

(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
4. Mai 2006 (04.05.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/045596 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)

G01N 21/86 (2006.01)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HORN, Carina
[DE/DE]; Frankenstr. 5, 68647 Biblis (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/011448

(74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach
860 820, 81635 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Oktober 2005 (25.10.2005)

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

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2004 051 830.0

25. Oktober 2004 (25.10.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
DE, US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH];
Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel (CH).

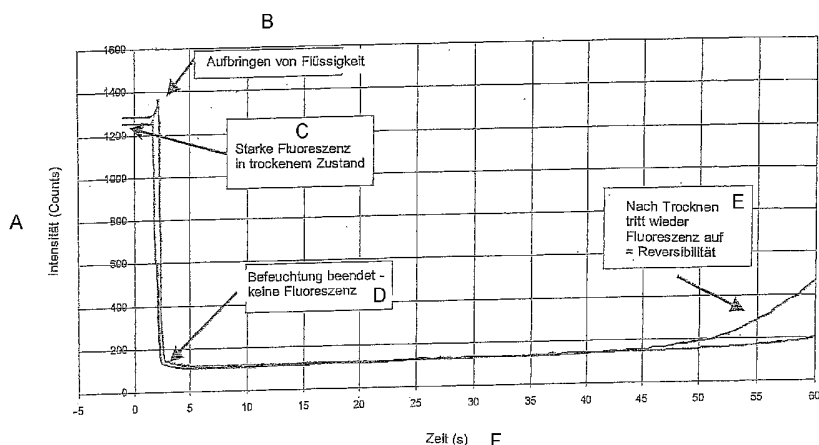
(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
(DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL REFERENCE SYSTEM FOR USE IN ANALYTE DETECTION BY FLUORESCENCE

(54) Bezeichnung: MULTIFUNKTIONALES REFERENZSYSTEM BEI ANALYBESTIMMUNGEN DURCH FLUORESCENZ



A... INTENSITY (COUNTS)

B... APPLICATION OF LIQUID

C... STRONG FLUORESCENCE WHEN DRY

D... WETTING ENDED - NO FLUORESCENCE

E... REOCCURRENCE OF FLUORESCENCE ONCE DRY = REVERSIBILITY

F... TIME (S)

(57) Abstract: The invention relates to a system for luminescence detection of an analyte in a sample, said system comprising a carrier on which an analyte-specific substance and a reference substance are present. The invention also relates to a method for detecting an analyte in a sample using said system. The inventive system, in addition to detecting the analyte, is adapted to determine the sample quantity, the quantity of the analyte and/or the operational readiness of the support for detection.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/045596 A1



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein System für den Lumineszenz-Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei das System einen Träger umfasst, auf dem sich eine Analyt-spezifische Substanz und eine Referenzsubstanz befinden. Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei das genannte System verwendet wird. Das erfindungsgemäße System eignet sich zusätzlich zum Nachweis eines Analyten dazu, die Probenmenge zu bestimmen, die Menge des Analyten zu bestimmen und/oder die Funktionsbereitschaft des Trägers für einen Nachweis festzustellen.

Multifunktionales Referenzsystem bei Analytbestimmungen durch Fluoreszenz

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein System für den Lumineszenz-Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei das System einen
5 Träger umfasst, auf dem sich eine Analyt-spezifische Substanz und eine Referenzsubstanz befinden. Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe, wobei das genannte System verwendet wird. Das erfindungsgemäße System eignet sich zusätzlich zum Nachweis eines Analyten dazu, die Probenmenge zu
10 bestimmen, die Menge des Analyten zu bestimmen und/oder die Funktionsbereitschaft des Trägers für einen Nachweis festzustellen.

Das erfindungsgemäße System und Verfahren zum Nachweis eines Analyten beruht auf einem Lumineszenz-Nachweis, insbesondere einem
15 Fluoreszenz-Nachweis. Solche Nachweissysteme sind im Stand der Technik bereits seit langem bekannt. Bei den heutigen Analysemethoden stellt die photometrische Auswertung von analytischen Testelementen eines der gebräuchlichsten Verfahren zum schnellen Nachweis bzw. zur schnellen Bestimmung der Konzentration von Analyten in Proben dar. Allgemein
20 werden photometrische Auswertungen im Bereich der Analytik, der Umweltanalytik und vor allem im Bereich der medizinischen Diagnostik eingesetzt. Insbesondere im Bereich der Blutglucosediagnostik aus Kapillarblut besitzen Testelemente, die photometrisch ausgewertet werden, einen großen Stellenwert.

25 Bei fluoreszenzspektrometrischen Nachweissystemen hängt die Intensität der Emission der fluoreszenzierenden Substanzen direkt proportional von der Intensität der Anregung ab. Dabei kann die Intensität der Anregung durch viele Faktoren beeinflusst werden, zum Beispiel durch das Verhalten der
30 Lichtquelle über die Zeit oder Veränderungen der Lichtwege. Gerade in

- 2 -

einem Kleingerät, welches nicht feststehend in einem Labor zur Messung benutzt wird, können Veränderungen der Lichtwege unterschiedliche Anregungsintensitäten hervorrufen. Daher ist es sehr schwierig, absolute Fluoreszenzmessungen reproduzierbar durchzuführen.

5

Aus diesem Grunde verwenden die heute gängigen Fluoreszenz-Testsysteme eine Referenzsubstanz, auf die bezogen werden kann. Es sind verschiedene Arten von Referenzsubstanzen bekannt.

10 Beispielsweise ist im Stand der Technik bekannt, in Nachweissystemen, die auf einem Fluorophor beruhen, einen zweiten Fluorophor zu verwenden, der bei einer anderen Wellenlänge emittiert als der für den Analyten spezifischen Fluorophor. Dieser zweite Fluorophor kann somit als Referenz benutzt werden. Dabei kann dann durch zwei verschiedene Filter (und zwei
15 Detektoren) zwischen den beiden Fluorophoren unterschieden werden, wobei ein Fluorophor keine chemische Umsetzung erfährt und als Referenz dienen kann. Dieses Nachweissystem ist beispielsweise in der folgenden Literaturstelle beschrieben: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lackowicz, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston,
20 Dordrecht, Moscow 1999, 2. Auflage.

Ein anderer Ansatz besteht in einer zeitaufgelösten und phasenmodulierten Referenzierung, bei der ein sehr langlebiger Fluorophor, der eine längere Lebensdauer als ein für den Analyten spezifischer kurzlebiger Fluorophor
25 hat, als Referenzsubstanz verwendet wird. Während die langlebige Lumineszenz in ihren Parametern vom Analyten nicht beeinflusst wird, verändert sich die Intensität des für den Analyten spezifischen, kurzlebigen Leuchtstoffs in Abhängigkeit von der jeweiligen Analytkonzentration. Dann kann durch zeitaufgelöste Messung zuerst Analyt-Fluorophor gemessen
30 werden und anschließend das Abklingen der Referenz aufgenommen werden. Das Verhältnis des Abklingsignals zu dem Signal des Analyten plus dem der Referenzsubstanz muss immer gleich sein, unabhängig mit welcher Intensität eingestrahlt wurde.

WO 99/06821 offenbart ein solches System. Hierbei werden zumindest zwei verschiedene Leuchtstoffe co-immobilisiert auf einem Träger verwendet, deren erster zumindest in der Lumineszenzintensität auf den zu bestimmenden Parameter des Analyten anspricht, und deren zweiter
5 zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den zu messenden Parameter nicht anspricht. Die Leuchtstoffe weisen unterschiedliche Abklingzeiten auf. Das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort kann somit zur Bildung einer
10 Referenzgröße für die Bestimmung des zu messenden Parameters des Analyten verwendet werden.

WO 02/056023 offenbart einen optischen Sensor zur Bestimmung zumindest eines Parameters in einer Probe, wobei auch hier ein auf den
15 Parameter ansprechendes Indikatormaterial mit kurzer Abklingzeit und ein auf den Parameter nicht ansprechendes Referenzmaterial mit langer Abklingzeit verwendet werden. Hierbei sind das Indikatormaterial und das Referenzmaterial auf einem gemeinsamen Träger immobilisiert und auf der Probenseite mit einer lichtundurchlässigen Schicht abgedeckt.

20 Die Referenzierung über einen zweiten Fluorophor, der bei einer anderen Wellenlänge gemessen wird, benötigt allerdings einen höheren apparativen Aufwand. So werden zum Beispiel zwei Filter anstelle nur eines einzigen Filters benötigt, um das Anregungslicht abblocken zu können, und es
25 werden in der Regel auch zwei Detektoren benötigt. Hinzu kommt, dass durch die Trennung der optischen Wege nach der Anregung in unterschiedliche Detektoren einer der beiden Wege fehlerhaft sein kann, was dann zu einer falschen Referenzierung führen würde.

