

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-140169

(P2013-140169A)

(43) 公開日 平成25年7月18日(2013.7.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/569 G	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	
	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 有 請求項の数 7 O L 外国語出願 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-33441 (P2013-33441)	(71) 出願人	507168144
(22) 出願日	平成25年2月22日 (2013. 2. 22)		テクラブ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2007-543567 (P2007-543567) の分割		アメリカ合衆国 ヴァージニア州 240 60 ブラックスバーグ クラフト ドラ イヴ 2001
原出願日	平成17年11月23日 (2005.11.23)	(74) 代理人	110000109
(31) 優先権主張番号	60/630, 152		特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日	平成16年11月24日 (2004.11.24)	(72) 発明者	ブーン ジェイムズ エイチ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ヴァージニア州 240 73 クリスチャンズバーグ アロウヘッ ド トレイル 545
		(72) 発明者	ライアリー デヴィッド エム
			アメリカ合衆国 ヴァージニア州 241 42 ラドフォード マッカーサー アベ ニュー 204

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物を検出するための装置および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 液体試料内の物質を検出するための装置を提供する。

【解決手段】 多孔質材料を含む受け具と、少なくとも1つの対象物質または前記物質に結合された物質に特異的に結合する、少なくとも1つの特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を含む装置であって、前記受け具は、塗布ゾーンと、ろ過ゾーンと、反応ゾーンとを備え、前記受け具および前記多孔質膜は、前記多孔質膜の底面が前記多孔質材料と物理的に接触するように、前記特定結合対メンバーを含む、前記多孔質膜の少なくとも一部と、前記反応ゾーンの少なくとも一部とで物理的に接触し、かつ前記特定結合対メンバーが前記多孔質材料と連続的に接触することにより、前記多孔質材料と、前記液体試料が塗布された多孔質材料の真上に位置する特定結合対メンバーとの間における試料の連続的な拡散が可能になる、装置。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料内の少なくとも 1 つの対象物質を検出する方法であって、
前記対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を提供するステップと、
多孔質材料を少なくとも部分的に湿らせるに十分な量の前記液体試料を、前記多孔質材料に塗布するステップと、

前記多孔質材料を、直接的または間接的に前記対象物質を結合することができる、少なくとも 1 つの特定結合対メンバーを含む多孔質膜と接触させるステップと、

前記多孔質材料内に存在する液体が前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺に拡散するように、前記多孔質材料と多孔質膜との接触を十分な時間保持するステップであって、

前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺への前記液体の拡散によって、前記対象物質が存在する場合に、前記特定結合対メンバーへの直接的または間接的な接触をもたらすステップと、

前記特定結合対メンバーおよび前記対象物質を含む複合体の有無を検出するステップであって、

前記少なくとも 1 つの複合体の存在が、前記液体試料内に前記対象物質が少なくとも 1 つ存在することを示すステップと、を含む方法。

【請求項 2】

前記多孔質材料および多孔質膜を含む装置を提供するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記多孔質材料は、前記液体試料をろ過して設定値よりも大きいサイズの物質を取り除く、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ろ過は、前記多孔質材料を通った前記液体試料からの液体の不連続な入り込みによるものである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記液体は、2 つ以上の対象物質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

各対象物質は、互いに異なる対象物質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記液体は、糞便、血液、食品、または環境試料を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象物質は、クロストリジウム・ディフィシル毒素 A、クロストリジウム・ディフィシル毒素 B、またはその両方である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象物質は、1 つ以上の毒素、細菌、ウイルス、細菌産物、酵素、または寄生体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象物質は、グルタミン酸脱水素酵素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記物質は、動物またはヒトの生成物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記物質は、抗体またはラクトフェリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記特定結合対メンバーのうちの 1 つ以上が抗体であり、前記抗体のそれぞれが異なるか、または 1 つ以上の他のものと同じである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記複合体の存在を検出する前に、前記膜を洗浄するステップをさらに含む、請求項 1

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 15】

前記多孔質材料に前記液体試料を塗布するステップは、前記多孔質膜から空間的に分離された、前記多孔質材料上の 1 つの位置において前記液体試料を塗布するステップを含み、それによって、前記液体試料の少なくとも前記液体が前記多孔質材料に移動し、次いで前記多孔質膜に移動する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記液体試料は、前記多孔質材料を通過して、入り込みプロセスを介して前記多孔質膜に移動する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記膜、前記多孔質材料、またはその両方に物理的な力を加えるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

検出するステップは、対象物質に結合された標識から発せられたシグナルを認識するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記シグナルは、前記特定結合対メンバー内、またはその周辺に形成された有色の沈殿生成物によって生成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記多孔質材料に前記液体試料を塗布する前に、標識複合体を前記液体試料と混合するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記標識複合体は、ラテックスビードまたは他の有色粒子、コロイド状金粒子、または基質と結合して検出可能なシグナルを作成する反応性物質を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記シグナルは、非視覚的なシグナルである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

前記方法は、1 つ以上の核酸を検出し、または 1 つ以上の核酸は、特定結合対メンバーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

液体試料内の少なくとも 1 つの対象物質を検出するための装置であって、

(a) 前記液体試料を受けるための多孔質材料を含む受け具であって、前記液体試料の少なくとも一部を吸収して透過することができる前記多孔質材料と、

(b) 前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を備え、

前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形される装置。

【請求項 25】

前記受け具を含む容器をさらに備える、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 26】

前記多孔質膜のための把持部をさらに備える、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 27】

洗浄液受けパッドをさらに備える、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 28】

液体試料塗布パッドをさらに備える、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 29】

ろ過パッドをさらに備える、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

前記装置は、前記多孔質材料および前記多孔質膜を含む反応パッドを含む容器を備え、
前記容器は、前記多孔質膜のための把持部を備え、

前記容器は、前記多孔質材料の少なくとも一部が加圧されるように、前記多孔質膜および/または前記多孔質材料に作用する圧力を生じさせる、請求項 2 4 に記載の装置。

【請求項 3 1】

前記圧力は、前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質膜および前記多孔質材料を直接接触させる、請求項 3 0 に記載の装置。

【請求項 3 2】

前記圧力によって、液体が、受動拡散によって前記多孔質膜と前記多孔質材料との間を通過できる、請求項 3 0 に記載の装置。

10

【請求項 3 3】

液体試料内の少なくとも 1 つの対象物質を検出するための装置であって、

(a) 前記液体試料を受けるための多孔質材料を含む受け具であって、前記液体試料の少なくとも一部を吸収して透過することができる前記多孔質材料と、

(b) 前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を備え、

前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形され、

前記多孔質膜および多孔質材料は、異なる化学構造を有する異なる要素である装置。

20

【請求項 3 4】

前記多孔質膜および多孔質材料は、前記多孔質材料に塗布された液体試料が、前記多孔質膜の内側、外側、内部、およびその周辺に拡散するように、物理的に接触する、請求項 3 3 に記載の装置。

【請求項 3 5】

前記多孔質膜と多孔質材料との間の物理的接触は、前記装置の感度が改善されるように発生される、請求項 3 3 に記載の装置。

【請求項 3 6】

前記多孔質材料と多孔質膜は、前記対象物質が、前記装置に対する一方向の様態で前記多孔質膜を横断して前記対象物質を検出する必要がないように、互いに接触して構成される、請求項 3 3 に記載の装置。

30

【請求項 3 7】

前記多孔質材料と多孔質膜は、それら 2 つの間に液体の単一な、無方向性の拡散が生じるような方法で互いに接触する、請求項 3 3 に記載の装置。

【請求項 3 8】

液体試料内の対象物質の存在または量を検出するための装置であって、

前記液体試料を受けるための試料受けゾーンであって、

多孔質材料上に存在する前記試料受けゾーンと、

前記試料受けゾーンで受けた前記液体試料をろ過するための試料ろ過ゾーンであって、

多孔質材料上に存在する前記試料ろ過ゾーンと、

40

前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に、特異的に結合する検出ゾーンにおいて、特定結合対メンバーを備える多孔質膜と、を備え、

前記多孔質膜は、前記多孔質材料のうちのいずれとも同じ要素ではなく、

前記多孔質材料および多孔質膜は、前記検出ゾーンの一部を含む少なくとも 1 つの領域上で物理的に接触し、

前記多孔質材料および多孔質膜は、前記液体試料内に存在する液体が、前記検出ゾーンの少なくとも一部を含む領域において、実質的に任意の無方向性の様態で、前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺に拡散できるような構成で物理的に接触する装置。

【請求項 3 9】

50

前記多孔質材料および多孔質膜の少なくとも一部を含む容器をさらに備える、請求項 38 に記載の装置。

【請求項 40】

洗浄液受けゾーンを含む多孔質材料をさらに備える、請求項 39 に記載の装置。

【請求項 41】

受け具と、

少なくとも 1 つの対象物質または前記物質に結合された物質に特異的に結合する、少なくとも 1 つの特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を含む装置であって、

前記受け具は、塗布ゾーンと、ろ過ゾーンと、反応ゾーンとを備え、

前記受け具および前記多孔質膜は、前記特定結合対メンバーと前記反応ゾーンの少なくとも一部を含む、前記多孔質膜の少なくとも一部上で物理的に接触する装置。

10

【請求項 42】

前記受け具または前記多孔質膜と物理的に接触する、洗浄受けパッドをさらに備える、請求項 41 に記載の装置。

【請求項 43】

洗浄受けパッドと、液体不透過性膜と、をさらに備え、

前記洗浄受けパッドは、前記受け具に隣接し、前記液体不透過性膜は、前記受け具と洗浄受けパッドとの間に挿入され、これらの両方と物理的に接触する、請求項 41 に記載の装置。

【請求項 44】

前記不透過性膜を取り除くことによって、前記受け具と洗浄受けパッドの少なくとも一部の間で物理的な接触がもたらされる、請求項 43 に記載の装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国暫定特許出願第 60 / 630 , 152 号 (2004 年 11 月 24 日出願) の開示の利益に依存し、これを主張するものであり、その全体の開示は、参照することによりその全体が本願明細書に組み込まれる。

【背景技術】

30

【0002】

本発明は、液体内に存在する物質を検出するための装置および方法に関する。特に、本発明は、生体組織または環境に由来する液体試料内に存在する、薬品または生物学的生成物のような小分子を検出するための装置および方法に関する。

【0003】

当技術分野において、試料内の物質を検出するための様々な装置および方法が利用可能である。大部分の分野では、対象物質または対象物質に特異的に結合した分子に結合する膜結合型の分子を用いている。こうした装置および方法には、大きく分けてラテラルフローとフロースルーの 2 種類がある。これらの試験は、概して比較的高速 (1 時間未満で物質を検出) かつ高感度 (ng/ml の範囲) である。

40

【0004】

フロースルー装置では、試料が毛管現象によって膜を通過し、物質 (分析物、抗原など) が、特定の抗体、受容体、ペプチドなどに結合することによって膜上に保持される。この結合は、第 2 の抗体、または酵素 (例、西洋わさびペルオキシダーゼ)、コロイド粒子 (例、金ゾル) または様々な他の標識および粒子 (例、蛍光標識、常磁性ビーズ) と連結する他の分子の結合によって検出される。この結合は、試料が膜を通過するときに非常に迅速に生じ、次いでその膜を洗浄して (緩衝剤がその膜を通過する) 検出試薬を添加する。その結果、色の斑点、線、プラス記号などのような検出可能なシグナルが得られる。

【0005】

ラテラルフロー装置では、試料が毛管現象によって薄膜全体に入り込み、抗体または他

50

の結合構成要素（結合ペプチド、受容体など）のような一連の試薬を通して流れる。特定のバージョンでは、分析物は、抗体によって、付着させた有色粒子（例、金ゾル、青デキストランビードなど）とすでに結合している。この抗原および抗体 - 金の複合体が試薬線に結合され、有色線が出現する。試料を、乾燥試薬として抗体 - 金ゾルを含む複合体パッド上に配置する前に緩衝液で希釈することが可能であることを除いて、いかなる洗浄も伴わず、いかなる液体試薬も使用しない。

【0006】

ラテラルフロー装置の他のバージョンでは、試料は、通常、抗体酵素複合体を含む緩衝剤と混合される。これを膜上に配置すると、薄膜に沿ってラテラルフローによる入り込みが生じる。試薬を添加しなければならないので、線は直ちに明らかにならない。通常、これは、酵素（例、西洋わさびペルオキシダーゼなど）によって不溶性の有色沈殿物に変換される、無色の薬品である。このバージョンでは、洗浄して非結合酵素を浸出させなければならないので、膜の各端部に吸収パッドがあり、この膜は、一般に（洗浄を容易にする）金ゾルラテラルフローに使用されるものよりも多孔質である。

10

【0007】

液体試料内の物質を検出するための現在利用可能な装置および方法は、ほとんどの対象物質の検出に好適かつ有効であるが、速度、感度、および使いやすさを改善した新たな装置および方法が必要である。

【発明の開示】

【0008】

本発明は、液体試料内の物質を迅速に検出するための高感度で使いやすい装置および方法を提供することによって、当技術分野での要求に対処する。本装置および方法によって、臨床医は、組織試料内の有機体、毒素のような生物学的生成物またはタンパク質、核酸（DNA、RNA）、および多糖類のような他の生物学的材料、および薬剤または他の合成薬品を迅速に検出することができる。組織試料とは、ヒトおよび動物（例、家畜またはペットからの獣医学的試料、ハンバーガー、ステーキ、ベーコン、卵、加工食品のような人間が消費することを目的とした肉）の組織（例、血液またはその留分、腫瘍組織、尿、糞便、下痢のような排泄物または排出生成物）を含むがこれらに限定されない、1つ以上の動物細胞または組織（血液系を含む）に由来する生物学的材料を含む、あらゆる組成物を意味する。したがって、本発明の方法で使用するか、または本発明の装置で使用する前に希釈を必要としない、生物学的材料の液体または半液体を含む。同様に、表層土、心土、石、水および表層水を含む、環境試料内の生物学的または化学的物質を検出することが可能である。加えて、当該の物質を捕捉して液体に溶解することができる大気中の物質の検出に使用することができる。例えば、エアロゾルは、可溶化するか、または液体と混合して液体組成物を作成することができ、対象物質を検出するための試料として使用することができる。

20

30

【0009】

概して、本発明の方法は、膜を介した物質の拡散を用いて、特定結合対メンバーによって、直接的または間接的にその物質の検出を可能にするものである。物質を、一方向の様態で、その物質のための特定結合対メンバーを含む膜の上または中を通過させることに依存する、現在使用している検出方法とは異なり、本方法では、物質を一方向の様態で膜の上または中を通過させることに依存しない。むしろ、本方法では、必要な膜に対して同じ方向性で移動させずに、膜の中、周り、上、全体、および周辺への物質の拡散に依存して、その物質を検出する。意外なことに、対象物質のための特定結合対メンバーを含む膜の中、周り、上、全体、および/または周辺への単純な拡散でも、物質の迅速かつ高感度な検出には十分であることがわかっている。

40

【0010】

したがって、本発明の方法は、概して、対象物質を含む、または含むと思われる液体を提供するステップと、多孔質材料を少なくとも部分的に湿らせるのに十分な量の前記液体を、パッドなどの多孔質材料に塗布するステップと、前記多孔質材料を、直接的または間

50

接的に前記対象物質を結合することができる特定結合対メンバーを含む多孔質膜と接触させるステップと、前記特定結合対メンバーおよび前記対象物質を含む複合体の有無を検出するステップであって、そのような複合体の存在が、前記液体内に前記物質が存在することを示すステップと、を含む。

【0011】

概略的に、本発明の装置は、本発明の方法を実行することができるあらゆる構成要素の構成を備える。さらに具体的には、本発明の装置は、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、前記装置の所定の領域または区域に保持することができるあらゆる構成要素の構成を備え、前記領域または区域は、前記物質に対して直接的または間接的に特異的である特定結合対メンバーを含む、多孔質膜を含む。この領域内では、前記試料は、前記膜の全体、その中を通るなどして拡散することができる。

10

【0012】

最も基本的な形態では、本発明の装置は、(a)液体試料を吸収して透過することができる多孔質材料またはパッドを含む受け具と、(b)検出すべき物質に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜とを備える。前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形される。いくつかの実施態様では、前記パッドおよび膜は、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって互いに直接接触する。前記装置は、受け具を含む容器を備えることができる。前記装置は、前記多孔質膜のための把持部を備えることができる。いくつかの実施態様では、前記装置は、互いに接触する前記容器と把持部とを備え、前記2つの要素間の接触によって、前記多孔質膜と前記多孔質材料とが、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって互いに直接接触する。加えて、前記装置は、サンプル塗布パッドと洗浄液受けパッドとを備えることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】多孔質膜および受け具を備えた、本発明の装置の基本構成の斜視図である。

【図2】多孔質膜が多孔質材料と直接接触する、図1に示される装置の構成の斜視図である。

【図3】柔軟な蝶番によって互いに直接連結した容器および把持部を備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。

30

【図4A】洗浄液受けパッドを試料受けおよび反応パッドに連結した、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図4B】洗浄液受けパッドを試料受けおよび反応パッドの下に配置した、図4Aに示される装置の代替構成の側断面図である。

【図4C】取り外し可能な液体不透過性の壁を、試料受けおよび反応パッドと洗浄液受けパッドとの間に配置した、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図5】試料受けおよび反応パッドを反応領域を越えて延在させて、別個の試料受け領域と反応領域とを備えたユニットを形成した、本発明の装置の構成の側面図である。

【図6】試料塗布ポートと観察窓とを備えた容器内に含めた図5に示される装置の側断面図である。

40

【図7】試料塗布ポートおよび観察窓を備えた本発明の装置の構成の側断面図である。

【図8】多孔質膜のための把持部が、膜のサイトにおいて反応パッド上に圧力を加えて、この領域においてパッドを加圧する、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図9】容器が、膜のサイトにおいて下側から反応パッドに圧力を加えて、この領域においてパッドを加圧する、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図10】試料塗布ポートおよび観察窓を示す、本発明の装置の構成の平面図である。

【図11】試料塗布ポートおよび観察窓を示す、本発明の装置の代替構成の平面図である。

【図12】観察窓によって画定された領域内の膜上に特定結合対メンバーおよび/または

50

対照分子を含む領域を備えた、図 1 1 に示される装置の平面図である。

【図 1 3】それぞれが 2 つの別個の洗浄液受けパッドに連結する、2 つの別個の反応パッドおよび多孔質膜に分岐した単一のサンプル塗布パッドを示す、本発明の装置の構成の上面断面図である。

【図 1 4 A】サンプル塗布パッドが、容器によって画定された領域を越えて延在する、本発明の装置の構成の平面図である。

【図 1 4 B】図 1 4 A に示される本発明の装置の構成の一実施態様の側断面図である。

【図 1 4 C】図 1 4 A に示される本発明の装置の構成の一実施態様の側断面図である。

【図 1 5 A】「二枚貝型」容器を使用した、本発明の装置の構成の側面図である。

【図 1 5 B】図 1 5 A に示される装置の下半分の平面図である。

【図 1 5 C】上半分が上方に位置するが、下半分とは接触せず、また蝶番を取り除いて上半分および下半分を調整できるようにした、図 1 5 A に示される装置の側断面図である。

【図 1 5 D】上半分および下半分が摩擦嵌め合いによって連結された、図 1 5 A に示される装置の側断面図である。

【図 1 6】装置が蝶番によって接続された 2 つの部分の備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図 1 7】装置が不透過性の壁を備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図 1 8】装置が不透過性の壁を備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図 1 9】装置が上半分および下半分を連結する蝶番を備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。パネル A は、試料塗布および結合のための閉じた位置における装置を示す。パネル B は、反応結果を読み取るための開いた位置における装置を示す。

【図 2 0】装置の底部に塗布ポートを備え、側部に洗浄液受けパッドを備えた、本発明の装置の構成の側断面図である。

【図 2 1】(A) 陽性試料が検出されたことを示したときの、本発明の装置の構成の平面図である。(B) 陽性試料が検出されたことを示したときの、本発明の装置の構成の平面図である。(C) 装置および / または方法が失敗したことを示したときの、本発明の装置の構成の平面図である。(D) 装置および / または方法が失敗したことを示したときの、本発明の装置の構成の平面図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明および様々な実施態様の説明を始める前に、本願明細書に用いられる用語をこの時点で定義する。本願明細書に用いられる他の用語は、当技術分野における通常の定義に従うものであるか、または別の時点で定義される。

【0015】

本願明細書において使用する場合、物質とは、糖類および短鎖酸のような単純な天然有機分子；ペプチド、核酸（例、DNA、RNA、PNA）および多糖類のような複合生体分子；および薬剤、工業用薬剤、殺虫剤、および枯葉剤のような（生物学的プロセスまたは化学的合成を介して操作した）合成分子を含むがそれらに限定されない、あらゆるものである。したがって、物質は、薬剤、（妊娠中または排卵中に存在するもののような）ホルモン、タンパク質（抗体を含む）、毒素、DNA（一本鎖 DNA を含む）、RNA（二本鎖 RNA を含む）、ウイルスまたはウイルスタンパク質あるいは核酸、バクテリアまたは細菌タンパク質あるいは核酸、多糖類、汚染物質、などとすることができる。よって、細菌またはウイルス病原体、または原核生物または真核生物の寄生体とすることができる。

【0016】

例えば、物質は、高分子を含むがこれに限定されない、有機体またはウイルス、またはその任意の一部とすることができる。したがって、物質は、真正細菌または古細菌のような、グラム陽性またはグラム陰性の原核生物の有機体とすることができる。細菌性の有機体には、これに限定されないが、C. ディフィシル、破傷風菌、C. ボツリヌス菌、およびウェルシュ菌のようなクロストリジウム属；大腸菌；ネズミチフス菌およびチフス菌の

10

20

30

40

50

ようなサルモネラ菌属；炭疽菌およびB．セレウスのようなバチルス属；S．アウレウスおよびS．エピデルミダスのようなブドウ球菌属；化膿連鎖球菌、ミュタンス連鎖球菌、および肺炎連鎖球菌のような連鎖球菌属；髄膜炎菌および淋菌のようなナイセリア属；インフルエンザ菌のようなヘモフィルス属；百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌のようなボルデテラ属；L．モノサイトゲネスのようなリステリア属；C．ジフテリアおよびC．偽結核症のようなコリネバクテリウム属；ヒト型結核菌、ウシ型結核菌、非定型抗酸菌、トリ型細胞内結核菌、ハンセン菌のようなミコバクテリウム属；放線菌属；肺炎桿菌のようなクレブシエラ属；霊菌のようなセラチア属；P．ミラビリスおよび変形菌のようなプロテウス属；S．フレクスネリのような赤痢菌属；コレラ菌のようなビブリオ属；緑膿菌のようなシュードモナス属；ペスト菌のようなエルシニア属；野兔病菌のようなフランキセラ属；ウシ流産菌、ブタ流産菌、およびイヌ流産菌のようなブルセラ菌属；梅毒トレポネーマのようなトレポネーマ属；B．ブルクドルフェリのようなボレリア属；C．ジェジュニおよびC．フィータスのようなカンピロバクター属；L．ニューモフィラのようなレジオネラ属；リケッチア属；C．トラコマティスおよびオウム病クラミジアのようなクラミジア種；およびミコプラズマ属またはアコレプラズマ属、が挙げられる。

10

【0017】

当然、物質は、ウイルスまたはその任意の一部とすることができる。ウイルスの例としては、これに限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（例えばHIV-1、HIV-2、HIV-O）のような免疫不全ウイルス；C型肝炎ウイルス（HCV）およびB型肝炎ウイルス（HBV）のような肝炎ウイルス；ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）のような乳頭腫ウイルス；およびヒトまたは動物の疾病に関連するあらゆる他のウイルスが挙げられる。

20

【0018】

物質は、生物または非生物体の任意の部分とすることができるので、その物質は、アルツハイマー病のような神経変性病またはプリオン病のような感染性海綿状脳症に関連する、タンパク質またはその一部とすることができる。したがって、物質は、プリオンタンパク質またはその一部とすることができる。

【0019】

他の物質には、これに限定されないが、寄生体またはその任意の一部が挙げられる。したがって、物質は、ジアルジア属、クリプトスポリジウム属、またはエントアメーバ属の全てまたは一部とすることができる。

30

【0020】

本願明細書において使用する場合、特定結合対メンバーとは、直接的または間接的に別の物質に特異的に結合する物質のことである。したがって、互いに、特定結合対メンバーおよび他の物質は、一对の物質を発生させる。2つの物質は互いに特異的に結合するので、どちらも互いに対して特定結合対メンバーであるとみなすことができる。しかし、明確にするために、一方を特定結合対メンバーと称し、他方をそれが結合する物質と称する。特定結合対メンバーには、これに限定されないが、抗体-抗原対（これに限定されないが、1つの抗体が別の抗体を特異的に結合する抗体-抗体対を含む）、酵素-基質対、相補的な核酸対、タンパク質-核酸対（これに限定されないが、オペレーター配列および転写制御因子を含む、DNAおよびDNA結合性タンパク質など）、およびタンパク質-タンパク質対（これに限定されないが、マルチサブユニットタンパク質を含む）が挙げられる。また、ターゲット、受容体、リガンド、人工抗体（例、一本鎖抗体、組み換え抗体、単に抗体結合領域を含む抗体、細菌的に生成された抗体または抗体の一部）に結合する人工ペプチドが挙げられる。他の例示的な結合対メンバーには、1つ以上の拡散の一部または全体に相補性領域を含み、適切な条件下で特異的に結合するか、または交雑することができる2つ以上の拡散が挙げられる。本発明は、試料内の物質を検出することを目的としている。しかし、その物質が必然的に特定結合対メンバーのうちの一つであるとみなすべきではない。むしろ、特定結合対メンバーは、別の特定結合対メンバーと反応し、同時に試料内の対象物質と結合する物質（例えば、対象物質に結合し、同時に別の抗体によって特異的に結合する抗体）となりうる。本願明細書において使用する場合、試料内の対象物質

40

50

に結合する特定結合対メンバー（例、抗体）の開示では、特定の物質への特定結合対メンバーの直接結合だけでなく、物質に結合する別の特定結合対メンバーへの直接結合を含む。例えば、特定結合対を、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジンとすることが可能である。

【0021】

当技術分野で使用される迅速試験装置および方法では、抗体を塗布した膜を通して試料を吸引する（フロースルー装置および方法）ことによって、または毛管現象によって試料を膜に沿って引っ張る（ラテラルフロー装置および方法）によって、物質（例、抗原）および特定結合対メンバー（例、抗体）を結合しなければならない。本発明は、これらの原理のいずれにも依存しない。本発明によれば、特定結合対メンバーを含む多孔質膜は、その物質を含む多孔質材料（例、パッド）に接触させることを単純に必要とする。多孔質材料および膜の内外への単純な拡散によって、物質と特定結合対メンバーとの接触が生じる。単純な拡散は、物質の検出には不十分であり、まして、膜のような関連する特定結合対メンバーに結合することによる高感度の検出ではないと、広く支持されていることから、試料内の物質の迅速かつ高感度の試験を提供する本発明は、驚くべきものである。実際に、本発明は、ラテラルフローまたはフロースルー装置および方法に使用されるものと比較して、非常に高感度に物質を検出する。試料を特定結合対メンバーを含む膜に直接塗布する必要がなく、必然的にその膜をフロースルーさせる必要がないので、この試験を、他の迅速試験の膜を詰まらせる試料にも使用することができる。

【0022】

第1の側面では、本発明は、液体試料内に存在する物質を検出する方法を提供する。本発明の方法では、パッドのような多孔質物質を含む受け具から多孔質膜への物質の受動拡散を用いる。当該の拡散によって、多孔質膜に関連する特定結合対メンバーによる直接的または間接的な物質の検出が可能となる。物質を、一方向の様態で、その物質のための特定結合対メンバーを含む膜の上または中を通過させることに依存する、現在使用している一般的な検出方法とは異なり、本方法では、当該の物質の一方向の移動に依存しない。むしろ、本方法では、必要な膜に対して単一の方向性で移動させずに、膜の中、周り、上、全体、および/または周辺への物質の拡散に依存して、その物質を検出する。意外なことに、対象物質のための特定結合対メンバーを含む膜の中、周り、上、全体、および周辺への単純な拡散で、物質の迅速かつ高感度な検出には十分であることがわかっている。

【0023】

本発明の方法は、概して、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を提供するステップと、多孔質材料を少なくとも部分的に湿らせるに十分な量の前記液体試料を、前記多孔質材料に塗布するステップと、前記多孔質材料を多孔質膜と接触させるステップであって、前記多孔質膜は、直接的または間接的に前記対象物質を結合することができる、特定結合対メンバーを含む、ステップと、少なくとも前記特定結合対メンバーを含む領域において前記多孔質膜が湿るように、前記湿らせた多孔質材料と前記多孔質膜との接触を十分な時間保持するステップと、前記特定結合対メンバーおよび前記対象物質を含む複合体の有無を検出するステップであって、当該の複合体の存在が、前記液体試料内に前記対象物質が存在することを示す、ステップと、を含む。

【0024】

対処物質を含む、または含むと思われる液体は、複数の方法で提供することができる。例えば、その自然環境から分離した形態で提供することができる（例えば、全血、尿、下痢性糞便、および小川、河川、湖の水を分離したときに直接使用することができる）。したがって、それを不希釈試料とすることができる。別様には、1つ以上の構成要素を取り除いた後の形態で提供することができる（例えば、血液および糞便の固体部分の遠心分離、ろ過、または沈殿後に、その液体部分を使用することができる）。加えて、元の試料が固体または実質的に固体である場合、水のような液体をその試料に添加して液体特性を提供することが可能である。液体の他の取り扱いまたは操作を、液体を提供する前に、または提供するときに行うことができる。本発明の方法または本発明の装置で使用できない試

10

20

30

40

50

料を提供しない限り、あらゆる取り扱いまたは操作を行うことが可能である。

【0025】

液体は、これに限定されないが、水、または生物学的組織、生物学的組織の抽出物、および生物学的排泄物のような水を含む組成物；有機溶媒または有機溶媒を含む組成物；および水と有機溶媒を組み合わせたもの、または水溶性および/または有機溶媒組成物を組み合わせたものを含む、あらゆる液体とすることができる。例えば、液体は、血液または血液の一部、尿、糞便、唾液、痰、粘膜、精液、または均質化組織のような、生物学的液体とすることができる。したがって、均質化肉（例、ハンバーガー、ラム肉、豚肉、鶏肉、魚、卵）のような、ヒトまたは動物の均質化試料とすることができる。また、糞便試料または消耗できる肉試料の水溶性抽出物のような、固体試料の抽出物とすることも可能である。分析すべき組織が、分離するときの液状化に好適でない場合、その組織に水または他の液体を添加して、好適な液体特性を提供することが可能である。本発明は、広範囲の粘性を有する液体内の物質の検出に好適であるので、本方法は、液体または半液体組成物内に存在する物質の検出に好適である。

10

【0026】

必要に応じて、液体内の検出すべき物質が存在すれば、その物質の量または濃度を調整して、申し分のない検出を達成することができる。この調整は、液体試料に適合する液体および本発明の装置の構成要素による希釈によって達成するか、またはこれに限定されないが、遠心分離、ろ過、蒸発、親和性精製などを含む、あらゆる好適な濃縮技術を使用した液体試料内の物質の濃縮によって達成することができる。一般に、検出される物質は、

20

【0027】

液体を多孔質材料に添加する前か、または添加するときに、その液体に更なる構成要素を添加することも可能である。物質またはその物質に結合する特定結合対メンバーと特異的に結合する特定結合対メンバーの能力を実質的に干渉しないものであれば、どんなものでも液体に添加することが可能である。いくつかの実施態様では、多孔質材料に液体を添加する前に、または添加するときに、物質が存在すれば、その物質と特異的に相互作用する標識をその液体に添加する。例えば、液体を多孔質材料に加える前に、対象物質に特異的に結合する抗体をその液体に添加することができる。抗体は、直接的に、または補助材料を使用して、検出可能な部分によって標識化することが可能である。この部分には、これに限定されないが、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、蛍光化合物、常磁性ビーズ、金または他の金属、ラテックスビード、アビジン（ストレプトアビジン）、およびビオチンが挙げられる。したがって、いくつかの実施態様では、多孔質材料/パッドに液体試料を添加する前に、または添加するときに、対象物質に特異的に結合する抗体複合体を添加する。

30

【0028】

少なくとも部分的に多孔質材料を湿らせるように、十分な量の液体を多孔質材料に添加する。十分な量の液体を添加して、特定結合対メンバーが位置する領域において多孔質膜と接触する多孔質材料のその部分を湿らせることが好ましい。いくつかの好ましい実施態様では、多孔質材料の全体、または多孔質材料の実質的に全体を湿らせる。いくつかの実施態様では、多孔質材料が、多孔質膜によって覆われる領域を越えて延在する場合は、十分な量の液体を添加して、少なくとも特定結合対メンバーが位置する領域において多孔質膜を湿らせることが好ましい。

40

【0029】

塗布は、これに限定されないが、液体に多孔質材料を浸漬すること、多孔質材料上に液体を注入すること、液体の流路に多孔質材料を配置すること（例えば、流れている河川に浸漬する、尿の流れに挿入する）、（例えば、点眼器またはピペットによって）多孔質材料上に液体を滴下すること、および多孔質材料上に半液体試料を塗ることによって達成することができる。塗布は、多孔質材料に、または多孔質材料と接触する他の多孔質材料に直接塗布することによって達成することができる。同様に、別のサイトから物理的に離れ

50

た多孔質材料の領域に塗布して、液体がこの多孔質材料を通過して他のサイトに移動できるようにすることによって達成することができる。

【0030】

本発明の実施では、塗布される液体の少なくとも一部が、特定結合対メンバーを含む膜の一部と直接接触するサイトに存在しなければならない。したがって、液体は、多孔質材料と接触する多孔質膜の領域か、または（例えば、検出領域またはサイトを含む、反応パッド領域において）多孔質材料と接触させようとする多孔質膜の領域に隣接する多孔質材料の一部に塗布するか、または反応パッド領域から離れており、その領域に移動することができるサイトに塗布することができる。離れたサイトに塗布した場合、材料の多孔性により、液体は、塗布するサイトから物質の存在を検出するサイト（すなわち、多孔質膜が接触している多孔質材料上のサイト）へ、多孔質材料を通過して移動することになる。

10

【0031】

検出サイトから離れたサイトに液体を塗布することによって、物質の検出前に液体をろ過することが可能になる。すなわち、多孔質材料は、検出サイトに液体とその構成要素とを運搬するように作用するだけでなく、試料内に存在する特定の構成要素の移動を遮断するか、または抑制するように作用することができる。したがって、特定のサイズの物質だけが検出領域に移動できるろ過系として効果的に作用する。様々な異なる孔サイズを有する多数の異なる多孔質材料が利用可能であり、適切な材料および孔サイズを選択して、液体内の不要な構成要素を効果的に除去することが可能である。例えば、液体を含む糞便を塗布するとき、消化されていないか、または部分的に消化された食品または細菌のような、大きな粒子を除去したい場合がある。そのような状況では、これらの比較的大きな構成要素の移動を遮断または大幅に抑制するが、より小さな構成要素（例、細菌タンパク質、核酸、細胞外血液タンパク質など）は移動できるような孔サイズを有する多孔質材料を選択して、基本的に妨げずにその材料を通して移動させることが可能である。

20

【0032】

本発明の方法は、多孔質材料と、直接的または間接的に対象物質を結合することができる特定結合対メンバーを含む多孔質膜とを接触させるステップも含む。多孔質材料と多孔質膜との接触は、多孔質材料に液体を塗布する前か、またはその後に行わせることができる。さらに、材料または膜を、接触させるために移動させるかどうかには関係がない。この接触には、接触を達成するための多孔質材料および多孔質膜の一方または両方の物理的な動きが包含される。

30

【0033】

必ずではないが、一般に、物質の存在を検出するサイトから離れたサイトにおいて多孔質材料に液体を塗布するときには、多孔質材料および多孔質膜は、液体が塗布される前に互いに接触する。一方で、多孔質材料および多孔質膜が接触するサイトか、またはこれに非常に近いサイトにおいて多孔質材料に液体を塗布するときには、その液体は、一般に膜および材料が接触する前に塗布される。

【0034】

特定結合対メンバーが対象物質が通ることができる多孔質材料とともに位置する場所における膜の直接接触によって、本発明の方法の感度および速度が改善されることがわかっている。したがって、多孔質膜および多孔質材料は、このサイトで接触するか、または少なくともこのサイトの一部にわたって接触することが望ましい。多孔質材料と多孔質膜との間の接触は、特定結合対メンバーが位置する膜の少なくとも一部にわたって、または液体内に対象物質が存在する場合に、検出可能なシグナルを識別できる特定結合対メンバーが位置するサイトにおいて、膜の十分な部分にわたって連続的に接触しなければならない。すなわち、いくつかの実施態様では、特定結合対メンバーが多孔質膜に結合する領域は、多孔質材料と直接接触する領域を越える場合があるが、液体内の物質の存在を検出できるように、十分な量の接触が形成される。

40

【0035】

膜と材料との直接接触が好ましいが、1つ以上の介在する多孔体であり実質的に親水性

50

の材料を、多孔質材料と多孔質膜との間に挿入することが可能である。そのような状況では、介在する多孔質材料は、第2の多孔質材料として効果的に作用するので、本発明の目的に関して、多孔質材料またはパッドであるとみなすことができる。したがって、使用される多孔質材料またはパッドという用語は、同じか、または基本的に同じ機能を提供する複数の材料を包含する。

