



F1000114826B



SUOMI – FINLAND  
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU  
PATENTSKRIFT

(10) FI 114826 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.12.2004

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

G01N 33/58, 33/543, C12Q 1/68

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

963560

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

10.09.1996

(24) Alkupäivä - Löpdag

10.03.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

10.09.1996

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/GB95/00521

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

11.03.1994 GB 9404709 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Multilyte Limited, 3rd floor, 63 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LW, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Ekins, Roger Philip, c/o Multilyte Limited, Dept. of Molecular, Endocrinology, University College and Middlesex, School of Medicine, Mortimer Street, London W1N 8AA, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab  
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

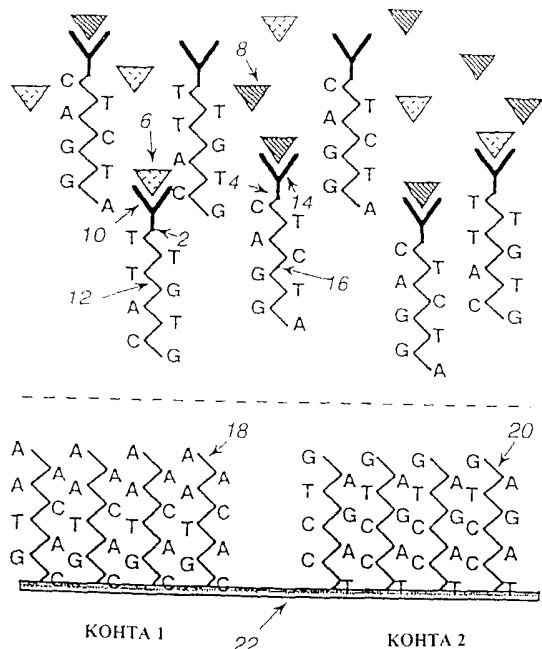
**Sidontamääritys, jossa käytetään häntäryhmiä sisältäviä sidonta-aineita**  
**Bindningsbestämning där bindningsämnen med svans-grupper används**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

-----

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä olevassa keksinnössä paljastetaan menetelmiä ja välinesarjoja yhden tai usempien analyyttien pitoisuuden määrittämiseksi nestemäisestä näytteestä käyttäen kiinteälle tukiaineelle immobilisoituja sieppausaineita ja sidonta-aineita analyyttien sitomiseen, joissa sidonta-aineissa on häntäryhmiä, jotka kykenevät sitoutumaan vastaavaan sieppausaineeseen. Sieppausaineet ja sidonta-aineet ovat edullisesti komplementaarisia oligonukleotideja ja sieppausaineet on immobilisoitu mikropisteiden muotoon. Häntäryhmien ja sieppausaineiden käyttö voi tehdä mahdolliseksi analyyttien sitomisen sidonta-aineisiin tapahtuvan liuoksessa eikä pinnalla, mikä parantaa tähän prosessiin liittyvää kinetiikkaa. Lisäksi määrittäksen käyttäjä voi räätälöidä mitkä tahansa sopivat sidonta-aineet käytettäväksi yhdessä yleispätevän tukiaineen kanssa kiinnittämällä niihin häntäryhmiä.



Den föreliggande uppfinningen avslöjar metoder och redskap för att fastställa koncentrationen av en eller flera analyter i ett flytande prov genom att använda snappämnen, som är immobiliserade i ett solid stödämne, och bindningsämnen för att binda analyterna, vilka bindningsämnen har svansgrupper, som binder sig till det motsvarande snappämnet. Snappämnena och bindningsämnena är fördelaktigt komplementära oligonukleotider och snappämnena är immobiliserade i form av mikropunkter. Användningen av svansgrupper och snappämnen kan möjliggöra att förbindningen av analyterna till bindningsämnena sker i lösning och inte på ytan, vilket förbättrar kinetiken i samband med denna process. Ytterligare kan användaren av bestämningsmetoden skraddarsy vilka lämpliga bindningsämnen som helst för att användas med ett allmängiltigt stödämne genom att fästa svansgrupper till dem.

**Sidontamääritys, jossa käytetään häntäryhmiä sisältäviä sidonta-aineita -  
Bindningsbestämning där bindingsämnen med svans-grupper används**

5 **Keksinnön ala**

Esillä oleva keksintö koskee sidontamäärityksiä, joissa käytetään häntäryhmiä sisältäviä sidonta-aineita ja erityisesti sidonta-aineita, joissa on oligonukleo-tidihäntäryhmiä. Nämä sidontamääritykset ovat hyödyllisiä analyyttien pitoisuuden määrittämisessä nestenäytteistä.

10

**Keksinnön tausta**

On tunnettua mitata analyytin, kuten lääkkeen tai hormonin pitoisuus nestemäisestä näytteestä saattamalla nestemäinen näyte kosketukseen sidonta-aineen kanssa, joka on immobilisoitu kiinteälle tukiaineelle, jossa sidonta-aineessa on analyyttille spesifiä sidontakohtia, erottamalla sidonta-aine, johon analyytti on sidottu ja mittaamalla arvo, joka edustaa sidonta-aineen sidontakohtien sitä jaetta, joka on analyytin haltuunottama. Tyypillisesti analyytin pitoisuus nestemäisessä näytteessä voidaan sitten määrätä vertaamalla arvoa, joka edustaa analyytin haltuunsaottamien sidontakohtien jaetta, arvoihin, jotka on saatu sarjasta standardiliuoksia, jotka sisältävät tunnetut pitoisuudet analyyttiä.

20

Aikaisemmin haltuunotettujen sidontakohtien jakeen mittaaminen on tavallisesti suoritettu takaisintitraamalla merkityllä kehitysreagenssilla käyttäen joko niinkutsuttua kilpailevaa tai ei-kilpailevaa menetelmää.

25

Kilpailevassa menetelmässä sidonta-aine, johon analyytti on sidottu, titrataan takaisin joko samanaikaisesti tai peräkkäin merkityllä kehitysaineella, joka on tyypillisesti analyytin merkitty versio tai anti-idiotyyppinen vasta-aine, joka kykenee tunnistamaan sidonta-aineen tyhjät sidontakohdat. Kehitysaineen voidaan sanoa kilpailevan sidonta-aineen sidontakohdista analyytin kanssa, jonka pitoisuutta parhaillaan mitataan. Sidontakohtien jae, jonka merkitty analyytti ottaa haltuunsa, voidaan sitten suhteuttaa analyytin pitoisuuteen edellä kuvatulla tavalla.

30

Ei-kilpailevassa menetelmässä sidonta-aine, johon analyytti on sidottu, titrataan takaisin merkityllä kehitysaineella, joka kykenee sitoutumaan joko sidottuun analyyttiin tai sidonta-aineessa oleviin haltuunotettuihin sidontakohtiin. Analyytin haltuunsa ottamien sidontakohtien jae voidaan sitten mitata toteamalla merkityn

35

kehitysaineen läsnäolo ja aivan kuten kilpailevissa määrityksissä, suhteuttaa se nestemäisessä näytteessä olevan analyytin pitoisuuteen edellä kuvatulla tavalla.

5 Sekä kilpailevassa että ei-kilpailevassa menetelmässä kehitysaine merkitään merkkiaineella, jota kehitysaine olisi mahdollista todeta. Aikaisemmin on käytetty lukuisia eri merkkiaineita, esimerkiksi radioaktiivisia isotooppeja, entsyymejä, kemilumiinoivia merkkiaineita ja fluoresoivia merkkiaineita.

10 Immuunimääritysten alalla kilpailevat määritykset on yleensä suoritettu suunnitteluperiaatteiden mukaisesti, jotka Berson ja Yalow ovat ilmaisseet esimerkiksi teoksessa "Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (1973), sivut 111 - 116. Barson ja Yalow arvelivat, että kilpailevien immuunimääritysten suorituksessa maksimiherkkyys saavutetaan kun käytetään sidonta-aineen määrää, joka sitoo suunnilleen 30 - 50 % todettavasta analyytin pienestä pitoisuudesta. Ei-kilpailevissa  
15 immuunimäärityksissä maksimiherkkyys arvellaan yleensä saavutettavan käyttämällä riittävästi sidonta-ainetta nestemäisessä näytteessä olevan analyytin sitomiseksi lähes 100 %:sesti. Kuitenkin molemmissa näissä tapauksissa immuunimääritykset, jotka on suunniteltu näiden laajasti hyväksytyjen ohjeiden mukaisesti, vaativat, että näytteen tilavuus tunnetaan ja että käytetyn sidonta-aineen määrä  
20 tunnetaan tarkasti tai sen tiedetään olevan vakio.

Kansainvälisessä patenttihakemuksessa WO 84/01031 paljastettiin, että analyytin pitoisuus nestemäisessä näytteessä voidaan mitata saattamalla nestemäinen näyte kosketukseen pienen määrän kanssa sidonta-ainetta, jonka sidontakohdat ovat spesifisiä analyytille. Tässä "ympäröivän analyytin" menetelmässä edellyttäen, että  
25 sidonta-aineen määrä on riittävän pieni, jotta sillä olisi vain merkityksetön vaikutus nestemäisessä näytteessä olevan analyytin pitoisuuteen, havaitaan että analyytin haltuunsa ottamien sidonta-aineen sidontakohtien jae on tehokkaasti riippumaton näytteen tilavuudesta.

