



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 37 001 T2 2007.12.06

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 871 887 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 37 001.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/10119

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 923 291.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1996/041175

(86) PCT-Anmeldetag: 06.06.1996

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 19.12.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.10.1998

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 28.03.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.12.2007

(51) Int Cl.⁸: G01N 33/535 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

484766 07.06.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Bioveris Corp., Gaithersburg, Md., US

(72) Erfinder:

MARTIN, Mark T., North Bethesda, MD 20852, US;
SAUL, Richard, Gaithersburg, MD 20882, US;
LIANG, Pam, Arlington, VA 22209, US

(74) Vertreter:

Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80639 München

(54) Bezeichnung: ELEKTROCHEMILUMINESZENZ-ENZYMMIMMUNOASSAY

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****Bereich der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Entwicklung eines Enzym-Immunoassays auf Elektrochemilumineszenz (ECL)-Basis zur Detektion und quantitativen Messung von Analyten. Der Immunoassay beruht auf einem katalytischen Prozess, welcher Laktamase-konjugierte Anti-Analyten verwendet, die elektrochemilumineszente substituierte Substrate enzymatisch hydrolysieren und sie dadurch stark elektrochemilumineszent machen. Der Immunoassay ist sehr sensitiv und zur Detektion und Überwachung beliebiger Analyten, für die ein Anti-Analyt hergestellt werden kann, geeignet.

Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Ein stetig wachsender Anwendungsbereich besteht für schnelle, hochspezifische, sensitive und genaue Verfahren zum Detektieren und Quantifizieren chemischer, biochemischer und biologischer Substanzen, einschließlich Enzymen, die beispielsweise in biologischen Proben vorliegen können. Da die Menge eines bestimmten Analyten von Interesse, wie beispielsweise eines Enzyms, in einer typischen biologischen Probe oftmals sehr klein ist, sind analytische Biochemiker fortwährend damit beschäftigt, die Assay-Leistungseigenschaften, wie beispielsweise die Sensitivität, zu verbessern.

[0003] Ein Ansatz zur Verbesserung der Assay-Sensitivität beinhaltet die Amplifikation des Signals, welches von einer detektierbaren Markierung erzeugt wird, die mit dem interessierenden Analyten verbunden ist. In dieser Hinsicht sind lumineszente Markierungen (Label) von Interesse. Es sind Markierungen bekannt, die durch photolumineszente, chemilumineszente oder elektrochemilumineszente Techniken lumineszieren können. "Photolumineszenz" ist ein Verfahren, in dem ein Material als Folge der Absorption von Licht durch dieses Material luminesziert (alternativ auch als elektromagnetische Strahlung oder EMR bezeichnet). Die Fluoreszenz und Phosphoreszenz stellen zwei verschiedene Typen von Photolumineszenz dar. "Chemilumineszenze" Prozesse beinhalten die Erzeugung einer lumineszenten Spezies durch eine chemische Reaktion. "Elektrochemilumineszenz" ist ein Prozess, in dem eine Spezies luminesziert, nachdem diese Spezies elektrochemischer Energie in einer geeigneten chemischen Umgebung ausgesetzt wurde.

[0004] Das Signal in jeder dieser drei Lumineszenz-Techniken ist durch die Anwendung bekannter Vorrichtungen (z. B. einer Photolelektronen-Vervielfacherröhre oder PMT), welche auf ein einzelnes

Photon ansprechen kann, zur sehr effektiven Amplifikation geeignet (d. h., hohe Ausbeute). Jedoch unterscheidet sich die Art und Weise, in der die lumineszierende Spezies erzeugt wird, bei photolumineszierenden, chemilumineszierenden und elektrochemilumineszierenden Verfahren beträchtlich. Außerdem sind diese mechanistischen Unterschiede der Grund für die wesentlichen Vorteile als bioanalytisches Werkzeug, welche die Elektrochemilumineszenz gegenüber Photolumineszenz und Chemilumineszenz genießt. Einige der Vorteile der Elektrochemilumineszenz sind: (1) einfache, weniger kostenaufwändige Vorrichtungen; (2) stabile, ungefährliche Markierungen (Label); und (3) erhöhte Assay-Leistungseigenschaften, wie beispielsweise niedrigere Detektionsgrenzen, höhere Signal-Stör-Verhältnisse und niedrigere Hintergrund-Niveaus.

[0005] Wie oben ausgeführt, besitzt in Messtechniken der bioanalytischen Chemie die Elektrochemilumineszenz signifikante Vorteile sowohl gegenüber der Photolumineszenz als auch der Chemilumineszenz. Außerdem wurden bestimmte Anwendungen der ECL entwickelt und in der Literatur beschrieben. Die US-Patente Nr. 5,147,806, 5,068,808, 5,061,445, 5,296,191, 5,247,243, 5,221,605, 5,238,808 und 5,310,687 beschreiben detailliert bestimmte Verfahren, Vorrichtungen, chemische Gruppen, Erfindungen und damit verbundene Vorteile der ECL.

[0006] Ein besonders geeignetes ECL-System ist in einer Veröffentlichung von Yang et al., Bio/Technology, 12, pp. 193-194 (Feb. 1994) beschrieben; siehe ebenso eine Veröffentlichung von Massey, Biomedical Products, Oktober 1992, sowie die US-Patente 5,235,808 und 5,310,687.

[0007] ECL-Verfahren wurden für viele verschiedene Moleküle unter Anwendung verschiedener Mechanismen gezeigt. In Blackburn et al. (1991) Clin. Chem. 37/9, pp. 1534-1539, verwenden die Autoren die ECL-Reaktion von Ruthenium(II)tris(bipyridyl); $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ sind sehr stabile, wasserlösliche Verbindungen, die mit reaktiven Gruppen auf einem der Bipyridyl-Liganden chemisch modifiziert werden können, wodurch aktivierte Spezies gebildet werden, mit denen Proteine, Haptene und Nukleinsäuren leicht markiert werden können.

[0008] Beta-Laktamasen, welche die Amidbindungen des Laktamrings sensitiver Penicilline und Cephalosporine hydrolysieren, sind weit verbreitet unter den Mikroorganismen und spielen eine Rolle bei der mikrobiellen Resistenz gegen Laktam-Antibiotika. Beta-Laktamasen bilden eine Gruppe verwandter Enzyme, welche in einer großen Anzahl von Bakterienarten vorkommen, jedoch nicht in Säugetiergeweben, und in ihren Substrat-Spezifitäten variieren können; siehe allgemein Payne, D. J., J. Med. Micro (1993) 39, pp. 93-99; Coulton, S. & Francois, 1.,

Prog. Med. Chem. (1994) 31, 297-349; Moellering, R. C., Jr., J. Antimicrob. Chemother. (1993) 31 (Suppl. A), pp. 1-8; und Neu, H. C., Science (1992) 257, pp. 1064-1072.

[0009] Es existieren derzeit verschiedene Verfahren zur Detektion mikrobieller Laktamases. Es folgen einige repräsentative Beispiele.

[0010] W. L. Baker, "Co-existence of lactamase and penicillin acylase in bacteria; detection and quantitative determination of enzyme activities"; J. Appl. Bacteriol. (1992) Vol. 73, Nr. 1, pp. 14-22, offenbart einer Kupfer-reduzierenden Assay zum Nachweis von Penicilloaten und einen Fluorescamin-Assay zum Nachweis von 6-Aminopenicillansäure-Konzentrationen, wenn beide Substanzen durch die Wirkung der Enzyme auf ein einziges Substrat erzeugt werden.

[0011] Das US-Patent Nr. 5,264,346 offenbart einen kolorimetrischen Assay für Laktamase, welcher vielfältig angewendet werden kann. Der Assay basiert auf der Entfärbung eines Chromophoren, der durch Oxidation des N-Alkylderivats von p-Phenyldiamin oder dem 3,3',5,5'-Tetraalkylderivat von Benzidin gebildet wird. Die Entfärbung wird auf die Anwesenheit eines offenen Laktamring-Produkts, welches aus der Hydrolyse von Cephalosporin oder Penicillin herührt, zurückgeführt. Die Entfärbung mit dem offenen Laktam-Produkt von Penicillin erfordert die Anwesenheit eines Entfärbungs-Verstärkers, wie beispielsweise Quecksilber-haltigen Verbindungen. Der Verstärker ist nicht für die Entfärbung mit dem offenen Laktam-Produkt von Cephalosporin erforderlich.

[0012] WO-A-87/06706 offenbart einen Assay auf ECL-Basis, in dem, inter alia, ein Enzym-konjugierter Antikörper ein makromolekulares Substrat in ein Produkt (markiert mit einem ECL-Anteil) spaltet. Das Produkt wird dann einer Energiequelle ausgesetzt, um Emission zu induzieren.

[0013] Das US-Patent Nr. 4,470,459 offenbart ein schnelles Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit von Laktamase aus mikrobiellen Quellen, welches auf einer Laktamase-Konversion eines Laktam-Substrats, was seine Fähigkeit zur Fluoreszenz wieder herstellt, beruht. Als spezifische Laktame, die diese Eigenschaft aufweisen, werden Ampicillin, Cephalexin, Amoxicillin, Cefadroxil und Cephaloglycin genannt. Die Änderung der Fähigkeit zur Fluoreszenz wird der Anwesenheit von Laktamase zugeschrieben.

[0014] WO 84/03303 offenbart ein mikrobielles Testverfahren zur Identifizierung der Erzeuger von Laktamase. Dieser Assay beruht auf Änderungen der Acidität, welche die Fluoreszenz des Indikators, wie beispielsweise Cumarin, beeinflussen. Diese Änderung der Acidität wird auf das Konversionsprodukt, wel-

ches durch die Anwesenheit der Laktamase erzeugt wird, zurückgeführt.

[0015] A. C. Peterson et al., "Evaluation of four qualitative methods for detection of lactamase production in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (1989), Vol. 8, No. 11, pp. 962-7, beschreibt bestimmte Faktoren, welche bei der Auswertung qualitativer Assays für Laktamase angewendet werden.

[0016] Robert H. Yolken et al., "Rapid diagnosis of infections caused by lactamaseproducing bacteria by means of an enzyme radioisotopic assay", The Journal of Pediatrics, Vol. 97, No. 5 (Nov. 1980) pp. 715-720, offenbart einen sensitiven enzymatischen Radioisotop-Assay zur Messung von Laktamase als Schnelltest zum Nachweis einer bakteriellen Infektion. Das Assay-Protokoll beinhaltet einen Inkubationsschritt mit der Probe und einen anschließenden Trennungsschritt auf einer positiv geladenen Säule, wie beispielsweise DEAE-Sephacel, vor der Messung der Radioaktivität der eluierten Fraktionen. Das durch Laktamase umgewandelte Penicillin-Produkt besitzt eine zusätzliche Carboxylgruppe, welche eine stärkere Bindung an die positiv geladene Säule vermittelt als es beim Penicillin der Fall ist. Die Unterschiede der Radioaktivität zwischen den eluierten Fraktionen und den Originalwerten werden der Anwesenheit von Laktamase zugeschrieben.

[0017] In Immunoassays werden im Allgemeinen Antikörper (die hierin äquivalent als "Anti-Analyten" bezeichnet werden) verwendet, um einen Analyten zu detektieren. Gewöhnlich ist ein Anti-Analyt mit einem Molekül markiert, welches beispielsweise durch Absorbanz, Fluoreszenz, Lumineszenz oder Elektrochemilumineszenz detektierbar ist. Alternativ kann der Antikörper mit einem Enzym markiert sein, welches eine Verbindung mit einem dieser Merkmale erzeugt oder zerstört. Es gibt zwei Haupttypen von Enzym-Immunoassays; Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA) und Enzym-vervielfachte Immunoassay-Techniken (EMIT); S. C. Anderson & S. Cockayne, Clinical Chemistry. Concepts and Applications, W. B. Saunders (1993) Philadelphia, PA. In den Enzym-Immunoassays ist der Prozess katalytischer Natur, so dass mehrere detektierbare Markierungen gebildet werden, wodurch die Möglichkeit einer verstärkten Sensitivität entsteht.

[0018] Elektrochemilumineszenz (ECL)-Immunoassays werden gewöhnlich mit einem an die Markierung konjugierten Antikörper, bei dem es sich im Allgemeinen um ein Derivat von Tris(bipyridyl)ruthenium(II) (abgekürzt als $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) handelt, durchgeführt; G. Blackburn et al. (1991) Clin. Chem. 37, 1534-1539. In diesen Assays weist jeder Antikörper eine begrenzte Anzahl an $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Molekülen auf seiner Oberfläche auf (beispielsweise 6-8).

[0019] Nun wurden Zusammensetzungen und Verfahren zur Herstellung und Verwendung Laktamase-konjugierter Antikörper in Immunoassays auf ECL-Basis entwickelt. Beispielsweise kann das Enzym Laktamase effizient Ru(bpy)₃²⁺-substituierte Penicilline hydrolysieren. Die Penicilline, die als Ru-Amp und Ru-APA bezeichnet werden, sind nur sehr schwach elektrochemilumineszent, werden jedoch, wenn sie erfindungsgemäß durch Laktamase hydrolysiert werden, stark elektrochemilumineszent. Die Anwesenheit von Laktamase kann somit mit einem hohen Sensitivitäts-Niveau in einer ECL-Vorrichtung unter Verwendung irgendeiner dieser Verbindungen detektiert werden. Im Gegensatz zu den konventionellen ECL-Immunoassays, bei denen die Ru(bpy)₃²⁺-Markierung direkt an den Antikörper gebunden ist, wird in den erfindungsgemäßen ECL-Immunoassays auf Enzyrbasis der elektrochemilumineszentaktive Ruthenium-Komplex katalytisch durch das an die Antikörper-Oberfläche gebundene Enzym erzeugt. Somit kann anstelle eines Antikörpers, welcher einige (typischerweise 6-8) Ruthenium-Markierungen zur Lichterzeugung erlaubt, ein Antikörper-Enzym-Komplex typischerweise 2.000 Ruthenium-Markierungen pro Sekunde, gegebenenfalls 10.000 oder mehr, erzeugen.

