

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. November 2018 (15.11.2018)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2018/206445 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/34 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2018/061557

(22) Internationales Anmeldedatum:

04. Mai 2018 (04.05.2018)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2017 004 606.9

12. Mai 2017 (12.05.2017) DE

(71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V. [DE/DE]; Hansastr. 27 C, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: SCHMIDT, Jennifer; Steinerstr. 11, 93167 Fal-
kenstein (DE). TRUPP, Sabine; Zur Viehtreibe 14, 07318
Saalfeld (DE).

(74) Anwalt: VOGELSANG-WENKE, Heike; Grünecker Pa-
tent- und Rechtsanwälte PartG mbB, Leopoldstr. 4, 80802
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE DETECTION OF CARBAPENEMASE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS VON CARBAPENEMASE

(57) Abstract: The invention relates to a method and a device for the phenotypic detection of carbapenemases and carbapenemase producers by adding a substrate of general formula A-(L)-M₁-(X)-Z, where M₁ is a carbapenem backbone, A or Z is a quencher, the other one of the two, Z or A, is a fluorophore, L is an optional linker, X is an optional leaving group for linking Z to the carbapenem backbone, and Z is an optional leaving group, to a sample suspected of containing such carbapenemase producers and/or carbapenemases. The invention further relates to a method for the phenotypic detection of resistant bacteria, in particular 3MRGN or 4MRGN, by releasing the enzymes of a bacterial culture into a lysate during lysis and then subjecting the lysate, as the sample to be analyzed, to an aforementioned method in order to phenotypically detect the presence of resistance-promoting carbapenemases.

(57) Zusammenfassung: Durch die Erfindung werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und Carbapenemase-Bildnern bereitgestellt, indem einer Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemase-Bildner und / oder Carbapenemasen enthält, ein Substrat der allgemeinen Formel A-(L)-M₁-(X)-Z worin M₁ ein Carbapenem Grundgerüst ist, einer von A oder Z ein Quencher, der andere von A oder Z ein Fluorophor, L ein fakultativer Linker, X eine fakultative Abgangsgruppe zur Verknüpfung von Z mit dem Carbapenem Grundgerüst und Z eine fakultative Abgangsgruppe ist, zugegeben wird. Weiter gibt die Erfindung ein Verfahren zum phänotypischen Nachweis resistenter Bakterien, insbesondere 3 MRGN oder 4MRGN, an, indem die Enzyme einer bakteriellen Kultur bei einer Lyse in ein Lysat freigesetzt werden und anschließend das Lysat als zu untersuchende Probe einem vorgenannten Verfahren unterzogen wird, um das Vorhandensein resistenzvermittelnder Carbapenemasen phänotypisch nachzuweisen.



WO 2018/206445 A1

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS VON CARBAPENEMASE

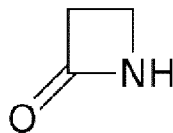
Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren sowie auf eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase und Carbapenemase-Bildnern. Ferner bezieht sie sich auf ein Verfahren zum phänotypischen Nachweis Antibiotika-resistenter Bakterien, wie beispielsweise Enterobacteriaceae, welche die vorgenannten resistenzvermittelnden Carbapenemasen bilden. Schließlich bezieht sich die Erfindung auch auf verschiedene Verwendungen der vorbeschriebenen Verfahren sowie auf ein markiertes Substrat zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase-Bildnern, welches zum Einsatz in den vorbeschriebenen Verfahren geeignet ist.

Hintergrund der Erfindung

Multiresistente gramnegative Stäbchenbakterien (MRGN), wie *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. oder *Enterobacteriaceae* (z. B. *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*), treten in den letzten Jahren immer häufiger als Erreger nosokomialer Infektionen in Erscheinung und sind heute vielerorts von größerer klinischer Bedeutung als multiresistente grampositive Bakterien (MRSA, MRSE). Die Übertragung von MRGN erfolgt durch direkten Kontakt mit infizierten Personen oder durch Weitergabe über das Pflegepersonal. Zudem ist die ausgeprägte Umweltpersistenz der MRGN problematisch. Diese Bakterien können auch auf unbelebten Oberflächen verweilen und sich über kontaminierte Gegenstände ausbreiten.

Unter den bevorzugten antibakteriellen Verbindungen, die als therapeutische Substanz verwendet werden können, sind β -Lactam-Antibiotika, welche als gemeinsames chemisches Merkmal einen β -Lactam-Ring als zentrale Struktur, also das Strukturelement



enthalten, welches in verschiedenen Stellungen des Ringes substituiert sein kann oder mit anderen Ringen oder Ringsystemen, die für sich wiederum substituiert oder unsubstituiert sein können, kondensiert sein kann. Beispiele solcher β -Lactam-Antibiotika sind Penicilline, Cephalosporine, Penam, Carbapeneme, Carbapenam und monocyclische β -Lactame.

Die antibakterielle Wirkung zahlreicher β -Lactam-Antibiotika beruht darauf, dass sie in die Synthese der bakteriellen Zellwand eingreifen, indem sie die Murein-Synthese und damit die Quervernetzung der bakteriellen Zellwand inhibieren. Der β -Lactam-Ring öffnet sich im Zytosol des exponierten Bakteriums und bindet in der geöffneten Form irreversibel an das für die Quervernetzung der Peptidoglykane benötigte bakterielle Enzym D-Alanin-Transpeptidase. Das Enzym wird vor allem bei sich teilenden Bakterien benötigt, da bei diesen die starre Zellwand geöffnet und teilweise neu synthetisiert werden muss. Durch die irreversible Bindung an die D-Alanin-Transpeptidase kann keine Zellwand mehr synthetisiert werden, und das Bakterium verliert seine wichtigste Schutzhülle. Daneben kommt es durch den ständigen Auf- und Abbau der defekten Zellwand zu toxischen Abbauprodukten, das befallene Bakterium stirbt schließlich ab.

MRGN, aber auch Gram positive Erreger wie multiresistente Staphylococcus Bakterien (z.B. MRSA und MRSE) sind jedoch in der Lage resistenzvermittelnde Enzyme, wie β -Lactamase und/oder Carbapenemase, zu bilden. Diese Enzyme spalten den β -Lactam-Ring des Antibiotikums hydrolytisch, woraufhin keine Bindung mehr zu den Proteinen der letzten Schritte der Biosynthese des Peptidoglykans in der bakteriellen Zellwand möglich ist und die antibiotische Wirksamkeit verloren geht. Bei einer Erhöhung der Konzentration von β -Lactam-Antibiotikum wird auch das spaltende Enzym vermehrt von MRGN gebildet.

Nachdem noch vor einigen Jahren Carbapenem-Resistenz bei Enterobacteriaceae und klinisch wichtigen Nonfermentern überwiegend in Südosteuropa, im Nahen Osten und Südostasien nachgewiesen wurden, häufen sich nun mehr auch in Deutschland Probleme mit Carbapenem-Resistenz. Es werden zunehmend Infektionen durch solche Erreger als importierte Pathogene beobachtet. Bei Enterobacteriaceae wird eine Carbapenem-Resistenz häufig durch Bildung einer Carbapenemase verursacht. Carbapenemasen sind besonders potente β -Lactam-Ring-spaltende Enzyme, die neben Penicillinen und Cephalosporinen auch Carbapeneme unterschiedlich stark hydrolysieren und damit inaktivieren können.

Die MRGN-Definition der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert-Koch-Institut (KRINKO) basiert auf der phänotypischen Resistenz gegen Leitsubstanzen aus den vier wichtigsten Antibiotikagruppen, die bei schweren Infektionen mit gramnegativen Stäbchenerregern (MRGN) eingesetzt werden: Acylaminopenicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Chinolone. Erreger werden als 3MRGN bezeichnet, wenn sie gegen drei der oben genannten Antibiotikagruppen resistent sind. Erreger werden als 4MRGN eingruppiert, wenn sie unabhängig von der Erregerart gegen alle vier Antibiotikagruppen resistent sind.

Antibiotika, die als Standardtherapeutika eingesetzt werden, sind also bei 3MRGN- oder 4MRGN-Infektionen ganz oder weitgehend unwirksam. Deshalb ist es notwendig, Infektionen mit multiresistenten Erregern sehr schnell nachzuweisen, um die richtige Therapie mit einem der wenigen noch vorhandenen Reserveantibiotika möglichst früh einleiten zu können. Ein weiterer wichtiger Grund für den Bedarf an schnellen Verfahren zum Nachweis von Keimen, die β -Lactam-Ring spaltende Enzyme (wie β -Lactamase oder Carbapenemase) bilden, ist, dass frühzeitig besondere hygienische Maßnahmen eingeleitet werden müssen, um die Verbreitung solcher Problemkeime zu verhindern. Konventionelle Nachweisverfahren sind jedoch zum Teil sehr zeit- und arbeitsintensiv und nicht in der Lage für alle β -Lactam-Ring spaltenden Enzyme zuverlässige Ergebnisse zu liefern.

Dies gilt insbesondere für konventionelle, mikrobiologisch-kulturelle Verfahren, bei denen verdächtige Proben zur Identifikation der Keime zunächst auf klassischen Nährmedien, wie z.B. festen Agarplatten, angezüchtet (kultiviert) und phänotypisch differenziert werden. Solche mikrobiologisch-kulturellen Verfahren sind in der Regel erst nach ca. 48 Stunden (im Falle eines negativen Befundes, d.h. ohne oder mit nicht relevantem Wachstum) oder erst nach ca. 48 bis 72 Stunden (bei relevantem Nachweis) in der Lage, ein Ergebnis zu liefern. Diese langen Bearbeitungszeiten sind jedoch, insbesondere wenn es sich um die Untersuchung klinischer Proben von beispielsweise hochgradig immungeschwächten Menschen, Säuglingen oder von Patienten auf der Intensivstation handelt, nicht tolerierbar, da hier potenziell keine Therapieoptionen mehr zur Verfügung stehen und oftmals jede Minute zählt.

Seit einiger Zeit stehen auch chromogene Nährmedien zur Verfügung, welche unter den Markennamen "CHROMagar Orientation" (Fa. Becton Dickinson) und "CPS ID2" (Fa. bioMérieux) erhältlich sind. Durch den Zusatz von speziellen Chromogenen werden entsprechend der Enzymaktivität des Keimes verschiedenfarbige Verbindungen freigesetzt (z.B. Bildung von braunen, blauen oder rosafarbenen Kolonien). Solche Medien sind jedoch speziell für die Harndiagnostik entwickelt und dienen in erster Linie der vorläufigen und raschen Identifizierung der wichtigsten Erreger von Harnwegsinfekten. Eine alleinige Verwendung von chromogenen Nährmedien zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen ist aber nicht ausreichend. Eine Zuordnung der Keime in Gruppen ist zwar möglich, eine exakte Speziesidentifizierung jedoch nicht.

Neben der Keimidentifizierung auf klassischen oder chromogenen Nährmedien stehen neue, leistungstärkere und schnellere massenspektrometrische Methoden (z.B. mittels eines MALDI-TOF-Massenspektrometers) zur Verfügung. Die Identifizierung der Bakterien kann hiermit nach ca. 24 Stunden Inkubation erfolgen. Danach wird ein Antibiotogramm (Antibiotikaempfindlichkeitstest) zur Auswahl geeigneter Antibiotika für die Therapie durchge-

führt. Dies dauert weitere ca. 24 Stunden. Bestätigt sich der Verdacht eines ESBL (extended spectrum β -Lactamase)- oder Carbapenemase-positiven Erregers, sind zusätzlich Bestätigungstests obligatorisch, z.B. mittels eines PCR-Nachweisverfahrens (PCR: Polymerasekettenreaktion) zur genotypischen Resistenzbestimmung und/oder mittels zusätzlicher standardisierter Bestimmungen der minimalen Antibiotika-Hemmkonzentrationen (Agardiffusionstest, Epsilometer-Test). Trotz fortschreitender Automatisierung der Verfahren zur Sensibilitätstestung kann eine Therapie zur Behandlung von MRGN also in jedem Fall frühestens nach ca. 48 Stunden beginnen.

