



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 18 104 T2 2004.07.15

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 044 373 B1

(51) Int Cl.⁷: G01N 33/53

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 18 104.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/SE98/02464

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 965 943.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/036777

(86) PCT-Anmeldetag: 30.12.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 22.07.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.10.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.09.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 15.07.2004

(30) Unionspriorität:

9704933 30.12.1997 SE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, SE

(72) Erfinder:

MENDEL-HARTVIG, Ib, S-756 55 Uppsala, SE;
GUSTAFSSON, Jörgen, S-753 37 Uppsala, SE

(74) Vertreter:

WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES NEUEN KALIBRATORS IN EINEM VERFAHREN SOWIE EINE VORRICHTUNG UND EIN TESTKIT MIT DIESEM KALIBRATOR

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

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

Beschreibung**Technisches Gebiet**

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren, welches mit einem Prozess zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe im Zusammenhang steht, wobei der Prozess das Verwenden von biospezifischen Affinitätsreaktionen involviert. Das Verfahren schließt die folgenden Schritte ein:

- i. Bilden eines Komplexes, umfassend: Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, worin
 - a. Reaktant* und Reaktant I biospezifische Affinität für den Analyten' zeigen,
 - b. Reaktant* analytisch nachweisbar ist, anschließend
- ii. Bestimmen des nachweisbaren Signals von Reaktant* in dem Komplex (Probenwert), und
- iii. Erhalten der Menge des Analyten in der Probe durch Vergleichen des Probenwerts mit einem oder mehreren Signalen) (Kalibratorwert(en)) vom Reaktanten*, welchem gesondert ermöglicht wurde, an einer oder mehreren Mengen eines Kalibrators zu binden (Kalibratormengen), von denen jede einer bekannten Menge an Analyt entspricht (Standardmenge(n)).

[0002] Der Analyt' ist der Analyt als solches (in der Probe) oder ein Analyt-verwandter Reaktant, d. h. ein zugesetzter biospezifischer Affinitätsreaktant, eingeschlossen in dem Komplex in einer Menge, welche mit der Menge des Analyten in der Probe zusammenhängt. Der Reaktant* und der Reaktant I können den Analyt' zur gleichen Zeit binden. Dies bedeutet, daß sie an räumlich getrennte Bindungsstellen binden.

[0003] Dieser Typ von Analyseverfahren ist u. a. in sogenannten Durchströmungsmatrizes ausgeführt worden, wobei Reaktanten, einschließlich Analyt, in einem Prozess-Strom durch die Matrix (= Durchströmungsbzw. Fluß-Methodik) zu einer Detektionszone (DZ) transportiert werden, wo Reaktant* in einer Menge eingefangen wird, welche mit der Menge des Analyten in der Probe zusammenhängt. Das Einfangen erfolgt über einen Reaktanten (Einfänger), welcher fest an die Matrix in der DZ verankert ist. Der Einfänger kann der Reaktant I oder ein Reaktant, welcher biospezifische Affinität für Reaktant I oder einen anderen Reaktanten aufweist, der seinerseits, gegebenenfalls über einen oder mehrere zusätzliche Reaktanten, biospezifische Affinität für Reaktant I aufweist, sein.

[0004] Mit Reaktanten (einschließlich Analyt), welche biospezifische Affinität aufweisen (bioaffine Reaktanten), sind individuelle Mitglieder der Reaktantenpaare: Antigen/Hapten – Antikörper; Biotin – Avidin/Streptavidin; zwei komplementäre Einzelketten von Nukleinsäure etc. gemeint. Als Antikörper werden antigenbindende Antikörperfragmente, wie Fab, F(ab)₂', Einzelketten-Fv-Antikörper (scFv) etc. in Betracht gezogen. Die fraglichen Reaktanten müssen nicht natürlich vorkommend sein, sondern können auch synthetisch hergestellte Moleküle/Binder bzw. Bindepartner sein.

[0005] Der interessierende Typ von Testverfahren ist früher hauptsächlich für biospezifische Affinitätsreaktanten verwendet worden, wobei mindestens ein Teil eines verwendeten Reaktantenpaares Proteinstruktur aufgezeigt hat, insbesondere im Zusammenhang mit sogenannten immunchemischen Bestimmungsvorgehen.

[0006] Die biospezifischen Affinitätsreaktionen werden hauptsächlich in wässrigen Medien (wie Wasser) durchgeführt.

Früher verwendete Kalibratoren

[0007] Herkömmlicherweise sind der Kalibrator und Analyt häufig beide in der Lage gewesen, an Reaktant* zu binden. Die interessierenden Bindungsstellen auf dem Kalibrator für die Bindung an Reaktant* besitzen häufig Bindungseigenschaften, äquivalent zu entsprechenden Bindungsstellen auf dem Analyten. In der Praxis bedeutet dies, daß der Kalibrator und der Analyt Bindungsstellen aufwiesen, welche strukturell gleich oder ähnlich sind und hinsichtlich des Reaktant* miteinander kreuz-reagieren. Bindungsstellen, welche miteinander für/hinsichtlich eines gegebenen Reaktanten kreuzreagieren, sind äquivalent.

[0008] Im Stand der Technik ist die Kalibratormenge üblicherweise mit der Standardmenge gleichgesetzt worden.

[0009] Kalibratorwerte, entsprechend zu unterschiedlichen Analyt-Mengen/Konzentrationen (Standardmengen) sind häufig zu einer Dosis-Antwort-Kurve (Kalibrations- bzw. Eichkurve) oder einem Algorithmus zusammengestellt worden.

[0010] Der Ausdruck "einen Probenwert mit Kalibratorwert(en) vergleichen" beinhaltete ebenfalls, daß der Vergleich mit einer Kalibrationskurve und/oder -Algorithmus stattfinden kann, welche/welcher mehreren Kalibratorwerten entspricht.

[0011] Der Kalibrator und der Analyt sind häufig die gleiche Substanz gewesen. Es gibt Ausnahmen hiervon. Bei der Antikörperbestimmung ist häufig ein und derselbe Kalibrator für mehrere Antikörper-Spezifitäten operational gewesen, vorausgesetzt daß die Kalibratormenge so gewählt worden ist, daß sie eine konstante Domäne des zu bestimmenden Antikörpers aufzeigt; siehe zum Beispiel Abbott, WO 97/27486.

[0012] Referenzzonen mit einer bekannten Menge an freiem Analyt und einer begrenzten Menge an Konjugat zur Detektion werden in Applied Research Systems ARS Holding N. V., WO 95/16914, beschrieben. Die Referenzzone und die Detektionszone sind nicht im gleichen Prozess-Strom plaziert.

[0013] Eine andere Erfindung, offenbart in Agen Biomedical Limited, WO 97/09620, umfaßt ein separates Kalibrationssystem, welches parallel zu dem Detektionssystem betrieben wird, und wobei unterschiedliche Konjugate für Analyt bzw. Kalibration verwendet werden.

[0014] Kalibrationszonen-bindende Analytanaloge, welche der Probe zugesetzt werden, werden beschrieben in Applied Research Systems ARS Holding N. V., WO 92/09892. Die Bindung von Analyt und seinen Analogen führt zu einem detektierbaren Signal.

Nachteile des Stands der Technik

[0015] Der Stand der Technik hat üblicherweise die Bestimmung mehrerer Kalibratorwerte parallel zu Proben durch Laufenlassen von bekannten Analyt-Mengen (Standardmengen) auf eine, den Proben entsprechende Weise beinhaltet. Dies hat seinerseits dazu geführt, daß 5–20% aller Durchläufe Kalibratordurchläufe gewesen sind. Durch Verringern der Anzahl von Kalibratordurchläufen, möglicherweise auch durch Verringern der Anzahl von Reaktionsschritten in jedem Kalibratordurchlauf, könnten Zeit und Verbrauch von Reagenz eingespart werden.

[0016] Es treten häufig Probleme in Abhängigkeit von Kalibrator und Probenlösungen auf, welche unterschiedliche Eigenschaften und Gehalte aufweisen. Dies ist besonders ausgeprägt bei immunologischen Tests, wo der Kalibrator oft in einem Puffer gemessen wird und die Analyse der Probe an Serum- oder Plasmaproben durchgeführt wird. Ein Unterschied im Gehalt und der Viskosität ergibt unterschiedliche Antworten (u. a. gemessen als "Rückgewinnung" und Parallelität). Zusätzlich dazu wird die Viskosität in einem Fließ- bzw. Durchströmungs-Verfahren außergewöhnlich bedeutend, da sie die Wanderungs/Stömungs-Geschwindigkeit beeinflußt. Dieser Unterschied kann kompensiert werden, jedoch macht er zur gleichen Zeit die Systeme empfindlicher für Störungen und somit für eine erhöhte Variation zwischen den Assays. Andere Probleme mit Tests, welche Strömungen verwenden, sind mögliche Flußvariationen in Abhängigkeit von Temperatur- und Feuchtigkeits-Schwankungen etc.

[0017] Die obenstehenden Probleme sind zu einem gewissen Ausmaß durch das Assayverfahren überwunden worden, welches in EP-A-253 464 offenbart wird und welches eine Testzone und eine Referenzzone auf einer Festphase einsetzt.

Ziel der Erfindung

[0018] Ein erstes Ziel der Erfindung besteht darin, die derzeitig in Tests der anfänglich erwähnten Art verwendeten Kalibrationsverfahren zu verbessern.

[0019] Ein anderes Ziel der Erfindung besteht darin, die Verwendung von Kalibratoren zu vereinfachen, hauptsächlich durch Verringern des notwendigen Verbrauchs von benötigten Reagenzien und/oder Verringern der Anzahl von Messungen zum Erhalten von Kalibratorwerten.

[0020] Ein drittes Ziel der Erfindung, insbesondere im Zusammenhang mit Strömungsverfahren, besteht darin, eine Kompensation für die Unterschiede zu ermöglichen, welche zwischen Kalibrator und Probenlösung und zwischen Durchläufen, durchgeführt zu verschiedenen Zeiten und/oder an verschiedenen Orten, existieren können.

Die Erfindung

[0021] Wir haben nun erkannt, daß diese Ziele erreicht werden können, wenn der Kalibrator an die Matrix gebunden wird, bevor mit der Bestimmung des Kalibratorwertes gemäß eines relevanten Protokolls begonnen wird. Dieser Typ von Kalibrator wird nachstehend als ein Matrix-Kalibrator bezeichnet werden. Der erste Hauptaspekt der Erfindung besteht deshalb in einem Verfahren gemäß der anfänglich erwähnten Vorgehensweise, welches das kennzeichnende Merkmal, wie beansprucht, aufweist, daß der Kalibrator, oder ein Reaktant, fähig zur Bindung des Kalibrators, vor dem Beginn der Bestimmung eines Kalibratorwertes an eine Matrix, welche in dem flüssigen Medium unlöslich ist, in welchem die Bindung von Reaktant* an den Kalibrator stattfindet, gebunden worden ist. Der Kalibrator bzw. der Kalibrator-Binder, wie beansprucht, ist üblicherweise bereits vom Hersteller an die Matrix gebunden worden, so daß der Matrixkalibrator als eine fertige Komponente in einem Kit geliefert wird. Die Bindung zwischen Kalibrator und Matrix ist normalerweise von einer anderen Art als diejenige, welche zwischen Analyt' und Reaktant I beim Laufenlassen einer Probe erhalten wird.

