

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. August 2019 (15.08.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/154559 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: *G01N 33/569* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01) Oestrich-Winkel (DE). **HEKTOR, Thomas**; Draustraße 5, 64347 Griesheim (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/025002 (74) **Anwalt: BAUMBACH, F.**; Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 03. Januar 2019 (03.01.2019) (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 18000114.1 08. Februar 2018 (08.02.2018) EP
- (71) Anmelder: **R-BIOPHARM AG** [DE/DE]; An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt (DE).
- (72) Erfinder: **WEIB, Thomas**; Lerchenweg 9a, 64291 Darmstadt (DE). **LACORN, Markus**; Fontanestraße 3, 65375

(54) **Title:** METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF THE TOTAL GLUTEN CONTENT OF GRAINS IN FOOD SAMPLES
(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON GESAMTGLUTEN AUS GETREIDE IN LEBENSMITTELPROBEN

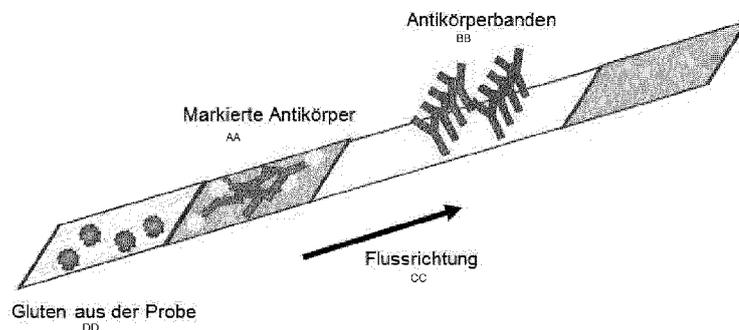


Abbildung 1
EE

- | | | | |
|----|---------------------|----|------------------------|
| AA | Labelled antibodies | DD | Gluten from the sample |
| BB | Antibody bands | EE | Figure |
| CC | Flow direction | | |

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the quantification of the total gluten content of grains in food samples. Areas of application are primarily the food industry, service laboratories and government test laboratories or biotechnology. The invention aims to quickly and cost-effectively determine the total gluten content in foods with just one measurement. Therefore the object of the invention is to develop a method with which, based on the detection of prolamins and glutelins, all potentially coeliac-relevant gluten protein fractions in food samples are quantified as a total corresponding to their mass. The method according to the invention is based on the joint use of specific prolamin and glutelin antibodies as a combined conjugate according to the invention for the detection of the total gluten content. In addition, the individual antibody conjugates are thinned in such a way that the contribution of the individual antibodies to the total signal strength corresponds to the proportion of the gluten fraction that they each detect.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Gesamtgluten aus Getreide in Lebensmittelproben. Anwendungsgebiete sind vor allem die Lebensmittelindustrie, Servicelabore und staatliche Kontrolllabore oder die Biotechnologie. Die Erfindung hat das Ziel, den Gesamt-Glutengehalt in Lebensmitteln mit nur einer Messung schnell und preiswert zu bestimmen. Daraus leitet sich die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ab, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem, basierend auf der Detekti-



WO 2019/154559 A1

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit geänderten Ansprüchen gemäss Artikel 19 Absatz 1

on von Prolaminen und Glutelinen, alle potentiell Zöliakie-relevanten Gluten-Proteinfraktionen in Lebensmittelproben entsprechend ihren Massen als Summe quantifiziert werden. Das vorliegende Verfahren basiert auf der gemeinsamen Verwendung spezifischer Prolamin- und Glutelinantikörper als erfindungsgemäßes Kombinationskonjugat zur Detektion von Gesamtgluten. Dabei erfolgt eine Verdünnung der einzelnen Antikörperkonjugate derart, dass der Beitrag der einzelnen Antikörper zur Gesamtsignalstärke dem Anteil der Gluten-Fraktion entspricht, die sie jeweils detektieren.

Verfahren zur Quantifizierung von Gesamtgluten aus Getreide in Lebensmittelproben

Beschreibung

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Gesamtgluten aus Getreide in Lebensmittelproben. Anwendungsgebiete sind vor allem die Lebensmittelindustrie, Servicelabore und staatliche Kontrolllabore oder die Biotechnologie.

10

Hintergrund der Erfindung

Mit einer Jahresernte von 2,5 Milliarden Tonnen ist Getreide das wichtigste Nahrungsmittel des Menschen. Die Bandbreite der Lebensmittel, die aus Getreide hergestellt, mit Getreideprodukten ergänzt oder mit Getreideinhaltsstoffen behandelt werden, ist unüberschaubar. Einige Getreide, wie z.B. Weizen, Gerste und Roggen, enthalten große Mengen Klebereiweiße, das sogenannte Gluten, das zwar für den Backvorgang vorteilhaft ist, bei bestimmten Personen jedoch eine Unverträglichkeit auslöst, die man als Zöliakie bezeichnet. Zusätzlich wurde eine weitere Unverträglichkeit in Form der „Non Celiac Gluten Sensitivity“ (nicht zöliakie-assoziierte Glutensensitivität) beobachtet, die jedoch noch nicht vollständig erforscht ist.

Die Prävalenz der Zöliakie schwankt je nach Kulturkreis; im weltweiten Durchschnitt liegt sie bei 1:270, das sind also ca. 250 Mio. Menschen. Die Zöliakie ist eine teilweise autoimmune Krankheit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt, was sich in Durchfall, Erbrechen, Mangelernährungserscheinungen und Gewichtsverlust manifestiert. Da die Krankheit nicht heilbar ist, bleibt für den Erkrankten nur die strikte Gluten-freie Diät. Zöliakie-Patienten, die sich an eine solche Diät halten, leben weitgehend symptomfrei. Die Erkrankten sind somit auf Lebensmittel angewiesen, die kein oder sehr wenig Gluten enthalten.

30

Der 1963 durch die World Health Organization (WHO) und Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) ins Leben gerufene Codex Alimentarius beschreibt die Anforderung an Lebensmittel, die als „Gluten-frei“ gelten. Die aktuell gültigen Standards definieren Lebensmittel als „Gluten-frei“, wenn sie weniger als 20

mg Gluten pro kg Lebensmittel enthalten (Codex Standard 118 - 1979). Andere Länder und Regionen wie z. B. die EU, USA und Kanada haben ihre gesetzlichen Verordnungen an diesen Codex-Grenzwert übernommen. Lebensmittelhersteller, die die Versorgung von Zöliakie-Patienten mit „Gluten-freien“ Produkten gewährleisten möchten, müssen diesen Grenzwert für ihre Produkte überprüfen und einhalten.

Gluten ist ein heterogenes Proteingemisch aus alkohollöslichen Prolaminen und alkoholunlöslichen Glutelinen. Glutenproteine kommen in allen Triticum-Spezies (z. B. Weizen, Dinkel, Emmer, Einkorn), Roggen und Gerste vor, sowie in deren Kreuzungen und werden je nach Getreideart unterschieden. So werden im Weizen die Prolamine als Gliadine bezeichnet und die Gluteline in Low Molecular Weight Glutenin Subunit (LMW)-Proteine und High Molecular Weight Glutenin Subunit (HMW)-Proteine unterteilt. Historisch wurden nur die Prolamine als „toxisch“ für Zöliakiepatienten angesehen. In letzter Zeit wurde jedoch festgestellt, dass auch LMW- und HMW- Proteine toxisch wirken (Tye-Din et al. 2010).

Stand der Technik

Die am meisten verbreitete Detektionsmethode zum Nachweis von Glutenproteinen ist momentan der Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA). Für die Extraktion der Lebensmittelproben werden Extraktionslösungen benutzt, die reduzierende Substanzen (z. B. β -Mercaptoethanol, Sulfit, Thiosulfit), denaturierende Substanzen (z. B. Guanidin-Hydrochlorid, Harnstoff) und/oder Detergenzien (z. B. Tween, Triton-X100, Natriumdodecylsulfat) enthalten. Eine dieser Extraktionsmethoden ist die sog. Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1; Lizenz bei R-Biopharm AG). Alle Extraktionslösungen werden zusammen mit Ethanol oder Isopropanol verwendet.

Kommerziell erhältliche immunologische Detektionssysteme basieren meist auf monoklonalen Antikörpern (z. B. Skerritt, R5, G12 und Alpha20). Die meisten dieser Antikörper detektieren hauptsächlich oder ausschließlich die besser löslichen Prolamine (Wieser et al. 2014).

Beispielhaft wird nachfolgend eines der am häufigsten verwendeten Messsysteme zur Quantifizierung von Gluten näher erläutert, das sogenannten Mendez System

bestehend aus Cocktail Extraktion und R5 ELISA. Dieses System ist z. B. kommerziell erhältlich als Cocktail (patented EP 1 424 345 A1) R7006 (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) und RIDASCREEN® Gliadin R7001 (R-Biopharm AG). Die homogenisierte Lebensmittelprobe wird mittels Cocktail (patented) bei 50°C
5 extrahiert und anschließend mit Ethanol versetzt. Nach Verdünnung des erhaltenen Extraktes wird die so vorbereitete Probe auf einer, mit dem monoklonalen Antikörper R5, beschichteter Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Waschen wird ein R5-Meerrettichperoxidase-Konjugat inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Farbreaktion durch Zusatz einer Substrat/Chromogen Lösung. Die Reaktion wird
10 durch Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte (OD) mittels Photometer gemessen. Die Quantifizierung erfolgt anhand mitgeführter Kalibratoren bekannten Gliadinegehaltes. Aus dem so erhaltenen Gliadin-Gehalt wird durch Multiplikation mit dem Faktor 2 der Gesamt-Glutengehalt errechnet.

15 Diese Multiplikation ist gemäß Codex-Alimentarius vorgeschrieben (CODEX-STAN 118 - 1979). Zunehmend wird jedoch deutlich, dass ein allgemeiner Faktor 2 in vielen Fällen zu einer Fehlkalkulation führt (Wieser und Köhler, 2009). So können sich z. B. Weizenmehle sowohl im Gesamtproteingehalt als auch in der Zusammensetzung der Glutenproteine deutlich unterscheiden (Hajas et al., 2017).
20 Wird allein der Prolamin-Gehalt bestimmt, so kann dies bei unterschiedlicher Zusammensetzung der einzelnen Glutenproteinfraktionen zu verfälschten Ergebnissen bei der Berechnung des Gesamt-Glutengehalts führen.

Weiterhin können je nach Aufbereitung des Getreides zum „Gluten-freien“ Produkt
25 bestimmte Glutenfraktionen (Prolamine und Gluteline) selektiv ab- oder angereichert werden, so dass bei einer nur teilweisen Bestimmung der Glutenfraktionen es zu signifikanten Fehlbestimmungen kommen kann (Wieser und Köhler 2009).

