

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4763066号  
(P4763066)

(45) 発行日 平成23年8月31日(2011.8.31)

(24) 登録日 平成23年6月17日(2011.6.17)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 27/28	(2006.01)	GO 1 N 27/28	R
GO 1 N 27/327	(2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 7
GO 1 N 33/535	(2006.01)	GO 1 N 33/535	

請求項の数 4 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2009-32424 (P2009-32424)	(73) 特許権者	508012840
(22) 出願日	平成21年2月16日(2009.2.16)		アボット ポイント オブ ケア インコ ーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2003-575110 (P2003-575110) の分割		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 8 5 4 0 プリンストン カレッジ ロー ド イースト 4 0 0
原出願日	平成15年3月5日(2003.3.5)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2009-150902 (P2009-150902A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成21年7月9日(2009.7.9)	(74) 代理人	100128048
審査請求日	平成21年3月16日(2009.3.16)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	10/087,730	(72) 発明者	デイビス グラハム
(32) 優先日	平成14年3月5日(2002.3.5)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン ケアアウェイ コート 2 2
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物測定および免疫アッセイ法のための装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、センサーを含む導管内で電気化学的なアッセイ法を使用して、分析物の量を測定する方法であって、センサーが、分析物を結合する固定された抗体の表層を有する電極、および導管内に配置された対極/基準電極を含む方法：

分析物を含む液体試料とセンサーを接触させる段階；

センサーを分析物に結合することができる酵素標識抗体と接触させることにより、固定された抗体、分析物、および標識された抗体の複合体を形成させる段階；

センサーを酵素の基質および少なくとも1つの空気セグメントを含む溶液と接触させて、センサー領域から未結合の分析物および標識された抗体を除去する段階；

センサーから実質的に全ての前記溶液を除去するが、電極、対極/基準電極、および電極を接続する壁の隣接部分上の前記溶液を保持する段階；ならびに

センサーを使用して酵素と基質の間の反応生成物を検出することにより、液体試料の中の分析物の量を測定する段階。

【請求項 2】

試料が、その中に溶解された酵素標識抗体を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記溶液が前記導管の本体から除去されるときに、所定の溶液の体積が、前記各電極上に保持される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

10

20

導管の壁の少なくとも一部が、酵素標識抗体の非特異的な結合を減少するための処理がなされている、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

#### I. 発明の分野

その最も広い側面において、本発明は、例えば、事故部位、救急室で、外科で、集中治療室で、および更に非医学的な環境での使用を含む臨床的な診断の分野の観点で使用することができる液体試料中の分析物のインサイチュウでの迅速な決定のための装置および方法に関する。

10

【0002】

したがって、本発明は、液体試料中の分析物の存在および/または濃度を決定するための装置およびその使用方法に関する。より詳細には、本発明は、多様なリアルタイムまたはリアルタイムに近い分析物のアッセイ法を行うために適応された、使い捨ての、使い捨て可能なカートリッジを提供する。本発明は、さらに、計測した試料部分を処理するための新規の特徴を提供するカートリッジに関する。カートリッジは、カートリッジ内の試料または第2の液体の動作を正確かつ柔軟に制御するための、およびアッセイ法の間に1つまたは複数のさらなる試薬または化合物で試料または液体を任意に修正するための新規の特徴を組み込む。本発明のカートリッジは、読出装置に使用されることが企図されるが、これらはまた、別々に使用されてもよい。これらは、導管、ポンプ手段、液体、計測手段、バルブ、および導管内の液体の位置を決定するための任意のセンサーを含む。特定の態様において、本発明は、電気化学的な免疫センサーまたはその他のリガンド/リガンド受容体に基づいたバイオセンサーを使用する、血液などの生体試料中の分析物を決定することに関する。本発明は、さらに、バイオセンサーの簡略構築に、特に受容体または抗体が得ることができる広範囲にわたる分析物を決定することができる電気化学的な免疫アッセイバイオセンサーの製作に関する。

20

【背景技術】

【0003】

#### II. 発明の背景

関心対象の分析物のための臨床検査の多くは、診断、スクリーニング、疾患進捗、法医学的な分析、妊娠検定、薬物試験、およびその他の理由のために、生体試料に対して行われる。妊娠テストなどの少数の定性試験では、患者の家庭での使用のための単純なキットに変形されているが、大部分の定量試験は、精巧な装備を使用する研究室設定での訓練された技術者の専門知識が必要である。研究室での試験により、解析の費用が増大し、結果が遅れる。多くの状況において、遅延は、たとえば心筋梗塞の解析でのマーカー指標などの患者の症状または予後に有害であり得る。これらの重要な局面およびその他において、看護の場所で、このような解析を正確に、安価に、および最小の遅延で行うことができることは有利である。

30

【0004】

血液の試料中の分析物を測定するための使い捨て可能な検出装置は、Lauksにより、米国特許第5,096,669号(特許文献1)に開示されている。その他の装置は、Davisらにより、凝固時間についての米国特許第5,628,961号(特許文献2)および第5,447,440号(特許文献3)に開示されている。開示された装置は、読出装置およびカートリッジを含み、時間の関数として、血液試料中の分析物の濃度および粘性の変化を測定するために読出装置内に適合されている。使い捨て可能な装置に関する潜在的な問題は、製造誤差または機械の消耗により、カートリッジ間で液体試験パラメーターが多様であることである。Zelinの米国特許第5,821,399号(特許文献4)は、カートリッジ内に位置する電導度センサーを使用する読出装置によって制御される自動流量補正を使用して、この課題を解決するための方法を開示する。米国特許第5,096,669号(特許文献1)、第5,628,961号(特許文献2)、第5,447,440号(特許文献3)、および第5,821,399号(特許文献4)は、参照によ

40

50

りこれらのそれぞれの全体が本明細書に組み込まれる。

【0005】

抗体は、生物学的な分析物の解析に広く使用されている。基本原理の総説については、Eddowes, Biosensors 3: 1-15, 1987(非特許文献1)を参照されたい。このような適用の全てにおいて、抗体は、分析物に結合特異性を提供するが、その分析物に抗体の結合を直接または間接的に検出するために、種々の異なる解析アプローチが使用されてきた。定量的免疫アッセイ方のために、種々のその他のアッセイ様式(ウエスタンブロット法などの、典型的な研究室で使用されるもの以外)が採用されており、これらは、妊娠試験キットなどの定性的な免疫アッセイキットとは区別される。抗体使用の例として、Liglerの米国特許第5,183,740号(特許文献5)は、標識抗原に結合する抗体で被覆された粒子を充填したカラムを具備する、フロースルー免疫センサー装置を開示した。試料がカラムを流れて流されると、非標識の抗原が標識抗原を置換し、次いで検出器へと流れる。他のアプローチでは、Giaeverの米国特許第4,018,886号(特許文献6)は、抗体で被覆された磁性粒子の使用を開示しており、これはまず試料中で磁的に循環させて、分析物の結合を促進させ、次いで小体積に濃縮し、最後に抗体-抗原複合体をビーズから切断して複合体の濃縮溶液を得る。Swansonに対する米国特許第5,073,484号(特許文献7)は、液体透過性の固形媒体が、試料が流れる反応ゾーンを有する方法を開示する。分析物と反応できる反応物は、ゾーン内の固形媒体に結合されている。分析物が存在するときは、局在化した検出可能な生成物がゾーン内に生じる。同様の概念に、Brizgysに対する米国特許第5,807,752号(特許文献8)では、関心対象の分析物の受容体を固相に注入させる試験システムを開示する。分光学的に決定可能な標識および遮断薬に付着された第2の分析物結合パートナーを導入し、標識の空間分布を測定する。分光計測には、光トランスデューサー、典型的には光電子増倍管、ホトトランジスター、または光ダイオード、および大きくてまたは高価であろう関連したオプティクスを必要とするが、電気信号が直接生じる電気化学的な方法では必要ではない。

10

20

【0006】

定量的免疫アッセイは典型的には、多くの工程(例えば、結合工程に続いて、第2の試薬を含んでいてもまたは含んでいなくてもよい溶液でリンスする工程)を必要とするため、前述の方法のほとんどは、手動で操作すること、または複雑な流体力学の大きな機械類を必要とする。後のアプローチの例は、米国特許第5,201,851号(特許文献9)に提供されており、これは、平面上の非常に小さい体積に複雑な流体力学を提供する方法を開示する。この方法は、例えばベンチトップに収容され、表面上に固定された受容体に対する巨大分子の結合を検出するために、表面プラスモン共鳴を使用するBiacoreシステム(Pharmacia)に使用される。米国特許第5,242,828号(特許文献10)および第5,313,264号(特許文献11)を参照されたい。

30

【0007】

前述の参照は、受容体に対する分析物の結合を検出するための光学手段を開示する。電気化学的な検出も免疫アッセイ法に適用されており、これは、分析物の結合が、電極に隣接した電気活性種の活性の変化を直接または間接的に引き起こす。電気化学的な免疫アッセイの総説については、Laurellら、Methods in Enzymology, vol.73, "Electroimmuno assay", Academic Press, New York, 339, 340, 346-348 (1981)(非特許文献2)を参照されたい。たとえば、米国特許第4,997,526号(特許文献12)は、電気活性な分析物を検出するための方法を開示する。適切な電気化学ポテンシャルで平衡を保持した電極を分析物に対する抗体で被覆する。電気活性分析物が抗体に結合すると、電流が電極に流れる。このアプローチは、検出することができる分析物、つまり、電極により、電極に試料中に存在するその他の種の非特異的な酸化または還元を生じさせない範囲内で、電気化学的な中間電位を有する分析物だけに制限される。決定されるであろう分析物の範囲は、非メディエータからメディエータへの酵素による変換に基づいた米国特許第4,830,959号(特許文献13)に開示された方法によって拡張される。上述した発明のサンドイッチ免疫アッセイへの適用では、二次抗体が適切な基質からメディエータを産生することができ

40

50

る酵素によって標識されている場合、本方法を電気不活性な分析物を決定するために使用できることを示す。

【 0 0 0 8 】

その他の電氣的性質も、分析物センサーに使用されている。Malmrosに対する米国特許第4,334,880号(特許文献14)および4,916,075号(特許文献15)は、電気抵抗が分析物の存在に応答して変化するエレメントを含むポリアセチレンフィルムを開示する。電場効果は、Schenckに対する米国特許第4,238,757号(特許文献16)において利用されており、電界効果トランジスタ(FET)免疫センサーが開示されている。電極の電気リアクタンスに影響を及ぼす粒子で標識された分析物の使用に基づいた免疫アッセイ法が、Paceによって米国特許第4,233,144号(特許文献17)に開示されている。これらの記述から、  
10  
各々の前述の例において、その他の電氣的性質を使用した場合に、必要とされる電氣的性質の変化の存在または大きさは、それぞれの分析物について異なってもよいことが明らかである。したがって、個々の分析物種の特異的な特徴から独立した実質的に一様な特徴を有するアッセイ法を作製するために、自動化することができ、かつ多様な分析物に適用することができるアッセイ技術についての要求が存在する。

【 0 0 0 9 】

微細製造技術(例えば、フォトリソグラフィおよびプラズマ沈着)は、限られた間隔に多層状のセンサー構造物を構築するためには魅力的である。例えばシリコン基板上に電気化学的な免疫センサーの微細製造するための方法は、Cozetteらに対する米国特許第5,200,051号(特許文献18)に開示されており、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。これらは、分配方法、生物学的な試薬、たとえば抗体を光形成された(photofomed)層および微小粒子ラテックスを含む表面に付着するための方法、および電気化学的なアッセイ法を行う方法を含む。  
20

【 0 0 1 0 】

電気化学的な免疫センサーでは、分析物のその同族の抗体に対する結合により、適切な電気化学ポテンシャルで平衡状態にある電極において、電気活性種の活性の変化を生じて、電気活性種の酸化または還元を引き起こす。これらの条件を満たすために、多くの配置がある。たとえば、電気活性種は、直接分析物に付着されてもよく(上記を参照されたい)、または共有結合性に電気不活性な基質から電気活性種を生じるか、もしくは電気活性基質を破壊する酵素に抗体を付着してもよい。電気化学的な免疫センサーの総説については、M. J. Green (1987) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 316: 135-142(非特許文献3)を参照されたい。  
30

