

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Dezember 2011 (01.12.2011)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/147563 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/002586

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Mai 2011 (25.05.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10005425.3 25. Mai 2010 (25.05.2010) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ETTLINGER, Julia** [DE/DE]; Geschwister-Scholl-Strasse 78, 14471 Potsdam

(DE). **GAJOVIC-EICHELMANN, Nenad** [DE/DE]; Am Kinderdorf 39A, 14089 Berlin (DE). **BURKHARD, Michael** [DE/DE]; Pinnow 29, 17268 Gerswalde (DE). **SCHARTE, Gudrun** [DE/DE]; Kissingerplatz 4, 13189 Berlin (DE). **SCHENK, Jörg** [DE/DE]; Krügerstrasse 18a, 10439 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **KATZAMEYER, Michael**; V. Bezold & Partner, Akademiestraße 7, 80799 München (DE).

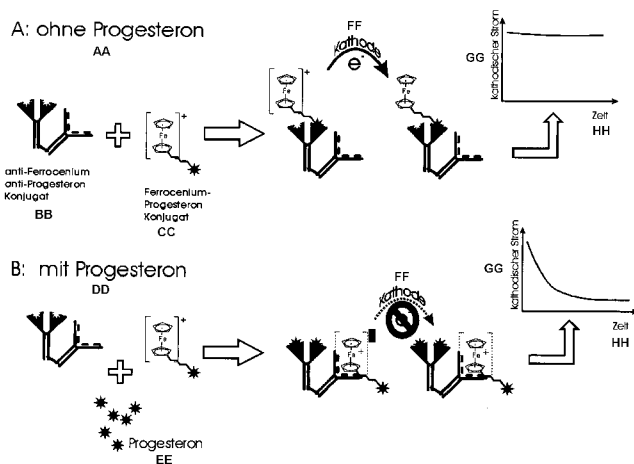
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ELECTROCHEMICALLY DETECTING BINDING REACTIONS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR ELEKTROCHEMISCHEN DETEKTION VON BINDUNGSREAKTIONEN



AA A : sans progesterone
BB Conjugué anti-ferrocénium/anti-progesterone
CC Conjugué ferrocénium/progesterone
DD B : avec progesterone
EE Progesterone
FF Cathode
GG Courant cathodique
HH Temps

(57) Abstract: The invention relates to a method for carrying out homogenous immunoassay formats with highly sensitive electrochemical detection in solution, characterized in that two different conjugates are combined as reagents with the sample or a sample/buffer mixture, wherein one conjugate comprises a redox marker and an analyte molecule and the second conjugate comprises an anti-redox marker antibody or a specifically binding fragment thereof and a molecule that specifically binds the analyte. The method is suitable for wash- and separation-free immunoassays in diagnostics, in particular for automated and microfluidic immunoassays. The method is also suitable for inexpensive immunoassay systems and test strips that are disposable.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von homogenen Immunoassay-Formaten mit hochempfindlicher elektro-chemischer Detektion in Lösung, dadurch gekennzeichnet, dass zwei verschiedene Konjugate als Reagenzien mit der Probe oder einem Proben-Puffer-Gemisch kombiniert werden, wobei das eine Konjugat einen Redoxmarker und ein Analytmolekül umfasst und das zweite Konjugat einen Anti-Redoxmarker-Antikörper

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

**Verfahren zur elektrochemischen Detektion von
Bindungsreaktionen**

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur direkten, hoch empfindlichen elektrochemischen Detektion von Antikörper-Antigen Bindungsreaktionen und anderen biochemischen Interaktionen in Lösung. Das Verfahren eignet sich für wasch- und separierungsfreie Immunoassays in der Diagnostik, insbesondere für automatisierte und mikrofluidische Immunoassays. Das Verfahren eignet sich auch für preiswerte Immunoassaysysteme und Teststreifen für den Einmalgebrauch.

15

20

25

30

Immunoassays nutzen die Antigen-Antikörper-Reaktion zur spezifischen Detektion geringster Konzentrationen eines Analyten in komplexen Medien wie Blut, Serum, Urin oder Lebensmitteln. In der klinischen Diagnostik, Umwelt- und Lebensmittelanalytik sind Immunoassays seit Jahrzehnten unverzichtbare Werkzeuge für die Detektion niedrigster Konzentrationen von Hormonen, Metaboliten, Proteinen, Biomarkern, Toxinen, Pestiziden, pathogenen Bakterien und Viren. Viele der wichtigsten klinisch-diagnostischen Analyten sind nur mit Immunoassays preiswert und schnell messbar, da es keine alternativen analytisch-chemischen Verfahren gibt, die eine gleichwertige Kombination aus hoher Sensitivität (Nachweis von nanomolaren oder niedrigeren Konzentrationen) und hoher Spezifität (Nachweis des Analyten in Gegenwart von chemisch ähnlich aufgebauten Störsubstanzen) bieten. Alternative Verfahren wie die Chromatografie (z.B. HPLC, Gaschromatografie) bedürfen einer oft mehrstufigen Probenvorbereitung, z.B. durch Extraktion und chemische Derivatisierung.

Seit der Erfindung des Immunoassays vor 50 Jahren durch Rosalyn Yalow und Salomon Berson wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Ausführungsformen entwickelt, die als verschiedene Immunoassayformate bezeichnet werden. Die
5 grundlegende Unterscheidung von heterogenen Formaten, wie dem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) und homogenen Formaten erfolgt anhand des Aggregatzustandes der zur Detektion genutzten Antikörper: Bei den heterogenen Assays wird der Antikörper (seltener das Antigen) an einer
10 Oberfläche immobilisiert (Reaktionsröhrchen, Mikrotiterplatte, Teststreifen), sämtliche Reaktionsschritte wie Wasch- und Separationsschritte sowie die Detektion erfolgen ebenfalls an der Oberfläche. Bei den homogenen Formaten wird keiner der Bindungspartner immobilisiert, es sind keine
15 Wasch- und Separationsschritte nötig, die Detektion erfolgt ebenfalls in Lösung.

Eine andere Unterscheidungsmöglichkeit ergibt sich anhand der verwendeten Detektionsmethode. Da die Antikörper-Antigen-
20 Bindungsreaktion nicht direkt sichtbar gemacht werden kann, muss einer der Bindungspartner chemisch mit einem molekularen Marker oder „Label“ gekoppelt werden (Ausnahme: Massensensitive Biosensoren auf der Basis von Oberflächenplasmonresonanz, Gitterkoppler, Quarz-Crystal Microbalance,
25 Surface acoustic waves und ähnlichen Techniken messen direkt die molekulare Bindungsreaktion in Echtzeit, wenn einer der Bindungspartner auf der sensitiven Oberfläche immobilisiert ist. Diese Verfahren werden jedoch bisher nur in Forschungsanwendungen, nicht in der Routineanalytik
30 eingesetzt). Ein geeignetes Label muss eine hohe „spezifische Aktivität“ haben, d.h. es muss pro Labelmolekül möglichst viele Signalereignisse produzieren. Zu den am häufigsten genutzten Labels gehören radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, „RIA“), Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorescein,

Rhodamine usw.), fluoreszente Halbleiternanopartikel („Quantum dots“), Polymernanopartikel („Latex beads“, Agglomerationsimmunoassay) und Enzyme wie Peroxidase, zusammen mit einem kolorimetrischen, fluorogenen oder chemolumineszenten Enzymsubstrat (ELISA). Die höchste spezifische Aktivität, die sogar den Nachweis eines einzelnen Labelmoleküls ermöglicht, besitzen radioaktive Isotope. Aufgrund der Gesundheitsgefährdung, die von Radioaktivität ausgeht, der damit verbundenen hohen Anforderungen an das Labor („Isotopenlabors“) und den hohen Kosten für die Entsorgung der Rückstände, werden Radioaktivimmunoassays zunehmend von alternativen Verfahren wie dem ELISA ersetzt.

Eine weitere Unterscheidung zwischen verschiedenen Immunoassays ergibt sich anhand der Art der verwendeten Antikörper. Antikörper sind komplex aufgebaute Proteine mit konstanten Bereichen, die die Struktur determinieren und bei allen Antikörpernklassen ähnlich zusammengesetzt sind, und hoch variablen Bereichen, die die Antigen-Bindungsstellen bilden. Die ursprünglich benutzten polyklonalen Seren, die eine Vielzahl von Antikörpern mit variabler Spezifität und Affinität enthalten, werden in vielen Anwendungen von monoklonalen Antikörpern ersetzt, die nur genau eine Antikörper-Entität („Klon“) enthalten, mit wohl definierter Spezifität und Affinität. Monoklonale Antikörper können theoretisch in beliebigen Mengen mit identischen Eigenschaften hergestellt werden. Daneben wurden für manche Analysen auch sog. Antikörper-Fragmente verwendet, die durch enzymatischen Verdau aus ganzen Antikörpern hergestellt werden können. Single-Chain-Antikörper sind rekombinante Antikörper-Fragmente, die durch Methoden des Genetic Engineering hergestellt werden können. Prinzipiell können alle Arten von Antikörpern und daraus abgeleiteten molekularen Bindern in den bekannten Immunoassayformaten

genutzt werden.

