

(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2005-517185

(P2005-517185A)

(43) 公表日 平成17年6月9日(2005.6.9)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|---------------|-------------|
| GO 1 N 33/82 | GO 1 N 33/82 | 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/53 | GO 1 N 33/53 | 4 B O 6 3 |
| GO 1 N 33/531 | GO 1 N 33/531 | A |
| // C 1 2 Q 1/37 | C 1 2 Q 1/37 | |
| C 1 2 Q 1/40 | C 1 2 Q 1/40 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-566562 (P2003-566562) | (71) 出願人 | 502301425 アクシス-シールド エイエスエイ |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年2月6日(2003.2.6) | | ノールウェー エヌ-0510 オスロ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成16年8月3日(2004.8.3) | | ウルフェンファイエン 87 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/GB2003/000529 | (74) 代理人 | 110000040 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ |
| (87) 国際公開番号 | W02003/067263 | (72) 発明者 | フランツェン、フランク ノールウェー エヌ-0510 オスロ |
| (87) 国際公開日 | 平成15年8月14日(2003.8.14) | | ウルフェンファイエン 87、アクシス-シールド エイエスエイ内 |
| (31) 優先権主張番号 | 0202776.1 | F ターム(参考) | 2G045 BA13 BB51 CA25 DA57 FB01 FB03 FB12 4B063 QA01 QQ35 QQ36 QQ61 QQ79 QR15 QR16 QR41 QR48 |
| (32) 優先日 | 平成14年2月6日(2002.2.6) | | 最終頁に続く |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | |

(54) 【発明の名称】 葉酸分析法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも葉酸のいくつかが少なくとも一つの付属グルタミン酸残基を含む、葉酸含有試料中の葉酸の分析方法である。前記方法は、パラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸またはそれらの塩を解離するために前記試料の加水分解を行うこと、解離したパラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸、塩またはそれらのジアゾ誘導体をそれらの結合パートナーと接触させること、および、生じた結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくはは派生物の組み合わせを直接的または間接的に検出することを含む。本発明はさらに、本発明の方法中で使用できるキットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも葉酸のいくつかが少なくとも一つの付属グルタミン酸残基を含む、葉酸含有試料中の葉酸の分析方法であって、パラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸またはそれらの塩を解離するために前記試料の加水分解を行うこと、解離したパラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸、塩またはそれらのジアゾ誘導体をそれらの結合パートナーと接触させること、および、生じた結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせを直接的または間接的に検出することを含む方法。

【請求項2】

前記方法がいかなるクロマトグラフィー分離工程をも含まない、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記試料が血液由来の試料である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記結合パートナーが抗体、抗体フラグメント、単一鎖の抗体、単一鎖の抗体フラグメント、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチドおよび小有機分子から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記小有機分子が、パラジアゾ安息香酸(PDBA)またはパラジアゾベンゾイルグルタミン酸を含むジアゾ化合物を形成することが可能な第3級芳香族アミン、フェノールまたはフェノール誘導体である、請求項5に記載の方法。

20

【請求項6】

前記加水分解が酸性条件下で金属を用いて前記試料を処理することを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記加水分解がマイクロ波照射を用いて前記試料を処理することを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記加水分解が酸化剤を用いて処理することを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記酸化剤が過酸化水素および/または過マンガン酸カリウムである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記加水分解が還元剤を用いて処理することを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記加水分解が酸化的光分解を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項13】

前記酸化的光分解が感光剤存在下で実行される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記試料が、前記末端グルタミン酸残基のほとんどを前記葉酸から除去するために自然に存在するおよび/または加えられる酵素の存在下で培養され、前記加水分解の生成物がPABA-gluである、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記試料が、前記末端グルタミン酸残基のほとんどを前記葉酸から除去するために少なくとも一つの加えられる酵素の存在下で培養され、前記加水分解の生成物がPABAである、

50

請求項 1 ~ 13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせが、吸収または蛍光によって直接的に検出される、請求項 1 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせが、第2結合パートナーによって間接的に検出される、請求項 1 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

本発明の分析を行う中で用いるキットであって、

i)葉酸加水分解試薬；および

ii)PABA、PABA-glu、PDBAまたはPDBA-glu結合パートナーを含むキット。

【請求項 19】

さらに酵素または酵素反応混液を含む、請求項18に記載のキット。

【請求項 20】

さらにPABAからPDBAへまたはPABA-gluからPDBA-gluへの変換試薬を含む、請求項18または19記載のキット。

【請求項 21】

さらに第2結合パートナーを含む、請求項18~20のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、葉酸の分析のためのキットおよび装置だけでなく葉酸の分析法にも関する。

【背景技術】

【0002】

葉酸(folic acid)、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸およびメチルテトラヒドロ葉酸を包括して用いられる言葉である葉酸(folate)は、チミジン、モノリン酸塩の合成、従ってDNAの合成のための補酵素であり、しばしばビタミンB複合体の一部として指される。葉酸の低い水準および葉酸代謝の障害は、特に巨赤芽球性貧血、神経管欠損症、癌および心臓血管系疾患を含む様々な疾病状態の病因に関係しているということが広く報告されている。妊婦の葉酸の不足は、また、幼年期白血病に関係している。従って葉酸の正確な評価が、疾患および危険性の評価および監視において臨床的に重要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、葉酸の評価は、例えば、プテリジン環構造およびグルタミン酸残基などの数多くの異なる形態と、血清および赤血球の中の葉酸の相違である種々の変異体分布とが存在するという事実によって、複雑化されている。確かに現在のところ2種類の広く用いられている葉酸分析法が存在する。すなわち一方は血清のためのものであり、他方は全血のためのものである。しかし、全血のための葉酸は、インターアッセイ中に大きな分散があり、インターアッセイは、研究室の違いから生じる。赤血球葉酸は、患者の長期の状態の測定を行い、血清葉酸よりも摂食による影響が少ないので、赤血球葉酸分析が一般的に好まれている。しかし、赤血球葉酸分析の確かな問題を考慮して、いくつかの研究室は、代わりに血清葉酸分析に戻ることを提案している。

