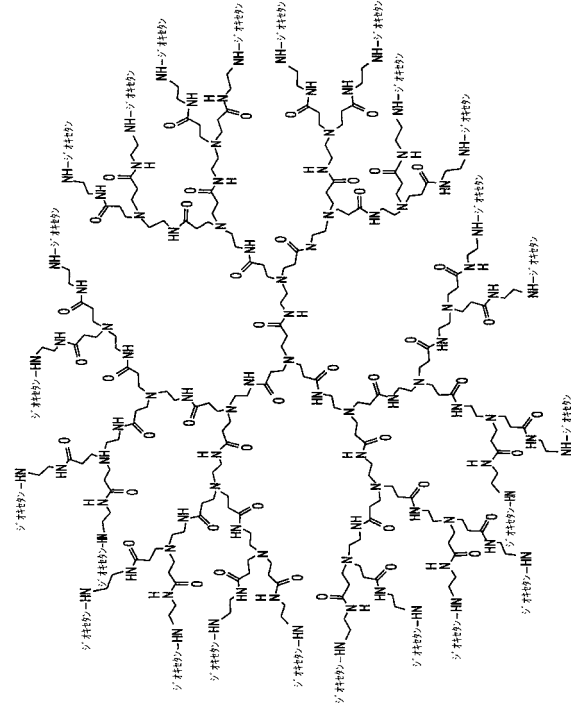
【 図 3 K 】



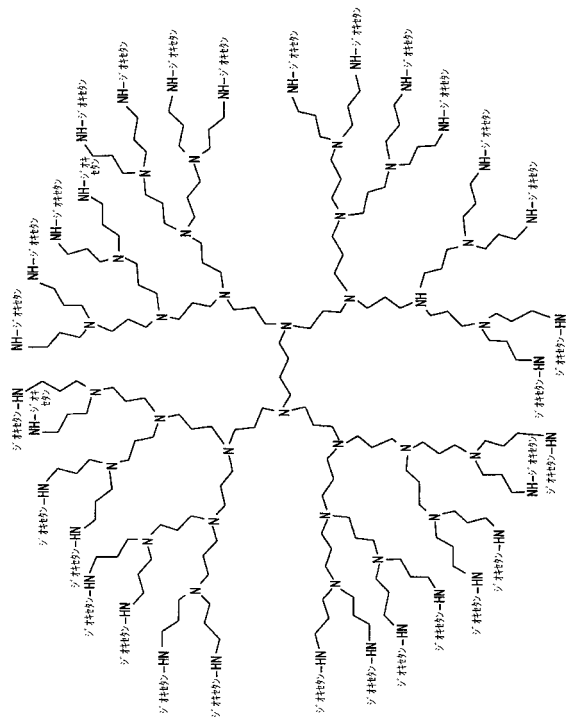
【 3 M 】



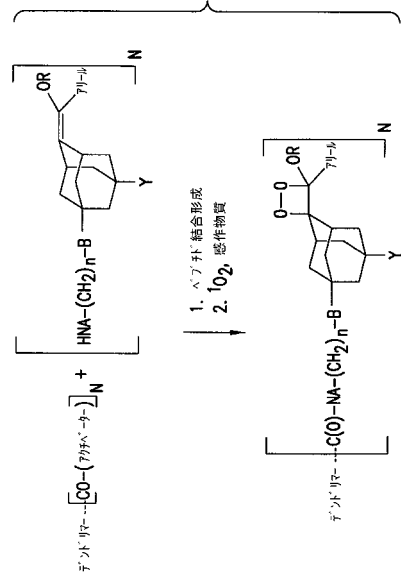
【 3 N 】



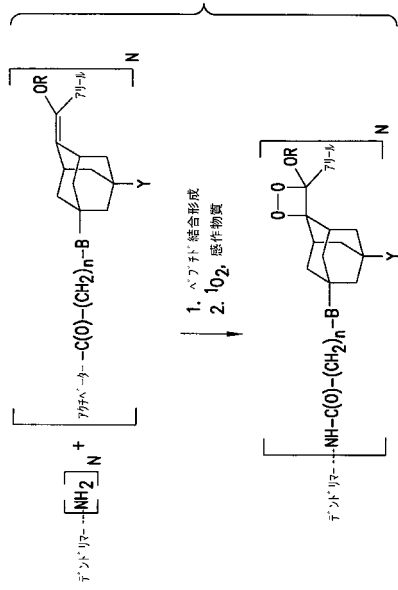
【 3 O 】



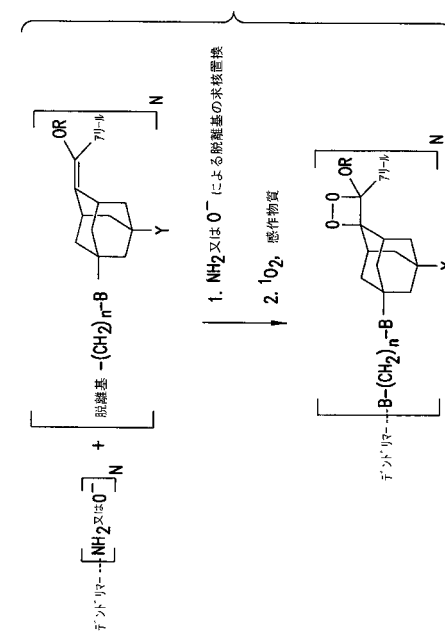
【 4 A 】



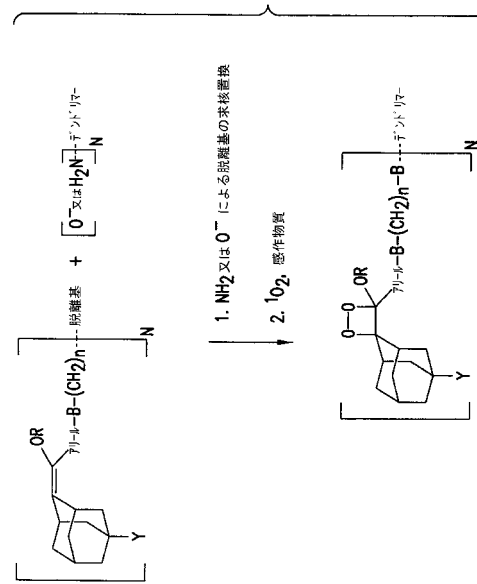
【 図 4 B 】



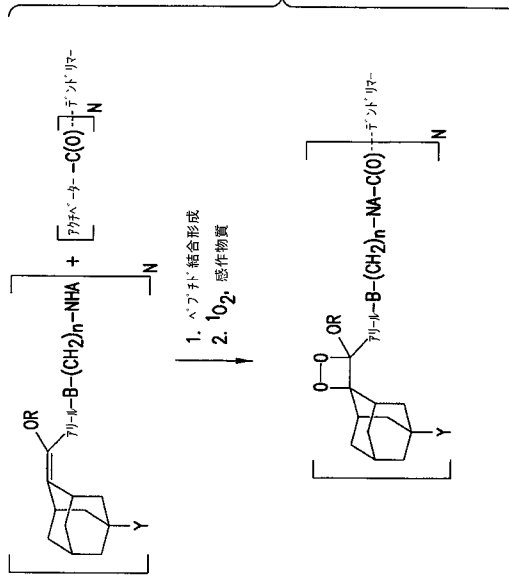
【 図 4 C 】



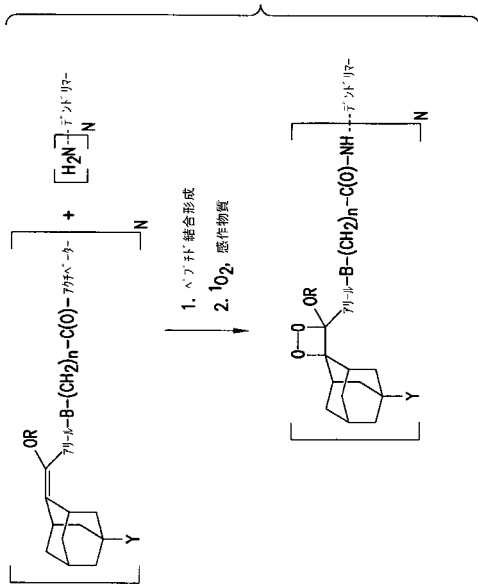
【 図 4 D 】



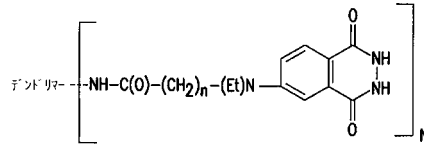
【 図 4 E 】



