(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
24. Dezember 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/107007 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 33/58, 33/569

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05829

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juni 2003 (04.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 26 097.4 12. Juni 2002 (12.06.2002) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **DORMANN, Jörg, Martin** [DE/DE]; Ulmer Strasse 6/2, 89134 Blaustein (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **WELSCH, Thomas** [DE/DE]; Erhard-Grötzinger-Strasse 80, 89134 Blaustein (DE). **GEIBEL, Margrit-Ann** [DE/DE]; Herrlinger Strasse 10/3, 89134 Blaustein (DE).

(74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR**; Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

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

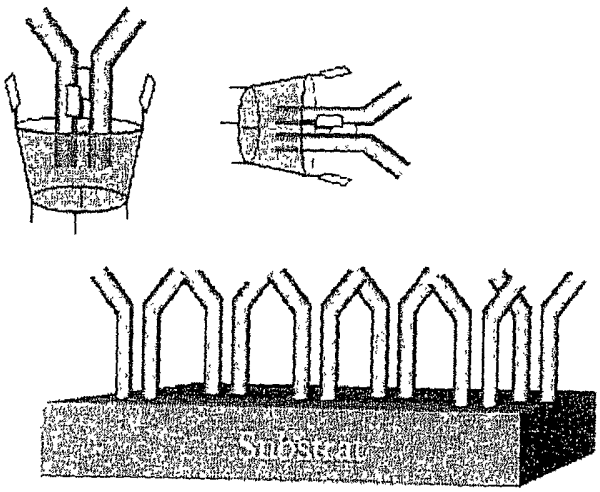
(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

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.

(54) **Title:** RAPID TEST METHOD FOR DETECTING AT LEAST ONE ANTIGEN, AND THE USE OF THE SAME

(54) **Bezeichnung:** SCHNELLTESTVERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MINDESTENS EINEM ANTIGEN SOWIE DESSEN VERWENDUNG



(57) **Abstract:** The invention relates to a rapid test method for detecting at least one antigen by means of optical and/or chemical detection, using specific interactions. The inventive method is a universal rapid test method which enables bacteria and viruses to be simultaneously and quantitatively determined.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Schnelltestverfahren zum Nachweis von mindestens einem Antigen unter Ausnutzung von spezifischen Wechselwirkungen mittels optischer und/oder elektrochemischer Detektion. Hierbei handelt es sich um ein universelles Schnelltest Verfahren, das die simultane, quantitative Bestimmung von Bakterien und Viren ermöglicht.

WO 03/107007 A2

Schnelltestverfahren zum Nachweis von mindestens einem Antigen sowie dessen Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Schnelltestverfahren zum Nachweis von mindestens einem Antigen unter Ausnutzung von spezifischen Wechselwirkungen mittels optischer und/oder elektrochemischer Detektion. Hierbei handelt es sich um ein universelles Schnelltest-Verfahren, das die simultane, quantitative Bestimmung von Bakterien und Viren ermöglicht.

Im Bereich der Infektologie sind verschiedene Methoden zur Identifizierung von Bakterien und Viren bekannt. Hierzu zählen die PCR, ELISA, andere Immunoassays und Blotting-Techniken sowie Antigen-Antikörper-Tests, z.B. die ABCS-Methode. Hinsichtlich der PCR, der ELISA und anderen Immunoassays erfolgt nach dem Stand der Technik die Quantifizierung über interne Standards. Allerdings wird hierdurch die Zahl der Spezies, welche simultan detektiert werden kann,

stark limitiert. Im Falle des Antigen-Antikörper-Prinzips wird bisher in der Regel nur eine einzige Spezies nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt dabei meist mittels Kolorimetrie (Kolloid-Technik und ähnliches), UV-Spektroskopie, Fluoreszenzmessungen und Messungen der Bindungsenergien, die auch laserinduziert erfolgen können. Als spezielle Nachweismethode sei ebenfalls die Cytometrie genannt.

All diesen Verfahren ist gemein, daß es bislang nicht möglich ist, ein komplettes Keimspektrum simultan und quantitativ zu erfassen. Hinzu kommt, daß die meisten der hier genannten Methoden aufwendige Labortests sind, welche einen erheblichen Zeit-, Personal- und Kostenaufwand mit sich bringen.

