(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 883671 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 883671

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
G01N 33/53
G01N 33/52

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **05.08.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **05.08.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.02.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

06.08.1987 US 082106

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Becton, Dickinson and Company,** One Becton Drive, Franklin Lakes N.J. 07417-1880, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Lovell, Stephen James,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Bruton, Jeffery Hayden,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Menetelmä analyytin visuaaliseksi määrittämiseksi
Förfarande för visuell bestämning av en analyt

Menetelmä analyytin visuaaliseksi määrittämiseksi

Tämä keksintö koskee määritysmenetelmää ligandin (analyytin) määrittämiseksi ja sellaisessa määrityksessä käytettäviä tuotteita. Tarkemmin tämä keksintö liittyy kiinteän faasin määritysmenetelmään.

Kiinteän faasin määrityksessä on sinänsä tunnettua määrittää analyytti niin sanotulla kerrosmääritysmenetelmällä. Sellaisessa kerrosmääritysmenetelmässä on kiinteällä alustalla sitojaa määritettävälle ligandille (analyytille) ja määrityksessä muodostuu kompleksi sellaisen sitojan, analyytin ja merkkiaineen välille, merkkiaineen koostuessa analyytin sitojasta, joka on leimattu havaittavalla merkkiaineella.

FR-patentti 2 523 311, annettu Institute Pasteurille, kuvaa epäsuoraa kerrosmääritysmenetelmää, jossa määrityksessä syntyy kompleksi, joka sisältää sitojaa, analyyttiä, sitoutunutta yhdistettä, joka koostuu analyytin sitojasta ja albumiinista, sekä merkkiainetta, joka koostuu leimatusta antialbumiinista.

Tämä keksintö koskee parannettua epäsuoraa kerrosmääritysmenetelmää analyytin määrittämiseksi, joka käyttää merkkiainetta, joka sisältää hiukkasmaista merkkiainetta.

Tämän keksinnön erään aspektin mukaisesti tarjotaan määritysmenetelmä, jossa analyytti määritetään (kvalitatiivisesti ja/tai kvantitatiivisesti) epäsuoralla kerrosmääritysmenetelmällä, jossa määrityksessä muodostuu kompleksi, joka sisältää (i) kiinteällä alustalla olevaa analyytin sitojaa; (ii) analyyttiä; (iii) kaksoisyhdistettä, joka sisältää analyytille spesifistä sitojaa ja ligandin; sekä (iv) merkkiainetta, joka sisältää kaksoisyhdisteen ligandille spesifistä sitojaa leimattuna näkyvällä hiukkasmaisella leima-aineella. Ainakin kiinteän alustan sen osan, jolla sitoja on, pinta-ala (materiaalin

alan ja painon suhde) on sellainen, että sitoja voi olla testialueella sellaisena konsentraationa (painon suhde alaan), että merkkiaine on näkyvä määritysolosuhteissa. Termi "näkyvä" tarkoittaa tässä käytettynä, että merkkiaine voidaan nähdä ilman instrumentteja, siis paljaalla silmällä. Sellaista määritystä kutsutaan tässä "näkyväksi epäsuoraksi kerrosmääritysmenetelmäksi" tai "näkyväksi määritykseksi".

Testialue, jota käytetään näkyvässä määrityksessä on yleensä selluloosaesteriä ja nitroselluloosa tuottaa erityisen hyviä tuloksia. On ymmärrettävä, että termi "nitroselluloosa" tarkoittaa selluloosan typpihappoestereitä, joka voi olla pelkkä nitroselluloosa tai typpihapon ja muiden happojen esterisekoitus, ja erityisesti alifaattisten karboksyylihappojen, joissa on 1-7 hiiliatomia, etikkahapon ollessa edullinen. Sellaisia kiinteitä alustoja, jotka ovat muodostuneet selluloosasta, joka on esteröity pelkällä typpihapolla tai typpihapon ja toisen hapon kuten etikkahapon seoksella, kutsutaan usein nitroselluloosapaperiksi.

Vaikka nitroselluloosa on edullinen materiaali testialueella, on ymmärrettävä, että muita materiaaleja, joiden pinta-ala on riittävä pitämään sitojaa yllä kuvatun mukaisena konsentraationa, voidaan myös käyttää sellaisiin testialueisiin.

Yleensä näkyvässä määrityksessä käytetyn testialueen pinta-ala on sellainen, että se voi kantaa sitojaa vähintään konsentraationa 1 $\mu g/cm^2$, (yleisimmin vähintään konsentraationa 10 $\mu g/cm^2$) ja edullisesti vähintään 40 $\mu g/cm^2$.

Niinpä erään tämän keksinnön aspektin mukaan tarjotaan kerrosmääritysmenetelmä, jossa kerrokset ovat: alusta-sitoja-analyytti-kaksoisyhdiste-merkkiaine, jossa kaksoisyhdiste on muodostettu kahdesta ligandista, yhden ligandeista ollessa analyytin sitoja ja toisen ligandin sitoutuessa merkkiaineeseen.

Kaksoisyhdiste koostuu analyytin sitojasta, joka on yleensä vasta-aine analyyttiä vastaan (polyklonaalinen ja/tai monoklonaalinen) ja ligandista, jolle on sitoja.

Kaksoisyhdisteen ligandi voi olla mikä tahansa erilaisista ligandeista, joille on olemassa sitoja. Niinpä kaksoisyhdisteen ligandi voi olla esimerkiksi biotiini, dinitrofenoli, trinitrofenoli, fluoresiini-isotiosyanaatti, fluoresiini-isosyanaatti, peroksidaasi, alkalinen fosfataasi, albumiini, ferritiini jne. Kaksoisyhdisteen ligandiosa on yleensä hapteeni.

