



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 11 776 T2 2006.06.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 200 826 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 776.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/06235**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 947 920.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/013116**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.06.2006**

(30) Unionspriorität:
99306347 **11.08.1999** **EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Inverness Medical Switzerland GmbH, Zug, CH

(72) Erfinder:
**BADLEY, Robert Andrew, Bedford, Bedfordshire
MK44 1LQ, GB; HOWELL, Steven, Bedford,
Bedfordshire MK44 1LQ, GB; VAN DER LOGT,
C.P.E., NL-3133 AT Vlaardingen, NL**

(74) Vertreter:
Meissner, Bolte & Partner, 81679 München

(54) Bezeichnung: **IMMUNOASSAY UND TEST-VORRICHTUNG MIT INTEGRIERTER REFERENZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Umfeld der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft Immunassays, die spezifische Bindung einschließen, und Testvorrichtungen zum Durchführen solcher Assays. Insbesondere betrifft diese Erfindung Immunassays (und Testvorrichtungen), die eine verbesserte Reproduzierbarkeit als ein Ergebnis des Assays, der eine integrierte Referenz aufweist, zeigen, wobei die integrierte Referenz die Berechnung des Assayergebnisses erlaubt, um Schwankungen in der Menge des Assaybindungsreagenz zu erklären.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Immunassays, welche die spezifischen Bindungseigenschaften von Antikörper-ähnlichen Molekülen verwenden, um die Anwesenheit von gewissen Analyten in einer Probe nachzuweisen, sind im Stand der Technik gut bekannt. Im Wesentlichen funktionieren solche Immunassays durch in Kontakt bringen einer Probe mit verschiedenen Bindungsreagenzien, so dass die Bildung eines Komplexes erlaubt wird, der aus dem Analyten und einem oder mehreren Antikörper-ähnlichen Molekülen besteht, und anschließendem darauf folgendem Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit des Komplexes auf einer Oberfläche oder in einer Lösung.

[0003] Immunassays können irgendeine von einer Vielzahl von spezifischen Formen annehmen, abhängig von der Art des Analyten, den sie messen sollen und/oder der besonderen diagnostischen Umgebung, in der sie verwendet werden. Beispielsweise können Immunassays ihrer Natur nach entweder kompetitiv oder nicht kompetitiv (d.h. vom "Sandwichtyp") sein, von denen beide in der Literatur in beträchtlichem Ausmaß beschrieben wurden. Darüber hinaus können Immunassays eine Vielzahl von Bindungsreagenzien einschließen, und eine solche Vielzahl, sowohl in der Zahl als auch der Art der verwendeten Bindungsreagenzien, kann ein Mittel bereitstellen, durch das die Selektivität und Sensitivität eines Assays gegenüber einer Vielzahl von Analyten moduliert werden kann. Immunassays können auch derart konstruiert werden, dass sie eine Vielzahl von Arten von Assaysignalen bereitstellen, beispielsweise Signale, die mit dem menschlichen Auge sichtbar sind oder Signale, die nur mit der Hilfe von komplexer Überwachungsausstattung gemessen werden können.

[0004] Wie das zuvor Gesagte impliziert, sind moderne kommerziell verwendete Immunassays komplexe diagnostische Werkzeuge. So existiert ein signifikantes Potenzial für Variabilität unter verschiedenen Tests für denselben Analyten, selbst wenn dieselbe Testvorrichtung verwendet wird. Die meisten Assays sind wenigstens teilweise sensitiv gegenüber Temperatur, Entwicklungszeit, Inkubation, Probengröße und Reagenzstabilität, von denen jede, wenn sie verändert wird, zu variablen und somit nicht akzeptablen Ergebnissen führen könnte. Eine andere potenzielle Fehlerquelle in Immunassays ist die Variabilität in der Menge des Bindungsreagenz, gegenüber dem eine gegebene Probe exponiert ist. Weil dies so ist, ist es wünschenswert, die Menge eines solchen Reagenz integriert zu messen und hinsichtlich irgendwelcher Variationen in ihrer Menge unter aufeinanderfolgenden Assaytests zu korrigieren.

[0005] In dieser Hinsicht beschreiben Attridge et al. WO 92/09892, Gunars et al. AU-A-70447/87 und Litman et al. EP-A-0093613 alle Immunassays, die eine Form einer integrierten Referenz einschließen, die fähig ist, hinsichtlich einer Variabilität in Testergebnissen zu korrigieren. Insbesondere die EP-A-0093613 beschreibt einen Immunassay (und Testvorrichtung), der eine Messoberfläche und eine Berechnungsoberfläche verwendet. Die Messoberfläche schließt die Bindung eines Konjugats an die Oberfläche durch eine spezifische Bindungspaar Komplexbildung ein, wobei das Konjugat zwei verschiedene-Bestandteile aufweist, nämlich ein Teil eines Signal bildenden Systems, das an ein Teil eines spezifischen Bindungspaares gebunden ist. Die Berechnungsoberfläche schließt im Gegensatz dazu ein Signal bildendes Teil ein, das an die Oberfläche gebunden ist, entweder anfänglich oder durch die Zwischenstellung von spezifischer Bindungspaar Komplexbildung, wobei das spezifische Bindungspaar von dem Bindungspaar der Messoberfläche verschieden ist.

[0006] Obwohl die EP-A-0093613 eine integrierte Referenz bereitstellt, tut sie dies in einer Weise, die offensichtliche Nachteile aufweist. Die EP-A-0093613 benötigt, sowohl in kompetitiven als auch in nicht kompetitiven Assayformaten, die Bildung einer Vielzahl von verschiedenen spezifischen Bindungsparteilen, von denen jedes unabhängig der Inaktivierung durch Denaturierung zugänglich ist, falls die Temperatur oder andere Testbindungen variieren. Eine solche Inaktivierung ist eindeutig und nicht gewünscht, weil sie zu nicht akzeptabler Variabilität in den Testergebnissen führen kann.

[0007] Immunassays mit integrierter Referenz, wie sie in der WO 92/09892 und AU-A-70447/87 beschrieben sind, zeigen in ähnlicher Weise diese selben Nachteile.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Es wäre deshalb wünschenswert, einen Immunassay bereitzustellen, der fähig ist, die zuvor genannten Nachteile zu überwinden, und eine analytische Testvorrichtung bereitzustellen, welche fähig ist, einen solchen Immunassay durchzuführen. In dieser Hinsicht stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines Analyten in einer Probe bereit, das Verfahren umfasst:

- a) in Kontakt bringen der Probe mit einem Bindungsreagenz und einem Analytrezeptor, um einen ersten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz, den Analyten und den Analytrezeptor, der erste Komplex liefert ein Testsignal, wobei der Analytrezeptor in einer ersten Testzone angeordnet ist und fähig ist, an den Analyten zu binden, und das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Analyten besitzt;
- b) in Kontakt bringen der Probe mit einem Referenzliganden, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz und den Referenzliganden, der zweite Komplex liefert ein Referenzsignal, wobei der Referenzligand in einer Referenzzone angeordnet ist, und weiterhin wobei das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden besitzt; und
- c) Nachweisen der Test- und Referenzsignale aus den Test- und Referenzzonen, wobei das Verhältnis des Testsignals zu dem Referenzsignal, wenn es aufgenommen wird, die Menge des Analyten in der Probe definiert, diese Menge ist unabhängig von der Menge des Bindungsreagenz, die mit der Probe in Kontakt gebracht wurde.

[0009] Ebenfalls umfasst ist eine analytische Testvorrichtung zum Nachweis der Anwesenheit eines Analyten in einer flüssigen biologischen Probe durch spezifische Bindung des Analyten an ein Bindungsreagenz, gegenüber dem die Probe ausgesetzt ist, und ein Analytrezeptor, um einen ersten Komplex zu bilden, wobei das Bindungsreagenz ausgewählt ist unter einem Antikörper oder einem multivalenten Antigen-bindenden Protein, der Antikörper und das multivalente Antigen-bindende Protein weisen jeweils eine erste und eine zweite Domänen-Bindungseinheit auf, wobei die erste Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Analyten liefert und die zweite Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für einen Referenzliganden liefert; die Vorrichtung umfasst einen ersten und zweiten festen Träger, der erste feste Träger umfasst eine Referenzzone, die Referenzzone weist an sie irreversibel immobilisiert den Referenzliganden auf, der, wenn er an das Bindungsreagenz gebunden ist, einen zweiten Komplex bildet, der ein Referenzsignal liefert, das ein Mittel ist, durch das Variationen in der Menge des Bindungsreagenz, die der Probe ausgesetzt ist, korrigiert werden; und der zweite feste Träger umfasst eine Testzone, die Testzone weist irreversibel an sie immobilisiert den Analytrezeptor auf, der, wenn er an den Analyten und das Bindungsreagenz gebunden ist, den ersten Komplex bildet, der ein Testsignal liefert.

[0010] Die erfindungsgemäßen Immunassays stellen herstellbare Assayvorrichtungen bereit, die zu akkuraten und reproduzierbaren Testergebnissen fähig sind, die ideal für kommerzielle Märkte, wie die klinischen Märkte oder die Märkte des Testens zu Hause geeignet sind. Die Immunassays besitzen eine integrierte Referenz durch Verwendung eines Bindungsreagenz, das spezifisch hergestellt ist, um die inhärenten Probleme des Standes der Technik zu vermeiden. Weil das Bindungsreagenz auf einem einzigen Molekül die zwei Domänen-Bindungseinheiten aufweist, die für die Analytmessung und die integrierte Referenz nötig sind, gibt es weniger Möglichkeiten für das Auftreten der Denaturierung von Assaybestandteilen unter variablen Testbedingungen, und somit wird die Variabilität von Testergebnissen minimiert. Weil darüber hinaus das Bindungsreagenz, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, nicht ein einzelnes Molekül sondern ein Komplex aus zwei oder mehr Molekülen ist, ist es wahrscheinlich, dass, falls Denaturierung auftritt, das gesamte Molekül denaturieren wird, so dass das Signalverhältnis von Test- zu Referenzsignal nicht beeinflusst werden wird.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0011] [Fig. 1](#) zeigt die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1, ein Lama biköpfiges grün fluoreszierendes Protein Bindungsreagenz, das zwei Bindungsstellen enthält, eine für menschliches Choriongonadotropin (hCG) und eine für reaktiven roten 6 Farbstoff (RR6).

