

(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
18. August 2011 (18.08.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/097664 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2011/000074
- (22) Internationales Anmeldedatum:
9. Februar 2011 (09.02.2011)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
A 184/2010 10. Februar 2010 (10.02.2010) AT
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSHOLDING TU GRAZ GMBH** [AT/AT]; Rechbauerstraße 12, A-8010 Graz (AT). **TECHNISCHE UNIVERSITÄT GRAZ** [AT/AT]; Rechbauerstraße 12, A-Graz 8010 (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GÜBITZ, Georg** [AT/AT]; Hans Klöpfer-Gasse 21, A-8047 Hart bei Graz (AT). **WEHRSCHÜTZ-SIGL, Eva** [AT/AT]; Korösisstraße 611, A-8010 Graz (AT). **HASMANN, Andrea** [AT/AT]; Sandgasse 41/42, A-8010 Graz (AT). **SCHRÖDER, Marc** [LU/LU]; Huserknapp 42, L-9753 Heinerscheid (LU). **SCHNEIDER, Konstanfin** [AT/AT]; Enge Gasse 4, A-8010 Graz (AT). **ROLLETT, Alexandra** [AT/AT]; Brockmanngasse 16, A-8010 Graz (AT). **KAUFMANN, Franz** [DE/DE]; Ferdinand-Weiss-Straße 57, 79106 Freiburg (DE). **HAFNER, Andreas** [CH/CH]; Balkenweg 23, CH-4460 Gelterkinden BL (CH).
- (74) Anwalt: **SONN & PARTNER**; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Erklärungen gemäß Regel 4.17:**
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)
- Veröffentlicht:**
- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)



WO 2011/097664 A2

(54) Title: TEST ARRANGEMENT

(54) Bezeichnung : TESTANORDNUNG

(57) Abstract: The invention relates to an arrangement, comprising a solid carrier and a matrix arranged on the solid carrier, said matrix comprising at least one enzymatically convertible or modifiable molecule and comprising at least one enzyme that can be released by the conversion or modification of the molecule, said enzyme being capable of converting at least one color-changing substrate located in the matrix and/or on the solid carrier.

(57) Zusammenfassung: Anordnung umfassend einen festen Träger und eine an dem festen Träger angeordnete Matrix umfassend mindestens ein enzymatisch umsetzbares oder modifizierbares Molekül, welche Matrix mindestens ein durch Umsetzung oder Modifikation des Moleküls freisetzbare Enzym umfasst, das in der Lage ist zumindest ein in der Matrix und/oder am festen Träger befindliches farbänderndes Substrat umzusetzen.

Testanordnung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anordnung, welche geeignet ist, u.a. Mikroorganismen in einer Probe zu detektieren.

Der Nachweis von Mikroorganismen im Allgemeinen und die Identifizierung der nachgewiesenen Mikroorganismen in einer Probe ist in vielen Bereichen von erheblicher Wichtigkeit. So können beispielsweise Mikroorganismen für den Verderb oder die kurze Haltbarkeit von Lebensmitteln verantwortlich sein. Ferner spielen Mikroorganismen auch eine wichtige Rolle bei vielen Erkrankungen (z.B. Entzündungen) des Menschen und der Tiere. Es ist daher von großer Wichtigkeit das Vorhandensein von Mikroorganismen rechtzeitig zu erkennen, um entsprechende Maßnahmen zu setzen.

Im Stand der Technik sind verschiedenste Systeme und Verfahren beschrieben, die geeignet sind Mikroorganismen in einer Probe zu bestimmen. Diese Systeme können teilweise auch dazu eingesetzt werden spezielle Substanzen (z.B. Proteine wie Enzyme) in einer Probe nachzuweisen.

Zur Bestimmung mikrobieller Kontaminationen, beispielsweise, können Systeme eingesetzt werden die simple Adsorption erfordern. So wird zum Beispiel in der US 2001/017270 A1 eine Goldoberfläche mit immobilisierten Kohlenhydraten oder einem entsprechenden Derivat beschrieben, wobei die Bindung von Proteinen, Viren oder Bakterienzellen ein detektierbares Signal bewirkt.

In anderen Systemen werden andere äußere Einflüsse, wie zum Beispiel pH-Wert, ionische Stärke und Polarität zunutze gemacht. Eine durch die Anwesenheit von Mikroorganismen bedingte Änderung dieser Parameter kann z.B. zu einer Farbentwicklung oder -änderung führen.

In der WO 2006/065350 A2 erfolgt die Detektion von Mikroorganismen mittels eines Farbstoffes, welcher einen sichtbaren Farbwechsel bei Anwesenheit eines oder mehrerer Mikroorganismen zeigt. Dieser Farbwechsel basiert auf Unterschieden in der Polarität des Lösungsmittels bzw. Säure-Base-Reaktionen, Redox-Reaktionen, welche durch die Wechselwirkung zwischen Mikroorganismus und Sensor entstehen.

Ein weiteres, sehr einfaches System basiert auf der Detekti-

on einer pH-Wert-Verschiebung während der mikrobiellen Kontamination (IE 20060034).

In der WO 98/010556 A1 wird unter anderem ein Verfahren geoffenbart, mit dessen Hilfe Moleküle an Bindungsstellen innerhalb eines Geltröpfchens gebunden werden können. Dabei werden Moleküle, welche von innerhalb des Geltröpfchens befindlichen Zellen sekretiert werden, an die freien Bindungsstellen der Geltröpfchen gebunden.

In der WO 03/033691 A1 wird ein Mikrochip geoffenbart, mit dessen Hilfe die antibakterielle Aktivität von Antibiotika getestet werden kann. Bei der Herstellung eines derartigen Chips werden prokaryotische und eukaryotische Zellen in einem Gel durch dessen Polymerisierung immobilisiert.

In der US 5,366,881 A werden polymerisierbare Lipide und Mischungen davon geoffenbart, in welche Wirkstoffe, Enzyme, fluoreszierende Substanzen und dgl. eingebracht werden können. Durch Stimulantien von außen, wie pH-Änderung oder Ionen, werden die eingekapselten Substanzen freigesetzt.

In der US 2006/0233854 A wird eine Matrix geoffenbart, welche aus einem Protein-„Backbone“ besteht, welches mit Polyethylenglykol quervernetzt ist. Diese Matrix eignet sich insbesondere zur Gewebsregeneration. Die Matrix kann dabei zusätzlich einen biologisch aktiven Wirkstoff umfassen, der durch den Abbau der Matrix am Wirkort an das umliegenden Gewebe abgegeben wird. Um zu testen inwieweit diese Matrix den darin enthaltenen biologischen aktiven Wirkstoff freigibt, wurden gefärbte Fibrinogen-Fragmente in die Matrix aufgenommen.

Yan et al. (Biosens Bioelectron. 24 (8) (2009):2604-2610) beschreibt Biosensoren, die geeignet sind Wasserstoffperoxid in einer Probe zu bestimmen. Diese Biosensoren umfassen ein Hydrogel auf Polyethylenglykolbasis, welche zusätzlich mit Meerrettichperoxidase versetzt ist. Um schlussendlich am Biosensor direkt die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in einer Probe zu bestimmen, wird zusätzlich noch ein Substrat der Meerrettichperoxidase, nämlich Amplex Red, zugesetzt.

Ulijn et al. (Materials Today 10 (4) (2007):40-48) befassen sich mit bioresponsiven Hydrogelen. Darin werden verschiedenste Hydrogele diskutiert die je nach Mittel mit denen sie in Kontakt gebracht werden unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.

Die US 2008/0057534 A1 beschreibt die visuelle Detektion ei-

ner mikrobiellen Kontamination durch den Abbau einer Deckschicht bestehend aus mikrobensensitiven Farbstoffen. Diese mikrobensensitiven Farbstoffe verändern bei Anwesenheit von Mikroben in der Probe die Farbe, so dass die Farbe entweder verloren geht oder ein Farbwechsel erfolgt. Die Farbstoffe können auf jede beliebige Unterlage aufgebracht werden. Eine gewisse, wenn auch sehr eingeschränkte, Selektivität wird durch die Art der Farbstoffe möglich.

Neben den Änderungen der unmittelbaren Umgebung können auch sekretierte Moleküle wie zum Beispiel Metabolite oder Enzyme zur Detektion von Mikroorganismen herangezogen werden. So beschreibt die EP 0 347 771, beispielsweise, ein Verfahren zur Charakterisierung von Enzymen verschiedener Bakterien, welche häufig in Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorkommen. Sechsvierzig verschiedene fluoreszierende Substrate können in einem derartigen Test verwendet werden. Anhand der Vielzahl an unterschiedlich fluoreszierenden Substraten und enzymatischen Reaktionsprofilen können mit diesem Verfahren unterschiedliche Mikroorganismen identifiziert werden.

Derartige Systeme können, z.B. in einem System wie in der US 2004/0018641 A1 beschrieben, zum Einsatz kommen. Durch Erscheinen oder Verschwinden von computerlesbaren Barcodes kann eine im Lebensmittelbereich vorhandene Kontamination aufgezeigt werden. Die Indikation beruht auf dem Nachweis von Gasen, Temperatur- und pH-Wert-Unterschieden, sowie Toxinen oder anderer Metaboliten aus Bakterien.

