

(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2009-536023

(P2009-536023A)

(43) 公表日 平成21年10月8日(2009.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/535 (2006.01)	G O 1 N 33/535	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 1	
G O 1 N 33/70 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 Z	
G O 1 N 33/66 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-508118 (P2009-508118)  
 (86) (22) 出願日 平成19年5月7日 (2007.5.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月24日 (2008.12.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2007/000824  
 (87) 国際公開番号 W02007/128286  
 (87) 国際公開日 平成19年11月15日 (2007.11.15)  
 (31) 優先権主張番号 102006021645.8  
 (32) 優先日 平成18年5月8日 (2006.5.8)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

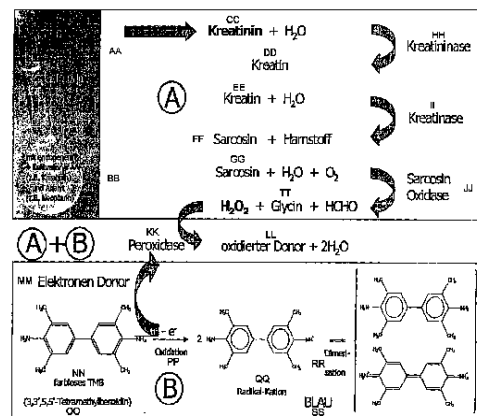
(71) 出願人 508332139  
 8センス・バイオノスティック・ゲゼルシャ  
 フト・ミト・ベシュレンクテル・ハフツン  
 グ  
 ドイツ連邦共和国、13125 ベルリン  
 、ロベルト・レスレーストラッセ、10  
 (74) 代理人 100069556  
 弁理士 江崎 光史  
 (74) 代理人 100093919  
 弁理士 奥村 義道  
 (74) 代理人 100111486  
 弁理士 鍛冶澤 貴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内在性キャリブレーターを用いるアナライトの連結された酵素-免疫化学的検出方法

(57) 【要約】

本発明は、生物学的液体試料又は他の液体試料中の多数のアナライト、例えば代謝物及び抗原を、分析エレメントを用いて、特にラテラルフロー試験ストリップ、フロースルー-膜システム(フロースルー試験)、マイクロタイタープレートのウェル/キャビティ又は試験用チューブを用いて検出する方法に関し、その際、前記方法は相互に連結した酵素反応及びアフィニティ反応に基づきかつ内在性キャリブレーター、つまり試料マトリックスの希釈度を修正することができる内在的に生成される物質(例えばクレアチニン、グルコース、グルコース-6-ホスファート、ラクタート、グルタマート、アスパルテート、コレステロール、ピルパート、尿素及びトリグリセリド)を用いて実現される。本発明の適用分野は、特に医学的診断、製剤工業及び環境保護である。有利には、本発明は抗原及び代謝物の同時検出又は順次検出に関する。これは本発明の範囲内においては、特に高分子の抗原、例えばタンパク質、又は低分子のハプテン、例えば殺虫剤、ネオプテリン、有害物質又はホルモンであり、代謝物、例えばグルコース又はクレアチニンであ



AA ... matrix (e.g. urine)  
 BB ... with endogenous calibrator (e.g. creatinine) and analyte (e.g. neopline)  
 CC ... creatinine  
 DD ... creatinase  
 EE ... creatin  
 FF ... sarcosin + urea  
 GG ... sarcosinase  
 HH ... creatinase  
 II ... creatinase  
 JJ ... sarcosinase  
 KK ... peroxidase  
 LL ... oxidized donor  
 MM ... electron donor  
 NN ... colorless dye  
 OO ... (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)  
 PP ... oxidation  
 QQ ... radical cation  
 RR ... dimethylation  
 SS ... BLUE  
 TT ... glycine

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

体液を酵素ミックスと一緒にインキュベーションし（反応 1）、その際、前記インキュベーションにおいて内在性キャリアレーターの酵素による変換によって生じる生成物（例えば過酸化水素（ $H_2O_2$ ））を部分的に、第 2 の免疫反応（反応 2）において、同じ体液とともにマーカー酵素によるシグナル形成のために利用し、このシグナルを検知し、第 1 の反応において生じる生成物のシグナル（例えば  $H_2O_2$ ）と比較するか又は前記シグナルを差し引いて考慮することを特徴とする、組み合わせられた酵素的 / 免疫学的試験方法。

**【請求項 2】**

前記の 2 つの反応を同時並行的に又は順次に実施することを特徴とする、請求項 1 記載の試験方法。

**【請求項 3】**

前記の 2 つの反応を 1 つのコンパートメント又は 2 つの相互に別個のコンパートメント中で実施することを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の試験方法。

**【請求項 4】**

前記コンパートメントが、特にラテラルフロー試験ストリップ、フロースルー - 膜システム（フロースルー試験）、マイクロタイタープレートのウェル / キャピティ又は試験用チューブであることを特徴とする、請求項 3 記載の試験方法。

