



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 246 120 A5

4(51) C 12 Q 1/34
G 01 N 33/573

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 Q / 291 381 0
(31) P3411574.9(22) 17.06.86
(32) 29.03.84(44) 27.05.87
(33) DE

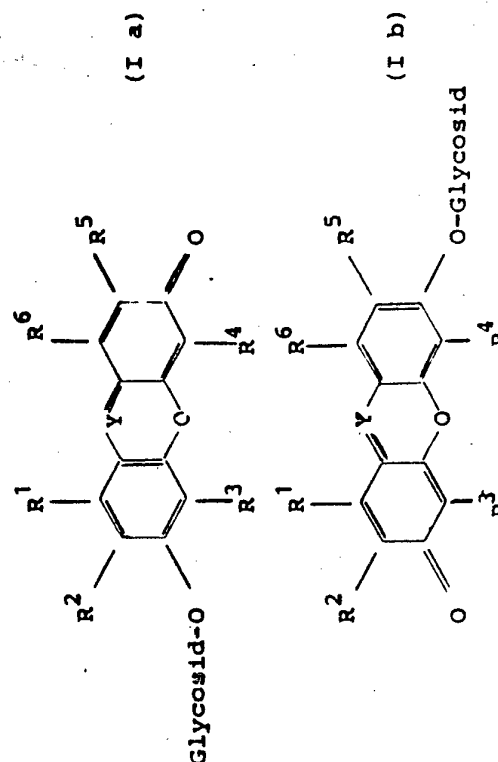
(71) siehe (73)

(72) Klein, Christian, Dr.-Chem.; Batz, Hans-Georg, Dr.-Chem.; Sernetz, Manfred, Prof.; Hofmann, Jürgen, Dr.-Chem., DE

(73) Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim 31, DE

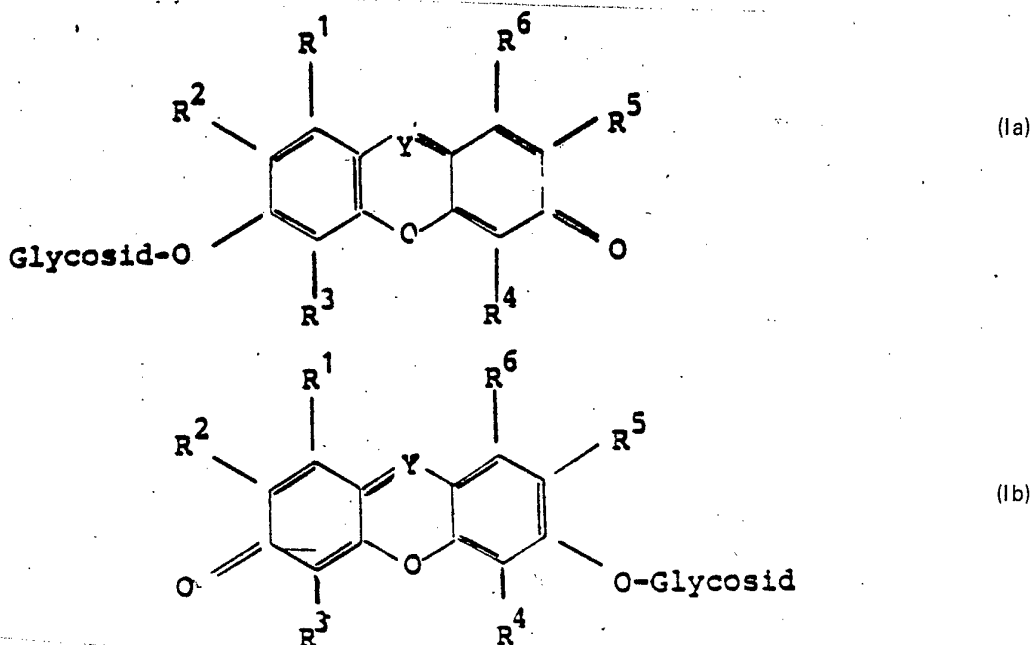
(54) Diagnostisches in-vitro-Mittel zum Nachweis von glycosidische Bindungen spaltenden Enzymen