Kaksoisyhdiste voidaan muodostaa konjugoimalla analyytin sitoja sopivan ligandin kanssa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esim. käyttämällä sopivaa kytkentä- tai väliyhdistettä, jossa on kaksi reaktiivista funktionaalista ryhmää, joista yksi kytketään sitojan funktionaaliseen ryhmään ja toinen pystyy kytkeytymään kyseisen ligandin funktionaaliseen ryhmään. Joissakin tapauksissa voi olla mahdollista kytkeä tai konjugoida sitoja suoraan ligandiin kaksoisyhdisteen muodostamiseksi; esim. kytkemällä sitojan reaktiivinen funktionaalinen ryhmä sopivan ligandin reaktiiviseen funktionaaliseen ryhmään.

Merkkiaine koostuu kaksoisyhdisteen ligandin sitojasta ja on edullisesti vasta-aine (monoklonaalinen tai polyklonaalinen). Niinpä määrityksessä merkkiaine sitoutuu kaksoisyhdisteeseen; kaksoisyhdiste sitoutuu analyyttiin; ja analyytti sitoutuu kiinteällä alustalla olevaan sitojaan.

Tämän keksinnön toisen aspektin mukaisesti tarjotaan reagenssisarja, joka sisältää testisubstraatin kuten yllä on kuvattu, jossa on sitoja testisubstraatin testialueella; kaksoisyhdiste, kuten yllä on kuvattu; ja merkkiaine, kuten yllä on kuvattu, joka koostuu kaksoisyhdisteen sitojasta leimattuna näkyvällä hiukkasmaisella leima-aineella. Reagenssisarja voi sisältää myös standardeja (näytteitä, joissa on tietty analyyttikonsentraatio), puskureita, pesuliuoksia ja vastaavia. Reagenssit voivat olla sopivissa astioissa, kuten testimaljoissa.

Kuten yllä on mainittu, tuotettaessa merkkiainetta näkyvään määritykseen ligandin sitoja leimataan hiukkasmaisella leima-aineella, joka on näkyvää. Edullinen hiukkasmainen leima-aine on pussi, joka sisältää väriä tai muuta värillistä ainetta merkkinä, jolloin merkkiaine on määrityksessä käytettynä näkyvä ilman että pussi rikotaan väriaineen ulos päästämiseksi.

Pussi, jota käytetään ligandin leimaamiseksi merkkiaineen muodostamiseksi voi olla mikä tahansa monista erilaisista pusseista, mukaan lukien mm. liposomit (yksiseinäiset tai monikerroksiset), polymeerimikrokapselit (esimerkiksi ne, jotka on tehty koaskervaatiolla tai rajapintapolymeraatiolla), jne.

Polymeerimikrokapseleita tuotetaan myös sinänsä tunnetuilla menetelmillä, paitsi että liuos, jossa mikrokapselit tuotetaan sisältää myös merkkiaineen, jolloin polymeerimikrokapselin sisäpuolella on merkkiainetta. Sellaisten mikrokapselien valmistus kuvataan esimerkiksi julkaisussa Microencapsulation Processes and Applications, toimittanut Jan E. Vandegger (Plenum Press 1974).

Kuten tunnettua liposomeja voidaan valmistaa erilaisista lipideistä, mukaan lukien fosfolipidit, glykolipidit, steroidit, suhteellisen pitkäketjuiset alkyyliesterit; esim. alkyylifosfaatit, rasvahappoesterit, lesitiini, rasva-amiinit ja muut sellaiset. Voidaan käyttää rasva-aineiden seosta, kuten neutraalin steroidin, varatun amfifiilin ja fosfolipidin yhdistelmää. Valaisevina esimerkkeinä fosfolipideistä voidaan mainita lesitiini, sfingomyeliini, dipalmitoyyli, lesitiini ja muut vastaavat. Edustavina steroideina voidaan mainita kolesteroli, kolestanoli, lanesteroli ja vastaavat. Edustavina esimerkkeinä varatuista amfifiilisistä yhdisteistä, jotka yleensä sisältävät 12-30 hiiliatomia, voidaan mainita mono- ja dialkyylifosfaattiesteri tai alkyyliamiini; esim. disetyylifosfaatti, stearyyliamiini, heksadesyyliamiini, dilauryylifosfaatti ja vastaavat.

Liposomipussit valmistetaan vesiliuoksessa, joka sisältää merkkiainetta, jolloin pussit sisältävät merkkiainetta. Liposomipussit voidaan valmistaa voimakkaalla sekoituksella liuoksessa, mitä seuraa merkkiaineen poisto pussin ulkopuolelta.

Lisää yksityiskohtia liposomien valmistuksesta esitetään US-patentissa nro 4 342 826 ja PCT kansainvälisessä julkaisussa nro WO80/01515, joihin molempiin tässä viitataan.

Kuten yllä on kerrottu, pussissa oleva merkkiaine voi olla väriä tai muuta ainetta, joka on näkyvä ilman pussien lyysaamista.

Merkkiaine, joka koostuu ligandin sitojasta ja näkyvästä hiukkasmaisesta leima-aineesta voidaan valmistaa myös leimaamalla sitoja hydrofobisen värin tai pigmentin vesidispersiolla tai sellaisella värillä päällystetyllä polymeeriytimellä. Sellaisia leima-aineita kuvataan lähemmin US-patentissa nro 4 373 932, annettu 15.2.1983. Sellaisen patentin mukaisesti valmistettuja merkkiaineita voidaan myös käyttää merkkiaineina tässä keksinnössä.

Kuten edellä mainitussa patentissa on mainittu, leimana käytetyt värilliset orgaaniset yhdisteet ovat hydrofobisen soolin muodossa ja nämä hydrofobiset orgaaniset värit tai pigmentit ovat veteen liukenemattomia tai hyvin vähän liukoisia. Kuten patentissa on mainittu, hydrofobisen värin tai pigmentin tai sellaisella värillä tai pigmentillä päällystettyjen polymeeriytimien partikkelien koko on vähintään 5 nm ja edullisesti 10-500 nm.