【 0 0 1 1 】

したがって、分析物センシングの分野内で、および特に分析物を血液などの生体試料内で決定しなければならないような適用については、治療の場所で迅速かつ簡単に分析物を決定することができ、従来の研究室に基づいた試験であり得るよりも高度に訓練されていないスタッフによって行うことができる装置の要求がある。頻繁に、主治医または看護婦が遅延することなく臨床試験結果を得ることができると、クリティカルな医学的症状診断および治療に有益であることが多いだろう。さらに、改善された装置は、分析物の範囲の決定に適應して、試験後の試料を即座に使い捨てることにより、生物学的または化学的な汚染のリスクを最小化するように一度使用したら捨てることのできるべきである。本発明が属する技術分野の当業者であれば、以下の開示を読むことによって明らかのように、本発明により、これらの及びその他の要求が満たされる。  
40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 特許文献 1 】 米国特許第5,096,669号

【 特許文献 2 】 米国特許第5,628,961号

【 特許文献 3 】 米国特許第5,447,440号

【 特許文献 4 】 米国特許第5,821,399号  
50

【特許文献 5】米国特許第5,183,740号  
 【特許文献 6】米国特許第4,018,886号  
 【特許文献 7】米国特許第5,073,484号  
 【特許文献 8】米国特許第5,807,752号  
 【特許文献 9】米国特許第5,201,851号  
 【特許文献 10】米国特許第5,242,828号  
 【特許文献 11】米国特許第5,313,264号  
 【特許文献 12】米国特許第4,997,526号  
 【特許文献 13】米国特許第4,830,959号  
 【特許文献 14】米国特許第4,334,880号  
 【特許文献 15】米国特許第4,916,075号  
 【特許文献 16】米国特許第4,238,757号  
 【特許文献 17】米国特許第4,233,144号  
 【特許文献 18】米国特許第5,200,051号  
 【特許文献 19】特表平9-504372  
 【特許文献 20】特表平4-501768

10

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献 1】Eddowes, Biosensors 3: 1-15, 1987

【非特許文献 2】Laurellら、Methods in Enzymology, vol.73, "Electroimmunoassay", Academic Press, New York, 339, 340, 346-348 (1981)

20

【非特許文献 3】M. J. Green (1987) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 316: 135-142

【発明の概要】

【0014】

### III. 発明の概要

したがって、上述した不利な点および欠点を回避して、液体試料中の分析物を決定するための改善された装置および方法を提供することが本発明の目的である。

【0015】

分析物センサーのアレイおよび分析物アレイに試料および液体（改善されたか、またはされていないもの）を経時的に提示するための手段を有するカートリッジを使用する、迅速な、安価な、インサイチュウでの分析物の決定を可能にすることが、本発明のさらなる目的である。カートリッジは、好ましくは、例えば1992年3月17日に発行されたLauksらに対する米国特許第5,096,669号、または1998年10月13日に発行されたZelinに対する米国特許5,821,399号（これらは参照によってこれらのそれぞれの全体が本明細書に組み込まれる）などの読出装置によって操作されるように設計されている。

30

【0016】

本発明は、試料内の分析物の存在または量を決定するために液体試料をプロセッシングするためのカートリッジ、およびこれらを使用するための方法を提供する。特定の態様において、カートリッジは、未計測の体積の試料をカートリッジに導入することができ、これにより、カートリッジおよびこれに付随した読出装置によって、計測した量をプロセスすることができる計測手段を含む。したがって、医師またはオペレーターは、測定前に試料の体積を正確に測定する作業から解放され、それに伴って時間、努力の節約、更に精度および再現性が増大される。大部分の特定の態様において、計測手段は、毛細管栓で境を接し、その長さに沿って空気注入口を有する細長い試料チャンバを含む。空気注入口に作用する空気圧は、毛細管栓を過ぎて計測された体積の試料を駆動する。計測された体積は、空気注入口と毛細管栓の間の試料チャンバの体積によってあらかじめ決定される。

40

【0017】

本発明に記載のカートリッジは、試料および第2の液体を、アッセイの順番の間に種々の時間においてセンサーアレイに接触させることができる利点がある。また、試料および

50

第2の液体は、初めはそれぞれの導管内に乾燥した被覆として存在するその他の試薬または化合物とは独立して、修正されてもよい。カートリッジ内の液体の制御された動きにより、試料または液体が導管の新たな領域へ移動するときにはいつでも、一つ以上の物質をそれぞれの液体内に修正することができる。このような方法で、それぞれの液体に多くの修正が提供され、実施することができる自動化アッセイ法の複雑度がさらに拡大し、したがって、本発明の有用性が增强される。

**【0018】**

したがって、本発明の目的は、多様なアッセイプロトコルに対して順応することができる柔軟な分析物分析システムを提供することである。液体の動きの制御は、ポンプ手段、バルブ、導管制限、空気セグメント、並びに気伝導度センサーおよびその他のセンサーの調整作用を介して達成される。カートリッジは、読出装置と組み合わせて使用されることが企図され、これがカートリッジ内の液体の動きを調整する。カートリッジの導管を介して試料および液体を移動させるために、圧力を加えるポンプ手段が提供される。一部の態様において、試料および液体の動きの正確な制御は、特定の点において伝導性の液体の有無を検出する、導管内に配置された1つまたは複数の電導度センサーによって提供される。この情報は、ポンプ手段を制御するために任意に使用される。その他の態様において、カートリッジは、試料および液体の動きの方向を制御するバルブをさらに含む。たとえば、1つの態様において、液体との接触後に閉じるバルブにより、1つのポンプ手段で分析物センサーアレイを超えて経時的に試料および第2の液体を移動させることができる。さらに、一部の態様において、1つまたは複数の空気セグメントを第2の導管内に導入して、その中の液体を区分し、したがって、セグメント間の混合を防止するための手段が提供される。

**【0019】**

使い捨て可能なカートリッジにおいて、含まれる液体の量は、好ましくは費用および大きさを最小にするために小さく保たれる。したがって、本発明において、導管内のセグメントは、センサーアレイまたは少なくとも一回リンスされるその他の領域上のセグメントの空気-液体界面を通過することによって、導管をクリーニングおよびリンスするのを助けるために使用される。驚いたことに、より大体積の液体による連続したリンスと比較して、より少ない液体を使用する、より効率的なリンスは、この方法によって達成されることが見出された。

**【0020】**

導管内の制限は、本発明のいくつかの目的に貢献する。試料チャンバと第1の導管の間に位置する毛細管栓は、十分な圧力が毛細管栓の耐性を克服するように適用されるまで、保持チャンバに導入される試料の置換を防止するために使用される。第2の導管内の制限は、液体が狭窄部に到達したときに、廃棄物チャンバの方へ別の経路に沿って洗浄液の進路を変更させるために使用される。十分な圧力が加えられるまで、第1の導管から第2の導管への流れを防止するために、ガスケット内の小さな穴が、疎水性コーティングと共に備えられる。本発明の導管内および導管間の液体の流れを制御する機能は、本明細書においてひとまとめに「バルブ」と呼ばれている。これらおよびその他の方法において、本発明は、多様なアッセイ法に適應できる柔軟な系を提供することを目的として有し、これは、本開示を読むことにより当業者には明らかになるであろう。

**【0021】**

したがって、本発明の1つの態様は、分析物センサーまたは分析物センサーのアレイを含む、第1の導管に接続された試料保持チャンバを有する使い捨てのカートリッジを提供する。部分的に液体を含む第2の導管は、第1の導管に接続されており、空気セグメントを第2の導管内の液体に導入して、これを区分することができる。第1の導管内の試料を移動させるために、ポンプ手段が提供され、第2の導管から第1の導管に液体を移す。したがって、センサーまたはセンサー群には、最初に試料を、および次いで第2の液体を接触させることができる。

**【0022】**

カートリッジの第2の態様は、第1の導管と廃棄物チャンバの間に位置する閉じることができる(closeable)バルブを含む。この態様では、第1の導管に接続された単一のポンプ手段のみを使用して、第2の導管から第1の導管に液体を移動させることができる。この態様では、小さな使い捨てのカートリッジの重要な特徴である、本発明のカートリッジの導管の効率的な洗浄がさらに可能となる。操作の際に、センサーに接触させるために試料を移動させ、次いで閉じることができるバルブを介して廃棄物チャンバに移動させる。湿潤にすることにより、閉じることができるバルブは、廃棄物チャンバに対する開口部を封着して、第1の導管に接続されたポンプ手段のみを使用して、第2の導管内の液体を排出してセンサーと接触させることができる気密シールを提供する。本態様において、閉じることができるバルブにより、このように液体を移動させることができ、空気が廃棄物チャンバから第1の導管に入ることを防止する。

10

## 【0023】

第3の態様において、閉じることができるバルブおよびセグメントを導管内に導入するための手段の両方が提供される。この態様は、多くの効果を有するであろうし、その中には、センサーまたはセンサーのアレイ上の区分された液体に往復運動させる能力がある。したがって、第1のセグメントまたはセグメントのセットを、センサーをリンスするために使用し、測定するために、新しいセグメントによってこれを置換する。1つのポンプ手段(第1の導管に接続されたもの)のみが必要とされる。

## 【0024】

第4の態様において、これは好ましい態様であり、分析物センサーを被覆する液体の薄膜で分析物の測定が行われる。このような薄膜での決定は、望ましくは電流測定によって行われる。好ましい態様のカートリッジは、試料がバルブを介して放出されるときに、封着される閉じることができるバルブ、および少なくとも1つの空気セグメントをその後に測定する液体に導入することができる導管内の空気孔の両方を有し、これにより、試料がセンサーからリンスされる効率を増大し、さらに、測定前にセンサーから実質的に全ての液体を除去することができ、さらに、精度の改善および再現性の内部チェックのために、新たな液体のセグメントをセンサーを横切って導いて、経時的な反復測定を可能にする点で、前述の態様と異なる。

20

## 【0025】

低濃度の免疫活性分析物の検出のための解析スキームは、酵素標識された抗体/分析物/表面-結合抗体の「サンドイッチ」複合体の形成に依存する。試料中の分析物の濃度は、酵素の表面濃度に比例して変えられる。酵素は、基質を検出可能な生成物に変えることによって、分析物の化学シグナルを増幅することができる。たとえば、アルカリホスファターゼが酵素である場合、単一の酵素分子により、分あたり数千の検出可能分子を産生することができ、アルカリホスファターゼの代わりに電気活性種が抗体に付着されるスキームと比較して、分析物の検出において数桁の改善がもたらされる。

30

## 【0026】

免疫センサーの態様において、最初に試料とセンサーを接触させ、次いでセンサーからの反応を記録する前に洗浄液と接触させることは有利である。特定の態様において、修正された試料がセンサーと接触する前に、試料内の関心対象の分析物に結合する抗体-酵素結合体によって試料を修正する。試料中の結合反応は、分析物/抗体-酵素複合体を生じる。センサーは、電極表面近くに付着された分析物に対する固定された抗体を含む。センサーを接触させることにより、分析物/抗体-酵素複合体は、電極表面の近くで固定された抗体に結合する。センサーからのバックグラウンド・シグナルを最小にするために、未結合の抗体-酵素結合体の多くをできる限り電極の付近から除去するというこの点で有利である。抗体-酵素複合体の酵素は、有利には液体に提供された基質を変換して、電気化学的に活性な種を産生することができる。この活性種は、電極の近くに産生され、適切な電位が適用されると、電極でレドックス反応からのいずれかの電流をもたらす(電流測定術)。または、電気活性種がイオンである場合、電位差測定によって測定することができる。電流測定の測定において、電位は、測定の間に固定されるか、またはあらかじめ決定

