

(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2004-509618

(P2004-509618A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl.⁷**C12Q 1/26****C12Q 1/32****GO1N 33/66**

F 1

C 12 Q 1/26

C 12 Q 1/32

GO1N 33/66

テーマコード(参考)

2 G 04 5

4 B 06 3

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2002-527297(P2002-527297)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月7日(2001.9.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年3月11日(2003.3.11)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2001/028169
 (87) 國際公開番号 WO2002/022855
 (87) 國際公開日 平成14年3月21日(2002.3.21)
 (31) 優先権主張番号 09/659,938
 (32) 優先日 平成12年9月12日(2000.9.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 596159500
 ライフスキャン・インコーポレイテッド
 Lifescan, Inc.
 アメリカ合衆国、95035 カリフォルニア州、ミルピタス、ジブラルター・ドライブ 1000
 1000 Gibraltar Drive, Milpitas, California 95035, United States of America
 (74) 代理人 100066474
 弁理士 田澤 博昭
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延

最終頁に続く

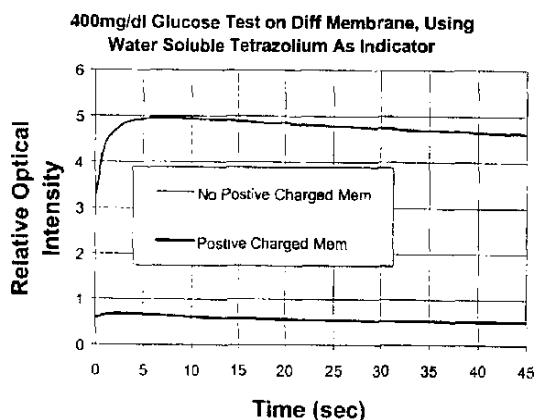
(54) 【発明の名称】サンプル中の還元された補助要因の存在を検出するための試験ストリップおよびその使用方法

(57) 【要約】

【課題】サンプル中の検体検出に使用される試験ストリップとその使用方法を提供する。

【解決手段】サンプル中の検体検出に使用される試験ストリップとその使用方法が提供される。この試験ストリップは、正電荷を持つ基質の表面に水溶性のテトラゾリウム塩を少なくとも含むことを特徴とする。多くの実施の形態として、水溶性のテトラゾリウム塩は検体酸化信号生成システムの構成要素として存在する。このシステムはさらに1以上の次のような成分を含む。すなわち、検体デヒドロゲナーゼ、検体オキシダーゼのような検体酸化酵素、電子伝達剤および酵素補助要因である。また、この試験ストリップが組み込まれたシステムおよびキットが提供される。これらの試験ストリップ、システムおよびキットは、サンプル、例えば血液、血液片のような生理学的サンプル中の種々の検体の検出に使用される。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

正電荷を持つ基質と、前記正電荷を持つ基質の少なくとも 1 つの面に存在する少なくとも 1 つの水溶性テトラゾリウム塩とを備えた組成物。

【請求項 2】

前記正電荷を持つ基質が吸収性の基質であることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記正電荷を持つ基質が非吸収性の基質であることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

前記水溶性テトラゾリウム塩が検体酸化信号生成システムの構成要素であることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。 10

【請求項 5】

前記検体酸化信号生成システムが検体オキシダーゼを含むことを特徴とする請求項 4 記載の組成物。

【請求項 6】

前記検体酸化信号生成システムが検体デヒドロゲナーゼを含むことを特徴とする請求項 4 記載の組成物。

【請求項 7】

前記検体酸化信号生成システムがさらに電子伝達剤を含むことを特徴とする請求項 4 記載の組成物。 20

【請求項 8】

前記検体酸化信号生成システムがさらに酵素補助要因を含むことを特徴とする請求項 4 記載の組成物。

【請求項 9】

前記検体酸化信号生成システムが試薬組成物として存在することを特徴とする請求項 4 記載の組成物。

【請求項 10】

正電荷を持つ基質と、前記正電荷を持つ基質上に存在する検体酸化信号生成システムとを備え、前記検体酸化信号生成システムが水溶性のテトラゾリウム塩を含むことを特徴とする試薬試験ストリップ。 30

【請求項 11】

前記正電荷を持つ基質が吸収性であることを特徴とする請求項 10 記載の試験ストリップ。

【請求項 12】

前記正電荷を持つ基質が非吸収性であることを特徴とする請求項 10 記載の試験ストリップ。

【請求項 13】

前記水溶性テトラゾリウム塩が無水物を受容して水溶性ホルマザン生成物を生成することを特徴とする請求項 10 記載の試験ストリップ。

【請求項 14】

前記検体酸化信号生成システムが検体オキシダーゼを含むことを特徴とする請求項 10 記載の試験ストリップ。 40

【請求項 15】

前記検体酸化信号生成システムがさらに電子伝達剤を含むことを特徴とする請求項 14 記載の試験ストリップ。

【請求項 16】

前記検体酸化信号生成システムがさらに酵素補助要因を含むことを特徴とする請求項 14 記載の試験ストリップ。

【請求項 17】

前記検体酸化信号生成システムがグルコース酸化信号生成システムであることを特徴とす 50

る請求項 10 記載の試験ストリップ。

【請求項 18】

(a) (i) 正電荷を持つ基質と、(ii) 前記基質上に存在し、水素化物を受容して水溶性ホルマザンを生成できる水溶性テトラゾリウム塩を含む検体酸化信号生成システムと、(b) 自動化装置とを備えた検体検出または測定システム。

【請求項 19】

サンプル中の検体の存在を検出する、または濃度を測定する方法であって、(a) (i) 正電荷を持つ基質と、(ii) 前記基質上に存在し、水溶性ホルマザン生成物を生成できる水溶性テトラゾリウム塩を含み、これにより前記ホルマザン生成物を含む洗浄不能スポットを前記基質上に生成できる検体酸化信号生成システムとを備えた試薬試験ストリップ 10 に前記生理学的サンプルを塗る工程と、

(b) 前記洗浄不能スポットを検出する工程と、

(c) 前記検出された洗浄不能スポットを前記生理学的サンプル中の前記検体の存在または濃度に関連付ける工程とを備えた方法。

【請求項 20】

前記信号生成システムがさらに検体オキシダーゼを含むことを特徴とする請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記信号生成システムがさらに少なくとも 1 つの電子伝達剤を含むことを特徴とする請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

前記サンプルが全血またはその抽出物であることを特徴とする請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

前記検出工程および関連付け工程が自動化された装置によって実施されることを特徴とする請求項 19 記載の方法。

【請求項 24】

生理学的サンプル中の検体の濃度測定に使用されるキットであって、(a) (i) 正電荷を持つ基質と、(ii) 前記基質上に存在し、水溶性ホルマザン生成物を生成できる水溶性テトラゾリウム塩を含む検体酸化信号生成システムとを含む試薬試験ストリップと、

(b) (i) 生理学的サンプルを取得する手段、(ii) 検体標準の少なくとも 1 つを備えたキット。

【請求項 25】

前記生理学的サンプルを取得するための前記手段がランスであることを特徴とする請求項 24 記載のキット。

【請求項 26】

前記検体標準が、既知の試薬を標準濃度含むことを特徴とする請求項 24 記載のキット。

【請求項 27】

前記キットが、生理学的サンプルを取得するための手段と、検体標準とを備えたことを特徴とする請求項 24 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

序

技術分野

この発明の分野は検体の測定に関するものである。

【0002】

従来技術

生理学的液体、例えば血液または血液抽出物中の検体の検出は、今日の社会においてはますます重要となっている。検体検出測定法は、臨床検査室試験、家庭試験等の様々な用途に使用され、これらの試験結果は様々な病状の診断と処理に卓越した役割を果たしている。関心が持たれている検体には、アルコール、ホルムアルデヒド、グルコース、グルタミ

10

20

40

50

ン酸、グリセロール、D-ヒドロキシブチレート、L-乳酸塩、ロイシン、リンゴ酸、ピルビン酸、ステロイド等が含まれる。このような検体検出の重要度の増大に応じて、様々な検体検出プロトコルや検体検出装置が、臨床用にも家庭用にも開発されてきた。これまでに開発されたプロトコルや装置の多くは、血液のような生理学的サンプル中に存在する当該検体を認識するために信号生成システムを用いている。

様々な検体を検出するために、これまでに上記のような種々の信号生成システムが開発されているが、このようなシステムのさらなる開発が引き続き求められている。

【0003】

関連文献

関連する特許は、欧州公開公報第0908453号、国際特許第94/01578号、国際特許第94/01544号を含む。 10

【0004】

発明の概要

サンプル中の検体検出に使用される試験ストリップとその使用方法が提供される。この試験ストリップは、正電荷を持つ基質の表面に水溶性のテトラゾリウム塩を少なくとも含むことを特徴とする。多くの実施の形態として、水溶性のテトラゾリウム塩は検体酸化信号生成システムの構成要素として存在する。このシステムはさらに1以上の次のような成分を含む。すなわち、検体デヒドロゲナーゼ、検体オキシダーゼのような検体酸化酵素、電子伝達剤および酵素補助要因である。また、この試験ストリップが組み込まれたシステムおよびキットが提供される。これらの試験ストリップ、システムおよびキットは、サンプル、例えば血液、血液片またはISF(細胞間液)のような生理学的サンプル中の種々の検体の検出に使用される。 20

【0005】

発明を実施するための最良の形態

サンプル中の検体測定に使用される試験ストリップとその使用方法が提供される。この試験ストリップは、正電荷を持つ基質の表面に水溶性のテトラゾリウム塩を少なくとも含むことを特徴とする。多くの実施の形態として、水溶性のテトラゾリウム塩は検体酸化信号生成システムの構成要素として存在する。このシステムはさらに1以上の次のような成分を含む。すなわち、検体デヒドロゲナーゼ、検体オキシダーゼのような検体酸化酵素、電子伝達剤および酵素補助要因である。また、この試験ストリップが組み込まれたシステムおよびキットが提供される。これらの試験ストリップ、システムおよびキットは、サンプル、例えば血液、血液片またはISF(細胞間液)のような生理学的サンプル中の種々の検体の検出に使用される。 30

