(12) **PATENT**

(19) NO (11) **302595** (13) B1

NORGE

(51) Int Cl[6] G 01 N 21/75, 33/543

Patentstyret

| | | | |
|---|---|---|---|
| (21) Søknadsnr | 890673 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 17.06.88, PCT/GB88/00471 |
| (22) Inng. dag | 17.02.89 | (85) Videreføringsdag | 17.02.89 |
| (24) Løpedag | 17.06.88 | (30) Prioritet | 20.06.87, GB, 8714503 |
| (41) Alm. tilgj. | 17.04.89 | | |
| (45) Meddelt dato | 23.03.98 | | |

(73) Patenthaver Applied Research Systems ARS Holding NV, John B. Gorsiraweg 6, Curaçao, AN

(72) Oppfinner Craig George Sawyers, St. Neots, Cambridgeshire, England, GB

(74) Fullmektig Arild Friberg, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte og apparat for deteksjon av en ligand**

(56) Anførte publikasjoner WO 86/07149

OPTICS LETTERS, Vol. 10, Nr.4, April 1984, New York, K. Tiefenthaler og W. Lukosz,"Integrated optical..., side 137-139

(57) Sammendrag

Oppfinnelsen vedrører teknikker for kvalitativ og/eller kvantitativ deteksjon av kjemiske, biokjemiske eller biologiske bestanddeler i en prøve, samt sensorer egnet for bruk i slike teknikker. Den angår spesielt en fremgangsmåte for søking etter en ligand i en prøve, omfattende a) inkubering av prøven i kontakt med overflaten til en optisk struktur, hvilken optiske struktur omfatter et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en annen brytningsindeks N2, idet overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus av resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og idet det på overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere, b) bestråling av den optiske struktur ved en vinkel eller innen et vinkelområde til normalen, c) analysering av den reflekterte, overførte og/eller forplantede stråling for å bestemme om, og om ønsket i hvilken grad og/eller hastighet egenskapene til de ledede bølgemodi i den optiske strukturen blir endret ved dannelse av et kompleks mellom liganden og den spesifikke bindingsdeltager.

Foreliggende oppfinnelse vedrører undersøkelsesteknikker for kvalitativ og/eller kvantitativ deteksjon av kjemiske, biokjemiske eller biologiske bestanddeler i en prøve, og angår nærmere bestemt en fremgangsmåte for deteksjon av en ligand i en prøve, samt et apparat til bruk ved en slik fremgangsmåte.

De prøveteknikker som foreliggende oppfinnelse vedrører, er basert på affiniteten mellom de bestanddeler som skal prøves (heretter kalt ligand) og et spesielt bindingsmateriale for liganden (heretter kalt spesiell eller spesifikk bindings-deltager) som er påført en spesiell type overflate.

Fra K. Tiefenthaler og W. Lukosz, Optics Letters 10, 137 (1984) er kjent retningsomkoplings-effekter i planare, optiske bølgeledere med overflategittere. Omkoplingen bevirkes ved adsorpsjon eller desorpsjon av vann eller andre adsorbater på bølgelederens overflate, gjennom en forandring i effektiv brytningsindeks for de ledede modi under gitteret, idet de ledede modi blir eksitert ved hjelp av en monokromatisk lyskilde, nemlig en laserstråle. Allment tilgjengelig internasjonal patentsøkad WO86/07149 beskriver en anvendelse av denne teknikken for selektiv deteksjon av spesifikke stoffer i gassformede, flytende, faste eller porøse prøver.

De internasjonale patentpublikasjoner WO84/02578 og WO86/01901 beskriver prøveteknikker som omfatter (a) belegging av minst en del av en overflate (som har en forut bestemt relieff-profil) på et substrat med en tynn film av en spesiell bindings-deltaker, idet nevnte del av overflaten er optisk aktiv med hensyn til stråling over et bølgelengdebånd, og (b) føring av den belagte overflate i kontakt med en prøve og observering av de optiske egenskapene til nevnte del av overflaten for å bestemme en kvalitativ og/eller kvantitativ endring i optiske egenskaper som et resultat av ligandens binding på den tynne filmen av den spesielle bindingsdeltager på overflaten.