Zum schnellen und direkten Nachweis von Carbapenemasen im Probenmaterial oder als Kulturbestätigungstest stehen zudem molekulargenetische Nachweissysteme zur Verfügung, die unter den Markennamen "Xpert Carba-R" (Fa. Cepheid GmbH) oder "eazypex SuperBug complete" (Fa. Amplex BioSystems GmbH) als entsprechende Kits kommerziell erhältlich sind. Allerdings erschwert die große genetische Variabilität und Flexibilität der β -Lactamase exprimierenden Gene den genotypischen Nachweis. Durch eine Mutation innerhalb der β -Lactamase exprimierenden Gene sind nämlich auch Bakterien mit veränderten Genen in der Lage, die extended spectrum β -Lactamase (ESBL) zu produzieren. Demzufolge existiert keine einheitliche Zielsequenz zum Nachweis aller ESBL- und/oder Carbapenemase-Gene und molekulargenetische Nachweisverfahren erlauben somit nur bedingt die Vielzahl an bekannten ESBL-assoziierten Gene und Genvarianten nachzuweisen.

Mit dem unter dem Markennamen "RAPIDEC CARBA NP" von der Fa. bioMérieux vertriebenen Schnelltest ist seit kurzem ein weiteres, biochemisches Nachweisverfahren auf dem Markt, welches den Nachweis auf Vorhandensein von Carbapenemase-bildenden Bakterien auf Basis einer Änderung des pH-Wertes im Wachstumsmedium erbringt. Diese pH-Änderung entsteht durch die Spaltung eines β -Lactam-Ringes und soll einen schnellen Carbapenemase-Nachweis ermöglichen, kritisch ist jedoch von vorneherein die Tatsache, dass die Änderung des pH-Wertes ein sehr unspezifischer Indikator ist. So scheiden Bakterien bei der Verstoffwechselung von Nährstoffen ebenfalls Säuren aus, die das Ergebnis beeinflussen können. Zudem werden Inkubatoren oftmals mit Kohlenstoffdioxid begast, welches sich in wässrigen Medien zum Teil unter Bildung von Kohlensäure löst. Darüber hinaus ist der pH-Wert von Puffersystemen, in denen der Test durchgeführt wird, oftmals temperaturabhängig und kann somit auch das Testergebnis beeinflussen. Bei all dem ist zu befürchten, dass mit diesem Test insbesondere bei komplexen klinischen Probenmaterialien keine eindeutigen und verlässlichen Ergebnisse geliefert werden können.

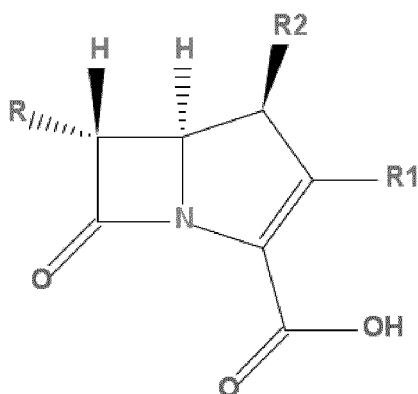
Es besteht somit ein Bedarf an Mitteln und Verfahren, welche schnell und spezifisch die Aktivität von ESBL- und / oder Carbapenemase-Enzymen, unabhängig von der genauen Identität des diese ESBL- und / oder Carbapenemase bildenden Erregers in klinisch relevanten Proben nachweisen können.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung wurde vor dem Hintergrund des vorstehend beschriebenen Standes der Technik gemacht, wobei es Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und Carbapenemase-Bildnern bereitzustellen, welche den Carbapenemase-Nachweis auf spezifische, schnelle und verlässliche Weise auch im Falle von komplexem (klinischem) Probenmaterial ermöglichen. Außerdem ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein entsprechendes Substrat zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und Carbapenemase-Bildnern bereitzustellen, welches in einem vorgenannten Verfahren bzw. einer vorgenannten Vorrichtung zum Einsatz kommen kann. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase-Bildnern und Carbapenemase, indem einer Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemase-Bildner enthält, ein Substrat der allgemeinen Strukturformel (I):



zugesezt wird, wobei M_1 ein Carbapenem-Grundgerüst der Formel (M_1) ist:



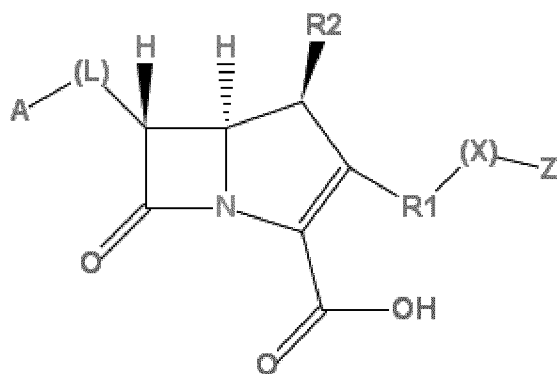
(M_1);

und wobei R, R1 und R2 jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H, ein C_1 - C_6 Alkyl, (Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, iso-Propyl, optional substituiert mit z.B. $-OH$, $-SH$, $=O$, $=S$, $-NH_2$), optional substituiertem Oxy-Alkyl, Halogen, $-OH$, $-SH$, primäres oder sekundäres Amin, Ether, Ester, einem optional substituierten Alkenyl, einer optional substituierten aromatischen Verbindung, einer optional substituierten heterozyklischen Verbindung, Thiol oder Thioether ist; wobei entweder A und Z ein

Fluorophor/Quencher-Paar bilden, oder A eine Reportergruppe und Z eine Festphase darstellt, oder A eine Festphase und Z eine Reportergruppe darstellt, L ein fakultativer Linker zur Kopplung von A an das Carbapenem-Grundgerüst ist, und X eine fakultative Abgangsgruppe zur Verknüpfung von Z mit dem Carbapenem Grundgerüst ist, und wobei nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch Carbapenemase die Gruppe Z freigesetzt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist R2 entweder H oder Methyl. Wenn A und Z ein Fluorophor/Quencher-Paar bilden, ist A ein Quencher oder ein Fluorophor und Z ein Quencher oder ein Fluorophor, wobei, wenn A ein Quencher ist, Z ein Fluorophor ist, und wenn A ein Fluorophor ist, Z ein Quencher ist. R1 ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{CO}-$. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist R1 CH_2 . Eine bevorzugte Abgangsgruppe (X) ist eine Abgangsgruppe, die einen Thioether $-\text{S}-$ oder eine Thioether-Verbindung $-\text{S}-\text{R}-$ oder ein Sulfonsäureester ($-\text{O}-\text{SO}_2-$) oder eine Sulfonsäureesterverbindung ($-\text{O}-\text{SO}_2-\text{R}$) ist oder enthält. Ein bevorzugter Linker (L) ist ein Linker, der eine Etherbindung, eine Esterbindung, ein Carbamat oder eine Amidbindung ist oder enthält.

Vorzugsweise ist die Gruppe A-(L)- mit dem beta-Lactamring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft und die Gruppe $-(\text{X})-\text{Z}$ mit dem fünfgliedrigen Ring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Substrate nimmt die Gruppe A-(L)- den Platz von R in der Formel (M_1) ein und die Gruppe $-(\text{X})-\text{Z}$ nimmt den Platz von R1 in der Formel (M_1) ein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das im Verfahren verwendete Substrat die Strukturformel (III) auf:



(III),

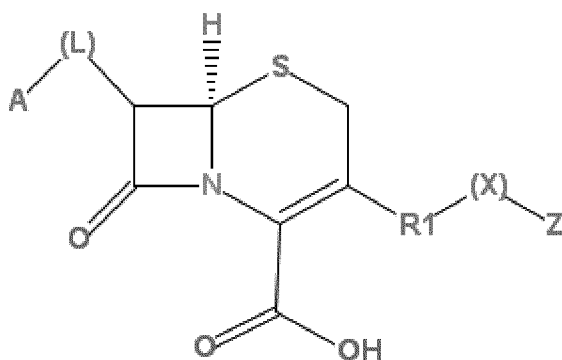
wobei R1 abwesend ist oder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{CO}-$, $(-\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}_2-$ (mit $n = 1-4$), CHOH , und wobei R2, A, L, X und Z wie oben definiert sind. In dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung eines Fluorophor/Quencher-Paares wird vor der Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z)

die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergie-Transfer auf den Quencher (A) verringert oder gelöscht und nach der Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z) sind der Quencher und der Fluorophor räumlich voneinander getrennt, so dass kein Förster-Resonanzenergie-Transfer mehr erfolgt und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen werden kann. Vorzugsweise wird als Quencher ein Fluorophor verwendet, der im Förster-Resonanzenergie-Transfer als Fluoreszenzakzeptor agiert. In einer weiteren Ausführungsform wird als Quencher ein energetisch auf den Fluorophor abgestimmter Black Hole Quencher eingesetzt, welcher die Fluoreszenz des Fluorophors im gebundenen Zustand auslöscht. In den erfindungsgemäßen Verfahren werden Fluorophore bevorzugt, deren Fluoreszenzintensität insensitiv auf pH-Änderungen des Umgebungsmediums reagiert. In einer weiteren Ausführungsform kann im Verfahren ein selbst-quenchernder Fluorophor verwendet werden.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung einer Reportergruppe und einer Festphase, wird das Substrat an einer Festphase (z.B. Glasträger) immobilisiert und die Carbapenemase-Aktivität durch Freisetzung (Abtrennung) der Reportergruppe von der Festphase nachgewiesen. Hierbei kann, je nach Konfiguration, lediglich die Reportergruppe vom Substrat abgespalten werden (wobei das Substrat an der Festphase verbleibt; wenn Z = Reportergruppe und A = Festphase), oder das Substrat zusammen mit der Reportergruppe abgespalten werden (wenn A = Reportergruppe und Z = Festphase).

Der Linker (L) kann eine Esterbindung RCOOR, Etherbindung –O– oder eine sekundäre Aminbindung –NH– darstellen oder enthalten. Die Abgangsgruppe (X) kann ein Thioether –S– oder eine Thioether-Verbindung –S–R– sein oder enthalten.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann zusätzlich ein phänotypischer Nachweis von weiteren beta-Lactamasen bzw. beta-Lactamase-Bildnern in der zu untersuchenden Probe geführt werden. Hierzu wird der Probe ein Substrat der Strukturformel (IV)



(IV)

zugegeben, wobei R1, A, L, X und Z wie oben definiert sind, und wobei nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch beta-Lactamase die Gruppe Z freigesetzt wird. In diesem Aspekt der Erfindung werden vorzugsweise die Substrate (III) und (IV) Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsmaxima aufweisen, um den phänotypischen Nachweis von Carbapenemase- und weiteren beta-Lactamase-Bildnern in der Probe parallel und gleichzeitig durchzuführen.

In den erfindungsgemäßen Verfahren wird die Fluoreszenzintensität vorzugsweise mittels hochsensitiver Messtechnik, insbesondere eines Photomultipliers, gemessen. Die Fluoreszenzintensität kann jedoch auch mit einer einfachen Photodiode gemessen werden, optional kann dann zusätzlich eine Signalverstärkung mittels eines Photomultipliers erfolgen.

In einem weiteren Aspekt bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum phänotypischen Nachweis resistenter Bakterien, indem die Enzyme einer bakteriellen Kultur bei einer Lyse in ein Lysat freigesetzt werden und anschließend das Lysat als zu untersuchende Probe einem oben beschriebenen Verfahren unterzogen wird, um das Vorhandensein resistenzvermittelnder Carbapenemasen und/oder beta-Lactamasen insbesondere beta-Lactamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) phänotypisch nachzuweisen. Vorzugsweise werden die Bakterien nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl, die z. B. durch Messen der optischen Dichte und / oder durch eine dynamische Messung des Streulichts bestimmt wird, lysiert. Hierzu kann der bakteriellen Kultur ein Lysepuffer zugegeben werden und / oder ein mechanisches Aufschlussverfahren, insbesondere ein Ultraschallverfahren, benutzt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können multiresistente grampositive oder gramnegative Bakterien, insbesondere 3MRGN oder 4MRGN, in einer zu untersuchenden Probe oder einem Lysat einer daraus erstellten bakteriellen Kultur nachgewiesen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die bakterielle Kultur zunächst in ein selektives Nachweismedium gegeben, in dem alle nicht-resistenten Bakterien abgetötet werden.