Ein gemeinsamer Nachweis von Prolaminen und Glutelinen, der diese Probleme
30 beheben könnte, wird im Stand der Technik nicht beschrieben. So offenbart beispielsweise EP 1 1779 115 B1 Antikörper gegen T-Zell Erkennungssequenzen in Gliadin (Prolamin in Weizen) bzw. in LMW und HMW (Gluteline in Weizen) und deren Verwendung in ELISA-Assays. Allerdings erfolgt kein gemeinsamer Nachweis, sondern nur entweder ein Nachweis von Prolamin oder LMW oder HMW. Der

getrennte Nachweis wird auch als besonders vorteilhaft hervorgehoben. Es findet daher keine ausreichende Quantifizierung von Gesamtgluten aus Weizen und/oder Roggen und/oder Gerste in einem ELISA statt.

5 Daneben wurden durch Skerritt et al. (1989) mehrere Antikörperkombinationen publiziert, die teilweise Prolamine, LMW und HMW detektieren können. Allerdings wurde jeweils nur mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet und ein monoklonaler Antikörper im Konjugat verwendet; es fand also keine Kombination mehrerer Antikörper in einer Kavität bzw. in einem Konjugat statt. Entsprechend
10 zeigt auch keines der getesteten Systeme eine ausreichend gleichmäßige Detektion der unterschiedlichen Glutenfraktionen und damit auch keine ausreichende Quantifizierung von Gesamtgluten. Tatsächlich handelt es sich vermutlich nur um Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper gegen die weiteren Glutenfraktionen, da es nicht vorgesehen war spezifische Antikörper gegen die einzelnen Fraktionen
15 herzustellen. Aus einer der durch Skerritt et al. (1989) beschriebenen Antikörperkombinationen wurde der kommerzielle ELISA ALLER-TEK™ Gluten ELISA Assay entwickelt (Anonymus, 2014). Die oben beschriebenen Einschränkungen der durch Skerritt et al. beschriebenen ELISA Systeme gelten folglich auch für dieses kommerzielle System.

20 Tatsächlich wurde dies durch Lexhaller et al. (2016) für den kommerziellen ELISA ALLER-TEK™ Gluten ELISA Assay sowie für vier andere kommerzielle Sandwich ELISA Systeme bestätigt, dass alle fünf kommerziellen ELISA Systeme Gesamtgluten nicht zufriedenstellend bestimmen können.

25 Wenige kommerzielle ELISA Assays verwenden polyklonale Antikörper (Wieser et al. 2014). Selbst bei Immunisierung mit Gesamtgluten wird die Antikörper-Reaktivität zufällig erzeugt. Dadurch ist es nicht möglich, im Nachhinein eine Einstellung des Systems vorzunehmen, so dass jede Glutenproteinfraktion entsprechend ihres
30 Masseanteils quantifiziert werden kann.

Aufgrund der genannten Nachteile sind diese Methoden nicht mehr Mittel der Wahl, um den tatsächlichen und genauen Gesamtgehalt von Glutenproteinen in Lebensmittel zu bestimmen.

Ziel und Aufgabe der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, den Gesamt-Glutengehalt in Lebensmitteln mit nur einer Messung schnell und preiswert zu bestimmen, wobei jede Glutenproteinfraktion
5 entsprechend ihres Massenanteils quantifiziert werden soll.

Daraus leitet sich die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ab, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem, basierend auf der Detektion von Prolaminen und Glutelinen, alle potentiell Zöliakie-relevanten Gluten-Proteinfraktionen in Lebensmittelproben
10 entsprechend ihren Massen als Summe quantifiziert werden, wobei die Quantifizierung durch Kombination mehrere Antikörper in einer Kavität und in einem Konjugat erfolgt. Das Verfahren soll zur Bestimmung des Gesamt-Glutengehaltes aus Weizenproben genutzt werden. Verwandte Glutenfraktionen in anderen Triticum-Spezies, Roggen und Gerste sollen mit dem Verfahren ebenfalls quantifizierbar sein.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst. Weitere mögliche Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen, der Beschreibung und den Beispielen.

Wesen der Erfindung

Das vorliegende Verfahren basiert auf der gemeinsamen Verwendung spezifischer Prolamin- und Glutelinantikörper als erfindungsgemäßes Kombinationskonjugat zur Detektion von Gesamtgluten. Zur Quantifizierung des Gesamtglutengehalts wird eine
25 Kombination spezifischer Bindungsreagenzien gegen Prolamine und Gluteline in einem einzigen analytischen Lauf eingesetzt, wobei diese spezifischen Bindungsreagenzien gemischt in einer Einheit vorliegen. Dabei erfolgt eine Verdünnung der einzelnen Antikörperkonjugate derart, dass der Beitrag der einzelnen Antikörper zur Gesamtsignalstärke dem Anteil der Gluten-Fraktion
30 entspricht, die sie jeweils detektieren.

Kurzbeschreibung des Verfahrens:

Der Gesamt-Glutenbestimmung vorgeschaltet ist die Extraktion der Glutenproteine aus dem Lebensmittel. Dazu wird eine Extraktionsmethode verwendet, die unter

reduktiven Bedingungen unter Zusatz von chaotropen Salzen in Anwesenheit von aliphatischen kurzkettigen Alkoholen, Glutenproteine aus der Lebensmittelmatrix herauslöst.

Der erhaltene Extrakt wird anschließend zur Gesamt-Glutenbestimmung in einem antikörperbasierten Nachweisverfahren z. B. in einem ELISA (Sandwich oder kompetitives oder direktes Format) oder Lateral-Flow Format bzw. Flow Through eingesetzt.

Zum besseren Verständnis wird nachfolgend das allgemeine Prinzip eines Sandwich-ELISAs erläutert. Bei einem Sandwich-ELISA wird das Antigen (Analyt) sandwichartig von zwei Antikörpern spezifisch gebunden. Der erste Antikörper (Fänger-Antikörper) wird an die feste Phase der Vertiefungen (Kavitäten) einer Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Kavitäten gegeben und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt. Zurück bleibt nur das am Fänger-Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zur Detektion (Detektionsantikörper) zugegeben, der an eine andere Stelle im Antigen als der Fänger-Antikörper bindet und an dessen Ende ein Reporterenzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet also ebenfalls an das Antigen, nur an einer anderen Position, und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der auch als Sandwich-Komplex bezeichnet wird. Durch erneutes Waschen der Platte wird überschüssiger, nicht gebundener Detektionsantikörper entfernt. Anschließend kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden: Es wird ein zum Reporterenzym passendes Substrat (auch „Chromogen“ genannt) zugegeben, das vom Reporterenzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird und auf diese Weise dessen Nachweis durch Farbumschlag ermöglicht. Weitere Möglichkeiten anstelle des Reporterenzyms wären direkte Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzmarkierung des Detektorantikörpers. Für eine quantitative Bestimmung wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (*Standardreihe*) mitgeführt, um eine Kalibrationskurve für das gemessene Signal zu erhalten.

Im Fall der vorliegenden Erfindung wird zur Durchführung eines Sandwich-ELISAs vor der Assay-Durchführung eine Mikrotiterplatte mit einer Kombination aus Antikörpern gegen Weizenprolamin, LMW- und HMW-Proteinen beschichtet, wobei jede Kavität mit dem Gemisch der Antikörper beschichtet wird. Anschließend wird die
5 extrahierte Probe zugegeben. Die extrahierten Gluten-Proteine binden spezifisch an diese Fänger-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die erfindungsgemäße kombinierte Zugabe von Detektions-Antikörpern gegen Weizenprolamin, LMW- und HMW-Proteinen, wobei die konjugierten Antikörper in einer Lösung vorliegen (Kombinationskonjugat). Diese Detektionsantikörper sind so konjugiert, dass deren
10 Bindung quantifizierbar wird. Dies kann z. B. durch Konjugation mit einem farbstoffbildenden Reporterenzym vorgenommen werden. Darüber hinaus werden die verwendeten konjugierten Detektionsantikörper gegen Prolamine und Gluteline im Kombinationskonjugat erfindungsgemäß derart gemischt, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke
15 gemessen werden.

Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich der Gesamtsignalstärke einer Probe mit den Signalstärken von Glutenkalibratoren bekannten Gehaltes. Als Kalibratormaterial kann z. B. ein Extrakt aus Weizenmehl verwendet werden.
20

Die Erfindung wird nachfolgend mit konkreten Ausführungsbeispielen näher erläutert, welche jedoch nicht beschränkend für den Schutzzumfang der Erfindung sein sollen. Für einen Fachmann naheliegende Abwandlungen und Änderungen der Erfindung fallen dementsprechend unter den Schutzzumfang der Patentansprüche.
25

Wie bereits in einem der oberen Abschnitte erwähnt, ist der Gesamt-Glutenbestimmung die Extraktion der Glutenproteine aus der zu untersuchenden Probe unter Zusatz von chaotropen Salzen in Anwesenheit von aliphatischen kurzkettigen Alkoholen vorgeschaltet. Beispielhaft wird nachfolgend die Extraktion
30 von Weizen-Glutenproteinen aus Lebensmittelproben verschiedenster Art mit einer Cocktail-Extraktionslösung [0,76 g/L NaCl, 0,224 g/L KCl, 1,42 g/L Na₂HPO₄ * 2H₂O, 0,272 g/L H₂KO₄P, 191 g/L Guanidin-HCl, 18,2 ml/L β-Mercaptoethanol] (EP 1 424 345 A1) stichpunktartig beschrieben.

- Eine ausreichend große Menge der Probe (mind. 5 g bzw. 5 ml) gut homogenisieren (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen).
- bei flüssigen Proben: zu 0,25 ml der homogenisierten Probe 2,5 ml Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- sonstige Proben (z.B. soja- und quinoahaltige Lebensmittelproben): 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittelproben: (z.B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Buchweizen, Hirse und Gewürze): 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen, 0,25 g Magermilchpulver und 2,5 ml Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- Fleisch- und Wurstwarenproben: die Glutenverteilung kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich sein, deshalb 50 g Probe einwiegen und homogenisieren: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail-Extraktionslösung hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- Haferproben: die Glutenverteilung kann sehr ungleich sein, zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren. Deshalb 200 g Probe homogenisieren, die Probenaufarbeitung sollte dann mindestens mit dem vierfachen Ansatz durchgeführt werden: 1 g der homogenisierten Probe einwiegen und 10 ml Cocktail-Extraktionslösung hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.

Alle Proben werden wie im Folgenden beschrieben weiter behandelt:

- 40 min bei 50 °C inkubieren
- Probe abkühlen lassen und anschließend mit 7,5 ml 80 % Ethanol versetzen (bei Haferproben: 30 ml 80 % Ethanol)
- Gefäß verschließen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)

- den Überstand in ein verschließbares Röhrchen überführen
- die Probe 1:25 (40 µl + 960 µl) mit Puffer, z. B. pH neutralem Phosphatpufferweiter verdünnen: der finale Verdünnungsfaktor ist 1000.

5 Die so erhaltenen Proben werden anschließend zur Gesamt-Glutenbestimmung vorzugsweise in einem Sandwich-ELISA eingesetzt. Nachfolgend wird beispielhaft die Durchführung eines Sandwich-ELISAs zur Bestimmung von Gesamt-Gluten von weizenhaltigen Proben beschrieben.