40

50

された波形に従って変化するかのいずれかであろう。たとえば、サイクリックボルタンメトリーの周知技術に使用されているように、限界の間の電位を掃きのけるために、三角形波を使用することができる。または、電極に隣接する電気活性種の検出の感受性を改善するために、方形波などのデジタル技術を使用することができる。電流または電圧測定から、試料中の分析物の量または存在を算出する。これらの及びその他の解析電気化学的な方法は、当該技術分野において周知である。

【0027】

カートリッジが免疫センサーを含む態様において、免疫センサーは、有利には金、白金、またはイリジウムなどの非反応性の金属の基盤センサーから微細製造され、これを微小粒子、たとえばラテックス粒子に付着された生理活性層で覆う。微小粒子を電極表面上に施して、付着させ、多孔性の生理活性層を形成する。生理活性層は、関心対象の分析物に特異的に結合する性質、または分析物が存在するときに検出可能な変化を明らかにする性質を有し、最も好ましくは分析物に対して向けられた固定された抗体である。

10

【0028】

したがって、操作において、本発明の1つの目標は、好ましくは次のように基本的感覚で作動される免疫センサーカートリッジを提供することである。(しかし、本発明は、免疫センサーを含む態様に制限されず、任意のリガンド-受容体相互作用を含む。)計測されていない量の好ましくは生物学的試料が、カートリッジの試料チャンバに入れられ、カートリッジが読出装置に入れられる。計測された試料部分を、少なくとも1つの抗体-酵素結合体によって修正し、次いで免疫センサーに接触させる。酵素の電気不活性な基質を含む第2の液体を使用して、免疫センサーを実質的に未結合の抗体-酵素結合体フリーにリンスし、免疫センサーの電極の電氣的反応を記録して、関心対象の分析物の存在または量について解析する。カートリッジは、複数の免疫センサーおよび試薬を含んでいてもよい。

20

【0029】

読み込み後、オペレーターは、カートリッジを除去して廃棄する。次いで、リーダーは、別の測定のための準備がなされる。本発明の使用は、生物学的または医学的な状況において頻繁に適用されると考えられるが、本発明は、リアルタイムに近づく速度で液体試料のインサイチュウの化学分析を行うことが要求される任意の局面において実施されてもよいことは言うまでもない。

【0030】

本発明のさらなる目的は、導管内での電気化学的な測定を行う新たな手段を提供することによって、免疫センサーを基質を含む試料および液体に曝露させ、その後、センサーの近くで導管壁上の液体の薄層以外の液体を導管から除去させることである。

30

【0031】

本発明は、免疫アッセイ・カートリッジの適用に関して記載されているが、本発明は、当該技術分野において既知のその他の臨床面化学的定量法をその範囲内に包含することが認識される。

【0032】

V. 本態様の詳細な記載

節Aにおいて、本発明の免疫センサーの特定の態様の記述を、これらを使用する3つの実施例とともに提供する。節Bにおいて、これを使用する1つの実施例と共に好ましい態様を記載してある。

40

【0033】

A. 特定の態様

カートリッジの構築:

図を参照し、本発明のカートリッジは、カバー図1、2、基盤図4、および基盤とカバーの間に配置された薄膜附着性のガスカート図3を含む。ここで図1を参照し、カバー1は、強固な材料、好ましくはプラスチックでできていて、亀裂のない柔軟なヒンジ領域5、9、10で繰り返し変形ができる。カバーは、柔軟なヒンジ9によってカバーの主本体部に付着された蓋2を含む。操作の際に、チャンバ34を保持する試料に試料を導入後、蓋は、試料

50

侵入ポート4への入口を通じて試料の漏出を防止することを確実にすることができ、蓋により、かぎ3によって適当な状態に保持される。カバーは、2つのパドル6、7をさらに含み、カバーの本体に関して移動可能であり、柔軟なヒンジ領域5、10によってこれに付着されている。操作の際に、ポンプ手段によって操作したときに、パドル6は、薄膜ガスケット21によって被覆された空隙43の中に含まれる空気袋によって力を及ぼし、カートリッジの導管内で液体を移動させる。第2のポンプ手段によって操作したときに、パドル7は、ガスケット21に力を及ぼされ、その中でスリット22を切断することにより、これを変形することができる。カートリッジは、読出装置に挿入するように適合され、したがって、この目的のために複数の機械的および電気的な結合を有する。カートリッジの手動操作が可能なることも、明らかにはずである。したがって、読出装置へのカートリッジの挿入により、ガスケットは、空隙42に位置する約130  $\mu$ Lの分析物/洗浄液溶液(「液体」)で満たされた液体を含有する箔パック上に圧力を伝え、スパイク38によりパッケージを破裂させ、導管39に液体を放出し、これが基盤内を横断する短い導管を経てセンサー導管に接続される。解析液体は、毛細管栓として作用するテープ・ガスケットの小さな開口部上に、液体を押し、最初に解析導管の前端を満たす。解析導管内の制御された位置で、解析液体に1つまたは複数のセグメントを注入するために、カートリッジに適用されるアナライザー機構のその他の動きを使用する。これらのセグメントは、センサー表面および周囲の導管を最小限の液体で洗浄するのを助けるために使用される。

10

## 【0034】

カバーは、細い柔軟なフィルム8によって被覆された穴をさらに含む。操作の際に、フィルムに及ぼされる圧力は、ガスケット内の小さい穴28を介して導管20内に1つまたは複数の空気セグメントを放出する。

20

## 【0035】

図2を参照し、基盤の底面は、第2の導管11、および第1の導管15をさらに含む。第2の導管11は、液体の流れに対する耐性を提供することによって液体の流れを制御する狭窄部12を含む。任意のコーティング13、14は、ガスケット・穴31、32と共に導管11、15の間で液体の流れを制御する疎水性表面を提供する。基板内の凹所17は、ガスケット内の穴27を介して導管34に通じぬける導管34内の空気のための経路を提供する。

## 【0036】

図3を参照し、薄膜ガスケット21は、基板およびカバー内の導管間の液体の移動を容易にし、必要な場合には、圧力下でガスケットを変形することができるように、種々の穴およびスリットを含む。したがって、穴24は、導管11から廃棄物チャンバ44に液体を流れさせ、穴25は、導管34と11の間の毛細管栓を含み、穴26は、空気を凹所18と導管40の間に流れさせ、穴27は、気動を凹所17と導管34の間に提供し、そして、穴28は、液体を任意の閉じることができるバルブ41を経て導管19から廃棄物チャンバ44に流れさせる。穴30および33は、それぞれ切欠35および37内に収容された複数の電極を導管15内の液体に接触させる。特定の態様において、切欠37は、接地電極および/または対基準電極を収容し、切欠35は、少なくとも1つの分析物センサーおよび任意に、電導度センサーを収容する。

30

## 【0037】

図4を参照し、導管34は、試料侵入ポート4を、組み立てたカートリッジ内の第1の導管11に接続する試料保持チャンバである。切欠35は、分析物センサーもしくはセンサー群、または任意の電導度センサーもしくはセンサー群と共に分析物応答表面を収容する。切欠37は、必要に応じて、電気化学的なセンサーのための還流経路として接地電極を収納し、また任意の電導度センサーを収容してもよい。切欠36は、液体が第1と第2の導管の間を通ることができるように、ガスケット穴31と32の間に液体経路を提供する。凹所42は、組み立てたカートリッジ内に液体を含有するパッケージ、たとえば破裂できる小袋を収容し、これは、読出装置に挿入することによりパドル7によって圧力が及ぼされるために、スパイク38によって穴がけられる。穴のあいたパッケージからの液体は、39で第2の導管に流れる。内袋は、ガスケット21によってその上面の上が封着された凹所43を含む。空気袋は、ポンプ手段の一態様であり、パドル6に適用される圧力によって作動して導管40内の

40

50

空気を置換することにより、試料を試料チャンバ34から第1の導管15に移す。

【0038】

空気が内袋から試料チャンバ（ガスケット・穴27）に入る位置、および毛細管栓25は、共に試料チャンバの所定の体積を定義する。パドル6がへこんだときは、この体積に対応する試料の量が、第1の導管内に移動する。したがって、この配置は、カートリッジの導管内の計測されていない試料の計測された量を送達するための計測手段の1つの可能な態様である。

【0039】

本カートリッジにおいて、試料セグメントを計測するための手段は、基盤のプラスチックの部分に提供される。セグメントの大きさは、基盤の区画の大きさおよび毛細管栓の位置およびテープ・ガスケットの空気管穴によって制御される。この体積は、2~200マイクロリットルで容易に変更することができる。試料の大きさをこの範囲で拡張することは、本発明の文脈内で可能である。

【0040】

液体は、事前解析導管11を介して押し出され、これは、試料内の試薬（たとえば、粒子または可溶性分子）を修正するために、センサー導管19にこれを提示する前に使用することができる。または、修正する試薬は、セグメント16を越えてセグメント15に位置してもよい。また、事前解析導管を介した試料の押し出しは、ダイアフラムポンパドル7に張力を導入するのに役立つ、これが液体置換操作のためのその反応性を改善する。

【0041】

一部のアッセイ法において、分析物の定量が必要とされる場合、計測は好都合である。廃棄物チャンバ44は、カートリッジの外面の汚染を防止するために導管から放出される試料および/または液体のために提供される。また、廃棄物チャンバを外部雰囲気と接続する排出口45も、提供される。カートリッジの特徴は、一旦試料が充填されたならば、解析を完了させることができ、およびオペレーターまたはその他が試料に接触することなくカートリッジを捨てられることである。

【0042】

ここで図5を参照し、カートリッジおよび構成成分の特徴の模式図が提供され、ここで、51-57は、導管および試料チャンバ部分であり、これらは、選択的に試料または液体を修正するために乾燥試薬で被覆することができる。これを溶解するために、試料または液体を、乾燥試薬上を少なくとも1回通過させる。カートリッジ内の試料または液体を修正するために使用される試薬は、アッセイ化合物中の特異的なまたは非特異的な結合反応を防止する抗体-酵素結合体、または遮断薬を含む。また、可溶性ではないが、カートリッジ内部表面に対するアッセイ成分の非特異的な吸着を防止するのに助ける表面被覆を提供することもできる。

【0043】

試料または液体のセグメント内で、修正する物質をセグメントの所定の領域内で優先して溶解および濃縮させることができる。これは、セグメントの位置および動きを制御することによって達成される。したがって、たとえば、最先端など一部のセグメントのみが修正された物質上を往復運動する場合、物質を高い局部濃度にすることによって、最先端の近くで達成することができる。または、物質の均一な分布が要求される場合、例えば、定量分析のために既知の濃度の修正物質が必要とされる場合、試料または液体のさらなる往復運動によって、混合し、均一な分布を生じる。

【0044】

特定の態様において、閉じることができるバルブは、第1の導管と廃棄物チャンバの間に提供される。1つの態様において、このバルブ58は、不浸透性の物質で被覆された乾燥スポンジ材料で構成される。操作の際に、試料または液体とスポンジ材料を接触させることにより、スポンジの膨張を生じて空隙41を満たし、これにより実質的に廃棄物チャンバ44へさらに液体が流れるのを遮断する。さらに、濡れたバルブも、第1の導管と廃棄物チャンバの間の空気の流れを遮断し、これにより第1のポンプ手段が試料チャンバに接続さ

10

20

30

40

50

れて、第2の導管内に液体を移動させ、以下の方法で第2の導管から第1の導管内に液体を移すことができる。試料を制御された時間センサーに曝露したあと、試料を解析後導管19に移動させて、ここでもう一つの試薬で修正することができる。次いで、これをセンサーに移動させることができ、第二の反応期間を開始することができる。または、解析後導管は、単に試料セグメントをセンサーから分離するのに役立つことができる。この解析後導管には、センサー導管の空気バルブを膜空気ポンプに接続する単一の閉じることができるバルブがある。このバルブが閉じると、試料は、解析後導管に係止され、センサー・チップへ移動することができない。本発明の範囲内に含まれるこのバルブのための異なるいくつかのデザイン例がある。一部のデザインは、機械的に活性化されるが、その他は、液体の接触により活性化される。本発明に含まれる閉じることができるバルブのその他のタイプは、液体もしくは試料と接触することによって溶解または膨張する可溶性接着剤またはゲル化重合体により開放位置に保持され、したがって、フラップを閉じさせる柔軟なフラップ、およびまたは、1つの特定の態様において、導管と廃棄物チャンバまたは周囲空気のいずれかの間におかれ、その結果ペーパーが空気に透過性であり乾燥しているが、湿ったときに不透過性である多孔性ペーパーまたは同様の材料の薄層を含むが、これらに限定されない。後者の場合、閉じることができるバルブが導管と廃棄物チャンバの間に配置されることは必要でなく：バルブは、閉じる前にはほとんど液体を通さず、そしてバルブは、カートリッジを囲んでいる導管と周囲空気の間位置するときに、適切に配置される。実用的な構築では、濾紙片を制御される液体経路のテーブ・ガスケットの開口部に配置させる。空気は、液体が液体経路で移動することができるようにこの媒体類を介して容易に移動することができる。液体がこのフィルターを通して押し出されるときに、濾過媒体は液体で満たされ、液体経路を介したさらなる動きが停止される。一旦フィルターが湿ると、フィルターの孔を介して液体を移動するために、有意な圧力が必要になる。また、フィルターを通る空気の流れは、フィルターから液体を押し出すよりも高い圧力が必要とされるので、防止される。このバルブの態様では、ごくわずかな液体しかバルブを動かすことを必要とせず、作動が迅速かつ確実に生じる。材料、これらの次元、気孔率、水和性、腫脹の特徴、および関連したパラメーターは、特異的な所望の密封時間に応じて、1秒以内またはよりゆっくり、たとえば最初に試料を接触させた後、60秒までに、迅速な密封を提供するように選択される。

#### 【0045】

または、閉じることができるバルブは、機械的バルブである。本態様において、ラテックス隔壁は、特別に構築されたウェル上の空気袋の底に配置される。ウェルは、流体工学により空気排出口を試料導管に接続する2つの開口部を含む。アナライザ・ブランジャが、内袋の底を押すので、これがこのラテックス隔壁を押しつけて、再び接着し、2つの穴間の結合を封着する。これにより、適所に試料に係止して、試料の空気排出口が遮断される。

#### 【0046】

ここで図6を参照し、免疫センサーカートリッジの模型図レイアウトを図示しており、3つのポンプ手段(61~63)が提供される。これらのポンプは、特定の態様に関して記載されていたが、ポンプ手段61~63のそれぞれの機能を実施することができる任意のポンプ手段が本発明の範囲内で使用されてもよいことは容易に理解される。したがって、ポンプ手段1、61は、試料を試料保持チャンバから第1の導管に移すことができなければならない。ポンプ手段2、62は、第2の導管内で液体を移動させることができなければならない。ポンプ手段3、63は、第2の導管内に少なくとも1つのセグメントを挿入することができなければならない。本出願において認識されるポンプのその他のタイプは、空気手段に接触する空気袋を含み、これにより、圧力が該空気袋、柔軟な隔壁、ピストンおよびシリンダ、電気力学的なポンプ、およびソニックポンプに適用されるものを含むが、これらに限定されない。ポンプ手段3、63に関して、「ポンプ手段」の用語は、空気袋から空気を移すための空気装置、溶解されたときに気体を生じる乾燥化学物質、または操作可能な状態で電流源につながれた複数の電解電極などの、1つまたは複数のセグメントが第2の導管に挿入

10

20

30

40

50

される全ての方法を含む。特定の態様において、セグメントは、複数の内袋またはチャンバを有してもよい膜を生成する機械的セグメントを使用して作製される。ウェル8は、内側の膜ポンプを接続する単一の開口部とセグメントが注入される液体の満たされた導管20を有する。膜は、多数のセグメントを作製するために分割することができ、それぞれ液体の満たされた導管内の特定の位置に注入される。

【0047】

別の態様では、セグメントは、受動的特徴を使用して注入される。カートリッジの基盤内のウェルをテープ・ガスケットによって封着する。ウェルをカバーするテープ・ガスケットは、いずれの末端にも2つの小さい穴を有する。1つの穴は開放性であるが、他方は液体との接触によって濡れた濾過剤でおおわれている。ウェルは、セルロース繊維フィルター、紙フィルター、またはガラス繊維フィルターなどのゆるい親水性の材料で満たされる。この親水性の材料は、毛細管の作用を介して基盤内のウェルに液体を引き出し、以前はウェル内にあった空気を置換する。空気は、体積がウェルの体積およびゆるい親水性の材料の体積によって決定されるセグメントを作成するテープ・ガスケット内の開口部を介して放出される。基盤内のウェルへの入口の1つをカバーするために使用されるフィルターは、液体がウェルを満たす割合を計測し、これによりセグメントがカバー内の導管に注入される割合を制御するように選択することができる。この受動的特徴により、液体経路内の特定の位置に注入される多くの制御されたセグメントを可能にし、最小の空間を必要とする。

【0048】

本発明は、以下の実施例に記載される特定の態様に関して、より理解されるであろう。

【0049】

#### 実施例1

ここで、心機能のマーカのトロポニンI (TnI) を決定するために、本発明の特定の態様に記載の電流測定の実験アッセイ法の原理を図7を参照する。血液試料を、たとえば本発明のカートリッジの試料保持チャンバに導入し、ポリクローナル抗トロポニンI抗体 (aTnI) 71に共有結合で付着されたアルカリホスファターゼ酵素 (AP) を含む結合分子によって修正する。この結合体は、血液試料の中のTnI70に特異的に結合し、AP-aTnI結合体に結合したTnIから成る複合体を生じる。捕獲工程では、この複合体が免疫センサー72に付着されたか、または近くの捕獲TnI抗体に結合する。センサー・チップは、試料がセンサー・チップに到達するときをモニターするために使用される導電率センサーを有する。カートリッジ内の漏れを検出するために、液体の到着時間を使用することができ、到着の遅延により、漏れのシグナルを送る。センサー導管内の試料セグメントの位置は、マーカーとして液体の縁を使用して能動的に制御することができる。試料/空気の界面は、導電率センサーをクロスするので、液体マーカーとして使用することができる正確なシグナルを生じ、これにより、制御された液体可動域を実行することができる。センサー界面に全ての試料を示すために、液体セグメントは、センサー上の縁から縁まで変動させることが好ましい。第2の試薬をセンサー・チップを越えてセンサー導管に導入することができ、これにより液体振動の間に均一に分配されることとなる。

【0050】

センサー・チップは、関心対象の分析物のための抗体で被覆された捕獲領域または領域群を含む。これらの捕獲領域は、ポリイミドの疎水性の環またはフォトリソグラフィによって作製される別の層によって定義される。一部の形態の抗体を含む微小液滴 (microdroplet) またはいくつかの微小液滴群 (約5~40ナノリットルの大きさ) は、例えばラテックス微粒子に結合され、センサー表面に定量吐出 (dispense) される。光定義 (photodefined) された環は、この水性液滴を含み、抗体被覆領域を数ミクロンの精密さで局在化させることができる。捕獲領域は、0.03~およそ2平方ミリメートルの大きさに作製することができる。この大きさの上端部は、本態様の導管およびセンサーの寸法によって限定され、本発明の制限とはならない。

【0051】

したがって、金電極74は、TnI/AP-aTnI複合体が結合する、共有結合で付着された抗トポニンI抗体を含むバイオ層 (biolayer) 73で被覆されている。したがって、APIは、初めに試料に存在するTnIの量に比例して電極の近くに固定される。特異的な結合に加えて、酵素抗体結合体は、センサーに非特異的に結合してもよい。非特異的な結合は、望ましくないセンサーからのバックグラウンド・シグナルを提供し、好ましくは最小化させる。上記の通りに、リンスプロトコル、および特にセンサーをリンスするための区分けした液体の使用は、このバックグラウンド・シグナルを最小にするための有効な手段を提供する。リンス工程後の第2の工程において、たとえばアルカリホスファターゼによって加水分解して電気活性生成物76を生じる基質75をセンサーに与える。特定の態様において、基質は、リン酸化されたフェロセンまたはp-アミノフェノールで構成される。電流測定電極は、直接基質ではなく、加水分解された基質の生成物を酸化または還元するために十分な固定電気化学ポテンシャルに固定するか、または電位を適切な範囲で1回または複数回掃引するかする。選択的に、第2の電極は、測定のための基準センサーまたはとして作用するように、TnI/AP-aTnIの複合体は、製造の間に作製された層で被覆されていてもよい。

#### 【 0 0 5 2 】

本実施例では、センサーは、酵素標識されたアルカリホスファターゼと4-アミノフェニルホスフェートの反応から酵素的に産生される4-アミノフェノールを検出するために使用される、2つの電流測定の電極を含む。電極は、好ましくはポリイミドの光定義された層で被覆された金界面から生じる。絶縁ポリイミド層の規則正しい間隔を置いた開口部は、4-アミノフェノールが分子反応につき2つの電子に酸化される小さな金電極の格子を定義する。センサー電極は、さらにバイオ層を含むが、基準電極は、例えばバイオ層を欠いた金電極から、または銀電極もしくはその他の適切な材料から、構築することができる。異なる分析物を検出する能力を有するそれぞれの電極に、異なるバイオ層を提供することができる。



#### 【 0 0 5 3 】

p-アミノフェノール種などの基質は、 $E_{1/2}$ の基質および生成物が実質的に異なるように選択することができる。 $E_{1/2}$ の基質は、実質的に生成物のものよりも高いことが好ましい。条件が合ったときに、生成物は、基質の存在下において選択的に電気化学的に測定することができる。

#### 【 0 0 5 4 】

電極の大きさおよび間隔は、感受性およびバックグラウンド・シグナルを決定するために重要な役割を演ずる。格子の重要なパラメーターは、曝露された金属の割合および探查電極間の間隔である。電極の位置が、制御された距離によって捕獲領域から抗体捕獲領域またはオフセットの下に直接あることができる。電極の実際の電流測定のシグナルは、抗体捕獲部位に相関したセンサーの位置および解析の間の液体の動きに依存する。センサーの近くの電気活性生成物の量に応じた電極の電流を記録する。

#### 【 0 0 5 5 】

この実施例でのアルカリホスファターゼ活性の検出は、4-アミノフェノールの酸化電流の測定に依存する。これは、Ag / AgCl グランドチップに対し約+60mVの電位で達成される。使用される検出の正確な形態は、センサー配置に依存する。センサーの1つのバージョンでは、金の微小電極アレイは、抗体捕獲領域の下に直接位置する。解析液体がこのセンサー上に引かれるときに、捕獲部位の上に位置する酵素は、酵素限定反応で4-アミノフェニルホスフェートを4-アミノフェノールに変換する。4-アミノフェニルホスフェートの濃度は、過剰に、たとえば、 $K_m$ 値の10倍であるように選択される。解析溶液は、pH9.8に緩衝された0.1Mのジエタノールアミン、1.0MのNaClである。その上、解析溶液は、酵素の補因子である0.5mMのMgClを含む。

#### 【 0 0 5 6 】

もう一つの電極の幾何学態様において、電極は、捕獲領域から数百ミクロン間隔をおいて配置される。解析液体の新しいセグメントが捕獲領域上に引かれるときに、電極反応の

ために損失することなく酵素生成物を構築する。しばらくして、検出器電極上の捕獲領域から溶液をゆっくりと引いて、電流のスパイクを生じ、これにより酵素活性を決定することができる。

【0057】

アルカリホスファターゼ活性の高感度検出に重要な点は、バックグラウンド酸化反応に付随する非4-アミノフェノール電流および金センサーで生じる還元である。金センサーは、これらの電位において塩基性緩衝液中で有意な酸化電流を与える傾向がある。バックグラウンド電流は、主に緩衝液濃度、金電極領域（被露出領域）、表面の前処理、および使用される緩衝液の性質に依存する。ジエタノールアミンは、アルカリホスファターゼの特に良好な活性化緩衝液である。モル濃度の濃度では、酵素の割合は、炭酸などの非活性化緩衝液の約3倍に増大される。

10

【0058】

別の態様では、抗体またはその他の分析物結合分子に結合した酵素は、ウレアーゼであり、基質は尿素である。尿素の加水分解によって生じるアンモニウムイオンは、本実施例ではアンモニウム感応電極の使用によって検出される。アンモニウム特異的な電極は、当業者に周知である。適切なマイクロ加工されたアンモニウムイオン選択性電極は、米国特許第5,200,051号に開示されており、本明細書に参照として組み込まれる。基質と反応してイオンを生じるその他の酵素は、当該技術分野に既知であり、これと使用するのためのその他のイオンセンサーとなる。たとえば、アルカリホスファターゼ基質から生じるホスフェートは、ホスフェートイオン選択性電極で検出することができる。

20

【0059】

ここで図8を参照し、微細製造によってつくられた免疫センサーの態様の構築を図示してある。好ましくは、平面の非電導性基質が提供され、80、この上には、従来手段または当業者に既知の微細製造によって伝導層81が沈着される。伝導材料は、好ましくは金または白金などの貴金属であるが、イリジウムなどのその他の非反応性の金属を使用してもよく、グラファイトの非金属電極、導電性ポリマー材料、またはその他の材料であってもよい。また、電気接続82が提供される。バイオ層83は、少なくとも電極の一部に沈着される。本開示において、バイオ層は、関心対象の分析物に結合することができるか、または測定可能な変化を産生することによってこのような分析物の存在に反応することができる分子84の十分な量をその表面に含む多孔層を意味する。選択的に、選択透過性のスクリーニング層は、米国特許第5,200,051号に記載されたとおり、電気化学的な干渉をスクリーニングするために電極およびバイオ層の間に配置されてもよい。

30

【0060】

特定の態様において、バイオ層は、約0.001~50ミクロンの範囲の特定の直径のラテックスビーズから構築される。ビーズは、バイオ層の上記の定義と整合した任意の適切な分子の共有結合性の付着によって修飾される。多くの付着方法が当該技術分野に存在し、タンパク質のリジンまたはN末端のアミノ基の安易なカップリングのためにアミン反応性N-ヒドロキシ琥珀酸イミドエステル基を提供することを含む。特定の態様において、生体分子は、イオノフォア、補因子、ポリペプチド、タンパク質、糖ペプチド、酵素、免疫グロブリン、抗体、抗原、レクチン、神経化学的な受容体、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、または適切な混合物の中から選択される。大部分の特定の態様において、生体分子は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、トロポニンI、トロポニンT、トロポニンC、トロポニン複合体、クレアチンキナーゼ、クレアチンキナーゼ・サブユニットM、クレアチンキナーゼ・サブユニットB、ミオグロビン、ミオシン軽鎖、またはこれらの修飾断片の1つまたは複数に結合するように選択された抗体である。このような修飾された断片は、天然の部分によるかまたは合成部分による化学修飾を含む、少なくとも1つのアミノ酸の酸化、還元、欠失、付加、または修飾によって作製される。好ましくは、生体分子は、特異的に分析物に結合し、分析物リガンドの結合について約 $10^7 \sim 10^{15} M^{-1}$ の親和定数を有する。

40

【0061】

50

1つの態様において、バイオ層は、適切な分子によって共有結合で修飾された表面を有するビーズを含み、以下の方法によってセンサーに付着される。センサー表面上に修飾されたビーズの懸濁液の小さな液滴、好ましくは約0.4nlを沈着させるために、微量調剤用針が使用される。液滴を乾燥させて、表面上に、使用する際の置換に耐える、ビーズの被覆を生じさせる。

#### 【0062】

バイオ層が電流測定センサーに相関して定位置にある免疫センサーに加えて、本発明は、バイオ層が可動性の粒子によって被覆されている態様も想定する。カートリッジは、分析物と相互作用することができる可動性の微小粒子、たとえば捕獲工程後の電流測定電極に局在化された磁性粒子を含むことができ、これにより測定のために、電極に粒子を濃縮するために磁力が使用される。本発明の可動性の微小粒子の1つの利点は、試料または液体中のこれらの動きが結合反応を促進し、より迅速にアッセイ法の捕獲工程を行えるということである。非磁性の可動性の微小粒子を使用する態様については、電極にビーズを閉じ込めるために、多孔性フィルターが使用される。

10

#### 【0063】

図9をここで参照し、単一基質に対するいくつかの電極のためのマスクデザインを図示してある。マスクングおよびエッチング技術によって、独立した電極およびリードを沈着させることができる。したがって、複数の免疫センサー94および96、並びに電導度センサー90および92を、読出装置に電氣的に接続するための、これらのそれぞれの接続パッド91、93、95、および97と共に低コストで密な領域に提供する。原則として、非常に大きなセンサーアレイは、このような方法で組み立てられることができ、それぞれ異なる分析物に感受性であるか、または対照センサーとして作用する。

20

#### 【0064】

特に、免疫センサーは次のように調製される。シリコンウエハーを熱的に酸化させて、ほぼ1ミクロンの絶縁酸化物層を形成させる。チタン/タングステン層を100~1000オングストロームの間の好ましい厚さに、続いて金の層を最も好ましくは800オングストロームの厚さに、酸化物層上へスパッタリングする。次に、ホトレジストをウエハー上に回転させて、乾燥し、適切に焼いた。次いで表面を図9に図示したものに対応するマスクなどの、コンタクトマスクを使用して曝露する。潜像を現像し、ウエハーを金腐食液に曝露する。パターン化された金層を光定義される (photodefinable) ポリイミドで被覆し、最適に焼き、コンタクトマスクを使用して曝露して現像し、 $O_2$  プラズマで掃除して、好ましくは350 で5時間イミド化させる。次いで、抗体被覆した粒子によって表面をプリントする。好ましくは、約0.4nlの体積の2%の固形分の脱イオン水溶液を含む液滴をセンサー領域上に沈着させて、風乾によって適所に乾燥する。選択的に、抗体安定化試薬 (例えば、Stabilicoat、SurModicaCorpから得られる) をセンサー上に被覆する。

30

#### 【0065】

粒子を乾燥させることにより、基質を含む試料または液体のいずれかに溶解することを防止する方法でこれらを表面に接着させる。この方法は、高体積でセンサー・チップを製造するために適した信頼性および再現性の高い固定化プロセスを提供する。

#### 【0066】

図10をここで参照し、0または50miU/mLのヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) およびHCG感受性の電流測定免疫センサーを含む試料の解析に対して得られる結果を図示してある。時間100において、p-アミノフェノールホスフェートを含む溶液を、HCGおよびアルカリホスファターゼに結合した抗HCGポリクローナル抗体であらかじめ処理したセンサーに供給する。基質は、アルカリホスファターゼによって加水分解されるので、センサーの拡散体積内の基質が減少し、酸化されたp-アミノフェノールが蓄積するので、電流は最大101に増大し、その後102に減退する。個々の使い捨てのセンサーの出力信号の特徴によって示されるとおり、良好な再現性がセンサー間で得られる。操作の際に、酵素基質を含む液体の置換により、電極表面に対して新しい基質をもたらし、更に生成物を除去し、その結果、単一の試料についての多くの読みが容易に得られる。別の実施例において、電極の

40

50

シグナルは、電極の近くで電気活性種の酵素による再生によって増幅される。特定の実施例において、抗体に付着したアルカリホスファターゼの基質として、リン酸化されたフェロセンが使用される。加水分解によりフェロセン生成物を生じ、これが酸化されて、電極で検出される。第2の工程において、電気化学的に酸化型のフェロセンを再び減少させるために、グルコースオキシダーゼ酵素およびグルコースが使用され、結果として電流および検出感度が増大する。図13をここで参照し、電極130は、電極表面上に、または近くに複合体131として固定されたアルカリホスファターゼの電気活性生成物132を酸化または還元する。第2の工程において、電気活性種132は、酵素134の触媒作用によって生成物133から再生される。このサイクリング反応は、電極表面130に近接する電気活性種132の濃度を増大し、これにより電極で記録される電流を増大する。

10

【0067】

図11をここで参照し、HCGおよびHCGに反応する電流測定の実験室センサーを使用して得られた用量反応の結果が示してある。図10のとおり、0~50miU/mLのHCG相当物の量が電極に付着された固定された抗体に結合することができる。図12をここで参照し、HCGの増加と共に、ピークセンサー電流の反応の良好な直線性121が見出される。したがって、この態様により正確かつ迅速に試料中のHCGを定量することができることが示される。

【0068】

#### 実施例2．請求項1記載のカートリッジの使用方法

第1のカートリッジの態様において、請求項1記載のカートリッジを使用する1つの典型的な分析物アッセイ法プロトコルを記載してある。試料入口ポート4を介して、未計測の流体試料が請求項1に記載のカートリッジの試料チャンバ34に導入される。毛細管栓25は、現段階で導管11に試料の通過を防止し、導管34は、試料で満たされる。蓋2は、カートリッジから試料が漏出するのを防止するために閉じている。次いで、カートリッジを、Zelinに対する米国特許第5,821,399号（これは参照として本明細書に組み入れられる）に開示されたものなどの読出装置に挿入する。読出装置へのカートリッジの挿入により機械が作動し、パッケージがスパイク38に押しつけられたときに、42に位置する液体を含有するパッケージに穴があく。これにより液体は、第2の導管に放出され、39、20、12、および11に順番に到着する。残りの静水圧は、第2の導管部11を経た廃棄物チャンバ44への液体の流れによって散逸されるので、12の狭窄部は、液体のさらなる動作を防止する。第2の工程において、ポンプ手段の操作により、圧力を空気袋43に適用し、空気を、導管40を

20

30

【0069】

切欠35内に位置する免疫センサーを使用する態様において、試料は、たとえばセンサーに到着する前に酵素抗体結合体によって修正される。関心対象の分析物に結合する抗体は、共有結合性に電流測定電極の近くにレドックス作用物質を生成することができる酵素に付着される。特定の態様において、酵素は、加水分解されたときにレドックス活性化化合物を放出するp-アミノフェノールの誘導体などの、特定の有機リン酸化化合物を加水分解するアルカリホスファターゼであってもよい。しかし、センサーによって検出されるであろう任意の化合物を産生し、破壊し、または変化させることができる任意の酵素を、適合するセンサーと連動して使用されてもよい。たとえば、抗体-ウレアーゼ結合体をアンモニウムセンサーと共に使用してもよい。したがって、酵素抗体結合体は試料を修正し、関心対象の分析物に結合する。免疫センサーは、関心対象の分析物に結合する固定された抗体を含むことができる。修正された試料が免疫センサー上を通過するとき、関心対象の分析物は、付着した抗体-酵素結合体と共にセンサーに結合する。

40

【0070】

50

センサーに対する分析物の効率的な結合を促進するために、分析物を含む試料を、振動運動のセンサー上に繰り返し任意に通過させる。好ましくは、約0.2~2Hzの間の振動数、最も好ましくは0.7Hzが使用される。したがって、酵素は、試料に存在する分析物の量に比例して、電流測定のエレクトロード表面の近くに運ばれる。

【0071】

一旦、分析物/酵素-抗体結合体複合体が免疫センサーに結合する機会が提供されると、試料は、空気袋43に適用されるさらなる圧力によって放出され、試料は廃棄物チャンバ44に移る。

【0072】

次に、洗浄液工程では、非特異的に結合した酵素-共役をセンサー室から除去する。第2の導管内の液体は、ポンプ手段43によって移動し、センサーと接触する。第1の空気セグメントが導電率センサーで検出されるまで、解析液体をゆっくりと引き寄せる。

【0073】

空気セグメントまたはセグメント群は、図14において示され、および下記の記載されているような受動的な手段；ポンプ手段を使用して導管内の圧力の一時的な低下させることにより、空気がフラップまたはバルブを通して導管内に引き込まれることを含む積極的手段；導管内に予め配置された、導管内の液体を接触させることにより気体を放出する化合物を溶解することによって（このような化合物は、炭酸エステル、炭酸水素塩等であってもよい）；を含む任意の適切な手段によって導管内で発生することができる。このセグメントは、導管15から試料に混入した液体を浄化するために極めて有効である。記載されているように、センサー領域のリンスの効率は、第2の導管に1つまたは複数の空気セグメントを導入することによって非常に増強される。空気セグメントの前縁部および/または後縁部は、リンスするためにセンサー上を1回または複数回通過し、試料から沈着したであろう外部の材料を再懸濁する。外部の材料は、特異的に結合した分析物または分析物/抗体-酵素結合体の複合体以外の任意の材料を含む。しかし、特異的に結合した分析物または分析物/抗体-酵素結合体の複合体にセンサーからの解離を促進するほど、リンスが十分に長くなくまたは激しくないことが、本発明の目的である。

【0074】

空気セグメントを液体に導入する第2の利点は、液体をセグメントに分けることである。たとえば、液体の第1のセグメントを、センサーをリンスするために使用した後、次いで第2のセグメントを、2つのセグメントの混合を最小限にしてセンサー上に配置する。この特徴により、未結合の抗体-酵素結合体をより効率的に除去することによって、センサーからのバックグラウンド・シグナルがさらに減少する。前縁部を洗浄後、第1の空気セグメントが導電率センサーで検出されるまで、解析液体をゆっくり引き寄せる。このセグメントは、第1の分析流体試料に溶け込んだ試料が混入した液体を浄化するのに極めて有効である。

【0075】

空気セグメントを導管2つに導入する第2の利点は、液体をセグメントに分けることである。たとえば、液体の第1のセグメントを、センサーをリンスするために使用した後、次いで第2のセグメントを、2つのセグメントの混合を最小限にしてセンサー上に配置する。この特徴により、未結合の抗体-酵素結合体をより効率的に除去することによって、センサーからのバックグラウンド・シグナルをさらに減少する。

【0076】

測定のために、液体の新たな部分をセンサー上に配置して、操作法に適した電流または電位を時間の関数として記録する。

【0077】

実施例3．請求項2記載のカートリッジの使用法

請求項2記載のカートリッジは、閉じることができるバルブと共に請求項1記載のカートリッジの全てのエレメントを含み、好ましくは、センサー室と廃棄物チャンバの間に位置する。請求項2記載のカートリッジの使用法は、HCGの濃度が、該カートリッジの試料チ

10

20

30

40

50

チャンバに導入される血液試料内で決定される特定の態様によって本明細書に図示してある。以下の一連の時間において、時間0 ( $t=0$ ) は、カートリッジがカートリッジ読み込み装置に挿入されることを表す。時間は、分で与えられる。 $t=0 \sim t=1.5$ の間に、カートリッジ読み込み装置をパッド91、93、95、および97を介してセンサーと電気的に接触させ、一定の診断試験を行う。カートリッジの挿入は、前述したように液体を第2の導管に導入する箔小袋を穿孔処理する。診断試験は、伝導度電極を使用して、液体または試料が導管に存在するかどうかを決定し；電気短絡が電極に存在するかどうかを決定し；並びに、センサーおよび接地電極が分析物決定の前に好ましくは37 に熱的に平衡にされていることを確認する。

**【 0 0 7 8 】**

$t=1.5 \sim t=6.75$ の間において、実施例2に記載したとおりに、試料の計測した部分、好ましくは4~200  $\mu\text{l}$ の間、より好ましくは4~20  $\mu\text{l}$ の間、最も好ましくは7  $\mu\text{l}$ を使用してセンサーに接触させる。試料の前縁部および後縁部を定義する縁は、好ましくは0.2~2.0Hzの間、最も好ましくは0.7Hzの振動数でセンサー領域上を往復して移動する。この間に、前述したように、酵素抗体結合体を試料内に溶解する。導管上に被覆された酵素抗体結合体の量は、溶解されるときに、好ましくは予想されるHCG濃度よりも高い濃度が得られるように選択され、最も好ましくは試料内の予想されるHCG濃度よりも6倍高い。

**【 0 0 7 9 】**

$t=6.75 \sim t=10.0$ の間に、試料を、閉じることができるバルブ41を経て廃棄物チャンバに移動させ、閉じることができるバルブを濡らし、前述したように閉じさせる。バルブの密封によって作製されたシールにより、第1のポンプ手段を、導管11から導管15への液体の動きを制御するために使用することができる。バルブが閉じて、全ての残りの試料が解析後導管にロックされた後、アナライザ・プランジャをセンサー導管に部分的に減圧を作り出すポンプ手段の柔軟な隔壁により収縮される。これにより、テープ・ガスケット31の小さい穴を介して、基盤13、14の短い横切する導管に解析液体を送り込む。解析液体をさらに引き寄せて、導管の壁の近くで試料を剪断するために、解析液体の前縁部をセンサー・チップ表面を横切って振動させる。センサー・チップの上の導電率センサーは、このプロセスを制御するために使用される。プロセスの効率は、酵素基質の4-アミノフェニルホスフェートも存在するときに、電極で測定される酸化電流を増強する未結合の酵素-抗体複合体の除去を介して、電流測定のセンサーを使用してモニターされる。電流測定の電極は、塩化銀参照-接地電極に対し0.06Vに分極する。本態様において、液体は、1mMの $\text{MgCl}_2$ 、1.0MのNaCl、10mMの4-アミノフェニルホスフェート、および10  $\mu\text{M}$ のNaIを有する0.1Mのジエタノールアミン緩衝液 (pH9.8) から構成される。洗浄の効率は、前述したように、導管内の液体をセグメント化する1つまたは複数のセグメントの液体に導入することによって至適にさらに増強される。空気セグメントは、能動的または受動的な手段によって導入されてもよい。図14をここで参照し、空気セグメントを前記液体に受動的に導入するための特異的な手段の構築物を図示してある。免疫センサーの基盤内では、先細の部分141と円柱形部分が接続されたものを含む凹所140を備える。先細の部分は、組み立てられた免疫センサーカートリッジの基盤 (図4) とカバー (図1および2) を分離するテープ・ガスケット (図3) 内に同じ直径の穴142が流体接続されている。凹所は、液体と接触することにより、導管から少量の液体を取り除き、これにより受動的に導管内に空気セグメントを導入する吸収材料を含む。凹所の体積並びにその中の材料の量およびタイプを調整して、導入される空気セグメントの大きさを調節してもよい。特異的な材料は、ガラスフィルター、およびシュークロスによって60%のビスコースシフォン層に結合された3ミクロンのVersaporフィルターラミネートを含むが、これらに限定されない。

**【 0 0 8 0 】**

液体は、パドル6により及ぼされる機械的圧力を減少することによって生じる部分的な減圧によって、強制的にセンサー・チップへ移動させ、横切る導管の近くにセンサーチャネルの「T」領域を生じて、解析液体でみたま。センサーチャネルのT領域は、選択的に高いチャネルの高さを有し、小さな曲率半径を有するメニスカスを生じる。T領域から解析

10

20

30

40

50

後導管の方へさらに離れると、導管の高さは、選択的に低い。解析液体は、T領域からこの低い導管の高さの領域の方へ受動的に流れて、導管壁を洗浄する。この受動的な漏出により、最小限の体積の液体を使用してT領域をさらに有効に洗浄することができる。

【0081】

この単純な態様において、第2の導管内に位置する液体は、酵素のために基質を含む。その他の態様において、第2の導管内の乾燥基質を使用する液体の修正を使用してもよい。

【0082】

センサー上の液体の最終的なセグメントの位置決めが続いて、センサー反応の測定を記録して、実施例2に記載されているように分析物の濃度を決定した。特に、少なくとも一つの試料のセンサーの読みは、酵素の基質を含む新しい液体部分をセンサー上に配置することによって行われる。迅速な置換により、すでに形成された生成物をすすぎ流し、電極に新たな基質を提供する。より高い精密さの測定を行うために、反復シグナルにより平均し、更にベースラインのより良い統計学的平均値を得るために、センサー上の溶液の置換に直後の電流によって表される。

【0083】

B. 好ましい態様

カートリッジの構造および操作：

図15をここで参照し、免疫センサーカートリッジの好ましい態様の上面図を示してある。

好ましい態様は、迅速な再現性があり、安価な分析物の測定のために有利であるいくらかの特徴および使用方法において、節Aの特定の態様と異なる。好ましい態様のカートリッジは、上記した特定の態様のカートリッジと同じような多くの特徴を共有し、したがって、特定の相違を強調して記載されている。本発明の属する分野の当業者は、節AおよびBを組み合わせた記述から、好ましい態様の構築および使用を容易に認識するであろう。

【0084】

好ましい態様のカートリッジ150は、基盤および上部部分を含み、好ましくはプラスチックで構築される。2つの部分は、薄い、粘着性のガスケットまたは細い柔軟なフィルムによって接続される。前の態様のように、組み立てられたカートリッジは、関心対象の分析物を含む試料が、試料導入口152を経て導入される試料チャンバ151を含む。計測された試料部分は、前の通り、好ましくはガスケット内に0.012"レーザーカット穴またはカートリッジの2つの部分を接続するフィルムによって形成された毛細管栓152と、試料チャンバ内の所定の点に位置する注入口155の作用を組み合わせることにより、試料導管154（第1の導管）を経てセンサー・チップ153に送達され、これにより、空気は、試料隔壁156によるパドルプッシングなどの、ポンプ手段の作用によって導入される。センサーに接触させて結合を生じさせた後に、試料は、試料を吸収するウィッキング材料を含む排出口157へ移動して、これにより閉じた排出口を封着し、液体または空気がさらに通過する。ウィッキング材料は、好ましくは綿繊維材料、セルローズ物質または細孔を有するその他の親水性の材料である。本出願において、材料は、十分に吸収性である（すなわち、十分なウィッキング速度を有する）ことが重要であり、下記に記載されている手段を作動させる試料隔壁をその後に取り除くのに対応する時間内にバルブが閉じて、その結果、試料は、その後センサー・チップ領域内に引き戻されない。

【0085】

特定の態様において、一方の端が排出口159に対して、および他方の端が試料導管の先端160の試料導管に対して結合された排出口157とセンサー・チップ153の間に位置する洗浄導管（第2の導管）158が提供される。読出装置にカートリッジを挿入することにより、液体は導管158に導入される。好ましくは、液体は初め箔小袋161内に存在し、これは作動手段が小袋に圧力を加えるときに、ピンによって穴があけられる。また、液体をガスケット163の小さな開口部を経て導管154に接続する短い導管162が提供される。第2の毛細管栓は、初めは毛細管栓160に液体が達するのを防止し、その結果、液体は導管158内に保持さ

10

20

30

40

50

れる。

【 0 0 8 6 】

排出口157が閉じたあと、ポンプ手段が作動し、導管154内に圧力の低下が生じる。好ましくは、ガスケットの小さなフラップカットまたは間欠性の空気流れを提供するための振動隔壁を含む空気排出口164により、空気が第2の排出口165を経て導管158に入るための手段が提供される。第2の排出口165は、好ましくはまた、濡れた場合に排出口を閉じることができるウィッキング材料を含み、必要であれば、その後に試料隔壁156抑制して排出口165を閉じられる。試料隔壁156の作動と同時に、液体は、導管158から毛細管栓160を介して導管154内へ引き寄せられる。液体の流れは、排出口164に入る空気によって妨害されるので、少なくとも1つの空気セグメント（セグメントまたはセグメントの流れ）が導入される。

10

【 0 0 8 7 】

試料隔壁156をさらに取り除くことにより、センサー・チップ153の検出面を超えて少なくとも1つの空気セグメントを含む液体を引きもどす。液体内に空気-液体境界が存在すると、残留する試料を除去するためのセンサー・チップ表面のリンスが增強する。好ましくは、試料隔壁156の動作は、分析物センサーに隣接してセンサー・チップ内に収容された伝導度電極から受けたシグナルと連動して制御される。このような方法で、センサー上の液体の存在が検出され、別々の工程の液体の動きによって多くの読みを行うことができる。

【 0 0 8 8 】

液体の薄膜だけがセンサー、接地チップ165、およびセンサーと接地電極の間の導管壁154に隣接する部分を被覆するとき分析物測定を行うことは、この好ましい態様において有利である。適切なフィルムは、センサーの隣に位置する電導度センサーが、導管154のその領域にバルク液体がもはや存在しないことを示すまで、試料隔壁156の操作によって液体を取り除くことによって得られる。測定が非常に低い(nA)電流で行うことができることを見いだされており、接地チップとセンサー・チップの間の薄膜の耐性を増大させることによって生じる電位の減少は、(バルク液体と比較して)有意でない。

20

【 0 0 8 9 】

適切な接地チップ165は、望ましくは銀/塩化銀である。比較的疎水性の塩化銀表面によって容易に形成される空気セグメントを避けるために、二酸化ケイ素表面などのより親水性の領域を点在させた銀/塩化銀の小領域として接地チップをパターン化することは有利である。したがって、好ましい接地電極の配置は、高密度に配列され、二酸化ケイ素を点在させた銀/塩化銀の四角のアレイを含む。銀/塩化銀の領域にいくぶん凹所を作られている場合、意図されないセグメントを回避する際にさらに有利である。

30

【 0 0 9 0 】

図16をここで参照し、免疫センサーカートリッジの好ましい態様の流体工学の略図を示してある。領域R1~R7は、特定の操作上の機能に関連した導管の特定の領域を表す。したがって、R1は試料チャンバを表す；R2は、試料導管で、これにより計測された試料部分は、捕獲領域に移動され、その中で試料は、導管の壁の被覆された物質によって選択的に修正され；R3は、捕獲領域を表し、電導度センサーおよび分析物センサーを収容し；R4およびR5は、導管壁上に被覆された物質によってさらに液体を修正するために選択的に使用される第1の導管部分を表し、これにより、より多くの複合体アッセイ法スキームが達成され；R6は、カートリッジを读出装置に挿入することにより液体が導入される第2の導管部分を表し；R7は、毛細管栓160と166の間に位置する導管の一部を含み、この中でさらなる修正を生じさせることができ；および、R8は、点160と排出口157の間に位置する導管154の一部を表し、これは、中に含まれる液体を修正するためにさらに使用することができる。

40

【 0 0 9 1 】

実施例4．流体工学および好ましい態様のカートリッジ内の分析物測定の協調

好ましい態様の免疫カートリッジ使用をこの実施例に図示してある。解析順序は、ユー

50

ザが試料をカートリッジに入れ、アナライザーへカートリッジを配置し、中で1~20分、1つまたは複数の分析物の定量的測定を行う。ここでは、解析の間に起こる一連のイ排出口の非限定の実施例であり：

1) 25~50  $\mu$ Lの試料を試料導入口167に導入し、カバーおよび主成分を保持する接着テープ内の0.012"レーザーカット穴によって形成された毛細管栓151に充填する。ユーザは、スナップフラップに取り付けられたラテックスゴムディスクを回転させて、試料導入口167を閉じて、カートリッジをアナライザーに入れる。

2) アナライザーをカートリッジと接触させて、モーターで動くプランジャーを箔小袋161上へ押圧して、中心導管158内に洗浄液/解析液を強制する。

3) 別々のモーターで動くプランジャーを、試料隔壁156に接触させて、試料導管に沿って測定した試料のセグメントを(試薬領域R1からR2に対して)押しつける。試料を、導電率センサーを経てセンサー・チップ153で検出する。センサー・チップは、捕獲領域R3に位置する。

4) センサーに対する結合を促進するために、制御された時間、予め定められ、かつ制御された機能のR2とR5の間の試料隔壁156の手段によって試料を振動させる。

5) 試料をカートリッジ(R8)の廃棄物領域の方へ押して、セルロースまたは同様の吸収芯(wick)の形態で受動的ポンプ157と接触させる。この芯が濡れる作用により芯を封着し、したがって空気流量が、試料隔壁156によって発生される排出口過圧に対するその能力を除去する。能動的排出口は、図16の「制御された空気排出口」になる。

6) 試料導管の迅速な減圧(モーターで動くプランジャーを試料隔壁156から取りのぞくことによって行なわれる)により、空気(排出口から)および洗浄液/解析液の混合物を、第2の導管から図16のR5とR4の間に位置する入口に移動させる。試料導管の迅速な減圧を繰り返すことによって、一連の空気中で分離された液体セグメントを生成させて、これをセンサー・チップを超えて試料導入口(R4からR3に、R2に、およびR1)の方へ引く。これにより、センサーを洗浄して過剰な試薬をなくし、解析のために適した試薬でセンサーを濡らす。箔小袋で生じる洗浄液/解析液は、中央の洗浄液/解析液導管内で、R7およびR6内の試薬の添加によって、さらに修正することができる。

7) 洗浄液/解析液セグメントを低速で試料導入口の方へ引いて、解析液の薄層のみを含むセンサー・チップを得る。電気化学的な解析は、この点で行う。解析の好ましい方法は電流測定であるが、電位差測定またはインピーダンス検出も使用される。

8) そして、カートリッジをアナライザーから取り出すことができるように、機構により引っ込める。

#### 【0092】

図17をここで参照し、試料隔壁156を作動させる電動機、電導度電極の反応171、および電流測定免疫センサーの電気化学応答172の位置を表す電気信号170を図示してある。免疫アッセイ173の開始後の40秒前の時間において、モーターにより隔膜を抑制し、試料を捕獲領域内に、電導度センサー上に押し込む。したがって、約10秒後に、伝導度は、電導度センサーを含む導管の一部を満たす試料を表す安定した値まで上昇する。この期間中に、バルブは試料との接触によって封着される。40秒~約63秒の間に、モーターの位置は、増分174でステップバックし、圧力に周期的な揺らぎが生じて、空気中でセグメント化された洗浄液部分をセンサーを超えて引き寄せる。この期間中に、免疫アッセイ・センサーの揺らぎ175が見られる。177では、電導度反応は、基質を含む洗浄液が電導度センサーを被覆することを示す。液体がゆっくりとセンサー上に引き寄せられるように、電位をセンサーに適用し(この実施例では、5秒ごとに2.5秒間)、センサーに結合した分析物の存在を示す反応176を生じる。

#### 【0093】

本明細書に記載され、および開示された発明は、以前の装置と比較して多くの利益および利点を有する。これらの利益および利点は、使いやすさ、全てではないにしても、ほとんどの解析の工程の自動化(これにより、解析の際の誤りに使用者が関与することを排除する)を含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 4 】

本発明は、種々の好ましい態様に関して記載されていたが、当業者は、本発明の精神から逸脱することなく、種々の修飾、置換、省略、および変化を行うことができることが認識される。したがって、本発明の範囲は、請求項の範囲のみによって単に限定されることが企図される。

## 【 0 0 9 5 】

## IV. 図面の簡単な説明

本発明のこれらの及びその他の目的、特徴、および効果は、以下の特定の態様の詳細な説明に記載されており、以下の図に図示されている。

## 【 図面の簡単な説明 】

10

## 【 0 0 9 6 】

【 図 1 】 免疫センサーカートリッジ・カバーの等角上面図である。

【 図 2 】 免疫センサーカートリッジ・カバーの等角底面図である。

【 図 3 】 免疫センサーカートリッジのテーブ・ガスケットのレイアウトの上面図である。

【 図 4 】 免疫センサーカートリッジ基盤の等角上面図である。

【 図 5 】 免疫センサーカートリッジのレイアウトの略図である。

【 図 6 】 乾燥試薬で液体を修正するための部位を含む、免疫センサーカートリッジ内の液体および空気経路の略図である。

【 図 7 】 電気化学的な免疫センサーの操作原理を図示する。

【 図 8 】 一定の比率で描かれない、抗体標識された粒子を有する電気化学的な免疫センサーの構築物の側面図である。

20

【 図 9 】 免疫センサーカートリッジのための電導度電極および免疫センサー電極のマスクデザインの上面図である。

【 図 1 0 】 50mU / mLのHCGと共に提示したときの、抗HCG抗体によって構築される免疫センサーの電気化学応答を図示する。

【 図 1 1 】 0 ~ 50mU / mLのHCGの種々の量と共に提示したときの、抗HCG抗体によって構築される免疫センサーの電気化学応答（電流対時間）を図示する。

【 図 1 2 】 抗HCG抗体によって構築された免疫センサーをHCGの種々の量と共に提示したときに得られた極大電流を図示する。

【 図 1 3 】 電気活性種の酵素による再生の概略図である。

30

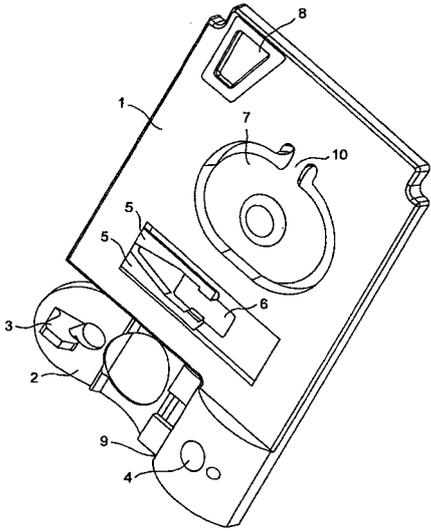
【 図 1 4 】 セグメント形成手段を図示する。

【 図 1 5 】 免疫センサーカートリッジの好ましい態様の上面図である。

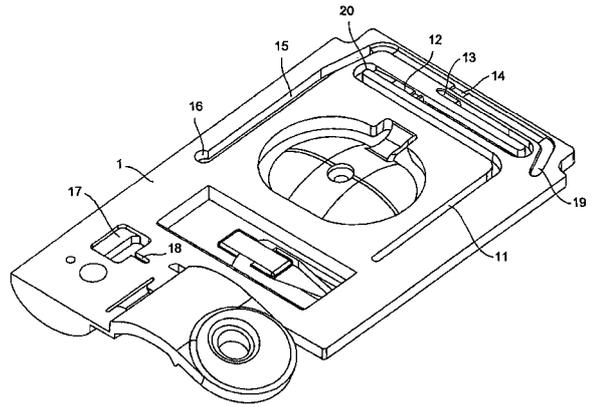
【 図 1 6 】 免疫センサーカートリッジの好ましい態様の流体力学の略図である。

【 図 1 7 】 免疫センサーの好ましい態様の、電気化学応答（電流対時間）およびその他の反応を図示する。

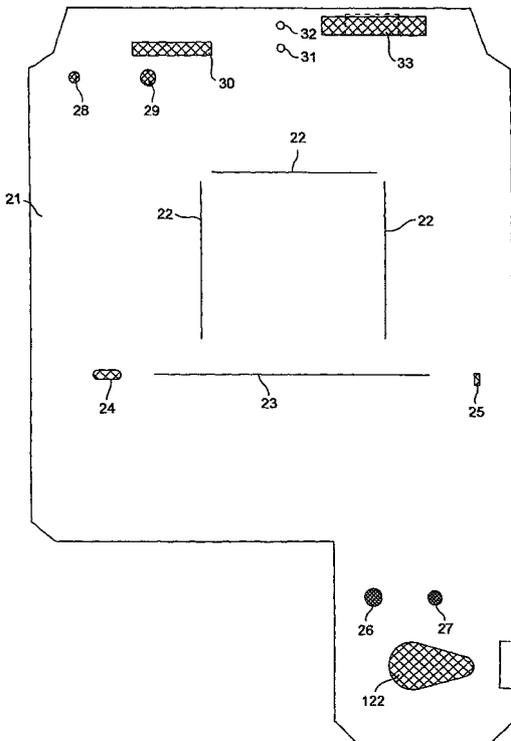
【図1】



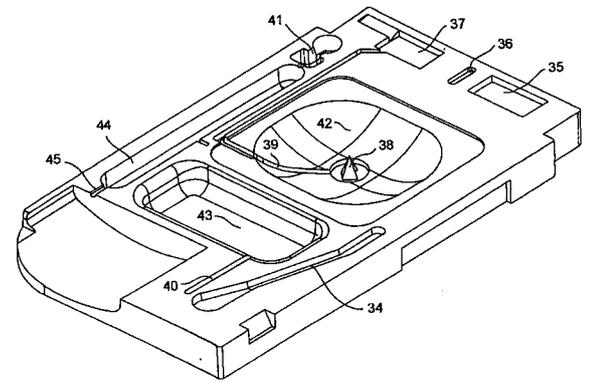
【図2】



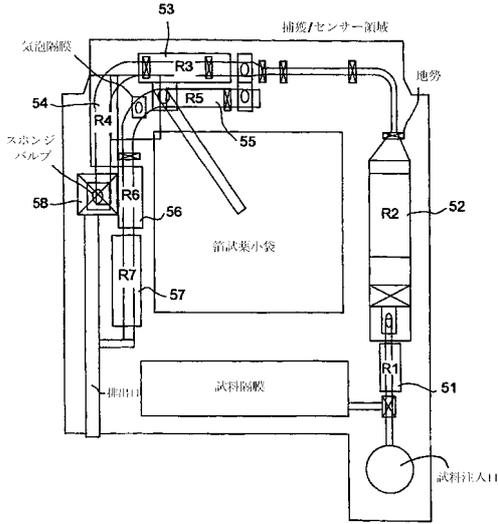
【図3】



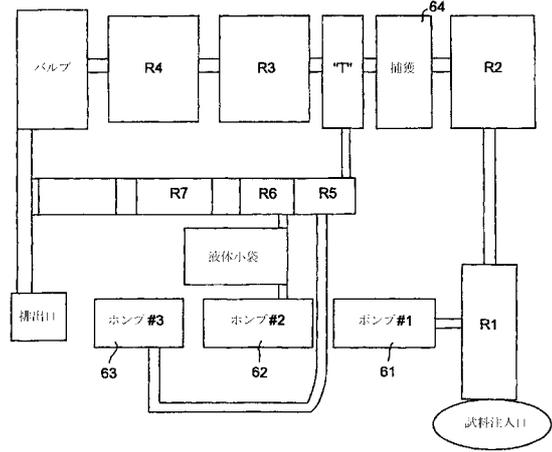
【図4】



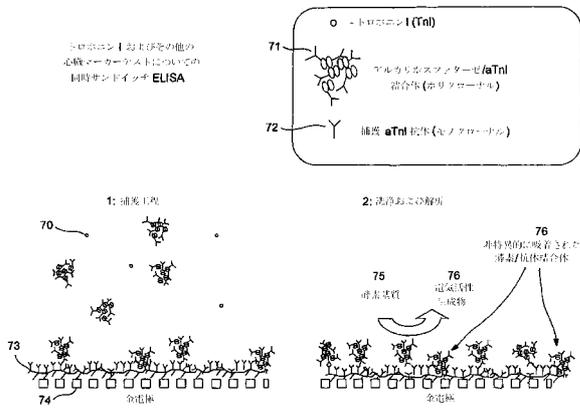
【図5】



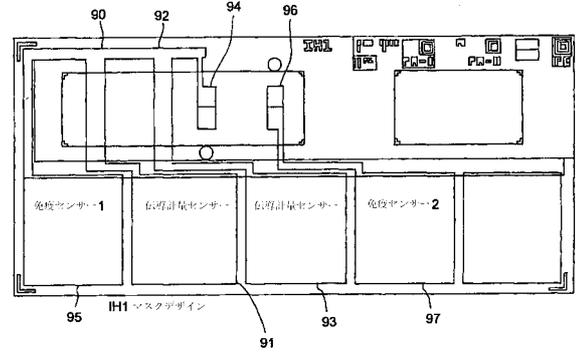
【図6】



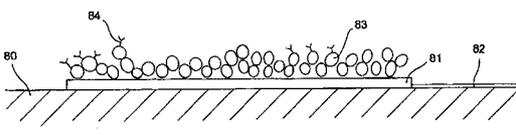
【図7】



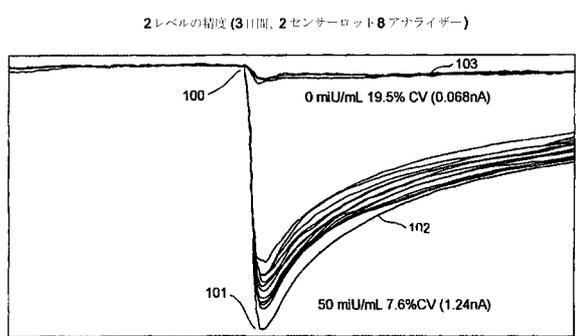
【図9】



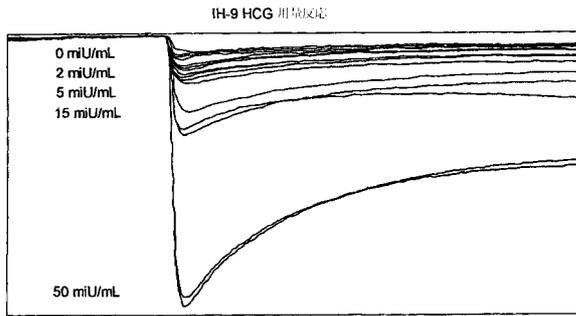
【図8】



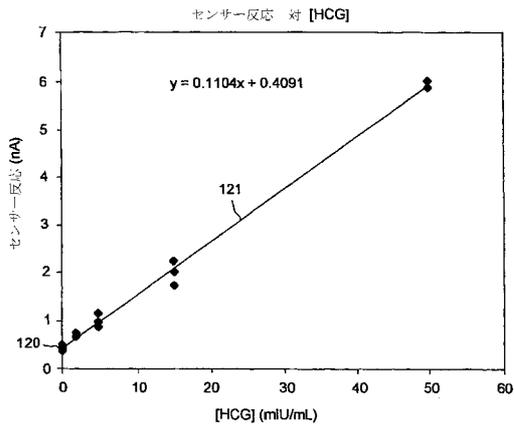
【図10】



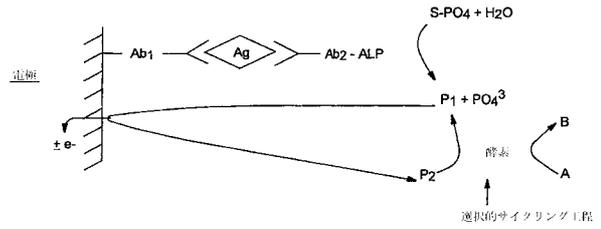
【図11】



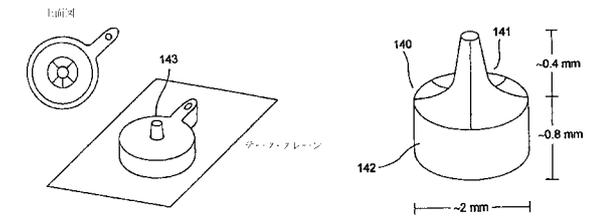
【図12】



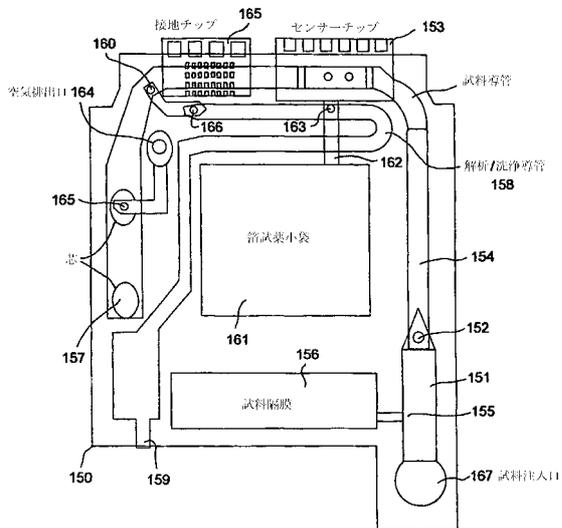
【図13】



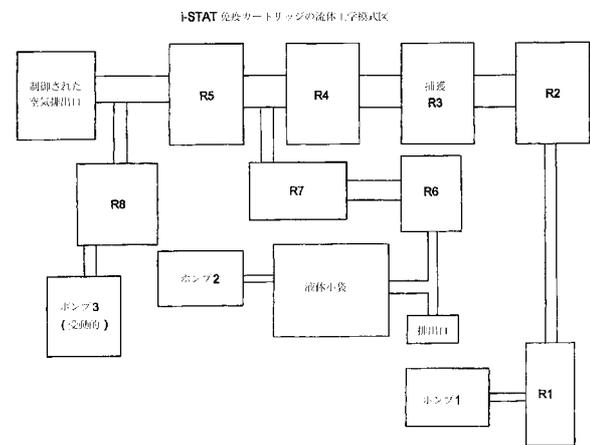
【図14】



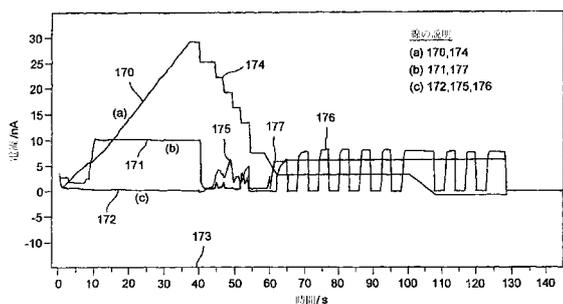
【図15】



【図16】



【図17】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 ラウクス イマンツ アール .  
カナダ国 オンタリオ州 オタワ コールトリン ロード 218
- (72)発明者 リン チャオ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ ハンターズ グレン ドライブ 1067  
6
- (72)発明者 ミラー カリー ジェイムス  
カナダ国 オンタリオ州 オタワ チッカソウ 93

審査官 黒田 浩一

- (56)参考文献 特開平05 - 072173 (JP, A)  
特表平09 - 504372 (JP, A)  
特表平04 - 501768 (JP, A)  
特表2000 - 514928 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/26 - 27/49  
G01N 33/535  
G01N 33/483

专利名称(译)	用于分析物测量和免疫测定的装置和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4763066B2</a>	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	JP2009032424	申请日	2009-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	艾统计公司		
申请(专利权)人(译)	艾 - Stat的公司		
当前申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
[标]发明人	デイビスグラハム ラウクスイマンツアール リンチャオ ミラーカリージェイムス		
发明人	デイビス グラハム ラウクス イマンツ アール. リン チャオ ミラー カリー ジェイムス		
IPC分类号	G01N27/28 G01N27/327 G01N33/535 B01L3/00 C12M1/34 G01N27/416 G01N33/543 G01N35/04 G01N35/08		
CPC分类号	G01N33/543 B01L3/502723 B01L3/50273 B01L3/502738 B01L2200/10 B01L2300/0663 B01L2300 /0816 B01L2300/087 B01L2400/0421 B01L2400/046 B01L2400/0481 B01L2400/0683 G01N33/54366 G01N35/08 G01N2035/0436		
FI分类号	G01N27/28.R G01N27/30.357 G01N33/535 C12M1/24 C12M1/34 G01N27/327.357		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA10 4B029/FA12 4B029 /GA02 4B029/GA08 4B029/GB01 4B029/GB02 4B029/GB10		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	黒田孝一		
优先权	10/087730 2002-03-05 US		
其他公开文献	JP2009150902A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供超过传统技术的实质性好处，包括操作员使用简单，快速决定一个或多个原位分析物，以及丢弃操作员或污染风险最小化的方法患者。解决方案：本发明涉及一种不可回收的盒，其被设计成使其能够适应用于决定生物样品中的分析物的分析，其使用各种实时分析方案，优选免疫传感器的一个方面或基于生物传感器的生物传感器。其他配体/配体受体。该盒提供新的功能，用于处理测量的样品部分，精确和灵活地控制样品在盒中或第二液体中的移动，通过测定方法之间的另一种化合物校正溶液，以及构建可适于测量各种测量的免疫传感器分析物。Ž

【 图 1 】

