



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 24 448 T2** 2006.08.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 190 231 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 24 448.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/12099**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 930 343.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/070327**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/00** (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

305771 05.05.1999 US

(73) Patentinhaber:

Intec Science, Inc., Brisbane, Calif., US

(74) Vertreter:

Bohmann & Loosen, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LU, Fang, Millbrae, US; LU, N., Frank, San Mateo,
US; WANG, Hua, Kai, San Bruno, US**

(54) Bezeichnung: **SYSTEM ZUR ELEKTROCHEMISCHEN QUANTITATIVEN ANALYSE VON ANALYTEN IN EINER FESTPHASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein System, Testverfahren und Testvorrichtung, die affinitätschromatographische Testtechniken und elektrochemische Quantifizierungstechniken für die Analyse von einem oder mehreren Analyten in einer Testprobe kombinieren. Genauer betrifft diese Erfindung ein elektrochemisches quantitatives Analysesystem zum Bestimmen eines Analyten (z. B. Proteine, Hormone oder Enzyme, kleine Moleküle, Polysaccharide, Antikörper, Nukleinsäuren, Wirkstoffe, Toxine, Viren oder Virenpartikel, Teile einer Zellwand und andere Verbindungen, die spezifische oder charakteristische Marker aufweisen, die ihre Identifizierung erlauben) in einer Festphase (z. B. einem Teststreifen) durch Messen von elektrochemischen Änderungen einer oder mehrerer Markierungen, die mit einer markierten Substanz verbunden sind, die mit der Konzentration des interessierenden Analyten korreliert werden können. Der in diesem Analysesystem verwendete Teststreifen umfasst ein Festphasenaffinitätschromatographiemedium mit einem elektrochemischen Nachweissystem, das damit verbunden ist, in dem Flüssigkeitspfad durch das Medium. Die hierin im folgenden detailliert angegebenen Erfindungen sind für die quantitative Analyse von tatsächlich einem jeglichen Analyten anwendbar, dessen Konzentration mit einer elektroaktiven Spezies einer elektroaktiven Substanz korreliert werden kann, die in der Lage ist, eine Änderung der elektrischen Antwort innerhalb der Umgebung der Testvorrichtung dieser Erfindung, die einer elektrochemischen Zelle ähnlich ist, zu zeigen.

2. Beschreibung des Standes des Technik

A. Immunodiagnostika

[0002] Die immunochemische Analyse auf einen Analyten innerhalb einer Festphase (Teststreifen) umfasst im allgemeinen einen Test, bei dem ein Analyt, in einer flüssigen Probe, und eine markierte Substanz oder ein anderer Reaktionsbestandteil miteinander in Wechselwirkung treten. Im Kontext des Standes der Technik wird verstanden, dass eine „markierte Substanz“ somit (a) eine Analytik-Mimik, die mit einem Indikator markiert ist, (b) einen markierten Liganden, der für die Wechselwirkung mit dem interessierenden Analyten spezifisch ist, oder (c) einen Komplex umfassen kann, der durch Wechselwirkung von (a) oder (b) und noch einem Reaktionsbestandteil ausgebildet ist.

[0003] Die die markierte Substanz und den Analyten enthaltende Flüssigkeit wird dann auf eine poröse Folie oder Membran übertragen, wo sie durch Diffusions- oder Kapillarwirkung entlang einem Flüssigkeitspfad der Membran gezogen wird und auf ein

oder mehrere Begleittestkitreagenzien trifft (von denen wenigstens eines innerhalb eines definierten Bereiches davon immobilisiert ist). Diese markierte Substanz und/oder der Analyt wird dann durch ein immobilisiertes Begleittestkitreagens an eine Teststelle gebunden, um einen Komplex auszubilden. Wenn der Komplex in ausreichender Konzentration vorhanden ist, liefert er eine erkennbare Veränderung an einer solchen Stelle. Wo der Indikator ein Pigment ist, wie beispielsweise ein Metall (z. B. kolloidales Gold), oder alternativ ein farbiges Latexpartikel, ist die erkennbare Veränderung im allgemeinen mit dem nackten Auge sichtbar.

[0004] Die folgenden Patente werden für diese Art von immunochemischem Test typisch betrachtet. Diese Patente sind in chronologischer Reihenfolge angeordnet und der Reihenfolge ihrer Diskussion soll was die Patentfähigkeit der hierin beschriebenen und beanspruchten Erfindung anbelangt, keine Bedeutung zugemessen werden.

[0005] Campbell et al, US-Patent 4,703,017 (auf Becton Dickinson übertragen) beschreibt ein Testverfahren zum Nachweis eines Analyten mit einem „direkten“ oder einem „partikulären“ Indikator, genauer einem Indikator, der mit dem nackten Auge visuell nachgewiesen werden kann, und somit ein derartiges Testverfahren für die diagnostische Anwendung zu Hause; oder, alternativ, in einer klinischen Umgebung, wo es an ausgereifter analytischer Ausrüstung mangelt, akzeptable macht. Der direkte Indikator der Wahl ist ein Liposom, das ein Pigment oder ein äquivalentes Farbmittel enthält. Das beanspruchte Testverfahren wird als für den Nachweis eines Analyten aus Urin geeignet beschrieben (z. B. Schwangerschaftstest); und kann somit einen erhöhten Titer des Analyten nachweisen. Entsprechend wird ein derartiger Test als eine semi-quantitative Bestimmung des interessierenden Analyten betrachtet. Da der Test einen einzigen Schritt umfasst (z. B. Auftragen der Probe auf den Teststreifen), ist der Test in der Technik als „Schnell“-Test bezeichnet worden.

[0006] Rosenstein, US-Patent 5,591,645 (auf Becton Dickinson übertragen) beschreibt ein immunochemisches Testverfahren, das auf dem in dem gemeinsam übertragenen US-Patent 4,703,017 (von Campbell et al.) basiert. Die Rosenstein-Testvorrichtung umfasst das gesamte Testkitreagenz in der „gleichen Ebene“ des Teststreifens und fasst das Auftragen der Probe direkt auf den Teststreifen ins Auge, um die darin enthaltenen Reagenzien zu rekonstituieren und dadurch die erwünschte Analyse zu bewirken. Der direkte Indikator der Wahl kann aus einer Anzahl von äquivalenten Farbmitteln ausgewählt sein, jedoch ist kolloidales Gold, das an ein Bindeprotein (z. B. Antikörper oder Antigen) adsorbiert ist, im allgemeinen bevorzugt. Das beanspruchte Testverfahren ist als für den Nachweis von Analyten in Urin

geeignet beschrieben (z. B. Schwangerschaftstest); und somit in der Lage, einen erhöhten Titer an Analyten nachzuweisen oder den interessierenden Analyten semiquantitativ zu bestimmen. Da der Test auch einen einzigen Schritt umfasst (z. B. Auftragen der Probe auf den Teststreifen), ist der Test in der Technik als ein „Schnell“-Test bezeichnet worden.

[0007] Swanson et al, US-Patent 5,073,484 (auf Abbott Laboratories übertragen) beschreibt ein immunchromatographisches Testverfahren, das mehrere Testzonen verwendet, wobei eine jede Zone entlang einem gemeinsamen linearen Flüssigkeitspfad angeordnet ist. Während die Testprobe und die Testkitreagenzien entlang dem Flüssigkeitspfad wandern, wird der interessierende Analyt (der im allgemeinen mit einem direkten Indikator verbunden ist) an ein immobilisiertes Begleitreagens in einer jeden der Testzone gebunden. Eine jede der Testzonen ist bezüglich eines Standards vorkalibriert und somit korrelierte das Auftreten von Farbe in einer spezifischen Testzone mit dem Konzentrationsniveau des Analyten in der Probe. Entsprechend kann die Konzentration des Analyten in der Probe aus dem Umfang der Farbentwicklung entlang dem Flüssigkeitspfad der Testvorrichtung abgeschätzt werden. Da der Test auch einen einzigen Schritt (z. B. Auftragen der Probe auf den Teststreifen) umfasst, ist der Test in der Technik als ein „Schnell“-Test bezeichnet worden.

[0008] May et al, US-Patent 5,602,040 (auf Unilever Patent Holdings übertragen) beschreibt ein immunchromatographisches Testverfahren, das analog ist zu den in den oben diskutierten Patenten von Campbell et al und Rosenstein. Einer der Hauptunterschiede, die von May et al identifiziert und beansprucht worden sind, ist die Lyophilisierung eines Zuckers zusammen mit dem direkten Indikator in der Probeaufnahme. Es wird berichtet, dass der Zuckerzusatz erforderlich ist, um die Rekonstitution des lyophilisierten Indikators zu bedingen und erlaubt dadurch seine Wechselwirkung mit dem Analyten in der Probe.

[0009] Mit der beschränkten Ausnahme der Anpassung der vorstehenden Schnelltests an den Nachweis eines erhöhten Analytentiters sind diese Schnelltests im allgemeinen für eine präzise quantitative Überwachung eines Analytentiters ungeeignet oder für den quantitativen Nachweis und die Differenzierung von mehr als einem Analyten innerhalb einer einzelnen Testumgebung ungeeignet.

B. Instrumentelle Analyse

[0010] Die Analyse von Fluidproben hat traditionell auch die Verwendung einer Ausrüstung und das Messen von Änderungen des elektrischen Potentials und/oder Stroms an einer gegebenen Stelle/Elektrode umfasst. Typischerweise wird die elektrische Mes-

sung auf eine zweite Elektrode bezogen und eine Anzahl von Messungen über ein gegebenes Intervall und/oder einen definierten Bereich an Zuständen durchgeführt.

[0011] Die folgenden Patente werden als für diese Art von elektrochemischer Analyse typisch betrachtet. Diese Patente sind in chronologischer Reihenfolge angeordnet und der Reihenfolge der Diskussion oder ihrer relativen Bedeutung hinsichtlich der Patentfähigkeit der hierin beschriebenen und beanspruchten Erfindung soll keine Bedeutung beigemessen werden.

[0012] Wang US-Patent 5,292,423 (übertragen auf New Mexico State University Technology Transfer Corp.) beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung für die Spurenmetallanalyse von Fluidproben (z. B. Trinkwasser, Blut, Urin etc.) mittels einer initialen Adsorption des Spurenmetalls aus einer Fluidprobe auf eine siebgedruckte Kohlenstoff (Arbeits-)Elektrode, die mit Quecksilber vorbeschichtet worden war. Die Wang-Testplattform verwendet auch wenigstens eine zusätzliche (Referenz-)Elektrode. Die Elektrode mit dem Spurenmetall wurde danach einer Analyse durch entweder inverse Voltammetrie (ASV) oder potentiometrische Inverspolarographie (PSA) unterzogen. Die berichteten Vorteile des Verfahrens und der Vorrichtung nach Wang umfassen die Fähigkeit, seine Erfindung auf das Testen von Probenfluiden im Feld vor Ort auf vermutete Verschmutzungen mit einer Einwegtestvorrichtung anzupassen.

[0013] Brooks US-Patent 5,753,517 (übertragen auf die University of British Columbia) beschreibt einen quantitativen immunchromatographischen Test unter Verwendung einer Vorrichtung zum Nachweis eines partikulären Latexindikators gemäß den mit der sogenannten RAMP™-Technologie verbundenen Vorgehensweisen. Gemäß Brooks et al verwendet die RAMP™-Technologie Latexpartikel in einer Art und Weise ähnlich den Enzymen in ELISA-Tests.

[0014] In der auf der RAMP™-Technologie basierten Analyse wird ein Teststreifen mit zwei distinkten fluoreszenzmarkierten Indikatoren in eine Kartusche gegeben und eine Fluidprobe auf den Teststreifen aufgetragen. Der interessierende Analyt wechselwirkt mit einem der Indikatoren, was einen fluoreszierenden Komplex ausbildet, der in der Testzone des Teststreifens gebunden ist, während der zweite Indikator innerhalb des Teststreifens intakt bleibt (um einen inneren Standard bereitzustellen). Die RAMP™-Technologie ist somit in der Lage, den fluoreszierenden Komplex von dem internen Standard zu differenzieren und dadurch in der Lage, die Menge an Analyten in der Probe zu bestimmen.

