



(19)  
**Bundesrepublik Deutschland**  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 10 2006 009 516 B4 2007.12.06**

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 009 516.2**  
 (22) Anmeldetag: **28.02.2006**  
 (43) Offenlegungstag: **30.08.2007**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **06.12.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/58 (2006.01)**  
**G01N 33/543 (2006.01)**  
**G01N 33/52 (2006.01)**  
**C12Q 1/68 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**ANALYTICON Biotechnologies AG, 35104**  
**Lichtenfels, DE**

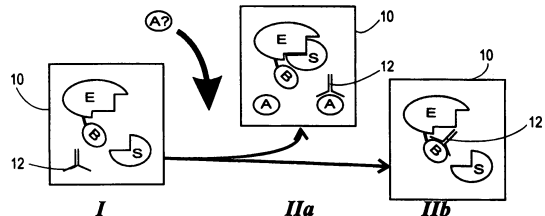
(74) Vertreter:  
**Fiedler, Ostermann & Schneider, 37073 Göttingen**

(72) Erfinder:  
**Lopez-Calle, Eloisa, Dr., 35066 Frankenberg, DE;**  
**Oberstraß, Jürgen, Dr., 34317 Habichtswald, DE;**  
**Siekmann, Werner, Dr., 35104 Lichtenfels, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
 gezogene Druckschriften:  
**DE 698 28 642 T2**  
**US 61 77 281 B1**  
**US 53 32 679**  
**US 38 17 837**  
**EP 02 91 194 B2**  
**WO 91/05 262 A1**

(54) Bezeichnung: **Testvorrichtung, Herstellungsverfahren dafür und Testverfahren**

(57) Zusammenfassung: Testvorrichtung zum Nachweis eines in einer Probenflüssigkeit enthaltenen Analyten (A), umfassend einen trockenen porösen Träger (10), auf dem in einer Reaktionszone (20) ein selektiver Binder (12) angeordnet ist, der in der Lage ist, nach Befeuchtung des Trägers (10) mit der Probenflüssigkeit den Analyten (A) selektiv zu binden, wobei in der Reaktionszone (20) weiter angeordnet sind:  
 ein Komplex, gebildet aus einem Biomarker (B) und dem ersten, komplexierten Reporterpartner eines zur Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals wechselwirkenden Reporterpaares aus Reporterenzym (E) und Reportersubstrat (S),  
 sowie der zweite, freie Reporterpartner des Reporterpaares,  
 wobei der Biomarker (B) hinsichtlich der Selektivität der Bindungsfähigkeit des selektiven Binders (12) dem Analyten (A) äquivalent und zu diesem kompetitiv ist und wobei eine Bindung des selektiven Binders (12) mit dem komplexierten Biomarker (B) die Wechselwirkung zwischen dem komplexierten und dem freien Reporterpartner behindert.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf eine Testvorrichtung zum Nachweis eines in einer Probenflüssigkeit enthaltenen Analyten (A), umfassend einen trockenen porösen Träger (10), auf dem in einer Reaktionszone angeordnet sind:

ein selektiver Binder (12), der in der Lage ist, nach Befeuchtung des Trägers (10) mit der Probenflüssigkeit den Analyten (A) selektiv zu binden,  
 ein Komplex, gebildet aus einem Biomarker (B) und dem ersten, komplexierten Reporterpartner eines zur Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals wechselwirkenden Reporterpaares aus Reporterenzym (E) und Reportersubstrat (S),  
 sowie der zweite, freie Reporterpartner des Reporterpaares,  
 wobei der Biomarker (B) hinsichtlich der Selektivität der Bindungsfähigkeit des selektiven Binders (12) dem Analyten (A) äquivalent und zu diesem kompetitiv ist.

**[0002]** Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Verfahren zum Herstellen einer Testvorrichtung sowie ein Verfahren zum Durchführen eines Nachweises eines Analyten in einer flüssigen Probe.

**[0003]** Eine häufig eingesetzte Testvorrichtung ist allgemein unter der Bezeichnung "Lateral-Flow"-Test bekannt und insbesondere beschrieben in der EP 0 291 194 B2. Bei dem Lateral-Flow-Test handelt es sich um einen trockenen, porösen Träger, auf dem in einer so genannten Startzone ein spezifisches Bindungsreagenz, z.B. ein spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen den Analyten, aufgetrocknet ist. Der Antikörper ist mit einem Markierungspartikel, z.B. einem Gold- oder Latexpartikel markiert. Er ist so auf den Träger aufgetrocknet, dass er im trockenen Zustand des Trägers an dessen Oberfläche fixiert ist und sich im feuchten Zustand des Trägers frei in diesem bewegen kann. Zur Anwendung des Tests wird eine mutmaßlich den Analyten enthaltende Probenflüssigkeit in der Startzone appliziert. In der Probenflüssigkeit enthaltener Analyt bindet mit dem markierten Antikörper und wird zusammen mit diesem aufgrund von Kapillarkräften aus der Startzone entlang der Längserstreckung des Trägers transportiert. In einer stromabwärts der Startzone gelegenen Detektionszone ist ein ebenfalls für den Analyten spezifisches Bindungsreagenz dauerhaft immobilisiert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um einen weiteren Antikörper, der spezifisch gegen ein anderes Epitop des Analyten als der markierte Antikörper gerichtet ist. Der Detektionsantikörper ist so an die Oberfläche des Trägers gebunden, dass er auch im feuchten Zustand des Trägers in der Detektionszone fixiert bleibt. Gelangt der mit dem markierten Antikörper gekoppelte Analyt in die Detektionszone, bindet er in einer so genannten Sandwich-Reaktion mit dem immobilisierten Antikörper, was zu einer dauerhaften

Anfärbung der Detektionszone aufgrund der Partikelmarkierung führt. Ist kein Analyt in der Probenflüssigkeit enthalten, erfolgt keine Bindung zwischen den beiden beteiligten Antikörpern, so dass der markierte Antikörper durch die Detektionszone hindurchläuft und sich keine Anfärbung der Detektionszone einstellt.

**[0004]** Der Test ist für eine Vielzahl von Analyten einsetzbar. Von besonderer Bedeutung ist seine Verwendung als Schwangerschaftstest zum Nachweis von hCG.

**[0005]** Ein weiterer Lateral-Flow-Test ist aus der US 6,177,281 B1 bekannt. In einer ersten von dem Analyten passierten Zone ist ein spezifisch bindender Antikörper immobilisiert. Stromabwärts ist ein zweiter, markierter Antikörper beweglich positioniert. Analytmoleküle, die die Immobilisierungszone passieren können, werden von den zweiten Antikörpern gebunden und laufen mit diesen in eine Detektionszone, in der sie zusammen mit den markierten Antikörpern von einer immobilisierten Detektionssubstanz festgehalten werden. Um eine quantitative Analyse zu ermöglichen, sind mehrere solcher Laufwege parallel zueinander angeordnet, wobei unterschiedliche Mengen erster, immobilisierter Antikörper verwendet werden.

**[0006]** Nachteilig bei diesen bekannten Testvorrichtungen ist ihre geringe Sensitivität gegenüber geringen Analytkonzentrationen. Jedes Analyt-Molekül trägt nämlich nur durch Bindung genau eines Markierungspartikels zur Anfärbung der Detektionszone bei. Für Tests, bei denen Analyten nachgewiesen werden müssen, die nur in geringen Konzentrationen vorliegen, ist die bekannte Testvorrichtung daher ungeeignet.

**[0007]** Aus der US 3,817,837 ist ein enzymatisch verstärktes Nachweisverfahren für einen Analyten in einer Probenflüssigkeit bekannt. Dieses Verfahren umfasst zunächst die Schritte des Bereitstellens der folgenden Reaktionselemente:

- Ein selektiver Binder, der in der Lage ist, den Analyten selektiv zu binden.
- Ein Komplex, gebildet aus einem Biomarker und dem ersten, komplexierten Reporterpartner eines zur Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals wechselwirkenden Reporterpaares aus Reporterenzym und Reportersubstrat. Der Biomarker ist dabei eine Substanz, die hinsichtlich der Selektivität der Bindungsfähigkeit des selektiven Binders dem Analyten äquivalent ist. Dies schließt die Möglichkeit ein, Analytmoleküle selbst als Biomarker zu verwenden.
- Der zweite, freie Reporterpartner des Reporterpaares.

**[0008]** Als Reporterpaar wird eine Paarung von En-

zym und zugeordnetem Substrat bezeichnet, wobei eine enzymatische Umsetzung des Reportersubstrats durch das Reporterenzym zu einem optisch detektierbaren Signal, z.B. zu einer Anfärbung, führt. Der Komplex aus Biomarker und erstem Reporterpartner ist so beschaffen, dass eine Bindung des selektiven Binders mit dem Biomarker die enzymatische Umsetzung des Reportersubstrats durch das komplexierte Reporterenzym behindert, d.h. in ihrer Effizienz reduziert oder vollständig unterbindet. Bei dem bekannten Verfahren werden sämtliche Reaktions-elemente zusammen mit der zu analysierenden Probenflüssigkeit in vorgegebener Reihenfolge und in vorgegebenen Mengen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Ist in der Probenflüssigkeit Analyt enthalten, konkurrieren die Analyt-Moleküle mit den Biomarker-Molekülen um Bindungsstellen des selektiven Binders. Je mehr Analyt in der Probenflüssigkeit enthalten ist, desto kleiner wird die Anzahl der Biomarker/Reporterpartner-Komplexe, die mit einem selektiven Binder-Molekül gekoppelt sind; umso geringer fällt also die Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen Reporterenzym und Reportersubstrat aus, was zu einem entsprechend stärkeren optisch detektierbaren Signal führt.