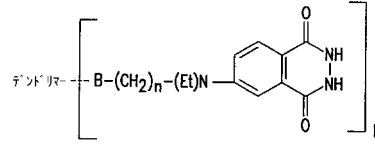
【 図 4 F 】



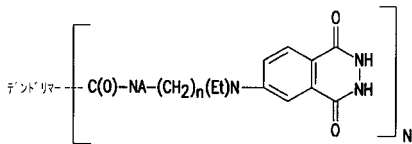
【 図 5 B 】



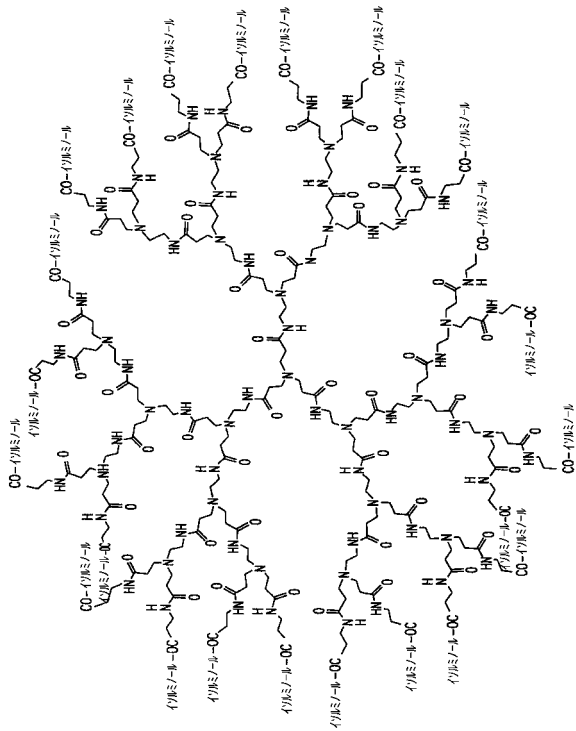
【 図 5 C 】



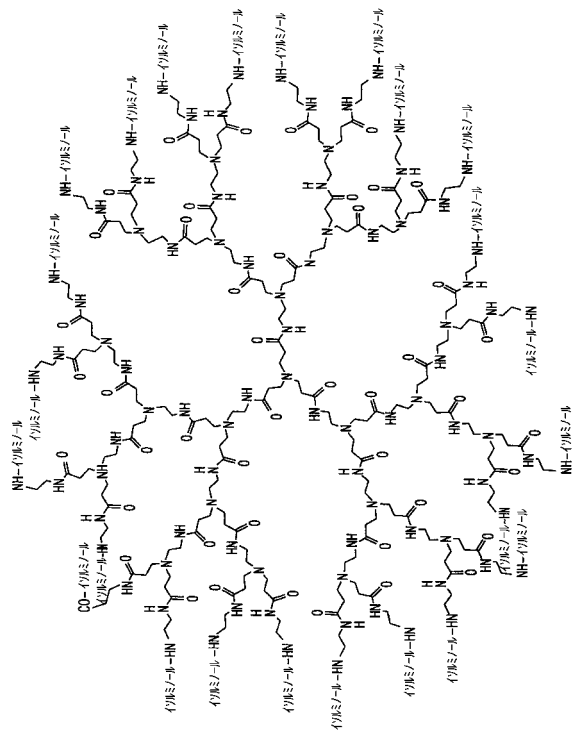
【 図 5 A 】



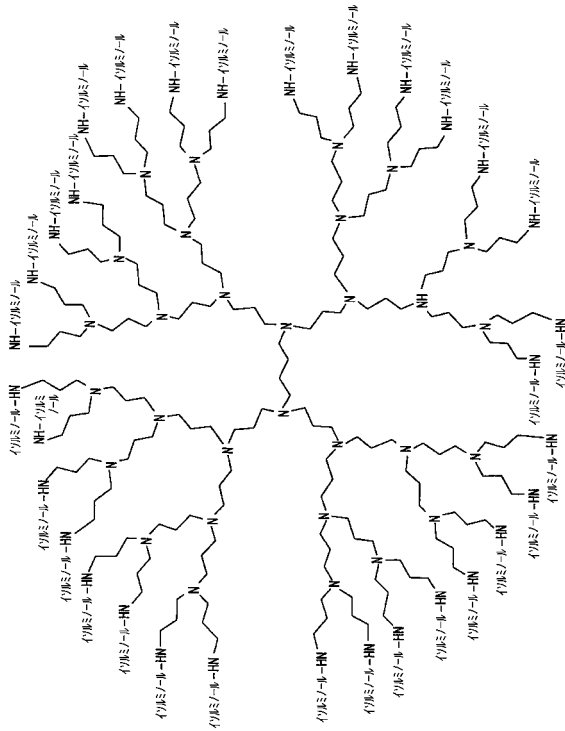
【 図 5 D 】



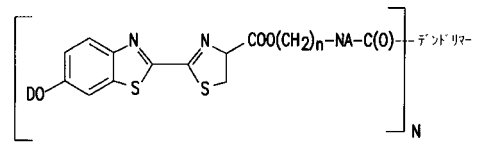
【 図 5 E 】



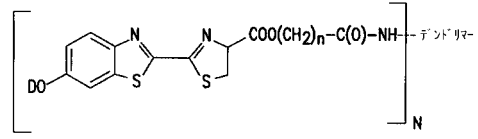
【 5 F 】



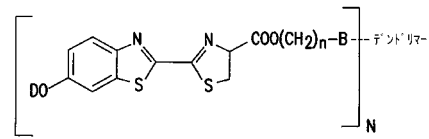
【 5 G 】



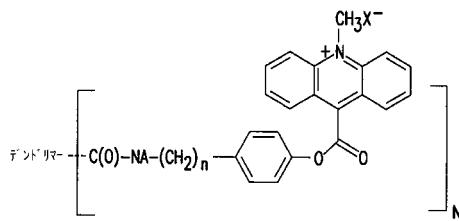
【 5 H 】



