

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-531458

(P2021-531458A)

(43) 公表日 令和3年11月18日 (2021.11.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5 2 G O 5 4
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2021-500951 (P2021-500951) (86) (22) 出願日 令和1年7月10日 (2019.7.10) (85) 翻訳文提出日 令和3年1月12日 (2021.1.12) (86) 国際出願番号 PCT/IB2019/055896 (87) 国際公開番号 W02020/012391 (87) 国際公開日 令和2年1月16日 (2020.1.16) (31) 優先権主張番号 62/697, 514 (32) 優先日 平成30年7月13日 (2018.7.13) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(71) 出願人 505005049 スリーエム イノベイティブ プロパティ ズ カンパニー アメリカ合衆国, ミネソタ州 55133 -3427, セント ポール, ポスト オ フィス ボックス 33427, スリーエ ム センター (74) 代理人 100110803 弁理士 赤澤 太朗 (74) 代理人 100135909 弁理士 野村 和歌子 (74) 代理人 100133042 弁理士 佃 誠玄 (74) 代理人 100171701 弁理士 浅村 敬一 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 アッセイ

(57) 【要約】

試料中の分析物についてアッセイする方法、及びアッセイを実行するためのキット。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の分析物についてアッセイする方法であって、
 反応混合物を形成すること、及び
 トリガー溶液を前記反応混合物に混和することを含み、
 前記アッセイされる分析物が前記試料中に存在してもよく、
 前記反応混合物は、

第 1 の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した化学発光標識を含む化学発光標識
 特異的結合パートナーであって、前記分析物に結合して、分析物と結合した化学発光標識
 特異的結合複合体を形成することができる、前記化学発光標識特異的結合パートナーと、

10

第 2 の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した活性化剤標識を含む活性化剤標識
 特異的結合パートナーと、

選択的シグナル阻害剤とを含む水溶液であり、

前記トリガー溶液が、結合していない化学発光基質からバックグラウンドシグナルを生
 成することができ、

分析物の存在下で、トリガー溶液が、前記試料中の分析物の量に関係する検出可能な分
 析物シグナルを生成することができ、

前記反応混合物が、結合していない化学発光基質を更に含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記トリガー溶液が増強剤を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記増強剤が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベ
 ンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される、請
 求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記トリガー溶液が、酸化剤又は還元剤を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の
 方法。

【請求項 5】

前記トリガー溶液が過酸化物を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

30

前記選択的シグナル阻害剤が、アスコルビン酸、イソアスコルビン酸、6-ヒドロキシ
 -2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸、アスコルビン酸 6-パルミ
 テート、5, 6-イソプロピリジエン-アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシトルエン、
 グルタチオン、尿酸、1 種以上のトコフェロール、及びカテキンからなる群から選択され
 る、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

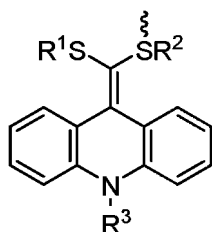
前記活性化剤標識がペルオキシダーゼ酵素である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載
 の方法。

【請求項 8】

前記化学発光標識特異的結合パートナーが、特異的結合パートナーに直接又は間接的に
 接続された化学発光標識を含み、前記化学発光標識が、式

40

【化 1】



[式中、

50

波線は前記特異的結合パートナーへの、又は前記化合物を前記特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1～20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ(C1～C8)アルキルシリル、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、グリコシル、 $-PO_3^-$ 、 $-OP(=O)(O^-)_2$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、C(O)NHNH₂、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

10

を有する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記化学発光標識特異的結合パートナー及び前記活性化剤標識特異的結合パートナーが、それぞれ前記試料中の前記分析物に結合する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記化学発光標識特異的結合パートナーが、前記分析物の類似体に接続された化学発光標識化合物を含み、更に、前記分析物と前記化学発光標識特異的結合パートナーとが競合して、前記活性化剤標識特異的結合パートナーに結合する、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項11】

前記結合していない化学発光基質が、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、アクリジニウムエステル、例えば、ルシゲニン及びアクリダン、フタルヒドラジド、例えば、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン、ルシフェリン、並びに1,2-ジオキシエタン含有化合物、例えば、ジオン、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(AMPPD)、及び3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-β-D'-ガラクトピラノイルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン(AMPGD)、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^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム、及び1,2-ジオキセタンジオン、アダマンチリデン-アダマンチル-1,2-ジオキセタンからなる群から選択され、具体的にはルミノール又はイソルミノールであり、より具体的にはルミノールである、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項12】

分析物シグナル及びバックグラウンドシグナルを検出することを更に含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

分析物シグナルを検出することが、既知濃度の分析物を有する標準試料である少なくとも1つの試料から、少なくとも1つの標準分析物シグナルを検出することを含み、かつ未知濃度の分析物を有する少なくとも1つの試験試料から、試験分析物シグナルを検出することを更に含む、請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

バックグラウンドシグナルを検出することが、既知濃度の分析物を有する標準試料である少なくとも1つの試料から、少なくとも1つの標準バックグラウンドシグナルを検出することを含み、かつ未知濃度の分析物を有する少なくとも1つの試験試料から、試験バックグラウンドシグナルを検出することを更に含む、請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

分析物についてアッセイするためのキットであって、

第1の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した化学発光標識を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、前記分析物に結合して、分析物と結合した化学発光標識特

50

異的結合複合体を形成することができる、前記化学発光標識特異的結合パートナーと、
第2の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した活性化剤標識を含む活性化剤標識特異的結合パートナーと、

選択的シグナル阻害剤とを含み、

トリガー溶液が、結合していない化学発光基質からバックグラウンドシグナルを生成することができるので、

分析物の存在下で、前記トリガー溶液が、試料中の分析物の量に相関する検出可能な分析物シグナルを生成することができ、

前記反応混合物が、結合していない化学発光基質を更に含むことを特徴とする、キット

10

【請求項16】

前記トリガー溶液が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される増強剤を更に含む、請求項14に記載のキット。

【請求項17】

前記結合していない化学発光基質が、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、アクリジニウムエステル、例えば、ルシゲニン及びアクリダン、フタルヒドラジド、例えば、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン、ルシフェリン、並びに1, 2-ジオキセタン含有化合物、例えば、ジオン、3-(2'-ス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(AMPPD)、及び3-(2'-ススピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-β-D'-ガラクトピラノイルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン(AMPGD)、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. 1³, 7]}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム、及び1, 2-ジオキセタンジオン、アダマンチリデン-アダマンチル-1, 2-ジオキセタンからなる群から選択され、具体的にはルミノール又はイソルミノールであり、より具体的にはルミノールである、請求項14又は15に記載のキット。

20

【請求項18】

試料中の分析物についての溶液相アッセイ方法であって、

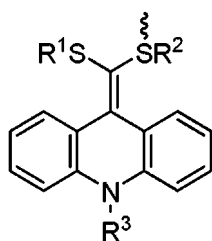
c) 以下の成分：

30

前記試料、

第1の特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された化学発光標識化合物を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、前記化学発光標識化合物が、式

【化2】



40

[式中、

波線は前記特異的結合パートナーへの、又は前記化合物を前記特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1～20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ(C1～C8)アルキルシリル、-SO₃⁻、-OSO₃²⁻、グリコシル、-PO₃⁻、-OPO₃²⁻、ハロゲン、ヒドロキシル、チオ

50

ール、アミノ、 $C(O)NHNH_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

の化合物である、前記化学発光標識特異的結合パートナー、

ペルオキシダーゼ活性を有し、第2の特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された、活性化剤標識化合物を含む活性化剤標識特異的結合パートナー、及び

L-アスコルビン酸、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマナン-2-カルボン酸、2-アミノフェノール、3-アミノ-L-チロシン、4-クロロカテコール、フェノキサジン、2-ブロモベンゼン-1, 4-ジオール、5, 6-イソプロピリデンアスコルビン酸、及びアスコルビン酸6-パルミテートからなる群から選択される選択的シグナル阻害剤

を含む水性反応混合物を、前記成分を任意の順序で又は同時に水溶液に加えることによって、形成することであって、

前記成分のすべてが前記水溶液に可溶であり、前記成分のいずれも固体支持体に固定されておらず、

前記化学発光標識特異的結合パートナーと前記活性化剤標識特異的結合パートナーとが、前記試料中に存在する前記分析物に結合して、前記水溶液中に結合複合体を形成することと、

d) 前記水性反応混合物に、過酸化化合物を含むトリガー溶液を加えることであって、前記トリガー溶液が、前記選択的シグナル阻害剤の存在下で、前記水性反応混合物中の分析物と結合した化学発光標識特異的結合パートナー及び分析物と結合した活性化剤標識特異的結合パートナーの量と相関する、検出可能な化学発光シグナルを放出し、前記選択的シグナル阻害剤が、前記化学発光標識化合物と前記活性化剤標識化合物との間の反応によって生成するシグナルの割合を、このような複合体ではない場合の、前記化学発光標識化合物と前記活性化剤標識化合物との間の反応からのシグナルを超えさせる、こととを含み、

前記反応混合物が、前記試料中の前記分析物の濃度と相関しない検出可能なバックグラウンドシグナルを生成する、結合していない化学発光基質を更に含むこと

を特徴とする、溶液相アッセイ方法。

【請求項19】

試料中の分析物を検出するためのキットであって、

前記分析物への第1の特異的結合パートナーと、

前記第1の特異的結合パートナーにコンジュゲートした化学発光化合物と、

前記分析物への第2の特異的結合パートナーと、

前記第2の特異的結合パートナーにコンジュゲートした活性化剤化合物と、

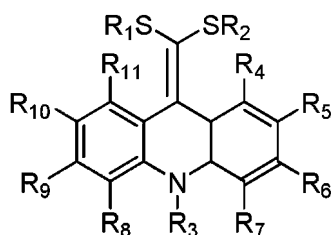
選択的シグナル阻害剤と、

トリガー溶液とを含み、

前記キットのこれらの成分のすべてが、水溶液に可溶であり、

前記化学発光化合物が、式

【化3】



[式中、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルからなる群から選択され、 R_1 及び R_2 が置換されている場合、 R_1 及び R_2 は最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ(アルキル)シリル、グリコシル

、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPO}_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される、1～3個の基によって置換されており、

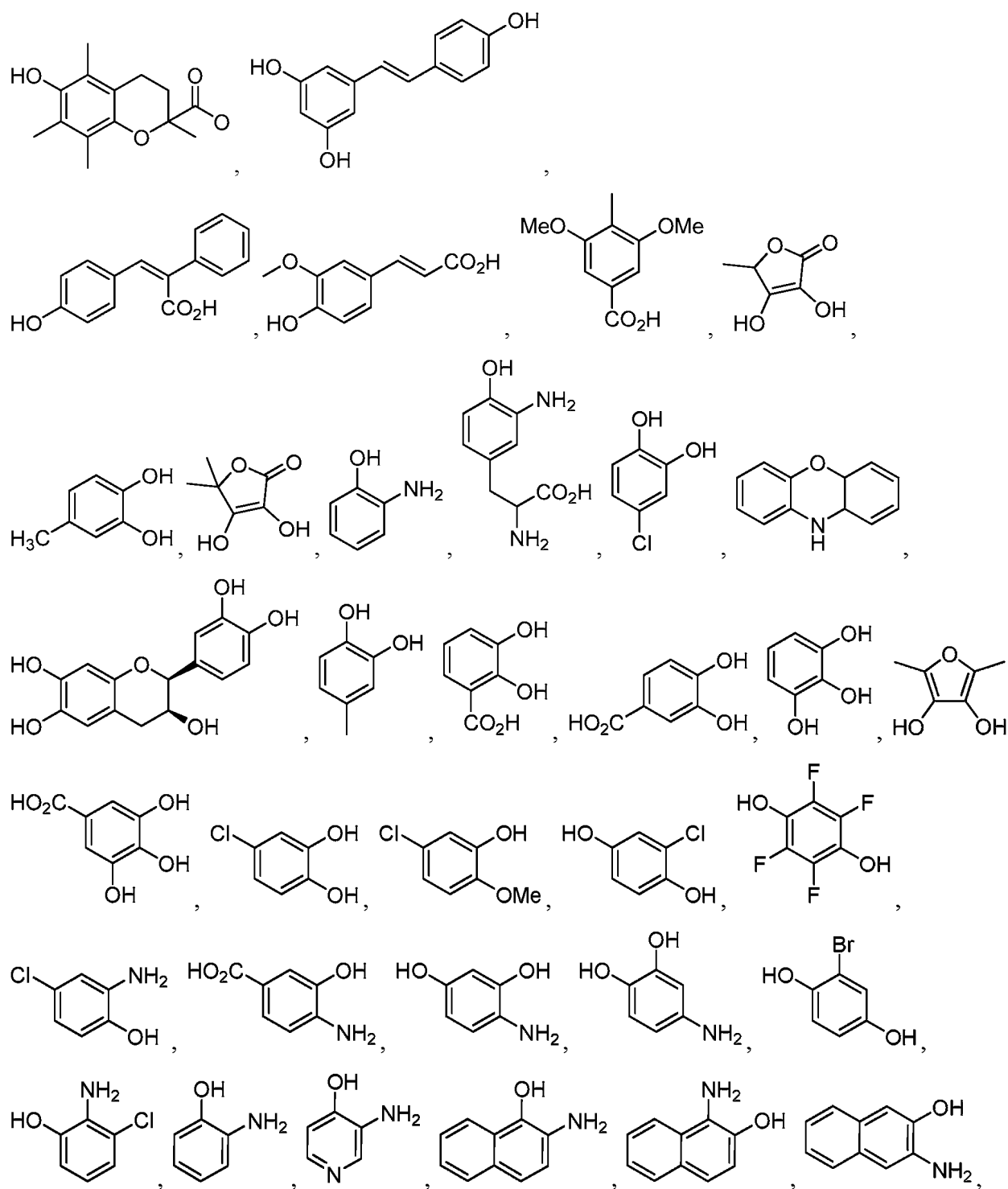
R_3 は、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルからなる群から選択され、

$\text{R}_4 \sim \text{R}_{11}$ のそれぞれは、独立して、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、ハロゲン、アミノ、置換アミン、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキシアミド、シアノ、又はスルホネートであり、近接する $\text{R}_4 \sim \text{R}_{11}$ 部分の対は、共有結合して5～7員の炭素環又は複素環式環を形成することができる]