【0006】

本発明について詳細に述べる前に理解されるべきことは、下記の特定の実施の形態を種々に変更することができ、それらの変更は依然として特許請求の範囲に含まれるので、この発明は下記の特定の実施の形態によって限定されないことである。また、用いられている用語は実施の形態を説明するためのものであり、限定するためのものではないことが理解されるべきである。むしろ、本発明の範囲は特許請求の範囲により確定されるであろう。 40

【0007】

本明細書と特許請求の範囲において、特に明示しない限り、単数に言及した場合は複数の場合を含むものとする。特に定義しない限り、本明細書で使われている全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の技術者に通常理解されるのと同様の意味を持つ。 40

【0008】

組成物

上記のように、本発明はサンプル中の種々の検体を検出するために使用される組成物を提供する。組成物は正電荷を持つ基質と、基質の表面に存在し、典型的には検体酸化信号生成システムの構成要素として存在する水溶性のテトラゾリウム塩を含む。本組成物は試薬試験ストリップ中で見られるように典型的には乾燥組成物として存在する。本発明は特に、全血または、グルコース、アルコール、グリケート化たんぱく質などの血液抽出片の中 50

の特定の検体の分析のためのストリップを提供する。最も広い意味では、試薬試験ストリップは、正電荷を持つ基質と、その基質の表面に存在する水溶性テトラゾリウム塩を含む検体酸化信号生成システムとを含む。以下、本組成物の上述した要素をより詳細に説明する。

【0009】

正電荷を持つ基質

本組成物の特徴は、正電荷を持つ基質の存在である。正電荷を持つ基質とは、1以上、通常は多くの正電荷を、正電荷を持つ基または部位の少なくとも1つの面に示す基質を意味する。この基質は1つの物質または2以上の異なる物質から生成されてもよい。これらの異なる物質は、所望の正電荷を有する面を提供するために混合されても、積層されても、または他の方法で配置されてもよい。10

【0010】

さらに、正電荷を持つ基質は吸収性でも非吸収性でもよい。吸収性とは、例えば、クロマトグラフィーによる分離の際に起こるように1以上の成分を吸収できる物質中で起こりうるように1以上の成分を優先的に維持することを示す物質を意味する。吸収性の物質には、例えば、限定されないが、未処理の形態の紙、ニトロセルロース等があり、これらは、これらを通過する液体に含まれる成分をクロマトグラフィーにより分離する。

【0011】

また、正電荷を持つ基質は非吸収性でもよい。非吸収性の正電荷を持つ基質は、以下に示す信号生成システムの種々の構成要素を支え、また正電荷を持つ不活性の多孔性マトリックスを含む。これらのマトリックスは、一般に、血液などの生理学的サンプルを塗る場所と、生成された発色性生成物を信号生成システムの着色によって検出する場所とを提供するように設計されている。したがって、多孔性マトリックスはその中を水性の液体が流れることができるようにし、信号生成システムにおいて化学反応が起こるための十分な空間を提供する。正電荷を持つ多くの多孔性マトリックスが、種々の検体検出分析において使用するために開発してきた。これらのマトリックスは原料、穴の大きさ、寸法等に関して異なってよく、代表的なマトリックスは、米国特許第55,932,431号、同第5,874,099号、同第5,871,767号、同第5,869,077号、同第5,866,322号、同第5,834,001号、同第5,800,829号、同第5,800,828号、同第5,798,113号、同第5,670,381号、同第5,663,054号、同第5,459,080号、同第5,459,078号、同第5,441,894号、同第5,212,061号に開示されるものを含み、これらの開示は参照されることによって本明細書の一部をなす。試験ストリップの寸法と多孔性は大きく異なってもよく、マトリックスは、例えばサンプルを塗る領域またはその付近には大きな穴を有し、検出領域には小さな穴を有するというような場所による多孔度の変化を有しても有しなくてもよい。正電荷を持つ薄膜は、ポリアミド等の正電荷を持つポリマーを使用して調製されてもよい。また、このような薄膜は、例えばカチオン性界面活性剤またはポリマーを用いて表面をコーティングするなど、種々の技術によって調製されてもよい。コーティングは、ディップコーティング、化学処理、フォトグラフト、プラズマ重合等によって行われてもよい。さらに別の実施の形態として、薄膜は正電荷を有する1以上の物質を薄膜形成ポリマーに混合することによって生成されてもよい。正電荷を有するポリマーの例として、ポリアミド、ポリ(ビニルピリジン)、ポリ(ビニルイミダゾール)、ポリ(アリルアミン)、ポリ(塩化ビニルベンジルジメチルアンモニウム)、ポリリシンおよびキトーサンがある。カチオン性界面活性剤には、第1、第2、第4アミノ基を含むものがある。これらの物質は、以下に詳細を示す信号生成システムの種々の構成要素との共有結合または非共有結合を提供する機能を有しても有しなくてもよい。203040

【0012】

多くの実施の形態として、マトリックスは薄膜試験パッドとして構成され、中空の支持材に固定される。支持材はプラスチック(ポリスチレン、ナイロンまたはポリエステル)、金属シートまたは本分野で既知の他の適切な物質でもよい。多くの実施の形態に関連のあ50

る試験ストリップの構成は、米国特許第5,972,294号、同第5,968,836号、同第5,968,760号、同第5,902,731号、同第5,846,486号、同第5,843,692号、同第5,843,691号、同第5,789,255号、同第5,780,304号、同第5,753,452号、同第5,753,429号、同第5,736,103号、同第5,719,034号、同第5,714,123号、同第383,550号、同第381,591号、同第5,620,863号、同第5,605,837号、同第5,563,042号、同第5,526,120号、同第5,515,170号、同第367,109号、同第5,453,360号、同第5,426,032号、同第5,418,142号、同第5,306,623号、同第5,304,468号、同第5,179,005号、同第5,059,394号、同第5,049,487号、同第4,935,346号、同第4,900,666号、同第4,734,360号に開示され、これらの開示は参照されることによって本明細書の一部をなす。 10

【0013】

信号生成システム

上記のように、本組成物の特徴は少なくとも1つの水溶性テトラゾリウム塩を含むことであり、この水溶性テトラゾリウム塩の成分は、典型的には検体酸化信号生成システムの1以上の構成要素と結合した状態で存在する。特に、本組成物の特徴は、水素化物を受容し水溶性で色を持つホルマザン生成物を生成することができる水溶性テトラゾリウム塩の存在である。関連のある水溶性テトラゾリウム塩には、例えば欧州特許第0908453号に開示されるものがあり、この開示は参照されることによって本明細書の一部をなす。関連のある水溶性テトラゾリウム塩の一種に、欧州特許第0908453号の第2項、第35行乃至第48行、式2に開示されるものがある。また、関連のある水溶性テトラゾリウム塩の他の種類には、欧州特許第0908453号の第3項、第10行乃至第25行、式1に開示されるものがある。 20

【0014】

特に関連のある特定の水溶性テトラゾリウム化合物または塩には、限定されないが、2',2'-ジベンゾチアゾリル-5,5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)ジテトラゾリウム二ナトリウム塩(WST-5)、2-ベンゾチアゾリル-3-(4-カルボニル-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルフォエチルカルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム(WST-4)等がある。多くの実施の形態としてはWST-5が好ましい。これはWST-5が水性の媒体に速やかに溶解し、生物学的サンプルと強い適合性があるからである。さらに、生成されるホルマザン化合物は、紫-青の領域でスペクトルの強い吸収を示し、これによりヘモグロビンによるバックグラウンドシグナルを修正する必要が減少する。 30

【0015】

上記のように、水溶性テトラゾリウム塩は、典型的には検体酸化信号生成システムの構成要素として存在する。信号生成システムとは、結合すると協働して作用し、与えられたサンプル中の特定の検体の存在としばしばその量を示す検出可能な信号を生成することができる2以上の化合物または分子の集まりを意味する。信号生成システムという用語は、広く、信号生成システムの全試薬成分の混合物と、1以上の試薬成分がキット中に存在するなど残りの試薬成分から分離されたシステムとの両方を包含するものとして使用される。 40

【0016】

上記のように、本組成物および試験ストリップにおける信号生成システムは、検体酸化信号生成システムである。検体酸化剤とは一般に、対象となる検体から水素化物を取り除き、検体の酸化体を生成できる酵素である。関連のある検体酸化酵素には、検体オキシダーゼ、検体デヒドロゲナーゼがある。関連のある検体オキシダーゼには、限定されないが、グルコースオキシダーゼ(検体がグルコースのとき)、コレステロールオキシダーゼ(検体がコレステロールのとき)、アルコールオキシダーゼ(検体がアルコールのとき)、ビリルビンオキシダーゼ(検体がビリルビンのとき)、コリンオキシダーゼ(検体がコリン 50

のとき)、ホリムアルデヒドオキシダーゼ(検体がホルムアルデヒドのとき)、グルタメートオキシダーゼ(検体がL-グルタミン酸のとき)、グリセロールオキシダーゼ(検体がグリセロールのとき)、ガラクトースオキシダーゼ(検体がガラクトースのとき)、L-アスコルベートオキシダーゼ(検体がアスコルビン酸のとき)、乳酸オキシダーゼ(検体が乳酸のとき)、ロイシンオキシダーゼ(検体がロイシンのとき)、リンゴ酸オキシダーゼ(検体がリンゴ酸のとき)、ピルビン酸オキシダーゼ(検体がピルビン酸のとき)、尿酸オキシダーゼ(検体が尿酸のとき)等がある。

【0017】

検体デヒドロゲナーゼには、限定されないが、アルコールに対してアルコールデヒドロゲナーゼ、ホルムアルデヒドに対してホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルコースに対してグルコースデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸塩に対してグルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸に対してグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールに対してグリセロールデヒドロゲナーゼ、ベータヒドロキシブチル塩に対してベータヒドロキシブチル塩デヒドロゲナーゼ、ステロイドに対してヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、L-乳酸塩に対してL-乳酸塩デヒドロゲナーゼ、ロイシンに対してロイシンデヒドロゲンザーゼ、リンゴ酸に対してリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸に対してピルビン酸デヒドロゲナーゼがある。

