



F10000964498



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT 96449
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 06 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

G 01N 1/18, 33/48

(21) Patentihakemus - Patentansökning 891379
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 22.03.89
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag 22.03.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 24.09.89
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.03.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
23.03.88 US 172108 P

(71) Hakija - Sökande

1. Becton, Dickinson and Company, One Becton Drive, Franklin Lakes, NJ 07417-1880, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Gary, Patricia A., 3521 N. Calvert, Daltimore, MD, USA, (US)
2. Maret, S. Melissa, 24105 Preakness Drive, Damascus, MD, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

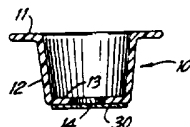
Laitte nestemäisen näytteen annostelemiseksi diagnostiseen laitteeseen säädetyllä nopeudella
Anordning för att fördela ett flytande prov till en diagnostisk anordning med en kontrollerad hastighet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 87279 (G 01N 33/52) EP A 217403 (G 01N 33/52), EP A 66648 (G 01N 33/54)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu laitteeseen nesteiden annostelemiseksi diagnostiseen läpivirtauslaitteeseen säädetyllä nopeudella. Se sisältää nestetilän (10), jonka pohjalla on aukko (14), ja virtausta säätelevän membraanin (30), joka peittää aukon (14). Aukon (14) koko ja virtausta säätelevän membraanin (30) keskihuokoskoko valitaan säädetyin virtausnopeuden aikaansaamiseksi. Käytön aikana annostelulaite saatetaan läheiseen yhteyteen diagnostisen läpivirtauslaitteen koepinnan kanssa, ja nestemäinen näyte asetetaan nestetilään (10). Neste virtaa annostelulaitteen läpi, ja saavuttaa kontaktin diagnostisen laitteen (40) koealueeseen (48) säädetyllä nopeudella. Sen jälkeen voidaan lisätä määrittysreagenssit koealueeseen annostelulaitteen kautta tai annostelulaite voidaan poistaa ja hylätä.



Uppfinningen hänför sig till en anordning för att fördela vätskor till en diagnostisk genomströmningsanordning med en kontrollerad hastighet. Den innehåller en brunn (10) med en öppning (14) i botten och en membran (30), som kontrollerar strömningen, övertäckande öppningen (14). Öppningens (14) storlek och medelporstorleken av den strömningskontrollerande membranen (30) utväljes för att förorsaka en kontrollerad strömningshastighet. Under användningen sammanföres fördelningsanordningen med provytan av den diagnostiska genomströmningsanordningen, och ett flytande prov föres till brunnen (10). Vätskan strömmar genom den fördelande anordningen och kommer i kontakt med provområdet (48) av den diagnostiska anordningen (40) med en kontrollerad hastighet. Efter det kan analysreagenser tilläggas till provområdet genom den fördelande anordningen eller den fördelande anordningen kan avlägsnas och förkastas.

Laite nestemäisen näytteen annostelemiseksi diagnostiseen laitteeseen säädetyllä nopeudella

- 5 Tämä keksintö koskee in vitro diagnostisten koelaitteiden aluetta. Se koskee erityisemmin laitetta nestemäisen näytteen annostelemiseksi koelaitteeseen säädetyllä nopeudella.

Viimeaikaiset kehitysaskleet immunologiassa ovat tuoneet
10 esille uuden ryhmän diagnostisia laitteita, joita nimitetään läpivirtauslaitteiksi. Näillä laitteilla suoritettavia ko-
keita on yleensä paljon helpompi suorittaa kuin tavanomaisia immunodiagnostisia määrityksiä. Niissä tarvitaan vähemmän tarkkuutta pipetoitaessa ja vähemmän käsittelyjä. Ne elimi-
15 noivat myös tarpeen käyttää kalliita instrumentteja tulosten lukemiseksi.

Yhtä sellaista läpivirtauslaitetta kuvaillaan US-patentti-
julkaisussa 4 632 901, Valkirs. Siinä esitettävä laite kä-
20 sittää ensimmäisen rakenneosan, joka on membraani tai suodin, johon on sidottu vasta-aine, tai joka pystyy poimimaan soluja tai solukappaleita nestemäisestä näytteestä. Tämän ensimmäisen rakenneosan tehtävänä on siepata analyytti membraanille tai suotimelle. Laite käsittää edelleen toisen
25 rakenneosan, joka aikaansaa virtauksen ensimmäisen rakenneosan läpi. Käytön aikana nestemäinen näyte ja nestemäiset reagenssit viedään ensimmäisen rakenneosan yhdelle pinnalle. Reagenssit virtaavat ensimmäisen rakenneosan läpi toiseen rakenneosaan. Kaikki se analyytistä, joka jää kiinni ensimmäiseen rakenneosaan, sitoutumalla analyyttille spesifiseen sidostekijään tai analyyttiin läheisesti liittyvän solun tai solukappaleen fysikaalisen estämisen kautta, ilmaistaan sen
30 jälkeen merkki-ilmaisuusysteemin avulla. Merkkisysteemiin kuuluvat reagenssit viedään myös ensimmäisen rakenneosan ensimmäiselle pinnalle, ja ne virtaavat sen läpi toiseen rakenneosaan. Ilmaistavissa olevan reaktion läsnäolo tai puuttuminen ensimmäisessä rakenneosassa on osoitus siihen sitoutuneen analyytin läsnäolosta tai puuttumisesta.