30 Bei der zeit- oder phasenaufgelösten Referenzierung besteht der Nachteil, dass die Messungen der Analyten immer vor einem leuchtenden Hintergrund durchgeführt werden müssen. Das bedeutet, dass immer ein gewisser Offset oder Signaluntergrund besteht, der den Messbereich

begrenzt. Dieses Prinzip ist beispielsweise in Figur 1 dargestellt.

In Figur 1 sieht man den Messbereich des Analytsignals mit und ohne Referenz. Ohne den Referenzfluorophor kann der Messbereich optimal auf den zu umspannenden Dynamikbereich angepasst werden. Mit Referenzfluorophor wird ein Teil des Messbereichs von der Referenz beansprucht.

Die Referenzsubstanzen bzw. Referenzleuchtstoffe, die in den oben genannten Verfahren des Standes der Technik eingesetzt werden, können nur als Referenzsubstanz für den Vergleich mit dem Analyten verwendet werden, sie können jedoch keine weiteren Funktionen erfüllen.

Ein wichtiges Thema bei der Bestimmung von Analyten im Diagnostik-Bereich ist jedoch auch die Benetzungserkennung und/oder eine Füllkontrolle des Testfeldes.

Auch in diesem Bereich gibt es im Stand der Technik Ansätze, die bestehenden Verfahren zu verbessern. WO 83/00931 offenbart eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Nachweis einer flüssigen Probe, wobei bestimmt wird, ob eine ausreichende Menge an Probenflüssigkeit aufgetragen wurde. Dies wird erreicht, indem von einem Tropfendetektor, der eine Lichtquelle umfasst, Strahlung auf die Probe abgegeben wird, die innerhalb der Absorptionsbande von Wasser liegt. Es wird zunächst der Probenträger im trockenen und dann im benetzten Zustand bestrahlt und somit die Feuchtigkeit gemessen. Aufgrund des Unterschieds der detektierten Signale wird dann der Feuchtigkeitsgehalt der Probe berechnet.

US-Patent 5,114,350 offenbart ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Konzentration eines Analyten in einer Körperflüssigkeitsprobe. Der Grad der Benetzung des Reaktionsträgers wird dadurch gemessen, dass die Menge an reflektiertem Licht gemessen wird, die mit zunehmender Benetzung abnimmt.

DE 10248555 A1 offenbart ein Verfahren zur Erkennung und Kompensation der Unterdosierung von Teststreifen. In dieser Druckschrift wird ein Testelement beschrieben, welches ein Analyt-spezifisches Reagenz umfasst, das mit einem Analyten in einer Probe wechselwirkt, sowie eine Kontrollsubstanz, die mit einer Probenmatrix der Probe wechselwirkt. Das Analyt-spezifische Reagenz wechselwirkt mit dem Analyten in Abhängigkeit von der Analytkonzentration in einem Detektionswellenlängenbereich. Die Kontrollsequenz wechselwirkt bei Bestrahlung des Testfeldes mit der Probenmatrix in Abhängigkeit von der auf das Testfeld aufgegebenen Probenmenge. Die Kontrollsubstanz kann dabei auch mit dem in der Probenmatrix enthaltenen Wasser reagieren. Ein Beispiel, das in DE 10248555 genannt ist, verwendet Chlorphenolrot als Analyt-unabhängigen Farbbildner zur Bestimmung der Probenmenge und 2,18-Phosphormolybdänsäure als Analyt-spezifisches Reagenz zur Bestimmung der Glucosekonzentration in einer Probe, z. B. einer Blutprobe. In dem genannten Beispiel dieses Dokuments müssen somit zwei Wellenlängenbereiche detektiert werden, was dieses Testsystem apparativ aufwändig macht.

Die der Erfindung zugrunde liegenden Aufgabe bestand darin, ein System und Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe bereitzustellen, welches mit einer Referenzsubstanz und einer analyt-spezifischen Substanz durchgeführt werden kann, ohne dabei den im Stand der Technik beschriebenen hohen apparativen Aufwand in Kauf nehmen zu müssen.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein System für den Lumineszenz-Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend einen Träger, umfassend eine Analyt-spezifische Substanz, die in der Lage ist, bei Kontakt mit dem Analyten ein erstes Lumineszenzsignal abzugeben, und eine Referenzsubstanz, die in der Lage ist, ein zweites Lumineszenzsignal abzugeben welches durch Kontakt mit der flüssigen

Probe im wesentlichen gequencht wird.

Überraschendeweise lassen sich aus dem Stand der Technik bekannte Nachweisverfahren dadurch erfindungsgemäß vereinfachen, dass eine Referenzsubstanz verwendet wird, welche in Abwesenheit der Probe ein Lumineszenzsignal abgibt, welches als Referenzsignal verwendet werden kann. Bei Zugabe der Probe wird dieses Lumineszenzsignal schlagartig im wesentlichen gequencht, d.h. es liefert im wesentlichen kein Signal mehr, oder zumindest ein sehr stark verringertes Signal.

Besonders vorteilhaft für die vorliegende Erfindung ist es, wenn Anregung und Emission bei etwa den gleichen Wellenlängen liegen wie für die analytspezifische Substanz. Dies bedeutet, dass dann für die Detektion der Lumineszenzsignale ein einziger Detektor verwendet werden kann.

Durch die Eigenschaft der Referenzsubstanz, in Abwesenheit der Probe ein Lumineszenzsignal abzugeben, was dann bei Inkontaktbringen mit der Probe gequencht wird, kann die Referenzsubstanz nicht nur zum Nachweis des Analyten verwendet werden, sondern auch zum Bestimmen der Probenmenge, zum Bestimmen der Menge des Analyten und/oder der Funktionsbereitschaft des Trägers. Die Referenzsubstanz kann beispielsweise so gewählt werden, dass ihr Lumineszenzsignal bei Benetzung gequencht wird. Dann kann die Funktionsbereitschaft des Testsystems sichtbar gemacht werden. Falls also der Träger, der das Testsystem umfasst, in etwa bei der Lagerung feucht geworden ist oder dgl., oder andere Substanzen mit ihm in Kontakt gekommen sind, wird dieses Lumineszenzsignal der Referenzsubstanz gequencht sein, und es ist erkennbar, dass dieses Testsystem nicht funktionsbereit ist.

Vorzugsweise ist das Quenchen reversibel, d.h. wird die Probe oder insbesondere die Benetzung entfernt bzw. rückgängig gemacht, so kann auch das Lumineszenzsignal wieder hergestellt werden.

- 7 -

Damit kann neben der Referenzierung eine Benetzungserkennung und/oder eine Füllkontrolle mit dem erfindungsgemäßen System erreicht werden. Wird z.B. auf dem Träger ein Testfeld vorgesehen und dieses nicht vollständig von der Probe benetzt, bleibt ein Restlumineszenzsignal bestehen. Es ist
5 dann möglich, rechnerisch eine Korrektur im Bezug auf das Analytsignal über diese Restlumineszenz zu machen.

Wenn die Lumineszenzeigenschaften im Bezug auf die Umgebungsfeuchte reversibel sind, kann eine solche Referenzsubstanz auch als
10 Feuchteindikator verwendet werden. Der Feuchteindikator gibt dann über die Lagerbedingungen des Testsystems und seine Funktionsbereitschaft Auskunft. Man kann somit die Referenzsubstanz auch als Indikator für ein zu wählendes Verfallsdatum des Testsystems verwenden.

15 Lumineszenzsubstanzen, insbesondere Fluorophore, die solche Eigenschaften aufweisen, sind im Stand der Technik kaum bekannt. Die meisten Fluorophore erfahren in feuchter Umgebung eine Fluoreszenzerhöhung und kein Quenchen.

20 Wenn die Lumineszenzeigenschaften der Analyt-spezifischen Substanz vom pH-Wert abhängen, kann die Analyt-spezifische Substanz zur Bestimmung des pH-Wertes verwendet werden. In einer Ausführungsform ist das erfindungsgemäße System daher ein pH-Sensor, d.h. ein System, wobei die Analyt-spezifische Substanz ausgewählt ist aus Substanzen, deren
25 Lumineszenzsignal vom pH-Wert abhängig ist. In dieser Ausführungsform ist die Referenzsubstanz vorzugsweise keine Substanz, deren Lumineszenzsignal bei einer pH-Änderung in wesentlichen gequencht wird. Bevorzugt als Analyt-spezifische Substanz ist LysoSensor Blue DND-167 oder ein Derivat davon, z. B. zur Bestimmung des pH-Wertes im Bereich von
30 etwa 3,5 bis etwa 7,0 oder etwa 4,5 bis etwa 6,0.

Vor Aufbringen der Probe weist der Träger des erfindungsgemäßen pH-Sensors vorzugsweise einen pH-Wert auf, bei dem die Analyt-spezifische

- 8 -

Substanz im wesentlichen keine Lumineszenz zeigt. Im Falle von LysoSensor Blue DND-167 kann dies ein pH ausgewählt aus dem Bereich von etwa 7 bis etwa 10 oder von etwa 8 bis etwa 9 sein.

