(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-527110
(P2024-527110A)
(43)公表日　令和6年7月19日(2024.7.19)

(51)国際特許分類　　FI
G01N 33/532 (2006.01)　　G01N 33/532 B

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全49頁）

(21)出願番号　特願2024-505423(P2024-505423)
(86)(22)出願日　令和4年7月21日(2022.7.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年1月29日(2024.1.29)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/070522
(87)国際公開番号　WO2023/006581
(87)国際公開日　令和5年2月2日(2023.2.2)
(31)優先権主張番号　21188638.7
(32)優先日　令和3年7月29日(2021.7.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　516125624
ユーロイミューン・メディツィニシェ・ラボルディアグノシュティカ・アクチエンゲゼルシャフト
ドイツ国 ２３５６０ リューベック，ザーカンプ ３１
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山 尚一
(74)代理人　100125380
弁理士　中村 綾子
(74)代理人　100142996
弁理士　森本 聡二
(74)代理人　100166268
弁理士　田中 祐
(74)代理人　100180231
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法および試薬

(57)【要約】
本発明は、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法であって、化学ルミネセンス性化合物を、有効量のエンハンサーの存在下で酸化して、増大された化学ルミネセンスシグナルを得ることを含む方法や、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドの化学ルミネセンス反応における、好ましくは化学ルミネセンス免疫アッセイにおける化学ルミネセンスシグナルを増大させるための式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される化合物の使用、それらに関連する化学ルミネセンス組成物やキットに関する。

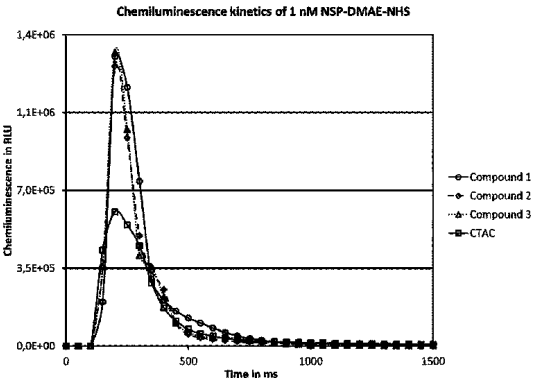
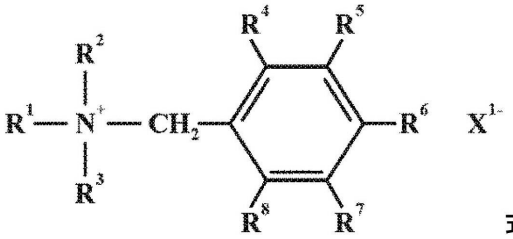


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法であって、
前記化学ルミネセンス性化合物を、有効量のエンハンサーの存在下で酸化して、増大された化学ルミネセンスシグナルを得るステップを含み、
前記化学ルミネセンス性化合物が、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドであり、
前記エンハンサーが、１つの化合物または２つ、３つもしくはそれ以上の化合物の混合物であり、
前記１つのエンハンサー化合物または前記複数のエンハンサー化合物のそれぞれが、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質
【化１】



式(I)

（式中、R^1は、C_3～C_{20}アルキルまたはアルケニルであり；R^2およびR^3は、互いに独立して、C_1～C_4アルキルまたはアルケニルであり；R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；X^{1-}は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）
からなる群から選択される、方法。
【請求項２】
－　R^1が、C_5～C_{18}アルキルもしくはアルケニルであり；
－　R^2およびR^3が、互いに独立して、メチル、エチル、プロピルもしくはブチル、好ましくはメチルであり；
－　R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8が、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、好ましくは水素、メチルもしくはエチルであり；かつ／または
－　X^{1-}が、塩化物イオンもしくは臭化物イオン、好ましくは塩化物イオンである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記エンハンサー、前記エンハンサーの少なくとも１つの化合物または前記エンハンサーの各化合物が、
－　ベンジルジメチルイコシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルノナデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルオクタデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルヘプタデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルペンタデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルトリデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルウンデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルデシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルノニルアンモニウムクロリド、

－　ベンジルジメチルオクチルアンモニウムクロリド、
－　塩化ベンザルコニウム、
－　ベンジルジメチルヘプチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルヘキシルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルペンチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルブチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジメチルプロピルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルトリプロピルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジプロピルエチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジエチルプロピルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジプロピルメチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルプロピルエチルメチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルトリブチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジブチルプロピルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジプロピルブチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルブチルプロピルエチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルブチルプロピルメチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルブチルエチルメチルアンモニウムクロリド、
－　ベンジルジエチルブチルアンモニウムクロリド、
－　Ｃ１２～１４－アルキルジメチル（エチルベンジル）アンモニウムクロリド、
－　ドデシル（エチルベンジル）ジメチルアンモニウムクロリド、
－　テトラデシルジメチル（エチルベンジル）アンモニウムクロリド、
－　オクタデシルジメチル（ａｒ－エチルベンジル）アンモニウムクロリド、およびクロリドの代わりにブロミドを含むそれぞれの上述の化合物からなる群から選択される、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

前記化学ルミネセンス反応混合物中の前記エンハンサーの有効量が、各場合の前記化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積当たりの重量で（ｗ／ｖ）０．００１％以上、好ましくはｗ／ｖで０．０１％、より好ましくはｗ／ｖで０．１％以上、最も好ましくはｗ／ｖで０．２％以上である、請求項１から３の少なくとも１項に記載の方法。

【請求項５】

前記エンハンサーが、前記化学ルミネセンス反応の開始の前に、同時に、または直後に、前記化学ルミネセンス反応混合物中の前記化学ルミネセンス性化合物と合わされる、好ましくは、前記エンハンサーが、前記化学ルミネセンス反応の開始と同時に、前記化学ルミネセンス反応混合物中の前記化学ルミネセンス性化合物と合わされる、請求項１から４の少なくとも１項に記載の方法。

【請求項６】

前記化学ルミネセンス反応により生じた前記化学ルミネセンスシグナルが一定の継続時間検出され、好ましくは、前記化学ルミネセンス反応混合物が形成され、前記化学ルミネセンス反応が開始され、前記シグナルが同時に検出され、より好ましくは、前記検出の継続期間が、０．０１から３６０秒、さらにより好ましくは０．１から３０秒、さらにより好ましくは０．３から１５秒、最も好ましくは０．５から１０秒の範囲であり、各場合において、前記検出の継続期間が前記化学ルミネセンス反応の開始と共に開始する、請求項１から５の少なくとも１項に記載の方法。

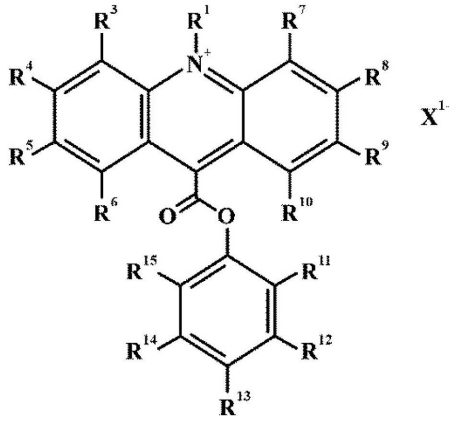
【請求項７】

前記化学ルミネセンス反応混合物が、さらに、過酸化水素、硝酸および／または水酸化ナトリウムを含む、請求項１から６の少なくとも１項に記載の方法。

【請求項８】

前記化学ルミネセンス性化合物が、式（ＩＩ）によるアクリジニウムエステル

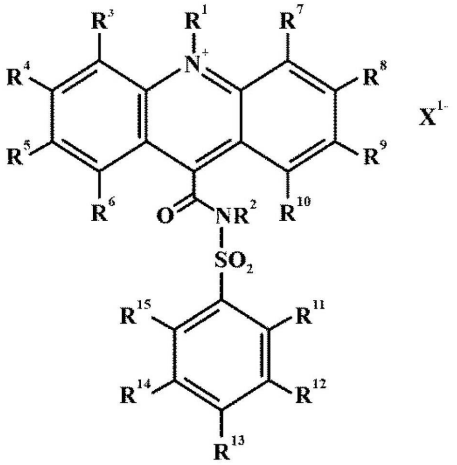
【化２】



式(II)

（式中、Ｒ１は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；
Ｒ３からＲ１５は、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハロゲン化物、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、スルファモイル、カルボキシアルキル、スクシンイミジルエステルおよびオキソアルキルまたは任意の他の脱離基からなる群から選択され；
任意に、存在する場合、Ｘ１－はアニオンである）；
または、式（ＩＩＩ）によるアクリジニウムスルホンアミド

【化３】

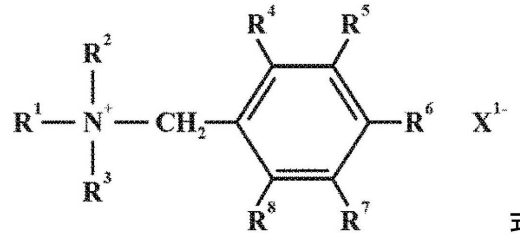


式(III)

（式中、Ｒ１は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルからなる群から選択され、および
Ｒ２からＲ１５は、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハロゲン化物、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、スルファモイル、カルボキシアルキル、スクシンイミジルおよびオキソアルキルまたは任意の他の脱離基からなる群から選択され；
任意に、存在する場合、Ｘ１－はアニオンである）
である、請求項１から７の少なくとも１項に記載の方法。

【請求項９】
アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドの化学ルミネセンス反応における、好ましくは化学ルミネセンス免疫アッセイにおける化学ルミネセンスシグナルを増大させるための、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質

【化４】



式(I)

（式中、Ｒ^{1}は、Ｃ$_{3}$～Ｃ$_{20}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}およびＲ^{8}は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；Ｘ$^{1-}$は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される化合物の使用。

【請求項１０】

－　Ｒ^{1}がＣ$_{5}$～Ｃ$_{18}$アルキルもしくはアルケニルであり；

－　Ｒ^{2}およびＲ^{3}が、互いに独立して、メチル、エチル、プロピルもしくはブチル、好ましくはメチルであり、

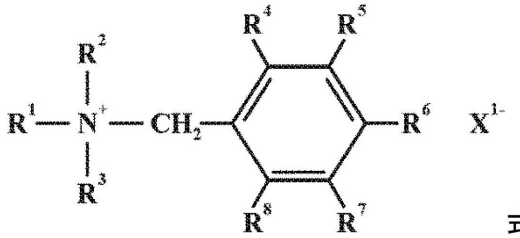
－　Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}およびＲ^{8}が、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、好ましくは水素、メチルもしくはエチルであり；かつ／または

－　Ｘ$^{1-}$が、塩化物イオンもしくは臭化物イオン、好ましくは塩化物イオンである、請求項９に記載の使用。

【請求項１１】

式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質

【化５】



式(I)

（式中、Ｒ^{1}は、Ｃ$_{3}$～Ｃ$_{20}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}およびＲ^{8}は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；Ｘ$^{1-}$は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される少なくとも１つの化合物と、

少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物であって、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは請求項の１から１０のいずれか１項に記載の式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）によるアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物と

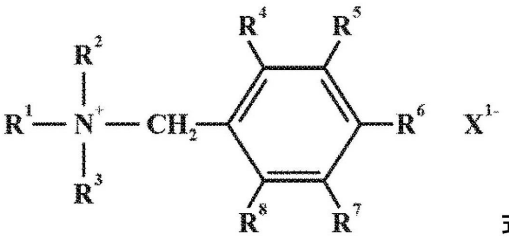
を含む化学ルミネセンス組成物。

【請求項１２】

少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物であって、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは請求項１から１１のいずれか１項に記載の式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）によるアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物と、

式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質

【化６】



式(I)

（式中、R^1は、C_3～C_{20}アルキルまたはアルケニルであり；R^2およびR^3は、互いに独立して、C_1～C_4アルキルまたはアルケニルであり；R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；X^{1-}は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物と
を含む、好ましくは化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスを増大させるためのキット。

【請求項１３】

液体溶液中の抗原、抗体または自己抗体を捕捉するための手段と、前記担体に結合した前記抗原、前記抗体または前記自己抗体を検出するための手段とを含む、診断上有用な担体、好ましくは固体担体を含み、

前記担体に結合した前記抗原、抗体または自己抗体を検出するための前記手段が、前記少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物により標識されている、請求項１２に記載のキット。

【請求項１４】

疾患の診断に使用するための、請求項１１に記載の化学ルミネセンス組成物または請求項１２もしくは１３に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法であって、化学ルミネセンス性化合物を、有効量のエンハンサーの存在下で酸化して、増大された化学ルミネセンスシグナルを得ることを含む方法や、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドの化学ルミネセンス反応における、好ましくは化学ルミネセンス免疫アッセイにおける化学ルミネセンスシグナルを増大させるための式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される化合物の使用、および関連する化学ルミネセンス組成物やキットに関する。

【背景技術】

【０００２】

非放射性の免疫アッセイ技術として、化学ルミネセンス免疫アッセイは、酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ、および蛍光免疫アッセイ技術の後に、世界中で非常に急速に発展した。化学ルミネセンス免疫アッセイは、高い感度、広い検出範囲、簡単で速い操作、安定な標識、および低い夾雑物を有する技術であり、それらにより望ましい定量的な免疫アッセイ方法となっている（Ｃｉｎｑｕａｎｔａ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ｗｈａｔ ｄｏｅｓ ｉｔ ｃｈａｎｇｅ ｉｎ ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ？，”Ａｕｔｏ Ｉｍｍｕｎ Ｈｉｇｈｌｉｇｈｔｓ，８：９，２４ Ｊｕｎｅ ２０１７）。

【０００３】

現在では、化学ルミネセンス免疫アッセイは、小分子、核酸、ホルモン、抗体などの種

々の生物学的物質の定量化のためのラジオイムノアッセイなどの従来の検出方法より好ましいことが多い。それは、化学的または酵素的トリガー物質による外部刺激による、化学ルミネセンス性物質による光の発生を特徴とする。化学ルミネセンス性物質の有名な例は、ルミノール、１，２－ジオキセタンアリールホスフェート、トリス－（ビピリジル）ルテニウム（ＩＩ）錯体またはアクリジニウム系プローブである。典型的には、化学ルミネセンス反応は、化学ルミネセンス性基質の性質、添加されるトリガー物質および光出力の得られるタイプによって、フラッシュタイプおよびグロータイプ化学ルミネセンスに分けることができる。Ｔａｎｎｏｕｓら（Ｔａｎｎｏｕｓ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｏｍｂｉｎｅｄ ｆｌａｓｈ ａｎｄ ｇｌｏｗ－ｔｙｐｅ ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ ｒｅａｃｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ ｏｆ ｂｉａｌｌｅｌｉｃ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ，”Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ３２０，Ｉｓｓｕｅ ２，Ｐａｇｅｓ ２６６－２７２，１５ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２００３）に記載されている通り、フラッシュタイプ反応は数秒から数分の範囲で明るい化学ルミネセンスシグナルをもたらし、グロータイプ反応における光出力はそれほど明るくないが、それは数時間まで持続できる。最適な方法によって、フラッシュタイプおよびグロータイプ免疫アッセイはそれに応じて設計できる。