(57) Die Erfindung betrifft diagnostische in-vitro-Mittel zum Nachweis von glycosidische Bindungen spaltenden Enzymen, wie z. B. Glycosidasen oder Saccharidkettén-spaltenden Enzymen. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung diagnostischer in-vitro-Mittel, mit denen die genannten Enzyme auf einfache, schnelle und zuverlässige Weise sowohl photometrisch als auch fluorometrisch bestimmt werden können. Die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel enthalten als chromogene und fluorogene Substrate Glycoside von Resorufin-Derivaten der allgemeinen Formeln Ia) bzw. Ib) worin beispielsweise bedeuten: R¹ Wasserstoff, R², R³ und R⁵, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen oder eine Niederalkylgruppe, R⁴ und R⁶, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen, eine Cyano-, Niederalkyl-, Niederalkoxy-, Carboxy-, Niederalkoxycarbonyl-, Carboxyniederalkyl-, Niederalkoxycarbonyl-niederalkyl- oder eine gegebenenfalls ein- oder zweifach substituierte Carboxamidogruppe oder die Gruppe -COO-(CH₂CH₂O)_n-R⁷. Formeln Ia und Ib



Erfindungsanspruch:

1. Diagnostisches in-vitro-Mittel zum Nachweis von glycosidische Bindungen spaltenden Enzymen, enthaltend ein oder mehrere Chromogene oder/und fluorogene Substrate, eine geeignete Puffersubstanz, gegebenenfalls weitere üblicherweise verwendete Hilfsstoffe sowie eventuell Hilfsenzyme, **gekennzeichnet dadurch**, daß als chromogene und fluorogene Substrate Glycoside von Resorufin-Derivaten der allgemeinen Formel (Ia) bzw. (Ib)



worin

R^1 Wasserstoff

R^2 , R^3 und R^5 , die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen oder eine Niederalkylgruppe, R^4 und R^6 , die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen, eine Cyano-, Niederalkyl-, Niederalkoxy-, Carboxy-, Niederalcoxycarbonyl-, Carboxyniederalkyl-, Niederalcoxycarbonyl-niederalkyl- oder eine gegebenenfalls ein- oder zweifach substituierte Carboxamidogruppe oder die Gruppe $-\text{COO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^7$

in der

R^7 Wasserstoff oder eine Niederalkylgruppe und
n eine ganze Zahl von 1 bis 4 bedeuten,

wobei

R^6 zusätzlich eine Sulphonyl- oder Nitrogruppe vorstellen kann, und
Y Stickstoff oder die Gruppe $\text{N} \rightarrow \text{O}$

bedeuten, eingesetzt werden.

2. Diagnostisches in-vitro-Mittel gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß zum Nachweis von Glycosidasen solche Glycoside von Resorufin-Derivaten gemäß Punkt 1 eingesetzt werden, worin der Glycosidrest ein β -D-Galactopyranosid-, α -D-Galactopyranosid-, β -D-Glucopyranosid-, α -D-Glucopyranosid- oder α -D-Mannopyranosidrest vorstellt.
3. Diagnostisches in-vitro-Mittel gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß zum Nachweis von Saccharidketten-spaltenden Enzymen solche Glycoside von Resorufin-Derivaten gemäß Punkt 1 eingesetzt werden, worin der Glycosidrest ein Oligosaccharid mit 2 bis 10 Monosaccharideinheiten vorstellt.
4. Diagnostisches in-vitro-Mittel gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als zusätzliche Hilfsmittel Netzmittel, galenische Zusatzstoffe oder/und Gerüstbildner verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft diagnostische in-vitro-Mittel zur Bestimmung von Enzymen, welche glycosidische Bindungen spalten. Die diagnostischen Mittel werden angewandt in der klinischen Diagnostik, beispielsweise zur Bestimmung der Aktivität von Glycosidasen oder von Saccharidketten-spaltenden Enzymen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Enzyme, die glycosidische Bindungen spalten, erfüllen im menschlichen und tierischen Organismus eine vielfache physiologische Funktion. So spielt beispielsweise die β -D-Galactosidase eine gewichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel, da durch sie die Hydrolyse der Lactose erfolgt. Darüber hinaus stellt die β -D-Galactosidase das Schlüsselenzym beim Abbau von Glycolipiden, Mucopolysacchariden und Glycoproteinen dar. Als weitere physiologisch bedeutsame Glycosidasen sind zu nennen: die α -D-Galactosidase, die α -D- und β -D-Glucosidase sowie α -D-Mannosidase.

