



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 857 T2** 2008.02.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 900 376 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 857.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/06578**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 921 279.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/040381**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.04.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.10.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

15633 P	19.04.1996	US
844336	18.04.1997	US

(73) Patentinhaber:

Xenogen, San Jose, Calif., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**CONTAG, Pamela R., San Jose, CA 95129, US;
BENARON, David A., Portola Valley, CA 94028, US;
CONTAG, Christopher H., San Jose, CA 95129, US**

(54) Bezeichnung: **BIODETEKTOREN FÜR SPEZIFISCHE LIGANDEN**

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 eingelegt, 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

I. Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Biodetektoren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Molekülen in Flüssigkeiten, Gasen oder festen Matrices. Spezifischer ausgedrückt, betrifft die vorliegende Erfindung Biodetektoren, die einen molekularen Schaltmechanismus umfassen, um im Anschluss an eine Wechselwirkung mit Zielsubstanzen ein Reportergeräten zu exprimieren. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren, die solche Biodetektoren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von ausgewählten Substanzen mit großer Genauigkeit und hoher Empfindlichkeit verwenden.

II. Hintergrund der Erfindung

[0002] Der Nachweis von geringen Konzentrationen biologischer und anorganischer Substanzen in biologischen Proben, im Körper oder in der Umwelt ist häufig schwierig. Assays für diese Art von Nachweis sind mit mehreren Verfahrensschritten verbunden, die das Binden eines Primärantikörpers, mehrfache Waschschriffe, das Binden eines zweiten Antikörpers, weitere Waschschriffe, sowie – abhängig von der Art des Nachweissystems – zusätzliche enzymatische und Waschmaßnahmen einschließen. Des weiteren leiden derartige Assays unter einem Mangel an Empfindlichkeit und neigen zu Ungenauigkeiten. Traditionelle Immunassays verpassen beispielsweise 30 % an Infektionen.

[0003] Molekülsonden-Assays sind zwar empfindlich, bedürfen aber hoch qualifizierten Fachpersonals sowie der genauen Kenntnis der Nucleinsäuresequenz des Organismus. Sowohl die Verwendung von Nucleinsäuresonden als auch die Verwendung von auf Polymerasekettenreaktion (PCR) basierenden Assays können nur Nucleinsäuren nachweisen, die komplizierte Extrahierungsverfahren benötigen und möglicherweise die Erstindikatoren eines Krankheitszustandes oder einer verunreinigenden Substanz sind, oder auch nicht. In Fällen, bei denen wenig Information über den nachzuweisenden Stoff vorliegt, sind beide Arten von Assays in ihrem Anwendungsbereich beschränkt.

[0004] Gegenwärtige nicht-invasive Methoden, mit denen die physischen Parameter eines Patienten gemessen werden können, wie zum Beispiel CAT oder MRI, sind kostspielig und oftmals unzugänglich. Dementsprechend bedarf die Überwachung vieler medizinischer Probleme immer noch Testverfahren, die langsam und kostspielig sein können. Die Zeitspanne, die zwischen dem ausgeführten Test und der Bestätigung des Leidens liegt, kann sehr wichtig sein. Viele Patienten erliegen beispielsweise einer Blutvergiftung, bevor die Infektion bestätigt und der infizie-

rende Organismus identifiziert werden konnte; die Behandlung tendiert daher dazu, empirisch und wenig effektiv zu sein. Ein weiteres Beispiel stellt das Absuchen des Blutnachschiebs nach Krankheitserregern dar.

[0005] Die Überprüfung von krankheitserregerfreier Blutversorgung bedarf einer Reihe arbeitsintensiver Testverfahren. Im Falle von HIV-1, des Virus, das AIDS hervorruft, suchen die gegenwärtigen Testverfahren Blut nach Anti-HIV-Antikörpern ab und nicht nach dem Virus selbst. Ein bis zu mehrere Wochen dauerndes Zeitfenster, nachdem der Patient dem Virus ausgesetzt gewesen ist, tritt auf, in dem die Antikörper nicht nachweisbar sind, das Blut jedoch große Mengen infektiöser Viruspartikel enthält. Clark et al., 1994, J. Infect. Dis. 170: 194–197; Piatak et al., 1993, Aids Suppl. 2: S65–71.

[0006] Um beispielsweise bei einer Blutversorgung sicherzustellen, dass sie HIV-1-frei ist, müssen mehrere arbeitsintensive, kostspielige Tests durchgeführt werden. Darüberhinaus identifizieren die Tests, die gegenwärtig zum ersten Absuchen verwendet werden, nicht das Virus selbst, welches in relativ geringen Mengen vorhanden sein kann, sondern sind auf HIV-Antikörper gerichtet, die jedoch noch Wochen nach der Erstinfektion nicht vorhanden sind. Clark et al., 1994, J. Infect. Dis. 170: 194–197; Piatak et al., 1993, Aids Suppl. 2: S65–71. Somit ist das Screenen der Blutzufuhr nicht nur zeitaufwändig, sondern kann auch ungenau sein.

[0007] In ähnlicher Weise ist die Fähigkeit, Substanzen in der Umwelt, wie zum Beispiel luft- oder wasserverschmutzende Substanzen, nachzuweisen, von großer Wichtigkeit. Es wäre beispielsweise wünschenswert, Grundwasser, industrielle Fertigungsprozesse, Nahrungsmittelherstellung und -handhabung mittels eines kostengünstigen und vielseitig verwendbaren Testverfahrens live zu überwachen. Gegenwärtige Verfahren sind jedoch nicht für eine derartige 'on-line'-Überwachung geeignet.

[0008] Es gibt verschiedene Gründe, warum die gegenwärtigen Verfahren so beschränkt sind. Zum einen mag es schwierig sein, genügende Mengen des nachzuweisenden Stoffes zu erhalten. Der Nachweis von biologischem Material kann beispielsweise schwierig sein, da die gewünschten biologischen Materialien oft innerhalb des Körpers abgesondert werden, und es daher schwierig ist, große Mengen zur ex vivo-Überwachung zu erhalten. Dementsprechend sind empfindliche Assays zur Verwendung bei kleinen Probenmengen notwendig. Dies bedeutet, dass ein Verfahren zur Amplifizierung des Signals erforderlich ist. Zum Nachweis von Nucleinsäuren sind Amplifikationsverfahren seit langem etabliert, nicht jedoch bei Antigen-Nachweisverfahren.

[0009] Ein zweites Problem ist, dass sich das Live-Untersuchen möglicherweise schwierig gestaltet, da die Zielmaterialien möglicherweise nur in geringen Mengen vorhanden sind, so dass zum Nachweis ihres Vorhandenseins zeitaufwändige, teure und technisch aufwändige Verfahren vonnöten sind. Im Falle einer bakteriellen Infektion des Blutes, einer Blutvergiftung, sind beispielsweise vielleicht nur 1–2 Bakterien in einer 1–10 ml-Blutprobe vorhanden. Gegenwärtige Verfahren erfordern es, dass die Bakterien erst gezüchtet werden, bevor sie nachgewiesen werden können. Askin, 1995, J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs. 24: 635–643. Diese zeitliche Verzögerung kann sich unter Umständen nachteilig auswirken, da die Verzögerung der Behandlung oder die Falschbehandlung von Erkrankungen den Unterschied zwischen Leben oder Tod bedeuten kann.

[0010] Andere Forschungsgruppen haben versucht, diese Beschränkungen zu umgehen, indem sie radioaktive oder fluoreszierende Marker in Kombination mit Antikörpern verwenden (Harlow et al., (1988), Antibodies. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Auf Antikörpern basierende Assays schliessen im typischen Fall das Binden eines Antikörpers an das Zielmolekül ein, gefolgt von einer Reihe von Waschschritten, um damit sämtliche ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das Binden des Antikörpers an sein Zielmolekül wird im typischen Fall durch ein Identifikationsmolekül nachgewiesen, beispielsweise einen zweiten Antikörper, der einen nachweisbaren Marker trägt und der spezifisch den zielmolekülspezifischen Antikörper erkennt. Auch auf diesen Schritt folgen mehrfache Waschschrritte. Alternativ dazu kann der zielspezifische Antikörper auch direkt an einen nachweisbaren Marker angehängt werden. Marker schliessen radioaktive Tracer, Fluoreszenzmarker sowie auf Chemolumineszenz beruhende Nachweissysteme ein. Harlow und Lane, 1988, Antibodies. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0011] Die Anzahl an Schritten, die bei der Verwendung solcher auf Antikörpern basierenden Assays zur Erlangung eines spezifischen Signals benötigt werden, sind zeitaufwändig und arbeitsintensiv. Darüberhinaus sind diese Art von Assays auf den Nachweis von Antigenen geschränkt, die an eine Art Matrix gebunden sind. Beispiele für diese Art von Nachweissystemen schliessen Western-Blots, Immunhistochemie und ELISA ein. Die höchste Empfindlichkeit wird gegenwärtig durch die Verwendung von chemolumineszenten und auf Radioisotopen beruhenden Markern erreicht. Jedoch stellt die Empfindlichkeit dieser Nachweissysteme, d.h. ein spezifisches Signal über einem Hintergrund, häufig den limitierenden Faktor dar.

[0012] In ähnlicher Weise stellt bei den radioaktiven

Immunassayverfahren die Hintergrundstrahlung ein Limit bezüglich der Empfindlichkeit dar. Darüberhinaus sind diese Verfahren zeitaufwändig und teuer. Schliesslich sind radioaktive Ansätze umweltbelastend, da sie erhebliche Müllentsorgungsprobleme mit sich bringen.

[0013] Ein weiterer Ansatz zur Überwachung von Substanzen umfasst die Verwendung von Licht. Licht hat den Vorteil, dass es leicht messbar, nicht-invasiv und quantitativ messbar ist. Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag).

[0014] Traditionelle Spektroskopie beinhaltet, dass Licht in Substanzen hineingestrahlt und daraufhin die Konzentration aufgrund des Absorptionsvermögens oder der Streuung des Lichts errechnet wird. Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag). Optische Verfahren weisen Variationen in der Konzentration von lichtabsorbierenden oder lichtstreuenden Materialien nach. Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag). Nah-Infrarot-Spektroskopie hat sich als eine nicht-ionisierende, relativ sichere Art von Strahlung erwiesen, die gut als medizinische Sonde funktioniert, da sie in Gewebe eindringen kann. Des weiteren wird sie auch in hohen Dosen gut vertragen. Licht wird heutzutage beispielsweise zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration im Blut (Nellcor) oder im Körper (Benaron image) verwendet, oder sogar zur Glucoseüberwachung im Körper (Sandia). Benaron und Stevenson, 1993, Science 259: 1463–1466; Benaron et al., 1993, in: Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring; G. Muller, B. Chance, R. Alfano et al., Hrsg. (Bellingham, WA USA: SPIE Press), pp. 3–9; Benaron und Stevenson, 1994, Adv. Exp. Med. Biol. 361: 609–617. Gegenwärtige Verfahren haben jedoch eine beschränkte Anwendung, da viele Substanzen kein für sie spezifisches spektroskopisches Signal aufweisen, das optisch leicht feststellbar ist und quantitativ gemessen werden kann. Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag). Darüberhinaus wird der Nachweis von Substanzen in geringen Konzentrationen oft durch hohe Hintergrundsignale erschwert, vor allem in biologischen Trägern, wie zum Beispiel Geweben. Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag).

[0015] In den letzten Jahren haben auf Lichtemission basierende Testverfahren, wie zum Beispiel Chemolumineszenz (Tatsu und Yoshikawa, 1990, Anal. Chem. 62: 2103–2106), auf Grund der Entwicklung

extrem empfindlicher Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Messung von Licht in zunehmenden Maße Aufmerksamkeit erregt. Hooper et al., 1994, J. Biolumin. Chemilumin, 9: 113–122. Ein Beispiel für ein biomedizinisches Forschungsprodukt, das Chemolumineszenz verwendet, ist das ECL-Nachweissystem (Amersham) für Immunassays und zum Nucleinsäurenachweis.

[0016] Die Verwendung von biologischen Lichtquellen, Biolumineszenz, in biologischen Assays ist mit der Entwicklung des Chemolumineszenz-Nachweises parallel verlaufen, da ähnliche Bauelemente zum Lichtnachweis benötigt werden. Kricka, 1991, Clin. Chem. 37: 1472–1481. Eine der am häufigsten angewendeten biologischen Lichtquellen ist Luciferase, ein lichterzeugendes Enzym, das von einer Reihe von Organismen synthetisiert wird, einschliesslich *Photinus pyralis* (Nordamerikanischer Leuchtkäfer), *Renilla reniformis* (phosphoreszierende Koralle) und *Photobacterium* (lumineszierende Bakterienart). Luciferase ist eine Oxidoreduktase mit niedrigem Molekulargewicht, die die Dehydrierung von Luciferin in Gegenwart von Sauerstoff, ATP und Magnesiumionen katalysiert. Bei diesem Prozess werden etwa 96 % der freiwerdenden Energie in Form von sichtbarem Licht erzeugt. Zur Übersicht siehe auch Jassim et al., 1990, J. Biolumin. Chemilumin. 5: 115–122.

[0017] WO91/01305 betrifft ein modifiziertes biolumineszentes Protein, das auf verschiedene physikalische, chemische, biochemische oder biologische Zustände dadurch reagiert, dass es Licht oder Strahlung von veränderter Eigenschaft erzeugt, sobald die Biolumineszenz-Reaktion ausgelöst wird. WO91/01305 betrifft ausserdem ein Verfahren zum Nachweis von Mutationen in einer DNA-Sequenz, einschliesslich einer Bindung des Proteins an ein Ende der Sequenz.

[0018] Die Empfindlichkeit des Photonennachweises und die Möglichkeit, Bakterien und andere Zellen so zu verändern, dass sie biolumineszente Proteine exprimieren, erlaubt die Verwendung solcher Zellen als empfindliche Biosensoren in Umweltstudien. Guzzo et al., 1992, Toxicol. Lett. 64: 687–693; Heitzer et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 1487–1494; Karube und Nakanishi, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 54–59; Phadke, 1992, Biosystems 27: 203–206; Selifonova et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3083–3090. Selifonova et al. beschreiben beispielsweise Biosensoren zum Nachweis von Schadstoffen in der Umwelt. Spezifischer ausgedrückt, konnten durch die Fusion des Hg(II)-induzierbaren Tn21-Operons mit dem promotorlosen luxCDABE aus *Vibrio fischeri* hoch empfindliche Biosensoren zum Nachweis von Hg(II) hergestellt werden.

[0019] Zusätzlich zu Systemen, in denen Biolumineszenz als Nachweisverfahren für ein spezifisches

Leiden verwendet wird, wie zum Beispiel Hg(II), siehe vorstehend, wurde die konstitutive Expression von Luciferase als Marker eingesetzt, um die Lebensfähigkeit von bakteriellen Zellen zu verfolgen, da der Luciferaseassay von der Lebensfähigkeit der Zellen abhängt. Die konstitutive Expression von Luciferase wurde beispielsweise vor kurzem zur Entwicklung von Arzneimitteln und Impfstoffen, die gegen bakterielle Erkrankungen gerichtet sind, eingesetzt. Im besonderen wurde ein verstärkt Luciferase exprimierender *Mycobacterium tuberculosis*-Stamm dazu eingesetzt, um die antimikrobakterielle Aktivität in Mäusen abzuschätzen. Hickey et al., 1996, Antibacterial Agents and Chemotherapy 40: 400–407.

[0020] Biosensoren, die auf einen bakteriellen Rezeptor angewiesen sind, um die Luciferase zu aktivieren, sind jedoch darauf beschränkt, jene Moleküle zu erkennen, die einen korrespondierenden bakteriellen Rezeptor aufweisen und an eine bekannte Promotorregion gebunden sind, die an das Luciferasegen fusioniert werden kann. Darüberhinaus sind die Luciferase exprimierenden Bakterien, die zum Testen der antimikrobiellen Aktivität in Mäusen verwendet wurden, nicht spezifisch.

[0021] Nachdem nun Verfahren, die Biolumineszenz im Allgemeinen, und Luciferase im Besonderen als Biolumineszenzsensoren in sehr spezifischen Anwendungen verwenden, erörtert wurden, ist die vorliegende Erfindung folglich auf hoch empfindliche und hoch selektive Liganden-spezifische Biotektoren ausgerichtet, für eine breite Palette an Anwendungen. Spezifischer ausgedrückt, vereint die vorliegende Erfindung die Selektivität einer Liganden-spezifischen Bindung und die Vielseitigkeit des Antikörperwirkungsbereichs mit der Empfindlichkeit eines Biolumineszenznachweises, unter Einsatz von Stoffen, die spezifisch auf vorgegebene Liganden mit Photonenemission reagieren. Die in der vorliegenden Erfindung vorgestellte Vorgehensweise erlaubt somit die Erzeugung äusserst empfindlicher Biotektoren zur Entwicklung vieler verschiedener Nachweisverfahren zum Nachweis von beliebig vielen kommerziell bedeutenden Molekülen.

III. Zusammenfassung der Erfindung

[0022] Die vorliegenden Erfindung ist gezielt ausgerichtet auf Liganden-spezifische Biotektoren zum Nachweis und zur Überwachung ausgewählter Substanzen. Spezifischer ausgedrückt, umfassen die Biotektoren der vorliegenden Erfindung (1) ein signalumwandelndes Element, umfassend einen extrazellulären Liganden-spezifisch bindenden Rest, welcher mit einer intrazellulären signaltransformierenden Domäne fusioniert ist, und welche dazu fähig ist, eine (2) Überträgerkomponente zu aktivieren, die in ihrer aktiven Form dazu fähig ist, ein (3) responsives Element zu aktivieren, wie zum Beispiel einen Pro-

motor, welches funktionell mit einem (4) Reporter gen verbunden ist, welches wiederum ein Polypeptid mit spezifischen und leicht, zum Beispiel optisch, nachweisbaren Eigenschaften codiert. Somit setzen die Biotektoren der Erfindung die Bindung an eine Zielsubstanz, zum Beispiel einen Ligand, in ein nachweisbares Signal um. In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist das von den Biotektoren erzeugte Signal Licht und wird von einem Lichtnachweisgerät nachgewiesen. Auf diese Weise kann eine gewünschte Substanz identifiziert werden.

[0023] Die vorliegende Erfindung ist ausserdem auf Verfahren ausgerichtet, die derartige Biotektoren zum Nachweis und zur Überwachung ausgewählter Substanzen unter hoher Empfindlichkeit und grosser Spezifität verwenden. Verfahren, welche die Biotektoren der Erfindung verwenden, schliessen den Nachweis von Verunreinigungen in Nahrungsmitteln und in der Agrarindustrie ein, die Diagnose und Überwachung in der Medizin und Forschung, sowie den Nachweis von Giften oder Schadstoffen in der Umwelt oder in Verteidigungseinrichtungen.

IV. Kurze Beschreibung der Figuren

[0024] [Fig. 1](#) stellt ein generisches Modell dar, das die Hauptbestandteile eines Biotektors aufzeigt. Ein Biotektor besteht aus einer Fühlereinheit (die wie ein "Y" geformte Struktur an der Oberfläche), Überträgerbestandteilen (der im Inneren des Biotektors vorhandene Teil der "Y"-Struktur) und lichtabgebenden Bestandteilen (kleine Kreise).

[0025] [Fig. 2](#) stellt ein detaillierteres Schema eines Biotektors auf molekularer Ebene dar.

[0026] [Fig. 3](#) stellt eine geordnete Anordnung von Biotektoren auf einem festen Träger dar, so dass eine Vielfalt von Substanzen in einer Probe gleichzeitig nachgewiesen werden kann.

[0027] [Fig. 4](#) stellt einen Biotektor dar, der mittels Integration eines Transposons in ein bakterielles Genom erzeugt wurde, wie in Beispiel 1 genauer ausgeführt. Das Luciferase-Operon codiert fünf Proteine (aus den Genen A, B, C, D und E), die zusammen Biolumineszenz erzeugen. Chl, Chloramphenicol-Resistenz-Gen; Kan, Kanamycin-Resistenz-Gen; Amp, Ampicillin-Resistenz-Gen; PO₄, Phosphat-Gruppe (als Aktivator des Überträgers).

[0028] [Fig. 5](#) stellt den Effekt von menschlichem Blut auf die Lichtemission von biolumineszenter Salmonella dar, und demonstriert damit den Nachweis nahezu von Einzelzellen.

V. Definitionen

[0029] Soweit nicht anderweitig angezeigt, werden

alle hierin verwendeten Begriffe in derselben Bedeutung verwendet, wie sie unter Fachleuten verstanden werden.

[0030] Der Begriff "Zielmolekül", wie er hierin verwendet wird, beschreibt eine Substanz, die nachzuweisen und/oder quantitativ zu messen ist.

[0031] Der Begriff "Luciferasen", wie er hierin verwendet wird, umfasst – soweit nicht anderweitig angezeigt – prokaryontische und eukaryontische Luciferasen, sowie Varianten mit abweichenden oder veränderten physikalischen und/oder Emissions-Eigenschaften.

[0032] Der Begriff "Biotektor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf eine Einheit, die auf eine Bindung oder anderweitige Wechselwirkung mit dem Zielmolekül durch Abgabe eines optischen Signals reagiert.

[0033] Der Begriff "optisches Signal", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf jegliche biochemische Reaktion oder auf jegliche biochemische Substanz, die unter Verwendung der Lichtüberwachungsverfahren unterschieden werden kann. Dies schliesst Photonenemission, Fluoreszenz und Extinktion ein.

[0034] Der Begriff "Licht", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 220 nm und etwa 1100 nm.

[0035] Der Begriff "Promotorinduktion", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Vorgang, der die direkte oder indirekte Aktivierung eines ausgewählten induzierbaren genetischen Elements zur Folge hat.

VI. Detaillierte Beschreibung der Erfindung

A. Allgemeiner Überblick über die Erfindung

[0036] Die vorliegende Erfindung ist ausgerichtet auf Liganden-spezifische Biotektoren zum Nachweis und zur Überwachung ausgewählter Substanzen, einschliesslich Mikroorganismen, Moleküle und Ionen in eine Reihe verschiedener Anwendungen. Die Biotektoren der vorliegenden Erfindung vereinen die Genauigkeit und die Selektivität einer Liganden-spezifischen Bindung mit der Empfindlichkeit eines Biolumineszenznachweises durch den Einsatz von Einheiten, die spezifisch auf die Bindung eines vorgegebenen Liganden mit Photonenemission reagieren. Die in der vorliegenden Erfindung vorgestellte Vorgehensweise erlaubt somit die Erzeugung empfindlicher Biotektoren zur Entwicklung vieler verschiedener Nachweisverfahren zum Nachweis und zur Überwachung einer beliebigen ausgewählten

Substanz.

[0037] Spezifischer ausgedrückt, stellen die Biotektoren der vorliegenden Erfindung die Koppelung einer Liganden-spezifischen Bindung über einen "molekularen Schalter", d.h. eine Signalweitergabe, mit der Aktivierung eines nachweisbaren Reporter-moleküls als Reaktion auf die Ligandenbindung bereit. Die Biotektoren der vorliegenden Erfindung können aus lebensfähigen biologischen Einheiten, wie zum Beispiel Bakterien, bestehen, oder aus abiotischen Stoffen, wie zum Beispiel Liposomen. Generell zeichnen sich Biotektoren durch ihre Fähigkeit aus, einen Liganden spezifisch zu erkennen, und die Bindung an den Liganden in ein messbares Signal, wie zum Beispiel Lichtemission, umzuwandeln. So können beispielsweise Bakterien als Liganden-spezifische Biotektoren verwendet werden, die auf vorgegebene Liganden spezifisch mit Photonenemission reagieren.

[0038] Die Biotektoren der vorliegenden Erfindung erlauben den hoch empfindlichen Nachweis vieler verschiedener Substanzen, beispielsweise Mikroben im menschlichen Blut, Viren und Bakterien, toxischer Moleküle, Ionen, Krebszellen, Antigenen, kleiner Moleküle (z.B. Glucose), pH, Sauerstoff und Metallen. Darüberhinaus stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung derartiger Biotektoren in vielen verschiedenen Nachweisverfahren bereit, um jegliche beliebige ausgewählte Substanz nachzuweisen. Generell umfassen die Biotektoren der vorliegenden Erfindung ein signalumwandelndes Element, umfassend einen extrazellulären Liganden-spezifischen bindenden Rest, welcher an eine intrazelluläre signaltransformierende Domäne angekoppelt ist und welche dazu fähig ist, eine Überträgerkomponente zu aktivieren. Die Überträgerkomponente ist in ihrer aktiven Form dazu fähig, ein responsives Element, wie zum Beispiel einen Promotor, zu aktivieren, welches funktionell mit einem Reporter-gen verbunden ist, welches wiederum ein diagnostisches Polypeptid mit spezifischen und leicht nachweisbaren Eigenschaften codiert. Ein Reporter-molekül kann dabei direkt durch Bindung an eine andere intrazelluläre signaltransformierende Domäne des signalumwandelnden Elements aktiviert werden. Somit wandeln die Biotektoren der Erfindung die Bindung an eine Zielsubstanz, zum Beispiel einen Ligand, in ein nachweisbares Signal um. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist das von den Biotektoren erzeugte Signal Licht und wird von einem Lichtnachweisgerät nachgewiesen. Somit kann auf der Basis dieses Zusammenwirkens der oder die Zielligand(en) identifiziert und quantitativ gemessen werden.

B. Biotektoren

[0039] Die Biotektoren der Erfindung sind dadurch gekennzeichnet, dass sie als Reaktion auf das

Vorhandensein einer Zielsubstanz ein nachweisbares Signal sowohl in vivo als auch in vitro erzeugen.

[0040] In einer spezifischen Ausführungsform ist das nachweisbare Signal, das von dem Biotektor als Reaktion auf das Vorhandensein der Zielsubstanz erzeugt wird, Licht. Da so gut wie kein Hintergrundlicht von normalem Gewebe oder anderen organischen oder anorganischen Materialien ausgeht, ist die Empfindlichkeit dieses Systems nur durch das Hintergrundrauschen des Biotektors selbst beschränkt. Spezifischer ausgedrückt, bestehen die gezielt ausgerichteten Liganden-spezifischen Biotektoren der vorliegenden Erfindung aus einer Liganden-spezifischen Domäne, welche über einen "molekularen Schalter" mit einem Reporter-gen verbunden ist, das ein nachweisbares Protein codiert. Das Reporter-gen wird somit als Reaktion auf die Bindung des Liganden an die Liganden-spezifische Domäne aktiviert. Der Ligandenspezifische bindende Rest kann ein beliebiger Antikörper sein, der selektiv an die gewünschte Substanz anbindet. Der "molekulare Schalter" ist ein signalübertragender Bestandteil, der die Bindung des Liganden mit der Aktivierung eines responsiven Elements verknüpft. Das Überträger-molekül kann ein beliebiges Zweikomponentenregulatorisches System aus Bakterien, einschliesslich eines Phosphatregulons, oder ein jeglicher beliebiger eukaryontischer Überträger sein. Das responsive Element kann ein induzierbarer Promotor sein, der funktionell mit einem Reporter-gen verbunden ist. Die Transkription und Translation dieses Reporter-gens wird ein Genprodukt zur Folge haben, welches ein nachweisbares Signal, wie zum Beispiel Licht, erzeugt. Das Signal wird mittels einer geeigneten Methode nachgewiesen; falls das Signal Licht ist, bedeutet dies ein Lichtnachweisgerät.

[0041] Beispielsweise kann die Bildgebung der lichtemittierenden Biotektor-Einheiten die Verwendung eines Photodetektors beinhalten, der dazu fähig ist, äußerst geringe Lichtmengen – im typischen Fall das Vorkommen von Einzelphotonen – nachzuweisen. Falls nötig, könnte die Position eines Signals durch Integration der Photonenemission bestimmt werden, bis ein Bild erzeugt werden kann. Beispiele für solche empfindlichen Photodetektoren schliessen Geräte (wie zum Beispiel Mikrokanalplatten-Verstärker und Photomultiplier-Röhren) ein, die das Erscheinen von Einzelphotonen verstärken. Diese Verstärker können vor einer Kamera angebracht werden. Darüberhinaus können empfindliche Kameras (beispielsweise mit Flüssigstickstoff gekühlt), die fähig sind, Einzelphotonen über dem Eigenrauschen eines Systems nachzuweisen, verwendet werden.

[0042] Sobald ein Photonen-Emissionsbild erstellt ist, wird es im typischen Falle einem "normalen" reflektierten Lichtbild des Gegenstandes überlagert um somit einen Bezugsrahmen für die Quelle der emit-

tierten Photonen bereitzustellen. Solch ein "zusammengesetztes" Bild wird sodann analysiert, um den Ort und/oder die Menge der Zielsubstanz in einem Gegenstand zu bestimmen. In den meisten Fällen sind Bilder der Lichtquelle nicht nötig. Die einfache Quantifizierung der Anzahl an Photonen, die von einer Probe emittiert werden (wie sie beispielsweise mittels eines Luminometers nachgewiesen werden), zeigt die Konzentration des lichtemittierenden Reporters an. Die Anzahl an Photonen wäre demnach proportional zur Menge an Zielligand, den ein spezifischer Detektor aufspürt. Ohne die Einschränkungen, die durch den Bedarf nach Bildern hervorgerufen werden, können Detektoren sehr nahe an dem lichtemittierenden Biotektor platziert werden um so den optischen Nachweis und die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens zu optimieren. In einer solchen Anordnung können Mikrokanalplatten-Verstärker verwendet werden, was den Nachweis von Einzelphotonen zur Folge hat. Ein solches Gerät wird gegenwärtig von der Hamamatsu Corporation hergestellt. In dem Hamamatsu-System können ATP-Konzentrationen aus einzelnen Zellen getestet werden, indem Lyse-Puffer, Luciferase und das Substrat, Luciferin, auf die immobilisierten Zellen aufgesprüht wird.

[0043] Der allgemeine Mechanismus eines Liganden-spezifischen Biotektors ist in [Fig. 1](#) dargestellt. [Fig. 2](#) stellt den molekularen Mechanismus eines bevorzugten Biotektors genauer dar. In dem abgebildeten Beispiel ist der Biotektor eine Bakterienzelle, die ein zielspezifisches signalumwandelndes Transmembranelement exprimiert, das einen extrazellulären Liganden-spezifischen bindenden Rest umfasst, zum Beispiel einen Antikörper, welcher an eine intrazelluläre signaltransformierende Domäne gekoppelt ist. Das zielspezifische signalumwandelnde Element ist in die Membran eingebettet, zum Beispiel eine Bakterienmembran, welche ein "extrazelluläres" Kompartiment von einem "intrazellulären" Kompartiment trennt. Der Liganden-spezifische Rest ist fähig, an eine ausgewählte Substanz anzubinden, welche die Aktivierung der intrazellulären signaltransformierenden Domäne auslöst. Die aktivierte intrazelluläre signaltransformierende Domäne wiederum wandelt einen inaktiven Überträger in einen aktiven Überträger um. Der Überträger zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, dass er, sobald er in seine aktive Form umgewandelt ist, an ein Promotorelement anbindet, welches funktionell mit einem Reportergen verbunden ist. Die Transkription und Translation des Reportergens oder Operons haben ein Genprodukt zur Folge, das ein nachweisbares Signal, wie zum Beispiel Licht, erzeugt. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist der Reporter ein Luciferase-Operon, welches sichtbares Licht erzeugt und leicht überwacht, gemessen und mit hoher Empfindlichkeit quantifiziert werden kann.

[0044] Die signaltransformierende Domäne könnte

jedoch auch direkt auf ein modifiziertes Reportermolekül wirken. Das Reportermolekül würde dabei so modifiziert sein, dass es in einem inaktiven Zustand exprimiert wird, der dann durch die gegenseitige Wechselwirkung mit der signaltransformierenden Domäne direkt aktiviert werden kann.

[0045] Biotektoren, die einen "Lichtschalter" liefern, der auf eine vorgegebene ausgewählte Substanz reagiert, weisen eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen gegenwärtig verwendeten Methoden auf. Zum einen erlaubt der Schalter den Nachweis von Antigenen, die in vielfältig zusammengesetzten Gemischen vorhanden sind, und schaltet die Notwendigkeit, ungebundene Antikörper auszuwaschen, aus, wodurch der Nachweis vereinfacht wird. Da der an den Antikörper gebundene Ligand Licht anschaltet, und in der Probe kein Hintergrundlicht vorhanden ist, ist das Waschen zur Verringerung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen nicht nötig, vermindertes Rauschen erhöht die Empfindlichkeit und nur spezifische Wechselwirkungen schalten das Licht an.

[0046] Sobald die Anbindung an einen Liganden erfolgt ist, wird eine enzymatische Kaskade aktiviert, die dazu dient, das Signal zu übertragen.

[0047] Darüberhinaus werden, wenn der Ziel-Ligand überreichlich an der Oberfläche von – beispielsweise pathogenen Mikroben – exprimiert wird, viele bindetektierende Bakterien an ein einzelnes Ziel anbinden, und somit das Signal verstärken, was ein äußerst empfindliches Nachweissystem zur Folge hat.

[0048] Weiterhin kann dadurch, dass die Liganden-spezifische Domäne des signalumwandelnden Elements des Biotektor-Systems wie eine Cassette ausgewechselt werden kann, eine unbegrenzte Anzahl von Biotektoren erzeugt werden, um eine beliebige gewünschte oder ausgewählte Substanz zu erkennen. Somit liefern die Biotektoren der vorliegenden Erfindung ein flexibles, generisches System, das dahingehend angepasst werden kann, dass es aus einer grossen Vielfalt von Möglichkeiten eine jegliche beliebige ausgewählte Substanz erkennen kann. Biotektoren, die auf eine bestimmte gewünschte Substanz zielen, können rasch entwickelt werden.

[0049] Die Biotektoren der Erfindung sind vielseitig anwendbar, da sie in vivo, in Lösung oder auf festen Sensorplatten wirksam sind. Weiterhin können Anordnungen dieser Biotektoren aufgebaut werden, die bei verschiedenen Wellenlängen wirksam sind oder an verschiedenen Stellen eines "Biosensor-Chips", was das gleichzeitige Überwachen und Absuchen multipler Agenzien, Gene, Genprodukte oder anderer Zielsubstanzen ermöglicht. Siehe auch [Fig. 3](#). Beispielsweise können Biotektoren in einer

einzigartigen Mehrfachnachweis-Anordnung zusammengefasst werden, um damit ein System zu erstellen, das eine weit reichende, leistungsfähige Analyse in einem einzigen Schritt ermöglicht. So kann der Biotektor beispielsweise auf einem Gel angebracht werden, welches auf einem gewöhnlichen signalerkennenden Instrument liegt, das – falls das erzeugte Signal Licht ist – zum Beispiel ein CCD-Chip (Charge Coupled Device) sein kann. Auf Grund der räumlichen Signalerkennung in einer CCD-Anordnung, kann die Biotektor-Anordnung eine auf Licht basierende Analyse bereitstellen, unter Verwendung vielfältiger verschiedener Sensoren, die in einem einzigen Sensor-Chip angeordnet sind. Somit kann eine Analyse von beispielsweise Blut-Typ, HIV-Exposition, Hepatitis-Status, Lymphokin-Profilen, sowie CMV-Positivtestung gleichzeitig ausgeführt werden. Multiple Arten von Infektionen können so schnell und gleichzeitig abgesucht werden.

[0050] Ist das vom Reporter erzeugte Signal Licht, so kann das Signal auf nichtinvasivem Wege nachgewiesen werden, da Licht beispielsweise durch Gewebe hindurch nachgewiesen werden kann. Siehe auch mit angemeldetes U.S. Patent No. 5,650,135.

[0051] Des weiteren weisen die Biotektoren der Erfindung dadurch, dass sie biologisch verträglich und somit umweltfreundlich sind, relativ geringe Entwicklungskosten und eine geringere Belastung für den Benutzer auf, vor allem im Vergleich mit Verfahren, die Giftmüll mit sich bringen, wie zum Beispiel auf Radioaktivität basierende Nachweismethoden.

[0052] Ein weiterer bedeutender Vorteil der Biotektoren der Erfindung ist die Verringerung an Zeit- und Arbeitsaufwand, welche zur Durchführung vieler diagnostischer Testverfahren notwendig sind. Ein häufiger, in vielen diagnostischen und Analyse-Bereichen geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist der Bedarf an genauen Messfühler- und Nachweissystemen, um sofortige Information zu liefern. Beispiele schliessen das Screenen der Blutversorgung auf das AIDS-Virus und andere durch das Blut übertragenen Krankheitserregern, die Untersuchung und Beurteilung neuartiger Arzneistoffe in Gewebekultur oder in Tiermodellen, sowie die Überwachung der Ausschüttung therapeutischer Proteine nach einer Gentherapie ein. Das gesetzlich vorgeschriebene Screenen der Blutversorgung auf AIDS-Virus und andere Krankheitserreger bedarf gegenwärtig zahlreicher Tests. Ein kosteneinsparender, schneller und spezifischer Sensor, der zahlreiche durch das Blut übertragene Krankheitserreger nachweisen kann und einen eingebauten Bestätigungstest aufweist, könnte dieses Verfahren maßgeblich rationalisieren, und so die Nettokosten für den Benutzer reduzieren. In ähnlicher Weise sind für die Bewertung potentieller neuer Arzneistoffe, Leitverbindungen genannt, durch die pharmazeutische Industrie inzwischen aufwendige,

teure Gewebekulturen und Tierversuche vorgeschrieben. Ein kostengünstiger Sensor mit den dazugehörigen Geräten zur in vitro- und in vivo-Überwachung von Kinetik und Wirksamkeit eines Arzneistoffs kann für Pharmafirmen, die nach Möglichkeiten zur Rationalisierung der Entwicklung solcher Leitverbindungen suchen, von großem Wert sein.

[0053] Zusammenfassend kann behauptet werden, dass die Biotektoren der Erfindung gegenüber den gegenwärtig erhältlichen diagnostischen Nachweissystemen zahlreiche Vorteile aufweisen.

1. Biotektoren beherbergende Einheiten

[0054] Die biologischen Komponenten des Biotektors können in lebenden oder unbelebten Einheiten enthalten, oder aber an diese angelagert sein, welche die entscheidenden Wechselwirkungen stabilisieren. Der Aufbau dieser Komponenten als solche hat ein Mikromessfühlersystem zur Folge, das zum Nachweis einer geringen Anzahl von Liganden mit hoher Genauigkeit und Empfindlichkeit fähig ist.

