

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6313407号  
(P6313407)

(45) 発行日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)

(24) 登録日 平成30年3月30日 (2018. 3. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/32 (2006. 01)

G O 1 N 27/416 (2006. 01)

C 1 2 N 9/04 (2006. 01)

C O 7 H 19/207 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/32

G O 1 N 27/416 3 3 8

G O 1 N 27/416 3 3 6 G

C 1 2 N 9/04 D

C O 7 H 19/207

請求項の数 8 外国語出願 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2016-232405 (P2016-232405)  
 (22) 出願日 平成28年11月30日 (2016. 11. 30)  
 (62) 分割の表示 特願2015-540118 (P2015-540118)  
                   の分割  
           原出願日 平成25年10月31日 (2013. 10. 31)  
 (65) 公開番号 特開2017-104101 (P2017-104101A)  
 (43) 公開日 平成29年6月15日 (2017. 6. 15)  
           審査請求日 平成28年12月7日 (2016. 12. 7)  
 (31) 優先権主張番号 13/667, 057  
 (32) 優先日 平成24年11月2日 (2012. 11. 2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591003013  
                   エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
                   F. HOFFMANN-LA ROCH  
                   E AKTIENGESELLSCHAFT  
                   スイス・シーエイチー4070バーゼル・  
                   グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100099759  
                   弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
                   弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
                   弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
                   弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試薬材料および関連検査素子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のグルコース値とケトン値とを電気化学的に測定するように構成された検査素子を設ける工程；

前記検査素子に該試料を接触させる工程、

ここで、前記検査素子は、

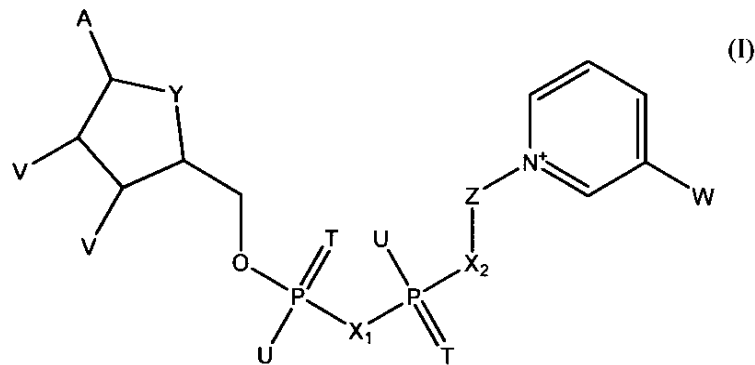
ケトン値を決定するためのヒドロキシ酪酸脱水素酵素と、チオNAD、チオNADP、及び式(Ⅰ)の化合物からなる群から選択される少なくとも1つの第1試薬材料補酵素を含み、前記検査素子の第1の電極系に関連する第1試薬材料と、

グルコース値を決定するためのグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼと、FAD、NAD、NADP、チオNAD、チオNADP、及び式(Ⅰ)の前記化合物からなる群から選択される少なくとも1つの第2試薬材料補酵素とを含み、前記検査素子の第2の電極系に関連する第2試薬材料、

を含み、

ここで、式(Ⅰ)の前記化合物は、以下の通りである：

## 【化 1】



10

[ 式中、

A は、アデニン又はその類似体を表わし、

T は、各場合に独立して O 又は S を表わし、

U は、各場合に独立して OH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は  $\text{BCNH}_2^-$  を表わし、

V は、各場合に独立して OH 又はリン酸基を表わし、

W は、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は  $\text{CSN}(\text{R})_2$  を表わし、ここで、R は 20  
各場合に独立して H 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$  アルキルを表わし、

$\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$  は、各場合に独立して O、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は  $\text{NCH}_3$  を表わし、

Y は、NH、S、O、又は  $\text{CH}_2$  を表わし、

Z は、O、S 及び N から選択されるヘテロ原子を任意に含み、1 つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基  $\text{CR}_{4_2}$  を含む、5 個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし（ここで、 $\text{CR}_{4_2}$  は前記環状基と  $\text{X}_2$  に結合している）、

ここで、 $\text{R}_{4_2}$  は、各場合に独立して H、F、Cl、又は  $\text{CH}_3$  を表わすが、但し、Z とピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]、

又は、その塩もしくは任意にその還元型；

30

前記第 1 の電極系と第 2 の電極系に電圧を印加し、該電圧に対する応答を計測する工程；並びに、

該検査素子に試料を接触後 7 . 5 秒以内に試料中のグルコース値とケトン値とを前記計測した応答値より測定する工程；

を含む、試料中のグルコース値とケトン値とを測定する方法。

## 【請求項 2】

前記試料中のグルコース値とケトン値とを測定する工程が、検査素子に試料を接触後 5 秒以内に完了する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記測定工程中に、グルコース値とケトン値は、互いに 2 秒以内に測定される、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 4】

前記試料が血液を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

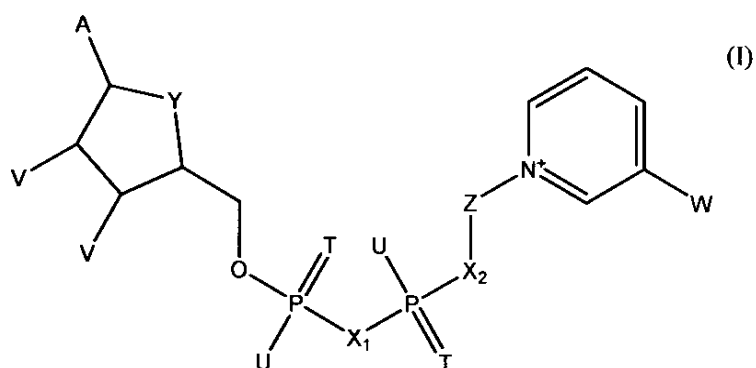
前記ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は 3 - ヒドロキシ酪酸脱水素酵素である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの第 1 試薬材料補酵素および前記少なくとも 1 つの第 2 試薬材料補酵素は、式 ( I )：

50

## 【化 2】



10

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、各場合に OH を表わし、

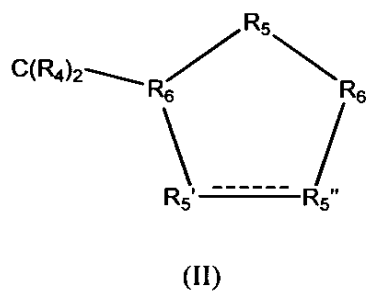
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 3】



30

( 式中、 $\text{R}5'$  と  $\text{R}5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R}4$  は、H を表わし、 $\text{R}5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5$  は、 $\text{CR}4_2$  を表わし、 $\text{R}6$  は、CH を表わし、そして

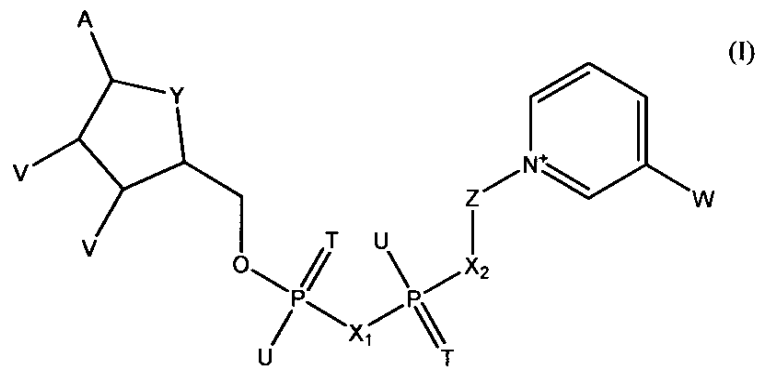
$\text{R}6'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの第 1 試薬材料補酵素および前記少なくとも 1 つの第 2 試薬材料補酵素は、式 ( I ) :

## 【化 4】



10

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、第 1 の場合に OH を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし

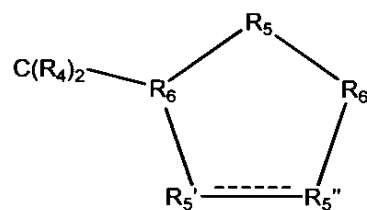
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 5】



30

( 式中、 $\text{R}5'$  と  $\text{R}5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R}4$  は、H を表わし、 $\text{R}5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5$  は、 $\text{CR}4_2$  を表わし、 $\text{R}6$  は、CH を表わし、そして

$\text{R}6'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

前記第 1 試薬材料が、ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン化合物と塩化ヘキサアミルテニウムとの組み合わせからなる群より選択される 1 つのメディエーターをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、試薬材料および関連検査素子に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

検査試料中の選択分析物の存在及び／又は濃度を測定するための、使い捨て検査素子の使用は一般的になっている。例えば、糖尿病及び同様の病状を患っている患者は、しばしば自身の血中グルコースレベルを監視する血中グルコースの自己モニタリングを行っている。血中グルコースレベルを監視する目的は、その濃度レベルを決定することと、そして、そのレベルが高すぎるか又は低すぎる場合に、必要であれば正常レベルに戻す対策をとり、そのレベルを許容範囲内に戻すためである。正常レベルに戻せないと、医学的に深刻な結果を招くこともある。グルコースのモニタリングは、糖尿病患者にとって日常的に行うことであり、かかるモニタリングの正確性が文字通り生死の差につながることもある。血中グルコースを許容レベルに定期的に維持できないことは、心臓血管疾患、腎臓病、神経損傷及び失明を含む深刻な糖尿病関連の合併症をもたらすことがある。

10

## 【 0 0 0 3 】

集中的に血中グルコースを管理している糖尿病患者は、長期的な利点がある。「糖尿病コントロールと合併症試験 (Diabetes Control and Complications Trial) (DCC T)」は、1983年から1993年に、国立糖尿病、消化器、腎臓疾患研究所 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) (NIDDK) で実施された臨床研究である。DCC Tでは、集中治療を従来の治療法と比較した。集中的に治療をしている患者は、1日に少なくとも3回のインスリン注射か又はインスリンポンプを用い、そして血中グルコースレベルを頻繁に自己モニタリングすることにより、グルコースレベルをできるだけ正常に近く維持した。集中的な治療により、ヘモグロビン A 1 c (Hb A 1 c) を、できるだけ正常に近く維持することを目指した。Hb A 1 c は、2～3ヶ月の期間にわたる平均血中グルコースを反映する。従来の治療法は、1日1回又は2回のインスリン注射と、1日1回の尿又は血液グルコース検査からなる。DCC T試験の結果により、血中グルコースレベルをできるだけ正常に近く維持することが、糖尿病によって引き起こされる眼、腎臓、神経疾患の発症及び進行を遅らせることが証明された。実際、たとえ過去に血糖管理がうまくできなかった人でも、血中グルコースの持続的に低下させるのに有用であることが示された。

20

30

## 【 0 0 0 4 】

個人が少量の血液試料でグルコースレベルを検査することを可能にする多くの分析装置又はバイオセンサー (例えばグルコース測定器) が、現在利用可能である。現在利用可能な測定器の多くは、測定器と組合せて、血液試料中のグルコースの量を電気化学的に又は光学的に測定する使い捨て検査素子を利用する設計である。現在のグルコース測定器では、血中グルコース測定が成功した結果として表示される情報は、典型的にはmg/dL又はミリモル単位の各血中グルコース値、そしておそらく測定が行われた時間と日付である。この情報は、炭水化物の計画されたか又は既知の摂取量、又は計画されたか又は既知の活動、及び他の状況又は個々の要因と組み合わせて、多くの場合、糖尿病患者がその食物摂取量及び／又は注射すべきインスリン即時用量を調整又は導き出して、短期的な血中グルコース値の管理を可能にする。また低グルコース値の場合には、糖尿病患者は、低血糖を避けるために、糖を摂取する必要があることを検出することができる。

40

## 【 0 0 0 5 】

インスリンの欠如又はインスリン量の不足は、体が、グルコースを燃料源として使用してエネルギーを作り出すことを妨害する。これが発生すると、体は脂肪酸を分解してエネルギーを作り出し、これがケトン副生成物を与え、ケトンレベルを上昇させる。糖尿病患者におけるケトンレベルの上昇は、心臓発作、脳卒中、快楽薬物使用、又は併発疾患、例えば肺炎、インフルエンザ、胃腸炎、又は泌尿器感染症によっても引き起こされ得る。糖尿病患者における過度のケトンレベルは、治療しなければ死亡することがある急を要する病状である糖尿病性ケトアシドーシス (DKA) を引き起こす。DKAの症状には、特に

50

吐き気、嘔吐、過度の口渇、及び尿産生、腹部の痛み、呼吸困難、疲労、及び昏睡が挙げられる。DKAの深刻さを考えると、DKAを完全に発症してしまう前にケトンレベルを低下させる処置を施すことが望ましい。さらに、DKAが発症する又はケトンレベルが不必要に高くなるまでDKAに関連する症状は現れないことがあるため、これらの症状に対する処置としてケトン低減処置を行わないことが一般的に好ましい。

#### 【0006】

DKAの予防は、ケトンレベルを測定し、これが一定濃度以上に上昇した場合に治療を受けることによって、達成することができる。ケトンレベルを測定するために、尿検査を利用することができる。ADAウェブサイトは、糖尿病患者に病気（例えば、風邪又はインフルエンザ）がある場合、又は糖尿病患者の血中グルコースが $240\text{ mg/dl}$ より高い場合は、ケトンレベルを4～6時間毎にチェックすることを推奨している。（<http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/ketoacidosis-dka.html>を参照）。しかし、1日に何度も血中グルコース検査を行う糖尿病患者にとっては、それらの血中グルコース検査に加えて別の尿検査を行うことは、時間がかかり面倒である。

#### 【0007】

同じ検査ストリップ上にグルコースレベルとケトンレベルを測定する2つの検査を実施することにより、糖尿病患者は高いケトンレベルを早期に検出して、検査の推奨事項やより安全な治療法に応じることがより一層可能となる。例えば、ケトンや血中グルコースのレベルが高いと、糖尿病の管理が不十分であることを示していることがあるため、これらの分析物のレベルが高い時は、運動を避けることが推奨される。しかし、ほとんどの糖尿病患者は、即時にケトン検査が可能な状態ではなく、状況の変化に対応するために即時に利用できるデータを有していない。

#### 【0008】

ケトンレベルを測定するために別の尿検査を使用すると、さらなる診断用品やそれらに付随するコストがかかりになり、また、血中グルコースとケトンレベルとを相関させることが困難になる。血液試料からケトンレベルを決定することが可能である。血液試料を使用する場合、ケトンレベルは一般に、血液中で優勢なケトンであるヒドロキシ酪酸塩の濃度を測定することで決定される。血中にヒドロキシ酪酸塩濃度が $0.6\text{ mM}$ 未満だと正常であると思われ、ヒドロキシ酪酸塩濃度が $0.6$ と $1.5\text{ mM}$ の間にあると、問題が発生し得ることを示し、 $1.5\text{ mM}$ を超えるとDKAを発症の危険性があることを示す。血液中のヒドロキシ酪酸塩濃度が $3\text{ mM}$ を超えると、DKAの兆候を示すか又はDKAであり、緊急の治療が必要である。

#### 【0009】

血液からケトンレベルを測定するための現在の技術には、例えば、ヒドロキシ酪酸塩の濃度を検出するのに適し、する機能が1つの検査素子がある。しかしながら、特に、現在の血中ケトン検査は上記尿検査のように最先端の血中グルコース検査より時間がかかるので、血中グルコース検査を一日あたり比較的多くの回数で行う糖尿病患者にとって、血中グルコース検査に加えて別のケトンレベル血液検査を行うことは、時間がかかり面倒だと思われる。また、血中グルコース検査とは独立して行うケトンレベル血液検査でもさなる診断用品やそれらに付随するコストがかかる。さらに、血中グルコースレベルと血中ケトンレベルを測定するために別々の検査を行うと、測定血中グルコース値と血中ケトン値とを相関させることが困難になる。

#### 【0010】

血液からケトンレベルを測定するための他の技術として、血中グルコースレベル及び血中ケトンレベルを検出するのに適した検査素子がある。しかし、現状のこれらの検査素子では、血中グルコースレベルが血中ケトンレベルよりもはやく測定され、つまり血中ケトン検査結果は遅れて血中グルコース検査結果の後に提供される。あるいは、血中グルコース及び血中ケトン両検査の結果が、後の血中ケトン検査が完了するまでは提供されない。いずれの場合も、特に、血中ケトン検査が終了するのに血中グルコース検査のほぼ2倍の時間がかかり得ることを考えると、血中ケトン検査が完了するまで1つ又は両方の検査結

10

20

30

40

50

果を待たなくてはならないことは、毎日比較的高頻度に血中グルコース検査を行う糖尿病患者にとってかなり煩わしく時間がかかることとなるだろう。さらに、血中グルコース検査結果が、血中ケトン検査結果より先に及びこれとは別に提供されると、使用者は、血中ケトン検査が完了する前に検査を止めるか、及び / 又は血中グルコース検査結果が提供されているが血中ケトン検査の結果は正しく提供される前に注意をしなくなる可能性が生じる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

血中グルコース測定に加えて血中ケトン測定の記録、報告、及び分析が正確に行われる効果を考慮すると、血中ケトンレベル及び / 又は血中ケトンレベルと血中グルコースレベルを検査するための技術、手順、及び装置の改良が望まれている。

【課題を解決するための手段】

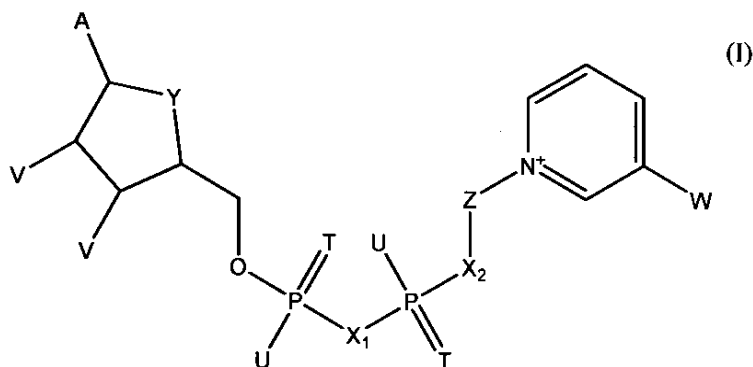
【0012】

試薬材料および関連検査素子が提供される。ある実施態様において、2つの機能を有する検査素子は、第1の補酵素依存性酵素又は前記第1の酵素用の基質と、第2の補酵素依存性酵素又は前記第2の酵素用の基質と、チオNAD、チオNADP、及び式(I)（後述で定義される）の化合物からなる群から選択される補酵素とを含む。ある態様において第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第1の酵素はヒドロキシ酪酸脱水素酵素であり、第2の分析物はグルコースであり、第2の酵素はグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである。本発明の他の態様は、非常に優れた試薬材料に関する。

【0013】

ある実施態様において、第1及び第2の分析物を測定するために構成された検査素子は、第1の補酵素依存性酵素又は前記第1の酵素用の基質と、第2の補酵素依存性酵素又は前記第2の酵素用の基質とを含む。検査素子はまた、チオNAD、チオNADP、及び式(I)：

【化1】



【0014】

[式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、BH<sub>3</sub><sup>-</sup>、又はBCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、COOR、CON(R)<sub>2</sub>、COR、又はCSN(R)<sub>2</sub>を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキルを表わし、

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>は、各場合に独立してO、CH<sub>2</sub>、CHCH<sub>3</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NH、又はNCH<sub>3</sub>を表わし、

Y は、NH、S、O、又はCH<sub>2</sub>を表わし、

Z は、O、S 及び N から選択されるヘテロ原子を任意に含み、1 つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基CR<sub>4</sub><sub>2</sub> (CR<sub>4</sub><sub>2</sub> は前記環状基とX<sub>2</sub>に結合している) を含む、5 個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