[0012] [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2, ein doppelköpfiges Antikörper Bindungsreagenz, das zwei Bindungsstellen enthält, eine für menschliches Choriongonadotropin (hCG) und eine für Glucoseoxidase (GOx).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0013] Die erfindungsgemäßen Immunassays können verwendet werden, um die Anwesenheit irgendeiner Anzahl von bekannten Analyten zu bestimmen. Repräsentative Analyten schließen Arzneimittel, metabolische

Analyten (z.B. Enzyme), Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlenhydrate ein. Alternativ dazu kann der Analyt von makromolekularer oder partikulärer Natur sein, wie Allergenen (z.B. Staubmilbenkot), Bakterien (z.B. Chlamydia oder Salmonella) oder Viruspartikel oder Bestandteilen davon, oder anderen Mikroorganismen wie Pilzen oder bakteriellen Sporen. Von besonderem Interesse sind hormonelle Analyten, insbesondere Sex- und/oder Fertilitätshormone und Analoge davon, wie Östrogen-3-Glucuronid (E3G), Pränandiol-3-Glucuronid (P3G), menschliches Choriongonadotropin (hCG), lutenisierendes Hormon (LH) und Follikel stimulierendes Hormon (FSH).

[0014] Die Immunassays können für irgendeine Art von biologischer oder nicht biologischer Probe verwendet werden, obwohl flüssige biologische Proben, die von Urin, Serum, Tränen, Speichel, Gebärmutterhals, Tränen oder Harnröhrenflüssigkeiten stammen, und Stuhlproben typischerweise am meisten verwendet werden. Andere Proben, die geeigneterweise für die erfindungsgemäßen Assays verwendet werden können, schließen flüssige oder feste Nahrungsmittelproben und Proben aus industriellen Umgebungen ein. Die Proben können vor dem Testen gereinigt oder verdünnt werden.

[0015] Wenn Proben verwendet werden, die bakterielle oder virale Analyten enthalten, kann es notwendig sein, die Probe zuerst mit einem Extraktionspuffer in Kontakt zu bringen, der fähig ist, den interessierenden Analyten aus dem Bakterium oder Virus zu extrahieren. Die Extraktion kann durch irgendein bekanntes Mittel durchgeführt werden, wie durch die Verwendung von zwitterionischen Detergenzien oder nicht ionischen Detergenzien.

[0016] Sobald eine geeignete Probe identifiziert wurde, können die erfindungsgemäßen Immunassays verwendet werden, um die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Analyten in der Probe zu bestimmen. Dies wird stattfinden durch

- a) in Kontakt bringen der Probe mit einem Bindungsreagenz und einem Analytrezeptor, um einen ersten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz, den Analyten und den Analytrezeptor, der erste Komplex liefert ein Testsignal, wobei der Analytrezeptor in einer ersten Testzone angeordnet ist und fähig ist, an den Analyten zu binden, und das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Analyten besitzt;
- b) in Kontakt bringen der Probe mit einem Referenzliganden, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz und den Referenzliganden, der zweite Komplex liefert ein Referenzsignal, wobei der Referenzligand in einer Referenzzone angeordnet ist, und weiterhin wobei das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden besitzt; und
- c) Nachweisen der Test- und Referenzsignale aus den Test- und Referenzzonen, wobei das Verhältnis des Testsignals zu dem Referenzsignal, wenn es aufgenommen wird, die Menge des Analyten in der Probe definiert, diese Menge ist unabhängig von der Menge des Bindungsreagenz, die mit der Probe in Kontakt gebracht wurde.

[0017] Das Bindungsreagenz in diesem Assay kann irgendeine Verbindung mit zwei verschiedenen Bindungsspezifitäten sein, von denen eine für den interessierenden Analyten und die andere für einen Referenzliganden ist. Unter Bindungsspezifität wird verstanden, dass das Bindungsreagenz fähig ist, an ein interessierendes Epitop in einer selektiven Weise in der Anwesenheit von überschüssigen Mengen an anderen, nicht interessierenden Materialien zu binden, und fest genug (mit genügend hoher Affinität), um einen nützlichen Assay bereitzustellen. Beispiele für Standardreagenzien, die spezifische Bindung zeigen, schließen Antikörper ein, die nur an eine Spezies von Bakterien, aber nicht an andere Spezies binden. Unter "verschieden" wird verstanden, dass das Bindungsreagenz zwei verschiedene Bindungsspezifitäten gegenüber zwei verschiedenen Molekülen, oder gegenüber zwei verschiedenen Stellen auf demselben Molekül zeigt, so dass eine sterische oder andere Wechselwirkung zwischen den resultierenden zwei Bindungsereignissen vernachlässigbar ist und die Fähigkeit des Bindungsreagenz, beide Moleküle oder Stellen gleichzeitig zu binden, nicht signifikant beeinflusst wird.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Bindungsreagenz ausgewählt unter einem Antikörper oder einem multivalenten Antigen-bindenden Protein, der Antikörper und das multivalente Antigen-bindende Protein weisen jeweils eine erste und eine zweite Domänen-Bindungseinheit auf, wobei die erste Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Analyten liefert und die zweite Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden liefert. Eine Domänen-Bindungseinheit, wie hier verwendet, bedeutet eine Immunglobulin variable Domäne, die natürlicherweise eine vollständige Antigen-bindungsstelle bildet.

[0019] Verschiedene Formen von Antikörpern sind vorgesehen, die solche Antikörper-ähnlichen Moleküle und Konstrukte wie Fv, Fab, ScFv und ähnliches einschließen können. Spezifische Beispiele von Antikörpern,

die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, schließen jene multivalente und/oder multispezifische Konstruktionen ein, die in der Literatur beschrieben wurden und zwei oder mehr Polypeptidketten aufweisen – siehe beispielsweise Patentanmeldung Harris et al., WO 94/09131 und Davis et al., WO 97/14719 – oder sie basieren auf einem "doppel ScFv" Ansatz, wobei die Multivalenz aus zwei oder mehr monovalenten ScFv Molekülen entsteht, die miteinander verbunden sind, und ein Einzelkettenmolekül liefern, das wenigstens vier variable Domänen umfasst, wie beispielsweise beschrieben in Whitlow et al., WO 93/11161 und Mezes et al., WO 94/13806. In all diesen Fällen werden die Domänen-Bindungseinheiten durch die Assoziation von variablen Domänen der leichten und schweren Kette gebildet. Andere geeignete Bindungsreagenzien können von solchen Antikörpern abgeleitet sein, wie jenen, die in Casterman et al., EP-A-0584421 beschrieben sind, die Fragmente von schweren Kette Immunglobulinen offenbart, die keine leichten Ketten aufweisen, einschließlich Fragmenten, die isolierten V_H Domänen oder V_H Dimeren, die durch das Brückendisulfid verbunden sind, entsprechen.

[0020] Das erfindungsgemäße Bindungsreagenz ist vorzugsweise ein multivalentes Antigen-bindendes Protein, weiter bevorzugt eines, das eine einzelne Polypeptidkette aufweist, in dem die ersten und zweiten Domänen-Bindungseinheiten in Reihen verbunden sind. Optimal umfasst das Bindungsreagenz ein bivalentes Antigen-bindendes Protein.

[0021] Die Domänen-Bindungseinheiten, die das multivalente Bindungsprotein umfassen, sind vorzugsweise variable Domänen der schweren Kette, die von einem Immunglobulin abgeleitet sind, das natürlicherweise keine leichten Ketten aufweist, so dass die Antigenbindungsstelle, ausschließlich in der variablen Domäne der schweren Kette angeordnet ist. Vorzugsweise sind die variablen Domänen der schweren Kette von Immunglobulinen abgeleitet, die natürlicherweise keine leichten Ketten aufweisen, die von Camelids, wie in Casterman et al., EP-A-0584421 beschrieben, erhalten werden können.

[0022] Variable Domänen von der schweren Kette, die von einem Immunglobulin abgeleitet sind, das natürlicherweise keine leichten Ketten aufweist, mit einer bestimmten Antigenspezifität können, geeigneterweise durch Screenen von Expressionsbibliotheken von klonierten Fragmenten von Genen, die gebildete Camelid-Immunglobuline kodieren, unter Verwendung herkömmlicher Techniken, wie beispielsweise beschrieben in Casterman et al., EP-A-0584421 und Frenken et al., WO 99/23221, erhalten werden.

[0023] Die multivalenten Antigen-bindenden Proteine können durch das Verknüpfen der Domänen-Bindungseinheiten in Reihen gebildet werden, so dass jedes einzelne Domänen-Bindungseinheit mit wenigstens einer anderen variablen Domäne verbunden ist. Die einzelne Domänen-Bindungseinheit kann sequentiell durch Peptidlinker verbunden werden, geeigneterweise flexible Peptidlinker, die es den Domänen erlauben, sich in Bezug zueinander zu bewegen, so dass die gleichzeitige Bindung an multiple antigene Determinanten erreicht werden kann. Es wird begrüßt, dass die Bindung des Linkers an die einzelne Domänen-Bindungseinheit derart ist, dass sie die Bindungsfähigkeit der Domänen-Antigenbindungsstelle nicht beeinflusst. Irgendein Peptidlinker, der es erlaubt, dass die Domänen-Bindungseinheitenbestandteile in einer solchen Weise miteinander verknüpft werden können, dass jede variable Domäne die Bindungsspezifität des gesamten Immunglobulins, von dem sie abgeleitet ist, behält, kann geeigneterweise verwendet werden. Solche Linker schließen beispielsweise z.B. Peptide, die von bekannten Proteinen, wie Glucoamylase, Zellobiohydrolase oder Zellwandproteinen (CWP) oder synthetischen Peptiden abgeleitet sind, ein. Der Linker kann geeigneterweise von 1 bis 400 oder mehr Aminosäureresten umfassen; weiter bevorzugt umfasst der Peptidlinker von 5 von 20 Aminosäureresten.