[0015] Brooks et al. alternatives System zum Durchführen seiner Analyse fasst die Verwendung von op-

tischen Nachweisverfahren (Lichtstreuung) und Messen von Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit oder des Widerstands ins Auge. In einer der vorgeschlagenen Alternativen fasst Brooks et al. (US 5,753,517, Spalte 7, Zeilen 7–19 einschließlich) die quantitative Messung des interessierenden Analyten durch den elektrochemischen Nachweis eines aus einem Komplex abgetrennten elektroaktiven Agens ins Auge, wie beispielsweise Wismuth, Gallium oder Tellurionen, das mit dem interessierenden Analyten verbunden ist. Gemäß Brooks et al. umfasst eine dieser Alternativen die Verwendung eines Konjugates aus Chelatbildner und Protein als ein Indikator für den interessierenden Analyten, und der Nachweis desselben fasst das Hinzugeben einer sauren Lösung zur Abtrennung der Metallmarkierung als Ionen für eine spätere quantitative Mengenbestimmung durch inverse Voltammetrie ins Auge (wie von Hayes et al., Anal. Chem. 66: 1860–1865 (1994) beschrieben).

[0016] Durst US Patent 5,789,154 (auf Cornell Research Foundation Inc. übertragen) beschreibt einen liposomenverstärkten Immunassay und eine Testvorrichtung, und Durst US 5,753,519 (übertragen auf Cornell Research Foundation Inc.) beschreibt einen liposomenverstärkten Immunaggregationstest und eine Testvorrichtung.

[0017] Die folgende veröffentlichte technische Literatur wird als typisch für diese Art von elektrochemischer Analyse betrachtet. Diese Veröffentlichungen sind in chronologischer Reihenfolge angeordnet und der Reihenfolge ihrer Diskussion oder ihrer relativen Bedeutung für die Patentfähigkeit der hierin beschriebenen und beanspruchten Erfindung soll keine Bedeutung beigemessen werden.

[0018] Elektrochemische Techniken, die mit Affinitätschromatographischen Reaktionen verbunden waren, stellten infolge ihres stabilen und empfindlichen Signals, niedrigerer Nachweisgrenze, einfacher Handhabung und Kosteneffektivität Herausforderungen dar. Grundlegende Studien von Henieman et al. (Hayes, F.H. et al., Anal. Chem., 66, 1860–1865 (1994)) stellten die Verwendung von Metallionenmarkierungen für heterogene Immunassays mit inverser Voltammetrie (ASV)-Nachweis dar. Derartige Immunassays umfassten das kovalente Verbinden eines Chelatbildners mit einem Protein, um als Chelon für die Metallmarkierung zu dienen. Nach einem kompetitiven Gleichgewicht zwischen dem markierten und dem nicht-markierten Protein für den Antikörper (immobilisiert auf der Oberfläche eines Polystyerröhrchens), wurde die Metallmarkierung abgetrennt und in eine elektrochemische Zelle für einen ASV-Nachweis mit einer Elektrode mit hängendem Quecksilbertropfen (HMDE) und einer entgasten Lösung überführt. M.B.G Garcia und A.C. Garcia (Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 38, 389–395 (1995)) beschreiben ein adsorptives Voltammetrie-Verfahren

für die Bestimmung von kolloidalem Gold. Wang et al. (Wang J., Anal. Chem., 70, 1682–1685 (1998)) verwendeten einen antikörperbeschichteten siebgedruckten Messfühler, führten das gesamte Testprotokoll direkt auf der Oberfläche des Einwegstreifens durch und verwendeten den hochempfindlichen potentiometrischen Voltametrimodus zum Nachweisen der abgespaltenen Metallionenmarkierung in Mikroliterlösungen. Wie für dezentralisierte Nachweisanwendungen erwünscht bietet ein derartiges auf dem Chip-Protokoll mehrere Vorteile verglichen mit herkömmlichen ASV-basierten Immuntests, einschließlich vereinfachter Handhabung (z. B. die Beseitigung der Trenn- und Reagenzienvolumina, Beseitigung toxischer Quecksilbertropfen und einen empfindlicheren voltametrischen Nachweismodus). Das System von Wang et al. erfordert vergleichsweise lange Inkubationszeiten für das Vorkonditionieren des Messfühlers (vor der Verwendung) und für die Wechselwirkung mit der Probe; und mehrere Waschschritte, was beides das Verfahren unpraktisch und beschwerlich macht. A.J. Bäumner und R.D. Schmid (Biosensors & Bioelectronics, 13, 519–529 (1998)) beschreiben amperometrische Immunmigrationsewegmessfühler zum Nachweis von Triazinpestiziden. K.S. Lee et al (Analytica Chimica Acta, 380, 17–26 (1999)) beschreiben einen elektrochemischen Immunmessfühler für die Bestimmung von Theophyllin.

ZIELE DER ERFINDUNG

[0019] Es ist das Ziel der Erfindung, die obigen und verwandte Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen.

[0020] Genauer besteht das Hauptziel der Erfindung darin, eine schnelle Affinitätschromatographische elektrochemische Analyse für die quantitative Bestimmung von interessierenden Analyten anzupassen.

[0021] Es ist ein weiteres Ziel dieser Erfindung, ein System bereitzustellen für die elektrochemische quantitative Analyse von einem oder mehreren Analyten in einem Festphasentestformat, das hinsichtlich der leichten Handhabbarkeit mit schnellen immunchromatographischen Tests vergleichbar ist.

[0022] Es ist noch ein weiteres Ziel der Erfindung, ein System bereitzustellen für die elektrochemische quantitative Analyse von einem oder mehreren Analyten in einem Festphasentestformat, das ein vereinfachtes Mittel zum Nachweis von Markierungen durch potentiostatische oder potentiometrische Messung von Änderungen innerhalb der Festphase umfasst, die der/den Konzentration(en) einer oder mehrerer Markierungen innerhalb der Teststelle zuweisbar sind.

[0023] Es ist ein noch weiteres Ziel dieser Erfin-

ung, ein System bereitzustellen zur gleichzeitigen elektrochemischen quantitativen Analyse einer üblichen Testprobe auf mehrere Analyte in einem Festphasentestformat, das ein vereinfachtes Mittel zum Nachweis einer oder mehrerer Markierungen umfasst, durch Voltametrie.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0024] Die obigen und verwandte Ziele werden durch das elektrochemische quantitative Analysesystem, das Verfahren und den Teststreifen dieser Erfindung zum Bestimmen der Konzentration eines Analyten innerhalb einer Festphasentestumgebung gelöst. Zu Beginn wird eine Testprobenlösung und eine markierte Substanz initial unter Testbedingungen in einer Festphasentestumgebung kontaktiert und dazu veranlasst, darin entlang einem Flüssigkeitspfad zu wandern. Unabhängig von dem Testformat (kompetitiver Test, Sandwich-Test, etc.) wird die markierte Substanz innerhalb eines abgegrenzten Bereiches der Festphase konzentriert (gebunden). Im Kontext des Systems und des analytischen Verfahrens dieser Erfindung kann eine „markierte Substanz“ ein jegliches geeignetes elektroaktives Material umfassen, das innerhalb eines abgegrenzten Bereiches der Festphase unter Testbedingungen isoliert werden kann, oder das eine elektroaktive Komponente innerhalb eines derartigen abgegrenzten Bereiches abtrennen kann (auch kollektiv hierin im Folgenden als „elektroaktive Spezies“ bezeichnet); und derartige elektroaktive Spezies erfahren danach eine elektrochemische Umwandlung (z. B. Redox), die mit der elektrochemischen quantitativen Analyse verbunden ist. Die beobachtete Messung (Umwandlung) der elektroaktiven Spezies kann direkt oder umgekehrt mit der Konzentration des interessierenden Analyten in der Testprobe in Beziehung gebracht werden (z. B. durch Vergleich mit einer Standardkurve).

[0025] Zwei prinzipielle Typen von elektroanalytischen Messungen zur Bestimmung der Konzentration des interessierenden Analyten sind potentiometrisch und potentiostatisch. Bei einem jeden dieser analytischen Protokolle sind zwei Elektroden und eine Kontaktproben(Elektrolyt)lösung erforderlich beteiligt, die zusammen innerhalb des Teststreifens eine Umgebung bilden, die einer elektrochemischen Zelle ähnlich ist. Die Elektrodenoberfläche ist somit die Verbindung zwischen dem ionischen Leiter (z. B. Elektrolyten aus der wässrigen Fluidprobe, den Testkitreagenzien, etc.) und einem elektrischen Leiter. Innerhalb dieser Umgebung des Teststreifens, die einer elektrochemischen Zelle ähnlich ist, wird die Elektrode, die auf den interessierenden Analyten (oder eine elektroaktive Substanz, die den interessierenden Analyten anzeigt) antwortet, als die „Indikator“- oder „Arbeits“-Elektrode bezeichnet, wohingegen die Elektrode, die bei einem konstanten Potential gehalten wird, als die „Referenz“-Elektrode bezeichnet

wird (wobei ihre Antwort unabhängig von der Probenlösung ist).

[0026] In einer der Ausführungsformen dieser Erfindung wird die immobilisierte markierte Substanz mit einem Trennmittel in Kontakt gebracht, um initial die Abtrennung/Ersetzung der Markierung von der immobilisierten markierten Substanz innerhalb dieses abgegrenzten Bereiches zu bedingen. Im Falle einer Metallmarkierung kann beispielsweise das abgetrennte/ersetzte Metall weiter mit der Substanz in der Trennreagenslösung interagieren, um eine Metallfolie (oder Metalloberflächen-aktiven Komplex) auf der Oberfläche der Arbeitselektrode innerhalb des abgegrenzten Bereiches der Festphase auszubilden. Danach wird der abgegrenzte Bereich des affinitätschromatographischen Teststreifens einer potentiostatischen Messung durch inverse Voltametrie der Markierung von der Metallfolie (oder des Metalloberflächen-aktiven Komplexes) auf der Arbeitselektrode unterzogen, was die Markierung veranlasst, noch eine zweite elektrochemische Umwandlung durchzuführen (Konversion der Markierung von der reduzierten Form in den oxidierten Zustand). Diese zweite elektrochemische Umwandlung der Markierung (von dem reduzierten in den oxidierten Zustand) weist einen charakteristischen Fingerabdruck auf, der überwacht werden kann, und, wenn er mit einer Standardkurve verglichen wird, direkt mit der Konzentration des Analyten in der Probe korrelieren kann.

[0027] Die desorbierte Markierung von der Metallfolie (oder dem Metalloberflächen-aktiven Komplex) und somit der interessierende Analyt kann quantifiziert werden durch Messung von Veränderungen innerhalb des abgegrenzten Bereiches des Teststreifens durch potentiostatische elektrochemische Techniken. Die Besonderheiten dieser elektrochemischen quantitativen Analyse umfasst das Anlegen eines elektrischen Potentials an dem abgegrenzten Bereich über einen definierten Potentialbereich und das Überwachen der Geschwindigkeit des Elektronentransfers (Stromes) bei einem jeden Potential. Die Änderung des elektrischen Potentials ist analog zu dem Aufnehmen einer Reihe von optischen Messungen eines Farbindikators bei unterschiedlichen Wellenlängen. Das an der Elektrode angelegte elektrische Potential treibt die targetierten elektroaktive Spezies an (zwingt sie dazu), Elektronen mit einer gegebenen Geschwindigkeit zu gewinnen oder zu verlieren (Reduktion bzw. Oxidation), die die Konzentration einer derartigen elektroaktiven chemischen Spezies angibt. Entsprechend kann der sich ergebende Strom nicht nur die Geschwindigkeit wiedergeben, mit der sich die Elektronen über die Elektroden-/Lösungsgrenzfläche bewegen, sondern auch (wenn mit einem Standard verglichen) die Konzentration des Analyten in der Testprobe. Diese potentiostatische Technik kann daher eine jegliche chemische Spezies messen, die elektroaktiv ist (z. B. die man in

der Umgebung einer elektrochemischen Zelle reduzieren oder oxidieren kann).