**【請求項 5】**

シグナルの検知を視覚的（肉眼）に、比色分析的に、濁度測定的に、蛍光を用いて又は電気化学的に行うことを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 6】**

ノモグラム、コンパレーター（参照ストリップ）、読み取り装置又は肉眼での視覚的比較により評価を行い、その際、後者の肉眼での視覚的比較の場合には、キャリアレーターを用いて酵素により生成されたシグナル（例えば試験ライン又は試験点（ドット））の数を、アナライトを用いて免疫化学的に生成されたシグナル（例えば試験ライン又は試験点（ドット））の数と対比することを特徴とする、請求項 5 記載の試験方法。

**【請求項 7】**

体液として、特に尿、唾液、涙、汗、髄液、血清、血漿又は血液を使用することを特徴とする、請求項 1 から 6 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 8】**

内在性キャリアレーターとして、特にクレアチニン、グルコース、グルコース - 6 - ホスフェート、ラクテート、グルタメート、アスパルテート、コレステロール、ピルベート、尿素及びトリグリセリド、並びに酵素、例えばアルファ - アミラーゼ、及びイオン、例えばカルシウムイオン、カリウムイオン及びマグネシウムイオンを使用することを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 9】**

マーカー酵素としてペルオキシダーゼ及びオキシダーゼを使用することを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 10】**

好ましくは酵素ミックスを使用し、前記酵素ミックスがそれぞれの体液中に存在する内在性キャリアレーターと反応して  $H_2O_2$  を形成させることを特徴とする、請求項 1 から 9 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 11】**

それぞれの内在性キャリアレーターを、それぞれの適用のために最適な一定の濃度で反応ミックスにも添加することを特徴とする、請求項 1 から 10 までのいずれか一項記載の試験方法。

**【請求項 12】**

10

20

30

40

50

体液が尿の場合に、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼからなる混合物を、内在性キャリブレーターとしてクレアチンを使用する場合に使用するか、又は酵素のグルコースオキシダーゼを、内在性キャリブレーターとしてグルコースを使用する場合に使用することを特徴とする、請求項 1 1 記載の試験方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的液体試料又は他の液体試料中の多数のアナライト、例えば代謝産物及び抗原を、分析エレメント、特にラテラルフロー試験ストリップ、フロースルー - 膜システム (フロースルー試験)、マイクロタイタープレートのウェル/キャビティ又は試験用チューブを用いて検出する方法に関する。本発明の適用分野は、特に医学的診断、製剤工業及び環境保護である。

10

【背景技術】

【0002】

生物学的液体中の多数のアナライトを検出するため又は環境試料中の有害物質を検出するための分析エレメント、例えば免疫クロマトグラフィー試験システムは数年来公知であり、かつ実際に極めて有効であることが実証されている。前記分析エレメントは、特にサンドウィッチ原理又は競合原理 (小さなアナライトの場合) により機能する。アフィニティアッセイ、例えばイムノアッセイ、レセプターアッセイ及び DNA アッセイの使用は、臨床的用途及び多くの他の用途のために次第に重要になってきている。この場合、多様な試料マトリックス (例えば、尿、唾液、涙、汗、髄液又は血液) 中に極めて多様なアナライトが検出される。この場合、現在ではまだ、前記マトリックス (例えば尿) の少なくとも一部はその希釈度において一定ではなく、日々の経過において明らかな濃度変動が生じ、それに応じてアナライト測定値に影響を及ぼすという問題がある。しかしながら、個々の身体マトリックスについては内在的に生成される物質が指摘されていて、前記物質を用いてその都度の希釈度を修正することができる。従って、このシステムは校正可能となる (非特許文献 1、非特許文献 2)。この内在性キャリブレーターとして機能する物質の例は、試料マトリックスの尿中ではクレアチニンである。健康な被験者の自発的 - 尿試料の場合に、尿 1 リットルあたり 4 ~ 28 mmol のクレアチニンの濃度変動は全く通常である (Fundamentals of Laboratory Testing: Urine, Roche Diagnostics GmbH, マンハイム、ドイツ国)。この値を 24 時間の尿の平均値 (15 mmol / l) と比較する場合、3 . 5 倍の希釈度が通常範囲であることが明らかであるが、この尿は 2 倍にも濃縮され得る。試料マトリックスの尿中で測定されるべきアナライトに関して、つまりこの測定された値は相応して修正しなければならず、これはつまり二重測定 (内在性キャリブレーター及びアナライト) 及びそれに続く計算が必要である。実際にこれは、2 つの別個の試験の実施を意味する。尿の場合には、酵素によるカスケードを介してまずクレアチニン濃度が測定され、第 2 段階でアナライトの量 (たいていは免疫化学的に) が測定される。この取り組み方法は時間がかかりかつ作業の手間がかかる。

20

30

【非特許文献 1】Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 5 20 05; Norpoth K, Heger M (1984) Kreatinin als Bezugsgroesse bei der Angabe von Stoffkonzentrationen im Harn