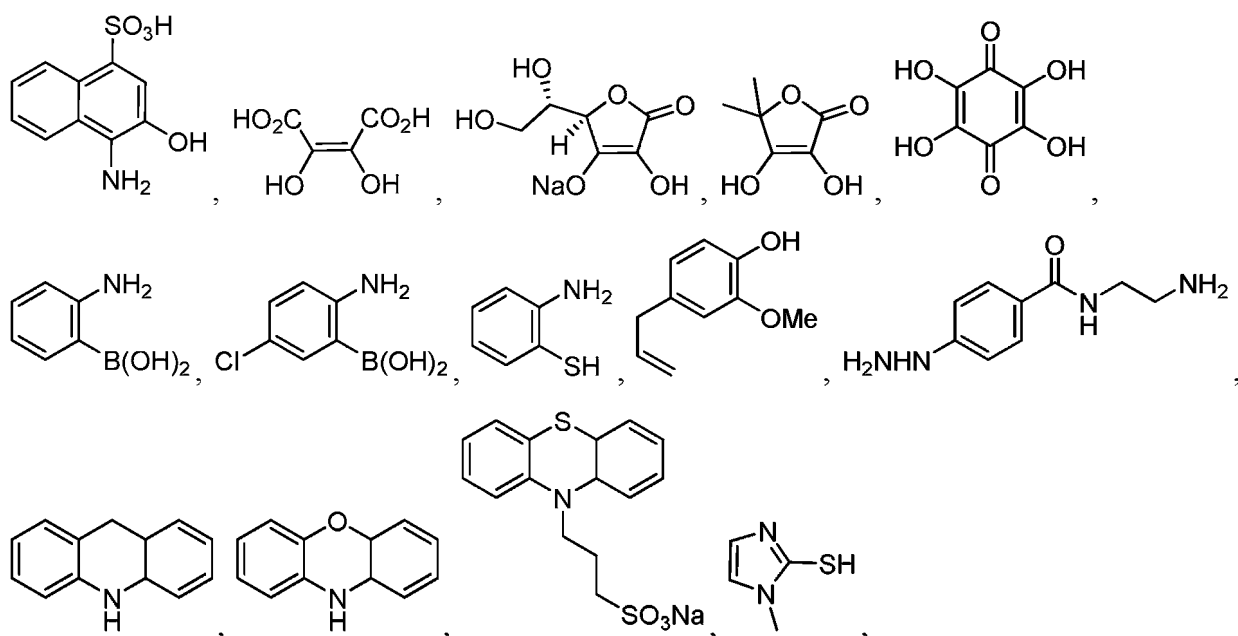
を有するアクリダンケテンジチオアセタール化合物であり、

前記選択的シグナル阻害剤が、グルタチオン、アスコルビン酸、具体的にはL-アスコルビン酸、アスコルビン酸の塩、具体的にはL-アスコルビン酸の塩、尿酸、L-アスコルビン酸-6-パルミテート、トコフェロール、5, 6-イソプロピリデン-L-アスコルビン酸、D-イソアスコルビン酸、L-イソアスコルビン酸、又は両方を含めたイソアスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、ジエチルヒドロキシルアミン、BHT、

【化 4】



【化 5】

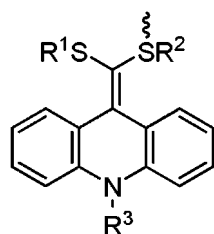


及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、キット。

【請求項 20】

前記化学発光標識化合物が、式

【化 6】



「式中、

波線は前記特異的結合パートナーへの、又は前記化合物を前記特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1～20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ(C1～C8)アルキルシリル、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^{2-}$ 、グリコシル、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPO}_3^{2-}$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、C(O)NHNH₂、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

の化合物である、請求項 19 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

溶液相発光アッセイは、例えば国際公開第2010099486号において公知である。公知のアッセイは、特異的認識、及び特異的結合パートナーと互いに結合することに基づき、物質の存在又は量を検出する。例えば、イムノアッセイにおいて、抗体は、特異的結合パートナーに結合する。別の例として、核酸結合アッセイにおいては、アダプターなどの核酸ストランドが、特異的結合パートナーに結合する。いくつかのアッセイは、化学発光を使用してシグナルを生成し、そのシグナルを分析物の量に関連付ける。

【発明の概要】

【0002】

試料中の分析物についてアッセイする方法は、反応混合物を形成すること、及びトリガー溶液を反応混合物に混和することを含むことができる。アッセイされる分析物は、試料中に存在し得るが、アッセイは、分析物が存在しないことも明らかにし得る。反応混合物は、第1の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した化学発光標識を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、分析物に結合して、分析物と結合した化学発光標識特異的結合複合体を形成することができる、化学発光標識特異的結合パートナーと、第2の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した活性化剤標識を含む活性化剤標識特異的結合パートナーと、選択的シグナル阻害剤とを含む水溶液である。

10

【0003】

反応混合物は、結合していない化学発光基質を更に含む。

【0004】

トリガー溶液は、結合していない化学発光基質からバックグラウンドシグナルを生成することができ、分析物の存在下では、トリガー溶液は、試料中の分析物の量と相関する検出可能な分析物シグナルを生成することができる。

【0005】

キットは、前述のアッセイを実施するために必要な、試料以外の成分を含むことができる。

【発明を実施するための形態】

20

【0006】

本開示を通じて、「a」、「an」及び「the」などの単数形は、しばしば便宜上使用されるが、単数のみであることが明示的に指定されている場合又は文脈によって明確に示されている場合を除いて、単数形は複数を含むよう意図される。単数のみに言及する場合、典型的には「1つ、かつ1つのみ」という用語が使用される。

【0007】

「通常の」、「通常」、「典型的には」、「通例の」、及び「通例」などの用語は、本明細書に記載する発明を作製又は実施する通常の、典型的な、又は通例の方法である特徴を指すために使用される。これらの用語は、そのような特徴が先行技術に存在すること、ましてや、先行技術において通常の、典型的な、又は通例のものであることを意味するものと解釈されるべきではない。

30

【0008】

本開示におけるいくつかの用語が、以下に定義される。他の用語は、当業者によく知られており、それらの用語には当業者がそれらに割り当ててきた意味を与えるものとする。

【0009】

分析物：アッセイにおいて検出又は定量される物質。分析物の検出を推進するために、分析物への特異的結合親和性を有する1種以上の物質、具体的には1種以上の特異的結合パートナーが、アッセイにおいて典型的に使用される。分析物は、特異的結合パートナーが結合することができる、タンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、抗体、ハプテン、又は小分子（すなわち、非ポリマー性分子）などであってもよい。例示的な分析物としては、ステロイド、ホルモン、タンパク質、糖タンパク質、ムコタンパク質、核タンパク質、リンタンパク質、オピオイド (opioids)、ビタミン、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、プリン、抗新生物剤、アンフェタミン、アゼピン、プロステグランジン (prostaglandins) などの薬物、並びに薬物の代謝物だけでなく、ヌクレオシド、有機ヌクレオシド、ヌクレオチド、有機ヌクレオチド、リボシド、DNA、DNAセグメント、RNA、RNAセグメント、PDNA、PDNAセグメント、アプタマー、ヘモトキシン、フォトトキシン、神経毒素、シアノトキシン、ジノトキシン (dinotoxins)、ネクロトキシン、ミオトキシン、マイコトキシン、例えばT-2マイコトキシン、アフラトキシン、ボツリヌス毒素、リシン、アピトキシン、及び他の環境毒素又は生物毒素などの毒素が挙げられる。分析物は、細胞、ウイルス、細菌、又は真菌であってもよい。

40

50

【0010】

活性化剤：トリガーの存在下で、化学発光化合物が発光するように、化学発光化合物の活性化を行う化合物。

【0011】

活性化剤標識特異的結合パートナー：分析物への特異的結合部材と、特異的結合パートナーに直接又は間接的に（例えば、リンカーを介して）結合した活性化剤とを含む反応物質。

【0012】

化学発光化合物：例えば、電子が励起された状態で形成される別の化合物に変換されることによって、又は電子が励起された状態に変換され、次いで、基底状態に緩和されることによって、光の放出を生じる反応を起こす化合物。励起状態は、一重項励起状態であっても、三重項励起状態であってもよい。励起状態は、基底状態への緩和の際に直接光を放出する場合もあり、又は、フェルスター機構若しくはデクスター機構などによって、まずエネルギーがエネルギー受容体に移動し、次にこれが光を放出する場合もある。

10

【0013】

化学発光標識特異的結合パートナー：分析物への特異的結合部材と、特異的結合パートナーに直接又は間接的に（例えば、リンカーを介して）結合した化学発光化合物とを含む反応物質。

【0014】

分析物シグナル：試料中に存在する分析物の量に関係する、アッセイからの化学発光出力などのシグナル。

20

【0015】

バックグラウンドシグナル：試料中に存在する分析物の量に関係しない、化学発光出力などのシグナル。

【0016】

不可逆結合：本明細書に記載するアッセイを実行している間に破壊されない、2つの部分を、典型的には、特異的結合パートナーと化学発光標識とを、又は特異的結合パートナーと活性化剤標識とを関連付ける結合。不可逆結合は、本明細書に記載するアッセイ中に不可逆結合が曝露されない、化学化合物の使用、又は温度などの物理的条件下のような、いくつかの他の手段によって破壊され得る。不可逆結合であり得る典型的な結合としては、共有結合、及びイオン結合などが挙げられる。不可逆結合によって接続される2つの部分は、「不可逆的に結合している」と言われる。不可逆結合は、特異的結合パートナー同士の、又は分析物の特異的結合パートナーへの可逆結合などの、可逆結合の相互作用とは区別される。

30

【0017】

先行技術の化学発光に基づくアッセイ、結合アッセイ、例えば、米国特許公開第20100267071号に記載されているイムノアッセイ、及び他のアッセイ、例えば、アダマー結合に基づくアッセイ等は、未知濃度の分析物を有する試験試料の化学発光シグナルを、既知濃度の分析物を有する複数の試料を使用することによって作成した標準曲線と比較する。

40

【0018】

特異的化学発光アッセイにおいては、例えば米国特許公開第20100267071号に記載されているように、未知濃度の分析物を含有する試験試料を、化学発光標識特異的結合パートナーと、活性化剤標識特異的結合パートナーと、選択的シグナル阻害剤とを含有するアッセイ溶液と混和させて、反応混合物を形成する。次いで、トリガー溶液を反応混合物と混和させる。トリガー溶液は、酸化剤又は還元剤、典型的には過酸化剤と、多くの場合、増強剤とを含有する。

【0019】

アッセイは、2つの方式のうちの1つで進む。「競合アッセイ」方式では、活性化剤標識特異的結合パートナーは、複合体において化学発光標識特異的結合パートナーに結合す

50

るが、複合体は、予め形成されてもよく、*in situ*で形成されてもよい。分析物が存在する場合、分析物と化学発光標識特異的結合パートナーとは、競合して分析物に結合する。トリガー溶液の存在下では、活性化剤標識特異的結合パートナーに結合している化学発光標識特異的結合パートナー上の化学発光標識は、活性化剤標識特異的結合パートナーに対して、機能可能な近接度であり、そのため、これによって活性化されて、発光を生じる。分析物に結合している化学発光標識特異的結合パートナーは、活性化剤標識特異的結合パートナーに対して、機能可能な近接度ではなく、そのため、化学発光標識は活性化されず、発光しない。この方式では、分析物シグナルは発光強度であり、分析物濃度に逆相関する。

【0020】

別の方法は、「サンドイッチアッセイ」方式であり、活性化剤標識特異的結合パートナーと化学発光標識特異的結合パートナーとの両方が、典型的には分析物の異なる一部において、分析物と結合して、化学発光標識が、活性化剤標識結合パートナーと機能可能な近接度に至る。得られる「サンドイッチ」複合体における、化学発光標識特異的結合パートナーの化学発光標識は、活性化剤標識特異的結合パートナーに対して、機能可能な近接度であり、そのため、発光する。分析物の非存在下では、活性化剤標識結合パートナーは、活性化剤標識特異的結合パートナーに対して、機能可能な近接度ではなく、そのため、発光しない。この方式では、分析物シグナルは発光強度であり、分析物濃度に直接的に関係する。

【0021】

いずれの場合においても、試験試料中の分析物シグナルの強度を、ルミノメータにおいて測定し、既知濃度の分析物を有する標準試料によって、同じアッセイを実行することによって構築された、発光強度対濃度の標準曲線と比較する。分析物シグナルを標準曲線に相関させると、分析物の濃度が提供される。

【0022】

これは、分析される試料が分析物と水のみを含有する場合に許容可能であり得るが、ほとんどの化学発光の商業用途では、分析物以外の他の物質も含有するであろう。例えば、食品物質からの試験試料を、毒素の存在についてアッセイする場合、多くの化学化合物が（そのような残りの化合物は食品物質からのものであるが）、一般に、毒素に加えて存在するであろう。これらの他の化合物は、典型的には、化学発光種を生成する酸化反応又は還元反応に干渉することによって、分析物シグナルの生成に干渉し得る。この場合、これらの他の干渉化合物を含有しない溶液から標準曲線が作成されるため、分析物シグナルと標準曲線との相関は、試験試料中の分析物の正確な濃度を提供しないことになる。このことは、分析物シグナルを標準曲線と比較することが、試験試料中の分析物の濃度を正確に提供しないという相関誤差をもたらす。例えば、使用することができる1つの選択的シグナル阻害剤はアスコルビン酸であるが、アスコルビン酸は、天然に、又は添加された抗酸化剤としてのいずれかで、多くの食品物質にも見出される。有意な量のアスコルビン酸が試験試料中に存在する場合、試験試料からの分析物シグナルの生成を更に阻害する場合があります、分析物シグナルと標準曲線とを相関させることによって得る濃度が、低過ぎるものとなり得る。これは、実際には、食品が安全でないレベルの汚染物質を有する場合に、アッセイが、食品は安全なレベルの汚染物質を有するという正しくない示唆をし得るため、特に有害な食品汚染物質についてアッセイしている場合に、重大な問題となり得る。

【0023】

より一般的には、アッセイしている試料中の他の化合物の干渉から生じ得る分析物濃度の誤差は、重大となることがあり、いくつかの場合、40%もの大きさ、又は更に大きいこともある。食品試料を毒素について分析する例では、いくつかの毒素は、5 ppbという低さ、又は更に低いレベルで、動物が消費するには安全ではない。したがって、これらの誤差は、一方では、実際には消費するのに安全な食品試料を廃棄すること、又は他方で、実際には消費した動物に病気若しくは死をもたらし得る、安全でないレベルで毒素が存在する場合に、毒素が安全なレベルで存在するという誤った確信を提供することとの間の

相違を意味し得る。

【0024】

この問題に対する先行技術の解決策は、許容可能なものではない。数千、数万、又は更に多くの、識別情報が未知である各種化合物が試験試料中に存在し得る場合、結合による干渉を防止するために、試験試料から分析物以外の化合物を除去して商業的状况を達成することは、不可能ではないとしても、極めて困難かつ非実用的である。別の許容可能でない先行技術の解決策は、分析物以外の化合物の干渉を無視できるほどに、試験試料を著しく希釈することである。この解決策は、分析物濃度も希釈され、そのため、分析物の最低検出レベル（「LLD」）及び最低定量レベル（LLQ）が低減するため、許容可能ではない。上に示したように、多くの関係する分析物の濃度は、ppbレベルで決定する必要があるため、LLQ及びLLDが低減することにより、試験試料の大幅な希釈を伴う解決策は許容可能ではない。