30 Tätä lähestymistapaa on edelleen jalostettu patentissa EP 304 202, jossa paljastetaan, että kehityksen herkkyyttä ja helppoutta patenttihakemuksen WO 84/01031 määrityksissä parannetaan käyttämällä sidonta-ainetta alle 0,1 V/K moolin määrä sijoitettuna pienelle alueelle (tai "mikropisteelle") kiinteää tukiainetta, jossa lausekkeessa V on näytteen tilavuus ja K on sidonta-aineen affiniteettivakio analyytin  
35 suhteen. Kummassakin näistä kirjallisuusviitteistä analyytin haltuunsa ottamat sidontakohdat mitataan käyttäen joko kilpailevaa tai ei-kilpailevaa tekniikkaa, joita kuvattiin edellä.

**Keksinnön yhteenveto**

On olemassa jatkuva tarve kehittää sidontamääriytyksiä, joilla on parannettu kinetiikka, jotta olisi mahdollista suorittaa määriytyksiä nopeammin ja helpommin. Lisäksi olisi toivottavaa aikaansaada sidontamääriytyks, jota määriytyksen käyttäjä voi helposti räätälöidä erilaisten analyyttiryhmien toteamiseen.

10 Näin ollen ensimmäisessä kohdassaan esillä oleva keksintö saa aikaan patenttivaatimuksen 1 mukaisen menetelmän analyyttien pitoisuuksien määriyttämiseksi nestemäisestä näytteestä, jossa menetelmässä:

immobilisoidaan useita sieppausaineita kiinteälle tukiaineelle, kunkin sieppausaineen kyetessä sitomaan spesifisesti annetun sidonta-aineen;

15 saatetaan nestemäinen näyte kosketukseen yhden tai useampien sidonta-aineiden kanssa, kunkin sidonta-aineen sisältäessä sidontakohtia, jotka ovat spesifisiä annettulle analyyttille niin, että analyytti ottaa haltuunsa tietyn jakeen sidontakohtista, ja häntäryhmän, joka on sovitettu sitoutumaan vastaavaan sieppausaineeseen;

20 saatetaan nestemäinen näyte joko samanaikaisesti tai peräkkäin edellisen vaiheen kanssa kosketukseen immobilisoitujen sieppausaineiden kanssa niin, että sidonta-aineet sitoutuvat niitä vastaaviin sieppausaineisiin; ja

määriitetään analyytin haltuunsa ottamien sidonta-aineen sidontakohtien jae analyytin pitoisuuden määriyttämiseksi nestemäisestä näytteestä.

25 Näin ollen esillä oleva keksintö kohdistuu määriytykseen, jossa analyyttien sitominen tapahtuu nestefaasissa eikä kiinteän alustan pinnalla. Tämä parantaa analyytin ja sidonta-aineen välisen reaktion kinetiikkaa.

30 Näin ollen eräässä toteutusmuodossa nestemäisen näytteen saattaminen kosketukseen sidonta- ja sieppausaineiden kanssa samanaikaisesti tekee mahdolliseksi määriytyksen suorittamisen yhdessä vaiheessa esim. käyttäen yhtä ainoaa reaktioastiaa.

Vaihtoehtoisesti kosketukseen saattaminen peräkkäin sidonta-aineen ja sieppausaineen kanssa voi olla edullista erityisesti, kun neste on seerumia tai verta ja erispesifinen sitoutuminen on tärkeä virhelähde. Näissä tapauksissa sidonta-aine voidaan ensin saattaa kosketukseen nestemäisen näytteen kanssa ensimmäisessä astiassa ja siirtää näyte sitten toiseen astiaan, jotta sieppausaineen olisi mahdollista sitoa sidonta-aine kiinteään tukiaineeseen.

Toisessa kohdassaan esillä oleva keksintö kohdistuu patenttivaatimuksen 15 mukaiseen menetelmään useiden sidonta-aineiden immobilisoimiseksi tukiaineelle, kunkin sidonta-aineen sisältäessä sidontakohtia, jotka ovat spesifisiä annetulle analyyttille, ja häntäryhmän, joka on sovitettu sitoutumaan sieppausaineeseen, jossa  
5 menetelmässä:

immobilisoidaan yksi tai useampia sieppausaineita tukiaineelle, kunkin sieppausaineen kyetessä sitoutumaan annetun sidonta-aineen häntäryhmään ja  
10 saatetaan sidonta-aineet kosketukseen tukiaineen kanssa, jonka pinnalle sieppausaineet on immobilisoitu niin, että sidonta-aineet sitoutuvat spesifisesti niitä vastaaviin sieppausaineisiin niiden häntäryhmien välityksellä.

Edellä esitetty menetelmä voi lisäksi sisältää vaiheen, jossa kiinnitetään häntäryhmät sidonta-aineisiin ennen niiden altistamista tukiaineille immobilisoiduille sieppausaineille.  
15

Näin ollen määrittämisen käyttäjälle on mahdollista räätälöidä sidonta-aineita käytettäväksi analyyttien eri ryhmien pitoisuuksien määrittämisessä ja käyttäen räätälöityjä sidonta-aineita yhdessä yleispätevän tukiaineen kanssa, jonka pinnalle on immobilisoitu sieppausaineita, joihin sidonta-aineet voivat yksilöllisesti sitoutua häntäryhmiensä avulla.  
20

Keksinnön tässä kohdassa määrittäminen suoritetaan saattamalla tukiaine alttiiksi neste-mäiselle näytteelle sen jälkeen, kun sidonta-aineet ovat sitoutuneet sieppausaineisiin.  
25

Kummassakin kohdassa esillä oleva keksintö saa aikaan määrittämisen, jossa sidonta-aine liitetään epäsuorasti sieppausaineeseen, joka on immobilisoitu alustalle, häntäryhmän kautta.  
30

Sieppausaine on edullisesti oligonukleotidisarja, joka voi risteytyä täydentäväksi sarjaksi, joka sisältää sidonta-aineen häntäryhmän. Oligonukleotidit, jotka toimivat sieppausaineena tai sidonta-aineen häntänä, ovat riittävän pitkiä aikaansaadakseen voimakkaan ja spesifisen risteytymisen määrittämisessä käytetyissä ankaruusolosuh-  
35 teissa. Tyypillisesti käytetään täydentäviä oligonukleotideja, joiden pituus on

vähintään noin 8 tai 9 nukleotidia. Edullisessa toteutusmuodossa oligonukleotidien pituus on edullisesti 8 - 30 emästä, edullisemmin 16 - 20 emästä. Hyvin pitkien polynukleotidien käyttö ei kuitenkaan ole edullista, koska nämä voivat johtaa erilais-  
5 ten sieppausaineiden sitomisspesifisyyden huononemiseen tai itseristeytyksiin, joissa muodostuu hiusneulasilmukoita (kaksoiskierteisiä alueita). Alaan perehtyneet voivat kuitenkin helposti määrittää oligonukleotidin sopivan pituuden ja järjestyksen sarjalle määritysolosuhteita.

Sidonta-aine on sopivasti vasta-aine, jossa on analyyttille spesifisiä sidontakohtia.  
10 Tästä johtuen kun tukiaineella oleva sieppausaine saatetaan alttiiksi nestefaasissa olevalle sidonta-aineelle, sidonta-aine sitoutuu kiinteään tukiaineeseen. Vaihtoehtoisesti kun analyytti on nukleiinihapposarja, sidonta-aine voi olla oligonukleotidi. Näin ollen tässä toteutusmuodossa sidonta-aineessa on ensimmäinen sarja, joka kykenee risteytymään analyyttiin, ja toinen sarja, joka toimii häntäryhmänä.

15 On edullista käyttää pientä määrää sidonta-ainetta patenttihakemuksessa WO 84/01031 tai patentissa EP 304 202 paljastettujen määritysten mukaisesti, joten nestemäisen näytteen tilavuutta ei tarvitse tuntea. Näin ollen sidonta-aineen määrän tulisi olla riittävän pieni niin, että se ei vaikuta merkittävästi analyytin ympäröivään  
20 pitoisuuteen nestemäisessä näytteessä. Tyypillisesti on edullista käyttää sidonta-ainetta määrä, joka sitoo alle 5 % analyytistä. Kuitenkin sidonta-aineen pienemmän määrän, esim. sellaisen, joka sitoo 1 tai 2 % analyytistä, vähentää edelleen analyytin ympäröivälle pitoisuudelle aiheutettua häiriötä ja auttaa minimoimaan virheen analyytin pitoisuuden määrittämisessä.

25 Kun määrittäminen suoritetaan patentin EP 304 202 mukaisesti käyttäen alle 0,1 V/K moolia sidonta-ainetta, affiniteettivakio (K) analyytin sitomiselle sidonta-aineeseen mitataan normaalikäytännön mukaan. Tämä tarkoittaa, että affiniteettivakion arvo, jota käytetään määrittäessä kuinka suuri määrä sidonta-ainetta muodostaa 0,1 V/K  
30 moolia on arvo, joka saadaan olosuhteissa (esim. reagenssit, termostointiaika, pH, lämpötila jne), joita määrittämisessä käytetään.

