

(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2014-516947

(P2014-516947A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07F 9/655 (2006.01)</b>	C O 7 F 9/655	2 G 0 5 4
<b>G01N 33/535 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/535	4 B 0 6 3
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 U	4 B 0 6 4
<b>G01N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 J	4 C 0 5 7
<b>G01N 21/76 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 5 5 D	4 H 0 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-509331 (P2014-509331)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月30日 (2012.4.30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月16日 (2013.12.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/035732  
 (87) 国際公開番号 W02012/151142  
 (87) 国際公開日 平成24年11月8日 (2012.11.8)  
 (31) 優先権主張番号 61/482, 134  
 (32) 優先日 平成23年5月3日 (2011.5.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502221282  
 ライフ テクノロジーズ コーポレーショ  
 ン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920  
 08, カールスバッド, パン アレン  
 ウェイ 5791  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラッシュ・グロー型の1, 2-ジオキセタン

## (57) 【要約】

化学発光のフラッシュ特性およびグロー特性を有する化合物を開示する。また、当該化合物を用いて光を生成し、酵素、抗原、および/または核酸を検出および/または定量する方法も開示する。また、これらの化合物に関するキットも開示する。

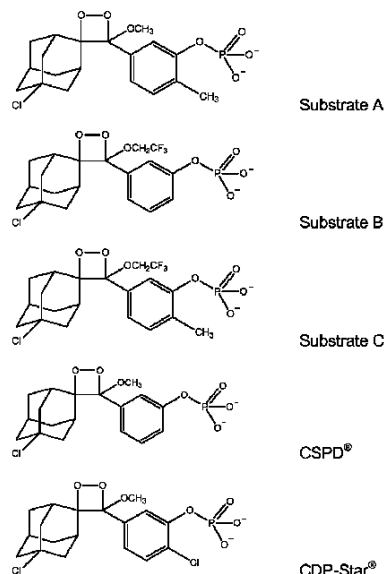
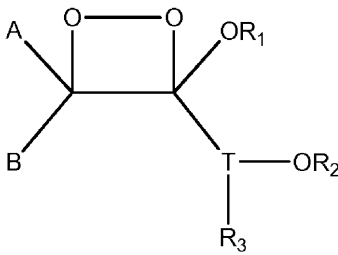


FIG. 5

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の構造を有する化合物：



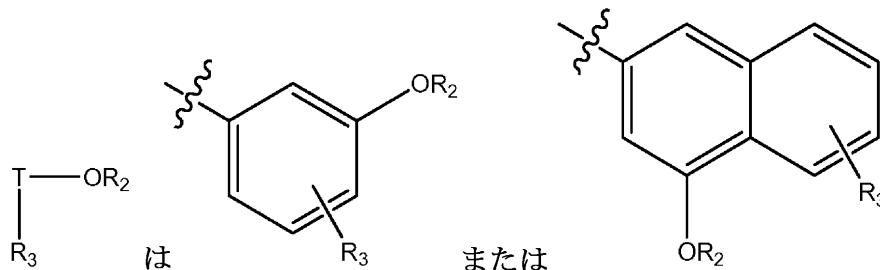
10

式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび 4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、かつ

20

A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルを形成する場合には、形成された基は、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、あるいは A および B は一緒になって、ハロゲンにより置換されたポリシクロアルキルを形成し；



30

であり；

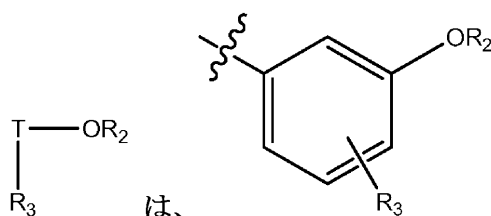
R<sub>1</sub> は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

R<sub>2</sub> は、T 上に酸素アニオンを生じさせる酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ

40

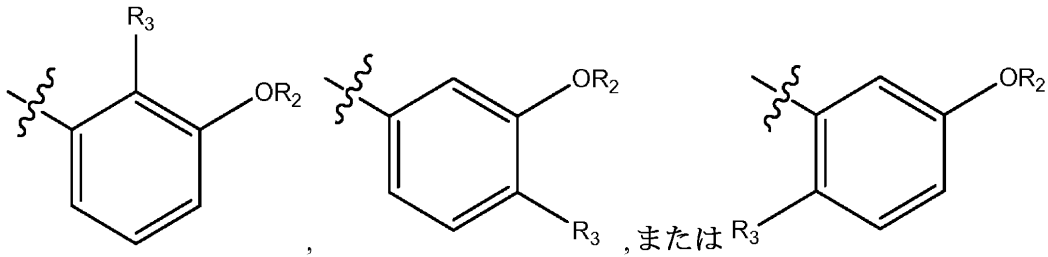
R<sub>3</sub> は、水素または電子供与基であり；ただし R<sub>1</sub> が非置換の場合、R<sub>3</sub> は電子供与基であり；

ここで、



50

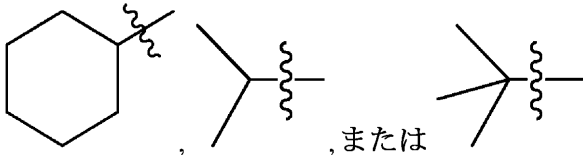
である場合は



である。

【請求項 2】

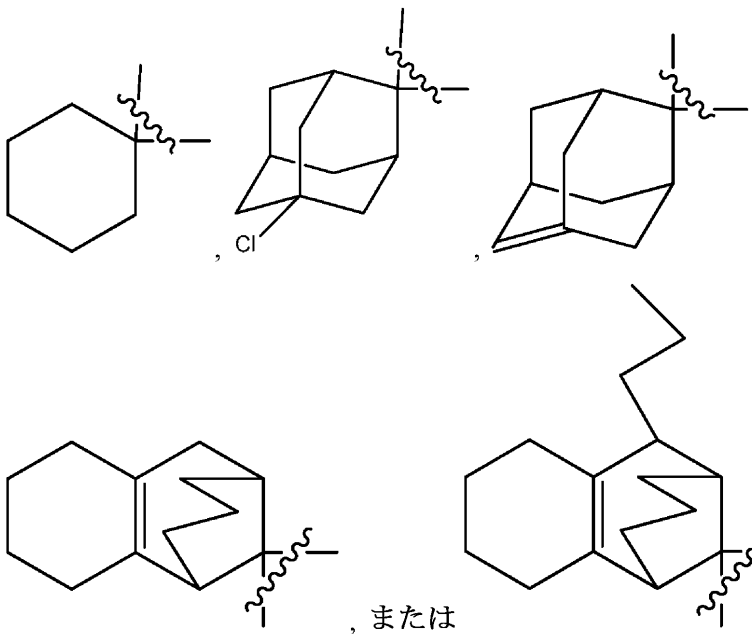
A または B のうちの少なくとも 1 つが、



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

A および B が全体として、



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

$R_1$  が、1 つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

$R_1$  が、1 ~ 2 個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは 1 ~ 2 個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

$R_1$  が、メチルまたは 1, 1, 1-トリフルオロエチルである、請求項 5 に記載の化合物。

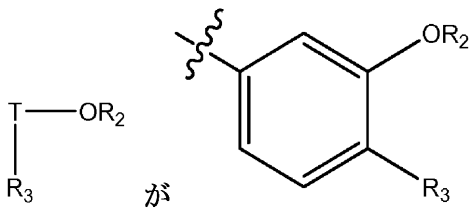
【請求項 7】

10

20

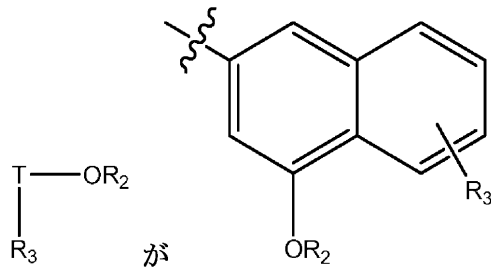
30

40



である、請求項 1 に記載の化合物。

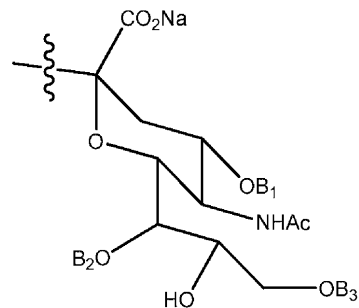
【請求項 8】



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

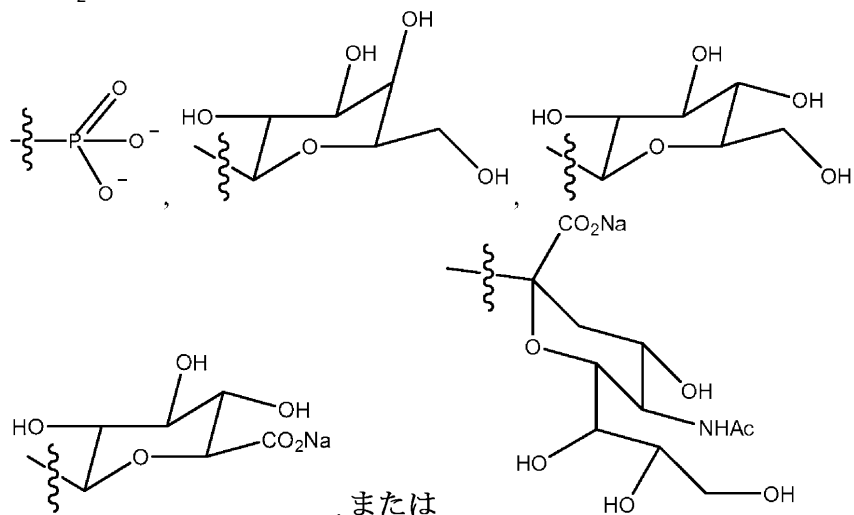
OR<sub>2</sub> が、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $\alpha$ -D-ガラクトシド、 $\beta$ -D-ガラクトシド、 $\alpha$ -D-グルコシド、 $\beta$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -フルクトフラノシド、 $\beta$ -D-グルクロニド、または



であり、式中、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> および B<sub>3</sub> はそれぞれ独立して、H、1～4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル（分岐鎖または直鎖）、または 3～6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】

R<sub>2</sub> が、



である、請求項 9 に記載の化合物。

## 【請求項 1 1】

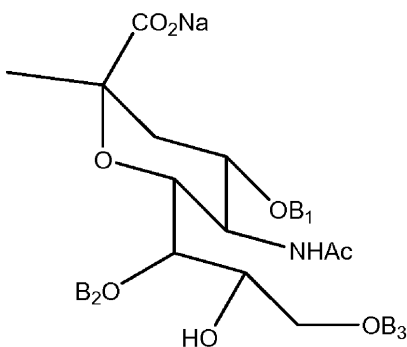
$R_2$  が E-L-Nuc-Z であり、式中、E は求電子性原子を含む基であり、該原子は、Z 基の酵素的切断に際して Nuc 基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し；L は連結基であり；Nuc は求核原子であり；かつ、Z は酵素により切断可能な基であり、ここで

E が、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

L が、1 ~ 4 個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または  $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、m および n は 0 ~ 3 であり、m + n は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1 ~ 10 個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1 ~ 24 個の炭素原子を含むアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含むアルケニル、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6 ~ 10 個の炭素を含むアリール、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または 2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

Nuc は酸素原子または硫黄原子であり；かつ

Z は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2, 3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または



であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、H、1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 1 2】

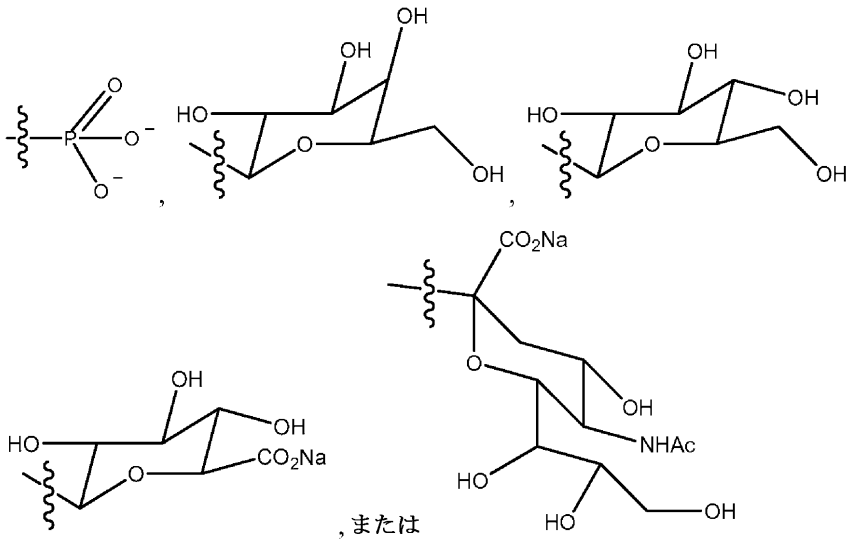
Z が、

10

20

30

40



である、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

前記電子供与基が、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシ、または 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルコキシである、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 1 4】

前記電子供与基が、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 5】

前記電子供与基が、1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは 1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

前記電子供与基が、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

前記酵素部分によって切断可能な結合の切断により、2 5 で光が生成され、これが約 1 5 分未満で最大に達する、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 1 8】

前記光の生成が約 1 0 分未満で最大に達する、請求項 1 7 に記載の化合物。

【請求項 1 9】

前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

前記酵素部分によって切断可能な結合の切断により、3 7 で光が生成され、これが約 1 5 分未満で最大に達する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 1】

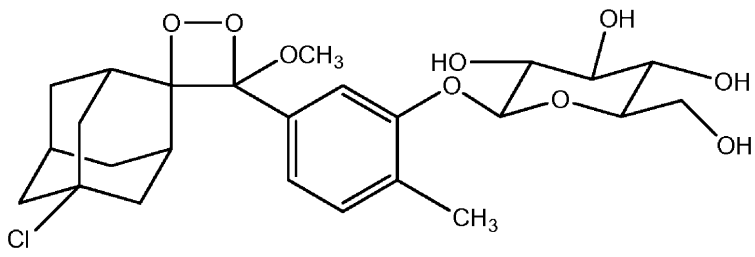
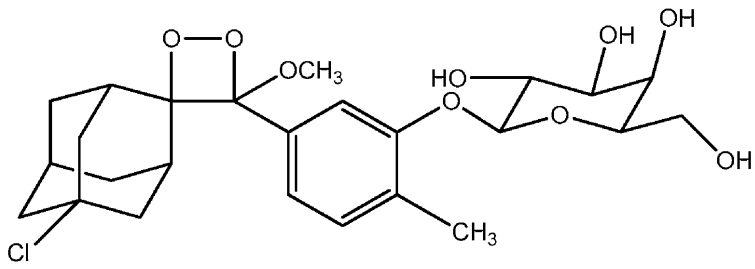
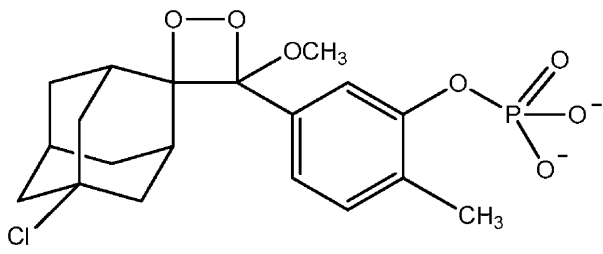
前記光の生成が約 1 0 分未満で最大に達する、請求項 2 0 に記載の化合物。

40

【請求項 2 2】

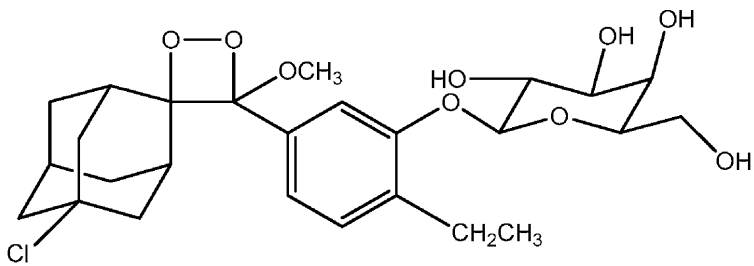
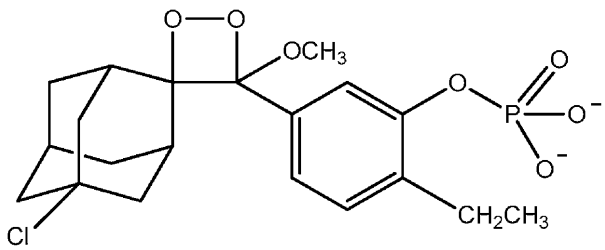
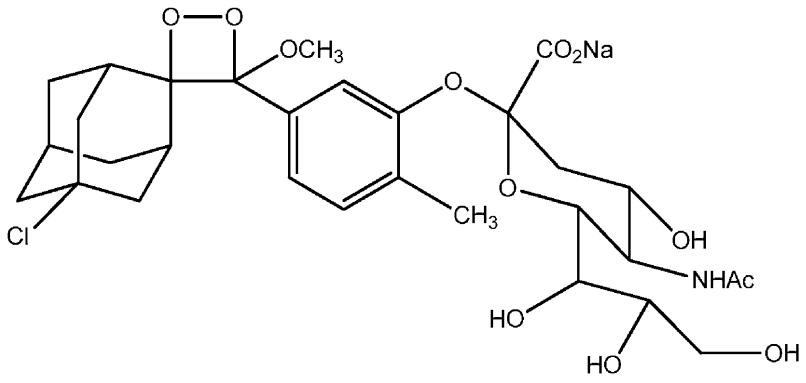
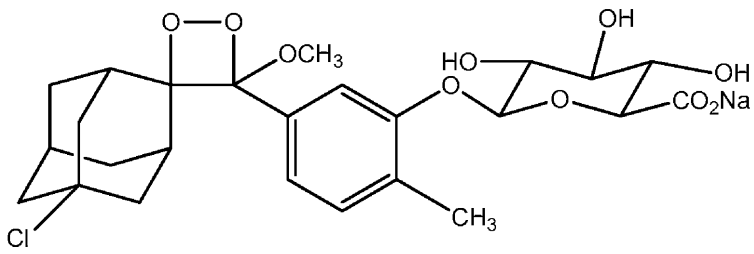
前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 2 0 に記載の化合物。

【請求項 2 3】



10

20

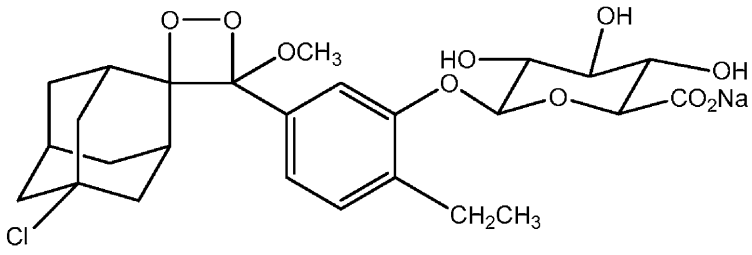
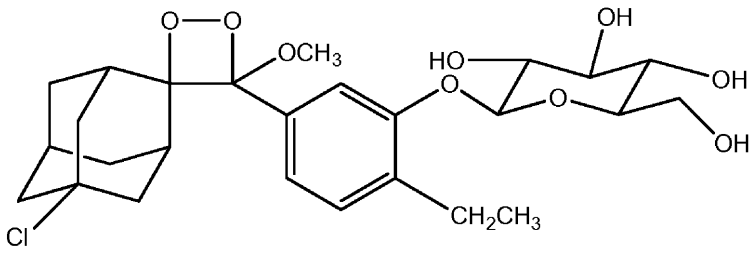


10

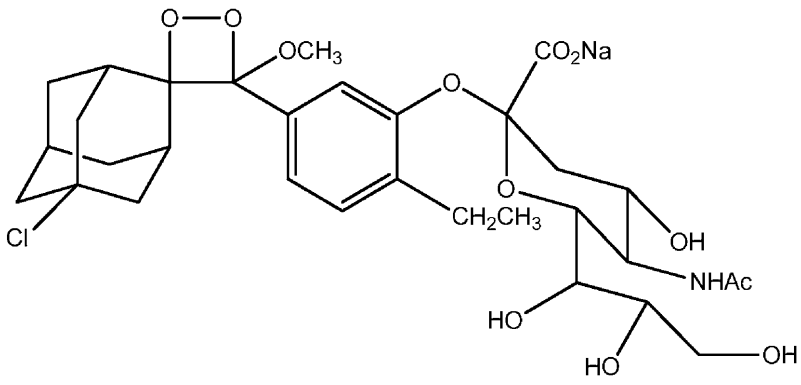
20

30

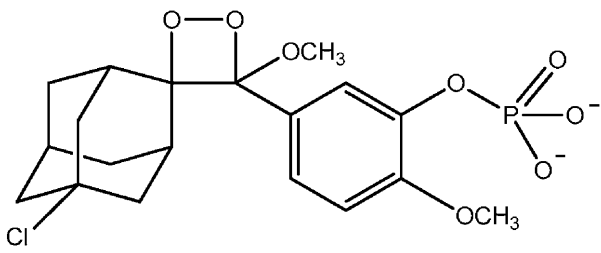




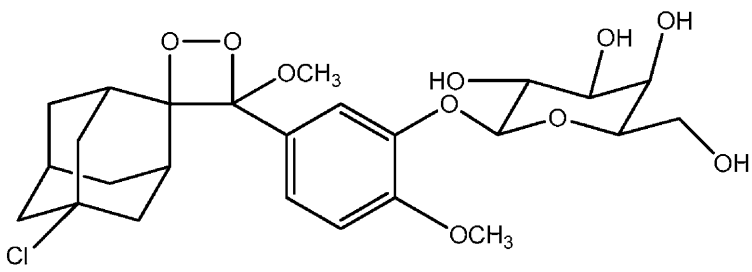
10

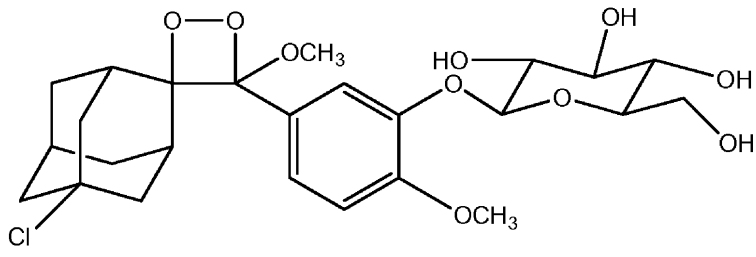


20

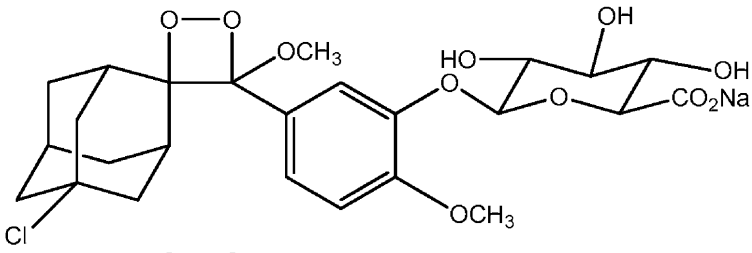


30

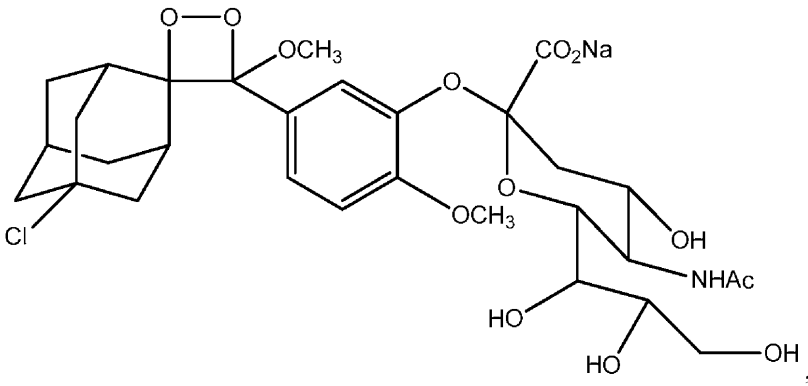




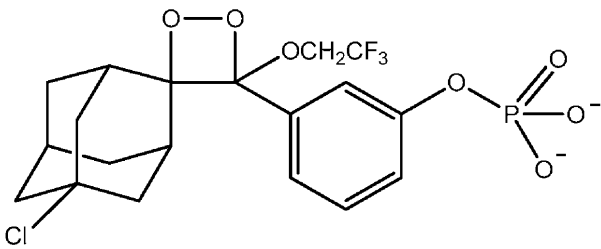
10



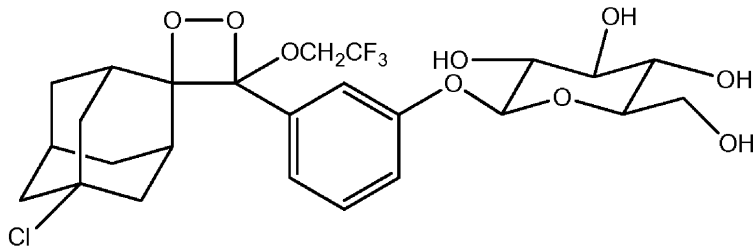
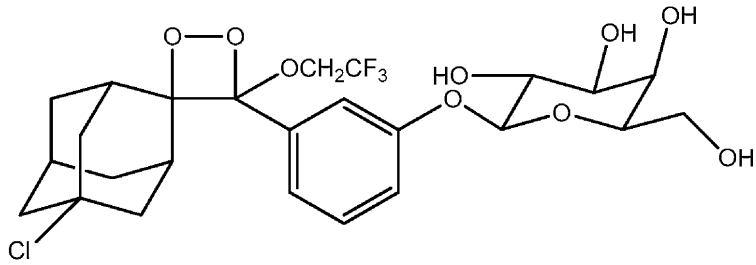
20

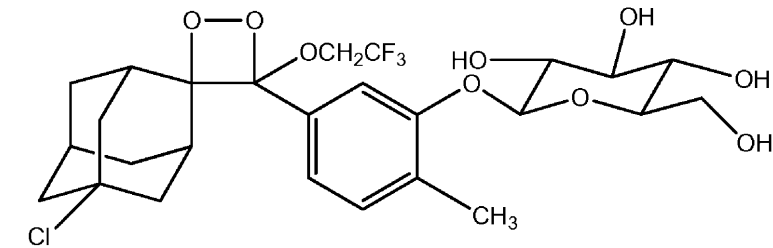
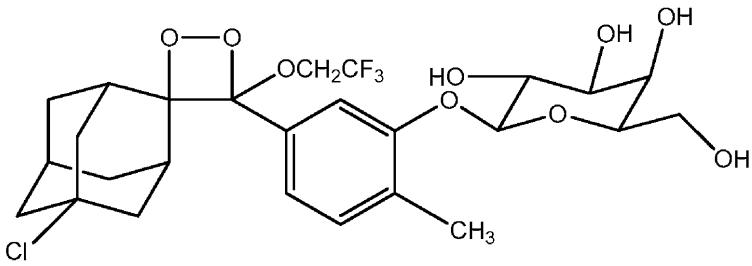
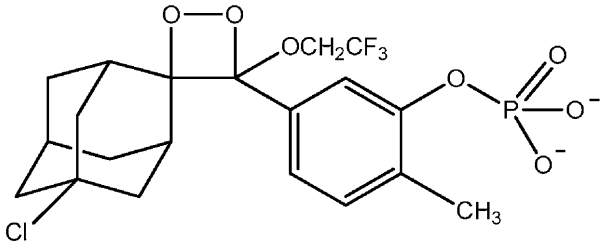
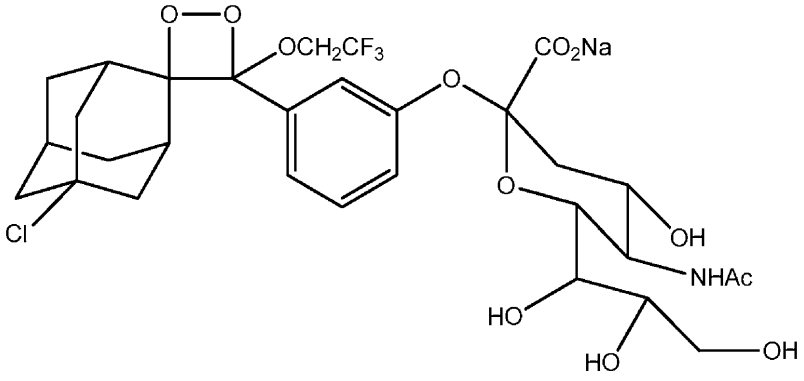
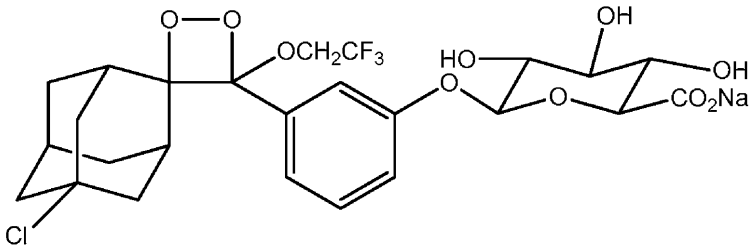


30



40

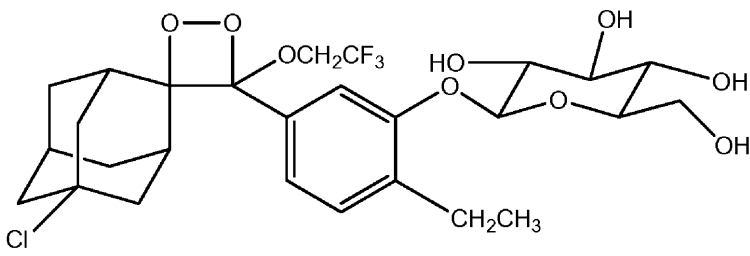
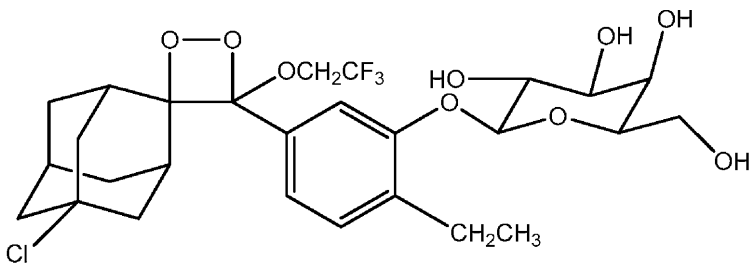
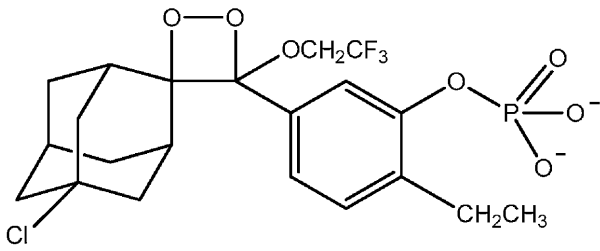
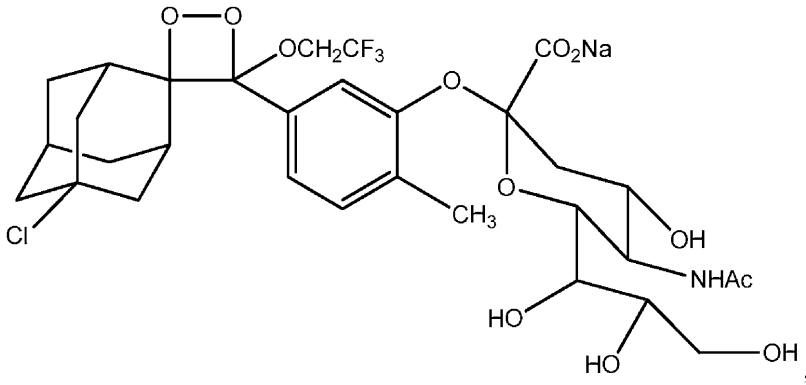
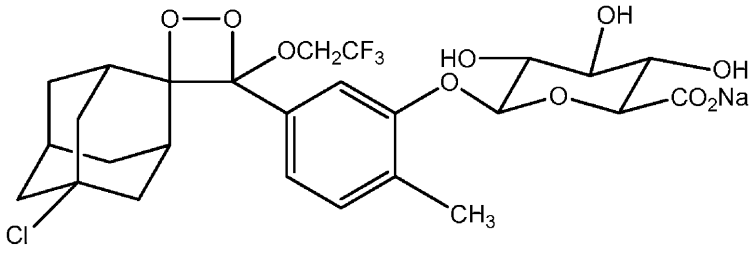




10

20

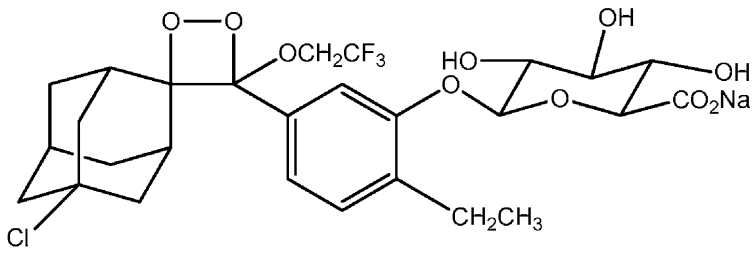
30



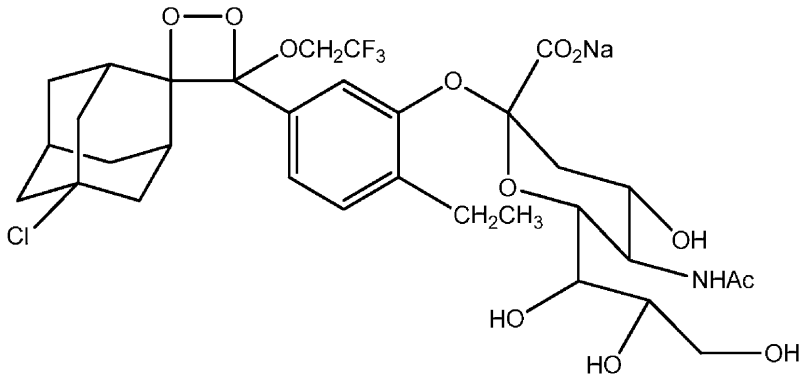
10

20

30



,または



10

である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

- ( a ) 請求項 1 に記載の化合物を提供する工程；
- ( b ) 該化合物を切断可能な酵素部分を含む酵素複合体を提供する工程；
- ( c ) 該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、
- ( d ) 該反応混合物に光を生成させる工程

20

を含む、光の生成方法。

【請求項 2 5】

2 5 での光の生成が約 1 5 分未満で最大に達する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記光の生成が約 1 0 分未満で最大に達する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 2 5 に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

3 7 での光の生成が約 1 5 分未満で最大に達する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記光の生成が約 1 0 分未満で最大に達する、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記酵素部分が加水分解酵素を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記加水分解酵素が、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、またはノイラミニダーゼである、請求項 3 1 に記載の方法

40

【請求項 3 3】

前記酵素部分が酵素である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記化合物の添加後に前記反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み、該光の生成が前記酵素の存在を示し、該生成された光の量が試料中に存在する該酵素の量に相関し得、2 5 ~ 3 7 での該光の生成が約 1 5 分未満で最大に達する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

50

前記光の生成が約 10 分未満で最大に達する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記酵素部分が、抗原に結合可能な第 1 の抗体と、基質が分解されて光を生成するように前記化合物を切断可能な酵素とを含む酵素結合抗体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 1 の抗体が、前記酵素に共有結合または非共有結合で結合されている、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 1 の抗体が、標識に共有結合で結合されており、前記酵素が、該標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記標識がビオチンまたはビオチン誘導体であり、前記分子がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記標識がハプテンであり、前記分子がハプテンに結合可能な抗体である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

(a) 抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；

(b) 該抗原に結合可能な第 2 の抗体を含む固相を提供する工程；

(c) 該試料および酵素結合抗体を該固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；  
ならびに

(d) 前記化合物の添加後に前記反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、該生成された光の量が該試料中に存在する該抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約 15 分未満で最大に達する、工程をさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

前記光の生成が約 10 分未満で最大に達する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記光の生成が約 5 分未満で最大に達する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

未結合の酵素結合抗体を酵素複合体から除去する工程をさらに含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

前記酵素部分が、抗原と、前記化合物が分解されて光を生成するように前記化合物を切断可能な酵素とを含む、酵素結合抗原である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 47】

前記抗原が前記酵素に共有結合または非共有結合で結合されている、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

抗原が標識に共有結合で結合されており、前記酵素が、該標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合されている、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記標識がビオチンまたはビオチン誘導体であり、前記分子がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記標識がハプテンであり、前記分子がハプテンに結合可能な抗体である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

10

20

30

40

50

( a ) 抗原を含む疑いのある試料を提供する工程 ;  
 ( b ) 該抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程 ;  
 ( c ) 該試料および酵素結合抗原を該固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程 ;  
 ならびに

( d ) 前記化合物の添加後に前記反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、該生成された光の量が、該試料中に存在する該抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約15分未満で最大に達する、工程をさらに含む、請求項46に記載の方法。

【請求項52】

前記光の生成が約10分未満で最大に達する、請求項51に記載の方法。

10

【請求項53】

前記光の生成が約5分未満で最大に達する、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

未結合の酵素結合抗原を酵素複合体から除去する工程をさらに含む、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

前記酵素部分が、核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、化合物が分解されて光を生成するように該化合物を切断可能な酵素とを含む酵素結合オリゴヌクレオチドである、請求項32に記載の方法。

【請求項56】

前記オリゴヌクレオチドが前記酵素に共有結合または非共有結合で結合されている、請求項55に記載の方法。

20

【請求項57】

オリゴヌクレオチドが標識に共有結合で結合されており、前記酵素が、該標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合されている、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記標識がビオチンまたはビオチン誘導体であり、前記分子がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記標識がハプテンであり、前記分子がハプテンに結合可能な抗体である、請求項57に記載の方法。

30

【請求項60】

( a ) 核酸を含む疑いのある試料を提供する工程 ;  
 ( b ) 該核酸を固相に固定化する工程、  
 ( c ) 固定化された該核酸と酵素結合オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程 ; ならびに

( d ) 前記化合物の添加後に前記反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該核酸の存在を示し、該生成された光の量が試料中に存在する核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約15分未満で最大に達する工程をさらに含む、請求項55に記載の方法。

40

【請求項61】

前記光の生成が約10分未満で最大に達する、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

前記光の生成が約5分未満で最大に達する、請求項60に記載の方法。

【請求項63】

未結合の酵素結合オリゴヌクレオチドを酵素複合体から除去する工程をさらに含む、請求項60に記載の方法。

【請求項64】

前記反応混合物が増強剤をさらに含む、請求項24に記載の方法。

【請求項65】

50

前記増強剤が、ポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

前記増強剤がアクセプター色素をさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記アクセプター色素が、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555である、請求項66に記載の方法。

10

【請求項68】

前記ポリマー性第四級アンモニウム塩が、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム)、ポリ[ビニルベンジル(塩化ベンジルジメチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリブチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム)]またはそれらの組み合わせである、請求項65に記載の方法。

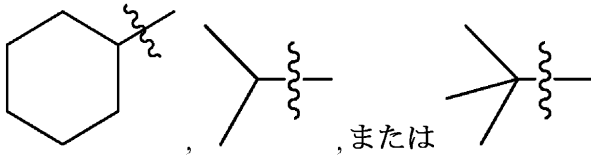
【請求項69】

前記ポリマー性第四級ホスホニウム塩が、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)とポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)とを含むコポリマー、またはそれらの組み合わせである、請求項65に記載の方法。

20

【請求項70】

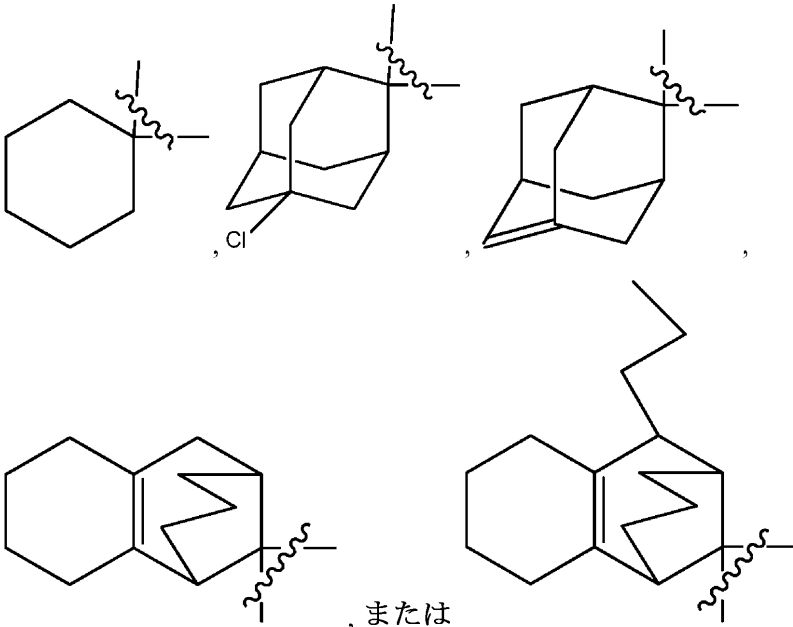
AまたはBのうちの少なくとも1つが、



である、請求項24に記載の方法。

【請求項71】

AおよびBが全体として、



30

40

である、請求項24に記載の方法。

【請求項72】

50



$R_1$  が、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルである、請求項24に記載の方法。

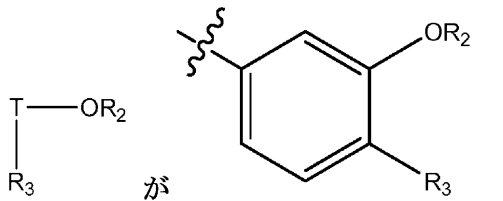
【請求項73】

$R_1$  が、1～2個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは1～2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルである、請求項24に記載の方法。

【請求項74】

$R_1$  が、メチルまたは1,1,1-トリフルオロエチルである、請求項73に記載の方法。

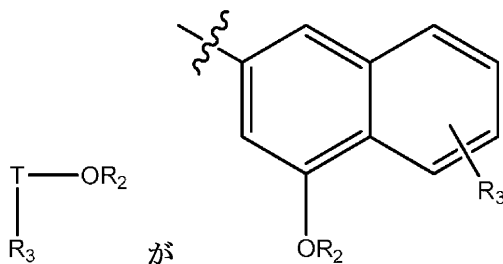
【請求項75】



10

である、請求項24に記載の方法。

【請求項76】



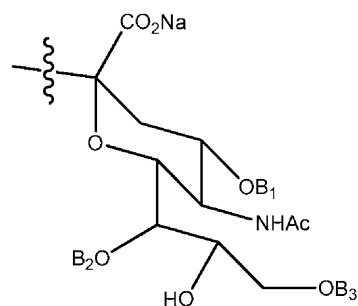
20

である、請求項24に記載の方法。

【請求項77】

$OR_2$  が、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $\alpha$ -D-ガラクトシド、 $\beta$ -D-ガラクトシド、 $\alpha$ -D-グルコシド、 $\beta$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -フルクトフラノシド、 $\beta$ -D-グルクロニド、または