10

【0025】

許容可能な解決策は、前述の欠点を回避するだけでなく、すなわち、商業的状况における使用が実用的であり、かつ試験試料の著しい希釈を必要としないだけでなく、多様な結合剤を用いて実行可能であるべきであり、これは、この技術が、結合パートナー（例えば、抗体、アプタマー等）の性質に依存せず、多様な異なる種類の結合アッセイに適用できることを意味する。

【0026】

本開示は、このような技術的解決策を提供する。簡潔に述べると、以降により詳細に記載する技術的解決策は、バックグラウンド剤として化学発光基質を使用することを伴う。バックグラウンド剤は、（化学発光標識からの分析物シグナルを生じる同じ一連の酸化又は還元反応によって）トリガー溶液の存在下で発光バックグラウンドシグナルを提供するが、分析物が化学発光標識特異的結合パートナーに結合することとは独立している。すなわち、バックグラウンドシグナルを生成するために、バックグラウンド剤は、結合パートナーのいずれにも結合する必要はない。バックグラウンド剤は、標準曲線を構築するために使用する複数の標準中に、同一の既知の量で存在する。バックグラウンド剤は、化学発光標識結合パートナーとともに、アッセイ溶液中にも同じ濃度で存在する。したがって、分析物シグナル及びバックグラウンドシグナルを生じる酸化又は還元反応に化合物が干渉しない状況では（例えば、分析物が試験試料中に溶解している唯一の化合物である）、試験試料におけるバックグラウンドシグナルは、標準試料におけるバックグラウンドシグナルと同一であることになる。しかしながら、干渉化合物が存在する場合、試験試料からのバックグラウンドシグナルは、標準試料からのバックグラウンドシグナルとは異なることになる。標準試料からのバックグラウンドシグナルと試験試料からのバックグラウンドシグナルとの割合をとると、倍率変更係数が提供される。観測された分析物シグナルに倍率変更係数を乗じることによって、干渉化合物の存在について補正された「補正分析物シグナル」が提供される。観測された分析物シグナルではなく、補正された分析物シグナルを標準曲線に相関させることによって、試験試料中の分析物の濃度の正確な指標が提供される。

20

30

【0027】

特異的結合パートナー

2種の標識特異的結合パートナーを用いる。一方は活性化剤標識され、他方は化学発光標識されている。特異的結合パートナーのそれぞれは、別の物質について特異的親和性を有する分子であり、通例は生物学的分子である。例としては、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、アプタマー、抗原、抗体、抗体-DNAキメラ、ハプテン、タンパク質、ペプチド、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンが挙げられる。

40

【0028】

それぞれの特異的結合パートナーは、一般に、2種の特異的結合パートナーが、分析物上の同じ又は重複する結合部分について競合しないという点で、他方のパートナーと同一ではない。活性化剤標識特異的結合パートナーと化学発光標識特異的結合パートナーとの

50

両方の特異的結合パートナー部が抗体である、典型的な場合では、抗体のそれぞれは、相異なる、分析物に関して競合しないエピトープを有する。

【0029】

組み合わせで使用され得る、すなわち、一方が化学発光標識を有することができ、他方が活性化剤標識を有することができる、特異的結合パートナー同士の例としては、DNA、RNA、及びアプタマーなどの相補的なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、ホルモン-受容体、レクチン-炭水化物、IGタンパク質A-結合タンパク質受容体、核酸-核酸結合タンパク質、アプタマー-アプタマー、並びに核酸-抗核酸抗体が挙げられる。米国特許公開第20100267071号において論じられている特異的結合パートナーが、好適である。

10

【0030】

これらのうちの任意のものを、競合アッセイ方式又はサンドイッチアッセイ方式に適合させることができる。特異的結合パートナーの識別情報によって、アッセイの方式が、具体的には、アッセイがサンドイッチアッセイであるか、又は競合アッセイであるかが決定される。いずれの場合においても、化学発光標識特異的結合パートナーに使用される特異的結合パートナーは、分析物に特異的に結合するように選択される。最も通常には抗体が使用されるが、上に論じた特異的結合パートナーのうちのいずれを用いることもできる。競合アッセイ方式に適合させるためには、活性化剤標識特異的結合パートナーは、活性化剤-分析物類似体コンジュゲートとして設計される。この場合、活性化剤は、直接、又は本明細書において論じる補助物質を含むリンカーを経由して、分析物の類似体にコンジュゲートし、類似体は、分析物そのものであっても、分析物に対して十分な構造的類似性を有する化合物であってもよく、類似体は分析物と本質的に同じ方法で、化学発光標識特異的結合パートナーにも結合する。

20

【0031】

サンドイッチアッセイ方式に適合させるためには、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの両方が、分析物に特異的に結合する。この場合、活性化剤標識特異的結合パートナーに使用される特異的結合パートナーは、典型的には抗体であるが、アプタマー又は上に論じた特異的結合パートナーのいずれかであってもよい。この場合、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの両方が、分析物に、典型的には分析物上の異なる結合部分に結合する。

30

【0032】

競合アッセイとサンドイッチアッセイとの両方が当技術分野において公知であり、これらの適合を実現する方法は公知である。アッセイの方式及び特異的結合パートナーに関する実施例及び追加の詳細は、米国特許公開第20100267071号に見出すことができる。

【0033】

化学発光標識特異的結合パートナー

化学発光標識特異的結合パートナーは、典型的には、 10^{-4} M未満、具体的には 10^{-6} M未満、最も具体的には 10^{-11} M～ 10^{-7} Mの濃度で、反応混合物中に存在する。

40

【0034】

化学発光標識特異的結合パートナーは、通例では不可逆結合によって、化学発光標識で標識された特異的結合パートナーを含む。典型的には、特異的結合パートナーの各分子は、各分子に不可逆的に結合した少なくとも1つの化学発光標識を有する。いくつかの場合では、各特異的結合パートナーに結合した 10^2 個もの、又は更に多くの化学発光標識が存在し得る。各特異的結合パートナー分子が、同じ数の化学発光標識を有する必要はない。

【0035】

1つ以上の化学発光標識は、典型的には不可逆結合によって、特異的結合パートナーに結合することができる、任意の好適な化学発光部分であり得る。結合、典型的には不可逆

50

結合は、直接的な接続であってもよく、間接的な接続であってもよい。直接的な接続では、1つ以上の化学発光標識と特異的結合パートナーとの間に、リンカー又は補助物質を使用することなく、1つ以上の化学発光標識が、特異的結合パートナーに直接接続される。直接的な接続は、典型的には、イオン結合、共有結合、疎水性相互作用、又は水素結合などの不可逆結合によるものであり、最も多くの場合、共有結合である。

【0036】

間接的な接続が用いられる場合、当技術分野において補助物質と呼ばれることもあるリンカーが使用され、1つ以上の化学発光標識と特異的結合パートナーとを接続する。任意の好適なリンカーを使用することができ、好適なリンカーは、1つ以上の化学発光標識が発光することを妨げず、典型的には、化学発光標識特異的結合パートナーを、水性媒体に不溶性にしない。例示的なリンカーとしては、ストレプトアビジン、アビジン、neutravidinのようなタンパク質、ビオチン、カチオン化BSA、fos, jun、キーホールヘモシアニン、免疫グロブリン（断片又はその一部を含む）、リボソーム、ミセル、AMAMのような合成デンドリマー、ポリアクリル酸のような合成ポリマー、多糖類のような天然ポリマー、例えば、官能化デキストラン、ポリヌクレオチド、アプタマー、及びオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。多糖類、具体的にはアミノデキストラン又はカルボキシルデキストラン、及び自己集合タンパク質が最も通常に用いられる。

【0037】

化学発光標識は、一般式CL-L-RGの化合物〔式中、CLは化学発光部分を表し、Lはリンカー又は共有結合を表し、RGは、特異的結合パートナーと反応性基を表す〕を、特異的結合パートナーと反応させることによって形成される。反応が完了すると、化学発光部分は、化学発光標識特異的結合パートナー上の化学発光標識となる。化学発光標識は、トリガー溶液中の酸化剤若しくは還元剤と、又は活性化剤標識特異的結合パートナーの活性化剤標識と反応して、典型的には化学発光標識の励起状態である、活性化した化学発光化合物を形成する。励起状態は、一重項励起状態、又は三重項励起状態のいずれであってもよい。励起状態は、発光によって緩和するか、又は放出性エネルギー受容体へのエネルギー移動を受け、次にこれが発光するかのものである。詳細な実施形態では、発光は、トリガー溶液を加えた後、非常に急速に起こり、より具体的には、トリガー溶液を加えて2秒以内にピーク強度に達する。しかしながらこのことは必須ではなく、その理由は、十分な時間にわたって分析物シグナルが測定される限り、より遅い反応も正確な結果を与えることができるためである。

【0038】

抗体又は抗体断片などの特異的結合パートナーへの結合に好適な多種多様な化学発光化合物が、当技術分野において公知である。これらのいずれかを、本明細書に記載するアクセシに用いることができる。

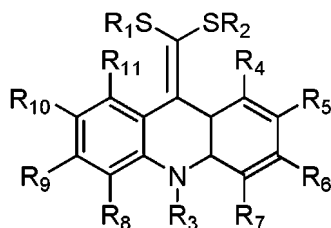
【0039】

例示的な化学発光部分及び化学発光標識としては、芳香環式ジアシルヒドラジン、例えば、ルミノール、イソルミノール、アミノブチルエチルイソルミノール、アミノヘキシルエチルイソルミノール、7-ジメチルアミノナフタレン-1,2-ジカルボン(dicarboxylic)酸ヒドラジン、環置換アミノフタルヒドラジド、アントラセン-2,3-ジカルボン酸ヒドラジド、フェナントレン(phenanthrene)-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド、ピレンジカルボン酸ヒドラジド、5-ヒドロキシフタルヒドラジド、6-ヒドロキシフタルヒドラジド、キサントン染料、例えば、フルオレセイン、エオシン、ローダミン染料、ロドール(rhodol)染料、化学発光芳香族アミン又は複素環式アミン、MCLA、インドール酢酸、イソブチルアルデヒド、トリヒドロキシ芳香族化合物、例えば、ピロガロール、フロログルシノール、及びプルプロガリン、並びに米国特許第5420275号及び同第5324835号に開示されているフタラジンジオン化合物、アクリダンケテンジチオアセタール化合物、並びにこれらの組み合わせが挙げられる。これらの標識のいずれも、放出性エネルギー受容体とともに、又は伴わずのいずれかで使用され得るが、イソブチルアルデヒドは、最も多くの場合、発光エネルギー受容体とともに使用される。

【0040】

いくつかの化学発光標識は、式 I の標識であり得る。

【化1】



I

10

【0041】

式 I の標識において、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、独立して、H、又は C、N、O、S、P、Si、及びハロゲンから選択される 1～50 個の原子を含有する有機部分であり、非水素原子の原子価を満たすのに十分な水素原子が加わる。最も通常には、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、独立して、特異的結合パートナーへのリンカー、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルである。 R_1 及び R_2 が置換されている場合、最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ（アルキル）シリル、グリコシル、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される 1～3 個の基によって置換されている。

20

【0042】

式 I の標識において、 R_3 は、H、又は C、N、O、S、P、Si、及びハロゲンから選択される、1～50 個の原子を、最も通常には 1～20 個の原子を含有する有機部分であり、非水素原子の原子価を満たすのに十分な水素原子が加わる。最も通常には、 R_3 は、特異的結合パートナーへのリンカー、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルである。そのような場合、 R_3 は、最も多くの場合、1～20 個の炭素原子を有する。多くの場合、 R_3 は、1～4 個の炭素原子を有するアルキル、フェニル、ベンジル、置換ベンジル、アルコキシアリル、カルボキシアリル、又はアルキルスルホン酸である。 R_3 がアルキル、置換アルキル、アルケニル、又は置換アルケニルである場合は特にであるが、他の場合にも、 R_3 が R_7 又は R_8 に共有結合して、環を、典型的には 5 又は 6 員環を形成することができる。上術の部分のうちの 1 つ以上が置換されている場合、最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ（アルキル）シリル、グリコシル、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される 1～3 個の基によって置換されている。

30

【0043】

標識式 I において、 $R_4 \sim R_{11}$ のそれぞれは、独立して、H、又は C、N、O、S、P、Si、及びハロゲンから選択される 1～50 個の原子を含有する有機部分であり、非水素原子の原子価を満たすのに十分な水素原子が加わる。最も通常には、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、独立して、特異的結合パートナーへのリンカー、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、ハロゲン、アミノ、置換アミン、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキシアミド、シアノ、又はスルホネートである。 R_4 及び R_5 、 R_8 及び R_9 等のような近接する $R_4 \sim R_{11}$ 部分の対は、共有結合して環を形成することができる。この場合、環は典型的には 5～7 員環であり、最も典型的には 5 員環又は 6 員環である。環は、炭素環式又は複素環式であってもよく、後者の場合、N、O、又は S などの複素原子を含有することができ、非置換であってもよ

40

50

く、1個以上の炭素原子上又は1個以上の複素原子上のいずれかで置換されていなくてもよく、又は置換されていてもよい。上術の部分のうちの1つ以上が置換される場合、最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ（アルキル）シリル、グリコシル、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPO}_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される1～3個の基によって置換されている。

【0044】

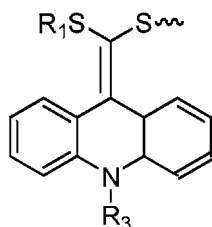
最も通常には、式 I において、 $\text{R}_4 \sim \text{R}_{11}$ のそれぞれは H である。

【0045】

最も通常には、用いられる式 I の標識は、式 I I の標識であり、

10

【化 2】



II

式中、波線は、特異的結合パートナーへの付着箇所を示す。このような場合、 R_3 は、典型的には、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルである。このような場合、 R_3 は、最も多くの場合、1～20個の炭素原子を、具体的には、1～4個の炭素原子を有するアルキル、フェニル、ベンジル、置換ベンジル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、又はアルキルスルホン酸を有する。上述の部分のうちの1つ以上が置換されている場合、最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ（アルキル）シリル、グリコシル、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPO}_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される1～3個の基によって置換される。

20

【0046】

式 I I の特定の標識において、波線は特異的結合パートナーへの、又は化合物を特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は、置換アルキル、非置換アルキル、置換アルキエニル、非置換アルケニル、置換アルキニル、非置換アルキニル、置換アラルキル、及び非置換アラルキルから独立して選択され、 R^1 又は R^2 が置換されている場合、 R^1 又は R^2 は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリアルキルシリル、 $-\text{SO}_3$ 、グリコシル、 $-\text{PO}_3$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、 $\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択され、 R^3 は、置換アルキル、非置換アルキル、置換アルキエニル、非置換アルケニル、置換アルキニル、非置換アルキニル、置換アラルキル、及び非置換アラルキルから選択され、 R^1 又は R^2 が置換されている場合、 R^1 又は R^2 は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリアルキルシリル、 $-\text{SO}_3$ 、グリコシル、 $-\text{PO}_3$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、 $\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される。