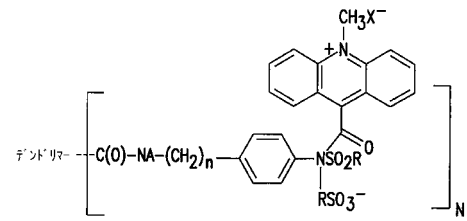
【 5 I 】



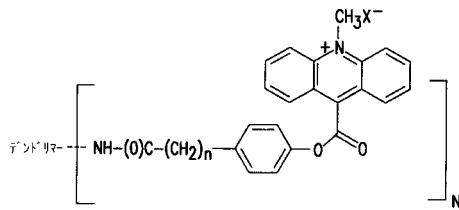
【 6 A 】



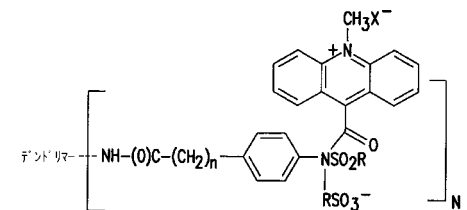
【 6 D 】



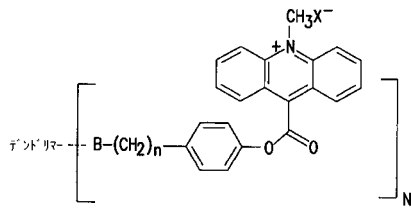
【 6 B 】



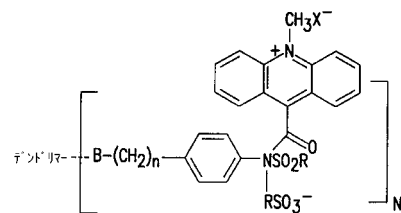
【 6 E 】



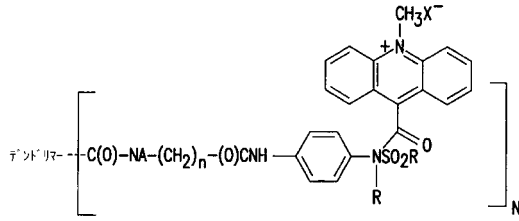
【 6 C 】



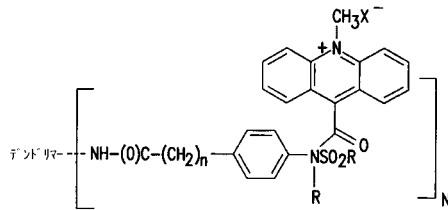
【 6 F 】



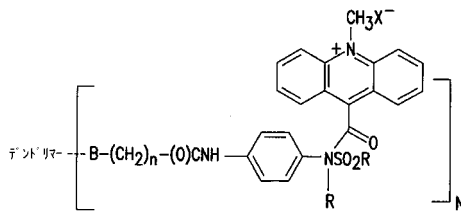
【 図 6 G 】



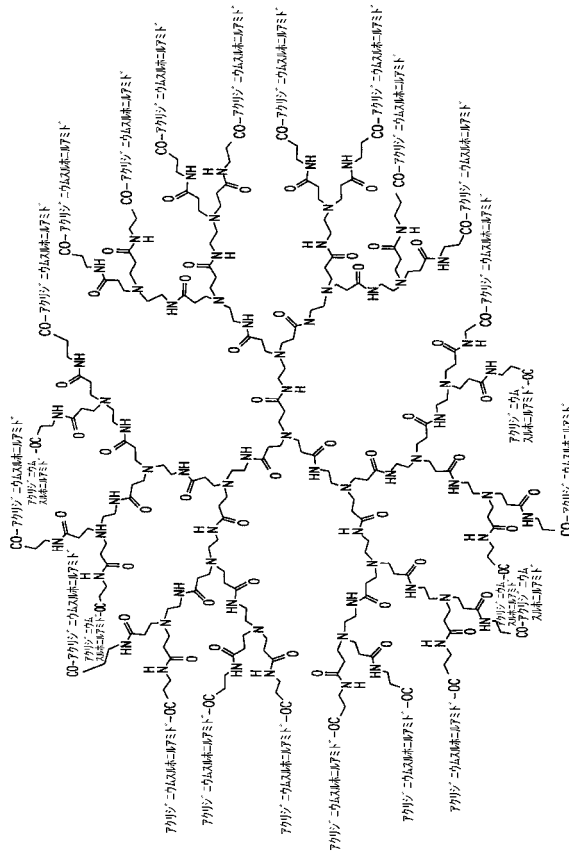
【 図 6 H 】



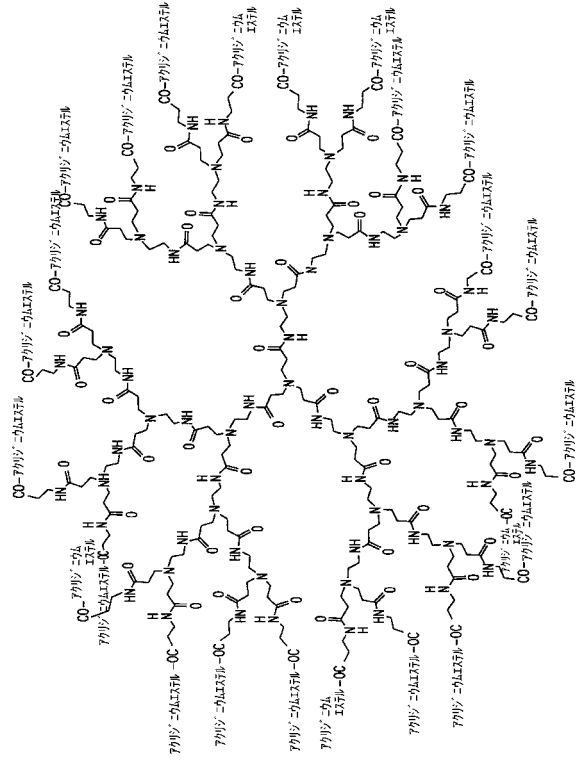