30

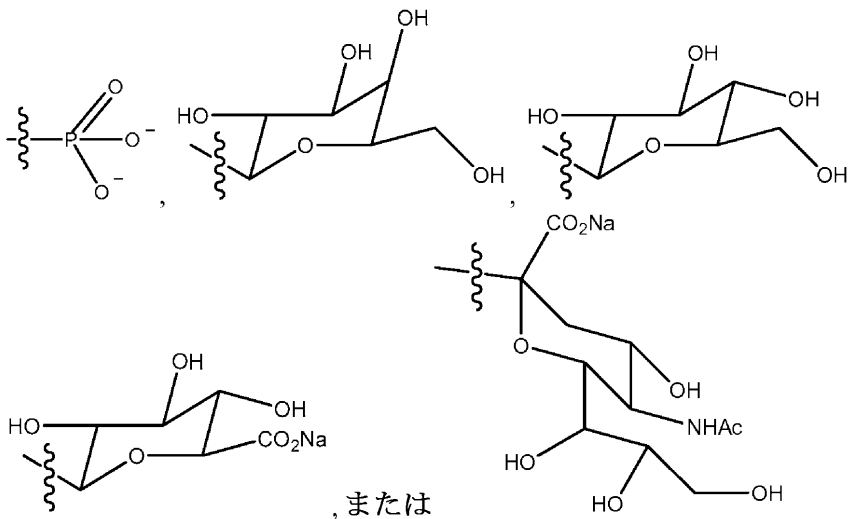


であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、H、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである、請求項24に記載の方法。

40

【請求項78】

$R_2$  が、



10

である、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

$R_2$  が E-L-Nuc-Z であり、式中、E は求電子性原子を含む基であり、該原子は、Z 基の酵素的切断に際して Nuc 基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し；L は連結基であり；Nuc は求核原子であり；かつ、Z は酵素により切断可能な基であり；式中、

20

E が、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

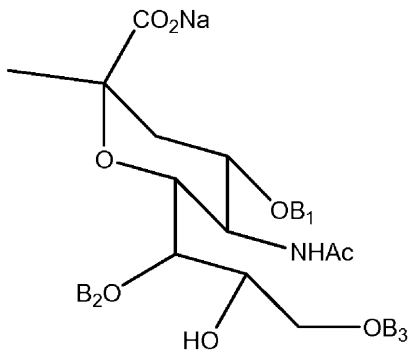
L が、1 ~ 4 個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または  $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、m および n は 0 ~ 3 であり、m + n は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1 ~ 10 個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1 ~ 24 個の炭素原子を含むアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含むアルケニル、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6 ~ 10 個の炭素を含むアリール、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または 2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

30

Nuc は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

Z は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または

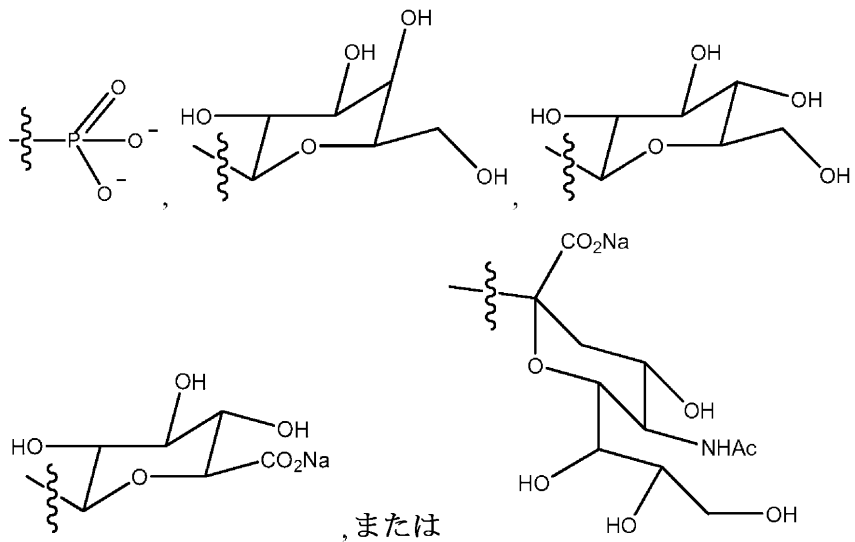
40



であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである、請求項24に記載の方法。

【請求項80】

Zが、



である、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記電子供与基が、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシ、または3～20個の炭素原子を含む分岐状アルコキシである、請求項24に記載の方法。

【請求項82】

前記電子供与基が、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシである、請求項24に記載の方法。

【請求項83】

前記電子供与基が、1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは1～5個の炭素原子を含む直鎖アルコキシである、請求項24に記載の方法。

【請求項84】

前記電子供与基が、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシまたはブチルオキシからなる群より選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項85】

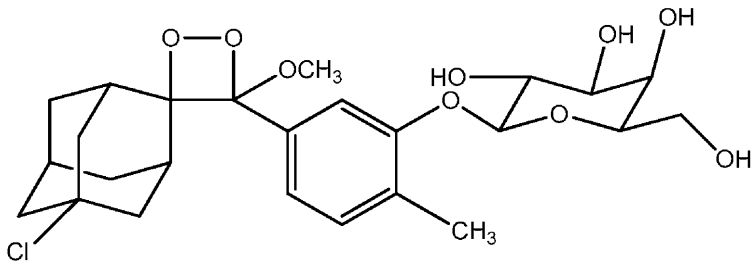
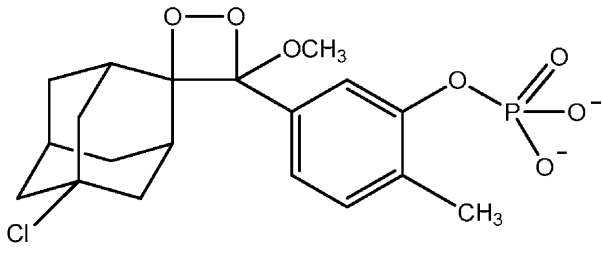
前記化合物が、

10

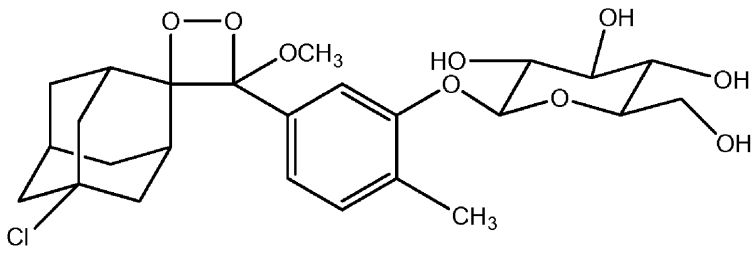
20

30

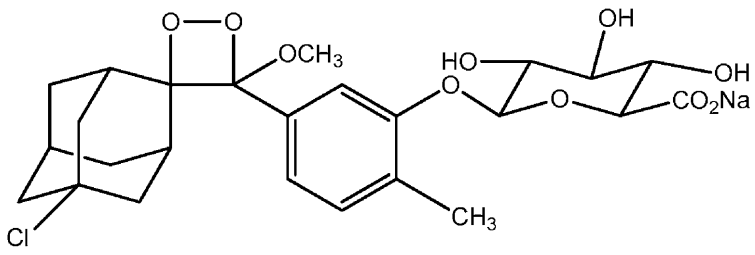
40

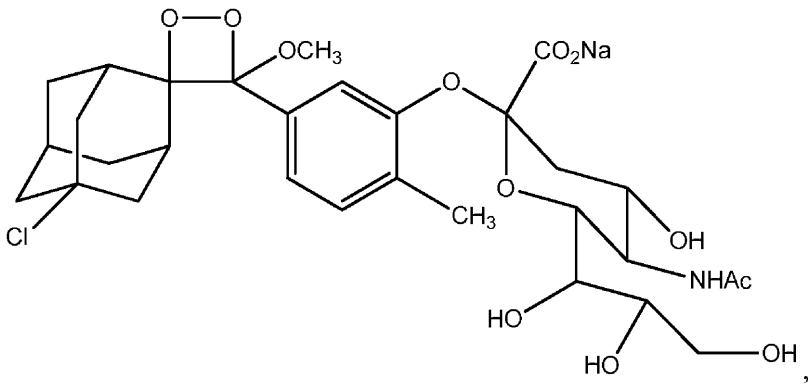


10

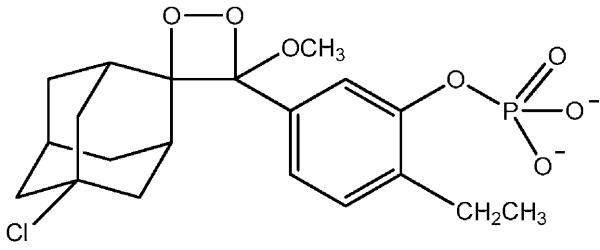


20

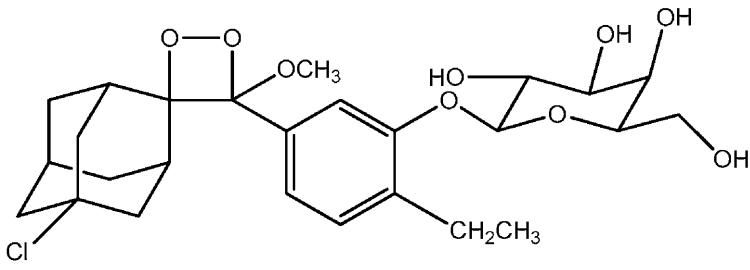




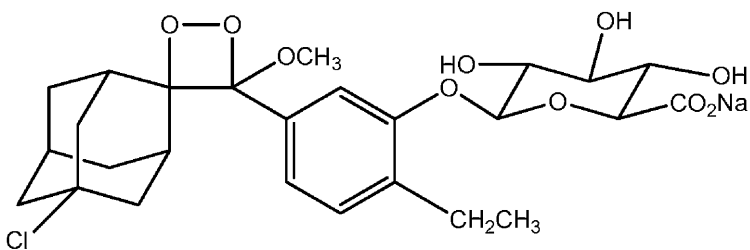
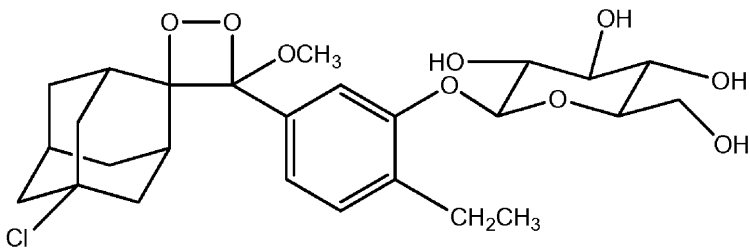
10

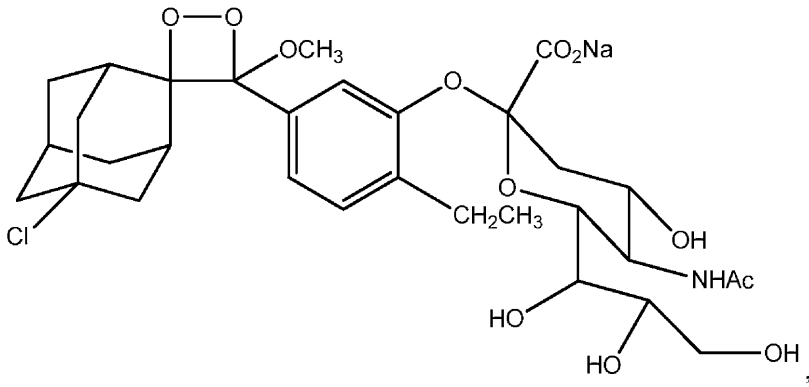


20

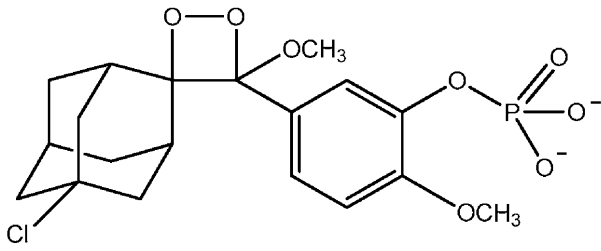


30

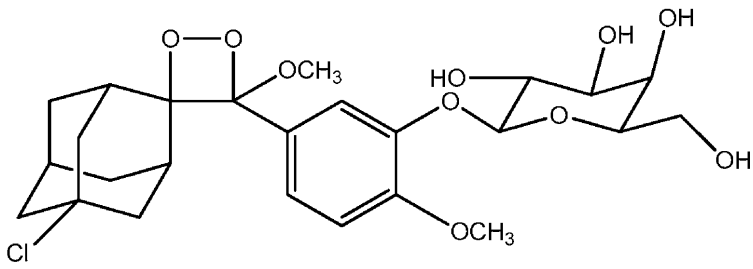




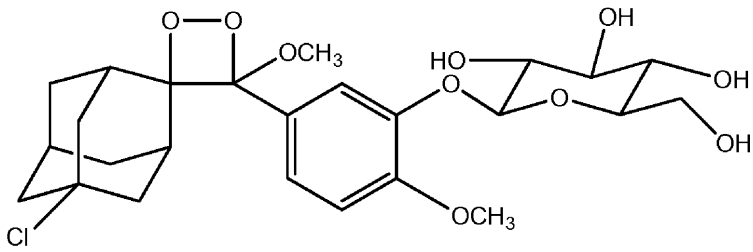
10

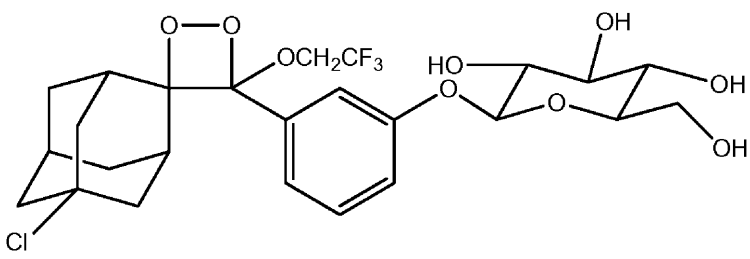
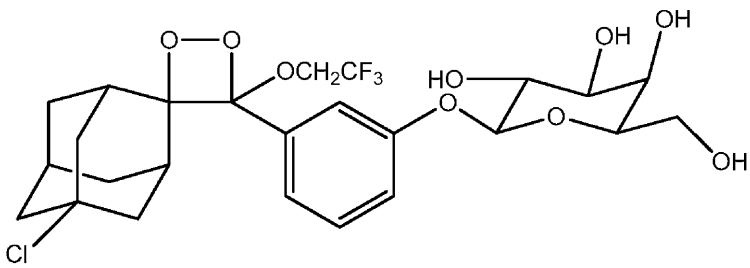
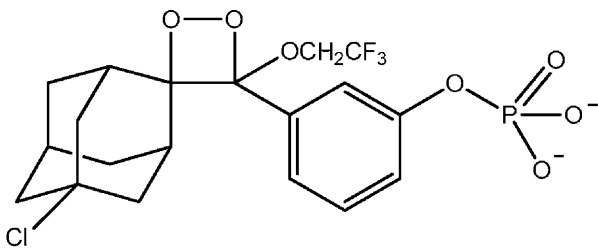
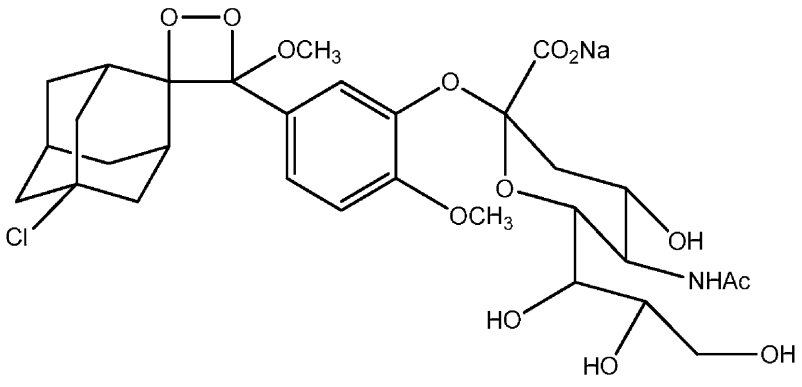
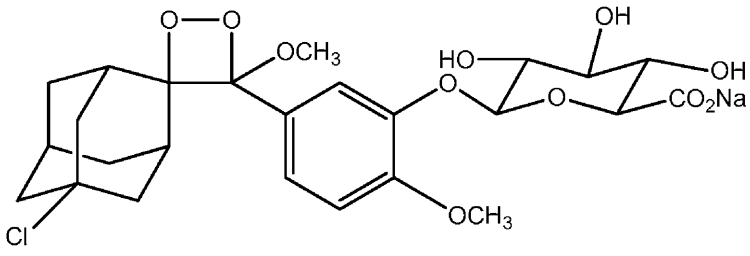


20



30

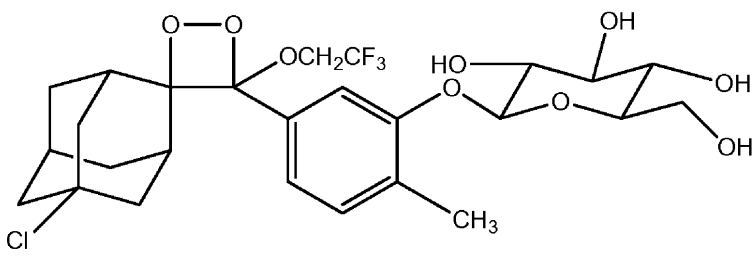
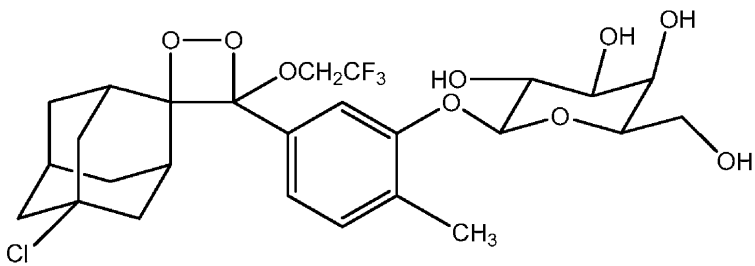
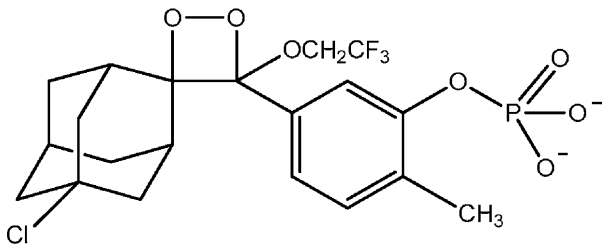
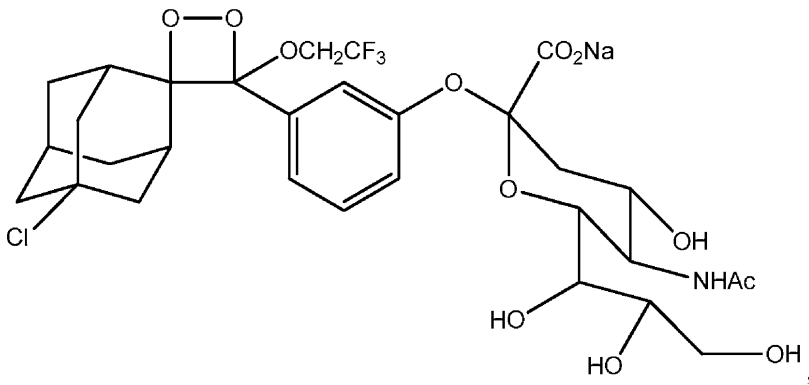
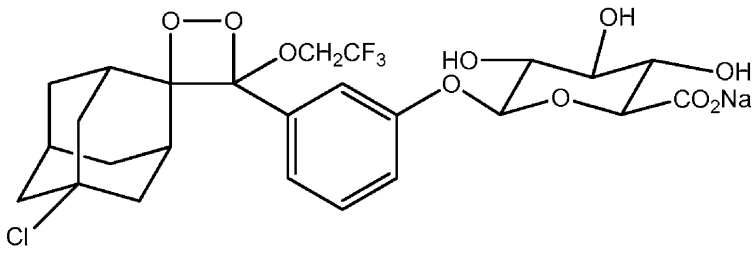




10

20

30

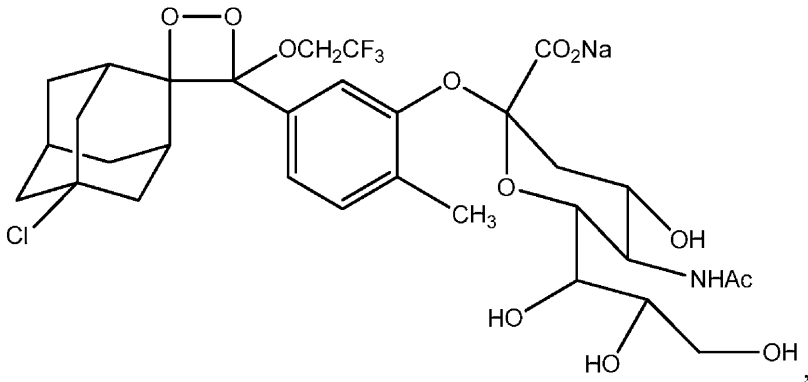
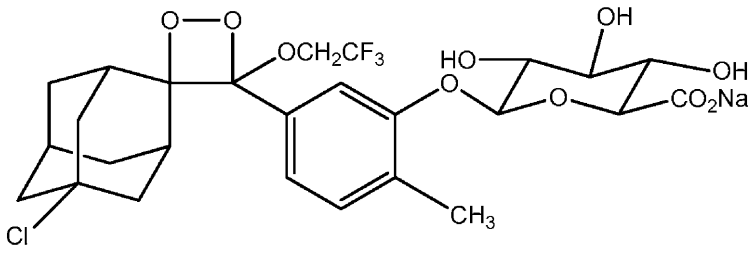


10

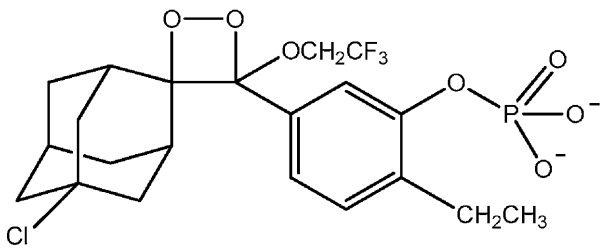
20

30

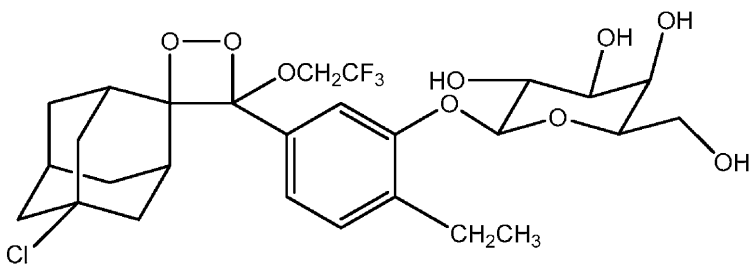




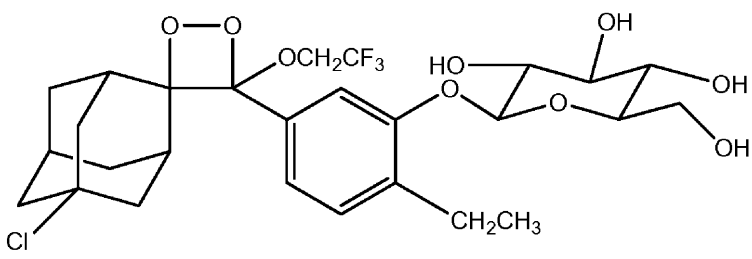
10

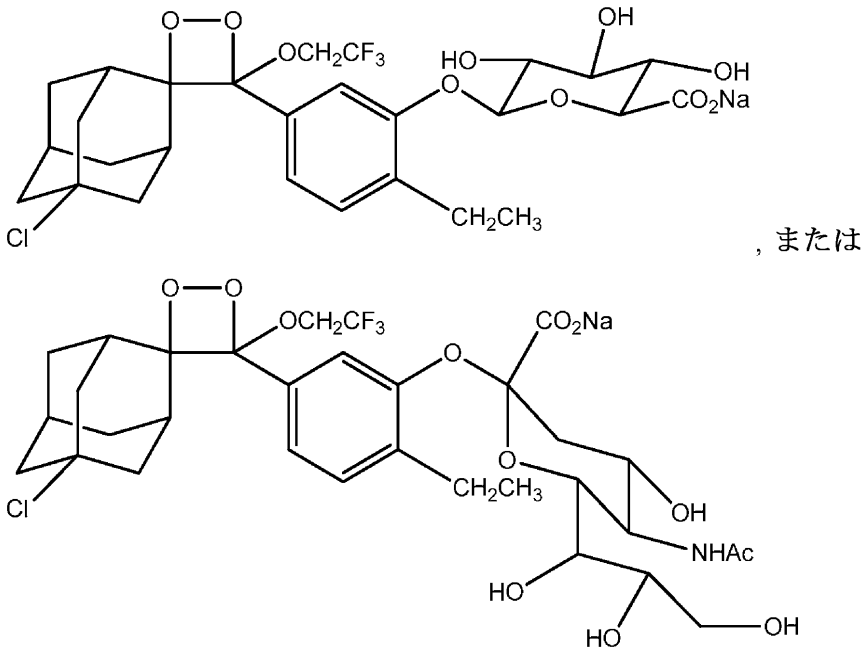


20



30





10

である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

- (a) 請求項 1 に記載の化合物を提供する工程；
- (b) 該化合物が分解されて光を生成するように該化合物を切断可能な酵素を含む疑いのある試料を提供する工程；
- (c) 該試料を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、
- (d) 該化合物の添加後に該反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該酵素の存在を示し、該生成された光の量が該試料中に存在する該酵素の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約 15 分未満で最大に達する、工程を含む、試料中の酵素の存在および / または量を決定するアッセイ方法。

20

【請求項 8 7】

- (a) 請求項 1 に記載の化合物を提供する工程；
- (b) 抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；
- (c) 該抗原と、該化合物が分解されて光を生成するように該化合物を切断することができる酵素とを含む、酵素結合抗原を提供する工程；
- (d) 該抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程；
- (e) 該試料および酵素結合抗原を該固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；
- (f) 該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、
- (g) 該化合物の添加後に該反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、該生成された光の量が該試料中に存在する該抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約 15 分未満で最大に達する、工程を含む、試料中の抗原の存在および / または量を決定するアッセイ方法。

30

【請求項 8 8】

- (a) 請求項 1 に記載の化合物を提供する工程；
- (b) 核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；
- (c) 該核酸を固相に固定化する工程；
- (d) 該核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、該化合物が分解されて光を生成するように該化合物を切断可能な酵素とを含む、酵素結合オリゴヌクレオチドを提供する工程；
- (e) 固定化された該核酸と該酵素結合オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程；
- (f) 該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、
- (g) 該化合物の添加後に該反応混合物により生成された光を検出する工程であって、

40

50

該光の生成が該核酸の存在を示し、該生成された光の量が該試料中に存在する該核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約15分未満で最大に達する、工程を含む、試料中の核酸の存在および/または量を決定するアッセイ方法。

【請求項89】

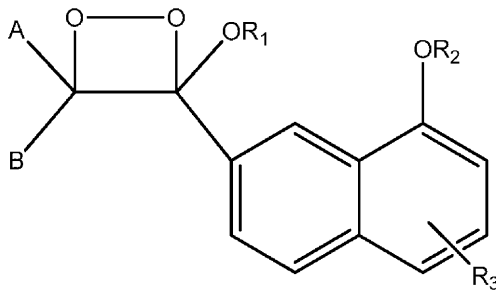
(a) 請求項1に記載の化合物、および

(b) 緩衝液

を含む、試料中の分析物の存在および/または量を検出するためのキット。

【請求項90】

以下の構造を有する化合物：



10

式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

20

R<sub>1</sub> は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

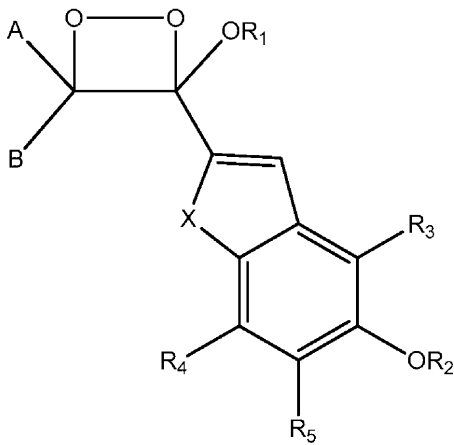
R<sub>2</sub> は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ

R<sub>3</sub> は、水素または電子供与基である。

30

【請求項91】

以下の構造を有する化合物：



10

式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび 4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

20

R<sub>1</sub> は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

R<sub>2</sub> は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；

30

R<sub>3</sub> は、水素または電子供与基であり；

R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> は独立して、H、F、Cl、Br、I、シアノ、ニトロ、スルホネート、サルフェート、トリフルオロメチル、トリフルオロエチル、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニル、1 ~ 20 個の炭素原子を含むアルコキシ、6 ~ 14 個の炭素原子を含むアリール、6 ~ 14 個の炭素原子を含むアリールオキシ、2 ~ 21 個の炭素原子を含むエステル、3 ~ 30 個の炭素原子を含むトリアルキルアンモニウム、3 ~ 30 個の炭素原子を含むトリアルキルホスホニウム、2 ~ 21 個の炭素原子を含むアルキルアミド、7 ~ 15 個の炭素原子を含むアリールアミド、2 ~ 21 個の炭素原子を含むアルキルカルバモイル、7 ~ 15 個の炭素原子を含むアリールカルバモイル、1 ~ 20 個の炭素原子を含むアルキルスルホンアミド、6 ~ 14 個の炭素原子を含むアリールスルホンアミド、3 ~ 60 個の炭素原子を含むトリアルキルシリル、18 ~ 42 個の炭素原子を含むトリアリールシリル、7 ~ 32 個の炭素原子を含むアルキルアリールシリル、1 ~ 20 個の炭素原子を含むアルキルアミドスルホニル、6 ~ 14 個の炭素原子

40

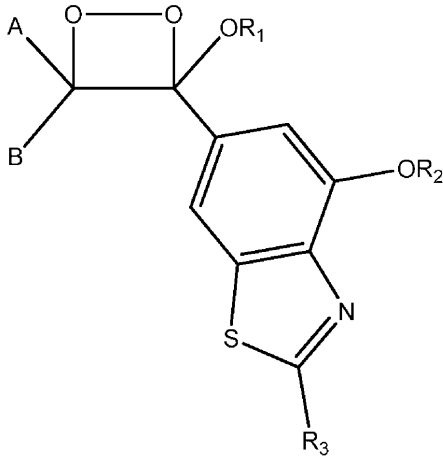
50

を含むアリールアミドスルホニル、1～20個の炭素原子を含むアルキルスルホニル、6～14個の炭素原子を含むアリールスルホニル、2～20個の炭素原子を含むアルキルチオおよび6～14個の炭素原子を含むアリールチオからなる群より選択され；かつ

Xは、硫黄原子、酸素原子、または窒素原子である。

【請求項92】

以下の構造を有する化合物：



10

式中、

20

AおよびBは独立して、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2～20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

30

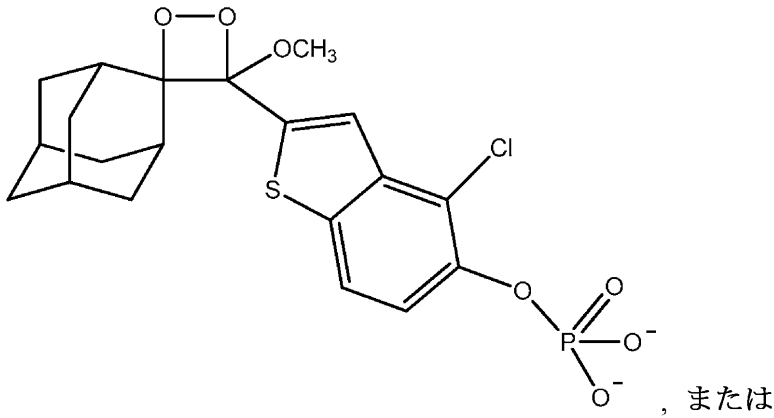
R<sub>1</sub>は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3～20個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

R<sub>2</sub>は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ

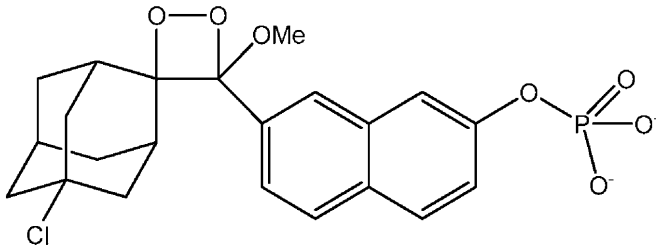
R<sub>3</sub>は、水素または電子供与基である。

【請求項93】

40



10



である化合物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、診断プラットフォームの検出試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

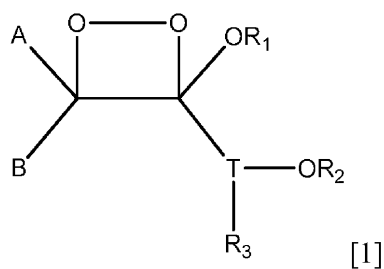
化学発光技術は、臨床診断プラットフォームにおける検出試薬として広範囲に使用されている。直接的な化学発光標識（アクリジニウムエステルまたはイソルミノール等）は、トリガー溶液添加後、速やかにフラッシュ化学発光信号を生成するため、検出時間が短い。酵素連結化学発光基質（1, 2-ジオキセタンまたはルミノール等）は、添加後のインキュベーション時間は長いが、超高感度検出および大きな基質試薬安定性を得られる。フラッシュ化学発光信号ならびに/または超高感度検出および大きな基質試薬安定性を得られる酵素基質が必要とされる。

30

【発明の概要】

【0003】

1つの態様では、本発明は、構造：



40

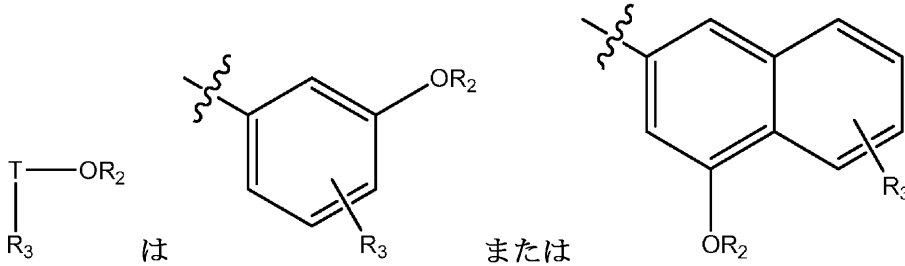
を有する化合物を提供するもので、

式中、AおよびBは独立して、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2~20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3~20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3~20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3~20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3~20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3~20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3~20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4~60個の炭素原

50

子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、またはAおよびBは一緒になって、ハロゲンにより置換されたポリシクロアルキルを形成し；

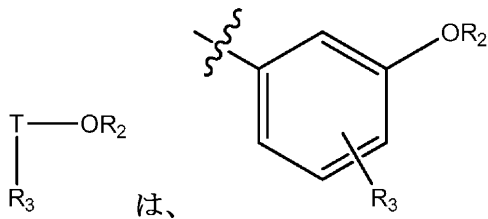
10



であり；

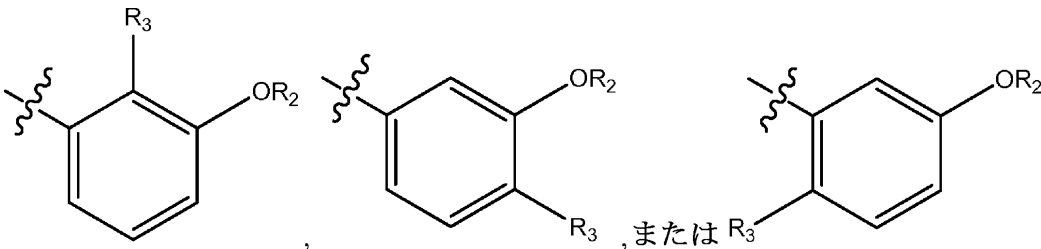
$R_1$  は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3～20個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり； $R_2$  は、T上に酸素アニオンを生じさせる酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ $R_3$  は、水素または電子供与基であり；ただし $R_1$  が置換されない場合、 $R_3$  は電子供与基であり；

20



30

である場合は

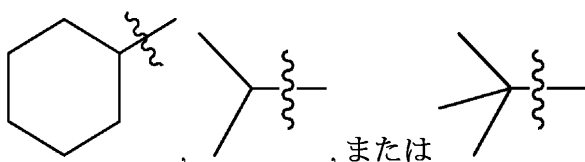


40

である。

【0004】

一部の実施形態では、AまたはBのうちの少なくとも1つは、

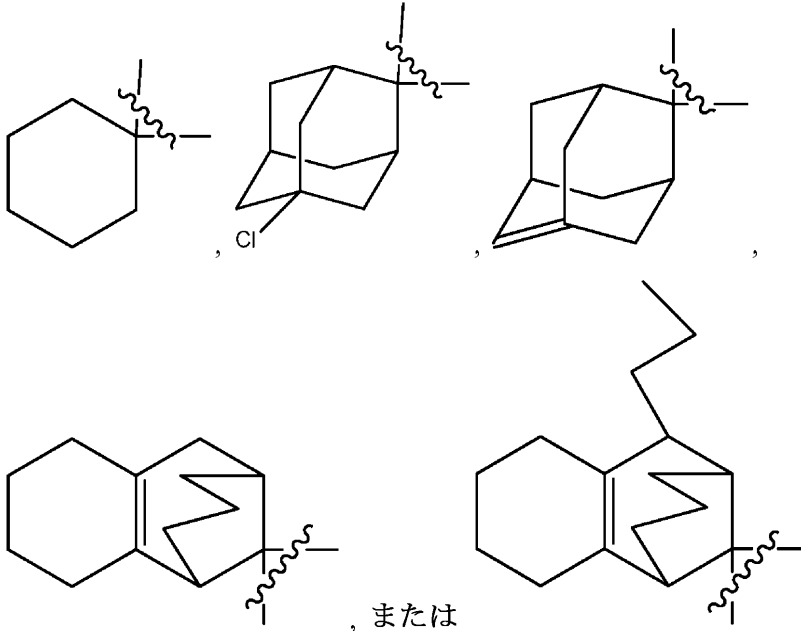


であり得る。

【0005】

50

一部の実施形態では、AおよびBは全体として、



10

であり得る。

【0006】

20

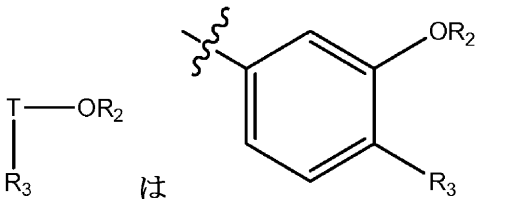
一部の実施形態では、R<sub>1</sub>は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

【0007】

一部の実施形態では、R<sub>1</sub>は、1~2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、R<sub>1</sub>は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

【0008】

一部の実施形態では、

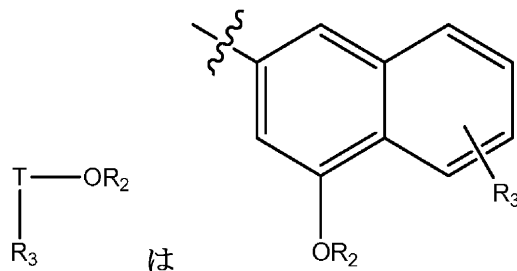


30

であり得る。

【0009】

一部の実施形態では、



40

であり得る。

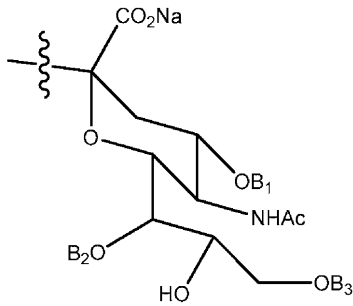
【0010】

一部の実施形態では、OR<sub>2</sub>は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、-D-ガラクトシド、-D-ガラクトシド、-D-グルコシド、-D-グルコシ

50

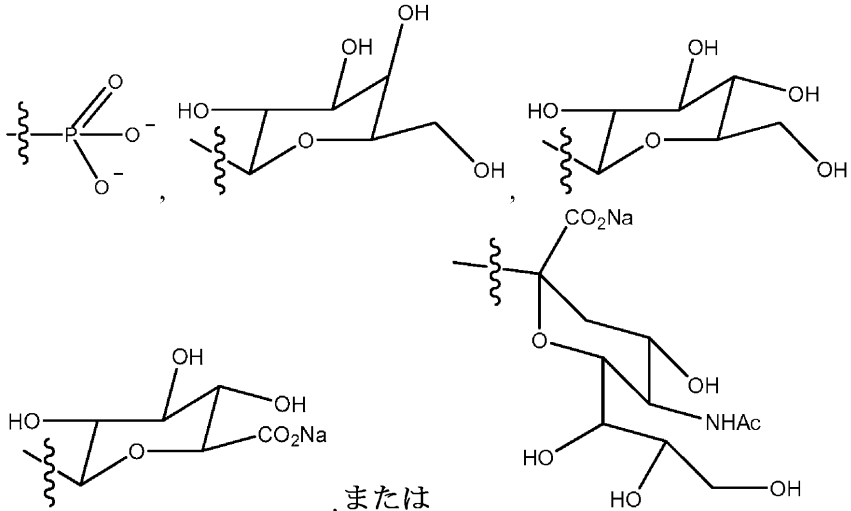


ド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -D-フルクトフラノシド、 $\beta$ -D-グルクロニド、または



10

であり得、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、H、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル（分岐状または直鎖）、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $R_2$  は、



20

であり得る。

【0011】

一部の実施形態では、 $R_2$  は、E-L-Nuc-Zであり得、式中、Eは求電子性原子を含む基であり、該原子は、Z基の酵素的切断に際してNuc基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し；Lは連結基であり；Nucは求核原子であり；Zは酵素により切断可能な基であり；式中

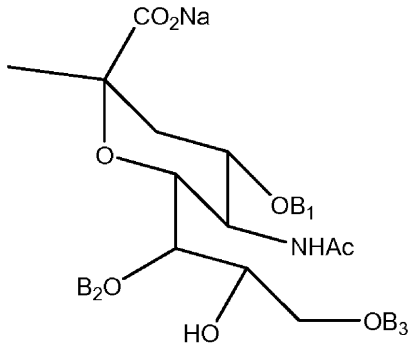
30

Eは、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；Lは、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、mおよびnは0～3であり、m+nは2または3であり、式中、 $R_6$  は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；Nucは酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ、Zは、ホス

40

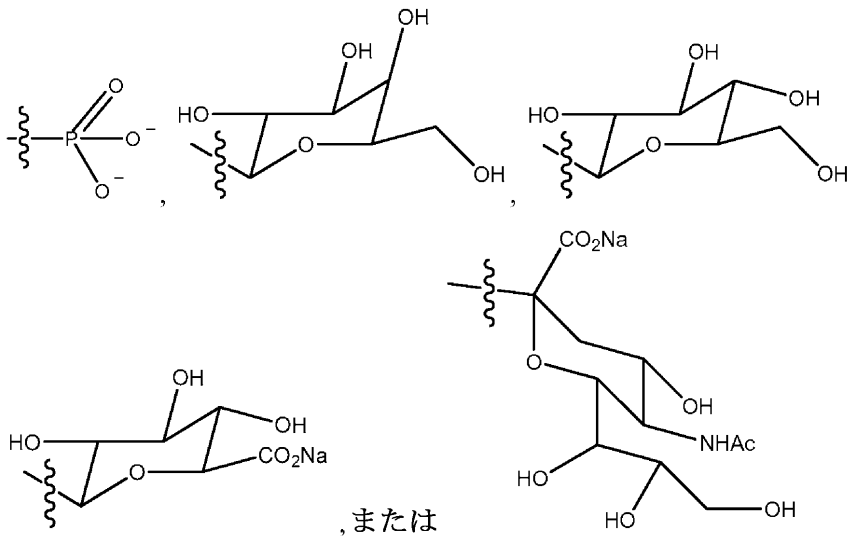
50

ホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、 $\alpha$ -D-ガラクトシル、 $\beta$ -D-ガラクトシル、 $\alpha$ -D-グルコシル、 $\beta$ -D-グルコシル、 $\alpha$ -D-マンノシル、 $\beta$ -D-マンノシル、 $\alpha$ -フルクトフラノシル、 $\beta$ -D-グルコシドウランシル (glucosiduransyl)、または