Som beskrevet i WO84/02578 og WO86/01901, har den forut bestemte relieffprofil vanligvis form av et optisk gitter som kan være et enkelt gitter eller to eller flere kryssede gittere hvis ribber for eksempel kan ha kvadratisk, sinus-

formet eller trekantet tverrsnittform, og i den følgende beskrivelse er referanser til et gitter ment å omfatte alle slike gittere.

I publikasjonen WO84/02578 blir endringen i gitterets optiske egenskaper som et resultat av bindingen til den liganden som skal prøves (slik som et spesielt antigen i blodserum) frembrakt hovedsakelig som et resultat av (1) massen eller mengden av den bundne ligand og (2) dens dielektriske egenskaper.

I publikasjonen WO86/01901 blir bindingstilfellene overvåket ved hjelp av endringer i de fluorescerende egenskapene til en fargemerket bindingsdeltager festet til sensoroverflaten.

Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en alternativ fremgangsmåte for prøving eller undersøkelse som involverer en mer følsom sensortype.

I sitt bredeste aspekt tilveiebringer derfor oppfinnelsen en fremgangsmåte for deteksjon av en ligand i en prøve, hvor prøven inkuberes i kontakt med overflaten til en optisk struktur, hvilken optiske struktur omfatter et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en andre brytningsindeks N2, der overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus med resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og der det til overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte, en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere. Fremgangsmåten kjennetegnes ved at den optiske struktur bestråles med polykromatisk lys ved en fast vinkel til normalen, og det reflekterte og/eller gjennomgående lyset analyseres for å bestemme om, og om ønsket, i hvilken utstrekning og/eller med hvilken hastighet absorpsjonen av noen lys-bølgelengder som resultat av resonans for ledede bølger, endres ved dannelse av et kompleks mellom liganden og den spesifikke bindingsdeltager.

Man vil forstå at for å forplante en ledet bølgemodus i overflatelaget, må N2 være større enn N1. Det blir imidlertid spesielt foretrukket at brytningsindeksene N1 og N2 er omtrent

like (men ikke helt identiske) og at begge er omkring 1,5.

Den optiske struktur er fortrinnsvis et diffraksjonsgitter med et substrat av klar plast, for eksempel polykarbonat, eller glass og et overflatelag med enhver egnet brytningsindeks. Det er fordelaktig å benytte en optisk struktur ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen der overflatelaget er mindre enn 700 nm tykt.

Overflatelaget med brytningsindeks N2 kan omfatte et tynt materiallag. Når substratet til den optiske struktur er av plast, kan eksempelvis det tynne materiallaget på denne være av glass eller silisiumoksyd, og når substratet er av glass, for eksempel fosfatglass, kan det tynne materiallaget være av silisiumoksyd eller spinnbelagt polymer, for eksempel polystyren. Imidlertid foretrekkes det spesielt at substratet til den optiske strukturen er av glass og at overflatelaget med brytningsindeks N2 omfatter overflaten av substratet impregnert med metallioner, for eksempel sølv- og/eller blyioner. En fremgangsmåte for dannelse av et overflatelag med brytningsindeks N2 på en optisk struktur som definert her, omfatter eksponering av den optiske strukturens overflate for sølvnitrat og/eller blynitrat.

I samsvar med et andre aspekt av oppfinnelsen er det frembrakt et apparat til bruk ved deteksjon av en ligand i en prøve i henhold til det bredeste aspekt nevnt ovenfor, og apparatet kjennetegnes ved at det omfatter en sensor som har et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en andre brytningsindeks N2, hvor overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus med resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og der det til overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte, en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere, en spektraldetektor, og en kilde for polykromatisk lys.

Oppfinnelsen er spesielt nyttig til deteksjon av antistoffer eller antigener [i hvilket tilfelle den spesielle bindingsdeltager kan være henholdsvis et antigen eller et antistoff (monoklonalt eller polyklonalt)], men andre ligander

kan detekteres ved bruk av andre, spesielle bindingsdeltagere, som diskutert nedenfor. Oppfinnelsen er imidlertid ikke begrenset til anvendelse av biosensorer, og kan involvere kjemiske sensorer, som for eksempel kjemiske gass-detektorer hvor spesifikk adsorpsjon på eller absorpsjon i overflatelaget kan inntreffe.