【 図 6 I 】



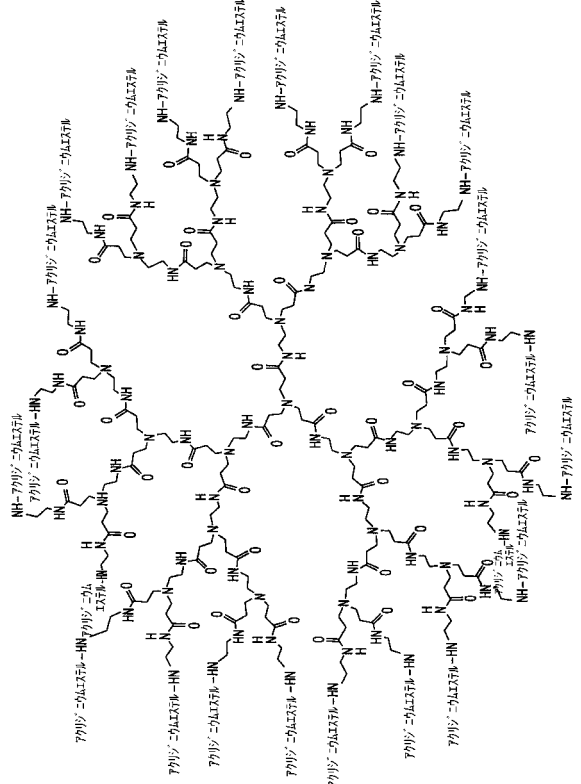
【 図 6 K 】



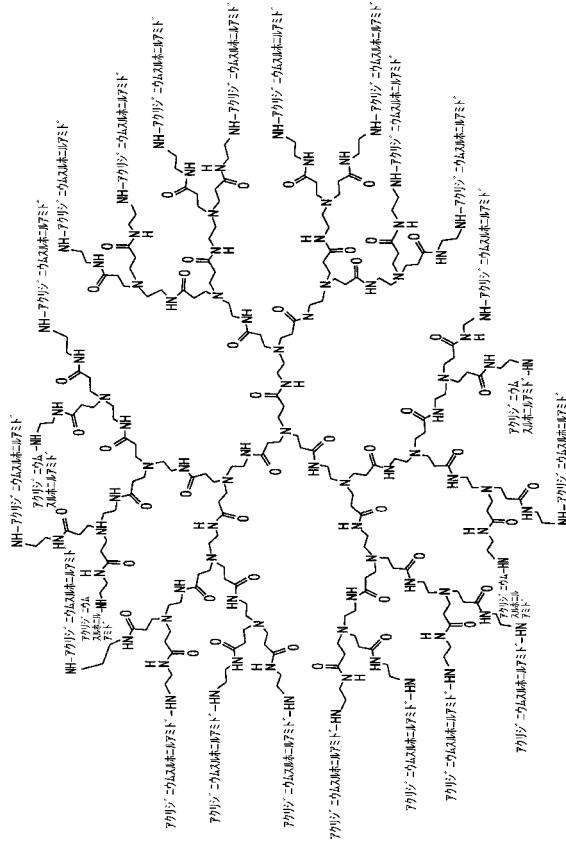
【 図 6 J 】



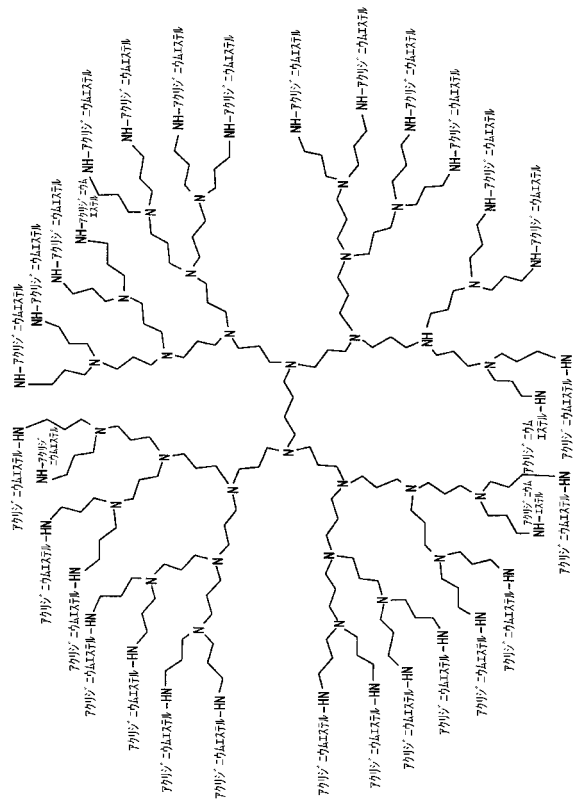
【 図 6 L 】



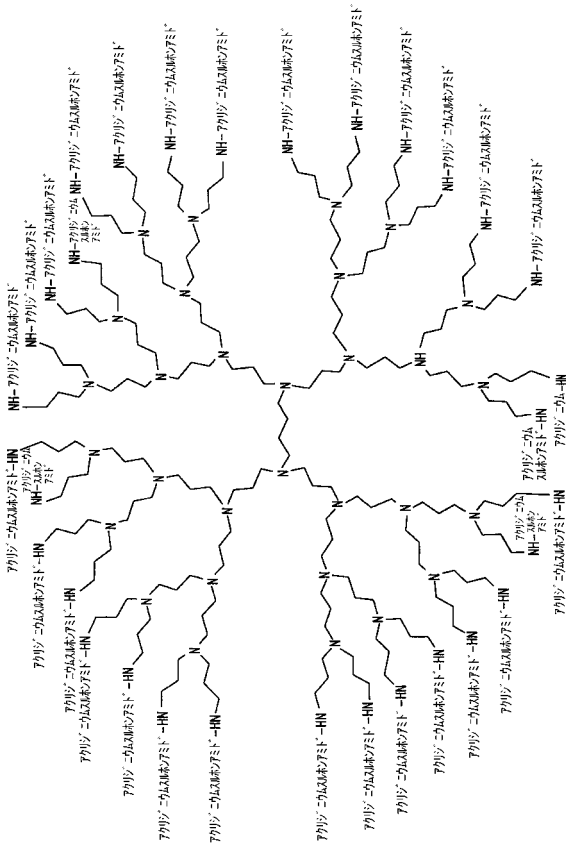
【 6 M 】



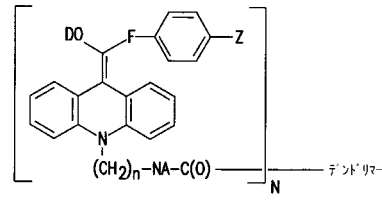
【 6 N 】



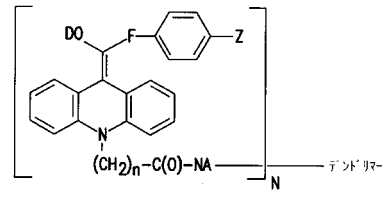
【 6 O 】



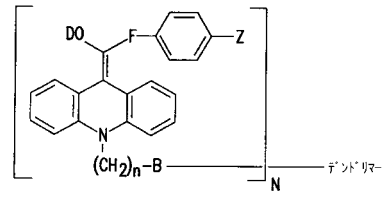
【 6 P 】



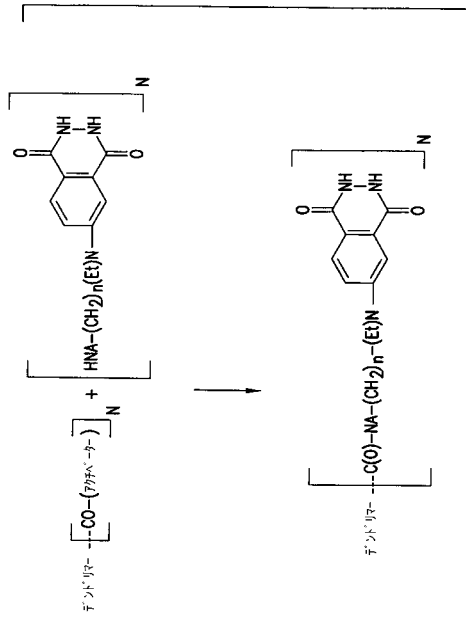
【 6 Q 】



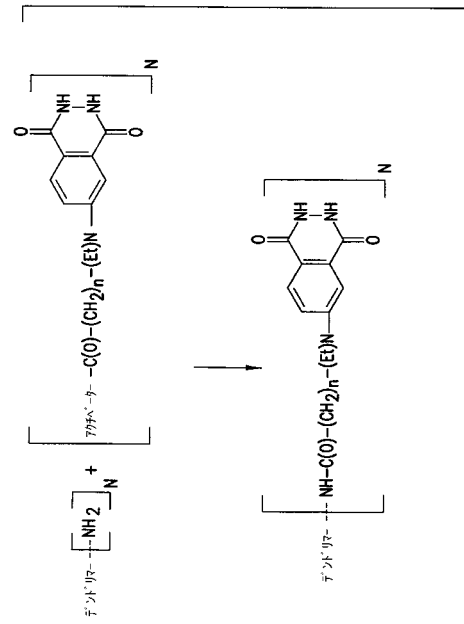