[0020] Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Detektion und/oder zur quantitativen Messung eines Analyten bereitgestellt, umfassend:

- (I) In-Kontakt-Bringen (i) eines für den Analyten spezifischen Enzym-konjugierten Bindungsreagenz mit (ii) dem Analyten in Gegenwart einer elektrochemilumineszenten Verbindung und eines Enzym-Substrats, wobei das Enzym das Substrat in ein Produkt umwandelt, und wobei (a) eine Mischung aus dem Substrat und der elektrochemilumineszenten Verbindung oder ein Konjugat aus dem Substrat und der elektrochemilumineszenten Verbindung Elektrochemilumineszenz emittiert, und (b) eine Mischung aus dem Produkt und der elektrochemilumineszenten Verbindung oder ein Konjugat aus dem Produkt und der elektrochemilumineszenten Verbindung Elektrochemilumineszenz emittiert, und die durch (a) emittierte Elektrochemilumineszenz sich von der durch (b) emittierten Elektrochemilumineszenz unterscheidet;
- (II) Anwenden elektrischer Energie auf die elektrochemilumineszente Verbindung und
- (III) Detektieren oder Messen der Elektrochemilumineszenz als eine Indikation, ob oder in welcher Menge der Analyt in der Probe vorliegt.

[0021] Die Erfindung stellt ebenso einen Kit zum Messen eines Analyten in einer Probe zur Verfügung, umfassend vorgegebene Mengen eines für den Analyten spezifischen Enzym-konjugierten Bindungsreagenz und vorgegebene Mengen einer elektrochemilumineszenten Verbindung und eines Enzym-Subst-

rats und eines Referenz-Standards, wobei die vorgegebenen Mengen hinreichend sind, um eine Einzelprobenmessung durchzuführen, und wobei das Enzym das Substrat in ein Produkt umwandelt, und wobei (a) eine Mischung aus dem Substrat und der elektrochemilumineszenten Verbindung oder ein Konjugat aus dem Substrat und der elektrochemilumineszenten Verbindung Elektrochemilumineszenz emittiert, und (b) eine Mischung aus dem Produkt und der elektrochemilumineszenten Verbindung oder ein Konjugat aus dem Produkt und der elektrochemilumineszenten Verbindung Elektrochemilumineszenz emittiert, und die durch (a) emittierte Elektrochemilumineszenz sich von der durch (b) emittierten Elektrochemilumineszenz unterscheidet.

[0022] Konventionelle Immunoassays auf ECL-Basis verwenden Ruthenium-markierte Antikörper. In der vorliegenden Erfindung wurde ein Immunoassay entwickelt, in dem der Ruthenium-markierte Antikörper durch einen Enzym-markierten Antikörper ersetzt wird. Bei dem Enzym handelt es sich um Laktamase. Tripropylamin (TPA) oder ähnliche Reduktanten werden nicht in der Lösung verwendet; stattdessen werden, beispielsweise im Fall von Infektions-bezogenen Assays, Ruthenium-markierte Penicilline verwendet. In Gegenwart Laktamase-markierter Antikörper werden die Ruthenium-markierten Substrate katalytisch hydrolysiert, wodurch ein enormer Anstieg der ECL erzeugt wird. Der Assay ist der Verwendung von Immunoassays mit Ruthenium-markierten Antikörpern überlegen, da die Erzeugung von ECL-aktivem Ruthenium durch das Enzym ein katalytischer Prozess ist, in dem viele ECL-aktive Moleküle gebildet werden.

[0023] Allgemein betrifft die Erfindung einen Immunoassay auf Elektrochemilumineszenz-Basis zur Detektion von Analyten. Die Erfindung verwendet Enzyme, wie beispielsweise Laktamasen, Proteasen oder Oxido-Reduktasen, konjugiert an Antikörper und ECL-Markierungen, und Enzymsubstrate, bevorzugt mit ECL-Markierungen substituierte Substrate, wie beispielsweise mit ECL-Markierungen substituierte Antibiotika, Peptide und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), welche gemeinsam einen Antikörper-Enzymkomplex bereitstellen, welcher katalytisch bis zu mehreren Tausend ECL-aktive Markierungen pro Sekunde erzeugen kann.

[0024] Ausschlaggebend für die Anwendung der Elektrochemilumineszenz-Methodik als Messsystem für Analyten war die Erkenntnis, dass Laktamase effizient Ru(bpy)₃²⁺-substituierte Penicilline hydrolysieren kann. Die Penicilline, Ru-Amp und Ru-APA, sind nur sehr schwach elektrochemilumineszent, werden jedoch, wenn sie durch Laktamase hydrolysiert werden, stark elektrochemilumineszent.

[0025] Zur Durchführung der Erfindung können ver-

schiedene Assay-Formate verwendet werden, wie ein Fachmann auf dem Gebiet leicht erkennen kann. Dazu zählen ein Sandwich-Assay, welcher beispielsweise magnetische Beads oder einen anderen festen Träger, wie beispielsweise Kohlenstoff-Fibrillen, verwendet, ein kompetitiver Assay, welcher ein Antigen, konjugiert an freie Laktamase, verwendet, ein kompetitiver Assay, in dem die Laktamase ein rekombinantes Protein ist, welches ein Segment enthält, das durch einen Antikörper gebunden wird, welcher ebenso den ausgewählten Analyten bindet, wobei das Enzym durch die Bindung des Antikörpers inaktiviert wird, und ELISA, wobei die Laktamase ein Reporter-Molekül auf einem sekundären Antikörper darstellt; The Immunoassay Handbook, D. Wild, Ed. (1994) Stockton Press, New York.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0026] [Fig. 1](#) zeigt die Hydrolyse von Ru-AMP und Ru-APA durch Laktamase.

[0027] [Fig. 2](#) zeigt die Synthese von Ru-AMP.

[0028] [Fig. 3](#) zeigt die Synthese von Ru-APA.

[0029] [Fig. 4](#) zeigt das Massenspektrum des Ammonium-Hexafluorophosphat-Salzes von Ru-APA.

[0030] [Fig. 5](#) zeigt das Protonen-NMR-Spektrum des Ammonium-Hexafluorophosphat-Salzes von Ru-APA.

[0031] [Fig. 6](#) zeigt die Strukturen von fünf spezifischen Laktamen.

[0032] [Fig. 7](#) zeigt die Hydrolyse von Ru-AMP (linke Seite) und von Ru-APA (rechte Seite) durch NaOH oder durch Laktamase-Enzym.

[0033] [Fig. 8](#) zeigt den Vergleich der gemessenen ECL für eine Reihe verschiedener Proben.

[0034] [Fig. 9](#) zeigt den Vergleich der gemessenen ECL für eine Reihe verschiedener Proben.

[0035] [Fig. 10](#) zeigt die Wirkung nicht-hydrolysiert (dunkle Kreise) und hydrolysiert (helle Kreise) Ru-AMP-Konzentrationen auf die gemessene ECL.

[0036] [Fig. 11](#) zeigt den Vergleich der gemessenen ECL für eine Reihe verschiedener Proben.

[0037] [Fig. 12](#) zeigt die Wirkung nicht-hydrolysiert (dunkle Kreise) und hydrolysiert (helle Kreise) Ru-APA-Konzentrationen auf die gemessene ECL.

[0038] [Fig. 13](#) zeigt den Vergleich der gemessenen ECL für eine Reihe verschiedener Proben.

[0039] [Fig. 14](#) veranschaulicht einen ECL-Enzym-Immunoassay. Verschiedene Konzentrationen eines Analyten, RT1-Hapten, wurden in einer 96-Loch-Platte immobilisiert. Zu der Platte wurde entweder ein Antikörper-Enzym-Konjugat (Anti-RT1-Antikörper, kovalent an ein Laktamase-Enzym gebunden) (Gerade 1) oder ein nicht-konjugierter Antikörper oder Enzym (Geraden 2 bis 4) zugegeben. Nach dem Waschen zur Entfernung des Proteins, welches nicht an den Analyten bindet, wurde das Laktamase-Substrat, Pen G, zugegeben. Nach einer Inkubation zur Hydrolyse des Pen G in der Platte durch die Laktamase wurden die Lösungen entnommen, mit Ru(bpy)₃²⁺ gemischt und die ECL in einer ECL-Analysenvorrichtung ausgelesen. Die Gerade 1 zeigt die Ergebnisse mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat. Die Geraden 2 bis 4 zeigen die Ergebnisse unter Verwendung nicht-konjugierten Antikörpers oder Enzyms.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0040] Das bevorzugte Verfahren zur Messung des Analyten unter Verwendung des Immunoassays auf Elektrochemilumineszenz-Basis beinhaltet die folgenden aufeinander folgenden Schritte:

1. Einer Analyt-enthaltenden Lösung wird ein an magnetische Beads immobilisierter Anti-Analyt-Antikörper mit einem Laktamase-Anti-Analyt-Antikörper-Konjugat zugegeben.
2. Nach Bindung der Antikörper an den Analyten zur Erzeugung einer Antikörper-Analyt-Antikörper- "Sandwich"-Struktur werden die Beads mit einem Magneten immobilisiert und gründlich gewaschen, um störende Nicht-Analyt-Moleküle und ungebundene Laktamase-Anti-Analyt-Antikörper-Konjugate zu entfernen.
3. Zu den Beads wird ECL-markiertes Substrat zugegeben, welches von dem Enzym umgesetzt wird, wobei die optimale Reaktionszeit durch die erwartete Konzentration des Analyten bestimmt wird; der Überstand, welcher keine Beads enthält, wird entnommen.
4. Die Elektrochemilumineszenz des Überstands wird gemessen und mit einer Standard-Kurve der hydrolysierten ECL-markierten Substrat-Konzentration vs. Elektrochemilumineszenz verglichen. Die Messung kann auf einer ORIGEN®-Analysenvorrichtung entsprechend den Handbuch-Anleitungen des Herstellers durchgeführt werden; die Vorrichtung ist von IGEN, Inc., 16020 Industriel Drive, Gaithersburg, MD 20877 USA, erhältlich.

[0041] Erfindungsgemäß wird ein ECL-Detektant, wie beispielsweise Ru(bpy)₃²⁺, auf einen Substrat, wie beispielsweise ein Antibiotikum, Peptid oder NADH, substituiert. Ebenso wird ein Enzym-markierter Anti-Analyt unter Verwendung von Laktamase hergestellt. Wenn das ECL-substituierte Substrat in Gegenwart des Laktamase-markierten Antikörpers

platziert wird, wird das Substrat katalytisch hydrolysiert, wodurch der angeregte Zustand des Detektanten, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, in beträchtlichen Mengen gebildet wird. Der angeregte Zustand fällt durch einen normalen Fluoreszenz-Mechanismus, bei dem ein Photon mit einer Wellenlänge von 620 nm emittiert wird, in den Grundzustand zurück.

[0042] Zu organischen Verbindungen, welche ECL-Detektanten sind, zählen beispielsweise Rubren und 9,10-Diphenyl-Anthracen. Viele metallorganische Verbindungen sind ebenso ECL-Detektanten; am bevorzugtesten sind Ru-enthaltende Verbindungen, wie beispielsweise Ruthenium-II-Trisbipyridin-Chelat, und Os-enthaltende Verbindungen. Die in der vorliegenden offenbarten Erfindung geeigneten Detektanten sind in dem US-Patent Nr. 5,310,687 beschrieben, deren Inhalt hiermit durch Verweis aufgenommen wird.

[0043] Diese Detektanten sind für lange Zeiträume stabil. Außerdem sind die Detektanten sicher und verhältnismäßig kostengünstig. Sie erzeugen ein hoch charakteristisches Signal und kommen nicht in der Natur vor. Messungen, die auf Lumineszenz derartiger Detektanten beruhen, sind sensitiv, schnell, reproduzierbar und mittels einfacher Vorrichtungen durchführbar. Das Signal wird durch jedes Molekül des Detektanten wiederholt erzeugt, wodurch die Sensitivität, mit der sie detektiert werden können, verstärkt wird. Die bevorzugten elektrochemilumineszenten Detektanten der vorliegenden Erfindung werden hierin als $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ bezeichnet. Es können verschiedene Mengen dieses Detektanten oder Äquivalente davon verwendet werden. Diese Detektanten haben ebenso den Vorteil, dass sie direkt in einer biologischen Probe verwendet werden können, ohne dass die Probe vorbehandelt werden muss.

[0044] Die zur Bildung des angeregten Zustands erforderliche Energie stammt aus der Hydrolyse des Laktams oder Peptids oder aus der Reduktion von NAD^+ zu NADH . Das $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ im angeregten Zustand fällt durch einen normalen Fluoreszenz-Mechanismus, bei dem ein Photon bei 620 nm emittiert wird, in den Grundzustand zurück.

[0045] Die Quantifizierung des $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Detektanten kann leicht mit relativ unkomplizierten Vorrichtungen automatisiert werden. Das Herz der Vorrichtung bildet die elektrochemische Durchflusszelle, welche Arbeitselektroden und Gegenelektroden zur Initiierung der ECL-Reaktion enthält. Beide Elektroden sind bevorzugt aus Gold gefertigt, es wurden jedoch auch andere Materialien mit verschiedenem Erfolg verwendet. Ein Potentiostat wird verwendet, um verschiedene Spannungs-Wellenformen an die Elektroden anzulegen, und eine einzelne Photoelektronen-Vervielfacherröhre (PMT) wird verwendet, um das während der ECL-Reaktion emittierte Licht zu

detektieren. Eine Ag/AgCl-Referenzelektrode wird in dem Fließweg stromabwärts der Durchflusszelle platziert, und eine peristaltische Pumpe wird verwendet, um verschiedene Flüssigkeiten durch die Durchflusszelle zu befördern. In einer typischen Abfolge wird das Assayfluid von einem Teströhrchen in die Durchflusszelle befördert und der Detektant durch Anlegen einer linear ansteigenden Spannung an die Elektroden und Messen des emittierten Lichts quantifiziert. Nach der Messung wird eine Waschlösung mit hohem pH-Wert in die Zelle geleitet, um ein elektrochemisches Reinigungsverfahren durchzuführen. Dann wird eine konditionierende Lösung in die Zelle geleitet und eine Spannungs-Wellenform angelegt, welche die Oberflächen der Elektroden in einem hochgradig wiederherstellbaren Zustand, bereit für den nächsten Messzyklus, zurücklässt.