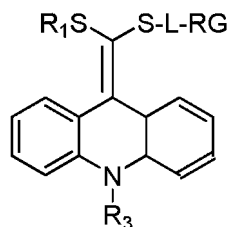
30

40

【0047】

式 I I の標識は、特異的結合パートナーと式 I I I の化合物との反応によって、特異的結合パートナーに結合される。

【化 3】



III

[式中、L 及び RG は、上記のとおりである。]

10

【0048】

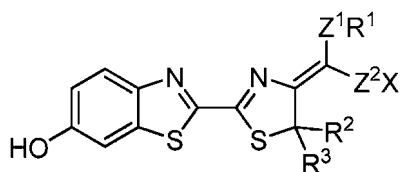
用いることができる式 I I I の化合物の例は、米国特許第 2 0 1 0 0 2 6 7 0 7 1 号の表 8 に提供されている。一般に式 I の化合物、及び具体的には式 I I I の化合物は、米国特許出願公開第 2 0 0 7 0 1 7 2 8 7 8 号に開示されている方法によって、調製することができる。例えば、市販のアクリダン又は N-置換アクリダンを強塩基で、続いて二硫化炭素で処理して、アクリダンジチオカルボキシレートを形成し、次に、従来のエステル化方法によって、エステル化又は部分エステル化して、置換基 R₁を導入することができる。R₂は、残りのチオールを、ブチルリチウム又は水素化ナトリウムなどの強塩基によって脱プロトン化し、次いで、適当な求電子体によって処理して、R₂を付着させることによって、加えることができる。置換基 R₁ 及び R₂ は、式 I I I の所望の化合物を達成するために、その上の官能基を操作する更なる反応を受けてもよい。

20

【0049】

化学発光標識はまた、芳香族環式ジアルヒドラジド、トリヒドロキシ芳香族化合物、アクリダンケテンジチオアセタール化合物、アクリダンエステル、アクリダンチオエステル、アクリダンエノール、及び式

【化 4】



30

[式中、

R¹ は、1～20 個の炭素のアルイル (allyl) 基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、及びアラルキル基、又はカルボニル、トリアルキルシリルから独立して選択される 1～3 個の基部分で置換された、これらのもののいずれかから選択され、SO₃ -、-OSO₃、グリコシル、PO₃ -、-OPO₃、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、又は第四級ホスホニウムであり、X は、1～20 個の炭素原子を有する C1～C8 アルキル、アリール、アラルキル、アルキル又はアルキルカルボニルから選択され、トリアルキルシリル、SO₃ -、グリコシル、及び PO(OR') (OR''') [式中、R' 及び R''' は、C1～C8 アルキル、シアノアルキル、シアノアリー

40

【0050】

いっそう更なる化学発光標識は、米国特許第 5 4 9 7 0 7 2、同第 5 2 3 2 1 2 号、同第 5 5 9 3 8 4 5 号、同第 5 9 2 2 5 8 8 号、同第 6 0 1 3 0 8 0 3 号、同第 6 6 9 6 5 6 9 号、同第 6 8 9 1 0 5 7 号、及び同第 2 0 1 0 0 2 6 7 0 7 1 号に開示されている。これらのいずれか、又は他の化学発光標識を用いることができる。特に好適な化学発光標

50

識及び化学発光標識特異的結合パートナーとしては、米国特許第20100267071号に開示されているものが挙げられる。

【0051】

活性化剤標識特異的結合パートナー

活性化剤標識特異的結合パートナーは、典型的には、 10^{-4} M未満、具体的には 10^{-6} M未満、最も具体的には 10^{-11} M～ 10^{-7} Mの濃度で、反応混合物中に存在する。

【0052】

活性化剤標識特異的結合パートナーは、特異的結合パートナーに結合している、典型的には不可逆的に結合している、活性化剤標識を含む。任意の好適な活性化剤標識を使用することができる。化合物は、2つの要件を満たす場合、活性化剤標識であることに好適であり得る。第1に、酸化剤若しくは還元剤から、又はこれらに電子を、いくつかの稀な場合には複数の電子を、受容又は供与することができ、ラジカル、イオンラジカル、又は通常でない場合ではイオンを形成できることであり得る。このようなラジカル、イオンラジカル、又はイオンは、活性化された活性化剤標識と呼ばれることもあり、活性化された活性化剤標識の形成は、活性化剤標識を活性化すると呼ばれることがある。第2に、活性化した活性化剤標識が形成されると、化学発光標識特異的結合パートナー上の化学発光標識を、及び適用可能な場合、結合していない化学発光基質を活性化することができ、化学発光標識を、及び適用可能な場合、結合していない化学発光基質を発光させるであろう。

【0053】

典型的な活性化剤標識は、ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様活性を有する化合物である。例としては、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、バナジウムプロモペルオキシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、真菌ペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、Mn依存性ペルオキシダーゼ、ダイズペルオキシダーゼ、及びMn-TPPS4のような、酵素ではないが、ペルオキシダーゼ様活性を有する、ペルオキシダーゼ模倣化合物が挙げられる。

【0054】

活性化剤標識特異的結合パートナーとしては、ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様活性を有する化合物と生物学的分子とのコンジュゲート又は複合体を挙げることができる。このような場合、用いることができる典型的な生物学的分子としては、DNA、RNA、アプタマー、抗体、抗体断片、抗体DNAキメラ、抗原、ハプテン、タンパク質、ペプチド、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンが挙げられる。

【0055】

1つ以上の活性化剤標識は、典型的には不可逆結合によって、特異的結合パートナーに結合する。結合、典型的には不可逆結合は、直接的な接続であってもよく、間接的な接続であってもよい。直接的な接続では、1つ以上の化学発光標識と特異的結合パートナーとの間に、リンカー又は補助物質を使用することなく、1つ以上の化学発光標識が、特異的結合パートナーに直接接続される。直接的な接続は、典型的には、イオン結合、共有結合、疎水性相互作用、又は水素結合などの不可逆結合によるものであり、最も多くの場合、共有結合である。

【0056】

間接的な接続が用いられる場合、当技術分野において補助物質と呼ばれることもあるリンカーが使用され、1つ以上の化学発光標識と特異的結合パートナーとを接続する。任意の好適なリンカーを使用することができ、好適なリンカーは、1つ以上の化学発光標識が発光することを妨げず、典型的には、化学発光標識特異的結合パートナーを、水性媒体に不溶性にしない。例示的なリンカーとしては、ストレプトアビジン、アビジン、neutravidinのようなタンパク質、ビオチン、カチオン化BSA、fos, jun、キーホールヘモシアニン、免疫グロブリン（断片又はその一部を含む）、リポソーム、ミセル、AMAMのような合成デンドリマー、ポリアクリル酸のような合成ポリマー、多糖類

のような天然ポリマー、例えば、官能化デキストラン、ポリヌクレオチド、アプタマー、及びオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。多糖類、具体的にはアミノデキストラン又はカルボキシルデキストラン、及び自己集合タンパク質が最も通常に用いられる。

【0057】

好適な活性化剤標識特異的結合パートナーとしては、米国特許出願公開第20100267071号に開示されているものが挙げられる。

【0058】

選択的シグナル阻害剤

選択的シグナル阻害剤は、反応混合物中に存在するが本明細書に記載するアッセイに関与しない、過剰な化学発光標識特異的結合パートナーによって生じるノイズシグナルを低減する。その機能は、米国特許公開第20100267071号に、より詳細に記載されている。

10

【0059】

典型的には、1種以上の選択的シグナル阻害剤が、反応混合物中に、 $10^{-6} \text{ M} \sim 10^{-1} \text{ M}$ 、最も多くの場合 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-4} \text{ M}$ の濃度で存在する。詳細な濃度としては、 $5 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、より具体的には $5 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ が挙げられる。

【0060】

選択的シグナル阻害剤としての使用に好適な化合物としては、抗酸化剤、具体的には犠牲型抗酸化剤、及び活性化剤標識選択的結合パートナー上の活性化剤標識と相互作用する酸化剤又は還元剤によって形成される、ラジカル、イオンラジカル、若しくはいくつかの場合ではイオンと、又はいくつかの場合では酸化剤若しくは還元剤と反応することができる、他の分子が挙げられる。この開示の目的については、選択的シグナル阻害剤の様々な選択肢が同じ方法で機能するため、任意の抗酸化剤を用いることができる。具体的には、通例では過酸化物である、酸化剤若しくは還元剤と反応して、又は活性化剤標識特異的結合パートナー上の活性化した活性化剤標識と反応して、過酸化物ラジカル又は活性化した活性化剤標識をクエンチする。

20

【0061】

選択的シグナル阻害剤として用いることができるいくつかの具体的な抗酸化剤は、米国特許公開第20100267071号に記載されている。例としては、グルタチオン、アスコルビン酸、具体的にはL-アスコルビン酸、アスコルビン酸の塩、具体的にはL-アスコルビン酸の塩、尿酸、L-アスコルビン酸-6-パルミテート、トコフェロール、5, 6-イソプロピリデン-L-アスコルビン (acobic) 酸、D-イソアスコルビン酸、L-イソアスコルビン (isoascorbic) 酸、又は両方を含めたイソアスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、ジエチルヒドロキシルアミン、BHT、

30

10



10



30

40

50

トリガー溶液

トリガー溶液は、化学発光標識特異的結合パートナーからの、いくつかの場合、バック

グラウンド剤から発光を生じるために必要な、1種以上の酸化剤又は還元剤を提供する。1種以上の酸化剤又は還元剤は、化学発光標識と直接反応することによってこの機能を実行する場合もあるが、適用可能な場合、バックグラウンド剤、より通常には1種以上の酸化剤又は還元剤は、活性化剤標識特異的結合パートナー上の活性化剤標識と反応して、活性化剤標識と化学発光標識との作用を推進する。

【0064】

1種以上の酸化剤又は還元剤は、活性化剤標識特異的結合パートナー上の活性化剤標識を活性化する、任意の化合物であり得る。最も通常には、1種以上の酸化剤又は還元剤は、活性化剤標識と相互作用する1種以上の過酸化物であり、典型的には、ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様活性を有する化合物であり、活性化剤標識を活性化する。ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様活性を有する化合物と反応する任意の過酸化物を使用することができるが、通常使用される過酸化物としては、過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、ヒドロ過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、芳香族過酸化物、具体的には過酸化ベンジル、ヒドロ過酸化脂質、具体的には、エイコサペンタエン (eicosapentaenoic) 酸、ドコサヘキサエン (docosahexanoic) 酸、又はリノール酸のヒドロ過酸化物、メタクロロ過安息香酸、過酸化水素、過酸化尿素、過酸化カルバメート、及び過ホウ酸塩などの過酸が挙げられる。過酸化物の濃度は変動し得るが、典型的には 10^{-8} M ~ 3 M、最も通常には 10^{-3} M ~ 10^{-1} M である。

【0065】

必須ではないが、トリガー溶液の成分として、増強剤が典型的に使用される。増強剤は、活性化剤標識、典型的にはペルオキシダーゼ酵素の反応性を促進する、アッセイにおけるノイズシグナルを低減する、又はその両方を行う、任意の化合物であり得る。典型的な増強剤としては、フェノール系化合物、芳香族アミン、フェノキサジン又はフェノチジン (phenothizine) とインドフェノール又はインドアニリンとの混合物、置換ヒドロキシベンゾオキサゾール、置換又は非置換アリールボロン酸、並びにこれらのエステル及び無水物などが挙げられる。いくつかの好適な増強剤は、米国特許公開第 20100267071 号、米国特許第 5171668 号、同第 5206149 号、及び同第 5512451 号に開示されている。用いる場合、増強剤は、典型的には、 10^{-5} M ~ 10^{-1} M の濃度で存在する。

【0066】

上に論じたように、酸化剤又は還元剤、及び用いる場合は増強剤に加えて、1種以上の選択的シグナル阻害剤が、トリガー溶液中に存在してもよい。

【0067】

トリガー溶液は、典型的には、記載する様々な溶質を、水性溶媒中に含有する。水性溶媒は、典型的には、緩衝水である。十分な分析物シグナルを生成することができないほどに、化学発光標識の発光又はアッセイに干渉しない限り、生物学的系に有用な任意の緩衝剤を用いることができる。最も有用な緩衝剤は、5 ~ 10.5 の pH を維持することになる。特に有用な緩衝剤は、6.0 ~ 9.0、例えば 6.5 ~ 8.5、最も具体的には 7.0 ~ 8.0 の pH を維持する。

【0068】

使用することができる例示的な緩衝剤は、米国特許第 20100267071 号に開示されている。最も通常には、緩衝剤は、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、トリス (ヒドロキシメチルアミン) メタン、グリシン、トリシン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、ジエタノールアミン、MOPS、HEPES、及び MES などから選択される。

【0069】

1種以上の洗浄剤又はポリマー性界面活性剤を使用して、発光を増強すること、又はノイズシグナルを減少させることができる。例としては、ポリオキシエチレン化アルキルフェノール、ポリオキシエチレン化アルコール、ポリオキシエチレン化エーテル、ポリオキ

シエチレン化ソルビトールエステル、C T A Bなどの第四級アンモニウム塩、及び第四級ホスホニウム塩が挙げられる。特に有用な例は、ポリマー性カチオン性界面活性剤、最も具体的には第四級アンモニウム塩及び第四級ホスホニウム塩である。

【0070】

上に論じたように、1種以上の選択的シグナル阻害剤が、トリガー溶液中に任意に存在してもよい。

【0071】

一例として、トリガー溶液は、水性緩衝液、 10^{-5} M～1 Mの濃度の過酸化物、及び 10^{-5} M～ 10^{-1} Mの濃度の増強剤を含むことができる。別の実施例では、トリガー溶液は、水性緩衝液、 10^{-5} M～1 Mの濃度の過酸化物を含有し得る。 10^{-5} M～ 10^{-1} Mの濃度の増強剤と、1つ以上の選択的シグナル阻害剤が、反応混合物中に 10^{-6} M～ 10^{-1} Mの濃度を有するような濃度の1つ以上の選択的シグナル阻害剤と、を含む。

10

【0072】

結合していない化学発光基質

結合していない化学発光基質は、分析物標識選択的結合パートナー又は化学発光標識特異的結合パートナーにコンジュゲートしていない、又は別の方法で不可逆的に結合した、任意の化学発光分子であり得る。ほとんどの場合、結合していない化学発光基質は、反応混合物に可溶である。化学発光標識特異的結合パートナーと結合していない化学発光基質との発光強度を別々に測定するために、化学発光標識の極大発光波長とは異なる極大発光波長を有する結合していない化学発光基質を選択することが便利であり得るが、これは必須ではない。