Zu den bekanntesten klinischen Analyten, die mit Immunoassays nachgewiesen werden, gehören hCG (Schwangerschaftstest),
5 Thyroid-Hormone wie TSH (Schilddrüsenerkrankungen), Steroidhormone (Endokrinologie, Fruchtbarkeit) und PSA (Biomarker für Prostatakarzinom).

Man kann zusammenfassend sagen, dass Immunoassays auf der
10 Basis von monoklonalen Antikörpern oder polyklonalen Antisera zu den wichtigsten analytisch-chemischen Verfahren der Biotechnologie, klinischen Diagnostik, Umwelt- und Lebensmittelanalytik zählen und einen hohen kommerziellen Wert besitzen.

15 Im Stand der Technik sind eine Vielzahl von Methoden beschrieben, um einen Immunoassay durchzuführen. Die meisten heterogenen Immunoassays erfordern mehrere manuelle Arbeitsschritte wie z.B. Pipettiervorgänge, Probenverdünnung,
20 Waschvorgänge, die einem genauen zeitlichen Protokoll folgen müssen. Daher ist in der Regel geschultes Personal und ein dafür speziell ausgerüstetes Labor nötig, um solche Assays korrekt durchzuführen. Die erforderlichen Detektionsgeräte („ELISA-Reader“, Mikrotiterplattenreader, Immunoassay-
25 analysator) sind teuer und nicht portabel. So werden z.B. in den Patentschriften [US4016043A, US3839153A] Protokolle zur Durchführung eines ELISA-Tests beschrieben. Der Fachmann erkennt leicht, dass derart komplexe Analysenabläufe nur von geschultem Personal und nur in einer geeigneten Laborumgebung
30 durchgeführt werden können. Die Automatisierung solcher Abläufe ist sehr aufwendig und erfordert hoch komplexe Automaten.

Für den Vor-Ort-Einsatz hat sich das heterogene Lateral-Flow

Immunoassayformat durchgesetzt („Teststreifen“-Immunoassay).
US6156271A beschreibt eine moderne Variante dieses
Assayformats. Dieser Test läuft nach Zugabe der Probenlösung
von alleine ab, und die Detektion erfolgt rein visuell
5 (Ablesen des Vorhandenseins von einer oder zwei farbigen
Banden auf dem Teststreifen durch den Nutzer). Es ist
offensichtlich, dass ein solches Ausleseverfahren keine
quantitativen Ergebnisse (d.h. genaue Konzentrations-
messungen) ergeben kann, sondern dass nur eine Ja/Nein-
10 Aussage oder eine semi-quantitative Aussage (Konzentration
liegt unter/über einem bestimmten Schwellenwert) möglich
sind.

Dem Fachmann ist bekannt, dass homogene Immunoassays dagegen
15 besonders geeignet sind, um schnelle, quantitative und voll
automatisierte Immunoassays zu realisieren. Bei homogenen
Immunoassays erfolgt die Signalgenerierung zeitgleich mit der
Bindungsreaktion. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen
heterogenen Immunoassays bestehen homogene Immunoassays
20 zumeist nur aus einer oder wenigen Dosieroperationen, einer
Inkubationszeit und dem Detektionsschritt. Im idealen Fall
ist nur die Mischung der Probe und eines fertigen
Reagenziengemisches nötig, bevor ein Endwert gemessen werden
kann (sog. „Mix-and-Measure“ Tests). Bei einer 1:1 Mischung,
25 d.h. gleichen Volumenanteilen Probe und Reagenziengemisch ist
die Dosierung mit einfachsten Mitteln mit hoher Präzision
möglich.

Es ist dem Fachmann leicht ersichtlich, dass ein homogener
30 Immunoassay auch die kürzest-mögliche Analysendauer erlaubt,
da die Messung sofort nach dem Erreichen des
Bindungsgleichgewichts zwischen Antikörper und Antigen
möglich ist.

Ein Nachteil von homogenen Immunoassays ist, dass ein höherer chemisch-synthetischer Aufwand nötig ist, um die Bindungsreaktion mit der Signalgenerierung zu koppeln.

5 Im Patent US4960693 A wird die Synthese eines Antikörper-Enzymfragment-1-Konjugates beschrieben, so dass erst nach der Bindung des Antigen-Enzymfragment-2-Konjugats das funktionsfähige Enzym („Holoenzym“) entsteht. Die chemische Synthese solcher Konjugate ist sterisch anspruchsvoll und nicht für
10 alle Arten von Analyten gleich gut geeignet. Daneben wird durch die Kopplung mit der Enzymreaktion eine zusätzliche Reaktionszeit nötig, so dass dieses Prinzip sich nicht durchsetzen konnte.

15 Ein universellerer und chemisch einfacherer Ansatz für niedermolekulare Analyten ist der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay, wie z.B. in EP0200960A beschrieben. Dabei wird ein Konjugat aus dem Analyten (hier: Östriol) und einem Fluoreszenzfarbstoff, meist Fluorescein, synthetisiert. Die
20 Messlösung wird mit linear polarisiertem Anregungslicht beleuchtet. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist nicht polarisiert (depolarisiert), solange das Konjugat frei in Lösung vorliegt. Erst nach Bindung an den Antikörper wird die Rotationsgeschwindigkeit des Konjugates so weit
25 eingeschränkt, dass auch das emittierte Fluoreszenzlicht polarisiert ist. Damit kann das Bindungsgleichgewicht in Echtzeit gemessen werden. Der Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe apparative Aufwand für die Detektion, da eine polarisierte monochromatische Lichtquelle und zwei mit
30 Polarisationsfiltern ausgerüstete Fluoreszenzdetektoren für die Detektion benötigt werden. Dieses Prinzip konnte sich daher nur bei speziellen Laboranwendungen, nicht jedoch bei Routinediagnostik und im Vor-Ort-Einsatz durchsetzen. Außerdem ist es nur für niedermolekulare Analyten geeignet.

Für Protein-Analyten wird ein zusätzliches Verfahren benötigt.

Eine technisch einfachere Detektion niedermolekularer Analyten wurde in dem Verfahren von Sellrie et al. am Beispiel eines Europium-Kryptat-Immunoassays (Abk: EuKr) realisiert [US2008199972A]. Hier wird ein EuKr-Fluorescein-Konjugat synthetisiert, wobei ein möglichst kurzer Linker, der aus einer bis höchstens drei Methylengruppen besteht, zwischen dem EuKr und dem Fluorescein sein darf. Neben dem Anti-EuKr-Antikörper wird zusätzlich ein Anti-Fluorescein-Antikörper, der nach Bindung an Fluorescein, dessen Fluoreszenz löscht, eingesetzt. Das Signalgenerierungsprinzip beruht darauf, dass aus sterischen Gründen nur einer der beiden Antikörper das Konjugat binden kann. Das Bindungsgleichgewicht und damit die Fluoreszenzintensität ist von der Konzentration an freiem EuKr abhängig und kann direkt in Echtzeit gemessen werden. Vorteil dieses Systems ist, dass nur ein herkömmlicher Fluoreszenzdetektor benötigt wird. Der Nachteil ist, dass es ebenfalls nur für niedermolekulare Analyten geeignet ist, und dass die Konjugatsynthese chemisch anspruchsvoll ist.

Ein alternatives homogenes Immunoassayverfahren für niedermolekulare Analyten, das ebenfalls auf dem Prinzip der bindungsabhängigen Fluoreszenzlöschung beruht, wurde von Coille et al. und, in modifizierter Form von Tan et al. publiziert [I. Coille, S. Reder, S. Bucher and G. Gauglitz, Biomol. Eng 18 (2002) 273-280, / Chongxiao Tan, Nenad Gajovic-Eichelmann, Walter F.M. Stöcklein, Rainer Polzius, Frank F. Bier, Analytica Chimica Acta 658 (2010) 187-192]. Hier wird der Analyt, Tetrahydrocannabinol, an ein Protein, Rinderserumalbumin, gekoppelt, das an der Oberfläche zusätzlich mehrere Fluoreszenzquencher-Moleküle trägt. Der Anti-Tetrahydrocannabinol-Antikörper ist mit einem

Fluoreszenzmolekül konjugiert. Die Fluoreszenz wird gelöscht, wenn der Antikörper an das Konjugat bindet. Enthält die Analysenprobe freies Tetrahydrocannabinol, bindet der Antikörper dieses, und fluoresziert wieder. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, ebenso wie bei Sellrie et al., der einfache Messaufbau für die Fluoreszenzmessung genutzt werden kann. Nachteilig ist auch hier die chemisch anspruchsvolle Synthese des Analyt-Quencher-Konjugates und des Antikörper-Fluorophor-Konjugates.

Obwohl die Fluoreszenzmesstechnik in den Biowissenschaften sehr oft eingesetzt wird, ist sie eine aufwendige und damit teure Messtechnik. Preiswerte und kompakte Detektoren, z.B. für den Vor-Ort-Einsatz, werden eher mit anderen Nachweisverfahren realisiert. Elektrochemische Detektionsverfahren ermöglichen die technisch einfachsten und am höchsten integrierten Messgeräte und haben sich z.B. im Bereich der Einweg-Biosensoren für Glucose gegenüber allen optischen Messverfahren durchgesetzt. Es gibt daher seit vielen Jahren Bemühungen, homogene Immunoassays auf der Basis eines einfachen elektrochemischen Detektionsprinzips zu realisieren.