Neben den visuell sichtbaren Farbstoffen kann auch Fluoreszenz herangezogen werden. Sehr oft werden hier Systeme basierend auf einer PCR Methode genutzt. Das beispielsweise in der US 2007/0122831 A1 beschriebene System nutzt die unterschiedlichen DNA Sequenzen verschiedener Mikroorganismen für die Detektion von mikrobieller Kontamination und zur Identifikation deren Ursprungs in wässrigen Proben.

Die US 6,297,059 B1 beschreibt ein Verfahren zur Messung mikrobieller Kontamination mittels Fluoreszenz aufgebaut auf eine flüssige Zweischichtmembran. Durch das Ansprechen mehrwertiger oder polyvalenter Zielbiomoleküle werden pro Molekül zwei oder mehrere Fluoreszenzquencher bzw. eine Übertragung der Extinktionsenergie auf einen Fluoreszenzakzeptor ausgelöst und somit eine Signalverstärkung erzielt.

Anordnungen und Vorrichtungen der oben beschriebenen Art weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Einer der wesentlichsten Nachteile vieler der oben beschriebenen Systeme ist deren Trägheit und geringe Nachweisempfindlichkeit, da die Reaktionen in diesen Vorrichtungen, welche durch unterschiedliche Substanzen („Trigger“) ausgelöst werden, nicht verstärkt werden und dies nur langsam zu einer Signalgebung führt.

Weiters ist in vielen Fällen keine Schutzschicht vorhanden, sodass das System nur begrenzt stabil ist. Einfache Anzeigesysteme basierend auf Adsorption oder Verschiebung des pH-Wertes besitzen sehr geringe Selektivität und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen. Alternativ hierzu können Systeme basierend auf Antikörpern verwendet werden. Diese haben jedoch den Nachteil hoher Kosten und den Bedarf an entsprechenden Instrumenten.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung Vorrichtungen bzw. Anordnungen zur Verfügung zu stellen, welche die oben genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anordnung umfassend einen festen Träger und eine an dem festen Träger angeordnete Matrix umfassend mindestens ein enzymatisch umsetzbares oder modifizierbares Molekül, vorzugsweise Polymer oder Oligomer, welche Matrix mindestens ein durch Umsetzung oder Modifikation des Moleküls, vorzugsweise Polymers oder Oligomers, freisetzbares Enzym umfasst, das in der Lage ist zumindest ein in der Matrix und/oder am festen Träger befindliches farberzeugendes Substrat umzusetzen.

Mit der erfindungsgemäßen Anordnung wird ein robustes System zur Verfügung gestellt, mit dessen Hilfe in einer Probe vorhandene Substanzen, insbesondere Enzyme, welche beispielsweise von Mikroorganismen sekretiert werden oder von anderen Quellen, wie beispielsweise dem Immunsystem stammen, zuverlässig detektiert werden können.

Die erfindungsgemäße Anordnung umfasst neben einem festen Träger und einer optionalen diesem gegenüberliegenden semipermeablen Membran eine Matrix, welche auf dem festen Träger bzw. gegebenenfalls zwischen dem festen Träger und der semipermeablen Membran angeordnet ist. Die Matrix umfasst mindestens ein Molekül, vorzugsweise Polymer, welches durch in der Probe vorhandene Substanzen (z.B. Enzyme), abgebaut, umgesetzt bzw. modifiziert

werden kann. Durch den Abbau, die Umsetzung bzw. der Modifizierung derartiger Moleküle bzw. Polymere in der Matrix verändern sich deren Eigenschaften. Insbesondere kann die Umsetzung bzw. Modifikation des Moleküls bzw. Polymers oder Oligomers dazu führen, dass sich deren strukturellen Eigenschaften ändern, was zu einer Reduktion des Vernetzungsgrades bzw. der Viskosität, zur Änderung der Poren im Polymer oder zu einem Abbau der Polymerketten führen kann. Durch diese Modifikationen wird das in der Matrix befindliche freisetzbare Enzym mobiler und kann sich innerhalb der Matrix, insbesondere im Zwischenraum zwischen festem Träger und semipermeabler Membran, freier bewegen bzw. diffundieren. Durch die erhöhte Mobilität des Enzyms innerhalb der Anordnung wird diesem ermöglicht ein in der Matrix und/oder am festen Träger befindliches farberzeugendes Substrat umzusetzen bzw. freizusetzen und/oder das in der Matrix befindliche Molekül bzw. Polymer abzubauen.

Durch das Vorsehen von Enzymen in der erfindungsgemäßen Matrix, welches das Molekül bzw. Polymer in der Matrix umsetzt, abbaut oder modifiziert, wird die Mobilität der Enzyme in der Matrix vergrößert, sobald das Molekül bzw. Polymer durch extrinsische Faktoren aus der Probe abgebaut wird. Es kommt somit zu einer Farbreaktion und gegebenenfalls zu einer Verstärkung der Detektionsreaktion, da die Freisetzung der Molekül- bzw. Polymermodifizierenden bzw. -umsetzenden Enzyme in der Matrix, falls vorhanden, den Abbau des Moleküls bzw. Polymers verstärkt und beschleunigt. Dadurch ist es erstmals möglich geringste Konzentrationen solcher Stoffe bzw. Mikroorganismen in einer Probe nachzuweisen.

In der Matrix bzw. im Polymer können neben den Enzymen, die ein farberzeugendes Substrat umsetzen, auch Enzyme enthalten sein, die die Modifikation, Umsetzung oder den Abbau des Polymers unterstützen. Diese Enzyme sind entweder in das Polymer eingelagert oder an das Polymer über kovalente Bindungen gebunden. Im Zuge des Abbaus des Polymers werden diese Enzyme mobilisiert und können mit deren Substrat, welches am festen Träger gebunden ist oder sich im Polymer befindet, reagieren und eine Farbreaktion (z.B. Bildung von Farbe oder Änderung der Farbe) hervorrufen.

Ein derartiges System eignet sich beispielsweise um bereits geringste Mengen an Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder

Pilze, in einer Probe nachzuweisen. Dabei durchdringt ein von einem kontaminierenden Bakterium oder Pilz sekretiertes Enzym die schützende, semipermeable Membran, baut eine auf einem Trägermaterial aufgebrachte Matrix (z.B. ein Polysaccharid, ein Enzym oder Kombinationen davon, mit oder ohne Quervernetzung) ab und leitet somit die Freisetzung des Enzyms ein, welches als enzymatisches Verstärkungssystem, die Freisetzung beschleunigt und/oder die Detektion einer mikrobiellen Kontamination erst ermöglicht.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten um das Polymer in der Matrix abzubauen, wie z.B. chemische, physikalische sowie biochemische. Beim chemischen Abbau wie z.B. einer Änderung des pH-Wertes, der ionischen Stärke oder chemischer Reagenzien werden die Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten untereinander oder der Ketten mit den Lösungsmitteln auf molekularer Ebene verändert. Bei der physikalischen Stimulation (z.B. Temperatur, elektromagnetisches Feld und mechanischer Stress) erfolgt eine Veränderung molekularer Wechselwirkungen. Generell können biosensible Polymere und Mikrokapseln einfach auf pH-Wert-Änderungen in verschiedenen Umgebungen reagieren (Khayat, Int. J. Pharma 2006 317: 175-186; Li and Szoka Pharmaceutical Res. 2007 24:438-449; Nagareskar J. Biomed. Mater. Res. 2002 62: 195-203).

Bioresponsives Verhalten wird Bauteilen durch eine Beschichtung mit Biomaterialien, welche durch extrazelluläre Enzyme abgebaut werden können, verliehen. Extrazelluläre mikrobielle Enzyme können als sog. Trigger fungieren und somit die Freisetzung von im Polymer eingeschlossenen und/oder gebundenen aktiven Enzymen initiieren. Dabei definiert die Art des Polymers (Polypeptid, Polysaccharid, synthetisches Polymer...) die Art der benötigten Trigger-Enzyme. Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, die sie an die Umgebung abgeben um neben vielen anderen Funktionen, z.B. Nahrungsbestandteile, aufzuschließen um diese in die Zelle aufnehmen zu können. Extrazelluläre Enzyme dienen somit unter anderem dem Abbau von großen Molekülen und Polymeren. Die Hydrolyse einer Vielzahl von Biopolymeren wird von Hydrolasen katalysiert, die je nach Substrat in Lipasen, Proteasen, Esterasen, Glycosidasen, u.a. eingeteilt werden können.

Der Begriff „Polypeptid“, wie hier verwendet, umfasst Po-

lypeptide mit einer Mindestgröße von 50 Aminosäuren und schließt somit auch Proteine ein.

Ein „durch Abbau des Polymers freisetzbare Enzym“ (Polypeptid) ist ein Enzym, welches in das Polymer der Matrix eingelagert ist und aufgrund der Quervernetzung des Polymers nicht diffundieren kann oder welches an das Polymer durch kovalente und/oder nicht kovalente Bindungen gebunden ist. In beiden Fällen sind die Enzyme vor Abbau des Polymers im Wesentlichen im Polymer immobilisiert bzw. nur beschränkt beweglich. Durch den Abbau, die Modifikation bzw. Umsetzung des Polymers werden dessen langkettige bzw. quervernetzte Ketten verkürzt bzw. gespalten, sodass die Enzyme in der Matrix freigesetzt, d.h. beweglicher, werden und darin herumdifundieren können.