Toista läpivirtauslaitetta kuvaillaan US-patenttijulkaisussa 4 366 241, Tom et al. Laite sisältää immunosorbenttivyöhykkeen ja nesteen vastaanottovyöhykkeen, joka on nesteen keruun osalta yhteydessä immunosorbenttivyöhykkeeseen. Immunosorbenttivyöhyke sisältää immunologisen parin toisen jäsenen ei-diffundoivasti sitoutuneena siihen. Käytön aikana nestemäinen näyte ja signaalin tuottavan systeemin sisältämät reagenssit viedään immunosorbenttivyöhykkeeseen. Ilmaistavissa olevan reaktion läsnä-olo tai puuttuminen immunosorbenttivyöhykkeessä on osoitus näytteen sisältämän analyytin läsnäolosta tai puuttumisesta.

Tom'in et al. patentissa kuvaillaan useita laitteita ja määrittämissuhteita. Patentissa osoitetaan, että immunosorbenttikerroksen ja nestettä absorboivan vyöhykkeen väliin voidaan sijoittaa yksi tai useampia kerroksia. Nämä kerrokset toimivat esteinä ehkäisemällä takaisinsiirtymistä nestettä absorboivasta kerroksesta immunosorbenttikerrokseen; täytekeroksina; virtauksen säätelijöinä; tai vastaavasti.

Yksi vaatimus näille läpivirtauslaitteille on se, että näyte saavuttaa riittävästi pintakerroksen analyytin pidättämiseksi kerrokseen, tyypillisesti spesifisen sitoutumisreaktion avulla. Sen jälkeen merkkisysteemin reagenssien on riittävästi saavutettava pintakerros sopivien reaktioiden tapahtumiseksi. Jos laite laskee nesteet kerrosten läpi liian nopeasti, reaktioita ei voi tapahtua. Yleisesti annettussa julkaisussa US-sarjanumero 106 757, lokakuun 8., 1987, osoitetaan virtauksen säätelyongelma huokoisen alustan läpi, joka sisältää koealueen yläpinnallaan. Siinä kuvailtu laite sisältää huokoisen kerroksen, jossa on riittävän suuret huokokset, jotta sitoutumaton merkkiaine ja analyytti voivat virrata sen läpi imeytyskerrokseen. Huokoinen kerros ja imeytyskerros toimivat yhdessä reagenssien virtauksen säätelymekanismiksi huokoisen kerroksen läpi imeytyskerrokseen. Laite voi myös sisältää virtauksen säätelykerroksen, joka on sijoitettu huokoisen kerroksen ja imeytyskerroksen väliin.

Äskettäin esitellyssä reagenssipakkauksessa A-ryhmän streptokokkien ilmaisemiseksi käytetään hyväksi sarjajulkaisussa 106 757 kuvailtua keksintöä. Pakkaus sisältää kaikki reagenssit ja tarvikkeet, jotka tarvitaan potilaiden kurkuista kerättyjen näytteiden sisältämän analyytin ilmaisemiseksi. Näyte uutetaan DispensTubeTM-laitteessa. Uuttolaite on koeputki, johon näyte ja uuttoreagenssit lisätään. Sen jälkeen kun näyte on uutettu, putkeen sijoitetaan tiputuspää, ja uutettu näyte voidaan annostella koelaitteeseen. Tiputuspää sisältää karkean suotimen kaikkien näytteessä läsnä olevien suurten kappaleiden poistamiseksi. Heti kun näyte on uutettu, koko määrittämenettely voidaan suorittaa niin lyhyessä ajassa kuin kolme - viisi minuuttia. Reagenssipakkauksen avulla voidaan ilmaista A-ryhmän Streptococcus varsin alhaisilla tasoilla.

Vaikkakin Directigen 1-2-3TM-koepakkaus (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cokeysville, MD), jota edellä on kuvailtu, toimii oikein hyvin koskien A-ryhmän streptokokkeja, virtauksen lisäsäätely on edullista muiden analyyttien määrittäyksissä.

Toinen ongelma, joka on syntynyt hyvin herkkien ja spesifisten määrittäysten tulemisen myötä, on vääristä positiivisista aiheutuva ongelma, joka saa alkunsa muun aineen kuin analyytin läsnäolosta, joka sitoutuu merkkisysteemin spesifiseen sidosmuotoon ja epäspesifisesti testisysteemin sisältämään analyytin immobilisointikerrokseen. Näin ollen, määrittäyksissä, joiden merkkisysteemissä käytetään monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat peräisin hiiristä saaduista antiseerumeista, ihmisnäytteet, jotka sisältävät vasta-aineita hiirille, tuottavat väärää positiivisia. Tästä syystä on olemassa tarve eliminoida tehokkaan spesifisyyden menetys, joka saa alkunsa vasta-aineiden läsnäolosta lajille, jota käytetään valmistettaessa määrittäyksessä käytettävää antiseerumia.

Esillä oleva keksintö koskee laitetta nestemäisten näytteiden annostelemiseksi diagnostiseen in vitro laitteeseen sää-

detyllä nopeudella. Se käsittää nestetilan nestemäisen näytteen vastaanottamiseksi, aukon nestetilan pohjasta ja virtausta säätelevän membraanin, joka peittää aukon. Aukon koko ja virtausta säätelevän membraanin keskihuokoskoko valitaan siten, että nestetilan sisältämä neste kulkeutuu diagnosti-

5 sen laitteen yläpinnalle säädetyllä nopeudella.

Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

10

Keksintöä koskevan lisänäkökohdan mukaisesti laite sisältää välineet, joilla poistetaan valikoivasti tekijät, jotka häiritsevät määritystä, antaen kuitenkin analyylille mahdollisuuden virrata ulos nestetilasta. Häiritsevien aineiden poistamisvälineet käsittävät edullisesti spesifisesti sitovan tekijän, joka tunnistaa häiritsevän aineen, eikä sido analyyttiä. Spesifinen sidostekijä häiritsevän aineen poistamiseksi on sopivasti kiinnitetty virtausta säätelevään membraaniin.