[0022] Matrixkalibratoren bieten große Vorteile, wenn der Transport von Reaktant* zu dem Kalibrator mittels einer Strömung (Prozess-Strom) in einer sogenannten Durchströmungsmatrix zu einer Zone in der Matrix stattfindet, welche den Matrixkalibrator oder den Kalibrator-Binder enthält (Kalibratorzone (CZ)).

[0023] Wenn ein Kalibrator-Binder an die Matrix gebunden wird, kann der Kalibrator entweder beweglich (diffundierbar) in der Matrix in einer Zone, welche von der Detektionszone getrennt ist, vorabgeschieden werden oder er kann zusammen mit oder getrennt von der Probe zugesetzt werden.

[0024] Der Kalibrator-Binder ist gewöhnlich ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares (Reaktantenpaar), wobei das andere Mitglied des Bindungspaares an die Kalibratormatrix gekoppelt oder konjugiert ist. Solche spezifischen Bindungspaares sind einem Fachmann auf dem Gebiet gut bekannt, und als Beispiele können erwähnt werden: Immunologische Bindungspaares, Antigen-Antikörper und Hapten-Antikörper, Biotin-Avidin oder -Streptavidin, Lectin-Zucker, Hormon-Hormonrezeptor, Nukleinsäuredoppelstrang.

Durchströmungsmatrizes

[0025] Die Durchströmungsmatrix definiert den Raum, in welchem die Reaktanten transportiert werden. Da-her kann die Matrix die Innenoberfläche eines Einzelstromkanals (wie einer Kapillare), die Innenoberfläche ei-ner porösen Matrix mit einem System von Strömungskanälen (poröse Matrix) etc., welche sich durch dieselbe erstrecken, sein. Dieser Typ von Matrices wird als Durchströmungsmatrizes bezeichnet. Die Matrices können in der Form von Monolithen, Blättern, Säulen, Membranen, Einzelstromkanälen mit kapillaren Abmessungen oder aggregierten Systemen derartiger Strömungskanäle etc. vorliegen. Sie können auch in der Form von Teil-chen, welche in Säulengehäuse gepackt sind, sowie als komprimierte Fasern etc. vorliegen. Die Innenoberflä-che der Matrix, d. h. die Oberfläche der Strömungskanäle, sollte hydrophil sein, so daß wäßrige Medien (haupt-sächlich Wasser) absorbiert und durch die Matrix transportiert werden können. Die Minimum-Innenabmessung der Strömungskanäle (gemessen als Durchmesser für Kanäle mit einem kreisförmigen Querschnitt) sollte aus-reichend groß sein, um den Transport der verwendeten Reaktanten durch die Matrix zu gestatten. Die Faust-regel besagt, daß geeignete Matrices wählbar sind unter denjenigen, welche Durchflußkanäle mit der kleinsten Innenabmessung im Intervall von 0,4–1000 µm, vorzugsweise 0,4– 100 µm aufweisen, wenn die Matrix ein System von wechselseitig kommunizierenden Strömungskanälen aufweist. Strömungskanäle mit einer kleinsten Innenabmessung im oberen Bereich des breiten Intervalls (bis zu 1000 µm) sind hauptsächlich von Inter-esse für Strömungen, welche von einem von außen angelegten Druck/Saugzug angetrieben werden.

[0026] Matrices von Interesse sind häufig aus einem Polymer aufgebaut, z. B. Nitrocellulose, Nylon etc. Das Material in der Matrix sowie die physikalische und geometrische Auslegung der Strömungskanäle können ent-lang der Strömung abhängig davon, wofür ein bestimmter Teil der Matrix verwendet werden soll, variieren (Pharmacia AB, WO 96/22532; Medix, WO 94/15215).

[0027] Entlang der Strömung in der Matrix können eine oder mehrere definierte Zonen für die Aufbringung bzw. Applikation von Probe, Reaktanten, Puffer etc. (A_SZ , A_RZ , A_BZ etc.), und eine oder mehrere Zonen für Ka-librator und/oder die Detektion (CZ bzw. DZ) vorliegen.

[0028] Verschiedene Durchströmungsmatrizes, welche in diesem Typ von interessierenden Tests verwendet werden können, werden in früheren Patentveröffentlichungen beschrieben; siehe z. B. Behringwerke US 4 861 711, Unilever 88/08534, Abbott US 5 120 643 und 4 740 468, Becton Dickinson EP 284 232 und 4 855 240; Pharmacia AB WO 96/22532.

Prozess-Strom

[0029] Die Richtung der Strömung verläuft von einer Zone der Aufbringung der Probe und/oder des Reaktan-ten und hin zu existierenden Kalibrator- und Detektionszonen (CZ bzw. DZ). Welche Zonen der Prozess-Strom im genauen passieren soll, wird durch das fragliche Testprotokoll festgelegt. Ein Prozess-Strom kann von ei-nem Punkt mit einer radialen Ausbreitung und einer Strömungsfront in der Gestalt eines kreisförmigen Um-fangs oder eines Teiles davon beginnen. Ein Prozess-Strom kann auch von einer Zone in der Form eines Ban-des bzw. einer Bande ausgehen und eine gerade Strömungsfront, senkrecht zur Richtung der Strömung, auf-weisen.

[0030] In einer weniger bevorzugten Variante geht der Prozess-Strom von einer Aufbringungszone für Reak-tant* aus, welche zur gleichen Zeit eine Kalibratorzone oder eine Detektionszone ist. In dieser Variante wird sich der Strom vorzugsweise radial von der Zone der Aufbringung ausbreiten und kann zusätzliche Kalibrator-zonen und/oder Detektionszonen passieren.

[0031] Die Strömung durch die Matrices kann durch den Einfluß von Kapillarkräften erreicht werden, z. B. durch Beginnen mit einer im wesentlichen trockenen Matrix. Ein saugender Körper kann am äußersten Ende des Stroms als ein Hilfsmittel angebracht werden. Mittels eines angelegten elektrischen Feldes können gelöste Komponenten aus der Zone der Aufbringung zu einer Detektions/Kalibratorzone transportiert werden.

[0032] Die verwendete Strömung ist vorzugsweise lateral, d. h. parallel zur oberen Oberfläche der Matrix. Es können auch andere Typen von Strömungen, wie in die Tiefe in der Matrix, verwendet werden.

Kalibrator- und Detektionszonen in Durchströmungsmatrizes

[0033] Die in der bevorzugten Ausführungsform verwendete Durchströmungsmatrix zeigt eine oder mehrere distinkte Zonen mit Kalibrator auf (Kalibratorzonen CZ1, CZ2, CZ3 etc.). Jede Kalibratorzone enthält Matrixkalibrator in einer derartigen Menge, daß das Meßsignal von Reaktant* (Kalibratorwert), nachgewiesen in der Zone wenn eine Strömung passiert, in distinkter Weise einer bestimmten Menge von Analyt in der Probe (Standardmenge) entspricht.

[0034] Der Kalibrator kann auf dieselbe Weise ausgewählt werden, wie es zuvor für die fraglichen Testtypen der Fall war. Unter Verwendung der Strömungsmethodik und unter Anordnung der durch eine Kalibratorzone zu transportierenden Probe (des Analyten), sollte der Kalibrator so gewählt werden, daß er nicht an den Analyt bindet. Wenn der Kalibrator in der Lage ist, Analyt zu binden, stellt er spezielle Anforderungen an die Position der Kalibratorzone in Bezug zur Zone der Aufbringung der Probe; siehe nachstehend.

[0035] Die Menge an Kalibrator, welche an eine Kalibratorzone gebunden hat, muß nicht die gleiche wie die entsprechende Standardmenge sein. Dies beruht darauf, daß die Bindungsaktivität in Bezug auf den Reaktant* häufig verändert wird, wenn die Kalibratormsubstanz an eine Matrix gebunden wird.

[0036] Wenn es wünschenswert ist, Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität, jedoch aus der gleichen Spezies, von der gleichen Ig-Klasse oder Ig-Unterklasse, zu bestimmen, wird es bevorzugt, daß der Kalibrator eine Bindungsstelle aufzeigt, welche für die Spezies, die Klasse oder Unterklassen einzigartig ist. Als eine Regel bedeutet dies, daß ein Kalibrator für die Bestimmung von Antikörpern ein Epitop aufweist, welches in einer konstanten Domäne der fraglichen Antikörper vorhanden ist, bei Säuger-Antikörpern vorwiegend einem Teil von Ig(Fc).

[0037] Ein und dieselbe Matrix kann eine oder mehrere Detektionszonen (DZ1, DZ2, DZ3 etc.), zusammen mit einer oder mehreren Kalibratorzonen aufweisen. In der Detektionszone binden Komplexe, enthaltend Analyt* und Reaktant*, über den anfänglich erwähnten Einfänger an die Matrix, welcher fest in einer DZ fixiert ist. Wenn Reaktant I über den Einfänger an die Matrix bindet, muß der Reaktant I nicht von Beginn an in der Matrix immobilisiert sein, sondern kann entweder beweglich (diffundierbar) in der Matrix in einem Bereich oder einer Zone vorabgeschieden sein, welche von der Detektionszone getrennt ist, oder er kann zusammen mit oder getrennt von der Probe zugegeben werden.

[0038] Wenn es mehrere Kalibrator- und/oder Detektionszonen in der gleichen Durchströmungsmatrix gibt, werden die größten Vorteile mit der Erfindung erzielt, wenn mehrere der Zonen entlang des gleichen Prozess-Stroms lokalisiert sind.

[0039] Wenn es mehrere Detektionszonen (DZ1, DZ2, DZ3 etc.) in ein und derselben Matrix gibt, können diese verschiedenen Analyten entsprechen. Man kann den gleichen Kalibrator für Analyten mit äquivalenten Bindungsstellen verwenden. Wenn dem Analyt äquivalente Bindungsstellen fehlen, wird ein Kalibrator für jeden Analyt erforderlich. Wenn alle Analyten die gleiche äquivalente Bindungsstelle aufweisen, wird der einfachste Zustand vorliegen. Der gleiche Kalibrator, die gleichen Kalibratorzonen und der gleiche Reaktant* können dann für alle Analyten verwendet werden.

