

(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2008-532006  
(P2008-532006A)

(43) 公表日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	2 G O 4 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	2 G O 5 8
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/72 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-556660 (P2007-556660)  
 (86) (22) 出願日 平成18年2月23日 (2006. 2. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月27日 (2007. 6. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/000638  
 (87) 国際公開番号 W02006/090154  
 (87) 国際公開日 平成18年8月31日 (2006. 8. 31)  
 (31) 優先権主張番号 0503836. 9  
 (32) 優先日 平成17年2月24日 (2005. 2. 24)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

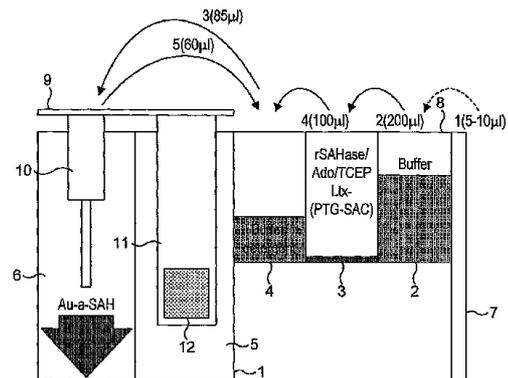
(71) 出願人 502301425  
 アクシス—シールド エイエスエイ  
 ノールウェー エヌ—0510 オスロ  
 ウルフエンファイエン 87  
 (74) 代理人 110000040  
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ  
 (72) 発明者 フランツェン、フランク  
 ノールウェー エヌ—0510 オスロ  
 ウルフエンファイエン 87、アクシス—  
 シールド エイエスエイ内  
 (72) 発明者 ファーレン、アーン、ルードヴィッグ  
 ノールウェー エヌ—0510 オスロ  
 ウルフエンファイエン 87、アクシス—  
 シールド エイエスエイ内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ方法

(57) 【要約】

本発明は、ホモシステインのためのカセットベースの自動アッセイを提供する。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト又はヒト以外の血管を有する動物の被検体から採取された血液試料中の血漿ホモシステインを分析する方法であって、

前記被検体からの全血試料を以下の試薬 - 液体稀釈液、還元剤、ホモシステイン変換酵素、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記ホモシステイン変換酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子に接触させること；

前記試薬との接触後、結合していない状態及び前記変換産物に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには十分であるが、前記微粒子に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには不十分な多孔性を示す膜を通して前記試料を引き込むこと；

前記膜上に保持された前記結合剤の色標識を検出すること；

前記全血試料中の赤血球細胞の濃度に依存する補正因子を適用することにより血漿ホモシステイン濃度の示度を前記検出から判断すること；

選択的ではあるが好ましくは、前記血漿ホモシステイン濃度を可視又は電子信号として提示することを含み、

前記試薬との接触が、下記規定に従うことを条件として連続して又は同時に行われる方法。

i) 前記溶解剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後に起こること、

i i) 前記阻害剤が存在する場合には前記阻害剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後であって前記溶解剤との接触前に起こること、及び

i i i) 前記結合剤及び前記微粒子との接触が、前記結合剤及び前記微粒子を共に含む液体との接触を伴わないこと。

## 【請求項 2】

前記膜を通して前記試料を引き込む前に、前記試料中の DNA をフラグメント化する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記試薬の少なくとも 1 つがビーズ形態で提供される請求項 1 及び 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記色標識結合剤が、金属ビーズ標識結合剤である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

全血を用いる血漿ホモシステインアッセイ用の使い捨てカートリッジであって、

前記カートリッジは、複数ウェルを備えたベース、先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペット、及びカバーを有し、

前記カバーは、先端に膜が付いたピペットを担持し、

前記ベースのウェルは、以下のアッセイ試薬：液体稀釈剤、還元剤、ホモシステイン変換酵素、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子を含み、

前記結合剤及び前記微粒子は異なる前記ウェル内に存在し、

前記阻害剤が存在する場合には、前記阻害剤及び前記酵素は異なる前記ウェル内に存在し、

前記溶解剤は、前記酵素並びに前記還元剤及び前記稀釈剤の少なくとも一部を含む 1 つ又は複数のウェルとは異なるウェル内に存在するカートリッジ。

## 【請求項 6】

前記ベースに少なくとも 5 つのウェルを線形配列で有する請求項 5 に記載のカートリッジ。

## 【請求項 7】

前記ベースにおける少なくとも 1 つのウェル内に少なくとも 1 つの試薬含有ビーズを有す

10

20

30

40

50

る請求項 5 及び 6 のいずれか 1 項に記載のカートリッジ。

【請求項 8】

前記ピペットの少なくとも 1 つに前記ビーズの少なくとも 1 つを有する請求項 7 に記載のカートリッジ。

【請求項 9】

前記ベース内の前記ウェルのうちの少なくとも 1 つにヌクレアーゼを含む請求項 5 から 8 のいずれか 1 項に記載のカートリッジ。

【請求項 10】

血漿及び血液細胞中に存在する分析物を分析する方法であって、

(a) 全血試料の血漿中の前記分析物の含有量を測定すること、

(b) 前記試料のヘマトクリット又はヘモグロビンの含有量を (好ましくは分光測光法で) 測定すること、及び

(c) 前記測定から前記分析物の血漿濃度を測定することを含む方法。

【請求項 11】

診断用アッセイのための使い捨てカートリッジであって、

少なくとも 1 つが前記アッセイを実施するための試薬を含む複数のウェルを含むカートリッジ本体を有し、

少なくとも 1 つのウェルが、溶媒中で、少なくとも 1 つの前記試薬を放出するビーズを含んでいることを特徴とするカートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中のホモシステインを分析する方法、及びそのような方法に用いられるアッセイキットに関する。

【背景技術】

【0002】

ホモシステイン (Hcy) は、蛋白質の合成には用いられないが、細胞及び細胞外液中に低濃度 (例えば、通常、成人の血漿中約  $10 \mu\text{M}$ ) で存在する、硫黄を含有する小さな - アミノ酸である。血漿 Hcy のレベルが高いことは、葉酸又はビタミン B 欠乏及び心臓血管疾患に関係があった。したがって、血漿中の Hcy を分析することは临床上重要な関心事である。

【0003】

このようなアッセイシステムの 1 つは、Axis - Shield ASA によって開発され、Abbott Laboratories から市販されている。販売開始後最初の 6 年間で、このシステムを使って 2,600 万件を上回るこのような Hcy アッセイが行われた。Axis - Shield / Abbott Hcy アッセイは、血漿中での Hcy の S - アデノシル - ホモシステイン (SAH) への酵素的変換、及び SAH のイムノアッセイ検出を含む。しかし、Axis - Shield / Abbott Hcy アッセイは、臨床実験室内で実施されるように設計されている。そのため、患者がアッセイの結果を聞くために再訪問する必要がないように、例えば診察室での治療時 (point - of - care) に実施可能な形態の Hcy アッセイが依然として求められている。

【0004】

治療時に用いられるアッセイ実施デバイスは、近年、Axis - Shield ASA によって開発された。これは、Afinion (商標) の下で市販されており、例えば WO 02 / 090995 (特許文献 1) に記載されている。本明細書では、その内容を参考のために援用する。Afinion システムでは、アッセイを実施するために必要な試薬が予め添加 (プレロード) されたいくつかのウェルを含み、特定の試料タイプ及び目的の分析物に対してアッセイをどのように行うかをデバイスが判断できるようにするための十分なコンピュータ読み出し可能情報を保持するアッセイカートリッジに試料 (例えば、血液、血漿、尿、など) が配置される。

10

20

30

40

50

【特許文献1】WO 02/090995

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

我々は、全血を用いて（すなわち、血液試料から細胞を分離する必要なく）、例えば、A f i n i o n デバイスを用いて、治療時に実施可能な血漿 H C y のアッセイを開発した。

【0006】

血漿ではなく、全血を用いることができることにより、医師に求められる試料の取扱いが大幅に簡略化される。

【0007】

しかし、全血を用いると、血漿 H C y アッセイの性能に深刻な問題を引き起こす。なぜなら、試料中の細胞内 H C y が場合によっては血漿に漏れることがあるからである。実際、現在行われている血漿 H C y の臨床実験室におけるアッセイでは、医師は、細胞内 H C y による汚染（コンタミネーション）を避けるために、30分以内に血漿を全血から分離して血漿試料を冷えた状態で保管するように指示されている。細胞内 H C y による汚染は回避されなければならない。なぜなら、正常/異常血液 H C y の現在の基準が血漿 H C y 用になっており、細胞内 H C y において患者間でどの程度のばらつきがあるのか、これが患者の健康によってどの程度変化するのかについては分かっていないからである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

しかし、我々は、血漿 H C y の酵素イムノアッセイにおいて、結合が起こるまで細胞溶解を遅らせ、ヘマトクリットを補正することによって、分離されていない全血試料を使用可能であることを見出した。

【0009】

したがって、1つの局面によると、本発明は、ヒト又はヒト以外の血管を有する（v a s c u l a r i z e d）動物の被検体から採取された血液試料中の血漿ホモシステインを分析する方法であって、前記被検体からの全血試料を以下の試薬、すなわち、液体稀釈液、還元剤、ホモシステイン変換酵素（c o n v e r t i n g e n z y m e）、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記ホモシステイン変換酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒に接触させること；前記試薬との接触後、結合していない状態及び前記変換産物に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには十分であるが、前記微粒に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには不十分な多孔性を示す膜を通して前記試料を引き込むこと；前記膜上に保持された前記結合剤の色標識を検出すること；前記全血試料中の赤血球細胞の濃度に依存する補正因子を適用することにより血漿ホモシステイン濃度の示度（i n d i c a t i o n）を前記検出から判断すること；選択的ではあるが好ましくは、前記血漿ホモシステイン濃度を可視又は電子信号として提示することを含み、前記試薬との接触が、下記規定に従うことを条件として連続して又は同時に行われる方法を提供する。

i) 前記溶解剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後に起こること、  
 i i) 前記阻害剤が存在する場合には前記阻害剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後であって前記溶解剤との接触前に起こること、及び  
 i i i) 前記結合剤及び前記微粒との接触が、前記結合剤及び前記微粒を共に含む液体との接触を伴わないこと。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の方法においては、細胞溶解が開始される前（又は開始されるのと同時に）ホモシステイン変換酵素によって H C y の変換を停止又は少なくとも減速させる方を講じることが好ましい。これは、試料の温度を変化させ、例えば、酵素反応を減速させるか、若