Oppfinnelsen vil spesielt bli beskrevet i det følgende under henvisning til et antistoff eller et antigen som den spesielle bindingsdeltager eller ligand. Oppfinnelsen er imidlertid ikke begrenset til fremgangsmåter for antistoff- eller antigen-prøver, men omfatter prøver som kan brukes til å detektere enhver kjemisk, biokjemisk eller biologisk bestanddel i en prøve. Eksempler på egnede bindingsdeltagere som kan immobiliseres på en optisk struktur ifølge oppfinnelsen og ligander som kan undersøkes ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, er gitt i tabell 1 nedenfor.

Tabell I

| Ligand bindingsdeltager | Spesifikk antigen spesifikt antistoff |
|---|---|
| antistoff | antigen |
| hormon | hormon-reseptor |
| hormon-reseptor | hormon |
| polynukleotid-tråd | komplementær polynukleotid-tråd |
| avidin | biotin |
| biotin | avidin |
| protein A | immunoglobulin |
| immunoglobulin | protein A |
| enzym | enzym-cofaktor (substrat) eller inhibitor |
| enzym-cofaktor (substrat) eller inhibitor | enzym |
| lektiner | spesifikt karbohydrat |
| spesifikt lektin-karbohydrat | lektiner |

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har en meget bred anvendelse, men den kan spesielt brukes til å detektere: hormoner innbefattet peptidhormoner, (for eksempel tyroidstimulerende hormon (TSH), luteiniserende hormon (LH), menneskelig korionisk gonadotrofin (hCG), follikkelstimulerende hormon (FSH) insulin og prolaktin) og ikke-peptid hormoner (for eksempel steroid-hormoner slik som kortisol, estradiol, progesteron og testosteron, eller tyroidhormoner slik som tyroksin (T4) og trijod-tyronin), proteiner (for eksempel karsino-embryonisk antigen (CEA) og alfafetoprotein (AFP)), narkotika (for eksempel digoksin) sukker, toksiner, vitaminer, virus, bakterier eller mikroorganismer.

Man vil forstå at uttrykket "antistoff" som brukt her, er ment å omfatte

a) enhver av de forskjellige klasser eller underklasser av immunoglobulin for eksempel IgG, IgA, IgM eller IgE, utledet fra noen av de vanlig brukte dyr, for eksempel sau, kanin, geit eller mus,
b) monoklonale antistoffer,
c) intakte molekyler eller "fragmenter" av antistoffer, monoklonale eller polyklonale, idet fragmentene er de som inneholder antistoffets bindingsområde, d.v.s. fragmenter som mangler Fc-delen (for eksempel Fab, Fab', $F(ab')_2$), eller de såkalte "halvmolekyl"-fragmenter som oppnås ved reduserende spalting av disulfid-bindinger som forbinder de tunge kjedekomponenter i det intakte antistoff.

Fremgangsmåten til preparering av fragmenter av antistoffer er velkjent på området og vil ikke bli beskrevet her.

Uttrykket "antigen" som brukt her, er ment å innbefatte både permanent antigeniske typer (for eksempel proteiner, bakterier, bakteriefragmenter, celler, cellefragmenter og virus) og haptener som kan gjøres antigeniske under passende forhold.

Oppfinnelsen vil bli beskrevet mer detaljert under henvisning til en foretrukket utførelsesform hvor den optiske struktur er et diffraksjonsgitter. Man vil imidlertid forstå

at andre optiske strukturer slik som for eksempel optiske bølgeledere, optiske fibere og belagte prismer med passende utforming kan være innbefattet innenfor oppfinnelsens ramme.

Oppfinnelsens virkning, når man observerer systemets nullte ordens diffraksjons-effektivitet, beror på den skarpe resonans-anomali som skyldes eksitasjon av ledede bølger i det trelags dielektriske arrangement som er dannet mellom den optiske struktur som beskrevet her slik som et belagt diffraksjonsgitter, og prøven i kontakt med den optiske strukturens overflatelag. Selv om man teoretisk ikke skulle vente å kunne observere denne resonansen, vil det i praksis vanligvis være en tilstrekkelig dempning av den innfallende stråling til å observere fenomenet. I visse tilfeller kan det imidlertid være ønskelig å stimulere absorpsjonen av koblet stråling ved egnet endring av ett eller flere av lagene til arrangementet. Et slikt arrangement kan bestå av et substrat med brytningsindeks N1, belagt med et likeformet belegg med brytningsindeks N2 i kontakt med luft eller en væske med en tredje brytningsindeks N3. Ved passende valg av gitterdybde, N1 og N2, og gitter-mellomrom (mellom ribbene) er en resonans med en meget smal spektralbredde i størrelsesorden 0,1 nm mulig.