20

【0073】

アッセイ中、結合していない化学発光基質は、酸化剤又は還元剤と、最も多くの場合、活性化剤標識特異的結合パートナー上の活性化剤標識によって間接的に、反応し得る。この反応によって、化学発光基質が、発光することができる電子励起状態となり、バックグラウンドシグナルを生成する。あるいは、より典型的ではないが、結合していない化学発光基質の励起状態は、放出性エネルギー受容体との更なる反応を受ける場合があり、これは次に、発光してバックグラウンドシグナルを生成することができる。

【0074】

好適な結合していない化学発光基質としては、ルミノール及びイソルミノールなどの環式ヒドラジド、ロフィンなどのイミダゾール化合物、ルシゲニン及びアクリダンなどのアクリジニウムエステル、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオンなどのフタルヒドラジド、ルシフェリン、並びにジオン、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 (AMPPD)、及び3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-β-D'-ガラクトピラノイルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン (AMPGD)、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. 13, 7]デカン}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム、及び1, 2-ジオキセタンジオン、アダマンチリデン-アダマンチル-1, 2-ジオキセタンなどの1, 2-ジオキシエタン含有化合物が挙げられる。ルミノール及びイソルミノール、具体的にはルミノールが最も通常である。

30

40

【0075】

このアッセイでは、結合していない化学発光基質は、化学発光標識と同じ光化学機構によって、すなわち、典型的には活性化剤標識による酸化剤又は還元剤との反応によって、典型的には発光の形態で、検出可能なバックグラウンドシグナルを生成する励起状態に変換される。検出可能なバックグラウンドシグナルは、分析物の濃度と相関しない。したがって、分析物シグナルの生成に干渉し得る、試料の非分析物成分は、同様に、バックグラウンドシグナルの生成に干渉することになる。

【0076】

50

これを利用して、非分析物化合物のアッセイへの干渉を補正する、補正係数を得ることができる。これを行うために、反応混合物の他の成分（すなわち、化学発光標識特異的結合パートナー、活性化剤標識特異的結合パートナー、及び結合していない化学発光基質）とともに、それぞれが異なる既知量の分析物を含有する、標準試料のセットを調製し、これらをトリガーに曝露する。標準試料とともに使用する反応混合物のそれぞれは、同じ量の化学発光標識特異的結合パートナー、活性化剤標識特異的結合パートナー、及び結合していない化学発光基質を有する。トリガー溶液を加え、異なる濃度の分析物における分析物シグナルとバックグラウンドシグナルの両方について、標準試料を測定するが、結合していない化学発光基質の濃度が、標準試料のすべてにおいて同一であるため、通常、バックグラウンドシグナルは、標準試料のすべてにおいて同じであることになる。バックグラウンドシグナルが、試験試料のすべてについて同じではない場合、これは、アッセイ装置の側の誤差、又は分析物が結合していない化学発光基質と相互作用することのいずれかを示している。後者の場合、異なる結合していない化学発光基質を用いてもよい。

10

【0077】

異なる濃度の分析物における分析物シグナルを使用して、分析物シグナル対分析物濃度の相関曲線を作成することができる。

【0078】

試験試料からのバックグラウンドシグナルを使用して、次のように、倍率変更係数を作成することができる。試験試料をアッセイして、分析物シグナルとバックグラウンドシグナルとの両方を決定する。倍率変更係数は、標準試料によって生成されるバックグラウンドシグナルと、試験試料によって生成されるバックグラウンドシグナルとの割合として計算される。この倍率変更係数は、試験試料中の非分析物化合物の効果を考慮するものであり、試験試料中に、アッセイに干渉する非分析物化合物が存在しない場合には、1である。

20

【0079】

試験試料中の分析物濃度を決定するために、試験試料の分析物シグナルに倍率変更係数を乗じて、補正分析物シグナルを得る。補正分析物シグナルを、標準試料から決定した分析物シグナル対分析物濃度の相関曲線と比較して、分析物濃度を提供する。

【0080】**検出**

30

バックグラウンドシグナル及び分析物シグナルなどの様々なシグナルは、当技術分野において公知の任意の装置によって検出することができる。装置の種類は、シグナルの種類に依存し得る。シグナルが発光シグナルである場合、ルミノメータ又はCCDカメラが典型的に使用される。他の有用な検出器としては、写真フィルム、X線フィルム、シンチレーションカウンター、光量計、並びにUV/VIS及びIR検出器のような透過検出器などが挙げられる。最も通常には、検出は、ルミノメータ中又はCCDカメラの前で、試験管内又はマルチウェルプレート内で実行される。マルチウェルプレートとCCDカメラとを使用することは、この場合、マルチウェルプレートの異なるウェルのそれぞれにおいて、複数の試験試料及び標準試料のアッセイ及び検出を同時に実行することができる場合があるため、便利であり得る。検出は、多数の市販されている、又は当技術分野において公知のルミノメータ、CCDカメラ等のいずれかによって、実行することができる。

40

【0081】**使用**

本明細書に記載するアッセイは、様々な系における使用を見出すことができる。ELISA系は1つの使用であるが、本明細書における手引及び当業者の知識に従って、アプタマー結合及び他の非免疫原特異的結合パートナーを伴うアッセイも用いることができる。例としては、溶液ハイブリダイゼーションアッセイ、サザンブロット法におけるDNA検出、ノーザンブロット法におけるRNA検出、DNA又はRNAの配列決定、DNA又はRNDのフィンガープリント法、コロニーハイブリダイゼーション、及びブランクアッセイが挙げられ、これらはすべて当技術分野において公知である。少なくとも1種の特異的

50

結合パートナーを作製することができる任意の分析物を、分析することができる。例としては、抗原、毒素、毒物、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、薬物、ステロイド、ハプテン、抗体、ペプチド、ペプチド断片、ホルモン、受容体、プライマー、及び小分子などが挙げられる。

【0082】

例示的な実施形態の列举

この実施形態の列举は、本発明の特定の態様の理解を助けることを意図している。限定を目的とするものではない。

【0083】

1. 試料中の分析物についてアッセイする方法であって、

10

反応混合物を形成すること、及び

トリガー溶液を反応混合物に混和することを含み、

アッセイされる分析物が試料中に存在してもよく、

この反応混合物は、

第1の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した化学発光標識を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、分析物に結合して、分析物と結合した化学発光標識特異的結合複合体を形成することができる、化学発光標識特異的結合パートナーと、

第2の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した活性化剤標識を含む活性化剤標識特異的結合パートナーと、

選択的シグナル阻害剤とを含む水溶液であり、

20

反応混合物が、結合していない化学発光基質を更に含み、

トリガー溶液が、結合していない化学発光基質からバックグラウンドシグナルを生成することができる、

分析物の存在下で、トリガー溶液が、試料中の分析物の量に関係する検出可能な分析物シグナルを生成することができる、方法。

2. 反応混合物が増強剤を更に含む、実施形態1に記載の方法。

3. トリガー溶液が増強剤を更に含む、実施形態1に記載の方法。

4. 選択的シグナル阻害剤が、分析物を有する複合体において、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの間の反応によって生成するシグナルの割合を、分析物を有する複合体が存在しない場合の、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの間の反応からのシグナルを超えさせる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

30

5. 選択的シグナル阻害剤が、オルト又はパラ配向性において少なくとも2つのヒドロキシル基を有する芳香族化合物、少なくとも1つのヒドロキシル基と、この少なくとも1つのヒドロキシル基のうちの1つ以上に対して、オルト又はパラであるアミノ基とを有する芳香族化合物、エチレン性不飽和基上で置換された少なくとも2つのヒドロキシル基を有する化合物、及び窒素複素環式基を有する化合物からなる群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

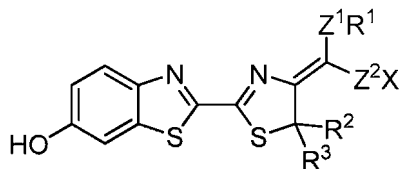
6. 選択的シグナル阻害剤が、アスコルビン酸、イソアスコルビン酸、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸、アスコルビン酸6-パルミテート、5, 6-イソプロピリジエン-アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシトルエン、グルタチオン、尿酸、1種以上のトコフェロール、及びカテキンからなる群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

40

7. 選択的シグナル阻害剤がアスコルビン酸である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

8. 化学発光標識特異的結合パートナーが、特異的結合対部材に直接又は間接的に接続された化学発光標識を含み、化学発光標識が、芳香族環式ジアルヒドラジド、トリヒドロキシ芳香族化合物、アクリダンケテンジチオアセタール化合物、アクリダンエステル、アクリダンチオエステル、アクリダンエノール、及び式

【化 7】



〔式中、

R¹ は、1～20個の炭素のアルイル (allyl) 基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、及びアラルキル基、又はカルボニル、トリアルキルシリル、SO₃－、－OSO₃、グリコシル、PO₃－、－OPO₃、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、若しくは第四級ホスホニウムから独立して選択された1～3つの基部分によって置換された、これらのもののいずれかから選択され、

10

Xは、C1～C8アルキル、アリール、アラルキル、1～20個の炭素原子を有するアルキル若しくはアルキルカルボニル、トリアルキルシリル、SO₃－、グリコシル、及びPO(OR') (OR'')〔式中、R'及びR''は、C1～C8アルキル、シアノアルキル、シアノアリール、シアノアラルキル、トリアルキルシリル、アルカリ金属カチオン、アルカリ土類カチオン、アンモニウムカチオン、及びトリアンルキル (anlky) ホスホニウムカチオンから独立して選択される〕から選択され、

Z¹ 及び Z² は、O及びS原子から独立して選択され、

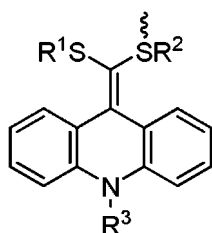
R² 及び R³ は、H及びC1～C8アルキルから独立して選択される〕

20

を有する化合物からなる群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法

9. 化学発光標識特異的結合パートナーが、特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された化学発光標識を含み、化学発光標識が、式

【化 8】



30

〔式中、

波線は特異的結合パートナーへの、又は化合物を特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1～20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ(C1～C8)アルキルシリル、－SO₃－、－OSO₃²⁻、グリコシル、－PO₃－、－OPO₃²⁻、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、C(O)NHNH₂、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される〕

40

を有する、実施形態1～7のいずれかに記載の方法。

10. 活性化剤標識特異的結合パートナーが、特異的結合対部材に直接又は間接的に接続された活性化剤標識化合物を含み、活性化剤標識が、遷移金属塩、遷移金属複合体、及び酵素から選択され、活性化剤標識がペルオキシダーゼ活性を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

11. 活性化剤標識がペルオキシダーゼ酵素である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

50

12. 活性化剤標識がセイヨウワサビペルオキシダーゼである、実施形態11に記載の方法。

13. 化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとのうちの少なくとも1つが、可溶性タンパク質、ストレプトアビジン、アビジン、neutravidin、ビオチン、カチオン化BSA、fos, jun、可溶性合成デンドリマー、可溶性合成ポリマー、多糖類、デキストラン、有機ヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、アプタマー、リボソーム、及びミセルから選択される補助物質を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

14. 増強剤が、ペルオキシダーゼ活性を有する活性化剤の触媒回転を促進する1種以上の化合物である、実施形態2～12のいずれかに記載の方法。

15. 増強剤が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される、実施形態13に記載の方法。

16. トリガー溶液が、酸化剤又は還元剤を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

17. トリガー溶液が過酸化物を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

18. 過酸化物が、過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、ヒドロ過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、芳香族過酸化物、具体的には過酸化ベンジル、ヒドロ過酸化脂質、具体的にはエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、又はリノール酸のヒドロ過酸化物、メタクロロ過安息香酸、過酸化水素、過酸化尿素、過酸化カルバメート、及び過ホウ酸塩などの過酸からなる群から選択される、実施形態17に記載の方法。

19. 過酸化物が過酸化水素である、実施形態18に記載の方法。

20. トリガー溶液が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される増強剤を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

21. トリガー溶液及び反応混合物の成分のすべて、並びに分析物が水溶性である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

22. トリガー溶液、アッセイ溶液、又は反応混合物のいずれも、固相物質に直接又は間接的にコンジュゲートされる材料を含有しない、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

23. 選択的シグナル剤が、オルト又はパラ配向性において少なくとも2つのヒドロキシル部分を有する芳香族化合物、オルト又はパラ配向性において、ヒドロキシル部分とアミノオ（amineo）部分とを有する芳香族化合物、少なくとも2つのビニルヒドロキシル基を有する化合物、及び窒素複素環からなる群から選択される化合物を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

24. 選択的シグナル阻害剤がアスコルビン酸を含み、アスコルビン酸が、具体的にはL-アスコルビン酸である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

25. 選択的シグナル阻害剤が、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチル（methyl）クロマン-2-カルボン酸を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

26. 選択的シグナル阻害剤が2-アミノオ（amineo）フェノールを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

27. 選択的シグナル阻害剤が、3-アミノオ（amineo）-チロシン、具体的には3-アミノ-L-チロシンを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

28. 選択的シグナル阻害剤が4-クロロカテコールを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

29. 選択的シグナル阻害剤がフェノキサジンを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

30. 選択的シグナル阻害剤が2-プロモベンゼン（benzne）-1, 4-ジオールを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

31. 選択的シグナル阻害剤が5, 6-イソプロピリジン (isopropylidene) アスコルビン酸を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

32. 選択的シグナル阻害剤が6-パルミテートを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

33. 化学発光標識特異的結合パートナー及び活性化剤標識特異的結合パートナーが、それぞれ試料中の分析物に結合する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

34. 化学発光標識特異的結合パートナーが、分析物の類似体に接続された化学発光標識化合物を含み、更に、分析物と化学発光標識特異的結合パートナーとが競合して、活性化剤標識特異的結合パートナーに結合する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

35. 結合していない化学発光基質が、環式ヒドラジド、例えば、ルミノール及びイソルミノール、イミダゾール化合物、例えば、ロフィン、アクリジニウムエステル、例えば、ルシゲニン及びアクリダン、フタルヒドラジド、例えば、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン、ルシフェリン、並びに1, 2-ジオキシエタン含有化合物、例えば、ジオン、3-(2'-ス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 (AMP PD)、及び3-(2'-ススピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-β-D'-ガラクトピラノイルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン (AMP GD)、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. 1³, 7]}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム、及び1, 2-ジオキセタンジオン、アダマンチリデン-アダマンチル-1, 2-ジオキセタンからなる群から選択され、具体的にはルミノール又はイソルミノールであり、より具体的にはルミノールである、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

36. 結合していない化学発光基質がルミノールを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

37. 結合していない化学発光基質の極大発光強度の波長が、化学発光標識の極大発光強度の波長と異なる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