Die vorbeschriebenen Verfahren können in der klinischen Diagnostik von Patientenproben und / oder zur Untersuchung von Abstrichen, die von Geräteoberflächen oder sonstigen Flächen im Rahmen einer Hygiene-Kontrolle genommen werden, und / oder zur Untersuchung von toxikologischen oder pharmakologischen Substanzen, insbesondere zum Nachweis überlebender multiresistenter (gramnegativer) Bakterien im Rahmen eines Wirkstoffscreenings eingesetzt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung richtet sich auf eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase-Bildnern mit (1) einer Einrichtung zur Zugabe eines Sub-

strates der Strukturformel (I) oder (III) wie oben definiert, zu einer Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemase-Bildner enthält, (2) einer Fluoreszenzanregungsquelle zur optischen Anregung des verwendeten Fluorophors, und (3) einem Messgerät zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenzintensität des vom Quencher getrennten Fluorophors. Vorzugsweise kann die Vorrichtung eine Einrichtung zur Zugabe eines Lyse-puffers und / oder eine Ultraschalleinrichtung, um durch Lyse einer bakteriellen Kultur die zu untersuchende Probe herzustellen, sowie ggf. eine Temperiereinrichtung zum Halten der bakteriellen Kultur und / oder Probe vor und / oder nach Zugabe des Substrates auf einer gewünschten Temperatur, umfassen. Das Messgerät enthält vorzugsweise einen Photomultiplier, der mit einer Ausgabeeinrichtung gekoppelt ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf die oben beschriebenen Substrate als solche. Ein weiterer Aspekt der Erfindung richtet sich auf Teststreifen und andere feste Substrate, wie z.B. Beads oder Mikropartikel, an denen das erfindungsgemäße Substrat immobilisiert vorliegt, sowie Testsysteme und Kits, die die an eine Festphase immobilisierten erfindungsgemäßen Substrate enthalten.

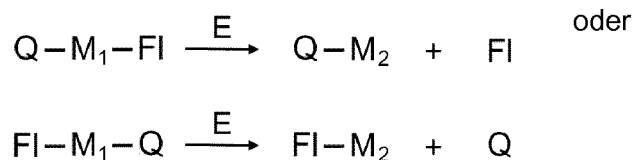
Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt den Reaktionsschritt eines Fluoreszenz-basierten Verfahrens zum Nachweis von extended spectrum β -Lactamase (ESBL) in einer Probe.

Fig. 2 zeigt den Reaktionsschritt eines erfindungsgemäßen, Fluoreszenz-basierten Verfahrens zum Nachweis von Carbapenemase in einer Probe.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Voraussetzung für den phänotypischen Nachweis eines β -Lactam-Ring spaltenden Enzyms wie einer Carbapenemase, oder einer ESBL ist die Synthese eines spezifischen markierten Substrats, das durch ein solches Enzym spaltbar ist und nach Spaltung ein messbares Signal auslöst. Dies Signal kann entweder eine freigesetzte Reportergruppe sein, oder es kann sich um ein optisches Signal handeln. Zur Auslösung eines messbaren optischen Signals wird erfindungsgemäß ein mit einem Fluorophor und einem energetisch passenden Quencher (insbesondere Black-Hole-Quencher, BHQ) markiertes Substrat verwendet, das durch ein solches Enzym spaltbar ist. Die Auswahl passender Fluorophor/Quencher Paare ist dem Fachmann bekannt (Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes, Designs and Protocols; Editors: Vladimir V. Didenko MD, PhD, (2006), Humana Press). Die Nachweisreaktion gehorcht der folgenden allgemeinen Beziehung



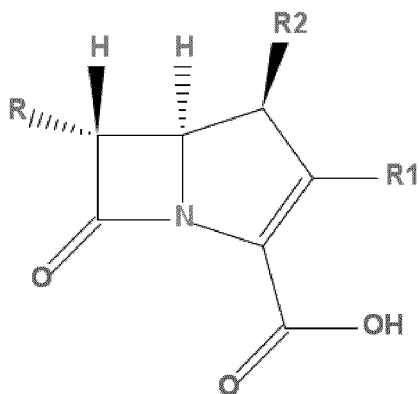
worin Q eine Quenchergruppe, FI eine Fluorophorgruppe, M₁ eine einen β-Lactam-Ring enthaltende Verbindung und M₂ eine Abbauverbindung nach enzymatischer Spaltung der Verbindung M₁ durch ein β-Lactam-Ring spaltendes Enzym E bezeichnen. Die als Striche ausgeführten Verbindungen zwischen Q und M₁ und zwischen FI und M₁ können Linker und/oder Abgangsgruppen darstellen oder beinhalten.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und Carbapenemase-Bildnern, wird einer Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemase-Bildner und / oder Carbapenemasen enthält, wenigstens ein Substrat der allgemeinen Strukturformel (I)



zugesetzt, wobei M₁ ein Carbapenem-Grundgerüst ist und wobei entweder A und Z ein Fluorophor/Quencher-Paar bilden, oder A eine Reportergruppe und Z eine Festphase darstellt, oder A eine Festphase und Z eine Reportergruppe darstellt, L ein fakultativer Linker zur Kopplung von A an das Carbapenem-Grundgerüst ist, und X eine fakultative Abgangsgruppe zur Verknüpfung von Z mit dem Carbapenem Grundgerüst ist. Nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch Carbapenemase wird die Gruppe Z freigesetzt (je nach Reaktion zusammen mit, oder getrennt von der Abgangsgruppe X).

Das Carbapenem-Grundgerüst M₁ ist vorzugsweise eine Verbindung der Formel (M₁)



(M₁)

wobei R, R₁ und R₂ jeweils unabhängig voneinander H, ein C₁-C₆ Alkyl, (Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, iso-Propyl, optional substituiert mit z.B. -OH, -SH, =O, =S, -NH₂), optional substituiertem Oxy-Alkyl, ein Halogen, -OH, -SH, ein primäres oder sekundäres Amin, ein Ether, ein Ester, einem optional substituierten Alkenyl, einer optional substitu-

ierten aromatischen Verbindung, einer optional substituierten heterozyklischen Verbindung, ein Thiol oder ein Thioether ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist R2 entweder H oder Methyl. Vorzugsweise ist R1 -CH₂-, -O-, -S-, oder -CO-, insbesondere bevorzugt ist R1 CH₂.

In einer Ausführungsform ist die Gruppe A-(L)- mit dem beta-Lactamring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft und die Gruppe -(X)-Z mit dem fünfgliedrigen Ring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft. Vorzugsweise ist die Gruppe A-(L)- an der Position von Substituent R mit dem Carbapenem-Grundgerüst verknüpft (R = A-(L)-) oder an den Substituenten R geknüpft und die Gruppe -(X)-Z ist vorzugsweise an der Position von Substituent R1 mit dem Carbapenem-Grundgerüst verknüpft (R1 = -(X)-Z), oder sie ist an den Substituenten R1 geknüpft.

Wird kein Fluorophor/Quencher-Paar verwendet ist die Reportergruppe (A bzw. X) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Quencher, einem Fluorophor, einer chromogenen Gruppe, einem Absorptionsfarbstoff wie z.B. einem Azofarbstoff, einem Metallkomplexfarbstoff, einem Dioxazinfarbstoff, einem Indigofarbstoff, einem Nitro- und/oder Schwefelfarbstoff, einem Triphenylmethanfarbstoff, einem Phthalocyaninfarbstoff, einem Nitrosifarbstoff (mit chromophoren Gruppe wie z.B. R-C=C-R, R-N=N-R, R-NO₂, R-C=O, R-C=NH, R-N=O); einer radioaktiv-markierten Gruppe (z.B. durch Einsatz von Isotopen: z.B. ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ²⁶Al, ³²P, ³³P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁴¹Ca, ¹²⁵I, ¹³¹I).

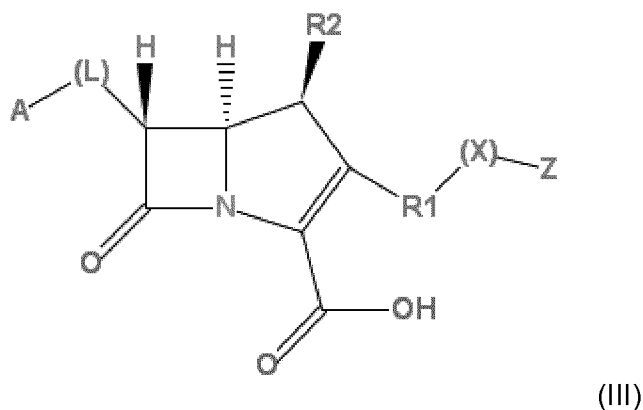
Wird eine Festphase verwendet, d.h. das Substrat über einen Linker an eine Oberfläche immobilisiert dann kann die Oberfläche z.B. ein Glasträger, ein Foliensubstrat (Substrate können z.B. PEN, PET sein), PDMA, oder partikuläre Strukturen (Nanopartikel, Mikropartikel z.B. Silica-Partikel, Beads z.B. magnetic Beads) oder ein Polymer (z.B. Polystyrol) sein. Die Immobilisierung über den Linker (L) kann z.B. erfolgen durch Chemisorption (Au – HS-R), durch kovalene Bindung (z.B. über Aldehyd-, Epoxy-, Isothiocyanat-Funktionalisierung der Oberfläche, diese reagieren mit H₂N-R; über Maleimide-, Mercaptosilan-Funktionalisierung der Oberfläche, diese bindet Thiole), oder durch nicht-kovalente Anbindung (z.B. durch Biotin-R an Streptavidin-funktionalisierte Oberfläche (und umgekehrt)).

Geeignete Linker (L) sind z.B. C₁-C₁₂ Alkyl und Oxy-Alkyl (Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, iso-Propyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl, Dodecyl, neben Alkanen auch Alkene und Alkine, optional substituiert mit z.B. -OH, -SH, =O, NH₂, =S, Halogen, primären oder sekundären Aminen, Ester, Ether, Thiole, weiterhin können sie bestehen aus / beinhalten: Thioether, aromatische Verbindungen, zyklische Verbindungen und Heterozyklen. Linker können mit funktionellen Gruppen zur Anbindung an feste Phase ausgestattet

sein, hierzu zählen z.B. Carbonsäuren, Thiocarbonsäuren, Peroxycarbonsäuren, Thiole, Sulfonsäuren, Sulfensäuren, Sulfinsäuren, Sulfoxide, Carbonsäureanhydride, Carbonsäureester, Sulfonsäureester, Salpetersäureester, Carbonsäurehalogenide, Sulfonsäurehalogenide, Carbonsäureamide, Sulfonsäureamide, Carbonsäurehydrazide, Nitrile, Aldehyde, Thioaldehyde, Ketone, Thioketone, Oxime, Hydrazone, Alkohole, Phenole, Amine, Imine, Hydrazine, Thioether, Thiolester und Ether, sowie und deren aktivierte Formen (z.B. Carbonsäurechloride, NHS-Ester, ...), daneben kann der Linker auch biotinyliert sein zur Bindung an Streptavidin (und umgekehrt).