【0004】

半分に濃縮された塩酸中において分析試料の長時間の煮沸(約6時間)を行い、ついでクロマトグラフィー分離および全ての異形に共通する葉酸フラグメント、すなわちパラアミノ安息香酸(PABA)の分析(例えば、マススペクトル等による)を行うことによって、葉酸の

10

20

30

40

50

ヘテロジェニシティ (heterogeneity) から生じる前記問題を取り除くことが提案されている。例えば、Anal. Biochem. 283: 266-275(2000)を参照。この厳しい処理および分離の影響は、プテリジン環の開裂および、PABAが脱離した全ての異形葉酸からの付着グリシン酸残基の脱離である。しかし、このような技術は、例えば、診断上の分析所または管理の間際等の一般的な臨床の利用には適していない。これは、特にクロマトグラフィー分離工程の時間の消費と不適切な通過量の性質とのため、または、多種の並行分析のためである。

【0005】

従って、生物学検査における確実に実現可能な葉酸分析法の前進が必要である。

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

我々は、そのような分析法は、試料のクロマトグラフィー分離と、厳しく使用者に不親切または実用的でない反応条件との必要が無いPABAの検出に基づいていることを見つけた。

【0007】

従って、本発明の一つの側面からの視点は、葉酸含有試料中の葉酸分析方法を提供し、前記方法は以下を含む：

パラアミノ安息香酸、パラアミノベンゾイルグルタミン酸(PABA-gul)またはそれらの塩を解離するために前記試料の加水分解を行う；前記解離したパラアミノ安息香酸、PABA-gulまたはそれらの塩もしくはそれらのジアゾ誘導体を結合パートナーと接触させる；および、前記生じた結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：PABA-gulまたは塩、もしくは結合誘導体を直接的または間接的に検出する。

20

【発明の効果】

【0008】

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

好ましくは、本発明が提供する葉酸含有試料中の葉酸分析法は、以下を含む：

パラアミノ安息香酸またはそれらの塩を解離するために前記試料の加水分解を行う；前記解離したパラアミノ安息香酸またはそれらの塩もしくはそれらのジアゾ誘導体を結合パートナーと接触させる；および、前記生じた結合パートナー：パラアミノ安息香酸または塩、もしくは結合誘導体を直接的または間接的に検出する。

30

【0010】

本発明の方法による前記分析試料は、どのような葉酸含有試料でも良いが、特に好ましくは、例えば、濃縮赤血球または血清などの血液または血液由来のものであり、より好ましくは、濃縮(および望ましくは洗浄した)赤血球(RBC)である。RBC試料を用いるとき、望ましくは前記加水分解の前に細胞を溶解させ、タンパク質を変性させる；しかし、任意におよび好ましくは、前記加水分解処理自身が、細胞の溶解およびタンパク質の変性を引き起こす。

【0011】

本発明の分析方法において、前記結合パートナーは、溶液中に存在していて良いし例えば、個体、液体またはゲル粒子もしくは基質表面等のマクロ構造上に固定されていても良く、例えば、シート、ロッド、チューブ、繊維、メッシュ、ウェッジ等である。前記結合パートナー：PABA、結合パートナー：PABA-gul等の組み合わせは、例えば、発光または吸収特性放射の効果もしくは酵素活性等によって直接的に検出して良い。間接的検出は、例えば、結合パートナーとの直接検出できる組み合わせを製造する、前記結合パートナーの競合物質との結合する能力等である。

40

【0012】

好ましい側面の一つとして、前記結合パートナーは、PABA、PABA-gulまたはPABA誘導体等と結合することが可能な、例えば、抗体、抗体フラグメント、単一鎖の抗体、単一鎖の抗体フラグメント、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチドまたは小有機分子等の抗体また

50

は抗体類似体である。例えば、PABA、PABA-gulもしくはPABA(またはPABA-gul)結合体または誘導体等の適切な抗原を用いると、そのような結合パートナーは、例えば、インビトロでの抗体発生、ファージディスプレイのような文献技術、組み合わせの化学技術およびコンピュータ利用分子設計等の選択される従来の技術を用いる。

【0013】

しかし、特に好ましい実施形態において、前記結合パートナーは、吸収または発光の光特性を有するジアゾ化合物を形成するために、パラジアゾ安息香酸(PDBA)またはパラジアゾベンゾイルグルタミン酸(PDBA)とカップリングが可能な芳香族第3級アミンもしくはフェノールまたはフェノール誘導体である。(ここで用いられる光は、例えば、IR、UV、特に近IR等の可視波長範囲外の発光を含む。)

10

実施形態において、前記解離されたPABAまたはPABA-gulは、好ましくは、前記結合パートナーと接触する前に、亜硝酸塩との反応によってそれぞれPDBAまたはPDBA-gulへと変換される。