20

Vielä toisen keksintöä koskevan näkökohdan mukaisesti virtausta säätelevä membraani sisältää reagensseja määritystä varten, jotka on päällystetty sen pintaan ja vapautettavissa. Tämä mahdollistaa reagenssien kuivavarastoinnin ennen käyttöä. Sitten kun näyte ja muut nesteet siirretään virtausta säätelevän membraanin läpi, reagenssit eluoituvat koelaitteeseen.

25

Edullisen konstruoinnin mukaan laite konstruoidaan niin, että nestetila ja nestetilan pohjassa oleva aukko sopivat kokonsa ja muotonsa puolesta yhteen koelaitteen sisältämän koealueen kanssa. Tämän konstruktion avulla laite toimii annostellen nesteitä koealueen koko pinnan läpi säädellyllä nopeudella. Laitteen erittäin edullinen konstruktio käsittää lisäksi kahvan, joka on kiinnitetty nestetilaan. Kahvan avulla on mahdollista käsitellä laitetta koskettamatta mihinkään nesteeseen, joka on laitettu nestetilaan. Silloin kun laitetta on tarkoitus käyttää ja poistaa se käytöstä

35

ennen kuin merkkiainereagenssit lisätään diagnostiseen laitteeseen, kahva on erityisen edullinen.

5 Esillä olevan keksinnön mukainen reagenssipakkaus käsittää edellä kuvailun virtausta säätelevän laitteen ja in vitro diagnostisen laitteen, joka on sovitettu yhteen sen nesteen annostelun mahdollistavien osien kanssa. Siten voidaan kehittää systeemejä, joissa nesteen annostelulaite ja diagnostinen läpivirtauslaite sovitetaan yhteen tiettyä analyysiä ja määrityskokoonpanoa varten.

10 Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä nestemäinen näyte annostellaan nesteenannostuslaitteen nestetilaan, ja sen annetaan virrata ulos aukosta virtausta säätelevän membraanin läpi diagnostisen laitteen koalueelle. Sen jälkeen voidaan annostella merkkiainesysteemin reagenssit koalueelle nesteenannostuslaitteen läpi tai riippumatta nesteenannostuslaitteesta. Näin ollen, silloin kun merkkiainekonjugaatin virtausnopeutta koalueen läpi on tärkeätä säädellä, 20 nesteenannostuslaitetta voidaan käyttää säätelyn aikaansaamiseksi. Samalla tavoin joissakin systeemeissä voidaan käyttää monia nesteenannostuslaitteita olennaisesti erikoisten tekijöiden annostelemiseksi säädellyillä nopeuksilla.

25

Kuvio 1 esittää esillä olevan keksinnön mukaisen annostuslaitteen sivupysty kuvaa;

30

Kuviossa 2 on poikkileikkaus otettuna pitkin leikkauslinjaa 2-2 kuviossa 1;

35

Kuvio 3 esittää ylätasokuvaa edullisesta diagnostisesta läpivirtauslaitteesta käytettäväksi esillä olevan keksinnön mukaisessa reagenssipakkauksessa;

Kuviossa 4 on pystykuvaa kuviossa 3 esitetystä laitteesta; ja

Kuviossa 5 on läpileikkauskuva kuviossa 3 esitetystä läpivirtauslaitteesta otettuna pitkin leikkauslinjaa 5-5.

Viittaamalla nyt piirroksiin esillä olevan keksinnön mukainen annostuslaite käsittää nestetilan 10, jonka yläosassa on ulospäin ulottuvat reunat 11 ja jossa on kaltevat sivuseinät 12. Kaltevat sivuseinät 12 päättyvät pohjaan 13. Pohjassa 13 oleva aukko 14 mahdollistaa nestetilassa olevan nesteen ulosvirtauksen. Annostuslaite sisältää edullisesti kahvan 20 kiinnitettynä nestetilaan 10. Kahva 20 sisältää edullisesti osuuden 21, jonka poikkileikkaus on ohuempi kuin muussa osassa kahvaa, kahvan tekemiseksi helposti joustavaksi.

Nestetila ja kahva on sopivasti muodostettu kokonaisuudeksi valamalla. Materiaalivalinta ei ole ratkaiseva. Alaa tuntevat henkilöt tuntevat sopivat muovit. Nestetilan tulisi olla riittävän suuri, jotta se vetäisi esim. 400 μ l:n nestenäytteen. Aukon koko on määritelty aikaansaamaan kysymyksessä olevan määrityksen kannalta edullinen virtausnopeus. Sen halkaisija voi sopivasti olla alueella 0,13 cm - 0,56 cm (0,05-0,22 tuumaa). Aukon halkaisija on edullisesti 0,3 cm (0,12 tuumaa).

Virtausta säätelevä membraani 30 on kiinnitetty nestetilan pohjaan. Virtausta sääteleviä membraaneja on saatavissa monesta eri lähteestä, jotka ovat alaa tuntevien tiedossa. Tällä hetkellä edullinen on nailon 66 -membraani, jonka keskihuokoskoko on 3,0 mikronia (ImmunodyneTM I, Pall Corporation, East Hills, N.Y. 11548). Membraani voidaan kiinnittää nestetilaan millä tahansa sopivalla menetelmällä, mukaanlukien liimaus, kuumasaumaus ja ultraäänihitsaus.

Esillä olevan keksinnön mukaisen reagenssipakkauksen yhteydessä käytetään edellä kuvailtua annostuslaitetta ja diagnostista läpivirtauslaitetta, jota on esitelty kuvioissa 3-5. Koelaite 40 käsittää huokoisen alustan 41, joka sisältää ylä- ja alapinnat ja koalueen 48 ylemmällä pinnallaan. Huokoisen alustan 41 alapinnan vieressä on virtauksen säätely-

kerros 42. Välittömästi virtauksen säätelykerroksen 42 alapuolella on huokoinen välikekerros. Välittömästi huokoisen välikekerroksen 43 alapuolella on imeytyskerros 44.