40

【非特許文献 1】Hentschler D, Lehnert G (Hrsg) Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) Arbeitsmedizinischtoxicologische Begründungen, Bd. 1. Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

従って、本発明の課題は、一定ではない濃度での試料マトリックス中の多様なアナライトを測定する試験システムのために新規の解決策を見出すことであった。

【課題を解決するための手段】

50

## 【0004】

本発明は、請求項によって実現される。本発明は、生物学的液体試料又は他の液体試料中の多数のアナライト、例えば代謝産物及び抗原を、分析エレメントを用いて、特にラテラルフロー試験ストリップ、フロースルー-膜システム（フロースルー試験）、マイクロタイタープレートのウェル/キャビティ又は試験用チューブを用いて検出する方法に関し、その際、前記方法は相互に連結した酵素反応及びアフィニティ反応に基づきかつ内在性キャリアレーターを用いて実現される。

## 【0005】

この基本思想は、酵素による方法と免疫化学による方法とを連結し、それぞれの試料マトリックスの内在性キャリアレーターの濃度を全体の結果に導入することにあり、その際、測定すべきアナライト濃度がこの実現されたシステムにより自動的に修正される。この組み合わせられた酵素/免疫化学による試験システムの場合には、体液を酵素ミックスと共にインキュベーションし（反応1）、その際、前記インキュベーションの際に内在性キャリアレーターの変換により生じる過酸化水素（ $H_2O_2$ ）を、部分的に又は完全に第2の免疫反応（反応2）において、同じ体液と共にマーカー酵素によるシグナル形成のために利用する。このシグナルを検知し、第1の反応において生じる $H_2O_2$ のシグナルと比較するか又はこれを差し引いて考慮する。

10

## 【0006】

この方法の両方の反応は同時に又は順次に実施することができ、さらにこれらの反応は1つのコンパートメント又は2つの相互に別個のコンパートメント中で実施することができる。コンパートメントとして、有利にラテラルフロー試験ストリップ、フロースルー-膜システム（フロースルー試験）、マイクロタイタープレートのウェル/キャビティ又は試験用チューブが利用される。このシグナル検知は、本発明の場合には、視覚的（肉眼）、比色分析、蛍光により又は電気化学的に行われる。

20

## 【0007】

この評価は、ノモグラム、コンパレーター（参照ストリップ）、読み取り装置又は肉眼での視覚的比較により行われ、その際、後者の場合には、キャリアレーターを用いて酵素により生成されたシグナル（例えば試験ライン又は試験点（ドット））の数を、アナライトを用いて免疫化学的に生成されたシグナル（例えば試験ライン又は試験点（ドット））の数と対比する。

30

## 【0008】

この新規の方法を用いて、体液、例えば尿、唾液、涙、汗、髄液又は血液が試験される。内在性キャリアレーターとして、特にクレアチニン、グルコース、グルコース-6-ホスフェート、ラクテート、グルタメート、アスパルテート、コレステロール、ビルベート、尿素及びトリグリセリドが用いられる。マーカー酵素は、好ましくはペルオキシダーゼ及びオキシダーゼである。好ましくは酵素ミックスが使用され、この酵素ミックスはそれぞれの体液中に存在する内在性キャリアレーターと反応して $H_2O_2$ を形成させる。体液が尿である場合に、内在性キャリアレーターとしてクレアチニンを利用する際には、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼからなるミックスが使用される。しかしながら、同じ試料マトリックス中でグルコースを内在性キャリアレーターとして利用する場合には、 $H_2O_2$ の生成のためにグルコースオキシダーゼを使用する。

40

## 【0009】

意外にも、この種の組み合わせられたシステムを用いて、試料マトリックス中で、一定ではない濃度の非常に多様なアナライトを、直接、つまり相応する希釈補正を用いて確実に測定できることが確認された。本発明を、次に、図面によって詳細に説明する。

## 【実施例】

## 【0010】

実施例1： サンプルマトリックスの尿中における、ラテラルフロー試験システムでの内在性キャリアレーター（クレアチニン）による同時補正を用いた心臓特異的な脂肪酸結合タンパク質（FABP）の検出（図1、3、4及び6を参照）