[0024] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die einzelnen Domänen-Bindungseinheiten direkt in Reihen ohne irgendeinen dazwischen geschalteten Linker miteinander verbunden werden. Auf diese Weise werden die Bindungsstellen in den multivalenten Bindungsproteinen, die in der Erfindung verwendet werden, in sehr viel engerer Nähe zueinander gehalten, als dies in dem ganzen Immunglobulin der Fall wäre, von dem die Immunglobulinfragmente abgeleitet sind.

[0025] Das Bindungsreagenz, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist vorzugsweise ein markiertes Bindungsreagenz. Alternativ dazu kann die Markierung auf dem Analytrezeptor oder dem Referenzliganden ruhen. Die Markierung erlaubt es dem ersten Komplex (d.h. dem gebundenen Bindungsreagenz, Analyten und Analytrezeptor) ein Testsignal zu liefern, das direkt mit der Menge des Analyten in der Probe verbunden ist. Die Markierung erlaubt es weiterhin dem zweiten Komplex (d.h. dem Bindungsreagenz und dem Referenzliganden) ein Referenzsignal zu liefern, das direkt mit der Menge des Bindungsreagenz, das in dem Assay für die Bindung an den Analyten zur Verfügung steht, verbunden ist, und das im Wesentlichen unabhängig von der Menge des Analyten in der Probe sein sollte. Durch Aufnehmen des Verhältnisses des Testsignals gegenüber dem Referenzsignal kann die Menge des Analyten in der Testprobe einfach bestimmt werden, wobei

die Menge unabhängig ist von der Menge des Bindungsreagenz, das mit der Probe in Kontakt gebracht wurde. So kann eine Abschwächung des Einflusses von Umgebungs- und nicht spezifischen Faktoren auf die Assay-ergebnisse, wie Temperatur, Probenviskosität, Innenstärke der Probe und ähnlichem, erreicht werden.

[0026] Die Test- und Referenzsignale können von den Test- und Referenzoberflächen durch irgendwelche bekannten Mittel nachgewiesen werden. Dies schließt die Bewertung mit dem nackten Auge ein, oder, falls präzisere Messungen gewünscht sind, durch geeignete Instrumente. Instrumente sind insbesondere geeignet, wenn das Referenz- oder Testsignal durch die Menge der Masse des Komplexes an der Referenz- oder Testoberfläche gemessen wird.

[0027] In der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Markierung, die an das Bindungsreagenz konjugiert ist, irgendeine Substanz sein, deren Anwesenheit einfach nachgewiesen werden kann. Vorzugsweise ist die Markierung eine direkte Markierung, wie jene, die im Detail in May et al., US Patent 5,656,503 beschrieben sind. Direkte Markierungen sind Substanzen, die, in ihrem natürlichen Zustand, einfach entweder mit dem nackten Auge sichtbar sind, oder mit Hilfe eines optischen Filters und/oder angewandeter Stimulation, z.B. UV-Licht, um Fluoreszenz zu verstärken. Beispiele schließen radioaktive, chemilumineszente, elektroaktive (wie Redox Markierungen) und fluoreszierende Verbindungen ein. Direkte partikuläre Markierungen, wie Farbstoffsole, metallische Sole (z.B. Gold) und farbige Latexpartikel, sind ebenfalls sehr geeignet und sind, zusammen mit fluoreszierenden Verbindungen, bevorzugt. Von diesen Möglichkeiten sind farbige Latexpartikel und fluoreszierende Verbindungen am meisten bevorzugt. Die Konzentration der Markierung in eine kleine Zone oder Volumen sollte ein einfach nachweisbares Signal erlauben, z.B. einen stark gefärbten Bereich.

[0028] Indirekte Markierungen, wie Enzyme, z.B. alkaline Phosphatase oder Meerrettichperoxidase, können ebenfalls verwendet werden, aber diese benötigen für gewöhnlich das Hinzufügen von einem oder mehreren Entwicklungsreagenzien, wie Substraten, bevor das sichtbare Signal nachgewiesen werden kann. Deshalb sind sie weniger bevorzugt. Solche zusätzlichen Reagenzien können in einen festen Träger einer Assayvorrichtung eingeschlossen werden, so dass sie sich lösen oder verteilen, wenn eine flüssige Probe aufgetragen wird. Alternativ dazu können die Entwicklungsreagenzien zu der Probe vor dem Auftragen der Probe auf dem festen Träger hinzugefügt werden.

[0029] Die Konjugation der Markierung an das Bindungsreagenz kann durch kovalente oder nicht kovalente (einschließlich hydrophobischer) Bindung sein, wenn gewünscht, oder durch Adsorption. Techniken für eine solche Konjugation sind im Stand der Technik bekannt und können einfach für das bestimmte Bindungsreagenz und die Markierung, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, angepasst werden. In der bevorzugten Ausführungsform, in der die Markierung ein farbiges Latexpartikel ist, ist die Markierung vorzugsweise an das Bindungsreagenz durch Adsorption konjugiert. Wenn die Markierung eine Fluoreszenzverbindung ist, ist es bevorzugt, dass die Markierung an das Bindungsreagenz konjugiert oder als Teil des Bindungsreagenz konstruiert ist.

[0030] Der Analytrezeptor, der in den Assays der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann jede Verbindung sein, welche fähig ist, an den interessierenden Analyten zu binden, weiter bevorzugt eine Verbindung, die eine Bindungsspezifität für den interessierenden Analyten zeigt. Der Analytrezeptor sollte an ein anderes Epitop auf dem Analyten binden, als jenes das von dem Bindungsreagenz gebunden wird, und sollte derart sein, dass minimale sterische oder andere Wechselwirkung zwischen den zwei Bindungsereignissen auftritt.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Analytrezeptor ein Antikörper, vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, aber es ist insbesondere vorgesehen, dass polyklonale Antikörper ebenfalls verwendet werden können. Die Antikörper können zusätzlich irgendwelche funktionalen Antikörperfragmente, wie Fab, Fv und sogar kleinere Einheiten, wie variable Fragmente der schweren Kette (im Stand der Technik auch als HCV oder VHH Fragmente bekannt), einschließen, die durch biochemische oder Antikörper Engineering Verfahren aus bekannten Gesamtantikörpern oder indirekt aus Bibliotheken von Antikörpern oder Antikörper-ähnlichen Molekülen hergestellt werden können (siehe beispielsweise Verhoeyen und Windust, *Advances in Antibody Engineering in Molecular Immunology: Frontiers in Molecular Biology*, 2. Aufl., veröffentlicht von Oxford University Press, S. 283–325 (Oxford, 1995)).

[0032] Polyklonale Antikörper und monoklonale Antikörper können durch irgendein geeignetes, bekanntes Verfahren, einschließlich jener, die beschrieben sind in Price et al., *Principles and Practice of Immunoassays*, 2. Aufl., veröffentlicht von Macmillan Publishers Ltd. (London, 1997), hergestellt werden.

[0033] Andere Substanzen, die fähig sind als ein Analytrezeptor zu dienen, schließen Einzel- oder Multiket-

tenpolypeptide ein, die fähig sind, an den Analyten zu binden. Diese können durch irgendwelche herkömmlichen Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, hergestellt werden.

[0034] Der Referenzligand, der in dem erfindungsgemäßen Assay verwendet wird, kann irgendeine Verbindung sein, die fähig ist, von dem Bindungsreagenz gebunden zu werden. Dies wird irgendwelche antigenen Verbindungen einschließen, für die das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität besitzt (einschließlich des bestimmten Analyten, für den der Assay ausgelegt ist), ebenso wie irgendein Antikörper- oder funktionelles Fragment davon, das eine Bindungsspezifität für das Bindungsreagenz besitzt. Vorzugsweise besitzt der Referenzligand keine spezifische Bindungsaffinität für den Analyten oder das Bindungsreagenz. So kann er antigene Verbindungen oder Antikörper (oder Fragmente davon) einschließen, die ein bestimmtes Epitop enthalten, an welches das Bindungsreagenz binden kann. Optimal ist der Referenzligand ein nicht-Antikörper Antigen, das von dem interessierenden Analyten verschieden ist.

[0035] Der Kontakt der Probe mit dem Bindungsreagenz und dem Analytrezeptor, und mit dem Referenzliganden, um jeweils die ersten und zweiten Komplexe zu bilden, kann durch irgendein herkömmliches Verfahren erreicht werden. Beispielhafte Verfahren reichen von der Kapillarwirkung, die in herkömmlichen, Streifen-enthaltenden Testvorrichtungen auftritt, zu einfacher Diffusion einer oder mehrerer der Bestandteile in einer Lösung an den Ort des anderen Bestandteils, die in manchen Formen von ELISA ähnlichen Immunassays und Energietransfer Immunassays ("ETI"), auftritt. In solchen zuletzt genannten Formen von Immunassays (d.h. ETIs) können die Test- und Referenzzonen derart sein, dass sie nicht mit irgendeiner Form eines Trägers verbunden sind. Typischerweise sind jedoch die Testzonen und Referenzzonen (für alle Ausführungsformen der Erfindung) auf einem oder mehreren Trägern angeordnet, so dass, im Wesentlichen, die Testzone die Testoberfläche ist, auf der das Bindungsreagenz irreversibel immobilisiert ist, und die Referenzzone ist eine Referenzoberfläche, auf der der Referenzligand irreversibel immobilisiert ist.