5 Koelaitteen sisältämät kerrokset 41, 42, 43, ja 44 voidaan kiinnittää toisiinsa millä tahansa sopivalla tavalla, esimerkiksi ompelemalla kerrokset toisiinsa kiinni. Kokoonpantua laite sijoitetaan sopivasti kotelon sisään, joka käsittää pohjaosan 45 ja kannen 46. Kansi 46, joka on huokoisen alustan 41 päällä, sisältää ulkonevan osan, joka sisältää sopivan aukon 47, joka on koealueen 48 päällä. Kuten kuviossa on esitetty, koealue 48 on kolmio, jota ympäröi joka puolelta huokoisen alustan taustaosa, joka sijaitsee myös aukon 47 määrittämällä alueella.

15

Kantta 46 kannattavat huokoisen alustan 41 päällä hammasmaiset ulokkeet 49, jotka ulottuvat pohjaosan 45 sivuilta ylöspäin. Ulokkeet 49 ovat riittävän korkeita jättääkseen ilmarakoja 50, jotka huolehtivat koelaitteen 40 sivuosien ilmanvaihdosta.

20

Kannen 46 kohonnut osa, joka ympäröi aukkoa 47, voi sisältää värillisen alueen 51, jonka väri eroaa selvästi kannen 46 väristä, ja väristä, joka muodostuu koealueella, koetulosten paremman luettavuuden luomiseksi, jotka tulokset yleensä määritetään väriin perustuen. Edullisessa suoritusmuodossa kotelo, joka käsittää pohjaosan 45 ja kannen 46, joka sisältää värillisen alueen 51, valmistetaan muoviaiaineista.

25

30 Annostuslaite tehdään edullisesti siten, että nestetila 10 sopii aukkoon 47 kotelon yläosassa. Edullisimmin nestetilan pohja tehdään koon ja muodon puolesta yhteensopivaksi alustan 47 yläpinnan kanssa. Käytön aikana nestemäinen näyte ja kaikki reagenssit, joiden virtauksen säätely on edullista, lisätään nestetilaan, ja niiden annetaan virrata membraanin läpi koealueelle. Kun annostuslaitetta ei enää tarvita, se voidaan poistaa kahvan avulla ja hylätä.

35

Keksintöä koskevassa toisessa näkökohdassa annostuslaitteen lisätehtävänä on poistaa häiritsevät aineet määrityksessä käytettävistä nesteistä. Tämä tehtävä voidaan toteuttaa päälylystämällä nestetilan sisäseinämät, virtauksensäättömembraani tai molemmat spesifisellä sidostekijällä, joka sitoo häiritsevän aineen sitomatta analyyttiä ja määrityksen kannalta aktiivista tekijää. Virtauksensäättömembraani päälylystetään edullisesti spesifisellä sidostekijällä. Esimerkiksi silloin, kun määrityksessä käytetään vasta-aineita, jotka on saatu hiiristä, kaneista tai vuohista, ja on ilmaistava hyvin alhaisia analyyttitasoja, potilaiden seerumien sisältämät vasta-aineet sille eläinlajille, jota käytetään reagenssien valmistuksessa, voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Tämä ongelma on myös olemassa silloin, kun käytetään monoklonaalisia vasta-aineita.

Keksintöä koskevat lisäpiirteet ja hyödyt selviävät seuraavista ei-rajoittavista esimerkeistä.

20 Vertailuesimerkki 1 Diagnostisen laitteen valmistaminen
Schleicher & Schuell'in nitroselluloosamembraaneja, joiden huokoskoko on 5 mikronia, päälylystetään 50 μ l:lla monoklonaalisia vasta-aineita sienen *Candida albicans* sytoplasman antigeeneille (48-52 kD), jota on kuvailtu US-patenttijulkaisussa no. 4 670 382.0. Päälylystysliuos sisältää vasta-aineita pitoisuudessa 100 mikrogrammaa/ml fosfaatilla puskuroidussa saliinissa (0,1 M, pH 6,0), joka sisältää 0,2 % NaN_3 . Kuivauksen jälkeen membraani suljetaan 0,5-%:ieen gelaatiiniin fosfaatilla puskuroidussa saliinissa (0,1 M, pH
30 8,0). Sen jälkeen membraanit kuivataan.

35 Koelaite kootaan asettamalla nitroselluloosamembraani kerrosyhdistelmän pinnalle. Kaksi pohjakerrosta koostuvat absorboivasta selluloosapaperista (paksuus 0,64 cm; 1/4 "); näiden pohjakerrosten yläpuolella on huokoinen välikekerros, joka koostuu raionkudosviirasta (Schleicher & Schuell Cat. no 5-S). Mainitut kolme kerrosta nidotaan yhteen, ja huokoinen nitroselluloosa-alustakerros asetetaan pinnalle. Kootun

yhdistelmän pinta-ala on 1 cm² ja paksuus 0,5 cm. Nitroseluloosamembraanilla oleva vasta-ainetäplä on kolmion muotoinen. Yhdistelmä asetetaan koteloon kuten kuvioissa on esitetty.

5

Annostuslaitteen valmistaminen

Nestetila ja kahva valetaan polystyreenihartsista (K-harts KR03, Phillips Petroleum, Bartlesville, OK). Nestetila on sylinterimäinen, ja sen ulkohalkaisija on 1,0 cm (0,395 tuumaa). Sen vetoisuus on 400 µl. Nestetila valmistetaan sen pohjassa olevalla aukolla 0,3 cm (0,12 tuumaa). Nestetila sopii tiiviisti läpivirtauslaitteen aukkoon.