„Semipermeable Membran“, wie hier verwendet, bezieht sich auf Membranen, die einen Zugang der Trigger bzw. Enzyme von außen in die erfindungsgemäße Anordnung erlaubt, aber die Diffusion der in der Matrix befindlichen Enzyme und anderer Matrixbestandteile nach außen verhindert.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Anordnung wird das im Polymer befindliche Enzym und das farberzeugende Substrat so gewählt, dass bei Inkontaktbringen beider Stoffe das Substrat umgesetzt wird und es dadurch zur Farbbildung kommt.

Das farberzeugende Substrat wird durch im Polymer befindliche Enzyme umgesetzt, wodurch es zu einer Farbbildung oder Farbänderung kommt. So kann z.B. durch Abspaltung einer chemischen Gruppe aus dem Substratmolekül oder durch Änderung des Redoxzustandes eine Farbbildung erfolgen. Die Farbbildung oder -änderung kann auch durch enzymatische Abspaltungen in der Umgebungsmatrix erfolgen (z.B. durch Abspaltung eines Quenchers, Änderung des pH-Wertes durch Umesterung).

Weiters kann auch eine in-situ Farbstoffsynthese oder Farbstoffentfärbung durch die enzymatische Umsetzung eines oder mehrerer Substraten stattfinden, z.B. Polymerisation oder Depolymerisation eines Phenols mittels Oxidoreduktase.

Das Indikatorsystem kann auch darin bestehen, dass das Verstärker-Enzym in der Lage ist, eine verdeckende Polymerschicht hydrolytisch abzubauen und somit die verdeckte Farbschicht in Erscheinung treten zu lassen.

In der folgenden Tabelle A sind besonders bevorzugte Kombinationen von Polymer (und dessen abbauendes Enzym), farbänder-

des Enzym und dessen Substrat angeführt:

Polymer	Abbauendes Trigger Enzym	Eingeschlossenes Polypeptid (Ver- stärkerenzym) bzw. gebundener Farbstoff	Farbreaktion durch Umsatz von
Pektin	Pektinase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid
Pektin	Pektinase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid
Pektin	Pektinase	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid
Pektin	Pektinase	Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Pektin	Pektinase	Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Pektin	Pektinase	Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Pektin	Pektinase	PEG- Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Pektin	Pektinase	PEG- Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Pektin	Pektinase	PEG -Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Pektin	Pektinase	PEG Laccase	ABTS
Pektin/Alginat	Pektinase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid

Pektin/Alginat	Pektinase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Pektin/Alginat	Pektinase	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Pektin/Alginat	Pektinase	Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Pektin/Alginat	Pektinase	Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Pektin/Alginat	Pektinase	Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Pektin/Alginat	Pektinase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Pektin/Alginat	Pektinase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Pektin/Alginat	Pektinase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Pektin/Alginat	Pektinase	PEG Laccase	ABTS
Pektin/Alginat	Pektinase	Laccase	ABTS
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	Laccase	ABTS
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	PEG-Laccase	ABTS
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Peptidogly- can/Alginat	Lysozym	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide

Peptidoglycan/Alginat	Lysozym	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Peptidoglycan/Alginat	Lysozym	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	Laccase	ABTS
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	PEG-Laccase	ABTS
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Amylopektin	Amylase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Peptidoglycan/Agarose	Lysozym	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Elastin/Agarose	Elastase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid
Elastin/Agarose	Elastase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilid

Elastin/Agarose	Elastase	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Elastin/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Elastin/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan- Kaffeesäure
Elastin/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Elastin/Agarose	Elastase	PEG-Laccase	ABTS
Elastin/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Elastin/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Elastin/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure
Silk/Agarose	Elastase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Silk/Agarose	Elastase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Silk/Agarose	Elastase	PVA -Protease	Silocxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Silk/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Silk/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Silk/Agarose	Elastase	Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoe- säure

Silk/Agarose	Elastase	PEG-Laccase	ABTS
Silk/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan-Ferulasäure
Silk/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan-Kaffeesäure
Silk/Agarose	Elastase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoesäure
Chitosan /Agarose	Lysozym	PEG-Laccase	ABTS
Chitosan /Agarose	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan-Ferulasäure
Chitosan /Agarose	Lysozym	PEG Laccase	Siloxan-Kaffesäure
Chitosan /Agarose	Amylase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoesäure
Chitosan /Agarose	Lysozym	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala-Pro-Leu-p-Nitroanilide
Chitosan /Agarose	Lysozym	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala-Pro-Leu-p-Nitroanilide
Chitosan /Agarose	Lysozym	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala-Pro-Leu-p-Nitroanilide
Gelatine/Agarose	Gelatinase	Laccase	ABTS
Gelatine/Agarose	Gelatinase	PEG-Laccase	ABTS
Gelatine/Agarose	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan-Ferulasäure
Gelatine/Agarose	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan-Kaffesäure
Gelatine/Agarose	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenzoesäure

Gelatine/Agarose	Gelatinase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Gelatine/Agarose	Gelatinase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Gelatine/Agarose	Gelatinase	PVA -Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Gelatine/Alginat	Gelatinase	Laccase	ABTS
Gelatine/Alginat	Gelatinase	PEG-Laccase	ABTS
Gelatine/Alginat	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Gelatine/Alginat	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Gelatine/Alginat	Gelatinase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenz oesäure
Gelatine/Alginat	Gelatinase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Gelatine/Alginat	Gelatinase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Xylan	Xylanase	Laccase	ABTS
Xylan	Xylanase	Xylan	ABTS
Xylan	Xylanase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Xylan	Xylanase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Xylan	Xylanase	PEG Laccase	Siloxan 3,4, Dihydroxybenz oesäure

Xylan	Xylanase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Xylan	Xylanase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Cellulose	Cellulase	Laccase	ABTS
Cellulose	Cellulase	Xylan	ABTS
Cellulose	Cellulase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Cellulose	Cellulase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Cellulose	Cellulase	PEG Laccase	Siloxan 3,4,Dihydroxybenz oesäure
Cellulose	Cellulase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Cellulose	Cellulase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
Dextran	Amylase	Laccase	ABTS
Dextran	Amylase	Xylan	ABTS
Dextran	Amylase	PEG Laccase	Siloxan- Ferulasäure
Dextran	Amylase	PEG Laccase	Siloxan- Kaffesäure
Dextran	Amylase	PEG Laccase	Siloxan 3,4,Dihydroxybenz oesäure
Dextran	Amylase	PEG-Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide

Dextran	Amylase	Protease	Siloxan -N Succinyl Ala-Ala- Pro-Leu-p- Nitroanilide
---------	---------	----------	---

Als Verstärker-Enzyme für die Amplifikation der Anzeige können Oxidoreduktasen wie Laccasen oder Peroxidasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen, Peptidasen, etc. eingesetzt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Matrix als Schicht, in Form von Kapseln oder als Hydrogel, auf dem festen Träger angeordnet.

Die Matrix zwischen dem festen Träger und der semipermeablen Membran kann unterschiedliche Formen aufweisen. Die Matrix kann beispielsweise als Schicht oder Kapseln aufgebracht werden. Die Verwendung von Kapseln bzw. mehrerer Schichten (mindestens zwei, drei oder vier) hat den Vorteil, dass die Kapseln und Schichten unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen können. So ist es möglich eine Kapselart bzw. eine Schicht zur Verfügung zu stellen, die Enzyme umfassen, die in der Lage sind das Polymer der Matrix abzubauen. Andere Kapseln bzw. Schichten können hingegen Enzyme umfassen, die in der Lage sind farberzeugende Substrate umzusetzen. Auch die Polymerzusammensetzung der verschiedenen Kapseln bzw. Schichten können variieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Matrix ein abbaubares, modifizierbares Molekül bzw. Polymer umfassen, welches durch Enzyme abgebaut bzw. modifiziert werden kann. Selbstverständlich können aber auch Moleküle bzw. Polymere eingesetzt werden, die im Zuge einer pH-Wert-Änderung oder durch Änderung der Ionenstärke abbaubar sind.

Das enzymatisch zersetzbare, umsetzbare oder modifizierbare bzw. abbaubare Polymer ist vorzugsweise ein Polysaccharid, Polypeptid, Polyester, Polyamid oder eine Kombination davon.

Das abbaubare bzw. modifizierbare Polymer kann, um den Abbau bzw. die Modifikation durch in der Probe vorhandenen Enzymen zu steuern, beispielsweise, verestert sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Polysaccharid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pektin, Amylose, Amylopektin, Agarose, Alginat, Carragenan, Chitin, Chitosan, Dextran, Glycogen, Guar, Johannisbrotkernmehl, Laevan, Pektin, Pollulan, Tamarindenkernmehl, Xanthan,

Zellulose und Xylan.

Um eine weitere Variationsmöglichkeit zu besitzen besteht ebenfalls die Möglichkeit das Polymer mit funktionellen Seitenketten zu modifizieren. Diese Seitenketten sind in der Lage durch kovalentes Quervernetzen ein gegen Autohydrolyse stabiles Polymernetzwerk zu bilden. Die Abbaubarkeit durch die bereits beschriebenen Trigger Enzyme wird dadurch nicht beeinflusst. Möglichkeiten für derartige Seitenketten wären radikalisch polymerisierende Monomere wie Acrylate bzw. Methacrylate.

Polymere auf Proteinbasis, welche erfindungsgemäß eingesetzt werden können, können Seide und Elastin ähnliche Proteinpolymere sein.