10

20

30

40

50

しくは酵素を変性させることにより、稀釈することにより、pHを変更することにより、又は、反応を阻害若しくは酵素を変性させるように作用する薬剤を添加することにより（例えば、SDSなどの界面活性剤、NaSCNなどのカオトロピック塩、尿素若しくは塩化グアニジニウムなどの他の公知の変性剤、又は（酵素反応が金属若しくは補助因子を必要とする場合には）金属若しくは補助因子結合剤を用いることにより）成し遂げられ得る。変性界面活性剤が用いられる場合、これは、溶解剤としても機能し得る。便宜上、酵素的HCy変換反応に干渉するこのような薬剤を、本明細書では、阻害剤と呼び、本発明の方法の好ましい実施形態では、阻害剤は、用いられる試薬のセットに含まれる。

【0011】

本発明の方法では、試薬との接触には、所定時間、かつ、好ましくは所定温度における、稀釈剤、還元剤、及び酵素との接触が行われる第一段階と、続いて、微粒子及び結合剤との接触が行われる第二段階との二段階のインキュベーションが含まれることが好ましい。

10

【0012】

第1の好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである。

- i) 稀釈液との接触、
- ii) 酵素及び還元剤との接触、
- iii) インキュベーション、
- iv) 微粒子、阻害剤、及び溶解剤との接触、
- v) 結合剤との接触、
- vi) インキュベーション、及び
- vii) 膜を通しての引き出し。

20

【0013】

第2のさらに好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである。

- i) 稀釈剤との接触、
- ii) 還元剤、酵素、及び微粒子との接触、
- iii) インキュベーション、
- iv) 溶解剤、阻害剤、及び結合剤との接触、
- v) インキュベーション、及び
- vi) 膜を通しての引き出し。

30

【0014】

第3の好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである：

- i) 稀釈剤との接触、
- ii) 還元剤、酵素、及び微粒子との接触、
- iii) インキュベーション、
- iv) 溶解剤及び阻害剤との接触、
- v) 結合剤との接触、
- vi) インキュベーション、及び
- vii) 膜を通しての引き出し。

40

【0015】

試薬は、概して、使い捨ての複数のウェルを備えたアッセイカートリッジで提供されるのが好ましい。特に好ましくは、このようなカートリッジは、試薬、先端に膜が付いたピペット、及び先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペットを含んでいなければならない。このようなカートリッジでは、少なくとも、結合剤及び酵素、並びに好ましくは結合剤が乾燥形態で提供され、結合剤と微粒子とが別個のウェルで提供される。

【0016】

したがって、他の局面によると、本発明は、全血を用いる血漿ホモシステインアッセイ用の使い捨てカートリッジであって、前記カートリッジは、複数のウェルを備えたベース、先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペット、及びカバーを有し、前記カバーは、先端に膜が付いたピペットを担持し、前記ベースのウェルは、以下のアッセイ試薬：

50

液体稀釈剤、還元剤、ホモシステイン変換酵素、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子を含み、前記結合剤及び前記微粒子は異なる前記ウェル内に存在し、前記阻害剤が存在する場合には、前記阻害剤及び前記酵素は、異なる前記ウェル内に存在し、前記溶解剤は、前記酵素並びに前記還元剤及び前記稀釈剤の少なくとも一部を含む1つ又は複数のウェルとは異なるウェル内に存在するカートリッジを提供する。

【0017】

第1の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも4つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤を含み、第2のウェルは、酵素及び還元剤を含み、第3のウェルは、微粒子、溶解剤、及び阻害剤を含み、第4のウェルは、結合剤を含む。第2の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも4つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤、阻害剤、及び溶解剤を含み、第3のウェルは、酵素、還元剤、及び微粒子を含み、第4のウェルは、結合剤を含む。第3の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも4つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤を含み、第2のウェルは、酵素、還元剤、及び微粒子を含み、第3のウェルは、稀釈剤、阻害剤、及び溶解剤を含み、第4のウェルは、阻害剤を含む。これら3つのカートリッジ形式は、特に、上記の好ましい接触シーケンスの実施に適切である。

10

【0018】

本発明のカートリッジのウェルが液体を含む場合には、ウェルには、取り外し可能又は穿孔可能なクロージャ（例えば、フイルシール）が設けられているのが好ましい。カバーは、このようなシールを貫通する穿孔管を有するのが好ましく、それ自体が全血試料を引き込んでカートリッジに導入するように用いられる取り外し可能なピペットを保持するように形成されているのが好ましい。

20

【0019】

使用前、カートリッジは、密封容器（例えば、フイルバック）に配置されているのが好ましく、密封容器も、乾燥剤（例えば、シリカゲル）又はモレキュラーシーブを含んでいるのが好ましい。

【0020】

したがって、第1の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイの実施は、以下の工程を含むのが適切である。

30

- 1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、
- 2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、
- 3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、
- 4) 稀釈剤を第1のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、
- 5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに導入する工程、
- 6) 第2のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第1のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、インキュベートされた液体を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第4のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 10) 第3のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 11) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、
- 12) 膜の外側に保持された結合剤を検出する工程、及び

40

50

13) 血漿HCy含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0021】

第2の好ましいカートリッジの実施形態のためのアッセイ実施シーケンスは、以下のとおりである。

1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、

2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程(すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される)、

3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、

4) 稀釈剤を第1のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、

5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第3のウェルに導入する工程、

6) 第3のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、

7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第1のウェル及び/又は第2のウェルから第4のウェルに導入する工程、

8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、溶解剤、及び阻害剤を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、

9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第4のウェルから第3のウェルに導入する工程、

10) 第3のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、

11) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、

12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び

13) 血漿HCy含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0022】

第3の好ましいカートリッジの実施形態のためのアッセイ実施シーケンスは、以下のとおりである。

1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、

2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程(すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される)、

3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、

4) 稀釈剤を第1のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、

5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに導入する工程、

6) 第2のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、

7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第3のウェルから第4のウェルに導入する工程、

8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、インキュベートされた液体を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、

9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第4のウェルから第3のウェルに導入する工程、

10) 第3のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、

11) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、

12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び

13) 血漿HCy含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0023】

本発明のアッセイ方法に用いられる少なくとも1つの試薬は、固形状又は半固形状で(例えば、膜、粉、又はビーズとして)提供され得る。ビーズ状の試薬を用いる場合、本明

10

20

30

40

50

細書に記載されているように、試薬が添加（ロード）されたカートリッジを用いてアッセイが実施される際には特に有利である。なぜなら、カートリッジ保管中に相互作用するかも知れない試薬が、保管中の相互作用の問題を引き起こさずに、同じカートリッジウェルにビーズ状で提供され得るだけでなく、カートリッジローディングの際の柔軟性が向上し、アッセイの実施が設計上向上するからである。さらに、個々の試薬の保管安定性は、溶液状よりもビーズ状の方が高いと思われる。

#### 【0024】

この結果、本発明のさらに3つの好ましい実施形態では、アッセイカートリッジは、ビーズ状の選択された試薬を含む。したがって、第4の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤を含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルは、阻害剤を含む第3のビーズを含み、第5のウェルは、酵素及び還元剤を含む第4のビーズ、並びに選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含む第5のビーズを含む。第5の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤、及び選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルは、阻害剤を含む第3のビーズを含み、第5のウェルは、酵素及び還元剤を含む第4のビーズを含む。第6の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤、及び選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルには、試薬は入っておらず、第5のウェルは、阻害剤、及び、それとは別に酵素及び還元剤を含む第3のビーズを含む。

10

20

30

#### 【0025】

これらの実施形態では、第5及び第4のウェル内のビーズは、先端にキャピラリーが付いたピペット又は先端に膜が付いたピペットのそれぞれ内部に配置されているのが望ましい。第5のウェルがビーズを含む場合、先端にキャピラリーが付いたピペットの貯蔵部（リザーバー）内であるのが好ましい。直前に記載された実施形態では、これらのビーズは、酵素及び還元剤を含む。第6の実施形態では、第5のウェルもまた、例えば、ウェルのベースにおける逆円錐形のプラスチックカップ内に（すなわち、ビーズとは別個に）乾燥形態で阻害剤を含む。

40

50

60

#### 【0026】

したがって、第4及び第5の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイの実施には、以下の工程を含むことが適切である。

- 1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、
- 2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、
- 3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、
- 4) 稀釈剤を第2のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、
- 5) 血液、稀釈剤、及び酵素を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに流す工程、
- 6) 第2のウェルの内容物をインキュベートする工程、
- 7) 稀釈剤及び細胞溶解剤を第1のウェルから先端に膜が付いたピペットに導入し、第1のウェルに流し戻す工程、
- 8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第1のウェルから第2のウェルに導入する工程、
- 9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、溶解した試料を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 10) 第3のウェルの内容物をインキュベートする工程、

1 1) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、

1 2) 膜の外側に保持された結合剤を検出する工程、及び

1 3) 血漿H C y含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0027】

第6の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイ実施には、以下の工程を含むことが適切である。

1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、

2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程(すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される)、

3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、

4) 稀釈剤を第2のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、

5) 血液、稀釈剤、及び酵素を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに流す工程、

6) 第2のウェルの内容物をインキュベートする工程、

7) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤及び細胞溶解剤を第1のウェルから第5のウェルに導入して阻害剤を溶解する工程、

8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第5のウェルから第1のウェルに移す工程、

9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第1のウェルから第2のウェルに移す工程、

10) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、溶解した試料を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、

11) 第3のウェルの内容物をインキュベートする工程、

12) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、

13) 膜の外側に保持された結合剤を検出する工程、及び

14) 血漿H C y含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0028】

それぞれの場合、試料のヘモグロビン含有量は、膜を通して試料を引き込む前に分光測光法によって測定されるのが好ましい。これは、試料が細胞溶解剤と接触した後に行われるのが望ましい。

【0029】

液体が1つのウェルから他のウェルに移される場合、一般に、ドナーウェルの液体の全含有量ではなく、所定の容量が移される。

【0030】

本発明の方法において用いられるホモシステイン変換酵素は、結合剤に直接的又は間接的に結合可能なホモシステイン変換産物を生成する任意の酵素であればよい。この場合、間接的な結合とは、最初の酵素的変換産物が、その産物が結合剤に結合可能であるさらなる反応において、反応物として用いられ得ることを意味する。いくつかのホモシステイン変換酵素が公知であり、使用できる。例えば、シスタチオニンシンターゼ、ホモシステイナーゼ、ホモシステインデスルフラゼ、メチオニンシンターゼ、ジメチルテチンホモシステインメチルトランスフェラーゼ、ベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ、5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ、5-メチルテトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸-ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ、O-スクシニルホモセリン-リアゼ、及びS-アデノシルホモシステインヒドラーゼ(SAH-ヒドラーゼ)などが挙げられる。SAH-ヒドラーゼ、特に、組換えSAH-ヒドラーゼを用いるのが好ましい。これらの酵素を用いたホモシステインの酵素的変換には、SAH-ヒドラーゼの場合にはアデノシン若しくはアデノ