[0028] Eine der bevorzugten Konstruktionen dieses Teststreifens, die bei dem elektrochemischen quantitativen Analysesystem der Erfindung nützlich sind, weist mehrere Komponenten und mehrere funktionale Bereiche auf, (a) um das Volumen und die Geschwindigkeit der Absorption der Probe durch den Teststreifen zu steuern; (b) um die gesteuerte Wechselwirkung der Probe und eine markierte Substanz mit einer immobilisierten Bindesubstanz innerhalb eines abgegrenzten Bereiches des Teststreifens aufzunehmen; (c) um die Trennung der markierten Substanz von den endogenen Komponenten der Probe zu bedingen; (d) für die Konzentrierung der markierten Substanz innerhalb eines abgegrenzten Bereiches des Teststreifens für die elektrochemische Verarbeitung, und (e) für die quantitative Bestimmung des interessierenden Analyten durch elektrochemische Mittel.

[0029] In einer weiteren der bevorzugten Ausführungsformen der vorstehenden Teststreifenkonstruktion kann die Probe und die markierte Substanz innerhalb eines saugfähigen Kissens (z. B. Faserglas) kombiniert werden, das in Fluidverbindung mit einem festphasenaffinitätschromatographischen Testmedium gehalten wird. Nach der Übertragung der Probe darauf wird die markierte Substanz rekonstituiert und die sich ergebende markierte Substanz und/oder ein Komplex davon, der mit dem interessierenden Analyten ausgebildet wird, in ein derartiges Testmedium gezogen. Während dieses Fluid und seine Bestandteile (z. B. Probe, Testkitreagens und Reaktionsprodukte davon) in und innerhalb des affinitätschromatographischen Testmediums diffundieren, wird die markierte Substanz an den abgegrenzten Bereich (hierin im folgenden auch „Teststelle“) entlang diesem Fluidpfad gebunden. Typischerweise kann der abgegrenzte Bereich durch eine immobilisierte Bindesubstanz definiert werden, die für die Wechselwirkung mit dem Analyten, einer Analyt-Mimik oder einem Komplex des Analyten und/oder eines markierten Ligand spezifisch ist (z. B. durch Binden an ein Epitop auf dem Analyten). Da der Analyt, die Analyt-Mimik oder ein Komplex aus dem Analyten und/oder einem markierten Liganden an der Teststelle zunehmend konzentriert wird, kann er gemessen werden und die Menge davon mit dem Analyten in der Testprobe korreliert werden.

[0030] Die Vorteile einer derartigen gesteuerten Potential(potentiostatischen)technik umfassen hohe Empfindlichkeit, Selektivität für eine elektroaktive Spezies, einen weiten linearen Bereich, tragbare und mit geringen Kosten verbundene Instrumentierung und Fähigkeit zur Speziesbestimmung.

[0031] Um mehrere funktionale Bestandteile inner-

halb der einstückigen Vorrichtung der bevorzugten Teststreifenkonstruktion dieser Erfindung aufzunehmen, sind alle Bestandteile bevorzugterweise auf einem gemeinsamen Träger oder Stützschrift (typischerweise einem inerten Kunststoff, z. B. Mylar) angeordnet angebracht. Das Substrat dieser Testvorrichtung kann mit einem leitfähigen Material vorbedruckt sein, um einen elektrischen Kontakt (direktes oder induktives Koppeln) zwischen dem affinitätschromatographischen Testmedium des Teststreifens und einem elektrochemischen Analysegerät bereitzustellen, das so konfiguriert ist, dass es feine elektrische Änderungen innerhalb des abgegrenzten Bereiches in dem Teststreifen misst. Wie detaillierter in der folgenden Beschreibung der Figuren dargelegt, ist diese Stützschrift typischerweise an zwei oder mehreren Stellen mit einem leitfähigen Material oder Metallsalz bedruckt, um das auszubilden, was hierin im Folgenden als „Elektroden“ bezeichnet wird. Diese Elektroden sind räumlich entlang der Stützschrift so angeordnet, um mit den abgegrenzten Bereichen des Festphasenmediums zusammenzufallen. Die Elektrode, die mit dem abgegrenzten Bereich der Teststelle zusammenfällt, wird als die „Arbeits Elektrode“ bezeichnet. Abhängig von dem elektrochemischen Analyseverfahren erfordert der Teststreifen im Allgemeinen wenigstens eine zusätzliche Elektrode (z. B. „Referenz“-Elektrode), um die Platten einer elektrochemischen Zelle auszubilden.

[0032] Nachdem die markierte Substanz innerhalb des abgegrenzten Bereiches der Teststelle konzentriert worden ist, kann sie durch eine Anzahl von elektrochemischen Techniken gemessen werden. Wie oben festgehalten kann es wünschenswert sein, vorläufig eine derartige Messung durchzuführen, um zuerst die Markierung aus dem Komplex durch ihre „Vor-Konzentrierung“ auf der Arbeits Elektrode zu isolieren. Dieser „Vor-Konzentrierungs“-Prozess kann die Trennung/das Ersetzen der Markierung von dem Komplex und die Bindung der Markierung in einer reduzierten Form (z. B. Metallfolie (oder Metalloberflächen-aktiver Komplex)) auf der Arbeits Elektrode umfassen, wo sie elektrochemisch verfügbarer oder aktiver ist. Nach Abschluss dieses Vor-Konzentrierungsprozesses kann die sich ergebende Metallfolie (oder der Metalloberflächen-aktive Komplex) einer potentiostatischen elektrochemischen quantitativen Analyse durch inverse Voltametrie unterzogen werden. Im Kontext dieses bevorzugten analytischen Systems (z. B. potentiostatische elektrochemische quantitative Analyse durch inverse Voltametrie) wird die Markierung unter elektrochemischen quantitativen analytischen Bedingungen erneut oxidiert und diese elektrochemische Umwandlung der Markierung (von dem reduzierten in den oxidierten Zustand) überwacht. Das Stromsignal, das während dieser Umwandlung (Spitze und Fläche) erzeugt wird, hängt von einer Anzahl von Systemvariablen, den Charakteristiken der Metallmarkierung und der Elektroden-

geometrie ab. In einem jeden Fall können diese Variablen jedoch durch empirische Einstellung optimiert und die Analysebedingung maßgeschneidert werden, um den Standardkurven zu entsprechen, die verwendet werden, um eine elektrische Signalantwort mit einer Analytenkonzentration zu korrelieren. Genauer ist [Fig. 4](#) eine graphische Darstellung der Stromsignalantwort einer Bleimetallfolie auf einer Kohlenstoffelektrode für die inverse Voltametrie von einer niedrigen zu einer hohen Konzentration von Blei. In ähnlicher Weise veranschaulicht [Fig. 5](#) die Schwankung der Signal(strom)intensität als eine Funktion der Dauer des „Vor-Konzentrierungs“-Intervalls (vor der elektrochemischen Analyse) beim Nachweis von Wismuth. Bei der graphischen Darstellung dieser in [Fig. 5](#) gezeigten Variable ist die Stromsignalintensität umso größer, je länger das Vor-Konzentrierungsintervall ist (das zwischen 1 und 15 Minuten variierte). Eine ähnliche Korrelation/Optimierung wird bei analytischen Prozessbedingungen für eine jede der Markierungen vorgenommen, die ausgewählt werden, und Standardkurven für jede erzeugt, wie angemessen, um mit dem dynamischen Bereich der Zustände und über einen Konzentrationsbereich zu korrelieren, von denen wahrscheinlich ist, dass sie für einen gegebenen Analyten angetroffen werden. [Fig. 6](#) zeigt die Antworten von mehreren Markierungen in einem Nachweisfenster in einer Lösung, die Indium, Blei, Kupfer und Wismuth enthält. Unter Verwendung mehrerer Markierungen können in dieser Erfindung interessierende Analyten in einer Probenlösung gleichzeitig quantifiziert werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0033] [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Darstellung eines Teststreifenbestandteils des elektrochemischen, quantitativen Festphasenanalysesystems der Erfindung (A: ein Zweielektrodensystem; B: ein Dreielektrodensystem).

[0034] [Fig. 2](#) ist ein Querschnitt des Teststreifens von [Fig. 1B](#) entlang der Ebene 2-2.

[0035] [Fig. 3](#) ist eine Darstellung der Testvorrichtung dieser Erfindung.

[0036] [Fig. 4](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve eines Wismuth/Quecksilberamalgams auf einer Kohlenstoffelektrode über einen Bereich von Konzentration bei inverser Voltametrie dar (1 ng/ml bis 50 ng/ml prä-konzentrierter Wismuthmetallmarkierung).

[0037] [Fig. 5](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die die Variation der Signal (strom)intensität als eine Funktion der Dauer des „Prä-Konzentrierungs“-Signals (vor der elektrochemischen Analyse) beim Nachweis von Wismuth veranschaulicht. In der graphischen Darstellung dieser in [Fig. 4](#)

gezeigten Variablen ist die Stromsignalintensität umso größer, je länger das Vor-Konzentrierungsintervall ist (das von 1 bis 15 Minuten schwankte).

[0038] [Fig. 6](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die die Antworten von mehreren Markierungen in einem Nachweisfenster in einer Indium-, Blei-, Kupfer- und Wismuth-Metallmarkierung enthaltenden Lösung veranschaulicht.

[0039] [Fig. 7](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die die elektrochemische Analyse von Standard-Myoglobin-Antikörperlösungen bei unterschiedlichen Konzentrationen gemäß dem System, dem Verfahren und dem Teststreifen ([Fig. 1](#) & [Fig. 2](#)) dieser Erfindung veranschaulicht.

[0040] [Fig. 8](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die sechs Wiederholungsmessungen einer 2,5 ng/ml HBsAg in einer Serumprobe unter Verwendung des Systems, des Verfahrens und des Teststreifens ([Fig. 1](#) & [Fig. 2](#)) dieser Erfindung veranschaulicht.

[0041] [Fig. 9](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die die Messungen von HBsAg in einer Serumprobe unter Verwendung eines mit Blei-, Kupfer- und Wismuth-Ionen markierten HBsAg Antikörpers veranschaulicht.

[0042] [Fig. 10](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die die Messung von HCG (links), HBsAg (rechts) und Kontrollmarkierung (Mitte) in einer Serumprobe unter Verwendung des Systems, des Verfahrens und des Teststreifens ([Fig. 1](#) & [Fig. 2](#)) dieser Erfindung veranschaulicht.

[0043] [Fig. 11](#) stellt graphisch eine Stromsignalantwortskurve dar, die den kompetitiven Nachweis von menschlichem NPOR (25mer Oligonukleotid) veranschaulicht, A (oben) ist das Signal der leeren Lösung (ohne menschlichem NPOR) und B (unten) ist das Signal der menschlichem NPOR enthaltenden Lösung.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG EINSCHLIEßLICH BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0044] Einer der entscheidenden Vorteile des Systems, des Verfahrens und des Teststreifens dieser Erfindung ist die einzigartige Fähigkeit, gleichzeitig eine quantitative elektrochemische Analyse für mehrere Analyten innerhalb einer gegebenen Testprobe durchzuführen. Somit ist es möglich, einen Satz von Tests bezüglich Drogenmissbrauch mit einer gegebenen Probe durchzuführen, indem einfach unterschiedliche markierte Substanzen für einen jeden der interessierenden Analyten innerhalb einer gegebenen Probe verwendet werden. Entsprechend versteht man, dass die folgende Diskussion nicht beab-

sichtigt, den Umfang oder die Anwendung der Erfindung auf die Analyse von einem einzelnen Analyten zu beschränken, und eine derartige Beschreibung auf die Analyse eines einzelnen Analyten nur aus Gründen des Verständnisses und der beispielhaften Darstellung beschränkt ist.

[0045] Wie oben zusammenfassend festgestellt und erneut hervorgehoben ist, basiert das elektrochemische, quantitative Analysesystem der Erfindung auf der anfänglichen Konzentrierung einer markierten Substanz innerhalb eines abgegrenzten Bereiches einer Festphasentestumgebung; und, danach, Bedingen einer elektronischen Umwandlung in der Form der Markierung, um ein messbares elektrisches Signal innerhalb der überwachten Umgebung zu produzieren, das mit der Menge des Analyten in der Testprobe korreliert werden kann.

