

(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2004-527758

(P2004-527758A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 O 1 Z
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/543	5 4 5 Z
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/53	F
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/53	Q
	GO 1 N 33/53	U

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-588189 (P2002-588189)	(71) 出願人	503410063 メッドシステムズ・ダイアグノスティクス ・ゲーエムベーハー オーストリア国アー―1030・ウィーン 、レンヴェック・95・ペー
(86) (22) 出願日	平成14年4月26日 (2002.4.26)	(74) 代理人	100081514 弁理士 酒井 一
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月7日 (2003.11.7)	(74) 代理人	100082692 弁理士 蔵合 正博
(86) 国際出願番号	PCT/AT2002/000112	(72) 発明者	レッヘーバイクセルブラウン、イレーネ オーストリア国アー―2161・ラクセン ブルク、ホーフアッケルガッセ・5
(87) 国際公開番号	W02002/090983	(72) 発明者	シャウデ、ミハエル オーストリア国アー―1230・ウィーン 、コープガッセ・2-4/12
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	GM 370/2001		
(32) 優先日	平成13年5月10日 (2001.5.10)		
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		

(54) 【発明の名称】 定量的な凍結乾燥形態における単一工程イムノアッセイ

(57) 【要約】

例えば抗体、抗原、受容体及びリガンド等の特異的結合パートナーの利用による試料の定性的及び定量的決定のためのイムノアッセイキットであって、担体又はマイクロタイタープレートであって複数のウェルを有し1次結合パートナーでプレコートされたものを含み、結合パートナーが凍結乾燥物として固定化された形で存在するキット。マイクロタイタープレートのウェルの一部は、増加的な希釈度の、凍結乾燥形の、決定されるべき試料の参照標準シリーズを追加的に含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体、抗原、受容体及びリガンド等の特異的結合パートナーの利用による試料の定性及び定量的決定のためのイムノアッセイキットであって、担体又はマイクロタイタープレートであって複数のウェルを有し1次結合パートナーでプレコートされたものを含み、前記結合パートナーは固定化された形で凍結乾燥物として存在するキットにおいて、マイクロタイタープレートのウェルの一部が、決定されるべき試料の参照標準シリーズを、増加する希釈度で、凍結乾燥形で、追加的に含むことを特徴とするキット。

【請求項 2】

マイクロタイタープレートのウェルが、酵素-又はビオチン-カップリングされた2次結合パートナーのコンジュゲート特に2次結合抗体と、ビオチン-カップリングされたコンジュゲートの場合酵素とを、凍結乾燥形で追加的に含むことを特徴とする請求項 1 記載のイムノアッセイキット。

10

【請求項 3】

マイクロタイタープレートのウェルが、試料希釈溶媒を凍結乾燥形で含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のイムノアッセイキット。

【請求項 4】

テストキットが、プレコートされたマイクロタイタープレートに加え、洗浄緩衝液、基質溶液及び停止溶液のみを含むことを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載のイムノアッセイキット。

20

【請求項 5】

ビオチン-カップリングされた抗体コンジュゲートの場合、ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)が2次試薬として用いられることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のイムノアッセイキット。

【請求項 6】

テストキットが、ペルオキシダーゼ安定剤及び/又は一般的な凍結乾燥保護剤例えばタンパク質(例えばアルブミン(例えばBSA)タンパク加水分解物(ペプトン、ゼラチン...)カゼイン)及び/又はポリマー(例えばデキストラン、PVA、PVP)、糖(たとえばスクロース、トレハロース、ラクトース、キシリット(xylite)、ソルビトール、マンニトール、マルトース、グルコース、イノシトール)及び/又は静菌剤(例えばチメロサル、プロクリン)及び/又はフェノール物質及びアニリン、または置換基を有するもの(低分子アルキル残基又はCl、Br...)(例えばo-メトキシフェノール、o-メチルフェノール、p-メチルフェノール、o-アミノフェノール、o-ヒドロキシ安息香酸、(o、m又はp)-ヒドロキシベンジルアルコール、アニリン、p-アミノ安息香酸、p-メトキシ-アニリン、ベンジルアルコール、安息香酸、p-ニトロフェノール、ベンジルアミン、1-フェニル-1,2-エタンジオール、トランス-1,2-シクロヘキサンジオール、シス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸、シクロヘキシルアミン)及び/又は疎水性の化合物及び/又は溶媒(例えばDMF、エチレングリコール、DMSO)及び/又は界面活性剤(例えばTween-20)及び/又はアリアルホウ酸化合物(例えばフェニルホウ酸、4-プロモフェニルホウ酸、3-アセトアミノフェニルホウ酸、1-ナフチルホウ酸)及び/又は基質類似物(例えばTMB、ルミノール)及び/又はポリヒドロキシ化合物(例えばポリオール、ポリ(エチレングリコール)、グリセロール)及び/又はエクトイン(例えば(S)-2-メチル-1,4,5,6-テトラヒドロピリミジン-4-カルボン酸[THP(B)]、(S,S)-2-メチル-5-ヒドロキシ-1,2,4,5,6-テトラ-ヒドロピリミジン-4-カルボン酸、[THP(A)])及び/又はイオン及び/又は多価イオン(例えば金属イオン(Al、Zn、Mg、Fe、Cu...))及び/又は錯体試薬(例えばEDTA)及び/又はアミノ酸(例えばグリシン、プロリン、4-ヒドロキシプロリン、セリン、グルタメート、アラニン、リシン、サルコシン、-アミノ酪酸、フェニルアラニン)及び/又はTRIS、塩、アミン、Na-コール酸塩、スクロースモノラウレート及び/又は2-0-マンノシルグリセレートのような物質を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載のイムノアッセイキット。

30

40

【請求項 7】

50

研究的診断及びin vitro診断における適用のための、菌血清学、例えばHIV、HepV、EBV、CMV等の感染の検出への適用のための、腫瘍の診断、例えば腫瘍マーカー又は腫瘍関連タンパク質、血管新生マーカー、転移マーカー等の検出への適用のための、例えば動物アレルギー、植物花粉、食品成分などのアレルギー学における適用のための、例えばANA/ENA、真性糖尿病/IDDM、甲状腺抗原、自己免疫肝炎、APS等の分野における自己抗原の検出等の自己免疫診断における適用のための、例えばサイトカイン、接着分子、ケモカイン等の検出等の、炎症性の工程又は感染により起される免疫疾患の検出のための、例えば排卵テスト、妊娠テスト等のホルモンバランスの変化の検出のための、例えば治療的抗体及び抗原、有機及び無機化合物の検出等の治療モニタリングにおける適用のための、アポトーシス又はネクローシスによる細胞死の検出のための、及び/又は遺伝的な変化、遺伝的疾患の検出のための、請求項1～6のいずれか1項記載のイムノアッセイキットの使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば抗体、抗原、受容体及びリガンド等の特異的結合パートナーの利用による、試料の定性的および定量的な決定のためのイムノアッセイキットであって、担体またはマイクロタイタープレートであって複数のウェルを有し一次結合パートナーでプレコートされたものを含み、前記結合パートナーが凍結乾燥物として固定化された形態で存在するものに関する。

【0002】

イムノアッセイ、酵素カップリングされたイムノアッセイ、蛍光ラベルイムノアッセイ、発光ラベルイムノアッセイまたは他のいずれかのマーカーでラベルされたイムノアッセイは、例えば抗原、リガンド、受容体、抗体等のタンパク質ならびに化学物質を検出及び定量するための、ルーチ的な診断及び研究的な診断に用いられる。従来技術によれば、そのようなテストキットにおける結合パートナーのひとつはポリスチレンプレート等の固体担体に結合し、一方テストを実行するのに必要な他の試薬は、テストキットの別のコンポネントとして添加される。これらの試薬は通常、濃縮液又は凍結乾燥物として定量された形の検出対象タンパク質(参照標準)、標準溶媒(medium)及びサンプル希釈溶媒、カップリングされた形の第2の特異的結合パートナー(コンジュゲート)であって濃縮又は作業溶液であるもの、必要であれば2次検出システム、並びに酵素ラベルの場合は検出に必要な基質試薬を含む。酵素反応を止めるため停止溶液が添加され、通常濃縮物として存在するアッセイ緩衝液が、第2の特異的結合パートナー及び2次試薬のための作業溶液を調製するのに利用可能である。作業工程間に洗浄工程が必要なため、慣用のイムノアッセイキットは洗浄緩衝液を、通常濃縮液の形で含む。

20

30

【0003】

商業的に利用可能なELISAキットは、有効なテストシステムをユーザーに提供する。その製品は、アッセイをするのに必要な全ての試薬を、最適化された濃度及び量で含み、且つアッセイをどのように実行するかについての詳細なプロトコルをも含む。個々の反応工程は、概して連続的に実行される。分析物(標準、試料)及び固相を伴う2次抗体(カクテル)を用いたジョイントインキュベーションは、多くのアッセイシステムにおいて有用である。

40

【0004】

イムノアッセイの典型的な例はサンドイッチELISA(酵素結合イムノソルベントアッセイ)である。

【0005】

典型的には、そのようなELISAキットは下記のコンポネントを含む：

- ・ 96ウェルを有し、1次抗体でプレコートされ、ブロックされ固定化されたマイクロタイタープレート；
- ・ 参照材料：規定された濃度の、標準のシリーズを確立するための分析物(標準)；
- ・ 酵素 - (西洋わさびペルオキシダーゼ)又はビオチン - カップリングされた2次抗体；