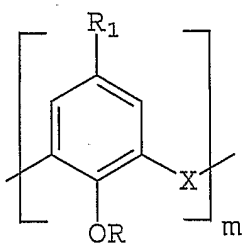
Ausgehend hiervon war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die Bestimmung mehrerer Spezies nach der Schnelltest-Methode ermöglicht und gleichzeitig eine gute Handhabbarkeit aufweist, wobei die Kosten eines derartigen Verfahrens gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren minimiert werden soll.

Diese Aufgabe wird durch das gattungsgemäße Schnelltestverfahren mit den kennzeichnenden Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die weiteren abhängigen Ansprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf. In den Ansprüchen 13 und 14 werden bevorzugte Verwendungen des Schnelltestverfahrens beschrieben.

Erfindungsgemäß wird ein Schnelltestverfahren zum Nachweis von mindestens einem Antigen unter Ausnutzung von spezifischen Wechselwirkungen mittels optischer und/oder elektrochemischer Detektion bereitgestellt. Unter spezifischen Wechselwirkungen sind

hierbei jegliche Arten von koordinativen, kovalenten und nicht kovalenten Wechselwirkungen, z.B. Van-der-Waals-Wechselwirkung, Dipol-Dipol-Wechselwirkung, elektrostatische Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken, zu verstehen.

Dabei wird ein Calixaren der allgemeinen Formel I

I 

mit R = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Aminosäuren, Zucker oder Kronenether,

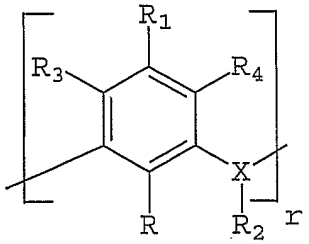
R_1 = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Sulfonamide, Aminosäuren, Zucker, Kronenether, Cyclodextrine, Purinbasen, Pyrimidinbasen oder Azophenylfarbstoffe,

X = Methylen, S, O, N, P oder Si und

m = 4, 5, 6 oder 8,

wobei die aromatischen Systeme Heteroatome aufweisen können und/oder

der Resorcinarene der allgemeinen Formel II

II 

mit R = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen oder Aminosäuren,

R_1 =H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Sulfonamide, Aminosäuren, Zucker, Kronenether, Cyclodextrine, Purinbasen, Pyrimidinbasen oder Azophenylfarbstoffe,

R_2 =Alkyl oder Aryl,

X = Methylen, S, O, N, P oder Si,

r = 4, 5, 6 oder 8,

und

R_3 = Hydroxyl und R_4 = H

oder

R_3 und R_4 = O, wobei R_3 und R_4 über Methylen, Ethylen oder Chinoxalin miteinander verbrückt sind, wobei die aromatischen Systeme Heteroatome aufweisen können, direkt und/oder über einen Antikörper an das mindestens eine Antigen gebunden.

Die Makromoleküle, welche oben aufgeführt wurden, weisen eine Ringstruktur mit einem oberen und einem

unteren Rand, sog. „upper rim" und „lower rim", auf. Die Ringstrukturen haben dabei die Eigenschaft, andere Substanzen, wie z.B. Ionen oder Moleküle, an- oder einzulagern. Es entstehen dabei sogenannte Wirts-Gast-Verbindungen welche man in Abhängigkeit vom verwendeten Makromolekül und der Form der Einlagerung als Clathrat, Komplex, Cavitate, Carceplex usw. bezeichnet.

In diesem Zusammenhang sei nochmals erwähnt, daß die Bezeichnung „Bindung" im Rahmen dieser Anmeldung sämtliche in der Chemie bekannten Bindungstypen umfaßt, z.B. auch ionische, koordinative und weitere nicht-kovalente Bindung, und sich nicht alleine auf klassische kovalente Bindungen beschränkt.

Sowohl die Calixarene wie auch die Resorcinarene lassen sich dabei nahezu beliebig nach einem Baukasten-Prinzip sowohl am oberen wie auch am unteren Rand modifizieren. Eine erfindungsgemäße Variante des Verfahrens sieht vor, daß das Calixaren und/oder das Resorcinaren an einen Antikörper gebunden ist, welcher wiederum an das Antigen bindet. Dabei wird der Antikörper mit dem Calixaren gelabelt, wie man es beispielsweise von Cyanin-5-dyes kennt. In Gegenwart des zu detektierenden Antigens kann es dann zur Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes kommen, wobei bei Verwendung eines an ein Substrat gebundenen Antikörpers als Fänger-Antikörper die Immobilisierung derartiger Sandwich-Komplexe möglich ist. In diesem Fall können sämtliche aus dem Stand der Technik bekannten Quantifizierungsmethoden angewendet werden, wobei sowohl die Kolorimetrie, aber auch die UV-Detektion anwendbar ist.