5 Ferner kann die Pufferkraft des Trägers so vorbestimmt werden, dass der Träger im wesentlichen vollständig auf den pH-Wert der Probe umgepuffert wird. Dem Fachmann ist bekannt, wie eine derartige Pufferkraft des Trägers eingestellt werden muss.

10 Als Referenzsubstanz kommen prinzipiell alle Substanzen infrage, welche in der Lage sind, ein Lumineszenzsignal abzugeben, welches durch Kontakt mit der Probe im wesentlichen gequencht wird. Hierbei können alle Arten von Substanzen verwendet werden, die durch Kontakt mit irgendeinem Bestandteil der Probe in ihrem Lumineszenzsignal gequencht werden.
15 Bestandteile in zu untersuchenden Proben, welche das Quenchen auslösen können, sind z.B. Wasser, Calcium, Magnesium oder andere Metalle oder deren Ionen, der pH-Wert sowie weitere Faktoren.

20 Wenn Wasser der für das Quenchen auslösende Faktor ist, ist die Referenzsubstanz vorzugsweise ausgewählt aus der Klasse der Chalcone der Formel I.

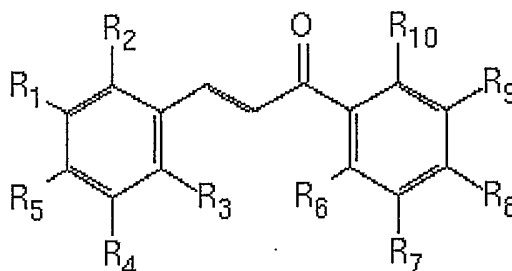
25 Chalcone sind im Stand der Technik bekannt (B.M. Krasovitskii, D.G. Pereyaslova, ZH. Vsesoyuznogo Obschestva im. D.I. Mendeleeva, 10 (6), 704 (1965); G.E. Dobretsov, V.A. Petrov, Yu.A. Vladimirov, Studia Biophysica Berlin, 71 (3), 181-187 (1978)).

Bevorzugt sind Substanzen der allgemeinen Formel I,

30

- 9 -

(I)

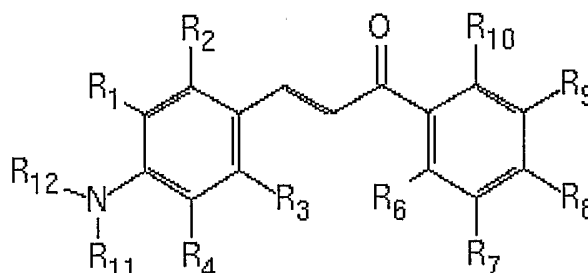


wobei einer der Reste R_2 , R_3 und R_5 vorzugsweise ausgewählt ist aus $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ und SO_3Na . Die übrigen Substituenten R_1 , R_4 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 und R_{10} können beliebige Substituenten sein, vorzugsweise Wasserstoff oder Halogen, insbesondere F, Cl, Br und I.

R_{11} und R_{12} sind vorzugsweise ausgewählt aus Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl, wobei C_1 - C_4 -Alkyl mit -OH, -SH, Phosphat, -COOH, - NH_2 , - SO_3Na , - NO_2 , Halogen, insbesondere F, Cl, Br und I, substituiert sein kann. Ein bevorzugter substituiertes Alkylrest ist $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-SO}_3\text{Na}$.

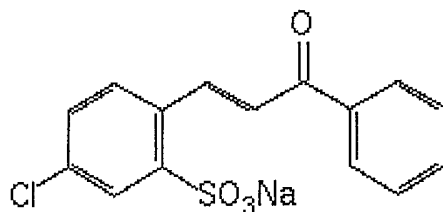
Besonders bevorzugte Substanzen, die als erfindungsgemäße Referenzsubstanz geeignet sind, sind Aminochalcone und Chlorchalcone, insbesondere gemäß den allgemeinen Formeln II, III und IV.

(II)



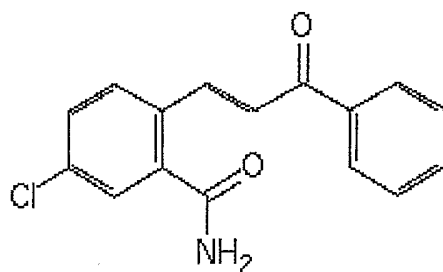
- 10 -

(III)



5

(IV)



10

Chlorchalcon wurde gemäß einem Verfahren von Krasovitskii hergestellt (B.M. Krasovitskii, D.G. Pereyaslova, Zh. Vsesoyuznogo Obshchestva im. D.I. Mendeleeva, 10 (6), 704 (1965)).

15 Amino-chalcon, bei dem R₁₁ und R₁₂ Methyl sind, ist gewerblich erhältlich und wurde für orientierende Untersuchungen eingesetzt.

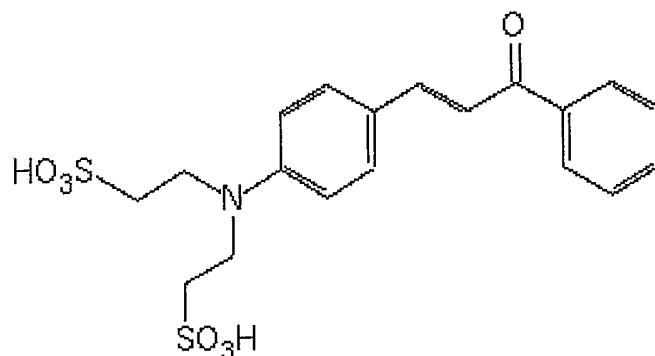
Das Amino-chalcon der allgemeinen Formel V, bei der R₁₁ und R₁₂ beide CH₂CH₂-SO₃Na sind, wurde über eine mehrstufige Synthese hergestellt.

20

Eine weitere bevorzugte Substanz ist somit die der Formel V.

- 11 -

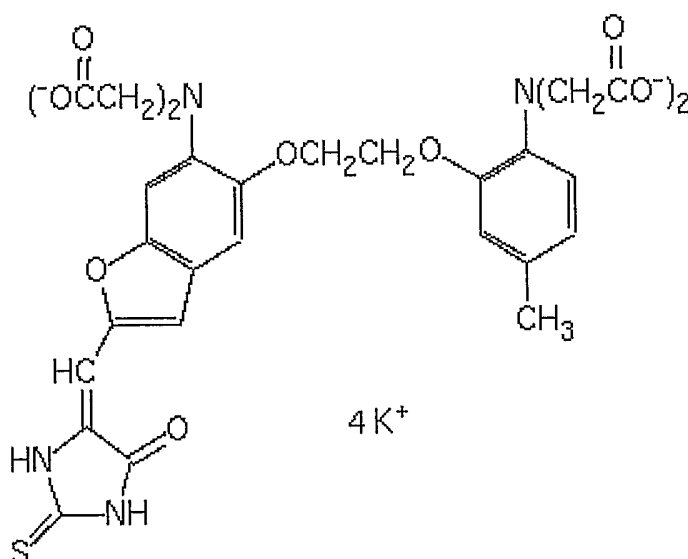
(V)



Die Quenchreaktion kann auch durch Metallionen hervorgerufen werden. Es sind somit auch solche Verbindungen als Referenzsubstanzen erfindungsgemäß geeignet, deren Lumineszenzsignal bei Kontakt mit Metallionen im wesentlichen gequenchet wird.

Insbesondere ist es möglich, Referenzsubstanzen auszuwählen, bei denen das Lumineszenzsignal durch den Kontakt mit Calcium- bzw. Magnesiumionen gequenchet wird. Hierfür kommen z.B. Fluoreszenzfarbstoffe infrage, die bei einer Komplexbildung mit Ca^{2+} und/oder Mg^{2+} aufhören zu fluoreszieren bzw. sehr reduziert fluoreszieren.

Ein Beispiel für einen solchen Fluoreszenzfarbstoff ist FuraRED, welcher von der Firma Molprobes erhältlich ist. FuraRED hat die folgende Struktur:



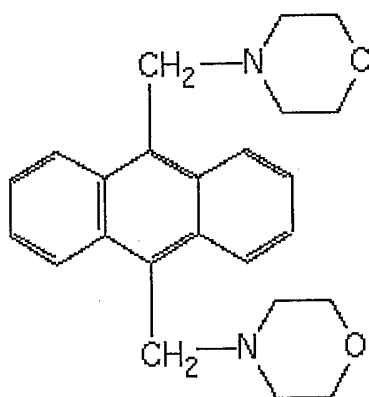
Eine dritte erfindungsgemäß geeignete Referenzsubstanz ist eine, welche auf eine pH-Änderung anspricht. Es handelt sich hierbei um Substanzen, deren Lumineszenzsignal bei einer pH-Wert-Änderung im wesentlichen gequenchet wird.

