

【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 6 部門第 1 区分

【発行日】平成25年11月14日 (2013.11.14)

【公開番号】特開2012-233922(P2012-233922A)

【公開日】平成24年11月29日 (2012.11.29)

【年通号数】公開・登録公報2012-050

【出願番号】特願2012-186627(P2012-186627)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/72 (2006.01)

C 1 2 Q 1/26 (2006.01)

C 1 2 Q 1/28 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/72 A

C 1 2 Q 1/26 Z N A

C 1 2 Q 1/28

C 1 2 Q 1/37

G 0 1 N 21/78 Z

C 1 2 N 9/04 Z

【手続補正書】

【提出日】平成25年10月2日 (2013.10.2)

【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】

血液サンプルにおける総ヘモグロビンに対する総糖化ヘモグロビンのパーセント、または総ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビン A 1 c のパーセントを、該血液サンプル中の総ヘモグロビンを別のプロセスにおいて測定することなく、直接定量するための方法であって：

a) 糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸を含むタンパク断片を、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼに接触させて過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を生成する工程であって、該タンパク断片は、該血液サンプルを、1) 該血液サンプル中の赤血球からヘモグロビンを放出させる溶解バッファー、2) 低分子量還元性物質を選択的に酸化する第 1 酸化剤、3) 高分子量還元性物質を選択的に酸化する第 2 酸化剤、および 4) 糖化ヘモグロビンを糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸に消化するプロテアーゼ、に接触させることによって生成される、工程；

b) 工程 a) において生成される  $H_2O_2$  を、ペルオキシダーゼの存在下に発色性物質に接触させて測定可能な信号を生成する工程；ならびに、

c) 工程 b) において生成される信号を、校正曲線に適用することによって、該血液サンプル中の総ヘモグロビンを別に測定することなく、該サンプル中の総糖化ヘモグロビンのパーセント、または糖化ヘモグロビン A 1 c のパーセントを決定する工程、を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 酸化剤が、D e s s - M a r t i n ペルヨージナンか、または N - エチルマレイミドであり、前記第 2 酸化剤がテトラゾリウム塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記溶解バッファーが、前記第 1 酸化剤または前記第 2 酸化剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記溶解バッファーが、前記第 1 酸化剤および前記第 2 酸化剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記溶解バッファーが、前記第 1 酸化剤、前記第 2 酸化剤、および前記プロテアーゼを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記溶解バッファーが前記プロテアーゼを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 酸化剤および前記第 2 酸化剤が、単一組成物中に処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 酸化剤および前記第 2 酸化剤が、別の組成物中に処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記プロテアーゼが、前記第 1 酸化剤または前記第 2 酸化剤と共に、単一組成物中に処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 酸化剤、前記第 2 酸化剤、および前記プロテアーゼが、単一組成物中に処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、前記ペルオキシダーゼ、および前記発色性物質が、単一組成物中に処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

テトラゾリウム塩が、2 - ( 4 - ヨードフェニル ) - 3 - ( 2 , 4 - ジニトロフェニル ) - 5 - ( 2 , 4 - ジスルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩、または 2 - ( 4 - ヨードフェニル ) - 3 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 5 - ( 2 , 4 - ジスルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記発色性物質が、N - カルボキシメチルアミノカルボニル ) - 4 , 4 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - ジフェニルアミンナトリウム塩 ( D A - 6 4 ) 、 N , N , N ' N ' , N " , N " - ヘキサ ( 3 - スルホプロピル ) - 4 , 4 ' , 4 " , - トリアミノ - トリフェニルメタン 6 ナトリウム塩 ( T P M - P S ) 、または 10 - ( カルボキシメチルアミノカルボニル ) - 3 , 7 - ビス ( ジメチルアミノ ) - フェノチアジンナトリウム塩 ( D A - 6 7 ) である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記血液サンプルが、全血液、または収集血球である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記プロテアーゼが、エンド型プロテアーゼか、またはエキソ型プロテアーゼである、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記プロテアーゼが、プロテイナーゼ K、プロナーゼ E、サーモリシン、スブチリシン、およびウシすい臓プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記プロテアーゼが、アスペルギルス (Aspergillus) 属またはバチルス (Bacillus) 属微生物起源の中性プロテアーゼである、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記プロテアーゼが、2 から 30 のアミノ酸残基の糖化ペプチドを生成する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記プロテアーゼが、糖化グリシン、糖化バリン、または糖化リシン残基、あるいは、糖化グリシン、糖化バリン、または糖化リシン残基を含む糖化ペプチドを生成する、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記ペルオキシダーゼが、西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記糖化ペプチド、または糖化アミノ酸を含む、前記タンパク断片が、前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼおよび前記ペルオキシダーゼに、順次、または同時に接触される、請求項 1 ~ 10 および 12 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 23】**