Eine weitere Alternative des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, daß der Antikörper zunächst an einen Marker gebunden ist, der anschließend durch das Antigen substituiert wird, daß es zur Freisetzung des Markers kommt. Dieses Verdrängungsprinzip beruht darauf, daß der Antikörper die Wechselwirkung mit dem Antigen aus energetischen Gründen bevorzugt, weswegen die Bindung zum Marker gelöst wird.

Der Marker wird dann im Anschluß detektiert, wobei die Detektion auf verschiedenen Wegen erfolgen kann:

- Bei kleinen organischen Molekülen in geladener oder ungeladener Form erfolgt die Detektion durch UV- oder Fluoreszenz-Spektroskopie.
- Bei größeren organischen Molekülen in geladener oder ungeladener Form steht für die Detektion neben der UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie auch noch die Koloriemetrie zur Verfügung.
- Bei organischen oder bioorganischen redoxaktiven Substanzen kann die Detektion über eine Redoxreaktion mit einer der Lösung zugesetzten Komponente erfolgen.
- Bei organischen oder bioorganischen pH-verändernden Substanzen erfolgt die Detektion bevorzugt durch eine Säure-Base-Reaktion mit einer der Lösung zugesetzten Komponente.
- Anorganische Cluster werden bevorzugt mit der UV-Spektroskopie detektiert.
- Kolloide werden ebenfalls vorzugsweise mit der UV-Spektroskopie detektiert.

Ergänzend sei noch darauf hingewiesen, daß auch biosensorische Nachweismethoden ebenso wie die Messung der Bindungsenergien im Sinne der Cytometrie für die Detektion angewendet werden können.

In einer vorteilhaften Weiterbildung des Verfahrens wird der Fänger-Antikörper an ein Substrat gebunden. Dies ermöglicht die Immobilisierung von zu detektierenden Antigenen an der Substratoberfläche.

Eine weitere wichtige Alternative des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, daß das Calixaren und/oder das Resorcinaren direkt an das Antigen gebunden wird. Dabei tritt das Calixaren als spezifisches Bindungsagens, sog. künstlicher Antikörper, für das Antigen auf. Dabei ist es ebenso wie bei den zuvor genannten Varianten möglich, daß an das Calixaren und/oder Resorcinaren ein Marker gebunden ist, der durch das Antigen substituiert wird. Der durch diese Verdrängungsreaktion freigesetzte Marker wird wie zuvor beschrieben, im Anschluß detektiert. Diese Variante kann sowohl in Lösung erfolgen, als auch in immobilisierter Form, indem das Calixaren und/oder das Resorcinaren an ein Substrat gebunden ist. Das Calixaren bzw. das Resorcinaren kann dabei sowohl als Fänger-Antikörper als auch als Marker-Antikörper verwendet werden.

Verwendung findet das erfindungsgemäße Verfahren vor allem im Bereich der Immunoassays, der Blotting-Techniken und der Antigen-Antikörper-Tests. Besonders bevorzugt wird das Verfahren im Bereich der ELISA und PCR.

Anhand der nachfolgenden Figuren soll das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert werden, ohne dieses auf diese einzelnen Ausführungsvarianten einzuschränken.

Die Figuren 1 bis 8 stellen verschiedene Varianten für die Verwendung der Calixarene bzw. Resorcinarene

in den einzelnen Schnelltestverfahren dar.

In Figur 1 sind mehrere an einem Substrat immobilisierte Antikörper dargestellt, die als Fänger-Antikörper für das Antigen wirken. Durch die spezifische Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen wird das Antigen zunächst an den Fänger-Antikörper gebunden. In einem weiteren Verfahrensschritt kann dann an das Antigen ein weiterer Antikörper gebunden werden. Dieser sogenannte Marker-Antikörper ist dabei mit einem Calixeren bzw. Resorcienaren gelabelt, das im Anschluß optisch oder elektrochemisch detektiert werden kann.