50

- ・必要であればストレプトアビジン酵素(西洋わさびペルオキシダーゼ)；
- ・基質溶液(テトラメチレン ベンジジン)
- ・洗浄緩衝液：試料のインキュベーションに先立ち、及び反応工程間に、プレートを洗浄するための生理食塩水溶液；
- ・アッセイ緩衝液：2次抗体及びストレプトアビジン酵素濃縮液を希釈(作業溶液を調製)するための生理食塩水溶液；
- ・試料希釈溶媒：参照材料及び未知の試料を希釈するための特定の液体溶媒；
- ・酵素反応を止めるための停止溶液

【0006】

アッセイを行なうためには、以下の作業工程をユーザーが実行しなければならない：

10

- ・作業溶液の調製
- ・参照材料の希釈による、標準のシリーズの確立
- ・マイクロタイタープレートの洗浄；
- ・試料希釈溶媒の提供；
- ・個々の参照希釈液の適用(標準のシリーズ)；
- ・未知の試料の適用；
- ・酵素-又はビオチン-カップリングされた2次抗体の添加；
- ・マイクロタイタープレートの洗浄；
- ・任意にストレプトアビジン酵素の添加；
- ・マイクロタイタープレートの洗浄；
- ・基質の添加；
- ・停止溶液の添加；
- ・光学密度の測定。

20

【0007】

本発明は、そのようなアッセイキットの操作を簡便にし、定性的識別に加えての定量的評価の実現を可能とすることを目的とする。アッセイの実施にかかる作業及び時間を減少させることに加え、本発明はさらに、必要な操作工程を最小化することにより、ユーザーの誤りの可能性を減少させることを目的とする。さらに、本発明は、キットの重量及び体積を明らかに減少させることによりパッケージングの体積及びパッケージングのコスト、並びに輸送料金を低減し、標準化された基礎キットを延長された製品保存寿命で提供することによりロジスティックを簡便にすることを目的とする。

30

【0008】

この目的を解決するため、本発明のイムノアッセイキットは本質的に、マイクロタイタープレートのウェルの一部が、決定されるべき試料の参照標準のシリーズを、凍結乾燥された形において増加的な希釈度をもって追加的に含むことからなる。担体又はマイクロタイタープレートは追加的に、決定されるべき試料の参照標準のシリーズを既に含むという事実により、実験室での分析における参照材料の作業溶液及び対応する希釈シリーズの調製の煩雑な工程が除かれる、純粋に定性的な分析に加えて、増加的に連続的な標準の間の領域内の規定されたテスト結果の間の内挿による定量的な見積りと定量的な決定もまた、簡便になった。参照材料の作業溶液の調製及び標準希釈溶媒のマイクロタイターウェルへの導入を必要としない、標準のシリーズのために提供されたそのようなイムノアッセイキットの設計は、実質的に方法を合理化及び単純化することを可能とする。特に精密な再現性のある標準のシリーズを提供し、そのため誤りの可能性を実質的に低減する。

40

【0009】

特に有利な態様においては、イムノアッセイキットの予製はさらに加速され、試料の決定に必要な工程がさらに低減される。この目的のために、形態(configuration)は、有利に、マイクロタイタープレートのウェルが追加的に2次結合パートナーの酵素-又はビオチン-カップリングしたコンジュゲート、特に2次結合抗体を含むように形作られ、前記ビオチン-カップリングしたコンジュゲートの場合、凍結乾燥された形の酵素を含む。従って、検出されるべきタンパク質を定量するための、規定されたタンパク濃度で用いられる標準

50

のシリーズに加え、上記ラベルの一つ以上とカップリングされた2次的な特異的結合パートナー(力価測定された濃度のコンジュゲート並びに任意に2次試薬)が、検出のために、既に凍結乾燥した固相の形で、相に強固に結合した1次結合パートナーと共に導入される。これらのコンポーネントの凍結乾燥形即ち約-30の低温での脱水形での提供は、参照材料の前反応をおそれる必要がない程度に反応動態を凍結させる。高度に希釈された作業溶液並びに安定性に乏しい溶液がストックの状態では保持されず、テストが始まる直前になって始めて、担体上で溶媒の添加又は再加水によって調製されるため、誤りのもととなりうるものがさらに除かれる。

【0010】

さらなる増強、及び決定に必要な作業工程数のさらなる減少のため、形態は、マイクロタイタープレートのウェルが、凍結乾燥形の試料希釈溶媒を含むように形作られる。特定の試料希釈溶媒をマイクロタイタープレートの対応するウェルに、例えば2において、必要量導入することができ、一方2次抗体-酵素コンジュゲート、又は2次抗体及びビオチンコンジュゲートの混合物を、同じ温度においてマイクロタイタープレートの全てのウェルに導入することができる。そこでそのように充填されたマイクロタイタープレートは、例えば-30に予め冷却された凍結乾燥装置における凍結乾燥工程により、凍結乾燥に供される。

10

【0011】

しかし、テストキットを完成させるために、そのような予製された担体又は予製されたマイクロタイタープレートは、少量の追加コンポーネントを必要とし、テストキットは有利には、プレコートされたマイクロタイタープレートに加えて、洗浄緩衝液、基質溶液、及び停止溶液だけを含む。

20

【0012】

したがって、試料の決定のためには、それは、規定された体積の蒸留水を標準シリーズ及び任意のブランクのウェル並びに試料のウェルに添加することによりマイクロタイタープレートを再水和するために単に必要となり、そこで未知の試料が充填されインキュベートされる。マイクロタイタープレートを洗浄し、アッセイに用いられる全てのマイクロタイターウェルに基質を適用した後、停止溶液を所定期間後に添加し、テストの評価を直ちに始める。

【0013】

このような点から形態は有利には、ビオチン-カップリング2次抗体コンジュゲートの場合、ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を2次試薬として用いるように形作られる。

30

【0014】

主として、本発明による形態は、ユーザーにとってのアッセイの実施が、未知の試料の添加及び酵素反応にまで減らされたものであり、全ての他の工程は予めELISAキットの製造者により実行されている。従ってマイクロタイタープレートは製造者により、特異的な1次抗体で被覆され、ブロックされ固定化されており、そこでプレートは、例えば-20に冷却され、上記の試料希釈試薬の標準シリーズ、並びに2次抗体-酵素コンジュゲート又は2次抗体-ビオチンコンジュゲート及びストレプトアビジン酵素混合物を導入する追加の工程が、製造者により、規定された様式で実行される。従ってアッセイの実施は、分析されるべき試料の添加及び基質の着色に基づいたアッセイの評価にまで減少される。

40

【0015】

特に有利な態様においては、本発明のイムノアッセイキットは、テストキットが、ペルオキシダーゼ安定剤及び/又は一般的な凍結乾燥保護剤(Iyoprotectants)例えばタンパク質(例えばアルブミン(例えばBSA)タンパク加水分解物(ペプトン、ゼラチン...)カゼイン)、ポリマー(例えばデキストラン、PVA、PVP)、糖(たとえばスクロース、トレハロース、ラクトース、キシリット(xylite)、ソルビトール、マンニトール、マルトース、グルコース、イノシトール)、静菌剤(例えばチメロサル、プロクリン)、フェノール物質及びアニリン、または置換基を有するもの(低分子アルキル残基又はCl、Br...)(例えばo-メトキシ

50

フェノール、*o*-メチルフェノール、*p*-メチルフェノール、*o*-アミノフェノール、*o*-ヒドロキシ安息香酸、(*o*、*m*又は*p*)-ヒドロキシベンジルアルコール、アニリン、*p*-アミノ安息香酸、*p*-メトキシ-アニリン、ベンジルアルコール、安息香酸、*p*-ニトロフェノール、ベンジルアミン、1-フェニル-1,2-エタンジオール、トランス-1,2-シクロヘキサンジオール、シス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸、シクロヘキシルアミン)；疎水性の化合物及び溶媒(例えばDMF、エチレングリコール、DMSO)；界面活性剤(例えばTween-20)；アリアルホウ酸化合物(例えばフェニルホウ酸、4-プロモフェニルホウ酸、3-アセトアミノフェニルホウ酸、1-ナフチルホウ酸)；基質類似物(例えばTMB、ルミノール)；ポリヒドロキシ化合物(例えばポリオール、ポリ(エチレングリコール)、グリセロール)；エクトイン(例えば(S)-2-メチル-1,4,5,6-テトラヒドロピリミジン-4-カルボン酸[THP(B)]、(S,S)-2-メチル-5-ヒドロキシ-1,2,4,5,6-テトラ-ヒドロピリミジン-4-カルボン酸、[THP(A)])；イオン及び/又は多価イオン(例えば金属イオン(Al、Zn、Mg、Fe、Cu...))；錯体試薬(例えばEDTA)；アミノ酸(例えばグリシン、プロリン、4-ヒドロキシプロリン、セリン、グルタマート、アラニン、リシン、サルコシン、 α -アミノ酪酸、フェニルアラニン)及び/又はTRIS、塩、アミン、Na-コール酸塩、スクロースモノラウレート、2-O- α -マンノシルグリセレートのような物質を含むように設計される。

10

20

30

40

50

【0016】

特に単純な手順モードを考慮すると、本発明のイムノアッセイキットは複数の適用オプションに適している。特に有利な態様においては、この形式のイムノアッセイキットの使用は、研究的診断及び*in vitro*診断への適用のためのもの、菌血清学、例えばHIV、HepV、EBV、CMV等の感染の検出への適用のためのもの、腫瘍の診断、例えば腫瘍マーカー又は腫瘍関連タンパク質、血管新生マーカー、転移マーカー等の検出への適用のためのもの、例えば動物アレルゲン、植物花粉、食品成分などのアレルギー学における適用のためのもの、例えばANA/ENA、真性糖尿病/IDDM、甲状腺抗原、自己免疫肝炎、APS等の分野における自己抗原の検出等の自己免疫診断における適用のためのもの、例えばサイトカイン、接着分子、ケモカイン等の検出等の、炎症性の工程又は感染により起される免疫疾患の検出のためのもの、例えば排卵テスト、妊娠テスト等のホルモンバランスの変化の検出のためのもの、例えば治療的抗体及び抗原、有機及び無機化合物の検出等の治療モニタリングにおける適用のためのもの、アポトーシス又はネクローシスによる細胞死の検出のためのもの、及び/又は遺伝的な変化、遺伝的疾患の検出のためのものである。