**[0009]** Dieses bekannte Verfahren ist zwar sehr sensitiv, da es zum einen einen kompetitiven Ansatz wählt und zum anderen einen Verstärkungseffekt zeigt, da jedes Analyt-Molekül zu einer Vielzahl von Substratumsetzungen beiträgt; seine Anwendung ist jedoch kompliziert und hängt von der korrekten Einhaltung der vorgegebenen Pipettier-Reihenfolge und den vorgegebenen Pipettier-Mengen ab. Ein solcher Test kann nur von geschultem Personal unter Laborbedingungen ausgeführt werden. Für den Hausgebrauch durch Laien oder in Notfallsituationen unter Zeitdruck und ohne optimale technische Ausrüstung ist das bekannte Verfahren nicht einsetzbar.

**[0010]** Aus der gattungsbildenden DE 698 28 642 T2 ist eine Testvorrichtung bekannt, die in der Reaktionszone eines festen Trägers zwei räumlich getrennte Oberflächen aufweist. Auf einer ersten Oberfläche ist ein für den Analyten spezifischer Antikörper immobilisiert, an den ein Komplex aus einem zu dem Analyten äquivalenten Biomarker und einem ersten Partner eines Reporterpaars gebunden ist. Der zweite Partner des Reporterpaars ist auf der zweiten Oberfläche immobilisiert. Nach Zugabe von den Analyten enthaltender Flüssigkeit verdrängt der Analyt den Komplex kompetitiv von seiner Bindungsstelle an dem Antikörper. Der Komplex wird dann von dem an der zweiten Oberfläche immobilisierten zweiten Partners des Reporterpaars abgefangen, wobei eine Wechselwirkung zwischen den Reporterpartnern zu einem detektierbaren Signal führt. Obgleich die genannte Druckschrift als Reporterpaar u.a. ein Enzym/Substrat-System vorschlägt, werden nicht die oben erläuterten Vorteile der enzymatischen Verstär-

kung genutzt, da die Immobilisierung des Komplexes durch den abfangenden, zweiten Partner an der zweiten Oberfläche eine mehrfache Signalgebung verhindert. Zudem ist der Aufbau der Vorrichtung, die zwei getrennte aber nah beieinander liegende Oberflächen verlangt, aufwendig und daher teuer.

**[0011]** Eine ähnliche Testvorrichtung ist auch aus der WO 91/05262 bekannt. Auch hier umfasst die Vorrichtung einen in einer ersten Zone immobilisierten Binder, an den ein dem Analyten äquivalenter Biomarker, der mit einem signalgebenden Molekül komplexiert ist, gebunden ist. Nach kompetitiver Verdrängung des Komplexes durch Zugabe von Analyt wird der Komplex in einer zweiten Zone an einem dort immobilisierten zweiten Binder gebunden. Die Bindung des Komplexes in der ersten und der zweiten Zone wirken unterschiedlich auf das Signalgebungsvermögen des Komplexes, sodass das Vorliegen von Analyt in der Probe durch Entstehung oder Vernichtung des Signals nachgewiesen werden kann.

**[0012]** Die US 5,332,679 offenbart einen nicht-kompetitiven Test.

**[0013]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine gattungsgemäße Testvorrichtung derart weiterzubilden, dass sensitivere Messungen durchführbar werden.

**[0014]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein kostengünstiges Herstellungsverfahren für eine derartige Testvorrichtung anzugeben.

**[0015]** Es ist schließlich eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Testverfahren anzugeben, das einfach anwendbar und gleichzeitig hoch sensitiv ist.

**[0016]** Die erstgenannte Aufgabe wird in Verbindung mit den Merkmalen des Oberbegriffs von Anspruch 1 dadurch gelöst, dass eine Bindung des selektiven Binders mit dem komplexierten Biomarker die Wechselwirkung zwischen dem komplexierten und dem freien Reporterpartner sterisch oder allosterisch behindert.

**[0017]** Die zweitgenannte Aufgabe wird mit den Merkmalen des Oberbegriffs von Anspruch 30 gelöst.

**[0018]** Die drittgenannte Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 50 gelöst.

**[0019]** Grundidee der vorliegenden Erfindung ist es, ein dem bekannten Nachweisverfahren vergleichbares, hochsensitives Testverfahren mit den Handhabungsvorteilen des Lateral-Flow-Tests zu kombinieren. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung noch eine Vereinfachung gegenüber der Handha-

bung und der Herstellung des Lateral-Flow-Tests dar, indem sämtliche Reaktionselemente in einer einzigen Reaktionszone angeordnet sind. Dem Anwender bleibt zum einen Wartezeit erspart, zum anderen fällt auch die Unsicherheit weg, ob ein scheinbar negatives Testergebnis eventuell auf eine Unterbrechung von Kapillarströmungen zurückzuführen ist. Bei dem bekannten Lateral-Flow-Test wird zu diesem Zweck eine eigene Kontrollzone vorgeschlagen, die die Herstellung des Tests erheblich verkompliziert und damit verteuert. Außerdem wird die Handhabung deutlich erleichtert, so dass das Fehlerpotential insbesondere im Hinblick auf falsch-negative Ergebnisse, die bei dem bekannten Lateral-Flow-Test z.B. bei versehentlicher Benetzung der Detektionszone mit Probenflüssigkeit auftreten, wesentlich reduziert wird.

**[0020]** Wie erwähnt, kann der Biomarker der Analyt selber sein. Dies stellt die größtmögliche Äquivalenz bezüglich der Bindung des selektiven Binders mit dem in der Probenflüssigkeit vorliegenden Analyten sicher, kann jedoch im Hinblick auf die Synthese des Komplexes schwierig und teuer sein. Häufig ist es daher günstiger, statt des Analyten ein Fragment des Analyten als Biomarker zu verwenden. Dabei handelt es sich vorzugsweise um dasjenige Fragment, mit welchem der selektive Binder bei seiner Bindung mit dem Analyten in Wechselwirkung tritt. Als weitere Alternative können Substanzen verwendet werden, die Abschnitte aufweisen, welche der Bindungsstelle des Analyten für den selektiven Binder entsprechen oder ihr ähnlich sind. Wichtig ist, dass der komplexierte Biomarker und der freie Analyt für den selektiven Binder im Wesentlichen ununterscheidbar sind, so dass eine echte Kompetitivität zwischen komplexiertem Biomarker und Analyt besteht.

**[0021]** Entsprechend der Vielzahl möglicher Analyten sind auch die Möglichkeiten der Gestaltung des Biomarkers weit gefächert. Es kann sich dabei insbesondere um eine Nukleinsäure, ein Protein, ein Peptid, eine niedermolekulare organische Verbindung, ein Kohlenhydrat oder eine Kombination hieraus handeln.

**[0022]** Die Kopplung des Biomarkers zu einem Komplex kann alternativ mit dem Reporterenzym oder Reportersubstrat erfolgen. Als besonders günstig hat sich die Kopplung des Biomarkers mit dem Reporterenzym zu dem Komplex erwiesen, da hierbei zur Behinderung der enzymatischen Umsetzung des Substrates sowohl sterische als auch allosterische Effekte genutzt werden können. Als geeignete Reporterenzyme sind beispielsweise alkalische Phosphatase, Peroxidase, Glucose-Oxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Maltatdehydrogenase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase oder Lysozym geeignet. Je nach konkreter Wahl des Reporterenzym hat der Fachmann als Reportersubstrat das für das jeweilige Enzym "passende" Substrat zu wählen.

**[0023]** Bei einer besonderen Variante des erfindungsgemäßen Tests ist das Reporterenzym aus wenigstens zwei Untereinheiten aufgebaut, die einzeln enzymatisch nicht aktiv sind, und die auf dem trockenen, porösen Träger getrennt vorliegen. Wenigstens eine Untereinheit ist dabei nicht mit dem Biomarker komplexiert. Eine Bindung des selektiven Binders mit dem komplexierten Biomarker behindert bei dieser Ausführungsform die enzymatische Umsetzungsreaktion indirekt, indem ein Binden der Enzym-Untereinheiten zu einem aktiven Reporterenzym behindert wird. Diese Ausführungsform ist insbesondere im Hinblick auf eine einfache Herstellung des erfindungsgemäßen Tests vorteilhaft, wie weiter unten detailliert erläutert werden soll.

**[0024]** Günstigerweise wird die Kopplung der komplexierten Reaktionskomponenten untereinander, d.h. des Biomarkers mit dem komplexierten Reporterpartner, durch eine kovalente Bindung realisiert. Die kovalente Bindung hat zum einen den Vorteil großer Stabilität, insbesondere auch während des Kontaktes des Komplexes mit der Probenflüssigkeit; zum anderen stellt eine kovalente Bindung eine enge Nachbarschaft der komplexierten Komponenten sicher, was insbesondere eine sterische Inhibition der enzymatischen Reaktion durch den selektiven Binder begünstigt. Alternativ können jedoch auch andere Komplexbildungsmechanismen angewandt werden.

**[0025]** Als selektiver Binder sind insbesondere ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein proteingener Binder oder ein auf Nukleinsäuren basierender Binder, insbesondere ein so genanntes Aptamer, geeignet. Die Größe des selektiven Binders ist dabei nicht auf die zum Eingehen der selektiven Bindung mit dem Biomarker bzw. dem Analyten erforderliche Struktur beschränkt; vielmehr kann der selektive Binder ein großvolumiges Molekül sein oder mit einem großvolumigen Molekül gekoppelt sein, welches mit dem Biomarker/Reporterpartner-Komplex in einer die enzymatische Reaktion behindernde Weise wechselwirkt.