[0036] Wenn ein erster und zweiter Träger für jeweils die Referenzzone und die Testzone verwendet wird, können sie im Wesentlichen in der Natur gleich oder identisch sein, oder sie können verschieden sein. Auf der Testzone wird ein irreversibel immobilisierter Analytrezeptor angeordnet sein, und auf der Referenzzone wird ein irreversibel immobilisierter Referenzligand angeordnet sein. Unter "irreversibel immobilisiert" wird eingeschlossen auf oder gebunden an den Träger in einer Art verstanden, um seine Wanderung zu verhindern, wenn er (oder der Träger) feucht ist. Die irreversible Immobilisierung des Analytrezeptors oder Referenzliganden kann in irgendeiner der Vielzahl von Arten erreicht werden, von denen jede für den Fachmann offensichtlich sein wird.

[0037] Wenn der Referenzligand und Analytrezeptor an Träger gebunden sind, profitiert die Erfindung von dem zusätzlichen Vorteil, dass sie fähig ist, stärkere Referenzsignale im Vergleich zu vielen der Assays mit integrierter Referenz zu liefern, die vorher im Stand der Technik beschrieben wurden. Dieser Vorteil stammt von der Tatsache, dass die erfindungsgemäßen Assays auf der Bindungsaktivität des Bindungsreagenz beruhen, in Lösung ein Referenzsignal zu bilden, anstelle auf der Bindungsaktivität eines Antikörperähnlichen Moleküls, das an die Referenzoberfläche gebunden ist. So wird unter den Umständen, unter denen eine signifikante Menge des Referenzliganden als ein Ergebnis dessen, dass sie auf einen Träger beschichtet ist, denaturiert, das Referenzsignal in der vorliegenden Erfindung minimal beeinflusst sein, insbesondere wenn die Spezifität des Bindungsreagenz für ein Epitop des Referenzliganden ausgestaltet ist, das durch die Denaturierung nicht beeinflusst ist. In bekannten Assays mit integrierter Referenz wird dagegen jedes Denaturieren des Antikörper-ähnlichen Moleküls auf der Referenzoberfläche sehr wahrscheinlich zu einem begleitenden Abfall der Bindung an die Oberfläche führen, und damit zu einem geringeren Referenzsignal.

[0038] Feste Träger, die in der Erfindung verwendet werden können, sind gut bekannt und schließen beispielsweise synthetische Plastikmaterialien, Mikrotriterassayplatten, Latexkügelchen, Filter enthaltend Cellulose (z.B. Nitrocellulose) oder synthetische polymere Materialien, Glas oder Plastikobjektträger, Tauchstäbchen, Kapillarfüllvorrichtungen oder ähnliches, ein.

[0039] Die erfindungsgemäße analytische Testvorrichtung schließt einen ersten und zweiten Träger, wie oben ausgeführt, ein. Die Einzelheiten der Vorrichtung können in Abhängigkeit von der exakten Natur des durchzuführenden Assays variiert werden. Beispielsweise können in einer Ausführungsform der erste und zweite Träger physikalisch sehr nahe zueinander liegen (in der Größenordnung eines Millimeters oder ähnlichem voneinander entfernt). In einer anderen Ausführungsform kann die Vorrichtung eine Kapillarfülltestvorrichtung aufweisen, in der eine flüssige Probe in eine Vorrichtung durch Kapillarwirkung entlang einem geeignet angeordneten Kapillareinlass gezogen werden kann. Kapillarfüllvorrichtungen, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung angepasst werden können, sind beispielsweise in Shanks et al., US Patent 5,141,868, Shanks et al.,

EP-A-0422708 und Birch et al., EP-B-0274215, offenbart.

[0040] In noch einer anderen Ausführungsform umfasst der erste Träger einen synthetischen Plastikstopfen, der entweder mit dem Bindungsreagenz oder dem Analytzeptor beschichtet ist und der so ausgelegt ist, dass er in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte passt, wobei sich nur eine schmale Trennung zwischen dem Stopfen und den Seiten der Vertiefung ergibt. Der zweite Träger wird durch die Mikrotiterplatte gebildet; die Vertiefung ist ebenfalls mit entweder dem Bindungsreagenz oder dem Analytzeptor beschichtet, wobei aber das Bindungsreagenz und der Analytzeptor nicht beide auf demselben Träger beschichtet sind. In dieser besonderen Ausführungsform kann der Kontakt der Probe mit dem Bindungsreagenz im Wesentlichen zu derselben Zeit stattfinden, zu der die Probe mit dem Referenzligand in Kontakt gelangt, was bevorzugt ist, weil es einen entscheidenden Vorteil über gewisse andere Formen von Vorrichtungen liefert, so dass irgendeine zeitbezogene Assayvariabilität minimiert werden kann. Idealerweise wird die Probe mit dem Bindungsreagenz und dem Referenzligand gleichzeitig in Kontakt gebracht.

[0041] Andere Vorrichtungen, wie jene die in May et al., US Patent 5,622,871 und May et al., US Patent 5,656,503 beschrieben sind, sind ebenfalls für die Durchführung der erfindungsgemäßen Immunassays geeignet. Wenn sie verwendet werden, umfassen diese Vorrichtungen vorzugsweise ein hohles langgestrecktes Gehäuse, das den festen Träger enthält, der am meisten typischerweise ein trockener poröser Träger ist. Der feste Träger kommuniziert indirekt mit dem Äußeren des Gehäuses über ein flüssigkeitsaufnehmendes Aufnahmeteil für die flüssige Probe, das von dem Gehäuse vorstehen kann, oder auch nicht, wobei der feste Träger und das Probenaufnahmeteil derart miteinander verbunden sind, dass die flüssige Probe zwischen den beiden durch Kapillarwirkung wandern kann, wobei der feste Träger eine Zone aufweist, in der das Bindungsreagenz reversibel immobilisiert ist – dies bedeutet, dass das Bindungsreagenz auf dem trockenen festen Träger immobilisiert ist, aber auf oder innerhalb des festen Trägers frei beweglich wird, wenn der Träger feucht wird. Eine solche reversible Immobilisierung des Bindungsreagenz in der Zone kann durch irgendeine der vielen bekannten Wege erreicht werden (z.B. wie beschrieben in beispielsweise Taylor et al. Protein Immobilisation, veröffentlicht von Marcel Dekker, Inc., 1991). Insbesondere ist es bevorzugt, dass eine solche Immobilisierung durch Adsorption an den Träger, wie beschrieben in May et al., US Patent 5,622,871, stattfindet.

[0042] Die Test- und Referenzzonen sind räumlich beabstandet von dem Probenaufnahmeteil entlang des festen Trägers angeordnet. Wie zuvor beschrieben, kann die Immobilisierung des Analytzeptors und Referenzliganden durch irgendeine Art von bekannten Mitteln erreicht werden. Der Analytzeptor oder Referenzligand kann chemisch an dem Träger unter Verwendung von beispielsweise CNBr, Carbonyldiimidazol oder Tressylchlorid, gekoppelt sein. Alternativ dazu können verschiedene "Druck" Techniken verwendet werden. Diese schließen das Auftragen von flüssigen Bindungsreagenzien durch Mikrospritzen, direktes Drucken, Tintenstrahldrucken und ähnlichem ein. Die chemische oder physikalische Behandlung des Trägers vor dem Auftragen des Bindungsreagenz ist ebenfalls insbesondere vorgesehen, weil dies die Immobilisierung erleichtern kann.

[0043] Das Gehäuse solcher Vorrichtungen ist typischerweise aus durchsichtigem oder durchscheinendem Material hergestellt, das wenigstens eine Öffnung aufweist, durch die das analytische Ergebnis beobachtet werden kann, vorzugsweise optisch durch das nackte Auge beobachtet werden kann.

[0044] Solche Vorrichtungen können an klinische Labors oder als Kits, die für die Verwendung zuhause geeignet sind, bereitgestellt werden, wobei solche Kits eine oder mehrere Vorrichtungen aufweisen, die einzeln in feuchtigkeitsundurchlässige Verpackung eingepackt und zusammen mit geeigneten Anweisungen an den Anwender verpackt sind.

[0045] Das Probenaufnahmeteil kann aus irgendeinem flüssigkeitsaufnehmenden, porösen oder fibrillären Material hergestellt sein, das fähig ist, Flüssigkeit schnell zu absorbieren. Die Porosität des Materials kann unidirektional (d.h. mit Poren oder Fasern, die insgesamt oder vorwiegend parallel zu der Achse des Teils verlaufen) oder multidirektional (omnidirektional, so dass das Teil eine amorphe, schwammähnliche Struktur aufweist) sein. Poröse Plastikmaterialien, wie Polypropylen, Polyethylen (vorzugsweise mit sehr hohem Molekulargewicht), Polyvinylidenfluorid, Ethylenvinylacetat, Acrylnitril und Polytetrafluorethylen können verwendet werden. Es kann vorteilhaft sein, das Teil mit einem oberflächenaktiven Mittel während der Herstellung vorzubehandeln, weil dies irgendeine inhärente Hydrophobizität in dem Teil reduzieren und deshalb seine Fähigkeit, eine feuchte Probe schnell und wirksam aufzunehmen und zu transportieren, verstärken kann. Poröse Probenaufnahmeteile können auch aus Papier oder anderen Cellulosematerialien, wie Nitrocellulose hergestellt werden. Vorzugsweise sollte das Material, welches das Probenaufnahmeteil umfasst, derart ausgewählt werden, dass das poröse Teil mit flüssiger Probe innerhalb von Sekunden gesättigt werden kann. Die Flüssigkeit muss

in der Lage sein, frei von dem porösen Probenaufnahmeteil in den festen Träger zu wandern.