Um eine verbesserte Spezifität der Polymere zu erreichen, können die Polymere mit spezifischen Sequenzen (z.B. Aminosäure- oder Oligosaccharidsequenzen) versehen werden, welche Spaltstellen für bestimmte Enzyme darstellen. Damit wird ermöglicht Polymere herzustellen, die in Kontakt mit den nachzuweisenden Substanzen (z.B. Enzymen) gespalten werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das abbaubare Polymer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gummiarabicum, Agar, Agarose, Maltodextrine, Alginsäure und deren Salze, insbesondere Natriumalginat oder Calciumalginat, Liposome, Fette, Cetylalkohol, Collagen, Chitosan, Peptidoglycan, Leithine, Gelatine, Albumin, Schellack, Polysaccharide, insbesondere Stärke oder Dextran, Cyclodextrine, Pektin, Carragenan und Wachse.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die polymerabbauende Verbindung ein Enzym.

Das Enzym welches in der Matrix umfasst ist, ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gruppen der Hydrolasen und Oxidoreduktasen wie zum Beispiel Proteasen, Laccasen oder Peroxidasen.

Um die Mobilität der Enzyme im Polymer vor dessen Abbau einzuschränken, um den vorzeitigen Abbau des Polymers zu verhindern bzw. zu unterbinden und um zu verhindern, dass das farberzeugende Substrat vorzeitig umgesetzt wird, ist das durch die Umsetzung oder Modifikation bzw. den Abbau des Moleküls bzw. Polymers freisetzbare Enzym chemisch oder adsorptiv, z.B., an Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol (PEG) oder Peptide gebunden oder dessen Molekulargewicht genetisch durch Fusion, z.B. mit Elastin

oder anderen Peptiden oder Proteinen vergrößert. Durch die Bindung des Polypeptids an diese hochmolekularen Gruppen wird die Diffusion im Polymer im Wesentlichen verhindert.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das farberzeugende Substrat ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus phenolischen Verbindungen und Azo-Farbstoffen wie Ferulasäure, Kaffeesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Reactive Blue, Indigo Carmine, ABTS oder Guaiacol.

Die semipermeable Membran ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cellulosederivate, Polyamide, Polyacrylamide und Polyester.

Ein semipermeabler Charakter wird durch Modifikation der Oberfläche einer Seite erreicht die z.B. hydrophiler oder hydrophober gemacht wird. Dies kann durch z.B. durch chemische, physikalische (Plasma) oder enzymatische Behandlung erzielt werden (z.B. Guebitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., 2008. Trends in Biotechnology 26, 32-38).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst der feste Träger ein Material, welches ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus anorganischen Materialien, vorzugsweise Silicagel, Aluminium, Silizium oder Glas, organischen Materialien, vorzugsweise Polyester, Polystyrol, Polyamid, Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol, oder Biopolymeren, vorzugsweise Papier.

Um die Bindung zwischen Trägermaterial und Matrix zu verbessern kann das Trägermaterial chemisch modifiziert werden. Bei der Modifikation werden funktionelle Gruppe auf die Oberfläche aufgebracht die anschließend mit Bestandteilen der Matrix kovalent quervernetzen können. Als Beispiel sei an dieser Stelle Trimethylsilyl methacrylate genannt. Wie an andere Stelle beschrieben können Trimethylsilyl Gruppen mit Hydroxygruppen an Oberflächen wie sie bei Glas aber auch bei andere Polymeren vorkommen kovalente Etherbrücken bilden. Die Metacrylgruppe kann im Anschluss mit Methacrylgruppen der Matrix quervernetzen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Anordnung zur Bestimmung der Anwesenheit und/oder Charakterisierung von Zellen, vorzugsweise von Mikroorganismen, in einer Probe.

Die zu bestimmenden und/oder charakterisierenden Mikroorganismen sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien

und Pilzen.

Die erfindungsgemäße Anordnung kann gemäß einem weiteren Aspekt zur Detektion mindestens eines Enzyms in einer Probe verwendet werden. Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Anordnung zur Detektion einer Wundinfektion durch Bestimmen des Vorhandenseins mindestens eines wund-spezifischen Enzyms.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind „wund-spezifische“ Enzyme Enzyme, die üblicherweise bei Infektionen von Wunden auftreten. Beispielhafte Enzyme sind solche Enzyme, die von den die Infektion auslösenden Mikroorganismen sekretiert werden oder solche Enzyme, die vom Körper als Antwort auf eine Infektion ausgeschüttet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das mindestens eine Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Hydrolasen bestehend aus Amylase, Cellulase, Xylanase, Mannanase, Protease, Lysozym, Lipase und Esterase, Oxidase.

Die gegenständliche Erfindung wird ferner anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher illustriert.

Fig. 1 zeigt die Freisetzung von Alizarinfarbstoff mittels verschiedenen Mikroorganismen nach 72 Stunden Inkubation (Beispiel 3).

Fig. 2 zeigt den Zeitverlauf der Freisetzung von Proteasen aus dem Biopolymer durch Einwirkung von Pektinasen (Beispiel 7).

Fig. 3 zeigt den Zeitverlauf der Freisetzung des Verstärkerenzym Laccase aus dem Biopolymer durch Einwirkung eines Triggerenzym (Pektinasen) (Beispiel 7).

Fig. 4 zeigt die Freisetzung von p-Nitroanilid des immobilisierten Substrats mittels kommerzieller Protease (Beispiel 8).

Fig. 5 zeigt den Farbumschlag immobilisierter Ferulasäure. Durch Einwirkung des Triggerenzym (Pektinase) wird das Verstärkerenzym (Laccase) aus dem Biopolymer freigesetzt und induziert die Farbreaktion (Farbgebung durch Oxidation immobilisierter Ferulasäure) (Beispiel 10).

Fig. 6 zeigt die Umsetzung von ABTS (Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) durch Laccase infolge deren Freisetzung aus einer Peptidoglycan Matrix nach Inkubation mit Lysozym (5000 U/mL) oder Puffer (Kontrolle) nach verschiedenen Zeitpunkten.

Fig. 7 zeigt ein erfindungsgemäßes bioresponsives System mit enzymatischer Verstärkungsreaktion zur kontrollierten Freisetzung und Sensorik.

BEISPIELE

Beispiel 1:

Herstellung eines Biopolymers A

Eine 5%ige Lösung aus Pektin, gewonnen aus Citrusschalen mit einem Veresterungsgrad von 50-60%, wurde durch Auflösen in Wasser über Nacht bei 50°C hergestellt. Alternativ kann auch Pektin aus Apfelschalen mit einem Veresterungsgrad von 70-75% verwendet werden.

Im Vorfeld wurde das Polysaccharid mit verschiedenen Farbstoffen wie z.B. Alizarin, Cibacrom, Remazol, Viktoriablauf oder anderen gefärbt. Dazu wurden 10g Pektin in Aceton mit 5mM Farbstoff suspendiert, über Nacht unter Rückfluss erhitzt und anschließend mehrere Male mit Aceton gewaschen. Die Pektinlösung wurde durch Eintropfen in eine 200mM CaCl₂ Lösung auspolymerisiert und die erhaltenen Pektinkugeln wurden mit Wasser gewaschen.

Enzymatischer Abbau von Biopolymer A

1g (Feuchtmasse) des Biopolymers A wurde mit Alizarin gefärbt und in 10mL Puffer (50mM, pH6,0) für 24h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln unter Verwendung verschiedener kommerziell erhältlicher Pektinasen inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mit 1M NaOH auf pH14 eingestellt und die Adsorption bei 550nm mit Hilfe eines UV/VIS Photometers gemessen.

Mikrobiologischer Abbau von Biopolymer A

Unterschiedliche potentiell kontaminierende Mikroorganismen wurden mittels Vorkultur angezüchtet. Zu 100mL der Hauptkultur wurden jeweils 1g Feuchtmasse des mit Alizarin gefärbten Biopolymers A zugegeben und mit 100µL Vorkultur inokuliert. Die Inkubation wurde für 72 Stunden bei 33°C durchgeführt. Anschließend wurde die Biomasse abzentrifugiert und die Adsorption des Über-

standes bei geeigneter Wellenlänge gemessen (Fig. 1).

Beispiel 2:

Siloxanimobilisierung des Substrats für das Verstärkerenzym

Methode A

10g Kieselgel wurden in 30mL einer 3-9% Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol (95%) für 4 Stunden bei 40°C gerührt. Anschließend wurde das aminierte Kieselgel abdekantiert, 3-mal mit 70% Ethanol gewaschen und im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

50mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid hydrochlorid, 5mg (1-Hydroxybenzotriazole hydrate) und 50mg Ferulasäure wurden in 20mL absolutem Ethanol gelöst. Anschließend wurde 5g aminierte Kieselgel zugegeben und 30min gerührt. Nach Zentrifugation wurde das Kieselgel mit der gekoppelten Ferulasäure mit 70% Ethanol gewaschen und im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Alternativ zur Ferulasäure kann Kaffeesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, oder Fast Blue RR etc. verwendet werden. Weiters können auch Proteasesubstrate wie z.B. N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilid, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid oder L-Leucin-p-nitroanilid auf die gleiche Art und Weise immobilisiert werden.