38. 分析物シグナル及びバックグラウンドシグナルを検出することを更に含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

39. 分析物シグナルを検出することが、既知濃度の分析物を有する標準試料である少なくとも1つの試料から、少なくとも1つの標準分析物シグナルを検出することを含み、かつ未知濃度の分析物を有する少なくとも1つの試験試料から、試験分析物シグナルを検出することを更に含む、実施形態38に記載の方法。

40. バックグラウンドシグナルを検出することが、既知濃度の分析物を有する標準試料である少なくとも1つの試料から、少なくとも1つの標準バックグラウンドシグナルを検出することを含み、かつ未知濃度の分析物を有する少なくとも1つの試験試料から、試験バックグラウンドシグナルを検出することを更に含む、実施形態38又は39に記載の方法。

41. 分析物についてアッセイするためのキットであって、

第1の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した化学発光標識を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、分析物に結合して、分析物と結合した化学発光標識特異的結合複合体を形成することができる、化学発光標識特異的結合パートナーと、

第2の特異的結合パートナーに不可逆的に結合した活性化剤標識を含む活性化剤標識特異的結合パートナーと、

選択的シグナル阻害剤とを含み、

トリガー溶液が、結合していない化学発光基質からバックグラウンドシグナルを生成することができる、

結合していない化学発光基質

を更に含む、

分析物の存在下で、トリガー溶液が、試料中の分析物の量に関係する検出可能な分析物シグナルを生成することができる、キット。

４２．トリガー溶液が増強剤を更に含む、実施形態４１に記載のキット。

４３．選択的シグナル阻害剤が、分析物を有する複合体において、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの間の反応によって生成するシグナルの割合を、分析物を有する複合体が存在しない場合の、化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとの間の反応からのシグナルを超えさせる、実施形態４１又は４２に記載のキット。

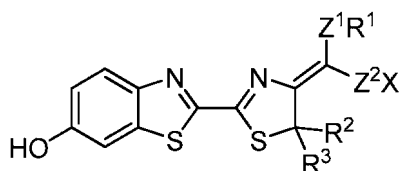
４４．選択的シグナル阻害剤が、オルト又はパラ配向性において少なくとも２つのヒドロキシル基を有する芳香族化合物、少なくとも１つのヒドロキシル基と、この少なくとも１つのヒドロキシル基のうちの１つ以上に対して、オルト又はパラであるアミノ基とを有する芳香族化合物、エチレン性不飽和基上で置換された少なくとも２つのヒドロキシル基を有する化合物、及び窒素複素環式基を有する化合物からなる群から選択される、実施形態４１～４３のいずれかに記載のキット。

４５．選択的シグナル阻害剤が、アスコルビン酸、イソアスコルビン酸、６－ヒドロキシ－２，５，７，８－テトラメチルクロマン－２－カルボン酸、アスコルビン酸６－パルミテート、５，６－イソプロピリジエン－アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシトルエン、グルタチオン、尿酸、１種以上のトコフェロール、及びカテキンからなる群から選択される、実施形態４１～４４のいずれかに記載のキット。

４６．選択的シグナル阻害剤がアスコルビン酸である、実施形態４１～４５のいずれかに記載のキット。

４７．化学発光標識特異的結合パートナーが、特異的結合対部材に直接又は間接的に接続された化学発光標識を含み、化学発光標識が、芳香族環式ジアルヒドラジド、トリヒドロキシ芳香族化合物、アクリダンケテンジチオアセタール化合物、アクリダンエステル、アクリダンチオエステル、アクリダンエノール、及び式

【化９】



〔式中、

R^1 は、１～２０個の炭素のアルイル (allyl) 基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、及びアラルキル基、又はカルボニル、トリアルキルシリル、 SO_3- 、 $-OSO_3$ 、グリコシル、 PO_3- 、 $-OP_3$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、若しくは第四級ホスホニウムから独立して選択された１～３つの基部分によって置換された、これらのもののいずれかから選択され、

X は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、アリール、アラルキル、１～２０個の炭素原子を有するアルキル若しくはアルキルカルボニル、トリアルキルシリル、 SO_3- 、グリコシル、及び $PO(OR')$ (OR'') [式中、 R' 及び R'' は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、シアノアルキル、シアノアリール、シアノアラルキル、トリアルキルシリル、アルカリ金属カチオン、アルカリ土類カチオン、アンモニウムカチオン、及びトリアンルキル (anlky) ホスホニウムカチオンから独立して選択される] から選択され、

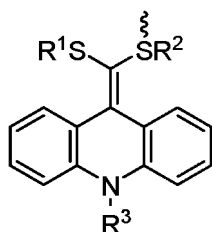
Z^1 及び Z^2 は、 O 及び S 原子から独立して選択され、

R^2 及び R^3 は、 H 及び $C_1 \sim C_8$ アルキルから独立して選択される]

を有する化合物からなる群から選択され、先行する実施形態のいずれかに記載のキット

。 ４８．化学発光標識特異的結合パートナーが、特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された化学発光標識を含み、化学発光標識が、式

【化 10】



[式中、

波線は特異的結合パートナーへの、又は化合物を特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

10

R^1 及び R^2 は、置換アルキル、非置換アルキル、置換アルキエニル (alkyenylyl)、非置換アルケニル、置換アルキニル、非置換アルキニル、置換アラルキル、及び非置換アラルキルから独立して選択され、 R^1 又は R^2 が置換されている場合、 R^1 又は R^2 は 1 ～ 3 個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリアルキルシリル、 $-SO_3$ 、グリコシル、 $-PO_3$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、 $C(O)NHNH_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択され、

R^3 は、置換アルキル、非置換アルキル、置換アルキエニル (alkyenylyl)、非置換アルケニル、置換アルキニル、非置換アルキニル、置換アラルキル、及び非置換アラルキルから選択され、 R^1 又は R^2 が置換されている場合、 R^1 又は R^2 は 1 ～ 3 個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリアルキルシリル、 $-SO_3$ 、グリコシル、 $-PO_3$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、 $C(O)NHNH_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

20

を有する、実施形態 41 ～ 46 のいずれかに記載のキット。

49. 活性化剤標識特異的結合パートナーが、特異的結合対部材に直接又は間接的に接続された活性化剤標識化合物を含み、活性化剤標識が、遷移金属塩、遷移金属複合体、及び酵素から選択され、活性化剤標識がペルオキシダーゼ活性を有する、実施形態 41 ～ 48 のいずれかに記載のキット。

50. 活性化剤標識がペルオキシダーゼ酵素である、実施形態 41 ～ 49 のいずれかに記載のキット。

30

51. 活性化剤標識がセイヨウワサビペルオキシダーゼである、実施形態 50 に記載のキット。

52. 化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとのうちの少なくとも 1 つが、可溶性タンパク質、ストレプトアビジン、アビジン、neutravidin、ビオチン、カチオン化 BSA、fos, jun、可溶性合成デンドリマー、可溶性合成ポリマー、多糖類、デキストラン、有機ヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、アプタマー、リボソーム、及びミセルから選択される補助物質を含む、実施形態 41 ～ 50 のいずれかに記載のキット。

53. 増強剤が、ペルオキシダーゼ活性を有する活性化剤の触媒回転を促進する 1 種以上の化合物である、実施形態 42 ～ 52 のいずれかに記載のキット。

40

54. 増強剤が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される、実施形態 53 に記載のキット。

55. トリガー溶液が、酸化剤又は還元剤を含む、実施形態 41 ～ 54 のいずれかに記載のキット。

56. トリガー溶液が過酸化化合物を含む、実施形態 41 ～ 55 のいずれかに記載のキット。

57. 過酸化化合物が、過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、ヒドロ過酸化アルキル、具体的にはアルキルがエチル又はメチルであるもの、芳

50

香族過酸化物、具体的には過酸化ベンジル、ヒドロ過酸化脂質、具体的にはエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、又はリノール酸のヒドロ過酸化物、メタークロロ過安息香酸、過酸化水素、過酸化尿素、過酸化カルバメート、及び過ホウ酸塩などの過酸からなる群から選択される、実施形態 56 に記載のキット。

58. 過酸化物が過酸化水素である、実施形態 57 に記載のキット。

59. トリガー溶液が、フェノール化合物、芳香族アミン、ベンゾオキサゾール、ヒドロキシベンゾチアゾール、アリールボロン酸、及びこれらのいずれかの混合物から選択される増強剤を含む、実施形態 41～58 のいずれかに記載のキット。

60. トリガー溶液及び反応混合物の成分のすべて、並びに分析物が水溶性である、実施形態 41～59 のいずれかに記載のキット。

61. トリガー溶液、アッセイ溶液、又は反応混合物のいずれも、固相物質に直接又は間接的にコンジュゲートされる材料を含有しない、実施形態 41～60 のいずれかに記載のキット。

62. 選択的シグナル剤が、オルト又はパラ配向性において少なくとも 2 つのヒドロキシル部分を有する芳香族化合物、オルト又はパラ配向性において、ヒドロキシル部分とアミノオ部分とを有する芳香族化合物、少なくとも 2 つのビニルヒドロキシル基を有する化合物、及び窒素複素環からなる群から選択される化合物を含む、実施形態 41～61 のいずれかに記載のキット。

63. 選択的シグナル阻害剤がアスコルビン酸を含み、アスコルビン酸が、具体的には L-アスコルビン酸である、実施形態 41～62 のいずれかに記載のキット。

64. 選択的シグナル阻害剤が、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸を含む、実施形態 41～63 のいずれかに記載のキット。

65. 選択的シグナル阻害剤が 2-アミノオフェノールを含む、実施形態 41～64 のいずれかに記載のキット。

66. 選択的シグナル阻害剤が、3-アミノオーチロシン、具体的には 3-アミノ-L-チロシンを含む、実施形態 41～65 のいずれかに記載のキット。

67. 選択的シグナル阻害剤が 4-クロロカテコールを含む、実施形態 41～66 のいずれかに記載のキット。

68. 選択的シグナル阻害剤がフェノキサジンを含む、実施形態 41～67 のいずれかに記載のキット。

69. 選択的シグナル阻害剤が 2-ブロモベンゼン-1, 4-ジオールを含む、実施形態 41～68 のいずれかに記載のキット。

70. 選択的シグナル阻害剤が 5, 6-イソプロピリジンアスコルビン酸を含む、実施形態 41～69 のいずれかに記載のキット。

71. 選択的シグナル阻害剤が 6-パルミテートを含む、実施形態 41～70 のいずれかに記載のキット。

72. 化学発光標識特異的結合パートナー及び活性化剤標識特異的結合パートナーが、それぞれ試料中の分析物に結合するようになっている、実施形態 41～71 のいずれかに記載のキット。

73. 化学発光標識特異的結合パートナーが、分析物の類似体に接続された化学発光標識化合物を含み、更に、分析物と化学発光標識特異的結合パートナーとが競合して、活性化剤標識特異的結合パートナーに結合するようになっている、実施形態 41～72 のいずれかに記載のキット。

74. 結合していない化学発光基質が、環式ヒドラジド、例えば、ルミノール及びイソルミノール、イミダゾール化合物、例えば、ロフィン、アクリジニウムエステル、例えば、ルシゲニン及びアクリダン、フタルヒドラジド、例えば、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン、ルシフェリン、並びに 1, 2-ジオキシエタン含有化合物、例えば、ジオン、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 (AMPPD)、及び 3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-β-D'-ガラクトピラノイルオキシ)フェニル-

10

20

30

40

50

1, 2-ジオキセタン (AMPGD)、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^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム、及び1, 2-ジオキセタンジオン、アダマンチリデン-アダマンチル-1, 2-ジオキセタンからなる群から選択され、具体的にはルミノール又はイソルミノールであり、より具体的にはルミノールである、実施形態41~73のいずれかに記載のキット。

75. 結合していない化学発光基質がルミノールを含む、実施形態41~74のいずれかに記載のキット。

76. 結合していない化学発光基質の極大発光強度の波長が、化学発光標識の極大発光強度の波長と異なる、実施形態41~75のいずれかに記載のキット。

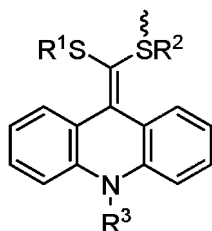
77. 試料中の分析物についての溶液相アッセイ方法であって、

a) 以下の成分：

試料 (sample)、

第1の特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された化学発光標識化合物を含む化学発光標識特異的結合パートナーであって、化学発光標識化合物が、式

【化11】



〔式中、

波線は特異的結合パートナーへの、又は化合物を特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1~20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1~3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ(C1~C8)アルキルシリル、-SO₃⁻、-OSO₃²⁻、グリコシル、-PO₃⁻、-OP₃²⁻、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、C(O)NHNH₂、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

の化合物である、化学発光標識特異的結合パートナー、

ペルオキシダーゼ活性を有し、第2の特異的結合パートナーに直接又は間接的に接続された、活性化剤標識化合物を含む活性化剤標識特異的結合パートナー、及び

L-アスコルビン酸、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマナン (chromanan)-2-カルボン酸、2-アミノフェノール、3-アミネオ-L-チロシン、4-クロロカテコール、フェノキサジン、2-ブロモベンゼン-1, 4-ジオール、5, 6-イソプロピリデンアスコルビン酸、及びアスコルビン酸6-パルミテートからなる群から選択される選択的シグナル阻害剤

を含む水性反応混合物を、成分を任意の順序で又は同時に水溶液に加えることによって、形成することであって、

成分のすべてが水溶液中に可溶であり、成分のいずれも固体支持体に固定されておらず、

化学発光標識特異的結合パートナーと活性化剤標識特異的結合パートナーとが、試料中に存在する分析物に結合して、水溶液中に結合複合体を形成する、ことと、

b) 水性反応混合物に、過酸化化合物を含むトリガー溶液を加えることであって、トリガー溶液が、選択的シグナル阻害剤の存在下で、水性反応混合物中の分析物と結合した化学発光標識特異的結合パートナー及び分析物と結合した活性化剤標識特異的結合パートナ

一の量と相関する、検出可能な化学発光シグナルを放出し、選択的シグナル阻害剤が、化学発光標識化合物と活性化剤標識化合物との間の反応によって生成するシグナルの割合を、このような複合体ではない場合の、化学発光標識化合物と活性化剤標識化合物との間の反応からのシグナルを超えさせる、こととを含み、