【0014】

抗体発生が前記選択した結合パートナーを用いて行われるとき、マクロ分子抗原キャリアーと結合する基、例えば、破傷風トキソイド、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)またはこの用途のための一般的なタンパク質等のようなタンパク質によって、2または3位が置換された前記PABAまたはPABA-gul抗原を用いることが好ましい。そのような抗原を製造するための好ましい開始点の一つは、例えば、2-ヒドロキシ-4-アミノ安息香酸、2-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、3-ヒドロキシ-4-アミノ安息香酸、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸またはそれらのモノグルタミンアミド等のようなヒドロキシおよび/またはニトロ置換されたPABAまたはPABA-gul誘導体である。前記2-ヒドロキシ基は、好ましくはトシル化等の活性化後に、すぐにカップリング試薬と反応する。望ましくはカップリング反応の間、前記4-アミノ基(およびいくつかのケースでは前記カルボキシル基または群)は、保護される。一般的な保護基、例えば、アミノ基のためのFmoc、Bocまたはアセトアミド、およびカルボン酸基または群のためのエステル形成等がここでは用いられる。

20

【0015】

もしくは、一般的な化学技術を用いてカップリング試薬と反応するカップリング基または置換基が、PABAまたはPABA-gulの2または3位に導入されても良い。前記2位に導入されるとき、好ましくはパラニトロ安息香酸または前記それらのモノグルタミンアミドを用い、および2-置換基の導入に続き、ニトロ基をアミノ基に還元する(例えばLi/H₂を用いて)。

30

【0016】

前記PABAまたはPABA-gulを前記キャリアーとつなぐ基は、好ましくは、1~50の原子架橋が2つ繋がったもの、より好ましくは5~20原子架橋である。前記架橋の骨格原子は、例えば、前記PABAまたはPABA-gul残基の方向を安全に直すために、固い構造(例えば、芳香環または脂肪族の籠)の部分でもよくそうでなくても良い。

【0017】

前記2または3位が置換されたPABAまたはPABA-gulの前記キャリアーとのカップリングは、一般的な方法で生じ、例えば、チオールで終結している2/3置換(例えば、Cys残基で終結されている)およびキャリアーが機能化されたジスルフィドまたはマレイミドである。

40

【0018】

少なくとも好ましくは、アンチ-PABAまたはアンチ-PABA-gulを増やすための前記抗原は、抗原性マクロ分子キャリアー(例えば、タンパク質等)とPABA自身のカルボキシまたはアミノ基とのもしくはアミノ基またはPABA-gulのカルボキシ基の一つとのカップリングによって調製される。前記アミノ基とのカップリングの場合において、Fmoc保護されたNHS-活性化アミノアルカン酸(例えば、アミノプロピオン酸)スペーサーは、PABAまたはPABA-gulと反応し、キャリアータンパク質とのカップリングにおいて脱保護される。かわりに、アルデヒド基輸送スペーサーとカップリングするタンパク質は、抗原を得るためにPABAまた

50

はPABA-gulの前記アミノ基と縮合される。さらなる代わるべき手段は、第1の前記スパーサーとキャリアタンパク質のカップリング後、随意にイソチオシアネイト活性化されたアミノアルカン酸が、スパーサーPABAまたはPABA-gulと反応すること、もしくはイソチオシアネイト活性化されたPABAまたはPABA-gulが、アミノアルカン酸と反応することである。

【0019】

前記結合パートナーは、好ましくは基質結合、例えば、多孔性織物(例えば、ニトロセルロース)または高分子溶球であり、特に好ましくは、磁気収集性溶球(例えば、DynaI AS、Oslo、Norwayから手に入るようなもの)である。固定された結合パートナーにおいて、PABAまたはPABA-gul溶液で培養後に、前記基質を洗浄することは可能であり、従ってPABA
10
：結合パートナーまたはPABA-gul：結合パートナー組み合わせの決定の邪魔となる試料中の他の物質を除くことが可能である。前記試料がヘモグロビンを含む、および前記結合パートナーが、PABAまたはPABA-gulと反応してアゾ化合物を形成する場合において、これは特に望ましい。前記結合パートナーと基質をカップリングするための標準的な技術を用いることができる。

【0020】

本発明の分析法の実施において、前記葉酸のPABA変換は、例えば、110 における6M塩酸で6時間または遮蔽容器中の塩酸蒸気層加水分解(例えば150 1時間)、または4Nメタン
20
スルホン酸のような強酸性培養の使用を都合よくもたらす。望ましい加水分解は、例えば、強(例えば 4M、好ましくは 5M、特に 6M)塩酸のような酸性溶液中における、例えば、1つまたはそれ以上のプロテアーゼを伴う最初のインキュベーション後任意に、遷移金属またはそれらの化合物、特に白金または白金化合物のような金属触媒の使用をもたされる。

【0021】

さらに非常に好ましい実施形態において、葉酸のPABAへの酸加水分解は、マイクロ波照射下でもたらされる。これは、5またはそれ以上および可能であれば25以上の率で加水分解に必要な時間を減らすことができる。

【0022】

さらに非常に好ましい実施形態において、過酸化水素のような試薬による酸化、および/または水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤を用いた処理は、様々な葉酸の酸性加水
30
分解の受けやすさを、前記様々な葉酸の試料から酸感応誘導体への変換によって、非常に増加させるために使用することができる。これらの誘導体は、すぐにPABAまたはPABA-gulへと分解されうる。好ましくは、還元および酸化法は、連続的に用いられる。そのような方法は、前記様々な葉酸の試料から酸感応葉酸誘導体へ変換するため、および、ほとんどのまたは最も好ましくは全ての葉酸誘導体から分析のための一定のPABAまたはPABA-gul生成物への素早い加水分解を引き起こすために、例えば、水素化ホウ素ナトリウムによる試料の処理と、続く過酸化水素および過マンガン酸カリウムによる酸化と、最後のpH1あたりまでのpH降下とを含む。