[0046] Die ECL-Reaktion kann effizient durch viele verschiedene Spannungs-Wellenformen initiiert werden. Die Messungen des Arbeitselektrodenstroms und der ECL-Intensität können beispielsweise durch das Anlegen einer Dreieckswellenspannung an die Elektroden induziert werden. Bei der angezeigten Spannung handelt es sich tatsächlich um die Spannung, die an der Ag/AgCl-Referenzelektrode gemessen wird; sie umfasst die Effekte eines im hohen Maße unkompenzierten Widerstands. Folglich ist die tatsächliche Spannung, die an die Arbeitselektrode angelegt wird, wesentlich niedriger als die dargestellte. Die Dreiecks-Wellenform nimmt von 565 bis 2.800 Millivolt (mV) mit einer Geschwindigkeit von 750 Millivolt pro Sekunde (mV/s) zu und fällt dann mit der gleichen Geschwindigkeit auf 1.000 mV ab. Die Oxidation des Laktam-Substrats und von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ wird sichtbar, wenn die angelegte Spannung 1.100 mV erreicht und eine Lumineszenz erzeugt. Die Intensität der Lumineszenz steigt mit der angelegten Spannung an, bis das Substrat an der Oberfläche der Elektrode erschöpft ist, was zu einem Abfall der Intensität führt. Die Intensität der beobachteten Lumineszenz ist groß genug, um leicht mit konventionellen Photoelektronen-Vervielfächern, die entweder im Photonenzähl- oder Strombetrieb-(Currentmode)-Modus arbeiten, gemessen zu werden.

[0047] Das bevorzugte Verfahren zum Messen eines Analyten unter Verwendung des Immunoassays auf Elektrochemilumineszenz-Basis erfolgt durch die folgenden aufeinander folgenden Schritte:

1. Mischen eines an magnetische Beads immobilisierten Anti-Analyt-Antikörpers mit einem Laktamase-Anti-Analyt-Antikörper-Konjugat in einer Analyt-enthaltenden Lösung.
2. Ermöglichen einer Bindung der Antikörper an den Analyten zur Erzeugung einer Antikörper-Analyt-Antikörper- "Sandwich"-Struktur. Immobilisieren der Beads mit einem Magneten, intensives Waschen zur Entfernung störender Nicht-Analyt-Moleküle und ungebundener Laktamase.

mase-Anti-Analyt-Antikörper-Konjugate.

3. Zugabe von ECL-markiertem Substrat zu den Beads, ermöglichen einer Enzymreaktion, wobei die optimale Reaktionszeit durch die erwartete Konzentration des Analyten bestimmt wird, Abnehmen des Überstands ohne Beads.

4. Messen der Elektrochemilumineszenz des Überstands und Vergleichen mit einer Standard-Kurve der Konzentration des hydrolysierten ECL-markierten Substrats vs. Elektrochemilumineszenz. Die Messung kann unter Verwendung etablierter Verfahren auf der ORIGEN®-Analysevorrichtung erfolgen.

[0048] Die Probe, zu der das interessierende Laktam zugegeben wurde, wird dann in einer Messzelle platziert, um eine anfängliche Ablesung zu erhalten. Typischerweise wird das interessierende Laktam in Konzentrationen zwischen 10 mikromolar und 1,0 millimolar zugegeben. Der elektrochemilumineszente Detektant liegt typischerweise in Konzentrationen von 10^{-6} M (Bereich 1–15 μ M) vor. Die Proben-enthaltende Zelle wird dann für einen ausreichenden Zeitraum inkubiert, um sicherzustellen, dass die Laktamase-katalysierte Hydrolyse erfolgen kann, wenn das Enzym vorliegt. Dieser Zeitraum beträgt typischerweise 5 Minuten bis 2 Stunden. Längere und kürzere Zeiträume sind möglich, in Abhängigkeit der Proben- und Reagenz-Konzentrationen. Da nur empirische Parameter eine Rolle spielen, können ihre Werte unter Verwendung konventioneller Techniken bestimmt werden.

[0049] Nach der Inkubation wird eine zweite Ablesung vorgenommen. Die Differenz der Ablesungen, falls eine vorliegt, korreliert mit der in der Probe vorliegenden Laktamase-Aktivität; siehe dazu [Fig. 2](#).

[0050] Die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtungen und Methoden sind, wie bereits erwähnt, in den US-Patenten Nr. 5,068,088, 5,061,455, 5,093,268 und 5,147,806 und 5,221,605 dargestellt. Außerdem zählen zu Elektrochemilumineszenz-Molekülen zur Verwendung in dem Messsystem als Detektanten solche bidentaten aromatischen heterozyklischen stickstoffhaltigen Liganden von Ruthenium und Osmium, wie sie in dem US-Patent Nr. 5,310,687 beschrieben sind.

[0051] Reagenz-Kits, welche für die Durchführung der Assays notwendige Materialien enthalten, können zusammengestellt werden, um die Handhabung und die Fostersche Standardisierung zu vereinfachen. Die in dem Kit enthaltenden Materialien können in Abhängigkeit des Verwendungszwecks variieren. Typischerweise enthält der Kit den elektrochemilumineszenten Detektanten, notwendige Puffer und Standards. Bei den Standards kann es sich um chemische Reagenzien oder Daten (empirisch) in gedruck-

ter oder elektronischer Form handeln, die für die Kalibrierung notwendig sind, die zur Durchführung des Assays erforderlich ist.

BEISPIELE

[0052] Ergänzend zu der vorhergehenden detaillierten Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden im Folgenden spezifische Beispiele gegeben, die lediglich illustrativen Zwecken dienen und als Hilfe zum Verständnis der Erfindung gedacht sind. Die Beispiele sind jeweils nicht einschränkend und nicht ausschließend. Dem entsprechend wird der Umfang der vorliegenden Erfindung, wie er in den angehängten Ansprüchen ausgeführt wird, im Hinblick auf die Lehren der gesamten Beschreibung bestimmt.

Beispiel 1 Herstellung von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -markierten Laktam-Antibiotika

[0053] (a) Herstellung von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -markierter 6-Aminopenicillansäure ("Ru-APA")

[0054] $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS-Ester (15 mg) (IGEN, Inc., Rockville, MD, USA) in Acetonitril (250 μ l) wurde mit 6-Aminopenicillansäure (12,4 mg) in 0,2 M Natriumbicarbonat, pH 8,0 (350 μ l) gemischt und bei Raumtemperatur 2 Stunden umgesetzt ([Fig. 3](#)). Ru-APA wurde mit einem Waters-HPLC-System (Milford, MA, USA), ausgestattet mit einer Progel™-TSK-CM-SPW-Säule (7,5 cm \times 7,5 mm) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) unter Anwendung eines 20-minütigen linearen Gradienten von 20–100 mM Natriumphosphat, pH 7,0, mit 1,0 ml/Minute gereinigt. Das Substrat wurde spektrophotometrisch durch Messen der Absorbanz des Ruthenium-Komplexes quantifiziert (der molare Extinktionskoeffizient bei 453 nm beträgt $13.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

(b) Herstellung von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -markiertem Ampicillin ("Ru-AMP")

[0055] $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS-Ester (15,1 mg) in Acetonitril (250 μ l) wurden mit Ampicillin (29,1 mg) in 0,2 M Natriumbicarbonat, pH 8,0 (250 μ l) gemischt und bei Raumtemperatur für 2 Stunden umgesetzt ([Fig. 2](#)). Ru-AMP wurde unter Verwendung eines Waters-HPLC-Systems (Milford, MA, USA), ausgestattet mit einer Progel™-TSJ-CM-5PW-Säule (7,5 cm \times 7,5 mm) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) unter Verwendung eines 15-minütigen linearen Gradienten von 20–180 mM Natriumphosphat, pH 7,0, mit 1,0 ml/Minute gereinigt. Das Substrat wurde spektrophotometrisch durch Messen der Absorbanz des Ruthenium-Komplexes quantifiziert (der molare Extinktionskoeffizient bei 453 nm beträgt $13.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Nach Bildung des Ammonium-Hexafluorophosphat-Salzes wurde die Struktur und Reinheit des Ru-AMP durch Massenspektroskopie und Protonen-NMR bestätigt ([Fig. 4](#)–[Fig. 5](#)).

(c) Herstellung anderer $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ -markierter Laktame

[0056] Andere Laktame, beispielsweise 7-Aminocephalosporansäure, welche ein primäres Amin in ihren Strukturen aufweisen, können ebenso mit $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ -NHS-Ester umgesetzt werden, um ähnliche Konjugate, wie oben beschrieben, zu bilden. Die Reaktions- und Aufreinigungsbedingungen sind ähnlich, eventuelle erforderliche Anpassungen können von einem Fachmann auf dem Gebiet leicht vorgenommen werden. [Fig. 6](#) zeigt die Struktur fünf spezifischer Laktame.

Beispiel 2 ECL-Assay der Ru-AMP-Hydrolyse

[0057] Die Experimente wurden durchgeführt, um die ECL-Eigenschaften von Ru-AMP (konjugiert) mit $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ und Ampicillin-Mischungen (nicht-konjugiert) zu vergleichen. Die ECL-Eigenschaften wurden sowohl vor als auch nach NaOH- und enzymatischer Hydrolyse verglichen ([Fig. 7](#)).

[0058] Es stellte sich heraus, dass Ru-AMP ein sehr gutes Substrat der Laktamase darstellt. Die Hydrolyse von Ru-AMP (33 μM) durch Laktamase I aus *Bacillus cereus* (0,3 nM) wurde spektrophotometrisch bei 240 nm unter Verwendung eines Hitachi-U3200-Spektrophotometers (Danbury, CT, USA) bei 25,0 °C in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0, verfolgt. Eine Analyse nach der Hälfte der Zeit ($t/2$) ergab einen k_{cat}/K_m -Wert für die enzymatische Hydrolyse von Ru-AMP von $3,9 \times 10^8 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$.

[0059] Die ECL-Eigenschaften äquimolarer Mischungen von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ und Ampicillin (hydrolysiert oder nicht-hydrolysiert) wurden mit denen gleicher Konzentration des Ru-AMP-Konjugats (hydrolysiert oder nicht-hydrolysiert) verglichen. In separaten Experimenten wurden Ampicillin und Ru-AMP entweder durch 50 mM NaOH (basische Hydrolyse) oder 347 nM Laktam I vom *Bacillus cereus* (enzymatische Hydrolyse) hydrolysiert. Für die basische Hydrolyse wurden 50 μl 5 M NaOH zu Lösungen von 1,0 ml deionisiertem Wasser, enthaltend entweder 30,1 μM Ru-AMP oder eine Mischung aus 30 μM Ampicillin und 30 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$, gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lösungen mit 50 μl 5 M HCl neutralisiert. Bei den entsprechenden nicht-hydrolyzierenden Vergleichsexperimenten wurden 50 μl (5 M) H_2O zu Lösungen von entweder 30,1 μM Ru-AMP oder einer Mischung, enthaltend 30,0 μM Ampicillin und 30,0 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$, gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurden 50 μl 5 M NaCl zu diesen Lösungen gegeben. Die in [Fig. 8](#) dargestellten Ergebnisse zeigen: (1) dass Ampicillin-Hydrolyse durch entweder NaOH oder Laktamase einen Anstieg der ECL der Mischungen verursacht; und (2) dass der durch die Hydrolyse verursachte Anstieg der ECL dramatisch höher ist, wenn der Licht-emittierende Rutheni-

um-Komplex kovalent an Ampicillin gebunden ist. Bei der basischen Hydrolyse stieg die ECL um das 1,5-fache an, wenn Ampicillin in einer Mischung aus Ampicillin und $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ hydrolysiert wurde, während die ECL um das 5,2-fache anstieg, wenn Ru-AMP hydrolysiert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden bei enzymatischer Hydrolyse erhalten: die ECL stieg um das 2,1-fache an, wenn Ampicillin in einer Mischung aus Ampicillin und $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ hydrolysiert wurde, während die ECL um das 9,8-fache nach der Hydrolyse von Ru-AMP anstieg. Die in [Fig. 8](#) dargestellten Daten bestätigen diese Schlussfolgerungen, wobei [Fig. 8](#) die experimentell gemessene Elektrochemilumineszenz von (von links nach rechts):

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ allein;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus nicht-hydrolysiertem Ampicillin;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus NaOH-hydrolysiertem Ampicillin;
nicht-hydrolysiertem Ru-AMP;
NaOH-hydrolysiertem Ru-AMP;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus nicht-hydrolysiertem Ampicillin;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus Laktamase-hydrolysiertem Ampicillin;
nicht-hydrolysiertem Ru-AMP; und
Laktamase-hydrolysiertem Ru-AMP zeigt.

[0060] Diese Arbeit wurde in einem zweiten Experiment bestätigt, in dem enzymatische Hydrolyse verwendet wurde, wobei die Inkubationszeit mit dem Enzym von 30 auf 60 Minuten verlängert wurde ([Fig. 9](#)). Hier verursachte die enzymatische Hydrolyse einen 2,5-fachen Anstieg der ECL, wenn Ampicillin und $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ konjugiert waren, und einen 11,1-fachen Anstieg der ECL, wenn das Ru-AMP-Konjugat hydrolysiert wurde. Die in [Fig. 9](#) dargestellten Daten bestätigen diese Schlussfolgerungen, wobei [Fig. 9](#) die experimentell gemessene Lumineszenz von (von links nach rechts):

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ allein;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus nicht-hydrolysiertem Ampicillin;
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ plus Laktamase-hydrolysiertem Ampicillin;
nicht-hydrolysiertem Ru-AMP; und
Laktamase-hydrolysiertem Ru-AMP zeigt.

[0061] Diese Ergebnisse zeigen, dass $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ -Konjugation intramolekulare Wirkungen hat, die zu einem dramatischen Anstieg der experimentell gemessenen Lumineszenz führen, wenn der Laktamring hydrolysiert wird.