Dies ist besonders vorteilhaft für Proben, wie z.B. Blut. Blut hat eine sehr hohe Pufferkraft und ist daher in der Lage, einen vorher im Testsystem eingestellten pH-Wert zu überspielen. Ist das Testsystem beispielsweise auf einen niedrigeren pH-Wert eingestellt (beispielsweise pH 5), wird bei Auftrag einer Blutprobe das Testsystem umgepuffert auf pH 7.

Ein Beispiel für eine solche Referenzsubstanz ist LysoSensor Blue DND-167 von Molprobes (Katalog Nr. L7533, ABS/EM' (nm): 373/425, PKA: 5,1, geeigneter pH-Bereich: 4,5-6,0).

LysoSensor Blue DND-167

VI



Ferner können für das erfindungsgemäße System oder das erfindungsgemäße Verfahren Derivate von LysoSensor Blue DND-167 verwendet werden, die eine bessere Wasserlöslichkeit als LysoSensor Blue DND-167 aufweisen. Durch die erhöhte Wasserlöslichkeit kann die

Reaktionsgeschwindigkeit mit der den Analyten enthaltenden Probe erhöht werden.

In den erfindungsgemäßen Derivaten von LysoSensor Blue DND-167 sind
5 ein oder mehrere Wasserstoffatome unabhängig voneinander durch Substituenten ersetzt, wobei ein Kohlenstoffatom mehr als einen Substituenten tragen kann. Besonders geeignete Substituenten sind polare Substituenten, die wenigstens eine positive oder/und negative Ladung tragen können.

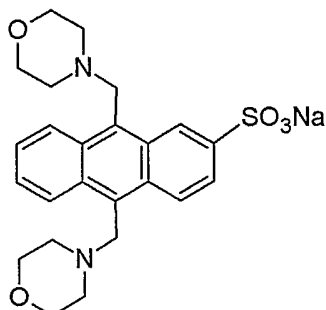
10 Alle mit Wasserstoff besetzten Positionen des Anthracengerüsts, der beiden Morpholinylgruppen und der beiden Methylengruppen aus LysoSensor Blue DND-167 sind für eine erfindungsgemäße Substitution geeignet.

15 Es ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen Derivate von LysoSensor Blue DND-167 genau einen, zwei, drei oder vier Substituenten tragen.

Bevorzugte Substituenten schließen -OH, -SH, Phosphat, -COOR₁₁,
20 -NR₁₁R₁₂, -SO₃Na, -NO₂, Halogen, insbesondere F, Cl, Br und I, ein. R₁₁ und R₁₂ sind vorzugsweise ausgewählt aus Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl, wobei C₁-C₄-Alkyl mit -OH, -SH, Phosphat, -COOH, -NH₂, -SO₃Na, -NO₂, Halogen, insbesondere F, Cl, Br und I, substituiert sein kann. Ein bevorzugter substituiertes Alkylrest ist
25 -CH₂CH₂-SO₃Na.

Beispielsweise ist ein Derivat von LysoSensor Blue DND-167 eine Verbindung der Formel VII:

(VII)



5

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße System ein System zur Bestimmung von Glukose, insbesondere der Blutglukose. Als Analyt-spezifische Substanz kann z. B. NAD oder NADP verwendet werden, welches in Anwesenheit eines geeigneten Enzymes, z. B. einer Glukosedehydrogenase, NADH oder NADPH bildet, welches eine Lumineszenz zeigt. Als Referenzsubstanz wird im erfindungsgemäßen System zur Bestimmung von Glukose z. B. eine Substanz verwendet, deren Lumineszenzsignal bei einer pH-Änderung im wesentlichen gequencht wird, z. B. LysoSensor Blue DND-167 oder ein Derivat davon.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe durch Lumineszenz, umfassend

- 20 (i) Bereitstellen eines Trägers, umfassend eine Analyt-spezifische Substanz, die in der Lage ist, bei Kontakt mit dem Analyten ein erstes Lumineszenzsignal abzugeben, und umfassend eine Referenzsubstanz, die in der Lage ist, ein zweites Lumineszenzsignal abzugeben, welches durch Kontakt mit der flüssigen Probe im wesentlichen gequencht wird,
- 25 (ii) Inkontaktbringen des Trägers mit einer flüssigen Probe, die einen nachzuweisenden Analyten umfasst, und
- (iii) Messen der Lumineszenzsignale und Nachweisen des Analyten durch

Vergleichen der Lumineszenzsignale.

Bei diesem Verfahren ist es ebenfalls, wie oben bereits erwähnt, bevorzugt, eine Referenzsubstanz und eine Analyt-spezifische Substanz zu verwenden, die im Wesentlichen im gleichen Wellenlängenbereich angeregt werden und emittieren. Vorzugsweise wird zunächst das Lumineszenzsignal der Referenzsubstanz in Abwesenheit der Probe gemessen, anschließend wird die flüssige Probe aufgebracht, und es wird das Lumineszenzsignal gemessen, welches von der Probe hervorgerufen wird. Dies kann vorzugsweise durch Verwendung eines einzigen Detektors geschehen. Es können jedoch auch verschiedene Detektoren angewandt werden, insbesondere dann, wenn die Wellenlängenbereiche der Referenzsubstanz und der Analyt-spezifischen Substanz sich unterscheiden.

Beschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt den Messbereich für die Messung für das Lumineszenzsignal eines Analyten mit oder ohne Referenzsubstanz gemäß Verfahren des Standes der Technik.

Figur 2 zeigt die Kinetik des Quenchens von Dimethylaminochalcon bei Benetzung.

Figur 3 zeigt ein Testsystem unter Verwendung eines Chalcones mit 0,05 % Feststoffgehalt. Als Proben wurden 4 Lösungen, jeweils enthaltend 0 mg/dl, 100 mg/dl, 300 mg/dl und 700 mg/dl Glucose verwendet. Es wurde die Intensität des Lumineszenz gemessen und mit dem gequenchten Signal, das von der Kontrollprobe mit 0 mg/dl Glucose stammte, verglichen. Die Differenz-Counts sind maximal, wenn ausreichend Probe aufgetragen wurde. Sie werden immer kleiner, je weniger Probe aufgetragen wird.

Figur 4 zeigt die Anzahl der Counts pro Volumen im selben Testformat wie in Figur 3 beschrieben. Ab ca. 1 µl wird ein Plateau erreicht, unterhalb

dessen keine zuverlässige Messung möglich ist.

Figur 5 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum von FuraRED.

5 **Figur 6 und Figur 7** zeigen die Fluoreszenzemission von LysoSensor Blue DND-167 in Abhängigkeit des pH-Werts.

Figur 8 zeigt ein Testsystem unter Verwendung von Lysosensor Blue DND167, NAD und einem Puffer pH=5. Als Proben wurden drei Lösungen mit 0 mg/dl, 1 mg/dl und 2 mg/dl Glukose und einem Puffer pH=7 verwendet.
10 Es wurde die Intensität der Lumineszenz für 24 Sekunden nach Aufbringen der Probe gemessen. Die Probenlösung pH=7 bewirkte eine Umpufferung der Schicht, welche Lysosensor Blue DND167 enthielt. Es wurde eine zeitabhängige Abnahme der Lumineszenz beobachtet. Nach 24 Sekunden
15 war praktisch keine Änderung der Lumineszenz mehr zu messen.

Figur 9 zeigt ein Testsystem unter Verwendung von Lysosensor Blue DND167, NAD und einem Puffer pH=5. Als Proben wurden vier Lösungen mit 0 mg/dl, 90 mg/dl, 300 mg/dl Glukose und 700 mg/dl und einem Puffer pH=7 verwendet. Es wurde die Intensität der Lumineszenz für 24 Sekunden
20 nach Aufbringen der Probe gemessen. Die Probenlösung pH=7 bewirkte eine Umpufferung der Schicht, welche Lysosensor Blue DND167 enthielt. Die Ergebnisse mit der Probe, welche 0 mg/dl Glukose enthielt, entsprechen dem Ergebnis aus Figur 8. Mit ansteigender Glukosekonzentration wird die
25 Abnahme der zeitabhängigen Lumineszenz geringer (90 mg/dl) bzw. die Lumineszenz steigt über den Ausgangswert an (300 mg/dl und 700 mg/dl Glukose). Deutlich können die unterschiedlichen Zeitverläufe der Lysosensor Blue DND167- und NADH-abhängigen Lumineszenz voneinander unterschieden werden.

Beispiele

Beispiel 1

In einer einfachen Rezeptur wurde die Funktion des Dimethylaminochalcon
5 überprüft. Da dieses Chalcon nicht wasserlöslich ist, wurde Methanol als
Wasserersatz verwendet.