【０００４】

フラッシュタイプアクリジニウム系プローブは、試料のハイスループットが要求される場合、速く超高感度なシグナル生成のために化学ルミネセンス免疫アッセイにおいてしばしば使用される。有名な例は、１０－メチル－２，６－ジメチル－アクリジニウム－ＮＨＳエステル（Ｍｅ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）、Ｎ－スルホプロピル－ジメチル－アクリジニウム－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）、Ｎ－スルホプロピル－アクリジニウム－スルホンアミド－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳ）および１０－メチル－２，６－ジメチル－アクリジニウム－（ポリエチレンオキシド）$_4$－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭｅＡＥ－ＰＥＯ４－ＮＨＳ）であり、これらの分子およびその変形体は、例えば、欧州特許第１２７３９１７号、欧州特許第１５３９７０２号などに記載されている。これらの分子の全ては、アルカリ性過酸化水素による外部刺激時に光を発生させる。典型的には、これらの試薬は、トリガー溶液ＡおよびＢに段階的に加えられる。過酸化水素は、通常、硝酸などの酸と組み合わせたトリガーＡの一部である。水酸化ナトリウムは、その後に、トリガーＢに注入される。

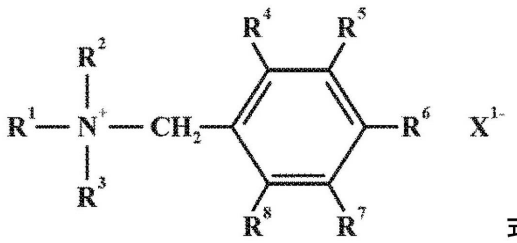
【０００５】

最適なシグナル生成のために、トリガーＢは、さらに、水溶液中でミセル構造を形成する可能性がある洗剤分子を要するとされている。ＣｈａｎｇおよびＭｉｌｌｅｒは、米国特許第４９２７７６９号において、四級アミンに基づくカチオン性洗剤が特に好都合であると記載している。非イオン性またはアニオン性洗剤も可能ではあるが、カチオン性洗剤の頭部基中の正電荷が、大部分疎水性のアクリジニウム系プローブと負電荷を帯びた過酸化水素アニオンをミセル界面で空間的に近づけて、そのため、Ｎａｔｒａｊａｎら（Ｎａｔｒａｊａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｓｕｒｆａｃｔａｎｔｓ ｏｎ ｔｈｅ ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ｏｆ ａｃｒｉｄｉｎｉｕｍ ｄｉｍｅｔｈｙｌｐｈｅｎｙｌ ｅｓｔｅｒ ｌａｂｅｌｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，９，ｐｐ．５０９２－５１０３，１３ Ａｐｒｉｌ ２０１１）にも記載の通り化学ルミネセンスシグナル出力を促進するとされている。米国特許第４９２７７６９号に含まれるそのようなカチオン性洗剤の有名な例はセチルトリメチルアンモニウムクロリド（ＣＴＡＣ）である。

【０００６】

しかしながら、超低濃度の分析物の定量化を可能にし、シグナルとノイズ全般の間の区別を容易にするには、化学ルミネセンス免疫アッセイ技術のさらなる改善が必要である。これらの改善は、おそらくは、最適化されたエンハンサー物質による化学ルミネセンスの増大を必要とする。

【０００７】
本発明の基礎となる問題は、特に超低濃度の分析物の改善された定量化に使用でき、シグナルとノイズ全般の間の区別をより容易にするために使用できる、化学ルミネセンス免疫アッセイ技術における方法および関連試薬および使用を提供することである。
【０００８】
本発明の基礎となる別の問題は、化学ルミネセンス免疫アッセイにおいて、化学ルミネセンス性化合物、好ましくは、例えばアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドとしてのアクリジニウム化合物の化学ルミネセンスシグナルを増大させることが可能な物質を提供することである。
【発明の概要】
【０００９】
第１の態様において、本発明の基礎にある問題は、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法であって、化学ルミネセンス性化合物を、有効量のエンハンサーの存在下で酸化して、増大された化学ルミネセンスシグナルを得るステップを含み、化学ルミネセンス性化合物が、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドであり、前記エンハンサーが、１つの化合物または２つ、３つもしくはそれ以上の化合物の混合物であり、前記１つのエンハンサー化合物または複数のエンハンサー化合物のそれぞれが、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質
【化１】



式(I)

（式中、R^1は、C_3～C_{20}アルキルまたはアルケニルであり；R^2およびR^3は、互いに独立して、C_1～C_4アルキルまたはアルケニルであり；R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；X^{1-}は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される、方法により解決される。
【００１０】
有効量の本発明に係るエンハンサーは、１つ、２つまたはそれ以上のエンハンサー化合物により提供され、ここで、それらのそれぞれは、本明細書に開示される式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される。
【００１１】
本発明に係る各エンハンサー化合物は芳香族頭部基を有する。本発明に係るエンハンサー化合物のカチオン性部分の可能なアニオン性対イオンとしては、塩化物イオン、臭化物イオンおよび水酸化物イオンがあるが、これらに限定されない。
【００１２】
好ましい実施形態において、本発明に係る方法は、エンハンサーを、化学ルミネセンス性化合物、すなわちアクリジニウム化合物、例えば、アクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドを含む化学ルミネセンス反応混合物に加える工程を含む。
【００１３】
好ましい実施形態において、本発明に係る１つのエンハンサー化合物または複数のエンハンサー化合物のそれぞれは、R^1が、C_3～C_{18}アルキルもしくはアルケニル、好ましくはC_5～C_{18}アルキルもしくはアルケニル；より好ましくはC_8～C_{16}アルキルもしくはアルケニル；最も好ましくはC_{12}～C_{14}アルキルもしくはアルケニルであり

；R^2およびR^3が、互いに独立して、メチル、エチル、プロピルもしくはブチル、好ましくはメチルであり；R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8が、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、好ましくは水素、メチルもしくはエチルであり；かつ／または$X^1$$^-$は、塩化物イオンもしくは臭化物イオン、好ましくは塩化物イオンである、本明細書に開示される式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される。

【００１４】

好ましい実施形態において、本発明に係る１つのエンハンサー化合物、エンハンサーの少なくとも１つの化合物またはエンハンサーの各化合物は、

－ ベンジルジメチルイコシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルノナデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルオクタデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルヘプタデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルペンタデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルトリデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルウンデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルデシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルノニルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルオクチルアンモニウムクロリド、
－ 塩化ベンザルコニウム、
－ ベンジルジメチルヘプチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルヘキシルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルペンチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルブチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジメチルプロピルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルトリプロピルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジプロピルエチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジエチルプロピルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジプロピルメチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルプロピルエチルメチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルトリブチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジブチルプロピルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジプロピルブチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルブチルプロピルエチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルブチルプロピルメチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルブチルエチルメチルアンモニウムクロリド、
－ ベンジルジエチルブチルアンモニウムクロリド、
－ Ｃ１２～１４－アルキルジメチル（エチルベンジル）アンモニウムクロリド、
－ ドデシル（エチルベンジル）ジメチルアンモニウムクロリド、
－ テトラデシルジメチル（エチルベンジル）アンモニウムクロリド、
－ オクタデシルジメチル（ａｒ－エチルベンジル）アンモニウムクロリドおよびクロリドの代わりにブロミドを含むそれぞれの上述の化合物

からなる群から選択される。

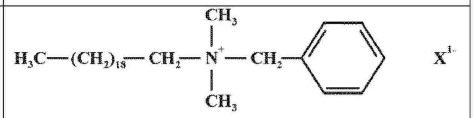
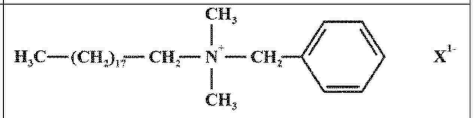
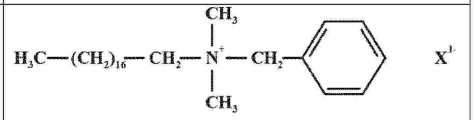
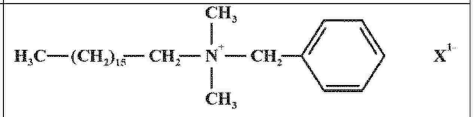
【００１５】

本発明に係る分子構造を含む例示的なエンハンサー化合物（化学ルミネセンスエンハンサーとして好適な芳香族頭部基を有するカチオン性物質）のリストは表１に表される。化学命名法において起こり得る曖昧さにもかかわらず列記された物質の正体を明らかにするために、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号お

よび／または化合物レコード（ＣＩＤ）が、この情報を見出すことができ一般に利用可能であれば、表１に列記される。Ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙによる ＣＡＳ登録番号は、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｃａｓ．ｏｒｇまたはｈｔｔｐｓ：／／ｃｏｍｍｏｎｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．ｃａｓ．ｏｒｇによりアクセス可能である。ＣＩＤレコードは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈの ＰｕｂＣｈｅｍデータベース中に、ｈｔｔｐｓ：／／ｐｕｂｃｈｅｍ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖにより見出すことができる。ＣＡＳおよび／もしくはＣＩＤが化合物に割り当てられていないか、または情報が一般に利用可能でない場合、それぞれの化合物は「ｎ．ｄ．」と定義された。

【００１６】

表1. 本発明による化学ルミネセンスエンハンサーとして好適な芳香族頭部基を有するエンハンサー化合物の例示的なリスト。化合物のカチオン性部分の可能な対イオンとしては、塩化物イオン、臭化物イオンおよび水酸化物イオンがあるがこれらに限定されず、それらが表に示される。

化学ルミネセンスエンハンサーとして好適な化合物のカチオン性部分	アニオン性対イオン X^{1-}						好適な化学ルミネセンスエンハンサーの分子構造(カチオン性部分プラスアニオン性対イオンX^{1-})
	塩化物イオン		臭化物イオン		水酸化物イオン		
	CAS	CID	CAS	CID	CAS	CID	
ベンジルジメチルイコシルアンモニウム	37557-89-4	37781	25271-92-5	21666128	n.d.	88777875	
ベンジルジメチルノナデシルアンモニウム	16576-99-1	14367850	2367044-60-6	141364238	n.d.	n.d.	
ベンジルジメチルオクタデシルアンモニウム	122-19-0	31204	22546-65-2	10479761	19493-24-4	13650437	
ベンジルジメチルヘプタデシルアンモニウム	16576-98-0	3014947	1098301-66-6	87844792	n.d.	n.d.	

ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム	122-18-9	31202	3529-04-2	165133	54942-73-3	129864 09		X^-
ベンジルジメチルペンタデシルアンモニウム	16576-96-8	301494 5	860534-71-0	87844402	n.d.	n.d.		X^-
ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム	139-08-2	8755	18773-88-1	9866364	75169-64-1	129400 63		X^-
ベンジルジメチルトリデシルアンモニウム	1641-93-6	301402 4	136816-61-0	85616532	2304352-54-1	882549 63		X^-
ベンジルジメチルドデシルアンモニウム	139-07-1	8753	7281-04-1	23705	500-33-4	123000 39		X^-
ベンジルジメチルウンデシルアンモニウム	16576-95-7	140295 37	776331-80-7	86005046	1429485-54-0	n.d.		X^-

ベンジルジメチルデシルアンモニウム	965-32-2	13762	32014-84-9	11660400	1429485-00-6	136504 36	
ベンジルジメチルノニルアンモニウム	3024-71-3	232755 23	73620-02-7	71402097	1429485-31-3	n.d.	
ベンジルジメチルオクチルアンモニウム	959-55-7	13740	58965-50-7	15636465	1929613-88-6	136504 35	
ベンジルジメチルヘプチルアンモニウム	33296-72-9	232749 18	77339-31-2	87776931	n.d.	n.d.	
ベンジルジメチルヘキシルアンモニウム	22559-57-5	232746 30	58965-49-4	71443268	1627560-59-1	880065 71	
ベンジルジメチルペンチルアンモニウム	54335-04-5	130861 97	1098023-81-4	87777946	n.d.	887780 49	

ベンジルジメチルブチルアンモニウム	72617-58-4	219880 52	58965-48-3	71443269	n.d.	n.d.	
ベンジルジメチルプロピルアンモニウム	87314-55-4	232739 22	54884-45-6	71364434	n.d.	881590 92	
ベンジルトリプロピルアンモニウム	5197-87-5	609706 7	5350-75-4	13056170	119496-03-6	184134 60	
ベンジルジプロピルエチルアンモニウム	5197-84-2	883181 57	90105-60-5	71430311	n.d.	883181 43	
ベンジルジエチルプロピルアンモニウム	5197-83-1	227682 69	n.d.	n.d.	n.d.	883178 89	
ベンジルジプロピルメチルアンモニウム	n.d.	121302 550	90105-59-2	71430312	1627560-55-7	n.d.	
ベンジルプロピルエチルメチルアンモニウム	5197-85-3.	883171 76	96200-25-8	n.d.	n.d.	883177 94	

ベンジルジエチルブチルアンモニウム	5197-86-4	883175 00	90105-68-3	71430302	n.d.	883177 93	
ヘキサデシルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	2065159-60-4	122443	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
テトラデシルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	n.d.	101575 58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
ドデシル(エチルベンジル)ジメチル-アンモニウム	14351-42-9	33917	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
ベンザルコニウム	63449-41-2; 8001-54-5; 64365-16-8	n.d.	91080-29-4 ; 8043-47-8	n.d.	n.d.	n.d.	
C_{12-14}-アルキルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	85409-23-0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

ベンジルトリブチルアンモニウム	23616-79-7	159952	25316-59-0	2724282	27574-41-0	221496 63	
ベンジルジブチルプロピルアンモニウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
ベンジルジプロピルブチルアンモニウム	n.d.	n.d.	90105-61-6	71430309	n.d.	n.d.	
ベンジルブチルプロピルエチルアンモニウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
ベンジルブチルプロピルメチルアンモニウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
ベンジルブチルエチルメチルアンモニウム	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

ベンジルジエチルブチルアンモニウム	5197-86-4	88317500	90105-68-3	71430302	n.d.	88317793
ヘキサデシルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	2065159-60-4	122443	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
テトラデシルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	n.d.	10157558	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ドデシル(エチルベンジル)ジメチル-アンモニウム	14351-42-9	33917	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ベンザルコニウム	63449-41-2; 8001-54-5; 64365-16-8	n.d.	91080-29-4 ; 8043-47-8	n.d.	n.d.	n.d.
C_{12-14}-アルキルジメチル(エチルベンジル)-アンモニウム	85409-23-0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