Methode B

10g Kieselgel wurde in 30mL einer 3-9% Mercaptopropyltriethoxysilan in Ethanol (95%) für 4 Stunden bei 40°C gerührt. Anschließend wurde das Kieselgel abdekantiert, 3-mal mit 2-Propanol gewaschen und im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zu 5g vorbehandeltem Kieselgel, suspendiert in 20mL Dichlormethan, werden 155mg Ferulasäure und 38mg Dimethylaminopyridin zugegeben. Zu der mit Eis auf 0°C gekühlten Reaktionsmischung wurden 165mg DCC zugegeben und über 3 Stunden gerührt. Dabei wurde die Temperatur auf Raumtemperatur (ca. 20°C) belassen. Anschließend wurde das feste, modifizierte Kieselgel abfiltriert, 3-mal mit Dichlormethan gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Beispiel 3:

Herstellung des Biopolymers B

Pektin, gewonnen aus Citrusschalen mit einem Veresterungsgrad von 50-60%, wurde unter leichtem Erhitzen über Nacht in Wasser gelöst. Zum Pektin als Hauptbestandteil der bioresponsiven Matrix wurde Alginat in verschiedenen Konzentrationen (1-

20%) beigemischt.

Vorzugsweise wurde eine Mischung bestehend aus 4,5g Pektin und 0,5g Natriumalginat in 100mL Wasser verwendet. Die Gelherstellung erfolgte durch Eintropfen der Pektin-Alginat-Lösung in eine vorgelegte 200mM CaCl₂ Lösung. Die erhaltenen Pektinkugeln wurden mit Wasser gewaschen.

Beispiel 4:

Inkorporation von Enzymen und Proteinen in Biopolymer B

Zu einer Mischung bestehend aus 4,5g Pektin und 0,5g Natriumalginat in 100mL Wasser wurden 5mL kommerziell erhältlicher Protease von *Aspergillus oryzae* zugegeben.

Nach dem Vermischen der Polysaccharidlösung mit dem Enzym wurde das Polymer in 200mM CaCl₂-Lösung eingetropft und ausgeleert. Die so gewonnenen Polymerkügelchen wurden abgeseibt, 3-mal mit 50mM Tris-HCl Puffer pH7,5 gewaschen und zu je 1g Feuchtmasse in Reaktionsgefäßen mit 5mL 50mM Tris-HCl Puffer pH7,5 portioniert.

Entsprechend können auch andere Enzyme wie z.B. Laccasen verschiedener *Trametes sp.* immobilisiert werden. Weiters können auch Proteine z.B. Casein, Collagen etc. entsprechend eingebaut werden.

Beispiel 5:

Freisetzung von Enzymen mittels Pektinasen

Als Testpolymer wurde das Biopolymer B (Beispiel 4) mit einer Protease von *Aspergillus oryzae* beladen.

Die so gewonnenen Polymerkügelchen wurden abgeseibt, 3-mal mit 50mM Tris-HCl Puffer pH7,5 gewaschen und zu je 1g Feuchtmasse in Reaktionsgefäßen mit 5mL 50mM Tris-HCl Puffer pH7,5 portioniert. Der enzymatische Abbau wurde durch Zugabe einer kommerziellen Pektinase gestartet. Während der Inkubation bei Raumtemperatur und unter Schütteln wurden in bestimmten Zeitintervallen Proben aus dem Überstand genommen. Von diesen Proben wurden die Proteaseaktivitäten mittels Azocasein Assay und der Proteingehalt bestimmt (Fig. 2).

Alternativ dazu kann das Biopolymer mit jedem anderen Enzym, wie z.B. Laccasen, aus der Gruppe der Oxidoreduktasen beladen werden. Hier wird dann entsprechend die Aktivität der freigesetzten Laccase mittels ABTS bestimmt (Fig. 3).

Beispiel 6:

Enzymatische Signalgebung und deren Verstärkung mittels Pro-

teasen

10mg Kieselgel mit immobilisiertem N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilid bzw. L-Leucin-p-nitroanilid oder N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid als Proteasesubstrate (Beispiel 2) wurden in 1300µL 50mM Tris-HCl Puffer pH8,3 suspendiert und mit kommerziell erhältlicher Protease von *Aspergillus oryzae* bzw. mit Wundflüssigkeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivität wurde mittels UV-Absorption des abgespaltenen p-Nitroanilides im Überstand bei 375nm bzw. bei 405nm bestimmt (Fig. 4).

Beispiel 7:

Enzymatische Signalgebung und deren Verstärkung mittels Laccasen

10mg Kieselgel mit immobilisierter Ferulasäure als Laccasesubstrat (Beispiel 2) bzw. mit immobilisiertem Fast Blue RR wurden in 1300µL 50mM Succinat Puffer pH4,5 suspendiert und mit Laccase vom *Trametes hirsuta* bzw. mit Wundflüssigkeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivität wird anhand einer Farbmessung (gelb-orange) mittels Spectrophotometer bestimmt.

Beispiel 8:

Enzymatische Signalgebung und deren Verstärkung durch Freisetzung von Laccasen mittels Pektinasen

Als Testpolymer diente das Biopolymer aus Beispiel 4 beladen mit Laccasen verschiedener *Trametes* sp.

Die Polymerkugeln wurden abgeseibt, 3-mal mit 50mM Succinat Puffer pH4,5 gewaschen und zu je 1g Feuchtmasse in Reaktionsgefäßen mit 5mL 50mM Succinat Puffer pH4,5 in Anwesenheit von 10mg Kieselgel mit immobilisierter Ferulasäure als Laccasesubstrat aus Beispiel 2 portioniert. Der enzymatische Abbau wurde durch Zugabe kommerziell erhältlicher Pektinase bei Raumtemperatur und unter Schütteln gestartet. Nach der Inkubation wurde der Farbumschlag zu gelb-orange anhand einer Farbmessung mittels Spectrophotometer bestimmt (Fig. 5).

Alternativ dazu kann das Biopolymer mit einer Protease von *Aspergillus oryzae* beladen werden. Hier wird dann entsprechend die Aktivität der freigesetzten Protease mittels UV-Absorption des abgespaltenen p-Nitroanilides im Überstand bei 375 nm bestimmt.

Beispiel 9:

Enzymatische Signalgebung und deren Verstärkung durch Freisetzung von modifizierten Proteasen mittels Pektinasen

Das Ansprechverhalten der bioresponsiven Polymere kann über das Diffusionsverhalten sowohl der Trigger- als auch der Verstärkerenzyme eingestellt werden. Durch eine chemische oder genetische Modifikation (z.B. Vergrößerung) der Verstärkerenzyme können entsprechend geringere Vernetzungsgrade des Biopolymers eingesetzt werden, bei einer gleichzeitigen Minimierung der Ausdiffusion des Verstärkerenzym.

Zur chemischen Modifikation von Verstärkerenzymen mit wasserlöslichen Polymeren wurden 1g Methoxypolyethylenglykol und 0,4g Cuanurchlorid in 100mL trockenem Toluol gelöst und für 40 Stunden bei 40°C gerührt. Anschließend wurde das aktivierte Polymer in Hexan gefällt, filtriert und unter Vakuum getrocknet. Durch Verwendung unterschiedlicher Molekulargewichte (350, 550, 1100, 2000, 5000 etc.) kann mittels der Länge des Polymers das Diffusionsverhalten des Konjugates eingestellt werden. Das Polymer wurde in schwach basischem Medium Boratpuffer pH9,3 an das Enzym gehängt. Nach der Reaktion wurde ungebundenes Polymer mittels Ultrafiltration entfernt und das Konjugat ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Entsprechend Beispiel 6 wurde das Biopolymer mit modifizierter Protease beladen. Die so gewonnenen Polymerkugeln wurden abgeseibt, 3-mal mit 50mM Succinat Puffer pH4,5 gewaschen und zu je 1g Feuchtmasse in Reaktionsgefäßen mit 5mL 50mM Succinat Puffer pH4,5 in Anwesenheit von 10mg Kieselgel mit immobilisierter Ferulasäure als Laccasesubstrat aus Beispiel 2 portioniert. Der enzymatische Abbau bei Raumtemperatur und unter Schütteln wurde durch Zugabe kommerzieller Pektinase gestartet. Nach der Inkubation wurde der Farbumschlag zu gelb-orange anhand einer Farbmessung mittels Spectrophotometer bestimmt (Fig. 5). Alternativ hierzu kann das Molekulargewicht des Triggerenzym gentechnisch erhöht werden.

Beispiel 10:

Enzymatische Signalgebung und deren Verstärkung durch Freisetzung von modifizierter Laccase mittels Lysozym

Ein System das im medizinischen Bereich zur Anwendung gebracht werden kann benützt das Enzym Lysozym als Trigger Enzym. Dieses Enzym der körpereigenen, nativen Immunantwort wird im Falle von Infektion gebildet und sekretiert. Hauptaufgabe des Enzyms ist eine Zerstörung von Bakterien durch Abbau von Peptidoglycan, einem Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Es wur-

de gezeigt, dass erhöhte Enzymmengen im Falle einer Wundinfektion vorliegen. Im folgenden System wurden 3,12mg Mikrokoccus lysodeicticus Zellwand von Sigma mit 1mL 1%iger Agarose in Phosphat-Puffer pH7,00 suspendiert. 100µl dieser Suspension wurden in einer Mikrotiterplatte mit 50µL einer PEG modifizierten Laccase vermischt. Nach Aushärten wird das Polymer mit Puffer gewaschen und 100µl einer LysozymLösung (200-5000U/mL) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Alle 30 Minuten wurden 25µl des Überstandes entnommen. Laccaseaktivität wurde mittels des ABTS Assays nachgewiesen (1400µL Saccharose Puffer + 45µL 1% H₂O₂ + 30µL ABTS 40mM): 25µL Überstand + 75µL ABTS-Lösung). Eine Grünfärbung trat nach einigen Minuten Inkubation mit Lysozym durch Umsetzung von ABTS durch die freigesetzte Laccase auf (Fig. 6).