Kutakin sieppausainetta käytetään edullisesti ylimäärin oleellisesti kaiken sidonta-  
35 aineen sitomiseksi. Tämä maksimoi määrityksen herkkyyden ja varmistaa, että kun käytetty sidonta-aineen määrä on tiedettävä tai sen tiedetään olevan vakio, määrityksen käyttäjä voi luottaa siihen, että oleellisesti kaikki määrityksessä käytetty sidonta-aine sitoutuu sen tukiaineella olevaan sieppausaineeseen.

- Sieppausaineen molekyylit immobilisoidaan edullisesti tukiaineelle erillisiin kohtiin, esim. mikropisteisiin. Tämä tekee mahdolliseksi useiden eri analyyttien samanaikaisen määrittämisen käyttäen useita eri sieppausaineita sarjassa tukiaineen kohtia. Kun sieppausaineet immobilisoidaan mikropisteiksi, määrityksen herkkyyttä voidaan parantaa immobilisoimalla sieppausaine erittäin tiheään, mikä parantaa signaalin ja taustamelun välistä suhdetta (kts. esiemrkiä ratkaisematon patenttihakemus PCT/GB94/-02814). Olettaen näytetilavuuksien olevan luokkaa 0,1 - 1,0 ml mikropisteiden pinta-ala on edullisesti alle  $1 \text{ mm}^2$  ja sidonta-aineen lopullinen pinta-ala välillä 1000 - 100 000 molekyylä/ $\mu\text{m}^2$ .
- 10 Vaihtoehtoisesti annettua sieppausainetta voidaan immobilisoida tukiaineelle useisiin kohtiin niin, että sarja analyytin pitoisuusmittauksia voidaan tehdä samanaikaisesti.
- 15 Edullisesti analyytin haltuunsa ottama sidontakohtien jae todetaan käyttäen kehitysaineita kilpailevassa ja/tai ei-kilpailevassa menetelmässä edellä kuvatulla tavalla. Kehitysaineet kykenevät sitoutumaan sidonta-aineen haltuunotettuihin tai -ottamattomiin sidontakohtiin tai sidottuun analyyttiin ja ovat merkittäviä, jotta sidottu kehitysaine olisi mahdollista todeta. Kehitysaineet ovat edullisesti merkittäviä vasta-
- 20 aineita.
- Merkintäaineet voivat olla radioaktiivisia isotooppeja, entsyymejä, kemiluminoivia merkintäaineita tai fluoresoivia merkintäaineita. Fluoresoivien värimerkintäaineiden käyttö on erityisen edullista, koska fluoresoivat väriaineet voidaan valita aikaansaamaan asianmukaisen värialueen (viritys- ja emissioaallonpituus) fluoresenssia toteamista varten. Fluoresoivia väriaineita ovat kumariini, fluoreseiini, rodamiini ja Texas-punainen. Fluoresoivia väriainemolekyylejä, joilla on pitkät fluoresointijaksot, voidaan käyttää, mikä tekee mahdolliseksi käyttää aika-analysoitua fluoresenssia fluoresenssisignaalin voimakkuuden mittaamiseen sen jälkeen, kun taustafluoresenssi on sammunut. Lateksimikropalloja, jotka sisältävät fluoresoivia tai muita merkintäaineita tai joiden pinnalla niitä on, voidaan myös käyttää tässä yhteydessä. Merkintäaineista tulevat signaalit voidaan mitata käyttäen samapolttopisteistä laserpyyhkäisymikroskooppia.
- 25
- 30
- 35 Vaihtoehtoisesti muita erittäin spesifisen aktiivisuuden omaavia merkkiaineita, kuten kemiluminoivia merkkiaineita voidaan käyttää. Kemiluminoivien merkkiaineiden kyseessä ollen sidonta-aineen tai kehitysaineen merkitsemiseen käytetyistä



eri kemiluminoivista merkkiaineista saatavat signaalit voidaan todeta samanaikaisesti käyttäen esimerkiksi varauskytkettyä laitetta (CCD).

5 Sidonta-aine (tai osa siitä) voidaan sopivasti merkata esim. fluoroforilla. Patentissa EP 271 974 esitetyn menetelmän mukaisesti tämä tarkoittaa, että määrittämisen käyttäjän ei tarvitse tietää sidonta-aineen määrää tai tietää, että se on vakio. Tämä johtuu siitä, että sidonta-aineesta saatujen signaalien ja sen signaalin suhde, joka osoittaa analyytin haltuunsa ottamaa sidonta-aineen sidontakohtien jaetta, riippuu analyytin haltuunsa ottamasta sidonta-aineen kohtien jakeesta, mutta on riippumaton  
10 läsnä olevan sidonta-aineen kokonaismäärästä.

Vaihtoehtoisesti, jos määrittämisen käyttäjä tietää näytteen tilavuuden, suurempaa määrää sidonta-ainetta voidaan käyttää niin, että määrittäminen ei toimi ympäröivän analyytin olosuhteissa. Tämä tekee mahdolliseksi määrittää analyytin pitoisuus käyttäen  
15 yhtä merkkiainetta kehitysaineesta ja joko tietämällä, että sidonta-aineen määrä on vakio tai merkkimäärällä se toisella merkintäaineella niin, että määrä on tunnettu.

Tämän lähestymistavan muunnelmassa (kuvattu ratkaisemattomassa patenttihakemuksessa PCT/GB94/02813) voidaan käyttää kahta merkintäainetta, kehitysainetta,  
20 ensimmäistä, joka kykenee spesifisesti sitoutumaan sidonta-aineen haltuunottamattomiin sidontakohtiin, ja toista, joka kykenee sitoutumaan haltuunotettuihin sidontakohtiin tai sidottuun analyysiin. Näin ollen kummasta tahansa merkintäaineesta tuleva signaali edustaa analyytin haltuunsa ottamaa sidontakohtien jaetta, kun taas signaalien summa edustaa käytetyn sidonta-aineen kokonaismäärää.

25 Tällä menetelmällä voidaan myös välttää tarve tietää, että käytetään vakiomäärää sidonta-ainetta, koska muutokset imobilisoidun sidonta-aineen määrässä voidaan helposti korjata. Näissä olosuhteissa näytteen tilavuuden  $v$  on joko oltava tunnettu tai vakio. Tämä voidaan nähdä seuraavasta kaavasta, joka esittää kuinka kahdesta merkintäainesta saadut signaalit suhtautuvat näytteessä olevan analyytin pitoisuuteen.  
30

Annettakoon sen signaalin, jota se merkkiaine emittoi, jolla sidonta-aineen haltuunotettuihin sidontakohtiin suuntautunut kehitysaine on merkitty, olla merkitty symbolilla  $S_o$ ,  
35 ja sen signaalin, jota se merkkiaine emittoi, jolla sidonta-aineen haltuunottamattomiin sidontakohtiin suuntautunut kehitysaine on merkitty, olla merkitty symbolilla  $S_u$ .

ja annettakoon vakioiden, jotka suhteuttavat vastaavat signaalit haltuunotettuihin ja -ottamattomiin kohtiin, olla samassa järjestyksessä  $\epsilon_o$ ,  $\epsilon_u$  ja  $K$  = tehollinen tasapainovakio, joka kattaa analyytin ja sidonta-aineen välisen reaktion.

5

Tällöin jos analyytin pitoisuus näytteessä on annettu symbolilla  $Y$ ,

$$Y = (S_o/\epsilon_o)[\epsilon_u/(KS_u) + 1/v]$$

10

Olettaen että  $v$  on tunnettu, tämä yhtälö sisältää kaksi tuntematonta vakiota  $\epsilon_o$  ja  $\epsilon_u/K$ . Määrittämällä signaalit  $S_o$  ja  $S_u$  sarjalla tunnettuja analyyttipitoisuuksia nämä vakiot voidaan määrittää ja tuntemattomat analyyttipitoisuudet arvioida vastaavista  $S_o$ :n ja  $S_u$ :n määrittämisestä. Näin ollen määrittäminen ei tarvitse toimia ympäröivän analyytin olosuhteissa.

15

Ympäristön analyytin olosuhteissa termistä  $1/v$  tulee mitättömän pieni ja  $S_o/S_u$  on verrannollinen ympäröivän analyytin pitoisuuteen.

20 Ensimmäisessä väliesarjakohdassaan esillä oleva keksintö kohdistuu väliesarjaan, jolla määritetään yhden tai useampien analyyttien pitoisuudet nestemäisestä näytteestä edellä kuvatussa menetelmässä, joka väliesarja käsittää:

25 (a) kiinteää alusta-ainetta, johon on kiinnitetty lukuisiin kohtiin sieppausainetta, joka kykenee spesifisesti sitomaan sidonta-ainetta;

(b) yhtä tai useampia sidonta-aineita, joissa kussakin on analyytin spesifisiä sidontakohtia, ja häntäryhmä, joka on sovitettu sitomaan yhtä tai useampia sieppausaineita; ja

30

(c) yhtä tai useampia kehitysaineita, joissa on merkintäaineita, jotka kykenevät siotutumaan sidonta-aineen haltuunotettuihin sidontakohtiin tai analyyttiin, joka on sidottu sidonta-aineeseen, tai sidonta-aineen haltuunottamattomiin sidontakohtiin.