10 Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, dass der Gesamt-Glutengehalt mit einem einzelnen Messschritt in einer einzelnen Kavität ermittelt wird. Dazu werden zunächst die Kavitäten einer handelsübliche Mikrotiterplatte mit spezifischen Fänger-Antikörpern gegen Gliadin (Weizenprolamin), LMW- und HMW-Glutenin (Weizengluteline) beschichtet; typischerweise mit Konzentrationen zwischen 0,5 und
15 5 µg/ml, wobei jede Kavität mit allen Antikörpern beschichtet wird. Unspezifische Bindungen werden durch, aus der Literatur bekannten, Block- und Stabilisierungslösungen abgesättigt und anschließend die extrahierte Probe bzw. der Standard (Kalibrator) vorzugsweise als Doppelproben in die einzelnen Kavitäten
20 zugegeben. Für die Herstellung des Kalibrators werden die Glutenproteine aus einem Weizenmehl mittels modifizierte Osborne Fraktionierung isoliert (Schalk et al. 2017). Zur Verbesserung der Haltbarkeit wird das so erhaltene Glutenisolat zur Trockne gebracht und gelagert. Zum Ansetzen der Kalibratoren wird dieses Isolat eingewogen, mittels Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1) R-Biopharm (Produktnummer R7006) gelöst und in einem pH neutralem Phosphatpuffer auf die
25 gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Nach erfolgter Proben- bzw. Kalibratorzugabe und einem anschließenden Waschschrift mit einem gängigen Waschpuffer (z. B. PBS/Tween) erfolgt die Zugabe von Detektions-Antikörpern gegen Gliadin (Weizenprolamin), LMW- und HMW-
30 Glutenin (Weizengluteline), die alle jeweils mit einem Reporterenzym konjugiert sind. Dieses Gemisch von Detektionsantikörpern, die an anderen Stellen der Glutenproteine binden als die Fängerantikörper, wird nachfolgend als Kombinationskonjugat bezeichnet. (Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung des erfindungsgemäßen Kombinationskonjugats erfolgt im Abschnitt "Herstellung des

Antikörper-Kombinationskonjugats“.) Nach anschließender Inkubation werden die einzelnen Kavitäten geleert, gewaschen, mit Substratreagenz aufgefüllt und für die Quantifizierung des Glutengehalts, also die quantitative Bestimmung des Anteils der an die Detektionsantikörper gebundenen Glutenproteine, durch Messung des Substratumsatzes durch die an die Detektionsantikörper gekoppelten Reporterenzyme bestimmt.

Das oben näher erläuterte Ausführungsbeispiel mit einem *Sandwich ELISA* ist ein mögliches Verfahren. Weitere mögliche Verfahren sind z. B. ein *kompetitiver ELISA* (Antigenbeschichtung oder Antikörperbeschichtung), ein *direkter ELISA* sowie *Lateral-Flow*-, *Flow-Through*-, *Mikroarray*- und *mikrofluidische* Formate. Diese Verfahren werden im folgenden kurz beschrieben.

Bei einem *kompetitiven ELISA mit Antigenbeschichtung* wird die Mikrotiterplatte mit einem Glutenextrakt, z. B. aus einem Weizenmehl beschichtet. Der Kalibrator ist identisch mit dem beim Sandwich-ELISA-Verfahren. Die Herstellung sowie die Einstellung der Einzelkonjugate und des Kombinationskonjugates erfolgen wie beim Sandwich-ELISA-Verfahren, allerdings nimmt die OD bei einem kompetitiven ELISA bei zunehmenden Glutenkonzentrationen ab. Die Probenextraktion ist identisch mit der beim Sandwich-ELISA-Verfahren.

Bei der ELISA-Testdurchführung werden im ersten Schritt Kalibratoren bzw. Proben in die Mikrotiterplattenvertiefungen gegeben und direkt anschließend wird das Kombinationskonjugat zugegeben und Kalibrator bzw. Proben und Konjugat werden gemeinsam inkubiert. Allerdings ist die Meerrettich-Peroxidase nicht stabil gegenüber der Cocktail Extraktionslösung in den Proben. Daher müssen die Antikörper in diesem Fall anders konjugiert werden, z. B. an Biotin. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Detektion über Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin. Alternativ werden unkonjugierte Antikörper verwendet und nach dem Waschschrift erfolgt die Detektion über Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. In beiden Fällen erfolgt nach einem erneuten Waschschrift die Zugabe des Farbreagenz. Im letzten Schritt wird die Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet.

Bei einem *kompetitiven ELISA mit Antikörperbeschichtung* wird die Mikrotiterplatte mit einer Lösung von Prolamin-, LMW- und HMW-Antikörper beschichtet, so dass in jeder Kavität alle Antikörper gebunden sind. Der Kalibrator ist identisch mit dem beim Sandwich-ELISA-Verfahren. Als Konjugate werden die Einzelproteinfraktionen Prolamine, LMW und HMW an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Einstellung der Einzelkonjugate und des Kombinationskonjugates erfolgen analog zum Sandwich-ELISA-Verfahren, allerdings nimmt die OD bei einem kompetitiven ELISA bei zunehmenden Glutenkonzentrationen ab. Die Probenextraktion ist identisch mit der beim Sandwich-ELISA-Verfahren.

10

Bei der ELISA-Testdurchführung werden im ersten Schritt Kalibratoren bzw. Proben in die Kavitäten gegeben und inkubiert. Nach einem optionalen Waschschrift wird das Kombinationskonjugat in die Kavitäten pipettiert und inkubiert. Nach einem (erneuten) Waschschrift wird das Farbreagenz zugegeben und inkubiert. Im letzten Schritt wird die Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet.

15

Alternativ kann auch eine gemeinsame Inkubation von Kalibratoren bzw. Proben mit dem Kombinationskonjugat erfolgen. Allerdings ist die Meerrettich-Peroxidase nicht stabil gegenüber der Cocktail Extraktionslösung in den Proben. Daher müssen die Prolamin-, LMW- und HMW-Fraktion in diesem Fall anders konjugiert werden, z. B. an Biotin. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Detektion über Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin. Nach einem erneuten Waschschrift wird das Farbreagenz zugegeben und inkubiert. Im letzten Schritt wird die Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet.

20

Bei einem *direkten ELISA* wird eine unbeschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Der Kalibrator ist identisch mit dem beim Sandwich-ELISA-Verfahren. Die Herstellung sowie die Einstellung der Einzelkonjugate und des Kombinationskonjugates erfolgen wie beim Sandwich-ELISA-Verfahren. Die Probenextraktion ist identisch mit der beim Sandwich-ELISA-Verfahren.

25

Im ersten Schritt der ELISA-Testdurchführung wird die unbeschichtete Mikrotiterplatte mit den Kalibratoren bzw. den Proben inkubiert. Nach einem Waschschrift wird als nächstes das Kombinationskonjugat zugegeben und inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift wird das Farbreagenz zugegeben und inkubiert. Im letzten Schritt wird die Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet.

Lateral-Flow Formate können dem Sandwich- oder kompetitiven Prinzip folgen. Bei Ersterem wird die Oberfläche einer streifenförmig zugeschnittenen Membran mit einer Lösung eines Gemisches von Prolamin-, LMW- und HMW-Antikörpern in Form einer schmalen Linie quer zur Laufrichtung beschichtet (Vgl Abb. 1). Die glutenhaltige Probenlösung wird über ein saugfähiges Material in den Bereich des Lateral-Flows transportiert, in dem sich ein Gemisch markierter Prolamin-, LMW- und HMW-Antikörper in getrockneter Form befinden. Die verwendeten konjugierten Detektionsantikörper gegen Prolamine und Gluteline im Kombinationskonjugat werden erfindungsgemäß derart gemischt, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden. Die Markierung der Antikörper folgt den Experten bekannten Methoden (z.B. in Form von kolloidalem Gold, farbigen, fluoreszierenden oder phosphoreszierenden Nanopartikeln). Die Glutenproteine reagieren mit dem jeweiligen markierten spezifischen Antikörper und werden durch Kapillarkräfte weiter zum Bereich der Membran transportiert, der wie oben beschrieben mit membrangebundenen Prolamin-, LMW- und HMW-Antikörpern beschichtet wurde. Dort reagieren die Gluten-Antikörper-Komplexe mit den membrangebundenen Antikörpern und bilden so einen Sandwich, der durch die Ausbildung einer gefärbten Bande sichtbar wird. Die Signalstärke der Bande entspricht der Menge an Gluten in der Probe. Eine weitere Bande dient als Kontrollbande und zeigt die generelle Funktionalität des Lateral-Flows an.

Das kompetitive Lateral-Flow Format folgt den Prinzipien des bereits beschriebenen kompetitiven ELISA, wobei das Gluten aus der Probe mit markierten spezifischen Antikörpern zuerst reagiert und dann durch Kapillarkräfte entlang der Membran transportiert wird, bis es auf eine Probenbande mit immobilisiertem Gluten trifft. Eine Verringerung der Intensität der Probenbande zeigt die Anwesenheit von Gluten an. Die verwendeten markierten Antikörper gegen Prolamine und Gluteline im Kombinationskonjugat werden erfindungsgemäß derart gemischt, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden. Alternativ befindet sich auf der Startlinie des Lateral-Flows markiertes Gluten, welches zusammen mit dem nicht-markierten Gluten aus der

Probe durch Kapillarkräfte transportiert auf die Testbande mit immobilisierten spezifischen unmarkierten Antikörpern trifft. Hier findet eine Konkurrenzreaktion um die Antikörperbindungsstellen statt. Dabei werden die verwendeten, gemischten Antikörper gegen Prolamine und Gluteline in der Testbande sowie die markierten, gemischten Glutenproteine auf der Startlinie des Lateral-Flows erfindungsgemäß derart gemischt, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden. Als Ergebnis färbt sich die Bande intensiver, wenn sich weniger Gluten in der Probe befindet.

Flow-Through Formate folgen im Prinzip den bereits beschriebenen Funktionsprinzipien von Lateral-Flow Formaten, unterscheiden sich lediglich in der Tatsache, dass der Stofftransport nicht entlang einer Membran sondern durch sie hindurch („through“) erfolgt. Anpassungen gegenüber den beschriebenen Lateral-Flow-Formaten sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen oder sind dem Experten bekannt.

Mikroarray- und mikrofluidische Formate folgen den bereits beschriebenen Prinzipien von ELISA und Lateral-Flow-Formaten. Weitere spezifische Einzelheiten sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen oder sind dem Experten bekannt.

Herstellung des Antikörper-Kombinationskonjugats:

Für das Ausführungsbeispiel der Bestimmung des Gesamt-Glutengehaltes aus weizenhaltigen Proben, werden als Prolamin-Detektionsantikörper ein Gliadin-Antikörper gegen das Epitop QQPFP eingesetzt und als Glutelin-Detektionsantikörper ein Antikörper gegen die LMW-Fraktion extrahiert aus Weizenmehl und ein Antikörper gegen HMW mit der Epitoperkennungssequenz GYYPTS eingesetzt.