10

20

30

40

50

シン類似体、又はホモシステイナーゼの場合には水などのさらなる反応物「補助基質 (co-substrate)」が必要な場合がある。補助基質が必要な場合、補助基質は、一般に、本発明のアッセイ方法及びカートリッジでは、試薬として提供される。このような補助基質は、1回目のインキュベーションに間に合うように血液試料と接触されるが、通常、希釈剤中に又は酵素と共に存在させることができる。

#### 【0031】

酵素がSAH-ヒドロラーゼである場合、分析物は、一般に、アデノシン若しくはSAH、又はこれらのうちの1つの酵素的変換産物である。しかし、SAHが好ましい分析物である。酵素がホモシステインデスルフラゼである場合、分析物は、一般に、 $\alpha$ -ケトンブチレート ( $\alpha$ -ketobutyrate) の酵素的変換産物である。

10

#### 【0032】

本発明により用いられる希釈剤は、pHが通常6から10、より好ましくは7から9、特に7.2から8.5である水性のもの (例えば、水) 又は水性緩衝剤 (例えば、リン酸、炭酸、ホウ酸、MOBS、HEPES, トリス、又はグリシルグリシン緩衝剤) であるのが好ましい。このようなpHをもつ他の緩衝剤を用いてよいことは言うまでもない。

#### 【0033】

本発明により用いられる還元剤は、血漿中で生じ得る様々な形態のHCyを遊離ホモシステインに変換するように作用する。還元剤のこのような使用は、血漿HCyアッセイにおいて従来から行われている。用いられ得る適切な還元剤の例としては、ジチオール類 (特に、ジチオスレイトール (DTT)、ジチオエリスロール (DTE)、及びビス-(2-メルカプトエチル)スルホン)、ホスフィン類 (例えば、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)、トリフェニルホスフィン、及びトリ-n-ブチル-ホスフィン)、ボラン類 (例えば、ボラン-テトラヒドロフラン複合体、ジメチルスルフィド-ボラン、及びデカボラン)、ボロヒドリド類 (例えば、 $\text{NaCNBH}_3$ 、 $\text{NaBH}_4$ 、及びトリアセトキシボロヒドリド)、ヒドリド類 (例えば、 $\text{LiAlH}_4$ )、並びにシラン類 (例えば、 $\text{Et}_3\text{SiH}$ などのアルキルシラン類、フェニルシラン類、及びトリス(トリメチルシリル)シラン)が挙げられる。トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン: HCl (TCEP)を用いるのが特に好ましい。

20

#### 【0034】

本発明により用いられる阻害剤は、試料中の細胞が溶解する前にホモシステイン変換を停止するように作用し、アッセイによって測定される血漿HCy値の、細胞内HCyからの多大な影響力によるコンタミネーションを防止する。酵素阻害剤は、周知である。一般に、このような阻害剤は、例えば、天然の基質の特性を模倣することによって、酵素と直接結合してその作用を阻止し、それによって、例えば、酵素又は他の産物の生成を阻止する。しかし、他の阻害剤は、基質若しくはコファクター、又は酵素プロセス中に形成された分子若しくは中間物に作用し (それによって、通常最終産物の形成を防止することができる)。SAH-ヒドロラーゼの場合、例えば、チオール基と反応するか、又はチオール基に干渉する試薬は、阻害剤として機能する。なぜなら、遊離チオール基は、この酵素の生物学的作用に必要なからである。例としては、メルチオレート (Mertiolate; チメロサル) 及びマレイミド化合物 (例えば、N-エチルマレイミド) が挙げられる。他の阻害剤の例としては、アデニン類似体及びアデニンヌクレオシド類が挙げられる。さらなる阻害剤としては、D-エリタデニン、9-D-キシロフラノシルアデニン、アデニン9-(-D-アラビノフラノシド、エリスロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)-アデニン、過ヨウ素酸アデノシン、2'-デオキシアデノシン、3'-デオキシアデノシン、2',3'-ジデオキシアデノシン、炭素環式アデノシン、2-クロロ-アデノシン、2-クロロデオキシアデノシン、アデノシンジアルデヒド、N6-メチルアデノシン、コホルマイシン、2'-デオキシコホルマイシン、ホルマイシン、2-アミノ-6-クロロ-プリンリボシド、ネブラリン、ピラゾマイシン (pyrazomycin)、3-デアザ(+/-)-アリステロマイシン、アリステロマイシン (及びその八口ピニル誘導体)、ツベリシン、並びに、アラ-A及びその誘導体 (例えば、2-クロロ-ア

30

40

50

ラ - A ) が挙げられる。メルチオレート ( M e r t h i o l a t e ; チメロサル ) を用いるのが好ましいが、例えば、300  $\mu$ g / mL の作用濃度で、N - エチルマレイミドを用いるのが特に好ましい。組換え SAH - ヒドロラーゼ及びその機能を阻害する様々な物質に関する刊行物へのリンクは、<http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/95822.html> において見出せる。

#### 【0035】

本発明によって用いられる細胞溶解剤は、血液細胞が膜の外側に保持されないように血液細胞を破壊するように作用する。細胞溶解剤は、周知であり、本発明により用いられる適切な細胞溶解剤として、界面活性剤、例えば、尿素、デオキシコレート、エンピゲン、アモニクス ( a m m o n y x )、SDS、セシト ( t h e s i t ) ( 例えば、ルプロール P X 及び C 1 2 E 9 )、及びトリトン X 1 0 0 ( 例えば、ノニデット P 4 0 ) が挙げられる。0.4 重量 % での作用濃度で SDS を用いるのが好ましい。

10

#### 【0036】

試料が多孔膜を通して引き出されて膜によって保持された物質が検出される前に試料中の細胞が溶解される、本発明のようなアッセイ方法では、細胞溶解によって放出される DNA が膜孔に少なくとも部分的に詰まる可能性がある。これは、特に、試料が高濃度の白血球を含んでいる場合に起こる。したがって、膜孔の詰まりは、DNase、すなわち、ヌクレアーゼを用いて、細胞溶解によって放出される DNA を消化させることによって低減され得る。ヌクレアーゼは、試料が膜を通して引き出される前の任意の時点で、試料と接触させればよい。

20

#### 【0037】

ヌクレアーゼは、アクチベータ、例えば、 $Mg^{2+}$  などの 2 族金属イオンを必要とし、この場合、ヌクレアーゼとアクチベータとの接触は、試料が膜を通して引き出される前に試料とヌクレアーゼとの接触が起こるのであれば、試料とヌクレアーゼとの接触前、接触中、又は接触後でよい。しかし、ヌクレアーゼとアクチベータとの接触は、試料とヌクレアーゼとの接触と同時であることが好ましい。ヌクレアーゼ及びヌクレアーゼが必要とするアクチベータは、周知であり、例えば、Merck からベンゾナーゼ ( B e n z o n a s e ) として市販されている。

#### 【0038】

本発明により用いられる結合剤は、試料中に存在する他の物質に対してよりも酵素的変換産物及びその競合剤 ( 微粒子 ) に優先的に結合する任意の物質であればよい。結合剤は、共有結合又はその他の方法で共に結合若しくは保持された 2 つの機能部、すなわち、色標識及び結合部分から構成される。色標識は、可視範囲で光を吸収、放射、散乱、又は生成する材料、例えば、発色団又は蛍光体であるのが望ましい。しかし、赤外線又は UV の領域における光を吸収、放射、散乱、又は生成する色標識を用いてもよい。したがって、色標識は、発色団又は蛍光体などの分光測光法によって検出可能な任意の部分、又は分光測光法によって読み取り可能な色、蛍光、発光、若しくは散乱信号を生成することが可能な酵素標識 ( 例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、若しくはホタルルシフェラーゼ ) であってよい。例えば、約 100 から 200 nm のクラスター用のモード粒径を有する金又は他の金属のクラスターコロイドを用いるのが特に好ましい。結合部分は、抗体、フラグメント、若しくはその構築物、又は小さな有機分子等であってよい。抗体及び抗体フラグメント又は構築物を用いるのが好ましい。用いられる酵素が SAH - ヒドロラーゼである場合、抗 SAH 抗体、特にこのような抗体の組換え体を用いるのが好ましい。このタイプの抗体については、例えば、Axis - Shield ASA の特許公報 ( 例えば、WO 00 / 40973 ) に記載されている。本明細書では、その開示を参考のために援用する。具体的には、モノクローナル抗 SAH 抗体は、WO 40973 の実施例 1 に記載されているように製造され得る。このような抗体への金コロイドの結合は、US - A - 5691207 及び US - A - 5650333 に記載されているように行われ得る。

30

40

#### 【0039】

50

本発明により用いられる微粒子は、稀釈剤に懸濁し、膜によって保持され得る任意の物質であればよい。微粒子は、同様に、2つの機能成分、すなわち、膜に保持されるバルキ一部 (bulky entity) 及び結合剤に結合する競合部を有し、これら2つの機能成分は、共有結合又は他の相互作用によって結合している。バルキーな物質 (agent) は、好ましくは、白色又は無色の、例えば、ポリマー粒子 (例えば、テックス粒子) である。競合部分は、通常、酵素的変換産物、又はその類似体若しくはフラグメントである。酵素がSAH-ヒドロラーゼである場合、競合部は、S-アデノシル-システインであるのが好ましい。競合部をバルキー部分にカップリングさせるために用いられる化学技術は、明らかに、反応のために利用できる後者の官能基の特性に依存する。通常、水溶性カルボジイミド類 (例えば、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC/EDAC)) などの連結剤、ビス(スルホ-スクシンイミジル)スベレート (BS<sub>3</sub>) などのホモ二官能連結剤、を用いてもよいが、バルキー部がクロロメチル若しくはアルデヒドなどの反応性の基若しくは予め活性化された基を担持する場合には、連結は直接行われてもよい。好ましくは、競合部は、まず、蛋白質-競合部複合体がバルキー部にカップリングされる前に蛋白質 (例えば、アルブミン、より好ましくはチログロブリン) にカップリングされる。このようなカップリングの化学的性質は、当該技術分野で十分確立されている。

10

#### 【0040】

本発明により用いられる膜は、微粒子を保持するが、結合剤とその変換産物との複合体を透過させるような多孔性を示す任意の物質であればよい。膜材料を選択する際に考慮されなければならない要因としては、孔径、強度、及び接着性が挙げられる。孔径は、所望の複合体を停止させるように十分に小さく、非複合物質及び望ましくない複合体を透過させるように十分に大きい。小さな微粒子 (例えば、0.1から1.0 μm) を用いることによって、大きな微粒子 (例えば、1から10 μm) よりもより良好な信号が提供されるものの、膜の詰まりは激しくなる。したがって、好ましい微粒子の粒径は、1から2 μmであり、膜孔径は、これに従って選択されるのが好ましい。親水性ポリエーテルスルホン及びアクリルコポリマー膜 (例えば、孔径が0.8 μmより大きい) が用いられるのが好ましい。このような膜は、PallからSupor及びVersaporとして入手できる。膜は、そのピペットに付着又は溶着され得る。好ましくは、膜は平坦であり、ピペットの軸に対して傾斜して (すなわち、垂直と水平との間に) 配置される。この配置については、WO 02/090995に記載され、Axis-Shield ASAから販売されているAffinionカートリッジにおいて見られる。

20

30

#### 【0041】

少なくとも、本発明により用いられるカートリッジ内のピペットを有さないウェルは、ウェルの軸に垂直な面に対してある角度で傾斜した平坦で透明なベースを有して、断面が長方形であるのが望ましい。

#### 【0042】

適切な分析物が生成されるように酵素反応が完全に起こるようになるためには、上記のように、試料をインキュベートすることが望ましい。同様に、適切な信号が生成されるように十分な結合剤の結合が起こるようになるためには、試料をもう一度インキュベートすることが望ましい。換言すると、いずれの反応も平衡になる必要はなく、ユーザがアッセイを最適に受け入れられるようにアッセイの所望の精度に適合しさえすれば、インキュベーション時間は、できるだけ短く保持されるのが望ましい。通常、このようなインキュベーションは、20 ~ 45分、好ましくは、30 ~ 45分、最も好ましくは36 ~ 42分である。適切なインキュベーション時間は、一般に、0.5分 ~ 10分、好ましくは0.75分 ~ 5分、より好ましくは1分 ~ 3分の範囲である。酵素インキュベーションについては、1分 ~ 2分が最も好ましい範囲である。

40

#### 【0043】

血漿HCYについて測定された値が血液試料の相対的な血漿含有量に対して補正されるように (これは、ヘマトクリットは患者によって変化し得るためである)、医師がヘマ

50

トクリットについての（又はヘマトクリットを示す）値を入力するか、より好ましくは、アッセイ工程中にヘマトクリットについての（又はヘマトクリットを示す）値を測定しなければならない。このため、試料のヘモグロビンの含有量は、細胞溶解の前、又はより好ましくは細胞溶解の後に分光測光法によって測定され得る。測定が細胞溶解の前に行われる際には、バックグラウンド補正は、例えば、赤外線範囲でなされる分光測光測定を用いて行われるのが好ましい。測定されたヘマトクリットの値が異常に低い、例えば、0.3未満、特に、0.25未満である場合、本発明の方法では、ヘマトクリット値、又はヘマトクリット値が低いことを知らせる警告を（視覚的又は電子的に）提示することも好ましい。必要に応じて、ヘマトクリット値をとにかく提示してもよい。

【0044】

ヘモグロビンの含有量は、光散乱、透過率、又は反射率によって測定され得る。ヘモグロビンの含有量は、例えば、光源として緑色又は青色ダイオードを用いて、吸収率によって測定されるのが好ましい。膜上に残存する結合剤の濃度は、一般に、例えば、光源として緑色又は青色ダイオードを用いて、反射率によって測定される。

【0045】

大抵のアッセイについては、アッセイは、例えば、HCY含有量が既知の標準物質を用いることによって校正されるのが好ましい。用いられる試薬用の校正データには、例えば、カートリッジ又はそのパッケージ上にバー若しくは他の機械読み出し可能コードがエンコードされたカートリッジが設けられているのが好ましい。

【0046】

本発明の方法は、30  $\mu$ Mまでの血漿HCYレベルを定量化する際に特に効果的である。血漿HCYが30  $\mu$ Mを上回る場合、アッセイ出力は、血漿HCY含有量が異常に高いことだけを単に示してもよい。通常のレベルは、一般に、10～15  $\mu$ M以下であり、これより高いレベルでは、例えば、ビタミンB若しくは葉酸の補給又は心臓血管障害の検査のために医師の介入が必要とされる。通常の血漿HCY値よりも低い値は、一般に問題であるとはみなされず、子供及び総合ビタミン補給をしている患者では、値は、約5  $\mu$ M程度であればよい。

【0047】

血液細胞内にも存在する細胞外分析物の血漿含有量を測定するために、全血に対して診断アッセイを実施することは、新規のことであり、本発明のさらなる態様を構成する。この態様によると、本発明は、血漿及び血液細胞中に存在する分析物を分析する方法であって、(a)全血試料の血漿中の前記分析物の含有量を測定すること、(b)前記試料のヘマトクリット又はヘモグロビンの含有量を（好ましくは分光測光法で）測定すること、及び(c)前記測定から前記分析物の血漿濃度を測定することを含む方法を提供する。

【0048】

したがって、工程(a)は、全血試料中の細胞が無傷の状態の前記全血試料の血漿中の分析物を反応させて検出可能な種（産物）を生成すること、細胞内分析物が反応して前記産物を形成しない条件下で前記細胞を溶解すること、及び、前記産物を検出することを含む得る。

【0049】

試薬がビーズの形態で提供される場合、これらの試薬は、乾燥試薬及び選択的に不活性かつ好ましくは非吸湿性のバインダー（例えば、トレハロース又はPEGなどの糖）でコーティング又は含浸された不溶性ビーズであってよい。しかし、ビーズは、試薬及び不活性バインダーを含む水溶性のビーズであるのが好ましい。このようなビーズは、例えば、5～100  $\mu$ L（好ましくは10～50  $\mu$ L）の緩衝試薬溶液の液滴を凍結させ、次いで、凍結された液滴を凍結乾燥させることによって調製され得る。

【0050】

このような試薬ビーズを診断アッセイ、特に、カートリッジベースのアッセイに用いることは新規であり、本発明さらなる局面を構成する。したがって、本発明の他の局面によると、本発明は、診断用アッセイ、例えば、体液、塊、若しくは組織試料中の分析物のア

10

20

30

40

50

ッセイ用の使い捨てカートリッジであって、少なくとも1つ、好ましくは、少なくとも2つが前記アッセイを実施するための試薬を含む複数のウェルを備えたカートリッジ本体を有し、少なくとも1つのウェルが、溶媒（例えば、水）中で、少なくとも前記1つの試薬を放出するビーズを含んでいることを特徴とするカートリッジを提供する。ビーズ形態で提供可能な試薬としては、例えば、分析物結合剤、競合結合微粒子、酵素（例えば、ヌクレアーゼ、分析物（例えば、ホモシステイン）変換酵素、等）などが挙げられる。このようなカートリッジを用いて分析される分析物はホモシステインであることが好ましいが、他の任意の適切な分析物、例えば、C反応性蛋白質、凝固因子、トランスフェリン、フェリチン、等であってもよい。

【0051】

これより、本発明の方法及びカートリッジを以下の限定しない実施例及び添付の図面を参照しながらさらに説明する。

【0052】

図1を参照すると、内部に5つのウェル2、3、4、5、6（実施例では、それぞれ、ウェルE、D、C、B、及びAと呼ぶ）と支持脚部7とを備えた透明なプラスチックベース1を有する5ウェルアッセイカートリッジが示されている。ウェル2、3、及び4は、フィルム8で密封されている。カートリッジカバー9（一部のみ図示）は、先端にキャピラリーが付いたピペット10及び膜先端12を有する固定ピペット11を備える。ウェル2から4の内容物は、実施例1に記載されるとおりである。図示される矢印は、実施例2に記載される連続した物質の移動を示す。

【0053】

図2は、ウェル2から4の内容物が実施例3に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例4に記載される連続した物質の転送を示す。

【0054】

図3は、ウェル2から4の内容物が実施例5に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例6に記載される連続した物質の転送を示す。

【0055】

図4は、ウェル2から4の内容物が実施例7に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例8に記載される連続した物質の転送を示す。

【0056】

図5は、ウェル1から5の内容物が実施例9に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例10に記載される連続した物質の転送を示す。

【0057】

図6は、ウェル1から5の内容物が実施例11に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例12に記載される連続した物質の転送を示す。

【0058】

図7は、ウェル1から5の内容物が実施例13に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例14に記載される連続した物質の転送を示す。

【0059】

図8を参照すると、実施例2において設定されている物質転送のシーケンスが、図8Aから図8Xに示されている。

【0060】

実施例において、パーセントは、特に規定のない限り、重量に基づいている。

【実施例1】

【0061】

図1のアッセイカートリッジ

ウェルA

このウェルは、WO 00/40973の実施例1に記載されるようにして調製され、US-A-5691207及びUS-A-5650333に記載されるように結合され、逆円錐形のプラスチックカップ上に真空乾燥された金コロイド（粒子径：約100nm）

10

20

30

40

50

と抗SAH抗体との複合体を約22 $\mu$ g含む。

#### ウェルB

このウェルは、約4mm $\times$ 8mmのSupor800膜(Pall-孔径0.8 $\mu$ m)が先端に付いたピペットを含む。

#### ウェルC

このウェルは、酵素阻害剤(0.2%メルチオレート(チメロサル))及び溶解剤(1%トリトンX-100)を含有する185 $\mu$ Lの緩衝剤(10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1)を含む。

#### ウェルD

このウェルは、0.27 $\mu$ gアデノシン、50 $\mu$ g微粒子(S-アデノシル-システインを結合した1 $\mu$ mのラテックス粒子)又は300 $\mu$ g微粒子(S-アデノシル-システインを結合した2 $\mu$ mのラテックス粒子)、約5ユニットの組換えSAH-ヒドロラーゼ、及び、還元剤(23 $\mu$ gTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスファイン:HCl))を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

#### ウェルE

このウェルは、300~350 $\mu$ Lの緩衝剤(10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1)を含む。