Voraussetzung für einen homogenen Immunoassay mit elektrochemischer Detektion ist die Verfügbarkeit einer sensitiven elektroanalytischen Methode und eines redoxaktiven Labels/Markers mit hoher spezifischer Aktivität. Amperometrische und voltammetrische Verfahren sind sensitive und geeignete Verfahren. Die spezifische Aktivität des Redoxlabels/markers hängt vor allem von der Geschwindigkeitskonstante des heterogenen Elektronentransfers mit der Elektrode und vom Detektionspotential ab. Es herrscht eine übereinstimmende Ansicht unter Fachleuten, dass ein Detektionspotential im Bereich von -200 mV bis +200 mV (gegen

Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode, künftig mit vs. Ag/AgCl abgekürzt) für Messungen in biologischen Lösungen wie Blut optimal ist. Die Elektronentransferkonstante ist eine Funktion der chemischen Struktur des Redoxlabels/markers, sowie des Diffusionskoeffizienten und des verwendeten Elektrodenmaterials. Eine Vielzahl von Redoxmediatoren sind dem Fachmann bekannt, die günstige elektrochemische Eigenschaften haben und damit prinzipiell geeignete Label/Marker für einen Immunoassay sind. Für den Einsatz in biologischen Medien dürfen die Redoxmediatoren nicht mit Probenbestandteilen reagieren, müssen im oxidierten und reduzierten Zustand stabil und ausreichend wasserlöslich sein. Dazu gehören z.B. die organischen Moleküle wie Hydrochinon/Chinon, p-Aminophenol, organisch/anorganische Sandwichmoleküle wie Ferrocen und anorganische Komplexe wie z.B. Hexacyanoferrat (II/III) oder Osmium-di-Bipyridin. Die Wasserlöslichkeit von Ferrocen und Osmium-di-Bipyridin ist schlecht, so dass hier meist wasserlösliche Derivate zum Einsatz kommen.

20

US2007/054317 beschreibt wasserlösliche Osmium-basierte Redoxmoleküle mit den oben genannten günstigen Eigenschaften und verschiedene elektrochemische Immunassayformate und Elektrodengeometrien, z.B. Interdigitalelektroden, mit denen die genannten wasserlöslichen Redoxmoleküle sensitiv detektiert werden können. Die in US2007/054317 beschriebenen Assayformate gehen außer durch die Verwendung der neuen Redoxmediatoren und darauf beruhender Antikörper- und Antigen-Konjugate nicht über den Stand der Technik hinaus, insbesondere wird kein neues, hoch sensitives homogenes Immunoassayformat beschrieben.

30

EP1331482A1 beschreibt ein elektrochemisches Immunoassayverfahren, wobei Konjugate aus Ferrocen und anderen

Redoxmediatoren mit dem Analyten eingesetzt werden. Zur Detektion wird ein Enzymbiosensor genutzt, z.B. ein Glucosesensor, indem die Freisetzung des Ferrocen-Analyt-Konjugates zu einer Modulation des elektrochemischen Signals des Glucosesensors führt. Ein Nachteil der beschriebenen Kopplungschemie ist, dass ein Protein wie Humanserumalbumin benutzt wird, um ein gut wasserlösliches Konjugat herzustellen. Dem Fachmann ist bekannt, dass es nicht möglich ist, Protein-Redoxmediator-Konjugate mit einem genau definierten stöchiometrischen Verhältnis zu synthetisieren. Damit ist die Charakteristik des Tests von Charge zu Charge stets verschieden. Dem Fachmann ist auch bewusst, dass ein solch indirektes Signalverfahren die Gefahr in sich birgt, dass Hemmstoffe aus der Probe die Enzymreaktion ebenso modulieren können wie das Redoxmediator-Analyt-Konjugat. Robuster wäre ein Verfahren, bei dem die das Redoxmediatorkonjugat direkt das elektrochemische Signal moduliert.

Nach einem solchen Prinzip ist der homogene elektrochemische Assay für Hippursäure in einem Mikrofluidikchip von Sung et al. aufgebaut [Sung Ju Yoo, Young Bong Choi, Jong Il Ju, Gun-Sik Tae, Hyug Han Kim and Sang-Hoon Lee. Analyst 134 (2009), 2462-2467]. Es wird ein Ferrocen-Hippursäure-Konjugat synthetisiert und ein Anti-Hippursäure-Antikörper genutzt. Konjugat und der an Polymerpartikel gebundene Antikörper werden in genau definierter Menge der Probe zugesetzt. Enthält eine Probe keine freie Hippursäure, bindet das Konjugat an die Antikörper-beladenen Partikel und wird mit diesen abzentrifugiert. Im Überstand wird in einem voltammetrischen Experiment wird beim Oxidationspotential des Ferrocens ein entsprechend kleiner Strom fließen. Enthält die Probe dagegen freie Hippursäure, so bindet der partikelgebundene Antikörper bevorzugt daran, das Konjugat bleibt beim Zentrifugieren in Lösung und es wird im voltammetrischen Experiment ein

entsprechend größerer Strom fließen (beim Oxidationspotential des Ferrocens). Dieser Assay und alle, die diesem Prinzip folgen, haben schwerwiegende Nachteile, die einen Einsatz in der Diagnostik praktisch nicht zulassen.

5

Erstens ist das Oxidationspotential von Ferrocen (+400 mV vs. Ag/AgCl) zu hoch für die selektive Detektion in Blut und Blutserum. Zweitens ist ein Zentrifugationsschritt für die meisten Vor-Ort-Anwendungen nicht akzeptabel. Drittens ist
10 dieses Verfahren trotz des Separationsschrittes (Zentrifugation) sehr unempfindlich. So haben Sung et al. als kleinste Konzentration ca. 10 mg/mL Hippursäure gemessen, das entspricht einer Konzentration von 55 mM. Typische Immunoassay-Analyten müssen jedoch im nanomolaren Konzentrationsbereich (oder darunter) gemessen werden, d.h. eine Million
15 mal empfindlicher.

Ein homogener elektrochemischer Assay, der ohne Separationsschritt auskommt, wurde von Di Gleria et al.
20 [Katalin Di Gleria, H. Allen, O. Hill, Calum J. McNeil, Anal. Chem. 1988, 58, 1203-1205] vorgestellt. Auch hier wird ein Konjugat aus Ferrocen und dem Analyten, Lidocain, sowie der Anti-Analyt-Antikörper der Probe zugesetzt. Als Detektionsprinzip wird eine Enzymreaktion genutzt, für die Ferrocenium-
25 Antigen-Konjugat als Redoxmediator wirkt. Enthält die Probe keinen freien Analyten, bindet das Konjugat an den Antikörper und die Enzymreaktion, hier Glucoseoxidase, wird verzögert, der amperometrische Strom wird geringer. Der Nachteil dieses Formats ist, dass es nicht sensitiv genug für einen typischen
30 Immunoassay ist. So wurde in Serum eine untere Nachweisgrenze von ca. 5 μ M erzielt, ca. 1000-fach höher als in typischen Immunoassays.

Eine Variante dieses homogenen Redoximmunoassays wurde

beschrieben, bei der der Redoxmediator-Konjugat direkt elektrochemisch gemessen wird. Auch hier wurden nur unzureichende Nachweisgrenzen erzielt.

5 Dieser Assay und alle, die einem ähnlichen Prinzip folgen (d.h. der Modulation der Diffusionskonstante durch die Antikörperbindung), haben schwerwiegende Nachteile, die einen Einsatz in der Diagnostik erschweren. Der Hauptnachteil ist die niedrige Sensitivität, da die Modulation der
10 Diffusionskonstante nur eine geringe Signalmodulation nach sich zieht: Auch wenn das redoxaktive Konjugat komplett vom Antikörper gebunden wird, kann man noch ein nennenswertes amperometrisches oder voltametrisches Signal messen. Wünschenswert wäre es, wenn das antikörpergebundene Konjugat
15 gar kein elektrochemisches Signal produzieren würde.

Gleiches gilt für das Prinzip der Modulation einer Enzymreaktion durch die Verknappung des Redoxmediators nach Bindung an einen Antikörper. Auch dieses Format konnte nur
20 mikromolare Konzentrationen (oder höher) detektieren.

Insgesamt kann man sagen, dass homogene elektrochemische Immunoassays, die auf der Modulation der Diffusionskonstante eines niedermolekularen Konjugates oder der Modulation einer
25 Enzymreaktion durch die Verknappung des Redoxmediators nach Bindung eines Antikörpers beruhen, nicht ausreichend sensitiv sind, um Konzentrationen im nanomolaren Bereich (oder darunter) zu messen, wie sie für Immunoassay-Analyten typisch sind. Deshalb konnte trotz des preiswerten Detektionssystems
30 keiner dieser Assays eine nennenswerte kommerzielle Anwendung finden.

Vor diesem Hintergrund liegt die Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung eines neuen verbesserten

Verfahrens zur Durchführung eines Immunoassays in Lösung, welches die genannten Nachteile des Standes der Technik nicht mehr aufweist und insbesondere eine deutlich verbesserte Sensitivität bietet.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst mit dem Verfahren nach Anspruch 1. Speziellere Ausführungsformen und weitere Aspekte der Erfindung sind Gegenstand der weiteren Ansprüche.

- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Durchführung von homogenen Immunoassay-Formaten mit elektrochemischer Detektion ist dadurch gekennzeichnet, dass zwei verschiedene Konjugate als Reagenzien mit der Probe oder dem Proben/Puffer-Gemisch kombiniert werden, wobei das eine Konjugat einen Redoxmarker
- 15 und ein Analytmolekül umfasst und das zweite Konjugat einen Anti-Redoxmarker-Antikörper oder ein spezifisch bindendes Fragment davon und ein den Analyten spezifisch bindendes Molekül umfasst.
- 20 Der Analyt kann grundsätzlich jedes in einem Immunoassay oder anderen Bindungsassay nachweisbare Molekül sein, für das ein spezifischer Bindungspartner existiert. Der Analyt kann niedermolekular sein, d.h. eine Molmasse von \leq etwa 1000 Dalton aufweisen, oder höher- und hochmolekular sein.
- 25 Beispiele für höher- und hochmolekulare Analyten sind Nukleinsäuren, Peptide und Proteine. Besonders bevorzugte Analyten sind niedermolekulare organische Moleküle und Proteine/Peptide, z.B. Hormone, Enzyme, Biomarker, biologische Wirk- und Schadstoffe und andere physiologisch
- 30 oder metabolisch relevante Substanzen.

Das den Analyten spezifisch bindende Molekül kann ein Anti-Analyt-Antikörper oder ein Fragment davon, ein Aptamer, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder ein, typischerweise

organischer, Chelator, der den Analyten spezifisch (z.B. in einer speziellen Bindungstasche oder Koordinationsstruktur) bindet und kein Antikörper ist (in der Literatur auch als „Wirtsmolekül“ für ein „Gastmolekül“ bezeichnet), sein.

5 Vorzugsweise handelt es sich um einen Anti-Analyt-Antikörper oder ein Fragment davon.

Spezieller ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Gegenwart von freiem Analyten in der Probe die Bindung des
10 Redoxmarkers an den Anti-Redoxmarker-Antikörper oder das spezifisch bindende Fragment davon veranlasst oder fördert, wobei durch diese Bindung die Redoxaktivität des gebundenen Redoxmarkers unterbunden („gelöscht“ oder „gequencht“) wird, wodurch ein detektierbares Signal erzeugt oder verändert
15 wird. Das erfindungsgemäße Verfahren ist oder beinhaltet typischerweise einen kompetitiven Assay.

Eine geeignete Verfahrensgestaltung ist beispielsweise wie folgt: Ein bispezifisches Antikörperkonjugat, umfassend einen
20 Anti-Analyt- und einen Anti-Redoxmarker-Antikörper, und das Redoxmarker-Analyt-Konjugat, werden in Puffer gelöst. Ein Teil der Konjugat-Moleküle bindet an das bispezifische Antikörper-Konjugat, die Mehrzahl davon am Anti-Analyt-Ende des bispezifischen Antikörperkonjugates, da der Anti-Analyt-
25 Antikörper, insbesondere unter den sterischen Bedingungen des Konjugats, vorzugsweise eine deutlich höhere Affinitätskonstante als die des Anti-Redoxmarker-Antikörpers besitzt. Das Redoxmarker-Ende des Konjugates wird daher praktisch nicht gebunden und ist so der elektrochemischen
30 Messung (z.B. Amperometrie oder Voltammetrie) frei zugänglich und es wird ein hoher Reduktionsstrom gemessen. Kommen nun freie Analytmoleküle aus der Probe dazu, verdrängen diese das Analytende des Analyt-Redoxmarker-Konjugates aus den Bindungsstellen des Analyt-Antikörpers. Erst jetzt können die

Redoxmarker-Enden des Konjugates an den Anti-Redoxmarker-Antikörper-Teil des bispezifischen Antikörperkonjugates binden, wodurch die Redoxaktivität des gebundenen Redoxmarkers unterbunden („gelöscht“) wird, und es wird ein
5 verringertes elektrochemisches Signal gemessen.

Das erfindungsgemäße Verfahren geht über den Stand der Technik weit hinaus, da es erstmalig das Prinzip des „Löschens“ eines Signals durch die Antikörper-Antigen-Bindung
10 (analog dem Fluoreszenz-Löschen bzw. Fluoreszenz Quenching) auf die direkte elektrochemische Detektion überträgt. Fluoreszenz Quenching Immunoassays gehören zu den sensitivsten und schnellsten homogenen Immunoassays, da das Signal in Echtzeit proportional zur Antikörper-Antigen-
15 Bindung generiert wird. Eine solche Signalcharakteristik wurde nun erstmals auch bei einer elektrochemischen Detektion realisiert.

Als redoxaktive Marker (in Analogie zum Fluorophor) können
20 erfindungsgemäß Ferrocen (bzw. beliebige Derivate des Ferrocens), Osmium-di-Bipyridyl-Komplexe und andere Osmium-basierte Komplexe, Ruthenium-Bipyridyl-Komplexe und andere Ruthenium-basierte Komplexe, p-Aminophenol, Hexacyanoferrat (II/III), Hydrochinone/Chinone, oder andere Redoxmediatoren,
25 insbesondere andere für Immunoassays bekannte und geeignete Redoxmarker, verwendet werden. Die „Löschung“ der Redoxaktivität des Ferrocens, oder eines anderen Redoxmediators, war bisher im Stand der Technik unter den Bedingungen eines Immunoassays nicht möglich. Zwar wurde in Arbeiten wie der
30 von Nielson et al. [Roger M. Nielson, Joseph T. Hupp, Inorg. Chem. 1996, 35, 1402-1404] beschrieben, dass Calixarene, die eine schwache Bindung zu Ferrocen ausbilden, in der Lage sind, die Redoxaktivität von Ferrocenen komplett zu löschen, jedoch erst bei Konzentrationen von ca. 10 mM und höher. So

hohe Konzentrationen eines Redox-Quenchers sind für Immunoassays völlig ungeeignet.

Überraschender Weise wurde gefunden, dass monoklonale
5 Antikörper, die von einem der Erfinder zur Bindung von Ferrocen generiert wurden, eine solche Lösungs-Charakteristik aufweisen. Ein besonders wirkungsvoller neuer monoklonaler Antikörper bindet ausschließlich die oxidierte Form von Ferrocen, das Ferrocenium-Kation (oder Ferricinium),
10 künftig Ferrocenium genannt. Die Redoxaktivität des gebundenen Ferroceniums wird dadurch komplett gelöscht, es lässt sich im gebundenen Zustand nicht mehr an einer Elektrode (Glaskarbon, Edelmetall) reduzieren. Der Ferrocenium-bindende Antikörper wird in den Ausführungs-
15 beispielen des erfindungsgemäßen Verfahren als Redox-Quencher (in Analogie zum Fluoreszenz Quencher) genutzt.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch jeder andere Antikörper genutzt werden, der den im Test
20 benutzten Redoxmediator bindet und dadurch dessen Redoxaktivität unterbindet (löscht). Es ist dabei für die Erfindung unerheblich, ob der Antikörper den oxidierten oder den reduzierten Zustand des Redoxmediators bindet. Besondere Vorteile bietet in manchen Anwendungen jedoch ein Antikörper,
25 der den oxidierten Mediator bindet, wie im Falle des Anti-Ferrocenium-Antikörpers, der in der beschriebenen Erfindung erstmals angewendet wird. Der Grund ist das niedrigere Detektionspotential, das für die Reduktion des Redoxmarkers genutzt werden kann (im Anwendungsbeispiel wird bei +100 mV
30 vs. Ag/AgCl detektiert, im Falle der Oxidation müsste bei +250 bis +400 mV detektiert werden, was erhöhte unspezifische Signale in Blutserum zur Folge hätte.)

Diese Redoxmarker-Antikörper mit Quencher-Wirkung und diese

umfassende bispezifische Antikörperkonjugate stellen einen der Aspekte der vorliegenden Erfindung dar. Die erfindungsgemäßen Redoxmarker-Antikörper mit Quencher-Wirkung sind in der Lage, die Redoxaktivität des gebundenen Redoxmarkers
5 weitgehend, vorzugsweise zu mehr als 80 %, bevorzugter mehr als 90 %, noch bevorzugter mehr als 95 %, oder vollständig zu unterbinden (zu „löschen“ oder „quenchen“).

Der Begriff „Antikörper“, wie in der vorliegenden Anmeldung
10 verwendet, soll grundsätzlich auch spezifisch bindende Fragmente davon umfassen, soweit aus dem Zusammenhang nicht eindeutig etwas Anderes hervorgeht.