In Figur 2 ist eine Variante eines Schnelltestverfahrens dargestellt, die große Ähnlichkeit zu dem in Figur 1 dargestellten Verfahren besitzt. Lediglich in Bezug auf die Immobilisierung der Antikörper am Substrat wird hier als Kopplungselement ein Calixaren bzw. Resorcinaren eingesetzt, mit dem eine größere Ankopplungsvielfalt realisiert werden kann.

In Figur 3 ist eine Variante des Schnelltestverfahrens dargestellt, daß nach einem Verdrängungsprinzip arbeitet. So sind zunächst an die immobilisierten Antikörper Marker angebunden. Diese Marker werden nun bei Zugabe des Antigens aufgrund dessen spezifischeren Bindungsmöglichkeit freigesetzt. Da es sich bei den Markern entweder um optisch oder elektrochemisch aktive Spezies handelt, können diese im Anschluß detektiert werden. Diese Verfahrensvariante ist ebenso in Lösungen durchführbar, wie Figur 4 zeigt. Auch hier werden die an die Antikörper gebundenen Marker durch das Antigen verdrängt und anschließend detektiert.

In Figur 5 ist eine erfindungsgemäße Variante des Verfahrens dargestellt, bei dem ein Calixaren bzw. Resorcinaren als Fänger-Antikörper fungiert. Die Calixarene bzw. Resorcinarene sind hierbei an ein Substrat gebunden und können durch entsprechende Modifizierungen antikörpergleich das Antigen mit hoher Spezifität binden. Das derart immobilisierte Antigen kann im Anschluß an weitere Antikörper angekoppelt werden.

Figur 6 zeigt ein zu Figur 5 vergleichbares System, bei dem Calixarene bzw. Resorcinarene an einem Substrat immobilisiert sind und im „Kelchinneren" jeweils Marker gebunden sind. Nach dem Verdrängungsprinzip werden diese Marker aufgrund des Eintreffens des Antigens dann freigesetzt und können im Anschluß detektiert werden.

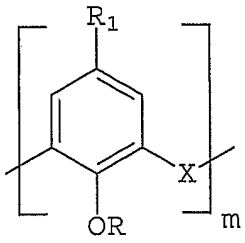
In Figur 7 ist eine Variante dargestellt, bei der das Calixaren bzw. Resorcinaren als Marker-Antikörper dient. Das Antigen ist hierbei an das oder die immobilisierten Antikörper gebunden. Die Marker-Antikörper können dabei entsprechend modifiziert werden, so daß sie auf einfache Weise optischen oder elektrochemischen Detektionsmethoden zugänglich sind.

In Figur 8 ist eine weitere Variante des Verfahrens dargestellt, bei der ein Antigen an ein mit einem Marker „gefülltes" Calixaren bzw. Resorcinaren gebunden ist. In diesem Stadium ist eine Freisetzung des Markers ausgeschlossen, da dies durch die Anbindung des Antigens verhindert wird. Kommt das Antigen nun mit dem am Substrat immobilisierten Antikörper in Kontakt, so erfolgt aufgrund der Spezifität der Bindung eine Ankopplung des Antigens an den Antikörper, wobei gleichzeitig das Calixaren freigesetzt wird.

Bei diesem Freisetzungsvorgang wird gleichzeitig auch der Marker aus dem „Kelchinneren" freigesetzt, der dann im Anschluß detektiert werden kann.

Patentansprüche

1. Schnelltestverfahren zum Nachweis von mindestens einem Antigen unter Ausnutzung von spezifischen Wechselwirkungen mittels optischer und/oder elektrochemischer Detektion,
dadurch gekennzeichnet,
dass mindestens ein Calixaren der allgemeinen Formel I

I 

mit R = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Aminosäuren, Zucker, Kronenether,

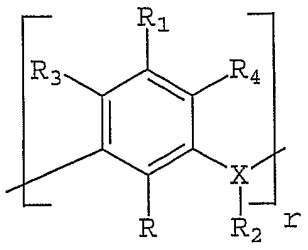
R_1 = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Sulfonamide, Aminosäuren, Zucker, Kronenether, Cyclodextrine, Purinbasen, Pyrimidinbasen, Azophenylfarbstoffe,