[0040] Die Kalibratorzonen und Detektionszonen können auf verschiedene Weisen geometrisch entworfen sein (rechteckig, kreisförmig, linear, punktförmig etc.). Die Zonen können relativ zueinander unterschiedliche Konfigurationen aufweisen. Gute Konfigurationen sind derartige, bei welchen ein gemeinsamer Strom aufeinanderfolgend oder gleichzeitig mehrere Zonen, insbesondere Zonen unterschiedlicher Arten (DZ und CZ) durchdringt. Ein Beispiel einer aufeinanderfolgenden Durchdringung besteht in parallelen Zonen, welche nacheinander im gleichen Prozess-Strom lokalisiert sind. Ein Beispiel einer gleichzeitigen Durchdringung besteht in Zonen, welche nebeneinander auf der gleichen kreisförmigen Umfangslinie lokalisiert sind, wobei der Prozess-Strom vom Zentrum des entsprechenden Kreises aus radial ausgebreitet wird. Es können Kombinationen dieser Varianten angewandt werden, d. h. es gibt neben den Zonen auf einer kreisförmigen Umfangslinie ebenfalls Zonen auf dem Umkreis von Kreisen, welche konzentrisch zur zuerst erwähnten kreisförmigen Umfangslinie vorliegen. Eine gleichzeitige Durchdringung kann auch mit einer geraden Strömungsfront erzielt werden, wobei Detektions- und Kalibratorzonen nebeneinander im gleichen Abstand vom Ausgangspunkt des Prozess-Stroms lokalisiert sind.

[0041] Wenn mehrere Detektionszonen und/oder Kalibratorzonen im gleichen Prozess-Strom lokalisiert sind, kann ein Meßsignal für diese Zonen in ein und derselben Testdurchführung/Reagenz-Applikation erhalten werden. Wenn es mehrere Kalibratorzonen im gleichen Prozess-Strom gibt, kann eine Dosis-Antwort-Kurve (Kalibrationskurve) oder ein Algorithmus für die Werte aufgestellt werden, welche für die gleiche Applikation von Reaktant* erhalten werden. Eine Kalibratorzone, welche zusammen mit einer Detektionszone im gleichen Strom existiert, kann als ein positiver interner Kalibrator (PIC) fungieren.

[0042] In einer Variante wird eine Matrix, aufweisend mindestens eine Kalibratorzone (CZ1, CZ2 etc. (positive interne Kalibratoren)) und mindestens eine Detektionszone (DZ1, DZ2 etc.), in Kombination mit einem oder mehreren getrennt erhaltenen Kalibratorwerten verwendet. Die getrennt erhaltenen Kalibratorwerte müssen nicht die gleichen Bedingungen betreffen, unter denen die Probe laufen gelassen werden soll. Zu dem Aus-

maß, daß getrennte Kalibratorwerte, Kalibrations-Kurve und -Algorithmus beabsichtigtermaßen während einer längeren Zeitdauer verwendet werden, wird Bezug auf Master- bzw. Grundbezugs-Werte, Masterkurve bzw. Master-Algorithmus genommen.

[0043] Die Verwendung von separat erhaltenen Kalibratorwerten beinhaltet:

- i. Durchlaufenlassen von Probe und Reaktant* durch eine Detektionszone (DZ) und einen positiven internen Kalibrator (PIC, CZ) in einer Matrix, welche sowohl DZ als auch CZ aufzeigt,
- ii. Bestimmen des Meßsignals aus einer CZ (PIC-Wert, CZ) und aus DZ,
- iii. Vergleichen des PIC-Wertes mit entsprechenden separat erhaltenen Kalibratorwert(en), wodurch etwaige Abweichungen ein Maß von Abweichungen zwischen den Bedingungen, unter welchen die Probe laufen gelassen worden ist, und den Standardbedingungen, welche für die separaten Kalibratorwert(e) zutreffen, sind,
- iv. Anpassen des gemessenen Signals für die Probe (Probenwert) an die Bedingungen, welche für die separat erhaltenen Kalibratorwerte zutreffend sind, und dann
- v. Erhalten der Menge an Analyt in der Probe durch Vergleichen des adaptierten bzw. angepaßten Meßsignals für die Probe mit den separaten Kalibratorwerte(en).

[0044] Alternativ dazu kann man die separaten Kalibratorwerte an Abweichungen der Bedingungen anpassen und dann direkt einen gemessenen Probenwert mit angepaßten Kalibratorwerten vergleichen. Dies ist zu den obenstehenden Schritten (iv) und (v) äquivalent (in den Ansprüchen umgekehrt benannt). In den Schritten (iv) und (v) ist es selbstverständlich als Alternative eingeschlossen, die entsprechende Kalibrationskurve oder -Algorithmus anzupassen, um den Spiegel an Analyt durch Vergleichen des Probenwertes mit einem von diesen beiden zu berechnen.

[0045] Was obenstehend aufgeführt worden ist gilt selbstverständlich auch für den Fall, daß ein Binder für den Kalibrator an die Kalibrationszone(n) der Matrix gebunden worden ist.

[0046] Eine Kalibrator- und Detektionszone im gleichen Prozess-Strom werden frühere Fehlerquellen verringern, welche durch Unterschiede bei Probe und Kalibrator verursacht worden sind. Ein positiver interner Kalibrator und mehrere Kalibratorzonen im gleichen Prozess-Strom werden Abweichungen in den Strömungen zwischen getrennten Durchläufen vollständig oder teilweise kompensieren. Die Schwankungsbreite im Meßergebnis sollte niedriger sein, während interne als auch externe Faktoren vollständig oder teilweise kompensiert werden können. Das Problem, daß Probe und Kalibrator unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen, wird eliminiert. Für Tests im Beisein von Patienten, wird der interne Kalibrator in der Lage sein, eine gut definierte Grenze dahingehend, was eine positive Antwort darstellt, vorzusehen und die Qualitätsgewährleistung vorzusehen, welche heutzutage für diese Typen von Tests fehlt.

[0047] Die Verankerung des Kalibrators an die Matrix kann über kovalente Bindung oder über physikalische Adsorption, biospezifische Affinität etc. stattfinden. Wie der Stand der Technik auf diesem Gebiet kann die Erfindung Kombinationen von Bindungstypen verwenden, wie das kovalente Binden eines biospezifischen Affinitätsreagens, gerichtet gegen den Kalibrator, an die Matrix. Spezifisch gesagt, kann physikalisch absorbiertes oder kovalent gebundenes Streptavidin in Kombination mit einem biotinylierten Kalibrator erwähnt werden, oder ein auf ähnliche Weise gebundener Antikörper, welcher gegen den Kalibrator gerichtet ist. Die Verankerung des Kalibrators an die Matrix kann über Teilchen stattfinden, welche in/auf der Matrix abgelagert worden sind, und an welche der Kalibrator kovalent, physikalisch adsorptiv oder biospezifisch etc. gebunden wird. Die Teilchen lagern sich, entweder weil ihre Größe so gewählt worden ist, daß sie nicht durch die Matrix transportiert werden können, oder durch physikalische Adsorption an die Matrix an; siehe u. a. Abbott/Syntex US 4 740 468; Abbott EP 472 376; Hybritech EP 437 287 und EP 200 381; Grace & Co EP 420 053; Fuji Photo Film US 4 657 739; Boehringer Mannheim WO 94/06012.

[0048] Der Einfänger kann gemäß den selben Prinzipien an eine Detektionszone gebunden werden, wie denjenigen, welche auf einen Kalibrator zutreffen. In ein und demselben Prozess-Strom können ein Kalibrator und ein Einfänger an ihre jeweiligen Zonen auf gleichem Wege oder auf verschiedenen Wegen gebunden werden. Was obenstehend in Bezug auf die Verankerung des Kalibrators und des Einfängers dargelegt worden ist, ist selbstverständlich auch für die Verankerung eines Binders für die Kalibratorkomponente anwendbar bzw. gültig. Zum Beispiel kann die obenstehend erwähnte Kombination aus einer biotinylierten Kalibratorkomponente und physikalisch oder kovalent gebundenem Streptavidin verwendet werden.

Zone der Aufbringung von Probe (A_sZ)

[0049] Die Zone für die Aufbringung bzw. Applikationszone der Probe kann stromaufwärts oder stromabwärts in Bezug auf die Kalibratorzonen lokalisiert sein, vorzugsweise stromaufwärts. In dem Fall, daß der Matrixkalibrator so gewählt worden ist, daß er Analyt bindet, muß die Applikationszone der Probe stromabwärts vom Matrixkalibrator lokalisiert sein. Im Verhältnis zu Detektionszonen sollte die Applikationszone der Probe, in nützlichen Ausführungsformen, stets stromaufwärts lokalisiert sein.

[0050] In bestimmten weniger bevorzugten Ausführungsformen ist es denkbar, die Probe in einer Kalibrator- oder Detektionszone aufzubringen.

Zone zur Aufbringung von Reaktant* ($A_R \cdot Z$) und anderer biospezifischer Affinitätsreagenzien ($A_R \cdot Z$)

[0051] Eine Applikationszone für Reaktant* ($A_R \cdot Z$) sollte stets stromaufwärts zu den Kalibratorzonen lokalisiert sein.

[0052] Wenn es eine Detektionszone im Prozess-Strom gibt, sollte die Reihenfolge der Zonen zur Applikation von biospezifischen Affinitätsreaktanten gewährleisten, daß Analyt' vor oder gleichzeitig mit Reaktant* in seine Detektionszone transportiert wird. Ein oder mehrere Reaktanten können in der gleichen Applikationszone zugesetzt werden. Wenn die Applikationszone gemeinsam für Probe und mindestens einen Reaktant vorliegt, sei es Reaktant*, kann eine Applikation gleichzeitig stattfinden, z. B. indem eine Probe und ein Reaktant gemischt worden sind, bevor sie in die Zone appliziert werden. Falls gewünscht, kann die Mischung so vorinkubiert werden, daß der Reaktant an den Analyt oder an andere Komponenten in der Probe, wie beabsichtigt, vor Applikation der Probe binden wird. Mit Kenntnis verschiedener Protokolle wird der Fachmann in der Lage sein, leicht zu bestimmen, welche Zonen er benötigt, und ihre mögliche Reihenfolge zu bestimmen.

[0053] Wenn Reaktant I in einer vorgelösten Form vorhanden ist, hat die Matrix eine Zone zur gleichzeitigen Applikation desselben, da ein Einfänger fest in der Detektionszone fixiert ist. Wenn der Einfänger zusätzliche biospezifische Affinitätsreaktanten erfordert, um an Reaktant I zu binden (siehe unter "Technisches Gebiet"), sind Zonen zur Applikation für diese Reaktanten vorhanden. Zonen zur Applikation für Reaktant I, wenn er nicht ein Einfänger ist, und jedweder zusätzlichen Reaktanten müssen so positioniert sein, daß der Reaktant I die Detektionszone vor oder zur gleichen Zeit wie Analyt' erreicht. Wenn Reaktant I in löslicher Form vorliegt, kann der Einfänger vorzugsweise ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares sein, wobei das andere Mitglied davon an Reaktant I gekoppelt oder konjugiert ist. Exemplarische spezifische Bindungspaares sind immunologische Bindungspaares, wie Antigen-Antikörper und Hapten-Antikörper, Biotin-Avidin oder -Streptavidin, Lectin-Zucker, Hormon-Hormonrezeptor, Nukleinsäureduplex.

[0054] Wenn sowohl der Kalibrator als auch Reaktant I in löslicher Form vorliegen, um dann über spezifische Bindungspaares an die Matrix zu binden, sind diese zwei Bindungspaares selbstverständlich unterschiedlich.