【0018】

多くの実施の形態として、本信号生成システムはまた、対象となる検体が酸化剤によって酸化され、それに伴って酸化剤が酵素補助要因を還元するといった方法で酸化剤と相互作用できる酵素補助要因を含む。関連のある酵素補助要因には、すなわち、限定されないが、ベータニコチニアミドアデニンジヌクレオチド(ベータ-NAD)、ベータ-リン酸ニコチニアミドアデニンジヌクレオチド(ベータ-NADP)、チオニコチニアミドアデニンジヌクレオチド、リン酸チオニコチニアミドアデニンジヌクレオチド、ニコチニアミド1,N6-エテノアデニンジヌクレオチド、リン酸ニコチニアミド1,N6-エテノアデニンジヌクレオチドおよびピロロキノリンキノン(PQQ)がある。本信号生成システムに含まれてもよい特に関連のある酵素補助要因には、NADHまたはNAD(P)Hがある。

【0019】

検体酸化酵素に加えて、本信号生成システムは典型的には電子伝達剤を含む。電子伝達剤とは、水素化物イオンの形態をした電子を還元された酵素補助要因から水溶性テトラゾリウム生成物に伝達できる化合物または分子を意味する。関連のある電子伝達剤は高分子量および低分子量の電子伝達剤を含む。本明細書において、低分子量とは約2000ドルトンを超えない範囲であり、通常は約1000ドルトン、多くの実施の形態では約500ドルトンである。高分子量とは、少なくとも約5000ドルトンの分子量を意味し、多くの実施の形態では10,000ドルトンまたは20,000ドルトンまたはそれより大きい。高分子量の電子伝達剤の分子量は、大抵約100,000ドルトンを超えないであろう。多くの実施の形態として、高分子量の電子伝達剤はタンパク性化合物であるのに対し、低分子量の電子伝達剤は非タンパク性化合物である。タンパク性とは、ポリペプチドまたはその擬似ポリマー体を意味する。

【0020】

種々の低分子量非タンパク性の電子伝達剤に関心が持たれている。これらの試剤には、リボフラビン(RBF)、アロキサジン(ALL)およびルミクロム(LC)のようなフラビン、フェナジン、フェナジンメトサルフェート(PMS)、フェナジンエトサルフェート、メトキシフェナジンメトサルフェートおよびサフラニンのようなフェナジン、メチル-1,4-ナフトール(メナジオン)、PTおよびそのラジカルカチオンPT+、チオニン(TH)、アズールA(AA)、アズールB(AB)、アズールC(AC)、メチレンブルー(MB)、メチレングリーン(MG)およびトルイジンブルーO(TOL)のようなフェノチアジン、フェノキサジン(POA)、ベーシックブルー3(BB3)、ブリリアントクレシルブルーALD(BCBA)、ベンゾ-フェナゾキソニウムクロライド

10

20

30

40

50

(Medola's blue)のようなフェノキサジン、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)のようなインドフェノール、バインドシェドラーズグリーン(Bindschedler's green)、フェニレンブルーのようなインダミン等が含まれる。多くの実施の形態で特に関心が持たれるのは、例えばPMS、フェナジンエトサルフェート、メトキシフェナジンメトサルフェートおよびサフラニンのようなフェナジン化合物である。多くの実施の形態では、PMSが低分子量非タンパク性の電子伝達剤として用いられる。

【0021】

多くの実施の形態では、高分子量でタンパク性の電子伝達剤は、例えばNAD(P)Hのような還元された補助因子を酸化し、それに付随して信号生成システムのテトラゾリウム塩を還元できる酵素である。多くの実施の形態として、この電子伝達酵素は、リポデヒドロゲナーゼ、フェレドキシン-NADPレダクターゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、NADPHデヒドロゲナーゼ等のジアホラーゼである。種々のジアホラーゼが利用可能であり用いられてもよい。本信号生成システム中に存在してもよい代表的な市販のジアホラーゼには、バチルスジアホラーゼ、クロストリジウムジアホラーゼ、ビブリオジアホラーゼ、ポルシンジアホラーゼ等がある。

【0022】

上述の信号生成システムは、一般に本組成物中に試薬組成物として存在する。多くの実施の形態として、この試薬組成物は乾燥組成物である。最小では本試薬組成物は水溶性のテトラゾリウム塩を含むものである。しかしながら、多くの実施の形態として、試薬組成物はさらに酵素補助要因、検体酸化酵素および電子伝達剤を含む。これらの成分は上述のものである。

【0023】

試薬試験ストリップ

本発明の多くの実施の形態で特に関連があるのは、上述した組成物を含み、サンプル中の検体の存在および濃度を測定するために使用される試験ストリップである。特に、本発明は全血中の特定の検体、例えばベータヒドロキシブチレート、グルコース等の検出のための乾燥ストリップを提供する。最も広い意味では、試薬試験ストリップは、正電荷を有する中空の支持材とその上の乾燥試薬組成物を含む。乾燥試薬組成物は、対象となる検体が存在するときに検出可能となる信号を生成するために必要なすべての試薬組成物から作られる。本発明の多くの実施の形態として、試験ストリップ上の乾燥試薬組成物は、検体酸化酵素、酵素補助要因、電子伝達剤および水溶性テトラゾリウム塩を含む。これらの各構成要素は詳細に上述したものである。

【0024】

多くの実施の形態として、本試験ストリップは中空の支持材に固定される薄膜試験パッドを含む。この支持材は、ポリスチレン、ナイロン、ポリエステルなどのプラスチックシート、金属シート、または当分野で知られるいかなる適当な物質であってもよい。試験パッド上にコーティングされたり、内部に包含させられたりして、試薬組成物が試験パッドに結合する。また、このストリップは入り組んだ構成に設計されてもよく、例えば試験パッドが、支持材と、サンプル処理中に用いられる1以上の試薬が存在しうる表層との間に存在してもよい。さらに、流れの道筋または経路が当業者に知られるように試験ストリップ上に存在してもよい。多くの実施の形態として関心が持たれる試験ストリップの構成は、米国特許第5,902,731号に開示されており、この開示は参照されることによって本明細書の一部をなす。

【0025】

本試験ストリップはいかなる便利なプロトコルを用いて作られてもよい。ある便利なプロトコルは、ストリップの少なくとも試験パッド部を、最終的な試薬試験ストリップにおける試験パッドに結合するであろう試薬組成物の全ての構成成分を含む水性組成物に接触させることである。好都合なことに、試験パッドをこの水性組成物に浸し十分な時間維持した後に乾燥させることにより、試薬組成物が結合された試薬試験ストリップの試験パッド

10

20

30

40

50

が生成される。上記のように、水性組成物は試薬試験ストリップの試験パッドと結合するであろう試薬組成物の種々の構成要素を含むであろう。ここで、種々の構成要素は試験パッド上に生成される試薬組成物を所望の量供給するのに十分な量存在する。したがって、電子伝達剤が非タンパク性であるとき、この水性組成物中に存在する非タンパク性電子伝達剤の濃度は、通常、約 10 μM 乃至 50,000 μM、多くは約 50 μM 乃至 10,000 μM、さらには約 100 μM 乃至 5,000 μM である。これに対し、電子伝達剤がタンパク性であるときは、水性組成物中の電子伝達剤の濃度は通常は約 10 U / mL 乃至 10,000 U / mL、多くは約 50 U / mL 乃至 5,000 U / mL、さらには約 100 U / mL 乃至 3,000 U / mL である。水性組成物中に存在するテトラゾリウム塩の濃度は約 3 mM 乃至 36 mM であり、通常は約 6 mM 乃至 24 mM である。酵素補助因子が存在するときは、その濃度は約 1.5 mM 乃至 28 mM、通常は約 3.5 mM 乃至 14 mM である。同様に、検体酸化酵素が存在するとき、この検体酸化酵素の濃度は約 100 U 乃至 2000 U、通常は約 200 U 乃至 1000 U である。本試薬試験ストリップを生成する代表的な方法のより詳細な記載については下記の実験項を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0026】

検体の検出方法

上記の信号生成システム、試薬組成物および試験ストリップは、サンプル中の検体の存在およびしばしばその量を検出する方法に使用される。種々の検体が本方法により検出できる。代表的な検体には、上述した例えばアルコール、ホルムアルデヒド、グルコース、グルタミン酸、グリセロール、ベータ-ヒドロキシブチレート、L-ラクテート、ロイシン、リンゴ酸、ピルビン酸、ステロイド等が含まれる。原理上は、本方法を種々の生物学的サンプル、例えば尿、涙、唾液等の中の検体の存在およびその濃度を測定するために用いてもよいが、特に血液または血液抽出サンプルなどの血液片、また特に全血、ISF（細胞間液）中の検体の濃度を測定するために用いるのに適している。

【0027】

本方法において、サンプルと信号生成システムとが混合されて反応混合物が生成され、反応はサンプル中の検体の存在（およびしばしばその量）を示す信号を生成するために十分な時間進行される。生成されたシグナルが検出され、サンプル中の検体の存在（およびしばしばその量）に関連付けられる。これらの工程は上述した試薬試験ストリップ上で行われる。

【0028】

本方法の特徴は、検出可能な信号がストリップの基質の表面に形成される洗浄不能なスポットから構成されることである。洗浄不能なスポットは、基質の表面にしっかりと結合される水溶性ホルマザン生成物から構成されるため、標準的な洗浄環境においては表面から容易に取り除かれることはない。標準的な洗浄環境とは、結合していない成分が表面から取り除かなければならぬ検体検出分析における基質表面によって実現される状況を意味する。標準的な洗浄環境の例として、アレーベース核酸の雑種化分析において当業者が使用するものがある。これは、雑種化工程の後にアレー表面から雑種化されていない核酸を取り除くものである。このような状況は当業者によく知られている。このように、本方法の特徴は正電荷を有する基質の表面に洗浄不能なスポットを生成することである。この洗浄不能なスポットは水溶性ホルマザン生成物から構成されている。