【0023】

さらに、葉酸は、酸化的光分解、特にリボフラビンのような感光性試薬の存在下で加水
40
分解を受ける。そのような方法は、さらに非常に好ましい実施形態を形成し、および可視、赤外または特に紫外光を用いる。前記光分解の主生成物は、典型的なPABA、PABA-gulおよびプテリジン-6-カルボン酸(PCA)である。これら生成物のいずれか、および好ましくはいずれか2つまたは3つ全てが、上記のまたはPCAの免疫測定のような類似した方法によって決定される。

【0024】

葉酸の酸化的光分解は、通常、室温で>5分の間、試料に強い光源を照射することによって行われる。前記光分解の有用性は、主として、溶存酸素の存在、照射時間、光源の強度および溶液中の温度とpHとに依存する。リボフラビンのような一定の添加剤は、感光剤として働き、光分解生成物の収量を劇的に増加させる。従って、そのような前記感光剤の
50

使用は、非常に好ましい。低いpH(すなわち、pH1-5、特にpH2-4、例えばpH3)が好ましいが、不可欠ではない。それはpH6-9の間でさえ行うことができる。UV光(例えば、波長約350nmまたはそれ以下)は素早い酸化に好ましいが、可視波長(例えば > 500nm)を用いたときでさえ酸化はかなり素早く起こるので、不可欠ではない。

【0025】

酸化的光分解は、溶解させた試料または酵素で前処理した試料で直接行うことができる。前記葉酸の種々の形態は、全て主生成物としてPABA、PABA-gluおよびプテリジン-6-カルボン酸に分解されている。これらの種の全てが、必要な特性を備えた抗体を用いて免疫学的に決定できるにもかかわらず、内生の化合物に対して前記抗体の交差反応性の危険は最小限度にするので、PABAまたはPABA-gluの検出は好ましい。PABAおよびPABA-グルタミン酸は、上記した蛍光アゾ-技術を用いることによって決定できる。

10

【0026】

前記酸加水分解は、また、例えば、任意にアミラーゼおよびコンジュガーゼのような更なる酵素を伴った、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンおよびカルボキシペプチダーゼAのいずれか一つまたは2つ以上の組み合わせのような酵素を用いた最初のタンパク質分解によってより使いやすくされる。前記解離された葉酸形態は、上記で説明した酸加水分解によってもしくは酵素または金属触媒分解によってPABAに変換される。この技術の組み合わせは、数分でPABAの葉酸含有試料からの遊離を引き起こすことができる。

【0027】

PABAの供給として上に説明された、前記穏やかなプテリジン環分解方法のいずれもまたはそれらのいずれの組み合わせも、PABA-gluの発生へと簡単に修正される。特に、血液または血液由来試料の生理学的温度における短期間(例えば、10分から6時間、好ましくは30分から3時間、最も好ましくは1-2時間)の培養は、通常、自然に存在しているコンジュガーゼの活動によって、前記種々の葉酸からのほとんどの末端グルタミン残基の除去が起こる。あるいは、またはその上に、酵素またはコンジュガーゼ、プロテアーゼおよび-アミラーゼのような成分を含む酵素反応溶液が用いられる。好ましい例として、コンジュガーゼ、プロテアーゼおよび-アミラーゼは、前記グルタミン残基の除去速度を速めるための三酵素混合物として用いられる。さらに、これらの酵素は、最終的に前記末端グルタミン酸残基のほとんどの除去を起こす。

20

【0028】

上記したプテリジン環分解に続くこの方法によると、前記種々の葉酸試料は、単一種(PABA-glu)に変換される。上で説明したように、この様なPABA-glu生成物は、PABAまたはそれらの単一異形の検出に用いられた前記方法によって分析される。従って、前記PABA-gluの形成および分析は、グルタミン酸残基を除去した条件下で形成されたPABAの分析と同様に全体葉酸量を反映するのに効果的である。

30

【0029】

前記末端グルタミン酸は、望ましくは穏やかな条件下で除去される、本発明において好ましくは、前記PABA-gluまたはその誘導体は、適切な条件下でカルボキシペプチダーゼ G2のような酵素によって処理される。代わりに、このまたは同等の酵素は、他のグルタミン酸残基の除去のために開示された酵素処理反応混液を含む、プテリジン分解との組み合わせによる方法によって、PABAは発生するだろう。

40

【0030】

PABAまたはPABA-gluをもたらすための前記酸加水分解に続いて、もし前記結合パートナーがpHに敏感ならば、前記試料のpHは、例えば、pH7近くまで調節される(例えば、水酸化ナトリウムのような塩基または緩衝溶液を加えることによって)。

【0031】

前記結合パートナーが、固定された構造であるとき、前記試料は、前記基質と接触した状態にされ、PABA：結合パートナーまたはPABA-glu：結合パートナーの結合が起こることを可能にするために培養される。望ましくは、前記基質は、PABA：結合パートナーまたはPABA-glu：結合パートナーの組み合わせが決定される前に、非結合物質を除去するために

50

濯がれる。この構成において、PABA/PABA-glu：結合パートナー錯体またはPABA/PABA-gluと結合していない固定された結合パートナーのどちらかと結合している結合パートナーと標識された第二のものをを用いることが好ましい。従って、前記標識の検出は、PABAまたはPABA-glu濃度の直接的または間接的な値を与える。使用された前記標識は、例えば、発蛍光団、発色団、放射能標識等である。