[0046] In bestimmten Fällen kann es angemessen sein (als ein Zwischenschritt in der Analyseroutine), die Markierung von der markierten Substanz zu trennen/zu ersetzen und sie dadurch umzuwandeln, oder sie zu veranlassen, mit einer weiteren Substanz zu reagieren, die eine bessere Zugänglichkeit für die elektrochemische quantitative Analyse erlaubt. Wo beispielsweise die markierte Substanz mit einem Metall markiert ist (z. B. markierter Ligand), erfordert dessen Isolierung und Konzentrierung innerhalb des abgegrenzten Bereiches des Teststreifens im allgemeinen deren Trennung und/oder deren Entfernung aus ihren Ligandenbestandteilen und ihre Umwandlung oder Umsetzung, um ihre Umwandlung in eine Form zu bedingen/zu bewirken (z. B. leicht oxidierbarer oder reduzierbarer Zustand), die für den elektrochemischen Zustand verglichen mit einem anderen leichter verfügbar ist. In einer der bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung besteht der markierte Ligand aus einer funktionellen Gruppe, die eine chelatähnliche Kopplung an die Metallmarkierung ausbildet. Diese Kopplung ist jedoch pH-empfindlich und somit kann die Metallmarkierung abgetrennt von ersetzt werden in dem Komplex nach Konzentrierung innerhalb eines abgegrenzten Bereiches der Festphase, einfach indem sie mit einer saueren Salzlösung kontaktiert wird.

[0047] Alternativ kann, wo der markierte Ligand aus einem Indikator (z. B. Metall) besteht, der in einem Liposom verkapselt ist, wie beispielsweise in Campbell et al, US-Patent 4,703,017 (zuvor hierin diskutiert) beschrieben ist, das wiederum mit einem Liganden konjugiert ist, die Integrität der Liposomenkapsel leicht mit einer Anzahl üblicher Lipidlösungsmittel (z. B. Detergenzien) gestört/abgelöst werden. Das Metall kann somit von den Ligandenbestandteilen des markierten Liganden getrennt werden und leichter für seine quantitative Analyse zugänglich/verfügbar gemacht werden.

[0048] Wo die elektrochemische quantitative Analyse inverse Voltametrie als das analytische Verfahren der Wahl verwendet, kann die abgetrennte/ersetzte Metallmarkierung mit Quecksilberionen in der saueren Salzlösung umgesetzt werden, um ein Amalgam auf der Arbeitselektrode benachbart dem abgegrenzten Bereich des Festphasenmediums auszubilden. Die elektrochemische Reaktion der Metallmarkierung wird danach bei der nachfolgenden elektrochemischen quantitativen Analyse umgekehrt und die feinen elektrischen Veränderungen während einer derartigen Umwandlung überwacht und mit der Anwesenheit und Konzentration von Analyten in der Testprobe korreliert.

[0049] Um die Einfachheit und Tragfähigkeit des Systems und der Verfahren der vorliegenden Erfindung bereitzustellen, verwendet das quantitative Analysesystem dieser Erfindung einen Affinitätschromatographischen Teststreifen, wobei ein abgegrenzter Bereich davon so konfiguriert ist, dass er den interessierenden Analyten konzentriert. Die in **Fig. 1** & **Fig. 2** dargestellten Testvorrichtungen sind typische Beispiele einer bevorzugten Ausführungsform dieser Testvorrichtung.

[0050] Die in den **Fig. 1** & **Fig. 2** dargestellte Testvorrichtung besteht initial aus einem Affinitätschromatographischen Teststreifen und einem elektrochemischen Nachweissystem.

[0051] Der Affinitätschromatographische Teststreifen (**10**) umfasst eine Vielzahl von diskreten Bereichen; und besteht, bevorzugterweise, aus einem Verbundwerkstoff aus wenigstens zwei (2) und bevorzugterweise drei (3) diskreten Bestandteilen in Flüssigverbindung miteinander. Wie in **Fig. 1** gezeigt umfasst der Teststreifen ein Probensammelkissen (**12**) mit der markierten Substanz (**14**) (z. B. markierter Ligand oder markierte Analyt-Mimik), die innerhalb des Probensammelkissens entweder zusammen mit oder benachbart zu dem Probensammelkissen (**12**) vorangeordnet ist, eine Membran (**22**) mit Substanz (**18**) (z. B. Ligand oder Analyt-Mimik), die auf der Membran vorbeschichtet ist, und ein Absorptionskissen (**20**), das verwendet wird, um das Wandern der Probenlösung zu erzwingen. In den bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung ist die markierte Substanz lyophilisiert (um eine Stabilisierung derselben vor der Verwendung zu erlauben); und wird danach nach Kontakt mit der flüssigen Probe rekonstituiert.

[0052] Im Kontext des Systems und des analytischen Verfahrens dieser Erfindung kann eine „markierte Substanz“ ein jegliches geeignetes elektroaktives Material umfassen, das innerhalb eines abgegrenzten Bereiches der Festphase unter Testbedingungen isoliert werden kann, oder das eine elektroaktive Verbindung innerhalb eines derartigen abge-

grenzten Bereiches abtrennen kann (kollektiv hierin auch als die „elektroaktive Spezies“ bezeichnet) und, danach, eine elektrochemische Umwandlung (z. B. Redox) erfährt, die mit der elektrochemischen quantitativen Analyse verbunden ist. Die beobachtete Messung (Umwandlung) der elektroaktiven Spezies kann direkt oder indirekt mit der Konzentration des interessierenden Analyten in der Testprobe in Beziehung gesetzt werden (z. B. durch Vergleich mit einer Standardkurve).

[0053] Bei den bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung besteht das markierte Testkitreagens typischerweise aus einem Protein oder Liganden, das/der mit einer Metallmarkierung verbunden ist. Nach dessen Kontakt mit der Probe wechselwirkt dieses Metall-markierte Reagens mit dem interessierenden Analyten in der Probe, um einen Komplex auszubilden. Eine markierte Substanz, die bei der Affinitätschromatographischen Isolierung/Konzentrierung des interessierenden Analyten verwendet werden kann, umfasst ein Protein/einen Liganden und eine Metallmarkierung, die bevorzugterweise hergestellt werden gemäß den in US 4,732,974 und in der technischen Literatur beschriebenen Verfahren, Gary, et al, Covalent Attachment of Chelating Groups to Macromolecules Biochem. And Biophys. Res. Comm. Band 77, Nr. 2 (1977) Seiten 581–585. Kurz gesagt kann eine Metallmarkierung mit dem Protein/Liganden konjugiert werden, der für den Analyten spezifisch ist, durch anfängliche Modifikation des Proteins/Liganden, indem kovalent daran eine „exogene Komplexbildnergruppe“ gebunden wird, die eine Affinität für die Metallmarkierung aufweist. Die komplexbildenden Gruppen, die für den interessierenden Metallindikator spezifisch sind, können kovalent direkt an das Bindeprotein/Liganden gebunden werden oder indirekt durch eine Zwischenprodukt oder eine Verbindungsgruppe gekoppelt werden. Diese Kopplungsstelle muss natürlich von der immunchemisch aktiven Stelle entfernt sein, die für den interessierenden Analyten spezifisch ist. Metallmarkierungen, die besonders geeignet sind für die Verwendung bei der Synthese der markierten Substanzen, die als die Testkitreagenzien in den Systemen und Verfahren dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen Mg, Al, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Y, Zr, Mo, Tc, Pd, Cd, In, Sn, Sb, Ba, Hf, W, Re, Hg, Tl, Pb, La, Ce, Rh, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yd, Th, U, Pu und deren Isotope.

[0054] Eine andere der markierten Substanzen, die in der Affinitätschromatographischen Trennung/Konzentrierung des interessierenden Analyten verwendet werden kann, umfasst eine Analyt-Mimik, die an ein Liposom gekoppelt ist. Die Herstellung von Liposom-markierten Immunreagenzien und ihre Verwendung in Affinitätschromatographischen Tests ist gut bekannt und in der technischen Literatur dokumen-

tiert, Roberts, et al, Investigation of Liposome-Based Immunomigration Sensors for the Detection of Polychlorinated Biphenyl Anal. Chem., Band 57, Nr. 5 (Februar 1, 1995) Seiten 482–491.

[0055] Die markierte Substanz und/oder der Komplex aus der markierten Substanz und dem Analyten wird durch die Diffusions-/Kapillarwirkung des Probenauftragungsskissens (12) entlang dem Flüssigkeitspfad des Festphasenaffinitätschromatographiemediums zu einer stromabwärtigen Teststelle (18) getragen, wo sie/er konzentriert und immobilisiert wird. Dies kann in herkömmlicher Art und Weise erreicht werden durch die Verwendung, beispielsweise, eines Begleittestkitreagens in der Form eines immobilisierten Bindeproteins oder anderen Hilfsmittels, das für die Wechselwirkung mit dem Analyten/Metallkomplex spezifisch ist. Während die markierte Substanz und/oder der markierte Komplex entlang dem Flüssigkeitspfad der Testvorrichtung wandert/diffundiert, trifft sie somit auf die immobilisierte Binde-substanz und wird daraufhin gebunden, um sich an der Teststelle anzureichern. Nach einer geeigneten Reaktionszeit hat sich ausreichend Analyt/markierte Substanz in dem abgegrenzten Bereich des Teststreifens angesammelt, um die erforderliche, nachzuweisende und durch elektrochemische Analyse zu quantifizierende Menge bereitzustellen.

[0056] Das elektrochemische Nachweissystem (26) wird hergestellt, indem zwei Elektroden (für ein Zweielektrodensystem) oder drei Elektroden (für ein Dreielektrodensystem) auf einem Matrixmaterial aufgedruckt werden (z. B. Mylar, Kunststoff oder anderes Material, das vergleichsweise elektrisch (nicht-leitend) isoliert). Ein Träger (24) mit doppelseitigem Kleber wird verwendet, um den Affinitätschromatographischen Teststreifen und das elektrochemische Nachweissystem zu kombinieren. In dem Träger ist ein Loch zwischen dem elektrochemischen Nachweissystem und der Testzone (18) in der Membran vorhanden.

[0057] Der Nachweis und die Messung der Menge des Analyten in der Probe wird erreicht mittels einer Ausrüstung, die feine elektrochemische Änderungen messen kann, die mit einer elektroaktiven Spezies verbunden sind, wie z. B. Änderungen des Stroms oder der Spannung, die durch die Umwandlung einer derartigen Spezies von der reduzierten zu einer oxidierten Form bedingt werden. In der Praxis kann dies durch Einführen des Affinitätschromatographieteststreifens dieser Erfindung in eine geeignete Messvorrichtung bewerkstelligt werden und dadurch die Vorrichtung an die Elektroden (26) an der Teststelle (18) elektrisch gekoppelt werden. Die elektrische Kopplung des Überwachungsinstrumentes mit dem Affinitätschromatographieteststreifen kann durch direktes (physikalischer Kontakt) oder indirektes (induktives) Koppeln des Instrumentes mit den Elektroden erfol-

gen, die mit dem abgegrenzten Bereich/Teststreifen der Testvorrichtung verbunden sind. Die Testvorrichtung ist auch elektrisch gleichzeitig mit dem Teststreifen an einer anderen Stelle (28) gekoppelt, um einen Referenzpunkt oder internen Standard zum Vergleich von Ablesungen an der Teststelle bereitzustellen. Danach wird ein elektrisches Potential an der Teststelle angelegt, um die Markierung anzuregen bzw. von einer Form/von einem Zustand in einen anderen umzuwandeln, und eine derartige Umwandlung wird überwacht. Diese Umwandlung manifestiert sich in einer Anzahl von Wegen, abhängig von der Art und/oder Größenordnung der an der Teststelle angelegten elektrischen Kraft und anderen Systemvariablen betreffend die Vor-Konzentrierung und die inhärenten Merkmale der Markierung.