【0029】

本方法の実施において、最初の工程は一定量の生理学的サンプルを試験ストリップに塗ることである。この試験ストリップについては上記に述べた通りである。試験ストリップに塗られる血液などの生理学的サンプルの量は様々であつてよいが、通常は約 2 μL 乃至 40 μL、多くは約 5 μL 乃至 20 μL である。本試験ストリップの性質から、試験ストリップに塗られる血液サンプルのサイズは比較的小さくてよく、約 2 μL 乃至 40 μL、通常は約 5 μL 乃至 20 μL である。生理学的サンプルが血液の場合、ヘマトクリット値が約 20 % 乃至 65 %、さらには 25 % 乃至 60 % であるときには、種々のヘマトクリット値を有する血液サンプルが本方法により測定されうる。

【0030】

試験ストリップをサンプルに塗った後、サンプルを信号生成システムの構成要素と反応させ、検出可能生成物、すなわち洗浄不能なスポットを生成させる。この検出可能生成物は、サンプル中に存在する当該検体の最初の量に比例する量生成される。検出可能な生成物、すなわち信号生成システムによって生成された洗浄不能スポットの形態の信号の量が測定され、最初のサンプル中の検体の量に関連付けられる。ある実施の形態として、上記検出工程および関連付け工程を行う自動化された装置が使用される。上記反応工程、検出工程、関連付け工程およびそれらを実施する装置について、米国特許出願第4,734,360号、同第4,900,666号、同第4,935,346号、同第5,059,394号、同第5,304,468号、同第5,306,623号、同第5,418,142号、同第5,426,032号、同第5,515,170号、同第5,526,120号、同第5,563,042号、同第5,620,863号、同第5,753,429号、同第5,573,452号、同第5,780,304号、同第5,789,255号、同第5,843,691号、同第5,846,486号、同第5,902,731号、同第5,968,836号、同第5,972,294号に開示されている。これらの開示は参考されることによって本明細書の一部をなす。関連付け工程において導かれた検体の濃度は、実測された信号に対する競争反応の一定の割合を装置の校正などにより考慮している。

10

20

30

【0031】

キット

また、本発明により本方法を実施するのに使用されるキットが提供される。上記のように、本発明のキットは少なくとも信号生成システムを含んでいる。この信号生成システムの構成成分は組み合わせて1つの試薬組成物にしてもよいし、別々の容器等に分離させててもよい。ある実施の形態として、信号生成システムは上述のように試薬試験ストリップの形態でキット中に存在するであろう。本キットはさらに生物学的サンプルを取得する手段を備えてよい。例えば、生理学的サンプルが血液の場合、本キットはさらに血液サンプルを得る手段、例えば指を穿刺するためのランス、ランス作動手段等を含んでもよい。さらに、本キットは標準溶液、例えば検体を標準濃度含む検体標準溶液を含んでもよい。ある実施の形態として、本キットはまた上述のようにサンプルを塗った後にストリップ上に生成される生成物の量を検出し、検出した生成物をサンプル中の検体の量に関連付けるための自動化された装置を含む。最後に、本キットは生理学的サンプル中の検体の濃度測定において本キットの構成要素を使用するための取扱説明書を備えている。これらの取扱説明書は包装、挿入されたラベル、キットに存在する容器等の1つ以上に存在してもよい。

以下の実施例は説明のために示されているものであって、限定のためのものではない。

30

【0032】

実験

実施例1

Pal1社(East Hills、ニューヨーク州)から入手したナイロン薄膜の0.8 μmを表1の試薬に浸し、飽和させた後、ガラスロッドを用いて丁寧に余分な試薬を絞り取った。得られた薄膜を乾燥室に取り付け56°で10分間乾燥させた。Porex(厚さ0.6 mm)を表2の硝酸溶液に浸した後、乾燥室に取り付け100°で10時間乾燥させた。最後に、この薄膜をポリエステル材料(ICI America(ウィルミントン、デラウェア州)から入手した0.4 mmのMelenex(登録商標)ポリエステル)と硝酸を染み込ませたPorexとの間に積層した。

40

【0033】

実施例2

実施例1の手順を繰り返す。ただし、最初に浸す試薬は表3に示す試薬である。また、Porexは必要ないため、2度目の浸し処理は行わない。

【表1】

グルコース試験パッドのための試薬

50

成分	量
水	100 ml
(2-[-モルホリノ]エタンスルホン酸)ナトリウム塩 MES (分子量 217.2、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)、 6M HCl を加えて pH 5 乃至 pH 7 に調整	2.2 gm
テトニック1307 (BASF社、マウントオリーブ、ニュージャージー州、USA)	1-3 gm
PSSA ポリスチレンスルホン酸ナトリウム塩 (分子量 70,000、 ポリサイエンス社、ワーリントン、ペンシルベニア州、USA)	2-4 gm
クロテイン (Croda社、パーシパニー、ニュージャージー州、 USA)	2-4 gm
マンニトール (分子量 182、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)	1-10 gm
フェナジンメトサルフェート (PMS、分子量 306.34、シグマ、 セントルイス、ミズーリ州、USA)	30-300 mg
WST-5 (分子量 1331.37、ドウジンドウ研究所、日本)	0.8-4 gm
グルコースオキシダーゼ (GO、トウヨウボウ)	100-1000 KU

10

20

30

【表 2】

亜硝酸塩試薬

成分	量
10 mM リン酸塩緩衝塩類溶液、pH 7.4 (P-3813、シグマ、 セントルイス、ミズーリ州、USA)	70 ml
エタノール	30 ml
亜硝酸ナトリウム (分子量 69、オールドリッヂケミカルズ、 ミルウォーキー、ウィスコンシン州、USA)	5 gm
ポリビニルピロジン (分子量 40,000、シグマ、セントルイス、 ミズーリ州、USA)	200 mg

【表 3】

グルコース試験パッドのための試薬

成分	量
水	100 ml
(2-[モルホリノ]エタンスルホン酸)ナトリウム塩 MES (分子量 217.2、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)	2.2 gm
ポリ(メチルビニルエーテルーオールトーマレイン無水物)* 6%	20 mL
50% NaOH を加えて pH 5.5 乃至 pH 7 に調整	
トリトンX-305 (BASF社、マウントオリーブ、ニュージャージー州、USA)	0.5-2 mg
マンニトール (分子量 182、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)	1-10 gm
亜硝酸ナトリウム (分子量 69、オールドリッヂケミカルズ、ミルウォーキー、ウィスコンシン州、USA)	1-5 gm
WST-5 (分子量 1331.37、ドウジンドウ研究所、日本)	0.8-4 gm
塩化マグネシウム (分子量 203、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)	3-5 gm
フェナジンエトサルフェート (PES、分子量 334.4、シグマ、セントルイス、ミズーリ州、USA)	100-1000 mg
グルコースオキシダーゼ (GO、トウヨウボウ)	100-1000 KU

* ポリ(メチルビニルエーテルーオールトーマレイン無水物)、分子量 1,080,000、カタログナンバー41632-0、(オールドリッヂケミカルズ、ミルウォーキー、ウィスコンシン州、USA)、水中6%(w/v)のポリ(メチルビニルエーテルーオールトーマレイン無水物)の重量を測り、その懸濁液を95度で45分間熱する。得られた溶液を使用できるように室温まで冷却する。

【0034】

種々のグルコース標準溶液を、電荷を持たない薄膜と正電荷を有する薄膜の上で試験を行った。血液中のグルコース量が 50 mg / dL 乃至 450 mg / dL の範囲では信号は直線的であった。図1は同一のディップを異なる薄膜にコーティングした場合を示す図である。一方は正電荷のナイロン薄膜であり、他方は電荷を持たないポリスルホン薄膜である。コーティングされた薄膜を 400 mg / dL のグルコースでテストした。

【0035】

以下のプロトコルを用いて、400 mg / dL グルコースを含む 10 μL の水性サンプルを、上述のストリップ上でテストした。このとき、ストリップの薄膜を、正電荷を持つナイロン薄膜と、(正電荷を持つ、または電荷を持たない)ポリスルホン薄膜とに変化させた。新たに準備した試験ストリップ上に 10 μL 水性サンプルを塗った。このストリップを反射率計に挿入し、データの取得を開始した。データを読み出すストリップの反射率を 615 nm において 1/2 秒間隔で 45 秒間測定した。続いて、取得したデータを反射率計のメモリバッファから修正シリアルケーブルを介してパソコンにアップロードした。反応の特性を K / S 対秒でプロットした (K / S は反射率の割合を示し、これは米国特許第 4,935,346 号 14 段に開示されており、この開示は参考されることによって本明細書の一部をなす)。

【0036】

上記の結果および検討から、従来の試薬試験ストリップの構成を改善できることが明らかである。水溶性のテトラゾリウム塩を正電荷を持つ基質に組み合わせて使用することによって、本発明はテトラゾリウム塩が正電荷を持つ特性の利益を全て享受し、得られた水溶性ホルマザン生成物から洗浄不能な通知信号を生成できる。したがって、本発明は当技術

分野への顕著な貢献を示している。

【0037】

本明細書中で引用されたすべての刊行物および特許文献は全て、それらが具体的にかつ個別に参照されるために示されているのと同様に、参照されることによって本明細書の一部をなす。すべての刊行物は本出願の出願日前に開示されているから引用したのであって、本発明が先発明のためにこれらの刊行物より先行しているという資格を有していないことを自認するものではない。

【0038】

本発明の明確な理解のために図示および実施例を用いて詳細に説明したが、本発明の教示するところにしたがって特許請求の範囲を逸脱しない範囲である程度の変更および改変を加えることができることは当業者にとって明らかである。10

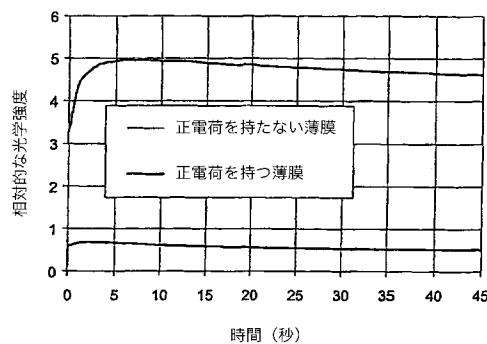
【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明に基づいて、指示薬として水溶性テトラゾリウム塩を使用し、正電荷を持つ薄膜上および電荷を持たない薄膜上で動作する400mg/dlグルコース試験の結果を示す図である。

【図1】

指示薬として水溶性テトラゾリウムを使用した、異なる薄膜上の400mg/dlグルコースの試験



【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
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

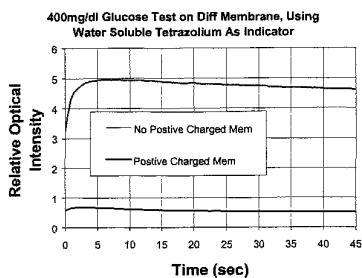
(10) International Publication Number
WO 02/22855 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/28169
- (22) International Filing Date: 7 September 2001 (07.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/659,938 12 September 2000 (12.09.2000) US
- (71) Applicant: LIFESCAN, INC. [US/US]; 1000 Gibraltar Drive, Milpitas, CA 95035-6312 (US).
- (72) Inventors: OUYANG, Tianmei; 41945 Via San Gabriel, Fremont, CA 94539 (US); YU, Yeung, Siu; 3158 Paseo Robles, Pleasanton, CA 94506 (US).
- (74) Agent: FIELD, Bret, E.; Bozicevic, Field & Francis LLP, Suite 200, 200 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

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.