Variasjon i tykkelsen av belegget, som virker som en bølgeleder ved resonans, forårsaker en endring i lederens modus-struktur og en tilsvarende forskyvning i den innfallsvinkel som er nødvendig for å eksitere den.

Følsomheten kan økes ved å gjøre N1 og N2 meget like og ved å redusere tykkelsen til belegget/bølgelederen. Dette skjer fordi reduksjon av beleggets tykkelse øker hastighetsendringen til forplantningshastigheten i dette for en gitt endring i beleggets tykkelse, og dette øker forskyvningen i den kritiske innfallsvinkel (for en gitt bølgelengde) i forhold til tykkelsesendringer.

En egnet sensor for anvendelse i samsvar med oppfinnelsen omfatter et diffraksjonsgitter med N1 lignende N2, og begge tilnærmet lik 1,5, en gitterdybde på omkring 0,1 mikrometer, gittermellomrom på omkring 0,3 mikrometer og en belegg/-

bølgeleder-tykkelse på omkring 0,7 mikrometer, med en følsomhet i likhet med den til sensoren som er beskrevet i internasjonal patentpublikasjon WO84/02578. Når tykkelsen av belegget/-bølgelederen blir redusert til under 0,7 mikrometer, kan denne følsomheten økes fire eller fem ganger.

Diffraksjons-gittere kan prepareres på enhver konvensjonell måte. Således kan for eksempel et plastgitter fremstilles ved injeksjonsstøping fra en modermatrise fremstilt ved hjelp av laser-interferometri. En sensor kan så syntetiseres ved avsetning av et tynt lag av et dielektrisk materiale på gitteret, for eksempel ved avsetning av glass eller $SiO_2$ ved henholdsvis sputtering eller vakuum-pådamping.

Alternativt kan et diffraksjonsgitter av glass fremstilles ved å tegne linjer i overflaten på optisk plant glass eller ved å spinne en fotoresist på et optisk plant glass-substrat, eksponere det for et interferensmønster, for eksempel frembrakt ved hjelp av et lysinterferometer, og så etse glassoverflaten ved å eksponere interferensmønsteret i resisten med reaktive ioner. Et glassgitter med en ione-impregnert overflate kan så konstrueres. For eksempel kan sølv- og/eller bly-ioner bindes i gitterets overflatelag ved å eksponere overflaten for sølvnitrat og/eller bly-nitrat. Dette tillater migrasjon av sølv- og/eller bly-ioner inn i glassoverflaten, og tilveiebringer således et meget tynt overflateområde med en brytningsindeks som er litt forskjellig fra resten av glasset. Den lille tykkelsen på overflatelaget og de tilnærmet like brytningsindeksene til substratet og overflatelaget, er begge nødvendige for å gi god følsomhet.

De optiske egenskapene til en optisk struktur belagt med en spesifikk bindingsdeltager, blir endret ved kompleks-dannelse mellom den spesifikke bindingsdeltager og den komplementære ligand, og i en utførelsesform av oppfinnelsen er det mulig, ved å sammenligne de optiske karakteristika for et standardområde (ubehandlet) med egenskapene til et behandlet testområde av overflaten, å bestemme kvalitativt eller kvantitativt om en bindingsreaksjon har inntruffet i testområdet. I en alternativ utførelsesform hvor for eksempel

den spesifikke bindingsdeltager er et antistoff, blir et antistoff som er spesifikt for antigenet det søkes etter, adsorbert på eller bundet til minst ett diskret testområde på den optiske strukturens overflate, og et protein som ikke er en spesifikk bindingsdeltager for noen ligand som kan være til stede i prøven som testes (her kalt et ikke-spesifikt protein) blir adsorbert på eller bundet til minst ett diskret referanseområde på overflaten. Det ikke-spesifikke protein kan for eksempel være et inaktivert antistoff eller et antistoff hevet mot en ligand som ikke er til stede i prøvene som skal testes, og for eksempel når prøvene som skal testes, er menneskelige sera, kan det ikke-spesifikke protein være et anti-mus antistoff. Eventuelle forskjeller mellom den ikke-spesifikke binding til for eksempel proteiner som er til stede i testprøven og enten det spesifikke antistoff eller det ikke-spesifikke protein kan bestemmes ved å sammenligne de optiske egenskapene til testområdet med referanseområdet etter eksponering for en prøve som ikke inneholder det antigenet det søkes etter, slik at en tilnærmet korreksjon om nødvendig kan foretas. Sammenligning av de optiske karakteristika for test- og standard-områdene til en lignende biosensor under eller etter eksponering for en prøve som skal testes, kan så tilveiebringe et mål på kompleks-dannelse mellom det antigen det søkes etter, og dets spesifikke antistoff. Hvert område kan omfatte et kontinuerlig lag med en spesifikk bindingsdeltager, eller hver bindingsdeltager kan være til stede ved diskrete intervaller innenfor ethvert gitt område for å danne et diskontinuerlig lag.