35 Toisessa väliesarjakohdassaan esillä oleva keksintö kohdistuu väliesarjaan, jolla räätälöidään määrittäystä yhden tai useampien analyyttien pitoisuuden määrittämiseksi, joka väliesarja käsittää:

(a) yhden tai useampia häntäryhmiä kunkin häntäryhmän ollessa tarkoitettu kiinnitettäväksi sidonta-aineeseen;

5 (b) kiinteän alusta-aineen, jonka lukuisiin kohtiin on kiinnitetty yhtä tai useampia sieppausaineita, jotka kykenevät sitoutumaan spesifisesti häntäryhmään;

jonka määrityksen käyttäjä kiinnittää häntäryhmät sidonta-aineisiin aikaansaaden siten sidonta-aineita, joita voidaan käyttää sen kiinteän alusta-aineen yhteydessä, johon sieppausaineet on kiinnitetty edellä kuvatussa menetelmässä.

#### 10 **Piirrosten kuvaus**

Esillä olevan keksinnön edullista toteutusmuotoa kuvataan nyt viitaten oheisiin kaavamaisiin piirroksiin, joissa:

15 Kuvio 1 esittää määritystä, jolla todetaan kaksi analyyttiä nestemäisestä näytteestä käyttäen kahta sieppausainelajia ja kahta sidonta-ainelajia, sieppausaineen ollessa immobilisoitu kahteen mikropisteeseen;

Kuvio 2 esittää kuvion 1 määritystä, jossa sieppausaine on sitoutunut sidonta-aineeseen;

20

Kuvio 3 esittää ei-kilpailevaa menetelmää sidonta-aineen haltuunoton määrittämiseksi käyttäen toista merkattua vasta-ainetta; ja

25 Kuvio 4 esittää käyrästä, johon signaali on piirretty TSH-pitoisuuden funktiona, jotka arvot on saatu jäljempänä olevasta kokeellisesta esimerkistä.

#### **Yksityiskohtainen kuvaus**

30 Kuviot 1 - 3 esittävät sidontamääritystä, jossa käytetään kahta sidonta-ainelajia 2 ja 4, joiden sidontakohdat ovat spesifisiä eri analyyyteille 6 ja 8. Kumpikin sidonta-aine 2 ja 4 sisältää vasta-ainetta 10 ja 14, jotka on varustettu oligonukleotidihäntäryhmällä 12 ja 16. Oligonukleotidihäntäryhmissä on erilaiset nukleotidisarjat, jotka sarjat täydentävät toista sieppausaineen 18 ja 20 sarjoista, jotka on immobilisoitu kiinteälle tukiaineelle 22 mikropisteiden muotoon. Tässä esimerkissä oligonukleotidit ovat 8 nukleotidin mittaisia.

35

Määrittäksessä näytteessä olevat kaksi analyyttiä 6 ja 8 saatetaan alttiiksi sidonta-aineille 2 ja 4 niin, että osa analyyyteistä 6 ja 8 sitoutuu vasta-

aineisiin 10 ja 14. Koska tämä reaktio tapahtuu nestefaasissa, vasta-aineiden 10 ja 14 ja analyyttien (antigeenien) 6 ja 8 välisen reaktion kinetiikka on optimoitu.

5 Samanaikaisesti tai peräkkäin alussa suoritettuna vasta-aine/analyyttireaktion kanssa nestemäinen näyte ja sidonta-aine saatetaan alttiiksi kiinteälle tukiaineelle 22, jonka pinnalle on immobilisoitu sieppausaineita 18 ja 20. Tämä tekee sidonta-aineiden 2 ja 4 nukleotidisarjoille 12 ja 16 mahdolliseksi sitoutua tukiaineelle 22 immobilisoidujen sieppausaineiden 18 ja 20 täydentäviin sarjoihin. Tätä esitetään kuviossa 2. Sieppausaineita 16 ja 18 käytetään kuitenkin yleensä ylimäärin, jotta varmistetaan, 10 että oleellisesti kaikki sidonta-aine 10 ja 14 sitoutuu tukiaineeseen 22. Niinpä kuvioissa 2 ja 3 yksi sieppausaineen 28 molekyyli jätetään haltuunottamatta.

Sidonta-aineiden 2 ja 4 sidontakohtien jae voidaan sitten määrittää käyttäen tavantomaista takaisintitraustekniikkaa. Niinpä kuviossa 3 merkattuja vasta-aineita 24 ja 15 26 käytetään ei-kilpailevassa tekniikassa merkitsemään haltuunotettujen sidonta-aineiden 2 ja 4 läsnäoloa samassa järjestyksessä. Koska vasta-aineet 24 ja 26 on merkattu merkintäaineilla (ei esitetty), sidonta-aineiden 2 ja 4 sidontakohtien jae voidaan tällöin määrittää. Tämä puolestaan tekee mahdolliseksi löytää analyyttien pitoisuus nestemäisessä näytteessä esim. vertaamalla tuloksiin, jotka on saatu käyttäen sarjaa liuoksia, joilla on tunnettu analyytin pitoisuus. 20

Kuvioissa 1 - 3 esitetty määrittäminen voidaan sovittaa minkä tahansa analyyttiparin pitoisuuden mittaamiseen käyttäen samaa kiinteää tukiainetta 22, jonka pinnalle on immobilisoitu sieppausaineet 18 ja 20. Tämä voidaan suorittaa aikaansaamalla 25 sidonta-aine, joka soveltuu sitomaan analyytin oligonukleotidihäntäryhmän 12 ja 16 avulla niin, että sidonta-aineet sitoutuvat spesifisesti toiseen mikropisteistä 18 ja 20. Näin ollen voidaan nähdä, että määrittäminen käyttäjä kykenee räätälöimään sidonta-aineensa käytettäväksi yhdessä mikropisteiden yleispätevän sarjan kanssa.

### 30 **Esimerkki**

#### **Reagenssit:**

- 1) Hiiren IgG (monoklonaalinen vasta-TSH), saatu laitokselta Scottish Antibody Production Unit (SAPU).
- 35 2) Kaniinin IgG, vuohen vasta-hiiri-IgG (koko molekyyli) ja vuohen vasta-kaniini-IgG (koko molekyyli) - vasta-aineet Sigma-yhtiöltä.

- 3) Sulfate Fluospheres, halkaisija 0,1  $\mu\text{m}$ , kelta/vihreää fluoresoivat (ex 490; em 515 nm) ja Sulfate Fluospheres, halkaisija 0,1  $\mu\text{m}$ , punaista fluoresoivat (ex 580; em 605 nm) Molecular Probes-yhtiöltä.
- 5 4) Oligonukleotidit Oswell DNA Service-yhtiöltä:
- a) CACACACACACACACA, jossa 5'-biotiinimodifiointi (poly -CA)
  - b) GTGTGTGTGTGTGTGTGT, jossa 5'-fosforotioaattimodifiointi (poly-GT)
  - c) GAGAGAGAGAGAGAGA, jossa 5'-biotiinimodifiointi (poly-GA)
  - d) CTCTCTCTCTCTCTCT, jossa 5'-fosforotioaattimodifiointi (poly-CT)
- 10 5) Sulfo-LC-SPDP {sulfosukkinimidyli-6-[3'-(2-pyridyyliditio)-propionamido]heksanoaatti} Pierce-yhtiöltä.
- 6) PD10-kolonnit ja Sephadex G200 Pharmacia-yhtiöltä.
- 15 7) RIA-laatua oleva naudan seerumialbumiini (BSA), Tween 20, natriumatsidi, dinatriumvetyortofosfaatti, kidevedetön, natriumdivetyortofosfaatti, EDTA ja Trizma Sigma-yhtiöltä.
- 20 8) Avidin DX Vector Laboratories-yhtiöltä.
- 9) Centricon-30 ja Centriprep-30-väkevöintilaitteet Amicon-yhtiöltä.
- 25 10) Kilpirauhasta kiihottava hormoni (TSH) yhtiöltä NIH USA:
- Vasta-hiiri IgG- ja vasta-kaniini IgG-vasta-aineiden adsorbointi Sulfate Fluospheres-valmisteeseen**
- 1) 0,5 ml:n osajae 2 %:sta (10 mg) 0,1  $\mu\text{m}$  kelta/vihreää Fluospheres-valmistetta lisättiin 2 mg:aan vuohen vasta-hiiri IgG-vasta-ainetta liuotettuna 0,5 ml:aan 0,1-M fosfaattipuskuria, pH 7,4. 0,5 ml:n osajae 2 %:sta (10 mg) 0,1  $\mu\text{m}$  punaista Fluospheres-valmistetta lisättiin 2 mg:aan vuohen vasta-kaniini IgG-vasta-ainetta liuotettuna 0,5 ml:aan 0,1-M fosfaattipuskuria, pH 7,4. Kumpaakin valmistetta ravisteltiin yli yön huoneenlämpötilassa.
- 30
- 35 2) Näitä kahta valmistetta sentrifugoitiin 10 min 8 °C:ssa MSE High-Spin 21-ultrasentrifugissa.

3) Jokainen rae dispergoitiin 2 ml:aan 1 %:sta BSA:a fosfaattipuskurissa, ravisteltiin 1 tunti huoneenlämpötilassa ja sentrifugoitiin kuten edellä.

5 4) Jokainen rae dispergoitiin 2 ml:aan 0,5 %:sta Tween 20:a fosfaattipuskurissa, ravisteltiin 30 min huoneenlämpötilassa ja sentrifugoitiin kuten edellä.