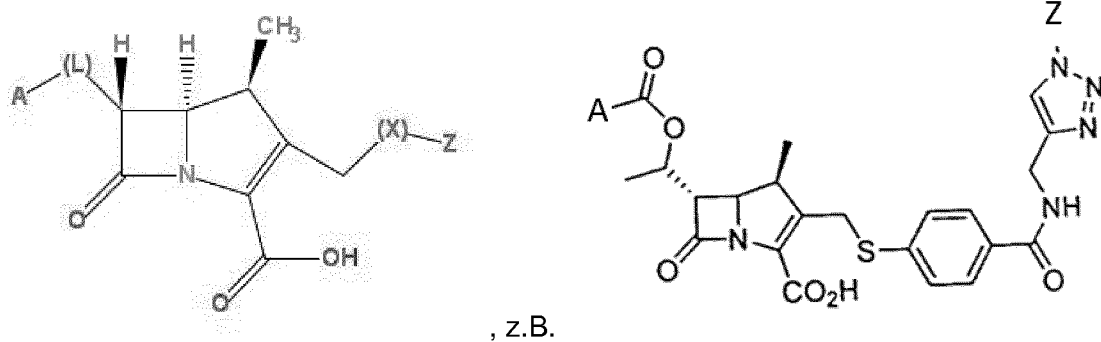
Geeignete chemische Abgangsgruppen (X) sind z.B. Thiole $-S-R$, Sulfonate, substituierte Tosylate, und Mesylate, Thiophenolate und substituierte Thiophenolate, $-S-Ar$, Phenolate oder substituierte Phenolate, Phenoxide $-O-Ar$ (mit $Ar = Aryl$). Weiterhin können die Abgangsgruppen Derivate von Carbamaten, Carbonaten, Thiocarbamaten oder Thiocarbonaten sein, darüber hinaus auch anorganische Ester (z.B. der Phosphorsäure / Phosphate oder der Schwefelsäure / Sulfonate), weiterhin organische Ester, Anhydride, Alkohole, Carbonsäuren und Halogenide (z.B. I- für Radioaktiv-Label) sowie Diazoverbindungen. Eine bevorzugte Abgangsgruppe (X) ist eine Abgangsgruppe, die einen Thioether $-S-$ oder eine Thioether-Verbindung $-S-R-$ oder ein Sulfonsäureester ($-O-SO_2-$) oder eine Sulfonsäureesterverbindung ($-O-SO_2-R$) ist oder enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase, bzw. Carbapenemase-Bildnern wird einer Probe, von der angenommen wird, dass sie Carbapenemase oder Carbapenemase-Bildner enthält, ein Substrat der allgemeinen Strukturformel (III)

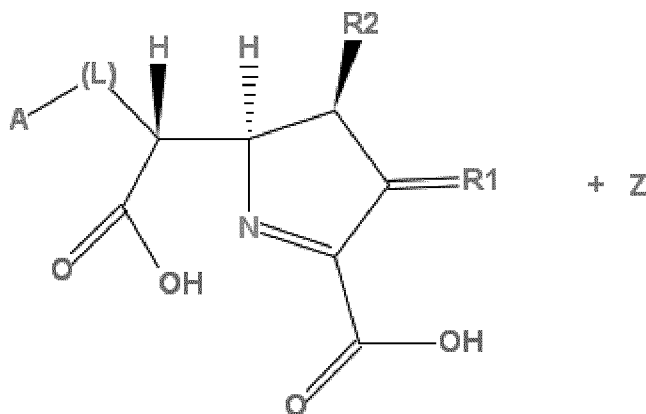


zugegeben, wobei R1 abwesend ist oder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-CH_2-$, $-O-$, $-S-$, $-CO-$, $CHOH$, $(-CH=CH)_n-CH_2-$ (mit $n = 1-4$), und wobei R2, A, L, X und Z wie oben definiert sind. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist R2 Methyl und

R1 eine CH₂ Gruppe, R2 Methyl und R1 abwesend, R2 H und R1 eine CH₂ Gruppe, oder R2 H und R1 abwesend. Speziell bevorzugte Substrate sind:



Nach enzymatischer Spaltung des obigen Substrates durch Carbapenemase zerfällt das obige Substrat (III) in die Reaktionsprodukte



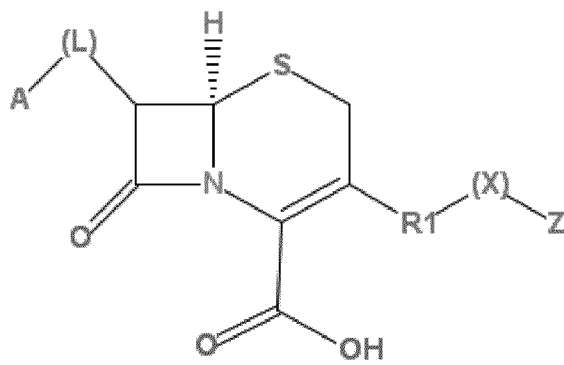
Je nach Ausführungsform für X bzw. Z kann zusätzlich zu Z auch X freigesetzt werden, oder es kann die Gruppe -(X)-Z freigesetzt werden.

Das Nachweisverfahren beruht auf einer Änderung der Fluoreszenz, die nach der Trennung der fluoreszierenden Gruppe Z oder A von der korrespondierenden quenchenden Gruppe A oder Z beobachtet wird, bzw. auf dem Nachweis der vom Substrat abgespaltenen oder mit dem Substrat abgespaltenen Reportergruppe. Das Verfahren ist per se spezifisch für Carbapenemasen, welche das jeweilige Substrat akzeptieren und den β -Lactam-Ring hydrolytisch unter Bildung einer Carbonsäure und unter gleichzeitiger Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z) bzw. der Reportergruppe öffnen. Wird ein Fluorophor/Quencher-Paar verwendet, kann z.B. die Freisetzung des Fluorophors bzw. des Quenchers und ein damit einhergehender Anstieg der Fluoreszenz der Anwesenheit einer den β -Lactam-Ring des Carbapenems spaltenden Carbapenemase in der jeweiligen Probe zugeschrieben werden. Ist das Fluorophor/Quencher-Paar ein FRET-Pärchen, kann man

im Fall der Abspaltung eines der beiden Partner auch eine Fluoreszenzabnahme messen, und/oder ggf. eine Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge. Der einzige Faktor für die Freisetzung des Fluorophors bzw. des Quenchers, oder der Reportergruppe stellt die Enzymaktivität dar. Somit ist eine gemessene Änderung der Fluoreszenz oder der Nachweis der freigesetzten Reportergruppe ein direktes und zuverlässiges Maß für das Vorhandensein von Carbapenemase in der Probe. Wird ein Substrat mit einer der anderen oben beschriebenen Reportergruppen (z.B. Farbstoff, radioaktive Gruppe) verwendet, kann der Nachweis auf für die jeweilige Reportergruppe geeignete Weise erfolgen (Nachweis der von der Festphase freigesetzten Radioaktivität, UV-Vis-Spektroskopische Messung, etc.). Als nicht-limitierendes Beispiel kann das Substrat an eine Festphase (A) gekoppelt sein, wobei A z.B. ein Bead oder eine Glasoberfläche ist. Unter Einwirkung einer Probe, die ein Carbapenemase enthält, wird die Reportergruppe (Z) von der Festphase getrennt und kann im Überstand nachgewiesen werden, oder es kann z.B. eine Entfärbung der Beads beobachtet werden. Ein weiteres Beispiel ist ein Teststreifen, auf welchem das oder die erfindungsgemäße(n) Substrat(e) immobilisiert wurden, wobei eine Entfärbung einer Bande mit immobilisiertem Substrat und/oder die Freisetzung der Reportergruppe nachgewiesen wird, (z.B. durch einen papierchromatographischen Nachweis der freigesetzten (chromophoren) Reportergruppe). Diese Ausführungsformen ermöglichen einen Nachweis mit einfachen Mitteln, sodass dieser auch unter schwierigen Bedingungen, z.B. in Gebieten mit einem geringeren Entwicklungsstandard zuverlässig durchgeführt werden kann.

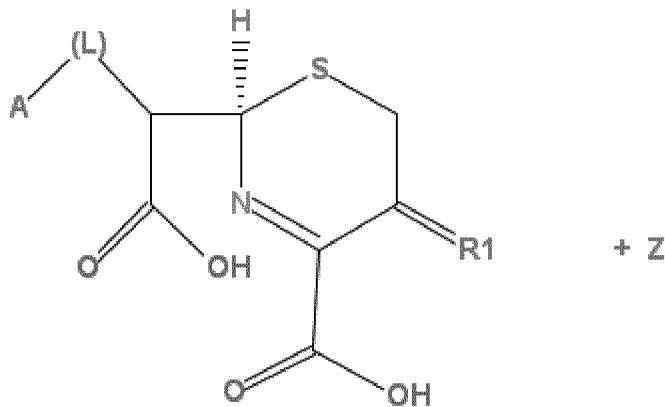
Durch den Einsatz eines Fluoreszenz-Messsystemes in Kombination mit der vorbeschriebenen Fluoreszenz-basierten, enzymatischen Nachweisreaktion wird die Zeit von der Probenahme bis zum Vorliegen eines Ergebnisses über das Vorhandensein von Carbapenemase in der Probe enorm verkürzt. Somit bietet das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit zum schnellen Vor-Ort-Nachweis von Carbapenemase in der Probe.

In einer besonders bevorzugten Ausführung der Erfindung können der Probe sowohl das vorgenannte Substrat zum Fluoreszenz-basierten Nachweis von Carbapenemase als auch das nachgenannte Substrat zum Fluoreszenz-basierten Nachweis von β -Lactamase wie z.B. ESBL der allgemeinen Strukturformel (IV)



(IV)

zugegeben werden, wobei R1, A, (L), (X) und Z wie oben definiert sind. Nach enzymatischer Spaltung durch β -Lactamase wird das obige Substrat zu



metabolisiert. Je nach Ausführungsform für X bzw. Z kann zusätzlich zu Z auch X freigesetzt werden, oder es kann die Gruppe $-(X)-Z$ freigesetzt werden.

Das zum Nachweis des Enzyms β -Lactamase eingesetzte Substrat basiert auf einer Cephalosporin-Grundstruktur, welche durch kovalente Anbindung einer Quencher- und einer Fluorophorgruppe, bzw. einer anderen Reportergruppe chemisch modifiziert worden ist. Durch Integration der fluoreszierenden oder quenchenden Gruppe, bzw. der Reportergruppe $-(X)-Z$ wird nach enzymatischer Spaltung des β -Lactam-Ringes der Fluorophor oder der Quencher, bzw. die Reportergruppe (Z) freigesetzt und somit eine Änderung der Fluoreszenzintensität detektierbar, bzw. ein Nachweis der freien Reportergruppe möglich.

Bei einem solchen Ausführungsbeispiel, bei dem der Probe sowohl das vorgenannte Substrat zum Fluoreszenz-basierten Nachweis von β -Lactamase als auch das vorgenannte Substrat zum Fluoreszenz-basierten Nachweis von Carbapenemase zugegeben werden, sind an die beiden Substrate (nämlich einerseits an dasjenige zum Nachweis von β -Lactamase und andererseits an dasjenige zum Nachweis von Carbapenemase) Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsmaxima angebunden, um somit den phänotypischen

Nachweis von β -Lactamase und Carbapenemase in der Probe parallel und gleichzeitig durchführen zu können.

Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz-Emissionen der beiden Fluorophore kann der Anteil an Fluorophor, der aus dem ersten, von der Carbapenemase gespaltenen Substrat freigesetzt wurde, und der Anteil an Fluorophor, der aus dem zweiten, von der β -Lactamase gespaltenen Substrat freigesetzt wurde, eindeutig bestimmt und somit den jeweiligen Enzymen zugeordnet werden.

Alternativ können die Reportergruppen und/oder die Fluorophor/Quencher Paare beliebig so gewählt werden, dass differenzieller Nachweis der Reportergruppen und/oder Fluorophor/Quencher Paare der verschiedenen Substrate möglich ist (z.B: Kombination eines Fluorophor/Quencher-Paares beim Carbapenemase Substrat (III) und einer chromogenen Reportergruppe/Festphase beim Substrat (IV), oder Verwendung zweier unterschiedlicher Farbstoffe (um z.B. die Verwendung beider Substrate auf einem Teststreifen zu ermöglichen).

In bevorzugter Weise wird vor der Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z) die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergietransfer auf den Quencher verringert oder gelöscht und sind nach der Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z) der Quencher und der Fluorophor räumlich voneinander getrennt, sodass kein Förster-Resonanzenergietransfer mehr erfolgt und eine Änderung der Fluoreszenz gemessen wird.