Sellaiset merkkiaineet, jotka on leimattu hydrofobisella värillä tai pigmentillä tai sellaisella värillä päällystetyllä polymeeriytimellä, ovat näkyviä merkkiaineita käytettäessä tämän keksinnön mukaisessa määritysmenetelmässä.

Näkyvä hiukkasmainen leima-aine voi olla näkyviä polymeeripartikkeleita, kuten värjättyjä polystyreenipartikkeleita, edullisesti muodoltaan pyöreitä.

Edustavina esimerkkeinä muista näkyvistä hiukkasmaisista leima-aineista, joita voidaan käyttää valmistettaessa merkkiainetta käytettäväksi tämän keksinnön mukaisessa määrityksessä, jossa merkkiaine olisi näkyvä, voidaan mainita: ferritiini, fykoerytriinit tai muut fykobiliproteiinit; saostuneet tai liukenemattomat metallit tai metalliseokset; sieni-, levä- tai bakteeripigmentit tai johdannaiset, kuten bakteeriklorofyllit; kasvimateriaalit tai johdannaiset ja muut vastaavat.

Kaksoisyhdisteen ligandin sitoja voi olla leimattu hiukkasmaisella leima-aineella, jolloin muodostuu merkkiaine käytettäväksi keksinnössä, sinänsä tunnetuilla menetelmillä, käytetyn menetelmän ollessa riippuvainen käytetystä sitojasta ja hiukkasmaisesta leima-aineesta. Sellaisia menetelmiä ovat mm. kovalenttikytkentä, derivointi tai aktivointi ja muut vastaavat. Tuotettaessa merkkiainetta, jossa sitoja on leimattu pussilla, pussi voidaan tuottaa komponentista, joka on derivoitu sitojalla, jolloin pussi tuotettaessa herkistyy sitojalla. Toisessa menetelmässä merkkiainetta sisältävä pussi voidaan muodostaa ensin, mitä seuraa pussin herkistäminen sitojalla sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Niinpä merkkiaine koostuu kaksoisyhdisteen ligandin sitojasta ja hiukkasmaisesta leima-aineesta (kiinteästä tai kiinteän tapaisesta, vastakohtana ei-kiinteille leima-aineille kuten radioisotoopeille, entsyymeille ja erilaisille fluoresoiville aineille), ja hiukkasmainen leima-aine tuottaa merkkiaineen,joka on näkyvä määritysolosuhteissa niin, että analyytin läsnäolo ja/tai määrä voidaan määrittää ilman enempää käsittelyä ja käyttämättä laitteita; esim. käyttäen liposomia, joka sisältää väriä hiukkasmaisena leima-aineena.

Tämän keksinnön erityisen aspektin mukaan analyytin sitoja, joka on testisubstraatin testialueella, on edullisesti sellaisen testialueen määrätyllä alueella, kuten esimerkiksi läiskän muodossa, sen sijaan, että se

olisi levitettynä testisubstraatin koko alueelle. Kuten yllä on mainittu, edullisen toteutustavan mukaan testialueella olevaa analyytin sitojaa on edullisesti vähintään yksi mikrogramma cm^2 kohden, yleisimmin vähintään 10 mikrogrammaa cm^2 kohden, ja edullisesti 40 mikrogrammaa cm^2 kohden. Koko testisubstraatin testialueen sidontakapasiteetti voi olla täytetty tai se voidaan estää käsittelemällä testialue yhden- tai useammanlaisella proteiinilla,jotka eivät spesifisesti sido määrityksessä käytettyjä materiaaleja. Niinpä esimerkiksi jäämäsidontakapasiteetti voidaan poistaa käyttämällä naudan seerumin albumiinia.

Joissakin tapauksissa levitettäessä analyytin sitojaa (erityisesti vasta-ainetta) testialueelle, vasta-aineliuokseen lisätään polyhydroksiyhdistettä (glyserolia, erytritolia, sorbitolia jne.) tai sokeria (glukoosia, sakkaroosia jne.), estämään ei-spesifistä sitoutumista (vääriä positiivisia) määrityksen aikana.

Edullisen toteutustavan mukaisesti testisubstraatti sisältää testikerroksen, jossa on testialue analyytin sitomiseksi konsentraationa, jolla määrityksessä käytetty analyytin sitoja sitoutuneena testialueelle on määritysolosuhteissa näkyvä testialueella ilman enempää käsittelyä, ja siinä on myös virtausta säätelevä kerros testialueen alla, joka on muodostettu huokoisesta materiaalista, jonka huokoskoko on sellainen, että se säätää määritysreagenssien virtausta testisubstraatin läpi, kun sellaisia reagensseja lisätään ensimmäiseen kerrokseen. Testisubstraatti sisältää myös edullisesti huokoisen erotinkerroksen erottamaan absorboivasta aineesta muodostetun absorboivan kerroksen virtauksensäätökerroksesta.

Absorboivan kerroksen absorbointikyky on riittävä absorboimaan testikerrokseen määrityksen aikana lisätyt reagenssinesteet. Lisäksi absorboiva aine aikaansaa virtausta testisubstraatin läpi.

On ymmärrettävää, että koko testikerros voi muodostua testialueen materiaalista tai vaihtoehtoisesti vain testikerroksen testialue voi muodostua sellaisesta materiaalista.