**[0026]** Günstigerweise liegt der selektive Binder auf dem trockenen, porösen Träger in mit dem Biomarker gebundener Form vor. Dies ist, wie weiter unten erläutert werden soll, für die Herstellung der erfindungsgemäßen Testvorrichtung besonders vorteilhaft. Aus biochemischer Sicht kann dies jedoch nachteilig sein, da sich die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem Analyten und dem komplexierten Biomarker in Bezug auf die Bindung mit selektiven Bindern verzögern kann, was die Testdauer nachteilig verlängern würde. In dieser Hinsicht günstiger kann es daher sein, wenn der selektive Binder auf dem trockenen, porösen Träger separat von dem komplexierten Biomarker vorliegt. Bei dieser Variante starten der Biomarker und der Analyt ihre Konkurrenz um Bindungsstellen des selektiven Binders aus der

gleichen Ausgangssituation. Ein Gleichgewicht kann sich daher schneller einstellen. Dies trifft insbesondere zu, wenn zwischen dem selektiven Binder und dem Analyten bzw. dem Biomarker eine stabile oder gar irreversible Bindung etabliert wird.

**[0027]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass ein Reaktionselement der Gruppe aus selektivem Binder, Komplex und zweitem Reporterpartner auf dem porösen Träger oder einem auf dem porösen Träger festgelegten Zwischenträger immobilisiert ist, so dass es auch im feuchten Zustand des porösen Trägers in der Reaktionszone räumlich fixiert ist. Diese Variante der erfindungsgemäßen Testvorrichtung bietet zwei Vorteile. Zum einen wird ein "Ausbluten" der Komponenten aus der Reaktionszone vermieden. Zum anderen hat sich herausgestellt, dass, insbesondere wenn der selektive Binder das immobilisierte Reaktionselement ist, die Behinderung der enzymatischen Umsetzung des Reportersubstrates deutlich effizienter erfolgt als in dem Fall, in dem sämtliche Reaktionselemente im porösen Träger frei beweglich sind. Als Grund hierfür wird die Einschränkung der räumlichen Freiheitsgrade durch die Immobilisierung angenommen durch welche die Reporterpartner in ihren Möglichkeiten einer z.B. sterischen Inhibition auszuweichen, eingeschränkt werden. Es hat sich erwiesen, dass eine Immobilisierung, insbesondere des selektiven Binders auf einem Zwischenträger, z.B. einem Glas-, Latex- oder Kunststoff-Bead, zu einem ähnlichen Effekt führt, wie die Immobilisierung auf der Oberfläche des porösen Trägers selbst. Die Verwendung eines Zwischenträgers kann in Bezug auf das Herstellungsverfahren günstig sein, da die Herstellung z.B. von Antikörpern auf Beads allgemein bekannt ist und eine mechanische Fixierung der Beads auf dem porösen Träger keine technischen Schwierigkeiten darstellt.

**[0028]** Vorzugsweise ist das immobilisierte Reaktionselement durch eine kovalente Bindung auf dem porösen Träger oder dem Zwischenträger fixiert. Dies führt zu einer besonders stabilen Immobilisierung. Dabei kann die kovalente Bindung zwischen dem Reaktionselement und einer reaktiven Gruppe auf der Oberfläche des porösen Trägers oder des Zwischenträgers ausgebildet sein. Als reaktive Gruppen sind insbesondere ein Säureester, ein Säureanhydrid, ein Säurehalogenid, ein Imid, ein Imidylester, ein Carboxyl, ein Halogencarbonamid, ein Sulfonylhalogenid, ein Isothiocyanat, ein Thiol, ein Pyrimidylsulfid, ein Halogenacetyl, ein Hydroxyl, ein Halogenalkyl, ein Phosphoramidit, ein Amin, ein Hydrazid, ein Azid, ein Aryldiazo, ein Nitren, ein Aldehyd und/oder ein Keton geeignet.

**[0029]** Dabei können zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und der reaktiven Gruppe eine oder mehrere Linkerverbindungen geschaltet sein.

Als Linkerverbindungen sind u.a. insbesondere eine Polyoxyalkyleinheit, eine aliphatische, eine cykloaliphatische und/oder eine aromatische Einheit, jeweils substituiert oder nicht substituiert, geeignet.

**[0030]** Alternativ zur kovalenten Bindung kann vorgesehen sein, dass das immobilisierte Reaktionselement durch eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen Paaren von Brücksubstanzen auf dem porösen Träger oder einem auf dem porösen Träger festgelegten Zwischenträger fixiert ist. Als Brücksubstanzen sind beispielsweise komplementäre Nukleinsäurestränge, Streptavidin/Biotin, Avidin/Biotin, Streptavidin/Streptag, MBP/Maltose, ProteinA-IgG/Antikörper, Hexa-His-Tag/NTA, Hexa-His-Tag/Anti-His-Antikörper, Digoxigenin/Anti-Digoxigenin-Antikörper und/oder GST/Glutathion geeignet.

**[0031]** Auch bei dieser Variante kann die Verwendung einer oder mehrerer Linkerverbindungen vorgesehen sein, die vorzugsweise zwischen dem porösen Träger oder dem Zwischenträger und den mit ihm gekoppelten Partner des Paares von Brücksubstanzen geschaltet sind. Als Linkerverbindungen sind u.a. die bereits oben im Zusammenhang mit der kovalenten Bindung des immobilisierten Reaktionselementes genannten geeignet.

**[0032]** Vorzugsweise besteht der poröse Träger aus Kunststoff wie etwa Polystyrol oder Polyester, Papier oder einem anderen Zellulosederivat, Glas, Metall, Silizium, Keramik oder einem Verbundmaterial hieraus.

**[0033]** Der poröse Träger ist vorzugsweise flächig ausgebildet, kann jedoch auch als dreidimensionaler, insbesondere sphärischer Träger ausgebildet sein. Bei beiden Varianten kann der Träger in einer vorteilhaften Ausführungsform an einer stabförmigen Haltevorrichtung angebracht sein. Mit einer solchen Vorrichtung ist es möglich, zur Applikation der Probenflüssigkeit in der Reaktionszone den Träger selbst in die Probenflüssigkeit zu tauchen.

**[0034]** Wie nachfolgend im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren eingehender erläutert werden soll, kann die Gefahr bestehen, dass einige Reaktionselemente vorzeitig miteinander reagieren. Bei einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist daher vorgesehen, dass wenigstens ein Reaktionselement der Gruppe aus selektivem Binder, Komplex und zweitem Reporterpartner gekapselt auf dem porösen Träger vorliegt. Das gekapselte Reaktionselement kann beispielsweise in Kapseln aus Dextran oder aus Gelatine und/oder in Liposom-Vesikeln eingeschlossen sein. Kapseln aus Dextran oder Gelatine bieten sich insbesondere bei Einrichtungen des erfindungsgemäßen Tests zur Untersuchung wässriger Probenflüssigkeiten an. Bei

Kontakt mit der wässrigen Probenflüssigkeit lösen sich solche Kapseln nämlich auf und geben das gekapselte Reaktionselement frei. Analoges gilt für Kapselung in Liposom-Vesikeln, wenn die Probenflüssigkeit auf organischen Lösungsmitteln basiert.

**[0035]** Als zu kapselndes Reaktionselement kommen insbesondere der selektive Binder und/oder der Komplex in Frage. In einem solchen Fall wird eine vorzeitige Bindung zwischen selektivem Binder und komplexiertem Biomarker zuverlässig verhindert.

**[0036]** Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist die gemeinsame Reaktionszone in eine Mehrzahl benachbarter Subzonen aufgeteilt, von denen jede ein oder mehrere Reaktionselemente der Gruppe aus selektivem Binder, Komplex und zweitem Reporterpartner trägt. Eine einzelne Subzone kann dabei als eine das zugeordnete Reaktionselement bzw. mehrere zugeordnete Reaktionselemente einschließende Gelatineschicht ausgebildet sein. Die Gelatineschichten können über- oder nebeneinander in der gemeinsamen Reaktionszone angeordnet sein. Der dieser Ausführungsform zugrunde liegende Gedanke ist wiederum eine Verhinderung einer vorzeitigen Reaktion mehrerer Reaktionselemente untereinander. Dabei wird es als besonders günstig angesehen, den selektiven Binder und den Komplex in unterschiedlichen Subzonen anzuordnen. Alternativ zur Verwendung einer wasserlöslichen Gelatineschicht können Subzonen auch als das zugeordnete Reaktionselement bzw. die zugeordneten Reaktionselemente einschließende, flüssigkeitspermeable Filme ausgebildet sein. Solche Filme lösen sich bei Kontakt mit der Probenflüssigkeit nicht auf; die erlauben jedoch ein Ausschwemmen der in ihnen enthaltenen Reaktionselemente, so dass diese gemeinsam reagieren können. Alternativ können die Subzonen auch als Papierschichten ausgebildet sein, die mit dem bzw. den zugeordneten Reaktionselement(en) imprägniert sind.