Mit einem hier erstmals beschriebenen Anti-Ferrocenium-
15 Antikörper läßt sich ein kompetitiver Immunoassay zur Detektion von Ferrocenium (oder Ferrocen) realisieren, der jedoch keine große technische Bedeutung hätte. Einen hohen technischen Nutzen und einen hohen kommerziellen Wert hat das Verfahren erst, wenn sich damit beliebige Analyten mit dem
20 elektrochemischen Immunoassay nachweisen lassen. Zu diesem Zwecke muss die Ferrocenium-Anti-Ferrocenium-Immunkomplexbildung mit einem beliebigen monoklonalen Antikörper gekoppelt werden können, derart, dass die Bindung des Zielanalyten an den komplementären Antikörper eine Modulation
25 der Ferrocenium-Anti-Ferrocenium-Bindung zur Folge hat. Der von Sellrie et al. [US2008199972A] beschriebene, elegante Ansatz der Kopplung zweier Immunreaktionen durch ein Konjugat aus beiden Antigenen, die mit einem sehr kurzen Linker verbunden sind, so dass jeweils nur der Anti-Pestizid-
30 Antikörper oder der Anti-Fluorescein-Antikörper binden kann, ließ sich im Falle des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht nutzen, da Ferrocenkonjugate, die mit niedermolekularen Substanzen gekoppelt werden, in der Regel nicht wasserlöslich sind. Für die praktische Nutzung musste ein Ferrocen-Analyt-

Konjugat hergestellt werden, dass eine ausreichend hohe Wasserlöslichkeit aufweist. Dem Fachmann sind eine Anzahl wasserlöslicher Linkermoleküle bekannt, die für die Synthese von Biokonjugaten genutzt werden können. Polyethylenglykol-
5 Linker (Synonym: Polyethylenoxid-Linker, PEG, PEO) gehören aufgrund der guten Wasserlöslichkeit, der geringen unspezifischen Bindung an Proteine und Oberflächen und der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Kettenlängen und chemischen
10 Linkern. Polyethylenglykol-Linker (Synonym: Polyethylenoxid-Linker) sind lineare Moleküle, die an einem oder beiden Enden koppelbare Funktionen aufweisen können, z.B. Carboxylgruppen, Aminogruppen, Thiolgruppen usw. Die Wasserlöslichkeit von Polyethylenglykol-Linkern ist sehr
15 hoch, und sie nimmt mit zunehmender Kettenlänge des Linkers zu.

Zur Herstellung der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Konjugate wird ein bifunktionseller wasser-
20 löslicher Linker ausreichender Kettenlänge, z.B. ein 400-30.000 Da PEG-Linker mit zwei terminalen koppelbaren Funktionen, vorzugsweise ein 2000 Da Diamino-PEG-Linker benutzt, um an einem Ende Ferrocen, oder einen anderen geeigneten Redoxmediator, und, am anderen Ende, den
25 Zielanalyten zu koppeln. Durch die Verwendung von PEG-Linkern ausreichender Länge können auch in Wasser unlösliche Analyten dem Test zugänglich gemacht werden. Homobifunktionelle Linker, die an beiden Enden die gleiche Kopplungsfunktion aufweisen, können ebenso genutzt werden wie hetero-
30 bifunktionelle Linker, die zwei unterschiedliche Kopplungsfunktionen aufweisen.

In Bindungsstudien mit dem Ferrocen-Analyt-Konjugaten in Anwesenheit des freien Anti-Ferrocenium-Antikörpers, des

freien Anti-Analyt-Antikörpers und des Ferrocen-Analyt-Konjugates zeigte sich, dass keine ausreichende Modulation des Ferrocen-Signals durch den Analyten erfolgte. Es zeigte sich auch, dass das Ferrocenium-Analyt-Konjugat über die
5 gesamte Analysendauer im oxidierten Zustand gehalten werden musste, um messbare Signale zu erzielen. Überraschend wurde herausgefunden, dass in einigen sauren Puffern Ferrocen dauerhaft im oxidierten Zustand bleibt. Im erfindungsgemäßen Verfahren wird der Assay vorzugsweise bei pH-Werten zwischen
10 pH 1 und pH 7, besonders bevorzugt zwischen pH 4 und pH 5, durchgeführt. Geeignete Puffersalze sind z.B. Phosphat, MES, HEPES, TRIS, Bistris, Acetat, Glycylglycin, Glycin.

Es wurde nun ein überraschend einfaches, neues Prinzip
15 gefunden, um die Ferrocenium-Anti-Ferrocenium-Bindungsreaktion mit der Analyt-Anti-Analyt-Bindungsreaktion zu koppeln. Dazu wurde ein bispezifisches Antikörperkonjugat hergestellt, indem der Anti-Ferrocenium-Antikörper im stöchiometrischen Verhältnis (1:1) mit dem Anti-Analyt-
20 Antikörper gekoppelt wurde, wobei ein kurzer Linker von höchstens 10 Methylenheiten Länge verwendet wurde. Damit konnte erstmals die oben beschriebene, gewünschte Signal-Löschungscharakteristik in einem elektrochemischen Immunoassay erzielt werden.

25

Das Funktionsprinzip, erklärt am Beispiel eines kompetitiven Progesteron-Immunoassays, ist dabei wie folgt: Das bispezifische Antikörperkonjugat, bestehend aus einem Anti-
Progesteron- und einem Anti-Ferrocenium-Antikörper, und das
30 Ferrocenium-Progesteron-Konjugat werden in Puffer gelöst. Ein Teil der Konjugat-Moleküle bindet an das bispezifische Antikörper-Konjugat, die Mehrzahl davon am Anti-Progesteron-Ende des bispezifischen Antikörperkonjugates (da dieser Antikörper eine höhere Affinitätskonstante besitzt). Das

Ferrocenium-Ende des Konjugates wird praktisch nicht gebunden, da der PEG-Linker dafür zu kurz ist, und außerdem eine energetisch ungünstige, gebogene Konformation annehmen müsste. Das Ferrocenium-Ende ist daher der elektrochemischen
5 Messung frei zugänglich (Amperometrie oder Voltammetrie) und es wird ein hoher Reduktionsstrom gemessen. Kommen nun freie Progesteronmoleküle aus der Probe dazu, verdrängen diese das Progesteronende des Progesteron-Ferrocenium-Konjugates aus den Bindungsstellen des Progesteron-Antikörpers. Erst jetzt
10 können die Ferrocenium-Enden des Konjugates an den Anti-Ferrocenium-Antikörper-Teil des bispezifischen Antikörperkonjugates binden und es wird ein verringertes elektrochemisches Signal gemessen (Veranschaulichung siehe Fig. 1).

15 Bei Zugabe eines Überschusses an bispezifischem Antikörperkonjugat im Vergleich zum Ferrocenium-Analyt-Konjugat werden die meisten Ferrocenium-Reste vom Antikörperkonjugat gebunden und das elektrochemische Signal
20 wird fast auf null reduziert, also gelöscht. Es ist dem Fachmann jedoch bekannt, dass die Antikörperkonzentration bzw. die Konzentration des bispezifischen Antikörpers im Immunoassay so gewählt wird, dass sich eine maximale Sensitivität für Progesteron ergibt, so dass das
25 Antikörperkonjugat in einem hoch empfindlichen Assay im Unterschuss zugesetzt wird. In diesem Fall wird das elektrochemische (Gesamt-)Signal auch bei hoher Progesteronkonzentration nicht komplett gelöscht. Es hat sich gezeigt, dass ein Progesteron-Assay am sensitivsten ist, wenn das
30 elektrochemische Signal durch Progesteronzugabe nur zu ca. 50 % gelöscht werden kann (siehe Fig. 2).

Die erzielte Signal-Löschungs-Charakteristik wurde bisher noch nicht bei elektrochemischen Immunoassays gezeigt, weil

keine entsprechenden Quencher-Moleküle zur Verfügung standen.

Die erfindungsgemäß genutzten Anti-Ferrocenium-Antikörper sind ein Beispiel für ein solches Redox-Quencher-Molekül. Es ist jedoch ebenso möglich, analoge Antikörper herzustellen, die andere Redoxmarker binden und deren Signal löschen. Der Einsatz solcher Antikörper in einem bispezifischen-Antikörperkonjugat ist ebenfalls Teil der Erfindung.

10 Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Durchführung von direkten, homogenen Immunoassays in Lösung mit sensitiver elektrochemischer Detektion bereit, das dadurch gekennzeichnet ist, dass nanomolare Konzentrationen von niedermolekularen oder hochmolekularen Analyten gemessen werden können, dass keines der Reagenzien immobilisiert ist, keine Separations- und Waschschr

15 itte erfolgen und die Bindungsreaktion in Echtzeit elektrochemisch detektiert wird.

Die technische Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist besonders einfach, da es mit verschiedenen elektroanalytischen Techniken genutzt werden kann, die dem Fachmann bekannt sind, keinerlei Modifikation der Messelektrode verlangt (z.B. chemische Modifikation, Membranen, Beschichtung mit Dün

20 nen Filmen, laterale Strukturierung etc.) und praktisch beliebig skalierbar ist (Verringerung der Elektroden dimensionen, Verringerung des Analysenvolumens). Da das Signalgenerierungsprinzip, d.h. die Löschung der Redoxaktivität eines beliebigen Redoxmediators, sich auf alle bekannten elektroanalytischen Messtechniken, wie z.B.