Dabei war schon visuell erkennbar, dass das unter UV-Licht in trockenem
Zustand stark fluoreszierende Chalcon schlagartig keine Fluoreszenz mehr
10 zeigt, wenn ein Tropfen MeOH aufgebracht wird.

Testrezeptur I:

Dimethylaminochalcon	0.2g
MeOH	25ml
Transpafill	5g
Propiofan	0.5g

15 Das Chalcon wurde in MeOH gelöst und mit dem Transpafill versetzt. Zu
dieser Mischung wurde Propiofan gegeben und die Aufschlemmung
homogenisiert. Anschließend wurde die Mischung auf eine Pokalonfolie
aufgerakelt und bei 50°C für 5 Minuten getrocknet.

20 Die in Figur 2 dargestellte Messung zeigt die Kinetik des Quenchens, wenn
ein Tropfen Methanol auf die grünlich leuchtende Schicht, die auf die
Pokalonfolie aufgerakelt wurde, aufgebracht wird. Hier sieht man ganz
deutlich, dass ein schlagartiges Quenchen bei Aufbringen von Methanol
erreicht wird, was jedoch reversibel ist, sobald das Methanol wieder von der
25 Chalconschicht verdunstet d.h. trocknet.

Beispiel 2

1. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom pH-Wert

5 Der Farbstoff Lysosensor Blue DND167 wurde in verschiedenen Puffern mit verschiedenen pH-Werten gelöst, und diese Lösung wurde auf einen Teststreifen, der nur eine blanke Folie als Auftropffläche enthielt, aufgegeben. Diese wurden auf dem Messgerät vermessen.

10 Anregungswellenlänge: 375 nm (UV-LED der Firma Roithner), Detektion ab 420 nm mit Hilfe eines Fluoreszenzfilters, Langpass, KV 418 der Firma Schott, Detektor BPW34.

15 Die Ergebnisse sind Figur 7 zusammengestellt (Blindwert = Lösung ohne Farbstoff). Mit steigendem pH-Wert sinkt die Fluoreszenz. Bei pH=8 ist der Blindwert nahezu erreicht.

2. Farbstoff Lysosensor Blue DND167 in einer Schicht bei pH5

20 Es wurde eine Schicht hergestellt, die Glukosedehydrogenase, NAD und einen Puffer enthielt. Der pH-Wert der Schicht betrug 5.

Figur 8 zeigt die Abnahme der Fluoreszenz bei Auftropfen der Puffer-Lösung pH 7. Dabei wurde der pH-Wert der Schicht von pH 5 auf pH 7 umgepuffert.
25 Bei der Umpufferung nahm die Fluoreszenz ab.

In einem weiteren Versuch wurde die Schicht mit gepufferter Glukoselösung betropft. Man konnte eine überlagerte Reaktion erkennen; einerseits nahm die Fluoreszenz durch die Umpufferung des Farbstoffes ab (vergleiche Figur
30 8), andererseits wurde durch die Glukosereaktion fluoreszierendes NADH gebildet, welches der Glukosekonzentration entspricht. Die Ergebnisse sind in Figur 9 dargestellt.

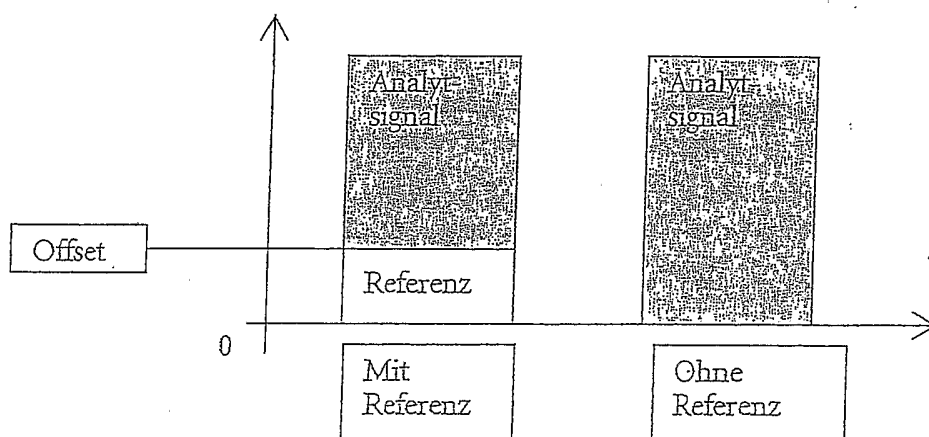
Ansprüche

1. System für den Lumineszenz-Nachweis eines Analyten in einer flüssigen
5 Probe, umfassend einen Träger, umfassend
eine Analyt-spezifische Substanz, die in der Lage ist, bei Kontakt mit
dem Analyten ein erstes Lumineszenzsignal abzugeben, und
eine Referenzsubstanz, die in der Lage ist, ein zweites
Lumineszenzsignal abzugeben, welches durch Kontakt mit der flüssigen
10 Probe im wesentlichen gequencht wird.
2. System nach Anspruch 1, weiterhin umfassend mindestens einen
Detektor zum Messen der Lumineszenzsignale der Analyt-spezifischen
Substanz und der Referenzsubstanz.
- 15 3. System nach Anspruch 1 oder 2, weiterhin umfassend eine
Auswertungseinheit zum Bestimmen der Probenmenge, der Menge des
Analyten und/oder der Funktionsbereitschaft des Trägers.
- 20 4. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Analyt-
spezifische Substanz und die Referenz Fluorophoren sind.
5. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
Referenzsubstanz ausgewählt ist aus Substanzen, deren
25 Lumineszenzsignal bei Kontakt mit Wasser im wesentlichen gequencht
wird.
6. System nach Anspruch 5, wobei die Referenzsubstanz eine Verbindung
der Formel I ist.

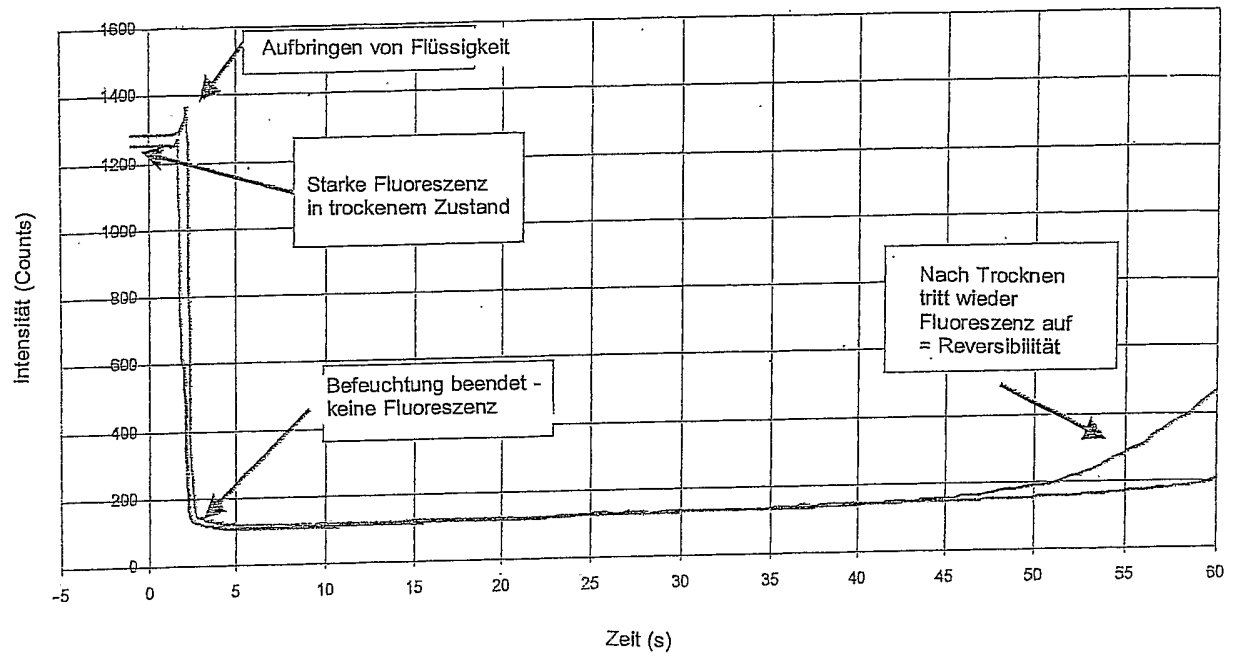
7. System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Referenzsubstanz ausgewählt ist aus Substanzen, deren Lumineszenzsignal bei Kontakt mit Metallionen im wesentlichen gequencht wird.
- 5 8. System nach Anspruch 7, wobei die Referenzsubstanz FuraRed ist.
9. System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Referenzsubstanz ausgewählt ist aus Substanzen, deren Lumineszenzsignal bei einer pH-Wert-Änderung im wesentlichen gequencht wird.
10. System nach Anspruch 9, wobei die Referenzsubstanz LysoSensor Blue DND-167 oder ein Derivat davon ist.
11. System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Analyt-spezifische
15 Substanz ausgewählt ist aus Substanzen, deren Lumineszenzsignal vom pH-Wert abhängig ist.
12. System nach Anspruch 12, wobei die Analyt-spezifische Substanz LysoSensor Blue DND-167 oder ein Derivat davon ist.
13. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Analyt-spezifische Substanz und die Referenzsubstanz in einem im wesentlichen gleichen Wellenlängenbereich angeregt werden und emittieren.
14. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein einziger Detektor zum Messen der Lumineszenzsignale der Analyt-spezifischen Substanz und der Referenzsubstanz verwendet wird.