[0055] In bestimmten weniger bevorzugten Ausführungsformen können biospezifische Affinitätsreaktanten (einschließlich Reaktant*) in einer Kalibrator- oder Detektionszone appliziert werden; siehe unter der Überschrift "Prozess-Strom".

[0056] In dem Verfahren verwendete Reaktanten können in ihrer jeweiligen Zone im voraus abgeschieden werden oder können in Verbindung mit der Durchführung des Bestimmungsverfahrens zugesetzt werden. Das Vorabscheiden beinhaltet die Applikation des fraglichen Reaktanten im voraus auf eine derartige Weise, daß er sich nicht außerhalb seiner Applikationszone ausbreiten wird, bis eine Strömung von Flüssigkeit in die Zone eingeleitet oder selbige durchläuft.

[0057] Die Vorausablagerung von Reaktanten kann durch per se bekannte Verfahren stattfinden; siehe zum Beispiel (Behringwerke US 4 861 711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5 120 643; Becton Dickinson EP 284 232). Es ist wichtig, die Tatsache zu berücksichtigen, daß ein im voraus abgeschiedener Reaktant sich leicht auflösen sollte, wenn Flüssigkeit durch die fragliche Applikationszone hindurchläuft. Um eine rasche Auflösung zu erzielen, ist es üblich, Reaktanten in/mit Substanzen, welche sich rasch lösen, einzubinden gemeinsam abzuscheiden. Dieser Typ an Substanzen ist häufig hydrophil mit polaren und/oder geladenen Gruppen, wie Hydroxy, Carboxy, Amino, Sulfonat etc. Insbesondere können hydrophile, rasch lösliche Polymere erwähnt werden, z. B. mit Kohlenhydrat-Struktur, einfache Zucker, einschließlich Mono-, Di- und Oligosacchariden und entsprechenden Zuckeralkoholen (Mannitol, Sorbitol etc.). Es ist eine übliche Praktik, die fragliche Applikationszone zuerst mit einer Schicht der rasch löslichen Substanz zu beschichten, worauf der Reaktant aufgebracht wird, möglicherweise gefolgt von einer zusätzlichen Schicht der rasch löslichen Substanz. Ein alternativer Weg besteht in der Einbringung des Reaktanten in Teilchen aus rasch löslichem Material, welches dann in der fraglichen Zone der Matrix abgeschieden wird.

Zonen für Puffer ($A_B \cdot Z$)

[0058] Puffersysteme, welche erforderlich sind, können in Lösungen eingeschlossen sein, welche gleichzeitig mit Proben und Reaktanten zugegeben werden. In herkömmlichen Techniken findet die Zugabe von Puffer in der Applikationszone statt, welche stromaufwärts von allen anderen Applikationszonen gelegen ist. Diese ist häufig gleich zu der Probenapplikationszone gewesen. In der vorliegenden Erfindung kann Puffer im Prinzip in einer wahlfreien Position entlang des Transportstroms zugesetzt werden; siehe untenstehend.

[0059] In der WO 99/36776 wird eine Erfindung offenbart, welche in einer Variante eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vorsieht. Diese Anmeldung ist hiermit im vorliegenden Text durch den Bezug darauf einbezogen. Die Erfindung in dieser getrennten Patentanmeldung basiert auf der Feststellung,

dass die Flüssigkeit aus zwei aufeinanderfolgenden Zonen (AZ2 und AZ1) in einer Durchströmungsmatrix ohne Vermischen nacheinander wandern kann. Dies wird erreicht, wenn Flüssigkeit auf die stromabwärts gelegene Zone (AZ1) vor oder im wesentlichen gleichzeitig zur Applikation von Flüssigkeit auf die stromaufwärts gelegene Zone (AZ2) appliziert wird. Diese Feststellung hat zur Fähigkeit geführt, eine zonenweise Migration von jeglichen in den Flüssigkeiten vorhandenen Reaktanten in Richtung auf eine Detektionszone hin zu erzielen. Wenn die Zone der Applikation der Probe (A_sZ) stromabwärts zur Zone der Applikation von Reaktant* ($A_{R^*}Z$) lokalisiert ist, und wenn Flüssigkeit auf $A_{R^*}Z$ und Probe auf A_sZ appliziert wird, kann der Analyt in die Detektionszone wandern, bevor dies die Reaktant* enthaltende Flüssigkeit tut. Wenn eine Zone zur Applikation von Flüssigkeit allein (Puffer) (A_BZ) zwischen $A_{R^*}Z$ und A_sZ vorliegt, wird eine Waschung der Detektionszone DZ zwischen dem Einfangen von Analyt und Reaktant* erhalten. Eine derartige intermediäre Pufferzone (A_BZ) kann auch gewährleisten, dass ein Reaktant (einschließlich Analyt), welcher in einer stromabwärts gelegenen Zone appliziert wird, DZ vor einem Reaktant erreicht, welcher von einer stromaufwärts gelegenen Applikationszone ausgeht. Letzteres kann bedeutend sein, wenn die Matrix als solche den Reaktant verlangsamt, welcher in der stromabwärts gelegenen Zone appliziert worden ist.

[0060] Reaktanten können in der Flüssigkeit, welche auf eine Zone appliziert wird, eingeschlossen sein. Alternativ dazu können sie in der Zone, wo die entsprechende Flüssigkeit appliziert werden soll, oder in einer Zone, welche zwischen dieser und der nächstgelegenen Zone, welche stromabwärts gelegen ist, lokalisiert ist, zur Applikation von Flüssigkeit im voraus abgeschieden sein. Die Probe (der Analyt) wird normalerweise in der Form von Flüssigkeit eingesetzt.

[0061] Diese Ausführungsform der Erfindung ist besonders interessant für sequentielle Verfahren des fraglichen Typs in Durchströmungsmatrizes, d. h. Verfahren, in welchen die Matrix zusätzlich zu einer Kalibratorzone auch eine Detektionszone enthält, und worin die Probe/Analyt vor der Flüssigkeit, welche Reaktant* enthält, in die Detektionzone transportiert werden soll.

Analytisch nachweisbarer Reaktant (Reaktant*)

[0062] Überlicherweise wird eine analytische Detektierbarkeit eines Reaktanten erhalten, weil er eine analytisch detektierbare Gruppe umfasst. Gut bekannte Beispiele von häufig verwendeten Gruppen sind enzymatisch aktive Gruppen (Enzym, Cofaktor, Coenzym, Enzymsubstrat etc.), Fluorophor-, Chromophor-, chemolumineszente, radioaktive Gruppen etc. Gruppen, welche mittels eines biospezifischen Affinitätsreaktanten detektiert werden, werden überlicherweise ebenfalls in diese Kategorie gezählt, z. B. Biotin, Hapten, Ig-Klassen-, Ig-Subklassen- und Ig-Spezies-spezifische Determinanten etc. In der Erfindung haben sich Teilchen, deren Oberflächen mit einem biospezifischen Affinitätsreaktanten beschichtet worden sind, als besonders vorteilhaft erwiesen. Die Teilchen können eine beliebige der zuvor erwähnten detektierbaren Gruppen, wie Fluorophorgruppen, enthalten oder sie können gefärbt sein (= enthaltend chromogene Gruppen). Nützliche Teilchen besitzen häufig eine Größe im Bereich von 0,001–5 µm vorzugweise 0,01–5 µm. Die Teilchen können sphärisch und/oder monodispers oder polydispers sein. Sie können kolloidale Abmessungen aufweisen, was als sogenanntes Sol (d. h. üblicherweise sphärisch und monodispers mit einer Größe im Bereich von 0,001–1 µm) bezeichnet wird. Gut bekannte teilchenförmige Markierungsgruppen sind Metallteilchen (wie Gold-Sol), Nicht-Metallteilchen (wie SiO₂, Kohlenstoff, Latex und abgetötete Erythrozyten und Bakterien). In bestimmten Fällen ist Wert darauf gelegt worden, dass die Teilchen unter den angewandten Bedingungen nicht-sedimentierbar sein sollten (siehe Pharmacia AB, WO 96/22532).

[0063] Siehe ebenfalls Unilever, WO 88/08534; Abott US 5 120 643; Becton Dickinson, EP 284 232.

[0064] Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Matrixkalibratoren haben wir überraschenderweise festgestellt, dass gute Ergebnisse erhalten werden können, wenn man gleichzeitig folgendes einsetzt:

- (a) Reaktant*, falls es sich bei der detektierbaren Gruppe um Teilchen, wie obenstehend offenbart, handelt, und
- (b) eine Detektionszone, in welcher der Einfänger die Matrix über Teilchen (Verankerungsteilchen) bindet, welche Abmessungen aufweisen, die einen Transport der Teilchen durch die Matrix erlauben würden.

[0065] Wir haben ein funktionierendes System erzielt, in welchem Markierungsteilchen und Verankerungsteilchen im wesentlichen die gleichen Abmessungen aufwiesen, was bedeutet, dass aller Wahrscheinlichkeit nach die Markierungsteilchen größer als die Verankerungsteilchen sein können und umgekehrt, so lange sie kleiner bleiben als die Strömungskanäle, welche von der Matrix definiert werden. Das System sowohl mit als auch ohne Voraus-Ablagerung von Reaktant* funktionieren. Diese Ausführungsform wird ausführlicher in der gleichzeitig anhängigen PCT-Anmeldung "Analytical method using particles and test kit for performing the method" (basierend auf SE 9704935-7) beschrieben. Auch diese letztgenannte Anmeldung ist hierin durch den Bezug einbezogen. Angewandt auf die vorliegende Erfindung bedeutet dies, dass der Reaktant* Teilchen als eine analytisch nachweisbare Gruppe gemäß obenstehendem a aufweist, und dass der Kalibrator und/oder der Einfänger an die Matrix über Teilchen gemäß obenstehendem b bindet.

Relevante Testprotokolle

[0066] Die Erfindung kann vorwiegend auf nicht-kompetitive (nicht-inhibitorische) Testvarianten, aber auch auf kompetitive (inhibitorische) Testvarianten angewandt werden, wenn diese beinhalten, dass ein Komplex mit einem Analyt-verwandten Reaktant, gebunden zwischen Reaktant I und Reaktant*, gebildet wird. Die Protokolle können als simultane oder sequenzielle Varianten durchgeführt werden. Mit simultanen Verfahren wird gemeint, dass Reaktant* und Analyt' während mindestens eines Teils des Transports in Richtung auf die Detektionszone gemeinsam transportiert werden und letztere vorzugsweise gleichzeitig erreichen. Mit sequenziellen Verfahren ist gemeint, dass Analyt' während mindestens eines Teils des Transports in Richtung auf die Detektionszone vor dem Reaktant* wandert und die Detektionszone vorzugsweise vor Reaktant* erreicht. Veranschaulichende Beispiele sind nachstehend angegeben. "-" bezeichnet die feste Verankerung an die Matrix von Anfang an. "---" bezeichnet eine Bindung über biospezifische Affinität. Es ist angenommen worden, dass die Reaktanten hinsichtlich der verwendeten Bindungsstellen monofunktionell sind.

A. Sandwich-Protokoll: Reaktant I (= Einfänger) und Reaktant* besitzen biospezifische Affinität für den Analyt (= Analyt'). x ist die Molanzahl von Reaktant I auf der Matrix. y ist Molanzahl von Analyt' (= Mole an Reaktant*), welche auf der Matrix über Reaktant I eingefangen worden ist.

Gebildeter Komplex:

[0067]

Matrix [-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I --- Analyt' --- Reaktant*]_y

B. Sandwich-Protokoll: Reaktant II (= Einfänger) besitzt biospezifische Affinität für Reaktant I, welcher seinerseits biospezifische Affinität für den Analyt (= Analyt') aufweist. Reaktant* besitzt biospezifische Affinität für den Analyt. x ist die Molanzahl von Reaktant II auf der Matrix. y ist Molanzahl von Analyt' (= Mole an Reaktant*), welche auf der Matrix über Reaktant II---Reaktant I eingefangen worden ist. z + y ist die Molanzahl von Reaktant I, welche auf der Matrix über Reaktant II eingefangen worden ist.

Gebildeter Komplex:

[0068]

Matrix [-Reaktant II]_{x-z-y}[-Reaktant II---Reaktant I]_z - [-Reaktant II---Reaktant I---Analyt'---Reaktant*]_y

C. Protokoll vom Inhibition-Typ: Reaktant I ist ein Analytanalog (= Einfänger) und besitzt Bindungsstellen, welche äquivalent mit den Bindungstellen auf dem Analyten sind. Analyt' ist ein Reaktant, welcher biospezifische Affinität für den Analyt und für Reaktant I hat. Reaktant* besitzt biospezifische Affinität für den Analyt und für Reaktant I hat. Reaktant* besitzt biospezifische Affinität für Analyt'. Analyt' ist im gebildeten Komplex in einer Menge eingeschlossen, welche mit der Menge an Analyt in der Probe zusammenhängt. x ist die Molanzahl von Reaktant I auf der Matrix. y ist die Molanzahl von Analyt' (= Molanzahl von Reaktant*), welche auf der Matrix über Reaktant I eingefangen worden ist.

Gebildeter Komplex:

[0069]

Matrix[-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I---Analyt'---Reaktant*]_y

Analyten in der Probe

[0070] Die Erfindung ist vorwiegend für die Bestimmung von biospezifischen Affinitätsreaktanten (Analyten) der anfänglich erwähnten Typen angepasst. Große Vorteile werden für Analyten erhalten, welche in mehreren Formen auftreten, welche als gemeinsamen Nenner mindestens eine Bindungsstelle mit äquivalenten Bindungseigenschaften besitzen.

[0071] Für nicht-kompetitive Verfahren (Sandwich) kann der Analyt ein Antikörper sein, gerichtet gegen ein Antigen (einschließlich Allergen) oder Hapten (obenstehende Testprotokolle A und B). Der Reaktant I ist in diesem Fall das Antigen oder das Hapten, gegen welches der Antikörper gerichtet ist, und Reaktant* ist ein gegen den Analyt gerichteter Antikörper. Alternativ dazu ist Reaktant* das Antigen oder das Hapten, und Reaktant I ist ein gegen den Analyt gerichteter Antikörper. Für nicht-kompetitive Verfahren kann der Analyt auch ein An-

tigen sein, wobei Reaktant* und Reaktant I gegen das Antigen gerichtete Antikörper sind. Als Beispiele von Analyt-Antigen kann Immunglobulin erwähnt werden, möglicherweise von einer besonderen Ig-Klasse oder Ig-Subklasse. Wenn der Analyt ein Antikörper oder ein Immunglobulin ist, können Reaktant* bzw. Reaktant I biospezifische Affinität gegenüber einer Ig-Determinante aufzeigen, welche für eine Ig-Klasse, wie IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM und oder, falls vorhanden, für eine Unterkategorie (z. B. IgG1, IgG2, IgG3 oder IgG4) und/oder für eine bestimmte Spezies spezifisch ist. Dies bedeutet, dass Reaktant* bzw. Reaktant I normalerweise ein Antikörper ist, der einige dieser Spezifitäten aufzeigt, wenn der Analyt ein Antikörper oder ein Immunglobulin ist.

[0072] Kompetitive Varianten sind vorwiegend auf niedermolekulare Analyten anwendbar. Im obenstehenden Testprotokoll C kann der Analyt ein Antigen/Hapten sein, in welchem Falle der Reaktant I das an die Matrix gebundene Antigen/Hapten ist, der Analyt' ein gegen das Antigen/Hapten gerichteter Antikörper ist, und der Reaktant* ein gegen Analyt' gerichteter Antikörper ist.

[0073] Es ist besonders interessant für die Erfinder gewesen, in der Lage zu sein, Analyten zu messen, deren Auftreten und/oder Menge im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten und Allergie steht. Es ist besonders interessant, Anti-Allergen-Antikörper der IgE- oder IgG-Klasse zu messen, bei letzterer vorzugsweise unter Betonung einiger der erwähnten Unterklassen. Die Messung von Allergen-spezifischen Antikörpern kann in Verbindung mit der Diagnose einer IgE-vermittelten Allergie angewandt werden.

Proben

[0074] Relevante Proben können biologischen Ursprungs sein, z. B. aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten (Gesamtblut, Serum, Plasma, Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit etc.), Extrakten aus biologischem Gewebe, aus Zellkulturmedien, Aufarbeitungs-Verfahrensprozessen in der Biotechnologie, aus Lebensmitteln, aus der Umwelt (Umwelt-Analyseproben) etc. Die Proben können vorbehandelt werden, um z. B. der Matrix, dem beteiligten Testprotokoll etc., zu entsprechen.

Zweiter Aspekt der Erfindung

[0075] Dieser Aspekt der Erfindung betrifft eine Testvorrichtung, worin der Matrixkalibrator einen zentralen Punkt darstellt. Der Matrixkalibrator wird in analytischen Verfahren zum Umwandeln gemessener Signalwerte (Probenwerte) für einen komplexierten, analytisch nachweisbaren Reaktant (=Reaktant*) in reale Mengen an Analyt in einer Probe, in Verbindung mit der Durchführung eines Analyseverfahrens unter Verwendung biospezifischer Affinitätsreaktionen, verwendet. Wie in dem Verfahrensaspekt wird Reaktant* in einer Menge komplexiert, welche mit der Analytmenge in einer Probe zusammenhängt. Der wichtigste Typ von analytischen Verfahren, für welche die Vorrichtung verwendet werden kann, besteht in denjenigen, für welche das Verfahren der Erfindung verwendet wird, d. h. Verfahren, worin man Komplexe, umfassend Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, bildet. Reaktant I, Analyt', Reaktant* und --haben dieselben Bedeutungen, wie im Verfahrensaspekt.

[0076] Die Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß sie folgendes aufweist:

- a) Eine Durchströmungsmatrix, in welcher ein Abschnitt des Prozess-Stroms zum Transport von Reaktant* vorliegt, und dadurch, daß dieser Abschnitt folgendes umfaßt
 - i. eine oder mehrere Kalibratorzonen (CZ1, CZ2 etc.), umfassend einen Kalibrator, oder einen Binder bzw. Bindepartner für den Kalibrator, welcher fest an die Matrix verankert ist, wobei die Mengen an Kalibrator oder Kalibratorbinder, jeweils, für mindestens zwei Kalibratorzonen verschieden sind, und wobei der Kalibrator Bindungsstellen aufzeigt, an welche Reaktant* binden kann, wenn Reaktant* durch eine Kalibratorzone transportiert wird, und
 - ii. eine Applikationszone für Reaktant* ($A_R \cdot Z$), lokalisiert stromaufwärts von der einen oder den mehreren Kalibratorzonen.

[0077] Wenn die Kalibratorzone/zonen anstelle des Kalibrators einen Binder für Kalibratormaterial enthält, enthält die Vorrichtung vorzugsweise ebenfalls:

- b) Kalibrator, welcher beweglich (diffundierbar) in oder stromabwärts von $A_S \cdot Z$ im voraus abgeschieden ist.

[0078] Vorzugsweise ist die Vorrichtung in einem Kit eingeschlossen, welches umfaßt:

- c) Reaktant*, welcher im voraus in $A_R \cdot Z$ abgeschieden sein kann.

[0079] Der Prozess-Strom kann ebenfalls (a) eine Detektionszone (DZ), lokalisiert stromabwärts oder zusammenfallend mit $A_R \cdot Z$, und in welcher ein Einfänger fest fixiert vorliegt, über welchen Reaktant* an DZ binden kann, und (b) ein Applikationszone für Probe ($A_S \cdot Z$), lokalisiert stromaufwärts oder zusammenfallend mit der DZ, enthalten. $A_R \cdot Z$ kann stromaufwärts oder stromabwärts zu $A_S \cdot Z$ (falls vorhanden) oder damit zusammenfallend, vorzugsweise stromaufwärts oder stromabwärts, lokalisiert sein. Wenn $A_S \cdot Z$ und DZ im gleichen Pro-

zess-Strom wie die Kalibratorzonen vorhanden sind, ist A_SZ vorzugsweise stromaufwärts und DZ vorzugsweise stromabwärts von existierenden Kalibratorzonen lokalisiert.

[0080] In bevorzugten Ausführungsformen hat der fest verankerte Reaktant (Einfänger) biospezifische Affinität für den Analyt oder für einen Analyt-verwandten Reaktant, welcher analytisch detektierbar sein kann. Der Analyt-verwandte Reaktant ist hauptsächlich für kompetitive Testvarianten relevant.

[0081] Die Kalibratorensubstanz wird auf die gleiche Weise ausgewählt, wie im Verfahrens-Aspekt der Erfindung. In denjenigen Fällen, wo die ausgewählte Kalibratorensubstanz biospezifische Affinität für den Analyten aufweist, sollte die entsprechende Kalibratorzone stromaufwärts von A_SZ lokalisiert sein.

[0082] Zusätzliche Details in Bezug auf Kalibratoren, Zonen, Reaktanten, Matrices, Prozess-Ströme, Testprotokolle, Proben etc. sind aus der Beschreibung des Verfahrensaspektes der Erfindung offensichtlich.

[0083] Die Erfindung wird nun mit einer Anzahl von Beispielen veranschaulicht werden, welche verschiedene bevorzugte Ausführungsformen davon zeigen. Die Erfindung wird durch die beigefügten Ansprüche und das, was in der Beschreibung offenbart wird, definiert.

Beispiel 1: Bestimmung von Birken-spezifischem IgE mit Kohlenstoffteilchen-Konjugat und mit an die Matrix gebundenem Kalibrator

Verfahren und Materialien

Adsorption von Phenyldextran an Polystyrolteilchen:

[0084] Phenyldextran (Substitutionsgrad: 1 Phenylgruppe auf jeder fünften Monosaccharideinheit = 20%, Mw Dextran 40000, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde auf Polystyrolteilchen (0,49 µm, Bangs Laboratories, USA) adsorbiert durch Inkubationen unter Röhren mit Phenyldextran, gelöst in entionisiertem Wasser, und zwar bei 1) 5 mg/ml, 10% Teilchensuspension, RT 1 Stunde, 2) 5 mg/ml, 5% Teilchensuspension, RT 1 Stunde, 3) 20 mg/ml, 1% Teilchensuspension, RT über Nacht 15 Stunden. Die Teilchen wurden anschließend zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die Teilchensuspensionen wurden zwischen jeder Inkubation und Waschung zentrifugiert (12100 × g, 25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10000 U/min). Die Teilchensuspension wurde schließlich sonifiziert (Ultraschall-Bad, Branson 5210, 5 Minuten).