50

尿試料(200  $\mu$ l)を2つの同じ分量(A及びB)に分けた。分量Aを試験用チューブ内へ注ぎ込んだ(図3参照)。これは次の凍結乾燥された酵素ミックス(それぞれ20  $\mu$ l)を含有する:クレアチナーゼ(18.8 U/ml)、クレアチナーゼ(7.5 U/ml)及びサルコシンオキシダーゼ(11.3 U/ml)。この試験用チューブを混合し、20分間室温(20~25)でインキュベーションした。こうして再構成された酵素ミックスにより、尿中の内在性のクレアチニンを特に過酸化水素( $H_2O_2$ )に変換した(図1参照)。分量Bをまず市販のタンパク質安定剤で1:4に希釈し、引き続き50  $\mu$ lを試験ストリップ上にのせた(図4;試料用開口部1)。試料用開口部1の下に固定された抗-FABP/ホースラディッシュ-ペルオキシダーゼ抱合体がそのマトリックスから溶け出し、アナライトと複合体(FABP-抗-FABP/ホースラディッシュ-ペルオキシダーゼ)を形成し、他の抗-FABP抗体がキャッチャーとして固定されている試験フィールド上を流れる。後者はFABPの存在により前記複合体とアナライト濃度に依存して結合する。分量Bをのせた20分後に、予めインキュベーションした分量A100  $\mu$ lを試料用開口部2に注ぎ込む。それにより、この試験ストリップ上に存在する固定された、 $H_2O_2$ 不含でかつ局所的に狭く限定的に沈積するペルオキシダーゼ基質が溶解し、 $H_2O_2$ (クレアチニンの変換から生じる)と一緒にテストフィールドの上を流れる。キャッチャーラインの位置に達すると、液状の無色の基質が青/紫の沈積物に変換される。沈積物の量、つまり生成されたシグナルは、アナライト濃度及び内在性キャリブレーションの量に依存し、前記内在性キャリブレーションは反応のために必要な $H_2O_2$ の生成のために利用される。多量の内在性キャリブレーション(濃縮された早朝尿(Morgenurin))は、同じアナライト濃度の場合に平均的なキャリブレーション濃度(日中の尿(Tagesurin))を有する試料よりも強いシグナルを生じる。この記載された試験システムでは、この効果がその機能的に補正され、コンパレータカード(図6参照)を用いて本当のアナライト濃度を検知することができる。

10

20

#### 【0011】

実施例2: サンプルマトリックスの尿中のマイクロタイタープレートに基づくマクロドットアッセイの場合の内在性キャリブレーション(グルコース)による同時補正を用いたFABPの検出(図2及び5を参照)

マクロドットアッセイのために、市販の膜被覆されたマイクロタイタープレート(96ウェル)を使用する(図5/1)。この膜材料は有利にはPVDf又はニトロセルロースからなる。使用される点-(ドット-)パターンは、それぞれの用途に依存し;例は図5/2に示されている。有利には、5個のドットで作業され(図5/3)、この場合、中央の点-ドットは原則として対照として機能する。外側のドットは、多様なアナライトの検出のために、並びに個々のアナライト濃度の希釈補正のために利用することができる。記載の実施例では、使用したサンプルマトリックス(尿)の希釈度の同時補正を用いた個々のアナライト(FABP)の検出にフォーカスする。ここでは、4個のドットで作業され(図5、中央参照)、これらのドットは多様な濃度の抗-FABP抗体(キャッチャー)を含有する。尿試料(400  $\mu$ l)を2つの同じ分量(A及びB)に分ける。分量Aは、グルコースオキシダーゼ6.5 U及びグルコース0.5 mMを含有する試験用チューブ内に注ぎ込む。少量かつ固定量のグルコースのこの別々の添加は、 $H_2O_2$ のベースレベルの生成のために必要である。この試験用チューブを混合し、60分間室温(20~25)でインキュベーションする。それにより、尿中の内在的に存在するグルコースが、特に過酸化水素( $H_2O_2$ )に変換される(図2参照)。分量Bを、まず市販のタンパク質安定剤で1:10に希釈する。引き続き次の反応バッチを製造する(表1):

30

40

#### 【0012】

【表 1】

表 1

	1	2
$\mu$ l 希釈度 (分量B)	199	194
$\mu$ l 抗-FABP-抗体-ホースラディッシュ-ペルオキシダーゼ抱合体	1	1
$\mu$ l 4000 ng/ml 溶液からなる FABP	0	5
次の FABP 最終濃度に相当 ng/ml	0	100
$\mu$ l 最終体積	200	200

## 【0013】

10

それぞれのウェルに反応バッチ 100  $\mu$  l を添加し、全て室温 (20 ~ 25 ) で 60 分間インキュベーションする。記載されるべき効果をより明らかに示すために、FABP の添加を行う。FABP の存在の場合にだけ、複合体のキャッチャー抗体 : キャッチャー抗体 / FABP / 抗 - FABP - 抗体 - ホースラディッシュ - ペルオキシダーゼ抱合体が形成されることが出来る。その後で、このプレートを 4 回洗浄 (0.1 M Na - P 緩衝液、pH 7.2) し、それぞれのウェルに次のバッチ 50  $\mu$  l を添加する :

分量 A 1 部

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不含の、局所的に狭く限定的に沈着するペルオキシダーゼ基質 1 部