15 Virtausta säätelevä membraani kuusasaumataan nestetilan pohjaan. Se peittää kokonaan aukon nestetilan pohjassa. Membraani on nailon 66 -membraani. Laitteita valmistetaan membraaneilla, joiden keskihuokoskoko on 3 mikronia, ja membraaneilla, joiden keskihuokoskoko on 1,2 mikronia (Immodyne ITM Cat. No. B1A030HC5 ja B1A012HC5 vastaavasti, Pall Corporation, East Hills, NY).

20

Koesuspension valmistaminen

Seeruminäytteitä, jotka sisältävät tunnettuja pitoisuuksia sienien *Candida albicans* sytoplasmista antigeeniä (48-50 kD), valmistetaan yhteenkerätyistä luovuttajaveren seerumeista, joihin on siirrostettu antigeeniä pitoisuuksissa 500 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, ja 25 ng/ml.

25

Merkkiaineen valmistaminen

30 A. Liposomipartikkelileiman valmistaminen

1. 100 ml:n pyöreäpohjaiseen pyöröhaihdutinpulloon lisätään:

a. 50 mg kolesterolia (Sigma no. CH-S),

b. 94 mg distearoyylifosfatidyylikoliinia, (Avanti Polar Lipids no. 850365),

35 c. 10 mg distearoyylifosfatidyyliglyserolia (Avanti Polar Lipids),

d. 3,75 mg ristisitovaa ainetta (distearoyylifosfatidyyli-
etanoli-amiini-p-maleimidofenyylimuokkama)kapryyli (Becton Dickinson
Immunodiagnostic, Orangeburg, N.Y.); ja
e. 50 ml kloroformia (Fisher).

5

2. Pyörresekoitetaan.

3. Asetetaan pyöröhaihduttajaan seuraavilla asetusarvoilla:
Vesihauteen lämpötila = 44°C

10 Pyörimisnopeus = 4

4. Lisätään hitaasti alipainetta, kunnes vaahtoaminen lakkaa
(suunnilleen 30-40 min.)

15 5. Alennetaan painetta ja annetaan liposomien seistä 44°C:ssa
30 min.

6. Lyofilisoidaan yli yön.

20 7. Pyöröhaihduttajaan lisätään 50 ml tislattua vettä ja se-
koitetaan 60°C:ssa ilman imua, kunnes lipidikalvo liukenee.

8. Jäädytetään kuivassa jäässä ja metanolissa.

25 9. Lyofilisoidaan kuivaksi liposomijauheeksi.

10. Valmistetaan erikseen värillinen Sulforhodamine B -liuos
(0,1 M natriumasetaatilisaliinipuskurissa, 0,1 M, pH 4,5).

30 11. Lisätään 50 ml värillistä liuosta liposomijauheeseen ja
lämmitetään 60°C:een 15 minuutin ajaksi.35 12. Ajetaan lämmin liposomivalmiste läpi Bio-Rad'in 1,0 mik-
ronin, 0,4 mikronin ja sen jälkeen 0,2 mikronin Unipore po-
lykarbonaattimembraanin (Bio-Rad).

13. Erotetaan vapaa värillinen aines liposomisuspensiosta
Sepharose CL6B -kromatografiakolonissa (Pharmacia), joka on

tasapainotettu 50 mM natriumasetaatipuskurissa pH 4,5 1 mM EDTA:n ja 50 mM NaCl:n kanssa.

14. Säilytetään liposomeja vaiheessa 13 määritellyssä puskurissa.

B. Liposomipartikkelileiman kytkeminen spesifiseen sidostekijään

10 1. Vuohen vasta-ainetta kanille (6 mg, Jackson Immuno Research, Westgrove, PA) fosfaatilla puskuroidussa salinissa (100 mM, pH 7,5) sekoitetaan SPDP:n (Sigma) kanssa molaarissa suhteessa 6,6 μ g SPDP: 1 mg vasta-aine; seos huuhdellaan typpivirrassa ja suljetaan tiiviisti. Sen annetaan reagoita kolmekymmentä minuuttia huoneen lämpötilassa sekoittaen.

20 3. Lisätään 1/10 tilavuus 1 M natriumasetattia pH 4,5 ja sekoitetaan 30 sekunnin ajan.

4. Lisätään 1/100 tilavuus 1 M ditiotreitolia vedessä.

25 5. Poistetaan ditiotreitoli ajamalla reaktioutilavuus läpi Sephadex G-25 keskilaatuksen kolonnin, joka on tasapainotettu Tris-puskurilla (50 mM Tris, 50 mM natriumasetatti, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Huuhdellaan typpellä ja suljetaan tiiviisti.

30 6. Seurataan O.D. 280 -arvoa, ja kerätään yhteen proteiinia sisältävät fraktiot.

7. Tämä liuos sekoitetaan 10 ml:n kanssa juuri valmistettuja liposomeja. Liposomien määrä määritetään suhteen 20 μ M fosforia 125 mg:aan talteenotettua proteiinia avulla. Fosforimääritys voi vaihdella liposomipreparaatista toiseen.

8. Huuhdellaan N₂:lla ja suljetaan tiiviisti.

9. Annetaan reagoida 2 tuntia yli yön huoneen lämpötilassa.
10. Erotetaan yhteenkytketty tuote Sepharose Fast Flow™
-kromatografiakolonnissa (Pharmacia), joka on tasapainotettu
5 standardiboraattipuskurilla (pH 8).
11. Otetaan talteen ja yhdistetään huokostilavuusfraktio.
12. Säilytetään 4°C:ssa.