10

であり、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1~4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3~6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$  は、



20

30

であり得る。

【0012】

一部の実施形態では、電子供与基は、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても3~20個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても1~20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても3~20個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

【0013】

一部の実施形態では、電子供与基は、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

40

【0014】

一部の実施形態では、電子供与基は、1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~5個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0015】

一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択され得る。

【0016】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、25で光が生成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満

50

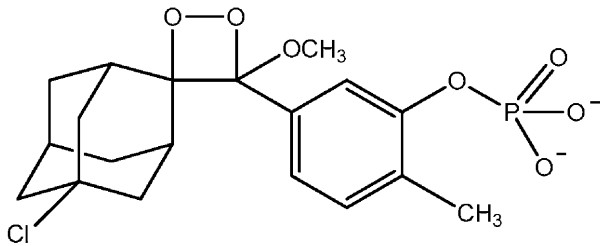
で最大に達し得る。

【0017】

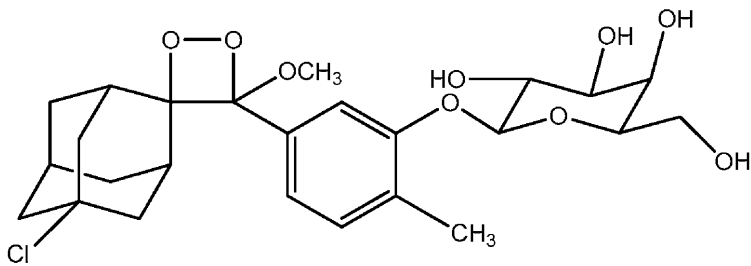
一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、37 で光が生成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0018】

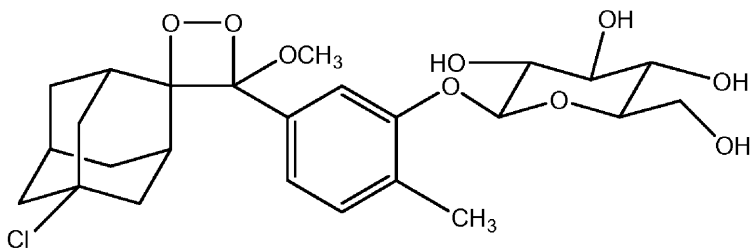
一部の実施形態では、化合物は、



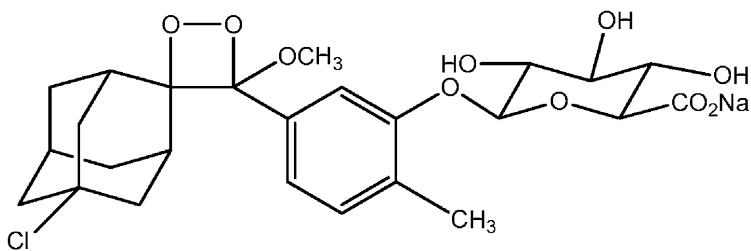
10



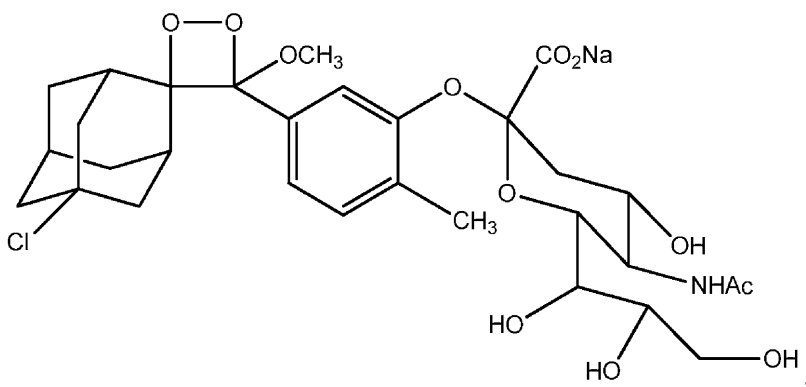
20

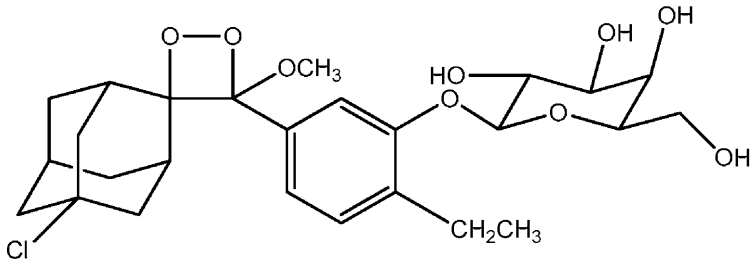
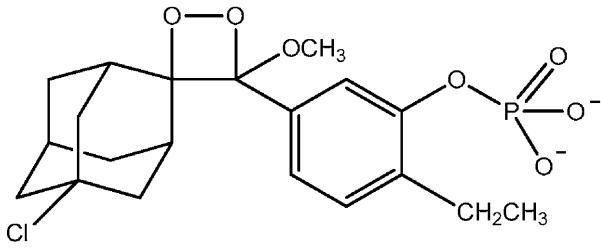


30

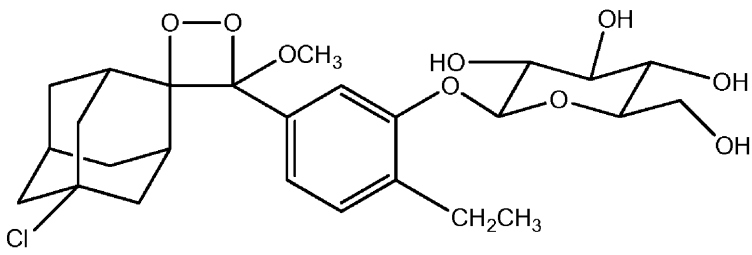


40

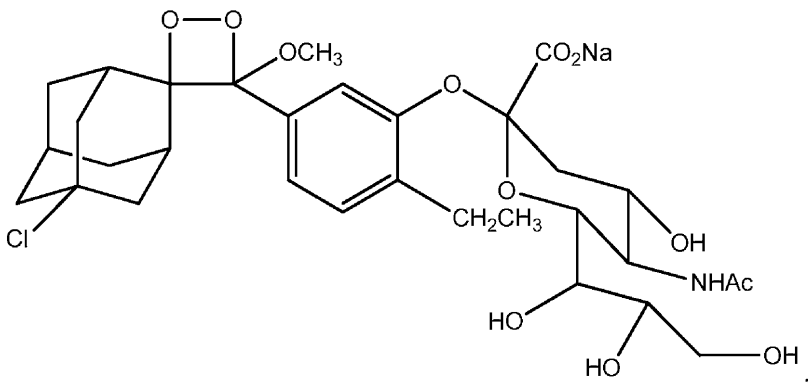
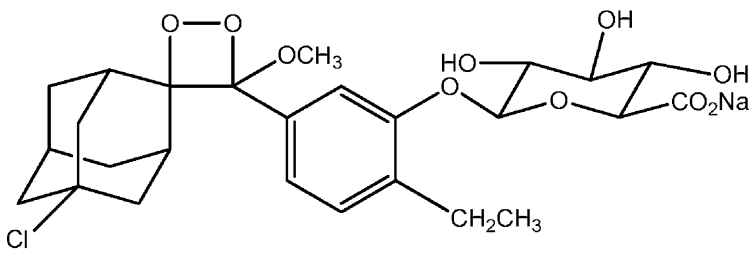




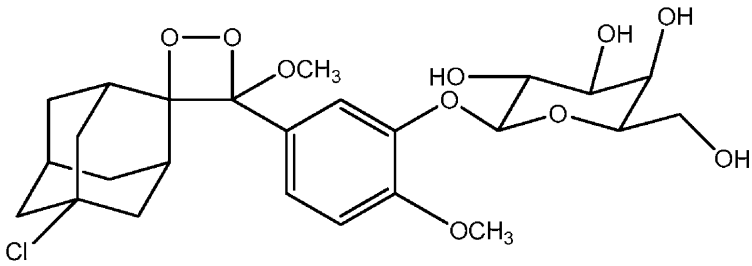
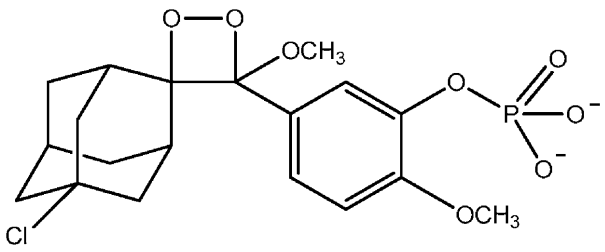
10



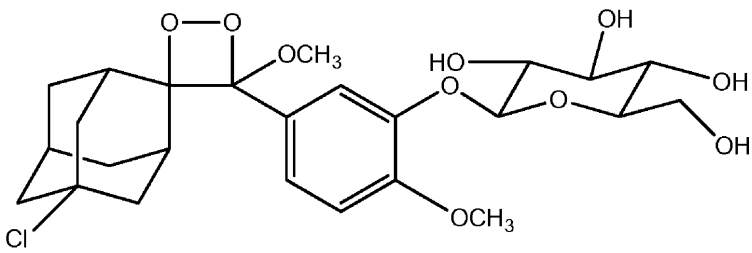
20



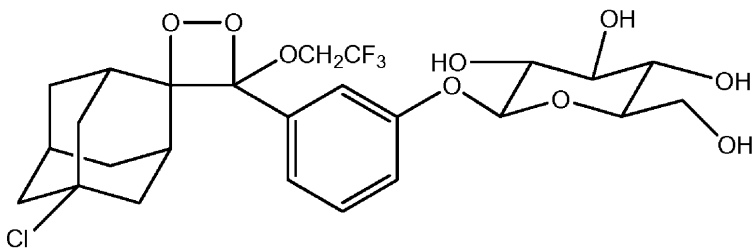
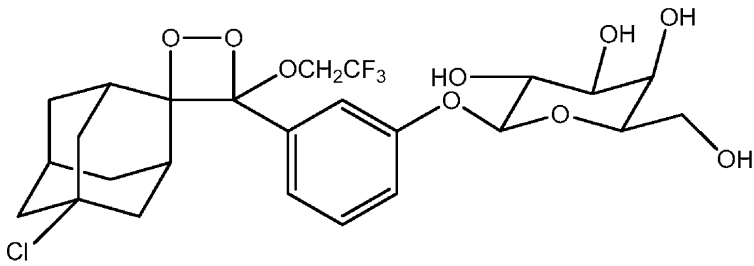
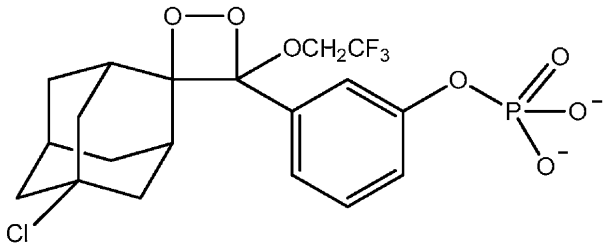
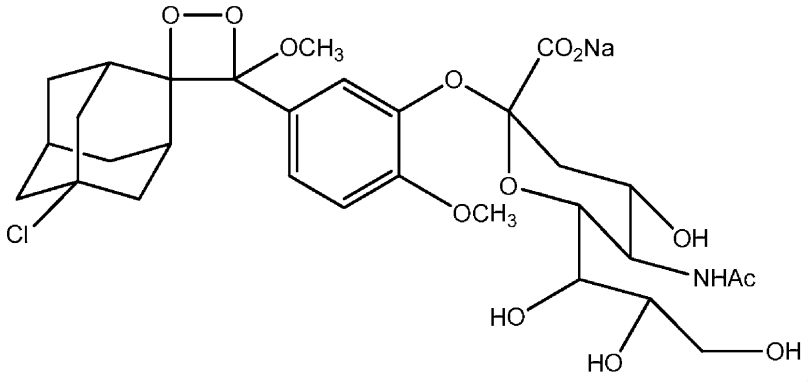
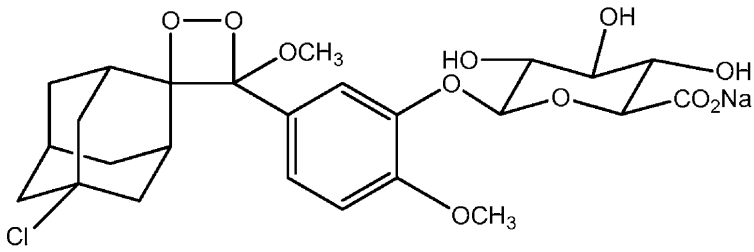
30



10



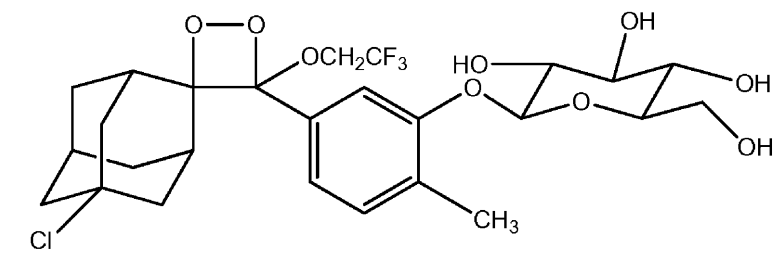
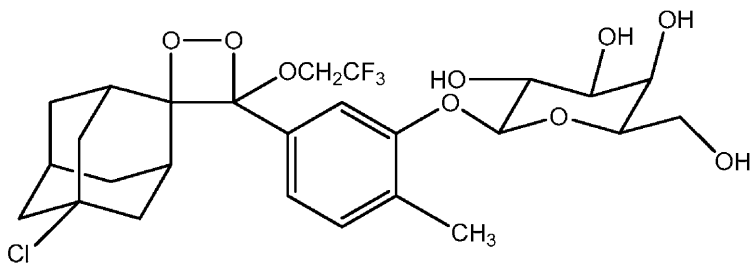
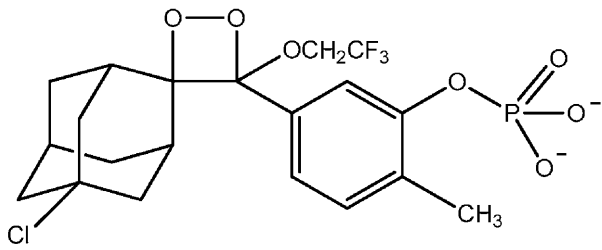
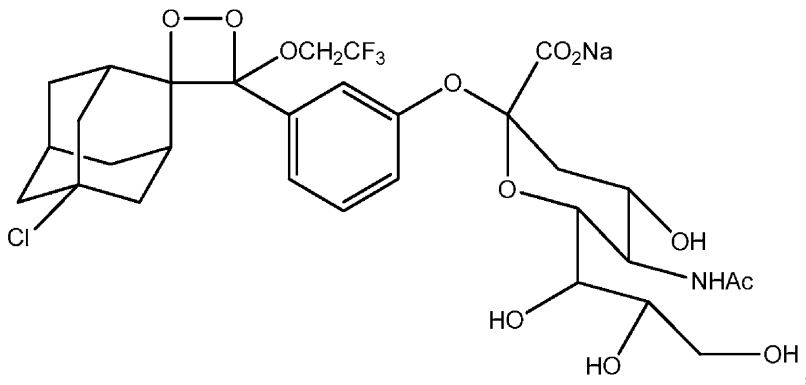
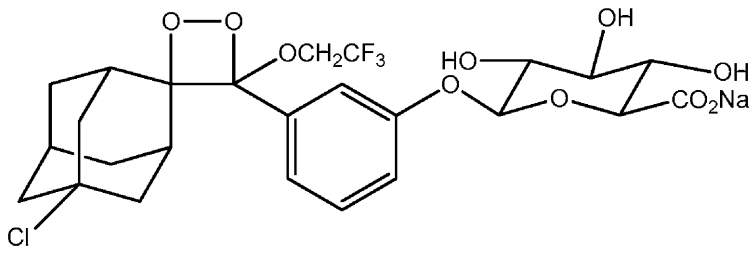
20



10

20

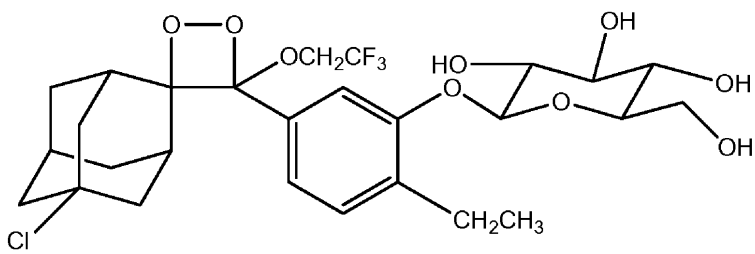
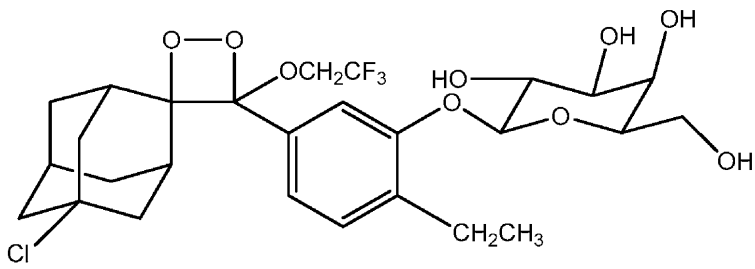
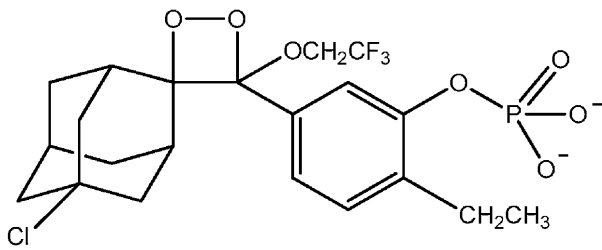
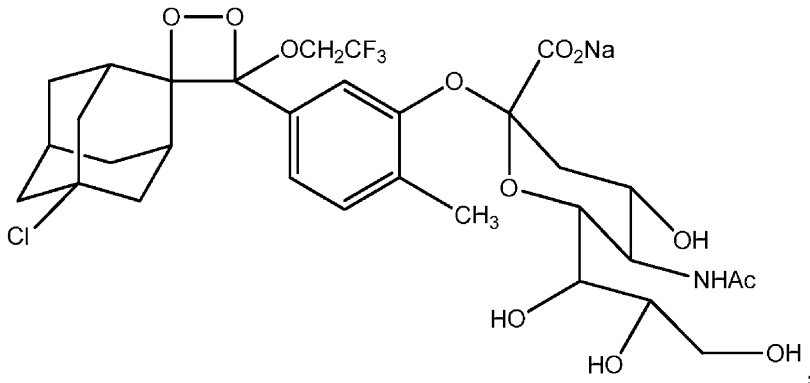
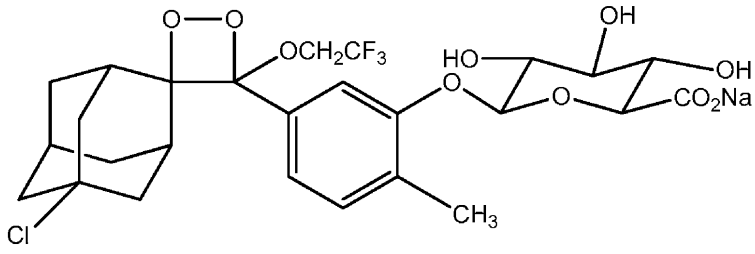
30



10

20

30

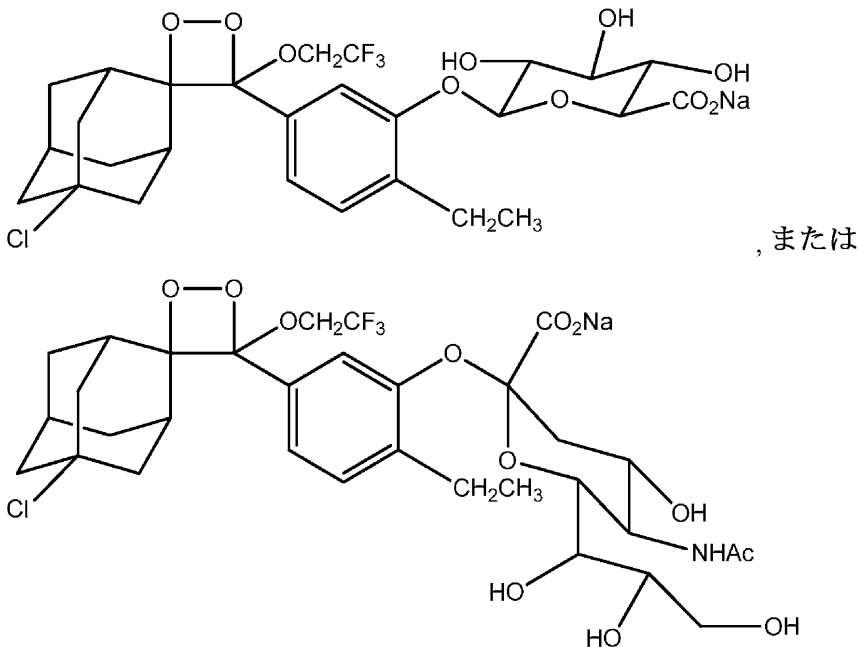


10

20

30





10

であり得る。

【0019】

別の態様では、本発明は、化合物[1]を提供する工程；該化合物を切断可能な酵素部分を含む酵素複合体を提供する工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、該反応混合物に光を生成させる工程を含む光の生成方法を提供する。

20

【0020】

一部の実施形態では、25での光の生成は、約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0021】

一部の実施形態では、37での光の生成は、約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

30

【0022】

一部の実施形態では、酵素部分は、加水分解酵素を含み得る。これらの実施形態の一部では、加水分解酵素は、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼまたはノイラミニダーゼであり得る。

【0023】

一部の実施形態では、酵素部分は、酵素であり得る。

【0024】

これらの実施形態の一部では、方法は、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み得、光の生成は酵素の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する酵素の量に相関し得、25～37での光の生成は約15分未満で最大に達するものとする。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

40

【0025】

一部の実施形態では、酵素部分は、抗原に結合可能な第1の抗体と、基質が分解されて光を生成するように該化合物を切断可能な酵素とを含む、酵素結合抗体であり得る。

【0026】

これらの実施形態の一部では、第1の抗体は酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、第1の抗体は標識に共有結合で結合され得、酵素は標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合される。これらの実

50

施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい；一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。

【0027】

これらの実施形態の一部では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な第2の抗体を含む固相を提供する工程；試料および酵素結合抗体を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み得、光の生成は、抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達するものとする。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

10

【0028】

これらの実施形態の一部では、方法は、未結合の酵素結合抗体を酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。

【0029】

一部の実施形態では、酵素部分は、抗原と、化合物が分解されて光を生成するように化合物を切断可能な酵素とを含む、酵素結合抗原であり得る。

【0030】

これらの実施形態の一部では、抗原は、酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、抗原は、標識に共有結合で結合され得、酵素は、標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合される。これらの実施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンまたはストレプトアビジンである；一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体である。

20

【0031】

一部の実施形態では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程；試料および酵素結合抗原を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み得、光の生成は、抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達するものとする。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

30

【0032】

これらの実施形態の一部では、方法は、酵素複合体から未結合の酵素結合抗原を除去する工程をさらに含み得る。

【0033】

一部の実施形態では、酵素部分は、核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドおよび化合物が分解されて光を生成するように化合物を切断可能な酵素を含む酵素結合オリゴヌクレオチドであり得る。

40

【0034】

これらの実施形態の一部では、オリゴヌクレオチドは、酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、オリゴヌクレオチドは、標識に共有結合で結合され得、酵素は、標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合される。これらの実施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンまたはストレプトアビジンである；一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体である。

【0035】

これらの実施形態の一部では、方法は、核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；核酸を固相に固定化する工程、固定化された核酸と酵素結合オリゴヌクレオチドを接触させ

50

て酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該核酸の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0036】

これらの実施形態の一部では、方法は、未結合の酵素結合オリゴヌクレオチドを酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。

【0037】

一部の実施形態では、反応混合物は、増強剤をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。これらの実施形態の一部では、ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム）、ポリ〔ビニルベンジル（塩化ベンジルジメチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリブチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム）〕またはそれらの組み合わせであり得る；一方、他の実施形態では、ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）とポリ（塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム）とを含むコポリマー、またはそれらの組み合わせであり得る。

10

20

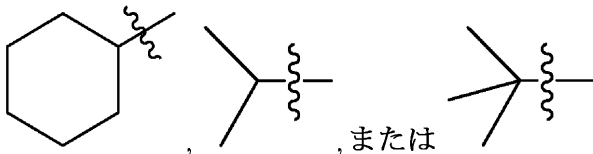
【0038】

これらの実施形態の一部では、増強剤はアクセプター色素をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、アクセプター色素は、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555であり得る。

【0039】

一部の実施形態では、AまたはBのうちの少なくとも1つは、

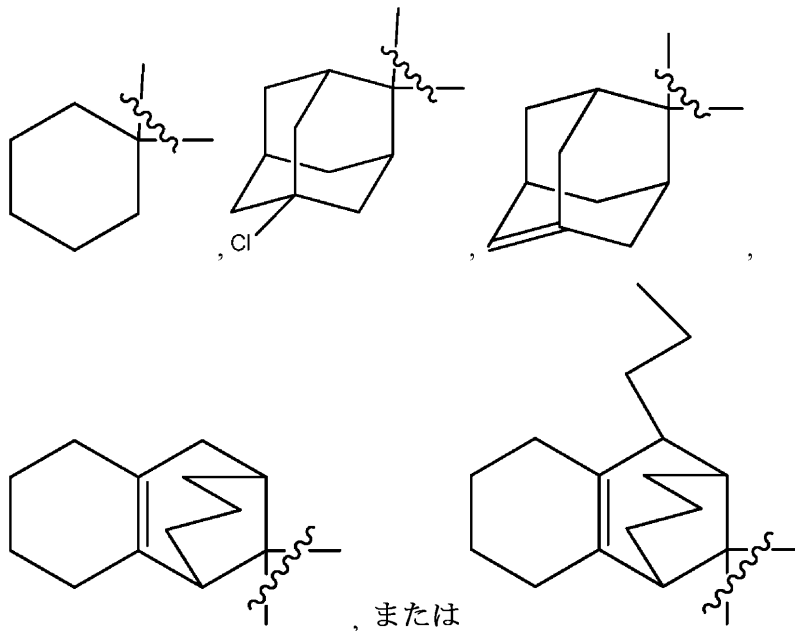
30



であり得る。

【0040】

一部の実施形態では、AおよびBは全体として、



10

であり得る。

【0041】

一部の実施形態では、 $R_1$ は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

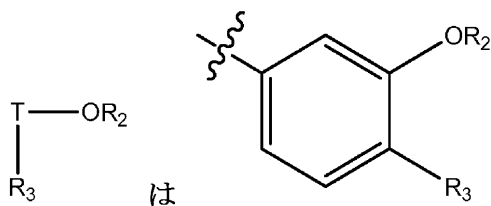
20

【0042】

一部の実施形態では、 $R_1$ は、1～2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1～2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、 $R_1$ は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

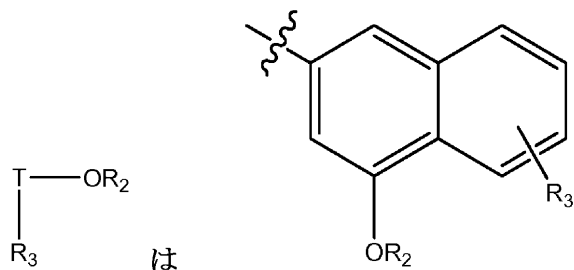
【0043】

一部の実施形態では、



30

であり得る；一方、他の実施形態では、

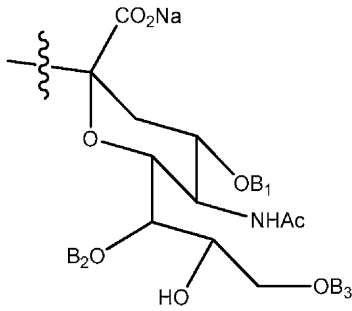


40

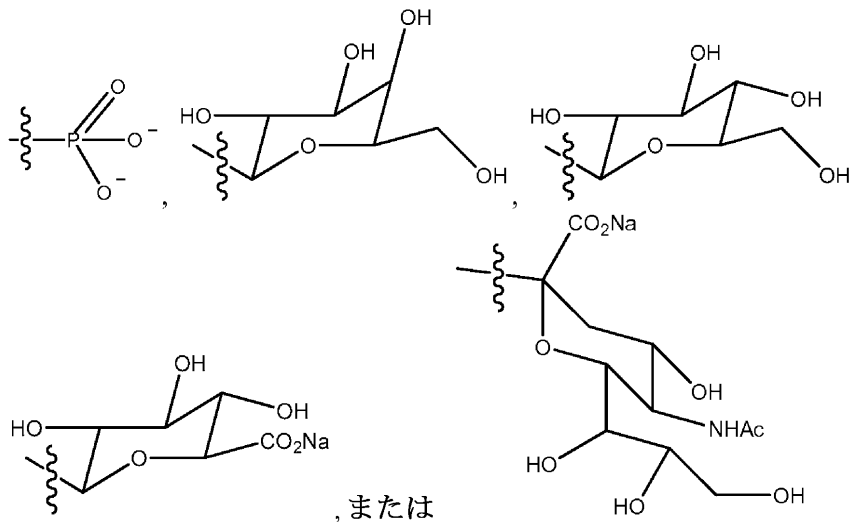
であり得る。

【0044】

一部の実施形態では、 $OR_2$ は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $-D$ -ガラクトシド、 $-D$ -ガラクトシド、 $-D$ -グルコシド、 $-D$ -グルコシド、 $-D$ -マンノシド、 $-D$ -マンノシド、 $-D$ -フルクトフラノシド、 $-D$ -グルクロニド、または



であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $R_2$  は、



であり得る。

一部の実施形態では、 $R_2$  は、 $E-L-Nuc-Z$  であり得、式中、 $E$  は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$  基の酵素的切断に際して  $Nuc$  基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$  は連結基であり； $Nuc$  は求核原子であり； $Z$  は酵素により切断可能な基であり；式中

$E$  は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサントート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

$L$  は、1 ~ 4 個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または  $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、 $m$  および  $n$  は 0 ~ 3 であり、 $m+n$  は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1 ~ 10 個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1 ~ 24 個の炭素原子を含むアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含むアルケニル、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつ 1 ~ 24 個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6 ~ 10 個の炭素を含むアリール、1 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または 2 ~ 24 個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

$Nuc$  は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

10

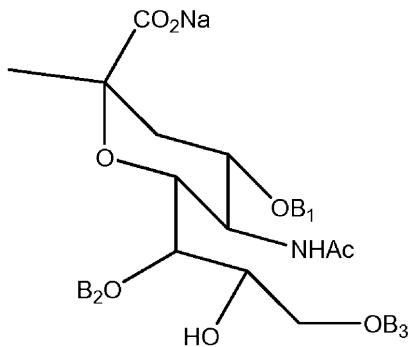
20

30

40

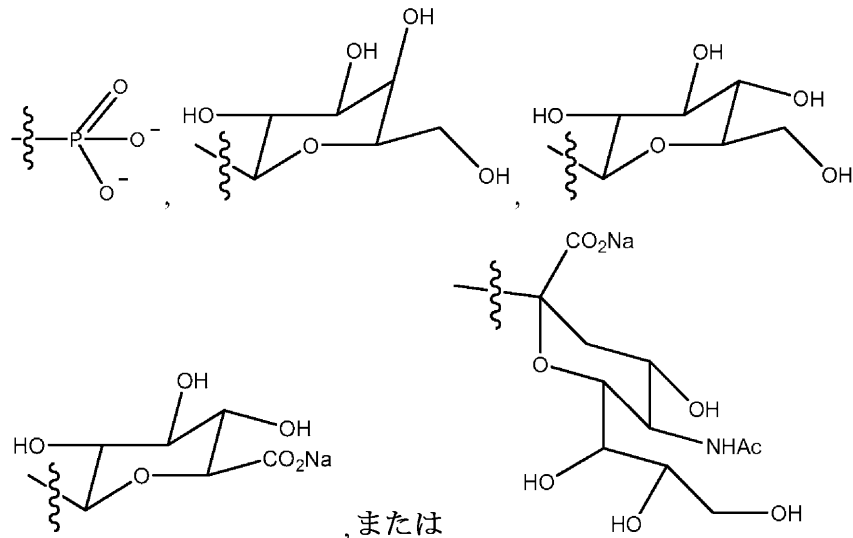
50

Zは、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または



10

であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1~4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3~6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、Zは、



20

30

であり得る。

【0045】

一部の実施形態では、電子供与基は、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても3~20個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても1~20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても3~20個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

【0046】

一部の実施形態では、電子供与基は、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

40

【0047】

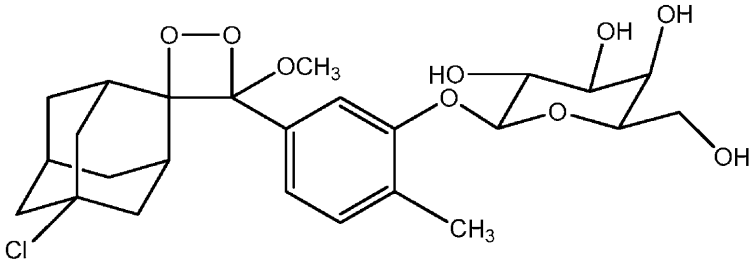
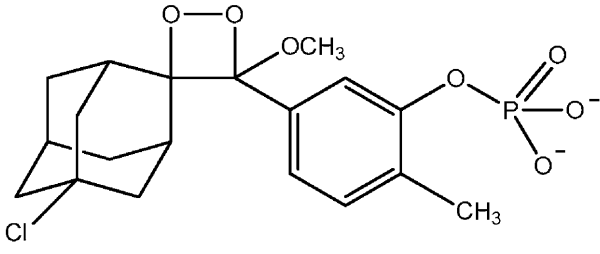
一部の実施形態では、電子供与基は、1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~5個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0048】

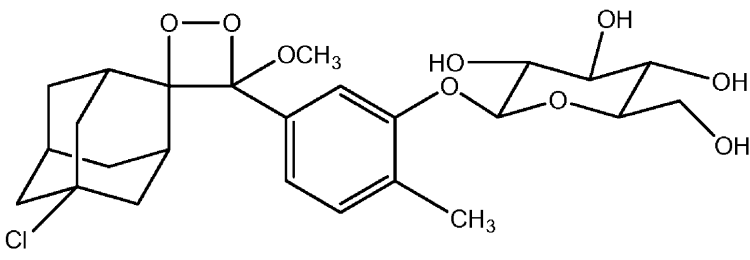
一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシまたはブチルオキシからなる群より選択され得る。

【0049】

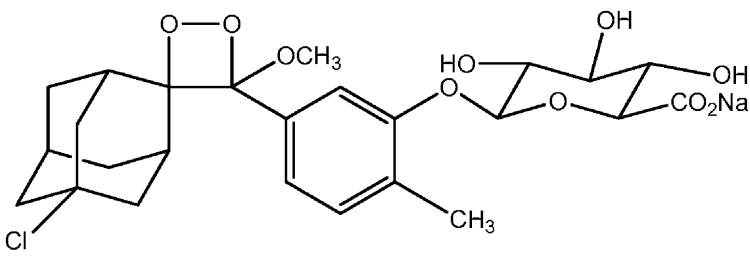
一部の実施形態では、化合物は、

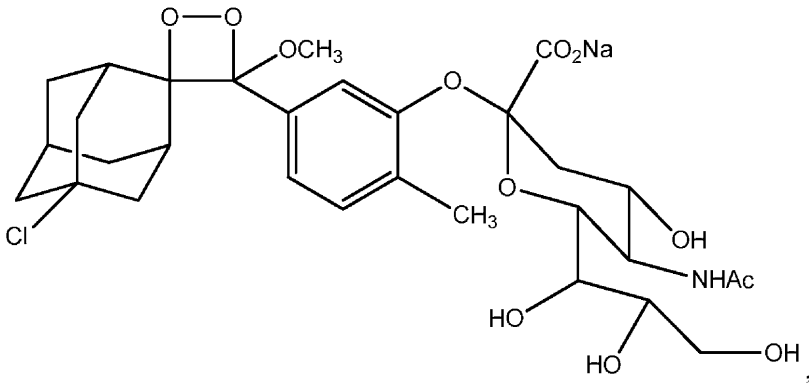


10

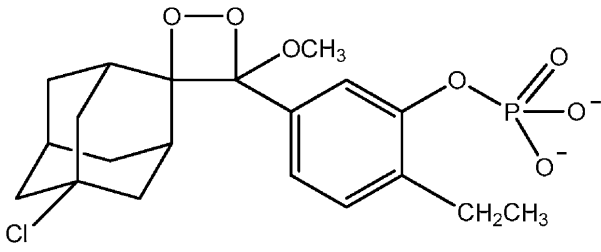


20

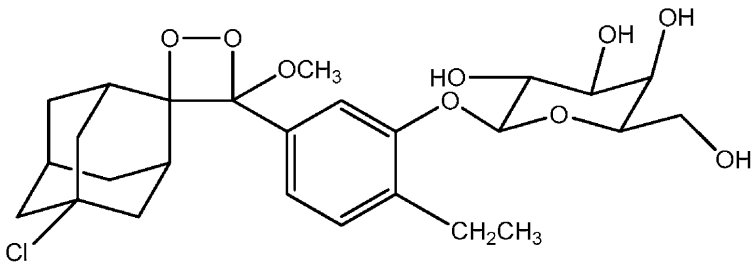




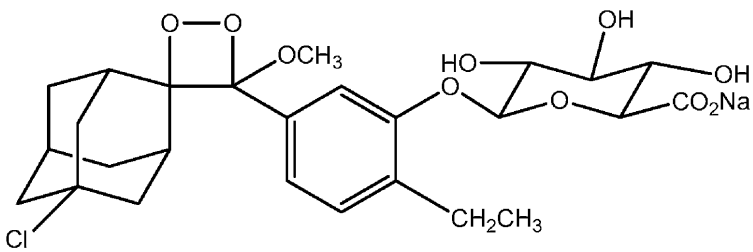
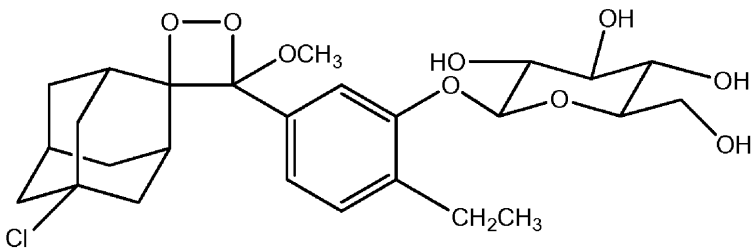
10



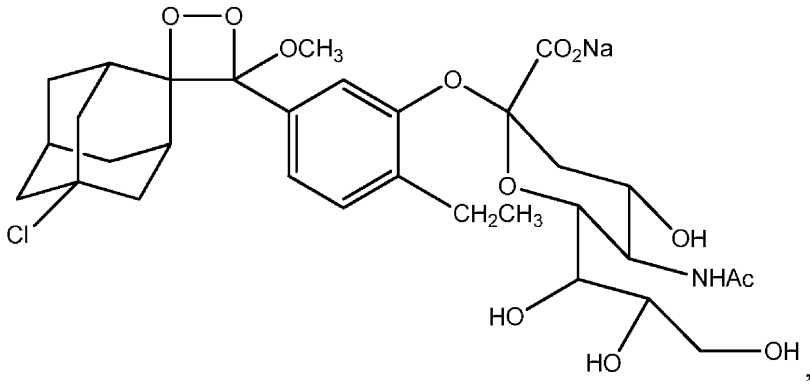
20



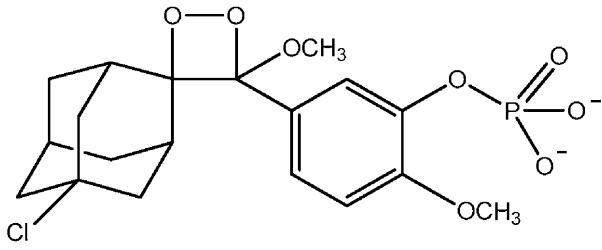
30



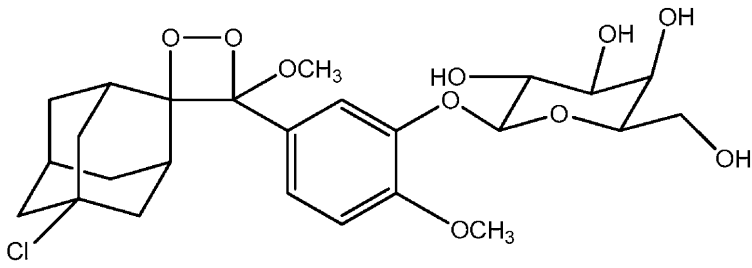




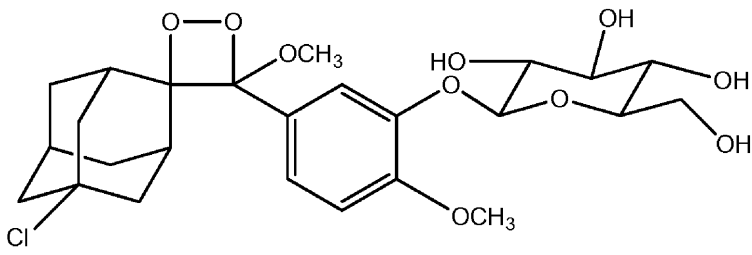
10

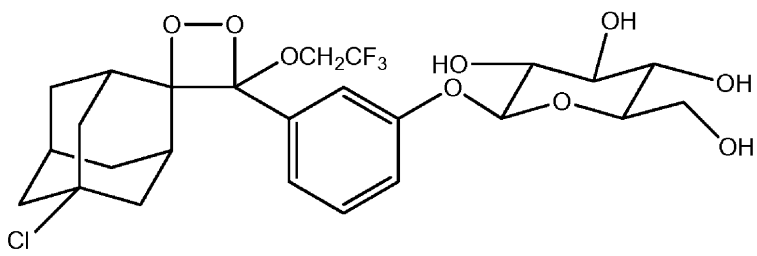
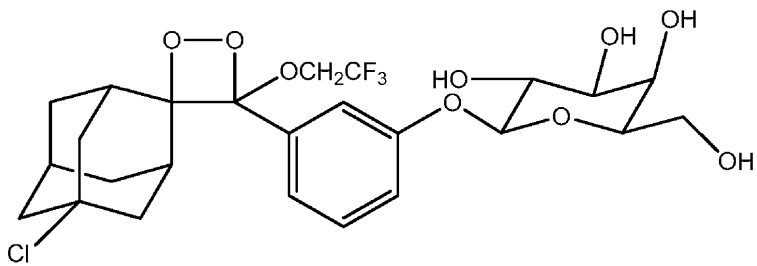
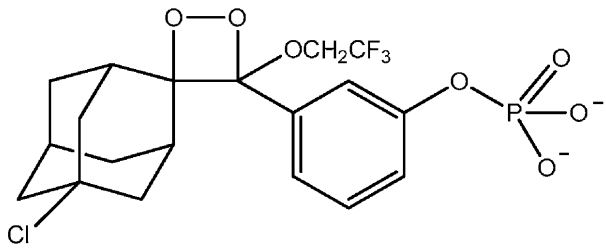
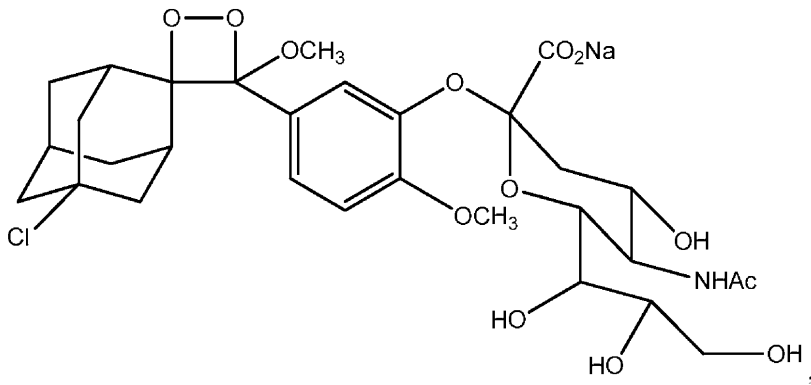
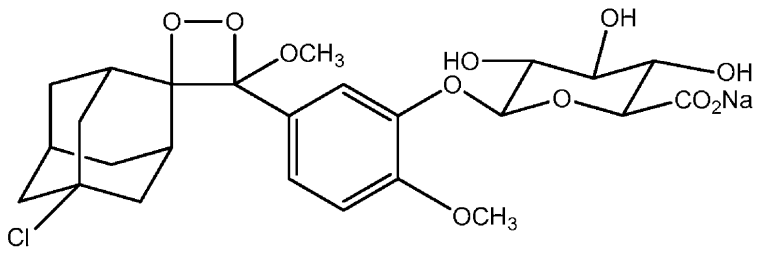