X = Methylen, S, O, N, P oder Si und

m = 4, 5, 6 oder 8,

wobei die aromatischen Systeme Heteroatome aufweisen können und/oder

der Resorcinarene der allgemeinen Formel II

II 

mit R = H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Aminosäuren,

R_1 =H, Alkyl, Aryl, Alkyloxy, Aryloxy, Amin, Amid, Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, Sulfonamide, Aminosäuren, Zucker, Kronenether, Cyclodextrine, Purinbasen, Pyrimidinbasen, Azophenylfarbstoffe,

R_2 =Alkyl, Aryl,

X = Methylen, S, O, N, P oder Si,

r = 4, 5, 6 oder 8,

und

R_3 = Hydroxyl und R_4 = H

oder

R_3 und R_4 = O, wobei R_3 und R_4 über Methylen, Ethylen oder Chinoxalin miteinander verbrückt sind, wobei die aromatischen Systeme Heteroatome aufweisen können,

direkt und/oder über einen Antikörper an das mindestens eine Antigen gebunden wird.

2. Schnelltestverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Calixaren und/oder das Resorcinaren an einen Antikörper gebunden ist, welcher wiederum an das Antigen bindet.

3. Schnelltestverfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein an das Calixaren und/oder das Resorcinaren gebundener Antikörper den detektierbaren Marker-Antikörper für das Antigen darstellt.

4. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass an den Antikörper ein Marker gebunden ist, der durch das Antigen substitutiert wird, wobei es zur Freisetzung des Markers kommt, der im Anschluß detektiert wird.

5. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein an das Calixaren und/oder Resorcinaren gebundener Antikörper den Fänger-Antikörper für das Antigen darstellt.

6. Schnelltestverfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Fänger-Antikörper an ein Substrat gebunden ist.

7. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Calixaren und/oder das Resorcinaren direkt an das Antigen gebunden wird.

8. Schnelltestverfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass an das Calixaren und/oder das Resorcinaren ein Marker gebunden ist, der durch das Antigen substituiert wird, wobei es zur Freisetzung des Markers kommt, der im Anschluß detektiert wird.

9. Schnelltestverfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Calixaren und/oder das Resorcinaren an ein Substrat gebunden wird.

10. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Calixaren und/oder das Resorcinaren als Fänger-Antikörper eingesetzt wird.

11. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Calixaren und/oder das Resorcinaren als Marker-Antikörper für das Antigen verwendet wird.

12. Schnelltestverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Calixaren und/oder das Resorcinaren direkt an das Antigen gebunden wird.

13. Verwendung des Schnelltestverfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12 für Immunoassays, Blotting-Techniken und Antigen-Antikörper-Tests.