【0032】

前記結合パートナーが芳香族アミンまたはフェノールである場合、例えば、亜硝酸ナトリウムや塩酸との反応によって、最初にPABAからPDBAに、またはPABA-gluからPDBA-gluに変換される。試料を含んでいる前記PDBAまたはPDBA-gluは、基質と結合しているまたはしていない芳香族アミンまたはフェノールと接触している。前記芳香族アミンまたはフェノールは、オルトまたはパラ位のアミノ基または水酸基が非置換である環を有していなければならないが、環の他のポジションまたはアミン窒素は、置換されていても良く、以下に開示するように、そのような置換基は、アミンまたはフェノールと基質とのカップルと同じように、PDBAまたはPABA-gluとの反応によって形成されるアゾ化合物の色または蛍光波長を選択して用いられる。前記アミンまたはフェノールが基質と結合している場合、PDBAまたはPDBA-glu含有試料の培養後に、前記基質は非結合物質を取り除くために濯がれ、前記アゾ化合物の濃度は、分光測定法によって直接決定される。前記アミンまたはフェノールが基質と結合していない場合、前記アゾ化合物の濃度は、さらに分光測定法によって直接決定される。しかし、前記試料がヘム分解生成物を含むので、この場合、前記アゾ化合物は蛍光であるため、または前記ヘム分解生成物からの“バックグラウンド”が比較的小さな波長を吸収する特徴を有しているため、前記アミンまたはフェノールが好ましくは選択される。

10

20

【0033】

ヒドロキシルおよびアミノ基、特にもしそれらがオルト-またはパラ-でならば、前記アゾ結合はアゾ化合物の色を強烈にする。これは、349nm(エタノール、 $\epsilon=26300$)の最大吸収を有するp-ヒドロキシアゾベンゼンおよび408nm(エタノール、 $\epsilon=27540$)の最大吸収を有するp-ジメチルアミノアゾベンゼンによって例証される。どちらのアゾ化合物も、アゾベンゼン自身よりも長波長で吸収し、高いモル吸収率を有する。

【0034】

一つの芳香環上の電子供与性置換基が他の環の電子吸引性基と共役しているアゾ化合物は、特に深い色である。よい例は、一つの環のオルトまたはパラ位上のニトロ基がアゾリンケージで置換されており、他の環のパラ位のジアルキルアミノ基がまたアゾリンケージで置換されているアゾベンゼンの前記基によって提供される。これは、これらの化合物の共鳴寄与者の一つがキノイド構造を有しているため、性質がアゾ化合物の深い色と関係している。このような特徴を示す化合物は、例えば、エタノール中で478nmに $\epsilon=33110$ の最大吸収を有する4-ジメチルアミノ-4'-ニトロベンゼンである。

30

【0035】

蛍光は、一般的に芳香族であり、高い程度の共鳴安定性を有する複数の共役二重結合を含むような化合物中で期待される。両方のクラスの物質が、低い励起一重項状態に置くことができる非局在電子を有する。アゾ化合物の蛍光を増加させる方法の一つは、前記励起一重項状態が分子内無放射遷移、すなわち、前記励起エネルギーを分子内の振動運動に変換することによってエネルギーを解放することを防ぐことである。分子の剛性は、振動の減少によって競合無放射遷移の可能性を減らす。すなわち、これは三重項状態および動的熱分解の異なるシステムの交差を最小にする。これは、4-ジアルキルアミノ-4'-カルボキシアゾベンゼンにおける第3級アミノ基のアルキル鎖を伸ばすことによって明らかに説明されている。アルキル鎖長が短いアゾベンゼン類の多くは、ほとんど蛍光が無く、一方で、長い鎖(>C3)のアゾベンゼン類は、蛍光を有する。また、前記蛍光強度は、アミノ基のアルキル鎖の長さに伴い増加する。しかし、これは前記化合物の疎水性が必然的に増加するので、長鎖蛍光アゾ化合物類の溶解度の減少が、それらの使用を制限する。従って、4-ジ(C₃₋₆アルキル)アミノ-4'-カルボキシアゾベンゼン類が特に好ましい。

40

50

【0036】

前記アルキル鎖の柔軟性の減少が、蛍光の性質に関する鍵となる要素なので、溶解性の問題を克服し、さらに“固定した”アルキル鎖にする方法の一つは、アルキル鎖が安定な環構造を形成する芳香族アミンを用いることである。そのような化合物の例は、ジュロリジンである。アゾ構造中にアミンのパラ位のアゾ結合が組み込まれているこの構造は、分子の振動による励起エネルギーの解放がかなり減少し、蛍光の増加を引き起こす。さらに、アゾ構造に追加のフェニル環を加えると、アミノおよび/またはヒドロキシル基を有するナフタレン誘導体(またはより多くのフェニル環が融合している化合物)(ナフトール/ナフタレンアミン)がPDBAまたはPDBA-gluのジアゾニウム基と反応する時、これらの形成は蛍光を強くする。

10

【0037】

一般的に、有機化合物類において最も平面性があり、固く、立体的に混雑していない分子は、最も蛍光を有する一つである。また一般に、金属イオンとのキレート形成は、固定化の増進および内部振動の最小化によって蛍光を増進する。この理由のために、ヒドロキシルもしくは置換されたまたは置換されていないアミノ基は、好ましくは、アミンまたはヒドロキシル基がメタ位にあるアミンまたはフェノールを含む。これらは、金属イオンと配位することができる。

【0038】

そのような置換基は、蛍光に強く影響する。例えば、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-F$ 、 $-NHCH_3$ または $N(CH_3)_2$ のような電子が非局在化する置換基は、しばしば蛍光を高める。一方で、例えば、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NHCOCH_3$ 、 $-NO_2$ または $-COOH$ のような電子吸引性置換基は、蛍光を減少させるか、完全に消す。

