

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5824523号
(P5824523)

(45) 発行日 平成27年11月25日 (2015.11.25)

(24) 登録日 平成27年10月16日 (2015.10.16)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 21/76 (2006.01)

F I

G O 1 N 21/76

請求項の数 16 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2013-535387 (P2013-535387)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成23年10月24日 (2011.10.24)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2013-542436 (P2013-542436A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		E AKTIENGESSELLSCHAF
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/068540		T
(87) 国際公開番号	W02012/055815		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年5月3日 (2012.5.3)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成26年5月16日 (2014.5.16)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	10192106.2		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成22年11月22日 (2010.11.22)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	10188716.4	(74) 代理人	100092967
(32) 優先日	平成22年10月25日 (2010.10.25)		弁理士 星野 修
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気化学ルミネセンス検出における信号増強化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、下記の段階を含む方法：

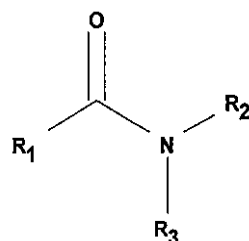
- a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする、
 b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する、
 c) 分離した被検体を結合した標識付き検出試薬を、下記を含む試薬組成物と共にインキュベートする：

i) 少なくとも1種類の E C L 共反応体、ならびに

i i) 式 I および式 I I のカルボン酸アミドの群から選択される少なくとも1種類の化合物

【化 1】

式 I



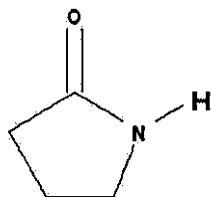
10

20

[$R_1 = CH_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 $CHClCH_3$ 、 CH_2CH_2Cl 、 $C(CH_3)_2CH_3$ 、 $CH_2CH_2CH_3$ 、 $CClHCH_2CH_3$ または $CH_2CH_2CH_2CH_3$ であり、 $R_2 = H$ であり、および $R_3 = H$ である]

【化 2】

式 II,



10

d) ルミネセンスの放出を電気化学的に誘発する、ならびに

e) 電気化学ルミネセンス (ECL) 信号を測定し、これにより被検体を測定する。

【請求項 2】

ECL を用いる試料中の被検体の測定を水溶液中で実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

カルボン酸アミドが、アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび 2-クロロブタンアミドからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

試薬組成物が 0.01 M ~ 0.25 M の濃度のカルボン酸アミドを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

段階 1 c) の試薬組成物が保存剤を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

段階 1 c) の試薬組成物が 0.1 % ~ 5 % の濃度の保存剤を含むことを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

段階 1 c) の試薬組成物がホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤を含むことを特徴とする、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

段階 1 c) の試薬組成物が界面活性剤および緩衝剤を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

段階 1 c) の試薬組成物が、さらに塩類および / または消泡剤を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

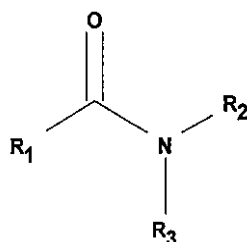
【請求項 10】

40

i) 式 I および式 II のカルボン酸アミドの群から選択される化合物、

【化 3】

式 I



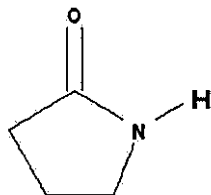
[$R_1 = CH_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 $CHClCH_3$ 、 CH_2CH_2

50

C_1 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CClHCH}_2\text{CH}_3$ または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ であり、および $\text{R}_3 = \text{H}$ である]

【化 4】

式 II,



10

ならびに

i i) 少なくとも 1 種類の共反応体

を含み、共反応体は、第三級アミン、オキサレートおよびペルスルフェートからなる群から選択される、ECL 測定用の試薬組成物。

【請求項 11】

第三級アミンがトリプロピルアミン (TPA) である、請求項 10 に記載の試薬組成物。

【請求項 12】

試薬組成物が、さらにホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤を含むことを特徴とする、請求項 10 または請求項 11 に記載の試薬組成物。

20

【請求項 13】

請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物、試験すべき試料、および電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも 1 種類の検出試薬を含む、ECL 測定用の試薬混合物。

【請求項 14】

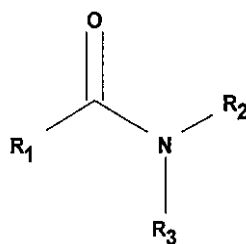
ECL の測定における、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物の使用。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するための、式 I および式 II

【化 5】

式 I

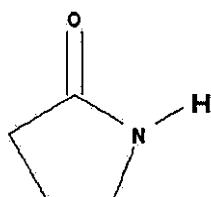


30

[$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 CHClCH_3 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CClHCH}_2\text{CH}_3$ または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ であり、および $\text{R}_3 = \text{H}$ である]

【化 6】

式 II,



40

の群から選択されるカルボン酸アミドの使用。

【請求項 16】

請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を含む、ECL 測定のためのキッ

50

ト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な試薬組成物を用いて電気化学ルミネセンスにより試料中の被検体を検出するための方法に関する。新規な試薬組成物、電気化学ルミネセンス（ECL）を測定するための試薬キット、および新規な試薬組成物を用いる電気化学ルミネセンス検出方法を開示する。特に、本発明は改善されたアッセイ性能をもたらすための、その測定に使用できる化合物の新規な組合わせの使用に関する。

【背景技術】

10

【0002】

電気化学ルミネセント現象を測定する方法は以前から知られている。そのような方法は、特殊な金属が錯化して酸化によって励起状態に達し、そこから基底状態まで減衰して電気化学ルミネセンスを放射する能力を利用する。総説については、Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036を参照されたい。

【0003】

現在、電気化学ルミネセンス（ECL）を分析測定のために利用した多数の市販計測器がある。ECLを放射するように誘導できる種（ECL活性種）がECL標識として用いられている。ECL標識の例には、有機金属化合物、たとえばトリス - ビピリジル - ルテニウム（RuBpy）部分が含まれ、その際、金属はたとえばVIIおよびVIII族の金属からのものであり、Re、Ru、IrおよびOsが含まれる。ECLプロセスでECL標識と反応する種を、本明細書中でECL共反応体(coreactant)と呼ぶ。ECLに一般に用いられる共反応体には、第三級アミン（たとえば、トリプロピルアミン（TPA））、オキサレートおよびペルスルフェートが含まれる。光はECL標識またはリガンドにより発生する；結合相互作用における結合試薬の関与は、ECL標識から放射されるECLを測定することによりモニターできる。あるいは、ECL活性化化合物からのECL信号は、化学的環境の指標となる可能性がある（たとえば、U.S. Pat. No. 5,641,623および5,643,713を参照；これらには、特殊なECL共反応体の存在または分解をモニターするECLアッセイ法が記載されている）。ECL、ECL標識、ECLアッセイ法、およびECLアッセイを実施するための計測器に関するこれ以上の背景については、U.S. Pat. No. 5,093,268；5,147,806；5,240,863；5,308,754；5,324,457；5,591,581；5,597,910；5,679,519；5,705,402；5,731,147；5,786,141；5,846,485；5,866,434；6,066,448；6,136,268および6,207,369、ならびにEP 0 441 875、ならびに公開されたPCT No. WO97/36931；WO98/12539；WO99/14599；WO99/32662；WO99/58962；WO99/63347；WO00/03233およびWO98/57154を参照されたい。

20

30

【0004】

市販のECL計測器は優れた性能をもつことが証明された。それらは、それらの卓越した感度、動的範囲、精度、および複雑な試料マトリックスの耐容性を含めた理由で、広く用いられるようになった。市販の計測器は、永続的に再使用できるフローセルを用いたフローセルに基づく設計を用いている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】U.S. Pat. No. 5,641,623

【特許文献2】U.S. Pat. No. 5,643,713

【特許文献3】U.S. Pat. No. 5,093,268

【特許文献4】U.S. Pat. No. 5,147,806

【特許文献5】U.S. Pat. No. 5,240,863

【特許文献6】U.S. Pat. No. 5,308,754

【特許文献7】U.S. Pat. No. 5,324,457

50

【特許文献 8】U.S. Pat. No. 5,591,581
【特許文献 9】U.S. Pat. No. 5,597,910
【特許文献 10】U.S. Pat. No. 5,679,519
【特許文献 11】U.S. Pat. No. 5,705,402
【特許文献 12】U.S. Pat. No. 5,731,147
【特許文献 13】U.S. Pat. No. 5,786,141
【特許文献 14】U.S. Pat. No. 5,846,485
【特許文献 15】U.S. Pat. No. 5,866,434
【特許文献 16】U.S. Pat. No. 6,066,448
【特許文献 17】U.S. Pat. No. 6,136,268
【特許文献 18】U.S. Pat. No. 6,207,369
【特許文献 19】EP 0 441 875
【特許文献 20】W097/36931
【特許文献 21】W098/12539
【特許文献 22】W099/14599
【特許文献 23】W099/32662
【特許文献 24】W099/58962
【特許文献 25】W099/63347
【特許文献 26】W000/03233
【特許文献 27】W098/57154

10

20

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

被検体の測定に利用できる試料体積にはしばしば限度があり、また 1 試料からよりいっそう多様な被検体を測定しなければならなくなってきた。アッセイ自動化のためのより迅速な実験室装置および被検体の検出のためのより感度の高い方法の開発も要求されている。これによって、高感度で特異的な電気化学ルミネセンスアッセイ、およびそれらを実施するための方法が必要になる。さらに、安全性妨害または環境事項に関連する改善を考慮しなければならない。

30

【0008】

しかし、よりいっそう感度の高い被検体検出は利点が大きいであろう。したがって本発明の目的は、それら既知の方法および試薬組成物を特に ECL 信号の増強に関して改善すること、ならびに電気化学ルミネセンス操作と組み合わせた被検体検出を改善することであった。新規な信号増強試薬および/または電気化学ルミネセンスアッセイにおいて改善された性能をもつ化合物を見出すことが望ましいであろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

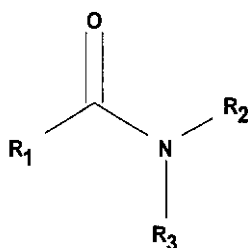
40

本発明は、1 態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、下記の段階を含む方法に関する： a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする、 b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する、 c) 分離した標識付き検出試薬を、下記を含む試薬組成物と共にインキュベートする： i) 少なくとも 1 種類の共反応体、ならびに i i) 式 I および式 II のカルボン酸アミド (carbonic acid amide) の群から選択される少なくとも 1 種類の化合物

【0010】

【化 1】

式 I



【0011】

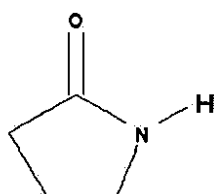
[$R_1 = CH_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 $CHClCH_3$ 、 CH_2CH_2Cl 、 $C(CH_3)_2CH_3$ 、 $CH_2CH_2CH_3$ 、 $CClHCH_2CH_3$ または $CH_2CH_2CH_2CH_3$ であり、 $R_2 = H$ であり、および $R_3 = H$ である]