Kopplung von humanem IgE (hIgE) an Polystyrolteilchen (= hIgE-Teilchen):

[0085] Humanes IgE wurde an Phenyldextran-beschichtete Polystyrolteilchen mit CDAP (1-Cyano-4-dimethylamino-pyridiniumbromid) gekoppelt (Kohn, J., und Wilchek, M., FEBS Letters 154(1), (1983) 209–210).

[0086] Die Entsalzung und der Pufferwechsel von hIgE wurden durch Gelfiltration (PD-10, Pharmacia Biotech AB, Schweden) in NaHCO₃, 0,1 M, pH 8,5, durchgeführt. 278 mg Polystyrolteilchen (wie obenstehend) in 2%iger Lösung in 30% (bezogen auf Volumen) Aceton wurden mit 4,2 ml CDAP (0,44 M) und 3,4 ml TEA (0,2 M Triethylamin, Riedel-de Haen, Deutschland) aktiviert. CDAP wurde während 60 Sekunden langem Röhren zugesetzt, und TEA während 120 Sekunden. Die Teilchen wurden mit 30% (bezogen auf Volumen) Aceton gewaschen und bei 12100 × g zentrifugiert (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10000 U/min). 25 mg hIgE wurden an die aktivierte Teilchen in einer Inkubation unter Röhren über Nacht bei +4°C gekoppelt. Dann wurden die Teilchen vor Deaktivierung mit 0,05 M Glutaminsäure und 0,05 M Asparaginsäure in NaHCO₃-Puffer zentrifugiert. Die Inkubation wurde unter Röhren über Nacht bei +4°C durchgeführt. Gekoppelte Teilchen wurden mit 0,1 M NaHCO₃ und zweimal mit 20 mM Boratpuffer, pH 8,5, gewaschen. Die Teilchenkonzentration wurde spektrophotometrisch bei A₆₀₀ nm mit unbehandelten Teilchen als Referenz bestimmt. Die Konzentration von gekoppeltem Protein wurde durch Vorliegen von radioaktivem humanen IgE während der Kopplung bestimmt.

Extraktion von t3 (Birkenpollen, Betula verrucosa):

[0087] 1 Teil (bezogen auf Gewicht) Birkenpollen (Allergon, Schweden) wurde mit 10 Teilen (Volumen) von 0,1 M Phosphatpuffer (bezeichnet als 1/10), pH 7,4, extrahiert. Die Extraktion dauerte 2 Stunden lang auf einem Schütteltisch bei +4°C. Der Extrakt wurde 1,75 Stunden lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Nach Filtrieren wurde die Lösung auf eine PD-10-Säule aufgetragen und in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5, eluiert (bezeichnet als 1/14).

Kopplung von t3-Extrakt an ein Polystyrolteilchen (t3-Teilchen):

[0088] t3-Extrakt (1/14) wurde mit CDAP (Kohn und Wilchek, FEBS Letters 154(1) (1983), 209–210) an mit Phenyldextran beschichtete Polystyrolteilchen gekoppelt. Polystyrolteilchen (400 mg, beschichtet mit Phenyldextran, wie oben) in 30% (bezogen auf Volumen) Aceton, 2%ige Teilchensuspension, wurden aktiviert mit 60

mg CDAP (100 mg/ml in 30% Aceton) und 0,48 ml 0,2 M Triethylamin (Riedel-de Haen, Deutschland). CDAP wurde unter Rühren zugesetzt, und TEA wurde tropfenweise während 90 Sekunden und bei insgesamt 120 Sekunden langem Rühren zugesetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 30% Aceton (4faches Volumen) und 35 Minuten langes Zentrifugieren bei $12400 \times g$ abgelöscht. Die Teilchen wurden einmal mit entionisiertem Wasser gewaschen. 32 ml t3-Extrakt in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5, wurden zu 80 mg der aktivierten Teilchen zugegeben, und die Kopplung wurde 1 Stunde lang auf einem Schütteltisch fortgesetzt. Dann wurden die Teilchen zentrifugiert, bevor sie mit 0,05 M Asparaginsäure und 0,05 M Glutaminsäure in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5, deaktiviert wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei +4°C auf einem Schütteltisch. Die Teilchen wurden durch Zentrifugieren in 1) 0,1 M NaHCO₃, 0,3 M NaCl, pH 8,5; 2) 0,1 M Na-Aacetat, 0,3 M NaCl, pH 5; 3) 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5; und 4) 20 mM Na-Borat, pH 8,5, gewaschen.

[0089] Die Teilchenkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 600 nm mit urbeschichteten Polystyrolteilchen als Referenz bestimmt.

Adsorption von Anti-Human-IgE-Antikörper auf Kohlenstoffteilchen (Kohlenstoffteilchen konjugat = Reaktant*):

[0090] Monoklonales Anti-hIgE wurde auf Kohlenstoffteilchen (sp 100 von Degussa, Deutschland) adsorbiert; siehe Pharmacia AB, WO 96/22532. Die fertige Suspension wurde mit Puffer auf 400 µg Kohlenstoffteilchen pro ml verdünnt.

Ablagerung von t3-Teilchen auf Membran in einer Detektionszone:

[0091] Auf Nitrocellulose-Blätter mit Polyester-Rückseite (Whatman, 8 µm, 5 cm breit) wurden 4% der obenstehend erwähnten t3-gekoppelten Teilchen mit einem Linear Striper (IVEK Corporation) mit einer Strömung von 1 µl/s und 1 µl/cm als eine gerade Zone aufgebracht. Die Blätter wurden 1 Stunde lang, 30°C, getrocknet, woraufhin die Blätter in rechten Winkeln relativ zu der Zone zu 0,5 cm breiten Streifen zerschnitten wurden (Matrix 1201 Membran Cutter, Kinematics Automation).

Ablagerung von hIgE-Teilchen in Kalibratorzonen:

[0092] Auf Nitrocelluloseblätter mit Polyester-Rückseite (Whatman, 8 µm, 5 cm breit) wurden hIgE-Teilchen als parallele Kalibratorzonen mit einem Linear Striper (IVEK Corporation, USA) abgeschieden. Die Strömung betrug 1 µl/s und 1 µl/cm. Die Blätter, welche für Streifen, die nur Kalibratorzonen aufweisen, beabsichtigt waren, wurden mit sechs parallelen Zonen beschichtet. Die hIgE-Konzentrationen in den Zonen betrugen 0, 0,84; 3,4; 14; 54,2 und 217 ng hIgE/0,5 cm. Vor der Ausführung der Ablagerung wurden die hIgE-Teilchen in Boratpuffer (20 mM, pH 8,5, Dextran T5000, 4,2% w/w, Sorbitol, 5,8% w/w) verdünnt. Alle Zonen umfaßten ebenfalls 1% Phenyldextranbeschichtete Teilchen, um dieselbe Menge an Teilchen in jeder Zone zu ergeben. Auf einem getrennten Nitrocelluloseblatt wurde eine Zone mit hIgE-Teilchen (14 ng hIgE/0,5 cm, PIC = positiver interner Kalibrator) und in einer parallelen Zone t3-Teilchen wie obenstehend (Detektionszone) abgelagert. Die Ablagerung fand mit denselben Parametern wie für hIgE-Teilchen statt. Die Blätter wurden 1 Stunde lang, 30°C, getrocknet, und wurden dann senkrecht im Verhältnis zu den Zonen zu 0,5 cm breiten Streifen geschnitten (Singularator: Matrix 1201 Membranschneider, Kinematic Automation, USA).

Test-Verfahrensweise:

[0093] Die Streifen wurden auf einer ebenen Kunststoffoberfläche montiert. An der Spitze (0,5 cm) auf dem Streifen wurde eine Ansaugmembran plaziert (Breite 3 cm, Whatman, 17 Chr). Um einen konstanten Druck zu erhalten, wurden Metallgewichte auf die Ansaugmembranen gesetzt. 10 mm von der unteren Kante wurde ein 2 mm breiter Inplastor-Streifen (vorverklebte Polyesterfolie) angebracht. Der Inplastor-Streifen sollte aufgebrachte Flüssigkeiten daran hindern, über einen zu großen Bereich der Membran auszufließen. An das untere Ende des Streifens wurden 30 µl Probe oder Puffer, als Alternative, aufgebracht. Nach Einsaugen der Probe wurde ein Volumen der folgenden Komponenten in der angegebenen Reihenfolge appliziert: 15 µl Puffer, 15 µl Kohlenstoffteilchenkonjugat, wie obenstehend, und 30 + 30 µl Puffer. Bei dem Puffer handelte es sich um: 0,1 M NaPO₄, 3% BSA, 0,05 NaN₃, 3% Saccharose, 0,5% NaCl, 0,25% Phenyldextran, 0,05% Rindergammaglobulin, pH 7,5. Das Ausmaß der Schwärzung der Reaktionszonen wurde als Extinktion mittels Ultroscan (Ultroscan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB) gemessen.

Ergebnisse

A) Aktivitätsbestimmung anhand von Kalibrator-Kurve von abgelagertem IgE gegen IgE-Kalibratoren (24°C), welche auf separaten Streifen mit Anti-hIgE-Antikörper in der Bindungszone als Proben laufen ge-

lassen wurden.

Tabelle 1:

	Abgelagerte Menge IgE	Berechnet KU/L	Extinktion (x1000)*
1	0,84	0,27	46
2	3,4	0,48	109
3	14	0,71	266 nachstehend als positiver interner Kalibrator verwendet
4	54,2	2,7	619
5	217	66,3	1882

* = Extinktion auf einer Reaktionszone, nachdem Kohlenstoffteilchenkonjugat gebunden hat.

B) Bestimmung von Birken-spezifischem IgE-Antikörper in Patientenproben, welche bei 18, 24 und 37°C mit und ohne positivem internen Kalibrator (PIC) laufen gelassen wurden, um die Standardkurve (Lauf bei 24°C) einzustellen.

Tabelle 2: Ergebnisse (KU/L) mit und ohne korrigierter Kalibratorkurve:

	Korrigiert			Nicht korrigiert		
	18°C	24°C	37°C	18°C	24°C	37°C
Probe 1	1,3	1,1	1,4	0,83	1,1	1,8
Probe 2	6,9	5,5	6,7	5,1	8,6	20

[0094] Die Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, die Variation in separaten Durchläufen durch Verwendung von positiven internen Kalibratoren zu kompensieren. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, daß es möglich ist, im voraus abgeschiedene Kalibratoren zu verwenden.