## 【0014】

20

室温で、少なくとも 5 分間のインキュベーションを行う。この場合、ホースラディッシュ - ペルオキシダーゼが結合している位置で、液状でかつ無色の基質が、青色の沈着物に変換され、その際、沈着物の量、つまり生成されるシグナルは、アナライト濃度及びこの反応のために必要な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成のために利用される内在性キャリブレーター (グルコース) の量に依存する。引き続き、前記プレートを再び 4 回洗浄する (上記と同様)。乾燥後に、例えばイメージング法を用いた評価を行う。図 5 は、FABP 添加なしの RGB 画像 (4) 及び FABP 添加ありの RGB 画像 (5) 並びに評価のために用いられる FABP 添加なしのグレースケール画像 (6) 及び FABP 添加ありのグレースケール画像 (7) を示す。後者の画像に基づき定量化が行われ、その定量化のデータが表 1 に示されている。この自己校正されるアッセイの効果は、両方の尿試料に FABP 100 ng/ml を添加することにより明らかとなる。最後の行から、使用された早朝尿が日中の尿と比較して 1.74 倍濃縮されていることが明らかである。使用されたパターンによりキャッチャー抗体 (1 ; 2 ; 4 及び 8 ng/ml) で生成されたシグナルが、その動力学に関して評価される。1 ng/ml のキャッチャー抗体についてのそれぞれ強いシグナルの後に、2 ng/ml のキャッチャー抗体から連続的なシグナルの上昇が飽和に至るまで生じる。この飽和は、同じアナライト濃度の場合には日中の尿において極めて早くに達成され、それというのもこの濃縮されていない試料は内在性キャリブレーター (この場合グルコース) をあまり含んでおらず、それにより少量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が形成できるにすぎないためである。診断的に重要な濃度範囲のための飽和曲線は数学的に記載することができ、これは評価ソフトウェアで実施することができる。試料中のアナライトの補正された濃度測定は、次に飽和曲線の比較によって行われる。

30

40

## 【0015】

## 【表 2】

表 2：図 5 において示された結果の定量化

キャッチャー ng/ml	アナライト添加なし				100 ng/ml のアナライト添加あり			
	1	2	4	8	1	2	4	8
測定値は、評価のためにそれぞれ選択された領域のピクセル平均値に相当する								
日中の尿	2830	3113	1582	2958	5623	3472	4042	4062
早朝尿	3897	2278	1950	3215	8970	5117	6808	9011
早朝尿－ 日中の尿	1067	-835	368	257	3347	1645	2766	4949
早朝尿： 日中の尿	1.38	0.73	1.23	1.09	1.60	1.47	1.68	2.22
合計 日中の尿	10483				17199			
合計 早朝尿	11340				29906			
合計早朝尿－ 合計日中の尿	857				12707			
合計早朝尿： 合計日中の尿	1.08				1.74			

10

20

30

40

50

## 【0016】

実施例 3： 種々のサンプルマトリックスのための内在性キャリブレーターによる同時補正を用いたアナライトの検出のためのフロースルー・マクロドットアッセイ（図 7）

実施例 3 は種々のサンプルマトリックスのための内在性キャリブレーターによる同時補正を用いたアナライトの検出のためのフロースルー・マクロドットアッセイの評価を記載する。この場合、フロースルー・膜システム（フロースルーデバイス）上にまず 7 つの点（ドット）をプロットする（図 7 参照）。点「1」～「4」はそれぞれ増加する濃度で抗 - アナライト抗体を含有する。点「K」は対照として機能し、有利には抗 - マウス - 免疫グロブリン G 又はプロテイン A を含有する。点「EK」はそれぞれの内在性キャリブレーターの検出のために利用され、つまり有利には単一の酵素又は酵素混合物並びにペルオキシダーゼからなる。点「EK - U」は任意であり、使用の際にそれぞれのキャリブレーター（例えばクレアチニン又はグルコース）を適用のために最適の濃度で含有し、そして前記キャリブレーターが例えば  $H_2O_2$  に変換されるために必要である成分を含有する。全ての点は、局所的に狭く限定的に沈着するペルオキシダーゼ基質が混合されている。

## 【0017】

この試験システムの評価の場合には、前記試料をまず、それぞれの内在性キャリブレーターの変換のために必要な酵素ミックス又は相応する単一酵素並びにホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを結合する抗 - アナライト抗体を含有する試験用チューブ中で予備インキュベーションする。引き続き、この反応ミックスをフロースルー・膜システムの試験フィールド上にのせる。アナライトが試料中に存在している場合には、複合体のアナライト・ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを結合する抗 - アナライト抗体がそれぞれのキャッチャー抗体に結合する（点「1」～「4」）。異なるキャッチャー抗体濃度に基づき、点「4」の方向に向かって飽和が生じる。反応ミックス中での内在性キャリブレーターの変換によって形成される生成物（有利には  $H_2O_2$ ）は、それぞれのドットにおいて

予め固定された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不含の、局所的に狭く限定的に沈着するペルオキシダーゼ基質がその無色の前駆体から青紫色の沈着物への変換することを開始させる。この場合、沈着物量は局所的に存在するペルオキシダーゼ及び例えば H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度に依存する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】試料マトリックスの尿及び内在性キャリブレーターのカレアチニンについての完全な反応図