Beispiel 11:

Quervernetztes Biopolymer und Freisetzung von Enzymen mittels Pektinasen oder Cellulasen

5 g Pektine oder/und Cellulosederivate werden in 100 mL Wasser gelöst und mit 3 mL einer 97% Glycidylmethacrylate Lösung in Gegenwart von 0,5 mL 6 M HCl gekoppelt.

PES Gewebe wird mit Trimethylsilyl methacrylate modifiziert und mit einer mit Glycidylmethacrylate modifizierten Matrix überschichtet und radikalisch auspolymerisiert und damit kovalent quervernetzt.

Extrazelluläre Enzyme wie Pektinasen oder Cellulasen können nun das PES Gewebe durch Diffusion überwinden und durch Abbau der Matrix darin eingeschlossene funktionelle Moleküle wie z.B. Enzyme freisetzen, die ihrerseits eine Farbreaktion auslösen.

Beispiel 12:

Quervernetztes Biopolymer und Freisetzung von Enzymen durch Freisetzung von modifizierten Enzymen mittels Elastase

Ein weiteres System, das im medizinischen Bereich zur Anwendung gebracht werden kann, benützt das Enzym Elastase als Trigger Enzym. Dieses Enzym wird von manchen Bakterienarten, aber auch von der körpereigenen Immunantwort im Falle von Infektion gebildet und sekretiert, wobei fast alle Arten von Protein gespalten werden können. Im Falle von Wundinfektion konnten eindeutig erhöhte Enzymmengen im Wundsekret nachgewiesen werden. Damit kann dieses Enzym als Markerenzym für beginnende Wundinfektion herangezogen werden. Im folgenden System wurden 3,12mg

Chitosan mit 1mL 1%iger Agarose in Phosphat-Puffer pH 7,0 suspendiert. Das Chitosan wurde zuvor mit GMBS aktiviert, um es beidseits über die SH Gruppe eines Cysteins und der Peptidsequenz Ala-Ala-Pro-Val quervernetzen. 100µl dieser Suspension wurden in einer Mikrotiterplatte mit 50µL einer PEG modifizierten Laccase vermischt. Nach Aushärten wird das Polymer mit Puffer gewaschen und 100µl einer ElastaseLösung (2-5 U/mL) oder mit Wundsekret aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Alle 10 Minuten wurden 25µl des Überstandes entnommen. Laccaseaktivität wurde mittels des ABTS Assays nachgewiesen (1400µL Saccharose Puffer + 45µL 1% H₂O₂ + 30µL ABTS 40mM): 25µL Überstand + 75µL ABTS-Lösung). Eine Grünfärbung trat nach einigen Minuten Inkubation mit Elastase durch Umsetzung von ABTS durch die freigesetzte Laccase auf. Ohne Elastase wurde keine Farbänderung festgestellt.

Patentansprüche:

1. Anordnung umfassend einen festen Träger und eine an dem festen Träger angeordnete Matrix umfassend mindestens ein enzymatisch umsetzbares oder modifizierbares Molekül, welche Matrix mindestens ein durch Umsetzung oder Modifikation des Moleküls freisetzbares Enzym umfasst, das in der Lage ist zumindest ein in der Matrix und/oder am festen Träger befindliches farbänderndes Substrat umzusetzen.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix als Schicht, in Form von Kapseln oder als Hydrogel auf den festen Träger angeordnet ist.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das enzymatisch umsetzbare oder modifizierbare Molekül ein Polymer ist.
4. Anordnung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Polysaccharid, Polypeptid, Polyester, Polyamid oder eine Kombination davon ist.
5. Anordnung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Polysaccharid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pektin, Amylose, Amylopektin, Agarose, Alginat, Carraghenan, Chitin, Chitosan, Dextran, Glycogen, Guar, Johannisbrotkernmehl, Laevan, Pektin, Pollulan, Tamarindenkernmehl, Xanthan und Xylan.
6. Anordnung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Gummiarabicum, Agar, Agarose, Maltodextrine, Alginsäure und deren Salze, insbesondere Natriumalginat oder Calciumalginat, Liposome, Fette, Cetylalkohol, Collagen, Chitosan, Peptidoglycan, Leithine, Gelatine, Albumin, Schellack, Polysaccaride, insbesondere Stärke oder Dextran, Cyclodextrine, Pektin, Carragenan und Wachse.
7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix zusätzlich durch Umsetzung oder Modifikation des Moleküls freisetzbares Enzym umfasst, das in der

Lage ist das in der Matrix befindliche Molekül ebenfalls umzusetzen oder zu modifizieren.

8. Anordnung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Gruppen der Hydrolasen und Oxidoreduktasen, wie Proteasen, Laccasen oder Peroxidasen.

9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das durch die Umsetzung oder Modifikation des Moleküls freisetzbare Enzyme an Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol (PEG), Polypeptide, insbesondere Elastin, oder Peptide gebunden ist.

10. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das freisetzbare Enzym, welches mittels eines Polypeptids oder Peptids am enzymatisch umsetzbaren oder modifizierbaren Molekül gebunden ist, durch ein Enzym, vorzugsweise einem mikrobiellen Enzym oder einem Enzym des Immunsystems, wie Elastase, freisetzbar ist.

11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das farberzeugende Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus phenolischen Verbindungen und Azo-Farbstoffen.

12. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das farberzeugende Substrat direkt von Enzymen, vorzugsweise mikrobiellen Enzymen, wie Laccasen oder Peroxidasen oder Enzymen des Immunsystems, wie Myeloperoxidase, umsetzbar ist.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung eine dem festen Träger gegenüberliegende semipermeable Membran aufweist.

14. Anordnung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die semipermeable Membran ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cellulosederivate, Polyamide, Polyacrylamide und Polyester.

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, dass der feste Träger ein Material umfasst, welches ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus anorganischen Materialien, vorzugsweise Silicagel, Aluminium, Silizium oder Glas, organischen Materialien, vorzugsweise Polyester, Polystyrol, Polyamid, Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol, oder Biopolymeren, vorzugsweise Papier.

16. Anordnung nach einem der Ansprüche 3 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer, das Enzym und das farbändernde Substrat ausgewählt sind aus Tabelle A.

17. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung der Anwesenheit und/oder Charakterisierung von Zellen, vorzugsweise von Mikroorganismen, in einer Probe.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die zu bestimmenden und/oder charakterisierenden Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Bakterien und Pilzen.

19. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Detektion mindestens eines Enzyms in einer Probe.

20. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Detektion einer Wundinfektion durch Bestimmen des Vorhandenseins mindestens eines wund-spezifischen Enzyms.

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe der Hydrolasen bestehend aus Amylase, Cellulase, Xylanase, Mannanase, Protease, Lysozym, Elastase, Collagenase, Cathepsin, Myeloperoxidase, Lipase und Esterase.