反応混合物が、試料中の分析物の濃度と相関しない検出可能なバックグラウンドシグナルを生成する、結合していない化学発光基質を更に含むこと

を特徴とする、溶液相アッセイ方法。

78. 試料中の分析物を検出するためのキットであって、

分析物への第1の特異的結合パートナーと、

第1の特異的結合パートナーにコンジュゲートした化学発光化合物と、

分析物への第2の特異的結合パートナーと、

第2の特異的結合パートナーにコンジュゲートした活性化剤化合物と、

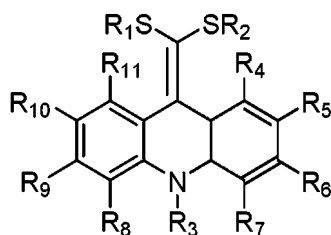
選択的シグナル阻害剤と、

トリガー溶液とを含み、

キットのこれらの成分のすべてが、水溶液に可溶であり、

化学発光化合物が、式

【化12】



[式中、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルからなる群から選択され、 R_1 及び R_2 が置換されている場合、 R_1 及び R_2 は最も通常には、カルボニル、カルボキシル、トリ（アルキル）シリル、グリコシル、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^-$ 、ハロゲン、ヒドロキシ、チオール、アミノ、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから選択される、1～3個の基によって置換されており、

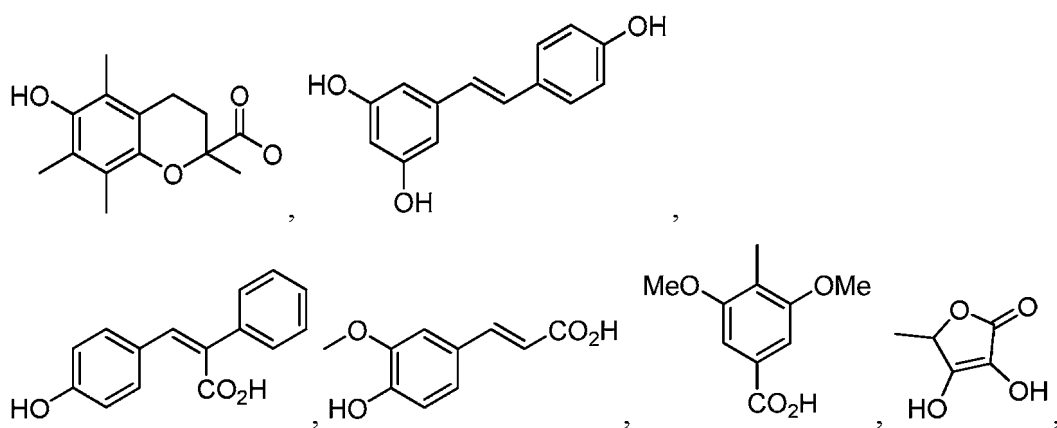
R_3 は、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、又は置換アラルキルからなる群から選択され、

$R_4 \sim R_{11}$ のそれぞれは、独立して、H、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、ハロゲン、アミノ、置換アミン、カルボキシル、カルボアルコキシ、カルボキシアミド、シアノ、又はスルホネートであり、近接する $R_4 \sim R_{11}$ 部分の対は、共有結合して5～7員の炭素環又は複素環式環を形成することができる]

を有するアクリダンケテンジチオアセタール化合物であり、

選択的シグナル阻害剤が、グルタチオン、アスコルビン酸、具体的にはL-アスコルビン酸、アスコルビン酸の塩、具体的にはL-アスコルビン酸の塩、尿酸、L-アスコルビン酸-6-パルミテート、トコフェロール、5, 6-イソプロピリデン-L-アスコルビン酸、D-イソアスコルビン酸、L-イソアスコルビン酸、又は両方を含めたイソアスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、ジエチルヒドロキシルアミン、BHT、

10



10

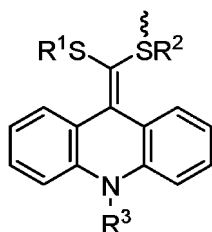


30

40

79. 化学発光標識化合物が、式

【化 15】



〔式中、

波線は特異的結合パートナーへの、又は化合物を特異的結合パートナーに接続しているリンカーへの付着部位を示し、

R¹、R²、及びR³は、1～20個の炭素原子の、置換アルキル基、非置換アルキル基、置換アルキエニル基、非置換アルケニル基、置換アルキニル基、非置換アルキニル基、置換アラルキル基、及び非置換アラルキル基から独立して選択され、R¹又はR²が置換されている場合、R¹又はR²は1～3個の置換基によって置換されており、各置換基は、カルボニル、カルボキシル、トリ（C1～C8）アルキルシリル、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^{2-}$ 、グリコシル、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPO}_3^{2-}$ 、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、アミノ、 $\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムから独立して選択される]

の化合物である、実施形態78に記載のキット。

【実施例】

【0084】

材料

エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩（EDTA-二カリウム塩）、パラークマル酸、TWEEN 20、トリス塩基、トリス塩酸塩、アスコルビン酸ナトリウム、及びルシゲニンはSigma-Aldrich Corporation（St. Louis, MO）から入手した。

過酸化水素（30%、Baker analyzed）は、VWR International（Radnor, PA）から入手した。

エタノール（200プルーフ）は、Decon Labs Incorporated, King of Prussia, PAから入手した。

PVP360 [平均分子量360,000のポリ（ビニルピロリジノン）] 及び

PEG-6000 [平均分子量6000のポリ（エチレングリコール）] をSigma-Aldrich Corporationから入手した。

ウシIgG SPARCLアッセイキットは、Life Diagnostics Incorporated（West Chester, PA）から入手した。PBS中のウシIgG標準溶液は、表1に記載の溶液配合に従って調製した。

ウシIgG標準+ルシゲニン溶液は、20体積部のウシIgG標準溶液（表1）を、1体積部のルシゲニンの脱イオン水中飽和溶液と組み合わせることによって調製した。

（抗ウシIgG）-HRPコンジュゲートを含有する溶液は、アッセイキットの指示に従って調製した。

アクリダン標識抗ウシIgGを含有する溶液は、アッセイキットの指示に従って調製し、更に、アスコルビン酸ナトリウム（200マイクロモル濃度）を追加した。

ウマ血清（16050-130）及びリン酸緩衝生理食塩水（PBS）は、Thermo Fisher Scientific Incorporatedから入手した。ウマ血清を有する試験試料は、PBS中、 $1e-1$ 、 $1e-2$ 、 $1e-3$ 、 $1e-4$ 、及び $1e-5$ （体積／体積）の希釈濃度で調製した。

【0085】

【表 1】

表1. ウシIgG標準溶液

成分	PBS溶液中の濃度
ウシIgG標準 (SPARCLアッセイキットから)	50ppb
TWEEN 20	3重量%
PVP360	3重量%
PEG-6000	3重量%

【0086】

実施例1のためのトリガー溶液は、表2に列挙する成分の水溶液として調製した。

10

【0087】

【表 2】

表2. トリガー溶液組成物

成分	トリガー溶液中の濃度 (g/L)
p-クマル酸	1.31
EDTA-二カリウム塩	0.40
TWEEN 20	2.00
過酸化水素, 30%	11.33
エタノール (200プルーフ)	32.00
トリス塩基	1.33
トリス塩酸塩	2.22

20

【0088】

Cortisol SPARCLアッセイキットは、Life Diagnostics Incorporatedから入手した。

【0089】

コルチゾール標準溶液は、アッセイキットにおいて提供されたコルチゾールストック及び希釈剤を使用して調製した。

【0090】

コルチゾール-HRPコンジュゲートを含む溶液は、キットのコルチゾール-HRPコンジュゲート (781マイクロリットル) を、キットの249マイクロリットルの希釈剤と混合することによって調製した。

30

【0091】

抗コルチゾールアクリダンコンジュゲートを含む溶液は、キットの抗コルチゾールアクリダンコンジュゲート (2.5マイクロリットル) を、キットの247.5マイクロリットルの希釈剤と混合することによって調製した。

【0092】

計算

倍率変更係数 (SF) は、報告された標準試料のバックグラウンドシグナルを、報告された試験試料のバックグラウンドシグナルで除することによって決定した。

40

【0093】

試験試料の補正分析物シグナルは、試験試料の分析物シグナルに倍率変更係数 (SF) を乗じることによって計算した。

【0094】

実施例1

まず、ウマ血清希釈試料 (20マイクロリットル) をプレートのウェルに加えることによって、反射性白色96ウェルプレート中に試験試料を調製した。各ウェルは単一の試験試料を含むし、各試験試料を3回試験した。標準試料を含むウェルについては、20マイクロリットルのPBS溶液を使用した (3回反復)。次に、20マイクロリットルのウシIgG標準+ルシゲニン溶液を各ウェルに加え、プレートを300rpmで30秒間

50

振盪した。抗ウシ I g G－H R P コンジュゲート溶液（20 マイクロリットル）を各ウェルに加え、プレートを 300 r p m で 30 秒間振盪した。次いで、アクリダン標識抗ウシ I g G コンジュゲート溶液（20 マイクロリットル）を各ウェルに加え、プレートを 300 r p m で 30 秒間振盪した。3 M M L S I I 注入ルミノメータ（3 M C o r p o r a t i o n (M a p l e w o o d , M N) から入手可能）を使用して、30 マイクロリットルのトリガー溶液を各ウェルに加えた。この機器を、フラッシュ発光シグナル（試験試料又は標準試料のいずれかの分析物シグナル）を 3 秒間読み取り、同時に積分するように設定した。フラッシュ発光シグナル（発光量、r e l a t i v e l i g h t u n i t、R L U）を記録した後、注入後 60～70 秒の期間、第 2 の発光シグナル（試験試料又は標準試料のバックグラウンドシグナル）を記録した（1 秒の積分時間による）。第 2 のシグナルについて報告された R L U 値は、10 秒の時間範囲にわたって記録した値の平均であった。表 3～7 において、試験試料のバックグラウンドシグナル（R L U）、標準試料の平均バックグラウンドシグナル（R L U）、試験試料の分析物シグナル（R L U）、標準試料の平均分析物シグナル（R L U）、計算された倍率変更係数、及び試験試料の補正分析物シグナル（R L U）の値を、各反復試料について報告する。各試験試料についての補正分析物シグナルが、対応する標準試料についての分析物シグナルの±20%以内であったかについての判定も、表に報告する。

10

【0095】

標準試料を含有する 3 つのウェルについて、個々のバックグラウンドシグナルは、643、748、及び 853 R L U であった。倍率変更係数は、標準試料のバックグラウンドシグナル（n = 3）についての平均値である、748 R L U を使用して計算した。標準試料の平均分析物シグナル（R L U）は、38015 R L U であると計算された（3 つの個々の標準試料の分析物シグナルは、35903、38075、及び 40067 R L U である）。

20

【0096】

【表 3】

表 3. 添加干渉剤として $1e-5$ のウマ血清を有する、試験試料 (IgG) の補正分析物シグナルの判定

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料のバックグラウンドシグナル (RLU)	697	1066	1018
標準試料の平均バックグラウンドシグナル	748	748	748
倍率変更係数	1.07	0.70	0.73
試験試料の分析物シグナル (RLU)	38645	59717	48375
標準試料の平均分析物シグナル (RLU)	38015	38015	38015
試験試料の補正分析物シグナル (RLU)	41350	41802	35314
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの±20%以内である	はい	はい	はい

30

【0097】

40

【表 4】

表4. 添加干渉剤として $1e-4$ のウマ血清を有する、試験試料(IgG)の補正分析物シグナルの判定

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料のバックグラウンドシグナル(RLU)	578	1106	881
標準試料の平均バックグラウンドシグナル	748	748	748
倍率変更係数	1.29	0.68	0.85
試験試料の分析物シグナル(RLU)	26397	54250	39458
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	38015	38015	38015
試験試料の補正分析物シグナル(RLU)	34052	36890	33539
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	はい	はい	はい

10

【0098】

【表 5】

表5. 添加干渉剤として $1e-3$ のウマ血清を有する、試験試料(IgG)の補正分析物シグナルの判定

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料のバックグラウンドシグナル(RLU)	547	950	792
標準試料の平均バックグラウンドシグナル	748	748	748
倍率変更係数	1.37	0.79	0.94
試験試料の分析物シグナル(RLU)	25661	51732	38585
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	38015	38015	38015
試験試料の補正分析物シグナル(RLU)	35156	40868	36270
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	はい	はい	はい

20

【0099】

【表 6】

表6. 添加干渉剤として $1e-2$ のウマ血清を有する、試験試料(IgG)の補正分析物シグナルの判定

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料のバックグラウンドシグナル(RLU)	283	790	616
標準試料の平均バックグラウンドシグナル	748	748	748
倍率変更係数	2.64	0.95	1.21
試験試料の分析物シグナル(RLU)	14738	33775	25536
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	38015	38015	38015
試験試料の補正分析物シグナル(RLU)	39807	32086	30989
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	はい	はい	はい

40

【0100】

【表 7】

表7. 添加干渉剤として $1e-1$ のウマ血清を有する、試験試料(IgG)の補正分析物シグナルの判定

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料のバックグラウンドシグナル(RLU)	139	383	327
標準試料の平均バックグラウンドシグナル	748	748	748
倍率変更係数	5.38	1.95	2.29
試験試料の分析物シグナル(RLU)	10707	15478	12754
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	38015	38015	38015
試験試料の補正分析物シグナル(RLU)	57602	30182	29206
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	いいえ	いいえ	いいえ

10

【0101】

比較例 A

ウシ IgG 標準 + ルシゲニン溶液 (20 マイクロリットル) を、ウシ IgG 標準溶液 (20 マイクロリットル) によって置き換えたことを除いて、実施例 2 に記載したものと同一手順に従った。表 8 ~ 12 において、試験試料の分析物シグナル (RLU) 及び標準試料の平均分析物シグナル (RLU) の値を、各反復試料について報告する。標準試料の平均分析物シグナル (RLU) は、37694 RLU であると計算された (3 つの個々の標準試料の分析物シグナルは、36955、37062、及び 39066 RLU である)。各試験試料についての分析物シグナルが、対応する標準試料についての分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内であったかについての判定も、表に報告する。

20

【0102】

【表 8】

表8. 添加干渉剤として $1e-5$ のウマ血清を有する、試験試料の分析物シグナルと標準試料の分析物シグナルとの比較

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料の分析物シグナル(RLU)	44823	52240	48061
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	37694	37694	37694
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	はい	いいえ	いいえ

30

【0103】

【表 9】

表9. 添加干渉剤として $1e-4$ のウマ血清を有する、試験試料の分析物シグナルと標準試料の分析物シグナルとの比較

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料の分析物シグナル(RLU)	30610	47831	39052
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	37694	37694	37694
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	はい	いいえ	はい

40

【0104】

【表 10】

表10. 添加干渉剤として $1e-3$ のウマ血清を有する、試験試料の分析物シグナルと標準試料の分析物シグナルとの比較

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料の分析物シグナル(RLU)	29907	45515	38403
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	37694	37694	37694
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	いいえ	いいえ	はい

10

【0105】

【表 11】

表11. 添加干渉剤として $1e-2$ のウマ血清を有する、試験試料の分析物シグナルと標準試料の分析物シグナルとの比較

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料の分析物シグナル(RLU)	17124	29716	25446
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	37694	37694	37694
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	いいえ	いいえ	いいえ

20

【0106】

【表 12】

表12. 添加干渉剤として $1e-1$ のウマ血清を有する、試験試料の分析物シグナルと標準試料の分析物シグナルとの比較

	試験試料の反復		
	1	2	3
試験試料の分析物シグナル(RLU)	12452	13552	12768
標準試料の平均分析物シグナル(RLU)	37694	37694	37694
試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の平均分析物シグナルの $\pm 20\%$ 以内である	いいえ	いいえ	いいえ

30

【0107】

比較例 B

ウマ血清の試験試料 ($1e-1 \sim 1e-5$ 希釈) を、上に記載したように調製した。標準試料は、ウマ血清を加えていない PBS 溶液であった。ウシ IgG ELISA キット (カタログ番号 IGG-11、Life Diagnostics Incorporated から入手) を使用して、製造業者の案内に従って、試験試料及び標準試料を分析した。各ウェルについての吸光度値 (A_{450}) を、BioTek POWERWAVE 340 プレートリーダー (Bio Tek Instruments Incorporated (Winooski, VT) から入手) によって決定した。各複製 (試験試料及び標準試料) についての吸光度 (A_{450}) 値を表 13 に報告し、標準試料について計算した平均 A_{450} 値と比較する。3つの標準試料についての平均 A_{450} 値は、0.551 であった。

40

【0108】

【表 13】

表13.