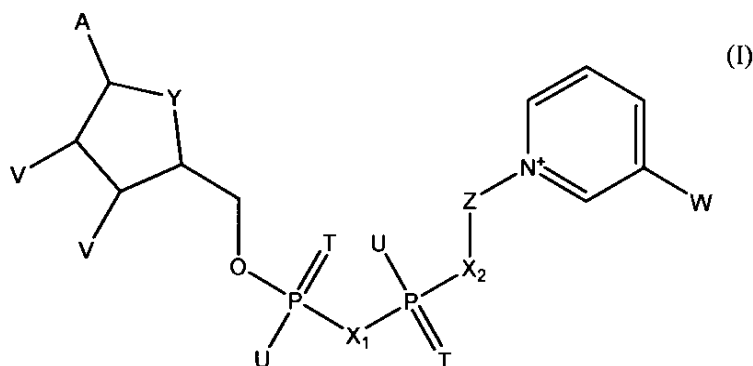
ここで、R<sub>4</sub> は、各場合に独立してH、F、Cl、又CH<sub>3</sub>を表わすが、但し、Z とピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない] の化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型、からなる群から選択される補酵素を含む。

#### 【0015】

この実施態様の1つの形態において、第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第1の酵素はヒドロキシ酪酸脱水素酵素である。この形態のある態様において、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素である。この形態の別の態様において、第2の酵素は、グルコース脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びL-アミノ酸脱水素酵素を含むアミノ酸脱水素酵素からなる群から選択される脱水素酵素である。この形態のさらに別の態様において、第2の分析物はグルコースであり、第2の酵素はグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである。さらなる態様において、補酵素は式(I)

#### 【化2】



#### 【0016】

[式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合にOを表わし、

U は、各場合にOHを表わし、

V は、各場合にOHを表わし、

W は、CON(R)<sub>2</sub>を表わし、ここでRはHを表わし、

X<sub>1</sub> は、Oを表わし、

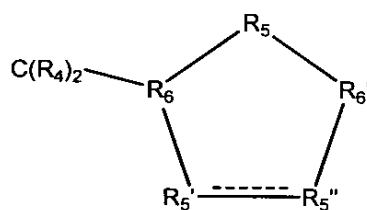
X<sub>2</sub> は、Oを表わし、

Y は、Oを表わし、そして

Z は、一般式(II)



## 【化 3】



(II)

10

## 【 0 0 1 7 】

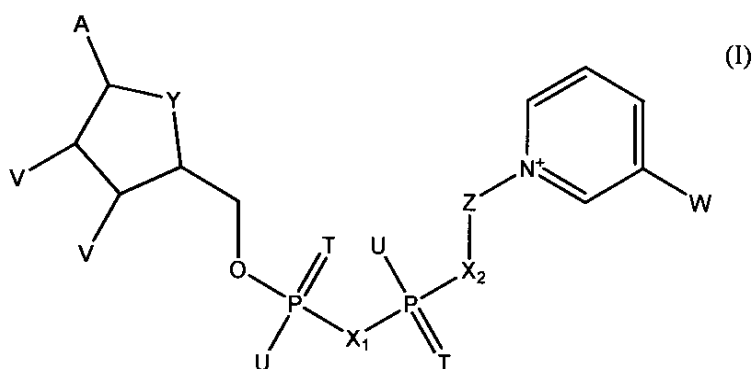
(式中、 $R_5'$ と $R_5''$ との間に1重結合が存在し、ここで、  
 $R_4$ は、Hを表わし、  
 $R_5'$ は、 $CHOH$ を表わし、  
 $R_5''$ は、 $CHOH$ を表わし、  
 $R_5$ は、 $CR_4_2$ を表わし、  
 $R_6$ は、 $CH$ を表わし、そして  
 $R_6'$ は、 $CH$ を表わす)の炭素環式5員環を表わす]の化合物である。

20

## 【 0 0 1 8 】

別のさらなる態様において、補酵素は式(I)：

## 【化 4】



(I)

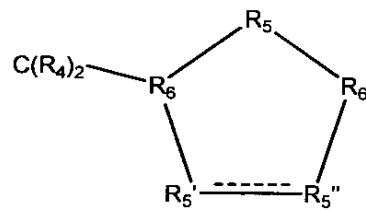
30

## 【 0 0 1 9 】

[ 式中、  
 $A$ は、アデニンを表わし、  
 $T$ は、各場合にOを表わし、  
 $U$ は、各場合にOHを表わし、  
 $V$ は、第1の場合にOHを表わし、第2の場合にリン酸基を表わし  
 $W$ は、 $CON(R)_2$ を表わし、ここで $R$ はHを表わし、  
 $X_1$ は、Oを表わし、  
 $X_2$ は、Oを表わし、  
 $Y$ は、Oを表わし、そして  
 $Z$ は、一般式(II)

40

## 【化 5】



(II)

10

## 【0020】

(式中、 $R_5'$ と $R_5''$ との間に1重結合が存在し、ここで、  
 $R_4$ は、Hを表わし、  
 $R_5'$ は、 $CHOH$ を表わし、  
 $R_5''$ は、 $CHOH$ を表わし、  
 $R_5$ は、 $CR_4_2$ を表わし、  
 $R_6$ は、 $CH$ を表わし、そして  
 $R_6'$ は、 $CH$ を表わす)の炭素環式5員環を表わす]の化合物である。

20

## 【0021】

さらに別のさらなる態様において、補酵素はチオNADである。別のさらなる態様において、補酵素はチオNADPである。

## 【0022】

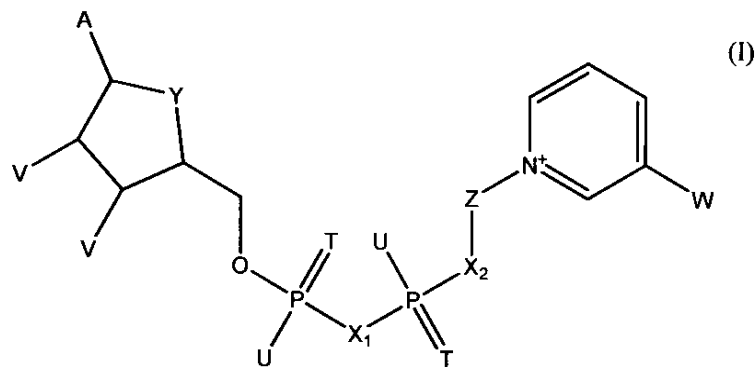
この実施態様のさらなる形態において、検査素子は、第1の酵素又は前記第1の酵素用の基質と、チオNAD、チオNADP、及び式(I)の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素とを含む、第1の試薬材料を含む。この形態のある態様において、検査素子はまた、第2の酵素又は前記第2の酵素用の基質と、FAD、NAD、NADP、及び式(I)の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素とを含む、第2の試薬材料を含む。さらなる態様において、検査素子は、前記第1及び第2の試薬材料を担持するように構成された検査ストリップを含む。さらに別のさらなる態様において、検査ストリップは、第1の試薬材料に関する第1の電極系と、第2の試薬材料に関する第2の電極系とを含む。この形態の別の態様において、第1の試薬材料はさらに、ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン誘導体と塩化ヘキサアミルテニウムとの組み合わせ、の1つを含む。

30

## 【0023】

別の実施態様において、試薬材料は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素と、式(I)：

## 【化6】



10

## 【0024】

〔式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は $\text{BCNH}_2^-$ を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は $\text{CSN}(\text{R})_2$ を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルを表わし、

$\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ は、各場合に独立してO、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は $\text{NCH}_3$ を表わし、

Yは、NH、S、O、又は $\text{CH}_2$ を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基 $\text{CR}_{4_2}$  ( $\text{CR}_{4_2}$ は前記環状基と $\text{X}_2$ に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

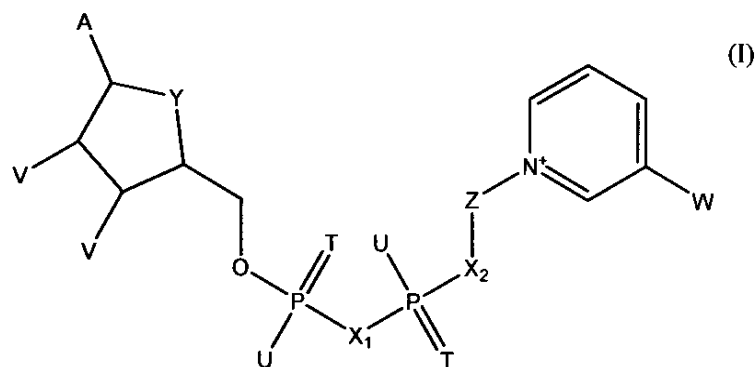
ここで、 $\text{R}_{4_2}$ は、各場合に独立してH、F、Cl、又 $\text{CH}_3$ を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の補酵素化合物と、

又は、その塩もしくは任意にその還元型と、を含む。

## 【0025】

この実施態様の1つの形態において、補酵素化合物は、式(I)：

## 【化7】



40

## 【0026】

〔式中、

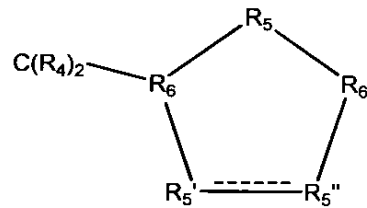
Aは、アデニンを表わし、

50

T は、各場合に O を表わし、  
 U は、各場合に O H を表わし、  
 V は、各場合に O H を表わし、  
 W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、  
 $\text{X}_1$  は、O を表わし、  
 $\text{X}_2$  は、O を表わし、  
 Y は、O を表わし、そして  
 Z は、一般式 ( I I )

【化 8】

10



(II)

20

【 0 0 2 7 】

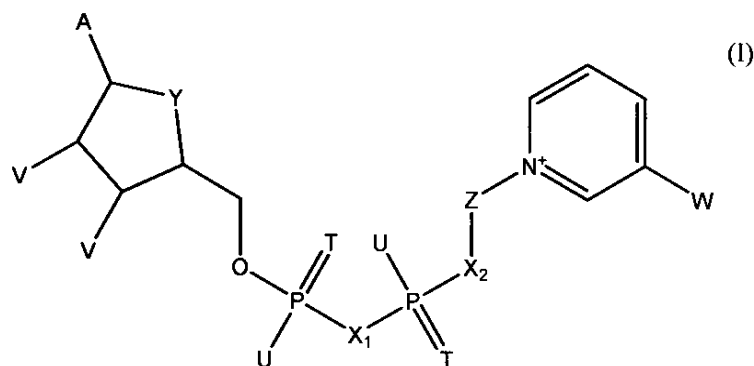
( 式中、 $\text{R}5'$  と  $\text{R}5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、  
 $\text{R}4$  は、H を表わし、  
 $\text{R}5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、  
 $\text{R}5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、  
 $\text{R}5$  は、 $\text{CR}4_2$  を表わし、  
 $\text{R}6$  は、 $\text{CH}$  を表わし、そして  
 $\text{R}6'$  は、 $\text{CH}$  を表わす ) の飽和炭素環式 5 員環を表わす ] に従う。

【 0 0 2 8 】

この実施態様の別の形態において、補酵素化合物は、式 ( I ) :

30

【化 9】



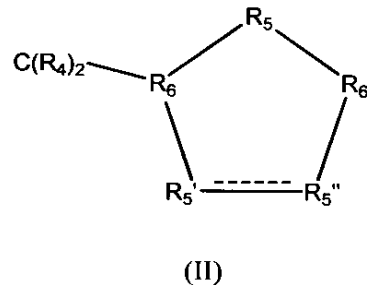
40

【 0 0 2 9 】

[ 式中、  
 A は、アデニンを表わし、  
 T は、各場合に O を表わし、  
 U は、各場合に O H を表わし、  
 V は、第 1 の場合に O H を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし

50

Wは、 $\text{CON}(\text{R})_2$ を表わし、ここでRはHを表わし、  
 $\text{X}_1$ は、Oを表わし、  
 $\text{X}_2$ は、Oを表わし、  
Yは、Oを表わし、そして  
Zは、一般式(I I)  
【化10】



10

## 【0030】

(式中、 $\text{R5}'$ と $\text{R5}''$ との間に1重結合が存在し、ここで、  
 $\text{R4}$ は、Hを表わし、  
 $\text{R5}'$ は、 $\text{CHOH}$ を表わし、  
 $\text{R5}''$ は、 $\text{CHOH}$ を表わし、  
 $\text{R5}$ は、 $\text{CR4}_2$ を表わし、  
 $\text{R6}$ は、 $\text{CH}$ を表わし、そして  
 $\text{R6}'$ は、 $\text{CH}$ を表わす)の飽和炭素環式5員環を表わす]に従う。

20

## 【0031】

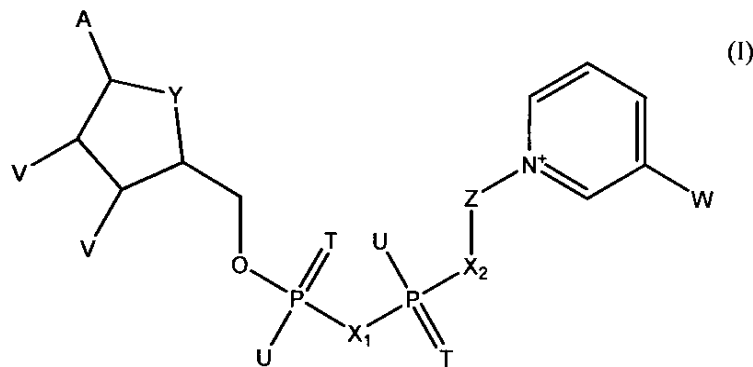
さらなる形態において、試薬材料はさらに、ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン誘導体と塩化ヘキサアミンルテニウムとの組み合わせ、の1つを含む。

## 【0032】

30

この実施態様の別の形態において、検査素子は、第1の分析物を測定するための試薬材料を担持する検査ストリップを含む。この形態のある態様において、検査ストリップはさらに、第2の分析物を測定するための第2の試薬材料を担持する。さらなる態様において、第2の試薬材料は、グルコース脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びL-アミノ酸脱水素酵素を含むアミノ酸脱水素酵素からなる群から選択される脱水素酵素を含む。さらに別のさらなる態様において、第2の試薬材料は、FAD、NAD、NADP、及び式(I)：

## 【化 1 1】



10

## 【0033】

[式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は $\text{BCNH}_2^-$ を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

20

Wは、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は $\text{CSN}(\text{R})_2$ を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルを表わし、

$\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ は、各場合に独立してO、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は $\text{NCH}_3$ を表わし、

Yは、NH、S、O、又は $\text{CH}_2$ を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基 $\text{CR}_4$  ( $\text{CR}_4$ は前記環状基と $\text{X}_2$ に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

ここで、 $\text{R}_4$ は、各場合に独立してH、F、Cl、又は $\text{CH}_3$ を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の化合物、

30

又は、その塩もしくは任意にその還元型、とからなる群から選択される補酵素を含む。

## 【0034】

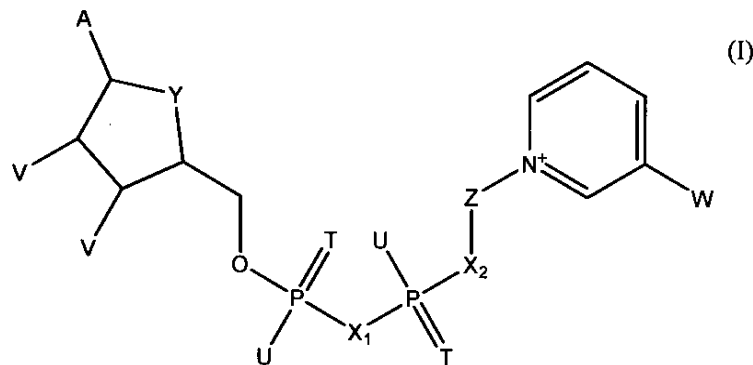
さらに別のさらなる態様において、検査ストリップは、第1及び第2の分析物を電気化学的に測定するために構成されている。

## 【0035】

さらに別の実施態様において、試料中の第1及び第2の分析物を測定するための方法は、第1及び第2の分析物を測定するために構成された検査素子であって、第1の補酵素依存性酵素又は前記第1の酵素用の基質、第2の補酵素依存性酵素又は前記第2の酵素用の基質、及びチオNAD、チオNADP、及び式(I)：

40

## 【化 1 2】



10

## 【0036】

〔式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は $\text{BCNH}_2^-$ を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は $\text{CSN}(\text{R})_2$ を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルを表わし、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ は、各場合に独立してO、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は $\text{NCH}_3$ を表わし、Yは、NH、S、O、又は $\text{CH}_2$ を表わし、Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基 $\text{CR}_{4_2}$  ( $\text{CR}_{4_2}$ は前記環状基と $\text{X}_2$ に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、ここで、 $\text{R}_{4_2}$ は、各場合に独立してH、F、Cl、又 $\text{CH}_3$ を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型、からなる群から選択される補酵素、を含む前記検査素子を設けること；

前記検査素子に試料を接触させること；第1の分析物を検出すること；及び第2の分析物を検出すること、を含む。

## 【0037】

この実施態様の1つの形態において、第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第2の分析物はグルコースである。この形態のある態様において、第1の分析物を検出する工程と第2の分析物を検出する工程は、同時に行われる。この形態の別の態様において、第1の分析物を検出する工程と第2の分析物を検出する工程は、検査素子に試料を接触後5秒以内に完了する。

40

## 【0038】

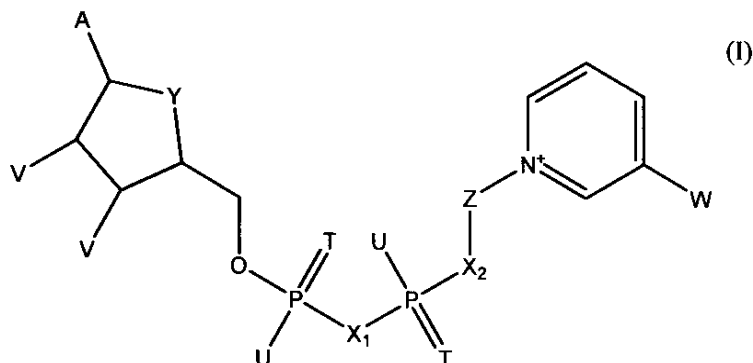
さらに別の実施態様において、ある方法は、試料中のグルコース値とケトン値とを測定するように構成された検査素子を設ける工程と；検査素子に試料を接触させる工程と；検査素子に試料を接触後7.5秒以内に試料中のグルコース値とケトン値とを測定する工程とを含む。この形態において検査素子は、グルコース値を測定するための第1の試薬材料と、ケトン値を測定するための第2の試薬材料とを含む。この形態のある態様において、第2の試薬材料はヒドロキシ酪酸脱水素酵素を含む。別の形態において、試料中のグルコース値とケトン値とを測定する工程は、検査素子に試料を接触後5秒以内に完了する。さらに別の形態において、上記測定工程中に、グルコース値とケトン値は、互いに2秒以内に測定される。さらに別の形態において、試料は血液を含む。

50

## 【 0 0 3 9 】

この方法の1つの形態において、検査素子は、第1の補酵素依存性酵素又は前記第1の酵素用の基質と、第2の補酵素依存性酵素又は前記第2の酵素用の基質とを含む。検査素子はまた、チオNAD、チオNADP、及び式(I)：

## 【化13】



10

## 【 0 0 4 0 】

[式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、 $BH_3^-$ 、又は $BCNH_2^-$ を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、 $COOR$ 、 $CON(R)_2$ 、 $COR$ 、又は $CSN(R)_2$ を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又は $C_1 \sim C_2$ アルキルを表わし、