(54) Title: TEST STRIPS FOR DETECTING THE PRESENCE OF A REDUCED COFACTOR IN A SAMPLE AND METHODS FOR USING THE SAME

WO 02/22855 A2



(57) Abstract: Test strips and methods for their use in the detection of an analyte in a sample are provided. The subject test strips are characterized by at least including a water soluble tetrazolium salt on a surface of a positively charged substrate. In many embodiments, the water soluble tetrazolium salt is present as part of an analyte oxidizing signal producing system, which system includes one or more of the following additional components: an analyte oxidizing enzyme, e.g., an analyte dehydrogenase or an analyte oxidase; an electron transfer agent; and an enzyme cofactor. Also provided are systems and kits incorporating the subject test strips. The subject test strips, systems and kits find use in the measurement of a wide variety of analytes in a sample, such as a physiological sample, e.g., blood or a fraction thereof.

WO 02/22855

PCT/US01/28169

5 **TEST STRIPS FOR DETECTING THE PRESENCE OF A REDUCED
COFACTOR IN A SAMPLE AND METHODS FOR USING THE SAME**

10

INTRODUCTION

Field of the Invention

The field of this invention is analyte measurement

Background of the Invention

15 Analyte measurement in physiological fluids, e.g., blood or blood derived products, is of ever increasing importance to today's society. Analyte detection assays find use in a variety of applications, including clinical laboratory testing, home testing, etc., where the results of such testing play a prominent role in diagnosis and management in a variety of disease conditions. Analytes of interest include alcohol, 20 formaldehyde, glucose, glutamic acid, glycerol, beta-hydroxybutyrate, L-lactate, leucine, malic acid, pyruvic acid, steroids, etc. In response to this growing importance of analyte measurement, a variety of analyte measurement protocols and devices for both clinical and home use have been developed.

25 Many of the protocols and devices that have been developed to date employ a signal producing system to identify the presence of the analyte of interest in a physiological sample, such as blood.

While a variety of such signal producing systems have been developed to date for use in the measurement of a wide variety of different analytes, there continues to be a need for the further development of such systems.

30 Relevant Literature

Patent documents of interest include: EP 0 908 453 A1; WO 94/01578 and WO 94/01544.

WO 02/22855

PCT/US01/28169

SUMMARY OF THE INVENTION

Test strips and methods for their use in the detection of an analyte in a sample are provided. The subject test strips are characterized by at least including a water soluble tetrazolium salt on a surface of a positively charged substrate. In many embodiments, the water soluble tetrazolium salt is present as part of an analyte oxidizing signal producing system, which system includes one or more of the following additional components: an analyte oxidizing enzyme, e.g., an analyte dehydrogenase or an analyte oxidase; an electron transfer agent; and an enzyme cofactor. Also provided are systems and kits incorporating the subject test strips. The subject test strips, systems and kits find use in the measurement of a wide variety of analytes in a sample, such as a physiological sample, e.g., blood or a fraction thereof, or ISF (interstitial fluid).

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 provides the results of a 400mg/dl Glucose Test conducted on positively charged and non-charged membranes, using water soluble tetrazolium as indicator according to the subject invention.

DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS

Test strips and methods for their use in the measurement of an analyte in a sample are provided. The subject test strips are characterized by at least including a water soluble tetrazolium salt on a surface of a positively charged substrate. In many embodiments, the water soluble tetrazolium salt is present as part of an analyte oxidizing signal producing system, which system includes one or more of the following additional components: an analyte oxidizing enzyme, e.g., an analyte dehydrogenase or an analyte oxidase; an electron transfer agent; and an enzyme cofactor. Also provided are systems and kits incorporating the subject test strips. The subject test strips, systems and kits find use in the detection of a wide variety of analytes in a sample, such as a physiological sample, e.g., blood or a fraction thereof, or ISF (interstitial fluid).

Before the subject invention is described further, it is to be understood that the invention is not limited to the particular embodiments of the invention described

WO 02/22855

PCT/US01/28169

below, as variations of the particular embodiments may be made and still fall within the scope of the appended claims. It is also to be understood that the terminology employed is for the purpose of describing particular embodiments, and is not intended to be limiting. Instead, the scope of the present invention will be established by the 5 appended claims.

In this specification and the appended claims, singular references include the plural, unless the context clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all 10 technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

COMPOSITIONS

As summarized above, the subject invention provides compositions for use in 15 detecting a wide variety of analytes in a sample. The compositions include a positively charged substrate and water soluble tetrazolium salt present on the surface of the substrate, typically as a member of an analyte oxidizing signal producing system. The subject compositions are typically present as dry compositions, such as 20 are found in reagent test strips. In particular, the invention provides strips for assaying for a particular analyte in whole blood or a derivative fraction thereof, e.g., glucose, alcohol, glycated proteins, etc. In the broadest sense, the reagent test strips include a positively charged substrate and an analyte oxidizing signal producing system present on a surface of the substrate, which system includes a water soluble tetrazolium salt.

The above elements of the subject compositions are now further described in 25 greater detail.

Positively Charged Substrate

A feature of the subject compositions is the presence of a positively charged 30 substrate. By positively charged substrate is meant a substrate that displays one or more, usually a large plurality of, positive charges, e.g., as found on positively charged groups or moieties, on at least one of its surfaces. The substrate may be fabricated from a single material or may be a composite of two or more different materials,

WO 02/22855

PCT/US01/28169

where these different materials may be blended, layered, or otherwise arranged to provide for the desired positively charged surface.

In addition, the positively charged substrate may be bibulous or non-bibulous.

By bibulous is meant a material that exhibits preferential retention of one or more components as would occur, for example, in materials capable of absorbing or "imbibing" one or more components, as occurs in chromatographic separations. Examples of bibulous materials include, but are not limited to: untreated forms of paper, nitrocellulose and the like which result in chromatographic separation of components contained in liquids which are passed therethrough.

10 Alternatively, the positively charged substrate may be non-bibulous. Non-bibulous positively charged substrate include inert porous matrices which provide a support for the various members of the signal producing system, described *infra*, and have a positive charge. These matrices are generally configured to provide a location for application of a physiological sample, *e.g.*, blood, and detection of the

15 chromogenic product produced by the dye of the signal producing system. As such, the matrix is typically one that is permissive of aqueous fluid flow through it and provides sufficient void space for the chemical reactions of the signal producing system to take place. A number of different positively charged porous matrices have been developed for use in various analyte measurement assays, which matrices may

20 differ in terms of materials, pore sizes, dimensions and the like, where representative matrices include those described in U.S. Patent Nos: 55,932,431; 5,874,099; 5,871,767; 5,869,077; 5,866,322; 5,834,001; 5,800,829; 5,800,828; 5,798,113; 5,670,381; 5,663,054; 5,459,080; 5,459,078; 5,441,894 and 5,212,061; the disclosures of which are herein incorporated by reference. The dimensions and porosity of the test

25 strip may vary greatly, where the matrix may or may not have a porosity gradient, *e.g.*, with larger pores near or at the sample application region and smaller pores at the detection region. Positively charged membranes can be prepared by using positively charged polymers, such as polyamide. Alternatively, such membranes can be prepared by various techniques, such as surface coating using cationic surfactants or

30 polymers. The coating can be applied by dip coating, chemical treatment, photografting, plasma polymerization, etc. In yet other embodiments, the membrane can be prepared by means of blending one or more positively charged materials with the membrane forming polymer. Examples of positively charged polymers are

WO 02/22855

PCT/US01/28169

polyamide, poly(vinyl pyridine), poly(vinyl imidazole), poly(allylamine), poly(vinyl benzylidimethyl ammonium chloride), polylysine and chitosan. Examples of cationic surfactants include those containing primary, secondary and quaternary amino groups. The material may or may not be functionalized to provide for covalent or noncovalent attachment of the various members of the signal producing system, described in greater detail *infra*.

In many embodiments, the matrix is configured as a membrane test pad and is affixed to a solid support, where the support may be a plastic (e.g., polystyrene, nylon or polyester) or metallic sheet or any other suitable material known in the art. Of interest in many embodiments are the test strip configurations disclosed in U.S. Patent Nos. 5,972,294; 5,968,836; 5,968,760; 5,902,731; 5,846,486; 5,843,692; 5,843,691; 5,789,255; 5,780,304; 5,753,452; 5,753,429; 5,736,103; 5,719,034; 5,714,123; 383,550; 381,591; 5,620,863; 5,605,837; 5,563,042; 5,526,120; 5,515,170; 367,109; 5,453,360; 5,426,032; 5,418,142; 5,306,623; 5,304,468; 5,179,005; 5,059,394; 5,049,487; 4,935,346; 4,900,666 and 4,734,360, the disclosures of which are herein incorporated by reference.