Lisäksi, koska testisubstraattia käytetään siten, että määritysreagenssit virtaavat testisubstraatin kerrosten läpi, testialueen huokoskoko on sellainen, että se on suurempi kuin määrityksessä käytetyn hiukkasmaisen leima-aineen koko, niin että merkkiaineen osat, jotka eivät sitoudu määritysolosuhteissa virtaavat testisubstraattiin eivätkä ole näkyvissä testialueella. Yleisesti testialueen huokoskoon pitäisi olla vähintään 3 µm ja edullisimmin vähintään 5 µm. Yleensä huokoskoko ei ylitä 12 µm. On kuitenkin ymmärrettävä, että vaikka edellä kuvatut huokoskoot ovat edullisia, muitakin huokoskokoja voidaan käyttää, riippuen määrityksessä käytetyistä materiaaleista.

Testisubstraatin virtausta säätelevä kerros muodostuu huokoisesta materiaalista, jota käytetään säätelemään määritysreagenssien virtausta testialueen läpi testisubstraattiin. Virtauksensäätökerrosta muodostettaessa käytetyn huokoisen materiaalin huokoskoko on pienempi kuin testialuetta muodostettaessa käytetyn materiaalin huokoskoko. Niinpä käytännössä virtauksensäätökerros vähentää määritysreagenssien virtausta huokoisemman testialueen läpi.

Yleensä virtauksensäätökerroksen, joka kontrolloi määritysreagenssien virtausta testialueen läpi testisubstraattiin, huokoskoko on vähintään 0,5 mikronia, ja yleensä sen huokoskoko ei ylitä 10 mikronia.

Virtauksensäätökerroksen huokoskoko samoin kuin virtauksensäätökerroksen paksuus säädetään edullisesti sellaiseksi, että määritysreagenssien virtaus testialueen läpi tuottaa halutun herkkyyden sekä nopean ja tarkan määrityksen.

Toiselle kerrokselle valittu huokoskoko ja vastaava virtausnopeus riippuu odotetusta analyyttikonsentraatiosta. Kun odotettu analyyttikonsentraatio nousee, huokoskoko ja virtausnopeus voivat kasvaa. Tosiasiassa joillekin analyyteille joiden konsentraatio voi olla suuri, substraatin toinen kerros voidaan jättää pois.

Yhden toteutustavan mukaisesti kerros joka kontrolloi virtausnopeutta testisubstraatin läpi, on mitoitettu niin, että aineiden virtausnopeus testialueen läpi on luokkaa vähintään 0,5 ml/min ja yleensä ei enempää kuin 2 ml/min. On kuitenkin ymmärrettävä, että tämän keksinnön ala ei rajoitu sellaisiin virtausnopeuksiin.

Virtauksensäätökerros muodostuu edullisesti kuiduttomasta aineesta ja siinä on edullisesti huokosia tai käytäviä, jotka aikaansaavat yksisuuntaisen virtauksen testikerroksesta kerrokseen, joka on virtauksensäätökerroksen alla; toisin sanoen virtauksensäätökerroksessa on määrättyjä virtauskäytäviä, jotka ohjaavat virtausta kerroksen läpi ja minimoi virtausta kerroksen poikkisuuntaan. Huokoset tai käytävät ovat edullisesti saman kokoisia. Virtauksensäätökerros muodostetaan edullisesti polykarbonaatista.

Heti testisubstraatin virtauksensäätökerroksen alla on välikerros huokoisesta materiaalista,joka toimii erottimena virtauksensäätökerroksen ja huokoisen imukerroksen välillä. Välikerros toimii ensisijaisesti estäen aineita, jotka ovat läpäisseet testisubstraatin yläkerrokset testisubstraatin imukerrokseen, palaamasta takaisin yläkerroksiin. Tämän aikaansaamiseksi huokoinen kerros, joka toimii erottimena on paksuudeltaan riittävä estämään imukerrokseen tulleita aineita virtaamasta takaisin yläkerroksiin määritysolosuhteissa. Lisäksi huokoisen välikerroksen huokoskoko on suurempi kuin virtauksensäätökerroksen huokoskoko niin, että välikerros ei rajoita virtausta testisubstraatin läpi.

On kuitenkin ymmärrettävä, että joissakin tapauksissa on mahdollista eliminoida välikerros, edellyttäen, että substraatin muiden kerrosten, eli testialueen, virtauksensäätökerroksen ja imukerroksen, ominaisuudet ovat sellaiset, että aineen takaisinvirtauksen riski imukerroksesta on lähes täysin eliminoitu. On kuitenkin ymmärrettävä, että välikerroksen käyttö on edullista. Tapauksessa, jossa virtauksensäätökerrosta ei käytetä, välikerros erottaa testialueen imukerroksesta.

Testisubstraatti sisältää myös imukerroksen (neljännen kerroksen), joka on huokoista materiaalia, jonka imukyky riittää absorboimaan nestemäiset testireagenssit tai materiaalit, jotka virtaavat testisubstraattiin määrityksen aikana. Imukerros aikaansaa myös jännityksen (konsentraatioeron), joka saa testialueelle pannut reagenssit virtaamaan substraattiin; eli imukerrokseen.

Niinpä tämän keksinnön mukaisesti tarjotaan määritysmenetelmä, jossa käytetään merkkiainetta, jossa merkkiaineen leimaosa on näkyvä hiukkasmainen leima-aine ja jossa määritys suoritetaan testisubstraatilla, joka edullisesti muodostuu useista materiaalikerroksista, joilla on eri ominaisuudet kuten yllä on kuvattu ja jossa määritysreagenssit virtaavat testisubstraatin testialueen läpi.

Substraatin eri kerrosten valmistuksessa käytetyt materiaalit valitaan siten, että niillä on yllä kuvatut ominaisuudet. Lisäksi nämä materiaalit eivät saa aiheuttaa analyytin tai merkkiaineen ei-spesifistä sitoutumista. Materiaaleilla voi sinänsä olla sellaiset ominaisuudet tai vaihtoehtoisesti materiaalit voidaan käsitellä ei-spesifisen sitoutumisen ehkäisemiseksi; esimerkiksi käsittely sopivalla proteiinilla, kuten naudan seerumin albumiinilla. Substraatin testialue on edullista käsitellä myös kostutusaineella määritysreagenssien kunnollisen virtauksen varmistamiseksi testialueen läpi ja testisubstraattiin. Edustavina esimerkkeinä kostutusaineista

voidaan mainita: sakkaroosi, glyseroli, glukoosi, sorbitoli jne. Testialue voidaan samanaikaisesti käsitellä proteiinilla ja kostutusaineella; esim. BSA:n ja sakkaroosin vesiliuoksella.