15. Verwendung einer Substanz, die in der Lage ist, ein Lumineszenzsignal abzugeben, welches bei Kontakt mit einer Flüssigkeit im wesentlichen gequencht wird, als Referenzsubstanz in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten.
16. Verwendung einer Substanz, die in der Lage ist, ein Lumineszenzsignal abzugeben, welches bei Kontakt mit einer Flüssigkeit im wesentlichen gequencht wird, als Referenzsubstanz zur Bestimmung der Probenmenge.
17. Verwendung einer Substanz, die in der Lage ist, ein Lumineszenzsignal abzugeben, welches bei Kontakt mit einer Flüssigkeit im wesentlichen gequencht wird, als Referenzsubstanz zur Feststellung der Funktionsbereitschaft eines Systems zum Nachweis eines Analyten.
18. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Probe durch Lumineszenz, umfassend
- (i) Bereitstellen eines Trägers, umfassend eine Analyt-spezifische Substanz, die in der Lage ist, bei Kontakt mit dem Analyten ein
20 erstes Lumineszenzsignal abzugeben, und umfassend eine Referenzsubstanz, die in der Lage ist, ein zweites Lumineszenzsignal abzugeben, welches durch Kontakt mit der flüssigen Probe im wesentlichen gequencht wird,
 - (ii) Inkontaktbringen des Trägers mit einer flüssigen Probe, die einen
25 nachzuweisenden Analyten umfasst, und
 - (iii) Messen der Lumineszenzsignale und Nachweisen des Analyten durch Vergleichen der Lumineszenzsignale.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Lumineszenzsignal der
30 Referenzsubstanz vor dem Inkontaktbringen des Trägers mit der flüssigen Probe gemessen wird.