[0062] [Fig. 10](#) zeigt, dass geringe Konzentrationen an Ru-AMP durch Hydrolyse detektiert werden können. Die untere Detektionsgrenze wurde mit 50 nM bestimmt (464 relative ECL-Counts bei der Hydrolyse von Ru-AMP gegenüber einer mittleren Instrumentenablesung von -152 relativen Counts für nicht-hydrolysiertes Ru-AMP). Dies stimmt hervorragend mit der unteren Detektionsgrenze für die Hydrolyse von

(nicht-konjugiertem) Ampicillin überein, welche 5.000 nM beträgt.

Beispiel 3 ECL-Assay der Ru-APA-Hydrolyse

[0063] Es wurde davon ausgegangen, dass sich die ECL-Eigenschaften von Ru-APA (vor und nach der Hydrolyse) von denen von Ru-AMP unterscheiden könnten. Die Unterschiede wären eine Folge der strukturellen Unterschiede zwischen APA und AMP, insbesondere des unterschiedlichen Abstands zwischen dem Laktamring und der primären Aminogruppe, die zur Konjugation von Ru(bpy)₃⁺²-NHS-Ester verwendet wird ([Fig. 7](#)). In Ru-AMP ist der Laktamring drei Bindungslängen weiter von der Aminogruppe entfernt als in Ru-APA. Insbesondere könnte die Hydrolyse von Ru-APA (oder anderen Laktam-Konjugaten) mit höherer oder geringerer Sensitivität durch ECL detektiert werden als die Ru-AMP-Hydrolyse.

[0064] Die ECL-Eigenschaften des Ru-APA-Konjugats wurden mit denen der Mischungen von nicht-konjugiertem Ru(bpy)₃⁺² und 6-APA verglichen. Die ECL-Eigenschaften wurden vor und nach NaOH- und enzymatischer Hydrolyse verglichen. Die Daten wurden dann mit den in Beispiel 2 beschriebenen Ergebnissen der entsprechenden Experimente mit Ru-AMP verglichen.

[0065] Es stellte sich heraus, dass Ru-APA ein sehr gutes Substrat der Laktamase darstellt. Die Hydrolyse von Ru-APA (23 µM) durch Laktamase I von *Bacillus cereus* (0,6 nM) wurde spektrophotometrisch bei 240 nm unter Verwendung eines Hitachi-U3200-Spektrophotometers (Danbury, CT, USA) bei 25,0 °C in 0,1 M Natrumporphosphat, pH 7,0, verfolgt. Eine Analyse nach der Hälfte der Zeit (t 1/2) ergab einen k_{cat}/K_m -Wert für die enzymatische Hydrolyse von Ru-APA von $9,8 \times 10^7 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

[0066] Die ECL-Eigenschaften äquimolarer Mischungen von Ru(bpy)₃⁺² und Ampicillin (hydrolysiert oder nicht-hydrolysiert) wurden mit denen gleicher Konzentration des Ru-APA-Konjugats (hydrolysiert oder nicht-hydrolysiert) verglichen. In separaten Experimenten wurden 6-APA und Ru-APA entweder durch 50 mM NaOH (basische Hydrolyse) oder 3,8 µM Laktamase I von *Bacillus cereus* (enzymatische Hydrolyse) hydrolysiert.

[0067] Für die basische Hydrolyse wurden 50 µl 5 M NaOH zu 1,0-ml-Lösungen von deionisiertem Wasser, enthaltend entweder 23,0 µM Ru-APA oder eine Mischung aus 23,0 µM APA und 23,0 µM Ru(bpy)₃⁺², gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lösungen mit 50 µl 5 M HCl neutralisiert. Bei den entsprechenden nicht-hydrolysiierenden Vergleichsexperimenten wurden 50 µl (5 M) H₂O zu Lösungen von entweder 23,0 µM Ru-APA oder einer Mischung aus 23,0 µM APA und 23,0 µM Ru(bpy)₃⁺² gegeben. Nach

60-minütiger Inkubation wurden 50 µl 5 M NaCl zu diesen Lösungen gegeben. Die in [Fig. 11](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass: (1) die Hydrolyse von 6-APA (konjugiert oder nicht-konjugiert) durch entweder NaOH oder Laktamase einen Anstieg der ECL verursacht; und (2) der Anstieg der durch die Hydrolyse verursachten ECL dramatisch höher ist, wenn der Licht-emittierende Ruthenium-Komplex kovalent an 6-APA gebunden ist. Bei der basischen Hydrolyse stieg die ECL um das 1,9-fache an, wenn 6-APA (nicht-konjugiert) in einer Mischung aus 6-APA und Ru(bpy)₃⁺² hydrolysiert wurde, während die ECL um das 13,2-fache anstieg, wenn Ru-APA (konjugiert) hydrolysiert wurde. Auf ähnliche Weise stieg bei der enzymatischen Hydrolyse die ECL um das 1,4-fache an, wenn 6-APA (nicht-konjugiert) in einer Mischung aus 6-APA und Ru(bpy)₃⁺² hydrolysiert wurde, während die ECL um das 31,8-fache anstieg, wenn Ru-APA (konjugiert) hydrolysiert wurde.

[0068] Die in [Fig. 11](#) dargestellten Daten bestätigen diese Schlussfolgerungen, wobei [Fig. 11](#) die experimentell gemessene Lumineszenz von (von links nach rechts): Ru(bpy)₃⁺² allein; Ru(bpy)₃⁺² plus nicht-hydrolysiertem 6-APA; Ru(bpy)₃⁺² plus NaOH-hydrolysiertem 6-APA; nicht-hydrolysiertem Ru-APA; NaOH-hydrolysiertem Ru-APA; Ru(bpy)₃⁺² plus nicht-hydrolysiertem 6-APA; Ru(bpy)₃⁺² plus Laktamase-hydrolysiertem 6-APA; nicht-hydrolysiertem Ru-APA; und Laktamase-hydrolysiertem APA zeigt.

[0069] Diese Arbeit zeigt deutlich, dass die Konjugation von 6-APA und dem elektrochemilumineszenten Ruthenium-Komplex intramolekulare Wirkungen hat, durch welche die Elektrochemilumineszenz erhöht wird, wenn der Laktamring hydrolysiert wird. Des Weiteren zeigt ein Vergleich mit den in Beispiel 2 für das Ampicillin-Konjugat beschriebenen Ergebnissen, dass die Hydrolyse von Ru-APA zu einem sehr viel höheren Elektrochemilumineszenz-Signal führt als die Hydrolyse von Ru-AMP. Da in Ru-APA das Ruthenium-Atom näher an dem Laktamring liegt als in Ru-AMP, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Abstand zwischen dem Ruthenium-Komplex und dem Laktamring eine entscheidende Wirkung haben könnte. Andere als bisher getestete Laktam-Ru(bpy)₃⁺²-Konjugate könnten eine noch dramatischere Änderung der Elektrochemilumineszenz nach der Laktam-Hydrolyse ergeben.

[0070] [Fig. 12](#) zeigt, dass die Hydrolyse sehr geringer Konzentrationen von Ru-APA durch ECL detektiert werden kann. Insbesondere zeigt [Fig. 12](#) die Wirkung von nicht-hydrolysiertem (geschlossene Kreise) und hydrolysiertem (offene Kreise) Ru-APA-Konzentrationen auf die experimentell bestimmte Elektrochemilumineszenz. Die untere Detek-

tionsgrenze wurde mit 50 nM bestimmt (eine Instrumentenablesung von -33 relativen ECL-Counts für hydrolysiertes Ru-APA gegenüber durchschnittlich -648 relativen ECL-Counts für nicht-hydrolysiertes Ru-APA (konjugiert)). Dieses stimmt hervorragend mit der unteren Detektionsgrenze für die Hydrolyse von (nicht-konjugiertem) Ampicillin überein, welche 50 μ M (in Gegenwart von 10 μ M Ru(bpy)₃²⁺) beträgt.

[0071] Es wurde ein Experiment durchgeführt, um den Vorteil der Konjugation eines Laktams an die ECL-Markierung, Ru(bpy)₃²⁺, zu quantifizieren. Der Anstieg der ECL nach der Hydrolyse von 10 μ M Ru-APA wurde mit einer ECL-Standardkurve, in der verschiedene Konzentrationen von 6-APA (nicht-konjugiert) in Gegenwart von 10 μ M Ru(bpy)₃²⁺ hydrolysiert wurden, verglichen. Durch Extrapolation der 6-APA-Standardkurve zeigen die Ergebnisse ([Fig. 13](#)), dass die ECL-Änderung nach Hydrolyse von 10 μ M Ru-APA (konjugiert) äquivalent zu der ECL-Änderung bei der Hydrolyse von 1.250 μ M 6-APA (nicht-konjugiert) in Gegenwart von 10 μ M Ru(bpy)₃²⁺ ist. Dies zeigt, dass die Konjugation von Ru(bpy)₃²⁺ und 6-APA zu einem 125-fachen Anstieg der ECL-Änderung, die während der 6-APA-Hydrolyse beobachtet wird, führt. Die Daten in [Fig. 13](#) bestätigen diese Schlussfolgerungen, wobei in [Fig. 13](#) ein Vergleich der Elektrochemilumineszenz-Wirkungen von Ru-APA (konjugiert) mit Ru(bpy)₃²⁺ plus 6-APA (nicht-konjugiert) gezeigt ist. Die Dreiecke stellen die Elektrochemilumineszenz von 10 μ M nicht-hydrolysiertem (helle Dreiecke) und hydrolysiertem (dunkle Dreiecke) Ru-APA dar. Die Kreise stellen die Elektrochemilumineszenz-Wirkungen von nicht-hydrolysiertem (dunkle Kreise) und hydrolysiertem (offene Kreise) 6-APA (0–1.000 μ M) in Gegenwart von 10 μ M Ru(bpy)₃²⁺ dar. Eine Extrapolation in [Fig. 13](#) zeigt, dass die Elektrochemilumineszenz-Änderung nach Hydrolyse von 10 μ M Ru-APA äquivalent zu der Elektrochemilumineszenz-Änderung nach Hydrolyse von 1.250 μ M freiem 6-APA in Gegenwart von 10 μ M Ru(bpy)₃²⁺ ist.

Beispiel 4 Herstellung eines Antikörper-Laktamase-Konjugats

[0072] Antikörper-Laktamase-Konjugate wurden bereits hergestellt (Yolken et al., *J. Immunol. Meth.* 73 (1984) 109–123; Svensson et al., *Bioconj. Chem.* 5 (1994) 262–267). Die Konjugate werden im Allgemeinen unter Verwendung kommerziell erhältlicher bifunktioneller Vernetzungsmittel, wie beispielsweise Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat), welches hierin verwendet wird, hergestellt. Andere Verfahren der kovalenten Verknüpfung zweier Proteine sind etabliert und können ebenso zur Anwendung kommen. Es ist jedes Verfahren geeignet, solange der Antikörper und das Enzym nach der Konjugation biologisch aktiv bleiben.

[0073] Die Laktamase (3,7 mg) wurde in 0,500 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Sulfo-SMCC (5 mg) wurde in 1,500 ml PBS gelöst. Die Laktamase- und Sulfo-SMCC-Lösungen wurden gemischt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt.

[0074] Bei einem monoklonalen Antikörper gegen das Hapten RT1 (5 mg) wurde ein Pufferaustausch in PBS unter Verwendung eines Centricon-30-Konzentrators (Amincon) durchgeführt. Dithiothreitol (DTT, 5 mg) wurde in PBS gelöst und dann mit dem Anti-RT1-Antikörper gemischt, wodurch ein Gesamtvolumen von 1,300 ml erhalten wurde. Die Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Reduktion der Disulfid-Bindungen des RT1 durch DTT zu ermöglichen.

[0075] Die Proteine in den beiden oben beschriebenen Reaktionsmischungen wurden unter Verwendung von Sephadex-G-25M-PD-10-Säulen (Pharmacia), welche mit PBS pre-äquilibriert worden waren, entsalzt. Die gewonnenen Proteine wurden spektrophotometrisch bei 280 nm quantifiziert. Es ergaben sich Ausbeuten von 1,0 mg Laktamase und 3,1 mg Antikörper. Die Proteinlösungen wurden dann gemischt, wodurch ein molares Verhältnis von Laktamase zu Antikörper von 1,5:1,0 erhalten wurde. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C für 22 Stunden rotiert, um die Bildung eines Enzym-Antikörper-Konjugats zu ermöglichen. Nach der Reaktion wurde die Mischung auf einer Sephadryl-S-300-Säule (Pharmacia) chromatographiert. Es wurden drei Haupt-Protein-Peaks erhalten. Da die chromatographische Trennung nach der Größe erfolgte, wurde erwartet, dass der erste aus der Säule eluierte Peak das Enzym-Antikörper-Konjugat darstellt.

Beispiel 5 ECL-Enzym-Immunoassay

[0076] Ein ECL-Immunoassay unter Verwendung eines Laktamase-Antikörper-Konjugats kann entweder mit einer nicht-konjugierten Mischung von Ru(bpy)₃²⁺ und einem Laktam-Antibiotikum (wie beispielsweise APA oder Pen G) oder, bevorzugt, mit einem Ru(bpy)₃²⁺-Laktam-Konjugat (wie beispielsweise Ru-APA) durchgeführt werden. Die Verwendung eines konjugierten ECL-Substrat-Systems ist bevorzugt, da die Hydrolyse von Ru(bpy)₃²⁺-markierten Substraten sehr viel sensitiver durch ECL detektiert wird als Mischungen des Substrat und Ru(bpy)₃²⁺ und des Laktamase-Substrats Pen G.

[0077] Im vorliegenden Fall wurde ein ECL-Enzym-Immunoassay unter Verwendung eines Antikörper-Enzym-Konjugats (Anti-RT1-Antikörper, gebunden an Laktamase, wie in Beispiel 4 beschrieben) getestet. Die Anwesenheit des Analyten wurde durch den Laktamase-Anteil des Konjugats, welcher das Penicillin, Pen G, hydrolysierte, welches wiederum

Ru(bpy)_3^{2+} dazu bringt, Licht durch Elektrochemilumineszenz zu emittieren, angezeigt. Der Assay wurde in einer 96-Loch-Platte durchgeführt und die ECL wurde durch Überführen des Inhalts der Löcher in Teströhren, welche in einer ORIGEN®-Analysevorrichtung gelesen wurden, gemessen.