Signal Producing Systems

As summarized above, a feature of the subject compositions is that they include at least one water soluble tetrazolium salt, which component is typically present in conjunction with one or more members of an analyte oxidizing signal producing system. Specifically, a feature of the subject compositions is the presence of a water soluble tetrazolium salt that is capable of accepting a hydride to product a water soluble, colored formazan product. Water soluble tetrazolium salts of interest include those described in EP 0 908 453, the disclosure of which is herein incorporated by reference. One class of water soluble tetrazolium salts of interest include those described by formula 2 on page 2, lines 35 to 48 of EP 0 908 453. Another class of water soluble tetrazolium salts of interest include those described by formula 1 on page 3, lines 10-25 of EP 0 908 453.

Specific water soluble tetrazolium compounds or salts that are of particular interest include, but are not limited to: 2,2'-dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium,

WO 02/22855

PCT/US01/28169

disodium salt (WST-5); 2-benzothiazolyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbamoyl)phenyl]-2H-tetrazolium (WST-4) and the like. WST-5 is preferred in many embodiments because it readily dissolves in an aqueous medium, which is most compatible with biological samples. Furthermore, the resulting 5 formazan compound exhibits strong spectral absorption at the purple-blue region, thus reducing the need for correcting the background signal from hemoglobin.

As mentioned above, the water soluble tetrazolium salt is typically present as a member of an analyte oxidizing signal producing system. By signal producing system is meant a collection of two or more compounds or molecules which are capable of 10 acting in concert, when combined, to produce a detectable signal that is indicative of the presence of, and often amount of, a particular analyte in a given sample. The term signal producing system is used broadly to encompass both a mixture of all of the reagent constituents of the signal producing system as well as a system in which one or more of the reagent constituents are separated from the remainder of the reagent 15 constituents, e.g., as is present in a kit.

As mentioned above, the signal producing system of the subject compositions and test strips is a analyte oxidizing signal producing system. The analyte oxidizing agent is generally an enzyme that is capable of removing a hydride from the analyte of interest to produce an oxidized form of the analyte. Analyte oxidizing enzymes of 20 interest include analyte oxidases and analyte dehydrogenases. Analyte oxidases of interest include, but are not limited to: glucose oxidase (where the analyte is glucose); cholesterol oxidase (where the analyte is cholesterol); alcohol oxidase (where the analyte is alcohol); bilirubin oxidase (where the analyte is bilirubin); choline oxidase (where the analyte is choline); formaldehyde dehydrogenase (where the analyte is 25 formaldehyde); glutamate oxidase (where the analyte is L-glutamic acid); glycerol oxidase (where the analyte is glycerol); galactose oxidase (where the analyte is galactose); L-ascorbate oxidase (where the analyte is ascorbic acid); lactate oxidase (where the analyte is lactic acid); leucine oxidase (where the analyte is leucine); malate oxidase (where the analyte is malic acid); pyruvate oxidase (where the analyte 30 is pyruvic acid); urate oxidase (where the analyte is uric acid); and the like.

Analyte dehydrogenases of interest include, but are not limited to: alcohol dehydrogenase for alcohol; formaldehyde dehydrogenase for formaldehyde; glucose dehydrogenase for glucose; glucose-6-phosphate dehydrogenase for glucose-6-

WO 02/22855

PCT/US01/28169

phosphate; glutamate dehydrogenase for glutamic acid; glycerol dehydrogenase for glycerol; beta-hydroxybutyrate dehydrogenase for beta-hydroxybutyrate; hydroxysteroid dehydrogenase for steroid; L-lactate dehydrogenase for L-lactate; leucine dehydrogenase for leucine; malate dehydrogenase for malic acid, and pyruvate dehydrogenase for pyruvic acid.

In many embodiments, the subject signal producing systems also include an enzyme cofactor that is capable of interacting with the oxidizing agent in a manner such that the analyte of interest is oxidized by the oxidizing agent, which agent concomitantly reduces the enzyme cofactor. Enzyme cofactors of interest include, but 10 are not limited to: i.e., beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-NAD); beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (beta-NADP); thionicotinamide adenine dinucleotide; thionicotinamide adenine dinucleotide phosphate; nicotinamide 1,N6-ethenoadenine dinucleotide; nicotinamide 1,N6-ethenoadenine dinucleotide phosphate; and pyrrolo-quinoline quinone (PQQ). Enzyme cofactors of particular interest that 15 may be included in the subject signal producing systems include: NADH or NAD(P)H.

In addition to the analyte oxidizing agent, the subject signal producing systems typically include an electron transfer agent. By electron transfer agent is meant a compound or molecule that can transfer an electron, in the form of a hydride ion, from a reduced enzyme cofactor to the water soluble tetrazolium product. Electron transfer 20 agents of interest include both low and high molecular weight electron transfer agents. In this specification, low molecular weight means a molecular weight that does not exceed about 2000 daltons, usually about 1000 daltons and in many embodiments about 500 daltons. High molecular weight means a molecular weight of at least about 5000 daltons and in many embodiments 10,000 or 20,000 daltons or higher. The 25 molecular weight of the high molecular weight electron transfer agent often will not exceed about 100,000 daltons. In many embodiments, the low molecular weight electron transfer agent is a non-proteinaceous compound while the high molecular weight electron transfer agent is a proteinaceous compound. By proteinaceous is meant a polypeptide or polymeric mimetic thereof.

30 A variety of low molecular weight non-proteinaceous electron transfer agents are of interest. These agents include: flavins such as riboflavin (RBF), alloxazine (ALL) and lumichrome (LC); phenazines such as phenazine, phenazine methosulfate (PMS), phenazine ethosulfate, methoxyphenazine methosulfate and safranine; methyl-

WO 02/22855

PCT/US01/28169

1, 4-naphthol (menadione), phenothiazines such as PT and its radical cation, PT⁺, thionin (TH), azure A (AA), azure B (AB), azure C (AC), methylene blue (MB), methylene green (MG) and toluidine blue O (TOL); phenoxazines such as phenoxazine (POA), basic blue 3 (BB3), and brilliant cresyl blue ALD (BCBA), 5 benzo- α -phenazoxonium chloride (Medola's blue); Indophenols such as 2,6-dichlorophenol indophenol (DCIP); and Indamines such as Bindschedler's green and phenylene blue; and the like. Of particular interest in many embodiments are phenazine compounds, e.g. PMS, phenazine ethosulfate, methoxyphenazine methosulfate and safranine, where PMS is the low molecular weight, non- 10 proteinaceous electron transfer agent in many embodiments.

In many embodiments, the high molecular weight proteinaceous electron transfer agent is an enzyme that is capable of oxidizing a reduced cofactor, e.g. NAD(P)H, and concomitantly reducing the tetrazolium salt of the signal producing system. In many embodiments, this electron transfer enzyme is a diaphorase, such as 15 lipoic dehydrogenase, ferredoxin-NADP reductase, lipoamide dehydrogenase, NADPH dehydrogenase, etc. A variety of diaphorases are available and may be employed, where representative commercially available diaphorases that may be present in the subject signal producing systems include bacillus diaphorase, clostridium diaphorase, vibrio diaphorase, porcine diaphorase, and the like.

20 The signal producing systems described above are generally present in the subject compositions as reagent compositions. In many embodiments the reagent compositions are dry compositions. At a minimum, the subject reagent compositions are ones that include the water soluble tetrazolium salt. In many embodiments, however, the reagent compositions further include an enzyme cofactor, an analyte 25 oxidizing enzyme and an electron transfer agent, where these components are described above.

REAGENT TEST STRIPS

30 Of particular interest in many embodiments of the subject invention are reagent test strips that include the above described compositions and are intended for use in measuring the presence or concentration of an analyte in a sample. In particular, the

WO 02/22855

PCT/US01/28169

invention provides dry strips for assaying for a particular analyte in whole blood, e.g., beta-hydroxybutyrate, glucose, etc. In the broadest sense, the reagent test strip includes a positively charged solid support and a dry reagent composition present thereon, where the dry reagent composition is made up of all of the reagent compounds
5 necessary to produce a detectable signal in the presence of the analyte of interest. In most embodiments of the subject invention, the dry reagent composition present on the subject test strip is one that includes the following members: an analyte oxidizing enzyme, an enzyme cofactor, an electron transfer agent and a water soluble tetrazolium salt, where each of these constituent members are described in greater
10 detail above.

In many embodiments, the subject test strips include a membrane test pad that is affixed to a solid support. The support may be a plastic -- e.g., polystyrene, nylon, or polyester - or metallic sheet or any other suitable material known in the art. Associated with the test pad, e.g., coated onto the test pad, incorporated into the test pad, etc., is
15 the reagent composition. The strip may also be configured in more complex arrangements, e.g., where the test pad is present between the support and a surface layer, where one or more reagents employed in sample processing may be present on the surface layer. In addition, flow paths or channels may be present on the test strip, as is known in the art. Of interest in many embodiments are the test strip
20 configurations disclosed in U.S. Patent No. 5,902,731, the disclosure of which is herein incorporated by reference.

The subject test strips may be fabricated employing any convenient protocol. One convenient protocol is to contact at least the test pad portion of the strip with an aqueous composition that includes all of the members of the reagent composition that
25 is to be associated with the test pad in the final reagent test strip. Conveniently, the test pad may be immersed in the aqueous composition, maintained therein for a sufficient period of time and then dried, whereby the test pad of the reagent test strip which has associated therewith the reagent composition is produced. As stated above, the aqueous composition will include the various members of the reagent composition to
30 be associated with the test pad of the reagent test strip, where the various members are present in amounts sufficient to provide for the desired amounts in the reagent composition that is produced on the test pad. As such, where the electron transfer agent is non-proteinaceous, the concentration of electron transfer agent present in this

WO 02/22855

PCT/US01/28169

aqueous composition typically ranges from about 10 to 50,000, usually from about 50 to 10,000 and more usually from about 100 to 5,000 μM . In other embodiment where the electron transfer agent is proteinaceous, the concentration of the electron transfer agent present in the aqueous composition typically ranges from about 10 to 10,000,
5 usually from about 50 to 5,000 and more usually from about 100 to 3,000 U/ml. The concentration of tetrazolium salt present in the aqueous composition ranges from about 3 mM to 36 mM, usually from about 6 mM to 24mM. When present, the enzyme cofactor ranges in concentration from about 1.5 mM to 28 mM, usually from about 3.5mM to 14 mM. Similarly, the analyte oxidizing agent enzyme ranges in
10 concentration from about 100 U to 2000 U, and usually from about 200 U to 1000 U when present. See the experimental section, *infra*, for a more detailed description of a representative method for preparing the subject reagent test strips.