[0058] Eine weitere Konstruktion für diese Testvorrichtung ist in [Fig. 3](#) dargestellt, wobei der Affinitätschromatographische Teststreifen und das elektrochemische Nachweissystem innerhalb eines Gehäuses angeordnet sind, das aus einem Isolator (30), einem Oberteil oder einer Abdeckung (32) und einem Bodenteil oder Bodenplatte (34) besteht; wobei das Bodenteil angepasst ist, um an die Abdeckung gekoppelt zu werden, um den Affinitätschromatographischen Teststreifen und das elektrochemische Nachweissystem abzudichten und darin zu schützen und somit eine verfälschungssichere Umgebung bereitzustellen. Der Isolator (30) weist eine Trichterform auf und ist angepasst, um Testkitreagenzien auf die Teststelle zu leiten und danach durch ein Loch in der Abdeckung des Gehäuses in das Gehäuse eingeführt zu werden, wobei er aus einem definierten Bereich der Membran innerhalb der Nachweiszone (Teststelle) einen definierten Bereich ausstanzt, um einen abgegrenzten Bereich (Volumen) der Membran hinsichtlich des Volumens des Testkitreagens zum Vorkonzentrieren des Indikators zu isolieren.

BEISPIELE

[0059] Die folgenden Beispiele definieren, beschreiben und veranschaulichen eine Anzahl der bevorzugten Ausführungsformen der Testkitreagenzien und elektrochemischen Analyseverfahren dieser Erfindung weiter. Vorrichtungen und Techniken, die bei der Synthesen der in diesen Beispielen beschriebenen/verwendeten Materialien verwendet werden, sind Standard, sofern nicht anders angegeben. Teile und Prozentzahlen, die in diesen Beispielen auftauchen, sind auf das Gewicht bezogen, sofern nicht anders angegeben.

BEISPIEL 1

1. Herstellung von Ionen-markierten Proteinen (z. B. Antikörper und Antigen)

[0060] Diethylentriaminpentaessigsäure und Triet-

hylamin wurden in Wasser unter vorsichtigem Erhitzen gelöst. Die sich ergebende Lösung wurde lyophilisiert, um einen glasigen Rückstand zu ergeben und dann wurde dieser Rückstand in Acetonitril unter vorsichtigem Erhitzen gelöst. Diese Lösung wurde zu Isobutylchlorformat in einem Eisbad unter Rühren für die gesamte Reaktion hinzugegeben. Das sich ergebende Anhydrid Diethylentriaminpentaessigsäure wurde dann mit Protein in einer Schutzlösung mit einem bestimmten molaren Verhältnis bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde dann gegen einen Zitratpuffer dialysiert. Ein Überschuss an Markierungslösung wurde zu der dialysierten Lösung hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Das markierte Protein wurde gegen phosphatgepufferte Lösung dialysiert. Die Proteine (AntiHBsAg-Ab, AntiHCG-Ab, AntiMyoglobin-Ab, Anti-Tropin I-Ab, G-SAG, IgG-Fc, HIV und HCV etc.) wurden gut durch Metallionen (z. B. Wismuth, Blei, Indium, Thallium und Kupfer) unter Verwendung der obigen Verfahren in unserem Labor markiert. Das markierte Protein wurde verwendet, um einen Festphasen- und Affinitätschromatographischen-Teststreifen herzustellen.

2. Herstellung der Affinitätschromatographiefestphasentestvorrichtung

[0061] Zwei leitfähige Abscheidungen oder Bereiche (für ein Zweielektrodensystem) entsprechend der Teststelle (Kohlenstofftintenelektrode) und die Referenzstelle (Ag/AgCl-Tintenelektrode) werden mittels Tintenstrahl auf ein Polyesterblättchen gedruckt. Die Größe eines jeden bedruckten Bereiches beträgt 4 × 4mm und ist etwa 5/1000 Zoll (0,0127 cm) dick.

[0062] Eine Membran mit einem immobilisierten Liganden, der an der Teststelle (Nachweiszone) vorangeordnet ist, wurde auf die Rückseite laminiert, um die Teststelle über dem Kohlenstofftintenelektrodensystem auszurichten. Ein Glasfaserkissen (das die Markierungs/das Ligandenkonjugat enthält) und Überschussflüssigkeitsabsorptionsmedium werden jeweils relativ zu einem jeden Ende des Laminates angeordnet, um den zusammengebauten Teststreifen auszubilden. Die gemäß diesem Beispiel hergestellte Testvorrichtung ist in den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) & [Fig. 3](#) dargestellt.

3. Messen des Analyten

[0063] Im Verlauf der Durchführung eines Tests auf HCG, HBsAg, Myoglobin oder mehrere Analyten unter Verwendung des/der vorstehenden Metallionen-markierten Liganden und der Affinitätschromatographiefestphasentestvorrichtung wird zuerst eine flüssige Probe auf den Probenauftragungsbereich aufgetragen, gefolgt von der Wanderung der flüssigen Probe durch Kapillarkwirkung ent-

lang dem Affinitätschromatographischen Streifen zu dem anderen Ende des Affinitätschromatographischen Streifens. Während die Flüssigkeit innerhalb des Probenauftragungskissen wandert und den/die markierten Liganden, der/die darin enthalten ist, rekonstituiert, reagiert/reagieren der Analyt/die Analyten in der Probe mit dem/den markierten Liganden unter Ausbildung eines oder mehrerer Komplexe, der/die zu dem Affinitätschromatographischen Testmedium überführt und darin hineingezogen wird/werden. Wenn der Komplex den Nachweisbereich (Teststelle) erreicht, reagieren die Analyten in dem Komplex mit dem/den immobilisierten Liganden in dem Nachweisbereich unter Ausbildung eines oder mehrerer markierten Liganden-Analyten-Liganden-Komplex(es), während die nicht-gebundenen Bestandteile und Flüssigkeitsfraktionen weiter in das Absorptionsmedium am gegenüberliegenden Ende der Vorrichtung gezogen werden und dorthin fließen. Die Ausbildung des Komplexes in dem Nachweisbereich wird dann aufgezeichnet und die markierenden Metallionen durch Rechteckwellenvoltametrie (SWSV) quantifiziert. Wie oben beschrieben umfasst dieses Voltametrieverfahren das Vorkonzentrieren oder (Bildung adsorptiver Akkumulation eines oberflächenaktiven Komplexes) und Bestimmung des Metallions.

[0064] Die vorerwähnte Analyse ist besonders vorteilhaft, wo die Testprobe eine trübe Lösung ist, die traditionellere optische Messtechniken stört, wie beispielsweise Blut oder Harnstoffprobenlösung. [Fig. 7](#) veranschaulicht graphisch eine elektrochemische Analyse einer Standard-Myoglobinantikörperlösung bei unterschiedlichen Konzentrationen gemäß dem System, dem Verfahren und der Testvorrichtung ([Fig. 3](#)) dieser Erfindung. Die niedrigen Nachweisgrenzen und Empfindlichkeit des Tests beruht, teilweise, auf dem hohen molaren Markierungsverhältnis von Bleiionen zu dem Anti-Myoglobinantikörper und der Dauer des Vorkonzentrierungsintervall des Bleis auf der Arbeitselektrode. [Fig. 8](#) zeigt wiederholte Messungen von 2,5 ng/ml HBsAg in Serumprobe gemäß dem System, dem Verfahren und der Testvorrichtung ([Fig. 3](#)) der Erfindung. Eine wiederholbare Antwort wird über sechs wiederholte Messungen beobachtet. Der gleichzeitige Nachweis für mehrere interessierende Analyten ist mit dem System, dem Verfahren und der Testvorrichtung ([Fig. 3](#)) dieser Erfindung auch möglich. [Fig. 9](#) ist die Antwort von HBsAg in einer Serumprobe unter Verwendung eines mit Blei-, Kupfer- und Wismuth-Ionen markierten HBsAg-Antikörpers, wobei ein anderes Ion in der Antwortkurve gesehen werden kann, die zeigt, dass die Komplexe (anti-HBsAg Antikörper-HBsAg Antigen-anti-HBsAg Antikörper-anti-HBsAg Antikörper, markiert mit verschiedenen Metallionenkomplexen) gebildet und in der Testzone nachgewiesen wurden. [Fig. 10](#) ist ein gleichzeitiger Nachweis für HCG (links) und HBsAg (rechts) in einer Serumprobe unter Verwendung des Systems, des Verfahrens und der Test-

vorrichtung ([Fig. 3](#)) dieser Erfindung; die Spitze in der Mitte ist ein Kontrolltest, der zeigt, dass die Vorrichtung funktioniert.

BEISPIEL 2

Nukleinsäuren (Oligonukleotide, DNA und RNA)-Messfühler

1. Herstellung von Ionen-markiertem Oligonukleotid

[0065] Diethylentriaminpentaessigsäure und Triethylamin wurden in Wasser unter vorsichtigem Erhitzen gelöst. Die sich ergebende Lösung wurde lyophilisiert, um einen glasigen Rückstand zu ergeben und dann wurde dieser Rückstand in Acetonitril unter vorsichtigem Erhitzen gelöst. Diese Lösung wurde zu Isobutylchlorformat in einem Eisbad unter Rühren während der gesamten Reaktion hinzugegeben. Das sich ergebende Anhydrid Diethylentriaminpentaessigsäure wurde dann mit Oligonukleotiden in einem bestimmten molaren Verhältnis bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde dann gegen einen Trispuffer dialysiert. Ein Überschuss an Markierungslösung wurde zu der dialysierten Lösung hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Das markierte Oligonukleotid wurde wieder gegen Tris-Pufferlösung dialysiert. Das markierte Oligonukleotid wurde verwendet, um einen Testphasen- und Affinitätstestmessfühler herzustellen.

2. Herstellung von Affinitätschromatographiefestphasentestvorrichtung

[0066] Zwei leitfähige Abscheidungen oder Bereiche (für ein Zweielektrodensystem) entsprechend der Teststelle (Kohlenstofftintenelektrode) und der Referenzstelle (Ag/AgCl-Tintenelektrode) werden mittels Tintenstrahl auf ein Polyesterplättchen gedruckt. Die Größe einer jeden bedruckten Fläche beträgt ~ 4 × 4 mm und ist etwa 5/1000 Zoll (0,0127 cm) dick.

[0067] Eine Membran mit einem an der Teststelle (Nachweiszone) vorangeordneten immobilisierten Liganden, wurde auf die Rückseite laminiert, um die Teststelle über dem Kohlenstofftintenelektrodensystem auszurichten. Ein Glasfaserkissen, (das das Konjugat aus Markierung und Oligonukleotid enthält) und Überschussflüssigkeitsabsorptionsmedium werden jeweils relativ zu einem jeden Ende des Laminats angeordnet, um den zusammengebauten Teststreifen auszubilden. Die gemäß diesem Beispiel hergestellte Testvorrichtung ist in den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) & [Fig. 3](#) dargestellt.

3. Messen von menschlichem NPOR

[0068] Im Verlauf der Durchführung eines Test auf menschlichen NPOR unter Verwendung des vorste-

henden Metallionen-markierten Oligonukleotids und der Affinitätschromatographiefestphasentestvorrichtung wird zuerst eine Flüssigkeitsprobe, die das interessierende Oligonukleotid enthält, auf den Probenaufragungsbereich aufgetragen, gefolgt von der Wanderung der flüssigen Probe durch Kapillarwirkung entlang dem affinitätschromatographischen Streifen zu dem anderen Ende des affinitätschromatographischen Streifens. Während die Flüssigkeit innerhalb des Probenaufragungskissens wandert, wird das in dem Kontaktkissen eingebettete markierte Oligonukleotid ausgetragen und wechselwirkt in kompetitiver Weise mit dem Oligonukleotid, das an der Testzone beschichtet und komplementär zu dem interessierenden Oligonukleotid ist, in der Probenlösung, wodurch ein Komplex aus markiertem Oligonukleotid-Komplementoligonukleotid und ein Komplex aus Oligonukleotid-Komplementoligonukleotid ausgebildet wird, während die ungebundenen Bestandteile und die Flüssigkeitsfraktion weiterhin in das Absorptionsmedium an dem gegenüberliegenden Ende der Vorrichtung gezogen werden und dort hineinfließen. Die Ausbildung der Komplexe in der Nachweisregion wird dann registriert und die markierenden Metallionen durch die Rechteckwellenvoltammetrie (SWSV) quantifiziert. Wie oben beschrieben umfasst dieses Voltametrierfahren die Vor-Konzentrierung (oder Ausbildung von adsorptiver Akkumulation eines oberflächenaktiven Komplexes) und Bestimmung der Metallionen. [Fig. 11](#) zeigt den kompetitiven Nachweis von menschlichem NPOR (25 mer Oligonukleotid) unter Verwendung des Systems, des Verfahrens und der Testvorrichtung ([Fig. 3](#)) dieser Erfindung. A (oben) ist das Signal einer leeren Lösung (ohne menschlichen NPOR) und B (unten) ist das Signal einer Lösung, die menschlichen NPOR enthält. Dieses Ergebnis liefert ein Verfahren zum Nachweisen und Sequenzieren von DNA.