[0078] Der Analyt (das RT1-Hapten, konjugiert an bovines Serum-Albumin (BSA)) wurde für 2 Stunden bei 37 °C in einer 96-Loch-Platte mit 0, 0,2, 2,0 und 10,0 µg/ml inkubiert, um eine Anhaftung an die Platte zu ermöglichen. Die Platte wurde dann dreimal mit PBS gewaschen. In jedes Loch wurden 200 µl des 3%igen BSA in PBS gegeben; die Platte wurde für ungefähr 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zu jedem Loch wurden 50 µl der Chromatographie-Fraktionen von Beispiel 4 gegeben. Es wurde angenommen, dass die Fraktionen aus dem ersten eluierten Protein-Peak das Antikörper-Enzym-Konjugat darstellen, während die Fraktionen aus den später eluierenden Protein-Peaks entweder freie Antikörper oder freies Enzym darstellen, von denen keine ein ECL-Signal in diesem Experiment ergeben sollte. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, um die Bindung des Antikörper-Enzym-Konjugats an den Analyten zu ermöglichen. Die Platte wurde dann dreimal mit PBS, enthaltend 0,05 % Tween, gewaschen. In jedes Loch wurden 75 µl 10 mM Pen G gegeben; die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Hydrolyse von Pen G durch die vorliegende Laktamase zu ermöglichen. Nach dem Inkubationszeitraum wurden 25 µl aus jedem Loch in Teströhren überführt. Zu jedem Röhrchen wurden 25 µl 120 µM Ru(bpy)_3^{2+} und 250 µl 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0, gegeben. Die ECL der Mischungen wurden dann in einer ORIGEN®-Analysevorrichtung gelesen.

[0079] Die Ergebnisse des ECL-Enzym-Immunoassays sind in [Fig. 14](#) dargestellt. Bei dem in der Geraden 1 verwendeten Protein handelt es sich um das mutmaßliche Antikörper-Enzym-Konjugat. Aus [Fig. 14](#) wird deutlich, dass die ECL-Counts in der Geraden 1 mit ansteigender Analyt-Konzentration zunehmen. Dies zeigt, dass das Antikörper-Enzym-Konjugat an den Analyten gebunden ist und Pen G zu einer Form hydrolysiert, welche die ECL von Ru(bpy)_3^{2+} fördert. Es konnte sogar die niedrigste Konzentration des getesteten Analyten, 0,2 µg/ml, detektiert werden. Die anderen Geraden (2 bis 4) zeigen andere chromatographische Fraktionen, die vermutlich freie Antikörper und freie Enzyme darstellen. Diese Geraden, welche als Kontroll-Experimente betrachtet werden können, zeigen nur einen geringen Anstieg der ECL mit ansteigenden Konzentrationen des Analyten. Zusammengefasst wurde das Antikörper-Enzym-Konjugat in einem Enzym-Immunoassay verwendet, um unter Verwendung einer nicht-konjugierten Mischung aus Pen G und Ru(bpy)_3^{2+} einen Analyten sensitiv zu detektieren. Da das konjugierte Ru(bpy)_3^{2+} -Laktam-Substrat sehr viel sensitiver Lak-

tam-Hydrolyse durch ECL detektieren kann als eine Mischung von Ru(bpy)_3^{2+} und Laktam, können die hierin beschriebenen Ergebnisse vermutlich durch Verwendung eines konjugierten Substrats deutlich verbessert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion und/oder quantitativen Messung des Analyten, umfassend:

I) In-Kontakt-Bringen (i) eines für den Analyten spezifischen Enzym-konjugierten Antikörpers mit dem (ii) Analyten in Gegenwart eines elektrochemilumineszenten Detektanten und eines Enzym-Substrats, wobei das Enzym das Substrat in ein Produkt umwandelt und wobei (a) eine Mischung aus dem Substrat und dem elektrochemilumineszenten Detektanten oder ein Konjugat aus dem Substrat und dem elektrochemilumineszenten Detektanten nach Anwendung elektrischer Energie Elektrochemilumineszenz emittiert und (b) eine Mischung aus dem Produkt und dem elektrochemilumineszenten Detektanten oder ein Konjugat aus dem Produkt und dem elektrochemilumineszenten Detektanten nach Anwendung elektrischer Energie Elektrochemilumineszenz emittiert und die durch (a) emittierte Elektrochemilumineszenz sich von der durch (b) emittierten Elektrochemilumineszenz unterscheidet;

II) Anwenden elektrischer Energie auf den elektrochemilumineszenten Detektanten und

III) Detektieren oder Messen von Elektrochemilumineszenz als eine Indikation, ob oder in welchen Mengen der Analyt in der Probe vorliegt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Enzym β -Laktamase, Protease oder eine Oxidoreduktase ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Substrat ein Antibiotikum, ein Peptid oder ein Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ist.

4. Verfahren nach jedem beliebigen der Ansprüche 1–3, wobei der elektrochemilumineszente (ECL) Detektant und das Enzym-Substrat konjugiert sind.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der ECL-Detektant aus der Gruppe ausgewählt wird, bestehend aus Rubren, 9,10-Diphenylanthrazen, Ruthenium-enthaltende Verbindungen und Osmium-enthaltende Verbindungen.

6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der ECL-Detektant Ruthenium-II-Trisbipyridin-Chelat ist.

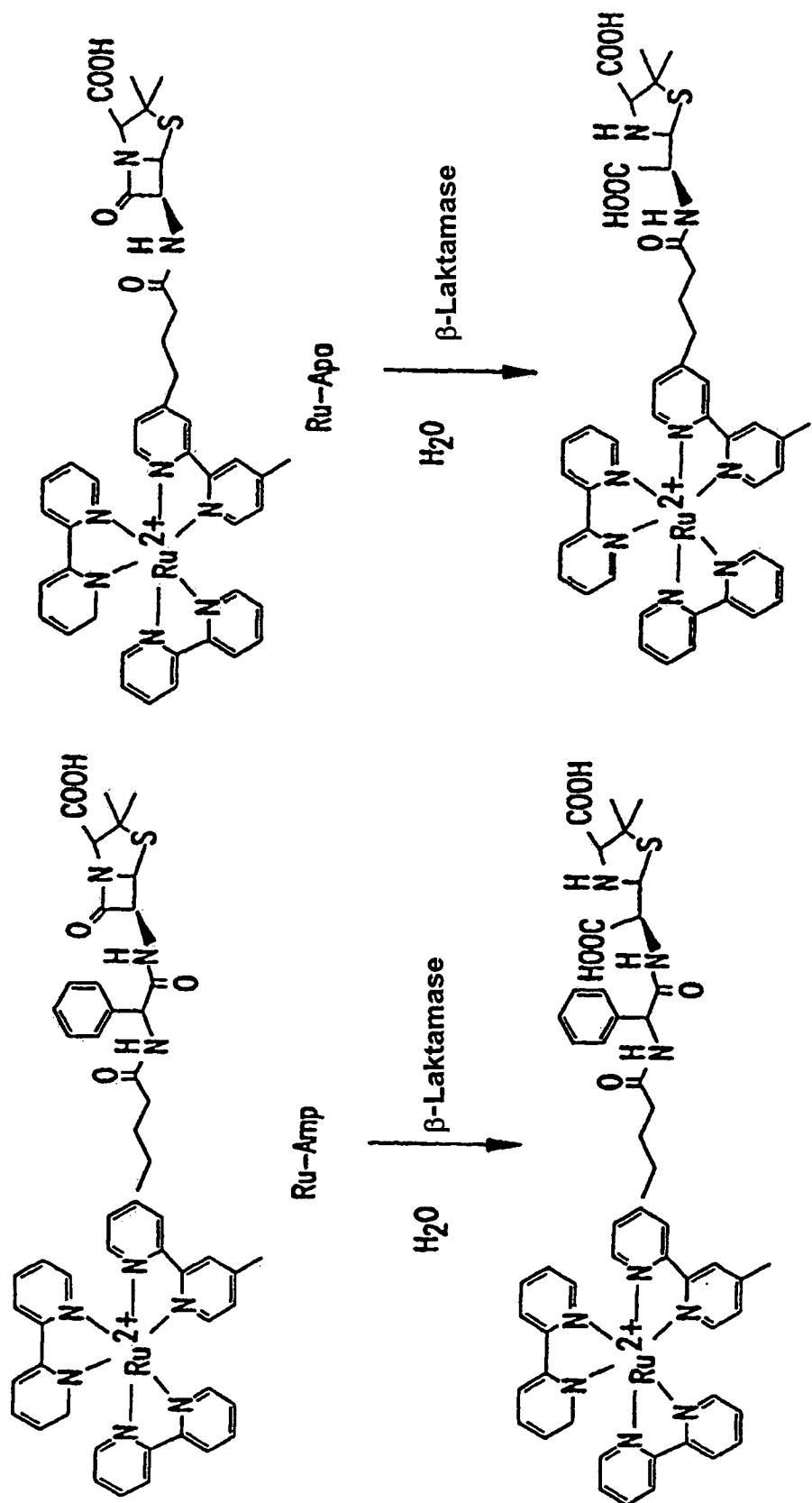
7. Verfahren gemäß jedem beliebigen der Ansprüche 1–6, wobei die Mischung aus Substrat und ECL-Detektant schwach elektrochemilumineszent ist und die Mischung aus Produkt und ECL-Detektant stark elektrochemilumineszent ist.

8. Kit zum Messen eines Analyten in einer Probe, umfassend vorgegebene Mengen eines für den Analyten spezifischen Enzym-konjugierten Antikörpers und vorgegebene Mengen eines elektrochemilumineszenten Detektanten und eines Enzym-Substrats und eines Referenz-Standards, wobei die vorgegebenen Mengen hinreichend sind, eine Einzelproben-Messung durchzuführen, und wobei das Enzym das Substrat in ein Produkt umwandelt und wobei (a) eine Mischung aus dem Substrat und dem elektrochemilumineszenten Detektanten oder ein Konjugat aus dem Substrat und dem elektrochemilumineszenten Detektanten nach Anwendung elektrischer Energie Elektrochemilumineszenz emittiert und (b) eine Mischung aus dem Produkt und dem elektrochemilumineszenten Detektanten oder ein Konjugat aus dem Produkt und dem elektrochemilumineszenten Detektanten nach Anwendung elektrischer Energie Elektrochemilumineszenz emittiert und die durch (a) emittierte Elektrochemilumineszenz sich von der durch (b) emittierten Elektrochemilumineszenz unterscheidet.

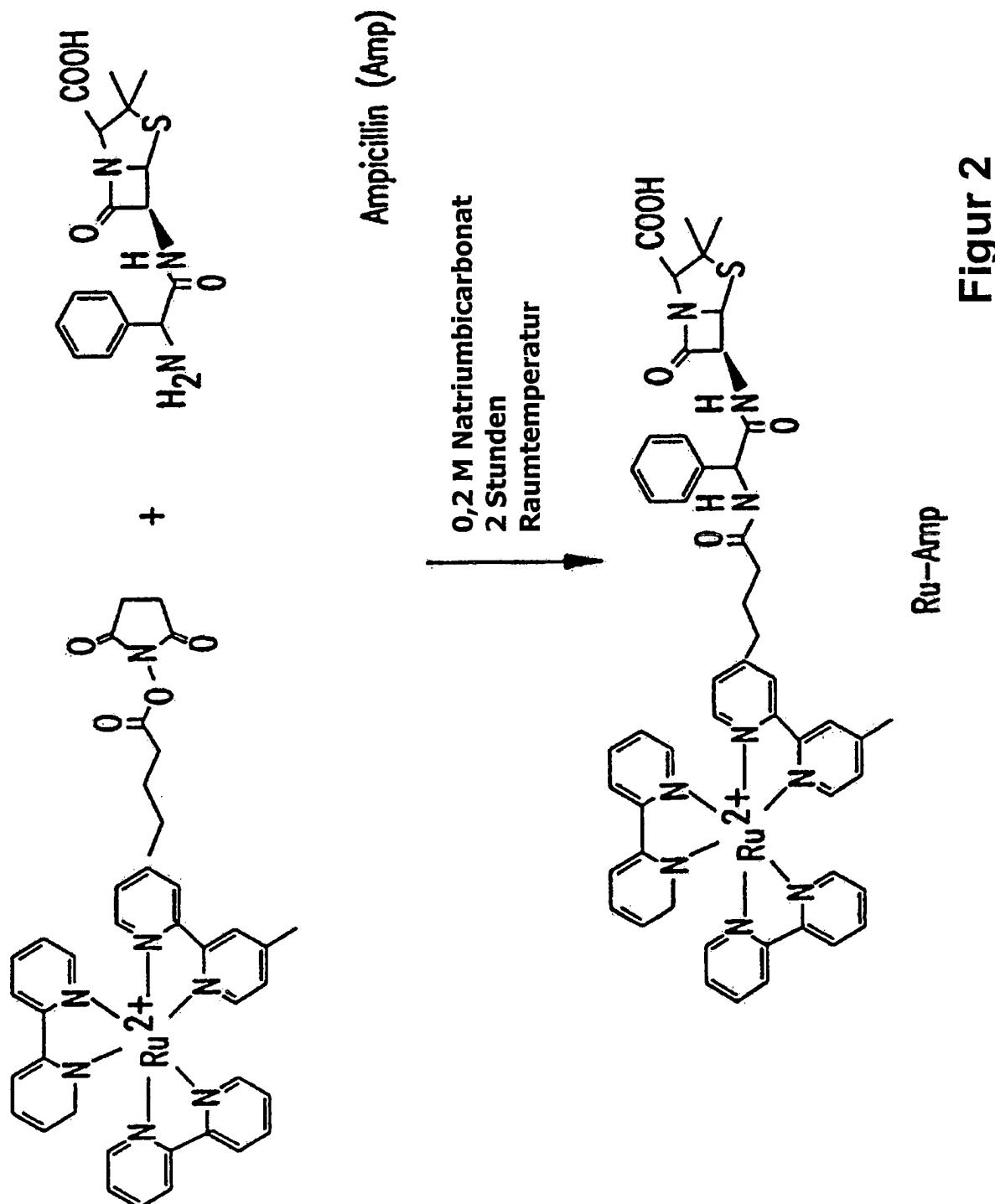
9. Kit nach Anspruch 8, wobei der elektrochemilumineszente Detektant und das Enzym-Substrat konjugiert sind.