	ウマ血清濃度	吸光度 (A450)	平均標準試料吸光度 (A450)の計算パーセンテージ	標準試料の 20%以内
標準試料	0	0.555	101	NA
標準試料	0	0.532	97	NA
標準試料	0	0.565	103	NA
試験試料	1e-5	0.600	109	はい
試験試料	1e-5	0.584	106	はい
試験試料	1e-5	0.567	103	はい
試験試料	1e-4	0.523	95	はい
試験試料	1e-4	0.589	107	はい
試験試料	1e-4	0.606	110	はい
試験試料	1e-3	0.501	91	はい
試験試料	1e-3	0.626	114	はい
試験試料	1e-3	0.589	107	はい
試験試料	1e-2	0.490	89	はい
試験試料	1e-2	0.501	91	はい
試験試料	1e-2	0.490	89	はい
試験試料	1e-1	0.180	33	いいえ
試験試料	1e-1	0.186	34	いいえ
試験試料	1e-1	0.196	36	いいえ

10

20

【0109】

実施例 2

乾燥飼料トウモロコシをRomer Series IIミル(Romer Labs (Getzendorf, Austria))を使用して粉碎し、#20篩を通過させた。篩にかけたトウモロコシ(2g)を、Cortisol SPARCLアッセイキット(Life Diagnostics Incorporatedから入手)の8mLの緩衝液に加えた。得られたスラリーを、3分間繰り返し反転させることによって混合した。試料の上澄みを、0.45ミクロンのシリンジフィルタ(Thermo Fisher Scientific (Waltham MA USA))を通して濾過した。アッセイキットの緩衝剤を使用して、希釈系列の5つの濾液を調製した(2×、4×、6×、8×、及び10×)。非希釈試料及び各希釈系列について、8個の個々の試験試料を調製した。各試験試料に、異なる濃度のコルチゾールを添加した(25nM、12.5nM、6.25nM、3.13nM、1.56nM、0.78nM、0.39nM、又は0.20nM)。対応する一連の標準試料を、コルチゾール溶液標準から調製した。ルシゲニン(5マイクロリットルの10mg/mL水溶液)を、各試料(試験試料及び標準試料)に加えた。

30

【0110】

競合方式アッセイのために、まずコルチゾール添加試料(50マイクロリットル)をプレート中のウェルに加えることによって、キットにおいて供給された96ウェルプレート中に試料を調製した。各ウェルは、単一の試験試料又は標準試料を含有した。次に、25マイクロリットルのコルチゾール-HRPコンジュゲート溶液を各ウェルに加え、プレートを300rpmで30秒間振盪した。次いで、抗コルチゾール-アクリダンコンジュゲート溶液(25マイクロリットル)を各ウェルに加え、プレートを300rpmで30秒間振盪した。

40

【0111】

Turner BioSystems TD 20/20nルミノメータ(Promega Corporation (Madison, WI))を使用して、30マイクロリットルのトリガー溶液(アッセイキットから入手)を、アッセイプレートの各ウェルに加

50

えた。この機器を、発光シグナルを60秒間読み取り、同時に積分するように設定した（0.1秒積分時間）。（試験試料又は標準試料のいずれかの）分析物シグナルを、最初の20秒の間測定し、平均した。フラッシュ発光シグナルを記録した後、58秒及び59秒の期間、第2の発光シグナル（試験試料又は標準試料のバックグラウンドシグナル）を記録し、平均した。

【0112】

表14～19において、試験試料のバックグラウンドシグナル（RLU）、標準試料のバックグラウンドシグナル（RLU）、試験試料の分析物シグナル（RLU）、標準試料の分析物シグナル（RLU）、計算された倍率変更係数、及び試験試料の補正分析物シグナル（RLU）の値を、各試料について報告する。

【0113】

各試験試料についての補正分析物シグナルが、対応する標準試料についての分析物シグナルの±7.5%以内であったかについての判定を、表26に報告する。

【0114】

【表14】

表14. 干渉剤として10×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の補正分析物シグナル(RLU)の決定

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	553317	658535	543582	490741	578933	328499	338088	271638
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	0.970	0.873	0.970	1.014	0.930	1.254	1.219	1.384
分析物シグナル試験試料 (RLU)	3236225	3613034	3237134	2671864	2457679	1296061	934213	463894
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	3140250	3153836	3138441	2707979	2286782	1625496	113880	642086

【0115】

【表15】

表15. 干渉剤として8×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の補正分析物シグナル(RLU)の決定

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	566466	625861	536361	486262	571577	321871	335035	268353
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	0.948	0.918	0.982	1.023	0.942	1.280	1.230	1.401
分析物シグナル試験試料 (RLU)	3329442	3318155	3099781	2717973	2343828	1214894	950182	463151
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	3155821	3047647	3045454	2780087	2208913	1555075	1168820	648902

【0116】

【表 1 6】

表16. 干渉剤として6×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の
補正分析物シグナル(RLU)の決定

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	506331	592650	491769	446645	523492	300334	297698	256791
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	1.060	0.970	1.072	1.114	1.029	1.372	1.384	1.464
分析物シグナル試験試料 (RLU)	2768949	3050402	2815308	2343694	2054745	1131264	787353	431397
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	2936167	2958729	3016776	2609887	2114342	1551863	1089996	631627

10

【0 1 1 7】

【表 1 7】

表17. 干渉剤として4×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の
補正分析物シグナル(RLU)の決定

20

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	515612	504591	478380	408393	464877	281948	263326	216780
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	1.041	1.139	1.102	1.218	1.159	1.461	1.565	1.734
分析物シグナル試験試料 (RLU)	3178009	2874138	2961188	2337276	1854375	963160	544177	302927
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	3309268	3274268	3261908	2846526	2148757	1407418	851682	525392

30

【0 1 1 8】

【表 1 8】

表18. 干渉剤として2×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の
補正分析物シグナル(RLU)の決定

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	444728	405951	389423	314420	370965	206136	191641	149302
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	1.207	1.416	1.353	1.582	1.452	1.999	2.151	2.518
分析物シグナル試験試料 (RLU)	2839788	2322543	2305990	1448249	1152668	452434	231905	138338
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	3428397	3288790	3120429	2290953	1673780	90262	498716	348368

40

50

【 0 1 1 9 】

【 表 1 9 】

表19. 干渉剤として非希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の補正分析物シグナル(RLU)の決定

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
バックグラウンドシグナル 試験試料 (RLU)	289665	329783	280283	223769	246972	166864	141918	99695
バックグラウンドシグナル 標準試料	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
倍率変更係数	1.854	1.743	1.880	2.223	2.181	2.469	2.904	3.771
分析物シグナル試験試料 (RLU)	1765315	1896647	1260152	737566	504160	30913	149433	73662
分析物シグナル標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
補正分析物シグナル 試験試料 (RLU)	3272093	3306015	2369216	1639399	1099636	750382	433949	277801

10

【 0 1 2 0 】

比較例 C

試験試料のいずれにもルシゲニンを加えなかったことを除いて、実施例 2 に記載したものと手順と同じ手順に従った。表 20 ～ 25 において、試験試料の分析物シグナル (RLU) 及び標準試料の分析物シグナル (RLU) の値を、各試料について報告する。各試験試料についての分析物シグナルが、対応する標準試料についての分析物シグナルの±7.5%以内であったかについての判定を、表 27 に報告する。

20

【 0 1 2 1 】

【 表 2 0 】

表20. 干渉剤としての10×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル 試験試料 (RLU)	2986836	2999758	2985115	2575683	2175063	1546084	1083165	610717
分析物シグナル 標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

30

【 0 1 2 2 】

【 表 2 1 】

表21. 干渉剤としての8×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル 試験試料 (RLU)	2961849	2860324	2858265	2609209	2073142	1459492	1096979	609017
分析物シグナル 標準試料 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

40

【 0 1 2 3 】

【表 2 2】

表22. 干渉剤としての6×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル試験試料(RLU)	2679541	2700131	2753105	2381779	1929545	1416228	994729	576422
分析物シグナル標準試料(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

【0 1 2 4】

10

【表 2 3】

表23. 干渉剤としての4×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル試験試料(RLU)	2618417	2590723	2580944	2252278	1700177	1113602	673883	415710
分析物シグナル標準試料(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

【0 1 2 5】

20

【表 2 4】

表24. 干渉剤としての2×希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル試験試料(RLU)	2124224	2037724	1933408	1419467	1037069	560278	309003	215848
分析物シグナル標準試料(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

【0 1 2 6】

30

【表 2 5】

表25. 干渉剤としての非希釈トウモロコシ抽出物を有する、試験試料(コルチゾール)の分析物シグナルと標準試料(コルチゾール)の分析物シグナルとの比較

	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
分析物シグナル試験試料(RLU)	1459352	1474481	1056669	731171	490437	334670	193541	123899
分析物シグナル標準試料(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

【0 1 2 7】

40

【表 2 6】

表26. 実施例2の結果

トウモロコシ抽出物 (添加干渉剤)の 希釈レベル	実施例2:試験試料の補正分析物シグナルは、標準試料の分析物シグナルの ±7.5%以内である							
	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
10×	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
8×	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
6×	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
4×	はい	はい	はい	はい	はい	いいえ	いいえ	いいえ
2×	はい	はい	はい	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
非希釈	はい	はい	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ

10

【0 1 2 8】

【表 2 7】

表27. 比較例Cの結果

トウモロコシ抽出物 (添加干渉剤)の 希釈レベル	比較例C:試験試料の分析物シグナルは、標準試料の分析物シグナルの ±7.5%以内である							
	コルチゾール濃度 (nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
10×	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
8×	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
6×	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
4×	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
2×	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
非希釈	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ

20

【0 1 2 9】

実施例 3

溶液相発光アッセイに対する、ルシゲニン、結合していない化学発光基質の効果を評価した。Cortisol SPARC Lアッセイ (Life Diagnostics Incorporated) を、競合方式で使用した。4つの異なる試料A~Dを調製した。試料Aでは、アッセイキットの希釈剤を使用して、25 nMのコルチゾール濃度を有するコルチゾール標準試料 (50 マイクロリットル) を調製した。試料Bでは、コルチゾールを含有しない対照標準 (50 マイクロリットル) を調製した (すなわち、試料Aの希釈剤のみを含有した)。試料Cでは、50 マイクロリットルのコルチゾール標準試料を試料Aと同様に調製し、5 マイクロリットルの10 mg/mLのルシゲニン水溶液を追加した。試料Dでは、50 マイクロリットルの対照標準試料を試料Bと同様に調製し、5 マイクロリットルの10 mg/mLのルシゲニン水溶液を追加した。試料A~D (それぞれ50 マイクロリットル) を、アッセイキットとともに提供された製造業者の指示に従って、個々に分析した。Turner BioSystems TD 20/20 nLミノメータ (Promega Corporation (Madison, WI)) を使用して、トリガー溶液 (100 μL) を、アッセイプレートの各ウェルに加えた。この機器を、トリガー溶液の添加後、1、2、5、10、15、20、30、40、及び60秒の時点で、発光シグナルを読み取るように設定した。報告された発光値 (RLU) のそれぞれを、直前の10個の0.1秒積分の平均として記録した。結果を表28に報告する。

30

40

【0 1 3 0】

【表 28】

表28.

時間(秒)	発光シグナル(RLU)			
	試料A コルチゾール(25nM) ルシゲニンなし	試料B コルチゾールなし、 かつルシゲニンなし	試料C コルチゾール(25nM) ルシゲニンあり	試料D コルチゾールなし、 かつルシゲニンあり
1	24695	500204	32773	281669
2	21928	325489	33014	195379
5	18750	163249	31739	115147
10	15393	96082	29732	80490
15	13731	69826	28939	65280
20	11968	56769	27976	57212
30	10106	39712	27384	47221
40	9144	31608	25668	43119
50	8163	26621	25408	38848
60	7673	22630	25097	35654

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/055896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/28 C09B15/00 G01N33/542 G01N33/58 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q C09B G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/099486 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]; AKHAVAN-TAFTI HASHEM [US] ET AL.) 2 September 2010 (2010-09-02) cited in the application	1-20
Y	Abstract; paragraphs 138, 155, 160-161; examples; claims	1-14, 18
Y	US 2006/046302 A1 (SPRINGSTON STEPHEN R [US] ET AL) 2 March 2006 (2006-03-02) Abstract, paragraph 65.	1-14, 18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 November 2019		29/11/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		López García, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/055896

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010099486 A1	02-09-2010	AU 2010217756 A1	15-09-2011
		BR PI1008760 A2	30-05-2017
		CA 2753598 A1	02-09-2010
		CN 102333886 A	25-01-2012
		EP 2401392 A1	04-01-2012
		ES 2622977 T3	10-07-2017
		HU E031737 T2	28-07-2017
		JP 5844643 B2	20-01-2016
		JP 6037522 B2	07-12-2016
		JP 2012519285 A	23-08-2012
		JP 2015172604 A	01-10-2015
		KR 20110134426 A	14-12-2011
		PL 2401392 T3	31-08-2017
		US 2010267071 A1	21-10-2010
		US 2015212005 A1	30-07-2015
		WO 2010099486 A1	02-09-2010

US 2006046302 A1	02-03-2006	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 シットン, グレゴリー ダブリュ.

アメリカ合衆国, ミネソタ州 5 5 1 3 3-3 4 2 7, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 3 3 4 2 7, スリーエム センター

Fターム(参考) 2G054 AA06 AA08 AA10 AB04 AB05 CA20 CA21 CA22 CA23 CA30

CE02 EA01 EA02 JA01 JA10

4B063 QA01 QA18 QQ22 QR02 QR56 QR58 QX02