10

【0012】

【化 2】

式 II



20

【0013】

d) ルミネセンスの放出を電気化学的に誘発する、ならびに e) 電気化学ルミネセンス (ECL) 信号を測定し、これにより被検体を測定する。

本発明はまた、i) 式 I および式 II のカルボン酸アミドの群から選択される化合物ならびに ii) 少なくとも 1 種類の共反応体を含む、ECL 測定用の試薬組成物に関する。

【0014】

本発明はさらに、i) 式 I および式 II のカルボン酸アミドの群から選択される少なくとも 1 種類の化合物ならびに ii) 少なくとも 1 種類の共反応体、試験すべき試料、ならびに電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも 1 種類の検出試薬を含む、ECL 測定用の試薬混合物に関する。

30

【0015】

本発明はまた、i) 式 I および式 II のカルボン酸アミドの群から選択される少なくとも 1 種類の化合物ならびに ii) 少なくとも 1 種類の共反応体を含む試薬組成物を含む、ECL 測定用のキットに関する。

【0016】

本発明、ならびにその他の目的、特徴および利点は、以下の特定の好ましい態様の詳細な記述からより十分に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1】図 1 は、0.001 M ~ 0.25 M のプロパンアミド濃度 (X - 軸) を用いた測定結果を示す； 人為的アッセイ (Artificial assay) (人為的アッセイ - アッセイ緩衝液バックグラウンド)、アッセイ緩衝液バックグラウンド、および遊離標識アッセイの測定値の相対回収率 (基準値に対する %) (Y - 軸)。詳細については実施例 1 を参照されたい。

40

【図 2】図 2 は、0.001 M ~ 1 M の 2 - クロロアセトアミド濃度 (X - 軸) を用いた測定結果を示す； 人為的アッセイ (人為的アッセイ - アッセイ緩衝液バックグラウンド)、アッセイ緩衝液バックグラウンド、および遊離標識アッセイの測定値の相対回収率 (基準値に対する %) (Y - 軸)。詳細については実施例 1 を参照されたい。

【図 3】図 3 は、0.001 M ~ 1 M のブタンアミド濃度 (X - 軸) を用いた測定結果を示す； 人為的アッセイ (人為的アッセイ - アッセイ緩衝液バックグラウンド)、アッセ

50

イ緩衝液バックグラウンド、および遊離標識アッセイの測定値の相対回収率（基準値に対する％）（Y - 軸）。詳細については実施例 1 を参照されたい。

【図 4】図 4 は、0.001 M ~ 1 M のアセトアミド濃度（X - 軸）を用いた測定結果を示す；人為的アッセイ（人為的アッセイ - アッセイ緩衝液バックグラウンド）、アッセイ緩衝液バックグラウンド、および遊離標識アッセイの測定値の相対回収率（基準値に対する％）（Y - 軸）。詳細については実施例 1 を参照されたい。

【図 5】図 5 は、0 ~ 5 % のホウ酸濃度（X - 軸）を用いた測定結果を示す；人為的アッセイを高特異的信号の一例として用いた；低レベルキャリブレーターとしての T S H はバックグラウンド信号を発生する（T S H C a l 1）；T S H キャリブレーター 2 は高い検出レベルの信号を発生する（T S H C a l 2）。結果を、ホウ酸添加なしの基準試薬組成物に対する％としてプロットする。詳細については実施例 2 を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の実施には、別途指示しない限り、当業者がなしうる範囲の一般的な分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の技術を採用するであろう。そのような技術は、たとえば下記の文献に十分に説明されている：“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, および定期的最新版); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., eds., 1994)。

【0019】

別途定義しない限り、本明細書中で用いる技術用語および化学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解しているものと同じ意味をもつ。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York (1994); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4th ed., John Wiley & Sons, New York (1992); Lewin, B., Genes V, published by Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287 9); Kendrew, J. et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9); および Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8) は、本明細書中で用いる用語の多くに対する一般的ガイダンスを当業者に提供する。

【0020】

特許出願および刊行物を含めて本明細書中で引用するすべての参考文献を全体として本明細書に援用する。

定義：

本明細書中で用いる以下の用語はそれぞれ、このセクションにおけるものと関連する意味をもつ。

【0021】

冠詞 “a” および “an” は、本明細書中で 1 つまたは 1 つより多い（すなわち、少なくとも 1 つ）目的語の冠詞を表わすために用いられる。たとえば、“an analyte” は 1 つの被検体または 1 つより多い被検体を意味する。用語 “少なくとも” は、場合により 1 以上のさらに他の目的語が存在する可能性を示すために用いられる。一例として、少なくとも 2 つの別個の領域を含むアレイは、場合により 2 以上の別個の被験領域を含む可能性がある。

【0022】

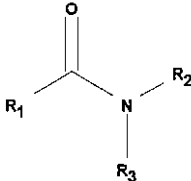
“1 以上” という表現は、1 ~ 50、好ましくは 1 ~ 20、および好ましい 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12 または 15 をも表わす。

“カルボン酸アミド” およびそれらの化学構造を表 1 に挙げる。

【 0 0 2 3 】

【表 1 - 1】

表 1: カルボン酸アミドは別途記載しない限り下記の一般構造をもつ:

No.	CA 指示名	CAS-No.	構造	残基
1	ホルムアミド	75-122-7		$R_1 = H$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
2	アセトアミド	60-35-5	上記を参照	$R_1 = CH_3$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
3	2-フルオロアセトアミド	640-19-7	上記を参照	$R_1 = CH_2F$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
4	2,2,2-トリフルオロアセトアミド	354-38-1	上記を参照	$R_1 = CF_3$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
5	2-クロロアセトアミド	79-07-2	上記を参照	$R_1 = CH_2Cl$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
6	2,2-ジクロロアセトアミド	68372-7	上記を参照	$R_1 = CHCl_2$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
7	2-ブロモアセトアミド	683-57-8	上記を参照	$R_1 = CH_2Br$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
8	2-ヨードアセトアミド	144-48-9	上記を参照	$R_1 = CH_2J$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
9	2-ヒドロキシアセトアミド	598-42-5	上記を参照	$R_1 = CH_2OH$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
10	アセトアセトアミド	5977-14-0	上記を参照	$R_1 = CH_2COCH_3$ $R_2 = H$ $R_3 = H$
11	2-クロロ-N,N-ジメチルアセトアミド	2675-89-0	上記を参照	$R_1 = CH_2Cl$ $R_2 = CH_3$ $R_3 = CH_3$
12	2-クロロ-N-ヒドロキシ-N-メチルアセトアミド	2832-19-1	上記を参照	$R_1 = CH_2Cl$ $R_2 = CH_2OH$ $R_3 = H$
13	2-クロロ-N-メトキシ-N-メチルアセトアミド	67442-07-3	上記を参照	$R_1 = CH_2Cl$ $R_2 = CH_3$ $R_3 = OCH_3$
14	プロパンアミド (プロピオンアミド)	79-05-0	上記を参照	$R_1 = CH_2CH_3$ $R_2 = H$ $R_3 = H$

【 0 0 2 4 】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

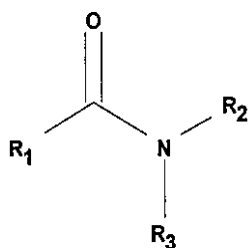
No.	CA 指示名	CAS-No.	構造	残基
15	2-クロロプロパンアミド	27816-36-0	上記を参照	$R_1 = \text{CHClCH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
16	3-クロロプロパンアミド	5875-24-1	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
17	N-メチルプロパンアミド	1187-58-2	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{H}$
18	2,2-ジメチル-プロパンアミド	754-10-9	上記を参照	$R_1 = \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
19	プロパンジアミド	108-13-4	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CONH}_2$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
20	ブタンアミド	541-35-5	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
21	2-クロロブタンアミド	2455-04-1	上記を参照	$R_1 = \text{CClHCH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
22	ペンタンアミド	626-97-1	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
23	ヘキサンアミド	628-02-4	上記を参照	$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{H}$
24	2-ピロリジノン	616-45-5		
25	2,5-ブタンイミド	123-56-8		

【 0 0 2 5 】

本明細書中で用いる式 I は

【 0 0 2 6 】

【 化 3 】



【 0 0 2 7 】

[$R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 CHClCH_3 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CClHCH}_2\text{CH}_3$ または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり、 $R_2 = \text{H}$ であり、および $R_3 = \text{H}$ である] を表わす。

【 0 0 2 8 】

本明細書中で用いる式 II は、表 1 に No. 24 として示す 2 - ピロリジノンという名

10

20

30

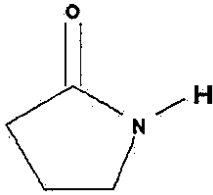
40

50

称の下記の構造を表わす。

【 0 0 2 9 】

【 化 4 】



【 0 0 3 0 】

本発明の態様は、被検体または目的活性を含む可能性のある多様な試料を検査するために使用できる。そのような試料は、固体、エマルジョン、懸濁液、液体または気体の形態であってもよい。それらはヒトまたは動物のものを含むかあるいはそれらに由来する下記の試料であってもよいが、それらに限定されない：、たとえば細胞（生細胞または死細胞）および細胞由来の産物、固定化された細胞、細胞断片、細胞画分、細胞溶解物、細胞小器官、細胞膜、ハイブリドーム、細胞培養上清（抗体産生生物、たとえばハイブリドームからの上清を含む）、廃水または飲料水、食品、飲料、医薬組成物、血液、血清、血漿、毛、汗、尿、大便、糞便、唾液、組織、生検体、排出液、分離および／または分画した試料、分離および／または分画した液体、臓器、植物、植物の部分、植物の副産物、土壌、水、給水、水源、流体（気体または液体）からの濾過残渣、麦芽酒(swipes)、吸収材、ゲル、形骸細胞、未分画試料、未分画細胞溶解物、細胞核(cell nucleus/nuclei)、核画分、化学物質、化学物質溶液、構造的生物成分、骨格（靱帯、腱）成分、分離および／または分画した骨格成分、毛の画分および／または分離物、皮膚、皮膚試料、皮膚画分、真皮、内皮、真核細胞、原核細胞、真菌、酵母、免疫細胞、薬物、治療薬、油類、抽出物、粘液、汚水、環境試料、有機溶媒、あるいは空気。ある態様において、試料はさらに、たとえば水、アルコール類、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、n - メチル - ピロリドン、メタノールまたは他の有機溶媒を含むことができる。

【 0 0 3 1 】

本明細書中で用いる“試料”は、インビトロ評価の目的で入手される。当業者に認識されるように、そのような評価はいずれもインビトロで行なわれる。試料が患者試料である場合、それはその後は廃棄される。患者試料は本発明のインビトロ診断方法にのみ用いられ、患者試料の物質が患者の体内へ戻されることはない。