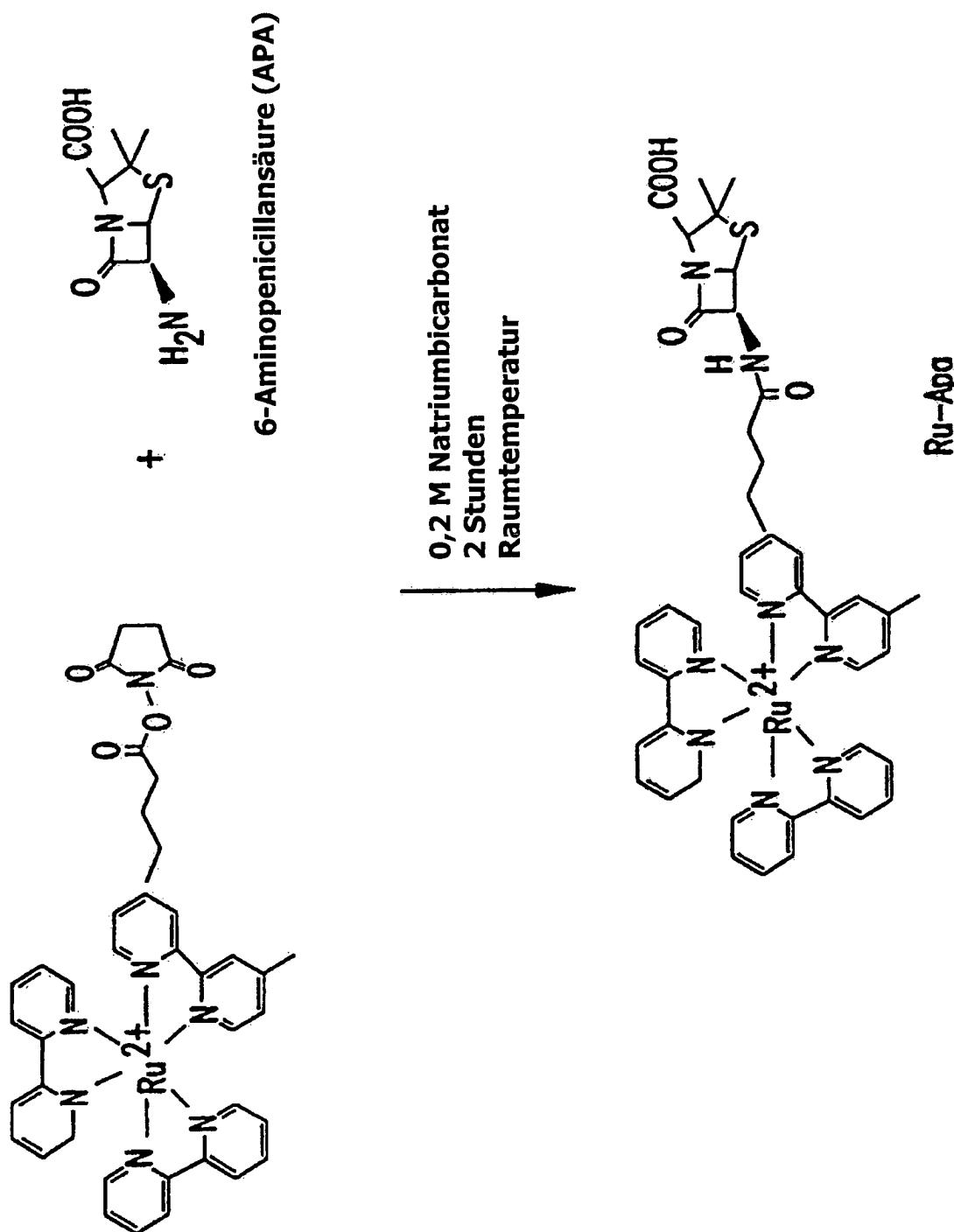
10. Kit nach den Ansprüchen 8 oder 9, wobei die Mischung aus Substrat und ECL-Detektant schwach elektrochemilumineszent ist und die Mischung aus Produkt und ECL-Detektant stark elektrochemilumineszent ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

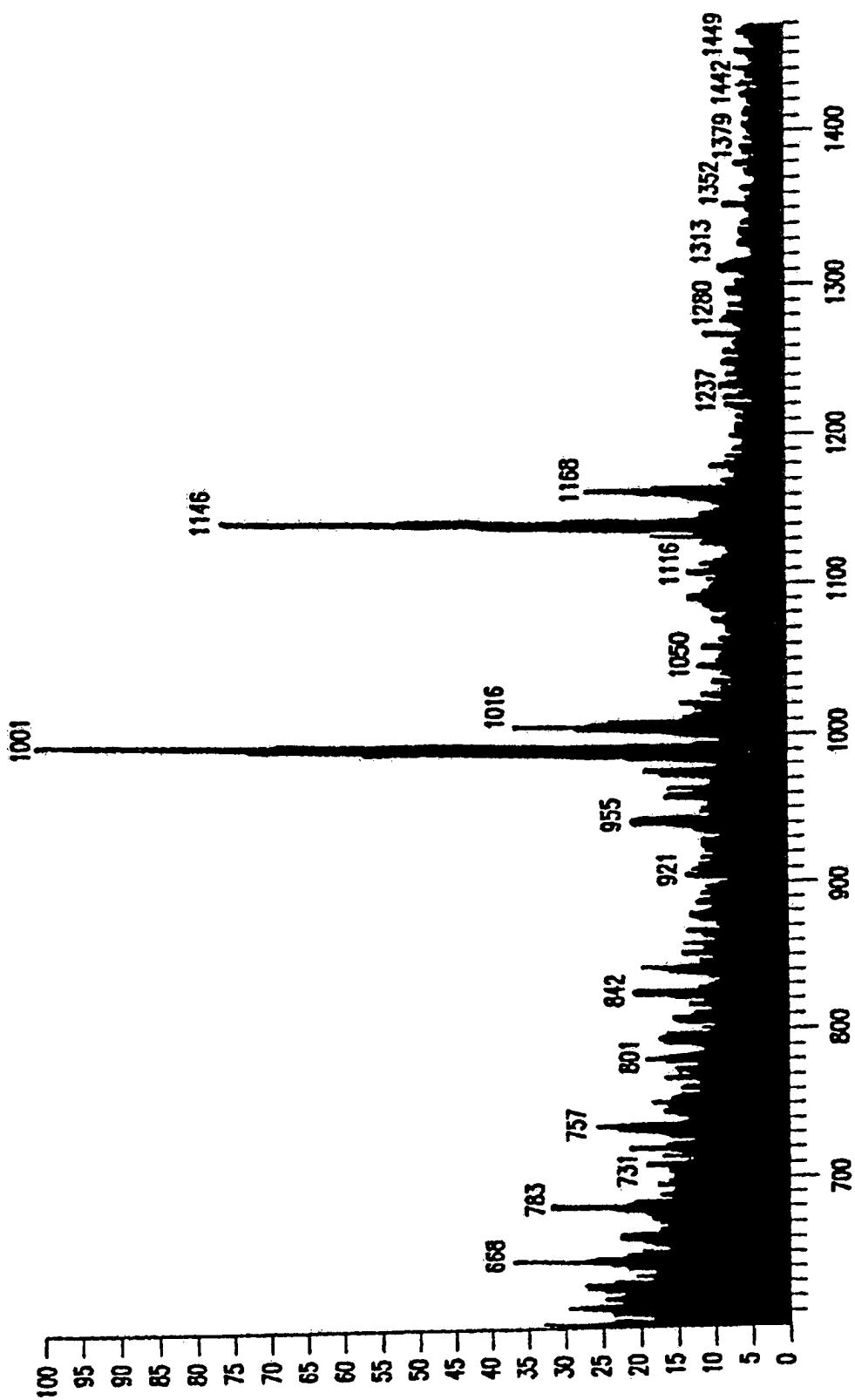


Figur 1





Figur 3



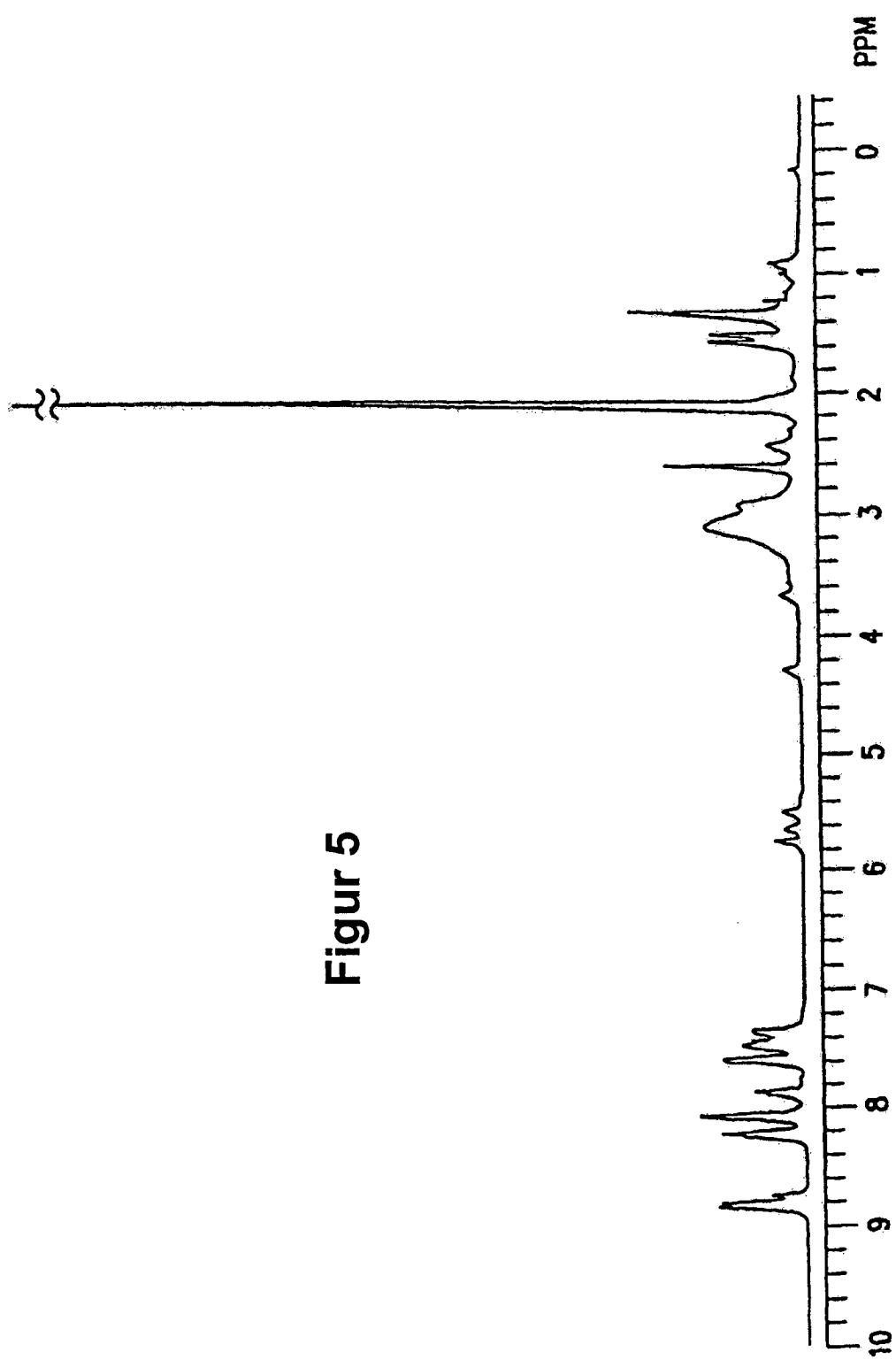


Figure 5

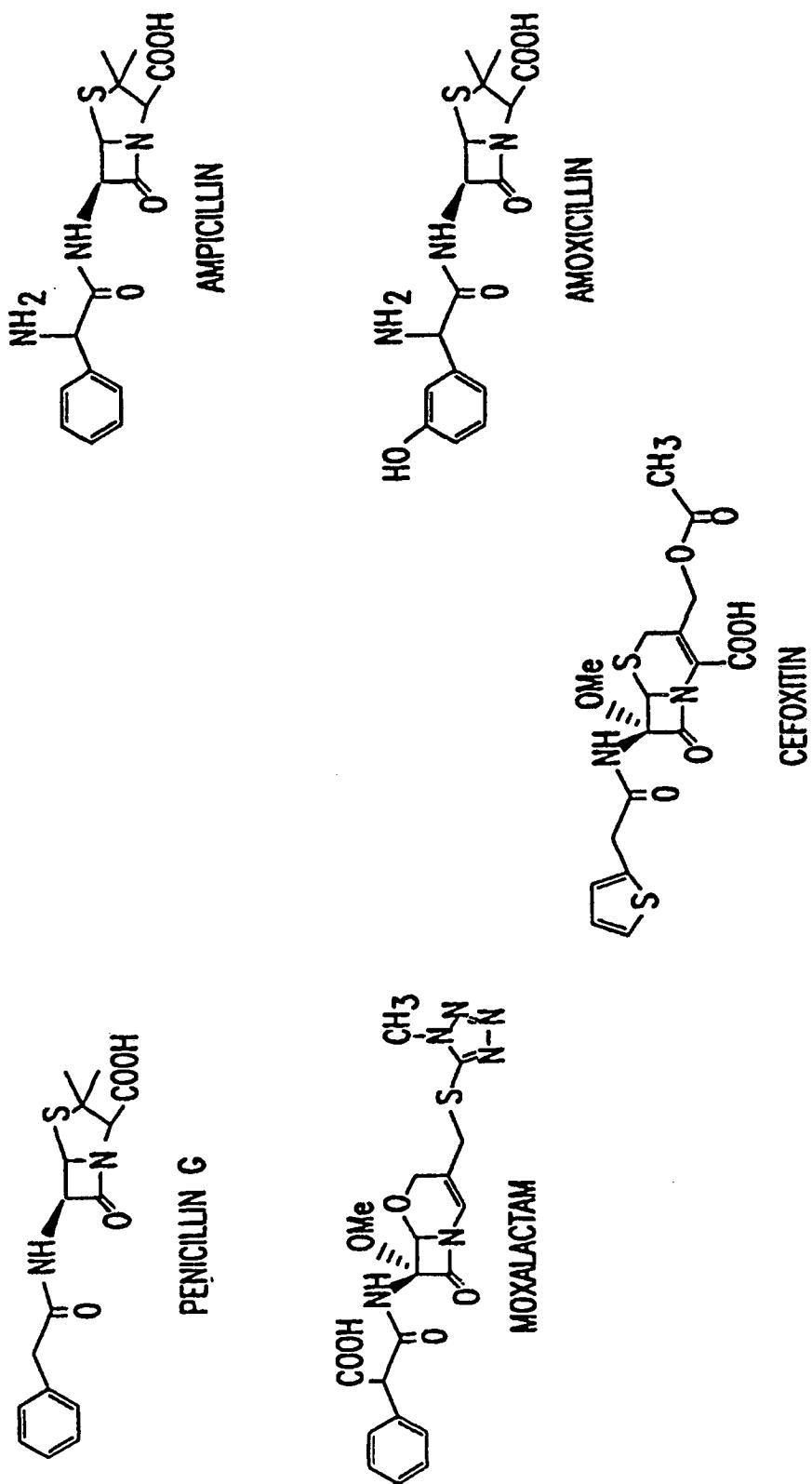


Figure 6

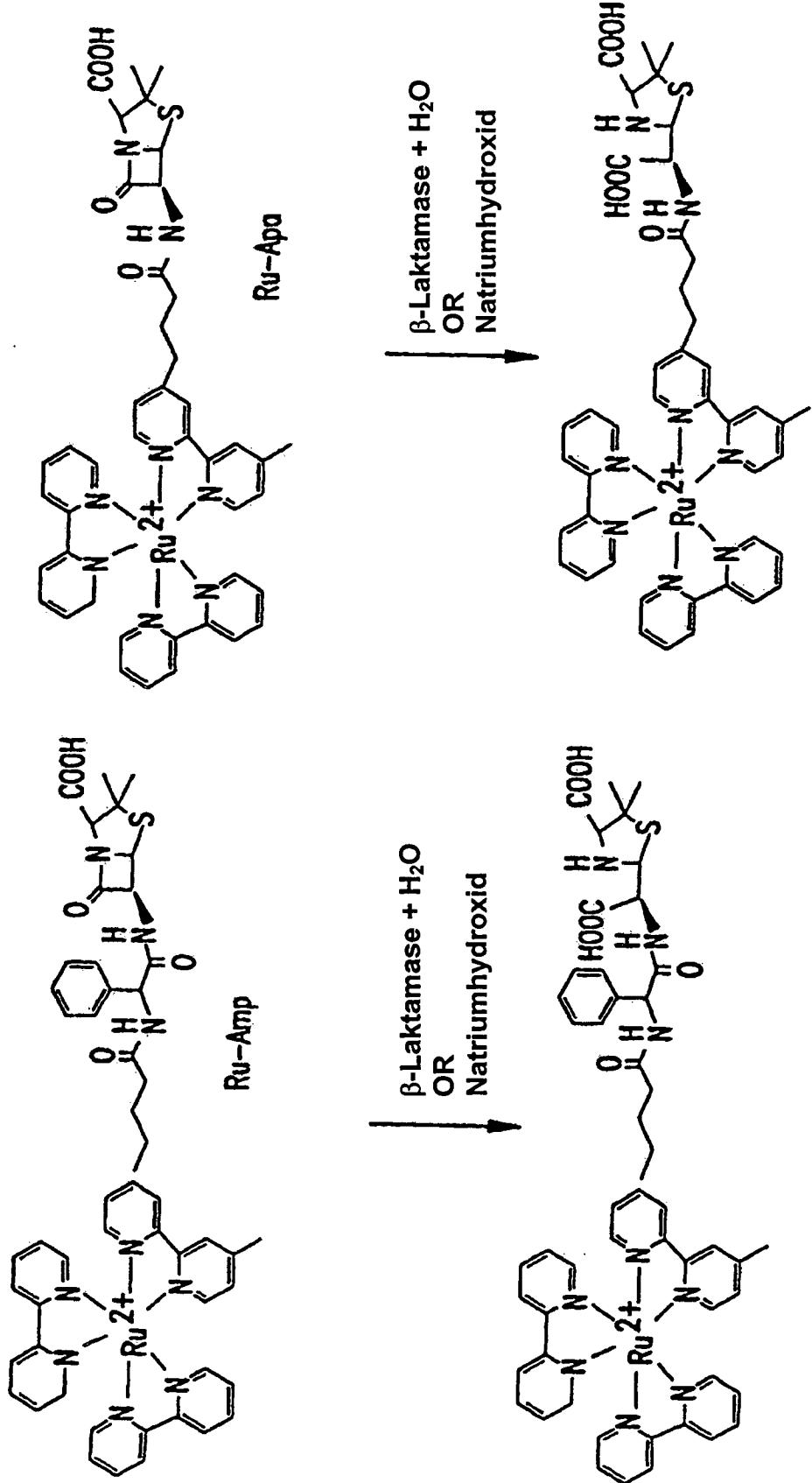
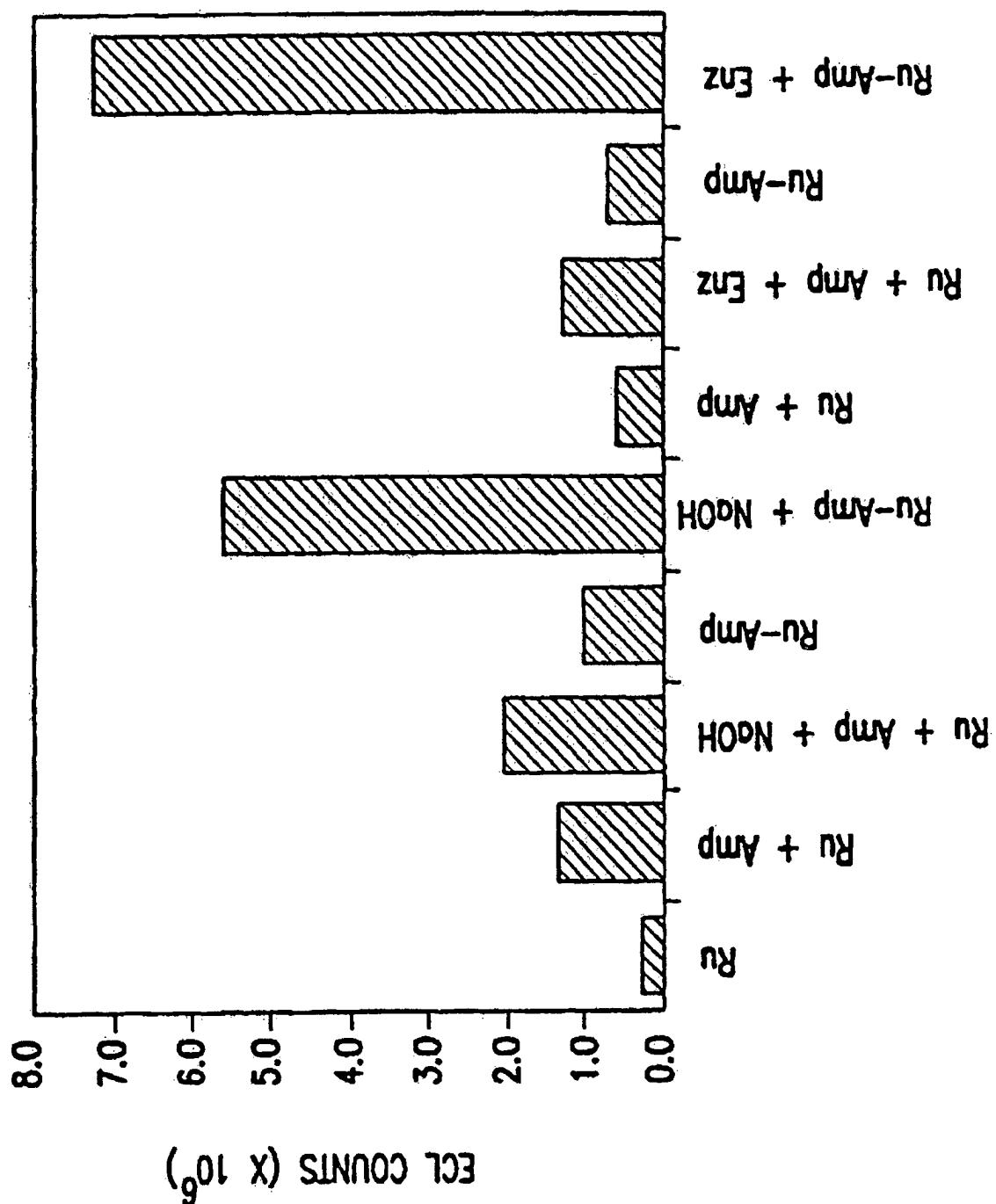
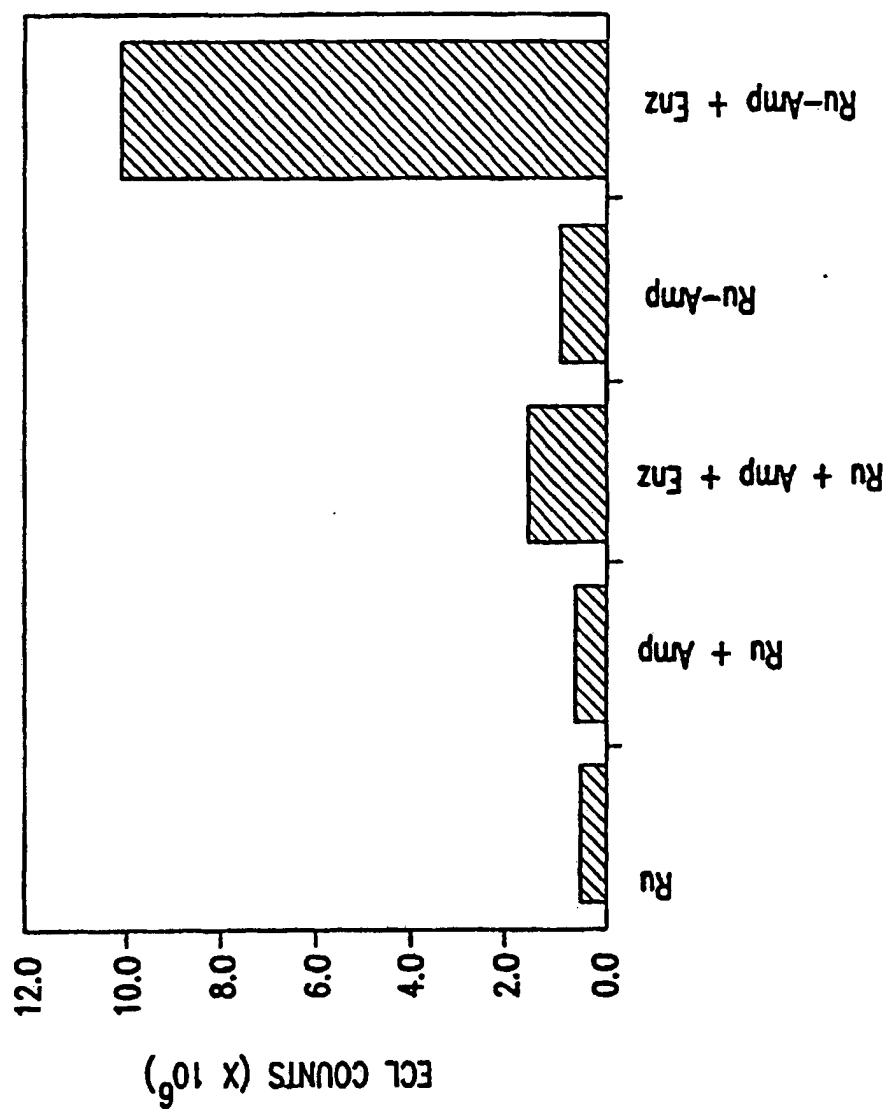