[0046] Der feste Träger in solchen Vorrichtungen ist vorzugsweise ein trockener poröser Träger. Er kann aus getrennten Streifen oder Schichten hergestellt sein und, wie das Probenaufnahmeteil, kann er aus irgendeinem Material hergestellt sein, das fähig ist, das Wandern der flüssigen Probe durch einen Abschnitt seiner Länge durch vorzugsweise kapillare Wirkung, zu erlauben. Der Träger sollte die Immobilisierung des Analytzeptors und Referenzliganden auf seiner Oberfläche erlauben und sollte nicht mit den Bindungsreaktionen, welche die ersten und zweiten Komplexe bilden, interferieren.

[0047] Der feste Träger kann mit sich assoziiert ein absorbierendes "Becken" aufweisen, das die Kapillarwirkung der Flüssigkeit über die Länge des Trägers erleichtert, und er wird ein Mittel bereitstellen, durch welches das Überfluten der Testvorrichtung durch das Auftragen von überschüssiger Probe verhindert wird. Besondere Materialien für und Anwendungen von Becken sind im Stand der Technik bekannt, und sie können einfach auf erfindungsgemäße Vorrichtungen angewendet werden.

[0048] Die Erfindung kann unter Bezugnahme auf die folgenden spezifischen Beispiele besser verstanden werden. Sie sollen darstellend und nicht erschöpfend für die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen sein.

Beispiele

[0049] Diese Beispiele zeigen, wie Bindungsreagenzien mit zwei unterschiedlichen Bindungsspezifitäten in Immunassays verwendet werden können, um absichtlich eingeführte Assayvariation zu korrigieren. Es wird begrüßt, dass es dem Fachmann möglich ist, alternative Konstruktionswege für die Bindungsreagenzien (und andere Bestandteile), die in den Beispielen verwendet werden, zu beschreiben.

Beispiel 1 Korrektur von Assayvariation unter Verwendung eines Bindungsreagenz eines Lama biköpfigen grün fluoreszierenden Proteins

[0050] Dieses Beispiel zeigt, dass ein Bindungsreagenz eines Lama biköpfigen grün fluoreszierenden Proteins, das zwei Bindungsstellen enthält, eine für menschliches Choriongonadotropin (hCG, der Analyt) und eine für reaktiven rot 6 Farbstoff (RR6, der Referenzligand), absichtlich eingeführte Assayvariation durch Aufnehmen eines Verhältnisses der resultierenden Assaybindungssignale korrigieren kann. In diesem Beispiel wird die Bindung des Bindungsreagenz durch seine grün fluoreszierende Proteindomäne unter Verwendung von Flusszytometrie nachgewiesen.

1.1 Konstruktion Expression und Reinigung des Bindungsreagenz

[0051] Die Konstruktion, Expression und Reinigung des Bindungsreagenz des Lama biköpfigen grün fluoreszierenden Proteins (GFP-HCV Lama biköpfiges grün fluoreszierendes Fusionsprotein), das in diesem Beispiel verwendet wurde, wird in der folgenden Weise durchgeführt.

1.1.1 Konstruktion des Bindungsreagenz Expressionsvektors

[0052] Die Konstruktion des endgültigen pPIC-HIS6-GFP-HCV21-myc Expressionsvektors schloss einige Klonierungsschritte und die folgenden Plasmide als Ausgangsmaterial ein:

pEGFP-N2	(CLONTECH, Genbank Zugangsnummer: U57608)
pPIC9	(Invitrogen, EMBL Zugang: Z46233)
pUC19	(New England Biolabs, GenBank Zugang: (veröffentlicht 14. Mai 1999, X02514)
pPIC.HCV21.	(erhalten in einer Weise, die detailliert in Frenken et al., WO 99/23221 beschrieben ist, veröffentlicht 14. Mai 1999 (EMBL Zugang CAA15419 und EMBL Zugang CAA15409)).

[0053] Um die Expression und Sekretion des HIS6-GFP-HCV21-myc Fusionskonstruks in *P. pastoris* zu erlauben, wurde das Gen, welches das HIS6-GFP-HCV21-myc Konstrukt kodiert, an die alpha-Paarungsfaktor Leitsequenz in dem kommerziell erhältlichen *P. pastoris* Expressionsvektor pPIC9 (Invitrogen) fusioniert. Die

Konstruktion der endgültigen Expressionsvektoren schloss einige Klonierungsschritte ein, die zu zwei Zwischenvektoren, pPIC9-HIS6 und pPIC9-HIS6-GFP führten. Für pPIC9-HIS6 wurde das XhoI/SnaBI Fragment des Leitpeptids in pPIC9 entfernt und durch ein synthetisches XhoI/SnaBI Fragment ersetzt, wodurch das deletierte Leitsequenzfragment ersetzt und es an eine 6 × HIS Sequenz fusioniert wurde.

Synthetisches Insert von pPIC9-HIS6:

---L E K R H H H H H H G S Y V--- (SEQ ID NO:4)

CTCTCGAGAAAAGACATCACCATCACCATCACGGCTCTTACGTACAG (SEQ ID NO:3)

XhoI

SnaBI

[0054] Der synthetische Linker wurde durch Annealen der synthetischen Oligonukleotide PCR.529 und PCR.530 hergestellt.

PCR.529: 5'-TCGAGAAAAGACATCACCATCACCATCACGGCTCTTAC-3' (SEQ ID NO:5)

PCR.530: 5'-GTAAGAGCCGTGATGGTGTGATGGTGTCTTTTC-3' (SEQ ID NO:6)

[0055] Der Expressionsvektor pPIC9-HIS6-GFP wurde durch Öffnen des pPIC9-HIS6 Vektors mit SnaBI/NotI hergestellt, wodurch die Polylinkersequenz aus dem Vektor entfernt und durch die SmaI/NotI GFP kodierende Gensequenz aus pEGFP-N2 ausgetauscht wurde.

[0056] Der endgültige Expressionsvektor pPIC9-HIS6-GFP-HCV21-myc wurde in einer 3 Punkt Ligationsreaktion hergestellt, in der das XhoI/XbaI HIS6-GFP PCR Fragment aus pPIC9-HIS6-GFP (unter Verwendung von PCR.393 und PCR.689) mit dem NheI/NotI HCV21-myc Fragment aus pPIC9-HCV21-myc verbunden und in den XhoI/NotI geöffneten pPIC9 kloniert wurde.

PCR. 393: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' (SEQ ID NO:7)

PCR. 689 : 5'-ATCGAATTCTCTAGATCCACCGC (SEQ ID NO:8)

CTCCAGAACCGCCAGTGATCCCGCGCGGTCACGAA-3'

[0057] 1.1.2 Expression und Reinigung des Bindungsreagenz

[0058] BglII geöffnetes pPIC9-HIS6-GFP-HCV21-myc wurde verwendet, um *P. pastoris* Zellen, wie im Folgenden beschrieben, zu transformieren:

P. pastoris GS115 Zellen wurden über Nacht bei 30°C in 500 ml YDP Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 1 % Glucose) bis zu einer OD₆₀₀ = 1,4 angezogen. Die Zellen wurden zentrifugiert, und das Pellet wurde mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen, bevor es in 100 ml KDTT Puffer (50 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 25 ml DTT) resuspendiert wurde. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen pelletiert (3 min 3000 rpm) und in 100 ml eiskaltem STM Puffer (92,4 g Glucose/l, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 ml MgCl₂) resuspendiert. Nach 5 Waschschrritten mit diesem Puffer wurde das Zellpellet in einem Endvolumen von 0,5 ml STM Puffer resuspendiert. Ungefähr 2–5 µl H₂O (gespaltene pPIC9 Konstrukte: DNA, die über Phenol/Chloroform Extraktionen und EtOH Präzipitation gereinigt wurde) wurde mit 70 µl frischen kompetenten *P. pastoris* Zellen (auf Eis) gemischt. Die Zellen wurden in 0,2 cm Küvetten bei 1,5 kV, 400, 25 µF in einem BioRad Gen-Pulser elektroporiert. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 1 ml YPD Medium zu den Zellen hinzugefügt. Nach dem Erholen für 1 h bei 30°C wurden die Zellen pelletiert und in 200 µl 1 M Sorbitol resuspendiert und auf einer MD Platte ausplattiert (1,34 % YNB, 4 × 10⁻⁵ % Biotin, 1 % Glucose, 0,15 % Agar). Kolonien, die von transformierten Zellen (His⁺) gebildet wurden, waren innerhalb von 48 Stunden Inkubation bei 30°C sichtbar. Transformierte *P. pastoris* Zellen GS115 wurden im Wesentlichen selektiert, wie in dem Invitrogen Pichia Pastoris Expressionshandbuch empfohlen: Die Platten, welche die His⁺ Transformanten enthielten, wurden verwendet, um hinsichtlich des Mut⁺ und Mut^S Phenotyps wie folgt zu screenen: unter Verwendung steriler Zahnstocher wurden Kolonien auf sowohl eine MM Platte (1,34 % YNB, 4 × 10⁻⁵ % Biotin, 0,5 % MeOH, 0,15 % Agar) als auch auf eine MD Platte in einem regelmäßigen Muster übertragen, wobei sichergestellt wurde, dass die MM Platte zunächst bestückt wurde. Ungefähr 100 Transformanten wurden für jedes Konstrukt gepickt. Nach Inkubieren der Platten bei 30°C für 2–3 Tage wurden die Platten bewertet. Kolonien, die normal auf den MD Platten wachsen, aber nur wenig oder kein Wachstum auf den MM Platten zeigen, wurden als Mut^S Klone klassifiziert.

[0059] Transformierte und selektiert *P. pastoris* Klone wurden unter Verwendung des im Folgenden angegebenen Protokolls induziert, um das Bindungsreagenz zu exprimieren:

1. Unter Verwendung einer einzelnen Kolonie von der MD Platte Inokulieren von 10 ml BMGY (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34 % YNB, 4 × 10⁻⁵ % Biotin, 1 % Glycerol) in einem 50 ml Röhrchen.