Patentansprüche

1. Affinitätschromatographischer Teststreifen (10) zur quantitativen Mengenbestimmung mindestens eines Analyten, der Folgendes umfasst:

- a) ein affinitätschromatisches Medium mit einem darin definierten Flüssigkeitspfad, das einen abgegrenzten Bereich (18) umfasst, wobei der abgegrenzte Bereich (18) eine immobilisierte Bindesubstanz umfasst, wobei die immobilisierte Bindesubstanz für die Bindung/Immobilisierung einer markierten Substanz (14) und/oder eines Komplexes einer markierten Substanz (14) und des Analyten spezifisch ist, wobei die markierte Substanz (14) eine Markierung umfasst, die unter elektrochemisch analytischen Bedingungen elektroaktiv ist;
- b) ein Mittel (26) zum Herstellen von elektrischen Kontakt zwischen einer externen Quelle elektrischer Energie und dem abgegrenzten Bereich (18), das die immobilisierte Bindesubstanz umfasst; und
- c) ein Mittel (26) zum Herstellen von elektrischem Re-

ferenzkontakt zwischen der externen Quelle elektrischer Energie und einem vom abgegrenzten Bereich (18) verschiedenen Bereich des affinitätschromatischen Mediums.

2. Affinitätschromatischer Teststreifen nach Anspruch 1 zur quantitativen Mengenbestimmung von mehr als einem Analyten, wobei der abgegrenzte Bereich (18) eine oder mehrere immobilisierte Bindesubstanzen umfasst, wobei die eine oder mehreren immobilisierten Bindesubstanzen für die Bindung/Immobilisierung einer oder mehrerer markierter Substanzen (14) und/oder eines oder mehrerer Komplexe einer oder mehrerer markierter Substanzen (14) und eines oder mehrerer Analyten spezifisch sind, und wobei jede markierte Substanz (14) eine andere elektroaktive Markierung umfasst und für die Interaktion/den Wettbewerb mit nur einem Analyten von Interesse spezifisch ist.

3. Affinitätschromatischer Teststreifen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das affinitätschromatische Medium einen zweiten abgegrenzten Bereich (18) umfasst, der eine immobilisierte Bindesubstanz umfasst, und wobei der Teststreifen (10) (i) ein zweites Mittel (26) zum Herstellen von elektrischem Kontakt zwischen einer externen Quelle elektrischer Energie und dem zweiten abgegrenzten Bereich (18) und (ii) ein zweites Mittel (26) zum Herstellen von elektrischem Referenzkontakt zwischen der externen Quelle elektrischer Energie und einem vom zweiten abgegrenzten Bereich (18) verschiedenen Bereich des affinitätschromatischen Mediums umfasst.

4. Affinitätschromatischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die markierte Substanz (14) in einem Probenauffangmedium (12) im Teststreifen prädisponiert ist.

5. Affinitätschromatischer Teststreifen nach Anspruch 4, wobei die prädisponierte markierte Substanz (14) in lyophilisierter Form ist.

6. Affinitätschromatischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mittel (26) zum Herstellen von elektrischem Kontakt eine Arbeitselektrode umfasst und das Mittel (26) zum Herstellen von elektrischem Referenzkontakt eine Referenzelektrode umfasst.

7. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach Anspruch 6, der weiter eine Gegenelektrode (26) umfasst.

8. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Markierung von der markierten Substanz (14) trennbar ist.

9. Affinitätschromatographischer Teststreifen

nach Anspruch 8, wenn abhängig von Anspruch 6 oder 7, wobei der Teststreifen so konfiguriert ist, dass die Markierung als Ablagerung auf der Arbeitselektrode (26) vorkonzentriert werden kann.

10. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Markierung ein Metall ist.

11. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Markierung aus der aus Mg, Al, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Y, Zr, Mo, Tc, Pd, Cd, In, Sn, Sb, Ba, Hf, W, Re, Hg, Tl, Pb, La, Ce, Rh, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd Tb, Dy, Ho, Er, Yd, Th, U, Pu und deren Isotopen bestehenden Gruppe ausgewählt wird.

12. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die markierte Substanz (14) eine Analyt-Mimik umfasst und die immobilisierte Binde substanz für die Bindung/Immobilisierung der markierten Substanz (14) spezifisch ist.

13. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die markierte Substanz (14) einen Ligand umfasst und die immobilisierte Binde substanz für die Bindung/Immobilisierung eines Komplexes der markierten Substanz (14) und des Analyten spezifisch ist.

14. Affinitätschromatographischer Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die markierte Substanz (14) ein die Markierung kapselndes Liposom umfasst.

15. Kit zur quantitativen Mengenbestimmung mindestens eines Analyten, der Folgendes umfasst:
a) den affinitätschromatographischen Teststreifen nach einem der vorangehenden Ansprüche; und
b) ein Trennmittel zum Trennen der Markierung von der aufgenommenen/immobilisierten markierten Substanz (14).

16. Kit zur quantitativen Mengenbestimmung mindestens eines Analyten, der Folgendes umfasst:
a) den affinitätschromatographischen Teststreifen nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 6 bis 14 wenn abhängig von Anspruch 1, 2 oder 3; und
b) ein die markierte Substanz (14) umfassendes Reagenz.

17. Verfahren zur quantitativen Mengenbestimmung mindestens eines Analyten, das Folgendes umfasst:
a) Bereitstellen des affinitätschromatographischen Teststreifens (10) nach einem der Ansprüche 1 bis 14;
b) Herstellen von elektrischem Kontakt zwischen einer externen Quelle elektrischer Energie und dem

abgegrenzten Bereich (18), wobei der abgegrenzte Bereich (18) die immobilisierte Binde substanz umfasst und Herstellen von elektrischem Referenzkontakt zwischen der externen Quelle elektrischer Energie und einem vom abgegrenzten Bereich (18) verschiedenen Bereich des affinitätschromatographischen Mediums;

c) Aufbringen einer den Analyten umfassenden Probe auf den Teststreifen (10) und optionales Aufbringen eines die markierte Substanz (14) umfassenden Reagenz;

d) Zulassen, dass die markierte Substanz (14) und/oder ein Komplex der markierten Substanz (14) und der Analyt von der immobilisierten Binde substanz gebunden/immobilisiert werden und sich dadurch im abgegrenzten Bereich (18) ansammeln; und
e) Durchführen einer elektrochemischen Analyse, um die Konzentration der markierten Substanz (14) im abgegrenzten Bereich zu bestimmen und Korrelieren derselben mit der Konzentration des Analyten.

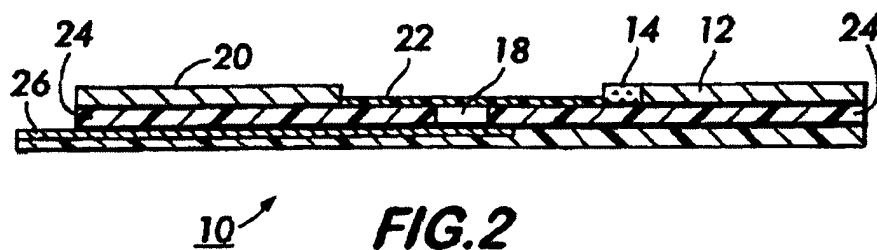
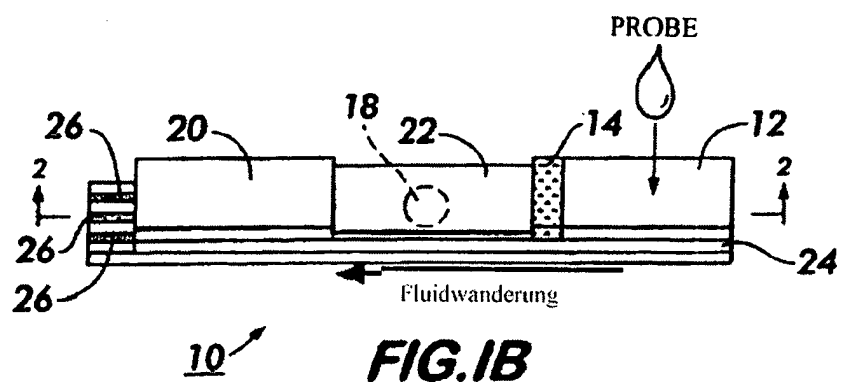
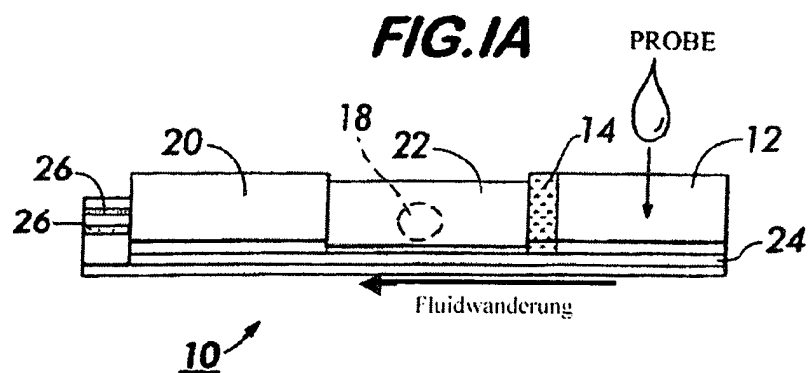
18. Verfahren nach Anspruch 17, das das Bereitstellen des affinitätschromatographischen Teststreifens nach einem der Ansprüche 9 oder 10 bis 14, wenn abhängig von Anspruch 9, das Trennen der Markierung von der markierten Substanz (14) und das Vorkonzentrieren der Markierung als Ablagerung auf der Arbeitselektrode (26) umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 18, das das Ablösen der Ablagerung von der Arbeitselektrode (26) unter anodischen Ablösebedingungen durch Oxidieren der Ablagerung auf der Oberfläche der Arbeitselektrode umfasst.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die elektrochemische Analyse potentiostatisch ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die elektrochemische Analyse potentiometrisch ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen



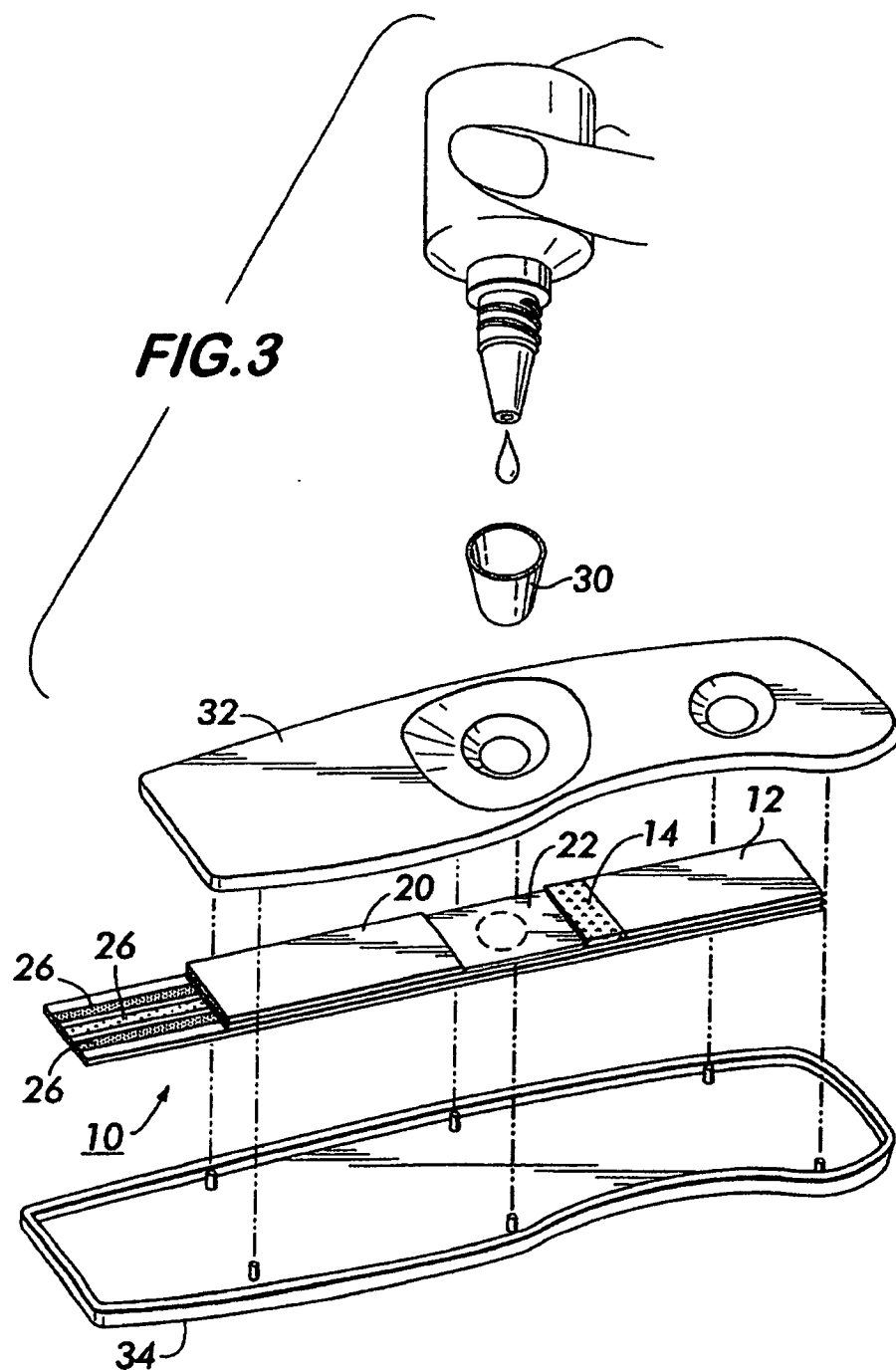


FIG.4

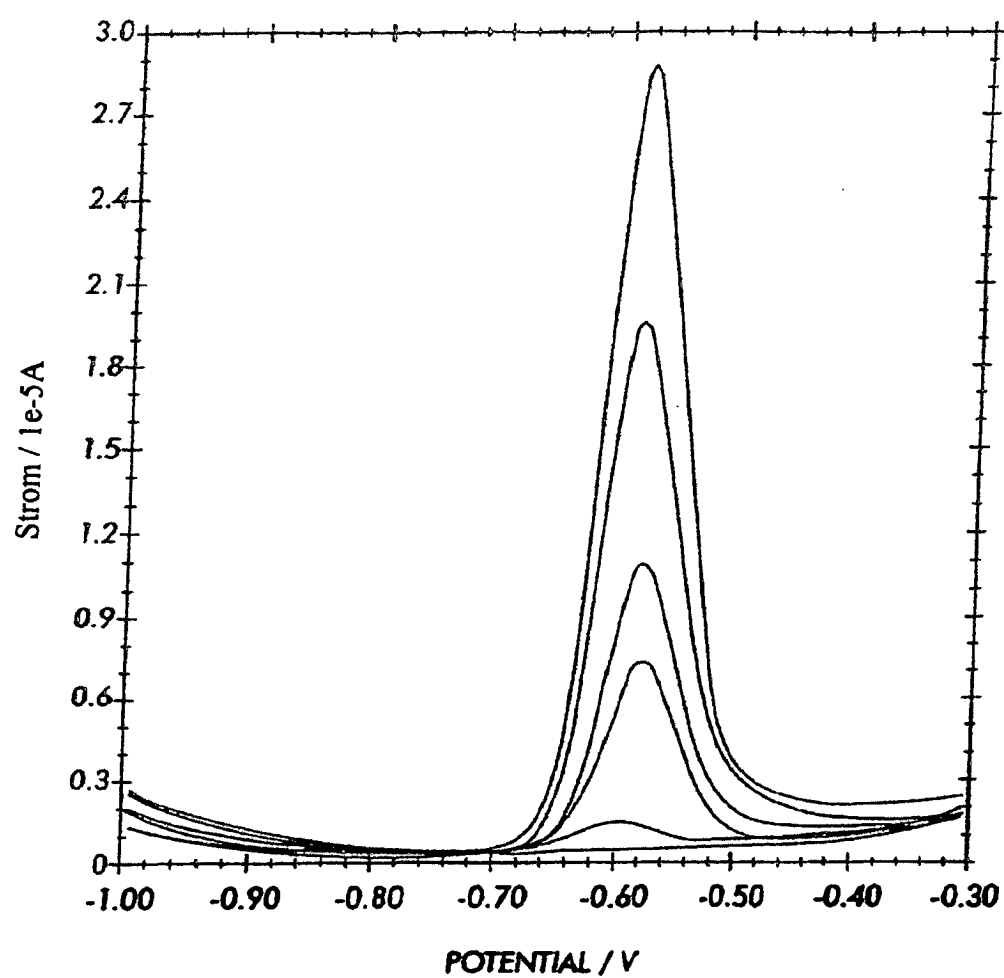


FIG.5

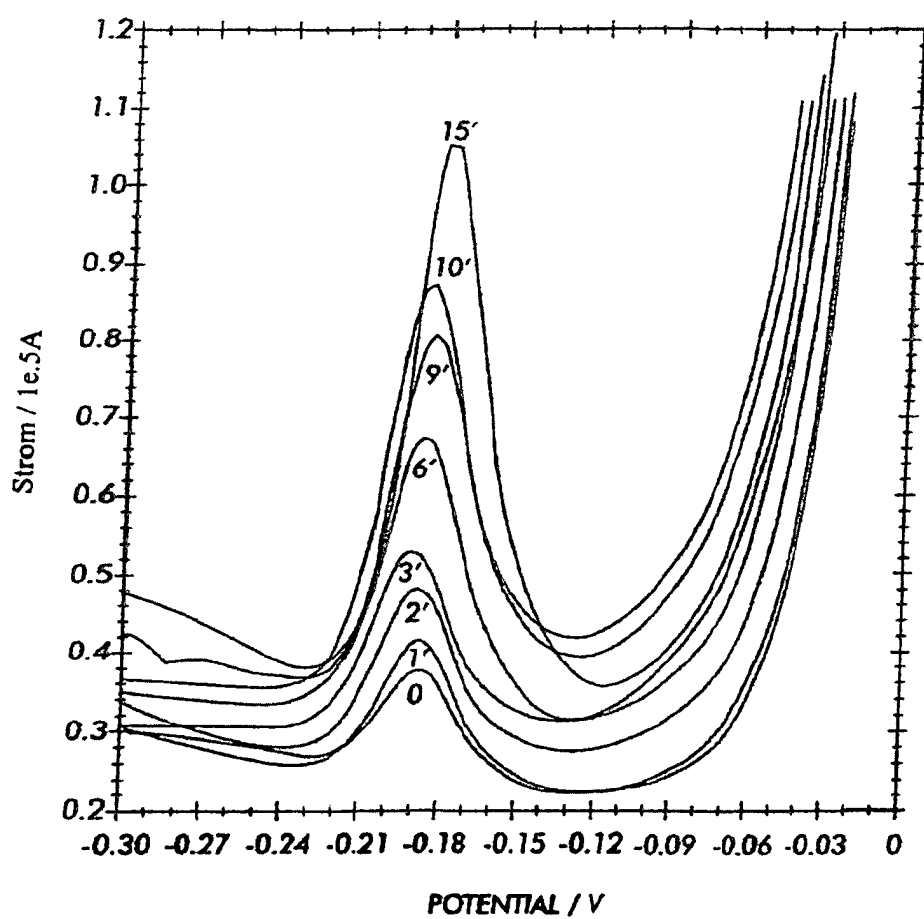


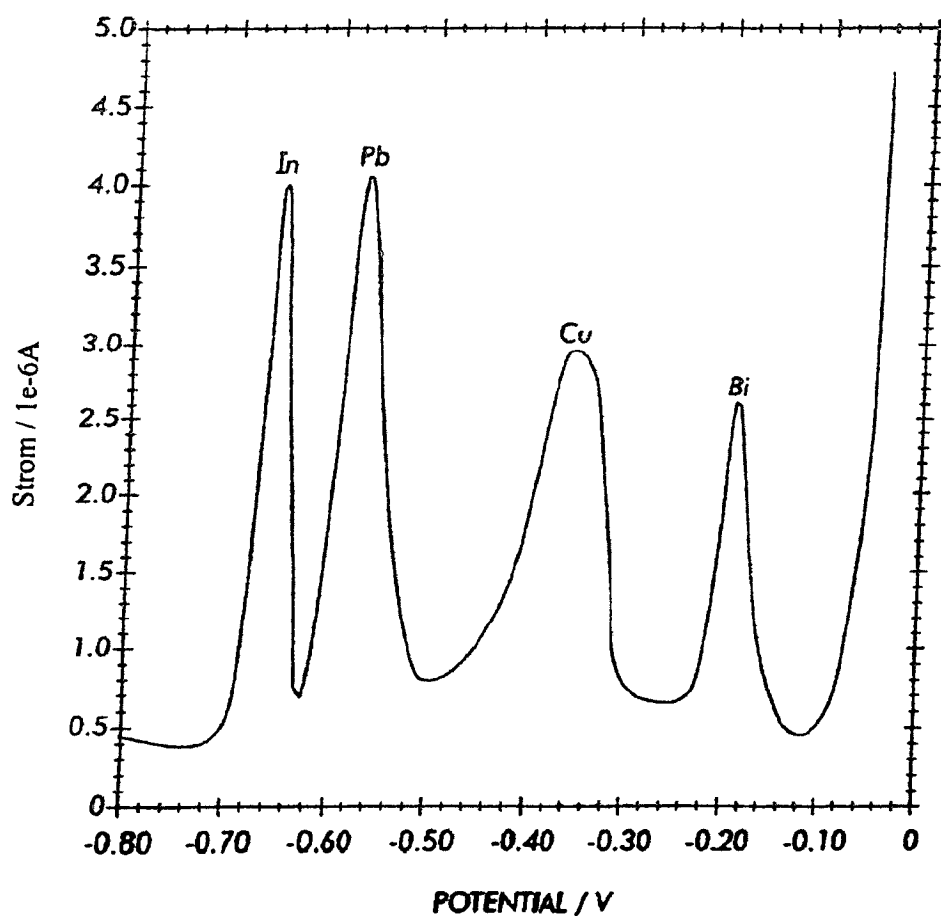
FIG.6

FIG. 7