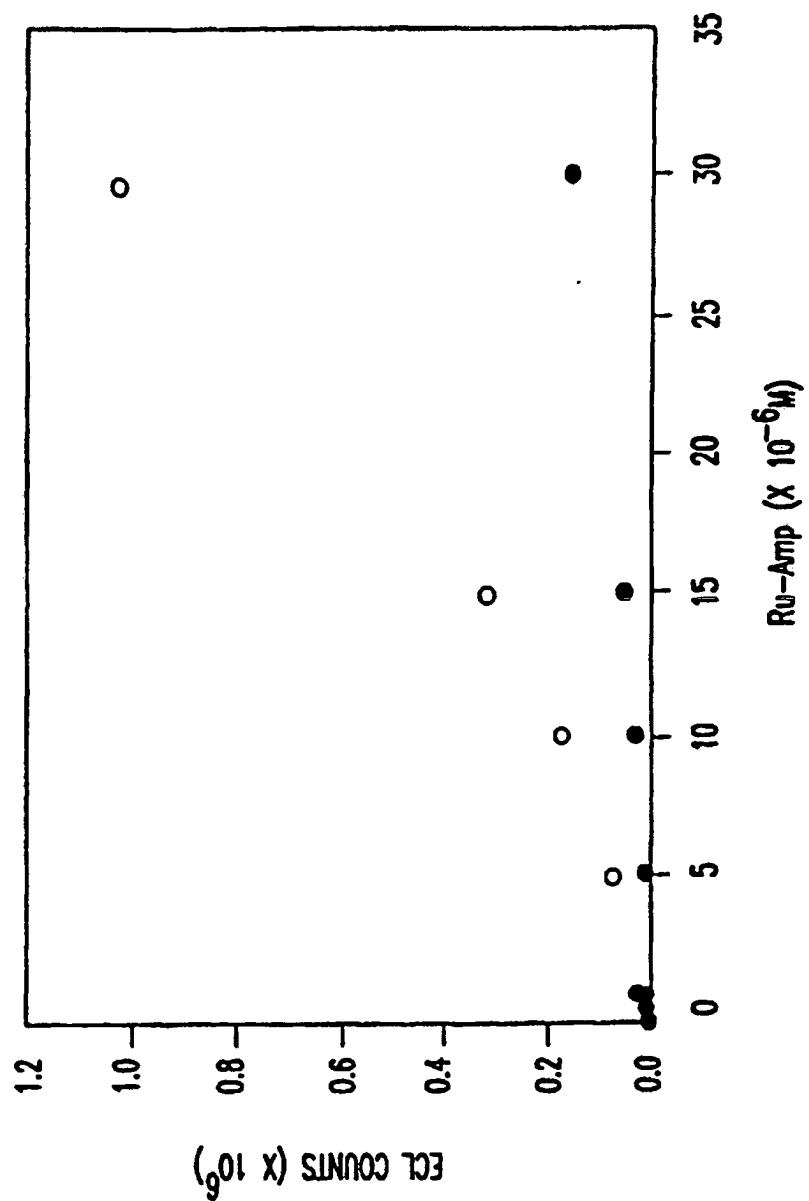
Figure 7

Figure 8

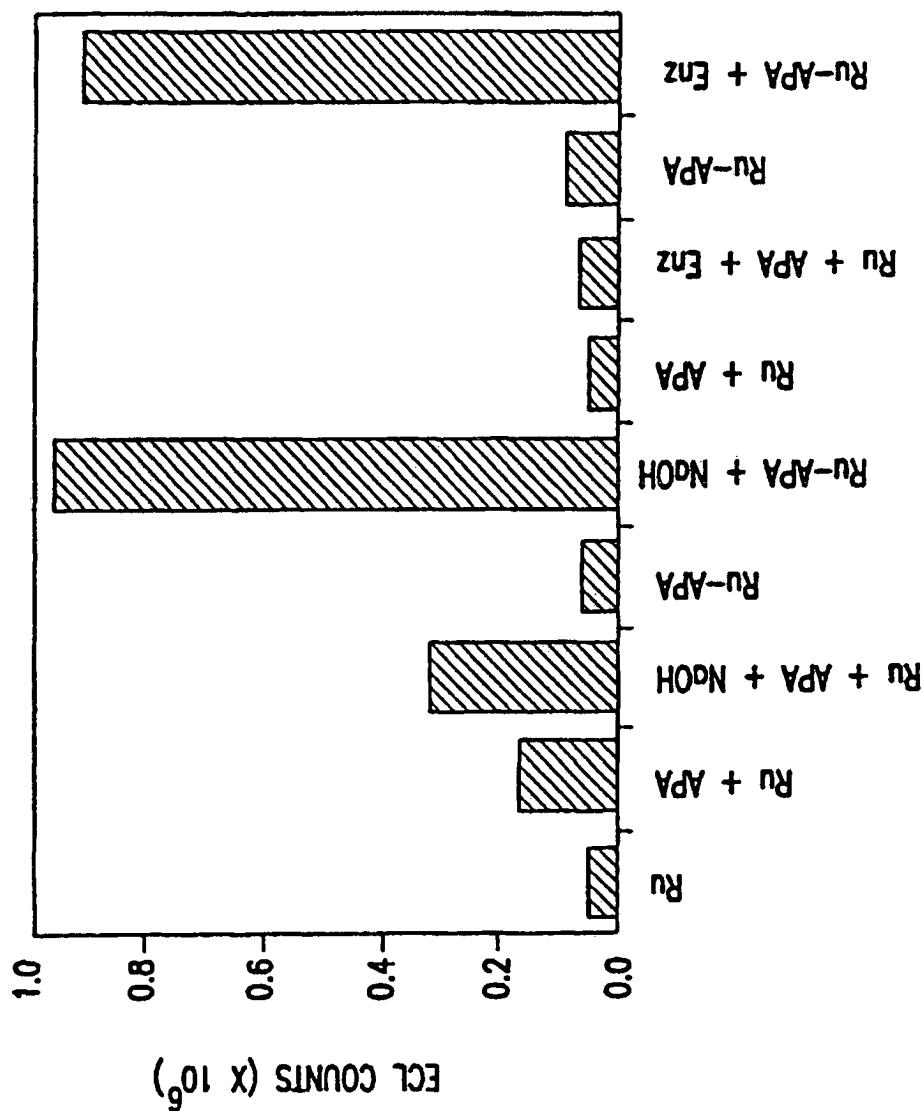




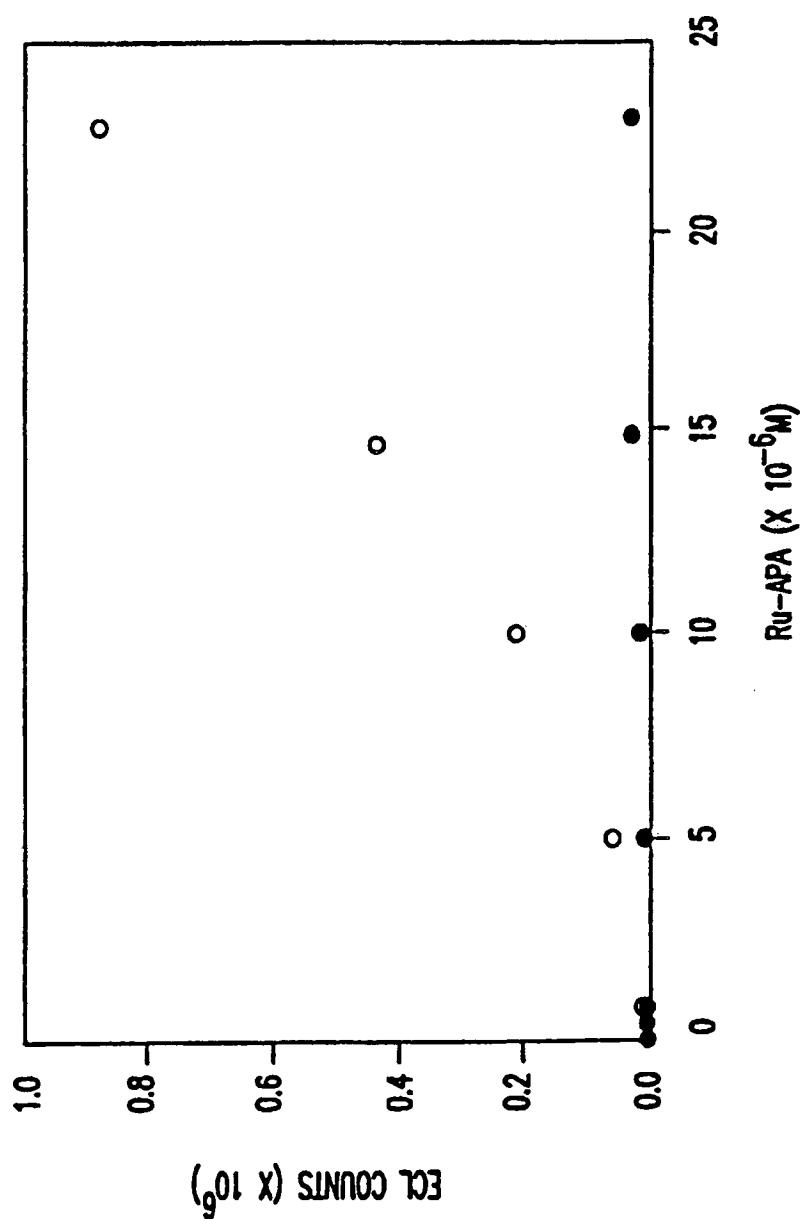
Figur 9



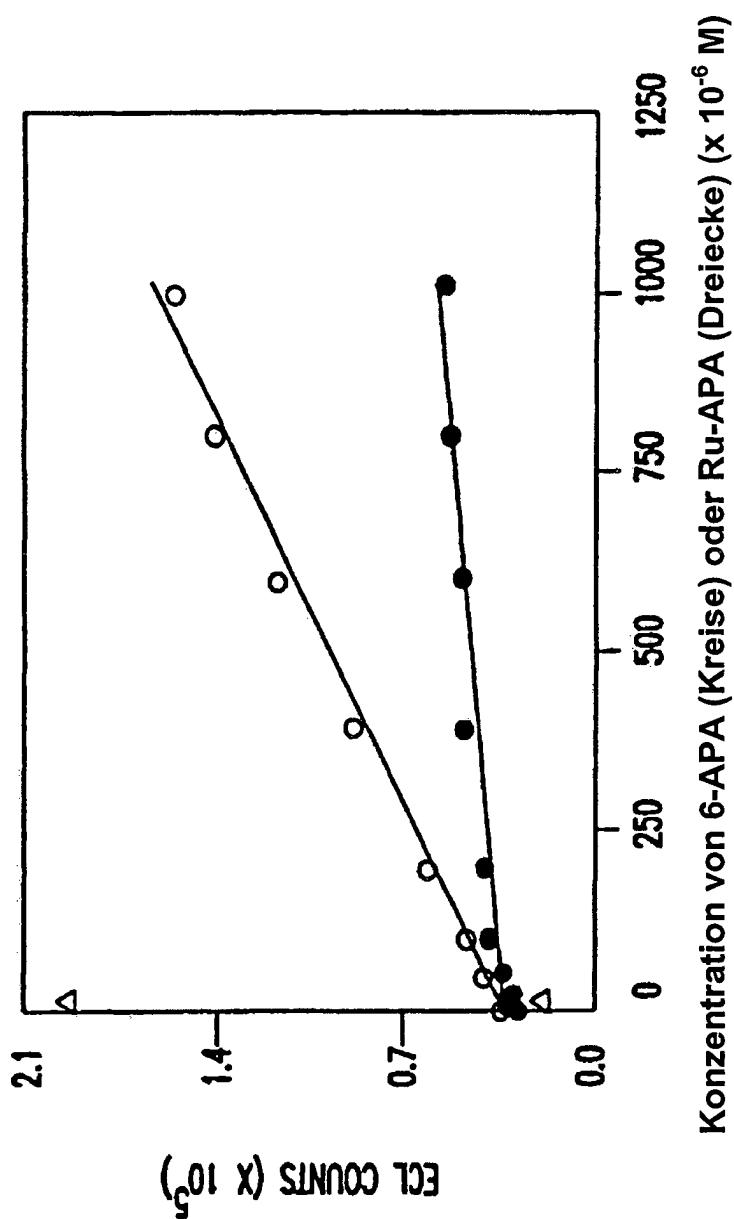
Figur 10



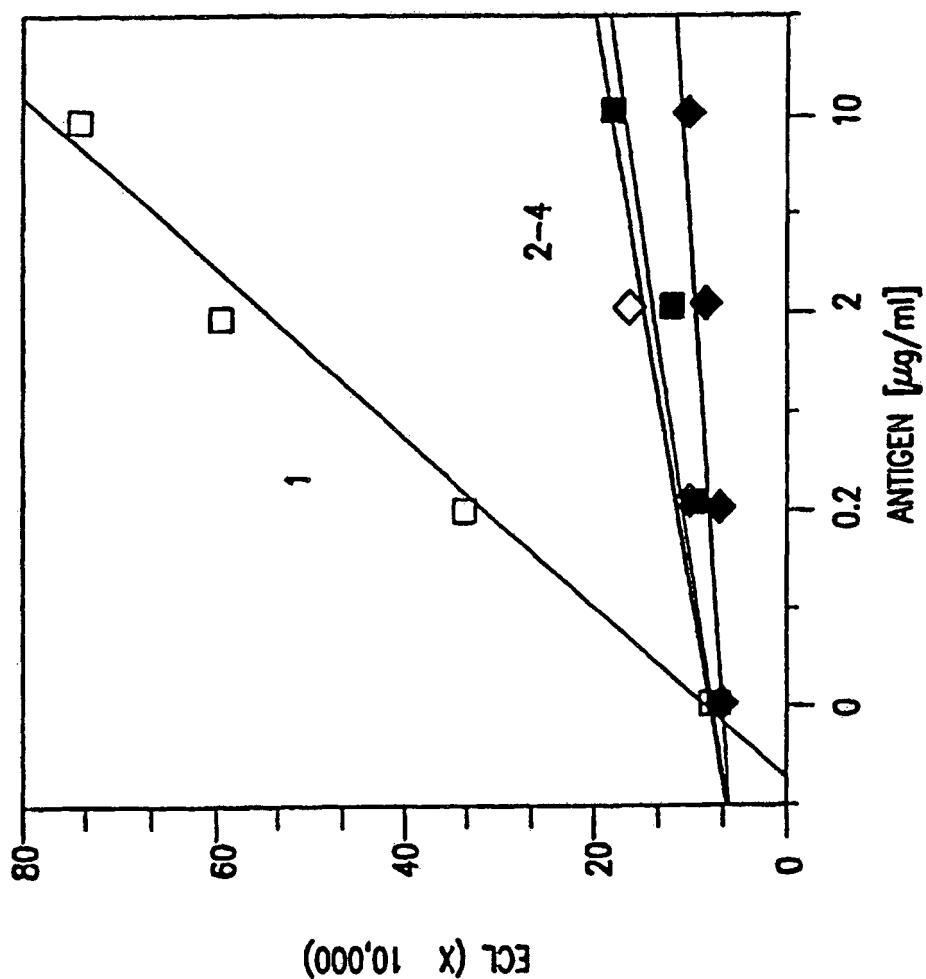
Figur 11



Figur 12



Figur 13



Figur 14