Yleisesti testisubstraatti on sopivalla alustalla, kuten kortilla tai astiassa. Sopivan testisubstraatin tuen valinnan katsotaan olevan alaa taitavien päätettävissä näiden oppien mukaisesti.

Lisäksi testisubstraattiin yleensä lisätään peiteaine, joka johtaa määritysreagenssit testialueelle, jossa sitoja on. Niinpä substraatti voi esimerkiksi olla peitetty kortilla, jossa on aukko, joka on sen testialueen osan kohdalla, jossa sitoja on, jolloin eri testireagenssit saatetaan suoraan siihen testialueen osaan, jossa sitoja on. Vaihtoehtoisesti testisubstraatti voi olla säiliössä, jossa on sopiva aukko määritysreagenssien johtamiseksi substraatin testialueelle.

Tätä keksintöä kuvataan edelleen sen toteutuksen avulla, joka on kuvattu oheisessa piirroksessa, jossa:

Piirros on kaavamainen kuvio tämän keksinnön edullisesta toteutustavasta.

On kuitenkin ymmärrettävä, että tämän keksinnön piiriä ei ole tarkoitus rajoittaa sillä.

Viitaten piirrokseen, siinä kuvataan testisubstraatti, jota yleisesti merkitään 10:llä, joka koostuu ensimmäisestä kerroksesta, jota yleisesti merkitään 11:llä, jossa on testialue sitojan pitämiseksi konsentraationa, jossa merkkiaine, jossa leima-aine on hiukkasmainen näkyvä leima-aine, on sitoutuneena näkyvä määritysolosuhteissa. Edullinen materiaali on nitroselluloosa, jonka huokoskoko on yli 2 mikronia ja yleensä alle 12 mikronia.

Heti kerroksen 11 alla ja kontaktissa sen kanssa on toinen kerros 12, joka kontrolloi materiaalin virtausta testisubstraatin läpi. Toisen kerroksen 12 huokoskoko on pienempi kuin kerroksen 11 huokoskoko ja sen ominaisuudet ovat yllä kuvatun mukaiset. Kerros on edullisesti muodostettu polykarbanaatista.

Heti kerroksen 12 alla ja kontaktissa sen kanssa on kerros 13, joka toimii välikerroksena kuten yllä on kuvattu.

Kerros 13 on muodostunut huokoisesta aineesta ja sen huokoskoko on yleensä suurempi kuin kerroksen 12 huokoskoko. Kerros 13 voi olla muodostettu esimerkiksi eikehrätystä polyasetaatista. Heti kerroksen 13 alla ja kontaktissa sen kanssa on kerros 14, joka on muodostettu absorboivasta aineesta kuten yllä on kuvattu. Kerros 14 on edullisesti muodostettu selluloosamateriaalista, esim. absorboivasta selluloosapaperista.

Niinpä testisubstraatti koostuu kerroksista 11, 12, 13 ja 14, jotka on yhdistetty tuottamaan yhdistetty substraatti 10. Kerrokset voi olla kiinnitetty toisiinsa esimerkiksi ompelemalla kerrokset toisiinsa; muutkin kiinnitystavat ovat kuitenkin mahdollisia.

Kuten erityisesti on esitetty, testisubstraatti 10 on testiastiassa, jossa on pohjaosa 15 ja kansiosa 16. Pohjaosan 15 syvyys on sellainen, että substraatti 10 on astiassa. Edullisessa toteutustavassa astiassa on kolme sivua yleensä kolmiomaisessa pyöreäkulmaisessa muodossa.

Kansi 16, joka on kerroksen 11, substraatin 10 ja testialueen 18 päällä, sisältää kohotetun osan, jossa on sopiva aukko 17, joka on sen kerroksen 11 osan kohdalla, joka sisältää sitojan ja sellaista testialueen osaa yleisesti kuvataan 18:lla.

Kansi 16 on kerroksen 11 päällä hammasmaisilla ulokkeilla 19, jotka nousevat ylös pohjaosasta 15. Ulokkeiden 19 korkeus on riittävä sallimaan ilmaraot 20, jotka sallivat substraatin 10 sivujen tuuletuksen. Ilmaraot 20 rajoittuvat ulokkeisiin 19, kanteen 16 ja pohjaosaan 15.

Aukkoa 17 ympäröivässä kannen 16 koholla olevassa osassa on värillinen alue 21, jonka väri eroaa kannen 16 väristä ja väristä, joka syntyy testialueella 18, testitulosten luvun helpottamiseksi, jotka yleensä määritetään

värin perusteella. Edullisessa toteutustavassa pohjaosa 15, kansi 16 ja värillinen alue 21 on tehty muovimateriaaleista.

Niinpä, kuten kuviossa on esitetty, kerroksessa 11 oleva sitoja on vain osalla koko alueesta 11 ja kansi 16 mukaan lukien aukko 17 toimivat ohjaten määrityksessä käytettyjä materiaaleja kontaktiin sitojan 18 kanssa, minkä jälkeen nämä materiaalit virtaavat testisubstraatin läpi imukerrokseen 14 virraten peräkkäin läpi kerrosten 11, 12 ja 13.

