

(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2004-510161

(P2004-510161A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/531 B	2 GO 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78 C	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 B	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/553	GO 1 N 33/543 5 1 5 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-530644 (P2002-530644)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成13年9月20日 (2001.9.20)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月24日 (2003.3.24)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/029390		アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
(87) 国際公開番号	W02002/027316		6050、アボット・パーク、アボット・
(87) 国際公開日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		パーク・ロード・100、チャド・037
(31) 優先権主張番号	09/669,082		7/エイ・ピー・6・ディー2
(32) 優先日	平成12年9月25日 (2000.9.25)	(74) 代理人	100062007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 義雄
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, JP	(74) 代理人	100105131
			弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 高分子ポリカチオンを用いることにより、特異的結合アッセイにおける血清または血漿含有アッセイ試料の干渉を減少させるための方法及びキット

(57) 【要約】

特異的結合アッセイ中のアッセイ試料へのポリカチオンの添加により、特異的結合アッセイの血漿又は血清含有アッセイ試料の中の、最適でない血液試料の試料取り扱いによる干渉及び誤差を減少させるための方法及びキットが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特異的結合アッセイ中に、血清又は血漿含有アッセイ試料に有効量の高分子ポリカチオンを添加することを含む、特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させる方法。

【請求項 2】

高分子ポリカチオンが 3,000 ダルトン以上の分子量を有している、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

高分子ポリカチオンが、ポリリシン、ポリオルニチン、ポリブレン、又は M E R Q U A T である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 4】

高分子ポリカチオンが、5,200 から 11,200 ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンを含む、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

高分子ポリカチオンが、8,800 ダルトンの分子量を有するポリリシンを含む、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

特異的結合アッセイが、甲状腺刺激ホルモン、遊離前立腺特異抗原、アルファ胎児タンパク、B 型肝炎コア抗体、B 型肝炎表面抗体、又はヒト免疫不全ウイルスを測定するものである、請求項 1 の方法。

20

【請求項 7】

特異的結合アッセイが固相上で実施される、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

固相が常磁性微粒子を含む、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイ中に、血清又は血漿含有アッセイ試料に高分子ポリカチオンを添加することを含む、甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させるための方法。

【請求項 10】

高分子ポリカチオンが 3,000 ダルトン以上の分子量を有している、請求項 9 の方法。

30

【請求項 11】

高分子ポリカチオンが、ポリリシン、ポリブレン、又は M E R Q U A T である、請求項 9 の方法。

【請求項 12】

高分子ポリカチオンが、5,200 から 11,200 ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンを含む、請求項 11 の方法。

【請求項 13】

高分子ポリカチオンが、8,800 ダルトンの分子量を有するポリリシンを含む、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

40

甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させるための方法であって、

a) 試料中に存在する甲状腺刺激ホルモンが、抗 β T S H 抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、抗 β T S H 抗体でコーティングされた常磁性微粒子及び高分子ポリカチオンを含むアッセイ希釈剤と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を、抗 α T S H 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること；

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；並びに

50

(d) 相対発光量 (relative light units) として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の甲状腺刺激ホルモンの量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む方法。

【請求項 15】

遊離型前立腺特異抗原特異的結合アッセイ中に、血清又は血漿含有アッセイ試料に高分子ポリカチオンを添加することを含む、遊離型前立腺特異抗原特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらず干渉を減少させるための方法。

【請求項 16】

高分子ポリカチオンがポリリシン又はポリオルニチンである、請求項 15 の方法。

10

【請求項 17】

遊離型前立腺特異抗原特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらず干渉を減少させる方法であって、

(a) 試料中に存在する遊離型 P S A が、抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、遊離型 P S A に特異的な抗体でコーティングされた常磁性微粒子と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を、抗 P S A 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること；

20

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；及び

(d) 相対発光量として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の前立腺特異抗原の量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む方法。

【請求項 18】

高分子ポリカチオンを含有している溶液を含む、血漿及び血清試料用の改良された特異的結合アッセイキット。

【請求項 19】

高分子ポリカチオンが 3,000 ダルトン以上の分子量を有している、請求項 18 の改良された特異的結合アッセイキット。

【請求項 20】

30

高分子ポリカチオンが、ポリリシン、ポリブレン、又は M E R Q U A T である、請求項 15 の改良された特異的結合アッセイキット。

【請求項 21】

特異的結合アッセイが、甲状腺刺激ホルモン、遊離型前立腺特異抗原、アルファ胎児タンパク、B 型肝炎コア抗体、B 型肝炎表面抗体、又はヒト免疫不全ウイルスを測定するものである、請求項 18 の改良された特異的結合アッセイキット。

【請求項 22】

(a) マウスモノクローナル抗 β T S H でコーティングされた微粒子と；

(b) マウスモノクローナル抗 α T S H アクリジニウム標識コンジュゲートと；

(c) 高分子ポリカチオンを含む修飾された T S H アッセイ希釈剤とを含む、甲状腺刺激ホルモンの検出用の改良されたキット。

40

【請求項 23】

高分子ポリカチオンが 5,200 ~ 11,200 ダルトンの分子量を有するポリリシンである、請求項 19 のキット。

【請求項 24】

(a) 高分子ポリカチオンを含む希釈剤の中に存在する、マウスモノクローナル抗遊離型 P S A でコーティングされた微粒子と；

(b) マウスモノクローナル抗 P S A アクリジニウム標識コンジュゲートとを含む、遊離型前立腺特異抗原の検出用の改良されたキット。

【請求項 25】

50

高分子ポリカチオンがポリリシン又はポリオルニチンである、請求項 24 のキット。

【請求項 26】

総前立腺特異抗原特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させる方法であって、

(a) 試料中に存在する P S A が、抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、遊離型 P S A 及び結合型 P S A の両方と結合する抗体でコーティングされた常磁性微粒子と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を、抗 P S A 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること； 10

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；並びに

(d) 相対発光量として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の前立腺特異抗原の量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の領域)

本発明は、アッセイ中に比較的高分子のポリカチオンがアッセイ試料に添加される、血漿又は血清試料を用いた特異的結合アッセイを実施するための改良された方法に関する。本発明は、キットの成分として高分子ポリカチオン含有溶液を含む、血漿又は血清試料用の改良された特異的結合アッセイキットにも関する。 20

【0002】

(発明の背景)

ポリカチオンとは、有機又は無機の、合成又は天然の、少なくとも二価の正の電荷を有する化合物である。比較的高分子のポリカチオンの例には、これらに制限されないが、ポリリシン、ポリエチレンイミン及びポリプロピレンイミン並びにポリブレンのようなそれらの低級アルキルアンモニウム塩、並びに M E R Q U A T が含まれる。

【0003】

ポリリシン、ポリアルギニン、及びポリヒスチジンのようなポリカチオンは、酵素阻害剤として、原形質膜の単離、染色体調製、マイクロカプセル作製、徐放性送達装置における基質として、そして薬物送達装置として使用するため、市販されている。ポリ L - リジンは、免疫原の合成における担体タンパク質としても使用され、ポリ D - リジンは、固定化抗原酵素免疫吸着アッセイ (E L I S A) における担体タンパク質として使用されている。ポリ (N - エチル - 4 - ビニルピリジニウム) のようなポリカチオンは、ポリ (メタクリレート) のようなポリアニオンと合わせて、E L I S A (Y a z y n i n a ら、A n a l y t i c a l C h e m i s t r y 1999 71 (16) : 3538 - 43) 及び視覚的酵素イムノアッセイ (D z a n t i e v ら、I m m u n o l o g y L e t t e r s 1994 41 (2 - 3) : 205 - 11) の両方における反応体の担体としても使用されている。 30

【0004】

磁性粒子への物質の非特異的結合の開始において使用するための、ポリカチオンを含むポリイオン試薬が、開示されている。例えば、米国特許第 4,935,147 号、第 5,076,950 号、第 5,279,936 号、及び第 5,770,388 号は、物質と磁性粒子との非特異的結合を形成させるための化学的手段として使用するための、ポリエチレンイミン及びポリプロピルエチレンイミン並びにポリブレン (N (C H ₃)₂ C H ₂ C H ₂ N (C H ₃)₂ C H ₂ C H ₂ C H ₂ C H ₂ C H ₂ -)_n) のようなそれらの低級アルキルアンモニウム塩のようなポリアルキレンアミン、カルシウムイオン及びバリウムイオンのような金属イオン、アミノデキストラン、プロタミン、正の電荷を有するリボソーム、ポリリシン等を含む例示的なポリカチオン試薬のリストを開示している。 40

【0005】

ポリカチオンは、全血試料のイムノアッセイのための分離技術においても有用であることが教示されている。WO 99 36781は、血清又は血漿をクロマトグラフィーカラムを通過させる前に、血清又は血漿に由来する試料の中の赤血球を分離するクロマトグラフィーアッセイ装置を開示している。この装置において使用される赤血球分離剤は、好ましくは、ポリL-リジン臭化水素酸塩、ポリL-アルギニン塩酸塩、ポリL-ヒスチジン、ポリ(リジン・アラニン)3:1臭化水素酸塩、ポリ(リジン・アルギニン)2:1臭化水素酸塩、ポリ(リジン・アラニン)1:1臭化水素酸塩、ポリ(リジン・トリプトファン)1:4臭化水素酸塩、又は具体的にはポリ(ジアリールジメチルアンモニウムクロリド)を含むポリカチオンである。しかしながら、ポリカチオンのような分離剤のアッセイ系への直接的な添加は、しばしば赤血球以外の試薬及び結合メンバーも凝集させることにより、系に干渉することが教示されている。 10