I samsvar med oppfinnelsen blir den optiske struktur bestrålt ved en fast innfallsvinkel med polykromatisk lys, og det reflekterte og/eller overførte lys blir analysert for å bestemme eventuelle bølgelengder av lys som blir absorbert på grunn av ledet bølgeresonans.

Midlene for analysering av det reflekterte eller overførte lys kan være en spektrumdetektor som bestemmer eventuelle bølgelengder som mangler i det reflekterte eller overførte lys, sammenlignet med det bestrålende lys, og som genererer et signal som indikerer de manglende bølgelengder. Den signalgenererende

anordning kan være kalibrert for å tilveiebringe en direkte utlesning.

Hvis en betydelig bølgelengde-forskyvning blir funnet mellom den manglende del av spekteret før og etter at en prøve bringes i kontakt med den belagte gitteroverflate, kan det sluttes at binding av et komplementært materiale har inntruffet ved overflaten, og dermed at prøven inneholdt en spesifikk ligand kjent for å binde seg til belegget med dens spesifikke bindings-deltager.

I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt et apparat til bruk ved en fremgangsmåte som beskrevet ovenfor, og apparatet omfatter (A) en sensor med et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en andre brytningsindeks N2, hvor overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus med resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og der det til overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte, en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere; og (B) en spektral-detektor. En kilde for polykromatisk lys inngår også i dette apparatet.

# P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for deteksjon av en ligand i en prøve, hvor prøven inkuberes i kontakt med overflaten til en optisk struktur, hvilken optiske struktur omfatter et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en andre brytningsindeks N2, der overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus med resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og der det til overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte, en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den optiske struktur bestråles med polykromatisk lys ved en fast vinkel til normalen, og

det reflekterte og/eller gjennomgående lyset analyseres for å bestemme om, og om ønsket, i hvilken utstrekning og/eller med hvilken hastighet absorpsjonen av noen lys-bølgelengder som resultat av resonans for ledede bølger, endres ved dannelse av et kompleks mellom liganden og den spesifikke bindingsdeltager.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den optiske struktur er et diffraksjonsgitter.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den spesifikke bindingsdeltager er et antigen eller et antistoff.

4. Fremgangsmåte ifølge noen av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at brytningsindeksene N1 og N2 er tilnærmet, men ikke nøyaktig like, og begge er omkring 1,5.

5. Fremgangsmåte ifølge noen av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at overflatelaget med brytningsindeks N2 omfatter et tynt materiallag.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at substratet til den optiske

strukturen er av glass og det tynne materiallaget er silisium-oksyd.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at substratet til den optiske strukturen er av plast og det tynne materiallaget er glass eller silisium-oksyd.

8. Fremgangsmåte ifølge noen av kravene 1 til 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at overflatelaget med brytningsindeks N2 omfatter substratets overflate impregnert med metallioner.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den optiske strukturens substrat er av glass og overflatelaget omfatter substratets overflate impregnert med sølv og/eller bly-ioner.

10. Fremgangsmåte ifølge noen av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at overflatelaget med brytningsindeks N2 er mindre enn 700 nm tykt.

11. Apparat til bruk ved en fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter

en sensor som har et substrat med en første brytningsindeks N1 og et overflatelag med en andre brytningsindeks N2, hvor overflatelaget er slik at en ledet bølgemodus med resonant stråling under bruk kan forplantes i dette, og der det til overflatelaget er adsorbert eller bundet, enten direkte eller indirekte, en spesifikk bindingsdeltager for den ligand det er ønskelig å detektere,

en spektraldetektor, og

en kilde for polykromatisk lys.