Esimerkiksi käytettäessä testisubstraattia 10 kerrosmääritysmenetelmään, sitoja voi olla määritettävälle analyytille spesifinen vasta-aine. Jos kerrosmääritystä aiotaan käyttää sekvenssimuodossa, näyte joka sisältää tai jonka epäillään sisältävän analyyttiä pannaan substraattiin kannessa 16 olevan aukon 17 kautta, jolloin näyte joutuu kontaktiin sitojan kanssa alueella 18, näytteen virratessa substraatin läpi imukerrokseen 14. Näytteessä oleva analyytti sitoutuu spesifisesti sitojaan alueella 18.

Kaksoisyhdiste, joka koostuu analyytin sitojasta ja ligandista, johon määrityksessä käytetyn merkkiaineen sitoja sitoutuu, pannaan testisubstraattiin ja se sitoutuu sitoutuneeseen analyyttiin.

Sen jälkeen testisubstraattiin pannaan merkkiainetta kannessa 16 olevan aukon 17 kautta, sellaisen merkkiaineen koostuessa sitojasta, joka sitoutuu kaksoisyhdisteen ligandiin ja joka on leimattu näkyvällä hiukkasmaisella leima-aineella. Merkkiaine sitoutuu kaksoisyhdisteeseen ja mahdollinen sitoutumaton osa virtaa testisubstraatin läpi imukerrokseen 14.

Jos halutaan, voidaan testisubstraattiin 10 lisätä pesuliuosta ennen merkkiaineen lisäämistä.

Samoin voidaan merkkiaineen lisäämisen jälkeen lisätä testisubstraattiin pesuliuosta pesemään merkkiaine, joka ei ole spesifisesti sitoutunut kompleksiin alueella 18, imukerrokseen 14.

Aukko 17 voidaan haluttaessa varustaa lisäosalla, joka sisältää suodattimen testialueelle lisättävien määritysmateriaalien suodattamiseksi.

Värin muodostuminen alueelle 18 osoittaa analyytin läsnäoloa ja jos määrityksen on tarkoitus olla kvantitatiivinen, sellaisen värin määrä osoittaa näytteessä olevan analyytin määrän.

Vaikka edullisessa toteutustavassa määritys suoritetaan "läpivirtaus" muodossa, jossa merkkiaine on sopivan substraatin pinnalla ja näytteen, kaksoisyhdisteen ja merkkiaineen annetaan virrata substraatin läpi, on mahdollista käyttää muita määritysmuotoja, esim. koskettaa pinnalla olevaa sitojaa ilman, että reagenssit virtaavat substraatin läpi, kuten testikortissa, tai kromatografista tai kapillaarista virtausta testisubstraatin pinnalla, jne.

Samoin, vaikka on edullista käyttää yllä kuvatun mukaista testisubstraattia käytettäessä läpivirtausmääritystä, on mahdollista käyttää muitakin rakenteita; esim. testisubstraatin ja absorboivan materiaalin yhdistelmää ilman virtauksensäätö- ja välikerroksia.

Epäsuora kerrosmääritys voidaan suorittaa eri tavoin.

Esimerkiksi analyytti ja kaksoisyhdiste voidaan saattaa yhteen ja syntyvä seos saattaa yhteen sitojan kanssa. Lisävaihtoehtona voidaan yhdistää merkkiaine, kaksoisyhdiste ja näyte, ja yhdistää syntyvä seos sitojan kanssa.

Lisävaihtoehtona tämän keksinnön hengen ja alan puitteissa on mahdollista käyttää epäsuoraa kerrosmääritysmenetelmää muussa määritysmuodossa kuin näkyvässä määrityksessä, jolloin merkkiaine koostuu kaksoisyhdisteen ligandin sitojasta ja liposomista, joka sisältää havaittavan merkin. Siten havaittava merkkiaine voi olla esimerkiksi entsyymi, radioaktiivinen materiaali, kromogeeni (fluoresoiva ja/tai absorboiva väri) jne.

Sellaisessa muunnelmassa sitojan kiinteä alusta voi olla putki, hiukkasmainen alusta, levy, membraani, suodatin jne. Määritys voidaan suorittaa läpivirtausmenetelmällä (määritysreagenssit virtaavat sitojaa sisältävän alustan läpi) tai se voi olla "kerta"tyyppinen määritys; esim. inkubaatio putkessa, maljalla jne. Analyytti voidaan määrittää määrittämällä merkkiaine sitoutuneessa muodossa (kompleksi) ja/tai sitoutumattomassa muodossa.

Yllä mainittujen ja muiden muunnelmien pitäisi olla selviä alaa taitaville.

Tätä keksintöä kuvataan edelleen seuraavien esimerkkien avulla; ne eivät kuitenkaan rajoita keksinnön alaa:

Esimerkki 1

A. Vasta-aineen (lysiini) aminoryhmien biotinylaatio

Tämä menetelmä käyttää N-hydroksisukkinimidibiotiinia (NHS-biotiinia), jota on kaupallisesti saatavilla (esim. Sigma Chemical Company). Biotinylaatiomenetelmä on seuraavanlainen:

(i) NHS-biotiinia (4 mg/ml dimetyylisulfoksidissa) lisätään tipoittain sekoittaen vasta-aineliuokseen (1 mg/ml 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,2) suhteessa 1:20 (v/v. Seoksen annettiin seistä 4 tuntia huoneen lämmössä.

(ii) 4 tunnin jälkeen lisätään 0,1 tilavuutta 1 M glysiinietyyliesteriä (pH 7,5) ja liuos dialysoidaan täysin 0,1 M $NaHCO_3$ vastaan kiinnittymättömän biotiinin poistamiseksi.

B. Vasta-aineen hiilihydraattifraktion biotinylaatio

(i) Vasta-aine dialysoidaan 10 mM Na-fosfaattipuskuria pH 7,4, joka sisältää 0,15 M NaCl vasten. Dialyysin jälkeen vasta-ainekonsentraatio säädetään arvoon 1 mg/ml ja pH säädetään arvoon 5,5 lisäämällä 1 M asetaattipuskuria pH 4,5.