5) Jokainen rae dispergoitiin 2 ml:aan fosfaattipuskuria ja sentrifugoitiin kuten edellä.

10 6) Jokainen rae dispergoitiin 2 ml:aan fosfaattipuskuria ja sentrifugoitiin kuten edellä.

7) Jokainen rae dispergoitiin 2 ml:aan 1 %:sta BSA:a, joka sisälsi 0,1 % natriumatsidia ja säilytettiin 4 °C:ssa.

15

**Hiiren monoklonaalisen IgG:n ja kaniinin IgG:n konjugointi oligonukleotideihin**

1) 3 mg sulfo-LC-SPDP:a lisättiin 4,6 mg:aan hiiren vasta-TSH monoklonaalialta tai kaniinin IgG:a liuotettuna 1 ml:aan PBS/EDTA:a ja ravisteltiin 30 min huoneenlämpötilassa.

20

2) Aktivoidut vasta-aineet erotettiin reagoimatta jääneestä SPDP:sta PD10-kolonneilla. Näytteet eluoiitiin PBS/EDTA:lla ja 0,5 ml:n jakeet kerättiin talteen.

25

3) Ensimmäisestä piikistä saadut jakeet, jotka sisälsivät aktivoitua vasta-ainetta, kerättiin yhteen ja väkevöitiin Centricon 30-väkevöintilaitetta käyttäen noin 10 µl:ksi.

30

4) 100 nmol 5'-fosforotioaatilla modifioitua poly-GT-oligonukleotidia lisättiin 14,8 nmol:iin aktivoitua hiiren monoklonaalista IgG:a. 58,3 nmol 5'-fosforotioaatilla modifioitua poly-CT-oligonukleotidia lisättiin 8,7 nmol:iin aktivoitua kaniinin IgG:a. Molemmat valmisteet laimennettiin 1ml:ksi PBS/EDTA:lla ja niitä ravisteltiin yli yön huoneenlämpötilassa.

35

5) Oligonukleotidin konjugoidut hiiren ja kaniinin IgG-valmisteet erotettiin reagoimatta jääneistä oligonukleotideista Sephadex G200-kolonnilla (1,5 x 45 cm). Näytteet eluoiitiin PBS/EDTA:lla ja 2 ml:n jakeet kerättiin talteen.

6) Ensimmäisestä piikistä saadut jakeet, jotka sisälsivät oligonukleotidiin konjugoitua vasta-ainetta, kerättiin yhteen ja väkevöitiin käyttäen Centriprep-30-väkevöinti-laitetta, noin 500 µl:ksi ja niitä säilytettiin 4 °C:ssa.

**5 Tarkoituksena osoittaa, että oligonukleotidiin konjugoitujen vasta-aineiden seos risteytyisi ainoastaan täydentävän oligonukleotidin kanssa, joka on kerrostettu mikropisteinä kiinteälle faasille**

1) Dynatech-yhtiön mustia Microfluor-mikrotiitterisyvennyksiä pinnoitettiin 50 µl:lla Avidin-DA-valmistetta 0,1-M bikarbonaattipuskurissa, jonka pH oli 8,5 ja pitoisuus 5 µg/ml, 5 minuutin ajan huoneenlämpötilassa.

2) Kun Avidin-pinnoitetut mikrotriitterisyvennykset oli pesty 0,01-M fosfaattipuskurilla, ne suljettiin 200 µl:lla 1 %:sta BSA:a 1 tunnin käsittelyllä huoneenlämpötilassa ja pestiin jälleen samalla puskurilla ja kuivattiin.

3) 0,25 µl:n pisara kumpaakin kahdesta 5'-biotiinilla modifioidusta poly-CA- ja poly-GA-oligonukleotidista 0,1 %:sessa BSA.:sa ja väkevyydellä 0,025 nmol/ml kerrostettiin Avidin-pinnoitettujen mikrotriitterisyvennyksien vastakkaisille puolille ja niiden annettiin reagoida 30 min kosteassa atmosfäärissä. Pisarat imettiin sitten kuiviin ja mikrotriitterisyvennykset pestiin fosfaattipuskurilla.

4) 50 µl:n osajae Tris-HCl-määrityspuskuria, joka sisälsi 0,25 µg/ml kumpaakin poly-GT-konjugoidusta hiiren monoklonalisesta IgG:sta ja poly-CT-konjugoidusta kaniinin IgG:sta, lisättiin kaikkiin muihin, muttei tarkistuskonjugaatioon (50 µl määrityspuskuria, joka sisälsi konjugoimatonta hiiren ja kaniinin IgG:a, lisättiin sensijaan tarkistussyvennyksiin), ravisteltiin 1 tunti kosteassa atmosfäärissä ja pestiin fosfaattipuskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween 20-valmistetta.

5) 200 µl:n osajae Tris-HCl-määrityspuskuria, joka sisälsi 0,3 µg/ml vuohen vastakaniini IgG-vasta-aineeseen konjugoitua punaista Fluospheres-valmistetta, lisättiin kaikkiin mikrotriitterisyvennyksiin, ravisteltiin 1 tunti huoneenlämpötilassa, pestiin fosfaatti-Tween20-puskurilla ja skannattiin samapolttopisteisellä laserpyyhkäisy-mikroskoopilla, joka oli varustettu argon/krypton-laserilla.

35

**Tulokset**

Viritys: 488DF10

Emissio: 525DF35

5	<b>Näyte</b>	<b>Kelta/vihreä signaali</b>
	Tarkistus	13,3 ± 0,5
	Avidin---B-poly-CA---poly-GT- hiiri IgG mikropiste	100,9 ± 10,9
10		
	Avidin--B-poly-GA---poly-CT- kaniini IgG mikropiste	16,9 ± 0,3
	Viritys: 568DF10	
15	Emissio: 585EFLP	
	<b>Näyte</b>	<b>Punainen signaali</b>
	Tarkistus	22,0 ± 0,2
	Avidin--B-poly-CA---poly-GT- hiiri IgG mikropiste	24,0 ± 0,4
20		
	Avidin---B-poly-GA---poly-CT- kaniini IgG mikropiste	99,8 ± 2,7
25	<b>Johtopäätökset</b>	
	(1) Poly-GT oligonukleotidilla merkitty hiiren IgG risteytyi ainoastaan täydentävän biotiinikäsitellyn poly-CA-, muttei ei-täydentävän biotiini-käsitellyn poly-GA-oligonukleotidiamikropisteen kanssa, jotka oli kerrostettu samaan mikrotiitterisyvennykseen.	
30		
	(2) Poly-CT-oligonukleotidilla merkitty kaniinin IgG risteytyi ainoastaan täydentävän biotiinikäsitellyn poly-GA-, muttei ei-täydentävän biotiinikäsitellyn poly-CA-oligonukleotidimikropisteen kanssa, jotka oli kerrostettu samaan mikrotiitterisyvennykseen.	
35		



**Tarkoituksena osoittaa antigeenin sitoutuminen oligonukleotidilla merkittyihin vasta-ainemikropisteisiin**

- 1) Dynatech-yhtiön mustia Microfluor-mikrotiitterisyvennyksiä pinnoitettiin 50 µl:lla Avidin-DX-valmistetta 0,1-M bikarbonaattipuskurissa pH-arvolla 8,5 ja 5 µg/ml:n väkevyydellä, 5 min ajan huoneenlämpötilassa.
- 2) Kun Avidin-pinnoitetut mikrotiitterisyvennykset oli pesty 0,01-M fosfaattipuskurilla, ne suljettiin 200 µl:lla 1 %:sta BSA:a 1 tunnin käsittelyllä huoneenlämpötilassa ja pestiin jälleen samalla puskurilla ja kuivattiin.
- 3) 0,25 µl:n pisara 5'-biotiinilla modifioitua poly-CA-oligonukleotidia 0,1 %:ssa BSA:ssa ja 0,025 nmol/ml väkevyydellä kerrostettiin kuhunkin Avidin-pinnoitettuun mikrotiitterisyvennykseen ja annettiin reagoida 30 min kosteassa atmosfäärissä.
- 4) 50 µl:n osajae Tris-HCl-määrityspuskuria, joka sisälsi 0,25 µg/ml poly-GT-konjugoitua vasta-TSH hiiren monoklonaalista IgG:a, lisättiin mikrotiitterisyvennyksiin, ravisteltiin 1 tunti kosteassa atmosfäärissä ja pestiin fosfaattipuskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween 20-valmistetta.
- 5) 200 µl:n osajae TSH-standardeja Tris-HCl-määrityspuskurissa (0, 0,1, 0,3 ja 1,0 µU/ml) lisättiin kolmeen rinnakkaiseen syvennykseen ja termostoitettiin 1 tunti huoneenlämpötilassa ja pestiin fosfaatti-Tween 20-puskurilla.
- 6) 200 µl:n osajae 50 µg/ml sisältävää vasta-TSH:a kehittävään vasta-aineeseen konjugoitua kelta/vihreää sulfaatti-Fluospheres-valmistetta, lisättiin kaikkiin mikrotiitterisyvennyksiin, ravisteltiin 1 tunti huoneenlämpötilassa, pestiin fosfaatti-Tween-20-puskurilla ja skannattiin samapolttopisteisellä laserpyyhkäisymikroskoopilla, joka oli varustettu argon/krypton-laserilla.

**Tulokset ja johtopäätökset**

Poly-GT-oligonukleotidilla merkitty vasta-TSH hiiren monoklonaalinen IgG oli täysin toimiva, mitä osoittaa standardikäyrän onnistunut muodostuminen, kun sitä käytettiin sitovana vasta-aineena, joka oli kerrostettu kiinteään faasiin biotiinikäsitellyn täydentävän poly-CA-oligonukleotidin kautta, joka oli yhdistetty Avidin-pinnoitettuihin mikrotiitterisyvennyksiin (kts. kuvio 4).

### Patenttivaatimukset

1. Menetelmä useiden analyyttien pitoisuuden määrittämiseksi nestemäisestä näytteestä, jossa menetelmässä käytetään

5

kiinteää tukiainetta, jolle on immobilisoitu erillisiin kohtiin useita erilaisia sieppausaineita; ja

10 useita sidonta-aineita, kunkin sidonta-aineen sisältäessä sidontakohtia, jotka ovat spesifisiä annetulle analyyttille, ja häntäryhmän, joka on sovitettu sitomaan vastaavaa sieppausainetta;

**tunnettu** siitä, että:

15 (a) saatetaan nestemäinen näyte kosketukseen sidonta-aineiden kanssa niin, että analyytti ottaa haltuunsa osan kunkin sidonta-aineen sidontakohdista,

20 (b) saatetaan nestemäinen näyte joko samanaikaisesti tai peräkkäin vaiheen (a) kanssa kosketukseen immobilisoitujen sieppausaineiden kanssa niin, että sidonta-aineet sitoutuvat niitä vastaaviin sieppausaineisiin; ja

25 (c) määritetään arvo, joka edustaa analyytin haltuunsa ottamaa annetun sidonta-aineen sidontakohtien jaetta, millä toimenpiteellä määritetään analyytin pitoisuus nestemäisessä näytteessä,

25

jossa menetelmässä sieppausaineet ovat oligonukleotideja, joissa on sekvenssejä, jotka kykenevät hybridisoitumaan vastaavan sidonta-aineen häntäryhmässä olevan komplementtisekvenssin kanssa.

30 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää lisäksi vaiheen, jossa kiinnitetään häntäryhmät sidonta-aineisiin ennen niiden saattamista alttiiksi tukiaineelle immobilisoiduille sieppausaineille.

35 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että oligonukleotidit ovat 8 - 30 emäksen mittaisia.

4. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sidonta-aine on vasta-aine, jossa on analyyttille spesifisiä sidontakohtia.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sidonta-aine on oligonukleotidi, joka kykenee hybridisoitumaan nukleiinihappo-analyyttiin.
- 5
6. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään pientä määrää kutakin sidonta-ainetta niin, että sen analyytin ympäröivä pitoisuus, jolle sidonta-aine on spesifinen, ei häiriinny merkittävästi.
- 10
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että pieni määrä sidonta-ainetta on alle 0,1 V/K moolia, jossa V on näytteen tilavuus ja K on sidonta-aineeseen sitoutuvan analyytin tehollinen affiniteettikerroin.
8. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tun-**
- 15 **nettu** siitä, että kutakin sieppausainetta käytetään ylimäärin oleellisesti kaiken annetun sidonta-aineen sitomiseksi.
9. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tun-**
- 20 **nettu** siitä, että erilliset kohdat ovat mikropisteitä.
10. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnet-**
- tu** siitä, että annettu sieppausaine immobilisoidaan tukiaineelle lukuisiin kohtiin niin, että annetun analyytin pitoisuuden mittaussarja voidaan suorittaa samanaikaisesti.
- 25
11. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tun-**
- nettu** siitä, että arvo, joka edustaa analyytin haltuunsa ottamaa sidontakohtien jaetta, määritetään käyttäen kehitysaineita kilpailevassa ja/tai ei-kilpailevassa menetelmäs-
- sä, kehitysaineiden ollessa merkattu merkintäaineilla.
- 30
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että merkintäai-
- neet ovat fluoresoivia tai kemiluminoivia merkintäaineita.
13. Välinesarja, joka on tarkoitettu käytettäväksi useiden analyyttien pitoisuuksien
- määrittämiseen minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 12 mukaisessa menetelmässä,
- 35 **tunnettu** siitä, että välinesarja käsittää:

(a) kiinteän alusta-aineen, johon on kiinnitetty lukuisiin erillisiin kohtiin useita erilaisia sieppaus-aineita, joka kykenee sitomaan spesifisesti annettua sidonta-ainetta;

5 (b) useita sidonta-aineita, kunkin sidonta-aineen sisältäessä tietylle analyylille spesifisiä sidontakohtia ja häntäryhmän, joka on sovitettu sitomaan yhtä tai useampia sieppausaineita; ja

(c) yhden tai useampia kehitysaineita, joissa on merkintäaineita ja jotka kykenevät  
10 sitoutumaan haltuunotettuihin sidonta-aineen sidontakohtiin tai sidonta-aineeseen sitoutuneeseen analyyytiin tai haltuunottamattomiin sidonta-aineen sidontakohtiin;

jossa sieppausaineet ovat oligonukleotideja, joissa on sekvenssejä, jotka voivat hybridisoitua vastaavan sidonta-aineen häntäryhmässä olevan komplementtisekvenssin  
15 kanssa.

14. Välinesarja, joka on tarkoitettu sellaisen määrittelyn räätälöintiin, jolla määritetään yhden tai useampien analyyttien pitoisuus nestemäisestä näytteestä, **tunnettu** siitä, että välinesarja käsittää:

20

(a) useita häntäryhmiä, kunkin häntäryhmän ollessa tarkoitettu kiinnitettäväksi sidonta-aineeseen;

(b) kiinteän alusta-aineen, johon on kiinnittynyt lukuisiin erilaisiin kohtiin useita  
25 sieppausaineita, jotka kykenevät sitoutumaan spesifisesti häntäryhmään;

jossa sieppausaineet ovat oligonukleotideja, joissa on sekvenssejä, jotka voivat hybridisoitua vastaavan sidonta-aineen häntäryhmässä olevan komplementtisekvenssin kanssa, ja määrittelyn käyttäjä kiinnittää häntäryhmät sidonta-aineisiin, jolloin ai-  
30 kaansaadaan sidonta-aineita, joita voidaan käyttää kiinteän alusta-aineen yhteydessä, johon sieppausaineet on kiinnitetty minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 13 mukaisessa menetelmässä.

15. Menetelmä useiden erilaisten sidonta-aineiden immobilisoimiseksi erillisiin  
35 kohtiin tukiaineelle, kunkin sidonta-aineen sisältäessä sidontakohtia, jotka ovat spesifisiä annetulle analyylille, ja häntäryhmän, **tunnettu** siitä, että:

(a) immobilisoidaan useita sieppausaineita kiinteälle tukiaineelle erillisiin kohtiin, kunkin sieppausaineen kyetessä sitoutumaan annetun sidonta-aineen häntäryhmään;

(b) saatetaan sidonta-aineet kosketukseen tukiaineen kanssa, jolle useat  
5 sieppausaineet on immobilisoitu, niin että sidonta-aineet sitoutuvat spesifisesti vastaaviin sieppausaineisiin häntäryhmän välityksellä;

jolloin sieppausaineet ovat oligonukleotideja, joissa on sekvenssejä, jotka kykenevät hybridisoitumaan vastaavan sidonta-aineen häntäryhmässä olevan komplementtisekvenssin kanssa.  
10

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää lisäksi vaiheen, jossa kiinnitetään häntäryhmät sidonta-aineisiin ennen niiden immobilisoinnista tukiaineelle.  
15

17. Patenttivaatimuksen 15 tai 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sidonta-aine on vasta-aine, jolla on analyytille spesifisiä sidontakohtia.

18. Patenttivaatimuksen 15 tai 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että  
20 sidonta-aine on oligonukleotidi, joka kykenee hybridisoitumaan nukleinihappoanalyttiin.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 15-18 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että erilliset kohdat ovat mikropisteitä.  
25

### **Patentkrav**

1. Förfarande för att bestämma halten av flera analyter i ett flytande prov, varvid vid förfarandet används  
30

en solid bärare, på vilket flera olika fångstämnen har immobiliserats på flera separata punkter; och

flera bindemedel, varvid varje bindemedel innehåller bindeställen, vilka är specifika  
35 för den givna analyten, och en svansgrupp, som är inrättad att binda motsvarande fångstämne;

**kännetecknat** av att:

(a) det flytande provet förs i kontakt med bindmedlet så att analyten övertar en del av varje bindemedels bindeställen,

5

(b) det flytande provet förs antingen samtidigt eller successivt med skede (a) i beröring med de immobiliserade fångstämnena så att bindemedlen binds vid motsvarande fångstämnen; och

10 (c) ett värde definieras som representerar en av analyten övertagen fraktion av det givna bindemedlets bindeställen, med vilken åtgärd analytens halt definieras i det flytande provet,

15 varvid vid förfarandet fångstämnena är oligonukleotider med sekvenser, vilka förmår hybridiseras med en komplementsekvens i en svansgrupp av motsvarande bindemedel.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att förfarandet dessutom innefattar ett skede, i vilket man fäster svansgrupperna vid bindemedlen innan de  
20 utsätts för de på bäraren immobiliserade fångstämnena.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att oligonukleotiderna är 8-30 baser långa.

25 4. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att bindemedlet är en antikropp med för analyten specifika bindeställen.

5. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1-3, **kännetecknat** av att bindemedlet är en oligonukleotid, som förmår hybridiseras med en  
30 nukleinsyraanalyt.

6. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att man använder en liten mängd av varje bindemedel så att dess halt omkring analyten för vilken bindemedlet är specifikt inte störs nämnvärt.

35

7. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat** av att en liten mängd bindemedel är under  $0,1 V/K$  mol, varvid  $V$  är provets volym och  $K$  är den effektiva affinitetskoefficienten för analyten som binds vid bindemedlet.

8. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att varje fångstämne används i överskott för att väsentligt binda det givna bindemedlet i sin helhet.

5 9. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att de separata ställena är mikropunkter.

10 10. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att det givna fångstämnet immobiliseras på ett flertal ställen på bäraren så att en mätningsserie av halten av den givna analyten kan utföras samtidigt.

15 11. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att värdet som representerar en av analyten övertagen fraktion av bindställena definieras genom att använda ett genereringsmedel i ett kompetitivt och/eller ett icke-kompetitivt förfarande, varvid genereringsmedlen är märkta med markörämnen.

20 12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av att markörämnena är fluorescerande eller kemiluminescerande markörämnen.

25 13. Kit, vilket är avsett att användas för att definiera halten av flera analyter vid ett förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1-12, **kännetecknad** av att kittet innefattar:

(a) en solid bärare, vid vilket flera olika fångstämmen har fästs vid ett flertal separata ställen, och som specifikt förmår binda det givna bindemedlet;

(b) flera bindemedel, varvid varje bindemedel innehåller för en given analyt specifika bindeställen och en svansgrupp som är inrättad att binda ett eller flera fångstämmen; och

(c) ett eller flera genereringsämnen, vilka innefattar markörämnena och vilka förmår bindas vid övertagna bindeställen av bindemedlet eller vid en analyt som är bunden vid bindemedlet eller vid icke-övertagna bindeställen av bindemedlet;

35 varvid fångstämnena är oligonukleotider med sekvenser som kan hybridiseras med en komplementsekvens i motsvarande bindemedels svansgrupp.

14. Kit som är avsett att skräddarsys för en bestämning, med vilken man bestämmer halten av en eller fler analyter i ett flytande prov, **kännetecknad** av att kittet innefattar:

5 (a) flera svansgrupper, varvid varje svansgrupp är avsedd att fästas vid ett bindemedel;

(b) en solid bärare, på vilket flera fångstämmen har fästs på flera olika ställen, vilka förmår bindas specifikt vid en svansgrupp;

10

varvid fångstämnena är oligonukleotider med sekvenser som kan hybridiseras med en komplementsekvens i svansgruppen av motsvarande bindemedel, och den som utför bestämningen fäster svansgrupperna vid bindemedlen, varvid man åstadkommer bindemedel, vilka kan användas i samband med en solid bärare, vid 15 vilket fångstämnena är fästa vid förfarandet enligt något av patentkraven 1 - 13.

15. Förfarande för att immobilisera flera olika bindemedel vid separata ställen på en bärare, varvid varje bindemedel innehåller bindställen, vilka är specifika för en given analyt och en svansgrupp, **kännetecknat** av att:

20

(a) man immobiliserar flera fångstämmen vid olika punkter på en solid bärare, varvid varje fångstämne förmår bindas vid svansgruppen av det givna bindemedlet;

(b) bindemedlen sätts i kontakt med bäraren, på vilken flertalet fångstämmen har 25 immobiliserats, så att bindemedlen binds specifikt vid motsvarande fångstämmen via en svansgrupp;

varvid fångstämnena är oligonukleotider med sekvenser som förmår hybridiseras med en motsvarande komplementsekvens i motsvarande bindemedels svansgrupp.

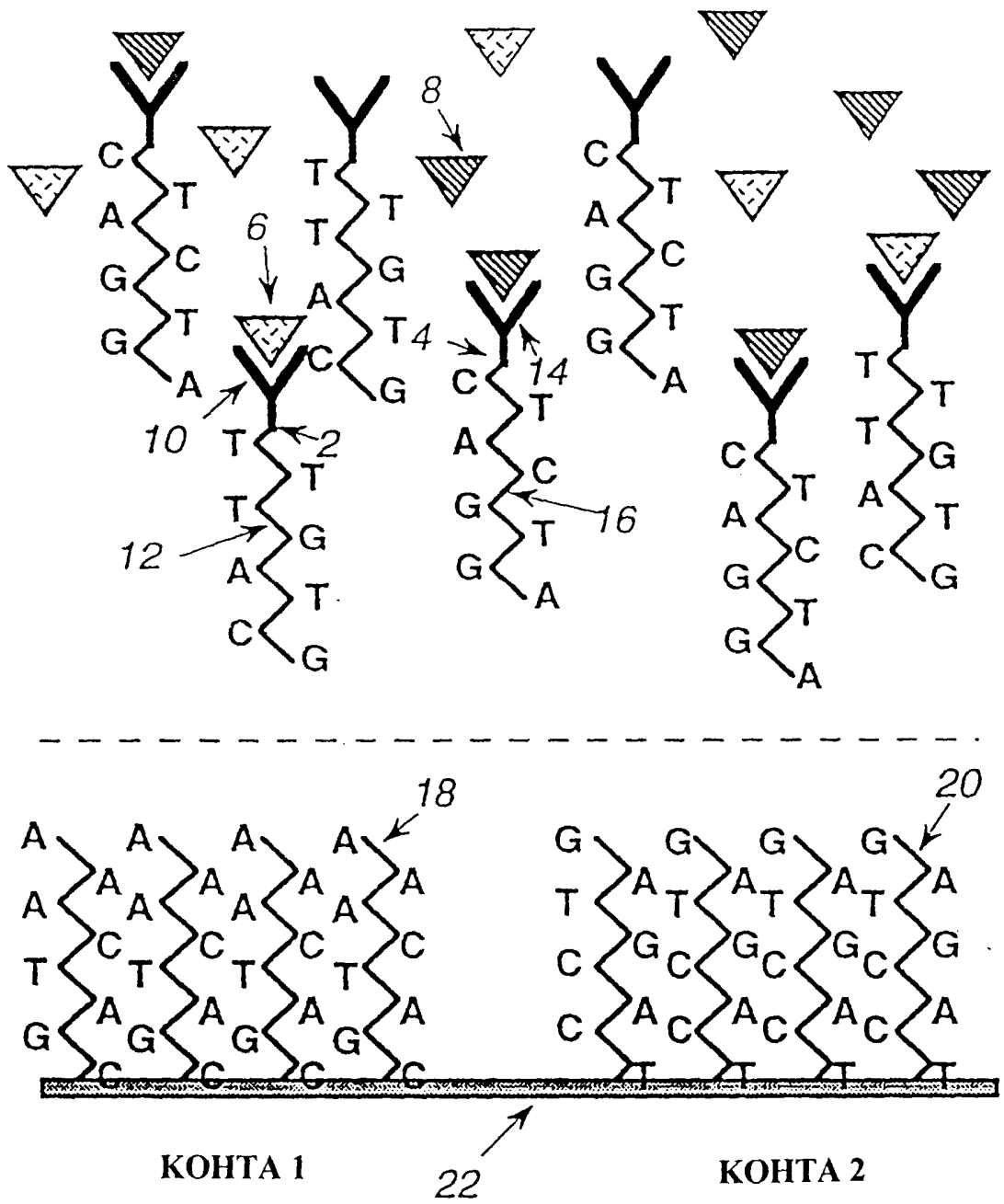
30

16. Förfarande enligt patentkrav 15, **kännetecknat** av att förfarandet dessutom innefattar ett skede, vid vilket man fäster svansgrupperna vid bindemedlen innan de immobiliseras på bäraren.