【００１７】

本発明に係るエンハンサーは、２つ、３つまたはそれ以上の表１中の上述の化合物の混合物で構成され得て、この混合物はまた個別の物品として市販されることもある。個別の物品として市販されている、２つ、３つまたはそれ以上の表１中の上述の化合物の混合物の一例は、例えば、塩化ベンザルコニウムまたは臭化ベンザルコニウムである。塩化ベンザルコニウムは、アルキルベンジルジメチルアンモニウムクロリド（ＡＢＤＡＣ）の混合物であり、そのアルキル部分は$Ｃ_{8}$から$Ｃ_{１８}$鎖からなる。混合物の組成に応じて、多数の市販物品およびＣＡＳ番号が、それぞれ、塩化ベンザルコニウムに見出され得る。

【００１８】

本発明に係るエンハンサー化合物がキラルＣ原子を含む場合、エンハンサー化合物は、前記化合物の全異性体形態を開示して、それらを含む。

【００１９】

好ましい実施形態において、化学ルミネセンス反応混合物中の前記エンハンサーの有効量は、各場合で化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積当たりの重量で（ｗ／ｖ）０．００１％以上、好ましくはｗ／ｖで０．０１％、より好ましくはｗ／ｖで０．１％以上、最も好ましくはｗ／ｖで０．２％以上である。一般に、化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスシグナルを増大させるのに必要なエンハンサーの有効量は、選択されるエンハンサーにより変わり、経験的に決定され得る。一般的規則として、化学ルミネセンス反応混合物中のエンハンサーの有効量は、各場合で化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積当たりの重量で０．００５％超、好ましくはｗ／ｖで０．０１％超である。好ましい実施形態において、化学ルミネセンス反応混合物に含まれる増大された化学ルミネセンスシグナルをもたらすエンハンサーの量は、各場合で化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、ｗ／ｖで０．００５％からｗ／ｖで３％の範囲、好ましくはｗ／ｖで０．０１％からｗ／ｖで２％の範囲、また好ましくはｗ／ｖで０．０５％からｗ／ｖで１％の範囲、より好ましくはｗ／ｖで０．０８％からｗ／ｖで０．８％の範囲、さらにより好ましくはｗ／ｖで０．１％からｗ／ｖで０．６％の範囲、最も好ましくはｗ／ｖで０．２％からｗ／ｖで０．５％の範囲である。特に好ましい実施形態において、化学ルミネセンス反応混合物に含まれる増大された化学ルミネセンスシグナルをもたらすエンハンサーの量は、各場合で化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、ｗ／ｖで０．０８％からｗ／ｖで０．４％の範囲である。

【００２０】

好ましくは、本発明の方法または使用による化学ルミネセンス反応は、２０℃から３７℃の温度で、および１０から１３．５の範囲のｐＨで実施されるべきである。本発明に係るエンハンサーは、好ましくは、本発明の方法での使用前に希釈される。好適な希釈剤としては、水、水性酸溶液または水性塩基溶液がある。

【００２１】

好ましい実施形態において、本発明に係るエンハンサーは化学ルミネセンス反応混合物に可溶性である。

【００２２】

好ましい実施形態において、本発明に係る方法は免疫アッセイにより実施されるか、または免疫アッセイの一部であり、免疫アッセイは、好ましくは、抗原、抗体または自己抗体の存在または不存在を検出する工程を含む。免疫アッセイは、好ましくは、競合アッセイ、キャプチャブリッジアッセイ（ｃａｐｔｕｒｅ　ｂｒｉｄｇｅ　ａｓｓａｙ）、免疫測定アッセイ、直接または間接クラスキャプチャアッセイ（ｃｌａｓｓ　ｃａｐｔｕｒｅ　ａｓｓａｙ）を含む群から選択できる。これらのフォーマットのそれぞれの原理は、Ｔｈｅ　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ，３ｒｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ，ｅｄｉｔｅｄ　ｂｙ　Ｄａｖｉｄ　Ｗｉｌｄ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，２００５に詳述されている。

【００２３】

好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス反応はフラッシュタイプ化学ルミネセンス反応である。フラッシュタイプ化学ルミネセンス反応は、数秒から数分の範囲の明るい化学ルミネセンスシグナルをもたらす。

【００２４】

さらに好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンスシグナルを増大させる方法は、化学ルミネセンス反応としてフラッシュタイプ化学ルミネセンス反応を含む。

【００２５】

好ましい実施形態において、本発明に係るエンハンサーは、化学ルミネセンス反応の開

始の前、同時に、または直後に、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物と合わされ、好ましくは、エンハンサーは、化学ルミネセンス反応の開始と同時に、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物と合わされる。

【００２６】

好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス反応により生じる化学ルミネセンスシグナルは一定の継続時間検出され、好ましくは、化学ルミネセンス反応混合物が形成され、化学ルミネセンス反応が開始され、シグナルが同時に検出され、より好ましくは、検出の持続期間は０．０１から３６０秒、さらにより好ましくは０．１から３０秒、さらにより好ましくは０．３から１５秒、および最も好ましくは０．５から１０秒の範囲であり、ここで、各場合で、検出の持続期間は、化学ルミネセンス反応の開始と共に開始する。

【００２７】

好ましい実施形態において、本発明に係る方法は、本発明に係るエンハンサーを、化学ルミネセンス反応混合物中の化学ルミネセンス性化合物と、化学ルミネセンス反応の開始と同時に合わせる工程および／または化学ルミネセンス反応の開始と共に開始して０．１から１０秒の一定の継続時間、本発明に係る化学ルミネセンス反応により生じる化学ルミネセンスシグナルを検出する工程を含む。

【００２８】

本発明によると、化学ルミネセンス反応は、好ましくは、化学ルミネセンス性化合物の酸化を開始することにより開始される。好ましくは、化学ルミネセンス性化合物の酸化の開始工程は、酸化性化合物、好ましくは過酸化水素を加えることにより実施される。

【００２９】

好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス反応混合物は、さらに、過酸化水素、酸、好ましくは硝酸、および／またはアルカリ水酸化物、好ましくは水酸化ナトリウムを含む。

【００３０】

好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス反応混合物はトリガー溶液Ａおよびトリガー溶液Ｂを含む。好ましくは、トリガー溶液Ａは、酸、好ましくは硝酸、および過酸化水素を含み、トリガー溶液Ｂは、アルカリ水酸化物、好ましくは水酸化ナトリウム、および本発明に係るエンハンサーを含む。

【００３１】

好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス反応混合物は、好ましくは硝酸および過酸化水素を含むトリガー溶液Ａ、ならびに好ましくは水酸化ナトリウムおよび本発明に係るエンハンサーを含むトリガー溶液Ｂを、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである化学ルミネセンス性化合物と混合することにより提供される。

【００３２】

本発明に係る化学ルミネセンス性化合物は、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである。

【００３３】

アクリジニウム化合物が、事実上全ての免疫アッセイが実施される水性媒体中で、アクリジニウム形態と擬塩基形態との間の平衡状態で存在することは当技術分野に周知である。アクリジニウム化合物の擬塩基形態は過酸化水素と反応できず、そのため化学ルミネセンスを生み出すことができない。化学発光性のアクリジニウム形態と非化学発光性の擬塩基形態との間の平衡は、媒体のｐＨにより強く影響される。酸性ｐＨはアクリジニウム形態の形成を促進し、塩基性ｐＨは擬塩基形態の形成を促進する。

【００３４】

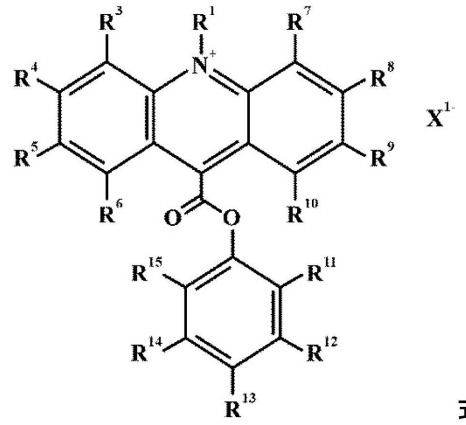
不均一アッセイフォーマットにおいて、アクリジニウム化合物またはトレーサーもしくはコンジュゲートと称されるアクリジニウム化合物により標識された生物活性のある分子

からの化学ルミネセンスは、通常、２種の試薬の連続的な添加により引き起こされる。過酸化物を含有する強酸によるアクリジニウム化合物の最初の処理は、アクリジニウム化合物の擬塩基形態をアクリジニウム形態に転化するために必要である。次いで、アルカリ溶液によるその後の処理は酸を中和し、過酸化水素のイオン化により発光が起こることを可能にするために反応媒体のｐＨを上昇させる。

【００３５】

好ましくは、本発明に使用される化学ルミネセンス性化合物は、式（ＩＩ）によるアクリジニウムエステル：

【化２】

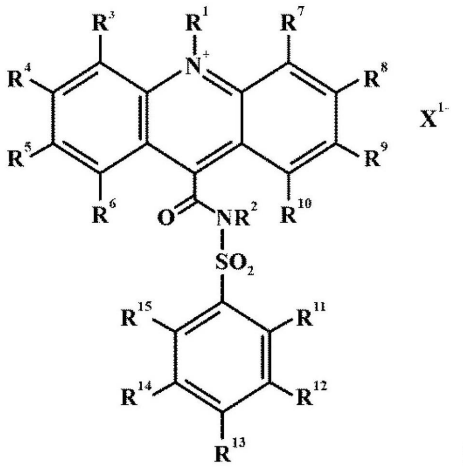


式(II)

（式中、R^1は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；R^3からR^{15}は、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハロゲン化物、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、スルファモイル、カルボキシアルキル、スクシンイミジルエステルおよびオキソアルキルまたは任意の他の脱離基からなる群から選択され；任意に、存在する場合、X^{1-}はアニオンである）；

または式（ＩＩＩ）によるアクリジニウムスルホンアミド

【化３】



式(III)

（式中、R^1は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルからなる群から選択され、R^2からR^{15}は、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハロゲン化物、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、スルファモイル、カルボキシアルキル、スクシンイミジルエステルおよびオキソアルキルまたは任

意の他の脱離基からなる群から選択され；任意に、存在する場合、X^{1-}はアニオンである）である。

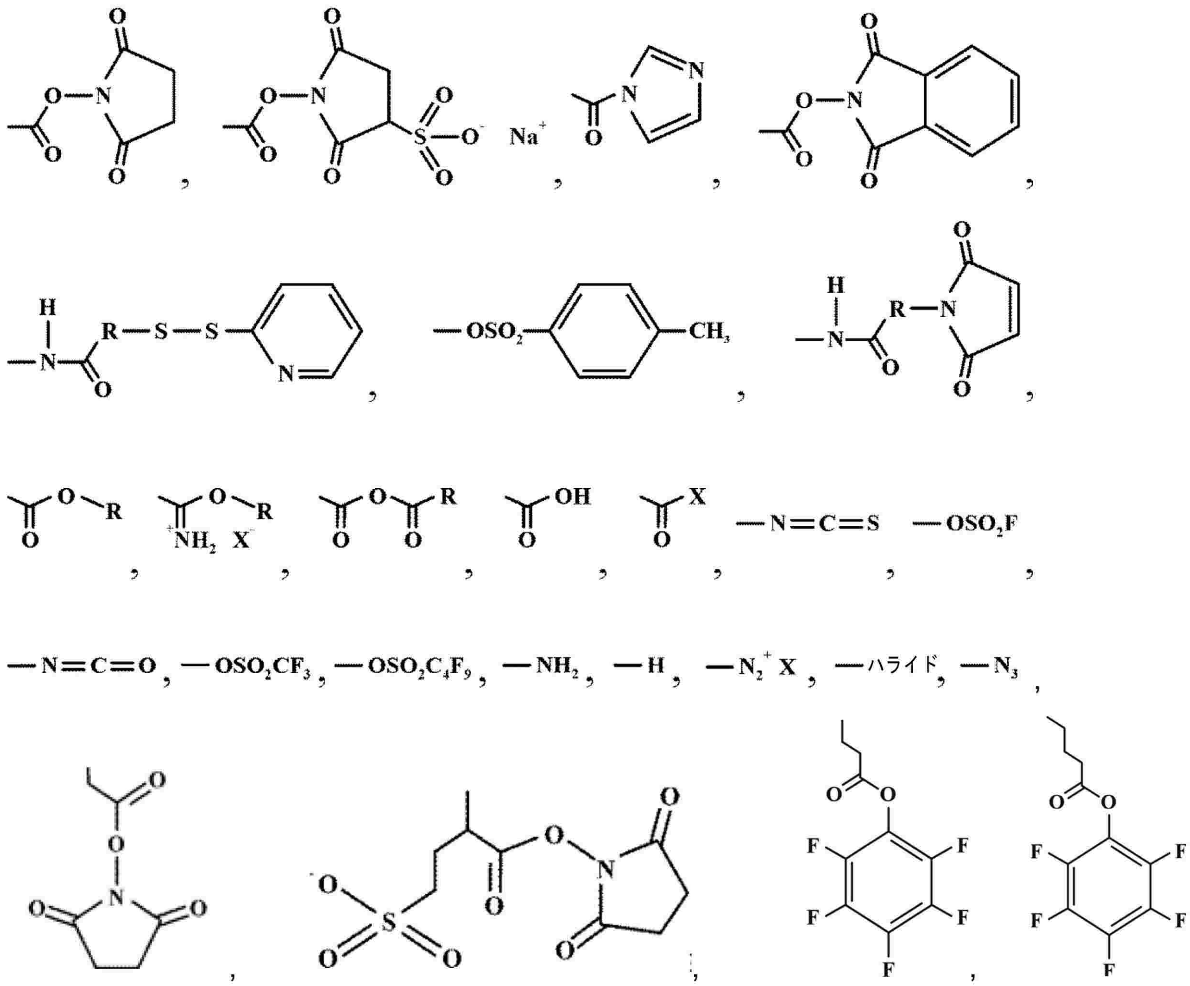
【００３６】

好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス性化合物は、さらに、R^{12}およびR^{14}が、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アミノ、カルボキシル、ヒドロキシル、アルコキシル、ニトロ、またはハロゲン化物からなる群から選択され；R^{11}およびR^{15}が、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルコキシル、アミノ、アミド、スルホンアミドまたはスルフィドからなる群から選択され；R^{13}が、以下の置換基

$R^{13}=L-R^{16}-R^{17}$

（式中、Ｌはスルファモイルであるか、または省略され、R^{16}は省略されるか、または、アルキル、アリール、アラルキル、ｚ＝１～１０、好ましくはｚ＝１もしくは２である（アミド）$_z$、もしくはｘ＝１～１０、好ましくはｘ＝４である（ポリエチレンオキシド）$_x$であり；R^{17}は、

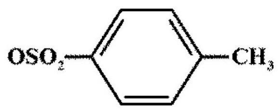
【化４】



SO_2Clまたは任意の他の脱離基からなる群から選択され、

式中、Ｒは、アルキル、アリール、またはアラルキルであり；Ｘは、CH_3SO_4、OSO_2F、ハロゲン化物、OSO_2CF_3、$OSO_2C_4F_9$、または