Über ihren physiologischen Stellenwert hinaus haben die Glycosidasen in den letzten Jahren im diagnostischen sowie im biotechnologischen Bereich an Bedeutung gewonnen. So werden beispielsweise diese Enzyme in zunehmendem Maße als Indikatorenzym für Enzymimmunoassays eingesetzt. Besonders bevorzugt wird in diesem Zusammenhang die β -D-Galactosidase (siehe beispielsweise *Annals of Clinical Biochemistry* **16**, 221–240 [1979]).

Die Bestimmung der Aktivität der Glucosidasen spielt demnach sowohl in der klinischen Chemie als auch in der Diagnostik eine zunehmende Rolle. Hierzu wird ganz allgemein die Glycosidase-haltige Probe mit einem geeigneten Substrat versetzt. Das Substrat wird von dem Enzym gespalten. Eines der Spaltprodukte wird in geeigneter Weise nachgewiesen. Es kann entweder das durch Einwirkung des Enzyms freigesetzte Glycon oder das Aglycon gemessen werden. In der Regel wird letzteres bestimmt. Als Substrat eignen sich oft die natürlichen Substrate der nachzuweisenden Enzyme. Besonders bevorzugt werden jedoch Glycoside verwendet, bei denen das Aglycon einen spektroskopisch leicht nachweisbaren Rest darstellt.

Es sind eine Reihe von Glycosidase-Substraten bekannt, bei denen nach der Spaltung durch die Glycosidase das Aglycon spektroskopisch im sichtbaren oder auch UV-Bereich sowie fluorometrisch gemessen werden kann.

So sind in *Biochem. Z.* **333**, 209 (1960) Phenyl- β -D-galactosid sowie einige weitere am aromatischen Ring substituierte Derivate (z. B. o-Nitrophenyl- und p-Nitrophenyl- β -D-galactosid) als Substrate der β -D-Galactosidase beschrieben. Die durch Hydrolyse freigesetzten Phenole werden photometrisch im UV-Bereich bzw. bei den Nitrophenolen im kurzwelligen sichtbaren Wellenlängenbereich bestimmt. Auch kann als Indikatorreaktion eine oxidative Kupplung mit Aminoantipyrin angeschlossen werden (*Analytical Biochem.* **40**, 281 [1971]).

Für histochemische Untersuchungen werden Naphthyl- β -D-galactoside verwendet, so z. B. die 1-Naphthyl-Verbindung in *Histochemie* **35**, 199 (1973), das 6-Brom-2-naphtyl-Derivat in *J. Biol. Chem.* **195**, 239 (1952) oder das Naphthol- β -D-galactosid (*Histochemie* **37**, 89 [1973]). Zur Visualisierung werden dabei die entstehenden Naphthole mit verschiedenen Diazoniumsalzen zu Azo-Farbstoffen umgesetzt.

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten mit fluorogenen Substraten ist weitverbreitet, da gegenüber den photometrischen Methoden die Empfindlichkeit fluorometrischer Bestimmungen oft um einige Zehnerpotenzen erhöht ist. In manchen Fällen muß mit fluorogenen Substraten gearbeitet werden, beispielsweise bei der Untersuchung enzymatischer Aktivität in Zellen mit automatischen Geräten zur Zelldifferenzierung (Zytofluorometrie) sowie bei der Analyse immobilisierter Enzyme mit Durchflußmikrofluorometrie. In anderen Fällen, beispielsweise bei der Bestimmung enzymatischer Markierung von Testsystemen (Enzymimmunoassays), wird der Multiplikationseffekt der enzymatischen Katalyse durch Verwendung fluorogener Substrate beträchtlich verstärkt.