#### 【実施例2】

#### 【0062】

##### 図1/実施例1におけるアッセイ実施

ウェルAに示されるキャピラリー中の血液試料(5~10 $\mu$ L)を、ウェルEから200 $\mu$ Lの緩衝剤を引き込むことによって希釈し、空になるまでウェルDに移す。キャピラリーピペットを用いてウェルCの85 $\mu$ Lの内容物をウェルAに移して、金複合体を溶解させる。キャピラリーピペットを用いてウェルDの100 $\mu$ Lの内容物をウェルCに移す前に、カートリッジを37 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートする。次に、ヘマトクリットレベルを、ウェルCの内容物による緑色又は青色ダイオードからの光の吸光度を検出ことによって測定する。次に、キャピラリーピペットを用いて、ウェルAの60 $\mu$ Lの内容物をウェルCに移す。次に、カートリッジを37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートする。次に、ウェルCの全内容物(選択的に、続いてウェルEに残存する緩衝剤)を先端に膜が付いたピペットに引き込み、バックグラウンドを低減させる。次に、膜の外側に保持される(2回目のインキュベーションで形成される金/ラテックス複合体に対応する)金コロイドを、緑色又は青色ダイオード照射を用いて反射モードで検出する。

#### 【0063】

アッセイは、HCy含有量が既知の標準物質にして較正され、同様に、ヘマトクリット測定(例えば、一連の血液試料についての遠心分離を利用したマトクリット測定)も標準物質に対して較正される。

#### 【実施例3】

#### 【0064】

##### 図2についてのアッセイカートリッジ

#### ウェルA

約22 $\mu$ gの複合体を用いること以外は実施例1と同様。

#### ウェルB

実施例1と同様。

#### ウェルC

このウェルは、0.27 $\mu$ gアデノシン、20 $\mu$ g微粒子(S-アデノシル-システインを結合した1 $\mu$ mのラテックス粒子)又は160 $\mu$ gの微粒子(S-アデノシル-システインを結合した2 $\mu$ mのラテックス粒子)、約5ユニットの組換えSAH-ヒドロラーゼ、及び、還元剤(23 $\mu$ gトリス(2-カルボキシエチル)ホスファイン:HCl)を含

10

20

30

40

50

む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

#### ウェル D

このウェルは、酵素阻害剤（0.4%メルチオレート（チメロサル））及び溶解剤（2%のトリトン X - 100）を含有する、225  $\mu$ L の緩衝剤（10 mM リン酸塩、150 mM NaCl、pH 7.4、又は、25 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8.1）を含む。

#### ウェル E

このウェルは、350  $\mu$ L の緩衝剤（10 mM リン酸塩、150 mM NaCl、pH 7.4、又は、25 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8.1）を含む。

【実施例 4】

【0065】

#### 図 2 / 実施例 3 におけるアッセイの実施

キャピラリーピペットに引き込まれた血液試料（5 ~ 10  $\mu$ L）を、160  $\mu$ L の緩衝剤をウェル E からキャピラリーピペットに引き込むことによって希釈する。次に、キャピラリーピペットの内容物をウェル C に排出する。キャピラリーピペットを用いて 85  $\mu$ L の緩衝剤をウェル E（又はウェル D）からウェル A に移す。次に、カートリッジを 37 で 3 分間インキュベートする。次に、キャピラリーピペットを用いて、ウェル D の 40  $\mu$ L の内容物をウェル C に移す。次に、ウェル C の内容物を用いて、ヘマトクリット値を実施例 2 のように測定する。キャピラリーピペットを用いて、ウェル A の 60  $\mu$ L の内容物をウェル C に移し、カートリッジを 37 で 1 分間インキュベートする。ウェル C の内容物（選択的に、続いてウェル D 及び / 又は E の残りの内容物）を先端に膜が付いたピペットで引き込み、膜の外側に保持された金コロイドを実施例 2 のように測定する。較正を実施例 2 のように行う。

【実施例 5】

【0066】

#### 図 3 におけるアッセイカートリッジ

#### ウェル A

実施例 1 と同様。

#### ウェル B

実施例 1 と同様。

#### ウェル C

このウェルは、20  $\mu$ g 微粒子（S - アデノシル - システインを結合した 1  $\mu$ m のラテックス粒子）又は 160  $\mu$ g 微粒子（S - アデノシル - システインを結合した 2  $\mu$ m のラテックス粒子）、75  $\mu$ g メルチオレート（チメロサル）、及び 750  $\mu$ g トリトン X - 100 を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

#### ウェル D

このウェルは、0.27  $\mu$ g アデノシン、5 ユニットの組換え SAH - ヒドロラーゼ、及び 23  $\mu$ g TCEP : HCl を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

#### ウェル E

このウェルは、350  $\mu$ L の緩衝剤（10 mM リン酸塩、150 mM NaCl、pH 7.4、又は、25 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8.1）を含む。

【実施例 6】

【0067】

#### 図 3 / 実施例 5 におけるアッセイの実施

キャピラリーピペット中の血液試料（5 ~ 10  $\mu$ L）を、ウェル E から 175  $\mu$ L の緩衝剤を引き込むことによって希釈し、ウェル D に排出する。次に、キャピラリーピペットを用いて 80  $\mu$ L の緩衝剤をウェル E からウェル A に移す。次に、カートリッジを 37 で 3 分間インキュベートする。次に、キャピラリーピペットを用いてウェル D の 75  $\mu$ L

10

20

30

40

50

の内容物をウェルCに移す。次に、ウェルCの内容物を用いて、ヘマトクリット値を実施例2のように測定する。次に、キャピラリーピペットを用いてウェルAの50 $\mu$ Lの内容物をウェルCに移す。次に、カートリッジを37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートする。次に、ウェルCの内容物（選択的に、続いてウェルEの内容物）を先端に膜が付いたピペット内に引き込み、次に、膜の外側に保持された金コロイドを実施例2のように測定する。較正を実施例2のように行う。

【実施例7】

【0068】

図4におけるアッセイカートリッジ

ウェルA

実施例3と同様。

ウェルB

実施例1と同様。

ウェルC

このウェルの内容物は、4.5 $\mu$ g/mL アデノシン、330 $\mu$ g/mL 微粒子（S-アデノシール-システインを結合した1 $\mu$ mのラテックス粒子）又は2.7mg/mL（S-アデノシル-システインを結合した2 $\mu$ mのラテックス粒子）、80U/mL 組換えSAH-ヒドロラーゼ、及び380 $\mu$ g/mL TCEP:HClを含有する60 $\mu$ Lの水性組成物である。

ウェルD

このウェルは、0.4%メルチオレート（チメロサル）及び2%トリトンX-100を含有する225 $\mu$ Lの緩衝剤（10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1）を含む。

ウェルE

このウェルは、285 $\mu$ Lの緩衝剤（10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1）を含む。

【実施例8】

【0069】

図4/実施例7におけるアッセイの実施

キャピラリーピペット中の血液試料（5~10 $\mu$ L）を、ウェルEから100 $\mu$ Lの緩衝剤を引き込むことによって希釈し、ウェルCに排出する。次に、キャピラリーピペットを用いて85 $\mu$ Lの緩衝剤をウェルE（ウェルD）からウェルAに移す。次に、カートリッジを37 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートする。次に、40 $\mu$ LのウェルDの内容物をウェルCに移し、次いで、ヘマトクリットを実施例2のように測定する。次に、キャピラリーピペットを用いてウェルAの60 $\mu$ Lの内容物をウェルCに移し、カートリッジを37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートする。次に、ウェルCの内容物（選択的に、続いてウェルD及び/又はEの内容物）を先端に膜が付いたピペット内に引き込み、次に、膜の外側に保持された金コロイドを実施例2のように測定する。較正を実施例2のように行う。

【実施例9】

【0070】

図5におけるアッセイカートリッジ

ウェルA

このウェルは、カートリッジ1内に配置されるとき先端にキャピラリーが付いたピペット10の先端から過剰な試料を除去するように作用する吸着ワイパー15を含む。ピペット10の本体内にビーズ16及び17を含む試薬が配置される。ビーズ16は、65 $\mu$ gのTCEPとともに約5ユニットのrSAHアーゼを含む。ビーズ17は、40 $\mu$ gのMgCl<sub>2</sub>とともに約0.1ユニットのヌクレアーゼ（例えば、Merckからのベンゾナーゼ）を含む。両ビーズもまた、バインダーとしてトレハロースを含む。

ウェルB

このウェルは、ピペットの本体内に120 $\mu$ g N-エチル-マレイミドを含む試薬含有

10

20

30

40

50

ビーズ18を含むこと以外は実施例1に記載されたとおりである。

#### ウェルC

このウェルは、2つの試薬含有ビーズ19及び20を含む。ビーズ19は、実施例1においてウェルAについて記載された約100 $\mu$ gの金複合体を含む。ビーズ20は、0.12 $\mu$ gの微粒子(実施例1においてウェルDについて記載されたS-アデノシル-システインを結合した1~2 $\mu$ m、好ましくは1.6 $\mu$ mのラテックス粒子)を含む。

#### ウェルD

このウェルは、200 $\mu$ Lの緩衝剤(10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1)中に0.27 $\mu$ gアデノシンを含む。

#### ウェルE

このウェルは、ウェルDの緩衝剤中に300 $\mu$ Lの0.4重量%SDSを含む。

#### 【実施例10】

#### 【0071】

#### 図5/実施例9におけるアッセイの実施

ウェルAにおいて示されるキャピラリー中4.5 $\mu$ Lの血液試料(3~10 $\mu$ L)とともに200 $\mu$ Lの緩衝剤(125~300 $\mu$ L)をウェルDから先端にキャピラリーが付いたピペット内に引き込み、ビーズ16及び17を溶解させる。内容物をウェルDに流し戻し、37で1分間(3分まで)インキュベートする。

#### 【0072】

このインキュベーション中、200 $\mu$ Lの界面活性剤溶液(125~300 $\mu$ L)をウェルEから先端に膜が付いたピペット内に引き込み、ビーズ18を溶解させる。次に、内容物をウェルEに流し戻す。

#### 【0073】

次いで、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて100 $\mu$ Lの界面活性剤及び阻害剤溶液(25~200 $\mu$ L)をウェルEからウェルDに移す。赤血球溶解後、ヘマトクリットを実施例2のようにウェルD内で測定する。

#### 【0074】

次に、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いてウェルD内の200 $\mu$ Lの混合物(150~275 $\mu$ L)をウェルDからウェルCに移し、ビーズ19及び20を溶解させ、混合物を1分間(3分まで)インキュベートする。