10

Määrittäminen

- Määrittäminen suoritetaan annostuslaitteen kanssa ja ilman
sitä. Silloin, kun annostuslaitetta ei käytetä, koesuspensio
ja kaikki reagenssit lisätään suoraan diagnostisen laitteen
15 sisältämälle koalueelle. Kun annostuslaitetta käytetään, se
liitetään diagnostisessa laitteessa olevaan aukkoon, ja koe-
suspensio (200 µl) lisätään nestetilaan; se virtaa läpi koe-
alueen ja sen läpi imeytyskerrokseen. Erä kanin vasta-ainet-
ta sienen *Candida albicans* sytoplasmista antigeeniä (48-52
20 kD) vastaan (150 µl, 300 µg/ml) lisätään sen jälkeen neste-
tilaan annostuslaitteessa, ja sen annetaan virrata läpi koe-
alueelle. Annostuslaite poistetaan sen jälkeen diagnostises-
ta laitteesta ja hylätään. Merkkiaine (150 µl) lisätään.
- 25 Koealuetta pestään sen jälkeen pesupuskurilla (0,1 M guani-
diini HCl), ja tulokset luetaan sen jälkeen tarkkailemalla
visuaalisesti koalueella erottuvaa vaaleanpunaista väriä
(kolmio).
- 30 Jokaisen määrittäksen suorittamiseen tarvittava kokonaisaika
on kolme - viisi minuuttia. Taulukossa I merkki "++" merkit-
see koalueella läsnä olevaa selvästi erottuvaa vaaleanpu-
naista väriä, merkki "+" tarkoittaa heikkoa vaaleanpunaista
väriä, ja merkki "-" tarkoittaa, että yhtään väriä ei havai-
35 ta. Annostuslaitteen käyttö parantaa huomattavasti määrittäyk-
sen herkkyyttä, tasolta 200 ng/ml tasolle 25 ng/ml.

Taulukko I

	Määrittys- muoto	Antigeenipitoisuus ng/ml				
		500	200	100	50	25
5	ei annostus- laitetta	++	+	-		
	3:n mikronin laite	++	++	++	++	+
10	1,2 mikronin laite	++	++	++	++	+

Esimerkki 2 Diagnostisen laitteen valmistaminen

15 Nitroselluloosamembraanit, joiden keskihuokoskoko on 5 mikronia (MSI, West Borough, MA) päällystetään 50 μ l:lla monoklonaalista vasta-ainetta sienen *Candida albicans* sytoplasmiselle antigeenille (48-52 kD), jota on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 670 382.0. Päällystysliuos sisältää vastaaineita pitoisuudessa 75 mikrogrammaa/ml fosfaatilla puskuroidussa saliinissa (0,1 M, pH 6,0), joka sisältää 0,2 % NaN_3 :a. Kuivaamisen jälkeen membraani suljetaan 0,5-%:isella

20 gelatiinilla fosfaatilla puskuroidussa saliinissa (0,1 M, pH 8,0). Membraanit kuivataan sen jälkeen.

25

Koelaite kootaan asettamalla nitroselluloosamembraanit kerrosyhdistelmän päälle. Kaksi pohjakerrosta koostuvat absorboivasta selluloosapaperista (0,63 cm; 1/4 " paksuja); näiden pohjakerrosten päällä on huokoinen välikekerros, joka

30 koostuu ei-kudotusta raion-kudoksesta (Schleicher & Schuell Cat. no 5-S). Raion-kerroksen päällä on yhdensuuntaista virtausta säätelevä polykarbonaattimembraani, jonka keskihuokoskoko on 1,0 μ m (Nucleopore, Pleasantville, CA). Neljä kerrosta nidotaan yhteen, ja huokoinen nitroselluloosainen

35 alustakerros asetetaan pinnalle. Kootun yhdistelmän pinta-ala on 1 cm², ja sen paksuus on 0,5 cm. Vasta-ainetäplä nitroselluloosamembraanilla on kolmion muodossa. Yhdistelmä sijoitetaan koteloon, kuten kuvioissa on esitetty.

Määrittymenetelmä

Määrittymiä suoritettiin käyttäen annostuslaitteita ja merk-
kisysteemiä, kuten on kuvailtu vertailuesimerkissä 1. Annos-
tusslaitteen ollessa sijoitettuna diagnostisen laitteen auk-
5 koon, lisätään 200 μ l seeruminäytettä, johon on siirrostettu
sytoplasmista antigeeniä (48-52 kD) 10 ng/ml sienestä *Candi-*
da albicans, ja sen annetaan virrata diagnostisen laitteen
läpi. Vastaava erä kanin vasta-ainetta antigeeniä vastaan
(150 μ l, 75 μ g/ml) lisätään sen jälkeen annostuslaitteen
10 nestetilaan, ja sen annetaan virrata läpi koealueeseen. An-
nostuslaite poistetaan sen jälkeen ja hylätään. Merkkiaine
(150 μ l) lisätään koealueeseen. Sen jälkeen, kun merkkiaine
on virrannut koelaitteen läpi, koealue pestään pesupuskuril-
la (0,1 M guanidiini HCl), ja tulokset luetaan havainnoimal-
15 la visuaalisesti koealueella olevan selvästi erottuvan vaa-
leanpunaisen kolmion läsnäoloa. Kun koe toistettiin käyttäen
seerumia, johon ei oltu siirretty antigeeniä, havaittiin
negatiivinen tulos.