$X_1$ 、 $X_2$ は、各場合に独立してO、 $CH_2$ 、 $CHCH_3$ 、 $C(CH_3)_2$ 、NH、又は $NCH_3$ を表わし、

Yは、NH、S、O、又は $CH_2$ を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基 $CR_4$  ( $CR_4$ は前記環状基と $X_2$ に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

ここで、 $R_4$ は、各場合に独立してH、F、Cl、又 $CH_3$ を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素、を含む。

## 【 0 0 4 1 】

ある態様において、第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第1の酵素はヒドロキシ酪酸脱水素酵素である。さらなる態様において、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素である。さらなる態様において、第2の酵素は、グルコース脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びL-アミノ酸脱水素酵素を含むアミノ酸脱水素酵素からなる群から選択される脱水素酵素である。さらに別の態様において、第2の分析物はグルコースであり、第2の酵素はグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである。さらなる態様において、補酵素は、式(I)：

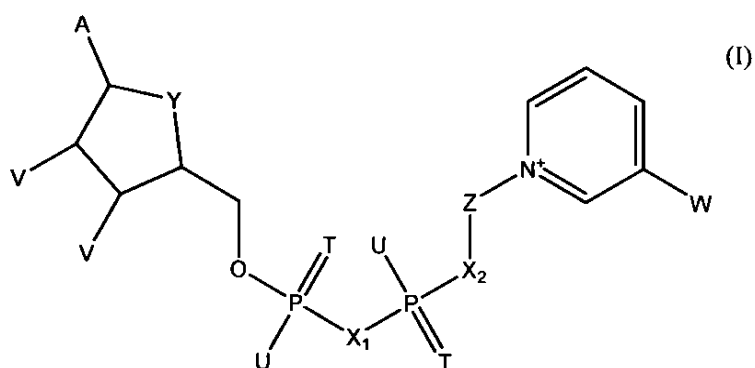
20

30

40



## 【化 1 4】



10

## 【 0 0 4 2】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、第 1 の場合に OH を表わし、

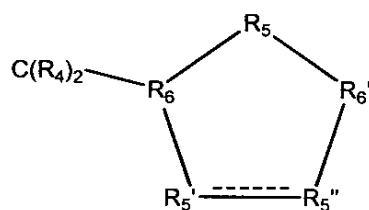
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 1 5】



(II)

30

## 【 0 0 4 3】

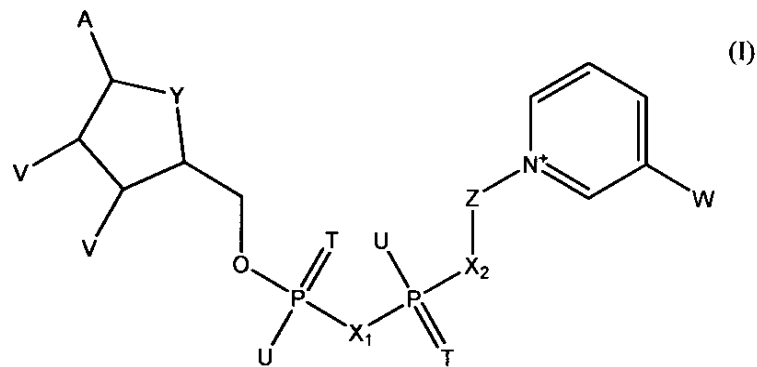
( 式中、 $\text{R}_5'$  と  $\text{R}_5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R}_4$  は、H を表わし、 $\text{R}_5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}_5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}_5$  は、 $\text{CR}_4_2$  を表わし、 $\text{R}_6$  は、CH を表わし、そして $\text{R}_6'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である。

40

## 【 0 0 4 4】

さらに別のさらなる態様において、補酵素は、式 ( I ) :

## 【化 1 6】



10

## 【 0 0 4 5】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、第 1 の場合に OH を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし

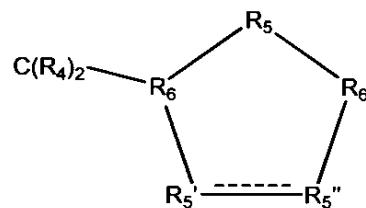
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 1 7】



(II)

30

## 【 0 0 4 6】

( 式中、 $\text{R5}'$  と  $\text{R5}''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R4}$  は、H を表わし、 $\text{R5}'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R5}''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R5}$  は、 $\text{CR4}_2$  を表わし、 $\text{R6}$  は、CH を表わし、そして $\text{R6}'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である。

40

## 【 0 0 4 7】

さらなる態様において検査素子は、第 1 の酵素又は前記第 1 の酵素用の基質、及びチオ NAD、チオ NADP、及び式 ( I ) の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素、を含む第 1 の試薬材料を含む。さらなる態様において検査素子はまた、第 2 の酵素又は前記第 2 の酵素用の基質、及び FAD、NAD、NADP、

50

及び式 (I) の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素、を含む第 2 の試薬材料を含む。さらなる態様において検査素子は、第 1 及び第 2 の試薬材料を担持するように構成された検査ストリップを含む。さらに別のさらなる態様において検査ストリップは、第 1 の試薬材料に関する第 1 の電極系と、第 2 の試薬材料に関する第 2 の電極系とを含む。別の態様において、第 1 の試薬材料はさらに、ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン誘導体と塩化ヘキサアミルテニウムとの組み合わせの 1 つ、を含む。

#### 【0048】

本出願の別の態様は、検査試料中の複数の分析物の存在及び / 又は濃度を測定するための非常に優れた技術である。他の態様は、試料中の分析物検出に関連した非常に優れた方法、システム、デバイス、キット、アセンブリー、機器、及び / 又は装置を含む。

10

#### 【0049】

さらなる態様、実施態様、形態、特徴、利益、目的、及び利点は、本明細書に提供される詳細な説明と図面から明らかであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0050】

【図 1】図 1 は、第 1 の実施態様の検査素子の透視図である。

【図 2】図 2 は、図 1 の検査素子の種々の特徴の展開透視図である。

【図 3】図 3 は、第 2 の実施態様の検査素子の展開透視図である。

【図 4】図 4 は、図 3 の検査素子の断片断面図である。

20

【図 5】図 5 は、図 1 の検査素子で使用するための構造をした分析装置の略図である。

【図 6】図 6 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 7】図 7 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 8】図 8 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 9】図 9 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 10】図 10 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

30

【図 11】図 11 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 12】図 12 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 13】図 13 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 14】図 14 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 15】図 15 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

40

【図 16】図 16 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 17】図 17 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

【図 18】図 18 は、種々の試薬材料を用いて測定されるヒドロキシ酪酸塩の応答のグラフ表示である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0051】

本発明の原理の理解を促進するために、これを説明するために使用される、図面中の実

50

施態様及び特定の用語を参照されたい。しかし、本発明の範囲はこれらに限定されることを意図せず、図示された装置におけるそのような変更及び更なる修正、及びそこに例示された本発明の原理のさらなる適用は、本発明が関連する技術分野における当業者に通常起こるであろうと考えられる。

#### 【0052】

試薬材料および関連検査素子が提供される。ある実施態様において、2つの機能の検査素子は、第1の補酵素依存型酵素又は前記第1の酵素用の基質、第2の補酵素依存型酵素又は前記第2の酵素用の基質、及びチオNAD、チオNADP、及び式(I)の化合物からなる群から選択される補酵素を含む。ある態様において、第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第1の酵素はヒドロキシ酪酸脱水素酵素であり、第2の分析物はグルコースであり、第2の酵素はグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである。別の実施態様において検査素子は、試料中の第1及び第2の分析物を評価するために、検査素子と相互作用するように構成された測定器も含むシステムの一部である。この評価は、第1及び第2の分析物の存在を検出することから、第1及び第2の分析物の濃度を決定することまでの範囲でもよい。第1及び第2の分析物及び試料流体は、検査システムが適している任意のものであってよいが、ある特定のしかし非限定的な形態では、第1の分析物はヒドロキシ酪酸塩であり、第2の分析物はグルコースであり、試料流体は血液又は間質液である。本出願の他の態様は、非常に優れた試薬材料に関する。以下、本出願の更なる態様及び特徴が、例示された実施態様に関して説明される。

#### 【0053】

図1及び図2を参照して、試料中の第1及び第2の分析物を評価するように構成された第1の実施態様の検査素子10のさらなる詳細が提供される。検査素子10は、試料流体用の試料受容チャンパーと、第1及び第2の分析物の存在下で、電気化学的信号を生成するための第1及び第2の試薬材料と、を含む電気化学センサとして提供される。図示された形態において、検査素子10は、測定器挿入端12と投与端14との間に延びる。図示されていない形態では、検査素子10の適切な取り扱いと使用でユーザを補助するように、投与端14の形状は測定器挿入端12と区別することができる。検査素子10はまた、適切な取り扱いと使用についてユーザーに指針を提供するための、1つ又はそれ以上のグラフ(図示せず)を含むことができる。

#### 【0054】

検査素子10は、ベース基板16、スペース層18、本体カバー20、及びチャンパーカバー22を含む層状構造を有する使い捨て検査ストリップの形で提供される。同様の層状構造を含む検査素子のさらなる詳細は米国特許第7,727,467号に提供されており、その内容は全体が参照することにより本明細書に組み込まれる。スペース層18は、ベース基板16と本体カバー20とチャンパーカバー22との間に延びる試料収容チャンパー26を設けるための空隙部24を含む。この構成では試料収容チャンパー26は、試料収容チャンパー26への試料流体の通過を促進するように構成された開口部28を介して、検査素子10の投与端14で開く。検査素子10の側面に沿って位置する開口部を介して試料収容チャンパー26が開く形態もまた企図される。投与端14の全長に沿って位置し側面の一部を含む開口部を介して試料収容チャンパー26が開く形態も企図される。

#### 【0055】

本体カバー20とチャンパーカバー22は、スペース層18を覆い、その間に、試料流体が開口部28を介して試料収容チャンパー26に入る時、空気が試料収容チャンパー26から逃げることを可能にするように試料収容チャンパー26と連通している通気開口部を設けるスロット30を規定する。スロット30は、試料収容チャンパー26中に位置する電極システム(後述)の位置の内部である、試料収容チャンパー26に対する位置に存在する。試料収容チャンパー26に入る試料流体は、通気開口部まで進むが、それ以上は進まない。上から見ると、スロットは「充填ライン」を視覚的に示して、試料収容チャンパー26中の電極システムが適切に湿潤されているか又はカバーされていて適切に機能することを確認している。追加的に又は代替的に、用量充足電極はまた、試料流体がスロ

ト 3 0 に進んだ時を検出して、測定電極の濡れが発生したことを保証するために、スロット 3 0 に隣接して配置することができる。

【 0 0 5 6 】

電極システム及び試薬材料以外では、試料収容チャンバー 2 6 は空であってもよく、又は代替的に吸着剤材料を含んでよい。適切な吸着剤材料は、ポリエステル、ナイロン、セルロース、及びセルロース誘導体、例えばニトロセルロースを含む。吸着剤材料は、含まれる場合、試料収容チャンバー 2 6 内に流体を吸い取ることを助けることにより、試料流体の取り込みを促進するのに役立つ。吸着剤材料の使用はまた、試料流体の受容のための試料収容チャンバー 2 6 の空隙容積をさらに減少させるために役立つであろう。ある形態において、試料収容チャンバー 2 6 の充填は毛管作用によって起きる。試料収容チャンバー 2 6 の充填はまた、試料流体に圧力を加えてこれを試料収容チャンバー 2 6 内に押し出すか、及び / 又は試料収容チャンバー 2 6 上で真空を生成させて、試料流体を試料収容チャンバー 2 6 中に引き込むなどの、他の手段によって増強させることができる。さらに、親水性材料の被覆を備えるか、又は親水性増強処理を施された、試料収容チャンバー 2 6 の 1 つ又はそれ以上の表面を親水性材料から形成して、検査試料による試料収容チャンバー 2 6 の充填を容易にすることができる。

【 0 0 5 7 】

検査素子 1 0 は、電気化学的酸化還元反応により、第 1 及び第 2 の分析物の存在を検出するか、及び / 又はそれらの濃度を測定するように構成される。これらの反応は、分析物の量又は濃度に相関させることができる電気信号に変換される。検査素子 1 0 の一部の機能のみが図示されている図 2 に示すように、基板 1 6 は、複数の電極 3 4 と、接触パッド 3 8 で終わる電極トレース 3 6 とを含む第 1 の電極システム 3 2 を有する。電極 3 4 は、試料収容チャンバー 2 6 内に位置する電極トレース 3 6 の部分として定義される。基板 1 6 はまた、複数の電極 4 8 と、接触パッド 5 2 で終わる電極トレース 5 0 とを含む第 2 の電極システム 4 6 を有する。電極 4 8 は、試料収容チャンバー 2 6 内に位置する電極トレース 5 0 の部分として定義される。電極システム 3 2 , 4 6 の図示された構成は限定的なものではなく、代替構成が企図されることを理解すべきである。

【 0 0 5 8 】

検査素子 1 0 はまた、試料収容チャンバー 2 6 内の第 1 の電極システム 3 2 の電極 3 4 の少なくとも一部を覆う第 1 の試薬材料 6 0 と、試料収容チャンバー 2 6 内の第 2 の電極システム 4 6 の電極 4 8 の少なくとも一部を覆う第 2 の試薬材料 6 2 とを含む。第 1 及び第 2 の試薬材料 6 0 , 6 2 は、第 1 及び第 2 の検査分析物の存在下で電気信号を生成するのに適しており、試料収容チャンバー 2 6 内の電極 3 4 , 4 8 に電気信号を提供するような位置で試料収容チャンバー 2 6 内に配置される。図示した形態では、第 1 及び第 2 の試薬材料 6 0 , 6 2 の間にスペース 6 4 が延びているが、スペース 6 4 が存在せず、第 1 及び第 2 の試薬材料が電極 3 4 , 4 8 上で連続層を形成する形態もまた企図される。第 1 及び第 2 の試薬材料 6 0 , 6 2 に関する更なる詳細は後述される。

【 0 0 5 9 】

第 1 の電極システム 3 2 の電極 3 4 は、作用電極 4 0 の両側に間隔を置いて配置された部分 4 4 a , 4 4 b とを含む、作用電極 4 0 と対向電極 4 2 の形の測定電極のセットを含む。本明細書において用語「作用電極」は、酸化還元メディエーターの補助有り又は無しで分析物が電解酸化又は電解還元される電極であり、用語「対向電極」は、作用電極と対を為し、かつこれを介して、作用電極中を流れる電流と強度が等しく信号が反対の電気信号が流れる電極を指す。用語「対向電極」は、参照電極としても機能する対向電極を含むことを意味する(すなわち、対向 / 参照電極)。第 2 の電極システム 4 6 の電極 4 8 は、作用電極 5 4 と作用電極 5 4 の両側に間隔を置いて配置された部分 5 8 a と 5 8 b とを含む対向電極 5 6 の形態の測定電極のセットを含む。この構成では、試料収容チャンバー 2 6 は、試料収容チャンバー 2 6 に入る試料流体が、作用電極 4 0 と 5 4 及び対向電極 4 2 と 5 6 と電解接触して配置されるように、構成される。この構成はまた、測定電極間に電流が流れることを可能にして、第 1 及び第 2 の分析物の電解酸化又は電解還元に影響を与

える。しかし前述は、測定電極のための多くの構成のうちのほんの1つであることが理解すべきである。

#### 【0060】

試料中の第1及び第2の分析物を評価するための代替実施態様の検査素子110が、図3と4に示される。検査素子110は、ヘッド対ヘッド(head-to-head)製造技術を利用して製造される。この技術及び検査素子110のさらなる詳細は、国際特許公開第2012/03306号パンフレットに一般的に見いだされ、その内容は、参照することにより全体が本明細書に組み込まれる。図3に示すように、電極パターン112は、基板114の細長い層(テープ)上の2つの列(列A中の電極パターンの1セットと列B中の1セット)に配置されている。検査素子110はまた、互いの近くに位置し基板114の中心近く10に位置する試料チャンバー電極パターン116と、互いから間隔を置いて配置され、基板114の反対の端の近くに配置された接触パッド118とを含む。図示された形態では、電極パターンはすべて同様であるが、代替的形態では、少なくとも1部の電極パターンは他の電極パターンとは異なる。第1の試薬材料120は、列A中の試料チャンバー電極116の上に適用され、第2の試薬材料122は列B中の試料チャンバー電極116の上に適用される。

#### 【0061】

スペーサー層124は、接着剤層126を用いて基板114の上部に取り付けられる。図示された形態では、1つの細長いストリップ又はテープの形態では、1つの細長いストリップ又はテープが、2つの別個の形が両方の列AとBの電極パターンを覆うようにスペーサー層124を形成して、両方の列AとBの電極パターンをカバーするが、スペーサー層124の2つの別のストリップが、列Aと列B中の基板114に個々に及び中心線128に沿って取り付けられる形態も可能である。スペーサー層124は、中心線128に沿って配置された複数の切り欠き部130を含む。スペーサー層124が基板114と組み立てられると、切り欠き部130は、試料チャンバー132の周囲を形成する(図4)。単一の連続上部基板層134は、接着剤層136を用いてスペーサー層124の上部に取り付けられ、複数の通気開口部142、144を備えて、試料チャンバー132が試料流体で充填される時、試料チャンバー132の通気を容易にする。先に説明されていないが、接着剤層126、136は、中心線128に沿って配置され、スペーサー層124の切り欠き部130に対応する複数の切り欠き部138、140をそれぞれ含む。あるいは、接着剤層136は、開口部又は切り欠きのない固体層であってもよいことが企図される。30

#### 【0062】

基板114、試薬材料120、122、スペーサー層124、及び上部基板134を組み合わせて一緒に積層した後、列AとB中の電極パターン116が相互に付着したままであり、一方隣接した行(並んで配向された検査ストリップ)が分離されているように、シート又はロールは分離される。言い換えれば、列A中の検査ストリップは、列B中の検査ストリップから完全には分離されず、ヘッド対ヘッド様式で整列された検査ストリップの各対を用いて検査ストリップ対が形成される。各検査ストリップ対は折り畳まれて、列Aからの検査ストリップの接触パッド118を、列Bからの検査ストリップの接触パッド118に隣接して配置し、列Aからの検査ストリップのサンプリング端を列Bからの検査ストリップのサンプリング端に隣接してかつ同じ方向を向くように配置することができる。この種のヘッド対ヘッド検査ストリップ対を使用して、ユーザーが同時に両方の検査ストリップに体液試料を適用して、単一の試料を使用して第1及び第2の異なる分析物を検査することができる2つの用途のバイオセンサーが提供される。ある実施態様において、この対と一緒に折り畳む前に、2重試料チャンバー132内に血液濾過媒体が提供されて、チャンバー132間での血液と試薬の混合を防止することができる。40

#### 【0063】

検査ストリップの対が中心線128に沿って曲げられる時、ヘッド対ヘッドで配向された対の各検査ストリップが露出されるべきであることを、理解すべきである。両方の試料50

チャンバー 1 3 2 が露出されていることを確保するために、代替の製造技術を使用することができる。例えばある実施態様において、基板層の 1 つ（例えば上部層 1 3 4）は製造中に中心線 1 2 8 に沿って完全に分離され、一方、基板 1 1 4 は改変されないか、又は中心線 1 2 8 の周りで予想通り曲げられるように改変される。代替実施態様において、例えば穿孔又は部分的な切断を介してユーザーが中心線 1 2 8 に沿って容易に分離できるように、基板層の 1 つが改変され、一方、他の基板は、例えば切れ目、へこみ、又はひだなどを介して、直線（例えば中心線 1 2 8）の周りで予想通りに曲げたり又は分離できるように改変される。さらに別の実施態様において、上部層 1 3 4 と下部基板 1 1 4 は、ヘッド対ヘッド検査ストリップが、いずれかの方向に折り畳むことができるように改変され、すなわちユーザーは、2 つの検査ストリップの上部層 1 3 4 が互いに隣接して配置されるように、又は 2 つの検査ストリップの基板 1 1 4 が互いに隣接して配置されるように、ヘッド対ヘッド対の検査ストリップを曲げるように選択することができる。