【 0 0 3 2 】

測定できる被検体には、試料中に存在する下記のものが含まれるが、それらに限定されない：全細胞、細胞表面抗原、タンパク質複合体、細胞シグナル伝達の因子および／または成分、二次メッセンジャー、二次メッセンジャーのシグナル伝達因子および／または成分、細胞下粒子（たとえば、細胞小器官または膜断片）、ウイルス、プリオン、塵ダニまたはその断片、ウイロイド、免疫因子、抗体、抗体フラグメント、抗原、ハプテン、脂肪酸、核酸（および合成類似体）、リボソーム、タンパク質（および合成類似体）、リボタンパク質、多糖類、阻害物質、補因子、ハプテン、細胞受容体、受容体リガンド、リボ多糖類、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、酵素基質、酵素産物、核酸プロセシング酵素（たとえば、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、リガーゼ、ヘリカーゼ、テロメラーゼなど）、タンパク質プロセシング酵素（たとえば、プロテアーゼ、キナーゼ、プロテインホスファターゼ、ユビキチン - プロテインリガーゼなど）、細胞代謝産物、エンドクリン因子、パラクリン因子、オートクリン因子、サイトカイン、ホルモン、薬理作用物質、薬物、治療薬、合成有機分子、有機金属分子、精神安定剤、バルビツレート、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖類、レクチン、組換えまたは誘導タンパク質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、あるいは無機分子。

【 0 0 3 3 】

全細胞は動物、植物または細菌であってもよく、生細胞または死細胞であってもよい。

例には、植物病原体、たとえば真菌および線虫が含まれる。用語“細胞下粒子”は、たとえば細胞下小器官、破碎した細胞からの膜粒子、細胞壁の断片、リボソーム、多酵素複合体、および他の粒子を含むものとし、生存生物に由来するものであってもよい。核酸には、たとえば多数の供給源に由来する染色体DNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、および組換えDNAが含まれる。核酸には、RNA、たとえばメッセンジャーRNA、リボソームRNA、およびトランスファーRNAも含まれる。ポリペプチドには、たとえば酵素、輸送タンパク質、受容体タンパク質、および構造タンパク質、たとえばウイルスコートタンパク質が含まれる。好ましいポリペプチドは、酵素および抗体である。特に好ましいポリペプチドは、モノクローナル抗体である。ホルモンには、たとえばインスリンおよびT4甲状腺ホルモンが含まれる。薬理作用物質には、たとえば強心配糖体が含まれる。生体物質に化学的に類似する合成物質、たとえば合成ポリペプチド、合成核酸、および合成膜、ベシクルおよびリボソームは、もちろん本発明の範囲内であり、本発明に含まれる。以上の記載は、本発明に用いるのに適した生体物質の包括的なリストを意図したものではなく、本発明の広い範囲を説明するためのものにすぎない。

【0034】

同様に一般的に、目的とする被検体は 10^{-3} モル濃度以下、たとえば少なくとも 10^{-18} モル濃度の低い濃度で存在する。

本発明による“被検体特異的試薬(analyte specific reagent)”(ASR)という用語は、被検体の特異的に結合する能力を備えた分子または生体分子(たとえば、タンパク質または抗体)であると理解すべきである。“被検体特異的試薬”(ASR)は、生物検体中の個々の化学物質を同定し、その量を測定するために使用できる生体分子のクラスである。ASRは、たとえば抗体(ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方)、特異的受容体タンパク質、リガンド、核酸配列、およびこれらに類する試薬であって、検体中の物質と特異的に結合または化学反応させることにより生物検体中の個々の化学物質またはリガンドを同定および定量するための診断用途に使用することを意図したものである。簡単に言えば、被検体特異的試薬はアッセイの活性成分である。ASRは、被検体を結合する親和性および特異性に関する両方の基準を満たすであろう。

【0035】

用語“抗体”は、最も広い意味で用いられ、具体的にはモノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(たとえば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメントを含む。用語“抗体”は、全抗体および抗体フラグメントを含めた多様な形態の抗体構造体を包含する。本発明による抗体は、1態様において、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス、ヤギもしくはヒツジなど他の動物種に由来する抗体、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはT細胞抗原枯渇抗体である。抗体の遺伝子工学的操作は、たとえばMorrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 およびUS 5,204,244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125に記載されている。

【0036】

被検体特異的試薬の前記基準を保持する抗体フラグメントはいずれも使用できる。抗体は現在の技術水準の方法により作成される;たとえば、Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the whole book, especially pages 43-78)に記載。さらに当業者は、抗体の特異的単離に使用できる免疫吸着剤に基づく方法を十分に承知している。これらの手段により、抗体の質、したがってイムノアッセイにおけるそれらの性能を向上させることができる(Tijssen, P., 前掲, pages 108-115)。

【0037】

本発明による“検出試薬”には、電気化学ルミネセント基で標識した被検体特異的試薬(ASR)、または電気化学ルミネセント基で標識した被検体ホモログが含まれる。この検査方式によれば、種々のアッセイ方式(たとえば、サンドイッチアッセイ、二重抗原架

橋アッセイ(double antigen bridging assay) (DAGS)、競合アッセイ、均一アッセイ、不均一アッセイ)についてどの検出試薬を選択すべきであるかは、当業者に既知である。不均一イムノアッセイにおける検出試薬は、たとえば抗体であってもよい。検出試薬を固相上に固定化できることは当業者に既知である。ある態様において、試料中の被検体を電気化学的ルミネセンス検出により測定するための方法は、均一アッセイとして実施できる。ある態様において、この方法は不均一アッセイとして実施できる。ある態様において、この方法はサンドイッチアッセイ方式で実施できる。ある態様において、この方法は競合アッセイ方式で実施できる。同様に、ある態様において、この方法は二重抗原架橋アッセイ方式(DAGS)で実施できる。既知のイムノアッセイ方式は、Price, C.P. and Newman, D.J., Principles and Practice of Immunoassay, 2nd ed. (1997)の書籍に詳細に詳細に記載されている。

10

【0038】

本明細書中で用いる用語“標識”は、視覚によるものまたは適切な計測器を使用するもののいずれであっても検出可能な信号を発生することができるいずれかの物質を表わす。本発明に用いるのに適した多様な標識には、色原体、蛍光性化合物、化学ルミネセント化合物または電気化学ルミネセント化合物、触媒、酵素、酵素基質、色素、コロイド状の金属粒子または非金属粒子、および有機ポリマーラテックス粒子が含まれるが、これらに限定されない。

【0039】

用語“ルミネセンス”は、エネルギー源(たとえば、電磁気放射源、化学反応、機械的エネルギー)の温度からエネルギーを導出しないいずれかの光の放射を表わす。一般に、これらのエネルギー源は、ある原子の電子をより低いエネルギー状態からより高い“励起”したエネルギー状態へ移動させる;次いで、その電子は、より低いエネルギー状態に戻る際にそのエネルギーを放射光の形で放出する。そのような光の放射は、通常は電磁スペクトルの可視領域または可視領域付近で起きる。用語“ルミネセンス”には、リン光、蛍光、バイオルミネセンス、放射線ルミネセンス、エレクトロルミネセンス、電気化学ルミネセンスおよび熱ルミネセンスなどの発光現象が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0040】

用語“ルミネセント標識”は、放射源の温度からエネルギーを導出しないルミネセント信号、たとえば光の放射を発生する標識を表わす。ルミネセント標識は、たとえば蛍光分子、リン光分子、放射線ルミネセント分子、ルミネセントキレート、リンもしくはリン含有化合物、または量子ドットであってもよい。

30

【0041】

“電気化学ルミネセンスアッセイ”または“ECLA”は、結合した被検体分子を検出試薬(標的分子)に連結した標識により検出する電気化学的アッセイである。電極が、検出試薬に連結した化学標識のルミネセンス発生を電気化学的に開始する。標識により放射される光は光検出器により測定され、結合した被検体分子/標的分子複合体の存在または量の指標となる。ECLA法は、たとえばU.S. Patent No. 5,543,112; 5,935,779; および6,316,607に記載されている。精確かつ高感度の測定のために、種々の被検体分子濃度について信号調節を最大限にすることができる。

40

【0042】

ECLA法では、微粒子を試料に懸濁して効率的に被検体に結合させることができる。たとえば、それらの粒子は $0.05\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、または $0.5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の直径、および被検体分子を結合しうる表面成分をもつことができる。しばしば用いられるECLA-システムのひとつ(Electsys(登録商標), Roche Diagnostics, ドイツ)では、微粒子は約 $3\mu\text{m}$ の直径をもつ。これらの微粒子は下記のもので作成できる: 架橋したデンプン、デキストラン、セルロース、タンパク質、有機ポリマー、スチレンコポリマー、たとえばスチレン/ブタジエンコポリマー、アクリロニトリル/ブタジエン/スチレンコポリマー、ビニルアセチルアクリレートコポリマー、塩化ビニル/アクリレートコポリマー、不活性無機物粒子、二酸化クロム

50

、鉄酸化物、シリカ、シリカ混合物、タンパク性物質、またはその混合物：セファロースビーズ、ラテックスビーズ、貝殻粒子などが含まれるが、これらに限定されない。微粒子は、好ましくは単分散性であり、磁性、たとえば常磁性のビーズであってもよい。たとえば、U.S. Patent No. 4,628,037; 4,965,392; 4,695,393; 4,698,302; および4,554,088を参照。微粒子は、約 $1 \sim 10,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $5 \sim 1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の量で利用できる。

【0043】

“目的とする”という表現は、分析または測定すべき被検体または物質であって関連をもつ可能性があるものを意味する。

“検出”には、直接および間接的な検出を含めたいずれかの検出手段が含まれる。用語“検出”は、被検体の定量および定性の両方の測定（本明細書中では被検体の測定）を含む最も広い意味で用いられる。1観点において、本明細書に記載する検出方法は、試料中の目的とする被検体の存在のみを同定するために用いられる。他の観点において、この方法は、試料中の目的とする被検体の量を定量するために使用できる。

【0044】

“低下させる”または“阻害する”は、基準と比較して、活性、機能および/または量を減少または低下させることである。低下または阻害は、全体として好ましくは10%以上、より好ましくは25%以上、最も好ましくは50%、75%、90%、95%以上の減少を引き起こす能力を意味する。

【0045】

“増強する”、たとえば“特異的信号を増強する”、または“ECL信号の増強”は、基準と比較して、活性、機能および/または量を増強または上昇させることである。増強または上昇は、全体として好ましくは10%以上、より好ましくは25%以上、最も好ましくは50%以上の増加を引き起こす能力を意味する。

【0046】

用語“決定すること”は、本明細書中で被検体の定量および定性の両方の検出について用いられ、被検体の量および/または濃度の決定を含むことができる。

科学の分野で“測定すること”/“測定”は、量の大きさ、たとえば長さまたは質量を、測定単位、たとえばメートルまたはキログラムに関して推定または決定するプロセスである。測定すること/測定は、それに対比して他のものを評価できる基準点を用いる。測定という用語は、測定プロセスから得られた特定の結果（測定値）を表わすためにも使用できる。それは比較のための基礎である。測定信号または測定値を濃度に相関させるための材料および方法を当業者は承知している。

【0047】

本発明による“試薬組成物”または“ECL試薬組成物”は、ECL信号発生を支持する試薬、たとえば共反応体、pH制御用の緩衝剤、および場合により他の成分を含む。電気化学ルミネセンス検出方法においてECL信号を発生するために必要な、試薬組成物中に存在すべき成分を、当業者は承知している。

【0048】

本明細書中で用いる“水溶液”は、水に溶解した粒子、物質または液体化合物の均質な溶液である。水溶液は、有機溶媒を含むこともできる。有機溶媒は当業者に既知のもの、たとえばメタノール、エタノールまたはジメチルスルホキシドである。本明細書中で用いるように、水溶液は最大50%の有機溶媒を含むことができるのも理解すべきである。