Durch den Förster-Resonanzenergietransfer wird die Energie im Substrat vom angeregten Fluorophor über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den Quencher übertragen. Dem Fluorophor steht somit die transferierte Energie nicht mehr für eine direkte Strahlungsabgabe zur Verfügung. Bei Anwesenheit des β -Lactam-Ring spaltenden Enzyms wird jedoch der Fluorophor unter gleichzeitigem Anstieg der Fluoreszenz vom Quencher getrennt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass der Quencher selbst ein Fluorophor ist. Somit binden zwei Fluorophore (ein Reporter-Fluorophor und ein Quencher-Fluorophor) an das Substrat. In diesem gebundenen Zustand wird die Emission des Reporters gequencht. Die enzymatische Spaltung des Substrates führt jedoch zu einer räumlichen Trennung von Reporter-Fluorophor und Quencher-Fluorophor und somit zu einem deutlichen Signalanstieg in der Empfängerinheit zur Aufnahme der Lumineszenzstrahlung. Durch Messung des Signalanstieges kann das jeweilige Enzym (Carbapenemase und ggf.

extended spectrum β -Lactamase) sehr empfindlich nachgewiesen werden. Beispiele für zum Enzymnachweis geeignete Fluorophor-Fluorophor-Paare sind:

- Fluorophor 1: Cy2 – Fluorophor 2: Cy3,
- Fluorophor 1: Carboxyfluorescein – Fluorophor 2: Texas Red,
- Fluorophor 1: Fluorescein – Fluorophor 2: Rhodamin.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht vor, dass als Quencher ein energetisch auf den Fluorophor abgestimmter Black Hole Quencher eingesetzt wird, welcher die Fluoreszenz des Fluorophors im gebundenen Zustand vollständig auslöscht.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung reagiert die Fluoreszenzintensität des Fluorophors insensitiv auf pH-Änderungen des Umgebungsmediums.

Durch die Verwendung pH-insensitiver Fluorophore kann sichergestellt werden, dass pH-Wert-Änderungen – unabhängig davon, ob sie durch die Art des Probenmaterials oder durch bakterielle Stoffwechselprodukte, Kohlenstoffdioxidgehalt oder Temperatur bedingt sind – das Messergebnis nicht beeinflussen. Durch Messung der Fluoreszenzverhältnisse ist somit eine unverfälschte Aussage über die Enzymaktivität in der Probe möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist es möglich, als Fluorophor ein selbstquenchendes Fluorophor zu verwenden. Beim selbstquenchenden (selbstlöschenden) Fluorophor kann es sich beispielsweise um folgende Fluoreszenzfarbstoffe handeln:

- Carboxyfluorescein
- NBD (Derivate von 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)
- BODIPY (Derivate von 4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)
- DPH (Derivate von 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)

Der Linker L zur kovalenten Anbindung der Gruppe A (z.B. Quencher- oder Fluorophorgruppe) an den β -Lactam-Ring kann eine Etherbindung –O– oder eine sekundäre Aminbindung –NH– sein oder eine solche aufweisen. Geeignete Linker sind wie für das erfindungsgemäße Carbapenem-Substrat beschreiben. Der Linker L muss so beschaffen sein, dass eine irreversible Kopplung der Gruppe A (z.B. des Quenchers oder des Fluorophors oder der Reportergruppe, je nachdem, was an dieser Stelle gebunden ist) an das Substrat auch nach seiner Spaltung durch die Carbapenemase- und β -Lactamase-Aktivität gegeben ist.

Ein solcher stabiler Linker kann außer durch die vorgenannten Ether- oder Aminbindungen auch durch Thiolgruppen, Carboimide, Succinimide u. ä. wie oben beschrieben verwirklicht werden.

Die Abgangsgruppe X zur Anbindung an die Grundstruktur des Substrats ermöglicht eine Freisetzung der Gruppe Z, wenn das Substrat vom entsprechenden Enzym gespalten wird. Geeignete Abgangsgruppen sind wie oben im Rahmen des Carbapenem-Substrates beschrieben. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung kann die Abgangsgruppe ein Thioether –S– oder eine Thioether-Verbindung –S–R– oder ein Sulfonsäureester (–O–SO₂–) oder eine Sulfonsäureesterverbindung –O–SO₂–R) sein oder eine solche enthalten. Zu den in den Strukturformeln der Substrate mit X bezeichneten Abgangsgruppen, die nach enzymatischer Spaltung des β -Lactam-Ringes das Austreten der mit Z bezeichneten Gruppe (z.B. der Fluorophor- bzw. der Quenchergruppe) begünstigen, zählen jene, die über Resonanz die negative Ladung stabilisieren können. Als weitere Beispiele neben den vorgenannten Thioethern oder Thioether-Derivaten seien hier Sulfonate aber auch Thiole, z. B. in Form von Thiophenolaten, und auch Phenole oder substituierte Phenoxide (R–O–Ar) genannt (mit Ar = Aryl). Weiterhin können die Abgangsgruppen Carbamate, Carbonate, Thiocarbamate oder Thiocarbonate sein. Darüber hinaus ist auch der Einsatz von anorganischen Estern (z. B. von Phosphat-Derivaten) möglich.

Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird die Änderung der Fluoreszenzintensität mittels hochsensitiver Messtechnik, insbesondere eines Photomultipliers, gemessen. Die durch den Photomultiplier ermöglichte hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung erlaubt demnach ohne aufwendige Probenaufbereitung mit einer kompakt und einfach gestalteten Fluoreszenzmessanordnung, die zudem mindestens eine Lichtquelle zur Anregung des Fluorophors umfasst, eine spezifische und aussagekräftige real-time Detektion von Zielenzymen (Carbapenemasen, ESBL) mit einer niedrigen Nachweisgrenze. Der Nachweis einer alternativ verwendeten Reportergruppe kann wie oben beschrieben auch im Rahmen des hier beschriebenen Nachweisverfahrens erfolgen.

Die Erfindung gibt außerdem ein Verfahren zum phänotypischen Nachweis resistenter Bakterien an, bei welchem die Enzyme einer bakteriellen Kultur durch Lyse in ein Lysat freigesetzt werden und anschließend dieses Lysat als zu untersuchende Probe einem vorbeschriebenen Verfahren unterzogen wird. Auf diese Weise kann das Vorhandensein resistenzvermittelnder, den β -Lactam-Ring spaltender Carbapenemasen phänotypisch nachgewiesen werden. Erfindungsgemäß kann die Lyse der bakteriellen Kultur durch Zufügen eines Lysepuffers und/oder ein mechanisches Aufschlussverfahren, insbesondere ein Ultraschallverfahren, erreicht werden.

Anders als bei PCR-basierten, molekularbiologischen Nachweisverfahren (genotypischen Nachweisverfahren) werden also mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die tatsächlichen (phänotypischen) Merkmale der Bakterien untersucht. Somit ist das erfindungsgemäße phänotypische Nachweisverfahren unabhängig von der genetischen Variabilität der MRGN bezüglich dieser Merkmale, wodurch die Erkennung von Erregern ermöglicht wird, die (z. B. aufgrund genetischer Instabilitäten sowie einer hohen Anzahl unterschiedlicher Enzym-Klassen/-Subtypen, für die viele unterschiedliche, ständig zu revalidierende Primer-Pärchen entwickelt werden müssen) durch PCR-basierte Verfahren nicht erfassbar sind.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Nachweisverfahren um ein Verfahren zum Nachweis multiresistenter grampositiver oder gramnegativer Bakterien, insbesondere 3MRGN oder 4MRGN. Diese bereiten im klinischen Alltag vor allem bei der Behandlung von Infektionen, wie Lungenentzündungen und Harnwegsinfekte, zunehmend Probleme.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des vorbeschriebenen Verfahrens wird die bakterielle Kultur zunächst in ein selektives Nachweismedium gegeben, in dem alle nicht-resistenten Bakterien abgetötet werden.

In besonderer zweckmäßiger Weise kann vor Zugabe des Lysepuffers die Zellzahl durch eine Messung der optischen Dichte der Probe und/oder durch eine dynamische Messung des Streulichts der Probe erfolgen und bei ausreichend großer Zellzahl die Lysepufferzugabe automatisch ausgelöst werden. Die Messung der optischen Dichte (Transmission) kann im Bereich um 600 nm durchgeführt werden. Bei einer automatisierten Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS-Messung) wird die Zellkultur mit Laserlicht durchstrahlt und die Fluktuationen der Intensität des von den Zellen gestreuten Lichtes als eine Funktion der Zeit aufgenommen. Die Intensität des gestreuten Lichtes verhält sich dabei proportional zu dem Produkt aus Konzentration und molekularer Masse der Zellen.

In diesem Zusammenhang kann ein mikrofluidisches System zum Einsatz kommen, welches einen Behälter mit einer darin enthaltenen Lysepufferlösung und eine Pumpe, mit der die Lösung aus dem Behälter in das Probegefäß (z. B. eine Mehrkammerküvette) gepumpt werden kann, umfasst. Dem Puffer kann zudem ein Protease-Inhibitor (bzw. ein Mix von Inhibitoren verschiedener Spezifität) zugesetzt werden, um die Degradation der Enzyme zu verzögern. Alternativ oder zusätzlich kann zum Bakterienaufschluss mit einem regelbaren Ultraschall-Homogenisator ein Ultraschalleintrag in die Probe erfolgen.

Die Erfindung sieht ferner eine Verwendung eines der vorbeschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren in zumindest einem der folgenden Bereiche vor: klinische Diagnostik von Patientenproben, Untersuchung von Abstrichen, die von Geräteoberflächen oder sonstigen

Flächen im Rahmen einer Hygiene-Kontrolle genommen werden, Untersuchung von toxikologischen oder pharmakologischen Substanzen. Im letztgenannten Bereich eignet sich ein erfindungsgemäßes Verfahren insbesondere zum Nachweis überlebender multiresistenter Carbapenemase-bildender Bakterien im Rahmen eines Wirkstoffscreenings.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zum phänotypischen Nachweis β -Lactam-Ring spaltender Enzyme (Carbapenemasen und ESBL) bzw. zum Nachweis resistenter Bakterien, insbesondere multiresistenter gramnegativer Bakterien (MRGN), ist Fluoreszenz-basiert und erfolgt direkt aus dem Probenmaterial. Demzufolge kann ein solches Verfahren sehr vielseitig eingesetzt werden. Da es gegen Infektionen mit MRGN bislang nahezu keine wirksamen Therapeutika gibt, wird es eine zukünftige Aufgabe der Menschheit sein, neue Wirkstoffe zu entwickeln. Hier kann ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Einsatz kommen, um neue Substanzen, die auf MRGN antibiotische Wirkung haben, zu identifizieren, z. B. indem große Substanzbibliotheken nach Wirkstoffen durchsucht werden.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich auch eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase-Bildnern, die eine Einrichtung zur Zugabe eines Substrates mit Carbapenem Grundstruktur, wie oben definiert, eine Fluoreszenzanregungsquelle zur optischen Anregung der Reaktionsprodukte und ein Messgerät zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenzintensität des freigesetzten Fluorophors umfasst.

Der Begriff "Fluorophor" betrifft ein fluoreszierendes Chromophor. Bei der Auswahl des Fluorophors wird darauf geachtet, dass dieser vorzugsweise keine Abhängigkeit der Fluoreszenzemission vom pH-Wert des umgebenden Mediums aufweist. Da der pH-Wert einer Vielzahl von Störfaktoren unterworfen ist (beispielsweise infolge der bei der Verstoffwechselung von Nährstoffen durch die Bakterien produzierten Säuren), ist die Verwendung pH-unabhängiger Fluorophore bevorzugt. Werden pH sensitive Fluorophore oder Quencher verwendet, ist darauf zu achten, dass die Reaktion in einer hinreichend gepufferten Lösung stattfindet.

Der Begriff "Quencher" bezieht sich auf ein Molekül oder einen Teil einer Verbindung, das/der in der Lage ist, die Emission von einer Fluorophorgruppe zu reduzieren. Quenching kann durch eine Vielzahl von Mechanismen stattfinden, einschließlich Förster-Resonanzenergietransfer, photoinduzierter Elektronentransfer, paramagnetische Steigerung von Intersystem Crossing, Dexter-Transfer (Austausch-Wechselwirkungen) und Anregungskopplung, wie die Bildung von dunklen Komplexverbindungen.

Der Begriff „ β -Lactam-Ring spaltendes Enzym“ bezeichnet Carbapenemase und β -Lactamase, insbesondere extended spectrum β -Lactamase (ESBL). Äquivalent wird hierin der Begriff „Zielenzym“ verwendet.

Der Begriff „Festphase“ bezeichnet eine jegliche feste Oberfläche, an welche die erfindungsgemäßen Substrate gekoppelt werden können und welche im Verlauf der beschriebenen Testverfahren an sich inert bleibt. Die Kopplung des Substrats kann kovalent oder nicht-kovalent erfolgen, wobei, wenn eine nicht-kovalente Kopplung an die feste Oberfläche gewählt wird, die nicht-kovalente Bindung im Verlauf der Nachweisverfahren ausreichend stabil ist, um die enzymvermittelte Spaltung des Substrats von einer spontanen Loslösung zu unterscheiden, vorzugweise bleibt auch die nicht-kovalente Kopplung des Substrats unter den Testbedingungen stabil.

Als zweckmäßige Fluorophor/Quencher-Paare zum Enzymnachweis sind im Einzelnen und exemplarisch die folgenden Kombinationen zu nennen:

Fluorophor: Quasar 570 – Quencher: Deep Dark Quencher II,
Fluorophor: Kal Fluor Red 610 – Quencher: BHQ3,
Fluorophor: ATTO647N – Quencher: BHQ2,
Fluorophor: BODIPY 581/591 – Quencher: BHQ2,
Fluorophor: Alexa Fluor 430 – Quencher: Eclipse Dark Quencher,
Fluorophor: Alexa Fluor 555 – Quencher: BHQ2,
Fluorophor: Cy3 – Quencher: BHQ1,
Fluorophor: Alexa Fluor 610 – Quencher: BHQ,
Fluorophor: DY633 – Quencher: BHQ3,
Fluorophor: ETERNEON YELLOW – Quencher: BHQ1,
Fluorophor: ETERNEON RED – Quencher: BHQ3.

Im Ausgangssubstrat Q-M₁-FI oder FI-M₁-Q befinden sich der Fluorophor und der Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander, sodass die vom Fluorophor emittierte Lichtenergie vom Quencher gequencht (d.h. erniedrigt) wird. Insbesondere absorbiert der Quencher die Fluoreszenzenergie des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und verhindert damit die Emission als Fluoreszenz. Die Effizienz des FRET hängt von der Fluoreszenz-Quantumausbeute des Fluorophors, der Entfernung von Fluorophor (Donor) zu Quencher (Akzeptor) und dem Überlappungsintegral der Fluoreszenzemission des Fluorophors (Donors) und der Absorption des Quenchers (Akzeptors) ab. Der Energie-

transfer ist am effizientesten, wenn ein Donor-Fluorophor mit einer hohen Fluoreszenz-Quantumausbeute (vorzugsweise nahe 100%) mit einem Quencher gepaart ist, der einen großen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen, die mit der Emission des Donors zusammenfallen, besitzt.

Infolge der katalytischen Spaltung des β -Lactam-Substrates durch das jeweilige Zielenzym wird auch die Verbindung zwischen Fluorophor oder Quencher und dem katalysierten Substrat gelöst. Die Fluoreszenz des freigesetzten oder im Metabolit zurückbleibenden ungequenchten Fluorophors kann dann in der Lösung als deutliche Änderung der Emission des Fluorophors nachgewiesen werden. Hierzu muss eine optische Anregung der Probe durch Anregungsstrahlung aus einer Fluoreszenzanregungsquelle erfolgen. In Reaktion darauf emittieren die freigesetzten (fluoreszierenden) Fluorophore in der Probe Strahlung mit einer Wellenlänge, die zu der Anregungswellenlänge verschieden ist. Optische Detektoren sammeln sodann die Emission aus der Probe, wobei die Zunahme der Fluoreszenzintensität evaneszent oder mittels Oberflächenscreenings detektiert werden kann. Berücksichtigt man, dass die gemessene Fluoreszenzintensität der Probe proportional zu der enzymatischen Umsetzung des Substrates ist, können über eine mitgeführte Eichreihe Rückschlüsse auf die Enzymaktivität bzw. -konzentration von β -Lactam-Ring spaltenden Enzymen gezogen werden, sofern denn eine quantitative Auswertung erwünscht ist.

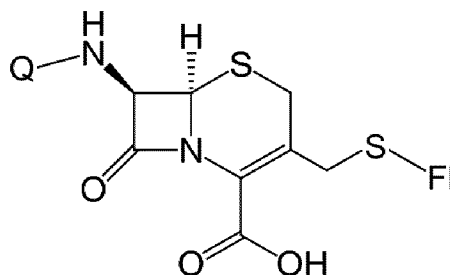
Der Begriff „Carbapenemase-Bildner“ bezeichnet einen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym Carbapenemase zu bilden und damit Carbapenem-Antibiotika abzubauen. Vorzugsweise ist der Mikroorganismus ein Bakterium. Dieses Bakterium kann gramnegativ, oder ein grampositiv sein. Beispiele gramnegativer Erreger sind Enterobakterien (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*) sowie die Gattungen *Pseudomonas*, *Legionella*, *Neisseria*, *Rickettsia*, sowie *Streptobacillus moniliformis*, *Meningococcus*, *Chlamydophila*, *Chlamydia* und *Spirochaeta Bacteroidetes*. Klinisch besonders relevante gramnegative Bakterien sind beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, und *Klebsiella pneumoniae*. Beispiele grampositiver Bakterien sind *Actinobacteria*, wie beispielsweise die der Gattungen *Actinomyces* und *Streptomyces*, und Arten des Stammes *Firmicutes*, wie beispielsweise die der Gattungen *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, und *Lactobacillus*. Klinisch relevante grampositive Bakterien sind beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium difficile*, oder *Listeria monocytogenes*.

Beispielhafte 3MRGN und 4MRGN Erreger umfassen *K.pneumoniae*, *E.coli*, *P.mirabilis*, *E.cloacae*, *P.aeruginosa* und *A.baumannii*.

Zwei bevorzugte Ausführungsformen, nämlich ein Nachweisverfahren für extended spectrum β -Lactamase (ESBL) entsprechend Fig. 1 und ein von der vorliegenden Erfindung umfasstes Nachweisverfahren für Carbapenemase entsprechend Fig. 2, werden nachfolgend im Detail beschrieben.

Fig. 1 zeigt anhand der zugehörigen Reaktionsgleichung das Prinzip des Nachweises einer extended spectrum β -Lactamase, die als enzymatischer Katalysator in abgekürzter Schreibweise ESBL über dem Reaktionspfeil dargestellt ist. β -Lactamasen sind eine Enzymklasse, die aufgrund ihrer klinischen Relevanz (Bakterienresistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika) sehr gut untersucht wurden. ESBL hingegen können ein größeres (erweitertes) Spektrum an β -Lactam-haltigen Antibiotika spalten. Die ESBL entsteht durch eine Mutation der bekannten β -Lactamase. Die Gene für die ESBL befinden sich häufig auf Plasmiden, die von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden können.

Als Substrat zum Nachweis der ESBL dient entsprechend der nachfolgenden Strukturformel ein mit Fluorophor und Quencher markiertes Substrat, dessen Grundgerüst durch ein Cephalosporin, welches zur Klasse der β -Lactam-Antibiotika gehört, gebildet ist.



Ein Linker und eine Abgangsgruppe dienen zur Anheftung der Quencherreste und Fluorophorreste an das vom Cephalosporin abgeleitete Grundgerüst und können die Synthese der Substratverbindung erleichtern. Beim hier vorgeschlagenen Substrat mit der oben angegebenen Strukturformel ist der Fluorophor über eine Thioether-Brücke mit dem 1,3-Thiazin-Sechsring des Cephalosporin verbunden. Die Thioether-Bindung ist sehr stabil und verringert aufgrund ihrer induktiven Wirkung die Reaktivität des β -Lactam-Ringes gegenüber Nukleophilen. Der Quencher ist am gegenüberliegenden Ende des Cephalosporin-Gerüsts über eine NH-Brücke mit dem β -Lactam-Ring verknüpft.

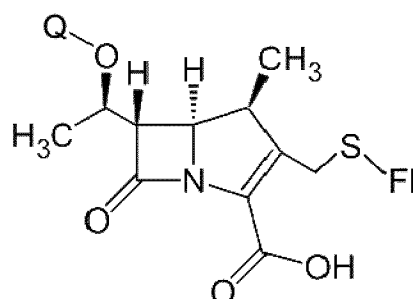
Quencher und Fluorophor sind jeweils Moleküle, die in einer Weise ausgewählt sind, dass eines Licht bei einer Wellenlänge absorbiert (Quencher), bei der das andere aussendet (Fluorophor). Bei intakter Bindung an das Cephalosporin-Rückgrat sind der Fluorophor (Donor) und der Quencher (Akzeptor) nahe benachbart, sodass Energie auf den Quencher durch Förster-Resonanzenergietransfer übertragen werden kann, was zu einem teilweisen

oder vollständigen Quenching der Donor-Fluoreszenz führt. Aus der Öffnung des β -Lactam-Ringes des Cephalosporins durch β -Lactamase resultiert jedoch eine Spaltung des Fluorophors von der 3'-Position des Cephalosporins. Der Fluorophor wird somit frei und kann von dem Quencher-Cephalosporin-Konjugat wegdiffundieren. Eine solche Spaltung verringert somit das Quenching und erhöht die Effizienz der Donor-Fluoreszenz um ein Vielfaches. Das Cephalosporin-Rückgrat dient somit quasi als spaltbarer Linker zwischen Quencher und Fluorophor.

Fig. 2 zeigt ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Nachweisreaktion einer Carbapenemase. Die nachzuweisende Carbapenemase ist in Fig. 2 wiederum als enzymatischer Katalysator über dem Reaktionspfeil dargestellt. Als Substrat kommt hier ein Fluoreszenz-markiertes Carbapenem zum Einsatz. Carbapeneme gehören ebenfalls zur Klasse der β -Lactam-Antibiotika, die eine auf einer irreversiblen Bindung an Transpeptidasen beruhende antibiotische Wirkung entfalten, wodurch die Murein-Synthese und damit der Aufbau der Zellwand der Bakterien gestört wird.

Carbapeneme unterscheiden sich jedoch von anderen β -Lactamen durch Substitution des Schwefelatoms im Penamring mit einem Kohlenstoffatom sowie einer Doppelbindung im Fünfring in Position 2-3. Sie gelten als Reserveantibiotika, die nur bei schweren Infektionen mit bestimmten, gegen andere Antibiotika unempfindlichen Bakterienstämmen Verwendung finden. Jedoch vermitteln Carbapenemase Resistenz gegen Carbapeneme, da sie sehr effizient die Amidbindung im β -Lactam-Ring der Carbapeneme hydrolysieren, wodurch auch Carbapeneme ihre Wirksamkeit verlieren. Derzeit existiert aber für den Nachweis von Carbapenemase-Bildnern kein Schnelltestverfahren, das den Nachweis dieses Resistenzmechanismus in klinischem Probenmaterial oder als Kulturbestätigungstest ermöglicht.

Die Erfindung schafft hier Abhilfe, indem sie als Substrat zum phänotypischen Fluoreszenz-basierten Nachweis von Carbapenemase die Verwendung einer chemisch modifizierten Carbapenem-Struktur mit der folgenden Strukturformel



bereitstellt. Der allgemein mit Q identifizierte Quencher ist z.B. über eine Esterbindung an die Hydroxyfunktionalität des Ethylrestes an der beta-Lactam-Grundstruktur gebunden. Der allgemein mit FI identifizierte Fluorophor ist wiederum, wie schon beim Substrat für den ESBL-Nachweis, über eine Thioether-Verbindung ($-S-R-$) als Linker-Abgangsgruppe mit dem Fünfring des Carbapenems verbunden. Der Quencher ist dabei so ausgewählt, dass er die Anregungsenergie des Fluorophors größtenteils aufnimmt und dadurch die Eigenfluoreszenz abschwächt, solange Quencher und Fluorophor beide am Carbapenem-Gerüst gebunden bleiben.

Wird jedoch beim Vorliegen einer Carbapenemase entsprechend der in Fig. 2 gezeigten Nachweisreaktion der β -Lactam-Ring durch Hydrolyse bei einer bestimmten, durch eine Temperiereinrichtung einstellbaren Probertemperatur zu einer Quencher-markierten Penicillosäure und dem Fluorophor gespalten, dann werden Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt. Mit dieser räumlichen Trennung wird die Fluoreszenzabsorption durch den Quencher unterbrochen und die Gesamtfluoreszenz der Reaktion nimmt deutlich und reproduzierbar zu. Da diese Fluoreszenzzunahme proportional zu der enzymatischen Umsetzung des Carbapenems ist, kann über eine mitgeführte Eichreihe auf die Aktivität bzw. Konzentration von Carbapenemase in der Probe geschlossen werden.