10

**【 0 0 6 4 】**

基板 1 6、1 1 4 は、その上に電極システム 3 2、4 6 及び電極パターン 1 1 2 がそれぞれ配置された絶縁材料で形成することができる。典型的には、ビニルポリマー、ポリイミド、ポリエステル、及びスチレンなどのプラスチックが、必要とされる電氣的及び構造的な特性を提供する。さらに検査素子は、材料のロールから大量生産することができるため、材料特性が、ロール加工のための十分な柔軟性を有し、また一方、最終的な素子に有用な剛性を与えるのに適切であることが望ましい。基板 1 6、1 1 4 の材料は、高温ポリエステル材料などのポリエステル；ポリエチレンナフタレート（PEN）；及びポリイミド、又はこれらの 2 つ又はそれ以上の混合物などの、可撓性高分子材料として選択することができる。ポリイミドは、商品名カプトン（Kapton）（登録商標）で E. I. duPont de Nemours and Company of Wilmington, Del. (duPont) から、市販されている。基板 1 6、1 1 4 用に可能な 1 つの具体的な材料は、duPont から入手できるメリネックス（MELINEX）（登録商標）3 2 9 である。

20

**【 0 0 6 5 】**

作用電極と対向電極、及び電極システム 3 2、4 6 の残りの部分、及び電極パターン 1 1 2 は、種々の材料から形成することができる。ある態様では、電極は比較的低い電気抵抗を有するべきであり、検査素子の動作範囲にわたって電気化学的に不活性であるべきである。作用電極のための適切な導体は、金、パラジウム、白金、炭素、チタン、二酸化ルテニウム、酸化インジウムスズ、及びイリジウムなどを含む。対向電極は、例えば銀/塩化銀などの同じか又は異なる材料で作ることができる。1 つの特定の実施態様では、作用電極及び対電極の両方とも金電極である。

30

**【 0 0 6 6 】**

電極システム 3 2、4 6 及び電極パターン 1 1 2 は、適切な導電性と一体性のある電極を与える任意の方法で、それぞれ基板 1 6、1 1 4 に適用することができる。典型的なプロセスは、ほんの少数の非限定的な可能性を提供するだけでも、スパッタリングや印刷などがある。1 つの特定の形態において、基板 1 6、1 1 4 の材料を被覆し、次にコーティングの選択された部分を除去して、電極システム 3 2、4 6 及び電極パターン 1 1 2 を与えることにより、金電極が提供される。コーティングの部分を除去するための 1 つの特定の方法はレーザアブレーションを含み、さらに詳しくは、米国特許第 7, 0 7 3, 2 4 6 号（この内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているような広範囲レーザアブレーションである。

40

**【 0 0 6 7 】**

レーザアブレーション技術は、典型的には絶縁材料及び導電性材料（例えば絶縁材料上に被覆されたか又は積層された金属層の金属積層物）を含む単一の金属層又は多層組成物を、除去することを含む。金属層は、金属導体である純粋な金属、合金、又は他の材料を含んでもよい。金属又は金属様導体の例としては、アルミニウム、炭素（黒鉛など）、コバルト、銅、ガリウム、金、インジウム、ニッケル、パラジウム、白金、銀、チタン、これらの混合物、及びこれらの材料の合金又は固溶体を含む。ある態様において、生物

50

系に対して本質的に非反応性である材料が選択され、その非限定的な例には、金、白金、パラジウム、炭素、及び酸化イリジウムスズが挙げられる。金属層は任意の所望の厚さであってもよく、1つの特定の形態において約500nmである。

#### 【0068】

検査素子10、110の図示された形態は限定するものではなく、本出願の2つの機能の検査素子用の代替的な構成（光学的検出技術のために構成されたものを含む）も企図されることを理解すべきである。この点において1つの追加の非限定的な形態で、2つの機能の検査素子は、第1電極システムを担持する第1基板が、第2電極システムを担持する第2基板上に配置されるサンドイッチ型の構成を含んでよい。第1基板と第2基板は、毛細管チャネルを含む中間層により互いに間隔を置いて配置されるか、又は第1基板と及び第2基板との間に毛細管チャネルが形成される。この構成では、毛細管チャネルに入る試料流体は、第1及び第2電極システムに向けられ、従って、第1及び第2電極システムの同時の又はほぼ同時の被覆が起きる。前述されていないが、第1基板は、第1分析物の測定に適した第1試薬材料を備え、第2基板は、第2分析物の測定に適した第2試薬材料を備えることを、さらに理解すべきである。非限定的な例として、このような構成を有する検査素子を製造するための1つの技術は、第1試薬材料と第1電極システムとを担持する第1基板と、第2試薬材料と第2電極システムとを担持する第2基板とを、別々に製造して、次に第1基板と第2基板とを一緒に組み立てることを含む。

#### 【0069】

別の非限定的な形態において、2つの機能の検査素子は、わずかに異なるサンドイッチ型の構成を含んでよい。この構成では、第1電極システムを担持する第1基板は、第2電極システムを担持する第2基板の上に配置される。しかし第1基板と第2基板は接着剤層によって接合され、各々は、単一の毛細管チャネルの代わりに各電極システム上に配置された別々の試料チャンバーを含む。この形態において検査素子は、個々の試料チャンバーの同時の又はほぼ同時の充填を促進する構成を含み、従って第1電極システムと第2電極システムの同時の又はほぼ同時の被覆も起きる。前述されていないが、第1基板は、第1分析物の測定に適した第1の試薬材料を備え、第2基板は、第2分析物の測定に適した第2試薬材料を備えることを、さらに理解すべきである。この検査素子はまた、本明細書に記載の他のサンドイッチ型の構成に関連して上記された技術を利用して製造してもよい。この形態を有する1つの非限定的な検査素子のさらなる詳細は、国際公開第2012/003306号パンフレットに提供されている（上記のように組み込まれる）に提供されている。

#### 【0070】

本出願の検査素子のために利用することができる非限定的構成のさらなる例は、米国特許第6,984,307号及び4,397,956号に開示されており、これらの内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0071】

検査素子10、110は、生体液からの広範囲の第1及び第2分析物の測定に有用であり得る。例えば、検査素子10、110は、第1及び第2分析物の存在及び/又は濃度を評価するために使用できる適切な化学を有する試薬材料60、62、及び120、122とともに使用するのに容易に適合させることができる。試薬材料60、62、及び120、122は、試料流体中の第1及び第2分析物の存在及び/又は濃度を示す電気化学信号を生成するための第1及び第2分析物との反応で、動作可能である。以下でより詳細に説明するように、試薬材料60、62、及び120、122は、種々の第1及び第2分析物の存在及び/又は濃度を測定するために選択される種々の活性成分を含むことができる。従って、試薬材料60、62、及び120、122の検査化学は、評価すべき第1及び第2分析物に関して選択される。かかる分析物は、例えば、グルコース、コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド、グリセリン、乳酸塩、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸塩、アルコール、尿酸、ソルビトール、アミノ酸、1,5-アンヒドログルシトール、及びケトン体を代表する分析物、例えばヒドロキシ酪酸塩を含む得る。1つの具体的な実



施態様において、検査素子 10、110 は、血液中のヒドロキシ酪酸塩及びグルコースの存在及び / 又は濃度を測定するために選択される試薬材料 60、62 及び 120、122 をそれぞれ含む。

【0072】

第1及び第2分析物を評価することができる生体液の非限定例として、その中の分析物を測定することができる間質液、涙、尿、及び血液などの任意の体液がある。本明細書において用語「血液」は、全血及びその細胞を含まない成分、すなわち血漿及び血清を含む。ヒドロキシ酪酸塩及びグルコースの検査のために検査素子が構成される時、試料流体は、例えば指の先端又は承認された別の部位（例えば、前腕、掌、耳たぶ、上腕、ふくらはぎ、太もも）、新鮮な静脈血又は尿から得られる新鮮な毛細管血を特に含んでよい。さらに、検査素子はまた、検査のためのシステムの完全性を証明するための通常の方法で使用される対照流体に関連して有用であり得る。

10

【0073】

評価すべき分析物を含む体液は、任意の方法で取得され、検査素子に送ることができる。例えば血液試料は、メスで皮膚を切開し、次に皮膚表面に現れる流体に検査素子を接触させることにより、従来の方法で得られてもよい。ある態様において検査素子は、非常に少量の流体試料を使用するだけで、標的分析物を評価するために動作可能である。同様に、ある態様において、検査に必要な流体の容量を生成するためにほんの少量の皮膚切開が必要なだけであり、このような方法に関連する痛みと他の懸念を最小化又は排除することができる。

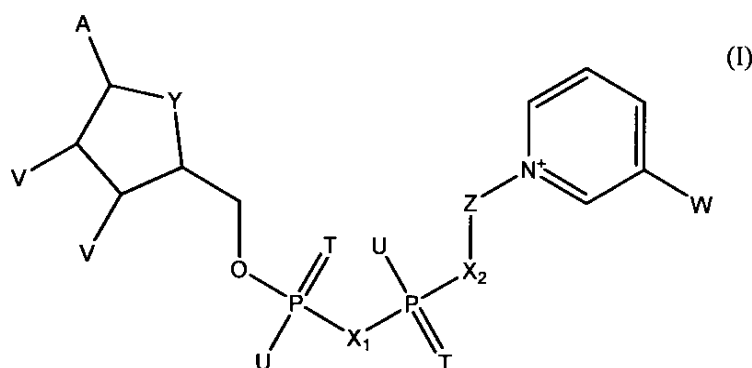
20

【0074】

試薬材料 60、120 は、第1の補酵素依存性酵素、又は前記第1の酵素用の基質、及び適切な補酵素を含む。これらの成分は典型的には、マトリックス中に溶解又は懸濁される。液体検査試料はマトリックスを水和又は溶解し、第1の分析物はマトリックス中を拡散して、1つ又はそれ以上の活性成分と反応する。試薬材料 60、120 に含めることができる適切な酵素は、例えば、グルコース脱水素酵素（EC 1.1.1.47）、乳酸脱水素酵素（EC 1.1.1.27、1.1.1.28）、リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）、グリセロール脱水素酵素（EC 1.1.1.6）、アルコール脱水素酵素（EC 1.1.1.1）、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（HBDH）、例えば 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素又はベータ-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、アルファヒドロキシ酪酸脱水素酵素及びガンマヒドロキシ酪酸脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びアミノ酸脱水素酵素、例えば L-アミノ酸脱水素酵素（EC 1.4.1.5）である。さらなる適切な酵素は、グルコースオキシダーゼ（EC 1.1.3.4）、又はコレステロールオキシダーゼ（EC 1.1.3.6）、又はアミノ転移酵素、例えばアスパラギン酸もしくはアラニン転移酵素、5'-ヌクレオチダーゼ、又はクレアチンキナーゼである。選択される酵素に依存して、試薬材料 60、120 に使用するのに適した可能性のある補酵素は、FAD、NAD、NADP、チオNAD、チオNADP、及び式（I）：

30

## 【化 18】



10

## 【0075】

[式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は $\text{BCNH}_2^-$ を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

20

Wは、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は $\text{CSN}(\text{R})_2$ を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルを表わし、

$\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ は、各場合に独立してO、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は $\text{NCH}_3$ を表わし、

Yは、NH、S、O、又は $\text{CH}_2$ を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基 $\text{CR}_4$  ( $\text{CR}_4$ は前記環状基と $\text{X}_2$ に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

ここで、 $\text{R}_4$ は、各場合に独立してH、F、Cl、又 $\text{CH}_3$ を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の化合物、

30

又は、その塩もしくは任意にその還元型を含む。

## 【0076】

ある実施態様において、Wは、 $\text{CONH}_2$ 又は $\text{COCH}_3$ を表わす。

Z上の典型的な置換基は、OH、F、Cl、及び $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルからなる群から選択され、これらは任意にフッ素化又は塩素化及び/又はOH置換された $\text{O}-\text{C}_1 \sim \text{C}_2$ アルキルである。

## 【0077】

別の実施態様において、第1の残基VはOHであり、第2の残基Vはリン酸基である。任意に、1つのOH基と1つのリン酸基は、これらが結合している炭素原子とともに環を形成することができる。

40

## 【0078】

アデニン類似体の非限定的な例としては、 $\text{C}_8$ 置換及び $\text{N}_6$ 置換アデニン、デアザ変種、例えば7-デアザアザ変種、例えば8-アザ、又は7-デアザもしくは8-アザ、又は炭素環式類似体の組合せ、例えばホルマイシン(7-デアザ変種は、7位でハロゲン、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルケニル、又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルで置換されることができ)がある。さらなる実施態様において、この化合物は、2-メトキシデオキシリボース、2'-フルオロデオキシリボース、ヘキシトール、アルトリトール、又は多環式類似体、例えば2環式、LNA、及びリボースの代わりに3環式糖を含有する。ある形態において、(ジ)ホスフェート酸素はまた、等電子的に置換することもでき、例えば、 $\text{S}^-$ により及び/又は $\text{BH}_3^-$ により置換されたO-、NH、 $\text{NCH}_3$ 及び/又は $\text{CH}_2$ により置換さ

50

れたO、及び= Sにより置換された= Oでもよい。ある実施態様において、式( I )の化合物の少なくとも1つの残基UはOHとは異なり、他の実施態様において、少なくとも1つの残基Uは、 $\text{BH}_3^-$ である。

【0079】

他のより具体的な、しかし非限定的な式( I )：

[ 式中、

Aは、アデニンを表わし、

Tは、各場合にOを表わし、

Uは、各場合にOHを表わし、

Vは、各場合にOHを表わし、

Wは、 $\text{CON}(\text{R})_2$  (ここで、RはHを表わす)を表わし、

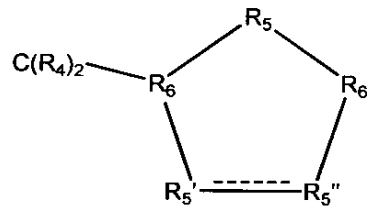
$\text{X}_1$ は、Oを表わし、

$\text{X}_2$ は、Oを表わし、

Yは、Oを表わし、そして

Zは、一般式( I I )

【化19】



(II)

【0080】

( 式中、 $\text{R}_5'$ と $\text{R}_5''$ との間に1重結合が存在し、ここで

$\text{R}_4$ は、Hを表わし、

$\text{R}_5'$ は、 $\text{CHOH}$ を表わし、

$\text{R}_5''$ は、 $\text{CHOH}$ を表わし、

$\text{R}_5$ は、 $\text{CR}_4_2$ を表わし、

$\text{R}_6$ は、 $\text{CH}$ を表わし、そして

$\text{R}_6'$ は、 $\text{CH}$ を表わす)の炭素環式5員環を表わす) ]の化合物は、カルバNAD又はcNADである。

【0081】

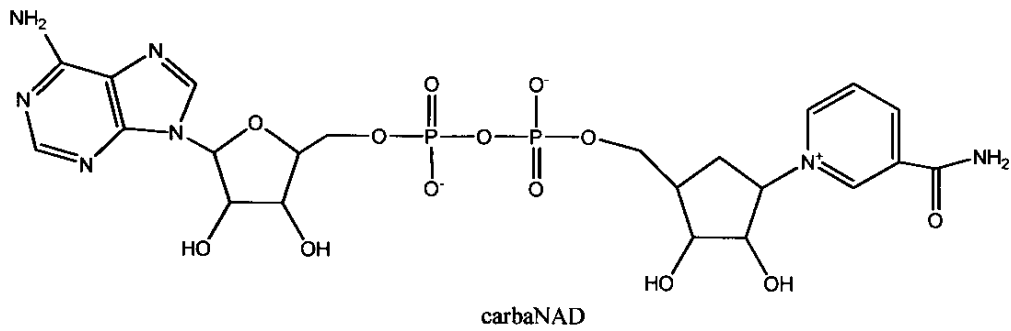
カルバNADは以下の構造：

10

20

30

【化 2 0】



10

【 0 0 8 2】

を有する。

【 0 0 8 3】

別のより具体的な、しかし非限定的な式 ( I ) :

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に O H を表わし、

V は、第 1 の場合に O H を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし、

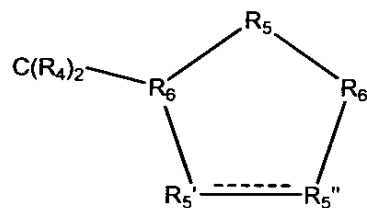
W は、 $C O N ( R ) _2$  (ここで、R は H を表わす) を表わし、 $X_1$  は、O を表わし、 $X_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

【化 2 1】



(II)

30

【 0 0 8 4】

( 式中、 $R 5'$  と  $R 5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで $R 4$  は、H を表わし、 $R 5'$  は、 $C H O H$  を表わし、 $R 5''$  は、 $C H O H$  を表わし、 $R 5$  は、 $C R 4_2$  を表わし、 $R 6$  は、 $C H$  を表わし、そして $R 6'$  は、 $C H$  を表わす) の炭素環式 5 員環を表わす) ] の化合物は、カルバ N A D P  
又は c N A D P である。

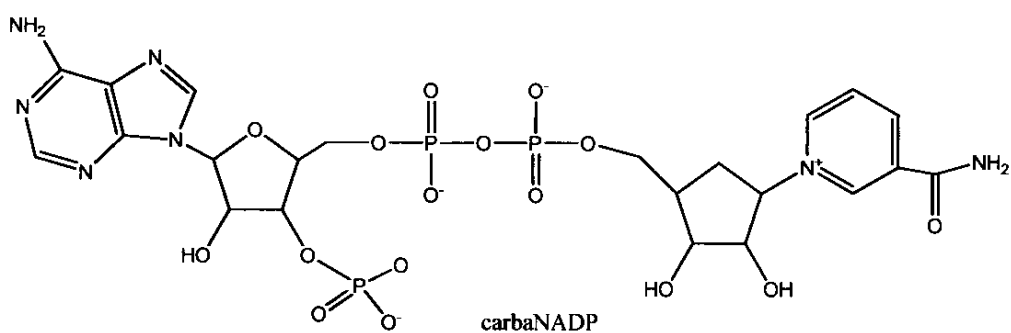
40

【 0 0 8 5】

カルバ N A D P は以下の構造 :

50

【化 2 2】



10

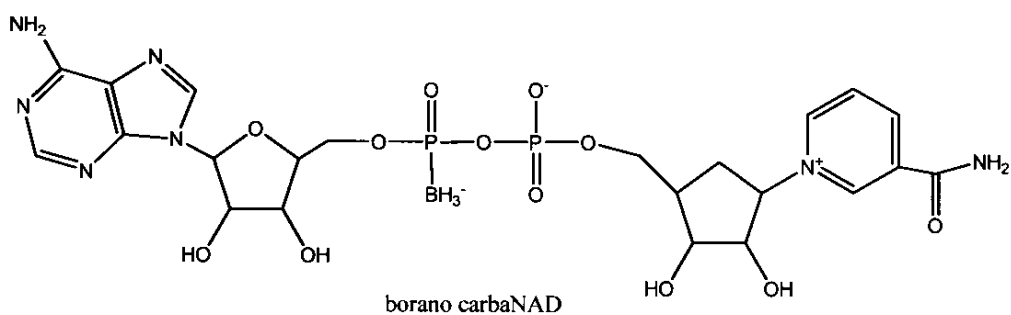
【 0 0 8 6】

を有する。

【 0 0 8 7】

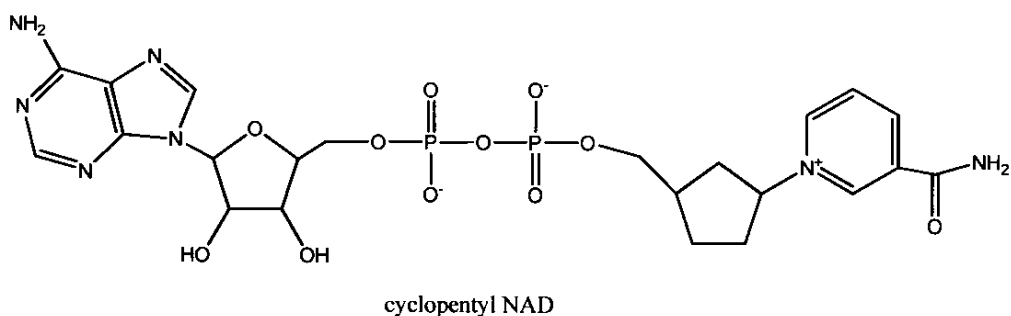
別のより具体的な、しかし非限定的な式 (I) の化合物は、ボラノカルバNAD、シクロペンチルNAD、及びカルバNADシクロホスフェートを含む。これらは化合物は、以下の構造を有する：