【0049】

ECLプロセスでECL標識と関与する種を、本明細書中でECL“共反応体”と呼ぶ。ECLに一般に用いられる共反応体には、第三級アミン（たとえば、トリプロピルアミン（TPA））、オキサレート、およびペルスルフェートが含まれる。電気化学ルミネセンス検出方法に有用な利用できる共反応体を当業者は承知している。

【0050】

“固相”（“固体支持体”としても知られる）は、不溶性の官能化されたポリマー材料

10

20

30

40

50

であり、それに固定化すべきライブラリーのメンバーまたは試薬を付着または共有結合させ（しばしば、リンカーを介して）、あるいはそれらを過剰の試薬、可溶性の反応副生物、または溶媒から容易に分離する（濾過、遠心分離、洗浄などにより）ことができる。本発明による方法のための固相は、当技術分野で広く記載されている（たとえば、Butler, J. E., Methods 22 (2000) 4-23を参照）。用語“固相”は、非流体物質を意味し、下記のものを含む：たとえば下記の材料から作成した粒子（微粒子およびビーズを含む）：ポリマー、金属（常磁性、強磁性の粒子）、ガラス、およびセラミック；ゲル状物質、たとえばシリカ、アルミナ、およびポリマーのゲル；ポリマー、金属、ガラス、および/またはセラミックで作成できるキャピラリー；ゼオライトおよび他の多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；ならびにキュベット、チューブ、チップまたは他の分光計試料容器。“固相”は捕獲抗体または捕獲分子と相互作用させることを意図した少なくとも1つの部分をその表面に含むという点で、アッセイの固相成分は、そのアッセイで接触する可能性のある不活性な固体表面と区別される。固相は、静止状態の構成要素、たとえばチューブ、ストリップ、キュベット、チップまたはマイクロタイタープレートであってもよく、あるいは非静止状態の構成要素、たとえばビーズおよび微粒子であってもよい。マイクロタイタープレートを均一アッセイ方式のための固相として用いることもできる。タンパク質および他の物質を非共有結合または共有結合させることができる多様な微粒子を使用できる。そのような粒子には、ポリマー粒子、たとえばポリスチレン、ポリ（メタクリル酸メチル）；金粒子、たとえば金ナノ粒子および金コロイド；ならびにセラミック粒子、たとえばシリカ、ガラス、および金属酸化物の粒子が含まれる。たとえば、Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features (1998) 322A-327Aを参照：これを本明細書に援用する。

【0051】

用語“チップ”、“バイオ-チップ”、“ポリマー-チップ”または“プロテイン-チップ”は互換性をもって用いられ、共通の支持体（たとえば、固相）上に配置された多数のプロブ、マーカーまたは生化学マーカーの集合体を表わし、支持体はシリコンウェハー、ナイロンストリップ、プラスチックストリップ、またはスライドガラスの一部であってもよい。

【0052】

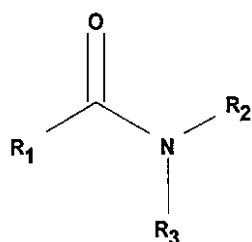
方法：

1 態様において、本発明は、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、下記の段階を含む方法に関する：a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする、b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する、c) 分離した標識付き検出試薬を、下記を含む試薬組成物と共にインキュベートする：i) 少なくとも1種類の共反応体、ならびに i i) 式 I および式 I I のカルボン酸アミドの群から選択される少なくとも1種類の化合物

【0053】

【化5】

式I



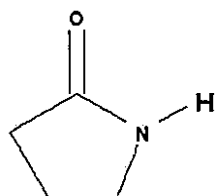
【0054】

[$R_1 = CH_3$ 、 CH_2F 、 CH_2Cl 、 CH_2CH_3 、 $CHClCH_3$ 、 CH_2CH_2Cl 、 $C(CH_3)_2CH_3$ 、 $CH_2CH_2CH_3$ 、 $CClHCH_2CH_3$ または $CH_2CH_2CH_2CH_3$ であり、 $R_2 = H$ であり、および $R_3 = H$ である]

【0055】

【化 6】

式 II,



【 0 0 5 6 】

d) ルミネセンスの放出を電気化学的に誘発する、ならびに e) 電気化学ルミネセンス (ECL) 信号を測定し、これにより被検体を測定する。

10

本発明の 1 観点は、本発明の試薬組成物に基づく改善された ECL 方法、特に低い検出限界を特徴とする ECL 方法に関する。この試薬組成物は意外にも、特異的信号を増強しつつバックグラウンド信号を低下させる。より詳細には、本発明の方法は、ECL 標識の不存在下でのバックグラウンド電気化学ルミネセンスを低下させることによって、低い検出レベルで改善された感度をもたらす。

【 0 0 5 7 】

本発明者らは意外にも、カルボン酸アミドの群からの特定の化合物の使用が、ECL 検出方法において改善された信号発生、したがって改善された ECL アッセイ性能を含めた、多数の利点をもたらすことを見出した。

【 0 0 5 8 】

20

本発明の特徴は、検査すべき試料中の被検体を電気化学ルミネセント標識により測定する方法であり、その際、電気化学ルミネセンス現象を測定するための下記に挙げる方法のひとつを用いる。

【 0 0 5 9 】

意外にも、カルボン酸アミドの群から選択される化合物を用いる方法は、これらの化合物を用いない一般的な検査試薬より低いバックグラウンドルミネセンスを放射する。これは特に、信号対バックグラウンド比 (= 信号対ノイズ比) の増大によって感度が大幅に改善される低い検出レベルにおける利点である。意外にも本発明者らは、本発明による方法を用いて電気化学ルミネセンス検出を実施すると、ECL 検出の信号対ノイズ比が 10% ~ 60% 改善されることを見出した。

30

【 0 0 6 0 】

試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための本発明による方法は、水溶液中での態様で実施できる。

ある態様において、本方法に用いるカルボン酸アミドは、アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび 2-クロロブタンアミドからなる群から選択される。

【 0 0 6 1 】

好ましい態様において、本方法に用いるカルボン酸アミドは、アセトアミド、2-クロロプロパンアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択される。

40

好ましい態様において、本方法に用いるカルボン酸アミドは、アセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択される。

【 0 0 6 2 】

好ましい態様において、カルボン酸アミドはこの方法に 0.01 M ~ 0.25 M の濃度で用いられる。さらに好ましい態様において、カルボン酸アミドは 0.01 M ~ 0.2 M の濃度で用いられる。さらに好ましい態様において、カルボン酸アミドは 0.01 M ~ 0.1 M の濃度で用いられる。

【 0 0 6 3 】

ある態様において、本発明による方法は、目的とする試料中の生体分子、たとえばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ペプチドフラグメント、ホルモン、ペプチドホルモン

50

、ビタミン、プロビタミン、ビタミン代謝産物およびアミノ酸を検出するのに特に好適である。

【0064】

本発明による方法に用いる試料は、ある態様において、液体試料、たとえば全血、血清または血漿である。試料、またはより具体的には目的とする試料は、ある態様において、いずれかの体液および糞便を含むことができる。ある態様において、試料は液体試料、たとえば唾液、糞便抽出物、尿、全血、血漿または血清であろう。ある態様において、試料は全血、血漿または血清であろう。

【0065】

本方法において、“a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする”および“b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する”段階を同じ場で、たとえば同じ反応器内で実施できることは、当業者に既知である。これらの段階(a)(b)は、制御手段によって制御された自動プロセスで実施できる。

【0066】

非特異的な試料成分および被検体を含まない標識付き検出試薬を、段階(b)において、本方法に従って分離プロセスで除去することができる。たとえば、その被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を、洗浄段階を用いて分離することができる。

【0067】

被検体の電気化学ルミネセンス検出を支持する他の検査成分を、本発明による方法に使用することもできる。

本発明の1観点は、試薬混合物および試薬組成物の有効保存、たとえば長期貯蔵の要望を満たす。適切な保存剤はECL信号発生に対して影響をもたないか、あるいは理想の場合にはECL信号発生にプラスの影響をもつべきである。

【0068】

適切な保存剤として、ホウ酸および/またはボレートが細菌および真菌の増殖を効果的に制御し、かつ意外にも特異的ECL信号を増強することが確認された。保存剤としてホウ酸および/またはボレートを含む試薬組成物を用いるECL検出方法は、発生する特異的ECL信号の増強という意外なプラスの効果をもつ。

【0069】

1態様において、本発明は、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、下記の段階を含む方法に関する：a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする、b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する、c) 分離した標識付き検出試薬を、下記を含む試薬組成物と共にインキュベートする：i) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、d) ルミネセンスの放出を電気化学的に誘発する、ならびにe) 電気化学ルミネセンス(ECL)信号を測定し、これにより被検体を測定する。

【0070】

ある態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための方法は、ECL信号発生のための試薬組成物がホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤を0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、より好ましくは0.5%~2%の濃度で含むことを特徴とする。

【0071】

ある態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための方法は、ECL信号発生のための試薬組成物が保存剤としてのホウ酸を0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、より好ましくは0.5%~2%の濃度で含むことを特徴とする。

【0072】

ある態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための方法は、ECL信号発生のための試薬組成物が保存剤としてのボレートが0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、より好ましくは0.5%~2%の濃度で含むことを特徴とする。

【0073】

本発明者らは意外にも、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、カルボン酸アミドとホウ酸および/またはボレートの効果を1つの試薬組成物中で組み合わせる方法が、ECL検出においてさらに改善された信号対ノイズ比をもたらしていることを見出した。1つの試薬組成物におけるカルボン酸アミドとホウ酸および/またはボレートの累積効果は、ECL検出において少なくとも10%、25%または50%改善された信号発生をもたらす。

10

【0074】

ある態様において、本発明は、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための、下記の段階を含む方法に関する：a) 試料を、電気化学ルミネセント基で標識した検出試薬と共にインキュベートする、b) 被検体を結合した標識付き検出試薬と被検体を含まない標識付き検出試薬を分離する、c) 分離した標識付き検出試薬を、下記を含む試薬組成物と共にインキュベートする：i) 少なくとも1種類の共反応体、ii) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される少なくとも1種類の化合物、ならびにiii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される少なくとも1種類の保存剤、d) ルミネセンスの放出を電気化学的に誘発する、ならびにe) 電気化学ルミネセンス(ECL)信号を測定し、これにより被検体を測定する。

20

【0075】

ある態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための方法は、試薬組成物がさらに界面活性剤および緩衝剤を含むことを特徴とする。

ある態様において、試料中の被検体を電気化学ルミネセンス検出により測定するための方法は、試薬組成物がさらに塩類および消泡剤を含むことを特徴とする。

【0076】

ある態様において、本発明は、電気化学ルミネセンスアッセイを実施するための方法であって、電気化学ルミネセンスを本発明による試薬組成物の存在下で誘導する方法に関する。

30

【0077】

ECLイムノアッセイのための一般的なECL測定プロセスは、ECL測定セル(たとえば、フローセル)内で液体および/または混合物を多数回交換することを含む。一般的なECL測定プロセスは、下記に説明する数段階からなる。