14. Verwendung nach Anspruch 13 für ELISA und PCR.

Fig. 1

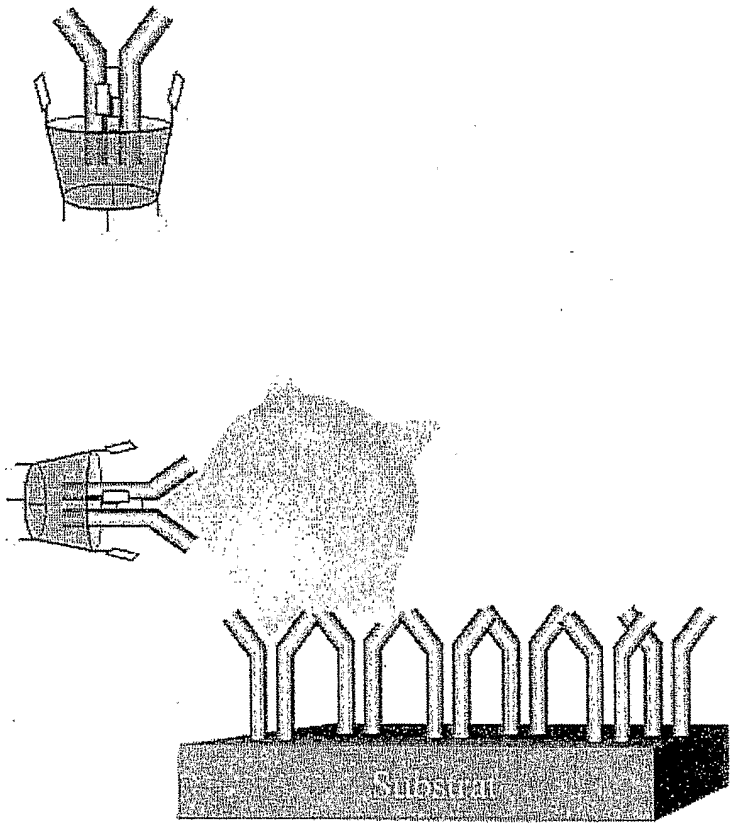


Fig. 2

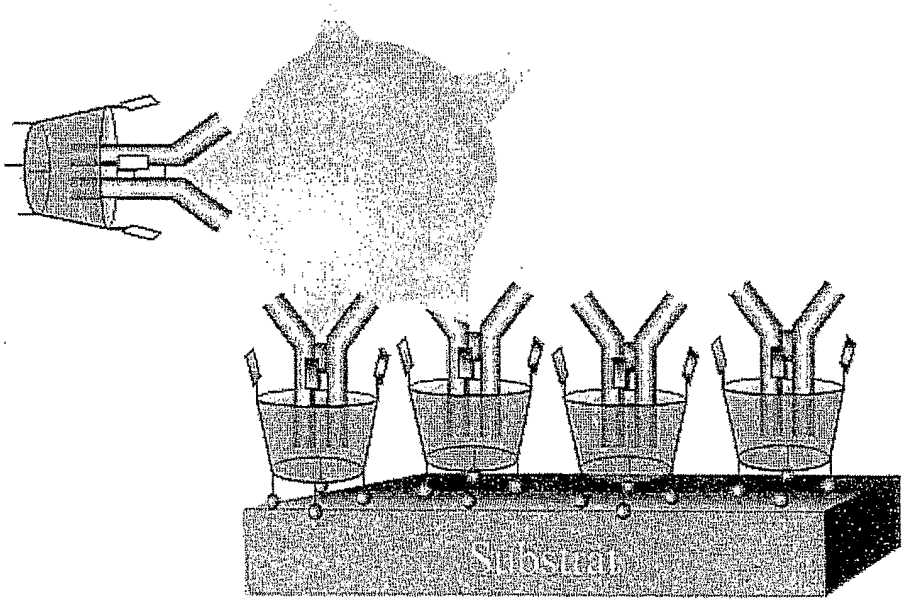