Die bisher bekannten fluorogenen Substrate für β -D-Galactosidase und andere Glycosidasen besitzen als Fluorophore Derivate von Fluorescein, Indoxyl oder Methylumbelliferon. Für die kinetische Analyse komplexer Systeme besitzen diese Verbindungen jedoch schwerwiegende Nachteile. Die disubstituierten Derivate von Fluorescein werden in einer mehrstufigen Reaktionsfolge hydrolysiert. Monosubstituierte Fluorescein-glycoside fluoreszieren bereits selbst. Indoxyl-Derivate unterliegen nach ihrer enzymatischen Spaltung einer Reihe von chemischen Umwandlungen, die ebenfalls die kinetische Analyse komplizieren. Derivate von Methylumbelliferon müssen im UV angeregt werden. Hierbei kann die Eigenfluoreszenz von biologischen oder synthetischen Materialien stören. Darüber hinaus ist die UV-Anregung, insbesondere bei Laseroptik, kostenaufwendig. Die meisten fluorogenen Substrate führen zu Reaktionsprodukten, die nur eine geringe Löslichkeit aufweisen, so daß sie für die kinetische Analyse von Enzymaktivitäten, wofür gerade gute Löslichkeit von Substrat und Produkt erforderlich ist, nicht geeignet sind.

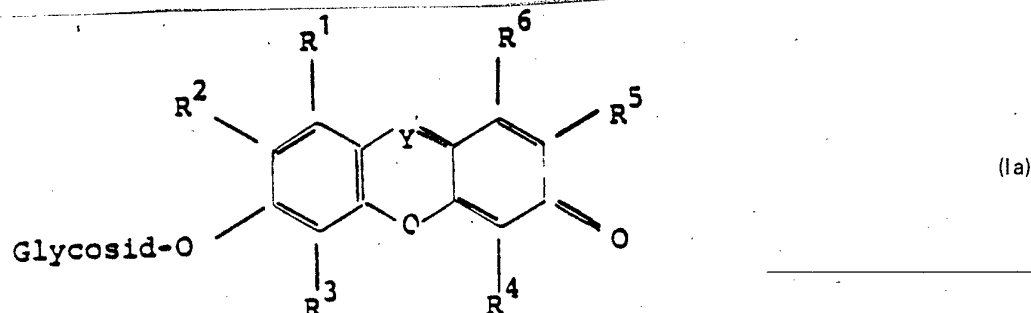
Ziel der Erfindung

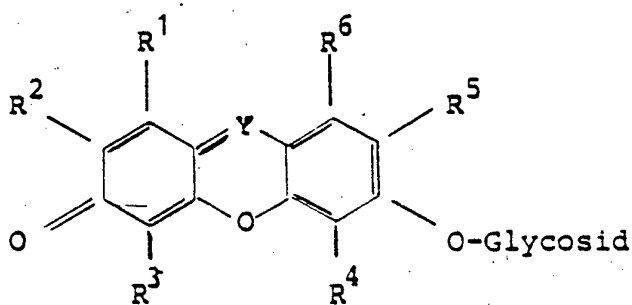
Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung diagnostischer in-vitro-Mittel mit denen glycosidische Bindungen spaltende Enzyme, wie z. B. Glycosidasen oder Saccharidketten-spaltende Enzyme auf einfache, schnelle und zuverlässige Weise bestimmt werden können. Sie sollen möglichst sowohl bei photometrischen als auch fluorometrischen Bestimmungsverfahren eingesetzt werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue diagnostische in-vitro-Mittel zu finden, die für die Bestimmung von Glycosidasen und Saccharidketten-spaltenden Enzymen geeignet sind.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel, die Glycoside von Resorufinderivaten der allgemeinen Formel (Ia) und (Ib)





worin

R¹ Wasserstoff

R², R³ und R⁵, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen oder eine Niederalkylgruppe, R⁴ und R⁶, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Halogen, eine Cyano-, Niederalkyl-, Niederalkoxy-, Carboxy-, Niederalkoxy-carbonyl-, Carboxyniederalkyl-, Niederalkoxy-carbonyl-niederalkyl- oder eine gegebenenfalls ein- oder zweifach substituierte Carboxamidgruppe oder die Gruppe -COO-(CH₂CH₂O)_n-R⁷,

in der

R⁷ Wasserstoff oder eine Niederalkylgruppe und
n eine ganze Zahl von 1 bis 4 bedeuten,

wobei

R⁶ zusätzlich eine Sulphonyl- oder Nitrogruppe vorstellen kann und
Y ein Stickstoff oder die Gruppe N→O

bedeuten, enthalten.