[0055] Lebende Einheiten. Im typischsten Fall ist die Biotektoreinheit eine lebende Zelle, die genetisch manipuliert wurde, so dass sie alle notwendigen Komponenten enthält. Lebende Einheiten umfassen, sind aber nicht auf sie beschränkt, Prokaryonten, Eukaryonten, Viren, Retroviren, Vektoren, Plasmide, Phagen, transformierte eukaryontische Zellen, wie zum Beispiel Lymphocyten, Makrophagen, etablierte Zelllinien. Im typischen Fall ist die eine Biotektor beherbergende Einheit eine genetisch manipulierte Bakterienzelle, wie zum Beispiel E. coli. Genetisch modifizierte Bakterien können unter geringem Kostenaufwand schnell gezüchtet werden. Somit liegt der Vorteil der Verwendung lebender Zellen als Biotektoreinheiten darin, dass ein großer Pool an diesen Biotektoren reproduziert und gezüchtet werden kann, nachdem der Original-Biotektor hergestellt worden ist.

[0056] Die Verwendung von lebenden Biotektoreinheiten hat mehrere Vorteile. Zum einen ermöglicht sie, nachdem die Sensoren konstruiert worden sind, das Züchten von Biotektoren unter geringem Kostenaufwand. Zum zweiten ermöglicht sie ein System, bei dem ein Detektor wachsen und sich innerhalb eines Gewebes weiterentwickeln kann, anstatt sich wie ein herkömmlicher anorganischer Sensor zu verbrauchen. Zum dritten kann ein lebender Biotektor ein nachweisbares Signal verstärken. Beispielsweise kann die Bindung eines einzigen Antigens an die Oberfläche eines Bakteriums die Bildung einer Reihe von lichterzeugenden Substanzen auslösen, von denen wiederum jede wiederholt Licht produziert. Somit kann die Bindung eines einzigen Antigens, das das System auf die rechte Weise anregt, die Bildung großer Mengen an Photonen aus einem lebenden Bio-

sensor zur Folge haben. Viertens können, da diese Biosensoren in großer Zahl an ein Ziel binden können viele Biotektoren, das heisst Bakterien, von denen jedes den Bindungsvorgang verstärkt, ein hohes Mass an Verstärkung bewirken. Damit kann eine hohe Empfindlichkeit erreicht werden.

[0057] Unbelebte Stoffe. Ebenso können jedoch abiotische Biotektoren erzeugt werden. Das Biotektor-System kann in ein unbelebtes Gel, in abiotische Kapseln und Liposomen eingebettet werden, und als solche in den Körper injiziert, oder auf Platten aufgebracht werden. Darüberhinaus kann jede andere Einheit, die fähig ist, einen vektoriellen Mechanismus aufrecht zu erhalten, wie zum Beispiel eine Lipiddoppelschicht, eingesetzt werden.

2. Das signalumwandelnde Element

[0058] Das signalumwandelnde Element setzt sich aus einem "extrazellulären" Teil, der selektiv an einen spezifischen Stoff bindet, und einem "intrazellulären" Teil, der fähig ist, den Überträger zu aktivieren, zusammen. Im typischen Fall ist das signalumwandelnde Element ein Transmembran-Fusionsprotein, das aus einem extrazellulären Liganden-bindenden Teil, wie zum Beispiel einem Antikörper, und einem intrazellulären enzymatischen Teil zusammengesetzt ist, der durch die Bindung des extrazellulären Teils an den ausgewählten Zielstoff aktiviert wird. Dementsprechend ist das signalumwandelnde Element so gestaltet, dass es die spezifische Substanz, das heisst den Ligand, erkennt und daran bindet und in ein intrazelluläres Signal umwandelt, wodurch die Aktivierung der Überträgerkomponente bewirkt wird, welche wiederum den Promotor, der die Expression des Reporters steuert, aktiviert.

[0059] Die Liganden-bindende Domäne. Substanzen, die mit der vorliegenden Erfindung identifiziert werden können umfassen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, Proteine, Peptide, Zucker, Fettsäuren, Ionen, Mikroorganismen, einschliesslich Bakterien, Viren und Retroviren. Dementsprechend kann die Liganden-bindende Domäne ein Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Zellrezeptor oder irgendein anderes Ligand-bindendes Protein, wie zum Beispiel die Staphylococcus Proteine A und G, ein Makrophagen Fc-Rezeptor, ein Kohlenhydratrezeptor oder ein innenbindender Rest, wie zum Beispiel die Domänen in Natrium- oder Kaliumkanälen, sein.

[0060] In spezifischen Ausführungsformen ist die Liganden-bindende Domäne ein Antikörper oder ein Derivat davon, einschliesslich, aber nicht auf sie beschränkt, polyclonaler Antikörper, monoclone Antikörper (mAbs), humanisierter oder chimärer Antikörper, einzelkettiger Antikörper, Fab-Fragmenten, F(ab')₂-Fragmenten, von einer Fab-Expressionsbank hergestellter Fragmente, Anti-idiotypischer (anti-Id)

Antikörper, sowie Epitop-bindender Fragmente eines beliebigen der oben genannten. Insbesondere haben die monoclonale Antikörper-Technologie und die vor nicht allzu langer Zeit stattgefunden Entwicklung von Verfahren zur Expression funktionaler Antikörper in Bakterienzellen die vielseitige Anwendbarkeit und Einfachheit erhöht, mit der geeignete Liganden-bindende Domänen für jegliche gewünschte Zielsubstanz identifiziert werden können. Zu Einzelheiten zur Expression von Antikörpern in Bakterienzellen siehe unter anderem Collet et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10026–10030, und Huse et al., 1989, Science 246: 1275–1281.

[0061] Darüberhinaus ist die Quelle an Antikörper codierenden Regionen nicht auf jene beschränkt, die aus Hybridomzelllinien geclont wurden, bei denen die Spezifität der Antikörper bekannt und monoclonaler Natur ist. Es können vielmehr umfangreiche Antikörper-Genbanken herangezogen werden, um die Fusionsproteine in solcher Weise zu erzeugen, dass eine große Anzahl an Biotektoren zum Nachweis einer unbegrenzten Reihe an Antigenen erzeugt werden kann.

[0062] Die signaltransformierende Domäne. Die signaltransformierende Domäne kann aus einem Enzym oder der aktiven Domäne eines Enzyms bestehen, das eine beliebige Anzahl proteinmodifizierender Funktionen aufweist, welche eine Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und Proteaseaktivität einschliessen kann. Solche Enzyme umfassen unter anderem Proteinkinasen, Phosphorylasen, Proteinmethylasen, Acetylase, Protease, Proteinase K und Serinproteasen. In einer spezifischen Ausführungsform dieses Patents wird die aktive Domäne der bakteriellen Phosphorylase PhoQ in einer Genfusion mit einer Region einer cDNA einer schweren Kette eines Antikörpers fusioniert. Die Wechselwirkung des exprimierten Fusionsproteins mit dem Ziel-Antigen (Ligand) wird somit eine Konformationsänderung in der Antikörper-Phosphorylase-Fusion zur Folge haben, was wiederum die spezifische Phosphorylaseaktivität aktiviert, die die PhoP, ein Überträgerprotein, über einen Phosphorylierungs/Dephosphorylierungsvorgang, aktiviert. Aktive PhoP aktiviert den Pho-Promotor, welcher zur Steuerung der Expression des Lux-Reporter-Operons verwendet wird. Die den Überträger aktivierende Domäne des signalumwandelnden Elements ist dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Konformationsänderung oder eine Änderung der elektronischen Ladung erfährt, nachdem sie ein spezifisches Molekül gebunden hat, was die Aktivierung des Überträgers zur Folge hat. Der Überträger kann durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Methylierung-Elektronentransport, Wasserstofftransport, Carboxylierung, Dehydrierung, Oxidation/Reduktion oder jegliche andere chemische Modifikation aktiviert werden.

3. Überträger

[0063] Der Überträger wird durch das signalumwandelnde Element nach der Bindung des Liganden aktiviert. Der Überträger kann dabei ein beliebiges Molekül sein, welches in der Lage ist, eine Konformationsänderung, eine Änderung in der elektrischen Ladung, das Hinzufügen oder Abspalten einer chemischen Untergruppe, wie zum Beispiel eine Phosphorylierung oder eine Glycolysierung, zu erkennen und darauf zu reagieren, und somit wiederum eine nachweisbare Signalantwort auslösen kann.

[0064] In spezifischen Ausführungsformen der Erfindung löst der Überträger direkt oder indirekt die Aktivierung eines Transkriptionsaktivierungselements, wie zum Beispiel einen Promotor, aus, und löst so die Aktivierung eines Reportergens oder eines Reporter-Operons aus. Die Transkription und Translation des Reportergens oder -Operons hat wiederum die Bildung eines Genprodukts oder Genprodukten zur Folge, welche ein nachweisbares Signal, wie zum Beispiel Licht, erzeugen. In anderen Ausführungsformen kann die Aktivierung des Überträgers jedoch auch direkt ein sichtbares und messbares Signal zur Folge haben.

4. Reportergene und Operons

[0065] Eine große Vielfalt an Reportergenen oder Reporter-Operons kann angewendet werden, einschließlich solcher, die in Biolumineszenz, kolorimetrischen Reaktionen oder Fluoreszenz resultieren. Reportergene können beispielsweise Farbpigmente codieren (Bonhoeffer, 1995, Arzneimittelforschung 45: 351–356), wie zum Beispiel bakterielles Rhodopsin (Ng et al., 1995, Biochemistry 34: 879–890), Melanin (Vitkin et al., 1994, Photochemistry and Photobiology 59: 455–462), Äquorine (Molecular Probes, Seattle), grün fluoreszierende Proteine (GFP, Clontech, Palo Alto; Chalfie et al., 1994, Science 263: 802–805; Cubitt et al., 1995, TIBS 20: 448–455), gelb fluoreszierende Proteine (Daubner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 8912–8916), Flavine, Biflavinoide, Hämoglobin (Chance et al., 1995, Analytical Biochemistry 227: 351–362; Shen et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 8108–8112), Häm (Pieulle et al., 1996, Biochem. Biophys. Acta 1273: 51–61), Indigo-Farbstoff (Murdock et al., 1993, Biotechnology 11: 381–386), Peridinin-Chlorophyll-A Protein (PCP) (Ogata et al., 1994, FEBS Letters, 356: 367–371), oder Pyocyanin (al-Shibib und Kandeel, 1993, Acta Microbiologica Polonica 42: 275–280). Alternativ dazu können Reportergene Enzyme codieren, die ein farbabsorbierendes Substrat spalten, wie zum Beispiel β -Lactamase, lumineszente und fluoreszente Proteine, Enzyme mit fluoreszenten Substraten oder beliebige andere Gene, die einen optisch aktiven chemischen Stoff codieren, oder die ein Substrat in eine optisch aktive Verbindung umwandeln. In

einer weiteren Ausführungsform können Reporterogene Photoproteine codieren, wobei in jedem Fall der Reporter funktionell mit einem induzierbaren Promotor verbunden ist, der durch die aktive Form der Überträgerkomponente aktiviert wird.

[0066] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung werden biolumineszente Reporter angewendet.

[0067] Auf Biolumineszenz basierende Reporterogene und Operons. Es sind verschiedene Typen von biolumineszenten Reporterogenen bekannt, einschliesslich der Luciferase-Familie (zum Beispiel Wood et al., 1989, Science 244: 700–702). Mitglieder der Luciferase-Familie konnten in einer Vielzahl von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen identifiziert werden. Luciferase und andere an prokaryontischen Lumineszenz (lux)-Systemen beteiligte Enzyme, sowie die entsprechenden lux-Gene, konnten aus marinen Bakterien der Gattungen *Vibrio* und *Photobacterium* und aus terrestrischen Bakterien der Gattung *Xenorhabdus*, auch *Photorhalodus* genannt, isoliert werden. Ein Beispiel für einen das Luciferase (lux)-System enthaltenden eukaryontischen Organismus ist der Nordamerikanische Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Leuchtkäfer-Luciferase ist intensiv erforscht worden und wird in großem Umfang in ATP-Assays eingesetzt. Die cDNAs, die die Luciferasen einer anderen Art, des Schnellkäfers *Pyrophorus plagiophthalmus*, codieren, konnten cloniert und exprimiert werden (Wood et al., 1989, Science 244: 700–702). Dieser Käfer ist insofern ungewöhnlich, als verschiedene Mitglieder derselben Art verschiedenfarbige Lumineszenz aussenden. Es konnten vier Clonklassen mit einer 95–99 %igen Homologie mit einander isoliert werden. Sie senden Licht einer Wellenlänge von 546 nm (grün), 560 nm (gelb-grün), 578 nm (gelb) und 593 nm (orange) aus.

[0068] Luciferase benötigt eine Energiequelle, wie zum Beispiel ATP, NAD(P)H und dergleichen, sowie ein Substrat, wie zum Beispiel Luciferin, Decanal (bakterielle Enzyme) oder Coelentrizin und Sauerstoff.

[0069] Dem Luciferase-Enzym muss das Substrat Luciferin zugeführt werden, so dass es lumineszieren kann. Somit besteht ein zweckdienliches Verfahren, Luciferin bereitzustellen darin, nicht nur die Luciferase zu exprimieren, sondern ebenso die biosynthetischen Enzyme zur Synthese des Substrats Decanal. Damit ist bei Bakterien, die diese Proteine aus einem Lux-Operon exprimieren, Sauerstoff der einzige Stoff, der von außen zugeführt werden muss.

[0070] So kann beispielsweise das aus dem Bodenbakterium *Xenorhabdus luminescence* (Frackman et al., 1990, J. Bact. 172: 5767–5773) gewonnene Lux-Operon als Reporter-Operon verwendet werden,

da es transformierten *E. coli* die Fähigkeit verleiht, durch das Expressieren der zwei Untereinheiten der heterodimeren Luciferase und von drei zusätzlichen Proteinen, Photonen zu emittieren (Frackman et al., siehe vorstehend).

[0071] Die optimale Biolumineszenz von *E. coli* zur Expression der Lux-Gene von *X. luminescence* wurde bei 37°C beobachtet (Szittner und Meighen 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 16581–16587; Xi et al., *J. Bact.* 173: 1399–1405), was im Gegensatz zu den niedrigen Temperaturoptima der Luciferasen aus eukaryontischen und anderen prokaryontischen lumineszierenden Organismen steht (Campbell, 1988, *Chemiluminescence, Principles and Applications in Biology and Medicine* (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd. und VCH Verlagsgesellschaft mbH)). Somit kann ein Reporter-Operon gemäß der Beschaffenheit und den Anforderungen einer bestimmten Anwendung ausgewählt werden. Die Luciferase aus *X. luminescence* ist daher beispielsweise gut zur Verwendung als Marker in Untersuchungen an Tieren geeignet.

[0072] Luciferasevektor-Konstrukte können dahingehend angepasst werden, dass sie zur Transformation einer Vielfalt von Wirtszellen, einschliesslich der meisten Bakterienzellen und vieler Eukaryontenzellen verwendet werden können. Darüberhinaus können bestimmte Viren, wie zum Beispiel das Herpes- und das Vaccinia-Virus genetisch so manipuliert werden, dass sie Luciferase exprimieren. Kovas und Mettenlieter, 1991, *J. Gen. Virol.* 72: 2999–3008, beschreiben beispielsweise die stabile Expression des die Leuchtkafer-Luciferase codierenden Gens in einem Herpesvirus. Brasier und Ron, 1992, *Meth. In Enzymol.* 216: 386–396, beschreiben die Verwendung von Luciferasegen-Konstrukten in Säugerzellen. Die Luciferaseexpression aus Säugerzellen in Kultur wurde unter Verwendung von CCD-Bildgebung sowohl makroskopisch (Israel und Honigman, 1991, *Gene* 104: 139–145) als auch mikroskopisch (Hooper et al., 1990, *J. Biolum. and Chemilum.* 5: 123–130) untersucht.

C. Bildgebung von Licht emittierenden Biodetektoren

[0073] Die Bildgebung von Licht emittierende Biodetektoren kann auf verschiedene Art und Weise ermöglicht werden. Richtlinien für derartige bildgebende Verfahren, sowie spezifische Beispiele werden nachstehend beschrieben.

1. Photodetektor-Vorrichtungen

[0074] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der das von einem Biodetektor erzeugte Signal Licht ist, ist die Wahl eines Photodetektor-Bauelements mit einer genügen hohen Empfindlichkeit um die Bildgebung von schwachem Licht zu ermöglichen, ein wichtiger Gesichtspunkt. Darüber-

hinaus muss in Fällen, in denen der Biodetektor in einem lebenden Organismus verwendet wird, die Bildgebung innerhalb einer angemessenen Zeit geschehen, vorzugsweise in weniger als etwa dreißig (30) Minuten und das Signal eines solchen Bauelements zur Erstellung eines Bildes verwendet werden.

[0075] In Fällen, bei denen es möglich ist, lichtzeugende Einheiten zu verwenden, die äußerst hell sind, und/oder Licht emittierende Konjugate nachzuweisen, die nahe der Oberfläche des abzubildenden Gegenstandes oder Tieres angeordnet sind, kann eine Nachtsicht-Brille oder eine Standard-Videokamera mit hoher Empfindlichkeit, wie zum Beispiel eine Silicon Intensified Tube (SIT)-Kamera (zum Beispiel Hamamatsu Photonic Systems, Bridgewater, NJ) verwendet werden. Typischerweise wird jedoch eine empfindlichere Methode des Lichtnachweises benötigt.

[0076] Bei äußerst geringen Lichtmengen, wie sie beispielsweise in der Praxis der vorliegenden Erfindung häufig angetroffen werden, ist der Photonenfluss pro Einheitsfläche so gering, dass das zu erstellende Bild nicht mehr zusammenhängend erscheint. Stattdessen wird es von einzelnen Photonen dargestellt, die sowohl zeitlich als auch räumlich von einander unterscheidbar sind. Auf einem Bildschirm betrachtet, erscheint ein solches Bild als flimmernde Lichtpunkte, von denen jeder ein einzelnes nachgewiesenes Photon darstellt.

[0077] Durch Ansammlung dieser nachgewiesenen Photonen in einem digitalen Bildprozessor über die Zeit kann ein Bild erhalten und zusammengefügt werden. Die flimmernden Punkte können jedoch auch einzeln gezählt und numerisch erfasst werden, wobei der Rekonstruktionsschritt umgangen und somit die Analyse beschleunigt wird. Im Gegensatz zu herkömmlichen Kameras, wo dem Signal in jedem Bildpunkt ein Intensitätswert zugeordnet wird, hat bei der Bildgebung mittels Photonen-zähler die Amplitude des Signals keine Bedeutung. Das Ziel ist, lediglich das Vorhandensein eines Signals (Photon) nachzuweisen und das Auftreten des Signals in Bezug auf seinen Ort über die Zeit zu erfassen.

[0078] Wenigstens zwei Arten von Photodetektoren, wie sie untenstehend beschrieben werden, können Einzelphotonen nachweisen und ein Signal erzeugen, das von einem Bildprozessor analysiert werden kann.

[0079] Rauscharme Photodetektionsgeräte. Die erste Klasse stellt Geräte dar, die Empfindlichkeit durch die Verminderung des Hintergrundrauschens im Photonendetektor erreichen, im Gegensatz zur Verstärkung des Photonen-signals. Das Rauschen wird in erster Linie durch Kühlen der Detektoranordnung verringert. Die verwendeten Geräte schliessen

Ladungsgekoppelte Bauelemente (Charged Coupled Device (CCD))-Kameras ein, die als "backthinned" bezeichnet werden, oder gekühlte Kameras. In empfindlicheren Instrumenten wird die Kühlung durch die Verwendung von beispielsweise flüssigem Stickstoff erreicht, welcher die Temperatur der CCD-Anordnung auf etwa -120°C drückt. "Backthinned" bezieht sich auf eine ultradünne Rückenplatte, die die Weglänge, die ein nachzuweisendes Photon zurücklegen muss, verringert und somit die Quanteneffektivität steigert. Eine besonders empfindliche "backthinned" kälteerzeugende CCD-Kamera ist die "TECH 512", eine Kamera der 200 Serie, erhältlich von Photometrics, Ltd. (Tucson, AZ).

[0080] Photonenverstärkungs-Bauelemente. Eine zweite Klasse empfindlicher Photodetektoren schliesst Bauelemente ein, welche die Photonen verstärken, bevor diese auf dem Nachweisschirm auftreffen. Diese Klasse schliesst CCD-Kameras mit Verstärkern, beispielsweise Mikrokanal-Verstärker, ein. Ein Mikrokanal-Verstärker enthält im typischen Fall eine metallene Anordnung von zur Mattscheibe der Kamera senkrecht angeordneten und flächengleichen Kanälen. Die Mikrokanal-Anordnung ist zwischen abzubildender Probe, abzubildendem Gegenstand oder Tier und der Kamera angebracht. Die meisten der in die Kanäle der Anordnung eintretenden Photonen berühren eine Seite eines Kanals bevor sie wieder austreten. Eine über die Anordnung angebrachte Spannung führt zur Freisetzung vieler Elektronen aus jedem der Photonenzusammenstöße. Die Elektronen aus einem jeden solchen Zusammenstoß treten aus ihrem ursprünglichen Kanal in einem "Shotgun"-Muster aus und werden von der Kamera nachgewiesen.

[0081] Eine noch höhere Empfindlichkeit kann dadurch erreicht werden, dass verstärkende Mikrokanal-Anordnungen in Serie angeordnet werden, so dass Elektronen, die in der ersten Phase erzeugt wurden, wiederum in einem verstärkten Signal von Elektronen der zweiten Phase resultieren. Eine Steigerung der Empfindlichkeit wird jedoch auf Kosten der räumlichen Auflösung erreicht, welche mit jeder zusätzlichen Verstärkungsstufe abnimmt.

[0082] Ein Beispiel für einen auf einem Mikrokanal-Verstärker basierenden Einzelphoton-Nachweisgerät, das zur Verwendung der Erfindung geeignet ist, sind Geräte der C2400-Serie von Hamamatsu.

[0083] Bildprozessoren. Die von Photodetektoren erzeugten Signale, die Photonen zählen, müssen von einem Bildprozessor verarbeitet werden, um ein Bild zu erzeugen, das beispielsweise auf einem Bildschirm dargestellt oder von einem Videodrucker ausgedruckt werden kann. Derartige Bildprozessoren werden im typischen Falle als Teil eines Systems verkauft, das die oben beschriebenen empfindlichen

Photonen zählenden Kameras beinhaltet und sind daher von derselben Bezugsquelle erhältlich (zum Beispiel Photometrics Ltd. und Hamamatsu). Bildprozessoren anderer Händler können ebenso verwendet werden, jedoch muss meist mehr Mühe aufgewendet werden, um ein funktionsfähiges System zu erhalten.

[0084] Die Bildprozessoren werden im allgemeinen an einen PC, wie zum Beispiel einen IBM-kompatiblen PC oder einen Apple Macintosh (Apple Computer, Cupertino, CA), angeschlossen, welcher als Teil eines erworbenen Bildgebungssystems eingeschlossen sein kann oder nicht. Nachdem die Bilder in digitale Dateien überführt worden sind, können sie mit Hilfe einer Reihe von Bildbearbeitungsprogrammen (wie zum Beispiel "ADOBE PHOTOSHOP", Adobe Systems, Mountain View, CA), bearbeitet und gedruckt werden.

2. Erstellen einer Photonenemissions-Abbildung

[0085] In Fällen, wo auf Grund einer außergewöhnlich hellen lichterzeugende Einheit und/oder Lokalisierung von Licht emittierenden Konjugaten nahe der Oberfläche des abzubildenden Gegenstandes eine Nachtsicht-Brille oder eine Videokamera mit hoher Empfindlichkeit zur Erhaltung des Bildes verwendet wurde, wird das Bild einfach auf einem Videobildschirm dargestellt oder betrachtet. Falls gewünscht, kann das Signal aus der Videokamera über einen Bildprozessor geleitet werden, welcher einzelne Videorahmen zur späteren Analyse oder zum Druck speichern, und/oder die Bilder zur Analyse oder zum Druck auf einem Computer digitalisieren kann.

[0086] Wird jedoch ein photonenzählender Ansatz gewählt, so erzeugt die Messung der Photonenemission im Bildprozessor eine Reihe von Zahlen, die die Anzahl der in jedem Pixelort nachgewiesenen Photonen darstellt. Diese Zahlen werden verwendet, um ein Bild zu erzeugen, typischerweise durch Vereinheitlichung der Photonenzählungen (entweder auf einen festen, vorbestimmten Wert oder auf eine in einem beliebigen Pixel nachgewiesene Höchstzahl), und durch Umrechnung der vereinheitlichten Zahl in eine Helligkeit (Grauskala) oder in eine Farbe (Pseudofarbe), die auf einem Bildschirm abgebildet wird. In einer Pseudofarb-Darstellung ist die typische Farbzurordnung folgendermaßen: Pixeln mit der Photonenzahl null wird Schwarz zugeordnet, niedrigen Zahlenwerten wird Blau, und höheren Zahlenwerten werden Farben größerer Wellenlänge zugeordnet, bis hin zu Rot für den höchsten Photonenzahlenwert. Die Position der Farben auf dem Bildschirm stellt die Verteilung der Photonenemission und dementsprechend der Position der Licht emittierenden Konjugate dar.

[0087] Um einen Bezugsrahmen für die Konjugate zu erhalten, wird im typischen Falle ein Grauskalenbild des (immer noch immobilisierten) Gegenstands,

in dem die Photonenemission gemessen wurde, hergestellt. Ein solches Bild kann beispielsweise durch das Öffnen einer Tür in der Abbildungskammer oder dem Gehäuse bei gedämpftem Licht erzeugt werden, wobei die reflektierten Photonen gemessen werden (typischerweise ein Bruchteil der Zeit, die es bedarf, um Photonenemission zu messen). Das Grauskalenbild kann entweder vor der Messung der Photonenemission konstruiert werden oder danach.

[0088] Die Abbildung einer Photonenemission wird im typischen Fall einem Grauskalenbild überlagert um so ein zusammengesetztes Bild einer Photonenemission in Bezug auf den Gegenstand herzustellen.

[0089] Falls man die Ortsbestimmung und/oder das Signal eines Licht emittierenden Konjugats über einen bestimmten Zeitraum hinweg verfolgen will, um beispielsweise die Auswirkungen einer Behandlung auf die Verteilung oder Lokalisierung einer ausgewählten biokompatiblen Einheit zu protokollieren, kann die Messung der Photonenemission oder die Bildgebung in definierten Zeitintervallen wiederholt werden, um eine Reihe von Bildern zu erstellen. Die Zeitintervalle können von Picosekunden (in Kameras mit schnellem Verschluss) oder Sekunden bis zu Tagen oder Wochen mit integrierenden Kameras reichen.

D. Anwendungen

[0090] Spezifische Anwendungen der Biotektoren schließen die Diagnose von Krankheiten, den Nachweis von klinisch relevanten Stoffen, den Nachweis von umweltverschmutzenden Substanzen und den Nachweis von Verunreinigungen in Nahrungsmitteln ein. Darüberhinaus werden die Biotektoren der vorliegenden Erfindung eine Reihe anderer Anwendungen in der Grundlagenforschung und Entwicklung haben.

[0091] Diagnose von Infektionskrankheiten. Die Biotektoren können zum Nachweis von Antigenen in Körperflüssigkeiten, einschliesslich Blut und Urin, oder Geweben und anderen Flüssigkeiten verwendet werden. Geeignete Ziel-Antigene schliessen ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, bakterielle Krankheitserreger, virale Krankheitserreger, Pilz-Krankheitserreger, Serumproteine, Lymphokine, Cytokine, Cytotoxine, Interferone, β -2-Mikroglobulin, Immunglobuline, Peptide und Polypeptide.

[0092] Spezifische diagnostische Test, die gezielt auf bakterielle Krankheitserreger ausgerichtet sind, schliessen ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, die Diagnose von Lyme-Borreliose, Streptococcus, Salmonella, Tuberculosis, Staphylococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Listeria, Shigella, Proteus, Enterococci, Clostridium, Bordatella, Bartonella, Rickettsia, Chlamydia, Spirochetes. Diagnosti-

sche Test, die gezielt auf virale Krankheitserreger ausgerichtet sind, schliessen ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, den Nachweis von Retroviren, wie zum Beispiel HIV-1, HTLV-1, Hepatitisviren (HBV, HCV, HAV), Herpesviren, einschliesslich EBV, CMV, Herpes simplex I, Herpes simplex II, und HHV-6, Encephalitis, einschliesslich Japanisches Encephalitis-Virus, Östliches und Westliches Encephalitis-Virus, Rotavirus, alle bekannten und noch zu identifizierenden menschlichen und tierischen viralen Krankheitserreger und unkonventionelle Krankheitserreger, wie die mit der Alzheimer-Krankheit und Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung verbundenen Stoffe (Prionen). Pilz-Krankheitserreger, auf die die Tests gerichtet sind, schliessen ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, Cryptococcus, Histoplasmose, Coccidio- des, Candida, Giardia.

[0093] Nachweis anderer klinisch relevanter Stoffe. Anwendungen der Biotektoren können den Nachweis von klinisch relevanten Stoffen einschliessen, wie beispielsweise Zuckermoleküle, Fettsäuren, Proteine oder Mikroorganismen in Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Blut oder Urin, oder in Gewebe. Antigene, auf die der Nachweis gerichtet ist, können Enzyme einschliessen, die eine einwandfreie Organfunktion anzeigen, einschliesslich Laktatdehydrogenase, Harnstoff, Glucose, und andere kleine Moleküle, sowie Cytokine. Alpha-Fetoprotein kann gezielt zur Diagnose von Spina bifida nachgewiesen werden. Bestimmte Bakterienarten und andere Mikroorganismen können gezielt nachgewiesen werden, um ihre Verteilung in gemischten Populationen, wie zum Beispiel im Darm und in der Scheidenflora zu messen. Ein wichtiges diagnostisches Ziel zur Diagnose und Prognose einer Reihe von Krankheiten sind Lymphokine. Mittels herkömmlicher Verfahren ist es nicht leicht, ein Lymphokinprofil zu erstellen, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass seine Bestimmung eine weite Reihe ungekannter Aspekte in der Beziehung zwischen Erkrankung und Krankheitszustand aufklärt. Eine weitere wichtige medizinische Anwendung liegt in der Perinataldiagnose von genetischen Krankheiten, einschliesslich Mukoviszidose, Sichelzellenanämie, Down-Syndrom, Phenylketonurie, Adenosindesaminasemangel, Thalassämie, Mangel an Wachstumshormon, Veranlagung zu Krebs. Schliesslich können die Biotektoren eine Anwendung in der Live-Überwachung von beispielsweise Glucose- und Arzneistoffkonzentration finden.

[0094] Landwirtschaftliche und veterinärmedizinische Anwendungen. Alle vorstehend beschriebenen medizinischen Anwendungen können auch in der Veterinärmedizin angewendet werden.

[0095] Nachweis von Umweltverunreinigungen. Die Biotektoren können beispielsweise auch zum Nachweis von Verunreinigungen in der Wasserversorgung verwendet werden. Ausgewählte Ziele kön-

nen einschliessen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, Giardia, Cryptococcus, Legionella, Clostridia-Toxine, Enterobacter, E. coli, Protozoen, Schwermetalle. Weiterhin kann das Vorhandensein bestimmter Bakterien in Bodenpopulationen mit Hilfe der Biodetektoren gemessen werden; Bodenproben können abgesucht werden, um genetisch manipulierte Organismen, die in die Umwelt freigesetzt wurden, aufzuspüren.

[0096] Nachweis von Nahrungsmittelverunreinigungen. Die Biodetektoren können dazu eingesetzt werden, Verunreinigungen in Nahrungsmitteln zu identifizieren, einschliesslich, aber nicht auf diese beschränkt, Bakterien, wie zum Beispiel Salmonella, coliforme Bakterien, Staphylococcus, Clostridium und Pilzen.

[0097] Grundlagenforschung und Entwicklung. Die Biodetektoren finden zahlreiche Anwendungen in der Grundlagenforschung und Entwicklung. Beispiele schliessen ein ein Nachweissystem im Standard-Immunassay, wie zum Beispiel Western-Blots, ELISA, die Bestimmung von Lymphokinprofilen, den Nachweis von Verunreinigungen in Zellkulturen, einschliesslich Mycoplasma. Weiterhin können die Biodetektoren als Nachweissystem in Expressionsassays geeignet sein, zum Nachweis von Markern an Zelloberflächen, wie zum Beispiel CD4, CD8, Adhärenen.

[0098] Abiotische Biodetektoren. Bei bestimmten Anwendungen, bei denen Antigenität ein Problem darstellt (zum Beispiel in vivo), sind abiotische Biodetektoren wünschenswert. Beispiele schliessen den in vivo-Nachweis und die Lokalisierung von Infektionen, Gewebeschädigung und andere pathologische Befunde ein. Die Einkapselung des Biodetektor-Mechanismus in generell inerte Bilayervesikel oder Membranen oder in eine beliebige andere unbelebte und den vektorialen Metabolismus erhaltende Einheit (wie zum Beispiel Liposome) auf eine Weise, in der der Kontakt mit den Liganden Licht zur Folge hat, erlaubt die Verwendung dieses Systems in vivo.

[0099] Die nachstehend aufgeführten Beispiele erläutern die Erfindung im Einzelnen. Die folgenden Zubereitungen und Beispiele sind angegeben, um Fachleuten ein besseres Verständnis der vorliegenden Erfindung zu ermöglichen sowie die Ausführung der Erfindung zu erleichtern. Die Anwendungsbereiche der vorliegenden Erfindung sind jedoch nicht auf die als Beispiele angeführten Ausführungsformen beschränkt, welche lediglich als Illustrationen einzelner Aspekte der Erfindung gedacht sind, und Verfahren, die funktionsgemäß entsprechend sind, liegen innerhalb des Schutzbereichs der Erfindung. Für Fachleute werden sich in der Tat verschiedene Abwandlungen der Erfindung, zusätzlich zu den hierin beschriebenen, aus der vorhergehenden Beschreibung und

den beigefügten Abbildungen deutlich abzeichnen. Derlei Abwandlungen fallen in den Schutzbereich der nachfolgenden Patentansprüche.

VII. Beispiele

[0100] Die ersten drei Beispiele sind drei Methoden, die dazu eingesetzt werden können, die Signalübertragung mit der Expression eines spezifischen Gens zu verknüpfen.

A. Beispiel 1: Verknüpfung von Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens (Methode 1)

[0101] Folgendes Beispiel illustriert eine Methode, die verwendet werden kann, um die Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens zu verknüpfen.

[0102] Ein Transposon wird hergestellt, um Promotoren zu identifizieren, die durch die Bindung des Liganden an die an der Oberfläche exprimierte Ligan-den-bindenden Moleküle, zum Beispiel Antikörper, aktiviert werden. Zur Identifizierung einer Vielzahl von Regulations-Sequenzen in Bakterien wurden promotorlose Reportersysteme eingesetzt. Ronald et al., 1990, Gene 90: 145–148. Das Transposon besteht aus (i) (1) einem promotorlosen Operon, das die Gene für Biolumineszenz enthält, (2) einem selektierbaren Marker (Kanamycin-Resistenz-Gen; Kan) und (3) einem negativen Regulator (der Lambda-Repressor); (ii) einem zusätzlichen selektierbaren Marker (Chloramphenicol-Resistenz-Gen; Chl), der von dem Lambda-Operator expriert wird; und (iii) einem dritten selektierbaren Marker, der konstitutiv expriert wird (Ampicillin-Resistenz-Gen; Amp). Bakterienzellen, die den gewünschten Antikörper expriieren, werden mit dem Transposon transformiert. Die Konformationsänderung im Transmembran-Antikörper-Fusionsprotein signalisiert die Aktivierung oder chemische Abwandlung des Überträgers, der so gestaltet ist, dass er diese Meldung an die Promotorregion des lux-Konstrukts weiterleitet. Positive Transformanten werden durch Bestimmung der erlangten Amp-Resistenz ausgewählt. Zellen, die das Transposon hinter Promotoren enthalten, die in Gegenwart von Antigen aktiv sind (einschliesslich konstitutiver Expression), sind in Gegenwart des Antigens Kan-resistent, und Zellen, die das Transposon hinter Promotoren enthalten, die in der Abwesenheit von Antigen ausgeschaltet sind, sind in der Abwesenheit des Antigens Chl-resistent. Demnach können durch Durchlaufen einer Reihe von Wachstumsbedingungen die gewünschten Transformanten, die in entsprechender Weise Luciferase als Reaktion auf Antigene expriieren, bestimmt werden. Die Promotoren können dann gekennzeichnet und zur Herstellung zusätzlicher Biodetektoren verwendet werden.

[0103] **Fig. 4** stellt einen der in BEISPIEL 1 beschriebenen Biotektoren dar. Wie in **Fig. 4A** gezeigt, überträgt das Fusionsprotein in Abwesenheit eines Antigens kein Signal auf den Promotor, welcher die Expression der clonierten und durch das integrierte Transposon codierten Gene steuert. Daher ist der Phänotyp des vorgeschlagenen *E. coli* in Abwesenheit des Antigens Ampicillin-resistent, Chloramphenicol-resistent, Kanamycin-empfindlich, aber nicht biolumineszent. Die Ampicillin-Resistenz wird konstitutiv exprimiert, um so die Auslese des integrierten Transposons zu erhalten.

[0104] Wird jedoch der Promotor durch Binden des aktivierten Überträgers angeschaltet, welcher wiederum durch die Bindung des Liganden an das Fusionsprotein aktiviert wird, werden das Luciferase-Operon, das Kanamycin-Resistenz-Gen und der Lambda-Repressor exprimiert. Der Lambda-Repressor wirkt auf den Lambda-Operator und schaltet damit die Expression der Chloramphenicol-Resistenz-Gene aus. In Gegenwart des Antigens wird der Phänotyp der Zellen demnach durch Ampicillin-Resistenz, Kanamycin-Resistenz, Chloramphenicol-Resistenz und Biolumineszenz charakterisiert.

[0105] Somit erlaubt die Induktion und Aktivierung von Genen, wie vorstehend beschrieben, eine positive Auslese der gewünschten Reaktion auf ein Antigen. Spezifischer ausgedrückt, überleben nur diejenigen Bakterienzellen, welche das beschriebene Transposon an einer geeigneten Stelle im Genom integrieren, das Ausleseverfahren, während nichtreponsive Bakterien absterben.

B. Beispiel 2: Verknüpfung von Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens (Methode 2)

[0106] Das folgende Beispiel veranschaulicht eine zweite Methode, die dazu verwendet werden kann, die Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens zu verknüpfen.

[0107] Das Fusionsprotein, das aus der schweren Kette des Antikörpers und einem Oberflächenprotein, das dafür bekannt ist, Signale zur Genregulierung zu übertragen, besteht, und ein durch das Signal beeinflusster Promotor, werden vor dem Markergen angeordnet. Die leichten Ketten des Antikörpers werden im Biotektor mitexprimiert, um zusätzliche Ligandenspezifität bereitzustellen (Borrebaeck et al., 1992, *Biotechnology* 10: 697–698). Als anfängliche Transmembran- und signalübertragende Komponente der Genfusion wurde bakterielle Phosphatase ausgewählt, auf Grund ihrer gegenwärtigen Verwendung bei der Bestimmung von an der Oberfläche exprimierten Fusionsproteinen in Bakterien (Kohl et al., 1990, *Nucleic Acid Res.* 18: 1069; Weiss und Orfanoudakis, 1994, *J. Biotechnol.* 33: 43–53), und da ein

kolorimetrisches Substrat zur Messung der Phosphataseaktivität erhältlich ist. Fusionen zwischen Antikörperfragment und Phosphatase wurden erzeugt unter Beibehaltung sowohl der Liganden-bindenden Spezifität wie auch der Phosphataseaktivität (Kohl et al., 1991, *Acad. Sci.* 646: 106–114; Wels et al., 1992, *Biotechnology* 10: 1128–1132). Die Phosphatase-Antikörper-Fusionen wurden dazu verwendet, markierte Antikörper für einen Immunassay zu erzeugen (Carrier et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 181: 177–186; Ducancel et al., 1993, *Biotechnology* 11: 601–605; Weiss et al., 1994, *J. Biotechnol.* 33: 43–53; Weiss und Orfanoudakis, 1994, *J. Biotechnol.* 33: 43–53; Wels et al., 1992, *Biotechnology* 10: 1128–1132). Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Fusion von Antikörpern an modifizierte bakterielle Phosphatase die Phosphatasefunktion verändert wird (Brennan et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5783–5787), was darauf hindeutet, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen die Phosphataseaktivität am wahrscheinlichsten durch Konformationsänderungen im Phosphatasemolekül regulieren. Die Expression von Phosphatase-Fusionsproteinen an der Oberfläche von Bakterienzellen überträgt ein Signal, Phosphorylierung, in die Zelle hinein, welches die Expression eines spezifischen Gens auslöst. Dieses System kann dahingehend modifiziert werden, dass die Expression der Markerproteine, Luciferase und ihre zugehörigen Proteine, eng mit der Bindung des Liganden an das Antikörper-Phosphatase-Fusionsprotein verknüpft ist, das heisst ein Liganden-abhängiger molekularer Schaltmechanismus.

C. Beispiel 3: Verknüpfung von Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens (Methode 3)

[0108] Das folgende Beispiel veranschaulicht eine dritte Methode, die dazu verwendet werden kann, die Signalübertragung mit der Regulierung eines spezifischen Gens zu verknüpfen.

[0109] Die in den BEISPIELEN 1 und 2 beschriebenen Methoden können unter Verwendung des oben beschriebenen Transposons in Zellen, die die Phosphatase-Antikörper Fusionen exprimieren, miteinander kombiniert werden.

[0110] Ein Bakterienstamm mit einem Reporter-gen, das mit einem induzierbaren Promotor verknüpft ist, wird etabliert, wobei der Promotor spezifisch auf die Aktivierung eines Überträgermoleküls, zum Beispiel die des Pho-Operons, reagiert. Eine Antikörperreservoir-Bank, die in einen Vektor cloniert wurde, der den Antikörper an ein Pho-Membranprotein fusioniert, kann dann in den obengenannten Bakterienstamm eingefügt werden. Diese Bank an Biotektoren kann dann gegenüber spezifischen gewünschten Molekülen, getestet werden, um den passenden Biotektor nachzuweisen und auszuwählen. Der so erhaltene

Biodetektor kann dann in großen Mengen vervielfältigt werden.

D. Beispiel 4: Nachweis von Substanzen in Lösung

[0111] Folgendes Beispiel ist eine veranschaulichende Anordnung zum Nachweis von Liganden, einschliesslich viraler und bakterieller Antigene in Lösungen, wie zum Beispiel Vollblut oder Plasma.

[0112] Proben, die den nachzuweisenden und zu quantifizierenden Liganden enthalten, werden in Platten mit 96 Vertiefungen zusammen mit Referenz-Standards verdünnt (zweifache Serienverdünnungen). Der spezifische Biodetektor wird als lebende aktive Zelle jeder der Vertiefungen zugegeben und sofort analysiert. Biolumineszente Signale aus der Platte werden unter Verwendung eines CCD-Detektors (CCD-Kamera) oder eines Luminometers im 96-Vertiefungsformat nachgewiesen. Zur quantitativen Bestimmung wird die relative Biolumineszenz der unbekannten Proben auf einer Standardkurve aufgetragen.

E. Beispiel 5: Nachweis von Substanzen auf einem festen Träger

[0113] Folgendes Beispiel ist eine veranschaulichende Anordnung zum Nachweis von Substanzen auf einem festen Träger, wie zum Beispiel Nitrocellulose oder Nylonmembranen, zum Beispiel in Western-Blot-Analysen, unter Verwendung eines spezifischen Biodetektors.

[0114] Nach der Übertragung der Proteine auf feste Träger (PVDF Immobilon Membran, Millipore) unter Verwendung von Standardverfahren, wird die Membran getrocknet und in ein Gefäß überführt, welches den spezifischen Biodetektor als biologisch aktive Zelle in Minimalmedium oder einem anderen klaren, mit Nährstoffen für den bakteriellen Metabolismus versetzten Puffer enthält. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Membran versiegelt entnommen und in noch nassem Zustand in eine hitze- oder luftdicht versiegelbare Plastiktüte überführt. Das Biolumineszenzsignal, das von den an die Membran gebundenen Biodetektoren ausgeht, wird unter Verwendung eines Röntgenfilms, eines CCD-Detektors oder eines anderen lichtempfindlichen Nachweisverfahrens nachgewiesen. Die Signale können unter Verwendung von Standard-Bildanalyse-Software quantitativ erfasst werden.

F. Beispiel 6: Wirkung von menschlichem Blut auf die Lichtemission von biolumineszierender Salmonella

[0115] Wie im folgenden Beispiel dargestellt wird, können weniger als zehn (10) Bakterienzellen mit einem verstärkten CCD-Detektor nachgewiesen werden.

[0116] Zweifache Reihenverdünnungen des *Salmonella*-Stamms LB5000, welcher mit einem die konstitutive Expression des Luciferase-Operons übertragenden Plasmid transformiert worden war, wurden in zweifacher Ausfertigung auf Platten mit 96 Vertiefungen ausgestrichen. Verdünnungen wurden in 30 µl Wachstumsmedium allein (als L65000 angegeben) und mit 30 µl Blut hergestellt, um die Auswirkungen von Blut als streuendes und absorbierendes Medium auf die Nachweisgrenzen festzustellen. Jede durch Ausplattieren der Proben aus konzentrierten Vertiefungen abgeleitete Verdünnung sowie die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (colony forming units CFU) sind in [Fig. 5](#) aufgezeigt. Die relative Biolumineszenz für jede Vertiefung, wie sie durch die Analyse des mit Hilfe des CCD-Detektors erzeugten Bildes bestimmt wurde, wird gezeigt ([Fig. 5](#)). Das Signal aus den stärker konzentrierten Vertiefungen ging über den Anschlagpunkt hinaus, und die Zahlen bei höheren Konzentrationen sind daher nicht linear.

Patentansprüche

1. Biodetektor für den Nachweis einer ausgewählten Substanz, umfassend:

(a) ein signalumwandelndes Element, welches einen extrazellulären Liganden-spezifischen Rest und eine intrazelluläre signaltransformierende Domäne umfasst, wobei der extrazelluläre Liganden-spezifische Rest die ausgewählte Substanz selektiv erkennt, wobei die Erkennung die intrazelluläre signaltransformierende Domäne aktiviert;

(b) einen Überträger, wobei der Überträger eine inaktive und eine aktive Form hat, welche sich voneinander unterscheiden, und wobei die aktivierte intrazelluläre signaltransformierende Domäne die inaktive Form des Überträgers in die aktive Form des Überträgers umwandelt; und

(c) ein responsives Element, welches funktionell mit einem Reporter gen verbunden ist, wobei das responsive Element durch die aktive Form des Überträgers aktiviert wird, woraus ein nachweisbares Signal resultiert.

2. Biodetektor nach Anspruch 1, wobei das responsive Element ein Transkriptionsaktivierungselement umfasst, welches durch die aktive Form des Überträgers aktiviert wird.

3. Biodetektor nach Anspruch 2, wobei das responsive Element weiterhin eine Nucleinsäure umfasst, welche ein Genprodukt oder eine Vielzahl von Genprodukten codiert, wobei das Genprodukt oder die Genprodukte das nachweisbare Signal erzeugen, und wobei die Nucleinsäure funktionell mit dem Transkriptionsaktivierungselement verbunden ist.

4. Biodetektor nach Anspruch 3, wobei das nachweisbare Signal Licht ist.

5. Biotektor nach Anspruch 3, wobei das Genprodukt durch Mittel nachweisbar ist, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Biolumineszenz, kolorimetrischen Reaktionen oder Fluoreszenz.

6. Biotektor nach Anspruch 3, wobei die Nucleinsäure ein Luciferase-Operon umfasst.

7. Biotektor nach Anspruch 6, wobei das intrazelluläre signaltransformierende Element ein Membransignalüberträger ist.

8. Biotektor nach Anspruch 7, wobei der Membransignalüberträger ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus bakteriellen Zweikomponenten-regulatorischen Systemen, eukaryontischen Rezeptor-vermittelten Signalüberträgern, prokaryontischen Rezeptor-vermittelten Signalüberträgern.

9. Biotektor nach Anspruch 6, wobei die Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mikroorganismus, Virus, Retrovirus, Protein, Zucker, Ion.

10. Verfahren zum Nachweis einer ausgewählten Substanz, umfassend:

(a) Erzeugen eines Biotektors, umfassend:

(i) ein signalumwandelndes Element, welches einen extrazellulären Liganden-spezifischen Rest und eine intrazelluläre signaltransformierende Domäne umfasst, wobei der extrazelluläre Liganden-spezifische Rest die ausgewählte Substanz selektiv erkennt, wobei die Erkennung die intrazelluläre signaltransformierende Domäne aktiviert;

(ii) einen Überträger, wobei der Überträger eine inaktive und eine aktive Form hat, welche sich voneinander unterscheiden, und wobei die aktivierte intrazelluläre signaltransformierende Domäne die inaktive Form des Überträgers in die aktive Form des Überträgers umwandelt; und

(iii) ein responsives Element, welches funktionell mit einem Reportergen verbunden ist, wobei das responsive Element durch die aktive Form des Überträgers aktiviert wird, woraus ein nachweisbares Signal resultiert;

(b) Hinzufügen des Biotektors zu einer Probe;

(c) Messen und Quantifizieren des nachweisbaren Signals; und

(d) In Beziehung setzen der Höhen des nachweisbaren Signals mit dem Vorhandensein und der Menge der Substanz.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das responsive Element des Biotektors ein Transkriptionsaktivierungselement umfasst, welches durch die aktive Form des Überträgers aktiviert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das responsive Element weiterhin eine Nucleinsäure umfasst, welche ein Genprodukt oder eine Vielzahl von

Genprodukten codiert, wobei das Genprodukt oder die Genprodukte das nachweisbare Signal erzeugen und wobei die Nucleinsäure funktionell mit dem Transkriptionsaktivierungselement verbunden ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das nachweisbare Signal Licht ist.

14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Genprodukt durch Mittel nachweisbar ist, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Biolumineszenz, kolorimetrischen Reaktionen oder Fluoreszenz.

15. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Nucleinsäure ein Luciferase-Operon umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mikroorganismus, Virus, Retrovirus, Protein, Zucker, Ion.

17. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das nachweisbare Signal durch ein Lichtnachweissystem nachgewiesen wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Lichtnachweissystem ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Luminometer, Spektrophotometer, Fluorimeter, CCD-Detektor.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der Biotektor oder die Probe auf einem festen Träger angebracht sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, welches weiterhin das Anbringen einer Reihe von Biotektoren in einer geordneten Anordnung auf einem festen Träger einschließt, so dass eine Vielfalt von Substanzen, die in einer Probe enthalten sind, nachgewiesen werden können.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

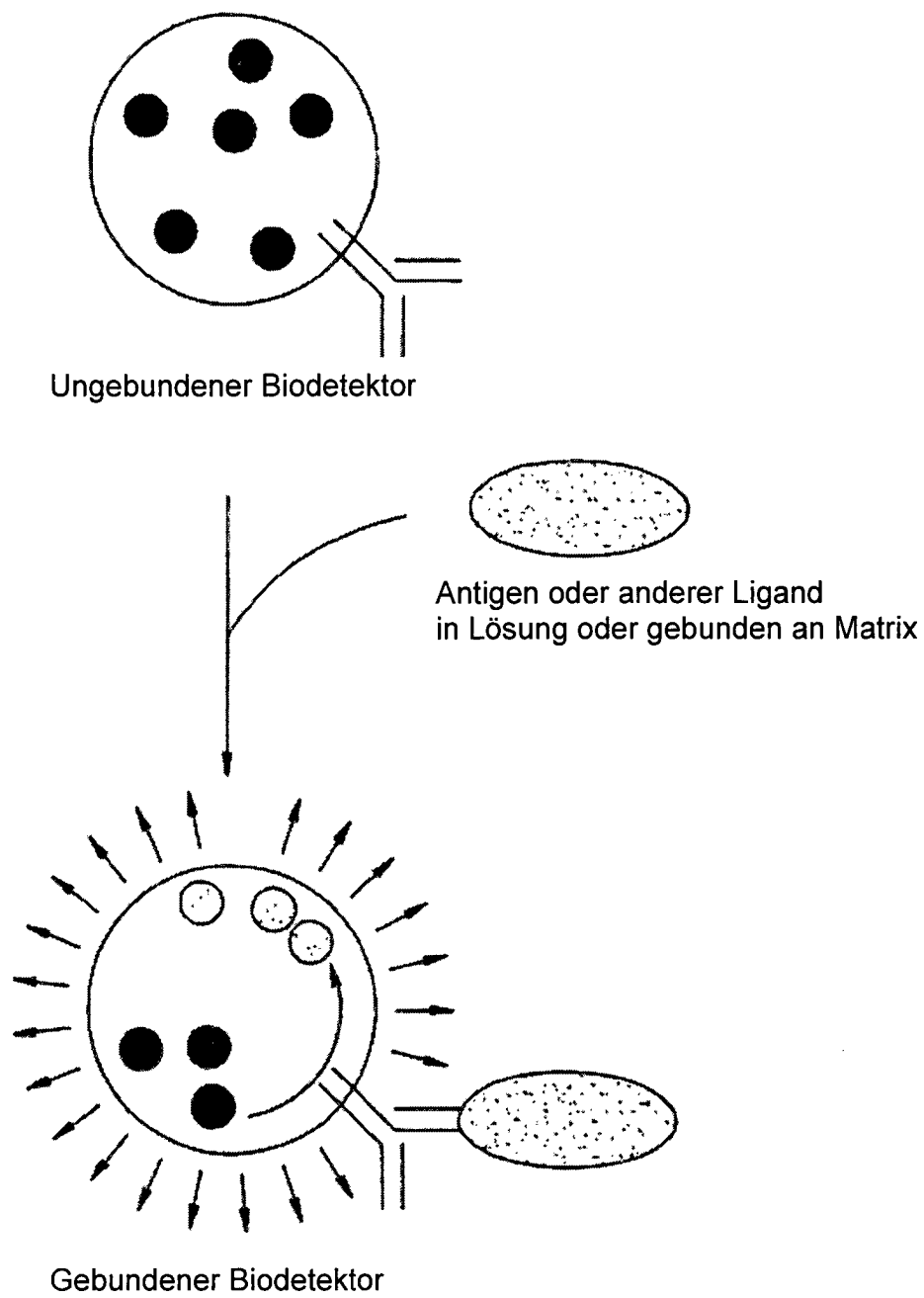


FIG. 1

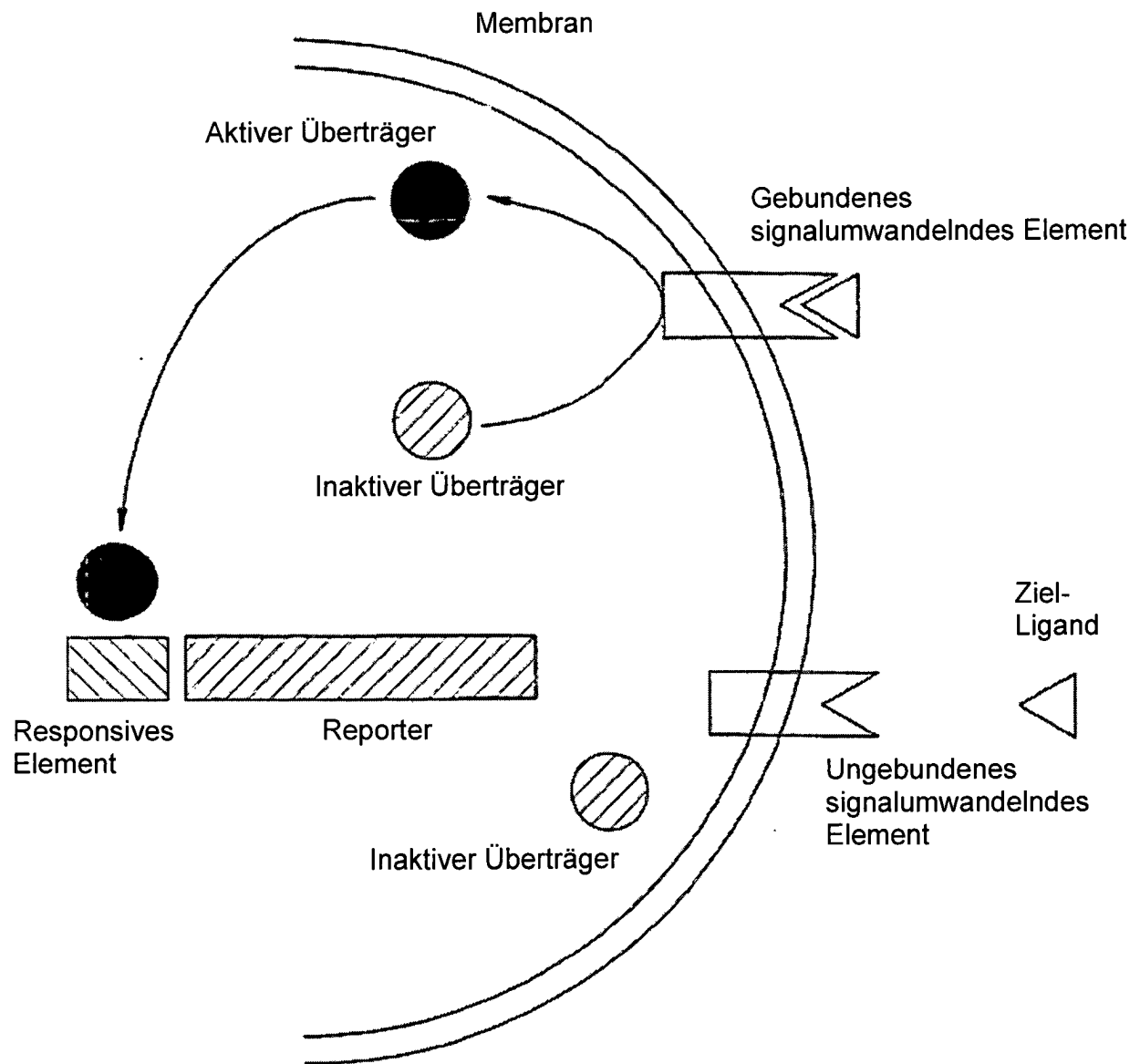


FIG. 2

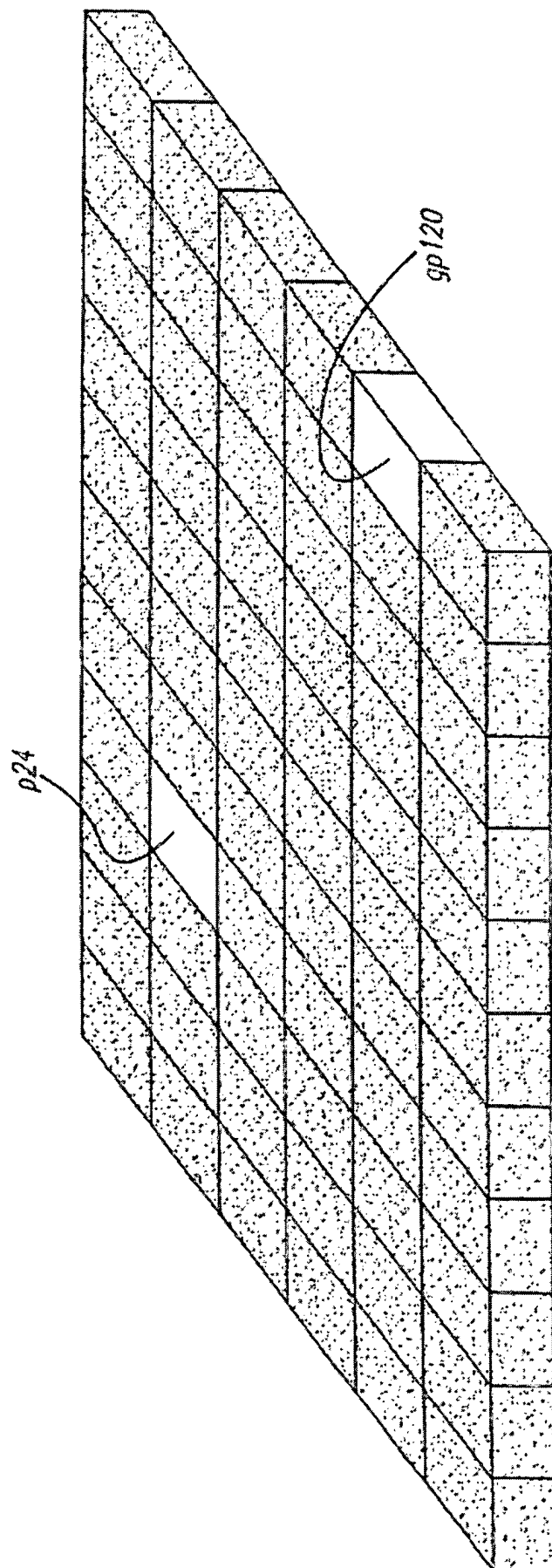


FIG. 3

Auswirkung von menschlichem Blut auf ein
Signal von biolumineszierender *Salmonella*

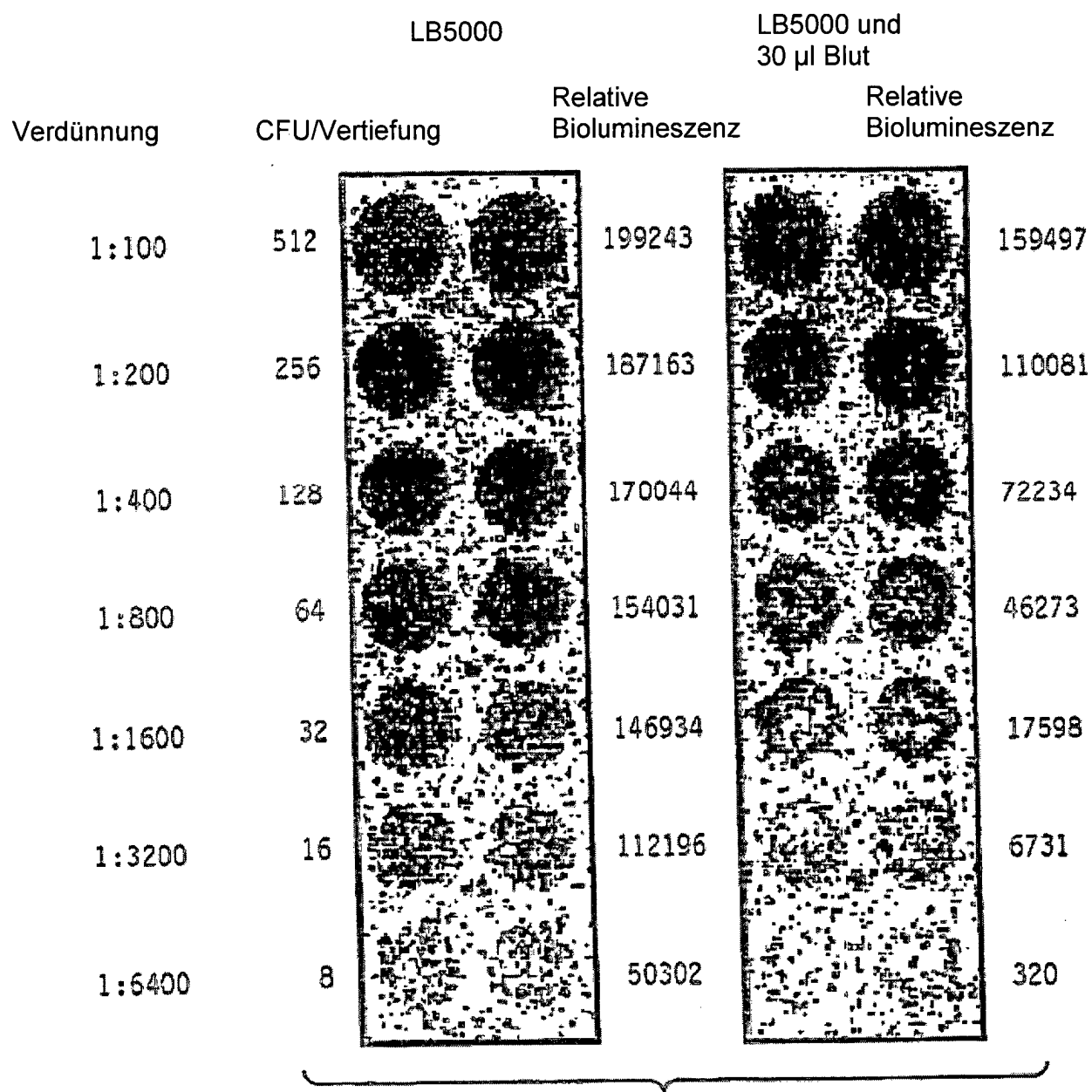


FIG. 5