【0006】

従って、本発明の目的は、特異的結合アッセイの血漿又は血清含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させるための方法を提供することである。その方法は、特異的結合アッセイ中に、血漿又は血清含有アッセイ試料に高分子ポリカチオンを添加することを含む。

【0007】

本発明のもう一つの目的は、キットの成分として高分子ポリカチオン含有溶液を含む、血漿及び血清含有アッセイ試料用の改良された特異的結合アッセイキットを提供することである。 20

【0008】

(発明の概要)

本発明は、特異的結合アッセイ中に血清又は血漿含有アッセイ試料に有効量の高分子ポリカチオンを添加することを含む、特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させる方法を提供する。好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、3,000ダルトン以上の分子量を有している。もう一つの好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、ポリリシン、ポリオルニチン、ポリブレン、又はMERQUATである。より好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、5,200から11,200ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンを含む。もう一つのより好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、8,800ダルトンの分子量を有するポリリシンを含む。もう一つの好ましい実施形態において、特異的結合アッセイは、常磁性微粒子のような固相の上で実施される。他の実施形態において、特異的結合アッセイは、甲状腺刺激ホルモン、遊離型前立腺特異抗原(PSA)、アルファ胎児タンパク、B型肝炎コア抗体、B型肝炎表面抗体、又はヒト免疫不全ウイルスを測定するものである。 30

【0009】

本発明は、甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイ中に血清又は血漿含有アッセイ試料に高分子ポリカチオンを添加することを含む、甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させるための方法も提供する。好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、3,000ダルトン以上の分子量を有している。もう一つの好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、ポリリシン、ポリオルニチン、ポリブレン、又はMERQUATである。より好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、5,200から11,200ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンを含む。もう一つのより好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、8,800ダルトンの分子量を有するポリリシンを含む。もう一つの好ましい実施形態において、特異的結合アッセイは、常磁性微粒子のような固相の上で実施される。最も好ましい実施形態において、甲状腺刺激ホルモン特異的結合アッセイは、 40

a) 試料中に存在する甲状腺刺激ホルモンが、抗 β TSH抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、抗 β 50

T S H 抗体でコーティングされた常磁性微粒子及び高分子ポリカチオンを含むアッセイ希釈剤と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を抗 α T S H 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること；

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；並びに

(d) 相対発光量として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の甲状腺刺激ホルモンの量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明は、遊離型前立腺特異抗原又は総前立腺特異抗原の特異的結合アッセイ中に血清又は血漿含有アッセイ試料に高分子ポリカチオンを添加することを含む、遊離型前立腺特異抗原又は総前立腺特異抗原の特異的結合アッセイの血清又は血漿含有アッセイ試料の中の不正確な読み取りをもたらす干渉を減少させる方法も提供する。好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、ポリリシン又はポリオルニチンである。もう一つの好ましい実施形態において、遊離型前立腺特異抗原 (P S A) 特異的結合アッセイは、

(a) 試料中に存在する遊離型 P S A が、抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、遊離型 P S A に特異的な抗体でコーティングされた常磁性微粒子と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を、抗 P S A 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること；

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；及び

(d) 相対発光量として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の前立腺特異抗原の量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む。

もう一つの好ましい実施形態において、総 P S A 特異的結合アッセイは、

(a) 試料中に存在する P S A が、抗体でコーティングされた微粒子と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、血清又は血漿試料を、遊離型 P S A 及び結合型 P S A の両方と結合する抗体でコーティングされた常磁性微粒子と共にインキュベートすることにより、第一の複合体を形成させること；

(b) コンジュゲートが第一の複合体と結合することを可能にする時間、そのような条件の下で、第一の複合体を、抗 P S A 抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートと共にインキュベートすることにより、第二の複合体を形成させること；

(c) 第二の複合体において化学発光反応を発生させること；並びに

(d) 相対発光量として化学発光反応を測定すること [ここで、血漿又は血清試料中の前立腺特異抗原の量は、測定された相対発光量と直接関係している] を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明は、高分子ポリカチオン含有溶液を含む、血漿及び血清試料用の改良された特異的結合アッセイキットも提供する。好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、3, 0 0 0 ダルトン以上の分子量を有している。もう一つの好ましい実施形態において、高分子ポリカチオンは、ポリリシン、ポリオルニチン、ポリブレン、又は M E R Q U A T である。より好ましい実施形態において、改良された特異的結合アッセイキットは、甲状腺刺激ホルモン、遊離型前立腺特異抗原、アルファ胎児タンパク、B 型肝炎コア抗体、B 型肝炎表面抗体、又はヒト免疫不全ウイルスを測定する特異的結合アッセイを含む。

【 0 0 1 2 】

本発明は、

(a) マウスモノクローナル抗 β T S H でコーティングされた微粒子と；

(b) マウスモノクローナル抗 α T S H アクリジニウム標識コンジュゲートと；

(c) 高分子ポリカチオンを含む修飾された T S H アッセイ希釈剤とを含む、甲状腺刺激ホルモンの検出用の改良されたキットも提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明は、

(a) 高分子ポリカチオンを含む希釈剤の中に存在する、遊離型 P S A に特異的なモノクローナル抗体を含む微粒子と；

(b) マウスモノクローナル抗 P S A アクリジニウム標識コンジュゲートとを含む、遊離型前立腺特異抗原の検出用の改良されたキットも提供する。好ましくは、高分子ポリカチオンは、ポリリシン又はポリオルニチンである。

【 0 0 1 4 】

(発明の詳細な説明)

これらに限定はされないが、不適切な遠心分離、不完全な凝固時間、及び熱ストレスの曝露を含む、最適でない血清又は血漿試料の調製技術は、特異的結合アッセイにおける不正確な読み取りをもたらす血漿又は血清含有アッセイ試料中の干渉を引き起こすことが見出されている。特異的結合アッセイ中の血漿又は血清含有アッセイ試料への高分子ポリカチオンの添加は、正確な読み取りが得られるよう、これらの干渉を減少させるか、又は排除することが、本発明において見出された。

【 0 0 1 5 】

本発明の目的のため、「高分子」ポリカチオンとは、およそ 3 , 0 0 0 ダルトン以上の分子量を有するポリカチオンを意味する。本発明において有用な高分子ポリカチオンの例には、これらに限定はされないが、5 , 2 0 0 から 1 1 , 2 0 0 の範囲の分子量を有するポリリシン、5 3 0 0 の分子量を有するポリオルニチン、およそ 4 , 0 0 0 から 6 , 0 0 0 ダルトンの範囲の分子量を有するポリブレン、及びおよそ 4 , 0 0 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する M E R Q U A T が含まれる。ポリカチオンは、別個の試薬としてイムノアッセイ中に添加されうる。または、ポリカチオンは、アッセイ特異的希釈剤に組み込まれうる。

【 0 0 1 6 】

アッセイにおいて使用されるポリカチオンの量は、型及びその分子量に依存して変動する。しかしながら、一般に、使用される量は、(感度、特異性等のような) 他のアッセイパラメーターに有害な影響を与えることなく、所望の結果、即ち干渉の排除を達成するために有効な量である。例えば、ポリリシン、ポリオルニチン、ポリアルギニン、及びポリヒスチジンのようなポリカチオンは、約 0 . 0 0 5 から約 1 重量 / 容量 (w t / v o l) % の範囲の最終濃度で使用されうる。より好ましくは、約 0 . 0 1 から約 0 . 5 w t / v o l % の範囲のポリリシンが使用される。さらに好ましくは、約 0 . 1 から約 0 . 5 w t / v o l % の範囲のポリリシンが使用される。8 , 8 0 0 ダルトンの分子量を有するポリリシンの場合、約 0 . 2 5 % の濃度が好ましい。ポリブレンの場合、約 0 . 2 から 1 w t / v o l % の範囲の濃度が好ましい。M E R Q U A T の場合、約 0 . 1 5 から約 0 . 3 0 % の範囲の濃度が好ましい。

【 0 0 1 7 】

より高濃度のポリカチオンも、試料中の干渉を減少させるために有効であるかもしれないが、いくつかのポリカチオンの添加に起因するより高い粘性は、特にハイスループット自動特異的結合アッセイ系において、キャリーオーバーを引き起こしうると考えられる。しかしながら、当業者であれば、特定のアッセイに適した適切な濃度を容易に決定することができよう。

【 0 0 1 8 】

本発明のポリカチオンは、これらに限定はされないが、サンドイッチ型及び競合型のイムノアッセイを含む、血清又は血漿試料中の (抗原又は抗体のような) 分析物の存在を試験する任意の型の特異的結合アッセイにおいて使用されうる。そのようなイムノアッセイは、ポリクローナル又はモノクローナルの抗体、(F a b ' 2 断片のような) 該抗体の断片、又はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及び抗体断片の組み合わせを含む試薬を利用しうる。典型的には、そのようなアッセイにおいては、(標識された抗原又は抗体のような) 標識された試薬が、目的の分析物の検出及び / 又は定量のため使用される。そ