**[0037]** Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Testvorrichtung ist vorgesehen, zunächst, wie aus dem eingangs erläuterten Nachweisverfahren nach dem Stand der Technik bekannt, alle Reaktionselemente, d.h. den selektiven Binder, den Komplex aus Biomarker und erstem Reporterpartner sowie den zweiten Reporterpartner bereitzustellen. Anstatt diese Reaktionselemente jedoch in Lösung vorzuhalten und bei Bedarf in vorgeschriebenen Mengen und vorgeschriebener Reihenfolge zu pipettieren, ist erfindungsgemäß vorgesehen, diese auf einem trockenen, porösen Träger in einer gemeinsamen Reaktionszone auszubringen, so dass sie im trockenen Zustand des Trägers auf diesem fixiert und wenigstens zwei der Reaktionselemente im durch Aufbringen der flüssigen Probe feuchten Zustand des porösen Trägers in diesem frei beweglich sind. Eine Aufbringung von Reaktionselementen auf einem porösen Träger,

so dass sie dort entweder dauerhaft immobilisiert oder lediglich im trockenen Zustand fixiert und im feuchten Zustand des Trägers frei beweglich sind, ist technisch auf verschiedene, dem Fachmann teils bekannte, teils jedoch auch neuartige Weise machbar. Allerdings wurde eine entsprechende Aufbringung bislang nicht realisiert, weil Vorurteile der Fachwelt in Bezug auf eine unvermeidbare, vorzeitige Reaktion einzelner Komponenten miteinander dem entgegenstanden. Insbesondere muss eine vorzeitige Umsetzung des Reportersubstrates durch das Reporterenzym verhindert werden. Auch ist es bei manchen Anwendungen erforderlich, den selektiven Binder und den komplexierten Biomarker getrennt zu halten, um bei Anwendung des Tests eine gleichberechtigte Konkurrenzsituation zwischen dem Analyten und dem komplexierten Biomarker zu schaffen, was im Hinblick auf die Testdauer vorteilhaft sein kann.

**[0038]** Bei einer günstigen Variante des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens ist vorgesehen, dass der Schritt des Aufbringens mehrere Teilschritte des Benetzens des porösen Trägers mit Lösungen, die jeweils ein oder mehrere in Lösungsmittel gelöste Reaktionselemente enthalten, sowie wenigstens einen nachfolgenden Teilschritt des Trocknens umfasst. Dabei ist vorgesehen, dass in einem zeitlich früheren Teilschritt eine das Reporterenzym enthaltende, stärker polare Lösung und in einem zeitlich späteren Teilschritt eine das Reportersubstrat enthaltende, schwächer polare Lösung verwendet wird. Die Benetzung des porösen Trägers kann beispielsweise durch Tränken, Aufsprühen oder Aufdrucken erfolgen. Die Benetzungsschritte erfolgen somit sukzessive und mit absteigender Polarität. Dies hat zur Folge, dass zunächst das in wässriger Umgebung aktive und gut lösliche Enzym auf den porösen Träger aufgebracht wird.

**[0039]** Vorzugsweise erfolgt unmittelbar nach der Aufbringung ein Trockenschritt, so dass das Enzym z.B. durch Adhäsionskräfte an den porösen Träger gekoppelt wird.

**[0040]** Wird in einem nachfolgenden Schritt das Reportersubstrat in wenig oder unpolare Lösung, z.B. Toluol, aufgebracht, kann das nur in wässriger Lösung aktive Reporterenzym das Reportersubstrat nicht umsetzen. In einem anschließenden Trocknungsschritt wird dann auch das Reportersubstrat beispielsweise durch Adhäsionskräfte am porösen Träger fixiert.

**[0041]** In ähnlicher Weise kann mit dem selektiven Binder verfahren werden, sofern dieser nicht zusammen mit dem Komplex, ggf. bereits an diesen gebunden, aufgebracht wird.

**[0042]** Bei einer besonders vorteilhaften Wahl der Reaktionselemente, bei der die enzymatische Um-

setzung des Reportersubstrats durch die Bindung des selektiven Binders mit dem Komplex aus Biomarker und erstem Reporterpartner vollständig oder nahezu vollständig unterbunden wird, ist auch ein einstufiges Herstellungsverfahren möglich, bei dem eine alle Reaktionselemente enthaltende Lösung in der Reaktionszone, z.B. durch Tränken, Aufsprühen oder Aufdrucken aufgetragen wird.

**[0043]** Die Fixierung der Reaktionselemente durch reine Trocknung wird in der Regel dazu führen, dass die so fixierten Reaktionselemente im feuchten Zustand des porösen Trägers in diesem frei beweglich sind. Da es sich jedoch, wie zuvor bereits erläutert, als vorteilhaft erwiesen hat, insbesondere den selektiven Binder fest an einer Matrix zu immobilisieren, so dass er auch im feuchten Zustand des porösen Trägers räumlich fixiert bleibt, ist bei einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens vorgesehen, dass die Immobilisierung durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und dem porösen Träger oder einem Zwischenträger erfolgt. Dies kann direkt oder indirekt über reaktive Gruppen auf der Oberfläche des porösen Trägers sowie mit oder ohne Schaltung einer oder mehrerer Linkerverbindungen zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und der reaktiven Gruppe erfolgen. Zur günstigen Wahl reaktiver Gruppen bzw. Linkerverbindungen wird auf die obige Erläuterung der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwiesen.

**[0044]** Alternativ zur Immobilisierung durch kovalente Bindung kann vorgesehen sein, dass die Immobilisierung durch eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen Paaren von Brückensubstanzen erfolgt, wobei jeweils ein Partner des Paares von Brückensubstanzen mit dem Reaktionselement und der andere Partner mit dem porösen Träger oder Zwischenträger gekoppelt wird. Auch hier kann die Schaltung einer oder mehrerer Linkerverbindungen, insbesondere zwischen dem porösen Träger oder dem Zwischenträger und dem mit ihm gekoppelten Partner des Paares von Brückensubstanzen vorgesehen sein. Bezüglich der günstigen Wahl von Brückensubstanzen bzw. Linkerverbindungen wird auf die obige Erläuterung der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwiesen.

**[0045]** Alternativ oder zusätzlich zu der Aufbringung durch Benetzungsschritte mit Lösungen abnehmender Polarität kann bei einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens vorgesehen sein, dass vor dem Schritt des Aufbringens wenigstens eines der Reaktionselemente gekapselt wird. Hierzu kann das bzw. die zu kapselnden Reaktionselemente in Kapseln aus Dextran oder Gelatine und/oder in Liposom-Vesikeln eingeschlossen werden. Hierdurch kann ebenfalls eine vorzeitige, unerwünschte Reaktion einzelner Reaktionselemente

miteinander verhindert werden. Je nach Wahl des Kapselmaterials wird der Fachmann selbstverständlich darauf zu achten haben, dass bei der Aufbringung der Reaktionselemente auf den porösen Träger das verwendete Lösungsmittel die Verkapselung nicht angreift.

**[0046]** Alternativ oder zusätzlich zu der Verkapselung einzelner Reaktionselemente kann vorgesehen sein, dass der Schritt des Aufbringens das Auftragen einer Mehrzahl von Schichten in der gemeinsamen Reaktionszone umfasst, wobei jede Schicht ein oder mehrere Reaktionselemente enthält. Insbesondere die Einschließung des Reportersubstrates und des Reporterenzym in unterschiedlichen Schichten ist günstig, um eine vorzeitige enzymatische Umsetzung und damit eine Signalerzeugung bereits bei der Herstellung zu verhindern. Auch die Aufbringung des selektiven Binders in einer eigenen Schicht kann im Hinblick auf die Schaffung einer gleichwertigen Ausgangssituation für die Konkurrenz zwischen Analyt und komplexiertem Biomarker um Bindungen mit dem selektiven Binder wünschenswert sein. Die Schichten können über und/oder nebeneinander in der Reaktionszone angeordnet sein.

**[0047]** Beispielsweise können die Schichten als Gelatineschichten aufgetragen werden, die jeweils das bzw. die zugeordneten Reaktionselemente einschließen. Diese Variante ist besonders günstig, da dabei während des gesamten Herstellungsverfahrens auf wässriger Basis gearbeitet werden kann.

**[0048]** Alternativ können die Schichten auch als flüssigkeitspermeable Filme aufgetragen werden. Solche Filme lösen sich bei Kontakt mit der Probenflüssigkeit nicht notwendig auf, gestatten jedoch die Durchmischung der Reaktionselemente bei Benetzung mit der Probenflüssigkeit.

**[0049]** Zur Aufbringung solcher Filme, aber auch von Schichten aus Gelatine oder anderen Matrixmaterialien können aus der Fotoindustrie zur Herstellung von Colorfilmen bekannte Kaskadengussmaschinen verwendet werden. Solche Maschinen erzeugen in einem einstufigen Arbeitsschritt mehrschichtige Strukturen, wobei die einzelnen Schichten als hochviskose Gele aufgetragen werden, die unterschiedliche Füllstoffe – hier die unterschiedlichen Reaktionselemente – enthalten, wobei eine Durchmischung der Schichten aufgrund ihrer Viskosität unterbleibt. Optional kann die Schichtenstruktur einem nachfolgenden Trocknungsschritt unterworfen werden.

**[0050]** Alternativ können auch unterschiedliche Papierschichten in der Reaktionszone aufgetragen werden, die jeweils einzeln mit einem oder mehreren zugeordneten Reaktionselementen imprägniert sind. Bei dieser Variante des erfindungsgemäßen Herstel-

lungsverfahrens ist zwar eine größere Anzahl von Arbeitsschritten erforderlich; diese sind jedoch jeweils besonders einfach gestaltet, so dass insgesamt ein sehr kostengünstiges und technisch wenig aufwendiges Herstellungsverfahren realisiert wird.

**[0051]** Außer dem gleichen Aufbau aller Subzonen ist auch eine Kombination von Subzonen unterschiedlicher Natur möglich. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, die zu einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung führt geht aus von einer Papierschicht, die mit einem ersten Reaktionselement imprägniert ist. Die Imprägnierung kann z.B. durch Tränken, Aufsprühen oder Aufdrucken einer das erste Reaktionselement enthaltenden Lösung erfolgen. Vorzugsweise nach Trocknung der Papierschicht wird auf deren Oberseite eine ein zweites Reaktionselement enthaltende Schicht, z.B. eine Gelatineschicht oder ein flüssigkeitspermeabler Film, aufgetragen. Anschließend kann auf der Unterseite der Papierschicht eine weitere Schicht aufgetragen werden, die ein drittes Reaktionselement enthält. In besonderen Fällen kann das dritte Reaktionselement auch mit dem zweiten Reaktionselement identisch sein. Natürlich ist es auch möglich, die Oberseite und die Unterseite der Papierschicht simultan zu beschichten.

