

(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2004-526156
(P2004-526156A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
GO 1 N 33/545	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 33/53 J	
	GO 1 N 33/545 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁)		

(21) 出願番号 特願2002-575646 (P2002-575646)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月14日 (2002. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年9月26日 (2003. 9. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/008284
 (87) 国際公開番号 W02002/077646
 (87) 国際公開日 平成14年10月3日 (2002. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 09/817, 781
 (32) 優先日 平成13年3月26日 (2001. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503351401
 レスポンス バイオメディカル コーポレ
 イション
 カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州
 バーナビー ノースブルック コート
 8 8 5 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 ハリス ポール シー,
 アメリカ合衆国 ワシントン州 ポセル
 1 8 4 ス プレイス エス. イー. 3 0
 2 2

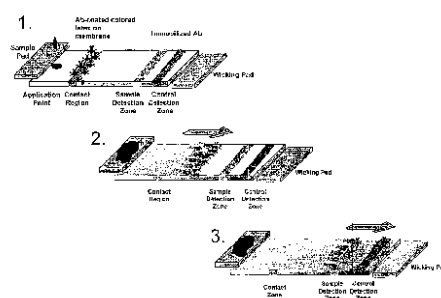
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 定量的アッセイ法における特異的結合の変動の補償

(57) 【要約】

流体試料中の関心対象の分析物量を定量的に測定する方法を開示する。本発明の方法は、投入点、接触領域（分析物結合粒子を含む）、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを有する膜を提供する段階を含み、ここで接触領域は、投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉領域は、接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する（図1）。本アッセイ法では、流体がアッセイ成分を、接触領域を介した毛管作用によって、試料捕捉ゾーンの方
 向へ輸送してこれを通過させ、続いて対照捕捉ゾーンの方
 向へ輸送してこれを通過させることができる。「サンドイッチアッセイ法」の態様では、流体試料中の分析物の量は、例えば、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量と、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比として決定可能な、補正後の分析物結合粒子の量に比例する。「競合アッセイ法」の態様では、流体試料中の分析物の量は、試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量と、対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量の比として決定可能な補正後の分析物被覆粒子の量に反比例する。

Quantitative RAMP Test



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；

b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる段階；

c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階（接触領域は、内部に固定された分析物結合粒子の集団を有し、ここで分析物結合粒子は分析物結合剤で被覆されている）；

d) 関心対象の分析物（試料中に存在する場合）が分析物結合粒子との結合を可能にすることにより、接触状態の分析物結合粒子を作製することを可能にする条件、試料中の流体が、接触状態の分析物結合粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および、接触状態の分析物結合粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、接触状態の分析物結合粒子を、対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有する）、および、接触状態の分析物結合粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の接触状態の分析物結合粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに

h) 試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量、および対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量から、補正後の分析物結合粒子量を決定する段階（流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する）。

【請求項 2】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；

b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる段階；

c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階（接触領域は、内部に固定された分析物被覆粒子の集団を有し、ここで分析物被覆粒子は関心対象の分析物で被覆されている）；

d) 試料中の流体が、分析物被覆粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および、分析物被覆粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、分析物被覆粒子を、対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有する）、および、分析物被覆粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分

10

20

30

40

50

析物被覆粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量を決定する段階；ならびに

h) 試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量、および対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量から、補正後の分析物被覆粒子量を決定する段階（流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物被覆粒子量に反比例する）。

【請求項3】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）； 10

b) 膜ストリップの試料捕捉ゾーンに流体試料を接触させる段階（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および関心対象の分析物（試料中に存在する場合）が、試料捕捉ゾーンの試料捕捉用試薬と結合することによって、停止状態の分析物を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階；

c) 膜ストリップの投入点に緩衝液を接触させる段階；

d) 緩衝液が、接触領域内に固定された分析物結合粒子の集団を、毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（分析物結合粒子は、分析物に対する抗体で被覆されている）、および停止状態の関心対象の分析物が、分析物結合粒子と相互作用することによって、停止状態の分析物-粒子複合体を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階； 20

e) 緩衝液が、分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有する）、および分析物結合粒子と対照捕捉用試薬を結合可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに 30

h) 試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量、および対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量から、補正後の分析物結合粒子量を決定する段階（流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する）。

【請求項4】

補正後の分析物結合粒子量を、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量に対する、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比として決定する、請求項1、2、または3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

補正後の分析物結合粒子量を、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量と試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の合計に対する、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比として決定する、請求項1、2、または3のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項6】

膜ストリップを、硝酸セルロースまたはガラス繊維から作製する、請求項1または2記載の方法。

【請求項7】

粒子がラテックスビーズである、請求項1または2記載の方法。

【請求項8】

粒子が標識されている、請求項1または2記載の方法。

【請求項9】

標識が、比色分子、蛍光分子、リン光分子、発光分子、化学発光分子、および酵素結合分子からなる群より選択される、請求項8記載の方法。

【請求項10】

分析物および分析物結合剤が結合対の要素であり、かつ結合対の1つの要素が、タンパク質、ホルモン、酵素、糖タンパク質、ペプチド、小分子、多糖、レクチン、抗体、抗体断片、核酸、薬剤、薬剤接合体、毒素、ウイルス、ウイルス粒子、細胞壁の一部、ハプテン、および受容体からなる群より選択される、請求項1または2記載の方法。

【請求項11】

分析物結合剤が、抗体、抗体断片、ハプテン、薬剤接合体、および受容体からなる群より選択される、請求項1または2記載の方法。

10

【請求項12】

分析物結合剤が抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項13】

対照捕捉用試薬が抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

試料捕捉用試薬が、分析物結合粒子表面の抗体と同じエピトープに対する抗体、および分析物結合粒子表面の抗体とは異なるエピトープに対する抗体からなる群より選択される抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項15】

対照捕捉用試薬が抗免疫グロブリン抗体である、請求項12記載の方法。

20

【請求項16】

被験試料が、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液、精液、硝子体、または滑液からなる群より選択される、請求項1または2記載の方法。

【請求項17】

関心対象の分析物が、ミオグロビン、CK-MB、トロポニンI、およびPSAからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項18】

関心対象の分析物が、ジゴキシン、テオフィリン、ホルモンT-3、ホルモンT-4、LSD、THC、およびバルビツール酸塩からなる群より選択される、請求項2記載の方法。

【請求項19】

段階(f)において、試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の接触状態の分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンを越えて吸い取りパッド中へと輸送する、請求項1または2記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2001年3月26日に出願された米国特許出願第09/817,781号の一部係属出願である。同出願の全開示は、参照として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

40

【0002】

発明の背景

流体試料（特に体液試料）に含まれる細胞および分析物の定量分析を行うことで、医師および患者にとって、診断および治療に関する極めて重要な情報が得られることは少なくない。定量的免疫アッセイ法では、抗原（Ag）抗体（Ab）反応の特異性を利用して、試料中のAgまたはAbの検出および定量を行う。固相免疫アッセイ法では、1種の試薬（例えばAgまたはAb）を固相表面に結合させることで、結合状態の試薬または分析物と、遊離状態の試薬または分析物の分離が容易になる。次に固相に、対象となるAgまたはAbに結合する分析物を含む試料を接触させる。結合の程度を定量することで、試料中の分析物濃度の尺度が得られる。しかし、測定可能なシグナルへと結合事象を変換することは、分析物の存在

50

または量に関連しない、アッセイ成分の結合の変動などの複数の干渉の影響を受ける。このような干渉により、定量的免疫アッセイ法の特異性および応用可能性が制限される。

【発明の開示】

【0003】

発明の概要

本発明は、内部対照を用いることで、アッセイ成分の特異的結合の変動を補償する、定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法（例えば、サンドイッチ免疫アッセイ法、または阻害免疫アッセイ法）などの固相アッセイ法により、流体試料中の関心対象の分析物の量を測定する方法に関する。本発明の方法では、関心対象の分析物および捕捉用試薬を、特異的な結合対の一部として使用する。

10

【0004】

定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法では、本発明の方法は、十分な空隙率と、分析物を含む流体による湿潤性を有し、また毛管作用により粒子の運動を可能にする、硝酸セルロースまたはガラス繊維などの適切な材料で作られた膜ストリップ（membrane strip）を用いる。膜ストリップには、投入点（application point）、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンがあり、接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する。

【0005】

「サンドイッチ」型のアッセイ法では、リポソームや有機高分子ラテックス粒子などの分析物結合粒子の集団が接触領域に固定される。分析物結合粒子は、関心対象の分析物に対する結合剤（例えば抗体）で被覆されている。このような粒子は、比色標識、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、（例えばELISAにおける）酵素結合標識、または他の適切な標識を用いて標識することで検出を容易にすることができる。試料捕捉用試薬（例えば、関心対象の分析物に対する抗体などの、関心対象の分析物に結合する薬剤）を試料捕捉ゾーンに固定する。対照捕捉用試薬（例えば、抗免疫グロブリン抗体などの、分析物結合粒子に結合する薬剤）を対照捕捉ゾーンに固定する。

20

【0006】

本発明の方法では、膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる。次に膜ストリップを、流体の毛管作用が、関心対象の分析物（存在する場合）を膜ストリップを介して、接触領域の方向へ輸送してこれを通過させることを十分可能にする条件で維持する。この装置を、関心対象の分析物が接触領域に到達する際に、接触領域内に固定された、分析物結合粒子表面に被覆された分析物結合剤に分析物が結合するようにさらに維持する。分析物と結合した状態の粒子を含む分析物結合粒子（「分析物結合」粒子）は、流体によって動かされ、また毛管作用によって、ストリップ中を試料捕捉ゾーンの方向へ移動してこれを通過する。

30

【0007】

試料捕捉用試薬は、分析物結合粒子と相互作用する。試料捕捉用試薬と分析物結合粒子が相互作用すると、分析物結合粒子は、試料捕捉ゾーンで停止する。流体の毛管作用は、分析物結合粒子を試料捕捉ゾーンの方向へさらに動かしてこれを通過させるだけでなく、（分析物結合粒子が対照捕捉用試薬に結合している）対照捕捉ゾーンの方向へ動かしてこれを通過させる。流体の毛管作用は、対照捕捉ゾーンを越えて、例えば吸い取りパッド（wicking pad）中に残存する、非結合状態の粒子を動かし続ける。次に試料捕捉ゾーンで停止状態にある、また対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量を決定する。

40

【0008】

次に、流体試料中の関心対象の分析物の量を決定する。流体試料中の関心対象の分析物の量は例えば、（1）試料捕捉ゾーンで停止した状態の分析物結合粒子の量と、（2）対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比として決定可能である。あるいは、流体試料中の関心対象の分析物の量は、（1）試料捕捉ゾーンで停止した状態の分析物結合粒子の量と、（2）対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量と、試料捕捉ゾーンで停止した状態の分析物結合粒子の量の合計の比として決定可能である。

50

【0009】

別の免疫クロマトグラフィーアッセイ法では、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を、装置の試料捕捉ゾーンに直接アプライする。膜ストリップは、流体試料中の分析物が試料捕捉用試薬と相互作用し、また試料捕捉ゾーンに固定される適切な条件で維持する。次に水または適切な緩衝液を膜の投入点に添加し、分析物結合粒子を動かす。分析物結合粒子は次に、毛管作用で試料捕捉ゾーンの方向へ輸送されてこれを通過し、続いて対照捕捉ゾーンの方向へ輸送されてこれを通過する。膜ストリップは、分析物結合粒子と、試料捕捉ゾーン内に固定された分析物の相互作用を可能にする条件でさらに維持する。分析物結合粒子が、固定された分析物と相互作用すると、試料捕捉ゾーンで分析物結合粒子の動きが停止する。また、分析物結合粒子が、対照捕捉用試薬と相互作用すると、対照捕捉ゾーンで分析物結合粒子の動きが停止する。流体試料中の分析物の量は、上述したように、対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量を考慮することで決定される。

10

【0010】

別の態様では、「競合」型または「阻害」型の免疫クロマトグラフィーアッセイ法では、分析物被覆粒子の集団が接触領域に固定される。この粒子の検出は、上述の手順で標識することにより、容易になりうる。試料捕捉用試薬（例えば、関心対象の分析物に対する抗体などの、関心対象の分析物に結合する薬剤）を試料捕捉ゾーンに固定する。また対照捕捉用試薬（例えば、分析物被覆粒子には結合するが、分析物そのものには結合しない薬剤）を対照捕捉ゾーンに固定する。

20

【0011】

本発明の方法では、膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる。次に膜ストリップを、流体の毛管作用が、関心対象の分析物（存在する場合）を膜ストリップを介して、接触領域の方向へ輸送してこれを通過させることを十分可能にする条件で維持する。この装置を、関心対象の分析物が接触領域に到達する際に、分析物被覆粒子が、ストリップを介して試料捕捉ゾーンの方向へ、流体によって、試料中に存在する任意の分析物とともに輸送されてこれを通過し、また毛管作用によって動くように、さらに維持する。

【0012】

試料捕捉用試薬は、分析物被覆粒子と相互作用する。試料捕捉用試薬と分析物被覆粒子が相互作用すると、分析物被覆粒子は、試料捕捉ゾーンで停止する。試料中では、試料捕捉ゾーンの試料捕捉用試薬上の結合部位をめぐって、分析物被覆粒子と分析物（存在する場合）が競合するので、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量は、試料中の分析物の量に反比例する。流体の毛管作用は、分析物被覆粒子を、試料捕捉ゾーンの方向へさらに輸送してこれを通過させるだけでなく、対照捕捉ゾーンの方向へ輸送してこれを通過させる（分析物被覆粒子は、同ゾーンで対照捕捉用試薬と結合する）。流体の毛管作用は、引き続き残存する非結合状態の粒子を、対照捕捉ゾーンを越えて（例えば吸い取りパッド中に）動かす。次に、試料捕捉ゾーンで停止状態にある、また対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量を決定する。

30

【0013】

次に、流体試料中の関心対象の分析物の量を決定する。流体試料中の関心対象の分析物の量は例えば、（１）試料捕捉ゾーンで停止した状態の分析物被覆粒子の量と、（２）対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量の比に反比例する。あるいは、流体試料中の関心対象の分析物の量は、（１）試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量と、（２）対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量と、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量の合計の比に反比例する。

40

【0014】

このような定量的アッセイ法における、固相を通過する流体の流れは、このアッセイ法の動的特徴に寄与する。つまり、分析物と粒子の結合の量は、固相上の位置に関連する粒子の位置と同様に変動する。このため、固相反応体の空隙率といった、固相反応体の構造の

50

変化、ならびに流体試料および他の因子の粘性の変化は、アッセイ成分の特異的結合の変動に寄与しうる。本発明の方法では、アッセイ法の動的な性質の結果生じる変動が補償されるので、溶液に含まれる関心対象の分析物量の、より正確な決定が可能となる。また、本発明のシステムは、比（例えば、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量と、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比、または試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物被覆粒子の量と、対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量の比）を関心対象の分析物量の決定に用いることで、アッセイ法の感度が高まる。より多くの粒子が試料捕捉ゾーンで結合した状態にあると、対照捕捉ゾーンにおける利用可能性は小さくなるので、関心対象の分析物濃度の上昇に伴い、分母が小さくなると同時に分子が大きくなる。また同比を用いる場合は、絶対的なシグナル値の使用は、関心対象の分析物量の計算で相殺される。したがって、シグナル値の検出に使用するシグナルリーダーの較正上の不正確さは極めて小さくなる。

10

【0015】

本発明の前述および他の目的、特徴、ならびに利点は、添付の図面において説明される、本発明の好ましい態様についての以下のより具体的な説明から明らかになるであろう。なお、図面中の同じ参照記号は、別の図全体を通して同じ部分を示す。図面は必ずしも実寸を反映しておらず、本発明の原理を説明するために強調されている。

【0016】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様について以下に説明する。

20

【0017】

本発明は、定量的なリガンド結合アッセイ法における、試薬の特異的結合の変動を補償する方法に関する。本明細書に記載されるように、出願人は、アッセイ法における特異的結合の変動を補償することで、関心対象の分析物の量の測定精度を高める手段を開発した。本発明の方法は、分析物結合粒子に特異的に結合する、対照捕捉ゾーンに対照捕捉用試薬を含む内部対照をアッセイ法に含む。対照捕捉用試薬に関する分析物結合粒子の挙動を、分析物結合粒子と、アッセイ法の表面との反応における変動量の補償に用いる。次に分析物結合粒子の変動量を、関心対象の分析物量を決定する際に考慮することで、分析物結合粒子の特異的な反応の量の、より正確な決定が可能となる。例えば、分析物結合粒子の補正後の量は、(1) 試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子量と、(2) 対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比を元に、または(1) 試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量と、(2) 対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量と、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量の合計の比を元に決定することができるほか、反応の特異的結合の成分の変動を除く別の適切な計算法で決定することができる。次に関心対象の分析物の量を、分析物結合粒子の補正後の量から計算することができる。