20

【0039】

さらに、もし前記発色団の性質変化に影響を与える場合は、系中のpHの変化もまた、蛍光に影響を与える。そのような変化は、アニオンおよびカチオンの共鳴の形成を含むことによって説明することができる。

【0040】

共役系を増大させるおよび/またはキノイド構造を導くような置換基パターンおよび共役環系は、一般的に、ヘム分解生成物の吸収バンドとは異なる可能性があるスペクトルの赤色部分の吸収バンドに帰着する深色シフトを生じさせる。前記ヘモグロビンの加水分解が、元々のヘムとは異なる吸収特性をもつヘム分解生成物を製造するということが、および、これらの化合物のほとんどが、スペクトルの青色部分で吸収する(淡黄褐色を示す)ということを実現させることが重要である。これは、ヘム由来のものとジアゾ化合物との間のスペクトルの重なりは元々のヘムを有する状況に比べて大いに減少するので、明らかに有利な状況である。

30

【0041】

前記結合パートナーが基質結合でも芳香族アミンまたはフェノールでもない場合、前記試料含有のPABAまたはPABA-gluは、望ましくは、第1に、標識された結合パートナーと培養され、第2に、PABA/PABA-glu:結合パートナー錯体またはフリーの結合パートナーのいずれかと結合できる基質が結合された結合パートナーと接触させる。そのとき前記基質は、望ましくは非結合物質を除去するために濯がれ、前記基質-結合標識は、PABAまたはPABA-glu濃度の直接的または間接的な値を与えることで検出される。

40

【0042】

代わりに、結合されていない、発蛍光団標識の結合パートナーは、PABA/PABA-glu:結合パートナー錯体の形成から生じる蛍光分極変化による、PABAまたはPABA-glu濃度決定に用いられる。しかし、前記発蛍光団は、好ましくはヘム分解生成物が与える最小バックグラウンド発光波長特性を有する。

【0043】

更なる側面から見ると、本発明は、本発明の分析の実行に用いるためのキットを提供する。前記キットは以下を含む：

50

- a) 葉酸加水分解試薬；
- b) 任意の酵素反応混液；
- c) PABA、PABA-glu、PDBAまたはPDBA-glu結合パートナー；
- d) 任意の[PABAからPDBAへ、またはPABA-gluからPDBA-gluへ変換する]試薬；および
- e) 任意の第2結合パートナー。

【0044】

本発明は、好ましくは本発明の分析の実行に用いるためのキットを提供する。前記キットは以下を含む：

- a) 葉酸加水分解試薬；
- b) PABAまたはPDBA結合パートナー；
- c) 任意の[PABAからPDBAへ変換する]試薬；および
- d) 任意の第2結合パートナー。

10

【0045】

本発明の分析方法は、好ましくは、例えば、米国-A-6063581、米国-A-5631127、国際出願00/40973、国際出願00/11479および国際出願00/17659に開示されているような、ホモシスチン分析および/またはホロ(holo)トランスコバラミンII分析と一緒に行われる。

【0046】

本発明は、さらに以下の実施例に関して開示するが、これには制限されない。

【実施例1】

【0047】

葉酸からPABAへの変換

200 μ Lの全血試料を、テフロン(登録商標)ラインのねじキャップを持つホウケイ酸ガラスチューブ中で500 μ Lの8.5M塩酸と混合させ、110 で6時間培養させる。

【実施例2】

【0048】

PABAからPDBAへの変換

実施例1の組成を含むPABAを室温まで冷却し、500 μ Lの精製水で希釈し、C18固層抽出カートリッジに装填する。無色の溶出液を塩酸濃度がおよそ0.3Mになるように水で1:10 v/vに希釈する。亜硝酸ナトリウム水溶液(50 mg/ml)を2:1(試料:NaNO₂溶液)の体積比で加え、混合物を4 で10分間反応させる。

30

【実施例3】

【0049】

PDBAからジアゾ化合物への変換

実施例2のPDBA溶液を芳香族アミンまたはフェノール溶液(10mMリン酸緩衝溶液中4 mg/ml、0.15M NaCl、pH7.4)と体積比3:2(PDBA溶液:アミン/フェノール溶液)で混合させ、30分間反応させる。そのときジアゾ化合物を分光測定で検出できる。

【0050】

この実施例において、芳香族アミン/フェノールは、通常、以下のものが用いられる：N,N-ジ-n-プロピル-アミノベンゼン；N,N-ジ-n-ブチル-アミノベンゼン；ジユロリジン；フェノール；および2-ヒドロキシナフタレン。

40

【実施例4】

【0051】

全ての葉酸種をPABA-モノグルタミン酸に分解するための過酸化水素の使用とpHとの組み合わせ

1. 25 μ Lの全血を加え、サポニン(最終濃度が100mg/Lとなるように加える)またはアスコルビン酸(最終濃度が1%アスコルビン酸となるように加える)を用いて細胞を溶解する。試料中に存在するコンジュガートを末端グルタミン酸残基をほとんど除去するために、37 で2時間培養する。
2. 分子ふるい(例えば、遠心分離濃縮器)を用いて全血から関係の無い分子を除去し、かなり純粋な葉酸/結合タンパク質錯体を残す。