【0078】

ECL検出段階を行なう前に、ECL測定セルを本発明による試薬組成物ですすぎ、さらに電位を付与することにより、そのECL測定セルをコンディショニングまたは再生しなければならないことを当業者は承知している。この段階は、ECLを用いて被検体を測定するプロセスの一部である。EP 1 051 621に、このコンディショニング段階で、測定電極(単数または複数)の表面に、ECL測定セル内での被検体の測定に際して信号発生を支持する層が形成されると記載されている。

40

【0079】

一般的なECL測定プロセスについて、試薬混合物は、清浄化およびコンディショニングしたECL測定セルに、流体導入路を通してECL測定セルキャビティー内へ導入される。この混合物は、試料、試薬および磁性粒子をインキュベートしたものである。測定セルに導入されたその混合物は、その混合物の前と後に流入する本発明による試薬組成物によって囲まれるであろう。

【0080】

そのようなECLイムノアッセイにおいて、複合分子(電気化学ルミネセント基で標識され、被検体に対して特徴的である)を含む検出試薬は、一対の特異的な生化学的結合パ

50

ートナー、たとえばストレプトアビジンとビオチンにより、これらの磁性粒子に結合する。磁性粒子をたとえばストレプトアビジン - ポリマーでコートし、一方、ビオチンを複合分子に結合させる。

【 0 0 8 1 】

E C L 測定セル内で、磁性粒子はそれに結合した標識付き複合分子と一緒に、電極近くに配置された磁石の磁界内で電極表面に捕捉される。磁界は混合物の連続流動中に付与され、これによりインキュベート物および/または試薬組成物は E C L 測定セルキャビティから流体排出路を通して排出される。

【 0 0 8 2 】

磁性粒子を捕捉した後、次の段階で、E C L 共反応体を含有する本発明による試薬組成物を E C L 測定セルに導入し、これにより磁性粒子はその試薬組成物で洗浄される。この洗浄段階は、インキュベート物の結合していない成分（電気化学反応を妨害する可能性がある）を電極から除去するためのものである。

【 0 0 8 3 】

その後、電位を付与することにより電気化学ルミネセンス（E C L）信号の放出を電気化学的に誘発し、これによりルミネセンス光の強度を光センサーにより検出し、電極表面にある磁性粒子上の標識付き複合分子の濃度の尺度として評価し、これによりこの濃度は試料中の被検体の濃度の尺度としても利用できる。

【 0 0 8 4 】

電気化学ルミネセンス検出の後、E C L 測定セルを通常は洗浄液ですすぐ。

電気化学ルミネセンスによる検出方法を実施するための装置は、実施例のセクション（実施例 1、2 または 3）に述べてあり、あるいは EP 1 892 524 (A1) に記載されている。さらに、そのような装置は測定ユニットおよび/または液体容器の温度を制御する手段も含むことができる。測定ユニットは、その中で電気化学ルミネセンスを測定するセルであると理解される。液体容器は貯蔵容器であってもよいが、供給デバイス、たとえば測定に際して測定ユニットに収容される試薬溶液用のチューブであってもよい。

【 0 0 8 5 】

組成物：

本発明のある観点は、E C L 信号発生のための、信号対ノイズ比を高める改善された試薬組成物に関する。より具体的には、本発明の試薬組成物は、E C L 標識の不存在下でのバックグラウンド電気化学ルミネセンスを低下させることによって、低い検出レベルでの改善された感度をもたらす。意外にも、カルボン酸アミドのような化合物を含む試薬組成物は、これらの化合物を用いない一般的な検査試薬より低いバックグラウンドルミネセンスを放射する。これは特に、信号対バックグラウンド比（＝信号対ノイズ比）の増大によって感度が大幅に改善される低い検出レベルにおける利点である。この改善された試薬組成物は、E C L を発生させるための方法を支持するカルボン酸アミドおよび他の化合物の群からの化合物を含む。意外にも本発明者らは、本発明による試薬組成物を用いて電気化学ルミネセンス検出を実施すると、E C L 検出の信号対ノイズ比が 1 0 % ～ 6 0 % 改善されることを見出した。

【 0 0 8 6 】

本発明のある観点は、電気化学ルミネセンスアッセイにおいて高い信号対バックグラウンド比を与える試薬組成物に関する。特異的信号とバックグラウンド信号の信号差が増大する。そのような改善された特性が、E C L 共反応体、p H 緩衝剤、界面活性剤および p H の有利な組合わせの同定により、特にカルボン酸アミドからなる群から選択される化合物の使用により、達成された。

【 0 0 8 7 】

この試薬組成物は、E C L 標識を効率的に誘導して E C L を放射させるのに適した、かつ E C L の測定により E C L 標識を高感度で測定するのに適した環境をもたらす。本発明の試薬組成物は、場合により、保存剤、界面活性剤、消泡剤、E C L 活性種、塩類、p H 制御用の酸性化合物および塩基性化合物（緩衝剤）、金属イオンおよび/または金属キレ

10

20

30

40

50

ート化剤を含めた、追加成分を含むことができる。本発明の試薬組成物は、生物学的アッセイの成分も含有することができ、それは場合によりECL標識で標識されていてもよく、結合試薬、酵素、酵素基質、補因子および/または酵素阻害剤を含む。本発明はまた、本発明の試薬組成物を含みかつ場合により追加のアッセイ成分を含む、アッセイ試薬、組成物、キット、システムおよびシステム構成要素を含む。本発明はまた、本発明の試薬組成物を用いてECLAッセイを実施するための方法を含む。

【0088】

ある態様において、本発明は、i)式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ならびにii)少なくとも1種類の共反応体を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

【0089】

ある態様において、試薬組成物のカルボン酸アミドは、アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび2-クロロブタンアミドからなる群から選択される。

【0090】

好ましい態様において、カルボン酸アミドは、アセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択される。さらに他の態様において、カルボン酸アミドは、アセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択される。カルボン酸アミドは、ECL増強効果に最適な個々の濃度をもつ。実験(特に、表2、3および4)に示すように、試薬組成物中の選択したカルボン酸アミドに適した濃度を選択することを当業者は承知している。試薬組成物中の選択したカルボン酸アミドに最適な濃度を選択する方法は、当業者に既知である。

【0091】

ある態様において、試薬組成物はカルボン酸アミドを0.01M~0.25Mの濃度で含む。さらに他の態様において、試薬組成物はカルボン酸アミドを0.01M~0.2Mの濃度で含む。さらに他の態様において、試薬組成物はカルボン酸アミドを0.01M~0.1Mの濃度で含む。

【0092】

試薬組成物の共反応体は、ある態様において、第三級アミン(たとえば、トリプロピルアミン(TPA))、オキサレート、およびペルスルフェートの群から選択される。好ましい態様において、共反応体はTPAである。

【0093】

試薬組成物を貯蔵する際には、微生物の増殖を阻止する保存剤を含有させることが有益な可能性がある。さらに、細菌および真菌の増殖を制御して試薬組成物の長期間の貯蔵および使用を可能にする適切な保存剤を同定する。本発明による試薬組成物は、さらに1種類以上の保存剤を含有することができる。本発明のある態様において、試薬組成物は保存剤(preservative、preservative agent)を含む。

【0094】

ある態様において、本発明は、i)式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii)少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii)1種類の保存剤を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

【0095】

好ましくは、保存剤はECL信号発生に対して効果をもたないか、あるいはプラスの効果をもつ。オキサゾリジン類(たとえば、Oxaban Aまたは4,4ジメチルオキサゾリジン)、アジドおよび関連の保存剤がECLと適合性であることは当業者に既知である。0.01%~1%の濃度のオキサゾリジン類が普通は検査試薬中に用いられる。ある態様において、試薬組成物は、オキサゾリジン類の群から選択される保存剤、好ましくはOxaban Aを含む。ある態様において、試薬組成物は0.01%~1%の濃度の保存剤を含み、他の態様において、試薬組成物は0.1%~1%の濃度の保存剤を含む。

10

20

30

40

50

2種類以上の保存剤の混合物を用いるのも有益な可能性がある。

【0096】

既に前記に述べたように、2-クロロアセトアミド(CAA)はそれのECL信号増強効果のほかに、保存剤機能も備えている。

前記のように、本発明のある観点は、ECL信号発生に対して影響をもたないかあるいはプラスの影響をもつ有効な保存剤の添加という要望を満たす。細菌および真菌の増殖を効果的に制御する適切な無機化合物であるホウ酸および/またはボレートが同定された。意外にも本発明者らは、ECL測定用の試薬組成物中に存在するホウ酸および/またはボレートがECL信号発生にマイナスの影響をもたないことを見出した。保存剤としてホウ酸および/またはボレートを含む試薬組成物がECL信号発生プロセスにプラスの効果、すなわち特異的信号の増強効果をもつことが、意外にも見出された。さらに、それらの高い活性、および安全性妨害または環境事項に関連する問題が軽度であることは有利である。ホウ酸またはボレートは、試薬組成物中に一般に用いられる他の幾つかの保存剤と異なり、ハロゲンを含まず、またホルムアルデヒドを放出しない。ECL信号発生に際してホウ酸を存在させた結果を、実施例のセクション、たとえば実施例2に示す。

10

【0097】

ある態様において、本発明は、i)少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii)ホウ酸およびボレートからなる群から選択される少なくとも1種類の保存剤を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

【0098】

ある態様において、本発明は、i)少なくとも1種類の共反応体、およびiii)保存剤であるホウ酸を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

20

ある態様において、本発明は、i)少なくとも1種類の共反応体、およびiii)保存剤であるボレートを含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

【0099】

ある態様において、本発明は、i)式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii)少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii)ホウ酸およびボレートからなる群から選択される少なくとも1種類の保存剤を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する。

【0100】

ある態様において、本発明による試薬組成物は、保存剤としてのホウ酸またはボレートを0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、特に好ましくは0.5%~2%の濃度で含む。

30

【0101】

好ましい態様において、本発明による試薬組成物は、保存剤としてのホウ酸を0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、特に好ましくは0.5%~2%の濃度で含む。

【0102】

好ましい態様において、本発明による試薬組成物は、保存剤としてのボレートを0.1%~5%の濃度、好ましくは0.5%~4%の濃度、特に好ましくは0.5%~2%の濃度で含む。

40

【0103】

本発明による試薬組成物は、場合によりさらに他の検査成分を含む。他の検査成分は、少なくとも1種類の界面活性剤、少なくとも1種類の信号増強化合物、pH制御用の酸性作用剤および塩基性作用剤を含む緩衝剤、ならびに水からなる群から選択される。

【0104】

ある態様において、本発明は、i)式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii)少なくとも1種類の共反応体、iii)少なくとも1種類の保存剤、iv)緩衝剤、v)少なくとも1種類の界面活性剤、vi)塩類および/または消泡剤、ならびにvii)場合により他の検査成分を含む、ECL測定用の試薬組成物に関する