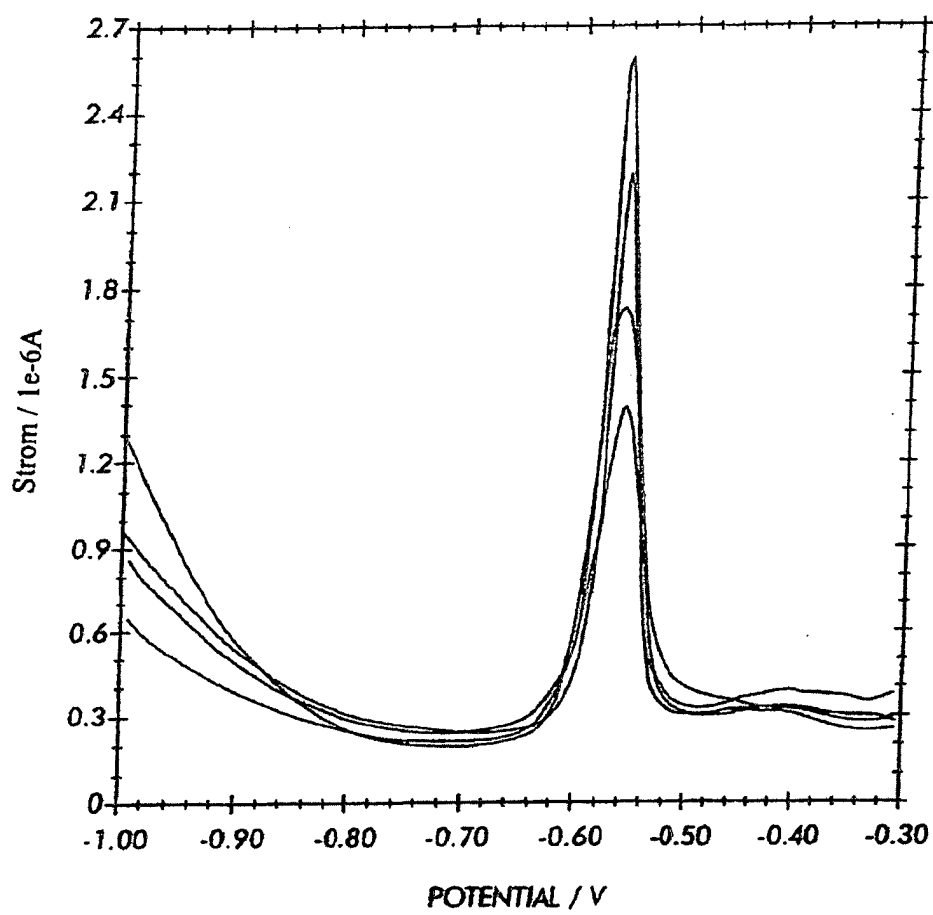


FIG.8

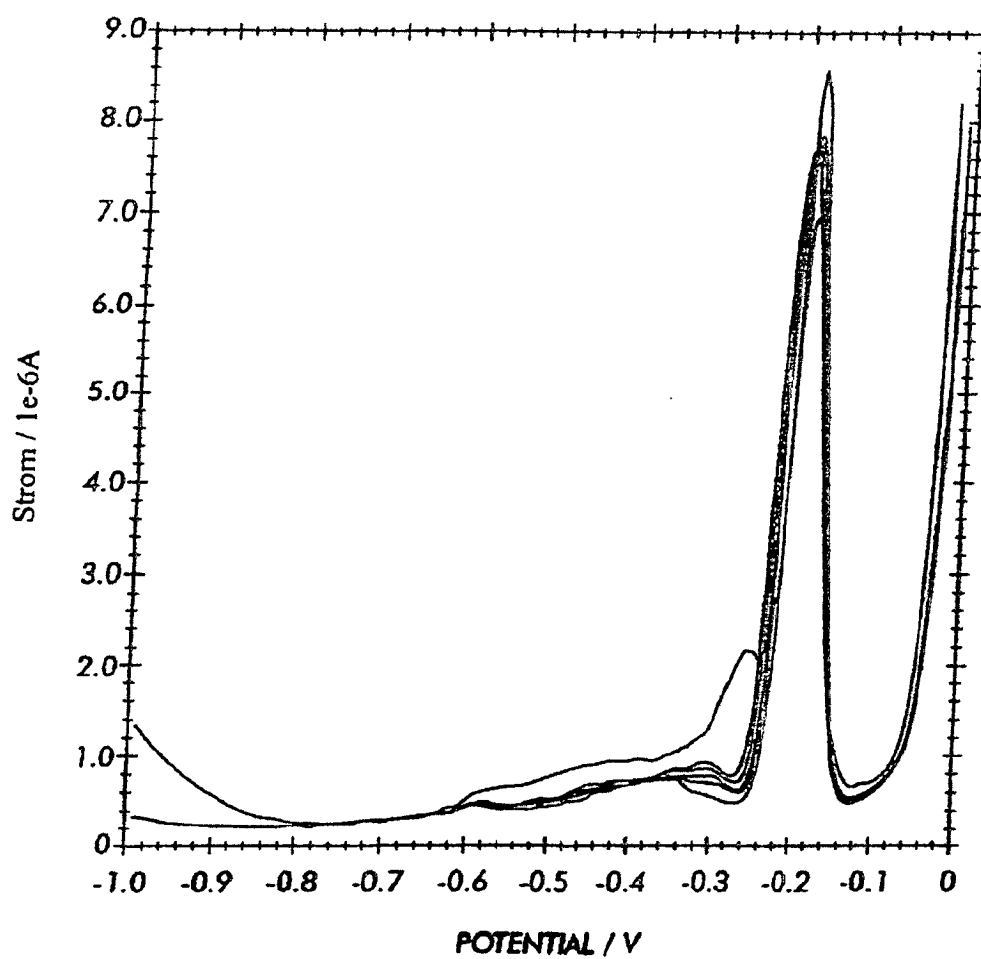


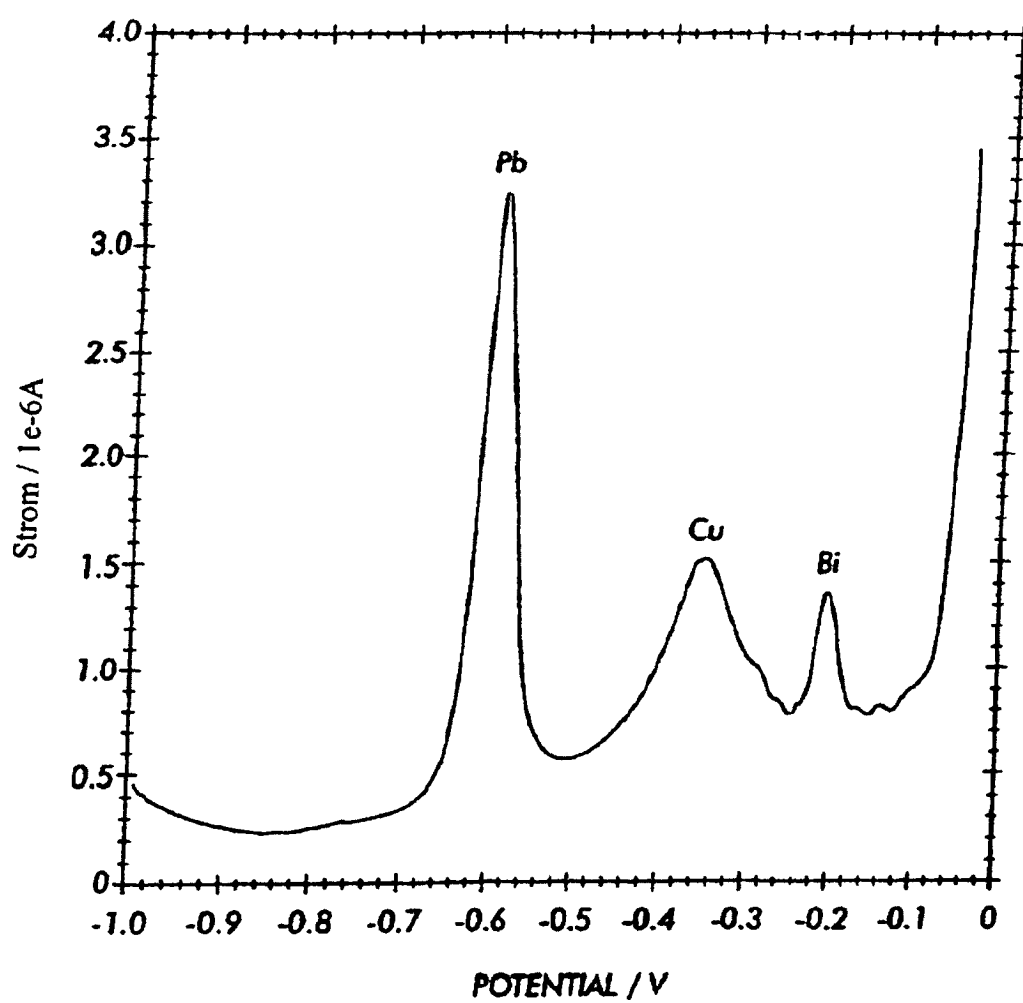
FIG.9

FIG.10

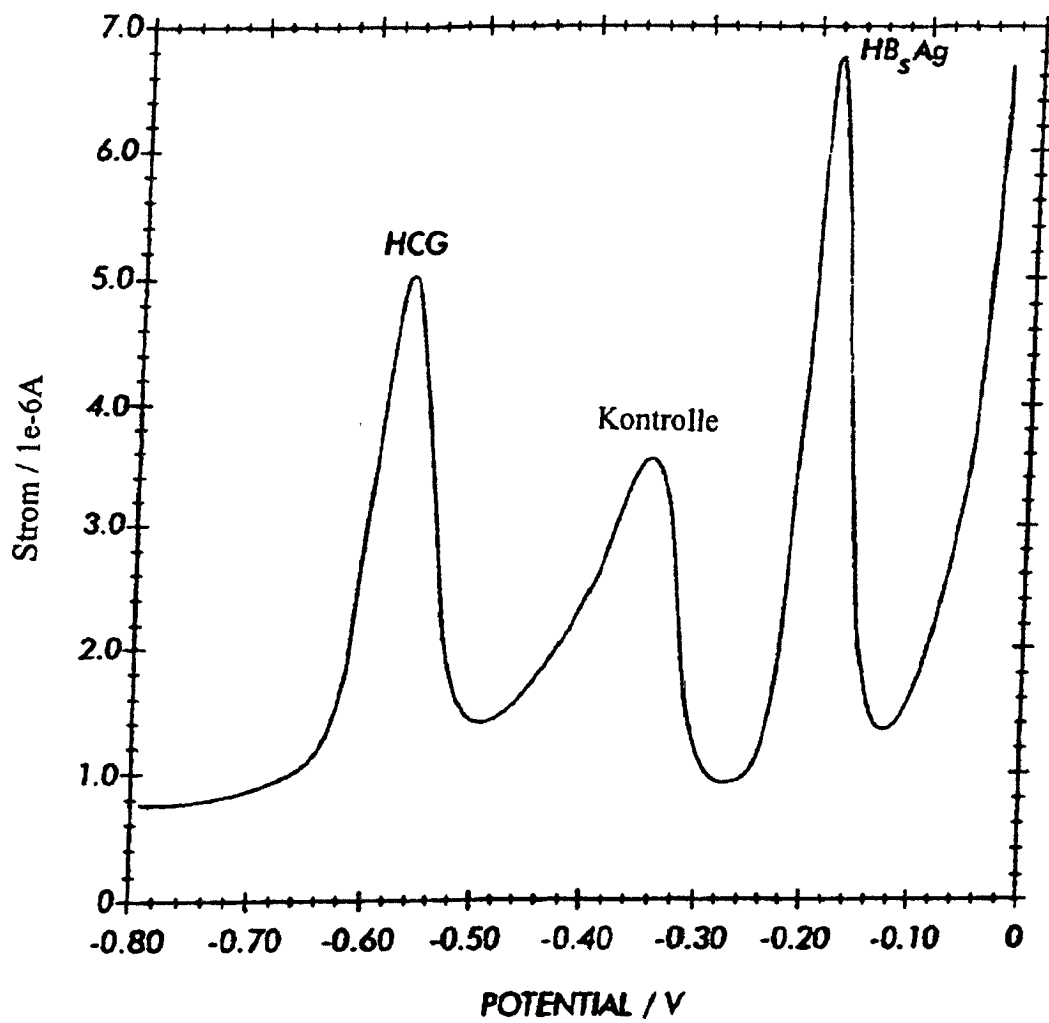


FIG. II