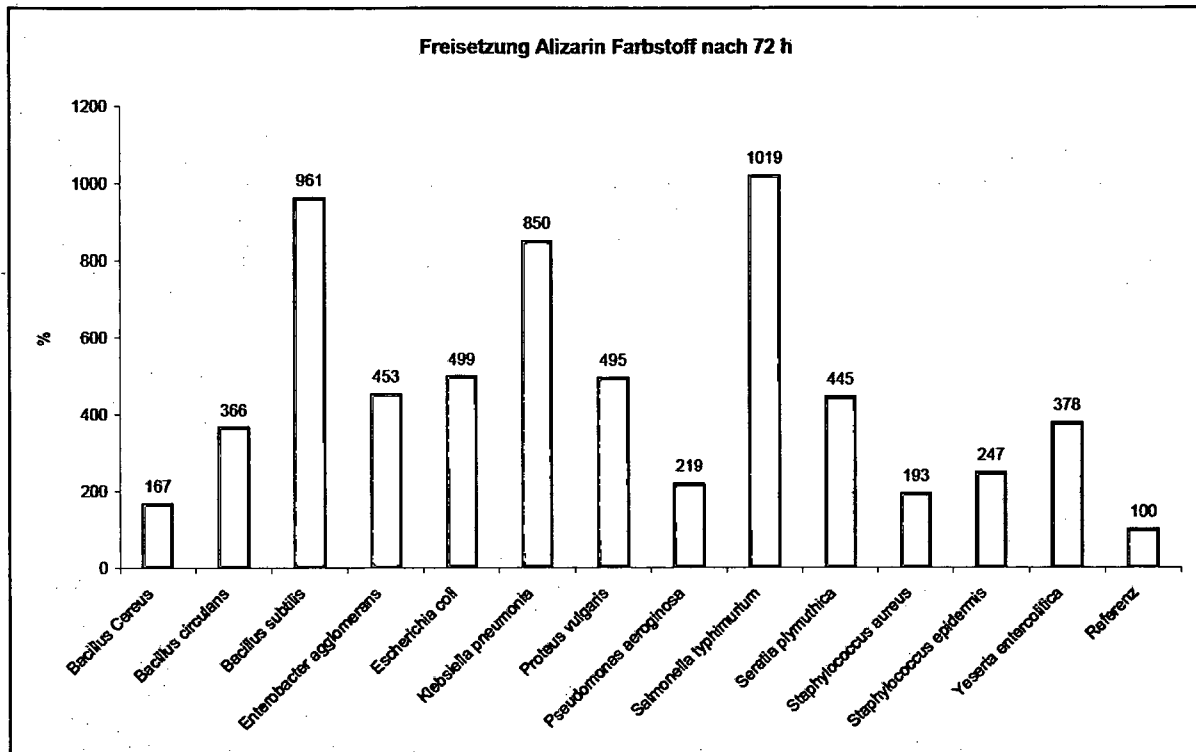


Fig. 1

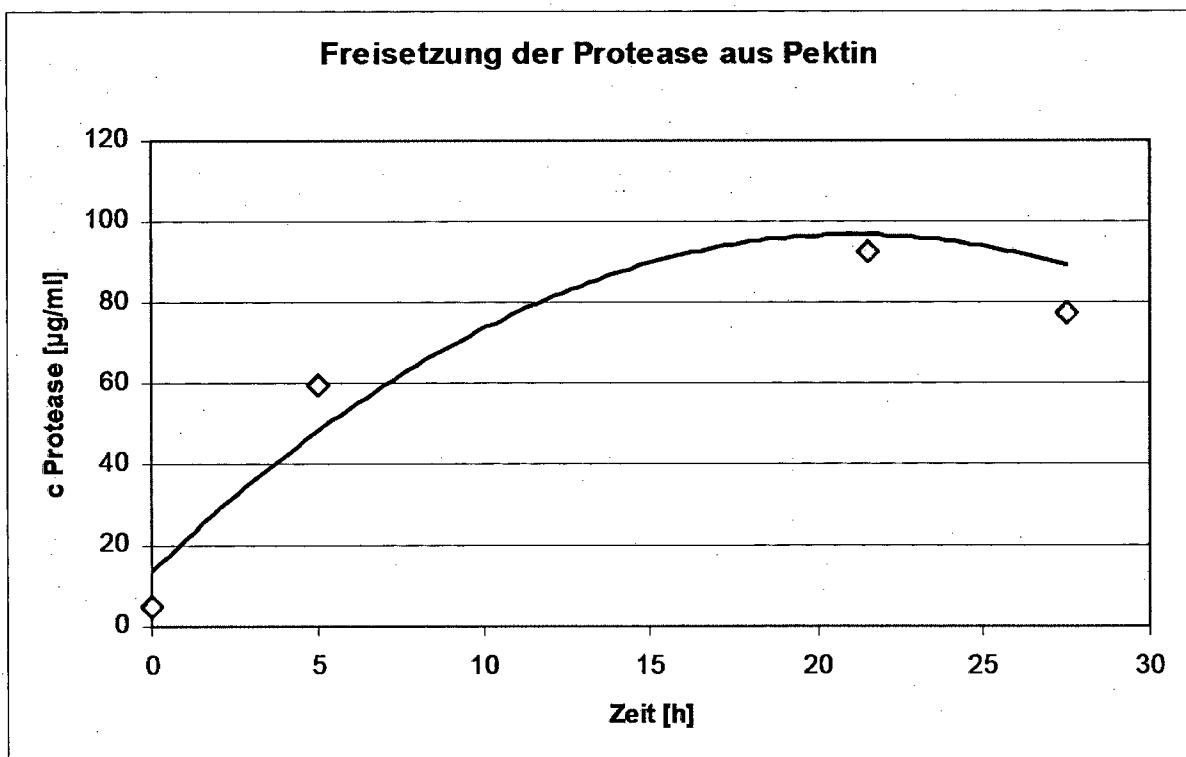


Fig. 2

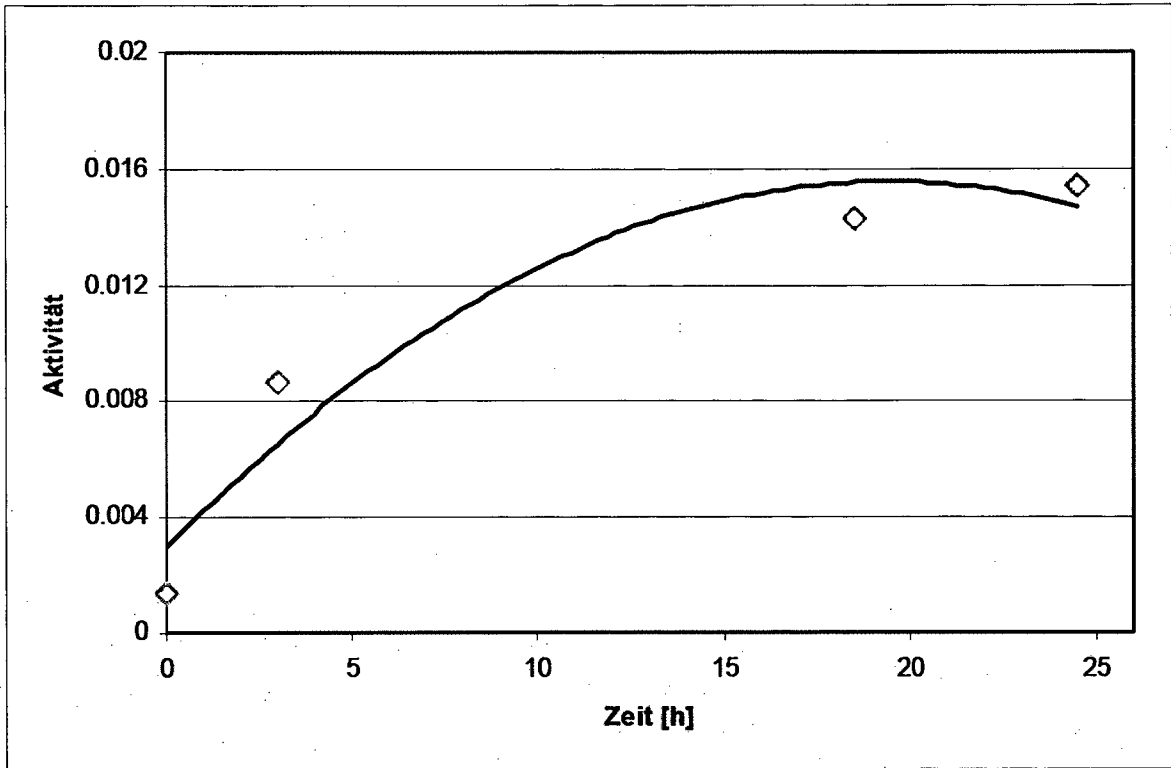


Fig. 3

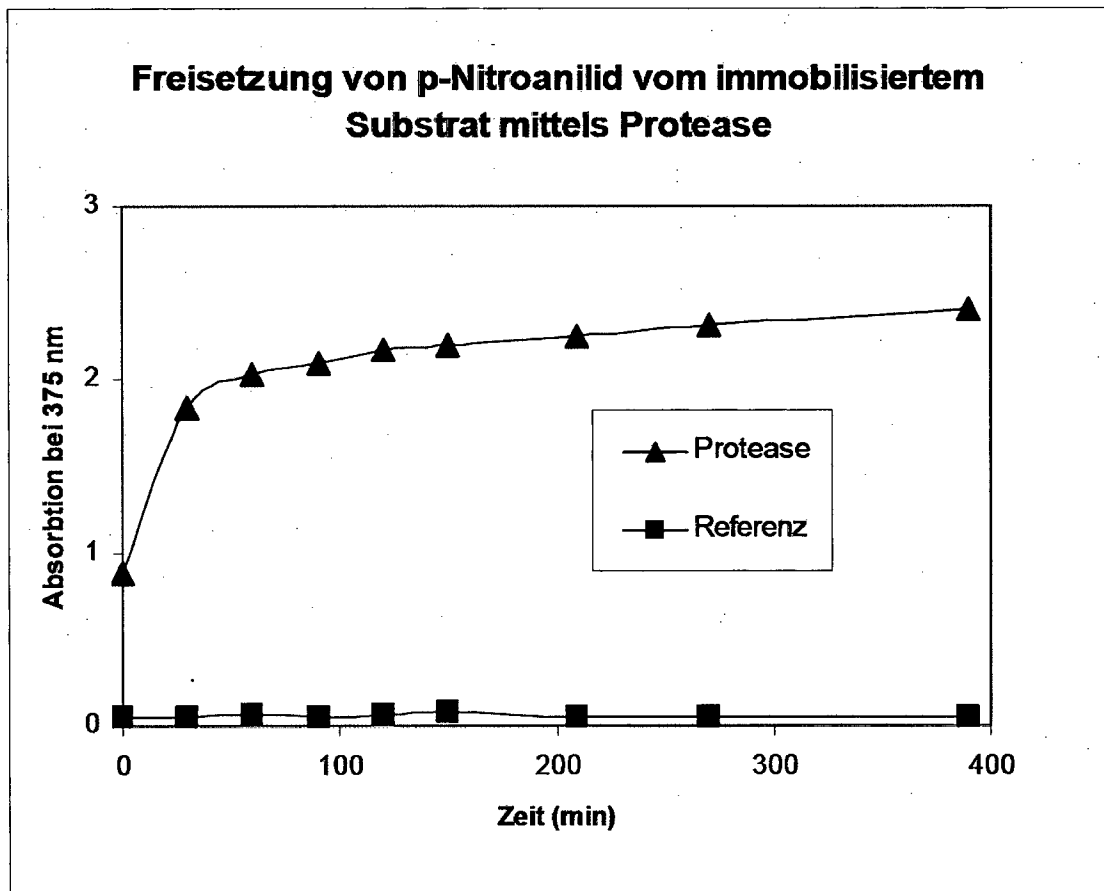