Die verschiedenen Detektionsantikörper werden unter Einsatz kommerzieller Konjugationsreagenzien (z. B. Pierce™ Conjugate Purification Kit Katalognummer 44920) separat an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Anschließend werden die so erhaltenen Antikörperkonjugate erfindungsgemäß derart gemischt, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden. Dazu wird das Kombinationskonjugat mit Verdünnungsreihen von

Prolamin-, LMW- und HMW-Fractionen aus Weizen getestet. Falls keine vergleichbare Signalstärke erreicht wird, wird das Mischungsverhältnis der Einzelkonjugate entsprechend ihrer Reaktivitäten mit den Weizenfraktionen im Kombinationskonjugat angepasst. Dazu kann es hilfreich sein, die Einzelkonjugate
 5 zunächst getrennt voneinander anzusetzen und die Verdünnungsfaktoren der Einzelkonjugate in einer Vortestung abzuschätzen (siehe Tabelle 1). Anschließend werden die Einzelkonjugate im Kleinansatz gemischt und die Reaktivität des Kombinationskonjugates wie oben beschrieben überprüft und ggf. werden die Verdünnungsfaktoren der Einzelkonjugate weiter angepasst. Erst nach erfolgreicher
 10 Einstellung im Kleinansatz werden die Einzelkonjugate auch insgesamt kombiniert.

Tabelle 1 zeigt das Beispiel einer solchen Vortestung. Hierzu werden die spezifischen Antikörperkonjugate zunächst einzeln mit der oben genannten beschichteten Mikrotiterplatte getestet. Ein Weizengesamtglutenextrakt wird auf drei
 15 verschiedene Konzentrationen verdünnt, bei denen jeweils dieselbe Menge an entweder Prolamin-, LMW- oder HMW-Proteine enthalten sind. So enthält ein Gesamtglutenextrakt mit der Konzentration 15,5 ng/ml Gesamtglutenprotein umgerechnet 10 ng/ml Gliadin. Entsprechend enthält ein Gesamtglutenextrakt mit der Konzentration 44,5 ng/ml Gesamtglutenprotein 10 ng/ml LMW-Proteine und ein
 20 Gesamtglutenextrakt mit der Konzentration 80 ng/ml 10 ng/ml HMW-Proteine (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Auswahl von Gesamtglutenkonzentrationen, bei denen die Konzentration der jeweiligen Einzelfractionen denselben Wert besitzt. Alle Angaben in ng/ml.

Gesamt Weizengluten	Prolamine 65% des Gesamtglutens	LMW 22,50% des Gesamtglutens	HMW 12,50% des Gesamtglutens
0	0,0	0,0	0,0
1,3	0,8	0,3	0,2
2,5	1,6	0,6	0,3
5,0	3,3	1,1	0,6
10,0	6,5	2,3	1,3
15,5	10,1	3,5	1,9
20,0	13,0	4,5	2,5
40,0	26,0	9,0	5,0
44,5	28,9	10,0	5,6
80,0	52,0	18,0	10,0

Die Gliadin-, LMW- und HMW-spezifischen Antikörperkonjugate werden nun so eingestellt d. h. derart verdünnt, dass der Gliadin-Antikörper mit dem 15,5 ng/ml Gesamtglutenextrakt dieselbe Signalstärke besitzt (im Beispiel in Tabelle 2: 2,0) wie der LMW-Antikörper mit dem 44,5 ng/ml Gesamtglutenextrakt und der HMW-Antikörper mit dem 80 ng/ml Gesamtglutenextrakt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beispiel der Vortestung von Einzelkonjugatverdünnungen.

	Prolamine	LMW	HMW
Konzentration Gesamtgluten (ng/ml)	15,5	44,5	80,0
Konzentration Zielproteinfraktion (ng/ml)	10,1	10,0	10,0
Zu testendes Einzelkonjugat	Prolamine	LMW	HMW
OD bei Verdünnung 1 des jeweiligen Einzelkonjugates	3,0	2,4	4,0
OD bei Verdünnung 2 des jeweiligen Einzelkonjugates	2,5	2,0	3,33
OD bei Verdünnung 3 des jeweiligen Einzelkonjugates	2,0	1,6	2,66
OD bei Verdünnung 4 des jeweiligen Einzelkonjugates	1,5	1,2	2,0
OD bei Verdünnung 5 des jeweiligen Einzelkonjugates	1,0	0,8	1,33

Anschließend wird das Kombinationskonjugat mit Kalibrationsreihen der Einzelfractionen (Weizenprolamine, LMW- und HMW-Proteine) überprüft (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Ggf. erfolgt eine weitere Anpassung der Zusammensetzung des Kombinationskonjugates. Die Einzelfractionen werden durch Extraktion aller Proteine aus einem Weizenmehl und anschließender Auftrennung in der HPLC erhalten (Schalk et al. 2017). Zur Verbesserung der Haltbarkeit werden die so erhaltenen Proteinisolate zur Trockne gebracht und gelagert. Zum Ansetzen der Stocklösungen werden die Fractionen eingewogen, mittels Cocktail-Extraktionslösung (EP 1 424 345 A1) gelöst und in einem pH neutralen Phosphatpuffer auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Im Anschluss ist noch einmal ein detailliertes Ausführungsbeispiel eines Sandwich ELISAs zur quantitativen Glutenbestimmung von einer Getreide oder Lebensmittelprobe z. T. aufgeführt:

- Je 100 µl der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.

- Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (PBS/Tween) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
- 5 - Je 100 µl des Kombinationskonjugates in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und weitere 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
- Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen
10 Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
- Je 100 µl einer handelsüblichen Meerrettich-Peroxidase Substrat/Chromogenlösung in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
- 15 - Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp Lösung in einem handelsüblichen Photometer messen.

Quantifizierung des Gesamt-Glutengehalts von verschiedenen Weizenmehlen:

20

Weizenmehle können sich sowohl im Gesamtproteingehalt als auch in der Zusammensetzung der Glutenproteine deutlich unterscheiden (Hajas et al. 2017). Aufgrund der Einstellung der Einzelkonjugate sollten Unterschiede in der Zusammensetzung der Glutenproteine keinen Einfluss auf die Messung haben, da
25 dieselbe Menge an Einzelfraktionprotein zu einem vergleichbaren Signal führt, egal um welche Weizenproteinfraktion es sich handelt (siehe Abbildung 2). Dadurch, dass alle Zöliakie-relevanten Glutenproteinfraktionen bestimmt werden, wird im Gegensatz zu herkömmlichen Testmethoden (siehe Stand der Technik) der Gesamtglutengehalt bei unterschiedlicher Glutenproteinzusammensetzung nicht verfälscht.

30

Für die Bestimmung des Gesamt-Glutengehalts von verschiedenen Weizenmehlen wurden neun Weizenmehle und ein Weizenmehlmix mit der Cocktail-Extraktionslösung aus EP 1 424 345 A1 extrahiert. Die Extrakte wurden im Extraktionsmedium und einem pH neutralen Probenverdünnungspuffer auf die

Konzentrationen 0; 5; 10; 20; 40 und 80 ng/ml Gesamtglutenprotein verdünnt. Die Glutenproteingehalte der verschiedenen Mehle waren zuvor mittels HPLC ermittelt worden (Schalk et al. 2017). Abbildungen 4 und 5 zeigen, dass alle Weizenmehle innerhalb akzeptabler Schwankungsbereichen gefunden werden, insbesondere wenn
5 der extrem hohe Verdünnungsfaktor berücksichtigt wird, der für die Messung der Extrakte erforderlich war.

Quantitative Bestimmung des Gesamt-Glutengehalts in anderen Getreiden.

10 Auch andere Getreidemehle können sich sowohl im Gesamtproteingehalt als auch in der Zusammensetzung der Glutenproteine deutlich unterscheiden. Die Gesamtreaktivität des Messsystems hängt dabei von der Stärke der einzelnen Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper zu den anderen Getreiden ab. So zeigen z. B. die Prolamine aus Weizen, Roggen und Gerste sehr große
15 Sequenzhomologien, so dass hier mit einem hohen Level an Kreuzreaktivität des Prolaminantikörpers zu rechnen ist. Weiterhin zeigen die HMW-Proteine aus Weizen und Roggen große Sequenzhomologien, so dass auch hier von einer hohen Kreuzreaktivität des Weizen-HMW-Antikörpers auszugehen ist. Je nachdem, welche Sequenzen genau die Prolamin- und HMW-Antikörper erkennen und wie häufig diese
20 Sequenzen in den Getreiden vorkommen, ist auch mit einer Reaktivität der Antikörper zu rechnen, die die Reaktivität gegenüber Weizen übersteigt. LMW-Proteine haben keine homologen Proteine in Roggen und Gerste, so dass hier nicht mit einer Kreuzreaktivität zu rechnen ist. Die Gerstengluteline besitzen kaum Homologien zu Weizen- und Roggenproteinen, so dass eine Detektion dieser
25 Fraktion mit Antikörpern gegen Prolamine, HMW- und LMW Proteine nicht wahrscheinlich ist.

Für die Überprüfung der Reaktivität gegenüber Roggen- und Gerstenmehlen werden verschiedene kommerzielle Mehle und reine Sorten mit der Cocktail-
30 Extraktionslösung aus EP 1 424 345 A1 extrahiert. Die Extrakte werden im Extraktionsmedium und einem pH neutralen Probenverdünnungspuffer auf die Konzentrationen 0; 5; 10; 20; 40 und 80 ng/ml Gesamtglutenprotein verdünnt. Die Glutenproteingehalte der verschiedenen Mehle waren zuvor mittels HPLC ermittelt worden (Schalk et al. 2017).

Abbildung 6 zeigt, dass alle Roggenmehle relativ ähnlich detektiert werden. Bei einer Berechnung der gemessenen Konzentrationen zeigt sich, dass alle Roggenmehle überbestimmt werden (Abbildung 7). Dies liegt in der erhöhten Reaktivität des eingesetzten Prolaminantikörpers gegenüber Roggenprolaminen begründet.

5

Im Gegensatz zu den Weizen- und Roggenmehlen zeigen die Gerstenmehle eine größere Schwankungsbreite (Abbildungen 8 und 9). Dies liegt vermutlich daran, dass die Gerstenfraktionen im Gegensatz zu den Weizen- und Roggenfraktionen unterschiedlich detektiert werden. Wie zu erwarten war, wird die Gerstenglutelinfraktion von keinem der eingesetzten Antikörper nennenswert detektiert, während die Prolamine sehr gut detektiert werden. Entsprechend würden geringe Verschiebungen in den Proteinfractionen bei den verschiedenen Mehlen zu deutlichen Unterschieden führen.

10

Bei einer generellen Über- oder Unterbestimmung von Getreiden gegenüber einem Weizenkalibratormaterial kann zur genaueren Glutengehaltsbestimmung ein Kalibrator mit Material aus dem entsprechenden anderen Getreide eingesetzt werden.