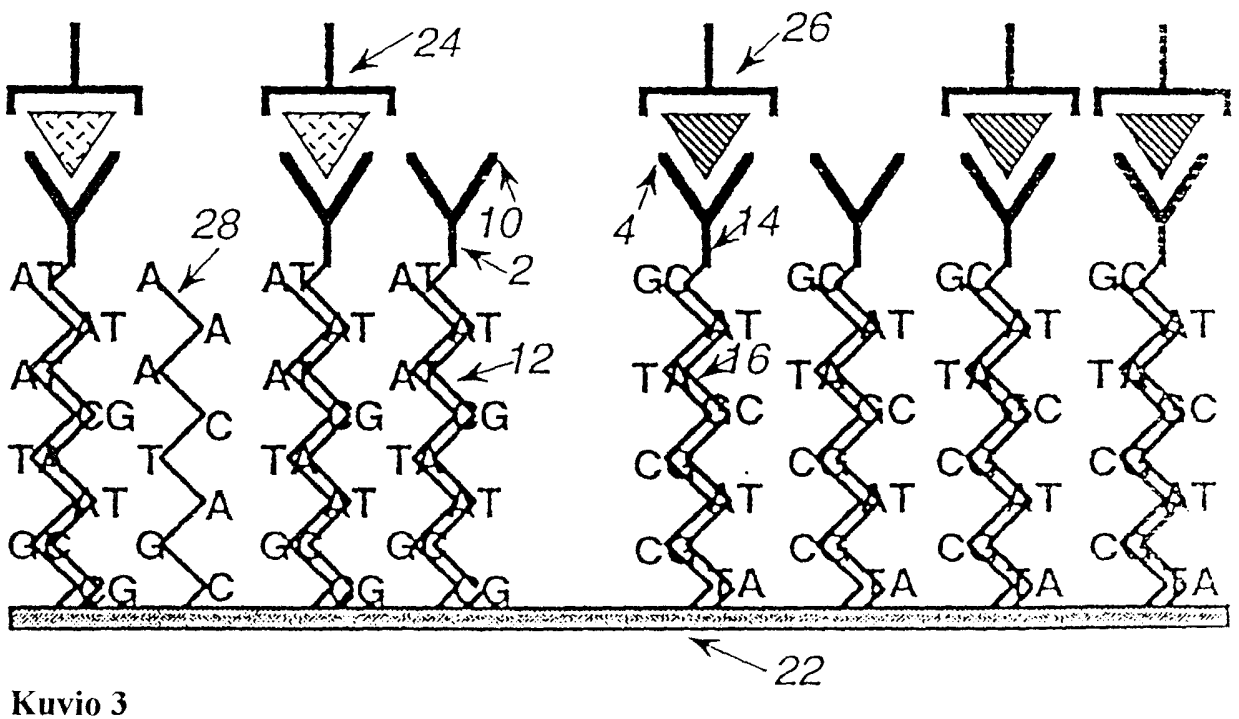
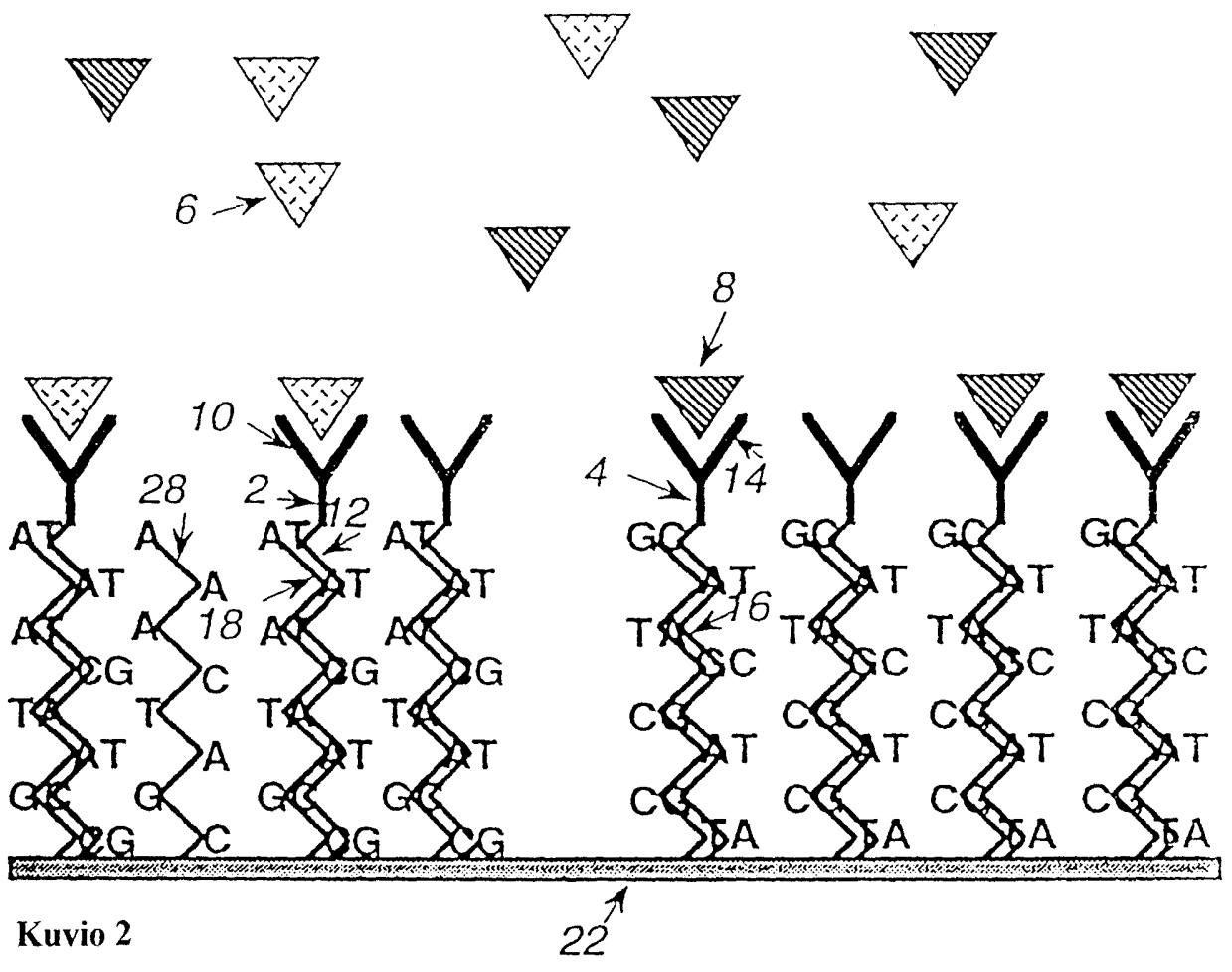
35 17. Förfarande enligt patentkrav 15 eller 16, **kännetecknat** av att bindemedlet är en antikropp, som har bindeställen som är specifika för en analyt.



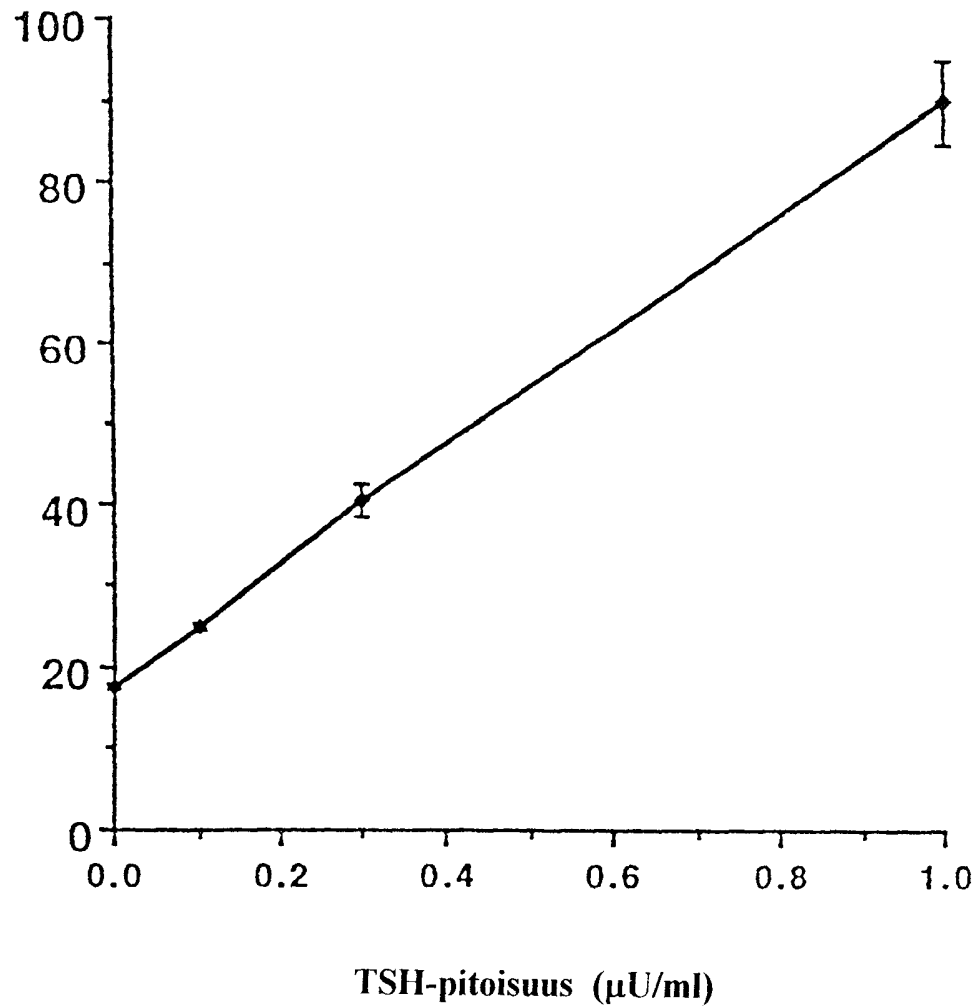
18. Förfarande enligt patentkrav 15 eller 16, **kännetecknat** av att bindemedlet är en oligonukleotid, som förmår hybridiseras med en nukleinsyraanalyt.
19. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 15-18, **kännetecknat** av att de separata ställena är mikropunkter.
- 5



Kuvio 1



**Mikrokohtamonikerros-TSH-määritys, jossa käytetään oligonukleotidilla merkattua anti-TSH-sieppausvasta-ainetta**



**Kuvio 4**