**[0052]** Die vorliegende Erfindung ermöglicht ein neues und besonders vorteilhaftes Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe. Dieses Testverfahren umfasst das Bereitstellen einer erfindungsgemäßen Testvorrichtung, das Befeuften der Reaktionszone mit der flüssigen Probe und, nach Ablauf einer vorgegebenen Reaktionszeit, das Detektieren des Vorliegens oder Nichtvorliegens einer durch die Umsetzungsreaktion der Reporterpartner erzeugten optischen Signals in der Reaktionszone. Dabei kann das Verfahren sowohl quantitativ als auch nicht-quantitativ angewendet werden, wobei zur quantitativen Bestimmung einer Analytkonzentration in der Probe ein gemessenes optisches Signal mit geeigneten Kalibrierwerten verglichen wird.

**[0053]** Die technische Realisierung der Signaldetektion hängt von der Natur des erzeugten Signals ab. Viele Enzym/Substrat-Paare, die zum Nachweis von Reaktionen verwendet werden, führen zu einer Anfärbung im Sinne einer Erhöhung der Absorption für Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs. Alternativ kann die enzymatische Umsetzung des Substrats auch zu einer Erzeugung bzw. Verstärkung oder zu einer Abschwächung eines Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzsignals führen. Je nach Art des optischen Signals sind dem Fachmann geeignete Detektionsmittel und -verfahren bekannt.

**[0054]** Weitere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachfolgen-

den, speziellen Beschreibung und den Zeichnungen.

**[0055]** Es zeigen

**[0056]** [Fig. 1](#): eine schematische Darstellung einer ersten biochemischen Variante der erfindungsgemäßen Testvorrichtung.

**[0057]** [Fig. 2](#): eine schematische Darstellung einer zweiten biochemischen Variante der erfindungsgemäßen Testvorrichtung.

**[0058]** [Fig. 3](#): eine schematische Darstellung einer dritten biochemischen Variante der erfindungsgemäßen Testvorrichtung.

**[0059]** [Fig. 4](#): eine schematische Darstellung einer vierten biochemischen Variante der erfindungsgemäßen Testvorrichtung.

**[0060]** [Fig. 5](#): eine erste Variante eines erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens.

**[0061]** [Fig. 6](#): eine zweite Variante eines erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens.

**[0062]** [Fig. 7](#): eine dritte Variante eines erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens.

**[0063]** [Fig. 8](#): eine schematische Schnittdarstellung einer ersten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

**[0064]** [Fig. 9](#): eine schematische Schnittdarstellung einer zweiten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

**[0065]** [Fig. 10](#): eine schematische Schnittdarstellung einer dritten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

**[0066]** Die [Fig. 1-Fig. 4](#) zeigen unterschiedliche Varianten eines mit der erfindungsgemäßen Testvorrichtung durchführbaren biochemischen Testverfahrens. Der Aufbau der Darstellung ist in allen vier Figuren derselbe. Teilbild I zeigt jeweils eine Ausgangssituation von Reaktionskomponenten, die auf einem trockenen, porösen Träger **10** fixiert sind. Teilbild IIa zeigt jeweils die Situation nach Zugabe einer analythaltigen Probenflüssigkeit. Teilbild IIb zeigt jeweils die Situation nach Zugabe einer analytfreien Probenflüssigkeit. Die Reaktionskomponenten sind ein Reporterenzym E, welches unter Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals ein Reportersubstrat S enzymatisch umsetzen kann. Eine weitere Reaktionskomponente ist ein selektiver Binder **12**, der beispielsweise als polyklonaler oder monoklonaler Antikörper, insbesondere als Fab-, Fab2-Fragment oder als ein anderer rekombinanter Antikörper, wie etwa ein "single chain"-Antikörper scFv ausgebildet sein



kann. Die Verwendung anderer selektiver Binder, wie etwa ein Aptamer ist ebenfalls möglich. Auch kann der selektive Binder **12** mit einem voluminösen Molekül derivatisiert sein, wobei das voluminöse Molekül gegen die enzymatische Wirkung des Enzyms E inert ist, jedoch für die erwünschte Behinderung der enzymatischen Umsetzung des Substrates S hilfreich ist. Das voluminöse Molekül kann beispielsweise ein synthetisches Polymer, ein Dendrimer, ein Naturstoff, eine Nukleinsäure, eine Peptidnukleinsäure (PNA), ein Peptid, ein Protein, ein Lipid oder ein Kohlenhydrat sein.

**[0067]** Alternativ oder zusätzlich kann auch das Reportersubstrat mit einem solchen voluminösen Molekül gekoppelt sein.

**[0068]** Schließlich ist als weitere Reaktionskomponente ein Biomarker B vorgesehen, der bezüglich seiner Bindungsfähigkeit mit dem selektiven Binder **12** dem Analyten A äquivalent ist. Insbesondere kann der Biomarker B selbst dem Analyten A entsprechen.

**[0069]** Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#) stellen jeweils einen typischen Testablauf dar, wobei in die Reaktionszone des in Teilbild I gezeigten porösen Trägers **10** eine Probenflüssigkeit, die mutmaßlich den Analyten A enthält, appliziert wird. Dies ist in den Zeichnungen durch "A?" angedeutet.

**[0070]** [Fig. 1](#) zeigt eine Ausführungsform, bei der der Biomarker B mit dem Substrat S komplexiert ist. Das heißt, es ist eine stabile und enge Bindung zwischen dem Biomarker B und dem Substrat S etabliert. Eine weitere Besonderheit der Ausführungsform von [Fig. 1](#) ist, dass der selektive Binder **12** im trockenen Zustand des porösen Trägers bereits mit dem komplexierten Biomarker B gebunden ist.

**[0071]** Bei Vorliegen von Analyt A in der applizierten Probenflüssigkeit konkurrieren Analyt-Moleküle mit Komplex-Molekülen um Bindungsstellen des selektiven Binders **12**. Dabei ist es erforderlich, dass die anfängliche Bindung des Binders mit dem Biomarker B reversibel ist. Bei Überschuss von Analyt A bindet der Binder **12** den Analyten A in großem Umfang, während er den komplexierten Biomarker B freigibt. Durch den Flüssigkeitseintrag werden das Enzym E und/oder der Komplex aus Biomarker B und Substrat S aufgeschwemmt, so dass wenigstens eines dieser Reaktionselemente im porösen Träger freibeweglich ist. Dadurch kommt es zu einer enzymatischen Umsetzung des Substrates S und in der Folge zu einem optisch detektierbaren Signal.

**[0072]** Der Fall, dass in der Probenflüssigkeit kein Analyt vorliegt, ist in Teilbild IIb von [Fig. 1](#) dargestellt. Hier werden zwar das Enzym E und/oder der Komplex durch den Flüssigkeitseintrag aufgeschwemmt, so dass wenigstens eines dieser Elemente im porösen

Träger freibeweglich ist; gleichwohl kommt es nicht zu einer enzymatischen Umsetzung des Substrates S, da eine Wechselwirkung zwischen dem Enzym E und dem komplexierten Substrat S durch den an den Biomarker gebundenen Binder **12** behindert wird. Im schematisch dargestellten Fall ist diese Behinderung eine vollständige Unterdrückung der enzymatischen Wirkung aufgrund einer sterischen Inhibition. Bei anderen Ausgestaltungen können auch allosterische Effekte benutzt werden. Insbesondere bei der sterischen Inhibition ist die zuvor erwähnte Derivatisierung des Binders **12** mit einem voluminösen Molekül hilfreich.

**[0073]** [Fig. 2](#) zeigt eine ähnliche Ausgangssituation wie [Fig. 1](#), jedoch mit dem Unterschied, dass der Binder **12** im trockenen Zustand des porösen Trägers separat von dem Biomarker B vorliegt. Dies hat den Vorteil, dass die kompetitive Reaktion von Analyt A und komplexiertem Biomarker B um die Bindungsstellen des selektiven Binders **12** von einer einheitlichen Ausgangssituation starten. Dies kann zu einer Beschleunigung der Einstellung des Gleichgewichtes und damit zu einer Verkürzung der Testdauer führen. Außerdem ist diese Variante auch geeignet, wenn die Bindung zwischen dem Binder **12** und dem Analyten bzw. dem Biomarker nicht oder nur wenig reversibel ist.

**[0074]** Die [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) zeigen eine andere grundlegende Variante der vorliegenden Erfindung, wobei der Biomarker B nicht mit dem Substrat S sondern mit dem Enzym E komplexiert ist. In [Fig. 2](#) ist der Binder **12** bereits im trockenen Zustand des porösen Trägers mit diesem Komplex gekoppelt, während er bei der Variante von [Fig. 4](#) im trockenen Zustand des porösen Trägers separat vorliegt. Im Übrigen erfolgt die Reaktion analog zu den oben im Zusammenhang mit den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) erläuterten Reaktionen.