#### 【0075】

次に、ウェルCの全内容物、及び、選択的に、続いてウェルE内の残りの緩衝剤を、先端に膜が付いたピペット内に引き込む。膜の外側に保持された(2回目のインキュベーションで形成された金/ラテックス複合体に対応する)金コロイドを、緑色又は青色ダイオード照射を用いて反射モードで検出する。

#### 【0076】

アッセイを、HCy含有量が既知の標準物質を用いて校正し、同様に、ヘマトクリットの測定(例えば、一連の血液試料についての遠心分離を利用したマトクリット測定)も標準物質に対して校正する。

#### 【0077】

ブラケット内の体積又は量の範囲は、移される量に対して自由に限定される。しかし、正確にアッセイ及び校正を実施するためには、これらの範囲内の所定値を用いるべきである。

#### 【実施例11】

#### 【0078】

#### 図6におけるアッセイカートリッジ

#### ウェルA

ビーズ17を省略すること以外は実施例9に記載されたとおりである。

#### ウェルB

10

20

30

40

50

実施例 9 に記載されたとおりである。

#### ウェル C

実施例 9 に記載されたとおりである。

#### ウェル D

0.1 ユニットのヌクレアーゼ（実施例 9 のウェル A の記載と同様）及び 40  $\mu\text{g Mg Cl}_2$  を含むこと以外は実施例 9 に記載されたとおりである。

#### ウェル E

実施例 9 に記載されたとおりである。

【実施例 12】

【0079】

図 6 / 実施例 11 におけるアッセイの実施

アッセイの工程は、実施例 10 に記載されたとおりに実施される。

【実施例 13】

【0080】

図 7 におけるアッセイのカートリッジ

#### ウェル A

先端にキャピラリーが付いたピペット及びその内部のビーズ（16）は、実施例 11 に記載されたとおりである。ウェルのベースは、80 ~ 200  $\mu\text{g}$ （例えば、120  $\mu\text{g}$ ）の N-エチル-マレイミドを含有する乾燥阻害剤組成物を含む（実施例 1 に記載された）挿入物を含む。

#### ウェル B

実施例 1 に記載されたとおりである。

#### ウェル C

実施例 9 に記載されたとおりである。

#### ウェル D

実施例 11 に記載されたとおりである。

#### ウェル E

実施例 9 に記載されたとおりである。

【実施例 14】

【0081】

図 7 / 実施例 13 におけるアッセイの実施

試料、酵素、及び還元剤をウェル D に移し、そこで実施例 10 のようにインキュベートする。

【0082】

このインキュベーション中、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて 50  $\mu\text{L}$  の界面活性剤溶液（40 ~ 100  $\mu\text{L}$ ）をウェル E からウェル A に移す。次に、この混合物をウェル E に戻す。

【0083】

次に、界面活性剤及び阻害剤を実施例 10 のようにウェル D に移し、実施例 10 のようにアッセイを続ける。

【実施例 15】

【0084】

試薬ビーズ

実施例 9 から 14 で用いられるビーズを以下のように調製する。

【0085】

一又は複数の試薬、トレハロース、ポリエチレングリコール（PEG）、25 mM トリス緩衝剤中のウシ血清アルブミン（BSA）、150 mM NaCl、pH 7.5 の水溶液を、ピペットを用いて冷えた（-50 より低い）金属プレートに滴下する。凍結した液滴を凍結乾燥させ、15 重量%トレハロース、0.5 重量%PEG、及び 0.1 重量%BSA を含有するビーズを得る。液滴のサイズは、5 ~ 100  $\mu\text{L}$  が都合よく、10 ~ 5

10

20

30

40

50

0 μL が好ましい。あるいは、溶液を液体窒素に滴状添加して、その後、凍結した液滴を収集して凍結乾燥させてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】図1は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図2】図2は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図3】図3は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図4】図4は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図5】図5は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図6】図6は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図7】図7は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図8A】図8Aは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8B】図8Bは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8C】図8Cは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8D】図8Dは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8E】図8Eは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8F】図8Fは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8G】図8Gは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8H】図8Hは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8I】図8Iは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8J】図8Jは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8K】図8Kは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8L】図8Lは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8M】図8Mは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8N】図8Nは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8O】図8Oは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図8P】図8Pは、図1に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

10

20

30

40

50

【図 8 Q】図 8 Q は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 R】図 8 R は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 S】図 8 S は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 T】図 8 T は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

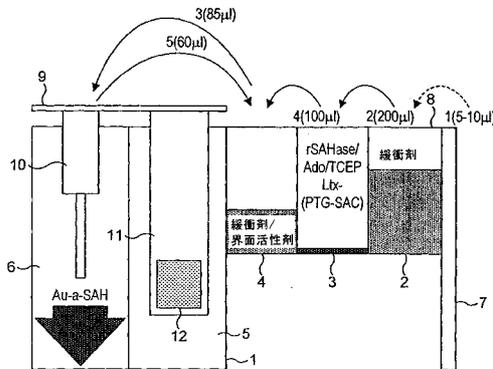
【図 8 U】図 8 U は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 V】図 8 V は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

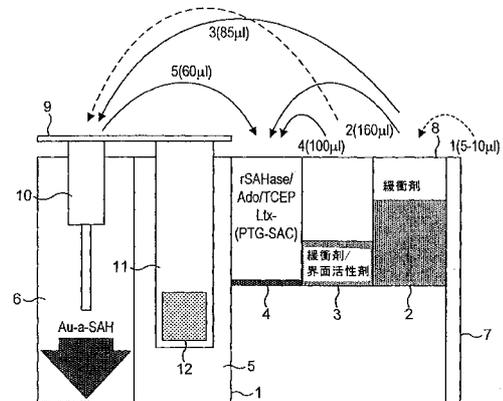
【図 8 W】図 8 W は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 X】図 8 X は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

