

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503556  
(P2005-503556A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34 Z	4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68	GO 1 N 33/53 Q	
GO 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

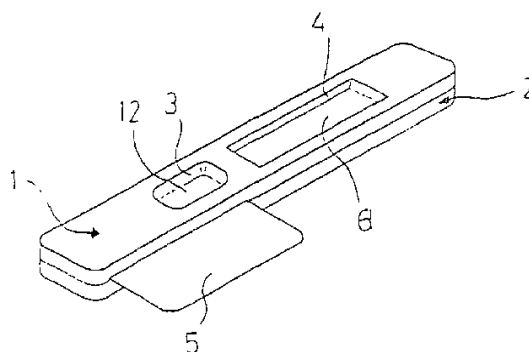
(21) 出願番号 特願2003-529151 (P2003-529151)	(71) 出願人 500139981 ファルマシア・ディアグノスティクス・アクチエボラーグ Pharmacia Diagnosti cs AB スウェーデン、エスエー751 82ウ プサラ
(86) (22) 出願日 平成14年9月17日 (2002.9.17)	(74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日 平成16年3月4日 (2004.3.4)	(74) 代理人 100106231 弁理士 矢野 正樹
(86) 国際出願番号 PCT/SE2002/001671	(72) 発明者 イブ・メンデルーハートヴィッグ スウェーデン、エス756 55ウプサ ラ、ラベニウスヴェーゲン28番
(87) 国際公開番号 W02003/025573	
(87) 国際公開日 平成15年3月27日 (2003.3.27)	
(31) 優先権主張番号 0103072-5	
(32) 優先日 平成13年9月17日 (2001.9.17)	
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)	
(31) 優先権主張番号 60/322, 616	
(32) 優先日 平成13年9月17日 (2001.9.17)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多数-スポット検出ゾーンでの多数-分析物アッセイデバイス

(57) 【要約】

本発明は、多数-スポット検出ゾーンを含む固相検出ゾーンを含む固相アッセイデバイス、および免疫クロマトグラフィーアッセイにおけるその使用に関する。より詳しくは、本発明は、それを通っての流体の横方向輸送を可能とする細長い流動マトリックス(6)、ここに、該マトリックスは試料適応ゾーン3およびその下流を含めた、分析物に直接または間接的に結合することができる固定化された捕獲剤を有する検出ゾーン(8)、ここに、該分析物は、標識された第2の結合剤を分析物に直接的または間接的に結合させることによって検出される；を含む、水性試料中の分析物を測定するためのデバイスに関する。該デバイスは、固定化された捕獲剤が複数の小さなスポットとして検出ゾーン8に分布されており、それにより多数-分析物および/または多数-特異性検出を行うことを特徴とする。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

それを通して流体の横方向輸送を行う細長い流動マトリックス(6)、ここに、上記マトリックスは試料適用ゾーン(3)およびその下流を含み、分析物に直接的または間接的に結合することができる固定化された捕獲剤を有する検出ゾーン(8)、ここに、上記分析物は、標識された第2の結合剤を上記分析物に直接的または間接的に結合させることによって検出され、を含む水性試料中の分析物を測定するためのデバイスであって、A)固定化された捕獲剤は複数の小さなスポットとして検出ゾーン(8)に分布され、それにより、多数-分析物および/または多数-特異性検出を行い、B)捕獲剤は固定化された粒子を介してマトリックスに係留され、C)流動マトリックス当たりのスポットの数は10未満であって、D)スポットのいくつかは陽性対照(類)および/または内部キャリブレーター(類)として機能することを特徴とする上記デバイス。

10

## 【請求項 2】

スポットが、直径が1mmより小さく、好ましくは、直径が0.5mmより小さい請求項1記載のデバイス。

## 【請求項 3】

交差反応性分析物または特異性の検出を可能とする、すなわち、交差反応性分析物が液体の同一の流動線に整列されないようなパターンでスポットが整列される請求項1または2記載のデバイス。

## 【請求項 4】

流動マトリックスが多孔性膜である前記請求項いずれか1記載のデバイス。

20

## 【請求項 5】

マトリックスが固体材料のストリップである請求項1ないし3いずれか1記載のデバイス。

## 【請求項 6】

捕獲剤が抗体またはその免疫反応性断片である請求項1ないし5いずれか1記載のデバイス。

## 【請求項 7】

捕獲剤がアレルゲンまたはその免疫反応性断片である請求項1ないし5いずれか1記載のデバイス。

30

## 【請求項 8】

捕獲剤が自己抗原またはその免疫反応性断片である請求項1ないし5いずれか1記載のデバイス。

## 【請求項 9】

捕獲剤がDNA/RNA、好ましくは、一本鎖核酸またはアプタマー、またはDNA/RNA様構造体である請求項1ないし5いずれか1記載のデバイス。

## 【請求項 10】

試料が全血、血清、血漿、唾液または尿である前記請求項いずれか1記載のデバイス。

## 【請求項 11】

標識が発蛍光体または色原体である前記請求項いずれか1記載のデバイス。

40

## 【請求項 12】

未知の特異性のスクリーニングのための前記請求項1ないし11の1以上のデバイスの使用。

## 【請求項 13】

特異的免疫グロブリンのスクリーニングのための前記請求項1ないし11の1以上のデバイスの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、多数-スポット検出ゾーンを含む固相アッセイデバイス、および免疫クロマト

50

グラフィーアッセイにおけるその使用に関する。

【0002】

発明の背景

あるタイプの固相アッセイデバイスは、吸収性材料のプレート-形状の流動マトリックス、通常は、硝酸セルロースまたはガラス繊維のごとき膜ストリップを含み、ここに、液体は膜中の毛管力によって横方向に(すなわち、ストリップの平面内を)輸送され得る。該膜は、通常、試料適用ゾーンおよび試料適用ゾーンの下流の検出ゾーンを含む。検出ゾーンにおいては、通常、分析物用の捕獲試薬を固定化する。アッセイを行うためには、適用ゾーンを液体試料と接触させて、注目する分析物につきアッセイする。デバイスは、もし試料中に存在すれば、膜ストリップを通じて、そこで分析物が捕獲される検出ゾーンへ液体の毛管作用が注目する分析物を輸送するのに十分な条件下に維持される。ストリップの下流端部における吸収パッド等は、通常、毛細管液体流動を保証する。次いで、通常は標識された検出試薬を検出ゾーンの上流に加え、検出ゾーン中の捕獲された分析物と相互作用させ、捕獲された分析物の量を測定する。しばしば、検出試薬は、試料適用ゾーンの上流、または試料適用ゾーンまたは検出ゾーンの間いずれかに、例えば、発蛍光または色原体基を含有する拡散して移動可能な粒子の形態で、膜ストリップ中にまたはその上に予め配置される。

10

【0003】

これらの既知のデバイスに伴う主な欠点は、少数の分析物がアッセイ当たりに測定できるに過ぎないことである。

20

EP191640 (Syntex Inc)において、1を超える分析物を検出することができるデバイスが開示されている。しかしながら、検出することができる分析物の数は制限されており、交差-反応性分析物を検出する問題は取り扱われていない。

【0004】

発明の概要

本発明に横たわる問題は、いくつかの分析物、および同一のIgEと反応する異なるアレルゲンのごとき、相互に交差反応する分析物さへの検出を可能とすることであった。この問題は、本発明により多数-スポットデバイスによって解決された。

【0005】

かくして、本発明の第一の態様において、それを通して流体の横方向輸送を行う細長い流動マトリックス、ここに、上記マトリックスは試料適用ゾーンおよびその下流を含み、分析物に直接的または間接的に結合することができる固定化された捕獲剤を有する検出ゾーン、ここに、上記分析物は、標識された第2の結合剤を上記分析物に直接的または間接的に結合させることによって検出され；を含む水性試料中の分析物を測定するためのデバイスであって、A)固定化された捕獲剤は複数の小さなスポットとして検出ゾーンに分布され、それにより、多数-分析物および/または多数-特異性検出を行い、B)捕獲剤は固定化された粒子を介してマトリックスに係留され、C)流動マトリックス当たりのスポットの数は10未満であって、D)スポットのいくつかは陽性対照(類)および/または内部キャリブレーター(類)として機能することを特徴とする上記デバイスが提供される。

30

【0006】

流動マトリックス当たりのスポットの数は好ましくは5ないし1000、より好ましくは10ないし100である。スポットは好ましくは、直径が1mmより小さく、好ましくは直径が約0.5mmより小さい。

40

スポットは、好ましくは、交差反応性分析物または特異性の検出を可能とするパターンで配置される。これは交差-反応性IgEを有するアレルゲンによって例示され、すなわち、そのようなアレルゲンは同一流動線に配置すべきではない。

【0007】

流動マトリックスは、ニトロ-セルロースのごとき多孔性膜、または固体材料のストリップであり得る。

捕獲剤は抗体またはその免疫反応性断片であり得る。あるいは、捕獲剤はアレルゲンまた

50

はその免疫反応性断片である。

【0008】

もう1つの代替法においては、捕獲剤はDNA/RNA、好ましくは一本鎖またはアプタマーである。

デバイスの好ましい具体例においては、スポットのいくつかは陽性対照(類)および/または内部キャリブレーター(類)として機能する。

試料は全血、血清、血漿、唾液または尿である。

標識された第2の結合試薬の標識は、例えば、発蛍光体または色原体である。

【0009】

該デバイスは、未知の特異性のスクリーニングで、ならびに特異的免疫グロブリンの検出で用いることができる。多くのスポットに既知の物質、例えば、蛋白質またはDNA等を沈積させることによって、特定のスポット(類)中の物質に特異的に結合する、試料中に存在するバインダー(類)につき迅速にスクリーニングすることができる。その例は特異的IgEの試料測定であり、ここに、スポットは異なるアレルゲンを含む。もう1つの例は、異なる反応性についてのライブラリー(DNA、抗体等)のスクリーニングについてである。

【0010】

発明の詳細な記載

図1に示すごとく、デバイスは、上方ハウジング部分1、試料に関して、デバイスで実行すべきアッセイで用いるいずれの試薬に対しても不活性な材料、例えば、ポリスチレンまたはポリプロピレンの下方ハウジング部分2を含む。上方ハウジング部分1は、試料ウエル開口3(ここでは、円錐状)および検出ウインドウ4を有する。

【0011】

下方ハウジング部分2は、そこに、吸収性材料(すなわち、毛細管作用による水性媒体の移動に対して感受性の多孔性材料)の膜ストリップ6、例えば、ポリエステル裏打ち上のニトロ-セルロースが設けられている。(図面中の左側の)ストリップ6の上流端部近くには、拡散により移動可能な検出試薬(標識された第2の結合試薬)を含むフィルターピース7がストリップ上に置かれている。そのような検出試薬は、例えば、標識粒子および分析物に結合することができる反応体間のコンジュゲートであり得る。さらに下流には、検出ウインドウ4の下方およびその中に、ストリップ上に特異的なパターンで固定化されたいくつかの捕獲剤または反応体を含むストリップ上の複数-スポット反応ゾーン8が設けられている。捕獲剤は、テストされるべき分析物に結合することができる。反応ゾーン8(図2ないし3)は、図面で示されるよりも小さくても大きくてもよく、5ないし1000の捕獲剤、好ましくは10ないし100の捕獲剤を含むことができる。重要なことには、交差-反応性分析物を有する捕獲剤は、所望により、同一レーンには配置されず、すなわち、液体の同一流動線には配置されない。

【0012】

上方ハウジング部分1は、膜ストリップ6の上流端部に、流動液体または緩衝液のための容器として働かせることを意図した液体吸収性材料のパッド11を含む。ハウジング部分1における開口3は、試料を膜6に導入することを意図している。示された場合には、(所望により、2以上のフィルターよりなることもできる)フィルターエレメント12が、アッセイ用の開口3の下方に設けられ、ここに、試料が全血であって、血液細胞を分離すべき場合には、試料液体は濾過される必要がある。かくして、緩衝液パッド11が緩衝液液体容器(以下、緩衝液パッドという)を形成し、試料開口3およびフィルターエレメント12によって規定される室は、試料ウエルまたは試料容器を形成する。

【0013】

所望により、引き出しフィルム5を、さらに後記する目的で存在させる。膜ストリップ6の下流端部には、吸上エレメント13が設置され(ここでは、セルロースのごとき吸収剤材料のパッドの形態である)、その目的は、膜ストリップ6を通過してのアッセイ液体の毛細管流動を維持するのを助けることにある。

## 【 0 0 1 4 】

試料における分析物のためのアッセイは、以下に記載するデバイスで実行することができる。

デバイスには、通常、緩衝溶液（流動液体）を浸漬した緩衝液パッド 11 を設け、検出試薬はフィルター 7 に予め沈積させ、各適当な捕獲試薬およびキャリブレーション剤は反応（または検出）ゾーン 8 中にスポットの特異的パターンで固定化する。これは、他のスポットよりはキャリブレーションスポットを最適に位置させる可能性を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

キャリブレーションスポットの機能は陽性対照および/または内部キャリブレーターとしてのものである。

もしテストすべき分析物が抗原であれば、フィルター 7 中の検出試薬は、例えば、フルオロゲン - 標識粒子にカップリングした抗原に対する抗体であり得、多数 - スポット反応ゾーン 8 中の固定化された捕獲試薬は抗体であり得、キャリブレーター剤は分析物または分析物のアナログであり得る。

## 【 0 0 1 6 】

所定量の試料をハウジング部分 1 中の開口 3 を通して添加する。全ての必要なアッセイ液体、すなわち、この場合には試料液体および緩衝液液体を次いでデバイス中に存在させるが、引き出しフィルム 5 は、各液体膜ストリップ 6 の間の接触を効果的に妨げる。次いで、引き出しフィルム 5 をオペレーターが除去し、それにより同時液体受領における膜ストリップ 6 を緩衝液パッドおよび試料ウエル 3 中の試料液体と接触させる。もし引き出しフィルムが存在しなければ、アッセイは試料の添加に続いて直接開始するであろう。

## 【 0 0 1 7 】

今や、パッド 11 からの緩衝液液体が、直接パッド 11 と接触する（図 3 参照）そのはるか上流の端部部分を介して膜ストリップ 6 に進入し、毛管力によって膜ストリップ 6 の下流まで輸送される。同時に、試料液体が直接輸送され、続いて、（第一の）緩衝液液体の流動パルスが輸送される。しかしながら、検出試薬フィルター 7 および緩衝液パッド 11 の主な部分は、流動バリア - フィルム 10 によって膜ストリップ 6 から離される。膜ストリップ 6 に輸送された緩衝液液体は、フィルター 7 に進入し、それを通して輸送され、それと共にその中に検出試薬を沈積させ、それにより、検出試薬の流動パルスを形成する。この検出試薬流動パルスは、試料流動および緩衝液流動パルスの後に順次に従う。検出試薬がフィルター 7 から除去された後に膜ストリップ 6 に輸送された緩衝液は、検出試薬流動パルスの後に第 2 の緩衝液流動パルスを形成する。

## 【 0 0 1 8 】

前記した異なる液体流は示した順番にすなわち、試料流動、第一の緩衝液流動、検出試薬流動、および第 2 の緩衝液流動の順で膜ストリップ 6 に沿って輸送され、結局は、多数 - スポット反応ゾーン 8 に到達する。反応ゾーン 8 においては、試料に存在する分析物は、膜中に特異的スポットパターンで固定化された試薬によって捕獲される。形成された分析物 / 捕獲試薬複合体は、以下の第 1 の緩衝液流動によって洗浄され、検出試薬の流れは反応ゾーン中に検出可能な試薬 / 分析物複合体を形成する。後者は最後には、第 2 の緩衝液の流れによって洗浄される。キャリブレーションスポットにおいてはその中の所定量の分析物が、検出試薬流中の検出試薬と反応して検出可能な検出試薬 / 分析物複合体を形成する。反応ゾーンに検出された試薬からのシグナル強度を分析することによって、それはキャリブレーションスポット（類）で得られたものと相関させて、試料中の分析物の量を決定することができる。

## 【 0 0 1 9 】

前記した反応（または検出）ゾーン 8 においては、分析物に特異的に結合することができるいくつかの反応体を（共有結合によって、物理的吸着を介して生物特異的親和性を介して、反応体が共有結合した固定化粒子を介して）特異的スポットパターンで固定化する。しかしながら、その代わりに、反応体と反応することができる剤を膜中に固定化させ、次いで、試料と共に反応体を添加し、あるいは反応ゾーンの上流の領域またはゾーンにある

10

20

30

40

50

膜中に予め沈積させることができる。そのような固定化された剤は特異的結合対 ( s p d ) の 1 つのメンバーであり得、次いで、反応体を s p d の他のメンバーにカップリングまたはコンジュゲートさせる。例示的な特異的結合対は抗原 - 抗体およびハプテン - 抗体、ビオチン - アビジンまたは - ストレプトアビジン、レクチン - 糖、ホルモン - ホルモン受容体、核酸デュプレックスのごとき免疫学的結合対を含む。例えば、反応ゾーンはその中に固定化されたストレプトアビジンを有することができ、分析物用の捕獲反応体はビオチニル化することができる。

**【 0 0 2 0 】**

同様に、キャリアレーションスポット ( 類 ) はキャリアレーター物質それ自体よりはむしろキャリアレーター物質のためのバインダーを含むことができる。バインダーは、通常、前記したもののうちの 1 つのごとき特異的結合対のメンバーである、他方、特異的結合対の他のメンバーは、試料と共に添加することができるか、あるいはキャリアレーターゾーンの上流に予め沈積させることができるキャリアレーター物質にカップリングまたはコンジュゲートさせる。例えば、ストレプトアビジンはキャリアレーターゾーンに固定化することができ、他方、キャリアレーター物質はビオチニル化される。

10

**【 0 0 2 1 】**

ここに考えられるタイプのアッセイデバイス、特に、流動マトリックス、順次アッセイ、キャリアレーターシステム、検出試薬に関するアッセイデバイスのさらなる詳細については、例えば、我々の公開された PCT 出願 W O 99/36776、W O 99/36777 および W O 99/36780 に言及することができる。

20

**【 0 0 2 2 】**

本発明のデバイスを用いて測定すべき分析物は、当業者に容易に明らかであろう。しかしながら、通常、分析物は生物特異的親和性試薬、例えば、抗体または他の蛋白質、ハプテン、DNA 配列のごとき核酸またはポリヌクレオチドである。後者の場合、反応ゾーンはストレプトアビジンを含むことができ、分析物の配列がそれにハイブリダイズする DNA 配列ビオチニル化することができる。

**【 0 0 2 3 】**

本発明のデバイスは、アッセイを開始する前に試料の便利な予備処理を可能とする。本発明のデバイスは我々の公開された PCT 出願 W O 99/60402 に記載されたタイプのアッセイを実行するのにも適しており、ここに、流動マトリックスは、分析物の測定を乱しまたはそれに影響するであろう試料成分を離すために反応 ( 検出 ) ゾーンの上流にクロマトグラフィー分離ゾーンを含む。

30

**【 図面の簡単な説明 】****【 0 0 2 4 】**

【 図 1 】 図 1 は、本発明によるデバイスの具体例の斜視図である。

【 図 2 】 図 2 は図 1 におけるデバイスの側面断面図である。

【 図 3 】 図 3 は、図 2 における側面図に対応する分解図である。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

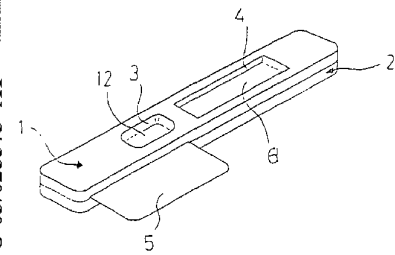
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/025573 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, C12Q 1/68 (74) Agent: DR LUDWIG BRANN PATENTBYRÅ AB, Box 1344, S-751 43 Uppsala (SE).
- (21) International Application Number: PCT/S1802/01671 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AU (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 17 September 2002 (17.09.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0103072-5 17 September 2001 (17.09.2001) SE; 60/322,616 17 September 2001 (17.09.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA DIAGNOSTICS AB [SE/SE]; S-751 82 Uppsala (SE).
- (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MENDELHARTVIG, Ib [SE/SE]; Rabeniusvägen 28, S-756 55 Uppsala (SE); BJÖRKMÄN, Rune [SE/SE]; Käbovägen 34, S-752 36 Uppsala (SE); RUNDSTRÖM, Cerd [SE/SE]; Bruksvägen 16, S-752 41 Uppsala (SE).
- Published:  
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MULTI-ANALYTE ASSAY DEVICE WITH MULTI-SPOT DETECTION ZONE



multi-analyte and/or multi-specificity detection.

(57) Abstract: The present invention relates to a solid phase assay device comprising a multi-spot detection zone, and to use thereof in immunochromatographic assays. More precisely, the invention relates to a device for determining analytes in an aqueous sample comprising: an elongate flow matrix (6) allowing lateral transport of fluid therethrough, wherein said matrix comprises a sample application zone (3) and downstream thereof, a detection zone (8) having immobilised capture agents capable of directly or indirectly binding to said analytes, wherein said analytes are detected by allowing a labelled second binding agent to bind directly or indirectly to the analytes. The device is characterised in that the immobilised capture agents are distributed in the detection zone (8) as a plurality of small spots, thereby permitting

WO 03/025573 A1

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

1

**MULTI-ANALYTE ASSAY DEVICE WITH MULTI-SPOT DETECTION ZONE****Field of the invention**

5 The present invention relates to a solid phase assay device comprising a multi-spot detection zone, and to use thereof in immunochromatographic assays.

**Background of the invention**

10 A type of solid phase assay devices comprises a plate-shaped flow matrix of fibulous material, usually a membrane strip, such as of cellulose nitrate or glass fibre, in which liquid can be transported laterally (i.e. in the plane of the strip) by capillary forces in the membrane. The membrane usually has a sample application zone and a detection zone downstream of the sample application zone. In the detection zone, usually a capturing reagent for the analyte is  
15 immobilised. To conduct an assay, the application zone is contacted with the liquid sample to be assayed for the analyte of interest. The device is maintained under conditions sufficient to allow capillary action of liquid to transport the analyte of interest, if present in the sample, through the membrane strip to the detection zone where the analyte is captured. An absorbing pad or the like at the downstream end of the strip usually insures the capillary liquid flow. A  
20 detection reagent, usually labelled, is then added upstream of the detection zone and interacts with captured analyte in the detection zone, and the amount of captured analyte is measured. Often, the detection reagent is pre-disposed in or on the membrane strip, e.g. in the form of diffusely movable particles containing fluorophoric or chromogenic groups, either upstream of the sample application zone or between sample application zone and the detection zone.

25

A major drawback with these known devices is that only a few analytes can be measured per assay.

30 In EP 191 640 (Syntex Inc) there is disclosed a device in which more than one analyte may be detected. However, the number of analytes that may be detected is limited and the problem of detecting cross-reacting analytes is not addressed.

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

2

**Summary of the invention**

The problem underlying the present invention was to enable detection of several analytes and even analytes which cross-react with each other, such as different allergens reacting with the same IgE's.

This problem has been solved by a multi-spot device according to the present invention.

Thus, in a first aspect the invention provides a device for determining analytes in an aqueous sample comprising:

an elongate flow matrix allowing lateral transport of fluid therethrough, wherein said matrix comprises a sample application zone and downstream thereof, a detection zone having immobilised capture agents capable of directly or indirectly binding to said analytes, wherein said analytes are detected by allowing a labelled second binding agent to bind directly or indirectly to the analytes, **characterised in** that A) the immobilised capture agents are distributed in the detection zone as a plurality of small spots, thereby permitting multi-analyte and/or multi-specificity detection, and B) the capture agents are anchored to the matrix via immobilised particles, and C) the number of spots per flow matrix is more than 10, and D) wherein some of the spots functions as positive control(s) and/or internal calibrator(s).

The number of spots per flow matrix is preferably 5-1000, and more preferably 10-100. The spots are preferably smaller than 1 mm in diameter, preferably smaller than 0.5 mm in diameter.

The spots are preferably arranged in a pattern that allows for detection of cross reactive analytes or specificities. This is exemplified by allergens having cross-reacting IgE, i.e. such allergens should not be arranged in the same flow line.

The flow matrix may be a porous membrane, such as nitro-cellulose or a strip of solid material.

The capture agents may be antibodies or an immunoactive fragment thereof. Alternatively, the capture agents are allergens or an immunoactive fragment thereof.

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

3

In another alternative, the capture agents are DNA/RNA, preferably single stranded or aptameres.

In a preferred embodiment of the device some of the spots functions as positive control(s) and/or internal calibrator(s).

The sample is whole blood, serum, plasma, saliva or urine.

The label of the labelled second binding reagent is, for example a fluorophore or a chromophore.

10

The device may be used for screening of unknown specificities as well as for detection of specific immunoglobulins. By depositing many spots with known material, for example protein or DNA etc, it is possible to rapidly screen for which binder(s) there are in a sample that are specifically binding to the material in particular spot(s). An example is sample determination of specific IgE, wherein the spots contain different allergens. Another example is for screening of libraries (DNA. antibodies, etc) for different reactivities.

15

#### **Brief description of drawings**

Fig. 1 is a perspective view of an embodiment of a device according to the present invention.

20

Fig. 2 is a sectional side view of the device in Fig 1;

Fig. 3 is an exploded view corresponding to the side view in Fig. 2.

25

#### **Detailed description of the invention**

As shown in Fig. 1 the device comprises an upper housing part 1 and a lower housing part 2 of material which is inert with respect to the sample and any reagents used in the assays to be conducted with the device, e.g. polystyrene or polypropylene. The upper housing part 1 has a sample well aperture 3 (here conical) and a detection window 4.

30

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

4

The lower housing part 2 has mounted therein a membrane strip 6 of bibulous material (i.e. a porous material susceptible to traversal of an aqueous medium due to capillary action), e.g. nitro-cellulose on a polyester backing. Near the upstream end of the strip 6 (to the left in the figures), a filter piece 7, containing diffusely movable detection reagent (labelled second binding reagent), is placed on the strip. Such a detection reagent may, for example, be a conjugate between a label particle and a reactant capable of binding to the analyte. Further downstream, and placed below and within the detection window 4, there is a multi-spot reaction zone 8 on the strip which contains several capturing agents or reactants immobilised in a specific pattern on the strip. The capturing agents are capable of binding to the analytes to be tested for. The reaction zone 8 (Fig. 2-3) may be smaller or larger than in the shown figures and may contain 5-1000 capturing agents, preferably 10-100 capturing agents. Importantly, capturing agents having cross-reacting analytes will optionally not be arranged in the same lane, i.e. not in the same flow line of liquid.

The upper housing part 1 contains at the upstream end of the membrane strip 6, a pad 11 of liquid absorbing material intended to serve as a container for flow liquid, or buffer. The opening 3 in the housing part 1 is intended for introducing sample to the membrane 6. In the illustrated case, a filter element 12 (which optionally may consist of two or more filters), is provided below the opening 3 for assays where the sample liquid needs to be filtered, e.g. when the sample is whole blood and blood cells are to be separated off. The buffer pad 11 thus forms a buffer liquid container, below referred to as buffer pad, and the room defined by the sample opening 3 and the filter element 12 forms a sample well, or sample container.

Optionally, a pull-out film 5 is present the purpose of which will be described further below. At the downstream end of the membrane strip 6, a wicking element 13 is placed, here in the form of a pad of absorbent material, such as cellulose, the purpose of which is to assist in maintaining a capillary flow of assay liquids through the membrane strip 6.

An assay for analytes in a sample may be performed with the device described above as follows.

The device is usually provided ready for use with the buffer pad 11 soaked with buffer solution (flow liquid), with the detection reagent pre-deposited in the filter 7, and with the

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

5

respective appropriate capture agents and calibration agents immobilised in a specific pattern of spots in the reaction (or detection) zone 8. This offers a possibility to optimally position the calibration spots among the other spots.

The function of the calibration spots is as a positive control and/or internal calibrator.

5

If the analyte to be tested for is, say, an antigen, the detection reagent in the filter 7 may, for example, be an antibody to the antigen coupled to a fluorogen-labelled particle, the immobilised capturing agents in the multi-spot reaction zone 8 may be antibodies, and the calibrator agent may be the analyte or an analyte analogue.

10

A predetermined amount of sample is added through the opening 3 in the housing part 1. All the necessary assay liquids, i.e. in this case sample liquid and buffer liquid, are then present in the device, the pull-out film 5, however, effectively preventing contact between the respective liquids and the membrane strip 6. The assay is then started by the operator removing the pull-out film 5 to thereby put the membrane strip 6 in simultaneous liquid receiving contact with the buffer pad 11 and the sample liquid in the sample well 3. If the pull-out film is not present, the assay will start directly following sample addition.

15

Buffer liquid from the pad 11 will now penetrate into the membrane strip 6 via the far upstream end part thereof which is in direct contact with the pad 11 (see Fig. 3) and be transported downstream the membrane strip 6 by capillary force. Simultaneously, sample liquid directly followed by a (first) flow pulse of buffer liquid. However, the detection reagent filter 7 and a major part of the buffer pad 11 are separated from the membrane strip 6 by the flow barrier film 10. Buffer liquid that has been transported into the membrane strip 6 will penetrate into and be transported through the filter 7 and bring the detection reagent deposited therein with it, thereby forming a detection reagent flow pulse. This detection reagent flow pulse will follow in sequence after the sample flow and the buffer flow pulse. Buffer that is transported in the membrane strip 6 after the detection reagent has been removed from the filter 7 will form a second buffer flow pulse following after the detection reagent flow pulse.

20

25

The above-mentioned different liquid flows will be transported along the membrane strip 6 in the indicated sequence, i.e. sample flow, first buffer flow, detection reagent flow, and second buffer flow, and will eventually reach the multi-spot reaction zone 8. In the reaction zone 8,

30

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

6

analytes present in the sample will be captured by the reagents immobilised in the specific spot pattern in the membrane. The analyte/capture reagent complexes formed will be washed by the following first buffer flow, and the flow of detection reagent will form detectable reagent/analyte complexes in the reaction zone. The latter will finally be washed by the second buffer flow. In the calibration spots, the predetermined amount of analyte therein will react with the detection reagent in the detection reagent flow to form a detectable detection reagent/analyte complex. By measuring the signal intensity from the detection reagent captured in the reaction zone and correlate it with that obtained in the calibration spot(s), the amount of analyte in the sample may be determined.

10

In the reaction (or detection) zone 8 described above, several reactants capable of specifically binding to analytes are immobilised in a specific spot pattern (by covalent binding, via physical adsorption, via biospecific affinity, via immobilised particles to which the reactant is covalently bound, etc.). However, instead an agent capable of reacting with the reactant may be immobilised in the membrane, and the reactant may then be added together with the sample, or be pre-deposited in the membrane in an area or zone upstream of the reaction zone. Such an immobilised agent may be one member of a specific binding pair (sbp) and the reactant is then coupled or conjugated to the other member of the spb. Exemplary specific binding pairs include immunological binding pairs, such as antigen-antibody and hapten-antibody, biotin-avidin or -streptavidin, lectin-sugar, hormone-hormone receptor, nucleic acid duplex. For example, the reaction zone may have streptavidin immobilised therein and the capture reactant for the analyte may be biotinylated.

15

20

Similarly, the calibration spot(s) may contain a binder for the calibrator substance rather than the calibrator substance *per se*. The binder is usually a member of a specific binding pair, such as one of those mentioned above, whereas the other member of the specific binding pair is coupled or conjugated to the calibrator substance, which may in turn be added with the sample or pre-deposited upstream of the calibrator zone. Streptavidin, for example, may be immobilised in the calibrator zone while the calibrator substance is biotinylated.

25

For further details on assay devices of the type contemplated herein, and particularly regarding flow matrixes, sequential assays, calibrator systems and detection reagents, it may

30

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

7

be referred to our published PCT applications WO 99/36776, WO 99/36777 and WO 99/36780, for example.

Analytes to be determined using the present device are readily apparent to the skilled person.

5 Usually, however, the analyte is a biospecific affinity reactant, e.g. an antibody or other protein, hapten, nucleic acid or polynucleotide, such as a DNA sequence. In the latter case the reaction zone may contain streptavidin and the DNA sequence to which the analyte sequence is to hybridise to may be biotinylated.

10 The present device permits convenient pre-treatment of the sample before starting the assay.

The present device may also be adapted for performing assays of the type described in our published PCT application WO 99/60402 where the flow matrix contains a chromatographic separation zone upstream of the reaction (detection) zone to separate sample components

15 which would otherwise disturb or influence the determination of the analyte.

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

8

**Claims**

1. A device for determining analytes in an aqueous sample comprising:  
5 an elongate flow matrix (6) allowing lateral transport of fluid therethrough, wherein said matrix comprises a sample application zone (3) and downstream thereof, a detection zone (8) having immobilised capture agents capable of directly or indirectly binding to said analytes, wherein said analytes are detected by allowing a labelled second binding agent to bind directly or indirectly to the analytes, **characterised in**  
10 that A) the immobilised capture agents are distributed in the detection zone (8) as a plurality of small spots, thereby permitting multi-analyte and/or multi-specificity detection, and B) the capture agents are anchored to the matrix via immobilised particles, and C) the number of spots per flow matrix is more than 10, and D) wherein some of the spots functions as positive control(s) and/or internal calibrator(s).  
15
2. A device according to claim 1, wherein the spots are smaller than 1 mm in diameter, preferably smaller than 0,5 mm in diameter.
3. A device according to claim 1 or 2, wherein the spots are arranged in a pattern that  
20 allows for detection of cross reactive analytes or specificities, i.e. cross reacting analytes are not arranged in the same flow line of liquid.
4. A device according to any of the above claims, wherein the flow matrix is a porous membrane.  
25
5. A device according to any of the above claims 1-3, wherein the matrix is a strip of solid material.
6. A device according to any of the above claims 1-5, wherein the capture agents are  
30 antibodies or an immunoactive fragment thereof.
7. A device according to any of the above claims 1-5, wherein the capture agents are allergens or an immunoactive fragment thereof.

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

9

8. A device according to any of the above claims 1-5, wherein the capture agents are autoantigens or an immunoactive fragment thereof.
- 5 9. A device according to any of the above claims 1-5, wherein the capture agents are DNA/RNA, , preferably single stranded nucleic acids or aptameres, or DNA/RNA like structures.
10. A device according to any one of the above claims, wherein the sample is whole  
10 blood, serum, plasma, saliva or urine.
11. A device according to any of the above claims, wherein the label is a fluorophore or a chromophore.
- 15 12. Use of the device according to one or more of the above claims 1-11 for screening of unknown specificities.
13. Use of the device according to one or more of the above claims 1-11 for screening of specific immunoglobulins.

20

WO 03/025573

PCT/SE02/01671

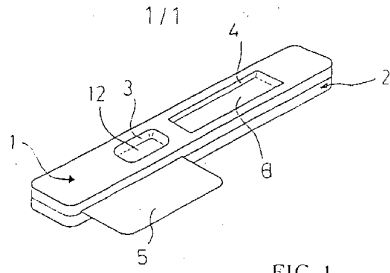


FIG. 1

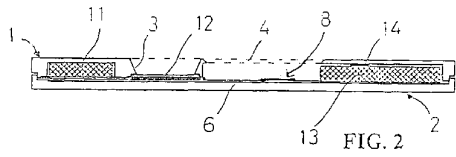


FIG. 2

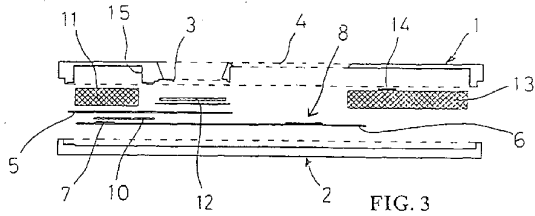


FIG. 3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01671
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/543, C12Q 1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G01N, C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation, to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1018649 A2 (ABBOTT LABORATORIES), 12 July 2000 (12.07.00), claims page 6, line 56 - page 7, line 6	1-13
	--	
X	US 6100099 A (GROUONET AL), 8 August 2000 (08.08.00), claim 1	1-13
	--	
X	US 5858732 A (SOLOMON ET AL), 12 January 1999 (12.01.99), column 9 - column 10	1-13
	--	
X	US 5244815 A (GUIRGUIS), 14 Sept 1993 (14.09.93), column 6, line 59 - column 11	1-13
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document: member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 December 2002	09-01-2003	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer CARL-OLOF GUSTAFSSON/BS Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01671
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4591570 A (CHANG), 27 May 1986 (27.05.86) -- -----	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/SE 02/01671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1018649 A2	12/07/00	AU 3942993 A	08/11/93
		CA 2133220 A	14/10/93
		DE 69329641 D,T	21/06/01
		EP 0633944 A,B	18/01/95
		ES 2153379 T	01/03/01
		JP 7505293 T	15/06/95
		US 5869252 A	09/02/99
		US 6210898 B	03/04/01
		WO 9320227 A	14/10/93
		US 6100099 A	08/08/00
		US 5869252 A	09/02/99
US 5858732 A	12/01/99	AT 215993 T	15/04/02
		CA 2221454 A	21/11/96
		DE 69620596 D,T	21/11/02
		EP 0826069 A,B	04/03/98
		JP 11505126 T	18/05/99
		WO 9636736 A	21/11/96
US 5244815 A	14/09/93	AT 157456 T	15/09/97
		AU 647066 B	17/03/94
		AU 6948391 A	25/07/91
		CA 2034534 A	20/07/91
		DE 69127383 D,T	05/03/98
		EP 0440350 A,B	07/08/91
		SE 0440350 T3	
		JP 5240858 A	21/09/93
		US 6352863 B	05/03/02
		US 2002160538 A	31/10/02
		AU 1589092 A	21/10/92
		CA 2062900 A	13/09/92
		EP 0637383 A	08/02/95
		WO 9216842 A	01/10/92
		AT 195587 T	15/09/00
		AU 1493197 A	22/05/97
		AU 2664392 A	27/04/93
		CA 2118713 A	01/04/93
		DE 69231362 D,T	28/12/00
		EP 0643834 A,B	22/03/95
JP 7503536 T	13/04/95		
WO 9306486 A	01/04/93		
US 4591570 A	27/05/86	AT 77699 T	15/07/92
		DE 3485785 A,T	30/07/92
		EP 0135541 A,B	03/04/85
		JP 60500732 T	16/05/85
		WO 8403151 A	16/08/84

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

---

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ルネ・ピエルクマン

スウェーデン、エス - 7 5 2 3 6 ウプサラ、コボヴェーゲン 3 4 番

(72) 発明者 ガード・ルンドストレム

スウェーデン、エス - 7 5 2 4 1 ウプサラ、ブルックスヴェーゲン 1 6 番

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11 HA13 HA14 HA20

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR38 QR56 QS32 QS34

QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	多重点检测区 - 分析物检测装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005503556A</a>	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2003529151	申请日	2002-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	PHARMACIA诊断		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚鹿ING亚诺斯焦散, Akuchieboragu		
[标]发明人	イブメンデルハートヴィッグ ルネビエルクマン ガードルンドストレム		
发明人	イブ・メンデル・ハートヴィッグ ルネ・ビエルクマン ガード・ルンドストレム		
IPC分类号	G01N33/543 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 C12Q1/6834		
FI分类号	G01N33/543.521 C12M1/34.Z C12Q1/68.A G01N33/53.Q C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	田中, 三夫 矢野正树		
优先权	0103072 2001-09-17 SE 60/322616 2001-09-17 US		
其他公开文献	JP4328203B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种固相测定装置，包括含有多点检测区的固相检测区，及其在免疫色谱测定中的用途。更具体地，本发明涉及一种细长的流动基质（6），其允许流体通过其横向输送，其中基质直接连接到分析物，包括样品适应区3及其下游。具有能够直接或间接结合的固定化捕获剂的检测区（8），其中通过直接或间接地将标记的第二结合剂结合到分析物上来检测分析物；测量水性样品中的分析物到一个设备。该装置的特征在于固定的捕获剂作为多个小斑点分布在检测区8中，从而进行多分析物和/或多特异性检测。