25 Amperometrie, Voltammetrie, Coulometrie, Amperometrische Titration, Coulometrische Titration, Potentiometrie, Impedanzspektroskopie usw. anwenden lässt, kann das erfindungsgemäße Verfahren mit allen diesen Verfahren zu neuen Immunoassay-Anwendungen kombiniert werden. So kann in

30

manchen Fällen Amperometrie die Methode der Wahl sein, z.B. um ein möglichst preiswertes Gesamtsystem zu erzielen, oder um bestehende amperometrische Detektoren (z.B. Glucose-Biosensor-Messgeräte) für den Einsatz von Immunoassays einzusetzen. Je nach Anwendungsfall und gewünschtem Analyt ist es möglich, die Elektroanalysen-Technik zu variieren, ohne den Immunoassay grundsätzlich neu entwickeln zu müssen.

Die Variabilität und technische Anwendbarkeit des neuen Immunoassay-Prinzips zeigt sich besonders deutlich, wenn es in mikrofluidischen Analysesystemen (Lab-on-a-Chip Systemen) genutzt wird. Dies ist besonders leicht möglich, da es sich um einen homogenen Immunoassay, ohne immobilisierte Komponenten und ohne Separationsschritte handelt. Die Reagenzien können in flüssiger oder getrockneter Form in das Lab-on-a-Chip System eingebracht werden, so dass sie durch Zugabe der Probe freigesetzt werden und der Assay gestartet wird. Das Messsignal kann kontinuierlich gemessen werden, oder nur zu Beginn und zum Ende der Analyse (nach Erreichen des Bindungsgleichgewichtes). Es ist keinerlei Synchronisation von Abläufen, Dosier- und Wasch- oder Zentrifugationsschritten nötig, um das Analyseergebnis zu bekommen. Im Gegensatz zu vielen optischen Messverfahren (z.B. Photometrie, Fluoreszenzmessung) verschlechtert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von elektroanalytischen Verfahren auch bei Miniaturisierung nicht, d.h. es müssen für miniaturisierte Elektroden keine neuen und aufwendigen Detektoren und Verstärker entwickelt werden.

Der hohe Wert des neuen Verfahrens zeigt sich auch darin, dass es damit möglich ist, hoch sensitive Wegwerf-Immunosensoren für den Einmalgebrauch zu realisieren, wie z.B. beim heute üblichen Schwangerschaftstest nach dem Lateral Flow Immunoassayprinzip. Die für die Detektion

benötigte Elektronik (z.B. ein amperometrischer Schaltkreis) kann in einem preiswerten portablen Gerät integriert (z.B. einem Glucose-Teststreifen-Messgerät) oder sogar als Wegwerf-Elektronik realisiert sein (z.B. eine gedruckte Schaltung
5 oder ein hoch integrierter Schaltkreis).

Ebenso ist das neue Verfahren auch für Laboranalysatoren geeignet, die voll automatisch eine Anzahl verschiedener Immunoassays parallel durchführen. Hier kommt die kurze
10 Analysezeit des erfindungsgemäßen Verfahrens von 1 bis 5 Minuten zum Tragen.

In einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die benötigten Reagenzien in löslicher Form
15 zugegeben und eine elektrochemische Detektion des Bindungsereignisses erfolgt in Echtzeit.

In einer anderen speziellen Ausführungsform werden alle benötigten Reagenzien als fertiges Gemisch zur Probe gegeben
20 und eine elektrochemische Detektion des Bindungsereignisses erfolgt in Echtzeit (Mix-and-measure Prinzip).

In einer weiteren speziellen Ausführungsform werden alle benötigten Reagenzien als Trockenreagenzien in einem
25 geeigneten Reaktionsgefäß (z.B. Eppendorf-Tube, Mikrotiterplatte, Lab-on-a-Chip-System, Teststreifen) zur Verfügung gestellt und erst durch Zugabe der Probe und ggf. Puffer aufgelöst, wodurch der Beginn der Analyse gekennzeichnet ist.

30 In einer noch weiteren, besonders günstigen speziellen Ausführungsform wird der Immunoassay in einem mikrofluidischen Analysensystem (Lab-on-a-Chip) durchgeführt.

In einer typischen Ausführungsform wird der Immunoassay auf

einem voll automatischen Analysator durchgeführt.

Eine weitere Verbesserung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann dadurch erreicht werden, dass anstelle einer einfachen Elektrode zur Detektion eine strukturierte Elektrode z.B. eine Interdigitalelektrode, verwendet wird, mit der sich die Sensitivität der Analyse durch sog. Redox-Recycling weiter erhöhen lässt.

10 Eine weitere vorteilhafte Modifizierung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass anstelle einer einfachen elektrochemischen Redoxreaktion (z.B. Reduktion des Ferroceniums zu Ferrocen) eine enzymatisch katalysierte zyklische Reaktion genutzt wird. (z.B. elektrochemische Reduktion gefolgt von enzymatischer Reoxidation von Ferrocenium), ein sog. Enzym-Recycling, mit der sich die Sensitivität der Analyse weiter erhöhen lässt.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für Messungen im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich geeignet und ca. 1000-fach sensitiver als die bisher bekannten homogenen elektrochemischen Immunoassays ohne Trennschritte. Diese enorme Verbesserung der Sensitivität wird durch das oben beschriebene, neue Signalprinzip erreicht, bei dem die Redoxaktivität des redoxaktiven Konjugates nach Bindung an den Antikörper komplett gelöscht werden kann (anstatt nur die Diffusionskonstante zu verringern wie bei den bisher bekannten Verfahren).

30 Das elektrochemische Messverfahren ist dabei technisch ebenso einfach wie bei den oben genannten Verfahren, da eine einfache amperometrische oder voltammetrische Messung an herkömmlichen, unbeschichteten Elektroden (z.B. Glaskarbon-elektroden) erfolgt. Die manuellen Handhabungsschritte

beschränken sich auf die Zugabe der Reagenzien, sowie die Zugabe der Probenlösung, ein Separationsschritt ist nicht nötig. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch eine Analyse nach dem Mix-and-Measure Prinzip und eignet sich im besonderen Maße für die Automatisierung. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dabei gut skalierbar, d.h. auf miniaturisierte Volumina, z.B. bei mikrofluidischen Anwendungen (Lab-on-a-Chip) anwendbar. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich aufgrund dieser Charakteristik und des niedrigen Detektionspotentials von typischer Weise +100 mV (vs. Ag/AgCl) damit für die direkte Messung von niedermolekularen Analyten wie z.B. Steroidhormonen ebenso wie von hochmolekularen Analyten wie z.B. hCG oder Proteinmarkern in komplexen biologischen Proben wie z.B. Blut.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist damit für eine Vielzahl kommerziell bedeutender Immunoassays geeignet und in der Lage, bisherige Detektionsverfahren, die technisch aufwendig (und damit kostspielig) oder schwer zu miniaturisieren und zu automatisieren sind, zu ersetzen. Es ist geeignet für Anwendungen in der klinischen Diagnostik, Umwelt- und Lebensmittelanalytik und aufgrund der guten Miniaturisierbarkeit und technischen Einfachheit insbesondere für Anwendungen außerhalb des Labors (Vor-Ort-Anwendungen, Point-of-Care Analysen, Einweg-Sensoren, Lab-on-a-Chip Immunoassays). Das erfindungsgemäße Verfahren verfügt damit über das Potential in vielen Anwendungen herkömmliche, teure Detektionssysteme wie z.B. Fluoreszenzdetektoren oder Fluoreszenzpolarisationsdetektoren, zu ersetzen.

Kurzbeschreibung der Figuren

Fig. 1: Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Immunoassays am Beispiel des Progesteron-Nachweises

Fig. 2: Dosis-Effekt Kurve für die amperometrische Messung von Progesteron nach dem erfindungsgemäßen Verfahren

Die folgenden, nicht-beschränkenden Beispiele sollen die
5 Erfindung näher erläutern.

BEISPIEL 1

Direkter kompetitiver Progesteronimmunoassay in Blutserum

10 Geräte: Elektrochemische Rührzelle 1 mL Arbeitsvolumen,
Potentiostat im amperometrischen Modus

Puffer: Acetatpuffer, pH 4,4

Probe: Humanserum unverdünnt,

Kalibrator: Humanserum unverdünnt, versetzt mit 2 ng/mL, 4
15 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL Progesteron

Verfahrensschritte:

- Befüllen der elektrochemischen Messzelle mit 450 µl Acetat-Puffer pH 4,4
- Polarisieren der Arbeitselektrode auf + 100 mV (vs.
20 Ag/AgCl)
- Zugabe von 10 µl bispezifisches Antikörper-Konjugat (Endkonzentration ca. 0,1 µg/mL)
- Zugabe von 10 µl Redoxmarker-Progesteron-Konjugat (Endkonzentration ca. 100 nM)
- 25 • Zugabe von 30 µl H₂O₂/Peroxidase (Endkonzentration 5 mM H₂O₂, 0,02 nM Peroxidase)
- Messung des Basissignals
- Zugabe von 500 µl Humanserum (oder 500 µl Kalibrator)
- Messung des Endsignals 180 sec nach Serum-Zugabe

30

Die Auswertung erfolgt anhand einer vorher gemessenen Dosis-

Effekt-Kurve oder anhand einer 2-Punktkalibrierung.