(ii) Natriumperiodaattia (100 mM 20 mM natrium-asetaattia/0,15 M NaCl pH 5,5) lisätään vasta-aineliuokseen, jolloin saadaan lopulliseksi konsentraatioksi 10 mM. Hapettumisen annetaan jatkua 15-30 min huoneen lämmössä, minkä jälkeen reaktio sammutetaan lisäämällä etyleeniglykolia (arvoon 0,1 M).

(iii) Vasta-aineliuos johdetaan läpi G-25 kolonnin, joka on tasapainotettu 20 mM asetaatilla/0,15 M NaCl pH 5,5. Vasta-ainetta sisältävät fraktiot yhdistetään.

(iv) Biotiinihydratsidia (noin 5 mg/ml DMSO:ssa) lisätään yhdistettyyn vasta-aineeseen niin, että biotiinihydratsidin lopullinen konsentraatio on 0,25 mg/ml. Vasta-ainekonsentraatio on tässä vaiheessa 0,3-0,5 mg/ml. Seoksen annetaan seistä 24 tuntia 4°C:ssa ja se dialysoidaan sitten 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,3 vasten sitoutumattoman biotiinihydratsidin poistamiseksi.

Esimerkki 2

Määritysjärjestely N. gonorrhoeae varten on seuraavanlainen:

vaihe (i) Monoklonaalista vasta-ainetta N. gonorrhoeae vasten (MAb 148,1) tiputetaan 5 µm nitroselluloosalle - 3 µl tiputetaan konsentraatiolla 500 ug/ml. Membraanin annetaan kuivua 15 min huoneen lämmössä.

vaihe (ii) Membraani blokataan inkuboimalla 0,5 % (w/v) vähärasvaista kuivamaitoa sisältävässä PBS:ssä 60 min 37°C:ssa.

vaihe (iii) Blokattu membraani pestään PBS:llä ylimääräisen blokkausliuoksen poistamiseksi ja sen annetaan kuivua huoneen lämmössä.

vaihe (iv) Membraani pannaan imupaperille.

vaihe (v) N. gonorrhoeae antigeenia johdetaan membraanin läpi. Osa antigeenistä tarttuu MAb 148,1 -läiskiin. Enintään 1 ml antigeenia 1 % BSA/1 % oktyyli-beta-D-glukopyranosidia/30 % vuohen seerumia/0,2 % kuivamaitoa/PBS (pH 7,4) voidaan johtaa membraanin läpi.

vaihe (vi) Biotinyloitua esimerkin 1 mukaisesti valmistettua kanin anti-N. gonorrhoeae -vasta-ainetta (100 ul) konsentraatiossa 10 µl/ml) johdetaan membraanin läpi. Tämä vasta-aine tunnistaa antigeenin joka on tarttunut MAb 148.1:een. Biotinyloitu kanin vasta-aine laimennetaan samalla puskurilla jota käytettiin vaiheessa (v).

vaihe (vii) Liuos, joka sisältää vuohen anti-biotiini vasta-aineilla päällystettyjä liposomeja johdetaan membraanin läpi (käytetään 100 µl liposomeja. Nämä liposomit, jotka sisältävät sulforodamiinia sitoutuvat biotinyloituun vasta-aineeseen ja tuottavat signaalin (punaisen värin).

vaihe (viii) PBS (200 µl) johdetaan membraanin läpi tarttumattomien liposomien pois pesemiseksi. Värin intensiteetti lisääntyy antigeenikonsentraation lisääntyessä.

Tätä keksintöä voidaan käyttää menetelmiin ja tuotteisiin hyvin erilaisten analyyttien määrittämiseksi. Edustavina esimerkkeinä analyyttilajeista voidaan mainita: lääkkeet, mukaan lukien terapeuttiset lääkkeet ja väärinkäytetyt huumeet; hormonit, vitamiinit, proteiinit, mukaan lukien kaikki vasta-aineet; peptidit; steroidit; bakteerit; sienet; virukset; loiset; bakteerien, sienten, virusten tai loisten tuotteet; kaikenlaiset allergeenit; normaalien tai pahanlaatuisten solujen osat tai tuotteet; jne. Erityisinä esimerkkeinä voidaan mainita T_4; T_3; digoksiini; hcG; insuliini; teofylliini; luteinisoiva hormoni; erilaisia tautitiloja aiheuttavat tai niihin liittyvät organismit, kuten streptococcus pyogenes (ryhmä A), Herpes Simplex I ja II, sytomegalovirus, rubella, klamydiat, Candida albicans, Neisseria gonorrhoeae, Hemophilus influenzae, ryhmä B Strep, S. pneumoniae, Neisseria meningitidis, Clostridium difficile, organismeille spesifiset vasta-aineet, esim. Rubella-spesifinen vasta-aine HTLV III (HIV), jne.

Analyytti voidaan määrittää erilaisista näytteistä kuten esimerkiksi ruumiinnesteistä kuten syljestä, virtsasta, seerumista, jne., pyyhkäisynäytteistä esim. kurkusta. Joissakin tapauksissa voi olla mahdollista havaita analyytti kokoverestä.

Tämä keksintö on erityisen edullinen koska määrityksen herkkyys paranee käyttämällä sekä kaksoisyhdistettä että merkkiainetta analyytin havaitsemiseen. Lisäksi on mahdollista käyttää yhtä merkkiainetta eri analyyttien määrityksiin.

Näiden ja muiden etujen pitäisi selvitä alaa taitaville näistä opeista.

Monet tämän keksinnön muunnokset ja muunnelmat ovat mahdollisia yllä olevan valossa ja siksi keksintöä voidaan käyttää liitteenä olevien patenttivaatimusten puitteissa toisin kuin erityisesti on kuvattu.