50

3. 0.1% (最終濃度) DTTを用いて結合タンパク質から葉酸を分離し、15分間沸騰させる。もしくは、DTTおよび0.15N(最終濃度)水酸化ナトリウムを加え、37℃で2.5分間培養する。
4. pHを6.0に調整し、水素化ホウ素ナトリウム(6mg/ml)を加え、室温で10分間培養し葉酸を還元する。
5. HClを用いて酸性にし、pHを調整し、ホウ化水素を壊す。
6. pHを9.0に調整し、過酸化水素および過マンガン酸カリウム(それぞれ0.015% H₂O₂および0.1% KMnO₄)を加え酸化する。続いて過剰の過酸化水素(0.3% H₂O₂)により過剰の過マンガン酸を沈殿する。沈殿したMnO₂は、4000 gで10分間の遠心分離により除去される。
7. カタラーゼを加えて(最終濃度は存在H₂O₂の体積の1/3の0.1%カタラーゼ)前記過酸化水素を壊す。
8. HClを用いてpHを1まで減少させ、室温で2時間培養し、葉酸からPABA-gluへの変換を引き起こす。
9. 試料の酸性度を中性に調整し、特異抗体をも用いることにより、またはPABA-gluを実施例3に記載しているような方法で蛍光アゾ染料に変形することにより、存在しているPABA-gluの量を決定する。前記PABA-gluの量は標準の曲線から決定され、結果の濃度は試料中の葉酸の全体濃度を反映している。

【実施例5】

【0052】

非末端グルタミン酸の除去の促進

実施例4に関して、工程1を除いては、さらにコンジュガーゼ、似-Glu-Xカルボキシペプチダーゼ; EC 3.4.19.9、またはコンジュガーゼからなる3酵素混合物を、葉酸の解離および変形の促進と反応の速度増加とを補助するため加える。

【実施例6】

【0053】

全ての葉酸種をPABAに分解するための過酸化水素の使用とpHとの組み合わせ

1. 実施例4および5の工程1に関して、タンパク質分解酵素カルボキシペプチダーゼG2を除いては、単独でまたは実施例5に記載された酵素に加えて用いる。この更なる酵素は、葉酸から全てのグルタミン酸残基の除去を引き起こし、PABA-gluよりもPABAの生成を引き起こす。
2. 分子ふるい(例えば、遠心分離濃縮器)を用いて全血から関係の無い分子を除去し、かなり純粋な葉酸/結合タンパク質錯体を残す。
3. 0.1% (最終濃度) DTTを用いて結合タンパク質から葉酸を分離し、15分間沸騰させる。もしくは、DTTおよび0.15N(最終濃度)水酸化ナトリウムを加え、37℃で2.5分間培養する。
4. pHを6.0に調整し、水素化ホウ素ナトリウム(6mg/ml)を加え、室温で10分間培養し葉酸を還元する。
5. HClを用いて酸性にし、pHを調整し、ホウ化水素を壊す。
6. pHを9.0に調整し、過酸化水素および過マンガン酸カリウム(それぞれ0.015% H₂O₂および0.1% KMnO₄)を加え酸化する。続いて過剰の過酸化水素(0.3% H₂O₂)により過剰の過マンガン酸を沈殿する。沈殿したMnO₂は、4000 gで10分間の遠心分離により除去される。
7. カタラーゼを加えて(最終濃度は存在H₂O₂の体積の1/3の0.1%カタラーゼ)前記過酸化水素を壊す。
8. HClを用いてpHを1まで減少させ、室温で2時間培養し、葉酸からPABAへの変換を引き起こす。
9. 特異抗体を用いた免疫決定(最初のpH調整の後、免疫反応のために最適なpHに調整する。例えば、pH7.0と8.5との間)、または、実施例3に記載しているようなPABAの蛍光アゾ染料への変形のどちらかによって、存在しているPABAの量を決定する。前記PABAの量は、標準の曲線から決定され、結果の濃度は試料中の葉酸の全体濃度を反映している。

【実施例7】

【 0 0 5 4 】

葉酸種のPABAへの酸化的光分解の使用。内生酵素の使用がないことを除く光分解。

1. サポニン(最終濃度が100mg/Lとなるように加える)またはアスコルビン酸(最終濃度が1%アスコルビン酸となるように加える)を用いて赤血球を溶解し、37 で1時間培養する。
2. 実施例4の工程2と同様。
3. 実施例4の工程3と同様。
4. 前記試料にUV-光源を室温で10分間照射する。主な光分解生成物は、PABA、PABA-gluおよびプテリジン-6-カルボン酸であり、全て最初の試料中の葉酸全体濃度を反映している。
5. 特異抗体を用いた免疫決定(最初のpH調整の後、免疫反応のために最適なpHに調整する。例えば、pH7.0と8.5との間)、もしくは、実施例3の記載によるPABAまたはPABA-gluの蛍光アゾ染料への変形のどちらかによって、存在しているPABAまたはPABA-gluの量を決定する。試料中の前記PABAまたはPABA-gluの量は、血液試料中の葉酸の濃度範囲の適切な標準曲線を使用した標準の曲線から決定される。

10

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成16年2月17日(2004.2.17)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

少なくとも葉酸のいくつかが少なくとも一つの付属グルタミン酸残基を含む、葉酸含有試料中の葉酸の分析方法であって、前記方法がいかなるクロマトグラフィー分離工程をも含まない、パラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸またはそれらの塩を解離するために前記試料の加水分解を行うこと、解離したパラアミノ安息香酸、p-アミノベンゾイルグルタミン酸、塩またはそれらのジアゾ誘導体をそれらの結合パートナーと接触させること、および、生じた結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせを直接的または間接的に検出することを含む方法。