**[0075]** [Fig. 5](#) zeigt eine erste Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens für eine erfindungsgemäße Testvorrichtung. Hierzu wird in einem ersten Schritt ein poröser Träger **10** in einer wässrigen Lösung getränkt, in der das Enzym E vorliegt. Anstelle einer Tränkung kann die Lösung auch aufgesprüht oder aufgedruckt werden. In einem anschließenden, nicht eigens dargestellten Trockenschritt wird das Enzym E an der Oberfläche des porösen Trägers durch Adhäsionskräfte fixiert. Dies kann durch geeignete Oberflächenbeschichtung des porösen Trägers unterstützt werden. In einem nachfolgenden Schritt, der in [Fig. 5b](#) dargestellt ist, wird der poröse Träger **10** erneut getränkt, wobei hierzu eine Toluol-Lösung eines mit dem Biomarker B komplexierten Substrates S verwendet wird. In der unpolaren Toluol-Lösung ist das Enzym nicht aktiv, so dass bei diesem zweiten Verfahrensschritt keine enzymatische Umsetzung des Substrates erfolgen

kann. Ein anschließender Trocknungsschritt fixiert den Komplex auf dem porösen Träger. In einem weiteren, nicht dargestellten Schritt ist noch der selektive Binder auf dem porösen Träger zu fixieren. Dies kann vor, zwischen oder nach den in [Fig. 5](#) dargestellten Schritten erfolgen, wobei vorzugsweise eine weitere Polaritätsabstufung des verwendeten Lösungsmittels erfolgt, so dass eine vorzeitige Bindung des Binders mit dem Biomarker B verhindert wird.

[0076] [Fig. 6](#) zeigt eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens. Hierbei wird der poröse Träger **10** in einer Flüssigkeit getränkt, in der sämtliche Reaktionselemente, d.h. im dargestellten Fall das Enzym E, den Binder **12** und einen Komplex aus Substrat S und Biomarker B enthält. Zur Verhinderung einer vorzeitigen Reaktion der einzelnen Elemente untereinander sind bei der dargestellten Ausführungsform das Enzym E und der Binder **12** gekapselt. Beispielhaft für derartige Kapselungen ist bei dem Binder **12** eine Kapselung in Liposom-Vesikeln und bei dem Enzym E in einer Gelatine- oder Dextranskapsel dargestellt. Bei der praktischen Anwendung werden vorzugsweise für beide gekapselten Elemente gleichartige Kapselungen verwendet. Anderenfalls sollte die Auftragung in mehreren Schritten, jeweils mit geeigneten Lösungsmitteln erfolgen.

[0077] [Fig. 7](#) stellt eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens dar. Dabei werden mit Hilfe einer Kaskadengussmaschine von der lediglich Extruderelemente **14**, **16**, **18** dargestellt sind, mehrere hoch viskose Schichten **24**, **26**, **28** aufgetragen, die jeweils eines der Reaktionselemente (selektiver Binder, Komplex aus Biomarker und erstem Reporterpartner, zweiter Reporterpartner) einschließen. Durch die hohe Viskosität ist ein Austausch zwischen den Schichten und somit eine vorzeitige Reaktion der Reaktionselemente ausgeschlossen. Die Schichten **24**, **26**, **28** können so ausgestaltet sein, dass sie sich bei Eintrag der Probenflüssigkeit auflösen; alternativ können sie auch als flüssigkeitspermeable Filme ausgebildet sein.

[0078] [Fig. 8](#) zeigt einen schematischen Querschnitt durch eine erfindungsgemäße Testvorrichtung, wie sie beispielsweise mittels eines Herstellungsverfahrens gemäß [Fig. 7](#) erzeugt wird. Auf einem porösen Träger **10** sind übereinander mehrere Schichten **24**, **26**, **28** aufgetragen, die jeweils ein Reaktionselement enthalten. [Fig. 9](#) zeigt eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Testvorrichtung, wobei eine Reaktionszone **20** auf einem porösen Träger **10** in mehrere Subzonen **20a**, **20b** und **20c** unterteilt ist, die jeweils ein Reaktionselement enthalten. Bei der Ausführungsform von [Fig. 9](#) sind die Grenzen zwischen den Subzonen gestrichelt dargestellt, um anzudeuten, dass eine derartige Unterteilung der Reaktionszone nicht zwingend erforder-

lich ist. Bei geeigneter Aufbringung der einzelnen Reaktionselemente, etwa in gekapselter Form, kann die Reaktionszone **20** auch einheitlich gestaltet sein.

[0079] Schließlich zeigt [Fig. 10](#) eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Testvorrichtung, wobei der poröse Träger als dreidimensionales sphärisches Gebilde ausgestaltet ist, welches mit einer stabförmigen Haltevorrichtung **22** verbunden ist. Die Reaktionszone **20** umschließt die gesamte Oberfläche des sphärischen Trägers **10**, wobei die gestrichelte Linie wiederum andeutet, dass eine Unterteilung in Subzonen (hier zwei Subzonen **20a** und **20b**) optional ist.

[0080] Natürlich stellen die in der speziellen Beschreibung und in den Figuren gezeigten Ausführungsformen nur illustrative Beispiele der vorliegenden Erfindung dar. Insbesondere hinsichtlich der räumlichen Gestaltung des porösen Trägers, der Wahl der Materialien für den Träger sowie die Wahl und Gestaltung der Reagenzien ist dem Fachmann ein breites Spektrum an Möglichkeiten an Hand gegeben. Insbesondere die im Einzelnen zugrunde gelegte Biochemie ist an die konkreten Erfordernisse beim Nachweis eines speziellen Analyten anzupassen.

## Patentansprüche

1. Testvorrichtung zum Nachweis eines in einer Probenflüssigkeit enthaltenen Analyten (A), umfassend einen trockenen porösen Träger (**10**), auf dem in einer Reaktionszone angeordnet sind: ein selektiver Binder (**12**), der in der Lage ist, nach Befeuchtung des Trägers (**10**) mit der Probenflüssigkeit den Analyten (A) selektiv zu binden, ein Komplex, gebildet aus einem Biomarker (B) und dem ersten, komplexierten Reporterpartner eines zur Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals wechselwirkenden Reporterpaares aus Reporterenzym (E) und Reportersubstrat (S), sowie der zweite, freie Reporterpartner des Reporterpaares, wobei der Biomarker (B) hinsichtlich der Selektivität der Bindungsfähigkeit des selektiven Binders (**12**) dem Analyten (A) äquivalent und zu diesem kompetitiv ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Bindung des selektiven Binders (**12**) mit dem komplexierten Biomarker (B) die Wechselwirkung zwischen dem komplexierten und dem freien Reporterpartner sterisch oder allosterisch behindert.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Biomarker (B) eine Nukleinsäure, ein Protein, ein Peptid, eine niedermolekulare organische Verbindung, ein Kohlenhydrat oder eine Kombination hieraus ist.

3. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der komplexierte Reporterpartner das Reporterenzym (E) ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Reporterenzym (E) aus wenigstens zwei Untereinheiten aufgebaut ist, die einzeln enzymatisch nicht aktiv sind und die auf dem trockenen, porösen Träger (10) getrennt vorliegen und von denen wenigstens eine nicht mit dem Biomarker (B) komplexiert ist, wobei eine Bindung des selektiven Binders (12) mit dem komplexierten Biomarker (B) ein Binden der Untereinheiten zu einem aktiven Reporterenzym (E) behindert.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der komplexierte Reporterpartner das Reportersubstrat (S) ist.

6. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Reporterenzym (E) alkalische Phosphatase, Peroxidase, Glucose-Oxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Malatdehydrogenase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase oder Lysozym ist.

7. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der selektive Binder (12) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein proteinogener Binder (12) oder ein auf Nukleinsäuren basierender Binder (12) ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der selektive Binder (12) auf dem trockenen, porösen Träger (10) in mit dem Biomarker (B) gebundener Form vorliegt.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der selektive Binder (12) auf dem trockenen, porösen Träger (10) separat von dem Biomarker (B) vorliegt.

10. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Reaktionselement der Gruppe aus selektivem Binder (12), Komplex und zweitem Reporterpartner auf dem porösen Träger (10) oder einem auf dem porösen Träger (10) festgelegten Zwischenträger immobilisiert ist, wobei es auch im feuchten Zustand des porösen Trägers (10) in der Reaktionszone (20) räumlich fixiert ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Reaktionselement durch eine kovalente Bindung auf dem porösen Träger (10) oder dem Zwischenträger fixiert ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung zwischen

dem Reaktionselement und einer reaktiven Gruppe auf der Oberfläche des porösen Trägers (10) oder des Zwischenträgers ausgebildet ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe ein Säureester, ein Säureanhydrid, ein Säurehalogenid, ein Imid, ein Imidylester, ein Carboxyl, ein Halogencarbonamid, ein Sulfonylhalogenid, ein Isothiocyanat, ein Thiol, ein Pyrimidylsulfid, ein Halogenacetyl, ein Hydroxyl, ein Halogenalkyl, ein Phosphoramidit, ein Amin, ein Hydrazid, ein Azid, ein Aryldiazo, ein Nitren, ein Aldehyd und/oder ein Keton umfasst.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und der reaktiven Gruppe eine oder mehrere Linkerverbindungen geschaltet sind.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Reaktionselement durch eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen Paaren von Brückensubstanzen auf dem porösen Träger (10) oder einem auf dem porösen Träger (10) festgelegten Zwischenträger fixiert ist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Paare von Brückensubstanzen komplementäre Nukleinsäurestränge, Streptavidin/Biotin, Avidin/Biotin, Streptavidin/Streptag, MBP/Maltose, ProteinA-IgG/Antikörper, Hexa-His-Tag/NTA, Hexa-His-Tag/Anti-His-Antikörper, Digoxigenin/Anti-Digoxigenin-Antikörper und/oder GST/Glutathion umfassen.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem porösen Träger (10) oder dem Zwischenträger und dem mit ihm gekoppelten Partner des Paares von Brückensubstanzen eine oder mehrere Linkerverbindungen geschaltet sind.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehrere Linkerverbindungen eine Polyoxyalkyleinheit, eine aliphatische, eine cykloaliphatische und/oder eine aromatische Einheit, jeweils substituiert oder nicht substituiert, umfassen.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Zwischenträger Glas-, Kunststoff- oder Latex-Beads vorgesehen sind.

20. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der poröse Träger (10) aus Kunststoff, Papier oder anderen Zellulosederivaten, Glas, Metall, Silizium oder Kera-

mik oder einem Verbundmaterial hieraus besteht.

21. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der poröse Träger (**10**) dreidimensional, insbesondere sphärisch ausgebildet ist.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der dreidimensionale Träger (**10**) auf einer stabförmigen Haltevorrichtung angebracht ist.

23. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Reaktionselement der Gruppe aus selektivem Binder (**12**), Komplex und zweitem Reporterpartner gekapselt auf dem porösen Träger (**10**) vorliegt.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das gekapselte Reaktionselement in Kapseln aus Dextran oder aus Gelatine und/oder in Liposom-Vesikeln eingeschlossen ist.

25. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die gemeinsame Reaktionszone (**20**) in eine Mehrzahl von benachbarten Subzonen (**24**, **26**, **28**; **20a**, **20b**, **20c**) aufgeteilt ist, von denen jede ein oder mehrere Reaktionselemente der Gruppe aus selektivem Binder (**12**), Komplex und zweitem Reporterpartner trägt.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Subzone (**24**, **26**, **28**) als eine das oder die zugeordnete(n) Reaktionselement(e) einschließende Gelatineschicht ausgebildet ist.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Subzone (**24**, **26**, **28**) als ein das oder die zugeordnete(n) Reaktionselement(e) einschließender, flüssigkeitspermeabler Film ausgebildet ist.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Subzone (**24**, **26**, **28**) als eine mit dem oder den zugeordneten Reaktionselement(en) imprägnierte Papierschicht ausgebildet ist.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionszone (**20**) eine mit einem ersten Reaktionselement imprägnierte Papierschicht umfasst, die auf ihrer Oberseite mit einer ein zweites Reaktionselement enthaltenden Schicht und/oder auf ihrer Unterseite mit einer ein drittes Reaktionselement enthaltenden Schicht beschichtet ist.

30. Verfahren zum Herstellen einer Testvorrichtung zum Nachweis eines in einer Probenflüssigkeit

enthaltenen Analyten (A), umfassend die Schritte des Bereitstellens der folgenden Reaktionselemente:

- einen selektiven Binder (**12**), der in der Lage ist, den Analyten (A) selektiv zu binden,
- einen Komplex, gebildet aus einem Biomarker (B) und dem ersten, komplexierten Reporterpartner eines zur Erzeugung eines optisch detektierbaren Signals wechselwirkenden Reporterpaares aus Reporterenzym (E) und Reportersubstrat (S),
- den zweiten, freien Reporterpartners des Reporterpaares,

wobei der Biomarker (B) hinsichtlich der Selektivität der Bindungsfähigkeit des selektiven Binders (**12**) dem Analyten (A) äquivalent und zu diesem kompetitiv ist

und wobei eine Bindung des selektiven Binders (**12**) mit dem komplexierten Biomarker (B) die Wechselwirkung zwischen dem komplexierten und dem freien Reporterpartner sterisch oder allosterisch behindert, wobei das Verfahren weiter den Schritt des Aufbringens aller Reaktionselemente in einer gemeinsamen Reaktionszone (**20**) auf einem porösen Träger (**10**) umfasst,

wobei sie im trockenen Zustand des Trägers (**10**) auf diesem fixiert und wenigstens zwei der Reaktionselemente im durch Aufbringen der flüssigen Probe feuchten Zustand des porösen Trägers (**10**) in diesem frei beweglich sind.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Aufbringens mehrere Teilschritte des Benetzens des porösen Trägers (**10**) mit Lösungen, die jeweils ein oder mehrere in Lösungsmittel gelöste Reaktionselemente enthalten, sowie wenigstens einen nachfolgenden Teilschritt des Trocknens umfasst, wobei in einem zeitlich früheren Teilschritt eine das Reporterenzym (E) enthaltende, stärker polare Lösung und in einem zeitlich späteren Teilschritt eine das Reportersubstrat (S) enthaltende, schwächer polare Lösung verwendet wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Benetzung des porösen Trägers (**10**) durch Tränken, Aufsprühen oder Aufdrucken erfolgt.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass ein Reaktionselement derart auf dem porösen Träger (**10**) oder einem auf dem porösen Träger (**10**) festgelegten Zwischenträger immobilisiert wird, dass es auch im feuchten Zustand des porösen Trägers (**10**) räumlich fixiert bleibt.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung durch Ausbilden einer kovalenten Bindung zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und dem porösen Träger (**10**) oder Zwischenträger erfolgt.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung zwischen dem Reaktionselement und einer reaktiven Gruppe auf der Oberfläche des porösen Trägers (**10**) oder des Zwischenträgers ausgebildet wird.

36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe ein Säureester, ein Säureanhydrid, ein Säurehalogenid, ein Imid, ein Imidylester, ein Carboxyl, ein Halogencarbonamid, ein Sulfonylhalogenid, ein Isothiocyanat, ein Thiol, ein Pyrimidylsulfid, ein Halogenacetyl, ein Hydroxyl, ein Halogenalkyl, ein Phosphoramidit, ein Amin, ein Hydrazid, ein Azid, ein Aryldiazo, ein Nitren, ein Adlehyd und/oder ein Keton umfasst.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem immobilisierten Reaktionselement und der reaktiven Gruppe eine oder mehrere Linkerverbindungen geschaltet werden.

38. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung durch eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen Paaren von Brückensubstanzen erfolgt, wobei jeweils ein Partner eines Paares von Brückensubstanzen mit dem Reaktionselement und der andere Partner mit dem porösen Träger (**10**) oder Zwischenträger gekoppelt wird.

39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Paare von Brückensubstanzen komplementäre Nukleinsäurestränge, Streptavidin/Biotin, Avidin/Biotin, Streptavidin/Streptag, MBP/Maltose, ProteinA-IgG/Antikörper, Hexa-His-Tag/NTA, Hexa-His-Tag/Anti-His-Antikörper, Digoxigenin/Anti-Digoxigenin-Antikörper und/oder GST/Glutathion umfassen.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem porösen Träger (**10**) oder dem Zwischenträger und dem mit ihm gekoppelten Partner des Paares von Brückensubstanzen eine oder mehrere Linkerverbindungen geschaltet werden.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehrere Linkerverbindungen eine Polyoxyalkyleinheit, eine aliphatische, eine cykloaliphatische und/oder eine aromatische Einheit, jeweils substituiert oder nicht substituiert, umfassen.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 41, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Schritt des Aufbringens wenigstens eines der Reaktionselemente gekapselt wird.

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch ge-

kennzeichnet, dass das gekapselte Reaktionselement in Kapseln aus Dextran oder aus Gelatine und/oder in Liposom-Vesikeln eingeschlossen wird.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 43, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Aufbringens das Auftragen einer Mehrzahl von Schichten in der gemeinsamen Reaktionszone (**20**) umfasst, wobei jede Schicht ein oder mehrere Reaktionselemente enthält.

45. Verfahren nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der Schichten als das oder die zugeordnete(n) Reaktionselement(e) einschließende Gelatineschicht aufgetragen wird.

46. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 oder 45, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der Schichten als das oder die zugeordnete(n) Reaktionselement(e) einschließender, flüssigkeitspermeabler Film aufgetragen wird.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Schichten mittels einer Kaskadengussmaschine aufgetragen werden.

48. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der Schichten als mit dem oder den zugeordneten Reaktionselement(en) imprägnierte Papierschicht aufgetragen wird.

49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass eine mit einem ersten Reaktionselement imprägnierte Papierschicht auf ihrer Oberseite mit einer ein zweites Reaktionselement enthaltenden Schicht und/oder auf ihrer Unterseite mit einer ein drittes Reaktionselement enthaltenden Schicht beschichtet wird.

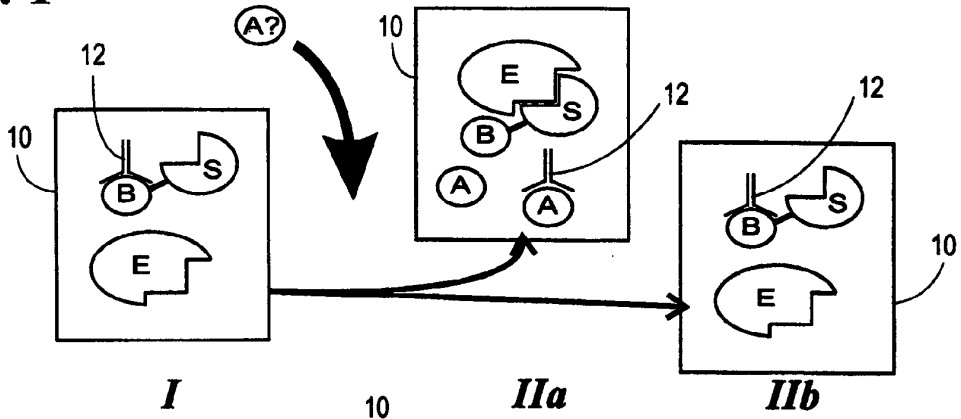
50. Testverfahren zum Nachweis eines Analyten (A) in einer flüssigen Probe, umfassend die Schritte:  
– Bereitstellen einer Testvorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 29,  
– Befeuchten der Reaktionszone (**20**) mit der flüssigen Probe,  
– nach Ablauf einer vorgegebenen Reaktionszeit, Detektieren des Vorliegens oder Nichtvorliegens eines durch die Umsetzungsreaktion der Reporterpartner erzeugten optischen Signals in der Reaktionszone (**20**).

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass bei Vorliegen des optischen Signals eine quantitative Bestimmung einer Konzentration des Analyten in der Probe durch Vergleich mit Kalibrierwerten erfolgt.

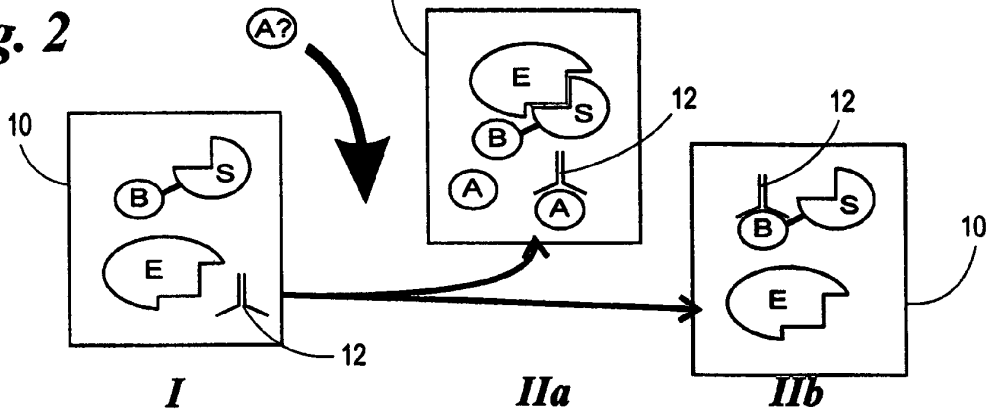
Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

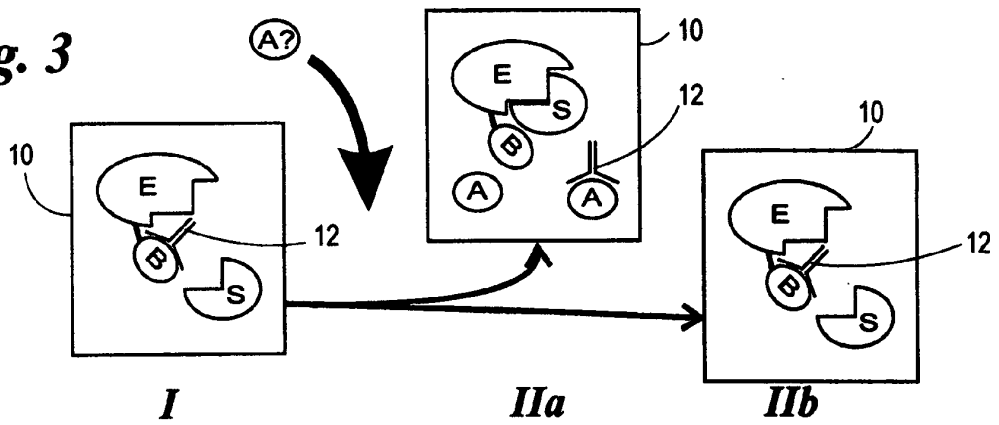
**Fig. 1**



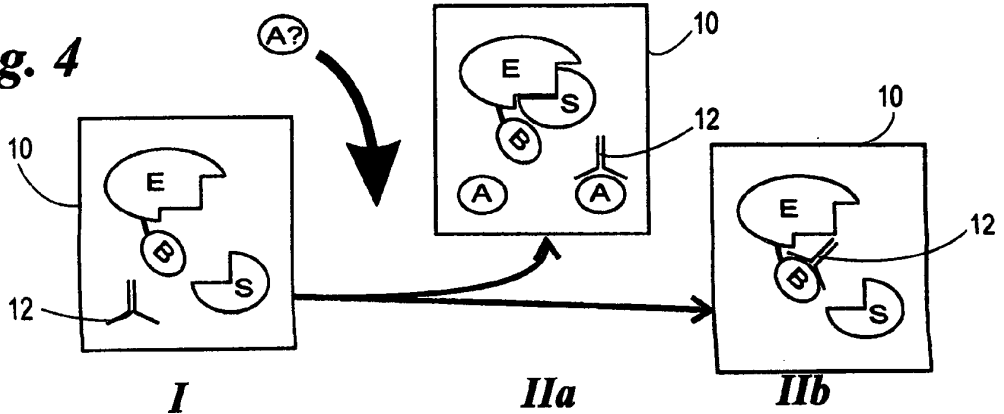
**Fig. 2**



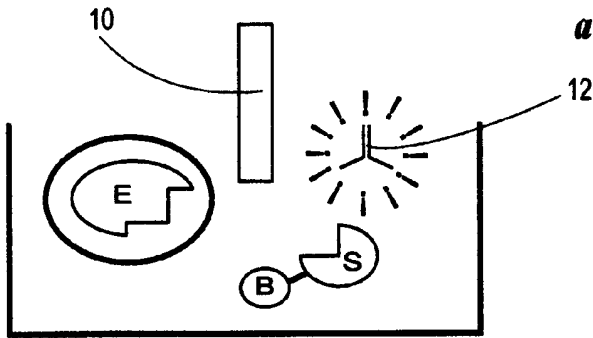
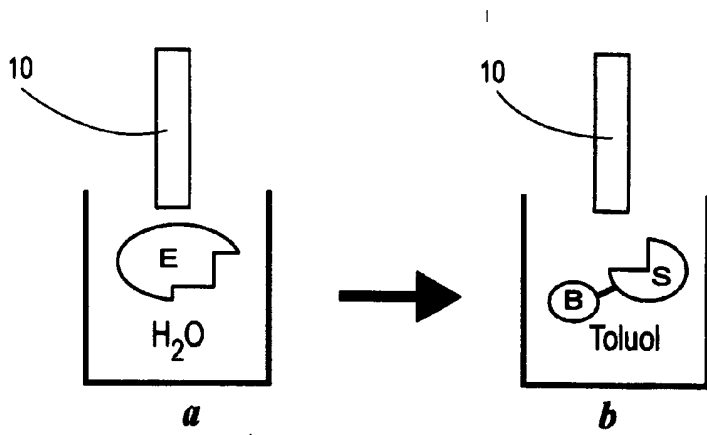
**Fig. 3**



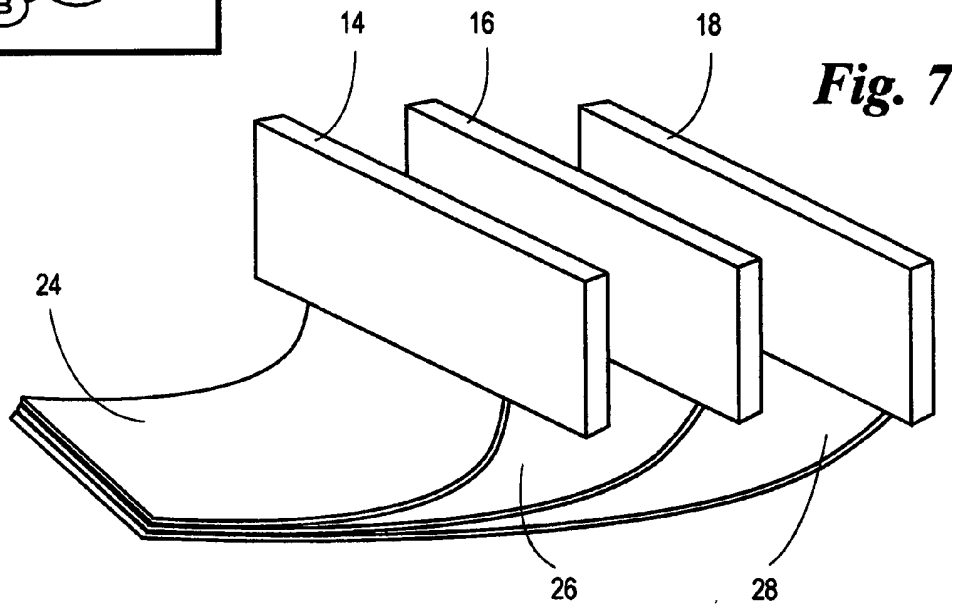
**Fig. 4**



**Fig. 5**

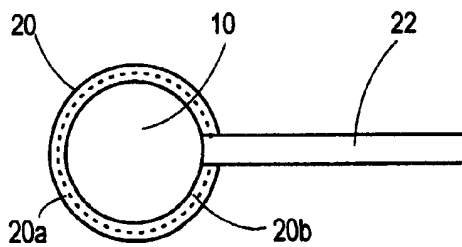
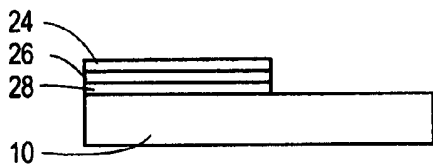


**Fig. 6**

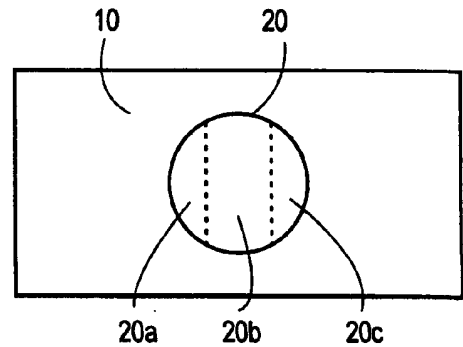


**Fig. 7**

**Fig. 8**



**Fig. 10**



**Fig. 9**