METHODS OF ANALYTE MEASUREMENT

15 The above described signal producing systems, reagent compositions and test strips find use in methods of detecting the presence of, and often the amount of, i.e., the concentration of, an analyte in a sample. A variety of different analytes may be detected using the subject methods, where representative analytes include those
20 described above, e.g., alcohol, formaldehyde, glucose, glutamic acid, glycerol, beta-hydroxybutyrate, L-lactate, leucine, malic acid, pyruvic acid, steroids, etc. While in principle, the subject methods may be used to determine the presence, and often concentration, of an analyte in a variety of different physiological samples, such as urine, tears, saliva, and the like, they are particularly suited for use in determining the
25 concentration of an analyte in blood or blood fractions, e.g., blood derived samples, and more particularly in whole blood, ISF (interstitial fluid).

In the subject methods, the sample and the signal producing system are combined into a reaction mixture, the reaction is allowed to proceed for a sufficient period to time to generate a signal indicative of the presence of (and often amount of)
30 analyte in the sample, and the resultant signal is detected and related to the presence of (and often amount of) analyte in the sample. The above steps take place on a reagent test strip as described *supra*.

WO 02/22855

PCT/US01/28169

A feature of the subject methods is that the detectable signal is made up of a non-washable spot that forms on the surface of the substrate of the strip. The non-washable spot is made up of water soluble formazan product which is tightly bound to the substrate surface such that it cannot be readily removed from the surface under standard washing conditions. By standard washing conditions is meant the conditions experienced by substrate surface in analyte detection assays where unbound component has to be removed from the surface. An example of standard washing conditions are those employed by those of skill in the art in array based nucleic acid hybridization assays, where non-hybridized nucleic acids are removed from the surface of an array following a hybridization step. Such conditions are well known to those of skill in the art. As such, a feature of the subject methods is the production of a non-washable spot on the surface of the positively charged substrate, where the non-washable spot is made up of the water soluble formazan product.

In practicing the subject methods, the first step is to apply a quantity of the physiological sample to the test strip, where the test strip is described *supra*. The amount of physiological sample, e.g. blood, that is applied to the test strip may vary, but generally ranges from about 2 μ L to 40 μ L, usually from about 5 μ L to 20 μ L. Because of the nature of the subject test strip, the blood sample size that is applied to the test strip may be relatively small, ranging in size from about 2 μ L to 40 μ L, usually from about 5 μ L to 20 μ L. Where blood is the physiological sample, blood samples of a variety of different hematocrits may be assayed with the subject methods, where the hematocrit may range from about 20% to 65%, usually from about 25% to 60%.

Following application of the sample to the test strip, the sample is allowed to react with the members of the signal producing system to produce a detectable product, i.e., the non-washable spot, that is present in an amount proportional to the initial amount of the analyte of interest present in the sample. The amount of detectable product, i.e., signal produced by the signal producing system in the form of the non-washable spot, is then determined and related to the amount of analyte in the initial sample. In certain embodiments, automated instruments that perform the above mentioned detection and relation steps are employed. The above described reaction, detection and relating steps, as well as instruments for performing the same, are further described in U.S. Patent Nos. 4,734,360; 4,900,666; 4,935,346; 5,059,394; 5,304,468;

WO 02/22855

PCT/US01/28169

5,306,623; 5,418,142; 5,426,032; 5,515,170; 5,526,120; 5,563,042; 5,620,863;
5,753,429; 5,573,452; 5,780,304; 5,789,255; 5,843,691; 5,846,486; 5,902,731;
5,968,836 and 5,972,294; the disclosures of which are herein incorporated by
reference. In the relation step, the derived analyte concentration takes into account the
constant contribution of competing reactions to the observed signal, e.g., by calibrating
the instrument accordingly.

KITS

10 Also provided by the subject invention are kits for use in practicing the subject
methods. The kits of the subject invention at least include a signal producing system as
described above, where the signal producing system components may be combined
into a single reagent composition or separated, e.g., present in separate containers. In
certain embodiments, the signal producing system will be present in the kits in the
15 form of a reagent test strip, as described supra. The subject kits may further include a
means for obtaining a physiological sample. For example, where the physiological
sample is blood, the subject kits may further include a means for obtaining a blood
sample, such as a lance for sticking a finger, a lance actuation means, and the like. In
addition, the subject kits may include a control solution or standard, e.g. an analyte
20 control solution that contains a standardized concentration of analyte. In certain
embodiments, the kits also include an automated instrument, as described above, for
detecting the amount of product produced on the strip following sample application
and relating the detected product to the amount of analyte in the sample. Finally, the
kits include instructions for using the subject kit components in the determination of
25 an analyte concentration in a physiological sample. These instructions may be present
on one or more of the packaging, a label insert, containers present in the kits, and the
like.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of
30 limitation.

WO 02/22855

PCT/US01/28169

EXPERIMENTALEXAMPLE 1

5 A 0.8 µm nylon membrane obtained from Pall Corporation (East Hills, NY) was dipped into the reagent of Table 1, until saturated. The excess reagent was scraped off gently with a glass rod. The resulting membrane was hung to dry in a 56° C oven for 10 minutes. Porex (0.6 mm thick) was soaked in the nitrite solution of
 10 Table 2 and then hung to dry in a 100° C oven for ten hours. Finally, the membrane was laminated between a polyester stock (0.4 mm Melenex® polyester from ICI America, Wilmington, DE) and the nitrite-impregnated Porex.

15 EXAMPLE 2

The procedure of Example 1 was repeated, except that the first dip was the reagent of Table 3, and there was no second dip, since the Porex was not needed.

20 **Table 1. Reagent for a Glucose Test Pad**

Components	Quantity
Water	100 ml
(2-[Morpholino]ethanesulfonic acid) sodium salt MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA) Adjust pH to 5-7 by adding 6 M HCl)	2.2 gm
Tetonic 1307 (BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA)	1-3 gm
PSSA, Polystyrenesulfonic acid, sodium salt (MW 70,000, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)	2-4 gm
Crotein (Croda Inc., Parsippany, NJ, USA)	2-4 gm
Mannitol (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 gm
Phenazine Methosulfate (PMS, MW 306.34, Sigma, St. Louis, MO, USA)	30-300 mg
WST-5 (MW 1331.37, Dojindo Laboratory, Japan)	0.8-4 gm
Glucose Oxidase (GO, TOYOB0)	100-1000KU

WO 02/22855

PCT/US01/28169

Table 2. Nitrite Reagent

Components	Quantity
10 mM Phosphate Buffer Saline, pH7.4, (P-3813, Sigma, St. Louis, MO, USA)	70 ml
Ethanol	30 ml
Sodium Nitrite (MW69, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	5 gm
Polyvinylpyrrolidone (MW 40,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)	200 mg

5 Table 3. Reagent for a Glucose Test Pad

Components	Quantity
Water	100 ml
(2-[Morpholino]ethanesulfonic acid) sodium salt MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA)	2.2 gm
Poly(methyl vinyl ether- alt-maleic anhydride)* 6%	20 mL
Adjust pH to 5.5-7 by adding 50% NaOH	
Triton X-305 (BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA)	0.5-2 gm
Mannitol (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 gm
Sodium Nitrite (MW69, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	1-5 gm
WST-5 (MW 1331.37, Dojindo Laboratory, Japan)	0.8-4 gm
Magnesium Chloride (MW 203, Sigma, St. Louis, MO, USA)	3-5 gm
Phenazine Ethosulfate (PES, MW 334.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)	100-1000 mg
Glucose Oxidase (GO, TOYOB0)	100-1000KU

* Poly(methylvinylether-alt-maleic anhydride), MW 1,080,000, Cat# 41632-0, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA) Weigh out Poly(methylvinylether-alt-maleic anhydride) 6% in water (w/v), and heat the suspension to 95 C for 45 min. The resulting solution is ready to use upon cooling to room temperature.

Various glucose standards were tested on the non-charged and positively charged membranes. The signals were linear from 50 to 450 mg/dl glucose levels in blood. Figure 1 shows the same dip was coated on different membrane. One is positive charged nylon membrane, one is no positive charged polysulfone membrane. The coated membrane was tested by 400mg/dl glucose.

Using the following protocol, 10 μ L of aqueous samples comprising 400mg/dL glucose were tested on strips as described above, where the membrane of the strips varied in terms of the positively charged nylon membrane and (no positive charged)(non -charged)polysulfone membrane on the strip. A 10 μ L aqueous sample was applied onto a freshly prepared test strip. The strip was inserted into a reflectometer and data acquisition was commenced. The reflectance of the reading

WO 02/22855

PCT/US01/28169

strip was monitored at 615 nm at one-second intervals for forty five seconds. Next, the data were uploaded from the reflectometer's memory buffer to a personal computer via a modified serial cable. The reaction profile was plotted by K/S versus seconds.

- 5 (K/S is a measure of reflectance, discussed and defined in USP 4,935,346, col. 14, the disclosure of which is herein incorporated by reference.)

It is evident from the above results and discussion that the subject invention provides for improvement over previous reagent test strip formats. By using a water
10 soluble tetrazolium salt in combination with a positively charged substrate, the subject invention is the beneficiary of all of the positive attributes of tetrazolium compounds and is able to produce a non-washable reporter signal from the resultant water soluble formazan product. As such, the subject invention represents a significant contribution to the art.