【化 2 3】



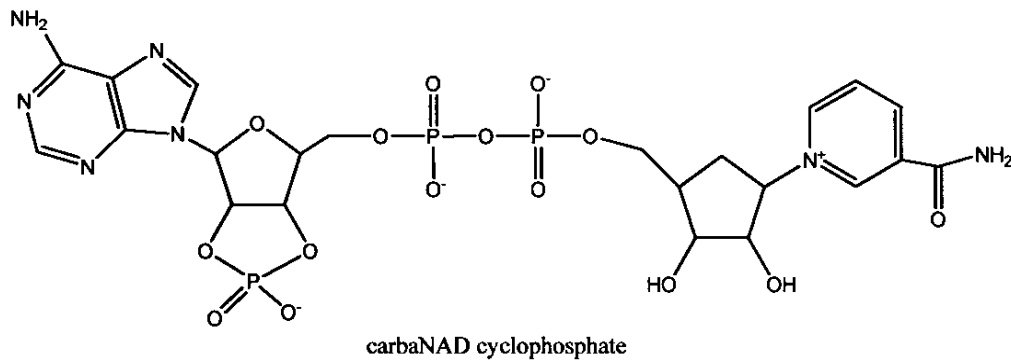
30

【化 2 4】



40

## 【化 25】



10

## 【0088】

式（I）の化合物及びその合成に関するさらなる詳細は、米国特許公報第2008/0231809号に記載されており、その内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0089】

ある実施態様において、試薬材料60、120は、ヒドロキシ酪酸塩の存在及び/又は濃度の検出を促進するように動作可能であり、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素を含む。ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の非限定例は、アルファヒドロキシ酪酸脱水素酵素、ベータ又は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びガンマヒドロキシ酪酸脱水素酵素を含む。ある具体的な形態において、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素である。この実施態様において、試薬材料60、120はさらに、チオNAD、チオNADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは還元型から選択される補酵素を含む。ある具体的な形態において、試薬物質60、120は、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びカルバNADとカルバNADPの1つとを含む。第一の試薬材料が、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びチオNAD、チオNADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは任意のその還元型から選択される補酵素を含む形態において、驚くべきことに、ヒドロキシ酪酸塩の存在及び/又は濃度の検出は、検査素子が試料と接触させられてから5秒間で又は約5秒間で完了することが発見され、これは一般的に、約5秒かかる最先端のグルコース検査に対応する。この点に関するさらなる詳細は、下記の「実施例」に関連して提供される。ヒドロキシ酪酸塩の存在及び/又は濃度の検出を完了するのに5秒超必要な試薬材料の使用もまた、本出願の検査素子での使用に適していることを、理解すべきである。

20

30

## 【0090】

さらに、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びチオNAD、チオNADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは任意に還元型からなる群から選択される補酵素を含む試薬材料の使用が、2つの機能を有する検査素子に関連して記載されているが、1つの機能を有する検査素子に関連する試薬材料の使用も可能であることを理解すべきである。この試薬材料の使用が企図される検査素子の追加の形態の非限定例は、米国特許出願公開番号2005/0016844号及び米国特許第7,008,799号に開示されており、これらの内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。ヒドロキシ酪酸塩の存在及び/又は濃度の検出のために動作可能であるために、この試薬材料は、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びチオNAD、チオNADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは任意に還元型からなる群から選択される補酵素を含む形態において、ジアホラーゼのような追加の酵素を必要としないことも理解すべきである。しかし、第1の試薬材料内へ追加の酵素を含めることも意図される。

40

## 【0091】

第1の試薬素材は、メディエーターを含むこともできる。メディエーターは、検出可能

50

な電子活性反応生成物を生成するために、酵素、第1の分析物、補酵素、及びその反応生成物が関与する反応スキームに参加することができる任意の化学種（一般的に電子活性）として選択することができる。典型的には、反応中のメディエーターの関与は、第1の分析物、酵素、又は補酵素、又はこれらの1つの反応生成物である分子種（例えば、異なる酸化状態に反応した補酵素）との相互作用による酸化状態の変化（例えば、還元）を伴う。種々のメディエーターが、適切な電気化学的挙動を示す。メディエーターは好ましくは、その酸化型でも非常に安定しており、任意に可逆的な酸化還元的電気化学を示し、好ましくは水溶液中で良好な溶解性を示すことができ、好ましくは急速に反応して電気活性な反応生成物を生成することができる。メディエーターの例としては、ベンゾキノン、メルドラブルー、遷移金属錯体、例えばフェリシアン化カリウム及びオスミウム誘導体（国際公開WO98/35225号パンフレットを参照）、及びフェナジン誘導体とヘキサアンミンルテニウムクロリド（米国特許第8,008,037号を参照）を含む。第1の試薬材料はまた、メディエーター前駆体として作用するニトロソアニリン系化合物を含んでよい（例えば、米国特許第5,286,362号を参照）。この点でニトロソアニリン系メディエーター前駆体は、血液などの分析物試料と接触すると、可逆的メディエーター成分に分解する。

#### 【0092】

メディエーター及びニトロソアニリン系メディエーター前駆体のさらなる例には、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-p-ニトロソフェニル-ピペラジン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-p-ニトロソアニリン、o-メトキシ-[N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)]-p-ニトロソアニリン、p-ヒドロキシニトロソベンゼン、N-メチル-N'-(4-ニトロソフェニル)-ピペラジン、p-キノンジオキシム、N,N-ジメチル-p-ニトロソアニリン、N,N-ジエチル-p-ニトロソアニリン、N-(4-ニトロソフェニル)-モルホリン、N-ベンジル-N-(5'-カルボキシペンチル)-p-ニトロソアニリン、N,N-ジメチル-4-ニトロソ-1-ナフチルアミン、N,N,3-トリメチル-4-ニトロソアニリン、N-(2-ヒドロキシエチル)-5-ニトロソインドリン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-3-クロロ-4-ニトロソアニリン、2,4-ジメトキシニトロソベンゼン、N,N-ビス(2-メトキシエチル)-4-ニトロソアニリン、3-メトキシ-4-ニトロソフェノール、N-(2-ヒドロキシエチル)-6-ニトロソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン、N,N-ジメチル-3-クロロ-4-ニトロソアニリン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-3-フルオロ-4-ニトロソアニリン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-3-メチルチオ-4-ニトロソアニリン、N-(2-ヒドロキシエチル)-N-(2-(2-メトキシエトキシ)-エチル)-4-ニトロソアニリン、N-(2-ヒドロキシエチル)-N-(3-メトキシ-2-ヒドロキシ-1-プロピル)-4-ニトロソアニリン、N-(2-ヒドロキシエチル)-N-(3-(2-ヒドロキシエトキシ)-2-ヒドロキシ-1-プロピル)-4-ニトロソアニリン、及びN-(2-ヒドロキシエチル)-N-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)-エチル)-4-ニトロソアニリンがある。

#### 【0093】

試薬材料62、122は、第2の補酵素依存性酵素、又は前記第2の酵素用の基質、及び適切な補酵素を含む。これらの成分は典型的には、マトリックス中に溶解又は懸濁される。液体検査試料はマトリックスを水和又は溶解し、分析物はマトリックス中を拡散して、1つ又はそれ以上の活性成分と反応する。試薬材料62、122に含めることができる適切な酵素は、例えば、グルコース脱水素酵素（EC1.1.1.47）、乳酸脱水素酵素（EC1.1.1.27、1.1.1.28）、リンゴ酸脱水素酵素（EC1.1.1.37）、グリセロール脱水素酵素（EC1.1.1.6）、アルコール脱水素酵素（EC1.1.1.1）、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（HBDH）、例えば3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素又はベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素、アルファヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びガンマヒドロキシ酪酸脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びアミノ酸脱水素酵素、例えばL-アミノ酸脱水素酵素（E.C.1.4.1.5）である。さらなる適切

10

20

30

40

50

な酵素は、オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ（EC 1.1.3.4）、又はコレステロールオキシダーゼ（EC 1.1.3.6）、又はアミノ転移酵素、例えばアスパラギン酸もしくはアラニンアミノ転移酵素、5'-ヌクレオチダーゼ、又はクレアチンキナーゼである。選択された酵素に依存して、試薬物質 62、122 に使用するのに適した可能性のある補酵素は、FAD、NAD、NADP、チオNAD、チオNADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型を含む。

ある実施態様において、試薬材料 60、120 は、ヒドロキシ酪酸塩の存在及び/又は濃度の検出を促進するように動作可能である場合、試薬材料 62、122 は、グルコースの存在及び/又は濃度の検出を促進するように動作可能であり、グルコースに対する酵素を含む。ある具体的な形態において、この酵素は、グルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである。この実施態様において、試薬材料 62、122 はさらに、FAD、NAD、NADP、及び式（I）の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型を更に含む。従前に議論されたことはないが、試薬材料 60 および 62 は、共通の補酵素、例えば、式（I）の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型、を有し、それらの間のスペース 64 が排除されるように一緒に併合されて単一試薬層を形成する形態も企図される。また、グルコースの存在および/または濃度を検出するための本明細書に記載されている試薬材料は限定的ではなく、他の形態も当分野で知られていることを理解すべきである。グルコースの存在及び/又は濃度の検出するように動作可能な試薬材料の追加的な非限定例は、米国特許第 7,727,467 号（上述）及び米国特許第 8,008,037 号に開示されており、これらの内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。第 2 の試薬素材は、メディエーターを含むこともできる。メディエーターは、検出可能な電子活性反応生成物を生成するために、第 2 の酵素、第 2 の分析物、補酵素、及びその反応生成物が関与する反応スキームに参加することができる任意の化学種（一般的に電子活性）として選択することができる。典型的には、反応中のメディエーターの関与は、第 2 の分析物、第 2 の酵素、又は補酵素、又はこれらの 1 つの反応生成物である分子種（例えば、異なる酸化状態に反応した補酵素）との相互作用による酸化状態の変化（例えば、還元）を伴う。種々のメディエーターが、適切な電気化学的挙動を示す。メディエーターは好ましくは、その酸化型でも非常に安定しており、任意に可逆的な酸化還元的電気化学を示し、好ましくは水溶液中で良好な溶解性を示すことができ、好ましくは急速に反応して電気活性な反応生成物を生成することができる。メディエーターの例としては、ベンゾキノン、メルドラブルー、遷移金属錯体、例えばフェリシアン化カリウム及びオスミウム誘導体（国際公開 WO 98/35225 号パンフレットを参照）、及びフェナジン誘導体とヘキサアンミンテニウムクロリド（米国特許第 8,008,037 号を参照）を含む。第 2 の試薬材料はまた、メディエーター前駆体として作用するニトロソアニリン系化合物を含んでよい（例えば、米国特許第 5,286,362 号を参照）。この点でニトロソアニリン系メディエーター前駆体は、血液などの分析物試料と接触すると、可逆的メディエーター成分に分解する。

#### 【0094】

メディエーター及びニトロソアニリン系のメディエーター前駆体のさらなる例には、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-p-ニトロソフェニル-ピペラジン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-p-ニトロソアニリン、o-メトキシ-[N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)]-p-ニトロソアニリン、p-ヒドロキシニトロソベンゼン、N-メチル-N'-(4-ニトロソフェニル)-ピペラジン、p-キノンジオキシム、N,N-ジメチル-p-ニトロソアニリン、N,N-ジエチル-p-ニトロソアニリン、N-(4-ニトロソフェニル)-モルホリン、N-ベンジル-N-(5'-カルボキシペンチル)-p-ニトロソアニリン、N,N-ジメチル-4-ニトロソ-1-ナフチルアミン、N,N,3-トリメチル-4-ニトロソアニリン、N-(2-ヒドロキシエチル)-5-ニトロソインドリン、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-3-クロロ-4-ニトロソアニリン、2,4-ジメトキシニトロソベンゼン、N,N-ビス-(2-メトキシエチル)-4-ニトロソアニリン、3-メトキシ-4-ニトロソフェノール、N-(2

10

20

30

40

50



- ヒドロキシエチル) - 6 - ニトロソ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキノリン、N, N - ジメチル - 3 - クロロ - 4 - ニトロソアニリン、N, N - ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - 3 - フルオロ - 4 - ニトロソアニリン、N, N - ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - 3 - メチルチオ - 4 - ニトロソアニリン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N - (2 - (2 - メトキシエトキシ) - エチル) - 4 - ニトロソアニリン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N - (3 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロピル) - 4 - ニトロソアニリン、及びN - (2 - ヒドロキシエチル) - N - (2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - エチル) - 4 - ニトロソアニリンがある。

【0095】

10

試薬材料はまた、その種々の特性又は特徴を増強するための補助剤を含んでよい。例えば、上記した米国特許第7, 749, 437号を参照。例えば試薬材料60, 62、及び120, 122は、各基板16、114上へのその配置を促進し、そこへの接着を改良するための、又は試料流体による試薬材料の水和物速度を上昇させるための、材料を含んでよい。さらに試薬材料は、生じる乾燥した試薬層の物理的特性を増強し、分析のための液体検査試料の取り込みを増強するために選択される成分を含むことができる。試薬材料とともに使用される補助剤材料の例は、増粘剤、粘度調節剤、成膜剤、安定剤、緩衝剤、界面活性剤、ゲル化剤、充填剤、膜開放剤、着色剤、及びチキソトロピー賦与剤が挙げられる。

【0096】

20

試薬材料に含めることができる増粘剤の非限定的な例には、(1) デンプン、ガム（例えば、ペクチン、グアーガム、ローカストビーン（イナゴマメ種子）ガム、コンニャクガム、キサントガム、アルギン酸、寒天）、カゼイン、ゼラチン、及びフィコロイド；(2) セルロース及び半合成セルロース誘導体（カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース）；(3) ポリビニルアルコール及びカルボキシビニレート；(4) ベントナイト、ケイ酸塩、コロイダルシリカがある。増粘剤のより具体的な形態は、商品名KeltrolでCP Kelco US, Inc.により販売されているキサントガムと、商品名AQUALON（登録商標）CMC 7F PHでHercules Inc., Aqualon Divisionにより販売されているカルボキシメチルセルロースとの組み合わせを含む。

30

【0097】

試薬材料に含めることができる成膜剤及びチキソトロップ剤は、ポリマー及びシリカを含む。1つのより具体的なチキソトロップ剤は、商品名Kieselsaure Sipemate FK 320 DSでDegussa AGにより販売されているシリカを含み、一方、より具体的な成膜剤は、商品名polyvinylpyrrolidone Kollidon 25でBASFによって販売されているポリビニルピロリドン、及びポリビニルプロピオネート分散液を含む。

【0098】

試薬材料中の酵素の安定化剤は、糖類及びモノ - 又はジ - 脂肪酸塩から選択することができる。より具体的な安定剤は、商品名D-(+)-Trehalose dihydrateでSigma Chemical Co.から販売されているトレハロース、及びコハク酸ナトリウムを含む。

40

【0099】

試薬材料に含めることができる界面活性剤の非限定的な例としては、水溶性石鹸、ならびに水溶性合成界面活性化合物、例えば、アルカリ、アルカリ土類、又は任意に置換された高級脂肪酸のアモニウム塩、例えば、オレイン酸又はステアリン酸、天然脂肪酸の混合物、例えば、ココナッツ油又はタロー油、脂肪硫酸塩、スルホン酸のエステル、アルキルスルホン酸の塩、脂肪酸のタウリン塩、脂肪酸アミド、及びエステルアミドを含む。界面活性剤のより具体的な形態は、商品名Mega-8でDojindo Molecular Technologies, Inc.により販売されているエステルアミド、n - オクタノイル - N - メチルグルカミド、及び、商品名Geropon T77でRhodia HPCI (Home, Personal Care and Industrial Ingredients)により販売されている脂肪酸塩、N - メチルオレイルタウリンナトリウム塩を含む。

50

## 【 0 1 0 0 】

ある形態において試薬材料は、その物理的特性を強化するための増粘剤及びチキソトロップ剤を含む粘性溶液として調製される。増粘剤は、均一に分散された残りの成分を有する厚い液体マトリックスを提供するように選択される。増粘剤及びチキソトロップ剤はまた、液体又は半ペースト物質が沈積された後で乾燥する前に、基板 1 6、1 1 4 の表面から流れたり又は広がりこぼれることを防ぐ。試薬材料が沈積された後、これらは急速に乾燥して容易に水和可能なマトリックスとなる。

## 【 0 1 0 1 】

上記したように、第 1 の試薬材料が、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びチオ N A D、チオ N A D P、及び式 ( I ) の化合物又はその塩もしくは任意に還元型から選択される補酵素を含む形態において、検査素子が試料と接触された後 5 秒で又は約 5 秒で、ヒドロキシ酪酸塩の存在及び / 又は濃度の検出を完了することができることが、驚くべきことに発見された。現代の最先端のグルコース検査は、検査素子が試料と接触された後 5 秒で又は約 5 秒でグルコースの存在及び / 又は濃度を検出することを促進する。米国特許第 8 , 0 0 8 , 0 3 7 号は、この時間枠内でグルコースの存在及び / 又は濃度の検出を促進するグルコース検査の非限定的形態を記載する。この時間枠内でグルコースの存在及び / 又は濃度の検出を促進するグルコース検査の追加の非限定例は、米国特許第 7 , 2 7 6 , 1 4 6 号及び 7 , 2 7 6 , 1 4 7 号に記載されてり、これらの両方の内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。しかし、この時間枠内でグルコースの存在及び / 又は濃度の検出を促進する他の試薬材料は公知であり、本明細書に開示される検査素子で使用するであろうことを理解すべきである。

## 【 0 1 0 2 】

上記の観点から、検査素子が、ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、及びチオ N A D、チオ N A D P、及び式 ( I ) の化合物又はその塩もしくは任意に還元型から選択される補酵素を有する第 1 の試薬材料と、グルコースの検出に適しており、適切に調製された第 2 の試薬材料とを含む時、検査素子が試料に接触された 5 秒以内に、ヒドロキシ酪酸塩及びグルコースの存在及び / 又は濃度の検出を完了することができることを理解すべきである。しかし、これらの検査素子を用いてヒドロキシ酪酸塩とグルコースの検出を完了するためのタイミングの変更態様も可能であり、例えば特に試薬材料の具体的な調製に依存することも理解すべきである。例えば、ある形態では、ヒドロキシ酪酸塩とグルコースの検出は、検査素子が試料と接触してから 1 0 秒以内に完了する。別の形態では、ヒドロキシ酪酸塩とグルコースの検出は、検査素子が試料と接触してから 7 . 5 秒以内に完了する。また、ヒドロキシ酪酸塩検出とグルコース検出の完了のタイミングは異なってもよいことを理解すべきである。例えば、上記形態又は他の形態の 1 つ又はそれ以上において、ヒドロキシ酪酸塩検出は、グルコース検出の完了前又は完了後 4 秒以内に完了される。別の変更態様において、ヒドロキシ酪酸塩検出は、グルコース検出の完了前又は完了後 2 秒以内に完了される。さらに別の変更態様において、ヒドロキシ酪酸塩検出は、グルコース検出が完了した時又はほぼ同時に完了される。しかし、ヒドロキシ酪酸塩とグルコース検出の完了のための時間枠の他の変更態様が企図されることを理解すべきである。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 0 3 】