【0036】

いくつかの実施態様では、材料と膜との接触は、膜および材料に圧力を加えて、特定結合対メンバーが位置する領域の少なくとも一部にわたって、これら2つの完全な、または基本的に完全な接触を確保することを含む。必ずではないが、特定の状況下では、この領域における圧力が本方法の能力を向上させることがわかっている。例えば、本方法の感度および信頼性を向上させることができる。また、反応領域内の試料の量を増加させることができる多孔質材料の入り込み特性を向上させることもできる。圧力によって、多孔質材料と多孔質膜との間の接触量をさらに増加させることができる。すなわち、多孔質材料が試料塗布サイトおよび反応サイトを含むいくつかの実施態様では、反応サイトにおける多孔質材料の加圧によって装置の感度、ひいては本発明のアッセイまたは方法を改善できることがわかっている。あらゆる特定の動作原理に限定することを望むものではないが、膜と材料との間の接触を向上させることに加えて、多孔質材料の反応領域の加圧によって、膜と接触する材料の領域、特に特定結合対メンバーを含む膜の部分への液体の移動が向上し、液体の領域外への移動を妨げる。実質的に、圧縮によって、液体が圧縮領域に集められる。領域外へ移動させずに、領域内への移動を向上させることによって、（加圧していない材料と比較して）その領域内の物質の量が増加し、多孔質膜への物質（存在すれば）の拡散が向上する。

10

20

【0037】

本発明の方法によれば、少なくとも特定結合対メンバーを含む領域において多孔質膜が湿るように、湿らせた多孔質材料と多孔質膜との接触が十分な時間保持される。そのようにすることによって、物質が試料内に存在すれば、その物質は、膜の中、上、周辺、周囲へ拡散して、その膜に関連する特定結合対メンバーと接触することができる。提供される時間の長さは、試料内の物質の量、多孔質材料および膜の多孔性、膜に関連する特定結合対メンバーの量、物質への特定結合対メンバーの特異性および結合強度、温度、および他の要因（これらは全て、概ね迅速な試験のための当技術で使用する時間、濃度、温度などに基づく過度の実験を行わずに、当業者が選択することができる）によって変化するが、一般に、膜の十分な湿潤は1分以内に生じるはずである。いくつかの好適な実施態様では、膜および材料は、約または正確に30秒、約または正確に1分、約または正確に2分、約または正確に3分、約または正確に5分、約または正確に10分、約または正確に15分、約または正確に20分、約または正確に25分、または、約または正確に30分のような、少なくとも30秒間接触が保持される。本願明細書で使用する場合、特に明記しない限り、列挙された時間、温度、および他の数値は、列挙された数の上限または下限において基準数の約5%の範囲を含む。したがって、「60秒」とあれば、57秒乃至63秒のうちの任意の時間の長さが含まれる。

30

40

【0038】

膜と材料との接触の保持は、任意の温度で行うことができる。なお、室温（20乃至25）、30、37、40、または50のような、100以下の温度を用いることが好ましい。実際に、本方法は、同じ特定結合対メンバーおよび物質を使用したELISA試験よりも高い感度を提供することができ、一方で、（ELISAに必要とされる）37ではなく室温で行うことができることが意外にも発見されている。

【0039】

同様に、特定結合対メンバーおよび物質のあらゆる好適な濃度または量を使用することができる。結合パートナー（例、抗原、酵素基質、核酸、または核酸結合タンパク質）の膜結合型の検出に使用される様々な特定結合対メンバー（例、抗体、酵素、核酸）の一般的な量は、公知技術である。例えば、特定結合対メンバーが抗体であるとき、それは、約

50

0.5 ng乃至約1000 ugで、約0.5平方mm乃至約100平方mm以上にわたって膜上に存在させることができる。膜に結合する量は、検出すべき物質の量、選択された標識およびシグナル生成システムによって本質的に発生されるシグナルの量/強度、および特定結合対メンバーを結合する領域のサイズに基づいて選択することができる。これらのパラメータは、各シグナル生成システムの公知の特性に基づいて、当業者が選択および調整することが可能である。

【0040】

いくつかの実施態様では、多孔質材料を多孔質膜と接触させる前に、液体の塗布を行う。他のいくつかの実施態様では、多孔質材料を多孔質膜と接触させた後に、液体の塗布を行う。したがって、いくつかの実施態様では、液体が塗布される前に、多孔質材料と多孔質膜とが互いに接触することになる。一般に、多孔質材料と多孔質膜との間の接触が、試料の塗布前または後に生じるかどうかは重要ではない。接触させる時間は、一般に、特定のアッセイに使用される装置の構成、およびその装置の使いやすさに関連して選択する。

10

【0041】

本方法は、前記特定結合対メンバーおよび前記対象物質を含む複合体の有無を検出するステップであって、当該の複合体の存在が、前記液体試料内に前記対象物質が存在することを示すステップをさらに含む。本発明によれば、試料が対象物質を含む場合、多孔質材料(すなわち反応パッド)と多孔質膜との間の拡散によって、物質は、膜に結合する特定結合対メンバーと接触できるようになる。本発明の方法は、複数の技術的に認識された検出スキームのうちのいずれかによって、特定結合対メンバーおよび物質から形成された複合体を検出する。例えば、物質に特異的である抗体(膜に結合する特定結合対メンバー以外)は、その物質を特定結合対メンバーに触れさせる前(例えば、試料を多孔質材料に塗布して、その試料が多孔質材料を通して移動する前、など)か、または物質と特定結合対メンバーとの接触に十分な時間を与えた後に、物質に触れさせることができる。状況によっては、抗体は、直接検出できる標識(例、コロイド状金のような金属ゾル;染料ゾル;ラテックスのような有色;常磁性のビード;および蛍光化合物)のような、検出可能な部分で標識化される。また、基質(例、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)に触れさせたときに検出可能なシグナルを発する酵素のような、間接的な標識によって標識化することもできる。他の状況では、例えば抗体のFc部分に標識を結合させることによって、抗体は、標識に対する特定結合対メンバーとしての機能を果たす。標識は、一方または両方のメンバーが、検出可能な部分、またはアビジン(ストレプトアビジン)/ビオチン対またはその機能的な同等物のような検出可能な部分を生成することができる物質を含む、特定結合対を含むこともできる。

20

30

【0042】

上述の paragraphs で言及したように、対象物質のための標識は、多孔質材料の構成要素として提供することが可能である。例えば、反応ゾーン、試料塗布ゾーン、または試料移動ゾーン(特定の実施態様では、試料塗布ゾーンと反応ゾーンとの間)に、(乾燥物質として、または多孔質材料内で乾燥させることが可能な液体溶液として)含浸させることが可能である。液体試料が多孔質材料に入って移動するときに、標識は、液体内に溶解され、液体とともに反応サイトに移動し、最終的に膜に移動する。移動プロセス中に、または反応プロセス中に、標識は、物質(存在すれば)に特異的に結合し、最終的に特定結合対メンバー、対象物質、および標識を含む膜結合型の複合体が得られる。標識が多孔質材料内に含まれる場合のいくつかの実施態様では、材料の孔サイズの選択は、標識または物質-標識複合体の移動特性に少なくとも部分的に依存する。

40

【0043】

物質の検出は、試料内の物質に、定性的、半定量的、または量的な情報を提供することができる。定性的検出は、量は必要ではないが、液体内の物質の存在を実行者に通知する情報を提供する。なお、公知の量の特定結合対メンバーを膜に配置することによって、特定結合対メンバーが結合することができる物質の量を知ることによって、および検出のために存在しなければならない物質-標識複合体の量を知ることによって、半量的である物

50

質の検出方法を提供することができる。より詳しくは、これらの量を知ることによって、および検出可能なシグナルを得ることによって、実行者は、その物質が液体内に存在することだけでなく、その物質は、少なくとも検出可能なシグナルを発生させるに必要な量が存在していたことも知ることになる。必要に応じて、飼料の量の量的な測定値は、試験試料のシグナルの強度を、公知の量の物質を含んでいる試料から導出される検量線と比較することによって得ることができる。半定量的および量的なアッセイの様々な設計方法が周知の技術であり、そのあらゆる好適なものを本発明に使用することが可能である。

【0044】

また、検出可能なシグナルが存在しないこと、またはその物質、または物質の存在を示す他の何らかの物質が存在しない場合に別に発生される、シグナルの減少を検出することが可能である。したがって、本発明の方法は、全てのタイプのアッセイ（サンドイッチ型アッセイおよび競合アッセイの両方を含む）、および対象物質に対する少なくとも1つの特定結合対メンバーの結合を検出できる、できないに依存する他のアッセイを包含する。

10

【0045】

本発明の方法は、これに限定されないが、1つ以上の対照反応を提供して、前記方法の1つ以上のステップが成功したかどうかを判断するステップ、1つ以上の試薬が予想通りに働いているかどうかを判断するステップ、または本発明の機能によって信頼できる結果の発生を妨げる物質が試料内に存在しているかどうかを判断するステップを含む、多数の他のステップを含むことができる。対照試薬として使用することができる物質には、これに限定されないが、検出すべき物質または構造的類似体、別の抗体と特異的に反応する抗体、または対象物質またはアッセイで使用される他の何らかの試薬に特異的に結合することができる他のものが挙げられる。したがって、本発明の方法は、検出すべき物質を含む公知の物質を添加して、本方法の1つ以上のステップが設計どおりに機能しているかどうかを判断するステップを含むことができる。当該の対照反応は、当業者に公知であるので、本願明細書ではそれらの設計および実施態様は必要ではない。一般的な対照反応は、標識化された物質を特異的に結合する多孔質膜、または第2の多孔質膜上に第2の領域を提供して、その標識が存在して機能していることを示すだけでなく、その標識が、その膜に関連する任意の結合相手と十分な時間接触していたことも示すステップを含む。当然、複数の線を様々な方向に提供することが可能であり、それぞれの線が、本方法の種々の側面に関する反復的な、または異なる情報を提供する。

20

30

【0046】

加えて、本発明の方法は、主要な対象物質に加えて、試料内の1つ以上の物質を検出することができる。他の物質は、試験する試料内に自然的に発生する他の物質とするか、または陽性対照、標識、競争相手などとしての機能を果たすように、試料に意図的に添加する物質とすることができる。したがって、本発明の方法は、試料内の2つ以上の物質を検出することができる。そのようにした場合、複数の物質を、同じ多孔質膜上に検出することができる。あるいは複数の膜を同じ装置上か、または2つの同一装置上（膜に結合する物質のアイデンティティを除く）に提供することが可能である。

【0047】

本発明の方法は、1つ以上の洗浄ステップを含むことが可能である。任意の特定の方法に限定されないが、洗浄ステップは、一般に、間接的な標識を使用して物質を検出する場合の実施態様に使用される。例えば、物質を使用してシグナル（例、西洋わさびペルオキシダーゼ）を発生させる標識を使用する場合、その標識は、一般に、物質にわたって過度に反応混合物内に存在する。加えて、物質-標識複合体が、膜に結合する特定結合対メンバーにわたって過度に存在する可能性がある。当該のいずれの状況でも、特定結合対メンバーを含む膜の内外に残存することが可能な場合は、過度の標識が標識基質と反応してシグナルを発生し、非特異的シグナルまたは暗騒音を表す。この暗騒音を減じるために、適切な量の適切な洗浄液で膜を洗浄することができる。洗浄液は、使用する量および存在する非結合標識の量に従って、1度または1度以上塗布することができる。同様に、他の洗浄ステップを本方法の他の時点に含めることが可能である。いくつかの実施態様では、洗

40

50

浄ステップを使用して、膜から非結合複合体を洗浄して検出感度を向上させる。当業者は、特異的な結合反応中の様々な時点で、洗浄ステップを行うか、行わないかの利点および不利点を十分承知しているので、洗浄ステップおよび洗浄液の種類および数量を選択して、本発明の特定の実施態様のそれぞれに使用することができる。当該の選択は、過度の実験を行わずに行うことができる。

【0048】

第2の側面では、本発明は、本発明の方法を実施するための装置を提供する。概略的に、本発明の装置は、本発明の方法を実行することができるあらゆる構成要素の構成を備える。さらに具体的には、本発明の装置は、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、前記装置の所定の領域または区域に保持することができる複数のあらゆる構成要素または要素の構成を備え、前記領域または区域は、前記物質に対して直接的または間接的に特異的である特定結合対メンバーを含む、多孔質膜を含む。

10

【0049】

その最も基本的な形態では、本発明の装置は、(a)液体試料を吸収して透過することができる多孔質材料を含む受け具と、(b)検出すべき物質(試料内の物質またはその物質に結合する物質)に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜とを備え、前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形される。前記装置は、前記受け具または前記受け具の一部を含む容器をさらに備えることができる。前記装置は、前記多孔質膜のための把持部をさらに備えることができる。いくつかの実施態様では、前記装置は、互いに接触する前記容器と把持部とを備え、前記2つの要素間の接触によって、前記多孔質膜と前記多孔質材料とが、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって互いに直接接触する。

20

【0050】

受け具は、装置の物理的および機能的ユニットである。それは、保持すべき対象物質を含む、または含むと思われる液体に、領域および容量を提供する。また、液体の貯蔵部を提供して、特定結合対メンバーを含む多孔質膜の内外に拡散させ、本願明細書では反応パッドまたはゾーンと称する。受け具は、あらゆる形状サイズのものことができ、あらゆる好適な材料で製作することができる。受け具は、少なくとも1つの多孔質材料を含み、同様に、本願明細書ではパッドと称する。なお、該多孔質材料は、受け具によって画定される領域のサイズに必ずしも制限されないことに留意されたい。すなわち、単一の多孔質材料または多孔質材料の組み合わせは、受け具の領域にサイズを制限するか、または試料塗布領域、および/または洗浄領域、または装置の特定の構成内に存在する他の領域を越えて延在させることができる。

30

【0051】

多孔質材料(同様に「パッド」と称する)は、1つ以上の液体が通過することができる孔、穴、または空間を有するあらゆる材料で作製することができる。したがって、多孔質材料は、吸収剤であるあらゆる材料のものである。多孔質材料には、これに限定されないが、吸収剤またはろ紙(例えばWhatman^(R)3mm紙、およびFiltrona^(R)製品)のような紙製品、合成ポリマー材料(例、ニトロセルロース、ナイロン)、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン、エチレンビニルアセテート、アクリロニトリルおよびポリテトラフルオロエチレンから形成されるようなプラスチックおよびプラスチック球(例、Porex^(R)プラスチックビード;ボールペンの作製に使用される材料)が挙げられる。他の例には、これに限定されないが、ナノ粒子/球/管が挙げられる。

40

【0052】

材料の孔サイズは、所望の特性に基づいて選択することができる。多孔質材料を形成することができる様々なタイプの材料に、多数の多孔性を利用することが可能である。例えば、塗布される試料が、粒状材料または固体(例、糞便、土壌)を含む場合は、これらの粒状材料または固体を移動させない、または移動を大幅に遅延させる孔サイズを選択する

50

ことができる。同様に、試料が血液を含む場合は、血球および血小板を移動させない、または移動を大幅に遅延させる孔サイズを選択することができる。別様には、試料が、検出サイトにおいて不適當であるあらゆる物質を含まない場合（例えば、ある程度まで事前洗浄した試料）は、材料の孔サイズは、ろ過特性に関係なく選択することが可能である。一般に、孔サイズは、約0.05マイクロメートル乃至約0.5マイクロメートルの範囲である。

【0053】

多孔質材料は、単一の材料から作製するか、または複数の異なる多孔質材料を含むことが可能である。異なる個々の材料は、一方を他方の上に層状にする、2つの端と端を当接する、または液体が、例えば多孔質材料と接触したときに、液体の塗布サイトから多孔質膜上の検出サイトに流れるような、材料の一方の領域から他方へ流れることができる他の構成などの、あらゆる好適な構成とすることが可能である。例えば、多孔質材料は、液体の塗布サイト（塗布ゾーン）における1つのタイプの孔サイズおよび材料、検出サイト（検出ゾーン）における第2の孔サイズおよび/または材料、および検出サイトから離れた（液体の塗布サイトに関して）第3の領域における第3の孔サイズおよび/または材料（第1のものと同じとすることが可能である）を含むことが可能であり、第3のサイトは洗浄液受けサイト（洗浄液受けゾーン）として機能する。孔サイズおよび材料およびその組み合わせは、様々な資料の特性、検出すべき物質、装置の構成、または他の要件に基づいて、個々のニーズに適合するように選択することが可能である。多孔質材料は、これに限定されないが、物質、活性炭、イオン交換樹脂、および界面活性剤のための標識を含む、本発明の実施に有用であるとみなされる物質を含むことが可能である。さらに、多孔質材料は、孔の少ない、孔の無い、または疎水性膜のような不透過性の材料によって、互いに分離することができる。これらの膜は、本発明の方法の実行中のある時点で取り除いて、液体が、1つ以上の物質から1つ以上の他の物質へ移動できるようにすることができる。例えば、2つの多孔質材料は、プルタブに取り付けられた無孔材料によって分離することが可能である。タブを引くことによって無孔材料を取り除いて、洗浄液のような液体が多孔質材料（例、洗浄パッド）に流れることができるようにする。

10

20

【0054】

多孔質膜は、液体および所定のサイズの浮遊物質がそれを通して流れることができるあらゆる好適な材料で作られた膜である。一般に、膜は、物質への膜結合型の分子の特異的な結合によって対象物質の検出に好適な、当業者に公知の材料から作製される。その例には、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、ポリビニルピロリドン膜、ガラス繊維などが挙げられる。

30

【0055】

多孔質膜は、少なくとも1つの特定結合対メンバーを含む。特定結合対メンバーは、それが、装置の製造および使用状態で膜との関連を保持するような方法で、膜と関連付けられる。一般に、特定結合対メンバーは、共有結合、イオン結合、または、疎水結合によって膜に結合する。膜は、結合を高めるために、結合する前に処理することが可能である。同様に、膜は、結合後に処理して、結合を高めるか、または他の物質の、特定結合対メンバーを結合するサイトとは異なる膜上のサイトへの結合を減じることが可能である。特定結合対メンバーは、あらゆる公知の技術を使用して膜に結合することが可能である。さらに、所望の形状、設計、パターン、方向（例、線、十字、点、円）など、および所望のサイズ（例、0.1mm、1mm、2mm、3mm、4mm、5mmの点の直径など；厚さ1mm長さ5mm、厚さ2mm長さ1cmの線など）で膜に結合することが可能である。いくつかの好適な実施態様では、線の形状であり、好都合かつ便利な検出形状を提供する。いくつかの実施態様では、多孔質膜は、特定結合対メンバーを含む2つ以上の異なる領域を含む。いくつかの特定の実施態様では、2つ以上の領域は、同じ特定結合対メンバーを含む。いくつかの他の実施態様では、各領域は、異なる特定結合対メンバーを含む。異なる特定結合対メンバーは、同じ物質に対して特異的とするか（内部再現性対照を提供する）、または異なる物質に対して特異的とすることが可能である（例えば、一方を対象

40

50

物質に対して特異的とし、一方で、1つ以上の他方を他の対象物質または本発明の方法で使用する試薬に対して特異的とする)。

【0056】

したがって、多孔質膜は、特定結合対メンバーに加えて、他の構成要素を含むことが可能である。例えば、試料内の対象物質の検出に使用される標識を特異的に結合する抗体のような、本発明の方法の機能に対する対照として使用される分子を含むことが可能である。また、第2の特定結合対メンバーを含むことが可能であり、第2の特定結合対メンバーは、試料内の第2の対象物質に特異的である(試料に意図的に添加して陽性対照としての機能を果たす物質を含む)。上述のように、特定結合対メンバーは、結合対内の抗原または抗体、結合対内の受容体またはリガンド、または結合対のいずれかの構成要素とすることが可能である。したがって、本発明は、抗体、抗原、受容体、リガンド、一本鎖核酸などを、その結合相手を検出するために膜に結合することを意図するものである。

10

【0057】

いくつかの実施態様では、多孔質膜は、把持部と接触する。把持部は、反応パッドによって膜の少なくとも一部にわたって接触を保持するような場所に、膜を保持することができる。また、必要に応じて、反応パッドと接触するように配置できる位置に、膜を保持することもできる。例えば、把持部は、膜と接触するプラスチックの環、四角いものなどとすることができる。接触によって、把持部上に膜を保持するか、または単純に膜と反応パッドとの接触を保持することができる。把持部は、別個の物理的な構成要素とするか、または、例えば装置の容器の一体部分のような、装置の一体部分として作製することが可能である。

20

【0058】

受け具は、容器内に配置することが可能である。容器は、あらゆる好適な材料で作成することが可能であるが、一般にプラスチックで作製される。容器は、本発明の装置に対する実質的な構造強度および液体の不透過性を提供し、また他の機能を提供することが可能である。本発明の装置の基本構成では、容器は、反応パッドおよび膜を含む。膜は、反応パッドとの接触が可能で、あらゆる好適な形態で提供することができる。例えば、膜は、蝶番を介して、容器に接続される把持部に結合することが可能である。別様には、膜は、容器と一体化された把持部に結合することが可能であり、その容器は、膜が反応パッドと接触するように互いに合わせられる2分割したもので作製される。その他の好適な構成は、当業者に明らかであり、全ての当該の構成は本発明に包含される。

30

【0059】

本発明の装置は、多孔質材料を含む試料塗布領域またはゾーン(本願明細書では、試料塗布パッドとも称する)をさらに備えることができる。上述のように、試料は、受け具または反応パッドに塗布することが可能である。なお、いくつかの実施態様では、試料は、受け具および反応パッドから離れたサイトにおいて添加される。いくつかの当該の実施態様では、試料は、多孔質材料を含む試料塗布パッドに添加される。試料塗布パッドの多孔質材料は、反応パッドに使用されるものと同じ材料とすることが可能である(すなわち、物理的に同じ要素とするか、または同じ材料で作製した2つの別個の要素とすることが可能である)。別様には、多孔質材料を異なる材料とすることが可能であり、2つの材料は、塗布パッドからの液体を反応パッドに移行できるように、互いに接触させて配置する。

40

【0060】

試料塗布ゾーンのサイズは、重要ではない。しかし、試料塗布ゾーンおよび反応ゾーンが、互いに、添加される全ての試料を吸収する十分な吸収能力を有することが好ましい。さらに、試料塗布ゾーンは、塗布パッドを含まない開放領域を含むことが可能である。この領域は、一般に、塗布パッドの周縁部および容器の側面によって定義される。この開放領域は、直接的に、またはあふれたものとして、添加される試料を受けようとして設計することが可能であり、試料内に存在する固体および大きな粒子のろ過および保持を助力することが可能である。

【0061】

50

装置は、多孔質材料を含む洗浄液受けゾーンまたは領域（本願明細書では、洗浄液受けパッドとも称する）をさらに含むことが可能である。洗浄液受けパッドの多孔質材料は、反応パッドおよび/または試料塗布パッドに使用するものと同じ材料とすることが可能である（すなわち、反応パッドおよび試料塗布パッドと物理的に同じ要素とするか、または他のパッドの一方または両方と同じ材料で作製した別個の要素とすることが可能である）。別様には、多孔質材料を反応パッドおよび試料塗布パッドの一方または両方とは異なる材料とすることが可能である。そのような状況では、洗浄液受けパッドを、（反応パッドを通った）膜からの洗浄液が洗浄液パッドに入れるように、反応パッドまたは塗布パッド、あるいはその両方と接触させて配置する。

【0062】

いくつかの実施態様では、着脱可能な液体不透過性または半透性バリアを、装置の洗浄液受けパッドと1つ以上の他のパッドとの間に挿入する。このバリアは実施態様内に存在し、洗浄液が装置に添加されるまで、反応パッドまたは塗布パッドからのいかなる液体も洗浄液受けパッドに入らないようにする。一般に、液体の流れおよび反応パッドの保持特性によりバリアは不要であるが、確実さを増すために、または他の理由のために、バリアを装置内に含めて、反応パッド内に存在する液体の量を増加させることが可能である。他のいくつかの実施態様では、1つ以上の液体不透過性バリアを、装置内に存在する1つ以上の種々のパッドの間に含む。

【0063】

装置は、試料塗布パッドまたはゾーンと反応パッドまたはゾーンとの間に、ろ過パッドまたはゾーンを備えていてもよい。試料塗布パッドおよび反応パッドは、試料を好適にろ過することができるが、試料が膜に触れる前に、試料の付加的なろ過が望ましい場合もある。そのような状況では、ろ過パッドを備えることが可能である。いくつかの実施態様では、ろ過パッドは、単純に、膜によって覆われた領域を越えた反応パッドの延長部分である。別様には、ろ過パッドは、単純に、試料が添加される領域を越えて延在する試料塗布パッドの延長部分とすることができ、いくつかの実施態様では、試料塗布パッド、ろ過パッド、および反応パッドは同じ要素であり、これら種々の「パッド」（または「領域」）は、その物理的特性ではなく、機能および装置内の位置に基づいて指定される。ろ過パッドの主要機能は、特定の物質の反応パッドへの移動を遮断すること、または抑制することである。当該のろ過は、有色複合物を抑制すること、バックグラウンドノイズを生じさせる大きな粒子を抑制することなどによって、対象物質の検出に貢献することが可能である。

【0064】

上記説明から分かるように、反応パッド、試料塗布パッド、およびろ過パッドは、全て（同じ材料か、または異なる材料の）多孔質材料から作製することが可能である。同様に、洗浄液受けパッドは、多孔質材料から作製することが可能である。多孔質材料は様々な機能を果たすが、概してそれらは全て、液体が別の材料に移動するように、その材料を通して液体を引き込む役目をする。例えば、試料塗布パッド、ろ過パッド、および反応パッドによって、液体は塗布サイトから検出サイト（すなわち、膜）に移動することができ、同時に、種々の固体および粒子、有色材料、または他の物質をろ過することができる。膜に洗浄液を添加するときに、洗浄液受けパッドは、反応パッドから液体を引き込むことができるので、洗浄液は、膜上の物質の特定の検出を妨げる可能性のある不要な物質を取り除くことができる。

【0065】

多孔質材料は、各領域またはゾーンにおいて様々な機能を果たし、これらの機能は、多孔質材料を含む装置の他の領域内に提供することができる機能とかなり重複する。説明を簡単にするために、機能の多くを、装置の特定の領域のそれぞれに関して記述する。しかし、その特性は、記述された領域のみに限定されるものとみなすべきではない。異なる実施態様における多孔質材料の特定の物理的な位置は、当業者に明らかとなり、また、各領域内の多孔質材料の特定の機能も同様に明らかになる。特性は、その領域に限定される

10

20

30

40

50

ものとみなすべきではない。例えば、受け具の領域では、多孔質材料の主要機能は、保持すべき対象物質を含む、または含むと思われる液体の領域または量を提供すること、特定結合対メンバーを含む多孔質膜への液体の拡散、およびそこから液体を取り出すための貯蔵部を提供すること、および液体を反応領域に引き込むことである。したがって、この領域内の多孔質材料は、本明細書において「反応パッド」と称することがある。なお、いくつかの特定の実施態様では、反応パッドは試料受け領域でもあるので、試料を受けて、一般にろ過を行うようにも機能する。さらに、反応パッドと接触する膜の配置により、反応パッドは、膜を洗浄する実施態様内の洗浄液のための初期受容体としての機能を果たす。したがって、反応パッドは、初期の洗浄液受けパッドとしての機能も果たす。

【0066】

当然、他の要素を本発明の装置に含めて、様々な利点を提供することができる。全ての当該の付加的な要素は、本発明に包含されるものと理解されたい。さらに、付加的な利点を提供する付加的な方法ステップを含むことができ、それらは本発明に包含される。当業者は、過度の実験を行わずに、また本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、当該の要素および方法ステップを含むことができる。

【0067】

いくつかの実施態様では、キット内に装置を備える。このキットは、装置を単独で、1つ以上の同じ、または複数の異なる様々な構成の装置を備えることができる。別様には、キットは、本発明の方法の少なくとも1つの実施態様の実行に必要な、材料、試料、および装置のうちのいくつか、または全ての材料のような他の材料を備えることが可能である。

【0068】

キット自体は、厚紙、プラスチック、金属、またはガラスなどのあらゆる好適な材料で作製することができる。厚紙およびプラスチックは、キットの好適な材料である。キットは、キットによって提供される構成要素の全てを適切に含むように作製される。したがって、キットによって提供されるように選択された、種々の構成要素を保持するような適切なサイズ、形状、および強度に設計される。

【0069】

キットが提供する構成要素は、1つ以上の容器内に存在させることができる。本発明の装置の容器は上述したものであり、この性質の装置の作製に有用であることが公知の様々なプラスチック材料のいずれかを含む、あらゆる好適な材料で作成することができる。他の構成要素のための容器は、プラスチック（例、ポリマー材料）、ガラス、金属、およびゴムを含むがそれらに限定されない、あらゆる好適な材料で作成することができる。容器は、あらゆる好適な形状または形態とすることができるので、例えば、金属、プラスチック、ゴム、ガラス、または布などで作製した、ボトル、小瓶、缶、ジャー、またはバッグとすることができる。容器は、再封可能に、または自動的に封止して最初の開封後に未使用の内容物を保存することが好ましい。

【0070】

したがって、いくつかの実施態様では、キットは1つ以上（例、10、20、25、30、50、100）の装置を備え、少なくとも1つの容器は、少なくとも1つの本発明の実施に有用である構成要素を含む。例えば、キットは、再封可能な小袋内に、単独で、または2つ以上を合わせて封止した、25の装置を備えることができる。状況に応じて、この小袋は、乾燥剤を含み、貯蔵中の内容物を低水分に保持することができる。また、キットは、あらゆる好適な容器および数/容量で、次の構成要素を含むことが可能である：元の試料を希釈するための希釈剤（水溶性が好ましい）；洗浄用緩衝剤（水溶性が好ましい）；特定結合対メンバー（例えば、試料内の対象物質に結合するための複合体、および、装置の多孔質膜に配置された抗体によって結合できるもの）；基質（例えば、酵素反応または検出可能なシグナルを発生するための基質）；陽性対照（例えば、公知の親和性によって装置の多孔質膜に配置された抗体に結合する、公知のアイデンティティの抗原）；ピペット（例えば、試料または装置に1つ以上の試薬を添加するための使い捨てピペット）

10

20

30

40

50

；試験管、手袋、塗布棒、ピペットチップ。当業者は、キットの他の任意の構成要素を想定することができ、全ての他の当該の構成要素は、本発明に包含される。

【0071】

少なくとも装置は、キットに挿入する前に、その間に、またはその後殺菌することが好ましい。1つの、いくつかの、または全ての他の構成要素は、キットに挿入する前に、その間に、またはその後殺菌することが好ましい。非常に好適ないくつかの実施態様では、キット内の各構成要素は、無菌のものであるか、または他の構成要素の1つ以上とは別々に、またはキット内で一緒に殺菌したものである。殺菌は、これに限定されないが、液体のろ過、電磁放射（例、UV、照射）による照射、化学殺菌（例えば、アルコールのような殺菌剤によって拭き取る）などを含む、あらゆる公知の手段によって達成することができる。

10

【0072】

キットの1つ以上の構成要素を使用するための、または本発明の方法を実施するための使用説明書をキット内に含めることが可能である。この使用説明書は、紙、カード、プラスチックシートなどへの印刷物のような、別個の構成要素として提供することが可能である。別様には、使用説明書は、キット自体（例えば、キットの側面、上面、または底面）に備えることが可能である。別様には、使用説明書は、キットの構成要素のための容器に備えることが可能である。

【0073】

以下、本発明の様々な限定されない特定の実施態様を示す図を参照する。上述の要素は、互いの様々な空間的關係において記述され、本発明の方法を実行する本発明の装置の様々な構成の使用について記述される。図示の大きさは例示のためだけに提供されるものであり、また装置の実際のサイズおよび形状は、図に提供されたものに限定されないことを理解されたい。例えば、サイズは、図に例示されたものの大きさか、またはこれより大きく、あるいは小さくなりうる。さらに、図は、互いに対して必ずしも適切な尺度で全ての要素を示したのではなく、いくつかは明確化または他の理由によって誇張されていることを理解されたい。

20

【0074】

図1は、概して本発明の装置1の基本構成を示す。図1に示される装置は、パッド110（本願明細書では「反応チャンパーパッド」とも称する）の形態で多孔質材料を含む、受け具100を備える。装置は、膜の中央の単一の線に沿って、共有結合、疎水性、または、イオン結合によって付着させた、対象物質のための特定結合対メンバー130を含む多孔質膜120をさらに備える。この装置の構成を有する本発明の実施では、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、任意の領域において受け具100に塗布する。次いで多孔質膜120を、膜120および材料110が、少なくとも特定結合対メンバー130を配置した膜110の領域にわたって、連続的な接触表面を形成するように、受け具100の多孔質材料110と直接接触させて配置する。多孔質材料110内に存在する液体は、これで膜120の中に、外に、これを通して、およびその周辺に拡散することが可能となり、物質が存在すれば、特定結合対メンバー130と接触して特異的に結合する。物質がすでに標識化されているいくつかの実施態様では、この時点で結合の検出が達成される。標識がまだ物質と関連付けられていないいくつかの実施態様では、特定結合対メンバーと物質の複合体を標識化してから、検出することができる。いくつかの実施態様では、バックグラウンドを減少させるために洗浄ステップを含む。洗浄を行うときには、洗浄液を膜120に塗布して、多孔質材料110に浸漬できるようにする。これによって、膜120に結合していない材料が取り除かれ、シグナル/ノイズ比が向上する。いくつかの実施態様では、液体内の物質は、最初に、膜に関連付けられたものに特異的に結合する特定結合部材（例、複合体）によって結合し、2つの特定結合対メンバーには反応する時間が与えられる。

30

40

【0075】

図1の装置1は、他の要素とともに使用するとき、以下の様々な点において「反応チ

50

ャンバー」とも称する。

【0076】

図2では、多孔質材料210を含む受け具200を備えた本発明の装置2を示す。本実施態様では、多孔質膜220は、特定結合対メンバー230の領域において多孔質膜220と多孔質材料210とが連続的に接触するように、多孔質材料210と接触する。この装置の構成を有する本発明の実施では、多孔質膜220と接触する領域以外の任意の領域において、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を受け具に塗布する。多孔質材料内に存在する液体は、これで膜220の中に、外に、これを通して、およびその周辺に拡散することが可能となり、物質が存在すれば、特定結合対メンバー230と接触して特異的に結合する。物質がすでに標識化されているいくつかの実施態様では、この時点で結合の検出が達成される。標識がまだ物質と関連付けられていないいくつかの実施態様では、特定結合対メンバーと物質の複合体を標識化してから、検出することができる。いくつかの実施態様では、バックグラウンドを減少させるために洗浄ステップを含む。洗浄を行うときには、洗浄液を膜220に塗布して、多孔質材料210に浸漬できるようにする。これによって、膜220に結合していない材料が取り除かれ、シグナル/ノイズ比が向上する。

10

【0077】

図3は、本発明の装置3の別の実施態様を示し、多孔質材料310を含む受け具300は容器335内に含まれ、多孔質膜320は把持部336によって保持される。本実施態様では、把持部336および容器335は、プラスチックで作製されている。把持部336は容器335と一体化され、これらは蝶番338の比較的柔軟なプラスチック部分によって連結される。他のいくつかの実施態様では、他の材料および/または他の構造物を使用して、これに限定されないが、蝶番機能の提供において使用する。

20

【0078】

この本発明の装置の構成を有する本発明の方法の実施では、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、多孔質材料310の任意の領域において受け具300に塗布する。塗布は、直接行うか、または領域331のような受け具300と容器335との間に存在する空間を通じて行う。膜320を含む把持部336は、次いで、特定結合対メンバー(図示せず)が存在する膜320の少なくとも一部において、膜320が多孔質材料310と接触するように、蝶番338を通じて回転させる。留め具すなわちリップ337は、把持部336を係合して、上述のような膜320と材料310との接触を保持する。多孔質材料310内に存在する液体は、これで膜320の内外に拡散することが可能となり、物質が存在すれば、膜320上に存在する特定結合対メンバー(図示せず)と接触して特異的に結合する。物質がすでに標識化されているいくつかの実施態様では、この時点で結合の検出が達成される。標識がまだ物質と関連付けられていないいくつかの実施態様では、特定結合対メンバーと物質の複合体を標識化してから、検出することができる。いくつかの実施態様では、バックグラウンドを減少させるために洗浄ステップを含む。洗浄を行うときには、洗浄液を膜320に塗布して、多孔質材料310に浸漬できるようにする。これによって、膜320に結合していない材料が取り除かれ、シグナル/ノイズ比が向上する。

30

40

【0079】

図4Aは、本発明の装置4を示し、図3の装置3を、多孔質膜410と接触して配置される洗浄液受けパッド440を含むように変更したものである。洗浄液受けパッド440は、反応パッド410と同じか、または異なる多孔質材料で作製される。本実施態様では、洗浄液受けパッド440は、反応パッド410とは別個のパッドである。しかし、他のいくつかの実施態様では、反応パッド410および洗浄液受けパッド440は同じ要素であり、主に機能に基づいて区別される。

【0080】

さらに具体的には、反応パッド410を備えた受け具400は、容器435内に含まれ、受け具400だけでなく洗浄液受けパッド440も含む。多孔質膜420は、把持部4

50

36によって保持される。本実施態様では、把持部436および容器435はプラスチックで作製される。把持部436は容器435と一体化され、これらは蝶番438の比較的柔軟なプラスチック部分によって連結される。他のいくつかの実施態様では、他の材料および/または構造物を使用して、蝶番機能などを提供する。

【0081】

この本発明の装置の構成を有する本発明の方法の実施では、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、反応パッド410の任意の領域において受け具400に塗布する。塗布は、直接行うか、または領域431のような受け具400と容器435との間に存在する空間を通じて行う。膜420を含む把持部436は、次いで、特定結合対メンバー（図示せず）が存在する膜420の少なくとも一部において、膜420が多孔質材料410と接触するように、蝶番438を通じて回動させる。留め具すなわちリップ437は、把持部436を係合して、上述のような膜420と反応パッド410との接触を保持する。反応パッド410内に存在する液体は、これで膜420の内外に拡散することが可能となり、物質が存在すれば、膜420上に存在する特定結合対メンバー（図示せず）と接触して特異的に結合する。物質がすでに標識化されているいくつかの実施態様では、この時点で結合の検出が達成される。標識がまだ物質と関連付けられていないいくつかの実施態様では、特定結合対メンバーと物質の複合体を標識化してから、検出することができる。

10

【0082】

いくつかの実施態様では、バックグラウンドを減少させるために洗浄ステップを含む。洗浄を行うときには、洗浄液を膜420に塗布して、反応パッド410に浸漬できるようにする。これによって、膜420に結合していない材料が取り除かれ、シグナル/ノイズ比が向上する。一般に、膜420に塗布した洗浄液の量は、パッド410の収容力を超えており、対象物質を含む液体によって（少なくとも部分的に）すでに湿っている。この状況では、過剰な洗浄液（および元の液体試料の一部）は、反応パッド410を通して洗浄液受けパッド440に移動する。

20

【0083】

図4Bは、図4Aに示される本発明の装置の代替構成を示し、洗浄液受けパッド440を反応パッド410の下に配置したものである。装置の動作の原理は、図4Aに関して上述したものと同じである。しかし、本構成では、液体が反応パッド410と容器435との間の空間に塗布されることは好ましくない。この図では、全ての要素は、図4Aのものと同じアイデンティティを有する。

30

【0084】

図4Cは、図4Aに示される装置の代替構成を示し、洗浄液受けパッド440および反応パッド410を、着脱可能な液体不透過性バリア445によって分離したものである。本構成では、不透過性の壁445は、洗浄液受けパッド440および反応パッド410との間に挿入され、スロット446を介して容器435の外部に延在してタブ447を触れさせる。この構成を有する本発明の方法の実施は、図4Aに関して上述したものと同じである。なお、不透過性の壁445は、洗浄液受けパッド440への液体の移動を遮断するので、不透過性の壁445は、一般に、膜420および反応パッド410に接触した後で、洗浄液を膜420に塗布する前に取り除かれる。また、このように使用することで、膜420の内外の試料の拡散が所望の時間進行した後まで、元の試料の塗布/反応パッド410から洗浄液受けパッド440への流れも制限する。このパネル内に示される全ての他の要素は、図4Aに関して上述したものと同じである。

40

【0085】

図5に示される別の構成の装置では、図1に示される基本的な設計を変更して、受け具500の多孔質材料510が反応チャンバーを越えるように（すなわち、多孔質膜520の領域よりも大きい）、装置5が試料塗布パッド551を備えた液体試料塗布ゾーン550を備えるように形成する。示される実施態様では、試料塗布パッド551および反応パッド510は、同一である。しかし、他のいくつかの実施態様では、これら2つの要素は

50

別個のものであり、液体が一方から他方に流れるように、それらが物理的に互いに接触するように構成する。この装置の構成を有する本発明の実施では、対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を、試料塗布ゾーン 550 内の任意の領域において試料塗布パッド 551 に塗布する。その多孔性の性質により、試料塗布パッド 551 によって、塗布された試料の少なくとも一部が、反応パッド 510 に移動する。試料は、次いで受動拡散を通じて多孔質膜 520 の内外に移動することができ、対象物質が存在すれば、多孔質膜 520 上の特定結合対メンバー（図示せず）と接触して結合することができる。検出および洗浄は、必要に応じて、上述のように行うことができる。

【0086】

図 6 は装置 6 を示し、図 5 に示される本発明の装置の構成であるが、試料塗布パッド 651 および反応パッド 610 のための容器 635 を含み、また多孔質膜 620 のための把持部 636 を含むように変更したものである。この特定の実施態様では、容器 635 は、塗布パッド 651 に液体試料を塗布できるようにする開口部、すなわちポート 655 を備える。この装置の実施態様の使用は、上述のように進めることができる。

10

【0087】

図 7 は装置 7 を示し、図 6 に示される装置の構成であるが、洗浄液受けパッド 740 を、反応パッド 710 の隣に接触させて備えたものである。この装置の構成を有する本発明の実施では、試料塗布パッド 751 に試料を塗布した後に、液体が反応パッド 710 に移動して多孔質膜 720 の内外に拡散する。洗浄液は膜 720 に添加され、過剰な洗浄液は（元の液体試料の一部とともに）反応パッド 710 を通って、洗浄液受けパッド 740 に流れる。特に参照したものの以外、図に示される全ての要素は、図 6 および / または図 5 内のものと同一である。示される類似の要素は、図面間において同じ要素である。

20

【0088】

図 8 は装置 8 を示し、本発明の装置の構成であり、反応パッド 810 は、液体試料塗布パッド 851 および洗浄液受けパッド 840 と同じ材料で作製されているが、把持部 836 によって及ぼされる圧力によって、液体試料塗布パッド 851 および洗浄液受けパッド 840 と比較して加圧されている。この本発明の好適な実施態様では、膜 820 に圧力を加えることによって、反応パッド 810 の圧縮が生じる。この圧縮は、反応パッド 810 における試料の保持を向上させて、反応パッド 810 と膜 820 との間の試料の拡散を促進する。特に参照したものの以外、図に示される全ての要素は、図 7、図 6 および / または図 5 内のものと同一である。示される類似の要素は、図面間において同じ要素である。

30

【0089】

図 9 は装置 9 を示し、本発明の装置の構成であり、反応パッド 910 は、液体試料塗布パッド 951 および洗浄液受けパッド 940 と同じ材料で作製されているが、容器 935 によって（多孔質膜 920 に対して）下から及ぼされる圧力によって、液体試料塗布パッド 951 および洗浄液受けパッド 940 と比較して加圧されている。図では、容器 935 によって圧縮が生じ、この効果を提供する形状に成形される。しかし、他の同等の実施態様では、容器 935 は、反応パッド 910 に圧力を加える更なる要素を備える。容器 935 による加圧は、図 8 に関して上述したもののおよび明細書内の他の場所で述べたものと同じ利点を提供する。特に参照したものの以外、図に示される全ての要素は、図 8、図 7、図 6 および / または図 5 内のものと同一である。示されるおよび / または番号をつけた類似の要素は、図面間において同じ要素である。

40

【0090】

図 10 は、本発明の装置 10 を示し、装置 10 の外部を上から見たものである。この図では、試料塗布ポート 1055 が装置 10 の一端に位置し、多孔質膜 1020 の上の装置 10 の開口部は、対象物質の存在の検出（および、状況に応じて、1 つ以上の対照反応）を観察することができる検出窓 1060 を提供する。ポート 1055 および窓 1060 は、容器 1035 上に配置される。この装置の実施態様を使用した方法の実施では、ポート 1055 の下または近くの塗布パッドまたは反応パッドに、パッドに直接、またはパッドと容器 1035 との間の空間に試料を添加する。試料またはその一部は、少なくとも膜 1

50

020と接触するまで、好ましくは膜1020の下の反応パッド（図示せず）を通過して、パッドに沿って移動する。膜1020の中、外、上、および全体への試料の拡散によって、試料内の対象物質と膜1020に関連する特定結合対メンバー（図示せず）との間の接触が可能となる。膜上の特定結合対メンバーと結合する物質の検出は、窓1060を通して膜を観察することによって行うことができる。

【0091】

図11は、図10に示される装置11の代替構成を示す。本構成では、試料塗布ポート1155が装置11の1つのコーナー部に配置され、検出窓1160および膜1120は中央に配置される。この装置の実施態様による本発明の方法の実施では、ポート1155の下または近くの塗布パッドまたは反応パッド（図示せず）に、パッドに直接、またはパッドと容器1135との間の空間に試料を添加する。試料またはその一部は、少なくとも膜1120と接触するまで、パッドに沿って移動する。膜1120の中、外、上、および全体への試料の拡散によって、試料内の対象物質と膜1120に関連する特定結合対メンバーとの間の接触が可能となる。膜上の特定結合対メンバーと結合する物質の検出は、窓1160を通して膜を観察することによって行うことができる。

10

【0092】

図12は、多孔質膜1220が特定結合対メンバー1230を含み、対象物質および陽性対照1270に対して特異的である、本発明の装置12の構成の平面図である。本構成では、両方の要素が、検出窓1260によって画定される領域内に存在するように、膜1220上に配置される。特に述べられていない図12に示される全ての要素は、図11に示されるものと同一であり、全てが同じ機能を有する。本発明の方法の実施は、上述の開示に基づいて進める。この装置の実施態様を使用した方法の実施によって、未知の物質に対する単一試料の試験が可能になり、また本装置および方法の機能に陽性対照を提供する。

20

【0093】

図13は、容器1335内の単一の試料塗布パッド1351が分岐して2つの別個の反応パッド1310aおよび1310bに連結した、本発明の装置13の構成を示す。それぞれのパッドは、異なる多孔質膜1320aおよび1320b、および異なる洗浄液受けパッド1340aおよび1340bの少なくとも部分的に下においてこれらと接触する。多孔質膜1320aおよび1320bは、特定結合対メンバー1330aおよび1330bを含み、それぞれは異なる物質に対して特異的である。この装置の構成では、本発明の方法を使用して、単一液体試料内の2つの異なる物質を検出することができる。いくつかの実施態様では、物質のうちの1つが試料内に（自然の、または添加された構成要素として）存在することがわかっているので、1つの膜（1320aまたは1320b）は、本装置および方法に対する陽性対照として作用する。

30

【0094】

図14Aは、試料塗布パッド1451が容器1435によって画定される装置14の内部の領域を越えて延在する、本発明の装置14の構成を示す。試料塗布パッド1451は、ろ過パッド1470、反応パッド1410、および洗浄液受けパッド1440と一体化される。反応パッド1410は、少なくとも部分的に膜1420の下においてそれと直接接触し、特定結合対メンバー1430を含む。本発明のこの装置の構成を使用した本発明の実施では、塗布パッド1451は、液体に浸漬すること、液体の流れ（例、尿の流れ）に挿入すること、ピペットによってパッドに試料を塗布すること、などによって液体試料と接触する。液体試料は、塗布パッド1451を通過してろ過パッド1470に入る。いくつかの実施態様では、対象物質に結合する標識（図示せず）は、ろ過パッド1470内に存在し、液体によって可溶化される。標識は、ろ過パッド1470の通過中（および/またはアッセイ中の後半）に試料内に存在する物質に結合する。液体試料は、次いで反応パッド1410に入り、膜1420内に、これを通過して、その外に、およびその周辺に拡散する。いくつかの実施態様では、対象物質に結合する標識は、反応パッド1410内および/またはその表面に存在し、液体によって可溶化される。標識は、反応パッド1410の通

40

50

過中（および／またはアッセイ中の後半）に試料内に存在する物質に結合する。反応パッド1410から膜1420内に、これを通して、その外に、およびその周辺に拡散することによって、（存在すれば）対象物質または基質-標識複合体の特定結合対メンバー1430との接触が可能になる。直接的な標識を使用したいいくつかの実施態様では、標識は、（上述のように）初期に物質に結合させるか、または特定結合対メンバーへの物質の結合と同時に、またはその後物質に結合させることができる。特定結合対メンバー-物質-標識複合体を形成すると、物質の存在を検出することができる。間接的な標識を使用したいいくつかの実施態様では、標識は、上述の任意の時期に添加することができる。特定結合対メンバー-物質-標識複合体を形成すると、あらゆる過剰な標識、および膜上に存在している可能性のある他の物質は、洗浄液を膜1420に添加することによって洗浄して取り除くことができる。洗浄液は、膜1420を通して反応パッド1410に入る。反応パッド1410の収容力を超える過剰な洗浄液が存在するので、液体は洗浄液受けパッド1440、ろ過パッド1470、またはその両方に導かれる。洗浄液受けパッド1440は、一般に（塗布ゾーン1451において添加すべき適切な量を選択することにより）乾燥しているか、または実質的に乾燥しており、一方で、ろ過パッド1470は、少なくとも部分的に湿っているので、洗浄液受けパッド1440は、一般に、膜に塗布される洗浄液の大部分を吸収する。洗浄は、好適なシグナル/ノイズ比を達成するまで何度でも繰り返すことが可能である。洗浄後に、間接的な標識のための基質を添加し、必要に応じて別の洗浄を行ってバックグラウンドシグナルを減じることが可能である。特定のシグナルの検出は、元の試料内の対象物質の存在を示す。

10

20

【0095】

図14Bは、図14Aに示される装置14の別の実施態様を示す。図14Bの装置では、塗布パッド1451は、対象物質に結合する酵素複合体を含む尿のような試料が直接塗布される、吸収性プラスチック材料を含む。試料を加えた酵素複合体は、塗布パッド1451と一体であるろ過パッド1470を通して移動し、容器1435によって加圧されたろ過パッド1470を通して容器1435に入る。試料を加えた酵素複合体は、ろ過パッド1470と一体であり、ろ過パッド1470と同様に容器1435によって加圧されたろ過パッド1470を通して反応パッド1410に入る。対象物質が存在する場合は、試料塗布パッド1451、ろ過パッド1470、または反応パッド1410の通過中に、塗布前の混合時に酵素複合体と反応する。試料は、物質（または物質-標識複合体複合体）が膜1420の中に、外に、およびこれを通して拡散し、特定結合対メンバー1430（図示せず）と接触して複合体を形成するための十分な時間、膜1420と接触する。次いで洗浄液を膜1420に塗布し、過剰な洗浄液は膜1420を通して、少なくとも洗浄液受けパッド1440に入る。試料内の物質の有無の検出は、特定結合対メンバー1430（図示せず）において、またはこの近くにおいて膜1420が発生するシグナルを検出することによって行う。

30

【0096】

図14Cは、図14Aおよび14Bに示される装置14のさらに別の構成を示す。本構成では、試料塗布パッド1451、ろ過パッド1470、反応パッド1410、またはこれらを2つまたは全て組み合わせたものは、金複合体を含む。金複合体は、対象物質に特異的に結合し、パッドに浸透するときに、塗布された液体試料によって溶解されて、物質が存在すれば結合する。膜1420の中に、外に、これを通して、およびその周辺への拡散によって（現在ろ過されている）液体が膜1420と接触すると、物質-金複合体は、特定結合対メンバー1430（図示せず）に結合し、特定結合対メンバー1430において、またはこの近くにおいて、液体と膜1420との30秒またはそれ以上の接触によって、検出可能なシグナルを発生させる。液体内の物質の存在は、洗浄ステップを必要とせずに、検出窓1460においてシグナルを（一般に肉眼によって）検出することによって判断する。

40

【0097】

図15は、本発明の装置15の構成を示す。図15Aに示されるように、容器1535

50

は「二枚貝型」型容器であり、上半分 1 5 3 5 a および下半分 1 5 3 5 b が、柔軟な蝶番 1 5 8 0 によって周縁部に沿って互いに取り付けられる。

【0098】

図には示されないが、いくつかの実施態様では、膜のための把持部が上半分 1 5 3 5 a と一体化され、検出窓の周縁部を画定する。試料供給ポートは、同様に上半分 1 5 3 5 a と一体化され、塗布パッドの上のサイトにおいて上半分 1 5 3 5 a の開口部によって画定される。上半分 1 5 3 5 a は、1 つ以上のピンまたはピンを収容するための凹部も備え、ピンと凹部との係合によって、上半分 1 5 3 5 a および下半分 1 5 3 5 b を互いに保持する摩擦嵌め合いが生じる。

【0099】

いくつかの代表的な実施態様では、下半分 1 5 3 5 b は、試料塗布パッド、ろ過パッド、反応パッド、および洗浄液受けパッドを含む。また、一般に、ピンまたは 1 つ以上のピンを収容するための 1 つ以上の凹部も備え、ピンと凹部との係合によって、上半分 1 5 3 5 a および下半分 1 5 3 5 b を互いに保持する摩擦嵌め合いが生じる。

【0100】

図 1 5 B は、図 1 5 A に示される装置 1 5 の一実施態様の下半分の平面図を示す。図では、試料塗布パッド 1 5 5 1 は、ろ過パッド 1 5 7 0、反応パッド 1 5 1 0、および洗浄液受けパッド 1 5 4 0 と一体化され、それらは全て幅 2 . 2 c m である。反応パッド 1 5 1 0 は、試料塗布パッド 1 5 5 1、ろ過パッド 1 5 7 0、反応パッド 1 5 1 0、および洗浄液受けパッドよりも 0 . 3 c m 広く（各側 0 . 1 5 c m ずつ）、膜 1 5 2 0（図示せず）を完全に支持し、その寸法は、長さ 0 . 7 5 c m、幅 2 . 5 c m である。摩擦嵌め合い調整ポスト凹部 1 5 8 1 は、容器 1 5 3 5 b の一部として、また留め具ポスト 1 5 8 2 として存在する。

【0101】

図 1 5 C は、図 1 5 A および / または図 1 5 B に示される装置 1 5 の側面からの断面図であり、上半分 1 5 3 5 a は上方に位置するが、下半分 1 5 3 5 b とは接触せず、説明のために蝶番を取り除いて上半分および下半分を調整できるようにする。図は、試料塗布ポート 1 5 5 5 および観察または検出窓 1 5 6 0 配置を示す。

【0102】

図 1 5 D は、図 1 5 A、図 1 5 B および / または図 1 5 C に示される装置 1 5 の側面からの断面図であり、上半分および下半分が摩擦嵌め合いによって連結される。図から分かるように、本実施態様では、上半分 1 5 3 5 a と下半分 1 5 3 5 b との連結によって、膜 1 5 2 0 が反応パッド 1 5 1 0 と接触する領域およびその近くにおいて、反応パッド 1 5 1 0 の圧縮が生じる。

【0103】

図 1 6 は、本発明の装置の別の実施態様を示す。図 1 6 A では、閉じた状態の装置を示す。図 1 6 B では、開いた状態の装置を示す。本実施態様では、装置 1 6 は、上半分 1 6 3 5 a と下半分 1 6 3 5 b とを備えたプラスチック製の蝶番付容器を備える。下半分 1 6 3 5 b は、試料供給ポート 1 6 5 5 を備え、液体試料塗布パッド 1 6 5 1、ろ過パッド 1 6 7 0、および反応パッド 1 6 1 0 を一体的に組み合わせたものを含む。上半分 1 6 3 5 a は、柔軟な蝶番 1 6 8 0 によって下半分 1 6 3 5 b に取り付けられ、他の容器 1 6 3 5 と同じプラスチック材料で作製される。上半分 1 6 3 5 a は、洗浄液受けパッド 1 6 4 0 と多孔質膜 1 6 2 0 とを含む。多孔質膜 1 6 2 0 は、少なくとも 1 つの特定結合対メンバー（図示せず）を含む。

【0104】

閉じた位置にあるとき、膜 1 6 2 0 は、反応パッド 1 6 1 0 と洗浄液受けパッド 1 6 4 0 との間に挟まれて両方のパッドと接触する。接触は、少なくとも 1 つの特定結合対メンバー（図示せず）を含む膜 1 6 2 0 の少なくとも一部にわたって、反応パッド 1 6 1 0 と膜 1 6 2 0 との間に生じる。試料は、塗布ポート 1 6 5 5 を通じて塗布パッド 1 6 5 1 に塗布され、試料は塗布パッド 1 6 5 1 およびろ過パッド 1 6 7 0 を通じて反応パッド 1 6

10

20

30

40

50

10に移動する。反応パッド1610内に存在する試料の一部は、膜1620の内外に拡散し、特定結合対メンバーと接触し、対象物質が存在すれば、特定結合対メンバーに結合し、膜1620上に保持される。

【0105】

物質と特定結合対メンバーが十分な時間反応した後に、上半分1635aおよび下半分1635bは、2つが蝶番1680を軸に回転することによって分離される。直接的な標識を使用した場合、その標識はこの時点で添加するか、または反応パッド1610、ろ過パッド1670、または塗布パッド1651に存在させておくことが可能であり、すでに対象物質と結合している。直接的な標識を使用するとき、物質の存在の検出はこの時点で行うか、または膜1620を洗浄してシグナル/ノイズ比を向上させることが可能である。洗浄を行う場合、洗浄液を膜1620に添加し、洗浄液は(膜1620を通した後に)洗浄液受けパッド1640によって吸収される。間接的な標識を使用する場合、標識(または、標識が塗布パッド1651、ろ過パッド1670、または反応パッド1610に組み込まれている場合は、標識のための基質)を、上半分1635aおよび下半分1635bを分離させた後に膜1620に塗布し、特定結合対メンバーを結合した物質との反応に十分な時間、膜1620との接触を保持することができる。洗浄液は、次いで上述のように膜1620に塗布される。必要に応じて、次いで間接的な標識のための基質を膜1620に塗布し、標識と標識基質との間の複合体の形成、または検出可能なシグナルの発生のために十分な時間接触を保持することができる。

10

【0106】

図17は装置17を示し、液体非透過性プラスチック膜1745を、容器1735内の反応パッド1710と洗浄液受けパッド1740との間に配置した、本発明の実施態様を示す。本実施態様では、大きな粒状材料を取り除いて浄化し、複合体を添加した液体試料は、膜1720に塗布され、膜1720と接触する反応パッド1710に流れることができる。対象物質が存在すれば、少なくとも1つの特定結合対メンバー(図示せず)に結合するように、反応パッド1710と膜1720との間を試料が拡散するための十分な時間が提供される。十分な時間の後、タブ1747を引っ張り、不透過性の壁1745を取り除く。洗浄液を膜1720に塗布し、過剰な洗浄液および非結合基質、複合体、および複合体-基質複合体を膜1720から反応パッド1710へ洗浄し、次いで洗浄液受けパッド1740へ洗浄する。物質の存在の検出は、次いで、特定結合対メンバー(図示せず)から、またはその近くからのシグナルを直接検出することによって、または標識のための基質を添加することによって達成される。1つ以上の更なる洗浄をこの時点で行うことが可能である。

20

30

【0107】

図18は、本発明の装置の別の構成を示す。本構成では、装置18は容器1835を備え、この容器は試料ポート1855と、試料塗布パッド1851とを備え、これらは反応パッド1810および膜1820の隣に接触して備えられる。洗浄液受けパッド1840は、反応パッド1810の下に配置され、不透過性膜1845によって反応パッド1810から分離される。タブ1847を引っ張って不透過性膜1845を取り除くことによって、洗浄液受けパッド1840および反応パッド1810は、直接接触することができ、膜1820から洗浄液受けパッド1840への連続的な流れを提供することができる。実用上、この装置の構成は、試料が膜1820を通してではなく、試料塗布ポート1855において添加されることを除いて、図17を参照して説明したものと同一ように使用される。

40

【0108】

図19は、図16に示されるもの類似した本発明の実施態様を示す。図19Aは、閉じた位置の装置を示す。図19Bは、開いた位置の装置を示す。図19Aから分かるように、装置19は、蝶番1980を介して連結される、上半分1935aと下半分1935bとを備えた容器を備える。上半分1935aは、試料塗布パッド1951と一体化され、把持部1936によって適所に保持される反応パッド1910を備える。膜1920は、

50

反応パッド 1910 と洗浄液受けパッド 1940 との間に配置され、把持部 1936 によって膜 1930 に加えられる圧力によってその両方と物理的に直接接触する。下半分 1935b は、膜 1920 と物理的に直接接触する洗浄液受けパッド 1940 を備える。この装置の構成を有する本発明の方法の一実施態様の実施では、図 19A および図 19B を組み合わせ示されるように、(標識複合体を添加した)試料は、(反応パッド 1910 およびろ過パッド 1970 と一体化された)塗布パッド 1951 に塗布され、試料の液体は、反応パッド 1910 に移動して膜 1920 の内外に拡散することができる。洗浄液は、試料塗布パッド 1951 に添加され、液体を洗浄液受けパッド 1940 に引き込む(乾燥している結果)ことによって、反応パッド 1910 および膜 1920 を通して引き込まれる。標識複合体のための基質を、次いで膜 1920 に塗布し、上半分 1935a および下半分 1935b の 2 つを蝶番 1980 を軸に回転させて分離することによって、膜 1920 が現れる。物質の存在は、膜 1920 上に配置される少なくとも 1 つの特定結合対メンバー(図示せず)から、またはその近くにおいて発せられるシグナルをアッセイすることによる、視覚的または非視覚的検出方法によって検出する。

【0109】

図 20 は、容器 2035 を備えた本発明の装置 20 の構成を示し、塗布パッド 2051 は反応パッド 2010 と一体化され、塗布ポート 2055 は膜 2020 および検出窓 2060 の上/下、およびその反対側に配置される。洗浄液受けパッド 2040 は、塗布パッド 2051 および反応パッド 2010 と直接接触し、塗布ポート 2055 および検出窓 2060 に対して、これらのパッドの側面に配置される。この装置の構成を有する本発明の方法の一実施態様の実施では、(複合体を添加した)試料は、塗布ポート 2055 を通して塗布パッド 2051 に塗布され、試料は、反応パッド 2010 に浸透して、少なくとも 1 つの特定結合対メンバー(図示せず)を含む、反応パッド 2010 と膜 2020 との間に拡散することができる。装置 20 は、液体試料が完全に、または実質的に完全に塗布パッド 2051 および反応パッド 2010 に引き込まれ、パッド 2010 と膜 2020 との間に所望の量の拡散が生じた後に、反転される。洗浄液は、膜 2020 に塗布され、反応パッド 2010 および塗布パッド 2055 を通して、洗浄液受けパッド 2040 に引き込まれる。複合体のための基質を添加して、公知および上述の開示に従って、液体内の対象物質の存在の検出を行う。間接的な標識を使用する他の全ての実施態様と同様に、最適なシグナルの強度を得るために、基質および標識を培養することが好ましい。

【0110】

図 21 は、以下の実施例においても参照される、本発明の装置の一実施態様を示す。一般に、本実施態様は、他の実施態様に関して上述した要素を含む。図 21 に示される装置のある特定の実施態様では、装置は、その上に配置された 2 つの線を備えた多孔質膜上に、反応窓の開口部を備える。例えば、装置は、C . ディフィシル毒素 A、毒素 B、またはその両方に対する抗体を有する試験線(すなわち「T」線)を含むことができる。また、例えば抗 IgG 抗体または他の抗体に特異的な他の抗体を有する、内部対照として作用する第 2 の線(すなわち「C」線)を含むこともできる。使用時には、装置は、試料内の毒素 A および/または B のような対象物質の存在を検出することができる。例えば、試料を、希釈剤(例えば、0.02%チメロサル含有の緩衝タンパク質溶液)と、複合体(例えば、0.02%チメロサル含有の緩衝タンパク質溶液内の、西洋わさびペルオキシダーゼに結合した毒素 A に特異的なマウスモノクローナル抗体、および西洋わさびペルオキシダーゼに結合した毒素 B に特異的なヤギポリクローナル抗体)との混合物を含む管に添加することができる。希釈試料 - 複合体混合物を、次いで試料ウェルに添加することができる。試料ウェルは、装置のシェルの開口部であり、開口部は、試料を得るための領域内の多孔質材料(ろ過パッド)上に開口し、反応窓とは異なる。試料ウェルを通して多孔質材料に希釈試料を添加した後に、装置は、好適な温度(例、室温)で十分な時間(例、15分)培養することができる。この培養期間中に、対象物質(例、毒素 A および/または B)は、試料内に存在すれば、複合体(例、抗毒素抗体 - ペルオキシダーゼ複合体)と結合する。装置に試料を塗布した後に、物質 - 複合体(例えば毒素 - 抗体)複合体は、存在

すれば、少なくとも1つの対抗質材料を通して固定化抗体を含む多孔質膜に移動する。多孔質膜の内外への複合体の拡散には、十分な時間（例、1分）が与えられる。複合体は、存在すれば、固定化抗体によって線上に捕捉される。多孔質膜は、少なくとも線の一部を含む領域において、次いで洗浄用緩衝剤（例、0.02%チメロサル含有の緩衝剤）で、状況に応じて洗浄される。装置は、次いで基質（例、テトラメチルベンジジンを含む溶液）の添加によって発現させることができる。培養期間（例、10分）の後に、試験線における複合体の存在は、例えば、「T」線が反応窓の下の多孔質膜に存在する領域において、線（例、青線）の出現を視覚的に検査することによって、判断することができる。この領域の線は、陽性試験を示す。線（例、青線）が、反応窓の下の多孔質膜の「C」領域に存在した場合は、陽性対照反応が生じており、これは装置および方法が適切に機能していること、および結果（対象物質の有無）が有効であることを示している。対照を実行した場合、この対照は、緩衝水溶液内の抗原のような、「C」線における膜上に配置された抗体のための適切な抗原を含むことができる。図21A乃至Dは、本願明細書に記載される線を示し、様々な起こりうる結果を表したものである。

10

20

30

40

50

【0111】

したがって、本発明は、液体試料内の少なくとも1つの対象物質を検出する方法であって、前記対象物質を含む、または含むと思われる液体試料を提供するステップと、多孔質材料を少なくとも部分的に湿らせるに十分な量の前記液体試料を、前記多孔質材料に塗布するステップと、直接的または間接的に前記対象物質を結合することができる、少なくとも1つの特定結合対メンバーを含む前記多孔質材料を、多孔質膜と接触させるステップと、前記多孔質材料内に存在する液体が前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺に拡散するように、前記多孔質材料と多孔質膜との接触を十分な時間保持するステップであって、前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺への前記液体の拡散によって、前記対象物質が存在する場合に、前記特定結合対メンバーへの直接的または間接的な接触をもたらすステップと、前記特定結合対メンバーおよび前記対象物質を含む複合物の有無を検出するステップであって、前記少なくとも1つの複合体の存在が、前記液体試料内に前記対象物質が少なくとも1つ存在することを示すステップと、を含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、前記方法は、前記多孔質材料および多孔質膜を含む装置を提供するステップをさらに含むことができる。いくつかの実施態様では、前記多孔質材料は、前記液体試料をろ過して設定値よりも大きいサイズの物質を取り除く。いくつかの実施態様では、前記ろ過は、前記多孔質材料を通った前記液体試料からの液体の不連続な入り込みによるものである。いくつかの実施態様では、前記方法は、2つ以上の対象物質を含む液体とともに使用することができ、これらの物質のうちの1つ、2つ、またはそれ以上を、本発明の方法の単一の装置および/または単一の実施によって検出することができる。したがって、前記方法のいくつかの特定の実施態様では、各対象物質は互いに異なり、前記方法は、それらのうちの1つ、2つ、またはそれ以上を検出する。前記方法は、糞便、血液、食品、または環境的な試料（例、地下水内の毒性物質）を含む、液体試料上で実施することができる。例示的ないくつかの実施態様では、前記方法は、クロストリジウム・ディフィシル毒素Aおよびクロストリジウム・ディフィシル毒素Bの一方または両方を検出する。いくつかの実施態様では、前記対象物質は、1つ以上の毒素、細菌、ウイルス、細菌産物、酵素（例、原核生物、真核生物）、または寄生体である。いくつかの実施態様では、前記対象物質は、グルタミン酸脱水素酵素である。また、動物のまたはヒトの生成物、抗体、またはラクトフェリンとすることができる。

【0112】

前記方法は、1つ以上の特定結合対メンバーを使用して実施することができる。いくつかの実施態様では、前記特定結合対メンバーのうちの1つ以上が抗体であり、前記抗体のそれぞれが1つ以上の他のものとは異なるか、または同じである。

【0113】

一般的な方法では、複合体の存在を検出する前に、前記膜を洗浄するステップをさらに含むことができる。

【0114】

いくつかの実施態様では、前記多孔質材料に前記液体試料を塗布するステップは、前記多孔質膜から空間的に分離された、前記多孔質材料上の1つの位置において前記液体試料を塗布するステップを含み、それによって、前記液体試料の少なくとも前記液体が前記多孔質材料に移動し、次いで前記多孔質膜に移動する。いくつかの特定の実施態様では、検出ゾーンから離れた試料供給ゾーンの領域において塗布される液体試料は、前記多孔質材料を通して、入り込みプロセスを介して前記多孔質膜に移動する。いくつかの実施態様では、前記膜、前記多孔質材料、またはその両方に物理的な力を加えるステップをさらに含み、当該の力は、本発明の装置および方法の感度を向上させる。

【0115】

本発明の方法は、シグナルを検出して対象物質の存在を判断するステップを含む。いくつかの実施態様では、検出するステップは、前記対象物質と結合する標識から発せられたシグナルを検出するステップを含む。いくつかの特定の実施態様では、前記シグナルは、前記特定結合対メンバー内、またはその周辺に形成された有色の沈殿生成物によって発せられる。したがって、検出するステップは、複合体の検出を介したものとすることができる。したがって、前記方法は、前記多孔質材料に前記液体試料を塗布する前に、標識複合体を前記液体試料と混合するステップをさらに含むことができる。前記標識複合体は、ラテックスビードまたは他の有色粒子、コロイド状金粒子、または基質と結合して検出可能なシグナルを発する反応性物質を含むことができる。いくつかの実施態様では、前記シグナルは、非視覚的なシグナルである。

【0116】

本発明は、液体試料内の対象物質を検出するための少なくとも1つの装置を含む。いくつかの実施態様では、装置は、(a)前記液体試料を受けるための多孔質材料を含む受け具であって、前記多孔質材料は、前記液体試料の少なくとも一部を吸収して透過することができる容器と、(b)前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を備え、前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形される装置。前記装置は、前記受け具を含む容器、前記多孔質膜のための把持部、洗浄液受けパッド、液体試料塗布パッド、ろ過パッド、またはこれらの要素のうち2つ以上を備えることができる。各要素は、2つ以上の機能的ゾーンに再分割することが可能であり、状況に応じて同じ材料で作製されるが、他のゾーンのうちの1つ以上とは異なる材料で作成することができる。

【0117】

いくつかの実施態様では、前記装置は、前記多孔質材料および前記多孔質膜を含む反応パッドを含む容器を備え、前記容器は、前記多孔質膜のための把持部を備え、前記容器は、前記多孔質材料の少なくとも一部が加圧されるように、前記多孔質膜および/または前記多孔質材料に作用する圧力を生じさせる。当然、前記容器は、上述のように他の要素を含むことができる。前記多孔質材料の圧縮によって、前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質膜および前記多孔質材料を直接接触させることができ、本発明の前記装置および方法の機能を向上させることができる。例えば、前記圧力によって、1つ以上の液体が、受動拡散によって前記多孔質膜と前記多孔質材料との間を通過できる。

【0118】

したがって、本発明は、液体試料内の少なくとも1つの対象物質を検出するための装置を提供する。前記装置は、(a)前記液体試料を受けるための多孔質材料を含む受け具であって、前記多孔質材料は、前記液体試料の少なくとも一部を吸収して透過することができる容器と、(b)前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に対して特異的である特定結合対メンバーを含む多孔質膜を備え、前記受け具および多孔質膜は、前記多孔質膜が、前記特定結合対メンバーを含む前記多孔質膜の少なくとも一部にわたって、前記多孔質材料と直接接触できるようにそれぞれ成形され、前記多孔質膜および多孔質材料は、異なる化学構造を有する異なる要素である装置。いくつかの実施態様では、前記多孔質

膜および多孔質材料は、前記多孔質材料に塗布された液体試料が、前記多孔質膜の内側、外側、内部、およびその周辺に拡散するように、物理的に接触する。加えて、前記装置は、前記多孔質膜と多孔質材料との間の物理的接触を、装置の感度が改善されるように発生するように構成することが可能である。前記装置は、前記対象物質が、前記装置に対する一方向の様態で前記多孔質膜を横断して前記対象物質を検出する必要がないように、前記多孔質膜と多孔質材料が互いに接触するように構成することが可能である。いくつかの例示的な実施態様では、前記多孔質膜と多孔質材料は、それら2つの間に液体の無方向性の拡散が単純に生じるような方法で互いに接触する。

【0119】

したがって、本発明は、液体試料内の対象物質の存在または量を検出するための装置であって、前記液体試料を受けるための試料受けゾーンであって、前記試料受けゾーンは多孔質材料上に存在する、試料受けゾーンと、前記試料受けゾーンで受けた前記液体試料をろ過するための試料ろ過ゾーンであって、前記試料ろ過ゾーンは多孔質材料上に存在する、試料ろ過ゾーンと、前記対象物質または前記対象物質に特異的に結合する物質に結合する検出ゾーンにおいて、特定の結合部材を備える多孔質膜を備え、前記多孔質膜は、前記多孔質材料のうちのいずれとも同じ要素ではなく、前記多孔質材料および多孔質膜は、前記検出ゾーンの一部を含む少なくとも1つの領域上で物理的に接触し、前記多孔質材料および多孔質膜は、前記液体試料内に存在する液体が、前記検出ゾーンの少なくとも一部を含む領域において、実質的にランダムな無方向性の様態で、前記多孔質膜の内側、外側、内部、および/またはその周辺に拡散できるような構成で物理的に接触する装置を提供する。当然、1つ以上のゾーンは、単一の多孔質材料にまたは2つ以上の異なる材料に存在させることができる。同様に、それらは、2つ以上の異なる材料に存在させることができ、1つ以上の別のものとして、同じか、または異なる組成物を有するように、それぞれ単独で選択することができる。上述のように、前記装置は、前記多孔質材料および多孔質膜の少なくとも一部を含む容器を備えることが可能である。いくつかの実施態様では、前記装置は、洗浄液受けゾーンを含む多孔質材料を備える。

【0120】

本発明の装置の他のいくつかの例示的な実施態様、および本発明の方法の実施における装置の使用は、以下の実施例において提供され、他のものは説明および図から明白となるであろう。

【実施例】

【0121】

以下の例により本発明をさらに説明するが、これらの例は純粋に本発明の例となることを意図しており、本発明を何ら限定するものではない。

【0122】

例1：本発明の装置および方法の実施例の使用

【0123】

本例は、図21A～Dに描写されるように、本発明の装置の実施例における本発明による方法の実施例の典型的な生体外での使用と生体外での使用の指針を詳述するが、ここではクロストリジウム・ディフィシル毒素AおよびBが検出される。本手続きは概ね、参照することにより全体として本文書に組み込まれるTOX A/B QUIK CHEK™キット(TechLab、バージニア州ブラックバーグ; cat. no. T5033)に規定される手続きに従う。特に断りのない限り、TOX A/B QUIK CHEK™キットに規定される手続きがこれらの例に使用された。この例およびTechLabのキットに規定される一般指針は、本発明による方法の別の実施例に必ずしも適用しない。

【0124】

糞便検体の採取および取扱い

【0125】

糞便検体に対し用いられる採取および取扱いの標準手順が適切である。検体は2から8の間で補完する。採取して24時間以上経過していない検体を検査することが望まし

10

20

30

40

50

い。検査を採取から72時間以内に実施することができない場合は、検体を凍結保存（-10以下）することが望ましい。データによると、1回の凍結融解サイクルは、C・ディフィシル毒素AおよびBとともに使用する試料を損ねないことが示されるが、検体の特に複数回の凍結融解は、毒素の分解により活性の喪失につながる可能性があることが知られている。10%ホルマリン、MF、SAF、またはPVA中に保存されていた糞便検体、あるいはキャリア・ブリアまたはC&Sなどの輸送培地中の検体では、通常新鮮な試料あるいは別の組成物中に保存された試料のような最良の結果は得られない。

【0126】

検体は、アッセイを実施する前に十分に混合しておく。糞便検体を希釈剤中に保管することは推奨されない。糞便検体が希釈剤中で希釈されたら速やかに試料を検査することが望ましい。50、100、200、および300 u lの目盛り付の使い捨てピペットを使用することができる。

【0127】

試料の調合

- 任意に、全ての試薬および装置を使用前に室温に戻す。
- 各検査検体に対し1つのカセット（装置）を準備する。
- 希釈剤0.4~0.6 ml（例えば0.425 mlまたは0.5 ml）をプラスチックのスポイトを使用して各希釈試験管に添加する。
- 移動前に検体を均一に懸濁（例えばボルテックス）させる。液体あるいは半固体の検体については、最初の目盛りから最後の目盛り（25 μ l）の間まで検体を吸う。検体を希釈剤に吐出する。同じピペットを使用し、希釈した検体を静かに吸引して、その混合液を吐出することを何度か行って混合する。成形されたあるいは固体の検体については、検体を完全に十分に混合する。木製の塗布棒を使用して、検体の少量を（直径約2 mm）希釈剤に移動する。その塗布棒を使用して、検体を乳化する。任意の対照として、陽性対照あるいは陰性対照（検体希釈剤）1滴を0.4 mlの希釈剤を入れた試験管に添加する。
- 複合体1滴を希釈した検体に添加し、ボルテックスを行なって試験管の中身を混合する。

【0128】

検査手順

- 検体につき1つ、陽性あるいは陰性対照につき1つの必要な数のカセットを取得する。
- 膜カセットに適切にラベルをつける。
- 調合した試料を取得する。使い捨てトランスファーピペットを使用して、300~400 μ lの希釈した試料-複合体混合液をカセットの試料ポートに移動し、そのカセットを室温で15分間培養する。増加する濡れ領域は、結果窓で見ることができる。ぬれ領域が結果窓に現れない場合は、希釈剤100 μ lを試料ポートに添加し、さらに5分間待つ。
- 15分後、洗浄用緩衝剤300 μ lを反応ポートに加える。洗浄用緩衝剤が完全に反応ポートに入るようにする。
- 基質2滴を反応ポートに添加し、カセットを10分間室温で培養させる。10分の終了時、検出窓から結果を読み取る。対照線を示す色付き線（青など）の様子を観察する（図21A参照）。線は、薄いものから濃いものまでが見られる。

【0129】

結果の解釈

【0130】

陽性結果（図21A）：2本の線が見られ、1本は反応ポートの下部（対照線）に、1本は反応ポートの上部（検査線）に現われる。陽性結果は、C・ディフィシル毒素の存在および適切に反応する対照を示唆する。

【0131】

陰性結果（図 2 1 B）：1本の対照線が、反応ポートの下部にのみ見られる。反応ポート上部には検査線が見られない。陰性結果は、C．ディフィシル毒素の不在を示唆するが、適切に反応する対照を示唆する。

【 0 1 3 2 】

無効結果（図 2 1 C および 2 1 D）：完了した反応は全て、反応ポートの下部に可視の対照線を有さなければならない。完了したカセットに対照線が存在しない場合は、検査は無効である。

【 0 1 3 3 】

例 2：本発明の装置と組織培養を使用したクロストリジウム・ディフィシル毒素 A および B の検出比較。

10

【 0 1 3 4 】

本発明による装置の実施例を使用して、50の糞便試料におけるC．ディフィシル毒素 A および毒素 B の組み合わせの検出を行ない、その結果を組織培養法を用いて同じ試料から得られた結果と比較した。糞便試料におけるC．ディフィシル毒素の組織培養検出は、毒素を検出する最も高感度な方法であると考えられているため、当技術分野で認められる最適なアッセイである。毒素を検出するために例 1 に記述される方法を使用した。

【 0 1 3 5 】

この組織培養検査は、Tech Lab, Inc. により製造されるC．ディフィシル TOX - B 検査キット (cat. no. T5003) と、製品の添付書類に記載の手順を用いた。端的に説明すると、糞便試料を 1 : 10 で希釈剤に希釈し、0.45 ミクロンの無菌フィルターを通した。各糞便試料を 2 つの組織培養ウェルそれぞれに添加した (50 マイクロリットル)。1つのウェルにはC．ディフィシル毒素 A および B を中和するために抗毒素 50 マイクロリットルを添加し、他方のウェルにはリン酸緩衝生理食塩水のみ 50 マイクロリットル添加した。ヒト包皮の組織培養細胞を 37 で 24 時間培養したあと細胞の円形化を調べ、48 時間後に再度調べた。50% を超える細胞が円形化したウェルは陽性とみなされた。陽性の総括反応に対しては、抗毒素を含まないウェルは細胞の円形化を示した一方、抗毒素を含むウェルは正常でなくてはならなかった。

20

【 0 1 3 6 】

表 1 は、アッセイの結果を示し、本発明の方法および装置と組織培養アッセイの結果を比較する。

30

【 0 1 3 7 】

【表 1】

N=50	A/B発明陽性	A/B発明陰性
組織培養陽性	8	0
組織培養陰性	1	41

感度	88.9
特異性	100.0
陽性的中率	100.0
陰性的中率	97.6
相関性	98.0

40

【 0 1 3 8 】

結果は、本発明の装置および方法が、組織培養とほぼ完全に同じように機能することを示す。

【 0 1 3 9 】

例 3：本発明の装置と E L I S A を使用したクロストリジウム・ディフィシル毒素 A および B の検出比較。

50

【 0 1 4 0 】

本発明による装置の実施例を使用して、50の糞便試料におけるC．ディフィシル毒素Aおよび毒素Bの組み合わせの検出を行ない、その結果をELISAを用いて同じ試料に対して得られた結果と比較した。毒素を検出するために例1に記述される方法を使用した。

【 0 1 4 1 】

この実験には、TechLab, Inc. のTOX - A / B検査キットを製品の添付書類の指示に従って使用した。端的に説明すると、糞便を1 : 5で試料希釈剤に希釈し、100マイクロリットルをELISAの96ウェルプレートのウェルに添加した。次に複合体溶液（西洋わさびペルオキシダーゼと複合したC．ディフィシル毒素AおよびBに対する抗体を含む）50マイクロリットルを各ウェルに添加した。ウェルを37で50分間培養し、毒素と結合していない（ウェルに固相化した抗体と結合した）西洋わさびペルオキシダーゼ複合体を除去するためにウェルを洗浄した。次に、この抗体と酵素のサンドイッチは、基質溶液100マイクロリットルを添加して10分間培養を行い、続いて反応を止めるために希酸50マイクロリットルを添加することにより検出された。陽性反応であったのは、450nmにおける光学密度が0.12を超えるウェルであった。

10

【 0 1 4 2 】

表2は、アッセイの結果を示し、本発明の方法および装置とELISAアッセイの結果を比較する。

20

【 0 1 4 3 】

【表2】

N=50	A/B発明陽性	A/B発明陰性
C. ディフィシルA/B II陽性	8	1
C. ディフィシルA/B II陰性	1	40

感度	88.9
特異性	97.6
陽性的中率	88.9
陰性的中率	97.6
相関性	96.0

30

【 0 1 4 4 】

結果は、本発明の装置および方法が、高感度なELISA法に相当する結果を出すことを示している。

【 0 1 4 5 】

40

例4：本発明の装置および方法の相対感度の検証

【 0 1 4 6 】

本発明の装置および方法の感度を判断した。用いた装置および方法は、TOXAJB QUIK CHECKTM毒素AおよびB検査（TechLab, Inc.）のものである。端的に説明すると、装置および方法の感度を高精製毒素AおよびBの2倍段階希釈を用いて判断した。

【 0 1 4 7 】

この検査は、濃度0.63ng/mLの毒素Aおよび濃度1.25ng/mLの毒素Bにおいて、一貫して陽性であった。検査用に段階的に希釈した毒素Aまたは毒素Bについての6つの別個の検査結果（検査1から6）を以下の表に示す。

50

【 0 1 4 8 】

【表 3】

TOX A/B QUIK CHEK™検査における高精製毒素Aの反応

	検査1	検査2	検査3	検査4	検査5	検査6
濃度 (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	+	+	+	+	+	+
0.32	+	+	-	+	+/-	+/-
0.16	-	-	+/-	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

10

【 0 1 4 9 】

【表 4】

TOX A/B QUIK CHEK™検査における高精製毒素Bの反応

	検査1	検査2	検査3	検査4	検査5	検査6
濃度 (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	-	-	-	-	+	+
0.32	-	-	-	-	-	-
0.16	-	-	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

20

表 3 および 4 に提示されるデータは、実施された特定の連続の検査で得られた特定の結果を代表する。別の検査では、毒素 A の 0.16 および毒素 B の 0.32 から 0.63 の感度がよく見られる。

30

【 0 1 5 0 】

例 5：本発明の器具および方法の再現性と精度

【 0 1 5 1 】

本発明の装置と方法の再現性と精度を判断するために、図 2 1 に描写するように、本発明の装置の実施例を本発明の方法の実施例を用い、Tech Lab の TOX A/B QUIK CHEK™検査に付属の手續きに従って検査した。さらに具体的には、6つの陽性と2つの陰性を含む合計8つの糞便検体を TOX A/B QUIK CHEK™検査 (Tech Lab、cat. no. T5033) を用い、製造会社の指示に従って、3つの異なる研究所で検査した。カットオフを調べるために、本発明者により分析した際に薄い線を示した弱陽性検体2つを6つの陽性に含めた。全検体は、合法的に市販される装置および、C. ディフィシル毒素 A および B の存在に対する非常に高感度で正確な検査として広く受け入れられている、C. ディフィシル TOX A/B IITM 検査 (Tech Lab; cat. no. T5003) により分類される。全検体はアッセイを実施するまで -10°C で凍結維持した。各研究所は、3日間の異なる日に検体を検査した。その後、各研究所からの結果が本発明者に提出され、本発明者自身の結果と比較された。結果は、下に示すが、異なる検査地に一貫しており、また 100% の相関性を示した。全ての研究所において、TOX A/B QUIK CHEK™検査を用い、陽性検体は陽性であると確認され、陰性検体は陰性であると確認された。

40

【 0 1 5 2 】

50

【表 5】

本発明に基づく装置および方法を用いた糞便試料の発明者による再現性／精度検査

検体 コード (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	1日目	2日目	3日目
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
相関率	N/A	100	100	100

10

【 0 1 5 3 】

【表 6】

本発明に基づく装置および方法を用いた糞便試料の再現性／精度外部検査

検体 コード (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	1日目	2日目	3日目
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
相関率	N/A	100	100	100

20

30

【 0 1 5 4 】

【表 7】

本発明に基づく装置および方法を用いた糞便試料の再現性／精度外部検査

検体 コード (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	1日目	2日目	3日目
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
相関率	N/A	100	100	100

10

【 0 1 5 5 】

【表 8】

本発明に基づく装置および方法を用いた糞便試料の再現性／精度外部検査

検体 コード (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	1日目	2日目	3日目
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
相関率	N/A	100	100	100

20

30

以上のように、本装置および方法は、4つの異なる実行者の管理下でうまく機能した。

【 0 1 5 6 】

例 6：検体の凍結融解による影響

【 0 1 5 7 】

本発明による装置および方法の特徴をさらに明らかにするために、本発明による方法と併せて装置の実施例を使用し、少なくとも1回の凍結融解サイクルを施した検体それぞれの適切性を判断した。

【 0 1 5 8 】

6つの陽性および2つの陰性検体を含む合計8つの糞便検体を図21に描写する本発明の装置の実施例、および本発明の方法の実施例を用いて検査したが、両者とも1回の凍結融解サイクル前後にTechLabのTOX A/B QUIK CHEK™検査(c at . no . T5033)で利用できる。検体は、あらかじめC . ディフィシルTOX A/B IITM (TechLab, Inc. ; c at . no . T5003)検査で、毒

40

50

素 A および B の有無を検査しておいた。その結果は下記の表に示す。含まれるのは凍結融解サイクル後の C . ディフィシル T O X A / B I I T M 検査での残存反応性である。結果は、凍結融解サイクル後も陽性検体は陽性のままで、陰性検体は陰性のままであることを示した。陽性から陰性へ、または陰性から陽性への転換は、どの検体にも見られなかった。

【 0 1 5 9 】

【表 9】

凍結融解サイクルが本発明の装置および方法に与える影響

検体 コード (n=8)	TOX A/B II™ ELISA (凍結前)	発明 (凍結前)	TOX A/B II™ ELISA (凍結後)	発明 (凍結後)
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-

10

20

【 0 1 6 0 】

例 7 : 2 から 8 での 7 2 時間の検体保存の影響

【 0 1 6 1 】

試料中の対象物質を検出する本発明の装置および方法の使用をさらに詳細に調査するために、6つの陽性および2つの陰性糞便検体(C . ディフィシル毒素 A および B に関して)を 2 4、4 8、および 7 2 時間後に、本発明による装置および方法を用いて、具体的には、T O X A / B Q U I K C H E K T M 検査 (T e c h L a b , I n c . ; c a t . n o . T 5 0 3 3) で製造会社の指示に従って検査し、糞便試料における毒素の安定性を評価した。結果は、以下に示されるが、本装置および方法が、それぞれの時間間隔において一貫して機能したことを示す。さらに、C . ディフィシル毒素が、これらの検査条件下で少なくとも 7 2 時間安定していることも示される。それぞれの時間において、全ての陽性検体は陽性のまま、陰性検体は陰性のままであった。

30

【 0 1 6 2 】

【表 10】

2°Cから8°Cでの72時間の検体保存の影響

検体 (n=8)	1日目	1日目	2日目	2日目	3日目	3日目
	<i>C.</i> ディフィンシル <i>TOX</i> <i>A/B II™</i> 20分 アッセイ	<i>TOX</i> <i>A/B</i> <i>QUIK</i> <i>CHEK™</i>	<i>C.</i> ディフィンシル <i>TOX</i> <i>A/B II™</i>	<i>TOX</i> <i>A/B</i> <i>QUIK</i> <i>CHEK™</i>	<i>C.</i> ディフィンシル <i>TOX</i> <i>A/B II™</i> 20分 アッセイ	<i>TOX</i> <i>A/B</i> <i>QUIK</i> <i>CHEK™</i>
TL001	+	+	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-	-	-

10

20

【0163】

例 8：臨床研究環境において臨床試料を検査するための方法および器具の使用

【0164】

上記の例 4～7で使用される方法および器具は、*C.* ディフィンシル毒素 A および / または B を含むと思われる臨床試料を分析するために用いられる。さらに具体的には、本発明の方法の実施例と一体となって、*TOX A/B QUIK CHEK™* (Tech Lab cat. no. T5033) の商標名で Tech Lab, Inc. によりとも販売される本発明の装置の実施例は、3つの民間臨床研究所において、また本発明者により、組織培養アッセイと比較された。試験地と研究者は、検体の数と供給源と併せ、以下の表に提示する。組織培養アッセイは、糞便試料における *C.* ディフィンシル毒素を検出する「最も基準となる検査」とみなされているため、本発明の装置および方法を組織培養アッセイと比較した。矛盾する結果は、*C.* ディフィンシル *TOX A/B II™* 検査または Meridian Premier™ 毒素 A および B 検査のどちらかを用いて分析したが、これらはともに糞便検体における毒素 A および B を検出するマイクロタイター ELSA である。この例で本発明者によって実施された試験に対しては、Tech Lab, Inc. の *C.* ディフィンシル *TOX - B* 検査アッセイを使用して、組織培養アッセイが実施された。

30

【0165】

本発明の装置および方法を組織培養アッセイと比較するとき、感度、特異性、陽性および陰性的中率、また相関率を判断した。また、本分析対組織培養アッセイについての 95% 信頼区間も判断された。

40

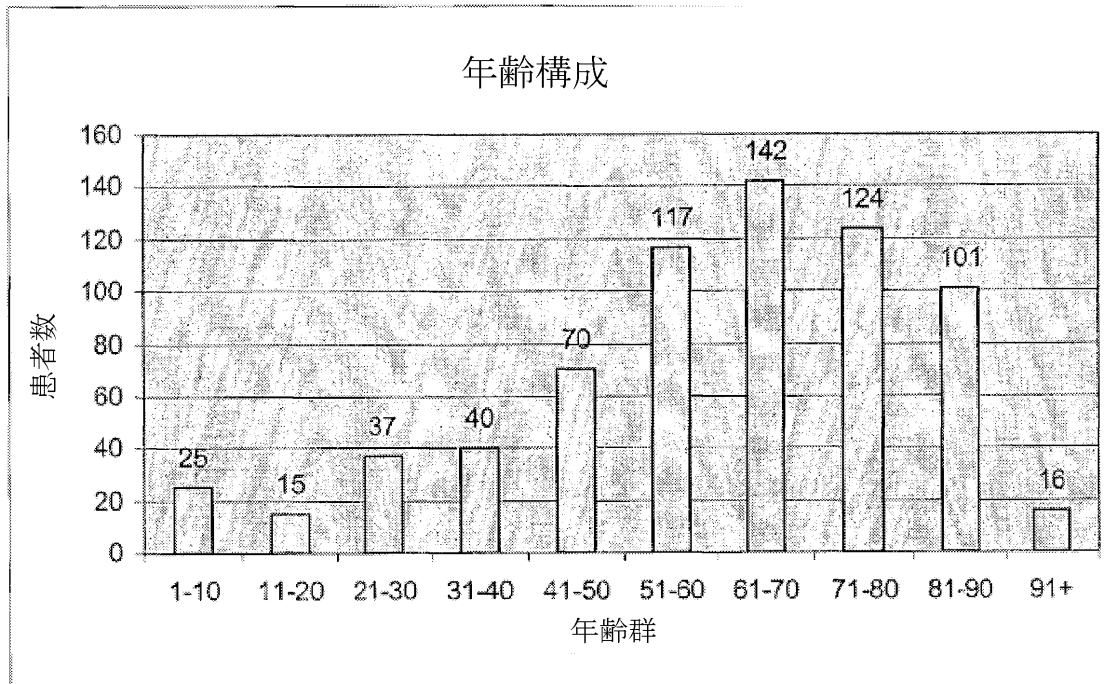
【0166】

性別識別は 294 人の患者について可能であった。177 人の女性 (60.2%) と 117 人の男性 (39.8%) が参加した。年齢情報は、613 人の患者について入手できた。約 1 歳から 95 歳までの範囲に及んだが、構成は以下の表に示す。表における各棒グラフ上の数字は、特定の年齢群における患者の数を示す。

【0167】

【表 1 1】

臨床試験における年齢構成



10

20

【 0 1 6 8 】

以下の表は、本発明の装置および方法の臨床成績の概要を示す。概要には実施された5つの臨床試験全てからの結果が含まれる。本発明の装置および方法からの結果は、組織培養アッセイと比較し、矛盾する結果は、C.ディフィシルTOX A/B IITM検査（現在論じている本発明の装置および方法）またはMeridian PremierTM毒素AおよびB検査のどちらかを用いて分析した。結果は、TOX A/B QUIK CHECKTM検査が、組織培養アッセイを比較して、それぞれ90.2%と99.7%の感度と特異性を示したことを表している。陽性および陰性的中率は、それぞれ98.6%と97.9%であり、相関性は98.0%であった。

30

【 0 1 6 9 】

【表 1 2】

本発明の装置および方法の臨床成績概要

n=842	組織培養陽性試料	組織培養陰性試料
TOX A/B QUIK CHECK™陽性	138	2
TOX A/B QUIK CHEK™陰性	15	687
		95%信頼区間
感度	90.2	84.1-94.2
特異性	99.7	98.8-99.9
陽性的中率	98.6	94.4-99.8
陰性的中率	97.9	96.4-98.7
相関性	98.0	97.8-98.2

40

【 0 1 7 0 】

50

培養陰性 / T O X A / B Q U I K C H E K T M 陽性の 2 つの組織試料のうち、1 つは T O X A / B I I T M 検査で陰性であった。組織培養陽性 / T O X A / B Q U I K C H E K T M 陰性の 1 5 検体のうち、1 2 検体が C . ディフィシル T O X A / B I I T M 検査または M e r i d i a n P r e m i e r T M 毒素 A および B 検査で陰性であった。

【 0 1 7 1 】

例 9 : 糞便検体の堅さの影響

【 0 1 7 2 】

本発明による方法および装置の特徴をさらに明らかにするために、装置の実施例を方法の実施例とともに検査し、糞便検体の堅さが装置と方法の機能に与える影響を判断した。

10

【 0 1 7 3 】

T O X A / B Q U I K C H E K T M 検査における様々な堅さの糞便検体の反応を以下の表に示す。堅さがわかっている合計 8 0 5 の糞便試料が分析に使用された。組織培養アッセイまたは T O X A / B Q U I K C H E K T M 検査のどちらかを使用して陽性反応を示した年齢別割合は、3 種類の糞便検体 (液体、半固体、および固体) 全てにおいて類似していた。全ての検体は、C . ディフィシル検査に提出された。提出の基準は患者の病歴であって、検体の堅さではない。結果は、T O X A / B Q U I K C H E K T M 検査が、異なる堅さの試料を検査する際、組織培養アッセイと同じように機能したことを示している。

20

【 0 1 7 4 】

【 表 1 3 】

T O X A / B Q U I K C H E K T M 検査における様々な堅さの糞便検体の反応

検体の数 (n=805)	液体検体 (n=487)	半固体検体 (n=294)	固体検体 (n=24)
組織培養アッセイによる 陽性	87(17.9%)	56(19.0%)	3(12.5%)
T O X A / B Q U I K C H E K T M に よる陽性	76(15.6%)	50(17%)	3(12.5%)

30

【 0 1 7 5 】

例 1 0 : 本発明および E L I S A を使用したクロストリジウム・ディフィシルのグルタミン酸脱水素酵素の検出比較。

【 0 1 7 6 】

本発明の装置を使用して、4 9 の糞便試料において C . ディフィシル抗原のグルタミン酸脱水素酵素を検出し、その結果を E L I S A 法で得た結果と比較した。毒素検出には例 1 に記載の方法に以下の修正を加え使用した。

【 0 1 7 7 】

装置で使用する糞便試料を例 1 に示すように、西洋わさびペルオキシダーゼ検出酵素 (複合体) に化学的に接合した抗体 (この場合、C . ディフィシルのグルタミン酸脱水素酵素に対して特異的な) を含む試料希釈剤で希釈した。続いて混合試料 (3 0 0 マイクロリットル) を装置の穴 (塗布ポート) を介して塗布パッド (入り込みパッド) に塗布し、1 5 分後に室温で洗浄溶液 (生理食塩水と洗浄剤の混合液) を膜の上部に添加し、続いて化学基質溶液を添加した。結果は、例 1 に示すように、目によって読み取った。

40

【 0 1 7 8 】

製造会社の製品添付書類に示されるとおり T e c h L a b I n c . の T o x A / B E L I S A を使用した。端的に説明すると、糞便試料を 1 : 5 で試料希釈剤に希釈し、ボルテックスを行なって混合した。E L I S A プレートの各ウェルに、西洋わさびペルオキシダーゼと結合したグルタミン酸脱水素酵素に対して特異的な抗体を含む複合体溶液 5

50

0 マイクロリットルを添加し、続いて混合試料 100 マイクロリットルを各ウェルに添加した。その後プレートを 37 で 50 分間培養し、マイクロウェルに付着した抗体および複合体溶液中の抗体をグルタミン酸脱水素酵素に結合させた。続いて、結合していない西洋わさびペルオキシダーゼを除去するためにウェルを十分に洗浄した。次に基質溶液 100 マイクロリットルを各ウェルに添加して 5 分間培養し、その後希酸溶液 50 マイクロリットルを添加することにより反応を停止した。結果は ELISA リーダーで 450 nm で読み取った。陽性試料は、0.12 を超える光学密度を有した。

【0179】

表 14 は、アッセイの結果を示し、その結果を本発明の方法および装置と ELISA アッセイの結果を比較する。

【0180】

【表 14】

方法および本発明の装置の ELISA 法との比較

N=49	抗原 発明陽性	抗原 発明陰性
C. ディフィシル検査陽性	9	0
C. ディフィシル検査陰性	0	40
感度	100.0	
特異性	100.0	
陽性的中率	100.0	
陰性的中率	100.0	
相関性	100.0	

【0181】

結果は、本発明の装置および方法が、使用した高感度な ELISA 法と同様の結果を出すことを示している。したがって、本発明の装置および方法は、多数の対象物質の検出に適している。

【0182】

当業者には明白であるが、本方法の実施および本装置の構成と使用には、本発明の要旨と精神を逸脱しない範囲で様々な修正と変更を行なうことができる。本発明の別の実施例は、本発明の明細と実施を検討することにより、当業者に明らかとなる。明細と例は、例としてのみ見なされることを意図する。

【0183】

本仕様に組み込まれてその一部を構成する添付図は、本発明の原理を説明する明細書とともに、本発明の実施態様を示す。図は、記載された実施態様の様々な機能の説明を助力するために、本発明の特定の実施態様の詳細を提供するものである。図は、本発明の例示的な実施態様を示すだけのものであるので、本発明の範囲がそれらの図に示される特定の詳細に制限されるものと解釈されるべきではない。

10

20

30

40

【 図 1 】

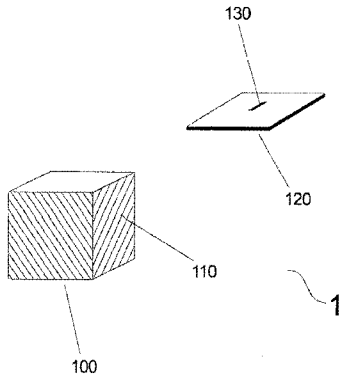


図 1

【 図 3 】

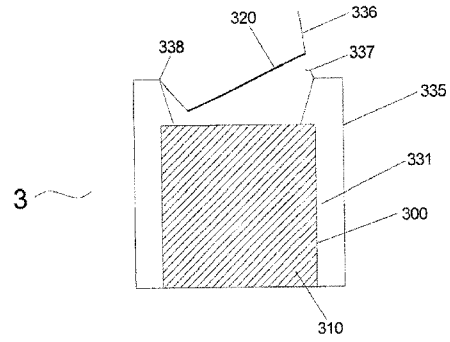


図 3

【 図 2 】

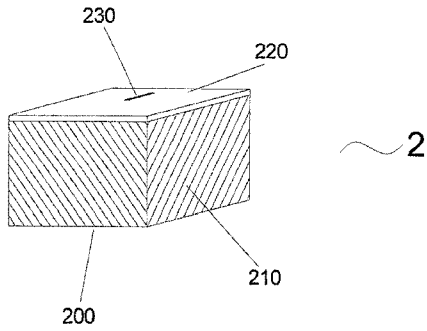


図 2

【 図 4 A 】

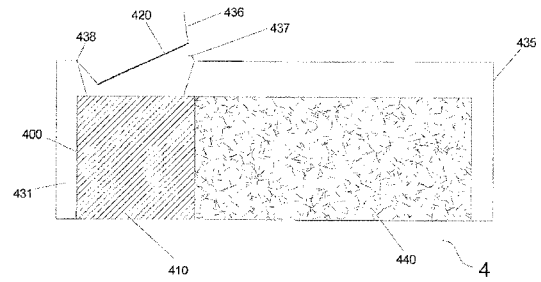


図 4A

【 図 4 B 】

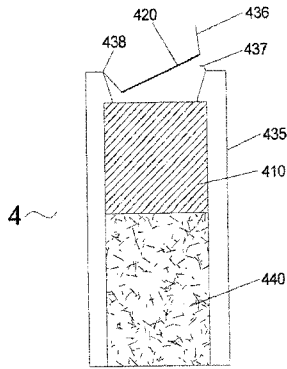


図 4B

【 図 5 】

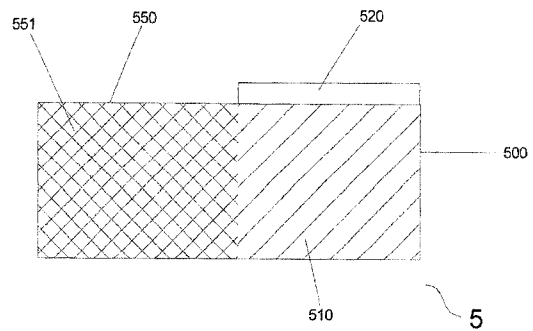


図 5

【 図 4 C 】

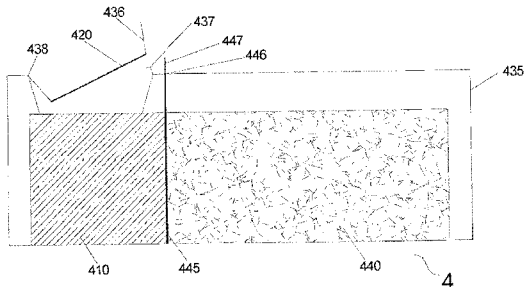


図 4C

【 図 6 】

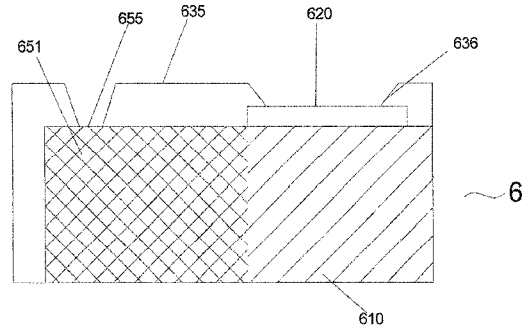


図 6

【 図 7 】

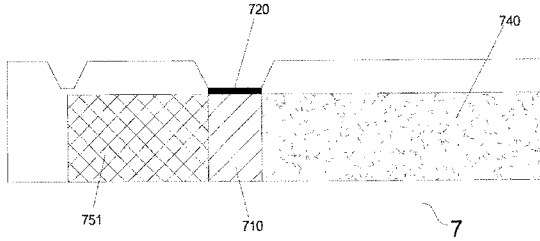


図 7

【 図 9 】

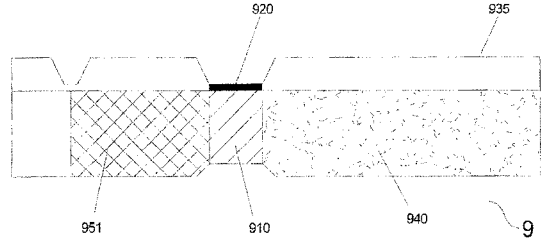


図 9

【 図 8 】

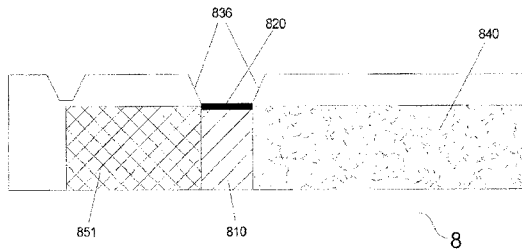


図 8

【 図 10 】

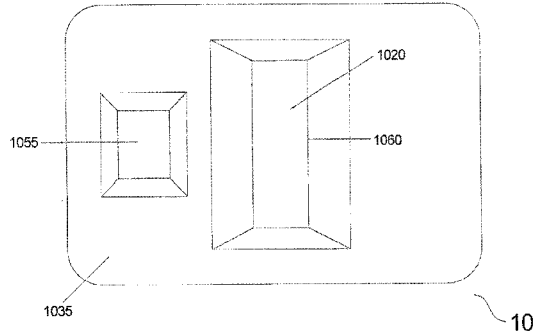


図 10

【 図 11 】

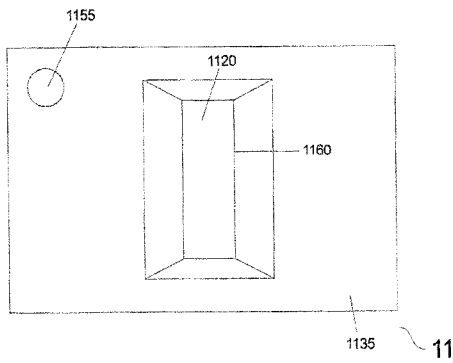


図 11

【 図 13 】

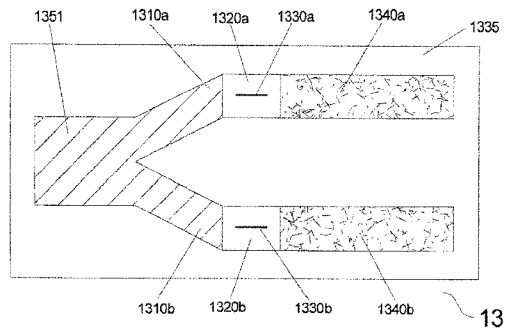


図 13

【 図 12 】

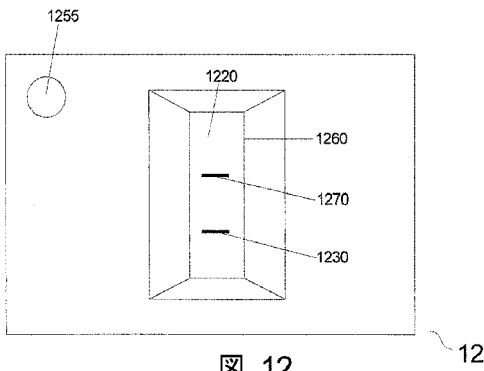


図 12

【 図 14 A 】

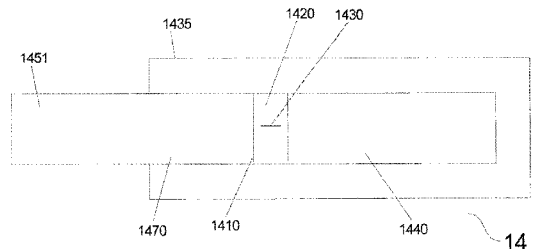


図 14A

【 図 1 4 B 】

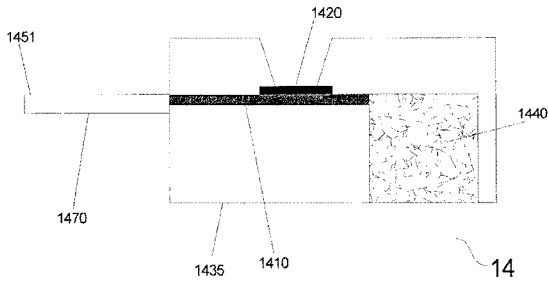


図 14B

【 図 1 4 C 】

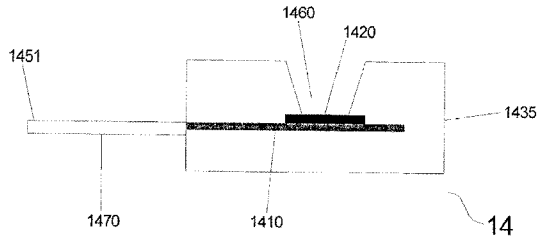


図 14C

【 図 1 5 A 】

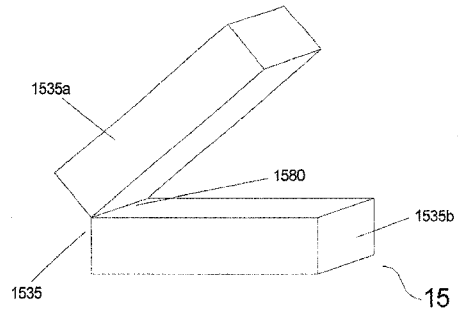


図 15A

【 図 1 5 B 】

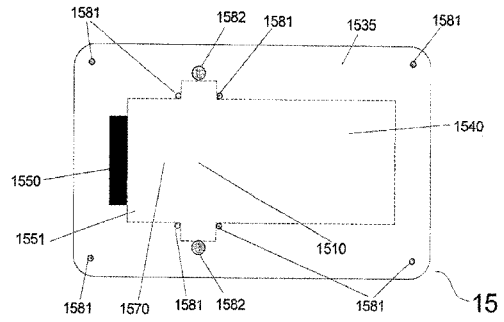


図 15B

【 図 1 5 C 】

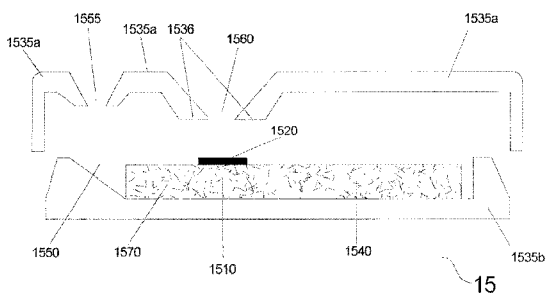


図 15C

【 図 1 5 D 】

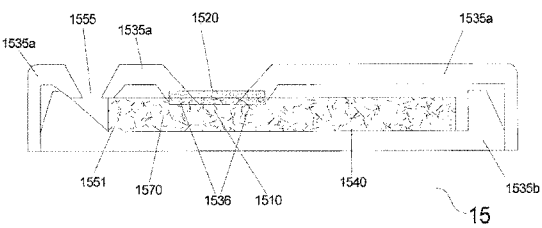


図 15D

【 図 1 6 】

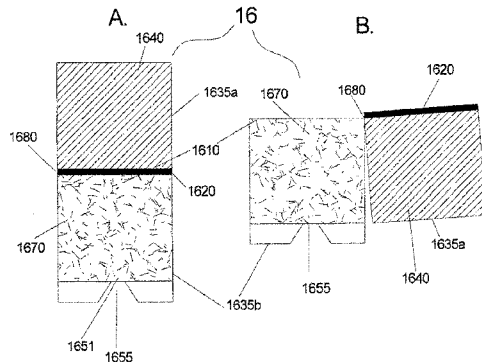


図 16

【 図 1 7 】

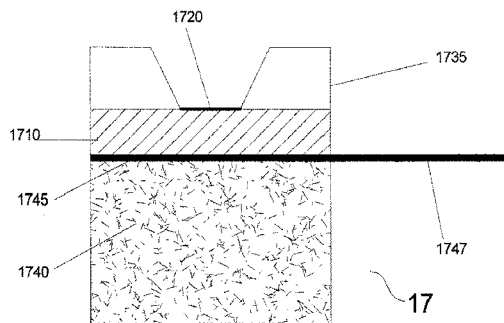


図 17

【図18】

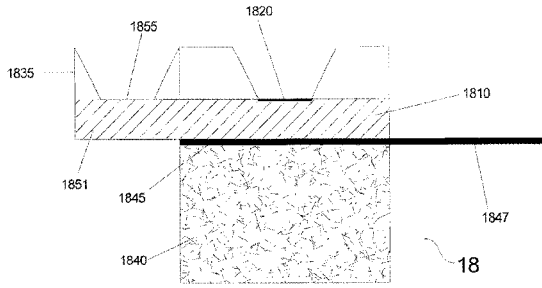


図 18

【図20】

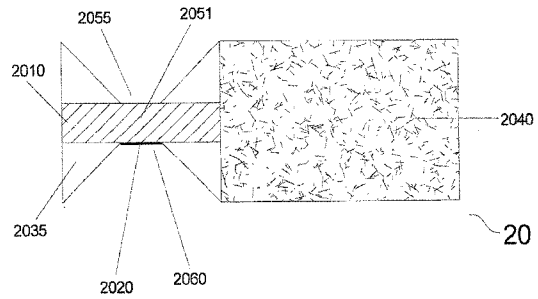


図 20

【図19】

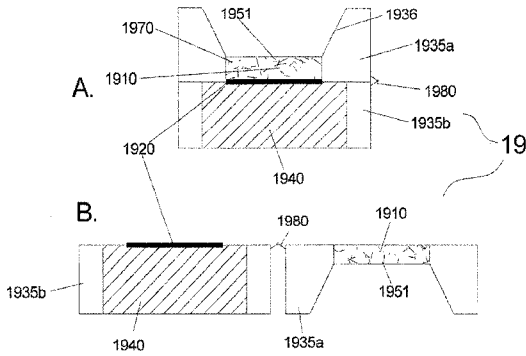


図 19

【図21】

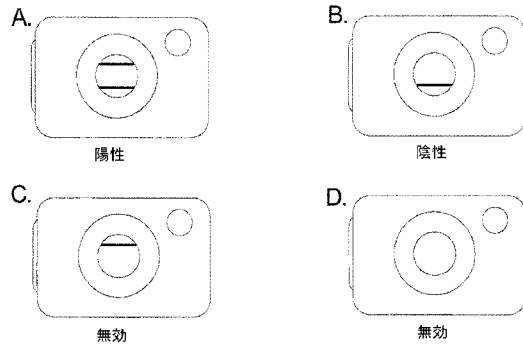


図 21

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月18日(2013.3.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体試料内の対象物質の存在または量を検出するための装置であって、
 前記液体試料を受けるための試料受けゾーンであって、
 多孔質材料上に存在する前記試料受けゾーンと、
 前記試料受けゾーンで受けた前記液体試料をろ過するための試料ろ過ゾーンであって、
 多孔質材料上に存在する前記試料ろ過ゾーンと、
 検出ゾーンにおいて、前記対象物質または前記対象物質に結合された物質に特異的に結合する特定結合対メンバーを備える多孔質膜と、を備え、
 前記多孔質膜は、前記多孔質材料のうちのいずれとも同じ要素ではなく、
 前記多孔質材料および多孔質膜は、前記検出ゾーンの一部を含む少なくとも一つの領域上で物理的に接触し、
 前記多孔質材料は、前記液体試料内に存在する液体が、前記検出ゾーンの少なくとも一部を含む領域において、上方に向けて前記多孔質膜の中に連続的に拡散できるように、前記多孔質膜の底面と物理的に接触し、かつ
 前記特定結合対メンバーが前記多孔質材料と連続的に接触することにより、前記多孔質材料と、前記液体試料が塗布された多孔質材料の真上に位置する特定結合対メンバーとの間における試料の連続的な拡散が可能になる、装置。

【請求項 2】

前記多孔質材料および多孔質膜の少なくとも一部を含む容器をさらに備える、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

洗浄液受けゾーンを含む多孔質材料をさらに備える、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 4】

多孔質材料を含む受け具と、

少なくとも 1 つの対象物質または前記物質に結合された物質に特異的に結合する、少なくとも 1 つの特定結合対メンバーを含む多孔質膜と、を含む装置であって、

前記受け具は、塗布ゾーンと、ろ過ゾーンと、反応ゾーンとを備え、

前記受け具および前記多孔質膜は、前記多孔質膜の底面が前記多孔質材料と物理的に接触するように、前記特定結合対メンバーを含む、前記多孔質膜の少なくとも一部と、前記反応ゾーンの少なくとも一部とで物理的に接触し、かつ

前記特定結合対メンバーが前記多孔質材料と連続的に接触することにより、前記多孔質材料と、前記液体試料が塗布された多孔質材料の真上に位置する特定結合対メンバーとの間における試料の連続的な拡散が可能になる、装置。

【請求項 5】

前記受け具または前記多孔質膜と物理的に接触する、洗浄液受けパッドをさらに備える、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 6】

洗浄液受けパッドと、液体不透過性膜と、をさらに備え、

前記洗浄液受けパッドは、前記受け具に隣接し、前記液体不透過性膜は、前記受け具と洗浄液受けパッドとの間に挿入され、これらの両方と物理的に接触する、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 7】

前記不透過性膜を取り除くことによって、前記受け具と洗浄液受けパッドの少なくとも一部の間で物理的な接触がもたらされる、請求項 6 に記載の装置。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 M
G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z

(72)発明者 ウィルキンズ トレイシー ディー
アメリカ合衆国 ヴァージニア州 2 4 1 4 9 ライナー チェスナット リッジ 6 2 5 4

【 外国語明細書 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

DEVICE AND METHOD FOR DETECTION OF ANALYTES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[001] This application relies on and claims the benefit of the disclosure and filing date of U.S. provisional patent application number 60/630,152, filed 24 November 2004, the entire disclosure of which is hereby incorporated herein by reference in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[002] The present invention relates to devices and methods for detecting substances that are present in liquids. In particular, the invention relates to devices and methods for detecting small molecules, such as chemicals or biological products, that are present in liquid samples derived from body tissues or the environment.

Description of Related Art

[003] There are various types of devices and methods available in the art for detecting substances in samples. A large segment of the field utilizes membrane-bound molecules that specifically bind to the substance of interest or to a molecule that is bound to the substance of interest. The two main types of devices and methods are generally referred to as lateral flow and flow through. These tests are generally relatively rapid (less than 1 hour to detect a substance) and sensitive (ng/ml range).

[004] In a flow through device, a sample is pulled through a membrane by capillary action and the substance (analyte, antigen, etc.) is retained on the membrane by binding to a specific antibody, receptor, peptide, etc. The binding is detected by binding of a second antibody or other molecule that is coupled to either an enzyme (e.g., horseradish peroxidase), a colloidal particle (e.g., gold sol), or various other labels and particles (e.g., fluorescent labels, paramagnetic beads). The binding occurs very rapidly as the sample is pulled through the membrane and the membrane is then washed (buffer is pulled through the membrane) and the detection reagent is added. The result is a detectable signal, such as a spot of color, a line, a plus sign, etc.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[005] In a lateral flow device, the sample wicks across a thin membrane by capillary action and flows through a line of a reagent, such as an antibody or other binding component (binding peptides, receptors, etc.). In certain versions, the analyte has already been bound by an antibody with a colored particle attached (*e.g.*, gold sol, blue dextran bead, etc). This complex of antigen and antibody-gold is bound by the reagent line and a colored line appears. There is no washing involved and no liquid reagents are used, except that the sample may be diluted in a buffered solution before it is placed onto the conjugate pad which contains the antibody-gold sol as a dried reagent.

[006] In other versions of the lateral flow device, the sample is usually mixed with a buffer containing an antibody-enzyme conjugate. This is placed onto the membrane, and wicking occurs by lateral flow along the thin membrane. A line is not immediately visible because a reagent must be added. Usually this is a colorless chemical that is converted into an insoluble colored precipitate by the enzyme (*e.g.*, horseradish peroxidase, etc.). This version must be washed to leach away the unbound enzyme, so there is an absorbent pad at each end of the membrane and the membrane is typically more porous than that used for gold-sol lateral flow (this facilitates washing).

[007] Although the devices and methods currently available for detecting substances in liquid samples are suitable and effective for detecting most substances of interest, there is a need for new devices and methods having improved speed, sensitivity, and ease of use.

SUMMARY OF THE INVENTION

[008] The present invention addresses needs in the art by providing a device and method for rapidly detecting substances in liquid samples, which are sensitive and easy to use. The present device and method enable clinicians to rapidly detect organisms, biological products such as toxins or other biological materials such as proteins, nucleic acids (DNA, RNA), and polysaccharides, and drugs or other man-made chemicals, in tissue samples. By tissue samples, it is meant any composition

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

that contains biological material originating from one or more animal cells or tissues (including the blood system), including, but not limited to, tissues (*e.g.*, whole blood or fractions thereof, tumor tissue, urine, excrement or excretion products, such as feces, diarrhea) of humans and animals (*e.g.*, veterinarian samples from farm animals or companion animals, meat intended for human consumption, such as hamburger, steak, bacon, eggs, prepared food). It thus includes liquid or semi-liquid samples of biological materials that do not need dilution prior to use in the method or with the device of the invention. It likewise permits the detection of biological or chemical substances in environmental samples, including surface soil, subsurface soil, rock, and water, and surface water. In addition, it can be used to detect airborne substances where such substances can be captured and dissolved in a liquid. For example, aerosols can be solubilized or otherwise combined with a liquid to create a liquid composition, which can be used as a sample for detection of a substance of interest.

[009] In general, the method of the invention uses diffusion of a substance through a membrane to permit detection, either directly or indirectly, of that substance by a specific binding pair member. Unlike detection methods in current use, which rely on passing, in a unidirectional manner, a substance over or through a membrane containing a specific binding pair member for the substance, the present methods do not rely on such unidirectional passing of substance over or through a membrane. Rather, the present methods rely on simple diffusion of a substance through, around, over, across, and about a membrane to detect the substance, with no uniform directionality of movement with respect to the membrane being necessary. Surprisingly, it has been found that simple diffusion through, around, over, across, and/or about a membrane containing a specific binding pair member for a substance of interest is sufficient for rapid and sensitive detection of the substance.

[010] Accordingly, the method of the invention generally comprises providing a liquid containing, or suspected of containing, a substance of interest; applying the liquid to a porous material, such as a pad, in a sufficient amount to at least partially wet the porous material; contacting the porous material with a porous membrane comprising a specific binding pair member that is capable of binding, either directly

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

or indirectly, the substance of interest; and detecting the presence or absence of a complex comprising the specific binding pair member and the substance of interest, where the presence of such a complex indicates the presence of the substance in the liquid.

[011] Broadly speaking, the device of the invention comprises any configuration of components that permit practice of the method of the invention. More specifically, the device of the invention comprises any configuration of components that permit a liquid sample containing, or suspected of containing, a substance of interest to be retained in a pre-defined area or region of the device, where the area or region comprises a porous membrane comprising a specific binding pair member that is specific, either directly or indirectly, for the substance. Within this area, the sample can diffuse across, through, etc. the membrane.

[012] In its most basic form, the device of the invention comprises (a) a receptacle comprising a porous material or pad that is capable of absorbing and transmitting a liquid, and (b) a porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for a substance to be detected. The receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member. In embodiments, the pad and membrane are in direct contact with each other over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member. The device can comprise a container containing the receptacle. The device can comprise a holder for the porous membrane. In embodiments, the device comprises the container and holder in contact with each other, the contact between the two elements causing the porous membrane and the porous material to be in direct contact with each other over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member. In addition, the device can comprise a sample application pad and a wash solution receiving pad.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[013] The accompanying Figures, which are incorporated in and constitute a part of this specification, illustrate several embodiments of the invention and together with the written description serve to explain certain principles of the invention. The Figures provide details of certain embodiments of the invention in order to help better explain various features of the depicted embodiments. Because the Figures depict exemplary embodiments of the invention only, they are not to be construed as limiting the scope of the invention to the particular details depicted in them.

[014] Figure 1 is a perspective view of a basic configuration of the device of the invention, comprising a porous membrane and a receptacle.

[015] Figure 2 is a perspective view of a configuration of the device depicted in Figure 1, in which the porous membrane is in direct contact with the porous material.

[016] Figure 3 is a cross-section side view of a configuration of a device of the invention, comprising a container and holder directly connected to each other by way of a flexible hinge.

[017] Figure 4A is a cross-section side view of a configuration of a device of the invention in which a wash solution receiving pad is connected to a sample receiving and reaction pad.

[018] Figure 4B is a cross-section side view of an alternative configuration of the device depicted in Figure 4A, in which the wash solution receiving pad is located below the sample receiving and reaction pad.

[019] Figure 4C is a cross-section side view of a configuration of the device of the invention in which a removable liquid impermeable barrier is located between a sample receiving and reaction pad and a wash solution receiving pad.

[020] Figure 5 depicts a side view of a configuration of the device of the invention in which the sample receiving and reaction pad is extended beyond the reaction area, to form a unit comprising a separate sample receiving area and a reaction area.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[021] Figure 6 depicts a cross-section side view of the device depicted in Figure 5 contained within a container that comprises a sample application port and a viewing window.

[022] Figure 7 depicts a cross-section side view of a configuration of the device of the invention comprising a sample application port and a viewing window.

[023] Figure 8 depicts a cross-section side view of a configuration of the device of the invention in which the holder for the porous membrane exerts pressure on the reaction pad at the site of the membrane to cause compression of the pad at this area.

[024] Figure 9 depicts a cross-section side view of a configuration of the device of the invention in which the container exerts pressure on the reaction pad from underneath at the site of the membrane to cause compression of the pad at this area.

[025] Figure 10 depicts a top view of a configuration of the device of the invention, showing a sample application port and viewing window.

[026] Figure 11 depicts a top view of an alternative configuration of the device of the invention, showing a sample application port and viewing window.

[027] Figure 12 depicts a top view of the device depicted in Figure 11, with areas comprising specific binding pair members and/or control molecules on the membrane within the area defined by the viewing window.

[028] Figure 13 depicts a cross-section top view of a configuration of the device of the invention, showing a single sample application pad bifurcating to two separate reaction pads and porous membranes, which are each connected to two separate wash solution receiving pads.

[029] Figure 14A depicts a top view of a configuration of the device of the invention in which the sample application pad extends beyond the area defined by the container.

[030] Figure 14B depicts a cross-section side view of an embodiment of the configuration of the device of the invention depicted in Figure 14A.

[031] Figure 14C depicts a cross-section side view of an embodiment of the configuration of the device of the invention depicted in Figure 14A.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[032] Figure 15A is a side view of a configuration of the device of the invention in which a "clam shell" container is used.

[033] Figure 15B is a top view of the bottom half of the device depicted in Figure 15A.

[034] Figure 15C is a cross-section from the side of the device depicted in Figure 15A, where the top half is positioned above, but not in contact, with the bottom half, and where the hinge is removed to permit alignment of the top and bottom halves for descriptive purposes.

[035] Figure 15D is a cross-section from the side of the device depicted in Figure 15A, in which the top half and bottom half are joined by friction fit.

[036] Figure 16 depicts a cross-section side view of a configuration of the device of the invention in which the device comprises two sections connected by a hinge.

[037] Figure 17 depicts a side cross-section of a configuration of the device of the invention in which the device comprises an impermeable barrier.

[038] Figure 18 depicts a side cross-section of a configuration of the device of the invention in which the device comprises an impermeable barrier.

[039] Figure 19 depicts a side cross-section of a configuration of the device of the invention in which the device comprises a hinge connecting the top and bottom halves. Panel A depicts the device in a closed position for sample application and binding. Panel B depicts the device in an open position for reading reaction results.

[040] Figure 20 depicts a side cross-section of a configuration of the device of the invention in which the device comprises an application port at the bottom of the device and a wash solution receiving pad on the side.

[041] Figure 21A depicts a top view of a configuration of the device of the invention, as it would look when a positive sample were detected.

[042] Figure 21B depicts a top view of a configuration of the device of the invention, as it would look when a negative sample were detected.

[043] Figure 21C depicts a top view of a configuration of the device of the invention, when the device and/or method failed.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[044] Figure 21D depicts a top view of a configuration of the device of the invention, when the device and/or method failed.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[045] Before proceeding with a description of the invention and various embodiments, certain terms used herein will be defined at this point. Other terms used herein are used in accordance with their normal definition in the art or are defined at some other point herein.

[046] As used herein, a substance is anything, including, but not necessarily limited to, simple, natural organic molecules such as sugars and short-chain acids; complex biological molecules such as peptides, nucleic acids (*e.g.*, DNA, RNA, PNA), and polysaccharides; and man-made (whether through manipulation of biological processes or through chemical syntheses) molecules such as drugs, industrial agents, pesticides, and defoliants. Thus, a substance can be a drug, hormone (such as one present during pregnancy or ovulation), protein (including antibody), toxin, DNA (including single-stranded DNA), RNA (including double-stranded RNA), virus or viral protein or nucleic acid, bacterium or bacterial protein or nucleic acid, polysaccharide, pollutant, and the like. It can thus be a bacterial or viral pathogen or a prokaryotic or eukaryotic parasite.

[047] For example, the substance can be a living organism or virus, or any part thereof, including, but not limited to, macromolecules. Thus, the substance can be a gram positive or gram negative procaryotic organism, such as a Eubacterium or Archaea. Non-limiting examples of bacterial organisms include *Clostridium* species, such as *C. difficile*, *C. tetani*, *C. botulinum*, and *C. perfringens*; *Escherichia coli*; a *Salmonella* species, such as *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella typhi*; a *Bacillus* species, such as *Bacillus anthracis* and *B. cereus*; a *Staphylococcus* species, such as *S. aureus* and *S. epidermidis*; a *Streptococcus* species, such as *S. pyogenes*, *S. mutans*, and *S. pneumoniae*; a *Neisseria* species, such as *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*; a *Haemophilus* species, such as *H. influenzae*; a *Bordetella* species, such as *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*, a *Listeria* species, such

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

as *L. monocytogenes*; a *Corynebacterium* species, such as *C. diphtheriae*, and *C. pseudotuberculosis*; a *Mycobacterium* species, such as *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare*, and *M. leprae*; an *Actinomyces* species; a *Klebsiella* species, such as *K. pneumoniae*; a *Serratia* species, such as *S. marcescens*; a *Proteus* species, such as *P. mirabilis* and *P. vulgaris*; a *Shigella* species, such as *S. flexneri*; a *Vibrio* species, such as *V. cholerae*; a *Pseudomonas* species, such as *P. aeruginosa*; a *Yersinia* species, such as *Y. pestis*; a *Francisella* species, such as *F. tularensis*; a *Brucella* species, such as *B. abortus*, *B. suis*, and *B. canis*; a *Treponema* species, such as *T. pallidum*; a *Borrelia* species, such as *B. burgdorferi*; a *Campylobacter* species, such as *C. jejuni* and *C. fetus*; a *Legionella* species, such as *L. pneumophila*; a *Rickettsiae* species; a *Chlamydia* species, such as *C. trachomatis* and *C. psittaci*; and a *Mycoplasma* or *Acholeplasma* species.

[048] Of course, the substance can be a virus or any part thereof. Non-limiting examples of viruses include immunodeficiency viruses, such as human immunodeficiency viruses (*e.g.*, HIV-1, HIV-2, HIV-O); hepatitis viruses, such as hepatitis C virus (HCV), and hepatitis B virus (HBV); papilloma viruses, such as human papilloma virus (HPV); and any other virus associated with human or animal disease.

[049] Because the substance can be any portion of a living or non-living entity, the substance can be a protein or portion thereof associated with a neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease or a transmissible spongiform encephalopathy, such as a prion disease. Thus, the substance can be a prion protein or portion thereof.

[050] Other non-limiting examples of substances include parasites or any portion thereof. Thus, substances can be all or part of a *Giardia* species, a *Cryptosporidium* species, or an *Entamoeba* species.

[051] As used herein, a specific binding pair member is a substance that specifically binds, either directly or indirectly, to another substance. Thus, together, the specific binding pair member and the other substance create a pair of substances. Because the two substances specifically bind each other, both can be considered specific binding pair members for each other. However, for clarity purposes, one will

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

be referred to as the specific binding pair member and the other as a substance to which it binds. Examples of specific binding pair members include, but are not limited to, antibody-antigen pairs (including, but not limited to, antibody-antibody pairs where one antibody specifically binds another antibody), enzyme-substrate pairs, complementary nucleic acid pairs, protein-nucleic acid pairs (such as DNA and DNA-binding protein pairs, including, but not limited to, an operator sequence and a transcription factor), and protein-protein pairs (including, but not limited to, subunits of a multi-subunit protein). Examples also include artificial peptides that bind to a target, receptors, ligands, artificial antibodies (*e.g.*, single chain antibodies, recombinant antibodies, antibodies containing just the antigen binding region, bacterially produced antibodies or antibody parts). Other exemplary binding pair members include two or more nucleic acids that contain regions of complementarity, either over a portion or the entirety of one or more of the nucleic acids, and which can specifically bind or hybridize under appropriate conditions. The invention is directed to detecting substances in a sample. However, it should not be assumed that the substances is necessarily one of the specific binding pair members. Rather, a specific binding pair member can be a substance that specifically reacts with another specific binding pair member, and at the same time binds to a substance of interest in the sample (*e.g.*, an antibody that binds to a substance of interest and at the same time is specifically bound by another antibody). As used herein, disclosure of a specific binding pair member (*e.g.*, an antibody) binding to a substance of interest in a sample includes not only direct binding of the specific binding pair member to the particular substance, but to another specific binding pair member that is bound to the substance. For example, a specific binding pair may be biotin and avidin or streptavidin.

[052] Rapid test devices and methods currently used in the art work because they force a substance (*e.g.*, an antigen) and a specific binding pair member (*e.g.*, an antibody) to come together, either by sucking the sample through a membrane coated with the antibody (flow through devices and methods) or by pulling it along a membrane by capillary action (lateral flow devices and methods). The present invention does not rely on either of these principles. According to the present

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

invention, a porous membrane comprising the specific binding pair member simply needs to contact a porous material (*e.g.*, a pad) that contains the substance. Simple diffusion in and out of the porous material and membrane causes the substance and specific binding pair member to come into contact. That the present invention provides a rapid and sensitive test for substances in samples is surprising because it is widely held that simple diffusion is not sufficient for detection of a substance, much less detection with high sensitivity by way of binding to a specific binding pair member associated with a solid support, such as a membrane. Indeed, the present invention provides exceptionally sensitive detection of substances at times comparable to those used for lateral flow or flow through devices and methods. Because the sample does not have to be applied directly to, and does not necessarily flow directly through, the membrane comprising the specific binding pair member, the test also can be used on samples that clog the membranes of other rapid tests.

[053] In a first aspect, the present invention provides a method of detecting a substance that is present in a liquid sample. The method of the invention uses passive diffusion of a substance from a receptacle comprising a porous material, such as a pad, to a porous membrane. Such diffusion permits detection, either directly or indirectly, of the substance by a specific binding pair member associated with the porous membrane. Unlike common detection methods in current use, which rely on passing, in a unidirectional manner, a substance across or through a membrane containing a specific binding pair member for the substance, the present methods do not rely on such unidirectional movement of the substance. Rather, the present methods rely on simple diffusion of a substance through, around, over, across, and/or about a membrane to detect the substance, with no single directionality of movement with respect to the membrane being necessary. Surprisingly, it has been found that simple diffusion through, around, over, across, and about a membrane containing a specific binding pair member for a substance of interest is sufficient for rapid and sensitive detection of the substance.

[054] The method of the invention generally comprises providing a liquid comprising or suspected of comprising a substance of interest; applying the liquid to a

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

porous material in a sufficient amount to at least partially wet the porous material; contacting the porous material with a porous membrane comprising a specific binding pair member that is capable of binding, either directly or indirectly, the substance of interest; maintaining the wetted porous material and the porous membrane in contact for a sufficient amount of time for the porous membrane to become wetted at least in the area comprising the specific binding pair member; and detecting the presence or absence of a complex comprising the specific binding pair member and the substance of interest, where the presence of such a complex indicates the presence of the substance in the liquid.

[055] The liquid comprising or suspected of comprising a substance of interest can be provided in any number of ways. For example, it can be provided in the form that it was isolated from its natural environment (*e.g.*, whole blood, urine, diarrheal feces, and stream, river, or lake water can be used directly as isolated). Thus, it can be an undiluted sample. Alternatively, it can be provided in a form after having been treated to remove one or more components (*e.g.*, the liquid portion of blood and feces can be used after centrifugation, filtration, or precipitation of solid matter). In addition, where the original sample is solid or substantially solid, a liquid, such as water, may be added to the sample to provide liquid characteristics. Other handling or manipulation of the liquid can be performed prior to or at the time of providing the liquid. Any handling or manipulation may be used as long as it does not render the sample incapable of use in the method of the invention or in the device of the invention.

[056] The liquid can be any liquid, including, but not limited to, water or compositions containing water, such as biological tissues, extracts of biological tissues, and biological excretions; organic solvents or compositions containing organic solvents; and combinations of water and organic solvents or combinations of aqueous and/or organic solvent compositions. For example, the liquid can be a biological fluid, such as blood or a portion of blood, urine, feces, saliva, sputum, mucous, semen, or homogenized tissue. It thus can be a homogenized sample of human or animal tissue, such as homogenized meat (*e.g.*, hamburger, lamb, pork,

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

chicken, fish, egg). It also may be an extract of a solid specimen, such as an aqueous extract of a fecal sample or of a consumable meat sample. Where the tissue to be analyzed is not suitable for liquification as isolated, water or another liquid may be added to the tissue to provide suitable liquid characteristics. Because the present invention is suitable for detection of substances in liquids having a wide range of viscosities, the present method is suitable for detecting substances present in liquid or semi-liquid compositions.

[057] Where necessary, the amount or concentration of the substance to be detected within the liquid, if present, can be adjusted to achieve satisfactory detection. Adjustment can be accomplished by dilution with a liquid that is compatible with the liquid sample and the components of the device of the invention, or can be accomplished by concentration of the substance within the liquid sample using any suitable concentration technique, including, but not limited to, centrifugation, filtration, evaporation, affinity purification, or the like. In general, the substance to be detected is present in the sample in nanogram (ng) to microgram (ug) amounts.

[058] Additional components may also be added to the liquid prior to, or at the time of, applying of the liquid to the porous material. Anything that does not interfere substantially with the ability of the specific binding pair member to specifically complex with the substance or a specific binding pair member that binds to the substance may be added to the liquid. In embodiments, a label that specifically interacts with the substance, if present, is added to the liquid prior to or at the time of applying the liquid to the porous material. For example, an antibody that specifically binds to the substance of interest can be added to the liquid prior to applying the liquid to the porous material. The antibody may be labeled with a moiety that can be detected, either directly or through the use of ancillary materials. Exemplary moieties include, but are not limited to, alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, fluorescent compounds, paramagnetic beads, gold or other metals, latex beads, avidin (streptavidin), and biotin. Thus, in embodiments, an antibody conjugate that specifically binds to the substance of interest is added to the liquid sample prior to or at the time of applying the liquid sample to the porous material/pad.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[059] The liquid is applied to the porous material in a sufficient amount to at least partially wet the porous material. It is preferred that a sufficient amount of liquid is applied to wet that portion of the porous material that is in contact with the porous membrane at the region where the specific binding pair member is located. In preferred embodiments, the entire porous material or substantially the entire porous material is wetted. In embodiments where the porous material extends beyond the area covered by the porous membrane, it is preferred that a sufficient amount of liquid is applied to wet the porous membrane at least at the region where the specific binding pair member is located.

[060] Applying can be accomplished by any suitable technique, including, but not limited to, dipping of the porous material into the liquid, pouring the liquid onto the porous material, placing the porous material in the path of a stream of liquid (*e.g.*, dipping into a flowing river, inserting into a stream of urine), dropping the liquid onto the porous material (*e.g.*, with an eye dropper or pipette), and smearing a semi-liquid sample onto the porous material. Applying can be accomplished by direct application to the porous material or to another porous material in contact with the porous material. Likewise, it can be accomplished by applying to an area of the porous material that is physically distant from another site, and permitting the liquid to migrate through the porous material to the other site.

[061] In practice of the invention, at least a portion of the liquid that is applied should be present at a site directly in contact with a portion of the membrane comprising a specific binding pair member. Thus, the liquid can be applied to a portion of the porous material adjacent the area where the porous membrane is in contact with the porous material or is intended to be in contact with the porous material (*e.g.*, in the reaction pad area, which includes the detection area or site) or can be applied at a site distal to the reaction pad area, and allowed to migrate to that area. When applied at a distant site, due to the porosity of the material, the liquid will travel through the porous material from the site of application to the site of detection of the presence of the substance (*i.e.*, to the site on the porous material where the porous membrane is in contact).

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[062] Applying the liquid at a site away from the site of detection can permit filtration of the liquid before detection of the substance. That is, the porous material can act not only to transport the liquid and its components to the site of detection, but can also act to block or retard migration of certain components present in the sample, thus effectively acting as a filtration system that permits substances of a certain size only to migrate to the detection area. Numerous different porous materials are available, having various different pore sizes, and one may select the appropriate material and pore size to effectively filter out unwanted components in the liquid. For example, when applying a liquid comprising feces, one may want to filter out large particles, such as undigested or partially digested food or bacteria. In such a situation, one may select a porous material that has a pore size that blocks or significantly retards migration of these relatively large components while permitting smaller components, such as bacterial proteins, nucleic acids, extracellular blood proteins, or the like, to migrate through the material essentially unimpeded.

[063] The method of the invention also comprises contacting the porous material with a porous membrane comprising a specific binding pair member that is capable of binding, either directly or indirectly, the substance of interest. Contacting of the porous material and the porous membrane can occur prior to or after applying the liquid to the porous material. Furthermore, it is not relevant whether the material or the membrane is caused to move in order to effect contact. Contacting encompasses physical movement of either or both the porous material and porous membrane to achieve contact.

[064] Although not necessary, typically when the liquid is to be applied to a porous material at a site away from the site of detection of the presence of the substance, the porous material and porous membrane are contacted with each other prior to applying the liquid. On the other hand, when the liquid is applied to the porous material at or very near the site where the porous material and porous membrane make contact, the liquid is typically applied before the membrane and material are contacted.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[065] It has been found that direct contact of the membrane at the site where the specific binding pair member is located with a porous material through which a substance of interest can travel improves the sensitivity and speed of the method of the invention. Therefore, it is preferred that the porous membrane and porous material are in contact at this site, or at least over a portion of this site. Contact between the porous material and porous membrane should be continuous contact over at least the portion of the membrane where the specific binding pair member is located, or over a sufficient portion of the membrane at the site where the specific binding pair member is located that a detectable signal can be identified if the substance of interest is present in the liquid. That is, in embodiments, the area where the specific binding pair member is bound to the porous membrane may exceed the area of direct contact with the porous material, but a sufficient amount of contact will be made such that the presence of the substance in the liquid can be detected.

[066] Direct contact of the membrane and the material is preferred; however, one or more intervening porous, substantially hydrophilic materials may be interposed between the porous material and the porous membrane. In such a situation, the intervening porous materials effectively act as secondary porous materials, and thus can be considered for the purposes of the invention, to be a porous material or pad. Thus, use of the terms porous material or pad encompasses multiple materials that provide the same or essentially the same function.

[067] In embodiments, contacting of the material and membrane comprises exerting pressure on the membrane and material to ensure complete or essentially complete contact of the two over at least a portion of the area where the specific binding pair member is located. While not necessary, it has been found that, under certain circumstances, pressure at this area may improve the performance of the method. For example, it can improve the sensitivity and reliability of the method. It can also improve the wicking characteristics of the porous material, which can increase the amount of sample in the reaction area. Pressure can further increase the amount of contact between the porous material and the porous membrane. That is, in embodiments where the porous material comprises both a sample application site and

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

a reaction site, it has been found that compression of the porous material at the reaction site can improve the sensitivity of the device, and thus the assay or method of the invention. While not desiring to be limited to any particular theory of operation, it is believed that, in addition to improving the contact between the membrane and the material, compression of the reaction area of the porous material improves migration of liquid into the area of the material in contact with the membrane, and in particular the portion of the membrane comprising the specific binding pair member, and impedes migration of liquid out of the area. In effect, the compression causes the liquid to collect in the area of compression. The improved migration into, but not out of, the area causes an increase in the amount of substance in the area (as compared to an uncompressed material) and enhances diffusion of the substance (if present) into the porous membrane.

[068] According to the method of the invention, the wetted porous material and the porous membrane are maintained in contact for a sufficient amount of time for the porous membrane to become wetted at least in a portion of the area comprising the specific binding pair member. Doing so permits the substance, if present in the sample, to diffuse through, over, around, and/or about the membrane and make contact with the specific binding pair member associated with the membrane. Although the amount of time provided will vary depending on the amount of substance in the sample, the porosity of the porous material and membrane, the amount of specific binding pair member associated with the membrane, the specificity and strength of binding of the specific binding pair member to the substance, the temperature, and other factors (all of which can be selected by those of skill in the art without undue experimentation based on times, concentrations, temperatures, etc. generally used in the art for rapid tests), typically, sufficient wetting of the membrane should occur within one minute. In preferred embodiments, the membrane and material are maintained in contact for at least thirty seconds, such as about or precisely thirty seconds, about or precisely one minute, about or precisely 2 minutes, about or precisely 3 minutes, about or precisely 5 minutes, about or precisely 10 minutes, about or precisely 15 minutes, about or precisely 20 minutes, about or

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

precisely 25 minutes, or about or precisely 30 minutes. As used herein, unless otherwise noted, times, temperatures, and other numerical values recited include a range about the stated number of 5% at either end of the recited number. Thus, recitation of "60 seconds" includes any amount of time from 57 seconds to 63 seconds.

[069] Maintaining the membrane and material in contact can be performed at any temperature. However, it is preferred that temperatures below 100°C be used, such as room temperature (20° - 25°C), 30°C, 37°C, 40°C, or 50°C. Indeed, it has surprisingly been found that the present method can provide sensitivities greater than ELISA tests using the same specific binding pair member and substance, while being performed at room temperature rather than 37°C (as is needed for an ELISA).

[070] Likewise, any suitable concentration or amount of specific binding pair member and substance can be used. General amounts of various specific binding pair members (*e.g.*, antibodies, enzymes, nucleic acids) to be used for membrane-bound detection of binding partners (*e.g.*, antigens, enzyme substrates, nucleic acids or nucleic acid binding proteins) are known in the art. For example, when the specific binding pair member is an antibody, it can be present on the membrane at an amount of about 0.5 ng to about 1000 ug and over an area from about 0.5 square mm to about 100 square mm or more. Amounts to be bound to the membrane can be selected based on the amount of substance to be detected, the amount/intensity of signal intrinsically produced by the selected label and signal generation system, and the size of the area on which the specific binding pair member is bound. These parameters may be selected and adjusted by those of skill in the art based on well known characteristics of each signal generation system.

[071] In embodiments, applying the liquid is performed before contacting the porous material with the porous membrane. In other embodiments, applying the liquid is performed after contacting the porous material with the porous membrane. Thus, in embodiments, the porous material and porous membrane are in contact with each other before the liquid is applied. In general, it is not important whether contact between the porous material and porous membrane occurs before or after application

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

of the sample. The time at which contact is made is typically selected in conjunction with the configuration of the device used for a particular assay, and the ease of use of the device.

[072] The method further comprises detecting the presence or absence of a complex comprising the specific binding pair member and the substance of interest, where the presence of such a complex indicates the presence of the substance in the liquid. According to the invention, if a sample contains a substance of interest, diffusion of the sample between the porous material (*i.e.*, reaction pad) and porous membrane will permit the substance to come into contact with the specific binding pair member, which is bound to the membrane. The method of the invention detects the complex formed from the specific binding pair member and substance by any of a number of art-recognized detection schemes. For example, an antibody (other than the specific binding pair member bound to the membrane) that is specific for the substance can be exposed to the substance, either before the substance is exposed to the specific binding pair member (*e.g.*, before the sample is applied to the porous material, while the sample is migrating through the porous material, etc.) or after sufficient time has been provided for the substance and specific binding pair member to come into contact. In some situations, the antibody will be labeled with a detectable moiety, such as with a label that can be directly detected (*e.g.*, a metal sol, such as colloidal gold; a dye sol; a colored particle, such as latex); a paramagnetic bead; and a fluorescent compound. It can also be labeled with an indirect label, such as an enzyme that produces a detectable signal when exposed to a substrate (*e.g.*, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase). In other situations, the antibody will serve as a specific binding pair member for a label, such as by binding of the label to the Fc portion of the antibody. Labels can also include specific binding pairs in which one or both members contain a detectable moiety or substance that can generate a detectable moiety, such as an avidin (streptavidin) / biotin pair or any of its functional equivalents.

[073] As alluded to in the previous paragraph, the label for the substance of interest may be provided as a component of the porous material. For example, it may

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

be impregnated (as a dry substance or as a liquid solution that is permitted to dry in the porous material) in the reaction zone, the sample application zone, or the sample migration zone (located between the sample application zone and reaction zone in certain embodiments). As the liquid sample migrates into and through the porous material, the label is dissolved in the liquid and migrates along with the liquid to the reaction site and, eventually, to the membrane. During the migration process or during the reaction process, the label specifically binds the substance (if present), ultimately resulting in a membrane-bound complex comprising the specific binding pair member, the substance of interest, and the label. In embodiments where a label is included in the porous material, selection of the pore size of the material will depend, at least in part, on the migration characteristics of the label or the substance-label complex.

[074] Detection of the substance can provide qualitative, semi-quantitative, or quantitative information on the substance in the sample. Qualitative detection provides information that informs the practitioner of the presence, but not necessarily the amount, of the substance in the sample. However, by placing a known amount of specific binding pair member on the membrane, by knowing the amount of substance that the specific binding pair member can bind, and by knowing the amount of substance-label complex that must be present for detection, one can provide a method of detection of a substance that is semi-quantitative. More specifically, by knowing these amounts, and by obtaining a detectable signal, the practitioner will know that the substance is not only present in the sample, but that the substance was present in at least an amount necessary to produce the detectable signal. If desired, quantitative measurement of sample amount can be obtained by comparing signal strength of the test sample with a standard curve of signal strengths derived from samples containing known amounts of substance. Various ways of designing semi-quantitative and quantitative assays are known in the art, and any suitable one may be used within this invention.

[075] Detection may also be the absence of a detectable signal, or the diminution of a signal that would otherwise be generated in the absence of the substance or some

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

other substance that is indicative of the presence of the substance. Thus, the methods of the invention encompass all types of immunoassays (including both sandwich-type assays and competitive assays) and any other assays that rely on detecting or failing to detect binding of at least one specific binding pair member to a substance of interest.

[076] The method of the invention can comprise numerous other steps, including, but not limited to, providing one or more control reactions to determine whether one or more steps in the method have been performed successfully, to determine whether one or more reagents is functioning as expected, or to determine if substances that interfere with the ability of the method to generate reliable results are present in the sample. Substances that can be used as control reagents include, but are not limited to, the substance to be detected or a structural analog, an antibody that specifically reacts with another antibody, or anything else that can specifically bind to the substance of interest or some other reagent used in the assay. Accordingly, the method of the invention can include adding a known substance, including the substance to be detected, to determine if one or more steps of the method are working as designed. Such control reactions are well-known to those of skill in the art, and their design and implementation need not be detailed herein. A common control reaction will comprise providing a second area, either on the porous membrane that specifically binds the labeled substance or on a second porous membrane, to show not only that the label is present and functional, but to show that the label has had sufficient time to contact any binding partner associated with the membrane. Of course, multiple lines may be provided in various orientations, each providing repetitive or different information about various aspects of the method.

[077] In addition, the method of the invention can detect one or more substances in the sample in addition to the substance of primary interest. The other substance(s) can be other substances that naturally occur in the sample being tested, or can be substances that are intentionally added to the sample to serve as positive controls, labels, competitors, and the like. Thus, the methods of the invention can detect two or more substances in a sample. When doing so, the multiple substances can be detected on the same porous membrane, or multiple membranes may be provided, either on the

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

same device or on two identical devices (with the exception of the identity of the substance(s) bound to the membrane).

[078] The method of the invention may comprise one or more washing steps. Although not limited to any particular method, washing is typically used in embodiments where indirect labels are used to detect the substance. For example, when using a label that uses a substrate to generate a signal (*e.g.*, horseradish peroxidase), the label will typically be present in the reaction mixture in excess over the substance. In addition, it is possible that the substance-label complex might be present in excess over the specific binding pair member bound to the membrane. In either such situation, the excess label, if permitted to remain in and around the membrane comprising the specific binding pair member, would react with the label substrate to produce a signal, which would represent non-specific signal or background noise. To reduce this background noise, the membrane can be washed with an appropriate volume of an appropriate wash solution. The wash solution can be applied once or more than once, depending on the amount used and the amount of unbound label present. Likewise, other wash steps may be included at other points in the method. In embodiments, the wash step is used to wash unbound conjugate from the membrane to improve detection sensitivity. Those of skill in the art are well aware of advantages and disadvantages of performing or not performing washing steps at various points during specific binding reactions, and can thus select the type and number of washing steps, as well as the washing solutions, to use for each particular embodiment of the invention. Such selection can be made without undue experimentation.

[079] In a second aspect, the invention provides a device for practicing the method of the invention. Broadly speaking, the device of the invention comprises any configuration of components that permit practice of the method of the invention. More specifically, the device of the invention comprises any number and configuration of components or elements that permit a liquid sample containing, or suspected of containing, a substance of interest to be retained in a pre-defined area or region of the device, where the area or region comprises a porous membrane

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

comprising a specific binding pair member that is specific, either directly or indirectly, for the substance.

[080] In its most basic form, the device of the invention comprises (a) a receptacle comprising a porous material that is capable of absorbing and transmitting a liquid, and (b) a porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for a substance to be detected (be it the substance in the sample or a substance that binds to that substance), where the receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member. The device can further comprise a container containing the receptacle or a portion of the receptacle. The device can further comprise a holder for the porous membrane. In embodiments, the device comprises the container and holder in contact with each other, the contact between the two elements causing the porous membrane and the porous material to be in direct contact with each other over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member.

[081] The receptacle is a physical and functional unit of the device. It provides an area and volume for liquids containing or suspected of containing a substance of interest to be retained. It also provides a reservoir for liquid to diffuse into and out of the porous membrane comprising the specific binding pair member, which is referred to herein as a reaction pad or zone. The receptacle can be of any shape and size, and fabricated of any suitable material. The receptacle comprises at least one porous material, also referred to herein as a pad. However, it is to be noted that the porous material is not necessarily limited in size to the area defined by the receptacle. That is, a single porous material or a combination of porous materials can be limited in size to the receptacle area or can extend beyond the receptacle area to the sample application area and/or wash area, or any other area present in a particular configuration of the device.

[082] The porous material (also referred to herein as a "pad") can be fabricated from any material that has pores, holes, or spaces through which one or more liquids

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

can pass. It is thus any material that is absorbent. Non-limiting examples of porous materials include, but are not limited to, paper products, such as bibulous or filtration paper (*e.g.*, Whatman[®] 3mm paper, and Filtrona[®] products), synthetic polymeric materials (*e.g.*, nitrocellulose, nylon), plastics and plastic spheres (*e.g.*, Porex[®] plastic beads; materials used in fabricating ballpoint pens), such as those made from polypropylene, polyethylene, polyvinylidene fluoride, ethylene vinylacetate, acrylonitrile, and polytetrafluoroethylene. Other non-limiting examples include nanoparticles/spheres/tubes.

[083] The pore size of the material can be selected based on the characteristics desired. Numerous porosities are available for the various types of materials that the porous material can be made from. For example, if a sample to be applied contains particulate materials or solids (*e.g.*, feces, soil), a pores size that excludes or significantly slows the migration of these particulate materials or solids can be chosen. Likewise, if the sample comprises blood, a pore size that excludes or significantly slows the migration of blood cells and platelets can be chosen. Alternatively, if the sample does not contain any substances that are undesirable at the detection site (*e.g.*, a sample that has been pre-purified to some extent), the pore size of the material may be selected without regard to filtration characteristics. In general, the pore size will range from about 0.05 micrometers to about 0.5 micrometers.

[084] The porous material may be fabricated from a single material or may comprise multiple different porous materials. The differing individual materials may be configured in any suitable configuration, such as layering one on top of another, abutting of two materials end-to-end, or any other configuration that permits a liquid to flow from one area of the material to another, such as from the site of application of a liquid to the site of detection on the porous membrane, when in contact with the porous material. For example, the porous material may comprise a pore size and material of one type at the site of application of the liquid (the application zone), a second pore size and/or material at the site of detection (the detection zone), and a third pore size and/or material (which can be the same as the first) at a third area distal (with respect to the site of application of the liquid) to the detection site, the third site

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

functioning as a wash solution receiving site (the wash receiving zone). The pore sizes and materials, and combinations thereof, may be selected to suit individual needs based on the various characteristics of the sample, the substance to be detected, the configuration of the device, or any other consideration. The porous material may contain substances that are deemed useful in practicing the invention, including, but not limited to, labels for the substance, activated charcoal, ion exchange resins, and surface active agents. Furthermore, the porous materials can be separated from each other by less porous, non-porous, or impermeable materials, such as hydrophobic membranes. These membranes can be removed at some point during practice of a method of the invention to permit flow of liquids from one or more materials to one or more other materials. For example, the two porous materials may be separated by a non-porous material attached to a pull-tab. Pulling of the tab removes the non-porous material and permits flow of liquids, such as wash solution, into a porous material (*e.g.*, a wash pad).

[085] The porous membrane is a membrane made of any suitable material that permits liquids and suspended substances of a pre-determined size to flow through it. Typically, the membrane is fabricated from materials known in the art to be suitable for detection of substances of interest by specific binding of a membrane-bound molecule to a substance. Examples include, nylon membranes, nitrocellulose membranes, polyvinylpyrrolidone membranes, glass fibers, and the like.

[086] The porous membrane comprises at least one specific binding pair member. The specific binding pair member is associated with the membrane in such a way that it remains associated with the membrane under the conditions of fabrication and use of the device. Typically, the specific binding pair member is bound, by covalent, ionic, or hydrophobic bonds, to the membrane. The membrane may be treated prior to binding in order to enhance binding. Likewise, the membrane may be treated after binding to enhance binding or to reduce binding of other substances to sites on the membrane that are different than the site where the specific binding pair member is bound. The specific binding pair member may be bound to the membrane using any known technique. Furthermore, it may be bound to the membrane in any

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

shape, design, pattern, direction, etc. desired (*e.g.*, a line, a cross, a dot, a circle) and in any size desired (*e.g.*, a dot of diameter of 0.1mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, etc.; a line 1 mm thick and 5 mm long, 2 mm thick and 1 cm long, etc.). In preferred embodiments, it is in the shape of a line, which provides an advantageous and convenient detection shape. In embodiments, the porous membrane comprises two or more different areas containing a specific binding pair member. In certain embodiments, two or more areas comprise the same specific binding pair member. In other embodiments, each area comprises a different specific binding pair member. The different specific binding pair members may be specific for the same substance (to provide an internal reproducibility control), or may be specific for different substances (*e.g.*, one is specific for a substance of interest, while one or more others are specific for other substances of interest or for reagents used in the method of the invention).

[087] Thus, the porous membrane may comprise other components in addition to the specific binding pair member. For example, it may comprise a molecule to be used as a control for the performance of the method of the invention, such as an antibody that specifically binds the label used to detect the substance of interest in the sample. It may also comprise a second specific binding pair member, the second specific binding pair member being specific for a second substance of interest in the sample (including a substance that is intentionally added to the sample to serve as a positive control). As discussed above, the specific binding pair member may be an antigen or antibody in a binding pair, a receptor or ligand in a binding pair, or either component of a binding pair. Thus, the present invention contemplates binding an antibody, an antigen, a receptor, a ligand, a single stranded nucleic acid, etc. to the membrane in order to detect its binding partner.

[088] In embodiments, the porous membrane is in contact with a holder. The holder can hold the membrane in place such that the membrane stays in contact, over at least a portion of the membrane, with the reaction pad. It also can hold the membrane in a position such that it is capable of being placed in contact with the reaction pad if so desired. For example, the holder can be a plastic ring, square, etc.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

that contacts the membrane. Contact can either retain the membrane on the holder or simply retain the membrane in contact with the reaction pad. The holder may be a separate physical component of the device or it may be fabricated as an integral portion of the device, for example as an integral portion of the container of the device.

[089] The receptacle may be located within a container. The container may be fabricated of any suitable material, but is typically made of plastic. The container provides substantial structural strength and liquid impermeability to the device of the invention, and may provide other functions as well. In a basic configuration of the device of the invention, the container contains the reaction pad, and comprises the membrane. The membrane can be provided in any suitable fashion that permits contact of the membrane with the reaction pad. For example, the membrane may be bound to a holder that is connected to the container through a hinge. Alternatively, the membrane may be bound to a holder that is integral with the container, where the container is fabricated from two halves that fit together such that the membrane contacts the reaction pad. Other suitable configurations will be apparent to those of skill in the art, and all such configurations are encompassed by the invention.

[090] The device of the invention can further comprise a sample application area or zone (also referred to herein as the sample application pad) comprising a porous material. As described above, the sample may be applied to the receptacle or reaction pad. However, in embodiments, the sample is added at a site distant to the receptacle and reaction pad. In such embodiments, the sample is added at the sample application pad, which comprises a porous material. The porous material of the sample application pad may be the same material as that used in the reaction pad (*i.e.*, it may physically be the same element or it may be two separate elements fabricated from the same material). Alternatively, it may be a different material, where the two materials are placed in contact with each other so that liquid from the application pad may pass into the reaction pad.

[091] The size of the sample application zone is not critical. However, it is preferred that the sample application zone and the reaction zone, together, have sufficient absorbent ability to absorb the entire sample being applied. Furthermore,

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

the sample application zone may comprise an open area not containing the application pad, the area typically being defined by the edge of the application pad and the side of the container. This open area may be designed to accept, either directly or as overflow, the sample being added, and may function to help filter and retain solids and large particles present in the sample.

[092] The device may further comprise a wash solution receiving zone or area (also referred to herein as a wash solution receiving pad) comprising a porous material. The porous material of the wash solution receiving pad may be the same material as that used in the reaction pad and/or sample application pad (*i.e.*, it may physically be the same element as the reaction and sample application pads, or it may be a separate element fabricated from the same material as one or both of the other pads). Alternatively, it may be a material that is different than either or both of the reaction pad and the sample application pad. In such a situation, the wash solution receiving pad is placed in contact with the reaction pad, the application pad, or both, so that wash liquid from the membrane (flowing through the reaction pad) may pass into the wash liquid pad.

[093] In embodiments, a removable liquid impermeable or semi-permeable barrier is interposed between the wash solution receiving pad and one or more other pads of the device. The barrier is present in embodiments to ensure that no liquid from the reaction pad or application pad enters into the wash solution receiving pad until the wash solution is added to the device. While typically not necessary due to the liquid flow and retention characteristics of the reaction pad, the barrier may be included in the device for added assurance, to increase the amount of liquid present in the reaction pad, or for any other reason. In other embodiments, one or more liquid impermeable barriers are included between one or more of the various pads present in the device.

[094] The device may comprise a filtration pad or zone between the sample application pad or zone and the reaction pad or zone. While the sample application pad and reaction pad can provide suitable filtration of the sample, it may sometimes be desired to have additional filtration of the sample prior to exposure of the sample to

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

the membrane. In such situations, a filtration pad may be provided. In embodiments, the filtration pad is simply an extension of the reaction pad beyond the area covered by the membrane. Alternatively, it can simply be an extension of the sample application pad that extends beyond the area where the sample is applied. In some embodiments, the sample application pad, filtration pad, and reaction pad are the same element, the various "pads" being designated (or referred to as "zones") based on function and location within the device rather than on physical characteristics. The primary function of the filtration pad is to block or retard migration of certain substances to the reaction pad. Such filtration may benefit the detection of the substance of interest by retarding colored compounds, retarding large particles that would cause background noise, and the like.

[095] As can be seen from the above description, the reaction pad, sample application pad, and filtration pad all may be fabricated from a porous material (either the same material or different materials). Likewise, the wash solution receiving pad may be fabricated from a porous material. The porous materials serve various functions, but generally all serve to draw liquid through the material such that it passes to another material. For example, the sample application, filtration, and reaction pads permit liquid to travel from the site of application to the site of detection (*i.e.*, the membrane), while simultaneously filtering various solids and particles, colored materials, or other substances. The wash solution receiving pad can draw liquid from the reaction pad when wash solution is added to the membrane, thus permitting the wash solution to carry away unwanted substances that might interfere with specific detection of the substance on the membrane.

[096] The porous material serves various functions within each area or zone, and these functions significantly overlap with the functions that can be provided in other areas of the device that comprise a porous material. For ease of description, many of the functions have been described with respect to each particular area of the device; however, the characteristics should not be considered to be limited to only the areas for which the characteristic has been described. The particular physical location of the porous material in differing embodiments will be apparent to those of skill in the art,

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

and the particular functions of the porous material in each area will likewise be apparent. The characteristics should not be considered limiting to that area. For example, in the receptacle region, the primary functions of the porous material are to provide an area or volume for liquids containing or suspected of containing a substance of interest to be retained, to provide a reservoir for liquid to diffuse into and out of the porous membrane comprising the specific binding pair member, and to draw liquid into the reaction area. Thus, the porous material in this region is sometimes referred to herein as the "reaction pad". However, in certain embodiments, the reaction pad is also the sample receiving area, and thus also functions to receive, and typically filter, the sample as well. Furthermore, due to placement of the membrane in contact with the reaction pad, the reaction pad serves as the initial acceptor for wash solution in embodiments where the membrane is washed. Accordingly, the reaction pad serves as an initial wash solution receiving pad as well.

[097] Of course, other elements can be included in the device of the invention to provide various advantages. All such additional elements are to be understood as encompassed by the present invention. Furthermore, additional method steps that provide additional advantages can be included, and are encompassed by the invention. Those of skill in the art are capable of including such elements and methods steps without undue experimentation and without departing from the full scope and spirit of the invention.

[098] In embodiments, the device is provided in a kit. The kit can comprise the device alone, in one or more copies of the same or multiple different various configurations. Alternatively, the kit may comprises other materials, such as some or all of the materials, reagents, and equipment needed to practice at least one embodiment of the method of the invention.

[099] The kits themselves can be fabricated from any suitable material, such as cardboard, plastic, metal, or glass. Cardboard and plastic are preferred materials for the kits. The kits are fabricated to suitably contain all of the components provided by the kit. Thus, they are designed to be the appropriate size, shape, and strength for holding the various components selected to be provided by the kit.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[100] The components provided by the kits can be in one or more containers. Containers of the device of the invention are described above, and can be made of any suitable material, including any of the various plastic materials known to be useful in fabricating devices of this nature. Containers for other components can be made of any suitable material, including, but not limited to, plastic (*e.g.*, a polymeric material), glass, metal, and rubber. The containers can be in any shape or form, and thus can be, for example, bottles, vials, cans, jars, or bags, such as those made of metal, plastic, rubber, glass, or fabric. The containers are preferably re-sealable or automatically sealing to preserve unused contents after initial opening.

[101] Thus, in embodiments, the kits comprise one or more devices (*e.g.*, 10, 20, 25, 30, 50, 100) and at least one container containing a component that is useful for practicing at least one embodiment of the invention. For example, a kit can comprise 25 devices, sealed independently or two or more together, in re-sealable pouches. Optionally, the pouches can contain a desiccant to maintain low moisture content during storage. The kit may also comprise any one or more of the following components, in any suitable container(s) and amounts/volumes: diluent (preferably aqueous) for diluting an original sample; wash buffer (preferably aqueous); specific binding pair member (*e.g.*, a conjugate for binding to the substance of interest in the sample, and which can be bound by an antibody spotted on the porous membrane of the device); substrate (*e.g.*, a substrate for an enzymatic reaction or otherwise for producing a detectable signal); positive control (*e.g.*, an antigen of known identity that binds with a known affinity to an antibody that is spotted on a porous membrane of the device); pipette (*e.g.*, disposable pipettes for adding one or more reagent, etc. to the sample or device); test tube, gloves, applicator stick, pipette tips. Other optional components of the kits can be envisioned by those of skill in the art, and all such other components are encompassed by the present invention.

[102] Preferably, at least the devices are sterilized prior to, during, or after insertion into the kits. Preferably, one, some, or all of the other components are sterilized prior to, during, or after insertion into the kit. In highly preferred embodiments, each component in the kit is sterile or has been sterilized, either

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

independently of one or more of the other components, or together in the kit.

Sterilization can be achieved by any known means, including, but not limited to, filtration of liquids, irradiation by electromagnetic radiation (*e.g.*, UV, gamma irradiation), chemical sterilization (*e.g.*, wiping with a disinfectant such as alcohol), and the like.

[103] Instructions for using one or more components of the kit, or for practicing the methods of the invention, may be included in the kit. The instructions may be provided as a separate component, such as printed material on a paper, card, plastic sheet, or the like. Alternatively, the instructions may be provided on the kit itself, for example, on a side or the top or bottom of the kit. Alternatively, the instructions may be provided on a container for a component of the kit.

[104] Turning now to the Figures, which depict various non-limiting specific embodiments of the invention, the elements described above are described in various spatial relationships to each other, and use of various configurations of the device of the invention to perform the method of the invention is described. It is to be understood that any dimensions provided in the Figures are provided as examples only, and that the actual sizes and shapes of the device are not limited to those provided in the Figures. For example, sizes can be on the order of a magnitude or more larger or smaller than those exemplified in the Figures. Furthermore, it is to be understood that the Figures do not necessarily depict all elements at proper scale with respect to each other, some being exaggerated for clarity purposes or for other reasons.

[105] Figure 1 depicts generally a basic configuration of the device 1 of the present invention. The device depicted in Figure 1 comprises a receptacle 100 that comprises a porous material in the form of a pad 110 (also referred to herein as the "reaction chamber pad"). The device further comprises a porous membrane 120 that comprises a specific binding pair member 130 for a substance of interest that is attached, by covalent, hydrophobic, or ionic bonding, along a single line in the center of the membrane. In practicing the invention with this configuration of the device, a liquid sample containing or suspected of containing a substance of interest is applied to the receptacle 100 at any area. The porous membrane 120 is then placed in direct

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

contact with the porous material 110 of the receptacle 100 such that the membrane 120 and material 110 form a continuous contacting surface over at least the area of the membrane 110 where the specific binding pair member 130 is located. The liquid present in the porous material 110 is then permitted to diffuse into, out of, through, and around the membrane 120, enabling the substance, if present, to contact the specific binding pair member 130 and become specifically bound to it. In embodiments where the substance has already been labeled, detection of binding can be accomplished at this point. In embodiments where a label has not yet been associated with the substance, the specific binding pair member-substance complex can be labeled and then detected. In embodiments, a wash step is included to reduce background. When a wash is performed, the wash solution is applied to the membrane 120 and permitted to soak into the porous material 110, thus removing materials that are not bound to membrane 120, and improving the signal-to-noise ratio. In embodiments, the substance in the sample is first bound by a specific binding member that specifically binds to the one associated with the membrane (e.g., a conjugate), and the two specific binding pair members are allowed time to react.

[106] The device 1 of Figure 1 is also referred to at various points below as a "reaction chamber" when used in conjunction with other elements.

[107] With respect to Figure 2, a device 2 of the invention is depicted that comprises a receptacle 200 comprising a porous material 210. In this embodiment, the porous membrane 220 is in contact with the porous material 210 such that there is continuous contact between porous membrane 220 and porous material 210 in the area of specific binding pair member 230. In practice of the method of the invention with this configuration of the device, a liquid sample containing or suspected of containing a substance of interest is applied to the receptacle at any area other than the area in contact with porous membrane 220. The liquid present in the porous material is then permitted to diffuse into, out of, through, and around membrane 220, enabling the substance, if present, to contact specific binding pair member 230 and become specifically bound to it. In embodiments where the substance has already been labeled, detection of binding can be accomplished at this point. In embodiments

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

where a label has not yet been associated with the substance, the specific binding pair member-substance complex can be labeled and then detected. In embodiments, a wash step is included to reduce background. When a wash is performed, the wash solution is applied to membrane 220 and permitted to soak into porous material 210, thus removing materials that are not bound to membrane 220, and improving the signal-to-noise ratio.

[108] Figure 3 depicts another embodiment of the device 3 of the invention, in which receptacle 300 comprising porous material 310 is contained in container 335, and wherein porous membrane 320 is held by holder 336. In this embodiment, holder 336 and container 335 are fabricated from plastic. Holder 336 is integral with container 335, the two linked by a relatively flexible portion of the plastic at hinge 338. In other embodiments, other materials and/or other structures are used, including, but not limited to use in providing the hinge function.

[109] In practicing the method of the invention with this configuration of the device of the invention, a liquid sample containing or suspected of containing a substance of interest is applied to the receptacle 300 at any area of the porous material 310, either directly or by way of the space present between the receptacle 300 and the container 335, such as in area 331. Holder 336 comprising membrane 320 is then swung down by way of hinge 338 such that membrane 320 is in contact with porous material 310, at least at a portion of membrane 320 where specific binding pair member (not depicted) is present. Clamp or lip 337 engages holder 336 to maintain membrane 320 in contact with material 310, as described above. The liquid present in porous material 310 is then permitted to diffuse into and out of membrane 320, enabling the substance, if present, to contact specific binding pair member (not depicted) present on membrane 320 and become specifically bound to it. In embodiments where the substance has already been labeled, detection of binding can be accomplished at this point. In embodiments where a label has not yet been associated with the substance, the specific binding pair member-substance complex can be labeled and then detected. In embodiments, a wash step is included to reduce background. When a wash is performed, the wash solution is applied to membrane

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

320 and permitted to soak into porous material 310, thus removing materials that are not bound to membrane 320, and improving the signal-to-noise ratio.

[110] Figure 4A depicts a device 4 of the invention in which the device 3 of Figure 3 is modified to include a wash solution receiving pad 440 positioned in contact with porous material 410. Wash solution receiving pad 440 is fabricated from a porous material which can be the same or different from reaction pad 410. In this embodiment, wash solution receiving pad 440 is a separate pad from reaction pad 410; however, in other embodiments, reaction pad 410 and wash receiving pad 440 are the same element, the differentiation being based primarily on function.

[111] More specifically, receptacle 400 comprising reaction pad 410 is contained in container 435, which contains not only receptacle 400 but wash receiving pad 440 as well. Porous membrane 420 is held by holder 436. In this embodiment, holder 436 and container 435 are fabricated from plastic and holder 436 is integral with container 435, the two linked by a relatively flexible portion of the plastic at hinge 438. In other embodiments, other materials and/or structures are used, such as to provide the hinge function.

[112] In practicing the method of the invention with this configuration of the device of the invention, a liquid sample containing or suspected of containing a substance of interest is applied to the receptacle 400 at any area of reaction pad 410, either directly or by way of the space present between the receptacle 400 and the container 435, such as in area 431. Holder 436 comprising membrane 420 is then swung down by way of hinge 438 such that membrane 420 is in contact with reaction pad 410, at least at a portion of membrane 420 where specific binding pair member (not depicted) is present. Clamp or lip 437 engages holder 436 to maintain membrane 420 in contact with reaction pad 410, as described above. The liquid present in reaction pad 410 is then permitted to diffuse into and out of membrane 420, enabling the substance, if present, to contact specific binding pair member (not depicted) present on membrane 420 and become specifically bound to it. In embodiments where the substance has already been labeled, detection of binding can be accomplished at this point. In embodiments where a label has not yet been associated

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

with the substance, the specific binding pair member-substance complex can be labeled and then detected.

[113] In embodiments, a wash step is included to reduce background. When a wash is performed, the wash solution is applied to membrane 420 and permitted to soak into reaction pad 410, thus removing materials that are not bound to membrane 420, and improving the signal-to-noise ratio. Typically, the amount of wash solution applied to membrane 420 exceeds the holding capacity of pad 410, which has already been wetted (at least partially) with the liquid containing the substance of interest. In this situation, excess wash solution (and some original liquid sample) travels through reaction pad 410 into wash solution receiving pad 440.

[114] Figure 4B depicts an alternative configuration of the device 4 of the invention depicted in Figure 4A, in which wash solution receiving pad 440 is located beneath reaction pad 410. The principle of operation of the device is the same as described with respect to Figure 4A. However, in this configuration, it is not preferred that the liquid be applied in the space between reaction pad 410 and container 435. In this Figure, all elements have the same identity as those in Figure 4A.

[115] Figure 4C depicts an alternative configuration of the device depicted in Figure 4A, in which wash solution receiving pad 440 and reaction pad 410 are separated by removable, liquid-impermeable barrier 445. In this configuration, impermeable barrier 445 is interposed between wash solution receiving pad 440 and reaction pad 410 and extends to the exterior of container 435 through slot 446 to expose tab 447. Practice of the method of the invention with this configuration is similar to that described above with respect to Figure 4A. However, because impermeable barrier 445 blocks migration of liquids into wash solution receiving pad 440, impermeable barrier 445 is typically removed after contacting of membrane 420 and reaction pad 410 and before application of wash solution to membrane 420. Use in this manner also restricts flow of the original sample from application/reaction pad 410 into wash receiving pad 440 until after diffusion of the sample in and out of

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

membrane 420 has proceeded for a desired amount of time. All other elements depicted in this panel are the same as those described with regard to Figure 4A.

[116] In another configuration of the device, depicted in Figure 5, the basic design depicted in Figure 1 is modified to produce a device 5 such that the porous material 510 of the receptacle 500 extends beyond the reaction chamber (*i.e.*, is larger than the area of the porous membrane 520) to provide a liquid sample application zone 550 comprising a sample application pad 551. In the depicted embodiment, the sample application pad 551 and the reaction pad 510 are the same. However, in other embodiments, these two elements are separate, and are arranged such that they are in physical contact with each other so that liquid may flow from one to the other. In practicing the invention with this configuration of the device, a liquid sample containing or suspected of containing a substance of interest is applied to the sample application pad 551 at any area within sample application zone 550. Due to its porous nature, sample application pad 551 causes at least a portion of the applied sample to migrate to reaction pad 510, where it can then migrate, through passive diffusion, into and out of porous membrane 520, and allow the substance of interest, if present, to contact and bind to specific binding pair member (not depicted) on porous membrane 520. Detection and washing, if desired, can be performed as described above.

[117] Figure 6 depicts device 6, which is a configuration of the device of the invention as depicted in Figure 5, but modified to include a container 635 for the sample application pad 651 and reaction pad 610, and to include a holder 636 for porous membrane 620. In this particular embodiment, container 635 comprises an opening or port 655 that permits application of the liquid sample to application pad 651. Use of this embodiment of the device can proceed as discussed above.

[118] Figure 7 depicts device 7, which is a configuration of the device depicted in Figure 6 in which a wash solution receiving pad 740 is provided adjacent to and in contact with reaction pad 710. In practice of the invention with this configuration of the device, after sample application to sample application pad 751, migration of the liquid to reaction pad 710 and diffusion of the liquid into and out of porous membrane 720, a wash solution is added to membrane 720 and the excess wash solution (along

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

with a portion of the original liquid sample) flows through reaction pad 710 into wash solution receiving pad 740. All elements depicted in this Figure other than those specifically referenced are the same as those in Figure 6 and/or Figure 5, where like elements depicted are the same element from figure to figure.

[119] Figure 8 depicts device 8, which is a configuration of the device of the invention in which reaction pad 810 is fabricated from the same material as liquid sample application pad 851 and wash solution receiving pad 840, but is compressed, as compared to sample application pad 851 and wash solution receiving pad 840, by pressure exerted by holder 836. In this preferred embodiment of the invention, pressure is exerted on membrane 820, which causes compression of reaction pad 810. This compression improves retention of sample in reaction pad 810, and promotes diffusion of sample between reaction pad 810 and membrane 820. All elements depicted in this Figure other than those specifically referenced are the same as those in Figure 7, Figure 6, and/or Figure 5, where like elements depicted are the same element from figure to figure.

[120] Figure 9 depicts device 9, which is a configuration of the device of the invention in which reaction pad 910 is fabricated from the same material as liquid sample application pad 951 and wash solution receiving pad 940, but is compressed, as compared to sample application pad 951 and wash solution receiving pad 940, by pressure exerted from below (with respect to porous membrane 920) by container 935. In the Figure, compression results from container 935, which is molded into a shape that provides this effect. However, in other equivalent embodiments, container 935 comprises an additional element that provides the pressure on reaction pad 910. Exertion of pressure by container 935 provides the same benefits described above with respect to Figure 8 and as discussed other places in the description. All elements depicted in this Figure other than those specifically referenced are the same as those in Figure 8, Figure 7, Figure 6, and/or Figure 5, where like elements are depicted and/or numbered the same from figure to figure.

[121] Figure 10 shows a configuration of device 10 of the invention, looking at the outside of device 10 from the top. In this Figure, sample application port 1055 is

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

located at one end of device 10, and an opening in device 10 above porous membrane 1020 provides a detection window 1060 through which detection of the presence of the substance of interest (and, optionally, one or more control reactions) can be viewed. Port 1055 and window 1060 are located on container 1035. In practicing the method using this embodiment of the device, sample is added to an application pad or reaction pad below or near port 1055, either directly to the pad or to a space between the pad and container 1035. The sample, or a portion of it, travels along the pad at least until it comes into contact with membrane 1020, preferably through a reaction pad (not depicted) beneath membrane 1020. Diffusion of the sample in, out, across, and over membrane 1020 permits contact between the substance of interest in the sample and a specific binding pair member (not depicted) associated with membrane 1020. Detection of the substance bound to the specific binding pair member on the membrane can occur by viewing the membrane through window 1060.

[122] Figure 11 shows an alternative configuration of the device 11 depicted in Figure 10. In this configuration, sample application port 1155 is located at one corner of device 11, and detection window 1160 and membrane 1120 are centrally located. In practice of the method of the invention with this embodiment of the device, sample is added to an application pad or reaction pad (not depicted) beneath or near port 1155, either directly to the pad or to a space between the pad and container 1135. The sample, or a portion of it, travels along the pad at least until it comes into contact with membrane 1120. Diffusion of the sample in, out, across, and over membrane 1120 permits contact between the substance of interest in the sample and a specific binding pair member associated with membrane 1120. Detection of the substance bound to the specific binding pair member on the membrane can occur by viewing the membrane through window 1160.

[123] Figure 12 shows a top view of a configuration of device 12 of the invention in which porous membrane 1220 comprises specific binding pair member 1230, which is specific for the substance of interest, and positive control 1270. In this configuration, both elements are located on membrane 1220 such that they are within the area defined by detection window 1260. All of the elements depicted in Figure 12

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

that are not specifically discussed are the same as those depicted in Figure 11, and all have the same function. Practice of the method of the invention proceeds according to the disclosure above. Practice of the method using this embodiment of the device permits a single sample to be tested for an unknown substance while providing a positive control for performance of the device and method.

[124] Figure 13 shows a configuration of device 13 of the invention in which a single sample application pad 1351 within container 1335 bifurcates to connect to two separate reaction pads 1310a and 1310b, each of which is at least partially beneath and in contact with a different porous membrane 1320a and 1320b and a different wash solution receiving pad 1340a and 1340b. Porous membranes 1320a and 1320b comprise specific binding pair members 1330a and 1330b, each of which are specific for a different substance. In this configuration of the device, the method of the invention can be used to detect two different substances in a single liquid sample. In embodiments, one of the substances is known to be present in the sample (either naturally or as an added component), and thus one membrane (either 1320a or 1320b) acts as a positive control for the device and method.

[125] Figure 14A depicts a configuration of device 14 of the present invention in which sample application pad 1451 extends beyond the interior area of device 14 defined by container 1435. Sample application pad 1451 is integral with filtration pad 1470, reaction pad 1410, and wash solution receiving pad 1440. Reaction pad 1410 is at least partially beneath and in direct contact with membrane 1420, which comprises specific binding pair member 1430. In practice of the invention using this configuration of the device of the invention, application pad 1451 is contacted with a liquid sample by dipping into the liquid, inserting into a stream of the liquid (*e.g.*, a stream of urine), application of the sample to the pad by pipetting, or the like. The liquid sample passes through application pad 1451 into filtration pad 1470. In embodiments, a label (not depicted) that binds to the substance of interest is present in filtration pad 1470 and is solubilized by the liquid. The label binds to substance that is present in the sample during passage through filtration pad 1470 (and/or at a later time during the assay). The liquid sample then passes into reaction pad 1410 and

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

diffuses into, through, out, and around membrane 1420. In embodiments, a label that binds to the substance of interest is present in and/or on the surface of reaction pad 1410 and is solubilized by the liquid. The label binds to substance that is present in the sample during passage through reaction pad 1410 (and/or at a later time during the assay). Diffusion from reaction pad 1410 into, through, out, and around membrane 1420 permits contact of the substance of interest (if present) or the substrate-label complex with specific binding pair member 1430. In embodiments where a direct label is used, it can either be bound to the substance at an earlier time (as described immediately above), or can be bound to the substance at the same time or after binding of the substance to the specific binding pair member. Upon formation of a specific binding pair member-substance-label complex, the presence of the substance can be detected. In embodiments where an indirect label is used, the label can be added at any of the times described above. Upon formation of a specific binding pair member-substance-label complex, any excess label and other substances that might be present on the membrane can be washed away by applying a wash solution to membrane 1420. The wash solution passes through membrane 1420 and into reaction pad 1410. Because there is excess wash solution beyond the carrying capacity of reaction pad 1410, liquid is driven into wash solution receiving pad 1440, filtration pad 1470, or both. Because wash solution receiving pad 1440 is typically dry or substantially dry (due to selection of the appropriate amount of volume to be added at application zone 1451) whereas filtration pad 1470 is at least partially wet, wash solution receiving pad 1440 typically absorbs a majority of the wash solution applied to the membrane. The wash may be repeated as many times as necessary to achieve a suitable signal-to-noise ratio. After washing, the substrate for the indirect label can be added, and another wash may be performed, if desired, to reduce background signal. Detection of a specific signal indicates the presence of the substance of interest in the original sample.

[126] Figure 14B depicts another embodiment of device 14 depicted in Figure 14A. In the device of Figure 14B, applicator pad 1451 comprises an absorbent plastic material onto which a sample, such as urine, comprising an enzyme conjugate that

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

binds to the substance of interest, is applied directly. The sample plus enzyme conjugate travels through filtration pad 1470, which is unitary with application pad 1451, and enters container 1435 through filtration pad 1470, which has been compressed by container 1435. Sample plus enzyme conjugate travels through filtration pad 1470 into reaction pad 1410, which is unitary with filtration pad 1470 and is compressed by container 1435 in a similar fashion as with filtration pad 1470. If a substance of interest is present, it will react with the enzyme conjugate upon mixture before applying, during passage through sample application pad 1451, filtration pad 1470, or reaction pad 1410. The sample is permitted to contact membrane 1420 for a sufficient amount of time for the substance (or the substance-label conjugate complex) to diffuse in, out, and through membrane 1420 and to contact specific binding pair member 1430 (not shown) and form a complex. Wash solution is then applied to membrane 1420 and excess wash solution travels through membrane 1420, and into at least wash solution receiving pad 1440. Detection of the presence or absence of the substance in the sample occurs by detecting a signal produced from membrane 1420 at or near specific binding pair member 1430 (not shown).

[127] Figure 14C shows yet another configuration of device 14 depicted in Figures 14A and 14B. In this configuration, sample application pad 1451, filtration pad 1470, reaction pad 1410, or a combination of two or all of these comprises a gold conjugate. The gold conjugate, which specifically binds to the substance of interest, is dissolved by the applied liquid sample as it traverses the pads, and binds to the substance, if present. Upon contact of the liquid (now filtered) with membrane 1420 via diffusion in, out, through, and about membrane 1420, the substance-gold conjugate binds to specific binding pair member 1430 (not shown), resulting in generation of a detectable signal at or near specific binding pair member 1430 within about 30 seconds or more of contact of the liquid with membrane 1420. Presence of the substance in the liquid is determined by detection of a signal (typically with the unaided eye) at detection window 1460 without the need for a washing step.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[128] Figure 15 depicts a configuration of device 15 of the present invention. As shown in Figure 15A, container 1535 is a "clam shell" type container in which a top half 1535a and a bottom half 1535b are attached to each other along an edge by a flexible hinge 1580.

[129] Although not depicted in the Figure, in embodiments, a holder for a membrane is integral with top half 1535a and defines the edges of a detection window. A sample loading port is also integral to top half 1535a and is defined by an opening in top half 1535a at a site above an application pad. Top half 1535a also comprises one or more pins or recesses to accommodate pins, wherein engagement of the pins with the recesses causes a friction fit that holds top half 1535a and bottom half 1535b together.

[130] In typical embodiments, bottom half 1535b contains a sample application pad, a filtration pad, a reaction pad, and a wash receiving pad. It also typically comprises one or more recesses to accommodate pins or one or more pins, wherein engagement of the recesses with the pins causes a friction fit that holds top half 1535a and bottom half 1535b together.

[131] Figure 15B depicts a top view of the bottom half of one embodiment of device 15 depicted in Figure 15A. In the Figure, sample application pad 1551 is integral with filtration pad 1570, reaction pad 1510, and wash solution receiving pad 1540, all of which are 2.2 cm wide. Reaction pad 1510 is 0.3 cm wider than sample application pad 1551, filtration pad 1570, reaction pad 1510, and wash solution receiving pad, (0.15 cm on each side) to completely support membrane 1520 (not depicted), which measures 0.75 cm long by 2.5 cm wide). Friction fit alignment post recesses 1581 are present as part of container 1535b, as are clamp posts 1582.

[132] Figure 15C shows a cross-section from the side of device 15 depicted in Figure 15A and/or Figure 15B, where top half 1535a is positioned above, but not in contact, with bottom half 1535b, and where the hinge is removed to permit alignment of the top and bottom halves for descriptive purposes. The Figure indicates the placement of sample application port 1555 and viewing or detection window 1560.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[133] Figure 15D is a cross-section from the side of device 15 depicted in Figure 15A, 15B, and/or 15C, in which the top half and bottom half are joined by friction fit. As can be seen from the Figure, in this embodiment, connection of top half 1535a with bottom half 1535b results in compression of reaction pad 1510 at and near the area where membrane 1520 is in contact with reaction pad 1510.

[134] Figure 16 depicts another embodiment of the device of the invention. In Figure 16A, the device is depicted in its closed state. In Figure 16B, the device is depicted in its open state. In this embodiment, device 16 comprises a hinged container of plastic comprising top half 1635a and bottom half 1635b. Bottom half 1635b comprises sample loading port 1655, and contains a unitary combination of liquid sample application loading pad 1651, filtration pad 1670, and reaction pad 1610. Top half 1635a is attached to bottom half 1635b by a flexible hinge 1680, which is fabricated from the same plastic material as the rest of container 1635. Top half 1635a contains wash solution receiving pad 1640 and porous membrane 1620. Porous membrane 1620 comprises at least one specific binding pair member (not depicted).

[135] When in its closed position, membrane 1620 is sandwiched between reaction pad 1610 and wash receiving pad 1640, and is in contact with both pads, contact being made between reaction pad 1610 and membrane 1620 at least over a portion of membrane 1620 comprising at least one specific binding pair member (not depicted). Sample is applied to application pad 1651 through application port 1655, and sample moves through application pad 1651 and filtration pad 1670 into reaction pad 1610. The portion of the sample present in reaction pad 1610 diffuses into and out of membrane 1620, and contacts the specific binding pair member(s), where the substance of interest, if present, binds to the specific binding pair member(s) and is retained on membrane 1620.

[136] After a sufficient amount of time for reaction of the substance with the specific binding pair member(s), top half 1635a and bottom half 1635b are separated by movement of the two about hinge 1680. If a direct label is used, it may be added at this time, or it may have been present in reaction pad 1610, filtration pad 1670, or

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

application pad 1651, and have already bound to the substance of interest. When a direct label is used, detection of the presence of the substance may be made at this time, or membrane 1620 may be washed to improve signal-to-noise ratio. If a wash is performed, the wash solution is added to membrane 1620, and the wash solution is absorbed (after flowing through membrane 1620) by wash solution receiving pad 1640. If an indirect label is used, the label (or the substrate for the label, if the label has been incorporated into application pad 1651, filtration pad 1670, or reaction pad 1610) is applied to membrane 1620 after separation of top half 1635a and bottom half 1635b, and allowed to remain in contact with membrane 1620 for a sufficient amount of time to react with the specific binding pair member-bound substance. Wash solution is then applied to membrane 1620 as described above. Where necessary, the substrate for the indirect label is then applied to membrane 1620 and allowed to remain in contact for a sufficient amount of time for a complex between the label and label substrate to be formed, or for a detectable signal to be generated.

[137] Figure 17 depicts a device 17, which shows an embodiment of the invention in which a liquid impermeable plastic membrane 1745 is placed between reaction pad 1710 and wash solution receiving pad 1740 within container 1735. In this embodiment, a liquid sample that has been clarified to remove large particulate material, and to which conjugate has been added, is applied to membrane 1720 and permitted to flow into reaction pad 1710, which is in contact with membrane 1720. Sufficient time is provided for diffusion of the sample between reaction pad 1710 and membrane 1720 such that the substance of interest, if present, binds to at least one specific binding pair member (not depicted). After a sufficient amount of time, impermeable barrier 1745 is removed by pulling on tab 1747. Wash solution is applied to membrane 1720, and excess wash solution and unbound substrate, conjugate, and conjugate-substrate complex is washed from membrane 1720 into reaction pad 1710 and then into wash solution receiving pad 1740. Detection of the presence of the substance is then accomplished by direct detection of a signal from or near the specific binding pair member(s) (not depicted), or by addition of substrate for the label. One or more further washings may be performed at this time.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[138] Figure 18 depicts another configuration of the device of the invention. In this configuration, device 18 comprises container 1835, which comprises sample port 1855 and sample application pad 1851, which are provided adjacent and connected to reaction pad 1810 and membrane 1820. Wash receiving pad 1840 is located below reaction pad 1810 and is separated from reaction pad 1810 by impermeable membrane 1845. Removal of impermeable membrane 1845 by pulling on tab 1847 permits wash solution receiving pad 1840 and reaction pad 1810 to come in direct contact, and provides a continuous flow from membrane 1820 to wash solution receiving pad 1840. In practice, this configuration of the device is used in a similar manner as described with respect to Figure 17, with the exception that sample is added at sample application port 1855 rather than through membrane 1820.

[139] Figure 19 depicts an embodiment of the invention similar to that depicted in Figure 16. Figure 19A depicts the device in a closed position. Figure 19B depicts the device in an open position. As can be seen in Figure 19A, device 19 comprises a container comprising upper half 1935a and lower half 1935b, connected via a hinge 1980. Upper half 1935a comprises reaction pad 1910, which is integral with sample application pad 1951, and which is held in place by holder 1936. Membrane 1920 is located in between reaction pad 1910 and wash receiving pad 1940, in direct physical contact with both through pressure exerted on membrane 1930 by holder 1936. Bottom half 1936b comprises wash receiving pad 1940, in direct physical contact with membrane 1920. In practice of one embodiment of the method of the invention with this configuration of the device, as depicted in the combination of Figure 19A and Figure 19B, sample (to which a label conjugate has been added) is applied to application pad 1951 (which is integral with reaction pad 1910 and filtration pad 1970), and liquid of the sample is permitted to travel to reaction pad 1910 and diffuse into and out of membrane 1920. Wash solution is added to sample application pad 1951 and is drawn through reaction pad 1910 and membrane 1920 by drawing of the liquid into wash solution receiving pad 1940 as a result of its being dry. Substrate for the label conjugate is then applied to membrane 1420 and the two halves 1935a and 1935b are separated by rotation about hinge 1980, thus revealing membrane 1920.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

The presence of the substance is detected by visual or non-visual detection methods by assaying for signal emitted from or near at least one specific binding pair member (not depicted) spotted on membrane 1920.

[140] Figure 20 is a configuration of device 20 of the invention comprising container 2035, and in which application pad 2051 is integral with reaction pad 2010, and in which application port 2055 is located above/beneath and on the opposite side of membrane 2020 and detection window 2060. Wash solution receiving pad 2040 is in direct contact with application pad 2051 and reaction pad 2010 and is located to the side of these pads, with respect to application port 2055 and detection window 2060. In practice of an embodiment of the method of the invention with this configuration of the device, sample (to which conjugate has been added) is applied to application pad 2051 through application port 2055, and sample is allowed to traverse into reaction pad 2010, and diffuse between reaction pad 2010 and membrane 2020, which comprises at least one specific binding pair member (not depicted). Device 20 is inverted after the liquid sample has been fully or substantially fully drawn into application pad 2051 and reaction pad 2010, and a desired amount of diffusion between pad 2010 and membrane 2020 has occurred. Wash solution is applied to membrane 2020, and drawn through reaction pad 2010 and application pad 2055 into wash receiving pad 2040. Substrate for the conjugate is added and detection of the presence of the substance of interest in the liquid is performed, in accordance with known procedures and the disclosure above. As with all other embodiments where an indirect label is used, incubation of the substrate and the label is preferred to obtain optimal signal intensity.

[141] Figure 21 depicts one embodiment of the device of the invention, which is also referenced in an Example below. In general, the embodiment comprises the elements discussed above with regard to other embodiments. In one particular embodiment of the device depicted in Figure 21, the device comprises a reaction window opening onto a porous membrane comprising two lines of immobilized antibodies spotted thereon. For example, it can contain a test line (or "T" line), having antibodies against *C. difficile* toxin A, toxin B, or both. It can also contain a second

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

line (or "C" line) to act as an internal control, for example having anti-IgG antibodies or other antibodies specific for other antigens. In use, the device can detect the presence of a substance of interest, such as toxin A and/or B, in a sample. For example, a sample can be added to a tube containing a mixture of a diluent (*e.g.*, a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal) and conjugate (*e.g.*, a mouse monoclonal antibody specific for toxin A coupled to horseradish peroxidase and a goat polyclonal antibody specific for toxin B coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal). The diluted sample-conjugate mixture can then be added to a sample well, which is an opening in the shell of the device, and which opens onto a porous material (filter pad) in an area for receiving the sample, which is distinct from the reaction window. After adding the diluted sample to the porous material through the sample well, the device can be incubated at a suitable temperature, for example at room temperature, for a sufficient amount of time, for example 15 minutes. During this incubation period, the substance of interest (*e.g.*, toxin A and/or B), if present in the sample, binds to the conjugate (*e.g.*, anti-toxin antibody-peroxidase conjugate). After application of the sample to the device, the substance-conjugate (*e.g.*, toxin-antibody) complexes, if present, migrate through at least one porous material to the porous membrane containing the immobilized antibodies. A sufficient amount of time (*e.g.*, one minute) is provided for diffusion of the complexes in and out of the porous membrane. Complexes, if present, are captured by the immobilized antibodies on the line(s). The porous membrane, at least at the area comprising a portion of the lines, can then be optionally washed with a wash buffer (*e.g.*, a buffered solution containing 0.02% thimerosal). The device can then be developed with the addition of a substrate (*e.g.*, a solution comprising tetramethylbenzidine). After an incubation period (for example, 10 minutes), the presence of a complex at the test line can be determined by, for example, visually examining for the appearance of a line (*e.g.*, a blue line) at the area where the "T" line is present on the porous membrane below the reaction window. A line at this area indicates a positive test. Where a line (*e.g.*, blue line) exists at the "C" area of the porous membrane below the reaction window, a positive control reaction has

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

occurred, indicating that the device and method are working properly, and that the results (presence or absence of substance of interest) are valid. Where a control is run, the control can include an appropriate antigen for an antibody spotted onto the membrane at the "C" line, such as an antigen in a buffered aqueous solution. Figure 21A-D depict the lines described herein, and note various possible results.

[142] Thus, the invention provides a method of detecting at least one substance of interest in a liquid sample, where the method comprises: providing a liquid sample comprising or suspected of comprising the substance(s) of interest; applying the liquid sample to a porous material in a sufficient amount to at least partially wet the porous material; contacting the porous material with a porous membrane comprising at least one specific binding pair member that is capable of binding, either directly or indirectly, the substance(s) of interest; maintaining the porous material and porous membrane in contact for a sufficient amount of time for liquid present in the porous material to diffuse in, out, through, and/or about the porous membrane, wherein diffusion of the liquid in, out, through, and/or about the porous membrane results in contact of the substance(s) of interest, if present, to be bound, either directly or indirectly, to the specific binding pair member(s); and detecting the presence or absence of a complex comprising the specific binding pair member(s) and the substance(s) of interest, wherein the presence of at least one complex indicates the presence of at least one of the substances of interest in the liquid sample. In embodiments, the method can further comprise providing a device comprising the porous material and porous membrane. In embodiments, the porous material filters the liquid sample to remove substances having a size greater than a pre-determined value. In embodiments, the filtering is by way of discontinuous wicking of liquid from the liquid sample through the porous material. In embodiments, the method can be used in conjunction with a liquid that comprises two or more substances of interest, and one, two, or more of these substances can be detected using a single device and/or a single practice of the method of the invention. Thus, in certain embodiments of the method, each substance of interest is different than each other substance of interest, and the method detects one, two, or more of them. The method can be practiced on

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

liquid samples containing feces, blood, food, or an environmental sample (*e.g.*, a toxic substance in ground water). In exemplary embodiments, the method detects one or both of *Clostridium difficile* toxin A and *Clostridium difficile* toxin B. In embodiments, the substance of interest is one or more toxin, bacterium, virus, bacterial product, enzyme (*e.g.*, prokaryotic, eukaryotic), or parasite. In some embodiments, the substance of interest is glutamate dehydrogenase. It can also be an animal or human product, an antibody, or lactoferrin.

[143] The method can be practiced using one or more specific binding pair members. In embodiments, one or more of the specific binding pair member(s) is an antibody, wherein each of the antibodies is either different or the same as one or more others.

[144] The general method can further comprise washing the membrane prior to detecting the presence of a complex.

[145] In embodiments, applying the liquid sample to the porous material comprises applying the liquid sample at a location on the porous material that is spatially separated from the porous membrane, whereby at least the liquid of the liquid sample travels into the porous material and then the porous membrane. In certain embodiments, liquid sample that is applied at a region of a sample loading zone that is distant from a detection zone travels through the porous material to the porous membrane through a wicking process. In embodiments, a physical force is applied to the membrane, the porous material, or both, and such a force improves sensitivity of the device and method of the invention.

[146] The method of the invention comprises detecting a signal to determine the presence of a substance of interest. In embodiments, detecting comprises observing a signal emitted from a label bound to the substance of interest. In particular embodiments, the signal is produced by a colored precipitating product that forms in or around the specific binding pair member. Detecting thus can be through detection of a complex. Therefore, the method can comprise combining a labeled conjugate with the liquid sample prior to applying the liquid sample to the porous material. The labeled conjugate can comprise a latex bead or other colored particle, a colloidal gold

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

particle, or a reactive substance that binds to a substrate to create a detectable signal. In some embodiments, the signal is a non-visual signal.

[147] The invention includes a device for detecting at least one substance of interest in a liquid sample. In embodiments, the device comprises: (a) a receptacle comprising a porous material for receiving the liquid sample, wherein the porous material is capable of absorbing and transmitting at least a portion of the liquid sample, and (b) a porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for the substance of interest or a substance bound to the substance of interest, wherein the receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member. The device can comprise a container containing the receptacle, a holder for the porous membrane, a wash solution receiving pad, a liquid sample application pad, a filtration pad, or two or more of these elements. Each element may be subdivided into two or more functional zones, which, while optionally being fabricated of the same material, can be fabricated from different materials than one or more of the other zones.

[148] In embodiments, the device comprises a container containing a reaction pad comprising the porous material and the porous membrane, the container comprising a holder for the porous membrane, wherein the container causes pressure to be exerted on the porous membrane and/or the porous material such that at least a portion of the porous material is compressed. Of course, the container can contain other elements, as discussed above. Compression of the porous material can cause the porous membrane and the porous material to be in direct contact over at least a portion of the porous membrane, and can improve the function of the device and method of the invention. For example, the pressure can permit one or more liquids to pass between the porous membrane and the porous material by passive diffusion.

[149] The invention thus provides a device for detecting at least one substance of interest in a liquid sample, where the device comprises: (a) a receptacle comprising a porous material for receiving the liquid sample, wherein the porous material is capable of absorbing and transmitting at least a portion of the liquid sample, and (b) a

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for the substance of interest or a substance bound to the substance of interest, wherein the receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member, wherein the porous membrane and porous material are different elements having a different chemical constitution. In embodiments, the porous membrane and porous material are in physical contact such that liquid sample applied to the porous material diffuses in, out, through, and about the porous membrane. In addition, the device may be constructed such that physical contact between the porous membrane and porous material is created such that the sensitivity of the device is improved. The device can be configured such that the porous material and porous membrane are in contact with each other such that the substance of interest does not need to traverse the porous membrane in a unidirectional manner for the device to detect the substance of interest. In exemplary embodiments, the porous material and porous membrane are in contact with each other in such a way to permit simple, non-directional diffusion of a liquid between the two to occur.

[150] The invention thus provides a device for detecting the presence or amount of a substance of interest in a liquid sample, where the device comprises: a sample receiving zone for receiving the liquid sample, wherein the sample receiving zone is present on a porous material; a sample filter zone for filtering the liquid sample received at the sample receiving zone, wherein the sample filtering zone is present on a porous material; a porous membrane comprising a specific binding member at a detection zone that specifically binds to the substance of interest or a substance bound to the substance of interest, wherein the porous membrane is not the same element as any of the porous materials, and wherein the porous material and porous membrane are in physical contact over at least an area comprising a portion of the detection zone, and wherein the porous material and porous membrane are in physical contact in a configuration that permits liquid present in the liquid sample to diffuse in, out, through, and about the porous membrane in a substantially random, non-directional

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

manner in an area comprising at least a portion of the detection zone. Of course, one or more zones can be present on a single porous material or on two or more different materials. Likewise, they can be present on two or more different materials, each independently selected to have the same or different composition as one or more other. As mentioned above, the device may comprise a container that contains at least a portion of the porous material(s) and porous membrane. In embodiments, the device comprises a porous material comprising a wash solution receiving zone.

[151] Other exemplary embodiments of the device of the invention, and use of the device in practice of the method of the invention, are provided in the Examples that follow and others will be apparent from the description and drawings.

EXAMPLES

[152] The invention will be further explained by the following Examples, which are intended to be purely exemplary of the invention, and should not be considered as limiting the invention in any way.

[153] Example 1: Use of an Embodiment of the Device and Method of the Invention

[154] This Example details a typical *in vitro* use and guidelines for *in vitro* use of an embodiment of the method of the invention in an embodiment of the device of the invention, as depicted in Figures 21A-D, in which *Clostridium difficile* Toxins A and B are detected. The protocol generally follows the protocol provided in the *TOX A/B QUIK CHEK™* kit (TechLab, Blacksburg, VA; cat. no. T5033), which is incorporated herein in its entirety by reference. Unless otherwise noted, the protocol provided in the *TOX A/B QUIK CHEK™* kit was use in the Examples. General guidelines are provided in this Example and in the TechLab kit, but are not necessarily applicable to other embodiments of the method of the invention.

[155] COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

[156] Standard collection and handling procedures used for fecal specimens are appropriate. Specimens should be stored between 2°C and 8°C. It is preferred to test

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

specimens that are less than 24 hours old. It is preferred to store specimens frozen (less than or equal to -10°C) if the test cannot be performed within 72 hours of collection. While data shows that one freeze-thaw cycle does not harm the sample for use with *C. difficile* toxins A and B, it is noted that freezing and thawing of a specimen, especially multiple times, might result in loss of activity due to degradation of the toxins. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, MF, SAF, or PVA, or specimens that are in transport media such as Cary Blair or C&S typically do not give as optimal results as fresh samples or those preserved in other compositions.

[157] Specimens should be thoroughly mixed (*e.g.*, vortexed) prior to performing the assay. Storing of fecal specimens in the diluent is not recommended. It is preferred that one immediately test a sample once the fecal specimen is diluted in diluent. Disposable pipettes graduated at 50, 100, 200, and 300 μl may be used.

[158] SAMPLE PREPARATION

- optionally bring all reagents and devices to room temperature before use.
- Set up one cassette (device) for each specimen to be tested.
- Add 0.4 - 0.6 ml (*e.g.*, 0.425 ml or 0.5 ml) diluent to each dilution tube using a plastic dropper.

- Evenly suspend (*e.g.*, vortex) the specimens before transferring. For Liquid/Semi-solid specimens, draw the specimen halfway to the first mark from the end (25 μl). Dispense the specimen into the diluent. Use the same pipette to mix the diluted specimen by gently aspirating, then dispensing the mixture several times. For Formed/Solid specimens, mix the specimen thoroughly. Using a wooden applicator stick, transfer a small portion (approximately 2 mm diameter) of the specimen into the diluent. Emulsify the specimen using the applicator stick. As an optional control, add 1 drop of positive control or negative control (specimen diluent) to tubes containing 0.4 ml diluent.

- Add 1 drop of conjugate to the diluted specimen and mix the tube contents by vortexing.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[159] TEST PROCEDURE

- Obtain the required number of cassettes, one per specimen, and one per positive or negative control. Label the membrane cassettes appropriately.

- Obtain the prepared samples. Using a disposable transfer pipette, transfer 300 - 400 ul of the diluted sample-conjugate mixture into the sample port of the cassette and incubate the cassette at room temperature for 15 minutes. An increasing wet area will be visible in the results window. If no wet area appears in the results window, add 100 ul of diluent to the sample port and wait an additional 5 minutes.

- After 15 minutes, add 300 ul of wash buffer to the reaction port. Allow the wash buffer to enter the reaction port completely.

- Add 2 drops of substrate to the reaction port and allow the cassette to incubate at room temperature for 10 minutes. At the end of 10 minutes, read the results from the detection window. Observe for the appearance of a colored (*e.g.*, blue) line representing the control line (see Figure 21A). The lines may appear faint to dark in color.

[160] INTERPRETATION OF RESULTS

[161] Positive Result (Figure 21A): Two lines are visible, one on the bottom of the reaction port (control line) and one on the top of the reaction port (test line). A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin and a properly reactive control.

[162] Negative Result (Figure 21B): A single control line is visible only on the bottom of the reaction port. No test line is visible on the top of the reaction port. A negative result indicates the absence of *C. difficile* toxin but a properly reactive control.

[163] Invalid Result (Figures 21C and 21D): All completed reactions should have a visible control line on the bottom of the reaction port. The test is invalid if a control line is not present on the completed cassette.

[164] Example 2: Comparison of Detection of *Clostridium difficile* Toxins A and B Using the Device of the Invention and Tissue Culture

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[165] An embodiment of the device of the invention was used to detect a combination of *C. difficile* toxin A and toxin B in 50 fecal samples, and the results compared to results obtained for the same samples using tissue culture methods. Tissue culture detection of *C. difficile* toxin in fecal samples is the art-recognized assay of choice because it is considered to be the most sensitive method for detecting the toxins. The method described in Example 1 was used to detect the toxins.

[166] The tissue culture test was the *C. difficile* Tox-B Test kit manufactured by TechLab, Inc. (cat. no. T5003), and the procedure was as described in the product insert. In brief, fecal samples were diluted 1:10 in diluent and filtered through a 0.45 micron sterile filter. Each fecal sample was added (50 microliters) to each of two tissue culture wells. One well received 50 microliters of antitoxin to neutralize *C. difficile* toxins A and B and the other well received 50 microliters of only phosphate buffered saline. The human foreskin tissue cultured cells were incubated at 37°C for 24 hours then examined for rounding of the cells, and examined again at 48 hrs. Wells in which greater than 50% of the cells were rounded were considered positive. For a positive overall reaction, the well containing antitoxin had to be normal while the well without antitoxin showed rounding of the cells.

[167] Table 1 shows the results of the assays, and compares the results of the method and device of the present invention with the tissue culture assay.

[168] Table 1:

N=50	A/B Invention pos	A/B Invention neg
Tiss cult pos	8	0
Tiss cult neg	1	41

Sensitivity	88.9
Specificity	100.0
Pred Pos Val	100.0
Pred Neg Val	97.6
Correlation	98.0

[169] The results indicate that a device and method of the present invention perform almost identically to tissue culture.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[170] Example 3: Comparison of Detection of *Clostridium difficile* Toxins A and B Using the Device of the Invention and ELISA

[171] A device of the invention was used to detect a combination of *C. difficile* toxin A and toxin B in 50 fecal samples, and the results compared to results obtained for the same samples using ELISA. The method described in Example 1 was used to detect the toxins.

[172] The TechLab Inc. Tox A/B Test kit was used in this experiment according to the directions in the product insert. Briefly, feces were diluted 1:5 in sample diluent and 100 microliters were added to wells in an ELISA 96 well plate. Then 50 microliters of conjugate solution (containing antibodies to *C. difficile* toxins A and B that had been conjugated to horseradish peroxidase) was added to each well. Wells were incubated 50 min at 37°C and then the wells were washed to remove horse radish peroxidase conjugate that had not bound to toxins (that had bound to antibodies coating the wells). This sandwich of antibodies and enzyme was then detected by addition of 100 microliters of substrate solution with incubation for 10 minutes followed by addition of 50 microliters of dilute acid to stop the reaction. Positive reactions were those wells with an Optical Density at 450 nm of greater than 0.12.

[173] Table 2 shows the results of the assays, and compares the results of the method and device of the present invention with the ELISA assay.

[174] **Table 2:**

N=50	A/B Invention pos	A/B Invention neg
C. DIFF A/B II pos	8	1
C. DIFF A/B II neg	1	40

Sensitivity	88.9
Specificity	97.6
Pred Pos Val	88.9
Pred Neg Val	97.6
Correlation	96.0

[175] The results indicate that the device and method of the present invention produce results that are comparable to the sensitive ELISA method used.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[176] Example 4: Investigation of Relative Sensitivity of a Device and Method of the Invention

[177] The sensitivity of a device and method of the invention was determined. The device and method used were that of the *TOX A/B QUIK CHEK™* test for toxins A and B (TechLab, Inc.). Briefly, the sensitivity of the device and method was determined using serial two-fold dilutions of highly purified toxins A and B.

[178] The test was consistently positive at a concentration of 0.63 ng/mL for toxin A and 1.25 ng/mL for toxin B. The results of six separate tests (Tests 1 through 6) with serially diluted toxin A or toxin B for the test are shown in the tables below.

[179] **Table 3: Reaction of highly purified toxin A in the *TOX A/B QUIK CHEK™* test**

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
Conc. (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	+	+	+	+	+	+
0.32	+	+	-	+	+/-	+/-
0.16	-	-	+/-	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[180] Table 4: Reaction of highly purified toxin B in the *TOX A/B QUIK CHEK™* test

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
Conc. (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	-	-	-	-	+	+
0.32	-	-	-	-	-	-
0.16	-	-	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

The data presented in Tables 3 and 4 are representative of the particular results obtained in the particular testing runs performed. In other tests, sensitivity of 0.16 for Toxin A and 0.32 to 0.63 for Toxin B has been often seen.

[181] Example 5: Reproducibility and Precision of An Apparatus and Method of the Invention

[182] To determine the reproducibility and precision of devices and methods of the invention, an embodiment of the device of the invention, as depicted in Figure 21, was testing using an embodiment of the method of the invention, according to a protocol supplied with the TechLab *TOX A/B QUIK CHEK™* test. More specifically, a total of 8 fecal specimens, 6 positive and 2 negative, were tested in three different laboratories using the *TOX A/B QUIK CHEK™* test (TechLab, cat. no. T5033) according to the manufacturer's instructions. To challenge the cutoff, 2 weakly positive specimens that gave faint lines when analyzed by the inventors were included in the 6 positive specimens. All of the specimens were classified by a predicate device, the *C. DIFFICILE TOX A/B II™* test (TechLab; cat. no. T5003), which is widely accepted as a highly sensitive and accurate test for the presence of *C. difficile* toxins A and B. All specimens were kept frozen at $\leq -10^{\circ}\text{C}$ until the assay was performed.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

Each of the laboratories tested the specimens on 3 different days. The results from each laboratory were subsequently submitted to the inventors and compared with the inventors' own results. The results, shown below, were consistent among the different locations, and exhibited a correlation of 100%. The positive specimens were confirmed to be positive and the negative specimens were confirmed to be negative at all sites using the *TOXA/B QUIK CHEK™* test.

[183] Table 5: Reproducibility/Precision Testing By Inventors Of Fecal Samples Using A Device And Method According To The Invention

Specimen Code (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	Day 1	Day 2	Day 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Percent Correlation	N/A	100	100	100

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

**[184] Table 6: External Reproducibility/Precision Testing Of Fecal Samples
Using A Device And Method According To The Invention**

Specimen Code (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	Day 1	Day 2	Day 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Percent Correlation	N/A	100	100	100

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

**[185] Table 7: External Reproducibility/Precision Testing Of Fecal Samples
Using A Device And Method According To The Invention**

Specimen Code (n=8)	TOX A/B II™ ELISA	Day 1	Day 2	Day 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Percent Correlation	N/A	100	100	100

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[186] **Table 8: External Reproducibility/Precision Testing Of Fecal Samples Using A Device And Method According To The Invention**

Specimen Code (n=8)	TOX A/B II TM ELISA	Day 1	Day 2	Day 3
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
Percent Correlation	N/A	100	100	100

As can be seen, the device and method performed well in the hands of four different practitioners.

[187] Example 6: Effect of Freeze-Thaw on Specimens

[188] To further characterize devices and methods according to the invention, an embodiment of the device was used in conjunction with a method according to the invention to determine the suitability of each with specimens that had been subjected to at least one freeze-thaw cycle.

[189] A total of eight fecal specimens, consisting of 6 positive and 2 negative specimens, were tested using an embodiment of the device of the invention, as depicted in Figure 21, and an embodiment of the method of the invention, both of which are available in the *TOX A/B QUIK CHEK*TM test from TechLab, Inc. (cat. no. T5033) before and after a single freeze-thaw cycle. The specimens had been tested previously in the *C. DIFFICILE TOX A/B II*TM (TechLab, Inc.; cat. no. T5003) test for

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

the presence or absence of toxins A and B. The results are shown in the table below. Included is the residual reactivity in the *C. DIFFICILE TOX A/B IITM* test after the freeze-thaw cycle. The results showed that the positive specimens remained positive after the freeze-thaw cycle and the negative specimens remained negative. No conversion of positive-to-negative or negative-to-positive was observed in any of the specimens.

[190] **Table 9: Effect of Freeze-Thaw Cycle on Device and Method of the Invention**

Specimen Code (n=8)	TOX A/B II TM ELISA (before freezing)	INVENTION (before freezing)	TOX A/B II TM ELISA (after freezing)	INVENTION (after freezing)
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-

[191] Example 7: Effect of Specimen Storage Between 2° and 8°C for 72 Hours

[192] To further investigate the use of the device and method of the invention for detection of substances of interest in samples, six positive and two negative fecal specimens (with respect to *C. difficile* toxins A and B) were tested at times 24, 48, and 72 hours using a device and method according to the present invention, specifically in the *TOX A/B QUIK CHEKTM* test (TechLab, Inc.; cat. no. T5033) according to the manufacturer's instructions, to evaluate the stability of the toxins in fecal samples. The results, shown below, demonstrate that the device and method performed

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

consistently at each time interval. In addition, it shows that the *C. difficile* toxins are stable for at least 72 hours under these test conditions. All of the positive specimens remained positive and the negative specimens remained negative at each time period.

[193] Table 10: Effect of Specimen Storage Between 2° and 8°C for 72 Hours

Specimens (n=8)	Day 1 <i>C. difficile</i> TOX A/B II™ 20 min assay	Day 1 TOX A/B QUIK CHEK™	Day 2 <i>C. difficile</i> TOX A/B II™	Day 2 TOX A/B QUIK CHEK™	Day 3 <i>C. difficile</i> TOX A/B II™ 20 min assay	Day 3 TOX A/B QUIK CHEK™
TL001	+	+	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-	-	-

[194] Example 8: Use of a Method and Apparatus to Test Clinical Samples in a Clinical Lab Setting

[195] The method and apparatus used in Examples 4-7, above, were used to analyze clinical samples suspected of containing *C. difficile* toxins A and/or B. More specifically, an embodiment of the device of the invention, coupled with an embodiment of the method of the invention, sold together by TechLab, Inc. under the tradename *TOX A/B QUIK CHEK™* (TechLab cat. no. T5033) was compared with tissue culture assays at 3 commercial clinical laboratories and by the inventors. The study sites and investigators, along with the number and source of specimens are

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

presented in the following table. The device and method of the invention were compared to tissue culture assay because tissue culture assay is considered the "Gold Standard" for detecting *C. difficile* toxin in fecal samples. Discrepant results were analyzed using either the *C. DIFFICILE TOX A/B II*TM test or the Meridian PremierTM Toxins A&B test, both of which are microtiter ELISAs for detecting toxins A and B in fecal specimens. For studies performed by the inventors in this Example, tissue culture assay was performed using the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* assay of TechLab, Inc.

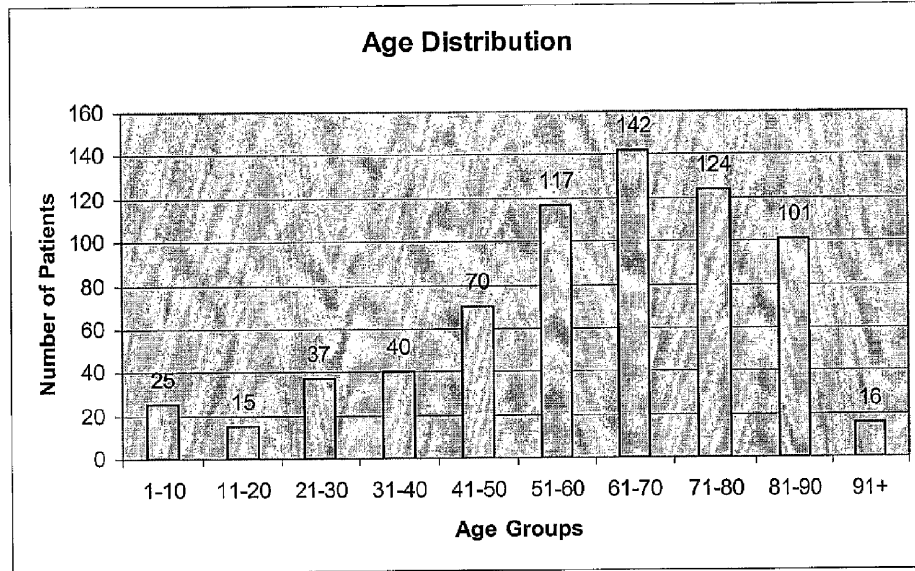
[196] When comparing the device and method of the invention to the tissue culture assay the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and percent correlation were determined. The 95% Confidence Intervals were also determined for the analysis versus tissue culture assay.

[197] The gender identification was available for 294 patients. There were 177 females (60.2%) and 117 males (39.8%). Age information was available for 613 patients. The age ranged from approximately 1 year to 95 years, with the distribution shown in the table below. The number above each bar in the table represents the number of patients who were in the specified age group.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[198] Table 11: Age Distribution for Clinical Study



[199] The tables below show a summary of the clinical performance of the device and method of the invention. Results from all 5 clinical studies performed are included in the summary. Results from the device and method of the invention were compared to tissue culture assay and discrepant results were analyzed by either the *C. DIFFICILE TOX A/B IITM* test (the presently discussed device and method of the invention) or the Meridian PremierTM Toxins A&B test. The results show that the *TOX A/B QUIK CHEKTM* test exhibited a sensitivity and specificity of 90.2% and 99.7%, respectively, compared to the tissue culture assay. The predictive positive and negative values were 98.6% and 97.9%, respectively, and the correlation was 98.0%.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[200] **Table 12: Summary of Clinical Performance of a Device and Method of the Invention**

n=842	Tissue Culture Positive Samples	Tissue Culture Negative Samples
<i>TOX A/B QUIK CHEK™</i> positive	138	2
<i>TOX A/B QUIK CHEK™</i> negative	15	687
		95% Confidence Interval
Sensitivity	90.2	84.1 - 94.2
Specificity	99.7	98.8 - 99.9
Predictive Positive Value	98.6	94.4 - 99.8
Predictive Negative Value	97.9	96.4 - 98.7
Correlation	98.0	97.8 - 98.2

[201] Of the 2 tissue culture-negative/*TOX A/B QUIK CHEK™*-positive samples, 1 was negative in the *TOX A/B I™* test. Of the 15 specimens that were tissue culture-positive/*TOX A/B QUIK CHEK™*-negative, 12 were negative in the *C. DIFFICILE TOX A/B I™* test or the Meridian Premier™ Toxins A&B test.

[202] Example 9: Effect of Fecal Specimen Consistency

[203] To further characterize the method and device of the invention, an embodiment of the device was tested with an embodiment of the method to determine the effect of fecal specimen consistency on the performance of the device and method.

[204] The reaction of fecal specimens of varying consistencies in the *TOX A/B QUIK CHEK™* test is shown in the table below. A total of 805 fecal samples of known consistency were included in the analysis. The percentages of positive

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

reactions using either tissue culture assay or the *TOX A/B QUIK CHEK™* test were similar in all three types of fecal specimens (liquid, semi-solid, and solid). All of the specimens were submitted for *C. difficile* testing. The basis of the submission was the clinical history of the patient and not the consistency of the specimen. The results show the *TOX A/B QUIK CHEK™* test performed similarly to the tissue culture assay when testing samples of different consistencies.

[205] Table 13: Reaction of fecal specimens of varying consistencies in the *TOX A/B QUIK CHEK™* test

# of Specimens (n=805)	Liquid Specimens (n=487)	Semi-solid Specimens (n=294)	Solid Specimens (n=24)
Positive by tissue culture assay	87 (17.9%)	56 (19.0%)	3 (12.5%)
Positive by <i>TOX A/B QUIK CHEK™</i>	76 (15.6%)	50 (17%)	3 (12.5%)

[206] Example 10: Comparison of Detection of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase Using the Device of the Invention and ELISA

[207] The device of the invention was used to detect the glutamate dehydrogenase antigen of *C. difficile* in 49 fecal samples, and the results compared to results obtained with an ELISA method. The method described in Example 1 was used to detect the toxins, with the following modifications.

[208] Fecal samples for use in the device were diluted as specified in Example 1 with sample diluent containing antibodies (in this case specific for the glutamate dehydrogenase enzyme of *C. difficile*) that had been chemically conjugated to horseradish peroxidase detecting enzyme (conjugate). The mixed sample (300 microliters) was then applied to the application pad (wicking pad) through the hole in the device (application port) and after 15 minutes at room temperature, washing solution (saline/detergent mix) was added to the top of the membrane followed by the chemical substrate solution. The results were read visually as specified in Example 1.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

[209] The TechLab Inc. Tox A/B ELISA was used as specified in the manufacturer's product insert. Briefly, the fecal sample was diluted 1:5 in sample diluent and mixed by vortexing. Each well of the ELISA plate received 50 microliters of conjugate solution containing antibodies specific for glutamate dehydrogenase coupled to horseradish peroxidase and then 100 microliters of a mixed sample was added to each well. The plate was then incubated at 37°C for 50 minutes to allow the antibodies attached to the microwells and antibody in the conjugate solution to bind the glutamate dehydrogenase. The wells were then washed thoroughly to remove unbound horseradish peroxidase. One hundred microliters of substrate solution was then added to each well, incubated 5 minutes, and then the reaction was stopped by adding 50 microliters of dilute acid solution. Results were read at 450 nm on an ELISA reader. Positive samples had an optical density greater than 0.12.

[210] Table 14 shows the results of the assays, and compares the results of the method and device of the present invention with the ELISA assay.

[211] **Table 14: Comparison of the method and device of the invention with an ELISA Method**

N=49	Ag Invention Pos	Ag Invention Neg
C. diff. Chek pos	9	0
C. diff. Chek neg	0	40
Sensitivity	100.0	
Specificity	100.0	
Predicted Positive Value	100.0	
Predicted Negative Value	100.0	
Correlation	100.0	

[212] The results indicate that the device and method of the present invention produce results that are identical to the sensitive ELISA method used. Thus, the

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

device and method of the invention are suitable for detection of numerous substances of interest.

[213] It will be apparent to those skilled in the art that various modifications and variations can be made in the practice of the present method and in construction and use of the present device without departing from the scope or spirit of the invention. Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from consideration of the specification and practice of the invention. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

CLAIMS

1. A method of detecting at least one substance of interest in a liquid sample, said method comprising:
 - providing a liquid sample comprising or suspected of comprising the substance(s) of interest;
 - applying the liquid sample to a porous material in a sufficient amount to at least partially wet the porous material;
 - contacting the porous material with a porous membrane comprising at least one specific binding pair member that is capable of binding, either directly or indirectly, the substance(s) of interest;
 - maintaining the porous material and porous membrane in contact for a sufficient amount of time for liquid present in the porous material to diffuse in, out, through, and/or about the porous membrane,
 - wherein diffusion of the liquid in, out, through, and/or about the porous membrane results in contact of the substance(s) of interest, if present, to be bound, either directly or indirectly, to the specific binding pair member(s); and
 - detecting the presence or absence of a complex comprising the specific binding pair member(s) and the substance(s) of interest,
 - wherein the presence of at least one complex indicates the presence of at least one of the substances of interest in the liquid sample.
2. The method of claim 1, further comprising:
 - providing a device comprising the porous material and porous membrane.
3. The method of claim 1, wherein the porous material filters the liquid sample to remove substances having a size greater than a pre-determined value.
4. The method of claim 3, wherein the filtering is by way of discontinuous wicking of liquid from the liquid sample through the porous material.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

5. The method of claim 1, wherein the liquid comprises two or more substances of interest.
6. The method of claim 5, wherein each substance of interest is different than each other substance of interest.
7. The method of claim 5, wherein the liquid comprises feces, blood, food, or an environmental sample.
8. The method of claim 1, wherein the substance(s) of interest is *Clostridium difficile* toxin A, *Clostridium difficile* toxin B, or both.
9. The method of claim 1, wherein the substance(s) of interest is one or more toxin, bacteria, viruses, bacterial products, enzymes, or parasites.
10. The method of claim 1, wherein the substance(s) of interest is glutamate dehydrogenase.
11. The method of claim 1, wherein the substance is an animal or human product.
12. The method of claim 1, wherein the substance is an antibody or lactoferrin.
13. The method of claim 1, wherein one or more of the specific binding pair member(s) is an antibody, wherein each of the antibodies is either different or the same as one or more others.
14. The method of claim 1, further comprising washing the membrane prior to detecting the presence of the complex.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

15. The method of claim 1, wherein applying the liquid sample to the porous material comprises applying the liquid sample at a location on the porous material that is spatially separated from the porous membrane, whereby at least the liquid of the liquid sample travels into the porous material and then the porous membrane.
16. The method of claim 15, wherein the liquid sample travels through the porous material to the porous membrane through a wicking process.
17. The method of claim 1, further comprising applying a physical force to the membrane, the porous material, or both.
18. The method of claim 1, wherein detecting comprises observing a signal emitted from a label bound to a substance of interest.
19. The method of claim 18, wherein the signal is produced by a colored precipitating product that forms in or around the specific binding pair member.
20. The method of claim 1, further comprising combining a labeled conjugate with the liquid sample prior to applying the liquid sample to the porous material.
21. The method of claim 20, wherein the labeled conjugate comprises a latex bead or other colored particle, a colloidal gold particle, or a reactive substance that binds to a substrate to create a detectable signal.
22. The method of claim 18, wherein the signal is a non-visual signal.
23. The method of claim 1, wherein the method detects one or more nucleic acids or wherein one or more nucleic acids are specific binding pair members.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

24. A device for detecting at least one substance of interest in a liquid sample, the device comprising:
- (a) a receptacle comprising a porous material for receiving the liquid sample,
wherein the porous material is capable of absorbing and transmitting at least a portion of the liquid sample, and
 - (b) a porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for the substance of interest or a substance bound to the substance of interest,
wherein the receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member.
25. The device of claim 24, further comprising a container containing the receptacle.
26. The device of claim 24, further comprising a holder for the porous membrane.
27. The device of claim 24, further comprising a wash solution receiving pad.
28. The device of claim 24, further comprising a liquid sample application pad.
29. The device of claim 24, further comprising a filtration pad.
30. The device of claim 24, wherein the device comprises a container containing a reaction pad comprising the porous material and the porous membrane, the container comprising a holder for the porous membrane,

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

wherein the container causes pressure to be exerted on the porous membrane and/or the porous material such that at least a portion of the porous material is compressed.

31. The device of claim 30, wherein the pressure causes the porous membrane and the porous material to be in direct contact over at least a portion of the porous membrane.

32. The device of claim 30, wherein the pressure permits liquids to pass between the porous membrane and the porous material by passive diffusion.

33. A device for detecting at least one substance of interest in a liquid sample, the device comprising:

(a) a receptacle comprising a porous material for receiving the liquid sample,

wherein the porous material is capable of absorbing and transmitting at least a portion of the liquid sample, and

(b) a porous membrane that comprises a specific binding pair member that is specific for the substance of interest or a substance bound to the substance of interest,

wherein the receptacle and porous membrane are each shaped to permit the porous membrane to be in direct contact with the porous material over at least a portion of the porous membrane that comprises the specific binding pair member,

wherein the porous membrane and porous material are different elements having a different chemical constitution.

34. The device of claim 33, wherein the porous membrane and porous material are in physical contact such that liquid sample applied to the porous material diffuses in, out, through, and about the porous membrane.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

35. The device of claim 33, wherein a physical contact between the porous membrane and porous material is created such that sensitivity of the device is improved.

36. The device of claim 33, wherein the porous material and porous membrane are configured in contact with each other such that the substance of interest does not need to traverse the porous membrane in a unidirectional manner for the device to detect the substance of interest.

37. The device of claim 33, wherein the porous material and porous membrane are in contact with each other in such a way to permit simple, non-directional diffusion of a liquid between the two to occur.

38. A device for detecting the presence or amount of a substance of interest in a liquid sample, the device comprising:

a sample receiving zone for receiving the liquid sample,

wherein the sample receiving zone is present on a porous material;

a sample filter zone for filtering the liquid sample received at the sample receiving zone,

wherein the sample filtering zone is present on a porous material;

a porous membrane comprising a specific binding member at a detection zone that specifically binds to the substance of interest or a substance bound to the substance of interest,

wherein the porous membrane is not the same element as any of the porous materials, and

wherein the porous material and porous membrane are in physical contact over at least an area comprising a portion of the detection zone, and

wherein the porous material and porous membrane are in physical contact in a configuration that permits liquid present in the liquid sample to diffuse in, out,

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

through, and about the porous membrane in a substantially random, non-directional manner in an area comprising at least a portion of the detection zone.

39. The device of claim 38, further comprising a container that contains at least a portion of the porous material(s) and porous membrane.

40. The device of claim 39, further comprising a porous material comprising a wash solution receiving zone.

41. A device comprising:

a receptacle; and

a porous membrane comprising at least one specific binding pair member that specifically binds to at least one substance of interest or a substance bound to that substance;

wherein the receptacle comprises an application zone, a filtration zone, and a reaction zone; and

wherein the receptacle and the porous membrane are in physical contact over at least a portion of the porous membrane comprising the specific binding pair member(s) and at least a portion of the reaction zone.

42. The device of claim 41, further comprising a wash receiving pad in physical contact with either the receptacle or the porous membrane.

43. The device of claim 41, further comprising a wash receiving pad and a liquid-impermeable membrane,

wherein the wash receiving pad is adjacent the receptacle, and the liquid impermeable membrane is interposed between, and in physical contact with both of, the receptacle and wash receiving pad.

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

44. The device of claim 43, wherein removal of the impermeable membrane results in physical contact between at least a portion of the receptacle and wash receiving pads.

Abstract: The present invention provides assays and devices for detection of substances in liquid samples. The assays and devices utilize passive diffusion between a porous material and a porous membrane containing a specific binding pair member to enable detection of the substance of interest.

【 図 1 】

WO 2006/058286

1/28

PCT/US2005/042902

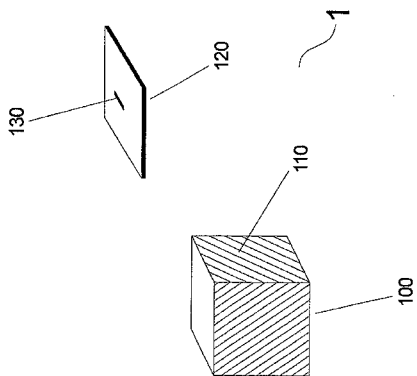


Figure 1

【 図 2 】

WO 2006/058286

2/28

PCT/US2005/042902

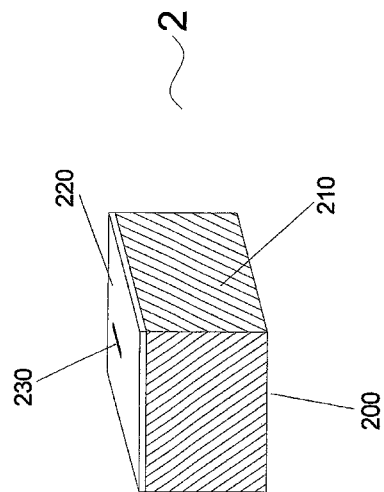


Figure 2

【 図 3 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

3/28

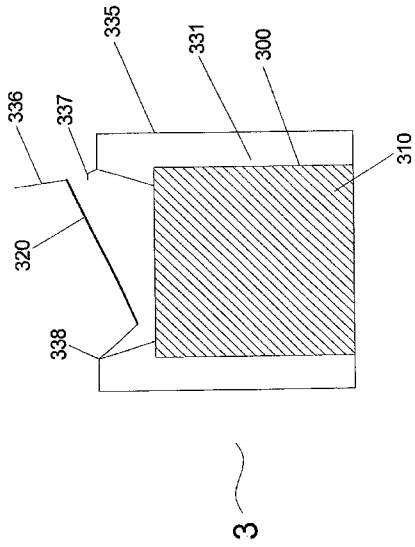


Figure 3

【 図 4 A 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

4/28

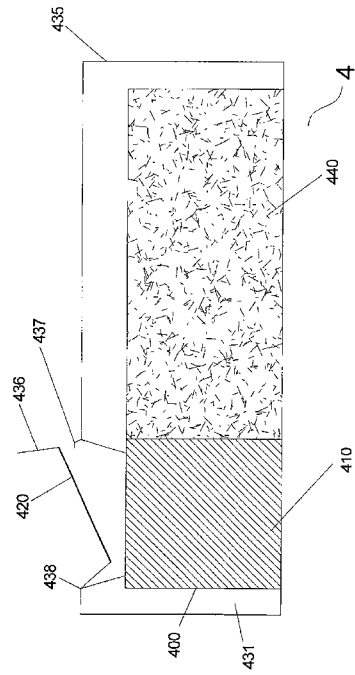


Figure 4A

【 図 4 B 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

5/28

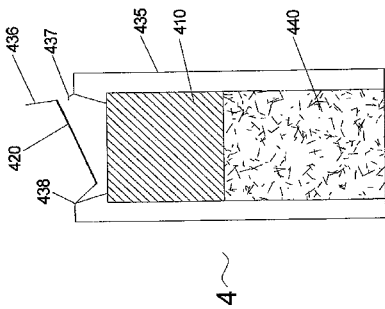


Figure 4B

【 図 4 C 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

6/28

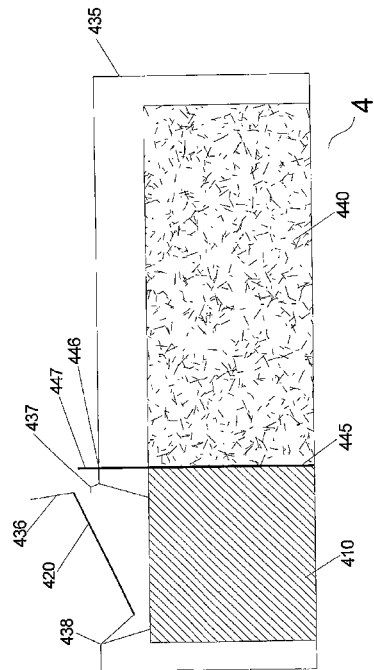


Figure 4C

【 図 5 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

7/28

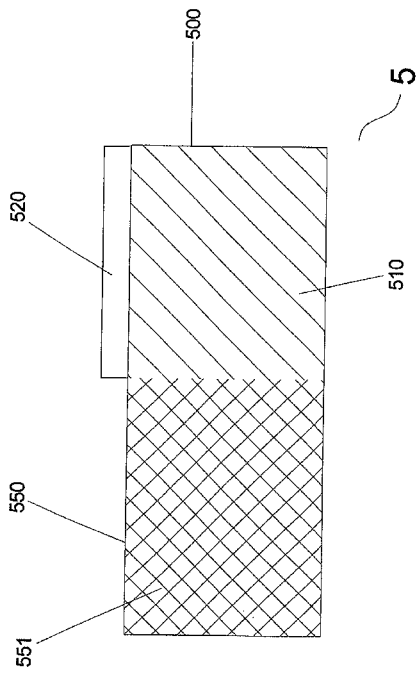


Figure 5

【 図 6 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

8/28

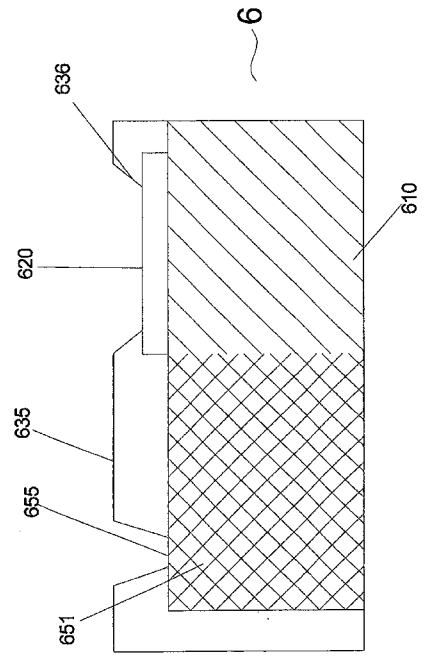


Figure 6

【 図 7 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

9/28

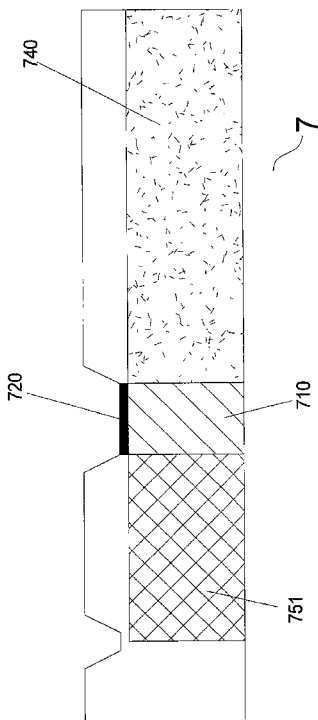


Figure 7

【 図 8 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

10/28

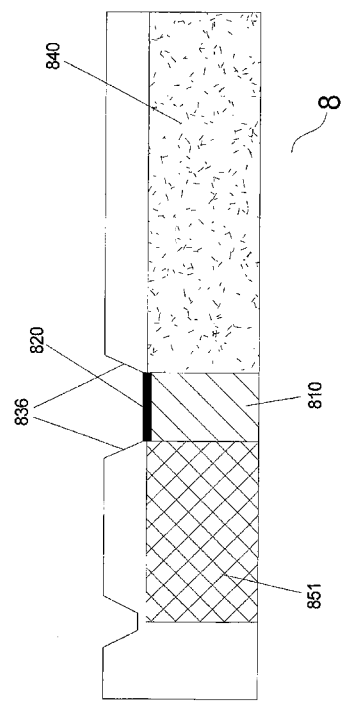


Figure 8

【 図 9 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

11/28

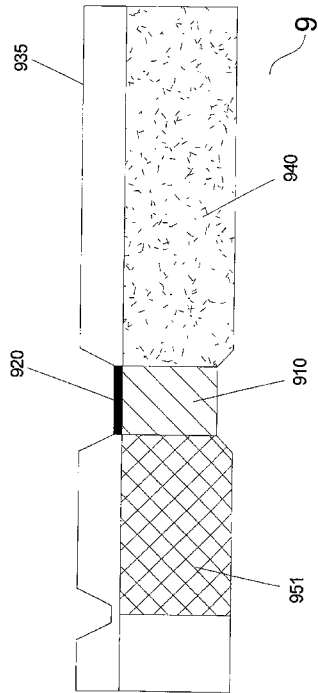


Figure 9

【 図 1 0 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

12/28

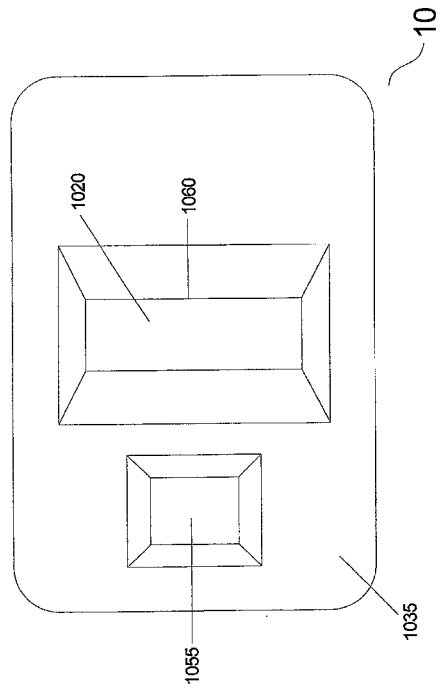


Figure 10

【 図 1 1 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

13/28

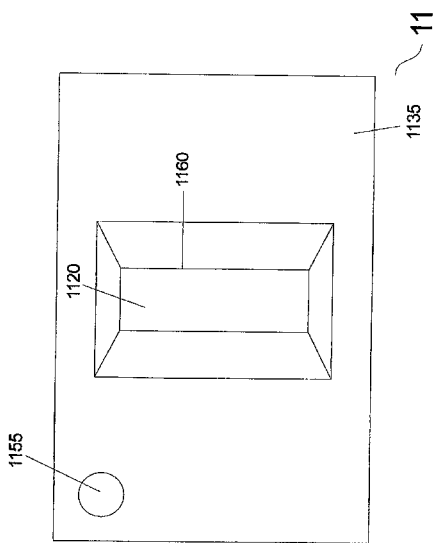


Figure 11

【 図 1 2 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

14/28

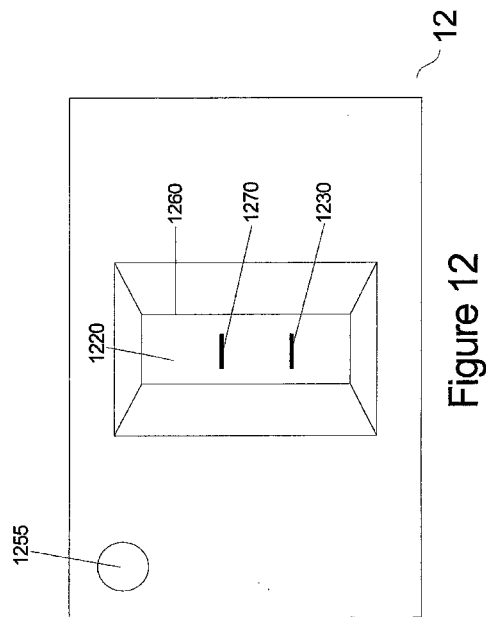


Figure 12

【 図 1 3 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

15/28

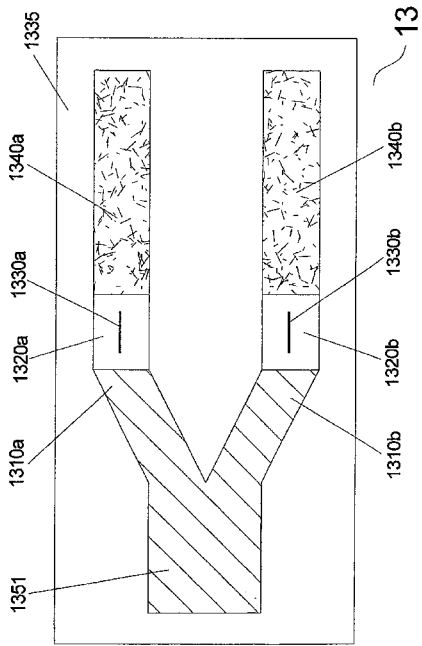


Figure 13

【 図 1 4 A 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

16/28

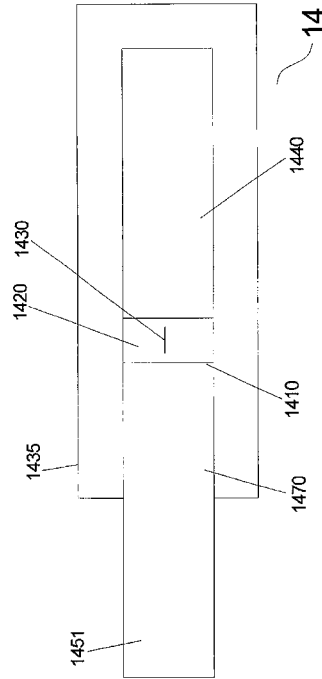


Figure 14A

【 図 1 4 B 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

17/28

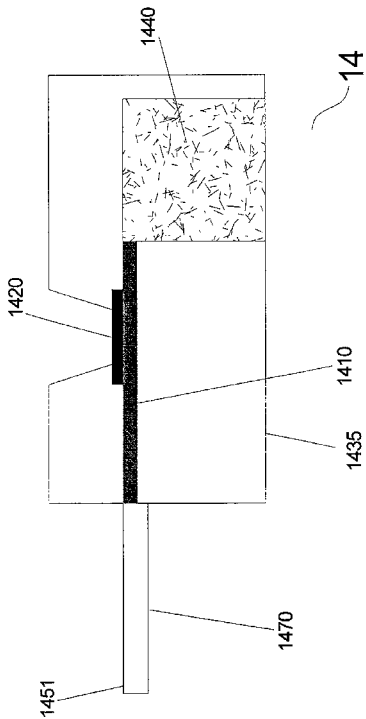


Figure 14B

【 図 1 4 C 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

18/28

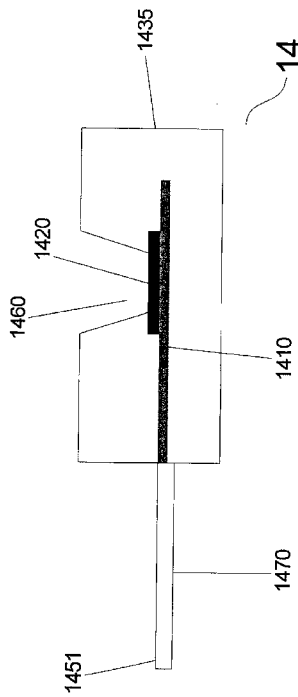


Figure 14C

【 図 1 5 A 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

19/28

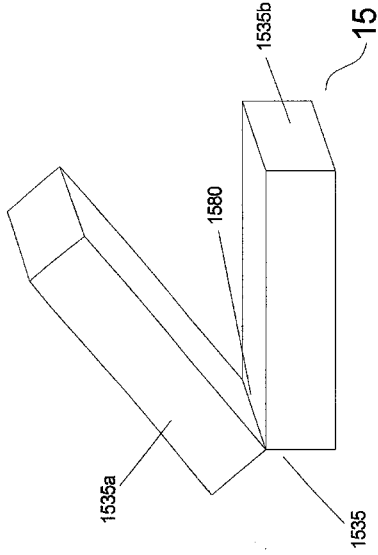


Figure 15A

【 図 1 5 B 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

20/28

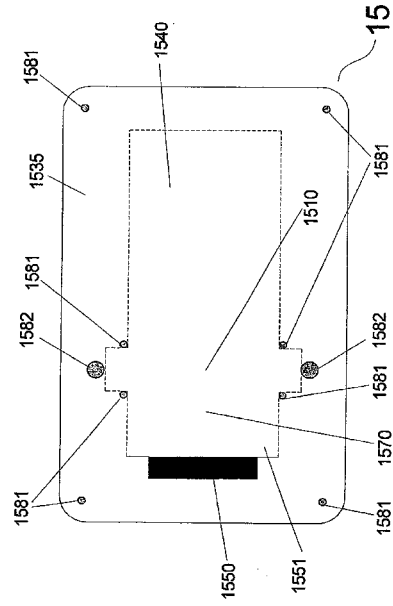


Figure 15B

【 図 1 5 C 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

21/28

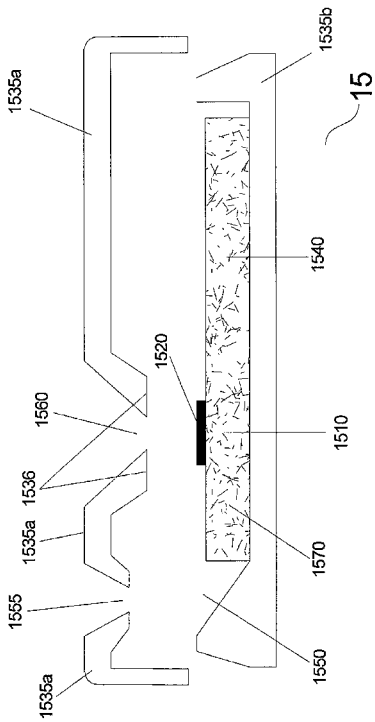


Figure 15C

【 図 1 5 D 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

22/28

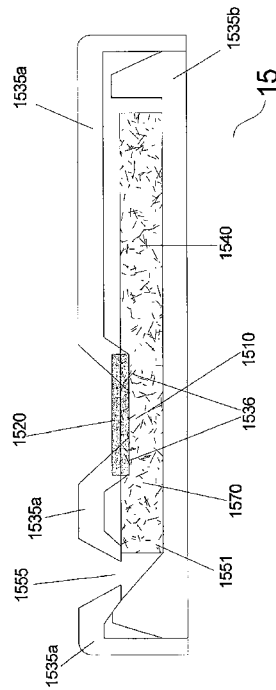


Figure 15D

【 図 1 6 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

23/28

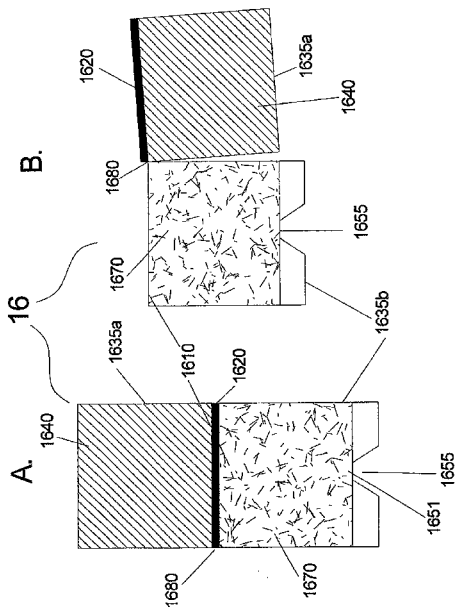


Figure 16

【 図 1 7 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

24/28

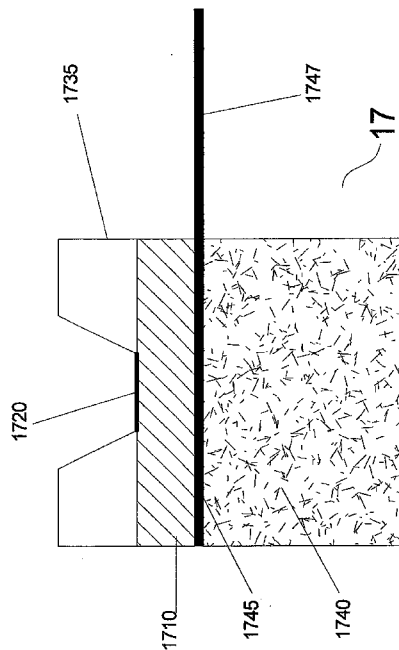


Figure 17

【 図 1 8 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

25/28

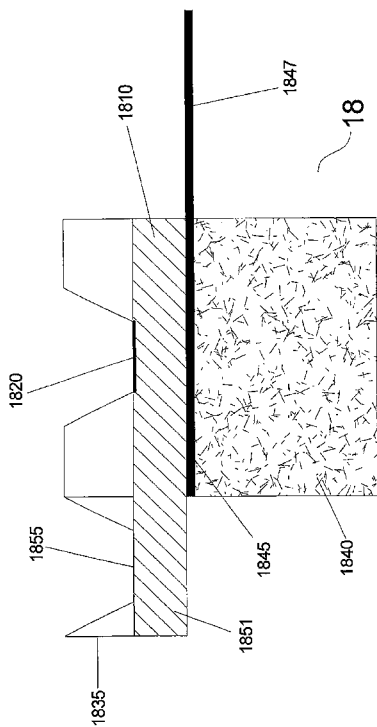


Figure 18

【 図 1 9 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

26/28

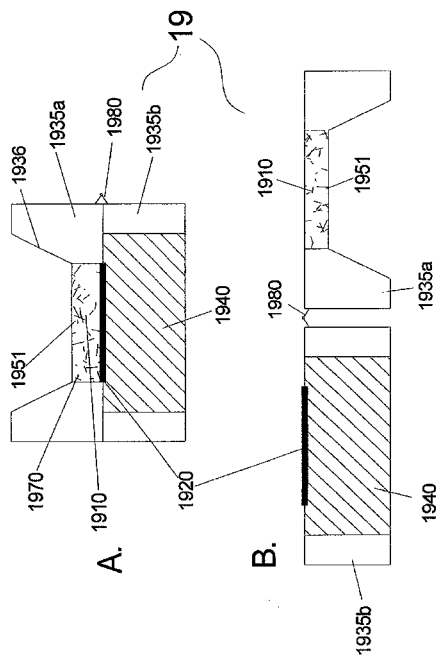


Figure 19

【 図 2 0 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

27/28

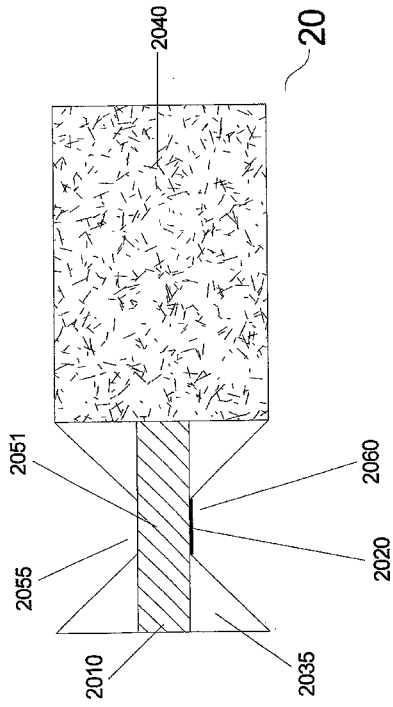


Figure 20

【 図 2 1 】

WO 2006/058286

PCT/US2005/042902

28/28

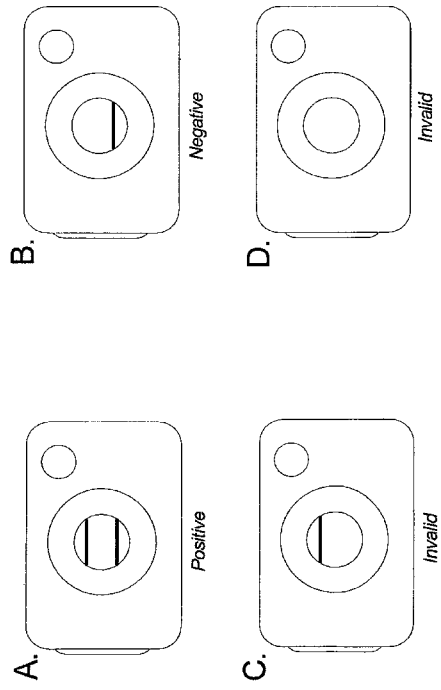


Figure 21

专利名称(译)	用于检测分析物的装置和方法		
公开(公告)号	JP2013140169A	公开(公告)日	2013-07-18
申请号	JP2013033441	申请日	2013-02-22
申请(专利权)人(译)	Tekurabu公司		
[标]发明人	ブーンジェームズエイチ ライアリーディヴィッドエム ウィルキンズトレイシーディー		
发明人	ブーン ジェームズ エイチ ライアリー ディヴィッド エム ウィルキンズ トレイシー ディー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N2333/33 G01N2333/79 G01N2333/906 G01N33/573 G01N33/6803 G01N33/6845 G01N2333/90611 G01N2333/90616 G01N2333/91097		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/569.F G01N33/569.G G01N33/573.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.541.Z		
优先权	60/630152 2004-11-24 US		
其他公开文献	JP5890789B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测液体样品中的物质的分析和装置。测定和装置利用多孔材料和含有特异性结合对成员的多孔膜之间的被动扩散，以能够检测感兴趣的物质。

N=50	A/B発明陽性	A/B発明陰性
C. デイフイルA/B I陽性	8	1
C. デイフイルA/B I陰性	1	40