のような標識には、これらに限定はされないが、酵素標識、蛍光標識、化学発光標識、及び放射標識が含まれる。全ての型のイムノアッセイを作製し、使用する様式、並びにそのようなアッセイにおいて使用される試薬及び/又は標識された試薬は、当業者に周知である。

【0019】

本発明の一つの実施形態は、血清又は血漿試料中のTSHを測定するための改良された特異的結合アッセイに関する。好ましい実施形態において、TSH特異的結合アッセイは、アッセイ中に、即ち試料の固相とのインキュベーションの前又は途中に、およそ3,000ダルトン以上の分子量を有する高分子ポリカチオンがアッセイ試料に添加される、修飾されたARCHITECT TSHアッセイフォーマット(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60035-6050)を含む。この実施形態において、ポリカチオンは、5,200~11,200ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンであることが好ましく、およそ8,800ダルトンの分子量を有するポリリシンが好ましい。血漿又は血清試料及びTSH抗体と組み合わされるTSHアッセイ希釈剤にポリカチオンが組み込まれることも、好ましい。TSHアッセイにおけるポリリシンの好ましい濃度範囲は、約0.1から約1wt/vol%の範囲であり、0.25wt/vol%が最も好ましい。

10

【0020】

本発明のもう一つの実施形態は、この修飾されたARCHITECT TSHアッセイを実施するための改良されたキットに関する。本発明のキットは、緩衝液、好ましくはTRIS緩衝液、さらに好ましくはタンパク質(ウシ)安定化剤及び保存剤としての抗微生物剤を含むものの存在する、抗 β TSH(マウスモノクローナル)でコーティングされた微粒子、好ましくはタンパク質(ウシ)安定化剤及び保存剤としての抗微生物剤を含むMES(2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)緩衝液の中に存在する、抗 α TSHモノクローナル抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲート、並びにポリカチオン、好ましくは5,200から11,200ダルトンの分子量範囲のポリリシンを約0.1から約0.5wt/vol%の範囲の濃度で含有している緩衝液、好ましくはTRISを含む、修飾されたTSHアッセイ希釈剤を、少なくとも含む。この希釈剤は、保存剤として抗微生物剤を含んでいることが好ましい。または、ポリカチオンは、TSHアッセイ希釈剤と共にアッセイ試料へ添加するための、別個のキット成分として提供されてもよい。本発明のこの実施形態のキットは、保存剤として抗微生物剤を含むリン酸緩衝生理食塩溶液を含有しているマルチアッセイマニュアルディリュエント(Multi-Assay Manual Diluent); 1.32%(w/v)過酸化水素を含有しているプレトリガー(Pre-Trigger)溶液; 0.35N水酸化ナトリウムを含有しているトリガー(Trigger)溶液; 並びにリン酸緩衝生理食塩溶液及び抗微生物剤保存剤を含有している洗浄緩衝液を含みうる。

20

30

【0021】

本発明の第二の好ましい実施形態は、血清又は血漿試料中の遊離型前立腺特異抗原(PSA)又は総PSAの測定のための、改良された特異的結合アッセイに関する。最も好ましい実施形態において、PSA特異的結合アッセイは、アッセイ試料と共に、即ち試料の固相とのインキュベーションの前又は途中に、およそ3,000ダルトン以上の分子量を有する高分子ポリカチオンがアッセイに添加される、修飾されたARCHITECT総PSA又は遊離型PSAアッセイフォーマット(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60035-6050)を含む。

40

【0022】

この実施形態において、ポリカチオンは、5,200から11,200ダルトンの範囲の分子量を有するポリリシンであることが好ましい。血漿又は血清試料と組み合わされる、抗PSAでコーティングされた微粒子の希釈剤(以後、「微粒子希釈剤」)に、ポリカチオンが組み込まれることも、好ましい。総PSAアッセイにおけるポリリシンの好ましい濃度範囲は、約0.005から約1wt/vol%であり、0.005wt/vol%が

50

最も好ましい。遊離型 P S A アッセイにおけるポリリシンの好ましい濃度範囲は、約 0 . 0 1 から約 1 w t / v o l % であり、0 . 0 1 w t / v o l % が最も好ましい。

【 0 0 2 3 】

本発明のもう一つの実施形態は、修飾された A R C H I T E C T 総前立腺特異抗原 (P S A) 又は遊離型 P S A アッセイを実施するための、改良されたキットに関する。本発明のキットは、ポリカチオンも含有している希釈剤の中に存在する、抗 P S A モノクローナル抗体 (遊離型 P S A アッセイの場合には遊離型 P S A に特異的なもの、総 P S A アッセイの場合には、遊離型 P S A 及び結合型 P S A の両方と結合するもの) でコーティングされた微粒子を含む。キットは、抗 P S A モノクローナル抗体を含むアクリジニウム標識コンジュゲートも含む。好ましくは、ポリカチオンは、約 0 . 0 0 5 から 0 . 5 w t / v o l % の範囲の濃度の、約 5 , 2 0 0 から約 1 1 , 2 0 0 ダルトンの分子量範囲のポリリシンである。微粒子希釈剤の緩衝液は、好ましくは T R I S 緩衝液であり、さらに好ましくは、タンパク質 (ウシ) 安定化剤及び保存剤としての抗微生物剤を含有している。アクリジニウム標識コンジュゲートは、好ましくは、タンパク質 (ウシ) 安定化剤及び保存剤としての抗微生物剤を含有している M E S (2 - [N - モルホリノ] エタンスルホン酸) 緩衝液の中に存在する。又は、ポリカチオンは、P S A 微粒子希釈剤と共にアッセイ試料へ添加するための別個のキット成分として提供されてもよい。本発明のこの実施形態のキットは、1 . 3 2 % (w / v) 過酸化水素を含有しているプレトリガー溶液、0 . 3 5 N 水酸化ナトリウムを含有しているトリガー溶液、並びにリン酸緩衝生理食塩溶液及び抗微生物剤保存剤を含有している洗浄緩衝液も含みうる。

10

20

【 0 0 2 4 】

最適に取り扱われなかった血漿及び血清試料の再遠心分離は、アルファ胎児タンパク (A F P) 、 B 型肝炎コア抗体 (H B c A b) 、 B 型肝炎表面抗体 (H B s A b) 、及びヒト免疫不全ウイルス (H I V) の特異的結合アッセイにおいても、干渉を減少させ、試料測定感度及び精度を回復させるために有効であることが証明された。従って、これらの分析物の特異的結合アッセイの実施中の、血漿又は血清含有アッセイ試料への高分子ポリカチオンの添加も、最適でない試料調製による干渉を減少させるために有用であろうと考えられる。

【 0 0 2 5 】

以下の非制限的な実施例は、本発明をさらに例示するために提供される。

30

【 0 0 2 6 】

実施例

実施例 1 : 汚染された血漿又は血清試料の調製

1 人の有志者より、S S T ヴァキュエーター (V a c u t a i n e r) チューブとも呼ばれる 4 本の血清分離チューブ (B e c t o n D i c k i n s o n , N u m b e r 3 6 6 5 1 0) 及び 6 本のエチレンジアミン四酢酸 (E D T A) ヴァキュエーターチューブ (B e c t o n D i c k i n s o n , N u m b e r 3 6 6 4 5 7) へと血液を採取した。血液を 3 0 分間凝固させ、次いで、3 , 5 0 0 R P M で 1 0 分間、遠心分離機でスピンドした。4 本の S S T チューブより血清を回収した。6 本の E D T A チューブより血清を回収した。次いで、血漿の一部を、E D T A チューブからのパフィーコート (赤血球を含む) 6 0 マイクロリットルの添加によって汚染した。

40

【 0 0 2 7 】

実施例 2 : A R C H I T E C T T S H アッセイにおけるポリカチオンの効果 a . 一般的な手順 : A R C H I T E C T T S H アッセイ (A b b o t t L a b o r a t o r i e s , A b b o t t P a r k , I L 6 0 0 3 5 - 6 0 5 0) は、C H E M I F L E X と呼ばれる、フレキシブルなアッセイプロトコルを有する化学発光微粒子イムノアッセイ (C h e m i l u m i n e s c e n t M i c r o p a t i c l e I m m u n o a s s a y) (C M I A) 技術を使用して、ヒトの血清及び血漿の中の甲状腺刺激ホルモン (T S H) の存在を決定する二段階イムノアッセイである。第一段階において、血清又は血漿試料と、抗 β T S H 抗体でコーティングされた常磁性微粒子と、T S H アッセイディリュ

50

ーエント (Assay Diluent) とが組み合わせられる (TSH アッセイディリユーエントは、0.5 M TRIS HCl、1.5 M TRIS 塩基、1.3 M NaCl、0.2 % の抗微生物剤 NIPASEPT (Nipa Laboratories Ltd., Wilmington DE) 及び抗微生物剤 A56620 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を pH 8.8 で含有している)。試料中に存在する TSH は、抗 TSH 抗体でコーティングされた微粒子と結合する。洗浄後、第二段階として、抗 α TSH アクリジニウム標識コンジュゲートが添加される。次いで、それぞれ過酸化水素及び水酸化ナトリウムを含むプレトリガー溶液及びトリガー溶液と呼ばれる 2 つの溶液が、反応混合物に添加され、得られた化学発光反応が相対発光量 (RLU) として測定される。血漿又は血清試料中の TSH の量と、ARCHITECT / 光学系によって検出される RLU との間には直接的な関係が存在する。

10

【0028】

b. 実験の設計：アッセイの感度に干渉する赤血球で故意に血清及び血漿試料を汚染する実験を設計した (実施例 1 を参照)。次いで、別々の実験において、TSH アッセイの第一段階において、ポリカチオン、即ちポリリシン、ポリブレン、又は MERQUAT を TSH アッセイディリユーエントに添加し、血清又は血漿試料 (150 μ L) 及び抗 β TSH 抗体でコーティングされた常磁性微粒子 (0.1 % 固体 50 μ L) と組み合わせた。次いで、前記の一般的な手順に記載されたようにして、アッセイを完了した。

【0029】

c. 結果：表 1 が示すように、5, 200、8, 800、及び 11, 200 の平均分子量を有するポリリシンは、0.25 % の濃度で、汚染された試料の中の干渉を排除するのに有効であることが見出された。

20

【0030】

【表 1】

表 1

ポリシンの型	遠心分離後試料の TSH(uIU/mL)	未遠心分離試料の TSH(uIU/mL)	差(%)
ポリシンなし	1.6654	0.1679	90
5200MW	1.9545	1.9441	1
8800MW	1.9665	1.9564	1
11,200MW	1.9939	1.9132	4

30

【0031】

4, 000 から 6, 000 ダルトンの分子量を有するポリブレンを、様々な濃度で、調査した。0.2 から 1 wt / vol % の範囲の濃度のポリブレンは、TSH アッセイの機能的感度の干渉又は改変を示すことなく、汚染された血漿又は血清試料のアッセイ感度を回復させるのに有効であることが見出された。

約 4, 000, 000 ダルトンの分子量を有するポリカチオン MERQUAT - 100 も、TSH アッセイディリユーエント中 0.15 % 又は 0.30 % のいずれかの濃度で、アッセイの全体的な機能に干渉することなく、汚染された試料のアッセイ感度を回復させた。

40

【0032】

実施例 3：ARCHITECT 遊離型 PSA アッセイにおけるポリカチオンの効果
アッセイ試料へのポリカチオンの添加は、ARCHITECT 遊離型前立腺特異抗原 (PSA) アッセイにおいても、最適でない血漿又は血清試料の取り扱いに起因する干渉を減少させるのに有効であることが証明された。

【0033】

a. 一般的な手順：ARCHITECT 遊離型 PSA アッセイは、化学発光微粒子イムノ

50

アッセイ (C M I A) 技術を使用して、ヒト血清中の遊離型 P S A の存在を決定する二段階イムノアッセイである。第一段階において、被検試料と、遊離型 P S A に特異的なモノクローナル抗体でコーティングされた常磁性微粒子とが組み合わされる。試料中に存在する遊離型 P S A は、抗遊離型 P S A でコーティングされた微粒子と結合する。洗浄後、第二段階として、抗 P S A アクリジニウム標識コンジュゲートが添加される。次いで、プレトリガー溶液及びトリガー溶液が反応混合物に添加され；得られた化学発光反応が R L U として測定される。試料中の遊離型 P S A の量と、A R C H I T E C T / 光学系によって検出される R L U との間には、直接的な関係が存在する。T S H アッセイと同様に、血清試料の最適でない調製は、蛍光の測定の干渉をもたらし、結果的に試料中の遊離型 P S A のレベルの不正確な読み取りをもたらす。

10

【 0 0 3 4 】

b . 実験の設計：これらの実験においては、微粒子希釈剤中のデキストラン硫酸を、ポリカチオン、特にポリアミノ酸へと置換した。次いで、前記の一般的な手順に記載されているようにして、アッセイを実施した。

c . 結果：表 2 に示されるように、ポリリシン (5 , 2 0 0 ~ 1 1 , 2 0 0 ダルトンの範囲) 及びポリオルニチン (5 , 3 0 0 ダルトン) の両方が、0 . 0 2 5 % の濃度で、遊離型 P S A アッセイの高い機能的感度の干渉又は改変を示すことなく、粗雑な試料調製によって引き起こされる遊離型 P S A 測定における干渉を減少させるのに有効であった。

【 0 0 3 5 】

【 表 2 】

20

表 2
遊離型 PSA 濃度 (ng/mL)

試料番号	デキストラン硫酸	ポリ-L-リジン	ポリ-L-オルニチン	ポリ-L-アルギニン	ポリ-L-ヒスチジン
30(スピノ後)*	0.699	0.703	0.697	0.528	0.558
30(未スピノ)	0.000	0.666	0.632	0.528	0.511
干渉率(%)**	100%	5%	9%	0%	8%
31(スピノ後)*	0.617	0.661	0.660	0.462	0.466
31(未スピノ)	0.000	0.614	0.585	0.459	0.441
干渉率(%)**	100%	7%	11%	0%	5%

30

* 「未スピノ」という用語は、前記の遊離型 PSA アッセイにおいて直接試験された、不適切に調製された血清又は血漿試料をさす。「スピノ後」という用語は、試験の前に再遠心分離された同一試料をさす。

** 干渉率(%)=(スピノ後試料からの遊離型 PSA 濃度-未スピノ試料からの遊離型 PSA 濃度)/
(スピノ後試料からの遊離型 PSA 濃度)×100
0.025%の濃度のポリリジン(分子量 13,200 ダルトン)又はポリアルギニン(分子量 8,500 ダルトン)のいずれかの添加も、干渉を減少させたが、これらの濃度は、アッセイ感度に干渉した。しかしながら、より低濃度のこれらのポリアミノ酸は、アッセイ感度に影響を与えることなく、干渉を排除するのに有効であるかもしれない。

40

【 0 0 3 6 】

実施例 4 : A R C H I T E C T 総 P S A アッセイにおけるポリカチオンの効果 A R C H I T E C T 総 P S A アッセイの一般的な手順は、遊離型 P S A 及び結合型 P S A の両方と結合する抗体で常磁性微粒子をコーティングすることを除き、前記実施例 3 の遊離型 P S A アッセイの場合と本質的に同様である。デキストラン硫酸 (0 . 0 5 % の濃度) 、又は 0 . 0 0 5 % の濃度の平均分子量 5 2 0 0 もしくは 1 1 , 2 0 0 のポリ L - リジン (デキストラン硫酸の代わり) を含有している微粒子希釈剤を利用した総 P S A アッセイに、未スピノ試料を供する実験を実施した。表 3 に示されている結果は、異なる平均分子量のポ

50

リ L - リジンが、総 P S A アッセイの高い機能的感度の干渉又は改変を示すことなく、未スピン試料における総 P S A 測定の干渉を減少させるのに有効であることを証明している。

【 0 0 3 7 】

【 表 3 】

表 3
未スピン試料の総 PSA 値 (ng/mL)

試料 番号	デキストラン 硫酸	干渉率 (%)	ポリ-L- リジン 5200MW	干渉率 (%)	ポリ-L- リジン 11200MW	干渉率 (%)	ポリ-L- リジン なし	干渉率 (%)
55	4.070	-62	10.707	-6	10.806	-8	7.724	-27
56	6.663	-33	10.329	-1	10.357	-2	8.922	-8
71	0.083	-99	13.431	-4	14.695	0	1.398	-90
72	0.483	-97	14.797	-8	15.025	-10	5.996	-61
73	0.057	-99	9.983	-8	10.353	-8	1.149	-89
74	0.099	-99	12.483	-1	13.414	4	2.573	-79
75	0.389	-97	14.658	-7	15.211	-6	8.892	-40
76	5.681	-52	12.158	-7	12.518	-5	9.665	-17
平均 干渉率		-80		-5		-4		-51

10

20

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/27316 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53** **LACH, Agnieszka**; 915 North Racine, Unit 1SW, Chicago, IL 60022 (US). **PESTEL, Cynthia, D.**; 131 South Luther Avenue, Lombard, IL 60148 (US). **RAMP, John, M.**; 462 Pine Grove Street, Gurnee, IL 60031 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/29390
- (22) International Filing Date:
20 September 2001 (20.09.2001) (74) Agents: CASUTO, Dianne et al.; Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, D377 AP6D/2, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English (81) Designated States (national): CA, JP.
- (30) Priority Data:
09/669,082 25 September 2000 (25.09.2000) US (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Applicant: **ABBOTT LABORATORIES** [US/US];
D377 AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US). **Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (72) Inventors: **SCOPP, Richard, L.**; 4803-68th Street, Kenosha, WI 53142 (US). **FINLEY, David, M.**; 2414-S. Hidden Trail, Spring Grove, IL 60081 (US). **TRIMPE, Kevin, L.**; 501 Majestic Court, Gurnee, IL 60031 (US). *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/27316 A2

(54) Title: METHODS AND KITS FOR DECREASING INTERFERENCES IN PLASMA OR SERUM CONTAINING ASSAY
SAMPLES OF SPECIFIC BINDING ASSAYS

(57) Abstract: Methods and kits are provided for decreasing interferences and inaccuracies due to nonoptimal sample handling of blood samples in plasma or serum containing assay samples of specific binding assays by addition of a large polycation to the assay sample during the specific binding assay.

WO 02/27316

PCT/US01/29390

METHODS AND KITS FOR DECREASING INTERFERENCES IN PLASMA OR SERUM CONTAINING ASSAY SAMPLES OF SPECIFIC BINDING ASSAYS**Field of the Invention**

The present invention relates to an improved method for performing specific binding assays with plasma or serum samples wherein a relatively large polycation is added to the assay sample during the assay. The present invention also relates to improved specific binding assay kits for plasma or serum samples which comprise as one component of the kit a solution containing a large polycation.

Background of the Invention

Polycations are organic or inorganic, synthetic or naturally occurring, compounds having at least two positive charges. Examples of relatively large polycations include, but are not limited to, polylysine, polyethyleneimine and polypropyleneimine and their lower alkyl ammonium salts such as polybrene, and MERQUAT.

Polycations such as polylysine, polyarginine and polyhistidine are commercially available for use as enzyme inhibitors, as substrates in the isolation of plasma membranes, in chromosomal preparations, in microencapsulation, in sustained release delivery devices, and as drug delivery devices. Poly-L-lysine is also used as a carrier protein in the synthesis of immunogens, while poly-D-lysine is used as a carrier protein in immobilized antigen enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs). Polycations such as poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium have also been used, in conjunction with polyanions such as poly(methacrylate), as carriers for reactants in both ELISAs (Yazynina et al. Analytical Chemistry 1999 71(16):3538-43) and visual enzyme immunoassays (Dzantiev et al. Immunology Letters 1994 41(2-3):205-11).

Polyionic reagents including polycations have been disclosed for use in initiating non-specific binding of a substance to magnetic particles. For example, U.S. Patents 4,935,147, 5,076,950, 5,279,936 and 5,770,388 disclose a list of exemplary polycationic reagents including polyalkylene amines such as polyethyleneimine and polypropyleneimine

WO 02/27316

PCT/US01/29390

and their lower alkyl ammonium salts such as polybrene $(N(CH_3)_2CH_2CH_2N(CH_3)_2CH_2CH_2CH_2CH_2-)_n$, metal ions such as calcium and barium ions, aminodextrans, protamine, positively charged liposomes, polylysine, and the like for use as a chemical means for forming non-specific bonds between the substance and magnetic particles.

Polycations have also been taught to be useful in separation techniques for immunoassay of whole blood samples. WO 9936781 discloses a chromatography assay device which separates red blood cells in a sample from serum or plasma prior to movement of the serum or plasma down the chromatography column. The red blood cell separating agent used in this device is preferably a polycation comprising poly-L-lysine hydrobromide, poly-L-arginine hydrochloride, poly-L-histidine, poly(lysine, alanine) 3:1 hydrobromide, poly(lysine, arginine) 2:1 hydrobromide, poly(lysine, alanine) 1:1 hydrobromide, poly(lysine, tryptophan) 1:4 hydrobromide or particularly poly(diallyldimethylammonium chloride). However, addition of a separating agent such as a polycation directly to the assay system is taught to interfere with the system, often by aggregating other reagents and binding members in addition to the red blood cells.

Accordingly, an object of the present invention is to provide a method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in plasma or serum containing assay samples of specific binding assays. The method comprises adding a large polycation to the plasma or serum containing assay sample during the specific binding assay.

Another object of the present invention is to provide improved specific binding assay kits for plasma and serum containing assay samples which comprise as one component of the kit a solution containing a large polycation.

Summary of the Invention

The present invention provides a method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of specific binding assays comprising adding an effective amount of a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the specific binding assay. In a preferred embodiment, the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater. In another preferred embodiment, the large polycation is a polylysine, polyornithine, polybrene or MERQUAT.

WO 02/27316

PCT/US01/29390

In a more preferred embodiment, the large polycation comprises a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons. In another more preferred embodiment, the large polycation comprises polylysine with a molecular weight of 8,800 daltons. In another preferred embodiment, the specific binding assay is performed on a solid phase, such as paramagnetic microparticles. In other embodiments, the specific binding assay measures thyroid stimulating hormone, free prostate specific antigen (PSA), alpha fetal protein, hepatitis B core antibody, hepatitis B surface antibody or human immunodeficiency virus.

The invention also provides a method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a thyroid stimulating hormone specific binding assay comprising adding a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the thyroid stimulating hormone specific binding assay. In a preferred embodiment, the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater. In another preferred embodiment, the large polycation is a polylysine, polyornithine, polybrene or MERQUAT. In a more preferred embodiment, the large polycation comprises a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons. In another more preferred embodiment, the large polycation comprises polylysine with a molecular weight of 8,800 daltons. In another preferred embodiment, the specific binding assay is performed on a solid phase, such as paramagnetic microparticles. In a most preferred embodiment, the thyroid stimulating hormone specific binding assay comprises:

- a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with anti- β TSH antibody and an assay diluent which comprises a large polycation, for a time and under conditions which allow the thyroid stimulating hormone present in the sample to bind to the anti- β TSH antibody coated microparticles;
- (b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti- α TSH antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;
- (c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

WO 02/27316

PCT/US01/29390

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of thyroid stimulating hormone in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

The present invention also provides a method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a free or total prostate specific antigen specific binding assay comprising adding a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the free or total prostate specific antigen specific binding assay. In a preferred embodiment, the large polycation is a polylysine or polyornithine. In another preferred embodiment, the free prostate specific antigen (PSA) specific binding assay comprises:

(a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with an antibody specific for free PSA, for a time and under conditions which allow the free PSA present in the sample to bind to the antibody coated microparticles;

(b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti-PSA antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;

(c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of prostate specific antigen in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

In another preferred embodiment the total PSA specific binding assay comprises:

(a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with an antibody which binds both free and complexed PSA, for a time and under conditions which allow the PSA present in the sample to bind to the antibody coated microparticles;

(b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti-PSA antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;

(c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

WO 02/27316

PCT/US01/29390

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of prostate specific antigen in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

The present invention also provides an improved specific binding assay kit for plasma and serum samples comprising a solution containing a large polycation. In a preferred embodiment, the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater. In another preferred embodiment, the large polycation is a polylysine, polyornithine, polybrene or MERQUAT. In a more preferred embodiment, the improved specific binding assay kit comprises a specific binding assay which measures thyroid stimulating hormone, free prostate specific antigen, alpha fetal protein, Hepatitis B core antibody, Hepatitis B surface antibody or human immunodeficiency virus.

The present invention also provides an improved kit for detection of thyroid stimulating hormone comprising:

- (a) mouse, monoclonal anti- β TSH coated microparticles;
- (b) mouse, monoclonal anti- α TSH acridinium-labeled conjugate; and
- (c) a modified TSH assay diluent comprising a large polycation. Preferably, the large polycation is a polylysine having a molecular weight from 5,200 to 11,200 daltons.

The present invention also provides an improved kit for detection of free prostate specific antigen comprising:

- (a) microparticles comprising a monoclonal antibody specific to free PSA in a diluent comprising a large polycation;
- (b) mouse, monoclonal anti-PSA acridinium-labeled conjugate. Preferably, the large polycation is a polylysine or polyornithine.

Detailed Description of the Invention

Non-optimal serum or plasma sample preparation techniques including, but not limited to, inadequate centrifugation, incomplete clotting time, and exposure to thermal stress, have been found to cause interferences in plasma or serum containing assay samples which lead to inaccurate readings in specific binding assays. It has now been found that addition of a large polycation to a plasma or serum containing assay sample during the

WO 02/27316

PCT/US01/29390

specific binding assay decreases or eliminates these interferences so that accurate readings can be obtained.

For purposes of the present invention, by "large" polycation it is meant a polycation with a molecular weight of approximately 3,000 daltons or greater. Examples of large polycations useful in the present invention include, but are not limited to, polylysines with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200, polyornithine with a molecular weight of 5300, polybrene with a molecular weight ranging between approximately 4,000 and 6,000 daltons, and MERQUAT with a molecular weight of approximately 4,000,000 daltons. The polycation can be added during the immunoassay as a separate reagent. Alternatively, the polycation can be incorporated into an assay specific diluent.

The amount of polycation used in an assay may vary depending on the type and its molecular weight. Generally, however, the amount used is a quantity which is effective at achieving the desired result, i.e. eliminating interference, without detrimentally affecting other assay parameters (such as sensitivity, specificity, etc.). By way of example, polycations such as polylysines, polyornithines, polyarginines, and polyhistidines at final concentrations ranging from about 0.005% to about 1% weight/volume (wt/vol) may be used. More preferably, polylysines ranging from about 0.01% to about 0.5% wt/vol are used. Even more preferably, polylysines ranging from about 0.1% to about 0.5% wt/vol are used. For a polylysine with a molecular weight of 8,800 daltons, a concentration of about 0.25% is preferred. For polybrene, concentrations ranging from about 0.2% to 1% wt/vol are preferred. For MERQUAT, concentrations ranging from about 0.15% to about 0.30% are preferred.

While higher concentrations of a polycation may still be effective at decreasing interferences in the sample, it is believed that the higher viscosity resulting from addition of some polycations may cause carryover, particularly in high throughput automated specific binding assay systems. However, those of ordinary skill in the art could easily determine the proper concentration suitable for a particular assay.

The polycations of the present invention may be used in any type of specific binding assay that tests for the presence of an analyte (such as an antigen or antibody) in a serum or plasma sample, including but not limited to sandwich and competitive type

WO 02/27316

PCT/US01/29390

immunoassays. Such immunoassays may utilize reagents comprising a polyclonal or monoclonal antibody, fragments of said antibodies (such as an Fab'2 fragment) or combinations of polyclonal, monoclonal and antibody fragments. Typically in such assays, a labeled reagent (such as a labeled antigen or antibody) is used for detecting and/or quantitating an analyte of interest. Such labels include, without limitation, enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, and radioactive labels. The manner of making and using all types of immunoassays as well as the reagents and/or labeled reagents used in such assays are well known to routine practitioners in the art.

One embodiment of the present invention relates to an improved specific binding assay for measuring TSH in serum or plasma samples. In a preferred embodiment, the TSH specific binding assay comprises a modified ARCHITECT TSH assay format (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60035-6050) wherein a large polycation with a molecular weight of approximately 3,000 daltons or greater is added to the assay sample during the assay, i.e. before or during the incubation of the sample with the solid phase. In this embodiment, it is preferred that the polycation be a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons, with a polylysine having a molecular weight of approximately 8,800 daltons being preferred. It is also preferred that the polycation be incorporated within the TSH assay diluent which is combined with the plasma or serum sample and the TSH antibody. Preferred concentration ranges of polylysine in the TSH assay range from about 0.1% to about 1% wt/vol with 0.25% wt/vol being most preferred.

Another embodiment of the present invention relates to improved kits for performing this modified ARCHITECT TSH assay. Kits of the present invention comprise at least anti- β TSH (mouse, monoclonal) coated microparticles in a buffer, preferably TRIS buffer, and even more preferably with protein (bovine) stabilizers and antimicrobial agents as a preservative, an acridinium-labeled conjugate comprising a mouse anti- α TSH monoclonal antibody, preferably in MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) buffer with protein (bovine) stabilizers and antimicrobial agents as a preservative; and a modified TSH assay diluent comprising a buffer, preferably TRIS, containing a polycation, preferably a polylysine ranging in molecular weight from 5,200 to 11,200 daltons at a concentration ranging from about 0.1% wt/vol to about 0.5% wt/vol. It is preferred that this diluent comprise antimicrobial agents as preservatives. Alternatively, the polycation can be

WO 02/27316

PCT/US01/29390

provided as a separate kit component for addition to the assay samples along with the TSH assay diluent. Kits of this embodiment of the present invention may also comprise a Multi-Assay Manual Diluent containing phosphate buffered saline solution with an antimicrobial agent as a preservative; a Pre-Trigger Solution containing 1.32% (w/v) hydrogen peroxide; a Trigger Solution containing 0.35 N sodium hydroxide; and a wash buffer containing phosphate buffered saline solution and an antimicrobial agent preservative.

A second preferred embodiment of the present invention relates to an improved specific binding assay for measuring free or total prostate specific antigen (PSA) in serum or plasma samples. In a most preferred embodiment, the PSA specific binding assay comprises a modified ARCHITECT total or free PSA assay format (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60035-6050) wherein a large polycation with a molecular weight of approximately 3,000 daltons or greater is added to the assay with the assay sample, i.e. before or during the incubation of the sample with the solid phase.

In this embodiment, it is preferred that the polycation be a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons. It is also preferred that the polycation be incorporated in the diluent of the anti-PSA coated microparticles (hereinafter "microparticle diluent") which is combined with the plasma or serum sample. Preferred concentration ranges of polylysine in the total PSA assay range from about 0.005% to about 1% wt/vol with 0.005% wt/vol being most preferred. Preferred concentration ranges of polylysine in the free PSA assay range from about 0.01% to about 1% wt/vol with 0.01% wt/vol being most preferred.

Another embodiment of the present invention relates to improved kits for performing a modified ARCHITECT total or free prostate specific antigen (PSA) assay. A kit of the present invention comprises microparticles, coated with an anti-PSA monoclonal antibody (one that is specific for free PSA in the case of the free PSA assay and one that binds both free and complexed PSA for the total PSA assay) in a diluent which also contains a polycation. The kit also includes an acridinium-labeled conjugate comprising an anti-PSA monoclonal antibody. Preferably, the polycation is a polylysine ranging in molecular weight from about 5,200 to about 11,200 daltons at a concentration ranging from about 0.005% wt/vol-0.5% wt/vol. The buffer of the microparticle diluent preferably is a TRIS buffer and even more preferably contains protein (bovine) stabilizers and

WO 02/27316

PCT/US01/29390

antimicrobial agents as a preservative. The acridinium-labeled conjugate is preferably in MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) buffer with protein (bovine) stabilizers and antimicrobial agents as a preservative. Alternatively, the polycation can be provided as a separate kit component for addition to the assay samples along with the PSA microparticle diluent. Kits of this embodiment of the present invention may also comprise a Pre-Trigger Solution containing 1.32% (w/v) hydrogen peroxide, a Trigger Solution containing 0.35 N sodium hydroxide, and a wash buffer containing phosphate buffered saline solution and an antimicrobial agent preservative.

Re-centrifugation of nonoptimally handled plasma and serum samples has also been demonstrated to be effective in decreasing interferences and restoring sensitivity and accuracy in sample measurement in specific binding assays for alpha fetal protein (AFP), Hepatitis B core antibody (HBcAb), Hepatitis B surface antibody (HBsAb), and human immunodeficiency virus (HIV). Accordingly, it is believed that addition of a large polycation to plasma or serum containing assay samples during performance of specific binding assays for these analytes will also be useful in decreasing interferences due to nonoptimal sample preparation.

The following nonlimiting examples are provided to further illustrate the present invention.

EXAMPLES

Example 1: Preparation of Contaminated Plasma or Serum Samples

Blood was drawn from one volunteer into four serum separator tubes, also referred to as SST Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Number 366510) and six ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Number 366457). The blood was allowed to clot for 30 minutes and then spun in a centrifuge at 3,500 RPM for 10 minutes. Serum was recovered from the four SST tubes. Plasma was recovered from the six EDTA tubes. A portion of the plasma was then contaminated by addition of 60 microliters of buffy coat (including red blood cells) from the EDTA tubes.

Example 2: Effect of Polycations in the ARCHITECT TSH Assay

WO 02/27316

PCT/US01/29390

a. General Procedure: The ARCHITECT TSH assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL. 60035-6050) is a two-step immunoassay which determines the presence of thyroid stimulating hormone (TSH) in human serum and plasma using Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) technology with flexible assay protocols, referred to as CHEMIFLEX. In the first step, a serum or plasma sample, anti- β TSH antibody coated paramagnetic microparticles, and TSH Assay Diluent are combined. (The TSH Assay diluent contains 0.5 M TRIS HCl, 1.5 M TRIS base, 1.3 M NaCl, 0.2% of the antimicrobial agent NIPASEPT (Nipa Laboratories Ltd., Wilmington DE) and the antimicrobial agent A56620 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), at pH 8.8). TSH present in the sample binds to the anti-TSH antibody coated microparticles. After washing, anti- α TSH acridinium labeled conjugate is added as the second step. Two solutions referred to as a Pre-Trigger and Trigger Solution, which comprise hydrogen peroxide and sodium hydroxide, respectively, are then added to the reaction mixture and the resulting chemiluminescent reaction is measured as relative light units (RLUs). A direct relationship exists between the amount of TSH in the plasma or serum sample and RLUs detected by the ARCHITECT/optical system.

b. Experimental Design: Experiments were designed in which serum and plasma samples were contaminated intentionally with red blood cells to interfere with the sensitivity of the assay (see Example 1). In separate experiments, a polycation, i.e. polylysine, polybrene or MERQUAT, then was added to the TSH Assay Diluent and combined with the serum or plasma sample (150 μ L) and anti- β TSH antibody coated paramagnetic microparticles (50 μ L at 0.1% solids) in the first step of the TSH assay. The assay then was completed as described in the general procedure above.

c. Results: As Table 1 shows polylysines having an average molecular weight of 5,200, 8,800 and 11,200 were found to be effective at eliminating interferences in contaminated samples at a concentration of 0.25%.

Table 1

Type of Polylysine	TSH (uIU/mL) of centrifuged sample	TSH (uIU/mL) of uncentrifuged sample	%Difference
No Polylysine	1.6654	0.1679	90

WO 02/27316

PCT/US01/29390

5200 MW	1.9545	1.9441	1
8800 MW	1.9665	1.9564	1
11,200 MW	1.9939	1.9132	4

Various concentrations of polybrene with a molecular weight of 4,000 to 6,000 daltons also were examined. Concentrations ranging from 0.2% to 1% wt/vol of polybrene were found to be effective at restoring assay sensitivity to contaminated plasma or serum samples without interfering with or altering the functional sensitivity of the TSH assay.

The polycation MERQUAT-100 having a molecular weight of about 4,000,000 daltons also restored assay sensitivity to contaminated samples without interfering with overall function of the assay at concentrations of either 0.15% or 0.30% in the TSH Assay Diluent.

Example 3: Effect of Polycations in the ARCHITECT free PSA Assay

Addition of a polycation to an assay sample also was demonstrated to be effective in decreasing interferences resulting from nonoptimal plasma or serum sample handling in an ARCHITECT free prostate specific antigen (PSA) assay.

a. General Procedure: The ARCHITECT Free PSA assay is a two step immunoassay to determine the presence of free PSA in human serum, using Chemiluminescent Microparticle immunoassay (CMIA) technology. In the first step, a test sample and paramagnetic microparticles, coated with a monoclonal antibody specific to free PSA, are combined. Free PSA present in the sample binds to the anti-free PSA coated microparticles. After washing, anti-PSA acridinium-labeled conjugate is added in the second step. Pre-Trigger and Trigger Solutions are then added to the reaction mixture; the resulting chemiluminescent reaction is measured as RLUs. A direct relationship exists between the amount of free PSA in the sample and the RLUs detected by the ARCHITECT/optical system. Like the TSH assay, nonoptimal preparation of the serum sample leads to interferences in measurement of fluorescence and ultimately an inaccurate reading of the levels of free PSA in the sample.

WO 02/27316

PCT/US01/29390

b. Experimental Design: In these experiments, a polycation, in particular, a poly-amino acid, was substituted in place of dextran sulfate in the microparticle diluent. The assay then was performed as described in the general procedure above.

c. Results: As shown in Table 2, both polylysine (ranging from 5,200 to 11,200 daltons) and polyornithine (5,300 daltons) at concentrations of 0.025% were effective at decreasing interferences in free PSA measurements caused by poor sample preparation without interfering with or altering the high functional sensitivity of the free PSA assay.

Table 2

Free PSA Concentration (ng/mL)

Sample No.	Dextran Sulfate	poly-L-lysine	poly-L-ornithine	poly-L-arginine	poly-L-histidine
30 (Spun)*	0.699	0.703	0.697	0.528	0.558
30 (Unspun)	0.000	0.666	0.632	0.528	0.511
% Interference**	100%	5%	9%	0%	8%
31 (Spun)	0.617	0.661	0.660	0.462	0.466
31 (Unspun)	0.000	0.614	0.585	0.459	0.441
% Interference	100%	7%	11%	0%	5%

*The term "unspun" refers to an improperly prepared serum or plasma sample which was tested directly in the free PSA assay described above. The term "spun" refers to the same sample, which was re-centrifuged prior to testing.

**% Interference = (Free PSA concentration from Spun sample - Free PSA concentration from Unspun Sample) / (Free PSA concentration from Spun sample) x 100

Although the addition of either polyhistidine (M.W. 13,200 daltons) or polyarginine (M.W. 8,500 daltons) at a concentration of 0.025% also reduced interference, these concentrations interfered with the assay sensitivity. Lower concentrations of these poly-amino acids, however, may be effective at eliminating interference without affecting assay sensitivity.

Example 4: Effect of Polycations in the ARCHITECT total PSA Assay

The general procedure of the ARCHITECT total PSA assay is essentially as described for the free PSA assay in Example 3, with the exception that the paramagnetic microparticles are coated with a monoclonal antibody that binds to both free and

WO 02/27316

PCT/US01/29390

complexed PSA. Experiments were performed in which unspun samples were subjected to a total PSA assay that utilized a microparticle diluent containing dextran sulfate (at a concentration of 0.05%) or a poly-L-lysine of average molecular weight 5200 or 11,200 (in place of dextran sulfate) at a concentration of 0.005%. The results, shown in Table 3, demonstrate that poly-L-lysines of different average molecular weights are effective at decreasing interferences in total PSA measurements in unspun samples without interfering with or altering the high functional sensitivity of the total PSA assay.

Table 3: Unspun Values for Total PSA (ng/mL)

Sample No.	Dextran Sulfate	% Int.	poly-L-lysine 5200 MW	% Int.	poly-L-lysine 11200 MW	% Int.	No poly-L-lysine	% Int.
55	4.070	-62	10.707	-6	10.806	-8	7.724	-27
56	6.663	-33	10.329	-1	10.357	-2	8.922	-8
71	0.083	-99	13.431	-4	14.695	0	1.398	-90
72	0.483	-97	14.797	-8	15.025	-10	5.996	-61
73	0.057	-99	9.983	-8	10.353	-8	1.149	-89
74	0.099	-99	12.483	-1	13.414	4	2.573	-79
75	0.389	-97	14.658	-7	15.211	-6	8.892	-40
76	5.681	-52	12.158	-7	12.158	-5	9.665	-17
Avg. Int.		-80		-5		-4		-51

WO 02/27316

PCT/US01/29390

What is Claimed is:

1. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of specific binding assays comprising adding an effective amount of a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the specific binding assay.
2. The method of claim 1 wherein the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater.
3. The method of claim 1 wherein the large polycation is a polylysine, polyornithine, polybrene or MERQUAT.
4. The method of claim 3 wherein the large polycation comprises a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons.
5. The method of claim 4 wherein the large polycation comprises polylysine with a molecular weight of 8,800 daltons.
6. The method of claim 1 wherein the specific binding assay measures thyroid stimulating hormone, free prostate specific antigen, alpha fetal protein,, Hepatitis B core antibody, Hepatitis B surface antibody or human immunodeficiency virus.
7. The method of claim 1 wherein said specific binding assay is performed on a solid phase.
8. The method of claim 7 wherein said solid phase comprises paramagnetic microparticles.
9. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a thyroid stimulating hormone specific binding assay comprising adding a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the thyroid stimulating hormone specific binding assay.

WO 02/27316

PCT/US01/29390

10. The method of claim 9 wherein the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater.

11. The method of claim 9 wherein the large polycation is a polylysine, polybrene or MERQUAT.

12. The method of claim 11 wherein the large polycation comprises a polylysine with a molecular weight ranging between 5,200 and 11,200 daltons.

13. The method of claim 12 wherein the large polycation comprises polylysine with a molecular weight of 8,800 daltons.

14. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a thyroid stimulating hormone specific binding assay comprising:

a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with anti- β TSH antibody and an assay diluent which comprises a large polycation, for a time and under conditions which allow the thyroid stimulating hormone present in the sample to bind to the anti- β TSH antibody coated microparticles;

(b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti- α TSH antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;

(c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of thyroid stimulating hormone in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

15. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a free prostate specific antigen specific binding

WO 02/27316

PCT/US01/29390

assay comprising adding a large polycation to serum or plasma containing assay samples during the free prostate specific antigen specific binding assay.

16. The method of claim 15 wherein the large polycation is a polylysine or polyornithine.

17. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a free prostate specific antigen specific binding assay comprising:

(a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with an antibody specific for free PSA, for a time and under conditions which allow the free PSA present in the sample to bind to the antibody coated microparticles;

(b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti-PSA antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;

(c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of prostate specific antigen in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

18. An improved *specific binding* assay kit for plasma and serum samples comprising a solution containing a large polycation.

19. The improved *specific binding* assay kit of claim 18 wherein the large polycation has a molecular weight of 3,000 daltons or greater.

20. The improved *specific binding* assay kit of claim 15 wherein the large polycation is a polylysine, polybrene or MERQUAT.

21. The improved *specific binding* assay kit of claim 18 wherein the *specific binding* assay measures thyroid stimulating hormone, free prostate specific antigen, alpha fetal

WO 02/27316

PCT/US01/29390

protein, Hepatitis B core antibody, Hepatitis B surface antibody or human immunodeficiency virus.

22. An improved kit for detection of thyroid stimulating hormone comprising:
- (a) mouse, monoclonal anti- β TSH coated microparticles;
 - (b) mouse, monoclonal anti- α TSH acridinium-labeled conjugate; and
 - (c) a modified TSH assay diluent comprising a large polycation.
23. The kit of claim 19 wherein the large polycation is a polylysine having a molecular weight from 5,200 to 11,200 daltons.
24. An improved kit for detection of free prostate specific antigen comprising:
- (a) mouse, monoclonal anti-Free PSA coated microparticles in a diluent comprising a large polycation;
 - (b) mouse, monoclonal anti- PSA acridinium-labeled conjugate;
25. The kit of claim 24 wherein the large polycation is a polylysine or polyornithine.
26. A method for decreasing interferences which result in inaccurate readings in serum or plasma containing assay samples of a total prostate specific antigen specific binding assay comprising:
- (a) forming a first complex by incubating a serum or plasma sample with paramagnetic microparticles coated with an antibody which binds both free and complexed PSA, for a time and under conditions which allow the PSA present in the sample to bind to the antibody coated microparticles;
 - (b) forming a second complex by incubating the first complex with an acridinium labeled conjugate comprising an anti-PSA antibody, for a time and under conditions which allow the conjugate to bind to the first complex;
 - (c) creating a chemiluminescent reaction in the second complex; and

WO 02/27316

PCT/US01/29390

(d) measuring the chemiluminescent reaction as relative light units wherein the amount of prostate specific antigen in the plasma or serum sample is directly related to the measured relative light units.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/27316 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/543, 33/76, 33/574 South Luther Avenue, Lombard, IL 60148 (US). RAMP, John, M.; 462 Pine Grove Street, Gurnee, IL 60031 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/29390 (74) Agents: CASUTO, Dianne et al.; Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, D377 AP6D/2, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(22) International Filing Date: 20 September 2001 (20.09.2001) (81) Designated States (national): CA, JP.

(25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/669,082 25 September 2000 (25.09.2000) US Published: — with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; D377 AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(72) Inventors: SCOPP, Richard, L.; 4803-68th Street, Kenosha, WI 53142 (US). FINLEY, David, M.; 2414 S. Hidden Trail, Spring Grove, IL 60081 (US). TRIMPE, Kevin, L.; 501 Majestic Court, Gurnee, IL 60031 (US). LACH, Agnieszka; 915 North Racine, Unit 1SW, Chicago, IL 60022 (US). PESTEL, Cynthia, D.; 131

(88) Date of publication of the international search report: 20 June 2002

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



WO 02/27316 A3

(54) Title: METHODS AND KITS FOR DECREASING INTERFERENCES OF ASSAYS SAMPLES CONTAINING PLASMA OR SERUM IN SPECIFIC BINDING ASSAYS BY USING A LARGE POLYCATION

(57) Abstract: Methods and kits are provided for decreasing interferences and inaccuracies due to nonoptimal sample handling of blood samples in plasma or serum containing assay samples of specific binding assays by addition of a large polycation to the assay sample during the specific binding assay.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/29390
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/76 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 5 370 993 A (LIN CHENG-I ET AL) 6 December 1994 (1994-12-06) column 17, line 55 -column 18, line 35 examples 4-10, 12-16 claims 1-17 ---	1-3, 7, 8, 18-20 6, 9-11, 14-16, 21, 22, 24, 25
X Y	EP 0 895 085 A (BAYER AG) 3 February 1999 (1999-02-03) the whole document --- -/-	17, 26 15, 16, 21, 24, 25
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 March 2002		Date of mailing of the international search report 09/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter-
national Application No
PCT/US 01/29390

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 478 729 A (ULLMAN EDWIN F ET AL) 26 December 1995 (1995-12-26) abstract column 6, line 43 - line 53 ---	1
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 GOROVITS ELENA L ET AL: "Effect of synthetic polyelectrolytes on enhanced chemiluminescence reaction in solution." Database accession no. PREV199698627596 XP002193761 ---	1
Y	abstract & BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 22, no. 3, 1995, pages 249-260, ISSN: 0885-4513 ---	6,9, 14-16
Y	US 5 747 254 A (PONTIUS BRIAN WYLIE) 5 May 1998 (1998-05-05) --- column 3, line 16 - line 29 column 9, line 45 - line 60 column 11, line 47 ---	6,9-11, 14-16, 21,22, 24,25
Y	US 5 770 459 A (LELAND JONATHAN K ET AL) 23 June 1998 (1998-06-23) examples 10,11 ---	6,9-11, 14,21,22
A	WO 92 21975 A (ABBOTT LAB) 10 December 1992 (1992-12-10) example 15 -----	6,9,14

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/29390

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5370993	A	06-12-1994	US 5136095 A 04-08-1992
		US 4812401 A 14-03-1989	
		US 5405743 A 11-04-1995	
		CA 1322067 A1 07-09-1993	
		DE 3816953 A1 08-12-1988	
		FR 2615621 A1 25-11-1988	
		GB 2206206 A ,B 29-12-1988	
		JP 2657066 B2 24-09-1997	
		JP 63314466 A 22-12-1988	
EP 0895085	A	03-02-1999	EP 0895085 A1 03-02-1999
		JP 11118804 A 30-04-1999	
US 5478729	A	26-12-1995	AU 2584495 A 29-11-1995
		CA 2188752 A1 09-11-1995	
		DE 69504191 D1 24-09-1998	
		DE 69504191 T2 11-02-1999	
		EP 0757794 A1 12-02-1997	
		ES 2133772 T3 16-09-1999	
		JP 9512634 T 16-12-1997	
		WO 9530151 A1 09-11-1995	
US 5747254	A	05-05-1998	US 5474911 A 12-12-1995
		US 5015569 A 14-05-1991	
		AU 7048791 A 26-06-1991	
		CA 2069948 A1 02-06-1991	
		EP 0503000 A1 16-09-1992	
		WO 9108480 A1 13-06-1991	
US 5770459	A	23-06-1998	US 5746974 A 05-05-1998
		AT 184320 T 15-09-1999	
		AU 676665 B2 20-03-1997	
		AU 2347892 A 11-02-1993	
		CA 2112675 A1 21-01-1993	
		DE 69229950 D1 14-10-1999	
		DE 69229950 T2 09-03-2000	
		EP 0594766 A1 04-05-1994	
		EP 0854194 A2 22-07-1998	
		ES 2137191 T3 16-12-1999	
		GR 3031217 T3 31-12-1999	
		JP 3053112 B2 19-06-2000	
		JP 7508340 T 14-09-1995	
		KR 212178 B1 02-08-1999	
		WO 9301308 A1 21-01-1993	
		AT 173542 T 15-12-1998	
		AU 668085 B2 26-04-1996	
		AU 1420692 A 07-09-1992	
		AU 1530492 A 07-09-1992	
		CA 2103674 A1 07-08-1992	
		CN 1065339 A 14-10-1992	
		CN 1064945 A 30-09-1992	
		DE 69227624 D1 24-12-1998	
		DE 69227624 T2 08-07-1999	
		DK 570518 T3 02-08-1999	
		EP 0570518 A1 24-11-1993	
		EP 0877252 A2 11-11-1998	
		ES 2126591 T3 01-04-1999	
		GR 3029446 T3 28-05-1999	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No.
PCT/US 01/29390

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5770459	A	HK 1017970 A1	11-08-2000	
		IE 920380 A1	12-08-1992	
		IE 920381 A1	12-08-1992	
		IL 100866 A	31-10-1995	
		IL 100867 A	08-12-1995	
		JP 3182515 B2	03-07-2001	
		JP 11148901 A	02-06-1999	
		JP 3128541 B2	29-01-2001	
		JP 11125601 A	11-05-1999	
		JP 3061416 B2	10-07-2000	
		JP 6509412 T	20-10-1994	
		JP 3013937 B2	28-02-2000	
		JP 6508203 T	14-09-1994	
		KR 226231 B1	15-10-1999	
		NZ 241537 A	25-06-1993	
		NZ 241538 A	25-02-1993	
		WO 9214138 A1	20-08-1992	
		WO 9214139 A1	20-08-1992	
		US 5962218 A	05-10-1999	
		US 5635347 A	03-06-1997	
		US 6325973 B1	04-12-2001	
WO 9221975	A	10-12-1992	AT 161104 T	15-12-1997
			CA 2110296 A1	10-12-1992
			DE 69223510 D1	22-01-1998
			DE 69223510 T2	18-06-1998
			EP 0586574 A1	16-03-1994
			ES 2112320 T3	01-04-1998
			JP 6508214 T	14-09-1994
			US 5459078 A	17-10-1995
			WO 9221975 A1	10-12-1992

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

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 33/577	G 0 1 N 33/543 5 1 5 J	
	G 0 1 N 33/553	
	G 0 1 N 33/577 B	
(74)代理人 100103920		
弁理士 大崎 勝真		
(72)発明者 スコツプ, リチャード・エル		
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・ 5 3 1 4 2、ケノーシャ、シツクステイエイス・ストリート・		
4 8 0 3		
(72)発明者 ファインリー, デイビッド・エム		
アメリカ合衆国、イリノイ・ 6 0 0 8 1、スプリング・グローブ、サウス・ヒドウン・トレイル・		
2 4 1 4		
(72)発明者 トリンブ, ケビン・エル		
アメリカ合衆国、イリノイ・ 6 0 0 3 1、ガーニー、マジエステイツク・コート・ 5 0 1		
(72)発明者 ラツシュ, アニエスカ		
アメリカ合衆国、イリノイ・ 6 0 0 2 2、シカゴ、ユニット・ 1・サウス・ウエスト・ノース・ラ		
シーン・ 9 1 5		
(72)発明者 ベステル, シンシア・ディー		
アメリカ合衆国、イリノイ・ 6 0 1 4 8、ロンバード、サウス・ルーサー・アベニュー・ 1 3 1		
(72)発明者 ランプ, ジョン・エム		
アメリカ合衆国、イリノイ・ 6 0 0 3 1、ガーニー、パイン・グローブ・ストリート・ 4 6 2		
F ターム(参考) 2G054 AA07 AB04 AB05 BA01 BB02 CA21 CA23 CE02 EA01 GE01		
JA11		

专利名称(译)	通过使用聚合聚阳离子在特异性结合测定中减少血清或含血浆测定样品的干扰的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2004510161A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002530644	申请日	2001-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	スコツプリチャードエル フィンリーデイビツドエム トリンプケビンエル ラツシユアニエスカ ペステルシンシアディー ランプジヨンエム		
发明人	スコツプ,リチャード・エル フィンリー,デイビツド・エム トリンプ,ケビン・エル ラツシユ,アニエスカ ペステル,シンシア・ディー ランプ,ジヨン・エム		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/76		
CPC分类号	G01N33/57434 G01N33/5306 G01N33/54333 G01N33/54393 G01N33/76		
FI分类号	G01N33/531.B G01N21/78.C G01N33/53.B G01N33/53.D G01N33/543.515.D G01N33/543.515.J G01N33/553 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BA01 2G054/BB02 2G054/CA21 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/GE01 2G054/JA11		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	09/669082 2000-09-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了方法和试剂盒,用于通过在特异性结合测定期间向测定样品中添加大聚阳离子来减少由于含有特异性结合测定的测定样品的血浆或血清中的血液样品的非最优样品处理而导致的干扰和不准确性。

ポリカの型	遠心分離後試料の TSH(uIU/mL)	未遠心分離試料の TSH(uIU/mL)	差(%)
ポリカなし	1.6654	0.1679	90
5200MW	1.9545	1.9441	1
8800MW	1.9665	1.9564	1
11,200MW	1.9939	1.9132	4