15

Das beanspruchte Verfahren ermöglicht durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Kombinationskonjugates die gleichzeitige Bestimmung von Prolamin und Glutelinproteinen und erlaubt damit erstmalig eine Quantifizierung des tatsächlichen Gesamt-Glutengehaltes. Dieses Verfahren einer gemeinsamen Bestimmung von Prolamin und Glutelinen ist sehr viel genauer als die bisher bekannten Methoden, bei denen nur der Prolamin-Gehalt bestimmt wird, aus dem anschließend wiederum der Gesamt-Glutengehalt berechnet wird. Die ebenfalls Zöliakie-relevanten Gluteline wurden bisher nicht mit bestimmt, was in der Vergangenheit zu falschen Ergebnissen führen konnte. Das beanspruchte Verfahren schließt diese Lücke.

20

25

Darüber hinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur zur Bestimmung des Gesamt-Glutenhaltes weizenhaltiger Lebensmittelproben geeignet, sondern auch für die Bestimmung des Gesamt-Glutengehaltes anderer Triticum-Spezies-, und/oder Roggen- und/oder Gerste-haltigen Lebensmittelproben.

Legende zu den Abbildungen

- Abb. 1 Schematische Funktionsweise eines Lateral-Flow Assays im Sandwichformat
5
- Abb. 2 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber den verschiedenen Weizenmehlfractionen
- Abb. 3 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber den verschiedenen Weizenmehlfractionen. Gemessene Konzentrationen für verschiedene Weizenmehlfractionen bei einem Zielwert von 20 ng/ml
10
- Abb. 4 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Weizenmehlen und einigen reinen Weizensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde
15
- Abb. 5 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Weizenmehlen und reinen Weizensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde. Gemessene Konzentrationen bei einem Zielwert von 20 ng/ml
20
- Abb. 6 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Roggenmehlen und reinen Roggensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde, sowie aufgereinigter Roggenfraktionen
25
- Abb. 7 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Roggenmehlen und reinen Roggensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde, sowie aufgereinigten Roggenfraktionen. Gemessene Konzentrationen bei einem Zielwert von 20 ng/ml
30

Abb. 8 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Gerstenmehlen und reinen Gerstensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde, sowie aufgereinigten Gerstenfraktionen

5

Abb. 9 Testung der Reaktivität des Kombinationskonjugates gegenüber verschiedenen kommerziellen Gerstenmehlen und reinen Gerstensorten, deren Glutenproteingehalt jeweils mittels HPLC bestimmt wurde, sowie aufgereinigten Gerstenfraktionen. Gemessene Konzentrationen bei einem Zielwert von 20 ng/ml

10

Literatur

- Anonymus (2014) ALLER-TEK™ Gluten ELISA Assay Instructions for use, catalogue number SE110019, manufactured by ELISA Technologies, Inc., 2501 NW 66th Court, Gainesville, FL 32653 USA.
- 5 • Hajas, L., Scherf, K., Török, K., Bugyi, Z., Schall, E., Poms, R., Koehler, P. and Tömösközi, S. (2018) Variation in protein composition among wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to identify cultivars suitable as reference material for wheat gluten analysis. *Food Chem.* 267: 387-394.
- 10 • Lexhaller, B., Tompos, C. and Scherf, K. A. (2016) Comparative analysis of prolamin and glutelin fractions from wheat, rye, and barley with five sandwich ELISA test kits. *Anal. Bioanal. Chem.* 498: 6093-6104.
- Schalk, K., Lexhaller, B., Koehler, P. and Scherf, K. (2017) Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and
15 oats for use as reference materials. *PLoS ONE* 12(2): e0172819.
- Skerritt, J. H., Jenkins, K. L. and Hill, A. S. (1989) Monoclonal antibody Based Two-site Enzyme Immunoassays for Wheat Gluten Proteins. 2. Specificity Analysis. *Food Agric. Immunol.* 1: 161-171.
- 20 • Tye-Din, J., Stewart, J., Dromey, J., Beissbarth, T., van Heel, D., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S., Gianfrani, C., Jewell, D., Hill, A., McCluskey, J., Rossjohn, J. and Anderson, R. (2010) Comprehensive, Quantitative Mapping of T Cell Epitopes in Gluten in Celiac Disease. *Sci. Trans. Med.* 2: 41ra51.
- 25 • Wieser, H. and Koehler, P. (2009) Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by factor 2 valid? *Eur. Food Res. Technol.* 229: 9-13.
- Wieser, H., Koehler, P. and Konitzer, K. (2014) *Celiac Disease and Gluten*. Academic Press, ISBN 978-0-12-420220-7.

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung von Gesamt-Gluten aus Getreide in Lebensmittelproben, bei dem eine Extraktion der Gesamt-Glutenproteine aus Lebensmittelproben und deren anschließende quantitative Konzentrationsbestimmung mittels spezifischer Affinitätsbindung erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass zur Quantifizierung des Gesamtglutengehaltes in einem einzigen analytischen Lauf eine Kombination spezifischer Bindungsreagenzien gegen Prolamine und Gluteline eingesetzt wird, wobei die spezifischen Bindungsreagenzien gemischt in einer Einheit vorliegen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von Gesamt-Gluten mit einem ELISA, einem immunturbidimetrischen Assay, einem *Lateral-Flow Assay*, einem *Flow-Through Assay*, einem *Mikroarray Assay* oder einem *mikrofluidischen Assay* erfolgt, unter Verwendung der Kombination spezifischer Bindungsreagenzien gegen Prolamine und Gluteline, wobei die spezifischen Bindungsreagenzien in einem homogenen bzw. einheitlichen Gemisch nicht physisch getrennt voneinander vorliegen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Bindungsreagenzien, welche spezifisch gegen unterschiedliche Glutenfraktionen erzeugt wurden, Antikörper, Antikörperfragmente, Nanobodies, Aptamere, spezifische Rezeptoren, T-Zellrezeptoren und/oder Molecularly Imprinted Polymers (MIP); vorzugsweise Antikörper verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von Gesamt-Gluten mit einem Sandwich-ELISA unter Verwendung einer Mikrotiterplatte mit einer gewünschten Anzahl von Kavitäten erfolgt, wobei jede einzelne Kavität der Mikrotiterplatte mit einem Gemisch der spezifischen Fängerantikörper vorzugsweise gegen Prolamine und gegen Gluteline beschichtet wird, die extrahierte Lebensmittelprobe oder ein Kalibrator in die jeweilige Kavität gegeben wird, nach einer Inkubation ungebundenes Proben-Material entfernt, anschließend ein einheitliches

Kombinationskonjugat aus konjugierten Detektionsantikörpern gegen Prolamine und Gluteline in die Kavität zugegeben und durch Messung der Signalstärke der Detektionsantikörper die Gesamt-Glutenmenge einer einzelnen Kavität im Vergleich zu mitgeführten Kalibratoren bestimmt wird.

5

5. Verfahren nach Anspruch 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten konjugierten Detektionsantikörper gegen Prolamine und Gluteline im Kombinationskonjugat derart gemischt werden, dass alle Glutenfraktionen (Gliadine, LMW-Glutenin Subunits und HMW-Glutenin Subunits jeweils aus Weizen, Prolamine aus Roggen und Gerste sowie HMW-Secaline aus Roggen) bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Prolamin-Detektionsantikörper ein Antikörper gegen das Epitop QQFPF eingesetzt wird, als LMW-Detektionsantikörper ein Antikörper gegen die LMW-Fraktion extrahiert aus Weizenmehl und als HMW-Detektionsantikörper ein Antikörper gegen das Epitop GYYPTS eingesetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8 dadurch gekennzeichnet, dass ein Kalibrator mit Glutenproteinen aus Weizen, und/oder anderen Triticum-Spezies, und/oder Roggen und/oder Gerste verwendet wird.
8. Verwendung eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 - 7 zur Quantifizierung von Gesamtglutenproteinen aus Weizen-, und/oder anderen Triticum-Spezies- und/oder Roggen- und/oder Gerste-haltigen Lebensmittelproben.
9. Testkit zur Quantifizierung von Gesamtgluten aus Weizen, und/oder Triticum-Spezies, und/oder Gerste und/oder Roggen in Lebensmittelproben, umfassend eine Mikrotiterplatte beschichtet mit Fängerantikörpern gegen Gliadine, LMW-Glutenin Subunits und HMW-Glutenin Subunits jeweils aus Weizen, Prolamine aus Roggen und Gerste sowie HMW-Secaline aus Roggen, Weizenmehlextrakt als Kalibrator, ein Kombinationskonjugat mit

10

15

20

25

30

Meerrettichperoxidase-konjugierten Detektionsantikörpern gegen oben genannte Proteinfractionen aus Weizen, Roggen und Gerste, die derart verdünnt sind, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden, Farbreagenz (Substrat),
5 Stopplösung, Probenverdünnungspuffer und Waschpuffer.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

beim Internationalen Büro eingegangen am 08 Juli 2019 (08.07.2019)

1. Verfahren zur Quantifizierung von Gesamt-Gluten aus Getreide in Lebensmittelproben, bei dem eine Extraktion der Gesamt-Glutenproteine aus Lebensmittelproben und deren anschließende quantitative Konzentrationsbestimmung mittels spezifischer Affinitätsbindung erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass zur Quantifizierung des Gesamtglutengehaltes in einem einzigen analytischen Lauf eine Kombination spezifischer Bindungsreagenzien gegen Prolamine und Gluteline eingesetzt wird, wobei die spezifischen Bindungsreagenzien gemischt in einer Einheit vorliegen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von Gesamt-Gluten mit einem ELISA, einem immunturbidimetrischen Assay, einem *Lateral-Flow Assay*, einem *Flow-Through Assay*, einem *Mikroarray Assay* oder einem *mikrofluidischen Assay* erfolgt, unter Verwendung der Kombination spezifischer Bindungsreagenzien gegen Prolamine und Gluteline, wobei die spezifischen Bindungsreagenzien in einem homogenen bzw. einheitlichen Gemisch nicht physisch getrennt voneinander vorliegen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Bindungsreagenzien, welche spezifisch gegen unterschiedliche Glutenfraktionen erzeugt wurden, Antikörper, Antikörperfragmente, Nanobodies, Aptamere, spezifische Rezeptoren, T-Zellrezeptoren und/oder Molecularly Imprinted Polymers (MIP); vorzugsweise Antikörper verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von Gesamt-Gluten mit einem Sandwich-ELISA unter Verwendung einer Mikrotiterplatte mit einer gewünschten Anzahl von Kavitäten erfolgt, wobei jede einzelne Kavität der Mikrotiterplatte mit einem Gemisch der spezifischen Fängerantikörper vorzugsweise gegen Prolamine und gegen Gluteline beschichtet wird, die extrahierte Lebensmittelprobe oder ein Kalibrator in die jeweilige Kavität gegeben wird, nach einer Inkubation ungebundenes Proben-Material entfernt, anschließend ein einheitliches

Kombinationskonjugat aus konjugierten Detektionsantikörpern gegen Prolamine und Gluteline in die Kavität zugegeben und durch Messung der Signalstärke der Detektionsantikörper die Gesamt-Glutenmenge einer einzelnen Kavität im Vergleich zu mitgeführten Kalibratoren bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten konjugierten Detektionsantikörper gegen Prolamine und Gluteline im Kombinationskonjugat derart gemischt werden, dass alle Glutenfraktionen (Gliadine, LMW-Glutenin Subunits und HMW-Glutenin Subunits jeweils aus Weizen, Prolamine aus Roggen und Gerste sowie HMW-Secaline aus Roggen) bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, dass ein Kalibrator mit Glutenproteinen aus Weizen, und/oder anderen Triticum-Spezies, und/oder Roggen und/oder Gerste verwendet wird.
7. Verwendung eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 - 6 zur Quantifizierung von Gesamtglutenproteinen aus Weizen-, und/oder anderen Triticum-Spezies- und/oder Roggen- und/oder Gerste-haltigen Lebensmittelproben.
8. Testkit zur Quantifizierung von Gesamtgluten aus Weizen, und/oder Triticum-Spezies, und/oder Gerste und/oder Roggen in Lebensmittelproben, umfassend eine Mikrotiterplatte beschichtet mit Fängerantikörpern gegen Prolamine und Gluteline, wobei alle Fängerantikörper vermischt in einer Kavität vorliegen, Weizenmehlextrakt als Kalibrator, ein Kombinationskonjugat mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Detektionsantikörpern gegen oben genannte Proteinfractionen aus Weizen, Roggen und Gerste, die derart verdünnt sind, dass alle Glutenfraktionen bei gleichem Massenanteil mit vergleichbarer Signalstärke gemessen werden, Farbreagenz (Substrat), Stopplösung, Probenverdünnungspuffer und Waschpuffer.

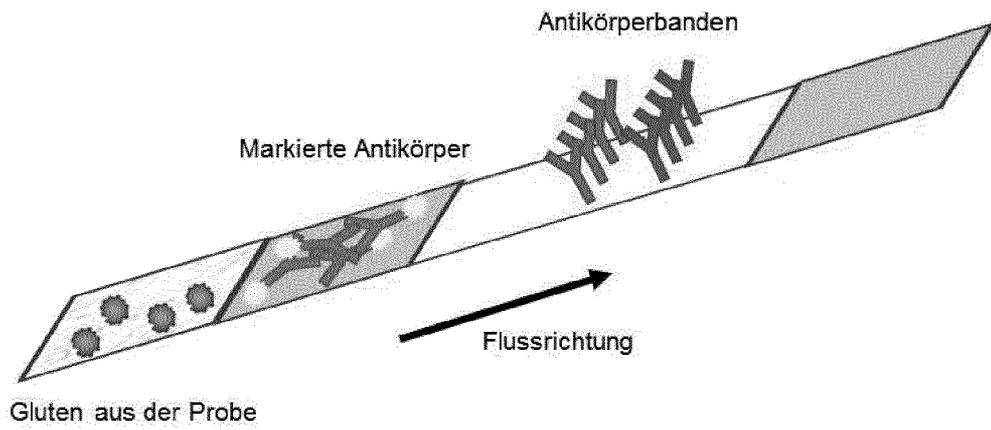


Abbildung 1

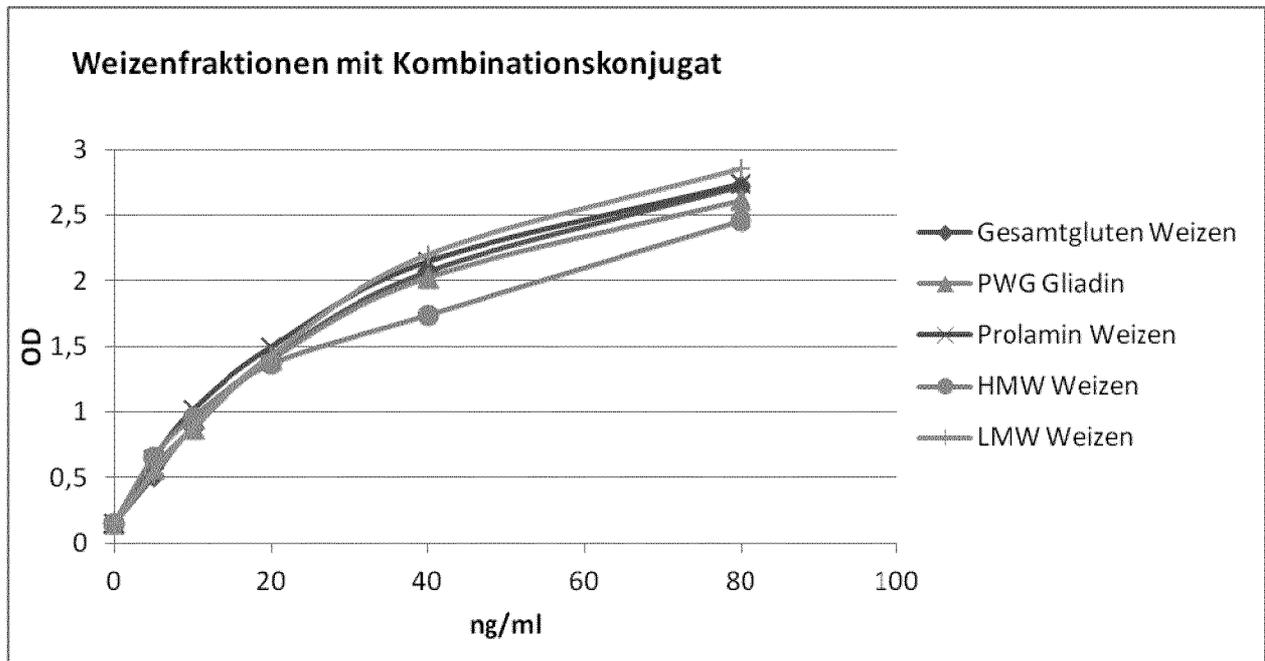


Abbildung 2

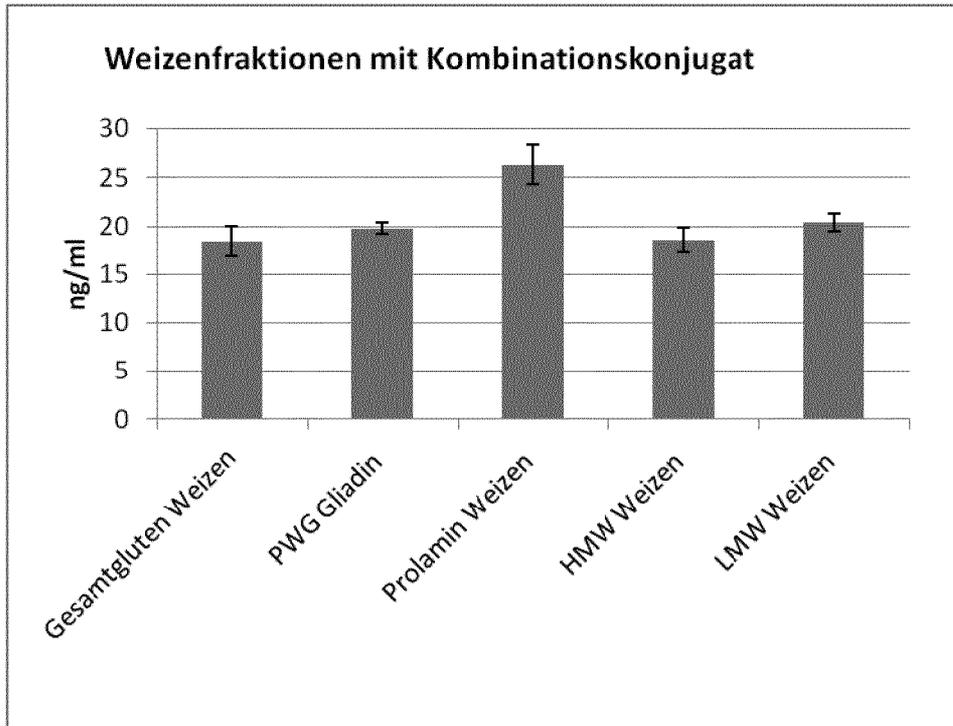


Abbildung 3

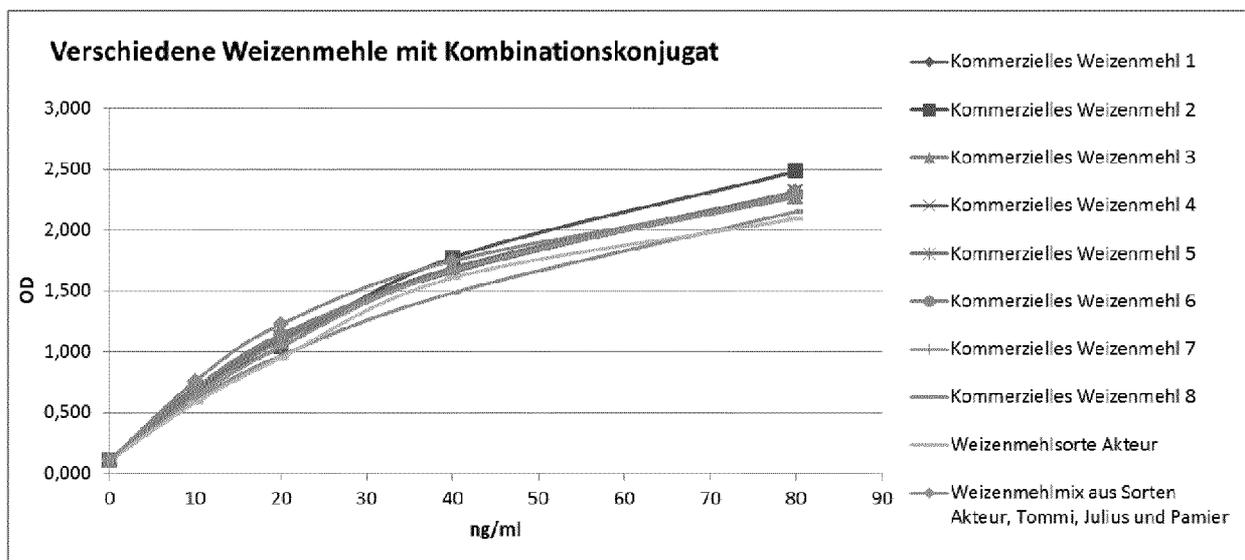


Abbildung 4

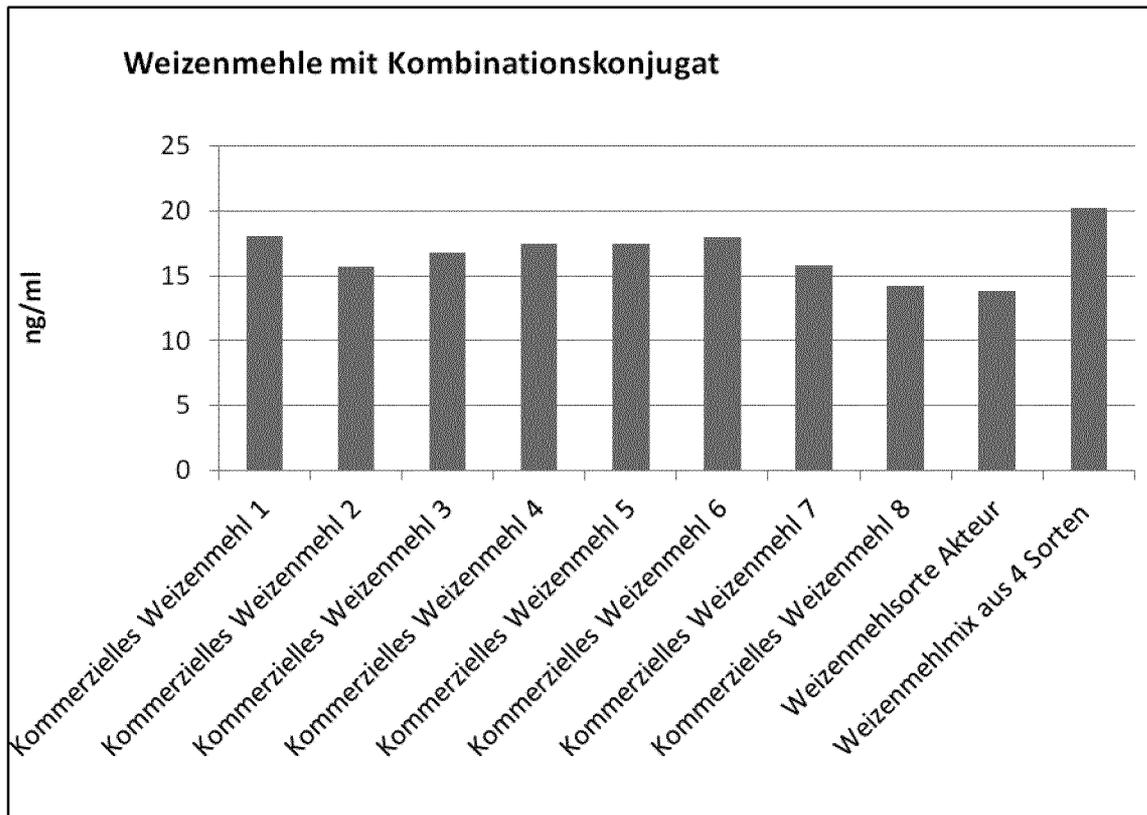


Abbildung 5

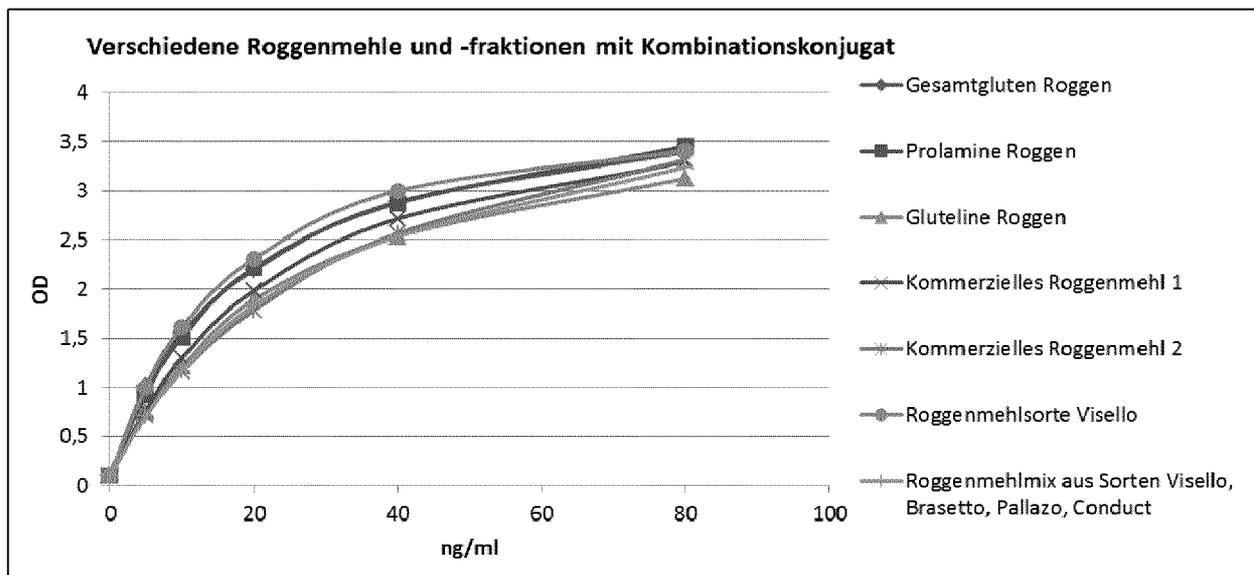


Abbildung 6

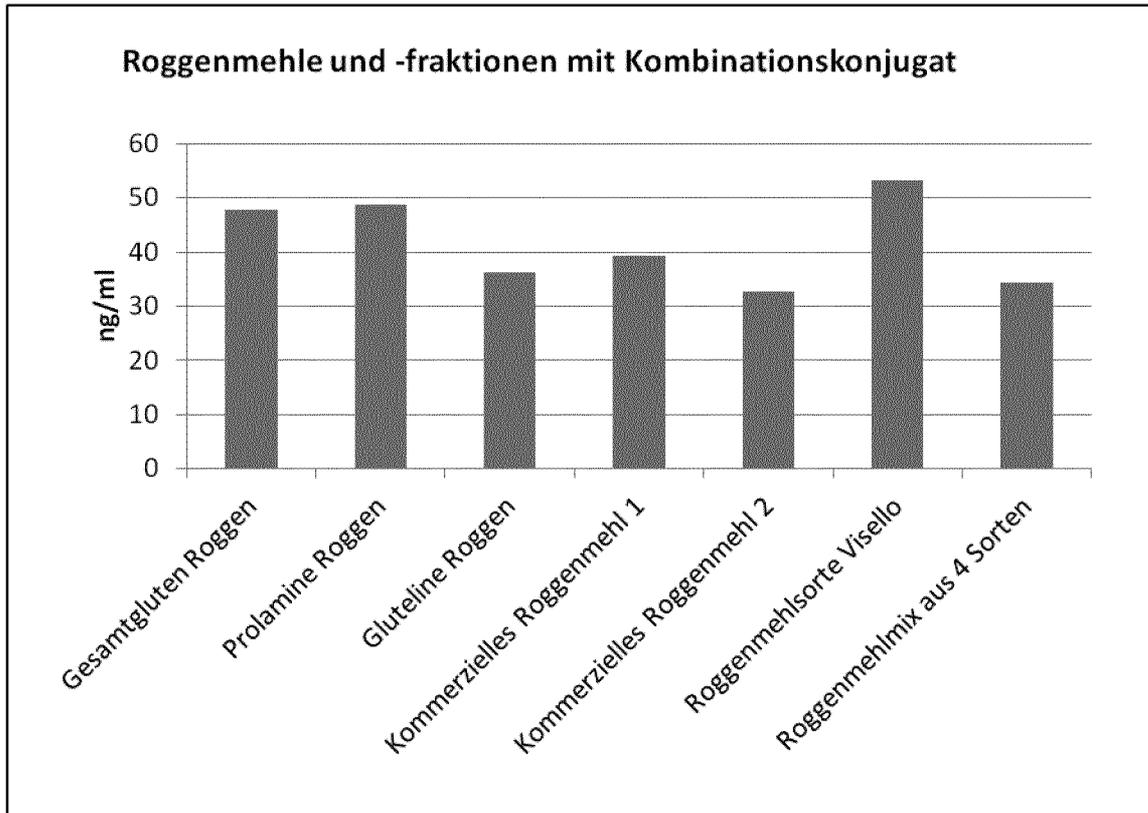


Abbildung 7

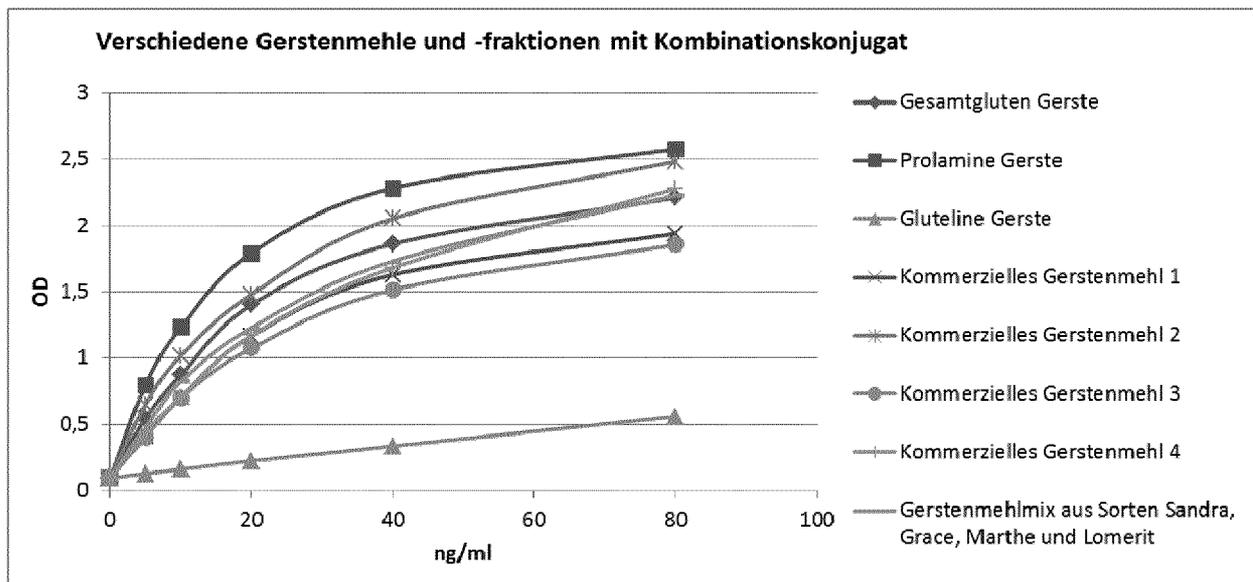


Abbildung 8

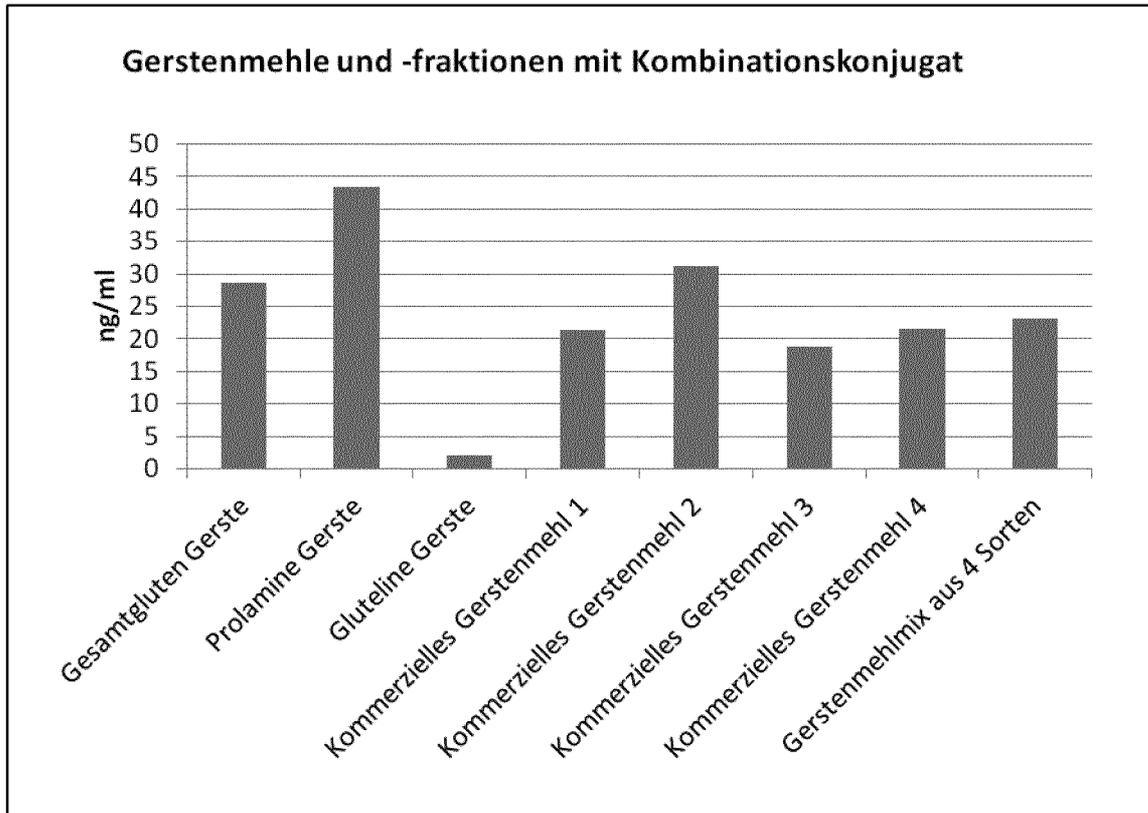


Abbildung 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/025002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/569</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/68</i> (2006.01)i		
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		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous. "ALLER-TEK(TM) GLUTEN ELISA ASSAY" 11 March 2014 (2014-03-11), pages 1-8, Retrieved from the Internet: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/se110019bul.pdf [retrieved on 2018-07-17] XP055493270 the whole document, in particular page 2, paragraphs 2-3; page 3, "Materials provided with the gluten assay"; page 4, paragraph 1; pages 5-6, "Test performance"; page 7, "Sample standard curves"	1-3, 7, 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2019		Date of mailing of the international search report 16 April 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Chrétien, Eva Maria Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/025002

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEXHALLER BARBARA ET AL. "Comparative analysis of prolamin and glutelin fractions from wheat, rye, and barley with five sandwich ELISA test kits" <i>ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE</i> , Vol. 408, No. 22, 24 June 2016 (2016-06-24), pages 6093-6104, [retrieved on 2016-06-24] DOI: 10.1007/S00216-016-9721-7 ISSN: 1618-2642, XP036028098	1-9
Y	the whole document, in particular page 6099, column 1, paragraph 1; page 6100, column 1, paragraph 1; paragraph spanning page 6100, column 2 - page 6101, column 1; paragraph spanning page 6101, column 2 - page 6102, column 1; paragraph spanning page 6102, columns 1-2; figures 1, 3-5; tables 1, 3	6, 9
Y	EP 1779115 A2 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL]) 02 May 2007 (2007-05-02) cited in the application the whole document, in particular paragraphs 25, 34	6, 9
Y	WO 2005105129 A2 (BTG INT LTD [GB]; ANDERSON ROBERT [AU] ET AL.) 10 November 2005 (2005-11-10) the whole document, in particular page 4, paragraph 3; paragraph spanning page 43 - page 44	6, 9
A	SKERRITT JH, JENKINS KL, HILL AS. "Monoclonal antibody based two-site enzyme immunoassays for wheat gluten proteins. II. Specificity analysis" <i>FOOD AGRIC IMMUNOL</i> , Vol. 1, 1989, pages 161-171 XP009506873 the whole document	1-9
A	JOHN H SKERRITT, A HILL. "Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study." <i>J ASSOC OFF ANAL CHEM</i> , Vol. 74, March 1991 (1991-03), pages 257-264 XP009506874 the whole document	1-9
A	JOHN H SKERRITT ET AL. "Wheat low molecular weight glutenin subunits - structural relationship to other gluten proteins analyzed using specific antibodies." <i>CER CHEM</i> , Vol. 67, 01 January 2018 (2018-01-01), pages 250-257 XP055493305 the whole document	1-9
A	JOHN H SKERRITT. "A Simple Antibody-Based Test for Dough Strength. I. Development of Method and Choice of Antibodies" <i>CEREAL CHEM</i> , Vol. 68, 1991, pages 467-474 XP009506877 the whole document	1-9
A	JOHN H SKERRITT. "A Simple Antibody-Based Test for Dough Strength. II. Genotype and Environmental Effects" <i>CEREAL CHEM.</i> , Vol. 68, 01 January 1991 (1991-01-01), pages 475-481 XP055493312 the whole document	1-9
A	DE 10154458 A1 (UNIV LEIPZIG [DE]) 17 July 2003 (2003-07-17) the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/025002

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	1779115	A2	02 May 2007	AT	456049	T	15 February 2010
				CA	2572185	A1	12 January 2006
				EP	1612558	A1	04 January 2006
				EP	1779115	A2	02 May 2007
				US	2008152780	A1	26 June 2008
				WO	2006004394	A2	12 January 2006
WO	2005105129	A2	10 November 2005	AU	2005237287	A1	10 November 2005
				BR	PI0510274	A	30 October 2007
				CA	2564521	A1	10 November 2005
				CA	2960504	A1	10 November 2005
				CN	1976715	A	06 June 2007
				CN	102430111	A	02 May 2012
				CN	104056251	A	24 September 2014
				EP	1755639	A2	28 February 2007
				EP	2412380	A1	01 February 2012
				EP	2486934	A1	15 August 2012
				EP	2486935	A1	15 August 2012
				ES	2648792	T3	08 January 2018
				JP	5946231	B2	05 July 2016
				JP	2008508856	A	27 March 2008
				JP	2014050386	A	20 March 2014
				JP	2015231991	A	24 December 2015
				JP	2017061493	A	30 March 2017
				NZ	550600	A	26 March 2010
				US	2008318852	A1	25 December 2008
				US	2013078267	A1	28 March 2013
				WO	2005105129	A2	10 November 2005
DE	10154458	A1	17 July 2003	NONE			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G01N33/569 G01N33/68
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>Anonymous: "ALLER-TEK(TM) GLUTEN ELISA ASSAY", 11. März 2014 (2014-03-11), Seiten 1-8, XP055493270, Gefunden im Internet: URL: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/se110019bul.pdf [gefunden am 2018-07-17] gesamtes Dokument, besonders S. 2, Par. 2-3; S. 3, "Materials provided with the gluten assay"; S. 4, Par. 1; S. 5-6, "Test performance"; S. 7, "Sample standard curves"</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-3,7,8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. April 2019

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/04/2019

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chrétien, Eva Maria

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEXHALLER BARBARA ET AL: "Comparative analysis of prolamin and glutelin fractions from wheat, rye, and barley with five sandwich ELISA test kits", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE, Bd. 408, Nr. 22, 24. Juni 2016 (2016-06-24), Seiten 6093-6104, XP036028098, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-016-9721-7 [gefunden am 2016-06-24]	1-9
Y	gesamtes Dokument, besonders S. 6099, Sp. 1, Par. 1; S. 6100, Sp. 1, Par. 1; S. 6100, Sp. 2 - S. 6101, Sp. 1, überbr. Par.; S. 6101, Sp. 2 - S. 6102, Sp. 1, überbr. Par.; S. 6102, Sp. 1-2, überbr. Par.; Fig. 1, 3-5; Tab. 1, 3	6,9
Y	EP 1 779 115 A2 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL]) 2. Mai 2007 (2007-05-02) in der Anmeldung erwähnt gesamtes Dokument, besonders Par. 25, 34	6,9
Y	WO 2005/105129 A2 (BTG INT LTD [GB]; ANDERSON ROBERT [AU] ET AL.) 10. November 2005 (2005-11-10) gesamtes Dokument, besonders S. 4, Par. 3; S. 43, Par. 3 - S. 44, überbr. Par.	6,9
A	SKERRITT JH, JENKINS KL, HILL AS: "Monoclonal antibody based two-site enzyme immunoassays for wheat gluten proteins. II. Specificity analysis", FOOD AGRIC IMMUNOL, Bd. 1, 1989, Seiten 161-171, XP009506873, das ganze Dokument	1-9
A	JOHN H SKERRITT, A HILL: "Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study.", J ASSOC OFF ANAL CHEM, Bd. 74, März 1991 (1991-03), Seiten 257-264, XP009506874, das ganze Dokument	1-9
A	JOHN H SKERRITT ET AL: "Wheat low molecular weight glutenin subunits - structural relationship to other gluten proteins analyzed using specific antibodies.", CER CHEM, Bd. 67, 1. Januar 2018 (2018-01-01), Seiten 250-257, XP055493305, das ganze Dokument	1-9

	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOHN H SKERRITT: "A Simple Antibody-Based Test for Dough Strength. I. Development of Method and Choice of Antibodies", CEREAL CHEM, Bd. 68, 1991, Seiten 467-474, XP009506877, das ganze Dokument	1-9
A	----- JOHN H SKERRITT: "A Simple Antibody-Based Test for Dough Strength. II. Genotype and Environmental Effects", CEREAL CHEM., Bd. 68, 1. Januar 1991 (1991-01-01), Seiten 475-481, XP055493312, das ganze Dokument	1-9
A	----- DE 101 54 458 A1 (UNIV LEIPZIG [DE]) 17. Juli 2003 (2003-07-17) das ganze Dokument	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/025002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1779115	A2	02-05-2007	AT 456049 T 15-02-2010
			CA 2572185 A1 12-01-2006
			EP 1612558 A1 04-01-2006
			EP 1779115 A2 02-05-2007
			US 2008152780 A1 26-06-2008
			WO 2006004394 A2 12-01-2006

WO 2005105129	A2	10-11-2005	AU 2005237287 A1 10-11-2005
			BR PI0510274 A 30-10-2007
			CA 2564521 A1 10-11-2005
			CA 2960504 A1 10-11-2005
			CN 1976715 A 06-06-2007
			CN 102430111 A 02-05-2012
			CN 104056251 A 24-09-2014
			EP 1755639 A2 28-02-2007
			EP 2412380 A1 01-02-2012
			EP 2486934 A1 15-08-2012
			EP 2486935 A1 15-08-2012
			ES 2648792 T3 08-01-2018
			JP 5946231 B2 05-07-2016
			JP 2008508856 A 27-03-2008
			JP 2014050386 A 20-03-2014
			JP 2015231991 A 24-12-2015
			JP 2017061493 A 30-03-2017
			NZ 550600 A 26-03-2010
			US 2008318852 A1 25-12-2008
			US 2013078267 A1 28-03-2013
WO 2005105129 A2 10-11-2005			

DE 10154458	A1	17-07-2003	KEINE