2. Wachstum bei 30°C in einem Schüttelinkubator (250 rpm) bis die Kultur eine OD₆₀₀ = 2–8 erreicht.
3. Zentrifugieren der Kulturen bei 2000 g für 5 min und Resuspendieren der Zellen in 2 ml BMMY Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34 % YNB, 4 × 10⁻⁵ % Biotin, 0,5 % Glycerol).
4. Zurückstellen der Kulturen in den Inkubator.
5. Hinzufügen von 20 µl MeOH zu den Kulturen nach 24 Stunden, um die Induktion aufrechtzuerhalten. Nach 48 Stunden Ernte des Überstandes durch Entfernen der Zellen durch Zentrifugation.

[0060] Die Rohüberstände wurden hinsichtlich der Anwesenheit von HCV biköpfigem Fragment über Analyse auf 12 % Acrylamidgelen unter Verwendung des Bio-Rad mini-Protean II™ Systems getestet.

[0061] Bispezifische Bindungsaktivität, gezeigt über ELISA wie folgt:

1. 96 Vertiefungs ELISA Platten (Greiner HC Platten) wurden über Nacht bei 37°C mit 200 µl/Vertiefung des BSA-RR6 Konjugats (siehe Beispiel 1) in PBS aktiviert.
2. Nach einem Waschschrift mit PEST wurden die Vertiefungen für 1 Stunde bei 37°C mit 200 µl Blockierpuffer pro Vertiefung inkubiert. Blockierpuffer: 1 % BSA in PBST.
3. Verdünnungsreihen der Testproben (100 µl) wurden mit gleichen Volumina des Blockierpuffers gemischt und zu den sensitivierten ELISA Vertiefungen hinzugefügt. Inkubieren bei 37°C für 1–2 Stunden.
4. 200 µl hCG-AP Konjugat in Blockierpuffer wurde zu jeder Vertiefung hinzugefügt, in der das hCG an die alkalische Phosphatase über Glutaraldehydkopplung gekoppelt war.
5. Nach einem Waschschrift mit PBST wurde gefangenes hCG-AG durch Hinzufügen von 100 µl/Vertiefung pNPP Substrat (1 mg/ml pNPP in 1 M Diethanolamin/1 mM MgCl₂) nachgewiesen.

[0062] Die Rohüberstände wurden hinsichtlich der Anwesenheit von GFP (grün fluoreszierendes Protein) Aktivität durch Verdünnen der Überstände (10 ml) auf 100 ml in PBSTA getestet. Diese wurden anschließend auf einem Perkin Elmer Fluorimeter mit Anregung bei 488 nm und Emission, die bei 509 nm nachgewiesen wurde, analysiert.

[0063] Der Kulturüberstand (200 ml, pH 6–8) wurde durch einen 0,45 m Actafilter mit Cellulose, die wenig Protein bindet (Nalge Nunc Intl.) geklärt, auf eine Ni-NTA Superfluss Säule (5 ml, Qiagen Ltd., UK) bei 2 ml/min aufgetragen und mit PBSA gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm die Grundlinie erreichte. Eine Elution mit einem linearen Gradienten von 0 – 500 mM Imidazol über 5 Säulenvolumina wurde unmittelbar gefolgt von Pufferaustausch durch Herunterpassagieren einer G-25 Sepadex Säule (150 ml Bettvolumen, Pharmacia), die mit PBSA prääquilibriert worden war, von der 4 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Peak Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und ELISA untersucht, anschließend vereinigt und in Aliquots gefriergetrocknet.

[0064] Insbesondere umfasste das Bindungsreagenz, das durch das zuvor genannte Verfahren hergestellt worden war, die Aminosäuresequenz, wie sie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben ist.

1.2 Herstellung eines Referenzliganden

[0065] Ein Referenzligand aus einem Konjugat von reaktivem rot 6 bovinem Serumalbumin (RR6-BSA) wurde hergestellt durch Inkubieren von 200 µl reaktivem rot 6 (10 mg/ml) mit 1 ml bovinem Serumalbumin (10 mg/ml) in einem Ende über Ende Mischer für 3 Stunden bei Raumtemperatur (20°C). Daran anschließend wurden 200 µl Ethanolamin (1 M) hinzugefügt, und die Lösung wurde für weitere 15 Minuten inkubiert. Freies ungebundenes reaktives rot 6 wurde von der Fraktion aus bovinem Serumalbumin durch das Durchlaufen von 0,75 ml der Lösung durch eine Pharmacia PD10™ Entsalzungssäule entfernt, die mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung enthaltend 0,01 % Natriumazid prääquilibriert worden war, und Eluieren mit Äquilibriumspuffer. Es wurden Fraktionen (1 ml) gesammelt und in diesem und folgenden Beispielen verwendet.

1.3 Herstellung eines Analytrezeptors

[0066] Ein monoklonaler Antikörper mit Bindungsspezifität für hCG und der den Analytrezeptor darstellt (MAB 1140) wurde gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt. Ein repräsentatives Verfahren zum Herstellen monoklonaler Antikörper ist bei Gani et al. J. Steroid Biochem. Molec. Biol 1994, Vol. 48, S. 277–282) beschrieben, und dieses Verfahren kann angepasst werden, um einen relevanten Antikörper mit einer Bindungsspezifität für hCG herzustellen. Ein geeigneter monoklonaler Antikörper kann auf der Basis seiner relativen Affinität und Spezifität für den Analyten und Analytanaloge selektiert werden. Dies kann beispielsweise unternommen werden durch Durchführen von Standard kinetischen Bestimmungen unter Verwendung eines Biacore™ 2000 Biosensors (Biacore AB, Schweden), wie in dem Protokoll des Herstellers beschrieben ist

(Anwendungshandbuch, Biacore AB), unter Verwendung einer Reihe von nahe verwandten Analoga. MAb ist auch kommerziell erhältlich und kann von Calbiochem – Novabiochem (UK) Ltd., Nottingham, UK erhalten werden.

1.4 Bildung von Test- und Referenzzonen

[0067] Die Bildung von Test- und Referenzzonen durch Adsorption des Analytrezeptors und des Referenzliganden an Latexoberflächen wurde in der folgenden Weise durchgeführt. Ein 3 µm Latex, adsorbiert mit RR6-BSA, wurde wie folgt hergestellt. Latexstocklösung (500 µl 1 % Feststoffe) wurde in ein Rundboden Eppendorf pipettiert und zu diesem wurden 500 µl 10 mM Boratpuffer, pH 8,5, enthaltend 0,01 % Merthiolat, hinzugefügt. Die Lösung wurde gemischt und in einer Tisch Eppendorfszentrifuge für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Pellet kurz gevortext. In einem getrennten Eppendorf wurden 100 µl RR6-BSA Konjugatlösung zu 900 µl Boratpuffer hinzugefügt, und die resultierende Lösung wurde gemischt und zu dem Latexpellet hinzugefügt. Die Latex-RR6-BSA Lösung wurde gevortext, mit einer Ultraschallsonde für 10 Sekunden sonifiziert und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20°C) in einem Ende über Ende Mischer inkubiert. Nach 1 Stunde wurden 50 µl einer 200 mg/ml bovinen Serumalbuminlösung hinzugefügt, und die Latexlösung wurde für weitere 30 min inkubiert. Die Latexkügelchen wurden für 10 min bei Raumtemperatur in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, und das Pellet wurde in 1 ml Boratpuffer resuspendiert. Eine Referenzzone, welche die Latexkügelchen adsorbiert mit RR6-BSA in einer Menge von 10 µl (0,5 % Feststoffe) darstellt, wurde von dieser Suspension getrennt und bei 4°C gelagert, bis sie benötigt wurde.

[0068] Ein 3 µm Latex, das wie oben beschrieben erhalten wurde, wurde mit einem MAb 1140 adsorbiert, das wie folgt hergestellt wurde: Latexstocklösung (500 µl 1 % Feststoffen) wurde in ein Rundboden Eppendorf pipettiert und in einer Tisch Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und zu diesem wurden 500 µl 10 mM Boratpuffer, pH 8,5, enthaltend 0,01 % Merthiolat hinzugefügt. Die Lösung wurde gemischt und, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Pellet wurde kurz gevortext. In einem getrennten Eppendorf wurde 1 ml einer 1 mg/ml MAb 1140 Lösung, die in Boratpuffer hergestellt wurde, hergestellt, und die resultierende Lösung wurde gemischt und zu dem Latexpellet hinzugefügt. Die Latex-MAb 1140 Lösung wurde gevortext und mit einer Ultraschallsonde für 10 Sekunden sonifiziert. Zu dieser Lösung wurden 200 µl 95 % (v/v) Ethanol 0,5 % (w/v) Natriumacetat hinzugefügt, und die resultierende Lösung wurde gevortext. Nach 2 Stunden des Mischens bei 37°C in einem Ende über Ende Drehmischer wurden 50 µl einer 200 mg/ml BSA Lösung hinzugefügt, und die Latexlösung wurde für weitere 30 min inkubiert. Die Latexkügelchen wurden 10 min bei Raumtemperatur in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, und das Pellet wurde in 1 ml Boratpuffer resuspendiert. Eine Testzone, welche die Latexkügelchen, die mit MAb 1140 in einer Menge von 10 µl (0,5 % Feststoffe) adsorbiert waren, darstellt, wurde von dieser Suspension getrennt und bei 4°C gelagert, bis sie benötigt wurde.

1.5 Assay mit integrierter Referenz zum Nachweis von hCG

[0069] Eine Zeitzone, die hergestellt und oben beschrieben wurde, wurde gegenüber einer Lösung enthaltend einen Analyten, hCG (10 µl einer 20 IU/ml) und einer 20 µl Lösung enthaltend ein Bindungsreagenz (d.h. Lama biköpfiges grün fluoreszierendes Protein, das hergestellt und oben beschrieben wurde) in einer Konzentration, wie in Tabelle 1 dargestellt, ausgesetzt, wobei das Volumen auf 50 µl mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufgefüllt wurde. Die Testzone wurde in der Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert.

[0070] Eine Referenzzone, die hergestellt und oben beschrieben wurde, wurde denselben Bedingungen wie die Testzone unterworfen. Nach der 1-stündigen Inkubationszeit wurden sowohl die Test- als auch die Referenzzonen hinsichtlich Fluoreszenz quantifiziert, unter Verwendung eines Coulter Elite™ Flusszytometers mit einem Argonlaser (durchschnittliche Fluoreszenzeinheiten wurden auf den Populationen der Latexkügelchen gemessen).

[0071] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 beschrieben. Wie eindeutig ersichtlich ist, wurde in jedem durchgeführten Test die Assayvariation, wie sie durch den Koeffizient der Variation gemessen wurde, durch Verwendung einer inneren Referenz reduziert; und, insbesondere durch Verwendung einer internen Referenz, welche eine Referenzoberfläche und ein Bindungsreagenz mit Bindungsspezifität für sowohl den Analyten als auch den Referenzliganden verwendete.

Tabelle 1

Bindungsreagenz Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Test- signal (Ts)	Durchschnitt- liches Test- signal	S.D.	Koeffizient der Variation*	Referenz Signal (RS)	Verhältnis (Ts/Rs)	Durchschnitt- liches Verhältnis (Ts/Rs)	S.D.	Koeffizient der Variation*
83	649,5	393	249	63	244,4	2,66	2,03	0,71	35
62	375,6				173,0	2,17			
40	153,1				121,2	1,26			
200	1055	1018	45,2	4,4	455,6	2,32	2,24	0,07	3,1
175	1033				462,8	2,23			
150	968				446,5	2,17			

* Eine Messung der relativen Verteilung einer Probe, gleich dem Verhältnis der Standardabweichung gegenüber dem Durchschnitt, und ausgedrückt als eine Prozentangabe, berechnet unter Verwendung von standardmathematischen Techniken von $(n-1)$.

Beispiel 2 Korrigieren von Assayvariation unter Verwendung eines doppelköpfigen Antikörperbindungsreagenz

[0072] Dieses Beispiel zeigt, dass ein doppelköpfiges Antikörperbindungsreagenz, das zwei Bindungsstellen enthält, eine für humanes Choriongonadotropin (hCG, der Analyt) und eine für Glucoseoxidase (GOx, der Re-

ferenzligand) absichtlich eingeführte Assayvariation korrigieren kann, indem es ein Verhältnis der resultierenden Bindungssignale aufnimmt. In diesem Beispiel wird die Bindung des Bindungsreagenz durch seine inhärente Masse unter Verwendung eines Oberflächenplasmon Resonanz Biosensors nachgewiesen.

2.1 Konstruktion Expression und Reinigung des Bindungsreagenz

[0073] Die Konstruktion, Expression und Reinigung des doppelköpfigen Bindungsreagenz, das in diesem Beispiel verwendet wurde, wurde in einer Weise durchgeführt, die beschrieben ist in Davis et al., WO 97/14719, insbesondere hinsichtlich der Konstruktion des GOSA.T Konstrukts, mit der Ausnahme, dass die anti-S. sanguis spezifischen VH4715 und VL4715 Domänen durch die anti-hCG spezifischen VH3299 und VL3299 Domänen ersetzt wurden (beschrieben in WO 96/27612 als FvKC-II, gebunden über ein BstEII-SacI Linkerfragment) durch herkömmliche Mittel (wie exemplarisch ausgeführt in Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press)), wodurch ein anti-hCG/anti-GOx doppelköpfiges Bindungsreagenz erhalten wurde, das die Aminosäuresequenz, die in [Fig. 2](#) dargestellt ist (SEQ ID NO:2), aufwies.

2.2 Herstellung einer Test- und Referenzzone auf einem Biosensorchip

[0074] Ein CM5 Biosensor Chip (Biacore AB) wurde mit Referenzligand GOx und Analytrezeptor MAb 1140 (hergestellt wie in Beispiel 1.3) in der folgenden Weise gekoppelt. Der Chip wurde in einen Biacore™ 2000 Biosensor (Biacore AB) eingesetzt, und ein Sensorgramm wurde wie folgt laufen gelassen. Der Flussweg wurde gesetzt, um über Flusszellen 1, 2, 3 und 4 zu fließen, und die Fließgeschwindigkeit von Hepes gepufferter Kochsalzlösung (HBS, Biacore AB) wurde auf 10 µl/min gesetzt. Die Sensorchipoberfläche wurde anschließend durch zwei aufeinanderfolgende Injektionen von 60 µl einer 1-Ethyl-3-[Dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC) N-Hydroxysuccinimid (NHS) Aktivierungslösung aktiviert, die wie von dem Hersteller (Biacore AB) beschrieben, hergestellt wurde. Der Flussweg wurde anschließend geändert, um über Flusszelle 2 zu fließen, und zwei aufeinanderfolgende Injektionen von GOx (*Aspergillus niger*, erhalten von Novo Nordisk, Kopenhagen, Dänemark), die auf 100 µg/ml in 10 mM Natriumcitratpuffer pH 4 verdünnt wurden, wurden durchgeführt. Der Flussweg wurde anschließend geändert, um über Flusszelle 3 und die Injektionen (3 × 20 µl und 1 × 40 µl) eines MAb 1140 zu fließen. Der Flussweg wurde nochmals geändert, um über die Flusszellen 1, 2, 3 und 4 zu fließen, und die im Überschuss aktivierten Bindungsstellen wurden durch zwei 60 µl Injektionen von 1 M Ethanolamin blockiert.

[0075] Die Menge an GOx, die an Flusszelle 2 des Biosensorchips gekoppelt war, betrug 2770 Antworteinheiten ("engl.: Response Units) (RU)", wie auf einem Biacore™ 2000 Biosensor gemessen). Die Menge von MAb 1140, die an Flusszelle 3 des Biosensorchips gekoppelt war, betrug 2570 RU. Keine andere Flusszelle wies an sich gekoppeltes GOx oder MAb 1140 auf. Die Flusszellen 1 und 4 stellten Kontrolloberflächen dar. Die Flusszelle 2 stellte die Referenzzone dar, wohingegen die Flusszelle 3 die Testzone darstellte.

2.3 Assay mit integrierter Referenz für den Nachweis von hCG

[0076] Das doppelköpfige Antikörperbindungsreagenz, das in Paragraph 2.1 hergestellt wurde, wurde mit HBS in den folgenden Verhältnissen (19:1, 18:2, 17:3; doppelköpfig: HBS) verdünnt. Deshalb variierten diese Lösungen gering von der nicht verdünnten Lösung und voneinander in der Menge des Bindungsreagenz, das sie enthielten.

[0077] Ein Biacore Verfahren wurde aufgestellt, um das Folgende durchzuführen. Die Fließgeschwindigkeit von HBS wurde auf 10 µl/min gesetzt und der Flussweg wurde gesetzt, um die Flusszellen 1, 2, 3 und 4 zu kreuzen. Zwanzig Mikroliter hCG (10 IU/ml in HBS) wurden über die Sensoroberflächen injiziert. Nur die Oberfläche bei Flusszelle 3 fing hCG (dies war die Oberfläche mit gekoppeltem Analytrezeptor MAb 1140). Zwanzig Mikroliter Bindungsreagenz (nicht verdünnte Lösung) wurden anschließend über alle Flusszellen des Sensorchips injiziert. Bindung des Bindungsreagenz fand an der Oberfläche von Flusszelle 2 (gekoppelt mit Referenzligand, GOx) und auch an der Oberfläche von Flusszelle 3 (enthielt jetzt gefangenen Analyt, hCG) statt. Die Menge an Bindungsreagenzbindung wurde in RU bestimmt. Die Oberflächen wurden anschließend durch eine Injektion von 5 µl 10 mM HCl regeneriert. Die Injektionen von hCG (10 IU/ml) und doppelköpfigem Bindungsreagenz wurden dreimal wiederholt, aber dieses Mal unter Verwendung der 19:1, 18:2 und 17:3 Verhältnisse des Bindungsreagenz. Dies ergab vier Werte für das Einfangen von Bindungsreagenz. Die Flusszellen 1 und 4 zeigten kein Einfangen. Die Flusszellen 2 und 3 zeigten Einfangen von Bindungsreagenz. Der vorherige Test (Test 1) wurde unter Verwendung von 5 IU/ml hCG wiederholt, um Test 2 zu erhalten.

[0078] Die Ergebnisse, als Variationskoeffizient, sind in Tabelle 2 gezeigt. Wie in Beispiel 1 war in jedem Test, der durchgeführt wurde, die Assayvariation, wie sie durch den Variationskoeffizient gemessen wurde, durch Verwendung einer integrierten Referenz reduziert; und insbesondere durch Verwendung einer integrierten Referenz, die eine Referenzoberfläche und ein Bindungsreagenz mit Bindungsspezifität für sowohl den Analyt als auch den Referenzliganden verwendete.

Tabelle 2

Bindungsreagenz Konzentration	Test-signal (Ts)	Durchschnittliches Test-signal	S.D.	Koeffizient der Variation*	Referenz Signal (RS)	Verhältnis (Ts/Rs)	Durchschnittliches Verhältnis (Ts/Rs)	S.D.	Koeffizient der Variation*
Test 1'	n	47,5			19,3	2,46			
	19:1	33,9	48,8	10	15,0	2,26	2,67	0,36	13,7
	18:2	56,7			18,8	3,02			
	17:3	56,9			19,5	2,92			
Test 2'	n	54,0			14,8	3,65			
	19:1	41,0	56,0	11,2	12,8	3,20	3,49	0,21	6,0
	18:2	65,0			18,6	3,50			
	17:3	64,1			17,6	3,64			

' Test 1, Assays durchgeführt bei 10 IU/ml hCG; Test 2, Assays durchgeführt bei 5 IU/ml hCG.

* Eine Messung der relativen Verteilung einer Probe, gleich dem Verhältnis der Standardabweichung gegenüber dem Durchschnitt, und ausgedrückt als eine Prozentangabe, berechnet unter Verwendung von standardmathematischen Techniken von $(n-1)$.

n = nicht verdünnt

Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys
 165 170 175

Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
 180 185 190

Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
 195 200 205

Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
 210 215 220

Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
 225 230 235 240

Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Ser Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly
 260 265 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Asn
 275 280 285

Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Pro Gly Pro Gly Val Asp Arg Glu Ala
 290 295 300

Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Val Ser Ser
 305 310 315 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
 325 330 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 340 345 350

Cys Ala Val Lys Pro Asp Asp Gly Trp Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Phe
 355 360 365

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly
 370 375 380

Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 385 390 395 400

Gly Asn Thr Phe Ser Gly Gly Phe Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
 405 410 415

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Arg Gly Ile Thr
 420 425 430

Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 435 440 445

Ala Lys Lys Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp
 450 455 460

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Thr His Tyr Phe Arg Ser Tyr Trp Gly
465 470 475 480

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
485 490 495

Glu Asp Leu Asn
500

<210> 2

<211> 495

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Expressionsprodukt

<400> 2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Pro Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr
65 70 75 80

Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln
130 135 140

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
145 150 155 160

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val
165 170 175

Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
180 185 190

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
195 200 205

Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 210 215 220

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Arg Phe Asp
 225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Met Lys Tyr Leu
 245 250 255

Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala
 260 265 270

Met Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser
 275 280 285

Leu Gly Glu Arg Ile Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn
 290 295 300

Thr Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr
 305 310 315 320

Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 325 330 335

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 340 345 350

Asp Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Leu
 355 360 365

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Asp Ile Glu
 370 375 380

Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
 385 390 395 400

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser
 405 410 415

Phe Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 420 425 430

Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 435 440 445

Gly Thr Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu
 450 455 460

Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Glu Tyr Pro
 465 470 475 480

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 485 490 495

<210> 3
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches
 Insert

<220>
 <211> CDS
 <222> (3)..(44)

<400> 3
 ct ctc gag aaa aga cat cac cat cac cat cac ggc tct tac gta cag 47
 Leu Glu Lys Arg His His His His His His Gly Ser Tyr Val
 1 5 10

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches
 Insert

<400> 4
 Leu Glu Lys Arg His His His His His His Gly Ser Tyr
 1 5 10

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches
 Oligonukleotid

<400> 5
 tcgagaaaag acatcacat caccatcacg gctcttac 38

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches
 Oligonukleotid

<400> 6
 gtaagagccg tgatggtgat ggtgatgtct tttc 34

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Linker

<400> 7
 gactggttcc aattgacagg c 21

<210> 8
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Linker

<400> 8
 atcgaattct.ctagatccac cgcctccaga accgccagtg atccccgçcgg cggtcacgaa 60

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines Analyten in einer Probe, wobei das Verfahren umfasst:
 a) in Kontakt bringen der Probe mit einem Bindungsreagenz und einem Analytrezeptor, um einen ersten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz, den Analyten und den Analytrezeptor, der erste Komplex liefert ein Testsignal; wobei der Analytrezeptor in einer ersten Testzone angeordnet ist und fähig ist, an den Analyten zu binden, und das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Analyten besitzt;
 b) in Kontakt bringen der Probe mit einem Referenzliganden, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das Bindungsreagenz und den Referenzliganden, der zweite Komplex liefert ein Referenzsignal, wobei der Referenzligand in einer Referenzzone angeordnet ist, und weiterhin wobei das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden besitzt; und
 c) Nachweisen der Test- und Referenzsignale aus den Test- und Referenzzonen, wobei das Verhältnis des Testsignals zu dem Referenzsignal, wenn es aufgenommen wird, die Menge des Analyten in der Probe definiert, diese Menge ist unabhängig von der Menge des Bindungsreagenz, die mit der Probe in Kontakt gebracht wurde.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Testzone eine Testoberfläche ist, an die der Analytrezeptor irreversibel immobilisiert ist, und wobei die Referenzzone eine Referenzoberfläche ist, an die der Referenzligand irreversibel immobilisiert ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Bindungsreagenz ausgewählt ist unter einem Antikörper oder einem multivalenten Antigen-bindenden Protein, der Antikörper und das multivalente Antigen-bindende Protein weisen jeweils eine erste und eine zweite Domänen-Bindungseinheit auf, wobei die erste Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Analyten liefert und die zweite Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden liefert.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Bindungsreagenz ein multivalentes Antigen-bindendes Protein ist.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Bindungsreagenz ein multivalentes Antigen-bindendes Protein ist, das eine einzelne Polypeptidkette mit den ersten und zweiten Domänen-Bindungseinheiten, die in Reihe verbunden sind, umfasst.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Bindungsreagenz ein bivalentes Antigen-bindendes Protein umfasst.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Einzeldomänen-Bindungseinheiten variable Domänen der schweren Kette sind, die von einem Immunglobulin abgeleitet sind, das natürlicherweise keine

leichten Ketten aufweist.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei die Einzeldomänen-Bindungseinheiten variable Domänen der schweren Kette sind, die von einem Camelid-Immunglobulin abgeleitet sind.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Bindungsreagenz ein markiertes Bindungsreagenz ist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Markierung ein farbiges Latexpartikel oder eine Fluoreszenzverbindung ist.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Harn, Serum, Speichel, Gebärmutterhals- oder Harnröhrenflüssigkeit.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 – 11, wobei das in Kontakt bringen der Probe mit dem Bindungsreagenz im Wesentlichen zur selben Zeit stattfindet, zu der die Probe mit dem Referenzliganden in Kontakt gebracht wird.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Analytrezeptor ein Antikörper mit einer Bindungsspezifität für den Analyten ist.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der Referenzligand ein Antigen ist, für welches das Bindungsreagenz eine Bindungsspezifität zeigt.

15. Analytische Testvorrichtungen zum Nachweis der Anwesenheit eines Analyten in einer flüssigen biologischen Probe, die Testvorrichtung umfasst ein Bindungsreagenz, einen Analytrezeptor, einen Referenzliganden und erste und zweite feste Träger, der zweite feste Träger umfasst eine Testzone, die Testzone weist irreversibel an sie immobilisiert den Analytrezeptor auf, der, wenn er an den Analyten und das Bindungsreagenz gebunden ist, einen ersten Komplex bildet, der ein Testsignal liefert, der erste feste Träger umfasst eine Referenzzone, die Referenzzone weist an sie irreversibel immobilisiert den Referenzliganden auf, der, wenn er an das Bindungsreagenz gebunden ist, einen zweiten Komplex bildet, der ein Referenzsignal liefert, das ein Mittel ist, durch das Variationen in der Menge des Bindungsreagenz, die der Probe ausgesetzt ist, korrigiert werden; wobei der Bindungsreagenz ausgewählt ist unter einem Antikörper oder einem multivalenten Antigen-bindenden Protein, der Antikörper und das multivalente Antigen-bindende Protein umfassen jeweils eine erste und zweite Domänen-Bindungseinheit, wobei die erste Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Analyten liefert und die zweite Domänen-Bindungseinheit eine Bindungsspezifität für den Referenzliganden liefert.

16. Analytische Testvorrichtung gemäß Anspruch 15, wobei das Bindungsreagenz ein multivalentes Antigen-bindendes Protein ist.

17. Analytische Testvorrichtung gemäß Anspruch 15 oder 16, wobei das multivalente Antigen-bindende Protein eine einzelne Polypeptidkette mit den ersten und zweiten Domänen-Bindungseinheiten, die in Reihe verbunden sind, umfasst.

18. Analytische Testvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei das Bindungsreagenz ein bivalentes Antigen-bindendes Protein umfasst, und der Analytrezeptor ein Antikörper mit Bindungsspezifität für den Analyten ist.

19. Analytische Testvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei die Einzeldomänen-Bindungseinheiten variable Domänen der schweren Kette sind, die von einem Immunglobulin abgeleitet sind, das natürlicherweise keine leichten Ketten aufweist.

20. Analytische Testvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei die Einzeldomänen-Bindungseinheiten variable Domänen der schweren Kette sind, die von einem Camelid-Immunglobulin abgeleitet sind.

21. Analytische Testvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei das Bindungsreagenz ein markiertes Bindungsreagenz ist.

22. Analytische Testvorrichtung gemäß Anspruch 21, wobei die Markierung ein farbiges Latexpartikel oder eine Fluoreszenzverbindung ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

HHHHHGSYGIHRPVATMVSKGEELFTGVVPIIIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKL
TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCESRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD
DGNKYTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLE
FVTAAGITGGSGGGSSQVKLES GGELVQPGGSLKLS CAASGLTFTNYSMGWFERPGGV
DREAVAAISWSGDNTYYVSSVKGRFTISRDNAKNTVYLOMNSLKPQDTAVYYCAVKPDDG
WWDYWGQGTQVTVSSQVQLQESGGGLVQAGESLKLSCAASGNTFSGGFMGWYRQAPGKQR
ELVATINSRGITNYADFVKGRFTISRDNAKRTVYLEMNSLEPEDTAVYYCYTHYFRSYWG
QGTQVTVSSEQKLISEEDLN

Fig. 1

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQQSGAELVKPGPSVKLSCKASDYFTTSYWMHW
VKQRPQGGLIEWIGEINPTNGRTYYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARRYGNSFDYWGQGTTVTVSSQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMH
WVKQKPGQGLEWIGYIYPYNDGTRYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAV
YYCSRREFDYWGQGTTVTVSSMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIELTQSPSSMYASLG
ERITITCKASQDINTYLTWFOQKPGKSPKTLIYRANRLLOGVPSRFSGSGSGQDYSLT
ISSLDYEDMGIYYCLOYDELYTFGGGKLEIKRDIELTQSPDSLAVSLGQRATIS CRA
SESVDSYGNSFMQWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGTGSRTDFTLTINPVE
ADDVATYYCQOSDEYPMYTFGGGKLEIKR

Fig. 2