50

。

【0105】

本発明による試薬組成物に適した界面活性剤は、下記からなる群からのものである：下記のものを含む脂肪酸エトキシレート：ポリ（エチレングリコール）エーテル類、たとえばポリドカノール(polidocanol)、もしくは他のポリ（エチレングリコール）エーテル類であって式 C_xEO_y をもつもの（ $x = 8 \sim 18$ 、および $y = 2 \sim 9$ ）、ゲナポール(genapol)（イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル） $_n$ ）、Plantaren（登録商標）（アルキルポリグルコシド）、オクチルグルコシド（オクチル - ベータ - D - グルコピラノシド）、および双性イオン界面活性剤、たとえば Zwittergent 3 - 12、またはその混合物。界面活性剤は 0.01% ~ 2% の範囲の濃度で用いられる。最適濃度はそれぞれの界面活性剤について容易に決定できる。最も適切な濃度は 0.05% ~ 1% の範囲のものである。

10

【0106】

ある態様において、本発明による試薬組成物は、下記からなる群から選択される界面活性剤を含む：ポリドカノール、もしくは他のポリ（エチレングリコール）エーテル類であって式 C_xEO_y をもつもの（ $x = 8 \sim 18$ 、および $y = 2 \sim 9$ ）、オクチルグルコシド（オクチル - ベータ - D - グルコピラノシド）、または双性イオン界面活性剤、たとえば Zwittergent 3 - 12、またはその混合物。好ましい態様において、試薬組成物は、ポリドカノール、オクチルグルコシド（オクチル - ベータ - D - グルコピラノシド）および Zwittergent 3 - 12、またはその混合物からなる群から選択される界面活性剤を含む。

20

【0107】

さらに、電気化学ルミネセンス信号は、pH を 6.0 ~ 8.0、好ましくは 6.0 ~ 7.5、特に好ましくは 6.2 ~ 6.9 に調整することによって増強させることもできる。これは、この範囲に適した、当業者に既知の pH 緩衝剤の使用によって、簡便に実施できる。ある態様において、試薬組成物に適した緩衝剤は KOH およびリン酸（ H_3PO_4 ）を含む。

【0108】

さらにまた、たとえば NaBr、NaCl、NaJ などの無機塩類を含めた塩類を添加することによって信号を増強することができる。塩類、特に NaCl を、1 mM ~ 1 M、好ましくは 10 mM ~ 100 mM、最も好ましくは 10 mM ~ 50 mM の範囲の濃度で添加する。

30

【0109】

特に HTS 用途においては、泡または気泡の生成を避けることが有益な場合がある。この理由で、消泡剤を試薬組成物に添加することが望ましい場合がある。市販の多数の消泡剤（Antifoams o-30、Antifoam 204、Antifoam A、Antifoam SE-15、Antifoam SO-25 および Antifoam 289 を含む）を、本発明による試薬組成物に添加することができる。

【0110】

本発明の試薬組成物は、ECL 標識を含むことができる。ECL 標識は一般的な ECL 標識であってもよい。ECL 標識の例には、トリス - ビピリジル - ルテニウム（RuBpy）および他の有機金属化合物が含まれ、その際、金属はたとえば V II および V III 族の金属からのものであり、Re、Ru、Ir および Os が含まれる。これらの ECL 標識は、被検体特異的試薬を電気化学ルミネセント基で標識するために、または被検体自体を電気化学ルミネセント基で標識するために、当業者が用いている。ある態様において、本発明の試薬組成物は、標識した被検体および / または標識した被検体特異的試薬を含有し、その際、ECL 標識は、それぞれ下記に開示される ECL 標識からなる群から選択される：US 5,310,687 (A)（BPRu = Ru(bpy) $_2$ - bpyCO - OSu）、US 2003/0124572(A1)（スルホ - BPRu - NHS エステル）、EP720614(A1)（Bpy $_2$ - Ru - bpy - CO - UEEK - korks - OSu）、および WO 2002/027317(A2)（BP

40

50

Ru - (UE) - 25 - KおよびBPRu2 - SK4)。

【0111】

本発明の試薬組成物中に用いられる試薬およびその混合物は、使用前は液体、凍結、超低温凍結、気化凍結、凍結乾燥、気体、固体または乾燥のいずれかの形態で供給できる。少なくとも試薬組成物の使用前に、試薬を溶媒に溶解する。本発明の試薬組成物は水溶液であろう。好ましい態様において、試薬を水に溶解する。

【0112】

これらの改良された配合物は、高感度アッセイにおいて特に価値がある。本発明のある態様において、ECLアッセイの性能は、試薬組成物と電極組成物の最適な組み合わせによってさらにいっそう改善される。そのような適切なECL電極組成物は、Ir、Ptまたは炭素の電極を含む。

10

【0113】

前記のECL増強用のカルボン酸アミドならびにホウ酸およびボレートから選択される適切な保存剤を含むこれらの有利な組み合わせは、両者とも改善された特性をもつ。これらには、本発明により開示された試薬組成物の使用による動的範囲の拡大、および結合標識からのECL信号 - 対 - ECLバックグラウンド信号比の改善が含まれる。この増大した感度は、たとえばより低い検出限界が有益であるアッセイにおいて重要である(たとえば、トロポニンTアッセイ(TNTHs; 注文No.: 05092744)、B型肝炎エンペロープ抗原アッセイ(HBeAg; 注文No.: 11820583)、抗チロトロピン受容体アッセイ(抗-TSHR; 注文No.: 04388780) - 詳細については実施例のセクションを参照)。

20

【0114】

これらの改善された試薬組成物の配合物はより良好な精度を与えることができ、その結果、ECLアッセイの検出限界がより低くなる可能性がある。

本発明の他の観点は、試料、検査特異的試薬および/または検査試薬の必要体積が少なくなることによる経費削減に関する。より低い試薬体積に対する信号損失は、本発明による有利な試薬組成物の使用によって補償できる。

【0115】

本発明のさらに他の観点は、本発明の試薬組成物を含む改善されたシステムおよび装置、ならびに/あるいは本発明の改善された方法を実行するように適合させた改善されたシステムおよび装置に関する。

30

【0116】

ECL信号発生は、前記の知見を単独でまたは互いに組み合わせて用いる場合、同様に改善できる。

試薬混合物:

ECLを測定するために、本発明による試薬組成物を追加化合物と混合して試薬混合物を調製することができる。ある態様において、本発明は、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する: i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、iii) 試験すべき試料、ならびにiv) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

40

【0117】

ある態様において、本発明は、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する: i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、iii) 少なくとも1種類の保存剤、iv) 試験すべき試料、ならびにv) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

【0118】

ある態様において、本発明は、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する: i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミ

50

ドの群から選択される化合物、i i) 少なくとも1種類の共反応体、i i i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、i v) 試験すべき試料、ならびにv) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

【0119】

さらに他の態様において、本発明は、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する：i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、i i) 少なくとも1種類の共反応体、i i i) 試験すべき試料、ならびにi v) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。好ましい態様において、試薬混合物は保存剤であるホウ酸を含む。好ましい態様において、試薬混合物は保存剤であるボレートを含む。

10

【0120】

本発明は、ある態様において、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する：i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、i i) 少なくとも1種類の共反応体、i i i) 試験すべき試料、i v) 界面活性剤、v) 緩衝剤、v i) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬、ならびにv i i) 塩類および/または消泡剤。

【0121】

さらに他の好ましい態様において、本発明は、ECL測定用の試薬組成物を含むECL測定用の試薬混合物であって、下記を含む試薬混合物に関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、i i) 少なくとも1種類の共反応体、i i i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、i v) 試験すべき試料、v) 界面活性剤、v i) 緩衝剤、ならびにv i i) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

20

【0122】

試薬混合物はさらに、少なくとも1種類の界面活性剤およびpH制御用の緩衝剤を含むことができる。場合により、試薬混合物は塩類および/または消泡剤を含むことができる。

【0123】

試薬混合物中の他の検査成分は、標識していない被検体特異的試薬、被検体ホモログ、固相コーティング、および干渉を減らす物質からなる群から選択される。

30

使用：

本発明のある観点では、電気化学ルミネセンス検出方法を実施するための、本発明の改良された試薬組成物および/または改良された試薬混合物の使用に関する。

【0124】

ある態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出を実施するための、式Iおよび式IIの群から選択されるカルボン酸アミドの使用に関する。ある態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出方法の操作を実施するための、式Iおよび式IIの群から選択されるカルボン酸アミドの使用に関する。

【0125】

好ましい態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出を実施するための、アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび2-クロロブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの使用に関する。

40

【0126】

他の好ましい態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出を実施するための、アセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの使用に関する。他の態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出を実施するための、アセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの使用に関する。

【0127】

50

ある態様において、本発明は、ECL測定のための、下記を含む試薬組成物の使用に関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii) 少なくとも1種類の保存剤。

【0128】

ある態様において、本発明は、ECL測定のための、下記を含む試薬組成物の使用に関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤。

【0129】

ある態様において、本発明は、ECL測定のための、下記を含む試薬組成物の使用に関する：i) アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび2-クロロブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii) 保存剤。

【0130】

本発明による試薬組成物は、ある態様において、ECL測定セルのコンディショニングまたは再生、およびECL信号の測定に適している。ある態様において、この試薬組成物はコンディショニング溶液として用いられる。ある態様において、本発明による試薬組成物は、ECL測定セルのコンディショニングまたは再生に用いられる。ある態様において、アセトアミド、2-フルオロアセトアミド、2-クロロアセトアミド、プロパンアミド、2-クロロプロパンアミド、3-クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび2-クロロブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの群から選択される化合物を含む試薬組成物は、ECL測定セルのコンディショニングまたは再生に用いられる。他の様において、アセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミドの群から選択される化合物を含む試薬組成物は、ECL測定セルのコンディショニングまたは再生に用いられる。

【0131】

電気化学ルミネセンス検出方法を実施するための使用について、試薬組成物を追加化合物、たとえば試験すべき試料、電気化学ルミネセント基付きの少なくとも1種類の検出試薬、および試薬混合物を調製する方法を支持する下記の他の成分と混合することができる。

【0132】

ある態様において、本発明は、ECLの測定における、下記を含む試薬混合物の使用に関する：a) i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii) 保存剤を含む、試薬混合物、b) 試験すべき試料、ならびにc) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

【0133】

ある態様において、本発明は、ECLの測定における、下記を含む試薬混合物の使用に関する：a) i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ii) 少なくとも1種類の共反応体、ならびにiii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤を含む、ECL測定用の試薬混合物、b) 試験すべき試料、ならびにc) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

【0134】

さらに他の態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出を実施するための、ホウ酸またはボレートの使用に関する。同様にある態様において、本発明は、電気化学ルミネセンス検出方法の操作を実施するための、ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤の使用に関する。

【0135】

ある態様において、本発明は、ECLの測定における、下記を含む試薬混合物の使用に

10

20

30

40

50

関する：a) i) ホウ酸およびボレーートの群から選択される保存剤、ならびに i i) 少なくとも1種類の共反応体を含む、E C L測定用の試薬混合物、b) 試験すべき試料、ならびに c) 電気化学ルミネセント基で標識した少なくとも1種類の検出試薬。

【0136】

さらに、E C Lの測定に使用する試薬混合物は、界面活性剤およびp H制御用の緩衝剤からなる群から選択される成分を含むことができる。場合により、使用する試薬混合物は塩類および/または消泡剤を含むことができる。試薬混合物中の他の検査成分は、標識していない被検体特異的試薬、被検体ホモログ、固相コーティング、および干渉を減らす物質からなる群から選択される。