【 6 R 】



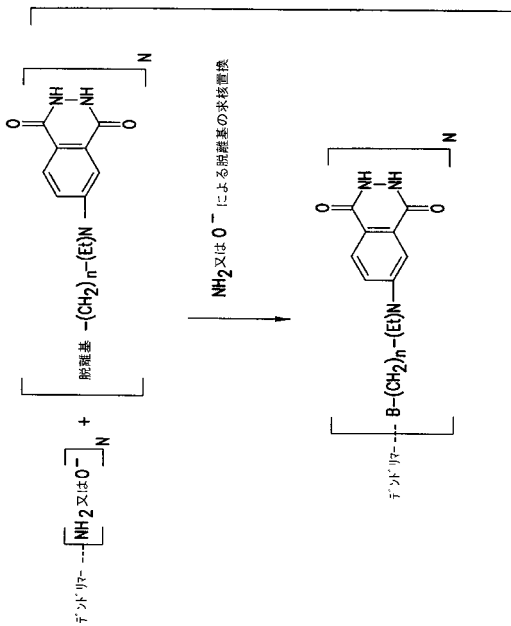
【 図 7 A 】



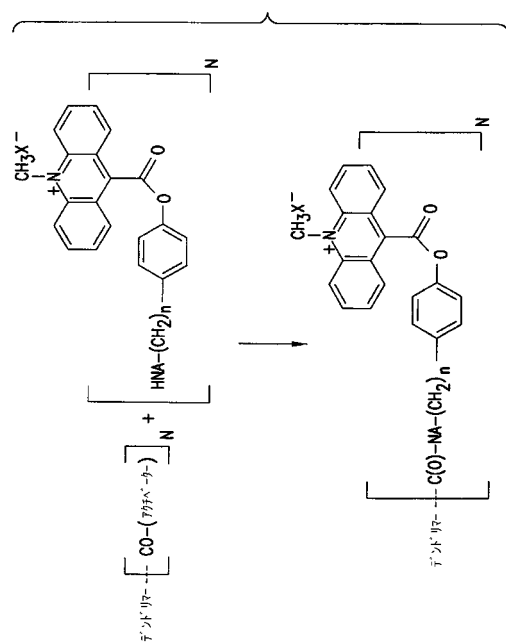
【 図 7 B 】



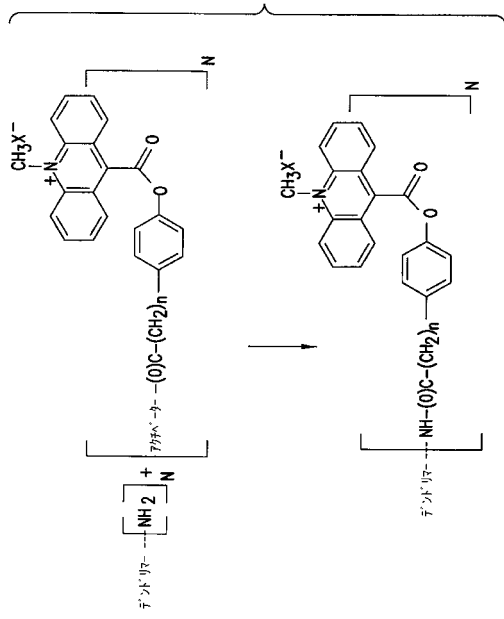
【 図 7 C 】



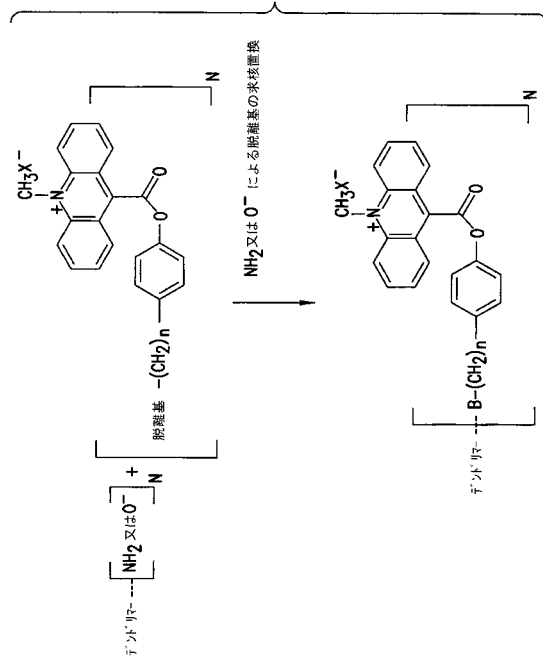
【 図 8 A 】



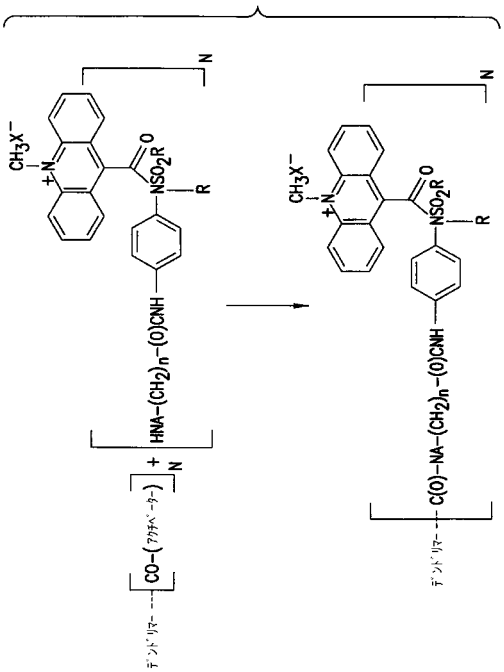
【 図 8 B 】



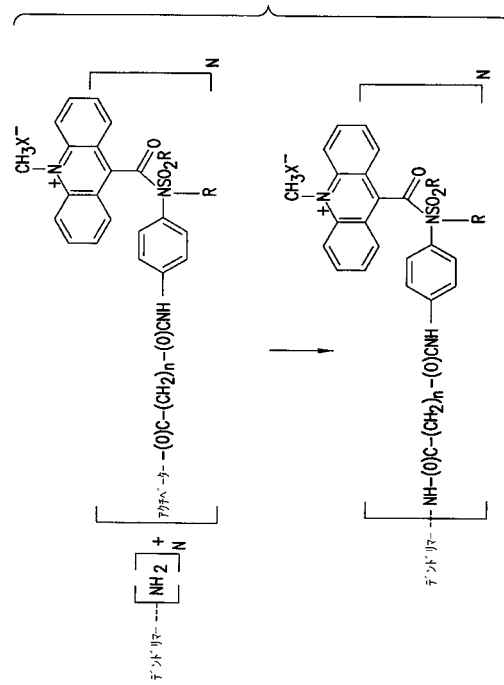
【 図 8 C 】



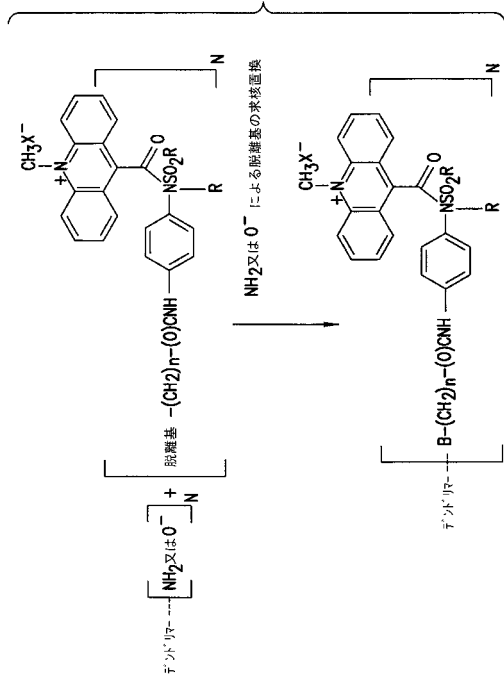
【 図 8 D 】



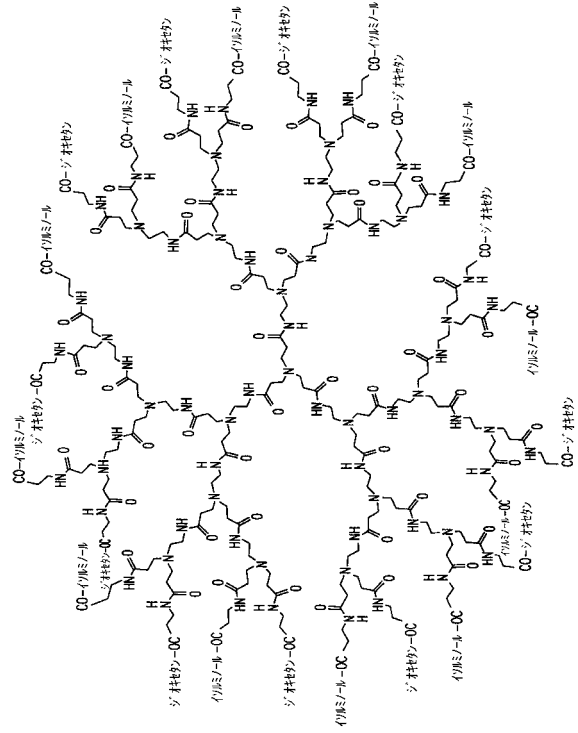
【 図 8 E 】



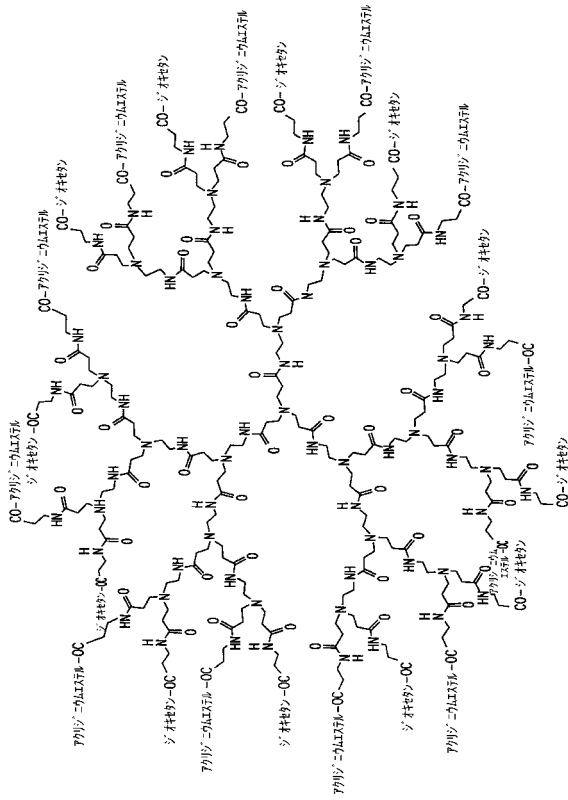