BEISPIEL 2

5 *Direkter kompetitiver Progesteronimmunoassay in Speichel*

Geräte: Elektrochemische Rührzelle 1 mL Arbeitsvolumen,
Potentiostat im amperometrischen Modus

Puffer: Acetatpuffer, pH 4,4

10 Probe: Humanspeichel 1:5 verdünnt,

Kalibrator: Humanspeichel 1:5 verdünnt, versetzt mit 2
ng/mL, 4 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL
Progesteron

Verfahrensschritte:

- 15 • Befüllen der elektrochemischen Messzelle mit 450 µl
Acetat-Puffer pH 4,4
- 20 • Polarisieren der Arbeitselektrode auf + 100 mV (vs.
Ag/AgCl)
- 20 • Zugabe von 10 µl bispezifisches Antikörper-Konjugat
(Endkonzentration ca. 0,1 µg/mL)
- 20 • Zugabe von 10 µl Redoxmarker-Progesteron-Konjugat
(Endkonzentration ca. 100 nM)
- 20 • Zugabe von 30 µl H₂O₂/Peroxidase (Endkonzentration 5 mM
H₂O₂, 0,02 nM Peroxidase)
- 25 • Messung des Basissignals
- 25 • Zugabe von 500 µl Humanspeichel 1:5 verdünnt (oder 500
µl Kalibrator)
- 25 • Messung des Endsignals 180 sec nach Speichel-Zugabe
- 30 Die Auswertung erfolgt anhand einer vorher gemessenen Dosis-
Effekt-Kurve oder anhand einer 2-Punktkalibrierung.

BEISPIEL 3*Direkter kompetitiver Humanchoriongonadotropinimmunoassay
(hCG) in Urin*

5 Geräte: Elektrochemische Rührzelle 1 mL Arbeitsvolumen,
 Potentiostat im amperometrischen Modus

 Puffer: Acetatpuffer, pH 4,4

 Probe: Humanserum unverdünnt,

 Kalibrator: Humanserum unverdünnt, versetzt mit 10 mIU/mL,
10 20 mIU/mL, 40 mIU/mL, 100 mIU/mL, 200 mIU/mL hCG

Verfahrensschritte:

- Befüllen der elektrochemischen Messzelle mit 450 µl
 Acetat-Puffer pH 4,4
- Polarisieren der Arbeitselektrode auf + 100 mV (vs.
15 Ag/AgCl)
- Zugabe von 10 µl bispezifisches Antikörper-Konjugat
 (Endkonzentration ca. 0,3 µg/mL)
- Zugabe von 10 µl Redoxmarker-hCG-Konjugat
 (Endkonzentration ca. 200 nM)
- 20 • Zugabe von 30 µl H₂O₂/Peroxidase (Endkonzentration 5 mM
 H₂O₂, 0,02 nM Peroxidase)
- Messung des Basissignals
- Zugabe von 500 µl Humanserum (oder 500 µl Kalibrator)
- Messung des Endsignals 180 sec nach Serum-Zugabe

25

Die Auswertung erfolgt anhand einer vorher gemessenen Dosis-
Effekt-Kurve oder anhand einer 2-Punktkalibrierung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Durchführung von homogenen Immunoassay-
5 Formaten mit elektrochemischer Detektion in Lösung, dadurch gekennzeichnet, dass zwei verschiedene Konjugate als Reagenzien mit der Probe oder einem Proben-Puffer-Gemisch kombiniert werden, wobei das eine Konjugat einen Redoxmarker und ein Analytmolekül umfasst und das zweite
10 Konjugat einen Anti-Redoxmarker-Antikörper oder ein spezifisch bindendes Fragment davon und ein den Analyten spezifisch bindendes Molekül umfasst.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
15 die Gegenwart von freiem Analyten in der Probe die Bindung des Redoxmarkers an den Anti-Redoxmarker-Antikörper veranlasst oder fördert, wobei durch diese Bindung die Redoxaktivität des gebundenen Redoxmarkers unterbunden („gequencht“) wird, wodurch ein detektier-
20 bares Signal erzeugt oder verändert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmarker aus der Gruppe aus
25 Ferrocen und Ferrocen-Derivaten, Osmium-di-Bipyridyl-Komplexen und anderen Osmium-basierten Komplexen, Ruthenium-Bipyridyl-Komplexen und anderen Ruthenium-basierten Komplexen, p-Aminophenol, Hexacyanoferrat (II/III), Chinonen und anderen für elektrochemische Immunoassays bekannten Redoxmarkern ausgewählt ist.
30
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmarker Ferrocenium ist und der Anti-Redoxmarker-Antikörper ein, vorzugsweise monoklonaler, Anti-Ferrocenium-Antikörper ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass das den Analyten spezifisch bindende Molekül einen Anti-Analyt-Antikörper, ein Aptamer, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder einen Chelator, der den Analyten spezifisch bindet, darstellt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das den Analyten spezifisch bindende Molekül ein Anti-Analyt-Antikörper oder ein Fragment davon ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Konjugate wasserlösliche Linkermoleküle, insbesondere PEG-Linker, umfassen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die benötigten Reagenzien in löslicher Form zugegeben werden und eine elektrochemische Detektion des Bindungsereignisses in Echtzeit erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass alle benötigten Reagenzien als fertiges Gemisch zur Probe gegeben werden und eine elektrochemische Detektion des Bindungsereignisses in Echtzeit erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass alle benötigten Reagenzien als Trockenreagenzien in einem geeigneten Reaktionsgefäß zur Verfügung gestellt werden und durch Zugabe der Probe und ggf. Puffer aufgelöst werden, wodurch der Beginn der Analyse gekennzeichnet ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass der Immunoassay in einem mikrofluidischen Analysensystem (Lab-on-a-Chip) und/oder auf einem vollautomatischen Analysator durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle einer einfachen Elektrode zur Detektion eine strukturierte Elektrode z.B. eine Interdigitalelektrode, verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle einer einfachen elektrochemischen Redoxreaktion eine enzymatisch katalysierte zyklische Reaktion genutzt wird.
14. Redoxmarker-Antikörper oder Fragment davon, der/das spezifisch an einen Redoxmarker, ausgewählt aus der Gruppe aus Ferrocen und Ferrocen-Derivaten, Osmium-di-Bipyridyl-Komplexen und anderen Osmium-basierten Komplexen, Ruthenium-Bipyridyl-Komplexen und anderen Ruthenium-basierten Komplexen, p-Aminophenol, Hexacyanoferrat (II/III), Chinonen und anderen für elektrochemische Immunoassays bekannten und geeigneten Redoxmarkern, bindet und die Redoxaktivität des daran gebundenen Redoxmarkers weitgehend, vorzugsweise zu mehr als 90 %, bevorzugter mehr als 95 %, oder vollständig unterbindet (quencht).
15. Redoxmarker-Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 14, bei dem es sich um einen Anti-Ferrocenium-Antikörper oder Fragment davon handelt, der/das die Redoxaktivität von daran gebundenem Ferrocenium weitgehend oder vollständig unterbindet.

16. Bispezifisches Antikörper-Konjugat zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-13, umfassend einen Redoxmarker-Antikörper oder ein Fragment davon nach Anspruch 14 oder 15 sowie einen Anti-Analyt-Antikörper oder ein Fragment davon.
- 5