後の実施例は例示目的であり、本明細書で開示された発明をこれらの例に開示された実施態様のみに限定するものとして解釈されるべきではない。

## 【 0 1 0 4 】

試薬材料調製

## 図 6 の試薬材料

7 . 3 4 4 g の M O P S ナトリウム塩、0 . 1 2 5 g のトリトン (登録商標) X - 1 0 0 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO の非イオン性界面活性剤)、2 . 4 0 0 g のトレハロース、及び 2 . 0 2 6 g のコハク酸ナトリウム六水和物を、4 0 0 m L の 2 回蒸留水に加え、溶液の p H を 8 . 1 4 に調整することにより、ストック緩衝液を調製し

た。この溶液を500 mLのメスフラスコに加え、2回蒸留水で希釈して500 mLの溶液を作成した。

【0105】

最初の緩衝液396 gに2 gのポリエチレンオキシド(300 K)と2 gのナトロゾール(登録商標)250 M(Ashland, Inc., Covington, KYの非イオン性水溶性ヒドロキシエチルセルロースポリマー)を組合せることにより、緩衝液/ナトロゾール/PEOポリマー溶液の調製を完了した。この混合物を、使用前に一晩混合した。

【0106】

5.0595 gの緩衝液/ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ニトロソアニリン/カルバNAD試薬材料を調製した：a) 0.0415 gの置換ニトロソアニリン誘導体(Roche Diagnostics, Inc.により供給されるNA1144)をこの容器に加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.7に調整した；b) 3 mLのニトロソアニリン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.0692 gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、c) アルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.2134 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

【0107】

図7の試薬材料

9.086 gのトリス塩基、0.125 gのトリトン(登録商標)X-100、0.625 gのターゲットール(登録商標)15-S-9(The Dow Chemical Company, Midland, MIからの非イオン性界面活性剤)、2.400 gのトレハロース、及び2.026 gのコハク酸ナトリウム六水和物を、400 mLの2回蒸留水に加え、溶液のpHを7.95に調整することにより、ストック緩衝液を調製した。この溶液を500 mLのメスフラスコに加え、2回蒸留水で希釈して500 mLの溶液を作成した。

【0108】

最初の緩衝液396 gに2 gのポリエチレンオキシド(300 K)と2 gのナトロゾール(登録商標)250 Mを組合せることにより、緩衝液/ナトロゾール(登録商標)/PEOポリマー溶液の調製を完了した。この混合物を、使用前に一晩混合した。4.048 gの緩衝液/ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ヘキサアミルテニウム/カルバNAD試薬材料を調製した：a) 0.0619 gの塩化ヘキサアミルテニウムとb) 0.0034 gの1-(3-カルボキシプロピルオキシ)-5-エチルフェナジンをカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；c) 3 mLのヘキサアミルテニウム/フェナジン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.07981 gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.24に調整した。次にアルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.0862 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

【0109】

図8と9の試薬材料

図7の試薬材料に関連して上記した4.048 gのトリス緩衝液/PEO/ナトロゾール(登録商標)ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ヘキサアミルテニウム/カルバNAD試薬材料を調製した：a) 0.062 gの塩化ヘキサアミルテニウムとb) 0.003 gの1-(3-カルボキシプロピルオキシ)-5-エチルフェナジンをカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；c) 3 mLのヘキサアミルテニウム/フェナジン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.079 gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、p

10

20

30

40

50

Hを7.24にした。次にアルカリゲネス・フェカリス (*alcaligenes faecalis*) からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素を容器に加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

【0110】

図10の試薬材料

9.086 gのトリス塩基、0.125 gのトリトン (登録商標) X-100、0.625 gのターゲットール (登録商標) 15-S-9、2.40 gのトレハロース、及び2.026 gのコハク酸ナトリウム六水和物を、400 mLの2回蒸留水に加え、溶液のpHを7.95に調整することにより、ストック緩衝液を調製した。この溶液を500 mLのメスフラスコに加え、2回蒸留水で希釈して500 mLの溶液を作成した。

10

【0111】

最初の緩衝液392 gに8 gのコリドン (登録商標) V A 6 4 (BASF Corporation, Florham Park, NJからのビニルピロリドン-酢酸ビニルコポリマー)を組合せることにより、緩衝液/コリドン (登録商標) V A 6 4 ポリマー溶液の調製を完了した。この混合物を、使用前に一晩混合した。

【0112】

6.071 gの緩衝液/ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ニトロソアニリン/カルバN A D試薬材料を調製した：a) 0.0600 gの未処理ヒュームドシリカ (カボシル (登録商標)、Cabot Corporation, Boston, MA) とb) 0.050 gの置換ニトロソアニリン誘導体 (Roche Diagnostics, Inc.により供給されるN A 1 1 4 4)をこのカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；c) 3 mLのニトロソアニリン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.069 gのカルバN A D遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、d) アルカリゲネス・フェカリス (*alcaligenes faecalis*) からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

20

【0113】

図11の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した4.049 gのトリス/コリドン (登録商標) 緩衝ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ヘキサアミルテニウム/カルバN A D試薬材料を調製した：a) 0.040 gの未処理ヒュームドシリカ (カボシル、Cabot Corporation, Boston, MA)、b) 0.062 gの塩化ヘキサアミルテニウムとc) 0.003 gの1-(3-カルボキシプロピルオキシ)-5-エチルフェナジンをカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；d) 3 mLのヘキサアミルテニウム/フェナジン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.079 gのカルバN A D遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及びe) アルカリゲネス・フェカリス (*alcaligenes faecalis*) からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

30

40

【0114】

図12の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074 gのトリス/コリドン (登録商標) 緩衝ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ニトロソアニリン/カルバN A D試薬材料を調製した：a) 0.060 gの未処理ヒュームドシリカ (カボシル (登録商標)、Cabot Corporation, Boston, MA) とb) 0.050 gの置換ニトロソアニリン誘導体 (Roche Diagnostics, Inc.により供給されるN A 1 1 4 4)をこのカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.8に調整した；c) 3 mLのニトロソアニリン溶液を含有

50

する10mLスピード混合カップに0.069gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、e)アルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.259gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000rpmで2分間スピード混合した。

【0115】

図13の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074gのトリス/コリドン(登録商標)緩衝ポリマーストック溶液を含有する20mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ヘキサアミルテニウム/チオNAD試薬材料を調製した：a)0.060gの未処理ヒュームドシリカ(カボシル、Cabot Corporation, Boston, MA)、b)0.093gの塩化ヘキサアミルテニウムとc)0.005gの1-(3-カルボキシプロピルオキシ)-5-エチルフェナジンをカップに加え、このマトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；d)3mLのヘキサアミルテニウム/フェナジン溶液を含有する10mLスピード混合カップに0.079gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及びe)アルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.259gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000rpmで2分間スピード混合した。

【0116】

図14の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074gのトリス/コリドン(登録商標)緩衝ポリマーストック溶液を含有する20mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ニトロソアニリン/チオNAD試薬材料を調製した：a)0.060gの未処理ヒュームドシリカ(カボシル(登録商標)、Cabot Corporation, Boston, MA)とb)0.050gの置換ニトロソアニリン誘導体(Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, INにより供給されるNA1144)をこのカップに加え、このマトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.8に調整した；c)3mLのニトロソアニリン溶液を含有する10mLスピード混合カップに0.079gのチオNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、d)アルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.259gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000rpmで2分間スピード混合した。

【0117】

図15の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074gのトリス/コリドン(登録商標)緩衝ポリマーストック溶液を含有する20mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ヘキサアミルテニウム/カルバNADP試薬材料を調製した：a)0.060gの未処理ヒュームドシリカ(カボシル、Cabot Corporation, Boston, MA)、b)0.093gの塩化ヘキサアミルテニウムとc)0.005gの1-(3-カルボキシプロピルオキシ)-5-エチルフェナジンをカップに加え、このマトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.9に調整した；c)3mLのヘキサアミルテニウム/フェナジン溶液を含有する10mLスピード混合カップに0.076gのカルバNADP遊離酸を加え、マトリックスを24,000rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及びd)アルカリゲネス・フェカリス(*alcaligenes faecalis*)からの0.259gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000rpmで2分間スピード混合した。

【0118】

図16の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074gのトリス/コリドン(登録商標)緩衝液/ポリマーストック溶液を含有する20mLスピード混合カップに、以下の成分を連

10

20

30

40

50

続して加えることにより、ニトロソアニリン／カルバNADP試薬材料を調製した：a) 0.060 gの未処理ヒュームドシリカ（カボシル、Cabot Corporation, Boston, MA）、b) 0.050 gの置換ニトロソアニリン誘導体（Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, INにより供給されるNA1144）をこのカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.8に調整した；c) 3 mLのニトロソアニリン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.076 gのカルバNADP遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、d) アルカリゲネス・フェカリス（*alcaligenes faecalis*）からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

10

#### 【0119】

##### 図17の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した4.049 gのトリス／コリドン（登録商標）緩衝液／ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、フェリシアニド／カルバNAD試薬材料を調製した：a) 0.040 gの未処理ヒュームドシリカ（カボシル、Cabot Corporation, Boston, MA）とb) 0.026 gのフェリシアン化カリウムをカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.8に調整した；c) 3 mLのフェリシアニド溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.076 gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及びd) アルカリゲネス・フェカリス（*alcaligenes faecalis*）からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

20

#### 【0120】

##### 図18の試薬材料

図10の試薬材料に関連して上記した6.074 gのトリス／コリドン（登録商標）緩衝液／ポリマーストック溶液を含有する20 mLスピード混合カップに、以下の成分を連続して加えることにより、ニトロソアニリン／カルバNAD試薬材料を調製した：a) 0.060 gの未処理ヒュームドシリカ（カボシル（登録商標）、Cabot Corporation, Boston, MA）とb) 0.050 gの置換ニトロソアニリン誘導体（Roche Diagnostics, Inc.により供給されるNA1144）をこのカップに加え、このマトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.8に調整した；c) 3 mLのニトロソアニリン溶液を含有する10 mLスピード混合カップに0.079 gのカルバNAD遊離酸を加え、マトリックスを24,000 rpmで1分間混合し、pHを7.2に調整した；及び、e) アルカリゲネス・フェカリス（*alcaligenes faecalis*）からの0.259 gのベータヒドロキシ酪酸脱水素酵素をカップに加え、24,000 rpmで2分間スピード混合した。

30

#### 【0121】

##### 検査ストリップの調製

スパーサーと毛細管デザインを有するACCU-CHECK（登録商標）Avivaブランド電極のカードを使用して、検査ストリップを作製した。上記した1.5  $\mu$ Lの試薬材料を、PixSys（登録商標）SQシリーズ分注システム（Cartesian Technologies Irvine California）を用いて、各電極のキャピラリーチャンネルに分注し、45℃で1.5分間乾燥した。乾燥したカードを乾燥雰囲気中で一晩保存し、親水性のトップホイルのストリップを、手動的に毛細血管上のスパーサ層上に積層した。次に、カードを個々のセンサーに切断し、使用するまで乾燥バイアル中で保存した。

40

#### 【0122】

##### 検査溶液の調製

0.1829 gのリン酸カリウム一塩基性塩、0.2007 gのリン酸カリウム二塩基性塩、及び2.7956 gの塩化カリウムを、200 mLの2回蒸留水に加え、溶液のpHを7.00に調整することにより、リン酸生理食塩水緩衝液のストック溶液を調製した。この溶液を250 mLのメスフラスコに加え、2回蒸留水で希釈して250 mLの溶液

50

を作成した。

【0123】

1. 3372 g のヒドロキシ酪酸ナトリウム塩を 40 mL のリン酸生理食塩水緩衝液に加えることにより、ヒドロキシ酪酸塩の 21 倍ストック溶液を調製した。この溶液を 50 mL のメスフラスコに加え、リン酸生理食塩水緩衝液で希釈して 50 mL とした。生じたストック溶液をリン酸生理食塩水緩衝液で連続希釈して、11 個のヒドロキシ酪酸塩検査ストックを作製した。

【0124】

リン酸生理食塩水又は血液 1 mL に 0.05 mL の検査ストックをスパイクすることにより、最終試験溶液を調製した。

【0125】

動力学的用量応答

種々のレベルのヒドロキシ酪酸塩 (mM) を含有する全血又は食塩水試料を、上記で調製した検査ストリップを使用して測定した。ストリップ上の試料に接触後、必要な電圧 (ヘキサミンルテニウムストリップについては 222 mV、ニトロソアニリンストリップについては 450 mV) を印加した。総アッセイ時間は 6 秒であった。アッセイのためのエンドポイントは、検査ストリップに試料を接触させた後、0.5 秒 (図 7) 及び 5 秒 (図 9 及び 10) とした。

【0126】

エンドポイント用量応答

種々のレベルのヒドロキシ酪酸塩 (0 ~ 10 mM) を含有する全血又は食塩水試料を、上記で調製した検査ストリップを使用して測定した。アッセイは、試料が検査ストリップに接触後の 4.5 秒の遅延と、この遅延期間後 6 秒間の電圧印加 (ニトロソアニリンストリップについては 450 mV、ヘキサミンルテニウムストリップについては 222 mV) から構成されていた。アッセイのためのエンドポイントは、検査ストリップに試料を接触させた後、5 秒とした。

【0127】

前述したわけではないが、ヒドロキシ酪酸塩濃度と測定された電流との関係が、ヒドロキシ酪酸塩を解析するための典型的な試薬材料の利用を容易にすることが理解されるべきである。

【0128】

本発明を図面及び前述の説明において詳細に説明してきたが、これは例示的であって、限定的ではないと考えられるべきであり、ただ特定の実施例を示して説明してきたのみであると理解すべきであり、全ての変更及び修正は本発明の精神の範囲内で保護されることが望まれる。上記説明における好ましい、「好ましくは」、「好適な」、「さらに好適な」などの用語の使用は、そのように記載された特徴がより望ましいことがあることを示すが、しかし必要でない場合があり、それを欠く実施態様が本発明の範囲 (以下の特許請求の範囲で定義される) 内である場合があることを理解すべきである。特許請求の範囲を読む場合、「1つ(a)」、「1つ(an)」、「少なくとも1つ」、又は「少なくとも1部」などの用語が使用される時、特許請求の範囲に反することが具体的に記載されない限り、具体的に特許請求の範囲を限定する意図は無いことが企図されている。用語「少なくとも一部」及び/又は「一部」が使用される場合、この項目は、特許請求の範囲に反することが具体的に記載されない限り、項目の一部又は全部を含むことができる。

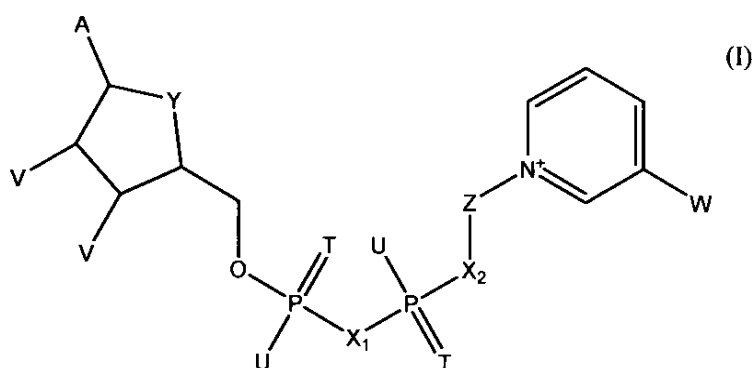
【0129】

本発明のさらなる実施態様は以下に示される。

【0130】

1. 第1及び第2分析物を測定するために構成された検査素子であって、  
第1の補酵素依存性酵素又は前記第1の酵素用の基質と、  
第2の補酵素依存性酵素又は前記第2の酵素用の基質と、  
チオNAD、チオNADP、及び式(I):

## 【化 2 6】



10

## 【 0 1 3 1】

[ 式中、

A は、アデニン又はその類似体を表わし、

T は、各場合に独立して O 又は S を表わし、

U は、各場合に独立して OH、SH、 $\text{BH}_3^-$ 、又は  $\text{BCNH}_2^-$  を表わし、

V は、各場合に独立して OH 又はリン酸基を表わし、

W は、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{COR}$ 、又は  $\text{CSN}(\text{R})_2$  を表わし、ここで、R は各場合に独立して H 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_2$  アルキルを表わし、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$  は、各場合に独立して O、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CHCH}_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、NH、又は  $\text{NCH}_3$  を表わし、Y は、NH、S、O、又は  $\text{CH}_2$  を表わし、Z は、O、S 及び N から選択されるヘテロ原子を任意に含み、1 つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基  $\text{CR}_{4_2}$  ( $\text{CR}_{4_2}$  は前記環状基と  $\text{X}_2$  に結合している) を含む、5 個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、ここで、 $\text{R}_{4_2}$  は、各場合に独立して H、F、Cl、又  $\text{CH}_3$  を表わすが、但し、Z とピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない] の化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型、からなる群から選択される補酵素と、を含む上記検査素子。

## 【 0 1 3 2】

2. 第 1 の分析物がヒドロキシ酪酸塩であり、第 1 の酵素がヒドロキシ酪酸脱水素酵素である、実施態様 1 の検査素子。

## 【 0 1 3 3】

3. ヒドロキシ酪酸脱水素酵素が 3 - ヒドロキシ酪酸脱水素酵素である、実施態様 2 の検査素子。

## 【 0 1 3 4】

4. 第 2 の酵素が、グルコース脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及び L - アミノ酸脱水素酵素を含むアミノ酸脱水素酵素からなる群から選択される脱水素酵素である、実施態様 2 の検査素子。

## 【 0 1 3 5】

5. 第 2 の分析物がグルコースであり、第 2 の酵素がグルコース脱水素酵素又はグルコースオキシダーゼである、実施態様 2 の検査素子。

## 【 0 1 3 6】

6. 実施態様 5 の検査素子であって、補酵素は式 ( I ) :

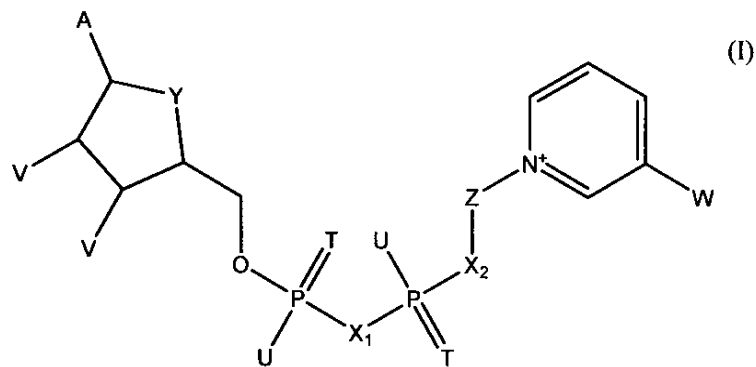
20

30

40



## 【化 2 7】



10

## 【 0 1 3 7】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に O H を表わし、

V は、各場合に O H を表わし、

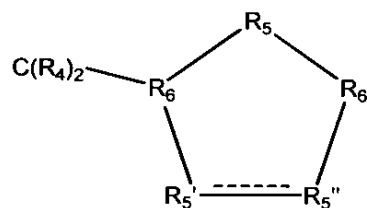
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 2 8】



(II)

30

## 【 0 1 3 8】

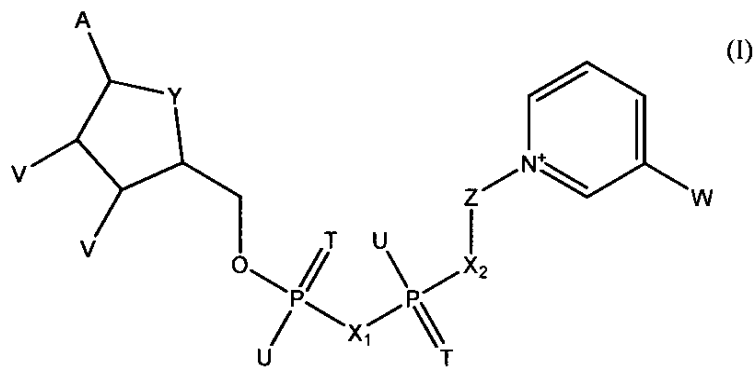
( 式中、 $\text{R}5'$  と  $\text{R}5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R}4$  は、H を表わし、 $\text{R}5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5$  は、 $\text{CR}4_2$  を表わし、 $\text{R}6$  は、CH を表わし、そして $\text{R}6'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である、上記検査素子

40

## 【 0 1 3 9】

7 . 実施態様 5 の検査素子であって、補酵素は式 ( I ) :

## 【化 2 9】



10

## 【 0 1 4 0 】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、第 1 の場合に OH を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし

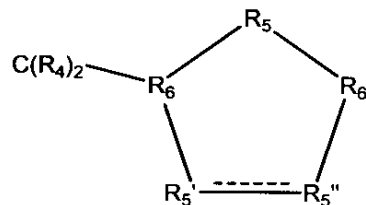
W は、 $\text{CON}(\text{R})_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、 $\text{X}_1$  は、O を表わし、 $\text{X}_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

20

## 【化 3 0】



(II)

30

## 【 0 1 4 1 】

( 式中、 $\text{R}5'$  と  $\text{R}5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、 $\text{R}4$  は、H を表わし、 $\text{R}5'$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5''$  は、 $\text{CHOH}$  を表わし、 $\text{R}5$  は、 $\text{CR}4_2$  を表わし、 $\text{R}6$  は、CH を表わし、そして $\text{R}6'$  は、CH を表わす ) の炭素環式 5 員環を表わす ] の化合物である、上記検査素子

40

## 【 0 1 4 2 】

8 . 補酵素がチオ NAD である、実施態様 5 の検査素子。

## 【 0 1 4 3 】

9 . 補酵素がチオ NADP である、実施態様 5 の検査素子。

50

## 【 0 1 4 4 】

10．第1の試薬材料をさらに含む、実施態様1の検査素子であって、第1の試薬材料が、第1の酵素又は前記第1の酵素用の基質と、チオNAD、チオNADP、及び式(I)の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素とを含む、上記検査素子。

## 【 0 1 4 5 】

11．第2の試薬材料をさらに含む、実施態様10の検査素子であって、第2の試薬材料が、第2の酵素又は前記第2の酵素用の基質と、FAD、NAD、NADP、及び式(I)の化合物又はその塩もしくは任意にその還元型からなる群から選択される補酵素とを含む、上記検査素子。

10

## 【 0 1 4 6 】

12．前記第1及び第2の試薬材料を担持するように構成された検査ストリップをさらに含む、実施態様11の検査素子。

## 【 0 1 4 7 】

13．前記検査ストリップが、第1の試薬材料に関する第1の電極系と、第2の試薬材料に関する第2の電極系とを含む、実施態様12の検査素子。

## 【 0 1 4 8 】

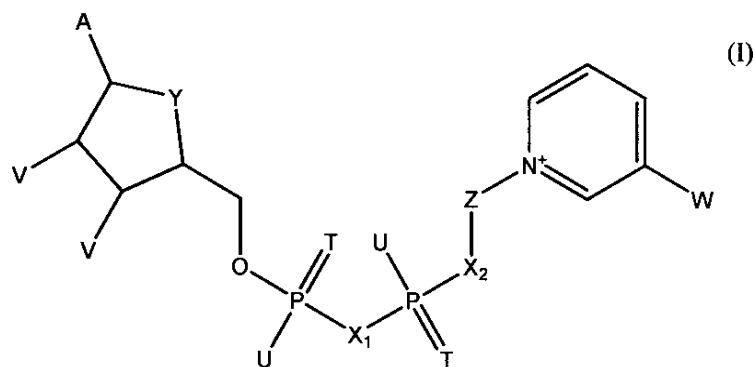
14．前記第1の試薬材料が、ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン誘導体と塩化ヘキサアミルテニウムとの組み合わせ、の1つをさらに含む、実施態様10の検査素子。

20

## 【 0 1 4 9 】

15．試薬材料であって、  
3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素と、  
式(I)：

## 【化31】



30

## 【 0 1 5 0 】

[ 式中、

40

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、BH<sub>3</sub><sup>-</sup>、又はBCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、COOR、CON(R)<sub>2</sub>、COR、又はCSN(R)<sub>2</sub>を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキルを表わし、

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>は、各場合に独立してO、CH<sub>2</sub>、CHCH<sub>3</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NH、又はNCH<sub>3</sub>を表わし、

Yは、NH、S、O、又はCH<sub>2</sub>を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換

50

基を任意に含み、及び残基  $CR_4$  ( $CR_4$  は前記環状基と  $X_2$  に結合している) を含む、5 個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

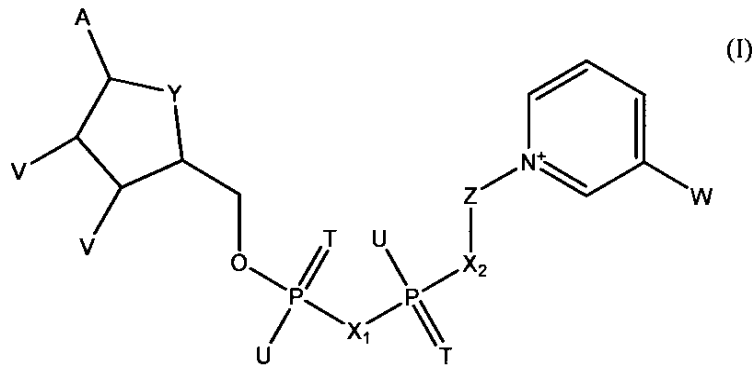
ここで、 $R_4$  は、各場合に独立して H、F、Cl、又  $CH_3$  を表わすが、但し、Z とピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない] の補酵素化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型と、を含む上記試薬材料。

【0151】

16. 実施態様 15 の試薬材料であって、前記補酵素化合物が、式 (I) :

【化 3 2】



【0152】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に OH を表わし、

V は、各場合に OH を表わし、

W は、 $CON(R)_2$  を表わし、ここで R は H を表わし、

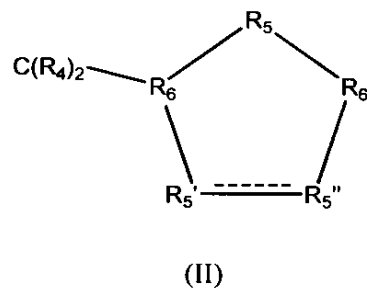
$X_1$  は、O を表わし、

$X_2$  は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 (II)

【化 3 3】



【0153】

( 式中、 $R_5'$  と  $R_5''$  との間に 1 重結合が存在し、ここで、

$R_4$  は、H を表わし、

$R_5'$  は、 $CHOH$  を表わし、

$R_5''$  は、 $CHOH$  を表わし、

$R_5$  は、 $CR_4$  を表わし、

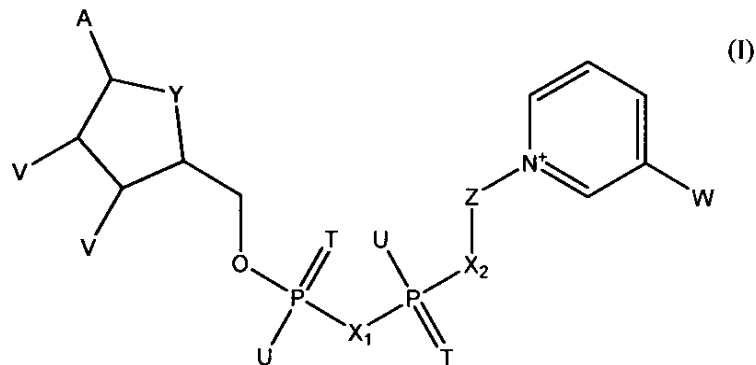
R 6 は、C Hを表わし、そして

R 6 ' は、C Hを表わす)の飽和炭素環式 5 員環を表わす]に従う、上記試薬材料。

【 0 1 5 4 】

1 7 . 実施態様 1 5 の試薬材料であって、前記補酵素化合物が、式 ( I ) :

【化 3 4 】



10

【 0 1 5 5 】

[ 式中、

A は、アデニンを表わし、

T は、各場合に O を表わし、

U は、各場合に O H を表わし、

V は、第 1 の場合に O H を表わし、第 2 の場合にリン酸基を表わし

W は、C O N ( R )<sub>2</sub>を表わし、ここで R は H を表わし、

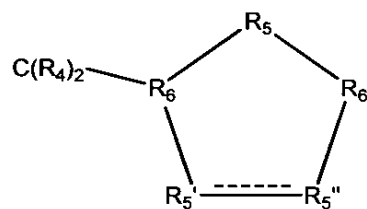
X<sub>1</sub> は、O を表わし、

X<sub>2</sub> は、O を表わし、

Y は、O を表わし、そして

Z は、一般式 ( I I )

【化 3 5 】



(II)

40

【 0 1 5 6 】

( 式中、R 5 ' と R 5 '' との間に 1 重結合が存在し、ここで、

R 4 は、H を表わし、

R 5 ' は、C H O H を表わし、

R 5 '' は、C H O H を表わし、

R 5 は、C R 4<sub>2</sub>を表わし、

R 6 は、C H を表わし、そして

R 6 ' は、C H を表わす)の飽和炭素環式 5 員環を表わす]に従う、上記試薬材料。

【 0 1 5 7 】

50

18．ニトロソアニリン、フェリシアン化カリウム、及びフェナジン誘導体と塩化ヘキサミンルテニウムとの組み合わせ、の1つをさらに含む、実施態様15の試薬材料。

【0158】

19．第1の分析物を測定するための、実施態様15の第1の試薬材料を担持する検査ストリップを含む検査素子。

【0159】

20．前記検査ストリップが、第2の分析物を測定するための第2の試薬材料をさらに担持する、実施態様19の検査素子。

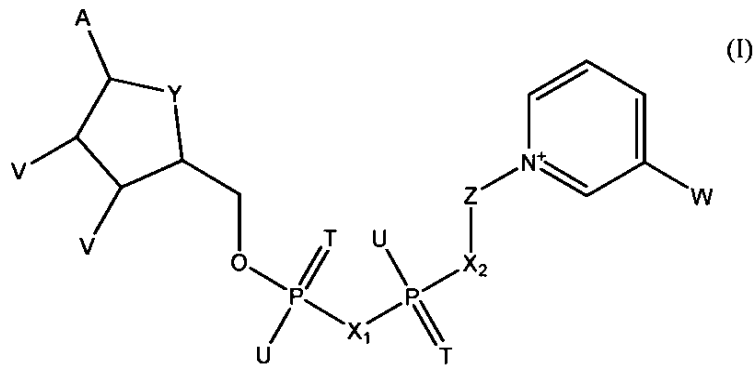
【0160】

21．前記第2の試薬材料が、グルコース脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、及びL-アミノ酸脱水素酵素を含むアミノ酸脱水素酵素からなる群から選択される脱水素酵素を含む、実施態様20の検査素子。

【0161】

22．実施態様21の検査素子であって、第2の試薬材料が、FAD、NAD、NADP、及び式(I)：

【化36】



【0162】

[式中、

Aは、アデニン又はその類似体を表わし、

Tは、各場合に独立してO又はSを表わし、

Uは、各場合に独立してOH、SH、BH<sub>3</sub><sup>-</sup>、又はBCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>を表わし、

Vは、各場合に独立してOH又はリン酸基を表わし、

Wは、COOR、CON(R)<sub>2</sub>、COR、又はCSN(R)<sub>2</sub>を表わし、ここで、Rは各場合に独立してH又はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキルを表わし、

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>は、各場合に独立してO、CH<sub>2</sub>、CHCH<sub>3</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NH、又はNCH<sub>3</sub>を表わし、

Yは、NH、S、O、又はCH<sub>2</sub>を表わし、

Zは、O、S及びNから選択されるヘテロ原子を任意に含み、1つ又はそれ以上の置換基を任意に含み、及び残基CR<sub>4</sub><sub>2</sub>(CR<sub>4</sub><sub>2</sub>は前記環状基とX<sub>2</sub>に結合している)を含む、5個の炭素原子を有する環状基を含む残基を表わし、

ここで、R<sub>4</sub>は、各場合に独立してH、F、Cl、又はCH<sub>3</sub>を表わすが、但し、Zとピリジン残基はグリコシド結合により連結されていない]の化合物、

又は、その塩もしくは任意にその還元型、とからなる群から選択される補酵素をさらに含む、上記検査素子。

【0163】

23．検査ストリップが、前記第1及び第2の分析物を電気化学的に測定するために構

成されている、実施態様 20 の検査素子。

【0164】

24．試料中の第1及び第2の分析物を測定するための方法であって、  
実施態様1の検査素子を設ける工程と、  
前記検査素子に前記試料を接触させる工程と、  
前記第1の分析物を検出する工程と、  
前記第2の分析物を検出する工程と、を含む上記方法。

【0165】

25．前記第1の分析物がヒドロキシ酪酸塩であり、前記第2の分析物がグルコースである、実施態様24の方法。

10

【0166】

26．前記第1の分析物を検出する工程と前記第2の分析物を検出する工程が同時に行われる、実施態様25の方法。

【0167】

27．前記第1の分析物を検出する工程と前記第2の分析物を検出する工程が、検査素子に試料を接触後5秒以内に完了する、実施態様25の方法。

【0168】

28．試料中のグルコース値とケトン値とを測定するように構成された検査素子を設ける工程と；

前記検査素子に試料を接触させる工程と；

20

前記検査素子に試料を接触後7.5秒以内に試料中のグルコース値とケトン値とを測定する工程と、を含む方法。

【0169】

29．前記検査素子が、グルコース値を測定するための第1の試薬材料と、ケトン値を測定するための第2の試薬材料とを含む、実施態様28の方法。

【0170】

30．前記第2の試薬材料がヒドロキシ酪酸脱水素酵素を含む、実施態様29の方法。

【0171】

31．前記試料中のグルコース値とケトン値とを測定する工程が、検査素子に試料を接触後5秒以内に完了する、実施態様28の方法。

30

【0172】

32．前記測定工程中に、グルコース値とケトン値は、互いに2秒以内に測定される、実施態様28の方法。

【0173】

33．前記試料が血液を含む、実施態様28の方法。

【図 1】

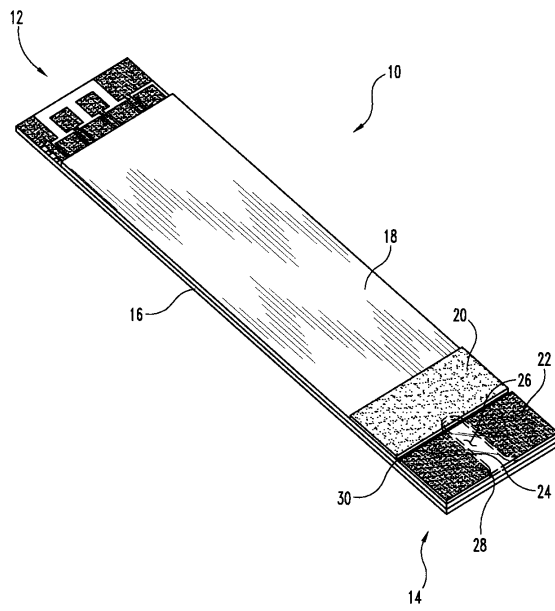


図1

【図 2】

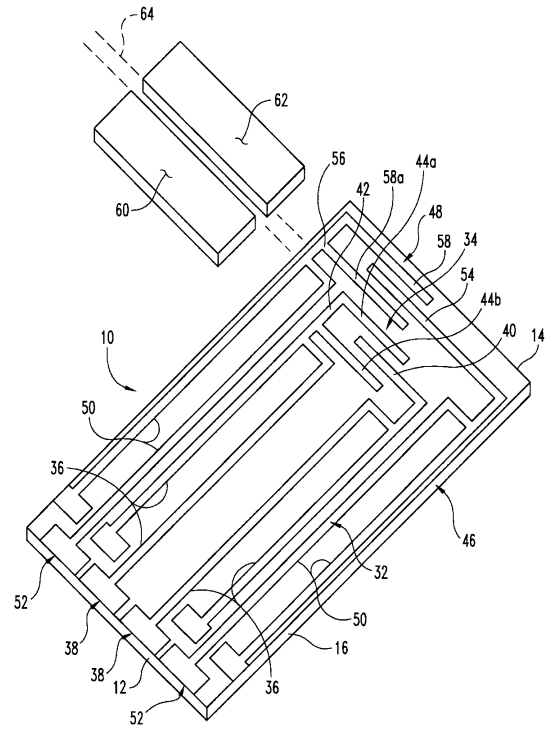


図2

【図 3】

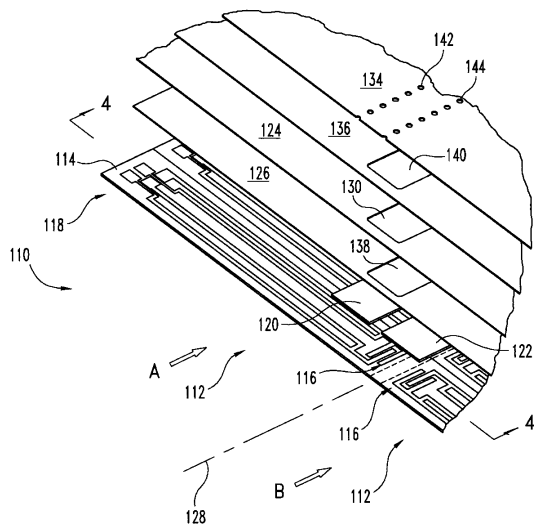


図3

【図 4】

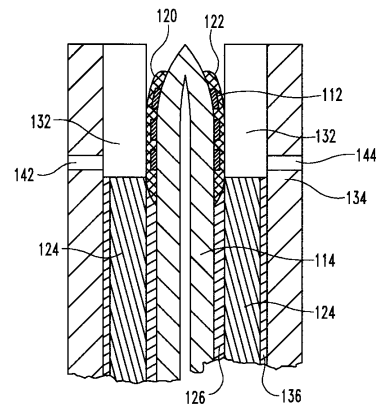


図4



【図 5】

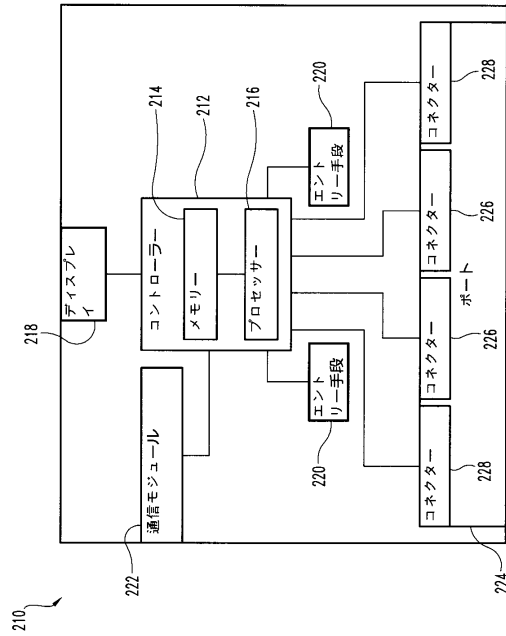


図 5

【図 6】

ヒドロキシ脂肪酸塩用量応答  
150mM Mops緩衝液 / 0.5% PEO / 0.5% ナトリウム (登録商標) / 120 $\mu$ L ヒドロキシ脂肪酸塩酵素 /  
/ 30mM NAI144 / 35mM cNAD  
pH 7.61  
試料 - 10mM リン酸塩 / 150mM KCL / ヒドロキシ脂肪酸塩

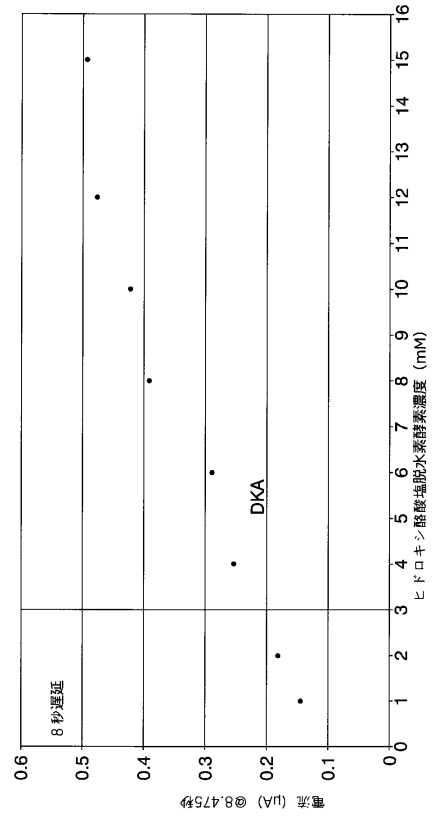


図 6

【図 7】

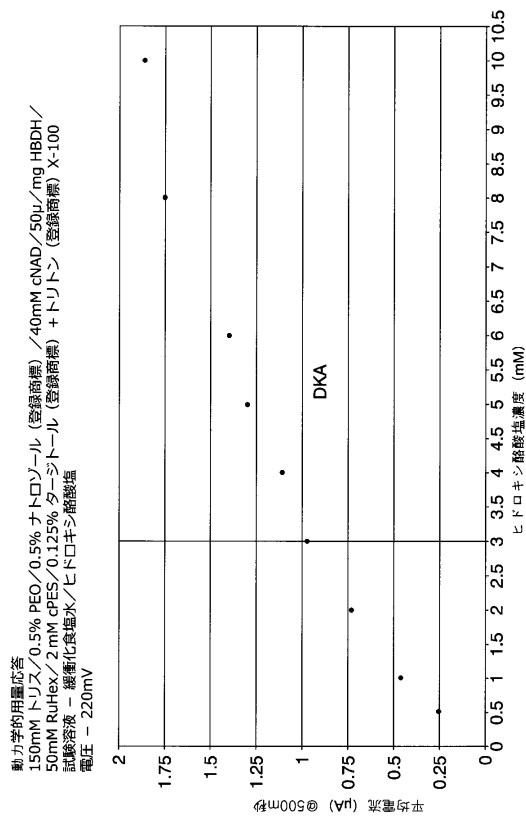


図 7

【図 8】

血液用量応答  
150mM トリス / 0.5% PEO / 0.5% ナトリウム (登録商標) / 40mM cNAD / 150  $\mu$ g HBDH / 50mM RuHex  
/ 2 mM cPES / 0.125% ターゲット (登録商標) / 0.025% トリトン (登録商標) X-100  
試験溶液 - スパイク血液 (Hct 42) / ヒドロキシ脂肪酸塩  
電圧 - 220mV

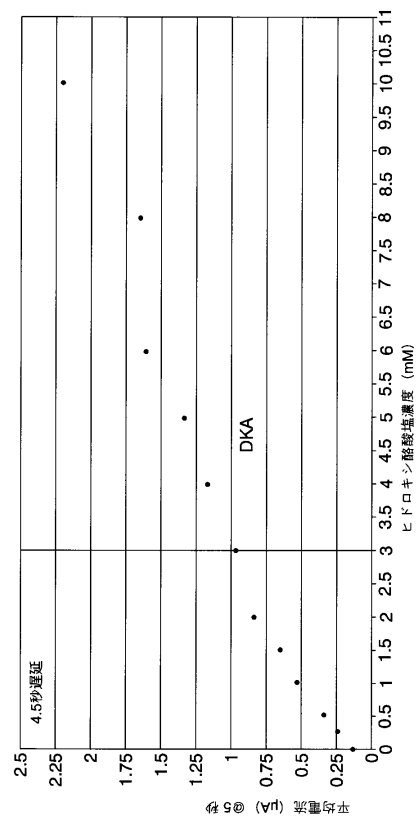
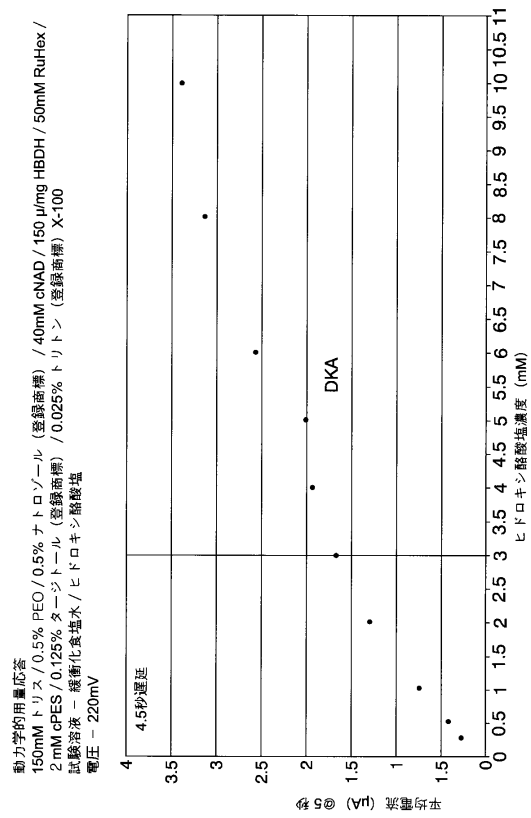
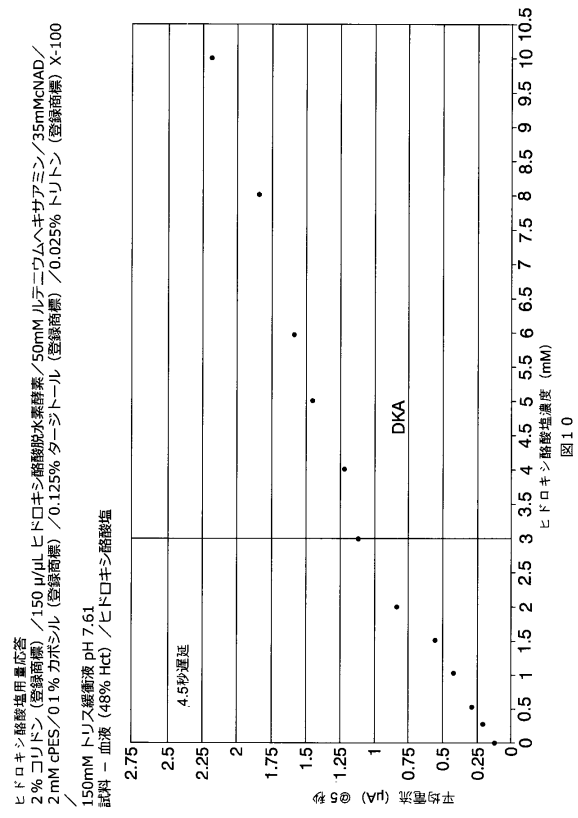


図 8

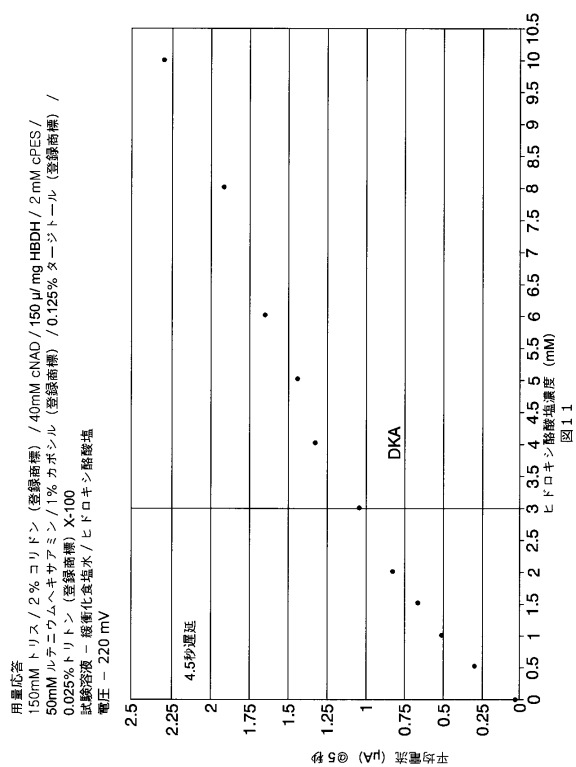
【図 9】



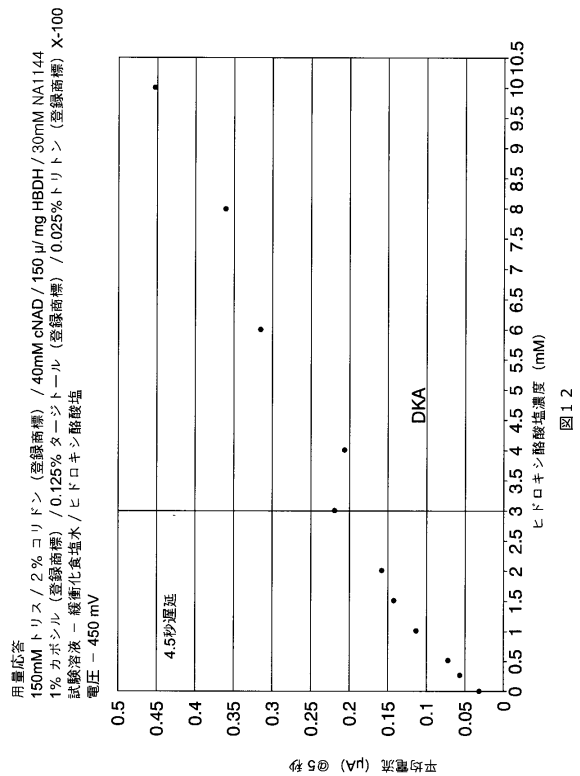
【図 10】



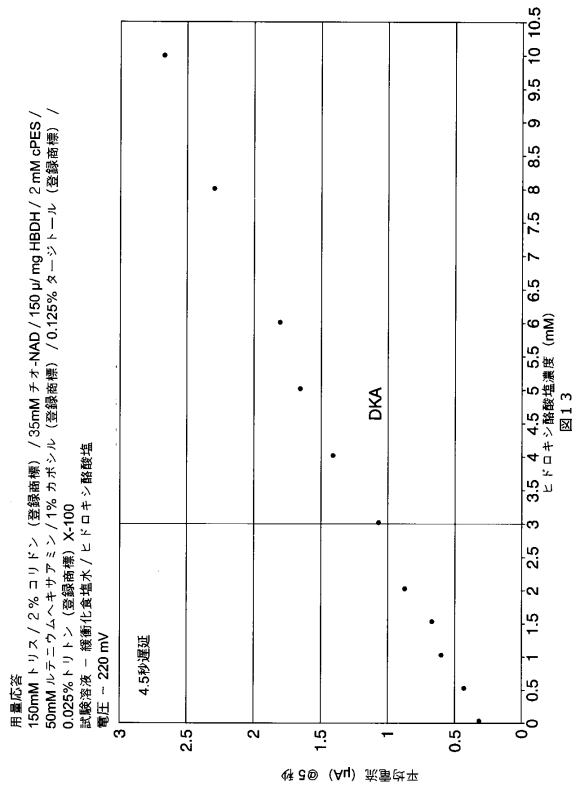
【図 11】



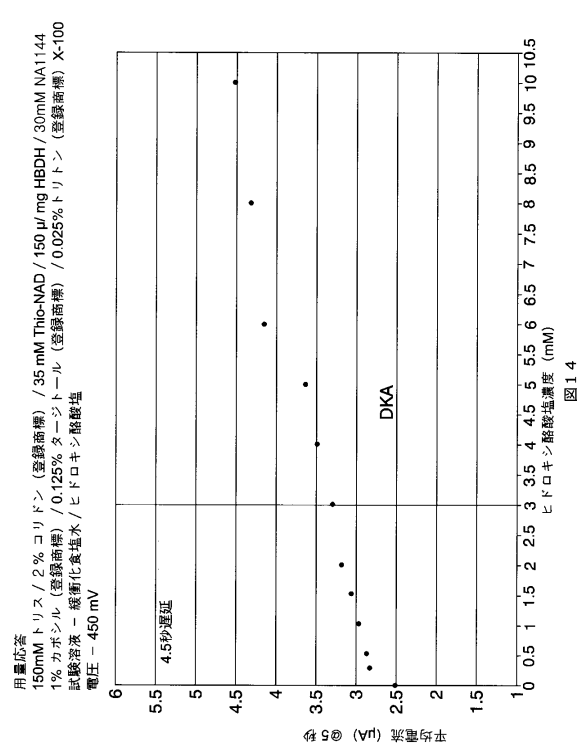
【図 12】



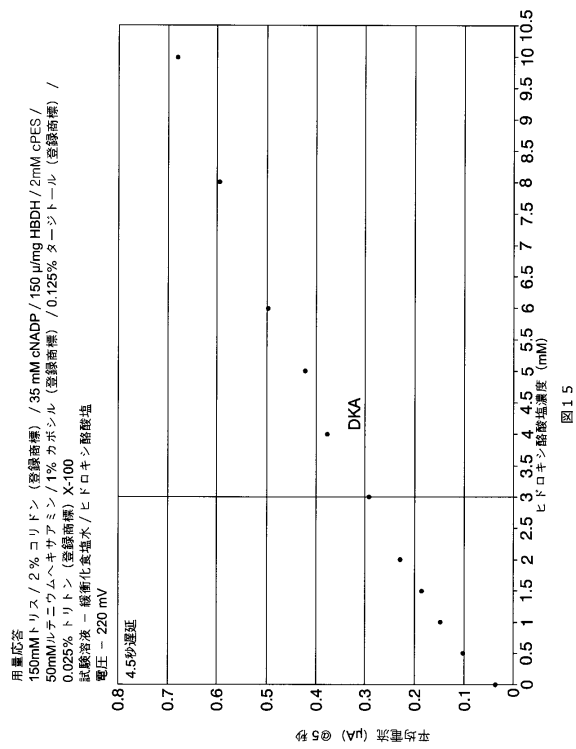
【図 13】



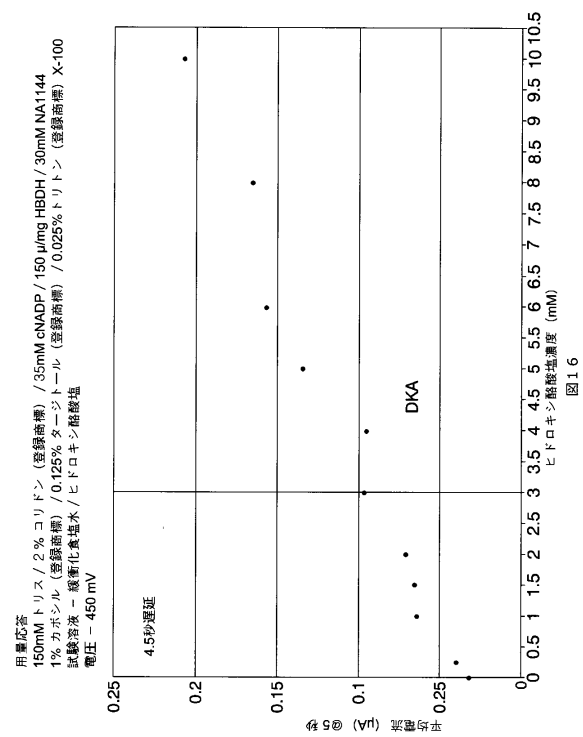
【図 14】

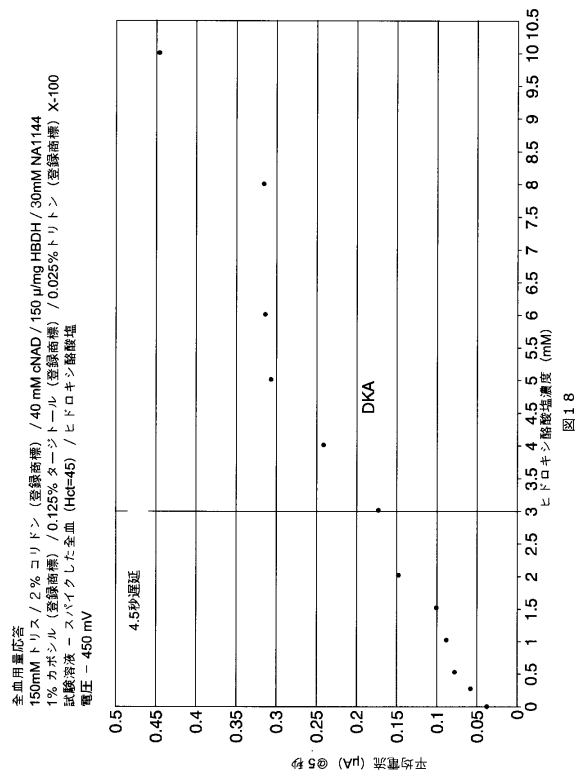
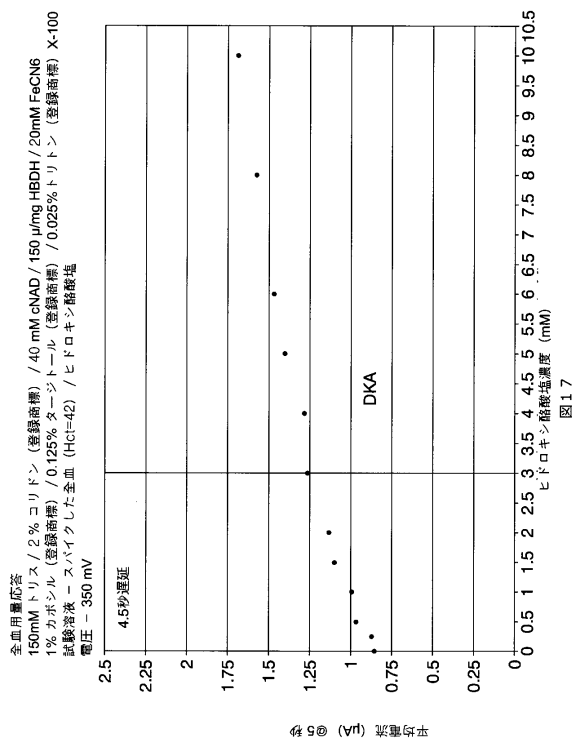


【図 15】



【図 16】





---

フロントページの続き

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 クリストファー ディー・ウィルジー

アメリカ合衆国, インディアナ 46032, カーメル, オーク ドライブ 516

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2003-518249(JP, A)

米国特許出願公開第2006/0051738(US, A1)

米国特許出願公開第2003/0068666(US, A1)

国際公開第2011/020856(WO, A1)

国際公開第2011/020914(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/32

G01N 27/416

C07H 19/207

C12N 9/04

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CAPLUS/REGISTRY(STN)