【 図 8 F 】



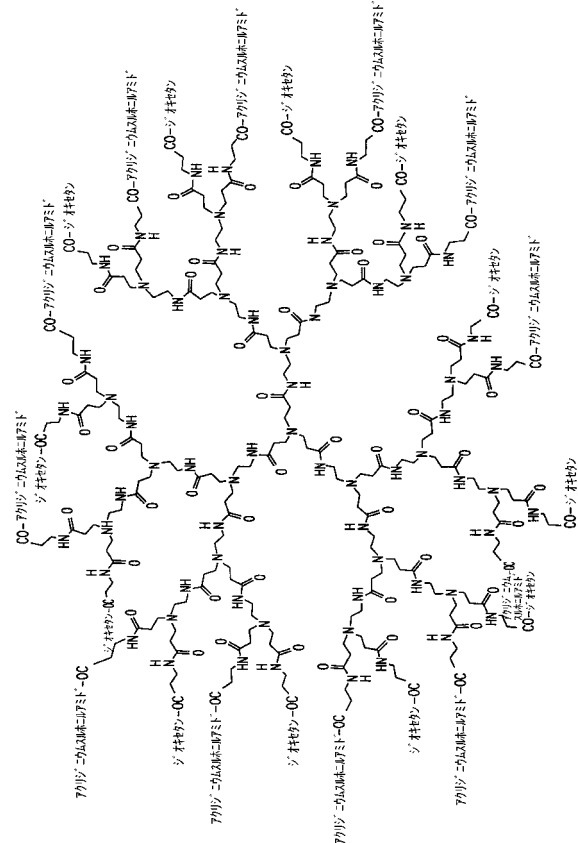
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 図 9 C 】





---

フロントページの続き

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 国際公開第00/48991(WO, A1)

Stephen Capaldi et al., Signal amplification through nucleotide extension and excision on a dendritic DNA platform, Nucleic Acids Research, 英国, Oxford University Press, 2000年 4月 1日, Vol. 28, No. 7, e21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/75 - 21/83

C12Q 1/00 - 3/00