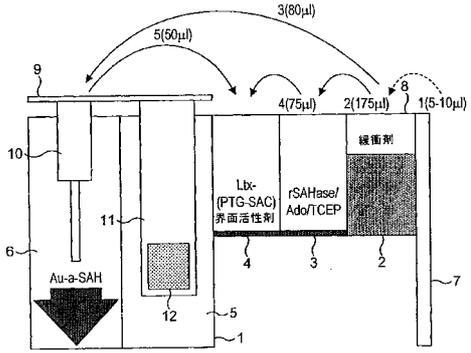
【 図 1 】



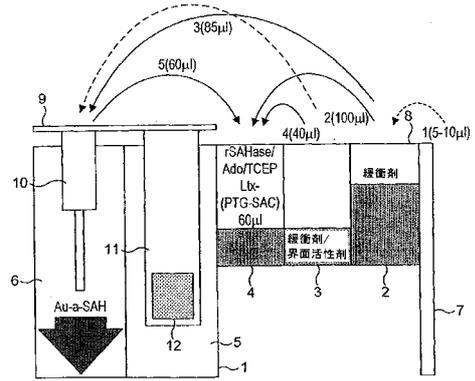
【 図 2 】



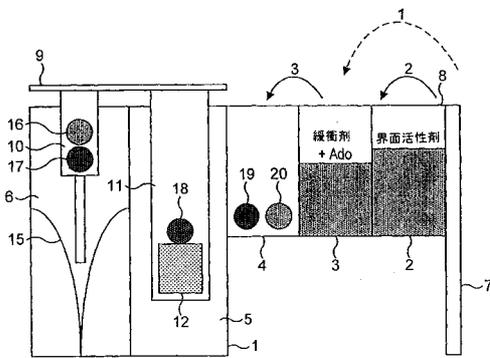
【 図 3 】



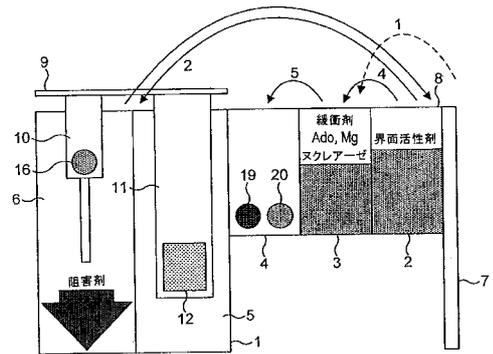
【 図 4 】



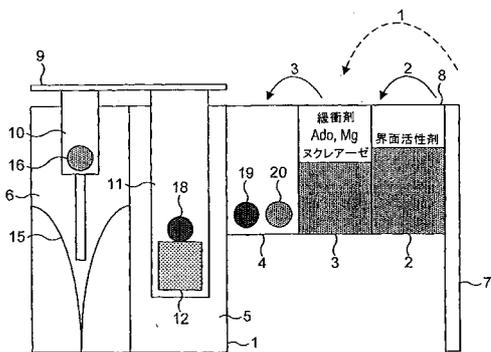
【 図 5 】



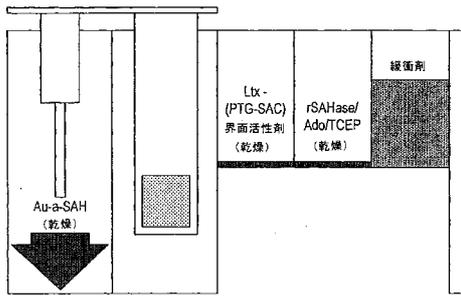
【 図 7 】



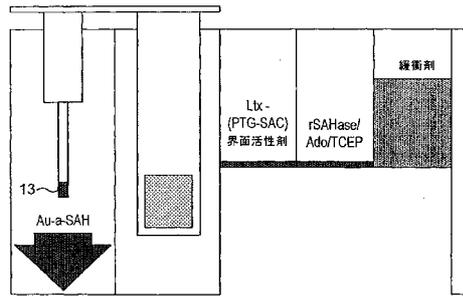
【 図 6 】



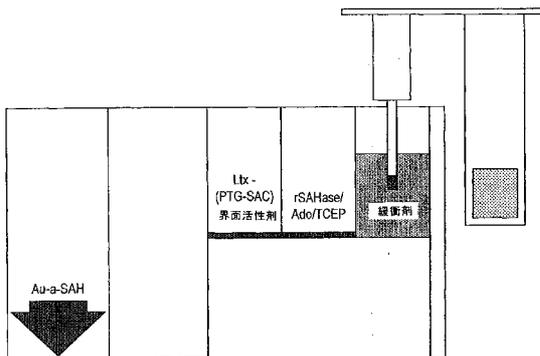
【 図 8 A 】



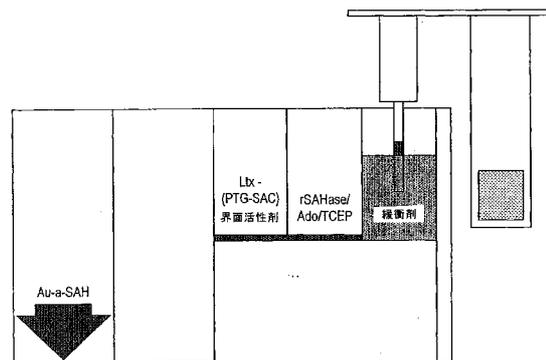
【 図 8 B 】



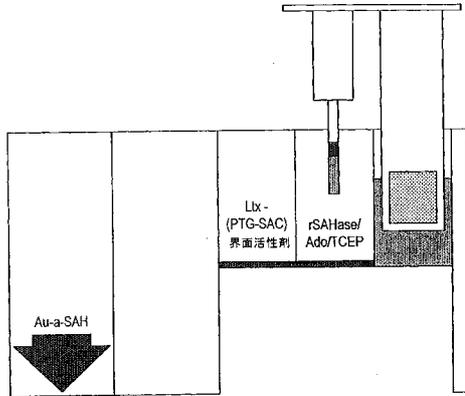
【 図 8 C 】



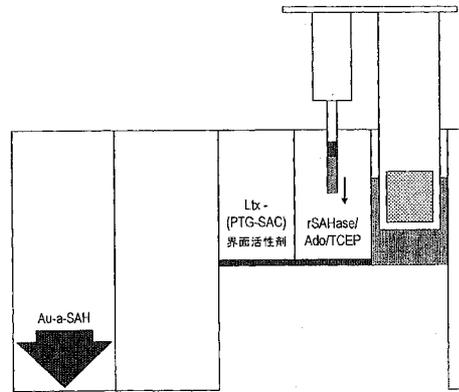
【 図 8 D 】



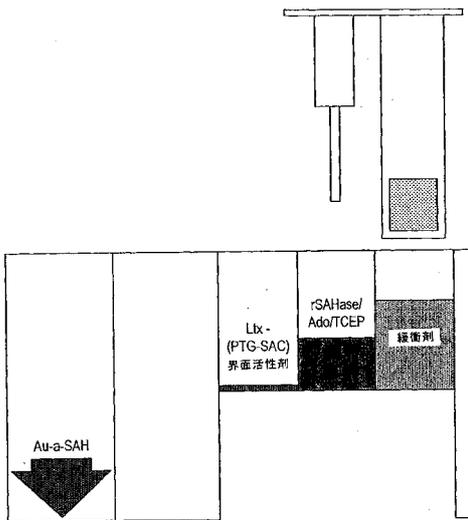
【 図 8 E 】



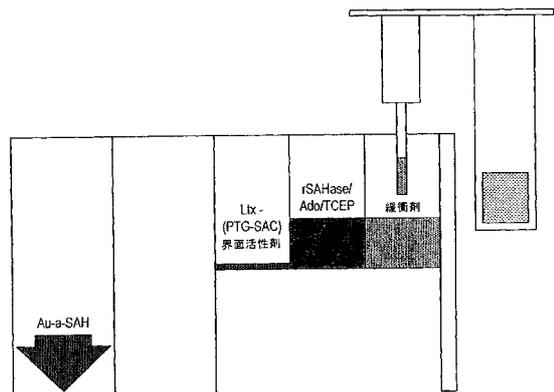
【 図 8 F 】



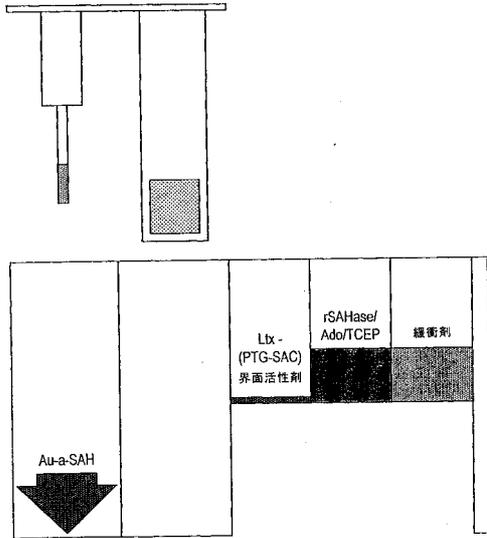
【 図 8 G 】



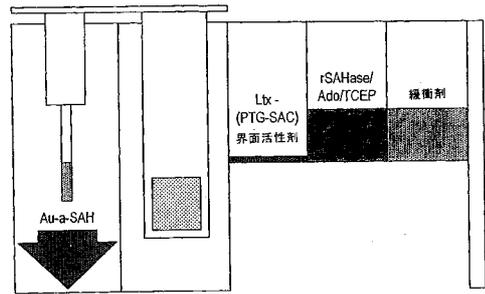
【 図 8 H 】



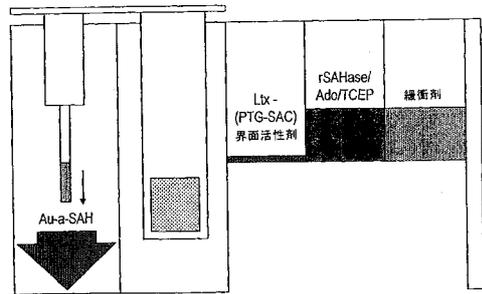
【 図 8 I 】



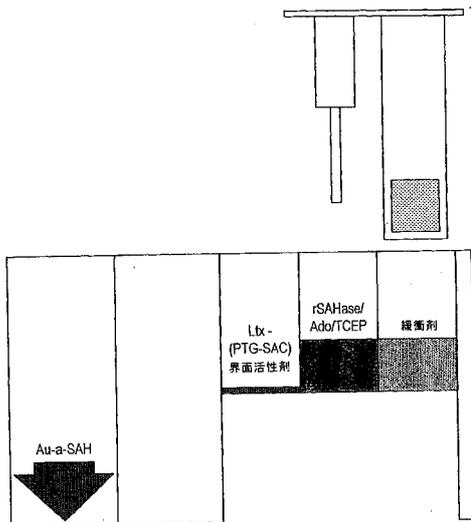
【 図 8 J 】



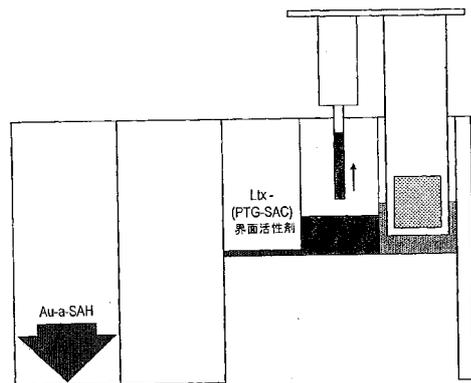
【 図 8 K 】



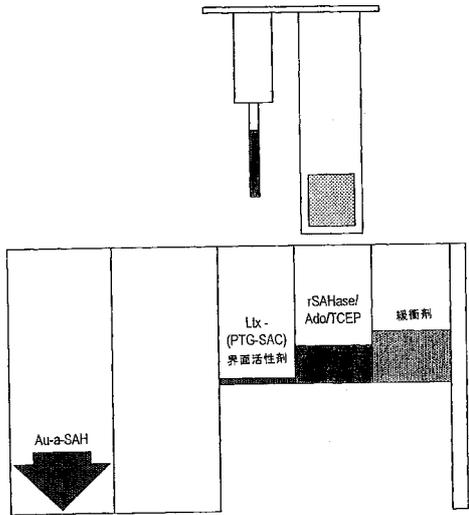
【 図 8 L 】



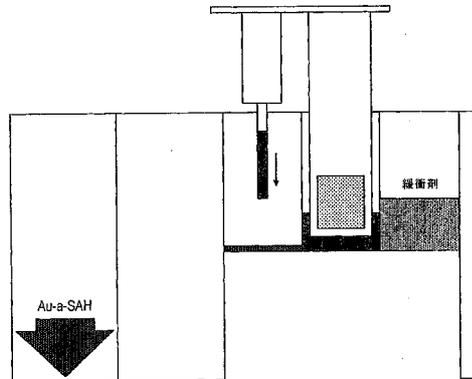
【 図 8 M 】



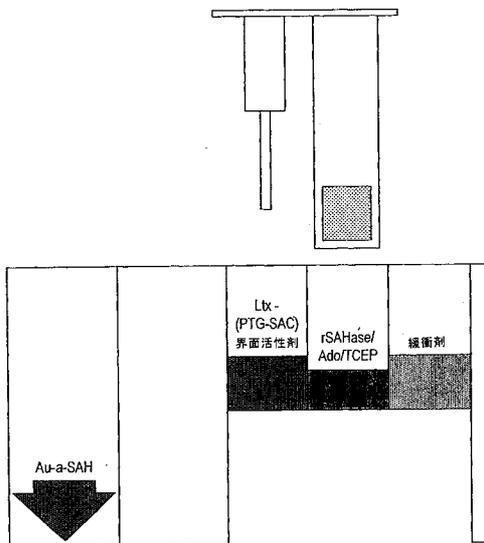
【 図 8 N 】



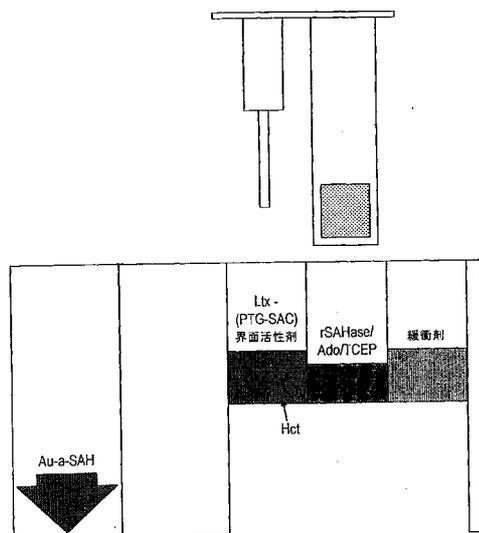
【 図 8 O 】



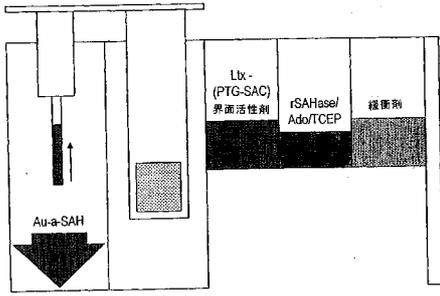
【 図 8 P 】



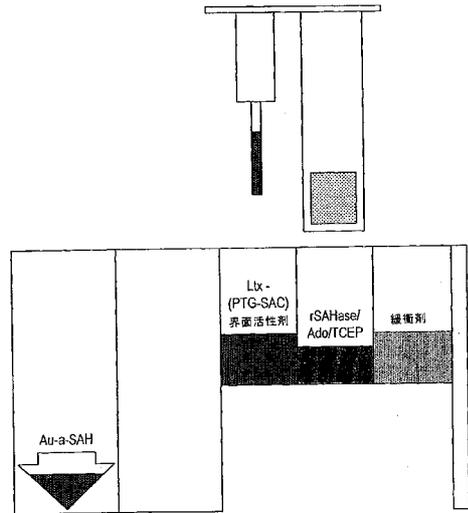
【 図 8 Q 】



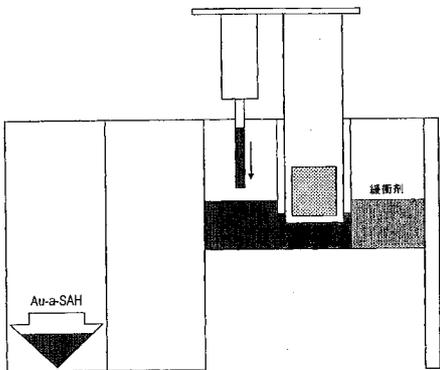
【 図 8 R 】



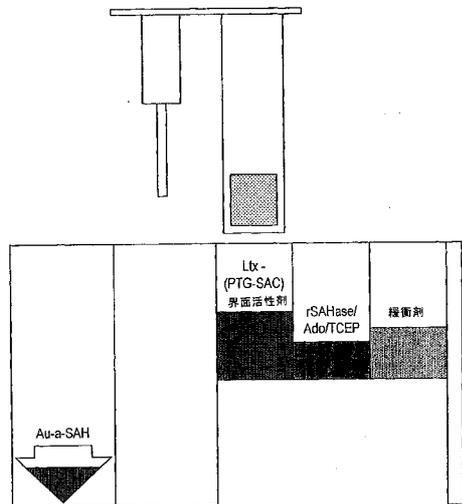
【 図 8 S 】



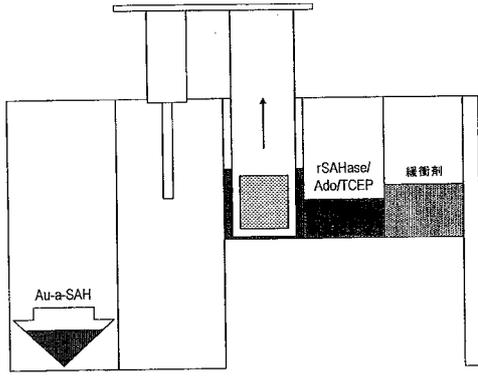
【 図 8 T 】



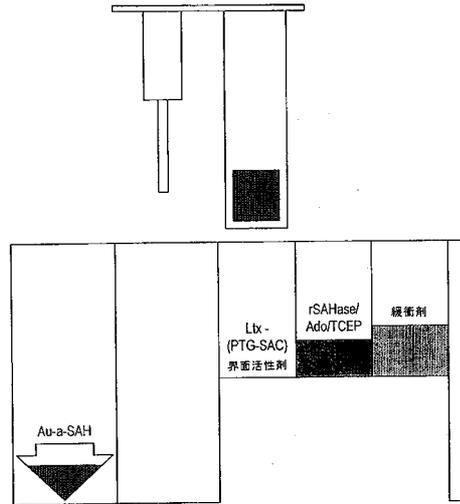
【 図 8 U 】



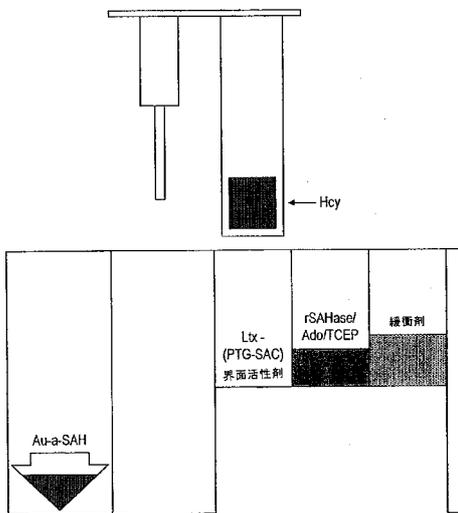
【 図 8 V 】



【 図 8 W 】



【 図 8 X 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/GB2006/000638
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/52 G01N33/543 G01N35/10 B01L3/00		
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) G01N B01L 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2001/039057 A1 (DOUGLAS JOEL S ET AL) 8 November 2001 (2001-11-08) abstract paragraphs [0088], [0098], [0099]	10
X	US 2002/125145 A1 (OHARA TIMOTHY ET AL) 12 September 2002 (2002-09-12) abstract ----- -/--	10
<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 combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  23 May 2006		Date of mailing of the international search report  12/06/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Boiangiu, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2006/000638

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRANTZEN F ET AL: "Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US, vol. 44, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 311-316, XP002135758 ISSN: 0009-9147 page 311, left-hand column, paragraph 1 page 311, right-hand column, paragraph 2 - page 313, left-hand column, paragraph 1 page 314, right-hand column, paragraph 3 page 316, right-hand column, paragraph 4	1-9
Y	US 6 096 563 A (HAJIZADEH ET AL) 1 August 2000 (2000-08-01) abstract column 4, line 60 - column 5, line 24 column 6, lines 28-34,40-51 column 6, line 66 - column 7, line 2 column 8, lines 14-46,60-63 column 9, lines 5-25 column 10, lines 16-27,45-47 column 12, lines 5-9 column 13, lines 34-36 column 17, lines 23-53 claim 1	1-4
Y	US 2004/161368 A1 (HOLTLUND JOSTEIN ET AL) 19 August 2004 (2004-08-19) abstract paragraphs [0017], [0019], [0021], [0123], [0159], [0165]; claims 1,33,35,43,45,47; examples 1,10,11	5-9,11
Y	US 6 649 419 B1 (ANDERSON N. LEIGH) 18 November 2003 (2003-11-18) abstract column 1, lines 5-12 column 3, lines 45-51 column 4, lines 44-48 column 8, lines 12-16 column 13, lines 1-12 column 19, lines 38-43 column 28, lines 8,9 column 29, lines 49-62 claim 11	11

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/000638

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRICK BARBARA ET AL: "Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC." CLINICA CHIMICA ACTA; INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY. MAY 2003, vol. 331, no. 1-2, May 2003 (2003-05), pages 19-23, XP002381939 ISSN: 0009-8981 abstract  -----	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/000638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001039057	A1	08-11-2001	NONE
US 2002125145	A1	12-09-2002	AT 313794 T 15-01-2006 AU 783311 B2 13-10-2005 AU 3297401 A 14-08-2001 CA 2398203 A1 09-08-2001 CN 1394280 A 29-01-2003 CZ 20021298 A3 14-05-2003 DK 1252514 T3 01-05-2006 EP 1252514 A2 30-10-2002 IL 149662 A 25-07-2005 JP 2003521708 T 15-07-2003 MX PA02005797 A 14-10-2003 PL 358492 A1 09-08-2004 TW 520439 B 11-02-2003 WO 0157510 A2 09-08-2001 US 6475372 B1 05-11-2002
US 6096563	A	01-08-2000	NONE
US 2004161368	A1	19-08-2004	BR 0209540 A 09-03-2004 CA 2445914 A1 14-11-2002 CN 1526074 A 01-09-2004 CZ 20033357 A3 12-05-2004 EP 1390760 A2 25-02-2004 WO 02090995 A2 14-11-2002 HR 20031022 A2 31-10-2005 HU 0303809 A2 01-03-2004 JP 2004531725 T 14-10-2004 MX PA03010209 A 16-03-2004 NZ 529715 A 23-12-2005 PL 366522 A1 07-02-2005 SK 14992003 A3 08-06-2004
US 6649419	B1	18-11-2003	AU 3393802 A 11-06-2002 JP 2003010647 A 14-01-2003 WO 0244327 A2 06-06-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/49 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/49	B
<b>G 0 1 N 35/10 (2006.01)</b>	G 0 1 N	35/06	A
<b>G 0 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/48	B
<b>C 1 2 Q 1/25 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/25	

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

(72) 発明者 ノードハイ、アーン、クリスティアン

ノールウェー エヌ - 0 5 1 0 オスロ 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

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA13 BB02 BB04 BB42 CA25 DA35 FA14 FB03 FB11  
GA05 GA06 GC11 HA06 HB03 JA07  
2G058 BA07 CA01 CC01 EA07 ED01 ED12 GA01 HA01  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ80 QR01 QR14 QR42 QR64 QR66 QR83  
QS28 QS36 QX01

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008532006A</a>	公开(公告)日	2008-08-14
申请号	JP2007556660	申请日	2006-02-23
[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 ファーレンアーンルードヴィッグ ノードハイアーンクリスティアン		
发明人	フランツェン、フランク ファーレン、アーン、ルードヴィッグ ノードハイ、アーン、クリスティアン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/72 G01N33/49 G01N35/10 G01N33/48 C12Q1/25 B01L3/00 B01L3/02 G01N33/68 G01N35/02		
CPC分类号	G01N33/6815 B01L3/021 B01L3/502 B01L2200/10 B01L2300/0681 G01N35/026 G01N35/1016 G01N35/1079 G01N2035/1032 G01N2035/1039		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/531.B G01N33/543.541.Z G01N33/553 G01N33/72.A G01N33/49.B G01N35/06. A G01N33/48.B C12Q1/25		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BA13 2G045/BB02 2G045/BB04 2G045/BB42 2G045/CA25 2G045/DA35 2G045 /FA14 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GA05 2G045/GA06 2G045/GC11 2G045/HA06 2G045/HB03 2G045/JA07 2G058/BA07 2G058/CA01 2G058/CC01 2G058/EA07 2G058/ED01 2G058/ED12 2G058 /GA01 2G058/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ80 4B063/QR01 4B063/QR14 4B063/QR42 4B063/QR64 4B063/QR66 4B063/QR83 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01		
优先权	2005003836 2005-02-24 GB		
其他公开文献	JP4820827B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了基于盒的同型半胱氨酸的自动化测定。点域1