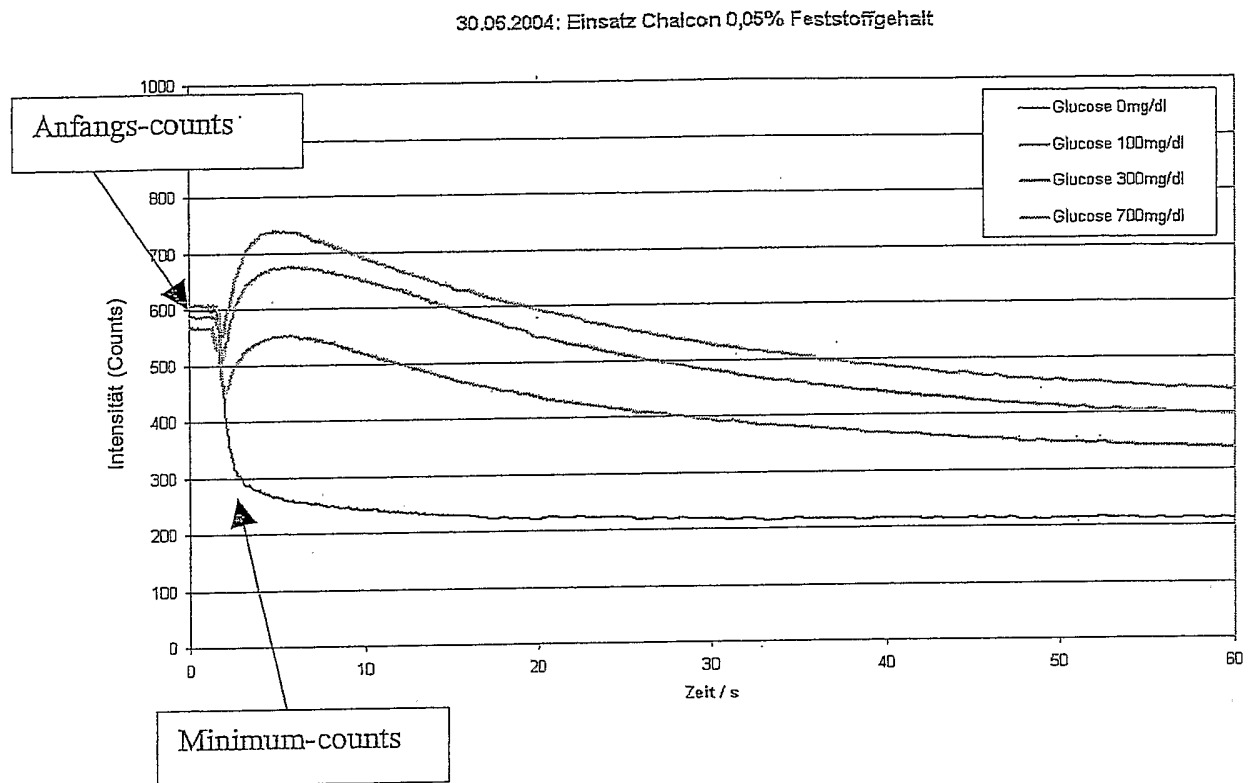
Figur 1



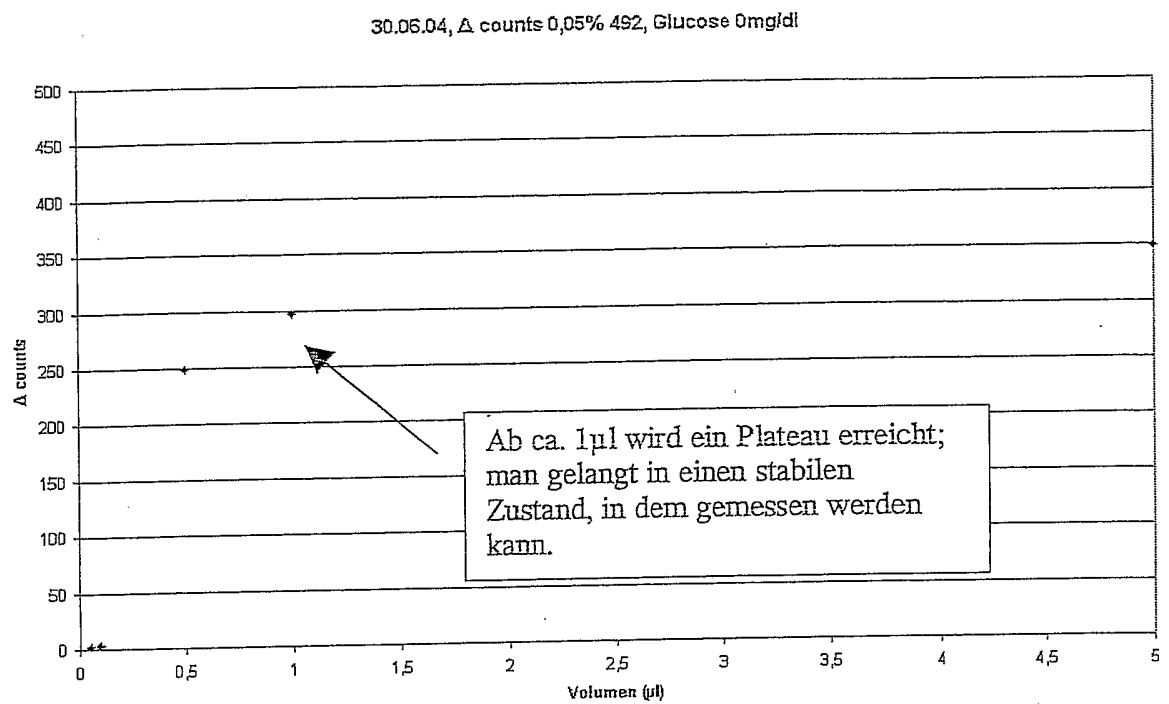
Figur 2



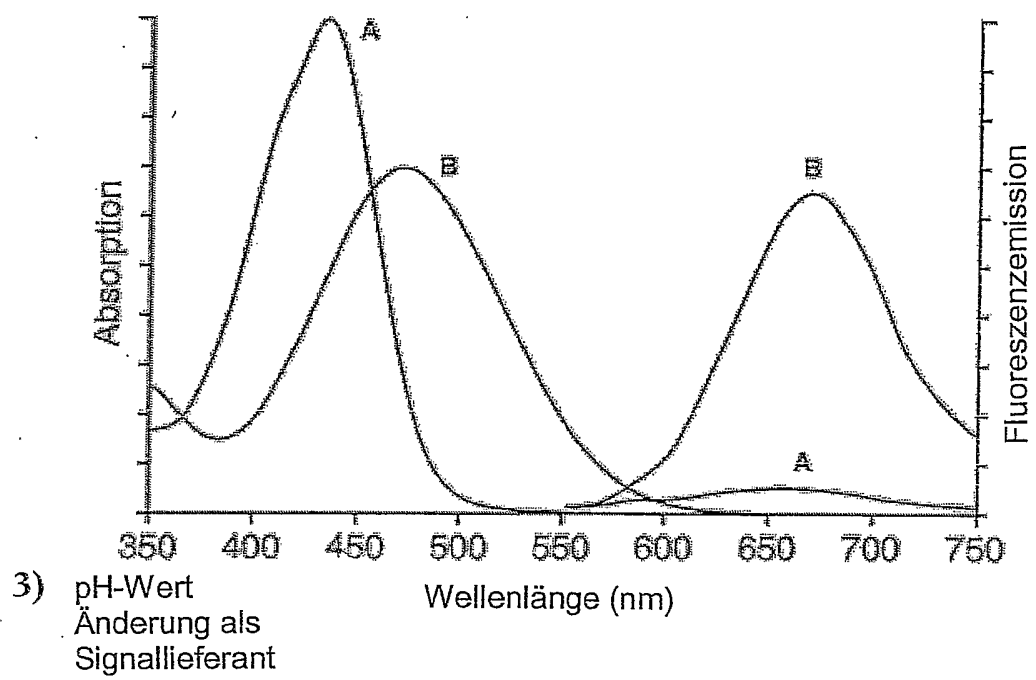
Figur 3



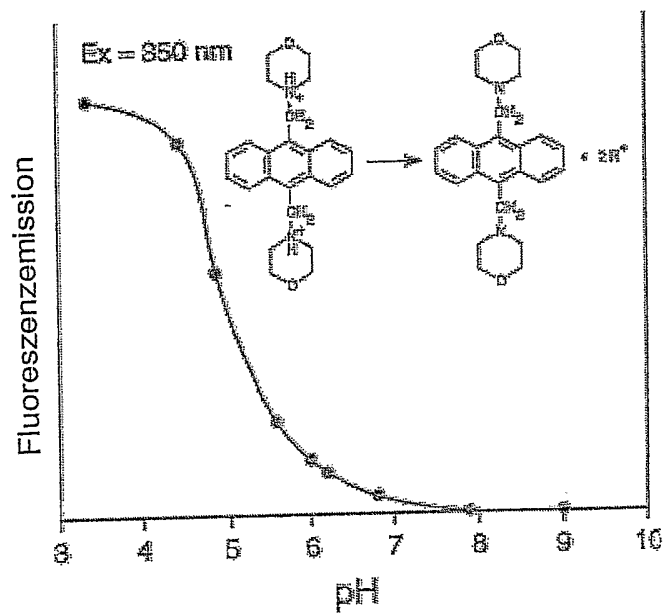
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7