Fig. 3

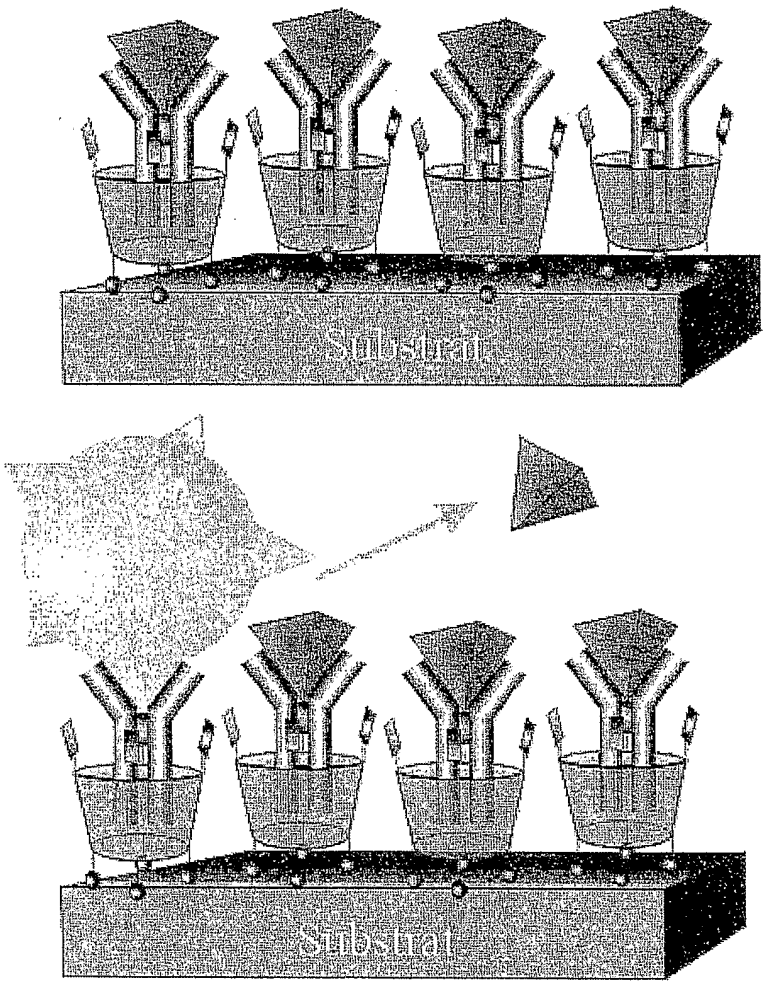


Fig. 4

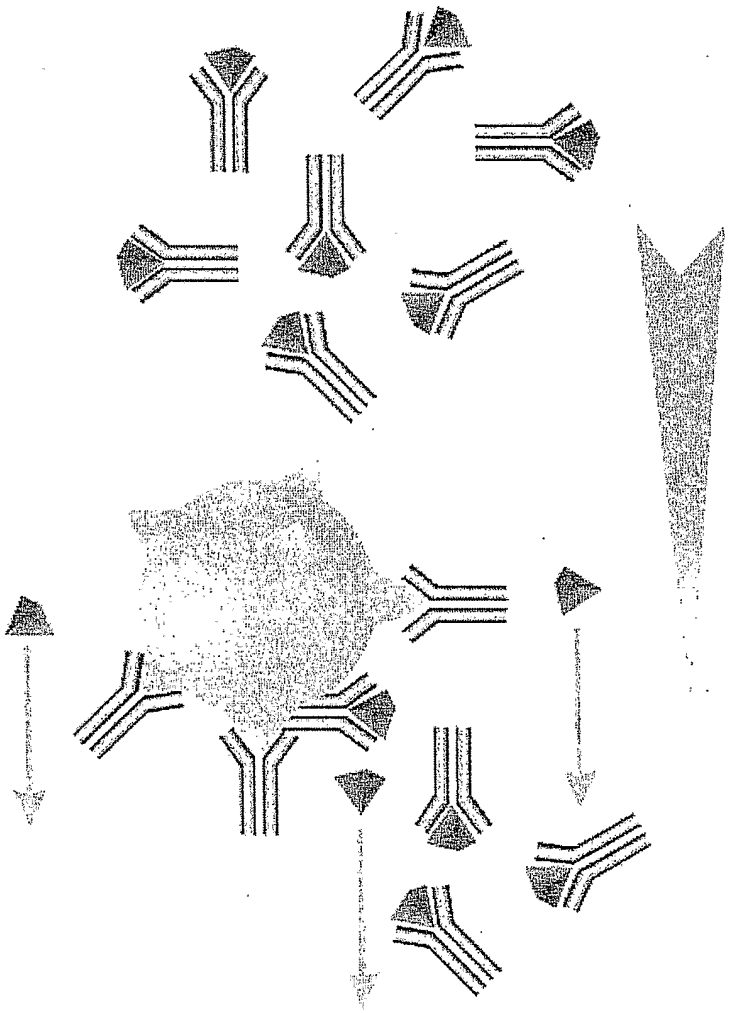


Fig. 5