Sofern auf die Anwesenheit bzw. Aktivität von mindestens zwei Zielenzymen getestet werden soll, kann durch den Einsatz von zwei oder mehr Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionsmaxima der Nachweis der Zielenzyme in einem Probegefäß parallel erfolgen. Eine zeitgleiche Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Zielenzymen ist somit möglich. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass unterschiedliche Fluorophore bei gemeinsamer Anregung (z. B. Laserpulsanregung) gleichzeitig mit unterschiedlichen Wellenlängen (z. B. im Spektralbereich) fluoreszieren. Somit kann Emissionslicht eines bestimmten Wellenlängenbereiches einer spezifischen Fluoreszenz für eine spezifische Nachweisreaktion zugeordnet werden.

Mit den vorerläuterten, in Fig. 1 und 2 dargestellten Nachweisreaktionen wird auch erstmals ein schnelles und verlässliches Nachweisverfahren von multiresistenten Erregern wie gramnegative Bakterien (MRGN), die resistenzvermittelnde, β -Lactam-Ring spaltende Enzyme bilden, realisierbar.

Zum Nachweis solcher Bakterien wird zunächst eine Probe (z. B. eine Patientenprobe in Form von Blut, Sputum, Urin, Faeces oder Liquor oder in Form einer Abstrichprobe aus Mundhöhle, Nasenraum, Haut oder Genitaltrakt) genommen und in ein flüssiges Selektiv-Medium, welches sich in einem Probengefäß (z. B. Küvette) befindet, gegeben, in dem zu-

erst alle nicht-resistenten Bakterien abgetötet werden. Hierfür wird das Probengefäß in ein temperierbares Messgerät gestellt. Zur Freisetzung der resistenzvermittelnden Enzyme (z. B. β -Lactamase und/oder Carbapenemase) erfolgt eine Lyse der Bakterien. Unter Lyse wird das Aufbrechen von Zellen verstanden, wobei Nukleinsäuren und Proteine aus dem Zellinneren freigesetzt werden. Zur Lyse kann das Zellmaterial mit einem Lysepuffer behandelt und/oder mechanisch (z. B. durch Einfüllen von Glaskügelchen und Stellen auf eine Rüttel- bzw. Schüttelapparatur) und/oder durch gezielten Ultraschalleintrag zerkleinert werden. Anschließend wird der Nachweis eines Zielenzyms (oder beider Zielenzyme) durch Ausnutzung einer enzymspezifischen Reaktion unter Zugabe eines Fluoreszenz-markierten Substrates entsprechend den vorbeschriebenen und in Fig. 1 und 2 gezeigten Nachweisreaktionen realisiert. Schließlich erfolgt unter optischer Anregung der Probe durch eine Anregungslichtquelle (wie z. B. eine gepulste LED) eine Messung der Fluoreszenz der durch die Reaktion der Zielenzyme freigesetzten Fluorophore.

Bei dem vorbeschriebenen Nachweisverfahren handelt es sich um ein phänotypisches Nachweisverfahren. Anders als bei einem PCR-basierten, molekularbiologischen Nachweis (genotypischen Nachweis) wird dabei das tatsächliche Erscheinungsbild der Bakterien untersucht. Damit ist dieses Verfahren unabhängig von der genetischen Variabilität der MRGN bezüglich dieses Erscheinungsbilds und erlaubt somit auch die Erkennung solcher Erreger, die durch PCR-basierte Verfahren nicht erfasst werden können.

Schließlich ist von der Erfindung auch eine Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenem-resistenten Erregern (wie z.B. Stämme der *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae*), die resistenzvermittelnde Carbapenemase produzieren, umfasst. Eine solche Vorrichtung kann eine regelbare Temperiereinrichtung zur Einstellung der Proben temperatur, eine Lysepufferzugabeeinrichtung und/oder Ultraschalleinrichtung zur Bakteriolyse, eine Nährmediumzugabe, eine Substratzugabeeinrichtung, eine Fluoreszenzanregungsquelle zur optischen Anregung der Probe und ein Fluoreszenzmessgerät (z. B. in Form eines hochempfindlichen Photomultipliers) zur quantitativen Detektion der Fluoreszenzintensität der Reaktionsprodukte umfassen. Das Fluoreszenzmessgerät ist vorzugsweise mit einer Ausgabeeinrichtung, insbesondere einer Anzeige, gekoppelt. Die vorbeschriebene Vorrichtung kann sehr vielseitig eingesetzt werden. Neben dem klinischen Einsatz zur Untersuchung von Patientenproben können beispielsweise auch Abstriche von Oberflächen von Geräten oder sonstigen Gegenständen im Rahmen einer Hygiene-Kontrolle analysiert werden. Die Nachweisvorrichtung eignet sich somit auch zur Kontrolle von Maßnahmen zur Dekontamination.

Zur Messung der Fluoreszenz kann die Probe unter einem Photomultiplier positioniert und dabei ggf. mittels einer (bewegbaren) Temperiereinrichtung aufgeheizt werden. Durch das Aufheizen kann eine größtmögliche Unabhängigkeit von der Umgebungstemperatur erreicht werden. Die optische Stimulation erfolgt für die Fluoreszenzmessungen z. B. mittels Leuchtdioden (LEDs), die über der Probenposition angebracht sind. Eine ringförmige Anordnung der LEDs ermöglicht eine gleichmäßige Ausleuchtung der Oberfläche des Proben-trägers. Sowohl zwischen der Probenposition und der Anregungsquelle als auch zwischen der Probenposition und dem Photomultiplier können austauschbare optische Filter vorge-sehen sein, die eine Detektion der Fluoreszenz in definierten Bandbreiten erlauben. Die Detektion der von den Reaktionsprodukten emittierten Fluoreszenzintensitäten erfolgt durch den Photomultiplier, ggf. unter Vorschaltung eines Filters.

Insbesondere multiresistente gramnegative Erreger (MRGN) stellen die Medizin vor neue Herausforderungen. Da es zur Dekolonisation bei MRGN keine wirksamen bakteriziden Therapeutika gibt, forschen Mediziner und Pharmazie-Unternehmen mit Hochdruck an neuen Antibiotika. Zur Identifikation neuer Substanzen, die auf MRGN antibiotische Wir-kung haben, kann die vorbeschriebene Vorrichtung ebenfalls zum Einsatz kommen, indem große Substanzbibliotheken damit in Form eines Wirkstoffscreenings untersucht werden. Eine Anwendung dieser Vorrichtung ist also auch in der Pharmaindustrie zum Nachweis (über)lebender MRGN denkbar.

In den letzten Jahren haben MRGN auch im Bereich der Viehhaltung, z. B. in Mastanlagen sowie in der Lebensmittelindustrie, durch unsachgemäßen Einsatz von Antibiotika und dar-aus resultierender Resistenzentwicklung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Neben den weiter oben genannten Beispielen ist das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungs-gemäße Vorrichtung somit auch zum Nachweis resistenter gramnegativer Bakterien in die-sen Bereichen geeignet.

Zusammenfassend kann das Vorhandensein (z. B. in menschlichem Serum, Eiter oder Urin) von Organismen wie z.B. Bakterien, die gegenüber Carbapenem-Antibiotika resistent sind, mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Substrates der allgemeinen Strukturformel (I) oder (III) wie hierin beschrieben nachgewiesen werden. Nur bei Auftreten aktiver, den β -Lactam-Ring des Carbapenems und anderer β -Lactam-Antibiotika zerstörenden Enzymen wie Carbapenemase erfolgt eine Änderung der Fluoreszenz von dem intakten Substrat zu einem, das für das Spaltprodukt charakteristisch ist. Die erfindungsgemäßen Fluoreszenz-markierten Substrate sind besser als die chromogenen Substrate Nitrocephin, CENTA und PADAC des Standes der Technik, da die erfindungsgemäßen Substrate gegenüber dem Untersuchungsmaterial stabil sind und sich Fluoreszenz sensitiver detektieren lässt. Wei-

terhin ist die Messung der Fluoreszenz dieser Substrate unempfindlich gegenüber Hintergrundsignalen in Untersuchungsmaterialien mit Eigenfarbe (wie z.B. Urin oder Serum).

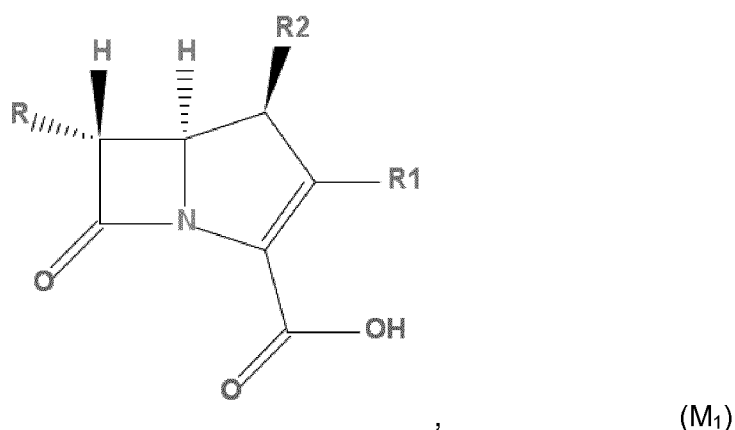
Patentansprüche

1. Verfahren zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase und Carbapenemase-Bildnern, indem einer Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemasen und/oder Carbapenemase-Bildner enthält, ein Substrat der allgemeinen Strukturformel (I) zugesetzt wird:



wobei

M_1 ein Carbapenem-Grundgerüst der Formel (M_1) ist:



wobei R, R1 und R2 jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus H, ein C₁-C₆ Alkyl (Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, iso-Propyl, optional substituiert mit z. B. -OH, =O, -NH₂, =S, -SH), optional substituiertes Oxy-Alkyl, Halogen, -OH, -SH, einem optional substituierten Alkenyl, optional substituierte, aromatische Verbindung, optional substituierte, heterozyklische Verbindung, primäres oder sekundäres Amin, Ester, Ether, Thiol oder Thioether ist;

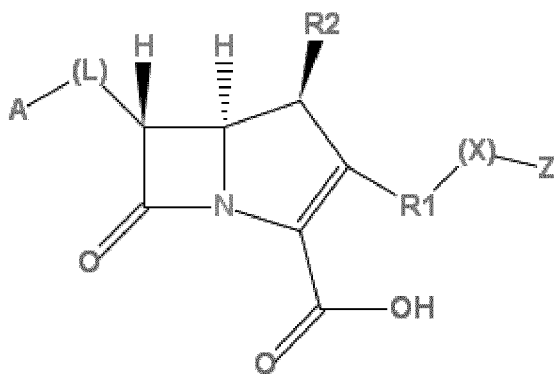
wobei die Gruppe A-(L)- mit dem beta-Lactamring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft ist und wobei die Gruppe -(X)-Z mit dem fünfgliedrigen Ring des Carbapenem-Grundgerüsts verknüpft ist,

A und Z ein Fluorophor/Quencher-Paar bilden, oder A eine Reportergruppe und Z eine Festphase darstellt, oder A eine Festphase und Z eine Reportergruppe darstellt, wobei, wenn A und Z ein Fluorophor/Quencher-Paar bilden, wenn A ein Quencher ist, Z ein Fluorophor ist, und wenn A ein Fluorophor ist, Z ein Quencher ist,

L ein fakultativer Linker zur Kopplung von A an das Carbapenem-Grundgerüst ist, und
X eine fakultative Abgangsgruppe zur kovalenten Verknüpfung von Z mit dem
Carbapenem Grundgerüst ist,

und wobei nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch Carbapenemase die
Gruppe Z freigesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei R2 entweder H oder Methyl ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus CH₂, O, S, (-CH=CH)_n-CH₂- (mit n = 1-4) und CO, vorzugsweise R1 CH₂ ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Substrat die Strukturformel (III) aufweist:



(III), wobei

R1 abwesend ist oder ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -CH₂-, -O-, -S-, -CO-, CHOH, (-CH=CH)_n-CH₂- (mit n = 1-4);

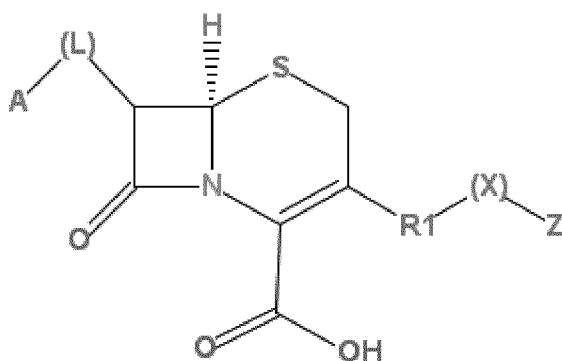
R2 wie in Anspruch 1 definiert ist, bevorzugt H oder Methyl ist;

und wobei A, L, X und Z wie in Anspruch 1 definiert sind.

5. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3, wobei vor der Freisetzung des Fluorophors oder Quenchers (Z) die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergie-Transfer auf den Quencher (A) verringert oder gelöscht wird und nach der Freisetzung des Fluorophors oder des Quenchers (Z) der Quencher und der Fluorophor räumlich voneinander getrennt sind, so dass kein Förster-Resonanzenergie-Transfer mehr erfolgt und eine Änderung der Fluoreszenz gemessen wird.
6. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4, wobei als Quencher ein Fluorophor verwendet wird, der im Förster-Resonanzenergie-Transfer als Fluoreszenzakzeptor agiert, oder wobei als Quencher ein energetisch auf den Fluorophor

abgestimmter Black Hole Quencher eingesetzt wird, welcher die Fluoreszenz des Fluorophors im gebundenen Zustand auslöscht.

7. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 6, wobei die Fluoreszenzintensität des Fluorophors insensitiv auf pH-Änderungen des Umgebungsmediums reagiert.
8. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 7, wobei als Fluorophor ein selbstquenchender Fluorophor verwendet wird.
9. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3, wobei die Reportergruppe ausgewählt ist aus einem Quencher, einem Fluorophor, einer chromogenen Gruppe, einem Absorptionsfarbstoff, einem Azofarbstoff, einem Metallkomplexfarbstoff, einem Dioxazinfarbstoff, einem Indigofarbstoff, einem Nitro- und/oder Schwefelfarbstoff, einem Triphenylmethanfarbstoff, einem Phthalocyaninfarbstoff, einem Nitrosifarbstoff und einer radioaktiv-markierten Gruppe.
10. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 9, wobei als Linker (L) ein Linker, der eine Etherbindung, eine Esterbindung, ein Carbamat oder eine Amidbindung ist oder enthält, verwendet wird.
11. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 10, wobei als Abgangsgruppe (X) eine Abgangsgruppe, die einen Thioether –S– oder eine Thioether-Verbindung –S–R– oder ein Sulfonsäureester (-O-SO₂-) oder eine Sulfonsäureesterverbindung –O-SO₂-R) ist oder enthält, verwendet wird.
12. Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 11, wobei der Probe weiter zum phänotypischen Nachweis von beta-Lactamasen und beta-Lactamase-Bildnern zusätzlich ein Substrat der Strukturformel (IV)



(IV)

zugegeben wird, wobei R1, A, (L), (X) und Z wie in den vorherigen Ansprüchen definiert sind, und wobei nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch beta-Lactamase die Gruppe Z freigesetzt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Substrate (III) und (IV) voneinander unterscheidbare Reportergruppen aufweisen, um den phänotypischen Nachweis von Carbapenemase- und beta-Lactamase-Bildnern bzw. der Enzyme Carbapenemase und beta-Lactamase (ESBL) in der Probe parallel und gleichzeitig durchzuführen.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Substrate (III) und (IV) Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsmaxima aufweisen.

15. Verfahren zum phänotypischen Nachweis resistenter Bakterien, indem die Enzyme einer bakteriellen Kultur bei einer Lyse in ein Lysat freigesetzt werden und anschließend das Lysat als zu untersuchende Probe einem Verfahren nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 14 unterzogen wird, um das Vorhandensein resistenzvermittelnder Carbapenemasen und/oder beta-Lactamasen mit erweitertem Spektrum phänotypisch nachzuweisen, vorzugsweise werden durch das Verfahren multiresistente grampositive oder gramnegative Bakterien, insbesondere 3MRGN oder 4MRGN, nachgewiesen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die bakterielle Kultur zunächst in ein selektives Nachweismedium gegeben wird, in dem alle nicht-resistenten Bakterien abgetötet werden.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei die Bakterien nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl, die durch Messen der optischen Dichte und/oder durch eine dynamische Messung des Streulichts bestimmt wird, lysiert werden, vorzugsweise wird zur Lyse der bakteriellen Kultur ein Lysepuffer zugegeben und/oder ein mechanisches Aufschlussverfahren, insbesondere ein Ultraschallverfahren, benutzt.

18. Verwendung eines Verfahrens nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 17 in der klinischen Diagnostik von Patientenproben und/oder zur Untersuchung von Abstrichen, die von Geräteoberflächen oder sonstigen Flächen im Rahmen einer Hygienekontrolle genommen werden, und/oder zur Untersuchung von toxikologischen oder pharmakologischen Substanzen, insbesondere zum Nachweis überlebender multiresistenter gramnegativer Bakterien im Rahmen eines Wirkstoffscreenings.

19. Vorrichtung zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase und Carbapenemase-Bildnern, umfassend eine Einrichtung zum Inkontaktbringen eines Substrates der Strukturformel (I) oder (III), wie in einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 11 definiert, mit einer

Probe, von der angenommen wird, dass sie solche Carbapenemase-Bildner enthält, und eine Einrichtung zur Detektion der durch Carbapenemase-Aktivität gebildeten Spaltprodukte des Substrates.

20. Vorrichtung nach Anspruch 19, wobei die Einrichtung zur Detektion der Spaltprodukte eine Fluoreszenzanregungsquelle zur optischen Anregung des verwendeten Fluorophors und ein Messgerät zur Messung der Fluoreszenz des vom Quencher getrennten Fluorophors umfasst.

21. Vorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, weiter umfassend eine Einrichtung zur Zugabe eines Lysepuffers und/oder eine Ultraschalleinrichtung, um durch Lyse einer bakteriellen Kultur die zu untersuchende Probe herzustellen.

22. Vorrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 19 bis 21, weiter umfassend eine Temperiereinrichtung zum Halten der bakteriellen Kultur und/oder Probe vor und/oder nach Zugabe des Substrates auf einer gewünschten Temperatur.

23. Vorrichtung nach zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche 19 bis 22, wobei zum Verstärken des Messsignals ein Photomultiplier vorgesehen ist, der mit einer Ausgabereinrichtung gekoppelt ist.

24. Substrat zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und Carbapenemase-Bidnern, wie in Anspruch 1, 2 oder 3 definiert.

25. Substrat zum phänotypischen Nachweis von ESBL, wie in Anspruch 11 definiert.

26. Eine Festphase, die das Substrat gemäß Anspruch 25 an ihrer Oberfläche gebunden enthält.

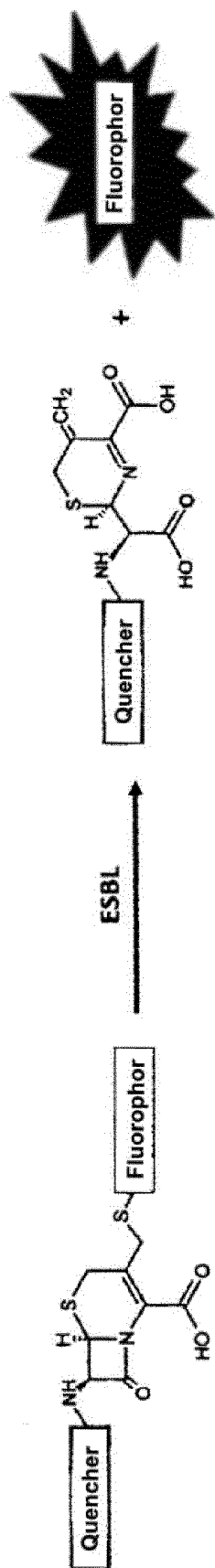


Fig. 1

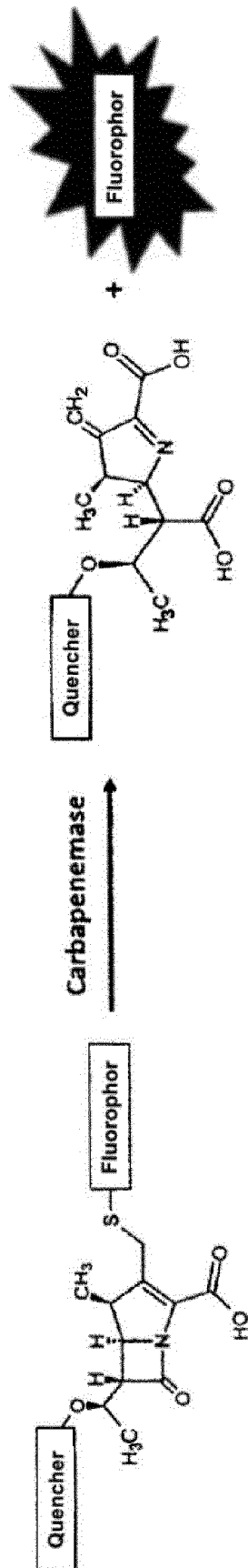


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/061557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/04</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/34</i> (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JUNE CYNTHIA M ET AL. "A fluorescent carbapenem for structure function studies of penicillin-binding proteins, [beta]-lactamases, and [beta]-lactam" <i>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC</i> , New York, Vol. 463, 21 July 2014 (2014-07-21), pages 70-74 DOI: 10.1016/J.AB.2014.07.012 ISSN: 0003-2697, XP029059938 page 70; abstract; page 71, figure 1b	1-26
A	WO 2011042454 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHCHE MÉDICALE [FR]) 14 April 2011 (2011-04-14) page 20, line 31 page 8, line 31 - page 9, line 13	1-26
A	WO 2012175637 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; HOPITAUX DE PARIS [FR]; UNIV PARIS SUD) 27 December 2012 (2012-12-27) abstract	1-26
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2018		Date of mailing of the international search report 01 October 2018
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Boiangiu, Clara Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/061557**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2018/061557

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2011042454	A1	14 April 2011	EP	2486131	A1	15 August 2012
				US	2012219952	A1	30 August 2012
				WO	2011042454	A1	14 April 2011
WO	2012175637	A1	27 December 2012	BR	112013033082	A2	08 August 2017
				CA	2837246	A1	27 December 2012
				CN	103764838	A	30 April 2014
				CN	105861630	A	17 August 2016
				DK	2723884	T3	05 December 2016
				EP	2723884	A1	30 April 2014
				JP	6101257	B2	22 March 2017
				JP	2014519833	A	21 August 2014
				US	2014134656	A1	15 May 2014
				WO	2012175637	A1	27 December 2012

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12Q1/04 C12Q1/34
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JUNE CYNTHIA M ET AL: "A fluorescent carbapenem for structure function studies of penicillin-binding proteins, [beta]-lactamases, and [beta]-lactam", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, Bd. 463, 21. Juli 2014 (2014-07-21), Seiten 70-74, XP029059938, New York ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2014.07.012 Seite 70; Zusammenfassung; Seite 71, Bild 1b.	1-26
A	----- WO 2011/042454 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHCHE MÉDICALE [FR]) 14. April 2011 (2011-04-14) Seite 20, Zeile 31 Seite 8, Zeile 31 - Seite 9, Zeile 13 ----- -/-	1-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. September 2018

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/10/2018

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Boiangiu, Clara

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2012/175637 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; HOPITAUX DE PARIS [FR]; UNIV PARIS SUD) 27. Dezember 2012 (2012-12-27) Zusammenfassung -----	1-26

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☒ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2018/061557

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2011042454	A1	14-04-2011	EP	2486131	A1		15-08-2012	
			US	2012219952	A1		30-08-2012	
			WO	2011042454	A1		14-04-2011	

WO 2012175637	A1	27-12-2012	BR	112013033082	A2		08-08-2017	
			CA	2837246	A1		27-12-2012	
			CN	103764838	A		30-04-2014	
			CN	105861630	A		17-08-2016	
			DK	2723884	T3		05-12-2016	
			EP	2723884	A1		30-04-2014	
			JP	6101257	B2		22-03-2017	
			JP	2014519833	A		21-08-2014	
			US	2014134656	A1		15-05-2014	
			WO	2012175637	A1		27-12-2012	