20 Esimerkki 3 Annostuslaitteen valmistaminen

Nestetila ja kahva valetaan polystyreenihartsista (K-harts
KR03, Phillips Petroleum, Bartlesville, OK). Nestetila on
sylinterinmuotoinen, ja sen ulkohalkaisija on 1,0 cm (0,395
tuumaa). Sen vetoisuus on 400 μ l. Nestetila valmistetaan
25 pohjassa olevalla aukolla, 0,3 cm (0,12 tuumaa). Nestetila
sopii tiiviisti läpivirtauslaitteen aukkoon.

Virtausta säätelevä membraani on kuumasaumattu nestetilan
pohjaan. Se peittää kokonaan aukon nestetilan pohjassa. Mem-
30 braanit, joita käytettiin olivat tyyppiä nailon 66 (Immuno-
dyne ITM, Pall Corporation, East Hills, NY) tai nitrosellu-
loosa (MSI, West Borough, Mass.). Virtausta sääteleviä mem-
braaneja annostuslaitteissa käsiteltiin sulkuliuksilla seu-
raavasti:

35 Laite 1 -- 3,0 mikronin keskihuokoskokoinen nailon-membraani
suljettiin 1-%:isella rasvattomalla kuivamaidolla.

Laite 2 -- 3,0 mikronin keskihuokoskokoinen nailon-membraani
suljettiin 10-%:isella hiiren seerumilla.

Laite 3 -- 5,0 mikronin keskihuokoskokoinen nitrosellulosa-membraani suljettiin 10-%:isella hiiren seerumilla.

Määrittäminen

- 5 Määrittämiä suoritettiin käyttäen diagnostisia laitteita, merkkiainetta ja menetelmää, kuten on kuvailtu esimerkissä 2. Näyte oli ihmisen normaalia seerumia, joka antaa väärän positiivisen tuloksen. Kun määrittäminen suoritettiin siten, että annostuslaitteen virtausta säätelevä membraani oli suljettu
- 10 rasvattomalla kuivalla maidolla, todettiin positiivinen tulos. Kun määrittäminen suoritettiin kahden annostuslaitteen ollessa suljettu hiiren seerumilla, tulokset olivat negatiivisia.

Patenttivaatimukset

1. Laite nestemäisen näytteen annostelemiseksi säädetyllä nopeudella diagnostiseen läpivirtauskoelaitteeseen, joka käsittää yläpinnan omaavan, huokoisen alustan (41), jolla on
5 spesifisen muotoinen koalue (48), jolloin se alustan (41) yläpinnan osa, jolla ei ole koaluetta (48), ympäröi koaluetta, **tunnettu** siitä, että laite käsittää:
nestetilan (10) nestemäiselle näytteelle käsittäen pohjaosaan (13) päättyvät sivuseinät (12), nestetilan pohjassa
10 aukon (14), joka on samanmuotoinen ja -kokoinen kuin spesifisen muotoinen koalue (48) läpivirtauskoelaitteessa, ja nestetilaan (10) liitetyn virtausta säätelevän kalvon (30), joka peittää aukon (14), nestemäisen näytteen annostelemiseksi säädetyllä nopeudella spesifisen muotoiselle koaluel-
15 eelle (48) diagnostisen läpivirtauskoelaitteen huokoisen alustan (41) yläpinnalla.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, **tunnettu** siitä, että se käsittää edelleen välineet laitteessa häiritsevien
20 aineiden poistamiseksi valikoivasti nestemäisestä näytteestä, ottamatta erilleen analyyttiä nestemäisestä näytteestä.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen laite, **tunnettu** siitä, että väline häiritsevien aineiden poistamiseksi on spesifi-
25 nen sidostekijä häiritsevälle aineelle.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen laite, **tunnettu** siitä, että spesifinen sidostekijä kiinnitetään virtausta säätelevään kalvoon (30).
30
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, **tunnettu** siitä, että virtausta säätelevä kalvo (30) sisältää määritysrea-
35 gensseja sen päälle irrotettavasti päällystettyinä.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, **tunnettu** siitä, että se käsittää edelleen kahvan (20), joka on kiinnitetty nestetilaan (10) laitteen käsittelymisen helpottamiseksi koskematta nestetilassa olevaa nestemäistä näytettä.

7. Diagnostinen määrityspakkaus, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen laitteen ja diagnostisen läpivirtauskoelaitteen.

5 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen diagnostinen määrityspakkaus, **tunnettu** siitä, että mainittu läpivirtauskoelaite käsittää kotelon, jossa on aukko ja huokoinen alusta (41), jossa on yläpinta ja yläpinnalla spesifisen muotoinen koealue (48), jolloin se alustan (41) yläpinnan osa, jolla ei
10 ole koealuetta (48) ympäröi koealuetta.

9. Määritysmenetelmä nestemäisessä näytteessä olevalle analyyttille, **tunnettu** siitä, että asetetaan patenttivaatimuksen 1 mukaisen laitteen nestetila (10) diagnostiseen läpivirtauskoelaitteeseen,
15 viedään nestemäinen näyte laitteen nestetilaaan, johdetaan nestemäinen näyte nestetilasta säädetyllä nopeudella, saatetaan spesifisen muotoinen koealue (48) läpivirtauskoelaitteen alustan (41) yläpinnalla kosketukseen näytteen
20 kanssa, jolloin koealueeton alustan yläpinta ei ole kosketuksissa nestemäisen näytteen kanssa, jolloin spesifisen muotoinen koealue (48) toimii spesifisenä sidostekijänä analyyttille ilman alustan häiriöitä, ja
25 detektoidaan analyytin läsnäolo spesifisen muotoiselle koealueelle annostellussa nestemäisessä näytteessä käyttäen merkkiainetta.