20



30

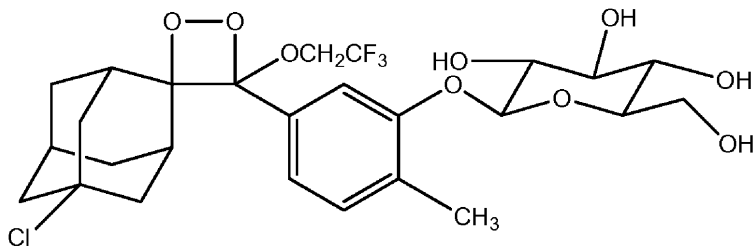
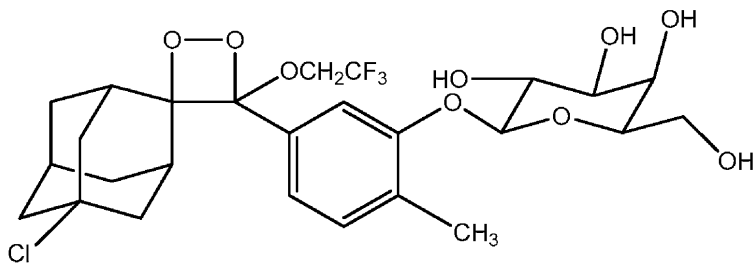
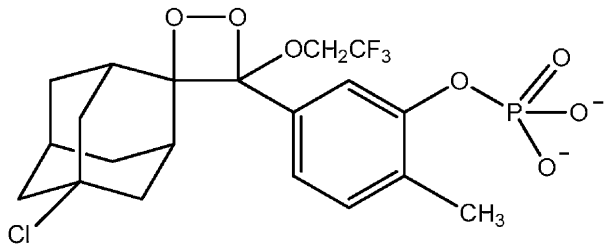
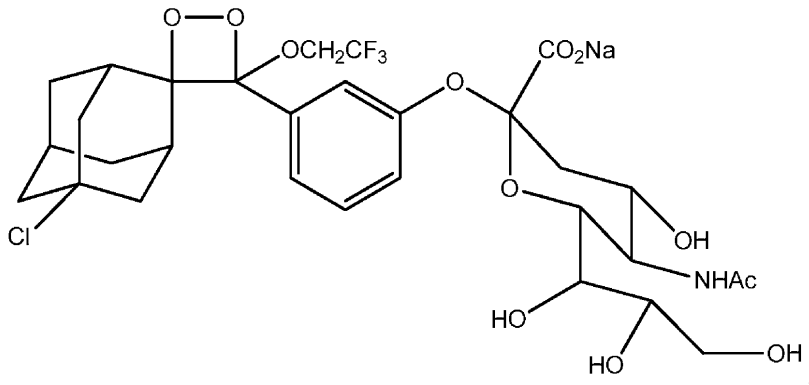
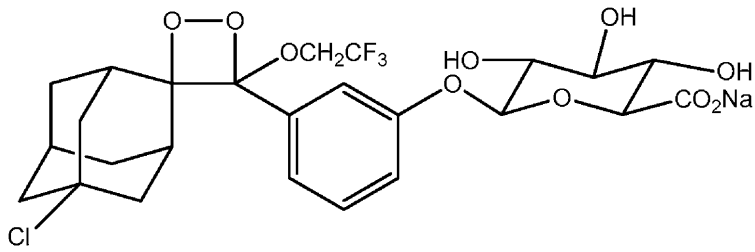




10

20

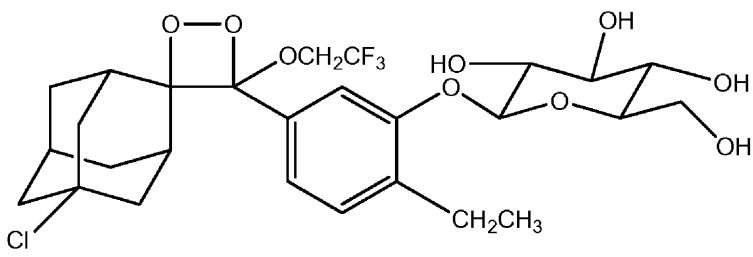
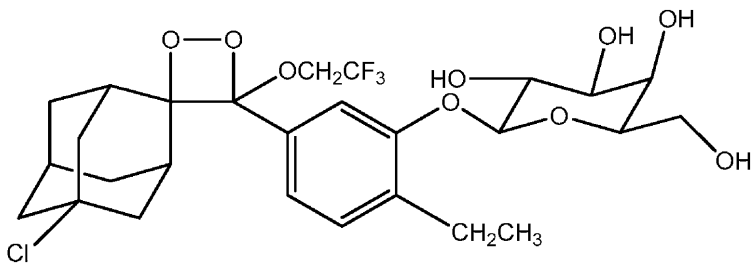
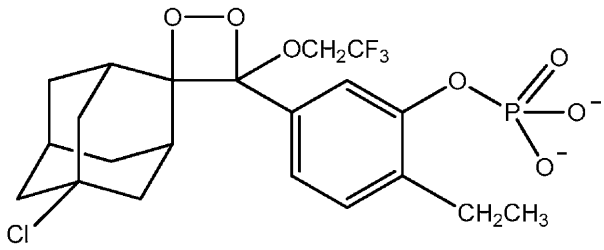
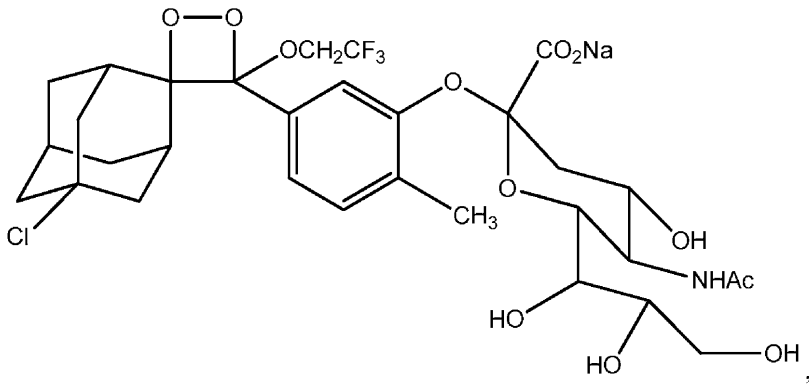
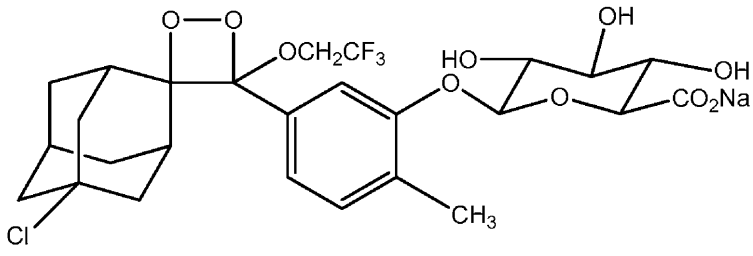
30



10

20

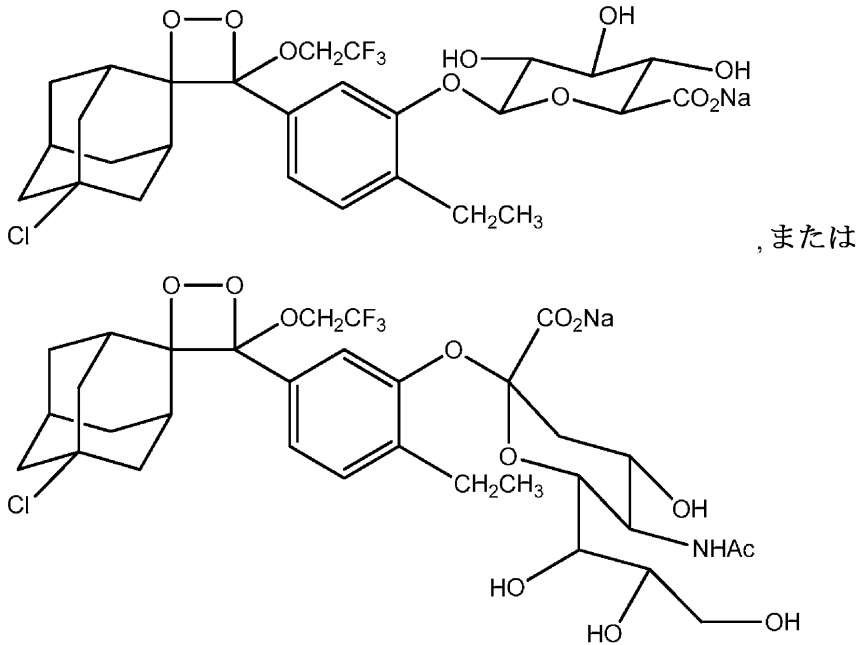
30



10

20

30



10

であり得る。

【0050】

別の態様では、本発明は、化合物[1]を提供する工程；化合物が分解されて光を生成するように化合物を切断可能な酵素を含む疑いのある試料を提供する工程；試料を化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、光の生成は酵素の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する酵素の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程を含む、試料中の酵素の存在および/または量を決定するアッセイ方法を提供する。

20

【0051】

一部の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0052】

別の態様では、本発明は、化合物[1]を提供する工程；抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原と、化合物が分解されて光を生成するように化合物を切断することができる酵素とを含む、酵素結合抗原を提供する工程；抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程；試料および酵素結合抗原を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程を含む、試料中の抗原の存在および/または量を決定するアッセイ方法を提供する。

30

【0053】

一部の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

40

【0054】

別の態様では、本発明は、化合物[1]を提供する工程；核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；核酸を固相に固定化する工程；核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、化合物が分解されて光を生成するように化合物を切断可能な酵素とを含む、酵素結合オリゴヌクレオチドを提供する工程；固定化された核酸と酵素結合オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該核酸の存在を示し、生成された光の量が試料中

50

に存在する核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程を含む、試料中の核酸の存在および/または量を決定するアッセイ方法を提供する。

【0055】

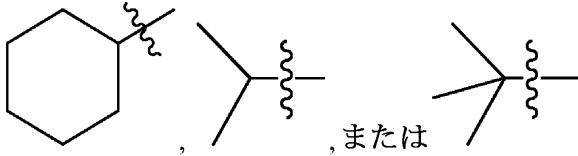
一部の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0056】

別の態様では、本発明は、化合物[1]；および緩衝液を含む試料中の分析物の存在および/または量を検出するためのキットを提供する。

【0057】

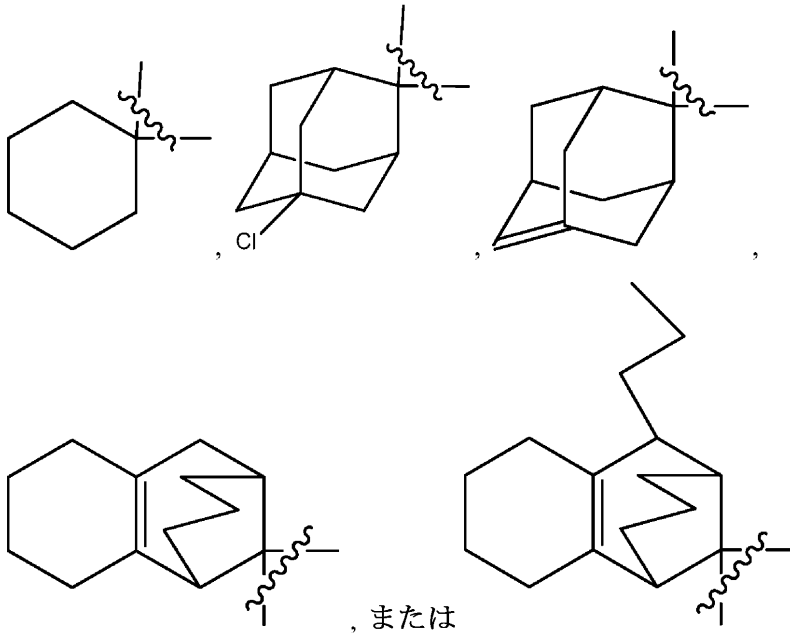
一部の実施形態では、AまたはBのうちの少なくとも1つは、



であり得る。

【0058】

一部の実施形態では、AおよびBは全体として、



であり得る。

【0059】

一部の実施形態では、R<sub>1</sub>は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

【0060】

一部の実施形態では、R<sub>1</sub>は、1~2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。

【0061】

一部の実施形態では、R<sub>1</sub>は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

【0062】

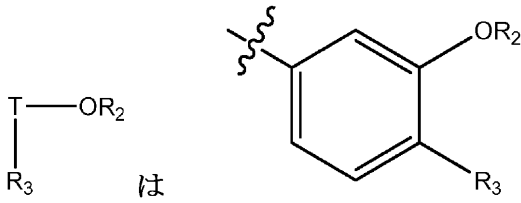
一部の実施形態では、

10

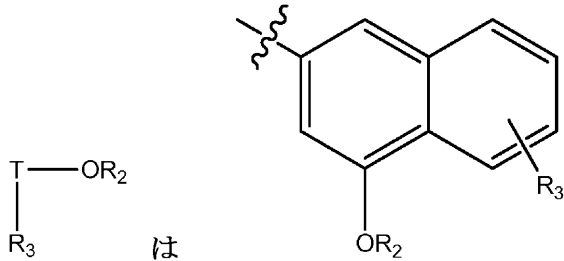
20

30

40



であり得る；一方、他の実施形態では、



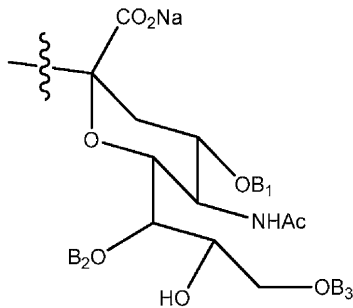
10

であり得る。

【0063】

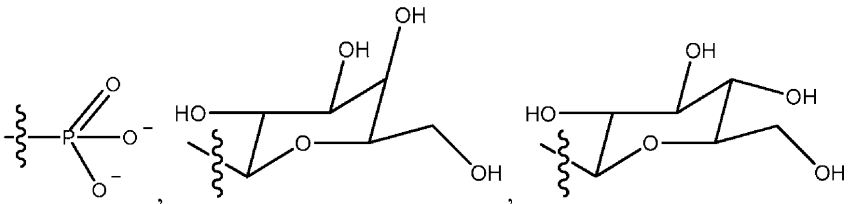
一部の実施形態では、OR<sub>2</sub>は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、-D-ガラクトシド、-D-ガラクトシド、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-マンノシド、-D-マンノシド、-フルクトフラノシド、-D-グルクロニド、または

20

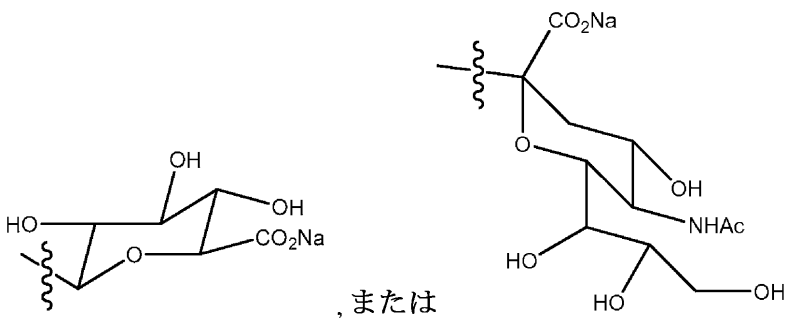


30

であり得、式中、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>およびB<sub>3</sub>はそれぞれ独立して、H、1~4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3~6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、R<sub>2</sub>は、



40



であり得る。

【0064】

50

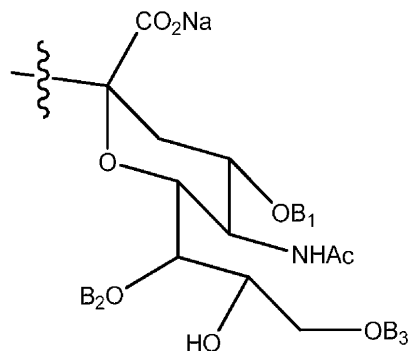
一部の実施形態では、 $R_2$  は、 $E-L-Nuc-Z$  であり得、式中、 $E$  は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$  基の酵素的切断に際して  $Nuc$  基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$  は連結基であり； $Nuc$  は求核原子であり； $Z$  は酵素により切断可能な基であり；式中

$E$  は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

$L$  は、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または  $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、 $m$  および  $n$  は 0～3 であり、 $m+n$  は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ 1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ 1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または 2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換され得；

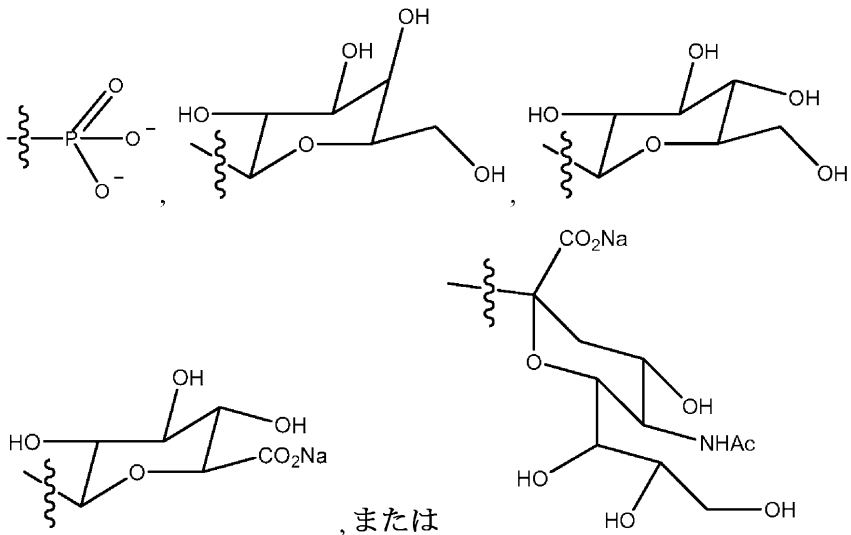
$Nuc$  は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

$Z$  は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または



であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル（分岐状または直鎖）、または 3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$  は、





10

であり得る。

【0065】

一部の実施形態では、電子供与基は、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても3～20個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

20

【0066】

一部の実施形態では、電子供与基は、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0067】

一部の実施形態では、電子供与基は、1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1～5個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0068】

一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択され得る。

30

【0069】

一部の実施形態では、キットは、増強剤をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。これらの実施形態の一部では、ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム)、ポリ[ビニルベンジル(塩化ベンジルジメチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリブチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム)]またはそれらの組み合わせであり得る；一方、他の実施形態では、ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)とポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)とを含むコポリマー；またはそれらの組み合わせであり得る。

40

【0070】

一部の実施形態では、増強剤はアクセプター色素をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、アクセプター色素は、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555であり得る。

【0071】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な化合物の結合の切断により、25

50

で光が生成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

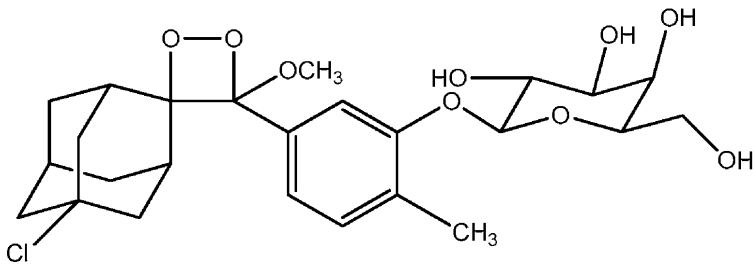
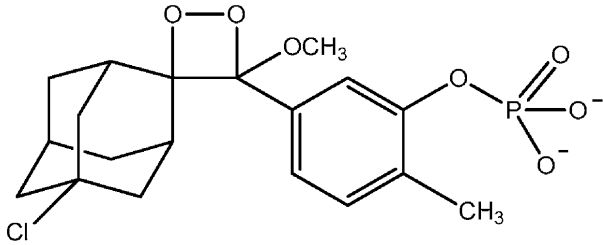
【0072】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な化合物の結合の切断により、37で光が生成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

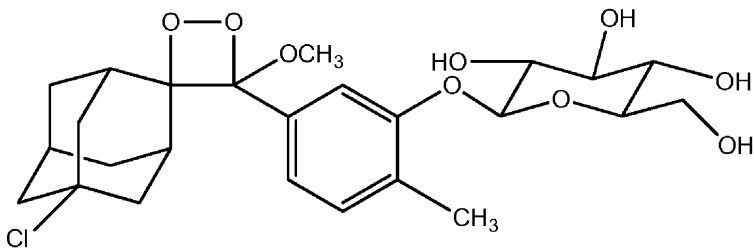
【0073】

一部の実施形態では、化合物は、

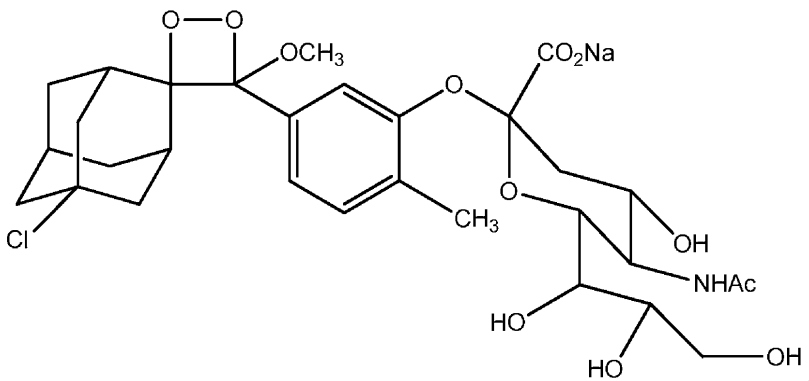
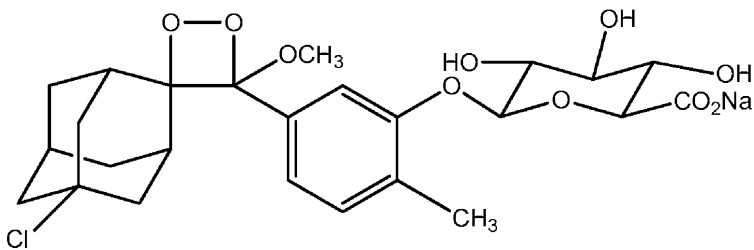
10



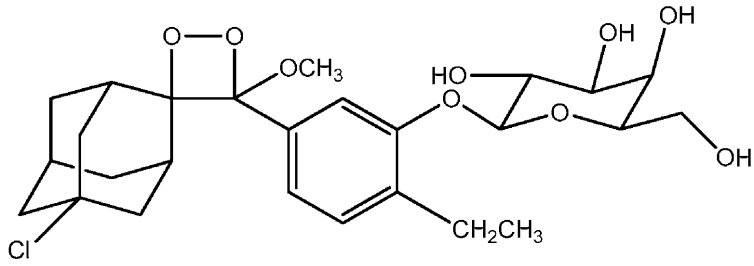
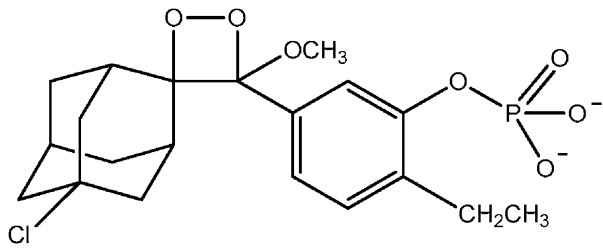
20



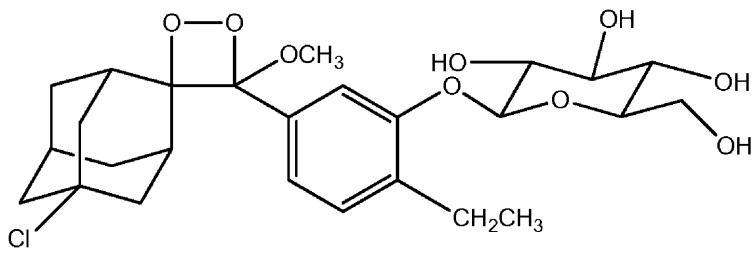
30



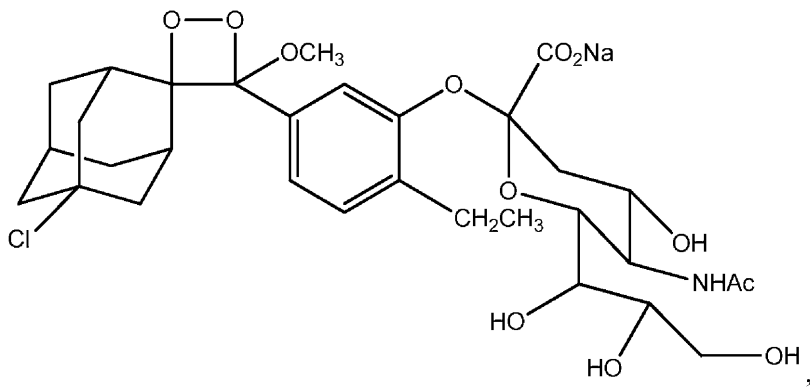
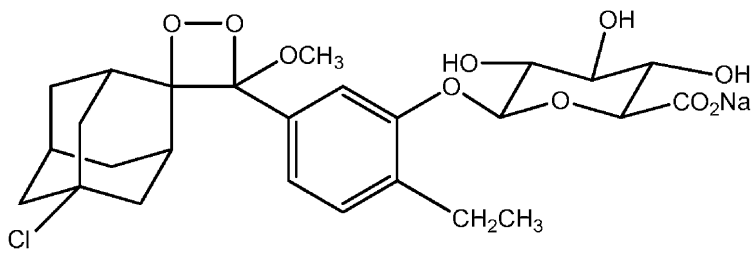
40



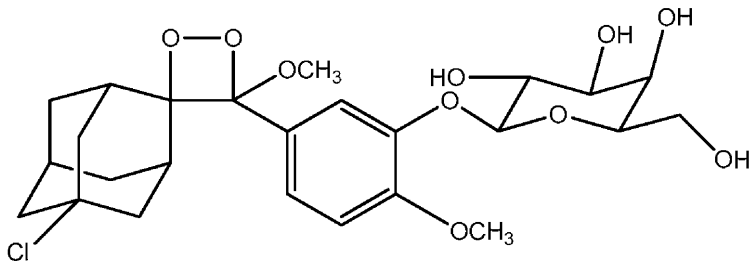
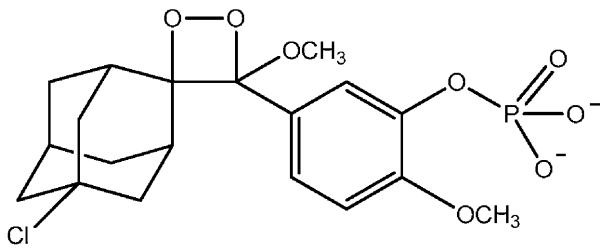
10



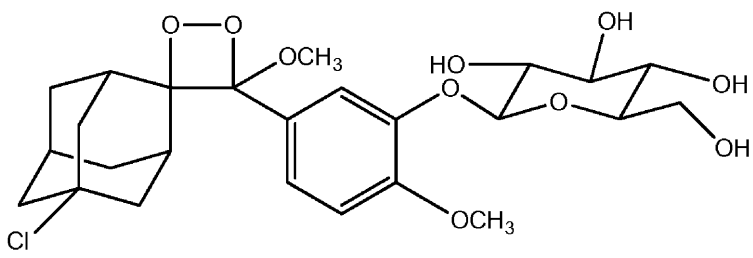
20



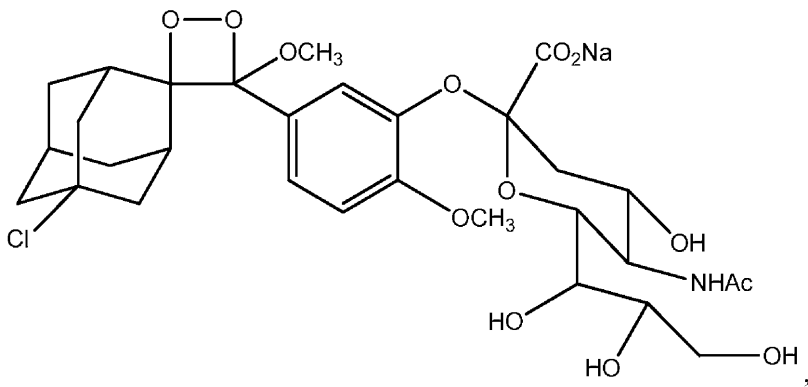
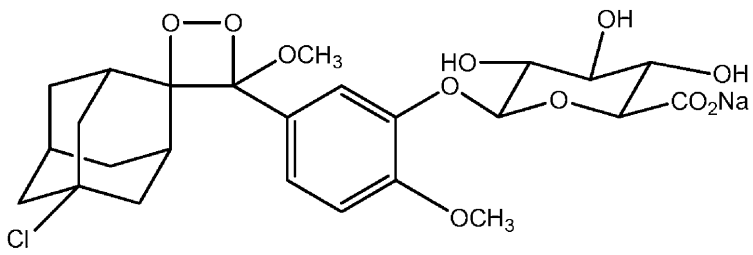
30



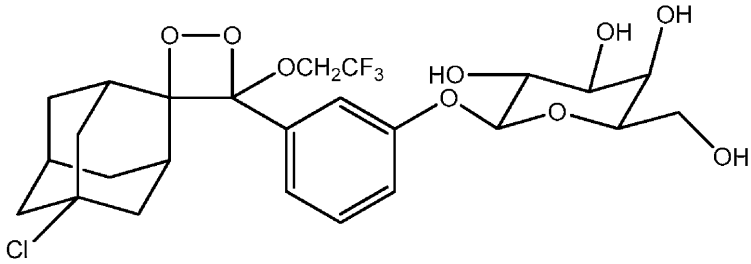
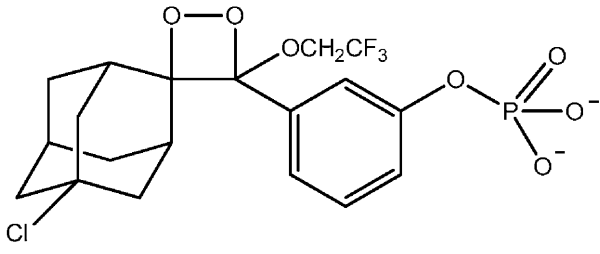
10



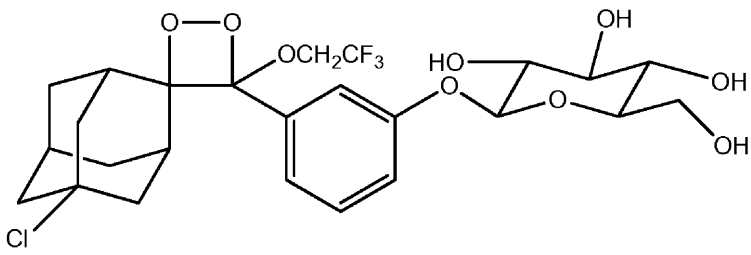
20



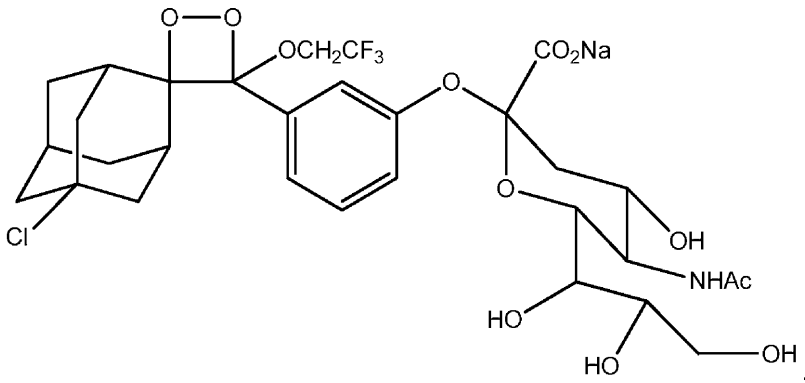
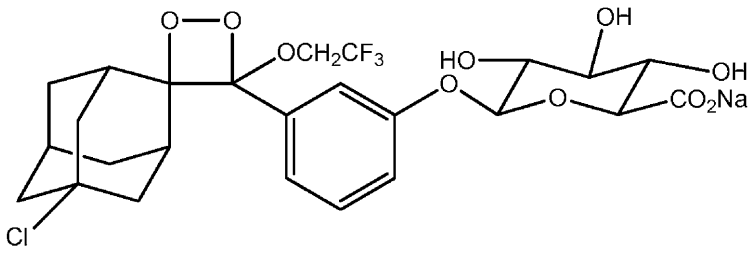
30



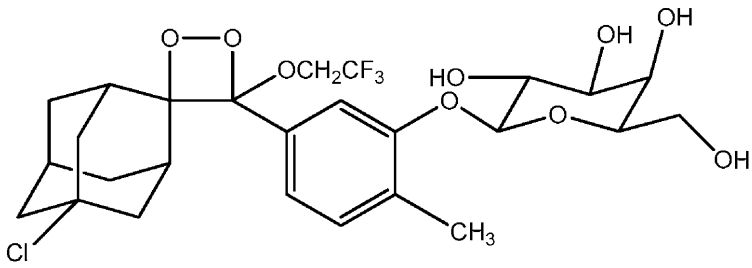
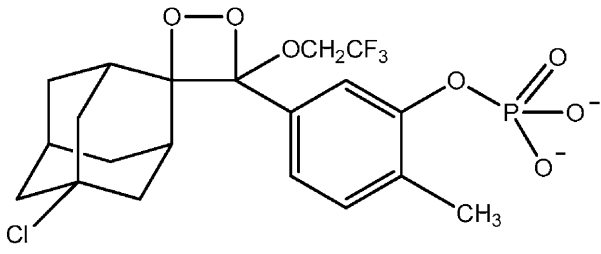
10



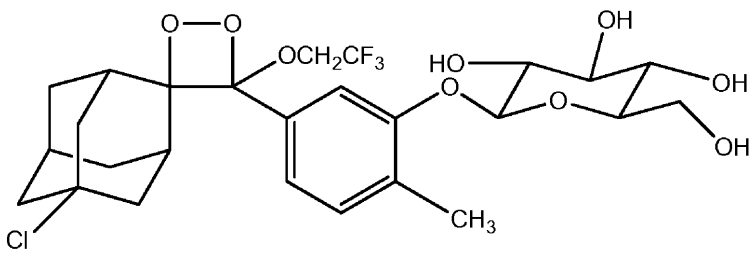
20



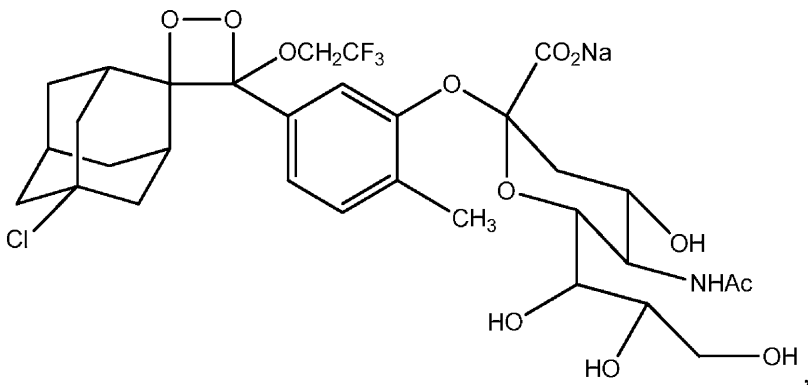
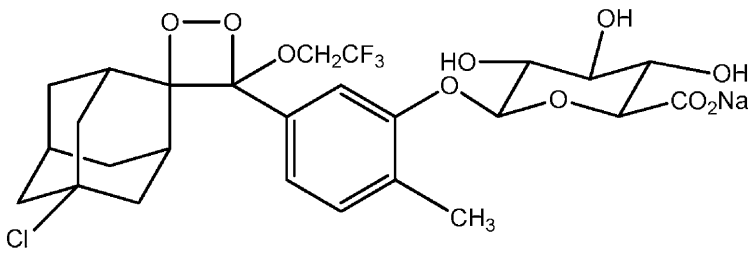
30



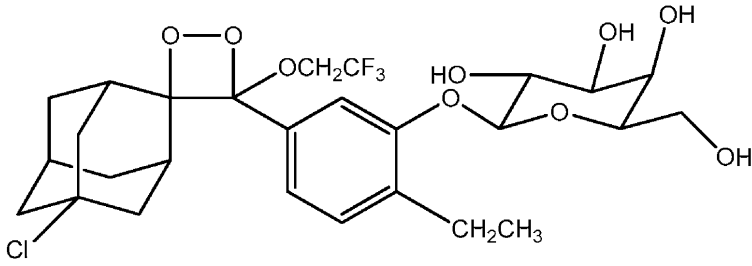
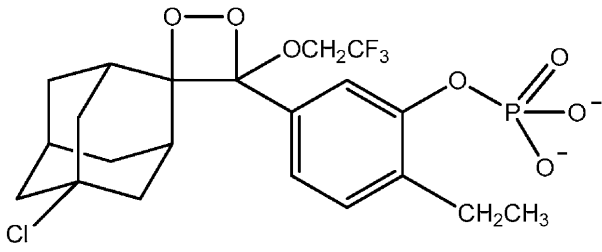
10



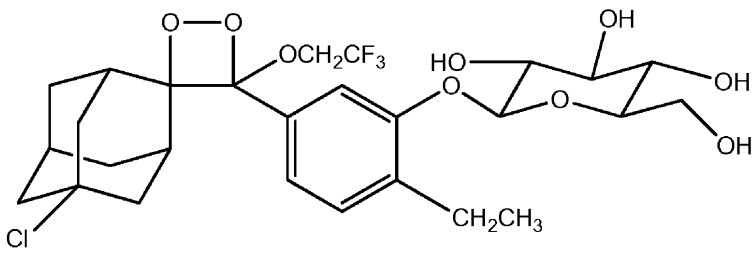
20



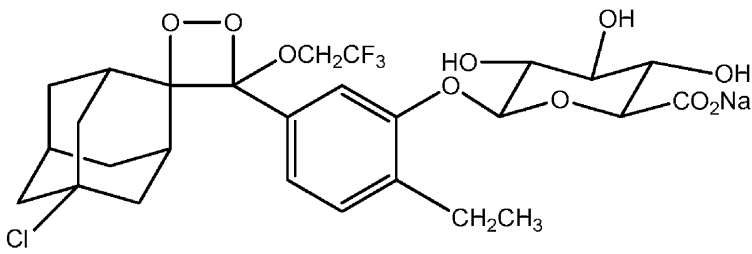
30



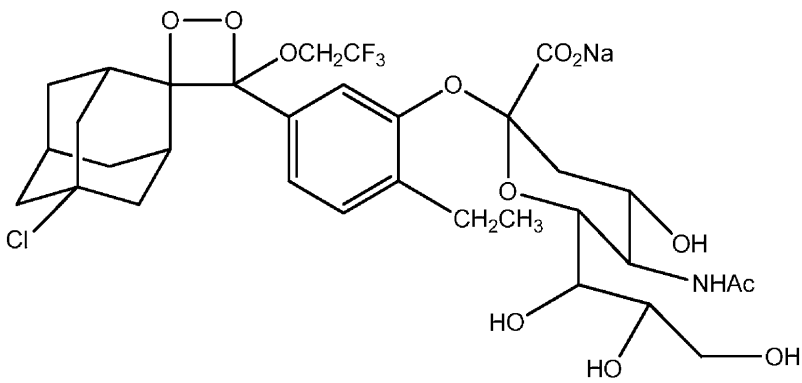
10



20



,または



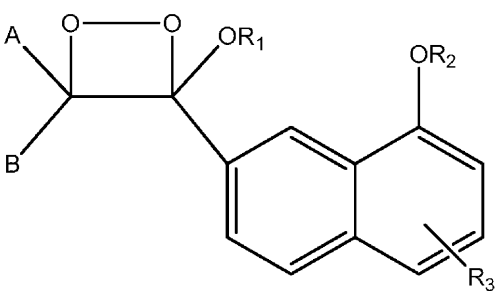
30

であり得る。

40

【0074】

別の態様では、本発明は、構造：



50

を有する化合物を提供し、  
式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび 4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

10

$R_1$  は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

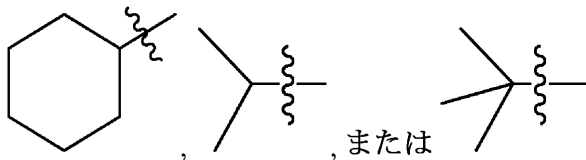
$R_2$  は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ

20

$R_3$  は、水素または電子供与基である。

【0075】

一部の実施形態では、A または B のうちの少なくとも 1 つは、



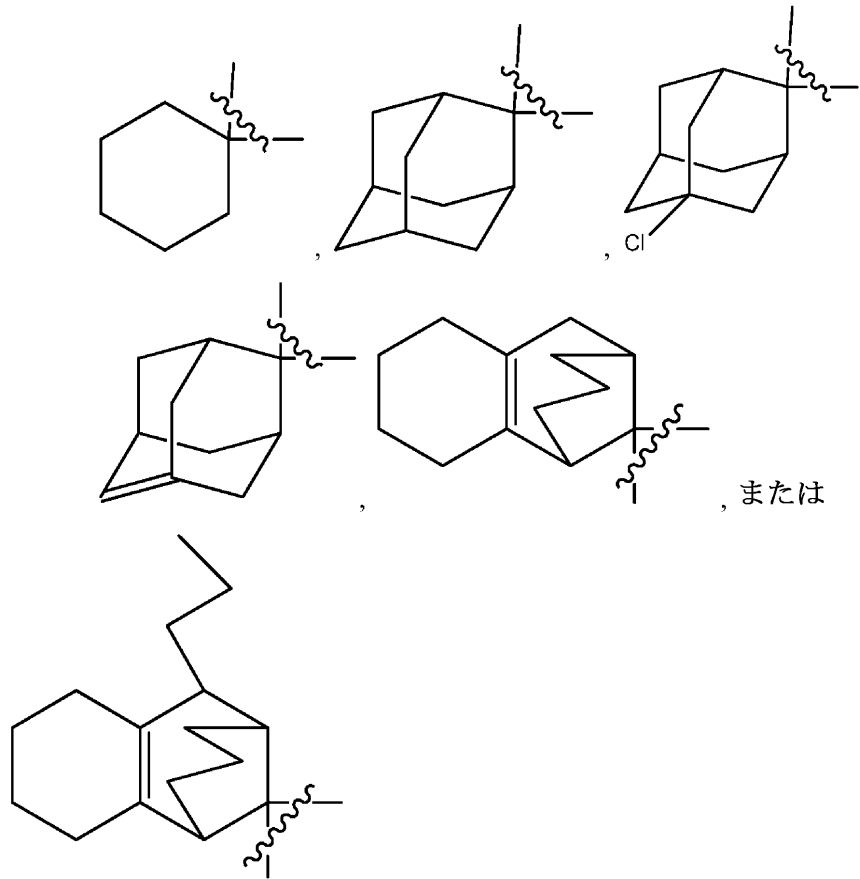
であり得る。

【0076】

一部の実施形態では、A および B は全体として、

30





10

20

であり得る。

【0077】

一部の実施形態では、 $R_1$ は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

【0078】

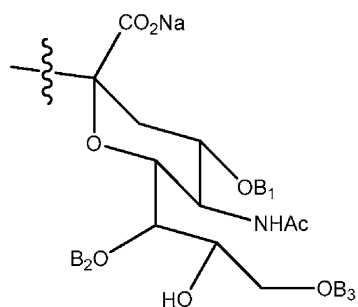
一部の実施形態では、 $R_1$ は、1~2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、 $R_1$ は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