【0137】

キット：

本発明の1観点は、1以上の容器内に本発明の試薬組成物の1以上の成分を含むキットに関する。これらの成分を、場合により追加試薬と組み合わせ、本発明の試薬組成物を調製することができる。キットは、ある態様において、追加のアッセイ関連構成要素、たとえばE C L標識、E C L標識したアッセイ試薬、希釈剤、洗浄溶液、タンパク質変性試薬、酵素、結合試薬、アッセイプレート、使い捨て用品なども含むことができる。

【0138】

ある態様において、試薬組成物は1以上のガラスまたはプラスチック容器に収容され、試薬組成物の内容に関する情報および適正な貯蔵と使用に関する指示を備えたラベルを適宜施される。試薬組成物の内容に関する情報、ロット番号、製造日、有効期限、および適正な貯蔵と使用に関する指示を、ガラスまたはプラスチック容器に付与したR F I Dチップに記憶させてもよい。そのようなR F I Dチップに記憶された情報は、R F I D読み取りデバイスに接続したアンテナにより読み取り、さらに制御手段で処理することができる。

【0139】

ある態様において、試薬組成物の一部または全部をある態様において液体または乾燥状態で貯蔵することができる。

ある態様において、本発明は、下記を含むE C L測定用の試薬組成物を含む、E C L測定用キットに関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、ならびに i i) 少なくとも1種類の共反応体。

【0140】

好ましい態様において、本発明は、下記を含むE C L測定用の試薬組成物を含む、E C L測定用キットに関する：i) アセトアミド、2 - フルオロアセトアミド、2 - クロロアセトアミド、プロパンアミド、2 - クロロプロパンアミド、3 - クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび2 - クロロブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミド、ならびに i i) 少なくとも1種類の共反応体。

【0141】

他の好ましい態様において、本発明は、下記を含むE C L測定用の試薬組成物を含む、E C L測定用キットに関する：i) アセトアミド、2 - クロロアセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミド、ならびに i i) 少なくとも1種類の共反応体。

【0142】

ある態様において、本発明は、下記を含むE C L測定用の試薬組成物を含む、E C L測定用キットに関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、i i) 少なくとも1種類の共反応体、ならびに i i i) 保存剤。

【0143】

好ましい態様において、本発明は、下記を含むE C L測定用の試薬組成物を含む、E C L測定用キットに関する：i) 式Iおよび式IIのカルボン酸アミドの群から選択される化合物、i i) 少なくとも1種類の共反応体、ならびに i i i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤。

【0144】

10

20

30

40

50

他の好ましい態様において、本発明は、下記を含む E C L 測定用の試薬組成物を含む、E C L 測定用キットに関する：i) アセトアミド、2 - フルオロアセトアミド、2 - クロロアセトアミド、プロパンアミド、2 - クロロプロパンアミド、3 - クロロプロパンアミド、ブタンアミドおよび 2 - クロロブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミド、ii) 少なくとも 1 種類の共反応体、ならびに iii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤。

【0145】

他の好ましい態様において、本発明は、下記を含む E C L 測定用の試薬組成物を含む、E C L 測定用キットに関する：i) アセトアミド、2 - クロロアセトアミド、プロパンアミドおよびブタンアミドからなる群から選択されるカルボン酸アミド、ii) 少なくとも 1 種類の共反応体、ならびに iii) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤。

10

【0146】

ある態様において、本発明は、下記を含む E C L 測定用の試薬組成物を含む、E C L 測定用キットに関する：i) ホウ酸およびボレートからなる群から選択される保存剤、ならびに ii) 少なくとも 1 種類の共反応体。

【0147】

前記の手段自体で、既知の方法が既に著しく改善される。さらに、これらの手段を組み合わせることにより、被検体検出アッセイの感度および/または動的測定範囲をいっそう著しく向上させることが可能である。

20

【0148】

以下の実施例および図面は本発明の理解を補助するために提示され、本発明の真の範囲は特許請求の範囲に示される。本発明の精神から逸脱することなくこれらの操作を改変しうることを理解すべきである。

【実施例】

【0149】

実施例 1

カルボン酸アミドを含むアッセイ緩衝液（試薬組成物）を用いる E C L 測定 Roche Elecsys（登録商標）2010 デバイスを用い、以下に述べるアッセイに利用できるプロトコルを用いて E C L 測定を実施した。

30

【0150】

表 2、3 および 4 に示すカルボン酸アミドの群から選択される種々の濃度の化合物を、下記のアッセイ緩衝液に添加した：

180 mM トリプロピルアミン（TPA）

0.1% ポリドカノール

300 mM リン酸緩衝液

KOH / H_3PO_4 を用いて最終 pH を pH 6.8 に調整した。アッセイ緩衝液もブランク値として用いた。

【0151】

カルボン酸アミドの群から選択される化合物（カルボン酸アミドの化学式を表 1 に示す）を、指示した濃度でアッセイ緩衝液（試薬組成物）に添加した。結果を、これらの化合物を含まないアッセイ緩衝液を用いた測定値に対する信号回収率として報告する。

40

【0152】

表 2 に示す濃度のカルボン酸アミドを含有するアッセイ緩衝液を用いて、アッセイ緩衝液バックグラウンド測定を実施した。100% 未満の値は、選択したカルボン酸アミドを指示した濃度で添加することにより E C L バックグラウンド信号が低下したことを示す。E C L 標識の不存在下でのバックグラウンド電気化学ルミネセンスの低下は、特に信号対バックグラウンド比（= 信号対ノイズ比）の増大によって感度が大幅に改善される低い検出レベルにおける利点である。

【0153】

50

【表 2】

表 2:

濃度	アッセイ緩衝液バックグラウンド				
	0.25 M	0.1 M	0.01 M	0.001 M	0.0001 M
2,2 ジクロロ-アセトアミド	30%	40%	70%	84%	93%
2-クロロアセトアミド	66%	69%	80%	94%	98%
2-クロロブタンアミド	91%	79%	80%	92%	98%
2-クロロ-N-ヒドロキシメチルアセトアミド	0%	46%	97%	91%	97%
2-クロロ-N,N-ジメチルアセトアミド	64%	75%	92%	99%	98%
2-クロロ-N-メトキシ-N-メチルアセトアミド	0%	0%	88%	99%	102%
2-クロロプロパンアミド	70%	68%	78%	93%	97%
3-クロロプロパンアミド	n.d.	n.d.	79%	91%	96%
アセトアミド	79%	80%	90%	95%	97%
アセトアセトアミド	n.d.	55%	85%	94%	98%
2-ブロモアセトアミド	n.d.	n.d.	39%	72%	93%
ブタンアミド	68%	68%	81%	108%	108%
ホルムアミド	74%	75%	81%	94%	98%
2-フルオロアセトアミド	73%	77%	91%	101%	102%
2-ヒドロキシ-アセトアミド	93%	90%	96%	100%	101%
ヘキサナミド	56%	53%	67%	83%	90%
2-ヨードアセトアミド	0%	0%	0%	0%	34%
プロパンジアミド	79%	84%	92%	91%	99%
N-メチルプロパンアミド	88%	90%	94%	98%	100%
2,2 ジメチルプロパンアミド	69%	68%	88%	98%	99%
プロパンアミド (プロピオンアミド)	77%	74%	86%	95%	88%
2-ピロリドン	88%	84%	96%	101%	100%
2,5-ブタンイミド	135%	103%	105%	103%	98%
2,2,2-トリフルオロ-アセトアミド	98%	85%	87%	95%	99%
ペンタンアミド	75%	63%	73%	91%	97%

【 0 1 5 4 】

n.d. = 測定しなかった

同様な実験で、遊離標識の信号を測定した。遊離標識値は、遊離 E C L 標識を含有する溶液が微粒子 (アッセイ緩衝液中 10 nM の Ru B p y) の不存在下で発生する信号を表わす。この値を、いずれかの追加化合物を含まないアッセイ緩衝液に対比して % で表 3 に示す。このアッセイ方式は、均一測定または均一アッセイ方式としても知られる。100 % を超える値は、選択したカルボン酸アミドを指示した濃度で添加することによって増強した E C L 信号の指標となる。結果を表 3 に示す。

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3:

濃度	遊離標識アッセイ				
	0.25 M	0.1 M	0.01 M	0.001 M	0.0001 M
2,2 ジクロロ-アセトアミド	33%	66%	145%	120%	104%
2-クロロアセトアミド	155%	151%	131%	109%	101%
2-クロロブタンアミド	157%	147%	126%	108%	100%
2-クロロ-N-ヒドロキシメチルアセトアミド	0%	6%	103%	125%	99%
2-クロロ-N,N-ジメチルアセトアミド	125%	116%	103%	100%	100%
2-クロロ-N-メトキシ-N-メチルアセトアミド	2%	5%	124%	0%	0%
2-クロロプロパンアミド	113%	155%	132%	110%	102%
3-クロロプロパンアミド	n.d.	n.d.	132%	107%	100%
アセトアミド	141%	132%	110%	102%	100%
アセトアセトアミド	6%	21%	130%	104%	97%
2-プロモアセトアミド	n.d.	n.d.	89%	139%	110%
ブタンアミド	145%	136%	114%	103%	99%
ホルムアミド	134%	145%	127%	111%	103%
2-フルオロアセトアミド	144%	134%	111%	102%	100%
2-ヒドロキシ-アセトアミド	130%	137%	109%	101%	99%
ヘキサンアミド	118%	105,7%	120%	111%	103%
2-ヨードアセトアミド	0%	0%	2%	3%	127%
プロパンジアミド	123%	135%	115%	115%	100%
N-メチルプロパンアミド	106%	99%	97%	98%	98%
2,2 ジメチルプロパンアミド	125%	120%	106%	99%	97%
プロパンアミド(プロピオンアミド)	144%	135%	113%	101%	99%
2-ピロリドン	142%	130%	107%	100%	99%
2,5-ブタンイミド	102%	136%	107%	100%	99%
2,2,2-トリフルオロ-アセトアミド	130%	150%	116%	103%	100%
ペンタンアミド	151%	140%	122%	108%	103%

【 0 1 5 6 】

n.d. = 測定しなかった

さらに、ビーズを含む簡略化アッセイを用いた値を測定した。この人為的アッセイは、高い特異的信号を得るための R u B p y 標識微粒子を含むアッセイである。このアッセイ方式は、不均一測定または不均一アッセイ方式としても知られる。この人為的アッセイの特異的信号と、追加化合物を含む前記のアッセイ緩衝液を用いたバックグラウンド信号（アッセイ緩衝液バックグラウンド）との差を、人為的アッセイとして、追加化合物を含まないアッセイ緩衝液に対する%で示す。100%を超える値は、選択したカルボン酸アミドを指示した濃度で添加することにより増強した E C L 信号の指標となる。結果を表 4 に示す。

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

【表 4】

表 4:

	Δ 人為的アッセイ = (人為的アッセイ - アッセイ緩衝液バックグラウンド)				
濃度	0.25 M	0.1 M	0.01 M	0.001 M	0.0001 M
2,2 ジクロロ-アセトアミド	73%	67%	92%	122%	109%
2-クロロアセトアミド	160%	165%	148%	113%	104%
2-クロロブタンアミド	119%	152%	149%	119%	102%
2-クロロ-N-ヒドロキシメチルアセトアミド	100%	54%	109%	121%	107%
2-クロロ-N,N-ジメチルアセトアミド	97%	115%	113%	103%	104%
2-クロロ-N-メトキシ-N-メチルアセトアミド	100%	100%	108%	100%	95%
2-クロロプロパンアミド	63%	109%	145%	119%	104%
3-クロロプロパンアミド	n.d.	n.d.	148%	111%	104%
アセトアミド	138%	144%	123%	110%	106%
アセトアセトアミド	n.d.	61%	125%	107%	98%
2-ブロモアセトアミド	n.d.	n.d.	68%	129%	114%
ブタンアミド	159%	161%	131%	95%	91%
ホルムアミド	51%	76%	116%	110%	105%
2-フルオロアセトアミド	148%	148%	118%	100%	97%
2-ヒドロキシ-アセトアミド	32%	85%	108%	100%	99%
ヘキサナミド	52%	59%	81%	113%	109%
2-ヨードアセトアミド	0%	0%	0%	0%	125%
プロパンジアミド	50%	84%	112%	108%	100%
N-メチルプロパンアミド	104%	106%	104%	102%	100%
2,2 ジメチルプロパンアミド	147%	149%	119%	103%	99%
プロパンアミド (プロピオンアミド)	157%	163%	133%	111%	116%
2-ピロリドン	117%	144%	116%	100%	99%
2,5-ブタンイミド	-11%	84%	101%	98%	103%
2,2,2-トリフルオロ-アセトアミド	47%	130%	133%	106%	100%
ペンタンアミド	129%	147%	136%	119%	107%

【 0 1 5 8 】

n.d. = 測定しなかった

図 1 に、表 2、3 および 4 に示すプロパンアミドについての結果を含むグラフを提示する。図 2 に、表 2、3 および 4 に示す 2 - クロロアセトアミドについての結果を含むグラフを提示する。図 3 に、表 2、3 および 4 に示すブタンアミドについての結果を含むグラフを提示する。図 4 に、表 2、3 および 4 に示すアセトアミドについての結果を含むグラフを提示する。

【 0 1 5 9 】

実施例 2

10

20

30

40

50

信号増強性保存剤としてのホウ酸

Roche Elecsys (登録商標) 2010 デバイスを用い、以下に述べるアッセイに推奨されるプロトコルを用いて ECL 測定を実施した。

【0160】

ブランク値を測定するために、下記のアッセイ緩衝液を用いた：

180 mM トリプロピルアミン (TPA)

0.1% ポリドカノール

0.1% Oxaban A

300 mM リン酸緩衝液

このアッセイ緩衝液に漸増量のホウ酸を指示に従って添加した。KOH / H₃PO₄ を用いて最終 pH を pH 6.8 に調整した。

【0161】

表 5 に示す濃度のホウ酸を含有するアッセイ緩衝液を用いたアッセイ緩衝液バックグラウンド測定を実施した。遊離標識値は、遊離 ECL 標識を含有する溶液が微粒子 (アッセイ緩衝液中 10 nM の RuBpy ; 均一測定) の不存在下で発生する信号を、追加化合物を含まないアッセイ緩衝液に対比して % で表わす。この人為的アッセイは、高い特異的信号を得るための RuBpy 標識微粒子を含むアッセイである。市販インビトロ診断アッセイとして、Elecsys (登録商標) TSH アッセイ (Elecsys チロトロピンアッセイ (登録商標) ; 注文 No. : 11731459) を用いて TSH を測定した。低レベルキャリブレーター (被検体を含まない) としての TSH キャリブレーター 1 (TSH Cal セット ; 注文 No. : 04738551) を TSH アッセイに用いて、バックグラウンド信号を得た (TSH Cal 1) ; TSH キャリブレーター 2 を TSH アッセイに用いて、高信号値を得た (TSH Cal 2)。

【0162】

人為的アッセイ、TSH Cal 1 および TSH Cal 2 についての結果を、ホウ酸を添加しない基準アッセイ緩衝液に対する相対回収率 % として図 5 にプロットする。

特に下記の測定を実施した：

【0163】

【表 5】

表 5:

相対回収率 (基準に対する%) - ホウ酸を含まないアッセイ緩衝液との比較						
ホウ酸濃度	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%
アッセイ緩衝液バックグラウンド	100%	103%	102%	98%	103%	103%
遊離標識アッセイ	100%	100%	99%	97%	93%	93%
人為的アッセイ	100%	104%	108%	107%	108%	108%
TSH Cal2	100%	105%	108%	108%	109%	112%
TSH Cal1	100%	100%	98%	95%	98%	94%

【0164】

ホウ酸を保存剤としてアッセイ緩衝液に添加すると、特に人為的アッセイおよび TSH Cal 2 測定において特異的不均一信号が改善される。

実施例 3

プロパンアミドおよびホウ酸を含有するアッセイ緩衝液が Elecsys (登録商標)

アッセイの検出下限に及ぼす効果

幾つかの市販インビトロ診断アッセイ（HBeAg：Roche注文No.：11820583，Anti-TSHR：Roche注文No.：04388780，TNThs：Roche注文No.：05092744）についての検出下限を測定して、2種類のアッセイ緩衝液調製物を比較した。

【0165】

アッセイ緩衝液A：

180mM TPA，0.1%ポリドカノール，300mMリン酸緩衝液，0.1% Oxaban A

アッセイ緩衝液B：

180mM TPA，0.1%ポリドカノール，50mMプロパンアミド，300mMリン酸緩衝液，1%ホウ酸

KOH/H₃PO₄を用いて、両方のアッセイ緩衝液AおよびBの最終pHをpH6.8に調整した。

【0166】

カルボン酸アミドであるプロパンアミドおよび保存剤であるホウ酸がきわめて低い被検体濃度を検出するアッセイ性能に及ぼす効果を示すために、前記の3種類の市販アッセイを分析した。

【0167】

アッセイをRoche Elecsys（登録商標）分析計で測定し、それらのパッケージ挿入物の記載に従って検量した。検出下限を計算するために、被検体（HBeAg、抗TSHR）を含まない試料またはきわめて低い被検体濃度（TNThs）の試料の信号を測定した。21倍測定の標準偏差を計算し、2（2SD）または3（3SD）を掛け、信号の平均値に加算し（HBeAg、TNThs）、または減算した（抗TSHR、競合アッセイ）。次いで、各アッセイについての検量曲線を用いて、計算した信号に対応する濃度を決定した。低い被検体濃度（TNThs）の試料については、試料の被検体濃度をこれらの計算した濃度から減算した。

【0168】

これら3種類の市販アッセイには、本発明によるカルボン酸アミドを含有しかつ保存剤機能も備えたホウ酸を含有する改善された試薬組成物が有益である。HBeAg、抗TSHRおよびTNThsアッセイの結果をそれぞれ表6、7および8に示す。

【0169】

【表6】

表6:

HBeAg	検出下限 [u/ml]	
	2 SD	3 SD
アッセイ 緩衝液 A	0.0030	0.0044
アッセイ 緩衝液 B	0.0018	0.0030

【0170】

10

20

30

40

【表 7】

表 7:

	検出下限 [u/ml]	
抗-TSHR	2 SD	3 SD
アツセイ 緩衝液 A	0.324	0.500
アツセイ 緩衝液 B	0.218	0.332

10

【 0 1 7 1 】

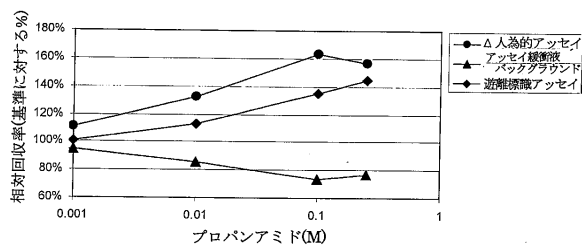
【表 8】

表 8:

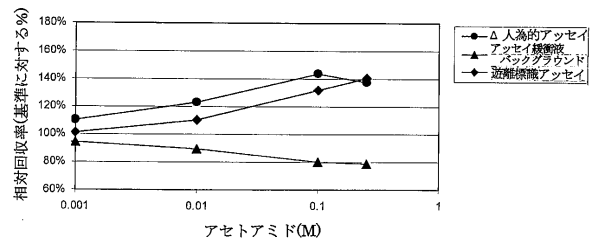
	検出下限 [pg/ml]	
TNThs	(2SD) – 試料濃度	(3SD) – 試料濃度
アツセイ 緩衝液 A	1.193	1.832
アツセイ 緩衝液 B	0.782	1.140

20

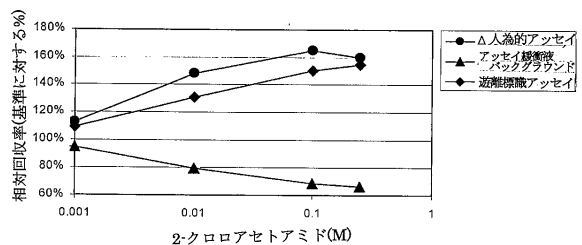
【図 1】



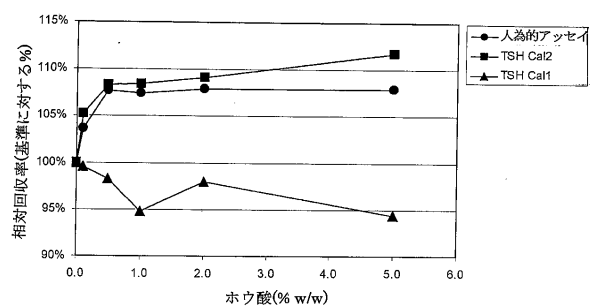
【図 4】



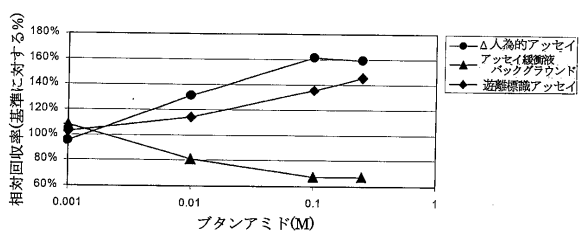
【図 2】



【図 5】



【図 3】



フロントページの続き

(74)代理人 100162455

弁理士 辻本 典子

(72)発明者 シュテッケル, ヨハネス

ドイツ国 8 1 5 4 5 ミュンヘン, メンターシュヴァイクシュトラッセ 1 2

(72)発明者 ヴィントフル, ミハエラ

ドイツ国 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, エアレンヴェーク 1 4

(72)発明者 フィンケ, アンドレアス

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, エーデルヴァイスシュトラッセ 2

(72)発明者 ハウプトマン, ベルンハルト

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ヴァルトシュトラッセ 1アー

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 特表平08-508102(JP, A)

特開2008-170449(JP, A)

特表2009-521686(JP, A)

特表2008-524604(JP, A)

特開平06-239704(JP, A)

特開昭50-121063(JP, A)

特開2010-237020(JP, A)

米国特許出願公開第2007/0116600(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 1 / 6 6

G 0 1 N 2 1 / 7 5 - 2 1 / 8 3

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8