【0017】

以下において、従来技術との対比において、本発明をより詳細に説明し、従来技術は、標準キットと称する。

【0018】

1.ELISAキットのコンポーネント：

a)直接的に酵素-カップリングしたコンジュゲート

【0019】

【表1】

	標準キット		本発明の単一工程キット
1	抗体被覆したマイクロタイタープレート	1	標準シリーズ、試料希釈溶媒、コンジュゲート抗体を含む、抗体被覆マイクロタイタープレート
2	標準材料		
3	アッセイ緩衝液		
4	コンジュゲート抗体		
5	試料希釈溶媒		
6	洗浄緩衝液	2	洗浄緩衝液
7	基質溶液	3	基質溶液
8	停止溶液	4	停止溶液

【0020】

b) ビオチンにカップリングした2次抗体、2次試薬ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)又は類似物。

【0021】

【表2】

	標準キット		本発明の単一工程キット
1	抗体被覆したマイクロタイタープレート	1	標準シリーズ、試料希釈溶媒、ビオチニル化抗体、ストレプトアビジン-HRP又は類似物を含む抗体被覆したマイクロタイタープレート
2	標準材料		
3	アッセイ緩衝液		
4	ビオチニル化抗体		
5	ストレプトアビジン-HRP又は類似物		
6	試料希釈溶媒		
7	洗浄緩衝液	2	洗浄緩衝液
8	基質溶液	3	基質溶液
9	停止溶液	4	停止溶液

10

【0022】

2. アッセイの実施のための操作工程：

a) 直接酵素-カップリングしたコンジュゲート

【0023】

【表3】

20

	標準キット		本発明の単一工程キット
1	抗体被覆したマイクロタイタープレートを洗淨		
2	参照材料の作業溶液(標準)を調製		
3	標準シリーズについては、標準希釈溶媒をマイクロタイターウェル中に入れる		
4	規定された濃度での、標準の作業溶液の外部又は内部(プレート内)希釈(標準シリーズ)		
4a	任意に、標準希釈を対応するマイクロタイターウェルへ導入		
5	ゼロ値(ブランク)としての試料希釈溶媒を対応するマイクロタイターウェルに入れる		
6	必要体積の試料希釈溶媒を対応するマイクロタイターウェルに導入	1	マイクロタイタープレートの再水化(規定された体積の蒸留水を標準シリーズ、ブランク及び試料ウェルのウェルに添加)
7	未知の試料を入れる	2	未知の試料を入れる
8	HRPコンジュゲート又は類似物の作業溶液を調製		
9	HRPコンジュゲート(又は類似物)を、アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに入れる		
10	インキュベーション	3	インキュベーション
11	マイクロタイタープレートを洗淨	4	マイクロタイタープレートを洗淨
12	アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに基質を入れる		アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに基質を入れる
13	停止溶液を添加	5	停止溶液を添加
14	アッセイを評価	6	アッセイを評価

10

20

30

【0024】

b) ビオチンにカップリングされた2次抗体、2次試薬ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ又は類似物

【0025】

【表4】

	標準キット		本発明の単一工程キット
1	抗体被覆したマイクロタイタープレートを洗浄		
2	参照材料の作業溶液(標準)を調製		
3	標準シリーズについては、標準希釈溶媒をマイクロタイターウェルに入れる		
4	規定された濃度での、標準の作業溶液の外部又は内部(プレート内)希釈(標準シリーズ)		
4a	任意に、標準希釈を対応するマイクロタイターウェルへ導入		
5	ゼロ値(ブランク)としての試料希釈溶媒を対応するマイクロタイターウェルに入れる		
6	必要体積の試料希釈溶媒を対応するマイクロタイターウェルに導入	1	マイクロタイタープレートの再水化(規定された体積の蒸留水を標準シリーズ、ブランク及び試料ウェルのウェルに添加)
7	未知の試料を入れる	2	未知の試料を入れる
8	ビオチニル化抗体の作業溶液を調製		
9	ビオチンコンジュゲートを、アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに入れる		
10	インキュベーション		
11	マイクロタイタープレートを洗浄		
12	ストレプトアビジン-HRP又は類似物の作業溶液を調製		
13	ストレプトアビジン-HRP又は類似物の溶液を、アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに入れる		
14	インキュベーション	3	インキュベーション
15	マイクロタイタープレートを洗浄	4	マイクロタイタープレートを洗浄
16	アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに基質を入れる		アッセイに使用される全てのマイクロタイターウェルに基質を入れる
17	停止溶液を添加	5	停止溶液を添加
18	アッセイを評価	6	アッセイを評価

10

20

30

40

50

【0026】

本発明は、抗体カップルの利用により、抗原の検出に適用しうる(サンドイッチELISA)。同様に、対応する抗原による抗体の検出は容易である。対応する結合パートナーによる受容体又はリガンドの検出は本発明の適用の他の選択肢であり、したがって非常に多くのテストフォーマットが利用可能である。アッセイは特に、タンパク質、ステロイド、化学的化合物、薬物、核酸及び同様の物質の検出に用いることができる。

【0027】

反応複合体の検出は、直接カップリングされた酵素(例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)の利用により、2次工程において生じる酵素反応(ビオチン-ストレプトアビジン-HRP、酵素カップリングされた抗体に対する検出抗体等)を介して行ないうる。イムノアッセイにおける使用に適切でないものの他のラベル、例えば蛍光色素、化学発光ラベル、放射活性ラベル等も、同様に用いることができる。

【0028】

1次結合パートナーを不動化するのに用いられる担体は、好ましくはポリスチレン96-ウェ

ルマイクロタイタープレートであるが、免疫アッセイにおける使用に適切な、他のいずれの担体をも同様に、本発明の実行に採用することができる。

【0029】

測定に用いられる全ての試料は、分析物を含有する液体の試料から構成されることができ、より具体的には、血清、血漿調製物、局所体液、全血等の体液、並びに細胞培養上清、緩衝された分析物溶液等とすることができる。

【実施例】

【0030】

以下において、本発明を、具体的な適用例を用いてより具体的に説明する。

【0031】

適用例 1

ヒトICAM-1の検出のためのサンドイッチELISA

A) 試料希釈溶媒、標準シリーズ、HRPコンジュゲートと関連したプレートの製造

工程 1 :

被覆 :

96-ウェルマイクロタイタープレートを、従来技術に従って、PMS緩衝液中2.5 µg/ml抗-ICAM-1で被覆する(ウェルあたり100 µl、インキュベーション一晩4)。

【0032】

工程 2 :

ブロッキング :

被覆溶液を吸い出し、プレートを洗浄緩衝液(PBS/Tween)で2回洗浄する。ポリスチレン表面を飽和させるため(非特異的結合の防止)、プレートをウェルあたり300 µl PBS/2%BSAでブロックする(2時間、室温)。

【0033】

工程 3 :

固定化 :

ブロック溶液を吸い出し、プレートを2回洗浄し、ウェルあたり150 µl PBS/15%スクロースを添加する。1時間室温でインキュベートした後、固定化溶液をデカントする。循環ドライヤー中28 で約20時間プレートを乾燥させる。プレートを-20 で凍結する。

【0034】

工程 4 :

試料希釈溶媒の導入 :

被覆したプレートを凍結状態で使用する。試料希釈溶媒を2 に冷却する。標準シリーズを確立するため、100 µlの試料希釈溶媒を、マイクロタイタープレートの最初の2つの列の各ウェルに導入する。100 µlの試料希釈溶媒をブランク決定のための対応するウェルに添加する。90 µlの試料希釈溶媒を、未知の試料を決定するためのそれぞれの対応するウェルに添加する。

【0035】

工程 5 :

標準シリーズの確立 :

参照材料(組換えヒトICAM-1)の作業溶液(20ng/ml) (2)を、二重決定において、マイクロタイタープレートの左側の最上の2つのウェル内に導入する(100 µl/ウェル)。標準シリーズ(10ng/ml; 5ng/ml; 2.5ng/ml; 1.25ng/ml; 0.63ng/ml)を、プレート中での連続1:2希釈により調製する。

【0036】

工程 6 :

HRPコンジュゲートの導入 :

HRPコンジュゲート(抗-ICAM-1-HRP)の作業溶液を、2 に冷却し、マイクロタイタープレートの全てのウェルに迅速に導入する(50 µl/ウェル)。

【0037】

10

20

30

40

50

工程 7 :

凍結乾燥 :

全てのコンポネントの充填の直後に、マイクロタイタープレートをホイルでカバーし、予め-30 に冷却した凍結乾燥装置内に導入する。凍結乾燥を、-30 で約20時間行なう。凍結乾燥装置から出した直後に、乾燥したプレートを、アルミニウムの袋に、乾燥剤と共に溶封する。

【0038】

B)アッセイの実施 :

プレートをアルミニウムの袋から取り出す。

標準シリーズ並びにブランクを、ウェルあたり150 μ lの蒸留水の添加により再水化し、試料ウェルを140 μ lのH₂Oの添加により再水化する。10 μ lの未知の試料をそれぞれ試料ウェルに入れる。プレートをホイルでカバーし、室温で1時間インキュベートする。プレートを3回洗浄し、100 μ lの基質溶液をプレートの各ウェルに添加する。15分後に、酵素反応を、停止溶液(100 μ l)の添加により停止し、各ウェルの色の密度を光学測定的に評価する。