30

【0018】

本明細書で用いる「アッセイ法」とは、試料を分析して1種もしくは複数の分析物の有無を判定したり定量したりする、インビトロにおける手法を意味する。本発明のリガンド結合アッセイ法では、分析物および分析物結合剤を使用する。分析物および分析物結合剤は、特異的な「結合対」の要素であり、結合対の第1の要素（例えば分析物）は、第2の要素（例えば結合剤）と特異的に反応する。結合対の一方または両方の要素は抗体であってもよい。例えば、結合対の第1の要素（例えば関心対象の分析物）は抗体であってもよく、結合対の第2の要素（例えば結合剤）は抗免疫グロブリン抗体であってもよい。あるいは、結合対の第1の要素（例えば分析物）は抗原で、結合対の第2の要素（例えば結合剤）は抗体であってもよい。好ましい態様では、アッセイ法とは、手法の成分として抗体を用いる「免疫アッセイ法」である。特に好ましい態様では、免疫アッセイ法は、「サンドイッチ」アッセイ法などの定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法であり、これは、膜を介する系の成分の毛管作用を引き起こす、分析物に対する抗体などの分析物結合剤で被覆された粒子がその表面に固定されている膜に、分析物を含む流体被験試料を接触させるような、分析物を対象とした試験法である。このアッセイ法で正の結果が得られれば、それは

40

50

膜の捕捉ゾーンにおける分析物と結合剤被覆粒子間の相互作用が検出されたことを意味する。また、捕捉ゾーンの結合剤被覆粒子の量は、被験試料中の分析物の量に比例する。代表的な定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法については、例えば、内容全体が参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,753,517号を参照されたい。別の特に好ましい態様では、免疫アッセイ法は、分析物を含む流体被験試料を、分析物で被覆された粒子を内部に固定した膜に接触させて、膜を介して系の成分の毛管作用を生じさせる「阻害」アッセイ法または「競合」アッセイ法などの定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法である。このアッセイ法で正の結果が得られれば、それは膜の捕捉ゾーンにおける薬剤被覆粒子間の相互作用が検出されたことを意味する。また、捕捉ゾーンの薬剤被覆粒子の量は、被験試料中の分析物の量に反比例する。

10

【0019】

本発明のアッセイ法の他の態様では、分析物も結合剤のいずれも抗体ではなく、例えば結合対の第1の要素はリガンドであり、結合対の第2の要素は受容体でありうる、または、結合対の第1の要素はレクチンであり、結合対の第2の要素は糖でありうる。さらに別の態様では、結合対の第1の要素は核酸（例えばDNA、RNA）であり、結合対の第2の要素は、結合対の第1の要素と特異的にハイブリッドを形成する核酸の場合がある。本明細書で用いる「特異的なハイブリッドの形成」という用語は、第1の核酸が第2の核酸と（第1の核酸が第2の核酸を除く任意の核酸とハイブリッドを形成しないように）ハイブリッドを形成可能なこと（例えば、第1の核酸が、試料中の、ハイブリッドを形成する他の任意の核酸と比較して第2の核酸と高い類似性をもつ）を意味する。ハイブリッド形成の「ストリンジエンシー条件」とは、インキュベーション条件および洗浄条件（例えば、特定の核酸と第2の核酸とのハイブリッド形成を可能にする温度および緩衝液濃度の条件）を意味する当該技術分野で用いられる表現であり、第1の核酸は、第2の核酸に対して完全に（すなわち100%）相補的であるか、第1の核酸と第2の核酸は、完全未満（例えば70%、75%、80%、85%、90%、95%）の、ある程度の相補性を有しうる。例えば、ある高いストリンジエンシー条件は、完全に相補的な核酸を、相補性の低い核酸と区別する際に使用されうる。核酸のハイブリッド形成における「高ストリンジエンシー条件」、「中ストリンジエンシー条件」、および「低ストリンジエンシー条件」は、「Current Protocols in Molecular Biology」（Ausubel, F.M.ら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons（1998）、これらは、その内容全体が参照として本明細書に組み入れられる）の2.10.1~

20

30

【0020】

分析物および結合剤の組成にかかわらず、これら2種類の成分は、第1の要素が第2の要素と特異的に反応する特異的な結合対を形成する。結合対の要素間の特異的な相互作用は、結合対の第1の要素が、結合対の第2の要素と、好ましくは、アッセイ法に含まれる別の化合物との任意の結合を除外するようにして選択的に結合すること、または相互作用することを意味する。

40

【0021】

本明細書で用いる「分析物」または「関心対象の分析物」という用語は、上述の結合対の第1の要素を意味する。分析物とは、その量が測定される分子または化合物である。分析物の例には、ホルモンまたは酵素などのタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、小分子、多糖、抗体、核酸、薬剤、毒素（例えば環境毒素）、ウイルスまたはウイルス粒子、細胞壁の一部、および他の化合物などが含まれる。好ましい態様では、分析物は「免疫原性」

50

を有する。この用語は、分析物に対して、または担体（例えば、ハプテンに対する抗体が生じる可能性がある、ハプテン-担体接合体）に結合した状態の分析物に対して抗体（上述）が生じる可能性があることを意味する。いくつかの代表的な態様では、関心対象の分析物は、ミオグロビン、CK-MB、トロポニンI、PSA、ジゴキシン、テオフィリン、ホルモン（例えばT-3もしくはT-4）、または乱用性薬剤（LSD、THC、バルビツール酸塩など）の

【0022】

関心対象の分析物は流体試料中に存在する。流体試料は、比較的少ない成分を含む流体でありうる（例えば関心対象の分析物を含む水溶液）。あるいは流体試料は、複合環境試料（例えば汚水、地下水）、または複合生物学的流体（例えば全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液、精液、硝子体液、滑液、または他の生物学的流体）などの多くの成分を有する流体でありうる。1つの代表的な態様では、関心対象の分析物がミオグロビンの場合、流体試料は通常、全血、血漿、または血清である。望ましいならば、流体試料は例えば、複合的な生物学的流体が流体試料として使用される場合に、溶液（例えば水溶液）で希釈することができる。あるいは、関心対象の分析物が溶液中に存在しない場合（例えば、関心対象の分析物が固体試料中に含まれる場合）、溶液中に抽出することができる。例えば関心対象の分析物が核酸の場合、対象細胞から溶液（例えば水溶液）中に抽出することができる。

10

【0023】

本明細書で用いる「分析物結合剤」という用語は、上述の結合対の第2の要素を意味する。分析物結合剤は、抗体、ハプテン、もしくは薬剤接合体、受容体、または別の結合パートナーなどの分析物（結合対の第1の要素）に特異的に結合する化合物である。好ましい態様では、分析物結合剤は、関心対象の分析物に対する抗体である。

20

【0024】

「サンドイッチ」アッセイ法

本発明の1つの態様では、米国特許第5,753,517号に記載されている定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法などの定量的アッセイ法を行う。このアッセイ法では、高速抗原測定プラットフォーム（RAMP（商標））装置（米国特許第5,753,517号）などの固相を使用する。固相は、投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを有する膜ストリップを含む。固相は任意選択で、対照捕捉ゾーンの後に吸い取りパッドを、また投入点の前に試料パッドを含んでもよい。膜ストリップは、（1）膜の表面に沿った、また膜の内部を通過する、流体の毛管作用を可能にする十分な空隙率、（2）被覆粒子の毛管作用による輸送可能性（粒子を妨害してはならない）、および（3）分析物を含む流体によって湿った状態になること（例えば、水性流体の場合は親水性、有機溶媒の場合は疎水性）といった特徴を有する物質から作製することができる。膜の疎水性は、水性流体を使用するために疎水性表面から親水性表面への変換について記載されている米国特許第4,340,482号、または米国特許第4,618,533号などに記載されている過程によって膜を親水性とるように変化させることができる。膜の物質の例には、セルロース、硝酸セルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、ナイロン、高分子電解質イオン交換膜、アクリル共重合体/ナイロン、およびポリエーテルスルホンなどが含まれる。好ましい態様では、膜ストリップは硝酸セルロースから作製される。

30

40

【0025】

「投入点」とは、流体試料をアブライする膜上の位置である。膜の「接触領域」は、投入点に隣接する。分析物結合剤で被覆された「分析物結合粒子」の集団が、膜の「接触領域」中に固定される（膜表面に被覆される、および/または膜内に浸透する）。粒子集団の数は、粒子の大きさおよび組成、膜の組成、ならびにアッセイ法の感度レベルに応じて変化する。粒子集団の数は通常、約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ 個であるが、望ましいならば、より少ない、またはより多いものを使用することができる。好ましい態様では、粒子集団は約 2×10^7 個の粒子である。

【0026】

50

分析物結合粒子は、分析物結合剤（結合対の第2の要素）で被覆可能な粒子である。好ましい態様では、分析物結合粒子は、リポソーム、有機高分子ラテックス粒子、無機蛍光粒子、またはリン光粒子である。特に好ましい態様では、粒子はポリスチレンラテックスビーズであり、具体的には、界面活性剤を含まないSuperactive Uniform Aldehyde/Sulfate Latexes（Interfacial Dynamics Corp.、Portland、OR）などの、界面活性剤の非存在下で調製されたポリスチレンラテックスビーズである。

【0027】

粒子の大きさは膜の空隙率に比例するので、粒子は、流体の毛管作用によって膜に沿って輸送されるためには十分小さくなければならない。粒子を標識することで、検出が容易になる可能性がある。粒子は、粒子の物理的特性に大きく影響しない手段で標識されうる。例えば粒子の内部を標識することができる（すなわち標識を、リポソームの内部、またはポリスチレンラテックスビーズの内部などの粒子内に含める）。代表的な標識には、発光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素結合標識、および比色性標識（色素もしくは蛍光標識など）がある。1つの態様では蛍光標識が使用される。別の態様では、リン光粒子、特に米国特許第5,043,265号に記載されているような「上位変換性（up-converting）」のリン光粒子が使用される。

10

【0028】

粒子を、結合対の第2の要素である分析物結合剤で被覆することができる。上述したように、分析物結合剤（結合対の第2の要素）は、関心対象の分析物（結合対の第1の要素）に特異的および選択的に結合する。代表的な分析物結合剤には、抗体（または抗体断片）、ハプテン、薬剤接合体、受容体、または他の結合パートナーなどが含まれる。1つの好ましい態様では、分析物結合剤は、関心対象の分析物に対する抗体である。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でありうる。本明細書で用いる「抗体」という用語は、関心対象の分析物に十分結合する抗体断片を意味する場合もある。あるいは別の態様では、分析物結合部位を有する工学的に作製されたタンパク質などの、関心対象の分析物に特異的に結合する分子を使用することもできる（Holliger, P.およびH.R. Hoogenbloom, Trends in Biotechnology 13: 7-9 (1995); Chamow, S.M.およびA. Ashkenazi, Trends in Biotechnology 14: 52-60: 1996)。さらに別の態様では、関心対象の分析物が薬剤の場合、ハプテンまたは他の薬剤接合体を分析物結合剤として使用することができる。あるいは別の態様では、分析物に結合する受容体を使用することができる（例えば関心対象の分析物がリガンドの場合）。分析物が既知の特異性をもつ抗体の場合、粒子は、分析物抗体が誘導される抗原で被覆することができるほか、分析物抗体に対する抗体で被覆することができる。また分析物および分析物結合剤は結合対を形成するので、代表的な分析物として記載されている化合物または分子は、分析物結合剤として作用する場合もあり、また代表的な分析物結合剤として記載されているものは、上述したように同様に分析物となりうる。

20

30

【0029】

膜の接触領域は、投入点と膜の「試料捕捉ゾーン」間に位置する。試料捕捉ゾーンとは、「試料捕捉用試薬」が固定される（例えば膜表面に被覆される、および/または膜を介して浸透する）、膜ストリップ上の部分を指す。試料捕捉用試薬は、上述したような分析物結合剤である。試料捕捉用試薬は、上記と同じ分析物結合剤である必要はない。しかし、試料捕捉用試薬も、関心対象の分析物と特異的および選択的に結合するという点で、関心対象の分析物と結合対を形成する。好ましい態様では、試料捕捉用試薬は、分析物に対する抗体であり、これは、分析物の同じエピトープに対する場合、または粒子表面に被覆された分析物結合剤として使用される抗体に結合するエピトープに由来する、分析物の異なるエピトープに対して誘導されうる。

40

【0030】

本装置はさらに、「対照捕捉ゾーン」内に固定された「対照捕捉用試薬」を付加的に含む。対照捕捉用試薬は、分析物結合粒子と反応するが、測定対象の分析物とは相互作用しない試薬である。例えば、対照捕捉用試薬は、分析物結合剤被覆粒子表面の分析物結合剤と

50

反応してもよく、粒子表面の別の材料と反応してもよく、または粒子そのものと反応してもよい。例えば分析物結合剤が抗体の場合、対照捕捉用試薬は抗免疫グロブリン抗体でありうる。好ましい態様では、分析物結合剤は抗体であり、対照捕捉用試薬は抗免疫グロブリン抗体である。対照捕捉用試薬は、対照捕捉ゾーンの膜上に固定される（膜表面に被覆される、および/または膜内に浸透する）。

【0031】

対照捕捉ゾーンは、試料捕捉ゾーンが接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置するように配置される。好ましい態様では、対照捕捉ゾーンは、試料捕捉ゾーンのすぐ隣に配置する。こうすることで、アッセイ成分の毛管作用の動態が、対照捕捉ゾーンと試料捕捉ゾーンの両方において同等（例えば本質的に同等）となる。対照捕捉ゾーンと試料捕捉ゾーンは密接に隣接するが、各ゾーンで停止状態にある粒子を（例えばクロストークなしに）個別に定量可能にするための十分な空間も確保する。また好ましい態様では、試料捕捉ゾーンは、試料捕捉ゾーンと対照捕捉ゾーン間の短い距離に対して長い距離を設けることで、接触領域から分離される。毛管先端（capillary front）（膜内を毛管作用で移動する流体の境界）の進む速度は、流体の投入点から毛管先端までの距離に反比例する。粒子捕捉は本発明のアッセイ法の律速段階なので、接触領域（毛管先端が分析物結合粒子を動かす場所）と、捕捉ゾーン（粒子が捕捉される場所）との距離は、毛管先端の速度を、毛管先端が試料捕捉ゾーンに到達したときに粒子の捕捉を可能にするように十分緩やかにするものでなければならない。また、この距離は、総移動時間（毛管先端が膜全体を移動する時間）が、流体試料中の遊離の分析物を分析物結合粒子と結合させるために十分長くなるように十分広くなければならない。膜ストリップ上における成分間の最適距離は、常用の実験法で決定および調節することができる。

10

20

【0032】

定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法を行うためには、上述したように、関心対象の分析物の有無の評価対象となる流体試料を用いる。流体は、（1）膜材料を湿らせる流体、（2）抗体/抗原反応などの、関心対象の分析物と分析物結合剤間の反応を支持する（抗体/抗原の相互作用に干渉しない）流体、および（3）毛管作用による流体の輸送を可能にするために十分低い粘性をもつ流体である。好ましい態様では、流体は水溶液（体液など）である。

【0033】

定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法の第1の態様では、膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる（図1の段階1を参照）。膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物を含む流体試料を接触させた後に、毛管作用によって流体を膜の「接触領域」の方向へ動かしてこれを通過させることを可能にすることで、関心対象の分析物（流体中に存在する場合）を接触領域の方向へ輸送してこれを通過させることを可能にする条件で膜ストリップを維持する。分析物が接触領域の方向へ輸送されてこれを通過すると、流体中に存在する分析物（存在する場合）は、接触領域内に固定された分析物結合粒子と結合する。分析物と分析物結合粒子の「結合」とは、粒子表面を被覆した分析物結合剤が、関心対象の分析物と相互作用している（例えば結合している）ことを意味する。流体に含まれる分析物（存在する場合）が、接触領域内に固定された分析物結合粒子と結合することを可能にする条件で維持された分析物結合粒子は、本明細書では「接触状態の分析物結合粒子」と表現する。接触状態の分析物結合粒子は、分析物が流体試料中に存在するか否かに、また分析物が分析物結合粒子表面で分析物結合剤に結合した状態にあるか否かに依存して、分析物結合剤に結合した状態の分析物を含んでも含まなくてもよい。分析物結合粒子表面には、分析物に対する結合部位が複数存在するので、分析物結合粒子に結合した状態の分析物の存在および濃度はさまざまであり、分析物結合粒子に結合した状態の分析物の濃度は、流体試料中に存在する分析物の量に比例して大きくなり、また分析物結合粒子が、試料捕捉ゾーンで停止状態（後述）にある確率は、分析物結合粒子に結合した状態の分析物の量が増加するにつれて同様に大きくなる。したがって、接触状態にある分析物結合粒子の集団は、分析物結合剤に結合した状態の、

30

40

50

さまざまな量の分析物を含む粒子、ならびに分析物結合剤に結合した状態の分析物を（分析物結合粒子が当初、分析物結合剤に結合した状態の分析物を含まないように）含まない粒子を含む可能性がある。

【0034】

接触状態にある分析物結合粒子はさらに、流体の毛管作用によって流体試料から動かされ（図1の段階2を参照）、また接触状態の分析物結合粒子は膜に沿って、膜上の「試料捕捉ゾーン」の方向へ動いてこれを通過し、続いて、「対照捕捉ゾーン」の方向へ動いてこれを通過する（図1の段階3を参照）。膜ストリップは、接触状態の分析物結合粒子を、試料捕捉ゾーンの方向、また（続いて）対照捕捉ゾーンの方向へ動かし、また両ゾーンを通過させ、続いて対照捕捉ゾーンを越えて（例えば吸い取りパッド中に）、毛管作用によって膜に沿って動かすことを可能にすることで、任意の非結合状態の粒子を捕捉ゾーンから除く条件（例えば十分な時間と流体容積）で維持する。

10

【0035】

一部の接触状態の分析物結合粒子の動きは、接触状態の分析物結合粒子が、試料捕捉ゾーンの試料捕捉用試薬と結合することにより、続いて一部の接触状態の分析物結合粒子が、対照捕捉ゾーンの対照捕捉用試薬と結合することにより停止する。分析物結合剤が対象抗原に対する抗体である1つの好ましい態様では、対照捕捉用試薬は、分析物結合剤が由来する種の免疫グロブリンに対する抗体でありうる。この態様では、免疫グロブリンに対する抗体は、試料中の他の成分と交差反応しないはずである。例えば、ヒト試料を検討する場合、ヒトの免疫グロブリンと反応しない抗体を、対照捕捉用試薬として使用することができる。

20

【0036】

試料捕捉用試薬は、接触状態の分析物結合粒子表面の分析物結合剤に結合した状態にある分析物との結合を可能にすることにより、接触状態の分析物結合粒子に結合する。本明細書で用いる「試料-試薬-粒子の複合体」という用語は、試料捕捉用試薬と、接触状態の分析物結合粒子の複合体を意味する。接触状態の分析物結合粒子は、試料捕捉ゾーンで停止状態にあり、試料捕捉ゾーンにおいて分析物と試料捕捉用試薬の相互作用によって接触状態の分析物結合粒子が捕捉されることから、試料-試薬-粒子の複合体を形成する。

【0037】

対照捕捉用試薬は、接触状態の分析物結合粒子表面の分析物結合剤との結合を可能にすることにより、接触状態の分析物結合粒子に結合する。本明細書で用いる「対照-試薬-粒子の複合体」という用語は、対照捕捉用試薬と、接触状態の分析物結合粒子の複合体を意味する。接触状態の分析物結合粒子は、対照捕捉ゾーンで停止状態にあり、対照捕捉ゾーンにおける分析物結合粒子と対照捕捉用試薬の相互作用により、接触状態の分析物結合粒子が捕捉されることによって、対照-試薬-粒子の複合体を形成する。上述したように、対照捕捉用試薬は、分析物結合粒子（例えば、分析物結合剤被覆粒子表面の分析物結合剤、もしくは粒子表面の別の材料、または粒子そのもの）と相互作用するが、分析物そのものとは相互作用しない。

30

【0038】

次に毛管作用によって、試料捕捉ゾーンまたは対照捕捉ゾーンのいずれにおいても停止状態にない任意の接触状態の分析物結合粒子が、対照捕捉ゾーンを越えるように移動することで、停止状態にない任意の粒子が、試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンの両方から除去される。好ましい態様では、流体は、いずれの捕捉ゾーンにおいても停止状態にない任意の接触状態の分析物結合粒子を、対照捕捉ゾーンに続く吸い取りパッド中に動かす。

40

【0039】

次に、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量を測定する。分析物結合粒子は、分析物結合粒子に使用される標識の型に適した手法で検出する。好ましい態様では、分析物結合粒子の量を、分析物結合粒子の標識の蛍光量を測定する方法などの光学的方法で検出する。対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量は、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量と同様の手順で検出する。1つの態様では、分析物結合粒子の量は

50

、固相（例えば膜ストリップ）に沿った位置に存在する標識の量に正比例する曲線で表される。例えば、膜ストリップ上の各位置（例えば試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーン、および/または試料捕捉ゾーンと対照捕捉ゾーンの間、または両ゾーンに隣接する領域、および/または膜ストリップの他の領域）における粒子の量を決定して、膜ストリップに沿った位置の距離の関数としてプロットすることができる。次に粒子量を、存在する標識の量に比例する曲線下面積の関数として計算することができる。

【0040】

補正後の分析物結合粒子量を決定し、次に分析物の量を、補正後の分析物結合粒子量から、適切な計算法で決定することができる。補正後の分析物結合粒子量は、試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量に基づく。例えば1つの態様では、補正後の分析物結合粒子量は、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量と、対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量の比（R）として決定される。次に、存在する分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量（比）から、標準曲線を参照して決定することができる。標準曲線は、検出対象となる分析物を含む流体に既知濃度の関心対象の分析物を含む一連の対照試料（分析物を含まない血清など）を調製することで作成する。次に、定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法を、一連の対照試料を対象に行い、R値を各対照試料について測定し、同値を、対照試料中の分析物の濃度の関数としてプロットする。未知量の分析物を含む試料（「被験試料」）を、被験試料のR値を測定することでアッセイし、被験試料中の分析物の濃度を、標準曲線を参照して決定する。上述したように、1つの標準曲線を、1つのロットの全被験試料に対して（例えば、被験試薬用の特殊な調製物を用いる全被験試料に対して）作成して使用することができる。標準曲線を、各被験試料用に再び作成する必要はない。別の態様では、補正後の分析物結合粒子量を、対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量と試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量の合計の比（R）に対する、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量の比として決定する。次に、存在する分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量（比）から、標準曲線を参照して決定することができる。あるいは、他の比、および/または標準曲線を参照して、試料中に含まれる分析物の量を決定することもできる。また望ましいならば、バックグラウンドの標識量を、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量と対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量から、比（R）の計算を行う前に差し引くこともできる。

【0041】

本発明の第2の態様では、流体試料を（投入点ではなく）膜ストリップの捕捉ゾーンに接触させる。この膜ストリップを、流体試料中の関心対象の分析物と、試料捕捉ゾーンの試験捕捉用試薬との結合を十分可能にすることで停止状態の分析物を作製することを可能にする条件で維持する。次に膜の投入点に、水または緩衝液を接触させる。緩衝液は、（1）膜材料を湿らせ、（2）関心対象の分析物と分析物結合剤の反応を支持し（例えば抗体/抗原相互作用に干渉しない）、また（3）毛管作用による流体移動を可能にするように十分低い粘性を有する水性流体でありうる。緩衝液の例には、例えば生理食塩水、または50 mM Tris-HCl、pH 7.4が含まれる。このような緩衝液は、膜の接触領域内部に固定された分析物結合粒子の集団を、毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送してこれを通過させ、続いて対照捕捉ゾーンの方向へ輸送してこれを通過させる。この膜ストリップを、停止状態の分析物（試料捕捉ゾーンで停止状態にある）と、分析物結合粒子との相互作用を十分可能にする条件でさらに維持する。停止状態の分析物と、分析物結合粒子が相互作用すると、分析物結合粒子の動きが止まり、停止状態の試料-試薬-粒子の複合体が生じる。次に、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量を上述の手順で測定し、対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子量と、流体試料中の分析物の量を、上述したように、補正後の分析物結合粒子の量を定めることで決定する。例えば、流体試料中の関心対象の分析物の量は、（例えば標準曲線を参照して）補正後の分析物結合粒子量に比例しうる。望ましいならば、この量も、追加の内部対照成分を用いて決定し、また比を上述の手順で決定することができる。

【0042】

「競合」アッセイ法または「阻害」アッセイ法

本発明の別の態様では、米国特許第5,753,517号に記載されている定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法などの定量的アッセイ法を、競合アッセイ法または阻害アッセイ法として行う。このようなアッセイ法では、高速抗原測定プラットフォーム（RAMP（商標））装置（米国特許第5,753,517号）などの固相を使用する。上述の物質から作製された膜ストリップには、投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンが含まれる。膜ストリップは任意選択で、対照捕捉ゾーンに続く吸い取りパッド、および投入点の手前の試料パッドを含みうる。前述したように、「投入点」とは、流体試料をアプライする膜上の位置である。膜の「接触領域」は、投入点に隣接する。膜の「接触領域」には、（「サンドイッチ」アッセイ法について説明したように、分析物結合剤で被覆されるのではなく）関心対象の分析物、または関心対象の分析物の類似物で被覆されている上述の粒子集団が固定される。本明細書で用いる、分析物の「類似物」とは、上述した、分析物結合剤と結合対を形成するという点で、分析物と類似の結合特性を有する化合物である。分析物、または分析物の類似物は、粒子表面を直接被覆することができるほか、粒子に間接的に結合させることができる。後述するように、「分析物被覆粒子」という用語は、関心対象の分析物、または関心対象の分析物の類似物のいずれかで被覆された粒子を意味してもよい。

10

【0043】

膜の接触領域は膜の投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、ここに試料捕捉用試薬が停止する。試料捕捉用試薬は、上述したような分析物結合剤（例えば結合対の第2の要素）である。好ましい態様では、試料捕捉用試薬は、分析物に対する抗体である。

20

【0044】

装置は、試料捕捉ゾーンが、接触領域と対照捕捉ゾーン間に配置されるように位置する対照捕捉ゾーン内に固定された対照捕捉用試薬を追加的に含む。上述したように、対照捕捉用試薬は分析物結合粒子と反応するが、測定対象となる分析物とは相互作用しない。例えば対照捕捉用試薬は、粒子表面の別の材料（例えば、粒子と結合状態にある分析物の担体；または抗体）と、または粒子そのものと反応しうる。好ましい態様では、試料捕捉用試薬および対照捕捉剤はいずれも抗体である。対照捕捉用試薬は、対照捕捉ゾーンの膜上に固定される（膜表面に被覆される、および/または膜内に浸透する）。

【0045】

競合アッセイ成分は、「サンドイッチ」アッセイ法に関して既に述べた位置と同様に位置する。例えば好ましい態様では、対照捕捉ゾーンは試料捕捉ゾーンに隣接するので、このアッセイ成分の毛管作用の動態は、対照捕捉ゾーンと試料捕捉ゾーンの両方において同等（例えば本質的に同等）であり、またさらに対照捕捉ゾーンと試料捕捉ゾーンは、各ゾーンに停止した状態にある粒子が個別に定量可能な十分な空間も有する。さらに好ましい態様では、試料捕捉ゾーンは、キャピラリ先端の進む速度が、粒子の捕捉を可能にするように十分緩やかになって、また総移動時間が、分析物と試料捕捉用試薬の結合を可能にするように十分長くなることを確実なものとするために、試料捕捉ゾーンと対照捕捉ゾーンの間の短い距離に対して距離の長い空間によって接触領域から隔てられる。

30

【0046】

競合的な定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法を行うためには、関心対象の分析物の有無の評価対象となる流体試料を上述の手順で得る。膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる。膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物を含む流体試料を接触させた後に、流体を接触領域の方向へ輸送してこれを通過させることによって関心対象の分析物（流体中に存在する場合）を接触領域の方向へ輸送してこれを通過させることを可能にする条件で膜ストリップを維持する。接触領域の分析物被覆粒子は、試料中の分析物（存在する場合）とともに、流体の毛管作用で、流体試料からさらに動かされ、また分析物被覆試料は、膜に沿って、流体および分析物とともに、膜上の「試料捕捉ゾーン」の方向へ動いてこれを通過し、またこれに続いて「対照捕捉ゾーン」の方向へ動いてこれを通過する。膜ストリップは、分析物被覆粒子を毛管

40

50

作用によって膜に沿って試料捕捉ゾーンの方向へ動かしてこれを通過させ、また（これに続く）対照捕捉ゾーンの方向へ動かしてこれを通過させ、およびこれに続いて、対照捕捉ゾーンを越える移動（例えば吸い取りパッド中に移動）を可能にすることで、任意の非結合粒子を捕捉ゾーンから除去する条件（例えば十分な時間および流体容積）で維持する。

【0047】

一部の分析物被覆粒子の動きは、試料捕捉ゾーンにおける分析物被覆粒子と試料捕捉用試薬との結合と、これに続く、対照捕捉ゾーンにおける一部の分析物被覆粒子と対照捕捉用試薬との結合によって停止する。分析物被覆粒子は、試料捕捉用試薬との結合をめぐって、試料中の分析物（存在する場合）と競合する。試料捕捉用試薬は、分析物被覆粒子表面の分析物との結合を可能にすることにより、分析物被覆粒子と結合する。本明細書で用い

10

【0048】

対照捕捉用試薬は、分析物そのものを除く、分析物被覆粒子の任意の成分に結合することで、分析物被覆粒子に結合する。上記のように使用される「対照-試薬-分析物被覆粒子の複合体」という用語は、対照捕捉用試薬と分析物被覆粒子の複合体を意味する。上述したように、分析物被覆粒子は対照捕捉ゾーンで停止状態となって、分析物結合粒子と、対照捕捉ゾーンの対照捕捉用試薬の相互作用によって分析物被覆粒子が捕捉されるために、対

20

【0049】

次に毛管作用は、試料捕捉ゾーンまたは対照捕捉ゾーンのいずれにおいても停止状態にない任意の分析物被覆粒子を、対照捕捉ゾーンを越える方向に向かって動かすことによって、停止状態にない任意の粒子を試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンの両方から除去する。好ましい態様では、流体は、いずれの捕捉ゾーンにおいても停止状態にない、任意の接触状態の分析物被覆粒子を、対照捕捉ゾーンに続く吸い取りパッド中に動かす。

【0050】

次に、試料捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量を決定する。分析物結合粒子は、分析物結合粒子に使用する標識の型に適した手法で検出する。好ましい態様では、分析物結合粒子量は、分析物結合粒子の標識の蛍光量を測定する方法などの光学的な方法で決定する。対照捕捉ゾーンで停止状態にある分析物結合粒子の量は、試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量と同様に決定する。1つの態様では、上述したように、分析物結合粒子の量は、固相（例えば膜ストリップ）に沿った位置に存在する標識の量に正比例する曲線で表される。例えば、膜ストリップの各位置（例えば、試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーン、および/または試料捕捉ゾーンと対照捕捉ゾーンとの間の領域、または試料捕捉ゾーンと対照捕捉ゾーンに隣接する領域、および/または膜ストリップの他の領域）における粒子の量を決定して、膜ストリップに沿った位置の距離の関数としてプロットすることができる。次に粒子量を、存在する標識の量に比例する曲線下面積の関数として計算することができる。

30

40

【0051】

補正後の分析物被覆粒子量を決定し、次に分析物の量を、補正後の分析物被覆粒子量から適切な計算法で決定することができる。補正後の分析物被覆粒子量は、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンに停止状態にある分析物被覆粒子の量に基づく。例えば1つの態様では、補正後の分析物被覆粒子量は、試料捕捉ゾーンに存在する分析物被覆粒子量と、対照捕捉ゾーンに存在する分析物被覆粒子量の比（R）に反比例する。次に、存在する分析物の量を、補正後の分析物被覆粒子量（比）から、標準曲線を参照して決定することができる。標準曲線は、検出対象となる分析物を含む流体に既知濃度の関心対象の分析物を含む一連の対照試料（分析物を含まない血清など）を調製することで作成する。次に、定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法を一連の対照試料を対象に行い、R値を各対照試料

50

について測定し、同値を、対照試料中の分析物の濃度の関数としてプロットする。未知量の分析物を含む試料（「被験試料」）のアッセイ法を、被験試料のR値を測定することで行い、被験試料中の分析物の濃度を、標準曲線を参照して決定する。上述したように、1つの標準曲線を作成して、1つのロットの全被験試料（試験用試薬の特定の調製物を用いる全被験試料）に対して使用することが可能であり、標準曲線を各被験試料について再び作成する必要はない。別の態様では、補正後の分析物被覆粒子量は、対照捕捉ゾーンに存在する分析物被覆粒子の量と、試料捕捉ゾーンに存在する分析物被覆粒子量の合計に対する、試料捕捉ゾーンに存在する分析物被覆粒子量の比（R）に反比例する。次に、存在する分析物の量を、補正後の分析物被覆粒子量（比）を元に、標準曲線を参照して決定することができる。あるいは、他の比、および/または標準曲線を参照して、試料中の分析物の量を決定することもできる。また望ましいならば、バックグラウンドの標識量を、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量から差し引いてから比（R）の計算を行うことができる。

10

【0052】

本発明のアッセイ法は、特に定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法に関して説明されているが、本発明のアッセイ法は、上記の他の結合対（例えば核酸、受容体-リガンド、レクチン-糖）を対象に、上記と同じ方法で、分析物および分析物結合剤として所望の成分を対象に同様に使用することができる。本発明はまた、本明細書に記載されている方法に使用されるキットも含む。キットの成分には、特異的な結合対の第1および/または第2の要素、緩衝液、流体採取法、および標準曲線の作成に使用する対照試料、分析物結合粒子、および/または対照粒子、捕捉用試薬、および/または抗体が含まれる。

20

【0053】

本発明は以下の実施例により説明されるが、これは何ら制限する意図をもつものではない。

【0054】

実施例

ミオグロビンを対象としたサンドイッチアッセイ法

直径約0.3ミクロンのラテックス粒子（Interfacial Dynamics、Portland、OR）を入手し、粒子内にインターカレートする蛍光色素で着色した（Molecular Probes、Eugene OR、またはDuke Scientific、Palo Alto、CA）。着色後のラテックス粒子を、分析物結合抗体と以下の手順で結合した。まず粒子を遠心分離して洗浄し、リン酸緩衝液中に約0.2%（固体）の濃度になるように再懸濁した。抗体（ミオグロビンに対するマウス抗体）を1 mg/mlの濃度になるように調製した。次に0.5 mlの2%ラテックス粒子懸濁物を4 mlの抗体溶液に添加し、抗体と粒子間に共有結合をもたらすような、シアノホウ化水素ナトリウムおよびスキムミルクの溶液とインキュベートし、粒子の残りの表面をスキムミルクタンパク質で飽和させた。この懸濁物を次にボルテックミキサーで攪拌し、超音波処理を行って凝集物を破壊した。

30

【0055】

膜ストリップは、ニトロセルロース膜（Sartorius）を用いて作製した。試料捕捉剤および対照捕捉剤は、膜ストリップ上のそれぞれ試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンに、直線ストリップ作製装置（IVEK）を用いて固定した。ミオグロビンのアッセイ法を行う場合は、ヤギ抗ミオグロビンポリクローナル抗体（1 mg/ml）を試料捕捉剤として、またヤギ抗マウス免疫グロブリン（0.4 mg/ml）を対照捕捉剤として使用した。次に膜ストリップを乾燥した。

40

【0056】

膜ストリップをポリビニルアルコール（PVA）の1%溶液に浸してブロックし、余分なタンパク質結合を防いだ。次に、膜ストリップを水で洗浄してから乾燥した。

【0057】

次に分析物結合粒子を、膜ストリップの接触領域にアプライした。最初に接触領域に30%ショ糖溶液でストライプをつけてから乾燥した。次に粒子を0.1%の懸濁物として、2 μl /

50

cmのストライプ生成速度でアブライした。次に、膜を乾燥させてからアッセイ法を行った。

【0058】

アッセイ法を行うためには、ミオグロビンを含む段階希釈の緩衝液の試料(0 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml)を膜ストリップの投入点に添加し、次に流体を毛管作用で膜ストリップ全体を移動させながら、膜ストリップを室温で維持した。次に接触状態の分析物結合粒子の量を、蛍光量を検出することで、試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンで測定した。図2A~図2Fに結果を示すが、スキャン距離20 mmの直前(試料捕捉ゾーンの位置)の曲線下面積(蛍光量を示す)が、ミオグロビン濃度の上昇に伴って増加し、一方で、スキャン距離25 mmの直前(対照捕捉ゾーンの位置)の曲線下面積は、ほぼ一定の状態が変わらないことがわかる。曲線下面積が変化するのは、試験法が変動する(例えば、対照捕捉ゾーンの曲線下面積は、試料捕捉ゾーンの曲線下面積と同じパーセントで変化するため)である。この変動は、本明細書に記載されている方法で補正される。

10

【0059】

標準曲線(図3)を以上のデータから作成した。(試料捕捉ゾーンにおける曲線下面積を総合することで計算される)試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量(試料捕捉ゾーンにおける曲線下面積を積算して計算される)の、対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量(対照捕捉ゾーンにおける曲線下面積を積算して計算される)と、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量(上記の手順で計算される)の合計に対する比(R)を決定し、ミオグロビンの濃度(ng/ml)と比較した。この比は、ミオグロビンの濃度の上昇に伴い大きくなることがわかる。

20

【0060】

本発明を、本発明の好ましい態様に関して特に説明および記述したが、添付の特許請求の範囲に含まれる本発明の範囲から逸脱することなく、形状および詳細のさまざまな変更がなされることは、当業者により理解される。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法の動的性質を示す図であり、ここで、関心対象の分析物を含む流体を膜の投入点に添加し(段階1)、関心対象の分析物に結合する抗体で被覆された粒子を、流体が接触領域から動かすように膜をインキュベートし(段階2)、膜に沿って、試料捕捉ゾーンの方向へ動かし、続いて対照捕捉ゾーンの方向へ動かす(段階3)。

30

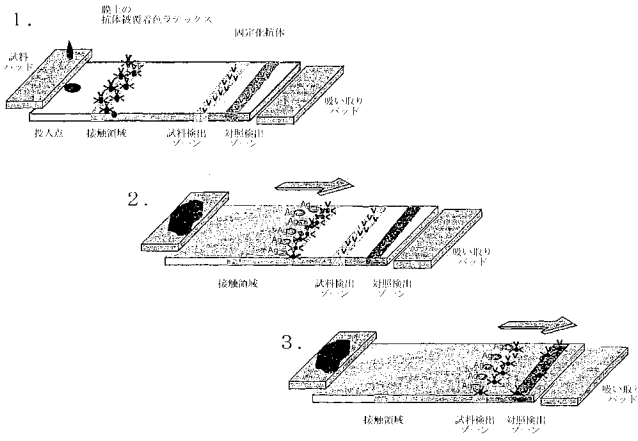
【図2】図2A~図2Fは、一連の被験試料中のミオグロビンの量を測定した定量的免疫クロマトグラフィーアッセイ法の結果を示す一連のグラフである。試料捕捉ゾーンおよび対照捕捉ゾーンで検出された蛍光分析物結合粒子の量に対応するシグナルの量は、被験試料中のミオグロビンの量の関数であることがわかる。図2Aは、0 ng/ml ミオグロビンの場合である。図2Bは、2.5 ng/ml ミオグロビンの場合である。図2Cは、3 ng/ml ミオグロビンの場合である。図2Dは、10 ng/ml ミオグロビンの場合である。図2Eは、20 ng/ml ミオグロビンの場合である。図2Fは、40 ng/ml ミオグロビンの場合である。

40

【図3】「サンドイッチ」定量免疫クロマトグラフィーアッセイ法によるミオグロビン量の測定に用いる標準曲線を示すグラフである。対照捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量および、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子の量の合計に対する、試料捕捉ゾーンに存在する分析物結合粒子量の比(R)を、試料中のミオグロビンの濃度(ng/ml)と比較する。

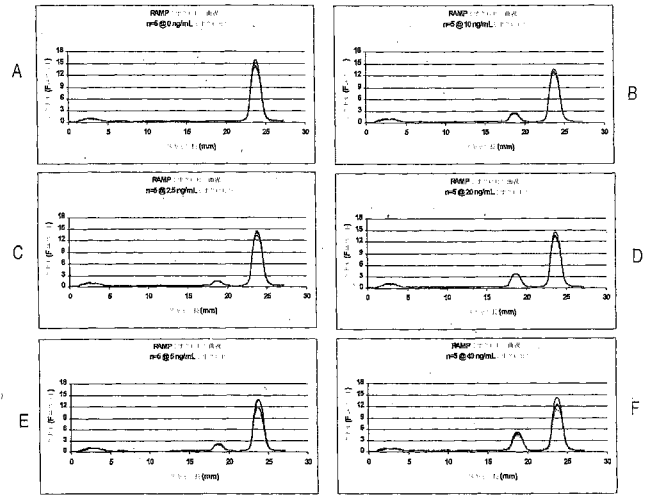
【 図 1 】

定量RAMP試験

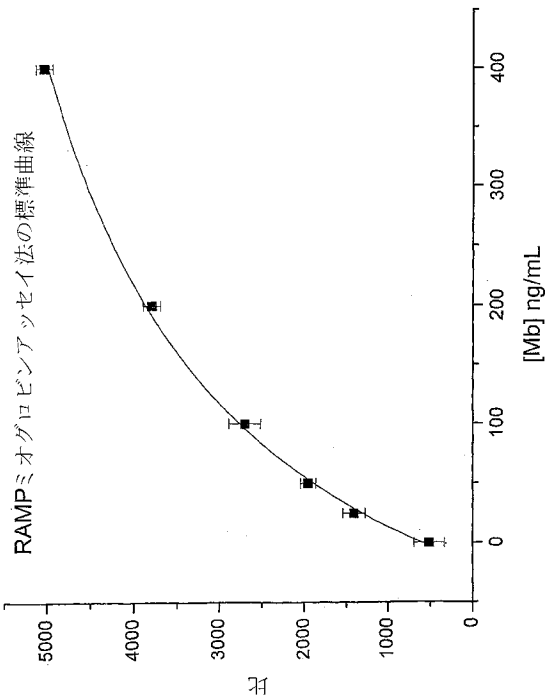


【 図 2 】

ミオグロビンの用量反応



【 図 3 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077646 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/543

RICHARDS, Brian, G. [CA/CA]; 4165 Fairway Place,
North Vancouver, British Columbia V7G 1Y8 (CA).

(21) International Application Number: PCT/US02/08284

(74) Agents: BROOK, David, E. et al.; Hamilton, Brook,
Smith & Reynolds, P.C., 530 Virginia Road, P.O. Box
9133, Concord, MA 01742-9133 (US).

(22) International Filing Date: 14 March 2002 (14.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/817,781 26 March 2001 (26.03.2001) US

(81) Designated States (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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 09/817,781 (CON)
Filed on 26 March 2001 (26.03.2001)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): RE-
SPONSE BIOMEDICAL CORPORATION [CA/CA];
8855 Northbrook Court, Burnaby, British Columbia V5J
5J1 (CA).

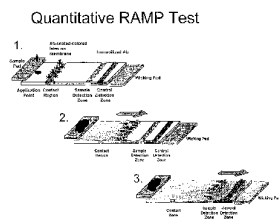
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HARRIS, Paul, C.
[US/US]; 3022 184th Place S.E., Bothell, WA 98012 (US).

Published:
— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: COMPENSATION FOR VARIABILITY IN SPECIFIC BINDING IN QUANTITATIVE ASSAYS



(57) Abstract: Methods for quantitatively measuring the amount of an analyte of interest in a fluid sample are disclosed. The methods involve providing a membrane having an application, a contact region comprising analyte-binding particles, a sample capture zone, and a control capture zone, where the contact region is between the application point and the sample capture zone, and the sample capture region is between the contact region and the control capture zone (Figure 1). In the assays, a fluid allows transport components of the assay by capillary action through the contact region, to and through the sample capture zone and subsequently to and through the control capture zone. In a "sandwich assay" embodiment, the amount of analyte in the fluid sample is related to a corrected analyte-binding particle amount, which can be determined, for example, as a ratio of the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone and the amount of analyte-binding particles on the control capture zone. In a "competitive assay" embodiment, the amount of analyte in the fluid sample is inversely related to a corrected analyte-coated particle amount, which can be determined as a ratio of the amount of analyte-coated particles in the sample capture zone and the amount of analyte-coated particles in the control capture zone.



WO 02/077646 A1

WO 02/077646 A1 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

COMPENSATION FOR VARIABILITY IN SPECIFIC BINDING
IN QUANTITATIVE ASSAYS

RELATED APPLICATION

This application is a continuation of U.S. Application No. 09/817,781, filed
5 March 26, 2001. The entire teachings of the above application is incorporated
herein by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Quantitative analysis of cells and analytes in fluid samples, particularly
bodily fluid samples, often provides critical diagnostic and treatment information for
10 physicians and patients. Quantitative immunoassays utilize the specificity of the
antigen (Ag) - antibody (Ab) reaction to detect and quantitate the amount of an Ag
or Ab in a sample. In solid phase immunoassays, one reagent (e.g., the Ag or Ab) is
attached to a solid surface, facilitating separation of bound reagents or analytes from
free reagents or analytes. The solid phase is exposed to a sample containing the
15 analyte, which binds to its Ag or Ab; the extent of this binding is quantitated to
provide a measure of the analyte concentration in the sample. Transduction of the
binding event into a measurable signal, however, is affected by a number of
interferences, such as variability in binding of components of the assay, which are
not associated with the presence or amount of the analyte. These interferences limit
20 the specificity and applicability of quantitative immunoassays.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to methods of measuring the amount of an analyte of
interest in a fluid sample, using a solid phase assay such as a quantitative
immunochromatographic assay (e.g., a sandwich immunoassay or an inhibition
25 immunoassay), in which an internal control is used to compensate for variability in
specific binding of assay components. In the methods of the invention, an analyte of
interest and a capture reagent are used as part of a specific binding pair.

For quantitative immunochromatographic assays, the methods use a
membrane strip made of a suitable material, such as cellulose nitrate or glass fiber,
30 which has sufficient porosity and the ability to be wet by the fluid containing the
analyte, and which allows movement of particles by capillary action. The membrane
strip has an application point, a contact region, a sample capture zone and a control

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-2-

capture zone; the contact region is between the application point and the sample capture zone, and the sample capture zone is between the contact region and the control capture zone.

In a "sandwich" type assay, immobilized in the contact region is a population
5 of analyte-binding particles, such as liposomes or organic polymer latex particles. The analyte-binding particles are coated with a binding agent (e.g., an antibody) to the analyte of interest. The particles can be labeled, using a colorimetric, fluorescent, luminescent, chemiluminescent, enzyme-linked label (e.g., in an ELISA), or other appropriate label, to facilitate detection. A sample capture reagent
10 (e.g., an agent that binds to the analyte of interest, such as an antibody to the analyte of interest) is immobilized in the sample capture zone. A control capture reagent (e.g., an agent that binds to the analyte-binding particles, such as an anti-immunoglobulin antibody) is immobilized in the control capture zone.

In the methods, the application point of the membrane strip is contacted with
15 the fluid sample to be assayed for the analyte of interest. The membrane strip is then maintained under conditions which are sufficient to allow capillary action of fluid to transport the analyte of interest, if analyte is present in the sample, through the membrane strip to and through the contact region. The apparatus is further maintained so that when analyte of interest reaches the contact region, analyte binds
20 to the analyte binding agent coated on the analyte-binding particles immobilized in the contact region. Analyte-binding particles, including those which are bound with analyte ("analyte-bound" particles) are mobilized by fluid and move by capillary action through the strip to and through the sample capture zone.

The sample capture reagent interacts with analyte-bound particles;
25 interaction of the sample capture reagent and the analyte-bound particles results in arrest of analyte-bound particles in the sample capture zone. Capillary action of the fluid further mobilizes the analyte-binding particles not only to and through the sample capture zone, but also to and through the control capture zone, where they bind to the control capture reagent. Capillary action of the fluid continues to
30 mobilize the remaining unbound particles past the control capture zone (e.g., into a

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-3-

wicking pad). The amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and in the control capture zone, are then determined.

The amount of analyte of interest in the fluid sample is then determined.

For example, the amount of analyte of interest in the fluid sample can be determined
5 as a ratio between 1) the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the amount of analyte-binding particles in the control capture zone. Alternatively, the amount of analyte of interest in the fluid sample can be determined as a ratio between 1) the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the sum of the amount of analyte-binding
10 particles in the control capture zone and the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone.

In an alternative immunochromatographic assay, the fluid sample to be assayed for the analyte of interest is applied directly to the sample capture zone of the apparatus. The membrane strip is maintained under appropriate conditions so
15 that analyte in the fluid sample interacts with the sample capture reagent, and is immobilized in the sample capture zone. Water or an appropriate buffer is then added to the application point of the membrane, to mobilize the analyte-binding particles, which are then moved by capillary action into and through the sample capture zone and subsequently into and through the control capture zone. The
20 membrane strip is further maintained under conditions which allow interaction of the analyte-binding particles with analyte that is immobilized in the sample capture zone. Interaction of the analyte-binding particles with immobilized analyte arrests movement of analyte-bound particles in the sample capture zone; interaction of the analyte-binding particles with the control capture reagent arrests movement of
25 analyte-binding particles in the control capture zone. The amount of analyte in the fluid sample is determined by taking into consideration the amount of analyte-binding particles that are arrested in the control capture zone, as described above.

In another embodiment, in a "competitive" or "inhibition" type immunochromatographic assay, immobilized in the contact region is a population of
30 analyte-coated particles. The particles can be labeled as described above, to facilitate detection. A sample capture reagent (e.g., an agent that binds to the analyte

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-4-

of interest, such as an antibody to the analyte of interest) is immobilized in the sample capture zone. A control capture reagent (e.g., an agent that binds to the analyte-coated particles and not to the analyte itself) is immobilized in the control capture zone.

5 In the methods, the application point of the membrane strip is contacted with the fluid sample to be assayed for the analyte of interest. The membrane strip is then maintained under conditions which are sufficient to allow capillary action of fluid to transport the analyte of interest, if analyte is present in the sample, through the membrane strip to and through the contact region. The apparatus is further
10 maintained so that when analyte of interest reaches the contact region, analyte-coated particles are mobilized by fluid and move by capillary action, along with any analyte present in the sample, through the strip to and through the sample capture zone.

The sample capture reagent interacts with analyte-coated particles;
15 interaction of the sample capture reagent and the analyte-coated particles results in arrest of analyte-coated particles in the sample capture zone. Because of competition between the analyte-coated particles and analyte (if present) in the sample for binding sites on the sample capture reagent in the sample capture zone, the amount of analyte-coated particles arrested in the sample capture zone is
20 inversely proportional to the amount of analyte in the sample. Capillary action of the fluid further mobilizes the analyte-coated particles not only to and through the sample capture zone, but also to and through the control capture zone, where they bind to the control capture reagent. Capillary action of the fluid continues to mobilize the remaining unbound particles past the control capture zone (e.g., into a
25 wicking pad). The amount of analyte-coated particles that are arrested in the sample capture zone, and in the control capture zone, are then determined.

The amount of analyte of interest in the fluid sample is then determined.
For example, the amount of analyte of interest in the fluid sample is inversely related
30 to a ratio between 1) the amount of analyte-coated particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the amount of analyte-coated particles in the control capture zone. Alternatively, the amount of analyte of interest in the fluid sample is

inversely related to a ratio between 1) the amount of analyte-coated particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the sum of the amount of analyte-coated particles in the control capture zone and the amount of analyte-coated particles that are arrested in the sample capture zone.

5 The flow of fluid through a solid phase in such quantitative assays contributes to the dynamic nature of the assays: the amount of binding of analytes to particles, as well as the location of particles in relation to positions on the solid phase, is in flux. Variations in the structure of the solid phase reactants, such as porosity of the solid phase reactants, as well as variations in the viscosity of the fluid
10 sample and other factors, can thereby contribute to variability in specific binding of components of the assays. The methods of the invention compensate for the variations that result from the dynamic nature of the assays, thereby allowing more accurate determination of the amounts of analytes of interest in solutions. Furthermore, the system increases the sensitivity of the assay when a ratio (e.g., the
15 ratio of the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and the amount of analyte-binding particles in the control capture zone; or the ratio of the amount of analyte-coated particles that are arrested in the sample capture zone, and the amount of analyte-coated particles in the control capture zone) is used to determine the amount of an analyte of interest. As more
20 particles are bound at the sample capture zone, fewer are available at the control capture zone, thereby simultaneously decreasing the denominator and increasing the numerator with an increase in concentration of the analyte of interest. In addition, when the ratio is employed, the use of absolute signal levels are canceled out in the calculation of the amount of analyte of interest; thus, inaccuracies in calibration of a
25 signal reader used to detect the signal levels are minimized.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the dynamic nature of a quantitative immunochromatographic assay, in which a fluid containing analyte of interest is added at an application point of the membrane (step 1), and the membrane is
30 incubated such that the fluid mobilizes particles coated with antibody that binds to

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-6-

the analyte of interest from the contact region, and moves them along the membrane (step 2) to the sample capture zone and subsequently to the control capture zone (step 3).

Figures 2A-2F are a series of graphs depicting the results of a quantitative immunochromatographic assay measuring the amount of myoglobin in a series of test samples. The amount of signal corresponding to the amount of fluorescent analyte-binding particles detected in the sample capture zone and in the control capture zone, are shown as a function of the amount of myoglobin in the test sample. Figure 2A, 0 ng/ml myoglobin; Figure 2B, 2.5 ng/ml myoglobin; Figure 2C, 3 ng/ml myoglobin; Figure 2D, 10 ng/ml myoglobin; Figure 2E, 20 ng/ml myoglobin; Figure 2F, 40 ng/ml myoglobin.

Figure 3 is a graph depicting a standard curve for measuring the amount of myoglobin by the "sandwich" quantitative immunochromatographic assay. The ratio (R) of the amount of the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone, to the sum of the analyte-binding particle amount present in the control capture zone and the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone is compared with the concentration of myoglobin (ng/ml) in the sample.

The foregoing and other objects, features and advantages of the invention will be apparent from the following more particular description of preferred embodiments of the invention, as illustrated in the accompanying drawings in which like reference characters refer to the same parts throughout the different views. The drawings are not necessarily to scale, emphasis instead being placed upon illustrating the principles of the invention.

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A description of preferred embodiments of the invention follows.

The current invention pertains to methods of correcting for variability in specific binding of reagents in quantitative, ligand-binding assays. As described herein, Applicants have developed a means for compensating for variability in specific binding in assays, thereby enhancing the accuracy of measurement of the

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-7-

amount of an analyte of interest. The methods involve inclusion, within the assay, of an internal control comprising a control capture reagent, in a control capture zone, that specifically binds to analyte-binding particles. The behavior of the analyte-binding particles with regard to the control capture reagent is used to compensate for the amount of variability in the reaction of the analyte-binding particles with the surfaces of the assay. The amount of variability of the analyte-binding particles can then be taken into consideration in a determination of the amount of analyte of interest, thereby allowing a more accurate determination of the amount of specific reaction of analyte-binding particles. For example, a corrected amount of analyte-binding particles can be determined by use of a ratio between 1) the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the amount of analyte-binding particles in the control capture zone; or use of a ratio between 1) the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone, and 2) the sum of the amount of analyte-binding particles in the control capture zone and the amount of analyte-binding particles that are arrested in the sample capture zone; or use of another appropriate calculation to eliminate the variability in the specific binding component of the reaction. The amount of analyte of interest can then be calculated from the corrected amount of analyte-binding particles.

20 An "assay," as used herein, refers to an *in vitro* procedure for analysis of a sample to determine the presence, absence, or quantity of one or more analytes. The ligand-binding assays of the inventions utilize an analyte and an analyte binding agent. The analyte and the analyte binding agent are members of a specific "binding pair," in which a first member of the binding pair (e.g., analyte) reacts specifically with a second member (e.g., the binding agent). One or both members of the binding pair can be an antibody: for example, a first member of the binding pair (e.g., an analyte of interest) can be an antibody, and a second member of the binding pair (e.g., a binding agent) can be anti-immunoglobulin antibody. Alternatively, the first member of the binding pair (e.g., the analyte) can be an antigen, and the second member of the binding pair (e.g., the binding agent) can be an antibody. In a preferred embodiment, the assay is an "immunoassay" which utilizes antibodies as a

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-8-

component of the procedure. In a particularly preferred embodiment, the immunoassay is a quantitative immunochromatographic assay such as a "sandwich" assay, which is a test for an analyte in which a fluid test sample containing analyte is contacted with a membrane having immobilized on it particles coated with an analyte-binding agent, such as antibodies to the analyte, causing capillary action of components of the system through the membrane, with a positive result indicated by detection of interaction between analyte and binding agent-coated particles in a capture zone of the membrane, the amount of binding agent-coated particles in the capture zone being related to the amount of analyte in the test sample. For representative quantitative immunochromatographic assays, see, for example, U.S. Patent 5,753,517, the entire teachings of which is incorporated by reference herein. In another particularly preferred embodiment, the immunoassay is a quantitative immunochromatographic assay such as an "inhibition" or "competitive" assay, which is a test for an analyte in which a fluid test sample containing analyte is contacted with a membrane having immobilized within it particles coated with the analyte, causing capillary action of components of the system through the membrane, with a positive result indicated by detection of interaction between agent-coated particles in a capture zone of the membrane, the amount of agent-coated particles in the capture zone being inversely related to the amount of analyte in the test sample.

In other embodiments of the assays of the invention, neither the analyte nor the binding agent are antibodies: for example, the first member of the binding pair can be a ligand, and the second member of the binding pair can be a receptor; alternatively, the first member of the binding pair can be a lectin, and the second member of the binding pair can be a sugar. In still another embodiment, the first member of the binding pair can be a nucleic acid (e.g., DNA, RNA), and the second member of the binding pair can be a nucleic acid which specifically hybridizes to the first member of the binding pair. "Specific hybridization," as used herein, refers to the ability of a first nucleic acid to hybridize to a second nucleic acid in a manner such that the first nucleic acid does not hybridize to any nucleic acid other than to the second nucleic acid (e.g., when the first nucleic acid has a higher

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-9-

similarity to the second nucleic acid than to any other nucleic acid in a sample wherein the hybridization is to be performed). "Stringency conditions" for hybridization is a term of art which refers to the incubation and wash conditions, e.g., conditions of temperature and buffer concentration, which permit hybridization of a particular nucleic acid to a second nucleic acid; the first nucleic acid may be perfectly (i.e., 100%) complementary to the second, or the first and second may share some degree of complementarity which is less than perfect (e.g., 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%). For example, certain high stringency conditions can be used which distinguish perfectly complementary nucleic acids from those of less complementarity. "High stringency conditions", "moderate stringency conditions" and "low stringency conditions" for nucleic acid hybridizations are explained on pages 2.10.1-2.10.16 and pages 6.3.1-6.3.6 in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, (1998), the entire teachings of which are incorporated by reference herein). The exact conditions which determine the stringency of hybridization depend not only on ionic strength (e.g., 0.2XSSC, 0.1XSSC), temperature (e.g., room temperature, 42°C, 68°C) and the concentration of destabilizing agents such as formamide or denaturing agents such as SDS, but also on factors such as the length of the nucleic acid sequence, base composition, percent mismatch between hybridizing sequences and the frequency of occurrence of subsets of that sequence within other non-identical sequences. Thus, equivalent conditions can be determined by varying one or more of these parameters while maintaining a similar degree of identity or similarity between the two nucleic acid molecules.

Regardless of the composition of the analyte and the binding agent, these two components nevertheless form a specific binding pair, in which the first member reacts specifically with the second member. Specific interaction between the members of the binding pair indicates that the first member of the binding pair preferentially binds or otherwise interacts with the second member of the binding pair, preferably to the exclusion of any binding to another compound in the assay.

The terms, "analyte" or "analyte of interest," as used herein, refer to a first member of a binding pair as described above. The analyte is a molecule or

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-10-

compound for which the amount will be measured. Examples of analytes include proteins, such as hormones or enzymes; glycoproteins; peptides; small molecules; polysaccharides; antibodies; nucleic acids; drugs; toxins (e.g., environmental toxins); viruses or virus particles; portions of a cell wall; and other compounds. In a preferred embodiment, the analyte is "immunogenic," which indicates that antibodies (as described below) can be raised to the analyte, or to an analyte that is bound to a carrier (e.g., a hapten-carrier conjugate, for which antibodies can be raised to the hapten). In some representative embodiments, the analyte of interest can be myoglobin; CK-MB; troponin I; PSA; digoxin; theophylline; a hormone (e.g., T-3 or T-4); or a drug of abuse (LSD, THC, barbituates, etc.).

The analyte is in a fluid sample. The fluid sample can be a fluid having relatively few components, for example, an aqueous solution containing the analyte of interest; alternatively, the fluid sample can be a fluid having many components, such as a complex environmental sample (e.g., sewage, groundwater), or a complex biological fluid (e.g., whole blood, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, saliva, semen, vitreous fluid, synovial fluid, or other biological fluid). In one representative embodiment, if the analyte of interest is myoglobin, the fluid sample is usually whole blood, plasma or serum. If desired, the fluid sample can be diluted; for example, if a complex biological fluid is used as the fluid sample, it can be diluted with a solution (e.g., an aqueous solution). Alternatively, if the analyte of interest is not in solution (e.g., the analyte of interest is in a solid sample), it can be extracted into solution; for example, if the analyte of interest is a nucleic acid, it can be extracted from cells of interest into a solution (e.g., an aqueous solution).

The "analyte-binding agent," as used herein, refers to second member of a binding pair as described above. The analyte-binding agent is a compound that specifically binds to the analyte (the first member of the binding pair), such as an antibody, a hapten or drug conjugate, a receptor, or another binding partner. In a preferred embodiment, the analyte-binding agent is an antibody to the analyte of interest.

"SANDWICH" ASSAYS

In one embodiment of the invention, a quantitative assay such as the quantitative immunochromatographic assay described in U.S. Patent 5,753,517, is performed. In such an assay, a solid phase, such as a rapid antigen measurement platform (RAMP™) apparatus (U.S. Patent 5,753,517), is used. The solid phase includes a membrane strip having an application point, a contact region, a sample capture zone, and a control capture zone. The solid phase may optionally include a wicking pad following the control capture zone, and a sample pad preceding the application point. The membrane strip can be made of a substance having the following characteristics: sufficient porosity to allow capillary action of fluid along its surface and through its interior; the ability to allow movement of coated particles by capillary action (i.e., it must not block the particles); and the ability to be wet by the fluid containing the analyte (e.g., hydrophilicity for aqueous fluids, hydrophobicity for organic solvents). Hydrophobicity of a membrane can be altered to render the membrane hydrophilic for use with aqueous fluid, by processes such as those described in U.S. Pat. No. 4,340,482, or U.S. Pat. No. 4,618,533, which describe transformation of a hydrophobic surface into a hydrophilic surface. Examples of membrane substances include: cellulose, cellulose nitrate, cellulose acetate, glass fiber, nylon, polyelectrolyte ion exchange membrane, acrylic copolymer/nylon, and polyethersulfone. In a preferred embodiment, the membrane strip is made of cellulose nitrate.

The "application point" is the position on the membrane where a fluid sample is applied. The "contact region" of the membrane is adjacent to the application point. Immobilized (coated on and/or permeated in the membrane) in the "contact region" of the membrane is a population of "analyte-binding particles" which are coated with the analyte-binding agent. The population of particles varies, depending on the size and composition of the particles, the composition of the membrane, and the level of sensitivity of the assay. The population typically ranges approximately between 1×10^3 and 1×10^9 , although fewer or more can be used if desired. In a preferred embodiment, the population is approximately 2×10^7 particles.

The analyte-binding particles are particles which can be coated with the analyte-binding agent (the second member of the binding pair). In a preferred embodiment, the analyte-binding particles are liposomes, organic polymer latex particles, inorganic fluorescent particles or phosphorescent particles. In a particularly preferred embodiment, the particles are polystyrene latex beads, and most particularly, polystyrene latex beads that have been prepared in the absence of surfactant, such as surfactant-free Superactive Uniform Aldehyde/Sulfate Latexes (Interfacial Dynamics Corp., Portland, OR).

The size of the particles is related to porosity of the membrane: the particles must be sufficiently small to be transported along the membrane by capillary action of fluid. The particles can be labeled to facilitate detection. The particles are labeled by a means which does not significantly affect the physical properties of the particles; for example, the particles are labeled internally (that is, the label is included within the particle, such as within the liposome or inside the polystyrene latex bead). Representative labels include luminescent labels; chemiluminescent labels; phosphorescent labels; enzyme-linked labels; and colorimetric labels, such as dyes or fluorescent labels. In one embodiment, a fluorescent label is used. In another embodiment, phosphorescent particles are used, particularly "up-converting" phosphorescent particles, such as those described in U.S. Patent No. 5,043,265.

The particles are coated with an analyte-binding agent that is a second member of the binding pair. As described above, the analyte-binding agent (second member of the binding pair) specifically and preferentially binds to the analyte of interest (first member of the binding pair). Representative analyte-binding agents include antibodies (or fragments thereof); haptens; drug conjugates; receptors; or other binding partners. In one preferred embodiment, the analyte-binding agent is an antibody to the analyte of interest. Antibodies can be monoclonal antibodies or polyclonal antibodies. The term "antibody", as used herein, also refers to antibody fragments which are sufficient to bind to the analyte of interest. Alternatively, in another embodiment, molecules which specifically bind to the analyte of interest, such as engineered proteins having analyte binding sites, can also be used (Holliger, P. and H. R. Hoogenbloom, *Trends in Biotechnology* 13:7-9 (1995); Chamow, S. M.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-13-

and A. Ashkenazi, *Trends in Biotechnology* 14:52-60:1996)). In still another embodiment, if the analyte of interest is a drug, a hapten or other drug conjugate can be used as the analyte binding agent. Alternatively, in a further embodiment, a receptor which binds to the analyte can be used (e.g., if the analyte of interest is a ligand). If the analyte is an antibody of known specificity, the particles can be coated with the antigen against which the analyte-antibody is directed, or can be coated with antibody to the analyte-antibody. Furthermore, because the analyte and the analyte binding agent form a binding pair, compounds or molecules described as representative analytes can also serve as analyte binding agents, and those described as representative analyte binding agents can similarly serve as analytes, as described herein.

The contact region of the membrane is between the application point and the "sample capture zone" of the membrane. The sample capture zone refers to a point on the membrane strip at which a "sample capture reagent" is immobilized (e.g., coated on and/or permeated through the membrane). The sample capture reagent is an analyte-binding agent, such as those described above. The sample capture reagent need not be the same analyte binding agent as described above; however, the sample capture reagent also forms a binding pair with the analyte of interest, in that it specifically and preferentially binds to the analyte of interest. In a preferred embodiment, the sample capture reagent is an antibody directed against the analyte; it can be directed against the same epitope of the analyte as, or against a different epitope of the analyte from, the epitope that binds to the antibodies used as analyte-binding agents coated on the particles.

The apparatus additionally includes a "control capture reagent" immobilized in a "control capture zone." The control capture reagent is a reagent which reacts with the analyte binding particles, but which does not interact with the analyte to be measured: for example, the control capture reagent can react with the analyte-binding agent on the analyte-binding agent-coated particles; with another material on the particles; or with the particles themselves. For example, if the analyte-binding agent is an antibody, the control capture reagent can be an anti-immunoglobulin antibody. In a preferred embodiment, the analyte-binding agent is an antibody, and

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-14-

the control capture reagent is an anti-immunoglobulin antibody. The control capture reagent is immobilized on the membrane (coated on and/or permeated in the membrane) in a control capture zone.

The control capture zone is positioned such that the sample capture zone is
5 between the contact region and the control capture zone. In a preferred
embodiment, the control capture zone is closely adjacent to the sample capture zone,
so that the dynamics of the capillary action of the components of the assay are
similar (e.g., essentially the same) at both the control capture zone and the sample
capture zone. Although they are closely adjacent, the control capture zone and the
10 sample capture zone are also sufficiently spaced such that the particles arrested in
each zone can be quantitated individually (e.g., without cross-talk). Furthermore, in
a preferred embodiment, the sample capture zone is separated from the contact
region by a space that is a large distance, relative to the small distance between the
sample capture zone and the control capture zone. The speed of the capillary front
15 (the border of the fluid moving through the membrane by capillary action) is
inversely related to the distance of the capillary front from the application point of
the fluid. Because particle capture is the rate limiting step in the assay, the distance
between the contact region (where the capillary front mobilizes analyte-binding
particles) and the capture zones (where particles are captured) must be sufficient to
20 retard the speed of the capillary front to a rate that is slow enough to allow capture of
particles when the capillary front reaches the sample capture zone. In addition, the
distance must be sufficiently large so that the total time of migration (movement of
the capillary front through the entire membrane) is long enough to allow free analyte
in a fluid sample to bind to analyte-binding particles. The optimal distances
25 between the components on the membrane strip can be determined and adjusted
using routine experimentation.

To perform the quantitative immunochromatographic assay, a fluid sample to
be assessed for the presence of the analyte of interest, as described above, is used.
The fluid can be a fluid that wets the membrane material; that supports a reaction
30 between the analyte of interest and the analyte binding agent, such as the
antibody/antigen reaction (i.e., does not interfere with antibody/antigen interaction);

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-15-

and that has a viscosity that is sufficiently low to allow movement of the fluid by capillary action. In a preferred embodiment, the fluid is an aqueous solution (such as a bodily fluid).

In a first embodiment of the quantitative immunochromatographic assay, the application point of the membrane strip is contacted with the fluid sample to be assayed for the analyte of interest (see Figure 1, step 1). After the membrane strip is contacted with the fluid sample containing the analyte of interest at the application point, the membrane strip is maintained under conditions which allow fluid to move by capillary action to and through the "contact region" of the membrane, thereby transporting the analyte of interest (if present in the fluid) to and through the contact region. As the analyte is transported to and through the contact region, analyte that is present in the fluid (if any is present) binds to the analyte-binding particles immobilized in the contact region. "Binding" of analyte to the analyte-binding particles indicates that the analyte-binding agent coated onto the particle is interacting with (e.g., binding to) analyte of interest. Analyte-binding particles which have been maintained under conditions allowing analyte in the fluid (if present) to bind to the analyte-binding particles immobilized in the contact region are referred to herein as "contacted analyte-binding particles". Contacted analyte-binding particles may or may not have analyte bound to the analyte-binding agent, depending on whether or not analyte is present in the fluid sample and whether analyte has bound to the analyte-binding agent on the analyte-binding particles. Because there are multiple binding sites for analyte on the analyte-binding particles, the presence and the concentration of analyte bound to analyte-binding particles varies; the concentration of analyte bound to the analyte-binding particles increases proportionally with the amount of analyte present in the fluid sample, and the probability of an analyte-binding particle being arrested in the sample capture zone (as described below) similarly increases with increasing amount of analyte bound to the analyte-binding particles. Thus, the population of contacted analyte-binding particles may comprise particles having various amount of analyte bound to the analyte-binding agent, as well as particles having no analyte bound to the analyte-

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-16-

binding agent (just as the analyte-binding particles initially have no analyte bound to the analyte-binding agent).

The contacted analyte-binding particles are further mobilized by capillary action of the fluid from the fluid sample (see Figure 1, step 2), and the contacted analyte-binding particles move along the membrane to and through the "sample capture zone" on the membrane and subsequently to and through the "control capture zone" (see Figure 1, step 3). The membrane strip is maintained under conditions (e.g., sufficient time and fluid volume) which allow the contacted analyte-binding particles to move by capillary action along the membrane to and through both the sample capture zone and (subsequently) to the control capture zone, and subsequently beyond the control capture zone (e.g., into a wicking pad), thereby removing any non-bound particles from the capture zones.

The movement of some of the contacted analyte-binding particles is arrested by binding of contacted analyte-binding particles to the sample capture reagent in the sample capture zone, and subsequently by binding of some of the contacted analyte-binding particles to the control capture reagent in the control capture zone. In one preferred embodiment in which the analyte-binding agent is antibody to the antigen of interest, the control capture reagent can be antibody against immunoglobulin of the species from which the analyte-binding agent is derived. In this embodiment, the antibody to immunoglobulin should be non-cross reactive with other components of the sample: for example, if a human sample is being tested, an antibody that does not react with human immunoglobulin can be used as the control capture reagent.

Sample capture reagent binds to contacted analyte-binding particles by binding to analyte which is bound to analyte-binding agent on the contacted analyte-binding particles. The term, "sample-reagent-particle complexes", as used herein, refers to a complex of the sample capture reagent and contacted analyte-binding particles. Contacted analyte-binding particles are arrested in the sample capture zone, forming the sample-reagent-particle complexes, due to capture of contacted analyte-binding particles by interaction of analyte with sample capture reagent in the sample capture zone.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-17-

Control capture reagent binds to contacted analyte-binding particles by binding to analyte-binding agent on the contacted analyte-binding particles. The term, "control-reagent-particle complexes," as used herein, refers to a complex of the control capture reagent and contacted analyte-binding particles. Contacted analyte-binding particles are arrested in the control capture zone, forming the control-reagent-particle complexes, due to capture of contacted analyte-binding particles by interaction of analyte binding particles with control capture reagent in the control capture zone. As indicated above, the control capture reagent interacts with the analyte-binding particles (e.g., with the analyte-binding agent on the analyte-binding agent-coated particles, or another material on the particles, or with the particles themselves), but not with the analyte itself.

Capillary action subsequently moves any contacted analyte-binding particles that have not been arrested in either the sample capture zone or the control capture zone, onwards beyond the control capture zone, thereby removing any particles that have not been arrested from both the sample capture zone and the control capture zone. In a preferred embodiment, the fluid moves any contacted analyte-binding particles that have not been arrested in either capture zone into a wicking pad which follows the control capture zone.

The amount of analyte-binding particles arrested in the sample capture zone is then detected. The analyte-binding particles are detected using an appropriate means for the type of label used on the analyte-binding particles. In a preferred embodiment, the amount of analyte-binding particles is detected by an optical method, such as by measuring the amount of fluorescence of the label of the analyte-binding particles. The amount of analyte-binding particles arrested in the control capture zone is detected in the same manner as the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone. In one embodiment, the amount of analyte-binding particles is represented by a curve that is directly related to the amount of label present at positions along the solid phase (e.g., the membrane strip). For example, the amount of particles at each position on the membrane strip (e.g., at the sample capture zone and the control capture zone, and/or areas in between or adjacent to the sample capture zone and the control capture zone, and/or other areas

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-18-

of the membrane strip) can be determined and plotted as a function of the distance of the position along the membrane strip. The amount of particles can then be calculated as a function of the area under the curve, which is related to the amount of label present.

5 A corrected analyte-binding particle amount is determined, and the amount of analyte can then be determined from the corrected analyte-binding particle amount using appropriate calculation. The corrected analyte-binding particle amount is based on the amount of analyte-binding particles arrested in the sample capture zone and in the control capture zone. For example, in one embodiment, the
10 corrected analyte-binding particle amount is determined as a ratio (R) of the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone to the analyte-binding particle amount present in the control capture zone. The amount of analyte present can be then determined from the corrected analyte-binding particle amount (the ratio), utilizing a standard curve. The standard curve is generated by preparing a
15 series of control samples, containing known concentrations of the analyte of interest in the fluid in which the analyte is to be detected (such as serum depleted of the analyte). The quantitative immunochromatographic assay is then performed on the series of control samples; the value of R is measured for each control sample; and the R values are plotted as a function of the concentration of analyte included in the
20 control sample. Samples containing an unknown amount of analyte (the "test samples") are assayed by measuring the value of R for the test sample, and the concentration of analyte in the test sample is determined by referring to the standard curve. As above, one standard curve can be generated and used for all test samples in a lot (e.g., for all test samples using a specified preparation of test reagents); it is
25 not necessary that the standard curve be re-generated for each test sample. In another embodiment, the corrected analyte-binding particle amount is determined as a ratio (R) of the amount of the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone, to the sum of the analyte-binding particle amount present in the control capture zone and the analyte-binding particle amount present in the
30 sample capture zone. The amount of analyte present can be then determined from corrected analyte-binding particle amount (the ratio), utilizing a standard curve.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-19-

Alternatively, other ratios and/or standard curves can also be used to determine the amount of analyte in the sample. In addition, if desired, the amount of label that is present in the background can be subtracted from the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone and the analyte-binding particle amount present in the control capture zone prior to calculation of the ratio (R).

In a second embodiment of the invention, the capture zone of the membrane strip, rather than the application point, is contacted with the fluid sample. The membrane strip is maintained under conditions which are sufficient to allow binding of analyte of interest in the fluid sample to the sample capture reagent in the sample capture zone, thereby generating arrested analyte. Subsequently, the application point of the membrane is contacted with water or a buffer. The buffer can be an aqueous fluid that wets the membrane material; that supports a reaction between the analyte of interest and the analyte-binding agent (e.g., does not interfere with antibody/antigen interaction); and that has a viscosity that is sufficiently low to allow movement of the fluid by capillary action. Examples of buffers include, for example, saline, or 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The buffer mobilizes and transports the population of analyte-binding particles immobilized in the membrane at the contact region by capillary action to and through the sample capture zone and subsequently to and through the control capture zone. The membrane strip is further maintained under conditions which are sufficient to allow interaction of the arrested analyte (arrested in the sample capture zone) with the analyte-binding particles. Interaction of arrested analyte with analyte-binding particles arrests the movement of the analyte-binding particles, and generates arrested sample-reagent-particle complexes. The amount of analyte-binding particles in the sample capture zone is then measured, as described above, as is the amount of analyte-binding particles arrested in the control capture zone, and the amount of analyte in the fluid sample is determined by determining the amount of corrected analyte-binding particles, as described above. For example, the amount of analyte of interest in the fluid sample can be related to the corrected analyte-binding particle amount (e.g., by a standard curve). If desired, the amount can also be determined using additional internal control components, and determining ratios, as described above.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-20-

"COMPETITIVE" OR "INHIBITION" ASSAYS

In another embodiment of the invention, a quantitative assay, such as the quantitative immunochromatographic assay described in U.S. Patent 5,753,517, is performed as a competitive or inhibition assay. In such an assay, a solid phase, such as a rapid antigen measurement platform (RAMPTM) apparatus (U.S. Patent 5,753,517), is used. The membrane strip, made of a substance as described above, includes an application point, a contact region, a sample capture zone, and a control capture zone. The membrane strip may optionally include a wicking pad following the control capture zone, and a sample pad preceding the application point. As before, the "application point" is the position on the membrane where a fluid sample is applied. The "contact region" of the membrane is adjacent to the application point. Immobilized in the "contact region" of the membrane is a population of particles, as described above, which are coated with the analyte of interest (in lieu of being coated with an analyte binding agent, as described for the "sandwich" assays) or with an analog of the analyte of interest. An "analog" of the analyte, as used herein, is a compound that has similar binding characteristics as the analyte, in that it forms a binding pair with the analyte-binding agent as described above. The analyte or analog of the analyte can be coated directly on the particles, or can be indirectly bound to the particles. As used below, the term "analyte-coated particles" can refer to particles that are coated either with analyte of interest or with an analog of the analyte of interest.

The contact region of the membrane is between the application point and the sample capture zone of the membrane, at which the sample capture reagent is arrested. The sample capture reagent is an analyte-binding agent, such as those described above (e.g., a second member of a binding pair). In a preferred embodiment, the sample capture reagent is an antibody directed against the analyte.

The apparatus additionally includes a control capture reagent immobilized in a control capture zone which is positioned such that the sample capture zone is between the contact region and the control capture zone. As above, the control capture reagent reacts with the analyte binding particles, but does not interact with the analyte to be measured: for example, the control capture reagent can react with

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-21-

another material on the particles (e.g., a carrier for the analyte that is bound to the particles; an antibody); or with the particles themselves. In a preferred embodiment, the sample capture reagent and the control capture agent are both antibodies. The control capture reagent is immobilized on the membrane (coated on and/or
5 permeated in the membrane) in the control capture zone.

The components of the competitive assay are positioned in a similar manner as described above with regard to the "sandwich" assay. For example, in a preferred embodiment, the control capture zone is closely adjacent to the sample capture zone, so that the dynamics of the capillary action of the components of the
10 assay are similar (e.g., essentially the same) at both the control capture zone and the sample capture zone; and yet the control capture zone and the sample capture zone are also sufficiently spaced such that the particles arrested in each zone can be quantitated individually. Furthermore, in a preferred embodiment, the sample capture zone is separated from the contact region by a space that is a large distance,
15 relative to the small distance between the sample capture zone and the control capture zone, in order to ensure that the speed of the capillary front is sufficiently slow to allow capture of particles, and the total time of migration is sufficiently long to allow for binding of analyte to the sample capture reagent.

To perform the competitive, quantitative immunochromatographic assay, a
20 fluid sample to be assessed for the presence of the analyte of interest is obtained, as above. The application point of the membrane strip is contacted with the fluid sample to be assayed for the analyte of interest. After the membrane strip is contacted with the fluid sample containing the analyte of interest at the application point, the membrane strip is maintained under conditions which allow fluid to move
25 by capillary action to and through the contact region of the membrane, thereby transporting the analyte of interest (if present in the fluid) to and through the contact region. The analyte-coated particles in the contact region, together with analyte (if present) in the sample, are further mobilized by capillary action of the fluid from the fluid sample, and the analyte-coated particles move along the membrane with the
30 fluid and analyte to and through the "sample capture zone" on the membrane and subsequently to and through the "control capture zone." The membrane strip is

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-22-

maintained under conditions (e.g., sufficient time and fluid volume) which allow the analyte-coated particles to move by capillary action along the membrane to and through both the sample capture zone and (subsequently) to and through the control capture zone, and subsequently beyond the control capture zone (e.g., into a wicking pad), thereby removing any non-bound particles from the capture zones.

5 The movement of some of the analyte-coated particles is arrested by binding of analyte-coated particles to the sample capture reagent in the sample capture zone, and subsequently by binding of some of the analyte-coated particles to the control capture reagent in the control capture zone. The analyte-coated particles compete
10 with analyte (if present) in the sample for binding to the sample capture reagent. The sample capture reagent binds to analyte-coated particles by binding to analyte on the analyte-coated particles. The term, "sample-reagent-analyte-coated-particle complexes", as used herein, refers to a complex of the sample capture reagent and analyte-coated particles. The analyte-coated particles are arrested in the sample
15 capture zone, forming the sample-reagent-analyte-coated-particle complexes, due to capture of the analyte-coated particles by interaction of the analyte on the particles with the sample capture reagent in the sample capture zone.

The control capture reagent binds to analyte-coated particles by binding to any component of the analyte-coated particles except the analyte itself. The term,
20 "control-reagent-analyte-coated particle complexes," as used above, refers to a complex of the control capture reagent and analyte-coated particles. As above, the analyte-coated particles are arrested in the control capture zone, forming the control-reagent-analyte-coated particle complexes, due to capture of the analyte-coated particles by interaction of the analyte binding particles with the control capture
25 reagent in the control capture zone.

Capillary action subsequently moves any analyte-coated particles that have not been arrested in either the sample capture zone or the control capture zone, onwards beyond the control capture zone, thereby removing any particles that have not been arrested from both the sample capture zone and the control capture zone.
30 In a preferred embodiment, the fluid moves any contacted analyte-coated particles

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-23-

that have not been arrested in either capture zone into a wicking pad which follows the control capture zone.

The amount of analyte-binding particles arrested in the sample capture zone is then detected. The analyte-binding particles are detected using an appropriate means for the type of label used on the analyte-binding particles. In a preferred embodiment, the amount of analyte-binding particles is detected by an optical method, such as by measuring the amount of fluorescence of the label of the analyte-binding particles. The amount of analyte-binding particles arrested in the control capture zone is detected in the same manner as the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone. In one embodiment, as described above, the amount of analyte-binding particles is represented by a curve that is directly related to the amount of label present at positions along the solid phase (e.g., the membrane strip). For example, the amount of particles at each position on the membrane strip (e.g., at the sample capture zone and the control capture zone, and/or areas in between or adjacent to the sample capture zone and the control capture zone, and/or other areas of the membrane strip) can be determined and plotted as a function of the distance of the position along the membrane strip. The amount of particles can then be calculated as a function of the area under the curve, which is related to the amount of label present.

A corrected analyte-coated particle amount is determined, and the amount of analyte can then be determined from the corrected analyte-coated particle amount using appropriate calculation. The corrected analyte-coated particle amount is based on the amount of analyte-coated particles arrested in the sample capture zone and in the control capture zone. For example, in one embodiment, the corrected analyte-coated particle amount is inversely proportional to a ratio (R) of the analyte-coated particle amount present in the sample capture zone to the analyte-coated particle amount present in the control capture zone. The amount of analyte present can be then determined from the corrected analyte-coated particle amount (the ratio), utilizing a standard curve. The standard curve is generated by preparing a series of control samples, containing known concentrations of the analyte of interest in the fluid in which the analyte is to be detected (such as serum depleted of the analyte).

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-24-

The quantitative immunochromatographic assay is then performed on the series of control samples; the value of R is measured for each control sample; and the R values are plotted as a function of the concentration of analyte included in the control sample. Samples containing an unknown amount of analyte (the "test samples") are assayed by measuring the value of R for the test sample, and the concentration of analyte in the test sample is determined by referring to the standard curve. As above, one standard curve can be generated and used for all test samples in a lot (e.g., for all test samples using a specified preparation of test reagents); it is not necessary that the standard curve be re-generated for each test sample. In another embodiment, the corrected analyte-coated particle amount is inversely proportional to a ratio (R) of the amount of the analyte-coated particle amount present in the sample capture zone, to the sum of the analyte-coated particle amount present in the control capture zone and the analyte-coated particle amount present in the sample capture zone. The amount of analyte present can be then determined from corrected analyte-coated particle amount (the ratio), utilizing a standard curve. Alternatively, other ratios and/or standard curves can also be used to determine the amount of analyte in the sample. In addition, if desired, the amount of label that is present in the background can be subtracted from the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone and the analyte-binding particle amount present in the control capture zone prior to calculation of the ratio (R).

Although the assays of the invention have been described particularly in relation to quantitative immunochromatographic assays, the assays can similarly be used with other binding pairs as described above (e.g., nucleic acids, receptor-ligands, lectin-sugars), using the same methods as described above with the desired components as the analyte and the and the analyte-binding agent. The invention also includes kits for use in the methods described herein. Kit components can include: first and/or second members of a specific binding pair, buffers, fluid collection means, and control samples for generation of a standard curve; analyte-binding particles and/or control particles, capture reagents, and/or antibodies.

The present invention is illustrated by the following Exemplification, which is not intended to be limiting in any way.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-25-

EXEMPLIFICATION Sandwich Assay for Myoglobin

Latex particles of approximately 0.3 microns in diameter (Interfacial Dynamics, Portland, OR) were obtained and dyed using a fluorescent dye that intercalated into the particles (Molecular Probes, Eugene OR, or Duke Scientific, Palo Alto, CA). Dyed latex particles were coupled to analyte-binding antibodies as follows: particles were washed by centrifugation and resuspended in phosphate buffer at a concentration of approximately 0.2% solids. The antibody (mouse antibody to myoglobin) was prepared to a concentration of 1 mg/ml; 0.5 ml of a 2% latex particle suspension was then added to 4 ml of antibody solution and allowed to incubate with a solution of sodium cyanoborohydride and skim milk, which caused covalent linkage of the antibodies to the particles and saturated the remaining surfaces of the particles with the skim milk protein. The suspension was then vortexed and sonicated to disrupt any aggregates.

Membrane strips were prepared using nitrocellulose membranes (Sartorius). The sample capture agent and the control capture agent were immobilized on the membrane strip in the sample capture zone and the control capture zone, respectively, using a linear striping apparatus (IVEK). For an assay for myoglobin, a goat anti-myoglobin polyclonal antibody (1 mg/ml) was used as the sample capture agent, and a goat anti-mouse immunoglobulin (0.4 mg/ml) was used as the control capture agent. The membrane strips were then allowed to dry.

The membrane strips were blocked by soaking them in a 1% solution of polyvinyl alcohol (PVA) to prevent additional protein binding. The membrane strips were then rinsed in water and dried.

The analyte-binding particles were then applied to the membrane strips at the contact region. First, the contact region is striped with a 30% sucrose solution and allowed to dry. Subsequently the particles were applied as a 0.1% suspension at a striping rate of 2 μ l/cm. The membrane was then allowed to dry before performing the assay.

To perform the assay, a sample of a serial dilution of buffer containing myoglobin (0 ng/ml; 2.5 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml; 40 ng/ml) was added to a membrane strip at the application point, and the membrane strips were then

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-26-

maintained at room temperature while the fluid moved through the membrane strip by capillary action. Subsequently, the amount of contacted analyte-binding particles was measured in the sample capture zone and in the control capture zone by detecting the amount of fluorescence. Results are shown in Figures 2A-2F, where it
5 can be seen that the area under the curve (depicting the amount of fluorescence) which is present just before the 20 mm of the scan length (the position of the sample capture zone) increases with increasing concentration of myoglobin, whereas the area under the curve which is present just before the 25 mm of the scan length (the position of the control capture zone) remains approximately constant. The area
10 under the curve varies because of test to test variability (e.g., the area under the curve for the control capture zone varies by the same percent as does the area under the curve for the sample capture zone); this variability is corrected for by the methods described herein.

A standard curve (Figure 3) was generated from the data. The ratio (R) of
15 the amount of the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone (calculated by integrating the area under the curve at the sample capture zone), to the sum of the analyte-binding particle amount present in the control capture zone (calculated by integrating the area under the curve at the control capture zone) and the analyte-binding particle amount present in the sample capture zone (calculated as
20 described above), was determined and compared with the concentration of myoglobin (ng/ml). It can be seen that the ratio increases with increasing concentration of myoglobin.

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled
25 in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the scope of the invention encompassed by the appended claims.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-27-

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for quantitatively measuring the amount of an analyte of interest in a fluid sample, comprising:
 - 5 a) providing a membrane strip comprising an application point, a contact region, a sample capture zone and a control capture zone, wherein the contact region is between the application point and the sample capture zone and the sample capture zone is between the contact region and the control capture zone;
 - 10 b) contacting the application point of the membrane strip with the fluid sample to be assayed for the analyte of interest;
 - c) maintaining the membrane strip under conditions which allow fluid to transport analyte of interest in the fluid sample by capillary action through the strip to and through the contact region, the contact region having a population of analyte-binding particles immobilized therein, wherein the analyte-binding particles are coated with an analyte-binding agent;
 - 15 d) further maintaining the membrane strip under conditions which allow analyte of interest, if present in the sample, to bind to analyte-binding particles, thereby generating contacted analyte-binding particles; allow the fluid in the sample to mobilize and transport contacted analyte-binding particles by capillary action through the strip to and through the sample capture zone, the sample capture zone having a sample capture reagent immobilized thereon; and allow contacted analyte-binding particles to bind to the sample capture reagent;
 - 20 e) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to transport contacted analyte-binding particles by capillary action through the strip to and through the control capture zone, the control capture zone having a control capture
- 25

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-28-

- reagent immobilized thereon; and allow contacted analyte-binding particles to bind to the control capture reagent;
- 5 f) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to transport any contacted analyte-binding particles not bound to the sample capture reagent or to the control capture reagent by capillary action beyond the control capture zone;
- g) determining the amount of contacted analyte-binding particles in the sample capture zone and the amount of contacted analyte-binding particles in the control capture zone;
- 10 h) determining a corrected analyte-binding particle amount from the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone and the amount of analyte-binding particles in the control capture zone, wherein the amount of analyte of interest in the fluid sample is directly related to the corrected analyte-binding particle amount.
- 15 2. A method for quantitatively measuring the amount of an analyte of interest in a fluid sample, comprising:
- a) providing a membrane strip comprising an application point, a contact region, a sample capture zone and a control capture zone, wherein the contact region is between the application point and the sample capture zone and the sample capture zone is between the contact region and the control capture zone;
- 20 b) contacting the application point of the membrane strip with the fluid sample to be assayed for the analyte of interest;
- c) maintaining the membrane strip under conditions which allow fluid to transport analyte of interest in the fluid sample by capillary action through the strip to and through the contact region, the contact region having a population of analyte-coated particles immobilized therein, wherein the analyte-coated particles are coated with analyte of interest;
- 25

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-29-

- 5 d) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to mobilize and transport analyte-coated particles by capillary action through the strip to and through the sample capture zone, the sample capture zone having a sample capture reagent immobilized thereon; and allow analyte-coated particles to bind to the sample capture reagent;
- 10 e) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to transport analyte-coated particles by capillary action through the strip to and through the control capture zone, the control capture zone having a control capture reagent immobilized thereon; and allow analyte-coated particles to bind to the control capture reagent;
- 15 f) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to transport any analyte-coated particles not bound to the sample capture reagent or to the control capture reagent by capillary action beyond the control capture zone;
- g) determining the amount of analyte-coated particles in the sample capture zone and the amount of analyte-coated particles in the control capture zone;
- 20 h) determining a corrected analyte-coated particle amount from the amount of analyte-coated particles in the sample capture zone and the amount of analyte-coated particles in the control capture zone, wherein the amount of analyte of interest in the fluid sample is inversely related to the corrected analyte-coated particle amount.
- 25 3. A method for measuring the amount of an analyte of interest in a fluid sample, comprising:
- a) providing a membrane strip comprising an application point, a contact region, a sample capture zone and a control capture zone, wherein the contact region is between the application point and the

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-30-

- sample capture zone and the sample capture zone is between the contact region and the control capture zone;
- 5 b) contacting the sample capture zone of the membrane strip with the fluid sample, the sample capture zone having a sample capture reagent immobilized thereon, and maintaining the membrane strip under conditions which allow analyte of interest, if present in the sample, to bind to the sample capture reagent in the sample capture zone, thereby generating arrested analyte;
- 10 c) contacting the application point of the membrane strip with a buffer;
- d) maintaining the membrane strip under conditions which allow the buffer to mobilize and transport a population of analyte-binding particles immobilized in the contact region by capillary action to and through the sample capture zone, wherein the analyte-binding particles are coated with an antibody to the analyte; and allow the arrested analyte to interact with analyte-binding particles, thereby
- 15 generating arrested analyte-particle complexes;
- e) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the buffer to transport analyte-binding particles by capillary action to and through the control capture zone, the control capture zone having a control capture reagent immobilized thereon; and allow analyte-binding particles to bind to the control capture reagent;
- 20 f) further maintaining the membrane strip under conditions which allow the fluid in the sample to transport any analyte-binding particles not bound to the sample capture reagent or to the control capture reagent by capillary action beyond the control capture zone;
- 25 g) determining the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone and the amount of analyte-binding particles in the in the control capture zone; and
- 30 h) determining a corrected analyte-binding particle amount from the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone and the amount of analyte-binding particles in the control capture zone,

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-31-

wherein the amount of analyte of interest in the fluid sample is directly related to the corrected analyte-binding particle amount.

4. The method of any one of Claims 1, 2 or 3, wherein the corrected analyte-binding particle amount is determined as a ratio of the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone, to the amount of analyte-binding particles in the control capture zone.
5. The method of any one of Claims 1, 2 or 3, wherein the corrected analyte-binding particle amount is determined as a ratio of the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone, to the sum of the amount of analyte-binding particles in the control capture zone and the amount of analyte-binding particles in the sample capture zone.
6. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the membrane strip is made of cellulose nitrate or glass fiber.
7. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the particles are latex beads.
8. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the particles are labeled.
9. The method of Claim 8, wherein the label is selected from the group consisting of: colorimetric, fluorescent, phosphorescent, luminescent, chemiluminescent, and enzyme-linked molecule.
10. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the analyte and the analyte-binding agent are members of a binding pair, and one member of the binding pair is selected from the group consisting of: a protein, a hormone, an enzyme, a glycoprotein, a peptide, a small molecule, a polysaccharide, a lectin, an antibody, an antibody fragment, a nucleic acid, a drug, a drug

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-32-

conjugate, a toxin, a virus, a virus particle, a portion of a cell wall, a hapten, and a receptor.

11. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the analyte-binding agent is selected from the group consisting of: an antibody; an antibody fragment; a
5 hapten; a drug conjugate; and a receptor.
12. The method of Claim 11, wherein the analyte-binding agent is an antibody.
13. The method of Claim 12, wherein the control capture reagent is an antibody.
14. The method of Claim 12, wherein the sample capture reagent is an antibody selected from the group consisting of: an antibody directed against the same
10 epitope as the antibody on the analyte-binding particles, and an antibody directed against a different epitope as the antibody on the analyte-binding particles.
15. The method of Claim 12, wherein the control capture reagent is an anti-immunoglobulin antibody.
- 15 16. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein the test sample is selected from the group consisting of: whole blood, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, saliva, semen, vitreous fluid, or synovial fluid.
17. The method of Claim 1, wherein the analyte of interest is selected from the group consisting of: myoglobin, CK-MB, troponin I, and PSA.
- 20 18. The method of Claim 2, wherein the analyte of interest is selected from the group consisting of: digoxin, theophylline, hormone T-3, hormone T-4, LSD, THC, and a barbiturate.

WO 02/077646

PCT/US02/08284

-33-

19. The method of Claim 1 or Claim 2, wherein in step (f) the fluid in the sample transports any contacted analyte-binding particles not bound to the sample capture reagent or to the control capture reagent by capillary action beyond the control capture zone into a wicking pad.

Quantitative RAMP Test

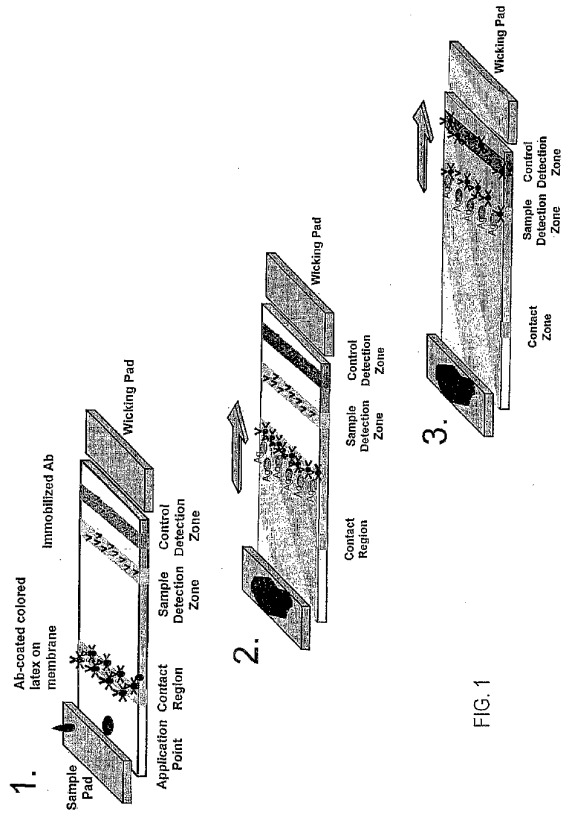
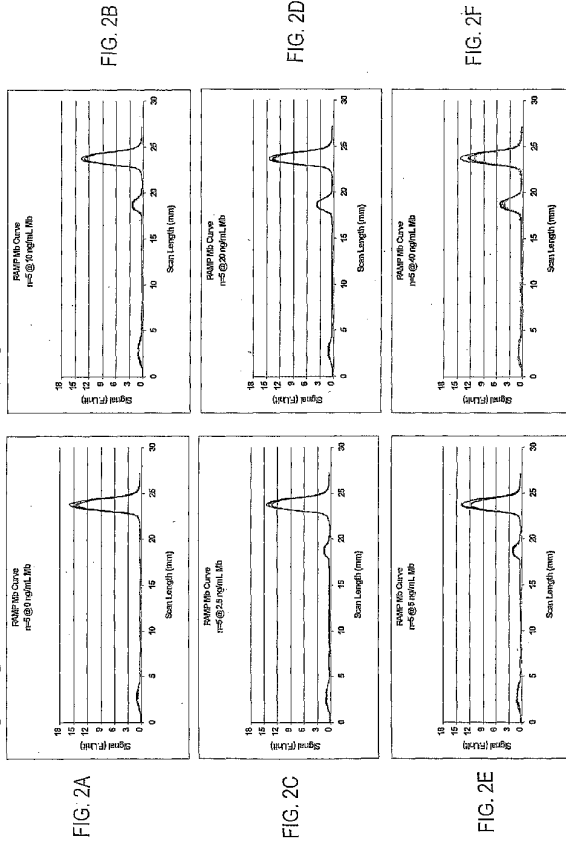


FIG. 1

Myoglobin Dose Response



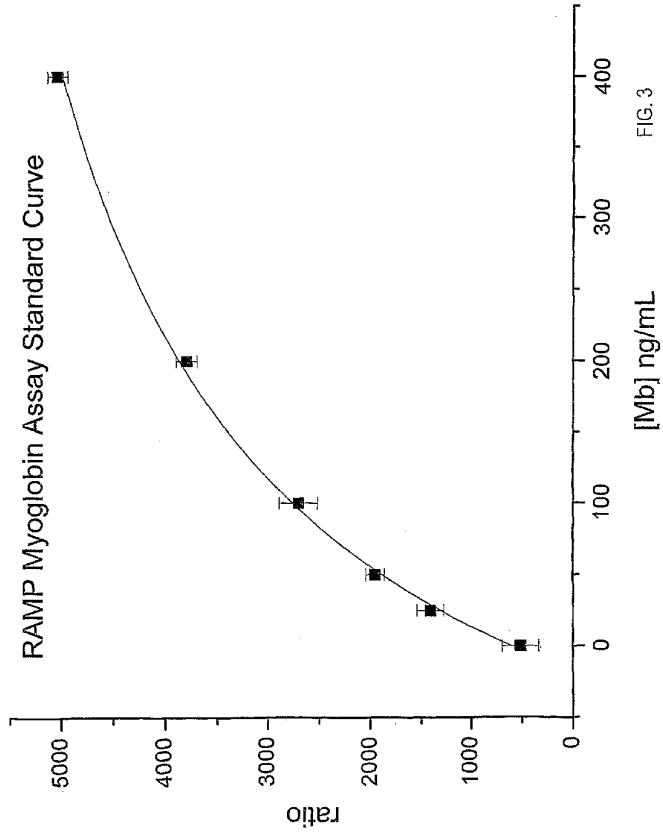


FIG. 3

【手続補正書】

【提出日】平成15年5月20日(2003.5.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；

b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる段階；

c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階（接触領域は、表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物結合粒子の集団を有し、ここで分析物結合粒子は分析物結合剤で被覆されている）；

d) 関心対象の分析物（試料中に存在する場合）が分析物結合粒子との結合を可能にすることにより、（分析物結合粒子の表面で分析物結合剤と結合した関心対象の分析物を有していてもいなくてもよい）接触状態の分析物結合粒子を作製することを可能にする条件、試料中の流体が、接触状態の分析物結合粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および、接触状態の分析物結合粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、接触状態の分析物結合粒子を、対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有し、ここで、対照捕捉用試薬は分析物結合粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない）、および、接触状態の分析物結合粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の接触状態の分析物結合粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに

h) （補正後の分析物結合粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量に対する試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比である）補正後の分析物結合粒子量を決定する段階（流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する）。

【請求項2】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；

b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる段階；

c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階（接触領域は、表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物結合粒子の集

団を有し、ここで分析物結合粒子は分析物結合剤で被覆されている)；

- d) 関心対象の分析物(試料中に存在する場合)が分析物結合粒子との結合を可能にすることにより、(分析物結合粒子の表面で分析物結合剤と結合した関心対象の分析物を有していてもいなくてもよい)接触状態の分析物結合粒子を作製することを可能にする条件、試料中の流体が、接触状態の分析物結合粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する)、および、接触状態の分析物結合粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、接触状態の分析物結合粒子を、対照捕捉ゾーンの方へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有し、ここで、対照捕捉用試薬は分析物結合粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない)、および、接触状態の分析物結合粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の接触状態の分析物結合粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- g) 試料捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の接触状態の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに
- h) (補正後の分析物結合粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量および試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の合計に対する試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比である)補正後の分析物結合粒子量を決定する段階(流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する)。

【請求項3】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

- a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階(接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する)；
- b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試薬を接触させる段階；
- c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階(接触領域は、表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物被覆粒子の集団を有し、ここで分析物被覆粒子は関心対象の分析物で被覆されている)；
- d) 試料中の流体が、分析物被覆粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する)、および、分析物被覆粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、分析物被覆粒子を、対照捕捉ゾーンの方へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有し、ここで、対照捕捉用試薬は分析物被覆粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない)、および、分析物被覆粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分析物被覆粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- g) 試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量を決定する段階；ならびに
- h) (補正後の分析物被覆粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量に対する試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量の比である)補正後の分析物被覆粒子量を決定する段階

(流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物被覆粒子量に反比例する)。

【請求項 4】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を定量的に測定する方法：

- a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；
- b) 膜ストリップの投入点に、関心対象の分析物に関してアッセイ対象となる流体試料を接触させる段階；
- c) 流体が、流体試料中の関心対象の分析物を、ストリップを介した毛管作用によって接触領域の方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階（接触領域は、表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物被覆粒子の集団を有し、ここで分析物被覆粒子は関心対象の分析物で被覆されている）；
- d) 試料中の流体が、分析物被覆粒子を、ストリップを介した毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および、分析物被覆粒子と試料捕捉用試薬の結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- e) 試料中の流体が、ストリップを介した毛管作用によって、分析物被覆粒子を、対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有し、ここで、対照捕捉用試薬は分析物被覆粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない）、および、分析物被覆粒子と対照捕捉用試薬との結合を可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分析物被覆粒子を、毛管作用によって、対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；
- g) 試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子の量を決定する段階；ならびに
- h) (補正後の分析物被覆粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量および試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量の合計に対する試料捕捉ゾーン内の分析物被覆粒子量の比である) 補正後の分析物被覆粒子量を決定する段階（流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物被覆粒子量に反比例する）。

【請求項 5】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を測定する方法：

- a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階（接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する）；
- b) 膜ストリップの試料捕捉ゾーンに流体試料を接触させる段階（試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する）、および関心対象の分析物（試料中に存在する場合）が、試料捕捉ゾーンの試料捕捉用試薬と結合することによって、停止状態の分析物を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階；
- c) 膜ストリップの投入点に緩衝液を接触させる段階；
- d) 緩衝液が、接触領域の表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物結合粒子の集団を、毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（分析物結合粒子は、分析物に対する抗体で被覆されている）、および停止状態の関心対象の分析物が、分析物結合粒子と相互作用することによって、停止状態の分析物-粒子複合体を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階；
- e) 緩衝液が、分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件（対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有する）、および分析物結合粒子と対照捕捉用試薬を結合可能にする条件（対照捕捉用試薬は分析物結合粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない）

で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに

h) (補正後の分析物結合粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量に対する試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比である)補正後の分析物結合粒子量を決定する段階(流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する)。

【請求項6】

以下の段階を含む、流体試料中の関心対象の分析物の量を測定する方法：

a) 投入点、接触領域、試料捕捉ゾーン、および対照捕捉ゾーンを含む膜ストリップを提供する段階(接触領域は投入点と試料捕捉ゾーン間に位置し、かつ試料捕捉ゾーンは接触領域と対照捕捉ゾーン間に位置する)；

b) 膜ストリップの試料捕捉ゾーンに流体試料を接触させる段階(試料捕捉ゾーンは、表面に固定された試料捕捉用試薬を有する)、および関心対象の分析物(試料中に存在する場合)が、試料捕捉ゾーンの試料捕捉用試薬と結合することによって、停止状態の分析物を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階；

c) 膜ストリップの投入点に緩衝液を接触させる段階；

d) 緩衝液が、接触領域の表面に被覆されたおよび/または内部に浸透した分析物結合粒子の集団を、毛管作用によって動かし、試料捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(分析物結合粒子は、分析物に対する抗体で被覆されている)、および停止状態の関心対象の分析物が、分析物結合粒子と相互作用することによって、停止状態の分析物-粒子複合体を作製することを可能にする条件で、膜ストリップを維持する段階；

e) 緩衝液が、分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンの方向へ輸送しかつ通過させることを可能にする条件(対照捕捉ゾーンは、表面に固定された対照捕捉用試薬を有する)、および分析物結合粒子と対照捕捉用試薬を結合可能にする条件(対照捕捉用試薬は分析物結合粒子と反応することができるが関心対象の分析物とは相互作用しない)で、膜ストリップをさらに維持する段階；

f) 試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンを越えて輸送することを可能にする条件で、膜ストリップをさらに維持する段階；

g) 試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量、および対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子の量を決定する段階；ならびに

h) (補正後の分析物結合粒子量が、対照捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量および試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の合計に対する試料捕捉ゾーン内の分析物結合粒子量の比である)補正後の分析物結合粒子量を決定する段階(流体試料中の関心対象の分析物の量は、補正後の分析物結合粒子量に正比例する)。

【請求項7】

膜ストリップを、硝酸セルロースまたはガラス繊維から作製する、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

粒子がラテックスビーズである、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

粒子が標識されている、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

標識が、比色分子、蛍光分子、リン光分子、発光分子、化学発光分子、および酵素結合分子からなる群より選択される、請求項9記載の方法。

【請求項11】

分析物および分析物結合剤が結合対の要素であり、かつ結合対の1つの要素が、タンパク質、ホルモン、酵素、糖タンパク質、ペプチド、小分子、多糖、レクチン、抗体、抗体断片、核酸、薬剤、薬剤接合体、毒素、ウイルス、ウイルス粒子、細胞壁の一部、ハプテン、および受容体からなる群より選択される、請求項1、2、5または6のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

分析物結合剤が、抗体、抗体断片、ハプテン、薬剤接合体、および受容体からなる群より選択される、請求項1、2、5または6のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

分析物結合剤が抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

対照捕捉用試薬が抗体である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

試料捕捉用試薬が、分析物結合粒子表面の抗体と同じエピトープに対する抗体、および分析物結合粒子表面の抗体とは異なるエピトープに対する抗体からなる群より選択される抗体である、請求項13記載の方法。

【請求項16】

対照捕捉用試薬が抗免疫グロブリン抗体である、請求項13記載の方法。

【請求項17】

被験試料が、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液、精液、硝子体、または滑液からなる群より選択される、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

関心対象の分析物が、ミオグロビン、CK-MB、トロポニンI、およびPSAからなる群より選択される、請求項1、2、5または6のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

関心対象の分析物が、ジゴキシン、テオフィリン、ホルモンT-3、ホルモンT-4、LSD、THC、およびバルビツール酸塩からなる群より選択される、請求項3または4記載の方法。

【請求項20】

段階(f)において、試料中の流体が、試料捕捉用試薬とまたは対照捕捉用試薬と結合していない任意の接触状態の分析物結合粒子を、毛管作用によって対照捕捉ゾーンを越えて吸い取りパッド中へと輸送する、請求項1または2記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/08284
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(C) : G01N 33/543 US CL : 436/518 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) U.S. : 436/518		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPATFULL, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,752,517 A (BROOKS et al) 19 May 1998. See entire document.	1-19
X	US 6,103,536 A (GEISBERG) 15 August 2000. See entire document.	1-19
A	US 5,141,850 A (COLE et al) 25 August 1992. See entire document.	1-19
A	US 5,384,264 A (CHEN et al) 24 January 1995. See entire document.	1-19
A	US 6,136,610 A (POLITO et al) 24 October 2000. See entire document.	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 30 May 2002 (30.05.2002)	Date of mailing of the international search report 13 JUN 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20281 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer: <i>Jayce Bridges</i> Bao Phuy L. Nguyen Telephone No. (703) 308-0196	

フロントページの続き

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

(72)発明者 リチャーズ ブライアン ジー .

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 ノース バンクーバー フェアウェイ プレイス 4
165

专利名称(译)	补偿定量测定中特异性结合的变化		
公开(公告)号	JP2004526156A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2002575646	申请日	2002-03-14
申请(专利权)人(译)	响应生物医学公司		
[标]发明人	ハリスポールシー リチャーズブライアンジー		
发明人	ハリス ポール シー. リチャーズ ブライアン ジー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/53.D G01N33/53.J G01N33/545.A		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/817781 2001-03-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种定量测量流体样品中感兴趣分析物的量的方法。本发明的方法包括提供具有输入点，接触区域（包括分析物结合颗粒），样品捕获区和对照捕获区的膜的步骤，其中接触区包括输入点和样品捕获区。位于其间的样品捕获区域位于接触区域和控制捕获区域之间（图1）。在该测定中，流体通过接触区域的毛细管作用将测定组分朝向并通过样品捕获区，然后运输并通过对照捕获区。可以。在“夹心测定”实施方案中，可以确定流体样品中分析物的量，例如，样品捕获区中分析物结合颗粒的量与对照捕获区中分析物结合颗粒的量的比率，它与校正后分析物结合颗粒的量成比例。在“竞争性测定”实施方案中，可以确定流体样品中的分析物的量，之后可以将其确定为样品捕获区中分析物涂覆的颗粒的量与对照捕获区中的分析物涂覆的颗粒的量的比率。与分析物包被的颗粒的量成反比。