30

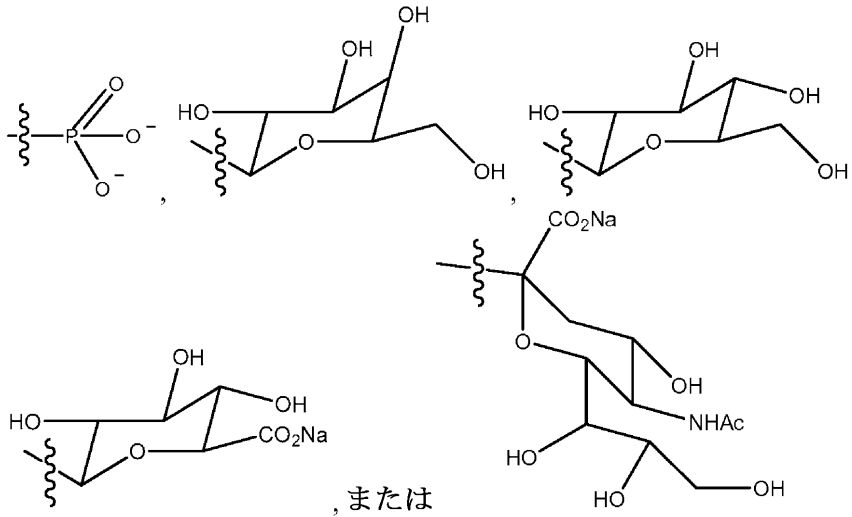
【0079】

一部の実施形態では、 $OR_2$ は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $\beta$ -D-ガラクトシド、 $\alpha$ -D-ガラクトシド、 $\beta$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -D-グルコシド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -フルクトフラノシド、 $\alpha$ -D-グルクロニド、または

40



であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$ および $B_3$ はそれぞれ独立して、H、1~4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3~6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $R_2$ は、



10

であり得る。

【0080】

一部の実施形態では、 $R_2$  は、 $E-L-Nuc-Z$  であり得、式中、 $E$  は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$  基の酵素的切断に際して  $Nuc$  基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$  は連結基であり； $Nuc$  は求核原子であり； $Z$  は酵素により切断可能な基であり；式中

20

$E$  は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

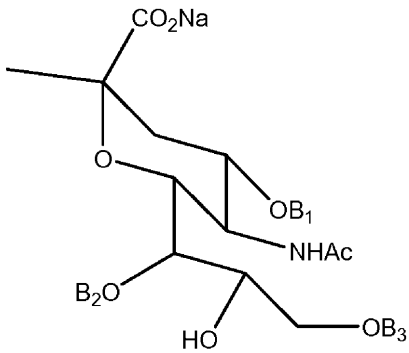
$L$  は、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、 $m$  および  $n$  は0～3であり、 $m+n$  は2または3であり、式中、 $R_6$  は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

30

$Nuc$  は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

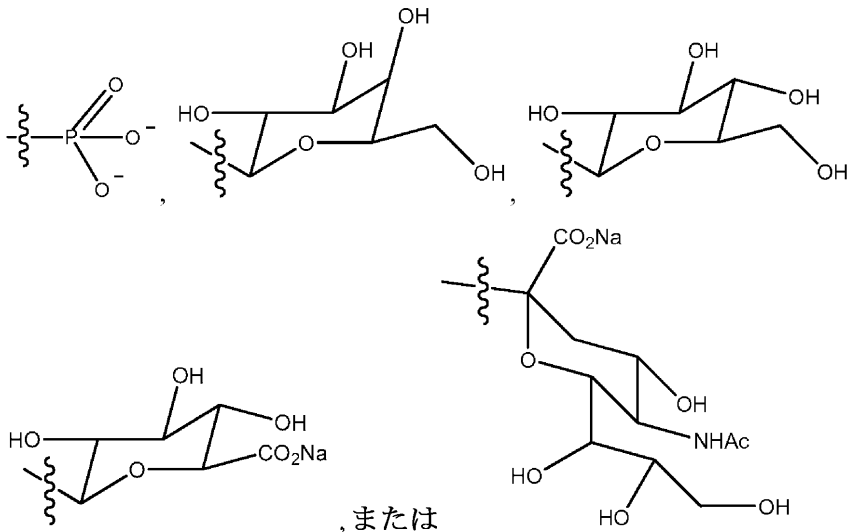
$Z$  は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、 $-D$ -ガラクトシル、 $-D$ -ガラクトシル、 $-D$ -グルコシル、 $-D$ -グルコシル、 $-D$ -マンノシル、 $-D$ -マンノシル、 $-D$ -フルクトフラノシル、 $-D$ -グルコシドウランシル、または

40



10

であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$  は、



20

であり得る。

【0081】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

30

【0082】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0083】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

40

【0084】

一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、メトキシ、エトキシ、およびプロピルオキシからなる群より選択され得る。

【0085】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、25 で光が生成され、これは約 15 分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約 10 分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約 5 分未満で最大に達し得る。

【0086】

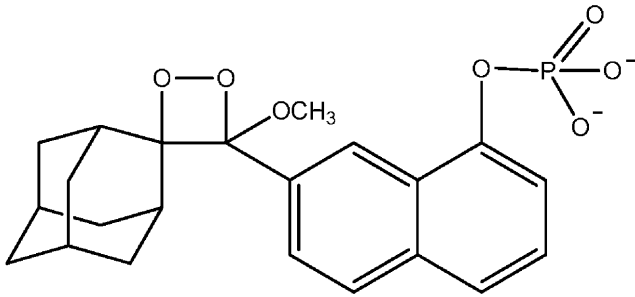
一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、37 で光が生

50

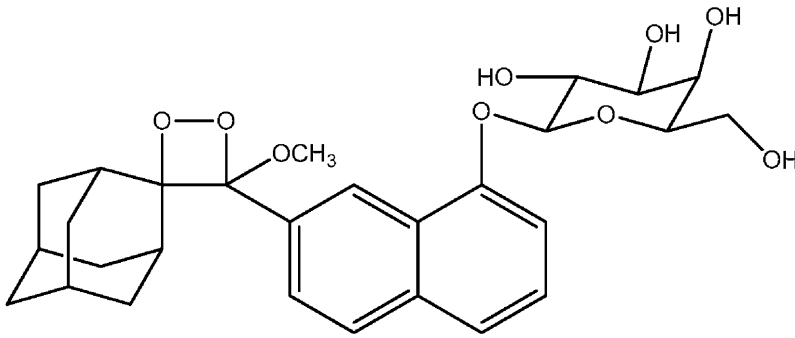
成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0087】

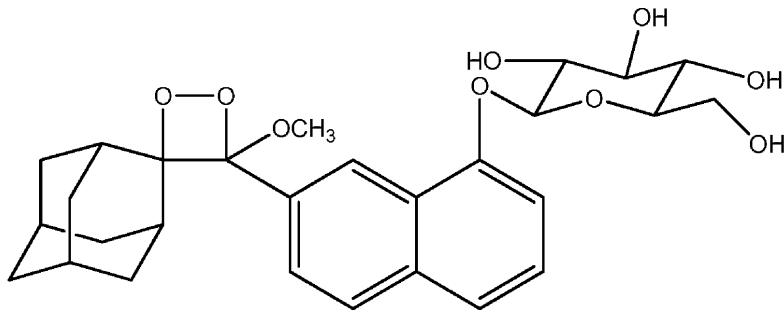
一部の実施形態では、化合物は、



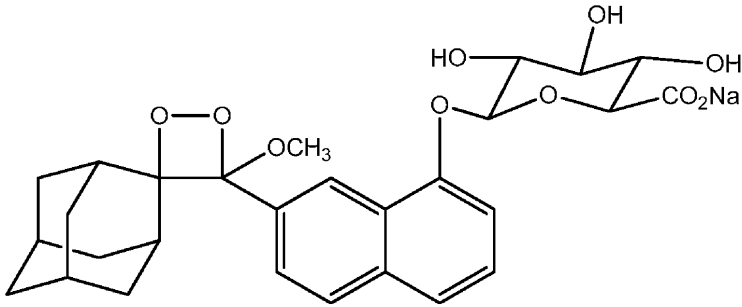
10



20

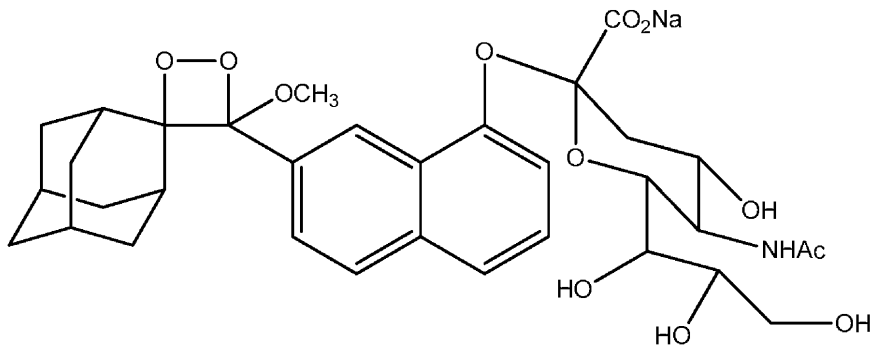


10



,または

20

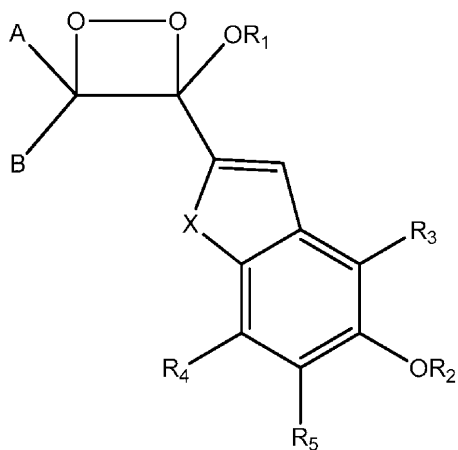


である。

30

【0088】

別の態様では、本発明は、構造：



40

を有する化合物を提供し、  
式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含

50

むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

R<sub>1</sub>は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3～20個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

R<sub>2</sub>は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；

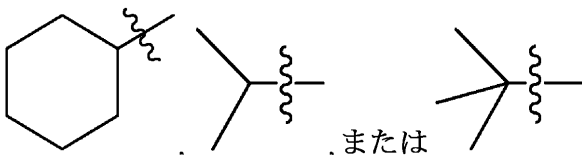
R<sub>3</sub>は、水素または電子供与基であり；

R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>は独立して、H、F、Cl、Br、I、シアノ、ニトロ、スルホネート、サルフェート、トリフルオロメチル、トリフルオロエチル、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、2～20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニル、1～20個の炭素原子を含むアルコキシ、6～14個の炭素原子を含むアリール、6～14個の炭素原子を含むアリールオキシ、2～21個の炭素原子を含むエステル、3～30個の炭素原子を含むトリアルキルアンモニウム、3～30個の炭素原子を含むトリアルキルホスホニウム、2～21個の炭素原子を含むアルキルアミド、7～15個の炭素原子を含むアリールアミド、2～21個の炭素原子を含むアルキルカルバモイル、7～15個の炭素原子を含むアリールカルバモイル、1～20個の炭素原子を含むアルキルスルホンアミド、6～14個の炭素原子を含むアリールスルホンアミド、3～60個の炭素原子を含むトリアルキルシリル、18～42個の炭素原子を含むトリアリールシリル、7～32個の炭素原子を含むアルキルアリールシリル、1～20個の炭素原子を含むアルキルアミドスルホニル、6～14個の炭素原子を含むアリールアミドスルホニル、1～20個の炭素原子を含むアルキルスルホニル、6～14個の炭素原子を含むアリールスルホニル、2～20個の炭素原子を含むアルキルチオおよび6～14個の炭素原子を含むアリールチオからなる群より選択され；かつ

Xは、硫黄原子、酸素原子、もしくは窒素原子である。

【0089】

一部の実施形態では、AまたはBのうちの少なくとも1つは、



であり得る。

【0090】

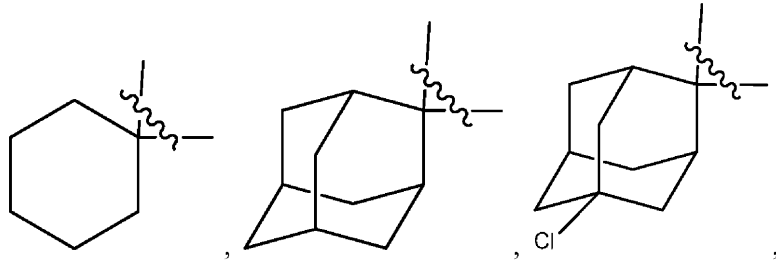
一部の実施形態では、AおよびBは全体として、

10

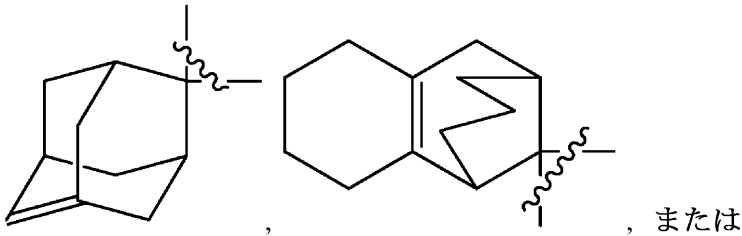
20

30

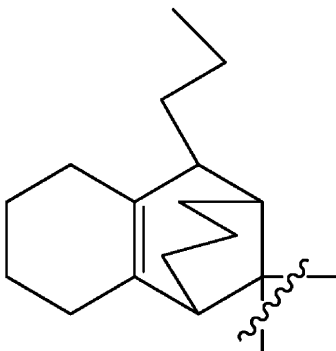
40



10



20



であり得る。

【0091】

一部の実施形態では、 $R_1$ は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

【0092】

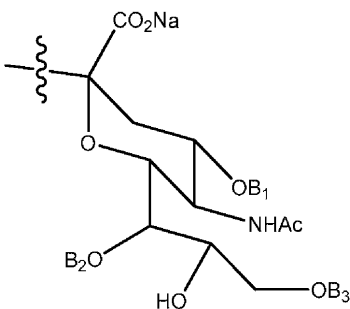
一部の実施形態では、 $R_1$ は、1～2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1～2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、 $R_1$ は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

30

【0093】

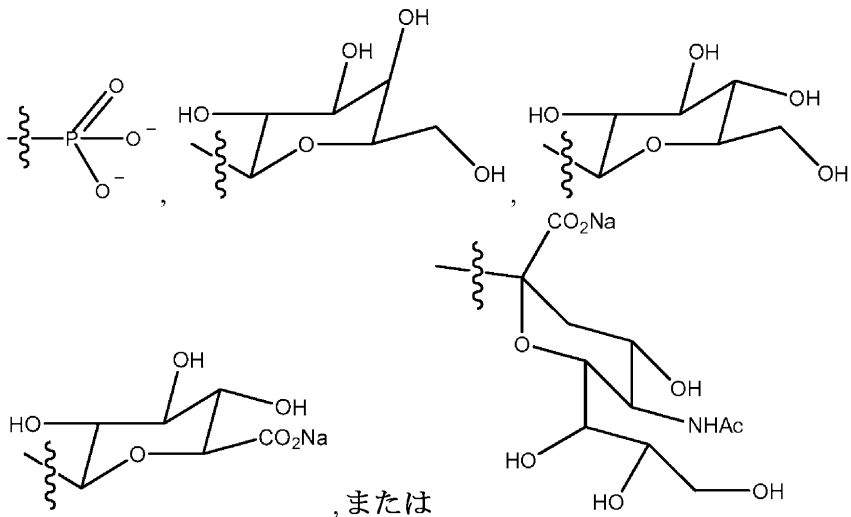
一部の実施形態では、 $OR_2$ は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $\beta$ -D-ガラクトシド、 $\alpha$ -D-ガラクトシド、 $\beta$ -D-グルコシド、 $\alpha$ -D-グルコシド、 $\beta$ -D-マンノシド、 $\alpha$ -D-マンノシド、 $\beta$ -フルクトフラノシド、 $\alpha$ -D-グルクロニド、または

40



であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$ および $B_3$ はそれぞれ独立して、 $H$ 、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $R_2$ は、

50



10

であり得る。

【0094】

一部の実施形態では、 $R_2$  は、 $E-L-Nuc-Z$  であり得、式中、 $E$  は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$  基の酵素的切断に際して  $Nuc$  基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$  は連結基であり； $Nuc$  は求核原子であり； $Z$  は酵素により切断可能な基であり；式中

20

$E$  は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

$L$  は、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、 $m$  および  $n$  は 0～3 であり、 $m+n$  は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

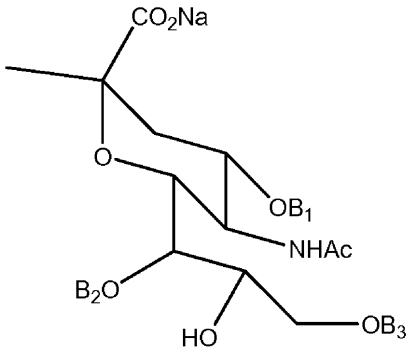
30

$Nuc$  は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

$Z$  は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、 $-D$ -ガラクトシル、 $-D$ -ガラクトシル、 $-D$ -グルコシル、 $-D$ -グルコシル、 $-D$ -マンノシル、 $-D$ -マンノシル、 $-D$ -フルクトフラノシル、 $-D$ -グルコシドウランシル、または

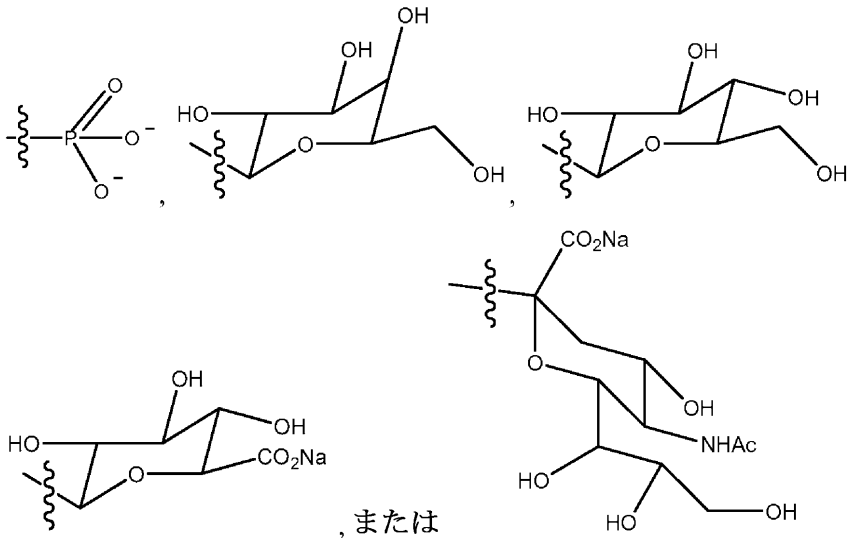
40





10

であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$  または 1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル（分岐状または直鎖）、または 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$  は、



20

であり得る。

【0095】

30

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

【0096】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0097】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

40

【0098】

一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択され得る。

【0099】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、25 で光が生成され、これは約 15 分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約 10 分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約 5 分未満で最大に達し得る。

【0100】

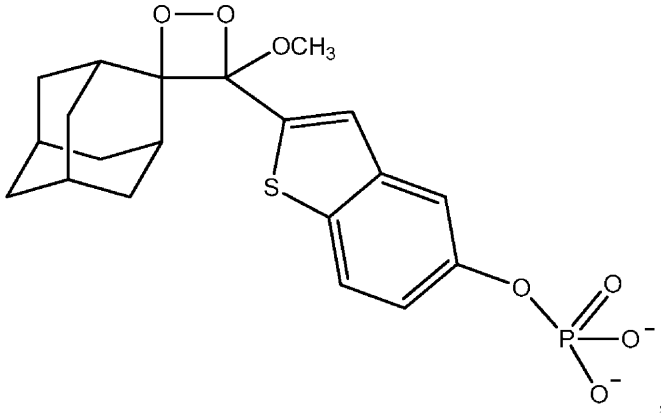
一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、37 で光が生

50

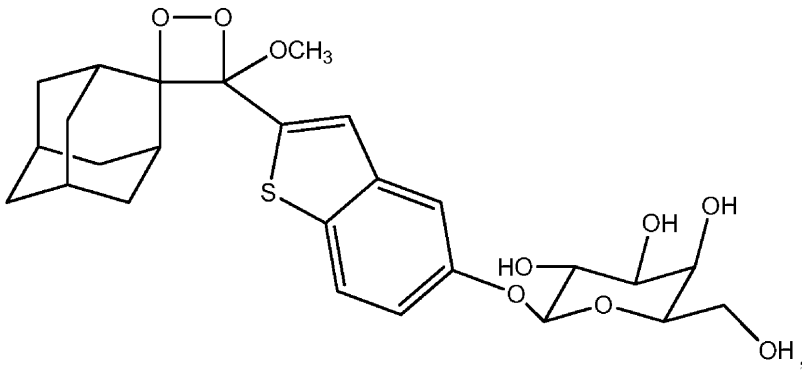
成され、これは約15分未満で最大に達し得る。一部の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0101】

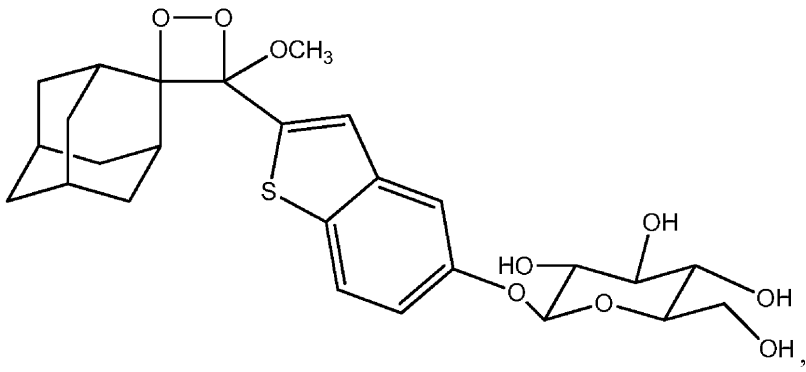
一部の実施形態では、化合物は、



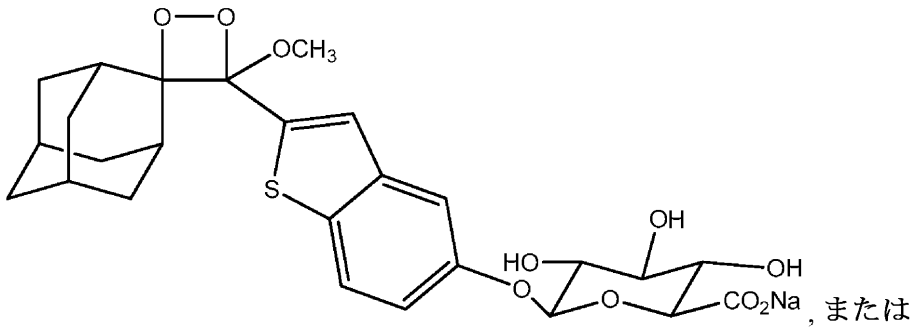
10



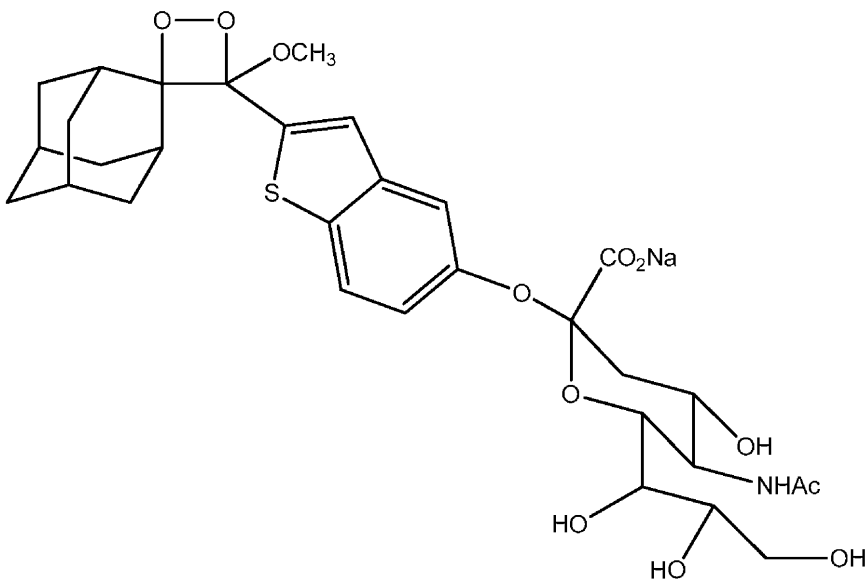
20



10



20

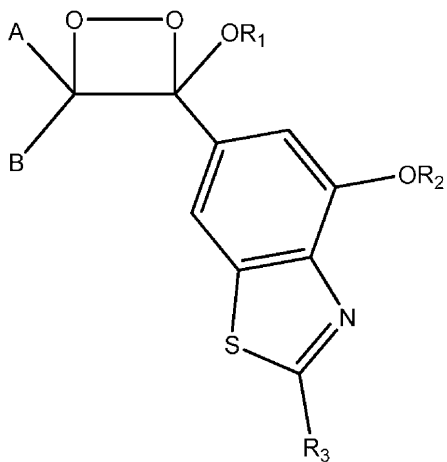


30

であり得る。

【0102】

別の態様では、本発明は、構造：



40

50

を有する化合物を提供し、  
式中、

A および B は独立して、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3 ~ 20 個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび 4 ~ 60 個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

10

$R_1$  は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり；

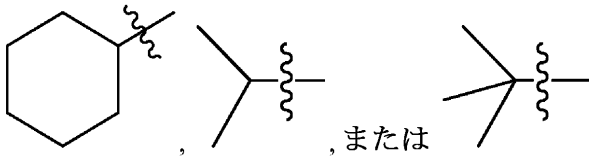
$R_2$  は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり；かつ

20

$R_3$  は、水素または電子供与基である。

【0103】

一部の実施形態では、A または B のうちの少なくとも 1 つは、

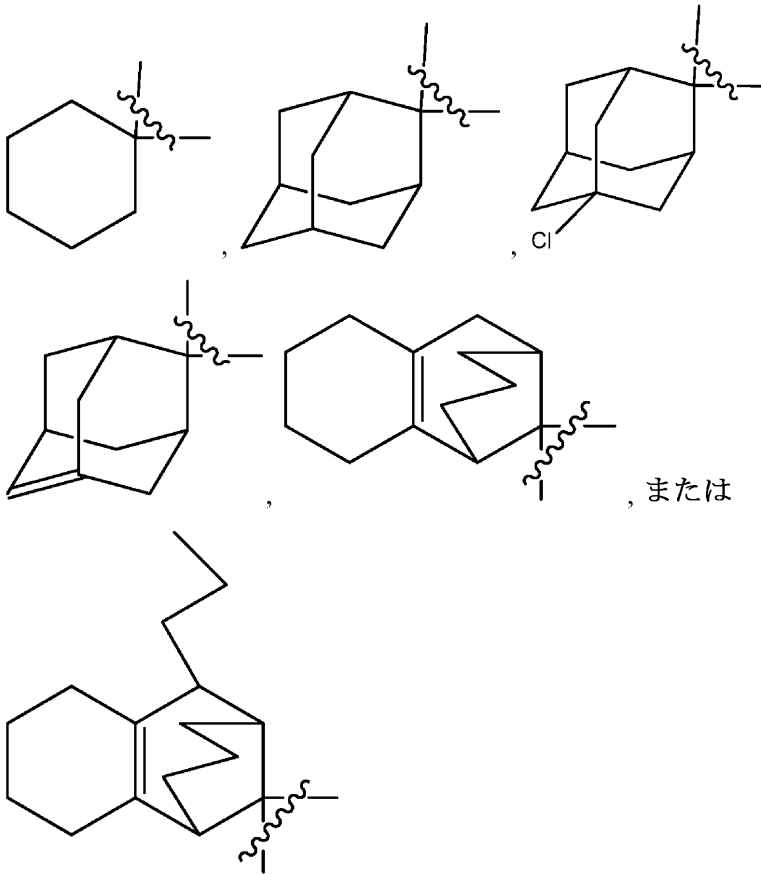


であり得る。

【0104】

一部の実施形態では、A および B は全体として、

30



10

20

であり得る。

【0105】

一部の実施形態では、 $R_1$  は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。

【0106】

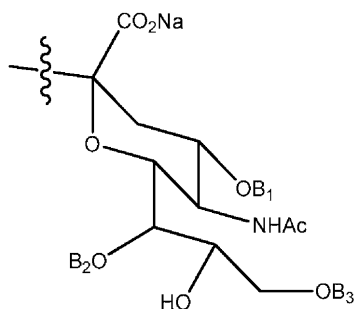
一部の実施形態では、 $R_1$  は、1～2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1～2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、 $R_1$  は、メチルであっても1,1,1-トリフルオロエチルであってもよい。

30

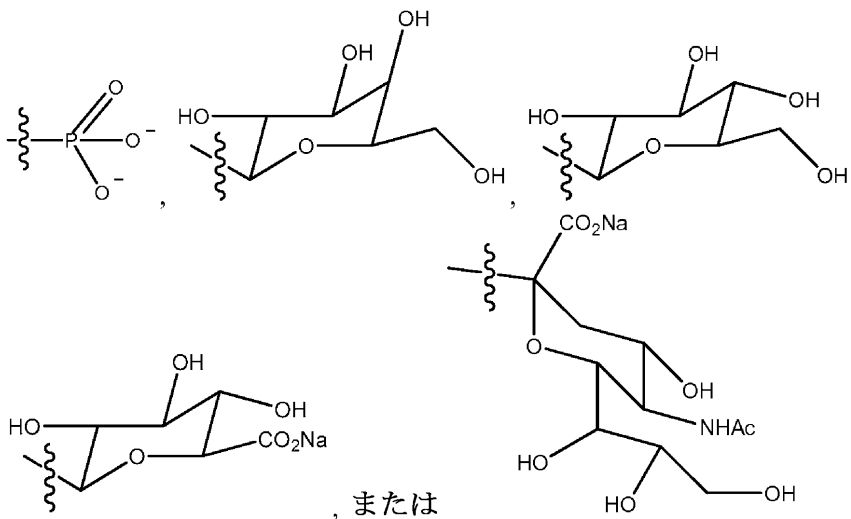
【0107】

一部の実施形態では、 $OR_2$  は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、 $-D$ -ガラクトシド、 $-D$ -ガラクトシド、 $-D$ -グルコシド、 $-D$ -グルコシド、 $-D$ -マンノシド、 $-D$ -マンノシド、 $-D$ -フルクトフラノシド、 $-D$ -グルクロニド、または

40



であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $R_2$  は、



10

であり得る。

【0108】

一部の実施形態では、 $R_2$  は、 $E-L-Nuc-Z$  であり得、式中、 $E$  は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$  基の酵素的切断に際して  $Nuc$  基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$  は連結基であり； $Nuc$  は求核原子であり； $Z$  は酵素により切断可能な基であり；式中

20

$E$  は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり；

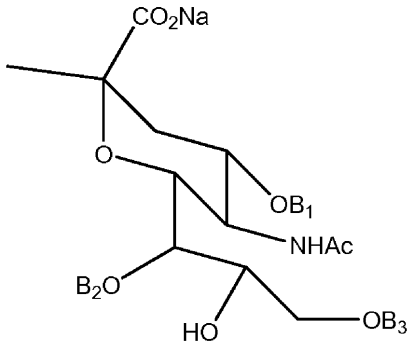
$L$  は、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または  $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$  からなる群より選択され、式中、 $m$  および  $n$  は 0～3 であり、 $m+n$  は 2 または 3 であり、式中、 $R_6$  は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ 1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ 1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または 2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換されていてもよく；

30

$Nuc$  は酸素原子もしくは硫黄原子であり；かつ

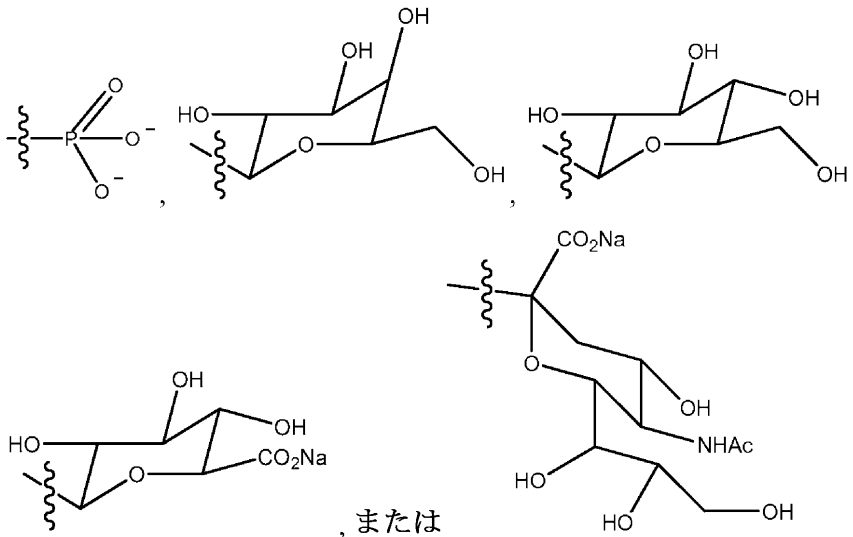
$Z$  は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または

40



10

であり、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$  は、



20

であり得る。

【0109】

30

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであってもよい。

【0110】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであってもよい。

【0111】

一部の実施形態では、電子供与基は、1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルキルまたは 1 ~ 5 個の炭素原子を含む直鎖アルコキシである。

40

【0112】

一部の実施形態では、電子供与基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択され得る。

【0113】

一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、25 で光が生成され、これは約 15 分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約 10 分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約 5 分未満で最大に達し得る。

【0114】

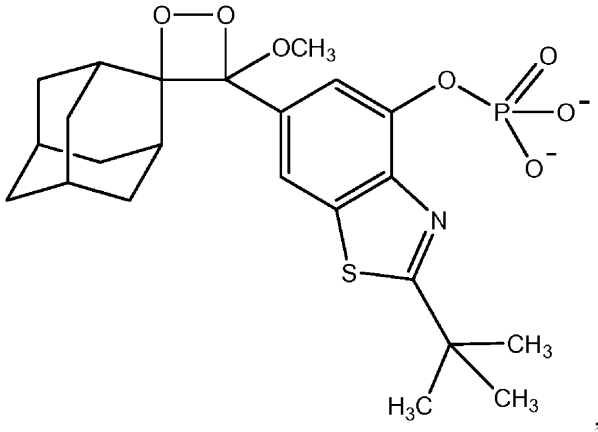
一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、37 で光が生

50

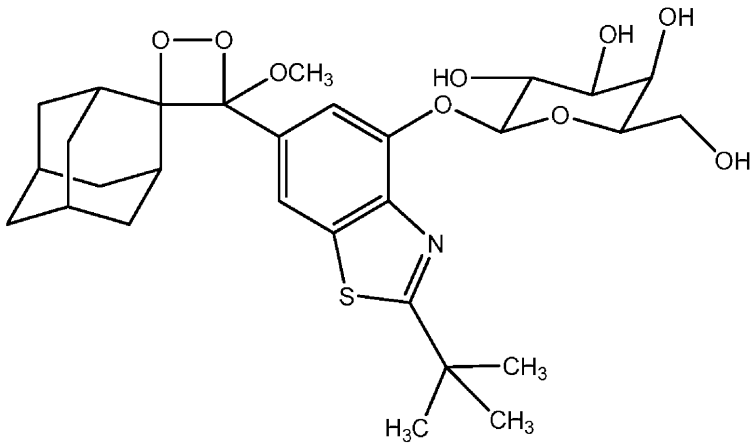
成され、これは約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0115】

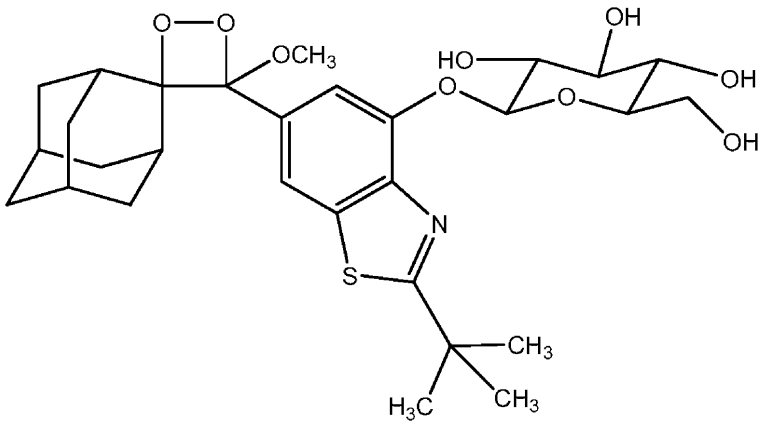
一部の実施形態では、化合物は、



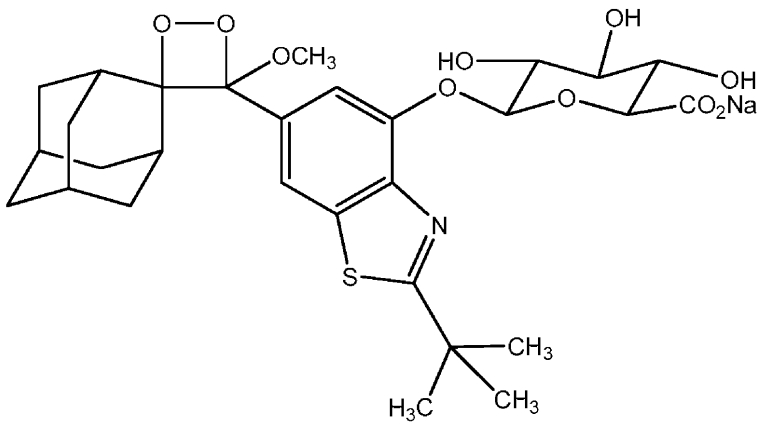




10

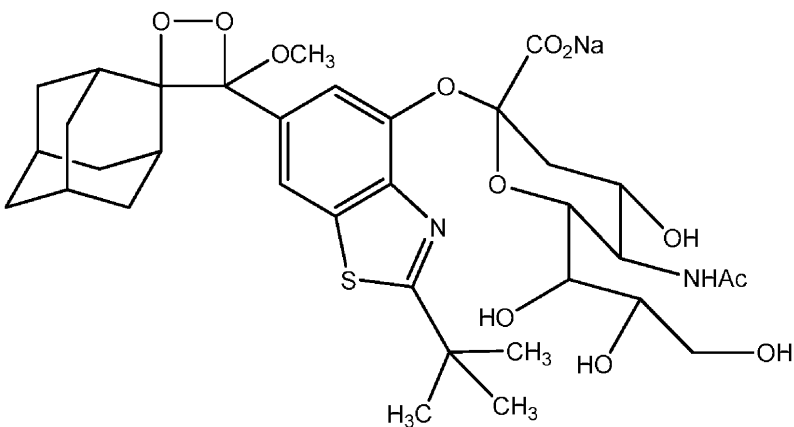


20



30

, または



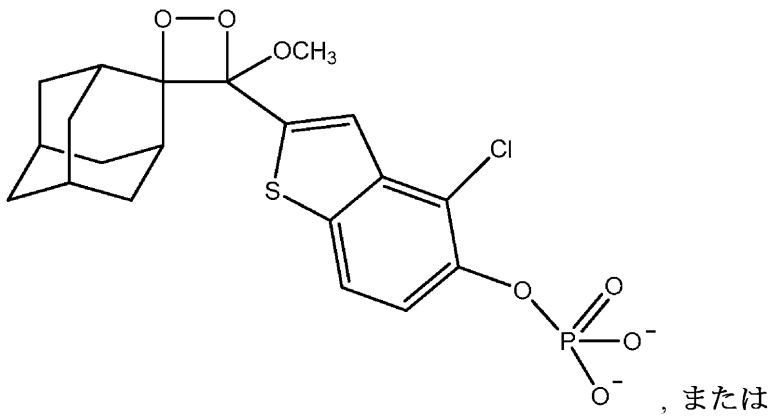
40

であり得る。

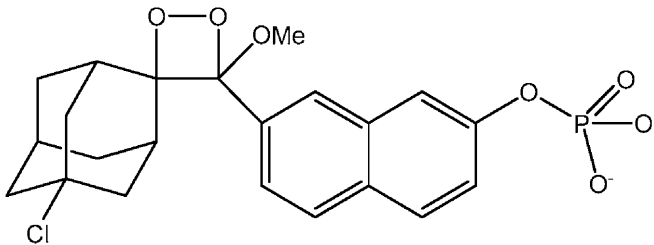
【0116】

別の態様では、本発明は、構造：

50



10

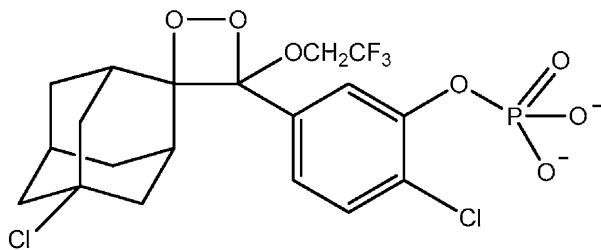


を有する化合物を提供する。

【0117】

20

別の態様では、本発明は、構造：



を有する化合物を提供する工程；該化合物を切断可能な酵素部分を含む酵素複合体を提供する工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、該反応混合物に光を生成させる工程を含む光の生成方法を提供するが；ただし、酵素複合体が固相を含み、抗原が固相に固定化され、抗原がタンパク質である場合、固相は膜またはマイクロアッセイではないものとする。

30

【0118】

一部の実施形態では、25 ~ 37 での光の生成は、約15分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0119】

一部の実施形態では、酵素部分は、アルカリホスファターゼであり得る。

【0120】

40

これらの実施形態の一部では、方法は、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み得、光の生成は、アルカリホスファターゼの存在を示し、生成された光の量が試料中に存在するアルカリホスファターゼの量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する。これらの一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0121】

一部の実施形態では、酵素部分は、抗原に結合可能な第1の抗体を含むアルカリホスファターゼ連結抗体であり得る。

【0122】

50

これらの実施形態の一部では、第1の抗体はアルカリホスファターゼに共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、第1の抗体は標識に共有結合で結合され得、アルカリホスファターゼは標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。これらの実施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい；一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。

【0123】

これらの実施形態の一部では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な第2の抗体を含む固相を提供する工程；試料およびアルカリホスファターゼ連結抗体を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

10

【0124】

これらの実施形態の一部では、方法は、酵素複合体から未結合アルカリホスファターゼ連結抗体を除去する工程をさらに含み得る。

【0125】

一部の実施形態では、酵素部分は、抗原を含むアルカリホスファターゼ連結抗原であり得る。

20

【0126】

これらの実施形態の一部では、抗原はアルカリホスファターゼに共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、抗原は標識に共有結合で結合され得、アルカリホスファターゼは標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。これらの実施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい；一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。

30

【0127】

これらの実施形態の一部では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程；試料およびアルカリホスファターゼ連結抗原を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0128】

これらの実施形態の一部では、方法は、酵素複合体から未結合のアルカリホスファターゼ連結抗原を除去する工程をさらに含み得る。

40

【0129】

一部の実施形態では、酵素部分は、核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含むアルカリホスファターゼ連結オリゴヌクレオチドであり得る。

【0130】

これらの実施形態の一部では、オリゴヌクレオチドは、アルカリホスファターゼに共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。これらの実施形態の一部では、オリゴヌクレオチドは標識に共有結合で結合され得、アルカリホスファターゼは標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。これらの実施形態の一部では、標識は

50

ビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよく、一方、他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。

【0131】

これらの実施形態の一部では、方法は、核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；核酸を固相に固定化する工程；固定化された核酸とアルカリホスファターゼ連結オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該核酸の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での該光の生成が約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る；一方、他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

10

【0132】

これらの実施形態の一部では、方法は、未結合の酵素結合オリゴヌクレオチドを酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。

【0133】

一部の実施形態では、反応混合物は、増強剤をさらに含み得る。

【0134】

これらの実施形態の一部では、増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。これらの実施形態の一部では、ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム)、ポリ[ビニルベンジル(塩化ベンジルジメチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリブチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム)]またはそれらの組み合わせであり得る；一方、他の実施形態では、ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)とポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)とを含むコポリマー、またはそれらの組み合わせである。

20

【0135】

これらの実施形態の一部では、増強剤はアクセプター色素をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、アクセプター色素は、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555であり得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】4-Me-3-OBn-ベンズアルデヒドの2工程合成を示す。

【図2】4-Me-Pheホスホネートの2工程、1ポット合成を示す。

40

【図3】ホーナー・エモンズカップリング、続いて脱ベンジル法による4-Me-Pheエノールエーテルの2工程合成を示す。

【図4】4-Me-Pheエノールエーテルから開始した4-Me-Pheジオキセタンの2工程合成を示す。

【図5】市販CSPD(登録商標)およびCDP-Star(登録商標)(共にLife Technologies製、サンディエゴ、カリフォルニア)と共に、本発明のフラッシュ基質である基質A、基質Bおよび基質Cの構造を示す。

【図6】25で実施した基質AおよびB、CSPDおよびCDP-Starの速度論的評価の結果を示す。

【図7】25で実施した精製アルカリホスファターゼ感度曲線を示す。感度は、信号対

50

雑音比 2 のアルカリホスファターゼ ( A P ) 濃度として定義する。

【図 8】 25 で実施した I L - 6 免疫アッセイにおける基質 A、C S D P、および C D P - S t a r の速度論的評価を示す。

【図 9】 C D P - S t a r / S a p p h i r e - I I および基質 A の様々な時点、25 での信号対雑音比を示す。

【図 10】 37 で実施した I L - 6 免疫アッセイにおける基質 A、B および C の速度論的評価を示す。

【図 11】 免疫アッセイ系における 37 での基質 A、B、C および競合者の基質の信号と信号対雑音との速度論比較を示す。

【図 12】 I L - 6 免疫アッセイ系における感度の比較を示す。

【図 13】 基質 A の貯蔵安定性試験の結果を示す。

【図 14】 ビオチン標識アルカリホスファターゼと結合したストレプトアビジン標識トシル基活性化 D y n a b e a d s M - 2 8 0 を用いて基質 A、B および C、C D P - S t a r / E m e r a l d - I I、競合者のフラッシュ ( F l a s h ) 基質 D、および競合者のグロー ( G l o w ) 基質 E の速度論的評価の結果を示す。

【図 15】 至適読み込み時点および室温で可変量のビオチン標識アルカリホスファターゼと結合したストレプトアビジン標識トシル基活性化 D y n a b e a d s M - 2 8 0 の感度曲線を示す。

【図 16】 信号を 2 分目に読み込んだ、至適読み込み時点、室温で可変量のビオチン標識アルカリホスファターゼと結合したストレプトアビジン標識トシル基活性化 D y n a b e a d s M - 2 8 0 の感度曲線を示す。

【図 17】 D y n a b e a d s M y O n e カルボン酸および基質 A / E m e r a l d - I I I、基質 B、および C D P - S t a r / E m e r a l d I I を使用して 37 で測定した光の放射速度論対、信号対雑音を示す。

【図 18】 基質 A / E m e r a l d - I I I、基質 B、および C D P - S t a r / E m e r a l d - I I を使用して抗 c T n I と結合した D y n a b e a d s M y O n e カルボン酸ビーズ上で、37 で実施したヒト心臓トロポニン ( c T n I ) 免疫アッセイにおける性能を示す。

【図 19】 基質 A を使用した D y n a b e a d s M y O n e カルボン酸、D y n a b e a d s M - 2 8 0、D y n a b e a d s M - 2 7 0 ビーズに基づく c T n I 免疫アッセイにおいて 37 で測定した c T n I 感度曲線を示す。

【図 20】 各読み込み時点で基質 A、B および C、C D P - S t a r / E m e r a l d - I I、および V e n d o r X の基質 D を併用した D y n a b e a d s M - 2 7 0 エポキシビーズに基づく c T n I 免疫アッセイの性能を示す。

【発明を実施するための形態】

【0137】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に記載する前に、本発明は本明細書において開示される実施形態に限定されていないことを理解されたい。さらに、方法およびキットは、様々な工程または構成要素を「含む」という用語で記載される（「含むが、これらに限定されない」という意味として解釈される）が、方法およびキットはまた、様々な工程および構成要素からも「本質的に成る」または「成る」ことができ、かかる用語は閉じたメンバーの群を本質的に定義すると解釈されるべきである。最後に、本明細書および添付の特許請求の範囲内で使用される、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に指示しない限り複数の指示物を含むものとする。

【0138】

定義：

アクセプター色素は、光を放射する別の分子からエネルギー（特に光）を受け取り、次には、検出可能なエネルギー（やはり好ましくは光）を放射することができる分子を指す。

。

10

20

30

40

50

## 【0139】

分析物は、分析手順において決定される物質または化学物質の組成を指す。本明細書において使用される場合、この用語は、抗原または抗体を含むが、これらに限定されない。

## 【0140】

抗原は、抗体が結合できる物質を指す。

## 【0141】

抗体は、脊椎動物の血液または他の体液中に見出され、外来物を同定し中和するために免疫系によって使用されるガンマグロブリンタンパク質を指す。本明細書において使用される時、この用語は、抗原を結合することができる任意のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体またはその断片を含むが、これらに限定されない。

10

## 【0142】

増強剤は、1, 2-ジオキセタン酵素基質の酵素的切断およびその後の分解からもたらされる特異的な光エネルギー産生を増加させ、観察されたこの光産生が増強剤のない状態で観察されたものを超える、水溶性物質を指す。

## 【0143】

酵素は化学反応を触媒するタンパク質を指す。

## 【0144】

ハプテンは、大きな担体（タンパク質等）に結合された場合のみ免疫反応を誘発できる低分子を指す。

## 【0145】

加水分解酵素またはヒドロラーゼは、化学結合の加水分解を触媒し、酵素のEC番号分類においてEC3として分類される酵素を指す。

20

## 【0146】

核酸は、単鎖または二重鎖DNA、RNAまたはその断片を指す。

## 【0147】

オリゴヌクレオチドは短い核酸ポリマーを指す。本明細書において使用される時、この用語は、2~1000の核酸を含む核酸ポリマーを含むが、これらに限定されない。

## 【0148】

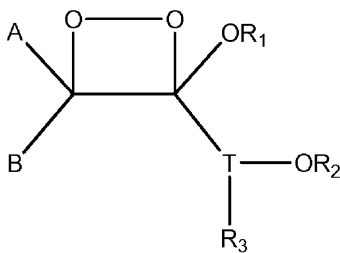
本発明は、1, 2-ジオキセタンである化合物を提供する。本発明は、1つまたは複数の本発明の化合物を使用する方法も提供する。提供される方法は、光の生成方法である。光の生成を使用して、試料中の酵素、抗原または核酸を含む1つまたは複数の分析物の存在および/または量を決定することができる。本発明は、試料中の1つまたは複数の分析物の存在および/または量を検出するためのキットも提供する。別の態様では、本発明は、光の生成のためのキットを提供する。キットは、1つまたは複数の本発明の化合物を含む。これらの化合物、方法およびキットは、当技術分野で認められているアッセイにおいて有用である。

30

## 【0149】

1つの態様では、本発明は、1, 2-ジオキセタンであり得る化合物を提供する。これらとしては、下記に示す各置換基を有する構造[1]~[4]を有するものが挙げられるが、これらに限定されない：

40



[1]

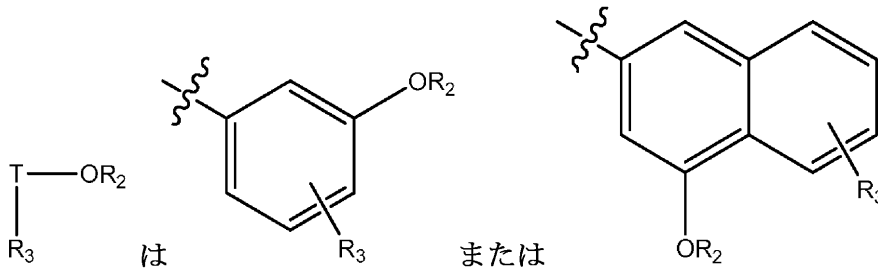
式中、

AおよびBは独立して、直鎖アルキル、直鎖アルケニル、分岐状アルキル、分岐状アル

50

ケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルキル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、またはAおよびBは一緒になって八口ゲンにより置換されたポリシクロアルキルを形成し；

10



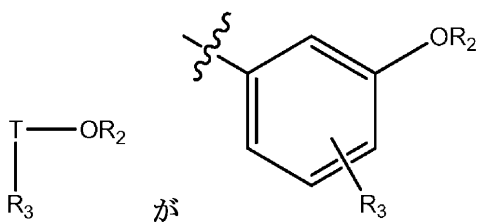
であり；

$R_1$  は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3~20個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり得；

20

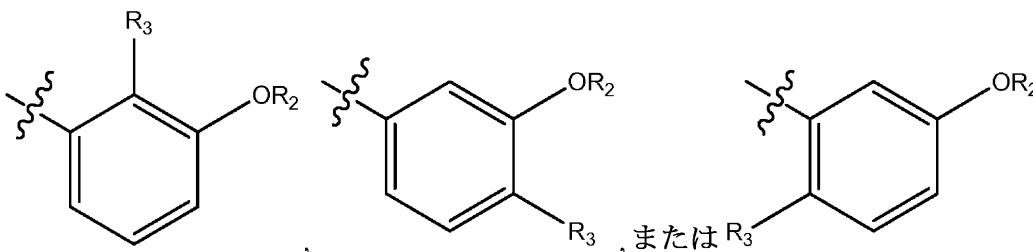
$R_2$  は、T上に酸素アニオンを生じさせる酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり得；かつ

$R_3$  は、水素または電子供与基であり得；ただし $R_1$ が置換されない場合、 $R_3$ は電子供与基であるものとし；



30

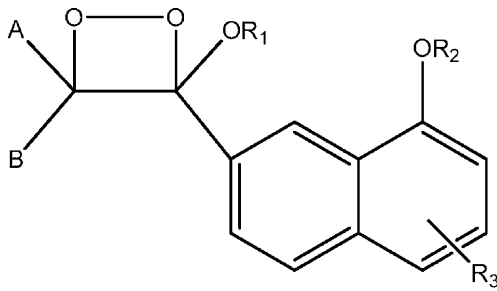
である場合、それは、



40

であり得る。

【0150】



[2]

式中、

A および B は独立して、直鎖アルキル、直鎖アルケニル、分岐状アルキル、分岐状アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルキル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

10

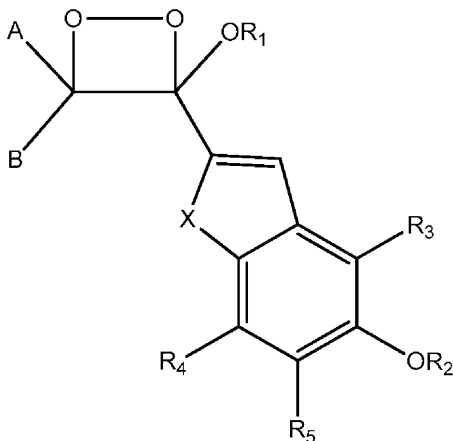
R<sub>1</sub> は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり得；

20

R<sub>2</sub> は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり得；かつ

R<sub>3</sub> は、水素または電子供与基であり得る。

【0151】



[3]

式中、

A および B は独立して、直鎖アルキル、直鎖アルケニル、分岐状アルキル、分岐状アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルキル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の 1 つは、置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または 1 つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

40

R<sub>1</sub> は、1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 1 ~ 20 個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または 1 つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい 3 ~ 20 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり得；

50



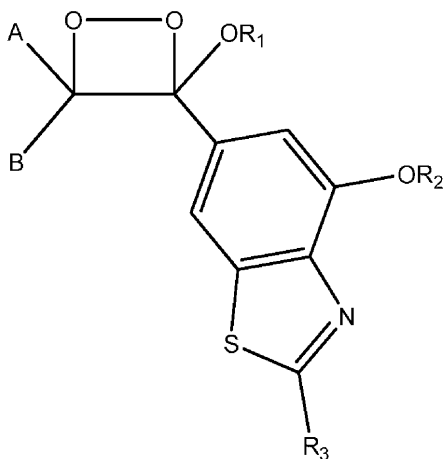
$R_2$  は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり得；

$R_3$  は、水素または電子供与基であり得；

$R_4$  および  $R_5$  は独立して、H、F、Cl、Br、I、シアノ、ニトロ、スルホネート、サルフェート、トリフルオロメチル、トリフルオロエチル、1~20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3~20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、2~20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3~20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3~20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3~20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3~20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3~20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4~60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4~60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4~60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキル、4~60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニル、1~20個の炭素原子を含むアルコキシ、6~14個の炭素原子を含むアリール、6~14個の炭素原子を含むアリールオキシ、2~21個の炭素原子を含むエステル、3~30個の炭素原子を含むトリアルキルアンモニウム、3~30個の炭素原子を含むトリアルキルホスホニウム、2~21個の炭素原子を含むアルキルアミド、7~15個の炭素原子を含むアリールアミド、2~21個の炭素原子を含むアルキルカルバモイル、7~15個の炭素原子を含むアリールカルバモイル、1~20個の炭素原子を含むアルキルスルホンアミド、6~14個の炭素原子を含むアリールスルホンアミド、3~60個の炭素原子を含むトリアルキルシリル、18~42個の炭素原子を含むトリアリールシリル、7~32個の炭素原子を含むアルキルアリールシリル、1~20個の炭素原子を含むアルキルアミドスルホニル、6~14個の炭素原子を含むアリールアミドスルホニル、1~20個の炭素原子を含むアルキルスルホニル、6~14個の炭素原子を含むアリールスルホニル、2~20個の炭素原子を含むアルキルチオおよび6~14個の炭素原子を含むアリールチオからなる群より選択され得；かつ

X は、硫黄原子、酸素原子、もしくは窒素原子である。

【0152】



[4]

式中、

A および B は独立して、直鎖アルキル、直鎖アルケニル、分岐状アルキル、分岐状アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルキル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、A および B が一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく；

$R_1$  は、1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~20個の炭

素原子を含む直鎖アルキル、または1つもしくは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい3～20個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであり得；

R<sub>2</sub>は、酸素アニオンを生じさせるよう酵素部分によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基であり得；かつ

R<sub>3</sub>は、水素または電子供与基であり得る。

#### 【0153】

化合物[1]の一部の実施形態では、AおよびBは独立して、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2～20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルケニル、ポリシクロアルケニル、ポリシクロヘテロアルキルおよびポリシクロヘテロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、またはAおよびBは一緒になってハロゲンにより置換されたポリシクロアルキルを形成する。

10

20

#### 【0154】

化合物[2]～[4]の一部の実施形態では、AおよびBは独立して、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、2～20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキルおよび4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニルからなる群より選択され得、これらのうちの任意の1つは、置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよく、AおよびBが一緒になってシクロアルキル、シクロアルケニル、ポリシクロアルキルまたはポリシクロアルケニルを形成する場合には、形成された基は置換されていなくてもよく、または1つもしくは複数の電子活性基、可溶化基、もしくは光増強基により置換されていてもよい。

30

#### 【0155】

電子活性基の例としては、F、Cl、Br、I、シアノ、ニトロ、スルホネート、サルフェート、トリフルオロメチル、トリフルオロエチル、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、2～20個の炭素原子を含む直鎖アルケニル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロアルケニル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルキル、3～20個の炭素原子を含むシクロヘテロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロアルケニル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルキル、4～60個の炭素原子を含むポリシクロヘテロアルケニル、1～20個の炭素原子を含むアルコキシ、6～14個の炭素原子を含むアリール、6～14個の炭素原子を含むアリールオキシ、2～21個の炭素原子を含むエステル、3～30個の炭素原子を含むトリアルキルアンモニウム、3～30個の炭素原子を含むトリアルキルホスホニウム、2～21個の炭素原子を含むアルキルアミド、7～15個の炭素原子を含むアリールアミド、2～21個の炭素原

40

50

子を含むアルキルカルバモイル、7～15個の炭素原子を含むアリールカルバモイル、1～20個の炭素原子を含むアルキルスルホンアミド、6～14個の炭素原子を含むアリールスルホンアミド、3～60個の炭素原子を含むトリアルキルシリル、18～42個の炭素原子を含むトリアリールシリル、7～32個の炭素原子を含むアルキルアリールシリル、1～20個の炭素を含むアルキルアミドスルホニル、6～14個の炭素原子を含むアリールアミドスルホニル、1～20個の炭素原子を含むアルキルスルホニル、6～14個の炭素原子を含むアリールスルホニル、2～20個の炭素原子を含むアルキルチオおよび6～14個の炭素原子を含むアリールチオが挙げられる。

【0156】

電子活性基は、電子供与基および電子求引基を含む。電子供与基の例としては、アルキル、アルコキシ、非置換および置換アミノ基等が挙げられるが、これらに限定されない。電子求引基としては、ハロゲン、シアノ、ニトロ、カルボキシ、エステル、カルボキサミド基等が挙げられるが、これらに限定されない。可溶化基としては、カルボキシ、スルホネート、サルフェート、トリアルキルアンモニウム、トリアルキルホスホニウム基等が挙げられるが、これらに限定されない。可溶化基としては、ヒドロキシ、カルボキシ、ホスフェート、スルホネート、サルフェート、トリアルキルアンモニウム、トリアルキルホスホニウム等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0157】

可溶化基の例としては、カルボン酸基、マロン酸基、ヒドロキシル基、サルフェート基、スルホネート基、ホスフェート基およびアンモニウム基；ポリ(エトキシ)<sub>n</sub>基[-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>]（式中、n=1～30、カルボン酸基、マロン酸基、ヒドロキシル基、サルフェート基、スルホネート基、ホスフェート基およびアンモニウム基を末端とする）；ポリ[-O-(CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>]（式中、n=1～30、カルボン酸基、マロン酸基、ヒドロキシル基、サルフェート基、スルホネート基、ホスフェート基およびアンモニウム基を末端とする）が挙げられる。

20

【0158】

光増強基の例としては、アルキルアンモニウム基、アルキルホスホニウム基、アルキルスルホニウム基；アルキルアリールアンモニウム基、アルキルアリールホスホニウム基およびアルキルアリールスルホニウム基；またはアリールアンモニウム基、アリールホスホニウム基およびアリールスルホニウム基；およびポリ(アルキルアンモニウム)基、ポリ(アルキルホスホニウム)基、ポリ(アルキルスルホニウム)基；ポリ(アルキルアリールアンモニウム)基、ポリ(アルキルアリールホスホニウム)基およびポリ(アルキルアリールスルホニウム)基；またはポリ(アリールアンモニウム)基、ポリ(アリールホスホニウム)基およびポリ(アリールスルホニウム)基等のカチオン性部分またはポリカチオン性部分が挙げられる。

30

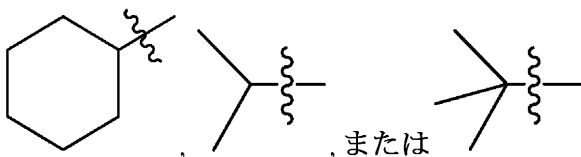
【0159】

ハロゲン基としては、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素原子が挙げられる。

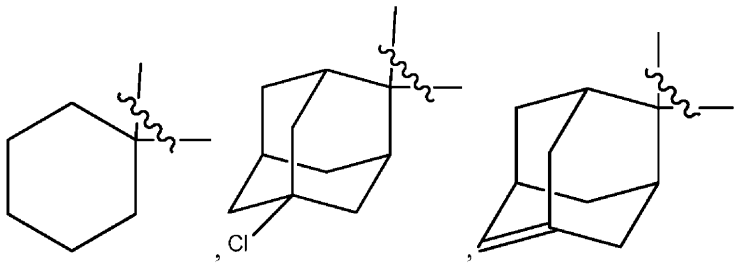
【0160】

化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、AまたはBのうちの少なくとも1つは、

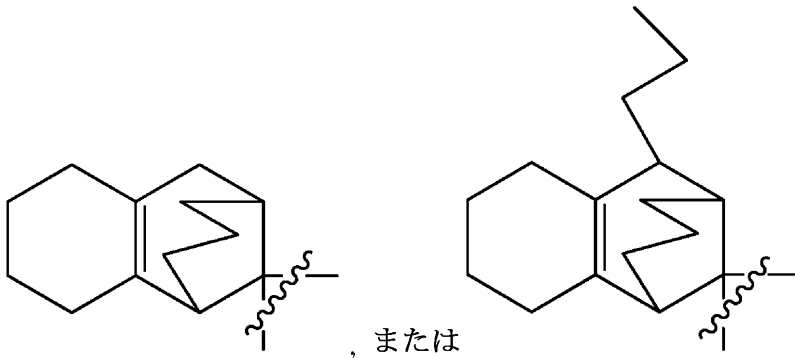
40



であり得る。化合物[1]の一部の実施形態では、AおよびBは全体として、

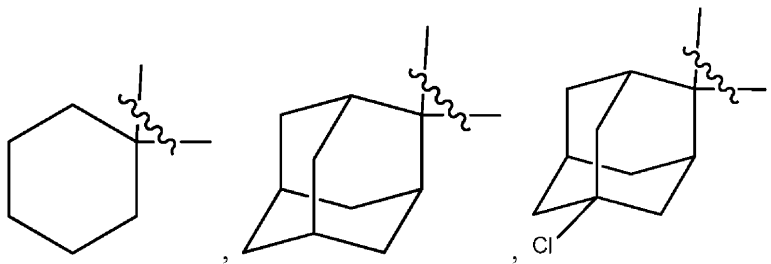


10

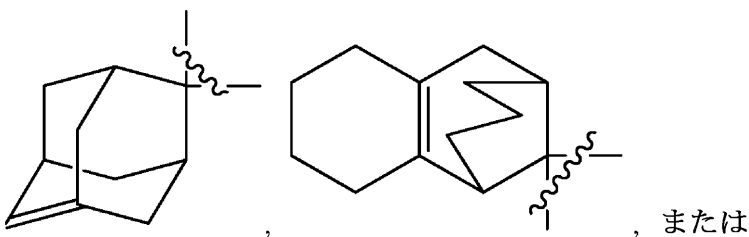


であり得る。化合物 [ 2 ] ~ [ 4 ] の一部の実施形態では、A および B は全体として、

20



30



40

であり得る。

【 0 1 6 1 】

化合物 [ 1 ] ~ [ 4 ] の一部の実施形態では、 $R_1$  は、1つまたは複数のハロゲン原子により置換されていてもよい1~5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであり得る。他の実施形態では、 $R_1$  は、1~2個の炭素原子を含む直鎖アルキルであっても1~2個の炭素原子を含む直鎖トリフルオロアルキルであってもよい。他の実施形態では、 $R_1$  は、メチルであっても1, 1, 1-トリフルオロエチルであってもよい。

【 0 1 6 2 】

50

一部の実施形態では、化合物 [ 1 ] は、光を放射できる、ヘテロアリール環を含むが、これに限定されない、アリール環化合物または縮合多環式化合物であり得る T を有する。T は、光の産生を妨害せず、それが結合しているジオキセタン環の 4 - 炭素原子の原子価を満たすように、選択される。T は、対応するジオキセタン分解断片がエネルギーを吸収し、励起状態を形成し、その励起状態から断片が光学的に検出可能なエネルギーを放射して基底状態に戻ることを可能にする多数の光放射性の発蛍光団形成性蛍光発色団基のいずれかを示す。T はまた、酵素によって切断可能な結合を含む、酵素により切断可能な基により置換されて、ジオキセタン環に結合された電子濃厚部分（例えば酸素アニオン、硫黄アニオンまたは窒素アニオン）を、直接的または後続の pH 調整のいずれかによって産出する。

10

## 【 0 1 6 3 】

一部の実施形態では、T はアリール（フェニル等）であり得、電子活性基、可溶化基または光増強基により置換され得る。

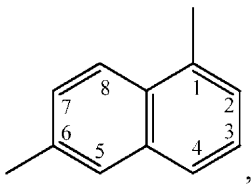
## 【 0 1 6 4 】

一部の実施形態では、T は、酵素によって切断された場合に縮合多環式部分を電子濃厚にし、次にジオキセタン化合物を光の放射のために分解可能にする結合を含む、酵素的に切断可能な不安定な環置換基を有する縮合多環含有発蛍光団部分であり得る。

## 【 0 1 6 5 】

その残基がこの発蛍光団部分の形成に使用できる縮合多環式化合物の中には、9 ~ 約 30 の環炭素原子（両端を含める）を含有する縮合多環式芳香族炭化水素環の発蛍光化合物が含まれ、例えばナフタレン：

20



ペントレン、アズレン、ヘプタレン、a s - インダセン、s - インダセン、ピフェニレン、ペリレン、アセナフチレン、フェナントレン、アントラセン、アセフェナントリレン、アセアントリレン、トリフェニレン、ピレン、クリセン、ナフタセン等に加えて、1 つまたは複数の非不安定置換基、例えば、1 ~ 20 個の炭素原子（両端を含む）を有する分岐状または直鎖アルキル基（例えばメチル、n - ブチルまたはデシル）、1 ~ 7 個の炭素原子（両端を含む）を有する分岐状または直鎖ヘテロアルキル基（例えばメトキシ、ヒドロキシエチルまたはヒドロキシプロピル）；1 もしくは 2 つの環を有するアリール基（例えばフェニル）；1 もしくは 2 つの環を有するヘテロアリール基（例えばピロリルまたはピラゾリル）；環内に 3 ~ 7 個の炭素原子（両端を含む）を有するシクロアルキル基（例えばシクロヘキシル）；環内に 3 ~ 6 個の炭素原子（両端を含む）を有するヘテロシクロアルキル基（例えばジオキサン）；1 もしくは 2 つの環を有するアラルキル基（例えばベンジル）；1 もしくは 2 つの環を有するアルカリール基（例えばトリル）；電子求引基（1 ~ 7 個の炭素原子（両端を含む）を有するペルフルオロアルキル基等、例えばトリフルオロメチル）；ハロゲン； $\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{Z}'\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{Z}'\text{NO}_2$ 、 $\text{CN}$ 、または  $\text{Z}'\text{CN}$ （式中、 $\text{Z}'$  は 1 ~ 7 個の炭素原子（両端を含む）を有する分岐状または直鎖アルキル基、例えばメチル基、または 1 もしくは 2 つの環を有するアリール基（例えばフェニル）である）；電子供与基（例えば分岐状または直鎖の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$  アルコキシ基、例えばメトキシまたはエトキシ）；1 もしくは 2 つの環を有するアラルコキシ基（例えばフェノキシ）；分岐状または直鎖の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$  アルコキシ基（例えばメトキシまたはエトキシ）；1 もしくは 2 つの環を有するアラルコキシ基（例えばフェノキシ）；分岐状または直鎖の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$  ヒドロキシアルキル基（例えばヒドロキシメチルまたはヒドロキシエチル）；1 もしくは 2 つの環を有するヒドロキシアリール基（例えばヒドロキシフェニル）；分岐状または直鎖の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$  アルキルエステル基（例えばアセテート）；1 もしくは

30

40

50

2つの環を有するアリールエステル基（例えばベンゾアート）；または1もしくは2つの環を有するヘテロアリール基（例えばベンゾオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾイミダゾールまたはベンゾトリアゾール）により置換されたその誘導体が包含される。

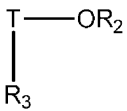
【0166】

さらに、Tによって示される発蛍光団部分の縮合多環式部分は、縮合多環式芳香族複素環の蛍光化合物、例えば、ベンゾ[b]チオフェン、ナフト[2,3-b]チオフェン、チアントレン、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサテン、フェノキサチン、キノリン、イソキノリン、フェナントリジン、フェナジン、フェノキサジン、フェノチアジン、フェナントロリン、プリン、4H-キノリジン、フタラジン、ナフチリジン、インドール、インドリジン、クロマン、イソクロマン、インドリン、イソインドリン等の残基でもあり得、非置換であるかまたは上記の非不安定置換基の1つまたは複数により置換され、9～約30の環原子（両端を含む）を含有し、その大部分は炭素原子である。

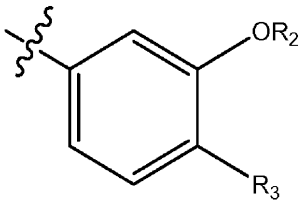
10

【0167】

化合物[1]の一部の実施形態では、

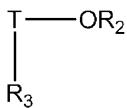


は、

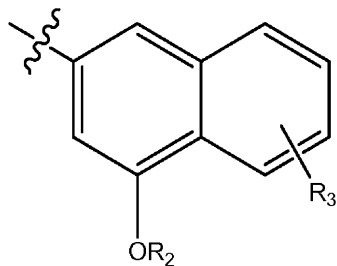


20

であり得、一方、他の実施形態では、



は、



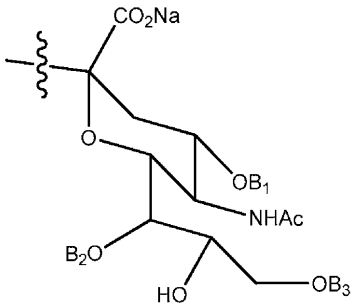
30

であり得る。

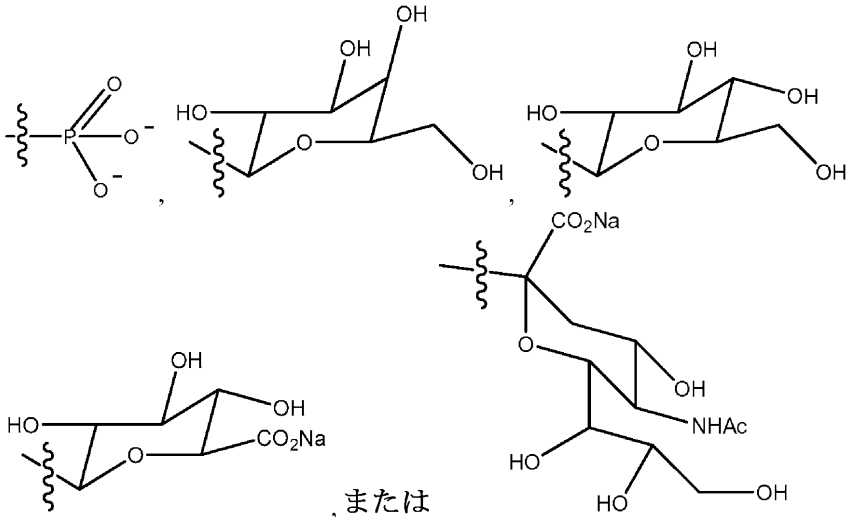
【0168】

化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、OR<sub>2</sub>は、ホスフェート、アセテート、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセリド、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、アデノシン一リン酸、アデノシン、-D-ガラクトシド、-D-ガラクトシド、-D-グルコシド、-D-グルコシド、-D-マンノシド、-D-マンノシド、-D-フルクトフラノシド、-D-グルクロニド、または

40



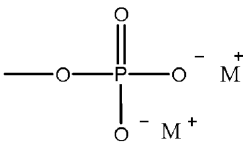
であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$  および  $B_3$  はそれぞれ独立して、 $H$ 、1 ~ 4 個の炭素原子を含む直鎖アルキル（分岐状または直鎖）であっても 3 ~ 6 個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルであってもよい。これらの実施形態の一部では、 $R_2$  は、



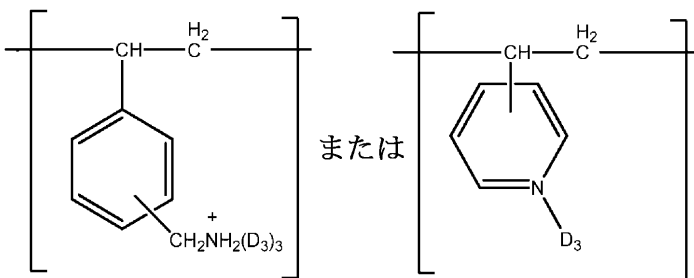
であり得る。

【0169】

化合物 [ 1 ] ~ [ 4 ] の一部の実施形態では、 $R_2$ （酵素的に切断可能な置換基）は、一般式：



（式中、 $M^+$  は、カチオン（アルカリ金属（例えばナトリウムまたはカリウム）、アンモニウム、または  $C_{1-7}$  アルキル、アラルキルもしくは芳香族第四級アンモニウムカチオン、 $N(DR_3)_4^+$ （式中、各  $D_3$  はアルキル、例えばメチルまたはエチル、アラルキル、例えばベンジルであり得るか、または複素環系（例えばピリジニウム）、および特にジナトリウム塩の一部を形成し得る）等）を示す）によって示されるリン酸エステル基であり得る。かかる第四級アンモニウムカチオンは、ポリマー性骨格にそれらの四級化基の 1 つを通して連結され得、すなわち



（式中、 $n$  は 1 より大きい）、またはポリ第四級アンモニウム塩（すなわちイオンポリマー）の一部であり得る。

## 【0170】

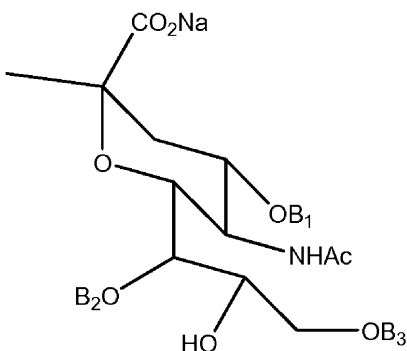
化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、 $R_2$ は、 $E-L-Nuc-Z$ であり得、式中、 $E$ は求電子性原子を含む基であり、該原子は、 $Z$ 基の酵素的切断に際して $Nuc$ 基の電子対によって攻撃され、隣接基関与によって化合物アニオンを放出し； $L$ は連結基であり； $Nuc$ は求核原子であり； $Z$ は酵素により切断可能な基であり；式中

$E$ は、カルボキシル、カルボニル、脱離基によって置換されたメチレン、ホスフェート、カルボネート、キサンテート、サルファイト、スルホネート、亜硫酸水素塩または二硫化物であり得；

$L$ は、1～4個の炭素原子を含むメチレンもしくはポリメチレン、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 、または $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$ からなる群より選択され得、式中、 $m$ および $n$ は0～3であり、 $m+n$ は2または3であり、式中、 $R_6$ は、1～10個の炭素原子を含むアルキルであり、該連結基は、1～24個の炭素原子を含むアルキル、2～24個の炭素原子を含むアルケニル、1～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルキル、2～24個の炭素原子を含み、かつ1～24個の炭素原子を含むアシルオキシにより一置換もしくは二置換されたアルケニル、6～10個の炭素を含むアリール、1～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾールもしくはカルバミルにより置換されたアルキル、または2～24個の炭素原子を含み、かつフェニル、ヒドロキシフェニル、インドリル、メルカプト、1～4個の炭素原子を含むアルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、グアニジノ、イミダゾール、もしくはカルバミルにより置換されたアルケニルによって置換することができる；

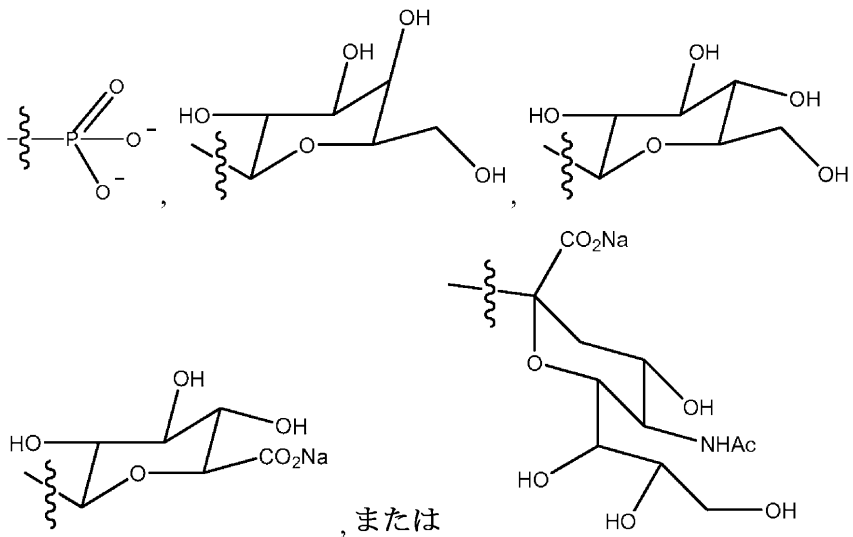
$Nuc$ は酸素原子もしくは硫黄原子であり得；かつ

$Z$ は、ホスホリル、アセチル、1-ホスホ-2,3-ジアシルグリセロシル、アデノシントリホスホリル、アデノシンジホスホリル、アデノシンモノホスホリル、アデノシル、-D-ガラクトシル、-D-ガラクトシル、-D-グルコシル、-D-グルコシル、-D-マンノシル、-D-マンノシル、-フルクトフラノシル、-D-グルコシドウランシル、または



であり得、式中、 $B_1$ 、 $B_2$ および $B_3$ はそれぞれ独立して、 $H$ 、1～4個の炭素原子を含む直鎖アルキル、または3～6個の炭素原子を含む分岐鎖アルキルである。これらの実施形態の一部では、 $Z$ は、





であり得る。

【0171】

化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、電子供与基、 $R_3$ は、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキル、3～20個の炭素原子を含む分岐状アルキル、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであっても3～20個の炭素原子を含む分岐状アルコキシであつてもよい。他の実施形態では、 $R_3$ は、1～20個の炭素原子を含む直鎖アルキルであつても1～20個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであつてもよい。他の実施形態では、 $R_3$ は、1～5個の炭素原子を含む直鎖アルキルであつても1～5個の炭素原子を含む直鎖アルコキシであつてもよい。他の実施形態では、 $R_3$ は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシおよびブチルオキシからなる群より選択される。

20

【0172】

化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、25で光が生成され得、これは約15分未満で最大に達する。他の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る。他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

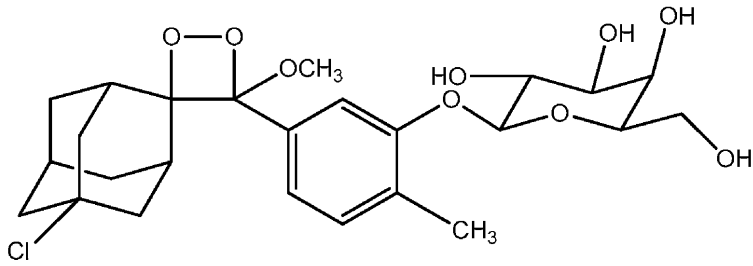
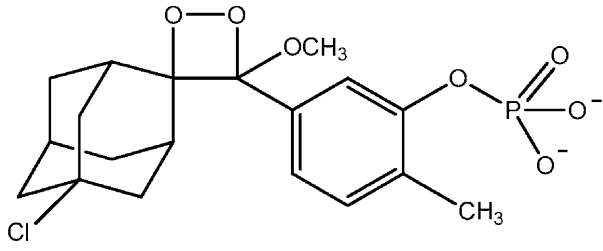
30

【0173】

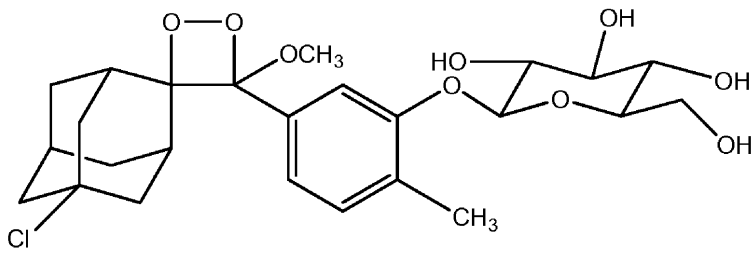
化合物[1]～[4]の一部の実施形態では、酵素部分によって切断可能な結合の切断により、37で光が生成され得、これは約15分未満で最大に達する。他の実施形態では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る。他の実施形態では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。

【0174】

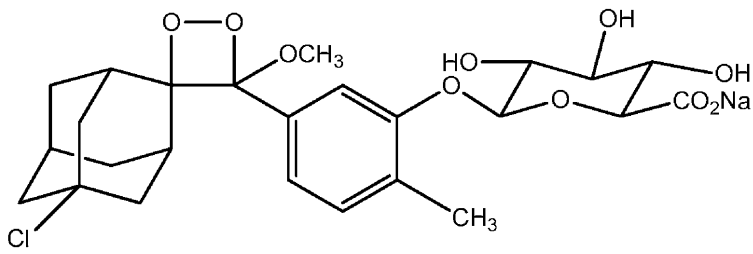
一部の実施形態では、化合物[1]は、

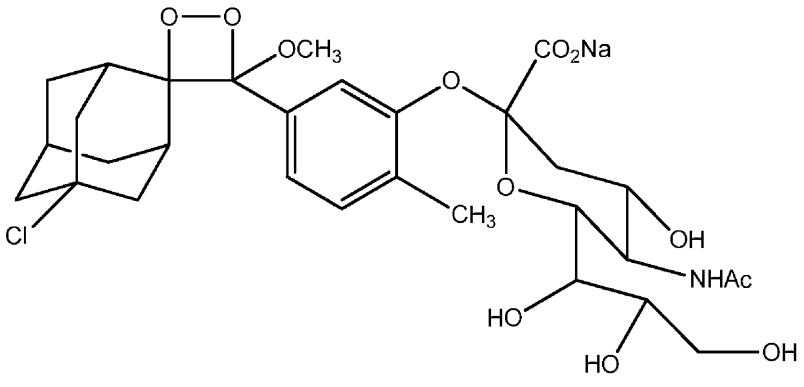


10

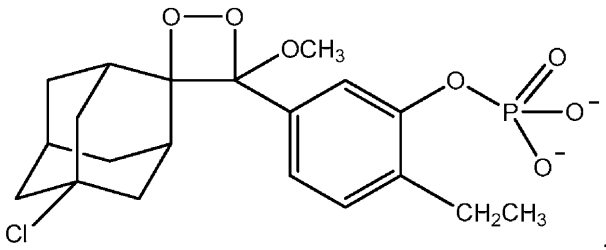


20

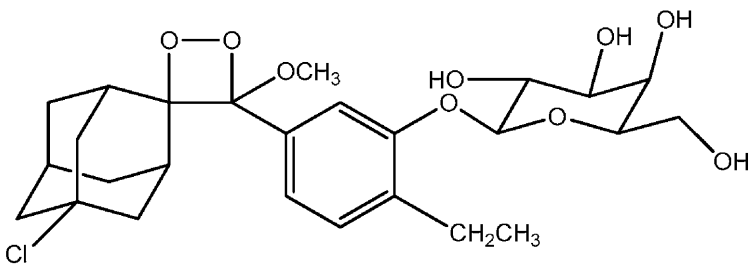




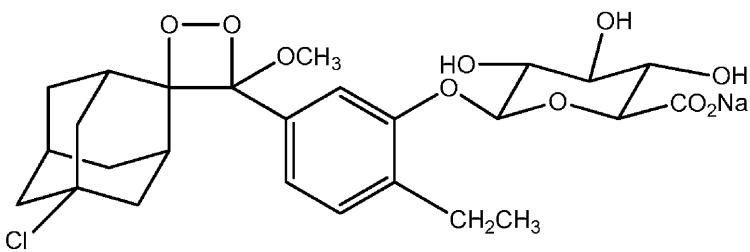
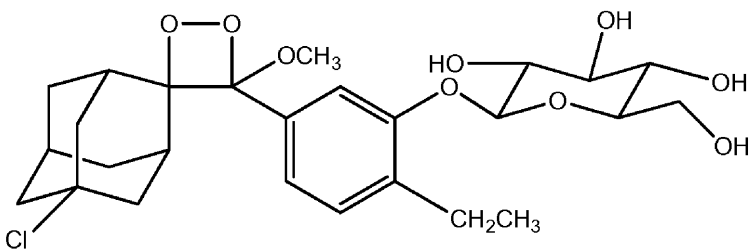
10

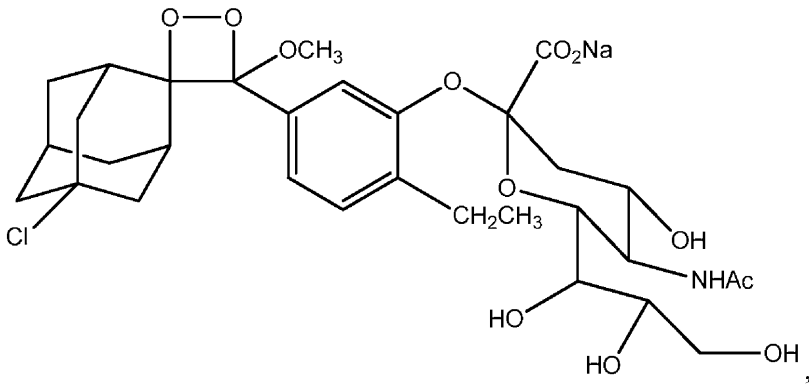


20

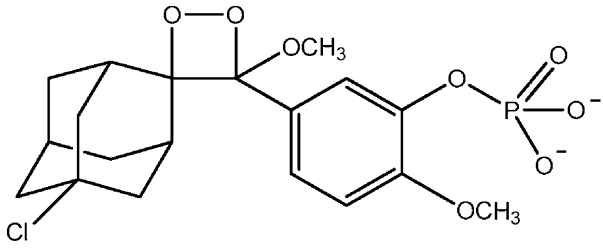


30

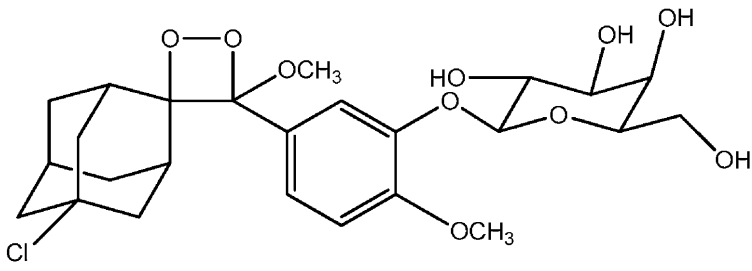




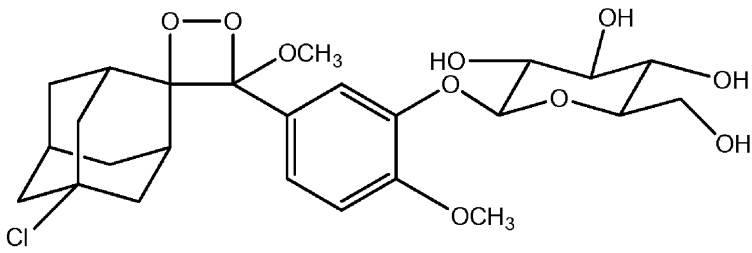
10

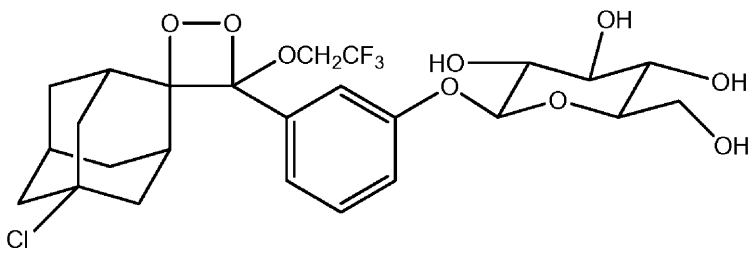
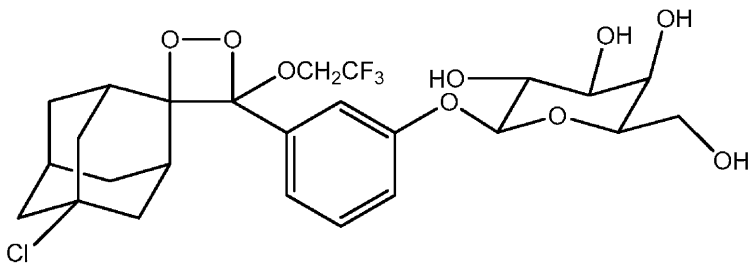
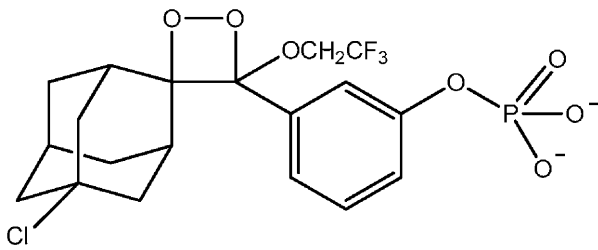
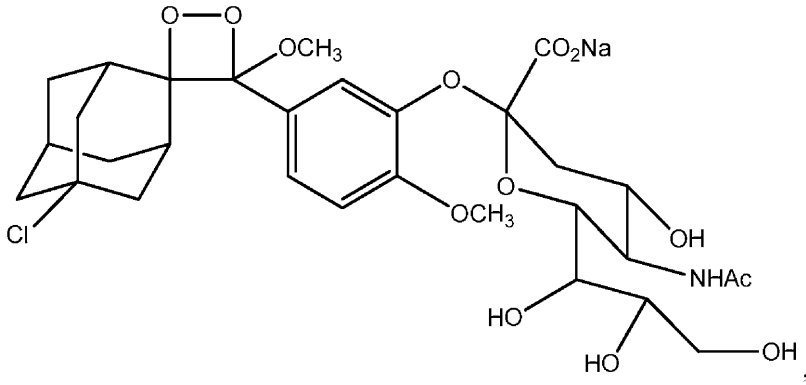
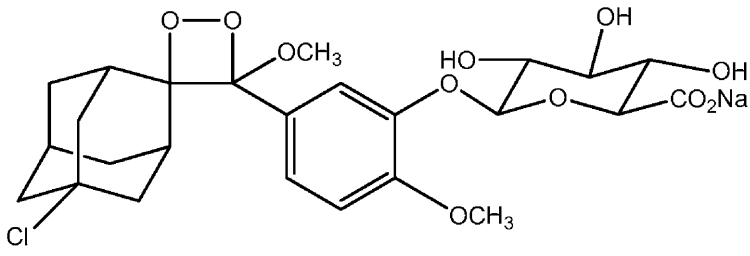


20



30

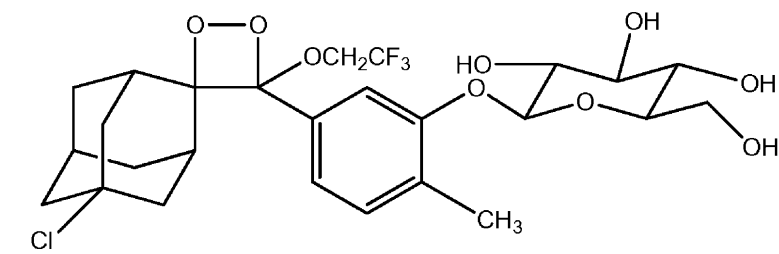
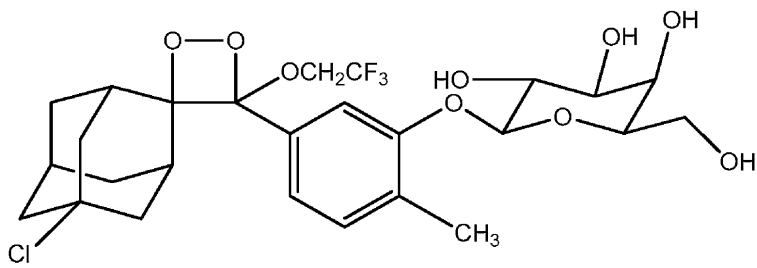
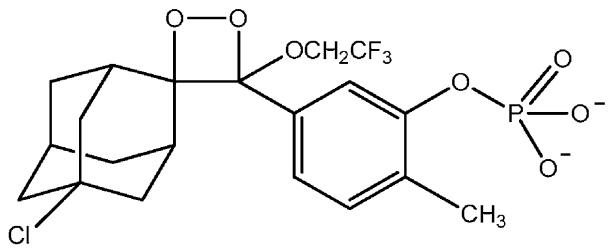
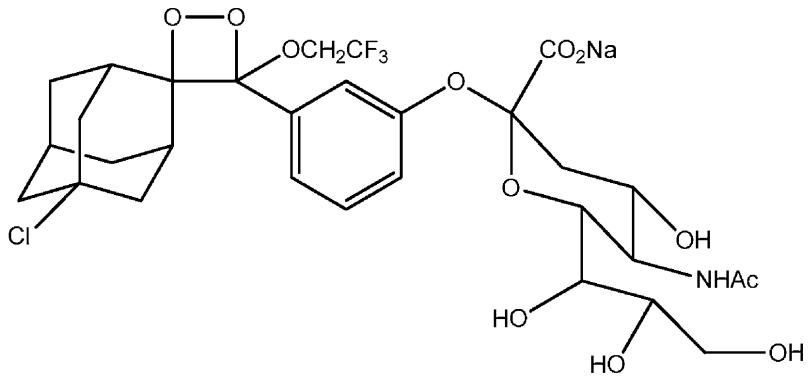
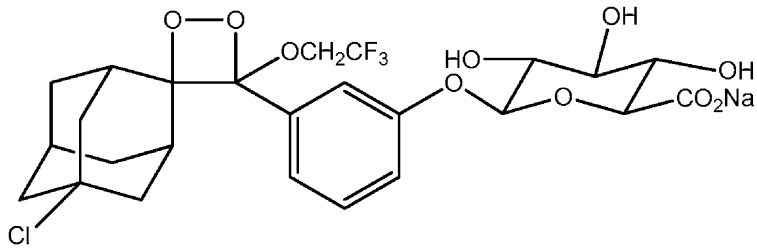




10

20

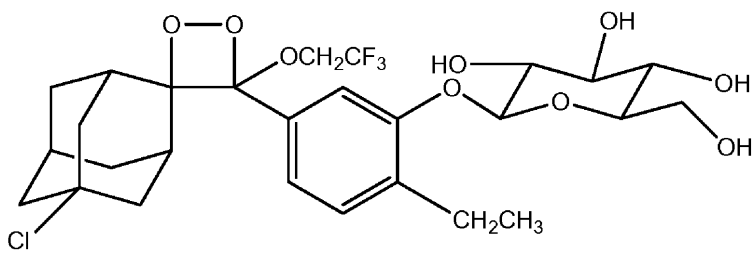
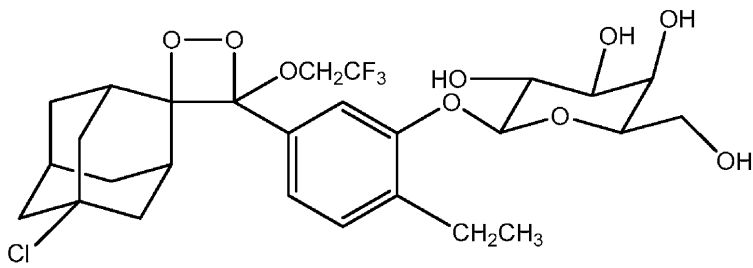
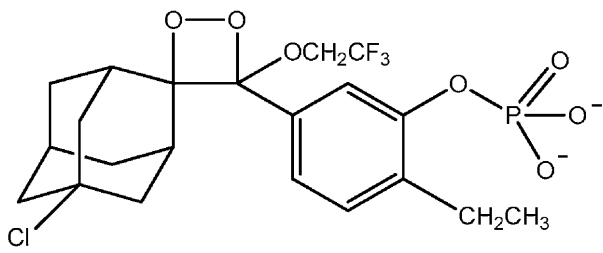
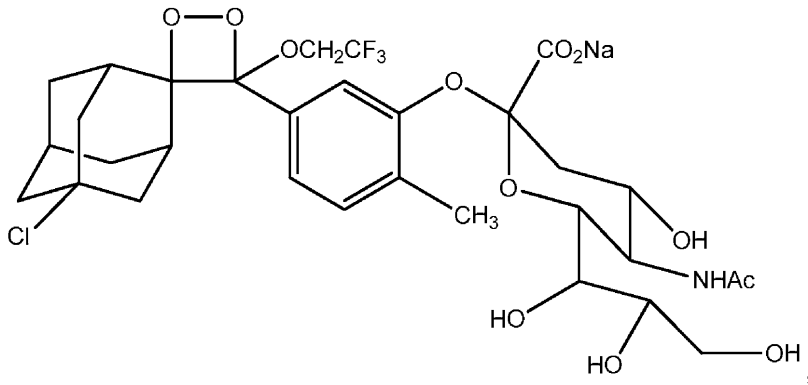
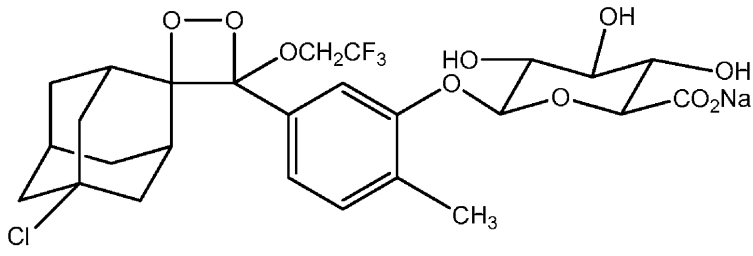
30



10

20

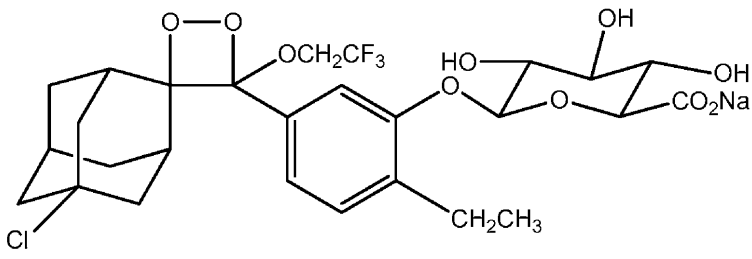
30



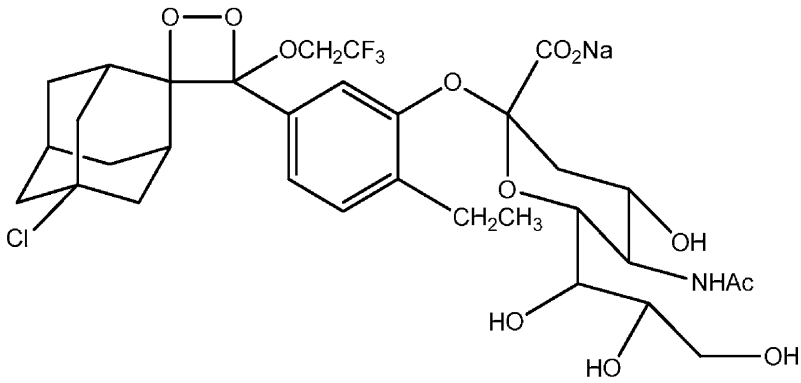
10

20

30



,または



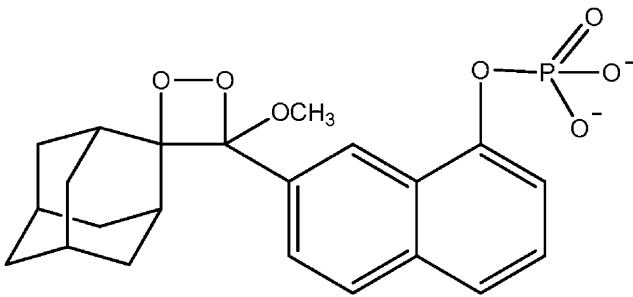
10

であり得る。

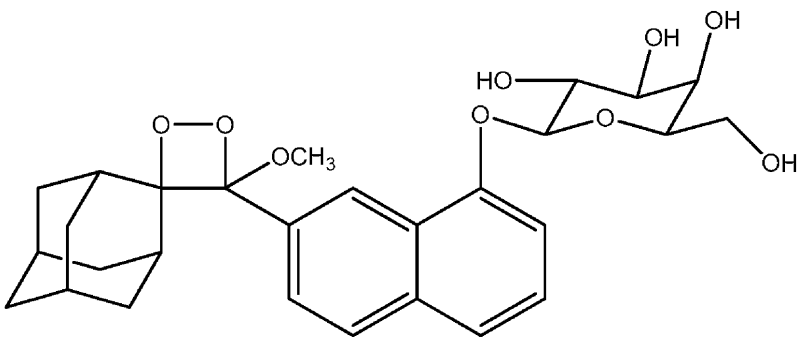
【0175】

一部の実施形態では、化合物[2]は、

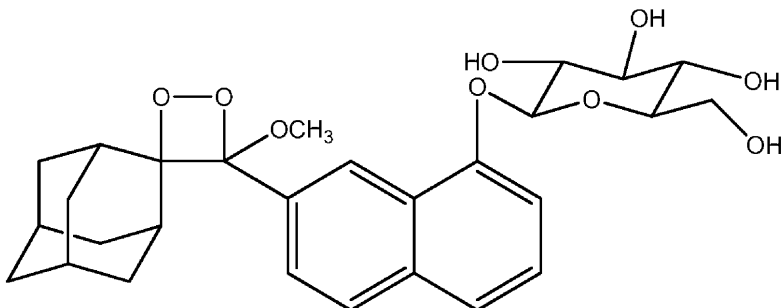
20



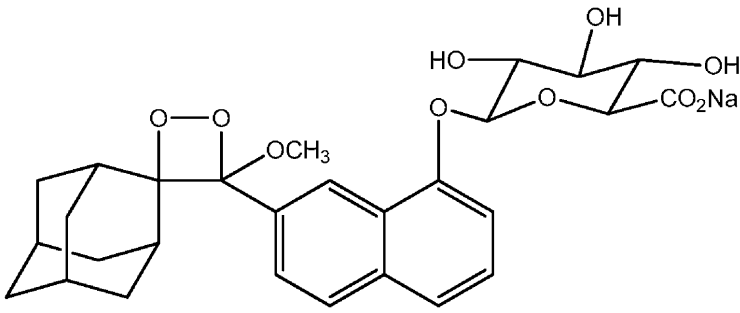
30



40

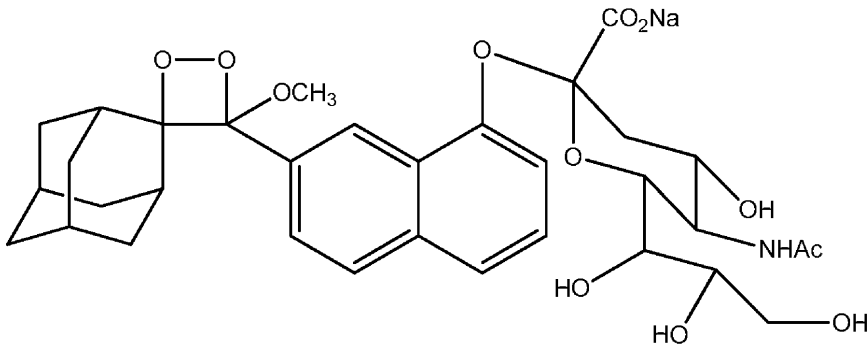






,または

10

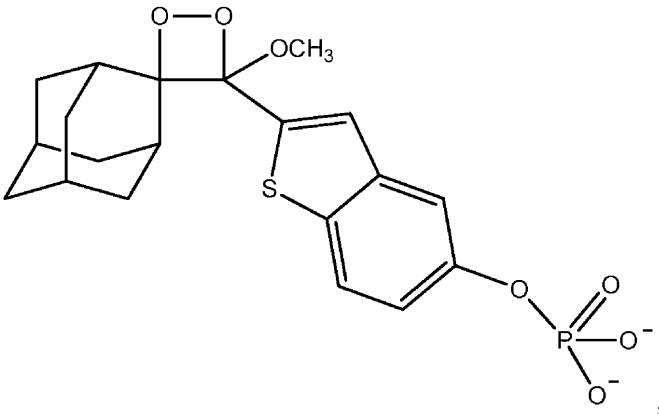


であり得る。

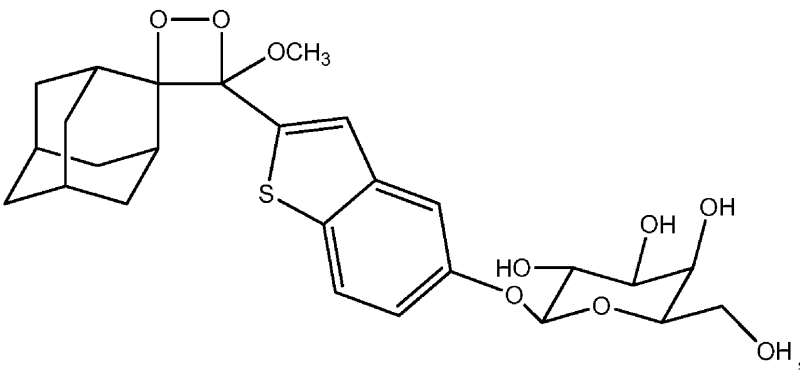
20

【0176】

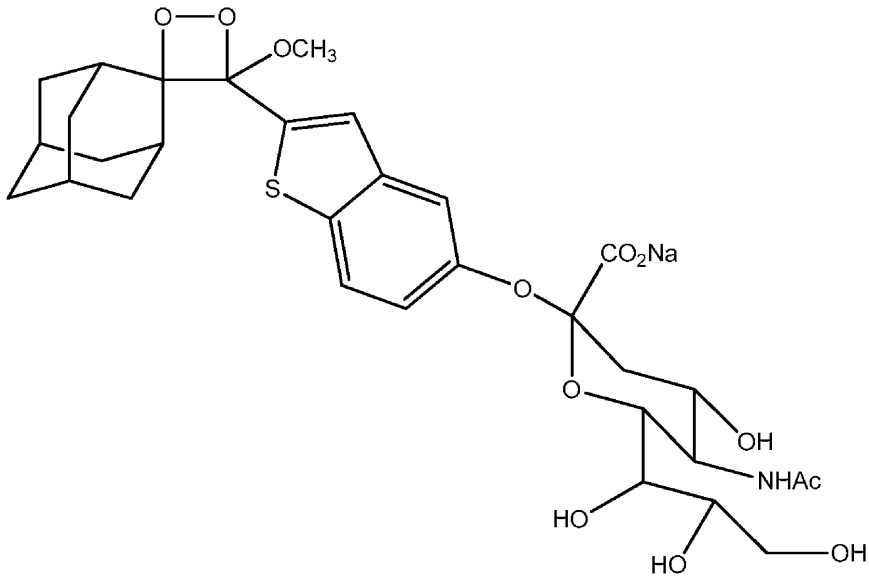
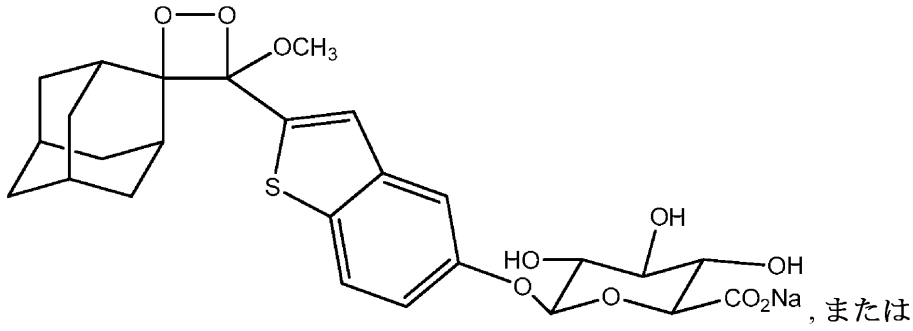
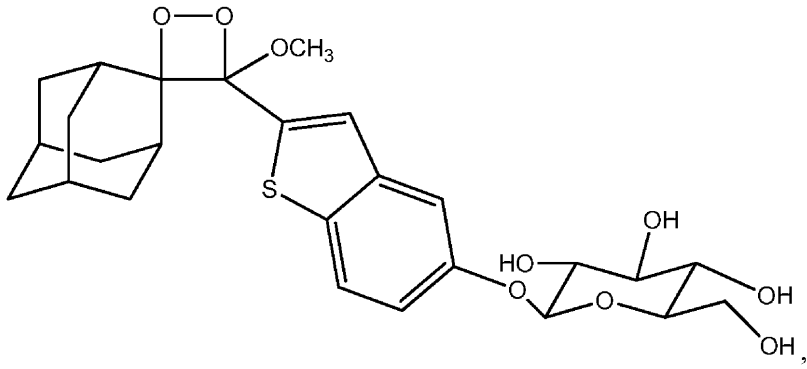
一部の実施形態では、化合物[3]は、



30



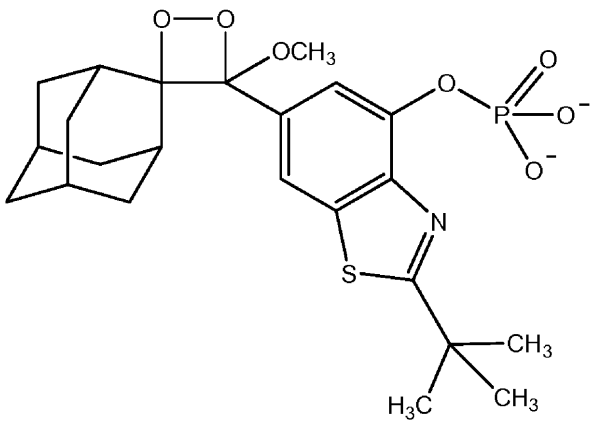
40



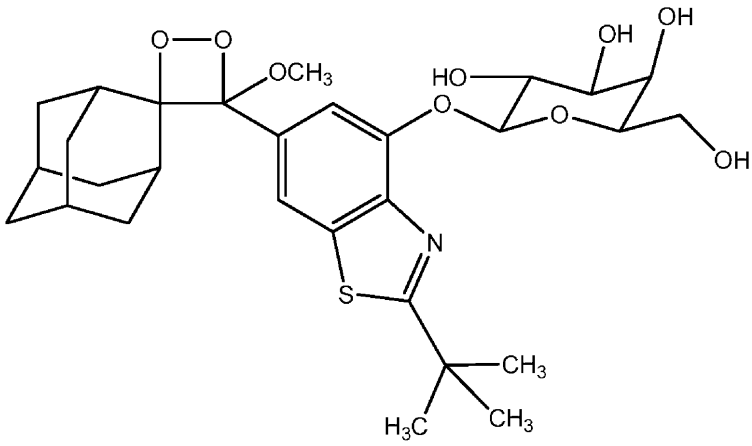
であり得る。

【 0 1 7 7 】

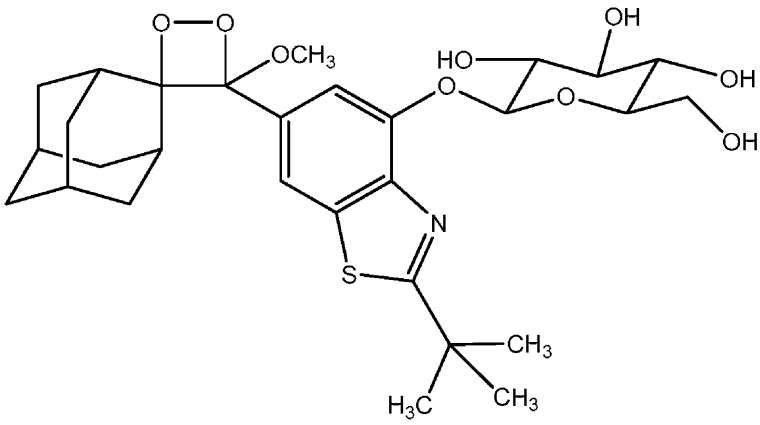
一部の実施形態では、化合物 [ 4 ] は、



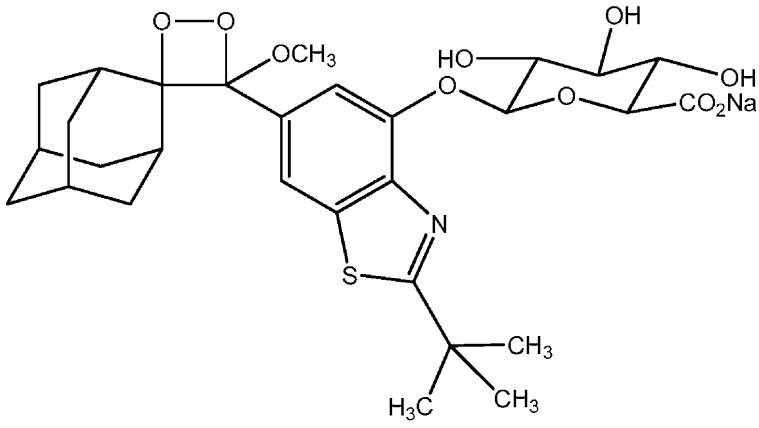
10



20

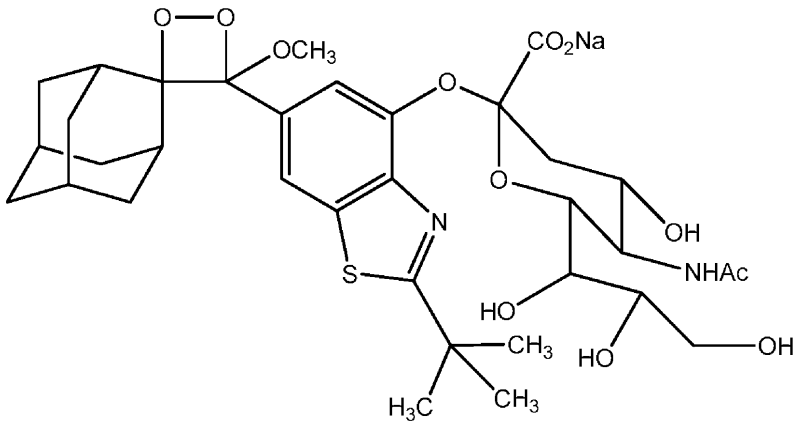


30



10

,または

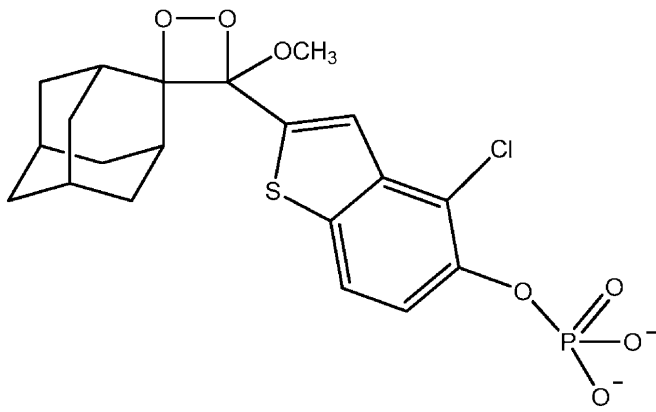


20

であり得る。

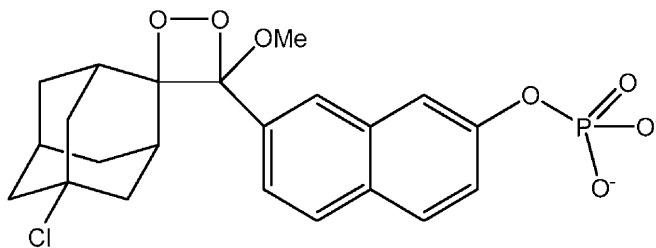
【0178】

一部の実施形態では、本発明の化合物は、



30

,または

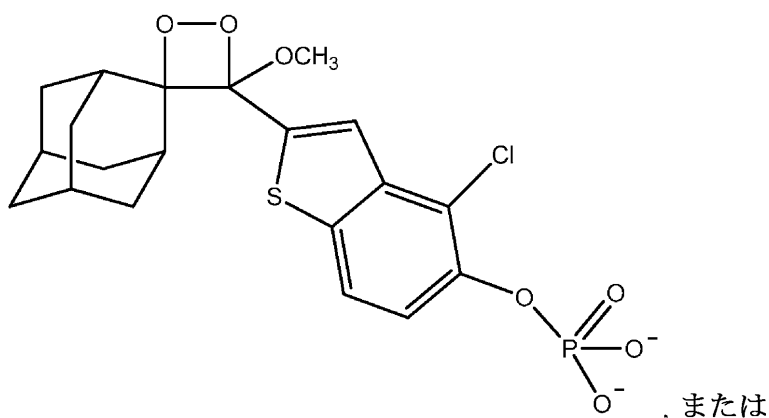


40

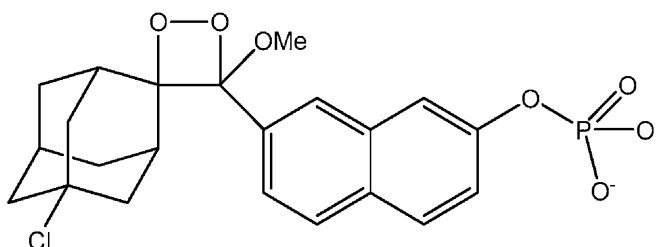
も含み得るが、これらに限定されない。

【0179】

別の態様では、本発明は、



10



である化合物を提供する。

【0180】

上記の本明細書において開示される本発明の化合物のいずれかを、以下または上記の発明の概要に開示の方法およびキットにおいて使用することができる。

【0181】

別の態様では、本発明は、方法を提供する。方法は、上に規定される本発明化合物を提供する工程；該化合物を切断可能な酵素部分を含む酵素複合体を提供する工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、反応混合物に光を生成させる工程を含み得る。

【0182】

これらの方法の1つの工程で、本発明の化合物が提供される。かかる化合物は、式 [ 1 ]、[ 2 ]、[ 3 ]、または [ 4 ] を有し得、上または発明の概要に開示するその任意の実施形態を含み得る。

【0183】

これらの方法の別の工程では、酵素、抗原、抗体、核酸または分析物を含む疑いのある試料が提供される。酵素、抗原、核酸または分析物を含む疑いのある試料をアッセイし得る。試料は生物学的な起源であっても非生物学的な起源であってもよい。試料は、生物学的起源である場合、血液、血清、血漿、尿、糞便、唾液、粘液、精液、組織、組織抽出物、細胞培養培地、細胞、細胞抽出物等であり得る。

【0184】

これらの方法の別の工程では、上に規定される本発明の化合物を切断可能な酵素部分を含み得る酵素複合体が提供される。酵素部分は、酵素であっても酵素結合抗体であっても酵素結合抗原であっても酵素結合オリゴヌクレオチドであってもよい。酵素部分は、本発明の化合物を切断可能な酵素を含み得る。一部の実施形態では、酵素は加水分解酵素であり得る。加水分解酵素は、エステル結合を開裂し、EC 3 . 1 として分類される酵素または糖結合を開裂し、EC 3 . 2 として分類される酵素を含み、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼまたはノイラミニダーゼを含むが、これらに限定されない。

【0185】

一部の実施形態では、酵素部分は酵素であり得る。これらの実施形態では、試料中の酵素は酵素複合体を含む。酵素複合体を本発明の化合物と接触させて反応混合物を形成させ、反応混合物に光を生成させる。

20

30

40

50

## 【0186】

一部の実施形態では、光の放射が検出され得、かかる放射が酵素の存在を示し、放射された光の量が試料中に存在する酵素の量に相関し得る。

## 【0187】

一部の実施形態では、酵素部分は酵素結合抗体であり得る。酵素結合抗体は、抗原に結合可能な第1の抗体と、本発明の化合物を切断しその結果基質が分解され、光を生成することができる酵素を含む。これらの実施形態では、酵素結合抗体、抗原、および抗原に結合可能で固相上に固定化された第2の抗体は、酵素複合体を構成する。酵素複合体を本発明の化合物と接触させて反応混合物を形成させ、反応混合物に光を生成させる。

## 【0188】

一部の実施形態では、抗原を含む疑いのある試料を、第1の抗体および酵素を含む酵素結合抗体ならびに第2の抗体を含む固相と接触させ、そこで両抗体が抗原と結合することにより、本発明の化合物を切断しその結果基質が分解されて光を生成することができる酵素複合体を提供することができる。試料、酵素結合抗体および固相は任意の順序で組み合わせることができる。

10

## 【0189】

一部の実施形態では、方法は、酵素複合体の洗浄によって、未結合の酵素結合抗体を酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。これは、酵素複合体の構成要素と適合性のある緩衝液の添加および除去によって実行され得る。かかる緩衝液は診断技術分野において周知である。固相の追加の洗浄工程を実行し得る。

20

## 【0190】

第1の抗体、第2の抗体または両抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または組換え抗体であり得る。

## 【0191】

固相は、ビーズ、試験管、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、ゲル、膜、微粒子、ナノ結晶、量子ドット等であり得る。これらの固相が作製される材料は診断技術分野において公知である。

## 【0192】

第2の抗体は、診断技術分野において公知の技法によって、固相に対する抗体の非共有結合によって固相上に固定化しても共有結合によって固相に固定化してもよい

30

## 【0193】

第1の抗体は酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。非共有結合で結合される場合、第1の抗体は標識に共有結合で結合され得、酵素は標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。

## 【0194】

一部の実施形態では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい。ビオチン誘導体は置換を有するビオチン分子である。ビオチン構造の一部が欠損しているビオチン分子もビオチン誘導体と判断される。ビオチン誘導体は置換された合成ビオチンに加えて天然に存在するビオチンも含む。

40

## 【0195】

一部の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。ハプテンとしてのジゴキシゲニンおよび分子としての抗ジゴキシゲニンの使用は、診断技術分野において公知である。

## 【0196】

一部の実施形態では、酵素部分は酵素結合抗原であり得る。酵素結合抗原は、抗原、および本発明の化合物を切断可能な酵素を含む。これらの実施形態では、酵素複合体は、抗原と結合できる抗体を含む固相に結合された酵素結合抗原を含む。酵素複合体を上記に規定される本発明の化合物と接触させて反応混合物を形成させ、反応混合物に光を生成させる。

50

## 【0197】

一部の実施形態では、抗原を含む疑いのある試料を、酵素結合抗原、および抗原に結合可能な抗体を含む固相と接触させ得る。試料、酵素結合抗原および固相は任意の順序で組み合わせることができる。

## 【0198】

一部の実施形態では、方法は、酵素複合体の洗浄によって、未結合の酵素結合抗原を酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。これは、酵素複合体の構成要素と適合性のある緩衝液の添加および除去によって実行され得る。かかる緩衝液は診断技術分野において周知である。固相の追加の洗浄工程を実行し得る。

## 【0199】

抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または組換え抗体であり得る。

10

## 【0200】

固相は、ビーズ、試験管、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、ゲル、膜、微粒子、ナノ結晶、量子ドット等であり得る。これらの固相が作製される材料は診断技術分野において公知である。

## 【0201】

抗体は、固相に対する抗体の非共有結合によって固相に固定化しても共有結合によって固相に固定化してもよい。

## 【0202】

抗原は酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。非共有結合で結合される場合、抗原は標識に共有結合で結合され得、酵素は標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。

20

## 【0203】

一部の実施形態では、上記のように、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい。

## 【0204】

一部の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。ハプテンとしてのジゴキシゲニン、および分子としての抗ジゴキシゲニンの使用は、診断技術分野において公知である。

## 【0205】

一部の実施形態では、酵素部分は酵素結合オリゴヌクレオチドであり得る。酵素結合オリゴヌクレオチドは、ある種の核酸にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド、および本発明の化合物を切断可能な酵素を含む。これらの実施形態では、酵素複合体は、核酸を含む固相にハイブリダイズされた酵素結合オリゴヌクレオチドを含む。酵素複合体を本発明の化合物と接触させて反応混合物を形成させ、反応混合物に光を生成させる。

30

## 【0206】

一部の実施形態では、方法は、核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；核酸を固相上に固定化する工程；固定化された核酸と酵素結合オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、1, 2-ジオキセタン酵素基質の水溶液の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程をさらに含み得、光の生成は核酸の存在を示し、放射された光の量が試料中に存在する核酸の量に相関し得るものとする。

40

## 【0207】

一部の実施形態では、方法は、酵素複合体の洗浄によって、未結合の酵素結合オリゴヌクレオチドを酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。これは、酵素複合体の構成要素と適合性のある緩衝液の添加および除去によって実行され得る。かかる緩衝液は診断技術分野において周知である。固相の追加の洗浄を実行し得る。

## 【0208】

固相は、ビーズ、試験管、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、ゲル、膜、微粒子、ナノ結晶、量子ドット等であり得る。これらが作製される材料は診断技術分野において公知である。

50

## 【0209】

オリゴヌクレオチドは酵素に共有結合で結合されても非共有結合で結合されてもよい。非共有結合で結合される場合、オリゴヌクレオチドは標識に共有結合で結合され得、酵素は標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合され得る。

## 【0210】

一部の実施形態では、上記のように、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンであってもストレプトアビジンであってもよい。

## 【0211】

一部の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体であり得る。ハプテンとしてのジゴキシゲニンおよび分子としての抗ジゴキシゲニンの使用は、診断技術分野において公知である。

## 【0212】

この方法の別の工程において、試料を単独または酵素部分を含む複合体としてのいずれかで上記に規定される本発明の化合物と接触させて反応混合物を形成させる。

## 【0213】

一部の実施形態では、試料を本発明の化合物に添加し得、一方、他の実施形態では本発明の化合物を含む水溶液を試料に添加し得る。

## 【0214】

一部の実施形態では、反応混合物は増強剤をさらに含み得る。増強剤はCTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）および他のミセル形成物質を含み得る。増強剤は、天然物質（ウシ血清アルブミン等）または類似タイプの生物学的またはタンパク質ベースの分子または化合物、無脂肪ウシ血清アルブミン、または増強物質によりもたらされる検出した化学光放射の増強を改善する任意の増強添加物であり得る。増強剤は、ポリマーであり得る。増強剤としての代表的なポリマーおよびそれらの効果については、出典明示によって本明細書に引用されている米国特許第5,145,772号および同第5,547,836号に説明されている。これらのポリマーは、単独で使用してもよく、やはり出典明示によって本明細書に引用されている米国特許第5,994,073号に開示の増強値をさらに改善するため、界面活性剤添加物と共に使用してもよい。増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム）、ポリ〔ビニルベンジル（塩化ベンジルジメチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリブチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム）〕またはそれらの組み合わせであり得る。ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）とポリ（塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム）を含むコポリマー、またはそれらの組み合わせであり得る。