【0039】

適用例 2

ヒトインターロイキン10(IL-10)検出のためのサンドイッチELISA

A)試料希釈溶媒、標準シリーズ、ビオチンコンジュゲート、ストレプトアビジン-HRPと関連したプレートの製造

工程 1 :

被覆 :

96-ウェルマイクロタイタープレートを、従来技術に従って、PBS緩衝液中5 μ g/ml抗-IL-10で被覆する(ウェルあたり100 μ l、インキュベーション-晩4)。

【0040】

工程 2 :

ブロッキング :

被覆溶液を吸い出し、プレートを洗浄緩衝液(PBS/Tween)で1回洗浄する。ポリスチレン表面を飽和させるため(非特異的結合の防止)、プレートをウェルあたり300 μ l PBS/2%BSAでブロックする(2時間、室温)。

【0041】

工程 3 :

固定化 :

ブロック溶液を吸い出し、プレートを2回洗浄し、ウェルあたり150 μ l PBS/15%スクロースを添加する。1時間室温でインキュベートした後、固定化溶液をデカントする。循環ドライヤー中28 で約20時間プレートを乾燥させる。プレートを-20 で凍結する。

【0042】

工程 4 :

試料希釈溶媒の導入 :

被覆したプレートを凍結状態で使用する。試料希釈溶媒を2 に冷却する。標準シリーズを確立するため、100 μ lの試料希釈溶媒を、マイクロタイタープレートの最初の2つの列の各ウェルに導入する。100 μ lの試料希釈溶媒をブランク決定のための対応するウェルに添加する。50 μ lの試料希釈溶媒を、未知の試料を決定するためのそれぞれの対応するウェルに添加する。

【0043】

工程 5 :

標準シリーズの確立 :

参照材料(組換えヒトIL-10)の作業溶液(400pg/ml) (2)を、二重決定において、マイクロタイタープレートの左側の最上の2つのウェル内に導入する(100 μ l/ウェル)。標準シリーズを、プレート中での連続1:2希釈により(200-3.1pg/ml)調製する。

【 0 0 4 4 】

工程 6 :

ビオチンコンジュゲート及びストレプトアビジン-HRPの導入 :

ビオチンコンジュゲート(抗-IL-10-BT)及びストレプトアビジン-HRPの混合物の作業溶液を、2 に冷却し、マイクロタイタープレートの全てのウェルに迅速に導入する(50 μ l/ウェル)。

【 0 0 4 5 】

工程 7 :

凍結乾燥 :

全てのコンポーネントの充填の直後に、マイクロタイタープレートをホイルでカバーし、予め-30 に冷却した凍結乾燥装置内に導入する。凍結乾燥を、-30 で約20時間行なう。凍結乾燥装置から出した直後に、乾燥したプレートを、アルミニウムの袋に、乾燥剤と共に溶封する。

【 0 0 4 6 】

B)アッセイの実施 :

プレートをアルミニウムの袋から取り出す。

標準シリーズ並びにブランクを、ウェルあたり150 μ lの蒸留水の添加により再水化し、試料ウェルを100 μ lのH₂Oの添加により再水化する。50 μ lの未知の試料をそれぞれ試料ウェルに入れる。プレートをホイルでカバーし、室温で3時間インキュベートする。プレートを3回洗浄し、100 μ lの基質溶液をプレートの各ウェルに添加する。15分後に、酵素反応を、停止溶液(100 μ l)の添加により停止し、各ウェルの色の密度を光学測定的に評価する。

【 0 0 4 7 】

適用例 3インターフェロン (IFN_γ)に対するヒト抗体の検出のための逆サンドイッチELISA

A)試料希釈溶媒、標準シリーズ、HRPコンジュゲートと関連したプレートの製造

工程 1 :

被覆 :

96-ウェルマイクロタイタープレートを、従来技術に従って、PBS緩衝液中10 μ g/mlストレプトアビジンで被覆する(ウェルあたり100 μ l、インキュベーション一晩4)。

【 0 0 4 8 】

工程 2 :

特異的コーティング/ブロッキング :

ストレプトアビジン被覆溶液を吸い出し、プレートを洗浄緩衝液(PBS/Tween)で1回洗浄する。プレートを特異的に被覆しポリスチレン表面を飽和させるため(非特異的結合の防止)、ウェルあたり300 μ lのIFN_γ-ビオチンコンジュゲート、1 μ g/ml PBS/2%BSA(2時間、37)で、プレートの被覆及びブロックをそれぞれ行なう。

【 0 0 4 9 】

工程 3 :

固定化 :

被覆/ブロック溶液を吸い出し、プレートを2回洗浄し、ウェルあたり150 μ l PBS/15%スクロースを添加する。1時間室温でインキュベートした後、固定化溶液をデカントする。循環ドライヤー中28 で約20時間プレートを乾燥させる。プレートを-20 で凍結する。

【 0 0 5 0 】

工程 4 :

試料希釈溶媒の導入 :

被覆したプレートを凍結状態で使用する。試料希釈溶媒を2 に冷却する。標準シリーズを確立するため、100 μ lの試料希釈溶媒を、マイクロタイタープレートの最初の2つの列の各ウェルに導入する。100 μ lの試料希釈溶媒をブランク決定のための対応するウェルに添加する。75 μ lの試料希釈溶媒を、未知の試料を決定するためのそれぞれの対応するウ

エルに添加する。

【0051】

工程5：

標準シリーズの確立：

参照材料(抗ヒトIFN_抗体)の作業溶液(200ng/ml) (2)を、二重決定において、マイクロタイタープレートの左側の最上の2つのウェル内に導入する(100 μ l/ウェル)。標準シリーズを、連続1:2希釈により調製する(100-1.6ng/ml)。

【0052】

工程6：

HRPコンジュゲートの導入：

HRPカップリングしたIFN_タンパク質の作業溶液を、2 に冷却し、マイクロタイタープレートの全てのウェルに迅速に導入する(50 μ l/ウェル)。

【0053】

工程7：

凍結乾燥：

全てのコンポーネントの充填の直後に、マイクロタイタープレートをホイルでカバーし、予め-30 に冷却した凍結乾燥装置内に導入する。凍結乾燥を、-30 で約20時間行なう。凍結乾燥装置から出した直後に、乾燥したプレートを、アルミニウムの袋に、乾燥剤と共に溶封する。

【0054】

B)アッセイの実施：

プレートをアルミニウムの袋から取り出す。

標準シリーズ並びにブランクを、ウェルあたり150 μ lの蒸留水の添加により再水化し、試料ウェルを125 μ lのH₂Oの添加により再水化する。25 μ lの未知の試料をそれぞれ試料ウェルに入れる。プレートをホイルでカバーし、室温で2時間インキュベートする。プレートを3回洗浄し、100 μ lの基質溶液をプレートの各ウェルに添加する。15分後に、酵素反応を、停止溶液(100 μ l)の添加により停止し、各ウェルの色の密度を光学測定的に評価する。

【0055】

適用例4

ヒト腫瘍壊死因子 (TNF)の検出のためのBioLISA(受容体-リガンド結合)

A)試料希釈溶媒、標準シリーズ、ピオチンコンジュゲート、ストレプトアビジン-HRPと関連したプレートの製造

工程1：

被覆：

96-ウェルマイクロタイタープレートを、従来技術に従って、PBS緩衝液中1 μ g/ml組換えTNF受容体で被覆する(ウェルあたり100 μ l、インキュベーション一晩4)。

【0056】

工程2：

ブロッキング：

被覆溶液を吸い出し、プレートを洗浄緩衝液(PBS/Tween)で1回洗浄する。ポリスチレン表面を飽和させるため(非特異的結合の防止)、プレートをウェルあたり300 μ lのPBS/2%BSA(2時間、室温)でブロックする。

【0057】

工程3：

固定化：

ブロック溶液を吸い出し、プレートを2回洗浄し、ウェルあたり150 μ l PBS/15%スクロースを添加する。1時間室温でインキュベートした後、固定化溶液をデカントする。循環ドレイヤー中28 で約20時間プレートを乾燥させる。プレートを-20 で凍結する。

【0058】

10

20

30

40

50

工程 4 :

試料希釈溶媒の導入 :

被覆したプレートを凍結状態で使用する。試料希釈溶媒を2 に冷却する。標準シリーズを確立するため、100 μ lの試料希釈溶媒を、マイクロタイタープレートの最初の2つの列の各ウェルに導入する。100 μ lの試料希釈溶媒をブランク決定のための対応するウェルに添加する。50 μ lの試料希釈溶媒を、未知の試料を決定するためのそれぞれの対応するウェルに添加する。

【 0 0 5 9 】

工程 5 :

標準シリーズの確立 :

参照材料(組換えTFN)の作業溶液(2000pg/ml) (2)を、二重決定において、マイクロタイタープレートの左側の最上の2つのウェル内に導入する(100 μ l/ウェル)。標準シリーズを、プレート中で連続1:2希釈により(1000-16pg/ml)調製する。

【 0 0 6 0 】

工程 6 :

ビオチンコンジュゲート及びストレプトアビジン-HRPの導入 :

ビオチンコンジュゲート(抗TFN BT)及びストレプトアビジン-HRPの混合物の作業溶液を、2 に冷却し、マイクロタイタープレートの全てのウェルに迅速に導入する(50 μ l/ウェル)。

【 0 0 6 1 】

工程 7 :

凍結乾燥 :

全てのコンポーネントの充填の直後に、マイクロタイタープレートをホイルでカバーし、予め-30 に冷却した凍結乾燥装置内に導入する。凍結乾燥を、-30 で約20時間行なう。凍結乾燥装置から出した直後に、乾燥したプレートを、アルミニウムの袋に、乾燥剤と共に溶封する。

【 0 0 6 2 】

B)アッセイの実施 :

プレートをアルミニウムの袋から取り出す。

標準シリーズ並びにブランクを、ウェルあたり150 μ lの蒸留水の添加により再水化し、試料ウェルを100 μ lのH₂Oの添加により再水化する。50 μ lの未知の試料をそれぞれ試料ウェルに入れる。プレートをホイルでカバーし、4 で一晩インキュベートする。プレートを3回洗浄し、100 μ lの基質溶液をプレートの各ウェルに添加する。15分後に、酵素反応を、停止溶液(100 μ l)の添加により停止し、各ウェルの色の密度を光学測定的に評価する。

10

20

30

【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090983 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/53
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00112
- (22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 2002 (26.04.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: GM 370/2001 10. Mai 2001 (10.05.2001) AT
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDSYSTEMS DIAGNOSTICS GMBH [AT/AT]; Rennweg 95 b, A-1030 Wien (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, 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, GR, 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, NI, 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.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RECH-WEICHSEL-BRAUN, Irene [AT/AT]; Hofackergasse 5, A-2161 Jaxenburg, AT (AT); SCHAUDE, Michael [AT/AT]; Korbgasse 2-4/12, A-1230 Wien, AT (AT).
- (74) Anwalt: HAFFNER, Thomas, M.; Schottengasse 3a, A-1014 Wien (AT).

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und ernen zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: QUANTITATIVE SINGLE-STEP IMMUNOASSAY IN LYOPHILISED FORM

WO 02/090983 A2 (54) Bezeichnung: QUANTITATIVER HINSCHEIT IMMUNTEST IN LYOPHILISIERTER FORM

(57) Abstract: An immunoassay kit for the qualitative and quantitative determination of a sample by means of specific binding partners, such as, for example, antibodies, antigens, receptors and ligands comprises a support or microtitre plate with a number of recesses. Said support or microtitre plate is pre-coated with a primary binding partner and the binding partner is applied and fixed as a lyophilisate. In addition a reference standard series of the sample to be determined lies in a part of the recesses of the microtitre plate with incremental dilution in lyophilisate form.

(57) Zusammenfassung: Ein Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden besteht aus einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt. In einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte liegt zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vor.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 1 -

Quantitativer Einzschritt Immuntest in lyophilisierter Form

Die Erfindung bezieht sich auf einen Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden, mit einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt.

Immuntests, Enzym gekoppelte Immuntests, Fluoreszenz Label gekoppelte Immuntests, Lumineszenz Label gekoppelte Immuntests oder mit einem anderen Label markierte Immuntests werden in der Routinediagnostik und Forschungsdiagnostik zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen, zum Beispiel Antigenen, Liganden, Rezeptoren, Antikörpern sowie von chemischen Verbindungen eingesetzt. Stand der Technik ist es, in solchen Test-Kits einen der Bindungspartner an einen festen Träger, zum Beispiel eine Polystyrolplatte, zu binden und die weiteren für die Versuchsdurchführung benötigten Reagentien als separate Komponenten des Testkits hinzuzufügen. Diese Reagentien sind üblicherweise das nachzuweisende Protein in quantifizierter Form als Konzentrat oder Lyophilisat (Referenzstandard), ein Standard- und Probenverdünnungsmedium, der zweite spezifische Bindungspartner in gekoppelter Form (Konjugat) als Konzentrat oder Arbeitslösung, falls benötigt ein sekundäres Detektionssystem sowie im Falle eines Enzymlabels das zum Nachweis benötigte Substrat-Reagenz. Zur Terminierung der enzymatischen Reaktion wird eine Stopp-Lösung beigelegt, zum Herstellen der Arbeitslösungen für den zweiten spezifischen Bindungspartner sowie für das Sekundärreagenz steht ein Assaypuffer zur Verfügung, welcher meist als Konzentrat vorliegt. Da zwischen den Arbeitsschritten Waschschritte erforderlich sind, enthält ein herkömmlicher Immun-Test-Kit einen Waschpuffer, üblicherweise in konzentrierter Form.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 2 -

Kommerzielle ELISA Kits bieten dem Anwender validierte Testsysteme. Die Produkte enthalten alle für die Testdurchführung erforderlichen Reagentien in optimierten Konzentrationen und Mengen sowie ein detailliertes Protokoll zur Durchführung des Tests. Die einzelnen Reaktionsschritte werden üblicherweise konsekutiv durchgeführt. Die gemeinsame Inkubation von Analyten (Standard, Probe) und sekundärem Antikörper mit der Festphase (Cocktail) ist für eine Vielzahl von Testsystemen möglich.

Ein typisches Beispiel für einen Immuntest ist der Sandwich ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

Typischer Weise enthalten solche ELISA Kits folgende Komponenten:

- Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, vorbeschichtet mit dem primären Antikörper, geblockt, fixiert.
- Referenzmaterial: Analyt (Standard) in definierter Konzentration zur Erstellung einer Standardreihe
- Enzym- (Horse Radish Peroxidase) oder Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper
- Falls erforderlich Streptavidin-Enzym (Horse Radish Peroxidase)
- Substratlösung (Tetramethylen-Benzidin)
- Waschpuffer: Salzlösung zum Waschen der Platten vor der Probeninkubation und zwischen den Reaktionsschritten
- Assay-Puffer: Salzlösung zur Verdünnung des Sekundärantikörpers und Streptavidin-Enzym Konzentrates (Herstellen der Arbeitslösungen)
- Probenverdünnungsmedium: Spezifisches flüssiges Medium zur Verdünnung des Referenzmaterials sowie der unbekanntes Proben
- Stopp-Lösung zur Beendigung der enzymatischen Reaktion

Zur Testdurchführung sind durch den Anwender folgende Arbeitsschritte durchzuführen:

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 3 -

- Herstellung der Arbeitslösungen
- Erstellung der Standardreihe durch Verdünnung des Referenzmaterials
- Waschen der Mikrotiterplatte
- Vorlegen des Probenverdünnungsmediums
- Auftragen der einzelnen Referenzverdünnungen (Standardreihe)
- Auftragen der unbekanntes Proben
- Zugabe des Enzym- oder Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers
- Waschen der Mikrotiterplatte
- Optional Zugabe von Streptavidin-Enzym
- Waschen der Mikrotiterplatte
- Zugabe des Substrates
- Zugabe der Stopplösung
- Messung der optischen Dichte

Die Erfindung zielt nun darauf ab, die Handhabung derartiger Test-Kits zu vereinfachen und neben einer qualitativen Aussage auch quantitative Aussagen zu ermöglichen. Des weiteren zielt die Erfindung neben der Reduktion des Arbeitsaufwandes und der zur Testdurchführung benötigten Zeit darauf ab, die Fehlerwahrscheinlichkeit für den Anwender durch Minimierung der durchzuführenden Arbeitsschritte zu reduzieren. Schließlich ist es Ziel der vorliegenden Erfindung, die Verpackungsvolumina sowie Verpackungskosten ebenso wie die Versandkosten durch deutliche Gewichtsverringering und Volumsverringering der Kits herabzusetzen und eine logistische Vereinfachung bereitzustellen, bei welcher standardisierte Basis-Kits mit verbesserter Lagerfähigkeit des Produktes zur Verfügung gestellt werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe besteht der erfindungsgemäße Immun-Test-Kit im wesentlichen darin, daß in einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vorliegt. Dadurch, daß der Träger bzw. die Mikrotiterplatte zusätzlich bereits eine Refe-

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 4 -

renzstandardreihe der zu bestimmenden Probe enthält, wird die Möglichkeit geschaffen, neben einer rein qualitativen Analyse auch eine quantitative Abschätzung und eine quantitative Bestimmung durch Interpolation zwischen definierten Testergebnissen im Bereich zwischen inkrementell benachbarten Standards vorzunehmen, wobei der aufwendige Schritt der Herstellung der Arbeitslösung des Referenzmaterials und der Herstellung der entsprechenden Verdünnungsreihe bei der Laborbestimmung entfällt. Mit einer derartigen Ausbildung des Immun-Test-Kits, bei welcher das Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials und das Auftragen des Standardverdünnungsmediums in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfällt, läßt sich somit bereits eine wesentliche Rationalisierung und Vereinfachung des Verfahrens und insbesondere eine exakt reproduzierbare Standardreihe vorgeben, wodurch die Fehlerwahrscheinlichkeit bereits wesentlich verringert wird.

In besonders vorteilhafter Weise kann aber die Vorfertigung des Immun-Test-Kits noch wesentlich weiter vorangetrieben werden und die notwendigen Bestimmungsschritte für die Probe weiter reduziert werden. Zu diesem Zweck ist mit Vorteil die Ausbildung so getroffen, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich ein Enzym- oder Biotin-gekoppeltes Konjugat eines Sekundärbindungspartners, insbesondere -antikörpers, und im Fall des Biotin-gekoppelten Konjugates ein Enzym in lyophilisierter Form enthalten. Auf diese Weise wird neben der Standardreihe zur Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins in definierten Proteinkonzentrationen auch der zweite, spezifische mit einem der oben genannten Labels gekoppelte Bindungspartner (Konjugat in titrierter Konzentration sowie gegebenenfalls das sekundäre Reagenz) zum Nachweis gemeinsam mit dem fest an Phasen gebundenen primären Bindungspartner bereits in lyophilisierter Form in der Festphase eingebracht, wobei die Bereitstellung dieser Komponenten in lyophilisierter Form, d. h. somit in bei tiefen Temperaturen von etwa -30°C dehydrierter Form, die Reaktionskinetik soweit einfriert, daß keine Vorabreaktion des Referenzmaterials zu befürchten ist. Da hochverdünnte Arbeitslösungen

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 5 -

ebenso wie begrenzt stabile Lösungen nicht vorrätig gehalten werden, sondern vielmehr erst unmittelbar zu Testbeginn durch Zugabe von Lösungsmittel bzw. Rehydrierung auf dem Träger erzeugt werden, werden weitere mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen.

In weiterer Verbesserung und zur weiteren Verringerung der erforderlichen Arbeitsschritte bei der Bestimmung ist die Ausbildung so getroffen, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ein Probenverdünnungsmedium in lyophilisierter Form enthalten. Das spezifische Probenverdünnungsmedium kann hierbei bei einer Temperatur von beispielsweise 2°C in der benötigten Menge in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht werden, wobei das Sekundärantikörper-Enzymkonjugat bzw. das Gemisch aus Sekundärantikörper-Biotinkonjugat bei gleicher Temperatur in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht werden kann, worauf die so beschickte Mikrotiterplatte einem Gefriertrocknungsprozeß in einer beispielsweise auf -30°C vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage der Lyophilisierung unterzogen wird.

Ein derartiger vorkonfektionierter Träger bzw. eine derartige vorkonfektionierte Mikrotiterplatte erfordert zur Vervollständigung des Test-Kits nur mehr eine geringe Anzahl zusätzlicher Komponenten, wobei mit Vorteil der Test-Kit zusätzlich zur vorbeschichteten Mikrotiterplatte lediglich Waschpuffer, Substratlösung und Stopplösung enthält. Für die Bestimmung der Probe ist es somit lediglich erforderlich, die Mikrotiterplatte durch Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, gegebenenfalls den Blanks und den Probenvertiefungen, zu rehydrieren, worauf die unbekannte Probe aufgegeben und inkubiert wird. Nach einem Waschen der Mikrotiterplatte und dem Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wird nach vorbestimmter Zeit die Stopplösung zugegeben und es kann unmittelbar die Testauswertung vorgenommen werden.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 6 -

Mit Vorteil ist die Ausbildung hiebei so getroffen, daß im Falle von Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper-Konjugat als Sekundärreagenz Streptavidin - Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt ist.

Insgesamt wird durch die erfindungsgemäße Ausbildung die Testdurchführung für den Anwender auf die Zugabe der unbekannt Probe sowie die enzymatische Reaktion reduziert, wobei alle weiteren Schritte zuvor vom Hersteller des ELISA Kits durchgeführt werden. Die Mikrotiterplatte wird somit beim Hersteller mit dem spezifischen Primärantikörper beschichtet, geblockt und fixiert, worauf die Platte beispielsweise auf -20°C gekühlt wird und die oben beschriebenen zusätzlichen Schritte zum Einbringen der Standardreihe des Probenverdünnungsmittels sowie des Sekundärantikörper-Enzymkonjugates bzw. des Gemisches aus Sekundärantikörper-Biotinkonjugates und Streptavidin-Enzymes in definierter Weise beim Hersteller vorgenommen werden. Die Testdurchführung reduziert sich somit auf die Zugabe der zu analysierenden Proben sowie die Testauswertung aufgrund der Substratfärbung.

In besonders vorteilhafter Weise ist der Immun-Test-Kit nach der vorliegenden Erfindung so ausgestaltet, dass der Test-Kit Stabilisatoren für Peroxidase beziehungsweise generelle Lyoprotektanten wie Proteine (z.B. Albumin (z.B. BSA) Protein Hydrolysate (Peptone, Gelatine...) Casein), Polymeren (z.B. Dextran, PVA, PVP), Zucker (z.B. Saccharose, Trehalose, Lactose, Xylit, Sorbit, Mannit, Maltose, Glucose, Inosit), Bakterioostatische Mittel (z.B. Thimerosal, Proclin), phenolische Substanzen und Aniline auch mit Substituenten (kleine Alkyl-Reste oder Cl, Br...) (z. B. o-Methoxyphenol, o-Methylphenol, p-Methylphenol, o-Aminophenol, o-Hydroxybenzoesäure, (o, m oder p)-Hydroxybenzylalkohol, Anilin, p-Aminobenzoessäure, p-Methoxyanilin, Benzylalkohol, Benzoesäure, p-Nitrophenol, Benzylamin, 1-Phenyl-1,2-ethandiol, trans-1,2-Cyclohexandiol, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäure, Cyclohexylamin); Hydrophobe Verbindungen und

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 7 -

Verbindungen und Lösungsmitteln (z.B. DMF, Ethylenglykol, DMSO); Detergenzien (z.B. Tween-20); Aryl-Borsäureverbindungen (z.B. Phenylborsäure, 4-Brom-Phenylborsäure, 3-Acetamidophenyl-borsäure, 1-Naphtyl-borsäure); Substratanalogen (z.B. TMB, Luminol); Poly-Hydroxy-Verbindungen (z.B. Polyole, Polyethylenglykol, Glycerin); Ectoine (z.B. (S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid [THP(B)], (S,S)- β -2-methyl-5-hydroxy-1,2,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid, [THP(A)]); Ionen bzw. polyvalente Ionen (z. B. Metalionen (Al, Zn, Mg, Fe, Cu,...)); Komplexbildnern (z.B. EDTA); Aminosäuren (z.B. Glyzin, Prolin, 4-Hydroxyprolin, Serin, Glutamat, Alanin, Lysin, Sarcosin, γ -Aminobutyric acid, Phenylalanin) und/oder Substanzen wie TRIS, Salze, Amine, N-Cholate, Saccharose monolaurat, 2-O- β -Mannosylglyzerat enthält.

Mit Rücksicht auf die besonders einfache Verfahrensweise eignet sich der vorliegende Immuntest-Kit für eine Vielzahl von möglichen Anwendungen. In besonders vorteilhafter Weise erfolgt die Verwendung eines derartigen Immuntest-Kits für den Einsatz in der Forschungsdiagnostik und in-vitro Diagnostik, für den Einsatz in der Erregererologie, wie zum Beispiel zum Nachweis von Infektionen durch HIV, HepV, EBV, CMV usw., für den Einsatz in der Tumordiagnostik, wie zum Beispiel zum Nachweis von Tumormarkern oder Tumor assoziierten Proteinen, Vaskularisierungsmarkern, Metastasierungsmarkern usw., für den Einsatz in der Allergologie wie zum Beispiel zum Nachweis von Tierallergenen, Pflanzenpollen, Nahrungsbestandteilen usw., für den Einsatz in der Autoimmun-Diagnostik wie zum Beispiel zum Nachweis der Auto-Antigene im Bereich ANA/ENA, Diabetes mellitus/ IDDM, Schilddrüsen Antigene, Autoimmun Hepatitis, APS, usw., für den Nachweis von immunologischen Störungen durch entzündliche Prozesse oder Infektionen wie zum Beispiel zum Nachweis von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, usw., für den Nachweis von Änderungen des Hormonhaushaltes wie zum Beispiel Ovulationstests, Schwangerschaftstests, usw., für den Einsatz zum Therapie-Monitoring wie zum Beispiel zum Nachweis von therapeutischen Antikörpern und Antigenen, organischen und

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 8 -

anorganischen Verbindungen, für den Nachweis von Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und/oder für den Nachweis von genetischen Veränderungen, genetischen Erkrankungen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand einer Gegenüberstellung zum Stand der Technik näher erläutert, wobei der Stand der Technik als Standard-Kit bezeichnet wird.

1. Komponenten der ELISA Kits:

a) direkt Enzym gekoppeltes Konjugat

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte	1	Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte inklusive Standardreihe, Probenverdünnungsmedium, Konjugatantikörper
2	Standardmaterial		
3	Assay-Puffer		
4	Konjugatantikörper		
5	Probenverdünnungsmedium		
6	Waschpuffer	2	Waschpuffer
7	Substratlösung	3	Substratlösung
8	Stopplösung	4	Stopplösung

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 3 -

b) zweiter Antikörper an Biotin gekoppelt, Sekundärreagenz
Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) o.ä.

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte	1	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte inklusive Standardreihe, Probenverdünnungsmedium, biotinylierter Antikörper, Streptavidin-HRP o.ä.
2	Standardmaterial		
3	Assay-Puffer		
4	Biotinylierter Antikörper		
5	Streptavidin-HRP o.ä.		
6	Probenverdünnungsmedium		
7	Waschpuffer	2	Waschpuffer
8	Substratlösung	3	Substratlösung
9	StoppLösung	4	StoppLösung

2. Arbeitsschritte zur Testdurchführung:

a) direkt Enzym gekoppeltes Konjugat

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Waschen der Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte		
2	Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials (Standard)		
3	Auftragen des Standardverdünnungsmediums in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
4	Externe oder interne (in der Platte) Verdünnung der Arbeitslösung des Standards in definierte Konzentrationen (Standardreihe)		

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 10 -

4a	Gegebenenfalls Einbringen der Standardverdünnungen in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
5	Auftragen des Probenverdünnungsmediums als Nullwert (blank) in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
6	Einbringen des benötigten Volumens des Probenverdünnungsmediums in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte	1	Rehydrierung der Mikrotiterplatte (Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, Blank und den Probenvertiefungen)
7	Auftragen der unbekannt Proben	2	Auftragen der unbekannt Proben
8	Herstellen der Arbeitslösung des HRP-Konjugates o.ä.		
9	Auftragen des HRP-Konjugates (o.ä.) in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
10	Inkubation	3	Inkubation
11	Waschen der Mikrotiterplatte	4	Waschen der Mikrotiterplatte
12	Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte
13	Zugabe der Stopplösung	5	Zugabe der Stopplösung
14	Testauswertung	6	Testauswertung

b) zweiter Antikörper an Biotin gekoppelt, Sekundärreagenz Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) o.ä.

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Waschen der Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte		
2	Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials (Standard)		

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 11 -

3	Auftragen des Standardverdünnungsmediums in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
4	Externe oder interne (in der Platte) Verdünnung der Arbeitslösung des Standards in definierte Konzentrationen (Standardreihe)		
4a	Gegebenenfalls Einbringen der Standardverdünnungen in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
5	Auftragen des Probenverdünnungsmediums als Nullwert (blank) in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
6	Einbringen des benötigten Volumens des Probenverdünnungsmediums in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte	1	Rehydrierung der Mikrotiterplatte (Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, Blank und den Probenvertiefungen)
7	Auftragen der unbekannt Proben	2	Auftragen der unbekannt Proben
8	Herstellen der Arbeitslösung des biotinylierten Antikörpers		
9	Auftragen des Biotin-Konjugates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
10	Inkubation		
11	Waschen der Mikrotiterplatte		
12	Herstellen der Streptavidin-HRP o.ä. Arbeitslösung		
13	Auftragen der Streptavidin-HRP o.ä. Lösung in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 12 -

14	Inkubation	3	Inkubation
15	Waschen der Mikrotiterplatte	4	Waschen der Mikrotiterplatte
16	Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte
17	Zugabe der Stopplösung	5	Zugabe der Stopplösung
18	Testauswertung	6	Testauswertung

Die Erfindung kann hierbei ihre Anwendung zur Detektion von Antigenen mit Hilfe eines Paares von Antikörper (Sandwich ELISA) finden. Ebenso ist der Nachweis von Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen möglich. Die Detektion von Rezeptoren bzw. Liganden durch den jeweiligen Bindungspartner ist eine weitere Möglichkeit der Anwendung der vorliegenden Erfindung, sodaß eine große Anzahl von Testformaten zur Verfügung steht. Insbesondere kann der Test zum Nachweis von Proteinen, Steroiden, chemischen Verbindungen, Medikamenten, Nukleinsäuren, und ähnlichen Substanzen eingesetzt werden.

Die Detektion des Reaktionskomplexes kann mit Hilfe eines direkt gekoppelten Enzymes erfolgen (zum Beispiel Horse Radish Peroxidase, Alkalische Phosphatase u.ä.), über eine enzymatische Reaktion, welche durch einen Sekundärschritt erfolgt (Biotin-Streptavidin-HRP, enzym-gekoppelter Antikörper gegen den Detektionsantikörper u.ä.). Jedes weitere Label, welches für die Durchführung eines Immuntestes geeignet ist, wie Fluorochrome, Chemiluminiszenz Labels, radioaktive Labels, u.ä., kann ebenso benutzt werden.

Der Träger zur Immobilisierung des primären Bindungspartners ist vorzugsweise eine Polystyrol 96 Well Mikrotiterplatte, wobei jedoch jeder andere Träger, der für die Durchführung eines Immuntestes geeignet ist, ebenso für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden kann.

Die zur Messung eingesetzten Proben können alle flüssigen Proben, die den Analyten enthalten, im speziellen Körperflüssigkeiten wie Seren, Plasmapräparationen, lokale Körper-

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 13 -

flüssigkeiten, Vollblut, u.ä. sowie Zellkulturüberstände, gepufferte Lösungen der Analyten u.ä., sein.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von spezifischen Anwendungsbeispielen näher erläutert.

Anwendungsbeispiel 1

Sandwich ELISA zum Nachweis von humanem ICAM-1

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Proben verdünnungsmedium, Standardreihe, HRP-Konjugat

Schritt 1:

Beschichtung:

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 2,5µg/ml anti-ICAM-1 in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Blockierung:

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

Schritt 3:

Fixierung:

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungsmedium

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 14 -

vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekanntenen Proben wird in jede entsprechende Vertiefung 90µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

Schritt-5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (20ng/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes ICAM-1) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (10ng/ml; 5ng/ml; 2,5ng/ml; 1,25ng/ml; 0,63ng/ml).

Schritt 6:

Einbringung des HRP-Konjugates:

Die Arbeitslösung des HRP-Konjugates (anti-ICAM-1-HRP) wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 140µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 10µl der unbekanntenen Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 15 -

15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100µl) abgebrochen und die Farbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Anwendungsbeispiel 2.**Sandwich ELISA zum Nachweis von humanem Interleukin 10 (IL-10)**

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, Biotin-Konjugat, Streptavidin-HRP

*Schritt 1:**Beschichtung:*

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 5µg/ml anti-IL-10 in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

*Schritt 2:**Blockierung:*

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

*Schritt 3:**Fixierung:*

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

*Schritt 4:**Einbringung des Probenverdünnungsmediums:*

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungs-

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 16 -

medium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekanntenen Proben wird in jede Vertiefung 50µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (400pg/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes IL-10) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (200 - 3.1 pg/ml).

Schritt 6:

Einbringung des Biotin-Konjugates und Streptavidin-HRP:

Die Arbeitslösung des Gemisches aus Biotin-Konjugat (anti-IL-10-BT) und Streptavidin-HRP wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 100µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 50µl der unbekanntenen Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 3 Stunden bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 17 -

(100µl) abgebrochen und die Farbtintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Anwendungsbeispiel 3

~~Inverser~~ Sandwich-ELISA zum Nachweis von humanem Antikörpern gegen Interferon alpha (IFNα)

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, HRP-Konjugat

Schritt 1:

Beschichtung: Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 10µg/ml Streptavidin in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Spezifische Beschichtung/Blockierung: Die Streptavidin-Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur spezifischen Beschichtung der Platte sowie zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well IFNα-Biotin Konjugat, 1µg/ml in PBS/2% BSA beschichtet beziehungsweise blockiert (2h, 37°C).

Schritt 3:

Fixierung: Die Beschichtungs/Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umlufttrockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vor-

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 18 -

gelegt. Zur Bestimmung der unbekanntenen Proben wird in jede Vertiefung 75µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (200ng/ml) des Referenzmaterials (anti-human-IFN α Antikörper) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (100 - 1,6ng/ml).

Schritt 6:

Einbringung des HRP-Konjugates:

Die Arbeitslösung des HRP-gekoppelten IFN α Proteins wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 125µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 25µl der unbekanntenen Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100µl) abgebrochen und die Farbbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 19 -

Anwendungsbeispiel 4**BioLISA zum Nachweis von humanem Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) (Rezeptor-Liganden Bindung)**

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, Biotin-Konjugat, Streptavidin-HRP

Schritt 1:

Beschichtung:

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 1 μ g/ml rekombinanten TNF-Rezeptor in PBS Puffer beschichtet (100 μ l pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Blockierung:

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschlösung gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300 μ l pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

Schritt 3:

Fixierung:

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro well werden 150 μ l PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekanntenen Proben wird in jede Vertiefung 50 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 20 -

Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (2000pg/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes TNF α) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100 μ l/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (1000 - 16 pg/ml)

Schritt 6:

Einbringung des Biotin-Konjugates und Streptavidin-HRP:

Die Arbeitslösung des Gemisches aus Biotin-Konjugates (anti-TNF α -BT) und Streptavidin-HRP wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50 μ l/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in Aluminiumtaschen eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150 μ l destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 100 μ l H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 50 μ l der unbekannt Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100 μ l Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100 μ l) abgebrochen und die Farbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 21 -

Ansprüche:

1. Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden, mit einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vorliegt.
2. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich ein Enzym- oder Biotin-gekoppeltes Konjugat eines Sekundärbindungspartners, insbesondere -antikörpers, und im Fall des Biotin-gekoppelten Konjugates ein Enzym in lyophilisierter Form enthalten.
3. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ein Probenverdünnungsmedium in lyophilisierter Form enthalten.
4. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Test-Kit zusätzlich zur vorbeschichteten Mikrotiterplatte lediglich Waschpuffer, Substratlösung und Stopplösung enthält.
5. Immun-Test-Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper-Konjugat als Sekundärreagenz Streptavidin - Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt ist.
6. Immun-Test-Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Test-Kit Stabilisatoren für Peroxidase beziehungsweise generelle Lyoprotektanten wie Proteine

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 22 -

(z.B. Albumin (z.B. BSA) Protein Hydrolysate (Peptone, Gelatine...) Casein) und/oder Polymere (z.B. Dextran, PVA, PVP), Zucker (z.B. Saccharose, Trehalose, Lactose, Xylit, Sorbit, Mannit, Maltose, Glucose, Inosit) und/oder Bakteriostatische Mittel (z.B. Thimerosal, Proclin) und/oder phenolische Substanzen und Aniline auch mit Substituenten (kleine Alkyl-Reste oder Cl, Br...) (z. B. o-Methoxyphenol, o-Methylphenol, p-Methylphenol, o-Aminophenol, o-Hydroxybenzoesäure, (o, m oder p)-Hydroxybenzylalkohol, Anilin, p-Aminobenzoessäure, p-Methoxyanilin, Benzylalkohol, Benzoesäure, p-Nitrophenol, Benzylamin, 1-Phenyl-1,2-ethandiol, trans-1,2-Cyclohexandiol, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäure, Cyclohexylamin) und/oder Hydrophobe Verbindungen und/oder Lösungsmittel (z.B. DMF, Ethylenglykol, DMSO) und/oder Detergenzien (z.B. Tween-20) und/oder Aryl-Borsäureverbindungen (z.B. Phenylborsäure, 4-Brom-Phenylborsäure, 3-Acetylphenylborsäure, 1-Naphthylborsäure) und/oder Substratanaloga (z.B. TMB, Luminol) und/oder Poly-Hydroxy-Verbindungen (z.B. Polyole, Polyethylenglykol, Glycerin) und/oder Ectoine (z.B. (S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic-acid [THP(B)], (S,S)-6-2-methyl-5-hydroxy-1,2,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylicacid, [THP(A)]) und/oder Ionen bzw. polyvalente Ionen (z. B. Metallionen (Al, Zn, Mg, Fe, Cu,...)) und/oder Komplexbildner (z.B. EDTA) und/oder Aminosäuren (z.B. Glyzin, Prolin, 4-Hydroxyprolin, Serin, Glutamat, Alanin, Lysin, Sarcosin, γ -Aminobutyric acid, Phenylalanin) und/oder Substanzen wie TRIS, Salze, Amine, Na-Cholate, Saccharose monolaurat und/oder 2-O- β -Mannosylglyzerat enthält.

7. Verwendung eines Immun-Test-Kits nach einem Ansprüche 1 bis 6, für den Einsatz in der Forschungsdiagnostik und in-vitro Diagnostik, für den Einsatz in der Erregerserologie, wie zum Beispiel zum Nachweis von Infektionen durch HIV, HepV, EBV, CMV usw., für den Einsatz in der Tumordiagnostik, wie zum Beispiel zum Nachweis von Tumormarkern oder Tumor assoziierten Proteinen, Vaskularisierungsmarkern, Metastasierungsmarkern usw., für den Einsatz in der Allergologie wie zum Beispiel zum Nachweis von Tierallergenen, Pflanzenpollen, Nahrungsbestandteilen usw., für

WO 02/090983

PCT/AT02/00112

- 23 -

den Einsatz in der Autoimmun-Diagnostik wie zum Beispiel zum Nachweis der Auto-Antigene im Bereich ANA/ENA, Diabetes mellitus/ IDDM, Schilddrüsen Antigene, Autoimmun Hepatitis, APS, usw., für den Nachweis von immunologischen Störungen durch entzündliche Prozesse oder Infektionen wie zum Beispiel zum Nachweis von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, usw., für den Nachweis von Änderungen des Hormonhaushaltes wie zum Beispiel Ovulationstests, Schwangerschaftstests, usw., für den Einsatz zum Therapie-Monitoring wie zum Beispiel zum Nachweis von therapeutischen Antikörpern und Antigenen, organischen und anorganischen Verbindungen, für den Nachweis von Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und/oder für den Nachweis von genetischen Veränderungen, genetischen Erkrankungen.

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090983 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/543
 - (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00112
 - (22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 2002 (26.04.2002)
 - (25) Einreichungssprache: Deutsch
 - (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
 - (30) Angaben zur Priorität: GM 370/2001 10. Mai 2001 (10.05.2001) AT
 - (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDSYSTEMS DIAGNOSTICS GMBH [AT/AT]; Rennweg 95 b, A-1030 Wien (AT).
 - (72) Erfinder; und
 - (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RECH-WEICHSEL-BRAUN, Irene [AT/AT]; Hofäckergasse 5, A-2161 Laxenburg, AT (AT). SCHAUDE, Michael [AT/AT]; Korbgasse 2-4/12, A-1230 Wien, AT (AT).
 - (74) Anwalt: HAFFNER, Thomas, M.; Schottengasse 3a, A-1014 Wien (AT).
 - (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NG, NZ, OM, 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.
 - (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
 - Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht
 - (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 12. September 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*



(54) Title: QUANTITATIVE SINGLE-STEP IMMUNOASSAY IN LYOPHILISED FORM

WO 02/090983 A3 (54) Bezeichnung: QUANTITATIVER EINSCHRITT IMMUNTEST IN LYOPHILISIERTER FORM

(57) Abstract: An immunoassay kit for the qualitative and quantitative determination of a sample by means of specific binding partners, such as, for example, antibodies, antigens, receptors and ligands comprises a support or microtitre plate with a number of recesses. Said support or microtitre plate is pre-coated with a primary binding partner and the binding partner is applied and fixed as a lyophilisate. In addition a reference standard series of the sample to be determined lies in a part of the recesses of the microtitre plate with incremental dilution in lyophilised form.

(57) Zusammenfassung: Ein Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden besteht aus einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt. In einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte liegt zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vor.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/AT 02/00112
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 GO1N33/543 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GO1N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	FR 2 814 239 A (BIOPEP SA SOC) 22 March 2002 (2002-03-22) abstract ----- A US 4 828 986 A (SMITH RICHARD S ET AL) 9 May 1989 (1989-05-09) *claims; col. 24, lines 23 - 31* ----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *C* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 January 2003	23/01/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2140, fax: 31 551 6011 Fax: (+31-70) 340-0916	Authorized officer Thiele, U	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 02/00112

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RESEARCH DIAGNOSTICS INC: "RECEPTOR-BASED VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A (VEGF-A) RELIDA" CAT#RDI-DA066, 'OnLine! 2001, pages 1-13, XP002226522 Pleasant Hill, Flanders NJ 07836 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.researchd.com/rdikits/da066.htm> *retrieved on 2002-12-10! *forth page, section headed "Kit materials"* -----	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/AT 02/00112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2814239	A	22-03-2002	FR 2814239 A1 22-03-2002
US 4828986	A	09-05-1989	AT 85435 T 15-02-1993
			AU 611096 B2 06-06-1991
			AU 7902887 A 31-03-1988
			CA 1285869 A1 09-07-1991
			DE 3783991 D1 18-03-1993
			DE 3783991 T2 09-06-1993
			DK 509287 A 30-03-1988
			EP 0262854 A2 06-04-1988
			ES 2053555 T3 01-08-1994
			FI 874253 A , B, 30-03-1988
			GR 3008027 T3 30-09-1993
			IE 60119 B1 01-06-1994
			IL 83938 A 15-12-1991
			JP 2656774 B2 24-09-1997
			JP 63277968 A 15-11-1988
			NO 874056 A , B, 30-03-1988
			NZ 221941 A 29-05-1989
			PT 85827 A , B 01-10-1987
			ZA 8706970 A 21-03-1988

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 02/00112

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Researchiererte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, A	FR 2 814 239 A (BIOPEP SA SOC) 22. März 2002 (2002-03-22) Zusammenfassung	
A	US 4 828 986 A (SMITH RICHARD S ET AL) 9. Mai 1989 (1989-05-09) *claims; col. 24, lines 23 - 31*	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht, als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
Datum des Abschusses der internationalen Recherche 15. Januar 2003		Abschussdatum des internationalen Researchenberichts 23/01/2003
Name und Postanschrift der internationalen Researchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5016 Patentaan 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040 Tlx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Thiele, U

Formblatt PCT/ISA219 (Seite 2) (A4) 1992

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen
PCT/AT 02/00112

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Ustracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	RESEARCH DIAGNOSTICS INC: "RECEPTOR-BASED VASCULAR ENDOTHELIAL GROTH FACTOR-A (VEGF-A) RELIDA" CAT#RDI-DA066, 'Online! 2001, Seiten 1-13, XP002226522 Pleasant Hill, Flanders NJ 07836 Gefunden im Internet: <URL:http://www.researchd.com/rdikits/da066.htm> 'gefunden am 2002-12-10! *forth page, section headed "Kit materials"*	

*Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1982)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internat. Aktenzeichen
 PCT/AT 02/00112

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2814239 A	22-03-2002	FR 2814239 A1	22-03-2002
US 4828986 A	09-05-1989	AT 85435 T	15-02-1993
		AU 611096 B2	06-06-1991
		AU 7902887 A	31-03-1988
		CA 1285869 A1	09-07-1991
		DE 3783991 D1	18-03-1993
		DE 3783991 T2	09-06-1993
		DK 509287 A	30-03-1988
		EP 0262854 A2	06-04-1988
		ES 2053555 T3	01-08-1994
		FI 874253 A ,B,	30-03-1988
		GR 3008027 T3	30-09-1993
		IE 60119 B1	01-06-1994
		IL 83938 A	15-12-1991
		JP 2656774 B2	24-09-1997
		JP 63277968 A	15-11-1988
		NO 874056 A ,B,	30-03-1988
		NZ 221941 A	29-05-1989
		PT 85827 A ,B	01-10-1987
		ZA 8706970 A	21-03-1988

 フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/531	B
	G 0 1 N 33/574	Z

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

专利名称(译)	定量冻干形式的单步免疫测定		
公开(公告)号	JP2004527758A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002588189	申请日	2002-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	医疗诊断系统有限责任公司		
[标]发明人	レツヘバイクセルブラウンイレーネ シャウデミハエル		
发明人	レツヘ-バイクセルブラウン,イレーネ シャウデ,ミハエル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/54353		
FI分类号	G01N33/543.501.Z G01N33/543.545.Z G01N33/53.F G01N33/53.Q G01N33/53.U G01N33/531.B G01N33/574.Z		
代理人(译)	酒井 一 ZOGO正弘		
优先权	2001000370 2001-05-10 AT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于通过利用特异性结合配偶体(例如抗体,抗原,受体和配体)定性和定量测定样品的免疫测定试剂盒,其包含具有多个孔的载体或微量滴定板1下一个合作伙伴重涂的试剂盒,包括作为冻干物的固定形式的结合配偶体。微量滴定板的一部分孔另外含有待测定的参考标准系列样品,其中稀释度增加,为冻干形式。

	標準キット		本発明の単一工程キット
1	抗体被覆したマイクロタイタープレート	1	標準シリーズ、試料希釈溶媒、コンジュゲート抗体を含む、抗体被覆マイクロタイタープレート
2	標準材料		
3	アッセイ緩衝液		
4	コンジュゲート抗体		
5	試料希釈溶媒		
6	洗浄緩衝液	2	洗浄緩衝液
7	基質溶液	3	基質溶液
8	停止溶液	4	停止溶液