Patentkrav

30 1. Anordning för dosering av ett vätskeprov med kontrollerad hastighet i en genomströmningsdiagnostiseringsapparat, omfattande ett poröst underlag (41) med en övre yta, som uppvisar ett provområde (48) med specifik form, varvid det parti av underlagets (41) övre yta, som inte uppvisar provområde (48), omger provområdet, **kännetecknad** av att anordningen omfattar:
35 en vätskekammare (10) för vätskeprovet omfattande sidoväggar (12) som slutar vid ett bottenparti (13), en öppning (14) i

vätskekammarens botten vilken har samma form och storlek som provområdet (48) med specifik form i genomströmningsdiagnostiseringsapparaten, och

5 ett flödesreglerande membran (30) anslutet till vätskekammaren (10), som täcker öppningen (14), för att dosera vätskeprovet med kontrollerad hastighet på provområdet (48) med specifik form på övre ytan av det porösa underlaget (41) i genomströmningsdiagnostiseringsapparaten.

10 2. Anordning enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den ytterligare omfattar medel för att selektivt avlägsna störande ämnen från ett vätskeprov utan att separera analyten från vätskeprovet.

15 3. Anordning enligt patentkrav 2, **kännetecknad** av att medlen för att selektivt avlägsna störande ämnen består av ett bestämt bindemedel för det störande ämnet.

20 4. Anordning enligt patentkrav 3, **kännetecknad** av att det bestämda bindemedlet påförs det flödesreglerande membranet (30).

25 5. Anordning enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att det flödesreglerande membranet (30) påförts löstagbara analysreagenser.

30 6. Anordning enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den ytterligare omfattar ett handtag (20) som fästas vid vätskekammaren (10) för att underlätta hantering av apparaten utan att vidröra vätskeprovet i kammaren.

35 7. Diagnostiseringskit, **kännetecknad** av att den omfattar en anordning enligt patentkrav 1 och en genomströmningsdiagnostiseringsapparat.

8. Diagnostiseringskit enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av att nämnda genomströmningsdiagnostiseringsapparat omfattar ett hölje, som har en öppning och ett poröst underlag

(41) med en övre yta, och på denna ett provområde (48) med specifik form, varvid den del av underlaget (41) som inte uppvisar provområde (48) omger provområdet.

- 5 9. Förfarande för att bestämma en analyt i ett vätskeprov, **kännetecknat** av att vätskekammaren (10) av anordningen enligt patentkrav 1 placeras i genomströmningsdiagnostiseringsapparaten, vätskeprovet förs till vätskekammaren i apparaten,
- 10 vätskeprovet leds från vätskekammaren med kontrollerad hastighet,
- provområdet (48) med specifik form sätts på övre ytan av underlaget (41) av genomströmningsdiagnostiseringsapparaten i beröring med provet, varvid den övre yta av underlaget som
- 15 inte uppvisar provområde inte är i beröring med vätskeprovet, varvid provområdet (48) med specifik form fungerar som bestämt bindemedel för analyten utan störningar för underlaget, och
- närvaro av analyt detekteras i ett vätskeprov doserat på
- 20 provområdet med specifik form med hjälp av spårmaterial.

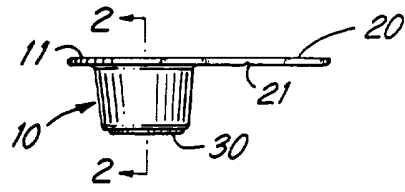


FIG. 1

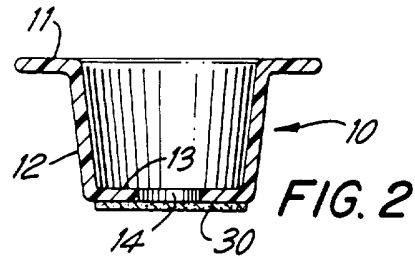


FIG. 2

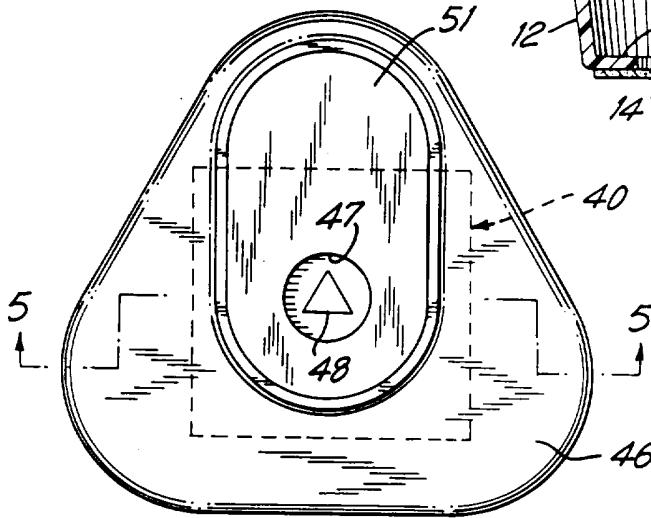


FIG. 3

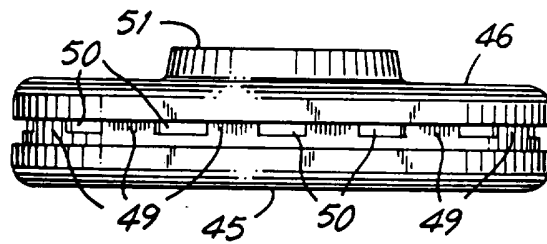


FIG. 4

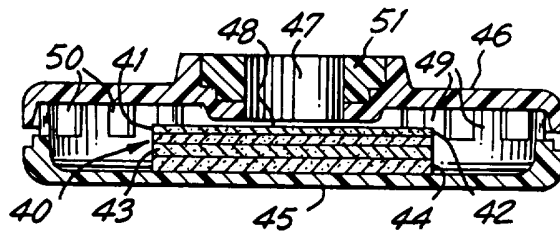


FIG. 5