疾患または障害の予後または診断に使用される、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記疾患または障害が、糖尿病である、請求項 23 に記載の方法。

**【請求項 25】**

血液サンプルにおける総ヘモグロビンに対する総糖化ヘモグロビンのパーセント、または総ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビン A1c のパーセントを、血液サンプル中の総ヘモグロビン含量の別途の測定を要することなく、直接定量するためのキットであって：

a) 血球を溶解してヘモグロビンを放出させる溶解バッファー；

b) 低分子量還元性物質を選択的に酸化する第 1 酸化剤；

c) 高分子量還元性物質を選択的に酸化する第 2 酸化剤；

d) ヘモグロビンを、糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸を含むタンパク断片に加水分解するプロテアーゼ；

e) 糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸と反応して、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を生成する、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ；

f) ペルオキシダーゼおよび発色性物質；

g) 校正曲線を構築するために使用される、既知パーセントの糖化ヘモグロビン、または既知パーセントの糖化ヘモグロビン A1c を有する校正因子 (単数または複数)、ならびに、

h) 請求項 1 に記載の方法を実行するための指示書、を含む、キット。

**【請求項 26】**

前記第 1 酸化剤および前記第 2 酸化剤が、前記溶解バッファーの中に含まれる、請求項 25 に記載のキット。

**【請求項 27】**

前記第 1 酸化剤および前記第 2 酸化剤が、前記プロテアーゼと同じバッファーに含まれる、請求項 25 に記載のキット。

**【請求項 28】**

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、前記ペルオキシダーゼ、および前記発色性物質が、単一組成物中に処方される、請求項 25 に記載のキット。

**【請求項 29】**

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 25 ~ 28 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 30】**

前記第 1 酸化剤が、D e s s - M a r t i n ペルヨージナンか、または N - エチルマレイミドであり、前記第 2 酸化剤がテトラゾリウム塩である、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 31】**

前記テトラゾリウム塩が、2 - ( 4 - ヨードフェニル ) - 3 - ( 2 , 4 - ジニトロフェニル ) - 5 - ( 2 , 4 - ジスルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩、または 2 - ( 4 - ヨードフェニル ) - 3 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 5 - ( 2 , 4 - ジスルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩である、請求項 30 に記載のキット

。

**【請求項 32】**

前記発色性物質が、N - カルボキシメチルアミノカルボニル ) - 4 , 4 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - ジフェニルアミンナトリウム塩 ( D A - 6 4 )、N , N , N ' N ' , N " , N " - ヘキサ ( 3 - スルホプロピル ) - 4 , 4 ' , 4 " , - トリアミノ - トリフェニルメタン 6 ナトリウム塩 ( T P M - P S )、または 10 - ( カルボキシメチルアミノカルボニル ) - 3 , 7 - ビス ( ジメチルアミノ ) - フェノチアジンナトリウム塩 ( D A - 6 7 ) である、請求項 25 ~ 31 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 33】**

前記ペルオキシダーゼが、西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 34】**

前記プロテアーゼが、エンド型プロテアーゼか、またはエキソ型プロテアーゼである、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 35】**

前記プロテアーゼが、プロテイナーゼ K、プロナーゼ E、サーモリシン、スブチリシン、およびウシすい臓プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 36】**

前記プロテアーゼが、アスペルギルス ( A s p e r g i l l u s ) 属またはバチルス ( B a c i l l u s ) 属微生物起源の中性プロテアーゼである、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 37】**

血液サンプルにおける総ヘモグロビンに対する総糖化ヘモグロビンのパーセント、または総ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビン A 1 c のパーセントを、該血液サンプル中の総ヘモグロビンを別のプロセスにおいて測定することなく、直接定量するための方法であって：

a ) 糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸を含むタンパク断片を、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼに接触させて過酸化水素 ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) を生成する工程であって、該タンパク断片は、該血液サンプルを、1 ) 該血液サンプル中の赤血球からヘモグロビンを放出させる溶解バッファー、2 ) テトラゾリウム塩である酸化剤、および 3 ) 糖化ヘモグロビンを糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸に消化するプロテアーゼ、に接触させることによって生成され、ここで、該フルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むか、または配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの機能的断片もしくは誘導体であり、該機能的断片もしくは該誘導体は、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの活性の

少なくとも50%を保持する、工程；

b) 工程a)において生成される $H_2O_2$ を、ペルオキシダーゼの存在下に発色性物質に接触させて測定可能な信号を生成する工程；ならびに、

c) 工程b)において生成される信号を、校正曲線に適用することによって、該血液サンプル中の総ヘモグロビンを別に測定することなく、該サンプル中の総糖化ヘモグロビンのパーセント、または糖化ヘモグロビンA1cのパーセントを決定する工程、を含む、方法。

【請求項38】

前記溶解バッファーが前記酸化剤を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記溶解バッファーが前記プロテアーゼを含む、請求項37または38に記載の方法。

【請求項40】

前記酸化剤および前記プロテアーゼが、単一組成物中に処方される、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項37～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

前記テトラゾリウム塩が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムナトリウム塩、または2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムナトリウム塩である、請求項37～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

前記発色性物質が、N-カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)-ジフェニルアミンナトリウム塩(DA-64)、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4'',-トリアミノ-トリフェニルメタン6ナトリウム塩(TPM-PS)、または10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-フェノチアジンナトリウム塩(DA-67)である、請求項37～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

前記ペルオキシダーゼが、西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項37～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

前記プロテアーゼが、エンド型プロテアーゼか、またはエキソ型プロテアーゼである、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

前記プロテアーゼが、プロテイナーゼK、プロナーゼE、サーモリシン、スブチリシン、およびウシすい臓プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

前記プロテアーゼが、アスペルギルス(Aspergillus)属またはバチルス(Bacillus)属微生物起源の中性プロテアーゼである、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

前記機能的断片または前記誘導体が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの活性の少なくとも90%を保持する、請求項37～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

血液サンプルにおける総ヘモグロビンに対する総糖化ヘモグロビンのパーセント、また

は総ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビン A 1 c のパーセントを、血液サンプル中の総ヘモグロビン含量の別途の測定を要することなく、直接定量するためのキットであって：

- a) 血球を溶解してヘモグロビンを放出させる溶解バッファー；
- b) テトラゾリウム塩である酸化剤；
- c) ヘモグロビンを、糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸を含むタンパク断片に加水分解するプロテアーゼ；
- d) 糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸と反応して、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を生成する、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼであって、該フルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むか、または配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの機能的断片もしくは誘導体であり、該機能的断片もしくは該誘導体は、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの活性の少なくとも 50 % を保持する、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ；
- e) ベルオキシダーゼおよび発色性物質；
- f) 校正曲線を構築するために使用される、既知パーセントの糖化ヘモグロビン、または既知パーセントの糖化ヘモグロビン A 1 c を有する校正因子（単数または複数）、ならびに、
- g) 請求項 37 に記載の方法を実行するための指示書、を含む、キット。

【請求項 50】

前記酸化剤が、前記溶解バッファーの中に含まれる、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 51】

前記プロテアーゼが、前記溶解バッファーの中に含まれる、請求項 49 または 50 に記載のキット。

【請求項 52】

前記酸化剤および前記プロテアーゼが、単一組成物中に処方される、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 53】

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 54】

前記テトラゾリウム塩が、2 - (4 - ヨードフェニル) - 3 - (2, 4 - ジニトロフェニル) - 5 - (2, 4 - ジスルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩、または 2 - (4 - ヨードフェニル) - 3 - (4 - ニトロフェニル) - 5 - (2, 4 - ジスルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウムナトリウム塩である、請求項 49 ~ 53 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 55】

前記発色性物質が、N - カルボキシメチルアミノカルボニル) - 4, 4' - ビス(ジメチルアミノ) - ジフェニルアミンナトリウム塩(DA - 64)、N, N, N', N', N'', N'' - ヘキサ(3 - スルホプロピル) - 4, 4', 4'', 4''', 4''', 4'''' - トリアミノ - トリフェニルメタン 6 ナトリウム塩(TPM - PS)、または 10 - (カルボキシメチルアミノカルボニル) - 3, 7 - ビス(ジメチルアミノ) - フェノチアジンナトリウム塩(DA - 67)である、請求項 49 ~ 54 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 56】

前記ベルオキシダーゼが、西洋ワサビベルオキシダーゼである、請求項 49 ~ 55 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 57】

前記プロテアーゼが、エンド型プロテアーゼか、またはエキソ型プロテアーゼである、請求項 49 ~ 56 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 58】

前記プロテアーゼが、プロテイナーゼK、プロナーゼE、サーモリシン、スブチリシン、およびウシすい臓プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求項49～56のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項59】**

前記プロテアーゼが、アスペルギルス (Aspergillus) 属またはバチルス (Bacillus) 属微生物起源の中性プロテアーゼである、請求項49～56のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項60】**

前記機能的断片または前記誘導体が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を含むフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの活性の少なくとも90%を保持する、請求項49～59のいずれか一項に記載のキット。