【 請 求 項 2 】

前記試料が血液由来の試料である、請求項1に記載の方法。

【 請 求 項 3 】

前記結合パートナーが抗体、抗体フラグメント、単一鎖の抗体、単一鎖の抗体フラグメント、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチドおよび小有機分子から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【 請 求 項 4 】

前記小有機分子が、パラジアゾ安息香酸(PDBA)またはパラジアゾベンゾイルグルタミン酸を含むジアゾ化合物を形成することが可能な第3級芳香族アミン、フェノールまたはフェノール誘導体である、請求項3に記載の方法。

【 請 求 項 5 】

前記加水分解が酸性条件下で金属を用いて前記試料を処理することを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【 請 求 項 6 】

前記加水分解がマイクロ波照射を用いて前記試料を処理することを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【 請 求 項 7 】

前記加水分解が酸化剤を用いて処理することを含む、請求項1～6のいずれか一項に記

載の方法。

【請求項 8】

前記酸化剤が過酸化水素および/または過マンガン酸カリウムである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記加水分解が還元剤を用いて処理することを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記加水分解が酸化的光分解を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記酸化的光分解が感光剤存在下で実行される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料が、前記末端グルタミン酸残基のほとんどを前記葉酸から除去するために自然に存在するおよび/または加えられる酵素の存在下で培養され、前記加水分解の生成物が PABA-glu である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料が、前記末端グルタミン酸残基のほとんどを前記葉酸から除去するために少なくとも一つの加えられる酵素の存在下で培養され、前記加水分解の生成物が PABA である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせが、吸収または蛍光によって直接的に検出される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記結合パートナー：パラアミノ安息香酸、結合パートナー：p-アミノベンゾイルグルタミン酸、または塩もしくは派生物の組み合わせが、第 2 結合パートナーによって間接的に検出される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

本発明の分析を行う中で用いるキットであって、

i) 葉酸加水分解試薬；および

ii) PABA、PABA-glu、PDBA または PDBA-glu 結合パートナーを含むキット。

【請求項 18】

さらに酵素または酵素反応混液を含む、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

さらに PABA から PDBA へまたは PABA-glu から PDBA-glu への変換試薬を含む、請求項 17 または 18 に記載のキット。

【請求項 20】

さらに第 2 結合パートナーを含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載のキット。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PC/GB 03/00529 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/82 | | |
| 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) IPC 7 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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | ENGELHARDT R ET AL: "ADEQUACY OF ENZYMATIC DECONJUGATION IN QUANTIFICATION OF FOLATE IN FOODS" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 38, no. 1, 1990, pages 154-158, XP002257869 ISSN: 0021-8561 | 1, 2, 14, 18, 19, 21 |
| A | page 154, column 1, line 11-42 ----- -/- | 3-13, 15-17, 20 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 | | *I* 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 15 October 2003 | | Date of mailing of the international search report 29/10/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Hinchliffe, P |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 03/00529

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DUEKER STEPHEN R ET AL: "Determination of blood folate using acid extraction and internally standardized gas chromatography-mass spectrometry detection" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 283, no. 2, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 266-275, XP002257870 ISSN: 0003-2697 . | 1 |
| A | the whole document | 3-17 |
| X | EDGAR H ET AL: "A fully automated folate assay for use on the vitros Eci immunodiagnostic system" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 44, no. 6 PART 2, June 1998 (1998-06), page A153 XP001155642 50th Annual Meeting of the American Association of Clinical Chemistry;Chicago, Illinois, USA; August 2-6, 1998 ISSN: 0009-9147 abstract | 18,21 |
| A | EP 0 382 334 A (BIO RAD LABORATORIES) 16 August 1990 (1990-08-16) the whole document | 7 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 03/00529

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| EP 0382334 A | 16-08-1990 | CA 2008473 A1 | 09-08-1990 |
| | | EP 0382334 A2 | 16-08-1990 |
| | | JP 2247566 A | 03-10-1990 |

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

| | | | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 叶酸分析法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005517185A | 公开(公告)日 | 2005-06-09 |
| 申请号 | JP2003566562 | 申请日 | 2003-02-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿克西斯 - 希尔德公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 轴 - 盾Eiesuei | | |
| [标]发明人 | フランツェンフランク | | |
| 发明人 | フランツェン、フランク | | |
| IPC分类号 | C12Q1/37 C12Q1/40 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/82 | | |
| CPC分类号 | G01N33/82 | | |
| FI分类号 | G01N33/82 G01N33/53.S G01N33/531.A C12Q1/37 C12Q1/40 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BA13 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/DA57 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QQ35 4B063/QQ36 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QR15 4B063/QR16 4B063/QR41 4B063/QR48 | | |
| 优先权 | 2002002776 2002-02-06 GB | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明是一种分析含叶酸样品中叶酸的方法，所述叶酸含有至少一种附着谷氨酸残基的叶酸。方法氨基苯甲酸，对 - 氨基苯甲酰基谷氨酸或进行样品的水解解离其盐，解离对氨基苯甲酸，对 - 氨基苯甲酰基谷氨酸，盐或它们的diazoderivative将它们与其结合配偶体以及由此产生的结合配偶体接触：对氨基苯并酸，结合配偶体：对氨基苯甲酰谷氨酸，或直接或间接的盐或衍生物组合。本发明还涉及可用于本发明方法的试剂盒。

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex 2. |
| * Special categories of cited documents: | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | *I* 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 |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | *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 |
| *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification) | *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. |
| *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means | *Z* document number of the same patent family |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| Date of the actual completion of the international search: | Date of mailing of the international search report |
| 15 October 2003 | 29/10/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patristrasse 2 NL - 2280 HV The Hague Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010 | Authorized officer: Hinchliffe, P |