Fig. 4

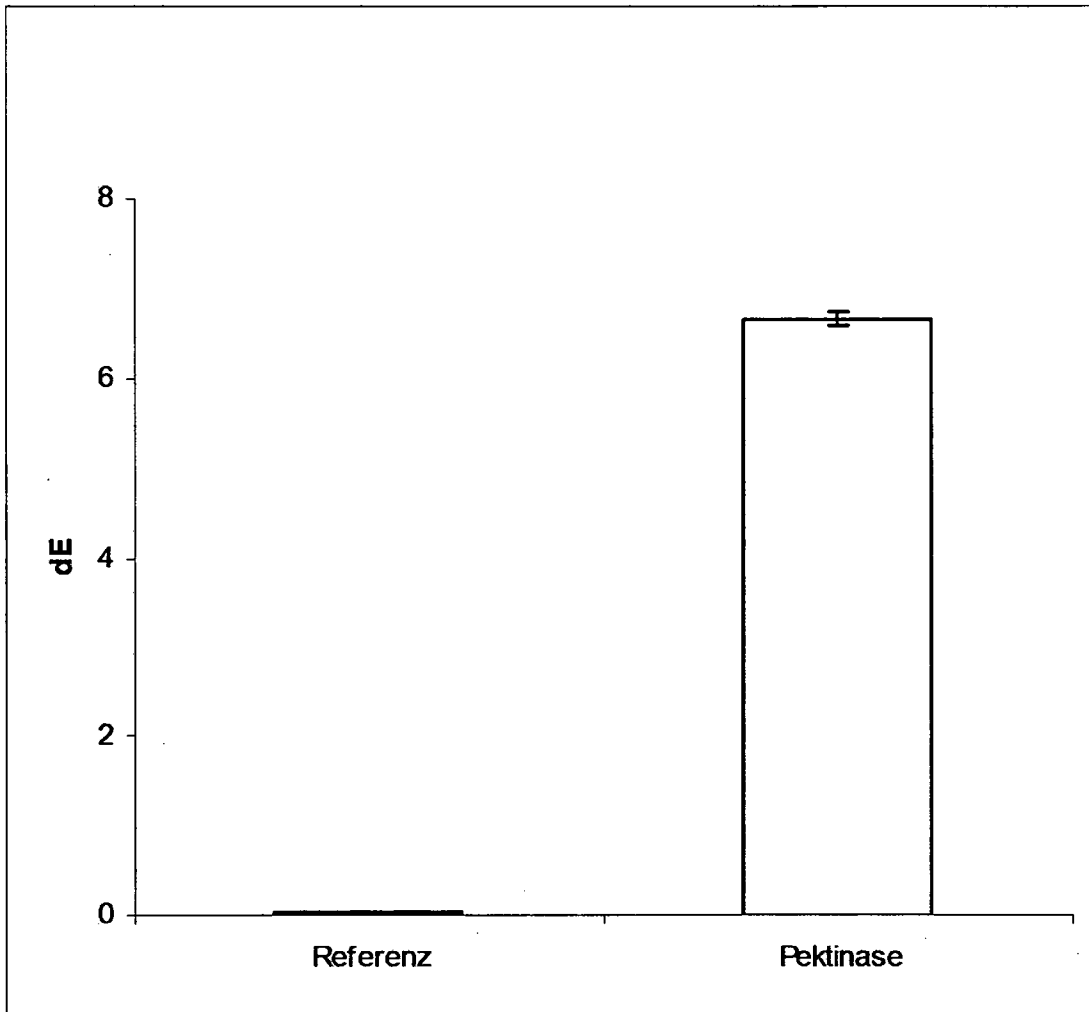


Fig. 5

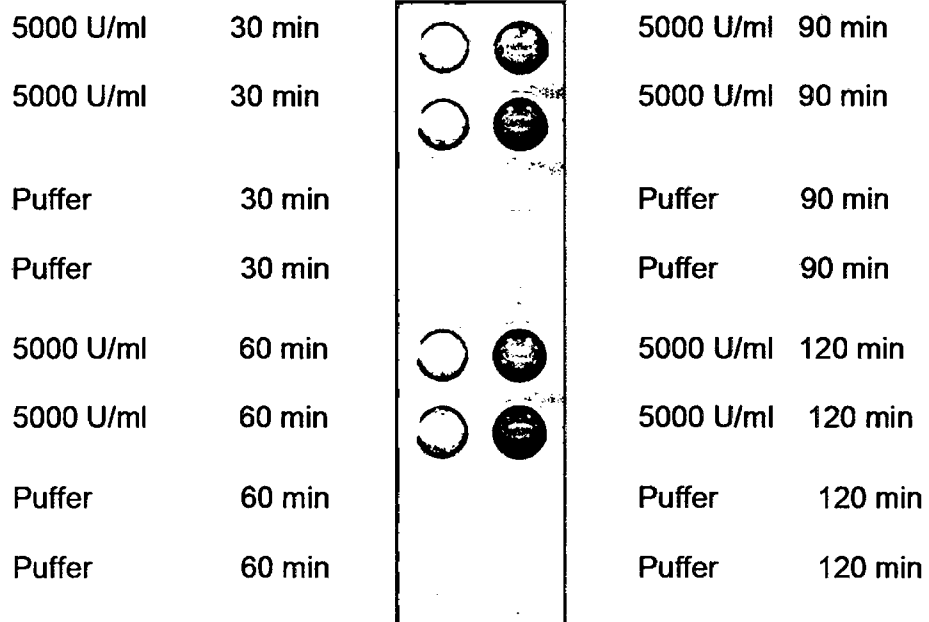


Fig. 6

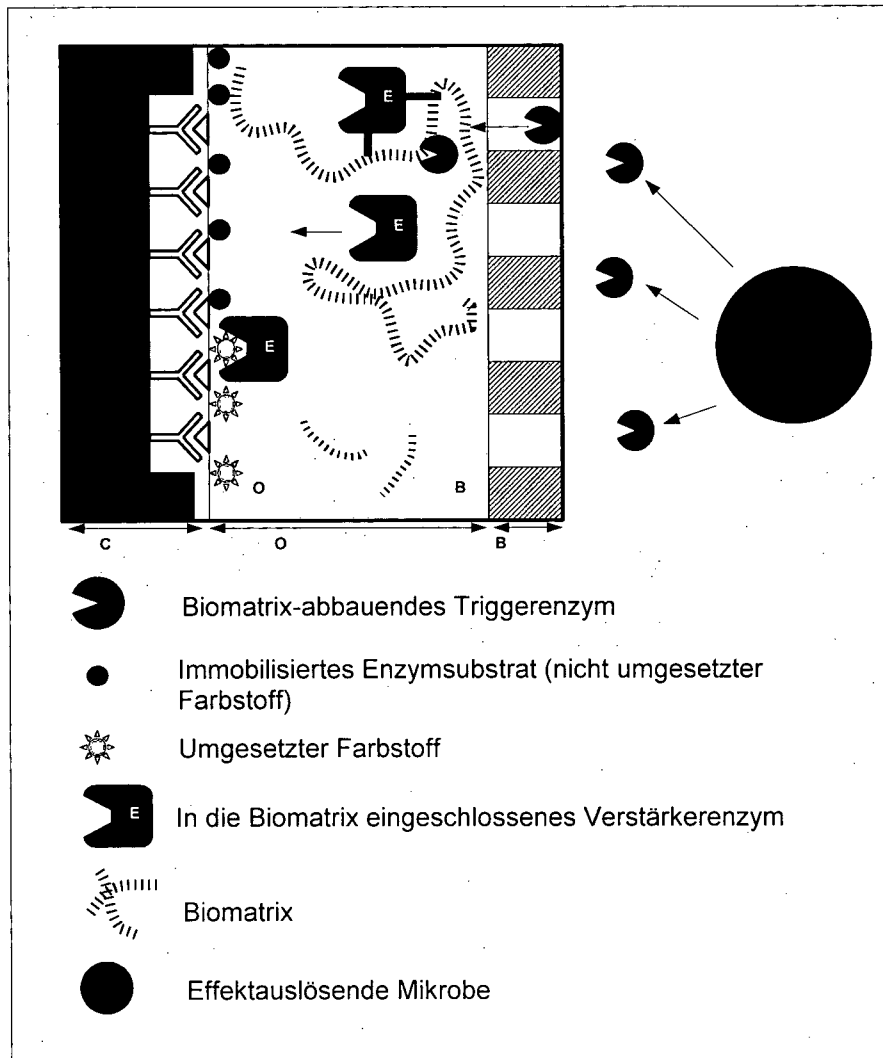


Fig. 7