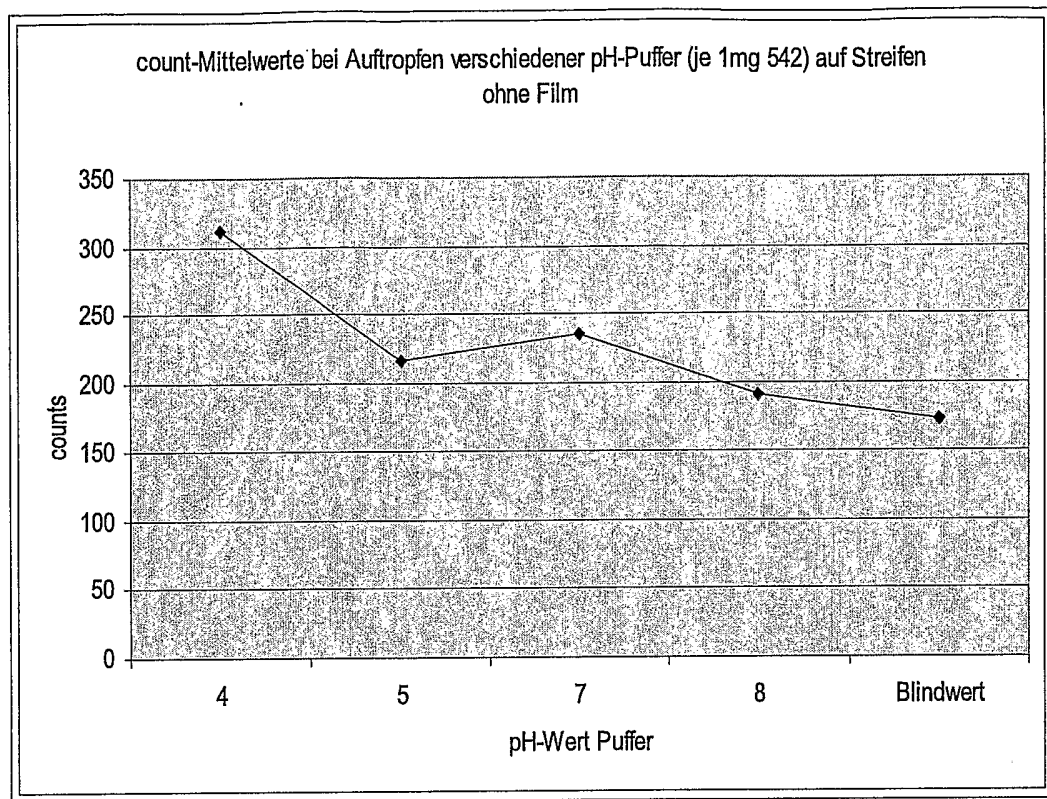


Figure 8

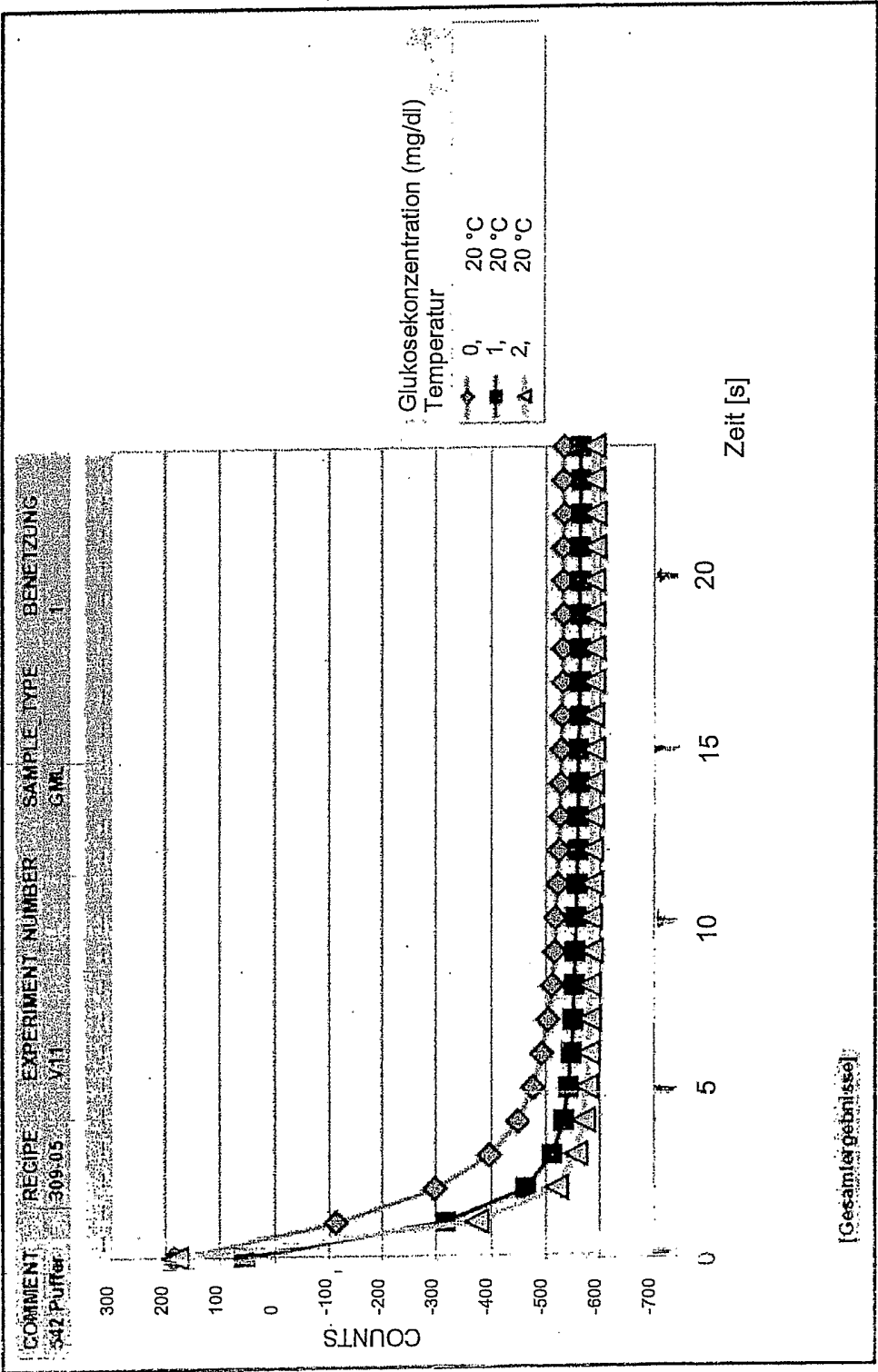
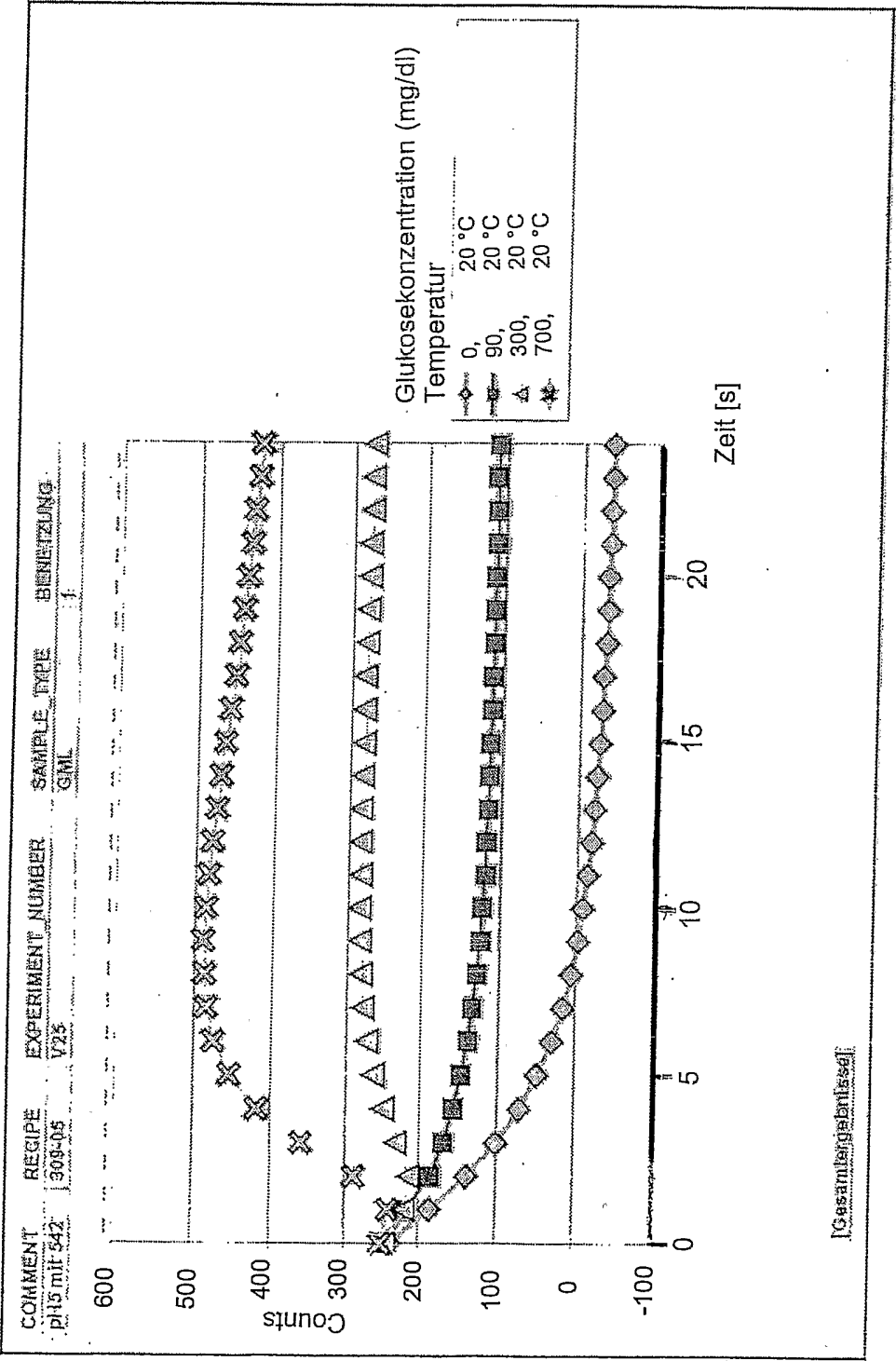


Figure 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/011448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N21/64 G01N21/86 G01N33/542

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, 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	US 5 194 393 A (HUGL ET AL) 16 March 1993 (1993-03-16) figure 1; example 5c column 1, line 5 - line 26 column 2, line 49 - column 4, line 25	1,2,4,5, 13-15, 18,19
X	US 2004/136871 A1 (PACHL RUDOLF 'DE! ET AL) 15 July 2004 (2004-07-15)	1-6, 15-19
Y	paragraphs '0001! - '0006!, '0016! - '0024!, '0031!, '0035!, '0059! - '0062!; figures 1,2	7-12
Y	US 2003/151741 A1 (WOLLESCHENSKY RALF ET AL) 14 August 2003 (2003-08-14) paragraphs '0017!, '0018!, '0074! - '0076!; figure 4	7,8
	----- -/--	

☒ 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

25 January 2006

Date of mailing of the international search report

08/02/2006

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Duijs, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/011448

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 204 067 B1 (SIMON SANFORD M ET AL) 20 March 2001 (2001-03-20) column 8, line 42 - line 55 column 10, line 7 - line 37 -----	9-12
Y	LIN H J ET AL: "Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 15 JUL 2001, vol. 294, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 118-125, XP002364278 ISSN: 0003-2697 abstract -----	9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/011448

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5194393	A	16-03-1993	AT 106566 T CA 2030244 A1 DK 429907 T3 EP 0429907 A2 FI 905701 A JP 3176662 A	15-06-1994 22-05-1991 03-10-1994 05-06-1991 22-05-1991 31-07-1991
US 2004136871	A1	15-07-2004	CA 2444909 A1 DE 10248555 A1 EP 1411346 A2 JP 2004138619 A	18-04-2004 06-05-2004 21-04-2004 13-05-2004
US 2003151741	A1	14-08-2003	DE 10151217 A1 EP 1308715 A1 JP 2003185581 A	17-04-2003 07-05-2003 03-07-2003
US 6204067	B1	20-03-2001	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011448

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
G01N21/64 G01N21/86 G01N33/542

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

B. RESEARCHIERTE 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, 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	US 5 194 393 A (HUGL ET AL) 16. März 1993 (1993-03-16) Abbildung 1; Beispiel 5c Spalte 1, Zeile 5 - Zeile 26 Spalte 2, Zeile 49 - Spalte 4, Zeile 25 -----	1,2,4,5, 13-15, 18,19
X	US 2004/136871 A1 (PACHL RUDOLF 'DE! ET AL) 15. Juli 2004 (2004-07-15)	1-6, 15-19
Y	Absätze '0001! - '0006!, '0016! - '0024!, '0031!, '0035!, '0059! - '0062!; Abbildungen 1,2 -----	7-12
Y	US 2003/151741 A1 (WOLLESCHENSKY RALF ET AL) 14. August 2003 (2003-08-14) Absätze '0017!, '0018!, '0074! - '0076!; Abbildung 4 -----	7,8
	----- -/--	

☒ 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
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/02/2006

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Duijs, E

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 6 204 067 B1 (SIMON SANFORD M ET AL) 20. März 2001 (2001-03-20) Spalte 8, Zeile 42 - Zeile 55 Spalte 10, Zeile 7 - Zeile 37 -----	9-12
Y	LIN H J ET AL: "Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 15 JUL 2001, Bd. 294, Nr. 2, 15. Juli 2001 (2001-07-15), Seiten 118-125, XP002364278 ISSN: 0003-2697 Zusammenfassung -----	9-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011448

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5194393	A	16-03-1993	AT	106566 T	15-06-1994
			CA	2030244 A1	22-05-1991
			DK	429907 T3	03-10-1994
			EP	0429907 A2	05-06-1991
			FI	905701 A	22-05-1991
			JP	3176662 A	31-07-1991
US 2004136871	A1	15-07-2004	CA	2444909 A1	18-04-2004
			DE	10248555 A1	06-05-2004
			EP	1411346 A2	21-04-2004
			JP	2004138619 A	13-05-2004
US 2003151741	A1	14-08-2003	DE	10151217 A1	17-04-2003
			EP	1308715 A1	07-05-2003
			JP	2003185581 A	03-07-2003
US 6204067	B1	20-03-2001	KEINE		