Unter Halogen in der Definition von R¹ bis R⁷ ist Fluor, Chlor, Brom und Jod, vorzugsweise Chlor und Brom, zu verstehen.

Die „Niederalkylgruppe“ in der Definition R¹ bis R⁷ enthält 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 3 Kohlenstoffatome, wobei die Methylgruppe besonders bevorzugt ist.

Die „Niederalkoxygruppe“, in der Definition von R⁴ und R⁶ enthält 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 3 Kohlenstoffatome, wobei die Methoxygruppe besonders bevorzugt ist.

Die „Niederalkoxy-“ bzw. die „Niederalkyl-“ Reste der Niederalkoxy-carbonyl-, Carboxy-niederalkyl- sowie der Niederalkoxy-carbonyl-niederalkyl-Reste in der Definition der Substituenten R⁴ und R⁶ weisen ebenfalls 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 3 Kohlenstoffatome auf, wobei die Methoxy-Gruppe bzw. der Methylene-Rest besonders bevorzugt sind.

Als Substituenten der Carboxamidgruppe kommen Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Carboxyalkyl- und Alkoxy-carbonylalkylreste in Frage, wobei die Alkylreste jeweils 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 3 Kohlenstoffatome aufweisen. Bei einer zweifach substituierten Carboxamidfunktion können die beiden Substituenten zu einem Ring geschlossen sein, der durch Heteroatome, z. B. Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, unterbrochen sein kann.

Als glycosidischer Rest, der mit den Resorufin-Derivaten zu Glycosiden der allgemeinen Formel I verknüpft ist, eignen sich alle Mono- und Oligo-Saccharide, die sich durch die entsprechenden Glycosidasen wieder von dem Resorufin-Grundgerüst abspalten lassen. Als Beispiele für erfindungsgemäße Glycoside seien erwähnt:

β-D-Galacto-pyranoside, α-D-Galactopyranoside, β-D-Glucopyranoside, α-D-Glucopyranoside sowie α-D-Mannopyranoside.

Als glycosidischer Rest sind auch Oligo-Saccharid-Ketten geeignet, die sich von Saccharidketten spaltenden Enzymen bis auf die Stufe eines Mono- bzw. Oligo-Saccharids abbauen lassen, das sich seinerseits mit den entsprechenden Glycosiden direkt vom Resorufin-Grundgerüst abspalten läßt. Als solche Oligo-Saccharidketten werden insbesondere Ketten verstanden, die aus 2 bis 10, vorzugsweise aus 2 bis 7 Mono-Saccharid-Einheiten aufgebaut sind.

Die Verwendung der Glycoside von Resorufin-Derivaten der allgemeinen Formel I als Substrate für die Glycosidasen führt zu deutlich empfindlicheren Testsystemen als sie bisher bekannt sind. Die neuen Substrate können zur Bestimmung der Aktivität von Glycosidasen mit Vorteil sowohl im biochemischen, biotechnologischen als auch im klinisch-chemischen Bereich eingesetzt werden. Sie sind empfindlicher. Daraus ergeben sich mehrere Vorteile:

- a) Es können geringere Enzymaktivitäten gemessen werden.
- b) Es können kleinere Probenmengen eingesetzt werden.
- c) Die Bestimmung der Aktivität kann in erheblich kürzerer Zeit erfolgen.
- d) Der geringe Probeneinsatz und die günstige Meßwellenlänge vermindern außerdem die Störanfälligkeit der Methode durch andere Probenbestandteile.
- e) Es kann der Umsatz in Trägermatrizen mit immobilisiertem Enzym gemessen werden.

Es hat sich gezeigt, daß die im erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel eingesetzten Substrate zur Bestimmung der Aktivität von Glycosidasen jeglicher Herkunft geeignet sind. Die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel mit Substraten der allgemeinen Formel I reagieren deutlich empfindlicher als die bisher bekannten Testmittel.

Geeignet sind die Glycoside von Resorufin-Derivaten der Formel I auch für immunologische Bestimmungsmethoden, bei denen Glycosidasen als Indikator-Enzyme verwendet werden, deren Aktivität nach Durchführung der immunologischen Reaktion ermittelt werden muß. Solche immunologischen Bestimmungsmethoden mit enzymatischer Indikatorreaktion sind dem Fachmann als Enzymimmunoassays bekannt. Diese Methoden dienen zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen,

Polysacchariden, Hormonen, Arzneistoffen und anderen nieder-molekularen Substanzen im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-12} mol/l. Je nach Erfordernis von Phasentrennschritten unterscheidet man zwischen homogener und heterogener Testführung. Eine weitere Unterteilung kann in kompetitive und nichtkompetitive Testprinzipien erfolgen.

Alle Testprinzipien arbeiten jedoch mit Enzym-Antigen- bzw. Enzym-Antikörper-Konjugaten. Die enzymatische Indikatorreaktion ist allen Enzymimmunoassays gemeinsam. Für solche Zwecke geeignete Indikatorenzyme sind beispielsweise Glycosidasen, insbesondere die β -D-Galactosidase. Die Bestimmung der Glycosidasen in solchen Enzymimmunoassays erfolgt üblicherweise, indem ein geeignetes Substrat zugesetzt wird, das enzymatisch gespalten und in üblicher Weise photometrisch oder auch fluorometrisch vermessen wird.

Eine Verbesserung des Glycosidase-Testsystems führt demnach ebenfalls zu erheblichen Vorteilen bei solchen Enzymimmunoassays:

1. Die höhere Empfindlichkeit ermöglicht auch hier eine weitere Erniedrigung der Nachweisgrenzen, kürzere Reaktionszeiten und geringeren Probeneinsatz und damit auch geringere Störungen durch andere Probenbestandteile.
2. Die günstigere Meßwellenlänge vermindert bei bestimmten Reaktionsführungen die Störanfälligkeit der Methode durch unlösliche Bestandteile, beispielsweise durch Trübungen.

Das diagnostische Mittel enthält neben einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Substrate der allgemeinen Formel I, ein geeignetes Puffersystem sowie gegebenenfalls weitere geeignete, üblicherweise für solche diagnostische Mittel verwendete Zusatzstoffe, wie beispielsweise Netzmittel, Stabilisatoren usw. Das diagnostische Mittel kann in Form einer Lösung, als Lyophilisat, als Pulvergemisch, Reagenztablette oder auf einem saugfähigen Träger aufgezogen, vorliegen.

Das erfindungsgemäße diagnostische Mittel in Form einer Lösung enthält vorzugsweise sämtliche für den Test benötigten Reagentien. Als Lösungsmittel kommen Wasser oder Gemische von Wasser mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel, wie z. B. Methanol, Äthanol, Aceton oder Dimethylformamid, in Frage. Aus Haltbarkeitsgründen kann es vorteilhaft sein, die für den Test benötigten Reagentien auf zwei oder mehr Lösungen zu verteilen, die erst bei der eigentlichen Untersuchung vermischt werden.

Zur Herstellung des diagnostischen Mittels in Form eines Lyophilisats im Gesamtgewicht von jeweils etwa 5–20 mg, vorzugsweise etwa 10 mg, wird eine Lösung getrocknet, die neben sämtlichen für den Test benötigten Reagentien übliche Gerüstbildner, wie z. B. Polyvinylpyrrolidon, und eventuelle weitere Füllstoffe, wie z. B. Mannit, Sorbit oder Xylit enthält. Ein diagnostisches Mittel in Form von Pulvermischungen oder Reagenztabletten läßt sich herstellen, indem die Bestandteile des Testes mit üblichen galenischen Zusatzstoffen versetzt und granuliert werden. Zusatzstoffe dieser Art sind z. B. Zuckeralkohole, wie Mannit, Sorbit oder Xylit, oder andere lösliche inerte Verbindungen, wie Polyethylenglykole oder Polyvinylpyrrolidon. Die Pulvermischungen oder Reagenztabletten weisen im allgemeinen ein Endgewicht von ungefähr 30 bis 200 mg, vorzugsweise 50 bis 80 mg, auf.

Zur Herstellung des diagnostischen Mittels in Form eines Teststreifens wird ein saugfähiger Träger, vorzugsweise Filterpapier, Cellulose oder Kunstfaservlies mit Lösungen der erforderlichen, üblicherweise zur Herstellung von Teststreifen verwendeten Reagentien in leicht flüchtigen Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, Methanol, Äthanol oder Aceton imprägniert. Dies kann in einem Imprägnierschritt erfolgen. Oft ist es jedoch zweckmäßig, die Imprägnierung in mehreren Schritten durchzuführen, wobei Lösungen eingesetzt werden, die jeweils einen Teil der Bestandteile des diagnostischen Mittels enthalten. So kann beispielsweise in einem ersten Schritt mit einer wäßrigen Lösung, die den Puffer und andere wasserlösliche Zusatzstoffe enthält, und dann in einem zweiten Schritt mit einer Lösung, die das Glycosidase-Substrat enthält, imprägniert werden. Die fertigen Testpapiere können als solche verwendet werden oder in an sich bekannter Weise an Griffe angeklebt oder vorzugsweise zwischen Kunststoffen und feinmaschigen Netzwerken gemäß DBP 2118455 eingesiegelt werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert. Sie sollen jedoch keine Einschränkung des Erfindungsgedankens bedeuten.

Beispiel 1

Bestimmung der Aktivität der β -D-Galactosidase

a) Zubereitung der verwendeten Lösungen:

Pufferlösung: HEPES	100 mmol/l
Natriumchlorid	154 mmol/l
Magnesium-L-Aspartat	2 mmol/l
BSA	10 g/l
Tween-20	0,5 g/l
pH-Wert (mit Natronlauge eingestellt)	7,3 (37°C)

Reagenzlösung 1:

In der vorstehend beschriebenen Pufferlösung werden 0,8 mmol/l Resorufin- β -D-galactopyranosid gelöst.

Reagenzlösung 2:

In der vorstehend beschriebenen Pufferlösung werden 3,5 mmol/l Resorufin-9-carbonsäure- β -D-galacto-pyranosid gelöst.

Reagenzlösung 3:

In der vorstehend beschriebenen Pufferlösung werden 1,0 mmol/l Resorufin-9-carbonsäuremethylester- β -D-galactopyranosid gelöst.

Enzymlösung

Handelsübliche β -D-Galactosidase aus *Escherichia coli* wird in der vorstehend genannten Pufferlösung gelöst. Die Aktivität dieser Lösung beträgt ca. 0,08 U/ml (bezogen auf die Hersteller-Angaben).

b) Durchführung der Messungen

Die Messung erfolgt photometrisch bei 579 nm.

950 μ l Reagenz werden in einer 1-cm-Küvette bei 37°C mit 50 μ l Enzymlösung vermischt. Als Maß für die Reaktion wird der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit in (mExt/min) ermittelt. Er wird berechnet aus der gemessenen Extinktion durch Division mit der Reaktionszeit.

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Meßwerte aufgeführt:

Reagenz-Nr.	Reaktion (mExt/min)
1	85
2	46
3	76

Beispiel 2**Nachweis von β -D-Galactosidase mit Hilfe eines Indikatorfilms**

Zu einer homogenen Masse werden verarbeitet:

5 ml einer wäßrigen Lösung mit 0,5 M Kaliumphosphat und 0,05 M Magnesiumchlorid, pH 7,3.

0,13 g Natriumalginat

8 g einer 50%igen Dispersion von Polyvinylpropionat

10 g Kieselgel

12 ml Wasser

0,4 g Triton X-100

50 mg Resorufin- β -D-galactopyranosid, in 5 ml Methanol gelöst. Diese Masse wird auf eine 0,1 mm starke Polycarbonatfolie (Pokalon, Fa. Lonza) mit einer Spaltbreite von 0,2 mm aufgetragen. Die Beschichtung wird bei 50°C getrocknet und danach in Stücke von 6 auf 6 mm geschnitten. Diese werden mit Hilfe von Klebeband auf eine 400 μ m starke Polystyrolfolie aufgeklebt. Die so erhaltenen Teststreifen werden kurze Zeit in die zu prüfende, β -D-Galactosidase enthaltende Lösung getaucht. Nach einer Wartezeit von 2 Minuten bei Raumtemperatur hat sich eine rote Reaktionsfarbe herausgebildet, deren Intensität von der Konzentration der β -D-Galactosidase in der Testlösung abhängt. Mit Hilfe von Testlösungen mit einem bestimmten, bekannten β -D-Galactosidase-Gehalt kann man eine Farbskala erhalten, anhand derer der unbekannte Gehalt an β -D-Galactosidase in einer Probe ermittelt werden kann.

Die vorstehend beschriebenen Teststreifen lassen sich auch dazu benutzen, die in einer Probe vorhandene β -D-Galactosidase Aktivität kinetisch mit Hilfe der Reflexionsphotometrie zu bestimmen. Auch hierzu wird in üblicher Weise anhand von Proben mit bekannter β -D-Galactosidase-Aktivität eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe eine unbekannte β -D-Galactosidase-Aktivität einer Probe ermittelt werden kann.

Beispiel 3**Bestimmung der Aktivität freier und konjugierter β -D-Galactosidase****a) Herstellung der verwendeten Lösungen**

Pufferlösung: HEPES	100 mmol/l
Natriumchlorid	154 mmol/l
Magnesium-L-Aspartat	2 mmol/l
BSA	10 g/l
Tween-20	0,5 g/l
pH-Wert (mit Natronlauge eingestellt)	7,3 (37°C)

Reagenzlösung:

In vorstehend beschriebener Pufferlösung werden 0,8 mmol/l Resorufin- β -D-galactopyranosid gelöst.

Enzymlösung: Handelsübliche β -D-Galactosidase aus *Escherichia coli* wird in Puffer gelöst. Die Aktivität dieser Lösung beträgt ca. 0,08 U/ml (bezogen auf die Hersteller-Angaben).

Enzym-Konjugat-Lösung:

Verwendet wird ein β -D-Galactosidase-Antikörper-Präparat. Die Herstellung solcher Enzym-Antikörper-Konjugate ist bekannt. Sie ist beispielsweise in Biochem. Biophys. Acta **612**, 40–49 (1980) beschrieben. Das Präparat wird in Puffer so verdünnt, daß sich eine mit der oben beschriebenen Enzymlösung ungefähr vergleichbare Aktivität ergibt.

b) Durchführung der Messung:

Die Messung erfolgt photometrisch bei 578 nm. 950 μ l Reagenzlösung werden jeweils in einer 1-cm-Küvette bei 37°C mit 50 μ l Enzymlösung bzw. mit 50 μ l Enzym-Konjugat-Lösung vermischt. Als Maß für die Reaktion wird der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit in (mExt/min) ermittelt.

Für die Reaktion mit der freien β -D-Galactosidase werden 85 mExt/min; für die Reaktion mit β -D-Galactosidase-Antikörper-Konjugat 92 mExt/min gemessen.

Beide Meßwerte zeigen, daß sowohl mit freier als auch mit konjugierter β -D-Galactosidase ein sehr gut meßbarer Extinktionsunterschied gefunden wird.

Daraus ergibt sich, daß die beschriebenen Verbindungen als Substrate sowohl für freie Glycosidase als auch für Glycosidase-Konjugate in gleicher Weise geeignet sind. Die neuen Substrate können somit nicht nur als diagnostische Mittel für die Bestimmung freier Glycosidasen eingesetzt werden. Sie sind in vorteilhafter Weise auch bei immunologischen Bestimmungsmethoden einsetzbar, bei denen eine Glycosidase als Indikator-Enzym verwendet wird.

Beispiel 4

Bestimmung der α -Amylase-Aktivität

Filterpapier wird mit Resorufin-maltoheptaosid (hergestellt gemäß Beispiel 17), gelöst in Citratpuffer, pH 6, getränkt. Das so erhaltene Reagenzpapier wird nacheinander mit der α -Amylase enthaltenden Probe sowie mit α - und β -Glucosidase versetzt. Nach wenigen Minuten ist eine deutlich sichtbare Rotfärbung nachzuweisen, deren Intensität der α -Amylase-Konzentration in der Probe proportional ist.

Mit Hilfe von Proben mit bekannter α -Amylase-Konzentration läßt sich eine Eichkurve ermitteln, anhand derer der unbekannte α -Amylase-Gehalt einer Probe bestimmt werden kann.

In den vorstehenden Beispielen wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin, (bovineserum-albumin)
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat