

(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2004-527760
(P2004-527760A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	2 G O 4 5
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/483 C	
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/558	GO 1 N 33/531 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 93 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-591831 (P2002-591831)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月26日 (2002. 4. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月15日 (2003. 10. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/N02002/000161
 (87) 国際公開番号 W02002/095409
 (87) 国際公開日 平成14年11月28日 (2002. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 20012150
 (32) 優先日 平成13年4月30日 (2001. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 ノルウェー (N0)

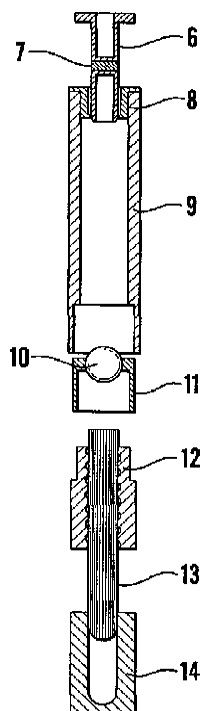
(71) 出願人 503377973
 サンドレハーゲン, アーリング
 ノルウェー国 エヌー0510 オスロ,
 ウーカン ビー. オー. ボックス 206
 (74) 代理人 100091683
 弁理士 ▲吉▼川 俊雄
 (72) 発明者 サンドレハーゲン, アーリング
 ノルウェー国 エヌー0510 オスロ,
 ウーカン ビー. オー. ボックス 206
 Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA22 BB01 BB04
 BB29 BB51 CA25 CB03 CB04
 CB08 DA36 DA37 DA38 FA11
 FB03 FB06 FB07 FB15 FB19
 GC12 HA06 HA09 HA14 JA07

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 着色粒子を用いる非計装的定量イムノアッセイ及び装置

(57) 【要約】

試料中における1種類もしくは数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。本方法は、a) 容器中において、サンプルと信号供給物質を含有する試薬とを混合するステップ、b) 前記容器を流体伝達装置にカップリングするステップ、c) 前記流体伝達装置を流体受容装置と接触させるステップを含む。この流体受容材料は、前記被分析物に対して特異的結合能力を有する固定化された試薬を含む。試料中における1種類もしくは複数の被分析物濃度の指標として、前記流体受容材料のパターンまたは面積が使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種類または複数の被分析物を含有するサンプルを、容器に収容された 1 種類もしくは複数の信号供給物質を含む試薬と混合して混合物を供給し、続いて、該容器を流体伝達装置にカップリングした後に、該混合物は、該流体伝達装置に包含された流体伝達材料により吸収され、そして、同時に、もしくは、後に、該流体伝達装置を、流体受容材料を包含する流体受容装置と接触させ、該流体受容材料は、該 1 種類もしくは複数の被分析物に対して特異的な結合能力を有する固定化された試薬、あるいは、固定化された被分析物分子、またはそれらの類似体、もしくは誘導體、あるいはフラグメントを含んでおり、ここで、該混合物は、前記もう一方の流体受容装置の該多孔質流体受容材料へ移送されてあるパターンを創出し、ここで、該パターン、または該パターンの面積、あるいはそれらのパターンエレメントの面積が、該試料中における 1 種類もしくは複数の被分析物濃度の指標として利用されることを特徴とする、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。 10

【請求項 2】

以下のステップ；

該試料を、信号供給物質を含有する容器内の液体試薬等の該試薬と混合し、流体伝達材料を包含する流体伝達装置を、前記流体伝達材料が上記容器内の該混合物と接触するように、前記容器内に導入し、
当該化学的分析方法を実行する過程において、前記流体伝達装置内の該流体伝達材料を、一方では、試薬と試験試料との前記混合物と、他方では、別の流体受容装置内における多孔質の流体受容材料と、同時に接触させ、ここで、前記流体伝達装置内の該流体伝達材料は、前記流体受容装置内の該多孔質流体受容材料と常に接触して取り付けられているのではなく、本方法を果たす過程の一部としてそのような接触がもたらされ、そして、ここで、前記もう一方の流体受容装置内における該多孔質流体受容材料は、前記 1 種類もしくは複数の被分析物に対して特異的な結合親和力を有する固定化された試薬を含んでおり、もしくは、前記固定化された試薬が、固定化された被分析物分子、もしくは、被分析物分子の類似体、誘導體、またはフラグメントを含んでおり、
これにより、前記混合物は、該流体伝達装置を通り、更に渡って、前記もう一方の流体受容装置内における該多孔質流体受容材料内で拡散し、これにより、前記流体受容装置内における上記多孔質流体受容材料内での該信号供給物質の分布を通じて現れる該パターン、該パターンの面積、及び/又は、それらのパターンエレメントの面積が、該試料中における 1 種類もしくは複数の被分析物濃度の指標として利用される、
ことにより特徴付けられる、請求項 1 記載の、試験試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。 20 30

【請求項 3】

上記容器が液漏れ防止タイプの容器であることにより特徴付けられ、また、流体伝達材料を包含する該流体伝達装置が、前記流体伝達材料が上記容器内の該混合物と接触するような方法で液漏れ防止タイプのゲートを通じて前記容器に導入されることにより [更に特徴付けられる]、請求項 1 記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。 40

【請求項 4】

前記流体伝達装置内の該流体移送材料が、毛管力、陽圧、または陰圧を利用して流体を移送するのに適した多孔質流体移送材料からなることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、請求項 1 乃至 3 記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 5】

前記流体伝達装置に非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具が含まれており、該非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具は、前記流体受容装置と常に接触して取り付けられているのではなく、当該定量的な化学的分析方法を実施するプロセス中に、該流体受容 50

装置との接触がもたらされることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 6】

試薬を試験試料と混合するための前記容器がゲートを備えた密閉容器であり、（もし都合がよければ）好適には、上記容器に壁部におけるノッチを設け、該壁部を薄く為し、そして、前記伝達装置がきっちりと填る方法で導き通されたときに該壁部がへこむようにすることにより、あるいは、（もし都合がよければ）上記流体伝達ユニットと前記容器を一緒にねじ込むことにより、（もし都合がよければ）好適には、該容器（及び/又は）該流体伝達装置を伴った該容器が保持されている空間的な位置に関わらず、前記混合物が該容器または流体伝達装置から漏れないような形状に為された小さなガス透過性の開口を該容器または伝達装置に伴った状態で上記流体伝達ユニットと前記容器を一緒にねじ込むことにより、上記流体伝達装置が該ゲートにおいて上記混合物と接触できることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、請求項 1 乃至 5 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

10

【請求項 7】

試薬を試験試料と混合するための前記容器が該試験試料を導入するための（ゲート）引き込み口を備えていることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、もしくは、該試験試料を包含する第三の装置が使用され、そして、望ましい場合には、前記第三の装置が、それ以外の装置と結合されたときに、あるいは、それ以外の装置へねじ込まれたときに、前記容器の一部を構成することを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、請求項 1 乃至 6 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

20

【請求項 8】

前記第三の装置が、前記容器の一部ではなく、そして、例えばガラス製の毛細管であることを特徴とする、請求項 7 記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 9】

前記流体受容装置が、固定化された形態及び/又は乾燥させた形態、あるいは、粒子上または粒子内に分散させた形態、もしくは、前記多孔質流体受容材料に均一または不均一（但し、前もって決定しておく）に分配した状態で前記流体受容装置の該多孔質流体受容材料に直接的に分散させた形態のいずれかで、種々の被分析物または被分析物全体に対して親和性を有する特異的結合分子、あるいは、全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子に対して親和性を有する特異的結合分子を含んでいることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 8 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

30

【請求項 10】

前記試薬が、付着された特異的結合分子を伴う、もしくはそれらを伴わない、あるいは、付着された全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子を伴う、もしくはそれらを伴わない、着色粒子、コロイド、酵素、発蛍光団、または染料の形態における信号供給物質を含んでいることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

40

【請求項 11】

前記試薬が、該試験試料中における細胞を溶解する化学薬品、及び/又は、酸性度またはイオン強度を調節する化学薬品、もしくはあらゆる可能な粒子を分散状態に保つ化学薬品を含んでいることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 10 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

50

【請求項 1 2】

前記流体伝達装置が、赤血球または白血球等の細胞を抑止する細孔径であって、但し、上記信号供給物質を通過させるのに十分な大きさの細孔径を有していることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 1 3】

信号供給物質として該試験試料中のヘモグロビンが使用されることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、請求項 1 乃至 1 2 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 1 4】

該試験試料が、上記試薬と混合される前に、化学薬品を加えることにより前処理され、または分離され、もしくは抽出されることにより特徴付けられる、あるいは、前記容器の内部で 2 種類または数種類の異なる試薬を混合することにより上記試薬を供給できることにより特徴付けられる、もしくは、前記流体受容装置に現れるパターンまたはパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積を引き出すため、または増強するため、もしくは明確にするため、前記流体受容装置の該多孔質流体受容材料に付加的な化学薬品が混ぜ合わされることにより特徴付けられる、請求項 1 乃至 1 3 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

10

【請求項 1 5】

前記流体受容装置に現れるパターンまたはパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積が、吸収測定、反射測定、または蛍光測定のいずれかにより、可視光線、紫外線、赤外線、または近赤外線をベースとしたアナログ式またはデジタル式の機器を用いて描写、走査、または測定されることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、また、該試験試料中における該 1 種類もしくは複数の被分析物濃度がこれらの測定に基づいて決定されることを特徴とする（ことにより特徴付けられる）、請求項 1 乃至 1 4 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

20

【請求項 1 6】

試薬と試験試料を混合するために漏れ防止タイプの容器が使用されることにより特徴付けられ、また、前記流体伝達装置が、上記流体受容装置の該多孔質流体受容材料と常に接触して取り付けられている多孔質の流体伝達材料を含んでいることにより更に特徴付けられる、請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

30

【請求項 1 7】

該試験試料が生物学的なサンプルであることを特徴とする、請求項 1 乃至 1 6 のいずれか一項または数項に記載の、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法。

【請求項 1 8】

試験試料を試薬と混合するための液漏れ防止タイプの容器、流体伝達材料を包含した流体伝達装置、及び、流体受容材料を包含した流体受容装置を含み、該流体伝達装置が、液漏れ防止タイプの引き込み口を通じて前記容器の内容物と接触することができ、且つ、前記流体受容材料を包含した前記流体受容装置とも接触できるように組み立てられることを特徴とする、試験試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための方法を実行するための装置。

40

【請求項 1 9】

前記流体伝達装置の該流体素子移送材料が、毛管力、陽圧、または陰圧を利用して流体を移送するのに適した多孔質の流体移送材料からなることを特徴とする、請求項 1 8 記載の装置。

【請求項 2 0】

50

非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具が該流体伝達装置に含まれていて、前記非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具が、該流体受容装置と常に接触して取り付けられているのではなく、当該定量的な化学的分析方法を実行するプロセス中に該流体受容装置との接触がもたらされることを特徴とする、請求項 18 乃至 19 に記載の装置。

【請求項 21】

前記漏れ防止タイプの容器が引き込み口を有していて、該引き込み口を通じて上記流体伝達装置が試験試料と試薬との前記混合物と接触できることを特徴とし、好適には、前記容器が壁部におけるノッチを有しており、ここで、該壁部は薄く為されていて、前記伝達装置がきっちりと填る方法で導き通されたときにへこむように為されており、あるいは、上記流体伝達ユニットと前記容器と一緒にねじ込まれ、好適には、該流体伝達装置を伴った該容器が保持されている空間的な位置に関わらず、前記混合物が該容器または流体伝達装置から漏れないような形状に為された小さなガス透過性の開口を該容器または伝達用具に伴った状態で上記流体伝達ユニットと前記容器と一緒にねじ込まれることを特徴とする、請求項 18 乃至 20 に記載の装置。

10

【請求項 22】

試薬と試験試料とを混合するための前記容器が、例えばガラス製の毛細管等のサンプル移送装置から該試験試料を導入するための引き込み口を備えていることを特徴とし、あるいは、該サンプル移送装置が、該引き込み口位置において前記容器と共に結合される蓋装置、あるいは、該引き込み口位置において前記容器にねじ込まれる蓋装置等の、前記容器の一部を構成していることを特徴とする、請求項 18 乃至 21 に記載の装置。

20

【請求項 23】

前記流体受容装置が、固定化された形態及び/又は乾燥させた形態、あるいは、粒子上または粒子内に分散させた形態、もしくは、前記多孔質流体受容材料に均一または不均一（但し、前もって決定しておく）に分配した状態で上記流体受容装置の該多孔質流体受容材料に直接的に分散させた形態のいずれかで、種々の被分析物または被分析物全体に対して親和性を有する特異的結合分子、あるいは、全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子に対して親和性を有する特異的結合分子を含んでいることにより特徴付けられる、請求項 18 乃至 22 に記載の装置。

【請求項 24】

前記容器に含有されている試薬が、付着された特異的結合分子を伴う、もしくはそれらを伴わない、あるいは、付着された全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子を伴う、もしくはそれらを伴わない、着色粒子、コロイド、酵素、発蛍光団、または染料の形態における信号供給物質を含んでいることを特徴とする、請求項 18 乃至 23 に記載の装置。

30

【請求項 25】

前記試薬が、該試験試料中における細胞を溶解する化学薬品、及び/又は、酸性度またはイオン強度を調節する化学薬品、もしくはあらゆる可能な粒子を分散状態に保つ化学薬品を含んでいることを特徴とする、請求項 18 乃至 24 に記載の装置。

【請求項 26】

前記流体伝達装置の上記流体伝達材料が、赤血球または白血球等の細胞を抑止する細孔径であって、但し、上記信号供給物質を通過させるのに十分な大きさの細孔径を有していることを特徴とする、請求項 18 乃至 25 に記載の装置。

40

【請求項 27】

組み込み式の毛細管（7）を伴うストッパー（6）、該ストッパーを取り巻くシーリングスリーブ（8）、液漏れ防止タイプの容器（9）、前記容器（9）の底部における引き込み口を密封する可動式のボール（10）を含んでいて、ここで、該ボール（10）は、芯またはフェルトチップガイド（12）に密封可能に取り付けられた弁座（11）に収容されており、また、ここで、芯またはフェルトチップ（13）は、密封可能で且つ移動可能に取り付けられており、更に、ここで、前記フェルトチップ（13）が、取り外し可能なキャップ（14）により保護されていることを特徴とする、請求項 18 乃至 26 に記載の

50

装置。

【請求項 28】

更に、吸収、反射、または蛍光、あるいはそれらの組合せを測定するための可視光線、紫外線、赤外線、または近赤外線、もしくはそれらの組合せをベースとしたアナログ式またはデジタル式の機器等の走査装置、それらのデータを処理するためのプロセッサ、表示媒体、及び、それらのデータを記憶するための媒体を含むことにより特徴付けられる、請求項 18 乃至 26 に記載の装置。

【請求項 29】

更に、可動式のホルダーを伴うラックを含んでいて、これにより、前記容器が、垂直方向の制御された動きのみが可能な前記流体受容装置の関係で統一された位置に固定されることにより特徴付けられる、請求項 18 乃至 28 に記載の装置。 10

【請求項 30】

血液、痰、粘液、糞便、吐出物、及び組織等の生物学的試料中における 1 種類もしくは数種類の被分析物濃度が測定される、請求項 1 乃至 17 による方法の使用。

【請求項 31】

該被分析物が、自己抗体、抗体、腐生菌、細菌、他の感染性物質、ヘモグロビン、アルブミン、CRP、U-アルブミン、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、フェリチン、ASAT、ALAT、LDH、ミオグロビン、トロポニン I、脂肪酸結合タンパク質、アミラーゼ、HCG、U-HCG、テオフィリン、及び抗生物質からなるグループから選択される、請求項 1 による方法の使用。 20

【請求項 32】

請求項 18 乃至 31 による装置、該試験試料と混合するための試薬、場合によっては、該試験試料を前処理または分離するための付加的な試薬、あるいは、該信号を明確にするために該流体受容装置に混ぜるための付加的な試薬を含んでいることを特徴とする、請求項 1 乃至 17 による方法を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中における 1 種類もしくは数種類の被分析物濃度を測定するための方法、その方法を実施するための装置、特定の分析を行うためのその方法の活用、及び、その方法を実施するためのキットに関するものである。 30

【背景技術】

【0002】

分析生物化学の分野においては、できるだけ分析ステップが少なくて済み、且つ、分析を実施する人のために特殊な技術を必要としない、生物学的流体中の被分析物を迅速に定性的及び定量的に決定するための方法に対するかなりのニーズがある。

【0003】

1986年に、ジョンソン エンド ジョンソン株式会社に属するOrtho Diagnostic Systems社のMochna1らは、後に欧州特許第0250137 B1号として認められた特許出願を提出した。この発明は、例えば尿や血液等の複雑な検査サンプル中における被分析物（即ち、決定されるべき物質）を定量するための方法を提供しており、その方法は、固定化結合分子を伴う多孔質膜ストリップを有していて、前記多孔質膜ストリップを通じて流れることが許容される、検査サンプルのアリコートとの接触がもたらされる金コロイド粒子上にコーティングされた他の分子を用いることを特徴とするものである。このストリップのうち、前記金コロイド粒子が保持されている部分の長さが、その検査サンプル中における被分析物分子の濃度に比例する。 40

【0004】

この方法は、尿中の黄体形成ホルモンの定量分析、及び、尿中のヒト性腺刺激ホルモン、並びに、血液中の医療用物質であるテオフィリンに対する方法の説明によって例証されており、そこでは、前記の試験ストリップにおける信号供給金コロイド粒子により創出され 50

た縞の長さが、その検査サンプル中における被分析物分子の濃度に直接的に比例するものであった。それらの試薬は、シンプル且つ迅速で、製造コストも安く、そして、信号展開試薬や、特殊な機器、あるいは温度制御を必要としない。それにもかかわらず、Johnson & Johnson社とOrtho Diagnostic System社のどちらも、これまで、このテクノロジーに基づく商業的な製品を市場に送り出していない。

【0005】

EP第0250137B1号は、請求項1のエLEMENT Cを如何にして実行すべきかについての詳細な説明を提示しておらず、即ち；前記膜ストリップへの流体の移送について詳細な説明が為されていない。3頁の下部には、それらの試薬が容器内に入れられており、そして、それらの試薬は、固定化された結合分子を含有する前記膜ストリップと接触させられることが指摘されている。請求項1のエLEMENT Cを実行する唯一の例証が5頁の1行目に見られ、そこでは、膜ストリップの一方の端部が検査サンプルと試薬の混合物中に浸漬されることが記述されている。同様に、実施例7における10頁の1行目には、そのストリップが10mmの深さまで浸されるという記述がある。実施例3における膜の説明では、膜ストリップについての綿密な描写の域を越えた詳細は提示されていない。従って、唯一理にかなった解釈は、この膜ストリップは、何ら特別な移送装置を伴うことなく、試薬/検査サンプル中に浸漬される、という解釈である。

10

【0006】

そのような浸漬テクノロジーを用いて定量分析しようとした場合、このテクノロジーに関わるかなりの不都合な点が存在する。一つの不都合な点は、試薬/検査サンプル混合物の正確な調製は、その混合物の正確な調製に関する熟練及び/又は能力を必要とすることである。膜ストリップは試薬/検査サンプル中に漬けた状態に維持しておく必要があるため、膜ストリップ用の保持装置を作成しなければならないか、あるいは、試薬/検査サンプル用の容器としても機能し得る膜ストリップを保持するための試験チューブを使用しなければならないかのいずれかである。そのようなチューブを用いた場合、流体は、膜ストリップの中央部とは異なりストリップの縁に沿って移動する傾向があり、そして、液体の前端は不揃いになりやすい。しかし、EP第0250137 B1号に記載されているストリップは、生物学的変動が比較的少ない被分析物の定量分析、あるいは、例えばいわゆる治療幅が狭い(治療値と毒性値との間の血中濃度差が小さい)医療用物質の定量分析に適することができるであろう。

20

30

【0007】

本発明者にとって既知の、EP第0250137 B1号の原理に似た何らかのものを利用している唯一の商業的製品は、米国特許第443504号に記載されている、チューブ形の容器と細い膜ストリップを使用したSyva社(世界で最大の診断薬メーカーの一つである、後のDade Behring社)のイムノクロマトグラフィーによる酵素をベースとした製品である。この製品については、Clinical Chemistry (vol. 31, 1144-1150, 1985年)の論文「エンザイムイムノクロマトグラフィー - 計装を必要としない定量イムノアッセイ (Enzyme immuno chromatography - a quantitative immunoassay requiring no instrumentation)」で説明されている。しかし、Syva社の製品は、酵素基質用容器を含めた数個の試薬容器を使用しており、そして、その方法は実行するのがかなりやっかいであった。かなりの需要があったにもかかわらず、この製品は、複雑でコストのかかる工業生産なので、ノルウェイにおけるSyva社の販売部門代表者により生産が中止された。

40

【0008】

EP第0250137 B1号は、更に広い濃度範囲(更に大きなダイナミック測定範囲とも呼ばれる)を測定するため、ストリップの異なるセクションに、単位面積当たりの量が異なる特異的結合分子を含有するストリップについて開示している。しかし、この特許保有者はそのようなストリップを市販したことがなく、そして、良好な精度を持ってその

50

ような生産を実行するのは技術的及び工業的にやっかいである。もっと簡単なアプローチは、ManciniらによるImmunochemistry、2:235-254(1965年)の「アガロースゲルにおける放射免疫沈降法(radial immunoprecipitation techniques in agarose gel)」で紹介されているような放射分析法を利用することである。放射移動を利用すると、このフォーマットにおける移動長さは、その面積の平方根に比例することになるため、もっと有意に大きなダイナミック測定範囲を達成することができる。従って、半径が1cmから3cmに増大すると、面積は9倍大きくなり、それ故、更に大きな濃度測定範囲における適用が可能になる。

【0009】

Ortho社及びSyva社のイムノクロマトグラフィーの分野で面積測定の原理が商業的にあまりうまく展開しなかった時期に、現代の妊娠検査により殆どの人々に知られている、薄層イムノクロマトグラフィーによる別の主要な原理も展開し、商業的に非常に成功裏の発展を納めた。それらの技術については、例えば、Rosenstein & Bloomsterの米国特許第4,855,240号及びMayらのEP第291,194号(1988年)を参照することができる。このテクノロジーの特徴は、付加された試薬を伴って、もしくは、付加された試薬を伴わずに、検査サンプルが、ウェル内に、もしくは、水分吸収性の膜ストリップに付着されたフィルター片上に滴下され、これにより、その検査サンプルは、多孔質膜内へ移動し、更に、多孔質膜に沿って移動する。この移動する液体は、前もって信号供給物質に化学的に結合されている乾燥した特異的結合分子を溶解し、そして、これらの結合分子(典型的には抗体)が、更に、検査サンプルからの被分析物分子に結合する。この移動方式のストリップでは、更に進んで、更に幾つもの特異的結合分子が、典型的には移動方向に垂直な縞の形態において、もしくは、例えば十字パターン等のあるパターンにおいて、固定化されている。特異的結合分子を担持した被分析物分子(特異的結合分子は、更に、それらに付着された信号供給物質を有している)が、固定化された結合分子を含有する前記縞またはパターンを通過するとき、これらの信号供給物質が、これらの縞またはパターンにおいて濃縮される。陽性試験は、その与えられた縞またはパターンにおける色または蛍光として読み取られる。非常に多くの会社がそのような製品を製造し、市場に投入している。

【0010】

世界の三大診断用具メーカーのうちの2社から始まって、今では、それらの製品リストから、この様式の定性薄層イムノクロマトグラフィーが広範に用いられていることが分かる。Bayer社(アメリカA)は、Clinitek hCG尿検査用具及びClinitek Microalbumin(マイクロアルブミン)尿検査用具を販売している。米国のAbbott Laboratories社は、Fact Plアメリカ Pregnancy Test(妊娠検査)、Test Pack hCG Combo、Test Pack Chlamydia(クラミジア)、Test Pack Strep A、Test Pack Rotavirusアメリカ(ロタウイルス)、及び、Test Pack RSVを販売している。もっと小さな会社ではあるが、更に専門的な会社のうちで、Nubenco Medical International社(アメリカA)を挙げることができ、この会社は、hCG、LH、Chagas(シャーガス)、Chlamydia(クラミジア)、Cholera(コレラ)、CK MB、Dengue(デング熱)、Myoglobin(ミオグロビン)、Strep A、Hepatitis B(B型肝炎)抗原、Tropnin I、糞便中のHemoglobin(ヘモグロビン)、並びに、Dengに対する抗体、Helicobacter Pylori(ヘリコバクター・ピロリ)、Hepatitis B(B型肝炎)抗体、単球増加症抗体、Trepnoma Pallidum及びMycobacteria Tuberculosis(結核菌)に対する抗体用のこれらのタイプの検査用具を販売しており、更には、腫瘍マーカーであるAlpha Fetoprotein(-フェトプロテイン)、Carcinoembryonal(癌胎児性)抗原、及びProstatospesific

10

20

30

40

50

前立腺特異)抗原を検出するためのこれらのタイプの試験用具も販売している。フィルター材料の専門的な生産者である米国のMillipore Incは、彼らのOEM部門から、いわゆるHiFlowアセンブリキットとして、これらのタイプの検査に対するフル・ハードウェア「アセンブリキット」を販売している。Pall Gelman plc(英国)は、そのような製品を製造するためのマニュアル、即ち、「イムノクロマトグラフィーを利用した側方フローまたは試験ストリップの開発概念(Immunokmatographic, Lateral Flow or Test Strip Development Ideas)」という彼らのパンフレットさえ発行しており、その内容は彼らのインターネットサイトからダウンロードすることもできる。アメリカのAcon Laboratories Inc.は、大きな独自の生産ラインを有しており、これらのタイプの検査用具を特には中国市場に販売しているが、いわゆるOEMとして、相手先の商標の下での再販用にそれらの検査用具を他の会社にも納品している。 10

【0011】

また、これらの縞またはパターンの強度を測定するための装置も構築されているが、十分な精度で正確な結果をもたらす化学製品及び装置を設計するのは難しかった。これらの制限を克服するため、高度に洗練されたテクノロジー、即ち、典型的にはPolitolaによる米国特許第6136610号:「側方フローアッセイを実施するための方法及び装置(Method and apparatus for performing a lateral flow assay)」が開発されている。この方法を定量的にするためにはもっと複雑で高等な方法及び装置が必要なことは米国特許第6136610号から明らかであり、工業的に再現性のある精度及び正確さを達成するのは非常にやっかいでコストが嵩み、実際、これまで、商業的な状況において実現されていない。 20

【0012】

Roche Diagnostics社は、様々なこのクロマトグラフィー原理を展開しており、そこでは、信号供給物質が進行する検査セクションにおける呈色の強度が、尿中のアルブミンを決定するための半定量的な測度として使用されている。Diabetes care, vol. 20, 11号, pp. 1642 - 1646がこの技術について開示している。

【0013】

Erich Cernyによる米国特許第5958790号は、特異的結合分子、続いて、金コロイド等の付着された信号供給物質を伴う結合分子を用いた、フィルターを通じるサンプルアリコートに垂直フローに基づく垂直フィルターイムノアッセイ法を開示している。この方法は、定量的な実施形態においては、反射率計を用いて光反射の強度を読み取ることにより商業的に利用され、そして、この方法は、種々の試薬の正確なピペティングが必要である。容量が校正された複数のピペットと1台の反射率計を用いれば、この方法は、良好な精度で定量分析を行うことができる。 30

【0014】

Hajizadeh及びWiljesuriyaは、米国特許第6180417号及びEP第1046913A2号において、クロマトグラフィーストリップの吸収性材料と直接的に接触している非多孔質の受容ユニットを有するイムノクロマトグラフィーストリップについて開示している。これらのタイプの工業的な製品の製造を制限してきた産業上の問題をBayer社が解決できるかどうかは、今後の様子を見なければ分からないが、Bayer社が定性分析用製品との関係でのみ彼らの装置の適用について記述しているのは注目に値する。 40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

これまでに説明してきた側方または垂直方向のイムノクロマトグラフィーを用いる方法では、機器を用いることなく定量分析を果たすことが不可能であるので、それでは何故、Ortho社または後のJohnson & Johnson社、あるいは、Syva社ま 50

たは後の D a d e B e h r i n g 社は、更に、試薬を滴下使用するためのそのようなウェルまたは付着フィルター片を用いた商業的定量分析用製品に対して、E P 第 0 2 5 0 1 3 7 B 1 号及びアメリカ第 4 4 3 5 5 0 4 号に記載されている彼らの側方薄層クロマトグラフィーを利用した方法を開発しなかったのであろうか？本発明者及び多くの同業者は、E P 第 0 2 5 0 1 3 7 B 1 号の原理による規則正しく且つ再現性のある移動パターン及び面積をもたらすウェルまたは付着フィルター片を構築しようと試みてきたが、成功することはなかった。辺縁効果及び接触効果が、工業的規模での再現性のある解決策の創出を不可能に為してきた。様々なライニング、o - リング、及び、種々の異なるタイプの膠または接着剤を試してきたが、うまくいかなかった。従って、信号供給物質が、再現性よく移動し、且つ、大きなダイナミック濃度測定範囲で、検査サンプル中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するために直接的に適用できるような大きさのパターンまたは面積をもたらす、専門的な実習を積んでいない人が実行するのに適した、工業的に再現性のある分析方法に対するニーズが尚も存在する。

【 0 0 1 6 】

従って、本発明の目的は、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための方法、その方法を実行するための装置、特定の分析を実行するためのその方法の使用、及び、その方法を実行するためのキットを提供することである。これらの目的は、添付の特許請求項により特徴付けられる本発明により達成された。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 7 】

本発明は、試料中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法に関するものであり、ここで、1 種類または複数の被分析物を含有するサンプルは、容器に収容されている試薬と混合され、また、ここで、その試薬は 1 種類または複数の信号供給物質を含んでおり、このようにしてもたらされた混合物は、続いて、流体伝達装置への容器のカップリング後に、その流体伝達装置に含まれている流体伝達材料によって吸収され、そして、同時に、もしくは、その後、その流体伝達装置は、前記 1 種類または複数の被分析物に対して特異的な結合能力を有する固定化された試薬、あるいは、固定化された被分析物分子、または、その類似体、誘導體、もしくはフラグメントを含む流体受容材料を包含した流体受容装置との接触がもたらされ、ここで、前記混合物は、前記のもう一方の流体受容装置に包含された多孔質の流体受容材料において運び出されて、あるパターンを創出し、ここで、そのパターン、またはそのパターンの面積、あるいは、それらのパターンエレメントの面積が、前記試料中における 1 種類または複数の被分析物濃度の測度として利用される。

【 0 0 1 8 】

より特定的には、本発明は、検査サンプル中における 1 種類または数種類の被分析物濃度を決定するための定量的な化学的分析方法に関するものであり、ここで、そのサンプルは、容器内の液体試薬等の、信号供給物質を含有する試薬と混合され、流体伝達材料を包含する流体伝達装置が前記容器内に導入され、従って、前記流体伝達材料は、その容器内における前記混合物と接触することとなり、本化学的分析方法を実行する過程において、前記流体伝達装置に包含されている前記流体伝達材料は、一方では、試薬と検査サンプルからなる前記混合物との接触、及び、他方では、別の流体受容装置に包含された多孔質の流体受容材料との接触が同時的にもたらされ、ここで、前記流体伝達装置に包含された前記流体伝達材料は、前記流体受容装置に包含された多孔質の流体受容材料と常に接触した状態では取り付けられているのではなく、本方法を実行する際の一部としてそのような接触がもたらされ、そして、ここで、前記のもう一方の流体受容装置に包含された前記多孔質の流体受容材料は、前記 1 種類または複数の被分析物に対して特異的な結合親和力を有する固定化された試薬を含んでいるか、あるいは、前記の固定化された試薬が、固定化された被分析物分子、もしくは、被分析物分子の類似体、誘導體、またはフラグメントを含んでおり、ここで、前記混合物は、前記の流体伝達装置を通じて移送され、更に渡って、前記のもう一方の流体受容装置に包含された

多孔質の流体受容材料で拡がり、ここで、前記流体受容装置に包含された前記多孔質の流体受容材料内における信号供給物質の分布を通じて現れるパターン、そのパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積が、前記試料中における1種類または複数の被分析物濃度の測度として利用される。

【0019】

前記流体伝達装置に包含された前記流体伝達材料と、一方での、前記容器内の試薬と検査サンプルとの混合物との接触、及び、他方での、前記もう一方の流体受容装置に包含された多孔質の流体受容材料との接触は、同時的に確立される接触、もしくは、最初に試薬と検査サンプルの混合物との間で確立される接触、あるいは、最初に前記のもう一方の流体受容装置における多孔質の流体受容材料との間で確立される接触のうちのいずれかから構成することができる。

10

【0020】

本発明の特に好適な一つの実施形態は、前記容器が液漏れ防止タイプの容器であることにより特徴付けられ、また、流体伝達材料を包含する流体伝達装置が、前記の流体伝達材料と前記容器内における前記混合物との接触がもたらされるような方法で、液漏れ防止タイプのゲートを通じて前記容器内に導入されることにより更に特徴付けられる。

【0021】

本発明の更なる特徴は、流体伝達装置に包含された流体移送材料が、毛管力、陽圧(over pressure)、または陰圧(under pressure)を用いて流体を移送するのに適した多孔質の流体移送材料からなり得ることである。

20

【0022】

本発明の別の実施形態は、流体伝達装置に、流体受容装置と常に接触した状態で取り付けられているのではなく、本定量的な化学的分析方法を実施するプロセスの間に流体受容装置との接触がもたらされる非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具を含むことにより特徴付けられる。

【0023】

本発明に関わる方法を更に特徴付ける内容は、試薬と検査サンプルとを混合するための前記容器が、前記流体伝達装置が前記混合物とそこで接触できるゲートを備えた密閉容器であってよいことであり；これは、もし都合がよい場合には、前記容器に壁部にV字型の切り込みを入れ、その壁部を薄くし、そして、伝達装置がきっちりと填る方法で導き通されたときにその壁部がへこむことにより果たすことができ、あるいは；もし都合がよい場合には、流体伝達ユニットと前記容器とを一緒にねじ込むことにより果たすことができ、もし都合がよい場合には、前記容器または伝達装置は、容器及び/又は流体伝達装置が保持されている空間的な位置に関わらず、前記混合物が前記の容器または流体伝達装置から漏れないような形状の小さなガス透過性の開口を有する。

30

【0024】

本発明を更に特徴付ける内容は、試薬と検査サンプルとを混合するための前記容器が、検査サンプルを導入するためのゲートを備え得ることであり、あるいは、検査サンプルを含有する第三の装置が使用され、そして、望ましい場合には、前記の第三の装置が、それ以外の装置と一緒に接合されたときに、もしくは、それ以外の装置にねじ込まれたときに、前記容器の一部を構成することである。更に、前記の第三の装置は、前記容器の一部ではなく、そして、例えばガラス製の毛細管である。

40

【0025】

本発明を更に特徴付ける内容は、前記流体受容装置が、種々の被分析物または被分析物全体(for analytes or the analytes)に対して親和性を有する特異的結合分子、あるいは、全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子に対して親和性を有する特異的結合分子を、固定化された形態及び/又は乾燥させた形態、あるいは、粒子上または粒子内に分散させた形態、もしくは、多孔質の流体受容材料に均一または不均一(但し、前もって決定しておく)に分配した状態で前記流体受容装置の多孔質流体受容材料内に直接的に分散させた形態のいずれかで含有して

50

いることである。

【0026】

本発明を更に特徴付ける内容は、前記試薬が、付着された特異的結合分子を伴った状態で、もしくは、そのような特異的結合分子を伴わない状態で、あるいは、全被分析物分子の付着された類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子を伴った状態で、もしくは、それらを伴わない状態で、着色された粒子、コロイド、酵素、発蛍光団、または染料の形態で信号供給物質を含み得ることである。

【0027】

本発明を更に特徴付ける内容は、前記試薬が、検査サンプル中における細胞を溶解する化学薬品、及び/又は、酸性度またはイオン強度を調節する化学薬品、あるいは、あらゆる考えられる粒子を分散状態に保つ化学薬品を含み得ることである。

10

【0028】

更に、本発明を特徴付ける内容は、前記流体伝達装置が、赤血球または白血球等の細胞を抑制できる細孔径であって、但し、前記信号供給物質を通過させるのに十分な大きさの細孔径を有していることである。

【0029】

本発明を更に特徴付ける内容は、検査サンプル中におけるヘモグロビンを信号供給物質として使用できることである。

【0030】

本発明を更に特徴付ける内容は、前記試薬と混合する前に、化学薬品を付加することにより検査サンプルを前処理するか、あるいは、検査サンプルを分離または抽出することにより、もしくは、前記容器の内部で2種類または数種類の異なる試薬と一緒に混合することにより前記試薬を提供できることであり、あるいは、前記流体受容装置に現れるパターン、そのパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積を引き出すため、または増強するため、あるいは明確にするため、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料に付加的な化学薬品が加えられることである。

20

【0031】

本発明の一つの特徴は、前記流体受容装置に現れるパターン、またはそのパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積を、吸収測定、反射測定、または蛍光測定のいずれかにより、可視光線、紫外線、赤外線、または近赤外線をベースとしたアナログ式あるいはデジタル式の機器を用いて描写、走査、または測定できることであり、また、これらの測定値に基づいて、検査サンプル中における1種類または複数の被分析物濃度が決定されることである。

30

【0032】

本発明の一つの別の実施形態は、試薬と検査サンプルとを混合するための容器として漏れ防止タイプの容器を使用することにより更に特徴付けられ、また、流体伝達装置が、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料と常に接触した状態で取り付けられている多孔質の流体伝達材料を含んでいることにより更に特徴付けられる。

【0033】

また、本発明は、検査サンプル中における1種類または数種類の被分析物濃度を決定する方法を実施するための装置にも関係し、その装置は、前記検査サンプルと試薬とを混合するための液漏れ防止タイプの容器、流体伝達材料を包含した流体伝達装置、及び、流体受容材料を包含した流体受容装置を含んでおり、それらの構成要素は、前記流体伝達装置が、液漏れ防止タイプの引き込み口を通じて前記容器の内容物と接触することができ、且つ、前記流体受容材料を包含した前記流体受容装置とも接触することができるように組み立てられる。

40

【0034】

更に、本発明は、毛管力、陽圧、または陰圧を利用して流体を移送するのに適した多孔質の流体移送材料からなる、流体伝達装置に包含された流体移送材料からなる装置にも関係している。

50

【0035】

また、本発明は、非多孔質の尖端またはチューブ形の伝達用具が、流体受容装置と常に接触した状態を取り付けられているのではなく、本定量的な化学的分析方法を実施するプロセスの間に流体受容装置との接触がもたらされるような状態で、流体伝達装置に含まれている装置にも関係している。

【0036】

本発明による装置の更なる実施形態では、前記漏れ防止タイプの容器は、前記流体伝達装置がそこを通じて 検査サンプルと試薬との前記混合物に接触できる引き込み口を有しており、好適には、前記の容器は、壁部にV字型の切り込みがあり、その壁部は、薄くなっている、あるいは、流体伝達装置がきっちりと填る方法で導き通されたときにその壁部がへこむようになっていて、あるいは、流体伝達ユニットと前記容器は一緒にねじ込まれ、好適には、前記容器または伝達用具に、流体伝達装置と共に前記容器が保持されている空間的な位置に関わらず、前記混合物が前記の容器または流体伝達装置から漏れないような形状の小さなガス透過性開口を有する。

10

【0037】

更に、本発明による装置は、試薬と 検査サンプルを混合するための前記容器が、例えばガラス製毛细管等のサンプル移送装置から 検査サンプルを導入するための引き込み口を備えていることを特徴とし、あるいは、サンプル移送装置が、その引き込み口の位置において前記容器と共に結合される蓋装置、あるいは、その引き込み口の位置において前記容器にねじ込みされる蓋装置等の、前記容器の一部を構成していることを特徴とするものである。

20

【0038】

本発明によれば、本装置は、前記流体受容装置が、種々の被分析物または被分析物全体に対して親和性を有する特異的結合分子、あるいは、全被分析物分子の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子に対して親和性を有する特異的結合分子を、固定化された形態及び/又は乾燥させた形態、あるいは、粒子上または粒子内に分散させた形態、もしくは、多孔質の流体受容材料に均一または不均一（但し、前もって決定しておく）に分配した状態で前記流体受容装置の多孔質流体受容材料内に直接的に分散させた形態のいずれかで含有していることにより特徴付けられる。

【0039】

更に、本発明による装置は、前記容器に含有されている試薬が、付着された特異的結合分子を伴った状態で、もしくは、そのような特異的結合分子を伴わない状態で、あるいは、全被分析物分子の付着された類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子を伴った状態で、もしくは、それらを伴わない状態で、着色された粒子、コロイド、酵素、発蛍光団、または染料の形態における信号供給物質を含んでいることを特徴とするものである。

30

【0040】

更なる実施形態では、本発明による装置は、前記試薬が、 検査サンプル中における細胞を溶解する化学薬品、及び/又は、酸性度またはイオン強度を調節する化学薬品、あるいは、あらゆる考えられる粒子を分散状態に保つ化学薬品を含んでいることを特徴とするものである。

40

【0041】

尚も更なる実施形態では、本発明による装置は、前記流体伝達装置内における前記流体伝達材料が、赤血球または白血球等の細胞を抑止できる細孔径であって、但し、前記信号供給物質を通過させるのに十分な大きさの細孔径を有していることを特徴とするものである。

【0042】

更なる実施形態では、本発明による装置は、本装置が、組み込み式の毛细管（7）を伴うストッパー（6）、そのストッパーを取り巻くシーリングスリーブ（8）、液漏れ防止タイプの容器（9）、前記の容器（9）の底部における引き込み口を密封する可動式のボー

50

ル(10)を含んでいて、ここで、ボール(10)は、芯またはフェルトチップガイド(12)に密封可能に取り付けられている弁座(11)に収容されており、また、ここで、芯またはフェルトチップ(13)は、密封可能で且つ移動可能に取り付けられており、更に、ここで、前記のフェルトチップ(13)が、取り外し可能なキャップ(14)により保護されていることを特徴とするものである。

【0043】

尚も更なる実施形態では、本発明による装置は、本装置が、更に、吸収、反射、または蛍光、もしくはそれらの組み合わせを測定するための、可視光線、紫外線、赤外線、または近赤外線、もしくはそれらの組み合わせをベースとしたアナログ式またはデジタル式の機器等の走査装置、データを処理するためのプロセッサ、表示媒体、及び、データを記憶するための媒体を含んでいることにより特徴付けられる。

10

【0044】

更なる実施形態では、本発明による装置は、本装置が、更に、可動式のホルダーを伴うラックを含んでおり、これにより、前記容器が、垂直方向の制御された動きのみが可能な前記流体受容装置の関係で統一された位置に固定されることにより特徴付けられる。

【0045】

本発明の更なる実施形態は、本方法の使用に関係し、そこでは、血液、痰、粘液、糞便、吐出物、及び組織等の生物学的試料中における1種類もしくは数種類の被分析物濃度が測定される。

【0046】

本発明による方法の更なる使用では、それらの被分析物は、自己抗体、抗体、腐生菌、細菌、他の感染性物質、ヘモグロビン、アルブミン、CRP、U-アルブミン、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、フェリチン、ASAT、ALAT、LDH、ミオグロビン、トロポニン I、脂肪酸結合タンパク質、アミラーゼ、HCG、U-HCG、テオフィリン、及び抗生物質からなるグループから選択される。

20

【0047】

また、本発明は、本方法を実施するためのキットにも関係し、そのキットは、前記装置、検査サンプルと混合するための試薬、場合によっては、検査サンプルを前処理または分離するための付加的な試薬、あるいは、信号を明確にするために流体受容装置に混ぜるための付加的な試薬を含む。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

次に、図面及び実施例を参照しながら、本発明を更に詳細に説明する。

【0049】

本発明は、一つの単一液体試薬を用いて、検査サンプルまたは検査サンプル材料中における1種類または数種類の被分析物を定量するための方法及び装置を提供する。この試薬は、1種類または複数の信号供給物質を含んでおり、そして、サンプル-検査サンプルのアリコートを用意-をその試薬15に混合して混合物をもたらすための容器2、9、流体伝達装置4、13、及び、伝達された流体を受容する多孔質材料17(即ち、流体受容材料)を包含した流体受容装置5、16と組み合わせて使用される。

40

【0050】

本発明によれば、複雑な検査サンプル中における被分析物を定量するためのペンとしてみなされ得るような総合装置を作成することもできる。その最も好適な実施形態における外観を見ると、それは、フェルトチップまたはファイバーチップ4、13あるいは先端を伴うフェルトチップペン、または万年筆、もしくはカートリッジペンに似ており、これにより、容器からの流体は、伝達装置を通じて、例えば紙またはフィルター材料、例えばニトロセルロース、あるいは、同様な特性を有する更に進んで開発されたもっと現代的な材料でできた二次元マトリックス5、17上へ下側に導かれる。この装置は、更に、組み込み式の毛細管7を伴うストッパー1、6、及び、前記フェルトチップ4、13を保持するフェルトチップガイド3、12を含んでいる。

50

【0051】

本発明による定量分析（即ち、本発明の使用）のための適当な材料は、体液またはその抽出物、典型的には、尿、唾液、血清、血漿、溶血血液、抗凝固血液または全血、脳脊髄液、体液の抽出物またはフラクション、あるいは植物界から得られる流体または抽出物、もしくは、例えば廃液などの水溶液等の流体、または懸濁液、あるいは他の液体、もしくは凝集性状の懸濁された状態物である。本発明では、サンプル-サンプル材料のアリコートとして用意 - は、容器内において試薬と混合される。そのアリコートは、例えば、検査サンプルが毛細管の内部に存在するエアーを表面張力により追放する結果として満たされる予め定められた内部容量を有する小さな毛細管等のサンプル採取装置内へ吸い上げられた後、容器内へ導入される。この毛細管は、例えば直線形または螺旋形等、あらゆる適当な形態であってよく、あるいは、例えば前記容器内のストッパーとしても機能できる装置の内部にあってもよく、従って、前記装置は、検査サンプルが試薬と混合されたとき、及び、混合後に、それが液漏れ防止手段になるような方法で容器を閉じることができる。この混合は、検査サンプルが試薬内へ流出して混ざるように、例えば、手または機器を用いて容器を振ることによりもたらすことができる。

10

【0052】

試薬と検査サンプルを混合するための液漏れ防止タイプの容器は好適な実施形態ではあるが、必ずしもそうでなくてもよい。この液漏れ防止タイプの実施形態における容器の利点は、望ましい書き方をもちたるときには種々の異なる位置で保持できることが好適であるはずのペンの場合と同様な方法で、液体混合物の漏出を伴うことなく、あらゆる可能な空間的位置でその容器を保持できることである。

20

【0053】

本発明の更なる特徴は、流体伝達装置が、好適には漏れ防止タイプのゲートを通じて、前記容器内へ導入されることである。この流体伝達装置は、一つの好適な実施形態では、一部もしくは全体が、フェルトチップペン、またはカートリッジペン、あるいは墨汁ペンの先端に類似した、もしくは、ペンの先端または細い金属製チューブ等の、チューブ形材料、または芯、あるいはスプリット形装置の形態を為す他の様々な設計における、液体を吸収する多孔質材料からなっていてよい。従って、前記試薬容器と伝達装置は、万年筆または墨汁ペンと同様に設計することができ、そこでは、試薬/検査サンプル混合物は、先端またはチューブ形伝達用具を介して、あるいは、好適には、水性液体を吸収する多孔質材料からなる伝達用具を介して移送されるが、但し、試薬が検査サンプルのアリコートと混合された状態になるまで伝達装置と試薬との接触がもたらされるべきではないという点において、それらの非常に一般的なペンとは幾分異なっている。これは、例えば、前記容器に一つの壁部におけるV字型の切込みを入れ、このポイントにおけるその壁部を薄くし、そして、流体伝達装置がきっちりと填る方法で導き通されたときにその壁部がへこむことにより達成することができ、あるいは、流体伝達ユニットと前記容器とを一緒にねじ込むことによっても達成することができ、もしくは、流体伝達ユニットに前記容器内に圧入される中空の先端を設けることによっても達成することができる。

30

【0054】

液漏れ防止タイプの実施形態では、一般的に、流体伝達を抑制することとなる容器内の陰圧を回避するため、流体伝達装置を通じて容器から移動するときに、流体伝達を抑制することとなる容器内の陰圧を回避すべく空気を容器内に入れることが必要であろう。それ故、小さなガス透過性開口を有効に使用することができる。表面張力のため、流体が漏れ出さないような非常に小さな開口、もしくは狭い開口であって、但し、気体分子が入り込むのを許容するのに十分な大きさの開口を使用するのが有利である。

40

【0055】

本発明は、更に、流体伝達材料を包含した流体伝達装置を使用し、その流体伝達材料は、前記容器内に存在する前記の混合物との接触がもたらされるような方法で前記容器内に導入される。更に、前記流体伝達装置内における前記の流体伝達材料は、一方では、試薬と検査サンプルからなる前記混合物との接触がもたらされ、他方では、それと同時的に行

50

われるか、あるいは、流体受容材料と流体伝達材料との接触があとで行われるかのいずれかで、別の流体受容装置内における多孔質の流体受容材料との接触がもたらされる。本発明は、更に、前記流体伝達装置内における前記の流体伝達材料が、前記もう一方の流体受容装置内における多孔質の流体受容材料と常に接触した状態で取り付けられているのではなく、本方法を適用する過程の一部として、そのような接触がもたらされることにより特徴付けられる。

【0056】

本発明の特に好適な一つの実施形態は、前記流体伝達装置内における多孔質の流体伝達材料の使用により特徴付けられる。この多孔質の流体伝達材料は、前記容器内における試薬と検査サンプルからなる混合物との接触、及び、別個の流体受容装置内における多孔質の流体受容材料との接触が同時的に起こる。従って、流体混合物は、伝達装置を通して、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料へ移送されるであろう。流体受容装置内における多孔質の流体受容材料に恒久的に取り付けられていないか、あるいは、そのような流体受容材料と恒久的に接触していない流体伝達装置を用いることにより、前記流体受容装置に包含された多孔質材料における良好で規則正しい拡散パターンを伴って流体を伝達するための再現性のある方法のための工業的に生産可能な装置を達成することができる。従って、その流体は、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料で均一且つ規則的に広がるであろう。これが図1～4に描かれている。

【0057】

図1aは、内蔵式の毛細管を伴うサンプル採取装置における血液サンプルの採取の様子を描いており、図1bは、本発明の特徴を為す試薬を既に含有している容器2内へ検査サンプルを導入する様子を示しており、図1cは、試薬と検査サンプルとの混合物が前記容器2から流体伝達装置を通して流体受容装置内5における多孔質の流体受容材料に伝達される様子と、流体受容装置に包含された前記多孔質流体受容材料における流体の拡散パターンを描いている。従って、流体受容装置に包含されたこの多孔質材料における信号供給物質の拡散の結果として表れるパターン、またはそのパターンの面積、あるいはそれらのパターンエレメントの面積は、EP第0250137 B1号に記載されているタイプの信号供給物質に限定されるものではないが、EP第0252137 B1号で説明されているのと同じ原理により、その検査サンプル中における種々の被分析物または被分析物全体の濃度の測度として使用することができる。

【0058】

図2には、本装置の別の実施形態が示されており、前記装置は、例えば5 μ lの流体を保持する毛細管等の内蔵式の毛細管7を伴うストッパー6、シーリングスリーブ8、耐液容器9、前記容器9の底部における引き込み口を密封するボール10を含んでいて、ここで、前記ボールは、シーリング接続で芯またはフェルトチップガイド12を受け入れるべく形成された弁座11に収容されている。芯またはフェルトチップ13は、芯またはフェルトチップガイド12にシーリング及びスライディング接続されており、そして、その先端はキャップ14で保護されている。流体伝達材料でできている芯またはフェルトチップを除き、本装置のすべてのパーツは、例えばプラスチック等の適当な材料で製造されている。

【0059】

図3は、図2に描かれている実施形態での使用の様子を示している。図3Aは、例えば商業的に供給されているといった試薬15が充填された装置を描いている。流体伝達装置は試薬15と接触しておらず、そして、フェルトチップ13はキャップ14で保護されている。図3Bでは、毛細管7に、例えば血液等の検査サンプルが充填されており、そして、図3Cでは、毛細管7の内容物を試薬15と接触させるため、ストッパー6が下向きに押し込まれている。図3Dでは、この装置を揺動または攪拌することにより、試薬15が検査サンプルと混合されている。図3Eでは、流体伝達装置13がボール10に対して押し込まれており、その後、このボールは容器9内へ移動し、流体伝達装置と検査サンプル及び試薬15からなる混合物との接触が確立される。

【0060】

図4は、例えばプラスチック等の適当な材料でできた円形トレー16からなる流体受容装置の一つの実施形態を描いており、ここには、流体受容材料17が配置されている。灰色の領域18は、多孔質材料17における信号供給物質の拡散の結果として現れるパターンを示している。

【0061】

特に好適なことは、流体受容装置における多孔質で均一な厚みの流体受容材料に、前記1種類または複数の被分析物に対して特異的な結合親和力を有する固定化試薬が均一に固定化された状態で拡散していることであり、あるいは、前記の固定化試薬が、固定化された被分析物分子、もしくは、被分析物分子の類似体、誘導体、またはフラグメントを含んでいることであり、その理由は、これが、検査サンプル中における被分析物濃度と、信号供給物質が流体受容装置の多孔質流体受容材料に形成する拡散パターンの面積との間に直接的な比例関係をもたらすためである。

10

【0062】

前記方法で可能な限り最大のダイナミック測定範囲を得るため、流体受容装置内における前記多孔質流体受容材料は、好適には、円形を為していて、前記流体伝達装置は、前記の流体受容装置内における多孔質の流体受容材料の中心との接触がもたらされ、そして、信号供給物質により輪が形成されることとなる。試薬と検査サンプルの混合物のための容器が、流体伝達のための装置と共に、ペンのようなデザインを有している場合には、このペンの先端は、典型的には、流体受容装置内における多孔質流体受容材料の中心に置かれてよく、そして、信号供給物質により輪が形成されることとなり、シンプルな手段を用いてこれらの輪を測定することができる。

20

【0063】

前記試薬が、被分析物分子に対して親和性を有する固定化された特異的結合分子を含んでいる場合には、付着された信号供給物質を伴う前記の被分析物分子は、それらの固定化された結合分子によって捕獲されて、被分析物濃度に比例した面積を有する輪を形成し、そして、被分析物分子に結合されていない信号供給物質は、前記流体受容装置内における多孔質の流体受容材料の外縁まで移動するであろう。

【0064】

本発明のうち、いわゆる競争型の実施形態の場合には、全被分析物分子の類似体、誘導体、フラグメント、または全被分析物分子が信号供給物質に結合され、そして、これらが、前記流体受容装置に存在する特異的結合分子と結合するであろう。この競合型の実施形態の場合、同一温度であれば、小さな分子の動力学的運動は、大きな分子の場合よりもはるかに速い、という熱力学原理を利用することができる。信号供給物質に結合されていない検査サンプルからの被分析物分子は、特異的結合分子と非常に急速に反応することができ、一方、付着された被分析物分子を伴って著しく粒子状化された信号供給物質は、自由な被分析物分子よりもはるかに遅く反応するであろう。従って、この実施形態の場合、粒子状化された信号供給物質は外側の輪を形成し、一方、検査サンプルからの被分析物分子は、信号のない内側の輪を形成することとなり、好適には、内側の輪は、本試験における被分析物分子の濃度に比例した面積を有している。

30

40

【0065】

本発明の別の実施形態では、全抗原の固定化された類似体、誘導体、フラグメント、または全抗原が、前記流体受容装置内における多孔質の流体吸収性材料において使用される。抗原は、そのような抗原に対して親和性を有する特異抗体と反応する分子である。この実施形態では、検査サンプル中に存在する特異抗体を測定することができる。そのような特異抗体は、特異抗原に対する親和性を有している。これは、特に、患者が自分自身の身体に存在する抗原に対する抗体を産生することにより特徴付けられるいわゆる自己免疫疾患のケースや、患者が感染性物質に対する抗体を産生する感染性疾患のケースで医学的に必要とされる。このとき、典型的には、信号供給物質に結合された競合抗体が使用され、そして、前記のこれらの抗体は、典型的には、動物または細胞培養において多クローン

50

的または単クローン的に産生され；あるいは、細菌培養を含めた細胞培養において組換え技術を用いることにより産生され；もしくは、植物において産生される。また、このケースでは、抗体のフラグメント、類似体、または誘導體、もしくは、ファージ提示法を含め、組合せ化学ライブラリーまたは組合せ生化学ライブラリーで製造された競合分子も使用することができる。これらの技術及び疾患状況に関する更なる説明は、公に入手可能な医学的及び生化学的専門文献で見出すことができる。

【0066】

本発明の種々の異なる実施形態で、数多くの異なる抗体を用いてきた。一般的に、多クローン抗体は、それらが、抗原の存在下においてマイクロスフェアを凝集する能力を有しているため、好適ではなく、一方、殆どが抗原の唯一の決定基に結合する単クローン抗体を用いたときには、そのような凝集は滅多に起こらない。

10

【0067】

被分析物が単量体ではなく、同じ抗原決定基を持った幾つかのサブユニットを有している場合には、そのコーティングを施したマイクロスフェアと、その被分析物を単量体に分割する試薬とを組み合わせるのが有利であろう。例えば、C反応性タンパクは、カルシウムイオンと結合して、そのときにそれらの異なるサブユニットが分離されるDTPA及びEDTAのようなキレート試薬を用いることにより、単量体に分割することができる。それらのキレート試薬の濃度は、分析すべき血液試料中に存在するカルシウム及びマンガンイオンの濃度よりも高くなければならない。

【0068】

更に、抗原が同じエピトープの複製を2つ以上有している場合には、粒子凝集が誘起される可能性があり、そのときには、その抗原の複数の場所には存在しない一つのエピトープに対して反応性を有する別の抗体を選択すべきである。

20

【0069】

特に好適なことは、その抗原に対するもう一方の抗体の結合を干渉することなく、また、粒子の凝集をもたらすことなく、その抗原の異なるエピトープに結合することが試験済みの、対を為す単クローン抗体を使用することである。

【0070】

形成されるパターンのサイズを適合させるため、前記試薬に校正用の競合物質を加えることが有益であり得る。例えば、試薬に、検査サンプル中の被分析物分子への結合に対して競合するような、付着された信号供給物質を伴わない、既知量の特異的結合分子を加えることが有益であり得る。また、存在する特異的結合分子と反応し、従って、形成されるパターンに影響を及ぼすような、全被分析物分子の既知量の類似体、誘導體、フラグメント、または全被分析物分子を加えることも有益であり得る。

30

【0071】

本発明に関わる方法は、流体伝達装置を通じて流体受容装置へ至り、更に流体受容装置内へ移る水性溶液の移送に基づくものである。本発明は一つのタイプの移送力に限定されるものではないが、水性溶液が多孔質材料と接触したときに現れる毛管力は、本発明の特徴を為す方法を適用するのに特に有利な移送力を提供する。原理的には、吸引ポンプまたは圧力ポンプと接続して利用されることが多い気体の陽圧力または気体の陰圧力（真空）も使用できるが、これは、一般的に、実践的な観点から見て適切性に劣る。

40

【0072】

前記流体伝達装置内における流体伝達材料として機能させるため、典型的には、墨汁ペンの尖端、または、いわゆるフェルトチップペンで使用されているタイプの材料が使用される；これらに限定するのではなく、典型的にはフェルト、スポンジ（天然及び合成）が使用されるが、特に好適にはポリエチレン繊維（中実または中空繊維）、ポリエステル繊維（中実または中空繊維）、または他のプラスチックポリマ繊維（中実または中空繊維）が使用される。中空繊維を使用したときには特に有利な毛管効果が得られるが、中実繊維も、これらの設計態様においては繊維間に毛管スリットが得られるため、使用することができる。ある材料は接着剤と一緒に接着され、他のものは一緒に融着され、または一緒に圧

50

着され、あるいは一緒に押し出され、または鑄造され、もしくは紡がれる。

【0073】

多孔質材料または流体受容材料として機能させるため、親水性材料と疎水性材料のどちらも使用することができる。親水性材料は良好な吸引特性を呈することが多く、一方、疎水性材料は、特異的結合分子の固定化に関する一層良好な特性を呈することが多い。

【0074】

液漏れ防止タイプの実施形態よりも好適性に劣る設計態様は、試薬と検査サンプルとを混合するための容器として開放度の高い容器を使用する設計態様である。この実施形態においても流体伝達装置が使用されるが、この実施形態は漏れ防止タイプではないため、流体の伝達は、一般的に、重力に逆らう方向、即ち、その容器から上向きに流れるであろう。この実施形態の場合、最も典型的には、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料と常に物理的な接触をしているのではなく、流体がこの材料と接触したときに現れる毛管力の結果として流体を吸い上げる多孔質の流体吸収性材料を包含した伝達装置が使用される。この伝達装置は、前記容器内における試薬と検査サンプルとの混合物と、流体受容装置内における多孔質の流体受容材料との両者との接触がもたらされ、そして、流体受容材料との接触は、典型的には、その流体混合物が多孔質の流体受容材料内で半径方向外向きに移動するように、この流体受容装置の中心において行われる。

10

【0075】

従って、本発明は、一部では、形成されたパターンがそこで読み取られる多孔質の流体受容材料と固定的または恒久的に接触しているのではない、前記ような別個の流体伝達装置を用いることによりもたらされ、また、一部では、試薬と検査サンプルのアリコートとを混合するために液漏れ防止タイプの容器を用いることによりもたらされる。このようにして、本発明の場合には被分析物分子を化学的に定量するための制御された定量的なパターンの面積を形成するためであるが、制御された筆記または描画を達成するためにペン及び筆記用具でこれまでに用いられていたと同様な制御された流体伝達が得られる。好適には、これら2つのエレメントの組合せが本発明において用いられる。

20

【0076】

一つの好適性に劣る実施形態では、本発明に関する方法は、前記流体伝達装置と前記流体受容装置が、連続的な多孔質の流体吸収性材料を伴う一つの連続的な装置を構成していることと組み合わせ、漏れ防止タイプの容器が試薬と検査サンプルを混合するために使用されることにより特徴付けられる。

30

【0077】

前記信号供給物質は、好適には、粒子状材料、典型的には金属コロイドまたは重合性状の粒子状材料、代替的には、ラテックスタイプの粒子状材料、あるいは、例えばカーボンブラック粒子(M. Lonnerberg及びJ. Carlsson、J. Immun. Meth.、246:(2000)、25-36)等のカーボン粒子から構成される。そのような着色粒子は、文献において既知であると同時に、通常の専門家の間で非常によく知られており、そして、British Biocell社(英国)及びBangs Laboratories社(Indiana、アメリカA)等の供給業者から公に入手することができる。また、これらの会社は、抗原または抗体、あるいは、これらの他の結合分子または誘導体、もしくは、全被分析物分子の類似体、誘導体、フラグメント、または全被分析物分子で物理的または化学的にコーティングされたそのような粒子も出荷している。重合粒子は、あらゆるサイズ及び色のものが出荷されており、蛍光粒子も同様である。これらの粒子のサイズ及び色の強度は、使用する測定法で必要とされる感度及び能力、並びに、前記流体受容装置内における多孔質の流体受容材料の細孔径に適合させなければならない。更に、それらは、結果を読み取るための機器に適合させねばならず、また、視覚的に読み取る必要がある場合には、視覚的直接読取りに適合させなければならない。

40

【0078】

小さな粒子は、大きな粒子よりも速く反応し、そして、粒子の質量単位当たり比較的多くの結合分子と結合する能力を有しており、一方、大きめの粒子は、使用される結合分子の

50

量に関して強めの呈色または蛍光をもたらす。

【0079】

また、信号供給物質は、結合分子に直接的に共役される蛍光染料からなっているもよいが、この場合、通常は、読み取りに蛍光スキャナーが必要である。高濃度で存在する被分析物に対しては、結合分子に直接的に共役される染料を使用することができ、そして、血液サンプル自身からのヘモグロビン分子の利用は本発明の一つの特殊な実施形態であり、そのようなケースでは、ヘモグロビンと被分析物分子の両方に対して親和性を有するキメラ抗体を用いることが多い。更に、信号供給物質として酵素を使用することもできるが、このケースでは、通常、前記流体受容装置に、例えば着色剤として沈殿する基質等の酵素基質を含有する付加的な溶液を供給しなければならない。

10

【0080】

前記それらの結合分子は、単クローン抗体または多クローン抗体、あるいは、これらの抗原結合フラグメントまたは誘導体、代替的に、F A B、F A B 2、またはF A B ' 2フラグメント、もしくは組合せ技術により製造された重合体；ファージディスプレイを含め、合成または生物学的なもの、例えばペプチド結合、または核酸アプタマー、あるいは例えばハプトグロビン、内因子、または葉酸結合タンパク質等の天然の特異的結合活性を有する分子等を含むことができる。特異的結合分子が、流体受容装置内と信号供給物質に結合させた状態との両方で使用される場合には、被分析物分子がそれらの特異的結合分子に同時的に結合できることを確認しておかなければならない。

【0081】

本発明の特徴を為す前記試薬は、更に、検査サンプル中の細胞を溶解する化学薬品、pH及びイオン強度を調節し、あるいは、(もし存在する場合には)粒子を分散状態に保つ界面活性剤及び/又は緩衝物質等の化学薬品を有効に含むことができる。

20

【0082】

本発明の更なる特徴は、流体伝達装置内における前記流体伝達材料が、赤血球または白血球等の細胞を抑止できる細孔径であって、但し、前記信号供給物質を通過させるのに十分な大きさの細孔径を有していることである。

【0083】

本方法で分析される生物学的な検査サンプルは、血液、痰、粘液、糞便、吐出物、及び組織を含むことができる。

30

【0084】

信号供給物質と被分析物分子との結合の強化、あるいは、被分析物分子と流体受容装置内における特異的結合物質との結合の強化が望ましい場合には、幾つかのタイプの結合分子を同時に使用することができ、代替的に、被分析物分子の異なる部分に対して特異性を有する幾つかのタイプの結合分子を使用することもできる。

【0085】

本発明の特定の設計態様では、検査サンプルを前記容器内に採取する前に、その検査サンプルの希釈、溶血、抽出、変性、または分離を実施することが好都合であり得る。典型的には、非常に高濃度で存在する物質は、本発明に関わる方法の結合能力以上の負荷をかけないようにするため、希釈が必要になり得る。例えば葉酸またはビタミンB12等の他の被分析物は、被分析物の分子構造を露出させるため、煮沸等の変性が必要である。炭水化物の少ないトランスフェリンは、炭水化物の少ないトランスフェリンの定量が行えるようになる前に、他のイソトランスフェリンから分離しなければならないことが多く、そして、試水は、典型的には、分析する前に濃縮するか、フィルターで抽出しなければならない。

40

【0086】

試薬と検査サンプルを混合するための前記容器内における試薬は、本発明のうちの好適性に劣る設計態様では、最も頻繁に試薬が溶液中で混ぜ合わされていると貯蔵期限が不足するために、2つの構成部分に分割することができる。これは、例えば、以下の方法に限定するものではないが、例えば試薬の一方の部分を容器内部のガラスの水薬瓶内に配置し

50

、そして更に、前記の容器を軟質のプラスチックで作成しておき、その軟質のプラスチック製容器を圧縮することによって前記のガラスの水薬瓶が破壊され、これにより試薬が混合されるようにして、使用の直前にこれら2つの構成部分を混ぜ合わすことにより使用可能な状態にすることができる。この最後の行為は、検査サンプルとの混合前または混合後に行うことができる。

【0087】

代替的に、分割された試薬のそれら2つの部分を、使用の直前に一緒につながれる2つの区画、あるいは、使用の直前に一緒にねじ込まれる2つの区画に保持することができ、もしくは、インクが万年筆に充填またはポンプで注入されるのと恐らく同じ方法で、部分的試薬のうち的一方または部分的試薬の両方を使用の直前に充填することにより、2つの区画に保持することができる。また、試薬が既製の試薬として供給される場合には、それを容器に充填することができ、あるいは、カートリッジを用いてインクをペン内にもたらし、それをカートリッジの形態において容器内にもたらし、別の態様は、詰め替え後にペンのような装置内に配置される詰め替え式のカートリッジを利用することであり、もしくは、試薬を含有する工業的に製造されたカートリッジを使用することもできる。

10

【0088】

流体受容装置の全体または一部を構成する多孔質の流体受容材料は、種々の異なる材料からなっていてよい。典型的には、その材料は、特に信号供給物質が粒子状の材料からなる場合には、比較的大きな細孔径を有するニトロセルローズから構成されるであろう。近年では、Pall Gelman社から入手可能な材料Predatorや、親水性及び疎水性の材料、並びに、ナイロン、セルローズ、及び他の天然及び合成高分子の誘導体等、更に発達した材料が供給されている。そのような材料は、通常、英国のPall Gelman社、アメリカのMillipore社、ドイツのSchleier & Schull社、及び他の数多くの会社から入手することができる。しかし、特異的結合分子は、多孔質材料内において分散する粒子（疎水性であることが多い）上に固定化することもでき、そして、それらの特異的結合分子はそれらのサイズによって固定化され、即ち、多孔質材料内においてそれらの特異的結合分子が液体の流れに沿って引っ張られることはない。

20

【0089】

本発明による方法は、更に、読み取りを視覚的に行うことができ、あるいは、吸収測定、反射測定、または蛍光測定のいずれかにより、前記流体受容装置に現れるパターン、またはそのパターンの面積、及び/又はそれらのパターンエレメントの面積を可視光線、紫外線、赤外線、または近赤外線をベースとしたアナログ式またはデジタル式の機器を用いて描写、走査、または測定することにより機器により行うことができ、そして、これらの測定に基づいて、検査サンプル中における1種類または複数の被分析物濃度が決定されるという事実により特徴付けられる。読み取りが機器により行われる場合または視覚的に行われる場合のいずれであっても、その読み取りは、流体受容装置に設けられた目盛表示器により、代替的には、流体受容装置の上層にある透明な材料に設けられた目盛表示器により補助されてよい。

30

40

【0090】

本発明による方法は、とりわけ、i . a . の濃度の分析に適している：

抗カルジオリピン抗体等の自己抗体、

関節炎に関係する抗原に対する抗体、

HIV、風疹及び他のウイルス、並びに、トキソプラズマ症、腐生菌、細菌、及び他の感染性物質に対する抗体、

ヘモグロビン、

アルブミン、

CRP、

U - アルブミン、

50

糖化アルブミン、
 糖化ヘモグロビン、
 フェリチン、
 A S A T、
 A L A T、
 L D H、
 ミオグロビン、
 トロポニン I、
 脂肪酸結合タンパク質、
 アミラーゼ、
 H C G、
 U - H C G、

それらに加えて、テオフィリン及び種々の異なる抗生物質等の非常に多くの医療用物質、並びに、非常に多くの他の被分析物。

【0091】

本発明は、更に、本方法を適用するのに必要な装置及び試薬、並びに、本発明に関わる方法を実施するためのキットを提供する。本発明に関わる装置は：

本発明に関わる方法を適用するための試薬、

検査サンプルのアリコートを用意して、その検査サンプルと前記試薬との接触をもたらすための装置、

検査サンプルと試薬を混合するための容器であって、好適には液漏れ防止タイプの容器であり、望ましい場合には、検査サンプルと試薬との接触をもたらすための前記装置を用いて一部が形成されている容器、

多孔質または非多孔質の材料からなり、好適には、前記容器内における試薬と検査サンプルとからなる前記混合物と液漏れ防止タイプの接触を為すための流体伝達材料を包含した流体伝達装置、

多孔質の流体受容材料を包含した流体受容装置であって、ここで、前記のもう一方の流体受容装置内における前記の多孔質流体受容材料は、前記1種類または複数の被分析物に対して特異的な結合親和力を有する試薬を含んでおり、あるいは、前記の試薬が、固定化された被分析物分子、もしくは、被分析物分子の類似体、誘導体、またはフラグメントを含んでおり；好適には、前記の試薬が固定化された形態を為している流体受容装置、及び、望ましい場合には、前処理、または検査サンプルの分離、あるいは信号を明確化するために行われる流体受容装置内への混ぜ合わせのための別個の付加的な試薬、を含む。

【0092】

本発明による方法が実行される好適な様式が、実施例12、13、14、及び17で説明されている。

【0093】

以下の実施例は、本発明の好適な実施形態を例証するために提示されているのであり、決して本発明を制限するものではない。

【実施例1】

【0094】

単クローン抗 - ヒトミオグロビン抗体でコーティングされたブルーラテックス粒子 60 mg の E s t a p o r ブルーカルボキシル化マイクロスフェア P S I 90 - 21 (バッチ 766、直径 0.117 μ m ; \pm 0.017 μ m ; C O O H = 164 μ eq / グラム) を水に対して洗浄及び透析し、2 ml の水に懸濁させる。M e d i x B i o c h e m i c a O y (フィンランド) から入手可能な 5 mg の単クローン抗ヒトミオグロビン抗体、クローン 7005 を、3 ml の 10 mM リン酸塩、15 mM N a C l 緩衝液 (p H = 7.2) 中において透析する。前記マイクロスフェア懸濁液を、10 ml の 10 mM リン酸塩、15 mM 塩化ナトリウム緩衝液 (p H = 7.2) と混合する。S i g m a C o r

10

20

30

40

50

p. (アメリカ) から入手可能な 2 mg の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを、 2 ml の冷却された 0 . 25 ml の 10 mM リン酸塩、 15 mM NaCl 緩衝液 (pH = 6 . 0) 中に溶解する。強制的な混合下において、 300 μ l の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド溶液を前記緩衝されたマイクロスフェア懸濁液と混合する。その後、直ちに、強制的な混合下において、 5 mg の単クローン抗体の 5 ml 溶液を混ぜ合わせる。

【 0095 】

前記懸濁液を夜通し攪拌し続けた後、攪拌下において、 5 ml の 0 . 02 M グリシン、 0 . 01 M リン酸塩、 0 . 3 M NaCl、 0 . 1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液を 0 . 5 % の正常マウス血清と共に混ぜ合わせる。それらのマイクロスフェアを、 0 . 5 % の正常マウス血清を伴う 0 . 05 M グリシン、 0 . 01 M リン酸塩、 0 . 3 M NaCl、 0 . 1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液中における 40000 g での 20 分間の遠心分離により 3 回洗浄し、そして、 0 . 5 % の正常マウス血清を伴う 0 . 02 M グリシン、 0 . 01 M リン酸塩、 0 . 3 M NaCl、 0 . 1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液中に再懸濁させ、所望の 2 w / v % のマイクロスフェア濃度にする。軽く超音波処理を施し、それらのマイクロスフェアを分散させる。

10

【 0096 】

それらの種々の異なる試薬の濃度は、 (1) ミクロスフェアのカルボキシル化の程度、 (2) ミクロスフェアの表面において望まれる抗体の濃度、及び (3) 共役の程度に依存して、幾分か調節が必要になり得る。

20

【 0097 】

容量を増やすと、もっと高濃度の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが必要になることが多く、実際、Merck 社は、彼らのテクニカルノート「NH₂またはCOOH 粒子への B4 カップリング (B4 coupling on NH₂ or COOH particles)」(Estapor Particle (Estapor 粒子) テクニカルノート 2000) において、本発明者の経験によればかなりの過剰共役及びマイクロスフェアの二量体化をもたらすような、もっと高濃度の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを推奨している。しかし、そのような過剰共役は、マイクロスフェアをもっと大きな容量で懸濁させる (これは、順に、 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドのもっと多量の消費をもたらす) ことにより補償され得る。Bangs Laboratories Inc. (アメリカ) 等の、官能基化された着色マイクロスフェアを供給している他の会社は、この目的で使用する事ができる彼ら自身の手順を有している。

30

【 0098 】

測定すべき被分析物濃度に依存して、重量単位当たり高い結合能力を有するもっと小さな粒子が好適であり得、もしくは、他の状況では、低めの結合能力を有するもっと大きなマイクロスフェアが好適であり得る。しかし、そのサイズは、流体受容装置における自由な移動を得るため、流体受容装置の細孔径よりも極めて小さくなければならない。

【 0099 】

抗体でコーティングする効果は、使用する抗体の pI に依存する。良好な経験に基づく方法は、使用する単クローン抗体の pI よりも 0 . 5 ないし 0 . 8 pH 単位だけ高い pH の緩衝液を使用することであるが、これは絶対的な制限ではない。

40

【 0100 】

本発明の異なる実施形態の場合、マイクロスフェアの表面において異なる量の抗体が必要になる。これは、共役中の抗体及びマイクロスフェアの濃度を調節することにより、ある程度まで果たすことができる。更に、単クローン抗体は、共役中に、非特異的な抗体で、もしくは、他のタンパク質においてさえ、希釈することができる。例えば、卵白アルブミンまたはウシガンマグロブリンをそのような希釈で使用することができる。しかし、表面のガンマグロブリンまたは抗体が多すぎると、マイクロスフェアがねばねばになって、流体受容

50

装置内で効果的に移動できなくなる可能性がある、という事実には注意を払わなければならない(以下を参照のこと)。

【0101】

たくさんの抗体-共役マイクロスフェアを使用に供する前に、それらのマイクロスフェアが流体受容装置内で自由に移動し、流体受容装置に固定化されている抗原に結合するのをチェックすること。

【実施例2】

【0102】

テオフィリン類似体抗原でコーティングされたブルーラテックス

Chemical Pathology and Pharmacology (Vol. 1 10
3、頁497-505、1976年)のResearch Communications
におけるC. E. Cookらによる方法に従って、8-(3-カルボキシプロピル)-
1,3-ジメチルキサンチンとウシ血清アルブミンとの間で共役を作成する。その際、ゆるやかな共役を用いるべきである。共役の程度は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチンを含む反応物の濃度を調節することにより制御することができ、そして、従来技術において広く知られた分光法によりその共役の程度をモニタリングすることができる。そうすることにより、ウシ血清アルブミン1モル当たり3モルの8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチンの共役度が得られた。代替的に、最適性には劣るが、Immune System Limited (英国)から入手可能な製品Theophylline 20
20 (テオピリン)-8-ウシ血清アルブミンを使用することもできる。

【0103】

実施例1で説明されている方法を用いて、Chemicon Inc. (カリフォルニア)から入手可能な抗-ウシアルブミン単クローン抗体にEstaporブルーカルボキシル化マイクロスフェアPSI 90-21を共役する。0.1mg/mlの共役濃度及び1ml当たり2mgの粒子の濃度において、8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチンとウシ血清アルブミンとの共役を、実施例4で説明されているアッセイ溶液に溶解する。その懸濁液を10分間放置した後、30,000gでの遠心分離により、0.25% v/vのマウス正常血清を伴うアッセイ溶液中において3回洗浄し、その後、穏やかな超音波処理により、アッセイ緩衝液中に懸濁させる。 30

【0104】

更に一層良好な代替的手段は、実施例1で説明されているカップリング方法を用いて、8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン・ウシ血清アルブミン共役をブルーラテックスに直接的に結合する方法である。しかし、ウシ血清アルブミン中においてすべてのアミン基がブロックされるのではなく、また、そのウシ血清アルブミンの等電点が下がりすぎず、従って、カップリング効率が乏しくなるのを防止できることを確実化するためには、前もって、ウシ血清アルブミンへの8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチンの共役度を低くしておくことが必要である。

【0105】

たくさんのタンパク質被覆マイクロスフェアを使用に供する前に、それらのマイクロスフェアが流体受容装置内で自由に移動し、流体受容装置の多孔質材料に固定化されている抗原に結合するのをチェックすべきである(実施例8を参照のこと)。 40

【実施例3】

【0106】

ストレプトアビジンでコーティングされ、且つ、単クローン抗体または多クローン抗体でビオチン化されたブルーラテックス

15mMのNaCl及び3.5容量%の粒子を伴う10mMのリン酸塩緩衝液(pH=6.0)を含めるべく、Merck EuroLab社から入手可能(製品番号K1010、平均直径185nm)なEstaporブルーカルボキシル化ラテックスマイクロスフェアの懸濁液を洗浄及び透析する。5mgのストレプトアビジン(Sigma社)を同じ緩 50

衝液に対して透析する。

【0107】

2 mg の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを、 15 mM の NaCl を伴う冷却された 0.25 ml の前記 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH = 6.0) 中に溶解し、直ちに、混合下において、40 μ l ないし 1.5 ml の前記粒子懸濁液を加え、その後、付加的に 2 mg のストレプトアビジンを含む 6 ml の前記緩衝液を混ぜ合わせる。その懸濁液を室温で 2 時間攪拌した後、その懸濁液を夜通し攪拌し続ける。その後、攪拌下において、0.5 % の正常マウス血清を伴う 5 ml の 0.02 M グリシン、0.01 M リン酸塩、0.3 M NaCl、0.1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液を混ぜ合わせる。

10

【0108】

これらのマイクロスフェアを、0.5 % の正常マウス血清を伴う 0.02 M グリシン、0.01 M リン酸塩、0.3 M NaCl、0.1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液中において 40,000 g で 20 分間遠心分離することにより 3 回洗浄し、そして、それらのマイクロスフェアを、0.5 % の正常マウス血清を伴う 0.02 M グリシン、0.01 M リン酸塩、0.3 M NaCl、0.1 % Tween 20 (Sigma 社から入手可能) 緩衝液中に再懸濁させ、所望のマイクロスフェア濃度にする。その際、軽く超音波処理して、それらのマイクロスフェアを分散させる。

【0109】

それらの種々の異なる試薬の濃度は、(1) ミクロスフェアのカルボキシル化の程度、(2) ミクロスフェアの表面において望まれる抗体の濃度、及び (3) 接合の程度に依存して、幾分か調節が必要になり得る。

20

【0110】

容量を増やすと、もっと高濃度の 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが必要になることが多い。実際、Merck 社は、彼らのテクニカルノート「NH₂またはCOOH粒子へのB4カップリング(B4 coupling on NH₂ or COOH particles)」(Estapor Particle (Estapor 粒子)テクニカルノート2000)において、もっと高濃度の1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを推奨している。本発明者の経験によれば、これは、かなりの過剰共役及びマイクロスフェアの二量体化をもたらしかねないが、

30

【0111】

測定すべき被分析物濃度に依存して、重量単位当たり高い結合能力を有するもっと小さな粒子が好適であり得、もしくは、他の状況では、低めの結合能力を有するもっと大きなマイクロスフェアが好適であり得る。しかし、そのサイズは、流体受容装置における自由な移動を得るため、流体受容装置の細孔径よりも極めて小さくなければならない。

40

【0112】

アビジンはアビジンよりも親水性が低いので、アビジンはストレプトアビジンよりも好適であることが多い。共役は非常に似通っている；しかし、アビジンはストレプトアビジンよりもはるかに高いPIを有しているので、もっと高いpHが選択される。このとき、カップリング緩衝液として0.1 Mのホウ酸塩緩衝液(pH = 9.0)を使用することができるが、そのときには、1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが非常に急速に加水分解され、そして、しばしば、幾分もっと良好な冷却及びもっと高い濃度が必要になるであろう。

【0113】

50

更に、所望の抗体をビオチン化するため、1 mlの溶液中における5 mgの単クローン抗体を、0.15 M塩化ナトリウム、0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH = 7.2)に対して透析する。

【0114】

Pierce Chemical Companyから入手可能な2 mgのスルホスクシンイミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエートを、10 mlの冷たい蒸留水(2~8)中に溶解し、そして、結果として生じたスルホ-NHS-ビオチン溶液のうちの100 µlを、ボルテックス混合しながら、1 mlの抗体溶液に加える。その試験管を冷蔵庫に2時間入れる。溶離液としてpH = 7.2の0.1 Mリン酸塩、0.15 M塩化ナトリウムを用いる30 cmのSuperose 6カラム(Amersham Pharmacia Biotech社、英国)でのサイズ排除クロマトグラフィーにより、カップリングされたビオチンを伴う抗体を遊離ビオチンから分離する。UVモニタリング装置を用いて、遊離ビオチンフラクションの前に溶出されるタンパク質フラクションを収集する。代替的に、例えばPierce Chemical Companyから入手可能なカセットSlide-A-Lyzer等の、7000ダルトン排除サイズを有する透析膜を用いて、同じ緩衝液に対して透析する。

10

【0115】

抗体へのビオチンの取込みは、Biochem J. 94, 23c-24c(1965年)でN.M.Greenが教示している方法を用いることによりモニタリングすることができる。前記手順は、抗体1モル当たり0.2モルのビオチンをもたらした。

20

【0116】

使用する抗体は、マウス、ヒツジ、雌鳥の卵、ヒツジ、ヤギ、ヒト由来のものや、あるいは、別の種からのものであってよく、また、単クローンまたは多クローン由来のものであってよい。多クローン抗体は、抗原が存在していると凝集する傾向を有しているため、殆どの場合には単クローン抗体が好適であるが、濃度を調節すれば、多クローン抗体も使用することができる。抗体の免疫活性フラグメントも使用することができ、従って、所望の結合特異性を有するペプチド、アプタマー、及び他の結合性物質も使用できるが、そのときには、ビオチン化化学反応を変えなければならない。一つの抗体分子における1より多くのビオチン部分は、抗原が存在していないときでさえ、ミクロスフェアを凝集させるので、1抗体分子当たりのビオチン部分の数は、平均が実質的に1未満でなければならない。更に、もっと小さい分数の活性抗体が所望の場合には、ビオチン化の前に、それらの特異抗体を非特異的な抗体で希釈することができ、もしくは、他のタンパク質においてさえ希釈することができる(但し、そのときには、ビオチン化の程度の計算はもっと難しくなる)。

30

【0117】

特異抗体が付着されたミクロスフェアを得るため、それらのビオチン化された抗体を、アビジンまたはストレプトアビジンがコーティングされたミクロスフェアに混合する。それらのミクロスフェアに結合される抗体の量は、ビオチン化抗体をどれだけ加えるかによって調節することができる。過剰量のビオチン化抗体を加えることにより、Biochem J. 94, 23c-24c(1965年)においてN.M.Greenが教示している方法を用いて、ミクロスフェアに結合されずに溶液中で遊離しているビオチン化抗体を(遠心分離による分離後)測定することができる。

40

【0118】

その後、それらのミクロスフェアを、0.5%の正常マウス血清を伴う0.02 Mグリシン、0.01 Mリン酸塩、0.3 M NaCl、0.1% Tween 20(Sigma社から入手可能)緩衝液中における40000 gでの20分間の遠心分離により3回洗浄し、そして、0.5%の正常マウス血清を伴う0.02 Mグリシン、0.01 Mリン酸塩、0.3 M NaCl、0.1% Tween 20(Sigma社から入手可能)緩衝液中に再懸濁させ、所望のミクロスフェア濃度にする。軽く超音波処理を施し、それらのミクロスフェアを分散させる。

50

【0119】

ストレプトアビジンまたはアビジンのコーティングは、幾分かの二重ビオチン化抗体の存在が粒子の凝集を引き起こす可能性があるため、マイクロスフェアへの直接的な抗体結合よりも好適性に劣る。

【0120】

たくさんのマイクロスフェアを使用に供する前に、それらのマイクロスフェアが流体受容装置内で自由に移動し、流体受容装置に固定化されている抗原に結合するのをチェックすべきである。

【実施例4】

【0121】

抗-ヒトアルブミン抗体でコーティングされた金コロイド

蒸留水中における10mlの1%塩化金を、1lの沸騰している蒸留水、10mlの34mMクエン酸ナトリウムと20分間混合し、pHをpH=4.2に調節する。すると、コロイド状の金が形成される。その懸濁液を室温にまで冷却する。1mlの1%PEG20.000を加えて混合し、pHをpH=7.2に調節する。それらの金コロイド粒子のサイズを、例えば540nmと600nmにおける光学密度比の測定等による通常の技術を用いて測定する。その方法は、30nmから50nmまでの範囲の平均粒径を得るべく調節されてよい。使用するガラス容器はシリコン処理しておかなければならない。それらの金コロイド粒子を、Eur. J. Cell. Biol. 38: 87-93 (1985年)においてSlot及びGeuzeが説明している方法を用いて、その同じ方法による飽和点まで、Medix Biochemical OY (フィンランド) から入手可能な単クローン抗ヒトアルブミン抗体、クローン6501で標識する。次いで、そのように限定するものではないが、典型的には、それらの標識された金コロイドを、0.3Mマンニトール、0.05%PEG20000を含むpH=7.4の10mMのHEPES緩衝液中に、10µg/mlのタンパク質濃度で懸濁させる。

【0122】

前記抗アルブミン抗体の代わりに他の抗体を使用することもできるが、手順の僅かな変更が必要になり得る。

【0123】

コーティングされたコロイド粒子の調製を実行に移す前に、それらのコロイドが流体受容装置内で自由に移動し、流体受容装置に固定化されている抗原に結合するのをチェックすべきである。

【実施例5】

【0124】

発蛍光性シアニン-5-テオフィリン接合体

Chemical Pathology and Pharmacology, vol. 13, p. 497-505 (1976年)のResearch Communications及びClinical Chemistry, vol. 27, 頁22-226 (1981年)に記載されているようにして、8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン無水物を合成する。ジアミノプロパノールを無水テトラヒドロフラン中に溶解する。別のフラスコにおいて、等M量の前記8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン無水物の半分を無水テトラヒドロフラン中に溶解する。前記8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン無水物溶液を、ジアミノプロパノール溶液に一滴ずつ攪拌しながら加え、結果として得られた溶液を室温で夜通し反応させる。随意的に、活性化シアニン染料の消費をもっと少なくしたい場合には、結果として得られたその付加物を、当業者に広く知られた通常の技術を用いて、HPLCクロマトグラフィーで精製する(以下を参照のこと)。

【0125】

その後、ジアミノプロパノールに対して使用したM量の6倍の、Amersham Pharmacia Biotech社(英国)から入手可能なCy5 Fluorolin

10

20

30

40

50

k 活性化シアニン染料を無水テトラヒドロフラン中に溶解し、それを、前記の溶液に攪拌しながら加える。結果として得られた混合物を暗所において室温で夜通し反応させる。このようにして、水溶性のジアミノプロパノール・スペーサーと共に Cy5 Fluorolink 活性化シアニン染料を伴う非精製 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物が得られる。結果として得られた、水溶性のジアミノプロパノール・スペーサーと共に Cy5 Fluorolink 活性化シアニン染料を伴う 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物を、1 : 1 : 1 の混合液において n - ブタノール : 酢酸 : 水を用いる (但し、この溶離混合液における n - ブタノール、酢酸、及び水の体積は、良好な分離を得るべく、シリカゲルプレートの質に応じて調節される) シリカゲルでの薄層クロマトグラフィーにより精製する。通常の技術による溶離後、そのシリカゲルプレートを乾燥させて、視覚的に、及び、UV ランプにより (また、場合によっては、並行実験でニンヒドリン・スプレーを用いて) 検査し、Cy5 Fluorolink スポットを伴う 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物のスポットを同定する。Cy5 Fluorolink を伴う 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物部分のシリカゲルをハサミまたはスパチュラで単離する。この単離されたシリカゲルを、50% v/v の酢酸中に懸濁させ、これにより、Cy5 Fluorolink を伴う 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物が、その溶液中に溶出される。シリカゲルは、試験管の底に沈降する。Cy5 Fluorolink を伴う精製 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1, 3 - ジメチルキサンチン付加物と共に酢酸溶液をデカンテーションにより取り出し、低い大気圧下における蒸発によって酢酸を除去する。代替的に、及び、スケール・アップする場合には、薄層クロマトグラフィーの代わりに、当業者に広く知られた通常の HPLC 分離技術を使用することもできる。

10

20

30

40

50

【実施例 6】

【0126】

アッセイ溶液

アッセイ緩衝液の一つの例は、0.1 M の水性リン酸塩緩衝液を作成し、0.3 M の濃度まで塩化ナトリウムを加え、更に、0.1% の最終濃度まで界面活性剤 Triton X-100 (Sigma 社 (アメリカ) から入手可能) を加え、そして、通常の方法で塩酸または水酸化ナトリウムを用いて、その pH を pH = 7.4 に調節する。次いで、実施例 1 から 3 までのいずれかによる信号形成粒子が加えられ、これは、そのように限定するものではないが、典型的には、0.01 から 1.0% v/w までのラテックス粒子、もしくは、そのコロイドに溶液 1 ml 当たり 1 ~ 25 µg の濃度で免疫グロブリンが標識されたコロイド状の金である。使用する抗体がそれから誘導される種のうちの一つから得た 0.25% の正常血清がその溶液に加えられる。実施例 8 で説明されている如く、アッセイを妨害しない限り、マウス血清の代わりに 0.1% w/v のウシガンマグロブリンを使用することができる。

【実施例 7】

【0127】

信号供給物質のための容器、及び、その容器に導入される液体伝達材料を包含した液体伝達装置

図 2 に描かれているように、本装置の一つの実施形態は、例えば 5 µl の流体を保持する毛細管等の内蔵式の毛細管 7 を伴うストッパー 6、シーリングスリーブ 8、耐液容器 9、その容器 9 の底部における引き込み口を密封するボール 10 を含んでいて、ここで、そのボールは、シーリング接続で芯またはフェルトチップガイド 12 を受け入れるべく形成された弁座 11 に収容されている。芯またはフェルトチップ 13 は、芯またはフェルトチップガイド 12 にシーリング及びスライディング接続されており、そして、その先端はキャップ 14 で保護されている。流体伝達材料でできている芯またはフェルトチップを除き、本装置のすべてのパーツは、例えばプラスチック等の適当な材料で製造されている。容器 9 は、図 3 に描かれているように、試薬 15 が充填されている。ヘパリン化された、もし

くは、ヘパリン化されていない、例えば血液等の生物学的流体のサンプルが毛細管 7 (この実施形態では 5 μ l を保持するが、それ以外の容量を保持すべく構成されていてよい) に充填され、ストッパー 6 が容器 9 内へ押し下げられ、そして、その容器 9 を動かすことにより、検査サンプルと試薬 15 が混合される。検査サンプルの容量は、容器 9 内の試薬の容量に合わせられている。本発明は、更に、ヘパリン化された、もしくは、ヘパリン化されていない検査サンプルが毛細管に充填され、その後、その毛細管が容器 9 内へ入れられる実施形態も含んでいる。ストッパー 6 で容器を閉鎖した後、その容器を適切に動かすことにより、検査サンプルが試薬と混合され、そして、検査サンプル試薬混合物、及び、流体受容装置を通じる流体受容材料 17 との接触が、次のいずれかにより；
 流体伝達材料を、前記混合物及び流体受容材料と同時的に接触させることにより、
 流体伝達材料を、最初に前記混合物と接触させ、次いで、流体受容材料と接触させることにより、
 流体伝達材料を、最初に流体受容材料と接触させ、次いで、前記混合物と接触させることにより
 もたらされる。

10

【実施例 8】

【0128】

抗 - テオフィリン抗体でコーティングされた Hi Flow ニトロ - セルロースフィルター材料

Immune System Limited (英国) から入手可能なヒツジ抗 - テオフィリン血清の IgG フラクシオンを、当業者に広く知られた通常の方法により、例えば硫酸アンモニウム沈殿法により、もしくは、Amersham Pharmacia Biotech 社から入手可能な Protein A カラムを用いることにより単離する。その後、それらの抗体を 10 mM リン酸塩、15 mM NaCl 緩衝液 (pH = 7.2) 中において透析し、次いで、それらの抗体を、2.5% v/v のエタノールを伴う 10 mM の酢酸アンモニウム溶液中に溶解する。低い結合能力が所望の場合には、その後の吸着プロセスでそれらの特異抗体と競合するアルブミンまたはカゼインのような他のタンパク質を追加的に加えることができる。

20

【0129】

前記溶液は、Hi-Flow 材料に噴霧されるか、あるいは、それらのシートが前記溶液に浸漬される。その後、それらのシートを 37 で 2 時間乾燥させる。更に、それらのシートを、0.01% w/v の 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-2-hydroxy-1-propanesulfonate (Pierce Chemical Company (アメリカ) から入手可能) と共に 2.5% v/v のエタノールを伴う 10 mM の酢酸アンモニウム溶液中に浸漬して室温で攪拌することにより洗浄する。

30

【0130】

特異抗体の濃度は、前記多孔質材料において必要とされる結合能力によって変動する。この実施例で必要な濃度を決定するため、50 ng のテオフィリンを含有する 10 μ l の血清サンプルを、実施例 2 で説明されているブルーラテックスマイクロスフェアの 0.1% 懸濁液 (2 mg のマイクロスフェア) を含有する実施例 4 の 2 ml のアッセイ溶液と混合する。

40

【0131】

Hi-Flow PL アメリカ HF12004 における抗体の適切な濃度は以下のようにして決定される：前記混合物が、流体受容装置で使用される多孔質材料内へ移動できるようにすること。溶液中に存在するテオフィリンは、マイクロスフェア上の接合体よりも、その多孔質材料に固定化されている抗体とはるかに速く反応し、そのフィルター材料におけるブルーマイクロスフェアの結合をブロックする。多孔質材料に固定化されている特異抗体が高濃度の場合には、比較的小さな領域で、溶液中に存在する遊離テオフィリンの急速な結合をもたらし、一方、低濃度の場合には、溶液領域中の比較的速く反応する遊離テオ

50

フィリンの結合に比較的大きな領域が必要になる；図4を参照して説明すると、領域(18)は、高濃度の抗体が固定化されているときには比較的小さくなり、そして、低濃度の抗体が固定化されているときには比較的大きくなる。この移動プロセスにおいて、溶液中の遊離テオフィリンからアッセイ溶液が枯渇すると、ブルーミクロスフェアに結合されたウシ血清アルブミンとの8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン共役を伴ったブルーミクロスフェアが、(図4を参照して説明すると、(18)の外側の領域(17)において)遊離テオフィリンでブロックされていない固定化単クローン抗-テオフィリン抗体と反応し始める。別の言葉で表現すると、内側の白色領域(18)の外側に比較的暗い青色の輪(17)が生成される。被分析物の特定の濃度に対して、多孔質HiFlow材料の所望の領域サイズにおける遊離テオフィリンの結合能力が得られるように、特異抗体の濃度を調節する。この実施例では、材料1平方cm当たり25-50 μ gの抗体を固定化するのが適切であると判明した。(抗体固定化後のHi-Flow PLアメリカ HF12004での結合能力は、文献で見られる通常の方法により、例えば、競合する既知の抗原標準液と組み合わせた放射能標識抗原または酵素結合抗原を用いて決定することができる。)もし非常に高い結合能力を所望の場合には、Immune System Ltd.(英国)から入手可能な単クローン抗体の使用が推奨される。

【0132】

代替的に、高い濃度及び化学活性において結合性タンパク質を結合することができ、且つ、例えば着色ラテックス粒子または金コロイド粒子等の信号担持抗体接合体の自由な移動を許容する細孔径を持った他の多孔質材料、例えば、Pall Gelman社(英国)から入手可能なPredator PREDL3Rフィルター材料等を使用することもできる。

【0133】

殆どのそのような多孔質材料は、うまく機能するために幾分かの湿潤剤を必要とするが、CHAPSのような界面活性剤は省けることが多く、あるいは、低濃度においてはあがるが、他の界面活性剤を使用することもできる。また、当業者に広く知られた技術を用いて、抗体の結合能力に及ぼす影響もチェックしなければならない。

【実施例9】

【0134】

ミオグロビンを定量するための流体受容装置で使用すべき多孔質材料 Millipore社から入手可能なHi-Flow PLアメリカ HF12004を適当なサイズのシートに切断する。

【0135】

Medix Biochemica OY(フィンランド)から入手可能な単クローンマウス抗-ミオグロビン抗体、クローン7004を、2.5%vol./vol.のエタノールを伴う10mMの酢酸アンモニウム溶液中に溶解する。もし低い結合能力が所望の場合には、以降の吸着プロセスでそれらの抗体と競合するアルブミンまたはカゼインのような他のタンパク質を追加的に加えることができる。前記溶液は、Hi-Flow材料に噴霧されるか、あるいは、それらのシートが前記溶液に浸漬される。次いで、それらのシートを37で2時間乾燥させる。その後、それらのシートを、0.01%w/vの3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-2-ヒドロキシ-プロパンスルホン酸(Pierce Chemical Company(アメリカ)から入手可能)と共に2.5%vol./vol.のエタノールを伴う10mMの酢酸アンモニウム溶液中に浸漬して室温で攪拌することにより洗浄する。

【0136】

特異抗体の濃度は、前記多孔質材料において必要とされる結合能力によって変動する。もし低い結合能力が所望の場合には、以降の吸着プロセスでそれらの抗体と競合するアルブミンまたはカゼインのような他のタンパク質を追加的に加えることができる。この実施例では、10ngのミオグロビンを含有する10 μ lの正常血清サンプルが、10ngより高いミオグロビンの全結合能力を有する、実施例1で説明されている単クローン抗-ミオ

グロビンを伴ったブルーラテックスミクロスフェアの0.1%懸濁液(2mgのミクロスフェア)を含有する実施例4の2mlのアッセイ溶液と混合される(即ち、はるかに高い結合能力が使用される。アッセイ試薬中におけるそれらの粒子に対する結合能力は、文献で見られる通常の方法により、例えば放射性同位体標識された抗原を用いてそれらの粒子の単離後に結合能力を測定することにより、あるいは、例えば平衡透析により、決定することができる。)

【0137】

多孔質材料における固定化に対する抗ヒトミオグロビン抗体の適切な濃度を、以下のようにして決定する：前記混合物が、流体受容装置で使用される多孔質材料内へ移動できるようにすること。多孔質材料に固定化されている特異抗体が高濃度の場合には、小さな領域でそれらの着色粒子のトラッピングがもたらされ、一方、低濃度の場合には、それに相当する粒子溶液をトラッピングするのに必要な領域が比較的大きくなる。被分析物の特定の濃度に対して所望の領域サイズをもたらす結合能力が得られるように、特異抗体の濃度を調節する。

10

【0138】

代替的に、高い濃度及び化学活性において結合性タンパク質を結合することができ、且つ、例えば着色ラテックス粒子または金コロイド粒子等の信号伝達抗体共役の自由な移動を許容する細孔径を持った他の多孔質材料、例えば、Pall Gelman社(英国)から入手可能なPredator PREDL3Rフィルター材料等を使用することもできる。

20

【0139】

殆どのそのような多孔質材料は、うまく機能するために幾分かの湿潤剤を必要とするが、CHAPSのような界面活性剤は省けることが多く、あるいは、低濃度においてではあるが、他の界面活性剤を使用することもできる。また、当業者に広く知られた技術を用いて、抗体の結合能力に及ぼす影響もチェックしなければならない。

【実施例10】

【0140】

尿アルブミンを定量するための流体受容装置で使用すべき多孔質材料 Millipore社から入手可能なHi-Flow PLアメリカ HF12004を適当なサイズのシートに切断する。

30

【0141】

Medix Biocemica OY(フィンランド)から入手可能な単クローンマウス抗-ヒトアルブミン抗体、クローン6502を、実施例9で説明されている方法を用いてHi-Flow PLアメリカ HF12004に固定化する。

【0142】

特異抗体の濃度は、前記多孔質材料において必要とされる結合能力によって変動する。もし低い結合能力が所望の場合には、以降の吸着プロセスでそれらの抗体と競合するカゼインのような他のタンパク質を追加的に加えることができる。この実施例では、0.02マイクログラムのヒトアルブミンを含有する10 μ lの正常血清サンプルが、0.3Mマンニトール、0.05%PEG20000を含有するpH=7.1の10mMのHEPES緩衝液中におけるタンパク質濃度が10 μ g/mlの、実施例4で説明されている金コロイド粒子の2mlのアッセイ溶液と混合される。Hi-Flow PLアメリカ HF12004に固定化されているクローン6502からの単クローン抗-アルブミン抗体の適切な濃度は以下のようにして決定される：前記混合物が、流体受容装置で使用される多孔質材料内へ移動できるようにすること。多孔質材料に固定化されている特異抗体が高濃度の場合には、小さな領域でそれらの着色粒子のトラッピングがもたらされ、一方、低濃度の場合には、それに相当する粒子溶液をトラッピングするのに必要な領域が比較的大きくなる。被分析物の特定の濃度に対して所望の領域サイズをもたらす結合能力が得られるように、特異抗体の濃度を調節する。

40

【0143】

50

代替的に、高い濃度及び化学活性において結合性タンパク質を結合することができ、且つ、例えば着色ラテックス粒子または金コロイド粒子等の信号伝達抗体共役の自由な移動を許容する細孔径を持った他の多孔質材料、例えば、P a l l G e l m a n 社（英国）から入手可能な P r e d a t o r P R E D L 3 R フィルター材料等を使用することもできる。

【0144】

殆どのそのような多孔質材料は、うまく機能するために幾分かの湿潤剤を必要とするが、C H A P S O のような界面活性剤は省けることが多く、あるいは、低濃度においてではあるが、他の界面活性剤を使用することもできる。また、当業者に広く知られた技術を用いて、抗体の結合能力に及ぼす影響もチェックしなければならない。界面活性剤が金コロイドに及ぼす影響は特に望ましくなく、従って、界面活性剤の適用後、続いて、界面活性剤を含んでいない対応する緩衝液中における洗浄が実施される。

10

【実施例11】

【0145】

液体受容装置

図4に描かれているように、流体受容装置の一つの実施形態は、例えばプラスチック等の適当な材料でできた円形のトレイ16を含んでいてよく、ここに流体受容材料17が配置される。灰色の領域18は、信号供給物質が多孔質材料17に拡散した結果として現れるパターンを示している。本発明の一つの実施形態では、トレイ16は、直径が3cm（但し、他の寸法も本発明のアイデアの範囲内である）の透明なプラスチックでできた円形のチップからなっていてよい。前記トレイは、中心に、流体伝達装置を配置するための窪みまたは穴を備えている。更に、トレイには、目盛の線、円、または、流体受容トレイ16の形態に合った何らかの他の形状が印刷されていてよい。例えば上で説明されているような固定化抗体が含浸された流体受容材料17がそのトレイに載置される。この流体受容材料上に呈示されるパターンは、実施する分析のタイプに依存するであろう。一つの実施形態では、検査サンプル中の抗原と前記試薬パターン中の抗体-着色粒子との複合体が、例えば図4に示されているような形態を為す流体受容材料上に、抗原-抗体-粒子-固定化抗体からなるサンドイッチ型の複合体をもたらすであろう。

20

【0146】

前記試薬が着色粒子に結合された抗原を含んでなる競合アッセイを構成する別の実施形態では、検査サンプル中の遊離抗原と抗原-着色粒子複合体との間で流体受容材料への競合結合が起こるであろう。後者の複合体は、比較的大きな分子量を有しているため、固定化抗体への結合が遅くに起こり、遊離抗原と固定化抗体との複合体を表す円形バンドの外側に円形のバンドを呈するであろう（図示せず）。

30

【0147】

実施例17で説明されているもの等の最後の実施形態において、これも競合アッセイを構成する、前記試薬中の抗原は発蛍光性部分に結合されており、そして、その複合体は、検査サンプル中の遊離抗原と同様な分子量を有している。結果的に生じる流体受容材料への競合結合では、固定化抗体への抗原-蛍光粒子の結合にサイズ由来の遅れは存在せず、従って、形成されるパターンは、前記最初の実施形態で形成されるものと同様である。

40

【実施例12】

【0148】

全血中のテオフィリンの定量

実施例11による試薬容器の上部にあるヘパリン処理された毛細管チャンネルに5 μ lの血液を吸い込む。前記毛細管部分を押し下げ、そして、穏やかな振動を与えることにより、毛細管の内容物が、実施例2で説明されているブルーラテックスミクロスフェアと0.25% v/vの正常マウス血清の0.1%懸濁液（1mgのミクロスフェア）を含有する実施例6の1mlのアッセイ溶液を含む試薬容器内の試薬と混合される。このステップで、テオフィリンは、ブルーラテックス上に過剰に存在する抗体と反応し、そして、赤血球はトリトンにより溶解され、また、血液に含まれている殆どの他の粒子もT r i t o n

50

X - 100により溶解または分散される。

【0149】

本発明の幾つかの実施形態では、その懸濁液は、1ないし5分間、反応させたままの状態に置かれることがある（特に、測定されるべき被分析物が非常に低濃度の場合）。しかし、本実施例を含め、殆どの実施形態では、結合は、振動を与える時間中にほぼ完了する。

【0150】

その後、上の実施例7で説明されている流体移送装置を、血液サンプル/試薬混合物を含有している試薬容器に導入する。その流体移送装置の他端を、上の実施例8で説明されている固定化抗テオフィリン抗体を伴ったフィルター材料を有する、上の実施例11で説明されている流体受容装置の中心に置く。そのサンプル/試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。この溶液中に存在しているテオフィリンは、ミクロスフェア上の共役よりもはるかに速く多孔質材料内に固定化されている抗体と反応し、そして、フィルター材料内におけるブルーミクロスフェアの結合と効率的に競合する。この移動プロセスにおいて、溶液中の遊離テオフィリンからアッセイ溶液が枯渇すると、ブルーミクロスフェアに結合されたウシ血清アルブミンとの8-(3-カルボキシプロピル)-1,3-ジメチルキサンチン接合体を伴ったブルーミクロスフェアが、前記競合を伴うことなく、固定化単クローン抗-テオフィリン抗体と結合し、内側の稠密性に劣る領域の外側に比較的暗い青色の輪を生成する。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れは自動的に止まる。

10

20

【0151】

流体受容装置に形成されるブルーラテックス粒子の輪の内側にある稠密性に劣る領域のサイズを検査し、流体受容装置の表面に印刷されているインジケータと比較する。全血中におけるテオフィリンの所望の濃度範囲において、校正された信頼性のある定量方法を確認するためには、既知のヒトテオフィリン濃度を有するヒト全血からなるキャリブレーターを使用するのが好適である。ブルーラテックス粒子により形成される、検査に適した望ましいサイズの円を得るために必要な、また、前記流体受容装置の表面に印刷されているインジケータに適切な濃度値を割り当てるために必要な、アッセイ溶液中におけるミクロスフェアの濃度、及び、それらの目的に必要な条件を選択する。

【実施例13】

【0152】

ヒト全血中のミオグロビンの定量

実施例11による試薬容器の上部にあるヘパリン処理された毛細管チャンネル（図2の7）に10 μ lの血液を吸い込む。その毛細管部分を押し下げ、そして、穏やかな振動を与えることにより、毛細管の内容物が、実施例1で説明されている単クローン抗-ミオグロビンを伴うブルーラテックスミクロスフェアと0.25% v/vの正常マウス血清の0.1%懸濁液（1mgのミクロスフェア）を含有する実施例6の1mlのアッセイ溶液を含む試薬容器内の試薬（図3Aの15）と混合される。このステップで、ミオグロビンは、ブルーラテックス上に過剰に存在する抗体と反応し、そして、赤血球はトリトンにより溶解され、また、血液に含まれている殆どの他の粒子もTriton X-100により溶解または分散される。本発明の幾つかの実施形態では、その懸濁液は、1ないし5分間、反応させたままの状態に置かれることがある（特に、測定されるべき被分析物が非常に低濃度の場合）。しかし、本実施例を含め、殆どの実施形態では、結合は、振動を与える時間中にほぼ完了する。

30

40

【0153】

その後、図3D-Eに示されているようにして、上の実施例7で説明されている流体移送装置を、図3B-Cに示されているようにして血液サンプル/試薬混合物を含有する試薬容器に導入する。次いで、その流体移送装置の他端を、上の実施例9で説明されている固定化抗ヒトミオグロビン抗体を伴ったフィルター材料を有する、上の実施例11で説明されている流体受容装置（図4）の中心に置く。そのサンプル/試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液

50

体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れは自動的に止まる。

【0154】

流体受容装置に形成されるブルーラテックス粒子の輪(図4の18)のサイズを検査し、そのサイズを、流体受容装置の表面に印刷されているインジケータと比較する。全血中におけるヒトミオグロビンの所望の濃度範囲において、校正された信頼性のある定量方法を確立するためには、既知のヒトミオグロビン濃度が付加されたヒト全血からなるキャリブレーターを使用するのが好適である。ブルーラテックス粒子により形成される、検査に適した望ましいサイズの円を得るために必要な、また、前記流体受容装置の表面に印刷されているインジケータに適切な濃度値を割り当てるために必要な、アッセイ溶液中におけるマイクロスフェアの濃度、及び、それらの目的に必要な条件を選択する。

10

【実施例14】

【0155】

尿中のアルブミンの定量

0.3Mマンニトール、0.05%PEG20000を含む10mMのHEPES緩衝液(pH=7.4)中における、実施例4から得られる1mlの抗ヒトアルブミン抗体被覆金コロイド粒子を、前記実施例7で説明されている容器(図2の9)に封入する。

【0156】

糖尿病性腎臓疾患を患っている患者から10µlの尿サンプル(もしくは、好適性には劣るが、希釈された尿サンプル)を、前記実施例7で説明されている自己検定型毛細管式サンプリング装置(図2の7)内に引き込み、そして、そのサンプルを、図3B-Cに示されているようにして、前記抗ヒトアルブミン抗体被覆金コロイド粒子懸濁液を含有する試薬容器に導入する。その容器に振動を与えて2分間放置し、金コロイドを試料中に存在するアルブミンに結合させる。

20

【0157】

その後、前記実施例7で説明されている流体移送装置を、尿サンプル/試薬混合物を含有する試薬容器に導入する;図3D-E参照。その流体移送装置の他端を、上の実施例11で説明されている流体受容装置に成るべくホルダーに取り付けられた、上の実施例10で説明されている固定化抗ヒトアルブミン抗体を伴ったフィルター材料の中心に置く。そのサンプル/試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れが止まる。

30

【0158】

流体受容装置に形成される金コロイド粒子の輪(図4の18)のサイズを検査し、それを、流体受容装置の表面に印刷されているインジケータと比較する。

【0159】

尿中におけるヒトアルブミンの所望の濃度範囲において、校正された信頼性のある定量方法を確立するためには、上の実施例10で説明されている多孔質材料における固定化抗ヒトアルブミン抗体の適切な結合能力が選択されねばならない。尿中のアルブミンの期待される濃度は、異なる患者群で大いに異なり、従って、意図された患者群に対するキャリブレーターが必要になる。この実施例は、尿1リットル当たり0から200mgまでの濃度範囲でうまく機能し、また、500mg/mlまでの濃度でさえ良好に測定することができる。アルブミンの濃度が非常に高い場合には、金コロイドの結合能力が飽和し、そして、流体受容装置の中央では、はるかに薄い色の領域が見られ、そこでは、先ず、金コロイドに結合されていない遊離アルブミンが、流体受容材料の固定化単クローン抗体に結合することにより、当業者は、金コロイド粒子により形成される望ましい外径の円を得るために必要な条件、及び、検査に適した色の強度を得るために必要な条件、更には、前記流体受容装置の表面に印刷されているインジケータに適切な濃度値を割り当てるために必要な条件を選択することができる。

40

【0160】

50

もし製品が、尿中のアルブミン濃度が非常に高い患者に対して意図されたものである場合には、毛細管型尿サンプラーのサイズを例えば $2\ \mu\text{l}$ 等に低減すべきであり、そして、抗ヒトアルブミン抗体被覆金コロイド粒子の濃度を増加させるべきである。

【実施例 15】

【0161】

全血試料中における抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の測定

抗 - ヒト甲状腺単クローン抗体を HyTest 社 (英国) から購入し、実施例 1 の方法により、カルボキシル化ブルーラテックスに共役する。

【0162】

タンパク性溶液中におけるヒト甲状腺ペルオキシダーゼ酵素を The Binding Site Ltd. (英国) から購入し、実施例 9 の方法により、Millipore 社から入手可能な Hi-Flow PL アメリカ HF12004 にコーティングする。この材料は運搬体タンパク質とかなりな量の血清アルブミンを含んでいるが、この材料は、甲状腺過酸化酵素のコーティングで良好に機能する。多孔質材料でもっと高濃度の固定化甲状腺ペルオキシダーゼが所望の場合には、先行技術において広く知られた方法によるイムノクロマトグラフィーにより、HyTest 社から入手可能なその製品から血清アルブミンを除去する。

【0163】

実施例 7 による試薬容器の上部にあるヘパリン処理された毛細管チャンネルに $10\ \mu\text{l}$ の血液を吸い込む。その毛細管部分を押し下げ、そして、穏やかに振動を与えることにより、毛細管の内容物が、上で説明されている単クローン抗 - 甲状腺過酸化物を伴うブルーラテックスマイクロスフェアと $0.25\% \text{ v/v}$ の正常マウス血清の 0.1% 懸濁液 ($1\ \text{mg}$ のマイクロスフェア) を含有する実施例 6 の $1\ \text{ml}$ のアッセイ溶液を含む試薬容器内の試薬と混合される。このステップで、患者サンプルからの抗甲状腺過酸化物抗体は、ブルーラテックス上に過剰に存在する抗体と反応し、そして、赤血球はトリトンにより溶解され、また、血液に含まれている殆どの他の粒子も Triton X-100 により溶解または分散される。その懸濁液を、3 分間、反応させた状態のまま放置する。

【0164】

その後、上の実施例 7 で説明されている流体移送装置を、血液サンプル / 試薬混合物を含有している試薬容器に導入する。次いで、その流体移送装置の他端を、固定化ヒト甲状腺ペルオキシダーゼを伴ったフィルター材料を有する、上の実施例 11 で説明されている流体受容装置の中心に置く。そのサンプル / 試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れは自動的に止まる。

【0165】

流体受容装置に形成されるブルーラテックス粒子の輪のサイズを検査し、そして、それを、流体受容装置の表面に印刷されているインジケータと比較する。全血中における抗甲状腺抗体の所望の濃度範囲において、校正された信頼性のある定量方法を確立するためには、既知の抗 - 甲状腺過酸化物抗体濃度を有するヒト全血からなるキャリブレーターを使用するのが好適である。測定されるべき臨床患者グループに対する多孔質流体受容材料において必要な甲状腺過酸化物抗原濃度を選択し、そして、既知含量の抗甲状腺過酸化物抗体から成るキャリブレーターを用いて、前記流体受容装置の表面に印刷されているインジケータに適切な濃度値を割り当てる。

【実施例 16】

【0166】

撮像または走査装置による測定

実施例 12、13、14、及び 15 で使用するため、実施例 11 で説明されている流体受容装置の表面に、問題としている被分析物の含量を視覚的に読み取るための校正用インジケータを印刷することができる。もっと正確な定量と分析結果の一層良好な資料化との両方を得るためには、流体受容装置が読み取られまたは描写される。その最もシンプル

な形態では、その装置を、パーソナルコンピュータに接続された平床式スキャナーに設置する。より洗練された形態では、デジタルカメラ、スキャナー、または蛍光スキャナーにより、その装置を描写する。殆どの場合、二次元スキャナーが使用されるが、リニアスキャナーを用いて、例えば丸形スポットの直径や矩形移動径路の長さ等を測定することもできる。流体受容装置を測定するためのそのようなスキャナー、カメラ、及びソフトウェアに関する詳細な説明は、Bremnes及びSundrehagenによる特許出願PCT/GB98/00120号に与えられている。

【実施例17】

【0167】

全血中におけるテオフィリン濃度の蛍光測定

10

実施例11による試薬容器の上部にあるヘパリン処理された毛細管チャンネルに5 μ lの血液を吸い込む。その毛細管部分を押し下げ、そして、穏やかに振動を与えることにより、毛細管の内容物を、実施例5で説明されている発蛍光性シアニン-5-テオフィリン接合体と0.25%v/vの正常マウス血清を含有する実施例6の1mlのアッセイ溶液を含む試薬容器内の試薬と混合する。

【0168】

その後、前記実施例7で説明されている流体移送装置を、血液サンプル/試薬混合物を含有している試薬容器に導入する。次いで、その流体移送装置の他端を、上の実施例8で説明されている固定化抗テオフィリン抗体を伴ったフィルター材料を有する、上の実施例11で説明されている流体受容装置の中心に置く。そのサンプル/試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。溶液中に存在するテオフィリンは、フィルター材料内の発蛍光性テオフィリン接合体の結合と競合する。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れは自動的に止まる。

20

【0169】

血液サンプルからのテオフィリンとテオフィリンの発蛍光性共役は、サンプルのテオフィリン濃度に比例した面積を持って流体受容装置に結合される(図4の(18)参照)。この流体受容装置が、648nmの励起波長を有する蛍光スキャナーで走査され、流体受容装置の表面に存在するシアニン-5の蛍光が測定される。Bremnes及びSundrehagenのPCT/GB98/00120号によるソフトウェアでの計算によって、

30

【実施例18】

【0170】

発蛍光性マイクロスフェアを用いる、全血中のテオフィリン濃度の蛍光測定

シアニン-5蛍光染料で染色されたカルボキシル化マイクロスフェア、製品番号PC04NをBangs Laboratories Inc. (アメリカ)から購入し、実施例2

40

【0171】

実施例11による試薬容器の上部にあるヘパリン処理された毛細管チャンネルに5 μ lの血液を吸い込む。そのヘパリン化された毛細管部分を押し下げ、そして、穏やかに振動を与えることにより、毛細管の内容物を、実施例6の1mlのアッセイ溶液と0.25%v/vの正常マウス血清を含み、且つ、実施例2のEstaporブルーマイクロスフェアの代わりにBangs Laboratories社から入手可能な前記シアニン-5-染色マイクロスフェアが使用される点を除き、実施例2によるテオフィリンコーティングマイクロスフェアを含む試薬容器内の試薬と混合する。

【0172】

50

その後、前記実施例 7 で説明されている流体移送装置を、血液サンプル / 試薬混合物を含有している試薬容器に導入する。その流体移送装置の他端を、上の実施例 8 で説明されている固定化抗テオフィリン抗体を伴ったフィルター材料を有する、上の実施例 11 で説明されている流体受容装置の中心に置く。そのサンプル / 試薬混合物を、流体移送装置を通じて、前記流体受容装置に流入させる。溶液中に存在するテオフィリンは、ミクロスフェア上の接合体よりもはるかに速く多孔質材料内に固定化されている抗体と反応し、そして、フィルター材料内におけるブルーミクロスフェアの結合と効率的に競合する。この移動プロセスにおいて、溶液中の遊離テオフィリンからアッセイ溶液が枯渇すると、ブルーミクロスフェアに結合されたウシ血清アルブミンとの 8 - (3 - カルボキシプロピル) - 1 , 3 - ジメチルキサンチン共役を伴ったブルーミクロスフェアが、前記競合を伴うことなく、固定化単クローン抗テオフィリン抗体と結合し、内側の稠密性に劣る領域の外側にもっと蛍光強度の高い輪を生成する。流体受容装置の多孔質フィルター材料が液体で飽和されると、流体移送装置を通じる液体の流れは自動的に止まる。

10

【 0 1 7 3 】

この流体受容装置が、648 nm の励起波長を有する蛍光スキャナーで走査され、流体受容装置の表面のシアニン - 5 の蛍光が測定される。上の実施例 16 によるソフトウェアでの計算、及び、Bremnes 及び Sundrehagen が説明しているようなソフトウェアでの計算によって、蛍光強度の低い面積が描写及び測定される。全血中におけるテオフィリンの望ましい濃度範囲において、校正された信頼性のある定量方法を確立するため、既知のテオフィリン濃度を有するヒト全血からなるキャリブレーターを使用する。

20

【 図面の簡単な説明 】**【 0 1 7 4 】**

【 図 1 】 図 1 A、B、及び C は、検査サンプル試薬混合物を混合及び伝達するための装置、及び、流体受容装置の一つの実施形態を示している。

【 図 2 】 図 2 は、検査サンプル試薬混合物を混合及び伝達するための装置の第二実施形態を示している。

【 図 3 】 図 3 A、B、C、D、及び E は、図 2 に示されている実施形態の使用の様子を描いている。

【 図 4 】 図 4 は、流体受容装置の一つの実施形態を示している。

【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
28 November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/095409 A1

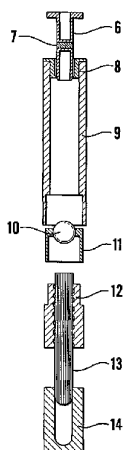
- (51) International Patent Classification: G01N 33/558, 33/58, 33/543, A61B 10/00, B01L 3/00
- (21) International Application Number: PCT/NO02/00161
- (22) International Filing Date: 26 April 2002 (26.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20012150 30 April 2001 (30.04.2001) NO
- (71) Applicant and
(72) Inventor: SUNDREHAGEN, Erling [NO/NO]; P.O.Box 206 Økern, N-0510 Oslo (NO).
- (74) Agents: MYHRE, Kjell et al.; Onsagers AS, P.O. Box 265 Sentrum, N-0103 Oslo (NO).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE, DF (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EG, 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, LT, 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, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, HR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: QUANTITATIVE NON-INSTRUMENTAL IMMUNOASSAY AND DEVICE USING COLOURED PARTICLES



WO 02/095409 A1



(57) Abstract: Quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample. The method involves a) mixing in a container the sample with a reagent containing signal-providing substances, b) coupling the container to a fluid-transmitting device, c) bringing the fluid-transmitting device in contact with a fluid-receiving device. The fluid-receiving material includes immobilized reagents with specific binding capacity for the analyte. A pattern or area of the fluid-receiving material is utilized as a measure of the concentration of analyte(s) in the sample.

WO 02/095409 A1 

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

1

Quantitative non-instrumental immunoassay and device using coloured particles

- 5 The present invention relates to a method for determining the concentration of one or several analytes in a sample, a device for performing the method, use of the method to perform specific analysis and a kit for performing the method.
- In the field of analytic biological chemistry there is a considerable need of methods for rapid qualitative and quantitative determination of analytes in biological fluids, requiring as few analytical steps as possible, and no special skills on behalf of the person performing the analysis.
- 10 In 1986 Mochmal & al. of Ortho Diagnostic Systems within the Johnson & Johnson Corporation filed a patent application, later granted as European Patent 0250137 B1. The invention provided a method for quantification of an analyte (i.e. the substances to be determined) in a complex test sample, e.g. urine or blood, characterized by having a porous membrane strip with immobilized binding
- 15 molecules, and using other molecules coated on gold colloid particles that are brought into contact with an aliquot of the test sample which is allowed to stream through the porous membrane strip. The length of the part of the strip where said gold colloid particles are retained, is proportional to the concentration of the analyte molecules in the test sample.
- 20 This method was exemplified by a method description for quantitative analysis of luteinizing hormones in urine and for human gonadotrophine in urine and the medical substance theophyllin in blood, for which the length of the stripe created by the signal-providing gold colloid particles in the prescribed test strip was directly proportional to the concentration of analyte molecules in the test sample. The
- 25 reagents were simple and quick and have a low production cost, and required no signal developing reagents, special equipment or temperature control. Still, neither Johnson & Johnson nor Ortho Diagnostic Systems have ever launched commercial products based on this technology.
- 30 EP 0250137B1 offers no detailed description of how element C of claim 1 should be carried out, that is; no detailed description of the transfer of fluid to the membrane strip. At the bottom of page 3 it is indicated that the reagents are held in a container and that the reagents are brought into contact with the said membrane strip, containing immobilized binding molecules. The only exemplification of carrying
- 35 out element C of claim 1 is found in the first line on page 5, where it is described that one end of the membrane strip is dipped into a mixture of test sample and reagent. Similarly there is a description, in the first line on page 10 in example 7, of the strip being immersed to a depth of 10 mm. In example 3, description of the membrane, no detail is offered beyond a thorough description of the membrane

strip. Consequently, the only reasonable interpretation is that this membrane strip is dipped into reagent/test sample without any particular transfer devices.

5 There are considerable disadvantages connected with such a dipping technology when it is attempted made quantitative. One disadvantage is that precise preparation of the reagent/test sample mixture might require practice and/or competence in precise preparation of the mixture. Since the membrane strip is to be held down in the reagent/test sample, either a holding device has to be made for the membrane strip or one must use a test tube to hold the membrane strip, which could function as a container for the reagent/test sample as well. In such tubes fluids tend to migrate 10 differently along the edges of the membrane strip than in the center of the strip, and the liquid front easily becomes uneven. The strip described in EP 0250137 B1 could, however, be well suited for quantitative analyses of analytes with relatively little biological variation, or for instance medical substances with so-called narrow therapeutic width (small difference in concentration in blood between therapeutic and toxic values). 15

The only commercial product, known to the present inventor, that puts to use anything resembling the principle of EP 0250137 B1 is the firm Syva's (Later Dade Behring, one of the world's largest diagnostics products firms) immunochromatographic enzyme-based product, described in US Patent 443504, 20 which used tube-shaped containers and narrow membrane strips. The product is described in the article »Enzyme immunochemistry – a quantitative immunoassay requiring no instrumentation», in *Clinical Chemistry* vol. 31, 1144-1150, 1985. But Syva's product made use of several reagent containers, including enzyme substrate containers, and the method was quite complicated to carry out. 25 Despite great demand the product was discontinued, according to Syva's sales representative in Norway, due to a complicated and costly industrial production.

EP 0250137 B1 describes strips containing different quantities of specific binding molecules per unit of area in different sections of the strip, to measure wider ranges of concentration (also called larger dynamic measurement range). The patent holder 30 has, however, never marketed such strips, and it is technically and industrially complicated to implement such production with good precision. A simpler approach is to make use of radial analysis techniques as introduced by Mancini *et al.*, *Immunochemistry*, 2: 235-254 (1965) in radial immunoprecipitation techniques in agarose gel. Using radial migration a significantly larger dynamic measurement range can be achieved, since the migration length in this format becomes 35 proportionate to the square root of the area. Increasing the radius from 1 to 3 cm will thus result in an area increase by factor 9, and will thus be applicable in a larger concentration measurement range.

At the time of Ortho's and Syla's commercially less successful development of the principles for area measurement in immunochromatography, a commercially very successful development of another main principle for thin-layer immunochromatography also took place, to most people known from modern pregnancy tests, and reference can be made to e.g. Rosenstein & Bloomster's US Patent 4,855,240 and May & al. in EP 291 194, 1988. It is characteristic of this technology that the test sample, with or without added reagent, is dripped into a well or onto a piece of filter affixed to a moisture absorbing membrane strip, whereby the test sample migrates into and further along the porous membrane. The migrating liquid dissolves desiccated specific binding molecules that have previously been chemically bound to signal-providing substances, and these binding molecules (typically antibodies) in turn bind to the analyte molecules from the test sample. Further along in the migration strip some more specific binding molecules have been immobilized, typically in a stripe perpendicular to the migration direction or for instance in a pattern, e.g. a cross. When the analyte molecules carrying specific binding molecules, which in their turn have signal-providing substances attached to them, pass the said stripes or patterns containing immobilized binding molecules, the signal-providing substances are concentrated in these stripes or patterns. A positive test is read as color or fluorescence in the given stripe or pattern. A large number of firms produce and market such products.

Starting with two out of the world's three largest diagnostics firms and their lists of products, we see that this form of qualitative thin-layer immunochromatography is used extensively. Bayer, USA, sells Clinitek hCG urine test and Clinitek Microalbumin urine test. Abbott Laboratories in the US sells Fact Plus Pregnancy Test, TestPack hCG Combo, TestPack Chlamydia, TestPack Strep A, TestPack Rotavirus, and TestPack RSV. Of the smaller but more specialized firms we might mention Nubenco Medical International, USA, which sells these types of tests for hCG, LH, Chagas, Chlamydia, Cholera, CK MB, Dengue, Myoglobin, Strep A, Hepatitis B antigen, Troponin I, Hemoglobin in stool, as well as for antibodies for Deng, Helicobacter Pylori, Hepatitis B antibodies, mononucleosis antibodies, antibodies for Treponema Pallidum and Mycobacteria Tuberculosis, and also for detection of the tumor markers Alpha Fetoprotein, Carcinoembryonal antigen and Prostatospecific antigen. Millipore Inc in the US, which is a specialized producer of filter materials, sells full hardware «assembly kits» for these types of tests from their OEM-department, so-called HiFlow assembly kits. Pall Gelman plc, UK, has even issued a manual for manufacturing such products, viz. their brochure «Immunochromatographic, Lateral Flow or Test Strip Development Ideas» which can also be downloaded from their Internet site. Acon Laboratories, Inc., in the US, has a big own production and sales of these types of tests, especially to the Chinese market, but also deliver tests, so-called OEM, to other firms for resale under the customer's trademark.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

4

- Apparatuses for measuring the intensity of these stripes or patterns have also been constructed, but it has been difficult to design chemicals and devices providing sufficiently precise and accurate results. Highly sophisticated technologies have been developed to overcome these limitations, viz. typically US 6136610: «Method and apparatus for performing a lateral flow assay» by Polito & al. It is evident from
- 5 US 6136610 that more complicated and advanced methods and apparatuses are needed to make this method quantitative, and it is very complicated and costly to achieve industrially reproducible precision and accuracy, until now it actually hasn't been feasible in a commercial context.
- 10 Roche Diagnostics has developed a variety of this chromatographical principle in which the intensity of coloration in the testing section to which the signal-providing substances proceed is used as a semi-quantitative measure for determining albumin in urine. Diabetes care, vol. 20, number 11, pp. 1642 – 1646, describes this.
- 15 US patent 5958790 by Erich Cerny describes a vertical filter immunoassay method based on vertical flow of sample aliquot through a filter with specific binding molecules, followed by binding molecules with attached signal-providing substances such as gold colloids. The method is used commercially by reading the intensity of the light reflection using a reflectometer in its quantitative embodiment, and the method requires accurate pipetting of reagents. Using volume calibrated
- 20 pipettes and a reflectometer the method can be made quantitative with good precision.
- Hajizadeh and Wiljesuriya in US Patent 6180417 and EP 1 046 913 A2 describe an immunochromatographic strip that has a non-porous receiving unit, which is in direct contact with the absorbing material in the chromatography strip. It remains to
- 25 be seen whether Bayer will be able to solve the industrial problems that have been limiting manufacturing of these types of industrial products, and it is remarkable that Bayer only describes application of their device in connection with qualitative analysis products.
- Since the described lateral or vertical immunochromatographic methods have been
- 30 impossible to perform quantitatively without using instruments, then why haven't Ortho or, later on, Johnson & Johnson or Syva or, later on, Dade Behring developed further their lateral thin-layer chromatographical methods described in EP 0250137 B1 and US 4435504 for commercial quantitative analysis products using such wells or affixed pieces of filter for drip application of reagents? The present inventor and
- 35 many of my colleagues have tried to construct wells or affixed pieces of filter providing regular and reproducible migration patterns and areas in accordance with the principles of EP 0250137 B1, without succeeding. Border effects and contact effects have made it impossible to create a reproducible solution on an industrial scale. Various linings, o-rings and different types of glue or adhesives have been

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

5

tried unsuccessfully. Thus, there still exists a need for an industrially reproducible method of analysis in which signal-providing substances migrate reproducibly and provide patterns or areas the size of which can be applied directly to determine the concentration of one or several analytes in a test sample with a large dynamic concentration measurement range, suitable for being performed by persons without specialized laboratory training.

It is therefore an object of the present invention to provide a method for determining the concentration of one or several analytes in a sample, a device for performing the method, use of the method to perform specific analysis and a kit for performing the method. These objects have been obtained by the present invention, characterized by the enclosed claims.

The present invention relates to a quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample, wherein a sample containing the analyte or analytes is mixed with a reagent contained in a container, wherein the reagent contains signal-providing substance(s), thus providing a mixture which is subsequently absorbed by a fluid-transmitting material contained in a fluid-transmitting device after coupling of the container to the fluid-transmitting device, and simultaneously or afterwards bringing the fluid-transmitting device in contact with a fluid-receiving device containing a fluid-receiving material which includes immobilized reagents with specific binding capacity for the analyte or analytes, or immobilized analyte molecules or analogues or derivatives or fragments thereof, wherein the mixture is transported out in the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device and create a pattern wherein the pattern or area of the pattern or area of the pattern elements are utilized as a measure of the concentration of analyte or analytes in the sample.

More specific the present invention relates to a quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a test sample wherein the sample is mixed with the reagent, such as a liquid reagent in a container containing signal-providing substances, a fluid-transmitting device containing a fluid-transmitting material is introduced into the said container so that the said fluid-transmitting material comes into contact with the said mixture in the said container, the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device in the course of performing the said chemical method of analysis is brought into simultaneous contact with on the one hand the said mixture of reagent and test sample and on the other hand into contact with a porous fluid-receiving material in another fluid-receiving device, wherein the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device is not permanently mounted in contact with the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, but is brought into such contact as a part of performing this method, and wherein the said porous

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

6

fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device includes immobilized reagents which have specific binding affinity for the said analyte or analytes or that the said immobilized reagents consist of immobilized analyte molecules or analogues or derivatives or fragments of analyte molecules,
5 whereby the said mixture is transported through the fluid-transmitting device and over into and spreads out in the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device, whereby the pattern, the area of the pattern and/or the area of the pattern elements that emerge through the distribution of the signal-providing substances in the said porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving
10 device, are utilized as a measure of the concentration of analyte or analytes in the sample.

The contact between the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device with on the one hand the mixture of reagent and test sample in the said container and on the other hand with a porous fluid-receiving material in
15 the said other fluid-receiving device) can comprise a contact which is established either simultaneously, or first with the mixture of reagent and test sample, or first with the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device.

An especially preferred embodiment of the present invention is characterized by the said container being a liquid leak proof container, and further characterized by the
20 fluid-transmitting device, which contains a fluid-transmitting material, being led through a liquid leak proof gate into the said container in such a way that the said fluid-transmitting material comes into contact with the said mixture in the said container.

It is further characteristic of the present invention that the fluid-transporting
25 material in the fluid-transmitting device can consist of a porous fluid-transporting material suitable for transporting fluids using capillary forces or overpressure or underpressure.

Another embodiment of the present invention is characterized by the inclusion in the fluid transmission device of a non-porous nib or a tube-shaped transmission
30 which is not mounted in permanent contact with the fluid-receiving device, but which is brought into contact with the fluid-receiving device during the process of carrying out the quantitative chemical method of analysis.

What further characterizes the method related to the present invention is that the said container for mixing of reagent with test sample can be a closed container with
35 a gate at which the said fluid-transmitting device can come into contact with the said mixture; if expedient, by supplying the said container with a notch in a wall where the wall is thinner and yields when the transmission device is led through in a tight fitting manner or; if expedient, by the fluid-transmitting unit and the said container being screwed together, if expedient with small gas permeable openings in

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

7

the container or transmission device, shaped in such a manner that the said mixture does not leak out of the container or fluid transmission device regardless of the spatial position in which the container and/or fluid transmission device are/is held.

5 What further characterizes the present invention is that the said container for mixing of reagent and test sample can be equipped with a gate for introduction of test sample or that a third device containing the test sample is used and, if desirable, that the said third device constitutes a part of the said container when it is joined together with or screwed onto the other devices. Furthermore the said third device is not a part of the container and is e.g. a glass capillary.

10 What further characterizes the present invention is that the said fluid-receiving device contains specific binding molecules with affinity for analytes or the analytes, or for analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules, either in immobilized form and/or in desiccated form or dispersed onto or into particles or directly into the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, with a homogeneous or inhomogeneous – but previously
15 determined – distribution in the porous fluid-receiving material.

What further characterizes the present invention is that the said reagent can contain signal-providing substances in the form of colored particles or colloids or enzymes or fluorophores or dyes, with or without attached specific binding molecules or with
20 or without attached analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules.

What further characterizes the present invention is that the said reagent can include chemicals that dissolve cells in the test sample and/or regulate the acidity or ionic strength or keep any possible particles dispersed.

25 Furthermore, what characterizes the present invention is that the said fluid-transmitting device can have a pore size that holds back cells such as red or white blood cells, but has a pore size large enough to let through the said signal-providing substances.

What further characterizes the present invention is that the hemoglobin in the test
30 sample can be used as signal-providing substance.

What further characterizes the present invention is that the test sample can be pretreated by adding chemicals or be separated or extracted prior to being mixed with the said reagent or that the said reagent can be provided by mixing together two or several different reagents inside the said container, or that additional
35 chemicals are added to the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device in order to evoke or enhance or clarify the patterns or areas of patterns and/or the area of the pattern elements that appear in the said fluid-receiving device.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

8

5 A characteristic of the present invention is that the patterns or areas of patterns and/or the area of pattern elements that appear in the said fluid-receiving device can be depicted or scanned or measured using analogue or digital instruments based on visible or ultraviolet or infrared or near-infrared light, either by absorption measurement or reflection measurement or fluorescence measurement, and that the concentration of the analyte or the analytes in the test sample is determined on the basis of these measurements.

10 A distinct embodiment of the present invention is further characterized by the use of a leak proof container for the mixture of reagent and test sample, and further characterized by the fact that the fluid-transmitting device contains a porous fluid-transmitting material which is mounted in permanent contact with the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device.

15 The present invention relates also to a device for performing a method for determining concentrations of one or several analytes in a test sample, comprising a liquid leak proof container for mixing of the test sample with a reagent, a fluid-transmitting device which contains a fluid-transmitting material, and a fluid-receiving device which contains a fluid-receiving material, assembled such that the fluid-transmitting device is able to be contacted with the content of the said container through a liquid leak proof port and contacted with the fluid-receiving device containing the fluid-receiving material.

20 Further the invention relates to a device in wherein the fluid-transporting material in the fluid-transmitting device consists of a porous fluid-transporting material suitable for transporting fluids using capillary forces or overpressure or underpressure.

25 The invention also relates to a device in wherein a non-porous nib or a tube-shaped transmission is included in the fluid transmission device, not mounted in permanent contact with the fluid-receiving device, but brought into contact with the fluid-receiving device during the process of carrying out the quantitative chemical method of analysis.

30 In a further embodiment the device in accordance with the present invention the said leak proof container has a port through which the said fluid-transmitting device can come into contact with the said mixture of test sample and reagent, suitably that the said container has a notch in a wall where the wall is thinner and yields when the transmission device is led through in a tight fitting manner or the fluid-transmitting unit, and the said container being screwed together, suitably with small gas-permeable openings in the container or transmission, shaped in such a manner that the said mixture does not leak out of the container or fluid transmission device regardless of the spatial position in which the container with the fluid transmission device is held.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

9

Furthermore the device in accordance with the present invention is characterized in that the said container for mixing of reagent and test sample is equipped with a port for introduction of the test sample from a sample transporting device, such as e.g. a glass capillary, or that the sample transporting device constitutes a part of the said container, such as a lid device which is joined together with, or screwed onto the said container in the port location.

According to the present invention the device is characterized by the said fluid-receiving device containing specific binding molecules with affinity for analytes or the analytes, or for analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules, either in immobilized form and/or in desiccated form or dispersed onto or into particles or directly into the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, with a homogeneous or inhomogeneous, but previously determined, distribution in the porous fluid-receiving material.

Furthermore the device in accordance with the present invention is characterized in that the said container contained reagent comprises signal-providing substances in the form of colored particles or colloids or enzymes or fluorophores or dyes, with or without attached specific binding molecules or with or without attached analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules.

In a further embodiment the device in accordance with the present invention is characterized in that the said reagent includes chemicals that dissolve cells in the test sample and/or regulate the acidity or ionic strength or keep any possible particles dispersed.

In a still further embodiment the device in accordance with the present invention is characterized in that the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device has a pore size that holds back cells, such as red or white blood cells, but with a pore size large enough to let through the said signal-providing substances.

In a further embodiment the device in accordance with the present invention is characterized in comprising a stopper (6) with a built in capillary (7), a sealing sleeve (8) surrounding the stopper, a liquid leak proof container (9), a movable ball (10) sealing the port in the bottom of the container (9), wherein the ball (10) is housed in a valve seat (11) which is sealingly fitted to a wick or felt tip guide (12), wherein a wick or felt tip (13) is sealingly and movable mounted, wherein the felt tip (13) is protected by a removable cap (14)

In a still further embodiment the device in accordance with the present invention is characterized by further comprising a scanning device, such as analogue or digital instrument based on visible or ultraviolet or infrared or near infrared light, or a combination thereof, to measure absorption or reflection or fluorescence, or a

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

10

combination thereof, a processor for processing the data, a display medium, and medium for storing the data.

5 In a further embodiment the device in accordance with the present invention is characterized by further comprising a rack with a movable holder, whereby the container is fixed in a standardized position in relation to the fluid-receiving device such that only vertical controlled movement is possible.

A further embodiment of the present invention relates to use of the method wherein the concentration of one or several analytes in a biological sample, such as blood, sputum, mucus, faeces, expectorates and tissue is measured.

10 In a further use of the method according to the present invention the analytes are selected from the group comprising autoantibodies, antibodies, saprophytes, bacteria, other infectious agents, hemoglobin, albumin, CRP, U-albumin, glycated albumin, glycated hemoglobin, ferritin, ASAT, ALAT, LDH, myoglobin, Troponin I, Fatty Acid Binding Protein, amylase, HCG, U-HCG, theophyllin, and antibiotics.

15 The present invention also relates to a kit for performing the method comprising the said device, reagent for mixing with the test sample, optionally additional reagents for pretreatment or separation of the test sample or admixing into the fluid-receiving device for clarification of the signal.

20 The present invention will now be described in more detail, with reference to figures and examples.

Figure 1 A, B and C illustrates one embodiment of the device for mixing and transmitting the test sample-reagent mixture and the fluid-receiving device.

Figure 2 illustrates a second embodiment of the device for mixing and transmitting the test sample-reagent mixture.

25 Figure 3 A, B, C, D and E illustrates the use of the embodiment illustrated in Figure 2.

Figure 4 illustrates an embodiment of the fluid-receiving device.

30 The present invention provides a method and device for quantification of one or several analytes in a test sample or in test sample material using one single liquid reagent. This reagent includes signal-providing substance(s) and is used in combination with a container for mixing a sample 2, 9 – readily an aliquot of a test sample – into the reagent 15 thus providing a mixture, a fluid transmission device 4,13, and a fluid-receiving device 5, 16 including a porous material 17 which receives the transmitted fluid (i.e. fluid-receiving material).

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

11

According to the present invention, it has also been possible to make a comprehensive device, which can be characterized as a pen for quantification of analytes in complex test samples. Viewed from the exterior in its most preferred embodiments it resembles a felt tip pen or a fountain pen or cartridge pen with a felt tip or fiber tip 4, 13 or nib, whereby fluid from a container is led through a transmission device down onto a two-dimensional matrix 5,17 made out of e.g. paper or a filter material, for instance nitrocellulose or more modern further developed materials with similar properties. The device further contains a stopper 1, 6, with a built-in capillary 7, and a felt tip guide 3,12 which holds the felt tip 4, 13.

10 Suitable materials for quantitative analysis in compliance with the present invention (i.e. use of the invention) are body fluids or extracts thereof, typically urine, saliva, blood serum, blood plasma, blood hemolysate, anti-coagulated blood or full blood, cerebrospinal fluid, extracts or fractions of body fluids, or fluids or extracts from the plant kingdom, or fluids or suspensions or other liquid or suspended states of aggregation in nature, such as aqueous solutions, e.g. waste water. In the present invention a sample – readily as an aliquot of a sample material – is mixed with a reagent in a container. The aliquot is led into the container after having been sucked up into a sample-taking device, e.g. a small capillary tube with a predetermined internal volume, which is filled as a result of the test sample displacing the air inside the capillary tube, due to the surface tension. This capillary tube can be of any suitable form, such as e.g. straight or spiral shaped or be inside a device which can also serve e.g. as a stopper in the said container, so that the device closes the container in such a way that it becomes liquid leak proof when and after the test sample is mixed with the reagent. This mixture can for instance come about through shaking of the container, manually or using an instrument, so that the test sample flows out into the reagent and mixes.

A liquid leak proof container for the mixture of reagent and test sample is a preferred embodiment, but not required. The advantage is that the container in the liquid leak proof embodiment can be held in all possible spatial positions without the liquid mixture leaking out, in the same way as with a pen, which it should preferably be possible to hold in different positions when producing the desired writing.

A further characteristic of the invention is that a fluid-transmitting device is led into the said container, preferably through a leak proof gate. This fluid transmission device can in a preferred embodiment consist partly or completely of a porous material which absorbs liquids, analogous to the tip of felt tip pens or cartridge pens or India ink pens, or in other design varieties in the form of a tube-shaped material or a wick, or a split-shaped device, such as the nib of a pen or a thin metal tube. The reagent container and the said transmission device can thus be designed similarly to a fountain pen or an India ink pen, in which the reagent/test sample mixture is

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

12

- transferred via a nib or a tube-shaped transmission or preferably a transmission consisting of a porous material that absorbs aqueous liquids, but which differs somewhat from the most common pens in that the transmission device should not be put into contact with the reagent until after the reagent is mixed with the test sample aliquot. This can for instance be achieved by providing the said container with a notch in one wall, at which point the wall is thinner and yields when the fluid transmission device is led through in a closefitting manner, or by screwing together the fluid-transmitting unit and the said container, or by providing the fluid-transmitting unit with a hollow tip which is pressed into the said container.
- 10 In a liquid leak proof embodiment it will, as a rule, be necessary to let air into the container to avoid underpressure in the container which would restrain the fluid transmission when fluids migrate out of the container through the fluid transmission device in order to avoid underpressure in the container which would restrain the fluid transmission. Small gas-permeable openings can therefore be used with advantage. It is advantageous to use openings that are so small or narrow that the fluid due to surface tension does not leak out, but big enough to allow gas molecules to diffuse in.
- 20 The present invention further uses a fluid-transmitting device containing a fluid-transmitting material which is led into the said container in such a way that the said fluid-transmitting material comes into contact with the said mixture in the said container. Further, the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device is brought into contact with on the one hand the said mixture of reagent and test sample and on the other hand into contact with a porous fluid-receiving material in another fluid-receiving device, either simultaneously or that the fluid-receiving material is contacted with the fluid transmitting material afterwards. The invention is further characterized by the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device not being permanently mounted in contact with the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device, but is brought into such contact as a part of applying this method.
- 30 A particularly preferred embodiment of the present invention is characterized by the use of a porous fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device. This porous fluid-transmitting material is simultaneously in contact with the mixture of reagent and test sample in the said container and in contact with a porous fluid-receiving material in a separate fluid-receiving device. The fluid mixture will thereby be transported through the transmission device and into the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device. By using a fluid-transmitting device which is not permanently mounted onto or in contact with the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device, one can achieve an industrially producible device for a reproducible method for transmission of fluids with good and regular dissemination patterns in the porous material in the said fluid-receiving device. The
- 40

fluid will thus spread out evenly and regularly in the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device. This is illustrated in figures 1 – 4.

5 Figure 1a illustrates blood sample taking in a sample-taking device with built-in capillary, figure 1b illustrates introduction of test sample into container 2 already containing the reagent characteristic of the present invention, figure 1c illustrates
10 transmission of the mixture of reagent and test sample from the said container 2 through the fluid transmission device and into the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device 5, and a fluid dissemination pattern in the said porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device. The pattern or the area of the
15 pattern or pattern elements that appear as a result of the signal-providing substances' dissemination in the porous material in the fluid-receiving device can thereby be used as a measure of the concentration of analytes or the analytes in the test sample, according to the same principles that are described in EP 0252137 B1, but not limited to the type of signal-providing substances described in EP 0250137 B1.

15 In figure 2 another embodiment of the device is described, comprising a stopper 6 with a built-in capillary 7, such as e.g. a capillary holding 5µl fluid, a sealing sleeve 8, a liquid proof container 9, a ball 10 sealing the port in the bottom of the container 9 wherein the ball is housed in a valve seat 11 which is formed to receive a wick or felt tip guide 12 in a sealing connection. The wick or felt tip 13 in a sealing and
20 sliding connection in the wick or felt tip guide 12, and the tip is protected by a cap 14. All parts of the device is produced by suitable materials such as e.g. plastic, except the wick or felt tip which is made of a fluid-transmitting material.

Figure 3 illustrates the use of the embodiment illustrated in figure 2. Figure 3 A depicts a device filled with the reagent 15, e.g. such as it may be provided
25 commercially. The fluid-transmitting device is not in contact with the reagent 15 and the felt tip 13 is protected by the cap 14. In figure 3B the capillary 7 is filled with a test sample, e.g. blood and in figure 3C the stopper 6 is pressed downwards in order to bring the content of the capillary 7 into contact with the reagent 15. In figure 3D the reagent 15 is mixed with the test sample by moving or stirring the device. In figure 3E the fluid-transmitting device 13 is pushed against the ball 10
30 which then moves into the container 9 and contact is established between the fluid-transmitting device and the mixture of the test sample and the reagent 15.

Figure 4 illustrates an embodiment of the fluid-receiving device comprising a circular tray 16 made of suitable materials such as e.g. plastic, wherein the fluid-receiving material 17 is located. The grey area 18 illustrates the pattern appeared as
35 a result of the signal providing substances' dissemination in the porous material 17.

Particularly preferable is an evenly thick fluid-receiving porous material in the fluid-receiving device with evenly immobilized dissemination of immobilized reagents of specific binding affinity for the said analyte or analytes or that the said

immobilized reagents consist of immobilized analyte molecules or analogues or derivatives or fragments of analyte molecules, because this will provide direct proportionality between the analyte concentration in the test sample and the area of the dissemination patterns that the signal-providing substances form in the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device.

To obtain the largest possible dynamic measurement range for the method the said porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device will preferably be circular, and the said fluid transmission device will be brought into contact with the center of the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, and rings will be formed by the signal-providing substances. If the container for the mixture of reagent and test sample together with the device for fluid transmission have a pen-like design, the tip of this pen could typically be placed in the center of the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device, and rings will be formed by the signal-providing substances, and these rings can be measured using simple means.

If the said reagent includes immobilized specific binding molecules with affinity for the analyte molecules, the said analyte molecules with attached signal-providing substances will be captured by the immobilized binding molecules and form rings with an area proportional to the analyte concentration, and the signal-providing substances that are not bound to analyte molecules will migrate out to the periphery of the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device.

In a so-called competitive embodiment of the present invention analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules are bound to the signal-providing substances, and these will bind with the specific binding molecules in the said fluid-receiving device. In this competitive embodiment one can make use of the thermodynamic principle that at the same temperature the kinetic movement of small molecules is much faster than for large molecules. Analyte molecules from the test sample which are not bound to signal-providing substances will be able to react very quickly with the specific binding molecules, while especially particulate signal-providing substances with attached analyte molecules will react much slower than free analyte molecules. Particulate signal-providing substances will therefore in this embodiment form outer rings, while the analyte molecules from the test sample will form an inner signal free ring, preferably an inner ring with an area proportional to the analyte molecule concentration in the test.

In another embodiment of the present invention immobilized analogues of or derivatives of or fragments of or whole antigens are used in the porous fluid absorbing material in the said fluid-receiving device. Antigens are molecules that react with specific antibodies with affinity for such antigens. In this embodiment specific antibodies present in the test sample can be measured. Such specific

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

15

antibodies have affinities for specific antigens. This is medically indicated especially in the case of so-called autoimmune diseases, characterized by patients producing antibodies against antigens that exist in their own body, and in the case of infectious diseases in which the patient produces antibodies against the infectious agents. Then typically competing antibodies bound to the signal-providing substances are used, these last antibodies typically produced polyclonally or monoclonaally in animals or in cell cultures; or using recombinant technique in cell cultures, including bacteria cultures; or in plants. Also in this case fragments or analogues or derivatives of antibodies, or competing molecules manufactured at combinatorial chemical or biochemical libraries, including phage display may be used. A further description of these techniques and disease situations can be found in the publicly available medical and biochemical specialized literature.

Numerous different antibodies have been used in different embodiments of the present invention. Generally polyclonal antibodies are not preferred because they have the ability to aggregate the microspheres in presence of antigens, which does not happen easily when monoclonal antibodies are used, which most often binds to only one determinant of the antigens.

If the analyte is not a monomer, but has several sub-nits with the same antigen determinant, it will be an advantage to combine the coated microsphere with a reagent splitting the analyte into monomers. E.g. C-reactive protein may be split into monomers using chelating agents like DTPA and EDTA which binds the Calcium ions, and then the different sub-nits are disconnected. The concentration of the chelating agents must be higher than the concentration of calcium and manganese ions in the blood sample to be analysed.

Furthermore, if the antigen has more than one replicate of the same epitope, particle aggregation may be induced, an another antibody reactive to an epitope which is not present at multiple locations of the antigen should be chosen.

Especially preferred are the use of pairs of monoclonal antibodies that have been tested to bind at different epitopes of the antigen without interfering with the other antibody's binding to the antigen, and without causing aggregation of the particles.

To adapt the size of the patterns that are formed, it might be of interest to add calibrating competing substances to the said reagent. It can e.g. be of interest to add to the reagent known quantities of specific binding molecules without attached signal-providing substances, which will compete for the binding to the analyte molecule in the test sample. It can also be of interest to add known quantities of analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules that will react with specific binding molecules which are present and thus influence the patterns that are formed.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

16

The method relating to the present invention is based on transportation of aqueous solutions through the fluid-transmitting device and to and within the fluid-receiving device. The invention is not limited to one type of transporting force, but the capillary forces that appear when aqueous solutions come into contact with porous materials will offer a transporting force that is especially favorable for application of the method that is characteristic of the present invention. In principle gas overpressure forces or gas underpressure forces (vacuum) can also be used, often in connection with suction or pressure pumps, but this is as a rule less appropriate from a practical point of view.

To serve as fluid-transmitting materials in the said fluid-transmitting device use is typically made of the type of materials that are used in India ink pen nibs or so-called felt tip pens; typically – but not limited to – felt, sponge (natural and synthetic), but especially preferred polyethylene fibers (dense or hollow fibers), polyester fibers (dense or hollow fibers) or other plastic polymer fibers (dense or hollow fibers). When use is made of hollow fibers especially favorable capillary effects are obtained, but also dense fibers can be used since in these design varieties capillary slits are obtained between the fibers. Some materials are glued together, others are melted together or pressed together or extruded or cast or spun together.

To serve as porous or fluid-receiving materials use can be made of both hydrophilic materials and hydrophobic materials. Hydrophilic materials often offer good suction features, while hydrophobic materials often offer better features for immobilizing specific binding molecules.

Less preferred design varieties than the liquid leak proof embodiment, are design varieties making use of a more open container for mixing the reagent and the test sample. In this embodiment as well a fluid transmission device is used, but since this embodiment is not leak proof, the transmission of fluids will as a rule flow against gravity, i.e. upwards from the said container. Most typical in this embodiment the use is made of a transmission device which contains a porous fluid absorbing material which draws up fluid as a result of the capillary forces that appear when fluid comes into contact with this material, and which is not in permanent physical contact with the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device. This transmission device is brought into contact with both the mixture of reagent and test sample in the said container, and with the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device, typically in the center of this fluid-receiving device so that the fluid mixture migrates radially out into the porous fluid-receiving material.

The present invention is thus provided partly by using a separate fluid transmission device as described above, which is not in fixed or permanent contact with the porous fluid-receiving material where the formed pattern is read, and partly by

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

17

using a liquid leak proof container for the mixture of reagent and test sample aliquot. In this way a controlled fluid transmission is obtained, as previously used in pens and writing instruments in order to achieve controlled writing or drawing, but in the present invention in order to form controlled quantitative pattern areas for chemical quantification of analyte molecules. Preferably a combination of these two elements is used in the present invention.

In a less preferred embodiment the method relevant to the present invention is characterized by the fact that a leak proof container is used for mixing reagent and test sample, in combination with that the said fluid transmission device and the said fluid-receiving device constitute one continuous device with a continuous porous fluid absorbing material.

The said signal-providing substances preferably consist of particulate material, typically of metal colloids or of polymeric nature, alternatively of latex type, or of carbon particles, such as e.g. carbon black particles (M. Lönneberg and J. Carlsson. J. Immun. Meth., 246: (2000), 25 -36.) Such colored particles are very well known in the literature and by the common specialist, and are publicly available from providers such as British Biocell, UK, and Bangs Laboratories, Indiana, USA. These firms also deliver such particles physically or chemically coated with antigens or antibodies or other binding molecules or derivatives of these or analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules. Polymeric particles are delivered in all sizes and colors, also as fluorescent particles. The particles' size and color intensity must be adapted to the sensitivity and capacity needed for the measurement method, as well as to the pore size of the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device. Further they must be adapted to the instrument that is going to read the result or for visual direct reading, if this is to be used.

Small particles react faster than big particles and have the capacity to bind more binding molecules per mass unit of particles, while bigger particles provide stronger color or fluorescence in relation to the quantity of binding molecules that is used.

The signal-providing substances can also consist of fluorescent dyes directly conjugated to the binding molecules, but will ordinarily require a fluorescence scanner to be read. Dyes directly conjugated to the binding molecules can be used for analytes with a high concentration, and making use of the hemoglobin molecules from blood samples themselves is a special embodiment of the present invention, in such cases often with chimeric antibodies with affinity both to hemoglobin and to analyte molecules. Further enzymes can be used as signal-providing substances, but the said fluid-receiving device must in that case usually be supplied with an enzyme substrate containing additional solution, e.g. with a substrate that precipitates as a colorant.

- The said binding molecules can include monoclonal or polyclonal antibodies or antigen binding fragments or derivatives of these, alternatively FAB or FAB2 or FAB'2 fragments, or polymers manufactured by way of combinatory techniques; synthetic or biological, including phage display, such as e.g. peptide binders or nucleic acid aptameres or molecules with a natural specific binding activity such as e.g. haptoglobin or intrinsic factor or folate binding proteins. If specific binding molecules are used both in the fluid-receiving device and bound to the signal-providing substances, it must be made certain that the analyte molecules can bind the specific binding molecules simultaneously.
- 10 The said reagent that is characteristic of the present invention can further with advantage contain chemicals that dissolve cells in the test sample, such as detergents and/or buffer substances that regulate pH and ionic strength or keep particles – if any – dispersed.
- 15 A further characteristic of the invention can be that the said fluid-transmitting material in the fluid-transmitting device has a pore size that holds back cells such as red or white blood cells but has a pore size that is sufficiently big to let through the said signal-providing substances.
- The biological test sample to be analyzed in the present method may comprise blood, sputum, mucous, faeces, expectorates and tissues.
- 20 If a strengthening of the bindings between the signal-providing substances and the analyte molecules or between the analyte molecules and the specific binding substances in the fluid-receiving device is desirable, several types of binding molecules can be used simultaneously, alternatively with specificity for different parts of the analyte molecules.
- 25 In certain design varieties of the present invention it can be advantageous to carry out dilution or hemolysis or extraction or denaturing or separation of the test sample before it is taken into the said container. Typically substances that are present in very high concentrations may require dilution in order not to overload the binding capacity of the method related to the present invention. Other analytes, such as e.g.
- 30 folates or vitamin B12, require denaturing such as boiling in order to expose the analyte molecular structure. Carbohydrate-low transferrins often have to be separated from the other isotransferrins before the quantification of the carbohydrate-low transferrins can take place, and water samples must typically be concentrated or be filter extracted prior to analysis.
- 35 The reagent in the said container for mixing of reagent and test sample can in less preferable design varieties of the present invention be divided into two constituent parts, most frequently due to lacking shelf life if the reagent is combined in a solution. This can e.g. be set up by letting the two constituent parts combine

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

19

5 immediately before use, e.g. by – but not limited to – placing one part of the reagent in a glass vial inside the container, and further that the said container is made of soft plastic and that the said glass vial is broken by compressing the said soft plastic container and that the reagent thereby is mixed. This last action can be performed prior to or after mixing in the test sample.

10 Alternatively the two parts of a divided reagent can be kept in two compartments that are joined together or screwed together immediately before use, or by one of the partial reagents or both the partial reagents being filled directly before use, possibly the same way as ink is filled or pumped into a fountain pen. Also if the reagent is provided as a ready-made reagent it can be filled into the container or be brought into the container in the form of a cartridge, the way ink can be brought into pens using cartridges. Another variety is to make use of refillable cartridges, which are thereafter placed into the pen-like device, or industrially manufactured cartridges containing reagents can be used.

15 The porous fluid-receiving material, which constitutes the whole or parts of the fluid-receiving device, can consist of different materials. Typically the material will consist of nitrocellulose with relatively large pore size, especially if the signal-providing substances consist of particulate material. Further developed materials have been provided in recent years, such as the material Predator from Pall Gelman and hydrophilic and hydrophobic materials and derivatives of nylon, cellulose and other natural and synthetic polymers. Such materials are commonly available from Pall Gelman in the UK, Millipore in the US, Schleier & Schull in Germany and numerous other firms. Specific binding molecules can, however, also be immobilized on particles, often of a hydrophobic character, which disperse in the porous material, and due to their size are immobilized, i.e. are not pulled along by liquid flow, in the porous material.

20 The method in accordance with the present invention is further characterized by the fact that reading can take place visually or instrumentally by way of imaging, scanning or measurement of the patterns or areas of patterns and/or areas of pattern elements that appear in the said fluid-receiving device using analog or digital instruments based on visible or ultraviolet or infrared or near-infrared light, either by absorption measurement or reflection measurement or fluorescence measurement, and that the concentration of the analyte or the analytes in the test sample is determined based on these measurements. Be it that the reading takes place instrumentally or visually, the reading can be assisted by calibration indicators being imprinted on the fluid-receiving device, alternatively on overlying transparent material.

25 The method in accordance with the present invention is among other things suitable for analysis of concentrations of i.a.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

20

autoantibodies such as anticardiolipin antibodies,
antibodies against antigens related to arthritis,
antibodies against HIV, rubella and other viruses as well as toxoplasmosis,
saprophytes, bacteria and other infectious agents,
5 hemoglobin,
albumin,
CRP,
U-albumin,
glycated albumin,
10 glycated hemoglobin,
ferritin,
ASAT,
ALAT,
LDH,
15 myoglobin,
Troponin I,
FattyAcidBindingProtein,
amylase,
HCG,
20 U-HCG,
plus a long list of medical substances, such as theophyllin and different antibiotics,
as well as a long list of other analytes.

The present invention further provides devices and reagents that are required for the
application of the method, as well as a kit for performing the method according to
25 the present invention. The devices related to the present invention include:
a reagent for application of the method related to the present invention,
a device for bringing the test sample, readily an aliquot of a test sample, into
contact with the reagent,
30 a container for mixing the test sample and the reagent, preferably a liquid leak proof
container, if desirable partially formed using the above mentioned device in order to
bring the test sample into contact with the reagent,
a fluid-transmitting device containing a fluid-transmitting material of porous or
non-porous material, preferably for liquid leak proof contacting with the said
mixture of reagent and test sample in the said container,
35 a fluid-receiving device including a porous fluid-receiving material, wherein said
porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device including
reagents that have specific binding affinity for the said analyte or analytes or that
the said reagents consist of immobilized analyte molecules or analogues or
derivatives or fragments of analyte molecules; the said reagents preferably in
40 immobilized form,

and, if desired, separate additional reagents for pretreatment or separation of test sample or admixing into the fluid-receiving device for clarification of the signal.

Best mode

5 Preferred modes by which the method according to the present invention is performed are described in examples 12, 13, 14 and 17.

The following examples are presented to illustrate preferred embodiments of the present invention and shall not in any way restrict the invention.

Example 1: Blue latex particles coated with monoclonal anti-human myoglobin antibodies.

10 Wash and dialyse 60 mg Estapor blue carboxylated microspheres PSI 90-21 Batch 766, diameter 0,117 μm ; +/- 0.017 μm ; COOH = 164 μeq /gram against water and suspend in 2 ml water. Dialyse 5 mg monoclonal anti human myoglobin antibodies clone 7005 from Medix Biochemica Oy, Finland, in 3 ml 10 mM phosphate 15 mM NaCl buffer pH = 7.2. Mix the microsphere suspension with 10 ml of a 10 mM
15 phosphate 15 mM sodium chloride buffer pH = 7.2. Dissolve 2 mg 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, supplied by Sigma Corp., U.S, in 2 ml chilled 0.25 ml of 10 mM phosphate 15 mM NaCl buffer pH= 6.0. Under vigorous mixing, mix 300 μl of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide solution with the above described buffered microsphere suspension. Immediately thereafter, under
20 vigorous mixing, admix the 5 ml solution of 5 mg monoclonal antibodies.

Keep the suspension agitating over night, and then admix 5 ml of a 0.02 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum under agitation. Wash the microspheres three times by
25 20 minutes centrifugation at 40000 g in a 0.05 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum, and re-suspend in 0.02 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum to a 2 w/v % microsphere concentration wanted. Use slight sonication to disperse the microspheres.

30 The concentrations of the different reagents may need some adjustments dependant on (1) the extent of carboxylation of the microspheres, (2) the concentration of antibodies wanted on the surface of the microspheres, and (3) the scale of the conjugation.

35 Larger volumes often need higher concentration of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, and Merck in their Technical note «B4 coupling on NH₂ or COOH particles»(Estapor Particle technical note 2000), in fact recommend a higher concentration of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide,

which according to the inventor's experience leads to some over-conjugation and dimerisation of the microspheres. However, such over-conjugation may be compensated by having the microspheres suspended in a bigger volume, which in turn leads to higher consumption of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. Other companies supplying coloured functionalised microspheres, like Bangs Laboratories Inc., U.S., have their own protocols that can be used for this purpose.

Dependant on the concentration of the analyte to be measured, smaller particles with high binding capacity per weight unit may be preferred, or larger microspheres with less binding capacity may be preferred in other circumstances. However, the size must be significantly lower than the pore size of the fluid receiving device to obtain free migration in the fluid receiving device.

The effectiveness of the coating with antibodies is dependant of the pI of the antibody in use. A good rule of the thumb is to use a pH of the buffer 0.5 to 0.8 pH units higher than the pI of the monoclonal antibody in use, but this is not an absolute limitation.

For different embodiments of this invention, different amounts of antibodies on the surface of the microspheres are needed. To some extent this can be done by regulating the concentration of antibodies and microspheres during the conjugation. Furthermore, the monoclonal antibodies can be diluted with non-specific antibodies or even other proteins during the conjugations. E.g. egg albumin or bovine gamma globulins may be used for such dilution. However, attention should be paid to the fact that too much gammaglobulin or antibodies of the surface make the microspheres sticky and they may not migrate efficiently in the fluid receiving device (see below).

Before a lot of antibody-conjugated microspheres is taken into use, check that the microspheres migrate freely in the fluid receiving device, and bind to antigens immobilised on the fluid receiving device.

Example 2: Blue latex coated with theophylline analogue antigen.

Make a conjugate between 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine and bovine serum albumin according to C.E.Cook & al. in Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 13, page 497-505, 1976. A lenient conjugation should be employed. The extent of conjugation can be regulated by regulating the reactants including the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and the 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine concentration and monitored by spectroscopy methods well known in the prior art. By so doing, a degree of conjugation of 3 moles 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine per mol of bovine serum albumin was obtained. Alternatively, the product Theophylline--8-

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

23

bovine serum albumin supplied from Immune System Limited, UK may be used, although less optimal.

5 Conjugate Estapor blue carboxylated microspheres PSI 90-21 to anti-bovine albumin monoclonal antibody supplied by Chemicon Inc., California, using the method described in example 1. Dissolve the conjugate between 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine and bovine serum albumin in the assay solution described in example 4, at a concentration of 0.1 mg/ml of the conjugate and 2 mg particles per ml. Leave the suspension to stand for 10 minutes, thereafter washed three times in assay solution with 0.25 % v/v mouse normal serum by centrifugation at 30.000 g, and suspend thereafter in assay buffer by gentle sonication.

10 An even better alternative is the use of a direct binding of the 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine bovine serum albumin conjugate to the blue latex using the coupling method described in example 1. However, to assure that not all amine groups are blocked in the bovine serum albumin and that the isoelectric point of the bovine serum albumin is not lowered too much, thus preventing a poor coupling efficiency, a low degree of conjugation of 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine to the bovine serum albumin on beforehand is necessary.

15 Before a lot of protein coated microspheres is taken into use, one ought to check that the microspheres migrate freely in the fluid receiving device, and bind to antigens immobilised on the porous material in the fluid receiving device, see example 8.

Example 3: Blue latex coated with streptavidin and biotinylated with monoclonal or polyclonal antibodies.

25 Wash and dialyse a suspension of Estapor blue carboxylated latex microspheres from Merck Eurolab, Product number K1010, mean diameter 185 nm, to contain 10 mM phosphate buffer pH= 6.0 with 15 mM NaCl and 3.5 vol. % particles. Dialyse 5 mg streptavidin (Sigma) against the same buffer solution.

30 Dissolve 2 mg 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide in chilled 0.25 ml of said 10 mM phosphate buffer pH= 6.0 with 15 mM NaCl, and add immediately 40 µl to 1.5 ml of said particles suspension under mixing, and thereafter 6 ml of said buffer solution and in addition comprising 2 mg streptavidin is admixed. Agitate the suspension at room temperature for 2 hours, and then keep the suspension agitating over night. Thereafter, admix 5 ml of a 0.02 M glycine, 0.01 M phosphate, 0.3 M NaCl, 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum under agitation.

35 Wash the microspheres three times by 20 minutes centrifugation at 40.000 g in 0.02 M glycine, 0.01 M phosphate, 0.3 M NaCl, 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma)

buffer with 0.5 % normal mouse serum, and re-suspend the microspheres in 0.02 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum to the microsphere concentration wanted. Use slight sonication to disperse the microspheres.

- 5 The concentrations of the different reagents may need some adjustments dependant on (1) the extent of carboxylation of the microspheres, (2) the concentration of antibodies wanted on the surface of the microspheres, and (3) the scale of the conjugation.

- 10 Larger volumes often need higher concentration of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. In fact, Merck in their Technical note «B4 coupling on NH₂ or COOH particles» (Estapor Particle technical note 2000), recommend a higher concentration of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. According to the inventor's experience, this may lead to some over-conjugation and dimerisation of the microspheres, which, however, may be compensated by having
- 15 the microspheres suspended in a bigger volume. This may in turn lead to higher consumption of the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. Other companies supplying coloured functionalised microspheres, like Bangs Laboratories Inc., U.S., have their own protocols that may be used for such purposes.

- 20 Dependant of the concentration of the analyte to be measured, smaller particles with high binding capacity per weight unit may be preferred, or larger microspheres with less binding capacity may be preferred in other circumstances. However, the size must be significantly lower than the pore size of the fluid receiving device to obtain free migration in the fluid receiving device.

- 25 Since avidin is less hydrophilic than avidin, avidin is often preferred over streptavidin. The conjugation is very much the same; however, a higher pH is chosen because avidin has a much higher pI. A 0.1 M borate buffer pH = 9.0 can then be used as a coupling buffer, however the 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide will then be hydrolysed very rapidly, and some better cooling and higher concentration will often be necessary.

- 30 Further, to biotinylate the antibody wanted, dialyse 5 mg monoclonal antibody in 1 ml solution against 0.15 M sodium chloride 0.1 M phosphate buffer pH = 7.2.

- 35 Dissolve 2 mg sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate from Pierce Chemical Company in 10 ml of cold distilled water, 2-8 °C, and add 100 µl of the resulting sulfo-NHS-biotin solution to the 1 ml antibody solution, while Vortex-mixing. Place the tube in a refrigerator for 2 hours. Separate the antibodies with biotin coupled from free biotin by size exclusion chromatography on a 30 cm Superose 6 column (Amersham Pharmacia Biotech, UK) using a 0.1 M phosphate 0.15 M sodium chloride buffer at pH = 7.2 as eluant. Collect the protein fraction eluted in front of

the free biotin fraction, using a UV monitoring unit. Alternatively, dialyse against the same buffer solution using a dialysing membrane with a exclusion size of 7000 Dalton, e.g. the cassette Slide-A-Lyzer from Pierce Chemical Company.

5 The biotin incorporation in the antibody can be monitored by the use of the method taught by N. M. Green in *Biochem J.* 94, 23c-24c, 1965. The above described procedure yielded 0.2 moles of biotin per mole of antibody.

10 The antibody in use can be of mouse, sheep, hen egg, sheep, goat, human origin or from another species, and can be of monoclonal or polyclonal origin. Mostly monoclonal antibodies are preferred, since polyclonal antibodies have a tendency to aggregate when antigens are present, but if concentrations are adjusted, also polyclonal antibodies can be used. Also immuno-active fragments of antibodies can be used, so also peptides and aptamers and other binding substances with the wanted binding specificity, but the biotinylation chemistry must then be modified.

15 The number of biotin moieties per molecules of antibody must be substantially lower than 1 in average, since more than 1 biotin moiety in an antibody molecule will aggregate the microspheres even without presence of antigens. Furthermore, if lower fraction of active antibodies are wanted, the specific antibodies can be diluted by non-specific antibodies or even other proteins prior to the biotinylation (however, then calculation of degree of biotinylation becomes more difficult).

20 Mix the biotinylated antibodies to the avidin or streptavidin coated microspheres to obtain microspheres with specific antibodies attached. The amount of antibodies bound to the microspheres can be adjusted dependent on how much biotinylated antibodies added. By adding an excess of biotinylated antibody, it is possible to measure (after separation by centrifugation) the free biotinylated antibodies in the solution not bound to the microspheres, using the method taught by N. M. Green in *Biochem J.* 94, 23c-24c, 1965.

25

30 Then wash the microspheres three times by 20 minutes centrifugation at 40000 g in 0.02 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum, and re-suspend in 0.02 M glycine 0.01 M phosphate 0.3 M NaCl 0.1 % Tween 20 (supplied from Sigma) buffer with 0.5 % normal mouse serum to the microsphere concentration wanted. Use slight sonication to disperse the microspheres.

35 The streptavidin or avidin coating is less favourable than direct antibody binding to the microspheres, since presence of some double-biotinylated antibodies may cause aggregation of particles.

Before a lot of microspheres are taken into use, one ought to check that the microspheres migrate freely in the fluid receiving device, and bind to antigens immobilised on the fluid receiving device.

Example 4: Gold colloid coated with anti-human albumin antibodies.

Mix for 20 minutes 10 ml of 1 % gold chloride in distilled water with 1 l of boiling distilled water, 10 ml of 34 mM sodium citrate, pH adjusted to pH = 4.2. Colloidal gold is formed. Allow the suspension to cool to room temperature. Add and mix 1 ml of 1 % PEG 20,000, and adjust pH to pH = 7.2. The size of the gold colloid particles is measured using a conventional technique, e.g. by measurement of the ratio of optical density of 540 nm and 600 nm. The method may be adjusted to obtain mean particle size between 30 and 50 nm. Glassware to be used must be siliconized. Label the gold colloid particles with monoclonal anti human albumin antibodies clone 6501 from Medix Biochemical OY, Finland, using the method described by Slot and Geuze in Eur. J. Cell. Biol. 38: 87-93, 1985, to the saturation point according the same method. Then, typically, but not limited to, the labelled gold colloids are suspended at a protein concentration of 10 ug/ml in a 10 mM HEPES buffer solution at pH = 7.4, comprising 0.3 M mannitol, 0.05 % PEG 20000.

Other antibodies can be used in the place of the said anti-albumin antibodies, but slight alterations of the procedure may be necessary.

Before a preparation of coated colloid particles is taken into use, one ought to check that the colloids migrate freely in the fluid receiving device, and bind to antigens immobilised on the fluid receiving device

Example 5: Florescent Cyanin-5-theophyllin conjugate.

Make a synthesis of 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin anhydride as described in Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, vol. 13, p. 497-505, 1976, and in Clinical Chemistry. vol. 27, page 22-226, 1981. Dissolve diaminopropanol in water-free tetrahydrofuran. In another flask, dissolve half of the equimolar amount of the said 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin anhydride in water-free tetrahydrofuran. Add the said 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin anhydride solution drop-wise to the diaminopropanol solution while stirring, and let the resulting solution react over night at room temperature. Optionally purify the resulting adduct by HPLC chromatography using conventional techniques well known to the skilled man of the art, if less consumption of activated cyanine dye is wanted (see below).

Thereafter, dissolve 6 times the molar amount which was used for diaminopropanol, of Cy5 Fluorolink activated cyanin dye supplied from Amersham Pharmacia Biotech, U.K., in water-free tetrahydrofuran, and add it to the previously described solution while stirring. Leave the resulting mixture to react over night at room temperature in darkness. In this way, a stock solution of non-pure 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink activated cyanin dye with a water-soluble diaminopropanol spacer is obtained. Purify the resulting 8-(3-

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

27

carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink activated cyanin dye with a water-soluble diaminoopropanol spacer by means of thin layer chromatography in silica gel using n-butanol: acetic acid:water in a 1:1:1 mixture, however adjust the volumes of n-butanol, acetic acid and water in the elution mixture depending on the quality of the silica gel plates to obtain good separation. After elution by conventional technique, dry the silica gel plate and inspect visually and by UV lamp (and optionally using ninhydrin spray in parallel experiments) to identify the spot of 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink spot. Isolate the silica gel 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink by scissors or spatula. Suspend the isolated silica gel in 50 % v/v acetic acid whereby 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink is eluted into the solution. The silica gel settles in the bottom of the tube. Decant off the acetic acid solution with the purified 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthin adduct with Cy5 Fluorolink, and remove the acetic acid by evaporation under low atmospheric pressure. Alternatively, and for up-scaling, conventional HPLC separation techniques well known to the skilled man of the art may be used in stead of thin layer chromatography.

Example 6: Assay solution.

An example of an assay buffer is to make a 0.1 M aqueous phosphate buffer, add sodium chloride to 0.3 M concentration, furthermore add the detergent Triton X-100 (Supplied from Sigma, U.S.) to a final concentration of 0.1 %, and adjust the pH to pH = 7.4 using hydrochloric acid or sodium hydroxide in conventional manner. Signal forming particles according to any of the examples 1 to 3 is then added, typically but not limited to from 0.01 to 1.0 % v/w of latex particles, or colloidal gold at a concentration of 1 - 25 ug immunoglobulin labelled to the colloid per ml solution. 0.25 % of normal serum from one of the species from which the antibodies in use are derived, are added to the solution. 0.1 % w/v bovine gammaglobulin can be used in stead of mouse serum, unless it interferes with the assay, as described in example 8.

Example 7: Container for signal-providing substances and a liquid - transmitting device containing a liquid-transmitting material to be introduced into the said container.

As illustrated in figure 2 one embodiment of the said device may comprise a stopper 6 with a built-in capillary 7, such as e.g. a capillary holding 5µl fluid, a sealing sleeve 8, a liquid proof container 9, a ball 10 sealing the port in the bottom of the container 9 wherein the ball is housed in a valve seat 11 which is formed to receive a wick or felt tip guide 12 in a sealing connection. The wick or felt tip 13 in a sealing and sliding connection in the wick or felt tip guide 12, and the tip is protected by a cap 14. All parts of the device is produced by suitable materials such

- as e.g. plastic, except the wick or felt tip which is made of a fluid-transmitting material. The container 9 is filled with a reagent 15 as illustrated in figure 3. The sample of a biological fluid, such as e.g. blood is filled in the capillary 7, heparinized or not, which in this embodiment holds 5 μ l, but which may be
- 5 constructed to hold other volumes, the stopper 6 pressed down into the container 9, and the test sample and reagent 15 are mixed by moving the container 9. The volume of the test sample is adapted to the volume of the reagent in the container 9. The present invention further comprises an embodiment wherein the test sample is filled in a capillary, heparinized or not, which thereafter is placed in the container 9.
- 10 After closing the container with the stopper 6 the test sample is mixed with the reagent by moving the container adequately, and the contact with the test sample-reagent mixture and the fluid receiving material 17 through the fluid-receiving device is provided either by;
- 15 simultaneously bringing the fluid-transmitting material in contact with the said mixture and the fluid-receiving material,
- bringing the fluid transmitting material first in contact with the said mixture, then in contact with the fluid receiving material,
- bringing the fluid-transmitting material first in contact with the fluid-receiving material, then in contact with the said mixture.
- 20 **Example 8: HiFlow nitro-cellulose filter material coated with anti-theophylline antibodies.**
- Isolate the IgG fraction of sheep anti-theophylline serum from Immune System Limited, U.K., by conventional techniques well known to the skilled man of the art, e.g. by ammonium sulphate precipitation or by the use of a Protein A column from
- 25 Amersham Pharmacia Biotech. Thereafter dialyse the antibodies in 10 mM phosphate 15 mM NaCl, buffer pH = 7.2, and thereafter dissolve the antibodies in a 10 mM ammonium acetate solution with 2.5 % v/v ethanol. If low binding capacity is wanted, other proteins like albumin or casein can be added in addition, which will compete with the specific antibodies in the subsequent adsorption process.
- 30 The said solution is either sprayed on the Hi-Flow material or the sheets are soaked in the said solution. Thereafter, dry the sheets at 37 °C for two hours. Further, wash the sheets by soaking and agitation at room temperature in a 10 mM ammonium acetate solution with 2.5 % v/v ethanol with 0.01 % w/v of 3-(3-(cholamidopropyl)dimethylammonio-2-hydroxy-1-propane sulfonate (from Pierce Chemical
- 35 Company, U.S.)
- The concentration of the specific antibody varies according to the needed binding capacity in the said porous material. To determine the concentration necessary in

this example, a serum sample 10 μ l comprising 50 ng of theophylline is mixed with 2 ml of the assay solution of example 4 comprising a 0.1 % suspension (2 mg microspheres) of the blue latex microspheres described in example 2.

- 5 The appropriate concentration of the antibodies in the Hi-Flow Plus HF12004 is determined as follows: Allow the said mixture to migrate into the porous material to be used in the fluid receiving device. The theophylline present in solution reacts much faster with the antibodies immobilised in the porous material than the conjugates on the microspheres, and blocks the binding of the blue microspheres in the filter material. High concentration of specific antibodies immobilised on the porous
- 10 material lead to rapid binding of free theophylline in solution in smaller areas, while low concentrations lead to larger areas are needed for binding of the faster reacting free theophylline in the solution areas; with reference to fig. 4, the area (18) is smaller when high concentration of antibody is immobilised, and larger when low concentration of antibody is immobilised. When the assay solution has been
- 15 depleted from free theophylline in solution in the migration process, the blue microspheres, with 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine conjugate with bovine serum albumin bound to the blue microspheres, start to react with the immobilised monoclonal anti-theophylline antibodies which have not been blocked with free theophylline; with reference to fig. 4 in area (17) outside (18). In other
- 20 words, a darker blue ring (17) is produced outside the inner whiter area (18). Adjust the concentration of specific antibodies to obtain a binding capacity of free theophylline in the porous HiFlow material size of the area wanted for a specific concentration of the analyte. In this example it was found appropriate to immobilise
- 25 25 - 50 μ g antibody per square cm of material. (The binding capacity for the Hi-Flow Plus HF12004 after immobilisation of antibodies can be determined by conventional methods found in the literature, e.g. using radio-labelled antigens or enzyme-linked antigens in combination with competing known standard solutions of antigen). If very high binding capacity is wanted, the use of monoclonal antibodies from Immun System Ltd., U.K., is recommended.
- 30 Alternatively, other porous materials may be used, e.g. the Predator PREDL3R filter material from Pall Gelman, U.K., that are able to bind binding proteins at a high concentration and chemical activity, and with a pore size that allows a free migration of the signal carrying antibody conjugates, e.g. coloured latex particles or gold colloid particles.
- 35 Most such porous materials need some wetting agents to perform well, but the detergents like CHAPSO may often be omitted, or other detergents may be used, although in low concentrations. Also, the effect on the antibodies ability to bind must be checked, using techniques well-known to the person skilled in the art.

Example 9: Porous material to be used in a fluid receiving device for quantitation of myoglobin.

Slit Hi-Flow Plus HF12004 supplied from Millipore into sheets of suitable size.

5 Dissolve monoclonal mouse anti-myoglobin antibodies clone 7004 supplied from Medix Biochemica OY, Finland, in a 10 mM ammonium acetate solution with 2.5 % vol./vol. ethanol. If low binding capacity is wanted, other proteins like albumin or casein can be added in addition, which will compete with the antibodies in the subsequent adsorption process. Said solution is either sprayed on the Hi-Flow material or the sheets are soaked in the said solution. Then, dry the sheets at 37 °C
10 for two hours. The sheets are thereafter washed by soaking and agitation at room temperature in 10 mM ammonium acetate solution with 2.5 % vol./vol. ethanol with 0.01 % w/v of 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-2-hydroxy-propane sulfonate (from Pierce Chemical Company, U.S.)

15 The concentration of the specific antibody varies according to the needed binding capacity in the said porous material. If low binding capacity is wanted, other proteins like albumin or casein can be added in addition, which will compete with the antibodies in the subsequent adsorption process. In this example, a normal serum sample of 10 µl comprising 10 ng of myoglobin is mixed with 2 ml of the assay solution of example 4 comprising a 0.1 % suspension (2 mg microspheres) of
20 the blue latex microspheres with monoclonal anti-myoglobin described in example 1, with a total binding capacity of myoglobin higher than 10 ng (i.e. much higher binding capacity is employed. The binding capacity for the particles in the assay reagents can be determined by conventional methods found in the literature, e.g. using radio-labelled antigens and measure the binding capacity after isolation of the
25 particles, or by e.g. equilibrium dialysis.)

Determine the appropriate concentration of anti human myoglobin antibodies for immobilisation in the porous material as follows: Allow the said mixture to migrate into the porous material to be used in the fluid receiving device. High concentration of specific antibodies immobilised on the porous material lead to trapping of the
30 coloured particles in small areas, while low concentrations lead to larger areas of trapping of corresponding particle solution. Adjust the concentration of specific antibodies to obtain the binding capacity leading to a size of the area wanted for a specific concentration of the analyte.

35 Alternatively, other porous materials may be used, e.g. the Predator PREDL3R filter material from Pall Gelman, U.K., that are able to bind binding proteins at a high concentration and chemical activity, and with a pore size that allows a free migration of the signal carrying antibody conjugates, e.g. coloured latex particles or gold colloid particles.

Most such porous materials need some wetting agents to perform well, but the detergents like CHAPSO may often be omitted, or other detergents may be used, although in low concentrations. Also, the effect on the antibodies ability to bind must be checked, using techniques well-known to the person skilled in the art.

5 **Example 10: Porous material to be used in a fluid receiving device for quantitation of urine albumin.**

Slit Hi-Flow Plus HF12004 supplied from Millipore into sheets of suitable size.

10 Immobilise monoclonal mouse anti- human albumin antibodies clone 6502 supplied from Medix Biochemica OY, Finland, on Hi-Flow Plus HF12004 using the method described in example 9.

15 The concentration of the specific antibody varies according to the needed binding capacity in the said porous material. If low binding capacity is wanted, other proteins like casein can be added in addition, which will compete with the antibodies in the subsequent adsorption process. In this example, a normal serum sample of 10 μ l comprising 0.02 micrograms of human albumin is mixed with 2 ml of the assay solution of the gold colloid particles described in example 4, a protein concentration of 10 μ g/ml in a 10 mM HEPES buffer solution at pH = 7.1, comprising 0.3 M mannitol, 0.05 % PEG 20000. The appropriate concentration of monoclonal anti-albumin antibodies from clone 6502 immobilised in the Hi-Flow Plus HF12004 is determined as follows: Allow the said mixture to migrate into the porous material to be used in the fluid receiving device. High concentration of specific antibodies immobilised on the porous material lead to trapping of the coloured particles in small areas, while low concentrations lead to larger areas of trapping of corresponding particle solution. Adjust the concentration of specific antibodies to obtain the binding capacity leading to a size of the area wanted for a specific concentration of the analyte.

25 Alternatively, other porous materials may be used, e.g. the Predator PREDL3R filter material from Pall Gelman, U.K., that are able to bind binding proteins at a high concentration and chemical activity, and with a pore size that allows a free migration of the signal carrying antibody conjugates, e.g. coloured latex particles or gold colloid particles.

30 Most such porous materials need some wetting agents to perform well, but the detergents like CHAPSO may often be omitted, or other detergents may be used, although in low concentrations. Also, the effect on the antibodies ability to bind must be checked, using techniques well-known for the person skilled in the art. Detergents effects on gold colloids are especially undesirable, so washing in a detergent-free corresponding buffer after applying the detergent is then performed.

Example 11: A liquid receiving device.

As illustrated in figure 4 one embodiment of the fluid-receiving device may comprise a circular tray 16 made of suitable materials such as e.g. plastic, wherein the fluid-receiving material 17 is located. The grey area 18 illustrates the pattern appeared as a result of the signal providing substances' dissemination in the porous material 17. In one embodiment of the present invention the tray 16 may comprise a circular chip, made of clear plastic, with a diameter of 3 cm, however other measures are within the idea of the invention. The tray is equipped with a cavity or hole in the center for placing the fluid-transmitting device. Furthermore calibration lines, circles or any other form suited to the form of the fluid-receiving tray 16, may be printed on the tray. The fluid receiving material 17, e.g. impregnated with immobilized antibodies as described above, is mounted in the tray. The pattern exhibited on the fluid receiving-material will depend on the type of analysis performed. In one embodiment the complex of the antigen in the test sample and the antibody-coloured particle in the said reagent pattern will provide a sandwich complex consisting of antigen-antibody-particle-immobilized antibody on the fluid-receiving material with the form e.g. exhibited in figure 4.

In another embodiment which constitutes a competitive assay, wherein the said reagent contains antigens connected to coloured particles there will be a competitive binding on the fluid-receiving material between the free antigens in the test sample and the antigen-coloured particle complex. Due to the larger molecular weight of the last complex the binding to the immobilized antibody occurs later and will exhibit a circular band outside the circular band depicting the complex of free antigens and immobilized antibody (not illustrated).

In the last embodiment, such as described in example 17, which also constitutes a competitive assay, the antigens in said reagent is connected to fluorescent moieties and the complex has a molecular weight similar to the free antigen in the test sample. In the resulting competitive binding on the fluid-receiving material there will be no size induced delay in the binding of the antigen-fluorescent particle to the immobilized antibodies and the pattern formed is similar to that formed in the said first embodiment.

Example 12: Quantitation of theophylline in whole blood.

5 μ l of blood is sucked into the Heparin-treated capillary channel at the top of reagent container according to example 11. Push down the capillary part, and the content of the capillary is by gently shaking mixed with the reagent in the reagent container comprising 1 ml of the assay solution of example 6 comprising a 0.1 % suspension (1 mg microspheres) of the blue latex microspheres described in example 2 and 0.25 % v/v normal mouse serum. In this step the theophylline reacts with the antibodies present in excess on the blue latex, and the red blood cells are

lysed by triton, and most other particles of blood are also dissolved or dispersed by the Triton X-100.

5 In some embodiments of the invention the suspension is allowed to stand to react for 1 to 5 minutes (especially if the analyte to be measured is in a very low concentration). However, in most embodiments, including the present example, the binding is close to complete during the time of the shaking.

10 Introduce thereafter the fluid transferring device described in example 7 above into the reagent container comprising the blood sample/reagent mixture. Place the fluid transferring device's other end in the centre of the fluid receiving device described in example 11 above, with filter material with immobilised anti theophylline antibodies described in example 8 above. Allow the sample/ reagent mixture to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. The theophylline present in the solution reacts much faster with the antibodies immobilised in the porous material than the conjugates on the microspheres, and compete efficiently with the binding of the blue microspheres in the filter material. When the assay solution has been depleted from free theophylline in solution in the migration process, the blue microspheres, with 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine conjugate with bovine serum albumin bound to the blue microspheres, bind without the said competition with the immobilised monoclonal anti-theophylline antibodies, and produces a darker blue ring outside the inner less dense area. When the porous filter material in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of liquid through the fluid transferring device stops automatically.

15 Inspect the size of the less dense area inside the ring of the blue latex particles formed in the fluid receiving device, and compare to the indicators printed on the surface of the fluid receiving device. To establish a calibrated reliable quantitative method in the wanted concentration range of theophyllin in whole blood, the use of calibrators of human whole blood with known concentrations of human theophylline is preferred. Select the microspheres concentration in the assay solution necessary and the conditions necessary to obtain the size of the circles formed by the blue latex particles wanted to be appropriate for inspection, and to assign appropriate concentration values to the indicators printed on the surface of the said fluid receiving device.

Example 13: Quantitation of myoglobin in human whole blood.

35 10 μ l of blood is sucked into the Heparin-treated capillary channel, fig. 2,7, at the top of reagent container according to example 11. Push the capillary part down, and the content of the capillary is by gently shaking mixed with the reagent in the reagent, fig. 3A 15, container comprising 1 ml of the assay solution of example 6 comprising a 0.1 % suspension (1 mg microspheres) of the blue latex microspheres with monoclonal anti-myoglobin described in example 1 and 0.25 % v/v normal

5 mouse serum. In this step the myoglobin reacts with the antibodies present in excess on the blue latex, and the red blood cells are lysed by triton, and most other particles of blood are also dissolved or dispersed by the Triton X-100. In some
10 embodiments of the invention the suspension is allowed to stand to react for 1 to 5 minutes (especially if the analyte to be measured is in a very low concentration).
15 However, in most embodiments, including the present example, the binding is close to complete during the time of the shaking.

10 Thereafter, introduce the fluid transferring device described in example 7 above as in fig. 3D-E, into the reagent container comprising the blood sample/reagent mixture as in fig. 3B-C. Then, place the other end of the fluid transferring device in the
15 centre of the fluid receiving device described in example 11 above and fig. 4, with filter material with immobilised anti human myoglobin antibodies described in example 9 above. Allow the sample/reagent mixture to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. When the porous filter material
15 in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of liquid through the fluid transferring device stops automatically.

20 Inspect the size of the ring of the blue latex particles (fig.4, 18) formed in the fluid receiving device, and compare the size to the indicators printed on the surface of the fluid receiving device. To establish a calibrated reliable quantitative method in the
20 wanted concentration range of human myoglobin in whole blood, the use of calibrators of human whole blood with added known concentrations of human myoglobin is preferred. Select the microsphere concentration in the assay solution necessary
25 and the conditions necessary to obtain the size of the circles formed by the blue latex particles wanted to be appropriate for inspection, and assign appropriate concentration values to the indicators printed on the surface of the said fluid receiving device.

Example 14: Quantitation of albumin in urine.

30 Seal 1 ml of the anti human albumin antibody coated gold colloid particles from example 4 in 10 mM HEPES buffer solution at pH = 7.4, comprising 0.3 M mannitol, 0.05 % PEG 20000, into the container described in example 7 above and
30 in fig. 2,9.

35 Draw a 10 µl urine sample (or a less preferred a diluted urine sample) from a patient suffering from diabetic renal disease into the self-calibrating capillary sampling device described in example 7 above and fig. 2, 7, and introduce said sample into
35 the reagent container comprising said anti human albumin antibody coated gold colloid particles suspension as in fig. 3B-C. Said container is shaken and allowed to stand for 2 minutes to let the gold colloids bind to the albumin present in the sample.

5 Introduce thereafter the fluid transferring device described in example 7 above into the reagent container comprising the urine sample/reagent mixture; see fig. 3D-E. Place the fluid transferring device's other end in the centre of the filter material with immobilised anti human albumin antibodies described in example 10 above,

10 mounted in the holder to become the fluid receiving device described in example 11 above. Allow the sample/reagent mixture to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. When the porous filter material in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of liquid through the fluid transferring device stops.

15 To establish a calibrated reliable quantitative method in the wanted concentration range of human albumin in urine, the appropriate binding capacity of the immobilised anti human albumin antibodies in the porous material described in example 10 above must be selected. The expected concentration of albumin in urine is very different in different patient groups, so a calibration for the intended patient group is necessary. This example functions well in concentrations varying from 0 to 200 mg per litre urine, and even concentrations up to 500 mg/ml can be measured well.

20 If the concentration of albumin is very high, the binding capacity of the gold colloids are saturated, and a much paler area in the centre of the fluid receiving device are seen, where free albumin not bound to gold colloids bind first to the immobilised monoclonal antibodies in the fluid receiving material. By the use of

25 calibrators of human urine with known concentrations of human albumin, the skilled person of the art can select the conditions necessary to obtain an outer diameter of the circles formed by the gold colloid particles wanted, the intensity of the colour to be appropriate for inspection, and to assign appropriate concentration values to the indicators printed on the surface of the said fluid receiving device.

30 If a product is intended for patients with very high albumin concentrations in urine, the size of the capillary urine sampler should be reduced, e.g. to 2 µl, and the concentration of the anti human albumin antibodies coated gold colloid particles should be increased.

Example 15: Measurement of anti- thyroid peroxidase antibodies in a sample of whole blood.

35 Anti- human thyroid monoclonal antibodies are purchased from HyTest, U.K., and conjugated to carboxylated blue latex according to the method of example 1.

Human thyroid peroxidase enzymes in a proteinaceous solution is bought from The Binding Site Ltd., U.K, and coated on HI-Flow Plus HF12004 from Millipore,

5 according to the method of example 9. Although this material contains carrier protein and significant amounts of serum albumin, this material behaves well for coating thyroid peroxidase enzymes. If higher concentrations of immobilised thyroid peroxidase in the porous material is wanted, remove the serum albumin from the product from HyTest by immunochromatography according to methods well known in the prior art.

10 10 µl of blood is sucked into the Heparin-treated capillary channel at the top of reagent container according to example 7. Push the capillary part down, and the content of the capillary is by gently shaking mixed with the reagent in the reagent container comprising 1 ml of the assay solution of example 6 comprising a 0.1 % suspension (1 mg microspheres) of the blue latex microspheres with monoclonal anti-thyroid peroxidase described above and 0.25 % v/v normal mouse serum. In this step, anti-thyroid peroxidase antibodies from the patients sample reacts with the antibodies present in excess on the blue latex, and the red blood cells are lysed by triton, and most other particles of blood are also dissolved or dispersed by the Triton X-100. Allow the suspension to stand to react for 3 minutes.

15 Introduce thereafter the fluid transferring device described in example 7 above into the reagent container comprising the blood sample/reagent mixture. Then, place the other end of the fluid transferring device in the centre of the fluid receiving device described in example 11 above, with filter material with immobilised human thyroid peroxidase. The sample/reagent mixture is allowed to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. When the porous filter material in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of liquid through the fluid transferring device stops automatically.

20 Inspect the size of the ring of the blue latex particles formed in the fluid receiving device, and compare it to the indicators printed on the surface of the fluid receiving device. To establish a calibrated reliable quantitative method in the wanted concentration range of anti-thyroid antibodies in whole blood, the use of calibrators of human whole blood with known concentrations of anti-thyroid peroxidase antibodies is preferred. Select the thyroid peroxidase antigen concentration necessary in the porous fluid receiving material for the clinical group of patients to be measured, and assign the appropriate concentration values to the indicators printed on the surface of the said fluid receiving device using the calibrator of known content of anti-thyroid peroxidase antibodies.

35 **Example 16: Measurement by means of imaging or scanning equipment.**

On the surface of the fluid receiving device described in example 11 for use of in example 12,13,14 and 15, it can be printed calibrating indicators to visually read the content of the analyte in question. To obtain both more exact quantitation and better documentation of the result of the assay, the fluid receiving device is scanned

or depicted. In its simplest form, place the device on a flatbed scanner connected to a personal computer. In a more sophisticated form, depict the device by means of a digital camera or a scanner, or a fluorescence scanner. Mostly two-dimensional scanners have been used, but the use of a linear scanner is also possible to measure e.g. diameters of round spots or length of a rectangular migration path. A detailed description of such scanners, cameras and software for measurements of the fluid receiving device is given in patent application PCT/GB98/00120 by Bremnes and Sundrehagen.

Example 17: Fluorescent measurement of theophylline concentration in whole blood.

5 μ l of blood is sucked into the Heparin-treated capillary channel at the top of reagent container according to example 11. Push the capillary part down, and gently shake the content of the capillary to be mixed with the reagent in the reagent container comprising 1 ml of the assay solution of example 6 comprising
15 fluorescent Cyanin-5-theophyllin conjugate described in example 5. and 0.25 % v/v normal mouse serum.

Then, introduce the fluid transferring device described in example 7 above into the reagent container comprising the blood sample/reagent mixture. Then, place the fluid transferring device's other end in the centre of the fluid receiving device described in example 11 above, with filter material with immobilised anti-theophylline antibodies described in example 8 above. The sample/reagent mixture is allowed to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. The theophylline, present in solution, competes with the binding of fluorescent theophylline conjugate in the filter material. When the porous filter material in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of
20 liquid through the fluid transferring device stops automatically.

The theophylline from the blood sample and the fluorescent conjugate of theophylline is bound in the fluid receiving device (see fig. 4, (18)) with an area proportional to the sample's concentration of theophylline. The fluid receiving device is scanned with a fluorescence scanner with excitation wavelength of 648 nm, and measure the fluorescence of the cyanine-5 on the surface of the fluid receiving device. By software computing according to Bremnes and Sundrehagen PCT/GB98/00120, the area of the fluorescence is depicted and measured. To establish a calibrated reliable quantitative method in the wanted concentration range of human transferrin in
30 whole blood, use calibrators of human whole blood with known concentrations of human theophylline. The amount of Cyanin-5- theophylline conjugate in the reagent container must be adjusted to the sensitivity of the fluorescence scanner.

Example 18: Fluorescent measurements of theophylline concentration in whole blood using fluorescent microspheres.

Carboxylated microspheres prod. no. PC04N dyed with Cyanin-5 fluorescent dye is bought from Bangs Laboratories Inc., U.S., and coated with theophylline analogue antigen according to example 2.

5 $5 \mu\text{l}$ of blood is sucked into the heparin-treated capillary channel at the top of reagent container according to example 11. Push down the heparinized capillary part, and the content of the capillary is by gently shaking mixed with the reagent in the reagent container comprising 1 ml of the assay solution of example 6 and 0.25 % normal mouse serum and comprising theophylline coated microspheres according to example 2, except that the above said Cyanin-5-dyed microspheres from Bangs Laboratories are used in the place of the Estapor blue microspheres of example 2.

10 Introduce thereafter the fluid transferring device described in example 7 above into the reagent container comprising the blood sample/reagent mixture. Place the fluid transferring device's other end in the centre of the fluid receiving device described in example 11 above, with filter material with immobilised anti theophylline antibodies described in example 8 above. The sample/reagent mixture is allowed to flow through the fluid transferring device into the said fluid receiving device. The theophylline present in solution reacts much faster with the antibodies immobilised in the porous material than the conjugates on the microspheres, and compete efficiently with the binding of the blue microspheres in the filter material. When the assay solution has been depleted from free theophylline in solution in the migration process, the blue microspheres, with 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine conjugate with bovine serum albumin bound to the blue microspheres, bind without the said competition with the immobilised monoclonal anti-theophylline antibodies, and produces a more fluorescent ring outside the inner less dense area. When the porous filter material in the fluid receiving device has been saturated with liquid, the flow of liquid through the fluid transferring device stops automatically.

15 The fluid receiving device is scanned with a fluorescence scanner with excitation wavelength of 648 nm, and the fluorescence of the cyanine-5 the surface of the fluid receiving device is measured. By software computing according to example 16 above and as described by Bremnes and Sundrehagen, the area of the less fluorescence is depicted and measured. To establish a calibrated reliable quantitative method in the wanted concentration range of theophylline in whole blood, use calibrators of human whole blood with known concentrations of theophylline.

CLAIMS

1. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample, characterized in that a sample containing the analyte or analytes is mixed with a reagent contained in a container, wherein the reagent contains signal-providing substance(s), thus providing a mixture which is subsequently absorbed by a fluid-transmitting material contained in a fluid-transmitting device after coupling of the container to the fluid-transmitting device, and simultaneously or afterwards bringing the fluid-transmitting device in contact with a fluid-receiving device containing a fluid-receiving material which includes immobilized reagents with specific binding capacity for the analyte or analytes, or immobilized analyte molecules or analogues or derivatives or fragments thereof, wherein the mixture is transported out in the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device and create a pattern wherein the pattern or area of the pattern or area of the pattern elements are utilized as a measure of the concentration of analyte or analytes in the sample.
2. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a test sample according to claim 1, characterized by the following steps;
- the sample is mixed with the reagent, such as a liquid reagent in a container containing signal-providing substances,
- a fluid-transmitting device containing a fluid-transmitting material is introduced into the said container so that the said fluid-transmitting material comes into contact with the said mixture in the said container,
- the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device in the course of performing the said chemical method of analysis is brought into simultaneous contact with on the one hand the said mixture of reagent and test sample and on the other hand into contact with a porous fluid-receiving material in another fluid-receiving device, wherein the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device is not permanently mounted in contact with the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, but is brought into such contact as a part of performing this method, and wherein the said porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device includes immobilized reagents which have specific binding affinity for the said analyte or analytes or that the said immobilized reagents consist of immobilized analyte molecules or analogues or derivatives or fragments of analyte molecules,
- whereby the said mixture is transported through the fluid-transmitting device and over into and spreads out in the porous fluid-receiving material in the said other fluid-receiving device, whereby the pattern, the area of the pattern and/or the area

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

40

of the pattern elements that emerge through the distribution of the signal-providing substances in the said porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, are utilized as a measure of the concentration of analyte or analytes in the sample.

- 5 3. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with claim 1, characterized by the said container being a liquid leak proof container, and [further characterized by] the fluid-transmitting device, which contains a fluid-transmitting material, being led through a liquid leak proof gate into the said container in such a way that the said
- 10 fluid-transmitting material comes into contact with the said mixture in the said container.
4. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with claim 1 - 3, characterized (by the fact) in that the fluid-transporting material in the fluid-transmitting device
- 15 consists of a porous fluid-transporting material suitable for transporting fluids using capillary forces or overpressure or underpressure.
5. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 4, characterized by the inclusion in the fluid transmission device of a non-porous
- 20 nib or a tube-shaped transmission which is not mounted in permanent contact with the fluid-receiving device, but which is brought into contact with the fluid-receiving device during the process of carrying out the quantitative chemical method of analysis.
6. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 5, characterized (by the fact) in that the said container for mixing of reagent with test sample is a closed container with a gate at which the said fluid-transmitting device can come into contact with the said mixture, (if expedient) suitably by
- 30 supplying the said container with a notch in a wall where the wall is thinner and yields when the transmission device is led through in a tight fitting manner or, (if expedient) by the fluid-transmitting unit and the said container being screwed together, (if expedient) suitably with small gas-permeable openings in the container or transmission device, shaped in such a manner that the said mixture does not leak out of the container or fluid transmission device regardless of the spatial position in
- 35 which the container (and/or) with the fluid transmission device is held.
7. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 6, characterized (by the fact) in that the said container for mixing of reagent and test sample is equipped with a (gate) port for introduction of the test sample or that

a third device containing the test sample is used and, if desirable, that the said third device constitutes a part of the said container when it is joined together with or screwed onto the other devices.

- 5 8. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with claim 7, characterized in that the said third device is not a part of the container and is e.g. a glass capillary.
- 10 9. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 8, characterized by the said fluid-receiving device containing specific binding molecules with affinity for analytes or the analytes, or for analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules, either in immobilized form and/or in desiccated form or dispersed onto or into particles or directly into the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, with a homogeneous or inhomogeneous, but previously determined, distribution in the porous fluid-receiving material.
- 15 10. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 9, characterized by the said reagent containing signal-providing substances in the form of colored particles or colloids or enzymes or fluorophores or dyes, with or without attached specific binding molecules or with or without attached analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules.
- 20 11. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 10, characterized by the said reagent including chemicals that dissolve cells in the test sample and/or regulate the acidity or ionic strength or keep any possible particles dispersed.
- 25 12. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 11, characterized by the said fluid-transmitting device having a pore size that holds back cells such as red or white blood cells, but with a pore size large enough to let through the said signal-providing substances.
- 30 13. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 12, characterized (by) in that the hemoglobin in the test sample being used as signal-providing substance.
- 35 14. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1

- to 13, characterized by the test sample being pretreated by adding chemicals or separated or extracted prior to being mixed with the said reagent or that the said reagent can be provided by mixing together two or several different reagents inside the said container, or that additional chemicals are admixed into the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device in order to evoke or enhance or clarify the patterns or areas of patterns and/or the area of the pattern elements that appear in the said fluid-receiving device.
15. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 14, characterized (by) in that the patterns or areas of patterns and/or the area of pattern elements that appear in the said fluid-receiving device being depicted or scanned or measured using analogue or digital instruments based on visible or ultraviolet or infrared or near-infrared light, either by absorption measurement or reflection measurement or fluorescence measurement, and that the concentration of the analyte or the analytes in the test sample is determined on the basis of these measurements.
16. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 15, characterized by the use of a leak proof container for mixing reagent and test sample, and further characterized by the fact that the fluid-transmitting device contains a porous fluid-transmitting material which is mounted in permanent contact with the porous fluid-receiving material in the fluid-receiving device.
17. A quantitative chemical method of analysis for determining concentrations of one or several analytes in a sample in accordance with one or several of the claims 1 to 16, characterized in that the test sample is a biological sample.
18. A device for performing a method for determining concentrations of one or several analytes in a test sample, characterized in comprising a liquid leak proof container for mixing of the test sample with a reagent, a fluid-transmitting device which contains a fluid-transmitting material, and a fluid-receiving device which contains a fluid-receiving material, assembled such that the fluid-transmitting device is able to be contacted with the content of the said container through a liquid leak proof port and contacted with the fluid-receiving device containing the fluid-receiving material.
19. A device in accordance with claim 18, characterized in that the fluid-device transporting material in the fluid-transmitting device consists of a porous fluid-transporting material suitable for transporting fluids using capillary forces or overpressure or underpressure.

20. A device in accordance with claims 18 to 19, characterized in that a non-porous nib or a tube-shaped transmission is included in the fluid transmission device, not mounted in permanent contact with the fluid-receiving device, but brought into contact with the fluid-receiving device during the process of carrying out the quantitative chemical method of analysis.
21. A device in accordance with claims 18 to 20, characterized in that the said leak proof container has a port through which the said fluid-transmitting device can come into contact with the said mixture of test sample and reagent, suitably that the said container has a notch in a wall where the wall is thinner and yields when the transmission device is led through in a tight fitting manner or the fluid-transmitting unit, and the said container being screwed together, suitably with small gas-permeable openings in the container or transmission, shaped in such a manner that the said mixture does not leak out of the container or fluid transmission device regardless of the spatial position in which the container with the fluid transmission device is held.
22. A device in accordance with claims 18 to 21, characterized in that the said container for mixing of reagent and test sample is equipped with a port for introduction of the test sample from a sample transporting device, such as e.g. a glass capillary, or that the sample transporting device constitutes a part of the said container, such as a lid device which is joined together with, or screwed onto the said container in the port location.
23. A device in accordance with claims 18 to 22, characterized by the said fluid-receiving device containing specific binding molecules with affinity for analytes or the analytes, or for analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules, either in immobilized form and/or in desiccated form or dispersed onto or into particles or directly into the porous fluid-receiving material in the said fluid-receiving device, with a homogeneous or inhomogeneous, but previously determined, distribution in the porous fluid-receiving material.
24. A device in accordance with claims 18 to 23, characterized in that the said container contained reagent comprises signal-providing substances in the form of colored particles or colloids or enzymes or fluorophores or dyes, with or without attached specific binding molecules or with or without attached analogues of or derivatives of or fragments of or whole analyte molecules.
25. A device in accordance with claims 18 to 24, characterized in that the said reagent includes chemicals that dissolve cells in the test sample and/or regulate the acidity or ionic strength or keep any possible particles dispersed.
26. A device in accordance with claims 18 to 25, characterized in that the said fluid-transmitting material in the said fluid-transmitting device has a pore size that

holds back cells, such as red or white blood cells, but with a pore size large enough to let through the said signal-providing substances.

27. A device in accordance with claims 18 to 26, characterized in comprising a stopper (6) with a built in capillary (7), a sealing sleeve (8) surrounding the stopper, a liquid leak proof container (9), a movable ball (10) sealing the port in the bottom of the container (9), wherein the ball (10) is housed in a valve seat(11) which is sealingly fitted to a wick or felt tip guide (12), wherein a wick or felt tip (13) is sealingly and movable mounted, wherein the felt tip (13) is protected by a removable cap (14)
28. A device in accordance with claims 18 to 26, characterized by further comprising a scanning device, such as analogue or digital instrument based on visible or ultraviolet or infrared or near infrared light, or a combination thereof, to measure absorption or reflection or fluorescence, or a combination thereof, a processor for processing the data, a display medium, and medium for storing the data.
29. A device in accordance with claims 18 to 28, characterized by further comprising a rack with a movable holder, whereby the container is fixed in a standardized position in relation to the fluid-receiving device such that only vertical controlled movement is possible.
30. Use of the method according to claims 1 -17 wherein the concentration of one or several analytes in a biological sample, such as blood, sputum, mucus, faeces, expectorates and tissue is measured.
31. Use of the method according to claim 1, wherein the analytes are selected from the group comprising autoantibodies, antibodies, saprophytes, bacteria, other infectious agents, hemoglobin, albumin, CRP, U-albumin, glycated albumin, glycated hemoglobin, ferritin, ASAT, ALAT, LDH, myoglobin, Troponin I, Fatty Acid Binding Protein, amylase, HCG, U-HCG, theophyllin, and antibiotics.
32. Kit for performing the method according to claims 1 - 17, characterized in comprising the device according to claims 18 - 31, reagent for mixing with the test sample, optionally additional reagents for pretreatment or separation of the test sample or admixing into the fluid-receiving device for clarification of the signal.

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

1/3

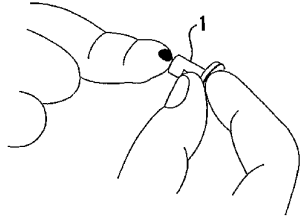


Fig. 1A

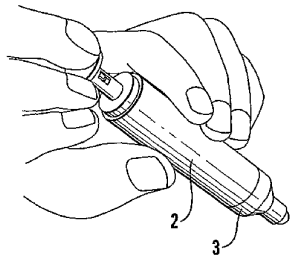


Fig. 1B

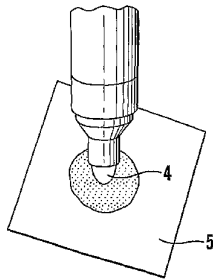


Fig. 1C

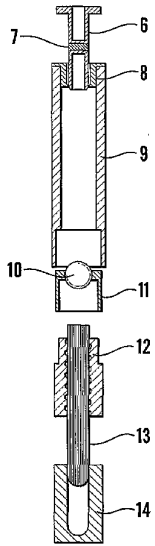


Fig.2

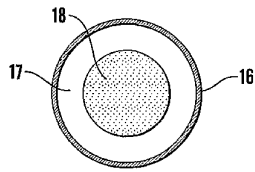


Fig.4

WO 02/095409

PCT/NO02/00161

3/3

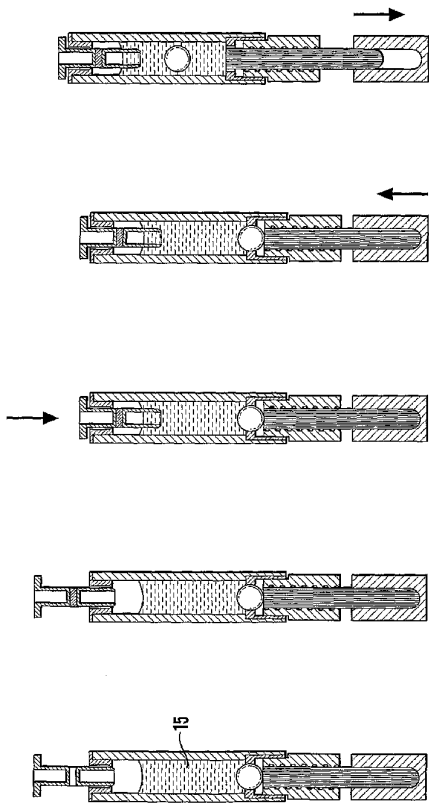


Fig.3E


Fig.3D

Fig.3C

Fig.3B

Fig.3A

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NO 02/00161
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/558, G01N 33/58, G01N 33/543, A61B 10/00, B01L 3/00 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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0923905 A2 (STARPLEX SCIENTIFIC), 23 June 1999 (23.06.99) --	1-32
A	EP 0250137 A2 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.), 23 December 1987 (23.12.87) --	1-32
A	US 5366902 A (COX ET AL), 22 November 1994 (22.11.94) --	1-32
A	US 5202267 A (DITLOW ET AL), 13 April 1993 (13.04.93) --	1-32
<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 "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 August 2002	Date of mailing of the international search report 23. 09. 2002	
Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer CAROLINA PALMCRANTZ/BS Telephone No.	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NO 02/00161
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 5022411 A (GUIRGUIS), 11 June 1991 (11.06.91) ---	1-32
A	WO 9839657 A1 (QUIDEL CORPORATION), 11 Sept 1998 (11.09.98), page 4, line 37 - page 5, line 2 -----	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NO02/00161
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 1-32 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see next sheet
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/NO02/00161

In respect of the wordings "fluid-transmitting device" and "fluid-transmitting material" claims 1-32 relate to a very large number of possible methods/devices. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the methods/devices claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out essentially for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely a device especially as described in Figures 3A-3E.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.		
Information on patent family members				06/07/02	PCT/NO 02/00161	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
EP 0923905 A2	23/06/99	US 6168758 B US 2002042145 A	02/01/01 11/04/02			
EP 0250137 A2	23/12/87	AT 79956 T AU 602694 B AU 7385487 A CA 1288337 A DE 3781335 A, T JP 2537873 B JP 63025553 A MX 173476 B US 5514602 A US 5571726 A	15/09/92 25/10/90 10/12/87 03/09/91 01/10/92 25/09/96 03/02/88 08/03/94 07/05/96 05/11/96			
US 5366902 A	22/11/94	AU 646305 B AU 8748191 A CA 2095240 A EP 0555296 A GB 9023965 D HU 9301278 D JP 6500174 T NO 931547 A NO 9207655 A GB 9024305 D GB 9101896 D	17/02/94 26/05/92 01/05/92 18/08/93 00/00/00 00/00/00 06/01/94 28/06/93 14/05/92 00/00/00 00/00/00			
US 5202267 A	13/04/93	AU 632467 B AU 656451 B AU 3026889 A AU 3180393 A CA 1335650 A JP 2012061 A JP 2823586 B JP 2999747 B JP 11002634 A JP 2000074920 A US 6083760 A	07/01/93 02/02/95 05/10/89 25/03/93 23/05/95 17/01/90 11/11/98 17/01/00 06/01/99 14/03/00 04/07/00			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

06/07/02

International application No.

PCT/NO 02/00161

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5022411 A	11/06/91	US 5077012 A	31/12/91
		US 5358690 A	25/10/94
		US 5998214 A	07/12/99
		AT 119071 T	15/03/95
		AU 644096 B	02/12/93
		AU 6252290 A	21/03/91
		DE 69017334 D,T	29/06/95
		EP 0419168 A,B	27/03/91
		ES 2072399 T	16/07/95
		JP 3170060 A	23/07/91
		US 4953561 A	04/09/90
		US 5016644 A	21/05/91
		US 5024238 A	18/06/91
		US 5042502 A	27/08/91
		US 5137031 A	11/08/92
		US 5139031 A	18/08/92
		US 5301685 A	12/04/94
		US 5471994 A	05/12/95
		US 6106483 A	22/08/00
WO 9839657 A1	11/09/98	AU 6450698 A	22/09/98

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/558	
	G 0 1 N 33/566	

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	非仪器化定量免疫测定和使用有色颗粒的设备		
公开(公告)号	JP2004527760A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002591831	申请日	2002-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	SUNDREHAGEN二荅		
申请(专利权)人(译)	沙莱斯哈根, 伊林		
[标]发明人	サンドレハーゲンアーリング		
发明人	サンドレハーゲン,アーリング		
IPC分类号	G01N33/483 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/54366		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/483.C G01N33/53.N G01N33/531.B G01N33/558 G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA22 2G045/BB01 2G045/BB04 2G045/BB29 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB08 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA38 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB15 2G045/FB19 2G045/GC12 2G045/HA06 2G045/HA09 2G045/HA14 2G045/JA07		
优先权	20012150 2001-04-30 NO		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

定量化学分析方法用于确定一个或多个样品中的分析物浓度的。该方法包括以下步骤：a) 将样品和含有信号物质的试剂在容器中混合，b) 将容器与流体输送装置连接，c) 并开始接触。流体接收材料包括对分析物具有特异性结合能力的固定化试剂。所述流体接收材料的图案或区域用作样品中一种或多种分析物浓度的指示剂。