Patenttivaatimukset

1. Reagenssisarja analyytin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää:

alustalla olevaa analyytin sitojaa, mainitun sitojan ollessa kiinteän alustan testialueella; kaksoisyhdistettä, joka koostuu analyytin sitojasta ja ligandista; ja merkkiainetta, joka koostuu kaksoisyhdisteen ligandin sitojasta leimattuna näkyvällä hiukkasmaisella leima-aineella, mainitun alustan testialueen ollessa valmistettu materiaalista, jossa on pinta-ala, joka kantaa alustalla olevan sitojan ja alustalla olevan sitojan ollessa konsentraationa, jossa merkkiaine on näkyvä alustalla määritysolosuhteissa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen reagenssisarja, t u n n e t t u siitä, että kiinteässä alustassa on ensimmäinen, toinen, kolmas ja neljäs kerros toistensa päällä, mainitun ensimmäisen kerroksen sisältäessä testialueen, jolla alustalla oleva sitoja on, mainitun toisen kerroksen ollessa huokoista materiaalia, jonka huokoskoko on pienempi kuin ensimmäisen kerroksen huokoskoko, kontrolloimaan määritysreagenssien virtausta kiinteän alustan läpi, kolmannen kerroksen ollessa huokoinen välikerros, mainitun neljännen kerroksen ollessa absorboivaa materiaalia, jonka imukyky on riittävä absorboimaan testisubstraatille pannut nesteet ja aikaansaamaan virtauksen substraatin läpi, jolloin analyytin määritysmenetelmä on läpivirtausmääritys.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että hiukkasmainen leima-aine on havaittavaa merkkiainetta sisältävä liposomi.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että testialue on muodostettu nitroselluloosasta.

5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että kaksoisyhdisteen sitoja on vasta-aine ja merkkiaineen sitoja on vasta-aine.

6. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3, 4 tai 5 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että kaksoisyhdisteen ligandi on biotiini.

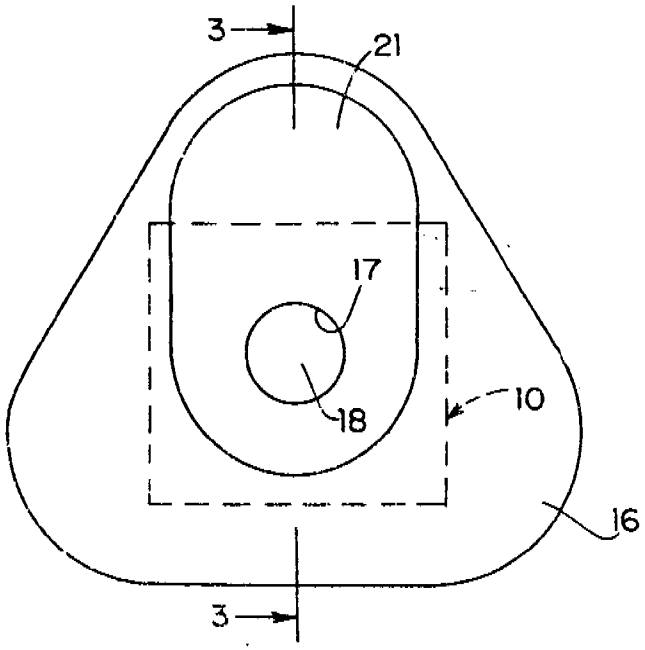
7. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3, 4 tai 5 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että alustalla oleva sitoja on kiinteällä alustalla vähintään konsentraationa 1 $\mu g/cm^2$.

8. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3, 4, 5, 6 tai 7 mukainen sarja, t u n n e t t u siitä, että toinen kerros ei-kuituista materiaalia, joka aikaansaa yksisuuntaisen virtauksen.

9. Menetelmä analyytin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että siinä:

käyttäen patenttivaatimusten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 tai 8 mukaista sarjaa muodostetaan kompleksi, jossa on (i) alustalla oleva sitoja; (ii) analyytti; (iii) kaksoisyhdiste; ja (iv) merkkiaine, ja määritetään analyytti määrittämällä merkkiaineen näkyvyys testialueella.

FIG. 1



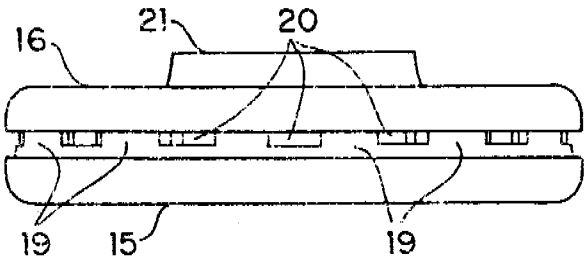
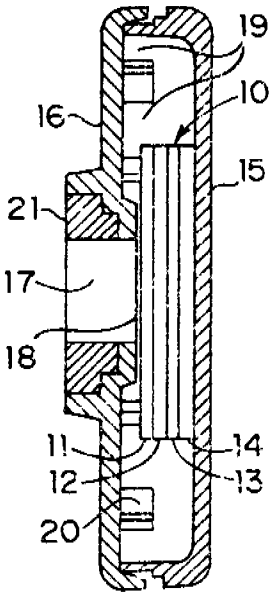


FIG. 2

FIG. 3



PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU
883671	G01N 33/53	RKK	EP | US

TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US	TUTK. KESK. *)
G01N 33/53	X X X X	
33/52 33/54	X X X X	
33/543	X X X X	

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
1) FR 2523311 A	G01N 33/68	
2) WO 85/05457 A	G01N 33/50	
3) EP 154749 A	G01N 33/548	
4) EP 196880 A	G01N 33/543	
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA, HAKUSANAT YM.)

HELSINKI 28.10.72

PÄIVÄYS

ALLEKIRJOITUS