[0095] Die in diesem Beispiel gezeigte Ausführungsform kann so modifiziert werden, daß eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllt werden, wobei vorliegen (a) im voraus abgeschiedener Reaktant* in einer Applikationszone und/oder (b) eine Applikationszone für Probe, lokalisiert stromabwärts oder stromaufwärts der Applikationszone für Reaktant*, (c) Zonen, welche die gleichzeitige Zugabe von Reaktant* und Probe gestatten.

Beispiel 2: Bestimmung von Birken-spezifischem IgE mit fluoreszenter Detektions-Teilchen und mit einem Kalibrator, der in der Applikationszone im voraus abgeschieden wird

Verfahren und Materialien

Kopplung von Streptavidin an Polystyrolteilchen:

[0096] Streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden) wurde kovalent an Phenyldextran-adsorbierte Polystyrolteilchen mit CDAP (1-Cyano-4-dimethylaminopyridiniumbromid) (Kohn, J., und Wilchek, M., FEBS Letters 154 (1) (1983) 209–210) gemäß der Beschreibung in obenstehendem Beispiel 1 für hIgE gekoppelt. Die gekoppelten Teilchen wurden dreimal mit 50 mM NaPO₄, 0,05% NaN₃, pH 7,4, gewaschen. Die Teilchenkonzentration wurde spektrophotometrisch bei A₆₀₀ nm mit unbehandelten Teilchen als Referenz bestimmt.

Ablagerung von Streptavidin-gekoppelten Teilchen auf Nitrocellulosemembranen:

[0097] Auf Nitrocelluloseblättern mit Polyesterrückseite (Whatman, 8 µm, 5 cm breit) wurden mit einem Linear Stripper (IVEK Corporation) Zonen aus folgendem aufgetragen:

- 1) Streptavidin-gekoppelte Teilchen, verdünnt auf 1% Teilchengehalt in 10 mM NaPO₄, 5% Saccharose, 5% Dextran T5000, 0,01% NaN₃, pH 7,4;
- 2) t3-gekoppelte Teilchen, hergestellt gemäß Beispiel 1, verdünnt auf 4% Teilchengehalt in 50 mM NaPO₄, 10% Saccharose, 0,05% NaN₃, pH 7,4. Die Abscheidungs-Strömung belief sich auf 2,5 µl/cm, und die Rate

betrug 20 mm/sec.

[0098] Die Ablagerungen wurden 1 Stunde lang bei 30°C getrocknet, und die Blätter wurden zu 0,5 cm breiten Streifen zerschnitten (Matrix 1201 Membranschneider, Kinematics Automation).

Kopplung von Anti-hIgE-Antikörpern an Detektionspartikel:

[0099] Antikörper gegen hIgE, welche mit Pepsin zu fab'2-Fragmenten gespalten worden waren, wurden an fluoreszente Polystyrolteilchen mit Aldehydgruppen auf ihrer Oberfläche (Molecular Probes C-17177-Trans-FluoSpheres, Aldehyd-Sulfat-Mikrokügelchen, 0,1 µm, 633/720, 2 Feststoffe) gekoppelt. Dann wurden 23 mg Antikörper an 66 mg Teilchen in 50 mM Na-PO₄-Puffer, pH 6,5, über Nacht bei Raumtemperatur gekoppelt, woraufhin 205 µl NaCNBH₄ (5 M) zugesetzt wurden, um die Kopplung während 3 Stunden bei Raumtemperatur zu reduzieren. Es wurde eine Zentrifugation bei 20800 × g (50 Minuten in Eppendorf 5417R, 14000 U/min) durchgeführt und eine Deaktivierung in 0,05 M Glutaminsäure und 0,05 M Asparaginsäure in entionisiertem Wasser, pH 6,5, wurde dann über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Zentrifugation während 50 Minuten bei 20800 × g wurde eine Blockierung mit 0,2% BSA in 50 mM NaPO₄, pH 7,4, mit 0,05% NaN₃ durchgeführt, und eine Inkubation fand bei +4°C statt. Die Zentrifugation wurde dann erneut bei 20800 × g während 50 Minuten durchgeführt, gefolgt von zwei Waschungen mit Blocking-Puffer, welcher dann ebenfalls für die Aufbewahrung verwendet wurde. Die Teilchenkonzentration wurde in einem Fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) mit einer Standardkurve, aufgestellt mit dem ursprünglichen Teilchen, bestimmt. Das gekoppelte Protein während der Kopplung wurde bestimmt durch Vorliegen von radioaktivem Anti-hIgE während der Kopplung.

Biotinylierung von hIgE:

[0100] Die Biotinylierung von hIgE wurde gemäß den vom Hersteller (Pierce) empfohlenen Bedingungen ausgeführt. hIgE wurde durch Gelfiltration mit PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech AB) in 0,15 M KPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,8, entsalzt. Zu 0,95 ml (0,59 mg) hIgE wurden 0,010 ml Biotin-LC-Sulfo-NHS (3,59 mM, Pierce), zugesetzt. Die Inkubation fand dann 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, woraufhin die Kopplungsreaktion durch die Zugabe von 40 µl 2 M Glycin abgelöscht wurde. Die Mischung wurde dann auf eine PD-10-Gelfiltrationssäule, äquilibriert mit 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,4, aufgetragen. Die Ausbeuten und die Endkonzentration wurden aus der Radioaktivität berechnet, da I-125-markiertes hIgE in die Kopplung eingeschlossen wurde. Die Konzentration von hIgE wurde durch Immunchromatographie und UniCAP tlgE (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Schweden) analysiert.

Ablagerung von biotinyliertem IgE auf Applikationsfilter:

[0101] Auf Applikationsfilter von 5 × 5 mm (Whatman F075-14) wurden 0,006 ml biotinyliertes IgE (1,6 ng), verdünnt in 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, 6% BSA, 5% Lactose, 5% Dextran T5000, pH 7,4, ausgegeben. Die Filter wurden 1 Stunden lang bei 30°C getrocknet.

Testverfahrensweise:

[0102] Streifen wurden auf eine Oberfläche montiert, welche zur Tischebene um etwa 16% geneigt war. Saugmembranen (3,5 cm breit, Schleicher & Schuell, GB004) wurden 0,5 cm in das obere Ende der Membran hinein plaziert. Um einen konstanten Druck zu erhalten, wurden Metallgewichte auf die Saugmembranen plaziert. Proben und Reagenzien wurden dann wie nachstehend beschrieben, aufeinanderfolgend pipettiert. Jedes Proben- und Reagenzvolumen wurde in die Membran aufgesaugt, bevor das nachfolgende Volumen pipettiert wurde.

- 1) 30 µl 50 mM NaPO₄, 0,15 mM NaCl, pH 7,4.
- 2) Ein Filter mit im voraus abgelagertem biotinyliertem IgE wurde am Boden des Streifens plaziert.
- 3) 30 µl Patientenserum wurden auf jeden Filter pipettiert.
- 4) 20 µl Testpuffer (0,1 Na-PO₄, 0,15 M NaCl, 10% Saccharose, 3% BSA, 0,05% Rinder gammaglobulin, 0,05% NaN₃, pH 7,4) wurden dem Filter zugesetzt.
- 5) Der Applikationsfilter wurde entfernt.
- 6) 20 µl Detektions-Konjugat (75 µg/ml), verdünnt in Testpuffer.
- 7) 2 × 30 µl Testpuffer.
- 8) Die Fluoreszenz der Detektionszone wurde als eine Antwortfläche (Vmm) mit einem Abtast-Rot-Laser-Fluorometer (635 nm) gemessen.

[0103] Es wurden drei positive t3-Seren ausgewählt und in dreifacher Ausfertigung mit drei unterschiedlichen Konjugat-Ansätzen analysiert. Die Signalflächen, die man mit Nitrocellulose, beschichtet mit unterschiedlichen IgE-Teilchenkonzentrationen (beschrieben im obenstehenden Beispiel 1), welche mit Konjugat 2 laufen gelassen wurden, erhielt, wurden als eine gespeicherte Kalibrationskurve verwendet.

[0104] Die PIC-Korrektur bedeutete, daß das Signal für die Reaktionszone für t3 mit $\text{PI-C}_{\text{exp.}}/\text{PIC}_{\text{beob.}}$ multipliziert wurde, bevor eine Ablesung gegen die gespeicherte Kalibrationskurve (Master-Kurve) vorgenommen wurde. $\text{PIC}_{\text{exp.}}$ war als der Durchschnitt der PIC-Signale definiert, welche im Durchlauf mit Konjugat 2 erhalten wurden.

Ergebnisse
Ablesung gegen Master-Kurve für unkorrigiertes Signal

Serum	Konz. (KU/L)	Durchschnitt von		Dreifache Ausfertigung	Zwischen-
		Konjugat 1	Konjugat 2	Konjugat 3	CV (%)
1	0,75		3,0	1,4	68
2	5,7		29,1	18,7	66
3	2,5		10,8	6,8	62

Ablesung gegen Master-Kurve für PIC-korrigiertes Signal

Serum	Konz. (KU/L)	Durchschnitt von		Dreifache Ausfertigung	Zwischen-
		Konjugat 1	Konjugat 2	Konjugat 3	CV (%)
1	2,5		3,5	1,9	29
2	14,2		19,5	20,7	19
3	3,6		5,3	6,1	26

[0105] Der Zwischen-CV (%) wird als die Variation der drei Mittelwerte, erhalten für die drei unterschiedlichen Konjugate, berechnet. Die Ergebnisse zeigen, daß die Idee einer im voraus abgelagerten Kalibratormatrix in der Applikationszone funktioniert, und daß deren Verwendung als ein PIC darüber hinaus eine verringerte Variation zwischen Assays ergibt.

Patentansprüche

1. Lateral-Durchströmungsverfahren bei einem Verfahrensprozess zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe, beinhaltend das Verwenden biospezifischer Affinitätsreaktionen, und umfassend die folgenden Schritte:

i. Bilden eines Komplexes, umfassend:

Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, worin

a. Reaktant* und Reaktant I biospezifische Affinität für den Analyten zeigen,

b. Reaktant* analytisch nachweisbar ist,

c. Analyt' der Analyt oder ein Analyt-verwandter Reaktant ist, und anschließend

ii. Bestimmen des nachweisbaren Signals von Reaktant* in dem Komplex, und

iii. Erhalten der Menge des Analyten in der Probe durch Vergleichen des Probenwerts mit einem oder mehreren Kalibratorwerten, von denen jeder einer Standardmenge an Analyt entspricht,

dadurch gekennzeichnet, daß

A) vor der Bestimmung des Kalibratorwertes entweder (i) der Kalibrator oder (ii) ein Bindepartner bzw. Binder für den Kalibrator an eine Matrix gebunden worden ist, und wenn ein Binder für den Kalibrator an die Matrix gebunden worden ist, Kalibrator zugegeben wird oder Kalibrator, der in der Matrix vorabgelagert wurde, bei der Bestimmung des Kalibratorwertes freigegeben wird, und daß die Matrix in dem flüssigen Medium unlöslich ist, in welchem die Bindung von Reaktant* an den Kalibrator stattfindet,

B) Kalibrator und der Analyt die Fähigkeit aufweisen, biospezifisch an Reaktant* über äquivalente Bindungsstellen zu binden,

C) a. die Matrix eine oder mehrere Kalibratorzonen (CZ1, CZ2, CZ3 etc.) aufweist, welche im selben Prozess-Strom bzw. Prozess-Durchfluß lokalisiert sind, von denen mindestens zwei unterschiedlichen Standard-

mengen an Analyt entsprechen, und

- (i) jede Kalibratorzone Kalibrator in einer Menge umfasst, entsprechend einer Standardmenge an Analyt, oder
- (ii) jede Kalibratorzone Kalibratorbinder enthält,
wobei die Menge an Kalibratorbinder und die Menge an Kalibrator einer Standardmenge an Analyt entsprechen, und
- c. Reaktant* an den Kalibrator gebunden wird durch Transportieren des Reaktanten* durch die Kalibratorzonen.

D) der Transport von Reaktant* zur Bindung an Matrix-Kalibrator in den verschiedenen CZ über diesen Prozess-Strom in Richtung auf die Detektionszone(n) (DZ) stattfindet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kalibrator vor der Bestimmung des Kalibratorwertes an die Matrix gebunden worden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Binder für den Kalibrator vor der Bestimmung des Kalibratorwertes an die Matrix gebunden worden ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Binder für den Kalibrator ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares ist, und dass das andere Mitglied des spezifischen Bindungspaares an den Kalibrator gekoppelt oder konjugiert ist.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass die Durchströmungsmatrix eine laterale Durchströmungsmatrix ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1–4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass

- a. die separaten Kalibratorzonen (CZ) in separaten Prozess-Strömen lokalisiert sind, und
- b. der Transport von Reaktant* für die Bindung an Kalibrator in einer Kalibratorzone CZ über den jeweiligen Prozess-Strom stattfindet

7. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass

- a. der Prozess-Strom bzw. die Prozess-Ströme keine Detektionszone aufweisen, und
- b. der Komplex in einer Detektionszone in einem Prozess-Strom ohne Kalibratorzone gebildet wird und in einer Matrix des gleichen Typs wie die Kalibratorzonen vorhanden ist.

8. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix eine Durchströmungsmatrix ist, und dass, entlang ein und desselben Prozess-Stroms, folgendes vorliegt:

- a. eine oder mehrere Kalibratorzonen (CZ), von denen jede einen Matrix-Kalibrator oder einen Matrix-Kalibratorbinder aufweist,
- b. eine oder mehrere Detektionszonen, von denen keine mit irgendeiner Kalibratorzone zusammenfällt, und in denen ein Einfänger fest verankert ist und entweder der Reaktant I oder ein biospezifischer Affinitätsreaktant ist, der direkt oder indirekt in der Lage ist, biospezifisch den Reaktanten I zu binden,
- c. eine Applikationszone für Reaktant*, $A_R \cdot Z$, welche stromaufwärts der genannten CZ und DZ liegt, und an welcher Reaktant* im voraus abgeschieden worden sein kann, und
- d. eine Applikationszone für Probe ($A_S \cdot Z$), welche gelegen ist
 - i. stromaufwärts oder zusammenfallend mit einer Detektionszone,
 - ii. stromabwärts oder stromaufwärts oder zusammenfallend mit $A_R \cdot Z$ ($A_S \cdot Z/A_R \cdot Z$), oder
 - iii. stromaufwärts, stromabwärts oder zusammenfallend mit einer Kalibratorzone, wobei die Zone zur Applikation der Probe ($A_S \cdot Z$) vorzugsweise stromaufwärts sowohl der Detektions- als auch Kalibratorzonen liegt, und dadurch, dass Reaktant* zu $A_R \cdot Z$ zugegeben wird, wenn Reaktant* nicht im voraus abgeschieden wird, oder Puffer zu $A_R \cdot Z$ zugegeben wird, wenn Reaktant* im voraus abgeschieden wird, und dass die Probe zu ASZ zugegeben wird, gegebenfalls vorgemischt mit Reaktant*, wenn $A_S \cdot Z$ und $A_R \cdot Z$ zusammenfallen, so dass Analyt und Reaktant* DZ zur gleichen Zeit erreichen, oder so dass der Analyt DZ vor dem Reaktant* erreicht.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibratorzone oder -zonen (KZ) einen Kalibratorbinder aufweisen, und dass der Kalibrator stromaufwärts der Kalibratorzone oder -zonen im voraus abgeschieden ist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Prozess-Strom zwei oder mehrere der Kalibratorzonen umfasst.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Prozess-Strom eine oder zwei

der Kalibratorzonen umfasst, und dass der Spiegel an Analyt in der Probe erhalten wird durch:

- a. Zugriff auf einen oder mehrere getrennt erhaltene Kalibratorwerte, und
- b. Vergleichen eines Kalibratorwertes für eine Kalibratorzone (Positiver Interner Kalibrator = PIC), welche im selben Prozeßstrom wie die Detektionszone liegt, mit einem oder mehreren der getrennt erhaltenen Kalibratorwerte,
- c. Adaptieren des Meßsignals aus der Detektionszone an die Abweichung des Meßsignals für PIC von den separaten Kalibratorwerten, und anschließend,
- d. Erhalten des Spiegels an Analyt in der Probe durch Vergleichen des adaptierten Meßsignals aus der Detektionszone mit einem oder mehreren der getrennt erhaltenen Kalibratorwerte, oder umgekehrt hinsichtlich dem, was in den Schritten c und d adaptiert und verglichen worden ist.

12. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 8–11, dadurch gekennzeichnet, dass

- a. $A_S Z$ (i) gemeinsam mit $A_{R^*} Z$ vorliegt ($= A_S Z / A_{R^*} Z$) oder (ii) stromaufwärts von $A_{R^*} Z$ lokalisiert ist, und
- b. für Alternative (i) die Probe mit Reaktant* vorgemischt wird, bevor sie auf die gemeinsame Zone $A_S Z / A_{R^*} Z$ gegeben wird, oder die Probe auf die gemeinsame Zone $A_S Z / A_{R^*} Z$ gegeben wird, welche im voraus abgeschiedenen Reaktant* enthält, und für Alternative (ii) Probe auf $A_S Z$ gegeben wird, welche stromaufwärts lokalisiert ist von $A_{R^*} Z$, welche ihrerseits im voraus abgeschiedenen Reaktant* enthält.

13. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 5–12, dadurch gekennzeichnet, dass Reaktant* Partikel als analytisch nachweisbare Gruppe aufweist, und/oder Kalibrator oder Kalibratorbinder und/oder Einfänger, falls eine Detektionszone vorliegt, an der Matrix über Partikel verankert ist/sind.

14. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1–13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ein Antikörper ist, gerichtet gegen Reaktant I oder Reaktant*, und

- a. Reaktant* ein gegen den Analyten gerichteter Antikörper und Reaktant I ein Antigen/Hapten ist, wenn der Analyt ein gegen Reaktant I gerichteter Antikörper ist, und
- b. Reaktant* ein Antigen oder Hapten ist und Reaktant I ein gegen den Analyten gerichteter Antikörper ist, wenn der Analyt ein gegen Reaktant* gerichteter Antikörper ist.

15. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1–13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ein Antigen ist, und Reaktant* und Reaktant I gegen den Analyten gerichtete Antikörper sind.

16. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1–15, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren als Teil der Diagnostizierung von Allergie oder einer Autoimmunkrankheit durchgeführt wird.

17. Vorrichtung zum Transformieren gemessener Signalwerte eines komplexierten, analytisch nachweisbaren Reaktanten (= Reaktant*) zu realen Mengen eines Analyten in einer Probe, in Verbindung mit der Durchführung eines Analyseverfahrens, welches biospezifische Affinitätsreaktionen zur Bestimmung der Menge eines Analyten in einer Probe anwendet, um Komplexe zu bilden, umfassend Reaktant* in einer Menge, welche mit der Menge an Analyt in der Probe zusammenhängt, dadurch gekennzeichnet, dass sie folgendes aufweist: eine Durchströmungsmatrix, in welcher ein Prozess-Strom-Bereich für den Transport von Reaktant* vorliegt, und dass in diesem Bereich vorliegen

- i. eine oder mehrere Kalibratorzonen (CZ1, CZ2 etc.), umfassend einen Kalibrator oder einen Binder für den Kalibrator, der fest an der Matrix verankert ist, wobei die Mengen an Kalibrator bzw. Kalibratorbinder für mindestens zwei Kalibratorzonen unterschiedlich sind, und der Kalibrator Bindungstellen aufweist, an die der Reaktant* binden kann, wenn Reaktant* durch eine Kalibratorzone in Richtung auf die Detektionszone(n) (DZ) transportiert wird, und
- ii. eine Applikationszone für Reaktant* ($A_{R^*} Z$) stromaufwärts der genannten einen oder mehreren Kalibratorzonen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kalibratorbinder fest in der Matrix verankert ist, und daß die Vorrichtung Kalibrator umfasst, der im voraus stromaufwärts der Kalibratorzone, zum Beispiel in $A_S Z$, abgeschieden wurde.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung Reaktant* umfasst, der im voraus in $A_{R^*} Z$ abgeschieden wurde.

20. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Prozeß-Strom eine Detektionszone (DZ), welche stromabwärts von oder zusammenfallend mit $A_{R^*} Z$ gelegen ist und einen fest verankerten Einfänger umfasst, über den Reaktant* an DZ binden kann, und eine Zone zur Applikation der Probe

(A_SZ), welche stromaufwärts der DZ liegt oder damit zusammenfällt, umfasst.

21. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass A_RZ stromaufwärts oder stromabwärts von A_SZ gelegen ist oder damit zusammenfällt, wobei stromaufwärts oder stromabwärts gelegene Lokalisierungen bevorzugt werden.

22. Vorrichtung gemäß einem beliebigen der Ansprüche 20–21, dadurch gekennzeichnet, dass der fest verankerte Reaktant (Einfänger) biospezifische Affinität für den Analyten oder für einen Analyt-verwandten Reaktanten aufweist.

23. Vorrichtung nach einem beliebigen der Ansprüche 20–21, dadurch gekennzeichnet, dass der fest verankerte Reaktant (Einfänger) biospezifische Affinität für einen zweiten Reaktanten aufweist, der seinerseits biospezifische Affinität für den Analyten oder einen Analyt-verwandten Reaktanten aufweist.

24. Vorrichtung nach einem beliebigen der Ansprüche 20–23, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehreren Kalibratorzonen stromaufwärts der DZ lokalisiert sind.

25. Vorrichtung nach einem beliebigen der Ansprüche 20–24, dadurch gekennzeichnet, dass A_SZ stromaufwärts aller Kalibratorzonen gelegen ist.

26. Testkit, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit eine Vorrichtung nach einem beliebigen der Ansprüche 17–25 umfasst.

27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit Reaktant* umfasst.

28. Kit gemäß Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit Kalibrator umfasst, wenn die Vorrichtung an die Matrix gebundenen Kalibratorbinder aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen