



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

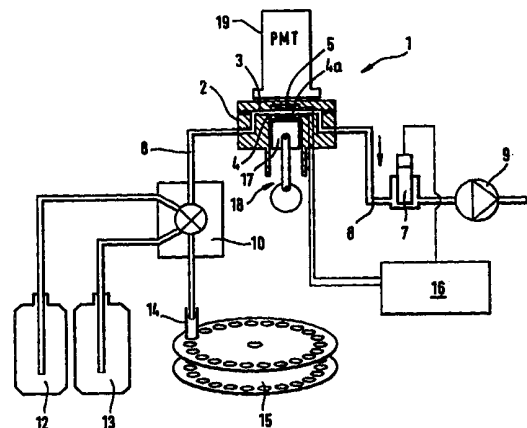
<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/543, 33/58, 27/327</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/39206</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00197</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Januar 1999 (23.01.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 03 528.4                      30. Januar 1998 (30.01.98)                      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EGGER, Martin [DE/DE]; Weilheimer Strasse 7a, D-82347 Bernried (DE). PUNZMANN, Gabriele [DE/DE]; Gozbertstrasse 8/10, D-81547 München (DE). MÜLLER, Günter [DE/DE]; Pfarrer-Schneider-Weg 17, D-82380 Peisenberg (DE). PAUSELIUS-FUCHS, Ursula [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Strasse 5c, D-82319 Starnberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: PFEIFER, Hans-Peter usw.; Beiertheimer Allee 19, D-76137 Karlsruhe (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING A TEST SAMPLE BY MEANS OF AN ELECTRO-CHEMOLUMINESCENCE BOND REACTION TEST

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE EINER PROBE MITTELS EINES ELEKTROCHEMOLUMINESZENZ-BINDUNGSREAKTION-TESTS

(57) Abstract

The invention relates to a method for analyzing a liquid test sample, especially of a body fluid by means of an electro-chemoluminescence bond reaction method in which a reaction sequence is carried out. The reaction sequence includes at least one specific biochemical bond reaction and leads to the formation of a complex which contains a chemoluminescence marker and which is characteristic for the analysis. Said reaction sequence also leads to the bonding of the complex to a magnetic microparticle. A detection cycle is carried out in a measuring cell having a collector in order to determine the concentration of the marked microparticle. The detection cycle includes a purification step (20), a conditioning step (22), a recovery step (23) and a measuring step (21), whereby a specified potential profile is applied to the collector during these steps. Between the conditioning step (22) and the recovery step (23), an additional potential pulse (DIP) with an oxidizing or reducing potential is inserted into the voltage shape of the detection cycle in order to improve the deposit of the microparticle, whereby before the collector contacts (instant  $t_p$ ) the test sample, the additional potential pulse (DIP) is restored to a neutral potential which is neither oxidant nor reductant.



whereby before the collector contacts (instant  $t_p$ ) the test sample, the additional potential pulse (DIP) is restored to a neutral potential which is neither oxidant nor reductant.

### (57) Zusammenfassung

Verfahren zur Analyse einer flüssigen Probe, insbesondere einer Körperflüssigkeit mittels eines Elektrochemolumineszenz-Bindungsreaktion-Verfahrens, bei dem eine Reaktionsfolge abläuft, die mindestens eine spezifische biochemische Bindungsreaktion einschließt und zur Bildung eines chemolumineszierenden Markersubstanz enthaltenden für die Analyse charakteristischen Komplexes und Bindung des Komplexes an magnetische Mikropartikel führt. In einer Meßzelle mit einer Arbeitselektrode läuft zur Bestimmung der Konzentration der markierten Mikropartikel ein Detektionszyklus ab, der einen Reinigungsschritt (20), einen Konditionierungsschritt (22), einen Abfangschritt (23) und einen Meßschritt einschließt, wobei während dieser Schritte ein bestimmter Potentialverlauf an die Arbeitselektrode angelegt wird. Zur Verbesserung der Ablagerung der Mikropartikel ist zwischen dem Konditionierungsschritt (22) und dem Abfangschritt (23) ein zusätzlicher Potentialpuls (DIP) mit einem oxidierenden oder reduzierenden Potential in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingefügt, wobei der zusätzliche Potentialpuls (DIP) vor der Kontaktierung (Zeitpunkt  $t_p$ ) der Arbeitselektrode mit der Probe auf ein neutrales, weder oxidierendes noch reduzierendes, Potential zurückgeführt wird.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Analyse einer Probe mittels eines  
Elektrochemolumineszenz-Bindungsreaktion-Tests

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse einer Probe bezüglich einer darin befindlichen Substanz.

Bei der Analyse einer flüssigen Probe geht es in der Regel darum, die Konzentration einer darin enthaltenen Substanz (Analyt) zu bestimmen (quantitative Analyse). In manchen Fällen genügt auch eine Aussage, ob der Analyt (in einer oberhalb eines Grenzwerts liegenden Konzentration) in der Probe enthaltenen ist (qualitative Analyse). Auf medizinischem Gebiet, auf das sich die Erfindung insbesondere bezieht, spielt die Analyse von Körperflüssigkeiten (vor allem Blut, Blutserum und Urin) auf darin enthaltene Analyten wie zum Beispiel Hormone, Antikörper, Antigene oder Medikamente eine große Rolle.

Die Erfindung befaßt sich mit der Verbesserung eines bestimmten Typs von Analyseverfahren, den man zusammenfassend als Elektrochemolumineszenz-Bindungsreaktion-Analyse (nachfolgend als "ECL-BBA" für electrochemoluminescence biochemical binding analysis bezeichnet) bezeichnen kann. Ein solches Verfahren weist folgende charakteristische Merkmale auf.

- a) Grundlage der analytischen Selektivität ist eine spezifische biochemische Bindungsreaktion unter Beteiligung biochemischer Substanzen, die nur miteinander selektiv bindungsfähig sind. Hierzu gehören vor allem immunchemische Bindungsreaktionen zwischen Antikörpern und Antigenen oder Haptenen, mit denen die Antikörper spezifisch binden. Andere biochemische Bindungsreaktionen sind Proteinbindungen, insbesondere zwischen Avidin und Biotin, die Lektin-Kohlenhydrat-Bindung, die Bindung zwischen Rezeptoren und Liganden und die Hybridisierung von Nukleinsäuren.

Solche spezifischen biochemischen Bindungsreaktionen werden seit langem für analytische Zwecke verwendet. Es gibt zahlreiche unterschiedliche ein- oder mehrstufige Reaktionsabläufe ("Testprotokolle"), die letztlich unter Beteiligung des Analyten und mindestens einer in dem Reagenzsystem enthaltenen spezifisch bindenden Substanz ("Bindungsreagenz") zur Bildung eines für die Analyse charakteristischen Komplexes führen. Dieser Komplex enthält in der Regel (jedoch nicht notwendigerweise) den Analyten.

- b) Um den Komplex, dessen Konzentration ein Maß für das gesuchte analytische Resultat bildet, detektierbar zu machen, wird in der Regel eine Markersubstanz ("Label") eingesetzt, die an ein Bindungsreagenz des Reagenzsystems, beispielsweise einen Antikörper, gekoppelt wird. Die Einheit aus Markersubstanz und Bindungsreagenz wird als Konjugat bezeichnet.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren, bei denen die Markersubstanz zu einer ECL-Reaktion fähig ist. Wenn eine solche Substanz an einer voltametrischen Elektrode einem geeigneten elektrischen Potential ausgesetzt wird, sendet sie Licht aus, das photometrisch gemessen werden kann. In der Regel ist an dieser Reaktion eine zweite elektrochemisch aktive Substanz beteiligt, die als "Precursor" bezeichnet wird. In der Praxis wird als ECL-Label vor allem ein Rutheniumkomplex (Ruthenium-tris[bipyridyl]), in Kombination mit TPA (Tripropylamin) als Precursor, verwendet. Die beiden elektrochemisch aktiven Substanzen reagieren an der Elektrode jeweils unter Abgabe eines Elektrons zu einer stark reduzierenden bzw. oxidierenden Spezies. Die nachfolgende Redoxreaktion bringt das ECL-Label in einen angeregten Zustand, von dem es unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurückfällt. Die Reaktion des ECL-Labels ist vorzugsweise eine Kreisreaktion, so daß ein einziges Label-Molekül nach Anlegen einer Spannung an die Elektrode eine Vielzahl von Photonen aussendet.

- c) Bei den Verfahren, auf die sich die Erfindung bezieht, werden die ECL-markierten für die Analyse charakteristischen Komplex-Moleküle an magnetische Mikropartikel ("Beads") fixiert. In der Praxis werden magnetisierte Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von typischerweise etwa 2 bis 3  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Fixierung erfolgt mittels eines Paares spezifischer biochemischer Bindungspartner, wobei sich insbesondere das Paar Streptavidin-Biotin bewährt hat. Die Beads sind mit Streptavidin-Polymer beschichtet. An die Komplex-Moleküle ist Biotin gebunden.

Die Beads mit dem daran gebundenen markierten Komplex werden in die Meßzelle eines Meßgerätes gebracht, das die erforderlichen Elektroden (in der Regel eine Arbeitselektrode, eine Gegenelektrode und, insbesondere im Fall eines potentiometrischen Meßprinzips, eine Referenzelektrode) zur Erzeugung des zum Triggern der ECL-Reaktion erforderlichen elektrischen Feldes aufweist. Im magnetischen Feld eines unter der Arbeitselektrode angeordneten Magneten werden die Beads an die Oberfläche der Arbeitselektrode gezogen. Da dies üblicherweise in Durchflußzellen bei kontinuierlich strömender Probenflüssigkeit stattfindet, wird die magnetisch bewirkte Ablagerung der Beads als "Abfangen" bezeichnet.

Nach dem Abfangschritt wird in der Regel ein Waschschritt durchgeführt, bei dem eine Waschflüssigkeit an der Arbeitselektrode vorbeiströmt und störende Komponenten entfernt. Danach wird ein zum Triggern der ECL-Reaktion erforderliches elektrisches Potential an die Arbeitselektrode angelegt und das resultierende Lumineszenz-Licht mittels eines geeigneten Fotoempfängers gemessen. Die Intensität des Lumineszenzlichts ist ein Maß für die Konzentration der markierten Beads an der Oberfläche der Arbeitselektrode und diese wiederum ist ein Maß für die Konzentration des Analyten in der Probe. Zur Berechnung der gesuchten Konzentration aus dem gemessenen Lumineszenzsignal dient eine Kalibration.

Es werden zahlreiche unterschiedliche Varianten derartiger ECL-BBA-Verfahren diskutiert und in der Literatur beschrieben, wobei sich die Abwandlungen auf jeden der genannten Teilaspekte beziehen können.

Hinsichtlich des Teilaspektes a) unterscheiden sich die Tests durch verschiedene Testprotokolle (beispielsweise Sandwich-Tests und kompetitive Tests, jeweils in einer Vielzahl möglicher Untervarianten). Ein grundsätzlicher Unterschied besteht zwischen homogenen Tests, die keine Trennung zwischen den gebildeten Komplex-Molekülen und unkomplexiertem Konjugat erfordern und heterogenen Tests, bei denen eine solche bound/free-Trennung notwendig ist. Die vorliegende Erfindung ist für die unterschiedlichsten Testprotokolle anwendbar, soweit in irgendeiner Weise eine Reaktionsfolge abläuft, die mindestens eine spezifische biochemische Bindungsreaktion einschließt und zur Bildung eines für die Analyse charakteristischen Komplexes führt, der mit einem ECL-Label markiert ist.

Auch hinsichtlich des Teilaspektes b) ist die Erfindung universell, d.h. unabhängig von dem verwendeten ECL-Label und eventuellen weiteren Komponenten der ECL-Reaktion, einsetzbar. Sie hat sich insbesondere für Tests bewährt, bei denen der erwähnte Rutheniumkomplex in Verbindung mit TPA verwendet wird.

Hinsichtlich des Teilaspektes c) richtet sich die Erfindung ausschließlich auf Tests, bei denen der für die Analyse charakteristische Komplex an magnetische Mikropartikel gebunden wird und diese Mikropartikel im Magnetfeld eines Magneten auf der Oberfläche einer Arbeitselektrode abgelagert werden. Im übrigen ist die Erfindung auch von Variationen des Teilaspektes c) unabhängig und beispielsweise mit unterschiedlichen Bead-Materialien und -Größen sowie mit unterschiedlichen Methoden zur Fixierung der Komplexe an den Beads verwendbar.

Nähere Informationen über ECL-BBA-Verfahren können der einschlägigen Literatur entnommen werden. Hierzu wird insbesondere auf folgende Publikationen verwiesen, deren Inhalt durch Bezugnahme zum Bestandteil der vorliegenden Beschreibung gemacht wird:

- 1) G.F. Blackburn et al. "Electrochemiluminescence Detection for Development of Immunoassays and DNA Probe Assays for Clinical Diagnostics", Clin.Chem. 37 (1991), 1534 - 1539
- 2) J.K. Leland und M.J Powell: "Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reduction Type ECL Reaction Sequence Using Tripropyl Amine", J. Electrochem. Soc., 137 (1990), 3127 - 3131
- 3) J.H. Kenten et al.: "Improved Electrochemiluminescent Label for DNA Probe Assays: Rapid Quantitative Assays of HIV-1 Polymerase Chain Reaction Products", Clin.Chem. 38 (1992), 873 - 879
- 4) N.R. Hoyle: "The Application of Electrochemiluminescence to Immunoassay-based Analyte Measurement" in "Bioluminescence and Chemiluminescence"; Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Cambridge, September 1994, A.K. Campbell et al. (edit.), John Wiley & Sons
- 5) WO 89/10551
- 6) WO 90/11511

Wie erwähnt findet die Messung des ECL-Lichtes üblicherweise in einer Durchflußmeßzelle statt. Sie enthält einen engen Strömungskanal für die Probenflüssigkeit, wobei die Arbeitselektrode an einer der Wände, die den Strömungskanal begrenzen, angeordnet ist. an dessen Wand die Arbeitselektrode angeordnet ist. Um mit der gleichen Meßzelle nacheinander unterschiedliche Proben messen zu können, muß die Zelle, und insbesondere die Arbeitselektrode, zwischen den Messungen von den darauf abgelagerten

Beads und sonstigen Verunreinigungen gereinigt werden. Dieser Reinigungsvorgang muß schnell und effizient sein, um eine hohe Durchsatzleistung des Analysegeräts und eine gute Analysegenauigkeit sicherzustellen.

Die Reinigung erfolgt deswegen nicht nur physikalisch (Durchleiten von Luftblasen) und chemisch (Durchleiten einer Reinigungsflüssigkeit, die unter anderem Detergenzien enthält), sondern auch elektrochemisch durch Anlegen eines stark oxidierenden und/oder reduzierenden Potentials an die Arbeitselektrode. Das Potential ist in der Regel so hoch, daß an der Oberfläche der Arbeitselektrode Gasblasen entstehen. Dadurch wird die Reinigung wirksam unterstützt, das elektrochemische Gleichgewicht der Elektrodenoberfläche jedoch so stark gestört, daß im Anschluß an den Reinigungsschritt ein Konditionierungsschritt erforderlich ist, bei dem eine Sequenz von Pulsen an die Arbeitselektrode angelegt wird, die den gesamten Potentialarbeitsbereich des jeweiligen Elektrodenmaterials abdecken.

In der Zelle wird demzufolge ein Detektionszyklus durchgeführt, der nacheinander einen Reinigungsschritt, einen Konditionierungsschritt, einen Abfangschritt und einen Meßschritt umfaßt. Während des Reinigungsschritts und des Konditionierungsschritts befindet sich eine Reinigungs- bzw. Konditionierungsflüssigkeit in der Zelle. Die Probenflüssigkeit mit den Beads wird erst zu Beginn des Abfangschritts in die Durchflußmeßzelle eingeleitet. Bei heterogenen Tests ist zwischen Abfangschritt und Meßschritt ein zusätzlicher Waschschrift eingefügt. Der Detektionszyklus wird in den Zitaten 1) bis 6), vor allem in der WO 89/10551, näher erläutert.

Das ECL-BBA-Verfahren zeichnet sich im Vergleich zu anderen Analyseverfahren, die auf der spezifischen Bindung biochemischer Bindungspartner beruhen, durch einfache Handhabung, hohe Empfindlichkeit, einen großen dynamischen Bereich meßbarer Konzentrationen, eine kostengünstige Analyse und gute Automatisierbarkeit (mit entsprechenden Analysegeräten) aus.

Um bei einem ECL-BBA-Verfahren der vorstehend erläuterten Art eine weitere Erhöhung der Analysegenauigkeit zu erreichen, wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, daß zur Verbesserung der Ablagerung der Mikropartikel zwischen dem Konditionierungsschritt und dem Abfangschritt ein zusätzlicher Potentialpuls mit einem oxidierenden und/oder reduzierenden Potential in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingeführt ist, wobei der zusätzliche Potentialpuls vor der Kontaktierung der Arbeitselektrode mit der Probe auf ein neutrales (weder oxidierendes noch reduzierendes) Potential zurückgeführt wird.

Der Zusammenhang zwischen einem während des Detektionszyklus an der Arbeitselektrode anliegenden Spannungsverlauf und der Qualität der Analyse wird in der WO 89/10551 (Zitat 5) diskutiert. Danach soll zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit des Analyseergebnisses am Ende des Konditionierungsschritts ein konstanter Potentialwert eingestellt werden, der als "preoperative potential" bezeichnet wird. Dieses "preoperative potential" soll konstant bleiben, bis die Arbeitselektrode mit der Probenflüssigkeit kontaktiert und die ECL-Messung durchgeführt wird. Das "preoperative potential" soll in Abhängigkeit von dem Material der Arbeitselektrode und in Abhängigkeit von dem verwendeten Elektrolyten entweder ein oxidierendes oder ein reduzierendes Potential sein.

Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, daß im Gegensatz zu der Lehre des Zitats 5) eine wesentliche Verbesserung der gleichmäßigen Ablagerung der Beads auf der Oberfläche der Arbeitselektrode und damit eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Analyse erreicht werden kann, wenn in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus der zusätzliche Potentialpuls eingefügt ist. Wesentlich ist, daß dieser einerseits ein oxidierendes oder reduzierendes Potential erreicht und andererseits auf ein neutrales (weder oxidierendes noch reduzierendes) Potential zurückgeführt wird, bevor die Probe in die Meßzelle eingeleitet und somit in Kontakt zu der Arbeitselektrode gebracht wird.

Während durch das "preoperative potential" der WO 89/10551 die für die Erzeugung des ECL-Signals entscheidenden Komponenten der Probe beeinflusst werden sollen, wird erfindungsgemäß eine erhebliche Verbesserung durch eine zusätzliche elektrochemische Vorbehandlung der Elektrode erreicht. Daß daraus eine Verbesserung der Ablagerung der Beads resultiert, ist unerwartet, weil angenommen werden mußte, daß die Bead-Verteilung von den Eigenschaften des magnetischen Feldes abhängt, während die elektrochemischen Maßnahmen der Konditionierung und Reinigung dem Zweck dienen, die Signalerzeugung zu verbessern.

Ein Potentialpuls in diesem Sinne ist eine kurzzeitige Änderung der an der Arbeitselektrode anliegenden Spannung, während der ein oxidierender bzw. reduzierender Potentialwert erreicht wird, wobei sich die elektrische Spannung vor und nach dem Potentialpuls im neutralen Bereich befindet. Auf die Form des Potentialverlaufs im einzelnen kommt es nicht an. Es ist also insbesondere nicht erforderlich, daß der Spannungsverlauf eine geome-

trisch definierte Form (z.B. Rechteck, Dreieck oder Treppenfunktion) hat.

Als oxidierendes Potential wird ein elektrisches Potential der Arbeitselektrode bezeichnet, bei dem deren Oberfläche in Kontakt mit der Konditionierungsflüssigkeit oxidiert wird. Entsprechend ist ein Potential reduzierend, wenn es eine elektrochemische Reduktion der Metalloberfläche der Arbeitselektrode in Kontakt mit der Konditionierungsflüssigkeit bewirkt. Neutral ist ein Potential, bei dem auf einer blanken Metalloberfläche praktisch keine Oxid- oder Hydrid-Schicht gebildet wird. Dieser Zustand wird auch als Doppelschichtbereich des jeweiligen Metalles bezeichnet.

Allgemein gültige Zahlenwerte für das maximale Potential des zusätzlichen Pulses und für den Potentialwert, auf den dessen Potential zurückgeführt wird, können nicht angegeben werden, weil diese Potentialwerte von dem Material der Arbeitselektrode, von der Referenzelektrode, auf die sich das Potential bezieht und (in geringerem Umfang) von der Zusammensetzung der Konditionierungsflüssigkeit abhängig sind. Der Fachmann kann hierzu nähere Informationen aus veröffentlichten Daten, insbesondere aus Cyclovoltamogrammen des verwendeten Elektrodenmaterials, entnehmen. In jedem Fall lassen sich die Werte eines oxidierenden, reduzierenden oder neutralen Potentials experimentell bestimmen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines in den Figuren schematisch dargestellten Ausführungsbeispiels näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Detektionseinheit eines ECL-BBA-Analysegeräts,

Fig. 2 eine graphische Darstellung des Potentialverlaufs an der Arbeitselektrode während eines Detektionszyklus,

Fig. 3 ein Cyclovoltamogramm einer Platinelektrode.

Die in Fig. 1 dargestellte Detektionseinheit 1 bildet denjenigen Teil eines Analysegeräts, der den Detektionszyklus automatisch durchführt. Daneben weist ein solches Analysegerät Einheiten zur Durchführung der Reaktionsfolge auf, die zur Bildung eines mit einem ECL-Label markierten Komplexes (dessen Konzentration für die Analyse charakteristisch ist) und zu dessen Bindung an magnetische Mikropartikel führt. Diese Teile sind in Fig. 1 nicht dargestellt.

Herzstück der Detektionseinheit 1 ist eine elektrochemische Durchflußzelle 2, in der an einem engen Durchflußkanal 3 eine Arbeitselektrode 4 und eine Gegenelektrode 5 derartig angeordnet sind, daß sie von einer durch den Durchflußkanal 3 strömenden Flüssigkeit kontaktiert werden. Die Gegenelektrode 5 ist bevorzugt, wie dargestellt, gegenüber der Arbeitselektrode 4 (d.h. auf der gegenüberliegenden Seite des Durchflußkanals 3) positioniert. Eine Referenzelektrode 7 ist, in der Regel außerhalb des Durchflußkanals 3, an der insgesamt mit 8 bezeichneten Flüssigkeitsleitung der Detektionseinheit 1 angeordnet. Zum Ansaugen der Flüssigkeit wird üblicherweise eine Präzisions-Kolbenhubpumpe 9 eingesetzt, die stromabwärts von der Durchflußzelle in die Flüssigkeitsleitung 8 eingebaut ist.

Stromaufwärts von der Durchflußzelle 2 sind an die Leitung 8 mehrere Flüssigkeitsbehälter angeschlossen, aus denen Flüssigkeit wahlweise, gesteuert beispielsweise durch ein Mehrwegventil 10, in die Durchflußzelle 2 ge-

saugt werden kann. Im dargestellten Fall sind dies ein Behälter 12 mit Reinigungsflüssigkeit, ein Behälter 13 mit Konditionierungsflüssigkeit und ein Behälter 14 mit Probenflüssigkeit. Der Probenflüssigkeitsbehälter 14 ist üblicherweise als Teströhrchen (reaction tube) ausgebildet und sitzt in einem Bearbeitungsrotor 15, in dem auch die erforderlichen Schritte zur Durchführung der Bindungsreaktionen stattfinden. Von den in dem Bearbeitungsrotor 15 sitzenden Teströhrchen ist der Übersichtlichkeit halber nur eines dargestellt.

In der Durchflußmeßzelle 2 ist auf der von dem Durchflußkanal 3 abgewandten Seite der Arbeitselektrode 4 ein Magnet 17 angeordnet. Im dargestellten Fall handelt es sich um einen Permanentmagnet, der mittels einer Bewegungsmechanik 18 von der dargestellten Abfangposition (bei der mindestens einer seiner Pole möglichst nah bei der Arbeitselektrode 4 ist) in eine von der Arbeitselektrode 4 entfernte Ruheposition beweglich ist. Alternativ kann auch ein ein- und ausschaltbarer Elektromagnet verwendet werden.

Auf der der Abfangfläche 4a gegenüberliegenden Seite des Durchflußkanals 3 ist als Lichtdetektor 19 ein Photomultiplier so positioniert, daß seine lichtempfindliche Fläche parallel zu der als Ablagerungsfläche 4a bezeichneten, dem Durchflußkanal 3 zugewandten (und von dem Magneten 17 abgewandten) Oberfläche der Arbeitselektrode 4 verläuft.

Zur Steuerung des Gerätes und Verarbeitung der Signale des Lichtdetektors 19 ist eine Elektronikeinheit 16 vorgesehen, an die die Elemente der Detektionseinheit 1 angeschlossen sind (Anschlußleitungen nur teilweise dargestellt).

Für die Funktion der Detektionseinheit 1 ist wesentlich, daß während der einzelnen Verfahrensschritte eines Detektionszyklus der an der Arbeitselektrode 4 (bezogen auf die jeweils mit dieser in Kontakt stehende Flüssigkeit und somit bezogen auf die Referenzelektrode) anliegende Potentialverlauf bestimmte Merkmale aufweist, die nachfolgend anhand der graphischen Darstellung eines solchen Potentialverlaufes in Figur 2 näher erläutert werden. Die Figur bezieht sich auf eine Ausführungsform mit einer Platin-Arbeitselektrode. Die auf der Ordinate angegebenen Werte der Spannung  $U$  sind gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode gemessen und gegen die Zeit  $t$  in Sekunden aufgetragen. Der Detektionszyklus wird für jede Analyse in gleicher Weise wiederholt. Die nachfolgende Beschreibung beginnt mit dem Reinigungsschritt.

Ein Reinigungsschritt 20 wird jeweils nach der vorausgehenden Messung durchgeführt, um die Ablagerungsfläche 4a der Arbeitselektrode 4 von darauf haftenden Beads und sonstigen Verunreinigungen oder Veränderungen der Elektrodenoberfläche zu befreien. Dabei wird zur elektrochemischen Unterstützung des Reinigungsvorganges ein stark oxidierendes und/oder reduzierendes Potential  $ClO$  bzw.  $ClR$  an die Arbeitselektrode angelegt, dessen Potentialwert in der Regel höher ist als jedes andere (oxidierende bzw. reduzierende) Potential des Detektionszyklus. Bevorzugt ist - wie dargestellt - ein oxidierendes Potential  $ClO$ , dessen Wert höher ist als das ebenfalls oxidierende Potential des vorausgehenden Meßschrittes 21. Im dargestellten Fall enthält der Reinigungsschritt zwei kleinere reduzierende Pulse  $ClR1$  und  $ClR2$ . Dies ist jedoch nicht zwingend. Die Erfindung ist für jeden Detektionszyklus geeignet, bei dem während des Reinigungsschrittes ein oxidierendes oder reduzierendes Potential an die Arbeits-

elektrode angelegt wird, das so stark ist, daß nachfolgend zur Wiederherstellung des elektrochemischen Gleichgewichtes ein Konditionierungsschritt notwendig ist. Während des gesamten Reinigungsschrittes wird mittels der Pumpe 9 Reinigungsflüssigkeit aus dem Behälter 12 durch die Leitung 8 und somit auch durch den Durchflußkanal 3 geleitet.

Der nachfolgende Konditionierungsschritt 22 dient dazu, nach dem Reinigungsschritt 20 das erforderliche elektrochemische Gleichgewicht an der Elektrodenoberfläche wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wird eine Sequenz von abwechselnd reduzierenden und oxidierenden Potentialpulsen an die Arbeitselektrode angelegt, die in Figur 2 mit CO1, CR1, CO2, CR2, CO3 und CR3 bezeichnet sind.

Vorzugsweise besteht die Sequenz der Konditionierungspulse - wie dargestellt - aus einer abwechselnden Folge oxidierender und reduzierender Potentialpulse, wobei eine gerade Gesamtzahl der reduzierenden und oxidierenden Potentialpulse besonders bevorzugt ist. Die Dauer jedes Konditionierungspulses liegt in der Praxis bei weniger als einer Sekunde, wobei Werte von weniger als 0,7 Sekunden und mehr als 0,1 Sekunden bevorzugt sind und sich der Bereich zwischen etwa 0,3 Sekunden und etwa 0,5 Sekunden besonders bewährt hat.

Für die Erfindung ist charakteristisch, daß im Anschluß an den Konditionierungsschritt 22 und vor dem in Figur 2 mit  $t_p$  bezeichneten Zeitpunkt, zu dem die Probe aus dem Probenbehälter 14 über das Ventil 10 in den Durchflußkanal 3 gepumpt wird (somit die in der Probenflüssigkeit enthaltenen Beads in Kontakt mit der Arbeitselektrode 4 gebracht werden), ein zusätzlicher Potentialpuls in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingefügt wird, der

in Figur 2 mit DIP für "deposition improvement pulse" bezeichnet ist. Dieser zusätzliche Potentialpuls ist so hoch, daß er für eine sehr kurze, jedoch zur elektrochemischen Beeinflussung der Elektrodenoberfläche wirksame Zeitdauer (vorzugsweise mindestens etwa 0,05 Sekunden, besonders bevorzugt mindestens 0,1 Sekunden) einen oxidierenden oder reduzierenden Potentialwert erreicht. Weiter ist wesentlich, daß das Potential vor dem Zeitpunkt  $t_p$  auf einen neutralen (weder oxidierenden noch reduzierenden) Potentialwert zurückgeführt wird. Besonders bevorzugt ist der dargestellte Fall eines oxidierenden DIP, wobei dieser wiederum vorzugsweise einem vorausgehenden reduzierenden Potentialpuls CR des Konditionierungsschrittes 22 folgt.

Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, daß es mittels des DIP möglich ist, die Oberfläche der Elektrode optimal für den Abfangschritt vorzubereiten und gleichzeitig auf die Eigenschaften der Beads (z.B. Oberflächeneigenschaften, Zeta-Potential, Klebrigkeit etc.) abzustimmen. Durch experimentelle Optimierung des DIP kann das Depositionsmuster so eingestellt werden, daß es optimal den Anforderungen eines ECL-Nachweisverfahrens entspricht.

Zu dem Zeitpunkt  $t_p$  befindet sich der Magnet 17 in der in Figur 1 dargestellten Abfangposition. Die mit der Probenflüssigkeit durch den Durchflußkanal 3 strömenden Mikropartikel werden unter Einwirkung seines Magnetfeldes auf der Oberfläche der Arbeitselektrode abgelagert. Während des Abfangschrittes 23 und auch während des nachfolgenden Waschschrattes 24 befindet sich das Potential der Arbeitselektrode bevorzugt - wie dargestellt - im neutralen Bereich. Bei vorbekannten Verfahren ist die Arbeitselektrode während dieser Schritte meist von dem Potentiosta-

ten getrennt, befindet sich also auf keinem definierten Potential. Gemäß der WO 89/10551 soll in diesem Abschnitt des Detektionszyklus das dort beschriebene "preoperative potential", nämlich ein konstantes oxidierendes oder reduzierendes Potential, an die Arbeitselektrode 4 angelegt werden.

Abgesehen von dem Potential der Gegenelektrode werden der Abfangschritt 23 und der Waschschrift 24 ebenso wie der nachfolgende Meßschritt 21 in der üblichen Weise durchgeführt, wobei zu dem Zeitpunkt  $t_W$  das Mehrwegventil 10 derartig umgeschaltet wird, daß statt der Probenflüssigkeit die Konditionierungsflüssigkeit aus dem Behälter 13 in die Leitung 8 angesaugt wird, welche zugleich als Waschflüssigkeit für die bound/free-Trennung dient.

Statt des einen zusätzlichen Potentialpulses DIP können auch mehrere zusätzliche Potentialpulse zwischen dem Konditionierungsschritt 22 und dem Abfangschritt 23 in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingefügt sein, wobei vorzugsweise alle DIPs entweder oxidierend oder reduzierend sind. Die Gesamtdauer der Zeit, in der sich der eine DIP oder die mehreren DIPs im oxidierenden bzw. reduzierenden Bereich befindet, sollte in jedem Detektionszyklus mindestens 0,05 Sekunden, vorzugsweise mindestens 0,1 Sekunden und höchstens eine Sekunde, bevorzugt höchstens 0,3 Sekunden, betragen.

Figur 3 zeigt ein zyklisches Voltamogramm einer Platinelektrode. Derartige Messungen werden üblicherweise durchgeführt, indem man das an der Elektrode anliegende Potential gegenüber einer Referenzelektrode dreieckförmig variiert und dabei die Strom/Spannung-Kurven in der dargestellten Weise registriert. Das hier dargestellte Cyclovoltamogramm resultiert aus der Messung einer

Platinelektrode in Kontakt mit einer 1M-Schwefelsäurelösung. Die auf der Abszisse angegebenen Spannungswerte beziehen sich auf eine Normal-Wasserstoffelektrode. Auf der Ordinate ist der Stromfluß  $I$  in  $\text{mA}/\text{cm}^2$  dargestellt.

Verfolgt man den Strom-Spannungsverlauf ausgehend von dem Punkt A in Richtung des Pfeiles, so befindet sich das Potential zunächst in einem Bereich, in dem nur ein kaum meßbarer Strom fließt, der durch die Aufladung einer Doppelschicht verursacht ist. Dieser Bereich wird in der englischsprachigen Literatur als "double-layer region" bezeichnet. In dem Kurvenabschnitt B steigt der Stromfluß stark an. Hier wird ein im Sinne der vorliegenden Erfindung oxidierender Potentialwert erreicht, d.h. die Platinoberfläche wird elektrochemisch oxidiert. Die Fläche unter der Kurve entspricht der für die Oxidation verbrauchte Ladungsmenge.

Wenn die an der Elektrode anliegende Spannung nach Erreichen ihres Maximalwertes (hier etwa 1,5 V) sinkt, ist der Stromfluß zunächst wieder gering, steigt dann jedoch in dem Bereich, in dem die Oxidschicht abgebaut wird, wieder an (Kurvenbereich C). Nach Abbau der Oxidschicht fällt die Stromstärke in dem Doppelschichtbereich wieder nahe Null ab, bis die Spannung einen Wert erreicht, bei dem eine Reduktion des (zuvor im wesentlichen reinen) Platin einsetzt. Dieser Anstieg im Kurvenbereich D markiert einen reduzierenden Potentialwert im Sinne der vorliegenden Erfindung. Der Spannungsbereich zwischen dem oxidierenden und dem reduzierenden Potential wird als neutraler Bereich N bezeichnet. Nach der erneuten Umkehrung des Potentials bei etwa 0,1 V wird die Reduktionsschicht auf der Platinoberfläche in dem Kurvenbereich E abgebaut.

Beispiel:

Mit einem Gerät Elecsys 2010 der Boehringer Mannheim GmbH wurden Vergleichstests durchgeführt, um die Ergebnisse mit und ohne DIP zu vergleichen. Der Detektionszyklus entsprach dabei Figur 2, wobei bei den Versuchen mit DIP ein zusätzlicher oxidierender Impuls in Rechteckform mit einer Impulshöhe von + 0,9 V und einer Impulsdauer von 0,2 sec. eingefügt wurde. Für einen PSA-Test (PSA = Prostata-spezifisches Antigen) ergaben sich dabei ohne DIP folgende Werte.

Tabelle 1:

Nr.	Konz. ng/ml	N	MW	VK %
1	0.00	11	1020.94	2.66
2	0.75	4	4957.80	2.00
3	2.97	2	16698.81	1.75
4	16.20	2	84445.07	2.10
5	75.10	2	398381.77	0.99
6	142.00	2	741512.39	1.62

Mit DIP ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2:

Nr.	Konz. ng/ml	N	MW	VK %
1	0.00	11	1045.33	1.12
2	0.75	4	5874.34	0.63
3	2.97	2	20930.29	1.06
4	16.20	2	107626.88	1.26
5	75.10	2	497223.62	0.09
6	142.00	2	950228.61	0.26

Darin haben die Spaltenüberschriften folgende Bedeutung:

Konz.: Soll-Konzentration der verwendeten Kalibrationsprobe

N: Anzahl der durchgeführten Messungen

MW: Mittelwert des Meßsignals in willkürlichen Einheiten

VK: Variationskoeffizient des Signals in Prozent

Man erkennt, daß der DIP zu einer wesentlichen Verbesserung der Signaldynamik (Quotient aus dem höchsten und niedrigsten MW) führt. Dieser Wert liegt mit DIP bei 909 und somit um etwa 25% höher als ohne DIP (726). Außerdem ist die Präzision, die sich durch die Höhe des Variationskoeffizienten VK ausdrückt, erheblich verbessert.

Durch visuelle Beobachtung und mittels Videoaufzeichnungen während des Analysezyklus ist festzustellen, daß die Beads außerdem wesentlich stabiler abgelagert werden. Ohne DIP findet während des Waschschruttes eine Bewegung der Beads statt, die für die Meßgenauigkeit nachteilig ist, insbesondere weil sie zu Verlusten von bereits abgelagerten Beads von der Arbeitselektrode führt.

## Ansprüche

1. Verfahren zur Analyse einer flüssigen Probe, insbesondere einer Körperflüssigkeit, bezüglich einer darin befindlichen Substanz,  
mittels eines Elektrochemolumineszenz-Bindungsreaktion-Verfahrens, bei dem  
eine Reaktionsfolge abläuft, die mindestens eine spezifische biochemische Bindungsreaktion einschließt und zur Bildung eines eine chemolumineszierende Markersubstanz enthaltenden für die Analyse charakteristischen Komplexes und Bindung des Komplexes an magnetische Mikropartikel führt  
und in einer Meßzelle (2) mit einer Arbeitselektrode (4) zur Bestimmung der Konzentration der markierten Mikropartikel ein Detektionszyklus mit einer Sequenz folgender Schritte abläuft:
  - ein Reinigungsschritt (20), bei dem zur elektrochemischen Reinigung der Arbeitselektrode (4) ein stark oxidierendes (ClO) und/oder reduzierendes (ClR) Potential an die Arbeitselektrode (4) angelegt wird,
  - einen Konditionierungsschritt (22), bei dem eine Sequenz von abwechselnd reduzierenden und oxidierenden Potentialpulsen (CO1, CR1, CO2, CR2 ...) an die Arbeitselektrode angelegt wird,
  - ein Abfangschritt (23), bei dem die Probe mit den Mikropartikeln derartig mit der Arbeitselektrode

(4) kontaktiert wird, daß sich die Mikropartikel unter Einwirkung des Magnetfeldes eines auf der von der Probe abgewandten Seite der Arbeitselektrode (17) positionierten Magneten auf einer der Probe zugewandten Ablagerungsfläche (4a) der Arbeitselektrode ablagern,

- ein Meßschritt (21), bei dem ein die ECL-Reaktion triggernder Potentialverlauf an die Arbeitselektrode angelegt und das dabei infolge der Elektrolumineszenz von der Markierungssubstanz ausgehende Licht gemessen wird, um die Konzentration der Markierungssubstanz an der Ablagerungsfläche (4a) der Arbeitselektrode (4) zu bestimmen,

**dadurch gekennzeichnet**, daß

zur Verbesserung der Ablagerung der Mikropartikel zwischen dem Konditionierungsschritt (22) und dem Abfangschritt (23) ein zusätzlicher Potentialpuls (DIP) mit einem oxidierenden oder reduzierenden Potential in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingefügt ist, wobei der zusätzliche Potentialpuls (DIP) vor der Kontaktierung (Zeitpunkt  $t_p$ ) der Arbeitselektrode (4) mit der Probe auf ein neutrales, weder oxidierendes noch reduzierendes, Potential zurückgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der dem zusätzlichen Potentialpuls (DIP) vorausgehende letzte Potentialpuls des Konditionierungsschritts (22) ein reduzierender Potentialpuls (CR3) ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zusätzliche Potentialpuls (DIP) ein oxidierender Potentialpuls ist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß in dem Konditionierungsschritt abwechselnd oxidierende (CO1, CO2 ...) und reduzierende (CR1, CR2 ...) Potentialpulse an die Arbeitselektrode (4) angelegt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Anzahl der reduzierenden und oxidierenden Potentialpulse gleich groß ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zusätzliche Potentialpuls (DIP) die gleiche Polarität wie der die ECL-Reaktion während des Meßschrittes (21) triggernde Potentialverlauf hat und der höchste Wert des zusätzlichen Potentialpulses (DIP) niedriger als der höchste Wert des die ECL-Reaktion triggernden Potentialverlaufes ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Arbeitselektrode eine Platinelektrode ist und der höchste Wert des zusätzlichen Potentialpulses (DIP) einer Spannung von mindestens 0,6 V, vorzugsweise mindestens 0,8 V, gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode entspricht.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der höchste Wert des zusätzlichen Potentialpulses (DIP) einer Spannung von höchstens 1,6 V, vorzugsweise höchstens 1,2 V, gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode entspricht.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Verbesserung der Ab-

lagerung der Mikropartikel mehrere zusätzliche Potentialpulse zwischen dem Konditionierungsschritt b) und dem Abfangschritt c) in den Spannungsverlauf des Detektionszyklus eingefügt sind, wobei der letzte zusätzliche Potentialpuls vor der Kontaktierung der Arbeitselektrode mit der Probe auf ein neutrales, weder oxidierendes noch reduzierendes, Potential zurückgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gesamtdauer der Zeit, in der sich der mindestens eine zusätzliche Potentialpuls im oxidierenden bzw. reduzierenden Potentialbereich befindet, in jedem Detektionszyklus mindestens 0,05 Sekunden, bevorzugt mindestens 0,1 Sekunden, beträgt.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gesamtdauer der Zeit, in der sich der mindestens eine zusätzliche Potentialpuls im oxidierenden bzw. reduzierenden Potentialbereich befindet, in jedem Detektionszyklus höchstens eine Sekunde, bevorzugt höchstens 0,3 Sekunden, beträgt.

Fig. 1

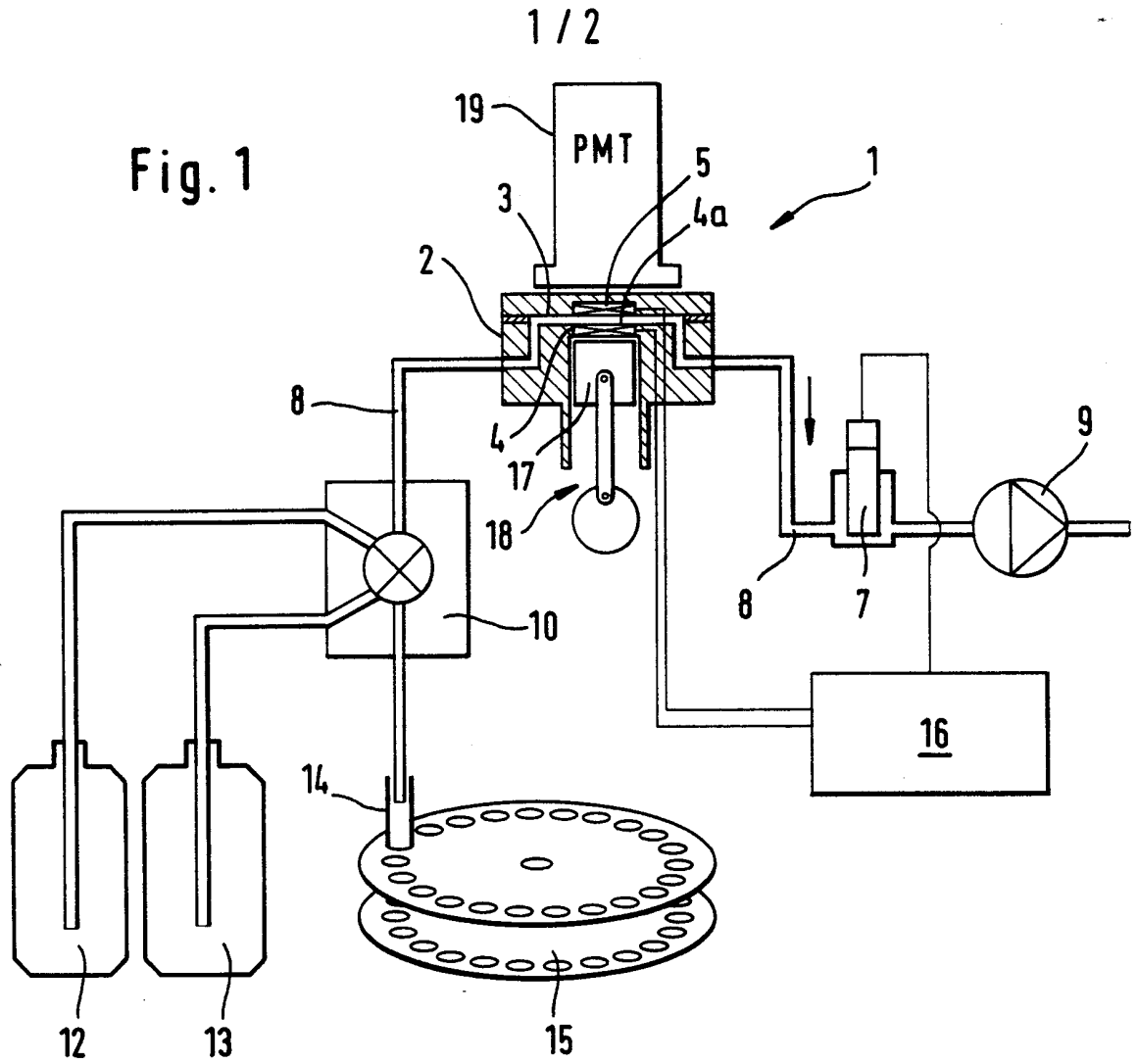
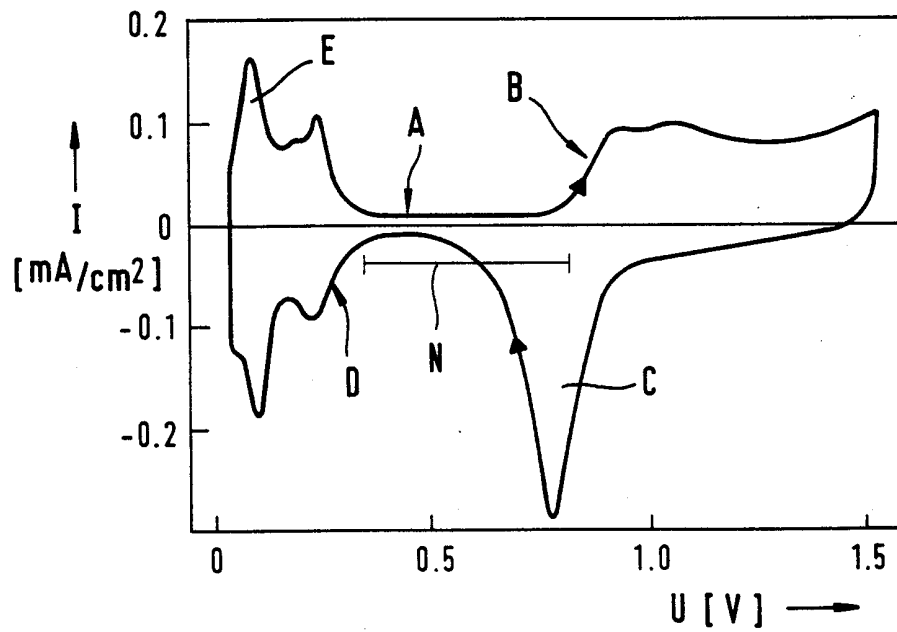


Fig. 3



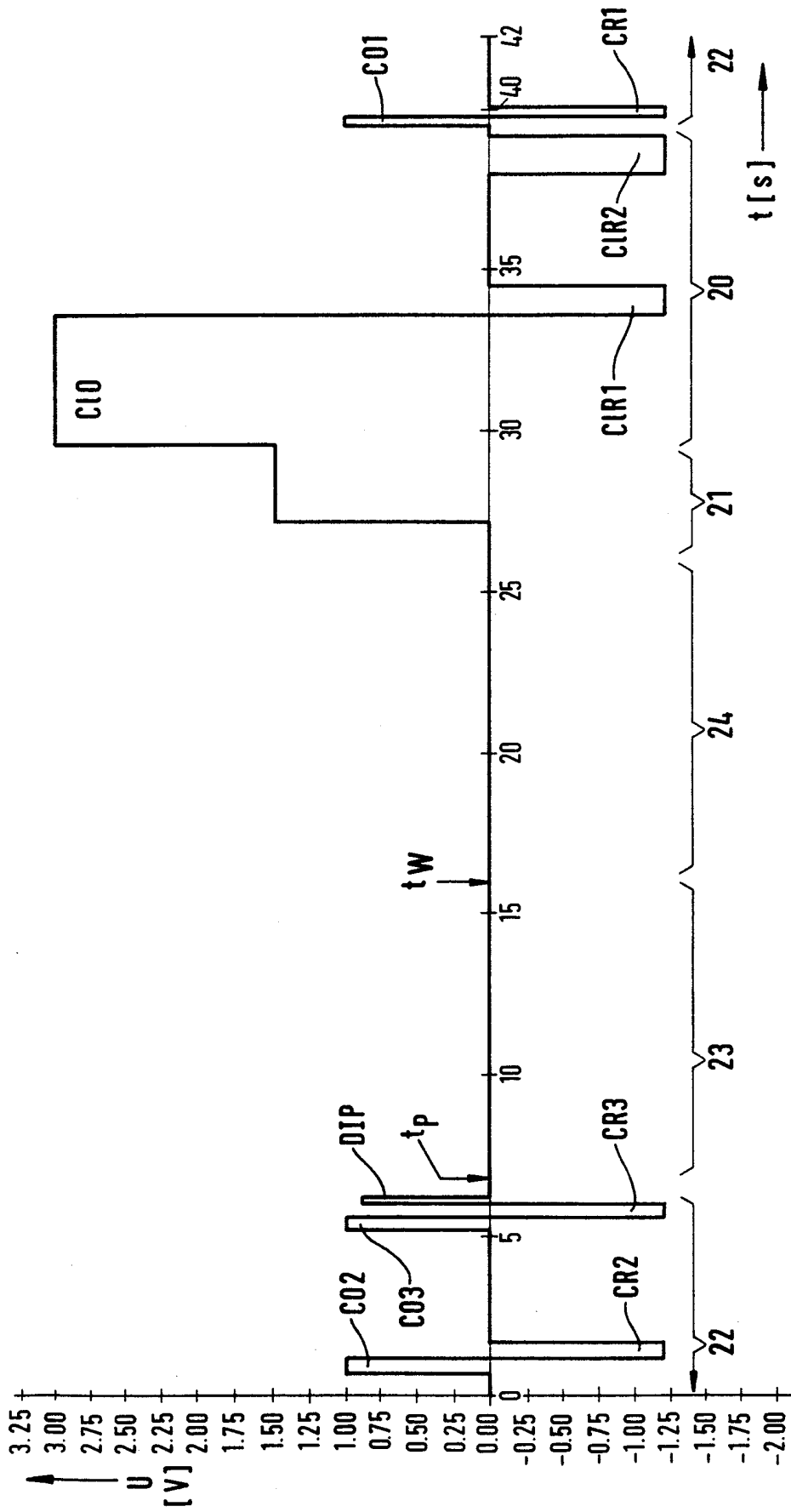


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/00197

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 G01N33/543 G01N33/58 G01N27/327

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 6 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)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 647 849 A (IGEN INC) 12 April 1995 see example 48 ----	1
A	WO 92 14138 A (EISAI CO LTD ; IGEN INC (US)) 20 August 1992 see the whole document ----	1
A	WO 89 10551 A (IGEN INC) 2 November 1989 cited in the application see abstract ----	1
A	WO 90 11511 A (IGEN INC ; HALL LEE O (US); ZOSKI GLENN (US); TYAGI SURENDERA K (US) 4 October 1990 cited in the application see abstract -----	1

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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 1999

Date of mailing of the international search report

30/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/00197

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0647849	A	12-04-1995	EP 0658564 A	21-06-1995
			AT 127923 T	15-09-1995
			AU 685071 B	15-01-1998
			AU 5754094 A	12-05-1994
			AU 644150 B	02-12-1993
			AU 7433891 A	08-08-1991
			AU 605158 B	10-01-1991
			AU 7581687 A	24-11-1987
			CA 1339465 A	16-09-1997
			DE 3751516 D	19-10-1995
			DK 16293 A	12-02-1993
			DK 689787 A	25-02-1988
			EP 0265519 A	04-05-1988
			FI 875732 A	28-12-1987
			IL 101990 A	04-01-1998
			IL 110557 A	04-01-1998
			JP 2648474 B	27-08-1997
			JP 9118688 A	06-05-1997
			JP 2674957 B	12-11-1997
			JP 7309836 A	28-11-1995
			JP 7267972 A	17-10-1995
			JP 7037464 B	26-04-1995
			JP 1500146 T	19-01-1989
			KR 9616340 B	09-12-1996
			NO 176071 B	17-10-1994
			NO 943690 A	23-02-1988
			WO 8706706 A	05-11-1987
			US 5635347 A	03-06-1997
			US 5591581 A	07-01-1997
			US 5770459 A	23-06-1998
			US 5846485 A	08-12-1998
			US 5811236 A	22-09-1998
			US 5716781 A	10-02-1998
WO 9214138	A	20-08-1992	AT 173542 T	15-12-1998
			AU 668085 B	26-04-1996
			AU 1420692 A	07-09-1992
			AU 1530492 A	07-09-1992
			CA 2103674 A	07-08-1992
			CN 1065339 A	14-10-1992
			CN 1064945 A	30-09-1992
			DE 69227624 D	24-12-1998
			EP 0570518 A	24-11-1993
			EP 0877252 A	11-11-1998
			ES 2126591 T	01-04-1999
			IE 69060 B	07-08-1996
			IE 69371 B	04-09-1996
			IL 100866 A	31-10-1995
			IL 100867 A	08-12-1995
			JP 6509412 T	20-10-1994
			JP 6508203 T	14-09-1994
			WO 9214139 A	20-08-1992
			US 5635347 A	03-06-1997
			US 5705402 A	06-01-1998
			US 5770459 A	23-06-1998
			US 5779976 A	14-07-1998
			US 5746974 A	05-05-1998
			US 5798083 A	25-08-1998

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/DE 99/00197
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8910551 A	02-11-1989	AT 155247 T	15-07-1997
		AT 172299 T	15-10-1998
		AU 620871 B	27-02-1992
		AU 3564989 A	24-11-1989
		CA 1333847 A	10-01-1995
		DE 68928168 D	14-08-1997
		DE 68928168 T	30-10-1997
		DE 68928835 D	19-11-1998
		DE 68928835 T	22-04-1999
		EP 0417140 A	20-03-1991
		EP 0601634 A	15-06-1994
		JP 7095034 B	11-10-1995
		JP 3503451 T	01-08-1991
		SG 48842 A	18-05-1998
US 5147806 A	15-09-1992		
WO 9011511 A	04-10-1990	US 5068088 A	26-11-1991
		AT 130090 T	15-11-1995
		AU 649220 B	19-05-1994
		AU 5335590 A	22-10-1990
		AU 672711 B	10-10-1996
		AU 7036194 A	13-10-1994
		CA 2012418 A,C	17-09-1990
		DE 69023509 D	14-12-1995
		DE 69023509 T	23-05-1996
		DK 496731 T	26-02-1996
		EP 0496731 A	05-08-1992
		ES 2079474 T	16-01-1996
		JP 4505657 T	01-10-1992
		KR 9616170 B	04-12-1996
		US 5296191 A	22-03-1994
		US 5247243 A	21-09-1993

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00197

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 6 G01N33/543 G01N33/58 G01N27/327

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 647 849 A (IGEN INC) 12. April 1995 siehe Beispiel 48 ----	1
A	WO 92 14138 A (EISAI CO LTD ; IGEN INC (US)) 20. August 1992 siehe das ganze Dokument ----	1
A	WO 89 10551 A (IGEN INC) 2. November 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ----	1
A	WO 90 11511 A (IGEN INC ; HALL LEE O (US); ZOSKI GLENN (US); TYAGI SURENDERA K (US)) 4. Oktober 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung -----	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/06/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00197

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0647849 A	12-04-1995	EP 0658564 A	21-06-1995
		AT 127923 T	15-09-1995
		AU 685071 B	15-01-1998
		AU 5754094 A	12-05-1994
		AU 644150 B	02-12-1993
		AU 7433891 A	08-08-1991
		AU 605158 B	10-01-1991
		AU 7581687 A	24-11-1987
		CA 1339465 A	16-09-1997
		DE 3751516 D	19-10-1995
		DK 16293 A	12-02-1993
		DK 689787 A	25-02-1988
		EP 0265519 A	04-05-1988
		FI 875732 A	28-12-1987
		IL 101990 A	04-01-1998
		IL 110557 A	04-01-1998
		JP 2648474 B	27-08-1997
		JP 9118688 A	06-05-1997
		JP 2674957 B	12-11-1997
		JP 7309836 A	28-11-1995
		JP 7267972 A	17-10-1995
		JP 7037464 B	26-04-1995
		JP 1500146 T	19-01-1989
		KR 9616340 B	09-12-1996
		NO 176071 B	17-10-1994
		NO 943690 A	23-02-1988
		WO 8706706 A	05-11-1987
		US 5635347 A	03-06-1997
		US 5591581 A	07-01-1997
		US 5770459 A	23-06-1998
		US 5846485 A	08-12-1998
		US 5811236 A	22-09-1998
		US 5716781 A	10-02-1998
-----			
WO 9214138 A	20-08-1992	AT 173542 T	15-12-1998
		AU 668085 B	26-04-1996
		AU 1420692 A	07-09-1992
		AU 1530492 A	07-09-1992
		CA 2103674 A	07-08-1992
		CN 1065339 A	14-10-1992
		CN 1064945 A	30-09-1992
		DE 69227624 D	24-12-1998
		EP 0570518 A	24-11-1993
		EP 0877252 A	11-11-1998
		ES 2126591 T	01-04-1999
		IE 69060 B	07-08-1996
		IE 69371 B	04-09-1996
		IL 100866 A	31-10-1995
		IL 100867 A	08-12-1995
		JP 6509412 T	20-10-1994
		JP 6508203 T	14-09-1994
		WO 9214139 A	20-08-1992
		US 5635347 A	03-06-1997
		US 5705402 A	06-01-1998
		US 5770459 A	23-06-1998
US 5779976 A	14-07-1998		
US 5746974 A	05-05-1998		
US 5798083 A	25-08-1998		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00197

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8910551 A	02-11-1989	AT 155247 T	15-07-1997
		AT 172299 T	15-10-1998
		AU 620871 B	27-02-1992
		AU 3564989 A	24-11-1989
		CA 1333847 A	10-01-1995
		DE 68928168 D	14-08-1997
		DE 68928168 T	30-10-1997
		DE 68928835 D	19-11-1998
		DE 68928835 T	22-04-1999
		EP 0417140 A	20-03-1991
		EP 0601634 A	15-06-1994
		JP 7095034 B	11-10-1995
		JP 3503451 T	01-08-1991
		SG 48842 A	18-05-1998
		US 5147806 A	15-09-1992
		WO 9011511 A	04-10-1990
AT 130090 T	15-11-1995		
AU 649220 B	19-05-1994		
AU 5335590 A	22-10-1990		
AU 672711 B	10-10-1996		
AU 7036194 A	13-10-1994		
CA 2012418 A,C	17-09-1990		
DE 69023509 D	14-12-1995		
DE 69023509 T	23-05-1996		
DK 496731 T	26-02-1996		
EP 0496731 A	05-08-1992		
ES 2079474 T	16-01-1996		
JP 4505657 T	01-10-1992		
KR 9616170 B	04-12-1996		
US 5296191 A	22-03-1994		
US 5247243 A	21-09-1993		