【化５】



である）を表し、
R^{12}、R^{13}およびR^{14}置換基位置が交換可能である、本明細書に開示される式（ＩＩ）によるアクリジニウムエステルである。

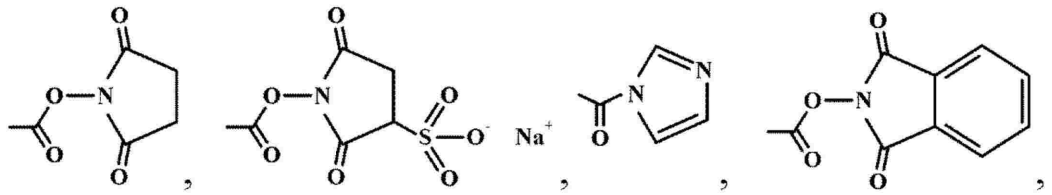
【００３７】

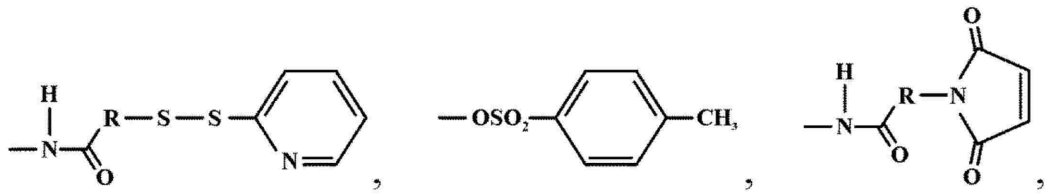
好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス性化合物は、さらに、R^{12}、R^{13}およびR^{14}が、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アミノ、カルボキシル、ヒドロキシル、アルコキシル、ニトロ、またはハロゲン化物からなる群から選択され；R^{11}およびR^{15}が、それぞれ互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルコキシル、アミノ、アミド、スルホンアミドまたはスルフィドからなる群から選択され；R^{2}が、以下の置換基

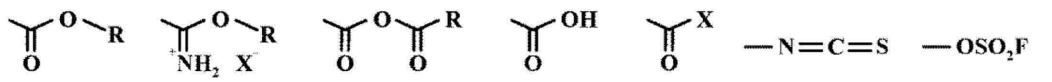
$R^{2}＝L－R^{16}－R^{17}$

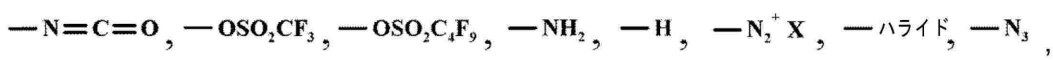
（式中、Ｌは、スルファモイルであるか、または省略され、R^{16}は省略されるか、またはアルキル、アリール、アラルキル、ｚ＝１～１０、好ましくはｚ＝１もしくは２である（アミド）$_z$、もしくはｘ＝１～１０、好ましくはｘ＝４である（ポリエチレンオキシド）$_x$であり；R^{17}は

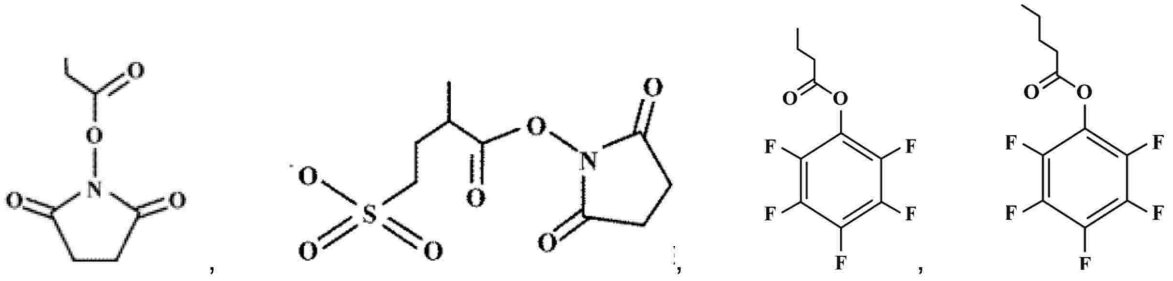
【化６】







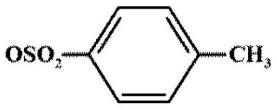




ハライド

SO_2Clまたは任意の他の脱離基からなる群から選択され、
式中、Ｒは、アルキル、アリール、またはアラルキルであり；Ｘは、CH_3SO_4、OSO_2F、ハロゲン化物、OSO_2CF_3、$OSO_2C_4F_9$、または

【化７】



である）を表し、
Ｒ１１からＲ１５置換基位置が交換可能である、本明細書に開示される式（ＩＩＩ）によるアクリジニウムスルホンアミドである。

【００３８】

本発明において有用であるアクリジニウム化合物は、１９８６年１０月６日に出願された米国特許出願番号第９１５，５２７号およびＮａｔｒａｊａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ａ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ ａｃｒｉｄｉｎｉｕｍ ｄｉｍｅｔｈｙｌｐｈｅｎｙｌ ｅｓｔｅｒ ｌａｂｅｌｓ ｗｉｔｈ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｓｉｔｅｓ”，Ｏｒｇ Ｂｉｏｍｏｌ Ｃｈｅｍ，１３（９）：２６２２－３３７，Ｍａｒｃｈ ２０１５にさらに記載されている。

【００３９】

好ましい実施形態において、好ましくは前述の実施形態の少なくとも１つによると、化学ルミネセンス性化合物は、
－ ｘ＝１～１０であるＮ－スルホプロピル－ジメチルアクリジニウム－（ポリエチレンオキシド）$_x$－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＰＥＯ$_x$－ＮＨＳ）、好ましくはＮ－スルホプロピル－ジメチルアクリジニウム－（ポリエチレンオキシド）$_4$－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＰＥＯ４－ＮＨＳ）；
－ ２，６－（ジメチル）－３－クロロスルホニルフェニル－Ｎ－（３－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキシレート（ＳＰＡＥ）；
－ ２，６－（ジメチル）－３－スルファモイルフェニル－Ｎ－（３－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキシレート－（ポリエチレンオキシド）$_4$－ペンタフルオロフェニルエステル（ＳＰＡＥ－ＰＥＯ$_4$－ＰＦＰ）；
－ ２，６－（ジメチル）－３－クロロスルホニルフェニル－Ｎ－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートトリフレート（ＭｅＡＥ）；
－ ２，６－（ジメチル）－３－スルファモイルフェニル－Ｎ－メチル－アクリジニウム－９－カルボキシレートトリフレート－（ポリエチレンオキシド）$_4$－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭｅＡＥ－ＰＥＯ$_4$－ＮＨＳ）、
－ ２，３，４，５，６－ペンタフルオロフェニルオキシ－１－カルボニル－４，７，１０，１３－テトラオキサペンタデシル－（１５－アミノ）－３’－スルホニル－２’，６’－ジメチルフェニル－Ｎ－（３－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキシレート、
－ １０－メチル－２，６－ジメチル－アクリジニウム－ＮＨＳエステルメチルスルフェート（Ｍｅ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）
－ Ｎ－スルホプロピル－ジメチルアクリジニウム－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ）；および
－ Ｎ－スルホプロピル－アクリジニウム－スルホンアミド－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳ）
からなる群から選択される。

【００４０】

本発明に係る化学ルミネセンス性化合物として好適な、本明細書に定義される式（ＩＩ）または（ＩＩＩ）による例示的なアクリジニウム化合物のリストは表２に表される。化学命名法において起こり得る曖昧さにもかかわらず列記された物質の正体を明らかにするために、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号および／または化合物レコード（ＣＩＤ）が、この情報を見出すことができ一般に利用可能

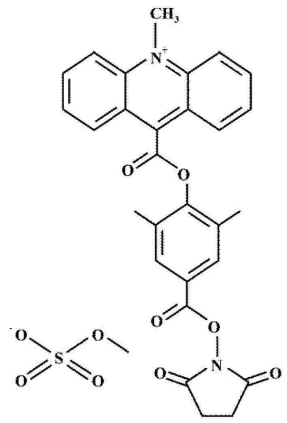
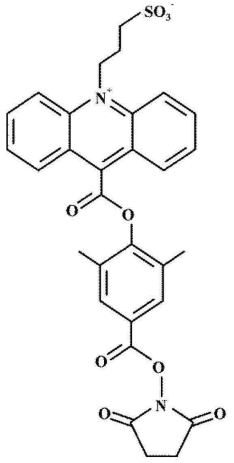
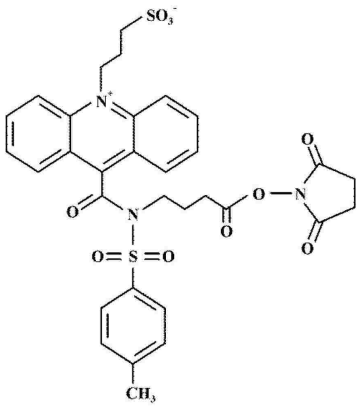
であれば、表２に列記される。Ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ＳｏｃｉｅｔｙによるＣＡＳ登録番号は、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｃａｓ．ｏｒｇまたはｈｔｔｐｓ：／／ｃｏｍｍｏｎｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．ｃａｓ．ｏｒｇによりアクセス可能である。ＣＩＤレコードは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ ＨｅａｌｔｈのＰｕｂＣｈｅｍデータベース中に、ｈｔｔｐｓ：／／ｐｕｂｃｈｅｍ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖにより見出すことができる。ＣＡＳおよび／もしくはＣＩＤが化合物に割り当てられていないか、または情報が一般に利用可能でない場合、それぞれの化合物は「ｎ．ｄ．」と定義された。

【００４１】

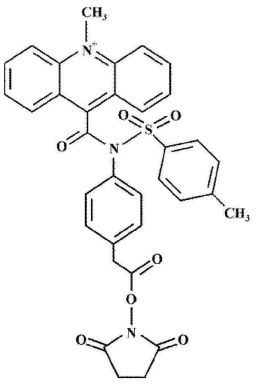
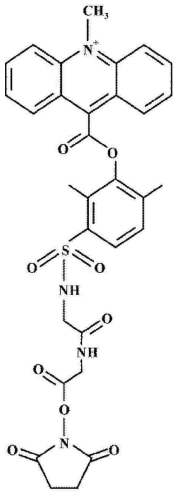
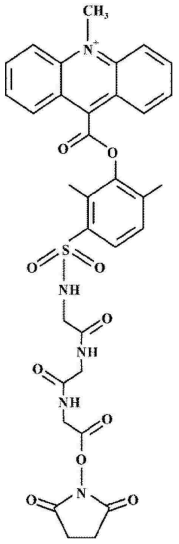
【表２】

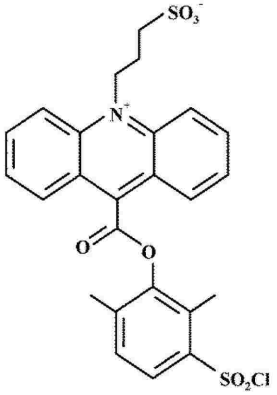
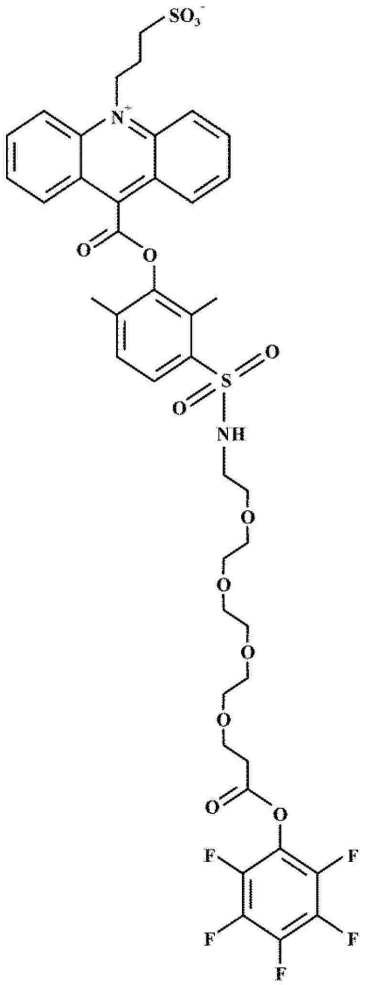
表2:

本発明による式(II)または(III)によるアクリジニウム化合物の例示的なリスト。

アクリジニウム化合物	CAS	CID	IUPAC名	アクリジニウム化合物の分子構造
Me-DMAE-NHS	115853-74-2	14153946	[4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシカルボニル-2,6-ジメチルフェニル]10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボキシレート;メチルスルフェート	
NSP-DMAE-NHS	194357-64-7	20608334	3-[9-[4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシカルボニル-2,6-ジメチルフェノキシ]カルボニルアクリジン-10-イウム-10-イル]プロパン-1-スルホネート	
NSP-SA-NHS	199293-83-9	59642932	3-[9-[[4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ-4-オキソブチル]-(4-メチルフェニル)スルホニルカルバモイル]アクリジン-10-イウム-10-イル]プロパン-1-スルホネート	

Me-DMAE-PEO4-NHS	MeAE-HCA-NHS
663921-17-3	664351-78-4
20818504	20818505
[3-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ-3-オキソプロポキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エチルスルファモイル]-2,6-ジメチルフェニル]10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボキシレート	3-[[2,4-ジメチル-3-(10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボニル)オキシフェニル]スルホニルアミノ]-4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ-4-オキソブタン-1-スルホネート

Me-SA-PhAc-NHS	MeAE-Gly2-NHS	MeAE-Gly3-NHS
		
125603-37-4	663921-21-9	663921-23-1
19598396	20818508	20818507
(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)2-[4-[(10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボニル)-(4-メチルフェニル)スルホニルアミノ]フェニル]アセテート	[3-[[2-[[2-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ-2-オキソエチル]アミノ]-2-オキソエチル]スルファモイル]-2,6-ジメチルフェニル]10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボキシレート	[3-[[2-[[2-[[2-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ-2-オキソエチル]アミノ]-2-オキソエチル]アミノ]-2-オキソエチル]スルファモイル]-2,6-ジメチルフェニル]10-メチルアクリジン-10-イウム-9-カルボキシレート

SPAE	663921-11-7	20818511	3-[9-(3-クロロスルホニル-2,6-ジメチルフェノキシ)カルボニルアクリジン-10-イウム-10-イル]プロパン-1-スルホネート	
SPAE-PEO4-PFP	663921-24-2	20818509	3-[9-[2,6-ジメチル-3-[2-[2-[2-[3-オキソ-3-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]エトキシ]エトキシ]エチルスルファモイル]フェノキシカルボニルアクリジン-10-イウム-10-イル]プロパン-1-スルホネート	

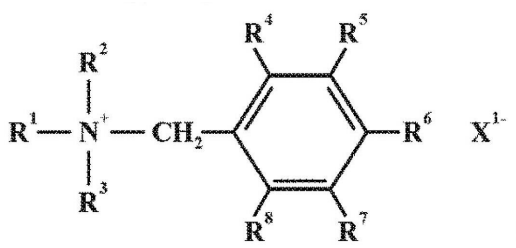
【００４２】

本発明に係るアクリジニウム化合物は、その化合物と反応して、化合物が化学ルミネセンス反応において光を発するように化合物の励起を起こす任意のオキシダントにより酸化され得る。好ましいオキシダントは、希アルカリ中の過酸化水素である。

【００４３】

好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス反応混合物は、オキシダントを、化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積で０．０１％から１％の量で、好ましくは化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積で０．０５％から０．５％の量で、最も好ましくは化学ルミネセンス反応混合物の総体積に基づいて、体積で０．１％から０．３％の量で含む。

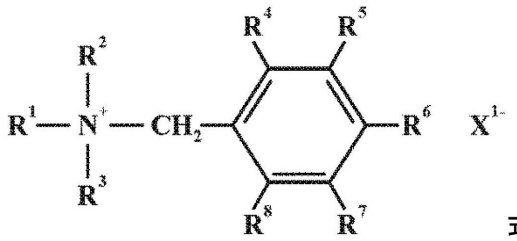
【００４４】
発せられる光は、ＬＢ ９６０ Ｃｅｎｔｒｏ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ Ｌｕｍｉｎｏｍｅｔｅｒ（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＧｍｂＨ ＆ Ｃｏ．ＫＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｍｏｄｅｌ ８１０ Ｌｕｍｉｎｏｍｅｔｅｒ（Ｃｉｂａ－Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ．，Ｍｅｄｆｉｅｌｄ，ＭＡ）またはＲＡ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０（Ｅｕｒｏｉｍｍｕｎ，ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ子会社，Ｇｅｒｍａｎｙ）などの標準的な測定装置を使用して定量化できる。
【００４５】
好ましい実施形態において、化学ルミネセンスの発光が可能である化学ルミネセンス性化合物は、４００ｎｍ以上、好ましくは４００ｎｍから６９０ｎｍ、より好ましくは４００ｎｍから５５０ｎｍ、より好ましくは４０５ｎｍから５００ｎｍ、最も好ましくは４１０から４９０ｎｍの波長を有するルミネセンスを発する。
【００４６】
第２の態様において、本発明の基礎にある問題は、化学ルミネセンス反応における、好ましくは化学ルミネセンス免疫アッセイにおける、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは本発明に係るそれらの化学ルミネセンスシグナルを増大させるための、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質
【化８】



式(I)

（式中、R^1は、C_3～C_{20}アルキルまたはアルケニルであり；R^2およびR^3は、互いに独立して、C_1～C_4アルキルまたはアルケニルであり；R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；X^{1-}は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される化合物の使用により解決される。
【００４７】
好ましい実施形態において、化合物は、R^1が、C_3～C_{18}アルキルまたはアルケニル、好ましくはC_5～C_{18}アルキルまたはアルケニル；より好ましくはC_8～C_{16}アルキルまたはアルケニル；最も好ましくはC_{12}～C_{14}アルキルまたはアルケニルであり；R^2およびR^3が、互いに独立して、メチル、エチル、プロピルまたはブチル、好ましくはメチルであり、R^4、R^5、R^6、R^7およびR^8が、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニル、好ましくは水素、メチルまたはエチルであり；かつ／またはX^{1-}が、塩化物イオンまたは臭化物イオン、好ましくは塩化物イオンである、本明細書に定義される式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される。
【００４８】
好ましくは、上記で開示された式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物は、化学ルミネセンス反応における、好ましくは化学ルミネセンス免疫アッセイにおける、化学ルミネセンス性化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、好ましくは本発明に係るそれらの化学ルミネセンスシグナルを増大させるために使用される。
【００４９】
本発明によると、化合物は、芳香族頭部基を有する本発明に係るエンハンサー化合物である。

【００５０】
第３の態様において、本発明の基礎にある問題は、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質
【化９】



式(I)

（式中、Ｒ^{1}は、Ｃ$_{3}$～Ｃ$_{20}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキルまたはアルケニルであり；Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}およびＲ^{8}は、互いに独立して、水素、アルキル、アルケニルであり；Ｘ$^{1-}$は、ハロゲン化物イオンまたはヒドロキシルイオン、好ましくは塩化物イオンまたは臭化物イオンである）からなる群から選択される少なくとも１つの化合物、および少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物であって、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは本明細書に開示される式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）のアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物を含む化学ルミネセンス組成物により解決される。
【００５１】
本発明によると、本発明に係る化学ルミネセンス組成物中の少なくとも１つの化合物は、芳香族頭部基を有する本発明に係るエンハンサー化合物である。
【００５２】
好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス組成物は蛍光剤をさらに含む。
【００５３】
本発明に係る化学ルミネセンス組成物は、１つまたは複数の蛍光剤、例えば、フルオレセインナトリウム、ローダミンＢおよび／またはローダミン６Ｇをさらに含み得る。蛍光剤は、化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスシグナルから光エネルギーを受け取った後、１つの蛍光を発するだろう。フルオレセインの量子収量が、化学ルミネセンス性化合物のものよりはるかに高くなり得るという可能性があり、そのため化学ルミネセンス性化合物の量子収量は間接的に改善し得る。例えば、フルオレセインナトリウム（９－（ｏ－カルボキシフェニル）－６－ヒドロキシ－３Ｈ－キサンテン－３－ケトン二ナトリウム）は水溶性蛍光剤であり、それぞれ４９４ｎｍおよび５１８ｎｍの励起波長および発光波長を有する。フルオレセインナトリウムの量子収量は最大０．９７である。同様に、ローダミン系列の蛍光剤も非常に高い蛍光量子収量を有する。蛍光剤は、好ましくは、本発明に係る化学ルミネセンス組成物中で約０．１ｍｇ／Ｌから約１ｇ／Ｌの濃度で使用される。
【００５４】
好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス組成物は、本発明に係る方法による化学ルミネセンス反応混合物である。好ましくは、本発明に係る化学ルミネセンス組成物は、硝酸、過酸化水素および／または水酸化ナトリウムをさらに含む。
【００５５】
好ましくは開示された実施形態による、本発明の化学ルミネセンス組成物は、化学ルミネセンス組成物の成分をマルチパッケージシステム（ｍｕｌｔｉ－ｐａｃｋａｇｅ　ｓｙｓｔｅｍ）に個別に包装することによりキットに含まれ得る。本発明に係る他の実施形態において、数種の成分は１つの容器中で合わされ得るが、その他の成分は別々な容器中に

保存されて、マルチパッケージシステムを形成する。代替的に、成分は混合されて、次いで単一の混合物として包装され得る。

【００５６】

第４の態様において、本発明の基礎にある問題は、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物であって、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは上記で開示された式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）のアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物および上記で開示された式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物を含む、好ましくは化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスを増大させるためのキットにより解決される。問題は、化学ルミネセンス性化合物が、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは上記で開示された式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）のアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドであり、および上記で開示された式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物も含まれる、化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスの増大に使用するためのキットにより好ましくは解決される。

【００５７】

好ましくは、式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物は、上述の本発明に係るエンハンサーである。

【００５８】

好ましい実施形態において、本発明に係るキットの成分は、個別に、または１、２もしくはそれ以上の混合物の形態で保存される。

【００５９】

好ましい実施形態において、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物、好ましくは本明細書に開示される式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）の化合物、および本明細書に開示される式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物は、共に本発明に係るキット中の１つの混合物中で、任意に、さらに水酸化ナトリウムと共に保存される。好ましくは硝酸および過酸化水素を含むトリガー溶液Ａは、好ましくは、本発明に係るキット中に個別に保存される。

【００６０】

好ましい実施形態において、好ましくは開示される好ましい実施形態の少なくとも１つによる本発明に係るキットは、診断上有用な担体、好ましくは固体担体であって、液体溶液中で抗原、抗体または自己抗体を捕捉する手段および担体に結合した抗原、抗体または自己抗体を検出する手段を含む、診断上有用な担体、好ましくは固体担体を含み、担体に結合した抗原、抗体または自己抗体を検出する手段は、少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物、すなわちアクリジニウム化合物、好ましくは本発明に係る式（ＩＩ）のアクリジニウムエステルまたは式（ＩＩＩ）のアクリジニウムスルホンアミドにより標識されている。本発明によると、診断上有用な担体が、ビーズ、好ましくは常磁性ビーズ、試験紙、マイクロタイタープレート、好ましくはウェスタンブロット、ラインブロットおよびドットブロットを含む群からのメンブレン、ラテラルフローデバイス、ガラス表面、顕微鏡法のためのスライド、マイクロアレイおよびバイオチップを含む群から選択されることがさらに好ましい。さらに好ましい実施形態において、診断上有用な担体は、ラインブロット、バイオチップまたはビーズ、最も好ましくはビーズである。好ましくは、診断上有用な担体はビーズにより提供される。少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物であって、アクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミド、より好ましくは本発明に係る式（ＩＩ）または式（ＩＩＩ）のアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである少なくとも１つの化学ルミネセンス性化合物がビーズに結合していることが、本発明によるとさらに好ましい。結合は、タンパク質－タンパク質相互作用により架橋した非共有結合性のタンパク質－タンパク質相互作用により存在し得るか、または共有結合性の結合により存在し得る。

【００６１】
好ましい実施形態において、本発明に係るキットは、上述の診断上有用な担体、トリガー溶液Ａおよびトリガー溶液Ｂをさらに含み、ここで、トリガー溶液Ａは硝酸および過酸化水素を含み、トリガー溶液Ｂは水酸化ナトリウムおよび上記で定義された式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択される１、２またはそれ以上の化合物を含み、少なくともトリガー溶液Ａおよびトリガー溶液Ｂは個別に保存される。
【００６２】
好ましい実施形態において、本発明に係るキットは、担体に結合した抗原、抗体または自己抗体を検出する手段であって、担体に結合した抗原、抗体または自己抗体を検出する手段が二次抗体であり得る手段をさらに含む。好ましくは、二次抗体は、抗体クラス、好ましくは哺乳動物の抗体クラス、より好ましくはＩｇＧなどのヒト抗体クラスの全ての抗体に特異的に結合する抗体である。二次抗体は、典型的には、前記クラスの定常ドメインを認識するが、対象とするクラスの抗体により共有される他のエピトープ、例えば３次元構造にわたる立体配座エピトープも認識し得る。広範囲のそれらは、例えばＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒから市販されている。それは、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体であり得る。好ましい実施形態において、本明細書で使用される用語「認識された」は、二次抗体が、検出されるべき抗原、抗体／複数の抗体または自己抗体／複数の自己抗体に特異的に結合することを意味する。二次抗体は、抗体クラスの全アイソタイプに特異的に結合し得る。例えば、ＩｇＧクラス抗体に対する二次抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４アイソタイプに結合し得る。これは、そのクラスに対する、好ましくはＩｇＧクラス抗体に対する二次抗体として、各ＩｇＧアイソタイプに特異的に結合する抗体を含む混合物または対象とする全アイソタイプと反応する単一の抗体を使用することにより達成され得る。二次抗体の使用は、Ｋｒｕｇｅｒ，Ｎ．Ｊ．，Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ ｏｎ Ｂｌｏｔｓ Ｕｓｉｎｇ Ｓｅｃｏｎｄａｒｙ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ（ｅｄ．Ｊ．Ｍ．Ｗａｌｋｅｒ），ｐａｇｅ ９６７，ｖｏｌｕｍｅ １９９６，Ｓｐｒｉｎｇｅｒに説明されている。簡単に言うと、そのような二次抗体は、実験動物を、認識されるべき抗体または認識されるべき抗体の混合物により免疫することにより生成され得る。
【００６３】
好ましい実施形態において、本明細書で使用される用語「特異的に結合する」は、好ましくは、その結合反応が、Ｂｉａｃｏｒｅ装置を使用して２５℃でｐＨ ７のＰＢＳ緩衝液中で表面プラズモン共鳴により測定される１×１０$^{-5}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-7}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-8}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-9}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-10}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-11}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-12}$Ｍの解離定数を特徴とする結合反応より強いことを意味する。
【００６４】
好ましい実施形態において、本発明に係る化学ルミネセンス組成物、化学ルミネセンス反応混合物および／またはキットは、安定剤、好ましくは１セットの安定剤、洗浄緩衝剤、劣化防止剤を含む群からの１つまたは複数の、好ましくは全ての試薬をさらに含む。
【００６５】
本発明に係る化学ルミネセンス組成物、化学ルミネセンス反応混合物および／またはキットは、反応系のｐＨを維持するための緩衝剤をさらに含み得る。適切な緩衝剤としては、炭酸塩緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、２－アミノ－２－メチル－１－プロパノールなどがある。緩衝剤は、約１０から約５００ｍＭの濃度で使用され得る。
【００６６】
本発明に係る化学ルミネセンス組成物、化学ルミネセンス反応混合物および／またはキットは、試薬の保存および長期貯蔵を促進する保存剤をさらに含み得る。保存剤の種類には制限がなく、Ｐｒｏｃｌｉｎ３００、アジ化ナトリウム、Ｋａｔｈｏｎ、およびゲンタマイシンなどの市販の保存剤が使用され得る。保存剤は、化学ルミネセンス反応に影響し

ない任意の濃度で使用され得る。

【００６７】

好ましい実施形態において、本発明に係るキットは、キャリブレーター、好ましくは１セットのキャリブレーター、陽性対照および陰性対照を含む群からの１つまたは複数の、好ましくは全ての試薬をさらに含む。

【００６８】

さらなる異なる検出用途によると、本発明に係るキットは、対応する酵素試薬、標識された酵素試薬、固相抗体および／または操作者に指示するマニュアルをさらに含み得る。

【００６９】

第５の態様において、本発明の基礎にある問題は、キット、医療機器、好ましくは疾患の診断のための診断機器の製造のための、本発明に係る化学ルミネセンス組成物または化学ルミネセンス反応混合物の使用により解決される。本発明によると、医療機器は、好ましくは顕微鏡法のためのガラススライド、バイオチップ、マイクロタイタープレート、ラテラルフローデバイス、試験紙、メンブレン、好ましくはラインブロット、クロマトグラフィーカラムおよびビーズ、好ましくは磁気または蛍光ビーズを含む群から好ましくは選択される。

【００７０】

別の態様において、本発明は、試験試料中の対象とする分析物を検出する免疫アッセイおよび／または方法であって、

（ａ）対象とする分析物を含むと疑われる試験試料を、対象とする分析物上の少なくとも１つのエピトープに結合する第１抗体と接触させて、第１抗体－分析物複合体を形成する工程であって、第１抗体が固相に固定化されており、さらに、試験試料中の少なくとも１つの自己抗体が、対象とする分析物上の少なくとも１つのエピトープに結合して、自己抗体－分析物複合体を形成し、前記自己抗体が固相に結合する工程；

（ｂ）第１抗体－分析物複合体および自己抗体－分析物複合体を含む前記混合物を、検出可能な標識にコンジュゲートされた第２抗体と接触させて、第１抗体－分析物－第２抗体複合体および自己抗体－分析物－第２抗体複合体を形成する工程であって、第２抗体が対象とする分析物上の少なくとも１つのエピトープに結合し、さらに、検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物、より好ましくは本発明に係る上述の式（ＩＩ）によるアクリジニウムエステルまたは式（ＩＩＩ）のアクリジニウムスルホンアミドである工程；

（ｃ）過酸化水素の源および本発明に係る上述の式（Ｉ）によるエンハンサーを、工程（ｂ）の混合物に生成させるか、または提供する工程；

（ｄ）塩基性溶液を、工程（ｃ）の混合物に加えて、光シグナルを生成させる工程；および

（ｅ）工程（ｄ）で生じたか、または発せられた光シグナルを測定して、試験試料中の対象とする分析物を検出する工程

を含む免疫アッセイおよび／または方法に関する。

【００７１】

上記免疫アッセイまたは方法において、試験試料は、全血、血清、または血漿であり得る。

【００７２】

さらなる態様において、本発明の基礎にある問題は、疾患の診断に使用するための本発明の化学ルミネセンス組成物または本発明のキットにより解決される。

【００７３】

本発明は、本明細書に開示される式（Ｉ）の四級アミンカチオン性物質からなる群から選択されるエンハンサー（化合物）を使用することにより、化学ルミネセンス反応における化学ルミネセンス反応混合物中のアクリジニウム化合物、好ましくはアクリジニウムエステルまたはアクリジニウムスルホンアミドである化学ルミネセンス性化合物の増大された化学ルミネセンスシグナルを提供できるという、発明者らの驚くべき発見に基づいてい

る。

【００７４】

発明者らは、驚くべきことに、四級アミンカチオン性物質の正電荷を帯びた頭部基中の芳香族部分の付加が、セチルトリメチルアンモニウムクロリド（ＣＴＡＣ）などの従来の物質と比べて化学ルミネセンスシグナル出力をさらに増大させることを見出した。さらに、発明者らは、驚くべきことに、そのような四級アミンカチオン性物質の疎水性尾部中の少なくとも３炭素原子の長さが、セチルトリメチルアンモニウムクロリド（ＣＴＡＣ）などの従来の物質と比べて、および正電荷を帯びた頭部基中に芳香族部分を有するが疎水性尾部中に少なくとも３炭素原子の長さを欠く四級アミンカチオン性物質と比べて化学ルミネセンスシグナル出力の増大のために追加的に重要であることを見出した。

【００７５】

したがって、本発明による記載される新たな方法（および関連する使用、組成物、混合物および／または物質）は、超低濃度の分析物のさらにより高感度の定量化を可能にするが、化学ルミネセンス免疫アッセイ全般におけるシグナル区別にも好都合である。

【００７６】

本発明に係る化学ルミネセンスエンハンサー化合物は、化学ルミネセンス性化合物、具体的には本発明に係る式（ＩＩ）および／または式（ＩＩＩ）の化学ルミネセンス性化合物の化学ルミネセンスのための望ましい増大効果を有する単純な成分を含む。本発明の化学ルミネセンス組成物は、安定で、長時間続き、非常に増大された化学ルミネセンスシグナルを与え、化学ルミネセンス免疫アッセイ、ＤＮＡプローブ検出、および生体膜タンパク質ブロッティングの化学ルミネセンス分析に使用され得る。本発明の化学ルミネセンス組成物は、臨床診断、科学的研究、環境および衛生検出、ならびに法医学鑑定の分野に広く使用され得る。一般に、本発明に係る化学ルミネセンスエンハンサー化合物は市販されており、低廉である。さらに、それらは、大規模での化学ルミネセンス組成物の製造に好適である。

【発明を実施するための形態】

【００７７】

別途示されない限り、本明細書で使用される用語は以下の意味を有する：

【００７８】

本明細書で使用される用語「増大させること」は、化学ルミネセンス反応の総発光および／または化学ルミネセンス反応のシグナル対バックグラウンドノイズ比が、本発明に係るエンハンサーを使用する場合には、本発明に係るエンハンサーがない場合より、および／または本発明まで使用されてきたいわゆるエンハンサー（すなわちヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド；ＣＴＡＣ）と比較して、より高いことを意味する。

【００７９】

個別または他の基と組み合わせて本明細書で使用される用語「アルキル」は、１～１２、１～８、および１～６個の炭素原子などの１～２０個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖のアルキル基を指す。「ｎ－プロピル」などの単一の直鎖アルキルへの言及は直鎖アルキル基を具体的に意味し、「イソプロピル」などの単一の分岐鎖アルキルへの言及は分岐鎖アルキル基を具体的に意味する。例えば、「$C_{1\sim6}$アルキル」は、$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{1\sim3}$アルキル、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルおよびｔｅｒｔ－ブチルを含む。同じ規則が、本明細書全体で使用される他の基に当てはまる。アルキルの代表例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｉｓｏ－プロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｉｓｏ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ｎ－ヘキシル、３－メチルヘキシル、２，２－ジメチルペンチル、２，３－ジメチルペンチル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、ｎ－ノニル、およびｎ－デシルがあるが、これらに限定されない。

【００８０】

本明細書で使用される用語「アルコキシ」は、酸素原子により親分子部分に付加された、本明細書に定義されるアルキル基を意味する。アルコキシの代表例としては、メトキシ

、エトキシ、プロポキシ、２－プロポキシ、ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ペンチルオキシ、およびヘキシルオキシがあるが、これらに限定されない。

【００８１】

本明細書で使用される用語「アリール」は、フェニル基、または二環式もしくは三環式縮合環系であって１つもしくは複数の縮合環がフェニル基である二環式もしくは三環式縮合環系を指す。二環式縮合環系は、シクロアルケニル基、シクロアルキル基、または別のフェニル基に縮合したフェニル基により例示される。三環式縮合環系は、本明細書に定義されるシクロアルケニル基、シクロアルキル基または別のフェニル基に縮合した二環式縮合環系により例示される。アリールの代表例としては、アントラセニル、アズレニル、フルオレニル、インダニル、インデニル、ナフチル、フェニル、およびテトラヒドロナフチルがあるが、これらに限定されない。本開示のアリール基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロ、およびヒドロキシルからなる群から独立に選択される１、２、３、４または５つの置換基により任意に置換され得る。

【００８２】

本明細書で使用される用語「アシル」は、R_aが、水素、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、フェニルまたはフェニルアルキルである－Ｃ（Ｏ）R_a基を指す。アシルの代表例としては、ホルミル、アセチル、シクロヘキシルカルボニル、シクロヘキシルメチルカルボニル、ベンゾイル、ベンジルカルボニルなどがあるが、これらに限定されない。

【００８３】

本明細書で使用される用語「アルケニル」は、２から２０個の炭素を含み、２つの水素の除去により形成された少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む直鎖または分岐鎖炭化水素を指す。アルケニルの代表例としては、エテニル、２－プロペニル、２－メチル－２－プロペニル、３－ブテニル、４－ペンテニル、５－ヘキセニル、２－ヘプテニル、２－メチル－１－ヘプテニル、および３－デセニルがあるが、これらに限定されない。

【００８４】

本明細書で使用される用語「アルキニル」は、２から２０個の炭素原子を含み、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を含む直鎖または分岐鎖炭化水素基を意味する。アルキニルの代表例としては、アセチレニル、１－プロピニル、２－プロピニル、３－ブチニル、２－ペンチニル、および１－ブチニルがあるが、これらに限定されない。

【００８５】

本明細書で使用される用語「アミド」は、カルボニル基により親分子部分に結合したアミノ基を指す（ここで、用語「カルボニル基」は－Ｃ（Ｏ）－基を指す）。

【００８６】

本明細書で使用される用語「アミノ」は、R_bおよびR_cが、水素、アルキルおよびアルキルカルボニルからなる群から独立に選択される－NR_bR_cを意味する。

【００８７】

本明細書で使用される用語「アラルキル」は、本明細書に定義されるアルキル基により親分子部分に付加されたアリール基を意味する。アリールアルキルの代表例としては、ベンジル、２－フェニルエチル、３－フェニルプロピル、および２－ナフタ－２－イルエチルがあるが、これらに限定されない。

【００８８】

本明細書で使用される通り、用語「カルボキシ」または「カルボキシル」は－CO_2Hまたは－CO_2を指す。

【００８９】

本明細書で使用される通り、用語「カルボキシアルキル」は、ｎが１から２０である－$(CH_2)_nCO_2H$または－$(CH_2)_nCO_2$－基を指す。

【００９０】

本明細書で使用される通り、用語「シアノ」は－ＣＮ基を意味する。

【００９１】

本明細書で使用される通り、用語「シクロアルケニル」は、３から１０個の炭素原子および１から３個の環を有する非芳香族環式または二環式環系であって、各５員環が１つの二重結合を有し、各６員環が１または２つの二重結合を有し、各７および８員環が１から３つの二重結合を有し、各９から１０員が１から４つの二重結合を有する非芳香族環式または二環式環系を指す。シクロアルケニル基の代表例としては、シクロヘキセニル、オクタヒドロナフタレニル、ノルボルニレニルなどがある。シクロアルケニル基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロ、およびヒドロキシルからなる群から独立に選択される１、２、３、４または５つの置換基により任意に置換され得る。

【００９２】

本明細書で使用される通り、用語「シクロアルキル」は、３から１２個の炭素原子を有する飽和単環式、二環式、または三環式炭化水素環系を指す。シクロアルキル基の代表例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、ビシクロ［３．１．１］ヘプチル、アダマンチルなどがある。本開示のシクロアルキル基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロ、およびヒドロキシルからなる群から独立に選択される１、２、３、４または５つの置換基により任意に置換され得る。

【００９３】

本明細書で使用される通り、用語「シクロアルキルアルキル」は、R_dがアルキレン基であり、R_eがシクロアルキル基である－R_dR_e基を意味する。シクロアルキルアルキル基の代表例はシクロヘキシルメチルなどである。

【００９４】

本明細書で使用される用語「ハロゲン化物」は、フルオリド、クロリド、ブロミド、およびヨージドを含む。

【００９５】

本明細書で使用される通り、用語「ヒドロキシル」は－ＯＨ基を意味する。

【００９６】

本明細書で使用される通り、用語「ニトロ」は－NO_2基を意味する。

【００９７】

本明細書で使用される通り、用語「オキソアルキル」は、R_aが、水素、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、フェニルまたはフェニルアルキルであり、ｎが１から２０である－（CH_2）$_n$Ｃ（Ｏ）R_aを指す。

【００９８】

本明細書で使用される通り、用語「フェニルアルキル」は、フェニル基により置換されたアルキル基を意味する。

【００９９】

本明細書で使用される通り、用語「スルホ」は－SO_3Hまたは－SO_3^-基を意味する。

【０１００】

本明細書で使用される通り、用語「スルホアルキル」は、ｎが１から２０である－（CH_2）$_n$$SO_3H$または－（$CH_2$）$_n$$SO_3^-$基を指す。

【０１０１】

本明細書で使用される用語「可溶性」は沈殿物がないことを指す。

【０１０２】

本明細書で使用される通り、用語「スルファモイル」は、R_1が、水素、アルキル、アリールおよびアルキルカルボニルからなる群から選択される－SO_2－NR_1－を指す。

【０１０３】

本明細書で使用される通り、用語「スルホンアミド」はスルホン酸の任意のアミドを指す。

【０１０４】

本明細書で使用される用語「化学ルミネセンス」は、化学物質の特定の反応で生じる光である。高エネルギー中間体が化学反応中で分解する際に一重項分子は励起されて形成さ

れ、次いで励起された一重項分子は基底状態に戻り、エネルギーの一部がルミネセンスの形態で発せられる。したがって、化学ルミネセンス反応は、２つのプロセス、励起プロセスおよびルミネセンスプロセスを含む。いくらかの分子エネルギーは、また、項間および項内交差（ｉｎｔｒａｓｙｓｔｅｍ　ｃｒｏｓｓｉｎｇ）のため励起状態で消散されるだろう。

【０１０５】

好ましい実施形態において、本明細書で使用される用語「診断」は、その最も広い可能な意味で使用されるものとし、疾患がどのように進行しているかもしくは将来進行する可能性があるかを見出すため、または特定の治療、例えば免疫抑制薬の投与に対する患者もしくは患者全般の反応性を評価するため、または試料がそのような患者由来であるかを見出すために、知られているまたはコホートからの匿名対象である患者が、過去に、診断の時点でもしくは将来に、特定の疾患または障害を患うか、または患う可能性があるか、または平均もしくは好ましくは類似の症状を有する同等な対象よりも患う可能性がより高いかの評価に役立つ情報を得ることを目指すあらゆる種類の手順を指し得る。そのような情報は臨床診断に使用され得るが、例えば患者コホート中または集団中の疾患を患っている対象の比率を決定するための一般的研究の目的で、実験および／または研究試験所によっても得られ得る。換言すると、用語「診断」は、診断することだけではなく、１人または複数人の患者の薬物または候補薬物の投与に対する反応をモニターして例えば薬物の効能を決定することを含む、疾患または障害の経過を予想することおよび／またはモニターすることも含む。結果は臨床診断用途のために特定の患者に割り当てられ得て、前記患者を治療する医師または施設に伝えられ得るが、これは、他の用途には、例えば研究目的の診断には必ずしも当てはまらず、その場合、結果を匿名化された患者由来の試料に割り当てることが充分であり得る。

【０１０６】

好ましい実施形態において、用語「診断」は、患者にとって最も見込みがある治療レジメンを選択するのに使用される方法または薬剤も指し得る。換言すると、方法または薬剤は、対象のために治療レジメンを選択することに関連し得る。例えば、自己抗体の検出は、患者に１つまたは複数の免疫抑制薬を投与することを含み得る免疫抑制療法が選択されるべきであることを示し得る。

【０１０７】

本発明に係る方法は、好ましくはインビトロ方法である。

【０１０８】

本発明によると、キットは、本発明に係る方法をどのように実施するかの説明書を含み得る。

【０１０９】

好ましい実施形態において、本発明に係るあらゆる方法または使用は、非診断用の使用向け、例えば、患者を診断する以外の使用のために自己抗体の存在を決定することであり得る。例えば、方法または使用は、患者の血液から自己抗体を除去するように設計された医療機器の効率をインビトロで試験するためであり得て、この場合、試験は患者の血液以外の液体に対して実施される。

【０１１０】

別の好ましい実施形態において、方法は、診断用アッセイの信頼性を確認するためであり得て、ポリペプチドに対する抗体を検出することを含み得る。

【０１１１】

好ましい実施形態において、本発明に係るあらゆる方法または使用は、疾患および／もしくは腫瘍を患うか、または発症するリスクがある対象を特定するためであり得る。

【図面の簡単な説明】

【０１１２】

【図１】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基を有する３種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化

ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くカチオン性化合物ＣＴＡＣの存在下での１ｎＭ　ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図２】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基を有する３種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くカチオン性洗剤ＣＴＡＣの存在下での１ｎＭ　ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図３】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基を有する３種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くカチオン性洗剤ＣＴＡＣの存在下での０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図４】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基を有する３種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くカチオン性洗剤ＣＴＡＣの存在下での０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図５】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基および少なくとも３炭素原子を有する長い疎水性尾部を有する４種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド；化合物４：ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を含むが長い疎水性尾部を欠くベンジルトリエチルアンモニウムクロリド（ＢＴＥＡＣ）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くが長い疎水性尾部を含むＣＴＡＣの存在下での１ｎＭ　ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図６】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基および少なくとも３炭素原子を有する長い疎水性尾部を有する４種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド；化合物４：ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を含むが長い疎水性尾部を欠くＢＴＥＡＣの存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くが長い疎水性尾部を含むＣＴＡＣの存在下での１ｎＭ　ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図７】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基および少なくとも３炭素原子を有する長い疎水性尾部を有する４種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド；化合物４：ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド）の存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を含むが長い疎水性尾部を欠くＢＴＥＡＣの存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くが長い疎水性尾部を含むＣＴＡＣの存在下での０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【図８】０．５％（ｗ／ｖ）のそれぞれ芳香族頭部基および少なくとも３炭素原子を有する長い疎水性尾部を有する４種の異なるカチオン性化合物（化合物１：ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；化合物２：塩化ベンザルコニウム；化合物３：アル

キル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド；化合物４：ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド）または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を含むが長い疎水性尾部を欠くＢＴＥＡＣの存在下、または０．５％（ｗ／ｖ）の芳香族頭部基を欠くが長い疎水性尾部を含むＣＴＡＣの存在下での０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡの化学ルミネセンス反応速度を示す。

【実施例】

【０１１３】

本発明は、本発明のさらなる特徴、実施形態、態様および利点がそこから理解され得る以下の非限定的な例によりさらに説明される。

【０１１４】

アクリジニウム標識およびコンジュゲート溶液の調製：

Ｎ－スルホプロピル－ジメチル－アクリジニウム－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ Ｉｎｃ．，Ｆｉｎｎｌａｎｄ）およびＮ－スルホプロピル－アクリジニウム－スルホンアミド－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳ；ＢＯＣ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）の１ｍｇ／ｍＬ標識ストック溶液を、それぞれ１００％（ｖ／ｖ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（Ｔｈ．Ｇｅｙｅｒ Ｈａｍｂｕｒｇ ＧｍｂＨ ＆ Ｃｏ．Ｋｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中に調製した。ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅヤギ抗ヒトＩｇＧ、Ｆｃγ断片特異的（抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ；Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｅｕｒｏｐｅ Ｌｔｄ．，ＵＫ）をリン酸（ｐｈｏｓｈａｔｅ）緩衝食塩水、ｐＨ７．６で０．３３ｍｇ／ｍＬの最終濃度に希釈し、その後に１０倍モル過剰のＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳと共に、または２．５倍モル過剰のＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳと共に、２時間室温で、Ｉｎｔｅｌｌｉ－Ｍｉｘｅｒ、ＲＭ－２Ｍ型（Ｈａｓｓａ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）内で、１０ｒｐｍでインキュベートした。標識反応を、１７．４ｍＭ Ｌ－リジン（ＶＷＲ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）の添加により３０分間室温で、１０ｒｐｍでの回転の間停止させた。過剰な遊離標識を、４℃で、Ｖｉｖａｓｐｉｎ ２０、分子量カットオフ１０ｋＤａコンセントレーター（ＶＷＲ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、Ｈｅｒａｅｕｓ Ｍｅｇａｆｕｇｅ ４０Ｒ遠心分離機（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）内で３，８００ｇでの限外濾過の間、抗体コンジュゲートから除去し、緩衝液を、０．０４５％（ｗ／ｖ）アジ化ナトリウム（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ）を含むリン酸緩衝食塩水、ｐＨ７．４に替えた。精製された抗体コンジュゲートを、０．０４５％（ｗ／ｖ）アジ化ナトリウム、１％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（Ｔｈ．Ｇｅｙｅｒ Ｈａｍｂｕｒｇ ＧｍｂＨ ＆ Ｃｏ．Ｋｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、０．３％（ｗ／ｖ）Ｋｏｌｌｉｐｈｏｒ（登録商標）Ｐ１８８（Ｔｈ．Ｇｅｙｅｒ Ｈａｍｂｕｒｇ ＧｍｂＨ ＆ Ｃｏ．Ｋｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）および０．５ｍＭエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩（Ｇｅｒｂｕ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｋ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を含むリン酸緩衝食塩水中で保存した。

【０１１５】

化学ルミネセンストリガー溶液の調製：

１００ｍＭ硝酸（ＶＷＲ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）および０．２％（ｖ／ｖ）過酸化水素（Ｒｏｔｈ ＧｍｂＨ ＆ Ｃｏ．ＫＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を含む化学ルミネセンストリガー溶液Ａならびに０．５Ｍ水酸化ナトリウム（Ｇｅｒｂｕ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｋ ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を含むトリガー溶液Ｂを調製した。トリガー溶液Ｂは、洗剤なしで、または０．０５、０．１、０．２５もしくは０．５％（ｗ／ｖ）の全て芳香族頭部基を欠くカチオン性化合物であるヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ）またはテトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ）を補って使用した。代替的に、トリガー溶液Ｂに、０．０５、０．１、０．２５または０．５％（ｗ／ｖ）の全て芳香族頭部基を含むカチオン性化合物であるヘキサデシルベンジルジメチ

ルアンモニウムクロリド（Ｍｅｒｃｋ　ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ；ＣＡＳ１２２－１８－９）、塩化ベンザルコニウム（Ｍｅｒｃｋ　ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ；ＣＡＳ６３４４９－４１－２）、アルキル（Ｃ１２～Ｃ１４）ジメチルエチルベンジル－アンモニウムクロリド（Ａｌｆａ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ＵＳＡ；ＣＡＳ８５４０９－２３－０）もしくはベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド（ＶＷＲ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ；ＣＡＳ１３９－０７－１）、または芳香族頭部基を含むが少なくとも３炭素原子の長い疎水性尾部を欠くベンジルトリエチルアンモニウムクロリド（Ｍｅｒｃｋ　ＫｇａＡ，Ｇｅｍａｎｙ）を補った。

【０１１６】

化学ルミネセンスシグナル強度の測定：

ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳおよびＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳ標識ストック溶液を１ｎＭの最終濃度に希釈し、抗体コンジュゲートをリン酸緩衝食塩水、ｐＨ７．４で０．１μｇ／ｍＬの最終濃度に希釈した。それぞれ１０μＬのこれらの希釈液を、９６ウェルＬｕｍｉＮｕｎｃ（商標）プレート（ＶＷＲ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＧｍｂＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）のウェルに移し、化学ルミネセンスシグナル強度をＬＢ　９６０　Ｃｅｎｔｒｏ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｌｕｍｉｎｏｍｅｔｅｒ（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ＧｍｂＨ　＆　Ｃｏ．ＫＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で、それぞれ１００μＬの化学ルミネセンストリガーＡ溶液ならびにカチオン性化合物の正体および濃度が様々である異なるトリガーＢ溶液の存在下で測定した。中間スピードでのトリガーＡの注入後、混合物を、二重軌道モード（ｄｏｕｂｌｅ　ｏｒｂｉｔ　ｍｏｄｅ）で、通常スピードでの混合の間１秒間インキュベートした。相対発光単位（ＲＬＵ）での化学ルミネセンス強度を、低注入スピードによる種々のトリガーＢ溶液の添加と同時に１．５秒の総時間にわたり５０ｍｓごとに記録した。試料の全てを、４つの技術的反復で測定した。対照実験において、全ての異なるトリガーＢ溶液を、トリガーＡと組み合わせて、９６ウェルプレートの空のウェルに注入した。後者の実験は、異なるトリガー溶液により生じるシグナルバックグラウンドを反映する。

【０１１７】

データ分析：

観察された化学ルミネセンス反応速度の図式的表示のために、代表的なデータセットを４つの技術的反復から選択し、ＲＬＵでのシグナル強度を時間に対してプロットした。さらに、総シグナル強度を、１．５秒の時間枠中に観察された全ＲＬＵ値の加法により計算した。異なるトリガーＢ溶液のバックグラウンドシグナル強度を、総シグナル強度から減算し、全てのバックグラウンド補正された総シグナル強度を比較した。

【０１１８】

［実施例１］

本発明に係る３種の代表的なエンハンサー化合物（化合物１～３）を分析のために選択した。これらの分子は、全て、四級アンモニウムに隣接する芳香族部分を含むカチオン性四級アンモニウム化合物に基づいている。本発明に係るエンハンサー化合物を通常のエンハンサー物質ＣＴＡＣ（例えば米国特許第４９２７７６９号において提案される）に対して試験した。対照的に、ＣＴＡＣは四級アンモニウムに隣接する芳香族部分を含まない。

【０１１９】

４種の代表的な分析物を選択して、従来技術において既に公知である通常のエンハンサー物質と比較した、これらの分析物により生じる化学ルミネセンスシグナルに対する本発明に係るエンハンサー化合物の効果を調査した（図１～４）。選択された分析物としては、遊離形態（図１～２）および抗体結合形態（図３～４）のアクリジニウム化合物ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳおよびＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳがある。ヤギ由来のポリクローナル抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ抗体を、両種類のアクリジニウム標識とのコンジュゲーションに選択した。

【０１２０】

アクリジニウム標識、コンジュゲート溶液および化学ルミネセンストリガー溶液は、上

記に開示した方法により得た。化学ルミネセンスシグナル強度の測定を実施し、データを上述の通り分析した。

【０１２１】

結果：

ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド（化合物１）を分析物ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳと共に使用するシグナル出力の４３％増加（図１、表３）が、同じ分析物に関してエンハンサー物質ＣＴＡＣと比較して観察された。

【０１２２】

塩化ベンザルコニウム（化合物２）およびアルキル（Ｃ$_{12}$～Ｃ$_{14}$）ジメチルエチルベンジルアンモニウムクロリド（化合物３）も、分析物としてＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳと一緒のＣＴＡＣと比較して、それぞれ１９％および１５％シグナル増加をもたらした。

【０１２３】

分析物をＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳに変えた場合、類似の結果を得た（図２、表３）。

【０１２４】

化合物１（ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド）は、物質ＣＴＡＣと比較して６７％増加したシグナルをもたらした。さらに、化合物２および３による５８％および４０％シグナル増加が、それぞれＣＴＡＣと比較してこの分析物に関して観察された。

【０１２５】

さらに、遊離型のアクリジニウム系プローブの両例に観察されるシグナル出力の増大が、典型的には免疫アッセイに要求される、プローブが抗体に共有結合的に結合している場合でも観察できたことが見出された。

【０１２６】

このシナリオにおいて、化合物１（ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド）は、分析物抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥ（図３、表３）および抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡ（図４、表３）に関して、ＣＴＡＣの存在下でのそれらの分析物のシグナル生成と比較すると、それぞれ４５％および６６％シグナル増加をもたらした。化合物２（塩化ベンザルコニウム）も、これらの２種の抗体コンジュゲートのシグナルを、それぞれ、４０％および５２％増加させた。さらに、２種の分析物に関して、化合物３（アルキル（Ｃ$_{12}$～Ｃ$_{14}$）ジメチルエチルベンジルアンモニウムクロリド）の存在下での２５％および３５％シグナル増加が、ＣＴＡＣの存在下でのシグナル生成と比較して観察された。

【０１２７】

【表３】

表3:

0.5% (w/v)のそれぞれ芳香族頭部基(化合物1～3)を有する3種の異なるカチオン性エンハンサー化合物の存在下、または0.5% (w/v)の芳香族頭部基を欠くカチオン性洗剤CTACの存在下での4種の異なる分析物のバックグラウンド補正された総シグナル強度の比較。

化合物	分析物			
	NSP-DMAE-NHS	NSP-SA-NHS	抗ヒトIgG-Fcγ-NSP-DMAE	抗ヒトIgG-Fcγ-NSP-SA
ベンジルジメチルヘキサデシル-アンモニウムクロリド (化合物 1)	4712949 RLU (+43%)	3631369 RLU (+67%)	2707416 RLU (+45%)	1449182 RLU (+66%)
塩化ベンザルコニウム (化合物 2)	3913778 RLU (+19%)	3432574 RLU (+58%)	2621080 RLU (+40%)	1325083 RLU (+52%)
アルキル(C_{12}~C_{14})ジメチルエチル-ベンジルアンモニウムクロリド (化合物 3)	3809207 RLU (+15%)	3042201 RLU (+40%)	2339403 RLU (+25%)	1175726 RLU (+35%)
CTAC	3299926 RLU	2169527 RLU	1871550 RLU	872358 RLU

【０１２８】

［実施例２］

説明：

化学ルミネセンス増大に対する、物質の疎水性尾部内の鎖長の影響を試験するために、さらなる実験を、化合物１～３（実施例１に記載の通り）により、通常のエンハンサーＣＴＡＣにより、本発明に係る追加のカチオン性エンハンサー（化合物４；ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド）により、および疎水性尾部中に３未満の炭素原子の鎖長を含む追加の物質ＢＴＥＡＣ（ベンジルトリエチルアンモニウムクロリド）により実施した（図５～８）。これらの追加の実験は、それぞれ上述の通り、および実施例１に記載の通り実施した。

【０１２９】

結果：

化合物１～３と同様に、化合物４は、通常のエンハンサーＣＴＡＣと比べて、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳ（図５）の、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳ（図６）の、０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥ（図７）の、および０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡ（図８）の化学ルミネセンスを増大させた。この実験において、化合物１～３は、通常のエンハンサーＣＴＡＣと比べて、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの化学ルミネセンスを４５～７９％、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳの化学ルミネセンスを６２～１０２％、０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥの化学ルミネセンスを４６～６３％、および０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡの化学ルミネセンスを４７～５０％増加させた（表４）。同様に、化合物４は、通常のエンハンサーＣＴＡＣと比べて、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＤＭＡＥ－ＮＨＳの化学ルミネセンスを５０％、１ｎＭ　ＮＳＰ－ＳＡ－ＮＨＳの化学ルミネセンスを４７％、０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＤＭＡＥの化学ルミネセンスを５０％、および０．１μｇ／ｍＬ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃγ－ＮＳＰ－ＳＡの化学ルミネセンスを４０％増加させた（表４）。

【０１３０】

ＢＴＥＡＣに関して、通常のエンハンサーＣＴＡＣと比べて、全４種の分析物により化学ルミネセンスの減少が観察された（図５～８および表４）。この物質は芳香族頭部基を含むが、おそらく、かつどのような理論にも拘束されないが、疎水性尾部の鎖長が短すぎ

てミセル構造を形成できないという理由で、この物質は同等な化学ルミネセンスエンハンサーとして機能しない。

【０１３１】

【表４】

表4: 0.5% (w/v)のそれぞれ芳香族頭部基および少なくとも3炭素原子を有する長い疎水性尾部を有する4種の異なるカチオン性エンハンサー化合物(化合物1～4)の存在下、または0.5% (w/v)の芳香族頭部基を含むが長い疎水性尾部を欠くベンジルトリエチルアンモニウムクロリド(BTEAC)の存在下、または0.5% (w/v)の芳香族頭部基を欠くが長い疎水性尾部を含むカチオン性洗剤CTACの存在下での4種の異なる分析物のバックグラウンド補正された総シグナル強度の比較。

化合物	分析物			
	NSP-DMAE-NHS	NSP-SA-NHS	抗ヒトIgG-Fcγ-NSP-DMAE	抗ヒトIgG-Fcγ-NSP-SA
ベンジルジメチルヘキサデシル-アンモニウムクロリド (化合物 1)	9285851 RLU (+74%)	7687351 RLU (+86%)	2545936 RLU (+55%)	13400308 RLU (+48%)
塩化ベンザルコニウム (化合物 2)	9554986 RLU (+79%)	8351873 RLU (+102%)	2667518 RLU (+63%)	13568679 RLU (+50%)
アルキル(C_{12}~C_{14})ジメチルエチル-ベンジルアンモニウムクロリド (化合物 3)	7746405 RLU (+45%)	6669609 RLU (+62%)	2389234 RLU (+46%)	13333146 RLU (+47%)
ベンジルジメチルドデシル-アンモニウムクロリド (化合物 4)	8015307 RLU (+50%)	6074325 RLU (+47%)	2450210 RLU (+50%)	12677099 RLU (+40%)
BTEAC	3663184 RLU (-31%)	1939935 RLU (-53%)	676605 RLU (-59%)	5143731 RLU (-43%)
CTAC	5333619 RLU	4125130 RLU	1637564 RLU	9041121 RLU

【０１３２】

全体として、記載された実施例において得られたデータは、本発明により提示されるエンハンサーの例を表す全４種の試験された化合物が、全ての試験されたアクリジニウム系分析物により生じたシグナルを、ＣＴＡＣとしての通常のエンハンサーの存在下での同じアクリジニウム系分析物によるシグナル生成と比較して増加させることが可能であったことを示す。

【０１３３】

さらに、これらの新たな化学ルミネセンスエンハンサーは、全て、芳香族部分、すなわち芳香族頭部基に連結したカチオン性四級アンモニウム化合物およびエンハンサーの疎水性尾部中に少なくとも３炭素原子の最低鎖長を含む分子構造を共有する。これらの分子部分、すなわち芳香族頭部基および疎水性尾部中の少なくとも３炭素原子の最低鎖長を含む全物質が、これらの分子部分、すなわち芳香族頭部基および疎水性尾部中の少なくとも３炭素原子の最低鎖長を欠くエンハンサー物質と比較して、同様に、アクリジニウム系分析物により生じる化学ルミネセンスを増大させるだろうことがあり得る。疎水性尾部中により短い鎖長を有する物質は、おそらくは、それらが化学ルミネセンス増大に有利になるとされるミセル構造を形成しないために、同様には化学ルミネセンスを増大させない。理論には拘束されないが、本発明による新たに提示されたカチオン性化学ルミネセンスエンハンサーが、いわゆる疎水性π－πスタッキング相互作用を形成するアクリジニウム環との直接的な相互作用により化学ルミネセンス反応プロセスを有利にすることがさらに考えられる。このようにして、アクリジニウム標識は、隣接するカチオン性アンモニウムイオン

の正電荷により引き寄せられる過酸化水素アニオンとの反応のために効率よく動員および配置され得る。

【０１３４】

本明細書のデータ、図、装置、試薬および工程は、限定的ではなく、例示的であると理解されるべきである。本開示は上記の具体的な実施形態を参照して記載されたが、多くの改変体および変形体が当業者には明らかだろう。全ての改変体および変形体も本開示の趣旨および範囲の中にある。

【図面】

【図１】

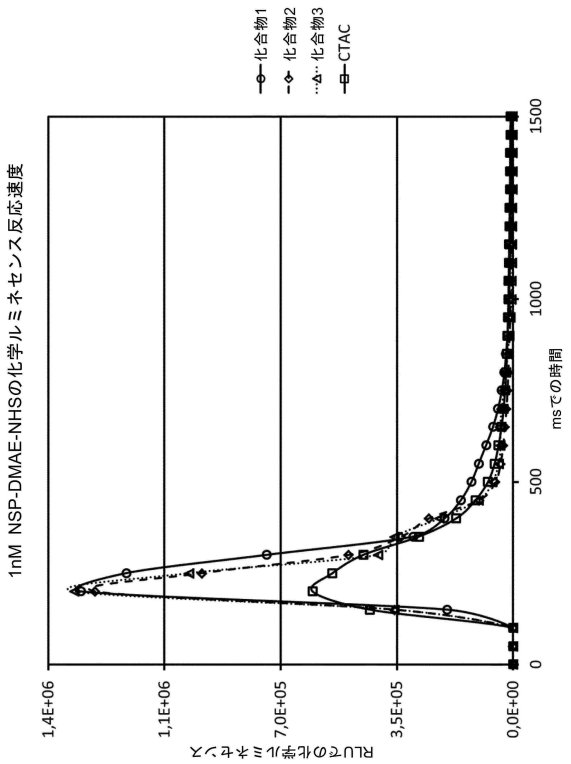


Fig. 1

【図２】

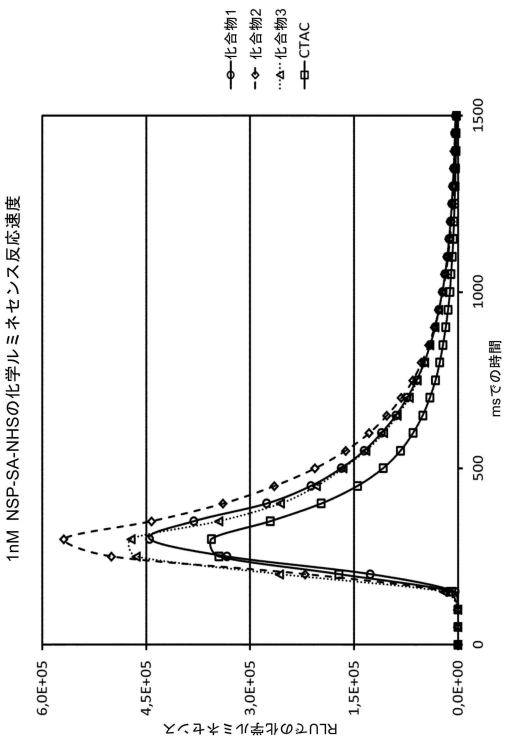


Fig. 2

【図３】

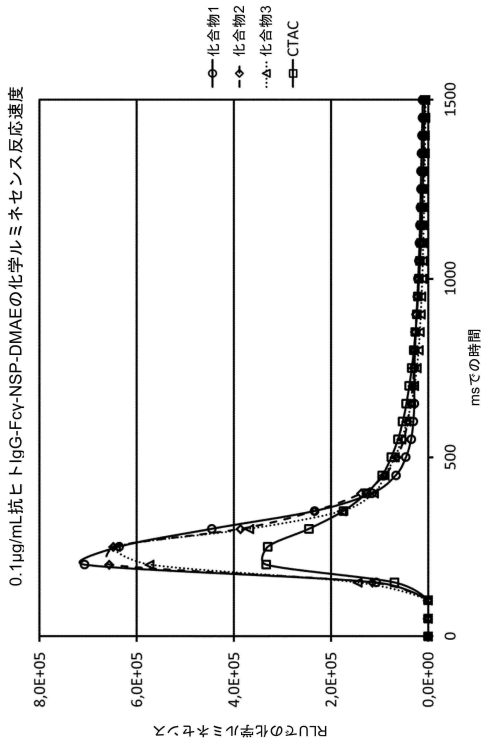


Fig. 3

【図４】

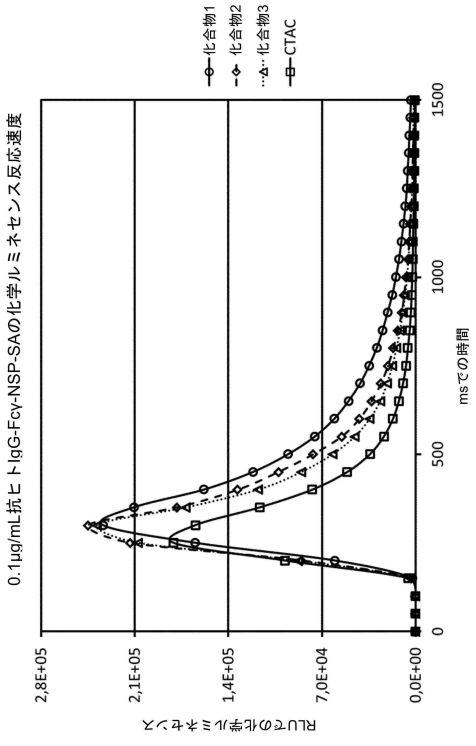


Fig. 4

【図５】

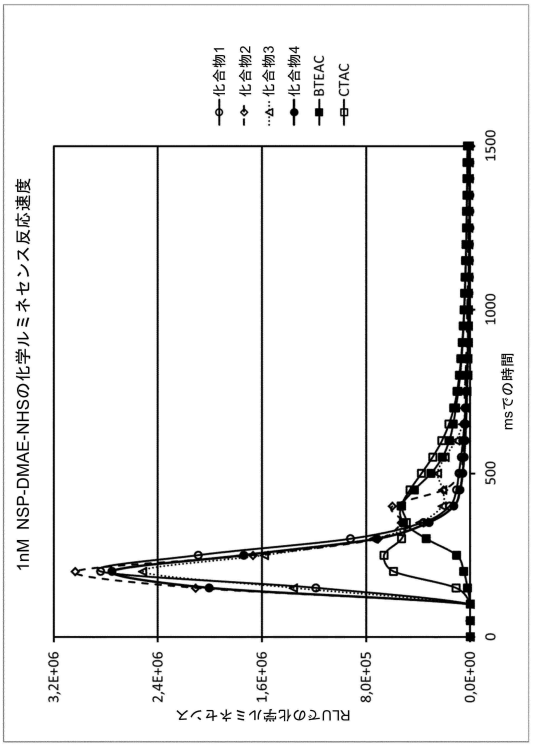


Fig. 5

【図６】

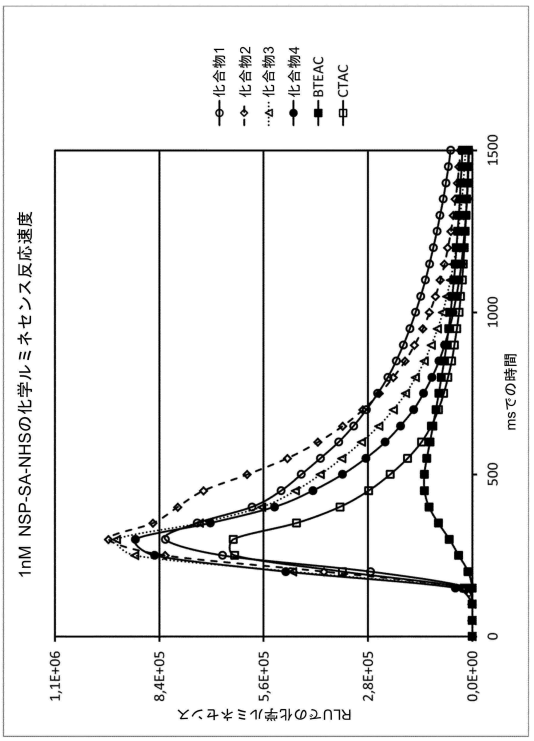


Fig. 6

【図７】

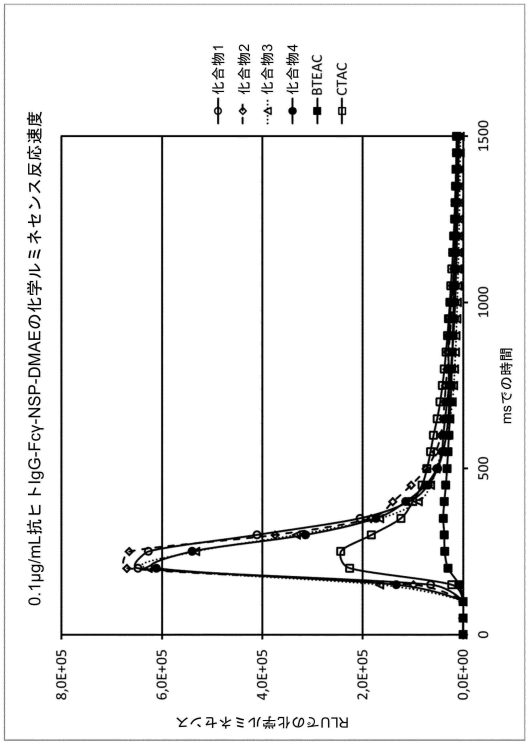


Fig. 7

【図８】

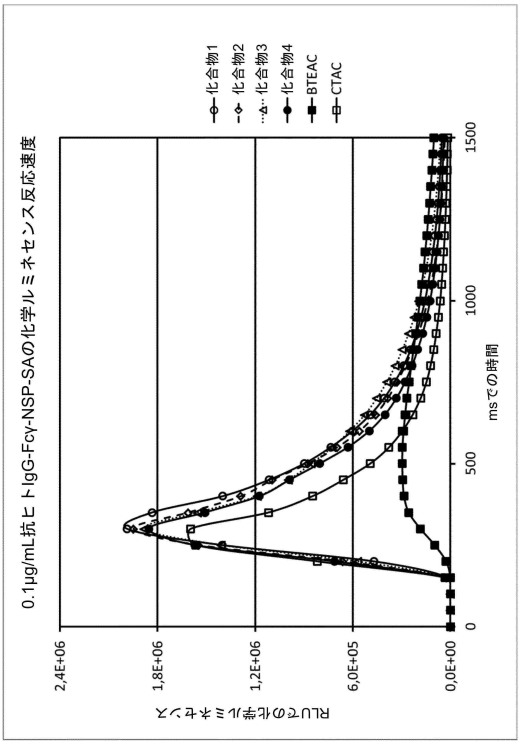


Fig. 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/070522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C09K11/07 G01N33/58 C09B67/22 C09B15/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C09K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARAKAWA HIDETOSHI ET AL: "Development of a highly sensitive chemiluminescent assay for hydrogen peroxide under neutral conditions using acridinium ester and its application to an enzyme immunoassay : We developed a highly sesitive chemiluminescent assay", LUMINESCENCE: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL AND CHEMICAL LUMINESCENCE, vol. 29, no. 4, 5 July 2013 (2013-07-05), pages 374-377, XP055876194, GB ISSN: 1522-7235, DOI: 10.1002/bio.2555 abstract;; page 375 page 376 ----- -/--	1-14

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
11 October 2022	26/10/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mehdaoui, Imed

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/070522

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/001136 A1 (QIAN CHUNGEN [CN] ET AL) 5 January 2012 (2012-01-05) claims 1-27; examples 1-17	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/070522

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012001136 A1	05-01-2012	CN 102311730 A	11-01-2012
		US 2012001136 A1	05-01-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

弁理士　水島 亜希子

(72)発明者　テウザー，マティアス
ドイツ国，リューベック

(72)発明者　コモロフスキ，ラース
ドイツ国，リューベック

(72)発明者　ダマーマン，アンティエ
ドイツ国，リューベック

(72)発明者　バウメルト，カスリン
ドイツ国，リューベック

(72)発明者　ホルシュテ，マレイケ
ドイツ国，リューベック

(72)発明者　ヒンケルアンメルト，マルセル
ドイツ国，リューベック