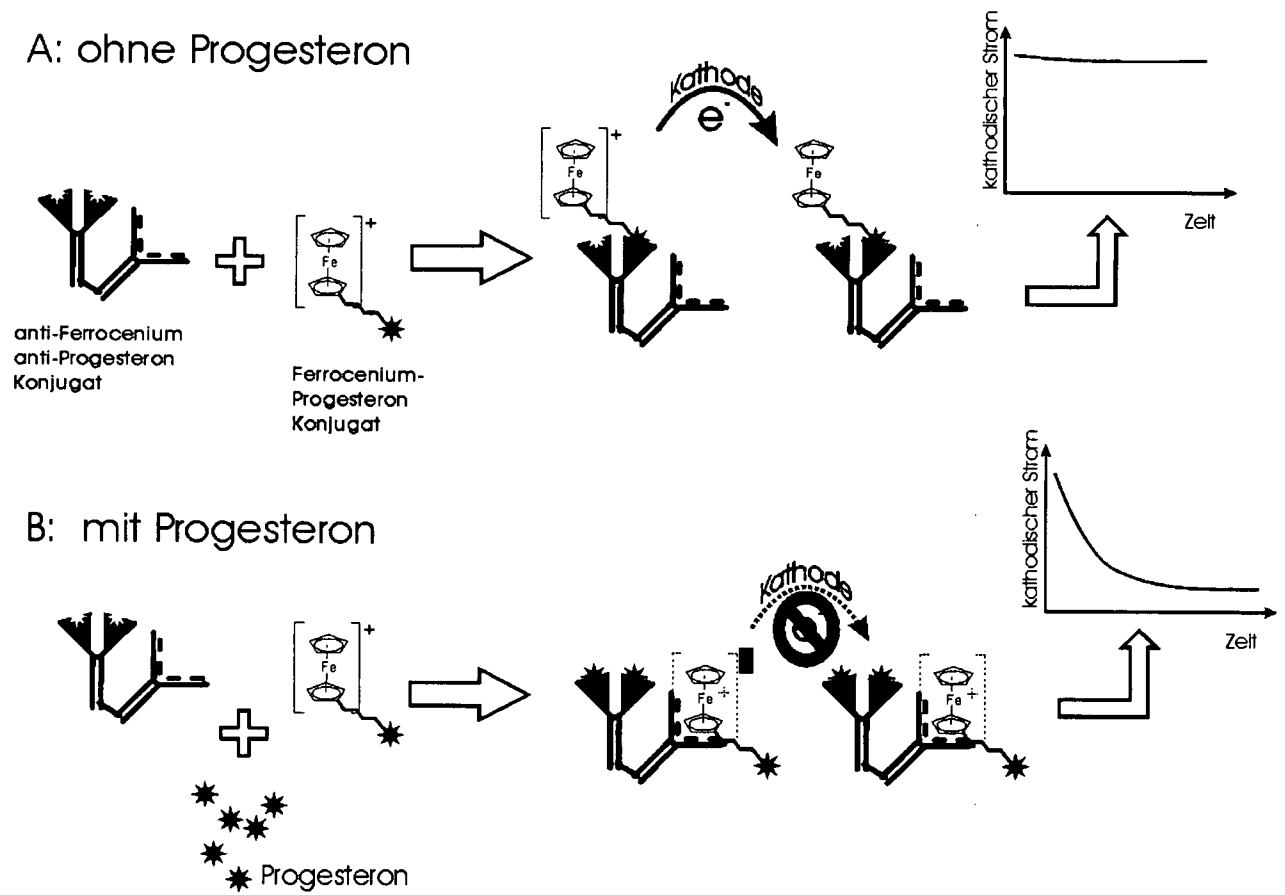


Fig. 1

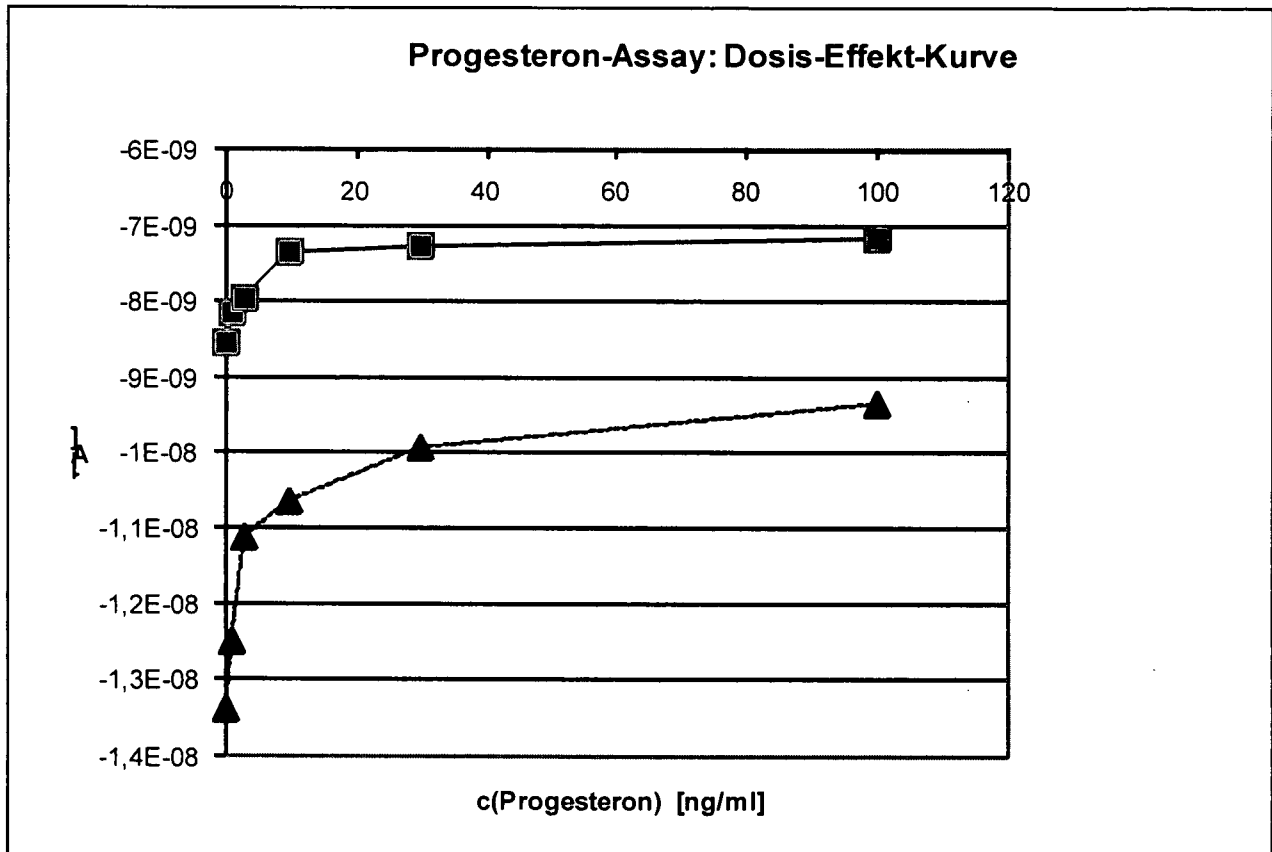


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/002586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/543 G01N33/74 G01N33/542
ADD.

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)
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, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 2004/020791 A1 (PORTER ROBERT ANDREW [GB] ET AL) 5 February 2004 (2004-02-05) the whole document insbesondere: examples 1,5 claims 1,8 figure 2</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	14-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 2011

Date of mailing of the international search report

26/08/2011

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Tuynman, Antonin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/002586

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GHINDILIS A L ET AL: "Nanomolar determination of the ferrocene derivatives using a recycling enzyme electrode: Development of a redox label immunoassay", ANALYTICAL LETTERS, vol. 28, no. 1, 1995, pages 1-11, XP008124810, ISSN: 0003-2719 the whole document insbesondere: page 2, line 1 - line 4 page 5, last paragraph - page 10, line 2 -----	14,15
X	SAPIN RÉMY ET AL: "Efficacy of a new blocker against anti-ruthenium antibody interference in the Elecsys free triiodothyronine assay.", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE : CCLM / FESCC 2007 LNKD- PUBMED:17378744, vol. 45, no. 3, 2007, pages 416-418, XP008124809, ISSN: 1434-6621 the whole document insbesondere: table 1 -----	14
A	FORROW NIGEL J ET AL: "Synthesis, characterization, and evaluation of ferrocene-theophylline conjugates for use in electrochemical enzyme immunoassay.", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 15, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 137-144, XP002593998, ISSN: 1043-1802 abstract -----	1-13
A	WEI M-Y ET AL: "Development of redox-labeled electrochemical immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons with controlled surface modification and catalytic voltammetric detection", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS 20090515 ELSEVIER LTD; ELSEVIER ADVANCED TECHNOLOGY; THE BOULEVARD GB, vol. 24, no. 9, 15 May 2009 (2009-05-15), pages 2909-2914, XP002593999, DOI: DOI:10.1016/J.BIOS.2009.02.031 abstract -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/002586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004020791	A1	05-02-2004	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N33/543 G01N33/74 G01N33/542
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>US 2004/020791 A1 (PORTER ROBERT ANDREW [GB] ET AL) 5. Februar 2004 (2004-02-05) das ganze Dokument insbesondere: Beispiele 1,5 Ansprüche 1,8 Abbildung 2</p> <p>----- -/-</p>	14-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. August 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/08/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Tuynman, Antonin

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GHINDILIS A L ET AL: "Nanomolar determination of the ferrocene derivatives using a recycling enzyme electrode: Development of a redox label immunoassay", ANALYTICAL LETTERS, Bd. 28, Nr. 1, 1995, Seiten 1-11, XP008124810, ISSN: 0003-2719 das ganze Dokument insbesondere: Seite 2, Zeile 1 - Zeile 4 Seite 5, letzter Absatz - Seite 10, Zeile 2	14,15
X	----- SAPIN RÉMY ET AL: "Efficacy of a new blocker against anti-ruthenium antibody interference in the Elecsys free triiodothyronine assay.", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE : CCLM / FESCC 2007 LNKD- PUBMED:17378744, Bd. 45, Nr. 3, 2007, Seiten 416-418, XP008124809, ISSN: 1434-6621 das ganze Dokument insbesondere: Tabelle 1	14
A	----- FORROW NIGEL J ET AL: "Synthesis, characterization, and evaluation of ferrocene-theophylline conjugates for use in electrochemical enzyme immunoassay.", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 15, Nr. 1, Januar 2004 (2004-01), Seiten 137-144, XP002593998, ISSN: 1043-1802 Zusammenfassung	1-13
A	----- WEI M-Y ET AL: "Development of redox-labeled electrochemical immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons with controlled surface modification and catalytic voltammetric detection", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS 20090515 ELSEVIER LTD; ELSEVIER ADVANCED TECHNOLOGY; THE BOULEVARD GB, Bd. 24, Nr. 9, 15. Mai 2009 (2009-05-15), Seiten 2909-2914, XP002593999, DOI: DOI:10.1016/J.BIOS.2009.02.031 Zusammenfassung -----	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/002586

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der
Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

US 2004020791 A1 05-02-2004 KEINE