15 All publications and patents cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent were specifically and individually indicated to be incorporated by reference. The citation of any publication is for its disclosure prior to the filing date and should not be construed as an admission
20 that the present invention is not entitled to antedate such publication by virtue of prior invention.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it is readily apparent
25 to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 02/22855

PCT/US01/28169

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition of matter comprising:
a positively charged substrate; and at least one
5 water soluble tetrazolium salt on at least one surface of said positively charged
substrate.
2. The composition according to Claim 1, wherein said positively charged
substrate is a bibulous substrate.
10
3. The composition according to Claim 1, wherein said positively charged
substrate is a non-bibulous substrate.
15
4. The composition according to Claim 1, wherein said water soluble tetrazolium
salt is part of an analyte oxidizing signal producing system.
15
5. The composition according to Claim 4, wherein said analyte oxidizing signal
producing system comprises an analyte oxidase.
20
6. The composition according to Claim 4, wherein said analyte oxidizing signal
producing system comprises an analyte dehydrogenase.
25
7. The composition according to Claim 4, wherein said analyte oxidizing signal
producing system further comprises an electron transfer agent.
25
8. The composition according to Claim 4, wherein said analyte oxidizing signal
producing system further comprises an enzyme cofactor.
30
9. The composition according to Claim 4, wherein said analyte oxidizing signal
producing system is present as a reagent composition.
30
10. A reagent test strip comprising:
a positively charged substrate; and
16

WO 02/22855

PCT/US01/28169

an analyte oxidizing signal producing system present on said positively charged substrate, wherein said analyte oxidizing signal producing system includes a water soluble tetrazolium salt.

5 11. The test strip according to Claim 10, wherein said positively charged substrate is bibulous.

12. The test strip according to Claim 10, wherein said positively charged substrate is non-bibulous.

10

13. The test strip according to Claim 10, wherein said water soluble tetrazolium salt accepts a hydride to produce a water soluble formazan product.

15

14. The test strip according to Claim 10, wherein said analyte oxidizing signal producing system comprises an analyte oxidase.

15. The test strip according to Claim 14, wherein said analyte oxidizing signal producing system further comprises an electron transfer agent.

20

16. The test strip according to Claim 14, wherein said analyte oxidizing signal producing system further comprises an enzyme cofactor.

17. The test strip according to Claim 10, wherein said analyte oxidizing signal producing system is a glucose oxidizing signal producing system.

25

18. An analyte detection or measurement system comprising:

- (a) a reagent test strip comprising:
 - (i) a positively charged substrate; and
 - (ii) an analyte oxidizing signal producing system present on said substrate, wherein said signal producing system includes a water soluble tetrazolium salt capable of accepting a hydride to produce a water soluble formazan; and

WO 02/22855

PCT/US01/28169

(b) an automated instrument.

19. A method for detecting the presence or determining the concentration of an analyte in a sample, said method comprising:

- 5 (a) applying said physiological sample to a reagent test strip comprising:
(i) a positively charged substrate; and
(ii) an analyte oxidizing signal producing system present on said substrate, wherein said signal producing system includes a water soluble tetrazolium salt capable of producing a water soluble formazan product,
10 whereby a non-washable spot comprising said formazan product is produced on said substrate;
(b) detecting said non-washable spot; and
(c) relating said detected non-washable spot to the presence or concentration of said analyte in said physiological sample.

15 20. The method according to Claim 19, wherein said signal producing system further comprises an analyte oxidase.

21. The method according to Claim 20, wherein said signal producing system
20 further comprises at least one of an electron transfer agent .

22. The method according to Claim 19, wherein said sample is whole blood or a derivative thereof.

25 23. The method according to Claim 19, wherein said detecting and relating steps are carried out by an automated instrument.

24. A kit for use in determining the concentration of an analyte in a physiological sample, said kit comprising:

- 30 (a) a reagent test strip comprising:
(i) a positively charged substrate; and

WO 02/22855

PCT/US01/28169

(ii) an analyte oxidizing signal producing system present on said substrate, wherein said signal producing system includes a water soluble tetrazolium salt capable of producing a water soluble formazan product; and
5 (b) at least one of:
(i) a means for obtaining said physiological sample and
(ii) an analyte standard.

25. The kit according to Claim 24, wherein said means for obtaining said physiological sample is a lance.

10 26. The kit according to Claim 24, wherein said analyte standard comprises a standardized concentration of a known reagent.

15 27. The kit according to Claim 24, wherein said kit comprises a means for obtaining said physiological sample and an analyte standard.

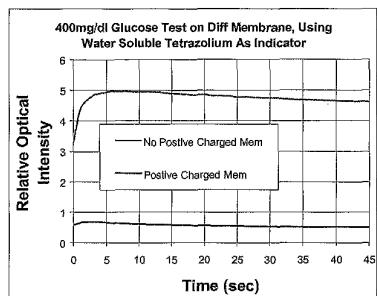


Fig. 1

【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

(10) International Publication Number
WO 02/022855 A3

(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

(51) International Patent Classification?
C12Q 1/26.
G01N 33/52

(21) International Application Number: **PCT/US01/28169**

(22) International Filing Date:
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: **English**

(26) Publication Language: **English**

(30) Priority Data:
09/659,938 12 September 2000 (12.09.2000) US

(71) Applicant: **LIFESCAN, INC. [US/US]; 1000 Gibraltar Drive, Milpitas, CA 95035-6312 (US).**

(72) Inventors: **OUVANG, Tianmei; 41945 Via San Gabriel, Fremont, CA 94539 (US); YI, Yeung, Siu; 3158 Paseo Robles, Pleasanton, CA 94506 (US).**

(74) Agent: **FIELD, Bret, E.; Bozicevic, Field & Francis LLP, Suite 200, 200 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).**

(81) Designated States (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,**

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

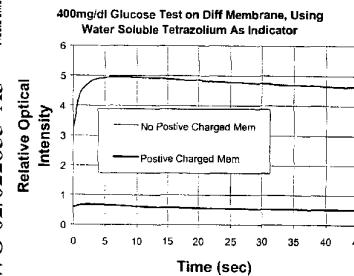
Published:

— 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

(88) Date of publication of the international search report:
18 July 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.

(54) Title: TEST-STRIIPS WITH POSITIVELY CHARGED MEMBRANES FOR TETRAZOLIUM BASED ASSAYS



(57) Abstract: Test strips and methods for their use in the detection of an analyte in a sample are provided. The subject test strips are characterized by at least including a water soluble tetrazolium salt on a surface of a positively charged substrate. In many embodiments, the water soluble tetrazolium salt is present as part of an analyte oxidizing signal producing system, which system includes one or more of the following additional components: an analyte oxidizing enzyme, e.g., an analyte dehydrogenase or an analyte oxidase; an electron transfer agent; and an enzyme cofactor. Also provided are systems and kits incorporating the subject test strips. The subject test strips, systems and kits find use in the measurement of a wide variety of analytes in a sample, such as a physiological sample, e.g., blood or a fraction thereof.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT																
International Application No PCT/US 01/28169																
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/26 G01N33/52																
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 C12Q 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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category^a</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5 902 731 A (OUYANG TIANMEI ET AL) 11 May 1999 (1999-05-11) cited in the application the whole document example 1</td> <td style="padding: 2px;">1-4, 6-13, 17-19, 22-27</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">SOCK J ET AL: "ACTIVITY STAINING OF BLOTTED ENZYMES BY REACTION COUPLING WITH TRANSFER MEMBRANE-IMMOBILIZED AUXILIARY ENZYMES" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 171, no. 2, 1988, pages 310-319, XPO08003063 ISSN: 0003-2697 abstract</td> <td style="padding: 2px;">14-16</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;">1-5, 7-21,24</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>		Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5 902 731 A (OUYANG TIANMEI ET AL) 11 May 1999 (1999-05-11) cited in the application the whole document example 1	1-4, 6-13, 17-19, 22-27	A	SOCK J ET AL: "ACTIVITY STAINING OF BLOTTED ENZYMES BY REACTION COUPLING WITH TRANSFER MEMBRANE-IMMOBILIZED AUXILIARY ENZYMES" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 171, no. 2, 1988, pages 310-319, XPO08003063 ISSN: 0003-2697 abstract	14-16	A	---	1-5, 7-21,24		---	-/-
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
X	US 5 902 731 A (OUYANG TIANMEI ET AL) 11 May 1999 (1999-05-11) cited in the application the whole document example 1	1-4, 6-13, 17-19, 22-27														
A	SOCK J ET AL: "ACTIVITY STAINING OF BLOTTED ENZYMES BY REACTION COUPLING WITH TRANSFER MEMBRANE-IMMOBILIZED AUXILIARY ENZYMES" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 171, no. 2, 1988, pages 310-319, XPO08003063 ISSN: 0003-2697 abstract	14-16														
A	---	1-5, 7-21,24														
	---	-/-														
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.																
<small> * 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 doubt on priority (claims) 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 *V* document containing relevant teaching which, when combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *8* document member of the same patent family </small>																
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report															
7 May 2002	22/05/2002															
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer															
European Patent Office, P.B. 5010 Patentlaan 2 NL-2233 RA Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax. (+31-70) 340-3016	Tuynman, A															

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/28169

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198512 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1985-070861 XP002198080 -8 JP 60 024199 A (NIPPON CHEMIPHAR CO), 6 February 1985 (1985-02-06) abstract -----	1,4,5, 7-17, 19-21,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/28169

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5902731	A	11-05-1999	AU 2037399 A	30-03-2000
			AU 4474399 A	30-03-2000
			BR 9901186 A	28-03-2000
			BR 9901431 A	09-05-2000
			CN 1249431 A	05-04-2000
			CN 1249349 A	05-04-2000
			EP 0990705 A1	05-04-2000
			EP 0990706 A1	05-04-2000
			JP 2000093198 A	04-04-2000
			JP 2000093199 A	04-04-2000
			NO 991185 A	29-03-2000
			NO 992026 A	29-03-2000
			US 6200773 B1	13-03-2001
			ZA 9901906 A	11-10-2000
			ZA 9902952 A	26-10-2000
JP 60024199	A	06-02-1985	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R0,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 オウヤング・ティアンメイ

アメリカ合衆国、94539 カリフォルニア州、フレモント、ビア・サン・ガブリエル 419
45

(72)発明者 ユー・ユング・シウ

アメリカ合衆国、94506 カリフォルニア州、プレザントン、パセオ・ロブレス 3158

F ターム(参考) 2G045 AA28 CA26 CA30 DA31 DA36 FB01 FB15

4B063 QA01 QQ03 QQ61 QQ68 QR03 QR04 QR51 QR57 QR64 QR66
QR84 QS28 QS36 QS39 QX01