## 【0215】

一部の実施形態では、増強剤はアクセプター色素をさらに含み得る。これらの実施形態の中で、アクセプター色素は蛍光色素であり得る。これらの実施形態の一部では、蛍光色素は、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555であり得る。これらの実施形態の一部では、蛍光色素はフルオレセインであり得る。

## 【0216】

これらの方法の別の工程において、反応混合物に光を生成させる。

## 【0217】

一部の実施形態では、光は肉眼により観察されるか、またはX線フィルムもしくは生成された光を検出および測定できる装置を使用して測定され得る。生成された光を検出およ

10

20

30

40

50



び測定できる装置としては、照度計、フィルムを用いるカメラ、または電荷結合カメラが挙げられるが、これらに限定されない。

【0218】

一部の実施形態では、本発明の化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出し、その場合、光の生成は抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する。これらの実施形態の一部では、光の生成は約10分未満で最大に達する。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約5分未満で最大に達する。

【0219】

別の態様では、本発明は、上記および本明細書において開示される様々な実施形態に規定される本発明の化合物および緩衝液を含む試料中の分析物の存在または量を検出するためのキットを提供する。

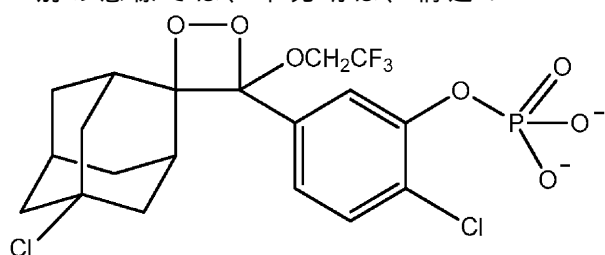
10

【0220】

一部の実施形態では、キットは上記のような増強剤をさらに含み得る。一部の実施形態では、キットは上記のようなアクセプター色素をさらに含み得る。

【0221】

別の態様では、本発明は、構造：



20

を有する化合物を提供する工程；該化合物を切断可能な酵素部分を含む酵素複合体を提供する工程；該酵素複合体を該化合物と接触させて反応混合物を形成させる工程；ならびに、該反応混合物に光を生成させる工程を含む光の生成方法を提供するが、ただし、酵素複合体が固相を含み、抗原が固相に固定化され、抗原がタンパク質である場合、固相は膜またはマイクロアッセイではないものとする。

【0222】

30

一部の実施形態では、酵素部分は、アルカリホスファターゼであり得る。

【0223】

一部の実施形態では、酵素部分は、抗原に結合可能であるアルカリホスファターゼ連結抗体であり得る。

【0224】

一部の実施形態では、酵素部分は、アルカリホスファターゼ連結抗原であり得る。

【0225】

一部の実施形態では、酵素部分は、アルカリホスファターゼ連結オリゴヌクレオチドであり得る。

【0226】

40

一部の実施形態では、アルカリホスファターゼは、抗体、抗原またはオリゴヌクレオチドに非共有結合で結合され得る。これらの実施形態の一部では、抗体、抗原またはオリゴヌクレオチドは、標識に共有結合で結合され得、アルカリホスファターゼは、標識に非共有結合で結合可能な分子に共有結合で結合される。これらの実施形態の一部では、標識はビオチンであってもビオチン誘導体であってもよく、分子はアビジンまたはストレプトアビジンであり、一方、これらの他の実施形態では、標識はハプテンであり得、分子はハプテンに結合可能な抗体である。

【0227】

一部の実施形態では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な第2の抗体を含む固相を提供する工程；試料およびアルカリホスファターゼ連結抗

50

体を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、方法は、酵素複合体から未結合のアルカリホスファターゼ連結抗体を除去する工程をさらに含み得る。

#### 【0228】

一部の実施形態では、方法は、抗原を含む疑いのある試料を提供する工程；抗原に結合可能な抗体を含む固相を提供する工程；試料およびアルカリホスファターゼ連結抗原を固相と接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該抗原の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する抗原の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、方法は、酵素複合体から未結合のアルカリホスファターゼ連結抗原を除去する工程をさらに含み得る。

10

#### 【0229】

一部の実施形態では、方法は、核酸を含む疑いのある試料を提供する工程；核酸を固相に固定化する工程、固定化された核酸とアルカリホスファターゼ連結オリゴヌクレオチドを接触させて酵素複合体を形成させる工程；ならびに、化合物の添加後に反応混合物により生成された光を検出する工程であって、該光の生成が該核酸の存在を示し、生成された光の量が試料中に存在する核酸の量に相関し得、25 ~ 37 での光の生成は約15分未満で最大に達する工程をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約10分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、光の生成は、約5分未満で最大に達し得る。これらの実施形態の一部では、方法は、未結合の酵素結合オリゴヌクレオチドを酵素複合体から除去する工程をさらに含み得る。

20

#### 【0230】

一部の実施形態では、固相は、ビーズ、試験管、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、ゲル、膜、微粒子、ナノ結晶、量子ドット等であり得る。これらの固相が作製される材料は診断技術分野において公知である。

30

#### 【0231】

一部の実施形態では、反応混合物は増強剤をさらに含み得る。増強剤はCTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）および他のミセル形成物質を含み得る。増強剤は、天然物質（ウシ血清アルブミン等）または類似タイプの生物学的またはタンパク質ベースの分子または化合物、無脂肪ウシ血清アルブミン、または増強物質によりもたらされる検出された化学光放射の増強を改善する任意の増強添加物であり得る。増強剤は、ポリマーであり得る。増強剤として代表的なポリマーおよびそれらの効果については、米国特許第5,145,772号および同第5,547,836号に説明されている（これらについては、出典明示により援用する）。これらのポリマーは、単独で使用してもよく、または米国特許第5,994,073号（これについても出典明示により援用する）に開示されたように、増強値をさらに改善するため、界面活性剤添加物と共に使用してもよい。増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム）、ポリ〔ビニルベンジル（塩化ベンジルジメチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリブチルアンモニウム）〕、ポリ〔ビニル（塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム）〕またはそれらの組み合わせであり得る。ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ（塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム）、ポリ（塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム）とポリ（塩化ビニル

40

50

ベンジルトリオクチルホスホニウム)とを含むコポリマー、またはそれらの組み合わせであり得る。これらの実施形態の一部では、増強剤はポリマー性第四級アンモニウム塩、ポリマー性第四級ホスホニウム塩、またはそれらの組み合わせを含み得る。これらの実施形態の一部では、ポリマー性第四級アンモニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルアンモニウム)、ポリ[ビニルベンジル(塩化ベンジルジメチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリブチルアンモニウム)]、ポリ[ビニル(塩化ベンジルトリペンチルアンモニウム)]またはそれらの組み合わせであり得る。これらの実施形態の一部では、ポリマー性第四級ホスホニウム塩は、ポリ(塩化ビニルベンジルトリメチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)、ポリ(塩化ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)とポリ(塩化ビニルベンジルトリオクチルホスホニウム)とを含むコポリマー、またはそれらの組み合わせであり得る。

10

## 【0232】

一部の実施形態では、増強剤はアクセプター色素をさらに含み得る。これらの実施形態の一部では、アクセプター色素は、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、またはALEXA FLUOR 555であり得る。

## 【実施例】

## 【0233】

以下の実施例は、本発明を説明するが限定しないことを意図する。

20

## 【0234】

機器。

化学発光を測定するために、96/384-ウェルHydroSpeedplate洗浄器(Tecan Group Ltd.、スイス国)、Orion-II 96/384-ウェルマイクロプレート照度計(Titertek Instrument Berthold Technologies、ハンツビル、アラバマ)を使用した。

## 【0235】

ビーズおよびマイクロプレート。

Dynabeads(登録商標)(Life Tech Dynal AS、ノルウェー国)、Corning 96-ウェルポリスチレンマイクロプレート、平底、高結合、白色(Corning, 3922)、およびCorning 96-ウェルマイクロプレート、丸底、白色(Corning, 3355)を入手した。

30

## 【0236】

化学発光基質および増強剤。

CSPD(登録商標)およびCDP-Star(登録商標)をLife Technologies、サンディエゴ、カリフォルニアから入手した。

AP-5化学発光基質(アルカリホスファターゼ用)をLumigen, Inc.(サウスフィールド、ミシガン)から入手した。これは本明細書において競合者の基質Dまたは競合者のAP基質D、競合者のフラッシュ基質D、またはVendor Xの基質Dと称す。

40

LumiGLO Reserve(商標)化学発光基質(HRP用)をKPL, Inc.(ゲイザースバーグ、メリーランド)から入手した。これは本明細書において競合者のHRP基質または競合者のグロー基質Eと称す。

Sapphire-II(商標)発光増強剤(Sapphire-II)、Sapphire-III(商標)発光増強剤(Sapphire-III)、Emerald(商標)-II発光増強剤(Emerald-II)、およびEmerald(商標)-III発光増強剤(Emerald-III)をApplied Biosystems Inc.、フォスターシティ、カリフォルニアから入手した。

## 【0237】

50

精製アルカリホスファターゼアッセイ。

100 μLの基質製剤を、アルカリホスファターゼ (BBI BioZyme, ALPI 12G) の連続希釈液 10 μL に添加し、基質添加後、白色マイクロタイタープレート を速度論的に 2 分読み込んだ。

【0238】

ストレプトアビジン被覆 M-280 トシル基活性化 Dynabeads (登録商標) 中でカップリングされたビオチニル化アルカリホスファターゼ。

10 μL の洗浄したビーズを、ビオチニル化アルカリホスファターゼ (BioLabs, N7022S) の 10 倍連続希釈液 40 μL と 25 で 40 分間インキュベートした。ドーナツ状の磁石 (Life Tech Ambion の磁石カタログ番号: AM10050) でビーズを 2 ~ 3 分間分離し、1% BSA を含む 1 倍 PBS で 3 回洗浄した。

100 μL 基質製剤を添加し、基質添加後、プレート を速度論的に 2 分読み込んだ。

【0239】

抗体捕獲のための固体支持体としてマイクロプレートを使用するサンドイッチ ELISA

ヒト IL-6 に対するモノクローナル抗体 (R&D Systems, MAB206) を 96-ウェルマイクロプレートに固定化して標準的なヒト組換え IL-6 (R&D Systems, 206-IL) に結合させる。ビオチニル化抗ヒト IL-6 (R&D Systems, BAF206) を添加し、これはプレート上で結合したヒト組換え IL-6 に結合し、次いで、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ (Jackson ImmunoResearch, 16-050-084) を添加した。化学検出とは独立して、免疫アッセイ手順は同一であった。基質製剤を洗浄したウェルに添加して、プレートを基質添加後 37 秒速度論的に読み込んだ。

【0240】

抗体捕獲のための固体支持体として Dynabeads (登録商標) を使用するトロポニン サンドイッチ ELISA。

ヒト血清 (Sigma, S7023) 中のヒト心臓トロポニン I (HyTest Ltd., 8T53) 50 μL を、LYNX Rapid Alkaline Phosphatase Antibody Conjugation キット (AbD Serotec, LNK012AP) を使用してアルカリホスファターゼにコンジュゲートした 50 μL のマウス -ヒト心臓トロポニン I (-cTnI)、SDIX (クローン TPC6) 抗体と共に 25 で 10 分間インキュベートした。

-ヒト心臓トロポニン I (-cTnI) モノクローナル抗体 (HyTest Ltd., 4T21, Mab560) とカップリングさせた 100 μL の Dynabeads (登録商標) を上記試料と攪拌しながら 37 で 30 分間インキュベートした。ビーズをドーナツ状の磁石 (Life Tech Ambion の磁石カタログ番号: AM10050) で 2 ~ 3 分間分離し、TBS-Tween 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。

100 μL の基質製剤を添加し、プレートを基質添加後 2 分速度論的に読み込んだ。

【実施例 1】

【0241】

基質 A の合成

図 1 ~ 図 4 に概説する反応スキームによって基質 A を作製した。

図 1 に示すように、4-Me-3-OBN-ベンズアルデヒドを作製した。17.56 g の出発材料によって 13.6 g の最終生成物を得た。4-Me-3-OBN-ベンズアルデヒドから開始して図 2 に示すように 4-Me-Ph e ホスフェートを作製した。13.6 g の出発材料によって 17.7 g の最終生成物を得た。図 3 に示す反応スキームによって 4-M e-Ph e ホスフェートから開始して基質 A のエノールエーテル前駆体を作製した。5.6 g の出発材料によって 2.1 g の最終生成物を得た。基質 A のエノールエーテル前駆体から開始して図 4 に示すように基質 A を作製した。1.5 g の出発材料によって 1.37 g の最終生成物を得た。

10

20

30

40

50

本発明の化合物は、当業者にとって公知の変更を加えた上記反応スキームによって作製することができる。

【実施例 2】

【0242】

マイクロタイタープレートにおいて 25 で行ったジオキセタン基質の速度論試験

25 で実行する「精製アルカリホスファターゼアッセイ」プロトコルを使用して C S D P、C D P - S t a r、基質 A および基質 B による光の放射の速度論を検討した。

【0243】

図 6 は、観察した光の放射の経時変化の結果を示す。当該結果は、基質 A および B が 5 ~ 10 分で光の最大放射に到達したが、C D P - S t a r は 30 ~ 60 分後に到達したことを示す。試験したすべての基質が、光の最大放射に到達後、数時間の信号安定性を示した。

10

【0244】

図 7 は、C D P - S t a r、基質 A、基質 B および A P - 5 と共に様々な濃度のアルカリホスファターゼを使用して、所定時点で総放射を読み込み、実行した感度曲線を示す。感度を、信号対雑音比が 2 と等しいアルカリホスファターゼの最低濃度として定義した。C D P - S t a r、基質 A、および基質 B の感度は A P - 5 の感度の 10 倍を超えることを見出した。

【実施例 3】

【0245】

マイクロタイタープレートにおいて 25 で行った I L - 6 免疫アッセイにおける基質 A、C S P D、および C D P - S t a r の速度論評価

「抗体捕獲のための固体支持体としてマイクロプレートを使用するサンドイッチ E L I S A」プロトコルにおいて 25 で、基質 A、C S D P、および C D P - S t a r による光の放射の速度論を検討した。

20

【0246】

図 8 は、S a p p h i r e - I I を併用した C S P D、S a p p h i r e - I I I を併用した C S P D、および S a p p h i r e - I I を併用した C D P - S t a r と比較時の基質 A による光放射の時間経過を示す。基質 A による光の最大放射は、C S P D および C D P - S t a r による 30 ~ 60 分に対して約 5 分時点である。

30

【0247】

図 9 は、S a p p h i r e - I I および基質 A を併用した 25 での C D P - S t a r の信号対雑音比を示す。C D P - S t a r によると、最大性能のためにはこの基質を添加後 15 分待つ必要がある。基質 A の場合、早期グロー信号によって、アッセイの観察した時間経過にわたって安定した信号対雑音比が得られ、マイクロプレート E L I S A にとって理想的なものとなった。

【実施例 4】

【0248】

マイクロタイタープレートにおいて 37 で行った I L - 6 免疫アッセイにおける基質 A、B、C および C D P - S t a r の速度論的評価

「抗体捕獲のための固体支持体としてマイクロプレートを使用するサンドイッチ E L I S A」プロトコルにおいて 37 で、基質 A、B、C および C D P - S t a r による光放射の速度論を検討した。

40

【0249】

図 10 は、適切な低い分析物濃度の代表的なものである免疫アッセイにおける 24 p g / m l の I L - 6 の速度論を示す。E m e r a l d - I I を併用した C D P - S t a r の光の最大放射到達時間は 15 ~ 30 分であるが、基質 A、B および C の光の最大放射到達時間は、それぞれ 3 分、2 分および即時である。

【0250】

図 11 は、競合者の基質 D と比較した基質 A、B および C の信号（光放射）および信号

50

対雑音についての速度論を示す。基質 A、B および C について観察された一定の信号対雑音比は検出時間中における柔軟性を可能にするため、これらの基質を使用する免疫アッセイはほとんどの機器形式と適合可能となる。

【実施例 5】

【0251】

マイクロタイタープレート上 37 で行った免疫アッセイ系における基質 A、B、および C の感度比較

「抗体捕獲のための固体支持体としてマイクロプレートを使用するサンドイッチ ELISA」プロトコルにおいて 37 で、Emerald-II、競合者の AP 基質 D、および競合者の HRP 基質と共に基質 A、基質 B、基質 C、CDP-Star を使用した場合の感度を検討した。

10

【0252】

図 12 は、基質 A、B および C がもたらす感度が、競合者の AP 基質 D および競合者の HRP 基質で観察された感度の 5 ~ 8 倍超であることを示す。感度は、信号対雑音 2 で検出した最低 hIL-6 量と定義される。

【実施例 6】

【0253】

基質 A の貯蔵安定性

「精製アルカリホスファターゼアッセイ」プロトコルを使用して -20、4、および 37 で保存した基質 A 試料による光の最大放射を検討した。これらの温度で保存した試料を、80 日間の経過を通して同じ日にアッセイした。

20

【0254】

図 13 は、本試験の結果を示す。37 加速曲線の外挿に基づき、基質 A のリアルタイム (4) 安定性は、14 ヶ月間と推定される。

【実施例 7】

【0255】

室温での Dynabeads M-280 ビーズ上の基質 A、B および C の速度論的評価

ビオチン標識アルカリホスファターゼと結合したストレプトアビジン標識トシル基活性化 Dynabeads M-280 ビーズを使用して、基質 A、基質 B、基質 C、Emerald-II を併用した CDP-Star、競合者のフラッシュ基質 D、および競合者のフロー (Flow) 基質 E の光放射速度論および信号対雑音を検討した。20 μg のストレプトアビジン標識 Dynabeads を 0.04 ng のビオチン標識アルカリホスファターゼと結合させた。評価は室温で行った。

30

【0256】

図 14 は、この評価の結果を示す。基質 B は光の最大放射までの急傾斜を有する点で目立ち、観察時間経過全体を通して一定の信号対雑音を持続した。基質 A の光の最大放射までの傾斜は基質 B の光の最大放射までの傾斜より緩慢であったが、基質 C の光の最大放射までの傾斜は非常に急速であった。

【実施例 8】

【0257】

室温での Dynabeads M-280 ビーズ上における基質 A、B および C の感度曲線

ビオチン標識アルカリホスファターゼと結合したストレプトアビジン標識トシル基活性化 Dynabeads M-280 ビーズを使用する「ストレプトアビジン被覆 M-280 トシル基活性化 Dynabeads (登録商標) でカップリングしたビオチニル化アルカリホスファターゼ」プロトコルを使用して、基質 A、基質 B、基質 C、Emerald-II を併用した CDP-Star、競合者のフラッシュ基質 D、および競合者のグロー基質 E の感度を検討した。20 μg のストレプトアビジン標識 Dynabeads を可変量のビオチン標識アルカリホスファターゼと結合させた。各基質の至適読み込み時点および室温で評価を行った。

40

50

## 【0258】

図15は、この評価の結果を示す。基質Aにより、高い信号および信号対雑音比が得られる。基質Bにより、最高信号および高信号対雑音比が得られる。基質Cの感度は競合者のフラッシュ基質Dに類似していた。基質Bの性能は、評価したジオキセタンと同等以上である。

## 【0259】

基質A、基質B、基質C、Emerald-IIを併用したCDP-Star、競合者のフラッシュ基質D、および競合者のグロ-基質Eの感度を上記のように検討し、信号を2分目に読み込んだ。

## 【0260】

図16は、この評価の結果を示す。基質Bの性能は、至適読み込み時点での他の基質と同等以上である。

## 【実施例9】

## 【0261】

37でのDynabeads MyOneカルボン酸ビーズ上の基質A、基質BおよびCDP-Starの光放射速度論および信号対雑音

Dynabeads MyOneカルボン酸ビーズを使用する「抗体捕獲のための固体支持体としてDynabeads（登録商標）を使用するトロポニンサンドイッチELISA」プロトコルを使用して、Emerald-IIを併用した基質A、基質B、およびEmerald-IIを併用したCDP-Starの光の放射の速度論および信号対雑音を検討した。プロトコルを16pg/mL cTnIを使用して37で実行した。

## 【0262】

図17は、この評価の結果を示す。信号対雑音比は基質製剤によって経時的に変動した。基質Bの信号対雑音比は最初の10分間において一定した。

## 【実施例10】

## 【0263】

至適読み込み時点および37での免疫アッセイ性能

「抗体捕獲のための固体支持体としてDynabeads（登録商標）を使用するトロポニンサンドイッチELISA」プロトコルを37で使用して、Emerald-IIを併用した基質A、基質B、およびEmerald-IIを併用したCDP-Starの性能を検討した。

## 【0264】

図18は、この評価の結果を示す。基質Bにより、最高の信号が得られ、その性能は高いバックグラウンドのために信号対雑音比において他の基質製剤試験と同様である。

## 【実施例11】

## 【0265】

基質Aを使用した免疫アッセイにおけるビーズおよび発光増強剤の評価

トシル基活性化Dynabeads M-280、Dynabeads MyOneカルボン酸、およびDynabeads M-270エポキシを-ヒト心臓トロポニンI（-cTnI）モノクローナル抗体（HyTest Ltd. , 4T21、Mab560）とカップリングさせた。

## 【0266】

「抗体捕獲のための固体支持体としてDynabeads（登録商標）を使用するトロポニンサンドイッチELISA」プロトコルを37で使用して、Sapphire-IIを併用した基質AおよびEmerald-IIを併用した基質のアッセイ性能を検討した。

## 【0267】

図19は、この評価の結果を示す。Dynabeads M-270エポキシビーズにより、最高のアッセイ性能が得られた。試験したすべてのビーズタイプについてEmerald-II発光増強剤により、より高い信号および幾分良好な感度が得られた。S-I

10

20

30

40

50

I I は S a p p h i r e - I I I を 指 し、 E - I I I は E m e r a l d - I I I を 指 す。

【実施例 1 2】

【0 2 6 8】

トロポニンサンドイッチビーズ免疫アッセイ

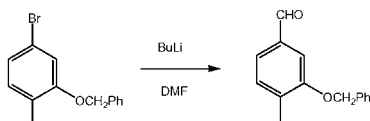
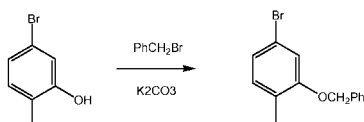
Dynabeads M-270 エポキシを - ヒト心臓トロポニン I ( - c T n I )  
モノクローナル抗体 ( H y T e s t L t d . , 4 T 2 1 , M a b 5 6 0 ) と カ ッ プ リ ン  
グさせた。「抗体捕獲のための固体支持体として Dynabeads (登録商標) を使用  
するトロポニンサンドイッチ E L I S A 」プロトコルを 3 7 で使用して、基質 A、基質  
B、基質 C、Emerald-I I を併用した C D P - S t a r および V e n d o r X の  
基質 D の免疫アッセイにおける性能を検討した。

10

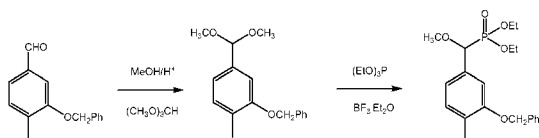
【0 2 6 9】

図 2 0 は 評 価 の 結 果 を 示 す。 信 号 対 雑 音 比 2 で、 基 質 A、 B ま た は C に よ り、 ヒ ト 血 清  
中 ヒ ト 心 臓 ト ロ ポ ニ ン I ( c T n I ) の 0 . 1 n g / ウ ェ ル 程 度 の 低 い 検 出 下 限 値 お よ び  
ダイナミックレンジ約 3 ログが得られた。 Vendor X の基質 D により、 c T n I の  
検出下限値 0 . 6 n g / ウェルおよびダイナミックレンジ約 3 ログが得られた。

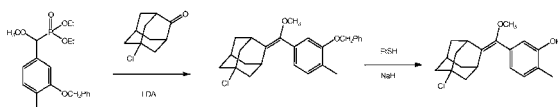
【図 1】



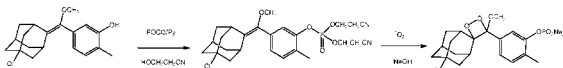
【図 2】



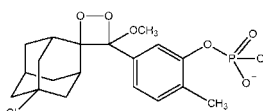
【図 3】



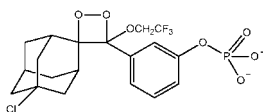
【図 4】



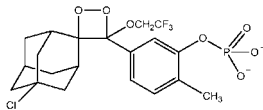
【図 5】



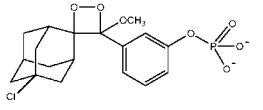
基質 A



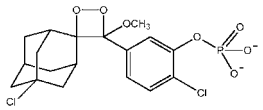
基質 B



基質 C



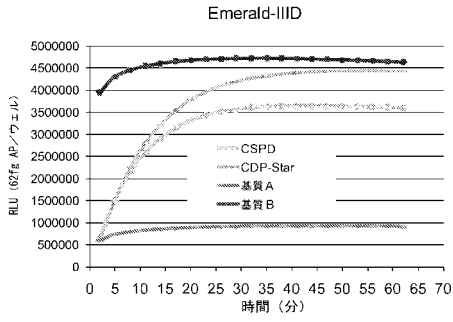
CSPD (登録商標)



CDP-Star (登録商標)

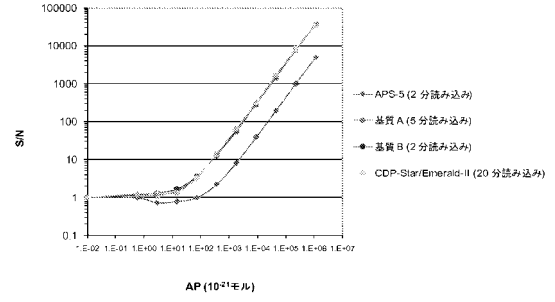


【 図 6 】



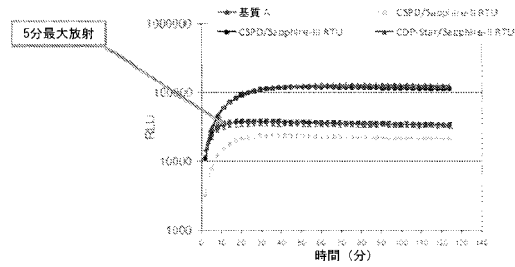
25°Cでの光の最大放射(ピーク)到達に必要な時間	
CDP-Star/Emerald-II	30-60分
基質 A	5-10分
基質 B	5-10分
25°Cでの光の最大放射到達後の信号安定性	
全ての基質	数時間

【 図 7 】

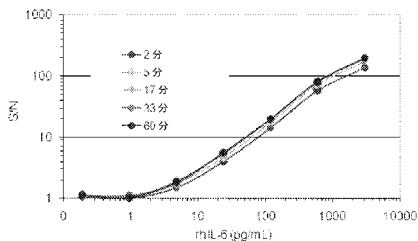
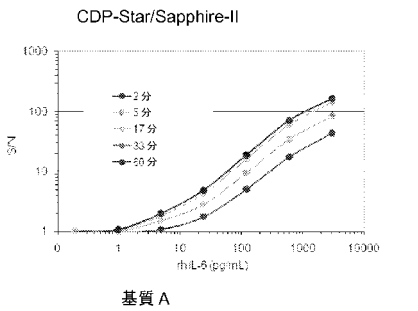


光検出	Lubigenの APS-5 (基質D)	基質 A	基質 B	CDP-Star/Emerald-II
S/N=2での AP量	0.36 アトモル	0.03 アトモル	0.03 アトモル	0.03 アトモル

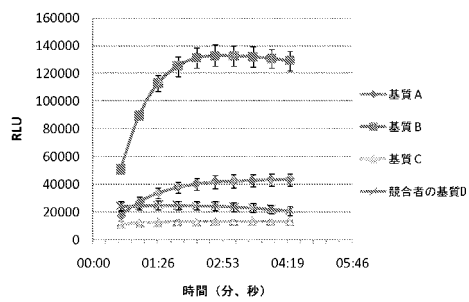
【 図 8 】



【 図 9 】



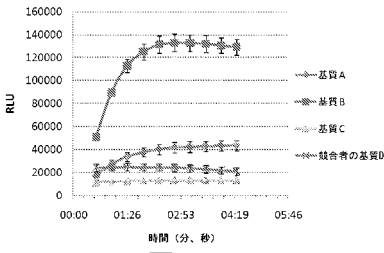
【 図 10 】



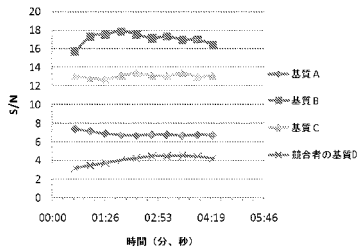
37°Cでの光の最大放射(ピーク)到達に必要な時間	
CDP-Star/Emerald-II	15-30分
基質 A	3分
基質 B	2分
基質 C	即時

【 図 1 1 】

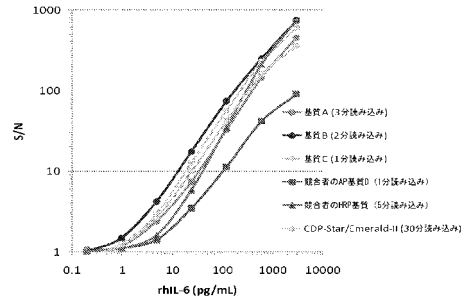
信号の速度論



信号対雑音の速度論



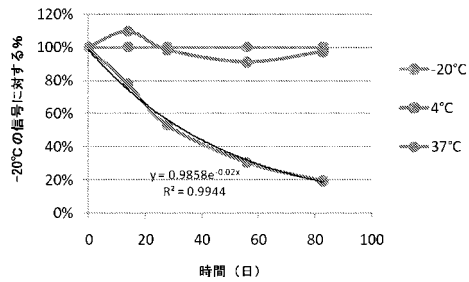
【 図 1 2 】



ラック	1	2	4	3	5	6
検出系	基質 B	基質 A	CDP-Star/Emerald-II	基質 E	融合者のHP基質	融合者のAPS-7 (AP基質)

S/N=2での [IL-6] の値: 1.6 pg/mL, 2.6 pg/mL, 3 pg/mL, 3.5 pg/mL, 8 pg/mL, 12 pg/mL

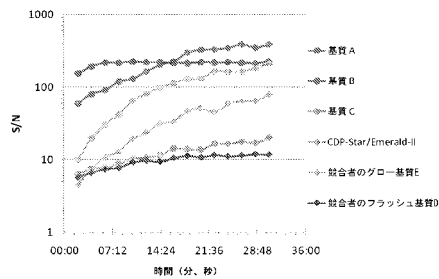
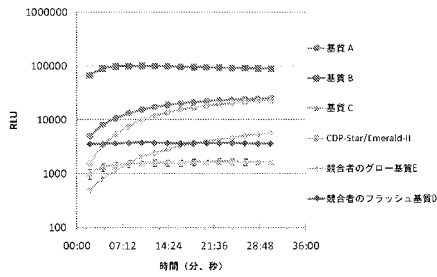
【 図 1 3 】



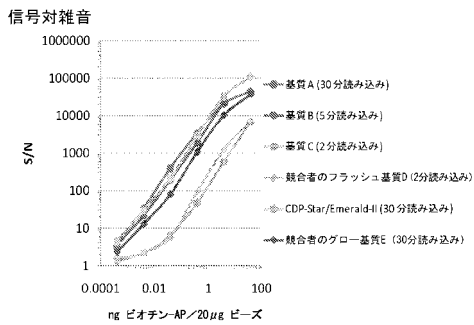
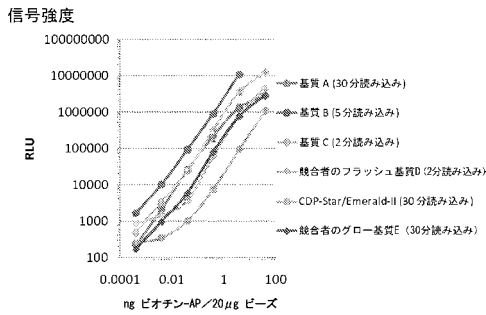
基準:

- このグラフにおけるデータは、各時点での-20°Cの信号強度に対して正規化されている。
- 安定性は、信号強度が-20°C対照の80%まで減衰するのにかかる時間として定義される。

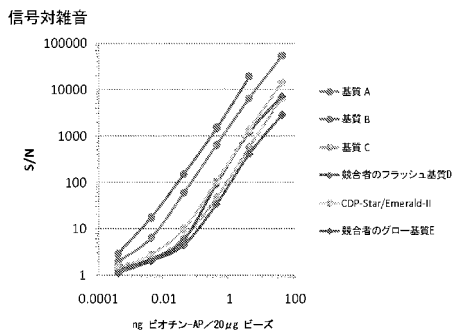
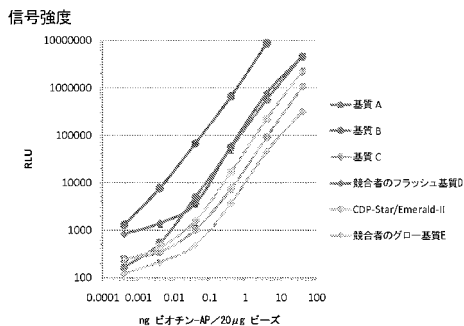
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

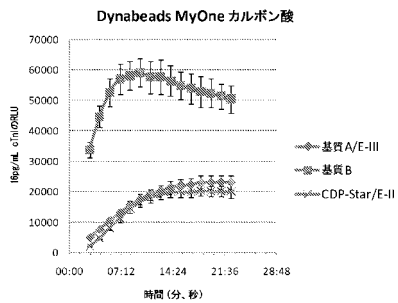


【 図 1 6 】

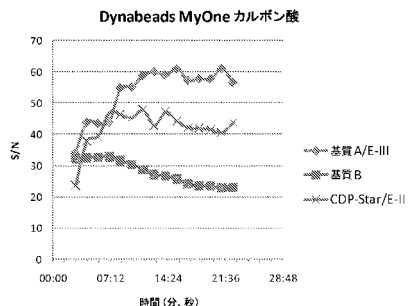


【 図 1 7 】

信号の速度論

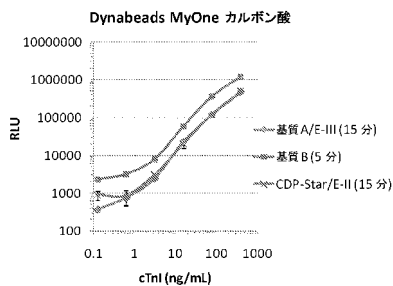


信号対雑音の速度論

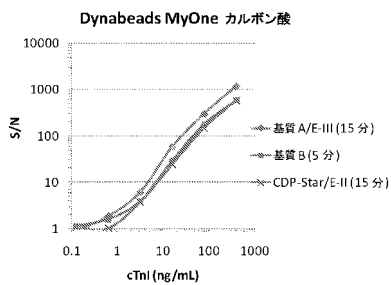


【 図 1 8 】

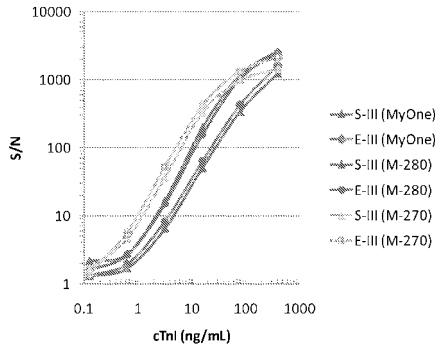
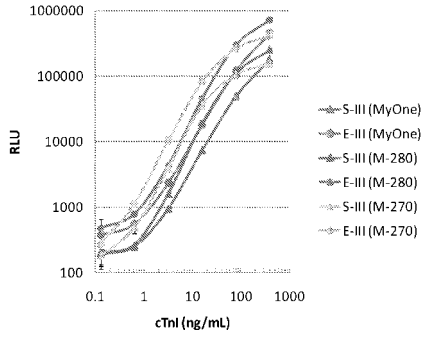
信号強度



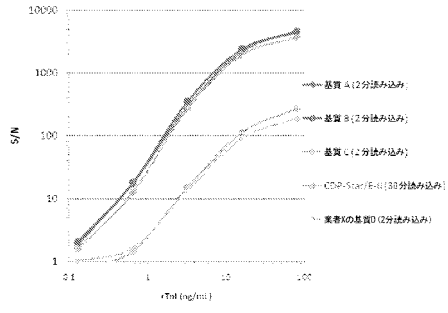
信号対雑音



【 図 19 】



【 図 20 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2012/035732**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
7, 23, 75, 85(completely); 1-6, 9-22, 24-74, 77-84, 86-89(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/035732

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07D321/00 C07D407/12 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D H01L		
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) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKHAVAN-TAFTI H ET AL: "A novel substitution process for the preparation of alkoxy-, aryloxy-, and acyloxy-substituted 1,2-dioxetanes", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC; US, vol. 119, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 245-246, XP002370651, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA962245A	1,4-7, 17-22, 24-69, 72-75, 86-89
Y	----- -/-- compound 2	1-7, 9-75, 77-89
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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
15 June 2012		16/11/2012
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

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/035732

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUMOTO M ET AL: "Synthesis of 3-Alkoxyethyl-4-aryl-3-tert-butyl-4-methoxy-1,2-dioxetanes as a Chemiluminescent Substrate with Short Half-life Emission", TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 37, no. 33, 12 August 1996 (1996-08-12), pages 5939-5942, XP004030579, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/0040-4039(96)01282-8 compound 11	1-7, 9-75, 77-89
X	US 5 780 249 A (WANG NAI-YI [US] ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14)	1,4,5,7, 9,10, 13-16, 24, 72-75, 77,78
Y	column 12, line 52 - line 64	1-7, 9-75, 77-89
X	WO 2010/101839 A2 (LIFE TECHNOLOGIES CORP [US]; JUO ROUH-RONG [US]; BROOKS EDWARD [US]; G) 10 September 2010 (2010-09-10)	1,7,24, 89
Y	claims 4,27,63; compound 2	1-7, 9-75, 77-89
Y	WO 2006/073424 A2 (GIRI BRIJ P [US]; DAGLI DINESH [US]; SINGH PRITAM [US]) 13 July 2006 (2006-07-13) compounds 114,139,141,143,145	1-7, 9-75, 77-89
A	US 2006/079699 A1 (EDWARDS BROOKS [US] ET AL) 13 April 2006 (2006-04-13) compound 9	1-7, 9-75, 77-89

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/035732

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5780249	A	14-07-1998	AU 5451194 A	24-05-1994
			CA 2146669 A1	11-05-1994
			DE 69331466 D1	21-02-2002
			DE 69331466 T2	26-09-2002
			EP 0666891 A1	16-08-1995
			ES 2171423 T3	16-09-2002
			JP 4074335 B2	09-04-2008
			JP H08502968 A	02-04-1996
			JP 2008164600 A	17-07-2008
			US 5603868 A	18-02-1997
			US 5607625 A	04-03-1997
			US 5780249 A	14-07-1998
			US 6001561 A	14-12-1999
			US 6001659 A	14-12-1999
			US 6139781 A	31-10-2000
			WO 9410258 A1	11-05-1994
-----				
WO 2010101839	A2	10-09-2010	EP 2403843 A2	11-01-2012
			US 2012100566 A1	26-04-2012
			WO 2010101839 A2	10-09-2010
-----				
WO 2006073424	A2	13-07-2006	CA 2562684 A1	13-07-2006
			EP 1735621 A2	27-12-2006
			US 2007225498 A1	27-09-2007
			US 2010317031 A1	16-12-2010
			US 2010317122 A1	16-12-2010
			US 2010317877 A1	16-12-2010
			WO 2006073424 A2	13-07-2006
-----				
US 2006079699	A1	13-04-2006	NONE	
-----				



International Application No. PCT/US2012/035732

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 7, 23, 75, 85(completely); 1-6, 9-22, 24-74, 77-84, 86-89(partially)

The compounds having four-membered cyclic structures having on positions 1 and 2 oxygens, on the position 4 two alkyl substituents (A and B) which can form a cycle and on position 3 one substituent OR1 and in geminal position another second cyclic structure carrying group OR2, wherein said second cyclic structure is phenyl.

---

2. claims: 8, 76, 90(completely); 1-6, 9-22, 24-74, 77-84, 86-89, 93(partially)

The compounds having four-membered cyclic structures having on positions 1 and 2 oxygens, on the position 4 two alkyl substituents (A and B) which can form a cycle and on position 3 one substituent OR1 and in geminal position another second cyclic structure carrying group OR2, wherein said second cyclic structure is naphthyl.

---

3. claims: 91, 92(completely); 93(partially)

The compounds having four-membered cyclic structures having on positions 1 and 2 oxygens, on the position 4 two alkyl substituents (A and B) which can form a cycle and on position 3 one substituent OR1 and in geminal position another second cyclic structure carrying group OR2, wherein said second cyclic structure is a heterocycle.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 H 15/26 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 6 5 E
<b>C 1 2 P 17/02 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 5 1 D
<b>C 1 2 Q 1/34 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 4 5 S
<b>C 0 7 F 9/6558 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 21/76	
	C 0 7 H 15/26	C S P
	C 1 2 P 17/02	
	C 1 2 Q 1/34	
	C 0 7 F 9/6558	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ミハイ アルバーナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ  
テクノロジーズ コーポレーション

(72) 発明者 エドワーズ ブルックス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ヒューロン アベニュー 2 6 9 # 6

(72) 発明者 ワン チーシアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチェスター ヘミングウェイ ストリート 3 6

F ターム(参考) 2G054 AB02 AB03 BB10 CA22 CA28 CE01 EA01 EB03

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ79 QR10 QR32 QR35 QR48 QR58 QS24

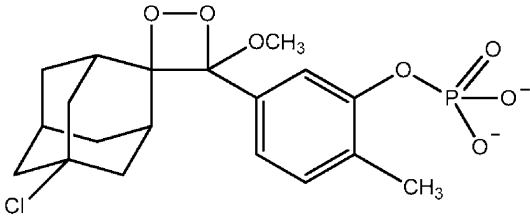
QS33 QS34 QS36 QX02

4B064 AE44 AE54 CA21 CB01 DA13

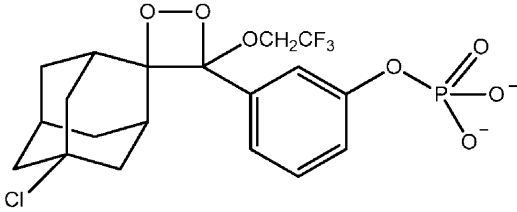
4C057 BB02 CC03 DD01 JJ55

4H050 AA01 AA03 AB80 AB99 WA15 WA23

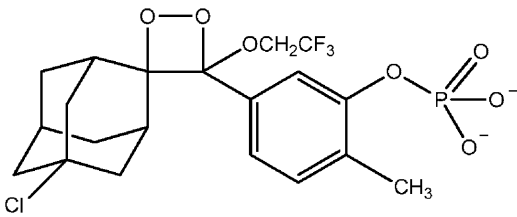
## 【要約の続き】



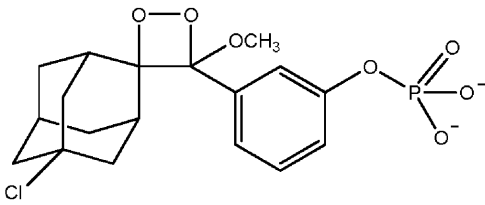
基質 A



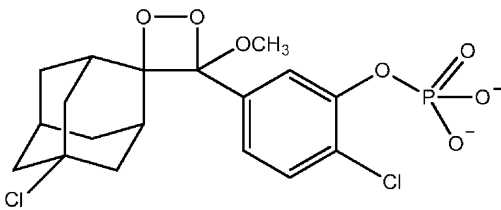
基質 B



基質 C



CSPD (登録商標)



CDP-Star (登録商標)