【図2】内在性キャリブレーターのグルコースについての完全な反応図

【図3】試料マトリックスの尿（内在性キャリブレーター：クレアチニン）についての「反応1」の図式

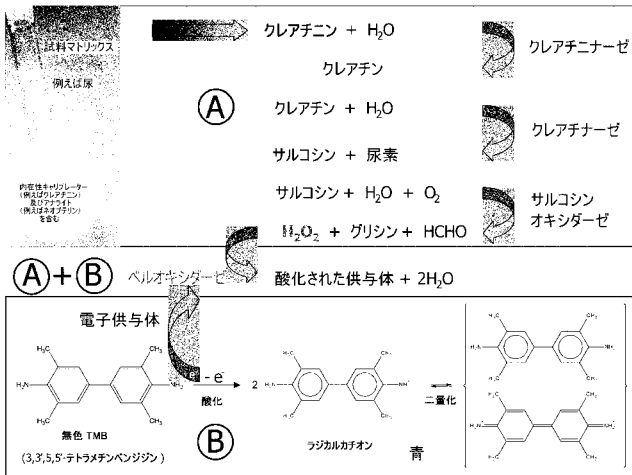
【図4】ラテラルフロー試験システム（図面によって示されている）の場合の内在性キャリブレーターによる同時補正を用いたアナライトの検出

【図5】マイクロタイタープレートに基づくマクロドットアッセイの場合の内在性キャリブレーターによる同時補正を用いたアナライトの検出

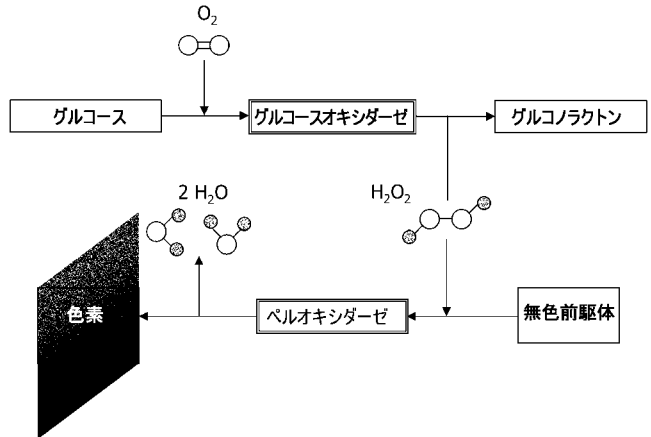
【図6】試料マトリックスの尿中の、ラテラルフロー試験システムの場合の内在性キャリブレーター（クレアチニン）による同時補正を用いたFABPの検出のためのコンパレータカード

【図7】種々のサンプルマトリックスのための内在性キャリブレーターによる同時補正を用いたアナライトの検出のためのフロースルー・マクロドットアッセイ

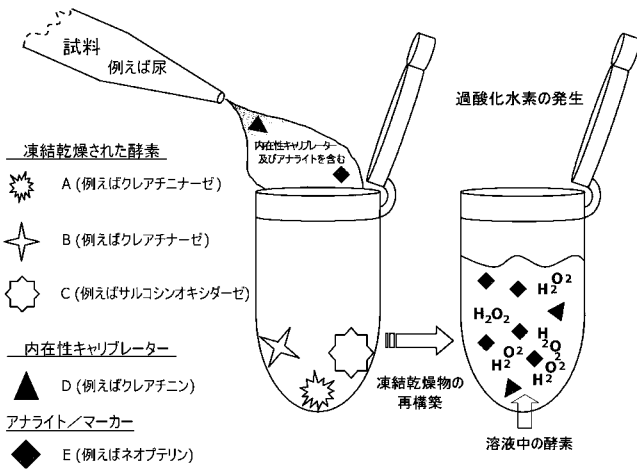
【図1】



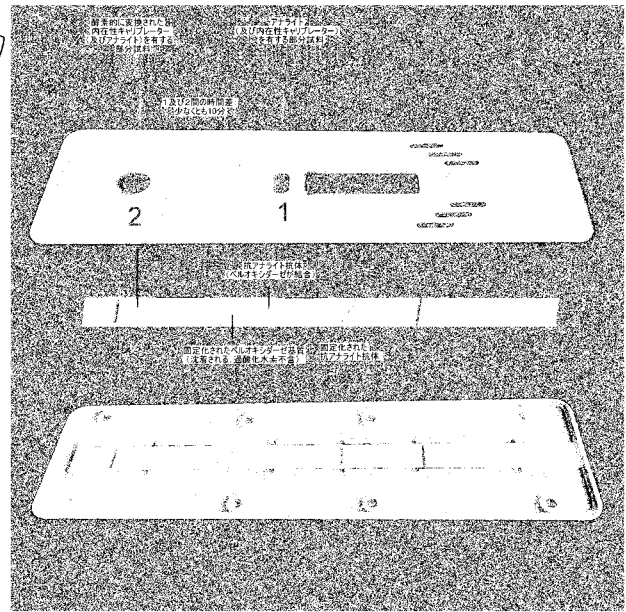
【図2】



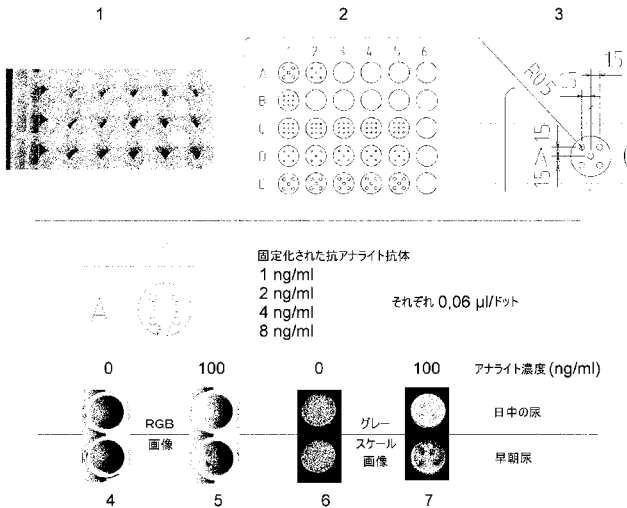
【 図 3 】



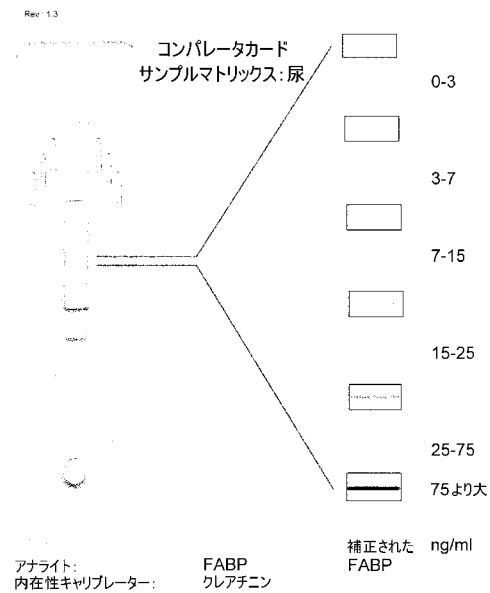
【 図 4 】



【 図 5 】

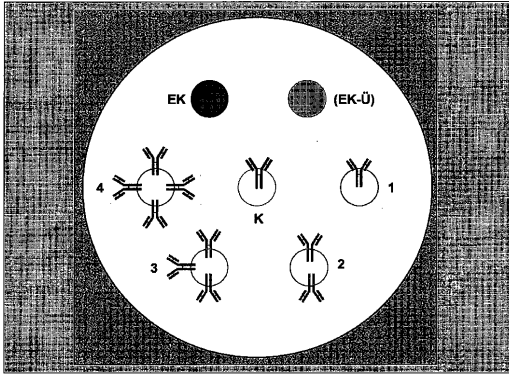


【 図 6 】



【 図 7 】

Abb. 7



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2007/000824

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
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) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/130293 A1 (BLATT JOEL M [US] ET AL) 16 June 2005 (2005-06-16) paragraphs [0035], [0050] - paragraph [0062]	1-12
A	WO 02/04950 A (NASER WERNER [DE]; GOERLACH GRAW ADA NASER WERNER [DE]; GOERLACH GRAW) 17 January 2002 (2002-01-17) Zusammenfassung, Seite 5, Satz 1-35, Ansprüche 1-16, Abbildungen 4-8	1-12
A	EP 0 357 400 A (CHOLESTECH CORP [US]) 7 March 1990 (1990-03-07) Zusammenfassung, Seite 2, Satz 45 - Seite 3, Satz 30, Ansprüche 1-20.	1-12
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier 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 '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 considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 September 2007		Date of mailing of the international search report 02/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 540-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 540-2016		Authorized officer Lindberg, Pia

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DE2007/000824

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/34271 A (QUIDEL CORP [US]) 31 October 1996 (1996-10-31) das ganze Dokument, besonders Ansprüche 1-23 -----	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2007/000824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005130293 A1	16-06-2005	NONE	
WO 0204950 A	17-01-2002	AU 9369901 A US 2004038296 A1	21-01-2002 26-02-2004
EP 0357400 A	07-03-1990	AU 625973 B2 AU 4209089 A DK 104890 A WO 9002200 A1	23-07-1992 23-03-1990 12-06-1990 08-03-1990
WO 9634271 A	31-10-1996	US 5804452 A	08-09-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2007/000824

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> INV. G01N33/543		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N C12Q		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2005/130293 A1 (BLATT JOEL M [US] ET AL) 16. Juni 2005 (2005-06-16) Absätze [0035], [0050] - Absatz [0062]	1-12
A	WO 02/04950 A (NASER WERNER [DE]; GOERLACH GRAW ADA NASER WERNER [DE]; GOERLACH GRAW) 17. Januar 2002 (2002-01-17) Zusammenfassung, Seite 5, Satz 1-35, Ansprüche 1-16, Abbildungen 4-8	1-12
A	EP 0 357 400 A (CHOLESTECH CORP [US]) 7. März 1990 (1990-03-07) Zusammenfassung, Seite 2, Satz 45 - Seite 3, Satz 30, Ansprüche 1-20.	1-12
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
17. September 2007		02/10/2007
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Lindberg, Pia

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2007/000824

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96/34271 A (QUIDEL CORP [US]) 31. Oktober 1996 (1996-10-31) das ganze Dokument, besonders Ansprüche 1-23	1-12

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2007/000824

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2005130293 A1	16-06-2005	KEINE	
WO 0204950 A	17-01-2002	AU 9369901 A US 2004038296 A1	21-01-2002 26-02-2004
EP 0357400 A	07-03-1990	AU 625973 B2 AU 4209089 A DK 104890 A WO 9002200 A1	23-07-1992 23-03-1990 12-06-1990 08-03-1990
WO 9634271 A	31-10-1996	US 5804452 A	08-09-1998

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/28	(2006.01)	G 0 1 N	33/70	
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	G 0 1 N	33/66	C
			C 1 2 Q	1/28	
			C 1 2 Q	1/34	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 レンネベルク・ラインハルト  
中華人民共和国、香港特別行政区、清水灣、香港科技大学、エスエスキュー・タワー・15・ジー  
エフ・エイ

(72)発明者 コーセリィ・ジョージ・ダブリュー・エイチ  
中華人民共和国、香港特別行政区、加列山道、崑廬、44、1ピー

(72)発明者 チャン・カンジェル・ピー・ワイ  
中華人民共和国、香港特別行政区、新界、元朗区、マ・ティン・ツェン、ナンバー・219

(72)発明者 レーマン・マティアス  
ドイツ連邦共和国、13125 ベルリン、タイヒベルクストラッセ、15

(72)発明者 レーマン・カーリン  
ドイツ連邦共和国、13125 ベルリン、タイヒベルクストラッセ、15

Fターム(参考) 2G045 AA16 BB50 BB51 CB03 DA31 DA36 DA43 FA14 FA18 FB01  
FB03 FB12  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QR02 QR03 QR10 QR41 QR44 QR47 QR48  
QR49 QR72 QS03 QS28 QS36 QS39 QX01 QX02 QX04

## 【要約の続き】

る。この結果は、ノモグラム、コンパレーター(参照ストリップ)、読み取り装置を用いるか又は肉眼で視覚的な比較により前記アッセイから直接測定することができる。

专利名称(译)	使用内源校准器的分析物的连接酶免疫化学检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009536023A</a>	公开(公告)日	2009-10-08
申请号	JP2009508118	申请日	2007-05-07
申请(专利权)人(译)	8意识生物亚诺斯释-GESELLSCHAFT美图-Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	レンネベルクラインハルト コーセリイジョージダブリューエイチ チャンカンジェルピーワイ レーマンマティアス レーマンカーリン		
发明人	レンネベルク・ラインハルト コーセリイ・ジョージ・ダブリュー・エイチ チャン・カンジェル・ピー・ワイ レーマン・マティアス レーマン・カーリン		
IPC分类号	C12Q1/26 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/70 G01N33/66 C12Q1/28 C12Q1/34		
CPC分类号	C12Q1/25 C12Q1/54		
FI分类号	C12Q1/26 G01N33/535 G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/543.575 G01N33/70 G01N33/66. C C12Q1/28 C12Q1/34		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB03 2G045/DA31 2G045/DA36 2G045/DA43 2G045/FA14 2G045/FA18 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QR02 4B063/QR03 4B063/QR10 4B063/QR41 4B063/QR44 4B063/QR47 4B063/QR48 4B063/QR49 4B063/QR72 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX04		
优先权	102006021645 2006-05-08 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及使用分析元件，特别是侧向流动测试条，流通膜系统（流通测试）分析生物液体样品或其他液体样品（例如代谢物和抗原）中的大量分析物的方法。使用微量滴定板或试管的孔/腔进行检测其中该方法基于相互连接的酶促反应和亲和反应，并包含内源校准物，内源性产生的物质（例如肌酸酐，葡萄糖，葡萄糖）-6-磷酸，乳酸，谷氨酸，aspartate，胆固醇，丙酮酸，尿素和甘油三酸酯）。本发明的应用领域特别是医学诊断，配方工业和环境保护。有利地，本发明涉及抗原和代谢物的同时检测或顺序检测。在本发明的范围内，这特别是大分子抗原如蛋白质，或小分子半抗原如杀虫剂，新蝶呤，有害物质或激素，并且是代谢物如葡萄糖或肌酸酐。该结果可以使用诺模图，比较物（参考条），读数器或通过肉眼视觉比较直接从测定中测量。