CAplus(STN)

PubMed

Science Direct

JMEDPlus(JDream2)

JSTPlus(JDream2)

专利名称(译)	树枝状化学发光底物		
公开(公告)号	<a href="#">JP3975167B2</a>	公开(公告)日	2007-09-12
申请号	JP2002557779	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	特比克斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	热带公司		
当前申请(专利权)人(译)	Apurera公司		
[标]发明人	スパークスアリソンエル		
发明人	スパークス,アリソン・エル		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 C08G69/08 C08G73/04 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/37 C12Q1/44 C12Q1/68 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/582 Y10S436/805		
FI分类号	G01N21/76		
代理人(译)	津国 肇		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	60/259870 2001-01-08 US 60/286383 2001-04-26 US		
其他公开文献	JP2004524521A JP2004524521A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了包含树枝状聚合物和至少一种化学发光底物的缀合物的化学发光底物递送系统。底物递送系统还可包括化学发光增强剂。树枝状聚合物/化学发光底物缀合物可用于试剂盒中，所述试剂盒包括能够活化化学发光底物以产生过氧化中间体的酶，所述过氧化中间体分解产生光。树枝状聚合物/化学发光底物缀合物可用于测定中以检测样品中分析物（例如，酶，抗体，抗原或核酸）的存在。

