

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2004-510130  
(P2004-510130A)  
(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

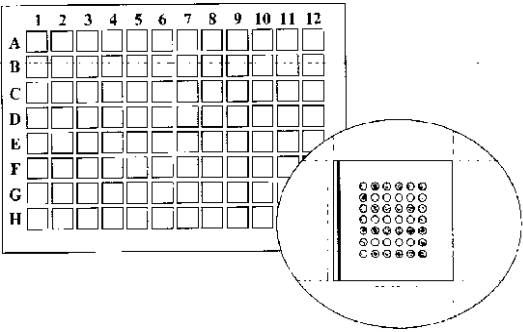
(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 M	2 GO 4 3
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64 F	2 GO 5 4
GO 1 N 21/76	GO 1 N 21/76	
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 9 7	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 136 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-501026 (P2002-501026)	(71) 出願人	599116649
(86) (22) 出願日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月2日 (2002.12.2)		Zeptosens AG
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/005995		スイス国 4108 ヴィッテルスヴィル
(87) 国際公開番号	W02001/092870		ベンケンシュトラーセ 254
(87) 国際公開日	平成13年12月6日 (2001.12.6)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	2000 1104/00		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成12年6月2日 (2000.6.2)	(74) 代理人	100075225
(33) 優先権主張国	スイス (CH)		弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者	パウラク, ミヒャエル
			ドイツ国、79275 ローフェンブルク
			、アンデルスバッハシュトラーセ 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 多分析対象物測定のためのキット及び方法

(57) 【要約】

複数の分析対象物の同時定性及び／又は定量測定のための、少なくとも一つの励起波長で透明である層 (a) を、少なくとも同じ励起波長で同じく透明である、層 (a) よりも低い屈折率を有する層 (b) の上に有し、層 (a) 中で変調される少なくとも一つの格子構造 (c) を有する薄層光学導波路からなるセンサプラットフォームを、直接又は付着促進層を介して層 (a) に固定化され、別個の計測区域 (d) に配置された生化学的又は合成検出要素の少なくとも一つのアレイとともに含むキットの種々の実施態様に関する。前記検出要素は、前記分析対象物の特異的認識及び／又は結合、及び／又はそれとの特異的相互作用に使用される。本発明のキットは、また、計測区域に存在する励起光強さの局所分解参照のための手段を、場合によっては、一つ又はいくつかの分析対象物の間の結合の結果として、又は一つ又はいくつかの分析対象物との特異的相互作用の結果として、層 (a) の近場で生成される少なくとも一つのルミネセンスを校正するための手段とともに含む。分析対象物が分析される液体試料は、センサプラットフォーム上の計測区域と



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多種の分析対象物の同時定性測定及び／又は定量測定のためのキットであって、少なくとも一つの励起波長で透明な層（a）を、少なくとも前記励起波長で同じく透明である、層（a）よりも低い屈折率の層（b）の上に有し、かつ、前記励起光を層（a）に内結合するための、前記層（a）中で変調される少なくとも一つの格子構造（c）を有する光学薄膜導波路を含むセンサプラットフォームと、  
前記分析対象物の特異的認識及び／又は結合のための、及び／又は前記分析対象物との特異的相互作用のための、別個の計測区域（d）に直接又は層（a）上の付着促進層を介して固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の少なくとも一つのアレイと、  
計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段と、場合によっては、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として、層（a）の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正のための手段と、  
を含み、  
前記分析対象物に関して分析される液体試料が、前記センサプラットフォーム上の前記計測区域と直接又はさらなる試薬との混合ののち接触させられるキット。

10

## 【請求項 2】

第一の光学的に透明な層（a）の屈折率が 1.8 よりも高い、請求項 1 記載のキット。

## 【請求項 3】

第一の光学的に透明な層（a）が、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  又は  $ZrO_2$  の群の材料、特に好ましくは  $TiO_2$  又は  $Nb_2O_5$  又は  $Ta_2O_5$  の群の材料を含む、請求項 1～2 のいずれか記載のキット。

20

## 【請求項 4】

層（a）の厚さとその屈折率との積が、層（a）中に結合される励起光の励起波長の  $1/10 \sim 1$ 、好ましくは  $1/3 \sim 2/3$  である、請求項 1～3 のいずれか記載のキット。

## 【請求項 5】

第二の光学的に透明な層（b）の材料が、ケイ酸塩、たとえばガラスもしくは石英、又はポリカーボネート、ポリイミド、アクリレート、特にポリメチルメタクリレートもしくはポリスチロールによって形成される群の透明な熱可塑性もしくは金型成形性プラスチックを含む、請求項 1～4 のいずれか記載のキット。

30

## 【請求項 6】

層（a）中で変調される格子構造（c）が、 $200\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ の周期と  $3\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ 、好ましくは  $10\text{ nm} \sim 50\text{ nm}$ の変調深さとを有する、請求項 1～5 のいずれか記載のキット。

## 【請求項 7】

第一の光学的に透明な層（a）の変調深さと厚さとの比が 0.4 以下である、請求項 1～6 のいずれか記載のキット。

## 【請求項 8】

格子構造（c）が、いかなるプロファイル、たとえば矩形、三角形又は半円形のプロファイルのレリーフ格子、又は本質的に平坦な光学的に透明な層（a）で屈折率の周期変調を有する位相もしくは容積格子である、請求項 1～7 のいずれか記載のキット。

40

## 【請求項 9】

格子構造（c）が、独自の周期の回折格子又は多回折格子である、請求項 1～8 のいずれか記載のキット。

## 【請求項 10】

格子構造（c）が、光学的に透明な層（a）に内結合される励起光の伝播方向に対して垂直又は平行に、横方向に変化する周期数を有する、請求項 1～9 のいずれか記載のキット。

## 【請求項 11】

センサプラットフォームが、格子構造（c）によって層（a）に内結合されかつ層（a）

50

中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層 (a) の均一な非変調領域を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか記載のキット。

【請求項 12】

格子構造 (c) が、計測区域への励起光の内結合、及び / 又は層 (a) 中に逆結合されるルミネセンス光の外結合に使用される、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載のキット。

【請求項 13】

センサプラットフォームが、同じ又は異なる周期の多数の格子構造 (c) を、場合によっては、層 (a) の隣接する均一な非変調領域とともに、共通の連続基板上に含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか記載のキット。

【請求項 14】

誘導される励起光を外結合するための専用の格子構造 (c) が、計測区域の各アレイの後に、内結合される励起光の伝播方向に設けられ、内結合される励起光の伝播方向に対して垂直に、異なるアレイの個々の格子構造を設けることができるか、又は、これらの格子構造がセンサプラットフォーム全体にかけてこの方向 (内結合される励起光の伝播方向に対して垂直) に延びることができる、請求項 1 ~ 13 のいずれか記載のキット。

【請求項 15】

センサプラットフォームの層 (a) 中を誘導される励起光の伝播方向で後続するアレイのための内結合格子が、前記伝播方向で先行するアレイの内結合格子で内結合された励起光の外結合格子として使用される、請求項 14 記載のキット。

【請求項 16】

格子構造が、異なる波長の励起光を内結合するために異なる周期数の二以上の格子構造を重畳したものであり、格子線が互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重畳された格子構造の場合では、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直である、請求項 1 ~ 15 のいずれか記載のキット。

【請求項 17】

格子構造 (c) 又は層 (a) 中でいくつかの格子構造を重畳したものが、本質的にセンサプラットフォームの全領域にわたって変調される、請求項 1 ~ 16 のいずれか記載のキット。

【請求項 18】

光学システムにおける調節の簡素化のため及び / 又は分析システムの一部としての試料区画への接続のための光学的又は機械的に認識可能なマークが、センサプラットフォーム上に設けられている、請求項 1 ~ 17 のいずれか記載のキット。

【請求項 19】

層 (a) よりも低い屈折率を有しかつ層 (a) に接する、厚さ 5 nm ~ 10000 nm、好ましくは 10 nm ~ 1000 nm のさらなる光学的に透明な層 (b) が、光学的に透明な層 (a) と (b) との間に位置する、請求項 1 ~ 18 のいずれか記載のキット。

【請求項 20】

厚さ好ましくは 200 nm 未満、より好ましくは 20 nm 未満の付着促進層 (f) が、生物学的又は生化学的又は合成認識要素の別個の計測区域への固定化のために、光学的に透明な層 (a) に被着され、かつ、付着促進層 (f) が、好ましくは、シラン、エポキシド、官能化された帯電の又は極性のポリマー及び「自己組織化パッシブ又は官能化単分子又は二分子層」を含む群の化合物を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか記載のキット。

【請求項 21】

横方向に分けられた計測区域 (d) が、好ましくは、インクジェットスポッティングと、ピン、ペンもしくは毛管を使用する機械的スポッティングと、マイクロコンタクトプリントと、生物学的又は生化学的又は合成認識要素を平行の又は交差したマイクロチャネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを印加することによって計測区域と流体接触させることと光化学的又は光リソグラフィー固定化方法と、を含む方法の群の方法を使用して、生物学的又は生化学的又は合成認識要素をセンサプラットフォーム上に横方向選択的に被着させることによって生成される、請求項 1 ~ 20 のいずれか記載のキット

10

20

30

40

50

。

【請求項 22】

核酸（たとえば DNA、RNA、オリゴヌクレオチド）及び核酸類似体（たとえば PNA）、モノクロナールもしくはポリクロナール抗体、ペプチド、酵素、アプタマー、合成ペプチド構造、可溶性の膜結合タンパク質及び膜から単離したタンパク質、たとえば受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」及びそれらの錯形成相手、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などを含む群の成分が、生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着されるか、完全な細胞、細胞成分、細胞膜又はそれらの断片が、生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着される、請求項 1～21 のいずれか記載のキット。

10

【請求項 23】

異なる分析対象物を検出するための別個の計測区域で異なる計測区域上に固定化された認識要素の密度が、共通のアレイでの異なる分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになる、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した校正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択される、請求項 1～22 のいずれか記載のキット。

【請求項 24】

計測区域のアレイが、分析対象物測定のための一以上の計測区域と、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び / 又は塗布される種々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置されている、請求項 1～23 のいずれか記載のキット。

20

【請求項 25】

一以上のアレイが、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域のセグメントを含む、請求項 1～24 のいずれか記載のキット。

【請求項 26】

アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、共通の群の分析対象物の測定のために、たとえば固定化された抗サイトカイン抗体を使用して種々のサイトカインを測定するために設けられている、請求項 1～25 のいずれか記載のキット。

【請求項 27】

同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられ、かつ、関連した固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する、請求項 1～26 のいずれか記載のキット。

30

【請求項 28】

アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、異なる群の分析対象物の測定のために、たとえば疾病の治療のための医薬品及び / 又はそれらの代謝産物及び / 又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカータンパク質」の測定のために設けられている、請求項 1～27 のいずれか記載のキット。

【請求項 29】

二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び / 又は計測区域のセグメントの同様な幾何学配列を有する、請求項 1～28 のいずれか記載のキット。

40

【請求項 30】

二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び / 又は計測区域のセグメントの異なる幾何学配列を有する、請求項 1～29 のいずれか記載のキット。

【請求項 31】

二以上の同一の計測区域が、各分析対象物の測定のために、又はセグメントもしくはアレイ内での物理的もしくは化学的参照のために、設けられている、請求項 1～30 のいずれか記載のキット。

【請求項 32】

50

前記同一の計測区域が、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置されている、請求項 3 1 記載のキット。

【請求項 3 3】

前記同一の計測区域が、計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布している、請求項 3 1 記載のキット。

【請求項 3 4】

横方向に分けられた計測区域の間の領域が、分析対象物、又はそれらのトレーサ化合物、すなわち、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物の、好ましくは、たとえば、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナル、測定される一又は多種の分析対象物に対して異質もしくは経験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイの場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20（登録商標）、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物（特にポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定の場合）又は帯電していないが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランによって形成される群からの化合物の、非特異的結合の最小化のために、「パシベート」されている、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか記載のキット。

10

【請求項 3 5】

分析対象物又はそれらのトレーサ化合物の最小化のための横方向に分けられた計測区域の間の領域のパシベーションの機能が、さらなる化合物の被着なしに、請求項 2 0 記載のセンサプラットフォームへの付着促進層の被着によって満たされる、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか記載のキット。

20

【請求項 3 6】

1 0 0 , 0 0 0 個までの計測区域が二次元配列で設けられ、かつ、単一の計測区域が 0 . 0 0 1 mm<sup>2</sup> ~ 6 mm<sup>2</sup> の面積を有する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか記載のキット。

【請求項 3 7】

生成された計測区域を上の有し光学的に透明な層（a）の上のセンサプラットフォームの上面が、さらなるボディと、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ボディとの間に、互いに対して流体的に封止される一以上の試料区画を生成するための一以上の空間的凹み（空洞）が形成されるような方法で組み合わせられ、前記試料区画が、一以上の計測区域又は計測区域のセグメントもしくはアレイをそれぞれ含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか記載のキット。

30

【請求項 3 8】

試料区画が、互いに対して流体的に封止されたフローセルとして設けられ、それぞれに、少なくとも一つの入口及び少なくとも一つの出口が設けられ、かつ、場合によっては、さらに、各フローセルの少なくとも一つの出口が、フローセルを出る液体を収容するように働くことができる流体的に接続された液溜めに通じている、請求項 3 7 記載の試料区画の配列を有するキット。

【請求項 3 9】

フローセルを出る液体を収容するための場合によって設けられるさらなる液溜めが、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わせられるボディの外壁の凹みとして設けられている、請求項 3 8 記載のキット。

40

【請求項 4 0】

生成されるフローセルのアレイのピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）を有する三次元構造が、センサプラットフォーム上にベースプレートとして設けられている、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか記載のキット。

【請求項 4 1】

凹みが、ベースプレートとそれと組み合わせられるボディとの間の空洞を生成するために、ベースプレートに設けられている、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか記載のキット。

【請求項 4 2】

50

凹みが、ベースプレートとそれと組み合わせられるボディとの間に空洞を生成するために、前記ボディに設けられている、請求項 37 ~ 41 のいずれか記載のキット。

【請求項 43】

試料区画が、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わせられるボディの、計測区域に対して、反対側で開口している、請求項 1 ~ 37 又は 40 ~ 42 のいずれか記載のキット。

【請求項 44】

試料区画の配列が、2 ~ 2000 個、好ましくは 2 ~ 400 個、もっとも好ましくは 2 ~ 100 個の個別の試料区画を含む、請求項 37 ~ 43 のいずれか記載のキット。

【請求項 45】

試料区画のピッチ（行及び / 又は列としての幾何学配列）が、標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致する、請求項 37 ~ 44 のいずれか記載のキット。

【請求項 46】

たとえば 1 列に 2 ~ 8 個の試料区画又はたとえば 1 行に 2 ~ 12 個の試料区画があり、試料区画そのものが、標準マイクロタイタプレートの寸法を有するキャリア（「メタキャリア」）と、フローセルの入口のピッチ（行及び / 又は列としての幾何学配列）が標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致するような方法で組み合わせられている、請求項 37 ~ 45 のいずれか記載のキット。

【請求項 47】

試料区画の配列が、さらなるカバートップ、たとえば箔、膜又はカバープレートによって閉止されている、請求項 37 ~ 46 のいずれか記載のキット。

【請求項 48】

各試料区画の内部容積が、 $0.1 \mu\text{l} \sim 1000 \mu\text{l}$ 、好ましくは  $1 \mu\text{l} \sim 20 \mu\text{l}$  である、請求項 37 ~ 47 のいずれか記載のキット。

【請求項 49】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ベースプレートと組み合わせられるボディとの間の空洞の深さが、 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $20 \sim 200 \mu\text{m}$  である、請求項 37 ~ 48 のいずれか記載のキット。

【請求項 50】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームとそれと組み合わせられるボディとの間の空洞のベース面積が、 $0.1 \text{mm}^2 \sim 200 \text{mm}^2$ 、好ましくは  $1 \text{mm}^2 \sim 100 \text{mm}^2$  であり、アレイの空洞の大きさが、均一であることもできるし多様であることもでき、ベース区域が、いかなる形状、好ましくは矩形もしくは多角形又は他の幾何学形状を有することもできる、請求項 37 ~ 48 のいずれか記載のキット。

【請求項 51】

ベースプレートと、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わせられるボディと、請求項 47 記載のさらなるカバートップとの材料が、成形性、金型成形性又はロール練り性のプラスチック、金属、ケイ酸塩、たとえばガラス、石英又はセラミックスの群から選択される、請求項 37 ~ 50 のいずれか記載のキット。

【請求項 52】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 1 ~ 51 のいずれか記載のキット。

【請求項 53】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームからルミネセンス波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 1 ~ 52 のいずれか記載のキット。

【請求項 54】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起

10

20

30

40

50

に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 1 ~ 53 のいずれか記載のキット。

【請求項 55】

センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成が、計測区域から発せられるルミネセンスの集光の場合と同じ光路を使用して実施される、請求項 52 又は請求項 54 記載のキット。

【請求項 56】

センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が、100  $\mu\text{m}$  未満、好ましくは 20  $\mu\text{m}$  未満である、請求項 52 ~ 55 記載のキット。

【請求項 57】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、計測区域の間の又は計測区域に隣接したところでの実際のルミネセンス波長のバックグラウンド信号の測定を含む、請求項 1 ~ 56 のいずれか記載のキット。

【請求項 58】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、「ルミネセンスマーカスポット」、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されている分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施される、請求項 1 ~ 56 のいずれか記載のキット。

【請求項 59】

「ルミネセンスマーカスポット」が、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けられている、請求項 58 記載のキット。

【請求項 60】

「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度が、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択される、請求項 58 ~ 59 のいずれか記載のキット。

【請求項 61】

「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度が、アレイ内で均一であり、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一である、請求項 58 ~ 60 のいずれか記載のキット。

【請求項 62】

種々の「ルミネセンスマーカスポット」の間の距離及び／又はサイズが、別個の計測区域からのルミネセンス強さの測定の所望の局所分解度に適合されている、請求項 58 ~ 61 のいずれか記載のキット。

【請求項 63】

センサプラットフォーム上の各アレイが、少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」を含む、請求項 58 ~ 62 のいずれか記載のキット。

【請求項 64】

少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」が、分析対象物測定のための計測区域の各セグメントに隣接して設けられている、請求項 58 ~ 63 のいずれか記載のキット。

【請求項 65】

各アレイが、前記アレイの領域で内結合される励起光の二次元分布の測定のために、内結合される励起光の伝播方向に対して平行及び／又は垂直な「ルミネセンスマーカスポット」の連続した行及び／又は列を含む、請求項 58 ~ 64 のいずれか記載のキット。

【請求項 66】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、多数の局所分解参照信号の平均値の測定を含む、請求項 1 ~ 65 のいずれか記載のキット。

【請求項 67】

一以上の分析対象物の結合又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層（

10

20

30

40

50

a) の近場で生成される一以上のルミネセンスを校正するための手段が、測定される分析対象物の既知の濃度を有する校正溶液を所定数のアレイに塗布することを含む、請求項 1 ~ 65 のいずれか記載のキット。

【請求項 68】

センサプラットフォームの 8 ~ 12 個のアレイが、校正のために専用に当てられている、請求項 67 記載のキット。

【請求項 69】

異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域が、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けられている、請求項 1 ~ 68 のいずれか記載のキット。

10

【請求項 70】

分析対象物の校正曲線が、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに一つの校正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との結合を示す信号の濃度依存性が既知である、請求項 69 記載のキット。

【請求項 71】

一以上のアレイが、校正のために、既知の濃度で試料に加えられる分析対象物の測定に専用の一以上の計測区域を含む、請求項 1 ~ 70 のいずれか記載のキット。

【請求項 72】

請求項 1 ~ 71 のいずれか記載のキットを有する分析システムであって、格子導波路構造（センサプラットフォーム）から発せられる一以上のルミネセンスを測定するための少なくとも一つの検出器をさらに含む分析システム。

20

【請求項 73】

少なくとも一つの励起光源と、  
請求項 1 ~ 71 のいずれか記載のキットと、  
センサプラットフォーム上の一以上の計測区域（d）から発せられる光を検出するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一以上のルミネセンスを測定するための分析システム。

【請求項 74】

励起光が、エピルミネーション又はトランスイルミネーション配置で計測区域に照射される、請求項 73 記載の分析システム。

30

【請求項 75】

ルミネセンス光の検出が、格子構造（c）又は（c'）によって外結合されたルミネセンス光が検出器によっても集光されるような方法で実施される、請求項 73 又は請求項 74 記載の分析システム。

【請求項 76】

少なくとも一つの光源から発せられる励起光が本質的に平行であり、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される格子構造（c）に照射される、請求項 72 ~ 75 のいずれか記載の分析システム。

40

【請求項 77】

少なくとも一つの光源からの励起光が拡大光学部品によって本質的に平行な光束に拡大され、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される大きな寸法の格子構造（c）に照射される、請求項 73 ~ 76 のいずれか記載の分析システム。

【請求項 78】

請求項 1 ~ 71 のいずれか記載のキット及び / 又は請求項 72 ~ 77 のいずれか記載の分析システムを使用する多種の分析対象物の同時定性測定及び / 又は定量測定の方法であって、前記分析対象物に関して分析される一以上の液体試料を、前記キットの一部としてのセンサプラットフォームの計測区域と接触させ、前記計測区域で利用可能な励起光強さを

50



局所分解的な方法で参照し、場合によっては、前記試料と接触させた計測区域から層（a）の近場で生成され、前記計測区域に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素に対する一以上の分析対象物の結合から、又は前記分析対象物と前記固定化された認識要素との相互作用から生じる一以上のルミネセンスを較正する方法。

【請求項 79】

励起光が、格子構造（c）によって計測区域に向けて光学的に透明な層（a）に内結合される、請求項 78 記載の方法。

【請求項 80】

センサプラットフォームが、格子構造（c）によって層（a）に内結合されかつ層（a）中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層（a）の均一な非変調領域を含む、請求項 78～79 のいずれか記載の方法。 10

【請求項 81】

（第一）等方的に発せられるルミネセンス、又は（第二）光学的に透明な層（a）に内結合されかつ結合格子（c）によって外結合されるルミネセンス、又は両部分（第一及び第二）を含むルミネセンスを同時に計測する、請求項 78～80 のいずれか記載の方法。

【請求項 82】

前記ルミネセンスの生成のため、励起されることができ、300nm～1100nmの波長で発光する発光染料又は発光ナノ粒子をルミネセンス標識として使用する、請求項 78～81 のいずれか記載の方法。

【請求項 83】

ルミネセンス標識を、分析対象物に結合させるか、競合検定では、分析対象物類似体に結合させるか、多工程検定では、固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つに結合させるか、又は生物学的又は生化学的又は合成認識要素に結合させる、請求項 82 記載の方法。 20

【請求項 84】

第一のルミネセンス標識と同様な又は異なる励起波長の二番目以降のルミネセンス標識と、同様な又は異なる発光波長と、を使用する、請求項 82～83 のいずれか記載の方法。

【請求項 85】

二番目以降のルミネセンス標識を、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起させることができ、他の波長で発光させることができる、請求項 84 記載の方法。 30

【請求項 86】

塗布される発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、又は部分的にしか重複しない、請求項 84 記載の方法。

【請求項 87】

供与体として作用する第一の発光染料から受容体として作用する第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用する、請求項 84～85 のいずれか記載の方法。

【請求項 88】

ルミネセンスの一以上の測定及び／又は励起波長における光信号の測定を偏光選択的に実施し、好ましくは、一以上のルミネセンスを、励起光の偏光とは異なる偏光で計測する、請求項 78～87 のいずれか記載の方法。 40

【請求項 89】

一以上のルミネセンスの測定の他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定する、請求項 78～88 のいずれか記載の方法。

【請求項 90】

種々の計測区域上の種々の分析対象物の検出のための別個の計測区域に固定化された認識要素の密度を、共通のアレイでの種々の分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択する、請求項 78～89 のいずれか記載の方法。 50

## 【請求項 9 1】

計測区域のアレイを、分析対象物測定のための一以上の計測区域と、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び／又は塗布される種々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置する、請求項 7 8 ~ 9 0 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 9 2】

一以上のアレイが、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域のセグメントを含む、請求項 7 8 ~ 9 1 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 9 3】

同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられ、関連した固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する、請求項 7 8 ~ 9 2 のいずれか記載の方法。 10

## 【請求項 9 4】

アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で、共通の群の種々の分析対象物、たとえば種々のサイトカインを、固定化された種々の抗サイトカイン抗体へのその結合によって同時に測定する、請求項 7 8 ~ 9 3 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 9 5】

種々の群の種々の分析対象物、たとえば疾病の治療のための医薬品及び／又はそれらの代謝産物及び／又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカタンパク質」を、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で同時に測定する、請求項 7 8 ~ 9 4 のいずれか記載の方法。 20

## 【請求項 9 6】

二以上の同一の計測区域を、セグメント又はアレイ内での各分析対象物の測定のために又は物理的もしくは化学的参照のために設ける、請求項 7 8 ~ 9 5 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 9 7】

前記同一の計測区域を、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置する、請求項 9 6 記載の方法。

## 【請求項 9 8】

前記同一の計測区域を、計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布させる、請求項 9 6 記載の方法。 30

## 【請求項 9 9】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 7 8 ~ 9 8 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 1 0 0】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 7 8 ~ 9 9 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 1 0 1】

局所分解参照のための励起波長を、一以上の分析対象物の検出のための又は参照もしくは校正のための検定の間、ルミネセンスが可能でありかつ被着される分子が、前記波長で吸収を有しないか、又はできるだけ低い吸収しか示さないような方法で選択する、請求項 1 0 0 記載の方法。 40

## 【請求項 1 0 2】

センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を、計測区域から発せられるルミネセンスの集光の場合と同じ光路を使用して実施する、請求項 9 9 ~ 1 0 1 のいずれか記載の方法。

## 【請求項 1 0 3】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームからルミネセンス波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項 7 8 ~ 1 0 2 のいづ 50

れか記載の方法。

【請求項 104】

センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が 100  $\mu\text{m}$  未満、好ましくは 20  $\mu\text{m}$  未満である、請求項 78 ~ 103 のいずれか記載の方法。

【請求項 105】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照を、「ルミネセンスマーカスポット」によって、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されていた分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施する、請求項 78 ~ 104 のいずれか記載の方法。

【請求項 106】

「ルミネセンスマーカスポット」を、センサプラットフォーム全体に及ぶネットスクリーンとして設ける、請求項 105 記載の方法。

【請求項 107】

ルミネセンス標識された分子の密度を、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択する、請求項 105 ~ 106 のいずれか記載の方法。

【請求項 108】

「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度が、アレイ内で均一であり、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一である、請求項 105 ~ 107 のいずれか記載の方法。

【請求項 109】

光学システムの調節の間にたとえば「光漂白」によって生じる「ルミネセンスマーカスポット」からの信号の減少を最小限にする、請求項 105 ~ 108 のいずれか記載の方法。

【請求項 110】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、多数の局所分解参照信号の平均の測定を含む、請求項 78 ~ 109 のいずれか記載の方法。

【請求項 111】

一以上の試料を、前記試料中で測定される分析対象物を測定するための種々のトレーサ試薬の混合物でプレインキュベートしたのち、これらの混合物を単一の供給工程で対応する専用アレイと接触させる、請求項 78 ~ 110 のいずれか記載の方法。

【請求項 112】

トレーサ試薬、たとえばサンドイッチ免疫分析における二次トレーサ抗体及び／又はルミネセンス標識ならびに場合によってはさらなるルミネセンス標識されたトレーサ試薬の濃度を、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、すなわち、共通のアレイにおける種々の分析対象物の測定により、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線が光電子システムの調節なしで記録することができるような方法で選択する、請求項 78 ~ 111 のいずれか記載の方法。

【請求項 113】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層（a）の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、測定される前記分析対象物の既知の濃度を有する一以上の較正溶液を、分析される一以上の試料が同じ又は異なる供給工程で塗布されるセンサプラットフォーム上で、同じ又は他の計測区域又は計測区域のセグメント又は計測区域のアレイに塗布することを含む、請求項 78 ~ 112 のいずれか記載の方法。

【請求項 114】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層（a）の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、センサプラットフォームの一以上の専用計測区域での分析のために、場合によっては既知の濃度のさらなる分析対象物を、分析される一以上の試料に添加することを含む、請求項 78 ~ 113 のい

10

20

30

40

50

ずれか記載の方法。

【請求項 1 1 5】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層 (a) の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、未知の試料及び対照試料を塗布したのちのルミネセンス強さの比較、たとえば、「野生型」DNA 試料及び「突然変異 DNA」試料を塗布したのちの比較を含む、請求項 7 8 ~ 1 1 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 1 6】

未知の試料及び対照試料を異なるアレイに塗布する、請求項 1 1 5 記載の方法。

【請求項 1 1 7】

未知の試料及び対照試料を同じアレイに順に塗布する、請求項 1 1 5 記載の方法。

【請求項 1 1 8】

未知の試料と対照試料とを混合したのち、その混合物をセンサプラットフォームの一以上のアレイに塗布する、請求項 1 1 5 記載の方法。

【請求項 1 1 9】

未知の試料及び対照試料で測定される分析対象物の検出を、未知の試料及び対照試料のための異なる励起及び / 又はルミネセンス波長を有するルミネセンス標識を使用して実施する、請求項 1 1 5 ~ 1 1 8 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 0】

種々の群の分析対象物の測定を、異なる励起及び / 又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して実施する、請求項 7 8 ~ 1 1 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 1】

たとえば、共通の群の分析対象物、たとえばサイトカインの間の交差反応性を測定するため、異なる励起及び / 又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して測定を実施する、請求項 7 8 ~ 1 1 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 2】

異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域を、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けておく、請求項 7 8 ~ 1 1 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 3】

分析対象物の較正曲線を、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに単一の較正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との結合を示す信号の濃度依存性が既知である、請求項 1 2 2 記載の方法。

【請求項 1 2 4】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層 (a) の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、本質的に一定の濃度の一連の試料中の一以上の分析対象物の存在によって生じるルミネセンス強さの測定を含む、請求項 7 8 ~ 1 2 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 5】

抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジントグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA もしくは RNA スtrand、DNA もしくは RNA 類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の一以上の分析対象物の同時又は順次の定量測定又は定性測定のための、請求項 7 8 ~ 1 2 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 2 6】

試験される試料が、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄又は光学的に濁った液体又は組織流体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、又は、生物学的組織部分又は細胞培養物もしくは細胞抽

10

20

30

40

50

出物から採取されるものである、請求項 78 ~ 125 のいずれか記載の方法。

【請求項 127】

薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、特に DNA 及び RNA 分析学のための分析対象物の定性及び定量分析、毒性発生研究ならびに遺伝子及びタンパク質発現プロファイルの決定ならびに医薬品研究開発、ヒト及び獣医診断学、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、症候性及び前症候性植物診断学、医薬品開発における患者層別化及び治療薬選択、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、請求項 1 ~ 71 のいずれか記載のキット及び / 又は請求項 72 ~ 77 のいずれか記載の分析システム及び / 又は請求項 78 ~ 126 のいずれか記載の方法の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、多種の分析対象物の同時定性及び定量のためのキットの種々の実施態様に関する。本発明はまた、本発明によるキットに基づく分析システム及びそれを使用して実施される一以上の分析対象物の測定の方法ならびにその使用に関する。

【0002】

多種の分析対象物の測定のためには、現在、種々の分析対象物の測定をいわゆるマイクロタイタプレートの別個の試料区画又は「ウェル」の中で実施するような方法が主に使用されている。もっとも一般的なものは、通常は約 8 cm × 12 cm のフットプリント上で 8 × 12 ウェルのピッチ（行及び列としての幾何学配列）を有し、単一のウェルを充填するのに約 100 マイクロリットルの量を必要とするプレートである。しかし、多くの用途にとって、できるだけ少量の試料しか使用せずに単一の試料区画の中でいくつかの分析対象物を同時に測定することが望ましいであろう。

20

【0003】

米国特許第 5,747,274 号では、少なくとも 3 種の梗塞マーカのいくつかの測定によって心筋梗塞を早期認識するための計測構造及び方法が記載されている。これらのマーカの測定は、個々の試料区画中で又は共通の試料区画中で実施することができ、後者の場合の開示によると、単一の（共通の）試料区画が連続流路として設けられ、この一つの境界がたとえば膜によって形成され、この膜に 3 種の異なるマーカに対する抗体が固定化される。しかし、このタイプのいくつかの試料区画又は流路を共通の支持体上に配置するという示唆はない。さらに、計測区域のサイズに関して幾何学的情報がない。

30

【0004】

WO 84/01031、米国特許第 5,807,755 号、米国特許第 5,837,551 号及び米国特許第 5,432,099 号には、分析対象物に特異的な認識要素を、部分的に 1 mm<sup>2</sup> を有意に下回る小さな「スポット」の形で、固体支持体に固定化することが提案されている。この固定化形状の目的は、存在する分析対象物分子の小さな部分だけと結合することにより、インキュベーション時間だけに依存し、試料の絶対量には本質的に依存しない（連続流が存在しない）方法で分析対象物の濃度の測定を実施できることである。関連する例で開示された計測構造は、従来のマイクロタイタプレートにおける蛍光計測による測定に基づく。また、それに関して、蛍光標識された 3 種までの異なる抗体のスポットが共通のマイクロタイタプレートウェルで計測される構造が記載されている。これらの特許明細書における理論的論証に従うと、スポットサイズの最小化が望ましいであろう。しかし、バックグラウンド信号から区別される最小信号高さがスポットサイズの下限を設定するであろう。

40

【0005】

近年、より低い検出限界を達成するため、分析対象物の測定が、光学導波路中を誘導される光に関連する減衰フィールドとの相互作用に基づく多くの計測構造であって、分析対象物分子の特異的認識及び結合のための生化学的又は生物学的認識要素が導波路の表面に固

50

定化されている多くの計測構造が開発された。

【0006】

光波が、光学的により希薄な媒体、すなわちより低い屈折率の媒体によって包囲された平面薄膜導波路に結合すると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。このような構造では、電磁エネルギーの一部が低屈折率媒体に浸透する。この一部がエバネッセント（減衰）フィールドと呼ばれる。減衰フィールドの強さは、導波層そのものの厚さと、導波層の屈折率及びそれを包囲する媒体の屈折率との比と、に非常に大きく依存する。薄い導波路の場合、すなわち、誘導される光の波長と同じ層厚さ又はそれよりも小さい層厚さの場合、誘導される光の別個のモードを区別することができる。このような方法の利点として、分析対象物との相互作用は、隣接媒体中への減衰フィールドの浸透深さ（約100ナノメートル程度）に限られ、（バルク）媒体の深さからの干渉信号をおおむね避けることができる。最初に提案されたこのタイプの計測構造は、約100マイクロメートルから数ミリメートルまでの厚さを有し、高マルチモードで自立性の単層導波路、たとえば透明なプラスチック又はガラスのファイバ又はプレートに基づくものであった。

10

【0007】

感度を改善すると同時に大量生産で製造しやすくするために、平面薄膜導波路が提案されている。もっとも簡単なケースでは、平面薄膜導波路は、支持材料（基板）と、導波層と、スーパストレート（及び分析する試料）との三層システムからなり、導波層が最高の屈折率を有している。さらなる中間層が平面導波路の動作をさらに改善することができる。

20

【0008】

励起光を平面導波路に内結合する方法がいくつか公知である。もっとも初期に使用された方法は、エアギャップによる反射を減らすため、一般には液体がプリズムと導波路との間に導入される、前面結合又はプリズム結合に基づくものであった。これら二つの方法は、主に、比較的大きな層厚さの導波路、すなわち、特に自立性の導波路について、及び屈折率が2よりも有意に小さい導波路について適している。しかし、高い屈折率の非常に薄い導波層に励起光を内結合させるためには、結合格子の使用が、有意には、より洗練された方法である。

【0009】

本出願では、「ルミネセンス」とは、光学的又は光学的以外の励起ののち、たとえば電氣的又は化学的又は生化学的又は熱的な励起ののちの、紫外線から赤外線までの範囲の光子の自発的放出をいう。たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセンス、エレクトロルミネセンス、特に蛍光及びリン光が共通に「ルミネセンス」の下で含まれる。

30

【0010】

より低い検出限界を達成するためには、より高い信号生成の選択性のため、有効屈折率の変化に基づく方法（たとえば格子カプラセンサ又は表面プラズモン共鳴に基づく方法）よりもルミネセンスベースの方法が適当であると思われる。

【0011】

この構造では、ルミネセンス励起は、より低い屈折率の媒体への減衰フィールドの浸透深さに、すなわち、媒体への浸透深さが約100ナノメートル程度であるとき、導波区域に近接する区域に限られる。この原理は減衰ルミネセンス励起と呼ばれている。

40

【0012】

近年、透明な支持材上のわずか100ナノメートルほどの薄い導波膜に基づく屈折率の高い薄膜導波路により、感度を大幅に高めることができた。たとえばWO95/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜中に結合する方法が記載されている。センサプラットフォームの表面を、分析対象物を含有する試料と接触させ、減衰フィールドの浸透深さ内に位置し、ルミネセンスが可能な物質から等方的に発せられるルミネセンスを、適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラによって計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち、導波路中に逆結合した部分を、格子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。こ

50

の方法は、たとえばW O 9 5 / 3 3 1 9 8に記載されている。

【 0 0 1 3 】

現在の技術水準として特に明細書W O 9 5 / 3 3 1 9 7及びW O 9 5 / 3 3 1 9 8に記載されている、減衰的に励起されるルミネセンスを検出する方法すべての欠点は、センサプラットフォームの、均質な膜として形成された導波層上で常に一つの試料しか分析することができないことである。同じセンサプラットフォーム上でさらなる計測を実施するためには、退屈な洗浄又は清浄工程が絶え間なく求められる。これは、初めの計測の分析対象物とは異なる分析対象物を測定しなければならない場合、特に当てはまる。免疫分析の場合、これは一般に、センサプラットフォームの固定化層をまるごと交換しなければならないか、全く新たなセンサプラットフォームを使用しなければならないことを意味する。したがって、多種の分析対象物の特に同時測定を実施することはできない。

10

【 0 0 1 4 】

たとえば、明細書W O 9 6 / 3 5 9 4 0には、本質的に単モードの平面無機導波路を用いて同時又は順次にルミネセンススペースの多数の計測を独占的に実施するため、励起光が別々に投射される少なくとも二つの別個の導波区域が一つのセンサプラットフォーム上に設けられる構造（アレイ）が提案されている。しかし、センサプラットフォームを別個の導波区域に分割することから生じる欠点は、共通のセンサプラットフォーム上の別個の導波領域における別個の計測区域のための比較的大きな空間を必要とすることであり、この理由のため、ここでもまた、比較的低密度の種々の計測区域（又はいわゆる「フィーチャ」）しか達成することができない。

20

【 0 0 1 5 】

本発明の本質による「局所的（又は横方向もしくは空間的）に分けられた計測区域」又は「別個の計測区域」なる言い回しの使用は、本発明の後の部分でさらに正確に定義する。

【 0 0 1 6 】

W O 9 8 / 2 2 7 9 9には、平面導波路の減衰フィールドで励起されるルミネセンスを測定するための計測構造の試料区画の設計のための多数の他の構造の他に、公知のマイクロタイタプレートの形を有する構造も提案されている。しかし、単一の試料区画内に固定化された種々の認識要素への結合による多種の分析対象物の測定は、この開示でも扱われていない。

【 0 0 1 7 】

米国特許第5,525,466号及び第5,738,992号には、自立型マルチモード導波路、好ましくは光ファイバタイプ導波路の減衰フィールドにおける蛍光励起に基づく光学センサが記載されている。励起光の内結合とマルチモード導波路に逆結合された蛍光の外結合とは、遠位端内結合及び外結合によって実施される。このようなマルチモード導波路の作動原理により、それによって検出される分析対象物測定のための蛍光信号が、試料と相互作用する全面の単一の積分値として得られる。主に信号の正規化のため、たとえば、信号に影響を及ぼす表面欠陥を考慮に入れるため、測定される分析対象物の特異的認識及び結合のための生化学的又は生物学的又は合成認識要素の他に、蛍光参照化合物がセンサ表面に同時に固定化される。しかし、基本的なセンサ原理により、局所的に分解されないが単一の積分計測値に影響する正規化が可能である。結果として、種々の分析対象物の測定は、異なる励起波長を有する標識を使用するか、前に結合した分析対象物を除去したのち順に計測することによってしか実施することができない。上記理由のため、これらの構造は、前記の参照法とともに、多種の分析対象物の同時測定に適しているとは言い難いか、適しているとは思えない。

30

40

【 0 0 1 8 】

米国特許第5,631,170号及び欧州特許出願093,613には、特に光学導波路の減衰フィールドにおける蛍光励起に基づくセンサのための種々の参照方法が論じられている。欧州特許出願093,613には、「計測区域」に隣接する領域で参照する方法が記載されている。特に、この開示では、センサプラットフォーム上の同じ領域からの参照及び（分析対象物）計測信号を使用する必要性が強調されている。可能な実施態様として

50

、動力的（時間分解）計測が挙げられている。理由は、分析対象物結合の動力学は、物理的な導波路パラメータ及び局所的に信号に影響する可能性のある欠陥に依存しないからである。しかし、動力的方法の欠点として、外部パラメータの依存、たとえば個々の試料の温度及び粘度への依存が記載されている。米国特許第5,631,170号には、分析対象物濃度から独立した単一の参照信号を生成し、共に固定化されたフルオロフォアによる参照が記載されている。分析対象物結合のための特異的認識要素及び参照のための共に固定化されたフルオロフォアは、センサプラットフォーム上に統計学的混合物として設けられることが好ましい。さらには、同時較正の方法が、「毛細管充填装置」(CFD)の例で、(たとえば競合免疫分析で)試料に加えて既知の量の分析対象物がCFDの局所領域に塗布される、たとえばこれらの加えられる既知の量の分析対象物をこの目的に専用の試薬区画(たとえばセンサ表面から反対側に位置する)からの試料の塗布によって溶解させることによって塗布される用途として提示されている。

10

#### 【0019】

国際特許出願WO97/35181には、導波路中に形成された「ウェル」の中に(すなわち、前記導波路の表面に)種々の認識要素を有するパッチを被着させ、それらを、一以上の分析対象物を含有する試料溶液と接触させる、一以上の分析対象物の同時測定の方法が記載されている。較正のためには、並行して、所定の分析対象物濃度の溶液を、同様なパッチを有するさらなるウェルに塗布する。一例として、多種の分析対象物の並行測定のためには、常に、種々のウェルごとに異なる別個のパッチ及び認識要素を有する3個のウェル(高い分析対象物濃度の較正溶液及び低い分析対象物濃度の較正溶液ならびに試料溶液の計測のため)が提示される。局所分解参照の示唆はない。

20

#### 【0020】

Analytical Chemistry Vol. 71(1999) 4344-4352には、窒化ケイ素導波路上の多分析対象物免疫分析が提示されている。種々の生物学的認識要素を有する3個の通路状の認識領域(計測区域)で3種までの分析対象物の同時測定が記載されている。分析対象物及びトレサ抗体が、混合物として、三つの計測区域を覆う試料セルに加えられる。バックグラウンドは常に、分析対象物を含まない専用溶液によって事前に決定される。この開示に基づくと、種々の計測区域に関してバックグラウンド測定が局所分解的に実施されるのか、積分的に実施されるのかが明らかではない。較正曲線の生成のためには、センサプラットフォームは再生されないため、常に新たなセンサプラットフォーム上で多数の個々の計測を実施しなければならない。センサプラットフォーム上のごく少数の計測区域及び検定設計からの生じるプロセスに直面すると、種々のセンサプラットフォームを使用するとき方法の精度が低下し、方法の期間が大幅に増すため、これは欠点と見なさざるを得ない。

30

#### 【0021】

また、Analytical Chemistry Vol. 71(1999) 3846-3852には、3種の異なる分析対象物の同時測定のための多分析対象物免疫分析が提示されている。Bacillus globigii、MS2バクテリオファージ及びブドウ球菌エンテロトキシンBが、群バクテリア、ウイルス及びタンパク質の分析対象物の例として使用され、これらの分析対象物に対する抗体が、(自立性マルチモード)導波路として作用するガラスプレート上で常に二つの平行な行(通路)に固定化されている。この開示の続きに記載された多分析対象物検定の過程で、固定化された認識要素の行に対して垂直な流路を有するフローセルがガラスプレート上に配置される。洗浄溶液(緩衝剤)、一以上の分析対象物を含有する試料、洗浄溶液(緩衝剤)、トレサ抗体(個々に又はカクテル混合物として)及び洗浄溶液(緩衝剤)の順次添加によってサンドイッチ免疫分析が実施される。計測区域に隣接して計測したバックグラウンド信号を除去することにより、計測した局所蛍光強さを修正する。同じくこの論文には、励起光強さの局所差を考慮に入れるという示唆はない。また、この構造は、多種の分析対象物の同時測定のための一連の計測を必要な較正とともに実施することを許さないが、そのような目的のために、いくつかの異なるセンサプラットフォームの使用、又は特に免疫分析の場合には限られた程

40

50



度にしか可能ではない、プラットフォーム上で中間再生をしながら計測を順次繰り返し実施することのいずれかを要する。

【0022】

B i o t e c h n i q u e s 27(1999) 778-788には、マイクロアレイに基づくE L I S A s (酵素結合免疫吸収検定)を開発するために、標準マイクロタイタプレート(約8cm×12cm)のフットプリント上で、それぞれが1列36個で4列のスポット(すなわち、ウェル1個あたり全部で144個)を有する96ウェルの構造が提示されている。6×6個の計測区域のうち、位置づけるためと、蛍光「アルカリホスファターゼ基質」(E L F (登録商標))の添加による検定の酵素的検出工程のために塗布される試薬の効能の制御のためと、に常に1行及び1列が「ビオチニル化B S A マーカ」専用

10

【0023】

概して、多種(すなわち3種以上)の分析対象物の速やかな同時高感度測定のための以下の課題、すなわち

一つのセンサプラットフォーム上での多種の分析対象物のピコモル範囲の検出限界での同時測定、

流体工学に対する要件を最小限にするための、できるだけ簡単な検定プロトコル(たとえば、いくつかのトレーサ分子で測定される多種の分析対象物を含有する試料の混合物の塗布)、

20

励起光強さの局所差を考慮に入れるための局所分解参照、

場合によっては、同じセンサプラットフォーム上での同時較正計測の実施に対する共通の解決法がこれまで提供されていないことが注目されなければならない。

【0024】

本発明の主題は、多種の分析対象物の同時定性測定及び/又は定量測定のためのキットであって、

少なくとも一つの励起波長で透明な層(a)を、少なくとも前記励起波長で同じく透明である、層(a)よりも低い屈折率の層(b)の上に有し、かつ、前記励起光を層(a)に内結合するための、前記層(a)中で変調される少なくとも一つの格子構造(c)を有する光学薄膜導波路を含むセンサプラットフォームと、

30

前記分析対象物の特異的認識及び/又は結合のための、及び/又は前記分析対象物との特異的相互作用のための、別個の計測区域(d)に直接又は層(a)上の付着促進層を介して固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の少なくとも一つのアレイと、

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段と、場合によっては、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として、層(a)の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正のための手段と、を含み、

前記分析対象物に関して分析される液体試料が、前記センサプラットフォーム上の前記計測区域と直接又はさらなる試薬との混合ののち接触させられるキットである。

40

【0025】

前記課題は、本発明によるキットによって解決することができる。特に、驚くことに、本発明によるキットを使用することにより、個々の分析対象物の測定のための個々の検定の対応する数で、試料中の多種の分析対象物の同時測定の同様に高い感度及び再現性を達成することができることがわかった。

【0026】

本発明の本質では、液体試料中の一又は多種の分析対象物の認識のため、空間的に分けられた計測区域(d)が、その上に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素によって占有される区域によって画定される。これらの区域は、いかなる形状、たとえばドット、円、矩形、三角形、楕円又は線の形を有することもできる。

50

## 【 0 0 2 7 】

属性「光学的透明性」の下では、この属性を特徴とする材料は、少なくとも、一以上のルミネセンスの励起に使用される一又はいくつかの励起波長で、本質的に透明であると、ひいては吸収を示さないと理解される。

## 【 0 0 2 8 】

光学的に透明な層 ( a ) の所与の層厚さに関して、本発明の構造の感度が高ければ高いほど層 ( a ) の屈折率と隣接媒体の屈折率との差が増大する、すなわち、層 ( a ) の屈折率が高まる。第一の光学的に透明な層 ( a ) の屈折率は 1 . 8 よりも高いことが好ましい。

## 【 0 0 2 9 】

層 ( a ) 性質に対するもう一つの重要な要件は、前記層中を誘導される光の伝播損失が可能な限り低いことである。第一の光学的に透明な層 ( a ) は、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$  又は  $ZrO_2$  の群の材料、特に好ましくは  $TiO_2$  又は  $Nb_2O_5$  又は  $Ta_2O_5$  の群の材料を含む。そのような材料のいくつかの組み合わせを使用することもできる。 10

## 【 0 0 3 0 】

層 ( a ) の所与の材料及び所与の屈折率に関して、層厚さが下限値よりも大きい限り、層厚さが小さければ小さいほど感度は高くなる。下限値は、層厚さが、誘導される光の波長に依存する値よりも低下すると、光誘導の停止によって決まり、また、非常に薄い層の場合、層厚さの減少とともに伝播損失が増大することによって決まる。層 ( a ) の厚さとその屈折率との積が、層 ( a ) 中に結合される励起光の励起波長の  $1 / 10 \sim 1$ 、好ましくは  $1 / 3 \sim 2 / 3$  であるならば、それは有利である。 20

## 【 0 0 3 1 】

光学的に透明な層 ( b ) は、低い吸収及び蛍光を特徴とすべきであり、理想的には、吸収及び蛍光を示さないべきである。さらには、表面粗さは低いべきである。理由は、層 ( b ) の表面粗さは、被着方法に依存して多少なりとも顕著な程度に、導波層として意図される被着後の層 ( a ) の表面粗さに影響するからである。層 ( a ) の界面における表面粗さの増大は、誘導光の散乱損失の増大につながり、それは望ましくない。これらの要求は多種の材料によって満たされる。第二の光学的に透明な層 ( b ) の材料は、ケイ酸塩、たとえばガラスもしくは石英、又はポリカーボネート、ポリイミド、アクリレート、特にポリメチルメタクリレートもしくはポリスチロールによって形成される群の透明な熱可塑性もしくは金型成形性プラスチックを含むことが好ましい。 30

## 【 0 0 3 2 】

層 ( a ) 中で変調される格子構造 ( c ) が、 $200\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$  の周期と  $3\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ 、好ましくは  $10\text{ nm} \sim 50\text{ nm}$  の変調深さとを有することが好ましい。それに関して、第一の光学的に透明な層 ( a ) の変調深さと厚さとの比は 0 . 4 以下であることが好ましい。

## 【 0 0 3 3 】

格子構造は、種々の幾何学形状に設けることができる。格子構造 ( c ) は、いかなるプロファイル、たとえば矩形、三角形又は半円形のプロファイルのレリーフ格子又は本質的に平坦な光学的に透明な層 ( a ) で屈折率の周期変調を有する位相もしくは容積格子であることもできる。 40

## 【 0 0 3 4 】

構造の一つの実施態様に関しては、格子構造 ( c ) は、均一な周期の回折格子であることが好ましい。

## 【 0 0 3 5 】

しかし、特定の用途、たとえば異なる波長の励起光を同時に内結合する場合、格子構造 ( c ) が多回折格子であるならば、それは有利であることができる。

## 【 0 0 3 6 】

特定の実施態様の場合、格子構造 ( c ) が、光学的に透明な層 ( a ) に内結合される励起光の伝播方向に対して垂直又は平行に、横方向に変化する周期数を有することが好ましい 50

。

【0037】

多くの実施態様の場合、センサプラットフォームは、格子構造(c)によって層(a)に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層(a)の均一な非変調領域を含むことが好ましい。

【0038】

一般に、格子構造(c)は、計測区域(d)への励起光の内結合、及び/又は層(a)中に逆結合されるルミネセンス光の外結合に使用することができる。

【0039】

したがって、一般的な実施態様として、センサプラットフォームは、同様な又は異なる周期の多数の格子構造(c)を、場合によっては、層(a)の隣接する均一な非変調領域とともに、共通の連続基板上に含む。

【0040】

本発明によるキットを使用する検定用途の場合、多数の計測区域がその上に位置するアレイとして有する層(a)の非変調領域が、層(a)中を誘導される内結合された光の伝播方向に隣接している格子構造(c)によって適当な励起光を内結合することが一般に有利である。計測区域の隣接するさらなるアレイを有するもう一つの格子構造が、第一の格子構造と計測区域の第一のアレイとに隣接して誘導光の伝播方向に設けられるなどするならば、それは有利である。層(a)中を誘導される光は、非変調領域を通過したのち、常に再び外結合される。誘導される光の伝播方向に対して垂直な方向に(すなわち、格子線に対して平行に)、計測区域のさらなるアレイが設けられる。したがって、誘導される励起光を外結合するための専用の格子構造(c)が、計測区域の各アレイの後に、内結合される励起光の伝播方向に設けられ、内結合される励起光の伝播方向に対して垂直に、異なるアレイの個々の格子構造を設けることができるか、又は、これらの格子構造がセンサプラットフォーム全体にかけてこの方向(内結合される励起光の伝播方向に対して垂直)に延びることができることが好ましい。これは、センサプラットフォームの層(a)中を誘導される励起光の伝播方向で後続するアレイのための内結合格子が、前記伝播方向で先行するアレイの内結合格子で内結合された励起光の外結合格子として使用されることを意味する。

【0041】

特定の用途、たとえば、異なる励起波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用する場合、格子構造が、異なる波長の励起光を内結合するために異なる周期数の二以上の格子構造を重畳したものであり、格子線が互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重畳された格子構造の場合では、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直であるならば、それは有利である。

【0042】

変調された格子構造をその中に有する区分と、隣接する非変調区分とへのセンサプラットフォームの分割は、実施に際して、二つの連続格子構造の間の計測区域の単一のアレイに要する面積(前記アレイ専用の少なくとも一つの格子構造を含む)を、格子構造の製造のためと適した励起光束の内結合のためとの現在の技術能力に直面する $0.1\text{ mm}^2 \sim 1\text{ m}^2$ 程度である一定の最小値未満に減らすことができないことを意味する。したがって、格子構造(c)又は層(a)中でいくつかの格子構造を重畳したものが、本質的にセンサプラットフォームの全領域にわたって変調されるならば、それは、多数の小面積アレイが望まれる構造に特に有利である。

【0043】

本発明の特別な実施態様の場合、光学システムにおける調節の簡素化のため及び/又は分析システムの一部としての試料区画への接続のための光学的又は機械的に認識可能なマークが、センサプラットフォーム上に設けられることが好ましい。

【0044】

層(b)の自己蛍光を排除することができないならば、特に、ポリカーボネートのような

プラスチックを含むならば、又は層 ( a ) における光誘導に対する層 ( b ) の表面粗さの影響を減らすため、中間層が層 ( a ) と ( b ) との間に被着されるならば、それは有利であることができる。したがって、層 ( a ) よりも低い屈折率を有しかつ層 ( a ) に接する、厚さ 5 nm ~ 1 0 0 0 0 nm、好ましくは 1 0 nm ~ 1 0 0 0 nm のさらなる光学的に透明な層 ( b ) が、光学的に透明な層 ( a ) と ( b ) との間に位置することが、本発明の構造のもう一つの実施態様に特徴的である。

#### 【 0 0 4 5 】

生物学的又は生化学的又は合成認識要素のもっとも簡単な固定化方法は、たとえば認識要素とベースプレートとの間の疎水性相互作用による物理的吸着にある。しかし、これらの相互作用の程度は、媒体の組成とその物理化学的性質、たとえば極性及びイオン強度とによって強く影響されることがある。特に、多工程検定で異なる試薬を順次に添加する場合、表面への認識要素の付着は、吸着固定化しただけでは不十分であることが多い。本発明によるキットの好ましい実施態様では、付着は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素の固定化のための、ベースプレートへの付着促進層 ( f ) の被着によって改善される。特に、固定化される生物学的又は生化学的認識要素の場合、付着促進層は、また、これらの認識要素の自然な生物学的又は生化学的環境における結合能力に比較して「生適合性」を改善する、すなわち、認識要素の結合能力を保存し、変性を避けるのに貢献することができる。付着促進層 ( f ) は、厚さ 2 0 0 nm 未満、好ましくは 2 0 nm 未満であることが好ましい。付着促進層を形成するためには、多くの材料を使用することができる。制限なしに、付着促進層 ( f ) は、シラン、エポキシド、官能化された帯電の又は極性のポリマー及び「自己組織化パッシブ又は官能化単分子又は二分子層」を含む群からの一以上の化合物を含むことが好ましい。

10

20

#### 【 0 0 4 6 】

本発明のキットの重要な態様は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素が別個の ( 横方向に分けられた ) 計測区域 ( d ) に固定化されることである。これらの別個の計測区域は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素をセンサプラットフォーム上に空間選択的に被着させることによって形成することができる。被着には多くの方法を使用することができる。一般性の制限なしに、生物学的又は生化学的又は合成認識要素は、「インクジェットスポッティングと、ピン、ペンもしくは毛管による機械的スポッティングと、「マイクロコンタクトプリント」と、生物学的又は生化学的又は合成認識要素を平行の又は交差したマイクロチャネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルに暴露することによって計測区域と流体接触させることと光化学的又は光リソグラフィー固定化方法と、を含む方法の群からの一以上の方法によってセンサプラットフォームに被着させる。

30

#### 【 0 0 4 7 】

前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素としては、核酸 (たとえば DNA、RNA、オリゴヌクレオチド) 及び核酸類似体 (たとえば PNA)、モノクロナールもしくはポリクロナール抗体、ペプチド、酵素、アプタマー、合成ペプチド構造、可溶性の膜結合タンパク質及び膜から単離したタンパク質、たとえば受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジntag成分」及びそれらの錯形成相手、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などを含む群からの成分が被着される。また、完全な細胞、細胞成分、細胞膜又はそれらの断片を生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着させることを意図する。

40

#### 【 0 0 4 8 】

本発明のキットのさらなる特別な実施態様は、異なる計測区域上の異なる分析対象物を検出するための別個の計測区域に固定化された認識要素の密度が、共通のアレイでの異なる分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになる、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択されることを特徴とする。

#### 【 0 0 4 9 】

いくつかの用途では、計測区域のアレイが、分析対象物測定のための一以上の分析区域と

50

、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び／又は塗布される種々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置されていることが好ましい。それに関して、一以上のアレイは、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域をセグメントを含むことができる。しかし、セグメントはまた、互いに異なる認識要素を有するいくつかの別個の計測区域を含むことができる。

【0050】

本発明のキットの一つの可能な実施態様には、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、共通の群の分析対象物の測定のために、たとえば固定化された抗サイトカイン抗体を使用して種々のサイトカインの測定するために設けられることが特徴的である。同様な方法で、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイをいわゆる「マーカタンパク質」の全セットの同時測定に使用することができる。これは、たとえば、体内で細胞内的又は細胞外的に起こることができ、たとえば、特定の疾病、たとえば変性疾患、ある種のガン又は自己免疫疾患によって生じ、それらを示唆する高い濃度で明らかである。

10

【0051】

分析対象物の測定のための、固定化される認識要素は、通常、前記分析対象物に対してできるだけ高い特異性及び結合親和力を示し、かつ、前記分析対象物と（生）化学的に類似しているかもしれない他の分析対象物に対してできるだけ低い交差反応性を有するような認識要素である。特定の用途、たとえば免疫分析学における低分子量化合物の測定又は核酸分析学における単点突然変異の検出の場合には、（生）化学的に大部分の類似化合物との交差反応をほとんど避けることができない。そのような用途では、同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられかつ関連した固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する本発明のキットの実施態様が有利であることができる。それに関して、認識要素が、異なる、ただし（生）化学的にいくらか類似した分析対象物に対するそれらの親和力が認識要素ごとに異なる特徴的な方法で変化するような方法で選択されるならば、それは好都合である。そして、指紋と同様な方法で、一つの分析対象物に関して異なる認識要素を有する異なる計測区域からの信号の総計から分析対象物の正体を決定することができる。

20

【0052】

もう一つの実施態様は、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、異なる群の分析対象物の測定のために、たとえば疾病の治療のための医薬品及び／又はそれらの代謝産物及び／又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカタンパク質」の測定のために設けられることを特徴とする。

30

【0053】

これは、上記「マーカタンパク質」の全セットの濃度ならびに疾病治療のために投与された薬物とそれらの代謝産物との濃度を一回の計測で測定することを可能にする。可能な組み合わせの多様性により、たとえば医薬品開発の促進又は最適な薬物治療を決定するための患者層別化の促進に大きな潜在性がある。

【0054】

特定の用途の場合、たとえば、共通のセンサプラットフォーム上の多数のアレイからの結果の再現性の様子が高い優先順位を有する用途の場合、二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び／又は計測区域のセグメントの同様な幾何学配列を有するならば、それは有利である。

40

【0055】

他の用途の場合、たとえば共通のセンサプラットフォーム上で同様な構造を複製することによって起こりうるので、結果に対する体系的誤差の影響を最小限にすることが重要である。たとえば、そのような用途の場合、二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び／又は計測区域のセグメントの異なる幾何学配列を有するならば、それは有利であることができる。

【0056】

50

共通のセンサプラットフォーム上に多数を再び設けることができる別個のアレイ中に多数の計測区域を有する本発明のキットは、比較的少量の試料溶液、試薬及び場合によっては校正溶液を一つの同じプラットフォームで使用するにより、本質的に同一の条件の下で同様な計測の多くのタイプの再現又は多数の複製を実施する可能性をもたらす。したがって、たとえば、一回の計測で統計的データを生成することができる。従来の方法ならば、多数回の個々の計測を要し、これに応じて、合計の計測時間はより長くなり、試料及び試薬の消費はより多量になるであろう。二以上の同一の計測区域が、各分析対象物の測定のために、又はセグメントもしくはアレイ内での物理的もしくは化学的参照のために、設けられることが好ましい。それに関して、前記同一の計測区域は、たとえば、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置することができる。参照の態様は、センサプラットフォームの物理的又は化学的パラメータ、たとえば励起光強さの局所差（以下を参照）ならびに試料によって誘発される影響、たとえばそのpH、イオン強度、屈折率、温度などに関連することができる。

10

**【0057】**

他方、他の用途では、前記同一の計測区域が、計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布しているならば、それは有利であることができる。

**【0058】**

一般に、固定化された認識要素は、測定される分析対象物をできるだけ高い特異性で認識し、それと結合するような方法で選択される。しかし、通常は、特に計測区域に固定化された認識要素の間に空の場所がまだあるならば、ベースプレートの表面上の分析対象物分子の非特異的吸着が起こることを予想しなければならない。したがって、横方向に分けられた計測区域の間の領域が、分析対象物又はそれらのトレーサ化合物、すなわち、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物、好ましくは、たとえば、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナル、測定される一又は多種の分析対象物に対して異質もしくは経験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイの場合）、洗浄剤、たとえばTween 20（登録商標）、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物（特にポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定の場合）又は帯電していないが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランによって形成される群からの化合物の非特異的結合の最小化のために、「パシベート」され、横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着されていることが好ましい。

20

30

**【0059】**

上記のように、生物学的又は生化学的又は合成認識要素の固定化の前に付着促進層がセンサプラットフォームに被着される本発明によるキットのこのような実施態様は、大部分とはいえないにしても多くの用途で有利である。それに関して、分析対象物又はそれらのトレーサ化合物の最小化のための横方向に分けられた計測区域の間の領域のパシベーションの機能が、さらなる化合物の被着なしに、センサプラットフォームへの前記付着促進層の被着によって満たされるような実施態様が好ましい。

**【0060】**

本発明のキットは、非常に多数の個々の計測区域を含むことができる。100,000個までの計測区域が二次元配列で設けられかつ単一の計測区域が0.001mm<sup>2</sup> ~ 6mm<sup>2</sup>の面積を有することが好ましい。

40

**【0061】**

本発明のさらなる主題は、生成された計測区域を上の有し光学的に透明な層（a）の上のセンサプラットフォームの上面が、さらなるボディと、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ボディとの間に、互いに対して流体的に封止される一以上の試料区画を生成するための一以上の空間的凹み（空洞）が形成されるような方法で組み合わせられ、前記試料区画が、一以上の計測区域又は計測区域のセグメントもしくはアレイをそれぞれ含む本発明のキットの実施態様である。それに関して、センサプラットフォームと組み

50

合わされる前記ボディとは、本発明では、自立性の構造だけでなく、たとえば、キットの使用条件で、このように設けられた（この場合は通常開いた）試料区画から隣接する試料区画への液体の移動を防ぐ、場合によってはマイクロメートル単位の薄さの被着された構造化被覆をもう。

【0062】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、試料区画が、互いに対して流体的に封止されたフローセルとして設けられ、それぞれに、少なくとも一つの入口及び少なくとも一つの出口が設けられ、かつ、場合によっては、さらに、各フローセルの少なくとも一つの出口が、フローセルを出る液体を収容するように働くことができる流体的に接続された液溜めに通じていることである。

10

【0063】

それに関して、フローセルを出る液体を収容する場合によって設けられるさらなる液溜めが、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディの外壁の凹みとして設けられるならば、それは有利である。

【0064】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームとそれと組み合わされるボディとの間に空洞を生成するためにはいくつかの技術的解決方法がある。一つの可能な構造では、生成されるフローセルのアレイのピッチ（行及び／又は列として幾何学配列）を有する三次元構造が、センサプラットフォーム上にベースプレートとして形成される。ベースプレート上のこれらの構造は、たとえば、互いに隣接するフローセルの間に壁又は壁の一部、たとえばソケットを形成することができ、フローセルは、ベースプレートと適切に形成されたボディとの組み合わせによって形成される。フローセルのアレイの生成のためには、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームとそれと組み合わされるボディとの間の空洞を生成するために、センサプラットフォームに凹みが設けられる。

20

【0065】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、凹みが、ベースプレートとそれと組み合わされるボディとの間に空洞を生成するため、前記ボディに設けられることである。

【0066】

フローセルのアレイを生成するためにベースプレートと組み合わされるボディは、単一の工作物からなることができる。別の実施態様では、ベースプレートと組み合わされるボディは、いくつかの部品から形成され、前記ボディの組み合わせ部品は、好ましくは、不可逆的に組み合わせられるユニットを形成する。

30

【0067】

ベースプレートと組み合わされるボディは、前記ボディとベースプレートとの組み合わせを容易にする補助手段を含むことが好ましい。

【0068】

配列は、多数、すなわち2～2000個、好ましくは2～400個、もっとも好ましくは2～100個の別個の試料区画を含むことがさらに好ましい。

【0069】

たとえば、試料及び／又は試薬の塗布がディスペンサによって直接実施される用途の場合、試料区画は、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディの、計測区域に対して反対側で開口していることが好ましい。

40

【0070】

試料区画のピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）は、標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致することが好ましい。

【0071】

本発明のキットの一部としての試料区画の配列のもう一つの実施態様に特徴的であることは、それがさらなるカバートップ、たとえば箔、膜又はカバープレートによって閉止されることである。

【0072】

50

フローセルの容量は、ベース区域のサイズ及び凹みの深さの変化により、大きな範囲内で異なることができ、その結果、各試料区画の内部容積は、通常  $0.1 \mu\text{l} \sim 1000 \mu\text{l}$ 、好ましくは  $1 \mu\text{l} \sim 20 \mu\text{l}$  である。それに関して、種々のフローセルの容積は、同様であることもできるし異なることもできる。

#### 【0073】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ベースプレートと組み合わされるボディとの間の空洞の深さは、 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $20 \sim 200 \mu\text{m}$  であることが好ましい。アレイの空洞の大きさは、均一であることもできるし多様であることもでき、ベース区域は、いかなる形状、好ましくは矩形もしくは多角形又は他の幾何学形状を有することもできる。ベース区域の横方向寸法もまた、広い範囲で異なることができ、通常、ベースプレートと前記ベースプレートと組み合わされるボディとの間の空洞のベース面積は、 $0.1 \text{mm}^2 \sim 200 \text{mm}^2$ 、好ましくは  $1 \text{mm}^2 \sim 100 \text{mm}^2$  である。

10

#### 【0074】

ベース区域の角は丸められていることが好ましい。丸められた角は、流動プロフィールに好ましい方法で影響し、形成されるかもしれない気泡の除去を容易にし、その形成を防ぐ。

#### 【0075】

試料又は試薬を多数の試料区画に同時に供給するためには、手動又は自動化試薬投入のためのマルチチャネルピペットを使用することができ、本発明の試料区画の配列の入口が同じピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）で配置されているならば、個々のピペットは一又は二次元のアレイに配置される。したがって、好ましくは、配列のピッチは、標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチに合致する。それに関して、約  $9 \text{mm}$  の（中心間）距離で  $8 \times 12$  個のウェルの配列が工業規格として確立されている。たとえば同じ距離で配置された  $3$ 、 $6$ 、 $12$ 、 $24$  及び  $48$  個のウェルを有する小さなアレイがこの規格に準拠する。フローセルの小さなアレイとして設けられた本発明の試料区画のいくつかの配列は、また、前記フローセルの個々の入口が約  $9 \text{mm}$  の距離の整数倍で位置するような方法で組み合わせることができる。

20

#### 【0076】

最近、同じフットプリント上に  $96$  の整数倍のウェルとして  $384$  個及び  $1536$  個のウェルを有し、ウェル間距離をそれに応じて減らしたプレートが使用されており、これらもまた、標準マイクロタイタプレートと呼ばれる。本発明の配列の試料区画のピッチを、各フローセルの入口及び出口を含め、これらの規格に適合させることにより、工業的に確立され、利用されている多くの実験室用ピペット及びロボットを試料供給に使用することができる。

30

#### 【0077】

本発明によるキットの一部としての試料区画の配列の外寸がこれらの標準マイクロタイタプレートのフットプリントに合致することが好ましい。

#### 【0078】

本発明によるさらなる特別な実施態様は、上記性質を有する本発明のキットの一部として、たとえば  $1$  列に  $2 \sim 8$  個の試料区画又はたとえば  $1$  行に  $2 \sim 12$  個の試料区画があり、試料区画そのものが、標準マイクロタイタプレートの寸法を有するキャリア（「メタキャリア」）と、フローセルの入口のピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）が標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致するような方法で組み合わされている配列である。

40

#### 【0079】

試料区画の配列とメタキャリアとの接続は、たとえば、 $1$  回しか使用しないためのものであるならば、接着によって又は接着せずに正確な嵌め合いによって実施することができ、多数回使用するためのものであるならば、掛け止め又は挿入によって実施することができる。メタキャリアの材料は、たとえば、成形性、金型成形性又はロール練り性のプラスチック、金属、ケイ酸塩、たとえばガラス、石英又はセラミックスを含む群から選択するこ

50



とができる。

【0080】

フローセルの入口のピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）が標準マイクロタイタプレート（ウェル）のピッチ（幾何学配列）、すなわち、9 mm（96ウェルプレートに対応）又は4.5 mm（384ウェルプレートに対応、上記を参照）又は2.25 mm（1536ウェルプレートに対応、上記を参照）の整数倍に合致するような方法で、このような試料区画のいくつかの行又は列は、また、単一のメタキャリアと、組み合わせることができる。

【0081】

当然、本発明による試料区画の配列は、別のピッチ（幾何学形状）で配置することもできる。 10

【0082】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディ及び場合によってはさらなるカバートップの材料は、実際に意図する用途の要件を満たさなければならない。具体的な用途に依存して、これらの要件は、たとえば、酸性又は塩基性の媒体、塩、水溶液の一部としてのアルコールもしくは洗浄剤又はホルムアミドとの接触による化学的及び物理的安定性や、温度変動（たとえば - 30 ~ 100 ）時の安定性や、ベースプレート及びそれと組み合わされるボディの可能な限り同様な熱膨張率や、光学特性（たとえば非蛍光性、反射率）や、機械加工性などに関連する。ベースプレートと組み合わされるボディ及び場合によってはさらなるカバートップの材料は、メタキャリアの材料と同じ 20 群から選択されることが好ましい。それに関して、上述した部品（ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディ、カバートップ）は、均一な材料で構成されることもできるし、異なる材料を層状に又は横方向に接続させた、材料が互いに置き換わることができる混合物又は組成物を含むこともできる。

【0083】

本発明の非常に重要な側面は、利用可能な励起光強さの局所分解参照の可能性に関する。エピイルミネーション又はトランスミッションイルミネーションの配置で励起光を照射する従来の構造の場合、照射区域の利用可能な励起光強さは、主として、励起光束の断面の励起光密度によって決まる。この場合、照射面（たとえばガラスプレート）の性質の局所差は二次的影響しかもたない。しかし、本発明のキットの場合、センサプラットフォーム 30 の物理的パラメータの局所差、たとえば励起光を光学的に透明な層（a）に内結合するための格子構造（c）の内結合効率又は光学的に透明な層（a）中を誘導されるモードの伝播損失の局所差が主に重要である。

【0084】

したがって、本発明のさらなる重要な主題は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含むような本発明のキットの実施態様である。それに関して、伝播損失は、局所的に誘導される光の強さに本質的に比例すると考えられる。伝播損失は、主に、光学的に透明な層（a）及び下に位置する基板（光学的に透明な層（b））の表面粗さ及び均一性によって決まる。特に、このタイプの参照は、局所的に利用可能な励起光強さの 40 、その伝播方向における局所的低下が、たとえば、励起波長で吸収性である、層（a）の減衰フィールドにおける分子の高い局所濃度によって生じる励起光の吸収によって起こるならば、この低下を考慮に入れることができる。

【0085】

しかし、誘導光の強さに対する発された散乱光の比例性の仮定は、層（a）と接触した局所的巨視的散乱中心により放出（外結合が起こる場所では有効ではない。これらの場所では、放出される散乱光は、誘導光と比較して正比例よりも有意に強くなる。したがって、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームからルミネセンスで発せられる光の像の同時又は順次生成を含むならば、それはまた 50 有利である。当然、両方の方法を組み合わせることもできる。参照像の生成により、計測

信号の収集に対する結像光学部品の種々の影響が除かれる。したがって、計測区域から発せられるルミネセンスの集光の場合と同じ光路を使用して、センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を実施することが好ましい。

【0086】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、「光化学漂白」の影響を避けるため又は最小限にするため、一以上の分析対象物の測定のための又は参照もしくは校正のための方法の過程で塗布される分子が吸収を示さない又はできるだけ低い吸収しか示さない励起波長が選択されることが好ましい。

10

【0087】

さらには、センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満、好ましくは $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満であることが好ましい。また、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、計測区域の間の又は計測区域に隣接したところでの実際のルミネセンス波長のバックグラウンド信号の測定を含むことが好ましい。

【0088】

本発明によるキットの特徴的な好ましい実施態様は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、「ルミネセンスマーカスポット」、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されいる分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施されることである。それに関して、「ルミネセンスマーカスポット」が、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けられることが好ましい。

20

【0089】

以下さらに詳細に記載するように、好ましくは局所分解検出器、たとえばCCDカメラ（CCD：電荷結合素子）が信号検出に使用される。これらの検出器は、その感光素子（ピクセル）が、局所光信号の検出のための下限しきい値を画定する一定の（主に温度依存性の）バックグラウンド信号を出力し、高い光強さの検出のための最大能力（飽和）を有することが特徴的である。所与の露光時間に関して、信号検出のダイナミックレンジは、これらのしきい値の差によって定められる。分析対象物検出のためのルミネセンス信号及び参照信号の両方がこのダイナミックレンジ内にあるべきである。それに関して、両方の信号が同程度の大きさであるならば、すなわち、たとえばそれらが一以上の10単位よりも大きく異ならないならば、それは有利である。本発明によると、たとえば、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度が、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択されるならば、これを達成することができる。

30

【0090】

好ましくは、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度は、アレイ内で類似し、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一である。

40

【0091】

このタイプの参照の場合、局所分解度は、主として、アレイ内及びセンサプラットフォーム全体の「ルミネセンスマーカスポット」の密度によって決まる。好ましくは、種々の「ルミネセンスマーカスポット」の間の距離及び/又はサイズは、別個の計測区域からのルミネセンス強さの測定の所望の局所分解度に適合される。

【0092】

センサプラットフォーム上の各アレイが、少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」を含むことが好ましい。少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」が分析対象物測定のための計測区域の各セグメントに隣接して設けられるならば、それは有利である。

50

## 【0093】

アレイ内及びセンサプラットフォーム上に「ルミネセンスマーカスポット」を幾何学的に配置するための多様な可能性がある。可能な配列は、たとえば、各アレイが、前記アレイの領域で内結合される励起光の二次元分布の測定のために、内結合される励起光の伝播方向に対して平行及び／又は垂直な「ルミネセンスマーカスポット」の連続した行及び／又は列を含むことである。

## 【0094】

これは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、多数の局所分解参照信号の平均値の測定を含むことを意図する。

## 【0095】

本発明によるキットのさらなる特徴は、一以上のルミネセンス信号の存在で計測されたルミネセンス信号を校正するための手段に関する。可能な実施態様として、一以上の分析対象物の結合又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近場で生成される一以上のルミネセンスを校正するための前記手段は、測定される分析対象物の既知の濃度を有する校正溶液を所定数のアレイに塗布することを含む。たとえば、センサプラットフォームの8～12個のアレイを校正のために専用にあてることができる。

## 【0096】

本発明によるキットは、一つのセンサプラットフォーム上の多数の計測区域に基づく、これまで記載されていないもう一つの機会を可能にする。この機会として、異なる既知の濃度の多数の校正溶液を一以上のアレイに塗布する必要はなく、校正のための専用の計測区域における既知であるが異なる局所濃度で分析対象物検出のために塗布される生物学的又は生化学的又は合成認識要素を固定化することが可能である。異なる分析対象物濃度の異なる校正溶液を、認識要素を有するアレイに単一の均一な固定化密度で塗布することによって校正曲線を生成することが可能であるだけでなく、主として、単一の校正溶液を、異なる固定化密度で設けられた認識要素を有するアレイに塗布することにより、分析対象物とその認識要素との間の結合活性及び多数の結合イベントを表すそのような標準曲線を生成することが可能である。この簡素化されたタイプの校正にとって、分析対象物とその認識要素との間の結合挙動が周知であり、分析対象物に専用の計測区域における最低固定化密度と最高固定化密度との差、すなわち違いが、分析対象物検出のための検定に当てられる全適用範囲を校正がカバーするのに十分な大きさであることが重要である。

## 【0097】

したがって、本発明のさらなる主題は、異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域が、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けられているキットである。それに関して、分析対象物の校正曲線が、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに一つの校正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との間の結合を示す信号の濃度依存性が既知であることが特に好ましい。

## 【0098】

本発明によるキットのもう一つの実施態様では、異なるサイズ(直径)のいくつかの計測区域が常に一以上の分析対象物の測定に当てられる。この実施態様は、予想される信号強さ(専用計測区域の面積単位あたりの信号の高さ)が前記計測区域の面積の減少とともに増大するという公知の事実により、前記分析対象物を測定するためのダイナミックレンジの増大を可能にする。

## 【0099】

本発明によると、一以上のアレイが、校正のために、既知の濃度で試料に加えられる分析対象物の測定に専用の一以上の計測区域を含むもう一つの実施態様がある。この実施態様は、分析分離法におけるいわゆる標準の添加と匹敵しうる。また、この実施態様に関して、一つ又はすべての試料に加えられる分析対象物と固定化された認識要素との間の結合挙

10

20

30

40

50

動が周知であることが必要条件である。そして、たとえば、この既知のさらなる分析対象物の場合の結合信号の差（たとえば、試料の物理的性質、たとえば粘度などの違いから生じる）から、測定される未知の濃度の分析対象物の結合挙動の対応する差に対して外挿することができる。この実施態様は、前記の組み合わせに特に適している。

【0100】

本発明のさらなる主題は、本発明によるキットの所与の実施態様を有する分析システムであって、格子導波路構造（センサプラットフォーム）から発せられる一以上のルミネセンスを測定するための少なくとも一つの検出器をさらに含む分析システムである。

【0101】

特に、本発明の主題は、  
少なくとも一つの励起光源と、  
本発明のキットと、  
センサプラットフォーム上の一以上の計測区域（d）から発せられる光を検出するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一以上のルミネセンスを測定するための分析システムである。

10

【0102】

本発明の分析システムの一つの可能な実施態様に特徴的であることは、励起光が、エピルミネーション又はトランスイルミネーション配置で計測区域に照射されることである。

【0103】

ルミネセンス光の検出は、格子構造（c）又は（c'）によって外結合されたルミネセンス光が検出器によっても集光されるような方法で実施されることが好ましい。

20

【0104】

本発明の分析システムの好ましい実施態様に特徴的であることは、少なくとも一つの光源から発せられる励起光が本質的に平行であり、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される格子構造（c）に照射されることである。

【0105】

一つの可能性として、少なくとも一つの光源からの励起光が拡大光学部品によって本質的に平行な光束に拡大され、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される大きな寸法の格子構造（c）に照射される。

【0106】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、少なくとも一つの光源からの励起光が、一つの回折光学要素により、又は光源がいくつかある場合には多数の回折光学要素、好ましくはDammann格子又は屈折光学要素、好ましくはマイクロレンズアレイにより、共通の光源から発せられるできるだけ同じ強さの多数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、層（a）に内結合するための共振角で格子構造（c）に照射されることである。

30

【0107】

ある改良に特徴的であることは、同じ又は異なる発光波長の二以上の光源を励起光源として使用することである。

【0108】

たとえば、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管によって形成される群の少なくとも一つの局所分解検出器を信号検出に使用することが好ましい。

40

【0109】

本発明は、透過した光束を成形するためのレンズもしくはレンズシステムや、光束を偏向させるための、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラーと、光束を偏向させるための、場合によってはスペクトル分離するためのプリズムや、光束の部分をスペクトル選択的に偏向させるためのダイクロイックミラーや、透過した光の強さを調整するためのニュートラルフィルタや、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータや、励起もしくはルミネセンス光の別個の偏光

50

方向を選択するための偏光選択要素、を含む群の光学部品が、一以上の励起光源とセンサプラットフォームとの間及び／又は前記センサプラットフォームと一以上の検出器との間に位置することを特徴とする分析システムを含む。

【0110】

光励起は連続的に実施することができる。しかし、励起光を1 f s e c ~ 1 0 m i nの間隔のパルスで投射することが好ましい。

【0111】

分析システムの進んだ実施態様に特徴的であることは、計測区域からの発光が時間分解的に計測されることである。

【0112】

本発明による分析システムの一つの実施態様では、発光の投射及び検出がすべての計測区域で同時に実施される。もう一つの実施態様に特徴的であることは、励起光の投射と一以上の計測区域からの発光の検出とが一以上の試料区画で順に実施されることである。また、励起光の順次投射と一以上の計測区域からの発光の検出とを単一の試料区画内で数回実施することが可能である。

【0113】

それに関して、ミラー、偏向プリズム及びダイクロイックミラーを含む群の可動光学部品を使用して励起及び検出を順に実施することが好ましい。順に実施される励起及び検出は、また、励起光及びルミネセンス光を一以上の計測区域に向かう方向及びそれから離れる方向に順に誘導するための、可動ガラス繊維（光ファイバ）ガラスファイバ束（光ファイバ束）を使用して実施することができる。

【0114】

種々の計測区域からのルミネセンスを順に検出する場合、局所分解検出器は必須ではないが、そのような場合、簡単な（局所分解ではない）検出器、たとえば従来の光電子増倍管又はフォトダイオードもしくはアバランシェフォトダイオードを使用することができる。

【0115】

特に、本質的に焦点及び角度保存型のスキャナを使用して励起及び検出を順に実施することが好ましい。

【0116】

また、順次の励起及び検出を伴う分析システムのもう一つの実施態様に特徴的であることは、上述した実施態様のいずれかの配列が順次の励起及び検出の過程の間で動かされることである。

【0117】

また、本発明による分析システムは、一以上の試料をセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段をさらに含むことが好ましい。

【0118】

一つの可能な実施態様として、試料区画は、試料又は試薬の場所を指定した供給又は除去のための開口を光学的に透明な層（a）とは反対の側に有する。

【0119】

分析システムの改良に特徴的であることは、一以上の分析対象物を測定する方法の過程で湿潤されかつ計測区域と接触させられる試薬のための区画が設けられることである。特別な実施態様に特徴的であることは、前記試薬のためのこれらさらなる区画が、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディに設けられることである。

【0120】

本発明のさらなる主題は、上記実施態様のいずれかのキット及び／又は本発明の分析システムを使用する多種の分析対象物の同時定性測定及び／又は定量測定の方法であって、前記分析対象物に関して分析される一以上の液体試料を、前記キットの一部としてのセンサプラットフォームの計測区域と接触させ、前記計測区域で利用可能な励起光強さを局所分解的な方法で参照し、場合によっては、前記試料と接触させた計測区域から層（a）の近場で生成され、前記計測区域に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素に対

10

20

30

40

50

する一以上の分析対象物の結合から、又は前記分析対象物と前記固定化された認識要素との相互作用から生じる一以上のルミネセンスを校正する方法である。

【0121】

励起光は、格子構造(c)によって計測区域に向けて光学的に透明な層(a)に内結合されることが好ましい。

【0122】

本発明の方法の一つの可能な実施態様に特徴的であることは、センサプラットフォームが、格子構造(c)によって層に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層(a)の均一な非変調領域を含むことである。

【0123】

(第一)等方的に発せられるルミネセンス、又は(第二)光学的に透明な層(a)に内結合されかつ結合格子(c)によって外結合されるルミネセンス、又は両部分(第一及び第二)を含むルミネセンスを同時に計測することが好ましい。

【0124】

また、前記ルミネセンスの生成のため、励起されることができ、300nm~1100nmの波長で発光する発光染料又は発光ナノ粒子をルミネセンス標識として使用することが本発明の一部である。

【0125】

ルミネセンス標識を、分析対象物に結合させるか、競合検定では、分析対象物類似体に結合させるか、多工程検定では、固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つに結合させるか、又は生物学的又は生化学的又は合成認識要素に結合させることが好ましい。

【0126】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、第一のルミネセンス標識と同様な又は異なる励起波長の二番目以降のルミネセンス標識と、同様な又は異なる発光波長と、を使用することである。

【0127】

それに関して、二番目以降のルミネセンス標識を、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起させることができ、他の波長で発光させることができることが好ましい。

【0128】

他の用途の場合、塗布される発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、又は部分的にしか重複しないならば、それは有利である。

【0129】

方法のもう一つの変形に特徴的であることは、供与体として作用する第一の発光染料から受容体として作用する第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用することである。

【0130】

方法のもう一つの実施態様に関して、一以上のルミネセンスの消衰の程度を測定することが特徴的である。

【0131】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、一以上のルミネセンスの測定の他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定することである。

【0132】

方法の改良は、ルミネセンスの一以上の測定及び/又は励起波長における光信号の測定を偏光選択的に実施することを特徴とする。

【0133】

一以上のルミネセンスを、励起光の偏光とは異なる偏光で計測することが好ましい。

【0134】

本発明の方法の好ましい実施態様にとって、種々の計測区域上の種々の分析対象物の検出のための別個の計測区域に固定化された認識要素の密度を、共通のアレイでの種々の分析

10

20

30

40

50

対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択することが特徴的である。

【0135】

方法の改良にとって特徴的であることは、計測区域のアレイを、分析対象物測定のための一以上の計測区域と、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び/又は塗布される種々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置することである。それに関して、一以上のアレイは、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域のセグメントを含むことができる。しかし、セグメントはまた、互いに異なる認識要素を有するいくつかの別個の計測区域を含むこともできる。

10

【0136】

本発明の方法のもう一つの可能な変形に特徴的であることは、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で、共通の群の種々の分析対象物、たとえば種々のサイトカインを、種々の抗サイトカイン抗体へのその結合によって同時に測定することである。

【0137】

特定の用途、たとえば免疫分析学における低分子量化合物の測定又は核酸分析学における単点突然変異の検出の場合には、(生)化学的に大部分の類似化合物との交差反応をほとんど避けることができない。そのような用途では、同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられ、関連の固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する本発明によるキットの実施態様が有利であることができる。それに関して、異なる分析対象物、ただし(生)化学的にいくらか類似した分析対象物に対するそれらの親和力が認識要素ごとに異なる特徴的な方法で変化するような方法で、認識要素が選択されるならば、それは好都合である。そして、指紋と同様な方法で、単一の分析対象物に関して異なる認識要素を有する異なる計測区域からの信号の総計から分析対象物の正体を決定することができる。

20

【0138】

もう一つの可能な変形に特徴的であることは、種々の群の種々の分析対象物、たとえば疾病の治療のための医薬品及び/又はそれらの代謝産物及び/又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカータンパク質」を、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で同時に測定することである。

30

【0139】

たとえば、再現性の側面を調査するために、セグメント又はアレイ内での各分析対象物の測定又は物理的もしくは化学的参照のために二以上の同一の計測区域を設けるならば、それは有利であることができる。それに関して、前記同一の計測区域を、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置することができる。

【0140】

他の問題に対処する場合、たとえば、励起条件の体系的局所差を調査する場合、前記同一の計測区域を計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布させるならば、それは有利であることができる。

40

【0141】

本発明の方法による一つの可能な実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、計測区域から発せられるルミネセンスの収集の場合と同じ光路を使用して、センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を実施することが好ましい。

【0142】

方法のもう一つの可能な実施態様として、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照は、センサプラットフォームからルミネセンス波長で発せられる光の像の同時又は順

50

次生成を含む。

【0143】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、局所分解参照のための励起波長が、「光化学漂白」の影響を避ける、又は最小限にすることができるように、一以上の分析対象物の検出のための又は参照もしくは校正のための検定の間で、ルミネセンスが可能でありかつ塗布される分子が、前記波長で吸収を示さない又はできるだけ低い吸収しか示さないような方法で選択されることが好ましい。

【0144】

センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が100  $\mu\text{m}$ 未満、好ましくは20  $\mu\text{m}$ 未満であることが好ましい。

【0145】

本発明の方法のさらなる主題は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照を、「ルミネセンスマーカスポット」によって、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されていた分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施することである。

【0146】

それに関して、「ルミネセンスマーカスポット」を、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けることが好ましい。

【0147】

本発明の方法の改良は、ルミネセンス標識された分子の密度を、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択することである。

【0148】

方法の好ましい実施態様に特徴的であることは、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度が、アレイ内で均一であり、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一であることである。

【0149】

ルミネセンスが可能である分子は、外部励起光による限られた数のサイクルの励起にしか暴露することができず、発されるルミネセンスによって非活性化したのち、光化学的に破壊される、すなわち、一般にはもはやルミネセンスが可能ではない別の分子に変わることは公知の事実である。このプロセスが一般に「光漂白」と呼ばれる。活性化及び非活性化の可能なサイクルの数は、特定のタイプの分子に特徴的な平均値（放射性化合物の半減期に匹敵しうる）である。本発明による方法における参照の有効性をできるだけ大きな程度に保証するため、光学システムの調節の間にたとえば「光漂白」によって生じる「ルミネセンスマーカスポット」からの信号の減少を最小限にすることが好ましい。

【0150】

また、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、多数の局所分解参照信号の平均の測定を含むことが好ましい。

【0151】

測定方法で塗布される一以上の試料及び試薬の供給は、いくつかの工程で順に実施することができる。一以上の試料を、前記試料中で測定される分析対象物を測定するための種々のトレーサ試薬の混合物でブレインキュベートしたのち、これらの混合物を単一の供給工程で対応する専用のアレイと接触させることが好ましい。

【0152】

本発明の方法の好ましい実施態様に特徴的であることは、トレーサ試薬、たとえばサンドイッチ免疫分析における二次トレーサ抗体及び/又はルミネセンス標識ならびに場合によってはさらなるルミネセンス標識されたトレーサ試薬の濃度を、ルミネセンス信号が同程

10

20

30

40

50



度の大きさになるような方法で、すなわち、共通のアレイにおける種々の分析対象物の測定により、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線が光電子システムの調節なしで記録することができるような方法で選択する。

【0153】

本発明の方法の実施態様のさらなる主題は、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、測定される前記分析対象物の既知の濃度を有する一以上の較正溶液を、分析される一以上の試料が同じ又は異なる供給工程で塗布されるセンサプラットフォーム上で同じ又は他の計測区域又は計測区域のセグメント又は計測区域のアレイに塗布することを含むことである。

10

【0154】

方法の特別な実施態様に特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、センサプラットフォームの一以上の専用計測区域での分析のために、場合によっては既知の濃度のさらなる分析対象物を、分析される一以上の試料に添加することを含むことである。

【0155】

方法のもう一つの好ましい実施態様に特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、未知の試料及び対照試料を塗布したのちのルミネセンス強さの比較、たとえば、「野生型」DNA試料及び「突然変異DNA」試料を塗布したのちの比較を含むことである。それに関して、未知の試料及び対照試料を異なるアレイに塗布することが可能である。

20

【0156】

この方法のもう一つの変形に特徴的であることは、未知の試料及び対照試料を同じアレイに順に塗布することである。一般に、この実施態様では、未知の試料の供給と対照試料の供給との間に再生工程、すなわち、第一の試料の供給ののちに形成する認識要素-分析対象物複合体を解離させ、続いて、解離した分析対象物分子を試料区画から取り出したのち、第二の試料の供給を実施する工程が必要である。同様な方法で、いくつかの試料を計測区域のアレイ上でその分析対象物に関して順に分析することができる。

30

【0157】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、未知の試料と対照試料とを混合したのち、その混合物をセンサプラットフォームの一以上のアレイに塗布することである。

【0158】

本発明の方法の改良に特徴的であることは、未知の試料及び対照試料で測定される分析対象物の検出を、未知の試料及び対照試料のための異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有するルミネセンス標識を使用して実施することである。

【0159】

たとえば、種々の群の分析対象物の測定を、異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して実施することが好ましい。

40

【0160】

いくつかの異なるルミネセンス標識の使用はまた、共通の群の異なる分析対象物の測定に有利であることができる。本発明の方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、たとえば、共通の群の分析対象物、たとえばサイトカインの間の交差反応性を測定するため、異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して測定を実施することである。

【0161】

上記のように、単一のセンサプラットフォーム上に多数の計測区域を有する本発明によるキットは、一以上のアレイ上で一以上の分析対象物を定性及び/又は定量するための簡素化されたタイプの較正の可能性を提供する。最良の場合、センサプラットフォームからの

50

信号の本発明の新規なタイプの較正のために単一の較正溶液の塗布しか要らない。したがって、本発明による方法のこの改良にとって、異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域を、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けておくことが好ましい。方法のこの改良にとって、分析対象物の較正曲線を、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物に対する生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに単一の較正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との間の結合を示す信号の濃度依存性が既知であることが特徴的である。

**【 0 1 6 2 】**

10

本発明の方法のさらなる好ましい変形にとって特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層 ( a ) の近場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、本質的に一定の濃度の一連の試料中の一以上の分析対象物の存在によって生じるルミネセンス強さの測定を含むことである。特に DNA 分析学では、たとえばいわゆる「野生型」試料と「突然変異」試料との比較のため、いわゆるハウスキーピング遺伝子が公知であり、その含量は種々の起源 ( 組織、有機体のタイプなど ) の一連の試料の中で本質的に一定である。同様に、免疫分析学では、一定の免疫グロブリンが公知であり、その濃度は、共通のタイプの有機体からの試料の間ではわずかに異なる。

**【 0 1 6 3 】**

20

本発明の一部は、抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジntag成分」、オリゴヌクレオチド、DNA もしくは RNA スtrand、DNA もしくは RNA 類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の一以上の分析対象物の同時又は順次の定量測定又は定性測定のための、上記実施態様のいずれかの方法である。

**【 0 1 6 4 】**

また、方法の可能な実施態様に特徴的であることは、試験される試料が、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄又は光学的に濁った液体又は組織流体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、又は、生物学的組織部分又は細胞培養物もしくは細胞抽出物から採取されることである。

30

**【 0 1 6 5 】**

本発明のさらなる主題は、薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、特に DNA 及び RNA 分析学のための分析対象物の定性及び定量分析、毒性発生研究ならびに遺伝子及びタンパク質発現プロファイルの決定ならびに医薬品研究開発、ヒト及び獣医診断学、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、症候性及び前症候性植物診断学、医薬品開発における患者層別化及び治療薬選択、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、本発明によるキット及び / 又は本発明の分析システム及び / 又は本発明の方法の使用である。

40

**【 0 1 6 6 】**

本発明の範囲を制限することなく、本発明を以下の例でさらに説明する。

**【 0 1 6 7 】**

適用例

例 1

分析のための一又は多数の試料中の多種のサイトカインマーカの同時定量のためのキット  
a ) 本発明によるキットの主要部品は、外寸 1 1 3 . 5 m m × 7 5 . 0 m m × 0 . 7 m m 厚さの矩形のセンサプラットフォームを、散乱光による影響を抑えるためインクで黒くした厚さ 1 1 m m のポリカーボネート ( P C ) 層と合わせたものであった。P C 層には、側

50

面の各々が7 mm×7 mmの開口した正方形の凹み（ウェル）を中心間距離9 mmで設けており、これらを、分析する量（10～100 μl）の試料を収容するための試料区画として使用した。センサプラットフォームとPC構造との組み合わせが全部で96個の試料区画を含むよう、12列×8行で凹みを一面に配置した。

#### 【0168】

センサプラットフォームの基材（光学的に透明な層（b））は、AF45ガラス（633 nmでの屈折率 $n = 1.52$ ）からなるものであった。基板中に連続面レリーフ格子（センサプラットフォームの75 mmの全長にかけて）を距離9 mm、幅0.5 mmで生成した（格子構造によってセンサプラットフォームの層（a）に内結合される励起光の伝播方向に）。これらの格子は、360 nmの周期及び12 nmの深さを有し、格子線がウェルの列に対して平行に向くものであった。光学的に透明な層（b）上の光学的に透明なTa<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の導波層（a）は、633 nmで2.11の屈折率（層厚さ150 nm）を有するものであった。被着法により、光学的に透明な層（b）の格子構造を被着層（a）の表面にほぼ1：1の実物大で転写した。

10

#### 【0169】

ポリカーボネート構造と組み合わせる前に、センサプラットフォームの表面を、湿式化学法により、まずイソプロパノールで数回、次にペルオキシジ硫酸アンモニウム2.5%を含有する濃硫酸で清浄した。

#### 【0170】

次に、モノ-オクタデシルホスフェートの1分子層（単分子層）を付着促進層として親水性導波路面に自己集合によって被着した。この表面改質が疎水性の表面（水に対する接触角約110°）を生じさせた。表面改質の方法は、文献にさらに詳細に記載されている（D. Brovelli et al., Langmuir 15 (1999) 4324-4327）。

20

#### 【0171】

インクジェットプロッタのモデルNPIC（GeSiM、ドイツGrosserkmannsdorf）を使用して、付着促進層を設けられたセンサプラットフォームの疎水面に、42個の計測区域（スポット）（各々のアレイあたり7列×6行の配列）の同一アレイ96個（12列×8行に配列）を生成した。

#### 【0172】

サイトカインの群の分析対象物として、種々のヒトインターロイキンの測定のための認識要素（認識要素：モノクロナールマウス抗体、抗hIL-2、抗hIL-4及び抗hIL-6）を、10%リン酸緩衝塩溶液（PBS、pH7.4）中300～1000 μg/mlの濃度で再構成した。次に、抗体溶液を、10%PBS（pH7.4）で、実際の抗体の対応する抗原に対する親和力によって決まる異なる程度に希釈した。単一分析対象物インターロイキン免疫分析の前に、十分な濃度（抗hIL-2抗体及び抗hIL-6で100 μg/ml、抗hIL-4抗体で50 μg/ml）を測定しておいた。このようにして、一つのアレイでの3種のインターロイキンすべての同時測定の検定で予想される信号強さが同程度の大きさになるようにした。具体例のこの見地に関して、別個の計測区域で測定される対応する分析対象物に対して種々の親和力を有する種々の認識要素の固定化密度の適切な選択により、多数の異なる分析対象物の同時測定の検定で予想される信号強さのダイナミックレンジが一つのアレイ内で同程度の大きさになることが可能である。

30

40

#### 【0173】

抗体を付着促進層に被着させたのち、それ（センサプラットフォーム）を飽和水蒸気雰囲気中で15分間インキュベートした。次に、後の測定方法でトレーサ抗体の非特異的結合を最小限にするため、センサプラットフォームの、タンパク質で覆われていない疎水性面を、0.05%Tween 20の添加混合物を含有するウシ血清アルブミン（BSA）のPBS（1 mg/ml、pH7.4）溶液で飽和させた。そして、センサプラットフォームを水洗し、窒素で乾燥させた。

#### 【0174】

50

500  $\mu\text{m}$ の中心間距離で配置されたスポットの直径は約220  $\mu\text{m}$ であった。単一のアレイの各々は、3種の異なる認識要素(hIL-2、hIL-4及びhIL-6の認識のため)ならびにCy5で蛍光標識されたウシ血清アルブミン(Cy5-BSA)を有する「ルミネセンスマーカスポット」を含んでいた。それに関して、これらの「ルミネセンスマーカスポット」のルミネセンス強さもインターロイキン検定の過程で予想される信号強さの変化のダイナミックレンジ内になるような方法で固定化密度を選択した。実例として、BSA分子1個あたりCy5分子10個の標識レートでCy5-BSAの25ピコモル溶液が固定化溶液中のCy5-BSAの最適濃度であると決定した。加えて、固定化溶液としての、蛍光標識されたBSA分子と非標識BSA分子との混合物の適用は、蛍光標識されたタンパク質しか含有しない溶液の適用よりも、「ルミネセンスマーカスポット」中の蛍光標識されたBSA分子を対応する低めのタンパク質濃度で均一に分布させることに有意に適していた。すでに述べた、10%PBS(pH7.4)中非標識BSA25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度及びCy5-BSA25 pMの含量の固定化溶液が最適であることがわかった。「ルミネセンスマーカスポット」の被着の再現性を、上記と同様にして製造したセンサプラットフォームを使用して調査し、通常の市販スキャナ(Genetic Microsystems 418 Array Scanner)を使用して計測した。それにより、常に「ルミネセンスマーカスポット」で積分してわずか3%~4%のルミネセンス強さの差を測定した。

10

#### 【0175】

種々の認識要素を、図1に示すように、1行4個で3行の同一の計測区域(スポット)に配置した。これらの行は、供給される試料あたり各個々の計測からの検定再現性に関してすでに統計的な情報を得るため、導波路中の励起光の伝播方向に対して平行に配置した。「ルミネセンスマーカスポット」は、認識要素を有するスポットの行に対して平行に、1行4個で4行のスポットに配置した。「ルミネセンスマーカスポット」は、分析対象物検出のための計測区域に隣接するところで利用可能な励起光を参照するために使用した。層(a)に内結合され、層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に対して平行な行への配列はまた、伝播方向での励起光の減衰の測定に使用した。さらには、1列7個の「ルミネセンスマーカスポット」2列をアレイの始まり及び終わりに設けた。内結合され、誘導される励起光の伝播方向に関して。これらを、内結合格子の線に対して平行な、利用可能な励起光強さの均一性の測定に使用した。

20

30

#### 【0176】

##### 例2

本発明によるキットを有する分析システム

センサプラットフォームを、格子線に対して平行及び垂直な方向への並進と、センサプラットフォームの格子線に対して平行な回転軸を中心とする回転と、を可能にするコンピュータ制御調節装置に取り付けた。励起光源として使用されるレーザの直後には、計測データを収集しないとき光路を塞ぐために使用されるシャッタを光路中に配置した。さらには、ニュートラルフィルタ又は偏光子を、この位置又はセンサプラットフォームに向かう励起光のさらなる光路中の他の位置で光路に挿入して、励起光強さを段階的又は連続的に変化させることができる。

40

#### 【0177】

632.8 nmのヘリウムネオンレーザ(Melles-Griot、05-LHP-901、1.1 mW)の励起光を円柱レンズによって一次元に拡大し、スリット型ダイアフラム(開口0.5 mm $\times$ 7 mm)に通して、ほぼ矩形の断面及びほぼ均一な断面強さの光束を生成した。それに関して、内結合条件でのTE<sub>0</sub>モードの励起のため、レーザ光の偏光をセンサプラットフォームの格子線に対して平行に調節した。励起光を、センサプラットフォームの背面から、すなわち、光学的に透明な層(b)に通して、96個の試料区画の1個の中の内結合格子に投射し、この例の条件の下、試料区画内の計測区域のアレイの内結合格子を常に正方形ウェルの左端に位置させた。光学的に透明な層(a)への最大限の内結合のため、センサプラットフォームと照射される励起光束との間の角度を、上記軸

50

を中心にした回転によって調節した。センサプラットフォームの上記パラメータの場合、空気中の内結合のための共振角は約  $2.6^\circ$  であった。

#### 【0178】

Kodak CCDチップ KAF 0401 E-1 を備えたペルチェ冷却の CCD カメラ (Ultra Pix 0401 E、Astrocam、英国 Cambridge) (動作温度  $-30^\circ$ ) を局所分解検出器として使用した。Computar タンデム型対物レンズ ( $f = 50 \text{ mm}$ 、 $1:1.3$ ) を使用して、信号収集及び CCD チップへの焦点合せを実施した。フィルタ交換機には、中心透過波長  $680 \text{ nm}$  で帯域幅  $40 \text{ nm}$  の 2 個の干渉フィルタ (Omega、バーモント州 Brattleborough) を取り付け、ニュートラルフィルタ (減衰し、散乱した励起光及び計測区域からはるかに弱めのルミネセンス光を透過させるため) 又は干渉フィルタと組み合わせたニュートラルフィルタ (計測区域から散乱した減衰励起光を透過させるため) をタンデム型対物レンズの 2 個の半分の間に配置した。励起波長での信号とルミネセンス波長での信号とを交互に計測できた。市販の像解析ソフトウェア (Image Pro Plus) を使用してデータ解析を実施した。

10

#### 【0179】

##### 例 3

本発明によるキットを使用する検出方法

測定されるインターロイキンの特異的認識のために、サンドイッチアッセイのフォーマットを選択した。

20

#### 【0180】

##### 試料調製

3 種のインターロイキン (hIL-2、hIL-4 及び hIL-6) すべてを同じ濃度 ( $0.0$ 、 $1.0$ 、 $3.0$ 、 $7.0$ 、 $15.0$ 、 $30.0$ 、 $60.0$ 、 $100.0 \text{ pg/ml}$ ) でそれぞれ含有する、定量されるインターロイキンの混合校正溶液 8 種それぞれを、BSA  $0.1\%$  及び Tween 20  $0.05\%$  を含有する PBS ( $\text{pH } 7.4$ )  $50 \mu\text{l}$  中で製造した。これらの校正溶液は、センサプラットフォーム上の対応する専用アレイに塗布することにより、3 種すべての分析対象物の校正曲線の同時生成のために専用を使用した。

#### 【0181】

次に、校正溶液ならびに分析対象物として測定される 3 種のインターロイキンを未知の濃度で含む試料を、それぞれ、3 種の二次ポリクロナールトレサ抗体の混合物 ( $0.1\%$  BSA 及び  $0.05\%$  Tween 20 を含む PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) 中、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$  ビオチニル化抗 hIL-2 抗体、 $10^{-10} \text{ M}$  ビオチニル化抗 hIL-4 抗体及び  $10^{-10} \text{ M}$  ビオチニル化抗 hIL-6 抗体) を含有する溶液  $50 \mu\text{l}$  と混合した。そして、それぞれ  $100 \mu\text{l}$  容量のこれらの混合物を、 $0.1\%$  BSA 及び  $0.05\%$  Tween 20 を含有する PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) 中 Cy5-ストレプトアビジン ( $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、Amersham-Pharmacia) の溶液と混合した。上記で報じた 3 種の異なるトレサ抗体の濃度は、抗原-二次抗体複合体の、認識要素として別個の計測区域に固定化されたそれらのモノクロナール認識抗体への特異的結合から生じる蛍光の強さの予想される変化が同程度の大きさになる、すなわち、光電子システムの調節の変更なしに対応する校正曲線を記録することができるような方法で選択した。

30

40

#### 【0182】

この具体例のこの見地において、トレサ試薬の濃度の適切な選択により、別個の計測区域に固定化された対応する認識要素への特異的結合から生じる予想される蛍光の強さが、一つの検定で同時に測定されるすべての分析対象物で同程度の大きさになる、すなわち、光電子システムの調節の変更なしに対応する校正曲線を記録することができることが実証された。

#### 【0183】

そして、製造された混合溶液を暗所で 1 時間インキュベートしたのち、インキュベートしたもの (各  $100 \mu\text{l}$ ) を試料区画に充填した。それに関して、校正溶液を、濃度を増し

50

ながら、アレイ A 1 ~ H 1 の試料区画（マイクロタイタプレートフォーマット、図 1 を参照）に充填し、未知の濃度の 3 種のインターロイキン分析対象物として含有する、分析する 88 個の試料を他の試料区画 A 2 ~ H 12 に充填した。暗所で 2 時間さらにインキュベートしたのち、アレイを計測した。

#### 【0184】

アレイの読み出し

異なるアレイの計測区域から蛍光信号を読み出すために、試料区画を上にも有し、溶液を含有するセンサプラットフォームを、分析システム内に位置する上記調節装置に取り付けた。各アレイからのルミネセンス信号を測定するため、センサプラットフォームを、計測されるアレイに専用の格子構造により、励起光の最大内結合が得られるように調節した。この調節は、励起波長のためのフィルタ交換機を配置することによって制御した。そして、計測区域（スポット）からの蛍光の強さを、ルミネセンス波長のためのフィルタ交換機の位置によって計測した。センサプラットフォームを、次の試料区画からルミネセンス信号を読み出すための次の位置へと並進させるにより、さらなる試料区画のアレイの読み出しを順に実施した。

10

#### 【0185】

データ分析及び参照

市販の像解析ソフトウェア（Image Pro Plus）を使用して像解析を実施した。それに関して、各アレイのスポットごとに積分蛍光強さを測定した。このようにして、3 種のインターロイキンに関してアレイあたり常に 4 個の蛍光強さの積分値を得たのち、これら 4 個の値から、統計のために、平均値及び標準偏差を計算した。

20

#### 【0186】

さらには、インターロイキン測定のための常に 4 個の計測区域の対応する行の前のアレイの最初の列及び後のアレイの最後の列の 2 個の Cy 5 - BSA 参照スポット（「ルミネセンスマーカスポット」）を同様な方法で解析し、平均を出した。この平均参照値を、同じ行に位置する分析対象物測定のための計測区域からのルミネセンス信号の修正に常に使用した。

#### 【0187】

相応に、同じ行のインターロイキン計測区域の前及び後の Cy 5 - BSA 参照スポットの平均値をアレイごとに測定した。次に、3 種の分析対象物それぞれに測定した合計 96 の参照値から、もう一つの平均値を計算した。そして、アレイでの分析対象物測定のための計測値の個々の修正計数を、局所参照値と前記平均値との比として決定した。この修正計数で乗じることにより、共通のセンサプラットフォーム上で利用可能な励起光強さの局所差を修正した。

30

#### 【0188】

種々のセンサプラットフォーム（本例の場合、3 種のプラットフォーム）での結果の比較のため、上記方法によって修正したルミネセンス強さを、0 pg / ml のインターロイキン濃度の場合の正規化値 1 にセットした。

#### 【0189】

一例として、インターロイキン 4 の測定で得られ、この多分析対象物の免疫分析の較正に専用である修正していない未加工データを図 2 に示す。図中、蛍光強さの積分値は hIL 4 濃度の関数として示されている。図 3 は、上記平均計算の方法によって得られた較正データを示す。

40

#### 【0190】

図 4 の連続した曲線は、これらの修正されたデータに当てはめたヒル関数を表す。塗りつぶしていない記号は、3 種の異なるセンサプラットフォームを使用して測定された修正された較正信号を表す。塗りつぶした円は、それから測定した、種々の hIL 4 濃度の平均値を表す。このように、本発明のキット及びそれに基づく測定法により、すなわち、常に単一のセンサプラットフォームで実施される完全な多分析対象物免疫分析で、各プラットフォームでの完全な較正曲線の生成により、種々のセンサプラットフォームを比較した場

50

合（図 5）でさえ、わずか 5 % ~ 20 % の信号の可変性が達成されることが驚くべき結果として得られた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

1 行 4 個で 3 行の同一の計測区域（スポット）に配置した種々の認識要素を示す図である。

【図 2】

多分析対象物の免疫分析の較正に専用である修正していない未加工データを示す図である。

【図 3】

平均計算の方法によって得られた較正データを示す図である。

【図 4】

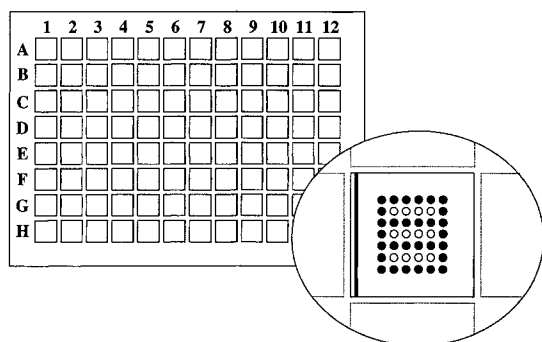
修正されたデータに当てはめたヒル関数を示す図である。

【図 5】

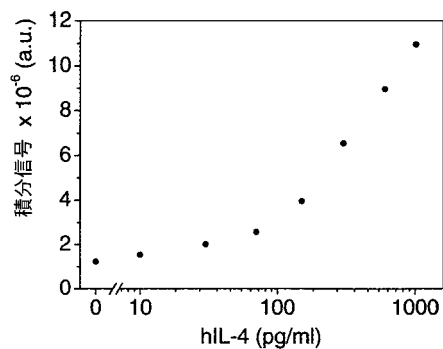
3 種の異なるセンサプラットフォームを使用して測定された修正された較正信号を示す図である。

10

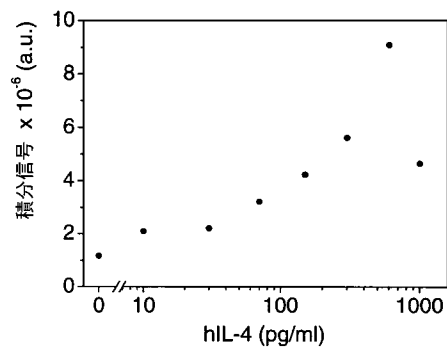
【図 1】



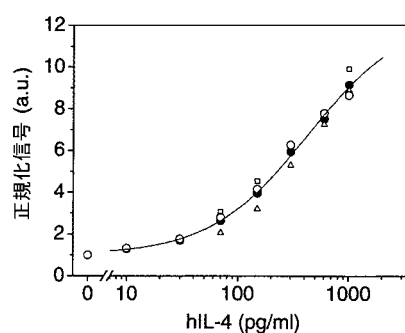
【図 3】



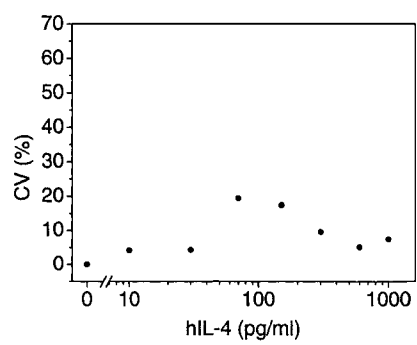
【図 2】



【図 4】



【 図 5 】





## 【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

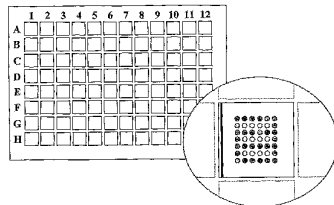
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/92870 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/00 (72) Erfinder; und  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05995 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAWLAK, Michael  
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Mai 2001 (25.05.2001) [DE/DE]; Andelsbachstrasse 5, 79275 Laufenburg (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch SCHICK, Eginhard [DE/DE]; Nordschwabener Strasse 9,  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch 79618 Rheinfelden (DE). ABEL, Andreas, P. [CH/CH];  
(30) Angaben zur Priorität: 2000 1104/00 2. Juni 2000 (02.06.2000) CH Rotbergerstrasse 16a, CH-4054 Basel (CH). DUVE-  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme NECK, Gert, L. [DE/DE]; Ezmattenweg 34, 79189 Bad  
von US); ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254, Krozingen (DE). EHRAT, Markus [CH/CH]; Im Brühl  
(74) Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG; Benken- 6, CH-4312 Magden (CH). KRESBACH, Gerhard,  
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH). M. [DE/DE]; Burghaldenweg 6, 79219 Staufen (DE).  
SCHÜRMANN-MADER, Eveline [CH/CH]; Talhübel  
1, CH-5089 Zeihen (CH). BOPP, Martin, A. [CH/CH];  
Brunnmattstrasse 11, CH-4053 Basel (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR DETERMINING A PLURALITY OF ANALYTES

(54) Bezeichnung: KIT UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG



(57) Abstract: The invention relates to various embodiments of a kit for simultaneous, qualitative and/or quantitative detection of a plurality of analytes, comprising a sensor platform consisting of a thin-layered optical wave guide with a layer (a) which is transparent at least at one excitation wavelength on a layer (b) which is also transparent at least at the same excitation wavelength, having a lower refraction index than layer (a), and at least one lattice structure (c) modulated in layer (a); in addition to at least one array of biochemical or synthetic detector elements immobilized on layer (a) and disposed in discrete measuring areas (d) either directly or by means of an adhesion promoting layer. Said detector elements are used for specific detection and/or bonding of said analytes and/or specific interaction therewith. The inventive kit also contains means for local resolution referencing of the excitation light intensity present in the measuring areas in addition to, optionally, means for calibrating at least one luminescence produced as a result of bonding between one or several analytes or as a result of the specific interaction with one or several analytes in the near field of layer (a). A liquid sample in which the analytes are to be examined is brought into contact, either directly or after mixing it with other reagents, with the measuring areas on the sensor platform. The invention also relates to analytic systems based on the inventive kit, methods which are conducted in order to detect one or several analytes and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend: eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/92870 A2

WO 01/92870 A2



(81) **Bestimmungsstaaten** (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a), mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und/oder Bindung besagter Analyten und/oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten; Vorkehrungen zur ortsauflösbaren Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls; Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer in Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen, wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird. Die Erfindung betrifft auch auf dem erfindungsgemässen Kit basierende analytische Systeme sowie damit durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

1

### Kit und Verfahren zur Multianalytbestimmung

Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten. Die Erfindung betrifft auch auf dem erfindungsgemässen Kit basierende analytische Systeme sowie damit durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

Zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten sind gegenwärtig vor allem Verfahren verbreitet, in denen in sogenannten Mikrotiterplatten der Nachweis unterschiedlicher Analyten in diskreten Probenbehältnissen oder "Wells" dieser Platten erfolgt. Am weitesten verbreitet sind dabei Platten mit einem Raster von 8 x 12 Wells auf einer Grundfläche von typischerweise ca. 8 cm x 12 cm, wobei zur Füllung eines einzelnen Wells ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern erforderlich ist. Für zahlreiche Anwendungen wäre es jedoch wünschenswert, mehrere Analyten in einem einzigen Probenbehältnis, unter Einsatz eines möglichst kleinen Probenvolumens, gleichzeitig zu bestimmen.

In der US-P 5747274 werden Messanordnungen und Verfahren zur Früherkennung eines Herzinfarkts, durch die Bestimmung mehrerer von mindestens drei Herzinfarktmarkern beschrieben, wobei die Bestimmung dieser Marker in individuellen oder in einem gemeinsamen Probenbehältnis erfolgen kann, wobei im letzteren Falle, der gegebenen Beschreibung folgend, ein einziges Probenbehältnis als ein durchgehender Flusskanal ausgebildet ist, dessen eine Begrenzungsfläche beispielsweise eine Membran bildet, auf der Antikörper für die drei verschiedenen Marker immobilisiert sind. Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine Bereitstellung von mehreren derartigen Probenbehältnissen oder Flusskanälen auf einem gemeinsamen Träger. Ausserdem werden keine geometrischen Angaben über die Grössen der Messflächen gegeben.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

2

In den WO 84/01031, US-P 5807755, US-P 5837,551 und US-P 5432,099 wird die Immobilisierung für den Analyten spezifischer Erkennungselemente in Form kleiner "Spots" mit teilweise deutlich unter  $1\text{ mm}^2$  Fläche auf festen Trägern vorgeschlagen, um durch Bindung eines nur kleinen Teils vorhandener Analytmoleküle eine nur von der Inkubationszeit abhängige, aber – in Abwesenheit eines kontinuierlichen Flusses – vom absoluten Probenvolumen im wesentlichen unabhängige Konzentrationsbestimmung des Analyten vornehmen zu können. Die in den zugehörigen Ausführungsbeispielen beschriebenen Messanordnungen beruhen auf Fluoreszenznachweisen in konventionellen Mikrotiterplatten. Dabei werden auch Anordnungen beschrieben, in denen Spots von bis zu drei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einem gemeinsamen Mikrotiterplattenwell ausgemessen werden. Den in diesen Patentschriften dargelegten theoretischen Überlegungen folgend, wäre eine Minimierung der Spotgröße wünschenswert. Limitierend wirke jedoch die minimale Signalthöhe, die vom Untergrundsignal unterschieden werden könne.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Messanordnungen entwickelt worden, in denen der Nachweis des Analyten auf dessen Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld beruht, welches mit der Lichtleitung in einem optischen Wellenleiter verbunden ist, wobei auf der Oberfläche des Wellenleiters biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung der Analytmoleküle immobilisiert sind.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen optischen Wellenleiter ein, der von optisch dünneren Medien, d.h. Medien mit niedrigerem Brechungsindex, umgeben ist, so wird sie durch Totalreflexion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der elektromagnetischen Energie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als evaneszentes oder quergedämpftes Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

3

geleiteten Lichts unterschieden werden. Derartige Verfahren haben den Vorteil, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ins angrenzende Medium, in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt ist und Störsignale aus der Tiefe des Mediums weitgehend vermieden werden können. Die ersten vorgeschlagenen derartigen Messanordnungen beruhten auf hoch multimodalen, selbsttragenden Einsichtwellenleitern, wie beispielsweise Fasern oder Plättchen aus transparentem Kunststoff oder Glas, mit Stärken von einigen hundert Mikrometern bis zu mehreren Millimetern.

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und gleichzeitig einfacheren Herstellung in Massenfabrikation wurden planare Dünnschichtwellenleiter vorgeschlagen. Ein planarer Dünnschichtwellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Trägermaterial, wellenleitende Schicht, Superstrat (bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

Es sind verschiedene Verfahren für die Einkopplung von Anregungslicht in einen planaren Wellenleiter bekannt. Die am frühesten benutzten Verfahren beruhten auf Stirnflächenkopplung oder Prismenkopplung, wobei zur Verminderung von Reflexionen infolge von Luftspalten im allgemeinen eine Flüssigkeit zwischen Prisma und Wellenleiter aufgebracht wird. Diese beiden Methoden sind vor allem in Verbindung mit Wellenleitern relativ grosser Schichtdicke, d. h. insbesondere selbsttragenden Wellenleitern, sowie bei einem Brechungsindex des Wellenleiters von deutlich unter 2 geeignet. Zur Einkopplung von Anregungslicht in sehr dünne, hochbrechende wellenleitende Schichten ist demgegenüber die Verwendung von Koppelgittern eine wesentlich elegantere Methode.

Mit dem Begriff "Lumineszenz" wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz,

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

4

Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen.

Zur Erreichung sehr tiefer Nachweisgrenzen erscheinen lumineszenzbasierende Methoden aufgrund grösserer Selektivität der Signalerzeugung besser geeignet als solche Methoden, welche auf einer Änderung des effektiven Brechungsindex beruhen (wie beispielsweise Gitterkoppler-Sensoren oder Verfahren basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz). Dabei ist die Lumineszenzanregung auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium, also auf die unmittelbare Umgebung des wellenleitenden Bereichs mit einer Eindringtiefe ins Medium in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, in Kombination mit Lumineszenzdetektion, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen, wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras, gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und der WO 95/33198, beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz mit Dünnschichtwellenleitern liegt jedoch darin, dass auf der als

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

5

homogener Film ausgebildeten Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind jedesmal aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dieses gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dieses im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als ganzes verwendet werden muss. Insbesondere können also keine gleichzeitigen Bestimmungen mehrerer Analyten durchgeführt werden.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform, relativ gross ist und daher nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messbereiche (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Die Verwendung des Begriffs "räumlich getrennter Messbereiche" oder "diskreter Messbereiche" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird im späteren Abschnitt zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung genauer definiert.

In der WO 98/22799 werden neben einer Vielzahl weiterer Vorrichtungen für die Ausgestaltung von Probenbehältnissen für Messanordnungen zur Bestimmung der im evaneszenten Feld eines planaren Wellenleiters angeregten Lumineszenz auch solche Vorrichtungen vorgeschlagen, welche der Form bekannter Mikrotiterplatten entsprechen. Die Bestimmung mehrerer Analyten durch Bindung an verschiedene innerhalb eines einzelnen Probenbehältnisse immobilisierte Erkennungselemente ist jedoch auch hier nicht vorgesehen.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

6

In der US 5525466 und US 5738992 wird ein optischer Sensor, basierend auf Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld eines selbsttragender Multimode-Wellenleiters, vorzugsweise faseroptischer Art, beschrieben. Einkopplung von Anregungslicht und Auskopplung von in den Multimode-Wellenleiter rückgekoppeltem Fluoreszenzlicht erfolgen über Stimflächenein- und -auskopplung. Das dabei detektierte Fluoreszenzsignal zum Analytnachweis ergibt sich aufgrund des Funktionsprinzips solcher Multimode-Wellenleiter als ein einziger integraler Wert für die ganze mit der Probe wechselwirkende Fläche. Vorwiegend zur Normalisierung der Signale, beispielsweise zur Berücksichtigung von signalverändernden Oberflächendefekten, sind auf der Sensoroberfläche neben den biochemischen oder biologischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und Bindung eines nachzuweisenden Analyten fluoreszente Referenzmaterialien co-immobilisiert. Aufgrund des zugrunde liegenden Sensorprinzips ist jedoch keine ortsauflöste, sondern nur eine auf den einzelnen, integralen Messwert wirkende Normalisierung möglich. Folglich kann auch der Nachweis unterschiedlicher Analyten nur mittels Verwendung von Labeln unterschiedlicher Anregungswellenlängen oder sequentiell, nach Entfernung vorangehend gebundener Analyten, erfolgen. Aus diesen Gründen erscheinen diese Anordnungen, zusammen mit dem beschriebenen Referenzierungsverfahren, für den gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten gar nicht oder nur wenig geeignet.

In der US 5631170 und in der EP-A-093613 werden verschiedene Methoden zur Referenzierung, insbesondere für Sensoren basierend auf Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld optischer Wellenleiter, diskutiert. In der EP-A-093613 wird eine Methode zur Referenzierung im Nachbargebiet zum "Messbereich" beschrieben. Insbesondere wird hierin die Notwendigkeit betont, auf einer Sensorplattform Referenz- und Meßsignale aus den gleichen Bereichen (auf dem Sensor) zu verwenden. Als eine mögliche Realisierung werden kinetische (zeitaufgelöste) Messungen genannt, da die Kinetik der Analytbindung nicht abhängig ist von den physikalischen Wellenleiterparametern und möglichen Defekten, welche sich lokal auf die Signale



WO 01/92870

PCT/EP01/05995

7

auswirken. Als nachteilig für die kinetische Methode wird jedoch deren Abhängigkeit von äusseren Parametern wie Temperatur und Viskosität der individuellen Probe benannt. In der US 5631170 wird die Referenzierung mittels co-immobilisierter Fluorophore beschrieben, welche ein von der Analytkonzentration unabhängiges Referenzsignal erzeugen. Es wird bevorzugt, dass die spezifischen Erkennungselemente zur Analytbindung und die zur Referenzierung eingesetzten co-immobilisierten Fluorophore in statistischer Mischung auf der Sensorplattform vorliegen. Weiterhin wird anhand des Ausführungsbeispiels einer "Capillary-Fill-Device" (CFD) eine Methode zur simultanen Kalibration vorgestellt, indem (beispielsweise in einem kompetitiven Assay-Format) in lokalen Zonen der CFD zusätzlich zur Probe bekannte Mengen des Analyten eingesetzt werden, beispielsweise indem sie durch Zugabe der Probe aus (beispielsweise der Sensoroberfläche gegenüberliegenden) dafür vorgesehenen Reagentienbehältnissen gelöst werden.

In der WO 97/35181 werden Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Analyten beschrieben, indem in einem im Wellenleiter ausgebildeten "Well" Patches mit unterschiedlichen Erkennungselementen aufgebracht sind, welche mit einer einen oder mehrere Analyten enthaltenden Probenlösung kontaktiert werden. Zu Kalibrationszwecken werden gleichzeitig Lösungen mit definierten Analytkonzentrationen in weitere Wells mit gleichartigen Patches gegeben. Als Beispiel werden je 3 Wells (zur Messung mit Kalibrationslösungen niedriger und hoher Analytkonzentration sowie der aktuellen Probe) mit diskreten und von Patch zu Patch verschiedenen immobilisierten Erkennungselementen zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten vorgestellt. Hinweise auf orts aufgelöste Referenzierungen werden nicht gegeben.

In Analytical Chemistry, Vol. 71 (1999), 4344 – 4352 wird ein Multianalyt-Immunoassay auf einem Silicium-Nitrid-Wellenleiter vorgestellt. Es werden bis zu drei Analyten gleichzeitig, auf drei kanalförmig ausgebildeten Erkennungsbereichen (Messbereichen) mit jeweils unterschiedlichen biologischen Erkennungselementen, beschrieben. Analyten und Tracer-Antikörper werden als Mischung in eine die drei Messfelder überdeckende Probenzelle gegeben. Der Background wird jeweils zuvor mit einer spezifisch dafür

hergestellten Lösung ohne Analyt gemessen. Aus der Beschreibung ist nicht ersichtlich, ob die Background-Bestimmung orts aufgelöst oder summarisch für die verschiedenen Messbereiche durchgeführt wird. Da eine Regenerierung der Sensorplattform nicht vorgenommen wird, müssen zur Erstellung einer Kalibrationskurve eine Vielzahl von Einzelmessungen mit immer wieder neuen Sensorplattformen durchgeführt werden. Dieses, durch die nur geringe Anzahl von Messfeldern auf einer Sensorplattform sowie durch das Assay-Design bedingte Vorgehen, ist als nachteilig anzusehen, da die Genauigkeit durch die Verwendung unterschiedlicher Sensorplattformen verringert wird und die Dauer des Verfahrens sich deutlich verlängert.

In *Analytical Chemistry*, Vol. 71 (1999), 3846 – 3852 wird ebenfalls ein Multianalyt-Assay zur gleichzeitigen Bestimmung dreier verschiedener Analyten vorgestellt. Als Beispiel gleichzeitig zu bestimmender Analyten aus den Gruppen Bakterien, Viren und Proteine werden *Bacillus globigii*, MS2-Bakteriophagen und "Staphylococcal enterotoxin B" benutzt, wobei in jeweils zwei zueinander parallelen Reihen (Kanälen) Antikörper gegen diese Analyten auf einem als (selbsttragendem Multimode-) Wellenleiter dienendem Glasplättchen immobilisiert wurden. In dem nachfolgend beschriebenen Multianalyt-Assay wird eine Flusszelle mit zu den immobilisierten Reihen von Erkennungselementen gekreuzten Fließkanälen auf das Glasplättchen aufgesetzt. Die Sandwich-Immunoassays werden unter sequentieller Zugabe von Waschlösung (Puffer), Probe mit einem oder mehreren Analyten, Waschlösung (Puffer), Tracer-Antikörper (einzeln oder als Cocktail) und Waschlösung (Puffer) durchgeführt. Die lokal gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden korrigiert mittels Subtraktion des neben den Messfeldern beobachteten Hintergrundsignals. Hinweise auf eine Berücksichtigung lokaler Variationen der Anregungslichtintensität werden auch hier nicht gegeben. Auch diese Anordnung ermöglicht jedoch nicht, eine ganze Messreihe zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten, zusammen mit den notwendigen Kalibrationen, durchzuführen, sondern erfordert dafür entweder die Verwendung mehrerer verschiedener Sensorplattformen oder repetitive, sequentielle Messungen auf einer Plattform mit zwischenzeitlicher Regenerierung, was besonders im Falle von Immunoassays in vielen Fällen nur in begrenztem Umfang möglich ist.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

9

In BioTechniques 27 (1999), 778 – 788 wird eine Anordnung von 96 Wells mit jeweils 4 Arrays aus 36 Spots (d.h. insgesamt 144 Spots pro Well) auf der Grundfläche einer Standard-Mikrotiterplatte (ca. 8 cm x 12 cm), zur Entwicklung von ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) basierend auf Mikroarrays, vorgestellt. Für Zwecke der Positionierung sowie der Kontrolle der Wirksamkeit der eingesetzten Reagentien beim enzymatischen Detektionsschritt des Assays mittels Zugabe von fluoreszentem "Alkaline phosphatase substrate" (ELP®) werden von den 6x6 Arrays jeweils eine Reihe und eine Spalte für "biotinylierte BSA-Marker" reserviert. – Diese Anordnung deutet zwar eine Möglichkeit zu einer deutlichen Erhöhung des Durchsatzes mit klassischen Assays (ELISAs) an, die demonstrierte Empfindlichkeit (13.4 ng/ml rabbit IgG) erscheint jedoch unbefriedigend.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bis jetzt keine gemeinsame Lösung der folgenden Aufgabenstellungen bereitgestellt wurde, die für einen schnellen hochempfindlichen gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von (d. h. drei oder mehr) Analyten bestehen:

- Gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyten auf einer Sensorplattform mit Nachweisgrenzen im pikomolaren Bereich
- Möglichst einfache Assay-Durchführung zur Minimierung der Anforderungen an die Fluidik (z. B. durch gleichzeitige Zugabe von Mischungen aus einer Probe mit mehreren nachzuweisenden Analyten und mehreren Tracer-Molekülen)
- Örtlich aufgelöste Referenzierung zwecks Berücksichtigung von örtlichen Variationen der Anregungslichtintensität
- Gegebenenfalls gleichzeitige Durchführung von Kalibrationsmessungen auf derselben Sensorplattform.

Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

10

- eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a),
- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls
- Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen,

wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird.

Mit dem erfindungsgemässen Kit kann die beschriebene Problemstellung gelöst werden. Überraschend wurde dabei festgestellt, dass es, unter Verwendung eines erfindungsgemässen Kits, möglich ist, in Multianalyt-Assays, zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten in einer Probe, eine ähnlich hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu erzielen wie bisher in einer entsprechenden Anzahl von Einzelassays zum Nachweis der individuellen Analyten.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte oder diskrete Messbereiche (d) durch die geschlossene Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur Erkennung

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

11

eines Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben.

Unter dem Begriff "optische Transparenz" wird nachfolgend verstanden, dass das durch diese Eigenschaft gekennzeichnete Material zumindest bei einer oder mehreren zur Anregung einer oder mehrerer Lumineszenzen benutzten Anregungswellenlängen weitgehend transparent und damit absorptionsfrei sein sollte.

Bei einer gegebenen Schichtdicke der optisch transparenten Schicht (a) ist die Empfindlichkeit einer erfindungsgemässen Anordnung um so grösser, je höher der Unterschied des Brechungsindex der Schicht (a) zu den Brechungsindices der umgehenden Medien ist, d.h. je höher der Brechungsindex der Schicht (a) ist. Es wird bevorzugt, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.

Eine weitere wichtige Anforderung an die Eigenschaften der Schicht (a) besteht darin, dass die Ausbreitungsverluste darin geführten Lichts möglichst niedrig sind. Es wird bevorzugt, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$ , besonders bevorzugt aus  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  umfasst. Es können auch Kombinationen mehrerer derartiger Materialien verwendet werden.

Bei gegebenem Material der Schicht (a) und gegebenem Brechungsindex ist die Empfindlichkeit bis zu einem unteren Grenzwert der Schichtdicke umso grösser, je geringer die Schichtdicke ist. Der untere Grenzwert wird bestimmt durch den Abbruch der Lichtleitung bei Unterschreiten eines von der Wellenlänge des zu führenden Lichts abhängigen Werts sowie einem zu beobachtenden Anstieg der Ausbreitungsverluste bei sehr dünnen Schichten mit weiterer Schichtdickenabnahme. Es ist von Vorteil, wenn das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

12

Ganzes, bevorzugt ein Drittel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.

Die optisch transparente Schicht (b) sollte absorptions- und fluoreszenzarm, im Idealfall absorptions- und fluoreszenzfrei sein. Ausserdem sollte die Oberflächenrauigkeit niedrig sein, da sich die Oberflächenrauigkeit der Schicht (b) bei Abscheidung einer weiteren Schicht (a) mit höherem Brechungsindex, welche als wellenleitende Schicht vorgesehen ist, in Abhängigkeit vom Abscheidungsprozess in mehr oder minder starkem Masse auf die Oberflächenrauigkeit der Schicht (a) auswirkt. Eine erhöhte Oberflächenrauigkeit an den Grenzschichten der Schicht (a) führt zu erhöhten Streuverlusten des geführten Lichts, was jedoch unerwünscht ist. Diese Anforderungen werden durch eine Reihe von Materialien erfüllt. Es wird bevorzugt, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) Silikate, z. B. Glas oder Quarz, oder einen transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe umfasst, die von Polycarbonat, Polyimid, Acrylat, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrol gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 50 nm beträgt. Dabei wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,4 ist.

Die Gitterstruktur kann in verschiedener Form gestaltet sein. Es wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil, oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.

In einer Ausführungsform der Anordnung wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

13

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise um gleichzeitig Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge einzukoppeln, kann es jedoch von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

Für bestimmte Ausführungsformen wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

Für eine Vielzahl von Ausführungsformen wird bevorzugt, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.

Generell gilt, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen können. In genereller Form wird die Sensorplattform daher eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfassen.

In den Assay-Applikationen mit einem erfindungsgemässen Kit ist es im allgemeinen vorteilhaft, ein geeignetes Anregungslicht über eine Gitterstruktur (c) einzukoppeln, an welche sich in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Lichts ein unmodulierter Bereich der Schicht (a) mit einer darauf befindlichen Vielzahl von Messbereichen in einem Array anschliesst, auf denen der Nachweis der verschiedenen Analyten erfolgt. Daran wird sich in der Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts vorteilhaft eine weitere Gitterstruktur mit einem dahinter befindlichen weiteren Array von Messbereichen anschliessen etc. Nach Durchlaufen eines unmodulierten Bereichs wird das in der Schicht (a) geführte Licht jeweils wieder ausgekoppelt. In der zur Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts senkrechten Richtung (d.h. parallel zu den Gitterlinien) werden sich weitere Arrays von Messbereichen

anschlüssen. Daher wird bevorzugt, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können. Dieses bedeutet also, dass das Einkoppelgitter eines in Ausbreitungsrichtung eines in der Schicht (a) einer Sensorplattform geführten Anregungslichts nachfolgenden Arrays als Auskoppelgitter für das am Einkoppelgitter des in besagter Ausbreitungsrichtung vorangehenden Arrays eingekoppelte Anregungslicht dient.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise für den Einsatz von 2 oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, ist es von Vorteil, wenn die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Unterteilung der Sensorplattform in Bereiche mit darin ausgebildeten Gitterstrukturen und sich daran anschliessenden unmodulierten Bereichen bedeutet für die Anwendung, dass der Platzbedarf für ein einzelnes Array von Messbereichen zwischen aufeinander folgenden Gitterstrukturen (einschliesslich mindestens einer zugeordneten Gitterstruktur) ein gewisses Minimum nicht unterschreiten kann, welches bei den gegenwärtigen technischen Möglichkeiten zur Erzeugung der Gitterstrukturen sowie zur Einkopplung eines geeigneten Anregungslichtbündels in der Grössenordnung von etwa  $0.1 \text{ mm}^2$  bis  $1 \text{ mm}^2$  liegt. Daher ist es insbesondere für Anordnungen, in denen eine Vielzahl jeweils kleinflächiger Arrays erwünscht ist, von Vorteil, wenn eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.



In einer speziellen Form der Erfindung wird bevorzugt, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Sofern eine Eigenfluoreszenz der Schicht (b) nicht auszuschliessen ist, insbesondere wenn diese aus einem Kunststoff wie beispielsweise Polycarbonat besteht, oder auch um den Einfluss der Oberflächenrauhigkeit der Schicht (b) auf die Lichtleitung in der Schicht (a) zu vermindern, kann es von Vorteil sein, wenn zwischen den Schichten (a) und (b) eine Zwischenschicht aufgebracht ist. Daher besteht eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemässen Anordnung darin, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.

Die einfachste Form der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente besteht in physikalischer Adsorption, beispielsweise infolge hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Erkennungselementen und der Grundplatte. Diese Wechselwirkungen können jedoch durch die Zusammensetzung des Mediums und dessen physikalisch-chemische Eigenschaften, wie beispielsweise Polarität und Ionenstärke, in ihrem Ausmass stark verändert werden. Insbesondere im Falle sequentieller Zugabe verschiedener Reagentien in einem mehrstufigen Assay ist das Haftvermögen der Erkennungselemente nach rein adsorptiver Immobilisierung auf der Oberfläche oft unzureichend. In einer bevorzugten Form des erfindungsgemässen Kits wird das Haftvermögen dadurch verbessert, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente auf der Sensorplattform eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Die Haftvermittlungsschicht kann dabei auch, insbesondere im Falle zu immobilisierender biologischer oder biochemischer Erkennungselemente, der Verbesserung der "Biokompatibilität" dienen, d.h. der Erhaltung der Bindungsfähigkeit, im Vergleich zu deren Ausmass in natürlicher

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

16

biologischer oder biochemischer Umgebung, und insbesondere der Vermeidung einer Denaturierung. Es wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, hat. Für die Herstellung der Haftvermittlungsschicht eignen sich eine Vielzahl von Materialien. Ohne jegliche Einschränkung wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine oder mehrere chemische Verbindungen aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Doppelschichten" umfassen.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt des erfindungsgemässen Kits ist, dass die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in räumlich getrennten Messbereichen (d) immobilisiert sind. Diese räumlich getrennten Messbereiche (d) können durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform erzeugt werden. Für die Aufbringung eignen sich eine Vielzahl bekannter Verfahren. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird bevorzugt, dass zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf der Sensorplattform eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemischen und photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.

Als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente können Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) oder Nukleinsäure-Analogen (z.B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten Proteinen wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

17

Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, gebildet wird. Es ist auch vorgesehen, dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen, Zellbestandteile, Zellmembranen oder deren Fragmente aufgebracht werden.

Eine weitere spezielle Form des erfindungsgemässen Kits besteht darin, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Für verschiedene Anwendungen wird bevorzugt, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgetragenen Proben. Dabei können ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen. Ein Segment kann aber auch mehrere diskrete Messbereiche mit voneinander unterschiedlichen Erkennungselementen enthalten.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung von Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise mit immobilisierten Anti-Zytokin-Antikörpern zur Bestimmung unterschiedlicher Zytokine, zugeordnet sind. In ähnlicher Weise können ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der gleichzeitigen Bestimmung eines ganzen Satzes sogenannter "Markerproteine" dienen. Beispielsweise können dieses

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

18

intra- und / oder extrazellulär vorkommende körpereigene Proteine sein, welche infolge und als Anzeichen verschiedener Krankheiten, wie beispielsweise degenerative Erkrankungen, bestimmte Krebsformen oder Autoimmunerkrankungen, beispielsweise in erhöhter Konzentration auftreten.

Üblicherweise wird ein zu immobilisierendes Erkennungselement zum Nachweis eines Analyten so ausgewählt, dass es für die Erkennung und Bindung des besagten Analyten eine möglichst hohe Spezifität und Bindungsaffinität und gegenüber anderen, möglicherweise (bio)chemisch ähnlichen Analyten eine möglichst geringe Kreuzreaktivität aufweist. Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen in der Immunoanalytik oder beim Nachweis von Einzelpunktmutationen in der Nukleinsäureanalytik, ist eine Kreuzreaktivität zu den (bio)chemisch ähnlichsten Verwandten des betreffenden Analyten kaum auszuschliessen. Für derartige Anwendungen kann eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits vorteilhaft sein, in denen ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen. Die Erkennungselemente sind dabei zweckmässigerweise so ausgewählt, dass sich ihre Affinitäten zu verschiedenen, einander (bio)chemisch ähnlichen Analyten in unterschiedlicher, charakteristischer Weise ändern. Aus der Gesamtheit der Signale von verschiedenen Messbereichen mit unterschiedlichen Erkennungselementen für einen einzelnen Analyten lässt sich dann, in vergleichbarer Weise zu einem Fingerabdruck, die Identität des Analyten bestimmen.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung unterschiedlicher Gruppen von Analyten, wie beispielsweise pharmazeutischer Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder derer Metaboliten und / oder der Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannter "Markerproteine", zugeordnet sind.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

19

Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, in einer einzigen Messung die Konzentration eines ganzen Satzes von "Markerproteinen", wie oben erläutert, und die Konzentration von zur Behandlung einer Krankheit verabreichten Präparaten und von deren Abbauprodukten zu bestimmen. Aus diesen Kombinationsmöglichkeiten ergibt sich ein hohes Potential beispielsweise zur Beschleunigung der pharmazeutischen Produktentwicklung oder der Patientenstratifikation zur Bestimmung einer optimalen präparativen Behandlung.

Für bestimmte Anwendungen, in denen beispielsweise Fragen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer Vielzahl von Arrays auf einer gemeinsamen Sensorplattform im Vordergrund stehen, ist es vorteilhaft, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

In anderen Applikationen ist es wesentlich, die Einflüsse systematischer Fehler auf die Ergebnisse zu minimieren, wie sich diese beispielsweise durch eine Replikation gleichartiger Strukturen auf einer gemeinsamen Sensorplattform ergeben können. Beispielsweise hierfür kann es von Vorteil sein, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Der erfindungsgemäße Kit mit einer Vielzahl von Messbereichen in diskreten Arrays, von denen ihrerseits eine Vielzahl auf einer gemeinsamen Sensorplattform angeordnet sein kann, bietet die Möglichkeit, dass unter Einsatz relativ geringer Mengen von Probelösungen, Reagentien oder gegebenenfalls Kalibrationslösungen auf ein- und derselben Plattform, unter weitestgehend identischen Bedingungen, auch viele Arten von Duplikationen oder Mehrfachausführungen gleichartiger Messungen durchgeführt werden können. Damit können beispielsweise in einer einzigen Messung statistische Daten erzeugt werden, wofür herkömmlicherweise eine Vielzahl von Einzelmessungen mit entsprechend längerer Gesamt-Messzeit und höherem Verbrauch an Proben- und Reagentienmengen erforderlich ist. Es wird bevorzugt, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung jeweils 2 oder mehr

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

20

identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können beispielsweise besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein. Die Aspekte der Referenzierung können physikalische oder chemische Parameter der Sensorplattform betreffen, wie beispielsweise lokale Unterschiede der Anregungslichtintensität (siehe hierzu auch weiter unten), als auch Einflüsse der Probe, wie beispielsweise deren pH, Ionenstärke, Brechungsindex, Temperatur etc.

Für andere Applikationen kann es aber auch vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Die immobilisierten Erkennungselemente sind im allgemeinen so ausgewählt, dass sie mit möglichst hoher Spezifität den nachzuweisenden Analyten erkennen und binden. Im allgemeinen ist jedoch zu erwarten, dass auch eine unspezifische Anlagerung von Analytmolekülen an die Oberfläche der Grundplatte stattfindet, insbesondere wenn zwischen den in den Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente noch reaktive Freistellen vorhanden sind. Es wird daher bevorzugt, dass Bereiche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen "passiviert werden", d.h. dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, artfremden oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 –, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

Wie vorangehend beschrieben, ist für viele, wenn nicht sogar die Mehrzahl von Applikationen eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits von Vorteil, in denen eine Haftvermittlungsschicht vor der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf der Sensorplattform aufgebracht wurde. Dabei werden solche Ausführungsformen bevorzugt, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die Funktion der Passivierung von Bereichen zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen durch die Aufbringung besagter Haftvermittlungsschicht auf der Sensorplattform, ohne Aufbringung zusätzlicher Substanzen, erfüllt wird.

Der erfindungsgemässe Kit kann eine sehr grosse Anzahl einzelner Messbereiche umfassen. Es wird bevorzugt, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von 0.001 – 6 mm<sup>2</sup> einnimmt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits, in der die Oberseite der Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist, dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander fluidisch abgedichteter Probenbehältnisse erzeugt werden, in denen jeweils ein oder mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen. Als besagter mit der Sensorplattform zusammenzubringender Körper werden dabei erfindungsgemäss nicht nur selbsttragende Strukturen verstanden, sondern auch beispielsweise aufgetragene strukturierte Beschichtungen von gegebenenfalls nur einigen Mikrometern Stärke, die, unter den Verwendungsbedingungen des Kits, ein Übertreten von Flüssigkeit von in einem so erzeugten (in diesem Fall typischerweise offenen) Probenbehältnis in ein benachbartes Probenbehältnis verhindern.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

22

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehälter als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.

Vorteilhafterweise ist dabei das gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Reservoir zur Aufnahme aus der Flusszelle austretender Flüssigkeit als eine Vertiefung in der Aussenwand des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers ausgebildet.

Für die Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper gibt es dabei verschiedene technische Möglichkeiten. In einer möglichen Anordnung sind auf der Sensorplattform als Grundplatte räumliche Strukturen im Raster des Arrays der zu erzeugenden Flusszellen ausgebildet. Diese Strukturen auf der Grundplatte können beispielsweise die Wände oder Teile der Wände, wie beispielsweise Sockel, zwischen den neben- und hintereinander angeordneten Flusszellen bilden, welche durch Zusammenbringen der Grundplatte mit einem entsprechend geformten Körper erzeugt werden. Um das Array von Flusszellen zu erzeugen, ist es auch möglich, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in der Sensorplattform ausgebildet sind.

Eine weitere Ausführungsform besteht darin, dass zur Erzeugung der Aussparungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in besagtem Körper ausgebildet sind. Für diese Ausführungsform wird bevorzugt, dass die Grundplatte im wesentlichen planar ist.

Der mit der Grundplatte zusammenzubringende Körper zur Erzeugung des Arrays von Flusszellen kann aus einem einzigen Werkstück bestehen. Eine andere Ausführungsform besteht darin, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper aus mehreren



WO 01/92870

PCT/EP01/05995

23

Teilen zusammengesetzt ist, wobei die zusammengefügte Bestandteile besagten Körpers vorzugsweise eine irreversibel zusammengefügte Einheit bilden.

Es wird bevorzugt, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper hilfsweise Vorkehrungen umfasst, welche das Zusammenfügen besagten Körpers und der Grundplatte erleichtern.

Die Anordnung umfasst vorzugsweise eine Vielzahl, d. h. 2 – 2000 Probenbehälter, bevorzugt 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 Probenbehälter. Beispielsweise für Anwendungen, in denen die Zugabe der Proben und / oder zusätzlicher Reagentien direkt durch einen Dispenser erfolgen soll, wird bevorzugt, dass die Probenbehälter auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.

Bevorzugt wird, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehälter dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Eine weitere Ausführungsform der Anordnung von Probenbehältern als Teil des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass sie durch einen zusätzlichen Abschluss, beispielsweise eine Folie, Membran oder eine Deckplatte, abgeschlossen wird.

Durch Variation der Grundflächen und der Tiefe der Ausnehmungen kann die Aufnahmefähigkeit der Flusszellen in einem weiten Bereich variiert werden, so dass das Innenvolumen jedes Probenbehälters typischerweise 0.1  $\mu\text{l}$  – 1000  $\mu\text{l}$ , bevorzugt 1  $\mu\text{l}$  – 20  $\mu\text{l}$  beträgt. Dabei können die Innenvolumina verschiedener Flusszellen einer Anordnung gleich oder unterschiedlich sein.

Es wird bevorzugt, dass die Tiefe der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügte Körper 1 – 1000  $\mu\text{m}$ , besonders bevorzugt 20 – 200  $\mu\text{m}$  beträgt. Die Grösse der Ausnehmungen eines Arrays kann

einheitlich oder unterschiedlich sein, und die Grundflächen können beliebige, vorzugsweise rechteck- oder polygonförmige oder auch andere Geometrie haben. Ebenso können die lateralen Abmessungen der Grundflächen in einem weiten Bereich variiert werden, wobei typischerweise die Grundflächen der Ausnehmungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammengefügteten Körpers jeweils  $0.1 \text{ mm}^2 - 200 \text{ mm}^2$ , bevorzugt  $1 \text{ mm}^2 - 100 \text{ mm}^2$  betragen. Es wird bevorzugt, dass die Ecken der Grundflächen abgerundet sind. Abgerundete Ecken wirken sich günstig auf das Strömungsprofil aus und erleichtern die Entfernung eventuell gebildeter Gasblasen aus den Flusszellen bzw. verhindern deren Entstehen.

Für die gleichzeitige Proben- oder Reagentienzugabe zu einer Vielzahl von Probenbehältnissen können Multikanalpipettoren für manuelle oder automatische Reagentienapplikation verwendet werden, bei denen die individuellen Pipetten in ein- oder zweidimensionalen Arrays angeordnet sind, sofern die Anordnung von Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemässen Kits die Zulaufe in dem entsprechenden Raster aufweist. Bevorzugt entspricht daher das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und Spalten) der Anordnung dem Raster der Wells von Standardmikrotiterplatten. Als industrieller Standard ist dabei eine Anordnung von  $8 \times 12$  Wells mit einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von ca. 9 mm etabliert. Hiermit kompatibel sind kleinere Arrays mit beispielsweise 3, 6, 12, 24 und 48 Wells in gleichem Abstand. Es können auch mehrere erfindungsgemässe Anordnungen von Probenbehältnissen mit solchen kleineren Arrays von Flusszellen derart zusammengefügt werden, dass die einzelnen Zulaufe besagter Flusszellen in einem ganzzahligen Vielfachen des Abstands von ca. 9 mm angeordnet sind.

Seit einiger Zeit werden auch Platten mit 384 und 1536 Wells, als ganzzahligem Vielfachen von 96 Wells auf gleicher Grundfläche mit entsprechend reduziertem Wellabstand, verwendet, welche ebenfalls als Standardmikrotiterplatten bezeichnet werden sollen. Durch die Anpassung des Rasters der Probenbehältnisse der erfindungsgemässen Anordnung, mit den Zu- und Abläufen jedes Probenbehältnisses, an

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

25

diese Standards können eine Vielzahl kommerziell eingeführter und erhältlicher Labor-Pipettoren und -Roboter für die Probenzugabe verwendet werden.

Bevorzugt entsprechen die äusseren Grundabmessungen der Anordnung von Probenbehältnissen, als Teil des erfindungsgemässen Kits, den Grundabmessungen dieser Standard-Mikrotiterplatten.

Eine weitere spezielle Form der Erfindung ist eine Anordnung von beispielsweise 2 bis 8 Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemässen Kits, mit den vorgängig genannten Eigenschaften, in einer Spalte oder beispielsweise 2 bis 12 Probenbehältnissen in einer Zeile, welche ihrerseits mit einem Träger ("Metaträger") mit den Abmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zulaufe der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Das Zusammenfügen der Anordnung der Probenbehältnisse mit dem Metaträger kann beispielsweise durch Kleben oder durch genaue Anpassung ohne Kleben erfolgen, wenn er für den einmaligen Gebrauch vorgesehen ist, oder beispielsweise durch Einklinken oder Einschieben in eine geeignet ausgebildete Halterung, wenn er für mehrfachen Gebrauch vorgesehen ist. Das Material des Metaträgers kann, beispielsweise, ausgewählt sein aus der Gruppe, die von form-, spritz- oder fräsbaren Kunststoffen, Metallen, Silikaten, wie zum Beispiel Glas, Quarz oder Keramiken gebildet wird

Es können auch mehrere solche Spalten oder Zeilen von Probenbehältnissen mit einem einzigen derartigen Metaträger so zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zulaufe der Flusszellen dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte, d. h. einem ganzzahligen Vielfachen von 9 mm (entsprechend 96-Well-Platte) oder von 4.5 mm (entsprechend 384-Well-Platte, siehe oben) oder von 2.25 mm (entsprechend 1536-Well-Platte, siehe oben) entspricht.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

26

Die Anordnung von Probenbehältnissen kann jedoch selbstverständlich auch in einem anderen Raster ausgebildet sein.

Die Materialien für den mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körper und einer gegebenenfalls verwendeten zusätzlichen Deckplatte müssen den Anforderungen für den jeweils geplanten Einsatz der Anordnung genügen. In Abhängigkeit von der spezifischen Applikation betreffen diese Anforderungen chemische und physikalische Beständigkeit, zum Beispiel gegen saure oder basische Medien, Salze, Alkohole oder Detergentien als Bestandteile von wässrigen Lösungen, oder Formamid, Temperaturbeständigkeit (zum Beispiel zwischen -30°C und 100°C), möglichst ähnliche thermische Ausdehnungskoeffizienten von Grundplatte und damit zusammengebrachtem Körper, optische Eigenschaften (z. B. Fluoreszenzfreiheit, Reflexionsvermögen), mechanische Bearbeitbarkeit etc. Es wird bevorzugt, dass das Material des mit der Grundplatte zusammengebrachten Körpers sowie eines optionalen zusätzlichen Abschlusses aus derselben Gruppe wie das Material des "Metaträgers" ausgewählt ist. Dabei können die genannten Komponenten (mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengefügt Körper, Deckplatte) jeweils aus einem einheitlichen Material bestehen als auch eine Mischung oder schichtweise oder laterale Zusammenfügung verschiedener Materialien umfassen, wobei die Materialien sich gegenseitig ersetzen können.

Ein äusserst wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung kommt den Möglichkeiten zur orts aufgelösten Referenzierbarkeit der verfügbaren Anregungslichtintensität zu. In herkömmlichen Anordnungen, mit Einstrahlung eines Anregungslichts in einer Auflicht- oder Transmissionsbeleuchtung, werden die verfügbaren Anregungslichtintensitäten einer beleuchteten Fläche im wesentlichen durch die Anregungslichtdichte im Querschnitt des Anregungslichtbündels bestimmt. Lokale Variationen in den Eigenschaften der beleuchteten Fläche (wie beispielsweise einem Glasplättchen) haben hier nur einen zweitrangigen Einfluss. In der Anordnung des erfindungsgemässen Kits jedoch sind lokale Variationen der physikalischen Parameter der Sensorplattform, wie beispielsweise die Einkoppeffizienz der Gitterstruktur (c) zur Einkopplung des Anregungslichts in die optisch transparente Schicht (a), oder lokale Variationen der Ausbreitungsverluste eines

geführten Modes in der optisch transparenten Schicht (a), von entscheidender Bedeutung. Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung sind daher Ausführungsformen des erfindungsgemässen Kits, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfassen. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Streulichtverluste im wesentlichen proportional zur lokal geführten Lichtintensität sind. Die Streulichtverluste werden vorwiegend bestimmt durch die Oberflächenrauigkeit und Homogenität der optisch transparenten Schicht (a) und des darunter befindlichen Substrats (optisch transparente Schicht (b)). Insbesondere ermöglicht diese Art der Referenzierung, eine Reduzierung der lokal verfügbaren Anregungslichtintensität in dessen Ausbreitungsrichtung zu berücksichtigen, wenn diese beispielsweise durch eine Absorption von Anregungslicht durch eine hohe lokale Konzentration im evaneszenten Feld der Schicht (a) befindlicher, bei der Anregungswellenlänge absorbierender Moleküle erfolgte.

Die Annahme der Proportionalität des abgestrahlten Streulichts zur Intensität des geführten Lichts gilt jedoch nicht an den Stellen, in denen eine Abstrahlung / Auskopplung durch lokale, in Kontakt mit der Schicht (a) stehende makroskopische Streuzentren erfolgt. An diesen Stellen ist das abgestrahlte Streulicht deutlich überproportional im Verhältnis zum geführten Licht. Daher ist es auch vorteilhaft, wenn die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfassen. Beide Methoden können selbstverständlich auch miteinander kombiniert werden. Bei der Erstellung eines Referenzbildes sollten unterschiedliche Einflüsse der Abbildungsoptik auf die Erfassung der Messsignale ausgeschlossen werden. Daher wird bevorzugt, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

28

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen. Dabei wird bevorzugt, dass eine solche Anregungswellenlänge ausgewählt wird, bei der im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen, so dass Effekte des "photochemischen Ausbleichens" vermieden oder minimiert werden können.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die Ortsauflösung des Bildes zur Referenzierung des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt. Es wird ausserdem bevorzugt, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die Bestimmung des Hintergrundsignals bei der jeweiligen Lumineszenzwellenlänge neben oder zwischen den Messbereichen umfassen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass die ortsauflöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebracht) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt. Dabei wird bevorzugt, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.

Für die Signaldetektion werden, wie nachfolgend noch genauer ausgeführt, bevorzugt ortsauflösende Detektoren, wie beispielsweise CCD-Kameras verwendet. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre photosensitiven Elemente (Pixels) ein bestimmtes (vor allem thermisch bedingtes) Hintergrundsignal aufweisen, was die untere Schwelle der

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

29

Detektion eines lokalen Lichtsignals bestimmt, und auch eine Maximalkapazität (Sättigung) zur Detektion hoher Lichtintensitäten besitzen. Die Differenz zwischen diesen Schwellwerten bestimmt, bei einer vorgegebenen Belichtungsdauer, den dynamischen Bereich der Signaldetektion. Innerhalb dieses dynamischen Bereichs sollten sich sowohl die zu erfassenden Lumineszenzsignale zur Analytdetektion als auch die Referenzsignale bewegen. Vorteilhaft ist dabei, wenn beide Signale von gleicher Grössenordnung sind, d.h. sich beispielsweise um nicht mehr als ein oder zwei Zehnerpotenzen unterscheiden. Erfindungsgemäss kann dieses beispielsweise dadurch erreicht werden, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb eines "Lumineszenzmarker-Spots" mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher Grössenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

Die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays sollen bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform einheitlich sein.

Bei dieser Art der Referenzierung wird ihre Ortsauflösung wesentlich von der Dichte der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays bzw. auf der ganzen Sensorplattform bestimmt. Der Abstand und / oder die Grösse verschiedener "Lumineszenzmarker-Spots" werden vorzugsweise auf die erwünschte Ortsauflösung bei der Bestimmung der Lumineszenzintensitäten aus den diskreten Messbereichen abgestimmt.

Es ist erwünscht, dass jedes Array auf der Sensorplattform mindestens einen "Lumineszenzmarker-Spot" umfasst. Vorteilhaft ist, wenn es zu jedem Segment von Messbereichen zur Bestimmung eines Analyten mindestens einen benachbarten "Lumineszenzmarker-Spot" gibt.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

30

Für die geometrische Anordnung der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays bzw. auf der Sensorplattform gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Beispielsweise besteht eine mögliche Anordnung darin, dass jedes Array eine durchgehende Reihe und / oder Spalte von "Lumineszenzmarker-Spots" parallel und / oder senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, zur Bestimmung der zweidimensionalen Verteilung des eingekoppelten Anregungslichts im Bereich besagten Arrays, umfasst.

Es ist vorgesehen, dass die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere orts aufgelöste Referenzsignale umfassen.

Ein weiteres wesentliches Merkmal des erfindungsgemässen Kits betrifft Vorkehrungen, um in Anwesenheit einer oder mehrerer Analyten erfasste Lumineszenzsignale zu kalibrieren. Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass besagte Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen. Beispielsweise ist es möglich, dass 8 – 12 Arrays einer Sensorplattform für Kalibrationszwecke vorgesehen sind.

Mit der Vielzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform ermöglicht der erfindungsgemässe Kit eine weitere, bislang nicht beschriebene Möglichkeit der Kalibration. Diese besteht darin, dass es im wesentlichen nicht notwendig ist, eine Vielzahl von Kalibrationslösungen mit unterschiedlichen, bekannten Konzentrationen auf ein oder mehrere Arrays zu geben, sondern in den für Kalibrationszwecke vorgesehenen Messbereichen die zum Analytnachweis eingesetzten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in bekannter, aber unterschiedlicher lokaler Konzentration zu immobilisieren. Ebenso wie durch Zugabe verschiedener Kalibrationslösungen unterschiedlicher Analytkonzentrationen auf ein Array mit



Erkennungselementen in einer einzelnen konstanten Immobilisierungsdichte eine Kalibrationskurve generiert werden kann, ist es prinzipiell möglich, eine solche Standardkurve, welche die Bindungsaktivität und Häufigkeit der Bindungsereignisse zwischen einem Analyten und seinen Nachweiselementen widerspiegelt, durch Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung auf ein Array mit Erkennungselementen in einer unterschiedlichen Immobilisierungsdichte zu erzeugen. Wesentlich für die Durchführbarkeit dieser vereinfachten Art der Kalibration ist, dass das Bindungsverhalten zwischen einem Analyten und seinen Erkennungselementen genau bekannt ist, und dass die Variation, d.h. die Spannbreite zwischen niedrigster und höchster Immobilisierungsdichte in den für einen Analyten vorgesehenen Messbereichen zur Kalibration ausreichend ist, um den gesamten für die Analytdetektion vorgesehenen Arbeitsbereich eines Assays abzudecken.

Daher ist weiterer Gegenstand der Erfindung ein Kit, welcher dadurch gekennzeichnet ist, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Dabei wird besonders bevorzugt, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits sind zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten jeweils mehrere Messbereiche von unterschiedlicher Grösse (Durchmesser) vorgesehen. Aufgrund der bekannten Tatsache, dass die zu erwartende Signalintensität (Signalhöhe pro Flächeneinheit des dafür vorgesehenen Messbereichs) mit abnehmender Fläche des Messbereichs ansteigt, ermöglicht diese

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

32

Ausführungsform eine Vergrößerung des dynamischen Bereichs zum Nachweis besagter Analyten.

Erfindungsgemäss besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass ein oder mehrere Arrays ein oder mehrere Messbereiche umfassen, welche dem Nachweis eines zu Kalibrationszwecken einer Probe hinzugefügten Analyten mit bekannter Konzentration dienen. Diese Ausführungsform ist vergleichbar mit der Zugabe von sogenannten bekannten Standards in analytischen Trennverfahren. Voraussetzung ist auch bei dieser Ausführungsform, dass das Bindungsverhalten zwischen dem zusätzlich zu einer oder allen Proben hinzuzufügenden Analyten und seinen immobilisierten Erkennungselementen genau bekannt ist. Dann lassen sich beispielsweise Unterschiede in den Bindungssignalen dieses bekannten zusätzlichen Analyten (z.B. infolge von Variationen der physikalischen Eigenschaften der Probe wie Viskosität etc.) übertragen auf entsprechende Unterschiede im Bindungsverhalten der nachzuweisenden Analyten in unbekannter Konzentration. Insbesondere eignet sich diese Ausführungsform auch zu einer Kombination mit der vorangehend beschriebenen Variante.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System mit einer beliebigen Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der Gitter-Wellenleiter-Struktur umfasst.

Inbesondere Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einem erfindungsgemässen Kit sowie
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von einem oder mehreren

Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Eine mögliche Ausführungsform des analytisches System ist dadurch gekennzeichnet,

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

33

dass das Anregungslicht in einer Aufflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.

Es wird bevorzugt, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine andere mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Damman-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.

Eine Weiterbildung ist dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

34

Es wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

Die Erfindung umfasst analytische Systeme, die dadurch gekennzeichnet sind, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform als Grundplatte, als Bestandteil eines erfindungsgemässen Kits, und /oder zwischen besagter Grundplatte und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Die Lichtanregung kann kontinuierlich erfolgen. Es wird jedoch bevorzugt, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.

Eine Weiterentwicklung des analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemässen analytischen Systems erfolgen Einstrahlung und Erfassung des Emissionslichts von allen Messbereichen simultan. Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

35

Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Probenbehältnisse erfolgt. Es ist auch möglich, dass innerhalb eines einzelnen Probenbehältnisses mehrfach sequentiell Einstrahlung des Anregungslichts und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen erfolgen.

Bevorzugt wird dabei, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird. Sequentielle Anregung und Detektion kann auch unter Verwendung beweglicher Glasfasern oder Glasfaserbündel erfolgen, mit denen das Anregungs- bzw. Lumineszenzlicht sequentiell einem oder mehreren Messbereichen zu- bzw. von ihnen abgeführt wird.

Bei sequentieller Detektion der Lumineszenz von verschiedenen Messbereichen ist ein ortsauflösender Detektor nicht zwingend erforderlich, sondern es kann in diesem Falle ein einfacher Detektor wie beispielsweise ein herkömmlicher Photomultiplier oder eine Photodiode oder eine Avalanche-Photodiode verwendet werden.

Insbesondere wird bevorzugt, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

Eine andere Ausführungsform eines analytischen Systems mit sequentieller Anregung und Detektion ist dadurch gekennzeichnet, dass die erfindungsgemäße Anordnung zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.

Es wird weiterhin bevorzugt, dass das erfindungsgemäße analytische System zusätzlich Zuführungsmittel umfasst, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

36

Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass die Probenbehälter auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

Eine Weiterentwicklung des analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass Behälter für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden. Eine besondere Ausführungsform besteht darin, dass diese zusätzlichen Behälter für besagte Reagentien in dem mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammenzubringenden Körper angeordnet sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem erfindungsgemässen Kit entsprechend einer der beschriebenen Ausführungsformen und / oder unter Verwendung eines erfindungsgemässen analytischen Systems, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf einer Sensorplattform als Teil besagten Kits in Kontakt gebracht werden, in ortsauflöser Weise die in besagten Messbereichen verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird und gegebenenfalls eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, kalibriert werden.

Es wird bevorzugt, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

37

Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.

Es wird bevorzugt, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

Bestandteil des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

Es wird bevorzugt, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

Eine andere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Dabei wird bevorzugt, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

38

Für andere Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.

Eine Variante des Verfahrens besteht darin, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass das Ausmass der Löschung ("Quenching") einer oder mehrerer Lumineszenzen bestimmt wird.

Eine weitere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden.

Es wird bevorzugt, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.



Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgetragenen Proben. Dabei können ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen. Ein Segment kann aber auch mehrere diskrete Messbereiche mit *voneinander unterschiedlichen Erkennungselementen* enthalten.

Eine mögliche Variante des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise unterschiedliche Zytokine durch ihre Bindung an unterschiedliche immobilisierte Anti-Zytokin-Antikörper, bestimmt werden.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen in der Immunoanalytik oder beim Nachweis von Einzelpunktmutationen in der Nukleinsäureanalytik, ist eine Kreuzreaktivität zu den (bio)chemisch ähnlichsten Verwandten des betreffenden Analyten kaum auszuschliessen. Für derartige Anwendungen ist eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens vorteilhaft, in denen ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen. Die Erkennungselemente sind dabei zweckmässigerweise so ausgewählt, dass sich ihre Affinitäten zu verschiedenen, einander (bio)chemisch ähnlichen Analyten in unterschiedlicher, charakteristischer Weise ändern. Aus der Gesamtheit der Signale von verschiedenen Messbereichen mit unterschiedlichen Erkennungselementen für einen einzelnen Analyten lässt sich dann, in vergleichbarer Weise zu einem Fingerabdruck, die Identität des Analyten bestimmen.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

40

Eine andere mögliche Variante zeichnet sich dadurch aus, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus unterschiedlichen Gruppen, wie beispielsweise pharmazeutische Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder deren Metaboliten und / oder die Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannte "Markerproteine", bestimmt werden.

Beispielsweise zur Untersuchung von Fragen der Reproduzierbarkeit kann es von Vorteil sein, wenn für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können besagte identische Messbereiche zum Beispiel in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein.

Zur Untersuchung anderer Fragestellungen, beispielsweise zur Untersuchung systematischer lokaler Unterschiede in den Anregungsbedingungen, kann es vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfasst. Bevorzugt wird dabei, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

41

Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfasst.

Eine weitere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen. Dabei wird bevorzugt, dass die Anregungswellenlänge für die orts aufgelöste Referenzierung so ausgewählt wird, dass im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle bei besagter Wellenlänge keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen, so dass Effekte des "photochemischen Ausbleichens" vermieden oder minimiert werden können.

Es wird bevorzugt, dass die Ortsauflösung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100 µm, bevorzugt besser als 20 µm beträgt.

Weiterer Gegenstand des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebrauchten) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.

Dabei wird bevorzugt, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

42

Größenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.

Eine bekannte Tatsache ist, dass ein lumineszenzfähiges Molekül nur eine beschränkte Anzahl von Zyklen der Anregung durch ein äusseres Anregungslicht und seiner nachfolgenden Deaktivierung, in Form der abgestrahlten Lumineszenz, erfahren kann, bevor es photochemisch zerstört, d.h. in ein anderes, im allgemeinen nicht mehr lumineszenzfähiges Molekül umgewandelt wird. Diesen Prozess bezeichnet man allgemein als "Photobleaching". Die Anzahl der möglichen Aktivierungs- und Deaktivierungszyklen ist eine für eine bestimmte Molekülart charakteristische durchschnittliche Grösse (ähnlich der Halbwertszeit einer radioaktiven Substanz). Um die Wirksamkeit der Referenzierung in dem erfindungsgemässen Verfahren in möglichst hohem Masse zu gewährleisten, wird bevorzugt, dass eine Verminderung der Signale aus den "Lumineszenzmarker-Spots", beispielsweise infolge "Photobleachings" bei Justierungen des optischen Systems, minimiert wird.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere orts aufgelöste Referenzsignale umfasst.

Die Zugabe der einen oder mehreren Proben und der im Nachweisverfahren einzusetzenden Nachweisreagentien kann sequentiell in mehreren Schritten erfolgen. Es wird bevorzugt, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

43

einzigsten Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Lumineszenzlabel und optional zusätzlicher lumineszenzmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Weiterer Gegenstand einer erfindungsgemässen Ausführungsform des Verfahrens ist, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.

Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe eines gegebenenfalls zusätzlichen Analyten bekannter Konzentration zu einer oder mehreren zu untersuchenden Proben zum Nachweis auf einem oder mehreren hierfür ausgewiesenen Messbereichen der Sensorplattform umfasst.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

44

Eine andere bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst. Es ist dabei möglich, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.

Eine andere Variante dieses Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt. Bei dieser Ausführungsform ist im allgemeinen zwischen der Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe ein Regenerierungsschritt notwendig, d.h. die Dissoziation von nach Zugabe der ersten Probe gebildeten Erkennungselement-Analyt-Komplexen, gefolgt von der Entfernung der dissoziierten Analytmoleküle aus den Probenbehältnissen, bevor die Zugabe der zweiten Probe erfolgen kann. In ähnlicher Weise können in sequentieller Form auch mehrere Proben auf einem Array von Messbereichen auf ihre Analyten untersucht werden.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.

Beispielsweise wird bevorzugt, dass zur Bestimmung von Analyten aus verschiedenen Gruppen der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

Die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Lumineszenzlabel kann auch bei der Bestimmung verschiedener Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe vorteilhaft sein. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens besteht daher darin, dass, beispielsweise zur Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise der Zytokine, und ihren Erkennungselementen, wie beispielsweise Anti-Zytokin-Antikörpern, der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

Wie vorangehend beschrieben, eröffnet der erfindungsgemässe Kit mit der grossen Anzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform die Möglichkeit einer vereinfachten Form der Kalibration zur qualitativen und / oder quantitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten auf einem oder mehreren Arrays. Im besten Fall ist bei dieser neuen, erfindungsgemässen Form der Kalibration der Signale einer Sensorplattform die Zugabe nur einer einzigen Kalibrationslösung erforderlich. In dieser Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens wird daher bevorzugt, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Diese Weiterentwicklung des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

Eine weitere, bevorzugte Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

46

Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Bestimmung der Lumineszenzintensität aufgrund der Anwesenheit eines oder mehrerer in einer Serie von Proben in im wesentlichen konstanter Konzentration vorhandenen Analyten umfasst. Beispielsweise sind in der DNA-Analytik, insbesondere für den Vergleich sogenannter "wild type" und "mutant" Proben sogenannte "Housekeeping Genes" bekannt, deren Häufigkeit in einer Serie von Proben ähnlicher Herkunft (Gewebe, Typ des Organismus etc.) im wesentlichen konstant ist. Ebenso sind in der Immunoanalytik bestimmte Immunoglobuline bekannt, deren Konzentration sich zwischen verschiedenen Proben eines gemeinsamen Typs von Organismen nur wenig ändert.

Bestandteil der Erfindung ist ein Verfahren nach einer der vorgenannten Ausführungsformen zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Mögliche Ausführungsformen des Verfahrens sind auch dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder -extrakten entnommen sind.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemässen Kits und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur



WO 01/92870

PCT/EP01/05995

47

Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung beispielhaft.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

48

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1:

#### **Kit zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung mehrerer Zytokin-Markerproteine in einer und mehreren Analysenproben**

a) Hauptbestandteil eines erfindungsgemässen Kits ist eine rechteckige Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 113.5 mm x 75.0 mm x 0.7 mm Dicke, verbunden mit einer 11 mm starken Polycarbonat (PC)-Schicht, welche zur Unterdrückung von Streulichtartefakten schwarz eingefärbt ist. In der PC-Schicht wurden offene, quadratische Ausparungen (Wells) mit jeweils 7 mm x 7 mm Kantenlänge, in einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von 9 mm geformt, die als Probenbehältnisse zur Aufnahme von Analysenvolumina (10-100 µl) dienen. Die Ausparungen sind in Form von 12 Spalten und 8 Reihen in einer Ebene angeordnet, so dass die Kombination aus der Sensorplattform und der PC-Struktur insgesamt 96 Probenbehältnisse umfasst.

Das Substratmaterial der Sensorplattform (optisch transparente Schicht (b) ) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat wurden durchgehende Oberflächenreliefgitter im Abstand von je 9 mm, mit einer Breite von 0.5 mm (in Ausbreitungsrichtung des über die Gitterstruktur in die Schicht (a) der Sensorplattform einzukoppelnden Anregungslichts) erzeugt. Diese Gitter weisen eine Periode von 360 nm und eine Tiefe von 12 nm auf, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zu den Spalten der Wells. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $Ta_2O_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) hat einen Brechungsindex von 2.11 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Infolge des Abscheidungsprozesses überträgt sich die Gitterstruktur der optisch transparenten Schicht (b) nahezu masstäblich im Verhältnis 1:1 in die Oberfläche der aufgetragenen Schicht (a).

Die Oberfläche der Sensorplattform wird vor dem Zusammenfügen mit der Polycarbonat-Struktur nasschemisch gereinigt, zuerst mehrfach mit Isopropanol, anschliessend mit konzentrierter Schwefelsäure, welche 2.5 % Ammoniumperoxodisulfat enthält.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

49

Anschliessend wird als Haftvermittlungsschicht eine monomolekulare Schicht (Monolayer) von Mono-Octadecylphosphat in einem Selbstorganisationsprozess (Self-Assembly) auf die hydrophile Wellenleiteroberfläche aufgebracht. Diese Oberflächenmodifizierung führt zu einer hydrophoben Oberfläche (Kontaktwinkel ca. 110° gegenüber Wasser). Der Prozess der Oberflächenmodifizierung wurde in der Literatur näher beschrieben (D. Brovelli et al., Langmuir 15 (1999) 4324 - 4327).

Auf die hydrophobe Oberfläche der mit der Haftvermittlungsschicht versehenen Sensorplattform werden 96 identische Arrays (in 12 Spalten x 8 Reihen) von je 42 Messbereichen (Spots), ihrerseits in einer Anordnung von jeweils 7 Reihen und 6 Spalten, mit einem Inkjet Plotter, Modell NP1C (Firma GeSiM mbH, Grosserkmannsdorf, DE) erzeugt.

**b)** Die Erkennungselemente zum Nachweis verschiedener Human-Interleukine, als Analyten aus der Gruppe der Zytokine (monoklonaler Maus anti-hIL-2, anti-hIL-4 und anti-hIL-6 Antikörper), werden in einer Konzentration zwischen 300 und 1000 µg/ml in zehnprozentiger phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7.4) rekonstituiert. Anschliessend werden die Antikörper-Lösungen in unterschiedlichem Ausmass in 10 % PBS (pH 7.4) verdünnt, welches bestimmt ist durch die Affinität des jeweiligen Antikörpers zum entsprechenden Antigen. Die erforderlichen Konzentrationen (100 µg/ml für anti-hIL-2 und anti-hIL-6 bzw. 50 µg/ml für anti hIL-4 Antikörper) wurden zuvor in Einzel-Interleukin-Immunoassays ermittelt. Hierdurch soll erreicht werden, dass der dynamische Bereich der zu erwartenden Signalintensitäten in einem Assay zum gleichzeitigen Nachweis aller drei Interleukine, innerhalb eines Arrays in derselben Grössenordnung liegt. An diesem Aspekt des Beispiels wird demonstriert, dass es durch geeignete Wahl der Immobilisierungsdichte verschiedener Erkennungselemente in diskreten Messbereichen, mit unterschiedlichen Affinitäten zu den jeweiligen nachzuweisenden Analyten, möglich ist, dass der dynamische Bereich der zu erwartenden Signalintensitäten in einem Assay zum gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl unterschiedlicher Analyten, innerhalb eines Arrays in derselben Grössenordnung liegt.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

50

Nach dem Aufbringen der Antikörper auf die Haftvermittlungsschicht wird für 15 min in gesättigter Wasserdampfatmosfera inkubiert, anschliessend die nicht proteinbedeckte, hydrophobe Oberfläche der Sensorplattform mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) in PBS (1 mg/ml, pH 7.4) mit einem Zusatz von 0.05% Tween 20, abgesättigt, zur Minimierung unspezifischer Bindung von Detektionsantikörpern im späteren Nachweisverfahren, danach mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Stickstoff getrocknet.

Der Durchmesser der Spots, mit einem Abstand (Zentrum-zu-Zentrum) von 500 µm, beträgt ca. 220 µm. Ein Einzelarray umfasst jeweils drei verschiedene Typen von Erkennungselementen (zur Erkennung von hIL-2, hIL-4 und hIL-6) sowie "Lumineszenzmarker-Spots" mit Cy5-fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin (Cy5-BSA). Die Immobilisierungsdichte des Cy5-BSA wird dabei so gewählt, dass die Fluoreszenzintensität dieser "Lumineszenzmarker-Spots" ebenfalls im dynamischen Bereich der erwarteten Signalintensitätsänderungen des Interleukinassays liegt. Als eine optimale Konzentration des Cy5-BSA in der Immobilisierungslösung wird für das vorliegende Beispiel eine 25 pikomolare Lösung von Cy5-BSA bestimmt, bei einer Markierungsrate von 10 Cy5-Molekülen pro BSA-Molekül. Weiterhin wird festgestellt, dass zur Erzielung einer homogenen Verteilung der fluoreszenzmarkierten BSA-Moleküle in den "Lumineszenzmarker-Spots" die Verwendung einer Mischung aus unmarkierten und fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen für die Immobilisierungslösung wesentlich besser geeignet ist als der Einsatz einer Lösung mit nur dem fluoreszenzmarkierten Protein, mit einer entsprechend niedrigeren Proteinkonzentration. Als optimal erweist sich eine Immobilisierungslösung mit einer Konzentration von 25 µg/ml unmarkiertem BSA in 10 % PBS (pH 7.4) und dem schon erwähnten Anteil von 25 pM Cy5-BSA. Die Reproduzierbarkeit der Aufbringung der "Lumineszenzmarker-Spots" wurde mit Sensorplattformen untersucht, welche in derselben Weise wie hier vorbeschrieben hergestellt wurden, deren Lumineszenzintensitäten in den "Lumineszenzmarker-Spots" aber mit einem regulären kommerziellen Scanner (Genetic Microsystems 418 Array Scanner) vermessen wurden. Dabei wurde eine Variation der jeweils über einen "Lumineszenzmarker-Spot" integrierten Lumineszenzintensität von nur 3 % bis 4 % festgestellt.

Die verschiedenen Erkennungselemente sind in drei Reihen mit jeweils vier Replikas identischer Messbereiche (Spots) gemäss Abb. 1 angeordnet, wobei die Reihen parallel zum sich im Wellenleiter ausbreitenden Anregungslicht verlaufen, um somit aus jeder Einzelmessung pro zuzuführender Probe bereits Daten zur statistischen Assayreproduzierbarkeit zu gewinnen. Die "Lumineszenzmarker-Spots" sind in vier Reihen mit je vier Spots, parallel zu den Reihen der Erkennungselement-Spots, angeordnet. Die "Lumineszenzmarker-Spots" dienen der Referenzierung des in den benachbarten Messbereichen zum Analytnachweis verfügbaren Anregungslichts; ihre Anordnung in Reihen parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die Schicht (a) einzukoppelnden und dort zu führenden Anregungslichts dient zusätzlich der Bestimmung der Dämpfung (Abschwächung) des Anregungslichts in Ausbreitungsrichtung. Zusätzlich sind noch zwei Spalten von "Lumineszenzmarker-Spots" mit je sieben Replikas zu Beginn und am Ende des Arrays, in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und geführten Anregungslichts, angeordnet. Sie dienen der Bestimmung der Homogenität der verfügbaren Anregungslichtintensität parallel zu den Linien des Einkoppelgitters.

#### **Beispiel 2: Analytisches System mit einem erfindungsgemässen Kit**

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation um eine Drehachse parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch an anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm (Melles-Griot 05-LHP-901, 1.1 mW) wird mit einer Zylinderlinse in einer Dimension aufgeweitet und durch eine spaltförmige Blende (0.5 mm x 7 mm Öffnung) geleitet, um so ein Lichtbündel von annähernd rechteckigem Querschnitt und annähernd homogener Querschnittsintensität zu erzeugen. Dabei ist die Polarisation des Laserlichts parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform ausgerichtet, zur Anregung des  $TE_0$ -Modes unter Einkoppelbedingungen. Das Anregungslicht wird von der Rückseite der Sensorplattform, d.h. durch die optisch transparente Schicht (b) hindurch, auf das Einkoppelgitter innerhalb eines der 96 Probenbehälter gerichtet, wobei das Einkoppelgitter zu einem Array von Messbereichen innerhalb eines Probenbehälters sich unter den Bedingungen des Ausführungsbeispiels jeweils am linken Rand des quadratischen Wells befindet. Der Winkel zwischen der Sensorplattform und dem eingestrahlichten Anregungslichtbündel wird durch Rotation um die vorgenannte Drehachse auf maximale Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) justiert. Mit den vorgenannten Parametern der Sensorplattform beträgt der Resonanzwinkel für die Einkopplung in Luft etwa  $2.6^\circ$ .

Als ortsauflösender Detektor dient eine CCD-Kamera (Ultra Pix 0401E, Astrom, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur  $-30^\circ\text{C}$ ), mit einem Kodak-CCD-Chip KAF 0401 E-1. Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgt mit Hilfe eines Computar-Tandem-Objektivs ( $f = 50\text{ mm}$ , 1:1.3). Zwischen den beiden Hälften des Tandem-Objektivs befinden sich, auf einem Filterwechsler montiert, 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 680 nm und 40 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge können alternierend gemessen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt durch kommerziell erhältliche Bildverarbeitungssoftware (ImagePro Plus).

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

53

**Beispiel 3: Nachweisverfahren mit einem erfindungsgemässen Kit**

Zur spezifischen Erkennung der nachzuweisenden Interleukine wird das Format eines Sandwich-Assays gewählt.

*Probenvorbereitung:*

Von den zu quantifizierenden Interleukinen (hIL-2, hIL-4, hIL-6) werden 8 Misch-Kalibrationslösungen von je 50 µl in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween20 hergestellt, welche jeweils alle drei Interleukine in gleicher Konzentration enthalten (jeweils 0, 10, 30, 70, 150, 300, 600, 1000 pg/ml). Diese Kalibrationslösungen sind vorgesehen für die gleichzeitige Erstellung von Kalibrationskurven für alle drei Analyten mittels Applikation auf dafür ausgewiesenen Arrays auf der Sensorplattform.

Die Kalibrationslösungen, wie auch die Proben mit unbekannten, zu bestimmenden Konzentrationen der drei Interleukine als Analyten, werden anschliessend mit jeweils 50 µl einer Lösung gemischt, welche eine Mischung von drei sekundären polyklonalen Nachweisantikörpern enthält ( $5 \times 10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-2-Antikörper,  $10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-4-Antikörper und  $10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-6-Antikörper in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween 20). Diese Mischungen von jeweils 100 µl Volumen werden dann gemischt mit je 100 µl einer  $5 \times 10^{-10}$  M Cy5-Streptavidin-Lösung (Amersham-Pharmacia) in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween 20. Die vorgenannten Konzentrationen der drei verschiedenen Detektions-Antikörper sind so gewählt, dass für alle drei Interleukine die erwarteten Fluoreszenzintensitätsänderungen, infolge der spezifischen Bindung der Antigen-Sekundärantikörper-Komplexe an ihre immobilisierten monoklonalen Erkennungantikörper als Erkennungselemente in den diskreten Messbereiche, von gleicher Grössenordnung sind, d.h. dass die entsprechenden Kalibrationskurven ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

An diesem Aspekt des Beispiels wird demonstriert, dass es durch geeignete Wahl der Konzentrationen der Nachweisreagentien möglich ist, dass für alle in einem einzigen

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

54

Assay gleichzeitig nachzuweisenden Analyten die erwarteten Fluoreszenzintensitäten, infolge von deren spezifischen Bindung an die jeweiligen in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente, von gleicher Grössenordnung sind, d.h. dass die entsprechenden Kalibrationskurven ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Es folgt eine einstündige Inkubation der hergestellten Misch-Lösungen bei Raumtemperatur im Dunkeln, bevor die Inkubate (je 100 µl) in die Probenbehälter gefüllt werden. Die Kalibrationslösungen werden dabei in aufsteigender Konzentration in die Probenbehälter für die Arrays A1 bis H1 (Mikrotiterplattennomenklatur, siehe Abbildung 1) der Sensorplattform gefüllt, wobei die 88 zu untersuchenden Proben mit unbekannten Konzentrationen der drei Interleukine als Analyten in den verbleibenden Probenbehältern A2 bis H12 verteilt werden. Nach weiterer, zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln werden die Arrays ausgelesen.

*Auslesen der Arrays:*

Zum Auslesen der Fluoreszenzsignale aus den Messbereichen der verschiedenen Arrays wird die Sensorplattform mit den darauf erzeugten Probenbehältern und den darin befindlichen Lösungen auf die vorangehend beschriebene Justiereinheit innerhalb des analytischen Systems montiert. Zur Bestimmung der Lumineszenzsignale aus jedem Array wird die Sensorplattform jeweils auf maximale Einkopplung des Anregungslichts über die dem jeweiligen Array zugeordnete Gitterstruktur justiert, was mit Position des Filterwechslers für die Anregungswellenlänge kontrolliert wird. Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) der Arrays mit Position des Filterwechslers für die Lumineszenzwellenlänge gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältern erfolgt sequentiell, mittels Translation der Sensorplattform zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehälter.



*Auswertung und Referenzierung:*

Die Bildanalyse erfolgt mit einer kommerziell erhältlichen Bildverarbeitungs-Software (Image Pro Plus). Dazu wird in jedem Array der integrale Fluoreszenzintensitätswert eines jeden Spots bestimmt. Für die drei verschiedenen Interleukine liegen demnach pro Array jeweils vier integrale Fluoreszenzintensitätswerte vor, von denen zu statistischen Zwecken anschliessend die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet werden.

Zusätzlich werden die zwei Cy5-BSA-Referenzspots ("Lumineszenzmarker-Spots"), aus der ersten Spalte des Arrays vor und der letzten Spalte nach der jeweiligen Reihe mit jeweils vier Messbereichen zur Interleukinbestimmung, gleichermassen ausgewertet und gemittelt. Dieser gemittelte Referenzwert dient jeweils für die Korrektur der Lumineszenzsignale aus den in der gleichen Reihe befindlichen Messbereichen für die Analytbestimmung.

Entsprechend werden für jedes Array die Mittelwerte der Cy5-BSA-Referenzspots vor und nach den Interleukin-Messbereichen in der jeweils gleichen Reihe gebildet. Aus diesen insgesamt 96 gemittelten Referenzwerten für jeden der drei Analyten wird jeweils wiederum ein Mittelwert gebildet. Der individuelle Korrekturfaktor für die Messwerte zur Analytbestimmung in einem Array ergibt sich dann als Quotient aus dem lokalen Referenzwert und dem letztgenannten Mittelwert. Durch Multiplikation mit diesem Korrekturfaktor werden die lokalen Unterschiede der verfügbaren Anregungslichtintensität auf einer gemeinsamen Sensorplattform kompensiert.

Zum Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen Sensorplattformen (im vorliegenden Beispiel drei Sensorplattformen) werden die nach dem oben beschriebenen Verfahren korrigierten Lumineszenzintensitäten auf den Wert 1 bei einer Interleukinkonzentration von 0 pg/ml normiert.

Abbildung 2 zeigt als Beispiel die für den Nachweis des Interleukin 4 erhaltenen, nicht korrigierten Rohdaten zur Kalibration dieses Multianalyt-Immunoassays, bei der die

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

56

integralen Fluoreszenzintensitätswerte in Abhängigkeit der hIL-4 Konzentration aufgetragen sind. Abbildung 3 zeigt die mithilfe der beschriebenen Mittelwertbildung erzeugten, korrigierten Kalibrationsdaten.

In Abbildung 4 ist als durchgezogene Kurve die an diese korrigierten Daten angepasste Hill-Funktion dargestellt. Die leeren Symbole zeigen die mit drei verschiedenen Sensorplattformen nach Korrektur bestimmten Kalibrationssignale. Die ausgefüllten Kreise stellen jeweils die daraus gebildeten Mittelwerte, bei den verschiedenen hIL-4 Konzentrationen, dar. Damit ergibt sich als überraschendes Gesamtergebnis, dass es mithilfe des erfindungsgemässen Kits und dem darauf basierenden Nachweisverfahren gelungen ist, in einem auf jeweils einer Sensorplattform durchgeführten vollständigen Multianalytassay, unter Erstellung von jeweils einer vollständigen Kalibrationskurve auf jeder Plattform, eine Variabilität der Signale von nur 5 % bis 20 %, selbst beim Vergleich unterschiedlicher Sensorplattformen, zu erzielen (Abbildung 5).

**Patentansprüche**

1. Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend
  - eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a),
  - mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
  - Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls
  - Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen,wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird.
2. Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.
3. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$ , besonders bevorzugt aus  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , umfasst.

4. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Drittel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.
5. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) Silikate, z. B. Glas oder Quarz, oder einen transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe umfasst, die von Polycarbonat, Polyimid, Acrylat, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrol gebildet wird.
6. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 50 nm beträgt.
7. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,4 ist.
8. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil, oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.
9. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter ist.

10. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.
11. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
12. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 11, dadurch gekennzeichnet, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen.
13. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.
14. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 13, dadurch gekennzeichnet, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können.
15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelgitter eines in Ausbreitungsrichtung eines in der Schicht (a) einer Sensorplattform geführten Anregungslichts nachfolgenden Arrays als Auskoppelgitter für das am

Einkoppelgitter des in besagter Ausbreitungsrichtung vorangehenden Arrays eingekoppelte Anregungslicht dient.

16. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.
17. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.
18. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.
19. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
20. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in den diskreten Messbereichen auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und

dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Doppelschichten" umfassen.

21. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemischen oder photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.
22. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 21, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanalogen (z. B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Peptiden, Enzymen, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten Proteinen, wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird, oder dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen, Zellbestandteile, Zellmembranen oder deren Fragmente aufgebracht werden.

23. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

24. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 23, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgetragenen Proben.

25. Kit nach einem der Ansprüche 1– 24, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.

26. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung von Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise mit immobilisierten Anti-Zytokin-Antikörpern zur Bestimmung unterschiedlicher Zytokine, zugeordnet sind.

27. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 26, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen.

28. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 27, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung unterschiedlicher



WO 01/92870

PCT/EP01/05995

63

Gruppen von Analyten, wie beispielsweise pharmazeutischer Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder derer Metaboliten und / oder der Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannter "Markerproteine", zugeordnet sind.

29. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

30. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

31. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 30, dadurch gekennzeichnet, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung jeweils 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind.

32. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

33. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

34. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 33, dadurch gekennzeichnet, dass Bereiche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen "passiviert werden", d.h. dass

zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten  
"chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise  
bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin  
oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen,  
artfremden oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten unspezifischen  
Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise  
Tween 20 –, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender,  
fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt  
von Herings- oder Lachsperma (insbesondere für Polynukleotid-  
Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie  
beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

35. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Funktion der  
Passivierung von Bereichen zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur  
Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen  
durch die Aufbringung einer Haftvermittlungsschicht nach Anspruch 20 auf der  
Sensorplattform, ohne Aufbringung zusätzlicher Substanzen, erfüllt wird.

36. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 35, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-  
dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein  
einzelner Messbereich eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt.

37. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberseite der  
Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch  
transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist,  
dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder  
mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander  
fluidisch abgedichteter Probenbehälter erzeugt werden, in denen jeweils ein oder  
mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

65

38. Kit mit einer Anordnung von Probenbehältnissen gemäss Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.
39. Kit nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass das gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Reservoir zur Aufnahme aus der Flusszelle austretender Flüssigkeit als eine Vertiefung in der Aussenwand des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers ausgebildet ist.
40. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 39, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform als Grundplatte räumliche Strukturen im Raster des Arrays der zu erzeugenden Probenbehältnisse ausgebildet sind.
41. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in der Sensorplattform ausgebildet sind.
42. Kit nach einem der Ansprüche 37 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in besagtem Körper ausgebildet sind.
43. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 37 oder 40 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

66

44. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung von Probenbehältnissen 2 – 2000, vorzugsweise 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 einzelne Probenbehältnisse umfasst.
45. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 44, dadurch gekennzeichnet, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.
46. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 45, mit einer Anordnung von beispielsweise 2 bis 8 Probenbehältnissen in einer Spalte oder beispielsweise 2 bis 12 Probenbehältnissen in einer Zeile, welche ihrerseits mit einem Träger ("Metaträger") mit den Abmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zulaufe der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.
47. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung von Probenbehältnissen durch einen zusätzlichen Abschluss, beispielsweise eine Folie, Membran oder eine Deckplatte, abgeschlossen wird.
48. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 47, dadurch gekennzeichnet, dass das Innenvolumen jedes Probenbehältnisses 0.1 µl – 1000 µl, bevorzugt 1 µl – 20 µl beträgt.
49. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiefe der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügt Körper 1 – 1000 µm, bevorzugt 20 – 200 µm beträgt.
50. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 49, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundflächen der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügt Körpers jeweils 0.1 mm<sup>2</sup> – 200 mm<sup>2</sup>, bevorzugt 1 mm<sup>2</sup> – 100 mm<sup>2</sup> betragen, wobei die Grösse der Ausnehmungen eines Arrays einheitlich

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

67

oder unterschiedlich sein kann und die Grundflächen eine beliebige, vorzugsweise rechteck- oder polygonförmige oder auch andere Geometrie haben.

51. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 50, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers sowie eines optionalen zusätzlichen Abschlusses nach Anspruch 47 ausgewählt sind aus der Gruppe von form-, spritz- oder fräsbaren Kunststoffen, Metallen, Silikaten, wie zum Beispiel Glas, Quarz oder Keramiken.

52. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfassen.

53. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 52, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfassen.

54. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen.

55. Kit nach Anspruch 52 oder Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

56. Kit nach einem der Ansprüche 52 - 55, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsauflösung des Bildes zur Referenzierung des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt.
57. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 56, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die Bestimmung des Hintergrundsignals bei der jeweiligen Lumineszenzwellenlänge neben oder zwischen den Messbereichen umfassen.
58. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 57, dadurch gekennzeichnet, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebracht) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.
59. Kit nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.
60. Kit nach einem der Ansprüche 58 - 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb eines "Lumineszenzmarker-Spots" mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher Grössenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

61. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 60, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.
62. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 61, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand und / oder die Grösse verschiedener "Lumineszenzmarker-Spots" abgestimmt sind auf die erwünschte Ortsauflösung bei der Bestimmung der Lumineszenzintensitäten aus den diskreten Messbereichen.
63. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 62, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Array auf der Sensorplattform mindestens einen "Lumineszenzmarker-Spot" umfasst.
64. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 63, dadurch gekennzeichnet, dass es zu jedem Segment von Messbereichen zur Bestimmung eines Analyten mindestens einen benachbarten "Lumineszenzmarker-Spot" gibt.
65. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 64, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Array eine durchgehende Reihe und / oder Spalte von "Lumineszenzmarker-Spots" parallel und / oder senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, zur Bestimmung der zweidimensionalen Verteilung des eingekoppelten Anregungslichts im Bereich besagten Arrays, umfasst.
66. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere ortsauflöste Referenzsignale umfassen.
67. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 66, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

70

Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen.

68. Kit nach Anspruch 67, dadurch gekennzeichnet, dass 8 – 12 Arrays einer Sensorplattform für Kalibrationszwecke vorgesehen sind.
69. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 68, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.
70. Kit nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.
71. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 70, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays ein oder mehrere Messbereiche umfassen, welche dem Nachweis eines zu Kalibrationszwecken einer Probe hinzugefügten Analyten mit bekannter Konzentration dienen.
72. Analytisches System mit einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der Gitter-Wellenleiter-Struktur umfasst.
73. Analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit



WO 01/92870

PCT/EP01/05995

71

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

74. Analytisches System nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.
75. Analytisches System nach Anspruch 73 oder Anspruch 74, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.
76. Analytisches System nach einem der Ansprüche 72 - 75, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
77. Analytisches System nach einem der Ansprüche 73 - 76, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
78. Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71 und / oder unter Verwendung eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 72 - 77, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu

untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf einer Sensorplattform als Teil besagten Kits in Kontakt gebracht werden, in ortsauflösender Weise die in besagten Messbereichen verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird und gegebenenfalls eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, kalibriert werden.

79. Verfahren nach Anspruch 78, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.
80. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 79, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
81. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 80, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.
82. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 81, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.
83. Verfahren nach Anspruch 82, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

73

oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

84. Verfahren nach einem der Ansprüche 82 – 83, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden
85. Verfahren nach Anspruch 84, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.
86. Verfahren nach Ansprüche 84, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.
87. Verfahren nach einem der Ansprüche 84 - 85, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.
88. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 87, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

89. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 88, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.
90. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 89, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
91. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 90, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgetragenen Proben.
92. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 91, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.
93. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 92, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

75

94. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 93, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise unterschiedliche Zytokine durch ihre Bindung an unterschiedliche immobilisierte Anti-Zytokin-Antikörper, bestimmt werden.
95. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 94, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus unterschiedlichen Gruppen, wie beispielsweise pharmazeutische Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder deren Metaboliten und / oder die Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannte "Markerproteine", bestimmt werden.
96. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 95, dadurch gekennzeichnet, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segements oder Arrays vorgesehen sind.
97. Verfahren nach Anspruch 96, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.
98. Verfahren nach Anspruch 96, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.
99. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 98, dadurch gekennzeichnet, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfasst.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

76

100. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 99, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen.
101. Verfahren nach Anspruch 100, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungswellenlänge für die ortsaufgelöste Referenzierung so ausgewählt wird, dass im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle bei besagter Wellenlänge keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen.
102. Verfahren nach einem der Ansprüche 99 – 101, dadurch gekennzeichnet, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.
103. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 102, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfasst.
104. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 103, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsauflösung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt.
105. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 104, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

77

Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebracht) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.

106. Verfahren nach Anspruch 105, dadurch gekennzeichnet, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.
107. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 106, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der "Lumineszenzmarkerspots" von ähnlicher Grössenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.
108. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 107, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.
109. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 108, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verminderung der Signale aus den "Lumineszenzmarker-Spots", beispielsweise infolge "Photobleachings" bei Justierungen des optischen Systems, minimiert wird.
110. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 109, dadurch gekennzeichnet, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere orts aufgelöste Referenzsignale umfasst.

111. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 110, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem einzigen Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.
112. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 111, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Lumineszenzlabel und optional zusätzlicher lumineszenzmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
113. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 112, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.
114. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 113, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe eines gegebenenfalls zusätzlichen



Analyten bekannter Konzentration zu einer oder mehreren zu untersuchenden Proben zum Nachweis auf einem oder mehreren hierfür ausgewiesenen Messbereichen der Sensorplattform umfasst.

115. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 114, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst.
116. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.
117. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt.
118. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.
119. Verfahren nach einem der Ansprüche 115 - 118, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.
120. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 119, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung von Analyten aus verschiedenen Gruppen der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabels mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

121. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 119, dadurch gekennzeichnet, dass, beispielsweise zur Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise der Zytokine, und ihren Erkennungselementen, wie beispielsweise Anti-Zytokin-Antikörpern, der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.
122. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 121, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.
123. Verfahren nach Anspruch 122, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher, kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.
124. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 123, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Bestimmung der Lumineszenzintensität aufgrund der Anwesenheit eines oder mehrerer in einer Serie von Proben in im wesentlichen konstanter Konzentration vorhandenen Analyten umfasst.
125. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 124 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren

oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymfaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

126. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 125, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen sind oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder -extrakten entnommen sind.

127. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 1 – 71 und / oder eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 72 – 77 und / oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 78 – 126 zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

1/4

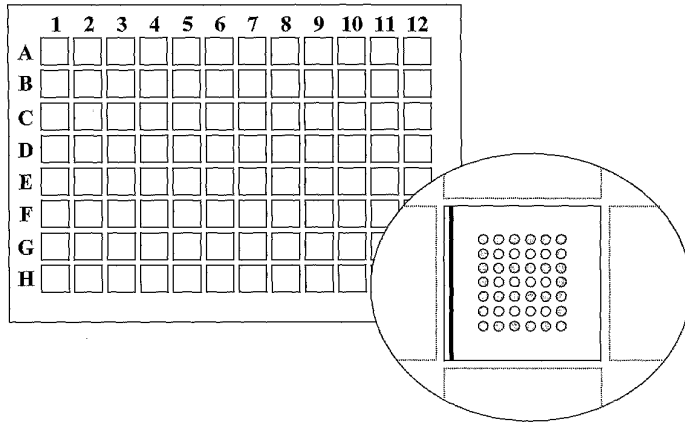
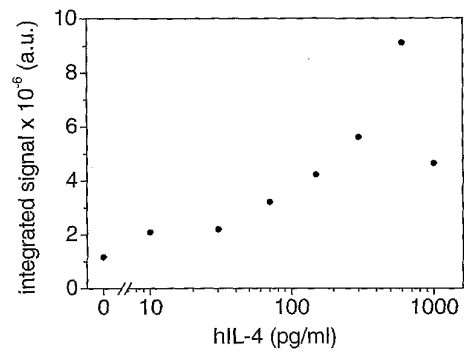


FIG. 1

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

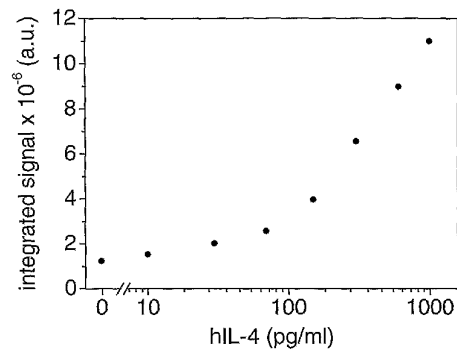
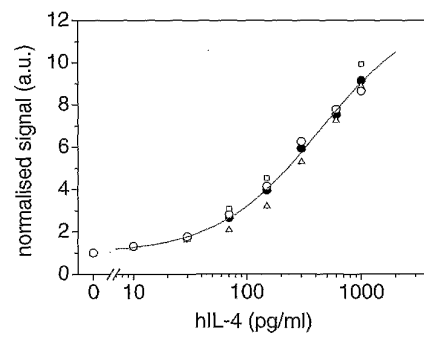
2/4

Fig. 2

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

3 / 4

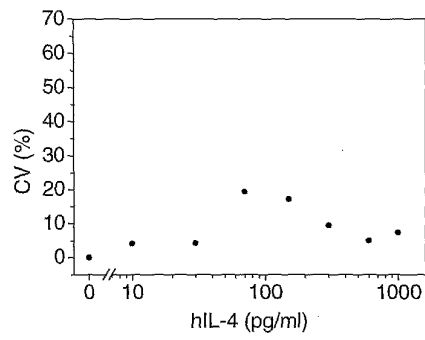
Fig. 3Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 01/92870

PCT/EP01/05995

4/4

Fig. 5

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/092870 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>2</sup>: G01N 33/543

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05995

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Mai 2001 (25.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
2000 1104/00 2. Juni 2000 (02.06.2000) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254,  
CH-4108 Witterswil (CH).

(72) Erfinder: und

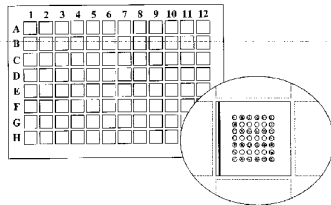
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAWLAK, Michael  
[DE/DE]; Andelsbachstrasse 5, 79275 Laufenburg (DE).  
SCHICK, Eginhard [DE/DE]; Nordschwabener Strasse 9,  
79618 Rheinfelden (DE); ABEL, Andreas, P. [CH/CH];  
Rothbergerstrasse 16a, CH-4054 Basel (CH). DUVE-  
NECK, Gert, L. [DE/DE]; Ezmattenweg 34, 79189 Bad  
Kreuzlingen (DE). EHRRAT, Markus [CH/CH]; Im Brühl  
6, CH-4312 Mägden (CH). KRESBACH, Gerhard,  
M. [DE/DE]; Burghaldenweg 6, 79219 Staufen (DE).  
SCHÜRMANN-MADER, Eveline [CH/CH]; Talhübel  
1, CH-5089 Zeihen (CH). BOPP, Martin, A. [CH/CH];  
Brunnmautstrasse 11, CH-4053 Basel (CH).

(74) Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG; Benken-  
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR DETERMINING A PLURALITY OF ANALYTES

(54) Bezeichnung: KIT UND VERFAHREN ZUR MULTANALYTBESTIMMUNG



(57) Abstract: The invention relates to various embodiments of a kit for simultaneous, qualitative and/or quantitative detection of a plurality of analytes, comprising a sensor platform consisting of a thin-layered optical wave guide with a layer (a) which is transparent at least at one excitation wavelength on a layer (b) which is also transparent at least at the same excitation wavelength, having a lower refraction index than layer (a), and at least one lattice structure (c) modulated in layer (a); in addition to at least one array of biochemical or synthetic detector elements immobilized on layer (a) and disposed in discrete measuring areas (d) either directly or by means of an adhesion promoting layer. Said detector elements are used for specific detection and/or bonding of said analytes and/or specific interaction therewith. The inventive kit also contains means for local resolution referencing of the excitation light intensity present in the measuring areas in addition to, optionally, means for calibrating at least one luminescence produced as a result of bonding between one or several analytes or as a result of the specific interaction with one or several analytes in the near field of layer (a). A liquid sample in which the analytes are to be examined is brought into contact, either directly or after mixing it with other reagents, with the measuring areas on the sensor platform. The invention also relates to analytic systems based on the inventive kit, methods which are conducted in order to detect one or several analytes and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend: eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/092870 A3



WO 01/092870 A3



(81) **Bestimmungsstaaten** (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EF, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen****Recherchenberichts:**

3. Oktober 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a), mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und/oder Bindung besagter Analyten und/oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten; Vorkehrungen zur ortsauflösenden Erfassung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen, wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplatte in Kontakt gebracht wird. Die Erfindung betrifft auch auf dem erfindungsgemässen Kit basierende analytische Systeme sowie damit durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/05995

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N3/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 35181 A (CHRISTENSEN DOUGLAS A ;UNIV UTAH RES FOUND (US); HERRON JAMES N (U) 25 September 1997 (1997-09-25) cited in the application the whole document	1-127
Y	PLOWMAN T E ET AL: "MULTIPLE-ANALYTE FLUOROIMMUNOASSAY USING AN INTEGRATED OPTICAL WAVEGUIDE SENSOR" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 71, no. 19, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 4344-4352, XP000854131 ISSN: 0003-2700 cited in the application the whole document	1-127
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 July 2002		29/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Niemann, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1993)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/05995

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ROWE C A ET AL: "ARRAY BIOSENSOR FOR SIMULTANEOUSLY IDENTIFICATION OF BACTERIAL, VIRAL, AND PROTEIN ANALYTES" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 71, 1999, pages 3846-3852, XP000996992  ISSN: 0003-2700  cited in the application  the whole document</p>	1-127
Y	<p>MENDOZA L G ET AL: "HIGH-THROUGHPUT MICROARRAY-BASED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 27, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 778,780,782-786,788, XP000992893  ISSN: 0736-6205  cited in the application  the whole document</p>	1-127
Y	<p>WO 98 29736 A (GENOMETRIX INC)  9 July 1998 (1998-07-09)  the whole document</p>	1-127
Y	<p>US 5 874 219 A (FODOR STEPHEN P A ET AL)  23 February 1999 (1999-02-23)  the whole document</p>	1-127
P,X	<p>SCHICK E ET AL: "Ultrasensitive multianalyte immunoassays: The synergy between planar waveguide- and microarray technology." EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, vol. 29, no. 4-5, 22 August 2000 (2000-08-22), page 379  XP002205023  3rd European Biophysics Congress;Munchen, Germany; September 09-13, 2000  ISSN: 0175-7571  the whole document</p>	1-127

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 01/05995

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9735181 A	25-09-1997	AU 2334497 A	10-10-1997
		CA 2248189 A1	25-09-1997
		EP 0890093 A1	13-01-1999
		JP 2000507350 T	13-06-2000
		NO 984355 A	13-11-1998
		WO 9735181 A1	25-09-1997
		US 6287871 B1	11-09-2001
WO 9829736 A	09-07-1998	AU 6646398 A	31-07-1998
		EP 0990142 A1	05-04-2000
		JP 2001510339 T	31-07-2001
		US 6083763 A	04-07-2000
		WO 9829736 A1	09-07-1998
		US 6331441 B1	18-12-2001
		US 6312960 B1	06-11-2001
US 5874219 A	23-02-1999	US 5545531 A	13-08-1996
		US 2002018991 A1	14-02-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/05995
<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 601N33/543 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RESEARCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 601N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beiz. Anspruch Nr.
Y	WO 97 35181 A (CHRISTENSEN DOUGLAS A ;UNIV UTAH RES FOUND (US); HERRON JAMES N (U) 25. September 1997 (1997-09-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-127
Y	PLOWMAN T E ET AL: "MULTIPLE-ANALYTE FLUOROIMMUNOASSAY USING AN INTEGRATED OPTICAL WAVEGUIDE SENSOR" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, Bd. 71, Nr. 19, 1. Oktober 1999 (1999-10-01), Seiten 4344-4352, XP000854131 ISSN: 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-127
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch eine am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
8. Juli 2002		29/07/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. Box 5518 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2000, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 840-3018		Bevollmächtigter Bediensteter Niemann, F

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		nationales Aktenzeichen PCT/EP 01/05995
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ROWE C A ET AL: "ARRAY BIOSENSOR FOR SIMULTANEOUSLY IDENTIFICATION OF BACTERIAL, VIRAL, AND PROTEIN ANALYTES" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, Bd. 71, 1999, Seiten 3846-3852, XP000996992 ISSN: 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-127
Y	MENDOZA L G ET AL: "HIGH-THROUGHPUT MICROARRAY-BASED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 27, Nr. 4, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 778,780,782-786,788, XP000992893 ISSN: 0736-6205 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-127
Y	WO 98 29736 A (GENOMETRIX INC) 9. Juli 1998 (1998-07-09) das ganze Dokument	1-127
Y	US 5 874 219 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 23. Februar 1999 (1999-02-23) das ganze Dokument	1-127
P,X	SCHICK E ET AL: "Ultrasensitive multianalyte immunoassays: The synergy between planar waveguide- and microarray technology." EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, Bd. 29, Nr. 4-5, 22. August 2000 (2000-08-22), Seite 379 XP002205023 3rd European Biophysics Congress;Munchen, Germany; September 09-13, 2000 ISSN: 0175-7571 das ganze Dokument	1-127

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/05995

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9735181 A	25-09-1997	AU 2334497 A	10-10-1997
		CA 2248189 A1	25-09-1997
		EP 0890093 A1	13-01-1999
		JP 2000507350 T	13-06-2000
		NO 984355 A	13-11-1998
		WO 9735181 A1	25-09-1997
		US 6287871 B1	11-09-2001
WO 9829736 A	09-07-1998	AU 6646398 A	31-07-1998
		EP 0990142 A1	05-04-2000
		JP 2001510339 T	31-07-2001
		US 6083763 A	04-07-2000
		WO 9829736 A1	09-07-1998
		US 6331441 B1	18-12-2001
		US 6312960 B1	06-11-2001
US 5874219 A	23-02-1999	US 5545531 A	13-08-1996
		US 2002018991 A1	14-02-2002

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1997)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	A
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 シック, エギンハルト  
ドイツ国、7 9 6 1 8 ラインフェルデン、ノルドシュワベナー・シュトラッセ 9

(72)発明者 アーベル, アンドレアス・ペー  
スイス国、ツェーハー - 4 0 5 4 バーゼル、ロットベルクシュトラッセ 1 6 アー

(72)発明者 ドゥフェネク, ゲルト・エル  
ドイツ国、7 9 1 8 9 パート・クロツィンゲン、エツマッテンヴェーク 3 4

(72)発明者 エーラート, マルクス  
スイス国、ツェーハー - 4 3 1 2 マグデン、イム・ブリューエル 6

(72)発明者 クレスバッハ, ゲルハルト・エム  
ドイツ国、7 9 2 1 9 シュタウフェン、ブルクハルデンヴェーク 6

(72)発明者 シュールマン - マーダー, エヴェリーネ  
スイス国、ツェーハー - 5 0 8 9 ツァイヒェン、タールヒューベル 1

(72)発明者 ポップ, マルティン・アー  
スイス国、ツェーハー - 4 0 5 3 バーゼル、ブルンマッットシュトラッセ 1 1

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 DA06 EA01 FA07 HA09 JA02 JA05  
LA01 LA02 LA03 NA13  
2G054 AA06 AA08 CA20 CA21 CA22 CA23 CA28 CE02 EA01 EA03  
FA08 FA16 FA18 FA19 FA20 GA04 JA08

## 【要約の続き】

直接又は他の試薬との混合ののち接触させられる。本発明はまた、本発明のキットに基づく分析システム、一又はいくつかの分析対象物を検出するために実施される方法及びその使用に関する。



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004510130A5</a>	公开(公告)日	2008-07-17
申请号	JP2002501026	申请日	2001-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
[标]发明人	パウラクミヒヤエル シックエギンハルト アーベルアンドレアスパー ドゥフェネクゲルトエル エーラートマルクス クレスパッハゲルハルトエム シュールマンマーダーエヴェリーネ ボップマルティンアー		
发明人	パウラク,ミヒヤエル シック,エギンハルト アーベル,アンドレアス・パー ドゥフェネク,ゲルト・エル エーラート,マルクス クレスパッハ,ゲルハルト・エム シュールマン-マーダー,エヴェリーネ ボップ,マルティン・アー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N21/76 G01N33/15 G01N33/543 G01N33/569 G01N37/00		
CPC分类号	B01L3/5085 G01N21/6452 G01N21/648 G01N33/54373 G01N2021/6441 G01N2021/6482 Y10S435/808 Y10S435/975 Y10S436/805 Y10S436/808		
FI分类号	G01N33/53.M G01N21/64.F G01N21/76 G01N33/15.Z G01N33/543.597 G01N33/569.A G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA07 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/JA05 2G043/LA01 2G043/LA02 2G043/LA03 2G043/NA13 2G054/AA06 2G054/AA08 2G054/CA20 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/FA08 2G054/FA16 2G054/FA18 2G054/FA19 2G054/FA20 2G054/GA04 2G054/JA08		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2000001104 2000-06-02 CH		
其他公开文献	JP2004510130A JP4812223B2		

#### 摘要(译)

为了同时定性和/或定量测量多种分析物，层（a）在至少一个激发波长下是透明的，至少在相同激发波长下也是透明的，其折射率低于层（a）。一种传感器平台，由薄层光波导构成，该薄层光波导在具有折射率的层（b）的顶部，并且具有直接或通过增粘层在层（a）中调制的至少一个光栅结构（c）。试剂盒的各种实施方案包括至少一个固定在层（a）中并布置在单独的测量区（d）中的生化或合成检测元件阵列。检测元件用于特异性识别和/或分析物结合和/或与之特异性相互作用。本发明的试剂盒还提供了用于局部解析参考测量区域中存在的激发光强度的装置，可选地由于一种或多种分析物之间的结合，或者包括用于校准由于与分析物的一种或几种特定相互作用而在层（a）的近场中产生的至少一种发光的装置。直接分析或在与其他试剂混合后，将分析了分析物

的液体样品与传感器平台上的测量区域接触。本发明还涉及一种基于本发明的试剂盒的分析系统，一种用于检测一种或多种分析物的方法及其用途。