

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年12月27日 (2012.12.27)

【公表番号】特表2012-517816(P2012-517816A)

【公表日】平成24年8月9日 (2012.8.9)

【年通号数】公開・登録公報2012-031

【出願番号】特願2011-550531(P2011-550531)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/32 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/32 Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月7日 (2012.11.7)

【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】

a) 分析物を含む試料を

i) 分析物に特異的な、変異された脱水素酵素および

ii) 人工の補酵素

を含む乾式試薬層を含んでなる診断素子に接触させる工程、ならびに、

b) 分析物の存在または / および量を測定する工程

を含んでなる、分析物を測定するための方法。

【請求項 2】

前記診断素子中の分析物の代謝回転速度が、人工の補酵素の代わりに対応する野生型補酵素を含んでなる、対応する診断素子中の分析物の代謝回転速度と同等かまたはより速く、とりわけ、少なくとも 20 % 速いことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

対応する野生型脱水素酵素と比較して低下した比酵素活性を有する、変異された脱水素酵素を使用することを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記変異された脱水素酵素として、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD / NADH) 依存性またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP / NADPH) 依存性の変異された脱水素酵素を使用することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記変異された脱水素酵素として、変異されたグルコース脱水素酵素 (EC 1.1.1.47) を使用することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記変異されたグルコース脱水素酵素が、対応する野生型グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列の 170 位または / および 252 位に変異を、とりわけ、170 位および 252 位に変異を含むことを特徴とする請求項 5 記載の方法であって、

170 位における変異が、好ましくは、グルタミン酸のアルギニンもしくはリジンによるアミノ酸置換、とりわけ、リジンによるアミノ酸置換を含み、または / および、252 位における変異が、好ましくは、リジンのロイシンによるアミノ酸置換を含む方法。

## 【請求項 7】

前記変異されたグルコース脱水素酵素が、バチルス メガテリウム、バチルス ズブチルスまたはバチルス チューリングエンシス由来、とりわけ、バチルス ズブチルス由来の野生型グルコース脱水素酵素の変異により得られるグルコース脱水素酵素であることを特徴とする請求項 5 または 6 記載の方法。

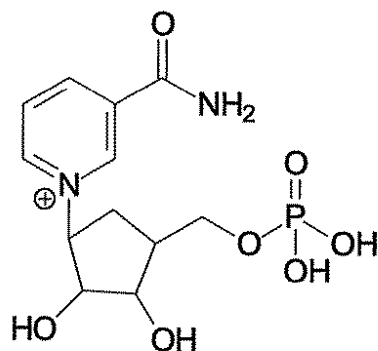
## 【請求項 8】

前記変異されたグルコース脱水素酵素が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記人工の補酵素として、人工のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD / NADH) 化合物、人工のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP / NADPH) 化合物または式 (I) の化合物

## 【化 1】



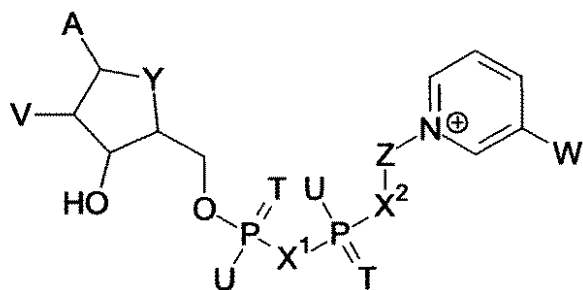
(I)

を使用することを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記人工の補酵素として、一般式 (II) の化合物またはその塩、または必要に応じてそれらの還元型

## 【化 2】



(II)

(式中、

A = アデニンまたはその類似体、

T = それぞれ独立して O、S、

U = それぞれ独立して OH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、 $\text{BCNH}_2^-$ 、

V = それぞれ独立して OH またはリン酸基、または 2 つの基が環状リン酸エステル基を形成する、

W =  $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、 $\text{CSN}(\text{R})_2$ 、R = それぞれ独立して H または

$C_1 \sim C_2$  - アルキル、

$X^1$ 、 $X^2$  = それぞれ独立して O、 $CH_2$ 、 $CHCH_3$ 、 $C(CH_3)_2$ 、NH、 $NCH_3$ 、

$Y = NH$ 、S、O、 $CH_2$ 、

Z = 直鎖状または環状有機残基であって、

ただし Z およびピリジン残基は、グリコシル結合により連結されない)

を使用することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記人工の補酵素として、carbaNAD を使用することを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記診断素子として、テストテープ、テストディスク、テストパッド、テストストリップまたはテストストリップドラムを使用することを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記分析物の存在または / および量を、光度計測的または蛍光計測的に測定することを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

分析物を測定するための診断素子であって、

(a) 分析物に特異的な、変異された脱水素酵素、および

(b) 人工の補酵素

を含有する乾式試薬層を含んでなる診断素子。

【請求項 15】

前記変異されたグルコース脱水素酵素が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 14 記載の診断素子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

170 位または / および 252 位における変異は、基本的には、安定化、たとえば野生型脱水素酵素の熱または / および加水分解安定性の増大をもたらすような、あらゆるアミノ酸置換を含み得る。170 位での変異は、好ましくは、グルタミン酸のアルギニンまたはリジンによるアミノ酸置換、特に好ましくは、グルタミン酸のリジンによるアミノ酸置換を含み、一方、252 位に関しては、リジンのロイシンによるアミノ酸置換が好ましい。