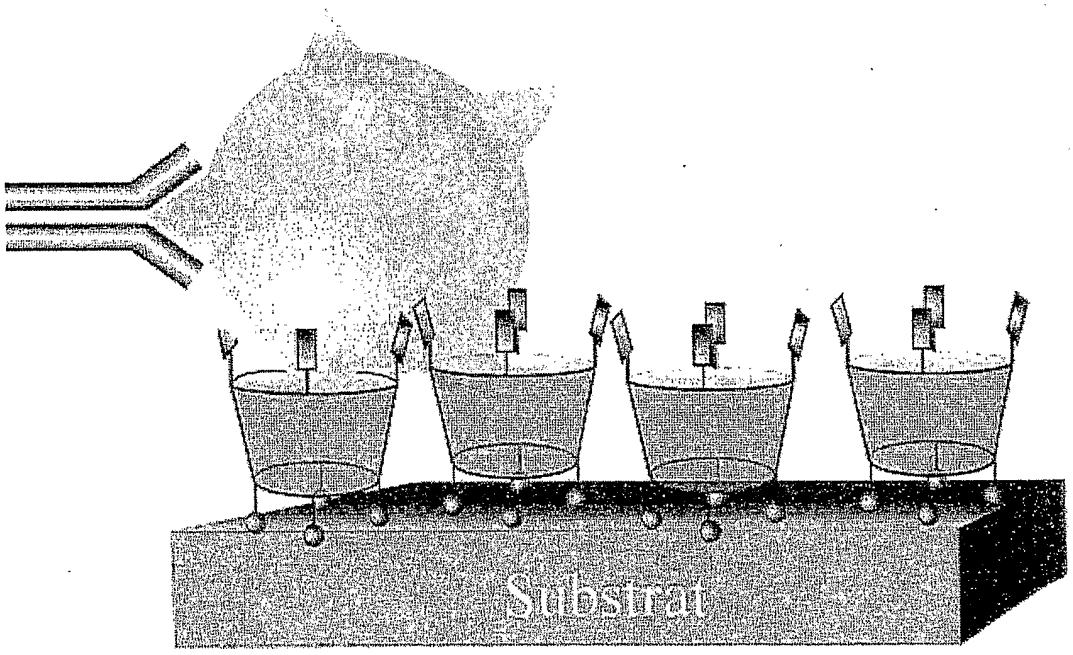


Fig. 6

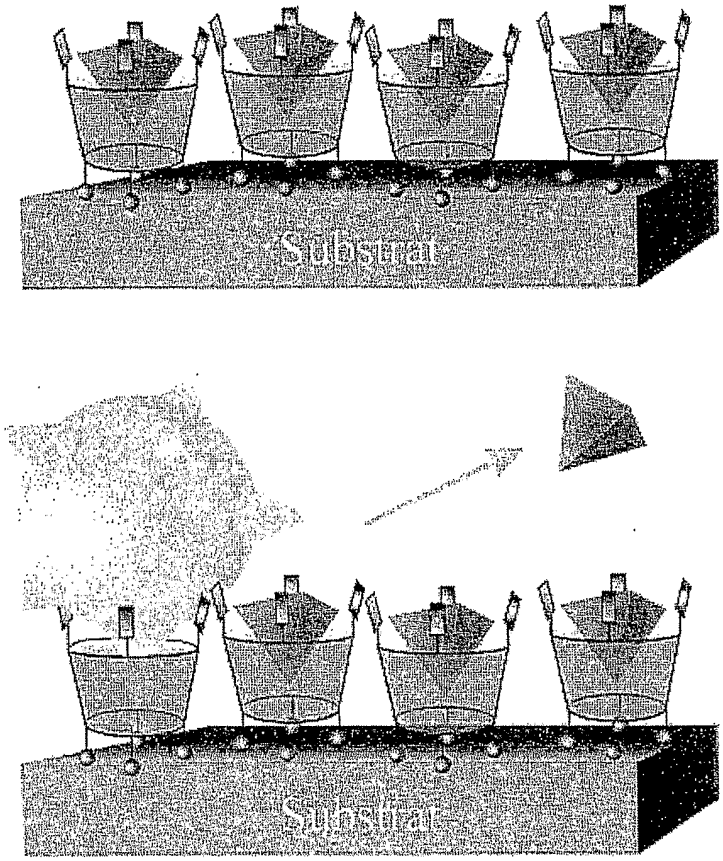


Fig. 7

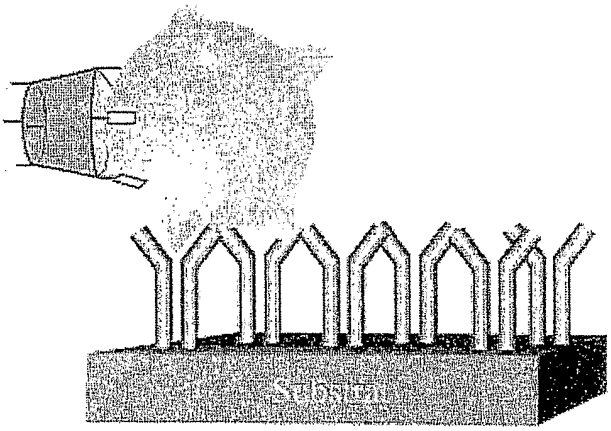


Fig. 8

